

高等学校试用教材

# 遗传学实验

河北师大 新乡师院 合编  
北京师院 山东师院

人民教育出版社

高等学校试用教材

**遗传学实验**

河北师大 新乡师院 合编  
北京师院 山东师院

\*

人民教育出版社出版

新华书店北京发行所发行

北京印刷一厂印装

\*

开本850×1168 1/32 印张4 字数90,000

1982年6月第1版 1982年8月第1次印刷

印数 00,001—11,500

书号 13012·0744 定价 0.38 元

## 前 言

这本“遗传学实验”是根据1980年8月高等师范院校遗传学教学大纲、配合“遗传学”教材而编写的。目的是通过实验课巩固和加深对遗传学知识的理解，并初步掌握遗传学研究所必需的基本实验技术。编写过程中，结合当前的教学实际，参考教学大纲进行了适当的增补与归纳，内容包括：遗传的物质基础、遗传学基本规律的验证、诱变和遗传学的应用等四个部分，一共安排了十九个实验。

针对高等师范院校的培养目标，一方面着重于遗传学基本规律的验证，另一方面则注意到基本实验技术的训练，以及近年来发展起来的有关新技术的介绍。同时在文字上较详细地描述了实验方法和步骤、材料与试剂的制备，并涉及了有关原理的讨论。

本教材供高等师范院校及师范专科学校试用，同时也可供其他有关专业的师生、以及中等专业学校和中学教学的参考。由于教学时数所限，各校可根据具体情况选做12—15个实验，有些课题还可分组选做或进行示范实验。

本教材中，实验一至八和十一由河北师大编写，实验九至十六由新乡师院编写，实验十七至十九由北京师院编写。初稿在1980年1月审稿会上进行了讨论，提出了许多宝贵意见。据此，由河北师范大学进行了全面修订，并提供全部插图、由于我们的经验较少，水平不高，可能存在一些缺点和错误，希望广大师生和同志们给予批评指正，以便做进一步的修改。

编 者

1981.12.

# 目 录

实验一、有丝分裂及染色体组型分析 .....	1
A. 蚕豆根尖的有丝分裂及染色体组型分析 .....	1
B. 人体外周血培养染色体标本的制备和分析 .....	9
实验二、减数分裂 .....	15
实验三、果蝇唾腺染色体的观察 .....	18
实验四、人体X-染色质的观察 .....	21
实验五、孚尔根(Feulgen)核反应染色法 .....	24
实验六、枯草杆菌的异源转化 .....	28
实验七、细菌转导 .....	37
实验八、大肠杆菌的杂交 .....	42
实验九、普通果蝇的形态和生活史 .....	45
实验十、果蝇的杂交 .....	52
实验十一、红色面包霉的分离和交换 .....	59
实验十二、玉米有性杂交和杂种的性状分析 .....	64
实验十三、辐射对植物的作用——苗期及染色体观察 .....	70
实验十四、植物多倍体的诱发实验 .....	73
实验十五、大肠杆菌营养缺陷型的分析 .....	77
实验十六、花药培养诱导单倍体植株——烟草 .....	87
实验十七、农作物的有性杂交 .....	95
实验十八、作物雄性不育的鉴别 .....	109
实验十九、农作物考种及数量统计分析方法 .....	113

## 实验一 有丝分裂及染色体组型分析

### A. 蚕豆根尖的有丝分裂及染色体组型分析

#### 一、实验目的

学习对植物组织、细胞的固定、离析和压片方法，借以观察有丝分裂过程和染色体的动态变化，并据此进行染色体的组型分析。

#### 二、实验原理

各种生长旺盛的植物组织中，包括：孢原组织、根尖茎尖等分生组织、愈伤组织以及分化的小孢子、萌发的花粉管，常进行着细胞分裂。经过适当的取材处理，加以固定、离析、染色、涂抹压片方法，可以迅速的将细胞分散附着在载片与盖片之间，进行有丝分裂和染色体动态的观察，这是遗传学上通过细胞分裂观察研究染色体形态、结构和计数，从而进行组型分析、鉴别杂种等常用的基本方法。

#### 三、实验用具和试剂

显微镜、测微尺、量角规(分规)、毫米尺、小计算器、解剖器及虹膜刀、载片、盖片、平底指管(带塞)、培养皿、搪磁盘、染色皿和染色缸、三角烧瓶(附回流装置)、量筒、恒温水浴、温度计(水银 $100^{\circ}\text{C}$ )、酒精灯及支架、石棉网、皮头吸管、小滴瓶(30 ml 棕色)、烧杯(200—500 ml)、纱布、吸水纸、绘图纸、铅笔。

固定液：卡诺氏、纳瓦新氏、FAA。染液：0.5% 醋酸洋红(或醋酸地衣红)、0.5% 苏木精水溶液、2%和4%铁矾水溶液。

水解分离液：1 N HCl、0.5% 的果胶酶和纤维素酶混合液、45% 冰醋酸、95% 及无水酒精、0.05%—0.2%秋水仙素水溶液、0.002 M 8-羟基喹啉水溶液、对二氯代苯饱和水溶液、叔丁醇、蒸

馏水、石蜡与蜂蜡、加拿大胶或尤派胶(Euparal)。

#### 四、实验方法和步骤

1. 材料准备:选取蚕豆(或小麦、水稻等)种子放在烧杯中,加少量热水搅动 1—2 分钟,倒进冷水使达 40—50°C 上下,放置过夜,使种子充分吸胀后将水倒出,用蒸馏水清洗,捞出包在干净的双层湿纱布内,置于 25°C 条件下,待种子开始萌动时取出,使胚根外露处向下插立到盛有水洗过的湿锯末的搪磁盘中,锯末可堆放约 3—5 cm 厚(小麦种子等可放在铺有湿吸水纸的培养皿内),保持温湿条件继续培养,当胚根长到约 1.5—3 cm 左右时,用水洗净备用。

2. 预处理:为了有利于对有丝分裂中染色体的观察和计数,在固定之前应用理化因素(温度或药物)进行预处理,这样可以改变细胞质的粘度,抑制或破坏纺锤丝的形成,促使染色体缩短和分散等。一般原则是在分裂高峰前处理 1.5 小时以上。常用的处理方法如下:

① 秋水仙碱水溶液:常用浓度为 0.05—0.2%,室温下处理 2—4 小时。对抑制纺锤体活动的效果明显,易于获得较多的中期分裂相,并且染色体收缩较直,有利于对染色体结构的研究。

② 对二氯苯饱和水溶液:室温下处理 3—5 小时,对阻止纺锤体活动和缩短染色体效果也较好,对染色体小而多的植物中,计数染色体制片效果最好。

③ 8-羟基喹啉水溶液:有效浓度在 0.002—0.004 M 之间,一般认为它将引起细胞粘滞度的改变,进而导致纺锤体活动的受阻。通常处理 3—4 小时,可使中期染色体在赤道面上保持其相应的排列位置,另一优点是处理后的缢痕区较为清晰。一般认为,对中等或长染色体的植物比较适用。

④ 低温处理:将材料如小麦,浸入蒸馏水内,放置到 1—4°C 冰箱中,(玉米及水稻在 6—8°C) 20—24 小时,对某些禾本科作物

效果良好。

植物细胞有丝分裂的周期,常因植物种类和培养条件而不同,因此在预处理和随后固定的时间上,最好掌握在细胞分裂高峰稍前,且大多数细胞在分裂中期时为宜。据前人经验总结如下表:

植物名称	染色体数(2n)	处理因素	处理时间	温度	效果*
小麦	42	0.2%秋水仙素水溶液	9:00—11:00	25°C	+++
小麦	42	对二氯苯饱和水溶液	10:00—14:00	室温	+++
小麦	42	1—4°C冰箱	20—24小时	1—4°C冰箱	+++
小黑麦	56	对二氯苯饱和水溶液	10:00—14:00	室温	+++
豌豆	14	对二氯苯饱和水溶液	10:00—11:30	室温	+++
烟草	48	对二氯苯饱和水溶液	8:30—11:30	室温	+++
蚕豆	12	0.05—0.1%秋水仙素水溶液	20:00—23:00	室温	+++
蚕豆	12	0.05—0.1%秋水仙素水溶液	14:30—17:30	8°C	+++
洋葱	16	0.05—0.1%秋水仙素水溶液	7:30—11:30	15°C	+++
茄子	24	0.002M 8-羟基喹啉	9:00—13:00	15°C	+++
大麦	14	0.05—0.1%秋水仙素水溶液	8:00—11:00	25°C	++

\* +++ 优 ++ 良

3. 固定:借助于物理方法或化学药剂的作用,迅速透入组织和细胞将之杀死,并且使其结构和内含物如:蛋白质、脂肪、糖类以及核物质与细胞器等,在形态结构上尽可能保持生活时的完整和真实状态,同时更易于染色,可以较清楚的显现细胞在生活时不易看清的结构。

固定时,在指管内放入卡诺氏液等固定液约 5 ml,用刀片或小剪刀切取经过预处理的长约 0.5—1 cm 的根尖 10—20 条(或茎尖、幼叶及其他),直接放入指管内,用塞盖紧,在室温下固定

2—24 小时，固定液用量应为材料体积的 15 倍以上。经过固定的材料如不及时使用，可以经过 90% 酒精换到 70% 酒精中各半小时，再换入一次 70% 酒精，在 0—4°C 冰箱内可以保存半年。经过较长时期保存的材料，进行观察前可以换用固定液再处理一次，效果较好。

4. 水解分离：水解分离的作用是去除未固定下来的蛋白质，同时使胞间层的果胶类物质解体，细胞分散而便于观察。水解分离所需时间的长短，依材料和解离液的成分而不同，时间短则细胞不易压散，时间过长细胞则容易被压碎并影响染色。方法是先取处理好的材料，放在小指管内加水解分离液，如盐酸—酒精液，在室温下处理 8—20 分钟，或用 1 N HCl 在 60°C 恒温下处理 6—20 分钟。此外，还可用 0.5% 的果胶酶和 0.5% 纤维素酶的等量混合液，在 25°C 下处理 2—3 小时，在 37°C 恒温箱内只需 0.5—1 小时左右。较难压的材料可以先在 1 N HCl 中水解几分钟，经水洗后再移入 1% 果胶酶与纤维素酶混合液中处理。

经过水解的材料，可放在醋酸酒精固定液中进行软化约 5 分钟，软化即对细胞壁起腐蚀作用。然后吸去固定液，用蒸馏水反复冲洗 4—5 次，目的是洗去材料中的酸以利于染色。适度的水解分离使材料呈白色微透明，状似豆腐，以解剖针能轻轻压碎为好。

#### 5. 染色、压片：

① 醋酸洋红染色法：将上述经过解离、软化和水洗的材料，切取其根尖分生组织放在染色皿中，加几滴 0.5% 醋酸洋红液染色 0.5—1 小时。然后用解剖针将根尖移到载玻片上，纵横切作 2—4 段，分置到几张载片上，加一滴 45% 醋酸后盖片，复以吸水纸，用解剖针柄或铅笔的橡皮头轻敲几下，再用拇指适当用力下压，注意不可使盖片移动，压好的片子中细胞刚好分散成一薄层，随即进行镜检。或者将处理好的材料，切取根尖分生组织一段（约 1 mm），同样分割成 2—4 块，移到不同载片上，各加 1—2 滴醋酸洋红，静置



5—10 分钟，然后在酒精灯上缓慢往复 3—4 次，轻微加热可促进着色，但不可使沸，以载片上出现水汽又刚好消失为度，随即用解剖针将材料拨碎，加盖片，复以吸水纸，压片镜检。

也可以用醋酸地衣红代替洋红，细胞质着色很少，效果亦好。

② 铁矾-苏木精染色法：将上述处理过的根尖放入新配制的 4% 铁矾水溶液中媒染 20—30 分钟，流水冲洗 10—20 分钟，洗净附着的铁矾后转入 0.5% 苏木精液中染色 30—120 分钟，使染色稍深，染后经自来水洗几次，水中可加几滴氨水，以使着色蓝化。这时材料变得较硬且脆，因此需放在 45% 醋酸中进行软化及分色，据材料的大小、染色深浅和软硬程度一般需 1—4 小时，应随时镜检。取染色适度的根尖置于载片上，如前切取分生组织且移到几张载片上，各加 1 滴 45% 的醋酸，用解剖针切压使碎，加盖片，复以吸水纸，同上法压片镜检。

6. 镜检：压好的片子先作低倍镜检 ( $15\times 10$ )，观察不同时期的细胞分裂相。选取不同分裂时期的典型细胞，换高倍镜观察，注意核及染色体、纺锤体等的动态变化。

7. 永久制片法：较好的临时压片材料做成永久玻片标本，一般以叔丁醇法最为简单可靠。步骤如下：① 选取临时压片反转，使盖片向下放入盛有 45% 醋酸 + 95% 酒精 (1:1) 的培养皿中。一端垫上一玻棒，使玻片稍为倾斜，约过 5—10 分钟，可见盖片与载片分离。用小镊子轻轻取出载片和盖片，用吸水纸吸去多余的醋酸酒精液。② 有材料的一面向上，放入盛有 95% 酒精 + 叔丁醇 [1:1] 的培养皿中 3 分钟。③ 换入纯叔丁醇中 3 分钟，最后用油派胶或加拿大胶 (溶于叔丁醇) 封片。

用苏木精染色的标本，直接从②开始，不能放入①中，以免褪色。为避免材料收缩，也可在①②之间经过 95% 酒精 + 叔丁醇 (2:1) 和②③之间加入 95% 酒精 + 叔丁醇 (1:2) 两步，不过步骤加多也增加了材料脱落的机会，因此，动作要细心轻巧。

8. 染色体组型分析：一个二倍体植物的配子的全套染色体，称为一个染色体组(genome)。各种动植物的体细胞，都有其特定的染色体组型。染色体组型或称为核型(karyotype)，是指染色体组在有丝分裂中期的表型，包括这一组染色体的数目(即基数)、大小、形态、着丝点的位置以及付缢痕、随体的有无等。染色体组型分析，就是对染色体组中的染色体作上述各种形态特征的描述。所用材料可以是根尖体细胞，包括单倍体根尖细胞，有丝分裂的花粉和减数分裂粗线期的小孢子母细胞。现以有丝分裂中期的细胞为例，简述染色体组型分析的方法和步骤如下：

① 选材：选取 10 个中期染色体分散良好的细胞，进行显微摄影(或用描绘器画图)。取清晰的底片放大出照片，或在放大机下精确描绘染色体的放大图像到绘图纸上。

② 测量与计算：在显微镜下和放大照片上，对染色体依次进行测量和描述。以微米记下绝对长度，同时计算出每条染色体的相对长度，目前普遍用每条染色体的长度各占全组染色体总长度的百分比为代表。进一步记录每条染色体的臂比，即长臂长度/短臂长度。

对已拍照的细胞，在镜下用测微尺量取染色体的实际长度时，在每个细胞中只需选取一条平直的染色体加以测量，依此与放大图片换算，即可求得每条染色体的实际长度。

③ 配对：根据目测和比较染色体的相对长度、臂比、付缢痕的有无和位置，随体的有无、形状和大小，进行同源染色体的剪贴配对。如用显带技术，要标明每条染色体的带型，可供参考。

④ 排列：染色体的排列通常是从大到小、按长度顺序编号。等长的染色体，以短臂长的在前，有特殊标记的、如具随体染色体多数排列在最后，性染色体也应单独列出。

⑤ 分类：以臂比数值确定着丝点位置，并据此分类如下：

正中部着丝点染色体(M)      臂比(长/短)1.0

中部着丝点染色体(m)	1.0—1.7
近中着丝点染色体(sm)	1.7—3.0
近端着丝点染色体(st)	3.0—7.0
端部着丝点染色体(t)	7.0以上

具随体染色体 (sat) 可以用 \* 标出, 随体的长度可以计入 或 否, 但需说明。

将所得的各项数据, 填入下列表中:

编 号	绝对长度( $\mu$ )	相对长度	短臂	长臂	臂比	随体	类型

染色体的总长度:

⑥ 翻拍与绘图: 将配对排列好的染色体组型, 贴在白卡纸上 进行翻拍, 并绘制出组型的模式图。

### 五、试剂的制备及其他

固定液: 1. 卡诺(Carnoy's)固定液的两组配方:

- ① 95% 酒精 15 ml + 冰醋酸 5 ml (3:1 液)。
- ② 纯酒精 30 ml + 氯仿 15 ml + 冰醋酸 5 ml (6:3:1 液)

2. 纳瓦申(Navashin's)固定液:

- ① 甲液: 铬酸 1.5g + 冰醋酸 10 ml + 蒸馏水 90 ml。

乙液: 福尔马林 40 ml + 蒸馏水 60 ml。

或②甲液: 1% 铬酸水溶液 30 ml, 10% 醋酸 20 ml。

乙液: 福尔马林 10 ml, 蒸馏水 40 ml。

临用前, 取等量甲、乙液混合, 在植物方面、尤其对一般细胞学

及组织学上是一种优良的固定液。

3. F. A. A 固定保存液 (福尔马林-醋酸-酒精液):

50% 酒精 89 ml + 福尔马林 5 ml + 冰醋酸 6 ml

用于一般植物组织及胚胎学材料。同时也是优良的保存剂。用以保存材料时,可加入 5% 甘油以防止蒸发及材料变硬。

水解分离液:95% 酒精 + 浓盐酸等量(1:1)

醋酸洋红染色固定液:取 90 ml 冰醋酸加入 110 ml 蒸馏水中,配成 200 ml 45% 冰醋酸液,加热至沸,溶入洋红(Carmine)粉末 1 g,轻微搅动,加回流继续煮沸 1/2 至 1 小时,放冷过滤后保存在有玻塞的棕色试剂瓶中,存放在避光冷凉处,用前分装到小滴瓶中。

醋酸地衣红的配法同上,将洋红改用地衣红(orcein)即可。

苏木精染液:取 0.5 g 苏木精粉末放在棕色瓶中,加入 1—5 ml 95% 酒精以加速溶解,然后加蒸馏水到 100 ml。取 2—4 层纱布包扎瓶口,通气防尘,放在窗前。经 4—5 周后当溶液变成深棕红色时,则完全成熟,过滤后即可使用。用软木塞或玻塞封好瓶口,在冰箱内可存半年。

苏木精染液也可用纯酒精配成 10% 的基液,经 1 个月左右的“成熟”就可应用。基液满装在棕色磨口瓶中,在低温下能较长期地保存,用时,取 5 ml 基液放入 95 ml 蒸馏水中,稀释成 0.5% 即可。

此染剂必须成熟,方可使用;成熟即氧化成氧化苏木色素的过程。为了加速成熟,可用以下方法处理:

1. 在新配制的苏木色素溶液中,加入数毫升  $H_2O_2$ ,不可过多,一起沉淀时即失去效用。

2. 在配成的 0.5% 染液中每 100 ml 加入 0.1 g 碘酸钠,溶后即可使用。

3. 将蒸馏水煮沸,加入适量苏木精,待稍冷却后约需半小

下,即可应用。

**铁矾媒染剂:**用蒸馏水配制4%的铁明矾液,过滤后备用。注意须用淡紫色的硫酸铁铵结晶,去掉表面的白绿色粉末。配好的溶液最好保存在18°C以下的阴凉处,否则由于氧化铁的形成会在瓶壁上生出黄色薄膜,使用前必须过滤,最好使用前临时配制。

## B. 人体外周血培养染色体标本的制备和分析

### 一、实验目的

学习人体外周血淋巴细胞的悬浮培养法,人体染色体标本的制备和组型分析的方法,是研究人体细胞遗传学的基本技术,在临床医学和遗传学等方面已得到广泛的应用。

### 二、实验原理

人体的1毫升外周血内,一般含有约 $1 \times 10^6$ — $3 \times 10^6$ 个小淋巴细胞,通常它们都处于间期的 $G_0$ 和 $G_1$ 期,在培养条件下给予药物刺激时,经过53—72小时就可在培养物中获得大量的有丝分裂细胞,供作染色体标本制备和分析之用。这种外周血培养方法,是在1960年由Moorhead等所建立的。近年来已发展了微量全血培养技术,不但取血量少,而且省去分离血浆、计数等操作,取材方便,适合在一般实验室条件下进行工作。

### 三、实验用具

显微镜(1500×,附照像装置)、分析天平、恒温培养箱(电热隔水式)、干燥箱(50—300°C)、普通冰箱、恒温水浴、高压灭菌器、洁净工作台、离心机(水平式、4000转/分)。

注射器(2和5 ml)、刻度离心管(5和10 ml)、吸管(1.5、10 ml)、滴管(自制)、三角烧瓶(50—2000 ml)、容量瓶(1000 ml)、量筒(10—1000 ml)、盐水瓶(250—500 ml)、玻璃砂芯过滤器( $G_5$ 和 $G_6$ 型)、培养瓶(25 ml小方瓶或青、链霉素小瓶)、研钵、立式染色缸、酒精灯、下口瓶、各种试剂瓶及滴瓶、载玻片、烧杯(500 ml)、铝

制饭盒、搪磁盘、大小镊子、针头(6—7号)、切片标本盒、纱布、吸水纸、蜡铅笔等。

以上玻璃器皿,须经洗液按常规清洗,直接接触培养材料的器皿,再经双蒸水浸泡1日,包好,高压蒸汽灭菌(15磅、120°C 20分钟),然后烘干备用。金属器具可用酒精洗净,干热灭菌,或煮沸消毒。

#### 四、培养液及各种试剂的制备

培养液:主要成分为多种氨基酸、维生素、碳水化合物和无机盐类的综合培养液,目前应用的成品有:Eagle、RPMI 1640、M 199和国产的771及772等。

有丝分裂刺激剂:植物血凝素(phytohemagglutinin简称PHA),是取自菜豆(*Phaseolus vulgaris*)种子的制剂。可用专供培养的PHA成品粉剂,每安瓿含10mg,溶解于5ml生理盐水中备用。

细胞繁殖促进剂:一般采用小牛血清,存放4°C冰箱中,用前在56°C水浴中30分钟灭活,经培养证明无菌,即可使用。

纺锤体抑制剂:常用秋水仙素水溶液,可抑制与破坏纺锤体的形成,使多数细胞停留在分裂中期,其作用与使用浓度和处理时间有关,一般以每毫升培养液中含0.2—0.5微克、处理4—6小时为宜。

配法是称取秋水仙素10毫克,溶于100毫升生理盐水中成0.01%原液,再稀释10倍成每毫升含10微克,经高压灭菌分装小瓶内备用。

抗菌素:常用试剂和剂量是每毫升培养液中含青霉素100单位,含链霉素100微克。

配制方法是取青霉素G钾(钠)盐40万单位,加无菌水40毫升溶解,得到每毫升含1万单位的青霉素,在-20°C冰箱保存。用时取1毫升加入99毫升培养液中即可。另取双氢链霉素1克

溶于 100 毫升无菌水中,使每毫升含量为 0.01 克(即 10000 微克),用时稀释一百倍即可。

**抗凝素:**通常用肝素,每 100 单位肝素一般可抗凝 5 毫升血液。静脉注射用肝素每 1 支安瓿中含 12500 国际单位,用无菌生理盐水稀释 25 倍,即得到每毫升含 500 单位的肝素液,经高压灭菌后,分装小瓶(每瓶不超过 1 毫升),在 4°C 冰箱中保存。

**低渗溶液:**目前多用 0.075 M 的氯化钾为低渗液,它可使细胞胀大,染色体铺展开来,并且轮廓清晰,染色性增强。用于 G 带技术时更能显示其作用。

称取氯化钾 11.18 克,溶于 100 毫升重蒸水中即成 1.5 M 原液,用前再稀释 20 倍便得到 0.075 M 的氯化钾低渗溶液。

**固定液:**常用甲醇-冰醋酸(3:1)混合液,可用前临时配制。

**其他溶液:**

**0.85%生理盐水:**取 8.5 克 NaCl 溶于重蒸水中使成 1000 毫升。

**5%碳酸氢钠液:**称取  $\text{NaHCO}_3$  5 克溶于重蒸水中使成 100 毫升。

**磷酸缓冲液:**

**甲液:** M/15 磷酸二氢钾,取  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  9.078 克溶于 1000 毫升重蒸水中。

**乙液:** M/15 磷酸氢二钠,取  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  11.876 克,(或  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  23.87 克)溶于 1000 毫升重蒸水中。

取甲液 18.2 毫升和乙液 81.8 毫升混合,即得 pH 7.4 的磷酸缓冲液。

以上三种溶液均需经高压灭菌后分装小瓶,保存在 4°C 冰箱内备用。

**吉姆沙(Giemsa)染液:**

取 Giemsa 粉剂 1 克置研钵中,加少量甘油研磨至无颗粒止,

再加入甘油共达 50 毫升，放在  $56^{\circ}$ — $60^{\circ}\text{C}$  的温箱或水浴内 2 小时，促使溶化。冷却后加入甲醇 50 毫升，室温下放置 2—3 周后，过滤使用。

用时将 Giemsa 原液 1 份加 pH 7.4 的磷酸缓冲液 9 份稀释，或在 10 毫升磷酸缓冲液 (pH 7.4) 中加入 10—15 滴 Giemsa 原液，应随用随配。

## 五、外周血染色体标本的制备和分析方法

### 1. 培养液的组成和分装(可选用下列培养液)：

RPMI 1640 80%，小牛血清 20%，青霉素 100 单位/毫升，链霉素 100 微克/毫升，用 5% 碳酸氢钠(或 0.1 N HCl)调节 pH 至 7.2—7.4，在无菌条件下，每个培养瓶内分装入 5 毫升(1640 4ml，小牛血清 1 ml)，冰冻保存。临用前，在  $37^{\circ}\text{C}$  水浴内融化；采血培养前加入 PHA 液 0.25 毫升(1 mg/ml)。

2. 采血：将 5 毫升注射器先吸取肝素溶液湿润，消毒皮肤，采取静脉血 1.0—1.5 毫升，在注射器内与肝素混匀。

3. 培养：在无菌室或洁净工作台上，将采取的抗凝血分别接种到 3 个培养瓶内，每瓶接种约 0.3 毫升(15—18 滴)全血，轻轻摇匀，放在  $37^{\circ}\text{C}$  温箱内静置培养。

4. 秋水仙素处理：研究放射对染色体作用时，应在培养 48—52 小时之间加入秋水仙素，以避免部分畸变的丢失；用于疾病诊断的染色体，可在培养开始后 66—70 小时之间加入 0.1 毫升制备好的秋水仙素，摇匀后继续培养 4—6 小时。

5. 收集细胞：将培养物混匀吸至离心管内，以 1000 转/分离心 8—10 分钟，吸去上清液，留下沉淀物(约 1 毫升)。

[从这一步起不需无菌操作]

6. 低渗处理：取 5 毫升预温  $37^{\circ}\text{C}$  的 0.075 M 氯化钾溶液加入离心管内，用滴管吹吸混匀成悬浮液，放入  $37^{\circ}\text{C}$  温箱中静置 10—15 分钟，使红细胞解体，白细胞膨胀，染色体分散。然后再以



1000 转/分离心 8—10 分钟,此时可见管内分为三层,吸去上层的培养液和中层的红细胞碎片,保留下层的白细胞。

7. 固定:沿管壁徐徐加入新配制的甲醇-冰醋酸(3:1)固定液 5 毫升,用滴管将沉淀物混匀,固定 20 分钟,此时因血红蛋白的释出,固定液呈浅褐色。又以 1000 转/分离心 8—10 分钟,弃去上清液。

8. 再固定:加入 5 毫升固定液,室温下再固定 30 分钟后如上处理,离心、去上清液。

9. 制备细胞悬液:根据以上得到沉淀细胞的数量,加入 0.5—1 毫升的固定液,用滴管制成细胞悬浮液。

10. 制片:取出冰水浸过的洁净载片,每片上滴加 1—2 滴悬液,轻轻吹散,并在酒精灯上过几次,促使染色体展开,随即将玻片放在标本盒内,在空气中晾干。

11. 染色:晾干的片子经 Giemsa 液染色 20—30 分钟,蒸馏水轻洗去外面浮色,仍在空气中晾干。

12. 镜检:取染色后的玻片标本,在低倍镜下( $15\times 10$ )全面观察,对有良好分裂相的细胞,换用高倍镜和油镜仔细观察研究。

13. 摄影:选取染色伸展良好,形态清晰有代表性的细胞分裂相,进行高倍的显微摄影,并放大出约 4 英寸的照片。

14. 组型分析:观察测量照片上的每条染色体,进行配对、排列,剪贴成组型分析图,进一步判断染色体结构有无异常,做出书面小结。

附图:人体染色体组型制备的程序