

液经过第三代和第四代试剂进行检测后,两代试剂均存在假阳性反应和假阴性反应。而第四代试剂的检测结果明显优于第三代试剂($P < 0.05$),见表 3、4。

表 1 2008~2011 年献血者艾滋病预防知识的知晓率

年份	有效调查人数	知晓人数	知晓率(%)
2008	1 357	687	50.62
2009	1 486	1 094	73.62
2010	1 677	1 375	81.99
2011	1 796	1 713	95.38

表 2 2008~2011 年献血者 HIV 筛查与确认结果

年份	检测标本	筛查结果	确认 HIV	HIV 阳性率
	数量	有反应性	感染	(%)
2008	7 649	17	10	0.13
2009	9 042	6	5	0.06
2010	10 746	12	11	0.10
2011	13 938	11	9	0.06

表 3 2008~2011 年献血者血液不同试剂筛查结果比较

年份	检测标本	第三代试剂	第四代试剂	两代试剂均
	数量	有反应性	有反应性	有反应性
2008	7 649	13	16	12
2009	9 042	5	6	5
2010	10 746	10	12	10
2011	13 938	10	11	10

表 4 2008~2011 年献血者血液 HIV 筛查与确认结果的比较

年份	第三代试剂		第四代试剂	
	筛查结果 有反应性	确认 HIV 感染	筛查结果 有反应性	确认 HIV 感染
2008	13	9	16	9
2009	5	4	6	5
2010	10	9	12	11
2011	10	9	11	9

3 讨论

HIV 检测的常规方法是检测血浆或者血清中存在的 HIV 抗体。第三代试剂即是对 HIV 抗体的检测,第三代试剂的应用,有效地减少了 HIV 的经血传播感染率。但是 HIV 抗体的检测也存在一定的局限性,许多 HIV 感染者血液中 HIV 抗体的含量要在感染 6 个月后才能被检测到^[2-3]。因此,使得 HIV 检测存在很长时间的窗口期,易导致窗口期感染的发生。而第四代试剂是 HIV 抗体和 p24 抗原的联合检测,通过对 p24 抗原的检测,可以有效地缩短 HIV 检测的窗口期。但是第四代试剂同样也存在着假阳性或者假阴性的结果。因此,为了更加有效地增加血液 HIV 复查的准确性,最佳的检测方式是在初检和复检过程中分别采用第三代和第四代试剂,以增加 HIV 的筛查检出率^[4-5]。同时,积极宣传艾滋病的预防措施以和安全输血的知识,可以有效地减少具有危险因素的人员参加献血,从而有效地降低了献血员中 HIV 的感染率,提高了血液的安全。

综上所述,通过积极宣传艾滋病的预防措施和安全输血知识的同时,联合使用第三代和第四代试剂,可以有效缩短 HIV 检测的窗口期,有效提高输血安全,值得广泛推广。

参考文献

[1] 蒋天伦,黎儒青,李兵,等. HIV 经输血传播的防范与献血跟踪策略[J]. 重庆医学,2006,35(11):989-990.

[2] 许四宏,李秀华,宋爱京,等. 第 4 代 HIV 抗原抗体联合检测试剂的评价[J]. 中国输血杂志,2006,19(3):188-191.

[3] 何亚琴,谢卫红,何明祯,等. 第 4 代艾滋病病毒检测试剂在血液筛查中的应用分析[J]. 临床血液学杂志:输血与检验版,2012,25(5):661-662.

[4] 蔡明翠,赵世能,罗传杰,等. 通过加强安全输血措施有效遏制艾滋病的传播[J]. 临床血液学杂志:输血与检验版,2011,24(1):90-92.

[5] 彭碧芳. 输血前人群 HIV 感染检测情况分析[J]. 航空航天医学杂志,2012,23(9):1058-1060.

(收稿日期:2012-09-02 修回日期:2012-11-28)

人外周血淋巴细胞培养 染色体制备及影响因素

侯艳香(山西医科大学汾阳学院,山西汾阳 032200)

【摘要】 目的 熟悉人外周血淋巴细胞的短期培养方法,掌握染色体的制备技术。**方法** 以人外周血为材料,采用 RPMI 1640 全培养基进行体外淋巴细胞培养,对采血后细胞培养时间、秋水仙碱浓度、固定液的配制时间、滴片距离及烤片温度等影响因素进行分析。**结果** 建立了较成熟的淋巴细胞体外培养方法及染色体制作技术。**结论** 该方法具有取材便利、用血量少、培养简单等优点,故在临床上得到广泛应用。

【关键词】 人外周血淋巴细胞培养; 染色体制备; 影响因素

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2013.07.060 文献标志码:B 文章编号:1672-9455(2013)07-0874-02

研究发现,植物血凝素(PHA)能促使淋巴细胞转化为原淋巴细胞,重新进入增殖周期进行有丝分裂;当体外培养 72 h 左右后,大多数淋巴细胞已处于第二增殖周期内;在培养终止

前数小时,加入适量秋水仙碱,可使许多分裂细胞停止在中期。经低渗处理使红细胞及分裂细胞的细胞膜破裂,进行离心,去掉细胞膜碎片,再用固定液处理使其形态固定,然后经空气干

燥法制成标本片, Giemsa 染色, 可得到染色体标本^[1]。

1 材料与与方法

1.1 材料 RPMI 1640 培养基、人静脉血(实验学生提供)、植物血凝素(PHA)、肝素(500 U/mL)、秋水仙碱、0.075 mmol/L 氯化钾溶液、甲醇、冰醋酸、Giemsa 染液等。

1.2 方法

1.2.1 采血 用一次性 5 mL 注射器抽取 500 U/mL 肝素稀释液 0.2 mL, 湿润针筒内壁, 然后将多余的肝素弃去。以聚维酮碘消毒供血者肘部皮肤, 用橡皮管结扎静脉回流的上端, 用注射器抽取静脉血 3~4 mL, 然后转动针管, 使血液和肝素混合。

1.2.2 接种和培养 在无菌工作台上, 先用聚维酮碘消毒培养瓶的瓶塞, 然后插入针头, 将抽得的抗凝血迅速接种到培养瓶中, 每瓶接种全血 0.25~0.3 mL(7 号针头 15~16 滴), 轻轻摇匀, 置 37 °C 培养箱中培养 72 h。

1.2.3 培养细胞的秋水仙碱处理 培养终止前 3~4 h, 将新鲜配制的 20 μg/mL 秋水仙碱工作液注入培养瓶中, 使其终浓度为 5 μg/mL(每瓶 0.04 mL, 7 号针头 2~3 滴), 轻轻摇匀, 放回培养箱中, 继续培养至 72 h^[2]。

1.2.4 低渗及离心 小心从培养箱取出培养瓶, 用吸管将培养后的血细胞混匀, 并移至离心管内, 以 1 000 r/min 离心 10 min, 吸弃上清液, 加入 8 mL 37 °C 预热的 0.075 mmol/L 氯化钾低渗液, 用吸管上下吹打约 50~60 次, 使细胞悬浮于低渗液中, 置 37 °C 水浴箱中, 温育 20~30 min, 每隔 10 min 时再吹打一次, 使低渗充分。

1.2.5 固定 低渗终止后, 加入新鲜配制的卡诺固定液(甲醇:冰醋酸=3:1) 1 mL, 预固定, 打匀, 放入离心机内, 以 1 000 r/min 离心 8~10 min, 吸弃上清液, 继续加入固定液 5 mL, 用吸管将沉淀的细胞轻轻吹打混合细胞悬液。室温下静置 20 min, 以 1 000 r/min 离心 8~10 min, 吸弃上清液。

1.2.6 重复固定 再加入固定液 5 mL, 用吸管将沉淀的细胞轻轻吹打成混合细胞悬液, 室温下静置 20 min, 以 1 000 r/min 离心 8~10 min, 吸弃上清液。

1.2.7 制片 向离心管中加入固定液 0.5 mL, 用吸管轻轻吹打成混合细胞悬液。滴片时, 先用吸管吸取少量细胞悬液以 20~30 cm 高的距离滴至事先冰冻的洁净载玻片上, 每片 2~3 滴, 随即对准玻片吹一口气, 以协助细胞的分散, 然后在乙醇灯火焰上方微烤, 最后在空气中继续晾干或吹干^[3]。

1.2.8 染色 将晾干的玻片标本用 Giemsa 染液染色 20 min(用 1 份 Giemsa 原液加 9 份 pH7.4 的磷酸缓冲液), 自来水缓缓冲洗玻片, 并晾干, 镜检。

1.3 结果观察 取制备好的健康人体染色体标本, 先用低倍镜观察, 选择染色体分散良好、无重叠的分裂中期细胞, 转换油镜下仔细观察分析。

2 结果

镜下可见, 中期细胞染色体都已纵裂成两条染色单体, 称姐妹染色单体, 相连于一着丝粒。根据每条染色体的大小和着丝粒的位置, 区分中央着丝粒染色体、亚中央着丝粒染色体和近端着丝粒染色体。健康人的每一体细胞都含有 46 条染色体, 其中有 22 对是男女共有的, 称为常染色体, 另外 1 对则男女相差很大, 称性染色体。

3 讨论

3.1 PHA 是体外淋巴细胞培养成败的关键, 只有在 PHA 的作用下才能进入有丝分裂, 因此要考虑它的质量和浓度。效价

低或量不足, 就不能刺激淋巴细胞转化; PHA 浓度过大会造成红细胞凝块。

3.2 秋水仙碱是纺锤体抑制剂, 作用时间为 2.5~3 h, 一般秋水仙碱溶液的浓度与处理时间有一定的关系。如果秋水仙碱的浓度过高或处理的时间过长, 虽标本中的分裂细胞多, 但染色体过于浓缩, 以致细胞形态特征模糊, 难以进行分析。相反, 如果秋水仙碱的浓度过低或处理的时间过短, 则标本中的分裂细胞就少。

3.3 0.075 mmol/L 氯化钾溶液作为低渗液, 用于处理中期细胞, 使细胞核膨胀破裂, 染色体分散良好而便于观察计数。低渗时间最好 20~30 min, 当低渗处理时间过长时, 细胞膜往往过早破裂, 导致分裂细胞丢失, 或染色体丢失; 如果低渗处理时间不足时, 细胞膨胀不够, 则染色体分散不佳, 难以进行染色体计数分析^[4]。经过低渗处理的细胞因已膨胀, 容易过早破裂, 造成分裂细胞丢失, 所以低渗后操作应特别注意不要用力冲吸。

3.4 离心时的速度太慢, 使许多细胞被丢失; 离心时的速度过快, 细胞团块不易打碎。

3.5 固定液应现用现配, 甲醇和冰醋酸按 3:1 的比例配制。如果固定液不新鲜或甲醇、冰醋酸的质量不佳时, 染色体形象模糊, 周围有胞质背景, 难以计数。加固定液时, 沿管壁加入, 边加边轻轻摇。

3.6 滴片是染色体制备中影响染色体形态的关键一步。首先是滴片用的玻片要非常干净, 冰冻 4 h 以上, 即为冰片, 滴片时现用现拿, 如果冷冻不够, 使细胞难以贴附在玻片上, 会影响染色体的分散和分带效果。其次是滴片的距离、滴加量多少、制片的方式都会影响染色体分期效果^[5]。

3.7 烤片是染色体制备中最后一步技术。烤片温度过高、时间过长, 胰酶对标本的消化时间也随之增加, 这既影响工作效率, 也影响标本的显带质量, 使显带达不到最佳效果。烤片温度过低、时间过短, 标本的老化程度不够, 不能很好地把握胰酶消化的时间, 导致消化不足或过度。所以, 适当的烤片时间和温度也是获得高质量染色体的必然要求。

随着医学的发展及人们对遗传疾病的逐步认识, 人类外周血淋巴细胞培养技术和显带方法的应用, 使人们不仅可以根据带型鉴别每一条染色体, 还能深入地研究染色体的形态、变异和畸变及其与表型或临床症状之间的关系。染色体检查作为干预出生缺陷、提高人口素质的一个重要内容和措施, 能更好地为临床诊断及优生与遗传咨询工作服务。

参考文献

- [1] 杨建一. 医学细胞生物学与医学遗传学实验指导[M]. 北京: 科学出版社, 2010: 47-51.
- [2] 曹海涛. 染色体外周血淋巴细胞培养中的几点体会[J]. 现代中西医结合杂志, 2007, 16(30): 4485.
- [3] 董烁, 谢振兴. 浅谈人体外周血淋巴细胞染色体制备[J]. 食品工程, 2008(2): 25-27.
- [4] 傅松滨. 医学遗传学[M]. 北京: 北京大学医学出版社, 2009: 63-84.
- [5] 慕明涛, 霍满鹏, 蒲力群. 人外周血染色体标本制备失败的影响因素分析[J]. 延安大学学报: 医学科学版, 2007, 5(4): 3-4.