

高等医学院校实验教材

▶ (供临床医学、全科医学、妇幼等专业使用)

# 实验诊断学 实验实习指导

SHIYANZHENDUANXUE

SHIYANSHIXIZHIDAO

◆ 刘孝武 陈育民 主编

SHIYANZHENDUANXUE SHIYANSHIXIZHIDAO

北京大学医学出版社

高等医学院校实验教材

# 实验诊断学实验实习指导

(供临床医学、全科医学、妇幼等专业使用)

主 编 刘孝武 陈育民  
编 委 (按姓氏笔画为序)  
王 红  
刘孝武  
华正祥  
张丽华  
李海涛  
陈育民  
郑文芝

北京大学医学出版社

# 前 言

实验诊断学是临床医学专业诊断学基础的主要内容，是基础医学和临床医学的桥梁课，实验诊断学也是临床医生和临床医学生必须掌握的一门理论和技能，是临床医生对疾病的预防、诊断、鉴别诊断、治疗和预后判断的重要组成部分。

由于实验诊断学发展迅速，新仪器、新参数的不断涌现，为适应新形势的发展和教学的需要，诊断学基础进行第二轮修改。《实验诊断学实验实习指导》是诊断学基础的配套教材。由于新版诊断学基础实验诊断学没有编入实验技术，本教材重点配合诊断学基础实验诊断部分，编写适合临床医学专业的实验内容，尤其是根据目前本、专科学生的培养目标，重点对常见病、多发病的实验诊断新项目的实验技术进行阐述，着重培养学生的动手能力，以适合到各级医院和社区工作。

由于实验诊断内容广泛，实验课内容较多，临床医学专业实验诊断学时有限，本教材根据实用情况，将内容分为实验和实习两部分；实验部分是学生实验课掌握的内容，实习部分是学生自学和生产实习期间学习的内容。

该书内容共有十一章，二十八个实验，二十八个实习内容，基本涵盖了实验诊断学的常规内容。

由于时间和编者水平所限，尽管在编写过程中不断努力认真，难免有不足之处，希望广大师生和临床医务人员在使用中提出意见，以便进一步完善。

编 者  
2003.6

# 目 录

<b>第一章 血液一般检查</b> .....	(1)
实验一 毛细血管采血法.....	(1)
实验二 红细胞计数.....	(1)
实验三 血红蛋白测定.....	(4)
实验四 网织红细胞计数.....	(6)
实验五 红细胞比积测定.....	(7)
实验六 白细胞计数.....	(8)
实验七 白细胞分类计数.....	(9)
实验八 嗜酸性粒细胞直接计数.....	(12)
实验九 血小板计数.....	(12)
实验十 红细胞沉降率测定.....	(13)
实 习 血液分析仪应用.....	(14)
<b>第二章 溶血性贫血的实验室检查</b> .....	(20)
实验一 红细胞渗透脆性试验.....	(20)
实验二 酸溶血试验 (Ham 试验).....	(21)
实 习 抗人球蛋白试验.....	(22)
<b>第三章 出血与血栓性疾病常用的实验室检查</b> .....	(24)
实验一 毛细血管脆性试验.....	(24)
实验二 出血时间测定.....	(24)
实验三 凝血时间测定.....	(25)
实验四 血块退缩试验.....	(26)
实验五 活化部分凝血活酶时间测定.....	(27)
实验六 血浆凝血酶原时间测定.....	(29)
实验七 凝血酶时间测定及甲苯胺蓝纠正试验.....	(30)
实验八 纤维蛋白原定量测定.....	(31)
实习一 血浆鱼精蛋白副凝试验.....	(33)
实习二 D-二聚体测定.....	(34)
<b>第四章 骨髓细胞学检查</b> .....	(36)
实习一 骨髓涂片检查.....	(36)
实习二 过氧化物酶染色.....	(40)
实习三 中性粒细胞碱性磷酸酶染色.....	(41)
实习四 骨髓铁染色.....	(42)
实习五 免疫细胞化学染色.....	(44)
<b>第五章 尿液检验</b> .....	(46)
实验一 理学检验.....	(46)

一、尿量 .....	(46)
二、颜色 .....	(46)
三、透明度 .....	(47)
四、比密 .....	(48)
实验二 化学检验 .....	(49)
一、酸碱度 (pH) .....	(49)
二、蛋白质定性试验 .....	(50)
三、Bence - Jones 蛋白定性试验 .....	(52)
四、糖定性试验 .....	(53)
五、酮体定性试验 .....	(55)
六、尿胆红素检验 .....	(57)
七、尿胆原检验 .....	(58)
八、隐血试验 (血红蛋白定性试验) .....	(59)
九、尿中亚硝酸盐还原试验 .....	(60)
十、乳糜尿检验 .....	(61)
实验三 显微镜检验 .....	(62)
附: 尿沉渣中常见的有形成分 .....	(62)
实验四 妊娠诊断试验 .....	(71)
一、胶乳凝集抑制试验 .....	(71)
二、单克隆双抗体酶免疫法 .....	(71)
三、胶体金标记免疫层析法 .....	(72)
实习一 尿沉渣染色法 .....	(73)
实习二 尿液自动分析仪 .....	(74)
<b>第六章 粪便检验</b> .....	(76)
实验一 粪便一般检验 .....	(76)
实验二 粪便隐血试验 .....	(78)
<b>第七章 脑脊液和浆膜腔穿刺液检查</b> .....	(81)
实验一 脑脊液检查 .....	(81)
一、一般性状检查 .....	(81)
二、化学检查 .....	(82)
三、显微镜检查 .....	(84)
实验二 浆膜腔积液检查 .....	(86)
一、一般性状检查 .....	(86)
二、化学检查 .....	(87)
三、显微镜检查 .....	(87)
<b>第八章 其他体液检验</b> .....	(89)
实习一 精液检查 .....	(89)
一、一般性状检查 .....	(89)
二、显微镜检查 .....	(90)
实习二 前列腺液检查 .....	(92)

一、一般性状检查 .....	(93)
二、显微镜检查 .....	(93)
实习三、胃液检验 .....	(94)
一、一般性状检查 .....	(94)
二、化学检查 .....	(95)
三、显微镜检查 .....	(96)
实习四 十二指肠引流液检查 .....	(97)
一、一般性状检查 .....	(97)
二、显微镜检查 .....	(98)
<b>第九章 肾功能试验</b> .....	(100)
实习一 酚红排泄试验 .....	(100)
实习二 Mosenthal 试验 .....	(101)
<b>第十章 免疫学检查</b> .....	(103)
实习一 抗链球菌溶血素“O”测定 .....	(103)
实习二 类风湿因子测定 .....	(104)
实习三 肝炎病毒标记物检查 .....	(105)
一、甲型肝炎病毒标记物检测 .....	(105)
二、乙型肝炎病毒标记物检测 .....	(107)
三、丙型肝炎病毒标记物检测 .....	(115)
四、丁型肝炎病毒标记物检测 .....	(117)
五、戊型肝炎病毒标记物检测 .....	(117)
六、庚型肝炎病毒标记物检测 .....	(119)
<b>第十一章 肝脏功能的实验室检验方法</b> .....	(120)
实习一 血清总蛋白测定 .....	(120)
实习二 血清白蛋白测定 .....	(121)
实习三 血清白蛋白(A)、球蛋白(G)比值(A/G) .....	(123)
实习四 血清总胆红素和结合胆红素测定 .....	(123)
实习五 血清丙氨酸氨基转移酶 .....	(125)
实习六 血清天门冬氨酸氨基转移酶 .....	(128)
实习七 血清碱性磷酸酶测定 .....	(128)
实习八 血清 $\gamma$ -谷氨酰转肽酶测定 .....	(131)

# 第一章 血液一般检查

## 实验一 毛细血管采血法

### 【目的】

掌握毛细血管采血技术。

### 【原理】

采血针刺破毛细血管后，吸取检验所需血液的量。

### 【应用范围】

适用于 $<0.1\text{ml}$ 血量的检验项目，如红细胞计数、血红蛋白测定、血小板计数等。

### 【器材】

一次性无菌采血针（有批准文号）、一次性定量采血管、无菌干棉球、75%酒精棉球。

### 【操作方法】

- (1) 轻轻按摩被检者左手无名指端，用75%酒精棉球消毒病人无名指头。
- (2) 片刻酒精挥发干燥后，左手拇指和食指固定病人无名指端，右手持采血针，迅速刺入指端外侧， $2\sim 3\text{mm}$ 深，拔出采血针，血液自然流出。
- (3) 弃去第一滴血，根据需要用一次性定量采血管采集血液。如血流不畅，以左手拇、食指，右手无名指在穿刺点周围轻压，流出所需血量。

### 【质量控制】

- (1) 严格无菌操作，防止采血部位感染；必须做到一人、一针、一管，以防院内感染。
- (2) 采血部位不能有烧伤、冻疮、水肿、炎症、发绀。严重烧伤病人可选择皮肤完整部位，婴、幼儿可用脚趾或足根采血。
- (3) 刺入深度要足够( $2\sim 3\text{mm}$ )，如血流不畅不可强行挤压，以免组织液混入，使结果不准。
- (4) 末梢循环障碍病人穿刺稍深，以免采血困难。
- (5) 进行多项目检查时，采集标本顺序：血小板计数（不弃第一滴血）、红细胞计数、白细胞计数、血红蛋白测定和白细胞分类计数。

## 实验二 红细胞计数

正常红细胞（red blood cell, RBC）为两面略凹的圆盘状，直径为 $6\sim 9\mu\text{m}$ ，平均 $7.2\mu\text{m}$ ，无核、具有折光性。在不染色标本中边缘较厚，呈橘红色，中央较薄呈草绿色，侧面观哑铃形。在高渗溶液中呈皱缩状，边缘锯齿形。在低渗溶液中，肿胀甚至破裂，血红蛋白逸出。经瑞特染色的血涂片上，红细胞呈粉红色，中央着色较淡。

## 显微镜计数法

### 【目的】

掌握红细胞显微镜计数的方法。

### 【原理】

定量的血液经定量的等渗液稀释后，于细胞计数池中镜下计数规定范围内的红细胞，求得每升血液内的红细胞数。

### 【器材】

(1) 血细胞计数板及专用盖片（图 1-1）。

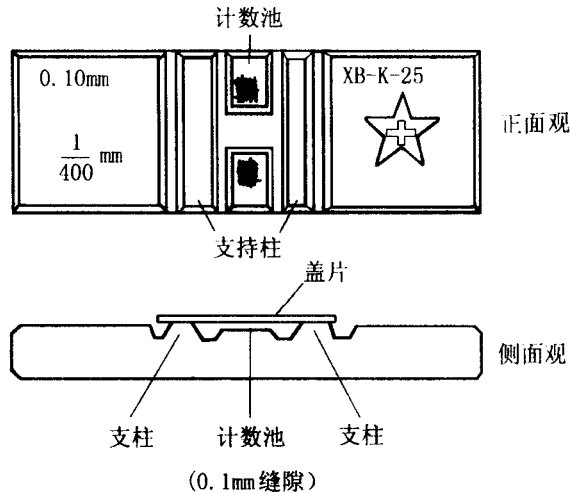


图 1-1 血细胞计数板

血细胞计数板：由一块长方形特制玻璃。中央有上下两个刻度平台（即血细胞计数池）。每个平台划分有 9 个大方格的划线，每个大方格的面积为  $1\text{mm}^2$ ，加盖片后的深度为  $0.1\text{mm}$ ，故每个大方格的容积为  $0.1\text{mm}^3$ （即  $0.1\mu\text{l}$ ），四个角的大方格以单线划分为 16 个中方格，作为计数白细胞用。中央的一个大方格，用双线划分为 25 个中方格；每个中方格又以单线分为 16 个小方格，共计 400 个小方格；中央大方格四角和中央的 5 个中方格供作 RBC 和 PLT 计数之用（图 1-2）。

盖片：是一块规格为  $24.0\text{mm} \times 20.0\text{mm} \times 0.6\text{mm}$  特制平滑玻璃。

- (2) 光学显微镜。
- (3) 玻璃纸。
- (4) 洁净软绸布或优质卫生纸。
- (5) 毛细血管采血用器材。
- (6) 2ml 刻度吸管。
- (7)  $100\text{mm} \times 10\text{mm}$  塑料试管。

### 【试剂】

#### RBC 计数稀释液

可用生理盐水或 Hayem 液（氯化钠 1.0g、无水硫酸钠 2.5g、氯化高汞 0.5g、蒸馏水加



至 200ml 混合，过滤后备用)。

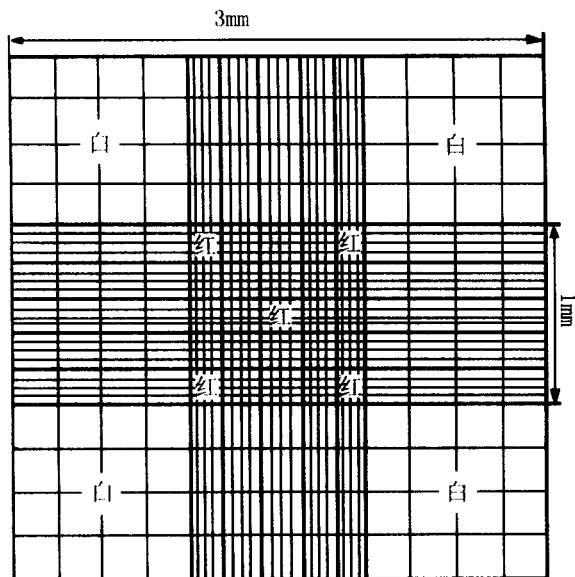


图 1-2 血细胞计数池划线

**【操作】**

(1) 以标准的刻度吸管吸取红细胞稀释液 2ml，置于试管内。

(2) 毛细血管采血法采血，用一次性吸管吸取血液 10 $\mu$ l，擦去管外余血，迅速将管内血液轻轻排入试管内稀释液中，用上清液洗管 3 次，立即混匀。

(3) 用一次性吸管或滴管吸取少量混匀的细胞悬液，由计数池和盖片之间的缝隙处充入清洁好的计数室内（液量应恰好充满也不能有气泡产生）。静止 2~3min，使细胞沉于计数室底面。

(4) 计数池置于显微镜载物台上，用低倍镜或高倍镜计数。计数中央大方格的四个角及中心 5 个中方格内的红细胞数。在计数时对于压在边线（即双线）的细胞应遵循“数两条边，舍两条边”的原则；即数上不数下，数左不数右，对各小方格内细胞的计数，按图中箭头所示进行（图 1-3）。

(5) 计数完毕，将 5 个中方格内所数红细胞数总和乘 10 000，再乘 10<sup>6</sup>，即每升血液内的红细胞数。

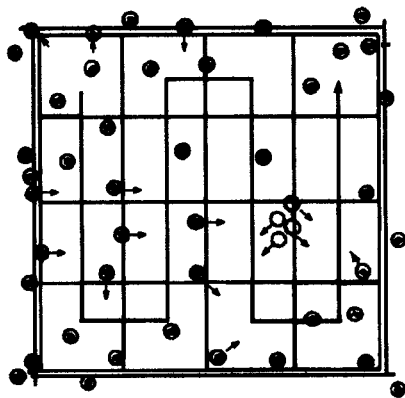


图 1-3 红细胞计数方式

**【计算】**

$$\text{RBC/L} = R (\text{数得红细胞数总和}) \times 5 (\text{变为 } 0.1\mu\text{l}) \times 10 (\text{变为 } 1\mu\text{l}) \times 200 (\text{稀释倍数}) \times 10^6 (\text{变为 } 1\text{L}) = 10\,000 \times 10^6$$

**【报告方式】**

RBC:  $\Delta\Delta \times 10^{12}/\text{L}$

### 【参考值】

成人男性： $(4.0 \sim 5.5) \times 10^{12}/L$

成人女性： $(3.5 \sim 5.0) \times 10^{12}/L$

新生儿： $(6.0 \sim 7.0) \times 10^{12}/L$

### 【质量控制】

(1) 计数室内细胞分布应均匀，各中方格的细胞数相差不得超过  $\pm 10\%$ ，否则应重新充池。

(2) RBC 稀释液不破坏白细胞，红细胞计数已将白细胞计入数内。一般情况下，计入白细胞仅相当于红细胞的  $1/500 \sim 1/1000$ ，对红细胞数值的影响可以忽略不计。但有白细胞数增高病人时，应从 RBC 数值中减去白细胞数。

(3) 冷凝集素增高的病人，在稀释液中的 RBC 凝集成颗粒状，应将细胞悬液和计数板置  $37^\circ\text{C}$  恒温箱，待凝集颗粒散开后，混匀细胞悬液，充液、计数。

(4) 计数时应注意霉菌、尘埃和 RBC 的区别，不能将霉菌、尘埃计数在内。

## 实验三 血红蛋白测定

### 1. 氰化高铁血红蛋白测定法

#### 【目的】

掌握氰化高铁血红蛋白测定的实验原理和操作方法。

#### 【原理】

血液经稀释，红细胞被破坏后，释放出血红蛋白 (hemoglobin, Hb)，除硫化血红蛋白外，各种 Hb 皆可被高铁氰化钾氧化成高铁血红蛋白 (Hi)。Hi 再与 CN 结合成稳定的棕红色氰化高铁血红蛋白 (HiCN)。在规定的  $540\text{nm}$  波长液层厚度  $1\text{cm}$  的条件下进行比色测定，根据标本的吸光度即可求得每升血液中 Hb 浓度。

#### 【器材】

- (1) 毛细血管采血用的消毒和采血器材。
- (2)  $100\text{mm} \times 12\text{mm}$  试管。
- (3)  $5\text{ml}$  刻度吸管或移液管。
- (4) 721 分光光度计。

#### 【试剂】

- (1) HiCN 标准液 ( $200\text{mg}/L$ ) 可商购。
- (2) HiCN 转化液 (改良 Van Kampen - Zijlstra)：高铁氰化钾  $[\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6]$   $200\text{mg}$ ，氰化钾 (KCN)  $50\text{mg}$ ，无水磷酸二氢钾 ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )  $140\text{mg}$ ，TritonX - 100 (聚乙二醇辛基苯基醚)  $1.0\text{ml}$ ，蒸馏水加至  $1000\text{ml}$ 。

该试剂过滤后为淡黄色透明液体， $\text{pH}$   $7.0 \sim 7.4$ ，置棕色玻璃瓶中冷暗处保存，至少稳定半年内不变质。但不可用塑料瓶贮存，因可使 KCN 分解而失去 CN。如果试剂变浊，变绿，则不能使用。若贮存于  $4^\circ\text{C}$  冰箱更稳定。该液以蒸馏水为空白，波长  $540\text{nm}$  测定其吸光

度应小于 0.001。

### 【操作】

(1) 用移液管吸取 HiCN 转化液 5ml 加入试管内，加入全血 20 $\mu$ l 于 HiCN 转化液中混匀，室温放置 5min。

(2) 在分光光度计上，用 540nm 波长，光径 1cm，以 HiCN 转化液为空白，调零点后，测定吸光度 A。

### 【计算】

$$\text{Hb g/L} = \frac{A}{44} \times \frac{64458}{1000} \times 251 = A \times 367.7$$

A: 为波长 540nm 处，比色杯内径 1.000cm 样本吸光度。

44: 为 HiCN 在光径 1.000cm、波长 540nm 条件下的毫摩尔吸光度系数。

64458: 为 Hb 的分子量。

1000: 为 mg 变为 g。

251 为血液稀释的倍数。

### 【质量控制】

试剂中的 KCN 属于烈性毒药，使用过程中应谨防污染皮肤。废液不准任意倾倒，以防污染环境造成公害。试验用过的废液应做无害化处理，方法是：废液加等量自来水混合后，按每升加入 35ml 安替福民液 (NaClO)，混匀，敞开容器盖放置 15 小时后，CN 则被 NaClO 氧化成 N<sub>2</sub> 和 CO<sub>2</sub>，或水解为 CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> 和 NH<sub>4</sub><sup>+</sup> 而去毒。而后倾入下水道。

2. 沙利 (Sahli) 法 (本法适用于县以下单位)

### 【目的】

掌握沙利 (Sahli) 血红蛋白测定的实验原理和操作方法。

### 【原理】

定量的血液加入稀酸后，红细胞释出血红蛋白，被酸化成为褐色血红素，其色泽深度与血红蛋白含量成正比。经与标准比色板比色后，即可得到每升血液中血红蛋白克数。

### 【器材】

(1) 沙利 (Sahli) 血红蛋白计，具有标准褐色玻璃比色板的比色座，和一个方形刻度测定管组成。

(2) 毛细血管采血用的消毒和采血器材。

### 【试剂】

(1) 0.1mol/L 盐酸。

(2) 蒸馏水。

### 【操作】

(1) 在血红蛋白比色管内加 0.1mol/L 盐酸到 2g% 处。

(2) 用经消毒的采血针，在经消毒过的指端上刺一深约 2~3mm 的切口，使血液自然流出，弃去第一滴血，用一次性采血管吸血 20 $\mu$ l，擦去吸管外围血液，迅速将血液排入比色管盐酸溶液底部，用上清液洗吸管 3 次，以洗出吸管内残余血液，立即混匀。在室温放置 10 分钟后进行比色。

(3) 将比色管放入比色座中，用滴管沿比色管内壁徐徐加入蒸馏水或 0.1mol/L 盐酸，

边加边摇，直到比色管内颜色与标准比色板一致为止。读取比色管内液体凹面的最低处所示刻度数 $\times 10$ ，即血红蛋白的含量 $\triangle\triangle\text{g/L}$ 。

### 【报告方式】

Hb:  $\triangle\triangle\text{g/L}$

### 【参考值】

成人男性: 120 ~ 160g/L

成人女性: 110 ~ 150g/L

新生儿: 170 ~ 200g/L

## 实验四 网织红细胞计数

网织红细胞较成熟红细胞稍大，直径 $8.0 \sim 9.5\mu\text{m}$ ，其主要特点是胞浆中残存多少不等的嗜碱性物质（核糖体），经新亚甲兰活体染色，胞浆内呈浅蓝或深蓝色的网状结构。在涂片中光学显微镜观察，网织红细胞分为四型：

I型 丝球型：无核红细胞中央有浓密蓝色网状物。正常人外周血为0，仅见于骨髓。

II型 网型：无核红细胞中央有疏松大网眼的蓝色网状物。正常人外周血为偶见。

III型 破网型：网状物减少形成残破不全的网状。正常人外周血可见少量。

IV型 点粒型：仅有少数枝点状的网状残余。正常人外周血的网织红细胞多为此型。

### 【目的】

熟悉网织红细胞计数方法，了解计数注意事项。

### 【原理】

红细胞经活体染色后在显微镜下计数1000个红细胞，记录胞浆中有蓝色网状物的细胞，求出网织红细胞所占百分比。

### 【器材】

器材同白细胞分类计数器材。

### 【试剂】

10g/L 煌焦油蓝生理盐水染色液

煌焦油蓝 1.0g，枸橼酸钠 0.4g，氯化钠 0.85g，蒸馏水 100.0ml，溶解上列成分，过滤后使用。

### 【操作】

(1) 取 10g/L 煌焦油蓝生理盐水染色液 2 滴，加入小试管中。

(2) 取血液 2 滴加于小试管染色液中，混匀，室温下静止 15 ~ 20min，使网织红细胞的网状物被染色。

(3) 将管中血液混匀制成薄涂片，干燥后选择细胞分布均匀，染色良好部位，滴加香柏油，用油镜计数，可将一圆形硬纸片中央剪一小孔放入镜筒内缩小视野用，计数 1000 个红细胞，并记录其中的网织红细胞。

### 【质量控制】

- (1) 应待玻片上的酒精挥发干燥后才能加血液；染色时用推片角充分混匀，防止凝固。
- (2) 染色时间一定要充足，室温低时染色时间应适当延长。

### 【计算】

$$\text{网织红细胞 \%} = \frac{\text{所计红细胞总数}}{1000} \times 100$$

网织红细胞绝对值 (网织红细胞数/L) = 血液红细胞数/L × 网织红细胞百分比

### 【报告方式】

网织红细胞  $\Delta$ .  $\Delta$  %

网织红细胞绝对值:  $\Delta\Delta \times 10^9$  /L

## 实验五 红细胞比积测定

### 【目的】

熟悉红细胞比积 (hematocrit, Hct) 测定的方法。

### 【原理】

红细胞比积又称红细胞压积 (packed cell volume, PCV), 是将定量的抗凝血装入 Wintrobe 管, 用一定的速度和时间离心沉淀, 即得出红细胞和血浆的比例, 从而得知全血的比积关系。

常用的方法有三种: Wintrobe 法、毛细管法和血液分析仪法。本实验仅介绍 Wintrobe 法。

### 【器材】

(1) Wintrobe 管及配套小橡胶塞: 为特制厚壁玻璃管。管长 120mm 左右, 管内径 2.5 ~ 3mm, 管壁的厚薄和腔内径的大小要求均匀一致, 管的内壁底面平坦, 管上刻线, 一侧刻线由下至上 0 ~ 100mm 刻度, 每格为 1mm 总共 100 格; 另一侧由上而下 0 ~ 100mm 刻度 (供作血沉用)。

- (2) 细长毛细滴管和 5.0ml 注射器。
- (3) 含有干燥抗凝剂的青霉素小瓶。
- (4) 水平离心机。要求 RCF > 2264g。

### 【试剂】

干燥的乙二胺四乙酸二钠盐 (EDTA - Na<sub>2</sub>) 2mg 或肝素钠 0.2mg 可抗凝 2ml 血液。

### 【操作】

- (1) 静脉采血 2ml 立即注入含有干燥 EDTA - Na<sub>2</sub> 2mg 的抗凝瓶中, 立即混匀。
- (2) 用细长毛细滴管吸取混匀的抗凝血, 将细长毛细滴管插至 Wintrobe 管底部, 将血液缓缓加入管内, 至血液的液平面与刻线标号 10 平行为止, 加血过程不得有气泡产生; 及时加盖小橡皮胶塞。
- (3) 用水平式离心机以相对离心力 (RCF) 2264g, 即有效半径 22.5cm 时 3000r/min 离心 30.0min。取出 Wintrobe 管。读取红细胞层的高度。自上而下依次观察结果如下:

- ① 淡黄色 - 血浆层。
- ② 乳白色 - 血小板层。
- ③ 灰红色 - 有核细胞层 (含白细胞及有核细胞)。
- ④ 紫黑色 - 含二氧化碳血红蛋白的红细胞层。
- ⑤ 鲜红色 - 含氧合血红蛋白的红细胞层。以紫黑色层上部为红细胞比积。

**【报告方式】**

Hct = 0.  $\Delta\Delta$ L/L

**【质量控制】**

(1) 抗凝剂选择 EDTA - Na<sub>2</sub> 或肝素钠最佳。EDTA - Na<sub>2</sub> 作抗凝剂, 对红细胞大小的影响甚微, 抗凝血室温放置 2 天内红细胞的大小不变, 但要严格控制其浓度, > 2mg/ml 时则可使红细胞缩小。肝素钠对红细胞大小的影响最小, 可略去不计。

(2) 空腹采血。最好不使用压脉带, 否则束臂时间须小于 1min, 不然会造成血液淤积浓缩, 使测定结果偏高。

(3) RCF 直接影响 Hct, 计算公式是:

$$RCF (g) = 1.118 \times 10^{-5} \times \text{有效离心半径 (cm)} \times (r/\text{min})^2$$

式中“有效离心半径”是离心管达水平位置时, 离心机轴心至离心管底距离的厘米数。

**【参考值】**

男 性: 0.42 ~ 0.49L/L

女 性: 0.37 ~ 0.43L/L

新生儿: 0.47 ~ 0.67L/L

## 实验六 白细胞计数

白细胞 (white blood cell, WBC) 是无色有核细胞, 球形, 直径 7 ~ 25 $\mu$ m, 正常外周血中有五种白细胞; 即中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、单核细胞、淋巴细胞。白细胞计数是测定每升血液中各种白细胞的总数。

显微镜计数法

**【目的】**

掌握血液白细胞显微镜计数方法。

**【原理】**

定量血液加入定量稀释后, 使红细胞被溶解。留下白细胞的悬液混匀, 充入计数室, 计数规定范围内的细胞, 求出每升血液内的白细胞数。

**【器材】**

- (1) 1ml 刻度吸管。
- (2) 10mm  $\times$  75mm 试管。
- (3) 其他同红细胞计数。

**【试剂】**

白细胞稀释液 0.2L/L (冰醋酸 2ml, 10g/L 亚甲兰数滴, 蒸馏水加至 100ml)。

### 【操作】

(1) 以刻度吸管准确吸取 0.2L/L 冰醋酸或 0.1mol/L 盐酸 0.38ml, 加于试管内。

(2) 一次性采血管取血 20 $\mu$ l 加于上述稀释液内, 混匀, 待液体显褐色后轻轻震荡混匀, 用玻棒取此稀释液充入计数室内, 静置 2~3min 后计数。

(3) 用低倍镜计数, 计数室内四角的 4 个大方格内的细胞数, 压线细胞计数同红细胞, 将其总数乘 50 乘 10<sup>6</sup>, 即得每升血液内白细胞数。

### 【计算】

WBC/L = 数得细胞数  $\div$  4 (变为 0.1 $\mu$ l)  $\times$  10 (变为 1 $\mu$ l)  $\times$  20 (稀释倍数)  $\times$  10<sup>6</sup> (变为 1L) = 数得细胞数  $\times$  50  $\times$  10<sup>6</sup>

### 【质量控制】

(1) 细胞于计数室内分布不均, 每大方格间不得相差 8 个以上, 否则应重新计数。

(2) 白细胞数量太小时应计数双侧计数室的白细胞计数区域, 或以 40 $\mu$ l 血液于稀释液内, 将所得细胞数被 2 除即可。WBC 数太高者, 可扩大血液的稀释倍数, 将所得细胞数乘稀释倍数即可。

(3) WBC 稀释液不能破坏有核红细胞, 如某些病理情况下外周血出现较多有核红细胞, 可使白细胞计数偏高, 按 WBC 分类计数时有核红细胞所占比例, 算出绝对值从 WBC 计数结果中减去。

### 【报告方式】

WBC:  $\Delta \times 10^9$ /L

### 【参考值】

成人: (4.0~10.0)  $\times 10^9$ /L

儿童: (11.0~12.0)  $\times 10^9$ /L

新生儿: (15.0~20.0)  $\times 10^9$ /L

## 实验七 白细胞分类计数

不同种类的白细胞可发生数量和质的变化, 进行白细胞分类, 同时观察白细胞总数的变化, 对某些疾病的明确诊断有重要意义。经瑞特染色的血涂片上白细胞形态:

1. 中性粒细胞 (neutrocyte, N) 细胞呈圆形, 直径 10~15 $\mu$ m, 细胞核染深紫红色, 染色质紧密成块状, 核形弯曲呈杆状的称杆状核粒细胞 (stab granulocyte, St), 分叶状的称分叶核粒细胞 (segmented granulocyte, Sg), 通常 2~5 叶, 叶与叶之间以细丝相连。胞浆淡红色, 内含许多淡紫红色的细小颗粒 (中性颗粒)。

2. 嗜酸性粒细胞 (eosinophil, E) 圆形, 略大于中性粒细胞。胞核多为两叶, 呈眼镜状, 深紫色。胞浆淡红色, 浆内充满粗大、均匀而圆的橘红色颗粒 (嗜酸性颗粒)。

3. 嗜碱性粒细胞 (basophil, B) 较中性粒细胞略小, 胞核呈深紫色或不明显, 一般为 2~3 叶, 但多不明显。胞浆紫红色, 内有大小不等的排列不规则的黑蓝色颗粒 (嗜碱性颗

粒), 有的覆盖于核上, 有时可见空泡。

4. 单核细胞 (monocyte, M) 直径  $15 \sim 20 \mu\text{m}$  胞核呈圆形或椭圆形, 常见伪足。胞核大, 核形不规则, 可呈肾形、马蹄形或 S 形等, 淡紫红色, 染色质疏松似网, 胞浆多, 呈淡灰蓝色, 内含较多细小的紫红色颗粒。

5. 淋巴细胞 (lymphocyte, L) 可分为大淋巴细胞 (直径  $10 \sim 15 \mu\text{m}$ ) 与小淋巴细胞 (直径  $6 \sim 10 \mu\text{m}$ ), 前者占有 10%, 后者占 90%。胞核呈圆形或椭圆形, 深紫色, 染色质粗密成块状。大淋巴细胞胞浆呈蔚蓝色, 内有少许紫红色颗粒。

### 【目的】

掌握血液涂片的制备, Wright 染色的原理、方法, 五种白细胞的形态特点及其分类计数的方法。

### 【原理】

将血液制成涂片, 经 Wright (或 Giemsa) 染色后, 各类细胞化学组成不同, 着色不同, 显微镜下根据白细胞的形态特征进行分类计数。算出各种白细胞的所占百分比进行报告。

### 【器材】

- (1) 载物玻片及推片。
- (2) 染色架。
- (3) 显微镜、记号笔、拭镜纸、香柏油、二甲苯等。

### 【试剂】

#### 1. Wright 染色液

(1) 成分: Wright 染色粉 (碱性美蓝、酸性伊红)。

(2) 配制方法: 称 Wright 染色粉 0.1g, 甲醇 (AR) 60ml, 中性甘油 3ml。置 Wright 染色粉 0.1g 于洁净干燥乳钵内, 加入少量甲醇慢慢研磨, 使其溶解, 将上清倒入洁净干燥棕色瓶中, 乳钵内未溶解的染色粉, 再加少许甲醇再研磨, 如此反复进行直到 Wright 粉全部被溶解、甲醇用完为止。然后加入甘油震荡混合, 密封瓶口, 放室温暗处保存, 每天震荡 3~5 次, 1 周后即可使用。

新配制的染液常偏碱。放置时间越长、震荡次数越多形成的天青成分越多, 染色效果越佳。盛 Wright 染液的瓶必须密封, 防止甲醇挥发或吸收空气中的水蒸气, 或进入氧气将甲醇氧化成甲酸, 影响对细胞的染色效果。甘油可防止甲醇挥发和促使染液增加染色效果的作用。

2. 磷酸盐缓冲液 (pH 6.6): 磷酸二氢钾 ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 0.3g; 磷酸氢二钠 ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) 0.2g; 蒸馏水加至 1L。

#### 细胞染色原理

细胞受色包括物理吸附与化学亲和作用。血细胞类型不同, 其化学成分不同, 对染料的亲和力亦不同, 酸性染料伊红与细胞中的碱性蛋白质颗粒结合着红色, 称为嗜酸性物质; 例如: 血红蛋白、嗜酸性颗粒等。嗜碱性粒细胞的颗粒、淋巴细胞的胞浆是酸性物质, 与碱性染料美蓝 (天青) 结合, 染成蓝色, 称为嗜碱性物质; 中性粒细胞的胞浆中的颗粒既能与美蓝结合, 又可和伊红结合, 染成紫红色, 称为中性颗粒。

### 【操作】

(1) 血液涂片制备: 取外周血液一滴, 滴于洁净载物玻片的右端, 以左手拇指和中指持



载物玻片的两个短边，右手持推片，推片置载玻片上的血滴前方，使推片与载物玻片接触，血液沿推片与载物片相接触处散开，推片与载物玻片保持  $15^{\circ} \sim 20^{\circ}$  左右夹角，均力地向前推动，即制备出血液涂片。血液在载物玻片上形成薄膜，应头、体、尾分明，边缘整齐，薄厚适宜（图 1-4）。

(2) 干燥：手持玻片在空气中挥动，使其血涂片尽快干燥。

(3) 染色：血液涂片干燥后，在血膜两端，以特种笔编号（玻璃器材用笔）并划一横线，防止染液扩散。然后滴加 Wright 染色液于血膜上，以覆盖血膜为度，静止约  $0.5 \sim 1\text{min}$ ，固定血细胞。滴加缓冲液为染液的  $1 \sim 3$  倍，充分混匀，放置染色  $5 \sim 10\text{min}$ ，随时以显微镜的低倍镜观察细胞的着色情况，待细胞核、浆分明，染色良好时，用自来水缓慢冲去染液（不得倾去染色液后再冲洗，会残留染液渣滓），干燥后镜检。

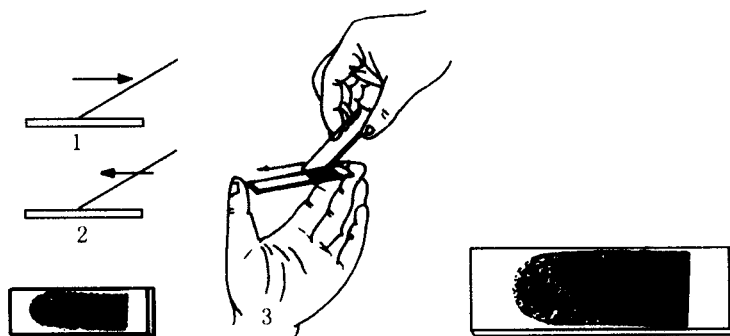


图 1-4 血片的制备

(4) 分类计数：以低倍镜观察全片，选择细胞分布均匀、着色良好区域（一般在体尾交界处）滴加香柏油，转换油镜分类，前后左右移动，对所见各种白细胞分别以画“正”字形记录，直至总数为 100 为止。分别计数各种白细胞所占百分率（%）。

#### 【质量控制】

(1) 血膜厚薄要适宜，血滴要适当，推片与载物玻片间的夹角不要太大，要反复练习，制得合格的血涂片。

(2) 染色过程不得使染液干涸。染色结束时，切不可先倒染液后冲洗，否则会残留沉渣。

(3) 每批新配制的染液、缓冲液，要首先试染找出合适比例，而后投入使用。染色时应注意到室温高低，调整染色时间。

#### 【报告方式】

各种类型白细胞所占百分比报告。

#### 【参考值】

成人：中性杆状核粒细胞	1% ~ 5%
中性分叶核粒细胞	50% ~ 70%
嗜酸性分叶核细胞	0.5% ~ 5%
嗜碱性分叶核细胞	0 ~ 1%
单核细胞	3% ~ 8%
淋巴细胞	20% ~ 40%