

中华人民共和国国家标准

染色体畸变分析估计生物剂量

GB/T 12715—91

Chromosomal aberration analysis for biological dose assessment

1 主题内容与适用范围

本标准规定了受电离辐射照射人员外周血淋巴细胞的细胞培养、染色体标本制备、染色体畸变分析及剂量估算方法。

本标准适用于受过量外照射人员的生物剂量估计。

2 术语

2.1 过量照射

工作人员受到大于国家标准推荐的相应剂量当量限值的照射。在本标准中指应急或事故情况下,超过 100 mSv 的照射。

2.2 持续照射

一般地指持续时间较长的照射,在本标准中,则指由于照射时间较长,需要对剂量效应加以修正的照射。

2.3 染色体

遗传基因的载体,存在于细胞内的线形结构,由脱氧核糖核酸(DNA)蛋白质和少量核糖核酸(RNA)等组成。在细胞分裂的中期变粗,其形态最为清晰,便于识别。每个中期染色体都含有两条染色单体。

2.4 染色体畸变

正常染色体在物理(如电离辐射)或化学等因素作用下发生的结构和数量上的异常。

2.5 生物剂量计

用以估计受照剂量的生物体系,这一生物体系受到照射后的反应与受照剂量之间存在着某种定量关系,从而可用来估算受照的剂量。

3 细胞培养与染色体畸变分析方法

3.1 材料

3.1.1 试剂

综合培养基(Eagal's MEM, TC-199, RPMI-1640 等)

小牛或胎牛血清

肝素钠

5-溴脱氧尿嘧啶核苷

33258 Hoechst

秋水仙素或甲基秋水酰胺

青霉素 (医用)

链霉素 (医用)

Giemsa 染料

甲醇 A. R

冰醋酸 A. R

碳酸氢钠 A. R

无离子水

玻璃器皿洗涤剂

3.1.2 器皿

培养瓶 (10~15 mL)

注射器 (各种容量)

注射针头 (各种规格)

试剂瓶 (各种容量)

刻度离心管 10 mL

吸管和橡皮头

载玻片

精密 pH 试纸 (6.0~8.4)

3.1.3 设备

冰箱 (最好也有-20℃的低温冰箱)

恒温培养箱 (最好带控温仪)

高压消毒锅

烘箱

恒温水浴锅

离心机 (甩平式)

药物天平 (感量 0.001 g)

紫外线灯或黑光灯 (20 W)

台秤 (最大称量 1 000 g)

双筒生物显微镜(带显微照相装置) (目镜 7X 或 10X,物镜 10X 和 100X 油镜)

接种箱或超净工作台

3.2 淋巴细胞培养

3.2.1 培养液配制

3.2.1.1 按选用的培养基说明要求,用灭菌无离子水溶解至工作液的浓度。

3.2.1.2 将血清加入至上述稀释的培养液中,占培养液总量的 12.5%~25%。

3.2.1.3 按规定将 PHA 用消毒的生理盐水溶解成工作液,加入至上述培养液中,加入量按使用说明或每 100 mL 培养液加入相当于 25 mg 莱豆的 PHA 提取液。

3.2.1.4 加入相当于培养液总体积 0.5%~0.8%的肝素工作液(500 IU/mL)。

3.2.1.5 于上述培养液中加入抗生素溶液,其最终浓度为:青霉素 100 IU/mL,链霉素 100 μg/mL。

3.2.1.6 用 5.5%的 Na₂HCO₃ 溶液调节培养基的 pH,可在 7.0~7.3 之间,以 7.2 为宜。

3.2.1.7 将上述培养液充分混匀后,即分装至每个培养瓶中,每瓶加入配制好的培养液 4~5 mL。培养瓶的容积、清洁度和无菌也十分重要。

3.2.2 接种和培养

3.2.2.1 用肝素溶液作抗凝剂,湿润灭菌注射器后,抽取静脉血 0.7 mL,于每培养瓶中加入 0.3 mL,平行接种两瓶。

3.2.2.2 对过量受照者,于照射后尽早取血,但不要超过 30 d,接种瓶数不少于 3 瓶。

3.2.2.3 为确保分析的细胞都为培养后第一次有丝分裂细胞,于每瓶培养物中加入 5-溴脱氧尿嘧啶

核苷溶液,使最终浓度为 $15\ \mu\text{mol}/\text{mL}$,然后放入恒温培养箱中避光培养。在培养 44 h 之后,加入适当浓度的秋水仙素液,使最终浓度为 $0.75\ \mu\text{mol}/\text{mL}$ 。此法为 FPG 染色法所必需。

3.2.2.4 可用此步骤代替 3.2.2.3,即在加入血样后,不加入 5-溴脱氧尿嘧啶核苷溶液。将培养物移至 37°C 的恒温培养箱中培养 24 h 后,加入适当浓度的秋水仙素溶液,使其最终浓度为 $0.5\sim 0.75\ \mu\text{mol}/\text{mL}$ 。秋水仙素稀释溶液也可在开始培养时加入。

3.2.3 注意事项

3.2.3.1 在操作时,必须严格注意在无菌条件下进行。

3.2.3.2 将培养物移入恒温培养箱后培养 48~50 h,注意避光并保持恒温箱内温度在 $37\pm 0.5^\circ\text{C}$ 的范围内。

3.3 染色体标本制备

3.3.1 低渗

3.3.1.1 用吸管将培养物轻轻吹散打匀,移至 10 mL 刻度离心管中,离心 ($800\sim 1\ 000\ \text{r}/\text{min}$, $6\sim 10\ \text{min}$),去掉上清液,留下 $1\sim 1.5\ \text{mL}$ 培养物。

3.3.1.2 加入预温至 37°C 的 $0.075\ \text{mol}$ 的 KCl 溶液 $6\sim 8\ \text{mL}$,打匀后进行低渗。

3.3.1.3 将离心管放入 37°C 的恒温水浴锅中停留 20 min,在 18 min 时加入 $0.5\sim 1\ \text{mL}$ 固定液到各管中进行预固定,旋即轻轻吹散打匀后离心,去掉上清液。

3.3.2 固定

3.3.2.1 加入新鲜配制的固定液(3:1 的甲醇与冰乙酸) $4\sim 6\ \text{mL}$,注意慢慢加入,轻轻打散细胞团块。直至 20 min 后才离心,去上清液。

3.3.2.2 再加入固定液 $2\sim 4\ \text{mL}$,静置 10 min(中间用吸管轻轻吹打 $1\sim 2$ 次)后,再离心去上清液,再加入 $0.2\ \text{mL}$ 新鲜配制的固定液。

3.3.3 制片

3.3.3.1 用作制片的载玻片,必须严格按照规定小心处理干净,用双蒸水浸泡,冰箱中保存(最好不超过一周)。

3.3.3.2 将余下 $0.2\ \text{mL}$ 左右的培养物,轻轻充分打匀,吸 $0.1\ \text{mL}$ 滴加在预冷的载玻片上。

3.3.3.3 接着由片的一方向另一方轻轻吹气,即从片子底部用吸水纸将水吸干,将片在酒精灯火焰上掠过 $1\sim 2$ 次,置晾片架上,待其自干。

3.3.3.4 重复制片步骤,使离心管内培养物制片两张。

3.4 染色

3.4.1 FPG 染色法

3.4.1.1 滴 10 滴 Hoechst 染液($0.5\ \mu\text{g}/\text{mL}$ pH 6.8 的磷酸缓冲液)于标本片上,并盖上盖玻片,将片放在紫外灯或黑光灯下照 0.5 h。

3.4.1.2 小心移走盖玻片,用 pH 6.8 的磷酸缓冲液仔细清洗。

3.4.1.3 放到 60°C 的 $2\times\text{SSC}$ 溶液 $20\sim 30\ \text{min}$,接着用蒸馏水冲洗。

3.4.1.4 用 Giemsa 染液染色,Giemsa 原液量为 pH 6.8 的磷酸缓冲液容积的 $5\%\sim 10\%$,染 3 min 以上。

3.4.1.5 用缓冲液浸泡短时间,蒸馏水洗,气干后封片。

3.4.2 通常的 Giemsa 染色

3.4.2.1 1 份 Giemsa 原液与 9 份 pH 为 $7.0\sim 7.2$ 的磷酸缓冲液混匀。

3.4.2.2 将片的正面朝下斜放在干净的玻璃板上,将染液沿片边加入, $15\sim 30\ \text{min}$ 后用自来水冲洗。

3.4.2.3 再用蒸馏水冲洗,置晾片架上晾干,即可观查。

3.5 显微镜下分析

3.5.1 进行镜下分析的工作人员,必须受过较严格训练,并具有辐射细胞遗传学的基本知识。

- 3.5.2 为尽量减少观察分析染色体畸变时判断标准的差异,应事先对工作人员进行训练,包括分析同一标本片的给定区域内的畸变类型及畸变数,并与其他人结果互相对比,以达到在±5%的差异范围为宜。
- 3.5.3 标本片上标签的规格、内容和粘贴位置应规范化。
- 3.5.4 分析片子时,应将片子标签始终放在镜台的同一方向。看片时应从片的一端开始,按横向或纵向顺序移动,选择可供分析的中期分裂细胞进行分析计数。
- 3.5.5 先在低倍镜下找出染色体长度适中、分散较好和极少重叠的中期细胞,再转油镜进行分析和记录 2N=46 或 46±1 条染色体的中期细胞。
- 3.5.6 一旦看到畸变时,应经他人确认,并记录该畸变在显微镜上位置的坐标。

4 估计剂量

- 4.1 电离辐射外照射的情况下,用染色体畸变分析作剂量估计的范围在 0.1~5 Gy 间。
- 4.2 各个实验室应建立各自的剂量效应标准曲线,注意都用上述相同的细胞培养和染色体分析方法。
- 4.3 应按本标准 3 所述要求,建立剂量效应标准曲线,要同时选用 2~3 名不吸烟的健康成年人血样进行离体照射,将其血样在照前、照射期间及照后(1.5~2 h)过程中,都应保持在 37℃ 的温度中,然后将受照射血液滴加到装有培养液的瓶中进行培养。
- 4.4 为使曲线的数学拟合有较优的适度和有更大可用性,从 0.1~5 Gy 间,最好要用 10 个以上的不同剂量进行照射以建立标准曲线。
- 4.5 对低传能线密度(LET)的电离辐射,以双着丝粒畸变或以无着丝粒畸变为指标,其剂量效应关系,以拟合二次多项式为宜。

$$Y = c + \alpha D + \beta D^2 \quad \text{或} \quad Y = \alpha D + \beta D^2 \quad \dots\dots\dots(1)$$

式中: Y——为某类染色体畸变的发生率,%;
 D——照射剂量,Gy;
 c——常数项,也为该类畸变本底值;
 β ——为剂量平方项系数;
 α ——为剂直线项系数。

对高 LET 辐射,剂量效应关系大多数为直线模式:

$$Y = c + \alpha D \quad \dots\dots\dots(2)$$

式(2)中符号同式(1)。

这样,可从检查到的畸变率估计出生物剂量值。

- 4.6 估计剂量时,要注意事故过量照射的射线种类、剂量分布均匀度、是一次全身均匀或局部照射还是迁延照射、取样时间及培养条件。
- 4.7 在估计剂量时,还应对受照者的情况有较详细调查,以除去其他因素对染色体畸变率的影响,如受照者在过量照射前半年内有无接受医疗照射;感染性疾病;近年来曾否接触有害物质(某些药物、病毒及有关化学品等);本人及家族有无遗传性疾病史等。
- 4.8 用染色体畸变分析法在估算全身受一次性均匀分布的贯穿性(X、 γ 射线和中子照射)的过量外照射较准确。对于不均匀照射,本法只能给出相当于一次全身均匀照射的等效剂量。对持续性外照射下的剂量估算,要引入一些因子,其准确性稍差。
- 4.9 为提高剂量估计的可信程度,应分析足够的细胞数以缩小可信区间,分析细胞数的多少,取决于受照剂量的高低(表 1)。

表 1 分析细胞数对剂量值估计的 95%可信限影响

Gy

估计剂量	可 信 限			
		分 析 细 胞 数		
		200	500	1 000
0.10	上限	—	0.34	0.25
	下限	—	<0.005	<0.005
0.25	上限	0.63	0.50	0.40
	下限	0.03	0.10	0.12
0.50	上限	0.87	0.71	0.64
	下限	0.19	0.30	0.36
1.00	上限	1.35	1.21	1.13
	下限	0.69	0.81	0.85

5 数据的记录、处理和保存

- 5.1 数据记录的目的是为了对每一事例、相应片号及原始情况有详细记载,便于日后查找和整理。
- 5.2 每个实验室应有工作日志、各自规格统一的标记、片号及原始记录纸、整理统计记录纸等。
- 5.3 原始记录纸除对每个细胞有记录格外,还应包括标本号、受检者姓名、制样日期、观察日期、观察者、所用显微镜号及各种畸变小计栏等。
- 5.4 记录畸变的文字和标记,应按国际染色体命名法书写,并应记下每一畸变在显微镜上的坐标位置。
- 5.5 对每例所受剂量的生物剂量估计方法、原始记录、估计剂量结果等资料,需要编档长期保存,以备查证。

附录 A
剂量估计中的实例
(补充件)

A1 γ 射线急性全身照射剂量估算步骤

A1.1 设在 γ 射线照射离体血后,建立的剂量效应模式为:

$$Y = 3.93 \times 10^{-4} + 8.16 \times 10^{-6}D^2 \quad \dots\dots\dots(A1)$$

式中: D 的单位为 rad, Y 的单位为畸变数/细胞。

A1.2 事故受照者在受照后 6 h 至 32 d 之间被取血 7 次,每次分析 300 个中期细胞,各次双着丝粒畸变数分别为 72、75、62、68、69、67 和 65,它们之间波动不大,取其平均值。

A1.3 观察了 2 100 个中期细胞,共 478 个双着丝粒染色体,代入式(A1)($Y=478/2\ 100$),求得 $D=1.44$ Gy,即平均全身吸收剂量为 1.44 Gy。

A1.4 再按 A4 所述步骤,算出 95%置信区间的上下限数值。

A2 γ 射线与中子对全身的急性混合照射的剂量估算步骤

A2.1 设中子对 γ 射线的吸收剂量比值为 2:3,中子为 0.7 MeV 的裂变中子, γ 射线为 ^{60}Co γ 射线,计数 100 个中期细胞有 120 个双着丝粒,即每个细胞有 1.2 个双着丝粒。其剂量效应曲线分别为:

$$0.7\ \text{MeV}\ \text{中子}\quad Y = 0.0005 + 8.32 \times 10^{-3}D \quad \dots\dots\dots(A2)$$

$$\gamma\ \text{射线}\quad Y = 0.0005 + 1.64 \times 10^{-4}D + 4.92 \times 10^{-6}D^2 \quad \dots\dots\dots(A3)$$

式中 Y 和 D 的单位同式(A1)。

A2.2 因为是混合的 γ 射线和中子照射,故进行剂量估计时按下述步骤进行。

表 A1 对 γ 射线和中子混合照射后进行剂量估算的步骤

步骤 A2.3 和 A2.7 中子剂量,Gy	步骤 A2.4 γ 射线剂量,Gy	步骤 A2.5 γ 射线照后, 双着丝粒/细胞	步骤 A2.6 中子射线照后, 双着丝粒/细胞
1.44	2.16	0.266	0.934
1.12	1.68	0.167	1.032
1.24	1.86	0.201	0.999
1.20	1.80	0.189	1.011
1.214	1.82	0.194	1.006
1.21	1.815	—	—

A2.3 每细胞 1.2 个双着丝粒相当于 1.44 Gy 的中子照射。

A2.4 $1.44\ \text{Gy} \times 3/2 = 2.16\ \text{Gy}$ γ 射线

A2.5 2.16 Gy γ 射线相当于每细胞为 0.266 个双着丝粒畸变。

A2.6 $1.2 - 0.266 = 0.934$ 是由中子诱发的双着丝粒产额。

A2.7 每细胞 0.934 个双着丝粒相当于 1.12 Gy 的中子剂量(又回到步骤 A2.3)。

A2.8 接着又按步骤 A2.4 算出 γ 线剂量为 1.68 Gy, 如此反复下去多次, 即可得到近似估计值, 中子剂量为 1.21 Gy, γ 射线剂量为 1.82 Gy。

A2.9 再按 A4 所述步骤算出 95% 置信区间的上限和下限值。也可用以下简法求得:

$$\text{对中子 } Y_n = c + \alpha_n D_n \dots\dots\dots (A4)$$

$$\text{对 } \gamma \text{ 射线 } Y_r = c + \alpha_r D_r + \beta_r D_r^2 \dots\dots\dots (A5)$$

式中: Y_n ——中子照射诱发染色体畸变率;

α_n ——直线模式中的一次项系数;

D_n ——中子吸收剂量, Gy;

Y_r —— γ 射线诱发染色体畸变率;

α_r ——直线项系数;

β_r ——平方项系数;

D_r ——射线吸收剂量, Gy;

如已知 $D_n = R \cdot D_r \dots\dots\dots (A6)$

式中: R ——中子与 γ 射线的吸收剂量比值。

则 $Y_{n+r} = c + (R\alpha_n + \alpha_r)D_r + \beta_r D_r^2 \dots\dots\dots (A7)$

解 2 次式求出 D_r , 而 $D_n = R \cdot D_r$, 故可求出 D_n 。

A3 持续照射

A3.1 在低 LET 射线持续照射时, 剂量平方项的系数下降。

A3.2 此时, 剂量平方项应引入一个依赖于时间的因子, 即 G 函数, 故公式可写为:

$$Y = \alpha D + \beta G(X) D^2 \dots\dots\dots (A8)$$

式中: Y 、 D 、 α 、 β 均与正文中式(1)同。

$$\text{而 } G(X) = \frac{2}{X^2} [X - 1 + \exp(-X)] \dots\dots\dots (A9)$$

$$X = t/T \dots\dots\dots (A10)$$

t 为照射持续时间, T 为染色体断裂的平均存在时间(~ 2 h)。

A3.3 设一人受照于工业照相的 γ 射源 8 h, 观察了 1 000 个中期细胞, 有 100 个双着丝粒畸变。

按公式计算, 相当于受 1.26 Gy 照射

引入 $G(X)$, $t/T = 8/2 = 4$

计算得 $G(X) = 0.377$

代入式(A8)后, 计算得剂量为 1.92 Gy。

A3.4 采用 G 函数进行计算的条件为, 照射时剂量率比较恒定, 受照的剂量大于二次项系数与一次项系数的比值, 即为 λ 值(β/α)。

A4 剂量估计中的不确定性的计算方法

用下例表示。

例:某人受 γ 射线照射后,被分析了500个中期细胞,观察到25个双着丝粒畸变,即每个细胞为0.05。按下述步骤计算:

A4.1 按数学模式($Y=5\times 10^{-4}+1.64\times 10^{-4}D+4.92\times 10^{-6}D^2$),求得剂量 D 为0.85 Gy。

A4.2 由于标准曲线不确定性,畸变产率的标准误为0.002 15 双着丝粒/细胞。

A4.3 由于计数的畸变产率标准误为 $\sqrt{25}/500$,相当于每细胞0.01个双着丝粒(实际应用时,也可只计算此项)。

A4.4 总标准误= $[(0.002\ 15)^2+(0.01)^2]^{\frac{1}{2}}=0.010\ 2$

A4.5 故观察到的畸变产率的95%可信限为 $0.05\pm 1.96(0.010\ 2)$,即每细胞为0.03和0.07个双着丝粒,此两值代入剂量效应曲线后,分别算得为0.63和1.03 Gy的吸收剂量。

附录 B

染色体畸变的分类

(参考件)

染色体畸变是辐射作用的敏感指标之一。因而,准确认识畸变类型,对生物剂量估算的准确性,有十分重要的关系。

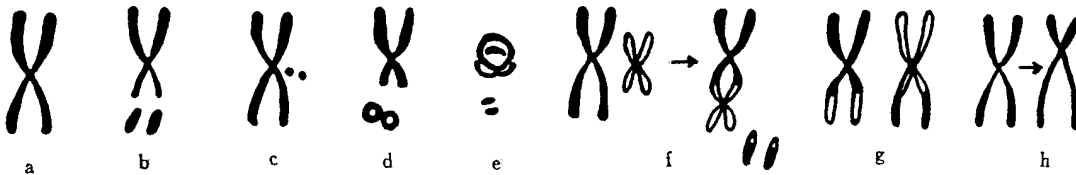


图 B1 各种类型的染色体型畸变模式图

B1 染色体型畸变

B1.1 非稳定性畸变

B1.1.1 末端缺失和中间缺失

B1.1.1.1 末端缺失:是一对无着丝粒断片,来源于横贯染色体臂的一个断裂,不伴随有互换的畸变(图 B1. b)。a 为正常染色体。

B1.1.1.2 中间缺失:染色体间有一对较小的染色质小点,是由横贯染色体臂的两个极端靠近的断裂而来(图 B1. c)。

B1.1.1.3 无着丝粒环:若上述两个断裂在同一臂上间距较大,而这一对断片的两个断端互相重接,则形成无着丝粒环(图 B1. d)。

B1.1.2 非对称性的染色体间互换

B1.1.2.1 双着丝粒染色体:辐射在两个染色体同时诱发末端缺失,两个染色体的断端互相接合,而两对断片断端也出现接合,因而形成一个双着丝粒染色体和一对断片(图 B1. f)。

B1.1.2.2 三着丝粒或更多着丝粒的染色体:三着丝粒染色体的出现伴随有两对断片,即伴随的断片数应为形成的多着丝粒染色体的着丝粒数减 1。

B1.1.3 非对称性的染色体内部互换

着丝粒环染色体:在一个染色体的两臂上,都出现横贯性断裂,带着丝粒染色体的两个断端彼此弯过来互相接合成环状,而末端两对断片的断端接合成一对断片(图 B1. e)。

B1.2 稳定性畸变

B1.2.1 对称性的染色体间互换(相互易位)

在甲乙两个染色体臂上同时发生断裂,甲染色体的断片与乙染色体断端接合,乙染色体的断片与甲染色体断端接合而成两个染色体。在用常规染色的标本上,难于发现,除非发生易位后的染色体与正常核型的染色体十分不同,才能观察到(图 B1.g)。

B1.2.2 对称性的染色体内互换

又称倒位,互换发生在同一个染色体内,即染色体的长臂和短臂上都出现一次横贯性断裂,接着是染色体倒位 180°,其断端再与两末端断片重接而成。这种畸变能否分辨出来,取决于着丝粒的位置改变是否明显(图 B1.h)。



图 B2 无着丝粒断片(长箭头)和缺失(短箭头)



图 B3 双着丝粒和伴随断片

B2 染色单体型畸变

B2.1 末端缺失和中间缺失

缺失发生在一条染色单体上,因而不是对称的,而是单一的碎片或在单体附近或距单体较远。

B2.2 非染色质损伤

此种损伤也称为裂隙,是在染色体的一条或两条单体上出现的不着色或染色非常浅的小区段,其宽度小于染色单体的直径。

B2.3 单体等位缺失

断位发生在两条染色单体的同一位置上。

B2.4 非对称性互换

此种互换在某种程度上与染色体型的双着丝粒畸变形成有些类似,断裂发生在两个染色体的单体上(图 B6)。

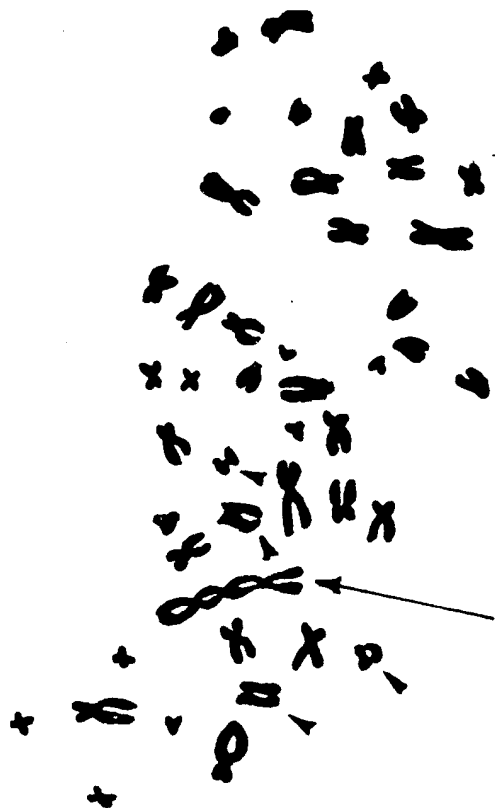


图 B4 三着丝粒和双着丝粒染色体及三对伴随的断片(箭头指处)



图 B5 中间缺失或称微小体(箭头指处)



图 B6 染色单体的非对称性互换

B2.5 对称性互换

此种互换在某种程度上与染色体的相互易位畸变的形成有些相似,两个单一断片发生了交换(图 B7)。

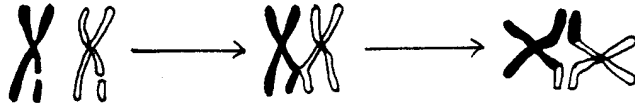


图 B7 染色单体的对称性互换

附加说明：

本标准由中国核工业总公司提出。

本标准由中国辐射防护研究院负责起草。

本标准主要起草人邓志诚。