

全国产前诊断羊水染色体技术学习班

人类染色体方法学手册

高锦声 郑斯英 等编
陈嘉政 殷雪瑞

江苏省医学情报研究所

一九八〇年四月

前 言

染色体(Chromosome)是遗传物质的载体。近10多年来,人类染色体的研究进展较快,主要是采用了新的现代的细胞遗传学方法,这不仅极大地加深了人们对染色体的认识,而且推动了医学的发展。目前,人类染色体的研究已应用于临床医学的各个方面,通过研究能为某些疾病的病因、发病机制、诊断、治疗、预防和预后等提供科学的依据。因此越来越引起人们的重视。

开展染色体的研究工作,关键的问题之一,是方法学。目前虽然国内关于染色体标本的制备技术文献亦有多篇,但大多散见于各种刊物,而且对初次建立方法时,仍感这些资料有关细节描述不够,工作中还会遇到不少困难。毫无疑问,开展染色体的研究工作,方法学的建立,已是当前非常迫切需要解决的问题。

根据1979年中国遗传学会人类和医学遗传学委员会全国产前诊断协作组的学术活动计划。为了预防严重危害我国人民健康的先天畸形和遗传性疾病,推动计划生育工作的开展。1980年我省受卫生部委托由南京市妇幼保健院负责组织“全国产前诊断羊水染色体技术学习班”,以培训产前诊断技术人员和交流经验。现将我们的教学、科研和实验室工作并参阅国内外有关资料,编写“人类染色体方法学手册”作为“全国产前诊断羊水染色体技术学习班”的教材,亦可供兄弟单位开展染色体研究时参考。

本手册是在苏州医学院“人类染色体方法学”(研究生实验室技术试用教材)讲义试用后的基础上,广泛地征求各方面的意见,进一步作了全面的修改而完稿。全书分三部份,第一部份人

类染色体研究的实验室建设，第二部份人类染色体标本的制备方法，第三部份人类染色体的识别与核型分析，最后附录中，有产前诊断羊水细胞培养的专题资料。本手册是在江苏省卫生局直接领导下，由苏州医学院高锦声老师郑斯英老师和南京市妇幼保健院陈嘉政院长殷雪瑞技师等编写。常州市第二人民医院苏世芳主任以及陈一鸣、李以明、徐梅玉和沈惠觉等老师、医师和技术人员参加部份编写工作。上海第一医学院医学遗传学研究室周焕庚老师和中国科学院遗传研究所周宪庭老师审阅。常州市第二人民医院和常州市人民印刷厂承印。

由于我们的政治思想和专业水平不高，加之我们染色体方面所做的工作不多，经验不足，错误之处难免，衷心希望读者批评指正。

编 者

1980.1.于苏州

目 录

第一部份 人类染色体研究的实验室建设.....	(1)
一、设备和器材.....	(1)
(一)实验室.....	(1)
(二)器材.....	(2)
二、培养液及其它试剂的配制.....	(5)
(一)RPMI—1640 营养液.....	(5)
(二)M199	(8)
(三)Eagle 液.....	(11)
(四)F ₁₀	(12)
(五)Hanks液.....	(15)
(六)植物血凝素 (PHA) 的提取.....	(16)
(七)小牛血清.....	(17)
(八)肝素.....	(18)
(九)抗菌素.....	(18)
(十)秋水仙素.....	(19)
(十一)外周血细胞培养液.....	(19)
(十二)骨髓细胞培养液.....	(20)
(十三)单层细胞培养液.....	(20)
(十四)生理盐水.....	(20)
(十五)0.02% 乙二胺四乙酸二钠溶液.....	(20)
(十六)氯化钠、枸橼酸钠(SSC)的配制.....	(21)
(十七)0.4%酚 红液.....	(21)

(十八) 0.25%胰蛋白酶溶液	(21)
(十九) 低渗液	(22)
(二十) 固定液	(22)
(二十一) 染色液	(22)
(二十二) 清洁液	(23)
(二十三) D-11显影液配方	(23)
(二十四) D-72显影液配方	(24)
(二十五) F-5酸性坚膜定影液配方	(24)
(二十六) 显、定影药的有关事项	(25)
三、各类器械和玻璃用具的清洗与灭菌	(26)
第二部份 人类染色体标本的制备法	(28)
一、外周血染色体标本的制备法	(28)
二、微量血染色体标本的制备法	(31)
三、骨髓染色体短期培养法	(32)
四、皮肤染色体标本的制备法	(33)
五、羊水细胞染色体标本的制备法	(35)
六、绒毛培养及其染色体标本的制备法	(39)
七、实体瘤细胞染色体标本的制备法	(39)
八、胸腹水细胞染色体标本的制备法	(40)
九、X染色质标本的制备法	(41)
十、鼓槌标本的制备法	(44)
十一、Y染色质标本的制备法	(44)
十二、Q分带染色体标本的制备法	(45)
十三、G分带染色体标本的制备法	(47)
十四、C分带染色体标本的制备法	(48)
十五、姐妹染色单体互换标本的制备法	(49)
十六、高分辨的染色体标本的制备法	(49)

第三部份 人类染色体的识别与核型分析.....	(52)
一、人类染色体的形态结构与常规染色体的识别	
.....	(52)
(一)人类染色体的一般形态结构.....	(52)
1. 细胞分裂	(52)
2. 人类染色体的形态结构.....	(53)
(二)人类染色体的组型和核型.....	(55)
(三)人类染色体常规染色体的命名和识别.....	(55)
1. 丹佛常规染色体体制	(55)
2. 单个染色体的识别	(56)
二、人类正常分带染色体的识别.....	(63)
(一)人类染色体分带的类型.....	(64)
(二)人类染色体分带的命名法.....	(65)
(三)人类染色体各条分带染色体的识别.....	(67)
三、人类异常染色体的识别.....	(74)
(一)染色体数目的异常.....	(74)
(二)染色体结构的异常.....	(75)
(三)细胞株嵌合异常.....	(78)
四、人类染色体的核型分析.....	(78)
五、染色体核型的表示法.....	(82)
附录:	
附录一: 染色体检查记录表格.....	(86)
附录二: 产前诊断羊水细胞培养专题资料.....	(91)

第 一 部 份

人类染色体研究的实验室建设

一、设备和器材：

开展人类染色体实验室工作，应具有一定的设备和器材，现简述如下：

(一)实验室：

实验室的大小，应根据从事该研究内容、工作人员和设备的多少，并根据各单位实际情况具体安排，一般应考虑设置总面积100平方米左右最为适宜。可分七室。

1. 办公室(兼资料室)：约 24m^2 ，供显微观察和分析、整理资料、接待来访、研究教学等。

2. 准备室(仪器室)： 25m^2 ，为实验室主要的工作场所，除放置温箱、烘箱、冰箱、离心机、天平等有关仪器外还备有药橱和其它橱柜放置玻璃器皿，各种实验室的日常应用物品。室中央设操作台，以供实验操作作用。

3. 无菌室：供无菌操作作用连同缓冲室约 $12-14\text{m}^2$ ，室内备有紫外线光源、电源等设备，有条件的单位应装有空调器以调节室内温度。

4. 消毒室：约 $10-12\text{m}^2$ ，供洗涤、灭菌以及处理玻璃器皿等用，应备有自来水管导，并应设有耐酸硷溶液的水槽，各种清洁贮缸等。

5. 照像室： $10-12\text{m}^2$ ，安置显微照像设备，有条件的单位

可设置万用显微镜一台。

6. 暗室: 6 m^2 , 备有放大机、翻拍机、上光机、印像机等, 供冲洗胶卷、印象、放大之用。

7. 贮藏室: 6 m^2 , 放置备用药品、杂物等。

(二) 器材

1. 大型器材:

(1) 电动离心机: 目前市场供应种类很多, 而我们备有转速为 $0-4000$ 转/分, 用四管时每管容量为 50 ml , 用12管时, 每管容量为 10 ml 的水平式离心机一台。如需自制血清, 则尚需购置转速为 $0-4000$ 转/分, 四管, 每管容量为 $250-300\text{ ml}$ 的水平式离心机一台。

(2) 架盘天平和分析天平。架盘天平购置2台, 应放在离心机附近, 以便及时称量离心管的重量以保证两管的重量相等。分析天平, 其精确度应达到 $1/\text{万克}$, 并应有固定的坐台, 避免随便移动, 以影响精确程度。

(3) 冰箱: 主要用于短期保存血清、培养液、药品等, 温度保持在 $0\sim-10^{\circ}\text{C}$ 。

(4) 电热恒温培养箱: 一般有隔水式和非隔水式二种, 隔水式温度比较恒定可作为培养细胞用, 非隔水式的升温比较快, 可用于低渗液的升温和干燥玻片标本等。

(5) 电热恒温干燥箱: 以中型的较合适, 因为干燥灭菌时温度需要达到 160°C , 故一般应购置能升温到 300°C 的较安全适用。

(6) 有机玻璃操作箱: 主要用于无菌操作, 目前市售种类较多, 以A型中号单人操作式较宜, 分操作室、备用室, 进气装置、排气装置、排水装置、搁板装置、紫外线灯和照明装置, 并以乳胶科研手套作为操作系统的主要工具, 目前在没有无菌室的单位, 可以用有机玻璃操作箱代替。

(7) 高压蒸气灭菌器：以电热恒温式较好。

(8) 电热煮沸消毒器：可作一般小器械，玻璃器皿的煮沸消毒用，目前市售种类较多，可选用“三用水箱”，它除用作电热煮沸消毒外，还具有电热恒温水浴锅、电热恒温水箱的作用。

(9) 低温冰箱：有条件的单位可备有低温冰箱，目前市售有水冷和气冷两种，水冷的降温效果较好，作为一般培养基、血清等的低温保存，有气冷的可达 -40°C 的冰箱就够用了。

(10) 蒸馏器：在制备培养基时，所用三蒸馏水必须用玻璃蒸馏器，将蒸馏水再蒸馏1—2次，最好是用石英蒸馏器。

(11) 磨粉机：国产铁制品，用于粉碎菜豆种子等。

(12) 酸度计：测定各种液体的酸碱度，又称为氢离子测定计或pH计。

(13) 显微镜：是从事染色体研究的必备工具，应配备每一研究人员一台，固定使用，应配置目镜 $5\times$ 、 $10\times$ 、 $13\times$ ；物镜、 $8\times$ 、 $20\times$ 、 $40\times$ 、 $100\times$ ；还要配备带刻度的移动尺。

(14) 荧光显微镜：在开展Q分带及Y小体等检查时，必须有荧光显微镜，国内已有成套设备生产。也可购置一台国产的荧光光源。

(15) 显微照像设备：进行核型分析的必备工具，进口的价格昂贵，但质量较满意，近年来国内已有生产、质量在提高中。此外尚需购置印象机、放大机、翻拍机、上光机等照像设备。

(16) 玻璃除菌滤器：因细胞培养液不能用高压灭菌，必须用玻璃除菌滤器（应备G5、G6型）除菌，一般应设置2—3套。

(17) 真空泵：是玻璃除菌滤器对各种溶液进行除菌时的必备工具，可购置压力2.5公斤的真空泵。

(18) 水浴箱：电热恒温双孔水浴箱、用于水浴加温。

(19) 超级恒温水浴箱：用于调控溶液温度，作染色体标本的各种显带处理时使用。

2. 小型器材：常用的小型器材有

(1) 剪：应配置各种直的、弯的、平头的、尖头的剪刀若干把。

(2) 刀：普通的解剖刀若干把。

(3) 镊子：中等大小的、直的、弯的、有齿的、无齿的各种类型镊子若干把。

(4) 钳子：普通外科手术用的直的、弯的止血钳若干把。

(5) 试管架：用于安插试管、离心管等。

(6) 橡皮塞：应选用质量好的用硅橡胶、纯树胶橡胶制的普通橡皮塞和反口橡皮塞。

(7) 清洗桶：配制和贮藏洗涤液用陶磁桶，贮藏新洁而灭，来苏等可用搪瓶桶。

(8) 酒精灯：用于封口灭菌等。

(9) 铝锅：用于肥皂煮沸玻璃器皿等。

另外需购置搬手、起子、钢丝钳、锤子、试电笔等修理工具。

3. 玻璃器皿：

应选用中性硬质的硼硅酸盐的玻璃制品

(1) 培养瓶：根据所培养物的不同选用不同容量的培养瓶。我们一般培养外周血、骨髓、胸腹水等用10ml链霉素瓶或14ml的水杨酸钠的空园瓶。培养羊水、绒毛、皮肤等用25ml的方瓶（用于贴壁生长型细胞的培养）。

(2) 试管：用于细胞培养，离心等。

(3) 离心管：5—10ml，用于沉降细胞等。

(4) 贮水瓶：5000—20000ml玻璃瓶，用于贮备蒸馏水和各

种溶液。

(5) 试剂瓶：30—500ml 无色或棕色瓶，用于贮备各种试剂。

(6) 研钵：容量20—500ml，用于研磨有关染料等。

(7) 量筒：容量5—1000ml，用于量取各种溶液。

(8) 吸管：容量1—20ml，用于量取各种溶液等。

(9) 烧杯：容量5—5000ml，用于盛装加温各种溶液等

(10) 载玻片：制作染色体等标本用。

二、培养液及其它试剂的配制：

在进行染色体研究中，所用的蒸馏水应为双或三蒸水，蒸馏水必须用玻璃制品贮放，所用的试剂必须为分析纯制品。

(一) RPMI—1640 营养液

1. 液：

(1) L—精氨酸(L—Arginine)	200mg
(2) L—组氨酸(L—Histidine)	15mg
(3) L—盐酸赖氨酸(L—Lysine hydrochloride)	40mg
(4) L—色氨酸(L—Tryptophane)	5mg
(5) L—苯丙氨酸(L—Phenylalanine)	15mg
(6) L—丝氨酸(L—Serine)	30mg
(7) L—蛋氨酸(L—Methionine)	15mg
(8) L—亮氨酸(L—Lencine)	50mg
(9) L—异亮氨酸(L—Isoleucine)	50mg
(10) L—缬氨酸(L—Valine)	20mg
(11) L—苏氨酸(L—Threonine)	20mg
(12) L—谷氨酸(L—Glutamic acid)	20mg
(13) L—天门冬氨酸(L—Aspartic acid)	20mg

(14) L-脯氨酸(L-Proline)	20mg
(15) L-羟脯氨酸(L-Hydroxyproline)	20mg
(16) L-甘氨酸(L-Glycine)	10mg
(17) L-谷氨酰胺(L-Glutamine)	300mg
(18) L-天门冬酰胺(L-Asparagine)	50mg

按以上顺序溶于200ml三蒸水中，待前一种溶解后再加入第二种，以免产生沉淀。如遇难溶解物质，可在60°C水浴中加温助其溶解。

2. 液

(19) L-酪氨酸(L-Tyrosine)	20mg
(20) L-胱氨酸(L-Cystine)	50mg

按顺序溶于300ml 0.075N HCl的三蒸水中，胱氨酸不易溶解，可置60°C水浴中，摇动助其溶解，配好后放在室温中，因为在冰箱中易产生沉淀，最好现用现配。

0.075 N 盐酸的配制方法：取1.89ml的12N HCl溶于300ml三蒸水中即成。

3. 液：

(21) 菸酰胺(Nicotnamide)	1mg
(22) 盐酸硫胺素(B ₁) (Thiamine HCl)	1mg
(23) 核黄素(B ₂) (Riboflavin)	0.2mg
(24) 盐酸吡哆醇(B ₆) (Pyridoxine HCl)	1mg
(25) 维生素B ₁₂ (Cyanocobalamin)	0.005mg
(26) 泛酸钙(Calcium pantothenate)	0.25mg
(27) i-肌醇(i-inositol)	35mg
(28) 对氨基苯甲酸(Para-Aminobenzoic acid)	1mg
(29) 氯化胆碱(Choline chloride)	3mg

按顺序溶于20ml 三蒸水中，保存于冷暗处。

4. 液

(30) 生物素(Biotin) 0.2mg

先溶于7.5ml三蒸水中，再加0.1ml 1N盐酸，再加三蒸水至20ml，保存于4°C冰箱中。

5. 液

(31) 叶酸(Folic acid) 1mg

溶于20ml 1N NaOH中，保存于4°C冰箱中。

6. 液

(32) 谷胱甘肽(还原型) (Glutathione reduced) 1mg

溶于10ml 三蒸水中，此氨基酸不稳定，配后三天内使用，最好现用现配，保存于4°C冰箱中。

7. 混合：

① 将2液放入大烧瓶中，按下列顺序将NaCl 6000mg、KCl 400mg、MgSO₄ 100mg加入2液中。

② 将Na₂HPO₄·7H₂O 1512mg溶于50ml三蒸水中，再加50ml三蒸水。

③ 将②加入2液中。

④ 将葡萄糖2000mg溶于100ml三蒸水中，加入0.4%酚红5ml，再加50ml三蒸水。

⑤ 将④加入2液中。

⑥ 将Ca(NO₃)₂·4H₂O 100mg溶于100ml三蒸水中，在不加热下使其完全溶解。

⑦ 将⑥慢慢加入2液中，边加边搅动，以免产生沉淀，不能加热。

⑧ 将4、5、6、3液依次加入2液中。

⑨ 将1液慢慢加入2液中。

⑩ 加三蒸水至1000ml。

⑪ 加入青霉素10万单位，链霉素10万微克。

⑫ 用G5或G6玻璃滤器除菌，分装保存于4℃冰箱或低温冰箱中。

⑬ 使用时用3.5% NaHCO_3 调至 $\text{pH}7.2 \pm$

* 配制时氨基酸用dL型。

(二) M199

先配成15种干液（按1.8升量计算）

干液一

精氨酸1.26克，组氨酸0.36克、赖氨酸1.26克，色氨酸0.36克，苯丙氨酸0.9克，蛋氨酸0.54克、丝氨酸0.9克、苏氨酸1.08克、亮氨酸2.16克、异亮氨酸0.72克、缬氨酸0.9克、谷氨酸2.7克、天冬氨酸1.08克、丙氨酸0.9克、脯氨酸0.72克、羟脯氨酸0.18克、甘氨酸0.9克、谷氨酰胺1.8克及水杨酸钠0.9克。

依次溶于100毫升蒸馏水中，必须等第一种完全溶解后再加第二种。如遇有不易溶化者，可置于60℃水浴中溶解。

干液二

酪氨酸0.72克，胱氨酸0.36克。依次溶于360毫升0.075 N 盐水中，胱氨酸不易溶解，可置于60℃水浴中半小时即溶，配成后放于室温内。

干液三

尼克酸2.5毫克、尼克酰胺2.5毫克，吡哆醇2.5毫克、吡哆醛2.5毫克、硫胺1.0毫克，核黄素1.0毫克，遍多酸钙1.0毫克、肌醇5.0毫克、对氨苯甲酸5.0毫克、氯化胆碱5.0毫克。按次溶于20毫升蒸馏水，保存于冰箱。

干液四

生物素1.0毫克、溶于7.5毫升双蒸水中，再加0.1毫升1 N 盐酸，最后加双蒸水到10毫升，保存于4℃。

干液五

叶酸1.0毫克，溶于10毫升双蒸水，保存于4°C。

干液六

骨化醇2.0毫克、胆固醇4.0毫克、先将骨化醇溶于4毫升的95%酒精，再加胆固醇，用力振荡溶化，再加5% Tween 80水溶液6毫升，保存于室温。

干液七

磷酸生育酚二钠1.0毫克，溶于10毫升双蒸水，保存于4°C。

干液八

维生素K1.0毫克、溶于10毫升蒸馏水，振荡或加温(37°C)溶化、保存于4°C。

干液九

硫酸腺嘌呤0.18克，溶于20毫升蒸馏水，稍稍振荡，再加0.025毫升浓 NH_4OH ，在室温内保存。临用时配。

干液十

黄嘌呤10.0毫克、次黄嘌呤10.0毫克，胸腺嘧啶10.0毫克，二氧嘧啶10.0毫克溶于100毫升蒸馏水。先于瓶内加0.35毫升浓 NH_4OH ，在60°C水浴中溶化。

干液十一

鸟嘌呤 HCl 5.4毫克溶于50毫升蒸馏水，并加0.15毫升浓 NH_4OH ，加蒸馏水到54毫升，火焰加热溶化。

干液十二

核糖10毫克，去氧核糖10毫克溶于10毫升蒸馏水，保存于4°C。

干液十三

腺苷酸10毫克溶于10毫升蒸馏水，保存于4°C。

干液十四

$\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 1.45毫克溶于10毫升蒸馏水，保存于 4°C 。
干液十五，不稳定，配后三天内可用

1. 半胱氨酸 HCl 10 毫克，谷胱甘肽 5 毫克，抗坏血酸 5 毫克，依次溶于50毫升蒸馏水中。

2. 维生素A结晶100毫克，95%酒精1毫升，5% Tween 80 水溶液10毫升。

以上二液混合成干液(1、2)。

3. 三磷酸腺苷200毫克(95% ATP)，溶于干液(1、2) 20毫升中，然后用玻璃滤器滤过。

上液各干液的混合

① 在容量为2升的三角烧瓶内加360毫升“干液二”，

② 加 NaCl 140克，

③ 加“干液十”及“十一”各54毫升，

④ 加 KCl 7.2克，

⑤ 加 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 3.6克；

⑥ 将 KH_2PO_4 1.08克溶于100毫升蒸馏水中，再加2.7克 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ，加蒸馏水到200毫升；

⑦ 将“干液六”倒入三角烧瓶。

⑧ 将葡萄糖18克溶于100毫升蒸馏水中，然后加酚红0.36克，加蒸馏水到200毫升。

⑨ 将“干液八”倒入三角烧瓶，

⑩ $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 3.31克溶于300毫升蒸馏水，将“干液十”溶后徐徐注入三角烧瓶中，并加以振动。

⑪ 取“干液三” 3.6毫升，“干液四” 1.8毫升，“干液五” 1.8毫升，“干液六” 9 毫升，“干液七” 1.8毫升，“干液八” 1.8毫升，“干液十二” 9 毫升，“干液十三” 9 毫升，“干液十四” 0.18毫升于三角烧瓶；

⑫ “干液九” 20毫升，加热溶化，注入三角烧瓶内；

⑬ 加青霉素(10,000单位/1毫升)及链霉素(10,000毫微克/1毫升)各9毫升；

⑭ 上述各液，依次溶化后加入，加毕用滤纸过滤；

⑮ 慢加“干液一”；

⑯ 加蒸馏水到1.8升，在4°C过夜，玻璃滤器滤过，然后按需要分装之，保存于4°C。

(三)Eagle液的配制

甲液：L—精氨酸	87.1毫克
L—组氨酸	39.0毫克
L—异亮氨酸	131.0毫克
L—亮氨酸	131.0毫克
L—赖氨酸	146.1毫克
L—苯丙氨酸	82.6毫克
L—苏氨酸	119.2毫克
L—缬氨酸	117.1毫克

依次于一种溶剂后，再加另一种，共溶于50毫升蒸馏水中。
10磅20分钟高压灭菌，冰冻保存。

乙液：L—胱氨酸	6.0毫克
L—甲硫氨酸	3.75毫克
L—酪氨酸	9.1毫克

依次于一种溶剂后，再加另一种，共溶于50毫升蒸馏水中。
10磅20分钟高压灭菌，冰冻保存。

丙液：L—谷氨酰胺	1.46克
-----------	-------

溶于50毫升蒸馏水中，G5漏斗过滤灭菌，冰冻保存。

丁液：

硫胺(VitB ₁₂)	1.7毫克
-------------------------	-------