

染色體檢查染色法

王寶田·陳明

摘要

早在顯微鏡發明後的十九世紀，就有科學家想了解人類染色體，第一個觀察的科學家是 Fleming (1889)，後來 Weissman，van Benedem，Strasburger，Waldeyer，等人跟進，直到 1944 年，Avery，McLeod 以及 MacCarty 確認了遺傳的基本物質是 DNA，而不是蛋白，進一步確認了包裝 DNA 的染色體，才是遺傳物質一代傳一代的基本單位。但是真正第一個成功把細胞核以及其中染色質染色的，是 Feulgen (1924)，其後配合 1953 年 Watson 和 Crick 對於 DNA 基本結構的發現，遺傳學才進入了 DNA 和染色體的領域。

有趣的是，直到 1956 年以前，科學家都一直以為人類染色體是 48 條，直到華裔科學家蔣有興 (J. H. Tjio) 和瑞典科學家李文 (Albert Levan) 才從培養的人類肺部組織正確的決定人類染色體數目 ($2N$) 是 46，也從此，我們人類才跟黑猩猩分開，否則有一段很長的時間，人類的染色體被認為是 48 條，而我們的近親黑猩猩 (Chimpanzee) 正好也是 48 條。

染色體製備的方法的進步，造成了人類細胞遺傳學的快速發展，一直到今天，人類細胞遺傳學還是跟果蠅一樣，是被研究得最徹底的物種，許多其他物種的細胞遺傳學研究，到現在還是緊跟著人類細胞遺傳學的發展腳步。





3.1 原理

要觀察染色體，首先要能夠做染色，染色體的結構，包含一個中節 (Centromere)，兩個端粒 (Telomere)，以及一些核蛋白 (Nuclear proteins) 把染色質 (Chromatin) 做層層的折疊，結構的不同使我們能夠透過一些特殊的染色劑 (Chromogens) 對於四種核苷酸 ATCG 不同的親合力而使每一條染色體因為細部結構和所含基因多少的不同，有不同的型式可以被分辨，特別是在哺乳動物的染色體，運用一些方法，可以是條帶很明顯，好像每一條染色體都有不同的紋路，來達成辨認和判讀。

1970年，Caspersson 等人第一次發現一種會發螢光的物質奎那克林 (Quinacrine mustard)，可以對染色體做染色，後來發現 AT-rich 的區域（指基因序列中富含 A 以及 T 的區域）會發螢光，反之 GC-rich 的區域相對來說是暗的；但最重要的染劑，還是傑姆沙氏染料 (Giemsa stain)，它裡面含有吡啶橙 (acridine orange) 和甲烯藍 (methylene blue) 兩種主要成分及一些次要成分，可以對 AT-rich 的區域染上深色，早期只有用 5~10% 的傑姆沙氏染料 (Giemsa stain) 去染，看起來就是深染的一整條，只能比較長短和數數目，後來發現用熱或者蛋白酶先處理一下，把鍵結在染色質上的蛋白質吃掉一些，造成明暗不一的細紋，也才造就了目前最標準的 Giemsa-banding。

在人類基因組內有一些區域基因數目較少，分裂時較慢複製，我們叫做異染色質 (heterochromatin)，包括中節都是以異染色質為主，也因此，運用 Giemsa stain 加上一些強酸強鹼的前處理，就成為 C-banding，可以染上結構性異染色質 (heterochromatin)（在整個細胞周期中恆常保持異染色質的部分，如中節，Yqh，9qh 等等）；而若以熱的鹼處理過，所造成的顯帶正好是 G-banding 的相反，我們稱之為 R-顯帶。

還有一種銀染，我們稱之為 Silver-NOR，NOR 是代表核仁形成區 (Nucleolus Organizer Region)，是活化的核糖體基因 (active ribosomal DNA)，在人類是位於 13，14，15，21，22 染色體的短臂衛星體附近，在診斷上也有特殊的價值。

我們在這裡介紹 G-banding，C-banding，Q-banding 以及 Ag-NOR stain，因為這是最被廣泛應用的染色法，至於其他染色法例如 R-banding，DAPI-banding，Replication-banding 等等，可能在研究上的應用較大，近年由於分子細胞遺傳學的進步，螢光原位雜合法 (FISH) 被大量應用在人類臨床細胞遺傳診斷上，但傳統的染色體分析，仍是最基本且必備的檢查項目，也惟有先應用 G-banding，C-banding，Ag-NOR 等傳統染色法，才能擬定進一步使用 FISH 甚至其他先進診斷工具如 SKY (spectral karyotyping)，



CGH (comparative genomic hybridization) , Microarray , SNP chip (single nucleotide polymorphism) 等等的方針。

一個良好完備的細胞遺傳實驗室，必須具備這些基本技巧，我們接著針對各種染色法做一介紹，在此強調的是，每一家實驗室有不同的細部修正，各實驗室應發展自己的標準作業程序 (SOP) ，我們謹在此對於染色法，提供一個我們運用以久且穩定的程序供大家參考。這些染色法是根據彰基遺傳實驗室多年來各主要成員所帶來的各大實驗室的經驗所匯集而成（包括王寶田博士來自的 UCLA , Genzyme Genetics ；陳明醫師來自的 Duncan Guthrie's Institute , U Glasgow ，以及溫保英醫檢師所來自的中山醫學大學李宣佑老師實驗室）。

3.2 G-染帶法 (G-banding)

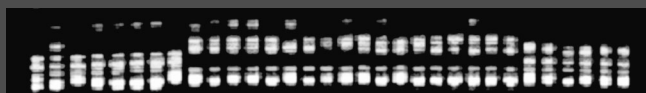
3.2.1 實驗目的

使細胞遺傳實驗室醫檢師在進行例行的 G.T.W (G-banding by Trypsin treatment and Wright's stain) 染色法檢查染色體時，有標準的作業程序與方法。

3.2.2 材料及方法

1. 材料

- (1) 95% 乙醇 (ethyl alcohol) 。
- (2) 二磷酸鹽 (Disodium phosphate) buffer :
將 KCl 0.2 g 、 NaCl 8.0 g 、 KH_2PO_4 0.2 g 、 Na_2HPO_4 1.16 g 溶於 1000 ml 蒸餾水中。
- (3) 介爾 (Gurr's) buffer (BDH. USA) :
將 1 錠溶於 1000 ml 蒸餾水，PH 調至 6.8 。
- (4) Wright's stain stock (Merck, USA) :
0.24 g Wright's dye 溶於 100 ml 甲醇。
- (5) Wright's working solution :
0.5 ml Wright's stain stock + 2 ml Gurr's buffer (1: 4) 。





(6) 2.5% 胰蛋白酶 (Trypsin) (Irvine Scientific, California, USA) :

0.05% Trypsin working solution 之配製：49 ml disodium phosphate buffer + 1 ml 2.5% Trypsin。

(7) Coplin jar 4 組。

(8) 固定液 [25 ml 醋酸 (Acetic acid) + 75 ml 甲醇 (Methanol) (1: 3)]。

2. 實驗步驟

(1) 製片 (slide making)

- 將玻片排列於玻璃缸之鐵架上，並加入 95% 酒精置於室溫隔夜，去油漬。
- 以超音波洗淨機震盪 60 分鐘，並將 95% 酒精倒掉，再加入 5% 酒精，置於 4°C。
- 將沈澱細胞 (cell pellet) 以固定液調成適當濃度。
- 取出玻片甩掉多餘的水分，讓玻片傾斜 30°，再以吸量管吸取細胞懸浮液 (cell suspension) 滴落至玻片上。
- 將玻片平置於溫片器 (約 60°C) 上，使細胞自然乾 (乾的速度快慢，會影響染色體是否均勻散佈) 並固著於玻片上。
- 在倒立顯微鏡下觀察，看染色體是否適當地均勻散佈，再做調整。

(2) G-Banding 染色流程

- 將製成的玻片放入裝有 0.05% Trypsin working solution 的 50 ml Coplin jar 中適當時間，進行去蛋白處理 (依檢體類別有所差異：羊水細胞作用時間約 70 秒、血液細胞作用時間較短約 30 秒)。
- 過 95% 酒精，以終止胰蛋白酶 (Trypsin) 的作用。
- 於二次蒸餾水中潤洗。
- 將 Wright's stain 加到玻片上進行染色。
- 用清水潤洗、風乾、觀察。



3.3 特殊染色法 (Special Stain)

3.3.1 實驗目的

為了使操作人員在從事例行染色體核型分析 (karyotyping) 過程中，發現有變異的染色體時，有輔助鑑定的依據，以提供正確完善之報告。一般常用的特殊染色方法，計有 C-banding，Ag-NOR staining 及 Q-banding 等三種方法。茲按順序敘述如下。

3.3.2 實驗方法

1. C 染帶法 (C -banding)

本法對著絲點及含有組成型異染色質 (constitutive heterochromatin) 之區段有特異的染色作用。因此，著絲點及染色體編號 1、9 及 16 的次級收縮區 (secondary constriction) 與 Y 染色體長臂的遠端區，用本法皆可染出。

(1) 預備工作與反應試劑

5% Ba (OH) ₂	50 ml
2 × SSC (0.3 M sodium chloride containing 0.03 M tri-sodium citrate)	50 ml
0.2 N HCl	50 ml

(2) 實驗步驟

- 將製成的玻片放在 50°C 的溫片器 (Slide warmer) 加熱 1 小時。
- 再放置於盛 50 ml 0.2 N HCl 之 Coplin jar 內中室溫 60 分鐘。
- 將新鮮配製的 5% Ba (OH)₂ 置於 50 ml Coplin jar 內，放入 50°C 水浴 (water bath)。
- 玻片自 0.2N HCl 之 Coplin jar 取出，放在蒸餾水中潤洗 3 次（每次均要換水）。
- 將玻片置於 50°C 水浴中的 Coplin jar 內含 5% Ba (OH)₂ [2.5 g Ba (OH)₂ + 50 ml H₂O]，其時間一般為 15 秒。
- 在二次蒸餾水中潤洗幾次（每次均要換水）。
- 將玻片放入置放於 65°C 水浴中的 Coplin jar，內含 2 × SSC (PH 7.0) 1.5 小時。
- 以蒸餾水潤洗。





- i. 用 Wright's stain 染色 (0.5 ml Wright + 2 ml Gurr's buffer) 2 分鐘。
- j. 用清水清洗，風乾、觀察。

2. Ag-NOR 染色法

本法是用銀的氨液來染出“核仁胞組成區”(nucleolar organizing regions)，也就是可把含有 28S 與 18S 核糖體基因的轉錄物 (rRNA) 的衛星染色體之軸區 (stalks) 染出。

(1) 預備工作與反應試劑

- a. 70°C 之烘箱或加熱器 (hot plate)。
- b. 50% silver nitrate (每 5 ml H₂O 加 2.5 g AgNO₃ 儲置於暗處)。
- c. 顯影液 (developer)。

製備：溶 0.2 g 粉狀 gelatin 於 10 ml dH₂O 中，置於 37°C 水浴槽 (water bath) 10~30 分鐘，隨時搖盪使之溶解，加入 0.1 ml 之 formic acid 混勻，儲置於暗處。

(2) 實驗步驟

- a. 先將烘箱設定在 70°C，或將玻片加熱器設定在 70°C。
- b. 將製成的玻片平放在鋁箔紙上。
- c. 在玻片上滴 2 滴顯影液與 4 滴 50% silver nitrate。
- d. 用吸量管 (pipette) 混合均勻。
- e. 蓋上蓋玻片，將玻片放在金屬盤內，再置入 70°C 烘箱內（或直接放在設定的加熱器上）直到看到玻片上之滴液變成金棕色為止（約兩分鐘）。
- f. 用蒸餾水將蓋玻片沖入垃圾袋中以免汙染桌面。
- g. 用 Wright's stain 染色 (0.5 ml Wright's stain + 2 ml Gurr's buffer)，2 分鐘。
- h. 用清水清洗，風乾、觀察。

3. Q 染帶法 (Q-banding)

染色體以 quinacrine dihydrochloride 染色後，在螢光顯微鏡下檢視，會呈現特異的亮暗交替的色帶 (Q 染帶)。

(1) 預備工作與反應試劑

- a. 螢光染劑：0.5% quinacrine dihydrochloride (Atebrin, USA)。



b. 緩衝溶液：McIlvaine's buffer，pH 5.6。

配製方法

(a) McIlvaine's buffer Stock solution：

Solution A: 0.1 M anhydrous citric acid (19.2 g/L)。

Solution B: 0.4 M anhydrous sodium phosphate dibasic (Na_2HPO_4) (56.8 g/L)。

(b) McIlvaine's buffer Working solution：

The buffer solution consists of 92 ml of solution A and 50 ml of solution B, (pH adjusted to 5.6)。

► 註：染劑液及緩衝溶液皆須錫箔紙包裹貯存於冰箱中。

(2) 實驗步驟

- 將染液倒入染色缸中，放入玻片，染色10分鐘。
- 把玻片取出，放入三個盛滿 McIlvaine's buffer 的 Coplin jar 中各清洗一次。
- 取出玻片，放在染色架上，加數滴 McIlvaine's buffer。
- 封上蓋玻片，用透明指甲油將四周封密。玻片染色後，儘量不要曝光，如不立刻觀察，需存放在4°C冰箱中。
- 於螢光顯微鏡下觀察。



