

中华人民共和国国家职业卫生标准

GBZ/T 248—2014

放射工作人员职业健康检查外周血 淋巴细胞染色体畸变检测与评价

Test and assessment of chromosomal aberrations on occupational health
examinations for radiation workers

2014-05-14 发布

2014-10-01 实施



中 华 人 民 共 和 国
国家卫生和计划生育委员会 发 布

目 次

前言 III

1 范围 1

2 规范性引用文件 1

3 术语和定义 1

4 微量全血培养 2

5 染色体标本制备 3

6 染色体畸变分析 3

7 检测结果评价 4

8 检测报告和归档 4

9 质量控制 4

附录 A（资料性附录） 常见的染色体畸变类型及鉴别分析 5

附录 B（资料性附录） 外周血淋巴细胞染色体畸变分析记录表和报告单 8

附录 C（资料性附录） 染色体畸变检测的实验室条件和试剂配制 10

前 言

根据《中华人民共和国职业病防治法》制定本标准。

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准起草单位：河南省职业病防治研究院、军事医学科学院放射与辐射医学研究所、中国疾病预防控制中心辐射防护与核安全医学所、中国医学科学院放射医学研究所。

本标准起草人：吕玉民、傅宝华、韩林、赵凤玲、陈英、刘青杰、刘建香、刘强、王喜爱。

放射工作人员职业健康检查外周血 淋巴细胞染色体畸变检测与评价

1 范围

本标准规定了放射工作人员职业健康检查中,外周血淋巴细胞染色体畸变检测的微量全血培养、标本制备、染色体畸变分析、结果评价、记录报告方法和质量控制。

本标准适用于放射工作人员职业健康检查。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

GBZ 235—2011 放射工作人员职业健康监护技术规范

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

放射工作人员 radiation worker

在放射工作单位从事放射职业活动中受到电离辐射照射的人员。

[GBZ 235—2011,3.1]

3.2

职业健康监护 occupational health surveillance

为保证放射工作人员参加工作时及参加工作后都能适任其拟承担或所承担的工作任务而进行的医学检查和评价。

[GBZ 235—2011,3.2]

3.3

染色体 chromosome

遗传物质的主要载体,主要由 DNA 和蛋白质组成。在细胞分裂的中期用碱性染料染色呈丝状或棒状的小体。每个中期细胞中的染色体均有两条染色单体。

3.4

染色体核型 karyotype

用显微描绘的方法把中期分裂细胞的染色体,按照从大到小和着丝粒的位置等形态特征进行排序,称为染色体核型。

3.5

染色体畸变 chromosomal aberration

正常染色体在受到物理(如电离辐射)、化学或生物因素作用下发生的数目和结构上的异常。染色体畸变是电离辐射作用的敏感指标之一。

3.6

染色单体型畸变 chromatid type aberration

当细胞处于 S 期或 G₂ 期受到诱变剂作用时,由于大部分已通过复制成为两条染色单体,因此断裂可以发生在一条单体上,也可以在两条单体上,从而诱发的畸变。

常见的有单体裂隙(chromatid gap, ctg)、单体断裂(chromatid break, ctb)、单体缺失(chromatid deletion, ctd)和单体互换(chromatid exchange, cte),如四射体(triradial, tri)和四射体(quadriradial, qr)。

3.7

染色体型畸变 chromosome type aberration

当细胞处于 G₀ 或 G₁ 期受到诱变剂作用时,染色体尚未复制,是单条染色体被击中而断裂,经 S 期复制后,在分裂中期(M)见到的是 2 条染色单体在同一部位显示有结构变化。按畸变在体内的转归,可分为非稳定性染色体畸变(unstable chromosomal aberration, Cu)和稳定性染色体畸变(stable chromosomal aberration, Cs)。前者主要包括双着丝粒体(dicentric, dic)、着丝粒环(centric ring, r)、无着丝粒环(acentric ring, ar)、无着丝粒断片(fragment, f)和微小体(minute, min),其中 ar、f 和 min 统称为无着丝粒体(acentrics, ace)等;后者主要包括相互易位(reciprocal translocation, t)、倒位(inversion, inv)和缺失(deletion, del)等。

3.8

染色体畸变率 frequency of chromosomal aberration

在所观察分析的中期细胞中染色体畸变所占的比率,以每百细胞中的染色体畸变数表示,见式(1):

$$\text{染色体畸变率} = \frac{\text{染色体畸变数}}{\text{分析细胞数}} \times 100\% \quad \text{..... (1)}$$

3.9

染色体畸变细胞率 frequency of cell with chromosomal aberration

在所观察分析的中期细胞中含有染色体畸变的细胞比率,以每百细胞中含染色体畸变细胞数表示,见式(2):

$$\text{染色体畸变细胞率} = \frac{\text{染色体畸变细胞数}}{\text{分析细胞数}} \times 100\% \quad \text{..... (2)}$$

4 微量全血培养

4.1 外周静脉血采集

4.1.1 体检时静脉血的采集应在所有放射性检查(如拍胸片、乳腺钼靶检查等)前进行。

4.1.2 采集受检者静脉血约 2 mL,需肝素抗凝。

4.2 微量全血培养步骤

将采集的静脉血 0.3 mL(7 号针头约 20 滴)加入到配制好的 5 mL RPMI-1640 培养液中,轻轻摇匀,在培养瓶上编号并注明培养开始时间和日期。每人平行培养 2 瓶。37 °C ± 0.5 °C 恒温培养箱内培养 24 h 后,每瓶培养液中加入 10 μg/mL 的秋水仙碱 20 μL~25 μL(终浓度 0.04 μg/mL~0.05 μg/mL),继续培养 24 h~28 h 后收获细胞。或培养开始时加入终浓度为 0.015 μg/mL~0.03 μg/mL 的秋水仙碱,培养至 48 h~52 h 后收获细胞。

5 染色体标本制备

5.1 低渗

终止培养后用吸管轻轻抽去培养瓶中的上清液,每瓶加入 8 mL 经 37 °C 预温的 0.075 mol/L KCl,将细胞团块充分吹打均匀后移至 10 mL 的尖底玻璃离心管中,放入 37 °C 恒温水浴锅(箱)中低渗 20 min~30 min。

5.2 预固定

取出低渗完毕的离心管,每管加入 5 滴~10 滴新配制的固定液(甲醇:冰醋酸体积比=3:1),用吸管吹打混匀,水平离心机中 1 000 r/min~1 500 r/min(约 200 g~250 g)离心 8 min~10 min。

5.3 第一次固定

取出离心管,用吸管吸去上清液,沿管壁每离心管中加入 8 mL 固定液,用吸管快速吹打细胞团块并充分吹打混匀,常温下固定 20 min~30 min,在水平离心机中 1 000 r/min~1 500 r/min(约 200 g~250 g)离心 8 min~10 min。

5.4 第二次固定

取出离心管,重复第一次固定的操作。

5.5 制片

取出离心管,吸去上清液,根据细胞团块的大小每离心管中加入 3 滴~5 滴固定液以调节细胞浓度。然后以一定高度(10 cm~30 cm)将细胞悬液滴在经 37 °C 水浴预热或在 4 °C 冰箱预冷的洁净载玻片上,室温空气自然干燥。每张玻片滴 2 滴~3 滴。

5.6 编号

对每一张染色体标本片进行编号,并按照编号做好记录。

5.7 染色

将用 pH6.8 的磷酸缓冲液配制的 10% 吉姆萨(Giemsa)染液均匀涂于染色体标本片上,室温下染色 8 min~10 min,以一定倾角(约 45°)用自来水轻轻冲洗,洗掉染液后置于玻片架上室温下自然晾干。

6 染色体畸变分析

6.1 染色体畸变阅片方法

6.1.1 盲法阅片。

6.1.2 按显微镜载物台刻度坐标,在低倍镜下(物镜 10 倍)从右至左逐列或逐行对每张染色体标本片扫描式寻找可供分析的中期分裂细胞,找到目标后在油镜(物镜 100 倍)下计数和分析。每位受检者至少分析 100 个中期分裂细胞,但作为慢性放射病诊断参考指标时至少分析 200 个中期分裂细胞。

6.1.3 中期细胞的选择:染色体数目为 46 ± 1 ;染色体分散良好,长短适中,各条染色体可清楚辨认。

6.1.4 出现以下情况的中期细胞不宜作计数分析:

- a) 染色体数目少于 45 条;

- b) 在同一细胞内染色体过于分散,不能在一个油镜视野内观察到;
- c) 染色体形态过度细长或过度短粗;
- d) 染色体呈扭曲状或紧缩成团;
- e) 染色体分散不良,重叠太多;
- f) 染色太深不能鉴别染色单体交叉重叠;
- g) 同一条染色体的两条染色单体间距离过大。

6.2 染色体核型分析

6.2.1 在油镜下依据染色体的形态进行分组,通过分组确定是否有染色体结构异常。见附录 A。

6.2.2 主要分析计数 ace、dic 和 r 等非稳定性染色体畸变(Cu),以及明显的非对称性的 t 和 del 等稳定性染色体畸变(Cs)。观察到的染色单体型畸变,如 ctb、cte 等也应记录,但不作为主要观察指标计数。观察到的畸变需由两名以上分析者复核确认。见附录 A。

6.2.3 伴随 dic 或 r 的 ace,不再单独计数,记录为 dic(1)或 r(1),如多于 dic 或 r 的 ace 数则另计为 +ace;如无 ace 伴随的 dic 或 r 记录为 dic(0)或 r(0),以区别细胞在受照后已进入第二次以后的分裂,造成 ace 丢失。

6.2.4 染色体断裂(chromosomal break, csb)指二条染色单体同时断开的距离大于染色单体的横径,应计数为 ace。

6.2.5 将选择分析的每一个中期细胞记录在染色体畸变分析记录表内。见表 B.1。

6.2.6 记录畸变的文字和标记应按国际染色体命名法书写,并记下每一畸变在显微镜的坐标位置。

7 检测结果评价

7.1 无着丝粒体畸变率(ace)正常参考值范围 0%~3%。大于 3%为异常。

7.2 双着丝粒体(dic)、着丝粒环(r)和稳定性染色体畸变(t)率大于或等于 1%为异常。

7.3 对检测结果异常的受检者,可在 3~6 个月内复查。

8 检测报告和归档

8.1 对每位受检者应出具外周血淋巴细胞染色体畸变检测报告单。见第 B.2 章。

8.2 检测的染色体标本片应保存至下次体检后,受检者登记表、染色体畸变记录表等原始资料应建档长期保存,并建立电子档案。

9 质量控制

9.1 实验室应通过计量认证或国家实验室认可,并定期参加国家组织的实验室间比对。

9.2 实验室应有 2 名以上专业技术人员,经严格训练,能掌握电离辐射生物效应的基础知识,熟练识别各种类型的染色体畸变。

9.3 对影响染色体畸变检测质量的实验室条件、仪器设备条件、试剂配制和实验前准备等要求,见附录 C。

附录 A

(资料性附录)

常见的染色体畸变类型及鉴别分析

A.1 染色体核型分组

正常人体细胞染色体数目为 46 条,其中 44 条为常染色体 (autosome),另 2 条为性染色体 (sex chromosome)。正常男性为 46,XY;正常女性为 46,XX。根据丹佛体系的分组原则,即在常规染色条件下,依据染色体从大到小和着丝粒的位置等形态学特征,将 46 条分为 22 对常染色体 (分为 7 组) 和 1 对性染色体。具体分组如下: A 组,1~3 号 3 对中或亚中着丝粒染色体; B 组,4~5 号 2 对亚中着丝粒染色体; C 组,6~12 号 7 对亚中着丝粒染色体; D 组,13~15 号 3 对端着丝粒染色体; E 组,16~18 号 3 对亚中着丝粒染色体; F 组,19~20 号 2 对中着丝粒染色体; G 组,21~22 号 2 对端着丝粒染色体。由于 X 和 Y 染色体在常规染色条件下分别与 C 组和 G 组染色体在形态上没有明显区别,通常将 X 染色体列入 C 组计数, Y 染色体列入 G 组计数。

A.2 染色体结构畸变的主要类型

A.2.1 非稳定性染色体畸变

包括 ace(f, min, ar)、dic 和 r。ace 在细胞分裂时由于未附着于纺锤丝往往丢失; 而 dic 如果两个着丝粒之间的节段相互平行, 两个单体可正常地分开, 但当两个着丝粒之间有一定距离时, 则易发生扭曲, 或如果两个着丝粒分别被纺锤丝拉向相反两极, 其结果发生不分离, 或者导致染色体桥的形成, 桥在分裂后期被拉断, 从而使其遗传物质在细胞分裂过程中分配不均匀, 造成子细胞遗传物质的不平衡, 使其不能继续存活而导致细胞死亡; r 由于几何学上的原因, 在细胞分裂时被丢失。

A.2.2 稳定性染色体畸变

包括 t、inv、del 等。t 和 inv 虽然引起染色体片段发生位置改变, 但遗传物质没有变化, 仍保留基因的总数。在细胞分裂过程中, 没有力学上的障碍, 在子细胞中能保持相对恒定而继续保留下来。

A.3 常见的染色体型畸变的主要类型

A.3.1 无着丝粒断片 (fragment, f): 染色体末端缺失部分形成的一对平行的无着丝粒染色单体。留下带有着丝粒的片段形成末端缺失的染色体 (deletion, del)。

A.3.2 等点染色单体断裂或染色体断裂 (isochromatid break or chromosomal break, csb): 2 条染色单体在相同的位置发生断裂, 断裂的远端部分发生了位置移动, 且断裂的宽度超过染色单体的横径, 形成染色体末端缺失和染色体断片。

A.3.3 微小体 (minute, min): 典型的微小体为一对圆形的染色质球, 比无着丝粒断片小。是染色体臂内发生两次断裂, 形成三个片段, 两个断裂之间的片段离开原位形成微小体, 余留的两个断端在断面直接连接形成中间缺失染色体。

A.3.4 无着丝粒环 (acentric ring, ar): 一对环形无着丝粒的染色单体。它和微小体其实是一种畸变类型, 两者的区别仅在断裂点之间的距离不同。无着丝粒环断裂点间的距离较大, 所以形成一对空心圆或中央略凹陷。

A.3.5 着丝粒环 (centric ring, r): 一对带有着丝粒的环形染色单体。在染色体长、短臂各发生一次断

裂后,带有着丝粒的片段两端断面重新连接形成环状染色体,两个无着丝粒片段连接成一个断片。所以计数染色体畸变时,着丝粒环加断片计为一个染色体畸变。着丝粒环和无着丝粒环的区别是,前者带有着丝粒,并伴有一个断片。

A. 3.6 双着丝粒体和多着丝粒体(dicentrics and polycentric, dic and pic):具有两个或两个以上着丝粒的染色体称为双着丝粒或多着丝粒染色体,为不对称互换。两条或两条以上染色体各发生一次断裂后,具有着丝粒的部分连接形成双着丝粒体或多着丝粒体,而无着丝粒断片连接形成断片。计数染色体畸变时,双着丝粒体也伴随一个断片,计为一个畸变;如果为多着丝粒体(如有 n 个着丝粒),则应换算成 $n-1$ 个双着丝粒体,并伴有 $n-1$ 个断片。

A. 3.7 相互易位(reciprocal translocation, t):两条染色体各发生一次断裂,并相互交换其无着丝粒片段,形成两个结构重排的染色体。如果交换长度是对称性的,也称为对称互换。如果互换的片段大小相差悬殊,则结构重排的两个染色体的形态会发生明显变化,其中一个明显变长,另一个变短,称为非对称互换,可在常规染色条件下识别到。

A. 3.8 倒位(inversion, inv):一条染色体发生两次断裂,形成上、中、下三个片段,中段上下颠倒后与上下两段连接,形成倒位染色体。如果断裂处发生在着丝粒两侧,则为臂间倒位(pericentric inversion);两个断裂如发生在着丝粒一侧(长臂或短臂),形成的倒位为臂内倒位(paracentric inversion)。前者如果两个断裂点与着丝粒之间的距离不等,因着丝粒的位置发生改变,可在非显带标本上识别到。

A. 3.9 由于电离辐射可以诱发上述几种染色体型畸变,所以这些畸变是评价电离辐射所致染色体结构异常的主要观察指标。

A. 4 常见的染色单体型畸变的主要类型

A. 4.1 染色单体断裂(chromatid break, ctb):一条染色单体发生断裂,且远端部分离开了原来的位置,形成染色单体缺失和染色单体断片。

A. 4.2 染色单体互换(chromatid exchange, cte):两条或两条以上的染色单体断裂后,染色单体的断裂端互换重接后形成的染色体,如四射体(tr)和四射体(qr)等。互换可以发生在不同染色体的染色单体间,称为间互换;也可以发生在一条染色体的染色单体间或染色体内,为内互换。

A. 4.3 裂隙(gap, g):一条染色单体上的非染色区(非染色质裂隙)的染色单体出现轻微的错排,光镜下显示为很小的裂缝,其宽度不超过染色单体横径。裂隙又分为染色单体裂隙(chromatid gap, ctg)和等点染色单体裂隙或染色体裂隙(chromosome gap, csg)。

A. 4.4 由于物理、化学和生物因素均能诱发染色单体型畸变,而且人体受到电离辐射照射后从外周血淋巴细胞观察到的染色单体型畸变与受照剂量无直接关系,所以染色单体型畸变一般不作为评价电离辐射损伤的观察指标。

A. 5 常见的数目异常(内复制, endoreduplication)

两次细胞分裂之间染色体不是复制一次而是两次,形成的包含 4 条姐妹染色单体的异常染色体,称为内复制。

A. 6 染色体畸变的鉴别分析方法

A. 6.1 染色体断裂(csb)与染色体裂隙(g)的区别

g 是染色单体上未染色的部分,藕断丝连仍有染色体的形态特征,且裂缝的宽度不超过染色单体的横径。

A.6.2 染色体早分离

着丝粒位置不明显的染色体,长度符合某条缺少的染色体,尤其是在观察到形似较大的断片时,要分析是从哪一号染色体上断下的,不能确定来源时,则可能是染色体早分离,不能计为无着丝粒断片。

A.6.3 杂质

形态不规则,大小不成对,染色过深或过浅,则可能是杂质,不能计为微小体或无着丝粒断片。

A.6.4 染色单体交叉

交叉部分比着丝粒染色深,其长度正好符合某条缺少的染色体长度,且未观察到伴随的无着丝粒断片,则应排除为双着丝粒体。

A.6.5 染色单体末端接触或随体相吸

长度正好符合某条缺少的染色体,近端或端部着丝粒染色体(如D组、G组和Y染色体)的数目正常。不具备形成双着丝粒在染色体数量上的条件,则排除双着丝粒体。

A.6.6 两条染色体的末端相接触

通过调节显微镜的微调旋钮,经仔细辨认后可能有接触点,但相接触的两条染色体形态正好符合缺少的染色体,没有伴随断片,应考虑排除双着丝粒体。

A.6.7 次缢痕

在放射工作人员体检的一些个体中,有些染色体的臂上可能有一种次缢痕区,如1号染色体长臂、2号染色体长臂远心端1/3处、3号染色体长臂接近着丝粒处、9号染色体长臂近心处、16号染色体长臂近心处,是这些个体染色体本身的特征性标志或变异,应将这种次缢痕与着丝粒区分开来,可考虑排除为双着丝粒体。

A.6.8 等点染色单体裂隙

裂隙区无缢痕收缩现象,仔细分析是哪条染色体,通过计数着丝粒数则可排除是否为双着丝粒体。

A.6.9 染色单体扭曲

扭曲区无缢痕和浅染现象,仔细分析是哪号染色体,通过计数染色体着丝粒数,则可排除是否为双着丝粒体。

附录 B

(资料性附录)

外周血淋巴细胞染色体畸变分析记录表和报告单

B.1 外周血淋巴细胞染色体畸变分析记录表

见表 B.1。

表 B.1 外周血淋巴细胞染色体畸变分析记录表

第 页, 共 页

受检者编号: _____
 染色体检查方法: _____ 分析细胞数量: _____
 载玻片编号: _____ 显微镜编号: _____

检测单位: _____
 分析人: _____ 复核人: _____
 检测日期: 年 月 日 复核日期: 年 月 日

填表说明:

- 用图示法或与命名法相结合填写染色体畸变细胞所在的纵横坐标刻度数值、畸变类型和数量。例如: 6. 6/136. 5;
1 个畸变仅记符号, 2 个或以上将数目记在符号前面, 如: ace 或 3 ace。
- 填写 N (Normal) 表示未见染色体畸变的中期细胞。
- 如果在一个视野中有多个中期分裂相, 还应画出在低倍镜下的镜像, 以便复核。

B.2 外周血淋巴细胞染色体畸变检测报告单

见表 B.2。

表 B.2 外周血淋巴细胞染色体畸变检测报告单

姓名		性别		年龄		岁
工种		工龄				年
检测方法： 微量全血培养。						
结果：						
染色体畸变率(%)：		染色体畸变细胞率(%)：				
畸变类型及数量(个)：						
dic		r		r ₀		ace
t		inv				
结果评价：						
检测日期： 年 月 日 报告日期： 年 月 日 分析人： 年 月 日 复核人： 年 月 日						

附录 C

(资料性附录)

染色体畸变检测的实验室条件和试剂配制

C.1 染色体畸变检测实验室

- C.1.1 普通实验室:用于实验的前期准备、试剂的配制、染色体制片,面积 $10\text{ m}^2 \sim 20\text{ m}^2$,配置超净工作台、普通水平离心机、恒温培养箱、冰箱、试剂柜、温箱或水浴锅(箱)等。
- C.1.2 洗刷消毒室:用于洗刷实验用品,要有良好的上下水装置,配置电热烤箱、高压灭菌锅、酸缸等。
- C.1.3 染色体畸变分析室:用于染色体畸变分析,配置光学显微镜、细胞遗传工作站等。

C.2 染色体畸变检测所需的仪器设备和用品

- C.2.1 超净工作台:首选双人双面、垂直送风。
- C.2.2 恒温培养箱:选择适宜于细胞培养的隔水式恒温培养箱,二氧化碳培养箱更佳。
- C.2.3 离心机:可放置 10 mL 离心管的水平式普通离心机。
- C.2.4 光学显微镜:有自带电源和标尺,油镜清晰(100 倍),配有数码照相机更佳。教学用显微镜更便于实验人员同时观察辨认染色体畸变。
- C.2.5 灭菌设备:干热灭菌或湿热灭菌所需的电热箱(有空气强制对流装置)或热压蒸汽灭菌器。
- C.2.6 冰箱: $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 低温冰箱(用于贮存配好的试剂和血清)和 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 普通冰箱(用于贮存近期所需的实验用试剂)。
- C.2.7 液体混合器:用于配制培养液和试剂时搅拌。
- C.2.8 水浴锅(箱):用于染色体的低渗及最后温片滴片等。
- C.2.9 细胞培养瓶:可多次使用的无菌玻璃培养瓶(可用 10 mL 圆柱状青霉素瓶替代)或一次性塑料培养瓶。
- C.2.10 其他物品:尖底刻度离心管(10 mL)、吸管、载玻片、锥形瓶(1 000 mL)、量筒、烧杯、酒精灯和记号笔等。

C.3 染色体畸变检测相关试剂的配制(化学试剂使用分析纯及其以上级别试剂)

C.3.1 肝素钠的配制

称取肝素钠 0.4 g,加入生理盐水至 100 mL,即成为 560 IU/mL 的肝素钠工作液。121 kPa、25 min 高压灭菌消毒,冷冻保存可长期使用。

C.3.2 RPMI-1640 细胞培养液的配制

- C.3.2.1 取市场购买的 RPMI-1640 培养基粉一袋(10.4 g),倒入 1 000 mL 烧杯中,缓慢加入三蒸水至 950 mL,边加入边搅拌,然后放在磁力搅拌器上搅拌约 30 min 以上(不能加热),使之完全溶解。
- C.3.2.2 加入无水碳酸氢钠(NaHCO_3)1.3 g 调整酸碱度, $\text{pH}7.0 \sim 7.2$ 。
- C.3.2.3 加入终浓度为 100 IU/mL 的庆大霉素,或加 100 U/mL 的青霉素和 100 mg/mL 的链霉素。或者如有条件优良的无菌实验室,并注意无菌操作,可不加抗生素。

C.3.2.4 加入谷氨酰胺 0.3 g,肝素钠工作液 8 mL。

C.3.2.5 用 1 000 mL 容量瓶进行定容,在无菌室内的超净工作台上用微孔滤膜(0.22 μm)滤器抽滤灭菌。

C.3.2.6 在超净工作台内加入用无菌生理盐水稀释后的 PHA(培养液内的终浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ~200 $\mu\text{g}/\text{mL}$)和 250 mL 的胎牛或新生牛血清,混匀后分装于培养瓶内,每瓶 5 mL 培养液,封口置于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。

C.3.3 秋水仙碱溶液的配制

称取秋水仙碱 0.05 g,溶于 50 mL 生理盐水中,配成浓度为 1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的液体;从中取出 10 mL 加入 90 mL 的生理盐水,即为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的贮存液;取贮存液 10 mL 加入 90 mL 的生理盐水,即为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的秋水仙碱工作液。在超净台内用微孔滤膜(0.22 μm)滤器过滤,分装在经高压灭菌的玻璃瓶内封口, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存,备用。

C.3.4 低渗液氯化钾(KCl)的配制

称取氯化钾 5.59 g,放入 1 000 mL 烧杯中,加双蒸水约 500 mL 使其充分溶解,1 000 mL 容量瓶中定容,配制成浓度为 0.075 mol/L 氯化钾工作液,常温保存备用。

C.3.5 固定液的配制

取甲醇 3 份、冰乙酸 1 份,配成体积比 3:1(体积分数)的固定液。固定液需在用前新鲜配制。

C.3.6 磷酸缓冲液的配制

C.3.6.1 甲溶液为 1/15 mol/L 磷酸氢二钠(Na_2HPO_4)溶液:称取磷酸氢二钠(Na_2HPO_4)9.410 g(如果是带 2 个水分子的 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$,称取 11.876 g;如果是带 12 个水分子的 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$,则称取 23.87 g),放入 1 000 mL 烧杯中,加双蒸水约 500 mL 使其充分溶解,1 000 mL 容量瓶中定容,配制成浓度为 1/15 mol/L 的磷酸氢二钠工作液,常温保存备用。

C.3.6.2 乙溶液为 1/15 mol/L 磷酸二氢钾(KH_2PO_4)溶液:称取磷酸二氢钾(KH_2PO_4)9.078 g,放入 1 000 mL 烧杯中,加双蒸水约 500 mL 使其充分溶解,1 000 mL 容量瓶中定容,配制成浓度为 1/15 mol/L 的磷酸二氢钾工作液,常温保存备用。

C.3.6.3 磷酸缓冲液的配置:由于人类的染色质偏于碱性,故将磷酸缓冲液配成弱酸性染色效果好。以下几种配制方法均可使用:

- 取甲溶液 62.0 mL、乙溶液 38.0 mL,混匀即配成 100 mL,pH 为 7.0;
- 取甲溶液 50.0 mL、乙溶液 50.0 mL,混匀即配成 100 mL,pH 为 6.8;
- 取甲溶液 37.0 mL、乙溶液 63.0 mL,混匀即配成 100 mL,pH 为 6.6。

C.3.7 吉姆萨(Giemsa)染液的配制

C.3.7.1 吉姆萨(Giemsa)原液的配制:吉姆萨(Giemsa)染料粉 1 g,甘油 50 mL,甲醇 50 mL。

方法 1:先将吉姆萨(Giemsa)粉加少许甘油用研钵充分研磨,逐步加入余下的甘油,置于 $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴 2 h,并不断研磨搅匀使其充分溶解。冷却后加入 50 mL 甲醇混匀。置带盖的瓶子中,室温密封放置 2 周(期间经常摇动瓶子,使染料溶解的更好),用定性滤纸(或普通粗滤纸)过滤即可使用。

方法 2:将吉姆萨(Giemsa)粉 1 g,边研磨边加足甘油(50 mL),室温下放置 2 d 左右,期间要经常将其搅匀,然后加入 50 mL 甲醇搅匀,室温密封放置 2 周,经过滤即可使用。

注:吉姆萨(Giemsa)原液放置越久,染色效果越好。

C.3.7.2 吉姆萨(Giemsa)工作液的配制:吉姆萨原液 1 mL,pH6.8 的磷酸缓冲液 9 mL,混匀。

注:吉姆萨(Giemsa)染料的质量有所差异,故工作液的稀释比例应根据实际情况来定。

C.4 染色体畸变检测的前期准备

C.4.1 配制的培养液中没有肝素时,静脉血需肝素抗凝。不能立即进行细胞培养时,可将抗凝血保存于4℃冰箱或放在冰盒中运输,但时间不超过48 h,或置于不加PHA的培养液中4℃保存或运输,可保存数日。

C.4.2 实验前细胞培养实验室和超净工作台需经紫外线消毒,消毒时间不低于1 h。关掉紫外线灯后再用酒精棉球全面擦拭超净台内工作面。

C.4.3 消毒灭菌的实验物品夏季可保存7 d,冬季10 d,过时需重新消毒。

C.4.4 每半年清洁消毒电热恒温细胞培养箱一次。

C.4.5 玻璃器皿适于干热灭菌(180℃、2 h),试剂适于湿热(121 kPa、25 min)或抽滤灭菌。

C.4.6 新的载玻片使用前需用清洁液浸泡3 h,自来水清洗干净,蒸馏水浸泡备用。