

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2023.22.010

不同悬液滴加剂量在人类染色体制备中的应用

杨丽霞¹, 陈 坤¹, 张 帆¹, 李淑云¹, 齐山芹²

1. 山东中医药大学第二附属医院生殖科, 山东济南 250001; 2. 山东中医药大学, 山东济南 250014

摘 要:目的 探讨人类染色体制备过程中所需适宜的细胞悬液滴加剂量,以提高染色体分析效率及核型诊断准确性。方法 使用染色体分散仪制片,预设相对稳定的制片环境(温度为 27℃,相对湿度为 55%),采用移液枪分别滴加 10、20、30、40 μL 4 种不同剂量细胞悬液于清洁玻片上,比较不同剂量悬液制片后染色体自动扫描分析系统采集的有效细胞图占比、分裂相展开面积(R 值)及染色体带纹分辨率。结果 10 μL 组、20 μL 组、30 μL 组采集有效细胞图占比分别为 81.36%、80.29%、80.64%,均大于 40 μL 组(74.89%),差异有统计学意义($P<0.05$);10 μL 组、20 μL 组、30 μL 组采集的有效细胞图占比比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。20 μL 组、30 μL 组、40 μL 组 R 值分别为 0.21 ± 0.04 、 0.25 ± 0.07 、 0.28 ± 0.08 ,均大于 10 μL 组(0.16 ± 0.03),差异有统计学意义($P<0.05$);40 μL 组 R 值与 20 μL 组比较,差异有统计学意义($P<0.05$);20 μL 组 R 值与 30 μL 组比较,差异无统计学意义($P>0.05$);30 μL 组 R 值与 40 μL 组比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。20 μL 组、30 μL 组、40 μL 组染色体带纹质量评分分别为 (2.25 ± 0.72) 、 (2.45 ± 0.83) 、 (2.65 ± 0.81) 分,均大于 10 μL 组 $[(1.60\pm0.60)$ 分],差异有统计学意义($P<0.05$);20 μL 组、30 μL 组、40 μL 组染色体带纹质量评分比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。结论 在人类染色体制备过程中,使用染色体分散仪制片,预设相对稳定的制片环境(温度为 27℃,相对湿度为 55%),细胞悬液滴加剂量选择 20~30 μL 较为适宜,可获得高质量染色体标本玻片,以提高染色体分析效率及核型诊断准确性。

关键词:人类染色体; 制片; 细胞悬液; 剂量; 核型分析

中图法分类号:R446.9

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2023)22-3305-05

Exploration of the application of different suspension dose drops in human chromosome preparation

YANG Lixia¹, CHEN Kun¹, ZHANG Fan¹, LI Shuyun¹, QI Shanqin²

1. Department of Reproductive Medicine, the Second Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan, Shandong 250001, China; 2. Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan, Shandong 250014, China

Abstract: **Objective** To investigate the appropriate dosage of cell suspension drops in the process of human chromosome preparation in order to improve the efficiency of chromosome analysis and the accuracy of karyotype diagnosis. **Methods** Chromosome dispersion apparatus was used for preparation, and a relatively stable preparation environment (temperature: 27℃, relative humidity: 55%) was preset. A pipette gun was used to add 4 kinds of cell suspensions of different doses (10, 20, 30, 40 μL respectively) to the cleaning slides. The proportion of effective cell map, the area of division phase development (R value) and the discrimination degree of chromosome band were compared by the automatic chromosome scanning system after different dose suspension preparation. **Results** The percentages of valid cell maps collected in 10 μL group, 20 μL group and 30 μL group were 81.36%, 80.29% and 80.64% respectively, which was greater than that in 40 μL group (74.89%), and the differences were statistically significant ($P<0.05$). There was no significant difference on the proportion of valid cell maps collected in 10 μL group, 20 μL group and 30 μL group ($P>0.05$). The R-values of 20 μL group, 30 μL group and 40 μL group were 0.21 ± 0.04 , 0.25 ± 0.07 and 0.28 ± 0.08 respectively, which were greater than those of 10 μL group (0.16 ± 0.03), the differences were statistically significant ($P<0.05$). There was significant difference on the R-value between 40 μL group and 20 μL group ($P<0.05$). There was no significant difference on the R-value between 20 μL group and 30 μL group ($P>0.05$). There was no significant difference on R-value between 30 μL group and 40 μL group ($P>0.05$). Chromosome band discrimination degree score in 20 μL group, 30 μL group and 40 μL group were (2.25 ± 0.72) ,

作者简介:杨丽霞,女,副主任技师,主要从事生殖与遗传相关研究。

网络首发 <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1167.R.20231101.1002.006.html>(2023-11-01)

(2.45 ± 0.83), (2.65 ± 0.81) score respectively, which were greater than those in $10 \mu\text{L}$ group [chromosome band discrimination degree score was (1.60 ± 0.60) score], the differences were statistically significant ($P < 0.05$). There was no significant difference on Chromosome band discrimination degree score among $20 \mu\text{L}$ group, $30 \mu\text{L}$ group and $40 \mu\text{L}$ group ($P > 0.05$). **Conclusion** In the process of human chromosome preparation, chromosome dispersing apparatus is used to prepare human chromosomes, a relatively stable preparation environment (temperature was 27°C , relative humidity was 55%) is preset, and $20-30 \mu\text{L}$ of cell suspension drops is selected as the appropriate dosage to obtain high-quality chromosome specimen slides, so as to improve the efficiency of chromosome analysis and the accuracy of karyotype diagnosis.

Key words: human chromosome; slide-making; cell suspension; dosage; karyotype analysis

染色体常规 G 显带检测作为细胞遗传学的经典检测技术,是染色体病诊断的金标准,在产前诊断、辅助生殖等领域也具有重要的作用^[1-2]。在染色体制备过程中滴片环节是其中重要的步骤之一,制作出高质量的标本玻片是保障染色体核型诊断准确的前提和必要条件。本研究使用染色体分散仪制片,在相对固定的温度及湿度环境设定下,采用 4 种不同剂量细胞悬液滴加制片,通过制片后自动扫描分析系统采集有效细胞图占比、分裂相展开面积、染色体带纹辨析度等指标评价,以期探讨制片环节中适宜的细胞悬液滴加剂量,制作出更加有利于核型分析的标本玻片,提高分析效率及诊断准确性,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 标本采集 在 2021 年 9—10 月山东中医药大学第二附属医院(以下简称本院)10 个不同批次的外周血染色体检测标本中随机选取标本各 1 份,共计选取 10 份标本为研究对象,在正式发放检测报告后剩余的细胞悬液标本用于本研究。

1.2 仪器与试剂 主要仪器:染色体分散仪(美国 IDEX)、染色体自动扫描分析系统(德国蔡司)、移液枪、超净工作台、恒温培养箱、离心机、医用冰柜、鼓风干燥箱、电热恒温水浴箱等;主要试剂:离心管式 T 型淋巴细胞培养基(广州拜迪)、秋水仙素、胰蛋白酶、吉姆萨染色液、低渗液、甲醇、冰乙酸等,均为国产试剂;玻片:病理级显微镜载玻片(10127107P-G,江苏世泰)。

1.3 方法

1.3.1 细胞悬液制备 采用常规方法接种及收获外周血细胞标本:采集外周血标本 3 mL 于肝素抗凝管中, 5 mL 注射器 7 号针头垂直接种 $26 \sim 28$ 滴于淋巴细胞培养基中,倾斜放置于 37°C 培养箱中培养 $68 \sim 72 \text{ h}$, 1 mL 注射器 5 号针头垂直加入秋水仙素($20 \mu\text{g}/\text{mL}$)2 滴,继续培养 1.5 h ,再经过离心、低渗、预固定、3 次固定后制成细胞悬液,放置于 -18°C 医用冰柜中保存备用。

1.3.2 滴片 染色体分散仪预设参数:温度为 27°C ,相对湿度为 55% ,玻片编号后平置于染色体分散仪内镂空架上,细胞悬液自低温冰柜中取出后立即滴片。采用移液枪吸取悬液滴加,每份标本调整 4 种

不同剂量各滴加 2 张玻片,每张玻片分别在两端近中心点 $1/2$ 处各滴加悬液 2 滴,分别制作 10 、 20 、 30 、 $40 \mu\text{L}$ 4 组各 20 张标本玻片,共计制片 80 张。滴片后静置 15 min ,玻片装入铜质染色架放置 75°C 鼓风干燥箱中烤片 3 h 。

1.3.3 常规 G 显带 参照文献[3]及《全国染色体病诊断与产前诊断培训班——细胞遗传学实验室工作手册》^[4],进行常规 G 显带操作。

1.3.4 扫描分析 采用染色体自动扫描分析系统采集细胞图,设置每张玻片高倍镜扫描 70 个细胞图,用于众数分析及核型诊断。

1.4 评价指标 (1)有效细胞图占比,染色体自动扫描分析系统所采集的细胞图图像清晰、细胞相对完整、可用于分析诊断的细胞图作为有效细胞图,并计算有效细胞图占比。(2)分裂相展开面积(R 值),4 组剂量分别选取 20 个有效细胞图,计算其 R 值: $R = \pi ab/4AB$ ^[5]。(3)染色体带纹辨析度评价,评价标准参照《人类细胞遗传学国际命名体制 ISCN2016》所示染色体核型示意图,质评条带及评分标准参考文献[6-7],制订以下评分标准: $320 \sim <400$ 条带计 1 分; $400 \sim <550$ 条带计 2 分; 550 条带计 3 分; >550 条带计 4 分。

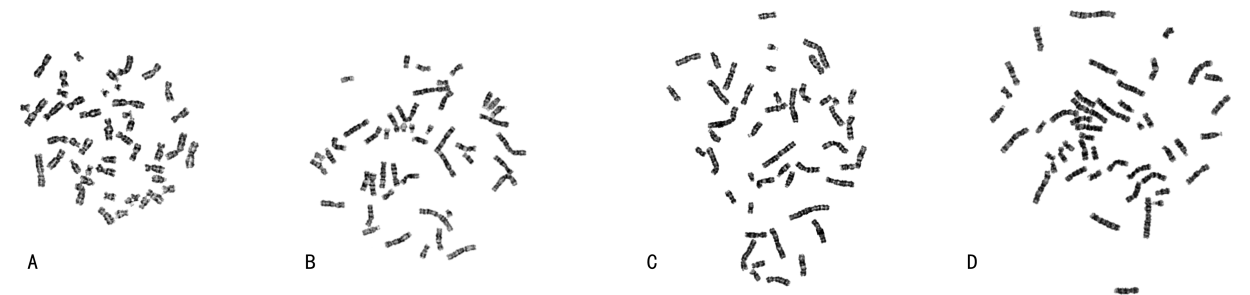
1.5 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计软件进行数据处理及统计分析。呈正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用方差分析,多组间中的两两比较采用 LSD- t 检验;计数资料以细胞数或百分率表示,组间比较采用 χ^2 检验,组间多重比较采用 Bonferroni 校正法。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 4 组有效细胞图占比比较 染色体自动扫描分析系统采集有效细胞图占比随着滴加剂量增大而降低: $10 \mu\text{L}$ 组、 $20 \mu\text{L}$ 组、 $30 \mu\text{L}$ 组采集有效细胞图占比均大于 $40 \mu\text{L}$ 组,差异有统计学意义($10 \mu\text{L}$ 组与 $40 \mu\text{L}$ 组比较 $\chi^2 = 17.106, P < 0.001$; $20 \mu\text{L}$ 组与 $40 \mu\text{L}$ 组比较 $\chi^2 = 11.683, P = 0.001$; $30 \mu\text{L}$ 组与 $40 \mu\text{L}$ 组比较 $\chi^2 = 13.378, P < 0.001$)。 $10 \mu\text{L}$ 组、 $20 \mu\text{L}$ 组、 $30 \mu\text{L}$ 组采集有效细胞图占比比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 1。

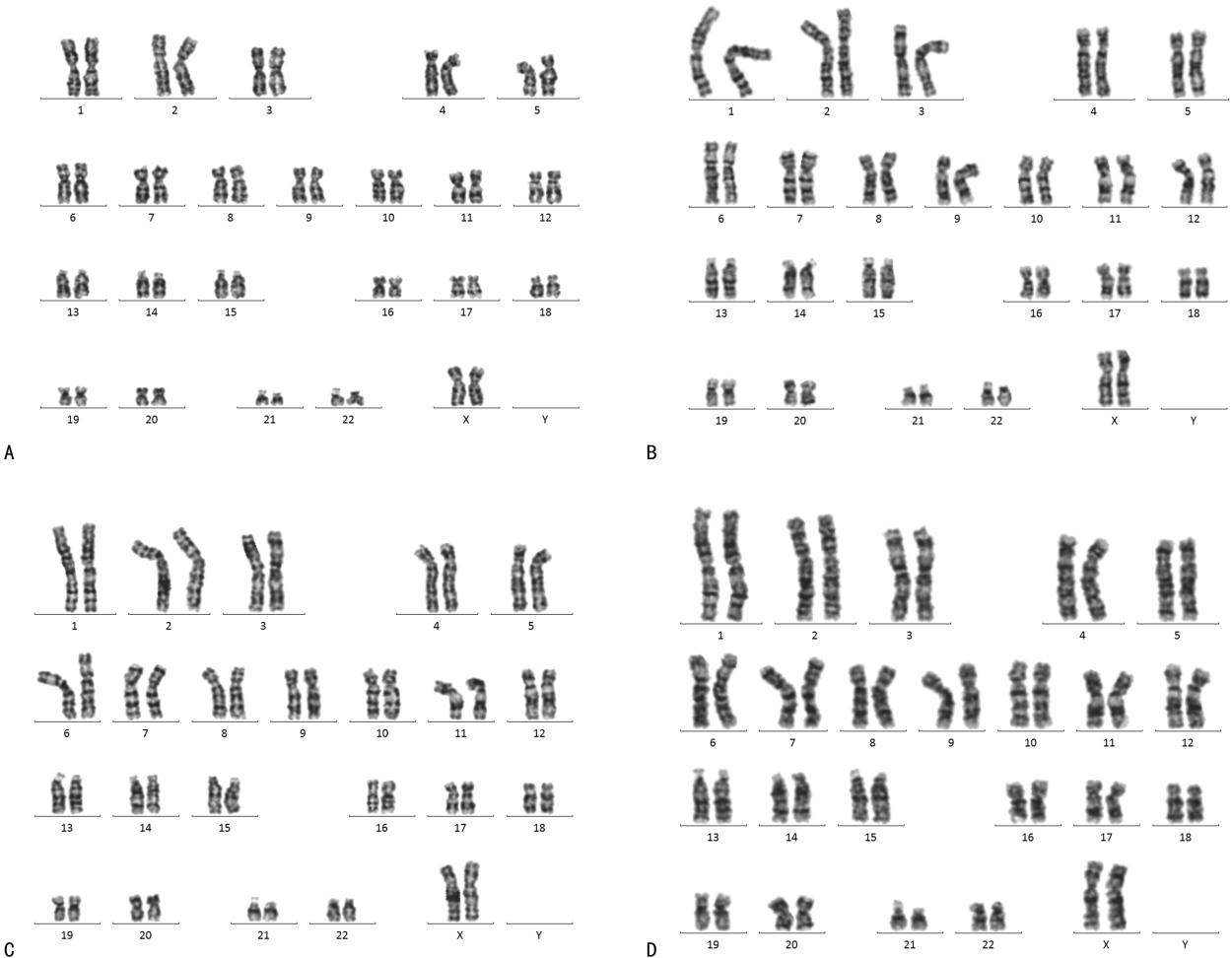
2.2 4 组 R 值比较 10 μL 组、20 μL 组、30 μL 组、40 μL 组 R 值分别为 0.16 ± 0.03 、 0.21 ± 0.04 、 0.25 ± 0.07 、 0.28 ± 0.08 ，4 组 R 值比较，差异有统计学意义($F=16.059, P<0.001$)。10 μL 组与 20 μL 、30 μL 、40 μL 组 R 值比较，差异有统计学意义($P<0.05$)；20 μL 组与 40 μL 组 R 值比较，差异有统计学意义($P<0.05$)；20 μL 组与 30 μL 组 R 值比较，差异无统计学意义($P>0.05$)；30 μL 组与 40 μL 组 R 值比较，差异无统计学意义($P>0.05$)。随着悬液滴加剂量增加，R 值随之增加，但是达到一定阈值后，展开面积过大，将影响扫描系统采集到完整的细胞图。见图 1。

2.3 染色体带纹解析度比较 10 μL 组、20 μL 组、30 μL 组、40 μL 组染色体带纹质量评分分别为 (1.60 ± 0.60) 、 (2.25 ± 0.72) 、 (2.45 ± 0.83) 、 (2.65 ± 0.81) 分，随滴加剂量增大而逐渐升高，差异有统计学意义($F=7.493, P<0.001$)。40 μL 组染色体带纹质量评分与 30 μL 组、20 μL 组比较，差异无统计学意义($P>0.05$)；20 μL 组染色体带纹质量评分与 30 μL 组比较，差异无统计学意义($P>0.05$)。10 μL 组染色体带纹质量评分低于其他 3 组，差异均有统计学意义($P<0.05$)。见图 2。



注：A 为 10 μL 组；B 为 20 μL 组；C 为 30 μL 组；D 为 40 μL 组。

图 1 4 组高倍镜下采集细胞图



注：A 为 10 μL 组；B 为 20 μL 组；C 为 30 μL 组；D 为 40 μL 组。

图 2 4 组染色体核型图

表 1 4 组有效细胞图占比比较

组别	扫描玻片数 (n)	采集细胞图 (n)	有效细胞图 (n)	有效细胞图占比 (%)
10 μL 组	20	1 400	1 139	81.36 *
20 μL 组	20	1 395	1 120	80.29 *
30 μL 组	20	1 400	1 129	80.64 *
40 μL 组	20	1 398	1 047	74.89

注:与 40 μL 组比较, * $P<0.05$ 。

3 讨 论

近年来,遗传学检测在优生优育及产前诊断、染色体疾病诊断等领域得到广泛应用,染色体核型分析目前仍然是遗传学诊断重要的检测方法之一^[8]。外周血染色体检测技术在 1960 年由 MOORHEAD 等建立,是细胞遗传学研究的重要基础。如何制备出高质量的染色体标本,提高分析效率及核型诊断的准确性,以便给予临床诊断及治疗更加精准的参考指标,是各个细胞遗传实验室不断追求的目标。染色体制备步骤繁琐,影响因素较多,制备过程中的实验室条件控制,尤其是制片环节的标准化及可重复性条件的建立是研究的重点之一^[9-10]。SPURBECK 等^[11]首次提出了染色体分散动力学理论,为解决染色体分散问题提供了理论基础。依据染色体分散动力学原理设计的染色体分散仪在染色体制备中的应用,为实验室制片环节的条件控制提供了可能性。在滴片时可设定相对稳定的温度及相对湿度等参数,从而保证染色体制备的重复性和一致性。尽管如此,不同的实验室设置参数也略有差异^[9,12-13],温度波动范围为 25~30℃,相对湿度波动范围为 50%~55%。本研究采用染色体分散仪滴片时设定温度为 27℃,相对湿度为 55%。但是即使对染色体分散仪进行相对稳定的参数设置,不同实验人员制片及不同批次制片效果仍有差异。因此,制片环节中只对滴片环境温度及湿度的控制尚不足以保证稳定的制片效果,如何进一步完善制片环节中的条件设定,以保证制片效果的稳定性是急需解决的问题。

染色体制备环节中滴加悬液剂量对制片效果影响的研究较少提及,本实验室在染色体制备的各个环节,如标本接种、细胞培养、细胞收获、显带等保持常规操作的前提下,制作本研究所用标本玻片,在滴片环节采用同一台染色体分散仪、在同一时间、由同一名实验室人员制片,分别采用 10、20、30、40 μL 4 种不同的悬液剂量,在相同滴片环境中制作 4 组染色体玻片,通过比较 4 组标本玻片中染色体自动扫描分析系统所采集有效细胞图占比、R 值、染色体带纹辨析度等指标,发现在相同或者相近的温度、湿度条件下滴

片时,细胞悬液滴加剂量不同,染色体制片效果不同:低剂量悬液滴片有效细胞图占比高于高剂量悬液滴片;随着剂量逐渐增加,R 值随之增加,染色体带纹辨析度也随之增高,但是剂量增加到一定程度时,因过度分散,易造成扫描系统采集细胞不完整,使有效细胞图数量减少,从而影响分析效率及诊断准确性。

有研究者认为,中期染色体分散质量主要取决于载玻片上固定液的挥发过程,通过温度及湿度的协同作用,以保证最佳的分散效果^[14]。本研究中滴片环节是在染色体分散仪中进行,设置了相对稳定的温度及湿度条件,4 组不同悬液剂量制片均由一名实验室人员在同一时间内完成,出现分散效果的不同,考虑是由于剂量效应使玻片表面固定液的挥发速度产生差异:滴加剂量小的玻片表面固定液在同等温度及湿度条件下,干燥时间相对较短,分散过程也相应缩短,R 值较小,染色体伸展不充分;而滴加剂量大的玻片表面固定液在同等温度及湿度条件下则干燥时间相对较长,染色体分散过程相应延长,展开面积也增大,染色体伸展充分。因此,增加悬液滴加剂量在同等温度及湿度设定条件下可提高染色体的分散程度及带纹辨析度。但是剂量增加到一定程度,细胞过于分散可造成扫描系统采集完整的细胞图数量减少,反而不利于核型分析。本研究中,在染色体分散仪设定温度为 27℃,相对湿度为 55%的条件下,20 μL 组、30 μL 组制片效果优于 10 μL 组、40 μL 组,能够在保证足量的有效细胞图被采集的前提下,获得适度分散及高质量带纹辨析度的中期染色体,以满足核型分析的需要。

本研究通过评价不同悬液滴加剂量在染色体分散仪制片中的效果,旨在探索染色体制片环节中重复性好、一致性程度高的条件设定,在以后的实验室推广中结合自动化设备的引进^[15],不断完善染色体制备标准化流程,获得高质量的中期染色体核型,提高分析效率及核型诊断准确性,为临床诊断及治疗提供更加科学的参考指标,以利于精准医疗的深入开展。

参考文献

[1] 罗小金,魏凤香,胡亮,等. 产前胎儿染色体倒位的临床诊断分析[J]. 实用医学杂志,2017,33(13):2183-2185.
[2] 胡卫华,李文杰,姜根凤,等. 染色体多态性对体外受精/卵胞质内单精子显微注射-胚胎移植胚胎结局的影响[J]. 中华生殖与避孕杂志,2019,39(5):385-389.
[3] 周焕康,夏家辉. 人类染色体[M]. 北京:科学出版社,1987:85-100.
[4] 医学细胞遗传学国家培训中心. 全国染色体病诊断与产前诊断培训班——细胞遗传学实验室工作手册[Z]. 北京:医学细胞遗传学国家培训中心,2017:47-53. (下转第 3312 页)

妇和新生儿均未出现上述甲状腺功能异常、低体质量、甲状腺功能减退等症状,可能与本地区碘缺乏程度较轻及研究样本量较少有关。

随着人们生活水平的逐步提高和对健康生活方式的日益重视,碘营养这一话题逐渐成为社会上的热门话题。孕妇定期筛查尿碘具有重要意义,碘缺乏及过量均会对胎儿产生一定的影响,过量补碘易引起高碘性甲状腺肿或黏液性水肿^[12],而长期高碘对大脑是有害的^[13]。通过研究碘营养情况及其与新生儿甲状腺功能的关系能够客观地得出向孕妇提供碘营养和保健建议的途径。在妊娠期对于孕妇的碘营养应该给予特别关注,碘缺乏和碘过量都会引发甲状腺疾病。因此,不但要注意补碘,还应该注意碘过量,避免碘过量导致的免疫性甲状腺疾病,减少孕妇和新生儿甲状腺疾病发病的风险,及时筛查新生儿的 TSH,保证新生儿无甲状腺疾病风险,提高新生儿的生活质量。

参考文献

[1] 邓姜云,张莉,张艳利. 碘营养配合左甲状腺激素治疗妊娠期糖尿病合并甲状腺功能减退孕妇的临床观察[J]. 贵州医药,2022,32(5):46-48.

[2] 蔡蘩波,柳光斌. 碘缺乏病的防治措施研究进展[J]. 中国城乡企业卫生,2022,37(7):103-104.

[3] 王涛涛,曹晓霞,刘煜洲,等. 江苏省镇江地区妊娠期女性碘水平及甲状腺疾病患病情况的研究[J]. 实用临床医学杂志,2021,25(10):61-63.

[4] 日沙来提·塔依尔,吴顺华,王琛琛. 妊娠期碘缺乏的研究进展[J]. 中华地方病学杂志,2021,40(9):55-57.

[5] 姬炳章,蔡蘩波,张坤明. 尿碘在碘缺乏病监测中的价值分析[J]. 中国城乡企业卫生,2022,21(3):37-39.

[6] BEHROOZLAK M, DANESHYAR M, FARHOMAND P. The effects of dietary iodine and its consumption duration on performance, carcass characteristics, meat iodine, thyroid hormones and some blood indices in broiler chickens[J]. J Anim Physiol a Anim Nutr, 2020, 104(3): 876-885.

[7] 都杨,刘鹏,范丽珺,等. 世界主要国家和地区食盐加碘概况及人群碘营养状况[J]. 中华地方病学杂志,2022,41(5):89-90.

[8] SHI L J, SHEN Y Y. Research progress on iodine nutrition status and thyroid related diseases of people in regions with different water iodine[J]. Bull Dis Cont Prevent, 2019, 13(10):156-159.

[9] 窦瑜贵,王燕玲,孙玮,等. 甘肃省不同儿童碘营养水平地区人群碘营养及甲状腺功能研究[J]. 中国地方病防治杂志,2019,34(6):230-234.

[10] 张桂芹,王凤,王秀珍,等. 滨州市孕妇碘营养状况调查及其对新生儿甲状腺功能的影响[J]. 滨州医学院学报, 2020, 43(3):194-197.

[11] 刘继巍,都杨,刘鹏,等. 不同水碘水平对孕妇碘营养和甲状腺功能的影响[J]. 中华地方病学杂志,2019,38(8):641-645.

[12] 马泰,卢佩章,于志恒. 碘缺乏病[M]. 北京:人民卫生出版社,1993:51.

[13] 高博. 高碘对小鼠脑发育的影响[J]. 中华预防医学杂志, 1997, 31(3):134-136.

(收稿日期:2023-03-05

修回日期:2023-08-12)

(上接第 3308 页)

[5] 王昊,汪燕. 染色体分散仪及改良滴片法在染色体制片中的应用[J]. 中国优生与遗传杂志,2013,21(7):64-65.

[6] 胡亮,罗小金,丛潇怡,等. 外周血淋巴细胞 G 显带高分辨染色体制片效果量化评价[J]. 国际生殖健康/计划生育杂志,2019,38(1):53-55.

[7] 谢晓贞,陈颖,杜涛,等. 外周血淋巴细胞 G 显带制备方案优化研究[J]. 检验医学与临床,2021,18(10):1452-1454.

[8] BRYNN L, MELISSA S. Traditional prenatal diagnosis: past to present[J]. Methods Mol Biol, 2019, 1885:3-22.

[9] 韦世录,余奇松,丘玉铃,等. 染色体分散仪在胎儿染色体标本制备中的应用[J]. 广东医学,2018,39(7):45-46.

[10] 谢节,杨素霞,常中宝,等. 一种外周血染色体制片技术的效果评价[J]. 中国优生与遗传杂志,2021,29(2):255-257.

[11] SPURBECK J L, ZINSMEISTER A R, MEYER K J, et

al. Dynamics of chromosome spreading[J]. Am J Med Genet, 1996, 61(4):387-393.

[12] 谢志威,张晶,李卫凯. 染色体分散仪在中期染色体标本制备过程中的应用[J]. 国际检验医学杂志,2013,34(9):1136-1137.

[13] 明盛金,马洪熹,黄滢,等. 染色体分散仪在外周血染色体标本制备中的应用[J]. 右江医学,2021,49(12):915-919.

[14] BARCH M J, KNUSTEN T, SPURBECK J L. The AGT cytogenetics laboratory manual[M]. 3rd ed. New York: Raven Press, 1997:25-52.

[15] 冯艺帆,王云梦,马婵婵,等. 全自动滴片在羊水细胞染色体制备中的应用价值[J]. 实用医学杂志,2023,39(6):667-671.

(收稿日期:2023-03-20

修回日期:2023-09-03)