

邻的细胞膜之间出现大量空泡。这种现象提示了激活T细胞培养上清液有侵袭肝癌细胞的特性,导致细胞溶解。

### 参 考 文 献

- [1] Granger, G. A., et al., 1978, *Cell. Immunol.*, 38: 388-402.
- [2] Hiserodt, J. C., et al., 1979, *J. Immunol.*, 123: 317-324.
- [3] Yamamoto, R. S., et al., 1978, *Cell. Immunol.*, 38: 403-416.
- [4] Rosenau, w., and C. D. Tsoukas, 1976, *Am. J. Pathol.*, 84: 580-596.
- [5] Gately, et al., 1976, *Cell. Immunol.*, 27: 82-93.
- [6] Onozaki, K., et al., 1985, *J. Immunol.*, 135: 3962-3968.
- [7] Granger, G. A., et al., 1980, In "Manual of Clinical Immunology second edition", pp. 267-274.
- [8] Green, L. M., et al., 1984, *J. Immunological Methods.*, 70: 257-268.
- [9] Russel, S. W., W. Rosenau, and J. C. Lee., 1972, *Am. J. Pathol.*, 69: 103-118.
- [10] Kobayashi, Y., et al., 1982, *J. Immunology.*, 128: 2714-2718.
- [11] Eileen, L., et al., 1984, *J. Immunol.*, 133: 3429-3436.
- [12] Bentwich, Z., et al., 1973, *Transplant Rev.*, 16: 29-50.
- [13] Greaves, M. F., et al., 1973, In "T and B lymphocytes; Origins, properties and Roles In "Immune Responses", American Elsevier, New York.
- [14] Hoffman, T., and H. G. Kunkel, In 1976, "In vitro Methods in cell mediated and tumor immunity" (B. R. Bloom and J. R. David, Eds), pp. 71, new York.
- [15] Falkoff, R. M., et al., 1982, *J. Immunol. Methods.*, 50: 39-45.

## 绒毛滋养层细胞直接制备染色体方法

陈园茶 马长俊 孙自国 \*刘淑芳 \*\*李立 \*\*\*谭晓菊

(四川省计划生育科研所组胚遗传室)

绒毛与胎儿是由同一个受精卵分化发育而成,它是胚胎的附属结构,因此其细胞染色体与基因组成同胎儿细胞是一致的。吸取绒毛比抽羊水细胞可提前八周左右进行遗传病的产前诊断,这样可以减少孕妇的精神负担,并可避免中期引产的并发症。

韩安国<sup>[1]</sup>早在1973年已吸取绒毛进行产前性别预测,直至1984年Simoni等<sup>[2]</sup>才报道100例绒毛细胞直接制备染色体方法。这一方法的最大优点,是其分裂来自绒毛的细胞滋养层细胞的自发分裂(Spontaneous Mitosis)在培养1小时后即可进行制片,因而可以避免

母体细胞污染。该文报道后立即受到普遍重视,认为这是一项开拓性工作,使产前诊断进入一个新领域。但以直接法作绒毛染色体制备是一个新问题。根据我们的经验要比羊水细胞制片难度大得多,例如分裂相少,染色体容易丢失且形态不佳,多呈弯曲和缩短,染色单体分开,G带的带纹不够清晰等。Perry等(1985)<sup>[3]</sup>认为绒毛直接法显带质量不如羊水细胞,核型分析成功率为97%,依靠直接法技术可能难以

\* 成都军区总医院。

\*\* 自贡市计划生育科研所。

\*\*\* 万县地区计划生育指导所。

诊断染色体的结构畸变,因而主张用两天短期培养技术才能获得优质适用的带型。

绒毛细胞染色体质量是关系到早期诊断正确性的重大问题。随 Simoni 等报道之后,北京<sup>[4,5]</sup>武汉<sup>[6]</sup>等地也先后获得成功,各取得不同程度的进展,但迄今如何进一步改进制备染色体的质量,仍为一急待研究的问题。为此,我们自 1984 年起采取人工流产及盲吸法,吸取绒毛 2 毫克—15 毫克/例,其中盲吸 65 例进行这方面的研究。

## 材料与方 法

### 取材和培养

选择怀孕 6—7 周(40—50 多天)的绒毛,放入 D-Hank's 液中洗去血液,首先在显微镜下辨别绒毛,以短粗带有小突起的为佳,指状绒毛较次,经 D-Hank's 液洗后移至 2—5 毫升 RPMI 1640 培养基,加入适量的 HEPES(不加小牛血清)。培养于 10 毫升离心管中,加秋水仙素最终浓度 1 微克/毫升。培养基用量的多少视绒毛量而变,培养时间为半小时至 1 小时。

### 制片步骤

1. 37℃培养半小时至 1 小时后,吸去培养液加低渗液 4 毫升(低渗液配法 1%枸橼酸钠与 0.075 mol/L KCl 按 1:1 配成),需预热至 37℃,低渗处理 15 至 20 分钟。

2. 预固定加甲醇冰醋酸(3:1)0.5—1 毫升混匀 1—2 分钟。

3. 待自然沉降后,去上清液,再加固定液甲醇冰醋酸(3:1)4 毫升,固定 40 分钟,此时绒毛沉于离心管底部。

4. 去固定液加 60%冰醋酸 1 毫升并静置 2—3 分钟后,加甲醇 3 毫升(滴管吸满甲醇,插至离心管底部,慢慢加入直至 3 毫升),然后以气泡轻轻混匀,操作时必须注意轻缓,否则染色体极易丢失。

5. 固定 10 分钟,在 5 分钟时,滋养层细胞已游离于固定液中,这时用滴管把剩余的绒毛挑出,然后 800—1000 rpm 离心 5 分钟,再加新鲜固定液 2 毫升固定 20 分钟,离心去上清液,再加新鲜固定液 2—3 滴,用手指轻弹离心管底部,使细胞混匀。

6. 滴片,滴在已用冰水浸泡的洁净载玻片上。

7. 60℃恒温箱过夜。放入温箱前先经热风吹干,以防止染色体(发霉),周围呈细微绒毛状染色,影响清晰程度。

8. 以 D-Hank's 液配 0.02%胰酶消化液(pH 7.0),处理细胞 15—30 秒。

9. 0.85%氯化钠液洗二次。

10. 4%Giemsa 染液(pH 6.8 磷酸缓冲液配制)染色 5 分钟。8、9、10 二步都在 37℃水浴锅内进行。

## 结 果

1. 严格按照上述方法,所得的分裂相中,染色体形态及分散良好,染色单体不分开,显带清晰,方法稳定(图 1—5)。对染色体结构畸变也易于鉴别。我们制备了 G 带、C 带、Ag-NOR 银染及 G 带+银染复合染色、及加入 BudR 培养 48 小时制成 SCE,所有显带在质与量上显然优于 Perry 等所报道的。

2. G 带分析绒毛细胞染色体核型共 249 例,除 5 例异常核型外,128 例为正常男性胎儿,116 例为正常女性胎儿。216 例其母龄 < 35 岁者中,仅发现一例 47,xy+mar,mar 为额外中央着丝粒型小染色体。其大小与 G 组染色体相似。其父母检查未发现这种额外小染色体。另外 33 例其母龄 ≥ 35 岁,则发现 4 例为异常核型—47,xyy, 47,xy+13.46,xy/92,xxyy, 与 69,xxx/46,xy。

## 讨 论

本文方法有别于 Simoni 等<sup>[2,7]</sup>及国内其他报道。

(1) 低渗液不同。Simoni 用 1%枸橼酸钠液,国内多采用这种低渗液。而我们则采用 1%枸橼酸钠液与 0.075 mol/L KCl 1:1 低渗液。因为我们在大量羊水细胞染色体制片中,曾分别用 0.4%枸橼酸钠或 0.075 mol/L KCl 低渗液,前者染色单体分开,且显带不佳;后者显带清晰,但染色体扩散不良,唯有以 0.4%枸橼酸钠与 0.4%KCl 1:1 相混作为羊水低渗液才兼取两者之长。

我们曾以上述羊水低渗液和单独使用 1%枸橼酸钠液或 0.075 mol/L KCl 液,用于绒毛直接法,结果染色体显带不佳扩散不好,因而

认为可能是羊水低渗液浓度与比例不适于绒毛直接法,但改用1%枸橼酸钠液与0.075 mol/L KCl 1:1低渗液,则染色体扩散与显带均收效良好。

#### (2) 秋水仙素浓度

纺锤丝微管(microtubules)连接于中心粒与着丝粒之间。秋水仙素有抑制微管蛋白的聚集能使微管解聚<sup>[8]</sup>,所以秋水仙素浓度与染色体扩散有一定关系。

我们用不同浓度的秋水仙素(0.5微克/毫升,1微克/毫升,2微克/毫升等)测试,在染色体扩散合适,和染色体的单体又不分开方面进行比较,结果发现其最适浓度为1微克/毫升。

(3) 固定 simoni<sup>[2,7]</sup> 报告中的固定时间为10分钟。按照我们的经验,三次固定时间总共以1小时零10分钟为宜。短时间(如10分钟)固定,其形态不佳,弯曲,发毛。而固定时间较长者,很少有上述现象发生。

我们认为以上三点是不可分割的,是相互影响的。

(4) 制片时室温控制在25℃以内(夏天绒毛制片时室温到30℃染色体丢失现象严重,当室内安装空调室温在25℃以下则染色体不丢失)。

Simoni等<sup>[9]</sup>(1985)报告446例母龄≥35岁者,发现有24例核型异常,53例母龄<35岁者则未发现核型异常者,这一现象与我们

所观察相似

### 摘 要

本方法对绒毛滋养层细胞直接制备染色体作了改进。分别将制片手法,低渗液配制,秋水仙素浓度与固定时间等方面给以改良。后三者不同于Simoni及国内报道,作者认为低渗液成分,秋水仙素浓度与固定时间是不可分割与相互影响的。此法所得分裂相中,染色体形态及分散良好和显带清晰,方法稳定,有利于孕早期诊断的染色体结构分析。

### 参 考 文 献

- [1] 韩安国等, 1973, 中华医学杂志, 9: 521.
- [2] Simoni, G et al., 1984, *Hum Genet.*, 66: 252—259.
- [3] Tracy B Perry et al., 1985, *Am. J. Obstet Gynecol.*, 15: 161—166.
- [4] 崔梅影、陈保江、周宪庭等, 1985, 优生快讯 8: 3—6.
- [5] 孙念恬、王凤云等: 1985, 遗传与疾病, 2(1) 1—4.
- [6] 杨大森、马庭元等, 1984, 优生快讯 4: 1.
- [7] Simoni, G. et al., 1983, *Hum Genet.*, 63: 349—357.
- [8] Vogel, F. and Motulok, A. G. 1982, *Human Genetics*, 22—23 Springer-Verlag.
- [9] Simoni, G. et al., 1985, *Cytogenetics of chorionic villi sampling: Technical Developments and Diagnostic Applications In: First Trimester Fetal Diagnosis Edited by M. Fraccaro G. Simoni B. Brambati 99—108 Springer-Verlag.*

## 用柠檬酸胰酶消化分散细胞

熊绍银 肖成祖

(军事医学科学院微生物流行病学研究所)

通常用于消化分散细胞的有胰酶、乙二胺四乙酸二钠(EDTA-2Na),以及两者的混合液,但它们消化分散细胞的效果并不理想。我们参考Adams用柠檬酸胰酶作消化剂获得了满意的效果,方法如下:

### 细胞

人正常二倍体肌皮细胞(SM<sub>2</sub>)、人喉癌细胞(Hep-2)、人肺癌细胞(A 549)、人宫颈癌细胞(HeLa)、鼠成纤维传代细胞(L<sub>929</sub>)、地鼠肾传代细胞(LLC-