

卫生部规划教材

高等医药院校 配套教材  
全国医学专科学校  
(供医学检验专业用)

# 血液学和 血液学检验 实验指导

潘恩潭 主编

人民卫生出版社

11-43

ET

R446.11-43  
D27

4736105

高等医药院校  
全国医学专科学校 配套教材

(供医学检验专业用)

# 血液学和血液学检验 实验指导

潘恩潭 主编

编者 (以姓氏笔画为序)

于增国 (大连大学医学院)	杨明燕 (吉林医学院)
冯文莉 (重庆医科大学)	杨 惠 (华西医科大学)
冯泰宝 (广州医学院)	张树平 (张家口医学院)
齐振华 (湖南医科大学)	胡翊群 (上海第二医科大学)
沙 滨 (吉林医学院)	谭齐贤 (青岛医学院)
余敦礼 (湖北医科大学)	潘恩潭 (华西医科大学)
罗殿熙 (贵阳医学院)	



A0295186

人民卫生出版社

**图书在版编目 (CIP) 数据**

血液学和血液学检验实验指导/潘恩潭主编. - 北京:  
人民卫生出版社, 1999  
ISBN 7-117-03283-9

I. 血… II. 潘… III. ①血液学②血液检查-方法  
IV. R446.11

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (1999) 第 48222 号

**血液学和血液学检验实验指导**

潘恩潭 主编

人民卫生出版社出版发行

(100078 北京市丰台区方庄芳群园 3 区 3 号楼)

北京市卫顺印刷厂印刷

新华书店经销

787×1092 16 开本 12.75 印张 289 千字  
1999 年 11 月第 1 版 1999 年 11 月第 1 版第 1 次印刷  
印数: 00 001—3 000

ISBN 7-117-03283-9/R·3284 定价: 11.80 元

(凡属质量问题请与本社发行部联系退换)

著作权所有, 请勿擅自用本书制作各类出版物, 违者必究。

## 前 言

为了适应临床医学检验教学的需要，在卫生部教材办公室和医学检验专业教材评审委员会的领导和支持下，组织全国部分从事教学和医疗的、有学术造诣和实践经验的专家教授编写了《血液学和血液学检验实验指导》一书，供高等医药院校和全国医学专科学校医学检验专业教学之用，也可供临床医师和检验人员参考。

本书共分6章。第一章：叙述检验的基本方法，介绍检验血细胞的基本技术；第二章～第四章分别叙述红细胞检验、白细胞检验、血栓与止血检验的目的和原理、器材和试剂、步骤和方法、临床意义、注意事项和评价。第五章简要讨论血液学检验的影响因素和质量控制。

编者曾参考部分院校的有关实验指导，认真研究和讨论教学大纲和编写提纲。结合我国实际情况反复修改编写内容，并互相审改和集体定稿。希望本书能作为配套教材的一部分，更能适合教学和临床的需要。虽经多方努力但缺点错误在所难免，敬请广大专家、教授和读者指正。在编写过程中，承蒙兰州军区乌鲁木齐总医院临床医学研究所仇东辉主任、华西医科大学分子生物学研究室刘伯林教授与刘菽秋老师的指导，深表谢意。

编 者

1998.8

# 目 录

<b>第一章 检验的基本方法</b> .....	1
<b>第一节 血细胞化学染色检验</b> .....	1
一、过氧化物酶 (POX) 染色 .....	1
二、苏丹黑 B (SB) 染色 .....	3
三、过碘酸-雪夫反应 (糖原染色) .....	4
四、碱性磷酸酶 (NAP) 染色 .....	6
五、脱氧核糖核酸 (DNA) 染色 .....	9
六、核糖核酸 (RNA) 染色 .....	10
七、酯酶染色 .....	11
八、酸性磷酸酶和抗酒石酸酸性磷酸酶染色 .....	13
九、铁染色 .....	15
<b>第二节 骨髓病理学检查</b> .....	16
一、红细胞系统疾病 .....	16
二、白细胞系统疾病 .....	20
三、巨核细胞系统疾病 .....	30
<b>第三节 血细胞超微结构检验</b> .....	31
一、细胞分离技术 .....	31
二、扫描电镜标本的制作 .....	33
三、透射电镜标本的制作 .....	34
四、电镜酶细胞化学标本的制作 .....	36
<b>第四节 造血祖细胞培养</b> .....	40
一、造血祖细胞的体外培养技术 .....	40
二、造血祖细胞体内扩散盒培养技术 .....	45
<b>第五节 血细胞染色体检验</b> .....	47
一、染色体标本的制作 .....	47
二、染色体显带技术 .....	51
三、姊妹染色单体差别染色技术 .....	53
<b>第六节 血细胞凋亡检验</b> .....	54
一、概述 .....	54
二、细胞凋亡的形态学检验 .....	55
三、琼脂糖凝胶电泳检测凋亡过程中 DNA 降解 .....	57
四、凋亡细胞的流式细胞术检测 .....	59
<b>第二章 红细胞检验</b> .....	61
<b>第一节 显示溶血的检验</b> .....	61
一、血浆游离血红蛋白检测 .....	61
二、血清结合珠蛋白检测 .....	62

三、尿含铁血黄素试验 .....	63
四、血浆高铁血红素白蛋白检测 .....	64
五、卟啉筛选试验 .....	65
第二节 红细胞膜缺陷检验 .....	66
一、红细胞渗透脆性试验 .....	66
二、红细胞渗透脆性孵育试验 .....	68
三、自身溶血试验及其纠正试验 .....	70
四、酸化甘油溶血试验 .....	71
第三节 红细胞酶缺陷检验 .....	73
一、高铁血红蛋白还原试验 .....	73
二、G6PD 缺陷变性珠蛋白小体试验 .....	74
三、G6PD 荧光斑点试验 .....	75
四、G6PD 活性检测 .....	76
五、丙酮酸激酶荧光斑点试验 .....	77
六、丙酮酸激酶活性检测 .....	78
第四节 珠蛋白合成异常的检验 .....	79
一、血红蛋白电泳检测 .....	79
二、抗碱血红蛋白检测 .....	80
三、HbF 酸洗脱法检测 .....	81
四、异丙醇沉淀试验 .....	82
五、热变性试验 .....	83
六、红细胞包涵体试验 .....	83
七、HbA <sub>2</sub> 微柱层析试验 .....	84
八、肽链分析 .....	85
九、红细胞镰变试验 .....	86
十、镰状细胞溶解度试验 .....	86
十一、碳氧血红蛋白检测 .....	87
第五节 免疫性溶血检验 .....	88
一、抗人球蛋白试验 .....	88
二、冷凝集素试验 .....	91
三、冷热溶血试验 .....	92
第六节 阵发性睡眠性血红蛋白尿检验 .....	93
一、酸化血清溶血试验 (Ham 试验) .....	93
二、蔗糖溶血试验 .....	94
第七节 低色素小细胞性贫血检验 .....	95
一、血清铁蛋白检测 .....	95
二、红细胞内游离原卟啉检测 .....	96
三、血清铁检测 .....	97
四、血清总铁结合力及转铁蛋白饱和度检测 .....	99
五、血清转铁蛋白检测 .....	99
第八节 正常色素正常细胞性贫血检验 .....	100
一、再生障碍性贫血检验 .....	100

二、骨髓病性贫血检验 .....	101
第九节 巨幼细胞性贫血检验 .....	102
一、血清维生素 B <sub>12</sub> 检测 .....	102
二、血清维生素 B <sub>12</sub> 吸收试验 .....	102
三、尿甲基丙二酸排泄试验 .....	103
四、血清(红细胞)叶酸检测 .....	104
五、组氨酸负荷试验 .....	106
六、叶酸吸收试验 .....	108
第三章 白细胞检验 .....	109
第一节 白细胞功能检验 .....	109
一、墨汁吞噬试验 .....	109
二、白细胞吞噬功能试验 .....	110
三、血清溶菌酶活性试验 .....	110
四、硝基四氮唑蓝还原试验 .....	111
五、白细胞趋化性试验 .....	112
六、吞噬细胞吞噬功能试验 .....	113
第二节 白细胞代谢及其产物检验 .....	115
一、末端脱氧核苷酰转移酶(TdT)检测 .....	115
二、N-碱性磷酸酶检测 .....	117
三、酸性 $\alpha$ -醋酸酯酶检测 .....	118
第三节 白细胞动力学检验 .....	120
一、流式细胞术检测 .....	120
二、泼尼松刺激试验 .....	121
三、肾上腺素激发试验 .....	122
四、二异丙基氟磷酸盐标记检测 .....	122
五、粒细胞抗体检测 .....	124
第四节 白细胞免疫标记检验 .....	126
碱性磷酸酶-抗碱性磷酸酶桥联酶标法检测 .....	126
第四章 血栓与止血检验 .....	129
第一节 筛检试验 .....	129
一、一期止血缺陷筛检试验 .....	129
二、二期止血缺陷筛检试验 .....	130
三、纤溶活性增强筛检试验 .....	130
第二节 血管壁检验 .....	132
一、血浆血管性血友病因子抗原检测 .....	132
二、血浆vWF瑞斯托霉素辅因子检测 .....	134
三、血浆6-酮-前列腺素F <sub>1<math>\alpha</math></sub> 检测 .....	135
第三节 血小板检验 .....	136
一、血小板生存时间检测 .....	136
二、血小板相关免疫球蛋白检测 .....	137
三、血小板相关补体3检测 .....	139
四、血小板粘附试验 .....	140

五、血小板聚集试验	141
六、血浆 $\beta$ -血小板球蛋白和血小板第4因子检测	144
七、血小板第3因子有效性检测	146
八、血块收缩试验	147
九、血浆血栓烷 $B_2$ 检测	148
十、血小板膜糖蛋白检测	149
<b>第四节 凝血因子检验</b>	<b>151</b>
一、简易凝血活酶生成试验及纠正试验	151
二、血浆蝰蛇毒时间	152
三、血浆因子VIII、IX和XI促凝活性检测	153
四、血浆因子II、V、VII、X促凝活性检测	155
五、血浆纤维蛋白原检测	156
六、血浆因子XIII定性试验	157
<b>第五节 生理性抗凝蛋白检验</b>	<b>158</b>
一、血浆抗凝血酶III活性检测	158
二、血浆蛋白C检测	160
三、血浆蛋白S检测	162
四、血浆活化蛋白C抵抗试验	163
<b>第六节 病理性抗凝物质检验</b>	<b>164</b>
一、复钙交叉试验	164
二、血浆因子VIII抑制物检测	165
三、血浆游离肝素时间(甲苯胺蓝纠正试验)	166
<b>第七节 纤溶活性检验</b>	<b>167</b>
一、血浆凝血酶时间	167
二、血浆硫酸鱼精蛋白副凝固试验	168
三、血浆纤溶酶原检测	169
四、血浆抗纤溶酶活性检测	171
五、血浆纤溶酶原活化剂检测	172
六、血浆纤溶酶原活化抑制剂检测	174
<b>第八节 血栓前状态检验</b>	<b>175</b>
一、血浆凝血酶(血栓)调节蛋白检测	175
二、血浆内皮素-1检测	176
三、血浆纤维蛋白肽A检测	177
四、血浆纤溶酶- $\alpha_2$ 抗纤溶酶复合物检测	179
五、血小板表面P( $\alpha$ -颗粒膜蛋白140)选择素检测	180
六、血浆凝血酶-抗凝血酶III复合物检测	181
七、血浆凝血酶原片段1+2检测	182
<b>第九节 血液流变学检查</b>	<b>184</b>
一、全血粘度检测	184
二、血清粘度检测	186
<b>第五章 血液学检验的影响因素和质量控制</b>	<b>187</b>
第一节 影响因素	187



一、标本因素 .....	187
二、试剂和仪器因素 .....	189
三、方法学和操作者因素 .....	190
第二节 质量控制 .....	190
一、质量控制的原则 .....	190
二、质量控制的方法 .....	191
三、实验的标准化 .....	193

# 第一章 检验的基本方法

## 第一节 血细胞化学染色检验

### 一、过氧化物酶 (POX) 染色

#### (一) 沃什伯恩法

**目的和原理** 细胞内的过氧化物酶 (peroxidase) 能将底物的过氧化氢分解, 产生新生态氧。后者将试剂中的联苯胺氧化为联苯胺蓝, 它是一种不稳定的中间产物, 无需酶的作用进而变成棕色化合物沉淀于酶的所在部位。

#### 器材和试剂

##### 1. 第一液

联苯胺	0.3g
360g/L 亚硝基铁氰化钠饱和液	1ml
95% 乙醇	加至 100ml

贮存于棕色瓶中, 可保存一年。小瓶分装备用。

##### 2. 第二液 (稀过氧化氢液, 新鲜配制)

3% 过氧化氢	0.3ml
蒸馏水	25ml

#### 步骤和方法

1. 于新鲜干燥血涂片或骨髓涂片上, 滴加第一液 5~8 滴, 使盖满整个血膜, 作用 1~2min。

2. 滴加等量的第二液, 混匀, 染 4~8min。

3. 勿倾去染液, 直接用水冲洗。

4. 干燥后再用瑞氏染液复染。

5. 结果 在细胞的胞浆中出现蓝色或蓝棕色颗粒为阳性反应。

(1) 阳性反应强度的判断:

阴性: 无颗粒。

弱阳性: 颗粒小, 分布稀疏。

阳性: 颗粒略粗, 分布较密集。

强阳性: 颗粒粗大。

(2) 粒细胞系统: 早期原始粒细胞阴性, 晚期 (分化好) 原始粒细胞以下各阶段均含不同程度的蓝黑色颗粒, 随粒细胞成熟而增多直至充满细胞浆。但衰老的中性粒细胞酶活性降低, 反应程度减弱, 甚至呈阴性反应。嗜酸性粒细胞颗粒更粗大, 呈深蓝色。嗜碱性粒细胞阴性。

(3) 单核细胞系统：除早期原始阶段外皆呈弱阳性反应。其颗粒细小，形态不规则，弥散分布，可覆盖核上。有的也可呈阴性反应。

(4) 正常网状细胞（分化型）及吞噬细胞：可呈不同程度阳性反应。

(5) 淋巴细胞、浆细胞、红细胞、巨核细胞系统等：均为阴性。

(6) 白血病时，Auer 小体：呈阳性。

**临床意义** POX 染色是鉴别急性粒细胞白血病（简称急粒）。急性单核细胞白血病（简称急单）、急性淋巴细胞白血病（简称急淋）类型的重要细胞化学方法。急粒的晚期原始粒细胞呈阳性反应，颗粒较多较大。M<sub>3</sub> 型时白血病细胞呈强阳性反应。急淋呈阴性反应，FAB 分型规定阳性率 < 3%。急单（M<sub>4</sub>、M<sub>5</sub> 型）呈阴性或弱阳性反应，颗粒细小，稀少。但粒-单型（M<sub>4</sub> 型）中的原始粒细胞与急粒中的原始粒细胞相同。

#### 注意事项

1. 应保证过氧化氢的质量，必须新鲜配制。过氧化氢的最适浓度是 0.05mol/L 左右，浓度过高，反而抑制酶作用。一般采用 5ml 蒸馏水，加 3% 过氧化氢一滴。若用 30% 的过氧化氢时，只能在 100ml 蒸馏水中加 1~2 滴。涂片中粒细胞看不见阳性颗粒，红细胞呈棕色或绿色，即示过氧化氢过浓。若过氧化氢加于血片上不产生气泡，则示无效。

2. 染色时加稀过氧化氢之后必须与联苯胺液充分混合，否则同一涂片细胞染色情况不一致。

**评价** POX 染色是鉴别急性白血病类型最常用的细胞化学染色方法。但因原始细胞多表现为阴性反应，故本法对白血病的分型也有一定的局限性，特别是对某些分化极差的白血病，可失去鉴别意义。

沃什伯恩法（Washburn 法）是 POX 染色的古老方法，操作简单，染色效果好，定位准确不扩散；缺点是染液中的联苯胺有致癌作用，目前许多国家已限用或禁用。国内也有主张用其它方法取而代之。

### **(二) 4-氨基安替比林 (4-AAP) 与 $\alpha$ -萘酚法**

**目的和原理** 4-AAP 与酚在过氧化物酶和过氧化氢存在的条件下，缩合呈醌型结构的红色化合物，沉积于颗粒中而显色。

#### 器材和试剂

1. 95% 乙醇。

2. pH7.3, 0.2mol/L Tris-HCl 缓冲液或 pH7.0±0.1 的蒸馏水。

3. 染色贮存液 取 4-AAP 及  $\alpha$ -萘酚各 1.0g 溶于无水乙醇 100ml 中。

4. 染色应用液 取贮存液 4ml 加 pH7.0~7.3 的蒸馏水或缓冲液 6ml 及 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1 滴混匀即可。

#### 步骤和方法

1. 涂片滴加 95% 乙醇数滴盖满涂片。

2. 倾斜去掉多余的乙醇直接滴加染色应用液盖满整个涂片。此时涂片上出现许多小气泡，大约 3min 即可用流水冲洗，待干。

3. 用 95% 乙醇脱色 1~2 次，流水冲洗，待干。

4. 用瑞氏或吉氏染液复染约 10min，水洗、待干后即可镜检。

5. 经瑞氏或吉氏染液复染后, 阳性反应可在细胞内出现蓝色颗粒。颗粒大小、多少及颜色深浅, 表明阳性程度等级不同。嗜酸性粒细胞呈深黄色圆形有折光的粗颗粒。

评价 用 4-氨基安替比林作 POX 染色与联苯胺法所显示的结果较一致。目前不主张应用联苯胺, 可以用 4-氨基安替比林取代联苯胺。

## 二、苏丹黑 B (SB) 染色

目的和原理 苏丹黑染料是一种脂溶性重氮染料, 可溶解于细胞浆内的含脂结构中, 而使脂类物质显示。

### 器材和试剂

1. 400g/L 甲醛溶液。

2. 缓冲液。

(1) 取酚 16g 溶于无水乙醇 30ml 中。

(2) 0.3g 磷酸氢二钠 ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ) 溶于 100ml 蒸馏水。将 (1) 与 (2) 液相混即可。

3. 苏丹黑贮备液

苏丹黑 B	0.3g
-------	------

无水乙醇	100ml
------	-------

在室温中经常摇荡, 数天后使其完全溶解。

4. 苏丹黑染色液

缓冲液	40ml
-----	------

苏丹黑贮备液	60ml
--------	------

混合后抽气过滤备用, 可用一周。

5. 70% 乙醇

6. 瑞氏染液

### 步骤和方法

1. 新鲜干燥涂片用 400g/L 甲醛蒸气固定 10min, 水洗 3~5min。

2. 以苏丹黑染色液在 37℃ 下染色 30~60min。

3. 用 70% 或无水乙醇冲洗 1~2min, 然后水洗 1min。

4. 待干后, 用瑞氏染色液复染 20~30min。

5. 结果 苏丹黑染色后呈棕黑或深黑色, 定位于胞浆者为阳性。

(1) 原始粒细胞一般为阴性, 有时可见少许阳性颗粒, 自早幼粒细胞开始阳性, 并随着细胞的成熟而阳性增强, 颗粒增多, 变粗, 至成熟粒细胞时反应最强。嗜酸性粒细胞和嗜碱性粒细胞的特异性颗粒阳性, 而颗粒的中心区为淡染, 颗粒边缘着色较深。

(2) 原始单核细胞为阴性, 幼稚和成熟单核细胞为阳性, 颗粒多数细小, 散在分布, 可覆于核上。

(3) 网状细胞含丰富脂类物质, 呈阳性反应。

(4) 淋巴细胞系、巨核细胞系、红细胞系、浆细胞系不含脂类物质, 呈阴性反应。

临床意义 SB 染色一般与 POX 染色结果相同, 二者的临床意义相似。它有助于鉴

别白血病类型。急性粒细胞白血病，一般呈阳性反应，以 M<sub>3</sub> 反应最强。急性淋巴细胞白血病呈阴性反应；慢性淋巴细胞白血病，少数可呈弱阳性反应；急性单核细胞白血病呈弱阳性反应。神经磷脂和脑甙细胞均为阳性。

评价 本反应大致与 POX 反应平行。但 POX 染色要求标本和试剂新鲜，本法不受限制，比 POX 染色更敏感。

### 三、过碘酸-雪夫反应（糖原染色）

目的和原理 糖原中的 1, 2-乙二醇基经高碘酸氧化后产生醛基，此醛基进而与雪夫 (Schiff) 液作用，使无色品红变为红色的化合物，定位于胞浆中。

#### 器材和试剂

##### 1. 10g/L 高碘酸液

HIO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	1g
蒸馏水	加至 100ml

溶解后盖紧放冰箱备用，一般可用三个月，变黄则不能用。

2. 雪夫 (Schiff) 染液 取蒸馏水 200ml 加入 500ml 三角烧瓶内，加热至沸，移开火焰缓缓加入碱性品红 1g 继续加热 2min，停止加热，待冷却到 50℃ 左右加入 1mol/L 盐酸 20ml，混匀。待冷却到 25℃ 后加入偏重亚硫酸钠 (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) 2g 混匀，置带玻璃塞棕色瓶中放暗处 24h 后取出，加活性炭 1g，振荡混合，用滤纸过滤后密封在棕色瓶内，放冰箱保存，本染液应是无色，变红则失效。

##### 3. 亚硫酸液

100g/L 偏重亚硫酸钠液	6ml
1mol/L 盐酸	5ml
蒸馏水	100ml
每次用前新配制	

##### 4. 20g/L 甲绿

甲绿	2g
蒸馏水	加至 100ml

#### 步骤和方法

1. 新鲜血片或骨髓片用 95% 乙醇固定 10min，蒸馏水冲洗，待干。

2. 10g/L 高碘酸氧化 15~20min，蒸馏水冲洗，待干。

3. 置雪夫试液室温染色 30~60min。

4. 用亚硫酸溶液冲洗 3 次后，以自来水冲洗 2~3min，待干。

5. 20g/L 甲绿复染 10~20min。

6. 水洗，待干，镜检。

#### 7. 结果

(1) 阳性反应：在细胞浆内染红色，呈弥漫状、颗粒或块状。胞核染成绿色。阴性反应，胞浆无色。

(2) 反应强度判断标准：

1) 中性粒细胞的分级标准:

- (-) 胞浆无红色颗粒。
- (+) 胞浆内呈淡红色有极少颗粒。
- (++) 胞浆呈红色, 厚而不透明, 或有较少颗粒。
- (+++ ) 胞浆呈深红色, 颗粒紧密, 但尚有空隙。
- (++++ ) 胞浆呈深紫红色, 颗粒紧密, 无空隙。

2) 淋巴细胞分级标准:

- (-) 胞浆内无颗粒。
- (+) 胞浆内呈弥散淡红或有少数颗粒 (<9 个)。
- (++) 胞浆内呈弥散较深的淡红色或有少数颗粒 (<10 个)。
- (+++ ) 胞浆内有较粗颗粒或少数小块状。
- (++++ ) 胞浆内呈多数粗颗粒并有大块红色物质。

3) 幼红细胞的分级标准:

- (-) 胞浆内无颗粒。
- (+) 胞浆内有少数分散细小颗粒或浅红色弥漫物质。
- (++) 胞浆内有 1~10 个中等颗粒或弥漫的红色。
- (+++ ) 胞浆内有 11~20 个较粗颗粒或呈深红色。
- (++++ ) 胞浆颗粒较多, 20 个以上, 并且粗, 致密或呈紫红色。

4) 巨核细胞的分级标准:

- (-) 细胞内没有糖原, 但细胞浆内有弥散性着色, 此系其它多糖类物质。
- (+) 含少量糖原, 即含数小块或一大块糖原, 糖原常定位于近核膜。
- (++) 胞浆内含有中等糖原, 即含许多小块或少数大块糖原。
- (+++ ) 胞浆内含有大量糖原, 呈大块状, 其总面积约占胞浆面积的五分之一以上。

(3) 阳性率和阳性积分: 根据不同情况的需要, 观察同一类细胞 100 个, 求出阳性率的百分比, 将百分率与分级数的积相加, 其总和即为积分。

### 临床意义

#### 1. 参考值

(1) 粒细胞系统: 原始粒细胞为阴性反应。自早幼粒细胞至中性分叶核粒细胞均呈阳性反应, 并随细胞的成熟阳性反应程度逐渐增强。嗜酸性粒细胞的颗粒本身不着色, 而颗粒之间的胞浆呈红色。嗜碱性粒细胞为阳性反应, 阳性反应物质为大小不一的紫红色颗粒。

(2) 红细胞系统: 幼红细胞和红细胞均呈阴性反应。

(3) 单核细胞系统: 原始单核细胞为阴性反应, 幼单核细胞为 (+) 阳性反应, 单核细胞为 (+) ~ (++) 阳性反应。有时在胞浆的边缘处阳性反应颗粒较粗大。

(4) 淋巴细胞: 大多数淋巴细胞为阴性反应, 少数淋巴细胞可呈 (+) 阳性反应, 阳性率 < 20%。

(5) 巨核细胞和血小板: 巨核细胞为阳性反应, 阳性反应物质显红色颗粒状, 有时为红色块状。血小板为阳性反应, 阳性反应物质为细颗粒状, 有时为红色小块状。

(6) 其他细胞：浆细胞一般为阴性反应，少数可呈阳性反应，阳性反应物质为红色细颗粒状。巨噬细胞可呈阳性反应，阳性反应物质为红色细颗粒状。

2. 用以鉴别淋巴系统增生的性质 凡恶性增生时如恶性淋巴瘤、霍奇金病、淋巴细胞白血病时其淋巴细胞的积分有所增高。而病毒感染时淋巴细胞积分值在正常范围。

3. 可鉴别幼红细胞增生的性质 于缺铁贫血、巨幼细胞贫血时 PAS 反应轻度增高，而红白血病时幼红细胞的 PAS 反应明显增强。

4. 帮助确认一些特殊细胞 详见本科教材。

#### 注意事项

1. 雪夫试剂的质量对结果影响较大，特别要注意：①不同牌号的碱性品红染色效果不一样；②偏重亚硫酸钠（或用重亚硫酸钠）量要充足，此药易于分解，若刺激性气味不强或消失，意味着药物变性不能使用。

2. 对照试验（唾液消化试验） 取同一标本，经固定后加水解液 [新鲜唾液 4ml 加 1/15mol/L 磷酸缓冲液 (pH7.0) 1ml]，布满涂片，置 37℃ 温箱中作用 30~60min，水洗，再按上法染色，糖原可被唾液水解，使反应变为阴性。若 PAS 染色阳性，经淀粉酶水解后仍为阳性，即是其它多糖类。

#### 评价

1. 固定试剂的影响 固定试剂不同，染色结果不同，可用 95% 乙醇，纯甲醇及甲醛蒸气三种中任一种，其中乙醇固定后糖原颗粒明显，成熟粒细胞的反应彼此之间有较明显的颜色差异，经唾液消化后的对照标本没有假阳性，因此易于鉴别反应的程度，故通常选用乙醇为固定剂。

2. 不同品牌的碱性品红对染色的影响 不同品牌的碱性品红染色效果不一样，有报道以北京及天津 (AR 级) 碱性品红为最好。

3. 染色后标本应及早观察和记录，染色后标本保存 8 天后，将逐渐退色，且随保存时间的延长，退色更为明显。

## 四、碱性磷酸酶 (NAP) 染色

### (一) 钙-钴法

目的和原理 细胞内的碱性磷酸酶在 pH9.2~9.8 时，将底物  $\beta$ -甘油磷酸钠水解，产生磷酸根，后者与基质液中的钙离子作用形成磷酸钙，再与硝酸钴起反应，形成磷酸钴，最后与硫化胺作用形成硫化钴黑色沉淀定位于胞浆中。

#### 器材和试剂

##### 1. 10% 甲醛甲醇固定液

甲醛	10ml
甲醇	90ml

混合后放冰箱备用，每周配一次。

##### 2. $\beta$ -甘油磷酸钠基质液 (临用时配制用后弃去)

30g/L $\beta$ -甘油磷酸钠液	5ml
20g/L 氯化钙或硝酸钙液	10ml

20g/L 巴比妥钠液	5ml
20g/L 硫酸镁液 (亦可不用)	1ml
蒸馏水	10ml

用玻璃棒搅拌使之完全溶解后用 1mol 盐酸或 1mol 氢氧化钠调整至 pH9.4。

3. 20g/L 硝酸钴。
4. 20g/L 硫化铵 (或 10ml 蒸馏水中加硫化铵溶液 4 滴混合, 临用前配制, 用完弃去)。
5. 20g/L 甲绿或 10g/L 伊红。

#### 步骤和方法

1. 取新鲜血片自然干燥后放入 10% 甲醛甲醇液固定 10min, 用流水冲洗, 待干。
2. 取基质液, 予温至 37℃, 将血片置入, 继续温育 4~6h。
3. 滴加 20g/L 硝酸钴, 作用 5min, 蒸馏水冲洗。
4. 滴加 20g/L 硫化铵, 作用 5min, 蒸馏水冲洗。
5. 用 20g/L 甲绿水溶液复染 2~3min 或用 10g/L 伊红复染 3~5min。
6. 水洗, 待干, 镜检。

#### 7. 结果

(1) 正常人的血细胞碱性磷酸酶除中性成熟粒细胞 (杆状核及分叶核) 可见阳性外, 其它细胞均呈阴性。

(2) 判断标准及分级:

(-) 0 分: 胞浆呈淡红色, 无任何棕黑色颗粒。  
 (+) 1 分: 胞浆呈均匀浅色, 无颗粒或有少量棕黑色颗粒, 但不超过胞浆总面积的 1/4。

(++) 2 分: 全部胞浆呈均匀棕黑色或出现较粗的黑色颗粒, 不超过胞浆 1/2。

(+++ ) 3 分: 胞浆中已基本充满棕黑色颗粒, 但密度较低。

(++++ ) 4 分: 全部胞浆充满粗大棕黑色颗粒而呈深黑色甚至掩盖其胞核。

(3) 计算积分值: 油镜下计数 100 个中性杆状核、分叶核粒细胞, 分别记录其分级情况, 全部阳性反应细胞之和即阳性率。将得出各种积分的百分率乘以该积分, 然后相加即为总积分。

例: 4 分: 占 20%  $4 \times 20 = 80$  分  
 3 分: 占 40%  $3 \times 40 = 120$  分  
 2 分: 占 18%  $2 \times 18 = 36$  分  
 1 分: 占 10%  $1 \times 10 = 10$  分  
 0 分: 占 12%  $0 \times 12 = 0$  分  
 总分: 阳性率 88% 积分 = 246 分

#### 临床意义

1. 参考值 成人 NAP 阳性率 2%~76%, 平均 37.3%, 以弱阳性为主。积分 2~162 分, 平均 62.1 分。但因实验条件 (实验方法、试剂质量、结果判断) 不同, 差别很大, 故最好能有自己实验室的正常数据。

2. NAP 染色对以下疾病的鉴别诊断有一定参考价值。临床上主要用于:



(1) 慢粒与类白血病反应的鉴别：慢粒（无继发性感染者）时，NAP一般明显下降，积分常常为零，一般积分 $<13$ （但是个别慢粒病人NAP可以增高）；类白血病反应时则显著增高，积分值常在200以上。

(2) PNH与再障的鉴别：前者常降低，后者常增高；再障患者如中性粒细胞愈低，贫血愈重，NAP则愈高。病情好转时，NAP则可逐步下降。

(3) 急性白血病的细胞类型鉴别：急淋增高，急粒下降。详见本科教材。

#### 注意事项

1.  $\beta$ -甘油磷酸钠的基质液必须新鲜配制。
2. 基质液的pH以9.4~9.6为宜，pH $<9$ 时酶活力明显下降，pH $>10$ 时细胞易破碎，使酶扩散造成假阴性。
3. 标本应新鲜，存放过久，酶活性降低，一般在1周内进行染色观察。
4. 每次染色时，最好做一份感染患者的血片，作为阳性对照，便于确定方法是否可靠。

**评价** 本法试剂配制复杂，操作繁琐，影响因素多，仅在不易购得重氮盐法试剂时用之。

## (二) 卡氏偶氮偶联法

**目的和原理** 细胞中碱性磷酸酶在pH9.2~9.8缓冲液中，能使磷酸萘酚水解，释放出磷酸与萘酚，再以重氮盐与萘酚偶联生成不溶性有色产物定位于胞浆中。

#### 器材和试剂

1. 固定剂 无水乙醇或福尔马林。
2. 丙二醇缓冲液。

##### 1) 贮备液 (0.2mol/L)

2-氨基-2-甲基-1, 3-丙二醇	10.5g
蒸馏水	加至 500ml

溶解后保存冰箱内。

##### 2) 应用液 (0.05mol/L, pH9.75)

0.2mol/L 贮存液	25ml
0.1mol/L 盐酸	5ml
蒸馏水	加至 100ml

3. 基质孵育液 (pH9.5~9.6, 用前临时配制)  $\alpha$ -磷酸萘酚钠 20mg 溶于 0.05mol/L 丙二醇缓冲液 20ml, 再加坚牢紫酱 GBC 盐 (或重氮坚牢蓝) 20mg 混合后用滤纸过滤, 立即应用。

4. 10g/L 亮绿 (或 20g/L 甲绿)。

#### 步骤和方法

1. 新鲜血片或骨髓片用无水乙醇固定或福尔马林熏蒸 3~5min。
2. 在涂片上滴加或浸入基质培养液, 在室温下温育 10~15min (冬季放孵育箱温育)。
3. 流水冲洗 2min。