


全国高职高专卫生部规划教材配套教材
供医学检验专业用

临床检验基础

实验指导

主编 龚道元

 人民卫生出版社

全国高职高专卫生部规划教材配套教材

供医学检验专业用

临床检验基础 实验指导

主 编 龚道元

副主编 罗春丽 张家忠

编 者 (以姓氏笔画为序)

张纪云	山东医学高等专科学校
张家忠	襄樊职业技术学院
张迎春	齐齐哈尔医学院第二附属医院
罗春丽	重庆医科大学
林发全	广西医科大学第一附属医院
郑文芝	河北北方学院
欧俐苹	重庆医科大学
龚道元	佛山科学技术学院医学院
康 梅	佛山科学技术学院医学院
曾素根	四川大学华西临床医学院

人民卫生出版社

图书在版编目(CIP)数据

临床检验基础实验指导/龚道元主编. —北京:
人民卫生出版社, 2010. 7
ISBN 978-7-117-13092-9

I. ①临… II. ①龚… III. ①临床医学-医学检验-
高等学校:技术学校-教学参考资料 IV. ①R446.1

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2010)第 104384 号

门户网: www.pmph.com 出版物查询、网上书店
卫人网: www.ipmph.com 护士、医师、药师、中医师、卫生资格考试培训

版权所有, 侵权必究!

临床检验基础实验指导

主 编: 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: 010-67605754 010-65264830
010-59787586 010-59787592
印 刷: 北京市卫顺印刷厂
经 销: 新华书店
开 本: 787×1092 1/16 印张: 11
字 数: 266 千字
版 次: 2010 年 7 月第 1 版 2010 年 7 月第 1 版第 1 次印刷
标准书号: ISBN 978-7-117-13092-9/R·13093
定 价: 18.00 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销售中心联系退换)

前 言

《临床检验基础》是高等医药院校检验专业必修课和主干课之一,为适应实验教学的需要,卫生部教材办公室组织编写了全国高职高专医学检验专业卫生部规划教材《临床检验基础实验指导》,作为全国高职高专医学检验专业卫生部规划教材《临床检验基础》(第3版)的实验教学配套教材,既可供全国高职高专医学检验专业师生使用,也可供临床医师、检验进修人员和实习生在临床检验实际工作中参考使用。

编写本版教材的主导思想是围绕理论教材的教学内容,选择相关的实验,通过实验课的学习,使学生巩固所学的理论知识,掌握临床检验的基本操作技能,提高分析问题、解决问题的能力。本教材的主要内容包括血液一般检验、血栓与止血一般检验、血型与输血检验、尿液检验、粪便检验、体腔液检验、生殖系统分泌物检验和脱落细胞及细针吸取细胞学检验,共八章。实验基本上按目的、原理、实验用品、标本、操作、参考区间、注意事项和实验评价等层次进行编写。

本教材充分反映了21世纪医学检验发展的现状和趋势,充分体现了“三基”即基本理论、基本知识和基本技能,力求突出“五性”即思想性、科学性、先进性、启发性和实用性。实验项目和内容编写以岗位需求为原则,注重实用性和应用性,加强基本操作技能培养,与临床岗位无缝接轨。本教材在保持传统《临床检验基础》实验内容的基础上,根据临床工作的实际,对实验项目进行了适当的调整和增减:删除了尿Addis计数、胃液、十二指肠液、泪液、唾液等临床上已多年不用或少用的检验项目或标本检验,删除了脑脊液葡萄糖和氯化物测定等检查项目。同时将新的检验项目、方法和技术引入其中,注重和加强仪器分析的有关实验内容,如血液自动分析、尿液自动分析、计算机辅助精液分析等。对每个实验项目较详细地介绍了操作方法和注意事项,其目的是强调规范操作、保证结果准确性。

本教材在编写的过程中得到了卫生部教材办公室、编写人员所在单位的大力支持,在此,感谢各位编委所付出的辛勤劳动。

尽管各位编者在编写过程中倾心尽力,但由于时间短促,水平和经验有限,难免有纰漏之处,恳请专家和读者提出宝贵意见,并致谢意。

龚道元

2010年5月

目 录

第一章 血液一般检验	1
实验一 光学显微镜、微量吸管及改良牛鲍计数板使用	1
一、光学显微镜使用与维护	1
二、微量吸管使用	2
三、改良牛鲍计数板的使用	2
实验二 血涂片制备与染色	5
一、血涂片制备	5
二、血涂片染色	6
实验三 毛细血管采血与显微镜法红细胞计数	9
一、毛细血管采血法	9
二、显微镜法红细胞计数	10
实验四 血红蛋白测定	11
一、氰化高铁血红蛋白(HiCN)测定法	11
二、十二烷基硫酸钠血红蛋白(SDS-Hb)测定法	13
实验五 红细胞平均直径测量及 Price-Jone 曲线绘制	14
实验六 网织红细胞计数	15
一、试管法	15
二、玻片法	17
实验七 嗜碱性点彩红细胞计数	18
实验八 静脉采血法	19
一、普通采血法	19
二、真空采血管采血法	21
实验九 血细胞比容测定	23
一、温氏法	23
二、毛细管法	24
实验十 红细胞沉降率测定	25
一、魏氏法	25
二、自动血沉仪法	27
实验十一 白细胞计数	28
实验十二 白细胞分类计数	29
实验十三 白细胞形态检查	30

实验十四 嗜酸性粒细胞直接计数	31
实验十五 红斑狼疮细胞检查	33
实验十六 血小板计数	34
实验十七 血细胞分析仪的使用及结果分析	35
一、三分群型血细胞分析仪使用及结果分析	35
二、五分类血细胞分析仪使用及结果分析	41
第二章 血栓与止血一般检验	43
实验一 出血时间测定	43
实验二 血块收缩试验	44
一、定性法	44
二、全血定量法	44
三、血浆定量法	45
实验三 凝血时间测定	46
一、玻璃试管法	46
二、硅管法	46
三、活化凝血时间法	47
实验四 血浆活化部分凝血活酶时间测定	47
一、试管法	47
二、血凝仪法	49
实验五 血浆凝血酶原时间测定	51
一、试管法	51
二、血凝仪法	52
实验六 血浆凝血酶时间测定	53
一、试管法	53
二、血凝仪法	54
实验七 血浆纤维蛋白原测定(凝血酶法)	55
实验八 血浆纤维蛋白(原)降解产物测定	57
一、胶乳凝集法	57
二、免疫比浊法(仪器法)	58
实验九 血浆D-二聚体测定	59
一、胶乳凝集法	59
二、免疫比浊法(仪器法)	60
第三章 血型与输血检验	61
实验一 ABO血型鉴定	61
一、盐水介质法	61
二、微柱凝胶血型卡法	65
实验二 A ₁ 和A ₂ 亚型鉴定	67

实验三 Rh 血型鉴定	68
一、盐水介质法	68
二、酶介质法	69
实验四 交叉配血试验	71
一、盐水介质配血法	71
二、凝聚胺介质配血法	73
三、酶介质配血法	74
四、抗球蛋白介质配血法	75
五、微柱凝胶介质配血法	75
实验五 直接抗人球蛋白试验	77
实验六 放散试验	78
一、加热放散法	78
二、乙醚放散法	79
实验七 血型抗体效价测定	80
一、IgM 抗体效价测定	80
二、IgG 抗 A(B)效价测定	81
第四章 尿液检验	83
实验一 尿液一般性状检查	83
一、尿量测定	83
二、尿液颜色和透明度观察	83
三、尿液酸碱度测定	84
四、尿液比密测定	85
五、尿渗量测定(冰点下降法)	88
实验二 尿蛋白定性检查	89
一、磺基水杨酸法	89
二、加热醋酸法	90
实验三 尿葡萄糖定性检查(Benidict 还原法)	91
实验四 尿酮体定性检查	93
一、Lange 法(朗格法)	93
二、改良 Rothera 法(酮体粉法)	93
实验五 胆红素定性检查(Harrison 法)	95
实验六 尿胆原定性检查(改良 Ehrlich 法)	96
实验七 血红蛋白定性检查(邻联甲苯胺法)	97
实验八 尿亚硝酸盐定性检查(Griess 法)	98
实验九 尿干化学分析仪使用	99
实验十 尿蛋白定量测定	103
一、双缩脲法	103
二、丽春红 S 法	104

实验十一 尿本周蛋白定性检查	105
一、热沉淀反应法	105
二、对甲苯磺酸法	106
实验十二 尿肌红蛋白定性检测(邻联甲苯胺法)	107
实验十三 尿含铁血黄素定性检查(Rous 法)	108
实验十四 尿乳糜定性检查	109
实验十五 尿人绒毛膜促性腺激素定性检查(胶体金法)	110
实验十六 尿卟啉定性检查	111
实验十七 尿苯丙酮酸定性检查	112
实验十八 尿液有形成分检查	113
一、尿液有形成分未染色显微镜检查法	113
二、尿液有形成分染色显微镜检查法	114
三、尿液有形成分定量计数板法	115
四、1 小时尿液有形成分计数	116
实验十九 尿有形成分分析仪使用	117
第五章 粪便检验	120
实验一 粪便一般性状和显微镜检查	120
一、粪便一般性状检查	120
二、粪便显微镜检查	121
实验二 粪便隐血试验	122
一、邻联甲苯胺法	122
二、单克隆抗体胶体金法	123
第六章 体腔液检验	125
实验一 脑脊液检查	125
一、脑脊液一般性状检查	125
二、脑脊液显微镜检查	126
三、蛋白定性试验(Pandy 试验)	129
实验二 浆膜腔积液检查	130
一、浆膜腔积液一般性状检查	130
二、浆膜腔积液显微镜检查	131
三、浆膜腔积液黏蛋白定性试验(Rivalta 试验)	132
实验三 滑膜液检查	133
一、滑膜液一般性状检查	133
二、滑膜液显微镜检查	134
实验四 羊水泡沫试验	136

第七章 生殖系统分泌物检验	139
实验一 精液一般性状检查.....	139
实验二 精子活动率、存活率和活力检查	140
实验三 精子计数.....	142
实验四 精子形态检查.....	143
实验五 精子尾部低渗膨胀试验.....	144
实验六 精浆果糖测定.....	146
一、间苯二酚法	146
二、吲哚显色法	147
实验七 抗精子抗体测定.....	148
一、精子凝集试验(试管-玻片法).....	148
二、精子制动试验	149
三、酶联免疫吸附试验	150
实验八 计算机辅助精液分析.....	152
实验九 前列腺液检查.....	154
一、前列腺液一般形状检查	154
二、前列腺液显微镜检查	155
实验十 阴道分泌物检查.....	156
一、阴道分泌物一般性状检查	156
二、阴道分泌物显微镜检查	156
 第八章 脱落细胞及细针吸取细胞学检验	 159
实验一 脱落细胞检验基本染色技术.....	159
一、巴氏(Papanicolaou)染色法	159
二、苏木素-伊红(hemotoxylin eosin, H-E)染色法.....	160
实验二 阴道涂片巴氏染色脱落细胞检查.....	161
实验三 浆膜腔积液 H-E 染色脱落细胞检查	164
实验四 肺部脱落细胞 H-E 染色检查	165

第一章

血液一般检验

实验一 光学显微镜、微量吸管及改良牛鲍计数板使用

一、光学显微镜使用与维护

【目的】 掌握光学显微镜的使用和维护方法。

【实验用品】

1. 器材 光学显微镜、擦镜纸。
2. 试剂 香柏油、清洁剂(无水乙醇:乙醚=3:7)。

【标本】 瑞氏染色血涂片。

【操作】

1. 显微镜的放置 显微镜应放在清洁、干燥、无震动的实验台上。
2. 低倍镜或高倍镜观察 将瑞氏染色血涂片放在载物台上,首先用低倍镜($\times 10$)对准镜筒,转动粗调旋钮将镜筒下降到近于接触到标本处后,选择平面光镜,调整聚光镜的高度和光栅大小,一边从目镜中观察视野,一边转动粗调旋钮将镜筒徐徐上升,见物像后,改用细调旋钮做精细调焦,直至物像最清晰为止。需要从低倍物镜转换到高倍物镜($\times 40$)时,如果物镜是显微镜的原装配置,所用的载玻片等符合标准,一般都可以进行“等高转换”,转换后,只要稍微调节一下细调旋钮,即可看到清晰的图像。
3. 油镜观察 将镜筒升高,在瑞氏染色血涂片体尾交界处滴两滴香柏油,转用油镜($\times 100$)对准镜筒,调粗调旋钮将镜筒下降接触到标本处后,升高聚光镜,将光栅放到最大,选择凹面反光镜调节角度,然后转动细调旋钮将镜筒缓缓上升,直至视野中出现最清晰的物像为止。
4. 显微镜使用后的处理 光学显微镜使用完毕,取下载玻片,滴1~2滴清洁液在擦镜纸上,拭净油镜镜头,将物镜转成“八”字形(不要将物镜与目镜相对)。镜筒、聚光器下降到最低处,反光镜放水平位,右手握镜臂,左手托镜座(不可单手提取,以免零件脱落或碰撞到其他地方),轻轻放入显微镜箱内。

【注意事项】

1. 放置载玻片标本的观察区域要对准载物台上的通光孔中央,且不能反放玻片,防止压坏玻片或碰坏物镜。
2. 单筒显微镜用左眼观察,双筒显微镜注意调好瞳距。在整个调整焦距过程中,每个动作都要缓慢进行,否则物像会一闪而过,找不到观察的目标。

3. 调整焦距时以使用粗调旋钮为主,尽量少用细调旋钮。在转高倍镜,特别是油镜时勿将旋钮向下调,以免压碎载玻片损坏镜头。

4. 显微镜维护主要应做到防尘、防潮、防热、防腐蚀,用后及时清洗擦拭干净,严禁用干擦镜纸擦拭镜头。

【实验评价】 光学显微镜是临床实验室最常用的基本设备,必须学会正确使用与维护。

二、微量吸管使用

【目的】 掌握微量吸管的使用方法。

【原理】 挤压乳胶头使微量吸管产生负压而吸取液体。

【实验用品】

1. 器材 微量吸管(一次性微量吸管)、带孔乳胶吸头、试管、消毒干棉球、2ml 吸管。

2. 试剂 生理盐水、95%(V/V)乙醇、乙醚、蒸馏水。

【标本】 新鲜抗凝血。

【操作】

1. 准备吸管 将带孔乳胶吸头套在微量吸管上,连接处应严密不漏气。

2. 加稀释液 取试管1支,加生理盐水2ml。

3. 持管吸血 右手拇指和中指夹住吸管及吸头交接处,示指盖住吸头小孔,三个指头轻微用力,排出适量的气体使管内形成较小的负压,将管尖插入抗凝血,三个指头慢慢松劲,吸取抗凝血到所需刻度后,抬起示指,注意管尖始终不要离开液面,以免吸入气泡,也不要过度用力将血液吸入乳胶吸头。

4. 拭净余血 用干棉球顺微量吸管口方向拭净余血。

5. 释放血液 将微量吸管插入含生理盐水的试管底部,慢慢排出吸管内的血液,再用上清液冲洗管内余血2~3次。

6. 洗涤吸管 依次用蒸馏水洗净,95%乙醇脱水,乙醚干燥。如为一次性微量吸管,可省略该步骤。

【注意事项】

1. 操作步骤3需反复练习才能准确吸取血液到所需量。

2. 一次吸取血液到所需的量,吸管内不能有空节也不能吸取血液过多,最好不要超过所需刻度的±2mm。

3. 释放血液前一定要拭净吸管外余血,释放血液时的动作不能太剧烈,避免破坏血液成分或不能利用上清液将管内血液洗净。

【实验评价】 微量吸管使用是手工法血细胞分析的第一步,有很多因素影响检验结果的准确性和精确度,如一次性吸管的质量、操作者的技术熟练程度和责任心等。全自动的血细胞分析仪,由于是仪器自动进样,将克服手工操作的不足。

三、改良牛鲍计数板的使用

【目的】 掌握改良牛鲍(Neubauer)计数板结构及使用方法。

【原理】 一定倍数稀释的血液或体液混匀后滴入具有固定体积和精密划分刻度的改良牛鲍计数板中,在显微镜下对所选择区域中的细胞进行计数,再乘以稀释倍数,即可换算成

单位体积内的细胞数。

【实验用品】

1. 器材 改良牛鲍(Neubauer)计数板、专用盖玻片、光学显微镜、绸布、微量吸管或小玻棒、带孔乳胶吸头、刻度吸管、试管。

2. 试剂 红细胞稀释液(见“显微镜法红细胞计数”节)。

【标本】 新鲜抗凝血。

【操作】

1. 稀释血液 取试管1支,加红细胞稀释液2ml,加抗凝血 $10\mu\text{l}$,立即混匀,制成红细胞悬液。

2. 准备计数板 用绸布拭净改良牛鲍计数板和专用盖玻片,采用推式法从计数板下缘向前平推盖玻片,将其盖在计数池上。

3. 充池 用微量吸管或小玻棒吸取制备好的再次混匀红细胞悬液,沿盖玻片与计数板之间的缝隙充入计数池,充液量以液体恰好充满一侧计数池为宜,不可过多、过少或有气泡,否则需重新操作。

4. 静置 红细胞悬液注入计数池后,静置2~3分钟待细胞下沉。

5. 显微镜计数 首先在低倍显微镜下观察整个计数池结构,同时观察细胞分布是否均匀,如严重不均应重新充池。根据计数不同的血细胞选用不同的放大倍数。计数时应遵循一定的路径进行,以免重复或遗漏。对压线细胞,依照“数上不数下,数左不数右”的原则进行计数(图1-1)。

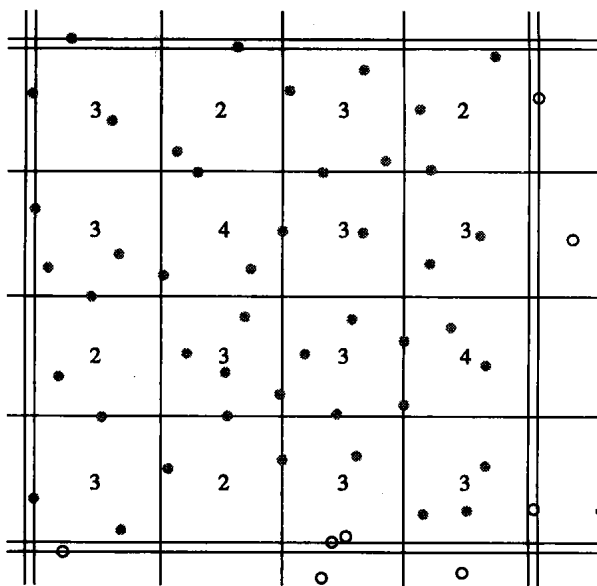


图 1-1 血细胞计数原则

【注意事项】

1. 正确识别改良牛鲍计数板的结构。优质厚玻璃制成的改良牛鲍计数板被H形凹槽分为2个相同的计数池,计数池两侧各有一条盖片支持堤,比计数池平面高出0.10mm。将特制的专用盖玻片覆盖其上,形成高0.10mm的计数池(图1-2)。计数池为边长3.0mm的

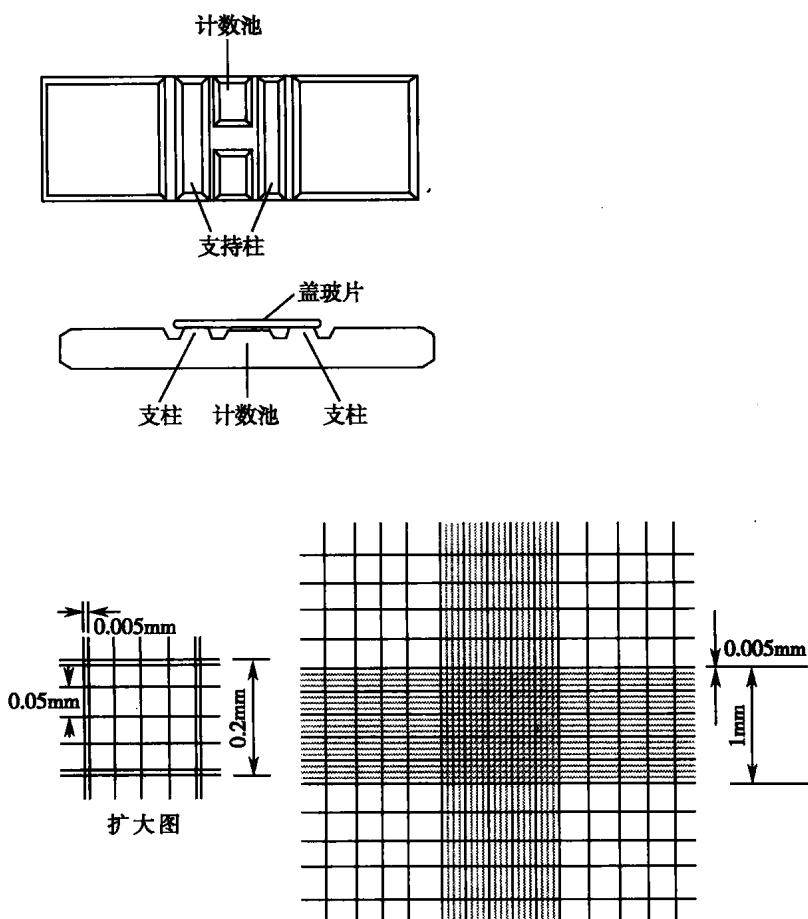


图 1-2 改良牛鲍计数板结构

方格,平均分为 9 个大方格,每个大格面积为 1.0mm^2 ,容积为 $0.1\text{mm}^3(\mu\text{l})$ 。在这 9 个大方格中,中央大方格用双线分成 25 个中方格,其中位于正中及四角的五个中方格是红细胞和血小板计数区域。每个中方格又用单线划分为 16 个小方格。位于四角的四个大方格是白细胞计数区域,用单线划分为 16 个中方格(图 1-3)。

2. 所用器材均应清洁干燥,改良牛鲍计数板、专用盖玻片、微量吸管及刻度吸管的规格应符合要求或经过校正。①计数板的鉴定:要求计数池的台面光滑、透明,划线清晰,计数池划线面积准确,必要时采用严格校正的目镜测微计测量计数池的边长,用微米千分尺测量计数池的深度,每个大方格边长的误差应小于 1%,深度误差应小于 2%,若超过上述标准,应弃之不用;②盖玻片的鉴定:覆盖计数池的盖玻片为专用盖玻片,长 25mm,宽 20mm,厚 0.6mm,盖玻片应具有一定的重量,平整、光滑、无裂痕,厚

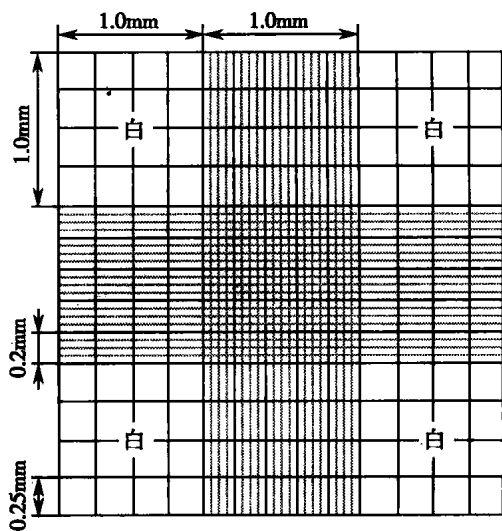


图 1-3 血细胞计数区域

薄均匀一致,可使用卡尺多点测量(至少9个点),不均匀度在0.002mm之内;也可将洁净的盖玻片紧贴于干燥的平面玻璃上,若能吸附一定时间不脱落,落下时呈弧线旋转,表示盖玻片平整、厚薄均匀;合格的盖玻片放置在计数池表面后,与支持堤紧密接触的部位可见到彩虹;③目前临床实验室多采用一次性微量吸管吸取毛细血管血,应对每一批量的微量吸管进行抽样检查,可通过水银称重法或有色溶液比色法进行校正,误差不应超过 $\pm 1\%$ 。

3. 充液应一次完成,充液量适当,如充液过多,液体溢出并流入两侧槽沟内,使盖玻片浮起体积改变,会影响计数结果;充液过少,经多次充液,易造成气泡。出现以上情况都应拭净计数板及盖玻片,干燥后重新充液。

4. 充液前必须将待测标本混匀,充池后不能移动盖玻片。

5. 计数池中细胞如果严重分布不均,应重新充池计数。

6. 计数板使用后,立即用自来水冲洗,切勿用硬物洗刷,洗后自行晾干或用吹风机吹干或用95%乙醇等有机溶剂脱水使其干燥备用。

【实验评价】 使用改良牛鲍计数板是医学生尤其是检验专业学生必须掌握的常用基本功之一。目前虽有各种自动化分析方法,但改良牛鲍计数板仍用于必要的临床检验和科研实践中。使用改良牛鲍计数板产生的技术误差主要包括:微量吸管和改良牛鲍计数板的质量;采血、稀释、混匀、充池等操作是否正确等。细胞计数的固有误差随计数量增加而减少。

(罗春丽)

实验二 血涂片制备与染色

一、血涂片制备

【目的】 掌握普通手工制备血涂片的方法。

【实验用品】

1. 器材 一次性采血针、消毒干棉球、推片、载玻片(宽25mm、长75mm,厚度为0.8~1.2mm)。

2. 试剂 75%乙醇、30g/L碘酊。

【标本】 EDTA-K₂抗凝静脉血或末梢血。

【操作】

1. 采血或取血 常规碘酊、乙醇消毒,采手指血或吸取EDTA-K₂抗凝静脉血1滴,置载玻片右端约1.5cm处。

2. 推片 左手持载玻片,右手持推片,在载玻片近一端1/3处,加一滴(约0.05ml)充分混匀的血液,握住另一张边缘光滑的推片,从血滴前方向后移动,接触血滴,使其沿推片下缘散开,以30°~45°使血滴沿推片迅速散开,然后以平稳的速度将血液向前推近于载玻片的另一端。血液在载玻片上形成一舌形,边缘整齐,厚薄适宜,头、体、尾分明的血膜片,长约4cm,两端和两侧留有空隙(各1.5cm和0.3cm左右),见图1-4。

3. 干燥 将推好的血涂片在空中晃动,使其迅速干燥。

4. 标记 用记号笔在载玻片右上角标记被检查者编号。

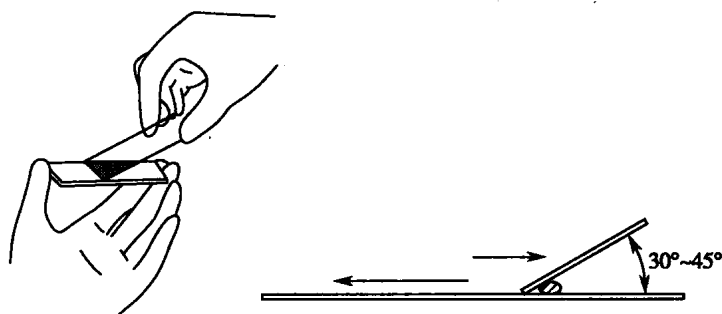


图 1-4 血涂片的制备

【注意事项】

1. 载玻片应清洁、干燥、中性、无尘、无油脂，表面平而光滑。新购置的载玻片常带有游离碱质，必须用约 1mol/L HCl 浸泡 24 小时后，用清水冲洗，干燥后备用。用过的载玻片可放入含适量肥皂或其他洗涤剂的水中煮沸 20 分钟，洗净，用清水反复冲洗，干燥备用。

2. 推片与血液接触的边缘要光滑、整齐，推片使用后要及时把血擦干净。

3. 推好的血涂片应在空气中晃动，使其尽快干燥。天气寒冷或潮湿时，应于 37℃ 恒温箱中保温促干，以免细胞变形缩小。

4. 血涂片应在 1 小时内染色或在 1 小时内用无水甲醇(含水量 < 3%)固定后染色。

5. 血涂片影响因素主要有：血滴大、血黏度高、推片角度大、速度快则血膜厚，反之则血膜薄。针对不同的患者应有的放矢，对红细胞比积高、血黏度高的患者应采用小血滴、小角度、慢推；而贫血患者则采用大血滴、大角度、快推。

6. 使用 EDTA-K₂ 抗凝血液样本时，应充分混匀后再涂片。抗凝血样本应在采集后 4 小时内制备血涂片，时间过长可引起中性粒细胞和单核细胞的形态改变。注意制片前样本不宜冷藏。

【实验评价】 血涂片制备方法很多，但普通手工法制作血涂片，因用量少，操作简单，是目前临床实验室普遍采用的方法，也是从事临床检验工作的基本功之一。尽管目前有些血液自动分析仪配备有自动涂片推片机，可按操作者的指令执行自动送片、采血、推片、标记等，但未广泛在临床使用。此外，还可根据不同需要(如疟原虫、微丝蚴检查等)采用厚血膜涂片法。目前发展的旋转器涂片法，可获得细胞分布均匀、形态完好的血涂片，但尚未普遍推广。

二、血涂片染色

【目的】 掌握瑞氏(Wright)染料的特性和染色方法及瑞氏-吉姆萨(Wright-Giemsa)复合染色方法。

【原理】

1. 染液的组成

(1)Wright 染液：由酸性染料伊红和碱性染料亚甲蓝组成复合染料溶于甲醇而成。各种染料的基本特性如下：①亚甲蓝(美蓝, methylene blue)：为四甲基硫堇染料，有对醌型和邻醌型两种结构，通常为氯盐(氯化美蓝, $M^+ Cl^-$)，其有色部分是美蓝，为阳离子，故为碱性

染料。亚甲蓝易氯化为一、二、三甲基硫堇等次级染料,亦称天青。亚甲蓝与天青的混合物又称为多色性亚甲蓝;②伊红(曙红, eosin):为不易解离的弱酸性染料,通常用伊红钠盐(Na^+E^-),其有色部分是伊红,为阴离子,故为酸性染料;③Wright 染料:亚甲蓝和伊红在水溶液中生成一种疏水的伊红化亚甲蓝中性沉淀物即 Wright 染料,加入有机溶剂甲醇可使 Wright 染料保持在解离状态(M^+E^-);④甲醇:具有强大的脱水力,可将细胞固定为一定形态并使细胞内蛋白质沉淀,形成颗粒状或网状结构,增加细胞与染料接触的表面积,提高对染料的吸附作用,增强染色效果。

(2)Wright-Giemsa 复合染液:是 Wright 染料和 Giemsa 染料组成复合染料溶于甲醇而成。

2. 细胞受色原理 细胞受色是染料透入被染物并存留其内部的一种过程,此过程既有物理吸附作用,又有化学亲和作用,不同的细胞由于所含化学成分不一样,化学性质也各不相同,故对各种染料的亲和力也不一样。

(1)细胞中的碱性物质如血红蛋白、嗜酸性粒细胞的嗜酸性颗粒等与酸性染料伊红结合染成红色,这些碱性物质又称为嗜酸性物质。

(2)细胞中的酸性物质如淋巴细胞胞质、嗜碱性粒细胞的嗜碱性颗粒等与碱染料亚甲蓝结合染成蓝色,这些酸性物质又称为嗜碱性物质。

(3)中性粒细胞的中性颗粒呈等电状态与伊红和亚甲蓝均可结合,染成淡紫红色,称为嗜中性物质。另外,细胞核主要由弱酸性 DNA 和强碱性核蛋白(组蛋白、精蛋白等)组成,碱性核蛋白与酸性染料伊红结合染成红色,酸性 DNA 与碱性染料亚甲蓝结合染成蓝色,因酸性弱,蓝色反应弱,故被染成紫红色。血小板颗粒也染成紫红色。有的胞质中含有 RNA 故染成蓝色。

(4)Giemsa 染料提高了噻嗪染料的质量,加强了天青的作用,对细胞核染色效果更好。

3. pH 的影响 细胞各种成分均属蛋白质,由于蛋白质是两性电解质,所带电荷随溶液 pH 而定, $\text{pH}<\text{pI}$,蛋白质带正电荷增多,易与伊红结合,染色偏红; $\text{pH}>\text{pI}$,蛋白质带负电荷增多,易与亚甲蓝或天青结合,染色偏蓝。因此细胞染色对氢离子浓度十分敏感。临床上常用缓冲液($\text{pH} 6.4\sim 6.8$)来调节染色时的 pH,以达到满意的染色效果。

【实验用品】

1. 器材 载玻片、推片、染色架、吸耳球、显微镜。

2. 试剂

(1)Wright 染液

I 液(Wright 染液):瑞氏染料 0.1g、甲醇(AR)60.0ml、甘油 2~3ml。将全部染料放入清洁干燥的乳钵中,先加少量甲醇慢慢研磨至少半小时,使染料充分溶解,再加一些甲醇混匀,然后将溶解的部分倒入洁净的棕色瓶内,乳钵内剩余的未溶解的染料,再加少许甲醇细研,如此多次研磨,直至染料全部溶解、甲醇用完为止,再加甘油 2~3ml 密封保存。甘油可防止甲醇过早挥发,同时也可使细胞着色清晰。

II 液:pH 6.8 磷酸盐缓冲液,磷酸二氢钾(KH_2PO_4) 0.3g、磷酸氢二钠(Na_2HPO_4) 0.2g,蒸馏水加至 1000ml。

(2)Wright-Giemsa 复合染液

I 液:瑞氏染料 1.0g、Giemsa 染料 0.3g、甲醇(AR)500ml,甘油 10ml。将 Wright 染料

和 Giemsa 染料置洁净研钵中,加少量甲醇(分析纯)研磨片刻,再吸出上液,再加少量甲醇,继续研磨,再吸上液,如此连续几次,共用甲醇 500ml,再加 10ml 甘油。收集于棕色玻璃瓶中,每天早晚各振摇 3 分钟,共 5 天,再存放一周,将染液过滤后即可使用。

Ⅱ液:磷酸盐缓冲液(pH 6.4~6.8),包含磷酸二氢钾(KH_2PO_4)6.64g、磷酸氢二钠(Na_2HPO_4)2.56g,加少量蒸馏水溶解,用磷酸盐溶液调整 pH,加水至 1000ml。

【操作】

1. Wright 染色

(1)加 I 液:将制备好的血涂片充分干透后,用蜡笔在血膜两端画弧线,以防染色时染液外溢,然后将玻片平放于染色架上,滴加 I 液数滴,以染液覆盖整个血膜为度,静置 0.5~1 分钟。

(2)加 II 液:滴加约等量 II 液,轻轻摇动玻片或用吸耳球对准血涂片吹气使其与染液充分混合,室温下染色 5~10 分钟。

(3)染色效果观察:将血涂片小心移至显微镜载物台上,用低倍镜观察体、尾交界处血细胞平铺的部分,如红细胞呈粉红色,各种白细胞胞核、胞质着色清晰,说明染色恰到好处,可进行冲洗。

(4)冲洗:不要先倒掉染液,平持血涂片用流水缓缓冲洗干净。

(5)干燥:直立血涂片使其自然干燥。

2. Wright-Giemsa 复合染色 同 Wright 染色法,只是染色时将 Wright-Giemsa 复合染色法的 I 液和 II 液替代 Wright 染色法的 I 液和 II 液。

【注意事项】

1. Wright 染液质量评价 新配染色液效果较差,放置时间越长,亚甲蓝转变为天青越多,染色效果越好。染料放置时间长,亚甲蓝逐渐氧化为天青,染色效果越好,可用染料成熟指标 $RA(A_{650\text{nm}}/A_{525\text{nm}})$ 判断染料成熟与否。 $A_{650\text{nm}}$ 是亚甲蓝和天青的特异吸收峰波长, $A_{525\text{nm}}$ 是伊红的特异吸收峰波长。具体方法是取染液 25 μl ,稀释于 10ml 甲醇中,以甲醇为空白调零,分别读取 650nm 和 525nm 的吸光度。染料成熟指标 RA 以 1.3 ± 0.1 为宜。染液应储存在棕色瓶中密封保存,以免甲醇挥发或氧化成甲酸。

2. 细胞染色与氢离子浓度的关系 细胞染色对氢离子浓度十分敏感,因此玻片必须清洁、中性,配制瑞氏染液必须用优质甲醇,稀释染液必须用 pH 6.8 的缓冲液。染色偏酸,则红细胞和嗜酸性粒细胞颗粒偏红,白细胞核呈浅蓝色或不着色;染色偏碱,则所有红细胞染成灰蓝色,白细胞颗粒深暗,嗜酸性颗粒可染成暗褐色,甚至紫黑色或蓝色,嗜中性颗粒紫黑色。遇此种情况应更换缓冲液。

3. 染色时间的确定 染色时间与染色液浓度、室温、细胞多少有关。染液淡、室温低、有核细胞多,则染色时间长;反之,可减少染色时间。冲洗前可先在低倍镜下观察有核细胞是否染色清楚,核浆是否分明。因此,染色时间应视具体情况而定,特别是更换新染料时必须试染,摸索最佳染色条件。

4. 血膜处理 未干透的血膜不能立即染色,否则染色时细胞易脱落。血涂片应在 1 小时内染色或在 1 小时内用无水甲醇固定后染色。冲洗时水流速不能太快。

【实验评价】 Wright 染色法是血液细胞分析常用的最经典的方法,尤其对于细胞质成