

中国人类遗传资源

人类染色体标本制备和处理技术规程

Technical Specification for Preparation and Disposition
of Human Chromosome

(讨论稿)

中国人类遗传资源平台项目组

2007年5月

前 言

为规范人类染色体标本的制备的技术，促进细胞遗传学及分子细胞遗传学的深入研究及应用，特制订《人类染色体标本制备和处理技术规程》。

本规程根据目前的研究积累并参考国际相关做法，结合中国现有比较通用的实验方法，特制定一个包括从外周血、骨髓、绒毛、羊水和实体瘤等制备人类染色体的全国统一技术规程，该规程的制定从技术标准方面提出了原则性要求。适用于遗传咨询、产前诊断、植入前诊断、肿瘤相关等研究，主要涉及基础研究、临床诊断和公共卫生预防的三个方面，因此在临床医院、研究单位、医学院校和国际交流中应按本技术规程执行。

目次

前言

1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	2
4 规范性技术要素	3
4.1 仪器设备	3
4.2 细胞培养用液	3
4.3 外周血染色体标本的制备	4
4.4 骨髓细胞染色体标本的制备	5
4.5 皮肤细胞染色体标本的制备	6
4.6 绒毛细胞染色体标本的制备	7
4.7 羊水细胞染色体标本的制备	8
4.8 实体瘤细胞染色体标本的制备	9
4.9 胸腹水染色体标本制备	10
4.10 传代培养细胞染色体标本的制备	11
4.11 高分辨显带染色体标本的制备	11
4.12 染色体标本制备时的注意事项	13
4.13 显带技术	14
附录 人类染色体命名符号与核型	19
参 考 文 献	23

人类染色体标本制备和处理技术规程

Technical Regulation for Preparation and Disposition of Human Chromosome

1 范围

本规程规定人类染色体标本制备和处理的技术标准和安全标准。

本规程适用于在我国进行染色体病的诊断和产前诊断、生殖辅助治疗、遗传基础研究等各方面进行的染色体标本的制备处理,确定人类染色体标本制备的标准操作或一般原则。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本规程的引用而成为本规程的条款。凡是注日期的引用文件,其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本规程,然而,鼓励根据本规程达成协议的各方研究是否可以使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件,其最新版本适用于本规程。

GB/T 1.1-2000 标准的结构和编写规则

ICD-10 WHO 国际疾病分类编码

ICD-10 中国修订版

GB 19489—2004 实验室生物安全通用要求

GB/T 2261.1~2261.7—2003 个人基本信息分类与代码

《人类遗传资源管理办法》 中华人民共和国卫生部

《遗传资源的共享原则》

《赫尔辛基宣言》

美国 人遗传学细胞库从人群中采集样品、存储及研究的政策 (Policy for the Responsible Collection, Storage, and Research Use of Samples from Named Populations for the NIGMS Human Genetic Cell Repository)

《人类细胞遗传学命名国际体制》(An International System for Human

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本规程。

3.1 核型 karyotype

一个体细胞中的全部染色体所构成的图像。

3.2 丹佛体制 Denver system

1960年，在美国 Denver 市召开了第一届国际细胞遗传学会议，讨论并确定正常人核型的基本特点，即 Denver 体制。

Denver 体制是识别和分析人类各种染色体病的基础。Denver 体制将人类体细胞的 46 条染色体按其相对长度和着丝粒位置分为 23 对，7 个组(A~G 组)。其中 22 对为男女共有，称常染色体(autosome)，以其长度递减和着丝粒位置依次编为 1~22 号；另一对与性别形成有关，随性别而异，称为性染色体(sex chromosome)。XX 代表女性，XY 代表男性。

3.3 核型分析 karyotype analysis

将待测细胞的全套染色体，按照 Denver 体制配对、排列后，分析确定其是否与正常核型完全一致。

3.4 带 band

染色体经显带后，延长轴显示的一条条宽窄和亮度不同的横纹。每一条染色体都可以看作由一系列连续的带构成，没有非带区。

3.5 带型 banding pattern

应用显带技术，将人类 24 种染色体显示出的各自特异的带纹。

3.6 界标 landmark

确认每条染色体时具有重要意义的、一个稳定的、有显著形态学特征的指标。包括染色体两臂的末端、着丝粒和某些带。

3.7 区 region

位于两相邻界标之间的区域。

3.8 中央着丝粒染色体 metacentric chromosome

着丝粒位于染色体纵轴 1/2~5/8 处，两臂长度基本相等。

3.9 亚中央着丝粒染色体 submetacentric chromosome

着丝粒位于染色体纵轴 5/8~7/8 处，把两臂分成一长一短，即长臂 (q) 与短臂 (p)。

3.10 近端着丝粒染色体 submetacentric chromosome

着丝粒位于染色体纵轴 7/8~末端，长臂与短臂相差较大。

3.11 随体 satellite

在近端着丝粒染色体上，可见球状物，通过细丝与短臂相连，称为随体。

4 规范性技术要素

4.1 仪器设备

4.1.1 显微镜

倒置显微镜用于观察细胞的生长情况并观察有无污染，普通光学显微镜用于染色体观察、分析。

4.1.2 培养箱

用于细胞培养。可以选择隔水式或CO₂培养箱。后者提供 5%CO₂浓度，保持培养液的pH稳定，适用于开放或半开放培养。

4.1.3 冰箱

适用于短期或长期储存培养时所需的各种试剂。

4.1.4 离心机及天平

离心机适用于细胞洗涤、收集和制备细胞悬液等工作。一般可常规配置 4 000 r/min 的国产台式离心机。天平适用于称量药品和离心配平。

4.1.5 消毒器

常用高压蒸汽消毒器。

4.1.6 染色体自动分析仪

用于染色体的显微摄影和核型分析。

4.2 细胞培养用液

4.2.1 平衡盐溶液

平衡盐溶液是组织细胞培养时常用的基本液体，可以维持细胞的渗透压、调节 pH 值以及提供细胞生存所需的无机离子成分，常用于细胞、组织的洗涤。常用 PBS、Hanks 液体，配制方法参见《人类染色体方法学》。

4.2.2 胰蛋白酶

胰蛋白酶的浓度为 0.25%，用于 G 显带和细胞消化。1 g 胰蛋白酶溶于 100 mL PBS 中，pH 调至 7.0。-20℃ 长期储存。

4.2.3 细胞培养液

含 15% 小牛血清的 R/MINI-1640，过滤除菌。

4.2.4 秋水仙素

生理盐水配制成 10 μg/mL，分装，置 -20℃ 避光保存。

4.2.5 固定液 (Carnoy 固定液)

甲醇：冰乙酸=3：1，新鲜配制。

4.2.6 其他

- 0.2% 的肝素钠（肝素），高压灭菌；0.075M KCl；PHA；Giemsa 染液配制方法参见《人类染色体方法学》。

4.3 外周血染色体标本的制备

4.3.1 原理

人外周血淋巴细胞，几乎都处在 G1 期（或 G0 期），一般情况下不进行分裂。如在培养液中加入植物血凝素（PHA），可以刺激外周血 T 淋巴细胞转化为淋巴母细胞，继而进行有丝分裂。这样经过短期（通常为 72 h）培养后，经秋水仙素处理、低渗和固定，就可以获得大量的有丝分裂细胞。人体的 1 mL 外周血内一般含有约 $1 \times 10^6 \sim 3 \times 10^6$ 个小淋巴细胞，足够染色体标本制备和分析之用。本方法已为临床医学、病毒学、药理学、遗传毒理学等方面的广泛应用。

4.3.2 操作方法

4.3.2.1 采血接种

在 4 mL 全培养液中加入 PHA 0.2 mL。注射器中抽取 0.2 mL 肝素抗凝，按常规方法采静脉血 1~2 mL，无菌状态下进行接种，8 mL 培养液中接种 30~40

滴全血，轻摇匀后置 37℃ 恒温箱培养，可接种 1~3 瓶。培养时间为 68 h。培养期间，定期轻摇匀，使细胞充分接触培养液。

终止培养前 2~4 h，在培养液中加入秋水仙素（用 1 mL 注射器 5 号针头滴加 2 滴，使终浓度为 0.05 μg/mL）。继续培养 2~4 h 后进行收获。

4.3.2.2 染色体标本的制备

1) 收集细胞：将培养物全部转入洁净离心管中，1000 r/min 离心 8~10 min，弃上清液。

2) 低渗处理：向离心管中加入 37℃ 预温的低渗液 8 mL，用滴管吹打混匀，置 37℃ 恒温水浴中低渗 10~15 min。

3) 预固定：低渗后加入 1 mL 新鲜配制的固定液，轻轻混匀后 1 000 r/min 离心 8~10 min。

4) 固定：弃上清液，加入 8 mL 固定液，轻轻混匀，室温固定 20 min。1 000 r/min 离心 8~10 min，弃上清液。重复固定 2 次。

5) 重悬：弃上清液后，视细胞数量多少加入适量固定液制成细胞悬液。

6) 滴片：吸取细胞悬液自 20~30 cm 高处滴在一张冰湿载玻片上，轻轻吹散，气干。

4.4 骨髓细胞染色体标本的制备

4.4.1 原理

骨髓染色体标本制备通常用于白血病患者，特别是慢性或急性粒细胞性白血病的病例。因为骨髓反映粒系统细胞增生情况，这些病人不宜用外周血。即使是淋巴细胞性白血病，也不主张用外周血，因为加 PHA 刺激外周血培养，只能获得正常淋巴细胞分裂相，并不能反映那些病理淋巴细胞的染色体改变。骨髓细胞属不断增殖的细胞，故可用短期培养法或直接制片法。

4.4.2 操作方法

4.4.2.1 培养

4.4.2.1.1 短期培养法

从髂骨抽取骨髓液 0.2~0.5 mL，无菌注入装有 5 mL 培养液的培养瓶中，

37℃培养 46~47 h, 加入秋水仙素 (终浓度为 0.05 μg/mL), 继续培养 1~2 h 后进行收获。

4.4.2.1.2 直接制备法

从髌骨抽取 0.3~0.5 mL, 立即注入 5 mL 含秋水仙素浓度为 0.05 μg/mL 的生理盐水中, 以吸管轻轻吹打, 室温放置 2~3 h 后收获。

4.4.2.2 染色体标本的制备

骨髓细胞染色体标本的制备同 4.3.2.2。

4.5 皮肤细胞染色体标本的制备

4.5.1 原理

临床上为了确定存在于内、中、外胚层嵌合体的核型, 或为了进一步确证外周血淋巴细胞中未发现或未知的核型时, 通常制备皮肤细胞染色体。皮肤细胞是最好的研究材料, 因为皮肤在人体各组织中是最容易取材的部位之一, 另外皮肤成纤维细胞培养技术日益成熟。皮肤培养物的建立具体方法有很多, 遵循细胞原代培养的原则可使皮肤取样成功地生长出成纤维细胞。

4.5.2 操作方法

4.5.2.1 活检取材

常用的皮肤取材部位是对痛觉不敏感的前臂内侧皮肤。按照无菌操作的原则消毒皮肤, 用长镊子夹起长约 10 mm、宽约 1.5~2 mm 的皮肤组织。待夹起的皮肤颜色发白后, 迅速用细小的无菌剪刀剪下或无菌手术刀切下长约 4~5 mm、宽约 1~1.5 mm 的皮肤。这样的取材方法一般都能取到真皮并培养出成纤维细胞。

4.5.2.2 皮肤的原代培养

4.5.2.2.1 皮肤材料预处理

将所取的皮肤材料置于 5 mL 无菌的 PBS 中洗涤 3 次。在无菌状态下剪成约 0.5~1 mm³ 的小块, 再用含抗生素的 PBS 洗涤 2 次。

4.5.2.2.2 细胞培养

用解剖针将皮肤小块植入培养皿中, 组织块间保持一定距离; 置 37℃ 培养

箱中静置 4~5 h 使组织小块干燥，有利于组织块的贴附。

在每一组织块上滴加一滴细胞培养液，呈“泡”状的培养液使组织块固定在一定位置上。37℃静置培养 48 h，然后缓慢加入 1 mL 细胞培养液，注意不要冲动组织块。

培养 4 d 后在倒置显微镜下观察，在组织块周围一般可见到有新的上皮样或成纤维细胞样的生长物出现。待成纤维细胞形成良好的生长晕，且其覆盖区域大于原皮肤块时（一般需 2~3 周），即可制备染色体。

4.5.2.2.3 染色体标本的制备

在培养液中加入秋水仙素使终浓度达到 0.05 μg/mL。继续培养 1~2 h 后进行收获。

弃去旧培养液用 PBS 冲洗，加入 0.25% 的胰蛋白酶进行消化，待细胞分离成单个细胞后终止消化，并转移至 10 mL 离心管中，1 000 r/min 离心 10 min 收集细胞。

- 其余染色体标本的制备步骤同 4.3.2.2。

4.6 绒毛细胞染色体标本的制备

4.6.1 原理

绒毛来源于胚胎的中胚层，最早的初级干绒毛出现于孕三周初，孕 8 周左右是绒毛发育最旺盛时期。目前国内外绒毛取材多选于 8-9 周。研究资料表明，绒毛取样一般不影响胚胎的发育及胎盘的功能，但取样不当可导致胚胎丢失而终止妊娠。

4.6.2 操作方法

4.6.2.1 取绒毛

妇产科职业医师根据妇产科绒毛取样的要求，在 B 超引导下用绒毛取样器进行绒毛取样。取一干净培养皿，加入 5 mL 生理盐水，将取样器中所吸出物注入培养皿内进行清洗，去除血污染。

4.6.2.2 染色体标本的制备

4.6.2.2.1 直接法

1) 选取发育良好绒毛枝（分芽多、末端粗壮成仙人掌状为佳）放入离心管中，加入 5 mL 含秋水仙素浓度为 0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的细胞培养液，37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 30~40 min。

2) 吸去培养液，加入 37 $^{\circ}\text{C}$ 预温的 0.075 M KCL 低渗液低渗 10 min。

3) 加甲醇：冰乙酸（3：1）的固定液 0.5 mL 进行预固定，吸去液体。

4) 加新鲜配制固定液 5 mL，固定 30 min 后吸去固定液。

5) 沿管壁缓慢加入 0.5 mL 60%的冰乙酸，轻轻均匀后静置 2 min，加入等量体积甲醇，轻柔吹打液体以解离细胞。继续固定 10 min，用吸管挑去绒毛枝及碎块。

6) 1 000 r/min 离心 8 min，加入少量新鲜固定液制成细胞悬液。冰湿片滴片。

4.6.2.2.2 培养法

1) 挑选发育良好的绒毛枝放入另一小培养皿中用眼科剪剪碎绒毛，转入培养瓶中培养加入 3 mL 的细胞培养液培养 70 h。加入秋水仙素（终浓度为 0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ），继续培养 1~2 h 后进行收获。

2) 培养的绒毛细胞染色体标本的制备同 4.3.2.2。

4.7 羊水细胞染色体标本的制备

4.7.1 原理

羊水细胞培养和染色体核型制备是传统的产前细胞遗传学诊断方法。但由于羊水细胞属于脱落细胞，培养较为困难，染色体标本制备操作难度较大。

人的羊水细胞能长成单层并可连续进行传代培养，但它们的一些特征与一般成纤维细胞不同。在人的羊水中存在着各种不同类型的胎儿细胞，依据其外形和生长特征可区分为以下三类：上皮细胞（E）、成纤维细胞（F）和羊水细胞（AF）。E 细胞在胰酶消化的连续培养中不再生长，所以在培养过程中的生长期最短。AF 细胞在再培养中一开始就长得很好，染色体分析大多用这类细胞。F 细胞在再培养中潜在的生长期最长，在较老的羊水培养物中占优势。通常在培养后 3~4 d（可能更早些）即出现 E 细胞的集落，它们不适合再培养作染色体分析。大约在第 7 d 出现的 AF 细胞群可用于染色体标本的制备。如果在培养后第 10 d 还未

见长出新的细胞，就应考虑第二次羊膜穿刺。

4.7.2 操作方法

4.7.2.1 培养

1) 在 B 超引导下，经腹腔抽取羊水。首先抽取 1~2 mL 羊水并弃去，以减少母体细胞的污染，然后再抽取 15~25 mL 羊水置无菌容器内，1000~1500 r/min 离心 10 min 收集细胞，弃上清，保留 1 mL 羊水和沉淀的细胞。

2) 轻轻吹打成悬液，吸取 0.3~0.5 mL 细胞悬液至细胞培养瓶中，再加入 3 mL 培养液。每次接种 2~3 瓶。

3) 混匀后 37°C 静止培养 6~7 d。不要挪动，以免影响细胞贴壁。

4) 培养 5~7 d 后在相差倒置显微镜下观察，可见部分细胞贴壁生长、扩增，及时进行换液继续培养。

5) 换液后的第 2 d 观察细胞群落数与细胞分裂情况。当出现许多圆形透亮的有丝分裂细胞（大约细胞培养至第 9~11 d）即可收获细胞。

6) 终止培养前 3 h 加秋水仙素，使终浓度为 0.05 $\mu\text{g/mL}$ 。

4.7.2.2 染色体标本的制备

1) 将上清液倒入离心管中进行离心，低渗、预固定、固定两次；

2) 培养瓶内细胞加入低渗液进行低渗、预固定、固定，每次上清液都收入离心管中离心留取沉淀。在第 2 次固定时，用细胞刮将瓶壁上细胞刮下，倒入装有沉淀的离心管中离心。

3) 收集所有的沉淀物，制成细胞悬液，冰玻片滴片。

关于低渗、预固定、固定、制片的染色体标本的制备步骤同 4.3.2.2。

4.8 实体瘤细胞染色体标本的制备

4.8.1 原理

实体瘤细胞具有较强的增殖能力，可以获得细胞分裂相。但是由于对实体瘤细胞的生物学特性，包括细胞周期、生长和分裂的特点还了解不够，并且各种实体瘤的细胞生物学特性各不相同，各类瘤细胞难以用同一方法处理等原因，实体瘤染色体标本的制备目前仍然是个难题。

对实体瘤的染色体标本的制备，一般采用直接法和短期培养法两种方法。在二十世纪八十年代末，哈尔滨医科大学医学遗传学研究室建立了一种改良直接法，在肺癌、食管癌、胃癌、阴茎癌和卵巢癌的染色体研究中取得了较好的结果，现已被国内外研究者应用。

4.8.2 操作方法

1) 从手术切除的新鲜标本，尽快切取 500 mg 左右、细胞丰富、坏死少的瘤体组织，置于无血清的 R/MINI-1640 培养液中。

2) 充分去除血液、脂肪、结缔组织及坏死部分，在平皿中用无血清的 R/MINI-1640 培养液清洗 2~3 次，将组织切成 1 mm³ 小块。在平皿中加入少量 0.25% 胰蛋白酶使组织保持湿润。

3) 将切碎的组织块及细胞混和液移至加入含秋水仙素浓度为 0.05 μg/mL 的无血清 R/MINI-1640 培养液中，总体积为 10 mL。37℃ 恒温水浴温育 1 h。在此期间每 10 min 用吸管轻轻吹打细胞，使细胞间充分分离。

4) 1 500 r/min 离心 8 min 收集细胞，弃上清后加入 8 mL 经 37℃ 预温的 0.4% KCl 和 0.4% 柠檬酸钠 1:1 低渗混合液，混匀后于 37℃ 低渗处理 10 min。

5) 1 500 r/min 离心 8 min 收集细胞，重复低渗处理 10 min。

6) 加入 1 mL 固定液进行预固定，轻轻混匀后 1 000 r/min 离心 8~10 min。

7) 弃上清液，加入 8 mL 固定液，轻轻混匀，室温固定 10 min。1 000 r/min 离心 8~10 min，弃上清液。重复固定 2 次。

8) 弃上清液后，视细胞数量多少加入适量新鲜配制固定液制成细胞悬液。

9) 吸取细胞悬液自 20~30 cm 高处滴冰湿片上，轻轻吹散气干。

4.9 胸腹水染色体标本制备

4.9.1 原理

某些肿瘤细胞可脱落入胸腹水中，并继续生长、增殖，因此由胸腹水细胞可制备较好的染色体标本。胸腹水细胞染色体分析对恶性肿瘤具有辅助诊断的价值，如分裂相多，异倍性，有结构畸变等。

4.9.2 操作方法

4.9.2.1 培养

抽取新鲜胸、腹水 20~40 mL 经 1 000 r/min 离心 10 min 收集细胞。弃去上清液，加入 37℃ 预温的细胞培养液 10 mL。轻轻将细胞团吹打成均匀的细胞悬液后，加入秋水仙碱使其终浓度为 0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，在 37℃ 中培养 1~2 h 后收获。

4.9.2.2 染色体标本的制备

胸、腹水细胞染色体标本的制备同 4.3.2.2。

4.10 传代培养细胞染色体标本的制备

4.10.1 原理

传代培养的细胞增殖能力旺盛，在生长营养丰富的条件下，能够获取大量高质量的分裂相。

4.10.2 操作方法

4.10.2.1 细胞培养

在收获染色体前一天对培养的细胞进行传代，使第二天细胞汇合率达到 80~90%，处于对数生长期。

在培养液中加入秋水仙素使终浓度达到 0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。继续培养 1~2 h 后进行收获。

4.10.2.2 染色体标本的制备

1) 收集细胞：弃去旧培养液后用 PBS 冲洗，加入 0.25% 的胰蛋白酶进行消化，待细胞分离成单个细胞后终止消化，并转移至 10 mL 离心管中，1 000 r/min 离心 10 min 收集细胞。

2) 其余染色体标本的制备步骤同 4.3.2.2。

4.11 高分辨显带染色体标本的制备

4.11.1 原理

一般的 G 显带技术在人类的单倍体染色体中仅能观察到 320 条带纹，这对于一些染色体细微结构异常的识别是不够的。染色体越长则带纹越丰富，分辨率越高。为了提高染色体的分辨率，可以用氨甲蝶呤等药物使细胞同步化，另加某些药物如胸腺嘧啶核苷、BrdU 等阻止染色体收缩，并用低浓度的有丝分裂抑制

剂秋水仙素或秋水酰胺短时间处理，结果就能得大量晚前期、前中期和早中期的染色体较长的有丝分裂图像。这样在人类染色体的单倍体带纹数可增加到 400 条、550 条和 850 条，甚至可达 1 200~2 000 条之多。这对于进一步研究较细小的染色体缺陷和基因定位，具有重大意义。

4. 11. 2 操作过程

4. 11. 2. 1 培养外周血 按照 4.3.2.1 的方法采取外周血，细胞培养液中加入 PHA 进行常规培养 54~56 h。

4. 11. 2. 2 同步化

同步化的药物可用氨甲蝶呤或胸腺嘧啶核苷。

如用氨甲蝶呤，则将 0.1 mL 浓度为 1×10^{-5} mol/L 的氨甲蝶呤加入到上述正在培养的外周血中，使其最终浓度为 1×10^{-7} mol/L；如用胸腺嘧啶核苷则加入已培养过的外周血中，使其最终浓度达 0.3 mg/mL。同步化需在加上述药物后再置于 37°C 中继续培养 17 h。即细胞培养累计时间为 72 h。

4. 11. 2. 3 去除药物

使用 Hank 液在无菌条件下去除培养物中残余的同步化药物。

将同步化培养后的培养物在无菌条件下 1 000 r/min 离心 10 min，弃上清液，加入无菌 Hank 液 5~10 mL 悬浮细胞，再离心弃上清液，如此重复洗涤细胞二次。

4. 11. 2. 4 重新培养

最后一次洗涤细胞后，吸去上清液，将底部细胞移至另一含有新鲜细胞培养液的培养瓶中（内含有 PHA），此生长培养液同时还需加入下列物质：即先前如用氨甲蝶呤同步化，则此时应加入胸腺嘧啶核苷，使其最终浓度达到 10^{-5} M；如先前用胸腺嘧啶核苷同步化，则此时应加入 BrdU，使其最终浓度达 10 μ g/mL。然后置于 37°C 中继续培养 6 h。

4. 11. 2. 5 阻止分裂

加入秋水仙素使其最终浓度达 0.05 μ g/mL，培养 15~30 min。

4. 11. 2. 6 低渗处理

用 37℃ 预温的 0.075 mol/L KCl 低渗处理 30 min。其余染色体标本的制备步骤同 4.3.2.2。

4.11.3 注意事项

用作高分辨显带的染色体因染色体长，因而分散差、重叠多，而影响核型分析。因此凡可能有助分散的技术细节都可以试用。

——增加固定次数。细胞固定 3 次；或将固定 2 次后的细胞置于 4℃ 过夜，次日滴片前再固定 2 次。

——改变固定液比例。即用 1 份甲醇：3 份冰醋酸的固定液；或用 6：1 的甲醇-冰醋酸固定液。

——增加滴片高度。滴管距玻片在 1 米以上，高距离滴片以促使染色体分散均匀，减少重叠。

——在同步化培养过程中，加入 BrdU 后则需在避光条件下培养。

4.12 染色体标本制备时的注意事项

4.12.1 一般原则

——培养温度应严格控制在 $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ ，培养液最适 pH 为 7.2~7.4。

——秋水仙素的作用是抑制纺锤丝形成，使染色单体缩短。秋水仙素的应用要适量、适时，使大量的细胞停留在分裂中期，又不至于使染色体缩的太短。其浓度过大或处理时间过长，分裂细胞多，但染色体短小；反之，则分裂细胞少而染色体细长。以上两种情况都不宜观察形态及计数。不同商品的秋水仙素其作用的能力不同，需要进行预实验。为了取得较长染色体的分裂相，可以适当降低秋水仙素浓度同时延长作用时间。

——离心前需将离心管配平。离心速度不易过高或过低。速度过高，细胞容易破碎并且细胞团不易打散；反之，细胞易丢失。

——固定液应现用现配，保持新鲜。

——载玻片为冰湿片。玻片洗净后浸于去离子水中 4℃ 保存，否则染色体分散不好。

——低渗处理的时间要适当。且低渗后混匀细胞一定要轻，否则将引起细胞膜过

早破裂、染色体散失。

4.12.2 外周血染色体标本的制备

外周血染色体标本的制备时，加入肝素的量要适宜。肝素的目的是抗凝，肝素加入过多能导致溶血和抑制淋巴细胞的转化和分裂；肝素加入过少发生凝血或培养物在 24 h 左右出现由纤维蛋白形成的膜状物，应该在无菌状态下将膜状物去除，以免影响培养效果。

4.12.3 实体瘤染色体标本的制备

——取材新鲜。材料越新鲜效果越好；

——取材不宜过多，取材时应准确选取瘤体组织，并尽量避免用退变组织，要挑选活力较好的部位；

——取材后，尽早进行接种、培养；

——增加低渗次数比只增加低渗时间能取得较好的染色体分散效果；

——细胞的固定时间不宜过长，以免影响染色体形态和显带效果。例如，肺癌、食管癌和阴茎癌固定两次，每次 10 min 为宜；结肠癌固定时间可更短些；500 mg 组织一般固定两次，250 mg 组织一般固定一次即可；胃癌组织固定时间需要略长，但可以增加固定次数。总之，实体瘤染色体标本制备时，适当缩短固定时间可以明显提高标本质量。

4.13 显带技术

4.13.1 概述

非显带染色体可根据形态分辨部分染色体，但多数染色体尤其是 C 组难以确认。染色体显带的方法是二十世纪 70 年代发展起来的技术，该技术可使各条染色体沿其长轴显示出宽窄不同、明暗交替的带纹，以辨认全部染色体。染色体显带的方法很多，如用胰蛋白酶处理后 Giemsa 染色形成的 G 带、盐溶液预处理 Giemsa 染色形成的 R 带、加热处理 Giemsa 染色形成的 T 带和 NaOH 预处理 Giemsa 染色形成的 C 带等。这些显带的方法可以恒定地显示人类 24 条染色体的特异带型，为识别每条染色体的改变提供分析基础。

4.13.2 G 显带

4.13.2.1 原理

在常规显带方法中使用最广泛的是用胰蛋白酶进行预处理的 G 显带，即 GTG 法 (G-band by Trypsin using Giemsa)，该方法使用简便，实验周期短，带型稳定。

G 显带机制有许多学说，但尚无定论。目前比较倾向于多因素决定论，即带型的形成主要取决于 DNA、核酸结合蛋白及染料三者的相互作用，主要是指 DNA 的碱基组成以及与结合蛋白相互作用形成的特定结构对染料分子的作用。DNA 分子的螺旋及折叠非组蛋白蛋白质的分布在染色体上呈区域性差异，这些差异导致二硫键与硫氢键分布不同。G 显带深染区由许多二硫键交联，易与染料结合；而浅染区则缺乏二硫键，多为硫氢键，不易与染料结合而呈浅色。此外，由于染色体 DNA 的碱基分布不同而造成 DNA 螺旋，折叠的程度也不同，继而影响到结合蛋白的分布与构型，与染料结合后呈现深浅不同的带纹。

4.13.2.2 操作方法

4.13.2.2.1 玻片老化

玻片老化的目的是为了与 DNA 结合蛋白质对胰蛋白酶有一定的抵抗力。

可以采取下述方法对上述制备的染色体标本进行处理：

- 玻片在 65℃ 烘箱烤片 2~3 h (烤箱顶端的出气孔应开着)，存放于 37℃ 温箱备用；
- 60℃ 烘箱烤片 8~10 h；
- 室温存放 3~7 d。

4.13.2.2.2 胰酶工作液配制

0.25% 胰蛋白酶液用 PBS 稀释至 0.025% 工作液，调 pH 至 7.0，37℃ 水浴预温。

4.13.2.2.3 显带

将玻片标本浸入胰酶中处理 20~30 S，取出后在蒸馏水中漂洗以去除胰酶液。Giemsa 工作液染色 8 min。用蒸馏水冲洗净、晾干后镜检分析。

4.13.2.2.4 观察

低倍镜下寻找分散良好、染色适中的分裂相，油镜下进行核型分析。

4.13.2.3 注意事项

——获得优良的 G 带需要反复的实践，干净的制片以获取标本清晰、带纹丰富而清楚的分裂相。同时稳定的实验条件和足够的经验是十分重要的。

——G 显带的染色体标本要求 3 d 左右片龄。且染色体长度适中（1 号染色体长度约 10 ± 2 微米），分散良好、重叠少或无。如片龄延长，其结合蛋白对胰蛋白酶的抵抗能力越大，则胰酶处理时间需要适当延长。经高温烤片的标本不需放置 3 d；片龄超过 20 d 以上的标本往往导致染色体呈斑点状而不是带纹。

——胰酶工作液应现配现用。如同时处理标本的片数多，酶活性会随之下降，处理时间需延长。

——GTG 带的关键在于胰酶处理的时间。显带时，可先取一片作试片，试片上分段以不同时间酶解，以确定较为合适的酶解最佳时间。若染色体仍着色较深，带纹不清，则胰酶处理时间不足，应延长预处理时间；若染色体变粗、发毛，甚至呈糊状，则为胰酶处理过度，应适当缩短处理时间。

——酶解作用的时间与酶液温度及胰酶浓度成反比，温度高或浓度大则处理时间短。

——G 显带不足时，经固定液褪色后可重新显带，但效果差一些。

——胰酶溶液也可用无 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 的 Hank 液或 0.02% EDTA 液作溶剂。胰酶在 EDTA 中活性较强，标本酶解时间应适当减少。

——Giemsa 染色时间要适中，时间短，着色不够，深浅带反差小；时间过长，着色深，亦影响带纹反差，不易识别。

4.13.3 R 显带

4.13.3.1 原理

R 显带产生的带纹在染色效果上和 G 显带相反，故称为 R 带。用一些荧光染料也可以产生 R 带的效果。R 显带的染色体末端着色浓，可以弥补 G 显带的不足。

4.13.3.2 操作方法

将玻片标本浸在 88°C 的 1 mol/L Na_2HPO_4 溶液 (pH4.0~4.5) 中作用 10 min; 蒸馏水冲洗以终止反应; Giemsa 工作液染色 8 min。用蒸馏水洗净染液、晾干后镜检分析。

4.13.4 C 显带

4.13.4.1 原理

C 显带是使结构异染色质或高度重复序列的 DNA 着色。在人类染色体中, 结构异染色质位于着丝粒区、端粒和 Y 染色体长臂上。在优质的 C 显带标本上, 结构异染色质着色很深而常染色质只呈现出染色体的一般外貌。

4.13.4.2 操作方法

4.13.4.2.1 方法一

1) 将玻片标本置于 0.2 mol/L 的 HCl 溶液中, 室温下处理 15 min 后用蒸馏水冲洗以终止反应;

2) 在 0.07 mol/L 的 NaOH 中处理 2 min。经 70% 乙醇冲洗, 95% 乙醇清洗 5 min×3, 气干;

3) 2×SSC 清洗 5 min×3, 70% 乙醇清洗 5 min×3, 95% 乙醇清洗 5 min×3, 气干;

4) Giemsa 工作液染色 10~30 min。

4.13.4.2.2 方法二

1) 将玻片标本置于 0.2 mol/L 的 HCl 溶液中, 室温下处理 15~30 min 后用蒸馏水冲洗以终止反应;

2) 标本在 56°C 预温的 5% $\text{Ba}(\text{OH})_2$ 中处理 10 min。蒸馏水冲洗;

3) 67°C 预温的 2×SSC 中处理 1~1.5 h, 蒸馏水冲洗;

4) Giemsa 工作液染色 10~30 min。

4.13.4.2.3 方法三

1. 将玻片标本置于 0.2 mol/L 的 HCl 溶液中, 室温下处理 1 h 后用蒸馏水冲洗以终止反应;

-
2. 标本在 50℃ 预温的 1% $\text{Ba}(\text{OH})_2$ 中处理 15~20 sec。蒸馏水冲洗；
 3. 60℃ 预温的 2×SSC 中处理 1~1.5 h，蒸馏水冲洗；
 4. 用 pH6.7 磷酸缓冲液 1:10 稀释 Giemsa 原液成 Giemsa 工作液，染色 10~30 min。

4.13.4.3 注意事项

1. 在上述三种方法中，第三种方法简便、稳定，效果较好。
2. 0.2 mol/L 的 HCl 溶液的作用是去除染色体上的组蛋白和非组蛋白，可以消除可能会出现 G 带带纹。
3. NaOH 和 $\text{Ba}(\text{OH})_2$ 处理的浓度和时间非常重要。如果染色体显示肿胀且呈现发空的形态，应当降低碱溶液的浓度并减少处理时间；如果染色体的外形仍旧不好，则改用 2×SSC 液，用 NaOH 调节 pH 至 12。

附录 人类染色体命名符号与核型

(规范性附录)

人类染色体命名符号与核型

《人类细胞遗传学命名国际体制 (ISCN) (1995)》中的命名符号

A.1 符号意义

A、B、C、D、E、F、G 染色体组的符号

1~22 常染色体号序

X、Y 性染色体

/ 隔开嵌合体或异源嵌合体的不同核型

+ 增加

- 缺失

→ 从...到...

:

断裂

::

断裂与重接

() ()内为结构发生改变的染色体

? 染色体或染色体结构未能确定

;

分开涉及结构重排的染色体

=

总数为

*

作为×号用, 其前是母本, 其后是父本。

A.2 术语意义

A I (first meiotic anaphase)

第一次减数分裂后期

A II (second meiotic anaphase)

第二次减数分裂后期

ace (acentric fragment)

无着丝粒片段

b (break)

断裂

cen (centromere)

着丝粒

chi (chimera)

异源嵌合体

cs (chromosome)	染色体
ct (chromatid)	染色单体
cx (complex)	复杂的染色单体内交换
del (deletion)	缺失
der (derivative chromosome)	衍生染色体
dia (diakinesis)	浓缩期
dic (dicentric)	双着丝粒染色体
dip (diplotene)	双线期
dir (direct)	正位
dis (distal)	远侧端
dit (dictyotene)	核网期
dmin (double minute)	双微体
dup (duplication)	重复
e (exchange)	交换
end (endoreduplication)	核内复制
f (fragment)	断片
fem (female)	女性
g (gap)	裂隙
h (heterochromatin)	异染色质
i (isochromosome)	等臂染色体
ins (insertion)	插入
inv (inversion)	倒位
lep (leptotene)	细线期
M I (first meiotic metaphase)	第一次减数分裂中期
M II (second meiotic metaphase)	第二次减数分裂中期
mal (male)	男性
mar (marker chromosome)	标记染色体

mat (maternal origin)	来自母方
med (median)	中央
min (minute)	微小体
mn (modal number)	众数
mos (mosaic)	嵌合体
oom (oogonial metaphase)	卵原细胞中期
p (short arm of chromosome)	染色体短臂
P I (first meiotic prophase)	第一次减数分裂前期
pac (pachytene)	粗线期
pat (paternal origin)	来自父方
pcc (premature chromosome condensation)	染色体提前浓缩
Ph (Philadelphia chromosome)	费城染色体
prx (proximal)	近侧端
psu (pseudo)	假
prz (pulverization)	粉碎
q (long arm of chromosome)	染色体长臂
qr (qua lriradial)	四射体
r (ring chromosome)	环状染色体
rcp (reciprocal)	相互易位
rea (rearrangement)	重排
rec (recombinant chromosome)	重组染色体
rob (Robertsonian translocation)	罗伯逊易位
s (satellite)	随体
SCE (sister chromatid exchange)	姐妹染色单体交换
sdl (sub-line, side line)	旁系、亚系
sl (stem line)	干系
spm (spermatogonial metaphase)	精原细胞中期

t (translocation)	易位
tan (tandem translocation)	串联易位
ter (terminal, end of chromosome)	末端 (染色体端部)
tr (triradial)	三射体
tri (tricentric)	三着丝粒染色体
var (variable chromosome region)	染色体可变区
xma(ta) [chiasma(ta)]	交叉
zyg (zygotene)	偶线期

A.3 核型描述方法

在用核型式描述一个核型时，第一项是染色体总数（包括性染色体），然后是一个逗号，最后是性染色体。下面是一些核型式的举例：

46, XX	正常女性；
46, XY	正常男性；
45, X	特纳氏综合征(Turner's syndrome)；
47, XXY	克氏综合征(Klinefelter's syndrome)；
47, XY, +21	男性 21 三体综合征；
46, XY, 1q+	具有 46 条染色体的男性，1 号染色体长臂延长；
chi46, XX/46, XY	具有 XX 和 XY 细胞系的异源嵌合体；

46, XY, t(2;5) (q21;q31) 具有 46 条染色体的男性，2 号染色体长臂与 5 号染色体长臂之间相互易位；

46, XX, del(1) (pter→q21::q31→qter) 具有 46 条染色体的女性，1 号染色体长臂上 1q21 和 1q31 带间发生断裂和重接，导致 1q21→1q31 的片段缺失。

参 考 文 献

- [1] 中华人民共和国卫生部 <http://www.moh.gov.cn>
- [2] 美国国立卫生研究院 <http://www.nih.gov>
- [3] 遗传资源获取和利益分享与知识产权保护 生物多样性 2002. 10 (2) . 243-246
- [4] 微生物和生物医学实验室生物安全通用准则 <http://www.cdc.gov>
- [5] 世界卫生组织 <http://www.who.int>
- [6] 人类细胞遗传学命名国际体制 <http://www.iscn1995.org/>
- [7] Lisa G Shaffer, Niels Tommerup. ISCN 2005: An International System for Human Cytogenetic Nomenclature[M]. Published in collaboration with “Cytogenetic and Genome Research”. Karger Press.
- [8] 刘权章. 人类染色体方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1992.