

# 细胞化学染色

细胞化学染色是将形态和功能相结合的细胞科学。它是在保持完整的细胞形态和细胞结构的前提下，运用化学反应将被检细胞内的各类化学成分和细胞结构及生理活性物质原位地显示。因而对于探索细胞内的化学成分、生理功能、新陈代谢及细胞生理和病理改变有着重要意义。

血液细胞化学染色的范围一般可分为：蛋白质类（氨基酸、酶）、核酸类、多糖类、脂类、盐类或金属类，采用的方法通常为化学结合和物理溶解及酶-底物反应。

## 临床评价：

1. 细胞化学染色的开展，已有数十年的历史。其在结合细胞形态学的基础上对各类白血病的确诊，对许多血液疾病鉴别诊断中的帮助，对各种良、恶性血液系统疾病疗效和预后估计提供一定的信息。

2. 血液系统各种恶性疾病，特别是急性白血病，因其多为早期分化较差的病理细胞增殖，客观上存在着形态变异、畸形发育，即使是有经验的检验人员仅凭细胞形态也难以避免错误诊断的发生。如将细胞形态和细胞化学染色相结合，能提高急性白血病的诊断和较正确地对其分型及亚型分型，即为急性白血病FAB分型。

3. 近年来，由于细胞免疫学、细胞遗传学、分子生物学和细胞超微结构等迅速发展，进一步推动了细胞化学染色这一领域的进展，并出现了细胞免疫组织化学染色、细胞超微化学染色等更新、更准确的检验方法与手段，对探讨各类血液疾病发病原理和观察治疗反应及预后起了极其重要的作用。如将细胞免疫化学、细胞遗传学、分子生物学这三者与细胞化学染色及细胞形态学相结合，对各种白血病进行分型，即成为白血病的MICM分型诊断。

4. 细胞化学染色通常应用在各种血液系统疾病特别是对各种急性白血病的诊断与鉴别诊断中。但白血病细胞因其呈高度的异质性和多态性，有时即使是同一类型的白血病也可在细胞形态、细胞化学染色结果、细胞免疫表型及分子生物学等方面存在较大的差异。所以对各类型白血病作一套较完整的细胞化学是补充了单凭形态对细胞辨认的不足。因此我们在实际工作中若要对各类型白血病作出比较准确的诊断与鉴别诊断，应尽可能采用多项细胞化学染色或双（多）重染色。

细胞化学染色方法分门别类有许多种，结果的显示也不尽相同，有时即使检测同一物质，因采用的方法不同其结果有可能存在一定的偏差，会造成科室间（甚至同科室不同操作人员间）对同一份标本作出不同的诊断。所以我们应注意选择结果稳定、操作简便（操作步骤越多，出现的误差几率就越大）、阳性显示明显的方法或标准试剂盒。如果条件允许可与细胞免疫化学、细胞遗传学、分子生物学等相结合，使细胞化学染色发挥最大、最准确的作用。

## 一、 过氧化物酶染色

### peroxidase , (POX)

#### 原理

在血液和骨髓细胞中，粒细胞系和单核细胞系的嗜苯氨蓝颗粒（“A”颗粒）内的溶酶体中存在有过氧化物酶（POX）。通过此酶氧化过氧化氢，释放出单原子氧，后者氧化3-3二氨基联苯胺，使之变成棕黑色颗粒状沉淀物，定位于酶活力所在处。由于各种细胞内过氧化物酶（POX）的活力不同，其颗粒大小与色泽深浅也有所不等。此酶的活性与溶酶体的数量有关，而与嗜苯氨蓝颗粒（“A”）颗粒的多少无关。淋巴细胞质嗜苯氨蓝颗粒中不存在溶酶体，所以过氧化物酶染色呈阴性反应，正常人群中性粒细胞、单核细胞、嗜酸粒细胞呈阳性反应。淋巴细胞、巨核细胞、红细胞、浆细胞等均呈阴性反应。

#### 正常细胞反应：

1. 粒细胞系---各阶段中性粒细胞（少数原粒除外）可呈颗粒状阳性或强阳性。定位于胞质内。嗜酸性粒细胞可呈均匀粗大颗粒状阳性。定位于胞质内。
2. 单核细胞系-成熟单核和幼稚单核及部分原始单核(分化较好)可呈弥散细颗粒状阳性，定位于胞质内。
3. 红细胞系、淋巴细胞系、巨核细胞系、浆细胞系---均呈阴性。

#### 病理变化

1. 酶活性增高可见于再生障碍性贫血、急性粒细胞性白血病、急性淋巴细胞性白血病、放射病、嗜碱粒细胞在慢性粒细胞性白血病时可出现阳性。
2. 酶活性减低可见于某些肿瘤、MDS、链球菌感染、风湿热等。
3. 酶活性缺乏可见于：
  - a. (MPO)髓过氧化物酶缺乏引起中性粒细胞和单核细胞POX呈阴性，仅在涂

片中见少数早幼粒细胞呈弱阳性反应。

b. 乳过氧化物酶缺乏引起的嗜酸粒细胞POX呈阴性。

### 临床评价：

1. 通常将其染色阳性率3%作为淋与非淋的分界标准。但需注意在淋巴细胞白血病时原始粒和单核细胞有时也会超过3%，此时应慎重考虑，结合形态反复观察。

2. 若POX染色阳性且强度较高可结合细胞化学染色、细胞免疫表型检测，遗传学和分子生物学检测对各种急性髓性白血病进行分型或亚型间的区别，特别有助于M1与M5a、M2b与M3b及M4型亚型的鉴别。

3. 若POX染色呈阴性反应，必须结合其它细胞化学染色、细胞免疫表型，遗传学和分子生物学，来加以区分出淋巴系、非淋巴系、双表型、干细胞型等恶性增生。并对Mo与L3、M5a与L2、干细胞白血病与L3等进行诊断及鉴别诊断。

### 操作步骤：

将新鲜涂片滴加POXI液数滴（覆盖血膜为宜），室温放置1分钟，勿冲洗即滴加POXII液数滴（与I液等量），可用洗耳球轻轻将二液充分混匀后置室温5分钟，随后用流水冲洗3~5分钟。再滴加95%乙醇脱色约2~3分钟，至涂片呈淡红色。水洗后以瑞氏染色液复染10~15分钟，水洗待涂片干燥后镜检并观察结果。

### 结果显示：

阴性 — (-) 胞质内无色。

阳性 — (+) 胞质中见棕黑色颗粒，呈局灶性分布。

(++) 胞质中见粗大、密集、分布较广的蓝黑色颗粒。

(+++) 胞质中几乎布满大量粗大、成团块、蓝黑色颗粒。

(++++) 胞质中充满粗大团块状蓝黑色颗粒并可覆盖于胞核上。位于胞质。

### 注意事项：

1. 每次操作均须取正常标本做阴、阳性同步对照。

2. 实验室操作人员最好相对稳定，可使结果稳定得以减少室内误差。

### 常见问题与解决方法

常见问题	原因	解决方法
未 见 阳 性 或 阳 性 减 弱	试剂盒过期太久	从新购买试剂盒
	载玻片未洗净标本被污染	取干净玻片从新采集标本
	标本放置时间过久	从新采集标本
	标本沾遇其他化学物质特别是甲醇、过碘酸、盐酸等	采用未被污染的标本重新染色
	试剂滴加量太少或滴加后沿载玻片边沿流失	可重新滴加试剂
染 色 背 景 太 杂	试剂启用后保存不当特别是II液	换新试剂或II液
	使用了加有抗凝剂的标本	从新采集标本
染 色 背 景 太 杂	采用了溶血的标本	采用未溶血的标本重新染色
	推制标本时用力过猛造成细胞破裂	从新采集标本
	部分白血病细胞易破碎特别是M3型白血病细胞	无法去除
	染色及复染后水洗时间不够或冲洗方法不当	通常水洗时间为2~3分钟而且不能先倒掉复染液，须连染液一起冲洗

## 二、中性粒细胞碱性磷酸酶染色

### Neutrophil alkaline phosphatase , (NAP)

#### 原 理

中性粒细胞内的碱性磷酸酶（NAP）在碱性环境下，水解 $\alpha$ -磷酸萘酚钠，产生 $\alpha$ -萘酚。后者与重氮剂偶联形成红色沉淀物，沉淀物的显色深浅与NAP活性成正比。

#### 正常血细胞反应：

中性粒细胞碱性磷酸酶是中性粒细胞中的特异性颗粒（“S”颗粒）所释放的一种酶，存在于细胞质内的三级颗粒中呈不规则形的管状结构，该酶的活力与积分受到体内许多因素的影响。如中性粒细胞的成熟程度、HbF、内分泌功能等均能使NAP的积分产生一定的差异，但正常人群中性粒细胞的阳性程度一般很少达到3分，绝对达不到4分。其酶活力的正常范围通常为：

细胞阳性率；2~56个/100个成熟中性粒细胞；

阳性细胞积分：4~80分/100个中性粒细胞

## 病理变化

### NAP 积分增高

1. 细菌感染,凡革兰阳性球菌感染、NAP活力显著升高。
2. 真性红细胞增多症,NAP活力持续增加,且治疗后未见能恢复正常。
3. 再生障碍性贫血,NAP活力持续增加,经治疗缓解时可有下降趋势。
4. 类白血病,由化脓性球菌引起的类白反应,NAP活力明显升高。
5. 急性淋巴细胞性白血病可见NAP中度增加,而多发性骨髓瘤则活力显著提高。
6. 其它类型如烧伤、中毒、手术后、外伤等均可使NAP活力升高。

### NAP 积分降低

1. 粒细胞缺乏症、脾亢等疾病时NAP活力下降。
2. 感染,由革兰阴性杆菌、结核、病毒、立克次体病等NAP活力可明显或重度减低。
3. 白血病,单核细胞和粒细胞系统白血病,特别是慢性粒细胞白血病 NAP活力明显减低甚至消失。

## 临床评价 :

若配合染色体检查及分子生物学诊断技术可提高慢性粒细胞白血病的诊断;配合酸溶血试验,尿含铁血黄素试验可提高PNH的诊断及有利于PNH与再生障碍性贫血的鉴别;配合其它细胞化学染色可辅助鉴别急性淋巴细胞性白血病与急性非淋巴细胞性白血病。

## 操作步骤

将新鲜涂片滴加固定液(4℃)30秒,水洗待干备用。将NAP I液置入NAP II液混合成为基质液(可先吸取少量NAP II液置入NAP I液内,待NAP I液充分溶解后再一起置入NAP II液内)。将涂片置入后,37℃放置30分钟。连染色缸流水冲洗数分钟,取出待干。苏木素复染1~2分钟,水洗,待干,镜检。

## 结果显示:

阴性 — (-) 0分:胞质内无色。

阳性 — (+) 1分:胞质见浅红色,无颗粒或有少量细小颗粒但小于胞质1/4面积。

(++) 2分:胞质见红色,有较粗红色颗粒但小于胞质1/2面积。

(+++) 3分:胞质见粗大红色颗粒,可达胞质面积3/4以上。

(++++) 4分:胞质见粗大深红色颗粒,达胞质全部面积甚至可掩盖于胞核上。

### 注意事项：

1. 年龄变化：新生儿NAP活性较高,以后逐渐下降。
2. 应激状态：紧张、恐惧、激烈运动等NAP积分可增高。
3. 妊娠和月经周期的变化也可使NAP的活力有所差异。
4. 药物所致,特别是激素类如肾上腺皮质激素、雌激素等均可使NAP积分增高。
5. 每次实验均设阴、阳性标本对照。
6. 实验室操作人员最好相对稳定,尽量减少室内误差。
7. 观察结果时需注意涂片的部位,最好选择体尾交接处,有时不同部位其阳性强度可相差二个(+)以上。尤其作慢粒随访病人积分计算时需特别注意。

### 常见问题与解决方法：

常见问题	原因	解决方法
未 见 阳 性 或 阳 性 减 弱	试剂盒过期太久 载玻片未洗净标本被污染 标本放置时间过久且未固定 固定液使用时大于4℃ 采用了加有抗凝剂的标本 标本沾遇其他化学物质乙醚、二甲苯等 试剂配制时 I 液未完全置入 II 液内或未完全溶解 试剂配制后未及时使用 孵育时间或温度不够	从新购买试剂盒 取干净玻片从新采集标本 从新采集标本并立即固定,在三天内检测完毕 另取标本重新用4℃固定液固定 从新采集标本 采用未被污染的标本重新染色 需取新试剂从新配制 需取新试剂从新配制 调整温度或孵育时间
染 色 背 景 太 杂	背景细胞染色过深 染色后冲洗方法不当 复染后水洗时间不够	孵育时间太长,若影响观察需另取标本重新染色 不能先倒掉染液,应连染色缸置流水冲洗染液,2~3分钟 复染后水洗时间通常为3~5分钟而且须连复染液一起冲洗

### 三、细胞内酸性磷酸酶染色

## acid phosphatase in cells , (ACP)

### 原理

酸性磷酸酶广泛存在于人体组织细胞内，其最适pH为4.5~5.5左右，酸性磷酸酶通常存在于溶酶体内，其同工酶有七种。血细胞内的酸性磷酸酶(ACP)能水解磷酸萘酚AS-BI，释放出萘酚AS-BI，后者与偶氮剂偶联形成红色沉淀物。沉淀物的显色深浅与ACP活性成正比。

### 正常血细胞反应：

1. 粒细胞系-----部分成熟粒细胞可呈弥散状弱阳性，定位于胞质内。
2. 淋巴细胞系-- ①部分T-淋巴细胞可呈粗颗粒或小块状阳性，定位于胞质内。  
②部分B-淋巴细胞可呈细颗粒或弥散状阳性，定位于胞质内。
3. 单核细胞系---部分单核细胞可呈弥散状弱阳性，定位于胞质内。
4. 巨核细胞系---巨核细胞和血小板可呈弥散状弱阳性，定位于胞质内。
5. 网状细胞、吞噬细胞、组织噬碱性细胞可呈弥散和/或颗粒状阳性，定位于胞质内。
6. 红细胞系----基本呈阴性。

### 病理变化

酸性磷酸酶在T-淋巴细胞异常增多时都具较强的活性，特别在急性T-淋巴细胞白血病时最为显著，但对L(+) 酒石酸敏感受其抑制，在B-淋巴细胞异常增生时，多数为阴性或弱阳性反应。而多毛细胞性白血病可呈较强的阳性反应，且因含独特的同工酶5, 不被 L(+) 酒石酸所抑制。所以酸性磷酸酶对多毛细胞白血病的诊断具重要价值。

在急性非淋巴细胞白血病中，单核细胞系统反应比粒系细胞系统较强。多发性骨髓瘤细胞、浆细胞均可呈强阳性反应。另对高-雪细胞和尼曼-匹克细胞的鉴别有较重要价，通常高-雪细胞呈强阳性反应而尼曼-匹克细胞呈阴性反气应。

### 临床评价：

1. 结合电镜超微结构检查，可对多毛细胞性白血病作出诊断。
2. 结合细胞免疫表型检测，有助于区别各种B-细胞克隆增生性疾病，如慢淋与毛白、B-ALL与毛白。
3. 结合其它细胞化学染色，有助于对急性粒-单细胞白血病亚型的分类。

### 操作步骤

将新鲜涂片滴加固定液5~8滴，盖满血膜即可，(4℃) 30秒水洗备用。将ACP I液、II

液加入 ACPIII液中混匀(可先吸取少量 ACPIII液分别置入 ACP I、II液内,待 ACP I、II液充分溶解后再一起置入 ACPIII液内)成为基质液。再将涂片置入后,37℃放置 90 分钟,流水冲洗数分钟。苏木素复染 1~2 分钟,水洗待干,镜检。

### 结果显示:

阴性 — (-) 胞质无沉淀物(无色)

阳性 — (+) 胞质见浅红色或有少量细小颗粒。

(++) 胞质见红色或有较粗红色颗粒但小于胞质1/2面积。

(+++ ) 胞质见粗大红色颗粒,可达胞质面积 3/4 以上。

(++++ ) 胞质见粗大深红色颗粒,达胞质全部面积。

### 注意事项

1. 由于含酸性磷酸酶的血液细胞有许多,且各种细胞所含 ACP同工酶不同,即同一基质可有阳性程度的差异,在同一类细胞中可因基质不同而使阳性结果存在明显差异,特别在不同的实验室之间尤为突出。
2. 在每次操作时均应设正常标本阴、阳性对照。
3. ACP染色结果以弥散状阳性出现的细胞较多,如为弱阳性反应,在复染时应注意在涂片纵向复染一半,另一半不复染以利弱阳性的观察。
4. 实验室操作人员最好相对稳定,尽量减少室内误差。
5. 观察结果时需注意涂片的部位,最好选择体尾交接处,有时不同部位其阳性强度可相差二个(+)以上。作L-酒石酸抑制实验时需特别注意。



常见问题	原因	解决方法
未见阳性或阳性减弱	试剂盒过期太久	从新购买试剂盒
	载玻片未洗净标本被污染	取干净玻片从新采集标本
	标本放置时间过久且未固定	从新采集标本并立即固定，在三天内检测完毕
	固定液使用时大于4℃	另取标本重新用4℃固定液固定
	采用了加有抗凝剂的标本	从新采集标本
	标本沾遇其他化学物质乙醚、二甲苯等	采用未被污染的标本重新染色
	试剂配制时 I、II 液未完全置入III液内或未完全溶解	需取新试剂从新配制
染色背景太杂	试剂配制后未及时使用	需取新试剂从新配制
	孵育时间或温度不够	调整温度或孵育时间
	背景细胞染色过深	孵育时间太长，若影响观察需另取标本重新染色
背景太杂	染色后冲洗方法不当	不能先倒掉染液，应连染色缸置流水冲洗染液，2~3分钟
	复染后水洗时间不够	复染后水洗时间通常为3~5分钟而且须连复染液一起冲洗

#### 四、氯化醋酸AS-D萘酚酯酶染色

##### naphthol-AS-D, chloracetate esterase (AS-DNCE)

#### 原理：

一般认为，氯化醋酸萘酚酯酶是粒细胞及肥大细胞的标志酶，其主要存在于粒细胞(包括分化较好的原粒细胞)的溶酶体上，此酶与过氧化物酶在中性粒细胞中均呈阳性反应，但此酶形成的产物比 POX 更为特异。血细胞内的氯化醋酸AS-D萘酚酯酶(AS-DNCE)将氯化醋酸AS-D萘酚水解，产生萘酚AS-D，后者与重氮剂偶联形成红色沉淀物。沉淀物的显色深浅与AS-DNCE活性成正比。

#### 正常细胞反应：

1. 粒细胞系---中性粒细胞(除原粒细胞外)均可呈阳性或强阳性，且酶活性并

不随细胞成熟而增强，定位于胞浆内。嗜酸和嗜碱粒细胞为阴性和弱阳性，定位于胞质内。

2. 肥大细胞有时可呈阳性反应，定位于胞质内。

3. 红细胞系、淋巴细胞系、单核细胞系、巨核细胞系、浆细胞系均呈阴性。

### 临床评价：

1. 氯化醋酸萘酚酯酶亦称为粒系细胞特异性酯酶，如与细胞免疫表型检测相结合，对AML分型具有很大的价值，特别是结合CD13、CD33、MPO等单克隆检测结果，对AML-M0的诊断有极大的帮助。

2. 如将氯化醋酸萘酚酯酶染色与 $\alpha$ -丁酸萘酚酯酶染色在同一标本进行双脂染色、其对AML-M4亚型分析非常有价值。因氯化醋酸萘酚酯酶仅为粒细胞阳性，而 $\alpha$ -丁酸萘酚酯酶可视作单核-巨噬细胞系统的标志酶。

### 操作步骤

将新鲜涂片滴加固定液5~8滴，盖满血膜即可，(4℃)30秒水洗。先将AS-DNCE I液和II液置入AS-DNCEIII液中溶解混和(可先吸取少量AS-DNCEIII液分别置入AS-DNCE I、II液内，待AS-DNCE I、II液充分溶解后再一起置入AS-DNCEIII液内)成为基质液。将涂片置入后，37℃放置30分钟，连缸流水冲洗3~5分钟。苏木素复染1~2分钟，水洗待干，镜检。

### 结果显示：

阴性 — (-) 胞质无沉淀物(无色)

阳性 — (+) 胞质见淡红色，无颗粒或有少量细小颗粒。

(++) 胞质见鲜红色，有较粗红色颗粒但小于胞质1/2面积。

(+++ ) 胞质见粗大深红色颗粒，可达胞质面积3/4以上。

(++++ ) 胞质见粗大红紫色颗粒，达胞质全部面积甚至可掩盖于胞核上。

### 注意事项：

1. 此酶主要以定性为主，而阳性强度仅作为参考。因为酶的活力并不随细胞成熟而增加。
2. 标本必须新鲜，取材后如无法及时染色可先行固定。
3. 每次操作均须取正常标本做阴、阳性同步对照。
4. 实验室操作人员最好相对稳定，可使结果稳定得以减少室内误差。
5. 氯化醋酸萘酚酯酶染色与 $\alpha$ -丁酸萘酚酯酶染色在同一标本进行双脂染色须向公司另购双酯酶染色专用试剂，用常规染色试剂无法分别阳性结果。

常见问题	原因	解决方法
未见阳性或阳性减弱	试剂盒过期太久	从新购买试剂盒
	载玻片未洗净标本被污染	取干净玻片从新采集标本
	标本放置时间过久且未固定	从新采集标本并立即固定，在三天内检测完毕
	固定液使用时大于4℃	另取标本重新用4℃固定液固定
	采用了加有抗凝剂的标本	从新采集标本
	标本沾遇其他化学物质乙醚、二甲苯等	采用未被污染的标本重新染色
	试剂配制时 I、II 液未完全置入III液内或未完全溶解	需取新试剂从新配制
染色背景太杂	试剂配制后未及时使用	需取新试剂从新配制
	孵育时间或温度不够	调整孵育时间或温度
	背景细胞染色过深	孵育时间太长，若影响观察需另取标本重新染色
背景太杂	染色后冲洗方法不当	不能先倒掉染液，应连染色缸置流水冲洗染液，2~3分钟
	复染后水洗时间不够	复染后水洗时间通常为3~5分钟而且须连复染液一起冲洗

## 五、 $\alpha$ -醋酸萘酚酯酶染色

( $\alpha$ -naphthol acetate esterase,  $\alpha$ -NAE)、

### 原理：

血细胞内的  $\alpha$ -醋酸萘酚酯酶 ( $\alpha$ -NAE) 将基质液中的  $\alpha$ -醋酸萘酚酯水解，释放出  $\alpha$ -萘酚，后者与重氮盐偶联形成灰黑色沉淀物。沉淀物的显色深浅与  $\alpha$ -NAE 活性成正比。

### 正常细胞阳性反应：

1. 粒细胞系----少数中晚幼粒可呈弥散状弱阳性，定位于胞质内。
2. 单核细胞系--成熟单核和幼稚单核及部分原始单核(分化较好)可呈不同程度阳性，定位于胞质内。
3. 红细胞系-----部分中晚幼红可呈弱阳性，定位于胞质内。

4. 巨核细胞系--巨核细胞和血小板可呈弱阳性或阳性，定位于胞质内。
5. 淋巴细胞系一部分淋巴细胞和浆细胞可呈弱阳性，定位于胞质内。
6. 吞噬细胞----可呈强阳性，定位于胞质内。

### 临床评价：

1.  $\alpha$ -醋酸萘酚酯酶染色属临床上常用的非特异性酯酶染色之一。此酶在单核细胞、吞噬细胞中含量较多且多数受到氟化钠(NaF)抑制；粒细胞、淋巴细胞、部分幼红细胞、巨核细胞和血小板等含量较少。非特异性酯酶由于具有较多的同工酶，且不同种类的细胞内存有的同工酶也不尽相同，所以此类酶除了在单核-巨噬系统反应较强烈以外，其它细胞系统也可呈现出不同程度的阳性，所以对细胞中非特异性酯酶如能组合检测比单一检测更具价值和意义。非特异性酯酶染色的主要意义在于结合细胞形态，结合其他细胞化学染色，为临床急性非淋巴细胞性白血病的分型和亚型确定提供重要的依据。

2.  $\alpha$ -醋酸萘酚酯酶因主要存在于单核细胞中，且为同工酶4、5，而中性粒细胞含有的同工酶为1、2、7、9，由于一定浓度的氟化钠能完全抑制酯酶3、5、6，此特点在对急性髓性白血病中M2、M4、M5等分型和亚型分类有一定参考价值。另由于巨核细胞此酶也可呈阳性反应，如结合酸性磷酸酶染色(ACP)和免疫表型检测，可对AML-M7作出诊断。

3. 非特异性酯酶染色若结合POX染色和PAS染色(双酶染色)来综合判断结果，特别是如能将POX染色与 $\alpha$ -醋酸萘酚酯酶染色联合显示于一张标本片上，这比分别染色效果要更好，对M4的分型尤为突出。

4. 将AS-DNCE染色与 $\alpha$ -醋酸萘酚酯酶染色同显示于一张标本片上，即双醋染色，可使单核细胞和粒细胞系分辨的更为清楚，并且能发现在同一个细胞上同时存在二种酯酶呈阳性反应，称酯酶双表现型细胞，为M4的诊断与分型提供了有力依据。

### 操作步骤

将新鲜涂片滴加固定液5~8滴，盖满血膜即可，(4℃)30秒水洗。先将 $\alpha$ -NAE I液和II液置入 $\alpha$ -NAE III液中溶解混和(可先吸取少量 $\alpha$ -NAE III液分别置入 $\alpha$ -NAE I、II液内，待 $\alpha$ -NAE I、II液充分溶解后再一起置入 $\alpha$ -NAE III液内)成为基质液。将涂片置入后，37℃放置30分钟，连缸流水冲洗3~5分钟。苏木素复染1~2分钟，水洗待干，镜检。

#### • NaF 抑制试验：

将新鲜涂片滴加固定液5~8滴，盖满血膜即可，(4℃)30秒水洗。先将 $\alpha$ -NAE I液和

II液置入 $\alpha$ -NAE III液中溶解混和(可先吸取少量 $\alpha$ -NAE III液分别置入 $\alpha$ -NAE I、II液内,待 $\alpha$ -NAE I、II液充分溶解后再一起置入 $\alpha$ -NAE III液内),再加入NaF一瓶(订货时可向公司要求配置)成为基质液。将涂片置入后,37℃放置30分钟,连缸流水冲洗3~5分钟。苏木素复染1~2分钟,水洗待干,镜检

#### 结果显示:

阴性 — (-) 胞质无沉淀物(无色)

阳性 — (+) 胞质见浅灰色,无颗粒或有少量细小颗粒。

(++) 胞质见深灰色,有较粗灰黑色颗粒但小于胞质1/2面积。

(+++) 胞质见粗大黑色颗粒,可达胞质面积3/4以上。

(++++) 胞质见粗大深黑色颗粒,达胞质全部面积甚至可掩盖于胞核上。

#### 注意事项:

1. 酶的活性随标本采集后的时间而逐步下降,如无法及时染色,应先固定否则将影响阳性结果。
2. 涂片固定时滴加固定液要迅速一次盖满血膜,反复滴加可造成染色背景深浅不一。影响结果观察。
3. 每次操作均须取正常标本做阴、阳性同步对照。
4. 以防引起背景污染,冲洗困难,特别在冬天,易使涂片表面产生脂质沉淀从而影响结果观察。
5. 实验室操作人员最好相对稳定,可使结果稳定得以减少室内误差。
6. 观察结果时需注意涂片的部位,有时不同部位其阳性强度可相差二个(+)以上。作NaF抑制率计算时需特别注意。

常见问题	原因	解决方法
未见阳性或阳性减弱	试剂盒过期太久	从新购买试剂盒
	载玻片未洗净标本被污染	取干净玻片从新采集标本
	标本放置时间过久且未固定	从新采集标本并立即固定，在三天内检测完毕
	固定液使用时大于4℃	另取标本重新用4℃固定液固定
	采用了加有抗凝剂的标本	从新采集标本
	标本沾遇其他化学物质乙醚、二甲苯等	采用未被污染的标本重新染色
	试剂配制时 I 液未完全置入 II 液内或未完全溶解	需取新试剂从新配制
染色背景太杂	试剂配制后未及时使用	需取新试剂从新配制
	孵育时间或温度不够	调整温度或孵育时间
	背景细胞染色过深	孵育时间太长，若影响观察需另取标本重新染色
染色背景太杂	染色后冲洗方法不当	不能先倒掉染液，应连染色缸置流水冲洗染液，2~3分钟
	复染后水洗时间不够	复染后水洗时间通常为3~5分钟而且须连复染液一起冲洗

## 六、 $\alpha$ -丁酸萘酚酯酶染色

( $\alpha$ -naphthol butyrase esterase  $\alpha$ -NBE)

### 1. 原理

血细胞内的 $\alpha$ -丁酸萘酚酯酶( $\alpha$ -NBE)将基质液中的 $\alpha$ -丁酸萘酚酯水解，释放出 $\alpha$ -萘酚，后者与重氮盐偶联形成棕褐色沉淀物。沉淀物的显色深浅与 $\alpha$ -NBE活性成正比。

### 正常细胞阳性反应：

1. 粒细胞系----个别成熟中性粒细胞可呈弥散状弱阳性，定位于胞质内。
2. 单核细胞系--成熟单核和幼稚单核及部分原始单核(分化较好)可呈不同程度阳性或强阳性，定位于胞质内。
3. 吞噬细胞----可呈阳性或强阳性，定位于胞质内

4. 红细胞系、巨核细胞系、淋巴细胞系、浆细胞均呈阴性。

### 临床评价：

1.  $\alpha$ -丁酸萘酚酯酶染色属临床上常用的非特异性醋酶染色之一。此酶在单核-巨噬细胞系统中反应强烈，同时此反应也能被NaF所抑制，而粒细胞、淋巴细胞、部分幼红细胞、巨核细胞和血小板等含量很少。所以 $\alpha$ -丁酸萘酚酯酶亦被视作单核-巨噬细胞系统所特有的标志酶。若结合细胞形态和其他细胞化学染色，为临床急性非淋巴细胞性白血病的分型和亚型确定提供重要的依据。

2.  $\alpha$ -丁酸萘酚酯酶染色也可结合POX染色来综合判断结果，特别是如能将POX染色与 $\alpha$ -丁酸萘酚酯酶染色联合显示于一张标本片上，这比分别染色效果要更好，对M2、M4、M5的分型尤为突出。

2. 将AS-DNCE染色与 $\alpha$ -丁酸萘酚酯酶染色同显示于一张标本片上，即双醋染色，可使单核细胞和粒细胞系分辨的更为清楚，并且能发现在同一个细胞上同时存在二种酯酶呈阳性反应，称酯酶双表现型细胞，为M4的诊断与分型提供了有力依据。

### 操作步骤

将新鲜涂片滴加固定液5~8滴，盖满血膜即可，(4℃)30秒水洗。先将 $\alpha$ -NBE I液和II液置入 $\alpha$ -NBE III液中溶解混和(可先吸取少量 $\alpha$ -NBE III液分别置入 $\alpha$ -NBE I、II液内，待 $\alpha$ -NBE I、II液充分溶解后再一起置入 $\alpha$ -NBE III液内)成为基质液。将涂片置入后，37℃放置30分钟，连缸流水冲洗3~5分钟。苏木素复染1~2分钟，水洗待干，镜检。

#### • NaF 抑制试验：

将新鲜涂片滴加固定液5~8滴，盖满血膜即可，(4℃)30秒水洗。先将 $\alpha$ -NBE I液和II液置入 $\alpha$ -NBE III液中溶解混和(可先吸取少量 $\alpha$ -NBE III液分别置入 $\alpha$ -NBE I、II液内，待 $\alpha$ -NBE I、II液充分溶解后再一起置入 $\alpha$ -NBE III液内)，再加入NaF一瓶(订货时可向公司要求配置)成为基质液。将涂片置入后，37℃放置30分钟，连缸流水冲洗3~5分钟。苏木素复染1~2分钟，水洗待干，镜检

### 结果显示：

阴性 — (-) 胞质无沉淀物(无色)

阳性 — (+) 胞质见淡棕红色，无颗粒或有少量细小颗粒。

(++) 胞质见棕红色，有较粗棕红色颗粒但小于胞质1/2面积。

(+++ ) 胞质见粗大棕红色颗粒，可达胞质面积3/4以上。

(++++ ) 胞质见粗大棕褐色颗粒，达胞质全部面积甚至可掩盖于胞核上。

### 注意事项:

1. 酶的活性随标本采集后的时间而逐步下降, 如无法及时染色, 应先固定, 否则将影响阳性结果。
2. 每次操作均须取正常标本做阴、阳性同步对照。
3. 此染色冲洗时间需适当延长, 特别在冬天, 易使涂片表面产生脂质沉淀, 引起背景污染影响结果观察。
4. 实验室操作人员最好相对稳定, 可使结果稳定得以减少室内误差。
5. 观察结果时需注意涂片的部位, 最好选择体尾交接处, 有时不同部位其阳性强度可相差二个(+)以上。作NaF抑制率计算时需特别注意。

常见问题	原因	解决方法
未见阳性或阳性减弱	试剂盒过期太久	从新购买试剂盒
	载玻片未洗净标本被污染	取干净玻片从新采集标本
	标本放置时间过久且未固定	从新采集标本并立即固定, 在三天内检测完毕
	固定液使用时大于4℃	另取标本重新用4℃固定液固定
	采用了加有抗凝剂的标本	从新采集标本
	标本沾遇其他化学物质乙醚、二甲苯等	采用未被污染的标本重新染色
	试剂配制时 I 液未完全置入 II 液内或未完全溶解	需取新试剂从新配制
染色背景太杂	试剂配制后未及时使用	需取新试剂从新配制
	孵育时间或温度不够	调整温度或孵育时间
	背景细胞染色过深	孵育时间太长, 若影响观察需另取标本重新染色
背景太杂	染色后冲洗方法不当	不能先倒掉染液, 应连染色缸置流水冲洗染液, 2~3分钟
	复染后水洗时间不够	复染后水洗时间通常为3~5分钟而且须连复染液一起冲洗



## 七、过碘酸一雪夫反应

### periodic acid Schiff reaction ,PAS

#### 原理

血细胞内含乙二醇的糖类物质（PAS）能被过碘酸氧化，形成双醛基类物质。后者与无色品红结合，形成紫红色沉淀物，沉淀物的显色深浅与乙二醇的含量成正比。

#### 正常细胞反应：

1. 粒细胞系-----原粒细胞多呈阴性，通常随细胞不断成熟阳性反应由弱渐强，至细胞完全成熟后达到最大强度。其中，中性粒细胞呈胞质内弥散状红色阳性，嗜酸粒细胞S颗粒之间的胞质呈红色阳性，嗜碱粒细胞呈大小不一的颗粒状紫红色阳性。
2. 单核细胞系---各阶段部分单核细胞可呈弥散伴细小颗粒状红色阳性。定位于胞质内。
3. 淋巴细胞系---由于亚群的关系，可有所不同，T-细胞仅一小部分可呈粗颗粒和小快状阳性，但B-细胞绝大部分呈阳性反应。
4. 红细胞系---红细胞系的各个阶段皆呈阴性反应，偶见少数幼红细胞有较弱的阳性反应。
5. 巨核细胞系-- 巨核细胞和血小板呈弥散性和粗大颗粒状强阳性反应，且随细胞成熟而增强。定位于胞质内。
6. 其他----浆细胞呈阴性反应，偶见少数呈较弱阳性。巨噬细胞可呈阳性反应。均定位于胞质内。

#### 临床评价：

1. 能被过碘酸一雪夫反应呈阳性的多糖类物质有糖原、粘多糖、糖蛋白、糖脂，还包括一些磷脂类物质等，因此PAS阳性不能简单地就表明有糖原的存在，只是在对血细胞的组织化学研究中通常习惯于将PAS阳性认同于糖原。

2. PAS染色虽然不完全代表糖原，但在血液系统疾病特别在各类型白血病中却有较大的应用价值。

(1) 粒细胞系统：糖原是保障中性粒细胞吞噬功能的能量来源，所以在急性炎症时PAS染色阳性程度明显增强，在淋巴系统恶性增生性疾病、真性红细胞增多症、类白血病反应等时亦可增强，在粒细胞系统恶性增生性疾病如急粒、慢粒等，其阳性程度可减低。

(2) 红细胞系统: PAS染色在红细胞疾病中具有较大的使用价值, 在大部分红血病、红白血病及部分重型海洋贫血等疾病中可呈强阳性反应, 部分缺铁性贫血、重型海洋贫血、MDS、骨髓硬化症等可见阳性反应。其它类型的贫血如巨幼红细胞性贫血、再生障碍性贫血、溶血性贫血等均为阴性反应。

(3) 巨核细胞和血小板系统: 巨核细胞胞浆中存有糖原和粘多糖两类物质, 糖原呈粗大紫红色颗粒或块状, 粘多糖呈弥散状红色细颗粒, 二者遍布于整个胞浆之中。此为一般血液细胞所不具有, 利用此特点有助于与恶性细胞相鉴别, 并结合电镜PPO染色, 免疫表型检测以确定原始巨核细胞的存在和对M7的诊断。

(4) 淋巴细胞系统: 淋巴细胞糖原的改变主要体现在不同类型的淋巴细胞克隆性增生疾病之, 其中尤以B-细胞恶性增多改变较为明显, 如慢淋、淋巴肉瘤、急性B-细胞白血病等疾病的PAS阳性率和阳性强度可明显提高。而T-细胞恶性病变PAS强度无明显改变, 另外, 淋巴细胞由于感染引起的增多通常PAS多在正常范围之内。

3. PAS 染色虽不能特异地表示何种病理改变, 但结合其它细胞化学染色和细胞免疫表型检测及超微结构检查等, 对部分疾病的诊断和鉴别诊断具有一定价值, 如MDS、M6与其它类型贫血的鉴别; 原淋巴细胞与原单核细胞、原粒细胞的鉴别; M6与M7的鉴别、高-雪细胞与尼曼达克细胞的鉴别、(Reed-Sternberg) 瑞-斯细胞和巨核细胞的鉴别、骨髓转移性腺癌细胞与白血病细胞的鉴别。

### 操作步骤

涂片滴加固定液5~8滴, 盖满血膜即可, 5分钟, 水洗待干。滴加PAS I液10分钟(若实验室温度较低可适当延长5~10分钟), 水洗待干。置入PAS II液内室温(20~25℃左右为宜)暗处放置30分钟, 然后小心取出涂片流水冲洗数分钟。苏木素复染1~2分钟, 水洗待干, 镜检。

### 结果显示:

- |          |                          |
|----------|--------------------------|
| 阴性 — (-) | 胞质内无色。                   |
| 阳性 — (+) | 胞质内呈淡红色或有少量细小红色颗粒。       |
| (++)     | 胞质呈红色或有10个以上红色颗粒。        |
| (+++)    | 胞质呈暗红色或有粗大红色颗粒, 可出现红色块状。 |
| (++++)   | 胞质呈紫红色或有粗大红色块状。          |

### 注意事项:

1. 标本除新鲜涂片外, 保存较好未被污染的涂片也可使用。

2. 标本和器材应避免被还原基团的物质所污染，以免出现假阳性。
3. 涂片经PAS I 液氧化水洗后，必须待涂片彻底干燥后方可置入PAS II 液中，以免细胞间隙中的残留水份导致整张涂片呈鲜红色，影响结果观察。
4. 每次操作均须取正常标本做阴、阳性同步对照。
5. 实验室操作人员最好相对稳定，可使结果稳定得以减少室内误差。
6. 观察结果时需注意涂片的部位，最好选择体尾交接处，有时不同部位其阳性强度可相差二个(+)以上。
7. 染色后应及时观察结果，或用中性树胶封片，以利长期保存。

常见问题	原因	解决方法
未 见 阳 性 或 阳 性 减 弱	试剂盒过期	从新购买试剂盒
	试剂开封后未盖紧	开启新试剂盒
	PAS II 开封后混入杂质或水	
	造成试剂变质返红	开启新试剂盒
	载玻片未洗净标本被污染	取干净玻片从新采集标本
	采用了加有抗凝剂的标本	从新采集标本
	标本沾遇其他化学物质维生素C、 甲醛等	采用未被污染的标本重新染色
	标本在 I 液内氧化时间不够	另取标本和新试剂从新操作
染 色 背 景 太 杂	试剂配制后未及时使用	需取新试剂从新配制
	孵育时间或温度不够	调整温度或孵育时间
	标本在 I 液内氧化水洗后未彻 底干透	若影响观察需另取标本重新染色
	背景细胞染色过深	孵育时间太长，若影响观察需另取标本 重新染色
	染色后冲洗方法不当	不要连染色缸一起置流水冲
	复染后水洗时间不够	复染后水洗时间通常为3~5分钟而且须 连复染液一起冲洗

## 八、铁染色

(Iron staining)

### 原理

骨髓中的细胞内外铁在酸性环境下与亚铁氰化钾作用，形成蓝色的亚铁氰化

铁沉淀，定位于含铁部位。蓝色沉淀颗粒的多少和深浅与细胞内外铁的含量成正比。

### 正常细胞反应：

骨髓铁包括幼红细胞外铁和幼红细胞内铁二部分。

细胞外铁正常为（+）~（++）

细胞内铁正常为 19~44%幼红细胞阳性，I型为主，少数II型。且无环行铁粒幼红细胞及铁粒红细胞。

### 临床评价：

1. 骨髓铁包括细胞内铁和细胞外铁。细胞内铁为幼红细胞合成血红蛋白时的利用形式，而细胞外铁是骨髓以含铁血黄素形式存在的贮存铁。骨髓铁染色可了解骨髓中幼稚红细胞对铁利用的功能和铁原料在机体内的吸收与贮存情况，但外铁在检测时易受到取材、仪器、试剂等因素的干扰，就其价值来说不及细胞内铁高。

2. 细胞内外铁减低或消失，见于铁原料摄入性降低，铁吸收功能障碍或铁的丢失和消耗过度，使幼红细胞血红蛋白合成量减少或障碍，如临床常见的缺铁性贫血及能引起机体缺铁的相关性疾病，如钩虫病、ITP等均能使机体中细胞内外铁减，产生贫血症状，因此对骨髓铁的检测是诊断缺铁性贫血最重要且较早期的指标之一。

3. 细胞内外铁增多性疾病见于机体造血功能障碍，铁利用和转换能力下降或迟缓及外源性含铁物质的多次输入等。临床常见的有：再生障碍性贫血、铁粒幼细胞贫血、骨髓增生异常综合征、溶血性贫血、白血病等，均可引起细胞内外铁的增多。

4. 如将铁染色与血清铁、总铁结合力等检测综合观察，可了解机体内铁的动态变化，机体对铁剂治疗的早期效果，可了解骨髓代偿造血的能力，所以我们只要严格控制铁染色操作技术，抓住取材、涂片、染色等几个重要环节，对结果严格辨认，就能使细胞内外铁染色在各种贫血的诊断、鉴别诊断中发挥更大作用。

### 操作步骤

骨髓涂片滴加固定液 5~8 滴，盖满骨髓膜即可。10 分钟水洗待干、备用。将铁染色 II 液缓缓滴入铁染色 I 液内，混匀后放入固定好的骨髓涂片，置入 37℃ 水浴箱内放置 60 分钟，然后连缸流水冲洗数分钟。核固红复染 3~5 分钟，水洗待干，镜检。

## 结果显示：

### 细胞外铁：

阴性 — (-) 细胞外和细胞间隙中无蓝色沉淀物（无色）。

阳性 — (+) 细胞外和细胞间隙中见少数蓝色颗粒。

(++) 细胞外和细胞间隙中见较多蓝色铁颗粒和铁小珠。

(+++) 细胞外和细胞间隙中见很多蓝色铁颗粒和铁小珠。

(++++) 细胞外和细胞间隙中见极多蓝色铁颗粒和铁小珠并可见铁小块。

### 细胞内铁：

阴性 — (-) 细质内无蓝色沉淀物（无色）

阳性 — (I) 胞质见 1~2 个蓝色细小颗粒。

(II) 胞质见 2 个以上蓝色颗粒。

(III) 胞质见 1~4 个蓝色粗大颗粒。

(IV) 胞质见 5 个以上蓝色粗大颗粒。

## 注意事项：

1. 标本取材要满意。外铁检查要选择含有髓小粒的涂片，如标本保存得当，陈旧骨髓涂片也可使用。
2. 所用载玻片及相关器皿应经去离子水洗涤（至少为双蒸水），除去载玻片和器皿上可能存有的污染铁，此点对外铁检测特别重要。
3. 试剂要新鲜配置，如二者混合后试剂颜色变绿则表示受污染不能使用。
4. 复染时应采用纵向，一半不复染以利观察细胞外铁，另一半复染以利观察细胞内铁。在寻找细胞外铁时，最好能在吞噬细胞体内看到铁颗粒，其比在细胞外看到铁颗粒更有意义。
5. 通常计算幼红细胞内铁染色积分时以中晚幼红为主，原红和早幼红不计入百分比内。为使结果准确，应选择不同的区域和部位仔细观察，避免发生遗漏和差错。
6. 每次操作均须取正常标本做阴、阳性同步对照。
7. 实验室操作人员最好相对稳定，可使结果稳定得以减少室内误差。
8. 观察结果时需注意涂片的部位，最好选择体尾交接处。

常见问题	原因	解决方法
未见阳性或阳性减弱	试剂盒过期	从新购买试剂盒
	试剂被污染变色	需取新试剂从新配制
	载玻片未洗净标本被污染	取干净玻片从新采集标本
	采用了加有抗凝剂的标本	从新采集标本
	标本沾遇其他化学物质乙醚、二甲苯等	采用未被污染的标本重新染色
	试剂配制时 I 液未完全置入 II 液内	需取新试剂从新配制
	II 液开启时间过长	需取新试剂从新配制
染色背景太杂	试剂配制后未及时使用	需取新试剂从新配制
	孵育时间或温度不够	调整温度或孵育时间
	标本被铁污染	采用未被污染的标本重新染色
	背景细胞染色过深	孵育时间太长, 若影响观察需另取标本重新染色
	染色后冲洗方法不当	不能先倒掉染液, 应连染色缸置流水冲洗染液, 2~3分钟
	复染后水洗时间不够	复染后水洗时间通常为3~5分钟而且须连复染液一起冲洗

## 九、白血病细胞免疫分型测定

### 检测原理

利用细胞膜表面所特有的分化抗原对细胞进行鉴别和分型, 将免疫酶标技术运用于普通骨髓(血)涂片。可以达到准确区别各种类型血液细胞的目的。本公司采用目前国际上较为先进的免疫组化二步法, 并选择国际上被公认的一线单抗和部分常用二线单抗, 运用 AP 染色技术, 只需 2-3 张普通推制的骨髓(血)涂片即可。该法具有灵敏度高, 操作简便, 试剂用量较少, 结果稳定, 重复性好, 背景清晰, 无需特殊仪器(仅用一台普通光学显微镜)、阳性结果保存时间长(便于会诊), 整个操作过程耗时仅需 2 小时即可获得满意的结果。能基本满足临床上对于各类型急、慢性白血病细胞的免疫分型检测。

在血液和骨髓细胞中有一部分细胞含有非常丰富的内源性过氧化物酶, 虽然在操作时可采取一些措施来抑制细胞内过氧化物酶, 但这种处理比较粗糙, 往往不能完全抑制该细胞内源

酶的活性，又可造成部分细胞表面抗原的破坏或丢失。而对血液系统中许多恶性疾病的诊断，通常是检测其细胞表面的分化抗原。再则在血液和骨髓组织中，还存在大量的成熟红细胞。其中的血红蛋白对本法也会产生强烈的干扰，(因血红蛋白具过氧化物酶的功能)，可对被检标本的背景产生难以去除的非特异性染色。从而导致结果难以判断。所以在血液学中的细胞免疫组化染色，应该首选碱性磷酸酶(AP)显色系统。而尽量不采用辣根过氧化物酶(HIP)显色系统。

#### 正常细胞反应：

1. T-淋巴细胞----- CD3、CD5、CD7 等标记可部分或全部表达，其他系列标记均不表达。
2. B-淋巴细胞----- CD10、CD19、CD20、HLA-DR 等标记可部分或全部表达，其他系列标记均不表达。
3. 髓系细胞----- CD13、CD14、CD33、CD34、CD68、MPO、HLA-DR 等标记可部分或全部表达，其他系列标记均不表达。
3. 巨核细胞----- CD41、HLA-DR、等标记可部分或全部表达，其他系列标记均不表达。

#### 临床评价：

1. 白血病细胞-----若呈 CD3、CD5、CD7 等部分或全部表达；而其他系列标记均不表达。  
提示：T-细胞性白血病。
2. 白血病细胞-----若呈 CD10、CD19、CD20、HLA-DR 等部分或全部表达；而其他系列标记均不表达。提示：B-细胞性白血病。
3. 白血病细胞-----若呈 CD13、CD14、CD33、CD34、CD68、MPO、HLA-DR 等部分或全部表达；其他系列标记均不表达。提示：非淋巴性白血病。
4. 白血病细胞-----若呈 CD41、HLA-DR、CD 34 等表达；而其他系列标记均不表达。  
提示：巨核细胞性白血病。
4. 白血病细胞-----若出现以上 1 和 3 或 2 和 3 同时表达；其他系列标记均不表达。  
提示：双表型白血病。

#### 操作方法：

1. 取干燥的骨髓(血)涂片 1~2 张。根据单抗检测所需数量用利器将骨髓(血)膜划分成若干小块，每小块约 5×5mm 左右，小块之间隙为 2mm 左右并用阻水笔分隔，并作相应记号，置纯丙酮内固定 5~10 分钟后即刻置于洗涤液内浸洗 3 分钟 / 次，三次。
2. 取出涂片，用吸水纸吸干分隔线上之水分，但注意勿使血膜干涸。依次滴加单克隆一抗，湿盒内室温 20~25℃放置 30 分钟，后置洗涤液内浸洗 3 分钟/次，三次。滴加酶标二抗，湿盒内室温 20~25℃放置 30 分钟，后置洗涤液内浸洗 3 分钟 / 次，三次。

3. 滴加显色剂湿盒内室温 20~25℃放置 5~10 分钟（可在低倍镜下观察，待阳性结果满意即可），流水冲洗 2~3 分钟。

4. 苏木素复染 2~3 分钟，流水冲洗 3~5 分钟。待干后用甘油-明胶封片。镜检。

#### 结果显示：

阳性表达—— 细胞膜或细胞质可见鲜红色沉淀物，细胞核呈兰色。

阴性表达—— 细胞膜或细胞质未见红色沉淀物，细胞核呈兰色。

#### 注意事项

1. 样本应新鲜，但注意须彻底干燥后方能检测（抗凝标本勿用）。通常放置 24 小时后检测，但样本采集后应在 3 天内测定完毕。若样本采集后不能及时测定，请勿预先固定和冰箱内保存，否则易使细胞溶解。
2. 样本应选用骨髓（血）膜较长和较薄的涂片为佳，若血膜偏厚，易引起脱膜，影响结果观察，甚至无法观察。
3. 划分小块时应选择涂片上细胞分布比较均匀的体部和尾部，尽量避免采用涂片头部因该处血膜较厚不利于结果观察，且容易脱膜。
4. 样本采集后至结果观察完毕前，应避免接触与实验无关的化学物品，特别是苯、二甲苯、醚、乙醇、双氧水等，以免细胞表面的抗原破坏，造成假阴性。
5. 抗体孵育操作不当，可造成背景吸附及阳性细胞呈局限状产生，使结果产生假阳性和假阴性。所以在整个检测过程中自固定后样本均应保持湿润，尽量避免涂片干燥(但是不要留有较多水分以免抗体被稀释使阳性表达被减弱甚至产生假阴性),直至复染后方能使其干燥,以利封片。
6. 滴加单克隆一抗时，格外小心避免小块之间相互混淆，而酶标二抗和显色剂等滴加时无须分开。
7. 每次洗涤需用染色缸浸洗而且要保证洗涤时间（3 分钟/次）与洗涤次数（3 次）
7. 苏木素复染后流水冲洗时间可适当延长，以保证胞核被兰化有利于结果观察。
8. 甘油-明胶封片时可吸取 50~80 μl 封片剂置被检涂片中间，采用 24×48mm、厚度为 0.13~0.17mm 盖玻片，轻轻放下即可，若有气泡可用手轻压盖玻片去除。
9. 应选择病理性细胞观察其阳性表达情况，若能同时做一张瑞氏染色涂片，对照观察，可进一步提高结果的可靠性。
10. 洗涤液因浓缩倍数较高，常有固体结晶析出，用前置于 37℃水浴 10min 后稀释。
11. 每次操作均须取正常标本做阴、阳性同步对照。



常见问题	原因	解决方法
未见阳性或阳性减弱	试剂盒过期或保存不当 载玻片未洗净标本被污染 标本放置时间超过3天以上 采用了加有抗凝剂的标本 标本沾遇其他化学物质甲醇二甲苯、甲醛等 血膜上留有较多水分 每次洗涤时间和次数不够 现色剂配制后未及时使用 封片前碰到苯类试剂 孵育时间或温度不够	从新购买试剂盒 取干净玻片从新采集标本 从新采集标本 从新采集标本 采用未被污染的标本重新染色 取新试剂从新操作 另取标本和新试剂从新操作 另取标本和新试剂从新操作 另取标本和新试剂从新操作 调整时间和温度另取标本和新试剂 从新操作
染色背景太杂	孵育时温度过高(>35 <sup>0</sup> C) 背景细胞染色过深 各种破碎细胞较多 显色后冲洗时间不够 复染后水洗时间不够	若影响观察需另取标本和新试剂重新操作 显色时放置时间太长, 若影响观察需另取标本和新试剂重新操作 无法去除 保证流水冲洗时间 复染后水洗时间通常为3~5分钟而且须连复染液一起冲洗