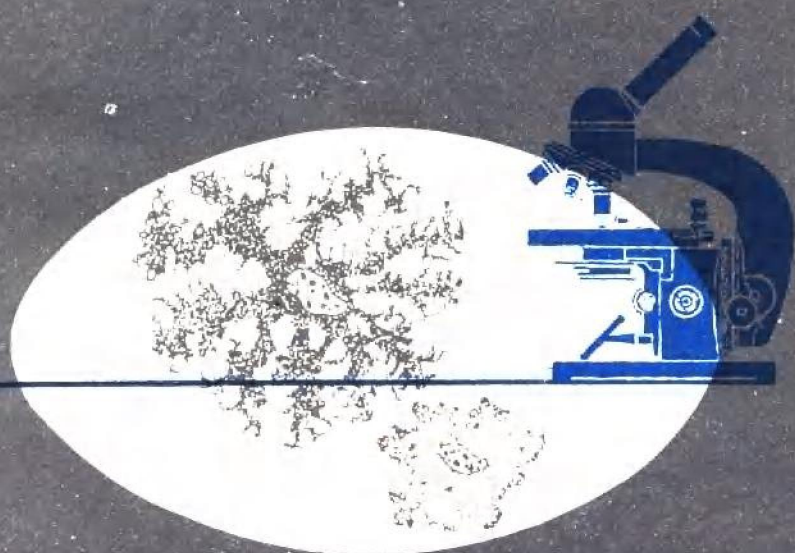


人体及动物细胞 遗传学实验技术

王子渊 编著



四川大学出版社

Q243-33

W28

人体及动物细胞遗传学实验技术

王子淑 / 编著

四川大学出版社

一九八七年·成都

内 容 简 介

本书收集了国内外已发表的比较新的人体及动物细胞遗传学实验技术,在编者自己实验室工作的基础上选编而成。是一本能反映当前细胞遗传学发展水平的实验技术书。全书主要包括:(1)各类动物细胞组织培养技术;(2)动物组织的染色体技术;(3)染色体分带技术;(4)理化诱变细胞遗传学检测法;(5)细胞工程技术;(6)放射自显影技术;(7)电镜技术;(8)显微摄影技术等。

本书方法新颖、效果稳定,可供大专院校生物系(包括医学院校及农学院畜医系)师生教材或参考书用,也可供从事细胞遗传学、细胞生物学、医学、肿瘤、农医等方面的研究人员及实验室工作人员参考。

人体及动物细胞遗传学实验技术

王子淑 编著

※

四川大学出版社出版(成都市四川大学内)

四川省新华书店发行 四川省彭山彩印厂印刷

※

开本:850×1168毫米 1/32 印张13.375 字数:320千

1987年1月第一版

1987年1月第一次印刷

印数:1—4,000册

ISBN--7—5614—0002—0/Q·1

统一书号:13404·3

定价:2.25元

前 言

细胞遗传学是细胞学和遗传学相结合的遗传学的一个分支，是一门历史比较悠久的学科。本世纪前叶，细胞遗传学研究的对象主要是植物和果蝇的染色体。近30年间由于新技术和方法的不断涌现，例如，植物血球凝集素（phytohemagglutinin）的发现，人和哺乳动物外周血离体培养技术的建立，低渗液和秋水仙素的应用，固定、制片方法和染色方法的改进等。染色体标本的制作从创立到完善，为人和哺乳动物细胞遗传学的研究打下了基础。特别是1968年后显带技术的建立和发展，以及定位DNA序列的原位杂交，基因放大，体细胞杂交，染色体媒介的基因的转移及间期染色体的显示，和许多其它新技术和方法在染色体上的应用等，使得细胞遗传学这一领域得到了蓬勃的发展。

由于细胞遗传学中所阐明的基本规律适用于包括分子遗传学在内的一切遗传学分支学科；目前，细胞遗传学已进入了当代生物学、医学、农学的许多分支，以及由细胞遗传学衍生的许多分支学科，如体细胞遗传学、分子细胞遗传学、细胞器遗传学、医学细胞遗传学等。它不仅在理论上而且在实践应用中都具有重大的意义。在理论上，如探讨遗传现象和染色体行为之间的关系，染色体畸变，及染色体倍性改变的遗传效应，发育细胞遗传学中癌的形成，配子发生，基因放大，染色体和有机体的进化等重大问题。在应用上，如医学细胞遗传学和人口统计学，家畜家禽的育种，癌的化学治疗，诱变剂的检测等方面的研究。著名细胞遗传学家徐道觉（T·C·Hsu）预言：“我深信，细胞遗传学，特别是与生物化学结合的细胞遗传学领域，在今后若干年内将进入一个蓬勃发展的时代。”

近年来生物学的发展，特别是细胞遗传学的发展，要求将这一发展的理论应用到生产实践中去，这就需要新的实验技术作为发展生产的先导或桥梁。现在，细胞遗传学的理论和不断涌现出来的一些新技术新方法已应用于生物学、医学、农学的许多分枝。因此，迫切需要这方面的技术资料。在国外，Schwarzacher等（1974）曾著“Methods in human Cytogenetics”一书。Yunis等（1974）曾著“Human chromosome methodology”一书，此书曾由山东师范学院翻译出版为“人类染色体方法学”（1980）。sharma等曾著“Chromosome techniques theory and practice”一书（1980）。以上这些著作对细胞遗传学的基本技术和方法阐述较系统全面，但对目前细胞遗传学新技术和方法则未能收集。在国内，尚未见有关细胞遗传学实验技术方面的专著。本书根据本学科的研究对象、目的和任务，在我们实验室多年来的工作基础上，汇集了国内外书刊近期的资料，系统汇编整理而成。旨在为发展我国的细胞遗传学技术作一定贡献。

我们在编写此书时，出发点是：（1）力求方法新颖，操作简便、效果稳定，而不列举许多类似的方法。（2）多数方法，仍为显微和亚显微水平技术。这是因为，尽管细胞遗传学已前入分子水平，但光学显微镜方面的细胞遗传学技术，仍然是一种使用得最广泛最普遍的基本技术。（3）本书原旨为我室动物细胞遗传学研究生所编写，考虑实际需要编写了部分有关细胞生物学的实验技术。

在本书中重点编写了以下几个部分：（1）细胞和组织培养技术；（2）染色体技术；（3）诱变剂的检测技术；（4）体细胞遗传学实验技术；（5）显微技术。包括光学显微技术，摄影技术，各类电子显微镜技术。

我们按照教科书的形式进行了本书的编写。对每个实验技术从原理到试剂、器材、操作方法、注意事项、参考文献等都一一

作了介绍，这就优于目前所发表的细胞遗传学实验技术资料。

本书可供综合大学、医学和农业院校，以及有关研究机构从事细胞遗传学、遗传学、细胞生物学、生物学、细胞工程、环境保护等有关人员参考，可作为大专院校研究生的参考书。

在编写过程中本室陈文元、王喜忠同志提出了宝贵意见，并对部分内容进行了修改，欧兵同志绘制图表，特此致谢。

由于时间仓促，经验不足，错误之处难于避免，请读者提出宝贵意见。

编者

1986年7月

目 录

第一章 细胞和组织培养…………… (1)

- 1、血培养
- 2、组织培养

第二章 染色体标本制作…………… (41)

- 1、淋巴细胞染色体标本之制作
- 2、骨髓细胞染色体标本的制备方法
- 3、动物减数分裂标本的制作方法
- 4、哺乳动物早期胚胎细胞染色体的制备
- 5、唾腺染色体
- 6、刷形染色体
- 7、快速制备小鼠外周血染色体的方法
- 8、固定剂中保存多年的骨髓和外周血标本的细胞遗传学分析
- 9、一种收获量低的各种组织染色体标本制备方法
- 10、蛙胚胎染色体的制备方法
- 11、增加动物骨髓细胞有丝分裂的新方法
- 12、用体内扩散小室培养外周血淋巴细胞制备染色体
- 13、拨出的停止生长的人毛发上皮细胞染色体
- 14、利用腹腔引流细胞制备小鼠染色体
- 15、鱼类外周血染色体的简易制备法
- 16、蛇类骨髓细胞染色体的制备方法
- 17、贝类胚胎染色体制片法
- 18、玻璃纸染色体压片法
- 19、胚胎组织的染色体制备法
- 20、脑细胞的染色体制备方法
- 21、柞蚕精巢染色体制备方法

第三章 人类体细胞染色体组型分析…………… (95)

第四章 染色体分带染色技术(或染色体的新技术)… (99)

- 1、Q一带

- 2、DA/DAP1 染色
- 3、AMD/DAP1 二重染法
- 4、用色霉素A₃/甲基绿染色R带
- 5、G一带 6、C一带
- 7、在人染色体中同时产生G带和C带的一种简单胰酶—Giemsa技术
- 8、R一带
- 9、骨髓染色体连续的R、Q及C—显带技术
- 10、一种同时显示哺乳动物染色体R带、G带的方法
- 11、复制带
- 12、高分辨染色体
- 13、T一带 14、Cd带
- 15、N一带 16、G—11方法
- 17、Ag—染色法
- 18、SCE的制备
- 19、微核测定

第五章 染色体畸变分析 (175)

- 1、⁶⁰Co—r射线照射离体外周血诱发的染色体畸变与剂量的关系
- 2、化学诱变剂诱发小鼠骨髓细胞的染色体畸变
- 3、染色体畸变试验中CHL细胞系/剂量法

第六章 人外周血淋巴细胞DNA损伤修复的测定..... (184)

第七章 小鼠显性致死试验 (186)

第八章 细胞工程 (187)

- 1、细胞融合法
- 2、细胞脱核法
- 3、小细胞媒介染色体转移法
- 4、微细胞某介染色体转移法
- 5、两栖类胚胎少量细胞的短期离体培养
- 6 两栖类胚胎细胞的分离和再聚集
- 7、基因定位(杂交细胞分布板)

第九章 热前染色体凝聚 (PCC) (217)

1、熟前染色体凝聚 (PCC)	
2、异种细胞融合诱导熟前染色体凝聚 (PCC)	
第十章 细胞免疫和胞细化学	(226)
1、制备单克隆抗体的B淋巴细胞杂交瘤技术	
2、玫瑰花结形成试验	
3、微管的免疫荧光细胞化学方法	
第十一章 细胞动力学	(249)
1、细胞周期的测定	
2、淋巴细胞转化试验	
3、pHA对外周淋巴细胞转化试验方法	
第十二章 短期细胞转化试验	(258)
第十三章 性染色质的测定	(262)
第十四章 性染色体	(271)
1、x染色体迟复制研究技术	
2、在淋巴细胞和成纤维细胞培养中脆性 x 染色体的表达一种新的技术	
第十五章 染色体的分离纯化	(277)
第十六章 染色体DNA的分离	(281)
第十七章 折叠染色体的提取法	(283)
第十八章 放射自显影	(284)
1、染色体放射自显影标本的制备	
2、培养细胞的放射自显影制备方法	
3、电子显微镜放射自显影	
4、改进的G—显带染色体放射自显影技术	
第十九章 核膜原位杂交	(300)
第二十章 电子显微镜技术	(305)
1、透射电子显微镜	
2、扫描电子显微镜	
3、冰冻刻蚀技术	
第二十一章 乳酸脱氢酶 (LDA) 同工酶的测定	(358)

第二十二章	显微摄影	(365)
第二十三章	附录	(368)

(一) 培养基各种成分的制备

- 1、人工合成培养液
- 2、胎牛血清
- 3、猪血清制备
- 4、植物血球凝集素的制备
- 5、肝素溶液
- 6、抗菌素
- 7、鸡胚浸液
- 8、鸡血浆
- 9、鼠尾胶原的制备
- 10、血清代用品
- 11、秋水仙素或秋水酰胺
- 12、5 % NaHCO_3 溶液
- 13、0.25 % 胰蛋白酶酸液
- 14、1 % 酚红溶液
- 15、Hepes的使用

(二) 各类缓冲液

- 1、磷酸盐缓冲液
- 2、柠檬酸—磷酸缓冲液 (pH7.0)
- 3、Dulbecco's液
- 4、McIlvaine (200毫升) 液
- 5、硼酸缓冲液 (0.2M 硼酸盐)
- 6、硼酸缓冲液 (pH8.0)
- 7、二甲胂酸盐缓冲液 (0.2M)

(三) 各类动物所需的生理盐水

(四) 几种生理盐水的配制

- 1、Hank's液 10×
- 2、D—Hank's液 10×
- 3、Ringer溶液

4、Earle溶液

5、GKN溶液

(五) 染液的配制

1、Giemsa

2、台盼兰

3、瑞特氏 (Wright)

4、中性红

5、May—Grunwald—Giemsa染液及染色

6、地衣红溶液

(六) 阿氏 (Alsever's) 血液保存液

(七) Versene液

(八) 50% 聚乙二醇 (PEG) 溶液

(九) 甘氨酸溶液

(十) 泛影葡胺—聚蔗糖 (Ficoll) 淋巴细胞分离液

(十一) 细胞悬液的制备

1、鸡血球

2、Ehrlich腹水肿瘤细胞

3、脾脏细胞

4、免疫小鼠脾脏细胞

5、小鼠腹腔巨噬细胞

注：饲养细胞 (Feeder Cell)

6、骨髓瘤细胞

7、肉瘤或其它肿瘤细胞的分离

8、白血球的分离

(十二) 蛙精子悬浮液的制备

(十三) 带有琼脂底层的手术盘

(十四) 仙台病毒的制备和选择

(十五) 二甲肿酸钠缓冲戊二醛固定液 (0.1M)

(十六) 三蒸水的制备

(十七) 清洁液的配制

(十八) 实验室及器材的清洗, 消毒

1、无菌室

2、器皿的清洗、干燥和灭菌

(十九) 几种哺乳动物细胞株

(二十) 化学诱变物的细菌检测试验 (Ames法)

(二十一) 常用缩写名词

(二十二) 离心速度和离心力换算表

第一章 细胞和组织培养

从机体中取出组织或细胞，模拟机体内生理条件在体外进行培养，使之生存和生长，为体外培养。体外培养包括器官培养，组织培养和细胞培养。因从组织块生长出来的仍然是细胞，细胞在生长的同时发生移动，致使培养中的组织难以长时间维持其原有的结构，结果也成了细胞培养，因此组织培养和细胞培养实际上并无严格区别，一般说组织培养，即包括组织培养与细胞培养。

体外培养细胞，根据是否能贴附于支持物上生长的性质，可分为贴附型（绝大多数培养细胞，如成纤维细胞型，上皮细胞型，游走细胞型，多形性细胞型等）和悬浮型（Suspension Culture）（如某些癌细胞和血液白细胞等）。

组织培养根据培养的方法不同又分为：（1）初代培养或原代培养（Primary Culture）：由体内取出组织所进行的首次培养。

（2）细胞系（Cell line）：当原代培养细胞增殖达到一定密度后，则需要做继代培养或简称传代培养（Subculture），从开始传代以后的细胞群统称为细胞系。因细胞系来源于初代培养，初代培养细胞成份很多，所以一个细胞系也是由多个不同细胞群所组成的。（3）细胞株（Cell Strain）：为用单细胞分离培养法和克隆（Cloning）形成法从原代培养或从细胞系所选出的细胞株。（4）二倍体培养：为具有和原机体相同二倍体数的细胞群。

细胞在离体环境中生长，繁殖要求有适宜的温度、气体和氢离子浓度、基本营养物质、渗透压、生长刺激因子等。不同物种的生物有不同的要求：（1）温度：是细胞体外培养的基本条件之一，一般培养温度随动物的体温而定，哺乳类最适为 $36-38^{\circ}\text{C}$

细胞对低温比对高温耐受力强。（2）气体和氢离子浓度：培养中需一定氧气和二氧化碳。一般动物内环境为微碱性，细胞

最适pH7.2—7.4，如低于6.8或高于7.6时，则不利于细胞生长，偏酸环境比碱性环境更利于生长。（3）基本营养物质：培养基必须供给活细胞所需要的全部盐类、氨基酸、脂类、糖类、维生素等。细胞的培养基可分为不同的两类，即天然培养基和合成培养基。前者由动物的体液或组织衍生而来；后者的精确定义是溶于纯净水的某些物质的混合。（4）渗透压：溶于培养基的物质浓度所产生的等渗性必须与细胞外的液体一致。如果培养液是高渗的，细胞会失去水分并发生皱缩。如果培养基是低渗的，细胞就会吸收水分而膨胀。（5）生长刺激因子：如植物血球凝集素（*Phytohemagglutinin*，简称PHA）血清中的某些激素等。（6）无菌：培养基不能有微生物。否则这些微生物便会利用培养基中的适于他们迅速繁殖的良好条件，很快增殖起来，并破坏培养的活细胞。

组织培养的优点在于：（1）便于应用各种物理、化学和生物等外界因素探索和揭示细胞生命活动的规律；（2）便于应用各种不同的技术方法研究和观察细胞结构和功能的变化；（3）可长期研究和观察细胞遗传行为的改变；（4）可提供大量生物性状相同的细胞作为研究对象；耗费少，比较经济。以上几点是其它实验对象或方法不能与之相比的，也是组织培养法在生物学、医学、农业研究中得到广泛应用的原因。但是，组织培养也有其局限性，组织和细胞离体以后，独立生存在培养环境中，其细胞生物学性质必然会发生某些改变。因此在利用培养细胞做研究时，应力戒与体内细胞等同起来，或作出轻率的判断。

1、血培养

1·1、微量全血培养

1966年以前基本上按Moorhead等1960年建立的人体外周血白细胞培养技术。它的优点是方法比较完善，缺点是取血量多，手

续较麻烦。近十多年来国内外绝大多数均采用微量全血培养技术不但取血量少，而且可略去一些操作过程，如离心，分离血浆、计数等，既方便，也节省人力和物力，便于推广应用。

淋巴细胞培养基组成：包括人工合成培养液、血清、PHA、肝素，抗菌素等。人工合成培养液有很多种，一般常用的有TC, 199, Meccy 5 A、HamF—10、RPMI1640等，我们常用自配的Eagle's MEM和配制好的商品RPMI1640，它们较简单，效果也较好（配制见附录）。人工培养液在培养基中约占80%，血清一般采用胎牛血清约占20%，另加少许肝素（抗凝），抗菌素（防污染）和PHA。PHA是从豆子（四季豆、雪山大豆等）经盐水浸渍后提取的一种糖蛋白，能刺激体外淋巴细胞转化为淋巴母细胞，进一步进行有丝分裂，培养终止前数小时，加入适量秋水仙素（或秋水酰胺）使许多分裂细胞停止于中期，经过制片，则可以得到大量含染色体的标本。

通过人体细胞染色体的研究，可以分析某些先天性遗传病、癌病、放射效应，拟放射药物的作用，某些病毒感染的后果。也是研究人体遗传物质的复制、结构和功能等理论问题的基本方法之一。

微量全血培养不仅适用于人和哺乳动物染色体研究，稍加改变也适用于家畜、家禽、以及其它很多动物的染色体研究。

[试 剂 和 器 材]

[试剂]

RPMI1640（或Eagle's 液）；胎牛血清；肝素；dHA；青；链霉素；5%NaHCO₃；2%碘酒；75%酒精；2微克/毫升秋水仙素（或10微克/毫升秋水酰胺）；以上试剂配制见附录

[器材]

- (1) 手套箱（内安装紫外线灯管）；
- (2) 恒温箱（37.5°C）；
- (3) 5毫升移液管；
- (4) 链霉素瓶（或25毫升组织培养方瓶）；

- (5) 100毫升血浆瓶;
- (6) 1毫升、2毫升注射器;
- (7) 50毫升量筒;
- (8) 烧杯(100毫升);
- (9) 采血针或三棱针;
- (10) 棉签, 剪刀;
- (11) 镊子;
- (12) 精密试纸;
- (13) 特种铅笔;
- (14) 记录本。
- (3) — (11) 项器材均需高压灭菌。

[实验材料] 人或家猪染色体制片。

[操 作 方 法]

一、配制培养基:

(1) 将无菌室紫外线灯开启0.5—1小时, 刷洗手, 穿上无菌衣, 换鞋进入无菌室, 开启手套箱内紫外线灯10—20分钟, 用75%酒精擦洗手和各种试剂瓶, 然后将Eagle's液(或其它培养液)、血清、肝素、青、链霉素, PHA等移入手套箱内。

(2) 用量筒量取 Eagle's 液 40毫升
血清 10毫升

用1毫升注射器吸取 肝素 0.3毫升
PHA 0.4毫升

青、链霉素 0.3毫升(各100单位/毫升)

(3) 混匀后吸1滴测pH, 如较低, 可加5% NaHCO_3 , 调整到pH6.8—7.0

(4) 用5毫升吸管分装每小瓶5毫升, 用胶布封口。

二、采血:

用肥皂和水洗净供血者之手, 再用2%碘酒。75%酒精拭擦指尖, 用无菌吸管吸血约0.2—0.3毫升移入培养瓶, 轻轻摇动,

使血与培养液混匀即可培养,或用2毫升注射器,7号针头,先吸取肝素少许,润湿针筒,从肘静脉采血1—2毫升,每个培养瓶接种全血0.3毫升左右。家猪从前腔静脉采血。

三、培养:

在37.5°C温箱中培养66—68小时,培养终止前6—10小时加秋水仙素(2微克/毫升,用5号针头加3—4滴),使最终浓度为0.01—0.02微克/毫升,或采用秋水酰胺(10微克/毫升,用5号针头加2—3滴),效果也好。

参 考 资 料

(1) 人类遗传学原理〔美〕C、斯特恩著、吴旻译、附录II550—563页,科学出版社1979。

(2) Schwarzscher, H. G. and walf, Ueds(1974),
Methods in human Cytogenetics,
springer, verlag.

1·2、一种快速、简便分离和培养家畜白细胞制备染色体的方法

〔试 剂 和 器 材〕

〔试剂〕

(1) Ficoll—(Hypaque) 梯度溶液。

① 9克Ficoll(分子量10万左右),加120毫升蒸馏水,高压灭菌(10磅,20分钟)。

② 50%(W/V) Hypaque 钠溶液。

③ 10% Hypaque(含6% Ficoll)混合液:取30毫升50%(W/V) Hypaque 钠溶液加到(1)溶液里。

(2) 肝素溶液(8毫克/毫升)。