

全国高等医药院校教材
供医学检验技术专业用

临床基础检验学 实验指导

主编 岳保红 龚道元



人民卫生出版社
PEOPLE'S MEDICAL PUBLISHING HOUSE

全国高等医药院校教材
供医学检验技术专业用

临床基础检验学 实验指导

主 编 岳保红 龚道元

副主编 张式鸿 闫海润 夏 琳 柯培锋

编 者 (以姓氏笔画为序)

王小林(北京大学医学部)

毛红丽(郑州大学第一临床学院)

石青峰(桂林医学院附属医院)

刘 文(川北医学院)

刘 艳(吉首大学医学院)

闫海润(牡丹江医学院附属红旗医院)

李兴武(郑州大学第一临床学院)

李树平(湖南医药学院)

李新岳(湖南师范大学医学院)

吴盈盈(西南医科大学附属医院)

张 杰(齐鲁医药学院)

张式鸿(中山大学第一临床学院)

张海方(苏州大学附属第二医院)

岳保红(郑州大学第一临床学院)

郝艳梅(蚌埠医学院)

柯培锋(广州中医药大学第二附属医院)

夏 琳(武汉大学中南医院)

郭 翀(昆明医科大学第一附属医院)

唐 敏(重庆医科大学检验医学院)

龚道元(佛山科学技术学院口腔医学院)

康 梅(佛山科学技术学院口腔医学院)

彭永正(南方医科大学珠江医院)

彭克军(成都医学院)

葛晓军(遵义医学院附属医院)

谢婷婷(贵州医科大学医学检验学院)

秘 书 毛红丽 康 梅

人民卫生出版社

图书在版编目(CIP)数据

临床基础检验学实验指导 / 岳保红, 龚道元主编. —北京:
人民卫生出版社, 2017

ISBN 978-7-117-25163-1

I. ①临… II. ①岳… ②龚… III. ①临床医学 - 医学
检验 - 医学院校 - 教材 IV. ①R446.1

中国版本图书馆CIP数据核字(2017)第224112号

人卫智网	www.ipmph.com	医学教育、学术、考试、健康, 购书智慧智能综合服务平台
人卫官网	www.pmph.com	人卫官方资讯发布平台

版权所有, 侵权必究!

临床基础检验学实验指导

主 编: 岳保红 龚道元

出版发行: 人民卫生出版社(中继线 010-59780011)

地 址: 北京市朝阳区潘家园南里19号

邮 编: 100021

E - mail: pmph@pmph.com

购书热线: 010-59787592 010-59787584 010-65264830

印 刷: 三河市尚艺印装有限公司

经 销: 新华书店

开 本: 787×1092 1/16 印张: 12

字 数: 300千字

版 次: 2017年10月第1版 2017年10月第1版第1次印刷

标准书号: ISBN 978-7-117-25163-1/R·25164

定 价: 32.00元

打击盗版举报电话: 010-59787491 E-mail: WQ@pmph.com

(凡属印装质量问题请与本社市场营销中心联系退换)

前 言

《临床基础检验学实验指导》是全国高等医药院校医学检验技术专业本科教材《临床基础检验学》的配套教材,供4年制医学检验技术专业本科学生使用,同时也可作为卫生专业技术资格考试和临床检验工作者的参考用书。

本实验教材编写以医学检验技术专业本科培养目标为依据,以《全国临床检验操作规程》(第4版)、ISO 15189、GB/T 22576—2008和《医疗机构临床实验室管理办法》等文件为指南,结合医学检验技术专业特点和临床实验室的实际,力求反映医学检验基础发展的现状和趋势,内容编写以临床检验岗位需求为原则,注重实用性,加强和重视基本操作技能培养。

本实验指导共有十一章,由58个独立实验及6个综合设计性实验组成,内容涉及血液学基础检验、血栓与止血基础检验、血液分析仪的使用、血型与输血的基础检验、尿液分析基础检验、尿液分析仪使用、粪便与分泌物的基础检验、体腔液的基础检验、脱落细胞病理学检验及综合设计性实验。由长期从事临床检验及教学、科研一线的临床专家、教学经验丰富的教师编写,理论结合实际,贴近临床,符合实际工作需求,便于师生“教”与“学”,着重培养学生的动手能力和实际工作能力。

尽管各位编者在编写过程中倾心尽力,但因编者对科学问题的认知和理解能力差异,加上临床检验实践与工作经验沉淀和积累有关,内容表述和文字表达难免有纰漏,恳请使用本书的教师、学生以及临床检验工作者提出宝贵意见,以便今后进一步修订和完善。

岳保红 龚道元
2017年4月

目 录

第一章 血液一般检验基本技术	1
实验一 光学显微镜使用	1
实验二 微量吸管及改良牛鲍血细胞计数板使用	4
实验三 末梢血采集、血涂片制备与染色	8
实验四 静脉采血	12
第二章 血液一般检验	16
实验一 白细胞计数	16
实验二 白细胞分类计数	18
实验三 嗜酸性粒细胞直接计数	20
实验四 红细胞计数	22
实验五 血红蛋白测定	24
实验六 网织红细胞计数	28
实验七 血细胞比容测定	31
实验八 红细胞沉降率测定	34
实验九 血小板计数	36
实验十 外周血细胞形态学检查	38
第三章 血液分析仪检验	41
实验一 血细胞分析仪的使用和结果分析	41
实验二 血细胞分析仪校准、性能评价和比对	49
第四章 血栓与止血一般检验	56
实验一 活化部分凝血活酶时间测定	56
实验二 凝血酶原时间测定	58
实验三 纤维蛋白原测定	60
实验四 凝血酶时间测定	62
实验五 纤维蛋白(原)降解产物测定	64
实验六 D-二聚体测定	65
实验七 血凝分析仪的比对	68
第五章 血型与输血检验	70
实验一 ABO 血型鉴定	70

实验二 RhD 抗原鉴定	75
实验三 交叉配血试验	77
第六章 尿液一般检验	82
实验一 尿液理学检查	82
实验二 尿液显微镜检查	86
实验三 尿蛋白定性检查	92
实验四 尿葡萄糖班氏法定性检查	94
实验五 尿酮体定性检查	95
实验六 胆红素改良 Harrison 法定性检查	97
实验七 尿胆原改良 Ehrlich 法定性检查	98
实验八 尿含铁血黄素定性检查	100
实验九 尿本周蛋白定性检查	101
实验十 尿苯丙酮酸定性检查	103
实验十一 乳糜尿定性检查	104
实验十二 尿绒毛膜促性腺激素定性检查	105
第七章 尿液分析仪检验	107
实验一 尿液干化学分析仪检查	107
实验二 自动尿液有形成分分析仪检查	110
第八章 粪便和分泌物一般检验	112
实验一 粪便一般检查	112
实验二 隐血试验	116
实验三 精液一般检查	118
实验四 计算机辅助精液分析	125
实验五 前列腺液一般检查	128
实验六 阴道分泌物一般检查	130
实验七 阴道分泌物其他检查	134
实验八 痰液一般检查	137
第九章 体腔液一般检验	140
实验一 脑脊液检验一般检查	140
实验二 浆膜腔积液一般检查	146
实验三 关节腔积液一般检查	151
第十章 脱落细胞病理学检验	154
实验一 脱落细胞检查常规标本制备	154
实验二 液基薄层细胞制片技术	159
实验三 脱落细胞检查基本染色技术	160

实验四	宫颈脱落细胞病理学观察·····	165
实验五	痰脱落细胞病理学观察·····	170
实验六	浆膜腔积液脱落细胞病理学观察·····	174
实验七	尿液脱落细胞病理学观察·····	176
第十一章	综合及设计性实验·····	177
实验一	贫血疾病红细胞参数及其细胞形态学变化观察的综合性实验·····	177
实验二	发热患者血细胞检验的综合性实验·····	178
实验三	肾病患者尿液分析综合性实验·····	179
实验四	尿蛋白定性试验方法学评价的设计·····	180
实验五	不同尿糖检测方法灵敏度比较的设计性试验·····	181
实验六	腹水性质及可能产生原因鉴别的实验设计·····	182

第一章 血液一般检验基本技术

实验一 光学显微镜使用

【实验目的】掌握光学显微镜的使用和维护方法。

【实验材料】

1. 器材 双目电光源普通光学显微镜、擦镜纸等。
2. 试剂 香柏油、清洁剂(无水乙醇:乙醚=7:3)。
3. 标本 瑞氏染色血涂片。

【实验操作】

1. 准备工作

(1) 取显微镜:按分配编号打开显微镜柜,取出显微镜,右手紧握住镜臂,左手托住镜座,镜身直立方式拿显微镜。

(2) 放置显微镜:将显微镜放置在自己左前方的实验台上,距桌边 2~4cm 为宜。

(3) 调坐凳:调节可升降凳子至适当高度。

(4) 开电源:插电源插座、打开电源开关。

2. 调光 旋粗调焦旋钮使显微镜物镜头距载物台适当距离,握住物镜转换器,将 10× 镜头(低倍镜)旋入光路;目镜观察,调节聚光器和光亮度旋钮使光亮度至适当。

3. 低倍视野调焦及观察

(1) 放置血片:辨认血片正反面,将有血膜的一面朝上放置在载物台标本夹中,移动标本夹将血片移入通光孔的中央。

(2) 调焦:从侧面窥视血片,旋粗调焦旋钮使低倍物镜接近血片(略小于相应物镜的工作距离,一般工作距离为 1cm),观察目镜视野,同时缓慢转动粗调焦旋钮使载物台缓慢下降(或物镜缓慢上升),待初见到物像后,再旋转细调焦旋钮至观察到清晰物像为止。

(3) 调瞳间距:调节目镜瞳间孔距至适合自己眼睛的位置,视野中呈单一物像。

(4) 调节屈光度:调节目镜屈光度调节环,使左右目镜见到清晰物像。

(5) 调节视野亮度:调节光阑至适当位置,使视野光亮度至合适。

(6) 观察 10× 物镜:移动标本夹,微调焦同时观察血片全貌,包括涂片、染色、细胞分布及尾部细胞情况。选择细胞分布均匀、染色良好的体尾交界部位供高倍视野、油镜视野观察。

4. 高倍视野调焦及观察

(1) 转换高倍物镜:转动物镜转换器,将高倍物镜头旋入光路,旋转细调焦旋钮直至物像清晰为止。

- (2) 调聚光器及光阑:通过调节聚光器及光阑使光亮度至合适。
- (3) 观察高倍视野:移动标本夹同时微调焦,观察血片中的血细胞。

5. 油镜视野调焦及观察

(1) 转换油浸物镜头:依次低倍视野及高倍视野观察选择好血片上的适当区域,暂时移开物镜头,在目标位置加香柏油 1~2 滴,转动物镜转换器将油浸物镜头至光路。观察油浸镜视野时,一般将光源聚光器上升至最高,调聚光器孔径光阑至合适位置,调光亮度至合适。

(2) 调节焦距:从侧面窥视血片,旋粗调焦旋钮使油浸物镜头缓缓接近血片,直至油浸镜的前透镜浸没在香柏油中(但未接触玻片)。然后一边从目镜中观察,一边缓慢旋细调焦旋钮使载物台缓慢下降(或物镜头缓慢上升),待初见到物像后,再旋转细调焦旋钮至观察到清晰物像为止。

(3) 观察油浸镜视野:移动标本夹,微调细焦旋钮同时仔细观察血片中各种细胞形态,绘图或记录。

6. 显微镜使用后收尾工作

- (1) 调节粗调焦旋钮:使物镜头离开血片适当位置,取下血片标本。
- (2) 关闭电源:先将光亮度调节旋钮调至最小;关掉电源开关,拔出电源插座。

(3) 脱油:①油浸镜脱油:先用拭镜纸直接擦拭油镜头 1~2 次,把大部分油擦掉。然后用清洁剂滴湿的拭镜纸擦 2 次,最后用干净的拭镜纸擦 1~2 次即可。②标本脱油:可用“拉纸法”擦净,即用一张干净的拭镜纸条覆盖在玻片的香柏油上,纸上滴清洁剂,趁湿将纸条平拖着往外拉,连续 3~4 次即可擦净。

(4) 清洁显微镜:先用绸布清洁显微镜机械部分,再用拭镜纸擦拭显微镜光学部分。

(5) 收回显微镜:旋转物镜转换器将物镜头移开光路,镜头成“八”字形排列。载物台、聚光器下降到最低处,标本夹回位,盖上绸布和外罩,最后放回显微镜柜中,做好使用情况登记。

【注意事项】

1. 持镜时必须右手握镜臂、左手托镜座的姿势,不可单手提取,以免零件脱落或碰撞到其他地方,轻拿轻放。不可把显微镜放置在实验台的边缘,以免碰翻落地。

2. 开、关电源开关前,最好将光亮度调节至最低;电源开关不要短时频繁开关;不观察显微镜的间歇要及时调低光亮度至最小,以保护灯泡。

3. 放置血片时,要放置在通光孔中央,且不能放反载玻片(底面朝上)。高倍视野观察液体标本一般加盖玻片,否则液体容易接触高倍镜头并进入镜头内,使镜头受到污染和腐蚀。

4. 在观察标本时应按照先低倍视野观察,再转高倍视野、油浸镜视野的顺序操作,不可直接用高倍视野或油浸镜视野观察;另外边观察边来回调节细调焦旋钮,使所观察物像清晰。转换物镜时不能用手推着物镜转换,应该通过物镜转换器。

5. 调焦要严格按照调焦程序来操作,防止压坏载玻片或碰坏物镜头,在调整焦距过程中动作要缓慢进行,否则物像会一闪而过,找不到观察的目标;如果是显微镜的原配物镜,所用的载玻片、盖玻片又符合标准,转换高倍镜头可以通过“等高转换”。否则最好先将镜筒升高后再转换高倍镜头,然后按低倍视野的调焦方法,重新调焦。注意高倍镜头的工作距离一般为 0.5mm 左右。为安全起见,油浸镜头一般不能“等高转换”。

6. 微调旋钮机构是显微镜机械装置中精细而又容易破坏的元件,旋到了限位后,不能

再强行旋转。

7. 不要随意取下目镜,以防止尘粒落入镜筒内,如需要拔出目镜,要用镜筒盖覆盖镜筒口,避免手触摸镜片及呼吸气流吹到目镜上。如需要取下物镜头,必须将其旋转座向下置放在干净的台面上或装入物镜头盒中。

8. 显微镜清洁

(1) 油浸镜使用后一定要及时擦拭干净,否则香柏油会变黏稠和干涸,很难擦拭。

(2) 每次使用完后,先用绸布擦拭显微镜机械部分,光学部分用擦镜纸轻轻地抹去灰尘,忌口吹、手抹或用布擦。如有污物、油渍或手印等,需要用擦镜纸蘸取清洁剂,轻轻擦拭去除。

9. 使用自然光源的显微镜,光亮度可通过反射镜、聚光器及光阑调节,一般采用平面镜,如需要可使用凹面镜增加光的强度。收镜时竖放反光镜,下降聚光器,关闭光圈。

10. 显微镜要应注意防尘、防潮、防热、防腐蚀、防振动。

11. 显微镜种类很多,具体操作步骤和注意事项因不同种类显微镜而异。

【实验讨论】普通光学显微镜在使用低倍视野、高倍视野及油镜视野时,如何调节焦距?

(龚道元)

实验二 微量吸管及改良牛鲍血细胞计数板使用

【实验目的】掌握微量吸管的使用方法和改良牛鲍血细胞计数板的结构及使用方法。

【实验原理】采用微量吸管吸取一定量的血液或体液,经稀释液稀释一定倍数后,滴入具有固定体积和精密划分刻度的改良牛鲍血细胞计数板中,显微镜观察并计数所选择区域中的细胞数,再乘以稀释倍数,即可换算成单位体积血液或体液中的细胞数。

【实验材料】

1. 器材

(1) 改良牛鲍血细胞计数板及盖玻片:改良牛鲍血细胞计数板由“H”形凹槽分为2个相同的计数池(图1-2-1),计数池两侧各有一条支持柱,较计数池平面高出0.10mm。将专用盖玻片覆盖其上,形成高0.10mm的计数池。计数池分为9个大方格,每个大格面积为 1.0mm^2 ,容积为 $0.1\text{mm}^3(\mu\text{l})$ 。中央大方格用双线分成25个中方格,位于四角的4个大方格分别用单线划分为16个中方格(图1-2-2)。

(2) 其他:微量吸管、带孔乳胶吸头、试管、试管架、刻度吸管、洗耳球、无菌干脱脂棉、玻璃棒、显微镜、绸布。

2. 试剂 白细胞稀释液、红细胞稀释液。

3. 标本 EDTA- K_2 抗凝血或未梢血。

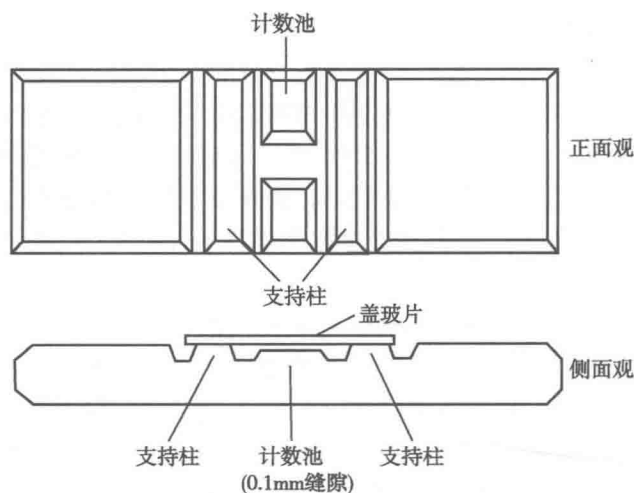


图 1-2-1 改良牛鲍血细胞计数板的构造

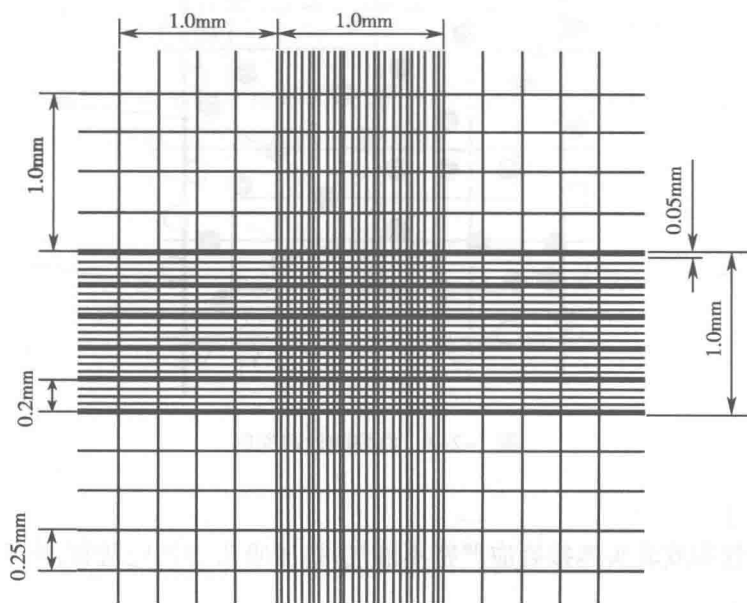


图 1-2-2 改良牛鲍血细胞计数板计数区域的划分

【实验操作】

1. 准备吸管 将带孔胶乳头套在微量吸管上,注意两者连接处应严密不漏气。
2. 加稀释液 取试管 2 支,标明 A、B,分别加白细胞稀释液 0.38ml,红细胞稀释液 2ml。
3. 持管吸血 右手拇指和中指夹住吸管与吸头交接处,示指按住吸头小孔,三指轻轻用力,排出适量气体使管内形成负压。将吸管尖插入血标本中,三指慢慢松开,吸取血液到所需刻度(白细胞计数取 20 μ l,红细胞计数取 10 μ l)后抬起示指,吸管尖移离血液标本。
4. 拭净余血 用干脱脂棉沿微量吸管口方向拭净余血,并使血量达到规定刻度。
5. 释放血液 将吸管插入含血细胞稀释液的试管底部,慢慢排出吸管内血液,再吸取上清液冲洗吸管内余血 3 次后排尽液体,立即混匀成细胞悬液。
6. 充液 用微量吸管吸取或用玻棒蘸取已充分混匀的细胞悬液 A 液 1 滴,滴于计数板和盖玻片交界处,利用虹吸作用让液体顺其间隙充满计数池;以相同方法取 B 液充入另一侧计数池,静置 2~3min,待细胞下沉。
7. 计数 先用低倍视野观察,降低聚光器、缩小光阑使光线减弱,以便清楚观察整个计数板结构和特征,同时观察血细胞分布是否均匀。在低倍视野(10 倍物镜头)下分别计数四角 4 个大方格的白细胞数并记录;在高倍视野(40 倍物镜头)下分别计数中央大方格中四角及中央 5 个中方格的红细胞数并记录。
8. 计数原则 计数时需遵循一定的方向逐格进行,以免重复或遗漏。对压线的细胞采用数左不数右,数上不数下的原则(图 1-2-3)。

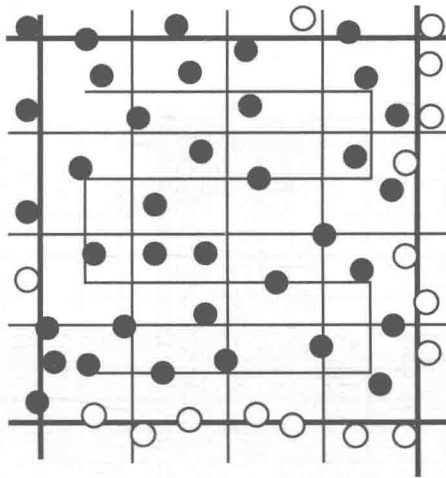


图 1-2-3 血细胞计数原则

【注意事项】

1. 微量吸管和胶乳头连接处应严密不漏气,挤压吸头力度应适宜,防止血液吸入胶乳吸头内。

2. 血液流出后易凝固,采血动作要快,血液凹面达到吸管刻度线即可。吸血过程中管尖始终不能离开液面,以免吸入气泡。

3. 计数板在启用前要鉴定是否合格,以后每年都要鉴定 1 次,以防不合格或磨损而影响计数结果的准确性,其鉴定内容包括计数池深度和盖玻片检查。

(1) 计数池深度:将微米级千分尺尾部垂直架在计数板两堤上,移动尾部微米级千分尺,多点测量计数池的高度误差应在 $\pm 2\%$ ($\pm 2\mu\text{m}$) 以内。

(2) 盖玻片检查:盖玻片要求厚度为 0.17mm,折射率为 1.522。新盖玻片启用前要检查厚度和平整的检查。厚度检查使用千分尺对盖玻片的厚度进行多点测定,最少 9 个区,每个区测 2 点,要求区域间厚度差应小于 $2\mu\text{m}$;平整度检查使用平面平晶仪检测盖玻片两表面的干涉条纹,其条纹细密均匀或微量弯曲即为符合要求。

4. 保证计数板和盖玻片清洁,操作过程中手指勿接触计数板表面,以防污染计数池,致使充液时产生气泡。如使用血液充液,计数板和盖玻片使用后应依次用 95% 乙醇、蒸馏水棉球擦拭,最后用清洁绸布拭净。

5. 加盖玻片时,WHO 推荐采用推式法,此法较盖式法更能保证充液的高度为 0.10mm。当盖玻片盖在计数板上,若在两层玻璃之间出现彩色条带(Newton 环),说明计数板和盖玻片清洁良好,否则应重新清洁计数板和盖玻片。

6. 充液前要充分混匀细胞悬液,计数板应平放。要求一次完成充液,如充液出现满溢、不足或有气泡,应拭净计数板及盖玻片后重新充液。充液后不能移动或触碰盖玻片。

7. 白细胞和红细胞计数一般需静置 3~5min,让细胞充分下沉;血小板需静置 10~15min 才能充分下沉,注意保湿,防止因静置时间过长引起稀释液挥发而影响计数结果的准确性。

8. 血液稀释后应在 1h 内完成计数,以免血细胞凝集、溶血、液体挥发后浓缩或分布不均。若细胞分布严重不均,则应重新充液计数。计数白细胞时用低倍视野,计数红细胞、血小板时用高倍视野,但需先在低倍视野下找到相应的计数区域。应遵循计数原则,计数过程



中要注意识别非细胞成分。

【实验讨论】

1. 改良牛鲍血细胞计数板中,红细胞、白细胞及血小板计数区域分布有什么不同?
2. 如何保证在计数池内计数血细胞或血小板结果的准确性?
3. 现有不知细胞浓度的细胞悬浮液样品,需调整细胞浓度为 $(1\sim5) \times 10^9$ 细胞/L,请设计实验方法和步骤调整细胞数到所需细胞浓度范围?

实验三 末梢血采集、血涂片制备与染色

一、末梢血采集

【实验目的】掌握末梢血采集的操作方法,了解不同部位采血对检验结果的影响。

【实验原理】采血针刺破末梢血管后血液自然流出,用微量吸管吸取所需的血量。

【实验材料】

1. 器材 一次性消毒采血针、75%乙醇脱脂棉球、无菌干脱脂棉球或棉签、一次性微量吸管、带孔胶乳吸头、试管、试管架、2ml吸管、洗耳球。

2. 试剂 生理盐水(或血细胞稀释液)、75%乙醇。

【实验操作】

1. 准备器材 取试管1支,加入2ml生理盐水。将胶乳吸头套在微量吸管上,检查连接处是否漏气。

2. 选择采血部位 成人选择左手中指或无名指指尖内侧(WHO推荐采血部位),一般以无名指为宜;1岁以下婴幼儿常选择足跟内外侧或足跖指采血;特殊情况可选择其他手指或耳垂。

3. 轻轻按摩采血部位,使局部组织自然充血。

4. 消毒皮肤 用75%乙醇脱脂棉球擦拭采血部位皮肤,待干。

5. 针刺皮肤 用左手拇指和示指固定采血部位使其皮肤和皮下组织绷紧,右手持一次性消毒采血针迅速刺入采血部位,深度2~3mm为宜,立即出针。

6. 拭去第1滴血 待血液自然流出或稍加压力流出后,用无菌干脱脂棉球擦去第1滴血。

7. 持管吸血 待血液再自然流出成滴后,用一次性微量吸管吸血至10 μ l或20 μ l刻度,然后用无菌干脱脂棉球压住伤口止血。

8. 稀释血液 用干脱脂棉球擦净微量吸管外部余血后,将吸管伸入含生理盐水的试管底部,轻轻排出吸管内血液,然后用上清液冲洗吸管内余血3次,立即混匀试管内液体。

【注意事项】

1. 所选采血部位的皮肤应完整,无烧伤、冻疮、发绀、水肿或炎症等;除特殊情况外,不选择耳垂采血;严重烧伤患者可选皮肤完整处采血。

2. 本试验具有创伤性,必须严格无菌操作,防止采血部位感染;必须使用一次性消毒采血针,做到一人一针一管,避免交叉感染。皮肤消毒后,应待乙醇挥发后采血,否则血液不易成滴。

3. 进、出针要迅速,且伤口要有足够的深度。

4. 因第1滴血可能混有组织液,应擦去不用;如血流不畅切勿用力挤压,以免混入组织液,影响结果的准确性。

5. 微量吸管吸血后应拭净吸管外余血,以保证血量的准确性。

6. 血液排入试管内速度不宜过快,避免产生气泡。吸管内血液应用上清液冲洗干净,以保证血量准确。

7. 标本采集后应及时测定,最好在 2h 内完成,不宜冷藏。在进行多项检查时,血液标本的采集顺序依次为血小板、红细胞计数、血红蛋白测定、白细胞计数及白细胞分类。如采血用于自动血液分析仪,最好以优质无菌纸巾擦血,防止棉纤维混入,造成仪器堵孔。

二、血涂片制备与染色

【实验目的】掌握血涂片的制备与染色方法。

【实验原理】取一滴血于载玻片上推成均匀血膜,用复合染料染色。细胞染色包括物理吸附及化学亲和作用,不同的细胞种类及细胞的不同成分,对酸性染料(如伊红)及碱性染料(如亚甲蓝)的结合能力不同,而使各种细胞呈现出不同的染色特点。

【实验材料】

1. 器材

(1) 载玻片、洗耳球、显微镜、一次性采血针或注射器、染色架、记号笔、蜡笔。

(2) 推片选择边缘光滑、平整的载玻片,在两角分别作斜线标记,然后用玻璃切割刀裁去两角,制成约 15mm 宽的推片。

2. 试剂

(1) 瑞氏(Wright)染液:①Wright 染料 1.0g、甲醇(AR 级以上)600ml、甘油 15ml。将全部染料放入清洁干燥的乳钵中,先加少量甲醇慢慢地研磨(至少 30min),使染料充分溶解,再加少许甲醇混匀,然后将溶解部分倒入洁净的棕色瓶内,乳钵内剩余未溶解的染料,再加入少许甲醇细研,如此多次研磨,直至染料全部溶解,甲醇用完为止。最后再加 15ml 甘油,密闭保存。②磷酸盐缓冲液(pH6.4~6.8):磷酸二氢钾(KH_2PO_4)0.3g、磷酸氢二钠(Na_2HPO_4)0.2g,加蒸馏水至 1000ml,塞紧瓶口贮存。配好后测定 pH,必要时可用磷酸盐溶液校正 pH。也可配制成 10 倍浓缩液,使用时再稀释。

(2) 吉姆萨(Giemsa)染液:包含 Giemsa 染料 1.0g、甲醇(AR 级以上)66ml、甘油 66ml。将染料全部倒入盛有 66ml 甘油的圆锥烧瓶内,在 56℃的水浴锅中加热 90~120min,使染料与甘油充分混匀溶解,然后加入 60℃预热的甲醇,充分摇匀后置棕色瓶中,于室温下静置 7 天,过滤后使用。

(3) Wright-Giemsa 复合染液:①中性甘油:取甘油与水按体积比 1:1 混合,加酚酞指示剂 2~3 滴,用 0.1mol/L 氢氧化钠溶液滴定至溶液显粉红色即可。②Wright-Giemsa 复合染液:包含 Wright 染料 1.0g、Giemsa 染料 0.3g、甲醇(AR 级以上)500ml、中性甘油 10ml。将 Wright 染料和 Giemsa 染料置洁净研钵中,加少量甲醇研磨片刻,再吸出上层混合液。如此反复几次,至 500ml 甲醇用完为止。收集上层液体于棕色玻璃瓶中,每天早、晚各摇 3min,共 5 天,存放 1 周后即可使用。③磷酸盐缓冲液(pH6.4~6.8):参见瑞氏染液配方。

3. 标本末梢血或 EDTA 抗凝静脉血。

【实验操作】

1. 采血 采集末梢血 1 滴置于载玻片一端 1cm 处,也可以使用玻璃棒、微量吸管、注射针头等取 EDTA 抗凝血 1 滴滴加于载玻片上,直径约 4mm。

2. 推片 左手平执载玻片两端,右手持推片将其一端放在载玻片上血滴前方,向后慢慢移动并接触血滴,血液即沿推片与载玻片的接触边缘展开,保持推片与载玻片呈

30°~45°平面夹角,匀速向前推动,载玻片上留下一层厚薄适宜的血膜(图 1-3-1),呈舌状,分头、体、尾三部分,且清晰可见。

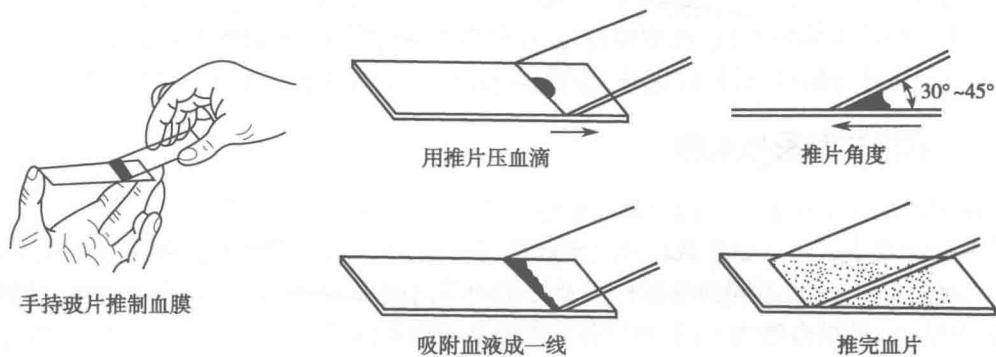


图 1-3-1 血涂片制备示意图

3. 干燥 将推好的血涂片在空气中晃动,使其迅速干燥。

4. 标记 在载玻片的一端用记号笔编号,注明受检者姓名。

5. 染色

(1) Wright 染色法:待血涂片干透后,用蜡笔在其两端画线,以防染色时染液外溢。将玻片平置于染色架上,滴加染液数滴,以覆盖整个血膜为宜;0.5~1min 后,滴加等量或稍多的缓冲液,轻轻摇动玻片或用洗耳球对准血涂片吹气,使染液与缓冲液充分混匀;室温下放置 5~10min 后用流水冲去染液,待干。

(2) Giemsa 染色法:将干透的血涂片用甲醇固定 2~3min 后,置于被磷酸盐缓冲液稀释了 10~20 倍的 Giemsa 染液中,浸染 10~30min(标本少时可用滴染),取出用流水冲洗,待干。

(3) Wright-Giemsa 复合染色法:操作步骤同 Wright 染色法,只是用 Wright-Giemsa 复合染液和缓冲液分别代替 Wright 染液和相应的缓冲液。

6. 观察结果

(1) 肉眼观察:染色前血膜呈肉红色、舌形,厚薄适宜,头、体、尾分明,血膜两侧应留空隙;染色后血涂片外观呈淡紫色。

(2) 显微镜观察:将干燥后的血涂片置于显微镜下观察,先用低倍视野观察血涂片体、尾交界处的血细胞分布及染色情况,再在油镜下观察各血细胞的形态特征。

【注意事项】

1. 载玻片必须清洁、干燥、中性、无油脂、表面无划痕、边缘完整,使用时只能手持载玻片边缘,勿触及表面。新载玻片常有游离碱质,事先须用铬酸洗液或 10% 盐酸浸泡 24h,清水彻底冲洗,干燥备用。使用过的载玻片可放入适量肥皂水或洗涤剂的水中煮沸 20min,用热水将肥皂和血膜洗净,再用清水反复冲洗,干燥备用。

2. 首选末梢血标本(非抗凝血),也可用 EDTA 抗凝血,不能用肝素抗凝血;EDTA-K₂ 能阻止血小板聚集,有利于观察血小板的形态。采集的血液标本须在 4h 内制作涂片,制片前标本不宜冷藏。

3. 一张良好的血涂片,要求厚薄适宜、头体尾分明、分布均匀、边缘整齐、两侧留有空隙。许多因素可影响血涂片的厚度,血滴大、推片角度大、速度快则血涂片厚;反之,则血涂