

GBZ

中华人民共和国国家职业卫生标准

GBZ/T 328—2023
代替 WS/T 187—1999

放射工作人员职业健康检查外周血淋巴细胞微核检测方法与受照剂量估算标准

Standard for the method of micronucleus detection in lymphocytes on occupational health examination for radiation workers and exposure dose estimation

2023 - 03 - 07 发布

2023 - 09 - 01 实施

目 次

前言	II
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
4 标本采集与微量全血培养	2
5 微核标本制备	2
6 微核分析	2
7 检测结果判断	3
8 检测报告与归档	3
9 剂量-效应标准曲线的建立	3
10 剂量估算	4
11 质量控制	5
12 CB 微核法估算剂量的原则	5
附录 A (规范性) 主要仪器设备和试剂配制	6
附录 B (资料性) 微核分析记录表和微核检测报告单	7
附录 C (资料性) 放射事故受照人员生物剂量估算应用示例	9
附录 D (规范性) 正确使用本标准的说明	10
参考文献	11

前 言

本标准代替WS/T 187—1999《淋巴细胞微核估算受照剂量方法》。与WS/T 187—1999相比，除结构调整和编辑性改动外，主要技术变化如下：

- a) 在范围中增加了“放射工作人员职业健康检查和受照剂量估算中，外周血淋巴细胞微核的标本制备、微核检测、结果评价、剂量估算方法和质量控制。”适用范围增加了“放射工作人员职业健康检查微核检测”（见第1章）；
- b) 增加了规范性引用文件（见第2章）；
- c) 术语和定义中删除了“生物剂量计”和“松胞素-B”（见WS/T 187—1999的2.1和2.5），增加了“生物剂量估算”“常规培养微核法”和“微核率”（见3.1、3.3和3.6），更改了“微核”（见3.2，见WS/T 187—1999的2.3）
- d) 删除了“剂量-效应曲线的建立方法”（见WS/T 187—1999的第3章）；
- e) 增加了“标本采集与微量全血培养”“微核标本制备”“微核分析”“检测结果判断”“检测报告与归档”“剂量-效应标准曲线的建立”“剂量估算”和“质量控制”（见第4章～第11章）；
- f) 更改了“CB微核法估算受照剂量的原则”（见第12章，WS/T 187—1999的第4章）；
- g) 更改了正确使用本标准的说明（见附录D，WS/T 187—1999的附录A）；
- h) 增加了附录A主要仪器设备和试剂配制（见附录A）；
- i) 增加了附录B微核分析记录表和微核检测报告单（见附录B）；
- j) 增加了附录C放射事故受照人员生物剂量估算应用示例（见附录C）；
- k) 增加了参考文献。

本标准由国家卫生健康标准委员会放射卫生标准专业委员会负责技术审查和技术咨询，由中国疾病预防控制中心负责协调性和格式审查，由国家卫生健康委职业健康司负责业务管理、法规司负责统筹管理。

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

本标准主要起草人：刘强、刘青杰、吕玉民、郝建秀、王彦、李爽、韩林、陈娜、李旭光、姜恩海。

本标准于1999年首次发布为WS/T 187—1999，本次为第一次修订。

放射工作人员职业健康检查外周血淋巴细胞微核检测方法与受照剂量估算标准

1 范围

本标准规定了放射工作人员职业健康检查和受照剂量估算中，外周血淋巴细胞微核的标本制备、微核检测、结果评价、剂量估算方法和质量控制。

本标准适用于放射工作人员职业健康检查微核检测和急性全身外照射受照人员的剂量估算。

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。

GBZ/T 248 放射工作人员职业健康检查外周血淋巴细胞染色体畸变检测与评价

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

3.1

生物剂量估算 biological dose estimation

用具有稳定剂量-效应关系的分子或亚细胞结构变化等生物学指标定量估算受照射个体的辐射吸收剂量的方法。

3.2

微核 micronucleus

由于基因组DNA损伤导致细胞分裂后期滞后的染色体断片、一个或多个染色体不能随有丝分裂进入子细胞，而在细胞质中形成直径小于主核的三分之一且完全与主核分开的圆形或椭圆形小核。

3.3

常规培养微核法 routine micronucleus method

采用微量全血培养法培养淋巴细胞，培养结束后经低渗、固定、制片和染色进行观察和分析微核的方法。

3.4

胞质分裂阻断微核法 cytokinesis-block micronucleus method

CB 微核法

在培养的淋巴细胞完成第一次有丝分裂前，向培养体系中加入松胞素-B，阻滞胞质分裂，培养结束后经低渗、固定、制片和染色，只计数和分析双核淋巴细胞中微核的方法。

3.5

微核细胞 micronucleus cell

如采用常规培养微核法，指胞质中含有微核的转化淋巴细胞；如采用CB微核法，指胞质中含有微核的双核淋巴细胞。

3.6

微核率 micronucleus frequency

如采用常规培养微核法，指每1000个转化的淋巴细胞中含有的微核数；如采用CB微核法，指每1000个双核淋巴细胞中含有的微核数。

3.7

剂量-效应曲线 dose-effect curve

描述生物效应依赖于剂量变化方式的曲线。

4 标本采集与微量全血培养

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 外周静脉血采集

采集静脉血约2 mL, 肝素抗凝, 颠倒混匀, 静脉血保存最佳温度是18 °C~24 °C, 72 h内送达实验室。

4.3 微量全血培养步骤

4.3.1 将采集的静脉血 0.3 mL~0.5 mL 加入 4 mL~5 mL 含植物血凝素和 10%~20%胎牛血清的洛斯维帕克纪念研究所-1640(RPMI-1640)培养基中, 在培养容器上编号并注明培养开始时间和日期, 轻轻摇匀, 37 °C±0.5 °C恒温培养。

4.3.2 如采用常规培养微核法, 培养至 68 h~72 h 收获细胞。

4.3.3 如采用胞质分裂阻断微核法, 培养至 40 h~44 h, 加入松胞素-B, 使其终浓度为 6 μg/mL, 继续培养至 72 h 收获细胞。

5 微核标本制备

5.1 低渗

吸弃培养液上清, 摇匀, 每管加入4 mL 37 °C预温的KCl低渗液(常规培养法低渗液浓度宜为0.075 mol/L, CB微核法低渗液浓度宜为0.1 mol/L), 轻轻吹打均匀, 立即加入新配制的固定液0.5 mL~1 mL(甲醇:冰醋酸体积比3:1), 混匀, 移至10 mL~15 mL离心管中, 水平离心机离心8 min~10 min, 离心力为200 g~250 g。

5.2 固定

弃上清, 摇匀, 加入4.5 mL固定液, 固定20 min~30 min, 水平离心机离心8 min~10 min, 离心力为200 g~250 g。离心后可用固定液洗涤细胞, 以减少细胞悬液中的杂质。

5.3 制片

弃上清, 视细胞数量酌情加入固定液数滴, 充分混匀, 将细胞悬液均匀滴在洁净干燥载玻片上, 室温干燥。

5.4 编号

对每一张微核标本玻片进行编号, 并做好记录。

5.5 染色

用体积比为8%~10%的瑞氏-吉姆萨染液或吉姆萨染液染色8 min~10 min, 轻轻冲洗, 室温干燥。

6 微核分析

6.1 阅片

盲法阅片。按显微镜载物台刻度坐标，从右至左逐列或逐行对每张微核标本玻片进行扫描式阅片，常规培养微核法寻找转化的单核淋巴细胞，如果采用CB微核法，即寻找双核淋巴细胞，对每位受检者至少分析1000个转化淋巴细胞。

6.2 双核淋巴细胞的判定标准

细胞应为双核细胞，同一个双核细胞中的两个细胞核应具有各自完整的核膜，并位于相同的细胞质边界内，两个细胞核大小、质感和染色强度应大致相等，两个细胞核完全分离，或者可由一个或多个核质桥连接，核质桥不超过核直径的1/4，两个细胞核重叠时，应看到各自的完整核膜。双核细胞的细胞质边界或细胞膜应完整，并与相邻细胞的细胞质边界明显区分。

6.3 微核的判定标准

微核应游离于胞质中，与主核完全分开，直径为主核的1/16~1/3，与主核不连接，不重叠（重叠或相切时，应看到各自的完整核膜），无折光性，与染料颗粒等杂质相区别，着色深浅与主核相同或略浅。

6.4 分析和记录

常规培养微核法观察转化的单核淋巴细胞，CB微核法观察双核淋巴细胞，如发现微核，应在微核分析记录表中记录显微镜坐标，有条件的机构可拍照，在微核分析记录表中记录图片文件名，以备复核。微核分析记录表样式参见附录B。

7 检测结果判断

7.1 常规培养法微核率的正常参考值范围0~6%；CB法微核率的正常参考值范围0~30%。

7.2 对检测结果超出正常参考值范围者，可检查外周血淋巴细胞染色体畸变。

8 检测报告与归档

8.1 对每位受检者应出具外周血微核检测报告单。检测报告单样式参见附录B。

8.2 检测的微核标本应保存两年。微核记录表等原始资料应建档长期保存，并建立电子档案。

9 剂量-效应标准曲线的建立

9.1 样品要求

采血前应获取志愿者的知情同意。志愿者2名~4名健康成年人，非放射工作者，男女各半，年龄在18岁~60岁，无烟酒嗜好，半年内无急慢性疾病史、无射线和化学毒物接触史，近一个月内无病毒感染史。抽取静脉血6 mL~8 mL，注入肝素抗凝管。

9.2 照射、培养和分析

9.2.1 应提供可靠的、明确的照射样品的物理剂量。受照样品应与照射源保持一定的距离以达到均匀照射的目的。有条件的实验室应建立包括不同辐射类型（如X射线、 γ 射线、中子）、不同剂量率（低LET辐射）的剂量-效应标准曲线。对于低LET辐射，剂量范围选择0.25 Gy~5.0 Gy，剂量率介于0.3 Gy/min~1.0 Gy/min之间，选择不少于8个剂量点，其中，0.25 Gy~1.0 Gy范围内刻度曲线的剂量点不少于4个。剂量点可选择0.25 Gy、0.5 Gy、0.75 Gy、1.0 Gy、2.0 Gy、3.0 Gy、4.0 Gy和5.0 Gy。对于高LET辐射，剂量范围选择0.05 Gy~3.0 Gy，剂量点可选择0.05 Gy、0.1 Gy、0.5 Gy、1.0 Gy、1.5 Gy、2.0 Gy、2.5 Gy和3.0 Gy。

9.2.2 培养方法同本标准第4章。

9.2.3 微核标本制备、分析和记录按照本标准第5章和第6章中所述方法进行。

9.2.4 按照公式（1）计算各剂量点应分析的细胞数。

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

式中:

n ——应分析的细胞数;

p ——微核率, 可在计数分析一定数量的细胞后求得。

9.3 剂量-效应标准曲线拟合

对X或 γ 射线诱导的微核与受照射剂量之间的剂量-效应关系以拟合一次方程或二次多项式为宜, 按照公式(2)或公式(3)进行拟合。

a) 一次方程模式

$$y = a + bD \dots \dots \dots (2)$$

式中:

y ——微核率, (%) ;

a ——本底微核率;

b ——回归系数;

D ——吸收剂量, 单位为戈瑞(Gy)。

b) 二次多项式模式

$$y = a + bD + cD^2 \dots \dots \dots (3)$$

式中:

y ——微核率, (%) ;

a ——本底微核率;

b ——回归系数;

D ——吸收剂量, 单位为戈瑞(Gy) ;

c ——回归系数。

10 剂量估算

10.1 微核标本的制备

所要估算剂量样品的微核标本制备方法均应与建立剂量-效应曲线的方法相同。

10.2 微核率、微核率的不确定度的计算

当分析细胞数足够多时(一般要求 ≥ 1000), 微核检测值符合泊松分布, 微核率和微核率的不确定度分别按照公式(4)和公式(5)计算:

$$p = \frac{x}{n} \times 1000\% \dots \dots \dots (4)$$

式中:

p ——微核率, (%) ;

x ——检测到的微核数;

n ——分析的细胞数。

$$u(p) = \sqrt{\frac{p}{n}} \times 1000\% \dots \dots \dots (5)$$

式中:

$u(p)$ ——微核率的不确定度, (%) ;

p ——微核率, (%) ;

n ——分析的细胞数。

10.3 微核率的置信限计算

置信水平为95%时，微核率的置信限按照公式（6）计算：

$$95\% \text{置信水平微核率的置信限} = p \pm 1.96u(p) \dots \dots \dots (6)$$

式中：

p ——微核率，（‰）；

$u(p)$ ——微核率的不确定度，（‰）。

当置信限下限 <0 时，覆盖区间下限默认为0。

10.4 受照剂量的估算

将所要估算剂量的标本中得到的微核率及95%置信限的上下限代入建立的剂量-效应标准曲线，估算出受照剂量。放射事故受照人员生物剂量估算示例参见附录C。

11 质量控制

11.1 进行微核标本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，熟练掌握显微镜下微核分析技术。每个微核需2名专业技术人员相互确认。

11.2 标本应有唯一性编号，标本分析完毕后，应置于玻片盒内保存，并做好记录。

11.3 分析细胞数应满足本标准第6.1条的要求。

11.4 正确使用本标准的说明参见附录D。

12 GB 微核法估算剂量的原则

12.1 事故后应尽早取血，不宜超过4周。

12.2 培养条件、制片方法和微核的判断标准应与建立剂量-效应曲线时相同。对估算剂量的个体，至少应分析500个以上的双核淋巴细胞。对受照剂量较大的个体，如达不到上述细胞数，可全片计数所有双核淋巴细胞。

12.3 应选择和事故条件接近的刻度曲线进行剂量估算，在曲线剂量范围内应用，不应外推。

12.4 估算剂量时，除给出平均值以外，同时给出剂量的95%置信限。

附 录 A
(规范性)
主要仪器设备和试剂配制

A.1 主要仪器设备

- A.1.1 超净工作台：用于细胞接种。
- A.1.2 恒温培养箱：用于细胞培养。
- A.1.3 普通水平式离心机：用于细胞分离。
- A.1.4 光学显微镜：带坐标刻度，用于细胞观察。
- A.1.5 冰箱：至少具备-20℃和4℃条件，用于储存实验用试剂。
- A.1.6 水浴锅：用于细胞低渗。
- A.1.7 通风橱或通风柜：用于实验中的排风。

A.2 主要试剂的配制

- A.2.1 RPMI-1640培养基、低渗液、固定液、磷酸盐缓冲液和吉姆萨染液的配制参照GBZ/T 248的规定。
- A.2.2 松胞素-B储存液：松胞素-B储存液应避光保存。松胞素-B的分子式为 $C_{29}H_{37}NO_5$ ，不溶于水，易溶于二甲基亚砜，在培养体系中适宜的浓度可以抑制细胞运动和细胞质分裂，而不影响细胞核分裂。将松胞素-B溶于二甲基亚砜中，浓度为2mg/mL，-20℃储存，用前融化，生理盐水稀释，加入培养体系后的终浓度为6 μg/mL。

B.2 微核检测报告单

微核检测报告单（样式）见表B.2。

表B.2 微核检测报告单（样式）

编号		姓名		性别	
年龄	周岁	工种		工龄	
检测方法： <input type="checkbox"/> 常规培养微核法 <input type="checkbox"/> 胞质分裂阻断微核法					
结果： 微核数量：_____个。 微核率（‰）：_____。					
结果评价：					
检测单位：_____ 分析人：_____ 复核人：_____ 检测日期：_____年_____月_____日 复核日期：_____年_____月_____日					

附录 C (资料性)

放射事故受照人员生物剂量估算应用示例

某人受⁶⁰Co γ射线一次全身照射，照后48h内取血，采用微量全血法培养淋巴细胞，分析800个双核淋巴细胞，发现微核514个，估算其生物剂量。

每细胞微核数为 $0.6425 \times 1000\% = 642.5\%$ ，微核率的不确定度为 $\sqrt{514}/800 \times 1000\% = 28.3\%$ 。

微核率的95%置信限为 $642.5\% \pm 1.96 \times 28.3\%$ ，即587.0%~698.0%。

根据本实验室所建立的⁶⁰Co γ射线照射离体血建立的CB微核剂量-效应曲线：

$Y = 17.9119 + 33.3838D + 42.8809D^2$ ，该曲线的剂量范围为0.1 Gy~5.0 Gy，剂量率为0.38 Gy/min， Y 为微核率(%)， D 为剂量(Gy)。

将642.5%、587.0%和698.0%分别代入 Y 项，解方程后求出平均剂量为3.45 Gy，下限为3.27 Gy，上限为3.61 Gy，估算剂量结果均值为3.45 Gy，95%置信水平的剂量范围为：3.27 Gy~3.61 Gy。

附录 D
(规范性)

正确使用本标准的说明

- D.1 本标准对常规培养微核和CB微核技术进行了规定，建议本标准的使用单位在放射工作人员的职业健康检查中视本单位情况选择具体的培养方法，在应急剂量估算中采用CB微核法进行剂量估算。
- D.2 静脉血的采集应在所有放射性检查前进行。
- D.3 两种微核法的正常参考值个体差异较大，随年龄变化的波动也较大，各单位可参考本标准中规定的正常参考值，也可根据本实验室的总结分析结果来确定其正常参考值。对于检测结果的判断，各单位也可根据其确定的正常参考值进行判断是否异常。
- D.4 微量全血培养过程的培养时间给出了时间段范围，各实验室可依据本实验室的具体情况而定。
- D.5 本标准规定了标本制备过程中KCl低渗液的浓度、固定液成分和染色时间，各实验室可依据本实验室的具体情况而定。
- D.6 本标准第9章给出了剂量-效应标准曲线的拟合包括一次方程或二次多项式，在应用中常用二次多项式进行生物剂量估算。

参 考 文 献

[1] ISO 17099:2014 Radiological protection – Performance criteria for laboratories using the cytokinesis block micronucleus (CBMN) assay in peripheral blood lymphocytes for biological dosimetry, ISO, 2014.

[2] IAEA. Cytogenetic dosimetry: applications in preparedness for and response to radiation emergencies – A Manual. Technical Document Publications, IAEA, Vienna 2011.
