

染色体制备及核型分析室内质控及其考评标准的探讨

翁炳煊 任宇珂 朱瑞建 李文静 沈敏 卢欢明 孙亚莉 潘玲 徐晨明

(浙江大学医学院附属妇产科医院 浙江省产前诊断中心, 浙江 杭州 310006)

【中图分类号】 R-331 【文献标识码】 A

近年来,染色体核型分析已作为惟一的染色体病确诊实验项目而广泛应用于临床及产前细胞遗传学诊断。作为临床实验项目,均应有规范的实验室质量控制方法^[1-5]。室内质控是实验室质量控制的关键环节,是开展和做好室间质评的前提和保障。但该项目的室内质量控制方法至今尚未见国内外文献报道。本文参考相关文献^[6-8],结合国内外有关染色体分析室间质评的文献报道^[9-13],对该项目的室内质控方法提出探讨,以提高染色体制备及核型分析的质量。

1 标本采集与接种的室内质量控制

1.1 抗凝剂用量的控制 肝素过量会产生溶血或抑制淋巴细胞的转化和分裂,肝素过少会使血液凝固,两者均可使染色体分裂象减少。应以0.1 ml 肝素(125 μ /ml)润湿注射器抽取1 ml 静脉血为标准,为除去抗凝血浆中肝素对淋巴细胞生长的影响,可采用离心沉淀法或自然下沉法相对集中、分离淋巴细胞接种。

1.2 无菌操作过程的室内质控 在标本采集与细胞培养过程中必须严格无菌操作,吸取过培养液的吸管不能再用火焰烧灼,以防止残留在吸管中的培养液焦化,将有害物质带入培养液中。火焰消毒后的器材需适当冷却后使用,以免烫死细胞。如果在镜检或肉眼观察中发现培养液混浊,疑有细菌时,可取少量培养物离心后,沉淀物涂片用革兰染色油镜

检查,判断有无细菌,可据细菌鉴定及药敏试验选择抗生素加入到培养基中,以有效抑制细菌生长。

1.3 影响淋巴细胞生长的因素 被检标本中含有过高的免疫抑制剂、成人尤其是新生儿严重黄疸、高胆红素血症、严重溶血、败血症、细胞免疫水平低下、长期接受放疗化疗、服用其他不利于细胞生长的药物或食物等均会影响细胞生长,使染色体分裂象减少。此类病例标本可相对分离淋巴细胞并以无菌生理盐水洗涤后接种。

1.4 标本接种与处理过程的室内质控 外周血或脐血标本可根据白细胞数绝对含量多少决定接种血液量,有条件者可分离淋巴细胞后接种培养,或将采血针筒的针尖向上,倒置于37 $^{\circ}$ C数小时,待细胞自然下沉后,挤掉含有不利于淋巴细胞生长的肝素、免疫抑制剂等的上层血浆,或经离心后再把红细胞表面灰白色的白细胞层吸入培养基中培养。如为陈旧性出血的羊水标本,应用液体培养基清洗沉淀细胞数次后接种,大量新鲜出血或穿刺性出血的羊水标本,应去除部分离心沉淀的细胞中的下层红细胞后接种培养。

2 细胞培养过程的室内质量控制

2.1 培养基质量控制

2.1.1 标准细胞生长试验 每批培养基使用前及保存过程定期作标准细胞培养试验,并作培养物目的细胞(各类可制作出染色体的细胞)计数,以检查培养基的质量。方法是根据培养物细胞浓度,用培养基或生理盐水稀释后或直接滴加培养物细胞悬液到白细胞计数池中计数,或按全自动血细胞计数仪

计数。以目的细胞计数值为纵坐标,以培养基批号或质控时间为横坐标,连接各点,绘制直观的室内质控图,对比质控图上历次相同条件下目的细胞计数值的偏离情况,发现目的细胞计数值偏低者(可绘制成 Levey-Jennings、Westgard 等临床检验常用的质控图并按其常规处理方法处理),说明培养基质量不符合要求,需及时做出处理。

2.1.2 无菌试验 ①新批次培养基、培养瓶、注射器等无菌器材要做无菌试验,或在使用过程中定期做无菌培养试验,方法是用羊水细胞的处理、接种和培养:用注射器吸取培养基放入培养瓶中培养,观察培养基有无变混浊,并做细菌培养鉴定,如有细菌生长,应弃用污染的器材;②无菌室及培养箱内定期作空气及物表细菌培养试验,记录菌落数,并作细菌鉴定和药敏试验,掌握本室在不同季节、不同条件下可能发生的常见污染菌及其敏感的抗生素,制定污染预防措施。

2.2 细胞培养条件的室内质控 若温度、湿度及 CO₂ 浓度不适宜、培养基营养不良,则会使细胞生长不良、染色体分裂象少、小、短、着色不良。应作恒定或定期监测、记录。

2.2.1 培养箱温度 细胞生长以(37±0.5)℃为佳,除了每天观察培养箱指示温度外,还应在培养箱内放置温度计或控温仪定时观察与记录结果,以确保培养箱的指示温度与培养箱内的实际温度一致,从而确保细胞在实际的温度下良好生长。

2.2.2 PHA 质量 PHA 失效或含量不足会影响淋巴细胞转化为淋巴母细胞,从而影响淋巴细胞生长;反之若 PHA 过量,则细胞凝聚,同样影响淋巴细胞生长,使染色体分裂象减少。

2.2.3 培养液的酸碱度 在培养箱内通入 5% CO₂ 以维持不密封培养液的 pH 值稳定,CO₂ 浓度过高会使 pH 值太低,反之则 pH 值升高,两者均会影响细胞生长,如果不在培养箱内通入 CO₂,则必须盖紧瓶盖,使培养液处于密封状态,以防 CO₂ 逸出而致 pH 值改变,如果此时培养液酸化较严重(培养液呈黄色),将不利于细胞生长,可加入 2~3 ml 新鲜培养液来校正。所用的培养瓶以具有可透过二氧化碳、水蒸汽等细胞生长所必需的小分子、但不易透

过分子较大的细胞的瓶盖较好,以使细胞在相对防污染的条件下培养。

3 染色体制片的室内质控

3.1 秋水仙素质量与用量的影响 其作用是使细胞在增殖、分裂过程中停留在适合于染色体分析的中期,其质量低劣、配制的浓度不足、作用的时间不够就会使染色体分裂象细长、形态不佳、分裂象减少;其浓度过高或作用时间过长,虽会增多分裂象,但染色体过于浓缩短小,难辨带纹,难以分析。在绒毛组织培养染色体制度备中,应据收获时生长细胞的数量加大秋水仙素用量。

3.2 低渗液质量与作用程度的影响 低渗时间长、温度高、低渗液浓度偏低会使染色体过度分散丢失,分裂象减少或不完整;反之染色体分散不佳,呈团块状或留有细胞浆背景,如因低渗不足致染色体分散不良,可加大冰醋酸在固定液内的比例,再固定一次,以改善染色体分散程度。

3.3 离心速度与时间的影响 离心速度过低,细胞或染色体难以沉淀而丢失;离心速度过高、时间过长,可使胞膜过早破裂致染色体过度分散丢失,或使染色体成堆粘连无法分析,使分散良好的分裂象减少。

3.4 固定液质量及用量的室内质控 固定液不新鲜、质量不合格、配制不准确,则染色体模糊、带纹不清,染色体周围有细胞浆背景;若增加更换固定液次数和延长固定时间(冰箱过夜次日固定)效果较好。预固定时加入固定液过多,或低渗不充分会造成残留的核质过多,影响染色体的展开和染色体显带的质量。若固定时,加入固定液的速度太快、混匀太快则会使固定作用过强,染色体扭转;固定液作用不足会使染色体出现毛刷状,因此固定液纯度要高,临用时新配,应沿管壁慢慢加入固定液后彻底打匀。

3.5 其他操作与条件的室内质控 吹打无力则细胞成团,用力过猛则细胞膜早破,染色体分散丢失,但刚加低渗液后要以能混匀沉淀细胞凝块为标准,可以用力吹打,在低渗开始后,吹打必须很轻慢,尤其是羊水细胞,经低渗后,在预固定、固定等步骤中,最好以吹气泡或手指轻击离心管底部的方法,使羊

水细胞团块均匀散开,这可使分裂象中染色体不丢失,亦可使分裂象不黏附在管壁上。在羊水细胞染色体制备过程中,若室温超过 30℃ 时会使染色体丢失,若室温控制在 25℃ 以下,可获得良好的效果。滴片时滴加沉淀细胞悬液的量一般为 2~3 滴(根据沉淀细胞的量决定),否则细胞核染色体分裂象会流失减少。滴片后应立即使全片在酒精灯外焰通过 10 个来回,每个来回约 1 秒钟,然后置 37℃ 2~3 天后或 75~80℃ 3 小时后,每次以固定时间显带。标本保存时间(片龄)越长对胰酶消化抵抗力越强,片龄超过 20 天者甚至不显带纹。

3.6 试剂与器材的室内质控 各种试剂严格按操作过程配制,尤其是胰酶要在有效期内使用,用前校正 pH7.2,此为胰酶作用的最适 pH,活性最强,并严防酸碱、细菌及重金属离子等污染,以免胰酶失活。胰酶可用 Hanks 液、0.02% EDTA、生理盐水或蒸馏水配制成所需浓度后使用,Hanks 液为缓冲液,有稳定 pH 作用,生理盐水中的 Na⁺ 有激活胰酶活性的作用,为了防止重金属离子污染使胰酶失活,可选用 0.02% EDTA 溶液配制,EDTA 是一种化学螯合剂,能与重金属离子结合而形成螯合物,从而保持胰酶稳定,所以在 Hanks 液中加入 EDTA 使终浓度为 0.02%,加入 NaCl 使 Na⁺ 终浓度为 0.9% 后配制胰酶消化液,显带效果较好,用浓度低的胰酶和延长显带处理时间,对较细的亚带显带效果较好。所用载玻片要清洁,有酸碱、油脂、冷却不够活未达玻片表面浮霜均会影响细胞铺开,从而使细胞及染色体分裂象流失、分散不均匀、或有油泡等。

3.7 染色体显带及染色过程的室内质控 甘油要用分析纯,甲醇要用无水分析纯(AR 纯)或优级纯(GR 纯),染料粉末要在甘油中充分研磨后加热完全溶解,染色体原液要密封避光防氧化保存 3 个月以上使用,且保存时间越长越好,缓冲液 pH 值及离子强度要准确,否则会影响染色,胰酶显带后,在加染色液前须冲洗干净,否则残留的胰酶会在染色过程中起作用,使染色体消化过度而呈现相应的形态,或呈现带纹不清、肿胀及小空泡状,影响染色效果。此外,固定、低渗、培养条件及细胞生长周期等均会影响染色效果。

4 羊水细胞培养染色体制备结果的质量评估

4.1 细胞培养质量评估 通常情况下,羊水细胞按常规培养 7 天,换液后再培养 1 天左右,然后在低倍镜下观察结果,按以下标准判断培养质量。对于达不到下列要求者,应继续培养,否则会致染色体制片失败。

优:在两培养瓶中贴壁生长细胞的面积至少达 50 个满低倍视野,细胞生长密度达 85%~95%,其中小圆形细胞占 50% 以上。

良:在两培养瓶中贴壁生长细胞的面积至少达 30 个满低倍视野,细胞生长密度达 85%~95%,其中小圆形细胞占 30% 以上。

合格:在两培养瓶中贴壁生长细胞的面积至少达 10 个满低倍视野,细胞生长密度达 85%~95%,其中小圆形细胞占 10% 以上。

不合格:在两培养瓶中贴壁生长细胞的面积不到 10 个满低倍视野,细胞生长密度稀疏,几乎无小圆形细胞。

4.2 染色体制片质量评估 按常规方法制片,每个培养瓶中的细胞可先制 2 张片(余下细胞保留备用),然后按以下标准判断制片质量(包括从培养、细胞收集、低渗、固定、烤片等的各个环节),其中以下所指的可分析分裂象是指一个分裂象中染色体数目为 46 条,染色体基本无重叠、无交叉,分散均匀,染紫红色,长短适中,能看清显带染色体的结构异常;可计数分裂象是指能计数染色体数目。

优:显带后每片中可见 30 个以上可分析分裂象,有较多的可计数分裂象。

良:显带后每片中可见 15 个以上可分析分裂象,有较多的可计数分裂象。

合格:显带后每片中可见 3~5 个以上可分析分裂象,可计数分裂象达 10 个以上。

不合格:看完全部经显带的原代和传代羊水细胞片,其中可分析分裂象不到 5 个,可计数分裂象不到 30 个,无法作出报告。

4.3 染色体显带质量评估 优:在可分析分裂象中,可清晰辨认出 50% 以上的 16q 2 条带纹,可清晰辨认出几乎所有的 10q 3 条带纹,其他染色体显带

清晰。

合格:在可分析分裂象中,可清晰辨认出70%以上的10q3条带纹,可辨认出部分16q的2条带纹及其他染色体的主要带纹。

不合格:看完所有片子,找不到5个分带清晰的分裂象,无法作出报告。

5 外周血染色体分析室内质量评估

5.1 细胞培养考评标准 细胞培养的质量是制片质量的基础,可用淋巴细胞转化检查来考评细胞培养质量。具体方法是取1滴细胞培养液与载玻片上,制成推片,干燥后用吉姆萨染色,油镜下见比小淋巴细胞大3倍以上,并可呈染色体分散状的分裂象的大淋巴细胞即为淋巴母细胞,根据油镜下见到的所有淋巴母细胞占白细胞的百分比数来计算淋巴母细胞转化率。

优良或合格:在涂片均匀、基本无细胞重叠的细胞片中,平均每个油镜视野中淋巴母细胞达3~5个,转化率达30%,或根据细胞培养液体积、细胞计数及转化率算出淋巴母细胞绝对值,用其绝对值来考评。

不合格:大淋巴母细胞较少、较小,多数为小型淋巴细胞,并且分裂象很少或未见到分裂象,所见到的分裂细胞小,其中染色体密集不散开,或淋巴母细胞转化率小于30%。

5.2 制片与显带 优良:几乎每个低倍视野均可找到1个以上可分析分裂象,染色良好,分带清晰,10q的3条带纹清晰易分辨,能辨认出每条染色体的细微结构,能分别辨认出16p及16q的1条及2条带纹。

合格:在所有血片中,至少能找到20个可分析分裂象,10q的3条带纹清晰易辨,能辨认出每条染

色体的细微结构。

不合格:达不到合格标准,无法完成报告。

参 考 文 献

- [1] 杨振华. 实验室认可和认可标准, 临床实验室质量管理[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2003. 132-137.
- [2] 丛玉隆. 临床实验室分析前质量管理及对策[J]. 中华检验医学杂志, 2003, 27(8): 483-487.
- [3] 申子瑜. 临床实验室管理概论, 医院管理学临床实验室管理分册[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2003. 1-14.
- [4] 楼慧萍. 谈检验科的全面质量管理[J]. 中华医院管理学杂志, 2003, 19(5): 276-278.
- [5] 雷志勇, 郑静晨, 王发强, 等. 目前医疗质量管理中的问题与对策[J]. 中华医院管理学杂志, 2000, 16(10): 604-605.
- [6] 刘权章. 人类染色体方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1992. 1-292.
- [7] 蔡文琴. 现代实用细胞与分子生物学试验技术[M]. 北京: 人民军医出版社, 2003. 3-8.
- [8] 章静波. 细胞生物实用方法与技术 [M]. 北京: 北京医科大学中国协和医院和医科大学联合出版, 1995. 1-37.
- [9] 翁炳焕, 蔡剑平, 王绪敏, 等. 染色体异常核型淋巴细胞建系及其在染色体分析室间质评中的应用[J]. 中华医学遗传学杂志, 2007, 24(6): 689-691.
- [10] 翁炳焕, 任宇珂, 吕时铭. 产前诊断中染色体核型分析的质量控制[J]. 中华医院管理学杂志, 2008, 24(3): 216-217.
- [11] Binghuan Weng, Xiao Li. An external quality assessment scheme for prenatal detection of rare chromosomal abnormalities[J]. Clinica Chimica Acta, 2012, 413: 1721-1724.
- [12] 翁炳焕, 黄荷凤, 贺晶, 等. 我国产前诊断学科建设的现状与展望[J]. 中国产前诊断杂志(电子版), 2012, 4(4): 22-25.
- [13] 翁炳焕. 染色体异常核型图像库在染色体分析室间质评中的应用[J]. 中国产前诊断杂志(电子版), 2013, 5(1): 11-15.

编辑: 宋文颖

(收稿日期: 2013-04-22)