

ICS 07.080

CCS A 40

团体标准

T/SDHCST002—2024

外周血染色体核型分析技术检测操作技术规范

Technical Specification for Chromosome Karyotype Analysis in Peripheral Blood

2024 年 6 月 12 日发布

2024 年 7 月 10 日实施

目录

前 言 2

1 范围 1

2 规范性引用文件 1

3 术语和定义..... 1

4 符号和缩略语 2

5 检测目的 2

6 检测周期 3

7 染色体异常类型 3

8 实验方法 5

9 注意事项 6

10 质量控制要求 10

前 言

本标准依照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化标准的结构和起草规则》的规定起草。

本标准的某些内容可能涉及专利，本标准的发布机构不承担识别这些专利的责任。

本标准由山东省保健科技协会提出并归口。

本标准起草单位：山东省药物研究院、淄博市妇幼保健院、山东卫康医学检验有限公司。

本标准主要起草人：李胜、牟凯、吴慧、吕国健、刘轶、孙学成、刘娜、郑茂坤、王梦晗、刘智鸿、王文君、高德海、夏梅、黄正、黄璐璐、谢春波、孟祥吉、刘晓峰、孙丹丹、车美玲

本标准为首次发布。

外周血染色体核型分析技术检测操作技术规范

1 范围

本文件规定了外周血染色体核型分析技术的检测目的、检测周期、检测疾病、仪器与试剂、操作步骤、注意事项、质控标准、报告发放。

本文件适用于发育迟缓、智力障碍、多发畸形婴幼儿、儿童；夫妻不孕不育者以及其他有检测需求的人群的外周血染色体核型分析。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本标准必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本标准；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本标准。

GB 19489 实验室生物安全通用要求；

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法；

《染色体核型检验诊断报告模式专家共识》；

《外周血染色体核型分析技术》；

3 术语和定义

3.1 外周血

外周血（Peripheral Blood）是除骨髓之外的血液，是指被造血器官释放到循环系统且参与集体血液循环的血。

3.2 核型

核型（Karyotype）是指染色体组在有丝分裂中期的表型，是染色体数目、

大小、形态特征的综合。

3.3 染色体核型分析技术

染色体核型分析技术（Detection of Chromosome Karyotype）是以分裂中期染色体为研究对象，根据染色体的长度、着丝点的位置、长短臂的比例、随体的有无等特征，并借助现代技术对染色体进行分析、比较、排序和编号，根据染色体结构和数目的变异情况进行诊断。

4 常见符号和缩略语

del: 染色体缺失
inv: 染色体倒位
t: 相互易位（平衡易位）
der: 衍生染色体
rob: 罗氏易位
r: 环状染色体
dic: 双着丝粒染色体
i: 等臂染色体
mos: 嵌合体
dn: 新发染色体异常
dup: 重复
pat: 父系来源
mat: 母系来源
mar: 标记染色体

5 检测目的

本标准规范外周血染色体核型分析技术的检测流程，有助于染色体异常患儿得到较早的干预和治疗，对于肿瘤患者的疗效评估、预后判断具有重要的临床

意义。本标准还可以指导不孕不育患者的染色体检查，为不孕不育患者下一步的治疗提供依据。

6 检测周期

外周血染色体核型分析的检测周期为 20 天。

7 染色体异常类型

7.1 染色体数目异常

7.1.1 整倍体改变

染色体数目以染色体组为单位的增减，即整倍体改变，如单倍体、三倍体、四倍体等，三倍体以上的称为多倍体。

7.1.2 非整倍体改变

如果一个体细胞的染色体数目增加或减少了一条或数条，这种细胞或个体称为非整倍体，是临床上最常见的染色体异常类型。非整倍体可分为亚二倍体以及超二倍体，多数是由于在生殖细胞成熟过程或受精卵早期卵裂过程中，发生了染色体不分离或染色体丢失。

7.2 常见的染色体结构异常

7.2.1 缺失

染色体某处发生断裂后，产生的无着丝粒片段丢失所形成的一种结构畸变。分为末端缺失和中间缺失，用符号 del 表示。

7.2.2 倒位

一条染色体发生两次断裂，两断裂点中间片段旋转 180° ，又重新连接，分为臂内倒位和臂间倒位。

7.2.3 易位

一条染色体的断裂片段重接到另一条非同源染色体的臂上，称为易位。易位是最常见的结构畸变，包括相互易位、罗伯逊易位（罗氏易位）等。

7.2.4 环状染色体

一条染色体的长、短臂同时各发生一次断裂后，含有着丝粒节段的长、短臂的断端相连。

7.2.5 双着丝粒染色体

两条染色体分别发生一次断裂后，两个含有着丝粒的染色体的两臂断端相连接。

7.2.6 等臂染色体

在正常的细胞分裂中期，连接二姐妹染色单体的着丝粒进行纵裂，形成两条各具有长短臂的染色体。

7.2.7 嵌合体

是指在一个生物体内，存在着两种或多种类型的细胞系。这些细胞系可以来自相同的来源（同源嵌合体），也可来自不同的来源（异源嵌合体）。

8 实验方法

8.1 材料要求

- (1) 生产和检定用设施、原料及辅料、水、器具等应符合《中华人民共和国药典》2010年版第三部"凡例"的有关要求。
- (2) 所有试剂、材料应有国家批准文号或符合相关标准要求。
- (3) 培养基制备所接触的材料和试剂，应无污染。
- (4) 培养过程中所使用的皿或瓶，应为无划痕的器皿。

8.2 仪器及试剂

8.2.1 仪器

新华医疗超净工作台（CJV1500-Y）、隔水式电热恒温培养箱（上海跃进 PYX-DHS400-L）、HANABI-PII Plus、数显恒温三用水浴箱（江苏金域国胜实验仪器厂）、通风柜（山东-豪迈）、离心机（雷勃尔 LB5-2A/京立牌 LD5-10B）。

8.2.2 试剂

淋巴细胞培养基（达晖生物）、甲醇（国药，AR 级）、冰醋酸（国药，AR 级）、吉姆萨染液（上海乐辰）、低渗液（威海鑫普）、秋水仙素（达晖生物）、纯水。

8.3 培养基

无菌条件下配制，每瓶所含下列试剂：

- (1) RPMI 1640或199 90%
- (2) 小牛血清 10%
- (3) PHA 0.1mL 3%
- (4) 肝素 10u/mL 2%

(5) 双抗 100u/mL

(6) 分装于10mL培养瓶内，每瓶5mL培养液，封口置冷藏柜备用。

8.4 操作流程

8.4.1 接种前准备

(1) 接种前先用 1:1000 的 84 消毒剂将无菌净化的台面擦拭消毒，打开超净工作台的电源开关，同时用紫外线灯将接种室消毒 30 分钟。

(2) 下午 14:00 从冰柜中取出外周血染色体培养基，将其恢复至室温。

(3) 采血：采血前先将病人的申请单核对信息并完善，然后用碘伏消毒液消毒后抽取静脉血 5mL，用肝素锂采血管保存。

(4) 录入信息：由实验室操作人员统一审核申请单信息和采血质量，合格后带回实验室进行编号、贴好标签并登记。

8.4.2 接种

(1) 技术人员于下午 16 点左右进入无菌接种室，戴好口罩、帽子和一次性手套。用一次性无菌注射器（5mL）抽取 1-2mL 病人的静脉血以无菌的方法（酒精灯灭菌法）注入外周血培养基中。接种时：将 5mL 空针倾斜 45° 角，滴入培养基 30-35 滴血，幼儿 18-20 滴。

(2) 采用两线培养并在接种记录单上登记。

8.4.3 培养

(1) 将完成接种的培养瓶，分别放入 1 号和 2 号隔水式电热恒温培养箱中，37℃ 条件下培养 69~72 小时。

(2) 培养期间注意观察培养基有无凝血、溶血或者污染的现象。

8.4.4 制片

8.4.4.1 手工制片法

(1) 加秋水仙素：在培养完成前 25 分钟，向培养瓶内加秋水仙素 4-5 滴，轻转摇匀，置于隔水式电热恒温培养箱中继续培养 25 分钟。

(2) 离心：从恒温箱中取出培养瓶，把培养液混匀后倒入 15mL 离心管中，2000 rpm/min, 离心 10 分钟, 吸弃上清液，保留管底的沉淀物。

(3) 低渗：

①低渗液 (0.075M/L 氯化钾) 配制，取低渗液 (氯化钾) 2 瓶 (达辉 0.01mg 溶 500mL 水) 溶于 1000mL 的容量瓶中，加二蒸水，充分溶解后定容，放到室温备用。

②低渗液预热：需提前 60 分钟配制，使用时预先置于 37°C 水浴箱中预热。

③重悬：每管加已预温的 6mL 低渗液 (37°C, 30 分钟)，用吸管混匀，使细胞悬浮于 6mL 低渗液中，置 37°C 水浴箱中温育 25 分钟。

(4) 固定

①预固定：现用现配固定液 (甲醇：冰醋酸=3：1)，防止挥发。在完成低渗后，沿管壁缓慢加入 1.5mL 固定液，轻轻混匀，1800rpm/min 离心 10 分钟后弃上清液，保留沉淀物。

②固定：沿管壁加入 6mL 固定液，用吸管将沉淀物混匀；置 37°C 恒温水浴箱中固定 10 分钟，1800 rpm/min 离心 10 分钟弃上清液，保留沉淀物；

③二次固定：再加 6mL 固定液，混匀后室温过夜，第二天早上 1800rpm/min 离心 10 分钟后弃上清液保留沉淀物。

8.4.4.2 自动收获制片法

在 HANABI-PII Plus 全自动收获仪中进行。

(1) 开机运行机器 (检查气阀是否关闭)；

(2) 试剂交换：①点击“Reagent Exchange”；②低渗液条件下选择“Hypotonic”；③固定液选择“Fixative 1”；

- (3) 放入标本：①点击“MAN”回到主界面；②选择“Select Protocol”；③选择 8/12/16/20 的量，然后依次点击 “NEXT”对称放入标本；
- (4) 标本放置完成后盖上防溢盖，长按“Alt start”运行；
- (5) 收获完成后依次点击 “NEXT”取出标本；
- (6) 试剂交换：
- ①点击“Reagent Exchange”；
 - ②H₂O 条件下选择“Hypotonic”；
 - ③固定液空放选择“Fixative 1”；
- (7) 关闭电源；
- (8) 放气：按住气管打开放气阀，结束后关闭气阀；顶一下另一个气阀。
- (9) 标本存放：
- ①依次取出放在试管架上；
 - ②准备固定液（甲醇：乙酸=3:1）；
 - ③每个收获后的离心管内加入 6mL 固定液后，拧盖保存。

8.4.5 滴片

- (1) 根据细胞数量, 加适量新鲜固定液（1.5mL）制成细胞悬液,
- (2) 打开通风橱、加湿器，调节温湿度（T: 25℃；W: 40%），然后在通风橱内用滴管吸取细胞悬液, 每张片子分散均匀滴 3-4 滴,
- (3) 当在没有滴片仪的情况下维持滴片条件稳定的方法：
- ①放置室内温湿度计，注意滴片温度和湿度，干燥时开加湿器或将空调调至制冷模式增加湿度；湿度过大时调用空调抽湿模式除湿。
 - ②在小范围空间进行操作，使用加湿器或其它小型设备来维持需要的温湿度。湿度超过 30%可以尝试用干片；湿度在 30%以下用水片。
 - ③滴片前用湿抹布擦实验台或地面喷水，增加湿度。北方地区天气干燥时选择蒸汽法，夏天湿度 60%到 70%时用冰片过火方式制片。

8.4.6 烤片

滴片后等待 1-2 分钟，立即放入 80℃烤箱中, 烤片 3-4 小时。

8.4.7 显带

8.4.7.1 G 显带

(1) 取立式小染色缸 2 个，其中一个染缸加生理盐水预温备用；另一个染缸加配好的缓冲液适量，再加姬姆萨染液 3 滴管充分混匀，均放 37℃ 预温。

(2) 胰蛋白酶：每瓶成品胰酶溶于 50mL 蒸馏水，37℃ 充分溶解 30 分钟后使用。预测胰酶消化时间，取已烤干的标本 1 张，放入胰酶中，估计消化时间。

(3) 染色：从胰酶缸中取出，浸泡生理盐水，立即放入姬姆萨染液中浸泡 2 分钟，取出玻片后用流动清水冲洗。

注意：如预测好消化分带和染色时间，即可将成批标本片消化染色。

(4) 镜检：G 显带后的玻片先在低倍镜下进行全视野检查，挑选良好的分裂相后，改用油镜观察，若染色体染色分散均匀，分裂相较多，显带清晰，说明此次试验符合质控标准

8.4.7.2 C 显带

(1) 预热：将恒温水浴箱调至 60℃，向一个染缸中加入 50mL 蒸馏水后放入水浴箱预热至 60℃。

(2) 试剂配制：

① 2×SSC 液 200mL 称量分析纯氯化钠 3.52g+柠檬酸钠 1.8g，放入容量瓶中，加蒸馏水定容至 200mL，摇匀至完全溶解，取 50mL 加入染缸中放水浴箱预热至 60℃。

② 5% 的氢氧化钡 称量分析纯氢氧化钡粉末 2.5g 加至前面预热好的 50mL 蒸馏水中，充分混匀，待用。

(3) 制片：常规外周法血制备的标本。

① 氢氧化钡处理：将标本浸入 60℃ 的、5% 的氢氧化钡溶液中约 10 秒至几分钟（常规：1 分 30 秒-2 分 30 秒；设置 8-16 分钟时间梯度），用流水冲净玻片。

② 2×SSC 液处理：在 60℃ 的 2×SSC 液中处理 90 分钟后用流水冲净玻片。

(4) 染色：吉姆萨染色 1 分 10 秒-2 分钟，流水冲净，空气干燥。

(5) 镜检：在显微镜高倍目镜下检查标本的 C 显带情况，如着丝粒区域或异染色质部位、次缢痕部位及 Y 染色体深染，染色体其他部位染色浅，即为可用标

本。若观察到染色体均呈白色，则可能是氢氧化钡处理或 $2\times\text{SSC}$ 液预热过度导致。

9 注意事项

- (1) 秋水仙素处理时间过长，分裂相多，染色体短小；反之，分裂相少，染色体细长，均不宜观察染色体形态及计数。故秋水仙素的浓度及时间须准确掌握。
- (2) 低渗使红细胞膜破裂，淋巴细胞膨胀，低渗液浓度及低渗处理时间要适当，且低渗后混匀细胞动作要轻柔，否则引起核膜破裂、染色体散失。
- (3) 离心转速应适中：离心速度过高，细胞团不易打散；反之，细胞易丢失
- (4) 固定液应现用现配。
- (5) 载玻片一定要洁净，否则影响染色体分散效果。

10 质量控制

10.1 检测分析前质量控制

(1) 标本收集和处理

由实验室操作人员统一审核申请单信息和采血质量，合格后带回实验室进行编号、贴好标签并登记。

(2) 标本质量

建立并记录标本接收和拒收的关键标准，如是否有以下情况：

- ①样本出现溶血的情况；
- ②样本标签不清晰的情况；
- ③样本信息与临床信息不符的情况；
- ④血浆样本出现裂管、开盖、泄漏或样品外溢情况等；并保证在研究、检测过程中符合伦理和法律的要求。

10.2 检测分析中质量控制

10.2.1 细胞培养及制片的控制规定

(1) 技术人员对标本进行核对后，在无菌条件下进行接种。每份标本接种 2 瓶（所用培养基必须做预试验），分别置两个不同的 37℃ 培养箱培养。

(2) 所有用于细胞培养的试剂，必须做预试验。

(3) 滴片时应先在载玻片上贴上标签后再滴片，每份标本使用一块载玻片。

(4) 制备的染色体短小、发泡、发毛、条带不清晰、肥胖、分收不足、过度分收或分裂相少时，可有以下解决方案：

①秋水仙素处理不当，如果处理时间太短，则标本中分裂细胞少；相反，如果处理时间太长，则标本中分裂细胞虽多，但其染色体太短，以致形态模糊，不容易观察；

②低渗处理不当，低渗处理细胞时间过长，细胞膜往往过早破裂，导致细胞或染色体丢失；如果处理时间不足时，细胞肿胀不够，则染色体分散不良；

③离心速度不合适，如果细胞低渗后，离心速度太低，吸弃上清时易导致细胞丢失；离心速度过高，会使细胞过早破裂，导致分散良好的染色体丢失，从而使制出的玻片分裂相较少或大部分为分散效果不佳的分裂相；

④标本固定不充分，如固定液不新鲜或者甲醇、冰醋酸质量不佳，会导致染色体形态模糊、不分散；

⑤玻片有油渍，致使滴在玻片上的细胞悬液不能均匀分散；

⑥细胞悬浮液浓度不可过高或过低，需根据细胞量决定；

⑦严格控制温湿度，滴片时的最适温度为 25℃ 左右、湿度为 50-55%。

(5) 从接种至出报告由一人主要负责完成，另一人负责审核。

10.2.2 数据存储要求

检测数据应当进行安全备份，并与互联网物理隔离。可追溯原始结果的核心数据，保存规定的期限。详细说明并记录数据存储路径，如有本地存储，应该说明本地存储所具备的储存容量，和存储备份的时间表及建议。应说明数据库是否

为云端存储，及数据库更新的流程和管理模式。

10.2.3 阅片及校片规定

(1) 两线随机计数 20 个细胞，染色体数目为 46 条时，则选择 3-5 个细胞进行核型分析。

(2) 如发现丢失同一条染色体有 3 个细胞则算一个细胞系，增加同一条染色体有 2 个细胞则算一个细胞系，同时具有两种以上细胞系的应加大计数到 100 个，并标出其所占比例。

(3) 对性畸形及高度怀疑性染色体异常的病人应加大染色体的计数，即计数 60 个，90 个或更多细胞。

(4) 技术人员完成阅片后，由同组人员进行校对，结合临床签发报告双方复核后将报告发出。

(5) 所有实验室记录、病历资料、临床报告、咨询记录、染色体玻片标本由专职技术员清理归档。并严格执行国家有关隐私权的规定。

10.3 检测分析后质量控制

(1) 报告的输出应该可以溯源到原始数据，如果报告输出是可以通过网络链接的，确认和批准的流程应该建立；

(2) 应建立标准化的结果报告格式，目前的报告内容，至少要有检测项目及项目设定阈值、样本编号、样本基本信息、采样时间地点、检测时间地点、采用的仪器设备、试剂、检测人员、检测结果、结果解释建议和发报告的流程及信息。