

# 染色体的研究方法

李俊凤 李玉环 编译

(中国科学院生物物理研究所)

在人染色体的研究中，经常采用的方法是组织培养法和前处理气干法等。各种新技术的

开发和运用，使人染色体的研究获得了迅速的发展。就人和哺乳动物染色体的研究方法而言，

由于研究材料和研究方法的不同,其使用的研究方法也不尽一致,而且各种方法经人们的不断改良又产生了不少新法,因此要作染色体研究方法的全面论述很不容易。在此仅就一些过去已发表过的,特别是以人染色体为中心的通用的研究技术介绍如下。

## 一、组织及血液培养法

在染色体的研究过程中,最重要的是细胞的繁殖,而细胞培养法则充分满足了细胞繁殖的条件。为了叙述简便,仅对为研究染色体而使用的培养方法加以叙述。一切操作都要在无菌条件下进行,器械和药品都要严格消毒。在实践中,最好先让有经验的人加以指导或在已有的实验室中实习一下,练练技术。只按一般教科书上的介绍进行实验至少对初学者是不充分的。

**培养前的准备工作**要求十分严格:

**器具:** 干热灭菌器,高压消毒器,恒温箱,CO<sub>2</sub> 恒温器,电冰箱,离心机,倒置显微镜过滤灭菌装置,离心用具,干燥箱。

**清洗、消毒:** 使用酸、碱或洗涤剂及洗液等清洗。用自来水洗八次以上,用蒸馏水冲洗3—4次。干燥后放入灭菌箱,烤干或高压消毒。烤干时温度要在160℃以上。约60—90分钟,高压消毒(压力为1kg/cm<sup>2</sup>)需时15—30分钟。

**培养液:** 常用的是市售 Eagle ↔ MEM, TC ↔ 199, F<sub>12</sub>。MEM溶于蒸馏水,高压灭菌,加10%的碳酸氢钠(无菌)调pH。调好pH之后加上谷氨酰胺使用。TC ↔ 199, F<sub>12</sub>呈粉末状,用时过滤灭菌。

**血清:** 培养时,在培养基中加10—20%的小牛血清。消过毒的血清有市售的,但要大量使用,可从屠宰场购牛或马的血液,自己分离血清。

**植物血球凝集素(phytohemagglutinin, PHA):** 有 Difco 和 Wellcome 等公司的制品, Difco 公司的 PHA 有 M 和 P 两种型号, P 的用量为 M 的 1/10。用无菌蒸馏水配制。用 P 时配

成 50ml 溶液冷冻保存。也可用鸡子豆(广东产)等以生理盐水自行抽提植物血球凝集素。

**肝素:** 用培养液或生理盐水将肝素钠浓度配成 100 单位/ml 或 500 单位/ml,保存使用。

**秋水仙素(秋水仙碱, Colchicine“Ciba”):** 配成 50μg/ml 的浓度保存。乙酰甲基秋水仙碱(秋水仙胺, Colcemid“Ciba”)对细胞毒性更小,且用量可减少至 1/10,很适用。

**胰蛋白酶溶液(trypsin):** 一般所用的胰蛋白酶溶液的浓度为 0.25%。取 2.5g 胰蛋白酶(Difco, NBC 制品),以不含 Ca 和 Mg 的 2—3 ml 缓冲液将其调成糊状,加上不含 Ca 和 Mg 的 pH 为 7.8 的缓冲液 1 升,在 4℃ 或室温下用磁力搅拌器搅拌溶解,变成透明的液体,过滤灭菌,分装小瓶,在 -20℃ 下冻结保存。缓冲液用 NaCl 8.0g, KCl 0.2g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.15g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.2g 加 1 升蒸馏水溶解而成,高压灭菌。

**吉姆萨染液(Giemsa stain):** Giemsa 粉剂 1 克,甘油(A. R)66 毫升,甲醇(A. R)66 毫升。先将 1 克 Giemsa 粉剂溶在少量甘油中研磨,直至无颗粒时再加入全部甘油,放入 56℃ 温箱内 2 小时,此后再加入甲醇,密封棕色瓶内备用。使用前必需用 1/15mol 磷酸缓冲液稀释 10—20 倍。

**氯化钾低渗透液:** 用 0.075mol/L 的溶液。把 2.8g 氯化钾溶于 500ml 蒸馏水,室温保存。

**Dulbecco 磷酸盐缓冲液:** 用来清洗细胞和组织。将下述溶液 1, 2, 3 分别高压灭菌,冷却后混合。

(1) 液: NaCl 8.0g, KCl 0.2g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.15g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.2g, 蒸馏水 800ml。

(2) 液: CaCl<sub>2</sub> 0.1g, 蒸馏水 100ml。

(3) 液: MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O 0.1g, 蒸馏水 100 ml。

**林格氏(Ringer's)液:** 将 NaCl 6.5g, KCl 0.14g, CaCl<sub>2</sub> 0.12g NaHCO<sub>3</sub> 0.2g 加在 1 升蒸馏水中,溶解后高压消毒。

**1. 外周血液培养法** 此法系由 Hungerford 发明,后由 Moorhead 等人确定的标准方法,也是广泛通用的方法。

1) 用含有 0.1ml 肝素(1000 单位/ml) 的注射器取 5—10ml (或 1—4ml) 的静脉血, 轻轻振动, 使血液和肝素充分混合, 慢慢地移入试管, 加塞盖严静置 30 分钟到 1 小时, 使红血球和含有白血球的血浆分开。

2) 用注射器吸取分离的上清液——血浆, 移入培养皿(器), 加上 3—5 倍的培养液。培养液可用 TC-199 或者 Eagle (谷氨酰胺和碳酸氢钠), 现在常用现成培养液 1640。为了防止细菌的繁殖可预先在培养液中加入青霉素和链霉素(青霉素浓度: 50,000 Iu/L, 链霉素浓度: 0.05g/L), 另外再加入胎儿血清或小牛血清(血清成分约占 20—30%)。例如, 配制 10ml 的此类溶液, 可加 2ml 血浆, 1 ml 牛血清和 7ml 培养液。

3) 每 10ml 培养液中需加 0.1ml PHA。

4) 标本的制作: 培养 2—3 天后加入秋水仙素, 最终浓度为  $0.4\mu\text{g/ml}$ ; 也可使用乙酰甲基秋水仙碱最终浓度为  $0.04\mu\text{g/ml}$ 。在  $37^\circ\text{C}$  温箱中处理 2 小时, 然后移入离心管, 用 1000rpm 转速离心 5 分钟, 除去上清液。

5) 低渗处理: 可用水、蒸馏水和盐溶液等进行低渗处理。近来, 一般采用 0.6—1.0% 的枸橼酸钠 (Sodium Citrate), 或者加 2 倍体积的  $0.075\text{mol/L}$  的氯化钾作低渗液, 处理过程中的温度为  $37^\circ\text{C}$ , 时间约 20 分钟。

6) 固定: 低渗处理后离心 (转速 1000 rpm) 5 分钟。弃去上清液加入固定液。固定常用卡诺固定液, 其配方为: 纯甲醇 3 份加冰醋酸一份。在加入固定液之前轻轻摇动试管, 使细胞充分扩散后徐徐加入固定液, 这样可使细胞固定均匀, 固定 5—10 分钟后, 离心 5 分钟换新固定液, 放置 5—10 分钟, 如此反复固定 2—3 次, 然后进行干燥。

7) 干燥: 使细胞悬浮于少量固定液中, 再将此悬浮液滴在冰冷的载玻片上 (每张载玻片可滴 1—2 滴), 让其自然干燥或者火焰干燥。

8) 染色: 把干燥的载玻片浸入缓冲液冲稀, 再在 10—20 倍体积的吉姆萨液中, 染色 10—30 分钟, 水洗, 清除多余的染液, 自然干

燥。

9) 树胶封固: 用加拿大树胶或合成封剂封固, 加盖片或不加盖片均可, 但加盖片便于保存。

**2. 微量血液培养法** 直接用全血培养的方法称为微量血液培养法。此法本身与末稍血液培养法相同。

取 0.2—1.0 ml 血液放入 5—10 ml 培养液 (含有 20% 牛胎儿血清和 10 u/ml 的肝素) 中, 加上 0.1ml PHA, 在  $37^\circ\text{C}$  温度下培养。培养三天后, 用秋水仙素, 低渗液处理, 干燥后放入吉姆萨液中染色。

中达(日本, 1968)培养法: 取无菌的直径为 1.0mm、长度为数 cm 的毛细管, 吸入少量肝素, 用它取一管左右的耳朵等部位的毛细管血, 放在 1.5—2.0ml 的培养液中培养。培养液使用 TC-199, 使用前预先加入大约 20% 的小牛血清。

### 3. 脾、淋巴组织培养法

从人工流产或死产胎儿身上取脾组织 (约  $3\text{cm}^3$ ), 用 Hank's 液充分洗涤, 剪碎组织放入离心管, 加入适量的含 20% 的牛血清和 2% PHA 的培养液。用吸管冲吸数次, 使组织块解离、细胞分散, 将离心管静置几分钟, 使大组织块下沉, 取上清液放入培养液中, 在  $37^\circ\text{C}$  下培养 3 天。培养材料经秋水仙素、低渗液处理后, 用固定气干法制作载玻片, 用吉姆萨液染色。

### 4. 皮肤组织培养法

这是用皮肤组织培养成纤维细胞的方法, 适于特殊目的研究, 步骤如下:

1) 用钳子夹起经酒精消毒过的皮肤, 用解剖刀轻轻切下一小块, 放在加入抗生素的培养液中洗净, 然后切成或剪成 1 毫米以下见方的小块。

2) 在培养液中加几滴鸡胚渗出液和雏鸡血浆(可以自制, 也可购买), 充分混合后, 在瓶的底部和侧部形成一层薄的被膜。将切成的皮肤组织块适当地摆在膜上, 静置 30 分钟到 1 小时, 组织块便可附着在培养瓶上。

3) 待组织块附着凝固后, 慢慢地加入掺有

浓度为 15—20% 小牛血清的 TC-199 培养液,液面要高于组织块,放在 37°C 下培养(用静置法或旋转法均可)。

4) 通常在培养 3—4 周(两周以上)后可得分裂细胞。在培养过程中要经常检查细胞增殖情况,不断加入新鲜液或更换新液。

5) 培养结束,用秋水仙素(或用乙酰甲基秋水仙碱 25—50  $\mu\text{g/ml}$ ) 处理 8—12 小时,弃去液体,换上 5ml 左右的 37°C 的胰蛋白酶,浓度为 0.2% (配在无 Ca, Mg 的 Hank's 液中),或 Rinaldini 氏液,放置 10—20 分钟后细胞开始从管壁上脱落下来,为了使细胞脱离完全,最好加以摇动。其后,加成倍的培养液,放在离心机上离心收集细胞(转速 1000 rpm, 5 分钟)。将这些细胞用低渗液处理(氯化钾溶液, 20 分钟),固定后在载玻片上气干,用吉姆萨染色。

Rinaldini 液的组成: NaCl 8.0g, KCl 0.2g,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0.05 g, 葡萄糖 1.0g,  $\text{NaHCO}_3$  1.0g, 枸橼酸钠 0.67g, 蒸馏水 1000ml, 胰蛋白酶 1.5g。

### 5. 胎儿组织培养法(一)

此法多用于胎儿先天性异常和流产胎儿的染色体检查。在技术方面与培养成纤维细胞的皮肤培养法相同。

1) 在无菌条件下从胎儿身上取组织块,用 Hank's 液充分洗涤、切碎、移入培养液。因为胎儿组织粘性较大,故在玻璃面上不用血浆膜。

2) 30 分钟到 1 小时后徐徐加入培养液(内含 20% 的小牛血清),在 37°C 下静置培养。一般培养一周左右便可得到适于研究的细胞。用秋水仙素处理,离心(1000rpm, 5 分钟),低渗液处理(KCl 液, 20 分钟),固定,干燥,吉姆萨染色。

附记: 用胰蛋白酶溶液分离组织块的细胞,获得的细胞比较均匀。首先用剪刀把组织块剪碎,然后移入 37°C 的 0.2% 的胰蛋白酶液(配在除去 Ca, Mg 的 Hank's 和 Eagle 液或者 Rinadini's 液)。静置 15—30 分钟,用吸管冲稀扩散,使组织块解离。用培养液洗涤后,经离心(1000 rpm, 5 分钟,除去未解离的大组织块。这样的

操作重复 2—3 次,便可得到分散度比较均匀的细胞悬浊液(含 20% 的小牛血清),移入培养瓶,在 37°C 下静置培养 4—7 天便可完成标本制作。然后用秋水仙素(或用乙酰甲基秋水仙碱)处理、离心、低渗处理、固定、气干、吉姆萨染色。

6. 胎儿组织培养法(二) 系通过穿刺取出子宫内胎儿组织块进行培养的方法。在取组织的过程中,不但需要熟练的技术而且要十分慎重。对要进行实验的胎儿要用 X 射线掌握胎儿的月数,一般在六个月以后才开始实验。此法多用于胎儿出生前的检查。

1) 让孕妇排尿,经外科和 X 射线确定胎儿的胎位和胎向。将母体的腹部充分消毒,通过腹壁用银质医学检查刺针(Vim-Silverman biopsy needle)刺入胎儿的臀部取组织块。

2) 取出的组织块放在盖玻片上,装入培养瓶。

3) 用 5ml 的 TC-199 培养液(加 20% 的小牛血清)在 37°C 下培养。

4) 每隔 3 天换一次新鲜培养液,培养 7—10 天。

5) 将带有组织块的盖玻片一起移入离心管,用秋水仙素处理。

6) 经 8—12 小时处理后,换加 0.2% 胰蛋白酶 Rinadini 溶液。放置 5—10 分钟,轻摇瓶子使细胞从盖玻片上脱离下来。然后离心 5 分钟,加低渗液处理(低渗液用 KCl 溶液),气干、吉姆萨染色。

7. 羊水细胞培养法 用穿刺法从外部取孕子宫中的羊水,培养其中游离的由胎儿上来的细胞进行实验,此法称为羊水细胞培养法,多应用于胎儿出生前染色体的检查。步骤如下:

1) 经外科检查确定胎儿位置,选择非头部部位。

2) 孕妇腹部充分消毒,用腰椎刺针穿过腹壁取羊水 5—10ml 左右,用 1000 rpm 离心 5 分钟,将沉渣移入盛有培养液的容器,在 37°C 温度下培养 3 天,再离心收集细胞,添加新培养液继续培养,如此重复操作,每隔 3 天换一次新液。

3) 因为细胞附着在玻璃片上增殖,可以通

过显微镜随时检查。一般说来,获得充分增殖的细胞的时间需2周以上(一般为3—4周)。

4) 秋水仙素处理。

5) 加0.15%的胰蛋白酶 Rinaldini 液处理,放置5—6小时。

6) 离心收集细胞,经低渗液处理、固定,气干后用吉姆萨染色。

**8. 老鼠 (Rat) 尾部组织培养法** 这是对老鼠等小动物一边进行饲养一边进行染色体观察的技术,也可用于其他方面的研究。

将老鼠尾部用70%酒精洗干净,切取2cm的尾组织,除去皮肤,用青霉素和链霉素洗涤,把组织块切碎放入培养瓶,用加入20%小牛血清的MEM培养液,在37℃—38℃下培养一周,然后经秋水仙素处理、固定、干燥、吉姆萨染色。因为老鼠还活着,所以可以通过一边饲养一边按照需要反复从尾部切取组织进行试验。

### 9. 骨髓细胞培养法

1) 在培养液(MEM或者TC-199)中加10%的小牛血清,取5—10ml放入培养瓶内。

2) 取骨髓1—2滴加到装有培养液的培养瓶中,在37℃下培养48—72小时。

3) 加入每毫升中含有0.5 μg的秋水仙素,保温37℃。

4) 经秋水仙素处理后,装入离心管。在1000—1500 rpm离心5分钟。

5) 弃去上清液,加入0.075 mol/L KCl(低渗液),在37℃下静置20分钟。

6) 加入等量固定液固定,在载玻片上气干。

## 二、骨髓细胞直接研究法

该方法是直接将骨髓样品放在载玻片上制作标本的方法,它也分为两种,即气干法和涂片法,现在常用的为气干法。

### 1. 气干法 (air-drying method)

基本操作与组织培养法相同。用含肝素(10u/ml)和秋水仙素(0.4 r/ml)的0.6%的枸橼酸钠溶用吉姆萨染色。液(5—10 ml);将取出的骨髓0.1—0.2ml放入此液处理1—2小

时,用卡诺氏液固定,气干法制作标本。气干法使用范围很广,在正常个体和白血病患者的骨髓染色体研究中都可使用。现将人和小动物骨髓染色体的具体操作步骤介绍如下。

### (一) 人的骨髓

1) 在离心管中加入低渗液(0.075 mol/L KCl)和秋水仙素(或乙酰甲基秋水仙碱0.5 μg/ml),放入37℃温箱内。

2) 取1—2滴骨髓加入上述低渗液中,充分搅拌后置37℃低渗20分钟。

3) 加入新配卡诺氏固定液(无水甲醇:冰醋酸3:1),充分混合。在1000—1500 rpm下离心5分钟。

4) 弃去上清液另加固定液、静置混合、离心。这样的操作反复两次,以期固定充分。弃去离心后的上清液,加入适量的固定液,制成细胞悬液。

5) 在载玻片上滴加1—2滴细胞悬液,自然干燥或在火焰上急剧干燥。用吉姆萨染色(10—20倍的吉姆萨液)10—30分钟。用水洗去载玻片上多余的染液,放室温下干燥,用加拿大树胶加盖玻片封固。

### (二) 小动物的骨髓

1) 杀死小动物(如小鼠,大白鼠,立即取下前后肢,除去肌肉,取出骨头。

2) 预先将注射器充满0.075 mol/L的氯化钾溶液,然后把骨关节用剪刀切断,把注射器针头插入骨髓中,用注射器中0.075 mol/L的KCl低渗液将骨髓挤出。

3) 在离心管中装上0.075 mol/L的KCl溶液和乙酰甲基秋水仙碱(0.5 μg/ml),予热至37℃。

4) 取出的骨髓放入上述的离心管中,充分搅拌混合,在37℃下保温20分钟。然后加入大约等量的卡诺氏固定液,轻轻搅拌,立即在1000至1500 rpm下离心5分钟。

5) 弃去上清液,再加入固定液离心,如此操作反复2次,然后制备细胞悬浮液。

6) 把悬浮液滴到载玻片上,自然干燥,用吉姆萨染色,加盖玻片用树胶封固。

### (三) 吉田法 (Yosida 等, 1965)

1) 用 0.1% 的秋水仙素 0.4 ml 对小鼠作腹腔注射, 两小时后杀死动物。

2) 取下大腿骨, 将其骨髓加入温热的生理盐水中, 慢离心 3 分钟 (165G)。

3) 在 38°C 温度下, 用含有透明质酶的 1% 枸橼酸钠溶液对细胞进行 10 分钟低渗处理。然后慢慢地加卡诺氏液固定。

4) 约固定 30 分钟后离心, 弃去上清液加入新固定液, 静置 30 分钟。

5) 将上述溶液滴加在 50% 酒精浸湿的载玻片上, 置于酒精灯或煤气灯上急剧干燥, 用乳酸、醋酸、地衣红液染色(地衣红 1g 和冰醋酸 45 ml 一起煮沸, 把此种液体 50 份与 70% 乳酸 50 份混合配成染液)。

### (四) 河野法 (Kohno 等, 1971)

1) 把秋水仙素 (1 mg/kg 体重) 注入小鼠腹腔。

2) 大腿骨部经酒精消毒后, 用消毒的穿刺针在大腿骨下部扎一小孔, 把含有 0.5 ml Hank's 液的注射针插入小孔吸取骨髓。

3) 其后的操作与吉田法相同(低渗液处理卡诺氏固定、离心、滴片、干燥、染色)。

用这种方法时, 可以只取骨髓而不杀死小动物, 所以可以利用同一只小动物在不同条件下随时取标本检查, 研究染色体的变化。

### (五) 马太法 (Matthey's 法)

对具有髓质和皮质的器官(如脾、睾丸、卵巢)因其髓部组织也经常处于分裂增殖状态, 故也可用直接法进行研究, 在此一并加以介绍。目前, 在小鼠等小哺乳动物的研究中, 最常用的是马太法。此法予先将载玻片涂以蛋白胶(蛋白粉 2g 溶于 100ml 蒸馏水), 干燥贮存。盖玻片在使用前以凡士林和乙醚 (1:100) 浸泡凉干。固定用 50% 的冰醋酸。染色用福尔根液(用 1N 的 HCl 水解处理)或用迈耶氏 (Mayer) 液。具体步骤如下:

1) 动物腹腔注射秋水仙素。

2) 90 分钟后杀死动物, 取出脾、睾丸、卵巢、浸入蒸馏水, 用手术剪将组织块切细 (约

2mm 大), 在蒸馏水中低渗 12—15 分钟。

3) 弃去水分, 加固定液 (50% 冰醋酸) 固定 45 分钟。

4) 将固定液和材料一起放到载玻片上, 用涂有凡士林的盖片盖住, 轻轻按压(按压时不要让盖片左右移动)。

5) 将上述载玻片夹在几张滤纸中间, 用拇指压实。

6) 载玻片放在 70% 酒精的染色缸中 1—2 小时, 盖片脱落, 脱不开时可稍加晃动。盖片脱落下来后, 在 70% 酒精中放置 5—10 分钟。

7) 福尔根染色。用蒸馏水轻轻洗载玻片, 用加温至 60°C、浓度为 1mol 的 HCl 水解 12 分钟, 迅速用蒸馏水洗, 在福尔根染液中染色 2—4 小时。

8) 用流水冲洗, 经 70%, 95%, 100% 酒精脱水待干燥后, 二甲苯溶液透明, 加拿大树胶封固。

用迈耶氏液染色时, 载玻片在染液中浸泡 15—20 分钟, 弃去染色液用分色液 (70% 酒精 100ml 和 1mol 盐酸 1ml 的混合液) 迅速分色, 流水(最好为碱性)冲洗。然后经酒精脱水, 二甲苯透明, 树胶封固。

## 2. 涂抹法

桑德伯格和艾什哈罗 (Sandberg and Ishihara) 氏涂抹法。

此法广泛用于白血病患者及正常个体骨髓染色体的观察。

1) 取 1—2 ml 骨髓。加入冷的 Eagle 液 (或者含有 0.6% 葡萄糖的 0.7% NaCl 水溶液), 轻轻振荡使细胞扩散, 产生悬浮液。

2) 约 7ml 的细胞悬液加入到 28 ml 0.44% 的枸橼酸钠内, 放置 15 分钟。

3) 在 800rpm 转速下离心 5 分钟, 弃去上清液, 用卡诺氏液 (或 50% 的冰醋酸液) 固定。固定时间不超过 30 分钟。

4) 弃去固定液, 加 1ml 左右的醋酸地衣红 (将地衣红按 2% 的比例溶于 65% 的冰醋酸), 用吸管反复冲吸, 使之充分混合, 染色 10 分钟。

(下转第 61 页)