



染色体显带原理与技术

肖文琚

首都医科大学附属世纪坛医院检验科
细胞分子遗传专业组

一、染色体制备基础知识

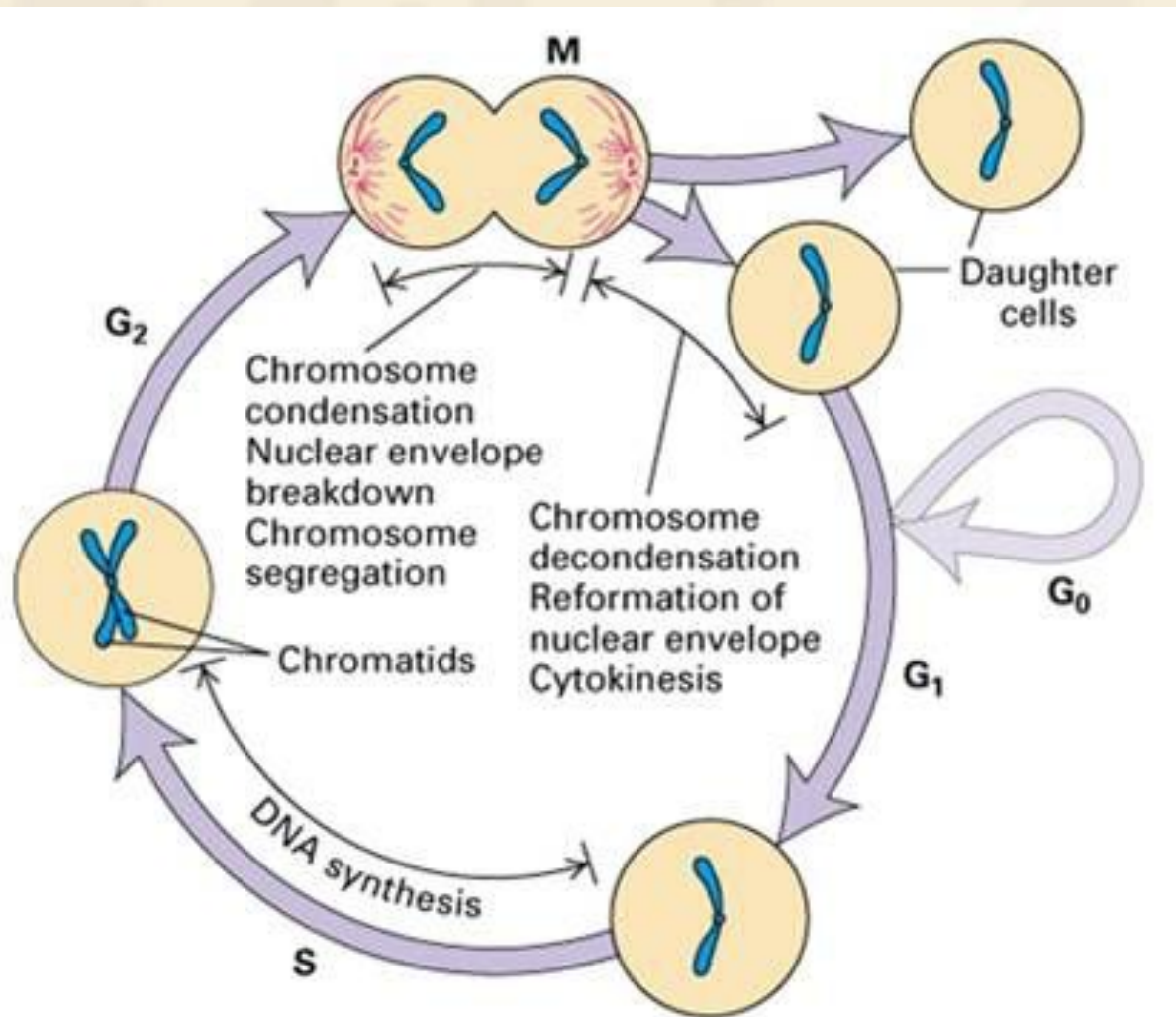
(一) 细胞及细胞周期

(二) 从DNA到染色体

(一) 细胞周期及有丝分裂

细胞：生物体结构和功能的基本单位，也是生命活动的基本单位。图略。

细胞周期：指由细胞分裂结束到下一次细胞分裂结束所经历的过程。



①**G₁期**，指从有丝分裂完成到**DNA**复制之前的间隙时间；

②**S期**，指**DNA**复制的时期；

③**G₂期**，指**DNA**复制完成到有丝分裂开始之前的一段时间；

④**M期**，细胞分裂开始到结束。

G₀期：间期细胞，细胞周期之外的细胞。

有丝分裂

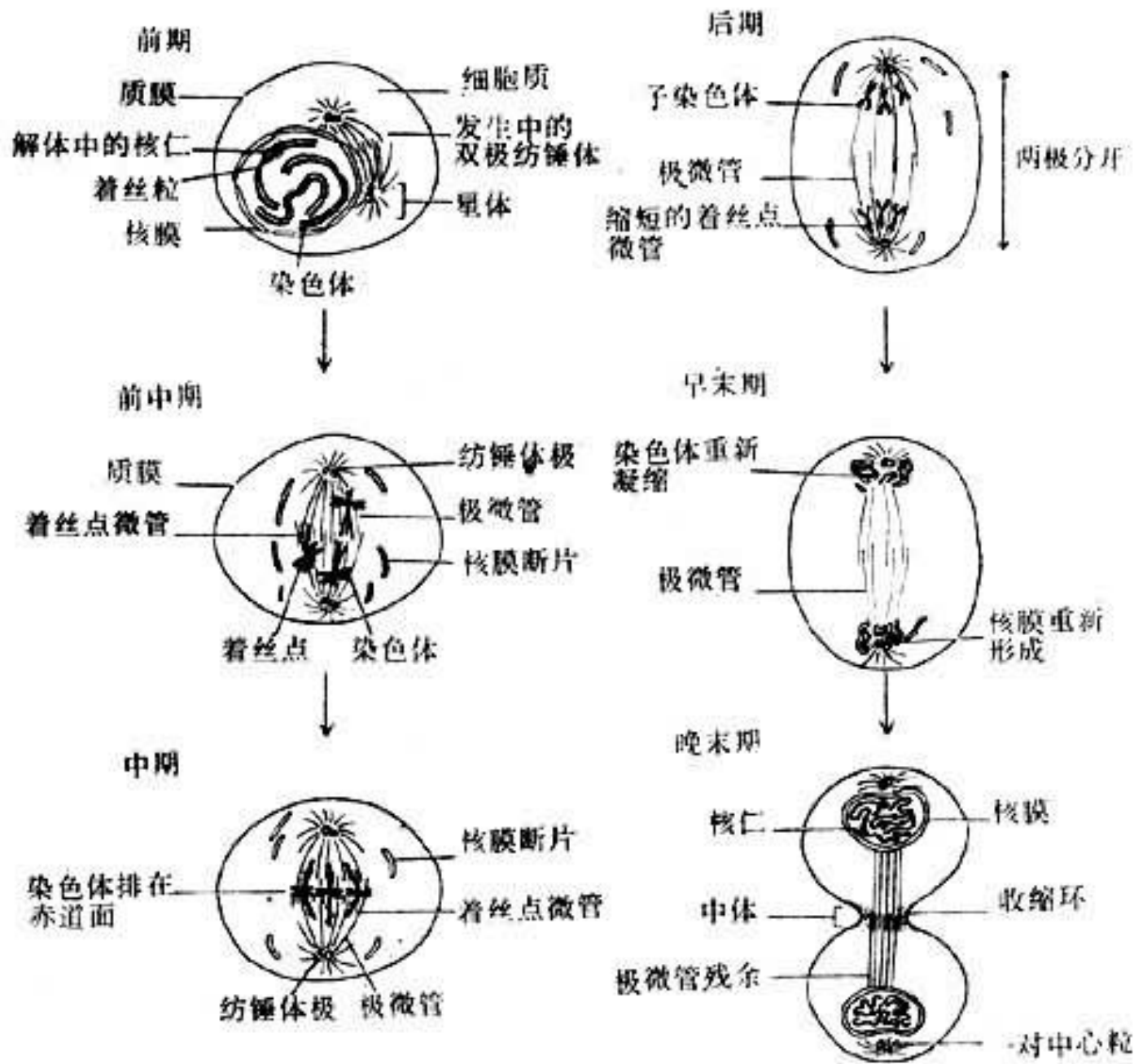
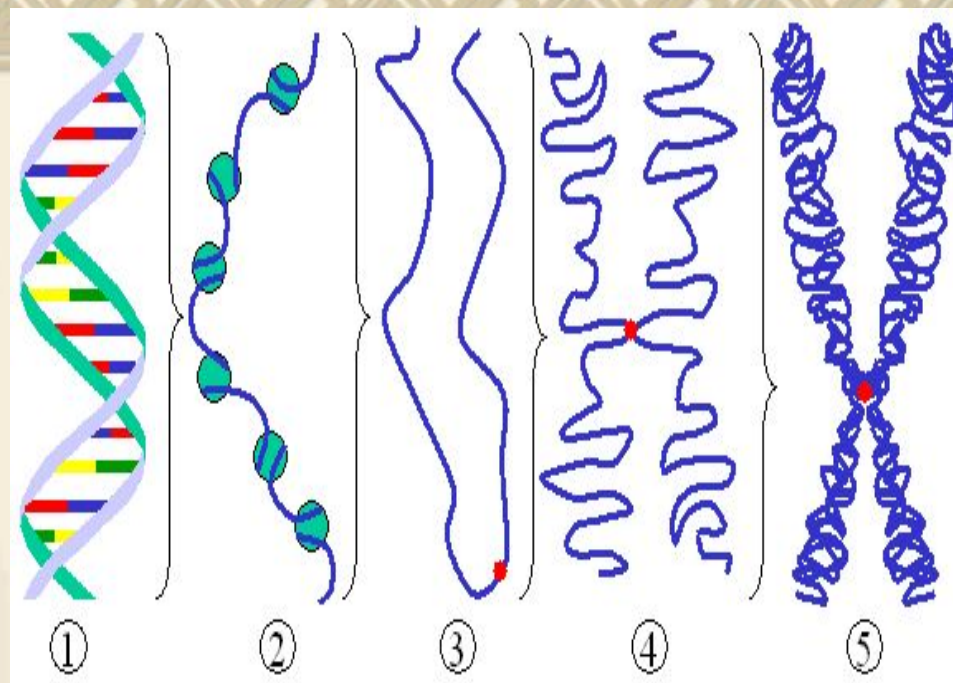


图1 有丝分裂过程图解

(二) 从DNA到染色体



DNA → 核小体 → 螺线管 → 超螺线管 → 染色单体

压缩
7
倍

压缩
6
倍

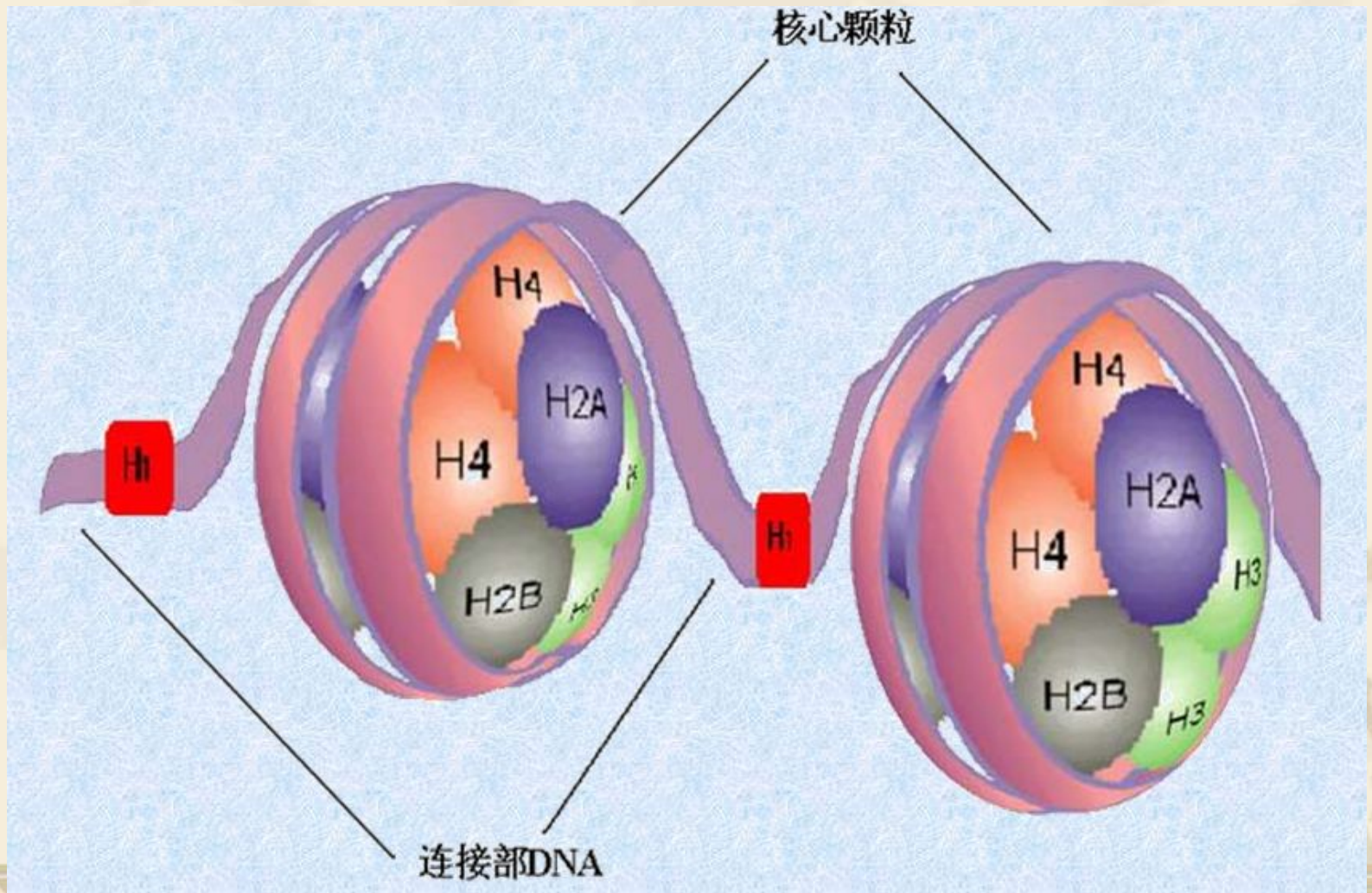
压缩
40
倍

压缩
5
倍

共计压缩8400倍

核小体 nucleosome:

染色质的基本结构

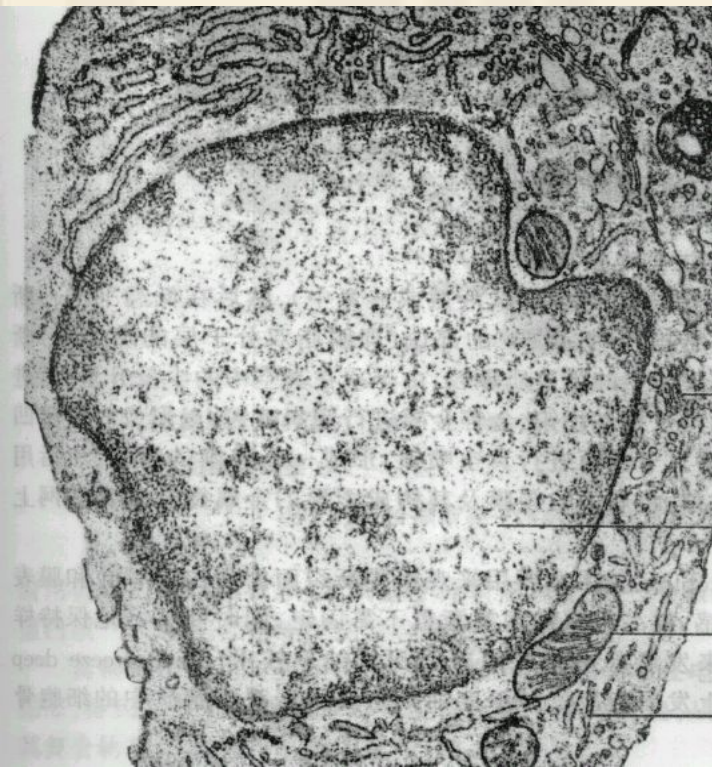


DNA分子的不同存在形式： 染色质和染色体

- ❖ 染色质：间期细胞核中遗传物质的存在形式。
- ❖ 染色体：分裂中期遗传物质的存在形式。一条染色体是一个DNA分子。

染色质：

根据在分裂期和间期的染色不同，分为



- ❖ **常染色质：** 在间期核中分布较稀疏，浅染色，是转录活跃的**DNA**部分，一般位于核中央。在分裂期，位于染色体臂，深染色。含大量功能基因。
- ❖ **异染色质：** 是呈凝集状态的**DNA**与组蛋白的复合物，由于螺旋化程度高，又称为浓缩染色质，一般位于核内膜的边缘形成一薄圈，即称周围染色质。主要位于位于染色体的着丝粒、次缢痕、端粒等位置。间期和分裂期都深染色。基本无功能基因。

基本概念

- ❖ 在细胞周期的有丝分裂中期，染色体的形态结构比较稳定，一般所描述的染色体的形态结构都是中期染色体。
- ❖ 染色体组型：又称核型**Karyotype**，是指将动物、植物、真菌等的某一个体或某一分类群（亚种、种、属等）的体细胞内的整套染色体，按它们相对恒定的特征排列起来的图像。
- ❖ 核型模式图**Idiogram**：是指将一个染色体组的全部染色体逐个按其特征绘制下来，再按长短、形态等特征排列起来的图像。

二、染色体显带技术

染色体分带技术是经物理、化学因素处理后，再用染料对染色体进行分化染色，使其呈现特定的深浅不同带纹（band）的方法。

分带技术可分为两大类：

一类是产生的染色带分布在整过染色体的长度上如：
G、Q和R带，

另一类是局部性的显带，它只能使少数特定的区域显带，如C、Cd、T和N带。

Q带：喹丫因染色后，紫外照射下的明暗带（富含**AT**的明带，富含**GC**的暗带）；

G带：**Giemsa**染料染色后所呈现的染色体区带；（**AT**区是深色）

R带：是中期染色体经碱性磷酸盐处理，丫啶橙或**Giemsa**染色后所呈现的带型，一般与**G**带正好相反；

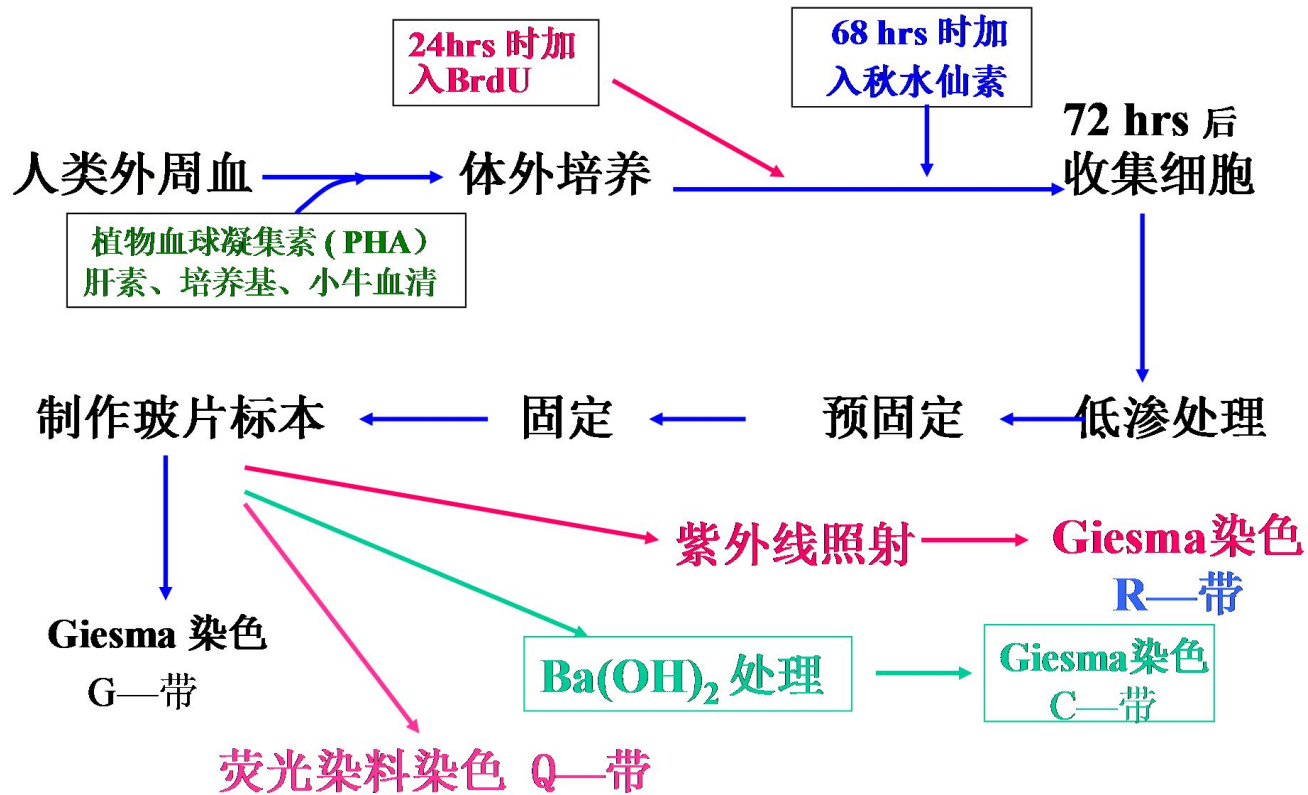
C带：显示着丝粒结构异染色质及其它染色体区段的**异染色质**。

T带：是**染色体端粒**部位经丫啶橙染色后呈现的区带；

N带：**Ag-As**染色，主要染核仁组织者区域的酸性蛋白。

1975年建立了染色体高分辨显带技术。

几种显带的制作方法之间的关系



染色体带的制作方法

G显带实验原理

基础G显带：制备的染色体标本经胰蛋白酶消化、**Giemsa**染色后，可在染色体纵轴上显示出着色深、浅相间的横纹——带，表明每条染色体的特征。

- ❖ 只有可以分裂的活细胞，才能制备染色体。**实验材料**：人外周血淋巴细胞，植物血凝素（**PHA**）刺激血中的淋巴细胞转化成淋巴母细胞，使其恢复增殖能力。
- ❖ 使用秋水仙素或者秋水仙碱破坏纺锤丝的形成，将细胞阻留在有丝分裂中期。从而获得大量的细胞中期分裂相供染色体分析。--采取少量外周静脉血，做短期培养，培养至**72**小时细胞进入增殖旺盛期，此时加入秋水仙素抑制细胞分裂，使细胞分裂停止在中期以获得足够量的分裂期细胞。
- ❖ 细胞低渗技术使细胞中的染色体在玻片上铺散得更好，易于计数和观察。
- ❖ 甲醇/冰醋酸固定液快速杀死和固定细胞。

染色体检查过程（G显带）

1. 培养细胞；
2. 秋水仙素处理；抑制中期分裂相
3. 低渗；使细胞膨胀
4. 固定；染色体形态固定
5. 滴片；分散染色体。冰片法，熏蒸法。
6. 显带和染色；
7. 显微镜下分析。

❖ 实验步骤

❖ 1. 采血及接种培养

❖ 1.1 采血：灭菌注射器抽取外周静脉血3~5ml(绿帽肝素抗凝管)

❖ 1.2 接种 在超净工作台，注射器滴加25滴全血（6号针头）至外周血淋巴细胞培养液中（5ml，含植物血凝素60mg/ml、10%小牛血清），水平摇动混匀。置37℃恒温培养箱中培养68~72小时。

❖ 1.3 终止培养前35~40min，加入秋水仙素，使终浓度达到0.5 μ g/ml。轻轻摇动培养瓶，使秋水仙素混匀。继续培养。

❖ **秋水仙素**主要作用在于能阻滞微管(纺锤丝)形成，或使已形成的微管解聚，从而使染色体停留在中期。

❖ 秋水仙素浓度大，则处理时间短，如浓度小，则处理时间长。但若秋水仙素加入过量，或处理时间过长，分裂细胞多，染色体凝集和收缩变小，或发生异常分裂现象，甚至染色体破碎，不宜用于观察染色体的形态及计数；秋水仙素加入太少，或处理时间偏短，染色体形态偏长或无中期分裂相。

❖ 2. 制片

❖ 2.1收集细胞：将全部培养物吸入刻度离心管中，2000 rpm离心5分钟

❖ 2.2 低渗：弃上清液，加入37℃预温的 0.075 mol/L KCl溶液8 ml，用吸管轻轻吹打细胞团混匀后，置37℃恒温水浴箱低渗处理20~25分钟。

❖ 2.3预固定：加入 1ml新配制的固定剂（甲醇：冰乙酸=3：1）或清质剂300ul，用吸管小心吹打、混匀，2000rpm离心5分钟。

❖ 2.5 固定：

❖ 第一次：弃上清液，加入3ml固定剂，吹打细胞团制成细胞悬液后，室温下固定15分钟，2000rpm离心5分钟。

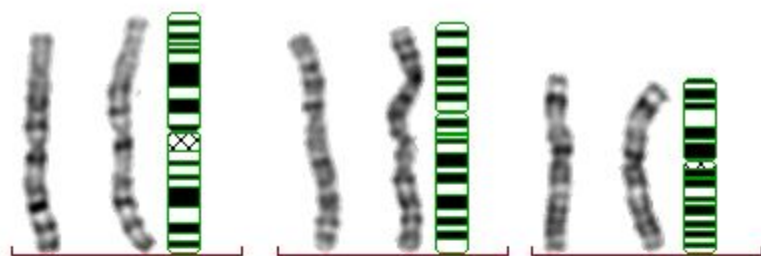
❖ 第二次：弃上清液，重复固定一次。

❖ 第三次：弃上清液，根据细胞数量的多少适当加入数滴新配制的固定剂，吹打细胞制成悬液。

❖ 2.6 滴片：吸取少量细胞悬液，滴2~3滴于冰水浸泡过的载玻片上，吹散，水蒸气熏蒸，70℃ 2小时烤片，待染色。

❖ 3.G显带

- ❖ 3.1 取2.5%胰酶溶液0.5ml，加入50 ml生理盐水染色缸中（终浓度0.025%），用 1N HCl或1N NaOH调节PH7.0左右，置 37℃预温。
- ❖ 3.2 将烤好的玻片标本放入胰酶溶液中处理60秒钟左右（胰酶消化时间需不断调试，摸索。不同时间配制，不同批号胰酶，以及随着处理标本数量增加，胰酶逐渐消耗，胰酶作用时间都会变化）
- ❖ 3.3 取出染色体玻片标本，置于37℃预温的生理盐水中，终止胰酶的作用。
- ❖ 3.4 将玻片标本放入37℃预温的1：10稀释的Giemsa染液中，染色5～10分钟。
- ❖ 3.5 自来水冲洗，自然晾干。



1

2

3



4

5



6

7

8

9

10

11

12



13

14

15



16

17

18



19

20



21

22



X

Y

G显带常见问题及处理:

1. 培养细胞: 细菌污染。霉菌污染。细胞收获量小。玻片上细胞间期核稀疏。
2. 秋水仙素: 大量染色体太细长, 缠成毛线团样。分裂相很多, 但染色体短小, 分叉。几乎没有分裂相。
3. 低渗: 太分散。不分散。
4. 固定: 太发毛。背景不干净。有大团块深染色物质。
5. 滴片: 不分散。太分散。
6. 显带和染色: 没有条带。条带模糊。一个分裂相内, 有的染色体有条带, 有的没有。有的胰蛋白酶消化太过, 有的分裂相则不足。
Giemsa染不上色。染色太深。染色太浅。

各种组织标本的染色体制作

不同的标本，不同的检查目的，
需要调整染色体的制作过程。处理原则：使尽可能多的细胞进入细胞周期，旺盛生长，大量分裂，防止污染。

- ❖ 外周血： 5%小牛血清RPMI-1640， +PHA。检查体细胞核型。
- ❖ 骨髓： 10 %小牛血清RPMI-1640， 不含PHA。检查肿瘤细胞核型。
- ❖ 羊水： 标本珍贵。专用羊水培养基，防止母体细胞污染。检查胎儿细胞核型。
- ❖ 绒毛组织： ...同上。细胞为细胞团（组织），防止细菌污染。清洗、剪碎后消化成单细胞或者细胞团培养。检查胎儿核型。
- ❖ 脐带血： 血液细胞，性质同外周血。一定注意防止母体污染！检查胎儿核型。
- ❖ 活检组织： 如实体瘤标本。
- ❖ 细胞系： 永生细胞。直接常规制作染色体标本即可。

C显带

将染色体用碱或者去垢剂处理后，再用
Giemsa 染色，可以得到只显示着丝粒区域的
带纹，称为 C—带。

实验原理

C显带技术由Arrighi和Hsu于1971年发明，是显带技术中最简单的一种带型。其方法的本身是起源于原位杂交。Arrighi和Hsu发现用碱处理载玻片上的染色体使DNA变性之后，再在SSC溶液中、65℃的条件下使其复性，在受控制的条件下经Giemsa染色可显示出在染色体的一定部位是深染的。70年代用原位杂交的方法证明深染的区域（C带区）是结构异染色质的区域，也就是一般而言的DNA高度重复序列的区域。然而，现在更为流行的看法认为氢氧化钡或其它碱性物质的处理是优先提取了非C带区的DNA，SSC的处理有助于带型的清晰。

实验用品

光学显微镜，恒温水浴箱，培养皿，小镊子，未染色的染色体标本片（片龄一周内），5%氢氧化钡水溶液， $2\times\text{SSC}$ 液， 0.2mol/L HCl，PBS，吉姆萨染液。

实验方法

- 1、制片：常规外周血法制备的标本。
- 2、HCl处理：取5-7天标本龄的染色体标本，选择染色体分散好的标本在0.2mol/L HCl中室温下处理10分钟-1小时，然后用自来（蒸馏）水冲洗干净。这一处理是使DNA脱嘌呤，但没有DNA骨架的断裂。（此步也可省略）
- 3、氢氧化钡处理：将标本浸入60-65℃的5%（饱和）氢氧化钡液中，10秒至几分钟（随标本龄而变动，常规：1-4分钟；1月龄片：8-16分钟，最好设置梯度），碱性处理可能通过产生一个高水平的DNA变性，促进DNA溶解。

- 4、**2×SSC处理**：在**60-65℃**的**2×SSC**液中处理**90**分钟时，用自来水冲洗干净，**2×SSC**温育可使**DNA**骨架断裂并使断片溶解。
- 5、**染色**：用蒸馏水配制**5%Giemsa**，染色**5-10**分钟，用自来水冲洗干净，室温下风干后即可镜检。
- 6、**镜检**：用显微镜高倍镜镜下检查显带标本，如着丝粒区域或异染色质部位（**1,9,16**号染色体次缢痕）及**Y**染色体长臂**q12**深染，染色体其它部位染色浅，即为可取标本。若观察到染色体均呈白色，那么，可能是碱处理或**2×SSC**温育过度。

显带观察

严格地讲，C带显示的是紧邻着丝粒的异染色质区。可见，在人体染色体C带标本中，深染的有：1、绝大多数染色体的着丝粒区；2、第1，9和16号染色体的次缢痕；3、Y染色体长臂的远侧端。

巴黎会议（1971）对各条染色体的C带描述如下：

1号 大，从着丝粒扩展到q。

2号 小。

3-8号 中等

9号 大，从着丝粒扩展到q。

10号 中等。

11号 中等，但比10号或12号大些。

12号 中等。

13号 中等，有时分为二节。

14号-15号 中等。

16号大，从着丝粒向q扩展。



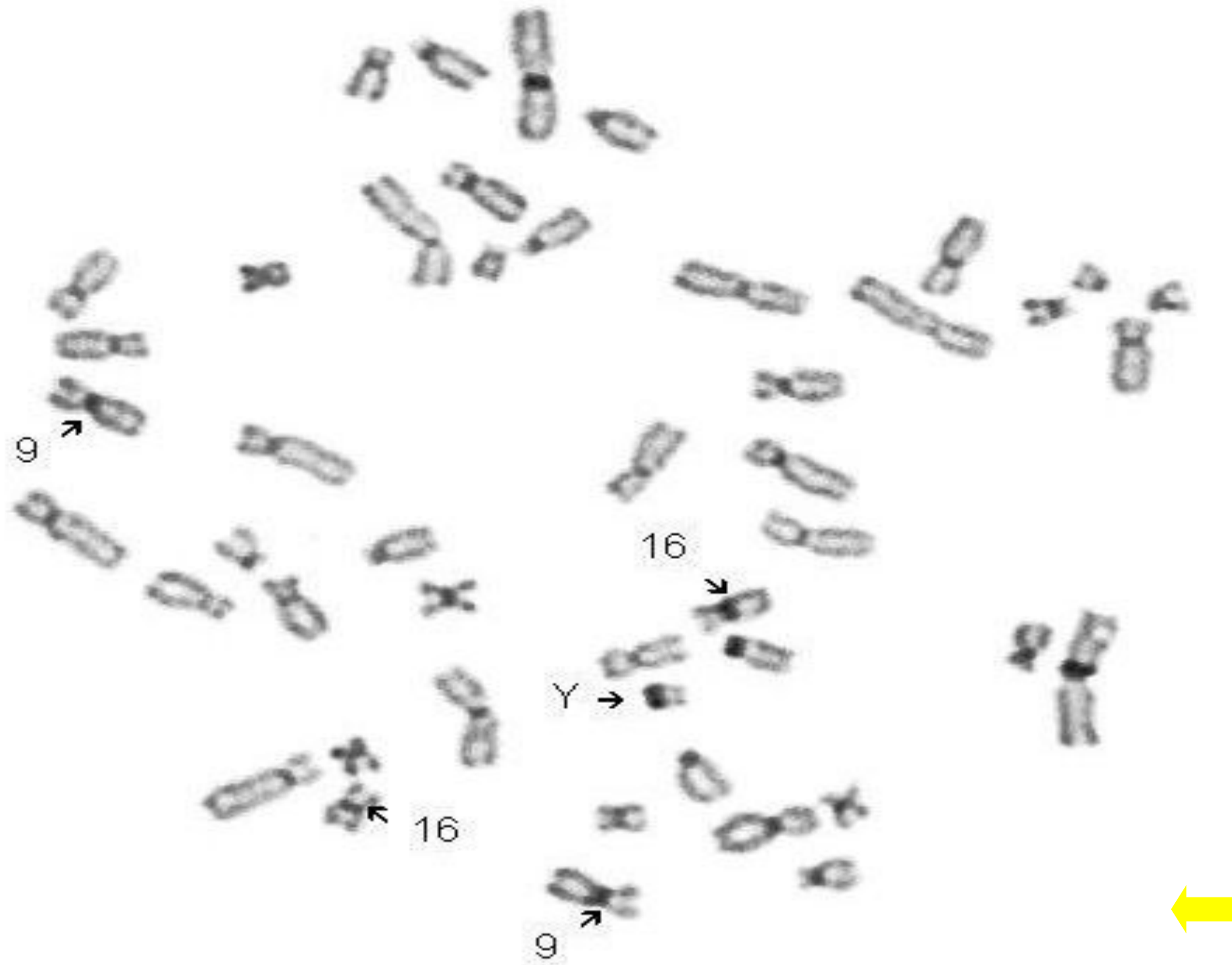
17号 中等。

18号 中等，但比17号大些。

19-22号 中等。

X 中等

Y在着丝粒处有一条非常窄的带；q的末端有一宽带。1，9，16号的C带和Yq上的宽阔的远侧带都有明显的形态变异及异态性。



**Human female
C-bands**



R显带

原理： 在细胞的培养过程中加入碱基的类似物，然后用紫外线照射后再用 **Giemsa** 染料染色，可以得到和 **G—**显带相反的带纹，称为 **R—**带。

即**G**显带的深带变为浅带，浅带染成深带。当**G**显带显示的染色体两臂末端为浅带时，如果两臂末端发生缺失等异常，一般难以发现和识别，而**R**带正好能将此处显示出易于识别的深带。所以，**R**显带技术有利于检测染色体的末端缺失、重排等。

实验用品

光学显微镜、恒温水浴箱、紫外灯、培养皿、
常规制片材料、BrdU、秋水仙素、 $2\times$ SSC溶
液（ $0.3\text{mol/L NaCl}+0.03\text{mol/L}$ 柠檬酸钠）、
Gimesa染液等。

实验方法

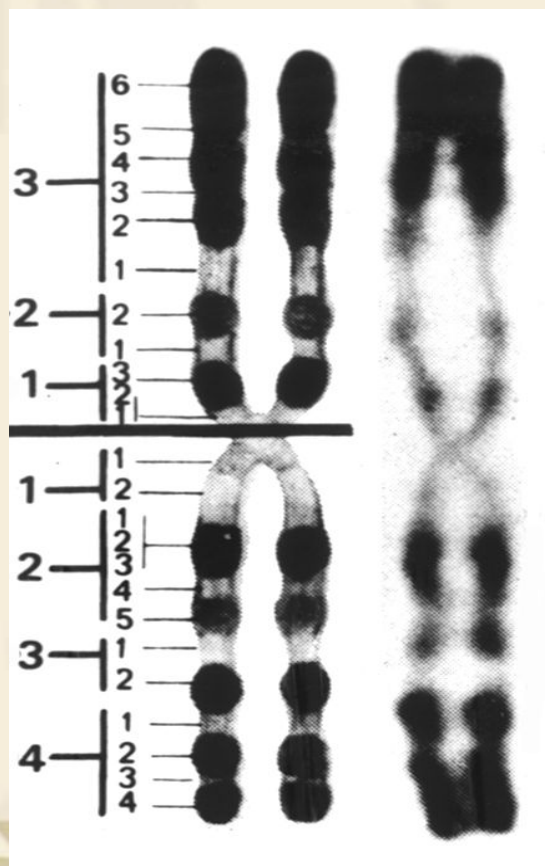
- 1.常规培养细胞，终止前10小时在培养基中加BrdU（使其终浓度为12 μ g/ml）。
- 2.继续培养6小时后加秋水仙素20 μ g/ml的3滴（7号针头垂直竖滴，使终浓度为0.04-0.08 μ g/ml）。
- 3.常规收获、处理细胞，制片。
- 4.在60℃恒温水浴箱中，置一培养皿于水面上（皿内加1/3 2×SSC溶液，将所制玻片浸泡在内）。距玻片10cm处放置一20瓦紫外灯，照射玻片30-45分钟。
- 5.待紫外处理时间结束后，用自来水冲净。
- 6.Gimesa染色5分钟，自来水冲净，室温干燥后于镜下观察。

注意：

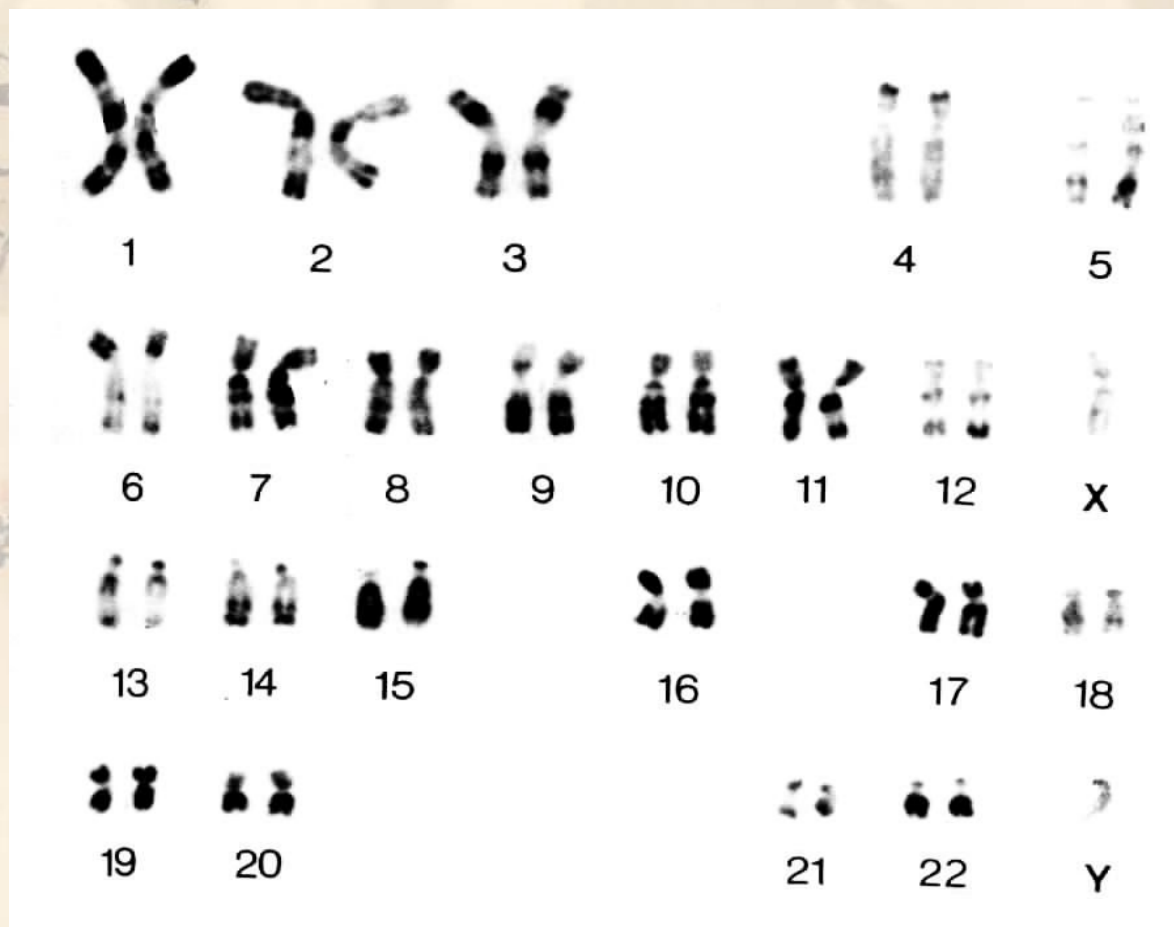
1. Brdu的浓度和作用时间是实验成败的关键。
2. 紫外灯照射距离玻片太远也不利于带型的显示。
3. 若为女性标本，还可见淡染的迟复制X。

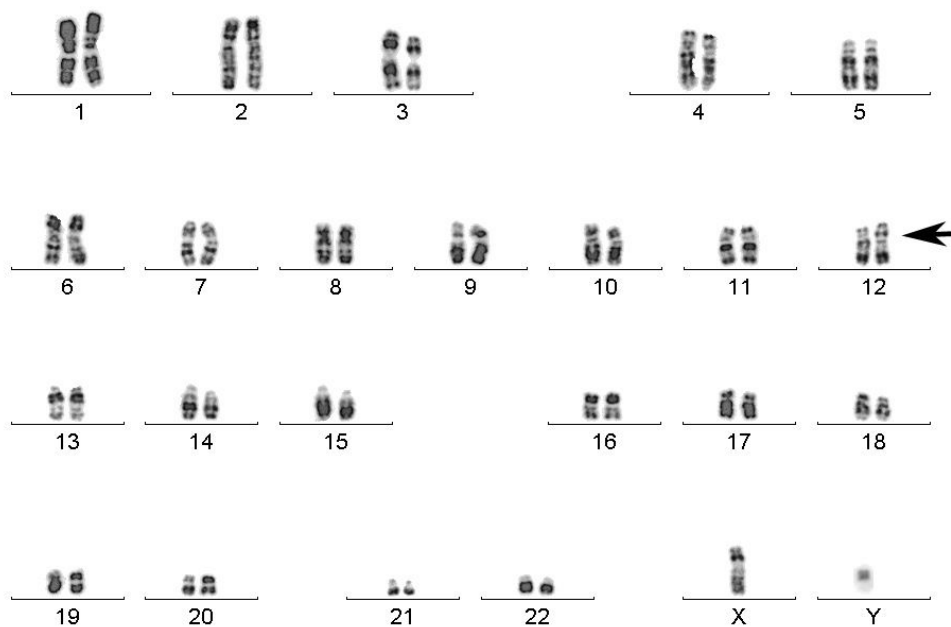
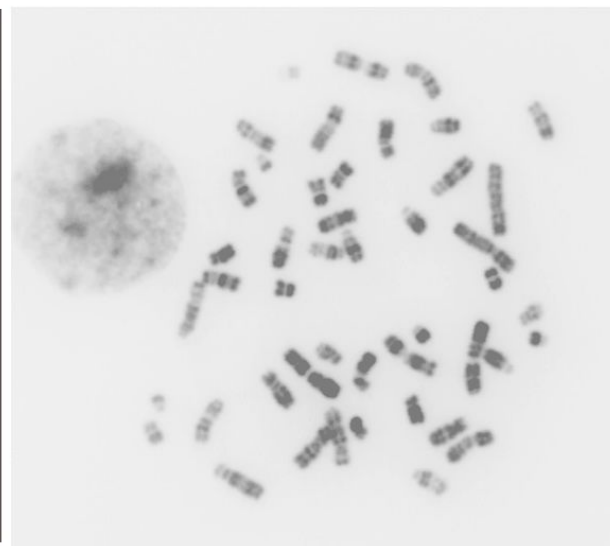
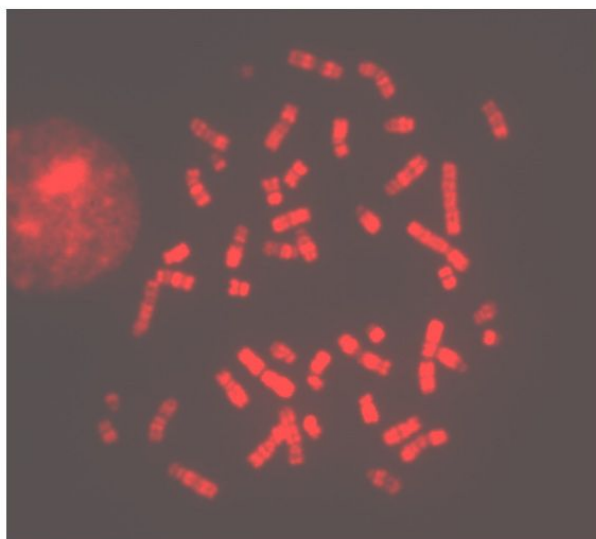
显带观察

各号染色体显现的带纹与G显带相反，在G带染色体标本出现的深带用R显带法就是浅带，同时在G显带染色体标本出现的浅带用R显带法就是深带。与G显带的对比图：



R显带总体图





G11技术

G11式显带是一种特异性显示9号染色体次缢痕的显带方法，一般用于9号染色体次缢痕多态分析、家系调查，亲子鉴定等研究以及9号染色体倒位的细胞遗传学分析。

实验用品

光学显微镜、恒温水浴箱、染色缸、自制新鲜染色体玻片、吸管、计时器、pH试纸、蒸馏水、0.1N氢氧化钠、Gimesa染液等。

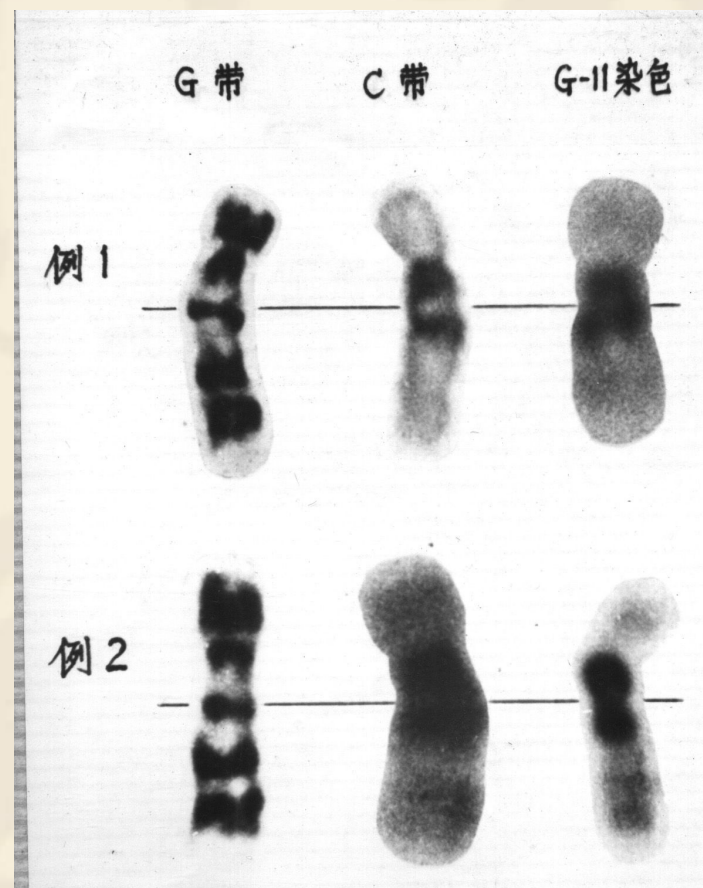
实验方法

1. 3 ml Gimesa原液中加入蒸馏水47 ml，混匀，用氢氧化钠调pH至11。
2. 将染色体玻片放入其中染色5分钟左右。
3. 自来水冲洗，干燥。
4. 观察可见9号染色体次缢痕染成紫红色，其它染色体长短臂均显示蓝色。

注意事项:

- 1、染色体玻片片龄一般不要超过一周，且在显带之前最好再次75℃烤片5分钟。
- 2、pH值为11是显带成功的关键。
- 3、染色时间可先摸索，如整个背景为蓝色、次缢痕未出现，可相应地延长染色时间；如整个背景为紫红色、次缢痕不明显则可相应地缩短染色时间。

显带观察：9号长臂次缢痕显紫色



Q显带

70 年代初期，瑞典的化学家 Caspersson 首先用荧光染料喹丫因氮芥 (Quinacrine Mustard) 处理染色体标本，发现在荧光显微镜下每条染色体出现了宽窄 和亮度不同的辉纹，即荧光带，而各条染色体有其独特的带，由此可以清楚地鉴别人类的每一条染色体，称为 **Q—带**。

实验原理

染色体用一种易结合于富含AT的DNA的荧光染料染色，如quinacrine，DAPI或Hoechst33258，通过UV荧光显微镜可以观察染色体显示亮度不同的带纹，Q显带的带纹与G显带的非常相似，亮带相当于G显带的深带，暗带相当于G显带的浅带。

实验用品

光学显微镜、恒温水浴箱、立式染色缸、

人外周血淋巴细胞染色体玻片标本（75℃中烤片3小时，未经染色）。pH6.0缓冲液，Soresens缓冲液(pH6.0)、pH6.0的磷酸缓冲液。

实验方法

将标本置于pH6.0缓冲液中浸5~10分钟后，再转浸入用Soresens缓冲液(pH6.0)配制的0.2%的喹吖因、阿的平染液中染色5~10分钟，用pH6.0的磷酸缓冲液漂洗2次，每次5分钟，于玻片上滴加1~2滴新鲜缓冲液，加盖片，在荧光显微镜下观察。

Caspersson等（1971）的方法：

取用空气干燥标本的玻片→浸入95%、70%、50%的乙醇和蒸馏水使其吸水→浸入pH7的柠檬酸/磷酸盐缓冲液中→用预温至20℃芥子喹吖因（50ug/ml）染液染色20分钟→在上述缓冲液中漂洗三次，每次5分钟→然后用缓冲液盖片封存→在荧光显微镜下观察。

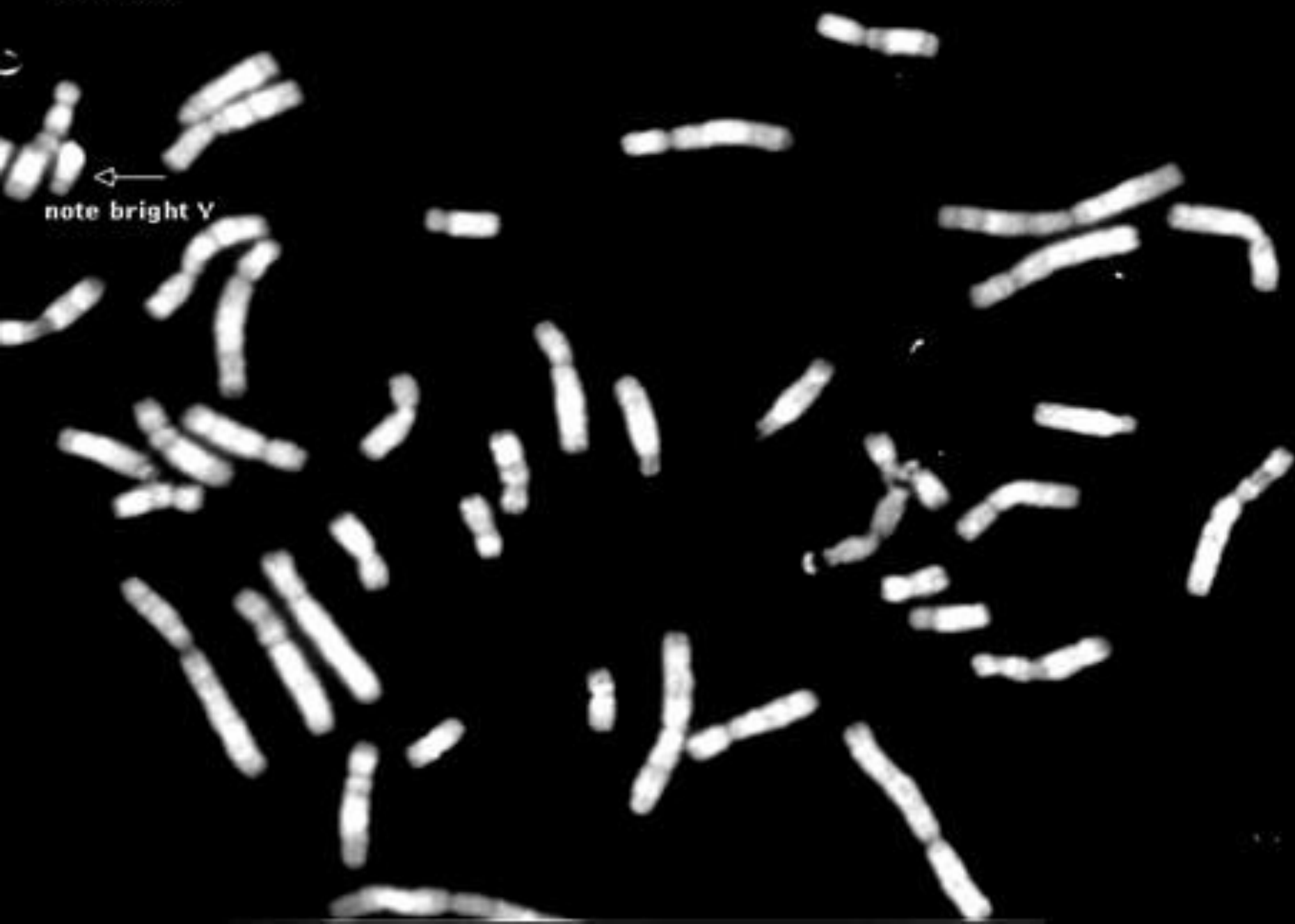
显带观察

带型与**G**显带标本一致，荧光显微镜下观察染色体上呈现出的亮带就相当于**G**显带染色体标本的深带。

1号染色体：短臂由远端的弱荧光节段逐渐过渡到一中等荧光节端，后者可分为两条带。长臂有5条中等荧光带，中央一条最明显，次缢痕的荧光阴性。

human male
Q-bands

note bright Y



N 显带

此技术可以使13、14、15、21和22号染色体的随体和随体柄着色。

实验原理

人类的近端着丝粒染色体(即13、14、15、21和22号染色体)的副缢痕处与核仁形成有关,故称核仁形成区(nucleolus-organizing region, NOR),它是中期染色体上的明显结构之一。应用DNA-RNA分子杂交技术,证明人类的18S和28S核糖体RNA (rRNA编码结构)的基因(rDNA)位于NOR。目前已有多种技术可以显示中期染色体上的核仁形成区。

其中最简单而又准确的方法是银染法,即利用硝酸银将具有转录活性的核仁形成区(rRNA基因)特异性地染成黑色,人们将这种银染阳性的核仁形成区称为Ag-NOR,它们是具有转录活性的18SrRNA基因和28SrRNA基因所在的部位。

由于具有转录活性的rRNA基因(rDNA)往往伴有丰富的酸性蛋白质,该类蛋白质含有巯基(-SH)和二硫键(-S-S-),能使AgNO₃中的Ag⁺还原成Ag颗粒,因此有转录活性的核仁形成区常被镀上银颗粒而呈现黑色,没有转录活性的NOR则不着色。故其着色程度与细胞中rRNA基因的转录活性相一致。在同一物种, Ag-NOR的数目以及它们在染色体上的位置是相对恒定的, 如果发生了改变就意味着rRNA基因的活性发生了变化, 故此项技术是目前探讨rRNA基因功能的方法之一

此外，人类近端着丝粒染色体的随体间易发生联合，这种联合可能是造成近端着丝粒染色体不分离、断裂和易位的原因。利用银染技术可在发生联合的染色体间清楚地看到有银染物质相连。因此，银染近端着丝染色体联合（**Ag-stained acrocentric association ,Ag-AA**）可以作为准确地判断人体细胞是否存在近端着丝粒染色体随体联合的客观标准。目前，也将**Ag-AA**看作反映rRNA基因活性大小的一个指标。所以银染技术已逐渐受到重视，并已开始广泛应用于肿瘤细胞遗传学、体细胞遗传学、进化遗传学、临床细胞遗传学及药物、化学因素等的遗传效应的研究上。

实验用品

光学显微镜、恒温水浴箱、移液枪、培养皿（干燥）、吸管、擦镜纸、小镊子、未染色的染色体标本片（片龄一周以内）、硝酸银、甲酸、**Giemsa**染液、一次性离心管（15ml）、去离子水、锡箔纸等。

实验方法

- 1、设一60℃水浴箱；另置Giemsa染液缸于37℃水浴箱。
- 2、临时配制新鲜的AgNO₃溶液：取一次性离心管（15ml）一支，称取AgNO₃ 5g溶于10ml去离子水中，加10ul甲酸，混匀。将一干燥培养皿漂于60℃水浴箱水面上。
- 3、将玻片用4层干净擦镜纸（略小于玻片大小）盖好。
- 4、用吸管将AgNO₃溶液慢慢滴于玻片纸上，直至擦镜纸呈棕黄色（黑色）为止，一般5ml能滴两张玻片。
- 5、擦镜纸变黑后，用镊子轻轻启开擦镜纸，（将玻片）用自来水冲干净。

6、**Giemsa**染色：吉姆萨母液用蒸馏水按一定的比例稀释。例如，10份蒸馏水加1份吉姆萨母液稀释即为10：1。一般染色5分钟。

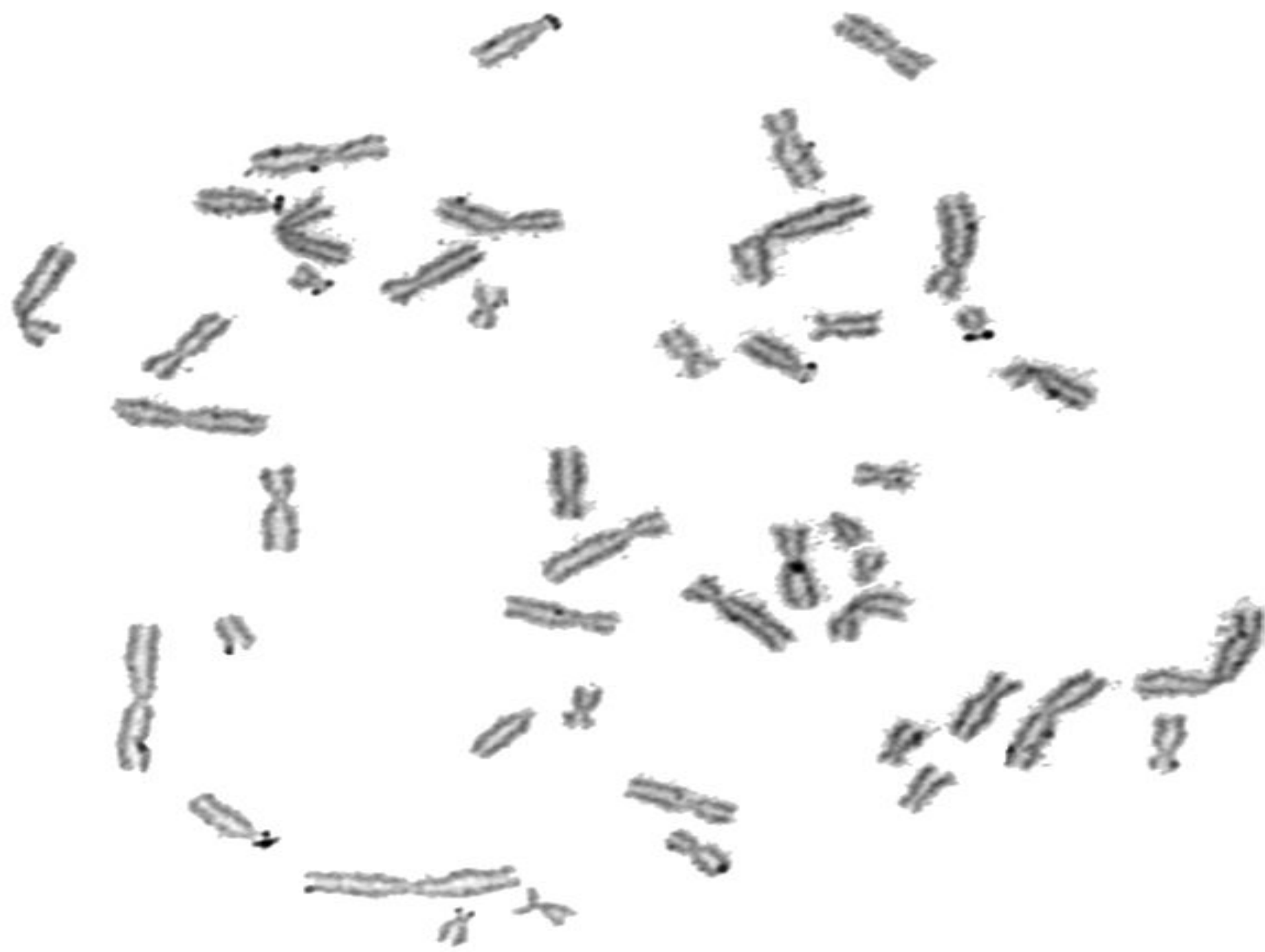
7、染色后的玻片标本用自来水洗去多余染料，染色过深可用磷酸缓冲液脱色。室温下风干后即可镜检，必要时可用树脂胶封片。镜检时先在低倍镜下选择分散好、长度适中的分裂相，然后转换油镜观察其显带的情况，选择显带好的标本进行核型分析。

注意事项:

- 1、 AgNO_3 工作液应现用现配，并注意避光。用锡箔纸包住离心管，放置时间不能超过20分钟，如放置的时间较长，溶液出现混浊即不宜再使用。
- 2、滴 AgNO_3 液时，不能让玻片干燥。注意防止银染液溅至衣物和手上，以免留下难以去除的黑色污点。
- 3、滴片时染色体标本片一定要平置，以使染液均匀分布在标本上，使标本着色均匀。
- 4、一定要让玻片擦镜纸变黑后再冲洗。
- 5、染色时间因材料而异，因吉姆萨染料批号不同、质量上有差异，因此其染色液浓度和染色时间需作适当调整。

显带观察

13、14、15、21和22号染色体的随体和随体柄为黑色。





T显带

T显带是R显带的亚类，因为特异地着色在端粒而称为T显带。T带是R带的最深染部分，必须用特殊的高热处理染色体，然后用吉姆萨或与荧光联合染色。但使用得不多，所以在此只是作简单介绍。

实验原理

端粒是维持染色体正常复制和上下代传递的三个基本功能单位之一。它的功能包括确保染色体末端的正常复制；防止断裂的**DNA**与染色体末端的重组。它们亦是哺乳动物生殖细胞减数分裂第一次分裂时同源染色体配对的起始部位。每次细胞分裂，染色体丢失其末端的约**100**核苷酸，此变短的端粒可为细胞提供一有丝分裂的时钟。丢失的端粒序列可经端粒酶的作用逐个加回。**T**显带技术专门显示染色体端粒，可用于分析染色体端粒有无缺失、易位等畸变。**T**显带是**R**显带的亚类，因为特别地着色在端粒而称为**T**显带。**T**带是**R**带的最深染部分，必须用特殊的高热处理染色体，然后用吉姆萨或 与荧光联合染色。

实验用品

光学显微镜、恒温水浴箱、培养皿、1ml注射器、擦镜纸、小镊子、未染色的染色体标本片（片龄一周以内）、磷酸盐缓冲液（pH6.7）、吉姆萨染液（pH5.1）、吖啶橙染料。

实验方法

1. 制片：常规外周血法制备的标本。
2. 把染色体玻片标本放在含吉姆萨的pH6.7磷酸盐缓冲液中，加热至87℃。
3. 染色：用吖啶橙染料染色，或者经同样热变性后用吉姆萨染液染色5分钟。
4. 镜检：用显微镜高倍目镜下检查显带标本，如染色体末端出现一定的带型，称端带型（T带），即为可取标本。

显带观察

1、4、11和19号染色体短臂的末端显出绿色T带，以8、9、10和17号染色体长臂的端带最为鲜明，5、12、14、16、20、21和22号染色体末端也稍显绿色，3、6、18、X和Y染色体不显端带。热处理如持续15~25分钟。11号染色体长臂近侧段和19号染色体短臂近侧段，以及22号染色体长臂近侧段均显示典型的中间绿带。此法特别用于识别22号染色体的长臂。热处理30分钟或更长时间，就会出现R带型。

性染色质检测技术

❖ X小体检测技术

❖ Y小体检测技术

X小体检测技术

X小体：在间期细胞核中，由于女性的两条X染色体中的一条基本处于失活状态而形成一种特殊的深染的块状结构，称为X小体。

X小体与X染色体的关系

用人体的体细胞，如口腔上皮细胞或女性个体的阴道上皮细胞，通过特异的处理和染色，在显微镜下可发现部分细胞核膜的内缘有一块染色较深、大小为 $1\text{ }\mu\text{m}$ 左右的呈半月形的小块，即X小体。有些细胞中，X小体的位置不在核膜的内缘，那就不容易与其他的染色质块区别了，所以一般只用紧贴于核膜内缘的作为阳性。

根据有关实验查明一个分裂间期细胞核中仅有一条X染色体呈松散状态，参加细胞生理活动，另一条X染色体则仍保持异固缩的状态，所以染色较深而成为X小体。据此，正常男性个体不可能出现X小体；正常女性可能出现一个X小体。其X小体与X染色体的关系如下表，即X小体数目等于X染色体数目减1。

性染色体的类型	性别	X小体的数目
X Y	男	0
X O	女	0
X X	女	1
XXY	男	1
XXX	女	2
XXXX	女	3

口腔粘膜细胞X小体检测法

- 1、漱口3次，然后以木质压舌板刮取口腔颊部粘膜细胞，放入盛有生理盐水的离心管中，摇动分散细胞。
- 2、用1 000转/分 离心10分钟，除去上清液，细胞沉淀物用3：1的甲醇冰醋酸固定剂固定10分钟。
- 3、再用1000转/分离心10分钟，除去上清液，向细胞沉淀物中加入几滴新的3:1的甲醇冰醋酸固定剂制成细胞悬液。
- 4、将细胞悬液滴入载玻片上，让其在空气中干燥后，放入5N HCl中处理10分钟，自来水中漂洗数秒钟，放入0.2%甲苯胺蓝染色液中染色1~1.5分钟或放入硫堇染色液中染色30分钟，自来水漂洗，空气中干燥后，在油镜下依次观察细胞核着色均质，核膜完整的细胞100个，并计数具靠近核膜边缘的半月形X小体的细胞数

羊水细胞X小体检测法

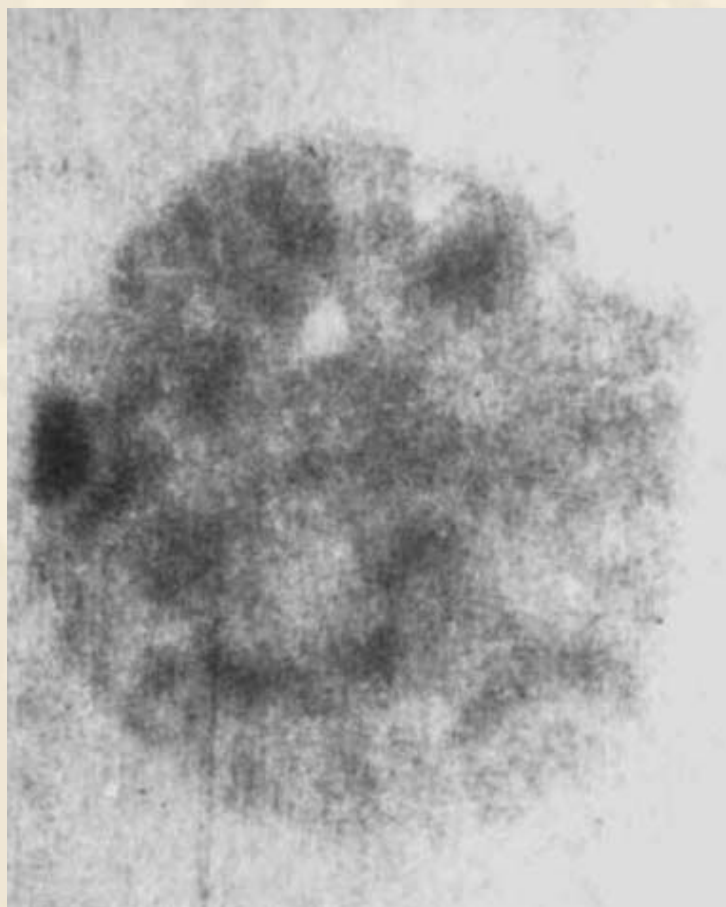
从中期妊娠（16周左右）的孕妇中，经羊膜穿刺抽取羊水5~10ml左右，放入离心管中，以1000转/分 离心10分钟，去上清液，加入3:1甲醇冰醋酸固定剂5~10ml,固定30分钟以后；再以1000转/分离心10分钟，去上清液，再加入新鲜的固定剂3~5滴制成细胞悬液；然后按口腔粘膜细胞X小体检测法制片，染色和读片。

若抽取的羊水呈乳白色，则表明羊水中含胎脂过多。如不经处理，对观察有极大的妨碍。为此，可先用1:1乙醚酒精处理20分钟，然后用95%酒精固定30分钟后，按口腔粘膜细胞制片法制片和读片。

绒毛膜细胞X小体检测法

取材方法与绒毛培养法相同。将绒毛枝取出放在玻片上，置显微镜下观察，确认为绒毛枝，则行两片对合压片4~6张，立即放入95%酒精中固定15~20分钟，取出晾干，用0.2%甲苯胺蓝染色1分钟。然后，按口腔粘膜细胞法进行漂洗，干燥和镜检。

X小体



Y小体检测技术

Y小体： 男性Y染色体长臂上的DNA重复序列具有强烈的荧光着色性，称为Y小体。正常男性体细胞中只有一个,正常女性没有。

Y小体和Y染色体的关系： 1970年Caspersson等发表了人类第一张中期染色体荧光带型照片，发现Y染色体长臂经荧光染料染色后具有特异的辉煌的荧光。随后，不同的研究者用同类的荧光染料对男性的各种间期细胞核，以及精子的头部进行染色，均可观察到一个类似于Y染色体长臂的直径约 $0.3\mu\text{m}$ 的圆形或椭圆形的荧光辉煌的亮点。而在女性中则没有。从而确认Y小体是Y染色体长臂上的一部分。

人类 Y小体与Y染色体的关系如下表：

性染色体的类型	性 别	Y小体的数目
XX	女	0
XY	男	1
XXY	男	1
XXXY	男	1
XYY	男	2

羊水细胞Y小体检测法

按检查X小体的方法获得羊水细胞，进行固定，制片。用0.5%的阿的平染色液染色15分钟以上，然后用pH5.6的McIlvaine磷酸缓冲液洗去剩余的染色液，再滴上新的缓冲液1~2滴并加上盖玻片，立即置荧光显微镜下用油镜进行检查。

血细胞Y小体检测法

取外周血2~3滴，置于玻片中央，用玻棒涂敷成直径约1cm的圆形厚血片。待干后加上数滴3%的冰醋酸固定15分钟左右，待红细胞全部溶解后，用pH5.6的McIlvaime缓冲液彻底冲洗，空气干燥。

再滴加0.5%阿的平水溶液染色15分钟，用缓冲液洗去剩余的染液后，再滴上新的缓冲液1~2滴并加上盖玻片，立即置荧光显微镜下用油镜进行检查。

绒毛细胞Y小体检测法

取材、制片同绒毛细胞X小体检查法，然后用0.5%的阿的平溶液染色20分钟左右，用pH5.6的McIlvaine缓冲液洗去剩余的染色液后，再滴上新的缓冲液1~2滴并加上盖玻片，立即置荧光显微镜下用油镜进行检查。

Y小体

