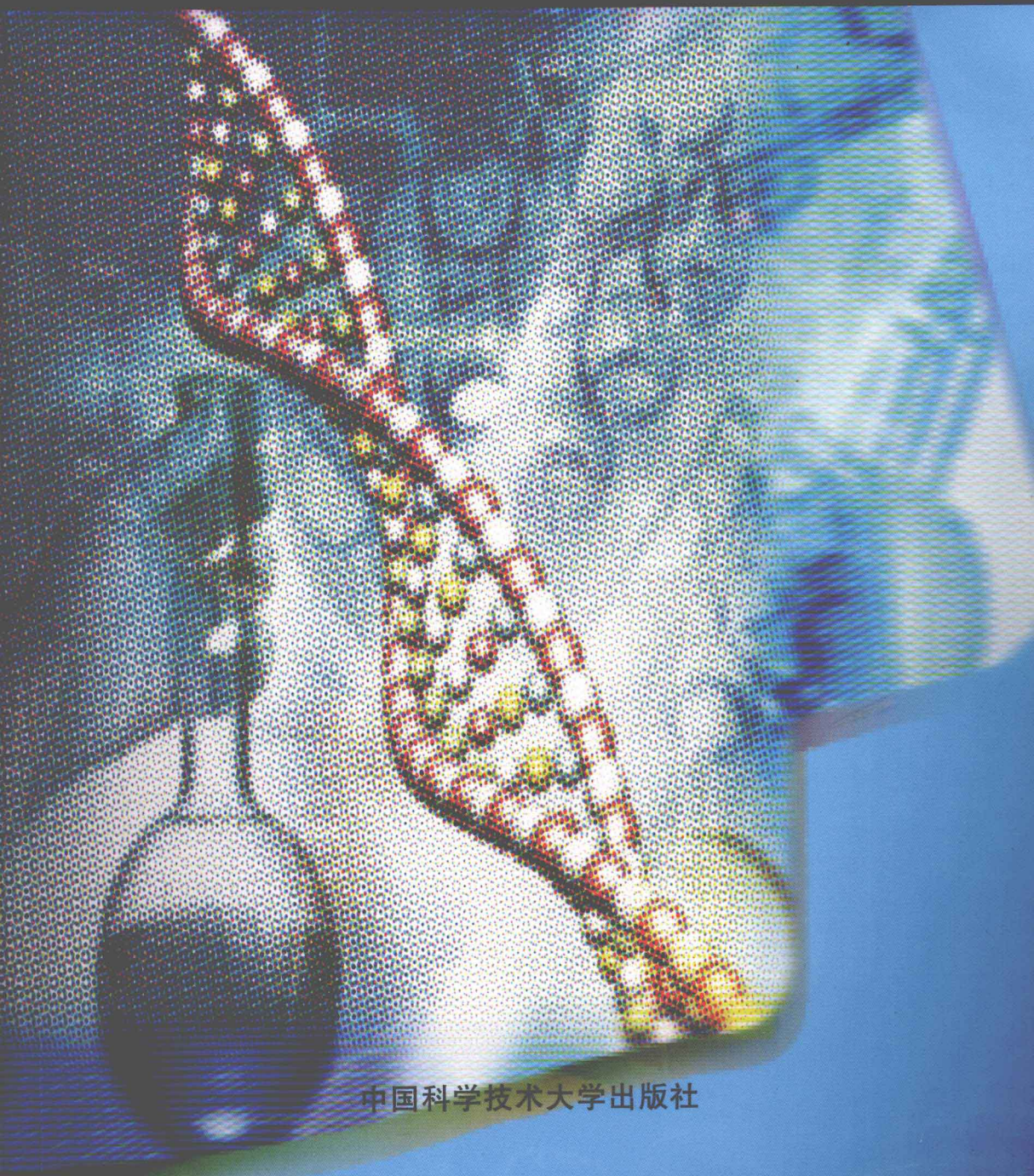


医学遗传学实验 与学习指导

主编
杜少陵
徐思斌



中国科学技术大学出版社

医学遗传学实验 与学习指导

YIXUE YICHUANXUE SHIYAN
YU XUEXI ZHIDAO

主编

杜少陵 徐思斌

编委（以姓氏笔画为序）

朱晓蕾 杨建课

汪 萍 林爱琴

赵跃华 宫 磊

黄顺国

中国科学技术大学出版社

内 容 简 介

医学遗传学是医学和遗传学相结合的一门边缘学科,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。

本书是《医学遗传学》的配套辅导教材。编写本书的目的是帮助学生梳理、归纳和总结所学的知识,以求提高教学效果,便于学生自学,并为学习医学专业的后续课程打下牢固的基础。

图书在版编目(CIP)数据

医学遗传学实验与学习指导/杜少陵,徐思斌主编. —合肥:中国科学技术大学出版社,2012.1

ISBN 978-7-312-02984-4

I. 医… II. ①杜… ②徐… III. 医学遗传学—实验—医学院校—教学参考资料 IV. R394-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2012)第 006902 号

出版 中国科学技术大学出版社

安徽省合肥市金寨路 96 号,邮编:230026

网址: <http://press.ustc.edu.cn>

印刷 合肥银联文化投资有限公司

发行 中国科学技术大学出版社

经销 全国新华书店

开本 710 mm×960 mm 1/16

印张 11.25

字数 220 千

版次 2012 年 1 月第 1 版

印次 2012 年 1 月第 1 次印刷

定价 20.00 元

前 言

医学遗传学是医学和遗传学相结合的一门边缘学科,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。医学遗传学又是一门依赖于实验技术的基础与临床密切结合的桥梁学科,因此,实验课也应该是医学遗传学教学的重要组成部分。

为适应医学遗传学的发展及教学的需要,配合普通高等教育“十一五”国家级规划教材《医学遗传学》(第5版)的教学及学习,我们根据多年的教学经验及我校的实际教学情况编写了这本《医学遗传学实验与学习指导》。本书分三个部分:实验部分,遗传咨询案例分析部分,学习指导及复习思考题部分。实验部分是向学生提供一个学习这一领域中有关实验技术的机会,也可以训练他们的观察、记录、分析、判断、推理等能力。遗传咨询案例分析是我们结合案例进行主体易位教学的一种尝试,我们力图通过这种教学方式,来训练学生对遗传病处理的临床能力、清晰而富有逻辑地将结果表达出来的能力,提高其综合分析和解决问题的能力。本书是《医学遗传学》的配套辅导教材,根据其各章节内容,结合我们的教学实际,就有了本书的第三部分——学习指导及复习思考题部分,其目的是帮助学生梳理、归纳和总结所学的知识,以求提高教学效果,便于学生自学,并为学习医学专业的后续课程打下牢固的基础。

参与本书编写的人员都是长期在第一线从事教学的教师。随着医学遗传学的飞速发展,有些问题过去认为正确,现在可能被证明是不完善的,因此在使用本学习指导时不要完全拘泥于参考答案。

由于编者水平有限,书中难免存在不妥之处,敬请读者批评指正。

作 者

2011年12月

目 录

前言	(I)
----	-------

第一部分 医学遗传学实验指导

实验一 动物骨髓细胞染色体的制备和观察	(3)
实验二 微核标本的制作和观察	(6)
实验三 人类外周血淋巴细胞的培养及染色体标本制备技术	(9)
实验四 人类 G 显带染色体标本制备和核型分析	(12)
实验五 姐妹染色单体交换标本的制备和观察	(18)
实验六 人基因组 DNA 的提取	(21)
实验七 聚合酶链反应和琼脂糖凝胶电泳检测技术	(23)
实验八 PCR-SSCP 与聚丙烯酰胺凝胶电泳	(27)
实验九 遗传病及遗传病家系的分析	(30)
实验十 医学遗传学设计性实验	(33)

第二部分 遗传咨询案例

第一章 基因病的遗传咨询	(41)
第二章 染色体病的遗传咨询	(48)
第三章 遗传伦理讨论	(53)

第三部分 医学遗传学学习指导及复习思考题

第一章 绪论	(57)
第二章 单基因疾病的遗传	(63)
第三章 多基因疾病的遗传	(76)
第四章 群体遗传	(86)

第五章 线粒体疾病的遗传和线粒体病	(95)
第六章 人类染色体	(102)
第七章 染色体畸变	(110)
第八章 单基因遗传病	(121)
第九章 多基因遗传病	(130)
第十章 染色体病	(133)
第十一章 肿瘤	(141)
第十二章 遗传病的诊断	(149)
第十三章 遗传病的治疗	(155)
第十四章 遗传咨询	(161)
附录 染色体分析报告单	(168)
参考文献	(169)

第 一 部 分

医学遗传学实验指导

实验一 动物骨髓细胞染色体的制备和观察

一、实验目的

1. 掌握动物骨髓细胞染色体直接制备的方法。
2. 了解几种实验动物的染色体数目和形态特征。

二、实验原理

细胞分裂中期染色体表现出典型形态,而中期染色体的获得,必须要采取特殊的技术方法,从发生有丝分裂的组织和细胞悬液中得到。骨髓细胞数量多,分裂旺盛,不需要体外培养和无菌操作,易于取材。用秋水仙素处理,可使一部分骨髓细胞停留在细胞分裂中期;低渗处理则使骨髓细胞胀大,这样得到的染色体标本更分散、更清楚,便于观察和计数。

三、实验用品

1. 器材

显微镜、解剖剪、镊子、培养皿、毛细吸管、刻度离心管、特种铅笔、预冷洁净的载玻片、擦镜纸、天平、离心机、恒温水浴箱、解剖盘、试管架、滴片、木盘、吹风机、小白鼠、家兔、黑斑蛙染色体标本。

2. 试剂

秋水仙素溶液、低渗液、甲醇、冰醋酸、Giemsa 染液、香柏油、二甲苯。

四、实验步骤

1. 秋水仙素处理

实验前 4~6 小时给小鼠腹腔注射秋水仙素(每克体重注射 2~4 μg)。

2. 取股骨

用颈椎脱臼法处死小鼠,剪开小鼠后肢大腿皮肤、肌肉,暴露股骨两端关节,分离股骨,除去肌肉和肌腱,洗净。

3. 收集细胞

在培养皿内将股骨剪碎,暴露骨髓,加 4~5 mL 的低渗液,用吸管反复吸打至

混浊,将制成的细胞悬液移入离心管。

4. 低渗处理

加入低渗液(0.075 mol/L 氯化钾溶液)至 4.5 mL,用吸管打匀,将离心管写上标记,置于 37℃ 恒温水浴箱中低渗 20 分钟。

5. 预固定和离心

加新配制的固定液(甲醇:冰醋酸为 3:1)至 5 mL,用吸管打匀,平衡重量,1500 r/min 离心 8 分钟。

6. 固定和离心

弃上清液,加固定液至 5 mL,用吸管轻轻打匀,室温下固定 15 分钟,离心 8 分钟。重复上述步骤(步骤 1~5)1 次。

7. 细胞悬液制备

弃上清液,加 0.2 mL 固定液,打匀制成细胞悬液。

8. 滴片

将冰水预冷的洁净载玻片斜置于滴片木盘上,从 20~30 cm 高度滴 2~3 滴细胞悬液,用吹风机微热吹干,将玻片标本注上标记。

9. 染色

将玻片标本放在 Giemsa 染液中染色 8 分钟后,用自来水轻轻冲洗,吹干镜检。

五、几种实验动物染色体的观察

将染色体标本放在低倍镜下作全面观察,可以看见许多大小不等被染成紫红色呈圆形的间期细胞核及分散在它们之间的中期分裂相。选取染色体形态良好、分散适中的分裂相,移至视野中央,转换高倍镜观察;再在标本载玻片上滴 1 滴香柏油,转换油镜进行观察。

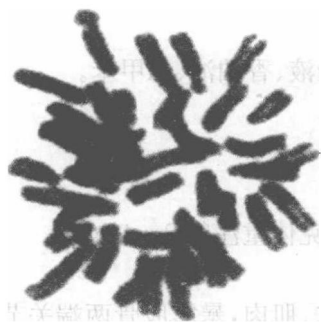


图 1-1 小白鼠染色体

(1) 小白鼠染色体($2n=40$):细胞中全部为近端着丝粒染色体(如图 1-1 所示)。

(2) 大白鼠染色体($2n=42$):细胞中染色体形态分中央、亚中、近端着丝粒染色体三种类型。

(3) 家兔染色体($2n=44$):细胞中染色体形态分中央、亚中、近端着丝粒染色体三种类型。

(4) 黑斑蛙染色体($2n=26$):细胞中染色体形态分中央、亚中、近端着丝粒染色体三种类型(如图 1-2 所示)。

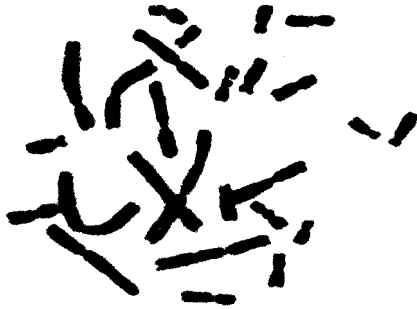


图 1-2 黑斑蛙染色体

六、实验作业

写出本次实验报告,内容包括方法步骤、实验结果及分析讨论。

七、思考题

1. 实验前若未给小鼠注射秋水仙素,所制备的染色体标本会出现什么情况?
2. 在染色体制备中低渗不足或低渗过度会出现什么问题?

八、实验资料

1. 秋水仙素溶液的配制

取秋水仙素 5 mg,加入 5 mL 无菌的等渗氯化钠溶液,即成 1 mg/mL 秋水仙素溶液,置于 4℃ 冰箱中避光保存备用。使用时可用等渗氯化钠溶液稀释。

2. Giemsa 染液的配制

Giemsa 粉 1 g,甘油 66 mL,甲醇 66 mL,先将 Giemsa 粉溶于少量甘油中,用研钵研磨成匀浆,再慢慢加入甘油研磨至 66 mL。放于 60℃ 温箱中 2 小时,冷却后取出并将甲醇加入混匀,经滤纸过滤,即配成原液,放置于棕色瓶中密封保存备用。使用时现配 Giemsa 工作液,即取 Giemsa 原液 1 mL,加入 10 mL pH 6.8 磷酸缓冲液,用吸管打匀后即成。

(林爱琴,赵跃华)

实验二 微核标本的制作和观察

一、实验目的

掌握微核标本的制作技术及其统计方法。

二、实验原理

微核是指存在于细胞主核之外,游离于细胞质中的一种颗粒,大小相当于细胞直径的 $1/20 \sim 1/5$,呈圆形或椭圆形,其染色与细胞核一致,在间期细胞中可出现一个或多个。现已证实微核是由染色单体或染色体的无着丝粒断片,或因纺锤丝受损伤而丢失的整个染色体所形成的产物,在细胞分裂后期,不受纺锤丝的牵引而滞留在赤道板附近,不能随其他染色体移向两极参与两个细胞核的形成,结果在细胞质中独自形成微核。研究证实微核与主核一样都是由 DNA 物质组成。微核率的大小和诱变剂的剂量呈正相关,可根据细胞的微核率来判断某些理化因子对染色体的损伤程度以及对遗传物质致畸效应的大小。小鼠骨髓嗜多染红细胞微核实验是经典标准的筛选环境诱变剂和化学致癌物的测定方法,方法快速、简便,技术易于掌握。

三、实验材料

1. 器材

注射器、烧杯、玻璃珠、载玻片、毛细吸管、染色缸、显微镜。

2. 试剂

明胶、瑞氏染液。

四、实验步骤

1. 动物处理

根据不同的毒物选择不同的染毒途径,以丝裂霉素 C 为例,一般常用腹腔注射,染毒剂量 10 mg/kg ,设阴性对照,用生理盐水代替丝裂霉素 C 注射,染毒时间一般选在取样前 4 天左右,染毒 2~3 次,间隔 24 小时注射一次,第 5 天取样。

2. 骨髓细胞收集

用颈椎脱臼法处死处理好的小鼠,取出股骨用纱布剔除肌肉后放置于培养皿

中,用生理盐水清洗后,将股骨剪碎,用吸管吹打均匀后移入离心管,1 000 r/min 离心 10 分钟,弃去多余的上清液,留下约 0.5 mL 与沉淀物混匀后,滴一滴在清洁的载玻片上,推片。

3. 固定

将晾干的骨髓片放入玻璃染色缸,用甲醇溶液固定 15 分钟,取出晾干。

4. 染色

在固定晾干的骨髓片上滴上新鲜配置的 Giemsa 工作液(Giemsa 原液与 pH 6.8 磷酸缓冲液 1:9 混合),均匀分布,染色 15~20 分钟,流水冲洗,晾干。

五、结果与观察

先在低倍镜下进行观察,选择分布均匀、染色较好的区域,再在油镜下按一定顺序进行微核的观察计数。嗜多染红细胞(Polychromatic,PCE)呈灰蓝色,正常成熟的红细胞为橘黄色。PCE 中的微核嗜色性和折光性与核质一致,呈紫红色或蓝紫色,典型的微核呈圆形,边缘光滑整齐,也可见椭圆形、肾形等不同的形状(如图 1-3 所示)。PCE 中微核的数目多数为 1 个,也可出现 2 个或 2 个以上,此时仍按 1 个有微核的 PCE 计算。计数 200 个细胞中 PCE 与正常红细胞的比值,并计数 1 000 个 PCE 中含微核的 PCE 数。

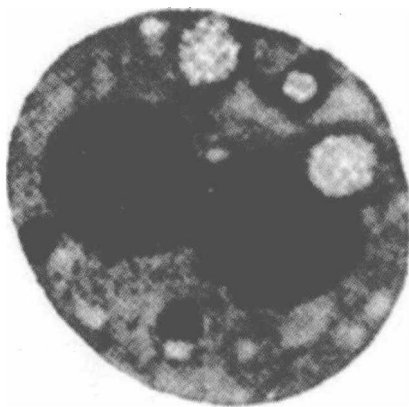


图 1-3 嗜多染红细胞中的微核

六、注意事项

微核可以出现在多种细胞中,但在有核细胞中较难与正常核的分叶及核突出物等相区别。由于红细胞在成熟之前最后一次分离后数小时可将主核排出,而仍保留微核于 PCE 中,因此通常计数 PCE 中的微核。

七、实验作业

写出本次实验报告,含原理、方法、结果和讨论。

八、思考题

1. 本实验为何选取骨髓标本以及为何选择计数 PCE 中的微核?
2. 观察 PCE 中微核时应注意的事项有哪些? 判断 PCE 中微核的标准是什么?
3. 计数正常对照小白鼠和染毒处理的小白鼠 PCE 中微核的出现率,并比较两者微核出现率差异有无显著性意义?

(赵跃华,林爱琴)

实验三 人类外周血淋巴细胞的培养及染色体标本制备技术

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(PHA)的刺激转化成能进入有丝分裂的幼细胞,以纺锤体抑制剂秋水仙素作用于细胞,使其停滞于分裂中期,从而可制备出处于有丝分裂中期的染色体标本。

三、实验用品

1. 器材

超净工作台(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、培养瓶(15~25 mL)或10 mL 青霉素瓶、5 mL 消毒注射器(7号消毒注射针头)、棉签、止血带、10 mL 刻度离心管、毛细管和滴头、试管架、煤气灯、粗天平、50 mL 注射器、长注射针头、烧杯、量筒、载玻片、pH 试纸等。

2. 试剂

肝素(500 IU/mL)、秋水仙素溶液(50 $\mu\text{g/mL}$)、RPMI 1640、小牛血清、青霉素、链霉素、5%碳酸氢钠、植物血凝素(PHA)、0.075 mol/L 氯化钾溶液、甲醇、冰醋酸、Giemsa 原液、双蒸水、生理盐水等。

四、实验方法和步骤

1. 细胞生长培养液的组合与分装

细胞生长培养液 RPMI 1640, 90%; 小牛血清, 10%; 青霉素, 100 IU/mL; 链霉

素, 100 IU/mL。

用 5 mol/L 碳酸氢钠溶液(或 0.1 mol/L 盐酸溶液)调节培养液的 pH 至 7.2~7.4。在每个培养瓶(10 mL 的链霉素瓶)中盛有已校正好酸碱度的培养液 5 mL, 冰冻保存。临用时在 37 °C 温箱融化。在加入静脉血前先加入植物血凝素(PHA)液 0.2~0.4 mL(以上药品配制后, 均需灭菌, 组合时要在超净工作台内或无菌操作室进行)。

2. 培养及细胞学操作

(1) 采血: 用 5 mL 的消毒注射器抽取 0.2~0.3 mL 的 500 IU/mL 肝素; 用含有肝素的消毒注射器抽取静脉血 3 mL(上下混匀); 立即将注射针直接穿过培养瓶的橡胶塞, 向 5 mL 培养液中注入 20 滴全血(7 号针头), 使每瓶全血量为 0.3~0.5 mL; 摇匀培养物后, 静置于 37 °C 恒温培养箱中。

(2) 秋水仙素处理: 在培养 66~70 小时后, 加入浓度为 50 $\mu\text{g/mL}$ 的秋水仙素溶液。用 1 mL 注射器, 4 号注射针头吸取秋水仙素溶液向 5 mL 全血培养液内垂直向下滴 1 滴, 混匀, 继续放入 37 °C 恒温培养箱内培养 3 小时。

(3) 收集细胞: 将培养物混匀吸至锥形刻度离心管内(两瓶培养物放入 1 只刻度离心管内), 1200 r/min 离心 8~10 分钟。

(4) 低渗处理: 吸去上清液, 放入 37 °C 恒温箱预温的 0.075 mol/L 氯化钾溶液 8 mL, 用滴管混匀, 置室温 10~15 分钟。

(5) 预固定: 在低渗后, 即加入 1 mL 固定液(甲醇: 冰醋酸=3:1)混匀, 离心 8~10 分钟。

(6) 固定: 吸去上清液, 加入 8 mL 固定液(甲醇: 冰醋酸=3:1, 需新鲜配制), 混匀后静置 30 分钟以上或过夜。

(7) 再固定: 加入 8 mL 固定液, 用吸管吹打均匀, 静置 30 分钟以上或过夜; 再次离心 8~10 分钟, 去上清液; 视细胞数量多少而加适量固定液制成细胞悬液。

(8) 制片: 在进行染色体制片前预先将清洁载玻片放入盛有蒸馏水的小搪瓷盆中在 4 °C 冰箱内存放数小时(4 小时以上)即为冰片。用吸管吸取混匀的细胞悬液在离冰片约 15 cm 距离处进行滴片, 每片约滴细胞悬液 2~3 滴, 随即吹气, 用火焰烘干。

(9) 染色: 标本用 1:10 的 Giemsa 染液(pH 为 7.4 的磷酸缓冲液配制), 染色 10 分钟; 用自来水冲净, 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, 在镜下进行计数、分组和性别鉴定, 并在镜下准确区分 1, 2, 3, 16, 17, 18 六对染色体。

五、注意事项

1. 秋水仙素溶液浓度和处理时间

一般最终浓度以每毫升培养液 $0.1 \sim 0.2 \mu\text{g}$ 为宜,作用时间为 $3 \sim 5$ 小时。秋水仙素溶液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,则标本中分裂细胞虽多,但其染色体缩得太短,以致形态特征模糊。

2. 培养温度

培养温度应严格控制在 $37^\circ\text{C} \pm 0.5^\circ\text{C}$ 。

3. 低渗

这一步骤极为重要,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。

4. 离心机速度

离心机最好用水平式的,速度不宜过快。速度太快细胞团不易打散,反之分裂相易丢失。固定液应在临用时新鲜配制,固定一定要彻底、均匀,若打散不够,则细胞在玻片上易集结。

5. 细胞悬液

细胞悬液吹打时若用力过猛,细胞易破碎,以致染色体数目不完整。

6. 玻璃器皿

玻璃器皿一定要十分干净、无酸,所用试剂以分析纯为好。

7. 滴片注意事项

滴片前要把冰片甩干,滴片时动作要快。

六、实验作业

写出本次实验报告,包括实验原理、方法步骤、结果和讨论。

七、思考题

1. PHA、秋水仙素在外周血淋巴细胞培养中的作用是什么?
2. 低渗、固定对染色体制备有什么影响?

(朱晓蕾,徐思斌)