

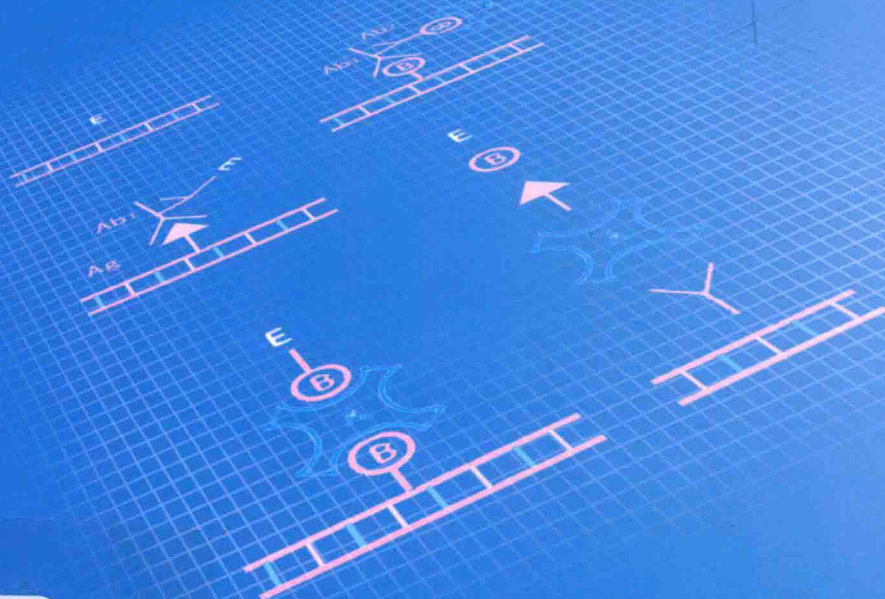


全国高等医药院校医学检验技术（医学检验）专业规划教材

分子诊断学

（第3版）

主编 李伟 黄彬



中国医药科技出版社

● 全国高等医药院校教材 | 临床医学·口腔医学类

分子诊断学

【第2版】

陈建忠 曹伟 主编

人民卫生出版社

· 全国高等医药院校医学检验技术(医学检验)专业规划教材 ·

分子诊断学

(第3版)

主 编 李 伟 黄 彬

副主编 陈 茶 季敬璋 姚群峰

编 者 (按姓氏笔画排序)

严永敏 (江苏大学)

李 伟 (温州医科大学)

应斌武 (四川大学)

张雪梅 (重庆医科大学)

陈 茶 (广州中医药大学)

陈培松 (中山大学)

陈维春 (广东医学院)

季敬璋 (温州医科大学)

郑 征 (青岛大学)

赵 屹 (中国科学院计算技术研究所)

姜 勇 (吉林医药学院)

姚群峰 (湖北中医药大学)

黄 彬 (中山大学)

秘 书 吴旭聪 (温州医科大学)

中国医药科技出版社

内 容 提 要

本书是全国高等医药院校医学检验技术(医学检验)专业规划教材之一。全书共十四章。第一章为绪论;第二章为基础理论知识,介绍基因组和分子标志物;第三章至第八章介绍分子诊断技术,包括样本采集与处理、核酸分子杂交技术、核酸扩增技术、基因芯片技术、核酸测序技术和蛋白质组学技术等;第九章至第十三章介绍分子诊断在临床上的应用,详细介绍感染性疾病的分子诊断、单基因遗传病的分子诊断、肿瘤的分子诊断、药物相关基因的分子诊断和分子诊断在染色体疾病、移植配型和法医学中的应用。第十四章介绍了临床分子诊断的质量控制。本书内容新颖、叙述严谨、文字精炼,并配有大量彩图。本书可供高等医学院校医学本、专科层次和成人教育(专升本)层次检验专业及其相关专业学生用作教材,也可作为临床检验工作者、继续教育和职称考试的参考用书。

图书在版编目(CIP)数据

分子诊断学/李伟,黄彬主编. —3版. —北京:中国医药科技出版社,2015.9

全国高等医药院校医学检验技术(医学检验)专业规划教材

ISBN 978-7-5067-7585-4

I. ①分… II. ①李… ②黄… III. ①分子生物学-实验室诊断-医学院校-教材
IV. ①R446

中国版本图书馆CIP数据核字(2015)第203774号

美术编辑 陈君杞

版式设计 郭小平

出版 中国医药科技出版社

地址 北京市海淀区文慧园北路甲22号

邮编 100082

电话 发行:010-62227427 邮购:010-62236938

网址 www.cmstp.com

规格 889×1194mm¹/₁₆

印张 16

字数 391千字

初版 2004年9月第1版

版次 2015年9月第3版

印次 2015年9月第1次印刷

印刷 三河市万龙印装有限公司

经销 全国各地新华书店

书号 ISBN 978-7-5067-7585-4

定价 40.00元

本社图书如存在印装质量问题请与本社联系调换

全国高等医药院校医学检验技术（医学检验）专业规划教材

建设委员会

主任委员 丛玉隆（中国人民解放军总医院）

副主任委员 （以汉语拼音为序）

樊绮诗（上海交通大学医学院）

胡丽华（华中科技大学同济医学院）

刘新光（广东医学院）

吕建新（温州医科大学）

王 前（南方医科大学）

吴忠道（中山大学中山医学院）

姚 智（天津医科大学）

尹一兵（重庆医科大学）

委 员 （以汉语拼音为序）

陈育民（河北工程大学医学院）

洪秀华（上海交通大学医学院）

胡建达（福建医科大学）

胡翊群（上海交通大学医学院）

李咏梅（北华大学医学部）

刘 辉（大连医科大学）

刘成玉（青岛大学医学院）

吕世静（广东医学院）

王 辉（新乡医学院）

徐克前（中南大学湘雅医学院）

姚群峰（湖北中医药大学）

张进顺（河北北方学院）

吴俊英（蚌埠医学院）

郑铁生（江苏大学医学院）

秘 书 长 匡罗均（中国医药科技出版社）

办 公 室 罗万杰（中国医药科技出版社）

尚亭华（中国医药科技出版社）

全国高等医药院校医学检验技术(医学检验)专业规划教材

出版说明

全国高等医药院校医学检验专业规划教材,于20世纪90年代开始启动建设。是在教育部、原国家食品药品监督管理局的领导和指导下,在广泛调研和充分论证基础上,由中国医药科技出版社组织牵头江苏大学、温州医科大学、中山大学、华中科技大学同济医学院、中南大学湘雅医学院、广东医学院、上海交通大学医学院、青岛大学医学院、广西医科大学、南方医科大学、301医院等全国20多所医药院校和部分医疗单位的领导和专家成立教材建设委员会共同规划下,编写出版的一套供全国医学检验专业教学使用的本科规划教材。

本套教材坚持“紧扣医学检验专业本科教育培养目标,以临床实际需求为指导,强调培养目标与用人需求相结合”的原则,10余年来历经二轮编写修订,逐渐形成了一套行业特色鲜明、课程门类齐全、学科系统优化、内容衔接合理的高质量精品教材,深受广大师生的欢迎,为医学检验专业本科教育做出了积极贡献。

本套教材的第三轮修订,是在我国高等教育教学改革的新形势和医学检验专业更名为医学检验技术、学制由5年缩短至4年、学位授予由医学学士变为理学学士的新背景下,为更好地适应新要求,服务于各院校教学改革和新时期培养医学检验专门人才需求,在2010年出版的第二轮规划教材的基础上,由中国医药科技出版社于2014年组织全国40余所本科院校300余名教学经验丰富的专家教师不辞辛劳、精心编撰而成。

本轮教材含理论课程教材10门、实验课教材8门,供全国高等医药院校医学检验技术(医学检验)专业教学使用。具有以下特点:

1. 适应学制的转变 第三轮教材修订符合四年制医学检验技术专业教学的学制要求,为目前的教学提供更好的支撑。

2. 坚持“培养目标”与“用人需求”相结合 紧扣医学检验技术专业本科教育培养目标,以医学检验技术专业教育纲要为基础,以国家医学检验技术专业资格准入为指导,将先进的理论与行业实践结合起来,实现教育培养和临床实际需求相结合,做到教师好“教”、学生好“学”、学了好“用”,使学生能够成为临床工作需要的人才。

3. 充实完善内容,打造教材精品 专家们在上一轮教材基础上进一步优化、精炼和充实内容。坚持“三基、五性、三特定”,注重整套教材的系统科学性、学科的衔接性。进

一步精简教材字数，突出重点，强调理论与实际需求相结合，进一步提高教材质量。

编写出版本套高质量的全国高等医药院校医学检验技术（医学检验）专业规划教材，得到了相关专家的精心指导，以及全国各有关院校领导和编者的大力支持，在此一并表示衷心感谢。希望本套教材的出版，能受到全国本科医学检验技术（医学检验）专业广大师生的欢迎，对促进我国医学检验技术（医学检验）专业教育教学改革和人才培养做出积极贡献。希望广大师生在教学中积极使用本套教材，并提出宝贵意见，以便修订完善，共同打造精品教材。

全国高等医药院校医学检验技术（医学检验）专业规划教材建设委员会

中国医药科技出版社

2015 年 7 月

前言

20 世纪 50 年代, DNA 双螺旋结构模型的提出标志着分子生物学作为一门独立学科的诞生。70 年代以来, 分子生物学已经成为生命科学最具有活力的学科前沿领域, 随着分子生物学理论、技术和方法不断地被应用于临床医学, 分子生物学在疾病的预防、预测、诊断、治疗和疗效评价等诸方面发挥着愈来愈重要的作用。分子生物学与临床医学的广泛交叉和渗透, 产生了一个崭新的学科方向——分子医学。20 世纪 70 年代末, 简悦威首次利用分子杂交技术检测 α 珠蛋白基因缺失进行产前诊断, 标志着基因诊断技术的问世。20 世纪 80 年代以来, 随着 PCR 技术的诞生和生物芯片技术、DNA 测序技术等的发展, 特别是 21 世纪以来, 基因组学、转录组学、蛋白质组学、代谢物组学等的快速崛起, 循证医学和系统生物学观点的引入, 临床检验诊断学赋予了自动化、简便化、分子化、标准化、信息化、安全化、国家化等新的特点, 分子诊断从核酸为主拓展到基因表达的产物及代谢产物等生物小分子, 并由此发展为新的学科——分子诊断学。分子诊断学作为分子医学的重要组成, 从研究人体内源性或外源性生物分子和生物分子体系的存在、结构及表达调控的变化, 发展到为疾病病因诊断以及疾病预测提供信息和依据。因此, 分子诊断已迅速发展成为一门具有广阔应用前景并逐渐走向成熟的学科。

鉴于分子诊断技术正在越来越多地被应用于临床检验诊断, 国内大多数高等医学院校医学检验专业也开设了分子生物学检验技术的课程。为了更好地规范《分子诊断学》课程的教学, 2004 年全国高等医药院校医学检验专业规划教材建设委员会组织编写, 中国医药科技出版社出版了《分子诊断学》本科教材, 供高等医学检验专业和医学相关专业使用。2009 年中国医药科技出版社组织温州医科大学、重庆医科大学、南方医科大学等高校教学与临床一线的教师对第 1 版教材进行修订。经修订的第 2 版教材在继续保持第 1 版教材风格的同时, 更加注重分子诊断技术的临床应用和快速发展的重要技术与应用(如蛋白质组学研究技术、生物信息学技术等)以及分子诊断技术的质量与标准化。2012 年国家教育部公布了新的《普通高等学校本科专业目录》, “医学检验”专业更名为“医学检验技术”专业, 归入“医学技术”一级学科, 学制变为四年制, 理学学位。这次调整对医学检验技术专业人才培养提出了新的要求, 为适应四年制医学检验技术专业教学, 2014 年中国医药科技出版社组织 11 所高等院校和科研院所的一线教师和专家进行了本次教材的编写。本教材在第 2 版的基础上, 更加注重技术的临床应用及临床价值, 使学生在掌握基础知识和基本技能的同时, 了解最新技术进展和技术应用, 为以后的实践工作和发展打好基础。

全书共十四章。第一章为绪论; 第二章为基础理论知识, 介绍基因组和分子标志物; 第三



章至第八章介绍分子诊断技术,包括样本采集与处理、核酸分子杂交技术、核酸扩增技术、基因芯片技术、核酸测序技术和蛋白质组学技术等;第九章至第十三章介绍分子诊断在临床上的应用,详细介绍感染性疾病的分子诊断、单基因遗传病的分子诊断、肿瘤的分子诊断、药物相关基因的分子诊断和分子诊断在染色体疾病、移植配型和法医学中的应用。第十四章介绍了临床分子诊断的质量控制。本书内容新颖、叙述严谨、文字精炼,并配有大量彩图。此外,为加强实验技术的教学,有关分子诊断学具体操作技术另编写于与本教材配套的《分子诊断学实验指导》教材。

中国医药科技出版社为策划和组织本教材的再版做了大量的工作,温州医科大学、中山大学医学院等为本次编写提供了诸多的支持和帮助,温州医科大学检验医学院研究生熊朝亮、李子阳为本教材的插图绘制和校稿提供帮助,在此一并表示感谢。分子诊断学是一个快速发展的学科,尽管本教材的编写人员均具有丰富的教学和研究工作经验,但由于再版时间仓促,因此免不了仍有疏忽和不足之处,恳请广大同仁和读者的批评指正。

编者

2015 年 7 月



目录

第一章 绪论	(1)
第一节 分子诊断学的概念、任务和特点	(1)
第二节 分子诊断学的发展简史	(1)
第三节 分子诊断的基本策略及其在医学中的应用	(3)
第四节 展望	(5)
第二章 基因、基因组与分子标志物	(6)
第一节 基因及其结构	(6)
一、基因的概念	(7)
二、原核生物基因的结构	(7)
三、真核生物基因的结构	(7)
第二节 基因组	(8)
一、原核生物基因组	(8)
二、真核生物基因组	(11)
三、病毒基因组	(15)
第三节 基因表达与表观遗传	(17)
一、基因表达的方式	(17)
二、基因表达的时空特异性	(18)
三、基因表达的调节	(18)
四、表观遗传	(19)
第四节 常见分子标志物	(20)
一、DNA 分子标志物	(20)
二、RNA 分子标志物	(22)
三、其他分子标志物	(23)
第三章 样本的采集与处理	(24)
第一节 样本的采集、运送与保存	(24)
一、样本的采集与处理	(24)
二、样本采集与处理的注意事项	(25)
三、样本的运送与保存	(25)
第二节 核酸的分离与纯化	(26)
一、DNA 的分离与纯化	(26)
二、RNA 的分离与纯化	(28)
三、核酸浓度、纯度与完整性的检测	(29)
第三节 蛋白质的分离与纯化	(30)



一、蛋白质分离纯化的基本原则	(30)
二、蛋白质分离纯化的技术方法	(30)
三、蛋白质浓度与纯度的检测	(32)
第四章 核酸分子杂交技术	(34)
第一节 核酸分子杂交的基本原理	(34)
一、核酸变性	(34)
二、核酸复性	(34)
三、核酸分子杂交	(35)
四、核酸分子杂交的影响因素	(35)
第二节 核酸探针	(35)
一、核酸探针的种类	(36)
二、核酸探针的标记	(36)
三、核酸探针的纯化	(41)
四、核酸探针的检测	(41)
第三节 核酸分子杂交的类型	(43)
一、固相核酸分子杂交	(43)
二、液相核酸分子杂交	(51)
第五章 核酸扩增技术	(53)
第一节 聚合酶链反应技术	(54)
一、PCR 原理	(54)
二、PCR 反应体系及其优化	(55)
三、扩增产物的检测与分析	(58)
四、常见问题原因分析与处理	(59)
五、PCR 衍生技术	(60)
第二节 荧光定量 PCR	(63)
一、荧光定量 PCR 简介	(64)
二、荧光定量 PCR 技术原理	(64)
三、荧光定量 PCR 的方法	(67)
四、荧光定量 PCR 测定的数据处理	(70)
五、实时荧光定量 PCR 技术的应用	(72)
第三节 其他核酸扩增技术	(72)
一、基于转录扩增技术	(73)
二、探针扩增技术	(74)
三、信号扩增技术	(75)
第六章 基因芯片技术	(78)
第一节 基因芯片基本原理	(79)
第二节 基因芯片分类	(79)
一、根据生产工艺分类	(79)
二、根据检测项目分类	(80)



第三节 基因芯片检测流程	(82)
一、基因芯片诊断技术管理规范	(82)
二、目的核酸的制备	(82)
三、分子杂交与洗脱	(84)
四、基因芯片的图像扫描	(85)
第四节 基因芯片生物信息学分析	(85)
一、基因芯片的图像处理	(85)
二、图像读数标准化	(85)
三、显著性分析	(86)
四、基因表达聚类分析	(87)
五、基因功能注释归类	(87)
六、基因芯片实验数据标准	(88)
七、基因芯片数据可靠性验证	(89)
第五节 基因芯片的临床应用	(89)
一、疾病的诊断和治疗	(90)
二、药物筛选及用药指导	(90)
三、产前筛查与诊断	(91)
第七章 核酸测序技术	(92)
第一节 核酸测序技术原理	(92)
一、第一代核酸测序技术原理	(92)
二、第二代核酸测序技术原理	(95)
三、第三代测序技术原理	(100)
第二节 核酸测序技术流程	(101)
一、DNA 测序技术流程	(101)
二、RNA 测序技术流程	(104)
第三节 核酸测序数据生物信息学分析	(107)
一、DNA 测序数据生物信息学分析	(107)
二、RNA 测序数据生物信息学分析	(109)
第四节 核酸测序技术的应用	(111)
一、DNA 测序技术的应用	(111)
二、RNA 测序技术的应用	(112)
第八章 蛋白质组学技术	(114)
第一节 蛋白质组学研究基本技术	(114)
一、双向凝胶电泳技术	(114)
二、生物质谱技术	(117)
三、蛋白质芯片技术	(119)
四、蛋白质印迹法	(121)
第二节 蛋白质间相互作用的研究技术	(122)
一、酵母双杂交技术	(122)
二、免疫共沉淀技术	(124)



第三节 蛋白质组学的生物信息学分析	(125)
一、蛋白质定性鉴定	(126)
二、蛋白质翻译后修饰分析	(127)
第九章 感染性疾病的分子诊断	(130)
第一节 感染性疾病的分子诊断策略	(130)
第二节 常见病毒感染的分子诊断	(131)
一、乙型肝炎病毒	(131)
二、丙型肝炎病毒	(134)
三、人乳头瘤病毒	(136)
四、流行性感冒病毒	(139)
五、人类免疫缺陷病毒	(140)
第三节 常见细菌感染的分子诊断	(143)
一、结核分枝杆菌	(143)
二、淋病奈瑟菌	(145)
第四节 常见真菌感染的分子诊断	(147)
一、白假丝酵母菌的基因组结构特征	(147)
二、白假丝酵母菌的分子诊断	(147)
三、白假丝酵母菌分子诊断的临床意义	(148)
第五节 其他病原体的分子诊断	(148)
一、沙眼衣原体	(148)
二、解脲脲原体	(149)
三、梅毒螺旋体	(150)
第十章 单基因遗传病的分子诊断	(152)
第一节 单基因遗传病的分子基础和分子诊断策略	(152)
一、单基因遗传病的分子基础	(152)
二、单基因遗传病的分子诊断策略	(154)
第二节 常见单基因遗传病的分子诊断	(155)
一、血红蛋白病	(155)
二、血友病 A	(162)
三、肌营养不良症	(165)
四、脆性 X 综合征	(168)
第三节 线粒体 DNA 突变相关疾病的分子诊断	(170)
一、Leber 遗传性视神经病变	(170)
二、线粒体肌病脑病伴乳酸酸中毒及卒中样发作综合征	(172)
第十一章 肿瘤的分子诊断	(175)
第一节 肿瘤分子诊断策略	(175)
第二节 肿瘤分子诊断的生物标志物	(176)
一、肿瘤相关的染色体异常	(176)
二、肿瘤相关的基因异常	(177)
三、肿瘤相关的单核苷酸多态性	(182)
四、肿瘤相关的表观遗传异常	(182)



第三节 肿瘤分子诊断的临床应用	(182)
一、肺癌	(183)
二、乳腺癌	(184)
三、结直肠癌	(185)
四、白血病	(187)
五、前列腺癌	(188)
第十二章 药物相关基因的分子诊断	(191)
第一节 药物基因组学	(191)
一、药物基因组学概念	(191)
二、药物基因组学研究范畴	(192)
三、药物相关基因分类	(192)
第二节 药物相关基因及其检测	(193)
一、药物作用靶点相关基因	(193)
二、药物代谢相关基因	(200)
三、药物副作用相关基因	(204)
第十三章 分子诊断技术的其他应用	(207)
第一节 染色体病的分子诊断技术	(207)
一、染色体疾病	(207)
二、染色体疾病的分子诊断技术	(208)
第二节 移植配型中的分子诊断技术	(213)
一、HLA 配型的分子生物学基础	(213)
二、HLA 分型技术	(213)
三、HLA 分型技术的临床应用	(215)
第三节 法医物证学中的分子诊断技术	(216)
一、法医物证鉴定遗传标记的选择	(216)
二、法医物证鉴定常用遗传标记与分子诊断	(217)
第十四章 临床分子诊断的质量控制	(220)
第一节 临床分子诊断质量控制的概述	(220)
一、临床分子诊断质量控制基本概念	(220)
二、临床分子诊断质量控制的相关规定	(221)
第二节 临床分子诊断的质量控制	(221)
一、临床分子诊断工作基本原则	(221)
二、检验前过程质量控制	(224)
三、检验过程中的质量控制	(225)
四、分析后质量控制	(228)
索引	(230)
英文索引	(230)
中文索引	(234)
参考文献	(238)



第一章 绪论

1953 年 Watson 和 Crick 提出 DNA 双螺旋结构模型, 标志着现代分子生物学的开始。此后, 随着分子杂交、分子克隆、PCR 和 DNA 测序等技术的出现, 分子诊断开始应用于临床实践, 通过检测生物体的 DNA (RNA) 对疾病做出诊断或确定疾病的易感性。自进入 21 世纪以来, 随着人类基因组计划的完成, DNA 测序和基因芯片等技术的迅猛发展, 蛋白质组学技术日趋完善, 各类“组学”逐渐兴起, 越来越多的疾病基因和分子标志物被发现, 分子诊断已成为临床实验室越来越重要的组成部分, 也加速了基础研究成果向临床实践的转化, 极大地推动了个体化医疗的发展。当然, 分子诊断在临床检验诊断中也存在一些亟须解决的问题: 包括技术、社会、伦理、法律问题等。总之, 分子诊断技术在单基因遗传病和感染性疾病的诊断、个体化医疗、公共卫生和法医学等领域发挥着重要的作用, 形成一门新的学科——分子诊断学 (molecular diagnostics)。

第一节 分子诊断学的概念、任务和特点

分子诊断学以分子生物学理论为基础, 利用分子生物学的技术和方法, 研究人体内源性或外源性生物大分子和大分子体系的存在、结构或表达调控的变化, 为疾病的预防、诊断、治疗和转归提供信息和依据。

分子诊断学的主要任务是利用基础医学和生命科学的理论和方法, 探讨疾病发生、发展及转归的分子机制; 为整个疾病过程寻求准确、特异的分子标志物; 利用分子生物学技术为这些分子诊断指标建立临床实用、可靠的检测方法。

分子诊断的主要特点是直接以疾病基因为探查对象, 属于病因学诊断, 对基因的检测结果不仅具有描述性, 更具有准确性; 可准确诊断疾病的基因型变异、基因表型异常以及由外源性基因侵入引起的疾病。

第二节 分子诊断学的发展简史

1949 年 Linus Pauling 对镰状细胞贫血病患者的血红蛋白 (HbS) 进行电泳分析, 推论其泳动异常是分子结构改变所致, 从而提出分子病 (molecular disease) 的概念, 该发现实际上也奠定了分子诊断的基础。但是, 当时分子生物学刚刚兴起, 提供分子诊断服务是不可思议的事情, 并且技术上也不可行。1953 年 DNA 双螺旋结构模型提出, 标志着现代分子生物学的开端。基于核酸变性和复性原理建立的核酸分子杂交技术 (molecular hybridization) 成为第一代分子诊断技术。20 世纪 60 年代, Joseph Gall 和 Mary Lou Pardue 认识到可以用分子杂交确定 DNA 序列在染色体的位置, 1969 年两位科学家建立了原位杂交技术 (*in situ* hybridization)。1970 年 Hamilton O. Smith 等人发现限制性内切酶可以在特定位点切割 DNA, 1972 年 Paul Berg 建立重组 DNA 技术, 该项技术可用于建立 cDNA 文库, 制备用于杂交的探针。1975 年英国生物学家 Ed-



win Southern 创建了 Southern 印迹杂交,从而使分子杂交技术发展成基因分析中一项重要技术。虽然 1977 年 Sanger 建立了 DNA 测序技术,但是 DNA 测序当时还不能成为基因诊断的手段。

1976 年,简悦威(Yuet Wai Kan)通过 DNA/DNA 分子杂交进行了 α 地中海贫血的产前诊断,这是世界上首例基因诊断。1978 年简悦威与 Andr  e M Dozy 通过使用限制性酶切片段长度多态性(RFLP)诊断镰状细胞贫血,这也是首次发现人类基因组 DNA 多态性。这些突破也为其他单基因遗传病(如苯丙酮尿症、囊性纤维化等)的分子诊断提供了参考方法。因此,简悦威被称为“基因诊断之父”。1984 年,上海市儿童医院曾溢滔教授通过点杂交技术进行了 α 地中海贫血的产前诊断,研究成果在《Lancet》杂志发表,成为我国基因诊断领域的里程碑。

当时,要想克隆突变基因和获得 DNA 序列,需要构建患者的基因组文库(genomic DNA library),虽然通过这种方法可以鉴定出多个人类 β 珠蛋白基因突变位点,但是也成为杂交技术上的一个瓶颈。1983 年 Orkin 等通过人工合成的寡核苷酸探针(ASO)检测 β 地中海贫血的基因突变,使得基因突变的检测更加方便。1985 年,Mayers 等人建立了一套简单快速的方法,通过核糖核酸酶裂解 RNA:DNA 异源杂合双链中错配的碱基,然后电泳分析裂解产物的大小来确定错配位置,后来 Mayers 又建立了变性梯度凝胶电泳(DDGE)来检测突变,这些技术均以分子杂交为基础。

1985 年, Kary Mullis 发明了 PCR 技术,带来了分子诊断的革命,PCR 成为第二代分子诊断的核心技术。PCR 可以通过指数扩增,获得大量的目的基因拷贝,可以在短时间内完成突变检测,不再依赖放射性物质,从而使得分子诊断技术进入临床实验室,可以提供遗传检测服务。以 PCR 技术为基础,还衍生出了许多分子诊断方法,其中比较成熟的方法有:限制性酶切片段长度多态性分析(PCR-RFLP)是检测与特异酶切位点相关突变的简便方法;等位基因特异性 PCR(AS-PCR)可针对等位基因设计引物,根据 PCR 产物来鉴定基因型;PCR 单链构型多态性技术(PCR-SSCP)可揭示 PCR 产物序列内的多态性等。另外,定量 PCR、实时 PCR(RT-PCR)可检测患者细胞中 RNA 的表达量,患者标本中特异的病原体 DNA 或 RNA 的滴度,实现了诊断从定性到定量的突破。数字 PCR(dPCR)是最新的定量技术,基于单分子 PCR 方法来进行计数的核酸定量,是一种绝对定量的方法。

2001 年 2 月,随着首张人类基因组序列图谱以及随后其他物种基因组序列的公布,分子生物学研究进入了后基因组时代(post-genomic era)。在后基因组时代,基因组学、蛋白质组学等方面的巨大技术进步促使分子诊断学随之进入第三个阶段,即建立可靠的、性价比高、快速、自动化和高通量的突变检测技术。其中,以基因芯片(microarray)和下一代测序技术(next generation sequencing)为代表。基因芯片目前在 DNA 测序、疾病的基因诊断、药物筛选和个体化用药方面广泛应用,如耳聋基因检测芯片、肝炎病毒检测诊断芯片、结核杆菌耐药性检测芯片、多种恶性肿瘤相关病毒基因芯片等一系列诊断芯片逐步进入市场。下一代测序技术大大提高了测序速度和降低了测序成本,个人基因组测序的费用很快会降到 1000 美元以下,未来也会开发出更小型的测序设备,个体化 DNA 测序将会成为分子诊断的主流。目前,高通量 DNA 测序技术已经在无创产前诊断和个体化用药方面得到临床应用。

1994 年以来,随着双向电泳等蛋白质分离纯化技术的不断完善,生物质谱技术及生物信息学的发展,出现了研究蛋白质的新领域——蛋白质组学。蛋白质组学技术具有高灵敏度、高通量、样品量少的优点,成为寻找新的诊断标志物和药物靶标的强有力工具,大大促进了分子诊断学科的发展。蛋白质芯片可以实现对复杂样本中多种诊断标志物的小型化和平行化检测,可以作为肿瘤疾病、遗传性疾病等的筛查工具。



第三节 分子诊断的基本策略及其在医学中的应用

从生物中心法则（图 1-1）来看，利用分子诊断技术可以判断疾病基因结构异常或基因表达异常。检测基因的存在和基因结构异常主要通过测定 DNA（RNA）来实现，其中核酸的分子杂交、PCR 和 DNA 测序三种基本技术和其联合应用仍然是分子诊断的主流技术。基因表达是指基因的转录和翻译，而检测基因表达的异常，在转录水平主要是检测 RNA 的表达的质和量，常用的方法有 Northern 印迹杂交、荧光原位杂交、反转录 PCR、实时荧光定量 PCR、基因表达谱芯片等；在翻译水平则以检测蛋白质的质和量来反映核酸表达水平的变化，常用的方法有 Western 蛋白质印迹、免疫组织化学染色、酶联免疫法、酶分析方法、蛋白质芯片和质谱技术等。

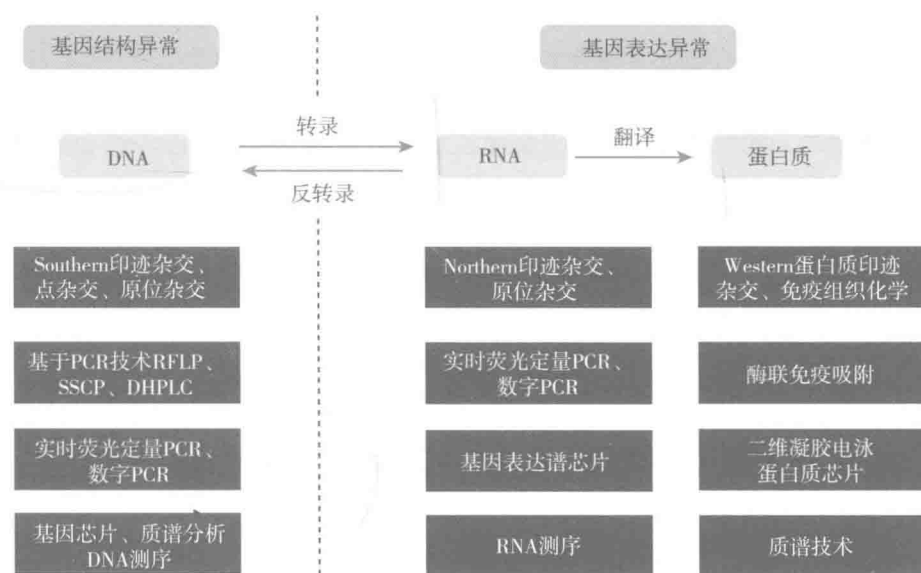


图 1-1 生物中心法则与分子诊断方法

分子诊断技术的不断发展，使分子诊断从传统的 DNA 诊断概念发展到更全面的核酸和蛋白质诊断的新概念；分子诊断的内容也从早期的单一疾病诊断发展到对疾病的易感性判断及提供临床用药指导等医学领域。目前分子诊断的主要应用包括以下几种。

1. 感染性疾病分子诊断 病原微生物导致的感染性疾病仍然是严重威胁人类健康的一个重要方面。以前对于这些病原体多采用微生物学、免疫学和血液学相关手段进行检测，但是这些方法不易早期诊断，并受灵敏度和特异性的限制。例如：诊断结核杆菌的感染经典的方法是进行体液标本的培养，不仅周期长，而且阳性率不高；丙型肝炎从感染到抗体出现的“窗口期”较长，用检测抗体的方法很难做到早期诊断。随着各种细菌或病毒等病原体的基因组序列的公布，可以利用分子诊断技术早期、快速、敏感、特异地检测侵入体内的外源性基因（感染性病原体的 DNA 或 RNA）。分子生物学技术不仅可以对微生物感染进行准确的病因学诊断，还可以对感染性病原体进行基因分型和耐药性监测，所以逐渐在人类感染性疾病的临床诊断、流行病学调查、微生物分类分型研究中显示出它独特的功能。

2. 遗传性疾病的分子诊断 目前已发现的人类遗传性疾病达数千种之多，主要分为两大类：符合孟德尔遗传规律的单基因遗传病和不符合孟德尔遗传规律的多基因遗传病（又称多因素性疾病）。传统的遗传性疾病的诊断方法以疾病的表型病变为依据，而表型则易受外界环境