

產前染色體分析與培養

陳持平

摘要

染色體 (Chromosome)，源自希臘文的中的“colored body”。早在十九世紀，這個概念就已被提出。這些存在於細胞核中，可以被染色的神秘物質，長久以來被視為遺傳之鑰。但一直到1956年，由於一次實驗的錯誤，導致細胞浸泡於過度低張的溶液，因而清楚地觀察到染色體，為史上一大突破。到了1959年，Dr. Lejeune 發現 Down syndrome 為第二十一號染色體多了一條，從此細胞遺傳學進入了一個新紀元。接著，由於許多前輩的努力，致力於改善細胞培養的方法，培養的方式由早期培養瓶 (flask) 培養，轉變為利用蓋玻片培養，培養的細胞範圍越來越廣，方法更臻成熟。即使，陸續有發展出更新的遺傳診斷方式，但傳統的細胞培養及染色體鏡檢仍然為不可取代的磐石。

5.1 羊水驗收程序

1. 收到羊水，即刻給予實驗室編碼，並登記在檢體登錄本。
2. 記錄所收羊水量以及羊水顏色、受檢人姓名、實驗室編碼、身份證字號或護照號碼、性別、出生日期、年齡、懷孕週數、適應症、採集時間、接收檢體時間、報告發出時間。
3. 羊水標本若在5~6小時內做組織培養，置於室溫即可；若有無法在當天做培養時，須放入冰箱4°C保存，切記不可冷凍。





4. 檢體若不是羊水、檢體汙染、冷凍、使用非無菌離心管、使用橡膠瓶蓋時，應拒收檢體。
5. 由超音波室直接留 2 ml，送核醫做甲型胎兒蛋白 AFP。

5.2 羊水細胞培養維繫過程

1. 目的

羊水細胞可用來做產前診斷染色體數目及構造異常。

2. 材料

(1) 培養基：

Bio-AMF-1 (Biological Industries)

Bio-AMF-1 supplement (Biological Industries)

penicillin-streptomycin (GIBCO) (每兩個禮拜要補充 1%)

L-glutamin (100X) (GIBCO) (每兩個禮拜要補充 1%)

(2) HBSS (1X)，1% penicillin-streptomycin。

(3) 無菌離心管兩支圓錐形 (conical shape)，15 ml，螺旋蓋 (screw up)。

(4) 35 mm 無菌培養皿 2~4 個。

(5) 22 × 22 mm 蓋玻片浸泡於 95% 酒精中 (95% 可燃燒，75% 只能滅菌)。

(6) 無菌可拋棄式 1 ml 吸管。

3. 程序

(1) 培養基在操作前 1~2 小時先從冰箱取出置於室溫，回溫至 20~37°C。

(2) 以無菌操作方式，將羊水分裝於兩支離心管中 (一支約 7 ml)，再把蓋子蓋上。

(3) 以 1200 rpm，離心 10 分鐘。

(4) 離心後，細胞沉在底端，將上層羊水倒掉 (約剩下 0.2 ml)。

(5) 取一片蓋玻片過火至乾，置於 35 mm 無菌培養皿中。



- (6) 加0.4 ml 培養基液入一支離心管（如果，細胞量足夠可設兩片玻片，則取0.8 ml），利用吸管操作，使離心管底部細胞在培養液中均勻混合。
- (7) 將此混合細胞培養液0.6 ml 置於22 × 22 mm 蓋玻片上。
- (8) 將此培養皿置於溫箱 (37°C，5% CO₂)，內置水盤保持溼度。

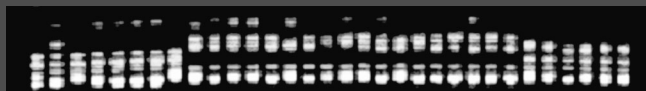
5.3 羊水細胞培養維繫過程

1. 48小時後，將培養皿取出，無菌操作加入1.5 ml 培養基。
2. 羊水細胞培養設立後第4~5天，利用倒置顯微鏡觀察，看是否有細胞附長在蓋玻片上。
3. 如果看見有相當數量的細胞附長 (attach) 在蓋玻片上，用無菌滴管操作，取出培養液及混合其中未附生的細胞，置於15 ml 無菌離心管中，以備不時之需。
4. 吸取1~2 ml HBSS 輕輕沖洗蓋玻片（斜放），再把HBSS吸棄。
5. 吸取2 ml 新鮮培養液，補充於原培養皿中。
6. 以後每2~3天補充新鮮培養液。

5.4 羊水細胞原位收成 (in situ harvest) 過程

1. 材料

- (1) Colcemid with HBSS (Gibco 10 µg/ml)。
- (2) 低張液：
37°C之0.0375 M KCl（用0.075 M KCl跟ddH₂O以1:1稀釋即可）0.075 M KCl (5.6g/l)
配製：
（稱5.6 g KCl溶於少於1 L之ddH₂O，再加ddH₂O至1 L把黏在瓶口之KCl粉末沖洗下來，搖一搖再分裝至500 cc瓶子，放置冰箱，要用再移到烘箱，500 cc還可再分裝到250 cc瓶子）。
- (3) 固定液：（甲醇：醋酸=3:1）。





(4) 超薄玻片 (SuperFrost)

(5) 封片膠 (Assistant-Histokitt, mounting medium for histology/microscopy)

2. 程序

(1) 羊水細胞經組織培養達足夠量時 (約一星期左右)，要取培養皿中之細胞做染色體分析、辨認。

(2) 加3滴秋水仙副素 (Colcemid) (1 ml 空針，#20 針頭) 於培養皿中。

(3) 秋水仙副素 (Colcemid) 加入後 3~4 hrs，用倒置顯微鏡觀察，看細胞分裂活性是否夠高，即可決定何時收成。

(4) 細胞分裂活性達可收成時，加入 2~3 ml 低張液，靜置 20 分鐘 (partial hypotonic)。

(5) 以滴管緩慢吸除上清液，並沿培養皿周圍加入 2~3 ml 低張液，靜置 25 分鐘。

(6) 25 分鐘後，沿周圍加入 2~3 ml 固定液，靜置 10 分鐘 (partial fixer solution)。

(7) 10 分鐘後，以滴管緩慢吸棄緩慢吸棄上清液，加入 2~3 ml 固定液，靜置 20 分鐘。

(8) 重複步驟 7，靜置 15 分鐘。

(9) 重複步驟 7，靜置 10 分鐘。

(10) 準備蒸氣盤，溫度到達後，將超薄玻片標示清楚，於上滴一滴封片膠，以竹籤輕輕挑起蓋玻片滴至半乾約 (30 sec)，平放在玻片上 (細胞面朝上)。

(11) 將玻片置於蒸氣盤至乾。

(12) 將玻片置於 62°C 之溫片器 (slide warmer) 上隔夜 (4:00 pm~ 隔天 8:00 am)。

5.5 組織細胞驗收程序

1. 組織、皮膚、胎盤檢體用 HBSS 或生理食鹽水 (normal saline) 採取後，若立即送達實驗室，可將檢體放置室溫；否則需冷藏保存，細胞才不會溶解，切記不可冷凍。

2. 收到檢體，即刻給予實驗室編碼，並登記之。



5.6 組織培養設立過程

1. 目的

評估染色體異常、血液鑲嵌症的進一步診斷：確認遺傳基因疾病及代謝異常的診斷、流產組織之染色體檢查。

2. 材料

(1) 培養基：

Bio-AMF-1 (Biological industries)

Bio-AMF-1 supplement (Biological industries)

penicillin-streptomycin (加1%入Bio-AMF-1中) (Gibco)

L-glutamin (100X) (加1%入Bio-AMF-1中) (Gibco)

(2) 無菌培養瓶-25 cm² 2個

(3) 無菌可拋棄之5 ml吸管

(4) 35 mm 無菌培養皿2~4個

(5) HBSS(1X), 1%penicillin-streptomycin

(6) 組織剪

(7) 95% 酒精

(8) Trypsin-EDTA(10X)(Gibco) (用注射用水稀釋成1X)

(一個培養瓶 (Flask) 用2 ml)

(9) RPMI-1640, 1%penicillin-streptomycin, 1%L-glutamin

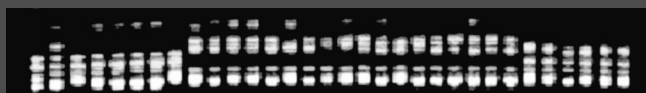
3. 程序

(1) 吸管將組織（胎盤，皮膚，肝，流產物 (abortus)）取出至含1.5 ml HBSS之培養皿沖洗。

(2) 沖洗後之組織挑至含0.5 ml培養液之培養皿中。

(3) 以組織剪將組織剪碎，並與培養液混合均勻（組織剪須先以95%酒精消毒，過火燒紅，放涼再使用）。

(4) 取1 ml混合組織培養液，放入培養瓶中，輕搖一下（培養瓶中一共是1~1.5 ml即可）（若檢體量一管可設2個培養瓶，則1 ml就各分0.5種進培養瓶）。





- (5) 將培養瓶置於 37°C 之溫箱中（若是像胎盤不容易生長的組織，可使之倒扣，讓組織在上方，較不會因為培養液 (medium) 的關係而無法附著）（剩餘的檢體需置於冰箱內）。

5.7 組織培養維繫及收成過程

1. 如果有倒扣，2~3 天再倒扣回來。
2. 依檢體種類，觀看組織附著的情形，皮膚約 1~2 天可加 2 ml 新培養液入舊的培養中，胎盤約 6~14 天（培養瓶中培養液總量不超過 3 ml）。
3. 2 天後，把舊的培養液吸起保存，更換新鮮 4~5 ml 培養基。
4. 移動細胞：
（Trypsin 從冷凍庫拿出來退冰）
（一個培養瓶須要用到 2 ml）
 - (1) 第一次先用 1 ml 的胰蛋白清洗，吸到原離心管中（因為 Trypsin 無法在有培養液中作用）。
 - (2) 第二次再用 1 ml Trypsin 作用 30 秒，用手左右拍培養瓶，但不要將細胞拍到上面去（胰蛋白讓細胞離開培養瓶，才有辦法移到培養皿上面去）。
 - (3) 將舊的培養液 2 ml 加到含胰蛋白的培養瓶中，使之停止作用。
 - (4) 將 0.5 ml 細胞移到培養皿上。
 - (5) 等 1~2 小時，即可附著於培養皿上（一般羊水要 48 hrs）。
 - (6) 1~2 小時後，加 1.5 ml 培養液。
5. 1~2 天後觀查情況並收細胞。
6. 收成過程同“羊水細胞原位培養收成過程”。

5.8 抽取血液染色體檢體步驟

1. 病人如需做染色體檢驗，由醫生填寫檢驗申請表送交實驗室。
2. 安排抽血日期及時間。



3. 將收費通知單開給受檢人，並且將抽血的日期、時間通知負責抽血的醫生。
4. 準備 Sodium Heparin 綠頭真空管（若沒有真空管則用 5 ml 針筒抽取約 0.1 ml Sodium Heparin 留於針筒內以防抽血時凝結）（若要做 DNA 則一定要用紫頭真空管）。
5. 綠頭管上的蓋子消毒後，由血管抽血 5 ml，抽完血後，立即將病人姓名標明上，送實驗室。
6. 血液檢體若非使用 Sodium Heparin 綠頭管採集時，應拒收檢體。

5.9 血液細胞設立過程

1. 材料

(1) 培養基：

RPMI 1640 (Hyclone)

fetal calf serum（加 20% 入 RPMI 1640）

（需為純胎牛血清，非小牛血清）

penicillin-streptomycin（每兩個禮拜要補充 1%）

L-glutamin（每兩個禮拜要補充，第八天要補充，若剩下 50 ml 培養液，就加 0.5 cc glutamin，即 1%）

(2) Phytohaemagglutinin(PHA) (HA15 Gibco)（一種植物激素，似抗原 (antigen) 的作用，可刺激淋巴球 (lymphocyte) 的分裂）

(3) 無菌培養瓶兩個 (25 cm²)

(4) 單支無菌塑膠滴管一支

2. 程序

(1) 收到血液檢體，即刻給予實驗編碼，並登記在檢體登錄本。

(2) 將檢體離心 1200 rpm，10 分鐘。

(3) 將 10 ml 培養基及 0.1 ml (0.15 ml) PHA 置於培養瓶中。

（若是胎兒臍帶血則加 0.2 ml PHA）

(4) 將離心管中的白血球與血清稍稍混合 (buffy coat)，取 0.5 ml 入一個培養瓶中。

(5) 將培養瓶蓋上，不要太緊，置於 37°C 之溫箱中。





若是使用針筒抽的血：

- 將血液檢體針筒倒立在試管架上，則紅血球會下沉，白血球會浮在上層。
- 將 10 ml 培養液及 0.1 ml (0.15 ml) PHA 置於培養瓶中。
- 如果此時針筒之紅白血球已經分離，輕轉針筒使白血球與血清稍稍混合，再將針頭彎曲成 90 度，用倒置方法把約 0.5 ml 的血清混合白血球，放入培養瓶中。
- 將培養瓶蓋上，不要太緊，置於 37°C 之溫箱中。

5.10 血液細胞收成過程

1. 材料

- 秋水仙素 (Colcemid) with HBSS (Gibco 10 µg/ml)
- 低張液：0.075M KCl，37°C (5.6 g/l) (存於冰箱，使用時記得拿出來烘箱預熱)
- 固定液：甲醇：冰醋酸 = 3:1
- 離心試管兩支-conical shape 15ml，離心
- 浸在蒸餾水中之清潔超薄玻片 (0.8 mm)(SuperFrost)
- Ethidium bromide (5 µg/ml)(SIGMA E-8751) (要避光)
(配製前要先從冰箱取出回溫，才不會影響秤重)
(5 µg/ml = 500 µg/100 ml = 0.0005 g/100ml)
(最好用有 0.45 µm filter 針筒過濾)

2. 程序

- 經過 48~72 小時培養，加 0.1 ml Ethidium bromide 作用 90 分鐘。
- 加 0.1 ml 秋水仙素 (colcemid)，置入溫箱，等 A 培養瓶：26 分鐘；B 培養瓶：16 分鐘
(先打秋水仙素 (colcemid) 入 A，等 10 分鐘，再打秋水仙素 (colcemid) 入 B，再一起等 16 分鐘。)
- 將培養基及細胞倒入離心管中。
- 超速離心 1200 rpm，10 分鐘。



- (5) 吸去上層無細胞液，只留0.1~0.2 ml與沉在底部細胞輕輕混合均勻。
- (6) 加5~10 ml低張液（約加到離心管的14 ml），頭1~2 ml慢慢加入，一邊加低張液，一邊用滴管操作，使其細胞混勻，留在低張液中18分鐘（置留時間不要超過27分鐘，否則會使白血球提早破裂）。
- (7) 18分鐘後，加入3~5 ml固定液，混合均勻。
- (8) 超速離心1200 rpm，10分鐘。
- (9) 倒掉上層無細胞液。
- (10) 加5~10 ml固定液，首先1~2 ml慢慢加入，一邊加固定液，一邊用滴管操作或用手輕搖，使其混勻，置於固定液中20分鐘。
- (11) 重複(8)~(10)的步驟2次。
- (12) 調整細胞濃度（低倍可看到5個細胞），約吸3 cm的量放到超薄玻片上，細胞在玻璃片上要分布均勻。
- (13) 放在60°~62°C之溫片器上隔夜（18~20小時）（12:30 pm~隔日9:30 am）使之老化(aging)。



