

遺傳基因診斷

原理與應用

遺伝子診断

——その原理と応用——

編著者

島田和典 / 前田秀一郎

編譯者

周振英

岐阜大學醫學院臨床外科系醫學博士

岐阜大學醫學院基礎形態系醫學博士

李茂生

台北醫學大學醫學研究所博士候選人



南江堂



合記圖書出版社 發行

第十三届全国书市样书

遺傳基因診斷

原理與應用

遺伝子診断

——その原理と応用——

編著者

島田和典 / 前田秀一郎

編譯者

周振英

岐阜大學醫學院臨床外科系醫學博士

岐阜大學醫學院基礎形態系醫學博士候選人

李茂生

台北醫學大學醫學研究所博士



南江堂



合記圖書出版社 發行

遺傳基因診斷：原理與應用 / 島田和典, 前田秀一郎

編著；周振英, 李茂生 編譯. -- 初版. --

臺北市：合記, 2002〔民91〕

面；公分

含索引

譯自：遺傳子診斷：その原理と應用

ISBN 957-666-803-4 (平裝)

1. 診斷學 2. 遺傳工程 3. 遺傳病

415.21

90020287

書名 遺傳基因診斷——原理與應用

編譯 周振英 李茂生

執行編輯 程慧娟

發行人 吳富章

發行所 合記圖書出版社

登記證 局版臺業字第 0698 號

社址 臺北市內湖區(114)安康路 322-2 號

電話 (02)27940168

傳真 (02)27924702

總經銷 合記書局

北醫店 臺北市信義區(110)吳興街 249 號

電話 (02)27239404

台大店 臺北市中正區(100)羅斯福路四段 12 巷 7 號

電話 (02)23651544 (02)23671444

榮總店 臺北市北投區(112)石牌路二段 120 號

電話 (02)28265375

台中店 台中市北區(404)育德路 24 號

電話 (04)22030795 (04)22032317

高雄店 高雄市三民區(807)北平一街 1 號

電話 (07)3226177

郵政劃撥 帳號 19197512 戶名 合記書局有限公司



序

「遺傳基因診斷」是指找出疾病原因的遺傳基因變化或感染病原體的遺傳基因來診斷疾病的技術。遺傳基因的本體是去氧核苷酸 (deoxyribonucleic acid; DNA) 的化學物質，因此又可稱為「DNA 診斷」。

1970 年代開發了試驗管內 DNA 重組技術。由這個技術的應用。有關人類的分子生物學研究成為可能。因此，人類疾病開始以遺傳基因層次進行研究，接著，各種人類遺傳基因急速地被單離出來，各個構造也被詳細地研究解析。就這樣，正常的遺傳基因及成為疾病原因之遺傳基因的構造解析結果，用遺傳基因來診斷可能的疾病種類也飛躍地增加。這個結果，遺傳基因診斷技術在臨床檢查的分野上，也因這種畫期性的進展獲得廣泛的理解，急速性受到注目。

人類的體內被外來的遺傳基因侵入，或是原來在細胞內之遺傳基因的一部份發生變化，與正常遺傳基因有所相異的情形，就可應用遺傳基因診斷技術來迅速找出其原因。所謂人類的體內被外來性遺傳基因侵入的情形，是指被病毒或微生物感染的情況，由於遺傳基因的診斷，若能確認是什麼樣的遺傳基因侵入，當然可以鑑定出感染症的病原體，這樣的診斷結果立刻成為決定治療方針的有力證據。特別是在鑑定困難的病毒或鑑定時間長的結核菌、真菌等感染症的情況，遺傳基因的診斷是有效的。遺傳病的情形是由雙親所繼承來的遺傳基因。其一部分和正常的遺傳基因在構造上是相異的。而惡性腫瘤的情形，則是一部份的遺傳基因在正常組織所包含的遺傳基因與腫瘤組織所含有的遺傳基因之間有微妙的差異。同時，有些特定的遺傳基因在正常細胞中所包含的遺傳基因數比腫瘤細胞的遺傳基因數要多亦為所知。像這樣，遺傳基因診斷是對遺傳病及感染症等的病因性變異及病原體，用遺傳基因層次來檢出的疾病診斷技術，應用的這種技術，可使疾病的發病前診斷、早期診斷、



遺傳病的出生前診斷，都成為可能。

遺傳基因診斷是什麼樣的技術，應用此種技術對疾病能得到什麼樣的情報，及診斷後有哪些治療的可能性？關於這種解說書在5、6年前已經計劃過，當時在基礎醫學講義時，就深感在這方面的進步用簡單易懂的說明書籍是有所必要的。在1991年秋天，已完成80~90%的時候，由於種種原因，把作業幾乎完全中斷，這期間，有關遺傳基因診斷的書，陸續出版。因此，本書的必要性與當時的狀態，有了極大的改變。由於南江堂書局的熱心推薦，在1993年底，把最初的原稿重新再過目，把變成陳舊的部份刪除，再加上新開發的重要新技術的相關解說，終於把此書完成，假使本書能成為引起對遺傳基因診斷的興趣，或更進一步對基礎醫學的研究發生興趣的話，是為至幸！

島田 和典

前田秀一郎

1994年7月



略語一覽

A	adenine
ADA	adenosine deaminase
AIDS	acquired immunodeficiency syndrome
ALL	acute lymphocytic leukemia
ASO	allele specific oligonucleotide
BMD	Becker type muscular dystrophy
bp	base pair(s)
C	cytosine
CML	chronic myelocytic leukemia
DMD	Duchenne type muscular dystrophy
DNA	deoxyribonucleic acid
<i>env</i>	envelope
FAP	familial amyloidotic polyneuropathy
G	guanine
<i>gag</i>	group sepcific antigen
GDP	guanosine di-phosphate
GTP	guanosine tri-phosphate
HbA	hemoglobin adult
HbS	hemoglobin sickle cell anemia
HCV	hepatitis C virus
HD	Huntington's chorea
HIV	human immunodeficiency virus
HPV	human papilloma virus
HSV	herpes simplex virus
kb	kilo-base pairs
LTR	long terminal repeat
mRNA	messenger RNA
OTC	ornithine transcarbamylase
PA	prealbumin
PCR	polymerase chain reaction
Ph ¹	Philadelphia chromosome 1
<i>pol</i>	polymerase



RB	retinoblastoma
RFLP	restriction fragment length polymorphism
RNA	ribonucleic acid
SSCP	single strand conformation polymorphism
T	thymine
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TIL	tumor infiltrating lymphocyte
T _m	melting temperature
TNF	tumor necrosis factor
TTR	transthyretin
U	uracil
VNTR	variable number of tandem



目 錄

I 遺傳基因與遺傳基因診斷	1
[A] 操縱基因的分子：DNA	2
[B] 遺傳基因的構造與遺傳情報的發現	7
[C] 疾病與遺傳基因診斷	11
II 遺傳基因診斷技術	15
[A] 南方氏點墨法（Southern blot 法）	16
1. Southern blot 法的概略	16
a. DNA 的抽取	18
b. DNA 的切斷與膠體電氣泳動法的分畫	18
c. 從膠體到濾紙的 DNA 移行	18
d. 探針的標識	19
2. Southern blot 法的變異檢出	20
3. 利用 DNA 鹼基配列多型性的遺傳基因診斷	22
[B] 遺傳基因增幅法 (polymerase chain reaction: PCR)	26
1. PCR 法的原理	26
2. PCR 法的變異檢出法	27
a. 鹼基配列的決定	27
b. PCR 法的遺傳基因診斷	28
[C] 利用合成寡核苷酸 (oligonucleotide) 的點變異檢出	31
1. 合成 oligonucleotide 的利用基礎	32
a. hybrid-DNA 的安定性	32
b. 合成 oligonucleotide 的設計	32
2. 標的 DNA 配列的檢出法	33
III 遺傳病的遺傳基因診斷	35
[A] 優性遺傳病的遺傳基因診斷	37



1. 家族性 amyloidotic polyneuropathy (FAP) 37
2. Huntington's chorea (哈丁頓氏舞蹈症) ---利用 RFLP 的診斷 45

[B] 劣性遺傳病的遺傳基因診斷 50

1. 鐮刀狀紅血球症 50
2. 地中海貧血症 (thalassemia) 54

[C] X 染色體連鎖遺傳病 56

1. ornithinetranscarbamylase 異常症 56
2. 肌萎縮症 61

[D] 母性遺傳性遺傳病---mitochondria 腦肌症 65

IV 感染症的遺傳基因診斷

71

[A] 細菌、黴漿菌、披衣菌感染症的遺傳基因診斷 72

[B] 病毒感染症的遺傳基因診斷 73

- C 型肝炎病毒 (HCV) 的檢出 74
- HPV (human papilloma virus) 的檢出 74
- HIV (human immunodeficiency virus) 的檢出 75
- HSV (herpes simplex virus) 的檢出 75

V 惡性腫瘤的遺傳基因診斷

77

[A] 癌遺傳基因 *ras* 的點變異診斷 78

1. 點變異在限制酶認識及切斷部位時 78
2. 利用合成 oligonucleotide 的點變異檢出 79

[B] 利用遺傳基因再構成檢索的診斷 80

[C] 癌原遺傳基因增幅檢出法的診斷 82

[D] 癌抑制遺傳基因缺失檢出法的診斷 82

VI 遺傳基因治療

87

[A] 反轉錄病毒的遺傳基因導入 89

[B] 遺傳基因治療的對象疾患 92

[C] 利用骨髓細胞的遺傳基因治療 92

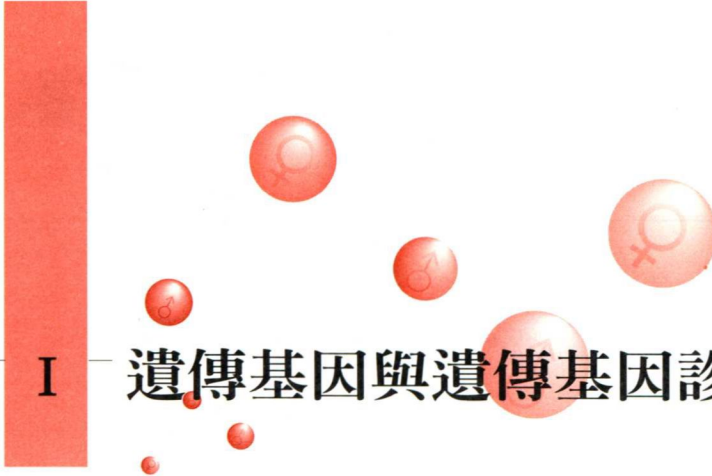


- D 利用各種細胞的遺傳基因治療 94
- E 惡性腫瘤的遺傳基因治療 95
- F 遺傳基因治療的展望 96

總結

99

- 解說 101
- 索引 107



I 遺傳基因與遺傳基因診斷

人體是由約 5×10^{13} 個的細胞集合體（圖 1.1）所形成，每個細胞裏面都存在著包含核內的 DNA 所儲備的所有的遺傳情報。在必要時核內儲備有遺傳情報的 DNA 會轉寫到糖核苷酸 (ribonucleic acid RNA) 送出到蛋白質合成場所的細胞質中，從 DNA 把情報轉寫成 RNA 稱為轉寫 (transcription)，依照 RNA 轉寫的遺傳情報所指示而合成蛋白質的過程稱為翻譯 (translation)。轉寫是把 DNA 所持有的遺傳情報正確地複製到 RNA 的工作，把 DNA 的遺傳情報傳達到細胞質的工作是由叫做 messenger RNA (mRNA) 的 RNA。在細胞質內有 20 種的氨基酸 (amino acid) 依照 mRNA 的指示，連接而合成蛋白質，所合成的蛋白質可幫助物質代謝的圓滑進行或是利用為細胞構造的形成，這些物質的全體集合體形成了人體。除了核以外，在細胞內的小器官粒線體 (mitochondria) 也會有複數的小 DNA 分子，這些 DNA 分子所持有的遺傳情報也在 mitochondria 內被轉寫、翻譯。

因此遺傳基因診斷及實際的理解必須對儲備遺傳情報的 DNA 的性質及所儲備的遺傳情報如何發現等有通盤的理解。

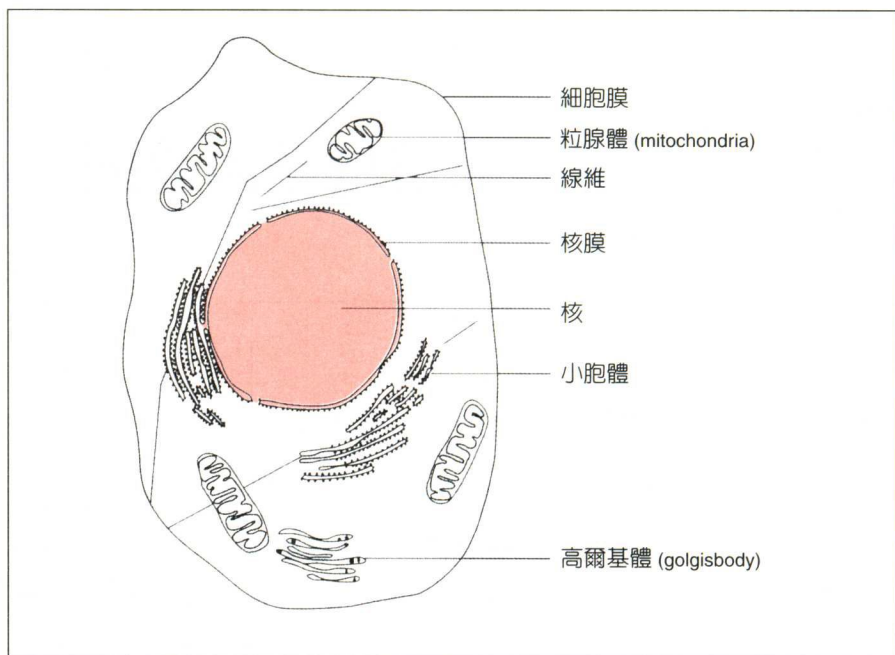


圖 1.1 真核細胞的模式圖

A 操縱基因的分子：DNA

操縱遺傳物質的本體是DNA，DNA是一種很長的纖維狀高分子，其構造單純，是由稱為deoxynucleotide的單位物質重複及重合所形成（圖 1.2）。deoxynucleotide是由稱為deoxyribose的含有從1'到5'的5個碳素原子的五碳糖，在1'的碳素原子與鹼基結合，而5'的碳素原子則與磷酸相結合而成。地球上所有的生物都是由DNA職司遺傳，其大部分存在於細胞的核內，包含在核內的DNA是二條很長的螺旋狀的polynucleotide鏈，捲繞於共通的軸心的構造，在mitochondria中有複數的小型

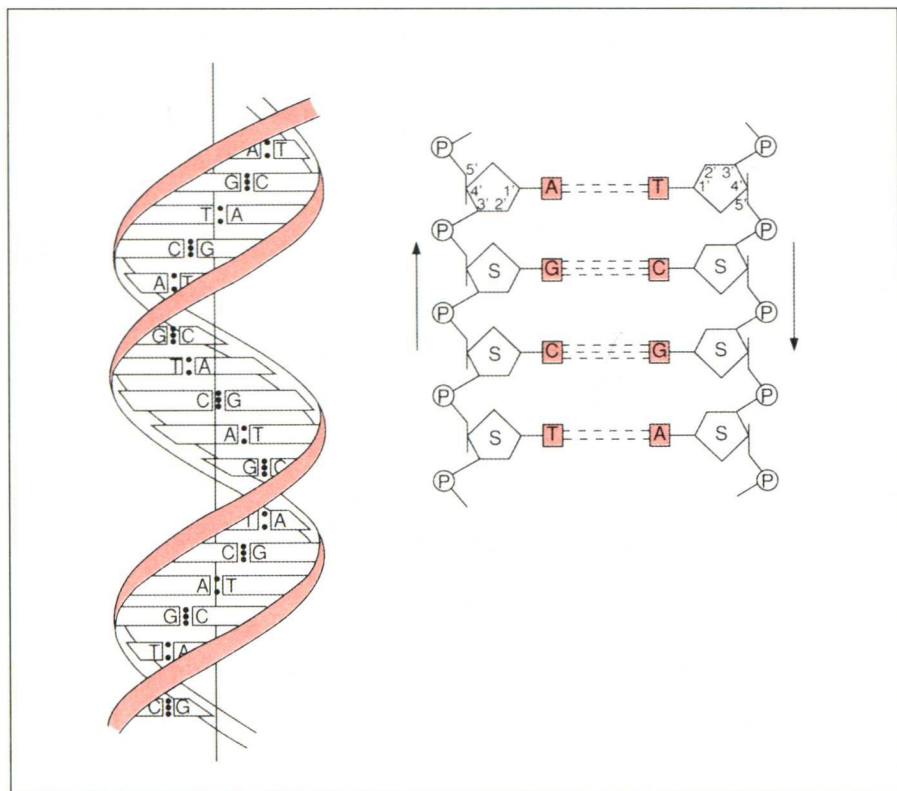


圖 1.2 DNA 的構造

P 為磷酸，S 為糖。A, T, G, C 為鹼基（本文參照），A 和 T 及 G 和 C 之間的破線或黑點分別表示氫鍵結合的存在。左側為 Watson-Crick 所提出的 DNA 構造的立體模型，右側為其平面圖，五角形為糖 (deoxyribose)。

環狀雙鏈 DNA 存在。

各五碳糖的 3' 碳素原子與相鄰的五碳糖的 5' 碳素原子間以磷酸的強度化學結合（共價結合）所形成的結合構造，一再重複而形成 DNA 鏈的骨架（圖 1.2）這個骨架位於二重鏈的外側，而另一側的 1' 碳素原子則與 Adenine (A)、Guanine (G)、Thymine (T)、Cytosine (C) 的四種鹼基



中任何一種鹼基相結合，這種鹼基則存在於二重鏈的內側，二重鏈經常是A與T以二條的弱度化學結合（氫鍵）成對，而G與C則以三條弱度化學結合成對，這稱為二重鏈DNA的相輔性鹼基配列構造，這樣的構造可以由一邊的DNA鏈鹼基配列構造決定後，另一邊便自然能決定，因此地球上的種種生物所持有的二重鏈DNA的鹼基組成必定是 $A=T$ 、 $G=C$ 的構造，但是 $A+T$ 、 $G+C$ 的含量則隨生物而不同，成直線型的二重鏈DNA的五碳醣，其終了側的一端為5'碳素原子，而另一端為3'碳素原子，互相對向的這二重鏈的走行方向是相反的（圖1.2）。RNA與單鏈DNA在基本構造上是相同的，但是鹼基中以Uracil(U)的U代替了T，五碳醣不是以deoxyribose而是以2'碳素原子上多結合了一個氧原子的ribose。

DNA的螺旋二重鏈對合的AT、GC間的弱度化學結合一旦被破壞，便很容易變成長單鏈DNA，這稱為DNA變性(denature)。DNA溶液在60~80℃以上，或是在強鹼性情形下就會發生變性，又融點(T_m)是以DNA的螺旋構成有一半解開時的溫度為定義，DNA的融點依存於鹼基的組成，如GC對的化學結合數比AT對多時，此GC含量高的DNA分子比AT含量高的DNA分子其 T_m 值比較高，分裂開的DNA相輔鏈當溫度漸漸下降到室溫時或是鹼性漸漸恢復到中性附近時，會自動地再會合成二重鏈，稱為再生（圖1.3），這個再會合過程稱為annealing。在annealing的過程中，在溶液中加入一條新的單鏈DNA，若所加上的單鏈DNA與變性的二重鏈DNA的鹼基配列為相輔的配列時，再生的二重鏈就不一定是原來的二重鏈而可能是與新加入的單鏈形成新的二重鏈，像這樣的DNA稱為hybrid DNA，這個操作就稱為雜交(hybridization)。假如新加入的單鏈DNA與原有的二重鏈DNA之間沒有相輔的鹼基配列則hybrid DNA不會形成，另外使用RNA亦可實施同樣的實驗，此時DNA及RNA有相輔性的鹼基配列同樣可以形成二重鏈，遺傳基因診斷

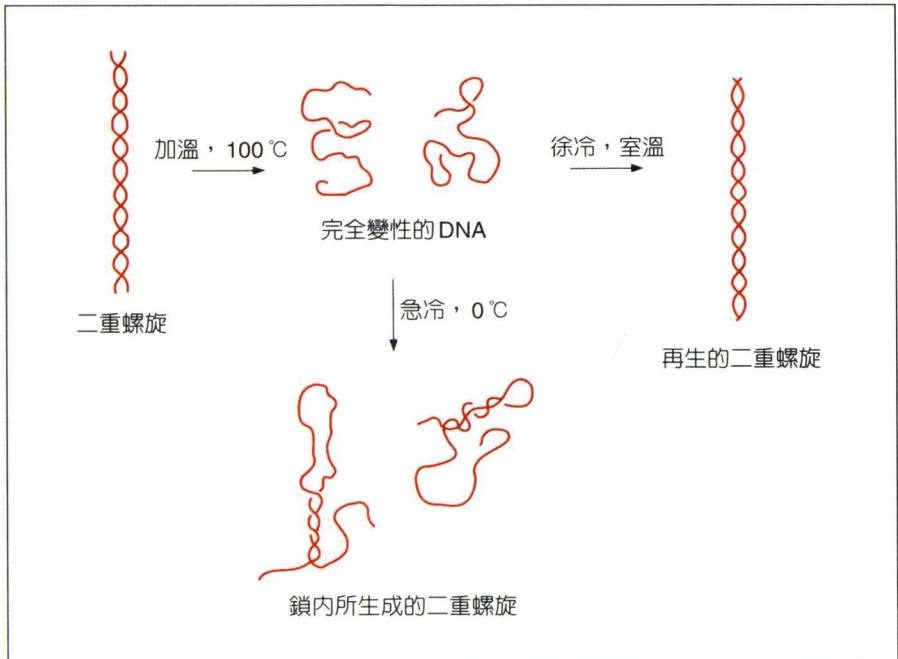


圖 1.3 DNA的變性冷卻變化

就是利用DNA鏈的這種性質。遺傳基因診斷時檢查的對象為人類的末梢血液或一部份的切除組織所抽取出來的DNA，在感染症的遺傳基因診斷則以血液、尿液、糞便、鼻咽腔分泌物、咳痰等存在的DNA或RNA為檢查對象。

人類的DNA與其他生物的DNA是完全相同性質的，不同的只是排列在DNA鏈上的A,T,G,C的配列順序及鹼基對的總數而已，生物所持有的一組遺傳物質稱為該生物 genome，genome的大小以其鹼基對的總數表示，人類身體構造的每一個細胞都有約30億對的鹼基（ 3×10^9 鹼基對）所形成的 genome 二組，一組由父親由來，一組由母親由來，人類

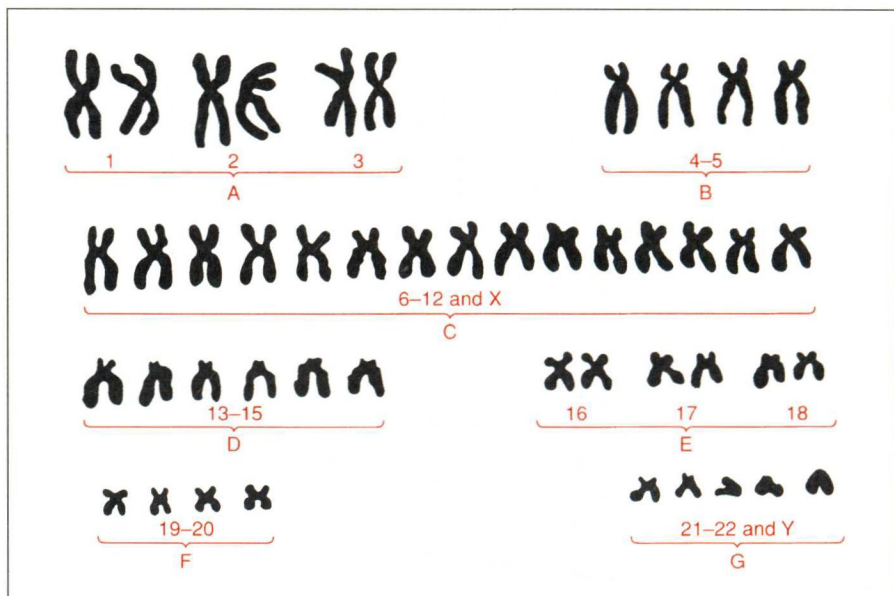


圖 1.4 正常男性的核型

分裂中期的染色體像及其形態及大小的分類（A～G群）。

的 genome DNA 是在細胞核內與蛋白質形成複合體稱為染色體的構造，染色體可分為與性決定無關的常染色體及直接關與性決定的性染色體，人類的染色體依 genome 的大小順序付上 1 號到 22 號的 22 對 44 個常染色體及 1 對 2 個的性染色體合計為 46 個染色體存在。在女生的體細胞中，其性染色體為 2 個 X 染色體而男性則為 1 個 X 染色體及 1 個 Y 染色體（圖 1.4）。精子有含一組從 1 號到 22 號的常染色體加 1 個 X 染色體及同樣含一組常染色體加上 1 個 Y 染色體的二種，而卵子則為一組 22 個的常染色體加上 1 個 X 染色體，因此人類的染色體除了男性的性染色體以外，全部存在著成對的染色體，因此從染色體的分佈來講，體細胞為二倍體，生殖細胞為一倍體。



遺傳情報是記入在DNA鏈上的鹼基配列來指令某種蛋白質的氨基酸的配列順序，遺傳的基本是DNA鏈上的鹼基配列單位稱為「遺傳基因」(gene)者，一般遺傳基因是以所指令的蛋白質的種類而命名，如albumin遺傳基因、insulin遺傳基因等，各個的遺傳基因都是位置在固定的染色體及固定的場所的集中鹼基配列。

人類的genome構成DNA鏈的長度合計在1公尺以上，1個人的全身的身體全體所含有的DNA鏈長度加起來足足可以來回地球和月球間好幾回的天文學數字的長度。微生物中最被研究的大腸桿菌其genome長度約為人類的500分之一，約有600萬鹼基對，結核菌或霍亂菌也大致在這種大小左右。在能引起人類疾病的微生物中，必須借用活細胞的助力才能殖增的一群稱為病毒(virus)的病原體，SV40是病毒中最小型的病毒，為一種對感染的動物細胞引起癌化的癌性病毒，約有5000鹼基對的大小，構成這個genome的所有的鹼基配列順序都已經決定出來了，這個約為人類genome長一百萬分之一的SV40病毒上的複數的遺傳基因都已經解讀出來，依此而單純類推人類的genome上大概有數百萬個遺傳基因，但是人類的基因大概推定只有十萬個左右，也就是在三十億鹼基對的10%程度是被利用為遺傳基因。而其他的則與直接指令蛋白質無關的DNA配列，因此人類的DNA鏈上遺傳基因分散於其中，以外都是重複的單純性鹼基配列，及一些功能不明的鹼基配列廣布其中。

B 遺傳基因的構造及遺傳情報的發現

DNA所擁有的遺傳情報は借助於稱為RNA polymerase的酵素轉寫到RNA，人體構成細胞中有3種類的RNA polymerase存在，RNA polymerase I是對在細胞質中當蛋白質合成時負有重要工作的ribosome中的