

· 短篇及病例报道 ·

外周血非同步培养制备染色体标本的效果比较

林 江¹, 徐灵玲¹, 陶大昌^{2△}

(1. 泸州医学院附属医院检验科, 四川泸州 646000; 2. 四川大学医学遗传学教研室, 四川成都 640041)

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.13.044

文献标识码:C

文章编号:1671-8348(2013)13-1557-02

随着医学遗传学发展,人们对优生优育的要求也更加迫切,人类染色体的研究技术已广泛地应用于医学遗传学研究和临床医学的检查诊断。许多疾病与染色体缺陷有关,例如一些遗传疾病、男女不孕不育、习惯性流产、两性畸形和内分泌失调及急、慢性粒细胞白血病等。染色体检查和研究可以为这些疾病的筛查和病因诊断提供科学依据。目前常用的染色体检查方法是通过外周血淋巴细胞培养制备染色体标本进行分析,以往的方法是抽取新鲜的外周血立刻接种培养^[1]。但由于就诊患者就诊时间不同,患者不易集中采血检查。因此,有必要探索非同时采血贮存后再集中同步培养制备染色体标本的方法。现将这一制作方法和结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2011 年 3 月至 2011 年 10 月四川省泸州医学院附属医院检验科采集的患者静脉血标本共 337 份,受检者年龄从 0(出生)至 50 岁。主要仪器:CO₂ 培养箱(上海益恒)购自上海益恒实验仪器有限公司;超净工作台(上海南通)购自南通沪南科学仪器有限公司;显微镜(OLYMPUS CX41),购自上海北昂医疗技术有限公司。试剂:RPMI-1640 外周血完全培养液,购自成都哈里生物试剂有限公司;秋水仙素,购自上海源聚生物科技有限公司;胰蛋白酶,购自上海伯奥生物科技有限公司;Giemsa 染料,购自成都凯威生物科技有限公司;冰乙酸,购自广东光华科技股份有限公司;甲醇,购自四川西陇化工有限公司(临用时按冰乙酸:甲醇=1:3 配制固定液)。

1.2 方法

1.2.1 标本分组 将采集的 337 份外周血标本,每份标本分别设为对照组、实验 1 组、实验 2 组。

1.2.2 试验方法 一次采集患者静脉血 2 mL,对照组即抽血后即时(0 d)在超净工作台将血液注入 RPMI-1640 外周血完全培养液内(每瓶培养液 5 mL 加 0.3 mL 血液)并放置于 37 ℃ 的 CO₂ 培养箱内培养 72 h 后收获细胞(收获前 4 h 加秋水仙素),培养终止后,离心将细胞提取出,所获得的外周血淋巴细胞用 0.075 mol/L KCL 溶液低渗以及固定液固定,制成细胞悬液;后取洁净冷湿的载玻片,吸取适量细胞悬液,滴于载玻片上(每片 3~4 滴),经乙醇灯外焰加热烘烤至干燥^[2],胰蛋白酶消化;Giemsa 染料染色,按 G 显带标本制备。实验 1 组为对照组同一患者剩余外周血,于抽血后即时注入另一 RPMI-1640 外周血完全培养液(每瓶培养液 5 mL 加 0.3 mL 血液)的血标本,然后放置于 4 ℃ 的冰箱内贮存待培养;实验 2 组为实验组 1 同一患者剩余外周血标本,不需处理直接放 4 ℃ 冰箱内贮存待用。每周二或周五(实验组标本已贮存于 4 ℃ 冰箱 1~3 d)集中将实验 1 组标本置于 37 ℃ 的 CO₂ 培养箱内,同一时间将未经处理的实验 2 组相应标本混匀抽取注入 RPMI-1640 外周血完全培养液(每瓶培养液 5 mL 加 0.3 mL 血液),置于 37 ℃ 的 CO₂ 培养箱内与实验 1 组同时培养,72 h 后收获细胞(收获前 4 h 加秋水仙素)。以后的细胞处理与对照组相同。

1.3 统计学处理 采用 SPSS13.0 统计软件进行统计学分

析,组间采用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

通过显微镜下低倍镜和油镜对对照组和实验 1、2 组每个染色体标本计数 20 个分裂象数,分析 4~5 个分裂象,观察其形态、分裂象数及分析效果,视其无缠绕、显带清晰、效果稳定的分裂象为有效分裂象。外周血染色体制作实验 1 组有效分裂象成功率为 94.0%,实验 2 组有效分裂象成功率为 98.1%,对照组的有效分裂象成功率为 98.4%,实验 1 组与对照组和实验 2 组比较成功率相对较低,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。对照组外周血染色体标本在 $\times 10$ 物镜视野中的有效分裂象平均值均较高,实验 2 组与对照组相近,实验 1 组相对较低,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。患者血液标本不同处理与结果比较,见表 1。

表 1 患者血液标本不同处理与结果比较

组别	4 ℃ 贮存 时间(d)	样本数 (n)	获得有效 分裂象(n)	成功率 (%)	样本数平均值 ($\times 10$)
对照组	0	337	332	98.4	17.6
实验 1 组	1~3	337	317	94.0	16.3
实验 2 组	1~3	337	331	98.1	17.1

3 讨 论

随着人们对保健知识及优生优育意识的不断增强,门诊患者逐年增加,染色体检查已经逐渐在临床检查中普及,而传统的外周血淋巴细胞培养是一个复杂、繁琐并且重复的过程,在实际的临床工作过程中需要 7 d 左右的时间才能正常的完成,同时,实验过程中若有一个过程出现纰漏,就极有可能导致实验的失败,近几年来,有关细胞遗传技术方法方面外周血淋巴细胞培养的报道较少。采用不同贮存时间的外周血淋巴细胞同步培养制备染色体的这一方法,将采集的血液直接放置于 4 ℃ 的冰箱中贮存,1~3 d 后再同时集中置于 37 ℃ 的 CO₂ 培养箱培养,通过外周血非同步培养制备染色体标本的效果比较,实验 2 组与对照组成功率比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),实验 2 组制作出染色体标本的成功率比实验 1 组成功率略高。

实验 1 组成功率相对较低的结果分析:对照组抽血后即时注入 RPMI-1640 外周血完全培养液,将采集的血液及时放置于 37 ℃ 的 CO₂ 培养箱内培养,使培养细胞处于模拟体内营养及 pH 环境适宜细胞生长;实验 1 组将患者外周血抽血后即时注入 RPMI-1640 外周血完全培养液然后放置于 4 ℃ 的冰箱内贮存待培养,培养液在 4 ℃ 的冰箱贮存过程中细胞要消耗部分营养物质,随着放置时间的延长(1~3 d)培养液的部分营养成分及 pH 值发生一定程度改变,细胞生长受到条件抑制;实验 2 组将患者外周血标本不需处理直接放 4 ℃ 冰箱内贮存待用,由于淋巴细胞同步化的作用^[3],全血中的淋巴细胞经低温贮存 DNA 合成受阻或停止,大多数细胞进入 G₁ 期,1~3 d 后将标本复温混匀抽取注入 RPMI-1640 外周血完全培养液放置 37 ℃ 的 CO₂ 培养箱内,当培养温度恢复 37 ℃ 培养后,在营养条件

及 pH 值适宜细胞生长时细胞进入 DNA 合成期^[4], 出现明显的细胞分裂高峰, 细胞分裂指数显著提高, 因此, 可以获得与对照组分裂象无显著差异的染色体标本。

本实验室现已采用实验 2 组方法, 减少了操作人员工作强度, 不需要每天进行细胞培养及处理, 最大的优势是不再限制患者采血时间, 临床上特别是门诊患者可以随时采血, 给患者带来很大的方便。

参考文献:

[1] 周焕庚, 夏家辉, 张思仲. 人类染色体[M]. 北京: 科学出版社, 1987.

[2] 金鹰, 唐玫, 李国明. 实用淋巴细胞培养技术[J]. 激光生物学报, 2000, 9(1): 75-78.

[3] 徐毓其, 孙蕙兰. 人类染色体的新方法及其临床应用[J]. 遗传与疾病, 1988, 5(1): 34-34.

[4] 张国庆, 焦顺昌, 林星石. 人外周血淋巴细胞体外扩增培养前后 19 种细胞表型研究[J]. 军医进修学院学报, 2008, 29(5): 352-354.

(收稿日期: 2012-11-18 修回日期: 2013-02-02)

IgG 抗-Mur 抗体引起交叉配血不合 1 例报道

王 芳, 黄 霞, 毛 伟, 李小红, 程 磊, 秦伟斐
(重庆市血液中心输血研究所, 重庆 400015)

doi: 10. 3969/j. issn. 1671-8348. 2013. 13. 045

文献标识码: C

文章编号: 1671-8348(2013)13-1558-02

人类 MNs 血型系统是继 ABO 血型系统后被检出的第 2 个血型系统, 复杂程度仅次于 Rh 系统^[1]。MNSs 血型系统共有 43 个抗原, 其中 Miltenberger 亚系统是与 MNSs 系统有关且相对较稀有的一系列血型, 有 11 种不同的低频率抗原, GP. Mur 抗原是其中最具临床价值的抗原之一, 在东方人群中的频率远高于其他人。因此, 针对 Miltenberger 系统抗原与抗体的研究在中国临床输血中的意义较大, 作者就在实际工作中遇到 1 例由低效价的 IgG 抗-Mur 抗体引起输血反应, 现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 患者, 女, 66 岁, 因贫血反复输血, 在 2011 年 10 月因输血后出现输血反应, 遂采集血液标本送至本中心血型实验室进行抗体筛查和交叉配血。

1.2 方法

1.2.1 采用试剂 血型检测卡、抗人球蛋白卡由博唯优提供, 抗 C、抗 c、抗 D、抗 E、抗 e、抗 M、抗 N、抗 P1、谱细胞、抗体筛选细胞、抗人球蛋白试剂由上海血液生物提供, 凝聚胺试剂由长春博德提供, 木瓜酶试剂和 O 型混合红细胞由实验室自制。

1.2.2 检测方法 (1) ABO、Rh、MNP 血型检测; 直接抗人球蛋白试验、间接抗人球蛋白试验和抗体筛查及鉴定均按《中国输血技术操作规程》(血站部分) 1997 版和试剂说明书进行。(2) 不规则抗体的筛查与鉴定检测: 筛查细胞、谱细胞和 O 型混合红细胞用凝聚胺法、木瓜酶法、抗人球蛋白试管法和微柱凝胶法进行不规则抗体的筛查与鉴定。(3) 抗体效价的检测: 选用 7 号和 3 号 Mur 阳性的红细胞细胞选用抗人球蛋白试验同时进行抗体效价检测。

2 结 果

该患者的血型 A, CCDEe, MP1; 患者直接抗人球蛋白实验为阴性。患者抗体筛查和鉴定结果: 筛查细胞、谱细胞和 O 型混合红细胞中除 2 号筛选细胞、7 号谱细胞在抗人球蛋白试管法和微柱凝胶法中出现阳性反应, 其他细胞均为阴性, 而且 3 号筛选细胞、7 号谱细胞在凝聚胺和木瓜酶中均无凝集。患者抗体效价用 7 号和 3 号 Mur 阳性细胞同时进行抗体效价的检测, 效价均为 8。患者血清与筛查细胞、O 型混合红细胞和谱细胞反应格局, 见表 1。

表 1 患者血清与筛查细胞、O 型混合红细胞和谱细胞反应格局

序号	Rh-hr					Kidd		MNSs					Duffy		Kell		Lewis		P	实验方法				
	D	C	E	c	e	JK ^a	JK ^b	M	N	S	S	Mur	Fy ^a	Fy ^b	K	k	Le ^a	Le ^b	P1	盐水	凝聚胺	酶	IAT	微柱凝胶
1	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-
2	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-
3	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
4	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	/	-	+	-	-	-	-	-	-
5	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-
6	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+
8	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	/	-	+	+	-	-	-	-	-
9	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
10	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-
S1	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	/	+	+	+	-	-	-	-	-	-
S2	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	/	-	+	-	-	-	-	-	-	-
S3	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	/	+	+	-	-	-	-	-	+	+
OC	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	-	-	-	-	-
自身	+	+	+	-	+	/	/	+	-	-	+	/	/	/	/	/	/	/	+	-	-	-	-	-

+: 阳性; -: 阴性; /: 表示无数据。