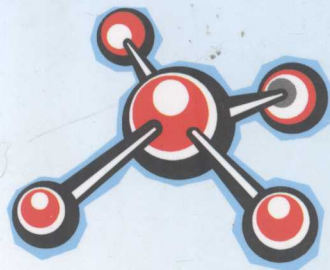




全国高职高专医药院校药学及医学检验
技术专业工学结合“十二五”规划教材

供医学检验技术及相关专业使用



张 申 王 杰 高江原 主编

分子生物学 检验技术

FenziShengwuxue

Ji Jianyanjishu



华中科技大学出版社

<http://www.hustp.com>



全国高职高专医药院校药学及医学检验
技术专业工学结合“十二五”规划教材

供医学检验技术及相关专业使用

分子生物学 检验技术

主 编 张 申 王 杰 高江原

副主编 蒋传命 张 晖 胥振国

编 者 (以姓氏笔画为序)

王 杰 (沈阳医学院)

王海英 (怀化医学高等专科学校)

田 野 (郑州铁路职业技术学院)

关 颖 (郑州铁路职业技术学院)

张 申 (怀化医学高等专科学校)

张 晖 (浙江医学高等专科学校)

林燕燕 (漳州卫生职业学院)

胥振国 (合肥职业技术学院)

高江原 (重庆医药高等专科学校)

梅序桥 (福建医科大学附属漳州市医院)

蒋传命 (邵阳医学高等专科学校)



华中科技大学出版社

<http://www.hustp.com>

中国·武汉

内 容 简 介

本书是全国高职高专医药院校药学及医学检验技术专业工学结合“十二五”规划教材。

本书由分子生物学基础理论、常用分子生物学技术和分子生物学检验实验室质量管理三部分组成。全书共10章,重点介绍医学检验岗位群所需要的实用知识和常用技术,并将理论与实训合二为一,实现理实一体化。为了增加本书的知识性和趣味性,在有的章节中增加了“知识链接”,在有的章节最后还安排了“本章小结”、“能力检测”等内容,以便学生在课后能对本章的主要知识点有一个比较明确的认识和理解。

本书适合于高职高专医学检验技术及相关专业使用。

图书在版编目(CIP)数据

分子生物学检验技术/张 申 王 杰 高江原 主编. —武汉:华中科技大学出版社,2013.2

ISBN 978-7-5609-8086-7

I. 分… II. ①张… ②王… ③高… III. 分子生物学-医学检验-高等职业教育-教材 IV. R446.1

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2012)第 135272 号

分子生物学检验技术

张 申 王 杰 高江原 主编

策划编辑:陈 鹏

责任编辑:熊 彦

封面设计:范翠璇

责任校对:代晓莺

责任监印:周治超

出版发行:华中科技大学出版社(中国·武汉)

武昌喻家山 邮编:430074 电话:(027)81321915

录 排:华中科技大学惠友文印中心

印 刷:华中科技大学印刷厂

开 本:787mm×1092mm 1/16

印 张:11.5

字 数:280千字

版 次:2014年2月第1版第3次印刷

定 价:28.00元



华中出版

本书若有印装质量问题,请向出版社营销中心调换
全国免费服务热线:400-6679-118 竭诚为您服务
版权所有 侵权必究

全国高职高专医药院校药学及医学检验技术专业 工学结合“十二五”规划教材

编委会

丛书学术顾问 文历阳 沈 彬

委 员(按姓氏笔画排序)

- | | | | |
|---------|-------------|-----|------------|
| 王 杰 | 沈阳医学院 | 周建庆 | 安徽医学高等专科学校 |
| 王志亮 | 枣庄科技职业学院 | 赵立彦 | 铁岭卫生职业学院 |
| 甘晓玲 | 重庆医药高等专科学校 | 胡殿宇 | 郑州铁路职业技术学院 |
| 艾力·孜瓦 | 新疆维吾尔医学专科学校 | 侯振江 | 沧州医学高等专科学校 |
| 卢 杰 | 大庆医学高等专科学校 | 俞启平 | 江苏建康职业学院 |
| 边毓明 | 山西职工医学院 | 宣永华 | 滨州职业学院 |
| 吐尔洪·艾买尔 | 新疆维吾尔医学专科学校 | 姚腊初 | 益阳医学高等专科学校 |
| 刘 燕 | 山西职工医学院 | 秦 洁 | 邢台医学高等专科学校 |
| 刘福昌 | 宝鸡职业技术学院 | 秦自荣 | 鄂州职业大学医学院 |
| 李炳宪 | 鹤壁职业技术学院 | 夏金华 | 广州医学院从化学院 |
| 李惠芳 | 长治医学院 | 徐 宁 | 安庆医药高等专科学校 |
| 杨凤琼 | 广东岭南职业技术学院 | 凌伯勋 | 岳阳职业技术学院 |
| 杨家林 | 鄂州职业大学医学院 | 唐 虹 | 辽宁卫生职业技术学院 |
| 张 申 | 怀化医学高等专科学校 | 唐忠辉 | 漳州卫生职业学院 |
| 张 鑫 | 南方医科大学 | 黄 剑 | 海南医学院 |
| 张平平 | 山东万杰医学院 | 曹 杰 | 哈密职业技术学校 |
| 陆予云 | 广州医学院从化学院 | 章绍清 | 铜陵职业技术学院 |
| 陆曙梅 | 信阳职业技术学院 | 蒋 斌 | 合肥职业技术学院 |
| 陈少华 | 广州医学院护理学院 | 魏仲香 | 聊城职业技术学院 |
| 范珍明 | 益阳医学高等专科学校 | | |

总序

ZONGXU

高职高专药学及医学检验技术等专业是以贯彻执行国家教育、卫生工作方针,坚持以服务为宗旨、以就业为导向的原则,培养热爱祖国、拥护党的基本路线,德、智、体、美等全面发展,具有良好的职业素质和文化修养,面向医药卫生行业,从事药品调剂、药品生产及使用、药品检验、药品营销及医学检验等岗位的高素质技能型人才为人才培养目标的教育体系。教育部《关于推进高等职业教育改革创新,引领职业教育科学发展的若干意见》(教职成〔2011〕12号)明确提出要推动体制机制创新,深化校企合作、工学结合,进一步促进高等职业学校办出特色,全面提高高等职业教育质量,提升其服务经济社会发展能力。文件中的这项规划,为高职高专教育以及人才的培养指出了方向。

教材是教学的依托,在教学过程中和人才培养上具有举足轻重的作用,但是现有的各种高职高专药学及医学检验技术等专业的教材主要存在以下几种问题:①本科教材的压缩版,偏重于基础理论,实践性内容严重不足,不符合高等卫生职业教育的教学实际,极大影响了高职高专院校培养应用型人才目标的实现;②教材内容过于陈旧,缺乏创新,未能体现最新的教学理念;③教材内容与实践联系不够,缺乏职业特点;④教材内容与执业资格考试衔接不紧密,直接影响教育目标的实现;⑤教材版式设计呆板,无法引起学生学习兴趣。因此,新一轮教材建设迫在眉睫。

为了更好地适应高等卫生职业教育的教学发展和需求,体现国家对高等卫生职业教育的最新教学要求,突出高职高专教育的特色,华中科技大学出版社在认真、广泛调研的基础上,在教育部高职高专相关医学类专业教学指导委员会专家的指导下,组织了全国60多所设置有药学及医学检验技术等专业的高职高专医药院校近350位老师编写了这套以工作过程为导向的全国高职高专医药院校药学及医学检验技术专业工学结合“十二五”规划教材。教材编写过程中,全体主编和参编人员进行了认真的研讨和细致的分工,在教材编写体例和内容上均有所创新,各主编单位高度重视并有力配合教材编写工作,编辑和主审专家严谨和忘我的工作,确保了本套教材的编写质量。

本套教材充分体现新教学计划的特色,强调以就业为导向、以能力为本位、以岗位需求为标准的原则,按照技能型、服务型高素质劳动者的培养目标,坚持“五性”(思想性、科学性、先进性、启发性、适用性),强调“三基”(基本理论、基本知识、基本技能),力求符合高职高专学生的认知水平和心理特点,符合社会对高职高专药学及医学检验技术等专业人才的需求特点,适应岗位对相关专业人才知识、能力和素质的需要。本套教材的编写原则和主要特点如下。

(1) 严格按照新专业目录、新教学计划和新教学大纲的要求编写,教材内容的深度和广度严格控制在职教高专教学要求的范畴,具有鲜明的高职高专特色。

(2) 体现“工学结合”的人才培养模式和“基于工作过程”的课程模式。

(3) 符合高职高专医药院校药学及医学检验技术专业的教学实际,注重针对性、适用性以及实用性。

(4) 以“必需、够用”为原则,简化基础理论,侧重临床实践与应用。

(5) 基础课程注重联系后续课程的相关内容,专业课程注重满足执业资格标准和相关工作岗位需求。

(6) 探索案例式教学方法,倡导主动学习。

这套教材编写理念新,内容实用,符合教学实际,注重整体,重点突出,编排新颖,适合于高职高专医药院校药学及医学检验技术等专业的学生使用。这套规划教材得到了各院校的大力支持和高度关注,它将为新时期高等卫生职业教育的发展作出贡献。我们衷心希望这套教材能在相关课程的教学发挥积极的作用,并得到读者们的喜爱。我们也相信这套教材在使用过程中,通过教学实践的检验和实际问题的解决,能不断得到改进、完善。

全国高职高专医药院校药学及医学检验技术专业工学结合“十二五”规划教材
编写委员会

前言

QIANYAN

21 世纪是“生命科学的世纪”,而分子生物学又是生命科学中的领头学科。分子生物学理论与技术已在生命科学、医药学等领域里得到广泛的应用,也使临床医学对于疾病的实验室诊断发生了革命性变化。用分子生物学技术分析疾病基因、从分子水平分析疾病发生的原因、跟踪疾病发展过程、检测感染性病原体已成为很多实验室的常规工作。

为了适应这种快速发展的需要,根据《教育部关于全面提高高等职业教育教学质量的若干意见》文件精神,结合各院校多年的教学经验,围绕高职高专应以培养高等“应用型”人才为目标,以职业技能培养为根本,教材内容应满足学科、教学、社会三方面需要的原则,作者精心组织教材编写,力求有所创新和体现高职高专教材的特色。

(1) 先进性和规范性相统一。根据“职业人”的培养目标和职业岗位群对知识、能力结构的要求,注重用先进理念和行业规范来组织教材。把职业岗位所需知识和实践能力的培养融汇于教材之中,并贯穿始终。

(2) 理论知识和实践知识相统一。兼顾理论知识和实践知识,紧紧抓住职业技能培养这个目标,从技能应用角度来选编教材内容。既选编“必需、够用”的理论内容,又融入足够的实训内容,实现理实一体化,使学生能在操作型、管理型岗位上发挥才能。

(3) 传统性与时代性相统一。教材内容以介绍成熟技术为中心,同时根据对人才的要求、专业知识与时代的特点,介绍新技术、新设备和学科发展的趋势,使学生能够适应未来技术进步的需要。

(4) 文字力求简明、精练、通俗易懂、易于学生阅读。内容力求重点突出、概念清晰、深入浅出,使教材体现出较强的系统性、逻辑性、可读性和实用性。每章均附有学习目标,以帮助学生学习的。

教材分章编写,全书最后由张申统稿。在教材编写过程中,我们得到了华中科技大学出版社的帮助,得到了各参编院校的大力支持,怀化医学高等专科学校周太梅老师做了大量的文字校对工作,在此一并表示衷心感谢。

分子生物学检验技术是生命科学领域发展最为迅速的学科,有的内容尚未成熟,加之编者的水平有限,书中难免存在不妥之处,敬请同行专家、广大教师、学生和其他读者多提宝贵意见,以期改进与提高。

编者

目录

MULU

第一章 绪论	/1
第二章 分子生物学基础理论	/7
第一节 基因与基因组学	/7
第二节 蛋白质组学	/16
第三章 分子生物学实验基础知识	/25
第一节 分子生物学检验实验室的一般规则	/25
第二节 实验样品的制备	/32
第三节 玻璃仪器的洗涤及铬酸洗液的配制	/34
第四节 常用试剂的配制	/36
第四章 核酸的分离与纯化	/42
第一节 核酸分离与纯化的设计与原则	/42
第二节 基因组 DNA 的分离与纯化	/46
实验 4-1 基因组 DNA 的分离与纯化	/49
第三节 质粒 DNA 的提取与纯化	/51
实验 4-2 大肠杆菌质粒 DNA 的提取与纯化	/53
第四节 RNA 的分离与纯化	/55
实验 4-3 细胞总 RNA 的分离与纯化	/57
第五章 重组 DNA 技术	/61
第一节 工具酶	/61
实验 5-1 限制性核酸内切酶的酶切实验	/64
第二节 重组 DNA 常用载体	/65
第三节 重组 DNA 技术的基本步骤	/68
第四节 重组 DNA 技术的应用	/76
第六章 临床基因扩增检验技术	/81
第一节 聚合酶链式反应	/81
实验 6-1 PCR 扩增制备目的基因	/86
第二节 PCR 衍生技术	/88
实验 6-2 RT-PCR 检测 β -肌动蛋白 mRNA	/93
第三节 PCR 检测技术的临床应用	/95
实验 6-3 结核杆菌基因检测	/100



第七章 核酸分子杂交技术	/104
第一节 核酸分子杂交的基本原理与分类	/104
第二节 核酸探针	/109
第三节 常用核酸分子杂交技术	/116
实验 7-1 Southern 印迹转移	/119
实验 7-2 反向点杂交法对 β -地中海贫血的检测	/120
第八章 蛋白质分析技术	/126
第一节 蛋白质的分离与纯化	/126
第二节 Western 印迹技术	/133
实验 8-1 蛋白质的 Western 印迹分析	/137
第九章 生物芯片技术	/144
第一节 基因芯片(DNA 芯片)技术	/144
第二节 蛋白质芯片技术	/151
第十章 分子生物学检验实验室的质量管理及标准化	/156
第一节 分子生物学检验实验室质量管理	/156
第二节 分子生物学检验实验标准化	/158
附录	/167
主要参考文献	/176

第一章 绪 论

学 习 目 标

掌握:分子生物学检验技术的定义、任务和特点。

熟悉:分子生物学检验技术在实验诊断中的应用。

了解:分子生物学检验技术的发展和未来。

自 20 世纪 70 年代以来,分子生物学已成为生命科学领域最具活力的学科。随着生命科学的发展,分子生物学技术已渗透生命科学的各个研究领域,如分子生物学理论和技术方法不断地被应用于临床,在疾病的预防、预测、诊断、疗效的评价等诸方面发挥着越来越重要的作用。以往疾病的诊断,只能从某些现象的变化描述和归纳其规律;体液中各种化学物质(如蛋白质、酶、激素、脂类以及糖类)的含量变化作为疾病诊断的主要依据;如今,分子生物学技术作为 DNA 分析的有力手段和工具,广泛用于检测人体基因结构、表达、调控的变化。由于基因诊断是从疾病基因或与致病相关的基因及其表达产物的水平上进行检测,由此形成了现代医学检验领域一门新的学科——分子生物学检验技术。

一、分子生物学检验技术的性质、任务和特点

分子生物学检验技术是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、预测、诊断、治疗和转归提供信息和决策依据的一门学科。其基本原理是检测 DNA 或 RNA 的结构变化与否、量的多少及表达功能是否异常,以确定受检者有无基因水平的异常变化,并以此作为确认疾病的依据。

分子生物学检验技术的任务是利用遗传学、病理学、免疫学、生物化学、基因组学、蛋白质组学和分子生物学的理论和方法,探讨疾病发生和发展的分子机制;为整个疾病过程寻求特异的分子诊断指标;利用分子生物学技术为这些分子诊断指标建立临床实用的、可靠的检测方法。

分子生物学检验技术的特点是直接从 DNA/RNA 水平检测基因结构及其表达水平是否正常,从而对疾病作出诊断。与传统的实验诊断技术相比,分子生物学检验技术的优点有早期诊断、特异性强、针对性强、灵敏度高、适用性强。

首先,分子生物学检验技术可用于研究基因差异表达,对组织细胞各分化阶段特异性表达的基因进行检测;其次,分子生物学检验技术不仅可对某些疾病作出准确检测,还能对



疾病的易感性、发病类型和阶段、感染性疾病以及疾病抗药性作出判断;最后,分子生物学检验技术还可快速检测不易在体外培养(如艾滋病病毒、各种肝炎病毒等)和不能在实验室安全培养的病原体,并可采用 DNA 长度片段多态性分析,对病原体进行基因分型。因此,分子生物学检验技术已成为实验诊断学(或谓临床检验医学)的一个重要组成部分,是联系临床与基础学科的纽带。随着基因组时代的到来,分子生物学检验技术已成为医学院校检验专业一门重要的主干课程。

二、分子生物学检验技术在实验诊断中的应用

回顾分子生物学检验技术的发展历史,大致经历了 3 个阶段:①利用 DNA 分子杂交技术进行遗传病的基因诊断;②以 PCR 技术为基础的 DNA 诊断,特别是定量 PCR 和实时 PCR 的应用,不仅可以检测存在于宿主的多种 DNA 和 RNA 病原体载量,还可检测多基因遗传病细胞中 mRNA 的表达量;③以生物芯片技术为代表的高通量密集型检测技术,生物芯片技术包括基因芯片、蛋白质芯片、组织芯片等,具有样品处理能力强、用途广泛、自动化程度高等特点,因此,成为分子生物学检验技术领域的一大热点。

(一) 分子生物学检验技术在遗传性疾病诊断中的应用

以分子生物学为基础的基因诊断则是在 DNA 水平上对遗传疾病进行诊断,可揭示疾病的遗传本质,不但可鉴定表现症状的有害基因纯合个体,也可鉴定出没有异常表型的有害基因的携带者,尤其适于早期诊断。因而基因诊断与传统的遗传性疾病诊断方法相比具有更准确、更可靠和诊断时间更早的特点。

遗传性疾病的诊断方式,可分为直接检测和间接检测两种。①对致病基因的发病机理已研究得很明了,且遗传病症是由于一个或有限的几个已探明的基因突变造成,则可依据分子生物学技术设计检验方法,对突变位点直接进行检测,如 β 地中海贫血、囊性纤维变性等。②对致病基因尚一无所知或已知致病基因及其部分结构,由于致病基因产生的突变多样化,或由于致病基因属于微效多基因,尚未确定和测序,因而无法用直接方法诊断,这种情况下主要依靠基因外与之紧密连锁的酶的限制性片段长度多态性(restriction fragment length polymorphism, RFLP)和微卫星 DNA 序列(microsatellite DNA)进行间接分析。如 X 连锁脆性智力低下综合征、Huntington 病、Wilson 病、甲型血友病等。这些与致病基因相连锁的具有多态性的 DNA 序列被称为遗传标记。随着人们对某些遗传病的病理分子生物学了解的日益深刻,可以直接检测的遗传病种类也会日益增加。

(二) 分子生物学检验技术在感染性疾病诊断中的应用

感染性疾病的诊断长期以来多采用形态学、生物化学及血清学诊断方法,这些方法常存在灵敏性和特异性低及速度慢等不足之处,操作亦存在一定的局限性。近年来分子生物学检验技术已在几十种感染性疾病中开展应用。为感染性疾病的病原学和流行病学诊断提供了新的有力“武器”。

1. 病原体的分子鉴定与分类

如肺孢子菌的生物学鉴定与分类,长期存在较大分歧。过去倾向于将该病原体归为原虫,因而命名为卡氏肺孢子虫。Edman 等通过对肺孢子菌生物高度保守性的 16S rRNA 编码基因进行核苷酸序列分析与鉴定,发现肺孢子菌的核苷酸序列与酿酒酵母同源性较高。

此后亦有学者发现肺孢子菌基因及其编码的蛋白均与真菌非常接近,因而从分子水平完全支持肺孢子菌应归属于真菌的学说。

2. 感染性疾病的分子诊断

在临床病原菌的检测中,利用细菌、真菌 16S rRNA 基因的高度保守性特点,通过设计保守区引物,即所有细菌或真菌的共同引物,经聚合酶链反应(PCR)扩增即可判断细菌的存在与否。此外,分子诊断技术还可对感染性疾病的病原体进行定量分析。如乙型肝炎和丙型肝炎病毒载量的定量测定,能反映患者体内病毒复制情况,更好地指导临床治疗方案的制订。

3. 病原体耐药性的分子机制

分子生物学技术的发展促进了对各种药物耐药机制的研究。通过探针杂交、单链构型多态性(SSCP)分析、直接测序分析等方法,证实过氧化氢酶的编码基因(Kat G)的点突变、插入和缺失是造成异烟肼耐药的主要原因。这将为临床耐药结核杆菌快速筛查的研制及新型抗结核药物的研发提供理论依据。

4. 病原体基因分型

基因分型方法在分子流行病学调查、控制医院感染等方面具有重要意义。如通过基因分型来判定临床分离株与环境株基因型是否相同,以追踪传染源,明确传播途径及确定有无暴发流行。常用基因分型方法有限制性片段长度多态性分析、质粒图谱分析、基因指纹图谱分析、核糖体分型及基因序列分析等。利用分子生物学技术建立起来的病原体基因分型方法,逐步代替了传统的表型基础分型。

5. 核酸疫苗的研制

核酸疫苗在安全性、稳定性及免疫效果等方面均具有其他传统疫苗所无法比拟的优势,为预防和治疗感染性疾病开辟了一条新途径。迄今已制备 10 余种 DNA 疫苗,并经动物试验证实对病毒、细菌、寄生虫感染的预防和治疗均有良好的免疫效果,现已有 HIV、流感病毒、乙型肝炎病毒、疟疾等 DNA 疫苗进入临床试验。

病原体的分子生物学检验与传统的检验相比具有以下特点。①灵敏性、特异性高。特别是体外不易培养或要求条件苛刻的病原体,可不经培养而直接进行鉴定。②可检出某一种病原体的亚型,并有助于流行病学调查。可区别结构近似的或变异的菌/毒株。③可提供有关发病机制和预后的信息。如人乳头瘤病毒(HPV)的某些型与宫颈癌、阴茎癌等生殖系肿瘤的发病有关,鉴别这些株型和确定潜在性或活动性病毒感染具有提示预后的意义。④可检出抗感染治疗中的耐药菌株。应用病原菌耐药基因探针检测耐药菌,如耐苯唑青霉素的金黄色葡萄球菌。

(三) 分子生物学检验技术在肿瘤诊断中的应用

1. 肿瘤的基因诊断

人类基因组序列和高通量分子分析技术的发展,使人们能够从 DNA、RNA 和蛋白质水平上对肿瘤进行全面研究。基因芯片技术能在 mRNA 水平上同时检测几千个生物样本的基因,具有巨大的临床应用潜能。①基因突变检测。肿瘤细胞的基因突变性是肿瘤分子生物学的重要特征之一,在检测单碱基替代突变时,基因芯片优于传统测序法。②寻找新的肿瘤相关基因。DNA 芯片的应用使发现新基因的效率大大提高。③基因多态性检测。



肿瘤细胞的基因多态性是肿瘤分子生物学的另一重要特征,第3代遗传标志单核苷酸多态性(SNP)分析被认为在肿瘤的诊断及治疗方面极其重要。

肿瘤通常被认为是基因性疾病,其实也可认为是一种蛋白质组疾病。找到相关的蛋白质标记物,就有望实现肿瘤的早期诊断、早期治疗,并开发出靶向药物。肿瘤蛋白质组学是指对正常组织与疾病组织(从癌前病变到肿瘤)之间差异表达的蛋白质的鉴定和定量分析。

2. 肿瘤的基因治疗

在DNA(RNA)分子水平上对肿瘤的控制与治疗,即将外源性(目的)基因导入患者细胞后再输回体内,或将外源性基因直接注入体内,使靶细胞表达正常基因产物或产生生物活性物质,从而治疗肿瘤。

(1) 免疫基因治疗 即以癌基因产物作为肿瘤疫苗的基因治疗。包括细胞因子诱导的杀伤细胞(CIK)治疗、树突状细胞(DC)瘤苗、GVAX 瘤苗等。这些治疗主要强调通过提高人体的抗肿瘤免疫能力治疗肿瘤,这种抗肿瘤效应只针对肿瘤而不针对正常细胞,十分安全、有效。免疫基因治疗被称为肿瘤的第四大类治疗技术。

(2) 抑癌基因治疗 体内导入野生型抑癌基因,替代缺失或异常的抑癌基因表达,可以达到抑制肿瘤细胞增殖的效果。如视网膜母细胞瘤(RB)的发生与RB等位基因的失活与丢失有关。当RB基因产物不存在时,受RB基因调控的某些基因会持续或过度表达,使细胞恶性转化。将RB基因导入RB细胞,可减少其增殖,抑制肿瘤形成。

(3) 肿瘤药物基因治疗 即将基因治疗与肿瘤化疗药物结合起来,选择性地杀伤肿瘤细胞,增强化疗效果。按目的基因可分3类。①肿瘤药物敏感基因治疗。将药物敏感基因有选择地导入肿瘤细胞,从而将无毒的药物前体转变成细胞毒性药物,特异性地杀伤肿瘤细胞。②肿瘤药物耐受基因治疗。将多药耐药基因转入病人造血干细胞,使病人能耐受大剂量化疗,不出现骨髓抑制,从而可替代自身骨髓移植。③封闭肿瘤细胞耐药基因。用人工合成的反义寡核苷酸,封闭细胞的多药耐药基因,使肿瘤细胞恢复对化疗药物的敏感性。

三、分子生物学检验技术的发展与展望

随着基因克隆技术日趋成熟和基因测序工作逐步完善,后基因时代已经到来。20世纪末数理科学在生物学领域广泛渗透,在结构基因组学、功能基因组学和环境基因组学蓬勃发展的形势下,分子生物学检验技术将会取得突破性进展,使医学检验进入崭新的领域,为学科发展提供新的机遇。

(一) 分子生物学检验技术的发展

1. 分子生物传感器的应用

分子生物传感器是利用一定的生物或化学的固定技术,将生物识别元件(酶、抗体、抗原等)固定在换能器上,当待测物与生物识别元件发生特异性反应后,通过换能器将所产生的反应结果转变为可以输出、检测的电信号和光信号等,以此对待测物质进行定性和定量分析,从而达到检测分析的目的。分子生物传感器可广泛应用于体液中的微量蛋白、小分子有机物、核酸等多种物质的检测。在现代医学检验中,这些项目是临床诊断和病情分析的重要依据。

2. 分子生物芯片技术的应用

随着分子生物学的发展及人们对疾病过程认识程度的加深,传统的医学检验技术已不

能完全适应快速、准确、全面的要求。所谓的生物芯片是指将大量探针分子固定于支持物上,并与标记的样品杂交或反应,通过自动化仪器检测杂交或反应信号的强度来判断样品中靶分子的数量。生物芯片技术在医学临床检验领域显示出了强大的生命力,其中关键就是生物芯片具有微型化、集约化和标准化的特点,从而有可能实现“将整个实验室缩微到一片芯片上”的愿望。

3. 分子生物纳米技术的应用

生物活性物质的检测有很多种方法。其中,以抗体为基础的技术尤为重要。免疫分析加上磁性修饰已成功地用于各种生物活性物质和异生质(如药物和致癌物等)的检测。将特异性抗体或抗原固定到纳米磁球表面,并以酶、放射性核素、荧光染料或化学发光物质为基础所产生的检测技术与传统微量滴定板技术相比具有简单、快速和灵敏的特点。

4. 分子蛋白质组学的应用

疾病的蛋白质组学研究,主要是通过比较和分析正常与异常组织细胞、同一疾病不同发展时期细胞内整体蛋白质的表达差异,对差异表达的蛋白质进行鉴定、定量、表征,寻找与疾病相关的新标志物。恶性肿瘤是多因素综合作用涉及多基因的复杂疾病,对其机制的阐明较困难。而直接从生命功能的执行者——蛋白质入手,就能动态、整体、定量地考察肿瘤发生过程中蛋白质种类、数量的改变,从而有助于寻找到肿瘤诊断和预后的特异性标志物。

(二) 分子生物学检验技术的未来

分子生物学是一门正在蓬勃发展的新兴学科,并且新的技术和应用不断涌现。但真正适合医学检验常规应用的还不多。其主要原因是有的新方法还不十分成熟,方法相对较复杂,商品化的试剂盒和设备价格高昂。但随着研究的深入和大规模商业开发,今天技术复杂、价高的试验,明天就可能方法简化、价格降低,达到普遍应用的要求。

分子生物学检验技术的发展方向主要体现在:①检验内容从传统的 DNA 检测到表达产物(mRNA、蛋白质)的检测;②检验的策略从利用单一检测技术发展到多项检测技术的有机组合;③检验方法从定性和半定量检测发展到定量检测(荧光定量 PCR 技术);④检验范围从单基因疾病的诊断发展到多基因疾病的诊断;⑤检验应用从治疗性诊断发展到预测、预防性分析评价。

小 结

分子生物学检验技术是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、预测、诊断、治疗和转归提供信息和决策依据的一门学科。分子生物学检验技术的任务是利用分子生物学的理论和方法,探讨疾病发生和发展的分子机制;寻求特异的分子诊断指标;建立临床实用的、可靠的检测方法。分子生物学检验技术的特点是直接从 DNA/RNA 水平检测基因结构及其表达水平是否正常,具有早期诊断、特异性强、针对性强、灵敏度高、适用性强等特点。

分子生物学检验技术被广泛用于遗传性疾病、感染性疾病和肿瘤等疾病的诊断和治



疗。常用检测技术包括:核酸分子杂交、PCR 技术、核酸测序技术、生物芯片技术等。分子生物学检验技术的发展方向:①检验内容从传统的 DNA 检测发展到表达产物的检测;②检验的策略从利用单一检测技术发展到多项检测技术的有机组合;③检验方法从定性和半定量检测发展到定量检测;④检验范围从单基因疾病的诊断发展到多基因疾病的诊断;⑤检验应用从治疗性诊断发展到预测、预防性分析评价。

(怀化医学高等专科学校 张 申)

第二章 分子生物学基础理论

学习目标

掌握:基因和基因组的概念、真核生物基因组的特点、原核生物基因组的特点;蛋白质组、蛋白质组学。

熟悉:染色体、核小体的结构功能,蛋白质组学的研究内容。

了解:蛋白质组学研究在医学中的应用。

分子生物学检验技术是以核酸或蛋白质为分析原材料,通过对基因的结构、表达的变化和由此而导致的基因功能的改变的分析,为人类疾病的研究和诊断提供更准确、更科学的信息和依据。人类的基因结构与功能、基因表达与调控,基因结构和表达的改变与疾病的发生;当今严重影响人类健康的病原生物体的基因结构特征、感染人类的方式和与人宿主细胞基因发生整合以后引发疾病;线粒体基因突变导致多组织、多系统异常而发生的线粒体遗传病;癌基因与抑癌基因结构改变和表达异常及其他因素共同作用而导致的恶性肿瘤等,都是分子生物学检验技术在医学领域中得以广泛应用的理论前提。



第一节 基因与基因组学

一、概述

基因组(genome)是一个细胞或一种生物体的整套遗传物质。生物界中从简单的低等生物到复杂的高等动植物细胞,都有一套决定生物基本特征和功能的遗传信息,这些信息存在于细胞的核酸中。这些序列蕴含的遗传信息决定了生物体的生长发育及各种生命现象。

基因(gene)是具有特定遗传效应的 DNA 片段,是遗传功能的基本单位,即基因是能够表达基因产物的完整 DNA 片段。基因是基因组中一个功能性遗传单位,是储存有功能的蛋白质多肽链信息或 RNA 序列信息以及表达这些信息所必需的全部核苷酸序列。一个基因不仅要包含编码蛋白质多肽链的核酸序列或编码 RNA 的核酸序列,还应包含保证转录所必需的调控序列、非编码序列及插入序列。因此,基因的本质是核酸片段。



二、真核生物基因组

真核生物的基因组组成很大,并且不同生物种间差异也是很大的,分细胞核基因组与细胞质基因组。细胞核基因组是双份的遗传物质,即二倍体;细胞质基因组可有许多拷贝。真核细胞基因转录产物为单顺反子,一个结构基因经过转录生成一个 mRNA 分子,翻译生成一条多肽链。细胞核基因组存在重复序列,重复次数可达到百万次以上;大多为非编码序列,因此基因组中不编码的区域多于编码区域;大部分基因有内含子,因此,基因是不连续的。真核生物的基因组远远大于原核生物的基因组,具有许多复制起点,但每个复制子的长度比较小。

(一) 细胞核基因组特征

细胞核基因组的 DNA 与蛋白质结合形成染色体(chromosome)。除配子细胞外,体细胞有两个同源染色体,因此有两份同源的基因组。基因组 DNA 在形成染色体时发生了高度的压缩,其中核小体(nucleosome)的形成使 DNA 压缩 6~7 倍,从核小体到形成 30 nm 螺线管(solenoid)纤维又使 DNA 压缩了 6 倍,30 nm 螺线管纤维再缠绕在一个由某些非组蛋白构成的中心轴骨架上形成螺线管纤维环再一次使 DNA 压缩,最后从螺线管纤维环到包装形成染色体 DNA 达到压缩程度最高阶段,压缩在 200~240 倍。染色体的形成,DNA 总共被压缩了大约 8100 倍。这样高度的压缩才能使每个染色体中几厘米长的 DNA 分子被容纳到直径为数微米的细胞核中(图 2-1)。

1. 单顺反子结构

真核细胞结构基因为单顺反子(monocistron)。一个结构基因经过转录生成一个单顺反子 mRNA,翻译成一条多肽链,真核生物基本上没有操纵子结构。

2. 断裂基因

真核生物其编码序列是不连续的,一些具有编码功能的 DNA 序列被一些非编码 DNA 序列隔开,形成镶嵌排列的断裂形式,真核细胞基因组的大部分序列属于非编码区,不编码具有生物活性的蛋白质或多肽。编码区通常为结构基因,结构基因不仅在两侧有非编码区,而且在基因内部也有许多不编码蛋白质的间隔序列(intervening sequence),因此,真核细胞的基因大多由不连续的几个编码序列所组成,称之为断裂基因(split gene)(图 2-2)。

(1) 内含子和外显子 真核生物断裂基因中,编码序列被非编码序列所分隔。其中具有编码功能的 DNA 序列,称为外显子(exon,E)。它是基因中可表达为多肽的部分。两个外显子之间的非编码 DNA 序列,称为内含子(intron,I)。

真核生物断裂基因的外显子和内含子的接头区是高度保守的一致序列,称为外显子-内含子接头,即在每个内含子的 5' 端开始的两个核苷酸为 GT,3' 端末尾的两个核苷酸为 AG,这种接头方式称为“GT-AG 法则”。这两组碱基是真核细胞基因中普遍存在的,这种特殊的碱基序列是 hnRNA 剪切加工成为成熟的 mRNA 的信号。

(2) 间隔区 DNA 真核生物基因之间存在编码空白区或转录空白区,称之为间隔区。这些序列往往在单拷贝的结构基因之侧翼,并使结构基因彼此分开。间隔区 DNA(spacer DNA)也可以存在于 rDNA 区。间隔区 DNA 大小与基因组的大小有关,一般来说,基因组越大,间隔区 DNA 所占的比例也越高。