DOI:10.16016/j.1000-5404.1985.02.006



# 羊水细胞染色体高分辨G显带的初步研究

汪大琨

（第一附属医院）

**提 要**

本文记述了使用改变的Shah方法，对人类羊水细胞染色体高分辨G显带获得成功。本技术对产前诊断，具有应用和临床意义。在国内我们的实验室领先掌握了羊水细胞染色体高分辨G显带技术。

自Yunis等[1][2]先后在1975年和1976年，使外周血淋巴细胞分裂同步化而获得分辨率更高的分裂早期细胞染色体，建立了高分辨显带技术，随即得到许多国家进一步研究采用。并于1981年制定了人类细胞遗传学高分辨显带命名的国际体制ISCN[3]，为描述染色体结构异常提供了国际标准。国内外已将这一先进技术用于血细胞遗传学的研究，成功的报道不少。而羊水细胞染色体高分辨G显带技术，除国外有文献[4][5][6]介绍外，则国内尚未见报道。我们于1983年开展外周血细胞染色体高分辨技术，获得成功，并应用于临床诊断，发现2例低分辨未能肯定的病变位点，一例平衡易位携带者，确诊核型为46，xx、t(14；20)($q^{23}$；$P^{13}$)，一例确诊为x长臂等臂，核型为46，xi(xq)。从而提高了诊断水平，在此基础上，于84年1～12月参照国外以上文献与我室具体条件，将常规技术作了改进，开始了羊水细胞染色体高分辨G显带技术的探索，获得成功。现介绍如下：

## 材料与方法

### 一、培养液的制备

1．70%FamF10＋20%小牛血清混合液，每ml培养液中加入青、链霉素各100单位。

2．自身羊水上清液

### 二、操作程序

1．经腹采集16～22孕周羊水20ml，1000转/分离心8分钟，取出上清液留作培养液和作甲胎蛋白测定，剩0.5ml与下沉底细胞混匀后，分别接种于3～4个25ml长方形培养瓶中，每瓶加培养液2ml及自身羊水上清液1ml，用血清及F10调pH7，放入37℃恒温箱内静置5～7天，（以上过程均需绝对无菌）。

2．观察瓶底有散在的小片单层细胞时，更换同样培养液，继续培养。每天观察，见细胞呈岛状生长并成栅栏状成纤维样细胞，其间有圆形亮细胞出现时，同时加入5-溴脱氧尿苷（BrdU）200μg/ml，胸腺嘧啶核苷（TdR）0.3μg/ml，秋水仙素0.05μg/ml，继续培养三小时收获。

3．消化：将培养瓶中的培养液倒入离心管内，培养瓶中放入0.02%EDTA胰酶消化液0.5ml，在37℃恒温下消化5分钟，用吸管轻轻吹打，使贴壁细胞消化下来后，用1～2ml盐水或倒出的培养液冲洗管壁后也一并倒入离心管内，1000转/分离心8分

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

钟，去上清液，留0.5ml。

4．低渗：离心管内加入预温37℃的0.4%氯化钾与0.4%枸橼酸钠等量混合液4 ml，轻轻打匀，在37℃温箱中低渗16分钟。

5．固定：加新鲜甲醇:冰醋酸（3:1）1 ml固定液，轻打匀，离心去上清液。再加入上述固定液5 ml，轻打匀，固定30分钟，离心去上清液，再加5 ml固定液，轻打匀，放置冰箱内14小时（过夜，常规不过夜），离心去上清液，以新配甲醇:冰醋酸（1:2）液1 ml，固定半小时，离心去上清液，再加入甲醇:冰醋酸（3:1）0.5ml制成细胞悬液。

6．制片：滴细胞悬液2～3滴在已被冰水浸泡的清洁载玻片上，立即用口轻轻吹散，然后在酒精灯火焰上快速通过2～3次，待其自然干燥，放置三天。

7．烤片：80℃烤箱内烘烤2小时取出，自然冷却备用。

**三、G显带**

将放置1～3天的冷却备用烤片投入生理盐水配制的0.05%胰酶一份及0.02% EDTA PBS液三份，pH 7的混合液中（胰酶最终浓度为0.0125%）消化10～30秒，取出后立即在pH 7磷酸缓冲液中一过性漂洗二次，然后投入姬姆莎:pH7.2磷酸缓冲液（1:15）中，染色8～12分钟，（以上过程均在恒温30℃内进行），自来水冲洗，自然干燥。

**四、镜检** 观察其细胞分裂指数及早期细胞所占百分数。

**五、照相** 选择带纹清晰的早期细胞用日本产Olympus$BH_2$型自动照相显微镜（油镜100×3.5倍）摄影。

**六、核型分析** 在熟练掌握中分辨模式图的基础上，参照ISCN（1981）制定的高分辨模式图带纹，必要时在显微镜下对照排对识别。

## 结果与讨论

1．我们根据5-溴脱氧尿苷（BrdU）可使染色体凝缩变短[7]的性能，参照shah JV[4]的方法，加以改进，试用了不同浓度的秋水仙素，最后将秋水仙胺0.25μg/ml改用为低浓度秋水仙素0.05μg/ml，效果较好。染色体增长，带纹增多，从实验表明，如果降低秋水仙素的浓度并在时间处理上加以适当调整，可收到减轻染色体浓缩的效果，得到分辨率较高的前期染色体，与文献[1]报导一致。获得了羊水细胞染色体高分辨的成功，在较好的20例标本中计数各期分裂细胞总数631个，其中早期分裂相422个（占66.9%），中期209个（占33.1%）。早期分裂相中染色体显示出清晰的550～850$^+$条带纹（图片）。羊水染色体高分辨G显带这一技术的成功，对产前诊断有重要价值，可以发现许多中期染色体显带技术无法识别的染色体缺陷病和染色体病变位置的准确定位。

2．要获得羊水染色体高分辨的成功，首先要使羊水细胞生长旺盛，但影响羊水细胞生长的因素很多，如采取羊水的孕期，羊水量和羊水中活细胞数目，血清质量以及pH值、污染等问题都要解决好。培养成功后，能否收到分裂图相，特别是早期分裂图相。就要求熟练地掌握好细胞培养生长收获时机和加药的准确性，以及制片操作过程的精细，以免在低渗、固定制片中细胞丢失。以上各个环节如果处理不当，均可导致失败。

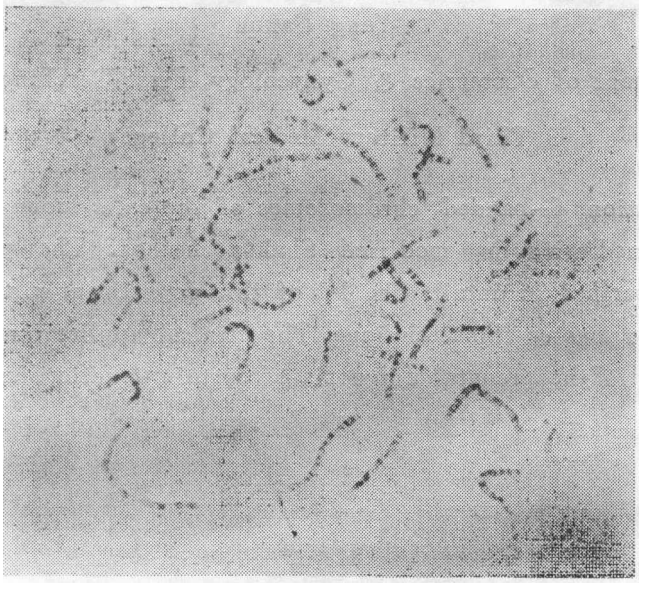
3．染色体的铺展：由于分裂早期的细胞，在制片时，细胞不易铺展开，我们利用了冰醋酸能使细胞膨胀的性能，延长固定时间及加大冰醋酸的比例，一般都能铺展开，减少了细胞的重叠，有利于识别与排对。

4．G显带技术的好坏，直接影响高分辨的效果，尽管培养制出了好的早期分裂图

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

相，如果没有好的G显带技术显出清晰的带纹，也就没有高分辨可言。我们采用固定片令，玻片在80℃烘烤2小时，避免了分带时染色体发毛。特别是在胰酶的浓度上，采用0.0125%较小浓度，这样在消化时间上易于控制。操作在恒温30℃内进行，气温影响较小，效果稳定。

因此，我们已掌握羊水高分辨G显带技术，并已开始应用于临床。于1984年11月经专家鉴定，认为达到国内领先水平。



附图　羊水染色体高分辨G显带核型

## 参 考 文 献

1. Yunis J and Sanchez O: The G-banded Prophase Chromosomes of Man. Humangenetik 1975; 27:167

2. Yunis JJ: High-resolution of Human Chromosomes. Sciene 1976; (191):1268

3. ISCN(1981):An International System for Human Cytogenetic Nomeclature-High-Resolution Banding. Cytogenet and Cell Genet 1981; (31):5—19

4. Shah JV, et al: Human Chromosomes in Prenatal Diagnosis: A One Stop High-Resolution Technique. Prenatal Diagnosis 1983; (3):253—256

5. Hoo JJ, et al: Preparation of High Resolution Chromosomes from Amniotic Fluid Cells. Prenatal Diagnosis 1983; (3):265—267

6. Yu RL, et al: Cytogenet and Cell Genet 1981; (311):111—114

7. Zakharov A and Egolina N: Differential Spiralization along Mammalian Mitotic Chromosomes: I. BUdR—Revealed Differentiation in Chinese Hamster Chromosomes. Chromosome 1972; 38:341

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

# A Preliminary Study on High Resolution G-banded Chromosomes from Amniotic Fluid Cells

Wang Dakun

(Department of Obstetrics & Gynycology, First Teaching Hospital, Third Military Medical College)

High resolution G-banded chromosomes of the cells from human amniotic fluid were obtained with the modified Shah's method. The procedures of this method were described in detail. The lab of this department is the first institute in our country to master this technique. The clinical application of the technique will be valuable in the prenatal diagnosis of certain genetic disorders.

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net