

2010,56(6):977-986.

- [4] Warnick GR, Nauck M, Rifai N. Evolution of methods for measurement of HDL-cholesterol; from ultracentrifugation to homogeneous assays[J]. Clin Chem, 2001, 47(10):1579-1596.
- [5] Contois JH, Warnick GR, Sniderman AD. Reliability of low-density lipoprotein cholesterol, non-high-density lipoprotein cholesterol, and apolipoprotein B measurement[J]. J Clin Lipidol, 2011, 5(4):264-272.
- [6] Perera NJ, Burns JC, Perera RS, et al. Adjustment of direct high-density lipoprotein cholesterol measurements according to inter-

current triglyceride corrects for interference by triglyceride-rich lipoproteins[J]. J Clin Lipidol, 2010, 4(4):305-309.

- [7] 王紫晨, 方向华, 汤哲, 等. 不同代谢综合征诊断标准与中老年人心脑血管病患率分析[J]. 中华老年医学杂志, 2011, 30(10): 871-875.
- [8] 李玢, 王永斌, 杨卫红, 等. 上海市奉贤东区 30 岁以上人群不同诊断标准下代谢综合征患病率调查[J]. 内科理论与实践, 2010, 5(3):228-233.

(收稿日期:2012-07-23)

• 检验技术与方法 •

外周血染色体制备改良方法的应用

谢志威, 张 晶, 李卫凯

(江门市中心医院检验科细胞遗传室, 广东江门 529023)

摘 要:目的 探讨外周血淋巴细胞培养和染色体制备方法的改良与应用。方法 采用改良方法对 1 057 例成人外周血标本进行细胞培养及染色体制备。结果 1 057 例标本全部培养成功, 所制备的染色体质量高。结论 改良方法可保证染色体标本的质量, 且操作更方便快捷、重复性好, 值得推广。

关键词:细胞培养技术; 染色体; 标本制备

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.01.038

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)01-0082-02

人类染色体分析技术在产前和产后诊断中发挥着非常重要的作用, 外周血淋巴细胞染色体核型分析已成为产前诊断的常规检测项目。随着产前诊断的应用日益广泛, 提高分析效率和保证分析结果准确性显得十分重要。笔者通过改良外周血细胞培养和染色体制备方法, 在规范操作的同时有效节约了工作时间和人力资源, 现将改良方法简介如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2010 年于本院生殖中心就诊的成人 1 057 例, 采集外周静脉血待测。

1.2 仪器与试剂 Maxchrome 染色体分散仪(北京中科汇文)。RPMI1640 培养瓶(广州达晖)^[1], 秋水仙素 100 $\mu\text{g/mL}$ 、胰酶(美国 Gibco), 0.075 mol/L 氯化钾低渗溶液, 新鲜配制的固定液(甲醇:冰醋酸=3:1), pH7.4 磷酸盐缓冲液, 吉姆萨染液(湖南湘雅基因技术有限公司)。

1.3 方法 (1)向细胞培养液中无菌加入全血 0.5 mL, 充分混匀后 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 68 h, 收获细胞前 12 min 加入 100 $\mu\text{g/mL}$ 秋水仙素 100 μL (传统方法为加入 25 $\mu\text{g/mL}$ 秋水仙素 20 μL , 继续培养 2 h)^[2-3]。(2)将培养的细胞移入 10 mL 刻度离心管中, 2 000 r/min 离心 10 min 后弃上清, 加入 10 mL 预温 37 $^{\circ}\text{C}$ 的 0.075 mol/L 氯化钾低渗液, 充分混匀, 低渗 10 min(传统方法为低渗 30 min)。(3)向离心管中加入固定液 0.5 mL^[4], 轻轻混匀后室温放置 5 min(传统方法为加入固定液 2 mL, 室温放置 5 min)。(4)2 000 r/min 离心 10 min 后吸去上清液, 加入新配制的固定液 10 mL, 混匀后室温放置 30 min, 重复以上固定步骤。最后根据细胞数量加入适量固定液制备细胞悬液, 在 Maxchrome 染色体分散仪中分散染色体, 参数设置为温度 25 $^{\circ}\text{C}$ 、相对湿度 50%, 在仪器抽屉中放入干的载玻片(无需清洗), 向每张载玻片滴加 30 μL 细胞悬液, 分散 5 min(传统方法为吸取 2~4 滴细胞悬液滴于清洗干净的冰冻载玻片上, 酒精灯火焰下通过几次后晾干)。(5)染色显带方法参考《人类染色体方法学手册》^[5]。

2 结 果

改良外周血淋巴细胞培养和染色体制备方法获得的染色体分裂相多, 分散良好, 长短适中, 吉姆萨染色显示带纹清晰,

见图 1。



图 1 改良方法制备的细胞染色体

3 讨 论

改良外周血淋巴细胞培养及染色体制备方法与传统方法相比, 在秋水仙素作用、低渗处理、预固定处理及染色体滴片等多个方面进行了改进和优化, 下面就各方面分别进行讨论。

3.1 秋水仙素的作用浓度和时间 在血细胞培养时, 秋水仙素加入剂量、浓度及处理时间与中期分裂相的多少和染色体长短有密切关系。秋水仙素加入过量或处理时间过长, 可导致分裂细胞多, 染色体凝集和收缩变小, 或发生异常分裂现象, 甚至染色体破碎, 不宜用于染色体形态观察及计数; 秋水仙素加入太少或处理时间偏短, 可导致染色体形态偏长或无中期分裂相^[6]。故需要准确控制秋水仙素剂量及处理时间。笔者将传统方法中秋水仙素终浓度 0.04 $\mu\text{g/mL}$ 作用 2 h, 改良为秋水仙素终浓度 2 $\mu\text{g/mL}$ 作用 12 min, 高浓度、短时间的秋水仙素作用不影响染色体分裂指数及长短, 且大大节省了操作时间。

3.2 低渗处理方法和时间 低渗处理一方面诱导淋巴细胞膨胀, 从而有利于染色体从细胞中分散出来, 另一方面可溶解并清除红细胞。长时间(45~60 min)低渗处理将导致染色体更长、更黏、难以分散且显带质量不好; 短时间低渗处理容易导致细胞质和细胞膜包裹在染色体周围, 影响染色体分散和显带质量。Henegariu 等^[7]研究认为 10 min 低渗处理对于人外周血淋巴细胞染色体制备已经足够。笔者的实践操作也表明, 10

min 低渗处理完全可以确保制备获得高质量的人外周血淋巴细胞染色体,同时也提高了染色体制备的效率。

3.3 预固定处理 在染色体标本制备过程中,预固定液用量也是影响染色体分散质量的重要因素之一。有研究者采用传统方法制备中期染色体标本,并经吉姆萨染色后统计不同预固定液剂量下淋巴细胞及中期染色体的铺展面积及分散质量,发现当预固定液剂量占总体积的 1.25%、2.50%或 3.75%时,染色体分散质量较好,可用核型多;预固定液比例大于或等于 6.25%可导致细胞间相互黏连,且染色体间相互积聚的倾向更为明显^[8]。本研究将预固定液剂量由原来的 16%改良为 4%,可使染色体分散程度显著提高。

3.4 染色体分散仪的应用 Spurbeck 等^[9]首次提出了染色体分散动力学,对染色体分散过程做出了详细阐述。传统的染色体冰冻滴片法需提前清洗载玻片,并冰冻备用,耗时费力且未考虑到温度和湿度对染色体制备的影响,导致染色体扩散效果不理想,且重复性差。染色体分散仪则根据染色体分散动力学原理,通过控制载玻片表面固定液的挥发速度对染色体分散程度进行控制,保证最佳的染色体分散程度,每次制备过程采用相同的仪器参数,可保证实验结果具有较好的重复性。

笔者通过大量实践,认为改良的外周血淋巴细胞培养及染色体制备方法在许多方面优于传统染色体制备方法,一方面保证了染色体制备的重复性和一致性,确保染色体制备质量,从而提高了诊断结果的准确性,另一方面缩短了秋水仙素作用和低渗处理的时间,同时也无须对载玻片进行预处理,提高了分

• 检验技术与方法 •

析效率。

参考文献

- [1] 刘祖洞,江绍慧.遗传学实验[M].2版.北京:高教育出版社,1987:153.
- [2] 蔡绍京.细胞生物学与医学遗传学实验指南[M].上海:第二军医大学出版社,2002:47-48.
- [3] 柳家英.医学遗传学[M].北京:北京医科大学出版社,1998:223-234.
- [4] 斯佩克特,戈德曼,莱因万德.生物学指南[M].黄培堂,译.北京:科学出版社,2002:1067-1068.
- [5] 高锦声,郑斯英,陈嘉政,等.人类染色体方法学手册(修订本)[M].南京:江苏省医学情报研究所,1981:4.
- [6] 江悦华,张中芬.早孕绒毛染色体直接制备方法研究及产前诊断的应用[J].中国优生与遗传杂志,1997,5(3):36.
- [7] Henegariu O, Heerema NA, Wright LL, et al. Improvements in cytogenetic slide preparation: controlled chromosome spreading, chemical aging and gradual denaturing[J]. Cytometry, 2001, 43(1):101-109.
- [8] 桂俊豪,黄国香,王铮,等. Carnoy's 预固定剂量对中期染色体分散度的影响[J]. 国际遗传学杂志,2006,12(15):416-419.
- [9] Spurbeck JL, Zinsmeister AR, Meyer KJ, et al. Dynamics of chromosome spreading[J]. Am J Med Genet, 1996, 61(4):387-393.

(收稿日期:2012-07-12)

超高倍显微镜法和培养法检测阴道分泌物支原体结果比较

吴全裕,谢正慧,吴 勇,米鲜艳,庞 莉

(广西浦北县人民医院检验科,广西浦北 535300)

摘要:目的 比较超高倍显微镜法和培养法检测阴道分泌物标本支原体的阳性率。方法 采用培养法和超高倍显微镜法对 200 例阴道炎或宫颈炎患者阴道分泌物标本进行检测。结果 培养法阳性率为 100%,而超高倍显微镜法阳性率为 62%。结论 培养法检测阴道分泌物支原体的阳性率大于超高倍显微镜法。

关键词:显微镜检查; 细胞培养技术; 阴道分泌物; 支原体

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.01.039

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)01-0083-01

支原体是引起人类非淋菌性尿道炎、前列腺炎、睾丸炎、反复妊娠失败、流产等疾病的主要病原体^[1-5],主要包括解脲原体(UU)和人型支原体(MH)。支原体常用检测方法包括荧光素单克隆抗体染色法,形态学、分子生物学、血清学检查,细胞培养法及超高倍显微镜法等。培养法及超高倍显微镜检测法操作简便,易于普及推广。现将两种方法阴道分泌物支原体检测结果比较分析如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 本院妇科门诊患者 200 例,年龄 17~53 岁,诊断为阴道炎或宫颈炎,阴道清洁度为Ⅲ级以上,支原体培养阳性。

1.2 仪器与试剂 BX51 超高倍显微镜仪(日本 Olympus)。培养法检测试剂盒(郑州安图绿科)。

1.3 方法 用拭子或棉球抹去宫颈口外区域黏液,将取样拭子(消毒拭子或消毒的亚麻、涤纶拭子)插入宫颈管内超过鳞柱状上皮交界处,旋转拭子 15~20 s 后取出,且不能碰到宫颈外及阴道壁,以保证采集到更多的柱状上皮细胞。培养法检测方法结果判断参照试剂和说明书。超高倍显微镜检测步骤为:(1)用拭子将标本滴于载玻片,加盖玻片后置载物台,高倍镜下(放大倍数 4 000)观察,白细胞或上皮细胞内发现 0.2~0.5

μm 大小、不停泳动的高度多形性细小颗粒判支原体阳性^[6-7]。

2 结 果

200 例阴道分泌物标本培养法检测阳性率为 100%(200/200),超高倍显微镜法检测阳性率为 62%(124/200)。

3 讨 论

培养法对支原体的检出有赖于标本中支原体含量、样本质量,而患者服用部分药物可导致假阳性结果。尤其需要注意的是标本采集方法,应使标本中含有大量的细胞成分而不只是体液。超高倍显微镜可直接观察标本中被感染的细胞数量,了解被感染程度,但不能直接判断支原体类型或其他类似多形态的微生物(如 L 型菌等)^[8],存在一定假阳性或假阴性结果。本研究结果与类似研究报道稍有差异,可能与无症状携带者和有症状感染者病情程度不同而导致报告结果不一致有关,也与操作者经验有关^[9]。而无症状携带者标本中检出的支原体是否应报告,值得讨论和探讨。

将形态上类似的多形性衣原体、L 型菌误判为支原体可导致超高倍显微镜检查假阳性结果,尤其是衣原体感染包含体形成早期、细菌在药物诱导下形成 L 型菌及尿肠球菌感染,更易导致假阳性结果。假阴性结果更为多见,特别(下转第 95 页)