


21

世纪

高等院校教材

王修海 刘 雯 主编
张咸宁 王振华

医学遗传学 实验指导

 科学出版社

21 世纪高等医学院校教材

医学遗传学实验指导

王修海 刘 雯 主编
张咸宁 王振华

科学出版社

内 容 简 介

本书是五校合编教材《医学遗传学》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、临床遗传学五个部分实验内容,共计42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。可供各类医学院校学生使用。

图书在版编目(CIP)数据

医学遗传学实验指导/王修海等主编.-北京:科学出版社,2001.7
21世纪高等医学院校教材
ISBN 7-03-009290-2

I. 医… II. 王… III. 医学遗传学 实验 IV. R394-33

中国版本图书馆CIP数据核字(2001)第15024号

科 学 出 版 社 出 版

北京东黄城根北街16号
邮政编码:100717

新 蕾 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:710×1000 1/16
2001年7月第一次印刷 印张:9 插页:1
印数:1-5 000 字数:162 000

定价:15.90元

(如有印装质量问题,我社负责调换〈新欣〉)

《医学遗传学实验指导》编写人员

王修海 青岛大学医学院

刘 雯 复旦大学医学院

张咸宁 宁波大学医学院

王振华 青岛大学医学院

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。

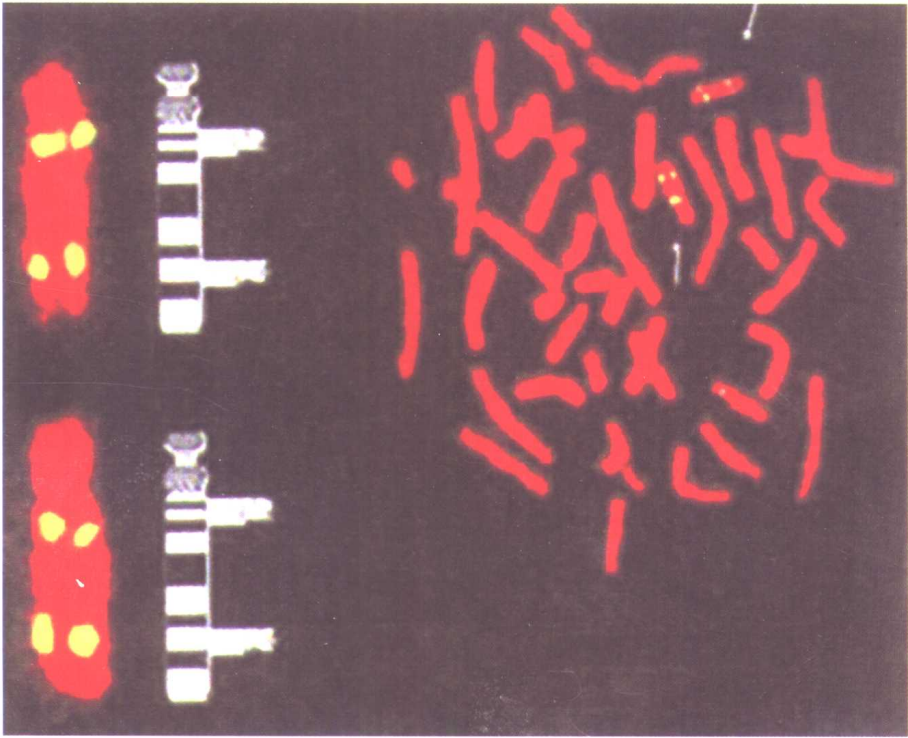
本书分细胞遗传学、生化遗传学、群体遗传学、分子遗传学、临床遗传学五个部分实验内容,共42个单项实验。这些实验项目既有一定的联系,又具有相对的独立性,每一实验项目都能体现其理论意义和实际应用价值。编写的每个实验项目,都对目的要求、实验原理、实验用品和材料、方法和步骤、注意事项等方面作了充分的阐述,并备有附录,供学生参考。

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。

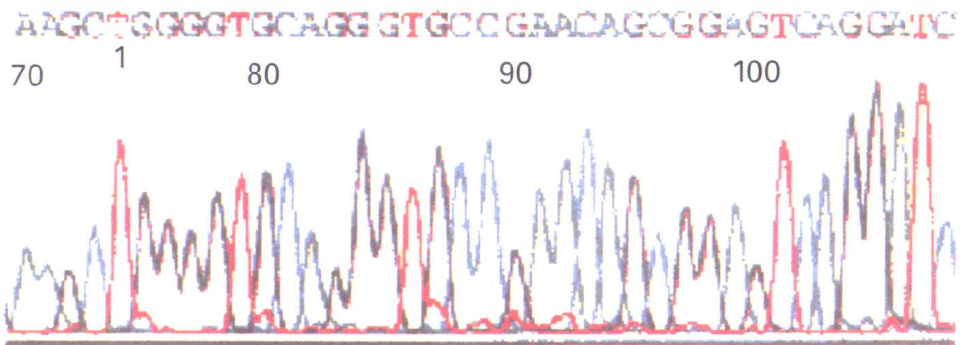
王修海

2001年1月

• i •



彩图1 荧光原位杂交染色体



彩图2 自动测序仪读序结果

目 录

前言	
绪论	(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的培养及染色体标本制备技术	(6)
实验三 正常人非显带染色体的核型分析	(10)
实验四 人类染色体 Q 显带技术	(12)
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	(23)
实验九 人类染色体 T 显带技术	(24)
实验十 人类高分辨染色体(HRC)标本的制备和观察	(25)
实验十一 人类外周血淋巴细胞姐妹染色单体(SCE)互换技术	(29)
实验十二 性染色质标本的制作与观察	(31)
I. X 染色质染色	(31)
II. Y 染色质染色	(33)
实验十三 银染核仁形成区与银染近端着丝粒染色体随体联合技术	(34)
实验十四 微核标本的制作	(36)
实验十五 荧光原位杂交技术	(38)
第二部分 生化遗传学实验	(42)
实验十六 细菌抑制筛选试验	(42)
实验十七 显色反应技术	(45)
I. 三氯化铁显色反应(FeCl_3 试验)	(45)
II. 甲苯胺蓝斑点试验	(46)
实验十八 酶活性测定技术	(47)
实验十九 蛋白质含量测定技术	(50)

实验二十 双向薄层层析技术	(52)
实验二十一 糖类定量测定技术	(53)
实验二十二 糖类定性分析技术	(55)
I. 尿半乳糖定性试验	(55)
II. 尿果糖定性试验	(56)
实验二十三 蛋白质电泳技术	(57)
I. 醋酸纤维素薄膜电泳	(57)
II. 琼脂糖凝胶电泳	(60)
III. 聚丙烯酰胺凝胶电泳	(61)
第三部分 群体遗传学实验	(64)
实验二十四 人类的皮肤纹理分析	(64)
实验二十五 PTC 尝味实验	(69)
实验二十六 人类性状的遗传学分析	(70)
实验二十七 遗传病的系谱分析	(72)
实验二十八 遗传度、杂合度、多态信息量和吻合度测验	(74)
实验二十九 遗传性疾病遗传方式的估计	(76)
实验三十 Bayes 法在遗传咨询中的应用	(80)
第四部分 分子遗传学实验	(86)
实验三十一 人基因组 DNA 的提取	(86)
实验三十二 DNA 的限制性内切酶酶解技术	(89)
实验三十三 DNA 酶解片段的电泳分离技术	(91)
实验三十四 Southern 印迹转移	(93)
实验三十五 DNA 分子杂交技术	(96)
实验三十六 聚合酶链反应(PCR)技术	(100)
实验三十七 致病基因的 RFLP 连锁分析	(104)
实验三十八 PCR-SSCP 法检测分析技术	(107)
实验三十九 PCR 双链 DNA 循环测序技术	(108)
第五部分 临床遗传学实验	(115)
实验四十 人类遗传病(观看录像)	(115)
实验四十一 遗传与优生咨询(计算机多媒体软件应用)	(116)
实验四十二 临床遗传与优生咨询门诊见习	(119)
第六部分 附录	(121)
附录一 核酸、蛋白质换算数据	(121)
附录二 常用染色液的配制	(122)
附录三 细胞遗传学技术常用溶液的配制	(122)

附录四	分子遗传学技术常用溶液的配制.....	(124)
附录五	查询医学遗传学、分子遗传学、人类基因组计划等有关 网站.....	(126)
参考文献	(132)
彩图		

绪 论

一、医学遗传学实验课的目的和任务

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，按规定座位入座。

2. 实验开始前要检查所用仪器、材料、实验用品是否完好齐全，如有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。值日生主要负责清扫地面，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。

二、实验原理

减数分裂是二倍体生殖细胞在形成配子时的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°C 恒温培养箱、水平离心机、显微镜、剪刀、镊子、匀浆管、离心管、烧杯、玻璃吸管、酒精灯、试管架、染片架等。
2. 试剂 Hanks 液、RPMI1640 培养液、小牛血清、青霉素、链霉素、秋水仙素溶液 (10 μ g/ml)、0.075mol/L KCl 溶液、甲醇、冰醋酸、Giemsa 染液。
3. 动物 体重为 25~30g 的小鼠。

四、实验方法和步骤

1. Hanks 液配制

(1) A 液: Na₂HPO₄ · 2H₂O 0.6g、KH₂PO₄ 0.6g、MgSO₄ · 7H₂O 2.0g、

KCl 4.0g、NaCl 80.0g 溶解于 900ml 三蒸水中。

(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 Hanks 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 值至 7.2~7.4, 装入 10ml 链霉素小瓶内。

3. 标本制作

(1) 动物处死后, 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 Hanks 液匀浆。静置 5min, 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°C 恒温培养箱内培养 24h。

(4) 培养终止前 4h, 加入秋水仙素 (终浓度 0.2 μg /ml 培养液)。

(5) 收获细胞, 0.075mol/L KCl 低渗处理。

(6) 1000r/min 离心 8min, 取沉淀。

(7) 甲醇: 冰醋酸 (3:1) 固定 30min, 滴片, 干燥后 Giemsa 染色、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)。

第一次分裂:

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:

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。

偶线期 (zygotene): 同源染色体配对, 也称联会, 每对染色体形成 1 个二价体。染色体形态仍较细长。

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, 1 个二价体由 4 条染色单体构成, 形成四分体, 共 20 个。同源染色体开始分开。但同源染色体间开始发生交叉。

双线期 (diplotene): 染色体继续缩短变粗, 同源染色体开始分离, 只在交叉的部位仍连在一起。核仁显著变小。

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“0”、“8”、“X”、“+”等各种形状, 核仁、核膜消失。

中期 I：四分体排列于赤道板上。

后期 I：每个四分体分为两个二分体，并移向两极。

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

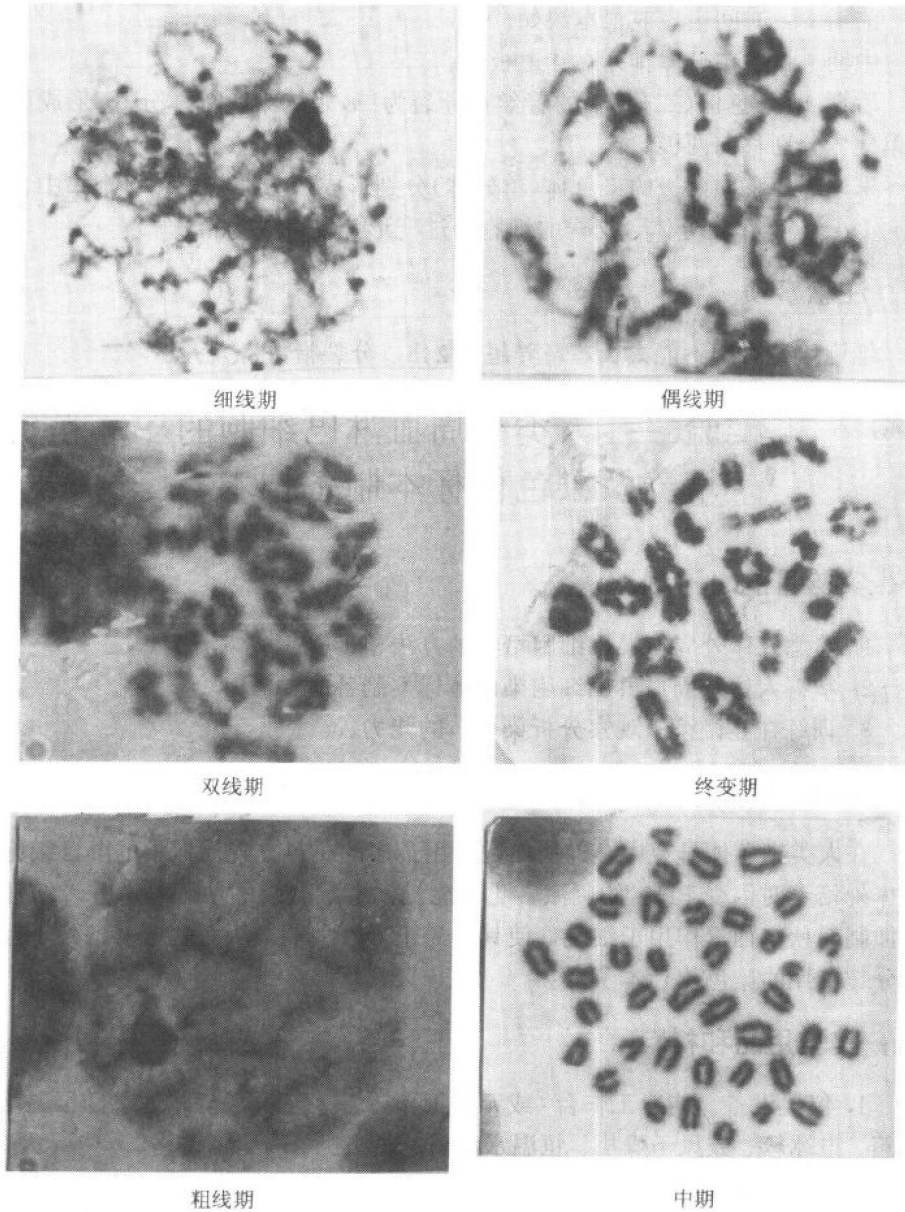


图 1-1 小鼠睾丸组织减数分裂前期 I 细胞形态

两个次级精母细胞。体积较小，染色体数目为原来的一半。

第二次分裂：

同有丝分裂过程，最后形成 4 个精细胞。

分裂相较小，分裂是以二分体为单位进行的。

前期 I：时间很短或根本缺如。

中期 I：各二分体排列在赤道板上。

后期 I：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。

末期 I：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 24h，分裂指数将大大下降。

实验二 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 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素作用于细胞，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. 仪器设备 洁净工作台(或无菌工作罩、或无菌操作室)、37°C 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 试纸等等。

3. 试剂 肝素 (500 IU/ml)、秋水仙素溶液 (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)、RPMI 1640、小牛血清、青霉素、链霉素、5% NaHCO_3 、植物凝集素 (PHA)、0.075mol/L KCl 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	100IU/ml
链霉素	100IU/ml

用 5mol/L NaHCO_3 液 (或 0.1mol/L HCl 溶液) 调节培养液的 pH 值至 7.2~7.4。在每个培养瓶 (10ml 的链霉素瓶) 中盛有已校正好酸碱度的培养液 5ml, 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 (图 1-2)

(1) 采血: ①用 5ml 的消毒注射器抽取 0.2~0.3ml 的 500IU/ml 肝素; ②用含有肝素的消毒注射器抽取静脉血 3ml (上下混匀); ③立即将注射针直接穿过培养瓶的橡胶塞, 向 5ml 培养液中注入 20 滴全血 (7 号针头)。每瓶含血量为 0.3~0.5ml 全血; 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 66~70h 后, 加入秋水仙素溶液 (秋水仙素浓度为 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)。用 1ml 注射器, 4 号注射针头吸取 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 浓度的秋水仙素溶液向 5ml 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 3h。秋水仙素溶液的最终浓度为 0.07 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

(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)。经 1200r/min, 离心 8~10min。

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

(5) 预固定: 在低渗后, 即加入 1ml 固定剂 (甲醇: 冰醋酸=3:1) 混匀, 即离心 8~10min。

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

(7) 再固定: 加入 8ml 固定液, 用吸管吹打均匀, 静置 30min 以上或过

夜。再次离心 8~10min，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在盛有蒸馏水的小搪

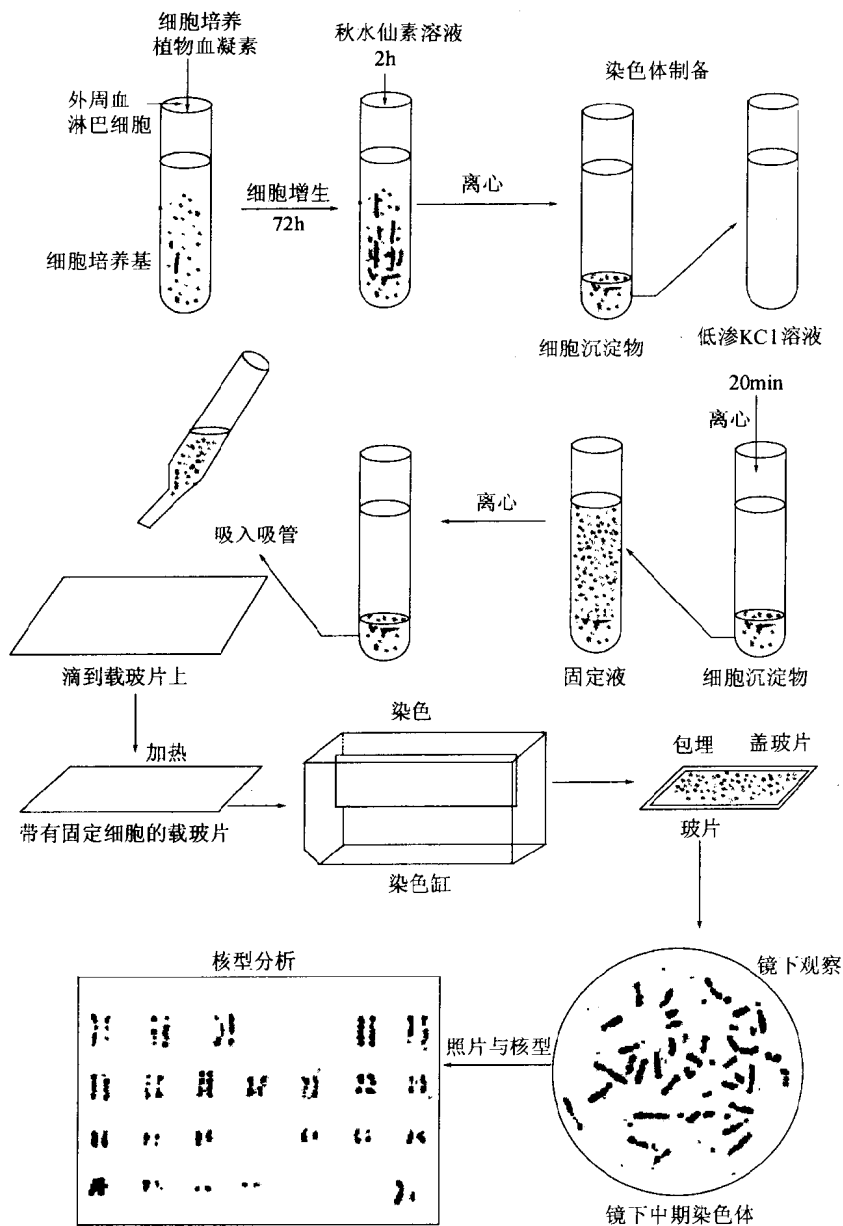


图 1-2 人体外周血淋巴细胞染色体标本制备方法流程图