

普通高等教育“十一五”国家级规划教材配套教材

全国高等医药院校教材

医学遗传学实验指导

第2版

主 编 王修海 单长民 杨康鹁

编写人员(按姓氏笔画为序)

王修海	青岛大学医学院	王振华	青岛大学医学院
王 萍	山东中医药大学	朱宏文	兰州大学医学院
朱金玲	佳木斯大学医学院	刘 爽	佳木斯大学医学院
苏 刚	兰州大学医学院	杨建一	山西医科大学
杨康鹁	延边大学医学院	李 兰	山东中医药大学
李培强	兰州大学医学院	张子波	延边大学医学院
张玉萍	佳木斯大学医学院	张春彬	佳木斯大学医学院
张新旺	山西医科大学	岳风珍	兰州大学医学院
金艳花	延边大学医学院	周 勇	新疆医科大学
单长民	滨州医学院	夏米西努尔·伊力克	新疆医科大学
滕 蕾	青岛大学医学院		

科 学 出 版 社

北 京

内 容 简 介

本书是12校合编普通高等教育“十一五”国家级规划教材《医学遗传学》(第2版)的配套实验教材。全书共分细胞遗传学、生化遗传学、群体遗传学、分子遗传学和临床遗传学5个部分实验内容,共计46个单项实验。编写的实验都是教学和科研工作中经典的、常用的、具有先进性的方法和技术。实验方法简明易懂,实用性强。所选入的实验方法和实验材料力求体现多样性和不同层次,有利于教学的可行性及教学内容和方法的改革。

可供各类医学院校本科学学生和研究生使用。

图书在版编目(CIP)数据

医学遗传学实验指导 / 王修海,单长民,杨康鹏主编. —2版. —北京:科学出版社,2007

普通高等教育“十一五”国家级规划教材配套教材

ISBN 978-7-03-019175-5

I. 医… II. ①王…②单…③杨… III. 医学遗传学—实验—高等学校—教学参考资料 IV. R394.33

中国版本图书馆CIP数据核字(2007)第089767号

责任编辑:胡治国/ 责任校对:陈玉凤

责任印制:刘士平/ 封面设计:黄超

版权所有,违者必究。未经本社许可,数字图书馆不得使用

科学出版社 出版

北京东黄城根北街16号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2001年7月第 一 版 开本:787×1092

2008年1月第 二 版 印张:9

2008年1月第四次印刷 字数:470 000

印数:9 001—14 000

定价:18.00元

(如有印装质量问题,我社负责调换(科印))

第 2 版前言

我们编写的《医学遗传学实验指导》于 2001 年 3 月由科学出版社正式出版发行。出版以来,已多次重印,使用本教材的院校师生反映较好,为了跟随学科发展,适合当前医学教育的现状,决定对本教材进行修订再版。根据出版社的要求,我们重新组织了国内 8 所医学院校有丰富教学经验的教师承担再版教材的编写任务。本次再版的教材保持原版教材的基本风格,总结吸收原版教材的成功经验,在内容和格式上有一定的创新和改进,突出三基,知识点明确,每项实验后都增加了作业和思考题,增加了医学遗传学学习和研究相关的网络资源,更适合教师教和学生学。基本达到 3 个层次的教学要求:即教育部制定的基本教学要求;学生毕业后执业考试的需求;硕士研究生入学考试的要求。

我们希望本书能对使用者有所帮助。但由于水平和经验所限,有不足之处在所难免,敬望广大师生在使用后及时提出宝贵意见,以便不断改进和更新。

王修海

2007 年 4 月

第 1 版前言

医学遗传学是遗传学和医学相结合的一门边缘学科,是现代医学中发展最为迅速的新兴学科之一。它运用遗传学的理论和方法研究人类遗传病的发生机制、传递规律,探索遗传病的诊断、治疗及预防手段。医学遗传学的研究领域非常广泛,涉及细胞学、生物化学、分子生物学、群体遗传学、临床医学等多门学科。其实验研究方法和技术也都和这些学科密切相关。这些实验研究方法和技术在现代基础和临床实践中得到广泛应用。在医学遗传学迅猛发展的今天,通过实验来培养学生基本技术操作的能力是医学遗传学教学不可缺少的一个方面。为了适应《医学遗传学》的实验课的教学要求,我们共同编写了这本教材。

本书是为医学院校本科学生编写的。它既可配合我们五校合编教材《医学遗传学》的理论教学,又有自己相对的系统性和完整性。本书编入的实验项目较多,各院校在使用本书时,应根据教学大纲要求和实验室的设备条件酌情选择实验项目。相关专业研究生也可选择使用。

本书编写的原则是:编写的实验应是教学和科研工作中经典的、常用的、具有先进性的方法和技术。实验方法要求简明易懂,实用性强。所选入的实验方法和实验材料力求体现多样性和不同层次,有利于教学的可行性及教学内容和方法的改革。

本书共分细胞遗传学、生化遗传学、群体遗传学、分子遗传学、临床遗传学五个部分实验内容,共 42 个单项实验。这些实验项目既有一定的联系,又具有相对的独立性,每一实验项目都能体现其理论意义和实际应用价值。编写的每个实验项目,都对目的要求、实验原理、实验用品和材料、方法和步骤、注意事项等方面作了充分的阐述,并备有附录,供学生参考。

我们希望本书能对使用者有所帮助,但由于水平和经验所限,有不足之处在所难免,敬望广大师生在使用后及时提出宝贵意见,以便不断改进和更新。

王修海

2001 年 2 月

目 录

绪言	(1)
第一部分 细胞遗传学实验	(3)
实验一 减数分裂标本的制备与观察	(3)
实验二 人类外周血淋巴细胞培养及染色体标本的制备技术	(5)
实验三 正常人非显带染色体的核型分析	(8)
实验四 人类染色体 Q 显带技术	(11)
实验五 人类染色体 G 显带标本的制备及观察	(13)
实验六 人类 G 显带染色体核型分析	(16)
实验七 人类染色体 C 显带技术	(21)
实验八 人类染色体 R 显带技术	(24)
实验九 人类染色体 T 显带技术	(26)
实验十 人类高分辨染色体(HRC)标本的制备和观察	(27)
实验十一 荧光原位杂交技术	(33)
实验十二 人类外周血淋巴细胞姐妹染色单体(SCE)互换技术	(36)
实验十三 性染色质标本的制作与观察	(39)
I. X 染色质	(39)
II. Y 染色质	(41)
实验十四 微核标本的制作	(42)
第二部分 生化遗传学实验	(44)
实验一 氨基酸代谢病检测技术	(44)
I. 细菌抑制筛选试验	(44)
II. 三氯化铁显色反应(FeCl ₃ 试验)	(46)
III. 双向薄层层析技术	(48)
实验二 糖类代谢病检测技术	(50)
I. 甲苯胺蓝斑点试验	(50)
II. 糖类定量测定技术	(51)
III. 糖类定性分析技术	(53)
A. 尿半乳糖定性试验	(53)
B. 尿果糖定性试验	(54)
实验三 遗传性酶病检测技术	(54)
I. 酶活性测定技术	(54)

实验四 分子病检测技术	(57)
I. 蛋白质含量测定技术	(57)
II. 蛋白质分型检测技术	(58)
A. 乙酸纤维素膜电泳	(59)
B. 琼脂糖凝胶电泳	(61)
C. 聚丙烯酰胺凝胶电泳	(62)
第三部分 群体遗传学实验	(65)
实验一 人体皮肤纹理分析	(65)
实验二 PTC 尝味能力的遗传分析	(69)
实验三 人类正常性状的遗传学分析	(70)
实验四 遗传度、杂合度、多态信息量和吻合度测验	(75)
实验五 遗传性疾病遗传方式的估计	(77)
第四部分 分子遗传学实验	(81)
实验一 人基因组 DNA 的提取	(81)
实验二 DNA 的限制性内切酶酶解技术	(84)
实验三 DNA 酶解片段的电泳分离技术	(86)
实验四 Southern 印迹转移	(89)
实验五 DNA 分子杂交技术	(91)
实验六 聚合酶链反应(PCR)技术	(95)
实验七 致病基因的 RFLP 连锁分析	(99)
实验八 PCR - SSCP 检测分析技术	(101)
实验九 PCR 双链 DNA 循环测序技术	(104)
第五部分 临床遗传学实验	(111)
实验一 人类遗传病(观看录像)	(111)
实验二 遗传病的系谱分析	(112)
实验三 遗传咨询	(115)
实验四 遗传病再发风险估计(Bayers 法)	(117)
实验五 遗传与优生咨询软件应用	(122)
实验六 临床遗传与优生咨询门诊见习	(126)
附录一 核酸、蛋白质换算数据	(127)
附录二 常用染色液的配制	(128)
附录三 细胞遗传学技术常用溶液的配制	(128)
附录四 分子遗传学技术常用溶液的配制	(130)
附录五 医学遗传学研究学习的网络资源	(132)
参考文献	(137)

绪 言

一、医学遗传学实验的目的和任务

(1) 实验是科学理论的实践与论证,通过实验,使学生了解医学遗传学知识和理论的由来。通过感性知识,加深对理性知识的理解。

(2) 通过具体的实验操作,使学生掌握医学遗传学的基本实验方法和技能,锻炼学生的动手能力。

(3) 通过实验培养学生观察、比较、分析和综合等科学思维能力,独立工作能力和实事求是的科学作风。

(4) 使学生学习并掌握绘图、书写实验记录和实验报告的基本方法和技巧。

二、医学遗传学实验的程序和要求

(1) 预习:学生在实验课前应认真预习本实验指导以及教材有关章节,必须对该次实验的目的要求、实验内容、基本原理和操作方法有一定的了解。

(2) 讲解:教师只对该实验内容的安排及注意事项进行讲解,让学生有充分的时间按实验指导的顺序进行独立的操作和观察。

(3) 独立操作与观察:实验一般都由学生独立进行。在实验中要按操作程序反复练习,以达到一定的熟练程度。

(4) 示教:有些实验备有示教。其目的是帮助学生对某些较难的操作过程和观察材料给予演示,学生建立初步认识后,再独立操作,仔细观察。

(5) 作业:实验报告必须根据各人的观察,以实事求是和一丝不苟的精神忠实地记录、分析、综合。不得抄袭教材或其他同学的报告。实验报告一般应于实验结束时呈交。它的形式可因实验内容而不同。

(6) 总结:实验结束后,一般由教师说明该次实验的主要收获及今后应注意的事项。

三、实验室规则和注意事项

(1) 学生上实验课时必须携带教材、实验指导、实验报告纸和文具,进入实验室要求穿好工作服,按规定座位入坐。

(2) 实验开始前要检查所用仪器、材料、实验品是否完好齐全,如果缺损及时向带课教师报告,自己不得随意调换仪器和实验用品。

(3) 实验时要遵守纪律,听从教师指导,保持肃静。有问题时举手提问,严禁彼此谈笑

喧哗或随意走动,也不得进行和实验无关的其他活动。

(4) 实验时要遵守实验操作规程,严格按照教师的安排和实验指导的要求进行。操作要正规,观察要认真仔细,边做、边看、边想,及时完成实验报告。

(5) 要爱护仪器、标本和器材设备,注意节约实验材料、试剂和水电。如果损坏了仪器或器材应主动报告,说明情况。

(6) 实验结束后,应自觉清理实验台面,认真清理好仪器、试剂及其他用品,放回原处。值日生要负责清扫地面,收拾实验用品,处理垃圾,关好水电门窗后再离开实验室。

(7) 实验课不得迟到、早退或无故缺课。

第一部分 细胞遗传学实验

实验一 减数分裂标本的制备与观察

一、实验目的

- (1) 掌握小鼠睾丸组织减数分裂染色体标本的制作技术。
- (2) 了解减数分裂过程中各期染色体的形态特征。
- (3) 掌握减数分裂的过程和重要意义。

二、实验原理

减数分裂(meiosis)是二倍体生殖细胞在形成配子时一种特殊的细胞分裂形式,研究减数分裂在细胞遗传学的理论和应用上都有重要意义。对人类减数分裂的研究可以阐明一些染色体畸变的根本原因。但人类减数分裂的标本制作比较困难,一方面人类的睾丸或卵巢组织不易获得,另一方面标本制作有一定难度。本实验采用小鼠的睾丸组织,通过睾丸细胞的体外培养以增加减数分裂相,获得分裂指数较高的标本。分裂指数即处于分裂相的细胞占有所有细胞的百分比。

三、实验用品和材料

1. 器械 恒温水浴锅、37℃恒温培养箱、水平离心机、显微镜、解剖剪刀、镊子、解剖盘、匀浆管、离心管、培养瓶、冰水载玻片、烧杯、玻璃吸管、酒精灯、试管架、染片架等。
2. 试剂 Hank's 液、RPMI-1640 培养液、小牛血清、青霉素、链霉素、秋水仙碱(10 μ g/ml)、0.075mol/L KCl 溶液、甲醇、冰乙酸、Giemsa 染液。
3. 动物 体重为 25~30g 的雄性小鼠。

四、实验方法和步骤

1. Hank's 配制

(1) A 液:Na₂HPO₄·2H₂O 0.6g、KH₂PO₄ 0.6g、KCl 4.0g、MgSO₄·7H₂O 2.0g、NaCl 80.0g 溶解于 900ml 三蒸水。

(2) B 液:CaCl₂·H₂O 1.4g 溶解于 100ml 三蒸水,使用时 10 倍稀释,加入 1% 酚红(每 1000ml Hank's 稀释液加 2ml 酚红),高温高压灭菌。

2. 细胞生长培养液配制 RPMI 1640 0.5ml(抽滤灭菌),小牛血清 0.5ml,青霉素 100IU/ml,链霉素 100IU/ml。用 5mol/L NaHCO₃液(或 0.1mol/L HCl)调节培养液的 pH 至

7.2~7.4,装入10ml链霉素小瓶内。

3. 标本制作

(1) 用断髓法处死小鼠,在解剖盘中剖开腹腔,在无菌条件下剥离睾丸,除去白膜等结构。

(2) 取部分睾丸组织,加3ml Hank's液匀浆,静置5分钟,吸管吸取上层细胞悬浮液。

(3) 0.5ml悬浮液加入培养液小瓶,置37℃恒温培养箱内培养24小时。

(4) 培养终止前4小时,加入秋水仙碱(终浓度0.2μg/ml培养液)。

(5) 收获细胞,37℃ 0.075mol/L KCl溶液低渗处理15分钟。

(6) 1000转/分离心8分钟,取沉淀。

(7) 加少许固定液(甲醇:冰乙酸=3:1)固定30分钟,滴片,干燥后Giemsa染色8分钟,冲洗干燥,镜检。

4. 标本观察

先用低倍镜找到细胞分裂较多的视野,可见有处于不同时期的细胞,首先找出精原细胞有丝分裂中期的分裂相观察、计数,明确小白鼠染色体数目为40($2n=40$),形态都为端着丝粒染色体,然后逐步找出减数分裂各期分裂相,用高倍镜(或油镜)仔细观察,着重观察第一次减数分裂的形态变化(图1-1)。



图1-1 小鼠睾丸组织减数分裂前期I细胞形态

(1) 第一次分裂

1) 前期I: 此期时间长而且变化复杂,按染色体的形态变化又分出:

a. 细线期(leptotene): 染色体细而长,其上经常有染色粒以固定的距离排列,染色体相互绕成一团,核仁明显。

b. 偶线期(zygotene): 同源染色体配对,也称联会,每对染色体形成一个二价体。染色体形态仍较细长。

c. 粗线期(pachytene): 染色体变得粗短,每一条染色体都由两条染色单体构成,一个二价体由四条染色单体构成,形成四分体,同源染色体间的开始发生交叉,但在形态上难以见到。

d. 双线期(diplotene): 染色体继续缩短变粗,同源染色体开始分离,但不是完全分开,在交叉的部位连在一起。镜下可看到交叉现象,且交叉逐渐端化,因此,可看到染色体形态上呈X形、O形和α形,核仁显著变小。

e. 终变期(diakinesis): 染色体更粗短,相互排斥而分离,由于四分体间交叉点的位置不同而呈现出“O”、“8”、“X”、“+”等各种形状,核仁、核膜消失,此时染色体最清楚,便于计数。

2) 中期 I :四分体排列于赤道板上。

3) 后期 I :每个四分体分为两个二分体,并移向两极。

4) 末期 I :二分体移到两极,分别形成两个细胞核。初级精母细胞分裂成两个次级精母细胞。体积较小,染色体数目为原来的一半。

(2) 第二次分裂

同有丝分裂过程,最后形成四个精细胞。分裂相较小,分裂是以二分体为单位进行的。

1) 前期 II :时间很短或根本缺如。

2) 中期 II :各二分体排列在赤道板上。

3) 后期 II :染色体(二分体)的着丝粒分裂为二,姐妹染色单体分开,形成两个单分体分别移向两极。

4) 末期 II :移向两极的染色体(单分体)分别形成两个细胞核,每个核中含有 $n(n=20)$ 个单分体,这样的细胞经过变形,发育成为精子。

五、注意事项

细胞培养时间不能太长,培养超过 24 小时,分裂指数将大大下降。

六、作业与思考题

(1) 实验报告:绘制细线期、粗线期、终变期细胞核图。

(2) 什么是减数分裂? 减数分裂过程中各期染色体的形态特征有什么特点?

(3) 为什么说减数分裂是遗传学三大定律的细胞学基础?

(4) 减数分裂有何生物学意义?

(张玉萍 张春斌)

实验二 人类外周血淋巴细胞培养及染色体标本的制备技术

一、实验目的

(1) 熟悉人体外周血淋巴细胞培养的方法和步骤。

(2) 掌握人体外周血淋巴细胞染色体标本制备的方法。

(3) 训练在显微镜下观察分析染色体的能力。

二、实验原理

在人类染色体研究中,外周血是运用的最多的材料。外周血中的淋巴细胞在体外培养时因受植物血凝素(phytohemagglutinin, PHA)的刺激转化成能进入有丝分裂的幼细胞;并以纺锤体抑制剂秋水仙碱作用于细胞,使其停滞于分裂中期,从而就可制备处于有丝分裂中

期的染色体标本了。

三、实验用品和材料

1. 器械与设备 洁净工作台(或无菌工作罩、或无菌操作室)、37℃恒温培养箱、电冰箱、鼓风干燥机、恒温水浴锅、离心机、高压消毒锅、分析天平、显微镜、显微照相设备等。

2. 一般用品 培养瓶(15~25ml)或10ml青霉素瓶、5ml消毒注射器(7号消毒注射针头)、棉花签、止血带、10ml刻度离心管、毛细管和滴头、试管架、煤气灯、粗天平、50ml注射器、长注射针头、烧杯、量筒、载玻片、pH试纸等。

3. 试剂 肝素(500IU/ml)、秋水仙碱(50 μ g/ml)、RPMI 1640、小牛血清、青霉素、链霉素、5% NaHCO₃溶液、植物凝集素(PHA)、0.075mol/L KCl溶液、甲醇、冰乙酸、Giemsa原液、双蒸水、0.9% NaCl溶液等。

四、实验方法和步骤

1. 细胞生长培养液的成分、比例与分装

细胞生长培养液 RPMI 1640	90%
小牛血清	10%
青霉素	100IU/ml(终浓度)
链霉素	100IU/ml(终浓度)

用5mol/L NaHCO₃液(或0.1mol/L HCl)调节培养液的pH至7.2~7.4。在每个培养瓶(或10ml的链霉素瓶)中盛有已校正好pH的培养液5ml,冰冻保存。临用时在37℃温箱融化。在加入静脉血前先加入植物凝集素(PHA)液0.2~0.4ml(以上药品配制后,均需灭菌,组合时要在无菌室或超净台内进行)。

2. 培养及细胞学操作

(1) 采血:先用5ml的消毒注射器抽取0.2~0.3ml的500IU/ml肝素,再抽取肘部静脉血3ml(上下混匀),在无菌操作下立即将注射针直接穿过培养瓶的橡胶塞,向含有5ml培养液的培养瓶中注入20滴全血(7号针头),每瓶含0.3~0.5ml全血;摇匀后,静置37℃恒温培养箱。

(2) 秋水仙碱处理:在培养后66~70小时加入秋水仙碱。用4号注射针头吸取50 μ g/ml浓度的秋水仙碱1ml向培养瓶内垂直向下滴一滴,混匀,继续放入37℃恒温培养箱内培养3小时。秋水仙碱的最终浓度为0.07 μ g/ml。

(3) 收集细胞:将培养瓶内液体混匀后,吸入至10ml刻度离心管内,经1200转/分,离心10分钟,弃上清液。

(4) 低渗处理:加入37℃恒温箱预热的0.075mol/L KCl溶液8ml,用吸管混匀,放置37℃恒温水浴箱25分钟(每隔10分钟用吸管混匀1次)。

(5) 预固定:低渗后加入新配制的固定液(甲醇:冰乙酸=3:1)2ml,混匀后离心10分钟。

(6) 固定:加入新配制的固定液10ml,混匀后静置20分钟,离心10分钟,弃上清液。

(7) 再固定:加入新配制的固定液10ml,用吸管混匀,静置20分钟,离心10分钟,弃上清液。

(8) 制片:视细胞数量多少而加适量固定液制成细胞悬液。用吸管吸取混匀的细胞悬

液在离冰片(预先将清洁载玻片放置在4℃冰箱存放数小时)约5寸距离进行滴片,每片2~3滴,随即吹气(注意滴片时动作要快,以保证冰片的冰冷程度),吹风机吹干。

(9) 染色:标本用1:10 Giemsa 染液(pH 7.4 磷酸缓冲液配制),染色10分钟。自来水冲洗,吹干后,镜检。

(10) 观察:将制片置于低倍镜下观察,选择染色体分散好,无胞浆背景的中期相,然后换高倍、油镜观察染色体形态,在镜下计数、分组和性别鉴定,并能在镜下准确区分1、2、3、16、17、18和Y染色体(图1-2)。

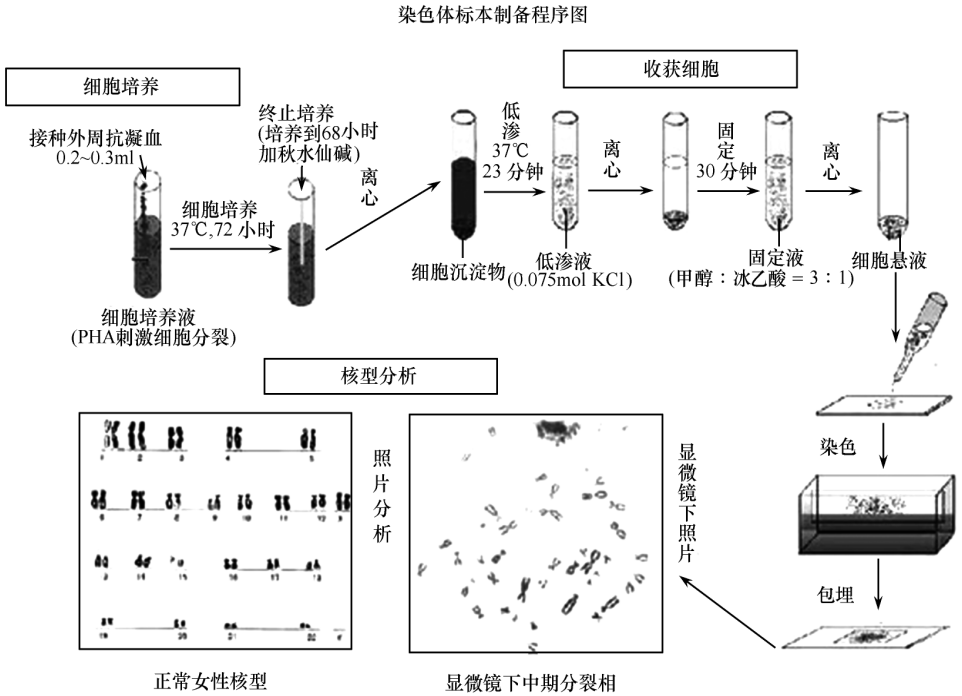


图1-2 人体外周血淋巴细胞染色体标本制备方法流程图

五、注意事项

(1) PHA 是体外淋巴细胞培养成败的关键问题,因此要考虑它的质量和浓度。盐水提取物一般冰冻保存的时间不宜过长,时间长了效价减低。浓度一般用1%~2%,每 ml 培养液加 0.2~0.4ml;浓度过高可能会导致红细胞凝集。

(2) 秋水仙碱浓度和处理时间。一般最终浓度每毫升培养液 0.1~0.2 μ g 为宜,作用时间为3~5小时,一般秋水仙碱的浓度与处理时间有一定的关系。如果处理时间太短,则标本中的分裂细胞就少,相反,如果处理时间太长,则标本中的分裂细胞虽多,但其染色体缩得太短,以至形态特征模糊。

(3) 培养温度应严格控制在(37 \pm 0.5)℃。

(4) 双蒸水必须用玻璃蒸馏器制备, pH 应在 6~7 之间。

(5) 低渗步骤极为重要, 关系到染色体分散的好坏, 因此低渗液浓度与低渗的时间应掌握适当。

(6) 离心机最好用水平式的, 速度不宜过高。速度太高细胞团不易打散, 反之分裂相易丢失; 若打散不够, 则细胞在玻片上易集结。固定液现用现配, 固定一定要彻底、均匀。

(7) 若吹打时用力过猛, 细胞易破碎, 以致染色体数目不完整; 培养液的 pH 应掌握在 7.4 ± 0.1 左右, pH 偏酸致发育不良, 偏碱时细胞出现轻度固缩。

(8) 玻璃器皿都要十分干净、无酸, 所用试剂以分析纯为好。

(9) 操作过程应保持高度无菌概念, 严防细菌和病毒污染; 在外周血培养中, PHA 对淋巴细胞的作用, 个体差异较大。同样方法和条件, 分裂相多少及分散情况不一样。因此, 若首次失败, 应充分考虑到这些因素。

六、作业与思考题

(1) 实验报告: 油镜下观察 1 个中期分裂相, 计数染色体数目, 绘制 1 个中期分裂相简图, 将每组染色体的位置和序号标记上。

(2) 要制备良好的染色体标本, 在实验操作中应注意哪些方面?

(3) 在染色体标本制备的过程中为什么要使用秋水仙碱和 0.075mol/L KCl 溶液?

(杨康鹏)

实验三 正常人非显带染色体的核型分析

一、实验目的

1. 观察人类中期染色体结构与数目。
2. 了解并掌握常规染色体的分类、分组标准。
3. 掌握非显带染色体的核型分析方法。

二、实验原理

染色体是物种的标志, 各种生物染色体数目和形态是恒定的, 因此对人类染色体的识别, 是依据正常人类染色体的固有形态特征和数目进行对照分析, 这也是确定和发现染色体异常和染色体畸变综合征的基本手段和诊断基础。

核型是一个体细胞全部染色体所构成的图像。核型分析是将待测细胞的染色体按照该生物固有的染色体形态特征和规定, 进行配对、编号和分组的分析过程。

人类染色体核型分析标准是建立于丹佛 (Denver) 体制。该体制规定每一条染色体可通过相对长度、臂率和着丝粒指数等三个参数予以识别; 常染色体按长度递减的次序以 1~22 号编号, 性染色体则称为 X 和 Y。另外人类的 46 条染色体应根据长度递减顺序和着丝

粒位置划分为7个易区分的组,即以字母A~G表示7组染色体,并决定将副缢痕和随体作为识别染色体的辅助指标。非显带的染色体核型分析可以明确将染色体分组并对A组、E组、F组的染色体进行识别,但对其他各号染色体还难以识别。因此,非显带的染色体核型分析是初步的分析,要准确识别各号染色体必须依靠显带染色体核型分析。

三、实验用品和材料

1. 器械 光学显微镜(带有油镜头)。
2. 试剂和材料 二甲苯、香柏油、擦镜纸、染色体分析纸、剪刀、镊子、胶水、尺子。
3. 标本 人类常规染色体的标本、人体中期染色体分裂相照片。

四、实验方法和步骤

1. 人体染色体形态观察 取染色体制片标本,先在低倍镜下选择合适的中期分裂相,然后转换油镜仔细分析观察染色体的形态特征,区分中央着丝粒染色体(M)、亚中着丝粒染色体(SM)、近端着丝粒染色体(ST),并进行染色体计数。男性:46,XY;女性:46,XX。为了准确分析染色体核型并进行病历报告,在显微镜下寻找最佳分裂相,进行拍照,扩印,再进行核型分析。图1-3、图1-4、图1-5、图1-6是正常男、女非显带照片核型的分析结果。

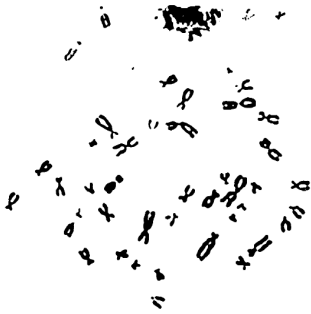


图1-3 中期染色体分裂相(男性)

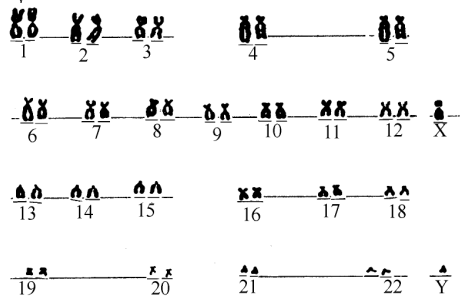


图1-4 正常人非显带染色体核型(男性)

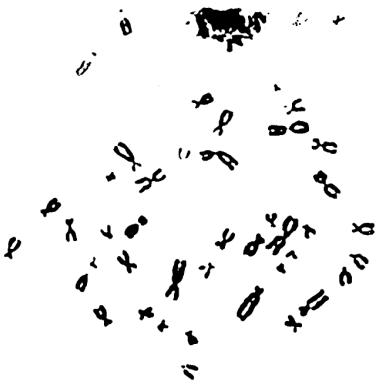


图1-5 中期染色体分裂相(女性)

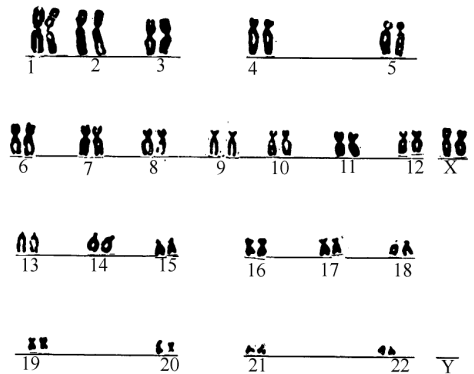


图1-6 正常人非显带染色体核型(女性)

人类染色体核型特点:根据 Dven 体制,总结各组染色体的特征,并予以分组列号如下:

(1) A 组(No. 1~3)是最大的一组染色体。No. 1 为一对最大的中央着丝粒染色体;No. 2 为最大的亚中着丝粒染色体;No. 3 为中央着丝粒染色体。

(2) B 组(No. 4~5)为二对较大的亚中着丝粒染色体,短臂较短,No. 4 和 No. 5 彼此间难以区别。

(3) C 组(No. 6~12+X)为中等大小的亚中着丝粒染色体,它们的大小差不多。识别该组中的最长者(No. 6)和最短者(No. 12)十分容易,而其他染色体较难识别。一般而言 No. 6、7、8 和 11 染色体的短臂较长;No. 9、10、12 短臂较短。No. 9 染色体的长臂有较显著的次缢痕。X 染色体的大小介于 No. 7 和 No. 8 染色体之间,一般不能与 C 组中的其他染色体相区分。

(4) D 组(No. 13~15)为中等大小的近端着丝粒染色体,它们的一个重要的形态特征是随体,随体是一对着色很深的小球,处于短臂的末端,随体与短臂之间的区域很少或全不着色,这正是核仁组织区。

(5) E 组(No. 16~18):No. 16 为中央着丝粒染色体;No. 17、18 为亚中着丝粒染色体, No. 17 的短臂比 No. 18 短臂长。

(6) F 组(No. 19~20)为二对最小的中央着丝粒染色体,彼此间难以区别。

(7) G 组(No. 21~22+Y)为最小的一组近端着丝粒染色体,在 No. 21 和 No. 22 染色体的短臂上可见到随体。No. 22 比 No. 21 要大些,因此把较小的那对染色体作为 No. 21,而把较大的另一对染色体当作 No. 22。Y 染色体的形态和大小,跟 G 组染色体相似。Y 染色体的识别是不难的,它有以下几个特征:呈现异固缩状态,通常比同一细胞中的其他染色体着色更深些;它的两条染色单体一般不作分叉状,而要比其他染色体(尤其是第 21 和第 22 染色体)的两条单体更为靠拢,几乎是平行的;在许多细胞中,在其长臂上可见到次缢痕;一般来说,它比第 21、第 22 染色体要长一些;没有随体;长臂的端部模糊不清,呈“细毛状”。在人类的所有染色体中,Y 染色体大小的变化范围最大,但来自同一个体的细胞,其大小是十分恒定的。

2. 显微相片核型分析 把正常人中期染色体相片中的每一个染色体剪下来,并粘贴于核型分析表上。各组染色体特征见表 1-1。

表 1-1 分裂中期染色体分组编号和主要形态

组号	染色体号	形态大小	着丝粒位置	鉴别要求
A	1~3	最大	1,3M;2SM	明确区分各号
B	4~5	次大	SM	不与其他组相混
C	6~12+X	中等	SM	6、7、8、11、X 不与 9、10、12 相混
D	13~15	中等	ST	不与其他组相混
E	16~18	较小	16M;17、18SM	明确区分各号
F	19~20	次小	M	不与其他组相混
G	21~22+Y	最小	ST	21、22 与 Y 区别

五、作业与思考题

(1) 实验报告:每人取一张中期染色体分裂相照片,在实验报告纸上画好核型分析板。按要求剪切非显带染色体照片,对每号染色体进行分组、配对、编号,并将染色体贴在核型分析板上。分析染色体数目和结构,写出结论。将每条染色体作为对照的中期分裂相贴在报告单上方,核型贴在下方。

(2) 人类染色体有几种类型,分几组,各组有什么特征?

(3) 什么叫核型、核型分析?

(杨康鹏)

实验四 人类染色体 Q 显带技术

一、实验目的

(1) 了解染色体 Q 显带原理。

(2) 掌握染色体 Q 显带技术方法。

二、实验原理

Q 显带技术(Q-banding)是使用荧光素使细胞染色,荧光素能使染色体着色,并在紫外线激发下显示荧光,这种荧光沿着染色体的长度均匀分布,在荧光素中加入烷化剂(常用的荧光烷化剂有氮芥喹吖因 QM 和二盐酸喹吖因 QD)能与 DNA 中的鸟嘌呤反应,同时喹吖因基团插入 DNA 双螺旋,使染色体不同区段呈现亮度不等的荧光。一般富含 AT 碱基的 DNA 区段表现为亮带,富含 GC 碱基的区段表现为暗带。该方法的优点是 Q 带受制片过程和热处理的影响较小,制片效果较好,分类简便,可显示独特的带型,带型鲜明。缺点是由于荧光持续存在的时间很短,必须立即进行显微摄影即标本易褪色,不能做成永久性标本片。另外,必须有荧光显微镜才能进行观察,所以,不能为一般实验室所采用。(图 1-7)

三、实验用品与试剂

1. 器材 吸管、烧杯、量筒、盖玻片、镊子、染液缸、荧光显微镜。
2. 试剂 Macilvaine 缓冲液、QM 荧光染料(50 μ g/ml)。
3. 标本 外周血培养按常规法制作染色体标本(白片)。

四、实验方法与步骤

(1) 缓冲液配制:0.1mol/L 枸橼酸溶液 16.47ml 与 0.2 mol/L 磷酸氢二钠 3.53ml 配制成 pH 7.0 的 Macilvaine 缓冲液。

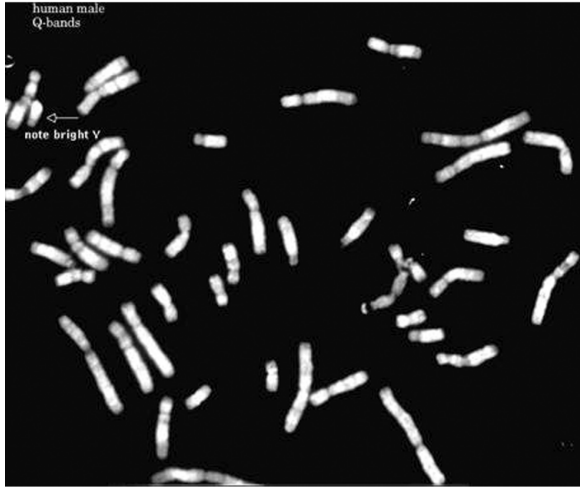


图 1-7 人类 Q 显带染色体

(2) 标本制备: 常规法制备染色体标本, 37℃ 培养箱内过夜, 或用无水乙醇处理数分钟。

(3) QM 染色: 标本在 pH7.0 Maellvaine 缓冲液内处理数秒。20℃ 预温的 QM 染液避光染色 20 分钟。缓冲液漂洗 3 次, 每次 2 分钟(避光)。

(4) 封片: 用盖玻片封存于缓冲液中, 周围用指甲油或石蜡封固。

(5) 置荧光显微镜下观察。

五、注意事项

- (1) 染色体制片一般放置 3~5 天为宜。
- (2) 选用染色体数量较多、分散较好的标本。
- (3) 玻片要干净, 以减少背景干扰。
- (4) 实验中注意避光操作。

六、作业与思考题

- (1) 镜下观察人类染色体 Q 带的形态特征。
- (2) 染色体 Q 显带的基本原理是什么?
- (3) 要制备出良好的 Q 带标本, 操作时需注意哪些问题?

(夏米西努尔·伊力克)

实验五 人类染色体 G 显带标本的制备及观察

一、实验目的

- (1) 了解 G 显带的原理。
- (2) 掌握人体染色体 G 显带技术方法。
- (3) 熟悉人类各号染色体 G 带型特征。

二、实验原理

G 显带是目前使用最广泛的一种染色体显带技术(G banding technique),是指将染色体标本特殊处理后,再用 Giemsa(姬姆萨)染料染色,显示的染色深、浅交替的、恒定的、使不同染色体显示出不同的带型。此技术的意义在于在普通光镜下就能鉴别每对染色体,对诊断某些染色体病起着重要作用。

关于 G 显带的机制,目前有多种说法,例如 Giemsa 染料是由噻嗪和曙红组成的,着色时 DNA 先与 2 个噻嗪分子结合,然后再与一个曙红分子结合,形成沉淀物,而 DNA 的某些部位对染料不敏感,由此形成明暗相间的条带。另外有人认为 DNA 分子上结合疏松的组蛋白易被胰蛋白酶等分解掉,则该区段显示浅染带,而与 DNA 牢固结合的组蛋白不易被分解,则该区段显示深染带。用 Giemsa 染色后,这些带的深浅就更清楚。还有人认为染色体本身具有带的结构,用不同方法染色处理,显出来的带不同。一般认为 G 显带使 DNA 分子中含 A、T 多的区段着色深;含 G、C 多的区段不着色则呈浅染带。

G 显带的方法很多,最常用的是将已固定的染色体制片进行预处理,再用 Giemsa 染色。预处理的方法非常多,可用热、碱、各种蛋白酶、尿素等,其中最常用的是胰蛋白酶进行预处理。方法简便,周期短,带纹清晰,标本可长期保存。G 显带区的 DNA 有较丰富的 A—T 对,有相当一部分中度重复序列 DNA 可能在 G 带区,Giemsa 染料在 G 带区的结合与其相应的 DNA 和非组蛋白有关。

三、实验用品和材料

1. 器材 光学显微镜、恒温培养箱、冰箱、烤箱、37℃ 恒温水浴锅、天平、酒精温度计、60ml 的染色缸、100ml 小烧杯、毛细滴管、刻度吸管(1ml)、滴头、1ml 注射器、4 号注射针头、镊子、吸水纸、玻片。
2. 试剂药品 2.5% 胰酶、0.4% 酚红、3% 三羟甲基氨基甲烷、Giemsa 原液、pH7.4 磷酸缓冲液、0.85% NaCl 溶液、二甲苯。
3. 标本 外周血培养按常规法制作染色体标本(白片)。

四、实验方法与步骤

1. 制片

(1) 方法 1:G 带胰酶消化法。

1) 外周血培养按常规法制作染色体标本,置 60℃ 烘箱过夜,或 80℃ 烘 3 小时,然后置 37℃ 烘箱烘 3 天左右,即可开始预处理。

2) 0.02% 胰酶的配法:取 2.5% 胰酶 0.5ml 溶解于 60ml 0.85% NaCl 溶液。将上述 0.02% 胰蛋白酶溶液倒入染色缸中,置 37℃ 水浴,加入 0.4% 酚红 2 滴,并以 3% 三羟甲基氨基甲烷液调节 pH 为 6.4~6.6(4 号针头,1ml 注射器,45°1 滴),使颜色为橙色。混匀后,放入 37℃ 水浴锅,使 0.02% 胰酶液温度升至 37℃。

3) 将经过烤 3 天的片子从 37℃ 烘箱取出,投入 0.02% 胰蛋白酶溶液中,并不断摆动,2.5 分钟左右。

4) 取出自来水冲洗。

5) 染色:Giemsa 染液(pH7.4 磷酸缓冲液 5ml + Giemsa 原液 11 滴(毛细滴管))染色 8~10 分钟,水冲洗。

6) 空气干燥、镜检。

(2) 方法 2:G 带胰酶-EDTA 方法。

1) 将保存 5 天的制片置 37℃ 温箱烤片 2~3 小时(或 70℃ 烤 2 小时)。

2) 将烤片投入冰箱预冷的胰酶-EDTA 混合液(临用前,将 0.1% 胰酶液和 0.02% EDTA 溶液按 1:1 比例混合用 NaHCO₃调 pH 6.8~7 放冰箱保存)中,轻轻摆动 4~10s 左右。

3) 在 pH6.8 的磷酸缓冲液中漂洗一次。

4) 稀释 Giemsa(1:10)染液染色 10~30 分钟。

5) 无离子水冲洗,空气干燥。

6) 显微镜观察。

2. 实验观察 先在低倍镜自上而下,自左至右地选择分散良好,没有染色体重叠,带纹清晰的 5 个 G 带中期分裂相,然后转至油镜下观察,计数染色体数目,根据每号染色体的特征予以鉴别。(图 1-8,图 1-9)

五、注意事项

(1) G 显带的好坏,首先取决于染色体本身制片的质量,染色体要较长,以早中期为宜,且中期相丰富、分散好,无胞浆背景。

(2) 标本保存时间不宜太长。时间越长,细胞对胰酶处理的抵抗性越强,片龄过长的标本染色后会导致斑点状而非带纹。

(3) 胰酶温度和处理时间需控制好,一般胰酶处理时间不少于 30s。

六、作业与思考题

(1) 实验报告:油镜下观察 1 个 G 显带中期分裂相,计数染色体数目,绘制 1 个 G 显带中期分裂相简图,将每号染色体的位置和序号标记上。

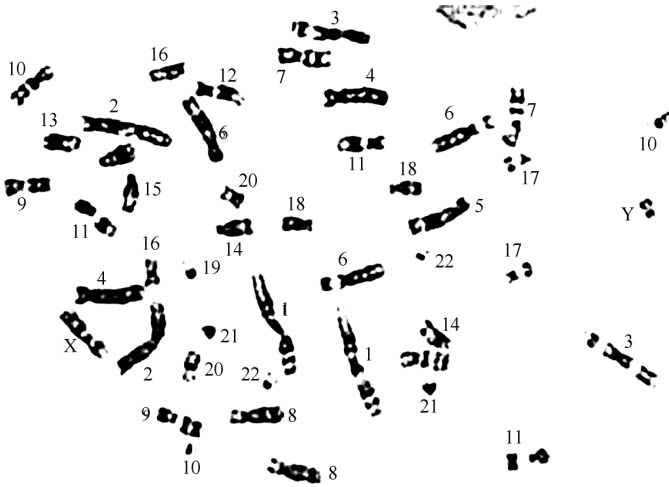


图 1-8 人类 G 显带染色体分裂相



图 1-9 人类 G 显带染色体核型

- (2) 要制备出良好的 G 显带标本,操作时需注意哪些问题?
- (3) 什么叫核型,人类正常核型分几组,各组有什么特征?

(夏米西努尔·伊力克)

实验六 人类 G 显带染色体核型分析

一、实验目的

- (1) 观察 G 显带染色体的形态结构,掌握各号染色体 G 显带特征。
- (2) 掌握 G 显带核型分析方法。
- (3) 了解几种染色体异常与疾病的关系。

二、实验原理

20 世纪 70 年代初,随着染色体显带新技术的问世和发展,极大地推动了染色体研究。所谓的显带技术就是利用特殊的染色方法使染色体的长轴上显示出一条条宽窄和明暗交替或染色深浅不同的横纹,将这横纹称为带(band)。通过显带技术,使人类的 24 种染色体都显示出独特的带纹,称为带型(banding pattern)。

经胰酶处理、Giemsa 染色后,染色体出现与 Q 显带类似的深浅不同的带纹,称为 G 显带。由于 G 显带方法简单、廉价、易行、带纹清晰易辨,在普通显微镜下可以分辨,标本可以长期保存,现已成为普遍采用的常规方法。每对同源染色体的带型基本稳定,不同对染色体带型不同,因此通过 G 显带染色体的核型分析不仅可以准确识别每一号染色体;而且也可以发现染色体上微小的结构特征,为基因定位、区域制图、临床染色体病精确诊断和病因研究创造了必要的前提。

三、实验用品和材料

1. 器械 剪刀、镊子、胶水、尺子、实验报告纸。
2. 照片 人类染色体 G 显带制片,G 显带染色体照片,异常 G 显带染色体照片。

四、实验方法和步骤

- (1) 教师讲解 G 显带染色体核型分析方法和各号染色体的带型特点。
- (2) 学生取 G 显带染色体照片一张,把正常人 G 带中期染色体相片中每一个染色体剪下来,按 ISCN 分组列号,并粘贴于核型分析板上。染色体的剪贴方法同非显带染色体,但要按照各号染色体的 G 显带特点明确区分各号染色体,并排列在正确的位置上。
- (3) 完成剪贴工作后,分析核型,写出结论:正常女性 46,XX 或正常男性 46,XY。(图 1-10)

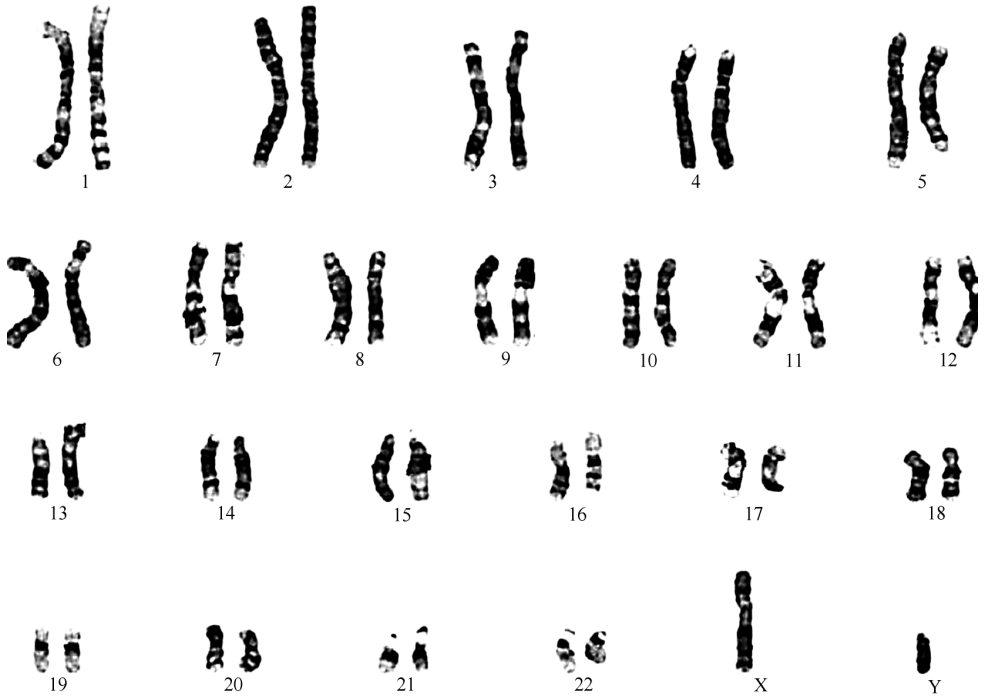


图 1-10 正常男性的 G 显带染色体

附 1: 正常人各染色体的 G 带特征及鉴别要点

1. A 组 1~3 号染色体。

(1) 1 号染色体

1) 短臂: 近侧段有 2 条深带, 第 2 深带稍宽, 在处理较好的标本上, 远侧段可显出 3~4 条淡染的深带。此臂分为 3 个区, 近侧的第 1 深带为 1p21; 第 2 深带为 1p31。

2) 长臂: 副缢痕紧贴着丝粒, 染色浓。其远侧为一宽的浅带, 近中段与远侧段各有两条深带, 此中段第 2 深带染色较浓, 中段两条深带稍靠近, 此臂分为 4 个区, 副缢痕远侧的浅带为 1p21 号带、中段第 2 深带为 1p31 号带, 远侧段第 1 深带为 1p41 号带。

(2) 2 号染色体

1) 短臂: 可见 4 条深带, 中段的 2 条深带稍靠近, 此臂分为 2 个区, 中段两条深带之间的浅带为 2p21。

2) 长臂: 可见 7 条深带, 第 3 和第 4 深带有时融合。此臂分为 3 个区, 第 2 和第 3 深带之间的浅带为 2p21 带, 第 4 和第 5 深带之间的浅带为 2p31 号带。

(3) 3 号染色体: 在长臂与短臂的近中段各具有 1 条明显的宽的浅带。

1) 短臂: 一般在近侧段可见 1 条较宽的深带, 远侧段可见 2 条深带, 其中远侧 1 条较窄, 且着色淡, 这是区别 3 号染色体短臂的显著特征。在处理较好的标本上, 近侧段的深带

可分为2条深带,此臂分2个区,中段浅带为2区1带。

2) 长臂:一般在近侧段和远侧段各有1条较宽的深带,在处理好的标本上,近侧段的深带可分为2条深带,远侧段的深带可分为3条深带,此臂分为2个区,中段浅带为2区1带。该染色体的G带图有点像蝴蝶结。

2. B组 4~5号染色体。

(1) 4号染色体

1) 短臂:可见2条深带,近侧深带染色较浅,短臂只有1个区。

2) 长臂:可见均匀分布的4条深带,在处理较好的标本上,远侧段的2条深带可各自分为2条较宽的深带。此臂分为3区,近侧段第1和第2条深带之间的浅带为2区1带,远侧段两条深带之间的浅带为3区1带。

(2) 5号染色体

1) 短臂:可见2条深带,其远侧的深带宽且着色浓,此臂仅1个区。

2) 长臂:近侧段2条深带,染色较淡,有时不明显,中段可见3条深带,染色较浓,有时融合成1条宽的深带,远侧段可见2条深带,近末端的1条着色较浓,此臂分为3个区,中段第2深带为2区1带,中段深带与远侧深带之间的宽阔的浅带为3区1带。

3. C组 6~12号和X染色体。

(1) 6号染色体

1) 短臂:中段有1条明显宽阔的浅带,形如“小白脸”,是此染色体的特征,近侧段和远侧段各有1条深带,近侧深带贴着丝粒。在处理较好的标本上,远侧段的深带可分为两条深带。此臂分为2个区,中段的明显而宽的浅带为2区1带。

2) 长臂:可见5条深带,近侧1条紧贴着丝粒,远侧末端的1条深带着色较淡;此臂分为2个区,第2和第3深带之间的浅带为2区1带。

(2) 7号染色体:着丝粒着色浓

1) 短臂:有3条深带,中段深带着色较淡,有时不明显,远侧深带着色浓,形似“瓶塞”。此臂分为2个区,远侧段的深带为2区1带。

2) 长臂:有3条明显深带,远侧近末端的1条着色较淡;第2和第3带稍接近。此臂分为3个区,近侧第1深带为2区1带,中段的第2深带为3区1带。

(3) 8号染色体

1) 短臂:有2条深带,中段有1条较明显的浅带,这是与10号染色体相鉴别的主要特征。此臂分为2个区,中段的浅带为2区1带。

2) 长臂:可见3条分界极不明显的深带,此臂分2个区,中段的深带为2区1带。

(4) 9号染色体:着丝粒着色浓

1) 短臂:近侧段和中段各有1条深带,在处理较好的标本上,中段可见2条较窄的深带。此臂分为2个区,中段深带为2区1带。

2) 长臂:可见明显的2条深带,次缢痕一般不着色,在有些标本上呈现出特有的颈部区。此臂分为3个区,近侧的1条深带为2区1带,远侧的1条深带为3区1带。

(5) 10号染色体:着丝粒着色浓

1) 短臂:近侧段和近中段各有1条深带,在有些标本上近中段可见2条深带,但与8号染色体短臂比较,其上深带的分界欠清晰。此臂只有1个区。

2) 长臂:可见明显的3条深带,远侧段的2条深带稍靠近,这是与8号染色体相鉴别的一个主要特征,此臂分为2个区,近侧段的1条深带为2区1带。

(6) 11号染色体

1) 短臂:近中段可见1条深带,在处理较好的标本上,这条深带可分为3条较窄的深带。此臂只有1个区。

2) 长臂:近侧有1条深带,紧贴着丝粒。远侧段可见1条明显的较宽的深带,这条深带与近侧的深带之间是1条宽阔的浅带,这是与12号染色体相鉴别的一个明显的特征,在处理较好的标本上,远侧段的这条较宽的深带可分为2条较窄的浅带,两深带之间有1条很窄的浅带,一般极难辨认,但它是区分的一个界标,在有些标本上近末端处可见1条窄的淡染的深带。此臂分2个区,上述远侧两条深带之间的那条很窄的淡带为2区1带。

(7) 12号染色体

1) 短臂:中段可见1条深带,此臂只有1个区。

2) 长臂:近侧有1条深带,紧贴着丝粒,中段有1条宽的深带,这条深带与近侧深带之间有1条明显的浅带,但与11号染色体比较这条浅带较窄,这是鉴别11号与12号染色体的一个主要特征。在处理较好的标本上,中段这条较宽的深带可分为3条深带。其正中一条着色较浓,在有些标本上,远侧段还可以看到1~2条染色较淡的深带。此臂分为2个区,中段正中的深带为2区1带。

(8) X染色体:其长度介于7号和8号染色体之间,主要特点是长臂和短臂中段各有1条深带,有“一担挑”之名。

1) 短臂:中段有一明显的深带,宛如竹节状。在有些标本上远侧段还可以看见1条窄的着色淡的深带,此臂分为2个区,中段的深带为2区1带。

2) 长臂:看见3~4条深带,近中部1条最明显,此臂分为2个区,近中段的深带为2区1带。

4. D组 13~15号染色体,具有近端着丝粒和随体。

(1) 13号染色体:着丝粒区深染

长臂:可见4条深带,第1和第4深带较窄,染色较淡;第2和第3深带较宽,染色较浓。此臂分为3个区,第2深带为2区1带,第3深带为3区1带。

(2) 14号染色体:着丝粒区深染

长臂:近侧和远侧各有1条较明显的深带。在处理较好的标本上,中段尚看见1条着色较浅的深带。此臂分为3个区,近侧深带为2区1带,远侧深带为3区1带

(3) 15号染色体:着丝粒区深染。

长臂:中段有一条明显深带;染色较浓,有的标本上近侧段可见1~2条淡染的深带。此臂分为2个区,中段深带为2区1带。

5. E组 16~18号染色体

(1) 16号染色体

1) 短臂:中段有1条深带,在较好的标本上看见2条深带,此臂只有1个区。

2) 长臂:近侧段和远侧段各有1条深带。有时远侧段1条不明显,次缢痕着色浓;此臂分2个区,中段深带为2区1带。

(2) 17 号染色体

1) 短臂:有 1 条深带,紧贴着丝粒,此臂只有 1 个区。

2) 长臂:远侧段看见 1 条深带,这条深带与着丝粒之间为一明显而宽的浅带,此臂分为 2 个区,这条明显而宽的浅带为 2 区 1 带。

(3) 18 号染色体

1) 短臂:一般为浅带,此臂只有 1 个区。

2) 长臂:近侧和远侧各有 1 条明显的深带,此臂分为 2 个区,两深带之间的浅带为 2 区 1 带。

(4) 19 号染色体:着丝粒及其周围为深带,其余为浅带。短臂和长臂均只有 1 个区。

(5) 20 号染色体:着丝粒区浓染。短臂有一条明显的深带,此臂只有 1 个区。

长臂:中段和远侧段看见 1~2 条染色较淡的深带,有时全为浅带。此臂只有 1 个区。此染色体有“头重脚轻”之名。

6. G 组:21~22 号染色体和 Y 染色体,21、22 号有随体

(1) 21 号染色体:着丝粒区着色淡。其长度比 22 号短,其长臂上有明显而宽的深带。此臂分 2 个区,其深带为 2 区 1 带。

(2) 22 号染色体:着丝粒区染色浓。其长度比 21 号长,在长臂上可见 2 条深带,近侧的 1 条着色浓,而且紧贴着丝粒。近中段的 1 条着色淡,在有的标本上不显现。此臂只有 1 个区。

(3) Y 染色体:长度变化大,有时整个长臂被染成深带,在处理好的标本上可见 2 条深带。此臂只有 1 个区。

附 2:人类染色体 G 带歌谣

一秃二蛇三蝶飘,四像鞭炮五黑腰;六号像个小白脸,七盖八下九苗条;
十号长臂近带好,十一低来十二高;十三、四、五一二一,十六长臂缢痕大;
十七长臂带脚镣,十八白头肚子饱;十九中间一点腰;二十头重脚飘飘;
二十一好像黑葫芦瓢,二十二头上一点黑;X 染色一担挑,Y 染色长臂带黑脚。

五、作业与思考题

(1) 实验报告:学生取 G 显带染色体照片一张,把正常人 G 带中期染色体相片中每一个染色体剪下来,按 ISCN 分组列号,并粘贴于核型分析版上。完成剪贴工作后,分析核型,写出结论:正常女性 46,XX 或正常男性 46,XY。

(2) 人类染色体 G 带技术的基本原理是什么?

(3) 怎样识别人类 G 带染色体?

(苏 刚)

实验七 人类染色体 C 显带技术

一、实验目的

- (1) 学习 C 显带标本制作法、了解 C 显带原理。
- (2) 掌握 C 显带染色体的基本特征。

二、实验原理

C 显带技术是一种染色体局部显带技术。染色体经碱、酸、盐处理后,再经 Giemsa 染色,呈现出特有的着丝粒、次缢痕区及 Y 染色体长臂远侧段等的结构异染色质区深染,称为 C 带。此区域的 DNA 多为高度重复序列,并仅与组蛋白紧密结合,因而保护了 C 带区的异染色质免受酸、碱、盐破坏,并易被 Giemsa 深染。如该区域的 DNA 一旦发生变性,在改变变性条件后,即可快速复性,这是高度重复序列 DNA 所具有的特性。其他部位的 DNA 一旦被碱破坏变性后,不易发生复性,或复性较慢,因此,不易被 Giemsa 着色。所以,染色体两臂的常染色质部分仅显示出浅淡的染色体轮廓。优良的 C 带标本,可使结构异染色质区着色很深。

C 带显示的结构异染色质表现在:①各号染色体的着丝粒部位;②各近着丝粒部位;③在各具有次缢痕的部位如 1、9、16 号染色体长臂上;④Y 染色体长臂远端。因此,利用 C 带,可以准确地识别这些染色体,并可确定着丝粒的位置和数目。不同个体、种族,C 带的大小和染色的强度不同,呈现出多态性,故 C 显带技术在多态性研究和鉴别染色体来源等方面具有一定的意义。

三、实验用品与材料

1. 器材 光学显微镜、恒温水浴箱、温度计、立式染缸、镊子、吸管、量筒、烧杯、盖玻片、擦镜纸等。

2. 试剂 0.2mol/L HCl 溶液、5% Ba(OH)₂ 溶液、2 × SSC 缓冲液、Giemsa 染液、70% 乙醇溶液、80% 乙醇溶液、95% 乙醇溶液和乙醇。

3. 标本 外周血培养按常规法制作染色体标本。(白片)。

4. 试剂配方

(1) 2 × SSC 溶液:称取 17.5g NaCl 和 8.8g 枸橼酸钠溶于 800ml 蒸馏水内,用 1mol/L NaOH 调 pH 到 7.0,加水到 1000ml。

(2) 0.01 mol/L 的磷酸缓冲液(PBS 液):称量 0.01 mol/L Na₂HPO₄ (M = 358.2g) 2.22g,然后溶于 620ml 蒸馏水内。0.01 mol/L KH₂PD₄ (M = 136.09g) 0.35g 溶于 380ml 蒸馏水中。上述两液混匀后用 0.2mol/L HCl 调 pH 到 6.8 左右,即配成 1000ml 0.01 mol/L PBS 液,室温保存。

(3) Giemsa 染液

Giemsa 染料	0.5g
甘油(丙三醇)	33ml
甲醇	33ml

用时与 pH 6.8 的 PBS 液以 1:9 稀释即可。

四、实验方法与步骤

方法(一)

- (1) 将制好的玻片放入 0.2 mol/L HCl 溶液中 1 小时。
- (2) 蒸馏水冲洗两遍。
- (3) 浸入预先水浴加温 50℃ 5% 的饱和 Ba(OH)₂ 溶液 8~10 分钟。
- (4) 蒸馏水冲洗二次。
- (5) 浸入预先水浴加温 60℃ 2 × SSC 溶液中 1.5 小时。
- (6) 蒸馏水冲洗三次。
- (7) Giemsa 染色 10~15 分钟。
- (8) 流水轻轻冲洗,空气干燥,镜检。

方法(二)

- (1) 将制好的玻片浸入预先水浴加温 58℃ 饱和 Ba(OH)₂ 溶液中 5 分钟。
- (2) 取出标本置 0.1mol/L HCl 溶液中漂洗 1~2 分钟。
- (3) 然后蒸馏水漂洗数次。
- (4) 乙醇脱水:70% 乙醇溶液→80% 乙醇溶液→95% 乙醇溶液→乙醇(每个浓度 5 分钟),空气干燥。
- (5) 浸入预先水浴加温 65℃ 2 × SSC 溶液中 1.5 小时。
- (6) Giemsa 染色 10~15 分钟。
- (7) 流水轻轻冲洗,空气干燥,镜检。
- (8) 实验观察:由低倍镜找到合适的细胞分裂相,然后换油镜观察(表 1-2)。

表 1-2 C 带标本的带型特征

染色体号	着色区大小	其他特征
1	大	从着丝粒伸展至长臂内
2	小	
3~8	中等	
9	大	从着丝粒伸展至长臂内
10	中等	
11	中等	
12	中等	
13	中等	有时分成两段
14、15	中等	
16	大	从着丝粒伸展至长臂内

续表

染色体号	着色区大小	其他特征
17	中等	
18	中等	但较 17 号稍大些
19~22	中等	
X	中等	
Y		着丝粒上有一较小的带,长臂的远端有一大带

五、注意事项

- (1) 片龄不宜过长,否则影响 C 带质量。
- (2) 制片从饱和 $\text{Ba}(\text{OH})_2$ 中取出时要迅速投入 0.1mol/L HCl 溶液中,以免 $\text{Ba}(\text{OH})_2$ 的沉淀物粘贴在玻片上影响 C 带的观察。
- (3) 染色浓度及时间不宜过高过长,以免影响 C 带的质量。(图 1-11)



图 1-11 人类染色体 C 显带核型图

六、作业与思考题

- (1) 实验报告:每人剪贴一张 C 带染色体照片,作为对照的中期分裂相贴在报告单上方,核型贴在下方。
- (2) 怎样识别人类 C 带染色体?
- (3) 制备 C 带染色体应注意哪些问题?

(朱宏文)

实验八 人类染色体 R 显带技术

一、实验目的

- (1) 掌握人类染色体 R 显带技术。
- (2) 观察人类染色体 R 带的形态特征。

二、实验原理

R 显带技术是因为该法显带与其他(Q、G)带型相反,巴黎会议(1971)将其定名为“reverse bands”,简称 R 带,又称“反带”或逆转 Giemsa 法。R 带特征与 G 带相同,只是浅带和深带颠倒而已。

由于 G 显带显示的各染色体两臂末端均为浅带,如果在染色体两臂末端发生缺失等异常时,一般难以识别检出。而 R 带正好能将各染色体末端显示出易于识别的深带,所以,R 显带技术对分析、研究染色体的末端缺失或者结构重排特别有用。

三、实验用品与材料

1. 器械 显微镜、超级恒温水浴锅、酒精温度计、染色缸、滴管。
2. 试剂药品 磷酸缓冲液(pH 6.5)、Giemsa 原液。
3. 标本 按常规法制作染色体标本(白片)。
4. 试剂配方

(1) Earles 液

- 1) 溶液 A:NaCl 6.80g、KCl 0.40g、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.14g、蒸馏水 800ml。
- 2) 溶液 B:CaCl 20.20g、 $\text{MgCl} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.17g、蒸馏水 200ml。

将溶液 A 倒入溶液 B 中,混合后即可。

(2) Hoechst-33258 原液:Hoechst-33258 2mg,蒸馏水 4ml。Hoechst 工作液:200ml 1/15mol/L,PBS 加 0.75ml 原液。

(3) 吖啶橙(acridineorange)。

(4) pH6.5 PBS

- 1) 溶液 A:0.07mol/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 。
- 2) 溶液 B:0.07mol/L KH_2PO_4 。
- 3) 将 32ml A 液和 68ml B 液混合。

(5) 吖啶橙工作液:0.1g 吖啶橙于 100ml 0.07mol/L PBS 中。

(6) 胸腺嘧啶核苷(Thymidine):使最终浓度为每毫升为 0.3mg。

(7) 5-溴脱氧尿嘧啶核苷(BrdU):使最终浓度为 3×10^{-5} mol/L。

四、实验方法与步骤

- (1) 所制标本在 Hoechst-33258 工作液中,浸染 20 分钟或在吖啶橙工作液中浸染 5