

● 章静波/主编

细胞生物学 实用方法与技术



北京医科大学中国协和医科大学联合出版社

Q28-3
ZJB

Y420/18

细胞生物学实用 方法与技术

主 编 章静波
副主编 蔡有余
张世馥

北京医科大学 联合出版社
中国协和医科大学

图书在版编目 (CIP) 数据

细胞生物学实用方法与技术/章静波主编. —北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1995

ISBN 7-81034-511-7

I. 细… II. 章… III. 人体细胞学: 生物学-实验-方法 IV. R329. 2-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (95) 第 06632 号

细胞生物学实用方法与技术

章静波 主编

责任编辑: 李宗彦 徐威

*

北京医科大学 联合出版社出版
中国协和医科大学

四方计算机照排中心排版

北京昌平精工印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行

*

787×1092 毫米 1/16 印张 25 千字 618 彩插 1 页

1995 年 8 月第一版 1996 年 10 月北京第二次印刷

印数: 2001—5000

ISBN 7-81034-511-7/R · 509

定 价: 36.00 元

内 容 简 介

这是一本介绍细胞生物学实验方法的书，内容包括从最基本的组织培养技术，实验胚胎手术，组化染色，同位素放射自显术，染色体技术，电镜技术，电泳技术到近年来问世的杂交瘤单克隆抗体技术以及分子杂交技术。由于所选的方法面很宽，所以适用范围颇广。另外，本书主要描述最常用的实验方法与步骤，不过多地研讨理论问题，实用性乃是它最大的特色。这些方法都是根据编者自己的经验体会写出来的，因此所描述的程序有较高的重复性与可靠性。本书适用于从事生物科学，尤其是细胞生物学、分子生物学以及生物工程学的工作者阅读和使用，对于生物系大学生、有关科研单位等都是必备的工具书。

前 言

细胞生物学、分子生物学以及免疫学是现代三大前沿生物学科，发展异常迅速。生物学再也不是跟随化学、物理学等学科的发展而发展了。当前，生物学科有逐渐领导某些自然科学的趋势。为此，学习和研究生物学科是时代的要求，广大自然科学工作者的共同愿望。

从事细胞生物学的研究，首先要掌握该学科最基本的技术和最新的实验方法。近年来国内各大学、各研究所以至企事业单位经常举办细胞生物学技术学习班，以及互派进修生相互学习，取长补短。然而，由于各实验室条件不一，实验程序也不尽相同，以至为实际工作及互相交流带来一定的困难。为了大学毕业生、进修生或研究生到新的专业部门能尽快地熟悉这方面的基本技能，适应科研、教学工作的需要，我们编写了这本书。读者对象主要是本科大学生、进修生、研究生以及从事生物工程的技术人员。

本书是在中国医学科学院肿瘤研究所细胞生物学室主任、中国科学院院士吴旻教授倡导下，在全体参加编写的同志共同努力下完成的。由于编写者多为本领域的专家，有较丰富的实践经验，对承担编写的技术方法比较熟悉，因此本书中所描述的程序具有较高的重复性与可靠性。此外，为了使本书适合于更多人的需要，收集的方法较多，读者可以各取所需，从中找到适用的资料。

本书在编写过程中因时间仓促，错误不当之处在所难免。我们殷切希望本学科的专家和同行提出批评和建议，使本书的内容不断地得到补充与日臻完善，以利再版和续编。

最后，需提及的是，在编辑过程中我们得到了高等教育出版社李茂国先生和中国医学科学院、中国协和医科大学陈永生、李宗彦教授，中国人民大学哲学系博士生王成同志的协助，做了大量工作，于此深致谢忱。

作 者

1988 年春于中国协和医科大学

第二版序

说实话，我们是怀着惴惴的心情看待本书第一版发行的。因为我们承认，该书是个“大杂烩”，只是将国内各细胞和分子生物学和部分生物化学实验室中现有的常用技术收集起来，哪怕是“过时的”方法。所以该书第一版印刷量很小。然而，我们也曾断言，该书的第二版将以新的面貌出现。

为了解该书的发行情况，在此书正式面市的当天，我们曾分头到北京各新华书店观察，看看此书是否“不屑一顾”，以致积压。不料从反馈信息看，北京王府井新华书店第一天便只剩下十余本，到第二天便售罄了。接着北京其它各新华书店以及高等教育出版社门市部亦相继脱销。大约过了三个月，各地同行，尤其是研究生们纷纷来信要求帮助购买此书，甚至在信中夹有现金。至于朋友、同事来函索书者更不在少数。这对我们是个鼓励，增强了我们再版的信心。

正如第一版前言中所说的，细胞生物学是当代新兴的三大生物学科之一，发展极其迅速。主要原因固然是学科本身的发展，但技术方法的不断创新不能不是一个巨大的推动力。自该书第一版的问世至今仅仅一年有余，但各种新技术层出不穷，并且已被不少实验室采用，如聚合酶链反应（PCR）技术、DNA 指纹图、隧道扫描电镜技术、核骨架显示技术等等。如果不将这些最先进的技术方法收载进来，该书便失去问世的意义与目的。因此，我们修订版的特色是，一方面继续保持其实用性，另一方面又要反映出细胞生物学技术方法的最新进展，使得该书能跟上时代的步伐。

此外，从迄今的趋向看，细胞生物学与分子生物学以及与分子遗传学是难以截然分开的，所以该书必然包含不少分子生物学与分子遗传学的内容。为此我们邀请细胞与分子遗传学工作者蔡有余先生以及擅长于分子生物学技术的张世馥同志担任该书副主编或审定。这样我们便毫无愧色地说，该书名为细胞生物学实用方法与技术，实为细胞生物学、细胞与分子遗传学以及分子生物学的较为全面的实用方法与技术的工具书。

我们有信心还将继续再版，使该书成为我国最新的细胞生物学技术与方法工具书之一。诚然，权威性我们是不敢说的，但我们将始终保持其最大的特色，即实用性与时代性。希望它对我国细胞生物学的发展作出贡献。

我们恳切希望使用该书的读者、同行、专家对该书提出批评、建议，如果有更好更新的方法技术提供给我们，我们将竭诚地欢迎并深致谢忱。

章静波写于深圳海上世界
1991.8.9;1994年夏重修
于中国协和医大

目 录

第一章 组织培养方法	(1)
一、人皮肤成纤维细胞的培养方法	(1)
二、人外周血淋巴细胞短期培养技术	(3)
三、人羊水细胞培养及染色体标本的制备	(6)
四、支持细胞的分离与培养	(8)
五、组织块与组织块的遭遇培养	(11)
六、细胞系与组织块的遭遇培养	(12)
七、琼脂培养法	(13)
八、血管壁平滑肌细胞和内皮细胞的培养	(15)
九、大鼠腺垂体细胞培养方法	(20)
十、神经细胞的分散培养	(22)
十一、人羊水细胞大量增殖培养及绒毛细胞培养技术	(25)
十二、培养细胞的电特性测定技术	(30)
十三、细胞骨架的光镜制样法	(35)
十四、建立永久性类淋巴母细胞样细胞系方法	(37)
第二章 器官培养方法	(39)
一、灌流式器官培养法	(39)
二、琼脂小岛器官培养法	(41)
三、鸡胚尿囊绒膜培养法	(42)
四、早期鸡胚胚盘培养法	(44)
五、滤纸虹吸培养	(44)
六、摇摆式器官培养	(46)
七、网格法器官培养	(47)
八、鸡胚上颌突上皮和间充质重组实验	(49)
第三章 培养细胞增殖动力学的常用分析方法	(52)
一、生长曲线的绘制	(52)
二、分裂指数测定	(53)
三、成集落实验	(53)
四、人体和哺乳动物细胞同步化方法	(54)
五、缩时显微电影拍摄技术	(55)
六、人类肿瘤集落形成检测与药敏实验	(56)
第四章 化学诱变及转化实验	(60)
一、诱导哺乳动物细胞次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖基转移	

酶位点正向突变的实验方法	(60)
二、人白血病 HL-60 细胞系 HGPRT 缺失突变型细胞株的 分离和建立	(62)
三、用 N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍在体外诱发金仓鼠 乳鼠肺细胞的恶性转化	(68)
四、DNA 介导的基因转移	(72)
第五章 培养细胞的药物、放射敏感性及杀伤试验	(76)
一、人癌细胞系对抗癌药物的敏感性试验	(76)
二、细胞培养的加温实验	(78)
三、细胞培养的 X 线照射试验	(79)
四、细胞培养的微波照射试验	(80)
五、高温-光动力效应研究	(81)
六、LAK 细胞的制备及其肿瘤细胞的杀伤试验	(83)
七、MTT 测定	(85)
第六章 染色体技术	(88)
一、小动物骨髓细胞染色体标本制作方法	(88)
二、人类皮肤成纤维细胞染色体标本制作方法	(90)
三、人实体瘤的细胞遗传学分析	(91)
四、哺乳动物细胞减数分裂标本的简易制作方法	(92)
五、成熟前聚集染色体标本制作方法	(93)
六、染色体 Q 带显带法	(95)
七、BSG-C 显带 (C 带) 技术	(96)
八、核仁组织区 (NORs) Ag-AS 二步镀银法	(97)
九、人类高分辨染色体技术	(98)
十、姊妹染色单体差别染色方法	(100)
十一、小动物体内显示 SCE 方法	(101)
十二、显示人体 X 染色体脆性位点的方法	(102)
十三、人类体细胞间期核内性染色质显示方法	(103)
十四、动物细胞染色体扫描电镜标本制备方法	(105)
十五、细胞中 DNA 的定量测定方法	(107)
十六、染色体分带技术——G 带	(109)
十七、X 小体显示法	(111)
十八、一种改良的 Y 小体显示法	(113)
十九、染色体原位杂交技术	(115)
二十、染色体 R 显带方法	(119)
二十一、人类精液的减数分裂相直接制备技术	(121)
二十二、用低渗处理来检测人类精子膜功能完整性的方法	(122)
第七章 同工酶技术	(124)
一、同工酶的凝胶分离技术	(124)

二、用醋酸纤维素薄膜电泳法测定培养的动物细胞中的 乳酸脱氢酶同工酶.....	(131)
三、LDH、G6PD 同工酶分离技术	(133)
四、胶原的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳	(136)
五、高活性 L-谷氨酸脱氢酶的制备	(138)
六、培养内皮细胞的聚丙烯酰胺凝胶电泳技术.....	(141)
第八章 单克隆抗体技术.....	(145)
一、人绒毛膜促性腺激素 (hCG) 单克隆抗体的制备.....	(149)
第九章 放射性自显技术及液闪测定技术.....	(152)
一、培养细胞的同位素自显术.....	(152)
二、器官培养的同位素自显术.....	(154)
三、整体动物的放射性同位素自显术.....	(156)
四、同位素双标记技术.....	(157)
五、染色体放射自显影标本制备方法.....	(158)
六、同位素液闪测定.....	(159)
七、原位杂交技术.....	(162)
八、放射受体结合测定法.....	(169)
九、非放射性标记检测体系.....	(173)
十、组织和血液细胞内环核苷酸水平的放射免疫分析法.....	(178)
十一、淬灭校正的内标准源法.....	(180)
十二、睾丸生精细胞动力学及蛋白质代谢放射自显影技术.....	(181)
十三、非同位素染色体原位杂交技术.....	(182)
十四、同位素液闪法检测程序外 DNA 合成	(186)
十五、DNA 合成抑制试验	(188)
十六、DNA 修复试验	(190)
十七、碱性洗脱荧光法检测 DNA 单链断裂和 DNA 蛋白质交联试验	(192)
第十章 细胞化学染色法.....	(194)
一、培养细胞的活体染色方法.....	(194)
二、定量细胞化学技术——显微分光光度计吸收测量法.....	(195)
三、免疫细胞化学技术.....	(198)
四、免疫荧光染色技术的应用.....	(206)
五、单细胞悬液染色标本的多信息分析法——流式细胞光度术.....	(209)
六、苦味酸天狼星红——偏振光法.....	(213)
七、生物素—抗生物素蛋白体系过氧化物酶染色法.....	(215)
八、生物素—抗生物素蛋白体系 DCS 间接免疫荧光法	(218)
九、哺乳类精子细胞嗜银结构的显示技术.....	(220)
十、小鼠精子头部银染异常的检测方法.....	(222)
十一、用纤维蛋白自显影系列鉴定内皮细胞释放的 PA 和 PAI	(223)
第十一章 电镜技术.....	(225)

一、扫描电子显微镜的生物学标本制作技术·····	(225)
二、培养细胞透射电子显微镜标本制备技术·····	(227)
三、冷冻蚀刻电镜技术·····	(236)
四、快速 HE 冰冻切片 Sheehan 染色法·····	(239)
五、扫描隧道显微镜及其生物学应用·····	(240)
六、一种观察核基质-中间纤维的简易整装电镜制样法 ·····	(248)
七、细胞核骨架制备技术·····	(250)
第十二章 细胞和细胞器及间质的分离技术·····	(252)
一、细胞的分离·····	(252)
二、微粒体的分离与纯化·····	(256)
三、细胞核的分离·····	(256)
四、溶酶体的分离·····	(257)
五、鼠肝微粒体酶的制备方法·····	(258)
六、染色体的分离方法·····	(260)
七、DNA 的分离与纯化 ·····	(262)
八、从培养哺乳动物细胞中分离 DNA 的方法 ·····	(263)
九、纤维连接蛋白的提取·····	(264)
十、层粘连接蛋白的提取·····	(266)
十一、碱洗脱荧光法检测细胞 DNA 交联性损伤 ·····	(268)
十二、弹性蛋白的分离提取·····	(270)
十三、胶原蛋白的分离提取·····	(271)
十四、人类和哺乳动物细胞同步化方法·····	(273)
十五、细胞及亚细胞组分分离技术·····	(275)
十六、细胞膜的分离技术·····	(279)
十七、线粒体的制备·····	(281)
十八、大鼠肝染色质小分子多肽的提取·····	(283)
十九、小鼠线粒体 DNA 的快速制备方法 ·····	(287)
二十、从组织与培养的细胞中分离 RNA 的方法 ·····	(288)
第十三章 体外受精技术·····	(291)
一、异种体外受精方法·····	(291)
二、同种体外受精方法·····	(293)
三、人精子单倍体染色体制作法·····	(294)
四、人精子冷冻保存技术·····	(295)
五、精子细胞生物学技术·····	(296)
第十四章 早期鸡胚的实验胚胎学技术·····	(307)
一、早期鸡胚原结的胚内诱导实验·····	(307)
二、早期鸡胚原结的离体诱导实验·····	(308)
三、胚胎冷冻保存技术·····	(310)
第十五章 核酸分子杂交及电泳技术·····	(316)

一、核酸分子杂交术.....	(316)
二、蛋白质的双向电泳.....	(321)
三、糖胺聚糖的提取及醋酸纤维素膜电泳法.....	(324)
四、原位缺口移位技术.....	(328)
五、聚合酶链反应 (PCR) 技术.....	(332)
六、PCR 技术在法医学中的应用	(336)
七、DNA 指纹 (DNA fingerprinting) 分析技术.....	(343)
八、基因文库的建立及用减除杂交法筛选基因文库.....	(348)
第十六章 实验动物遗传监测技术.....	(351)
一、小鼠遗传纯度的快速鉴定——尾部植皮法.....	(351)
二、大鼠品系定型血清的制备.....	(353)
三、微量淋巴细胞毒实验.....	(354)
四、近交系小鼠、大鼠的生化基因标志的鉴别.....	(355)

第一章 组织培养方法

组织培养是细胞生物学研究中最常用的方法之一。由于在培养中或在机体内，细胞行为的基本规律是一样的，因此许多研究可以在体外 (in vitro) 进行。此外，极为重要的一点是，在培养条件下，人们可以有目的、有选择地控制细胞生长的环境，因此可以研究在某种特殊条件下的细胞生物学行为。由此可见，组织培养在一定程度比动物实验更为优越。本章主要介绍一些最常用的细胞培养方法。

一、人皮肤成纤维细胞的培养方法

在研究人体细胞生物学、体细胞遗传学和疾病诊断方面，皮肤成纤维细胞培养日渐成为一种不可缺少的手段。如在鉴定患者是否有性染色体结构异常，两性畸形及嵌合体时，除了用外周血淋巴细胞作染色体检查外，同时还要做皮肤成纤维细胞培养物的染色体检查，方能使诊断更为准确，对一些先天性代谢异常的病人可取其皮肤成纤维细胞培养物进行组织化学、生物化学的试验或鉴定。为了制作人类染色体图，建立人体细胞库，积累具有各种不同的酶缺陷和易位染色体的细胞株系是必不可少的先决条件。为了研究人体细胞在体外培养条件下的恶性转化 (transformation)，建立皮肤成纤维细胞株系也是最常用的手段之一。

(一) 材料和方法

外科手术切下的皮肤组织立即放入有培养液的小瓶或平皿内。门诊活检取材时，要在病人痛觉小、血管少、不影响活动的适当位置（如前臂、臀部），用肥皂洗净，70%酒精消毒皮肤（忌用碘酒），皮下注入1%的盐酸普鲁卡因作局部麻醉，再用灭菌的皮肤钻钻取皮肤，放入有培养液的小瓶内。伤口用无菌纱布压迫1~2分钟即止血。然后包扎好伤口。

得到标本后便可进行无菌操作接种，若不能立即进行培养，或需要过夜时，将标本放入4℃冰箱保存，第二天再进行培养。培养液可用 McCoy's-5A 培养液（有市售），加入20%灭活的小牛血清，每毫升培养液含100IU青霉素和100μg的链霉素，用8%碳酸氢钠调pH至6.8~7.0。其具体操作程序如下：

1. 先将皮肤组织用每毫升含300IU青霉素和300μg的链霉素的磷酸缓冲液（PBS）或Hank's液（见附录）洗2次。
2. 用锋利的眼科剪，将附在皮肤上的脂肪和结缔组织去除干净。
3. 用PBS或Hank's液洗2~3次。
4. 用锋利的眼科弯剪将皮肤组织剪碎，使成为0.5mm³左右大小的小块。
5. 用PBS或Hank's液洗多次，直至液体不混浊、无油滴、清亮为止。
6. 用含20%小牛血清的McCoy's-5A培养液洗1次后，将皮肤小块浸没在5ml的McCoy's-5A培养液内，准备进行组织块接种。
7. 将皮肤小块按适当间隔放置在涂有大鼠鼠尾胶原（见附录）的25ml的无菌培养瓶内，

使其固定。然后翻转培养瓶，使有皮肤小块的一面向上。

8. 加入 1.5ml 含 20% 小牛血清的 McCoy's-5A 培养液。注意勿使培养液与组织块接触，塞紧瓶塞。

9. 将有皮肤小块的一面向上放入 37℃ 温箱，静置 3~4 小时后，轻轻将培养瓶翻转过来，使培养液与组织块接触，切勿晃动。3~4 天内不要观察和翻动，以免影响组织块的贴瓶及生长。

10. 约 1 周后每天换液 1 次。

(二) 细胞生长的观察

组织块接种后第 4~7 天开始长出细胞，有些组织块长出成纤维细胞，有些组织块长出上皮细胞。上皮细胞一般会在 1 个月左右自行退化，然后再长出成纤维细胞。当成纤维细胞长成若干大片的，密集细胞集落时，或是当成纤维细胞铺满瓶底时，便可进行传代。

传代时将瓶内的培养液弃去，用 PBS 洗 1 次，加入胰酶-EDTA 消化液（见附录）0.5ml，轻轻摇动，使湿润整个瓶底，置 37℃ 温箱内消化 3~5 分钟，加入新鲜配制的上述培养液 3ml，用滴管把细胞从瓶壁上轻轻地吹打下来，使其成细胞悬液，稍静止一下使组织块沉入瓶底，根据细胞的数量将细胞悬液分传到新的培养瓶内，25ml 的培养瓶大约接种 25 万个细胞。留在瓶底的组织块便可弃去。从细胞开始生长到第 1 次传代，大约要经历 1~2 个月左右的时间。以后视细胞生长的快慢，大约每 7~10 天传代 1 次，每 3~4 天换液 1 次。

(三) 注意事项

1. 由于外科手术的皮肤标本附有脂肪，在操作过程中使用的器皿上也都被涂上了一层脂肪油滴，这些油滴若洗不干净，就会污染培养液及培养瓶，使组织难以贴瓶，即使贴瓶也很少生长。因此必须用 PBS 或 Hank's 液将油滴彻底洗净。

2. 要尽可能地剪去皮下结缔组织，因为结缔组织不易长出细胞。组织碎块上带的结缔组织多了，就会包绕组织块的切面，使组织块的切面不能直接贴附瓶壁，影响细胞的生长。

3. 在接种组织块时，要将组织块的切面贴在瓶底上，这样，有活力的细胞层才能很快地长出细胞。

4. 外科手术或是活检皮肤时，若是用碘酒消毒时，需用 PBS 或 Hank's 液洗净以尽可能除去碘，因碘对细胞有毒性，使细胞不易生长。

5. 过去在组织块培养过程中，通常加二性霉素，以抑制霉菌生长。我们的经验表明二性霉素固然能抑制霉菌的生长，但对组织的生长也有抑制作用，而且使长出的细胞发生固缩、脱落、破碎等毒性效应。为此，我们不再使用这种制霉剂，只要按上述的操作步骤进行接种，注意无菌操作，就能减少或避免污染。

6. 组织块接种后，避免经常翻动和振动，否则组织块不易附着在瓶壁上，或是附着后又脱落。

7. 加入的培养液不宜过多，不然浸泡的组织块受液体轻微的波动便易脱落下来。

8. 皮肤细胞培养一般能传 30~60 代，在此期间，可按实验的要求选择不同代的细胞进行各种细胞生物学分析及致突变、癌变的研究。

(王秀琴 吴昱)

参 考 文 献

1. Hughes RG et al. Relationship between skin-biopsy site and successful fibroblast culture. Lancet, 1973, 1: 1261
2. Cox RP et al. Skin-biopsy site and success of fibroblast culture. Lancet, 1972, 2: 1373
3. Cooper JT, Goldstein S. Skin-biopsy and successful fibroblast culture. Lancet, 1973, 2: 673
4. Doherty RA et al. Skin-biopsy and successful fibroblast culture. Lancet, 1973, 2: 673
4. Steele MW. Skin-biopsy site and successful fibroblast culture. Lancet, 1973, 1: 1507

二、人外周血淋巴细胞短期培养技术

外周血的淋巴细胞在体内外一般是不分裂的，但在适宜的培养条件及植物血球凝集素 (phytohemagglutinin, PHA) 的刺激下，能转化为幼稚的、原给细胞样的 (blast-like) 细胞而具有重新分裂的能力。研究证实，这些细胞是胸腺依赖细胞，即 T 细胞。当人胸腺有缺陷时，淋巴细胞对 PHA 无反应，在切除胸腺的、照射的实验动物中亦得到证明。外周血淋巴细胞由于具有取材方便，容易培养，培养时间短即可得到大量有丝分裂相等优点，是目前细胞遗传学中广泛采用的一种方法。

按容器是否密闭，培养方法可分两种：一种是使用二氧化碳孵箱，培养容器不需密闭，用循环的 5% 的 CO₂ 调节培养基的 pH；另一种是使用普通的恒温箱，培养瓶口要密封或用瓶塞塞紧。后一种在一般实验室内即可做到。此外，按培养的血量或淋巴细胞数目，可分血浆法 (或称标准法)，半微量或微量全血法 (whole blood microculture) 两种。后一种方法采血量少，尤其对小儿、新生儿的研究中更为适用。在需要大量染色体标本 (如进行 G、Q 显带的研究) 以及需要积累大量有丝分裂细胞，特别是早期分裂细胞 (如高分辨染色体的研究) 时，标准培养法仍然适用。

淋巴细胞培养及染色体标本制作原理简述如下：培养基中加入适量的小牛血清、PHA、肝素及青霉素和链霉素。再加入一定量的血浆或全血。培养基的 pH 约为 7.1~7.2。将瓶塞盖紧，置 37℃ 恒温箱中 48~72 小时，即可收获细胞，在收获细胞前加入一定量的秋水仙素或秋水仙胺将细胞阻止于有丝分裂中期。然后将细胞悬液离心，进行低渗、固定处理，最后将细胞悬液滴于湿冷清洁的玻璃片上。空气中自然干燥即得中期染色体标本，用于各种研究。

(一) 器材和试剂

1. 仪器设备：带有照相装置的光学显微镜，隔水式恒温培养箱 (附温控仪) 或二氧化碳孵箱，恒温水浴箱，电热干燥箱，分析天平 (1/10,000)，普通天平或扭力天平，离心机，手提式高压消毒锅，普通冰箱，超净工作台或无菌室，小型真空抽气泵或玻璃抽气泵，pH 计，放大机及有关暗室设备，荧光显微镜，水质仪，定时钟，秒表、血细胞计数板。

2. 器材：G₆ 型玻璃漏斗或蔡斯漏斗 (细菌滤器)；不同容量的蒸馏水瓶及蒸馏水桶及蒸

馏水器；注射器（1，2，5，10ml）若干及微量注射器（50~100 μ l）；10ml 锥形刻度离心管；吸管（5ml，10ml）；滴管（直头，弯头）；烧杯；量筒；锥形瓶；25ml 培养小瓶或青霉素；链霉素小瓶（带瓶塞）；标本缸；染色缸；棕色试剂瓶；血浆瓶；盐水瓶；带盖搪瓷盘或铝饭盒；酒精灯；钻石笔；橡皮乳头；洗耳球；试管架；载玻片；盖玻片以及包布等。

3. 试剂：RPMI1640、TC199、Eagle 等培养基干粉任选 1 种，目前 RPMI1640 较普遍使用；小牛血清；肝素；青、链霉素；秋水仙素或秋水仙胺；PHA；KCl；NaCl；CaCl₂；Mg-SO₄·7H₂O；MgCl₂·6H₂O；KH₂PO₄；Na₂HPO₄·12H₂O；NaHCO₃；NaOH；葡萄糖；重铬酸钾；胰蛋白酶；酚红；甲醇；冰醋酸；无水乙醇及工业酒精；工业硫酸；分析纯硫酸；D72 及 D76 显影粉；F5 酸性定影粉；Giemsa 染液；甘油。

（二）操作程序

1. 实验准备：各种玻璃器皿、培养瓶、细菌滤器及瓶塞等清洗消毒备用。用三蒸水配制 RPMI1640 500~1000ml，分装于血浆瓶中，三蒸水导电度应不小于 30 万 Ω 。小牛血清需灭活（56℃，30~45 分钟）以破坏补体。配肝素溶液浓度为 500IU/ml 或 4 μ g/ml，8 磅 15 分钟高压灭菌。青链霉素分别配制为 10 000IU/ml 及 10 000 μ g/ml 的溶液。按下列比例混合（以每瓶含此种混合液 10ml 为例）：

RPMI1640 培养液 80~85%（8~8.5ml）

小牛血清 20~15%（2~1.5ml）

PHA 0.4ml（10mg/ml）

肝素 0.08ml

青霉素 100IU/ml

链霉素 100 μ g/ml

混合后用 5%NaHCO₃ 调 pH 至 7.0~7.2，分装于小瓶中，密闭瓶塞，置低温冰箱或普通冰箱冰盒中备用。临用前温化至 37℃。

2. 操作步骤：以半微量全血法为例：在严格无菌条件下，以肝素液湿润容积为 2ml 的注射器，推出多余的肝素液，取静脉血 1~2ml，在无菌室内或经用酒精灭菌的翻口瓶塞插入针头，注入全血（7 号针头）40 滴，血量约为 0.6ml，轻轻摇匀，静置 37℃ 恒温箱培养，根据研究需要可培养 48~72 小时。在 48 小时已有相当数量的有丝分裂相，有丝分裂的峰大约在培养 60~72 小时之间。

标准培养法由于用血量较大，不易为受检者接受。虽然各种显带技术以及染色体高分辨显带技术不断发展，但多数都是在 Moorhead 方法基础上的改良。一般的程序是：取静脉血 5~10ml，室温下静置 1~2 小时，或低速离心（400~500 转/分）数分钟。此时可见血浆及介于血浆及红细胞层之间的白细胞层，将血浆及此层吸出混匀，以 0.6~0.8ml 接种到已配制的混合培养液 5ml 中，或接种到 4ml 上述混合培养液中（不含小牛血清）。剩余红细胞层仍可按上述全血法进行培养。

3. 积累中期细胞及染色本标本的制备：在培养终止前 4~6 小时加入秋水仙素或秋水仙胺，一般在 5ml 培养液内入 3.125 μ g/ml 的秋水仙素 1 滴（4 号针头），以抑制纺锤体丝的形成，使细胞分裂停止在中期。关于秋水仙素的剂量及作用时间，各实验室条件不同，经验不一，如剂量过多或作用时间过久，会使染色体变得粗短，不易进行分析。因此，每个实验室最好事先实验性地确定加入的剂量及时间，以得到适宜的形态及足量的中期分裂相。下列步骤则不

需无菌操作：

(1) 低渗：培养 72 小时，将细胞混悬液移入刻度离心管内，1000r/min 离心 8 分钟，弃去小清，留 0.5ml，加入已温浴达 37℃ 的 0.075mol/L KCL 溶液 5~6ml，轻轻混匀置 37℃ 水浴中 20 分钟，离心，吸去上清液。

(2) 固定：沿离心管壁缓缓加入新配制的甲醇冰醋酸 (3:1) 固定液 4~5ml，用滴管轻轻吹打，使液体混匀，放置 20 分钟，离心，吸去上清液。如此固定 3 次。如由于某种原因，不能立即制片时，可将离心管口盖好，置冰箱中过夜或更长时间。

(3) 制片：将上述细胞混悬液离心，弃上清液，留 0.2~0.3ml，混匀，立即取 1 滴细胞悬液滴于清洁湿冷的玻片上，静置并空气干燥。此时可只制 1 张片子，将显微镜聚光镜降低，置低倍镜下观察细胞分裂相，主要是观察染色体的分散情况，如由于低渗不足造成染色体分散不佳，可加大冰醋酸在固定液内的比例，再固定 1 次，以改善染色体分散的程度。

(4) 染色：用常规方法配制 Giemsa 原液（见附录）以 pH6.8~7.0 的 0.1mol/L 磷酸缓冲液稀释 (1:20)，染色 10 分钟。

(三) 注意事项

外周血淋巴细胞短期培养及制备染色体标本并不困难，但如操作不严或试剂质量不好则可能使培养结果及标本制作不佳或失败。

1. 培养失败的常见原因

(1) 水质不合格：配制各种培养过程中所使用的溶液必须是三蒸水，或导电度至少在 30 万 Ω 以上；

(2) 玻璃器皿，尤其是培养瓶洗涤不干净，有酸残留；

(3) PHA 失效；

(4) 血清质量不佳；

(5) pH 过高或过低，或培养过程中瓶塞不紧，CO₂ 逸出，导致 pH 值上升；

(6) 细菌的污染，尤其在夏季是常见的失败原因。如污染不太严重，在 72 小时收获时仍可得到一定数量的有丝分裂相；

(7) 接种的细胞数目过少或过多；

(8) 个体机能状况：在相同条件下，某一受试者的血培养不成功，而对照实验培养结果正常，其原因有时无法查出。

2. 染色体标本质量不佳的常见原因

(1) 秋水仙素浓度过高或作用时间过久，使染色体形态粗短以及单体离散；

(2) 培养条件不适，分裂相过少，染色体亦较小，而且不易显带；

(3) 低渗处理不足或过度，造成染色体分散不佳（重叠、聚积、细胞核质仍保留）以及染色体分散过度甚至丢失；

(4) 离心、吹打等操作不当，造成分裂相或染色体的丢失；

(5) 固定液不新鲜，以及玻片不够清洁湿冷也影响标本的质量。

目前一些实验室采用所谓预固定的方法，应指出的是，如低渗不充分，或于低渗液中加入固定液过多，因而造成残留的核质较多，不仅影响染色体的展开，而且会直接影响染色体显带的质量。

(程在玉)

参 考 文 献

1. Moorhead P S et al. Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. *Exp Cell Res*, 1960, 20 : 613
2. Buckton K E et al. Method for the analysis of human chromosome aberration. WHO, Geneva, 1973
3. Yunis J J. Human chromosome methodology. 2ed. Acad Press, NY, 1974, pp 95—125
4. 吴旻译, 人类遗传学原理, Stern, C. 科学出版社, 1979, 550~563
5. Sharma A K and Sharma A. Chromosome Techniques: Theory and Practice, 3ed. Butterworths, London, 1980, pp 362—365

三、人羊水细胞培养及染色体标本的制备

利用培养的羊水细胞诊断胎儿遗传性疾病(称产前诊断或宫内诊断)是医学遗传学的一个重要进展。羊水细胞可能是胎儿皮肤, 消化道、呼吸道及泌尿生殖道脱落的细胞, 其中小部分是具有活力的细胞, 可以进行培养和增殖而用于细胞遗传学和生化遗传学研究, 目前已能用培养的羊水细胞测定几十种染色体病和近 80 种遗传性代谢病。对有产前诊断指征的孕妇通常在妊娠 15~17 周, 在超声定位后经腹壁作羊膜腔穿刺抽取羊水 10~20ml, 然后尽快送实验室进行培养, 一般不应晚于 48 小时, 但实践证明, 超过 48 小时有时亦可培养成功。有文献报道抽取羊水 5~7 天后进行培养也有获得成功者。

羊水培养方法可分开放系统及密闭系统两种。应用开放系统时, CO_2 培养箱内有 5% CO_2 进行交换, 调节培养瓶内培养液的 pH 值。密闭系统应用普通恒温箱即可。在培养过程中要用瓶塞塞紧瓶口, 不使瓶内气体与外界空气进行交换。因此, 这两种系统所有培养的 pH 值是不同的, 这点应予注意。实验者可根据自己的经验及实验室条件, 选择自己的方法。

(一) 器材和试剂

容积 25ml 的培养瓶或较大的不同容积的培养瓶及瓶塞; HamF10、TC199 或 Eagle 培养基干粉; 质量好的小牛血清; 胰酶。

(二) 操作程序

1. 培养液的制备或配制

(1) 根据文献及经验, HamF10、TC199 及 Eagle 等均适用于羊水细胞的培养。目前国内大多实验室使用 F10。具体配制程序为: 称取 F10 干粉 9.8g, 溶于约 800ml 三蒸水中。如 F10 不含谷氨酰胺 (L-glutamine), 则称取 292mg 谷氨酰胺溶于 F10 溶液中。然后加 NaHCO_3 0.8g, 再加三蒸水至 1000ml, 待完全溶解后, 用 G₆ 细菌漏斗过滤, 即得含 2mmol/L 谷氨酰胺及 pH 为 6.7~6.9 的 F10 溶液。在实际工作中, 也可不加谷氨酰胺, 而是将其配制为 20mmol/L 的 F10 溶液, 临用前按 1:10 稀释。 NaHCO_3 亦可不立即加入, 待临用前在加入血清后再用 NaHCO_3 (4% 溶液调 pH 值)。