

血液染色體分析

郭保麟 · 林穎慧

摘要

血液染色體是採用周邊血液來分析。因為染色體是要在細胞分裂至分裂中期的階段時在顯微鏡下才可清楚分析，但周邊血液淋巴球是已分化的細胞，正常情況下不會進行細胞分裂，所以我們必須在細胞培養時加入生長刺激素（例如 *bactophytohemagglutinin-M*；即 PHA）可刺激 T lymphocyte 生長，進行有絲分裂。

培養約三天後，加 *ethidium bromide* 可嵌入雙股 DNA 中，干擾 DNA 正常的收縮 (condensation)，再加入 *colcemid*，其作用是抑制 *metaphase spindle fiber* 的合成，故分裂細胞會停止在分裂中期 (*metaphase*)；因此收成的細胞能有較多 *prometaphase* 及分裂前期 (*prophase*) 染色體。

4.1 目的

對於先天缺陷兒、智障兒、生長發育遲緩、性腺發育不良、先天性異常兒童、習慣性流產的夫妻、性功能異常、精神疾患等患者，確定其是否具異常之染色體；後續檢查包括確定此異常染色體之來源是否與父母有關及遺傳諮詢。除了找出病發原因之外，也避免異常的染色體繼續傳給下一代。





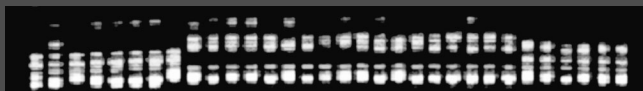
4.2 血液染色體製備所需材料及儀器

1. 材料

- (1) CR15 (含 15% FCS 的 RPMI-1640 medium)
- (2) PHA (HA15)
- (3) Ethidium bromide (0.5 mg/ml)
- (4) Colcemid (10 μ g/ml)
- (5) 0.54% KCl (pH6.8)
- (6) 固定液 (甲醇 : 醋酸 = 3:1)
- (7) 1X Trypsin-EDTA
- (8) 0.025 M KH_2PO_4 (pH6.8)
- (9) 95% 酒精
- (10) Wright's stain
- (11) Gurr's buffer
- (12) 玻片
- (13) 吸管
- (14) 離心管 15 ml
- (15) 紗布

2. 儀器

- (1) 無菌操作臺
- (2) 二氧化碳培養箱 (CO_2 incubator)
- (3) 離心機
- (4) 光學顯微鏡及照相設備
- (5) 位像差顯微鏡 (phase-contrast microscope)
- (6) 加熱器 (hot plate)
- (7) 化學抽氣櫃
- (8) 底片放大機
- (9) 自動洗相機
- (10) 56°C 水浴箱
- (11) 90°C 烘箱
- (12) 電腦影像處理系統



4.3 血液染色體製備實驗步驟

4.3.1 檢體採檢

1. 填寫「細胞遺傳檢驗單」及「優生健康檢查個案記錄聯」。申請書上除「相關資料」必須詳細填寫外，「臨床診斷」亦務必要填寫清楚，以利往後之診斷及相關作業。
2. 以細胞遺傳室提供的heparin為抗凝劑，因其不含防腐劑，較有利於細胞生長。先抽取heparin 0.5 ml於無菌針筒內，再直接採周邊靜脈血5-10 ml，混勻後送至實驗室。
 - 若為胎兒或新生兒，則取2-3 ml全血。
 - 血量太少、加錯抗凝劑或已凝固者，拒絕收件。

4.3.2 保存

當日以室溫送達，若檢體不能於採檢當日送達，應暫時保存於4°C冰箱中，並於24小時內送至實驗室。

4.3.3 細胞培養 (Cell culture)

1. 將針頭向上直立靜置約一小時後，大多數RBC已沉積至下層。
2. 取兩支15 ml離心管，將針頭彎成90度，上層多餘血漿排出，再將中間之buffy coat (WBC)層與其上層之血漿輕拍混勻。
3. 每支離心管各加0.5-0.7 ml WBC混合血漿。
 - 若為胎兒或新生兒，則加0.3-0.5 ml全血。
4. 每支離心管各加9.5 ml CR15及0.2 ml PHA。
5. 離心管蓋旋緊後，移入37°C培養箱內，幾近於平躺放置培養。
6. 每日早晚將離心管中沉至底面的細胞，上下翻轉輕輕搖勻。
7. 經過68-72小時培養後，收成細胞。





4.3.4 收成細胞 (Harvest)

1. 每支離心管各加0.26 ml Ethidium Bromide (0.5 mg/ml)，置回37°C培養箱中作用約90分鐘。
2. 每支離心管各加0.1-0.2 ml Colcemid (10 µg/ml)，置回37°C培養箱約20分鐘。
3. 於1000 rpm 離心8分鐘，吸除上清液，將管底細胞拍打均勻。
4. 緩慢加入37°C的0.54% KCl至整支離心管，再置於37°C培養箱中作用20分鐘。
— 0.54% KCl要先預溫至37°C。
5. 每支離心管各加幾滴固定液（甲醇：醋酸=3:1），於1000 rpm 離心8分鐘，吸除上清液，將管底細胞拍打均勻。
※ 3:1固定液要用當日配製，放冰箱預冷固定效果較好。
6. 緩慢加入1-2 ml的3:1固定液，一邊滴入一邊均勻混合，而後繼續加固定液至整支離心管。
7. 置於室溫或冰箱作用約20分鐘。
— 若將試管置於4°C以下，下一步驟可於數小時或隔夜再進行。
8. 於1000 rpm 離心8分鐘，吸除上清液，將管底細胞拍打均勻。
9. 加入2-3 ml之3:1固定液，均勻混合，而後繼續加固定液至整支離心管。
10. 重覆步驟8以及9，完成第三次固定，再於1000 rpm 離心8分鐘，準備滴片。

4.3.5 製片 (Making slide)

1. 吸除上清液，用3:1固定液將沉澱細胞 (cell pellet) 調成適當的濃厚。
2. 將2-3滴細胞固定液滴於濕冷的載玻片上，稍靜置或加上吹氣以助染色體展開，並立刻移到60°C加熱器 (hot plate) 上。
— 載玻片預先用清潔劑洗淨後，浸泡於RO水中，冷藏於4°C冰箱。
3. 玻片乾燥後要註明實驗室編碼 (Lab No)、姓名、日期、技術員。
4. 移置90°C烤箱，烤片約1小時，或依當日濕度調整烤片時間。
5. 進行染色及顯微鏡下分析。

