

全国高等学校“十二五”医学规划教材

医学教育改革教材

(供医学检验专业用)

临床分子生物学检验

主编 府伟灵 黄君富

 高等教育出版社
HIGHER EDUCATION PRESS

全国高等学校“十二五”医学规划教材
医学教育改革教材
(供医学检验专业用)

临床分子生物学检验

Linchuang Fenzi Shengwuxue Jianyan

主 编 府伟灵 黄君富

副主编 郑 芳 武汉大学
欧启水

郑 芳 天津医科大学

编 委 (以姓氏笔画为序)

王 丰 第三军医大学

王旭东 南通大学

李平法 新乡医学院

闫惠平 首都医科大学

张 磊 吉林医药学院

伊正君 潍坊医学院

邹明瑾 山东大学

府伟灵 第三军医大学

郑 芳 武汉大学

郑 芳 天津医科大学

郑 磊 南方医科大学

欧启水 福建医科大学

段 勇 昆明医学院

姚群峰 湖北中医药大学

赵春艳 大连医科大学

钱 晖 江苏大学

秦 雪 广西医科大学

曹颖平 福建医科大学

黄 庆 第三军医大学

黄君富 第三军医大学

童永清 武汉大学



高等教育出版社·北京
HIGHER EDUCATION PRESS BEIJING

内容简介

本书是全国高等学校“十二五”医学规划教材,也是医学教育改革教材。全书分为六章,第一章主要介绍临床分子生物学检验的基本概念、基因及基因组、蛋白质组学、生物信息学;第二章至第四章分别阐述了核酸检测技术、蛋白质检测技术、生物芯片与生物传感器技术;第五章较为详细地介绍了分子生物学诊断技术的临床应用;第六章介绍了临床分子生物学检验的常用实验。本书还配有网络资源与各章节内容配套使用。

本书主要供高等医学检验及相关专业学生使用,也可作为临床检验工作者的参考用书。

图书在版编目(CIP)数据

临床分子生物学检验 / 府伟灵, 黄君富主编. — 北京: 高等教育出版社, 2012.8
ISBN 978-7-04-035512-3

I. ①临… II. ①府… ②黄… III. ①分子生物学-医学检验-高等学校-教材 IV. ①R446

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2012)第 177703 号

策划编辑 席雁 孙葵葵 责任编辑 孙葵葵 封面设计 于文燕 责任印制 朱学忠

出版发行	高等教育出版社	咨询电话	400-810-0598
社址	北京市西城区德外大街4号	网 址	http://www.hep.edu.cn
邮政编码	100120		http://www.hep.com.cn
印 刷	涿州市星河印刷有限公司	网上订购	http://www.landaco.com
开 本	787mm×1092mm 1/16		http://www.landaco.com.cn
印 张	17.75	版 次	2012年8月第1版
字 数	420千字	印 次	2012年8月第1次印刷
购书热线	010-58581118	定 价	35.00元

本书如有缺页、倒页、脱页等质量问题,请到所购图书销售部门联系调换

版权所有 侵权必究

物料号 35512-00

全国高等学校医学检验专业教育改革教材 编写委员会

顾问 孙荣武 王鸿利 杨振华

主任委员 康熙雄 首都医科大学

副主任委员 (以教材计划出版顺序为序)

郑铁生 江苏大学
胡晓波 上海交通大学
裘宇荣 南方医科大学
高东英 北京市红十字血液中心

王惠民 南通大学
府伟灵 第三军医大学
刘运德 天津医科大学
陈文明 首都医科大学

委员 (以姓氏拼音为序)

曹珮华 西安医学院
陈 安 第三军医大学
陈晓婷 南京医科大学
崔 巍 协和医科大学
顾国浩 苏州大学
姜旭淦 江苏大学
鞠少卿 南通大学
孔令魁 深圳血液中心
李 山 广西医科大学
李 艳 吉林医药学院
李贵星 四川大学
李丽花 海南医学院
梁文飏 江苏省血液中心
林东红 福建医科大学
刘荣臻 山西医科大学
欧超伟 广东医学院
秦 雪 广西医科大学

常晓彤 河北北方学院
陈发林 福建省临床检验中心
陈筱菲 温州医学院
丁邦胜 安徽医科大学
姜 恺 中山大学
蒋显勇 湘南学院
孔长虹 浙江省血液中心
李 锋 济宁医学院
李 薇 吉林大学
李 艳 武汉大学
李洪春 徐州医学院
李平法 新乡医学院
梁晓华 大连血液中心
林雪松 哈尔滨医科大学
芦慧霞 东南大学
潘 卫 贵阳医学院
邵启祥 江苏大学

涂建成	武汉大学	王艾琳	北华大学
王昌富	华中科技大学	王开正	泸州医学院
王晓春	中南大学	王学锋	上海交通大学
王玉明	昆明医科大学	王跃国	南通大学
王治国	卫生部临床检验中心	武文娟	蚌埠医学院
徐霞	广州医学院	徐国宾	北京大学
杨国珍	贵阳医学院	伊正君	潍坊医学院
袁永强	重庆医科大学	张钧	浙江大学
张清	武汉职业病防治所	张展	郑州大学
张朝霞	新疆医科大学	张吉才	湖北医药学院
张军力	内蒙古医学院	赵春艳	大连医科大学
郑芳	天津医科大学	郑善奎	第四军医大学
朱自严	上海血液中心		

秘 书

张国军 吕虹 首都医科大学

编写说明

医学检验专业教育改革系列教材是全国高等学校医学检验专业教育改革教材编写委员会,根据《教育部关于“十二五”普通高等教育本科教材建设的若干意见(教高[2011]5号)》文件精神规划,组织全国60多所高等院校及附属医院积极参与编写的立体化教材。编写的指导思想是:综合考虑医学检验各专业课程目标的多维度、教学对象的多层次、表现形式的立体化,充分发挥各种教学媒体的优势,从而形成媒体间的立体互动和互补,为培养科学态度严谨、捕获知识能力强、实践能力强、开拓创新能力强的高等医学检验人才,提供先进实用的教学资源。

本系列教材的构建体系主要由纸质、网络、数字三部分组成。纸质教材是用于课堂教学的核心教材,注重实用性;数字课程配有与纸质教材各章节内容同步使用的网络教学资源,资源框架贯穿在整个教学环节中,注重全面性;数字教材是一本集纸质理论、实验,网络资源为一体的教材,注重方便性。教材的各组成部分在教学思想、教学内容、教学目标、教学策略上做到了有机融合,互为补充,形成了以纸质教材为核心,配集网络、数字教材为一体的综合的知识体系和立体的教学系统,以实现精品教材资源共知、共建、共享,实现教学效益的最大化。为提高医学检验本科教学质量和实现教学改革工程发展目标提供了丰富资源。

本系列教材具有立体化可伸可缩的功能,可供医学检验四年制和五年制专业及成人教育(专升本)等各层次学生使用,可作为临床检验诊断学研究生、临床医学专业实验诊断学必修课或选修课教材,也可作为临床检验工作者日常工作、继续教育和职称考试的参考用书。

本系列教材的编写,得到了高等教育出版社、全国诊断学指导委员会、教育部医学技术教育指导委员会的领导和孙荣武、王鸿利、杨振华等老一辈医学检验教育专家、教授的指导,得到了首都医科大学、江苏大学、南通大学、上海交通大学、天津医科大学、南方医科大学、第三军医大学等全国60多所兄弟院校的热情关心和支持,在此一并表示真诚的谢意。

本系列教材由长期从事医学检验教育教学和临床实践工作的一线专家、教授共同编写,全体编委为此付出了艰辛的劳动,但由于首次大范围尝试立体化教材编写,难免有不完善的地方,望读者不吝批评指正,以便再版时改进。

本系列教材包括《临床检验基础》《临床生物化学检验》《临床免疫学检验》《临床微生物学检验》《临床寄生虫学检验》《临床分子生物学检验》《临床实验室管理学》《临床血液学检验》和《输血技术学基础》。

全国高等学校医学检验专业教育改革教材编写委员会

2012年5月

前 言

20 世纪 50 年代, Watson 和 Crick 提出了 DNA 双螺旋结构模型, 为我们开启了分子生物学及遗传学的大门。20 世纪 70 年代以来, 分子生物学已成为生命科学及基础医学中最具活力的前沿学科。随着分子生物学理论、技术与方法的迅猛发展, 极大地推动了医学的进步, 并不断在临床医学中得以应用, 分子生物学不仅使疾病发生、发展及转归的分子机制得以阐明, 而且也在疾病的预防、预测、诊断及鉴别诊断、治疗方法选择及疗效评价、预后判断等方面发挥着越来越重要的作用; 不仅使一门新兴学科——分子医学应运而生, 而且也使临床医学对于疾病的实验室诊断发生了革命性的变化。在分子生物学发展过程中发明及采用的核酸杂交技术、PCR 技术、FISH 技术、DNA 测序技术、高通量芯片检测技术、生物质谱技术等逐渐在检验医学中得到广泛应用, 在疾病预测, 病原微生物确证及变异检测, 遗传性疾病诊断及产前筛查, 肿瘤诊断、分子分型、靶向治疗、预后判断, 以及某些药物个体化治疗方案的确定中发挥着越来越重要或不可替代的作用。21 世纪以来, 随着基因组学、蛋白质组学、转录组学、代谢组学等学科取得的重大突破, 已使单纯的基因诊断向基因表达产物及代谢产物等生物小分子方向拓展, 并由此发展为分子诊断学。

鉴于越来越多的分子生物学技术在检验医学中得到应用, 国内高等医学院校检验医学专业均已开设了分子生物学检验课程。同时, 为适应检验医学本科人才培养向五年制检验医师、四年制检验技师两个方向分化的需求, 重点突出与临床分子诊断应用密切相关的分子生物学检验的理论与技术, 全国高等学校医学检验专业教育改革教材编写委员会决定编写四年制和五年制检验医学专业本科可共用的《临床分子生物学检验》。

本教材不仅阐述了临床分子生物学检验的基本技术, 也介绍了生物芯片、生物传感器、双向电泳、生物质谱等新技术; 不仅阐述了核酸检测技术, 也适当讲解了蛋白质检测技术。在重点阐述临床分子生物学检验技术原理、方法与步骤的基础上, 也适度地阐述了临床分子生物学检验在感染性疾病、肿瘤、遗传性疾病等疾病实验诊断中的应用。全书分为六章, 第一章主要介绍临床分子生物学检验的基本概念、基因及基因组、蛋白质组学、生物信息学, 为基础部分; 第二章至第四章分别阐述了核酸检测技术、蛋白质检测技术、生物芯片与生物传感器技术, 为技术部分; 第五章较为详细地介绍了分子在生物学诊断技术的临床应用, 为本书的应用部分; 第六章为临床分子生物学实验, 精选了 11 个临床分子生物学检验的常用实验。本书还配有与纸质教材同步使用的网络教学资源, 以辅助学习。

参加编写本教材的 21 名编委来自全国 16 所高等院校, 均具有丰富的临床分子生物学检验教学与科学研究经验, 他们以高度责任感圆满地完成了各自承担的编写任务。本教材在编写过

程中得到了全国诊断学指导委员会、教育部医学技术教育指导委员会、各参编学校和高等教育出版社的大力支持,在此一并致谢。

尽管编者已尽力完成撰写任务,但由于水平有限,书中难免存在不足。不妥之处恳请同行专家、教师、学生和读者批评指正。

府伟灵 黄君富

2012年5月

目 录

第一章 临床分子生物检验学概论	1	一、聚合酶链反应	50
第一节 临床分子生物学检验基本		二、PCR 衍生技术	55
概念	1	三、实时荧光定量 PCR	59
一、临床分子生物学检验的概念	1	四、数字化聚合酶链反应技术	65
二、临床分子生物学检验的学科发		五、其他核酸体外扩增技术	66
展史	2	六、核酸扩增实验室管理规范与质量	
三、临床分子生物学检验在临床医学中的		控制	69
应用	3	第三节 核酸分子杂交	72
四、临床分子生物学检验的应用前景	5	一、核酸分子杂交的基本概念与原理	72
第二节 基因及基因组	6	二、核酸探针	75
一、基因、基因组和基因组学基本概念	6	三、核酸分子杂交技术及应用	84
二、病毒基因组	7	第四节 核酸测序	90
三、原核生物基因组	9	一、核酸测序技术概述	90
四、真核生物基因组	11	二、链终止法测序	91
五、人类基因组与人类基因组计划	14	三、焦磷酸测序	97
第三节 蛋白质组学	17	四、第二代核酸测序技术	100
一、蛋白质组学基本概念及其研究		五、第三代核酸测序技术	109
特点	17	第三章 蛋白质检测技术	114
二、蛋白质组学研究的内容及相关		第一节 双向电泳技术	114
技术	19	一、双向聚丙烯酰胺凝胶电泳概述	114
三、蛋白质组学在医学中的应用	22	二、双向聚丙烯酰胺凝胶电泳主要实验	
第四节 生物信息学	23	流程	115
一、生物信息学概论	23	三、双向电泳技术的优缺点	121
二、生物信息学数据库	24	四、双向电泳技术的应用	122
三、生物信息学所用的方法和技术	29	第二节 生物质谱技术	123
第二章 核酸检测技术	31	一、质谱技术基本原理	123
第一节 核酸分离与纯化	31	二、质谱仪基本结构	123
一、核酸分离纯化的基本原则与步骤	31	三、常见生物质谱离子源	126
二、DNA 的分离纯化	35	四、与生物质谱联用的分离技术	127
三、RNA 的分离纯化	46	五、生物质谱技术在蛋白质组学中的	
第二节 核酸扩增	49	应用	128

第四章 生物芯片与生物传感技术	132	四、常见肿瘤的分子生物学检验	219
第一节 基因芯片	132	五、分子生物学检验技术与肿瘤的 个体化医疗	222
一、基因芯片的发展历史和检测原理	132	六、肿瘤分子生物学检验的展望	223
二、基因芯片制备和检测	133	第四节 分子生物学技术在其他 领域的应用	223
三、基因芯片在临床和科研工作中的 应用	139	一、分子生物学技术在原发性高血压 诊断中的应用	223
第二节 蛋白质芯片	143	二、分子生物学技术在细菌耐药基因 检测中的应用	225
一、蛋白质芯片概述	143	三、分子生物学技术在器官移植中的 应用	228
二、蛋白质芯片分类	146	四、分子生物学技术在法医鉴定中的 应用	230
三、蛋白质芯片的制备及检测流程	150	第六章 临床分子生物学实验	234
四、蛋白质芯片技术在医学分子检验中的 临床应用	151	实验 1 人体外周血细胞基因组 DNA 的分离与纯化	234
第三节 生物传感器	153	实验 2 人体外周血细胞 RNA 的 分离与纯化	236
一、生物传感器概述	153	实验 3 质粒 DNA 的分离与纯化	238
二、常见生物传感器	154	实验 4 紫外-可见分子吸收光谱法 检测核酸浓度和纯度	241
第五章 分子生物学诊断技术的临床 应用	162	实验 5 琼脂凝胶电泳分离 DNA	243
第一节 感染性疾病的分子诊断	162	实验 6 常规 PCR 检测方法	245
一、概述	162	实验 7 RT-PCR 常规检测方法	249
二、病毒感染性疾病的分子诊断	162	实验 8 DNA 限制性片段长度 多态性实验	252
三、细菌感染性疾病的分子诊断	177	实验 9 Northern 杂交技术	256
四、其他感染性疾病的分子诊断	184	实验 10 蛋白质免疫印迹技术	259
五、实验室生物安全	186	实验 11 HBV DNA 实时荧光定量 PCR 检测	263
第二节 遗传性疾病的分子诊断	188	汉英名词对照索引	266
一、单基因遗传病的分子诊断	188		
二、多基因遗传病的分子诊断	195		
三、出生缺陷与产前分子诊断	199		
四、线粒体病的分子诊断	205		
第三节 肿瘤的分子生物学检验	208		
一、概述	208		
二、肿瘤标志物	209		
三、肿瘤的分子生物学检验策略与 方法	218		

第一章

临床分子生物学检验学概论

雷弟博士坐在放化疗大楼门前的台阶上愁眉不展。这本该是个幸福祥和的中秋节,但是他却快乐不起来,因为他那年仅 63 岁的父亲被确诊患有肺腺癌,而且已经是晚期,癌细胞已经侵犯到胸椎。父亲的身体一直都很好,但最近几个月以来,他总是抱怨后背疼痛,甚至严重地影响到他的行走和睡眠。化疗药物的副作用进一步地让父亲痛不欲生,他甚至要求放弃化疗,终结生命。

雷弟博士知道有一种肺腺癌二线靶向化疗药物,引起的不良反应小,对特定类型的肺腺癌患者有很好的控制效果。但首先要对患者的肺癌组织的表皮生长因子受体(EGFR)基因进行突变检测。研究发现,EGFR 基因的突变和药物的疗效之间有很密切的关系,如果不确认这种关系就进行二线化疗,一方面可能贻误病情,另一方面会极大地浪费医疗资源(这种药物的价格昂贵)。

在医师建议下,雷弟博士向检测中心送交他父亲的肺癌组织标本。很快,检测结果出来了,EGFR 基因突变阳性,从这个角度上来看,患者应该对此种药物治疗敏感。果然,在服用该药物 5 天后,患者的疼痛明显减轻了,全身状态有了明显改观,医生、患者和家属都很兴奋。

以上的故事就是关于肿瘤的个体化医疗的例子,雷弟博士是医学检验专业的同行。在这个案例中,对 EGFR 基因突变的检测就属于“临床分子生物学检验”的内容,它能很好地帮助医师选择针对特定病人的特定治疗方案,在个体化医疗中发挥了重要的作用。

然而,临床分子生物学检验的用途并不仅仅局限于上述肿瘤个体化医疗,它目前已经广泛地应用到感染性疾病、遗传性疾病的临床诊断,以及产前诊断等医学领域中,而且随着技术的进步和科技的发展,其应用领域在不断地扩展。今天,我们可以自豪地说,临床分子生物学检验的时代正在到来,在这个章节里,我们会详细地介绍“临床分子生物学检验”这门学科的基本理论,并对这一领域的基因组学、蛋白质组学的基本知识和生物信息学的基本技术进行阐述。

第一节 临床分子生物学检验基本概念

一、临床分子生物学检验的概念

临床分子生物学检验是将分子生物学应用于检验医学及实验诊断的一门学科,是采用分子

生物学的方法和技术检测人体内的生物大分子的变化,从而辅助疾病诊断的应用科学。谈及临床分子生物学检验,不得不提到分子生物学。

(一) 分子生物学是在分子水平研究生命现象的科学

分子生物学是在分子水平研究生命现象的本质和规律的科学,它研究的是生物大分子或生物大分子体系特别是核酸和蛋白质的结构、功能和生物大分子或生物大分子体系之间的相互作用。生物化学和分子生物学密切联系,又有所不同。生物化学侧重研究生物小分子如:氨基酸、葡萄糖、脂质等,而分子生物学侧重研究生物大分子,甚至所谓超分子结构。作为小分子的氨基酸或者核苷酸,并不表现任何生命物质的特征,但是当小分子和小分子相互结合的时候,当氨基酸连接成蛋白质,核苷酸连接成 DNA 的时候,情况发生了戏剧性的变化,完成了一个从无生命向生命物质的飞跃,生物大分子表现出生命物质的特征,简而言之,它是“活”的,它有“生命”,而分子生物学正是研究此类具有生命特质的大分子的学科。

分子生物学又不同于生物学和细胞生物学,虽然三者的研究对象都是生物体,但是它们是分别从分子水平、整体水平和细胞水平进行研究的。

(二) 临床分子生物学检验是分子生物学在临床医学的应用学科

临床分子生物学检验是运用分子生物学的技术,通过检测临床上保持健康和导致疾病状态的生物大分子结构、功能和相互作用的变化,从而辅助临床诊断、治疗和预后评估的学科。

二、临床分子生物学检验的学科发展史

Charles Darwin 的进化论,Matthias Schleiden 和 Theodor Schwann 的细胞学说,Gregor Darwin 的染色体学说和孟德尔遗传定律奠定了现代生物学的基础。但受到当时技术手段的限制,以上学说均是从整体、宏观和纯生物学的角度来阐述生命现象。不久,随着技术的进步,出现了分子生物学。

(一) 分子生物学的学科发展

在分子生物学的发展史上,有几件事情值得一提。首先是 Louis Pasteur 发现了细菌,成为分子生物学史上的一个里程碑。但是他提出的“活力论”,即认为细菌的代谢活动必须依赖于完整细胞的思想,在一定程度上阻止了分子生物学的发展。直到 1900 年,Buchner 兄弟发现仅仅是酵母的提取液就可以使糖发酵,人们才认识到,可以进一步提取出细胞成分并对其进行研究,随后又发现了一系列在细胞生命活动中起重要作用的酶或者其他的蛋白质大分子,开启了近代生物化学的纪元。第二件大事是 Watson 和 Crick 提出的 DNA 双螺旋结构,解释了基因复制的原理,使人们进一步地接受了遗传物质的基础是 DNA 而不是蛋白质这一观点。在这以后对 DNA 的研究成为分子生物学研究的热点,促进了遗传密码的破译。而遗传密码的破译进一步推动了生物不同种属间化学和分子差异的发现和比较,使确定生物之间的进化关系研究更加有效。在这随后的年代里,伴随着一系列 DNA 重组技术的基础材料物质(如 DNA 聚合酶、RNA 聚合酶、mRNA、质粒等)的发现,为 DNA 重组技术的问世奠定了物质基础。而 DNA 重组技术的问世使得分子生物学家利用分子生物学技术进行物种的创建和改造成为可能。

暂不论物种的创建和改造在伦理学上的功过是非,科学家利用基因工程生产的胰岛素救治了一大批糖尿病患者已是不争的事实。而克隆羊多利的诞生更是将基因工程技术推到了一个全新的顶点。

现今,荧光原位杂交技术的发展能够将疾病的缺陷基因准确地定位到某号染色体的短臂或长臂的某区某带;人类全基因组计划的完成使更加精确地定位疾病的致病基因位点成为可能;测序技术的发展使得我们可以在一天内即可获得一个体全部染色体的 DNA 碱基序列。

表观遗传学的概念又给我们打开了新的大门,如果说以前我们强调的是遗传物质对表型的指导作用,那么今天我们意识到,环境也可改变和修饰遗传物质,而不仅仅只限于进化压力下的基因突变。

(二) 分子生物学的临床应用

其实在分子生物学科形成的初期,就已经伴随着分子生物学技术在临床的早期应用。镰状细胞贫血是一种地中海地区常见的,以红细胞变形为镰状为特征的贫血病。1940 年,Pauling 发现其病因是血红蛋白结构的异常。1959 年,Ingram 进一步发现这一血红蛋白的异常是由珠蛋白第 6 位氨基酸由谷氨酸突变为缬氨酸引起。1978 年,华裔科学家简悦威(Kan YM)利用 DNA 多态性与致病基因的关联性,第一次成功地对镰状细胞贫血进行了产前诊断。此举开创了分子生物学技术用于临床基因诊断的新纪元。基因诊断成为疾病诊断和治疗监控的重要手段。

医学和分子生物学在临床应用领域的结合使得整个医学研究上升到一个全新的分子水平。如果说长期以来医学都是从表型的角度研究疾病,那么现在开始逐渐出现了一些改变,发生了从经验学科向科学学科的进一步的转变。

对遗传性疾病的认识不再限于粗略笼统地按器官系统对疾病进行分类,人们意识到相同的临床表现可能由不同基因的缺陷所引起,而同一种基因的不同种类突变可能会引起不同表型的疾病,甚至同一种基因的相同突变在不同的个体表现出不一致的临床表型。

基于病原体微生物和人体基因组序列的巨大不同,使得对病原体微生物基因组的检测成为可能,应该说所有已知遗传物质核酸序列的病原体都可以用分子生物学的方法进行分离和鉴定。

肿瘤性的疾病由于其发病机制复杂,目前已成为医学领域的难点和重点。分子生物学的发展、人类癌症基因组计划的完成给明确肿瘤性疾病的发病原因带来了一线曙光。虽然目前还难以找到攻克所有肿瘤性疾病的方法,但多年的研究积累使科学家们认识到肿瘤的异质性,同一种肿瘤在不同的患者身上产生的机制是不同的,而且患者对化疗药物的代谢机制也不一样,因而他们亟须区别对待,给予个体化的治疗方案。

(三) 临床分子生物学检验的学科形成

在这样的大环境下,临床分子生物学检验应运而生。药理学科需要采用分子生物学的概念和手段,明确患者对药物的敏感性和代谢动力学情况,以确定药物的剂量;感染学科需要进行少量标本的病原微生物的分子生物学鉴定;遗传学家们更需要利用分子生物学技术对遗传性疾病进行准确的分子诊断,以便于进行后续的产前诊断和早期筛查预防。所有这些分子生物学技术在临床辅助诊断领域的应用都可以称为临床分子生物学检验。

三、临床分子生物学检验在临床医学中的应用

下面,具体地介绍临床分子生物学检验在临床医学中的应用。

(一) 感染性疾病的临床分子生物学检验

感染性疾病的临床分子生物学检验的最典型例子就是乙型肝炎病毒核酸的荧光定量 PCR 检测。肝炎病毒侵入机体以后,机体需要一段时间才能产生出针对病毒的抗体。这段时间由于

检测不到抗体,而实际上病毒已经在体内存在,因而将这段时间称作窗口期。窗口期的病毒检测就要大大地依赖于对病毒核酸的检测。窗口期后机体内出现病毒抗体,但是由于个体免疫功能的差异,病毒抗体的滴度和患者体内的病毒含量并不成比例。仅仅通过病毒抗体滴度的检测不能够帮助临床医师评价治疗效果,及进行乙型肝炎疾病转归的判断,而对血液中乙型肝炎病毒载量的检测却可以部分地反映患者体内病毒含量的多少。当然也许肝细胞病毒含量的多少更能说明问题,而且病毒的含量其实仅仅是问题的一个方面,病毒在机体内的病理生理机制当然也会影响病情的转归。但不管怎样,抗体滴度结合病毒核酸载量的检测在某种程度上,比仅仅检测病毒抗体的滴度更有价值。

大家一定还记得2002年冬到2003年春,肆虐全球的严重急性呼吸综合征(severe acute respiratory syndrome, SARS, 传染性非典型肺炎),这种高传染性、高致死性的流行性疾病在全世界造成了巨大的恐慌,有些地区甚至出现了口罩的脱销情况。现今世界卫生组织正式确认SARS的病原体是冠状病毒的一个变种——SARS病毒,但SARS病毒很独特,以前从未在人类身上发现过。变种的冠状病毒和流感病毒有亲缘关系,SARS的初期表现也和流行感冒非常相似。SARS是致命性的,感染SARS病毒的患者需要应用大剂量的激素,而这种治疗方法对流感患者而言是有害而无益的。而且错误地隔离非SARS患者会增加无谓的恐慌,并极大地增加社会医疗的负担。然而鉴于对病毒分离和培养的难度,当时仅几个实验室有能力对SARS病毒进行培养和鉴定,急需一种可以快速准确的确诊SARS病毒感染的检测方法。

凭借对冠状病毒基因组的了解和分子生物学技术的发展,我国科学家们很快确定了SARS病毒的基因组序列,并采用临床分子生物学检验技术在第一时间推出了SARS病毒的核酸检测试剂盒。这一试剂盒的问世解决了SARS的快速诊断的问题,为临床治疗赢得了关键的时间,在阻遏SARS流行的工作中作出了巨大的贡献。

(二) 遗传性疾病的临床分子生物学检验

遗传性疾病一直以来是被临床医生忽略的一个领域,因为遗传性疾病大都没有好的治疗方法,进行疾病的分子诊断和后期的预防有一定的难度。

现在,许多遗传性疾病的致病基因都已经被克隆和鉴定,基本上所有的遗传性疾病的致病基因都不止一种,其致病的突变位点更是多种多样。利用现有的技术手段,去寻找一种遗传性疾病的致病基因位点及其突变无异于大海捞针,这等同于小概率事件的发生概率,如同“捕鱼”一样,在第一网就获得靶目标的可能性微乎其微。幸运的是,在大家系中采用遗传连锁分析的方法可以在不明确致病基因具体位点的情况下,根据家系中患者共有的单倍体基因型可对个体患病与否作出准确的判断。在遗传学上已经有多个这样的例子,正如我们前面所提到的简悦威博士所进行的第一例产前基因诊断就是采用这一方法。

(三) 肿瘤性疾病的临床分子生物学检验

正如在前面的故事中谈到的,肿瘤性疾病亟须个体化的治疗手段。一方面,因为现今以放、化疗为主的肿瘤性疾病的治疗手段,对人体的正常功能有很大的创伤性,放、化疗的医师们长期在化学药物治疗与营养支持之间左右权衡,仍造成少数病人不是死于肿瘤性疾病本身,而是死于过度治疗引起的并发症,然而对这个“度”的把握实在困难;另一方面,肿瘤性疾病也需要医师尽快确定对病人有益的治疗方案,以免贻误病情。但是如何判断患者对药物的有效性的确是一个难题。而分子生物学检验为这一难题开启了新的大门,通过对肿瘤患者特定基因的检测和分型,

可预测患者对化疗药物的反应和治疗效果,为临床医师提供有力的帮助。

四、临床分子生物学检验的应用前景

虽然临床分子生物学检验逐渐形成其完善的理论和知识体系,也已经在临床医学的很多方面得到广泛的应用,但是对生命世界的探索是永无止境的。以下的领域正是临床分子生物学检验的热点和前沿。

(一) 病原体及其耐药性的快速临床分子生物学检验

临床分子生物学检验对病原体的检测已经普遍为临床所接受,但是其检测的病原体谱还比较局限,对某些病原体的检测存在价格昂贵、病人难以承受的缺点。同时临床医师也迫切地需要一种快速地了解耐药性的检测方法,一个典型的例子是结核杆菌的耐药性检测:一位骨结核瘘道形成的患者经过医师明确诊断并手术后,给予标准的抗结核杆菌的三联疗法,但遗憾的是,一个多月以后,患者再度形成瘘道,同时耐药性检测结果也出来了,表明患者对经典的抗结核杆菌药物是耐药的。如果耐药性检测结果能够早些得到,医生就能给予病人适当的治疗,也许就可以避免二次的手术。而这一快速的耐药性检测只有通过临床分子生物学检验才能得以实现。

此外,社会的发展、人口的增多必然伴随着环境的破坏和随之带来的新的病原体的产生。正如在前面所提到的 SARS 病毒,就是一种新的病原体。当新的病原体产生并不幸造成重大疾病流行的时候,病原体的核酸检测是快速鉴定新病原体的最优方案。新发传染病病原体的检测是关系民生的重大事件,而临床分子生物学检验将在新发传染病病原体的检测方面发挥重要作用。

(二) 遗传性疾病的简便、快速、价廉的分子诊断

小家系散发遗传病患者的诊断,一直以来是临床基因诊断的难点,由于家系样本量太少,连锁分析完全没有用武之地,而进行候选致病基因的筛查又存在工作量大、价格昂贵的缺点。特别是一些发病率不够高的遗传性疾病,即便是常见致病基因的筛查在临床上也没有实践的可能。然而,测序技术的发展有可能在未来的 10 年中解决大量的单基因遗传性疾病的基因诊断和产前诊断。目前全转录组测序的费用已经降低到 2 万多元,相信在不久的将来,个体的全基因组测序会将单基因遗传性疾病的基因诊断提升到一个全新的境界。到那时,大多数散发的单基因疾病将通过全基因组的测序得到明确的基因诊断。

(三) 遗传性疾病的产前无创性临床分子生物学检验

在遗传性疾病的基因诊断的基础上,产前的基因诊断才有其实施的基础和平台。特别是无创性的、以母体血浆为检测样本的产前诊断将极大地开拓产前诊断的市场。

目前对胎儿游离 DNA、胎儿有核红细胞的单细胞、痕量 DNA 分子的检测受到越来越广泛的重视,相信会在不久的将来实现实质性的突破。

(四) 多基因疾病的临床分子生物学检验

单基因遗传病的有效基因诊断必然给多基因疾病的诊断带来一线曙光,如果说单基因遗传性疾病是由单个大砝码压倒了天平,多基因疾病诊断就要凭借多个小砝码的合力。如果能够检测出个体在多个基因上的序列差别,就有可能对多基因疾病作出相对准确的预测。

(五) 肿瘤性疾病的转移趋势的临床分子生物学检验

至此,我们不妨回到本章开头的故事,雷第博士的父亲目前情况怎么样了?很遗憾,在二线化疗药物显示有效的 3 个月以后,他的父亲发生了全身性的肿瘤转移,肺癌细胞侵入了大脑、

肌肉,出现了广泛的皮下结节。

相信大家不禁要问,既然药物的作用如此神奇和有效,为什么患者病情还会迅速恶化呢? *EGFR* 的突变虽然提示了药物的有效性,但是,一方面,肿瘤性疾病存在很大的异质性,不同来源的肿瘤细胞的基因组结构确定了它们对药物的敏感性,针对 *EGFR* 突变肿瘤细胞的药物虽然杀死了大部分的此类肿瘤细胞,却不能遏制那些 *EGFR* 突变阴性的肿瘤细胞;另一方面,肿瘤细胞在与药物的作用过程中可以出现自身的进化和演变,导致耐药。有报道 *K-ras* 基因突变阳性的患者是很容易出现对这种药物的耐药性的,而限于当时的条件,雷第博士没有进行 *K-ras* 基因的检测,而且与药物耐药性有关的基因的突变正在不断地被发现,对 *EGFR* 和 *K-ras* 基因的突变检测可能也不足以准确地预测患者的预后。

对于血液循环肿瘤数量的检测也可以早期预测肿瘤的转移和预后,但目前仅局限于对大肠癌、前列腺癌和乳腺癌的检测。

临床分子生物检验学科的发展正方兴未艾,等待我们解决的问题还很多。让我们带着这些问题来学习本章的另外三个基础知识章节:基因及基因组、蛋白质组学和生物信息学。

(武汉大学 郑 芳)

第二节 基因及基因组

基因是基因组的功能单位,随着遗传学和分子生物学的进展,基因概念被不断丰富和完善,基因组学、人类基因组计划启动显示生命科学从单个基因进入到整体系统研究。本节以基因为主线,围绕基因、基因组和基因组学相关内容,介绍真核生物、原核生物和病毒基因组的结构特征,比较相互间的差异。

一、基因、基因组和基因组学基本概念

对基因的最初认识可追溯到 19 世纪 Mendel 提出的“遗传因子”,基因一词最早由 Johansen 提出,随后 Morgan 创立了基因理论。随着基因与基因组概念的不断充实,基因组研究的新学科也不断涌现。

(一) 基因

DNA 双螺旋结构的揭示与遗传密码的破译,使人们对基因的认识逐步深入,从分子生物学的角度提出了基因概念。

1. 基因 基因(gene)是指合成有功能的蛋白质、多肽或 RNA 所必需的全部 DNA 序列(除部分病毒 RNA),是基因组的一个功能单位。一个基因不仅包括编码蛋白质或 RNA 的核酸序列(编码序列),还包括表达所必需的调控序列(非编码序列),如启动子、增强子等(图 1-2-1)。

2. 基因功能与表观遗传 在核酸序列不发生变化的条件下,基因功能可能出现可逆的、可遗传的改变,即表观遗传(epigenetics)现象,其涉及组蛋白修饰、DNA 甲基化、RNA 干扰等。组蛋白修饰包括乙酰化、甲基化、磷酸化等,赋予了遗传信息更广泛的灵活性和多样性,使机体在不同生长发育阶段呈现不一样的基因表达。DNA 甲基化是表观遗传现象的另一种重要表现形式,人类细胞中约有 1% 的 DNA 发生甲基化,且 DNA 甲基化一般发生在二核苷酸 CG(CpG 岛),

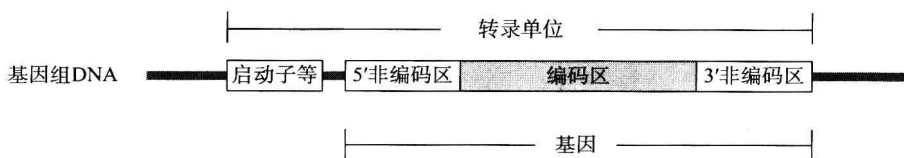


图 1-2-1 基因结构示意图

CpG island)的胞嘧啶上。DNA 甲基化影响基因的表达,在人类的正常发育、X 染色体失活、衰老以及许多人类疾病(如肿瘤、心血管疾病等)中都发挥重要作用。RNA 干扰(RNA interference, RNAi)是指在生物体细胞内,通过双链 RNA(dsRNA)使细胞内特定的同源 mRNA 特异性降解,从而关闭基因表达,导致基因沉默的现象。RNAi 在生物体内普遍存在,能高效特异地阻断基因的表达,也是生物体抵御外在感染的一种重要保护机制。

(二) 基因组

基因组(genome)是指生物体一套完整的单倍体遗传信息的总和,包括所有基因和基因间的区域。基因组的主要功能是贮存和表达遗传信息,是物种及其个体之间区别和联系的最本质生物学特征。

基因组大小称为 *C* 值(*C* value),常以碱基数(base)或碱基对数(base pair, bp)描述。同种生物不同个体中 *C* 值是恒定的,但不同种生物之间 *C* 值差异很大(图 1-2-2)。从病毒、细菌、真菌到高等真核生物,各种生物的 *C* 值依次递增,基本反映进化程度。但某些显花植物和两栖类动物基因组可达 10^{11} bp,甚至比人类的 *C* 值高。在某些结构与功能相似的同类生物,甚至亲缘关系接近的物种之间,*C* 值有时也相差数十倍,这种生物的进化程度与基因组大小不完全成比例的现象称为 *C* 值矛盾(*C* value paradox)。不同生物基因组的结构组成上存在的差异可能是 *C* 值矛盾出现的原因。

(三) 基因组学

基因组学(genomics)是研究生物基因组的结构、功能及表达调控的一门科学,指对某一生物全套基因组进行基因组作图、核苷酸序列分析、基因定位和基因功能分析等。主要包括两方面研究内容:结构基因组学(structural genomics)和功能基因组学(functional genomics)。结构基因组学是以全基因组测序为目标,属基因组研究早期阶段,以建立生物体高分辨率遗传图谱、物理图谱、转录图谱和序列测定为主。功能基因组学是以基因功能鉴定为目标,为基因组研究新阶段,是利用结构基因组学提供的信息,以高通量、大规模的实验方法,借助计算机分析,系统地对基因功能进行诠释。

基因组学研究对人类社会的发展与进步产生了广泛深远的影响,不仅源源不断地产生海量的基因组数据,改变了生命科学的研究模式,也为生物学和生物医学研究开辟了新方向、新方法,促进了分子诊断学及其技术的发展,产生了许多新的交叉学科。与此同时,大大加快了生命科学研究的步伐,加速了对疾病发病机制的揭示、诊断和治疗,并对人类文明产生巨大冲击,有助于人类更好地理解生命,造福人类,认清人类在自然界的位置和作用。

二、病毒基因组

病毒(virus)在自然界普遍存在,是一种结构简单、不能单独繁殖、只能在宿主细胞内进行复