

辐射生物剂量估算 早熟染色体凝集环分析法

Estimation of radiation biological dose—analyzing premature chromosome  
condensation ring

2018 - 06 - 15 发布

2018 - 12 - 01 实施

中华人民共和国国家卫生健康委员会 发布

## 前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由国家卫生标准委员会放射卫生标准专业委员会提出。

本标准起草单位：中国疾病预防控制中心辐射防护与核安全医学所、中国医学科学院放射医学研究所、苏州大学。

本标准主要起草人：刘青杰、赵骅、陆雪、刘强、朱巍。

# 辐射生物剂量估算 早熟染色体凝集环分析法

## 1 范围

本标准规定了通过分析早熟染色体凝集环，对电离辐射外照射受照人员进行生物剂量估算的方法。本标准适用于发生在受照后1个月内、吸收剂量在4 Gy~20 Gy范围内的X或 $\gamma$ 射线、急性全身均匀或近似均匀外照射的受照人员的生物剂量估算。

## 2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 28236—2011 染色体畸变估算生物剂量方法

## 3 术语和定义

GB/T 28236—2011界定的以及下列术语和定义适用于本文件。

### 3.1

**早熟染色体凝集** premature chromosome condensation; PCC

利用化学或生物的方法，间期淋巴细胞核被诱导提前进入有丝分裂期，使间期淋巴细胞核内极度分散状态的染色质凝缩成细纤维状的染色体样结构。

### 3.2

**早熟染色体凝集环** premature chromosome condensation ring; PCC-R

当早熟染色体凝集断裂后，一条染色体的两个断裂末端重接形成的环状染色体。

### 3.3

**剂量-效应曲线** dose-effect curve

某种生物体系受到照射后的反应与受照射剂量之间存在着某种定量关系，可用适当的数学模式描述，制备出相应的反应效应与受照剂量之间关系的刻度曲线，可用其估算受照剂量。

## 4 早熟染色体凝集标本制备

### 4.1 主要仪器和试剂配制

主要仪器和试剂配制参见附录A。

### 4.2 早熟染色体凝集标本制备

#### 4.2.1 样品采集

抽取人静脉血1 mL~2 mL, 注入肝素抗凝管。

#### 4.2.2 样品接种和细胞培养

将0.5 mL肝素抗凝全血加入到4.5 mL含有20%胎牛血清的全培养基(RPMI 1640)中, 每个样品设2个平行样, 37°C恒温培养箱中培养46 h~47 h后, 加入终浓度为50 nmol/L的花萼海绵体诱癌素A(Calyculin A)或终浓度为500 nmol/L的冈田酸(Okadaic acid), 继续培养1 h~2 h。

#### 4.2.3 收获细胞

用吸管吹打培养物, 转入15 mL刻度离心管中, 水平离心机250 g离心10 min, 弃上清液, 约留1 mL剩余沉淀物。

#### 4.2.4 低渗

每离心管中加入37°C预温的0.075 mol/L氯化钾(KCl)至8 mL~10 mL, 用吸管吹打均匀, 置37°C低渗10 min~30 min。

#### 4.2.5 预固定

每离心管中加入1 mL~2 mL新配制的固定液[甲醇/冰乙酸 = 3/1(体积比)], 用吸管轻轻吹吸混匀, 250 g离心10 min, 弃上清液。

#### 4.2.6 固定

每离心管中加入8 mL固定液, 轻轻吹吸混匀, 室温固定20 min, 250 g离心10 min, 弃上清液。

#### 4.2.7 第二次固定

加入8 mL固定液, 轻轻吹吸混匀, 室温固定15 min, 250 g离心10 min, 弃去大部分上清液, 留适量上清液。

#### 4.2.8 细胞悬液的制备

用吸管吹打混匀剩余上清液和沉淀, 制得细胞悬液。

#### 4.2.9 制片

将2滴~3滴细胞悬液滴在预冷玻片上, 过火2 s~3 s, 室温自然干燥。

#### 4.2.10 染色

用pH 6.8的磷酸缓冲液将吉姆萨染液(Giemsa)稀释成8%溶液, 染色8 min~10 min, 自来水冲洗后晾干。

### 5 早熟染色体凝集环的分析和记录

#### 5.1 光学显微阅片

在光学显微镜的低倍镜( $\times 10$ 倍)下, 寻找合适的早熟染色体凝集分裂相; 然后在油镜( $\times 100$ 倍)下将早熟染色体凝集分裂相调至视野正中间, 计数早熟染色体凝集环的数量。

## 5.2 早熟染色体凝集环判定标准及计数标准

早熟染色体凝集环分为空心环和实心环。空心环是呈中空的圆环形或不规则环形结构。实心环是呈实心球状的结构，稍致密，直径大于早熟凝集染色单体的横径。在分析时不计数实心环。早熟染色体凝集环示例参见附录B。

两条姐妹染色单体排在一起的分裂相称作G2/M期早熟染色体凝集分裂相，这种分裂相中出现的环称作G2/M期早熟染色体凝集环。G2/M期早熟染色体凝集分裂相中排在一起的2个大小相近的环状结构，计数1个早熟染色体凝集环。两条染色单体明显处于分开状态的分裂相称作M/A期早熟染色体凝集分裂相，这种分裂相中出现的环称作M/A期早熟染色体凝集环。M/A期早熟染色体凝集分裂相中的每个环状结构，计数1个早熟染色体凝集环。

## 5.3 结果数据的记录和保存

检测到早熟染色体凝集环时，需要进行拍照。将选择分析的每一个早熟染色体凝集分裂相记录在早熟染色体凝集环分析记录表中。早熟染色体凝集环分析记录表参见附录C。

## 6 剂量-效应曲线的建立

### 6.1 样品采集

抽取人静脉血6 mL~8 mL，注入肝素抗凝管。

### 6.2 供血者要求

2名~3名健康成年人，非放射工作者，男女均可，年龄在18岁~60岁，半年内无急慢性疾病、无射线和化学毒物接触史，近一个月内无病毒感染史。

### 6.3 照射条件

样品均匀照射；X或 $\gamma$ 射线照射剂量范围在4 Gy~20 Gy；照射剂量率选择0.3 Gy/min~1 Gy/min，照射剂量点在6个~8个（均匀布点）；37℃进行照射。照射后将样品置37℃恒温培养箱中修复2 h，然后进行细胞培养。

### 6.4 早熟染色体凝集标本制备、分析及记录

早熟染色体凝集标本制备、分析和记录按照第4章~第5章中所述方法进行。

### 6.5 数据处理

两组间早熟染色体凝集环每细胞数的比较用泊松分布的U检验，多组间早熟染色体凝集环每细胞数的比较用卡方检验；早熟染色体凝集环每细胞数与照射剂量的关系进行曲线拟合，对拟合回归方程进行假设检验用卡方检验。

### 6.6 剂量-效应曲线拟合

参照GB/T 28236-2011中4.3，对X或 $\gamma$ 射线诱导的早熟染色体凝集环与受照射剂量之间的剂量-效应关系以拟合二次多项式为宜，按照式（1）进行拟合：

$$Y = c + \alpha D + \beta D^2 \dots\dots\dots (1)$$

式中：

$Y$  —— 早熟染色体凝集环每细胞数；

- $c$  —— 常数项, 早熟染色体凝集环每细胞数本底值 (PCC环/分裂相);  
 $\alpha$  —— 剂量一次项系数;  
 $D$  —— 照射剂量, 单位为戈瑞 (Gy);  
 $\beta$  —— 剂量二次项系数。

## 6.7 建立剂量-效应曲线

进行剂量估算的实验室应建立剂量-效应曲线; 有条件的实验室可建立不同辐射类型、不同剂量率的剂量-效应曲线。

## 7 剂量估算

### 7.1 早熟染色体凝集标本的制备

所要估算剂量样品的早熟染色体凝集标本制备方法均应与建立剂量-效应曲线的方法相同。

### 7.2 分析早熟染色体凝集分裂相数的确定

可先分析200个早熟染色体凝集分裂相, 将得到的早熟染色体凝集环每细胞数 $p$ , 代入式(2)计算出需要分析的分裂相数。

$$n = \frac{(1-p) \times 96.04}{p} \dots\dots\dots (2)$$

式中:

- $n$  —— 需要分析的分裂相数;  
 $p$  —— 早熟染色体凝集环每细胞数;

96.04 —— 采用20%的允许误差, 令 $1.96 \sqrt{\frac{p(1-p)}{n}} = p \times 20\%$ , 根据95%可信区间计算获得的常数。

### 7.3 检测早熟染色体凝集环每细胞数和95%可信区间的计算

检测早熟染色体凝集环每细胞数的计算按照式(3)计算:

$$p = \frac{x}{n} \dots\dots\dots (3)$$

式中:

- $p$  —— 检测到的早熟染色体凝集环每细胞数;  
 $x$  —— 检测到的早熟染色体凝集环数;  
 $n$  —— 早熟染色体凝集分裂相数。

检测早熟染色体凝集环每细胞数的95%可信区间按照式(4)计算:

$$95\%CI = p \pm 1.96S_p \dots\dots\dots (4)$$

式中:

- 95%CI —— 95%可信区间;  
 $p$  —— 检测到的早熟染色体凝集环每细胞数;  
 $S_p$  —— 早熟染色体凝集环每细胞数的标准误, 按照式(5)计算:

$$S_p = \frac{\sqrt{x}}{n} \dots\dots\dots (5)$$

式中：

$S_p$ ——早熟染色体凝集环每细胞数的标准误；

$x$ ——检测到的早熟染色体凝集环数；

$n$ ——早熟染色体凝集分裂相数。

#### 7.4 受照剂量的估算

将所要估算剂量的标本中得到的早熟染色体凝集环每细胞数及95%可信区间的上下限代入建立的剂量-效应曲线，估算出受照剂量。事故受照人员生物剂量估算示例参见附录D。

### 8 质量控制

8.1 进行早熟染色体凝集制备与分析的实验室应有2名（含）以上专业技术人员，掌握电离辐射生物效应和细胞遗传学基础知识，熟练掌握早熟染色体凝集环显微镜下分析技术。每个早熟染色体凝集环需2名专业技术人员相互确认。

8.2 标本应有唯一性编号。

8.3 标本分析完毕后，应置于玻片盒内保存，并做好记录。

附 录 A  
(资料性附录)  
主要仪器设备和试剂配制

### A.1 主要仪器设备

- A.1.1 恒温培养箱：用于细胞培养。
- A.1.2 普通离心机：水平式离心机，用于收获细胞。
- A.1.3 光学显微镜：用于分析早熟染色体凝集环。
- A.1.4 恒温水浴箱：用于收获细胞。
- A.1.5 低温冰箱（-20℃）和普通冰箱：用于贮存少量实验用试剂。

### A.2 主要试剂的配制

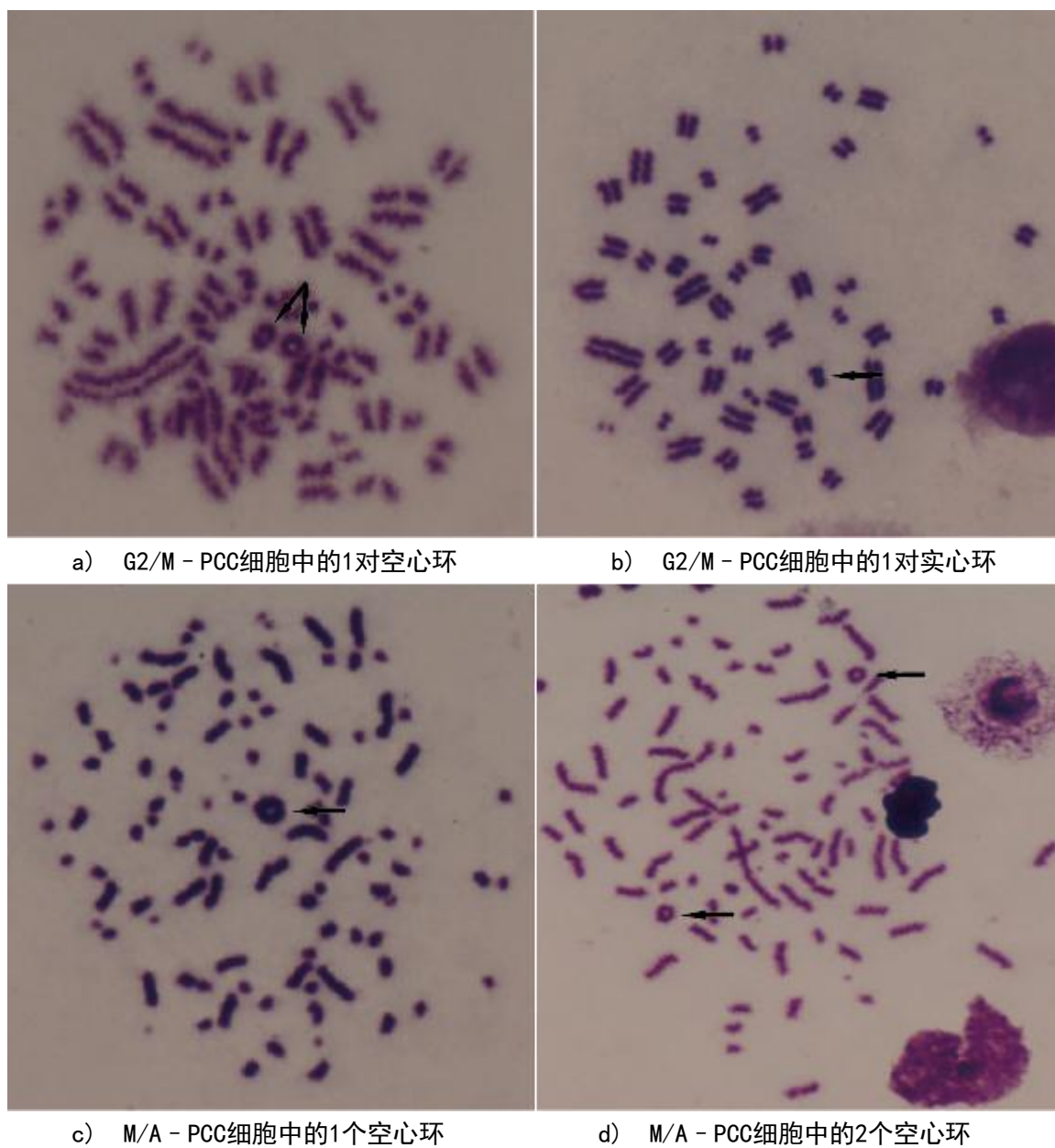
- A.2.1 Calyculin A工作液：将1 mL无水乙醇加入到10 μg花萼海绵体诱癌素A粉末中，混匀后置于-20℃低温冰箱保存。
- A.2.2 冈田酸工作液：将1 mL二甲基亚砷加入到25 μg冈田酸粉末中，混匀后置于-20℃低温冰箱保存。
- A.2.3 RPMI1640 全培养基：1L RPMI1640 培养基中含有10.4 gRPMI1640 粉末、1.3 g无水碳酸氢钠，pH在7.0~7.2之间。RPMI1640 全培养基中含20%胎牛血清、青霉素100 IU/mL、链霉素100 mg/mL、植物血球凝集素200 μg/mL。
- A.2.4 低渗液：称取5.59 g氯化钾（KCl）双蒸水溶解后定容到1 L，终浓度为0.075 mol/L，37℃保存。
- A.2.5 固定液：将甲醇与冰乙酸以3/1（体积比）的比例混匀，使用前新鲜配制。
- A.2.6 磷酸缓冲液：称取4.705 g磷酸氢二钾及4.54 g磷酸二氢钠双蒸水溶解后定容到1 L，pH为6.8，终浓度为1/15 mol/L，4℃保存。
- A.2.7 Giemsa染液：称取1.0 g吉姆萨粉末放入研钵中，加入少量甘油混匀研磨，边研磨边加入甘油至66 mL，充分混匀后，置于60℃水浴箱中2 h。冷却至室温后，加入66 mL甲醇，充分搅拌混匀，避光密闭保存。

注：试剂级别为分析纯。



附录 B  
(资料性附录)  
早熟染色体凝集环示例

早熟染色体凝集环示例见图B.1。



图B.1 早熟染色体凝集环示例

附 录 C  
(资料性附录)

早熟染色体凝集环分析记录表和检测报告

C.1 早熟染色体凝集环分析记录表

早熟染色体凝集环分析记录表见表C.1。

表C.1 早熟染色体凝集环分析记录表

第 页, 共 页

样本编号: \_\_\_\_\_ 受检者姓名: \_\_\_\_\_  
 分析细胞数量: \_\_\_\_\_ 检测到早熟染色体凝集环数: \_\_\_\_\_  
 载玻片编号: \_\_\_\_\_ 显微镜编号: \_\_\_\_\_


注：适用于记录每个细胞中的早熟染色体凝集环；N表示未见早熟染色体凝集环，R表示1个早熟染色体凝集环；记录含有早熟染色体凝集环分裂相的显微镜坐标（如130.5/14.2，R）或图片保存文件名（如liming 001,2R），以便复核。

检测单位: \_\_\_\_\_

分析人: \_\_\_\_\_ 分析日期: \_\_\_\_\_ 年 \_\_\_\_\_ 月 \_\_\_\_\_ 日

复核人: \_\_\_\_\_ 复核日期: \_\_\_\_\_ 年 \_\_\_\_\_ 月 \_\_\_\_\_ 日

## C.2 早熟染色体凝集环检测报告

早熟染色体凝集环检测报告见表C.2。

表C.2 早熟染色体凝集环检测报告

样本编号: _____	姓名: _____	性别: _____	年龄: _____	送检日期: _____
委托单位: _____			联系人: _____	联系电话: _____
工 种: _____			照射史: _____	
检测项目	人外周血淋巴细胞早熟染色体凝集环分析			
检测方法:	培养_____h加入花萼海绵体诱癌素A/冈田酸, _____h收获细胞。			
结 果:	分析_____个早熟染色体凝集分裂相, 检测到_____个早熟染色体凝集环, 根据公式_____ , 估算该样品受到的受照剂量为_____ ( _____ , _____ ) Gy。			
结果评价:				
分析人: _____	分析日期:	年	月	日
复核人: _____	复核日期:	年	月	日
签发人: _____	签发日期:	年	月	日

附 录 D  
(资料性附录)  
剂量估算应用示例

D.1 事故受照人员生物剂量估算（应用示例）

某男性受到<sup>60</sup>Co γ射线事故照射，受照后24 h内取外周血，分析1000个早熟染色体凝集分裂相，观察到57个早熟染色体凝集环。

早熟染色体凝集环每细胞数为  $p = \frac{57}{1000} = 0.057$ ，标准误  $S_p = \frac{\sqrt{57}}{1000} = 0.0075$ 。

95%可信区间： $p \pm 1.96S_p = 0.057 \pm 1.96 \times 0.0075$ ，因此，检测早熟染色体凝集环每细胞数可信区间为（0.0423, 0.0717）。

根据本实验室所建立的<sup>60</sup>Co γ射线照射离体血建立的早熟染色体凝集环的剂量-效应曲线： $Y = 0.0033 + 0.0083D + 0.00022D^2$ （剂量率为1 Gy/min）其中Y为早熟染色体凝集环每细胞数，D为剂量（Gy）。

将0.057、0.0423和0.0717分别代入Y项，解方程后求出平均剂量为5.63 Gy，下限为4.23 Gy，上限为6.95 Gy，估算的剂量为5.63（4.23, 6.95）Gy。