

实验二 人体X-染色体的观察 与分析

- 一 实验目的

- 1.学习人类X染色体的检测方法;

- 2.认识雌性哺乳动物X染色体失活假说和剂量补偿效应的机制。

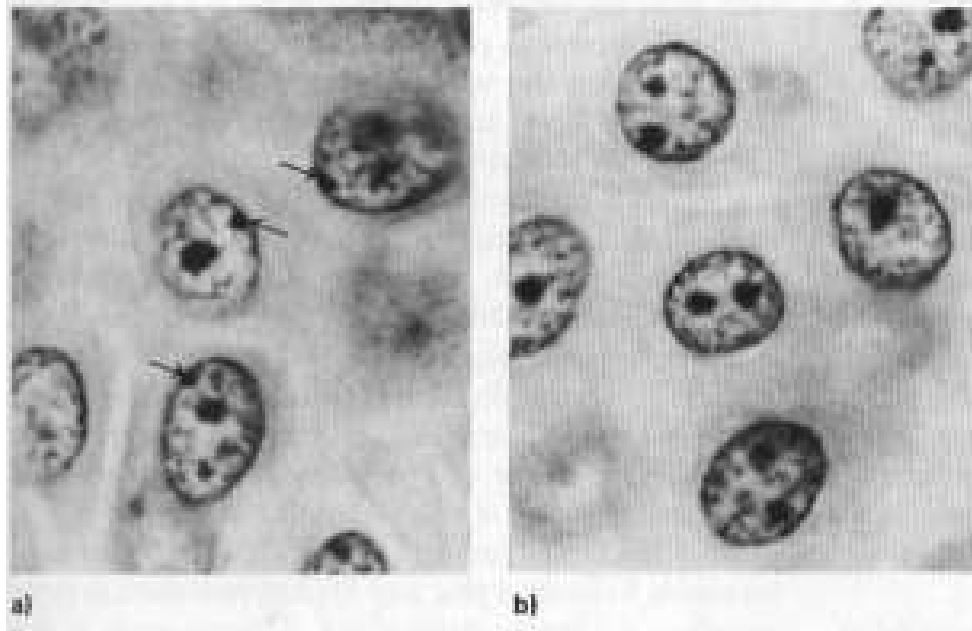
- 二、实验原理

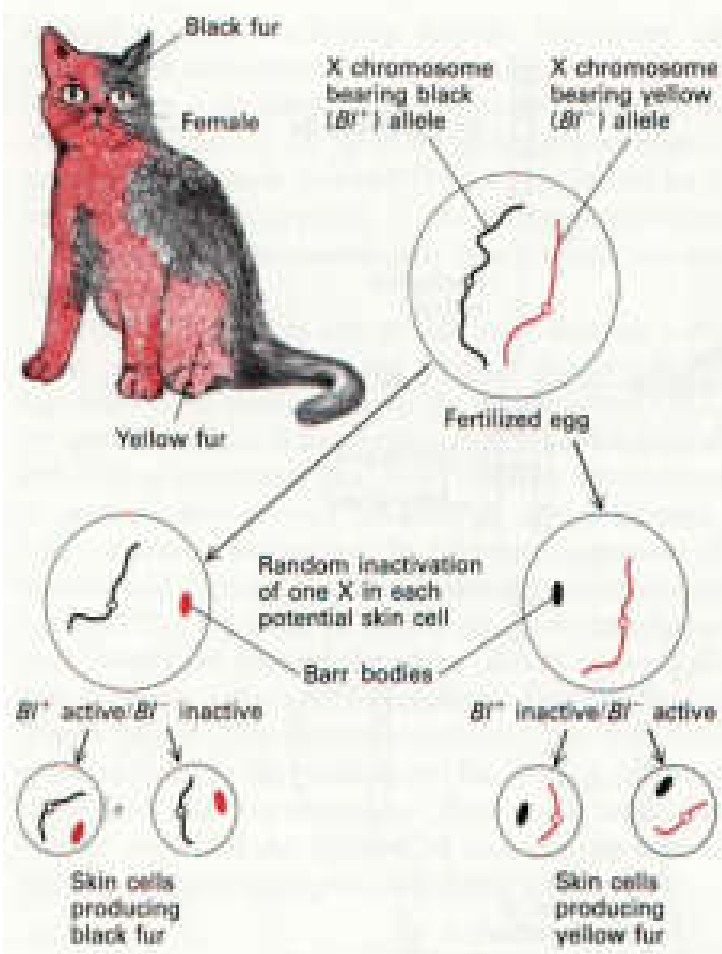
- 1949年Barr和Bertran在研究猫的间期神经细胞时，发现雌猫体细胞核膜边缘有一个可被碱性染料染色的小体，而雄猫没有该特征。后来发现人类正常女性口腔上皮、阴道上皮、皮肤、羊水等的细胞中都有一个这样的小体，继而进一步发现所有哺乳动物雌体细胞中都有同样的一个小体。一般认为这种小体是两个X染色体中的一个在间期发生异固缩形成的，故而将其称为X小体，X染色质，又称为Barr小体。Barr小体出现在哺乳动物雌性个体细胞的细胞核膜边缘，这主要是因为这条染色体处在失活状态所致，Morishima等利用放射性标记的方法证实了失活状态的性染色体与其他异染色质（heterochromatin）一样，在DNA复制时总落后于其他常染色质，且大多出现在核膜边缘。性染色质的数目是X染色体数减1。有两个X染色体的正常雌性有一个X小体；有三个X染色体者有两个X小体。雄性只有一条X染色体，不发生异固缩，因此没有X小体。但XXY的雄性也可有一个X小体。故可以根据X小体的有无、数目来鉴定胎儿的性别和性别畸形。

1949年M.L.Barr等

研究发现雌猫神经细胞核膜内凝缩的深染小体 [性染色质体 (sex-chromatin body) 或巴氏小体 (Barr body)], 而雄性个体细胞中则没有。进一步研究发现: 所有哺乳类雌体细胞中都可以见到这一结构。

Barr bodies: (a) Nucleus of normal human female cells (XX), showing Barr bodies; (b) Nucleus of normal human male cells (XY), showing no Barr bodies.





巴氏小体是由雌性哺乳动物体细胞中失活的X染色体在间期细胞核中呈异固缩状态（染色质高度螺旋化），形成直径约 $1\mu\text{m}$ ，贴近于核膜边缘的染色小体。

细胞分裂间期

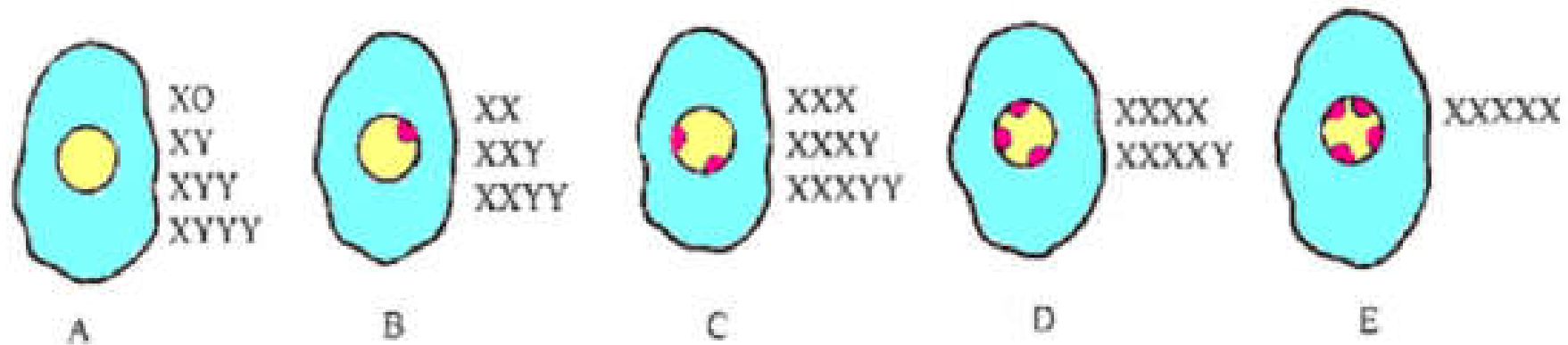
细胞核中出现异固缩现象：浓缩、染色深、无活性；

细胞分裂期

可形成正常的染色体形态；复制时间比有活性的X染色体稍迟一些。

基于barr小体鉴定胎儿的性别和性别畸形

Barr小体的数目= $n-1$ (n为X染色体数目)
正常女人的体细胞间期核中Barr小体为1;
正常男人的体细胞间期核中Barr小体为0;
XXX女人的体细胞间期核中Barr小体为2;
XXXX女人的体细胞间期核中Barr小体为3。



间期细胞核中巴氏小体出现情况与染色体组合的关系

A. 无巴氏小体; B. 1个巴氏小体; C. 2个巴氏小体; D. 3个巴氏小体; E. 4个巴氏小体

X染色体失活的假说（Lyon hypothesis）

- 剂量补偿效应（dosage compensation effect）是指XY型性别决定的生物，由X性染色体上的基因决定的性状在两性的表现几乎相同。也就是说X染色体上的基因的表达产物在雌、雄细胞中是等量的。这种剂量补偿效应可以通过两种途径实现：一是X染色体的转录速率的差异，即雌性细胞中的两条X染色体的转录速率低于雄性细胞中单条X染色体的转录速率，因而造成雌性和雄性细胞的总体表达水平接近；二是雌性细胞中有条X染色体在功能上是失活的。

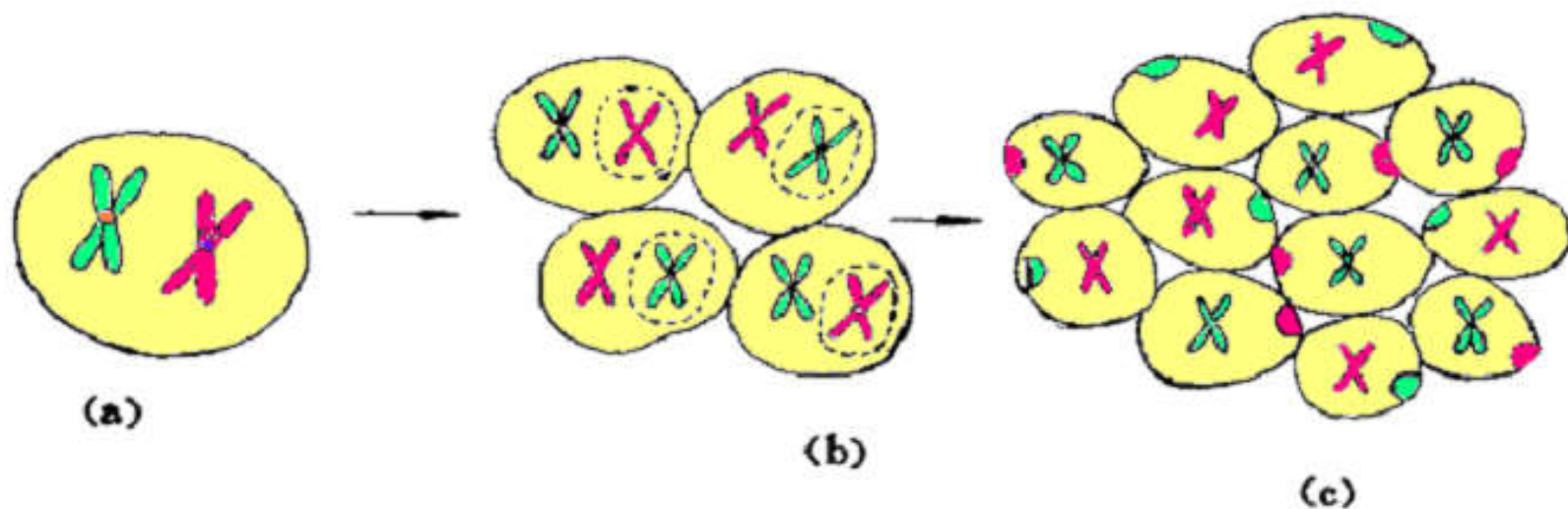
内容:

①巴氏小体是一条失活的X染色体；哺乳动物雌性个体两条X染色体的其中一条在受精后失活；

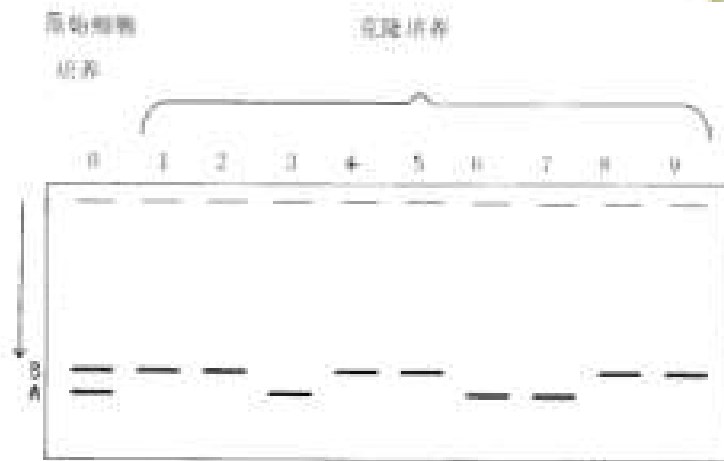
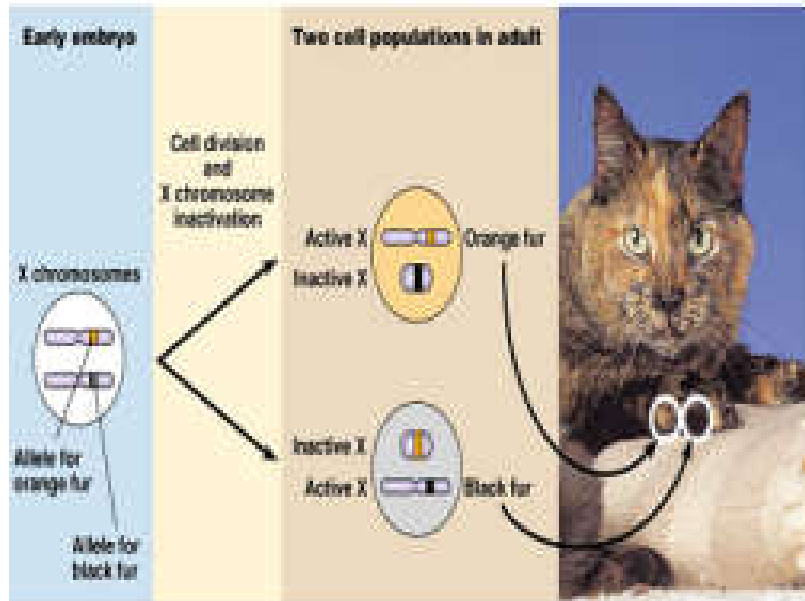
②两条X染色体中哪一条失活是随机的；在同一哺乳动物的体细胞中，有些父源X染色体失活，有些为母源失活。

③失活在胚胎早期发生(人类在胚胎发育16天时)，失活的X染色体在以后分裂中不会复活；当生殖细胞形成时，失活的染色体可恢复。

④杂合体雌性在伴性基因的作用上是嵌合体。



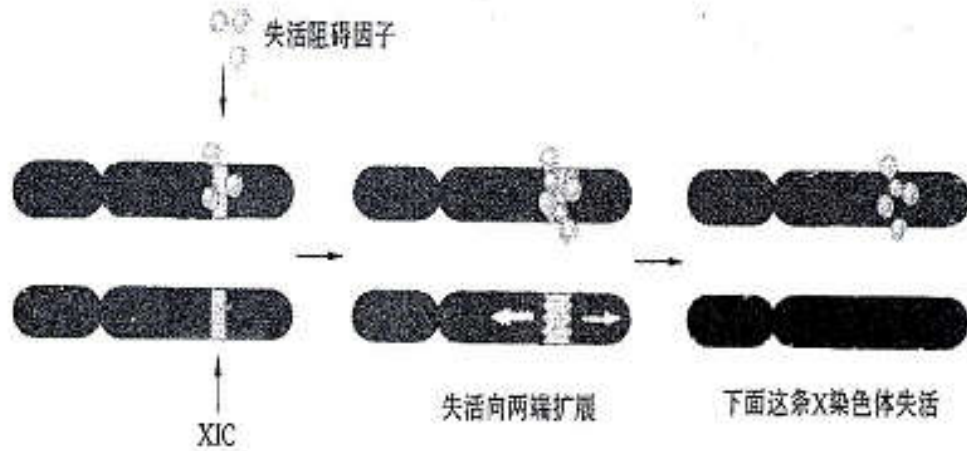
证据： 1) 玳瑁猫毛皮上的黑色和黄色斑块—— $X^O X^o$
 2) 人类葡萄糖-6-磷酸脱氢酶活性测定 Gd^A/Gd^B



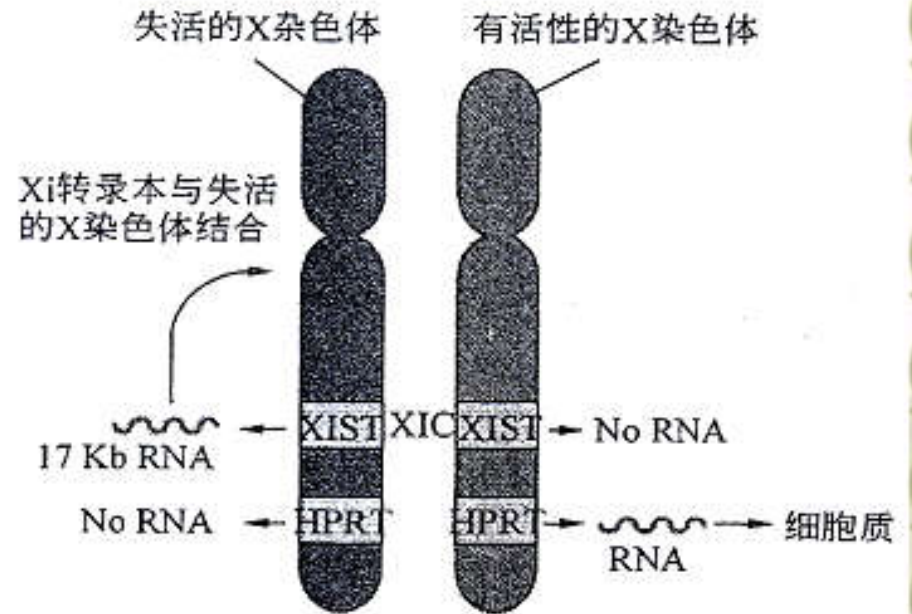
取自一个有 AB 表型的 G-6-PD 性成的细胞克隆
 0, 克隆化之前的一批培养物, 具有 AB 型
 1-9, 培养物在克隆 1, 2, 3, 4, 6, 8 中是杂
 A, 纯系在克隆 5, 6, 7 中是纯

X染色体失活的机制

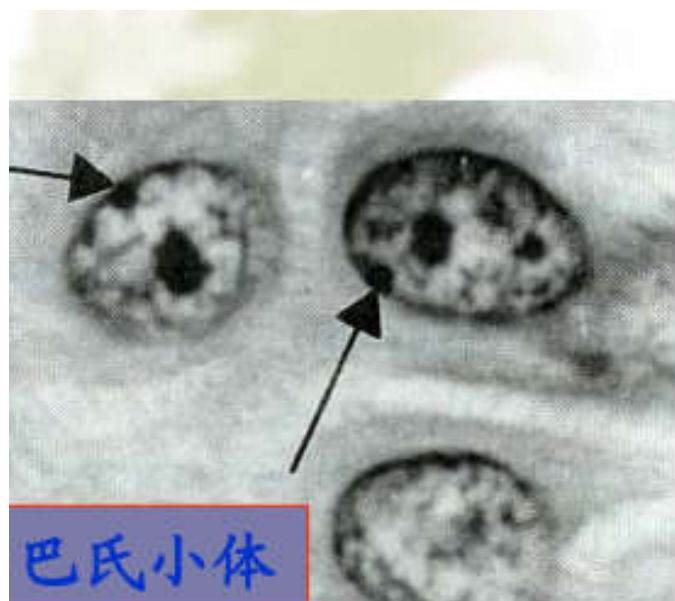
X染色体上都存在与失活有关的Xic（X染色体失活中心）位点，Xic位点的丢失会影响莱昂化，胚胎不能存活。X染色体失活分起始、维持、扩散3个阶段。X染色体失活只是部分失活，在失活染色体的Xic位点上发现有活性的基因（XIST）。



Xic的失活作用



XIST基因的表达



X-染色体的形态特征及所在部位:

X-染色体的形态表现为一结构致密的浓染小体; 轮廓清楚; 大小 $1\sim 1.5\mu\text{m}$; 常附着于核膜边缘或靠近内侧; 形状为凸形、三角形、卵形、短棒及双球形等。

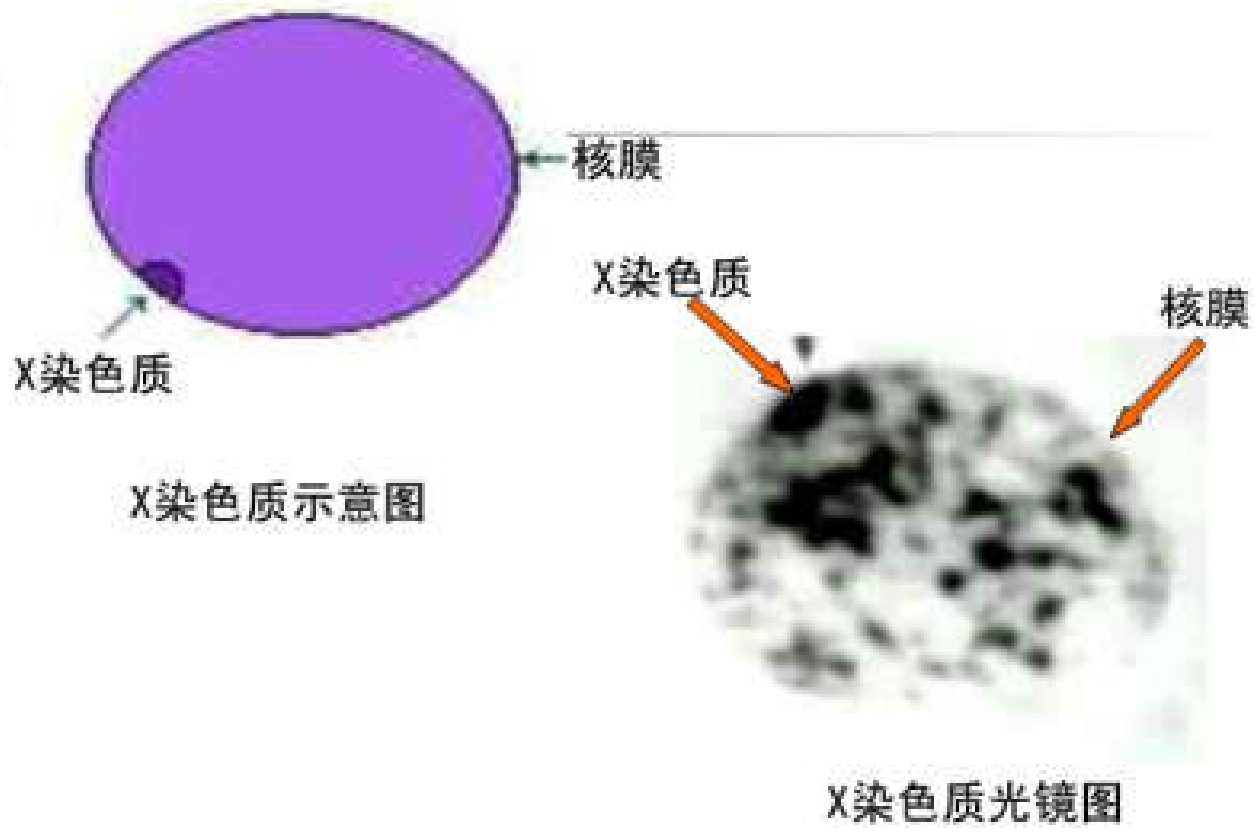
正常女性口腔黏膜细胞中出现率: $30\sim 50\%$ 。



女性细胞（箭头所指为巴氏小体）



男性细胞（没有巴氏小体）



- 三 实验材料

人体口腔上皮细胞或毛囊细胞

- 四 实验器具和药品

实验器具：显微镜、载片、盖片、无菌牙签等。

实验药品：

(1) 1N或5N盐酸或浓盐酸和95%乙醇 1: 1的混合液

(2) 改良苯酚品红染色液（卡宝品红）

- 五 实验过程

每个同学分别取男女性细胞制片检查

1. 口腔粘膜细胞Barr氏小体显示方法

- (1) 取材与固定 实验前用可食用水漱口，然后以无菌牙签刮取口腔颊部粘膜(第一次的刮取物弃去)，将刮取物均匀涂于载玻片上，放在空气中干燥（勿过度）。

- (2) 染色与观察：用卡宝品红染液染色10—15分钟，倾斜载玻片，倒掉染液。用吸水纸轻轻擦拭干载玻片上的染液。放于显微镜下观察。

2、发根细胞巴氏小体观察

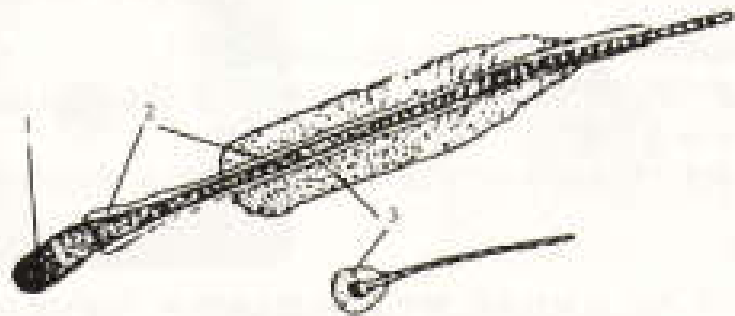


图 12-2 头发(上)及睫毛(下)结构示意

其中1.毛球,2.内层毛囊,3.外层毛囊。毛发露于皮肤的部分称为毛干,陷于皮内的称为毛根,毛根基部膨大的部分称毛球。毛根外包着的结缔组织鞘称毛囊。用肉眼查,毛囊呈乳白色。这次实验我们取外层的毛囊细胞为材料,因为内层毛囊细胞及毛球对于制片有害无益(引自 Schmidt W, 1967)

拔取带毛囊头发一段,置于载玻片上
→滴100 μ l 45%乙酸
解离5分钟后,吸掉乙酸
→解剖针剥取外层毛囊细胞,在载玻片上将组织细胞均匀摊平
→晾干
→滴上100 μ l 改良苯酚品红染色10分钟
→吸去染液,滴100 μ l 95%乙醇分色,1分钟后吸掉
→压片
→镜检

六、作业

- 绘制女性与男性barr氏小体的观察图



女性细胞（箭头所指为巴氏小体）



男性细胞（没有巴氏小体）