

收成細胞與製作 染色體玻片

林陳立

摘要

當細胞達到一定數量可以進行染色體檢查時，首先需要將細胞誘導至分裂中期，然後加工固定至準備漲破胞膜、核膜以打散染色體，這個過程稱為收成細胞；接下來為方便在顯微鏡下判讀，要將個別細胞中的染色體巧妙地散佈於玻片上，也就是製作染色體玻片，這兩項工作能否成功，需靠材料的選擇與操作人員的技術。

通常在收成細胞時，會加入避免紡錘絲形成的合成秋水仙素 (Colcemid) 以終止細胞分裂，並壓縮染色絲形成染色體，因此可在不同類型的細胞中，藉由調整其濃度和作用時間以控制染色體的長短，有時為偵測出細微的結構異常，可再加入減緩其作用的試劑如 Ethidium bromide 或 BrdU 等，以拉長染色體，更細緻地顯現其染色帶，稱為高解析度染色法。接下來，為得到散佈均勻的細胞，必須在收成時，依細胞類型不同控制細胞濃度及去除雜質，而染色體的散佈則與加入低張濃度的水溶液有關，這是利用胞膜對水的通透性，來加大細胞容積，以方便染色體的伸展和加寬，有些技巧，如預先加溫至 37°C，加入低張水溶液時的速度和擴散狀況，及適當的控制濃度和作用時間等，都需要注意，以免染色體散不開或細胞提早破裂，無法判斷其來源，因此在製作染色體玻片前，要先用固定劑將細胞殺死、使胞膜變硬、並保存染色體在最佳型態，一般使用的固定劑為三份甲醇 (Methanol) 和一份冰醋酸 (Acetic acid) 的新鮮混合液，並在第一次加入時非常輕柔，以避免





形成太大的渦流，太早破壞細胞。接下來的幾次沖洗則可加快速度，以去除雜質，將細胞固定在乾淨的環境中，準備製作染色體玻片。

為得到最佳的染色體鏡檢結果，在製作玻片時有許多不同的技巧，但最主要目的則是要讓各個染色體固定在玻片上時伏貼、平整、雜質最少，並且同一個細胞的染色體集中散佈、交錯最少。由於周遭環境的條件如溼度、溫度、風速等都是影響結果的因素，因此要有隨時調整不同方法和修正技巧的觀念。本章乃集結許多實驗室對收成細胞與製作染色體玻片的操作步驟，可供參考之用，但沒有一種方法是最好或最穩定的，唯有操作者的技巧、判斷和修正的能力才是成功的不二法門。

2.1 玻片製作

1. 原理

好的染色體分帶仰賴於適當的玻片準備、很多條件均會影響到製片，包括相對溼度、室溫、乾燥時間和玻片上的細胞數目。太平坦的染色體不會產生清楚的分帶，染色體太凸起、太黑則會在顯微鏡下產生光暈，在顯微鏡下最好的影像是清楚且沒有細胞質存在的。

2. 設備和材料

(1) 設備

- a. 有標示面的玻片
- b. pasteur 吸管和吸球
- c. 16X 鏡頭的位像差顯微鏡

(2) 材料

- a. 染色體細胞懸浮液：以固定液調整至適當濃度的細胞懸浮液。
- b. 蒸餾水和漂白劑
- c. 可吸乾的材料



3. 步驟

以下是在相對溼度 40% 和 72 °F 溫度下的製片法：

- (1) 取出玻片、置於含 95% 乙醇的染缸內。
- (2) 從乙醇中取出一玻片，以拭鏡紙用力擦拭 2-3 次，使其乾淨。
- (3) 將玻片背面浸於乙醇，然後放入裝有乾淨蒸餾水的燒杯，浸泡 8-10 次，或旋轉它直到乙醇與水混合的痕跡消失。
- (4) 握住玻片的標示處，確定水平均的覆蓋其上，將玻片較長面置於吸水紙巾上，使多餘的水流掉。
- (5) 輕輕的以吸管吸取細胞懸浮液，將玻片在紙巾上呈 20-30° 角，滴 2-4 滴細胞懸浮液於玻片表面，以紙巾將玻片吸乾。
- (6) 滴 4-6 滴固定液於原先滴片的地方。
- (7) 以紙巾吸乾多餘的水分。
- (8) 在玻片上標示病患資料、玻片編號和日期。
- (8) 當玻片表面呈現彩虹色澤，以手臂或腿溫熱玻片背面數秒鐘。

4. 不同環境的技術變化

- (1) 若溼度太高 (45% 或更高)，試著持續以手臂或腿乾燥玻片或放於 35-40°C 熱片器。
- (2) 若溼度太低 (30% 或更低)，將玻片置於已吸水的紙巾上，直到玻片乾燥。
- (3) 其他條件可能需藉由經驗觀察而得，例如在很潮濕的天氣用很薄層的水；或很乾燥的天氣用較厚的水。在潮濕的天氣滴片時，每滴一滴懸浮液即以紙巾擦乾一次，且在溫熱片子時在玻片被背面擦拭數次；在乾燥的天氣時，玻片放於濕紙巾前不要擦拭其背面。
- (4) 以顯微鏡檢視染色體，若細胞呈灰色或染色體太分散，則要溫熱久一點，細胞顏色很深或可見到細胞質，則減少或不用溫片。





2.2 羊水的玻片製作

2.2.1 羊水的原位收成和製片之方法一：

1. 原理

分析在蓋玻片上生長的羊水細胞的染色體。

2. 檢體

羊水。

3. 設備和材料

(1) 設備

- a. 37°C 培養箱
- b. Tuberculin 針筒
- c. 第二級生物操作箱、Type A
- d. 手套
- e. pasteur 吸管
- f. 抽吸機
- g. 吸球
- h. 蓋玻片，22 × 22 mm，1-1/2 厚
- i. 玻璃黏著劑
- j. 拋棄式 250 ml 微量離心管
- k. 35 × 10 mm 培養皿

4. 準備和貯存需求

(1) Chang C Medium（羊水培養用）：

100 mL 包裝的 Chang C Medium 與粉末的冷凍血清補充物 (Irvine Scientific)，保存期限 6 個月。

(2) Chang C Working Medium：

混合 100 mL Chang C Medium，冷凍補充物和 1 mL penicillin、streptomycin 和 L-glutamine，冷藏，保存期限 2 週。



- (3) α MEM Medium :
500 mL 瓶裝含 deoxyribonucleoside 和 ribonucleoside 無 L-glutamine (Irvine Scientific) 冷藏，保存期限1年。
- (4) α MEM Working Medium 25% FBS 或 CFBS :
75 mL α MEM Medium 、25 mL Fetal Bovin Serum 或 25 mL Colostrum-free bovine serum 和 1 mL penicillin 、streptomycin 和 L-glutamine 溶液，冷藏，保存期限2週。
- (5) Chang C/ α MEM Working Medium :
50 mL 的 Chang C Working Medium 和 50 mL α MEM Working Medium 25% FBS 或 CFBS ，冷藏，保存期限2週。
- (6) Colcemid :
Sigma Chemical Co. 50 mg 一瓶，保存期限5年。
- (7) Colcemid working solution (0.001%) :
將 0.001 g Colcemid 溶於 100 mL Hanks's balanced salt solution (1x)，過濾消毒，冷藏，保存期限1年。
- (8) Colostrum-free bovine serum :
Irvine Scientific ，每瓶 100 mL ， -20°C 冷凍，保存期限1年。
- (9) Ethidium Bromide :
Sigma Chemical Co. 1 g 一瓶，保存期限3年。
- (10) Ethidium Bromide working solution (1 mg/mL) :
0.05 g Ethidium Bromide 溶於 50 mL 去離子水以過濾法滅菌，放於棕色瓶子，冷藏，保存期限3年。
- (11) Fetal Bovine Serum :
Irvine Scientific ，每瓶 100 mL ， -20°C 冷凍，保存期限1年。
- (12) 固定液 (1: 3) :
10 mL 冰醋酸和 30 mL 甲醇。





(13) 冰醋酸：

貯藏室、試藥級、Meets ACS specifications，每瓶2.5 L，保存期限1年。

(14) penicillin、streptomycin 和 L-glutamine 溶液：

(Irvine Scientific) 10,000 units/mL penicillin G、10,000 µg/mL streptomycin sulfate，和29.2 mg/mL L-glutamine、100 mL 瓶裝，-20°C 冷凍，以2-100 mL medium 用2 mL、600 mL medium 用6 mL、200-500 mL medium 用10 mL的組合，保存期限6個月。

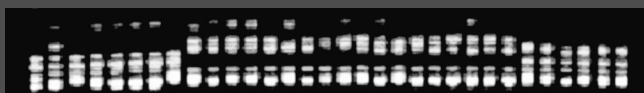
(15) 低張溶液 (0.075 M KCl)：

取5.592 g的KCl溶於1000 mL的去離子水，存放於室溫中，保存期限6個月。

5. 步驟

收成

- a. 當每個族群有50-200個細胞時為收成，95%的細胞在培養5-9天時可以收成。
- b. 加25 µL的EB working solution (1 mg/mL) 到可收成的培養皿內。
- c. 37°C 培養箱中45分鐘。
- d. 加25 µL的Colcemid working solution (0.001%) 到培養皿內。
- e. 37°C 培養箱中45分鐘。
- f. 以原位收成法 (0.075 M KCl)，步驟如下：
 - (a) 以吸管從培養皿的邊緣吸出所有的溶液。
 - (b) 加2 ml 事先預溫至室溫的0.075 M KCl Hypotonic Solution。
 - (c) 在室溫中靜置20分鐘。
 - (d) 非常小心的加1.5-2 ml的固定液，靜置2分鐘。
 - (e) 以吸管從培養皿的邊緣吸出所有的溶液。
 - (f) 加1.5-2 ml的固定液，靜置20分鐘。
 - (g) 重複步驟(e) 和(f) 兩次。
- g. 玻片的乾燥
 - (a) 移除所有的固定液，於溼度35-42%、風速160-200 ft/min的乾燥操作箱內自然乾燥。



- (b) 使用 Thermotron 玻片乾燥箱，將溼度設於 50%、溫度 25°C，以吸管吸出所有的固定液，讓玻片在乾燥操作箱內自然乾燥；若 metaphase 無法擴散，增加 5% 的溼度；若 metaphase 破損，降低 5% 的溼度。
- h. 以鑷子將蓋玻片夾出並擦乾背面。
- i. 以玻璃黏著劑，將蓋玻片黏著於標準玻片（檢體面朝上），將玻片放於 60°C 烤盤 5 分鐘，並以紫外燈照射 5-10 秒。
- j. 以 90°C 烤 30-90 分鐘或 60-65°C 烤 16 小時，若要做 FISH 則不可用烤箱。
- k. 現在可以各種方法進行染色。

2.2.2 羊水細胞收成之方法二

1. 原理

發育中的羊水細胞在蓋玻片培養的時間較短，提高了收成的效率，當細胞直接放在蓋玻片的面板上時，各別的細胞會附上去而且開始生長成群落，不需要 trypsinization 的作用，蓋玻片可以在很快的時間內生長出足夠的數目，可以提早到 5 天內收成，蓋玻片可以將生產的物量一次收成。BrdU 和 Colcemid 加入培養液的量對收成較重要，然後是低張溶液，其可極力的擴張細胞膜，增加染色體的展開，幾次固定液加入的步驟，目的是使染色體變得堅固，最後一次固定液加入以後，將蓋玻片移出，標示號碼及乾燥，待過程結束之後，完成染色體的顯帶及分析。

2. 標本

在 35 mm 培養皿內放 22 × 22 mm、1-1/2 mm 厚度之蓋玻片置於細胞培養盤上。

3. 設備

- (1) 0.45 μ Nalgene filter
- (2) 拋棄式微量滴管
- (3) 真空抽引系統
- (4) 烤片器
- (5) 刻度量筒
- (6) 滅菌吸管
- (7) 噴霧器





- (8) 濕度計
- (9) 乾濕度計
- (10) 25 μl 的拋棄式微量吸管
- (11) 100-mL 刻度量筒
- (12) (30 W) 紫外燈的生物操作箱

4. 材料

- (1) 低張溶液 (0.075 M KCl) :

取 5.592 g 的 KCl 溶於 1000 ml 的去離子水，存放於室溫中，保存期限 6 個月。

- (2) Colcemid (GIBCO) :

貯存液：加入 10 ml 無菌蒸餾水，混合均勻配，製成 1 mg/mL 貯存液。

工作液：將 0.1 ml 的貯存液加入 9.9 ml 無菌蒸餾水配製成 10 $\mu\text{g/mL}$ 的工作液，存放於 4 $^{\circ}\text{C}$ 。

- (3) BrdU 3 mg/mL :

取 0.03 g BrdU 加入 10 mL 去離子水，在避光下混合均勻，以 0.45 μ Nalgene 濾紙過濾，存放於避光瓶，在 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冷凍保存。

- (4) 固定液：

以 3 份的甲醇對一份的冰醋酸，每天新鮮配製。需少量貯存以防水解。

5. 準備

- (1) 烤片器設定在 60 $^{\circ}\text{C}$ 。
- (2) 霧化器的相對溼度調整為 28-32%。
- (3) 乾溼度計（乾溫 80 $^{\circ}\text{C}/2^{\circ}\text{C}$ ，濕溫 60 $^{\circ}\text{C}/2^{\circ}\text{C}$ ）。

6. 步驟

- (1) 大概在下午 5 點將 25 μL Colcemid 和 25 μL BrdU 加入每個培養液中。
- (2) 再培養至隔天。
- (3) 保持培養皿的平坦，用吸管小心從培養皿的邊緣吸去培養液。
- (4) 取 2 mL 0.075 M KCl 從培養皿的邊緣輕輕的緩慢的加入，低張溶液必須存放在 37 $^{\circ}\text{C}$ 中，可在室溫中停留 25-30 分鐘，需蓋上蓋子。



- (5) 加入 1 ml 新鮮準備冷的 1:3 的冰醋酸—甲醇固定液到低張溶液中，停留約 2 分鐘。
- (6) 從培養皿的邊緣移去所有的液體。
- (7) 從培養皿的邊緣緩慢的加入 2 mL 的固定液。
- (8) 停留 20 分鐘。
- (9) 移去固定液。
- (10) 重複前面 (6)-(9) 的步驟兩次，準備新鮮的固定液，一次固定 20 分鐘，一次是 10 分鐘或是兩次都是 10 分鐘。
- (11) 用噴霧器校正濕氣（必須在 28%-30% 之間），或是在有調整溫度和溼度的乾燥箱內。
- (12) 將蓋子放在培養皿的下方，移去培養皿內固定液，放入噴霧器內 1 分鐘。
- (13) 假如染色體展開的很好，4 個培養皿可以同時乾燥，假如沒有，則需調整溫度和溼度的必須的。
- (14) 從培養皿中將蓋玻片移出，放在溫暖的紫外燈下乾燥。玻片必須標示病人的 ID 號碼和培養的號碼。
- (15) 將蓋玻片放在溫熱的缸架上，乾燥 75 分鐘，然後染色。

蓋玻片成熟過程的選擇：

- a. 蓋玻片從培養皿移出之後，必須標示病人鑑別號碼和培養的號碼。謹慎傾斜的置放，使其完全的乾燥。
- b. 蓋玻片的蓋子要保持著傾斜的狀態，放在距離 20-24 吋的 30 W 的紫外燈下。
- c. 放下操作箱的門，打開紫外燈。對蓋玻片照射約 35-45 秒。避免眼睛和皮膚暴露其下。
- d. 關掉紫外燈，將蓋玻片移開，準備染色。
- e. 染色必須調整到顯帶最需要的時間。

7. 品質管制

大部分錯誤的來源是貼錯標籤，為避免錯誤的標示，在同一時間內只針對一個病人的檢體，不要重複標示培養皿，一個病人在接種時同時標示它，這是避免可能發生培養皿標示錯誤的方法。校訂病人的姓名和實驗室號碼，並確定它們之間是否一樣，尤其是雙胞胎的檢體，因為名字是相同的，而號碼只有極小的差距而已。





2.2.3 羊水細胞原位收成之方法三

1. 材料

(1) 低張溶液 (0.075 M KCl) :

取 5.592 g 的 KCl 溶於 1000 mL 的去離子水，存放於室溫中，保存期限 6 個月。

(2) Colcemid solution (Irvine Scientific) :

10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in Hanks' balanced Salts 的工作液，存放於 4°C。

(3) 固定液：以 3 份的甲醇對 1 份的冰醋酸，每天新鮮配製。

(4) 載玻片

(5) 封片膠

(6) 奇異筆

(7) pasteur 吸管

2. 設備

(1) 烤箱

(2) 烤片盤

(3) 電磁爐

(4) 真空吸引器

(5) 位像差倒立顯微鏡

3. 原位收成步驟

(1) 收取前一天最好換一次新培養液。

(2) 收取前 30 分鐘在每個培養皿各加一滴 Colcemid solution (以 24 號針頭滴加) 再放回培養箱中。

(3) 取出培養皿緩慢各加入 2 ml 低張液放置室溫 8 分鐘。

(4) 以真空吸引器吸除培養皿中培養液及低張液。

(5) 緩慢加入 2 ml 低張液放置室溫 60-70 分鐘。

(6) 再緩慢 (需特別注意) 加入 2 ml 固定液放置室溫 10 分鐘。

(7) 以真空吸引器除低張液及固定液。



(8) 緩慢加入 2 ml 固定液，放置室溫 10 分鐘。

(9) 以真空吸引器吸除固定液。

(10) 再加一次固定液（共三次），放置室溫中，同時準備“蒸片”。

(11) 蒸片：

- a. 準備電磁爐加熱，蒸氣量大小將影響染色體散佈情形，所以火候控制則非常重要，一般以微微看到白煙升起為度。
- b. 蒸片前需先依照 35 mm 培養皿上所寫個案編號及姓名及接種日期完全寫在載玻片，並逐一壓放在培養皿上。
- c. 逐一將蓋玻片挑出，並拭去多餘固定液，再以封片膠將蓋玻片黏貼在先前寫好的載玻片上。
- d. 放在蒸氣上將玻片蒸乾。
- e. 逐一利用倒立顯微鏡檢視染色體散佈情形，以便調整後續玻片的蒸氣量及固定液留量。

(12) 將蒸好的片子放在 90°C 烤箱中烤 72 分鐘，備用染色。





2.3 絨毛膜絨毛的收成

2.3.1 絨毛的胰蛋白酶處理直接收成法

1. 原理

細胞檢體的來源為懷孕9至12週胎兒的絨毛切片，相較於羊水，其較易有母體細胞的污染和鑲嵌型細胞核型產生。

2. 檢體

一個好品質的檢體約需 10 mg 或更多，較好的方式是將分離的絨毛直接用長時間的培養方法操作，但是假如需要，外層可以使用直接收成的方式，而近中心的絨毛，則使用組織的培養方式培養（在近中心層的絨毛組織必須數天培養）。

3. 設備

- (1) 37°C 培養箱
- (2) 離心機
- (3) 紫外燈 (30 W germicidal)

4. 材料

- (1) 運送絨毛之培養液 Transport media: 500 ml α MEM、10-50 IU/mL sodium heparin、100 ml 胎牛血清。
- (2) Colcemid：用 10 ml 無菌蒸餾水稀釋最後濃度是 10 μ g/mL。
- (3) Alpha MEM—complete: 160 ml α minimum essential media。
60 mL Amniomax C100 (complete)
25 mL 胎牛血清
2.5 mL Penicillin-streptomycin (10,000 U/mL; 10,000 g strep/mL)
2.5 mL L-Glutamine
- (4) Amniomax C100—complete:
225 mL Amniomax C100—basal
25 mL Amniomax C100—supplement
- (5) 0.075 M KCL。



- (6) 10x Trypsin。
- (7) 3:1 甲醇—冰醋酸。
- (8) 無菌滴管。
- (9) 35 × 15 mm 培養皿。
- (10) 60 × 15 mm 培養皿。
- (11) 無菌鑷子。
- (12) 15 mL 圓錐形離心管。

5. 品質管制

大部分錯誤的來源是貼錯標籤，爲了防止錯誤發生，同一時間只針對一個病人的檢體試管。每一個培養皿在接種時必須檢查是否爲同一個病人的，要校訂病人的名字和號碼，確定他們的一些相似情況，尤其是雙胞胎，因爲他們的名字是相同，而且號碼也只有幾個數字的差異而已。

6. 步驟

- (1) 取乾淨的絨毛直接放入內含有 2 mL 的 transport media 的 35 × 15 cm 培養皿中培養至隔天。
- (2) 隔天早上加入 150 μ L 的 Colcemid (1/10 solution) 至每一個培養皿中放置一小時。
- (3) 用無菌吸管吸取一些絨毛放入內含有 5 mL 的 10 倍 trypsin 的 60 × 15 mm 培養皿中搖盪一下。
- (4) 以無菌鑷子取一些絨毛放入內含有 5 mL 10x trypsin 和 0.05 mL 的 colcemid 的培養皿中，放入培養箱中 20-30 分鐘，查看絨毛是否已分開，絨毛的邊緣看起來應該不再是完整的，且細胞是浮動在 trypsin 中的。
- (5) 將變成粉末的絨毛與 trypsin，轉移至有標示病人名字和號碼的圓錐形的離心管，離心管內放 2-3 mL 的 α -MEM 培養液，使 trypsin 不活躍。（在此時，假如需要，可將部分的絨毛放在 5 ml 的 collagenase media 中做長時間的培養，其他在 trypsin 的細胞則可直接培養。）
- (6) 用 800 rpm 離心 5 分鐘。
- (7) 移去上清液加入 2 ml 的 0.075 M KCl 打入氣泡混合，停留在 Hypotonic solution 20 分鐘。





- (8) 加入幾滴新鮮 3:1 甲醇—冰醋酸固定液輕輕的混合之後在 800 rpm 離心 5 分鐘。
- (9) 移去上清液再加入 2 ml 的固定液打氣泡混合，等待 15 分鐘。
- (10) 離心 5 分鐘，移去上清液，沉澱物加入 2 mL 的固定液打氣泡混合。
- (11) 重複步驟 (10)。
- (12) 離心 5 分鐘，去上清液，沉澱物加入 0.1-0.2 mL 的固定液，作成細胞懸浮液，滴在濕冷的玻片上。
- (13) 把玻片放在 UV 燈下 60-120 秒，再用 GTG banding 染色法。

2.3.2 絨毛的酸處理直接收成法

1. 原理

這步驟主要是針對檢體量少於 10 mg，一或二部分的絨毛用直接的方法，剩下來的組織物則用長時間的培養法。

2. 設備

- (1) 37°C 培養箱
- (2) 離心機
- (3) 紫外燈 (30 W germicidal)

3. 材料

- (1) 運送絨毛之培養液 Transport media：
500 mL MEM, sodium heparin，100 mL 胎牛血清。
- (2) Colcemid：用 10 mL 無菌蒸餾子水稀釋最後濃度 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。
- (3) α MEM-complete：
160 mL α MEM
60 mL Amniomax C100 (complete)
25 mL 胎牛血清
2.5 mL Penicillin-streptomycin (10,000 U/mL; 10,000 g strep/mL)
2.5 mL L-Glutamine
- (4) Amniomax C100-complete：
225 mL Amniomax C100-basal



25 mL Amniomax C100-supplement

- (5) 0.075 M KCL。
- (6) 3:1 甲醇—冰醋酸固定液。
- (7) 40% 冰醋酸。
- (8) 含酒精的試紙。
- (9) 無菌吸管。
- (10) 35 × 15 mm 培養皿。
- (11) 無菌鑷子。

4. 品質管制

大部分錯誤的來源是貼錯標籤，為避免錯誤的標示，在同一時間內只針對一個病人的檢體，不要重複標示培養皿，一個病人在接種的同時標示它，這是避免可能發生培養皿標示錯誤的方法。為了防止太多干擾，校訂病人的姓名和實驗室號碼，確定它們之間是否一樣，尤其是雙胞胎的檢體，因為名字是相同的，而號碼只有極小的差距而已。

5. 步驟

- (1) 乾淨的絨毛直接放入內含有 5 ml transport media 的 35 × 15 mm 培養皿放入培養箱中至隔天。
- (2) 24 小時後，加入 150 μ L Colcemid 至 Dish 中一小時，玻片則直接放入 45°C 的溫熱盤中。
- (3) 用無菌吸管吸去培養液，留下部分在培養皿中，緩慢的加入 2.0 mL 0.075 M KCL，等待 10 分鐘。
- (4) 用無菌吸管，緩慢的加入 0.5 mL 新鮮的 3:1 甲醇—冰醋酸固定液，等待 2 分鐘。
- (5) 移去固定液和低張溶液的混合液，留下部分在培養皿上，加入 2.0 mL 新鮮的 3:1 固定液，等待 10 分鐘。
- (6) 重複步驟 (5) 兩次。
- (7) 用酒精擦拭小的鑷子，用小鑷子移去一部分的絨毛放入有蓋的培養皿中，使其在空氣中乾燥。
- (8) 加入 6-8 滴的 40% 冰醋酸到絨毛中。





- (9) 大概 30-60 秒之後，絨毛將會出現透明狀，用鑷子夾著絨毛使其與溫熱的玻片表面重複的接觸，若絨毛夠大則可覆蓋整片玻片。
- (10) 重複步驟 (7)-(9) 將其他部分的絨毛使用在新鮮的玻片上，直到絨毛被使用完為止。
- (11) 將玻片放在紫外燈下 60-120 秒。
- (12) 將玻片染色用 GTG 顯帶的方法。

2.4 固體組織的製片：由懸浮液滴片和原位蓋玻片法

1. 原理

固體組織的核型分析通常可由很多不同組織所完成，在流產事件中，材料通常有助於發現流產的原因，若胚胎的染色體核型是正常的，那麼其他因素如荷爾蒙失調，或子宮結構異常就可能被考慮，大約一半的案例是屬於染色體異常，被診斷為染色體異常的胎兒於引產後也需作染色體分析，以作為品管的確認。皮膚切片通常被用來觀察鑲嵌形的性染色體，或有組織特異性的鑲嵌型體染色體，偶爾這些細胞培養物也會被送至其他實驗室作生化或分子檢查。

2. 檢體

早期的流產物通常是刮除物，胎兒的材料通常有母體血液蛻膜的污染，其情形通常為小的、黏膠狀或伴隨著生理食鹽水的尿液狀物。

晚期的流產物通常由病理部門置於 15 ml 含培養液 (F10) 的試管，或於紅頭試管或尿液培養瓶，胎兒的皮膚、肋骨、臍帶和絨毛是較好的培養物質，其他許多的組織可能產生纖維母細胞。其他組織若以福馬林或甲醛處理過後則不適用。

3. 設備和材料

(1) 設備

- a. 37°C 培養箱
- b. Tuberculin 針筒
- c. 第二級生物操作箱、Type A



- d. 手套
- e. pasteur 吸管
- f. 真空抽吸機
- g. 吸球
- h. 顯微鏡玻片

(2) 材料

- a. colcemid (GIBCO lyophilized #120-5211)
- b. 蓋玻片 (#1-1/2, American Scientific)
- c. Ethidium Bromide (Sigma #e-2515)
- d. 固定液, 3:1的甲醇-冰醋酸, 需新鮮配置。
- e. 低張溶液 (0.075 M KCl): 取 5.592 g 的 KCl 加入 1000 c.c. 的去離子水混合後使用。
- f. Ethidium Bromide: 加一顆 10 mg 的錠劑於 33 mL 的水中、分裝成 3 瓶, 並以錫箔紙包覆存於冷凍庫。

4. 步驟

(1) 懸浮液滴片

製片的步驟與血液的製片幾乎一樣, 特別需注意的是保存少量的沉澱物材料。

- a. 吸出沉澱物上的所有液體。
- b. 加適量的固定液作成混濁狀的懸浮液, 若第一片太濃時再加固定液稀釋。
- c. 以冰且微濕的玻片以 30 度角的傾斜作滴片。
- d. 當滴液擴散開後, 輕輕的傾斜玻片的兩面, 使細胞薄薄的覆蓋於玻片的表面。
- e. 輕輕的吹掉過量的固定液及水分。
- f. 以 1 ml 的固定液去除玻片的殘餘水分。
- g. 吹掉但留一層薄薄的固定液, 以紙巾擦拭玻片底部。
- h. 輕輕的哈氣使其在固定液上形成薄薄的一層濕氣, 並儘速放入 65-68°C 的烤盤上, 不同的固定液殘留或哈的氣體量會增加或降低染色體擴散的程度。一般, 在玻片乾燥後可見小且一樣區塊的水坑, 可顯示染色體並無顯著的漏失。
- i. 將蓋玻片置於 90°C 烤 1 小時或於 60°C 隔夜。





(2) 原位收成蓋玻片法

- a. 以Tuberculin針筒加3滴EB在蓋玻片上，再放回培養箱中40分鐘。
- b. 在每一個蓋玻片中加2滴的colcemid，再放回培養箱中12分鐘。
- c. 以吸管從培養皿的邊緣吸出所有的溶液。
- d. 非常小心的加2-3 ml室溫的0.075 M KCl hypotonic solution，在室溫中靜置23分鐘。
- e. 非常小心的加1-2 ml的固定液，靜置5分鐘。
- f. 以吸管從培養皿的邊緣吸出所有的溶液，但不能使蓋玻片乾燥。
- g. 非常小心的加2-3 ml的固定液，靜置20分鐘。
- h. 吸除固定液，重複步驟g，最少一次以上。
- i. 吸除固定液，並對玻片哈氣，哈氣的強度取決於組織的型態及環境的溼度，溼度需控制於30-50%。
- j. 快速的翻轉蓋玻片和培養皿，在95%的酒精燈焰下直至蓋玻片接近乾燥為止。在室溫的環境下，熱的需求可決定擴散的程度。在乾燥的冬季月分，可能需要在火焰之前對蓋玻片多“哈氣”幾次。在乾燥的過程中，形成水坑狀的固定液區塊會使metaphase擴散不好，而使染色體看起來模糊。
- k. 太多的固定液存留在玻片上或溼度太高，可能使細胞破損、溼度不夠或固定液太多會使metaphase擴散不開，或細胞質仍殘留在metaphase周圍。
- l. 標示蓋玻片，並置於染色架。
- m. 將蓋玻片置於90°C烤1小時或於65°C隔夜。

2.5 骨髓玻片的製備

1. 原理

染色體分析最好是細胞在玻片上的分佈很均勻，且細胞的重疊率降到最低，而且在metaphases的周圍沒有細胞質圍繞著。溼度和細胞對hypotonic solution的敏感度是可變的。儘量調整製片技術到比較好的狀態是非常重要的。且確定玻片有正確的標示。



2. 品質管制

- (1) 依據培養和收成的步驟，必須培養於兩個培養瓶，且培養液需作記錄登記。
- (2) 所有的玻片必須註明病人的名字和登錄的號碼。
- (3) 玻片的製作是一個病人一個時間，且一個試管對一片玻片。
- (4) 在收成的時候不同的病人避免使用同一支的滴管。
- (5) 所有的檢體必須時常校正名字和號碼。

3. 步驟

- (1) 玻片應放在有水的瓶子中以保持其濕度。
- (2) 滴管用 1-2 英吋（輕輕敲擊幫助其擴張）。
- (3) 假如需要可用滴管加入兩滴冰醋酸可幫助其擴張。
- (4) 加入一些固定液或再離心和再次懸浮完成適當的細胞懸浮液。製作三張品質好的片子，將最好的一張片子放在 60°C 的烤片架上，其他兩張片子放在 70°C 的烤箱內隔夜，在顯帶之前加入 3 ml 的固定液製成懸浮液放入冰箱儲存。待分析完成之後，假如結果是正常的，則細胞懸浮液即可以丟棄，若是異常，則細胞懸浮液必須儲存至將來備用。

2.6 以 Thermotron CDS-5 細胞乾燥箱操作的玻片乾燥步驟

1. 原理

藉由控制相對溼度和溫度，在原位或非原位的培養收成中，使染色體獲得最佳的擴散和型態。

2. 關於玻片乾燥箱 — Thermotron Model CDS-5

Thermotron 溫度 / 溼度控制環境箱通常用來增加乾燥的結果，自我密閉的部分可使操作者在可控制乾燥的環境下操作，操作箱可阻隔樓層、天花板的空氣流向，使其氣流溼度和溫度得以控制。甚至在不同實驗室的環境下，操作箱內的空氣是冷是熱、濕或乾都得以適當的掌握。





3. 蓋玻片培養和原位收成

對於纖維母細胞、絨毛、羊水和固體腫瘤的蓋玻片培養，我們建議如下步驟：90分鐘的EB (10 $\mu\text{g/ml}$) 和45分鐘的colcemid (100 ng/ml)。我們也建議在0.075 M KCl (Hypotonic Solution) 20分鐘，以一份的hypotonic和一份的固定液（3：1的甲醇－冰醋酸）做2-10分鐘的前固定3次，每次20分鐘的固定液。對於血液科的血（如白血病）和骨髓檢體，則以12-16小時的colcemid (10 ng/mL) 而不用EB。

注意：若使用12-16小時的colcemid其濃度為原來的1/10。

4. 直接和培養瓶培養的收成－非原位法

通常大部分直接和培養瓶培養的方法應該都做的很好，關於PHA刺激的血液培養，用10 mL的培養液（含10% FBS的RPMI1640）和1 mL的全血，細胞以加FUdR (6 ng/mL) 16小時和2小時的EB (5 $\mu\text{g/mL}$) 和colcemid (50 ng/mL)，低張液以0.075 M KCl置放15分鐘，和換3次以上的固定液（3：1的甲醇－冰醋酸）。

5. 原位收成的玻片乾燥

原位培養法在收成的最後一次固定液時放入Thermotron玻片乾燥箱，此乾燥箱的溫度為25°C、濕度為50%，在此放5分鐘，於乾燥箱中將最後一次的固定液吸出，讓培養皿在乾燥操作箱內自然乾燥。

6. 直接和培養瓶培養的玻片乾燥－非原位法

將玻片及含細胞懸浮液的離心管置於乾燥操作箱內，此Thermotron玻片乾燥箱的溫度為25°C、濕度為50%，在此放5分鐘，將乾燥的玻片擺平於乾燥操作箱內，滴2滴（12.5 μl / 滴）細胞懸浮液於玻片上，2滴的距離約1公分，使其自然乾燥。

7. 染色體的擴散和評估矯正動作

以位像差顯微鏡評估染色體的擴散和型態，若染色體太緊密並有細胞質殘留，則增加5%溼度後再評估，若環境的溼度太高 (75%+)，則可能很難在20-25°C中獲得35%的相對溼度。若在30°C的環境中操作，相對溼度較易調整至35%。一個基本的原則，若metaphase太緊緻，則增加相對溼度，若metaphase破損或擴散太開、或有緊也有太散，則降低相對溼度，避免相對溼度在65%或更高，此高溼度會使染色體在顯微鏡下有不好的型態。



8. 螢光原位雜交法 (FISH) 的 metaphase 和 interphase 準備

最好的 FISH 結果是藉由在最佳的實驗室條件下將玻片乾燥所得的。在我們的實驗室我們建議在溫度 25°C、溼度 50% 的 Thermotron 玻片乾燥箱做 FISH 玻片的滴片。

2.7 疑難問題的處理

前言

準備染色體玻片時步驟的一致性是必要的，此將使之後的 G-banding 有一致性，這個需建立於製作每一玻片時均須以顯微鏡觀察檢視，細胞濃度需適當，染色體需擴散及型態要好，以此作為檢視的指標。

好的玻片、染色體的擴散程度要能容易計數與分析，過度分散的染色體會使計數時造成人為的錯誤，且照相也不方便。染色體的輪廓需鮮明且深、無光暈，同樣的也不能模糊不清、灰白或暗淡。

空氣乾燥這個階段是最重要且最不穩定的，這必須去注意每一個細節，然後在每一玻片上去遵循與監測。通常，染色體擴散不好且有光暈是因為乾燥太快，可藉由將其放在濕的紙巾上，以減緩乾燥的速度，或在一垂直或陡峭的角度，在固定液加上時輕輕的吹氣，或使用冰冷的固定液。染色體呈現灰白、暗淡或過度分散的原因是乾燥太慢，此可藉由調整乾燥的角度、短暫的溫熱玻片或在玻片放下乾燥前輕輕的揮動。

玻片乾燥時，對於溫度和溼度也很敏感，每天的情況都會不一樣，一個準確的創作力和經驗是很有用的。

玻片的加熱也很重要，這是人工促使玻片成熟的方法。過熱或不夠熱，藉由不同的溫度或時間，均會影響 trypsin 的作用，而使 G-banding 受影響。

疑難問題解決

1. 玻片上的細胞濃度太濃，有細胞核存在或細胞分裂的圖像：

以固定液稀釋。





2. 玻片上的細胞濃度太稀：

離心且移除固定液。

3. 擴散不好且有細胞質殘留

- (1) 增加滴片時吸管至玻片的高度。
- (2) 以固定液多沖洗幾次。
- (3) 增加固定液中冰醋酸的濃度。
- (4) 固定液中冰醋酸的濃度調整至50%。
- (5) 利用蒸氣而減少玻片在溫片器的時間。
- (6) 結合上述各種方法。

4. 染色體分散和 / 或因分散而造成破損

- (1) 降低吸管滴至玻片的高度。
- (2) 增加玻片在溫片器的時間。
- (3) 用冰水和 / 或冰凍的玻片。
- (4) 結合上述各種方法。

5. 如果沒有上述的問題、將檢體冷藏、以後再滴片，在檢體工作單上記錄每一培養管中 metaphase 擴散的質與量。

6. 培養失敗或細胞分裂不佳的分析。

問題 1：沒有分裂的細胞或只有少量的細胞分裂—沒激化的培養

- (1) 檢體中的細胞數目很少。
- (2) 不適合的組織。
- (3) 培養液過期或汙染。
- (4) 骨髓和周邊血液中只有少量不成熟分化的細胞。
- (5) 某些特定血液疾病的細胞分裂的情形很少，如毛細胞白血病和慢性淋巴球性白血病。
- (6) 少量分化的細胞和因為化療與減輕反應治療所造成的細胞減少。





問題 2：低分裂細胞的指引－PHA 刺激淋巴球培養

- (1) 在培養之初檢體量不足。
- (2) PHA 濃度太低或試藥過期。
- (3) 在某些血液疾病的病人對於細胞有絲分裂的刺激反應不好。

7. 找出導致失敗的方法

- (1) 以品管作研究的總結論－設計問題研究表，提交實驗室督導員和主管。
- (2) 拷貝一份完整的品管表－將問題研究表存放於品管記錄本。

