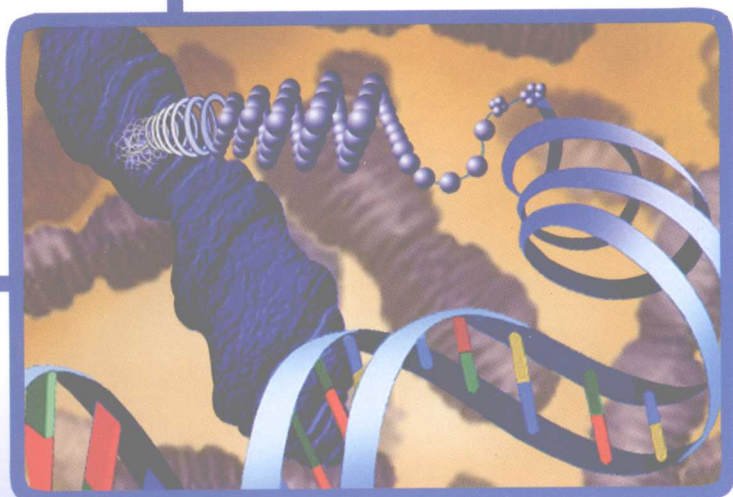


普通高等教育“十一五”国家级规划教材配套教材
全国高等医药院校教材

医学遗传学实验指导

(第2版)

王修海 单长民 杨康鹏 主编



科学出版社
www.sciencep.com

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 杨康鹏

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
杨康鹏	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>

双青印刷厂印刷

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 1/16

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〈双青〉)

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: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.6g、 KH_2PO_4 0.6g、KCl 4.0g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2.0g、NaCl 80.0g 溶解于 900ml 三蒸水。

(2) B 液: $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 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 NaHCO_3 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相比较多的视野,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)。

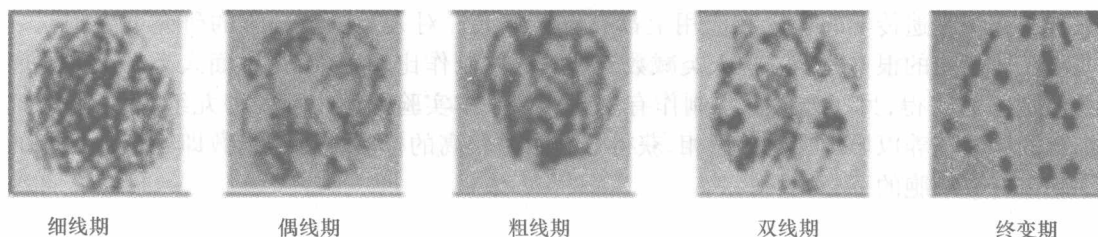


图1-1 小鼠睾丸组织减数分裂前期I细胞形态

(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(50μg/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50μg/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0.07μg/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)。

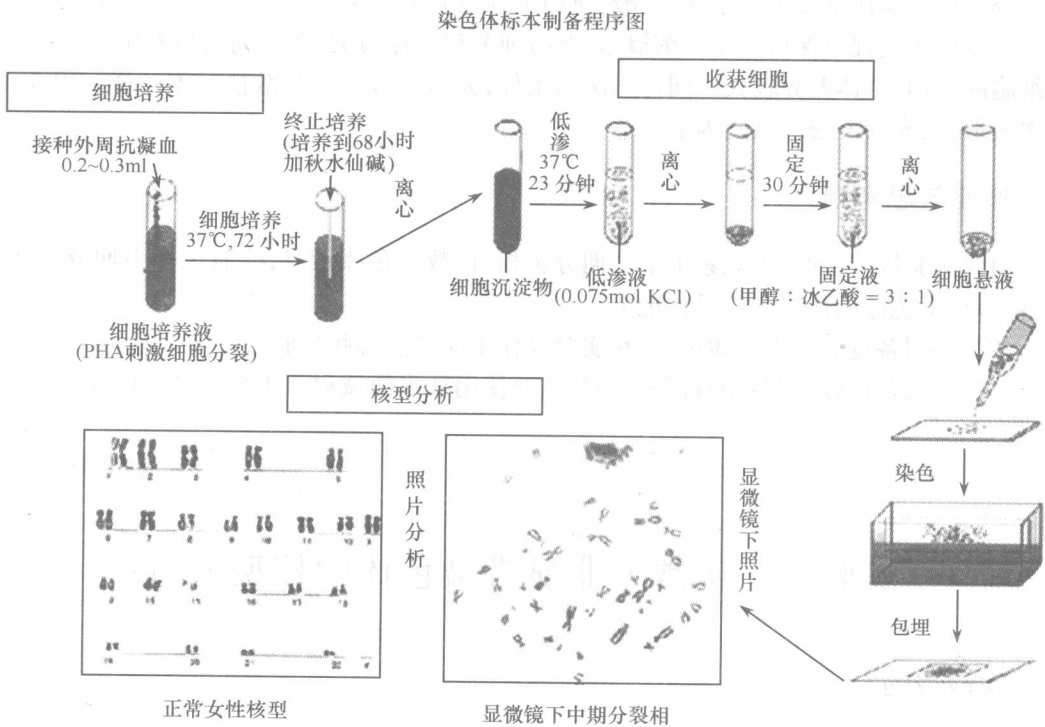


图1-2 人体外周血淋巴细胞染色体标本制备方法流程图

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0.1~0.2μg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±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?

(杨康鹄)

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)

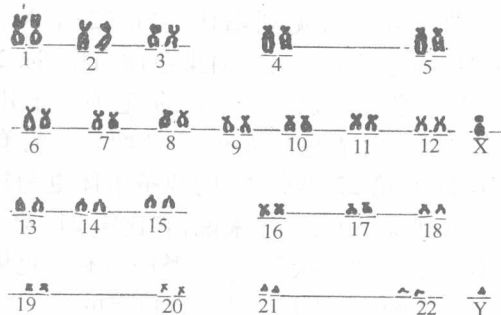


图 1-4 正常人非显带染色体核型(男性)



图 1-5 中期染色体分裂相(女性)

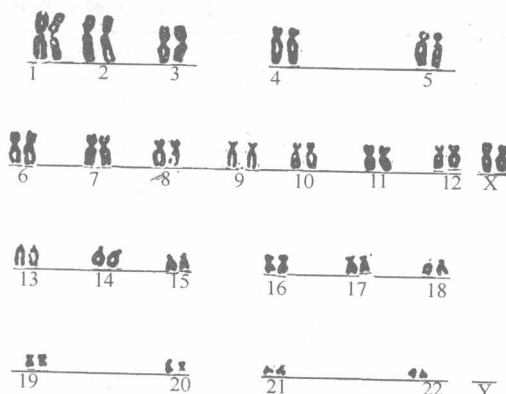


图 1-6 正常人非显带染色体核型(女性)

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