

北京大学医学实验系列教材

医学细胞生物学与 医学遗传学实验教程

主 编 肖军军

副主编 张 涛 吴 丹 白 云



北京大学医学出版社

北京大学医学实验系列教材

医学细胞生物学与医学遗传学实验教程

主 编 肖军军

副主编 张 涛 吴 丹 白 云

编 委 (以姓氏笔画排序)

王小竹 刘 卉 刘 林 闫 明

闫 武 吴白燕 宋书娟 邹俊华

李 莉 杨 华 宋 青 张 沙

孟书聪 林 明 赵 翔 董晓敏

梁红业 章远志 黄 昱 韩 玲

北京大学医学出版社

北京医学实验系列教材

图书在版编目 (CIP) 数据

医学细胞生物学与医学遗传学实验教程/肖军军主编. —北京: 北京大学医学出版社, 2008. 5

(北京大学医学实验系列教材)

ISBN 978-7-81116-555-5

I. 医… II. 肖… III. ①人体细胞学: 细胞生物学—实验—医学院校—教材 ②医学遗传学—实验—医学院校—教材 IV. R329.2-33 R394-33 白 晔 吴 朝 燕 主 编

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2008) 第 040144 号 委 编

主 编 白 晔 吴 朝 燕
副 主 编 白 晔 吴 朝 燕
参 编 白 晔 吴 朝 燕
参 编 白 晔 吴 朝 燕
参 编 白 晔 吴 朝 燕
参 编 白 晔 吴 朝 燕

医学细胞生物学与医学遗传学实验教程

主 编: 肖军军

出版发行: 北京大学医学出版社 (电话: 010-82802230)

地 址: (100083) 北京市海淀区学院路 38 号 北京大学医学部院内

网 址: <http://www.pumpress.com.cn>

E - mail: booksale@bjmu.edu.cn

印 刷: 北京东方圣雅印刷有限公司

经 销: 新华书店

责任编辑: 吕证宝 许立 责任校对: 金彤文 责任印制: 张京生

开 本: 787mm×1092mm 1/16 印张: 6.5 字数: 160 千字

版 次: 2008 年 5 月第 1 版 2008 年 5 月第 1 次印刷 印数: 1-3000 册

书 号: ISBN 978-7-81116-555-5

定 价: 13.00 元

版权所有 违者必究

(凡属质量问题请与本社发行部联系退换)

北京医学实验系列教材

序

北京大学医学实验系列教材编委会

主任委员 李学军
副主任委员 管又飞 宫恩聪
秘书长 张燕
委员 (按姓氏笔画排序)

卫 兰	王 宪	王月丹	白 云	李 彤	刘永寿
吴 丹	吴 伟	吴立玲	肖军军	宋德懋	张卫光
张 涛	范少光	祝世功	钟延丰	贾弘禔	贾竹青
徐 海	倪菊华	梁 静	谭焕然		

序

现代医学是一门实验科学。医学院校在培养学生时一般都很重视实验教学，北京大学医学部也是如此。但在我的印象中，以前都是各学科单独设立实验课程，彼此多有重复。从内容上看，有相当部分只是理论上某些结论的印证，学生们往往对着实验指导一步一步往下操作，实验结束、报告写完，脑子里并没有留下多少印象。近些年来，北京大学医学部基础医学院围绕培养创新人才的目标，在教学内容、教学方法、课程模式、考核体系等方面进行了新的探索和实践，其中也包括实验教学的改革。他们在1998年创建了生物医学实验教学中心，十年来对12门基础医学课程的实验教学进行了重组、整合和改革，打破了“单一课程”、“单一实验室”的原有模式，形成了以机能、形态、生物化学与分子生物学、病原与免疫、细胞生物与遗传五个模块和基础性实验、综合性实验、研究性实验三个层次所构成的基础医学实验教学体系，并且在实验内容方面注重培养学生科学思维，激发学生创新活力，提高学生解决实际问题的能力。我认为北京大学医学部在基础医学实验课程教学方面进行的改革是扎实的，是成功的。《北京大学医学实验系列教材》是他们十年改革成果的总结，值得各医学院校参考。我也衷心希望我国从事医学教育的同志们再接再厉，在实践中不断摸索新的经验，思想再解放一些，改革的步伐再迈得大一些，为建立具有中国特色的先进医学教育体系做出新的贡献。

是为序。

韩启德

二零零八年四月二十九日

前 言

21世纪被认为是生命科学的世纪。医学细胞生物学与遗传学作为生命科学的微观世界的重要基础学科,近年发展非常迅速,广泛地影响着基础医学与临床医学,已成为现代医学教育中的重要课程。掌握这两门学科实验的方法与技术对于从事基础医学和临床医学工作是十分必要的。

本教材是为《医学细胞生物学》和《医学遗传学》理论课配套的实验教材,实验包括:基本实验与综合实验两个部分。

在基本实验中,医学细胞生物学实验包括:细胞的原代培养、细胞的传代培养、各种光学显微镜与临时制片方法、荧光显微镜技术、吖啶橙荧光染色法、细胞化学染色(Feulgen反应显示DNA)、细胞骨架——微丝的显示与观察、电子显微镜术及电子显微镜生物样品制备。在医学遗传学实验中包括了细胞遗传学实验技术、分子遗传学实验技术和生化遗传学实验技术等主要领域的基础实验,结合了目前临床实用需求。实验中包括:人类基因组DNA提取、亨廷顿病的基因诊断与溶酶体酶贮积病的生化检测。

综合实验包括:遗传咨询、遗传病分析及风险评估、人类正常性状的遗传学分析、人类遗传病、人类皮纹分析、氨基酸分析(氨基酸分析仪)、单细胞凝胶电泳、磷酸钙介导的绿色荧光蛋白细胞转染技术。

融合实验包括:人体外周血淋巴细胞培养与非显带染色体标本的制备、正常人非显带染色体的核型分析与细胞分离。

这些实验既包括了经典实验,又增加了一些内容新颖、技术先进、教学实用性强的实验,有利于培养学生的综合实验素质和科研能力。本实验教材是北京大学医学部实验教学中心的系列实验教材之一,可供国内医科院校和综合性大学的医学和生物专业的专科生、本科生和研究生的实验教学使用,亦可作为基础医学和临床医学研究工作者的参考书籍。

编者

2008.4.2

目 录

基本实验

实验一 细胞遗传学实验技术	(5)
实验 1.1 小鼠骨髓染色体标本制备	(5)
实验 1.2 正常人非显带染色体的核型分析	(7)
实验 1.3 人类染色体 G 显带核型分析	(9)
实验二 分子遗传学实验技术	(13)
实验 2.1 人类基因组 DNA 提取	(13)
实验 2.2 亨廷顿病的基因诊断	(15)
实验三 生化遗传学实验技术	(18)
实验 3.1 溶酶体酶贮积病的生化检测	(18)
实验四 细胞生物学实验技术	(21)
实验 4.1 细胞的原代培养	(21)
实验 4.2 细胞的传代培养	(25)
实验 4.3 各种光学显微镜与临时制片方法	(27)
实验 4.4 荧光显微镜技术	(31)
实验 4.5 吖啶橙荧光染色法	(33)
实验 4.6 细胞化学染色 (Feulgen 反应显示 DNA)	(35)
实验 4.7 细胞骨架——微丝的显示与观察	(37)
实验 4.8 电子显微镜术及电子显微镜生物样品制备	(41)

综合实验

实验一 遗传咨询	(55)
实验二 遗传病分析及风险评估	(60)
实验三 人类正常性状的遗传学分析	(65)
实验四 人类遗传病分析 (观看光盘)	(69)
实验五 人类皮纹分析	(70)
实验六 氨基酸分析 (氨基酸分析仪)	(76)
实验七 单细胞凝胶电泳	(79)
实验八 磷酸钙介导的绿色荧光蛋白细胞转染技术	(83)

融合实验

实验一 人体外周血淋巴细胞培养及染色体标本制备	(87)
实验二 细胞分离	(90)

总 则

一、实验程序和要求

1. 预习 学生实验前必须认真预习实验指导及教材有关内容，应了解实验的目的要求、实验内容、基本原理和操作方法。
2. 讲解 教师只对实验原理、内容安排及注意事项进行讲解，让学生有充分时间进行独立的操作和观察。
3. 操作与观察 学生在实验中要按操作程序进行独立操作，仔细观察实验现象和结果并记录。
4. 示教 实验中的示教是对某些较难的实验操作过程和观察材料进行演示，学生初步认识后，再独立操作，仔细观察。
5. 作业 实验报告必须根据自己的观察，以实事求是和一丝不苟的科学精神忠实地记录、分析、思考、综合和总结。实验报告一般应于实验结束时呈交。
6. 总结 实验结束后，由教师进行实验总结。

二、实验规则和注意事项

1. 学生实验必须穿好工作服，要求携带教材、实验指导、实验报告纸和文具，按规定座位入座。
2. 学生实验前应检查所用仪器、实验用品、材料是否完好齐全，如有缺损要及时向教师报告，不得随意调换仪器和实验用品。实验时要爱护实验仪器、用品和标本，如有损坏应主动报告，说明情况。
3. 实验课不得迟到、早退或无故缺课。实验时要遵守课堂纪律，保持肃静，严禁谈笑喧哗或随意走动，有问题时举手提问，不得进行和实验无关的其他活动。
4. 实验时要听从教师安排和指导，严格遵守实验操作规程，按照实验指导的要求进行。要求操作规范、观察仔细、思维活跃和记录认真，及时完成实验报告。
5. 实验结束后，学生应自觉清理好实验台面、实验仪器、试剂及其他实验用品，物归原处。值日生负责清扫地面，整理实验用品，处理垃圾，关好水电、门窗后再离开实验室。

基本实验

实验一 细胞遗传学实验技术

实验 1.1 小鼠骨髓染色体标本制备

【实验目的】

掌握实验动物骨髓染色体标本的一般制备方法（直接法）。了解小鼠染色体的形态特征及其数目。

【实验原理】

动物骨髓细胞具有旺盛的分裂增殖能力。在骨髓细胞中处于分裂相的细胞数目较多。为了有效积累更多的有丝分裂中期细胞，可在收集骨髓细胞前用秋水仙素对其进行处理，其作用是抑制细胞分裂过程中纺锤丝的形成，使细胞有丝分裂停止于中期，可以积累中期分裂相细胞，以便于染色体标本的制备。

制备过程中用 KCl 低渗处理，可使细胞体积膨大，染色体分散。低渗后，需要用固定液固定染色体。高位滴片和吹散滴液，可使染色体进一步分散。用预冷的载玻片滴片后，迅速过火，可使染色体进一步扩散和固定，以便于制片和观察分析。

通过制备小鼠骨髓染色体标本，可以评价毒性物质对动物细胞染色体的影响。本法可应用于环境致突剂的检测，具有简单、直接、利于掌握的特点，普通实验室均可应用。因此本法是检测有害物质对机体遗传物质损伤的常用实验方法之一。

【实验材料】

1. 试剂 甲醇、冰醋酸、0.075mol/L KCl、乙醇、0.04%秋水仙素、Giemsa 染液。
2. 器械（仪器）离心机、普通天平、镊子、解剖剪子、搪瓷盘、搪瓷盆、纱布、试管架、片盘、10ml 量筒、1ml 注射器、5ml 注射器、滴管、刻度离心管、橡皮吸头、50ml 烧杯、预冷的载玻片（冰片）、酒精灯。
3. 动物（或标本）小白鼠（体重约为 20g）。

【实验步骤】

1. 取材 小鼠股骨骨髓细胞

取材前 4 小时于小鼠腹腔内注入 0.04% 的秋水仙素（0.1ml/10g）以积累中期分裂相。断颈髓法处死小鼠，取其股骨，用酒精纱布清除其上黏附的肌肉及结缔组织。剔除干净后，用剪刀剪去股骨两端少许骨髓及骨皮质，暴露出红骨髓。用 5ml 注射器吸取 0.075mol/L KCl 2.5ml，插入股骨一端，冲洗骨髓腔，将冲洗液收集到 5ml 刻度离心管中（注意不要让组织掉入离心管中），再用注射器吸取 0.075mol/L KCl 2.5ml，插入股骨另一端，冲洗骨髓腔，将冲洗液收集到同一刻度离心管中，吹打均匀。共收集 5ml 冲洗液。

2. 低渗

将收集有骨髓冲洗液的离心管放置在 37℃ 恒温箱中（或室温下），低渗处理 15~20 分钟。

3. 预固定

5ml 低渗液中加入 2~3 滴固定液（甲醇：冰醋酸=3：1），立即吹打混匀（不可用力过猛），平衡后离心，2500r/min（rpm），离心 5 分钟，然后弃上清液，留底物。

4. 固定一

取固定液 5ml 加入离心管中，吹打混匀（不可用力过猛）后，室温固定 10 分钟，2500r/min 离心 3 分钟，弃上清液，留底物。

5. 固定二

重复固定一的步骤。离心后弃上清液，加入少许固定液（约 0.3~0.5ml，加入量根据底物多少而定）。

6. 滴片

将沉淀物吹打混匀（不可用力过猛），吸于滴管内，滴管距离预冷的载玻片约 30~40cm，将沉淀液滴在载玻片上，每片 2~3 滴。滴片后迅速把载玻片上的液滴用力吹散，并立即用酒精灯迅速来回烘烤几次，以利于染色体在载玻片上进一步扩散及固定，但注意时间不可过长。最后，把滴片放入片盘中晾干。

7. 染色

将 1:10 的 Giemsa 染液扣染 15 分钟后，载玻片滴液面朝下，用流动的水冲洗，去除多余的染液。空气干燥，镜检观察小鼠细胞有丝分裂中期相及小鼠染色体形态和数目。

【分析与思考】

1. 提前给小鼠腹腔注射秋水仙素的意义。

2. 总结标本制备成功的注意事项。

【注意事项】

1. 取材时应取小鼠后肢最上端的股骨，不要误取下段的胫腓骨。

2. 在剪股骨两端的骨骺时，不要剪得太少，也不要剪得过多。

3. 低渗时间不可过短，以免影响染色体的分散。

4. 固定液应在使用时现配。

5. 离心前，离心管要基本配平，并放入离心机内对称的位置。

6. 滴片要迅速，要注意滴管与载玻片的距离不可太近。

7. 勿用带油渍的手抓取冰冻载玻片，勿用手触及载玻片滴液面。

8. 滴片后用酒精灯烘烤时，要迅速，时间不可过长，以免把滴片烤裂。

9. 染色前，应用记号笔在载玻片滴液面作记号。

10. Giemsa 染色后冲洗滴片时，滴液面不可直接对着流动的水冲洗。

11. 镜观时，应先在低倍镜下找到中期分裂相，把中期分裂相调至镜头中央，然后换成高倍镜，用微调调焦距，直到视野清晰为止。

实验 1.2 正常人非显带染色体的核型分析

【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。

【实验原理】

人类非显带染色体核型分析是染色体研究中的基本方法。它可根据染色体的数目、结构进行核型分析,对染色体病患者做出初步的诊断。该方法可在显微镜下直接做出判断,也可进行显微照相,经冲洗、放大后,根据照片进行分析。

人类染色体的命名是根据丹佛及伦敦会议提出的标准,按照染色体的长度和着丝点的位置,将染色体配对并按长度依次排列、分组、编号。人体细胞含有 46 条染色体,即 23 对,其中 22 对为常染色体,男、女相同,编为 1~22 号,另一对为性染色体,男、女有别,男性为 XY,女性为 XX。根据着丝点的位置及其相对长度可将 22 对常染色体分为 A、B、C、D、E、F、G 七个组。性染色体可根据它们的形态、大小编入组内,X 染色体编入 C 组,Y 染色体编入 G 组。在剪接配对制备核型图时,性染色体可单独排列。将照片上的染色体按其轮廓剪下,并根据它们的大小和着丝点的位置,进行配对、分组、排列、并贴在报告纸上,便构成了染色体核型图。根据每个染色体的正常形态特征,检查分析染色体核型正常与否,即为核型分析。核型分析后,将其分析结果按国际标准进行描述。

【实验材料】

1. 试剂 二甲苯、香柏油。
2. 器械 光学显微镜(带有油镜头)、擦镜纸、染色体分析纸、剪刀、镊子、胶水、尺子。

【实验步骤】

1. 人类染色体形态观察

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	中央着丝粒	要求明确区分染色体号
B	4~5	次大	亚中着丝粒	要求不与其他组相混
C	6~12+X	中等	亚中着丝粒	要求 6、7、8、11 不与 9、10、12 相混
D	13~15	中等	近端着丝粒	要求不与其他组相混
E	16~18	较小	中央着丝粒	要求明确区分染色体号
F	19~20	次小	中央着丝粒	要求不与其他组相混
G	21~22+Y	最小	近端着丝粒	要求 21、22 与 Y 区别

A 组 (No. 1~3)

最大的一组染色体,它们的着丝粒在中部或接近中部。

No1 为一对最大的中着丝粒染色体。

No2 较 No1 短些，着丝粒接近中部。

No3 为 A 组中最小的中着丝粒染色体。

B 组 (No4~5)

为两对大的亚中着丝粒染色体，它们有明显的长臂和短臂。

No4 和 No5 染色体一般不易区别。

C 组 (No6~12, +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 (No6) 和最短者 (No12) 十分容易，而其他染色体较难识别。一般而言，第 6、7、9 和 11 号染色体的着丝粒更接近于中部；第 9 号染色体的长臂有较显著的次缢痕。X 染色体的大小介于第 7 号和第 8 号染色体之间，一般不能与 C 组中的其他染色体相区分。

D 组 (No13~15)

为中等大小的端着丝粒染色体，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完全不着色，这正是核仁组织区。

E 组 (No16~18)

No16 为 E 组中最大的一对中着丝粒染色体。

No17 为中等大小的亚中着丝粒染色体，短臂看得很清楚。

No18 为 E 组中最小的一对染色体，其短臂很小，着丝粒的位置几乎与端着丝粒的染色体一样。

F 组 (No19~20)

为两对小的中着丝粒染色体，一般不易把它们区别开。作为一个组，它们是易于识别的。

G 组 (No21~22+Y)

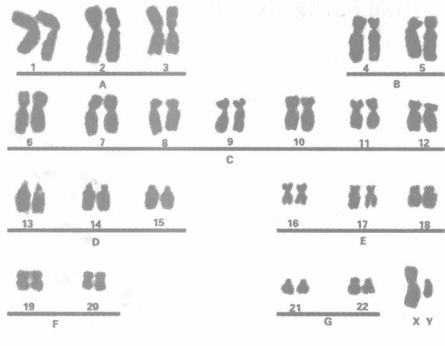
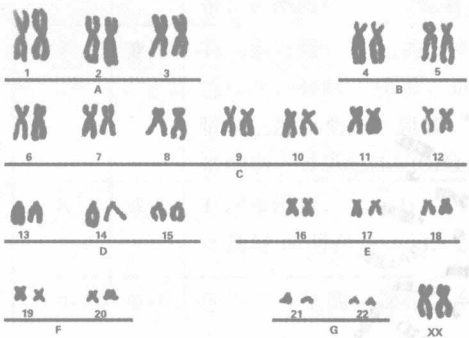
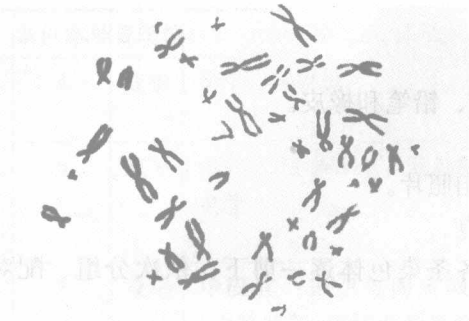
为最小的一组近端着丝粒染色体，在 No21 和 No22 染色体的短臂上可见到随体。No22 比 No21 要大些，因此，把较小的那对染色体作为 No21，而把较大的一对染色体当作 No22。

Y 染色体的形态和大小，与 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：①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；②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 22 号染色体）的两条单体更为靠拢，几乎是平行的；③在许多细胞中，在其长臂上可见到次缢痕；④一般来说，它比第 21、22 号染色体要长一些；⑤没有随体；⑥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 Y 染色体，其大小是十分恒定的。

2. 显微照片核型分析 把正常人中期染色体照片中的每一个染色体剪下来，并粘贴于核型分析板上。按 ISCN 分组列号，配成 23 对，其中 22 对常染色体按染色体的长短（形态大小）用阿拉伯数字 1~22 做标记，两条性染色体用字母 X、Y 做标记自成一对。常染色体又划分为 A、B、C、D、E、F、G 七组，X 染色体属 C 组，Y 染色体属 G 组。分类方法按国际统一分类。

【分析与思考】

1. 剪贴一张人体细胞非显带中期分裂相染色体照片。



2. 写出核型。
3. 简单描述正常人体细胞内各组染色体的非显带特点。

【注意事项】

1. 实验操作时，不宜面对剪下的染色体大声说话、咳嗽和打喷嚏，以免染色体被吹跑遗失。
2. 剪贴时应注意一对染色体要排列紧密，不要有间隔，而每对之间要有间隔。每组之间也要有间隔。着丝粒排列在横线上，上下线染色体要求对齐排列。
3. 将性染色体排列在 G 组旁。
4. 按染色体轮廓剪成长方形，以便排列、配对和粘贴。

(刘 卉 刘 林)

实验 1.3 人类染色体 G 显带核型分析

【实验目的】

1. 了解染色体 G 显带标本的制作过程。
2. 通过染色体 G 显带核型分析，初步掌握各号染色体 G 带的带型特征。

【实验原理】

将制备好的人类外周血淋巴细胞染色体标本在自然环境中老化 3~5 天，或在滴片次日将标本放入 80℃ 恒温烤箱中干燥 3 小时，然后将标本置于 37℃ 预温的 0.025% 的胰蛋白酶溶液中 (pH 7.2) 消化 15~25 秒，然后用生理盐水漂洗数次，Giemsa 染液染色 15 分钟，自来水冲洗，自然干燥，待观察。

在显微镜低倍镜下挑选出形态好的中期分裂相，然后转用油镜观察，如果此分裂相数目完整且带纹清晰，经显微照相、冲洗、放大，制成人类染色体 G 显带中期分裂相照片。

【实验材料】

人外周血淋巴细胞 G 显带中期分裂相照片。

实验用具：剪刀、镊子、剪贴纸、直尺、胶水、铅笔和橡皮。

【实验步骤】

1. 每人准备一张人类染色体 G 显带中期分裂相照片。
2. 熟悉记忆各号染色体 G 带带型的特征性特点。
3. 根据其大小、带型特点和着丝粒位置，将各条染色体逐一剪下，依次分组、配对和排列组合，待检查无误后，方可贴在报告纸上。
4. 用简式和繁式写出核型。

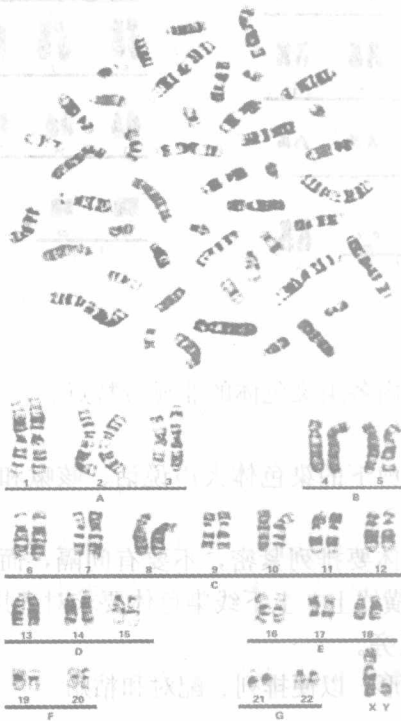


表 1-2 染色体的带型特点及鉴别要点

组	染色体号	着丝粒	短臂 (p)	长臂 (q)
A	1	中央	近侧段和中段各有一条深带，其中段深带稍宽，远侧段着色较淡	次缢痕紧贴着丝粒，染色浓，似一黑三角形。其远侧为一宽的浅带，中段和远侧段各有两条深带
	2	亚中	可见 4 条深带，中间的两条深带稍靠近	可见 6~7 条深带
	3	中央	近侧段可见 2 条深带，远侧段可见 3 条深带，其中远侧近端部的 1 条带较窄，且着色较淡，这是鉴别第 3 号染色体短臂的显著特征	一般在近侧段和远侧段各有一条较宽的深带