



“十二五”普通高等教育本科国家级规划教材



国家卫生和计划生育委员会“十二五”规划教材
全国高等医药教材建设研究会“十二五”规划教材

全国高等学校教材

供医学检验技术专业用

临床分子生物学检验技术



主 编 吕建新
王 晓 春

副主编 周 钦
黄 彬
钱 晖



 人民卫生出版社
PEOPLE'S MEDICAL PUBLISHING HOUSE



“十二五”普通高等教育本科国家级规划教材



国家卫生和计划生育委员会“十二五”规划教材
全国高等医药教材建设研究会“十二五”规划教材

全国高等学校教材
供医学检验技术专业用

临床分子生物学检验技术

主 编 吕建新 王晓春

副主编 周 钦 黄 彬 钱 晖

编 者 (以姓氏笔画为序)

王晓春 (中南大学湘雅医学院)

吕建新 (温州医科大学)

刘湘帆 (上海交通大学医学院)

李 伟 (温州医科大学)

陈昌杰 (蚌埠医学院)

罗 萍 (成都中医药大学)

周 钦 (重庆医科大学)

郑 芳 (天津医科大学)

赵春艳 (大连医科大学)

赵晓涛 (北京大学医学部)

姚群峰 (湖北中医药大学)

钱 晖 (江苏大学医学院)

徐 建 (南京医科大学)

唐冬生 (佛山科学技术学院医学院)

黄 海 (贵阳医学院)

黄 彬 (中山大学中山医学院)

黄迪南 (广东医学院)

曹颖平 (福建医科大学)

常晓彤 (河北北方学院)

秘 书 金 晶 (温州医科大学)

人民卫生出版社

图书在版编目(CIP)数据

临床分子生物学检验技术 / 吕建新, 王晓春主编. —北京: 人民卫生出版社, 2015

全国高等学校医学检验专业第六轮暨医学检验技术专业第一轮规划教材

ISBN 978-7-117-20237-4

I. ①临… II. ①吕…②王… III. ①分子生物学—医学检验—医学院校—教材 IV. ①R446

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2015)第 017801 号

人卫社官网	www.pmph.com	出版物查询, 在线购书
人卫医学网	www.ipmph.com	医学考试辅导, 医学数据库服务, 医学教育资源, 大众健康资讯

版权所有, 侵权必究!

临床分子生物学检验技术

主 编: 吕建新 王晓春

出版发行: 人民卫生出版社(中继线 010-59780011)

地 址: 北京市朝阳区潘家园南里 19 号

邮 编: 100021

E - mail: pmph@pmph.com

购书热线: 010-59787592 010-59787584 010-65264830

印 刷: 北京中新伟业印刷有限公司

经 销: 新华书店

开 本: 850×1168 1/16 印张: 18

字 数: 483 千字

版 次: 2015 年 3 月第 1 版 2015 年 3 月第 1 版第 1 次印刷

标准书号: ISBN 978-7-117-20237-4/R · 20238

定 价: 48.00 元

打击盗版举报电话: 010-59787491 E-mail: WQ@pmph.com

(凡属印装质量问题请与本社市场营销中心联系退换)

全国高等学校医学检验专业第六轮暨医学检验技术专业第一轮 规划教材 修订说明

我国高等医学检验教育始于 20 世纪 80 年代中期,经过近 30 年的发展,至今已有上百所院校开设了医学检验普通本科及高职本科专业。全国高等学校医学检验专业原卫生部规划教材自 1989 年首次出版以来,经过五轮教材的修订和 25 年全国广大院校实际教学的使用,对医学检验教育各个亚学科体系逐渐形成和发展起到积极的促进作用,极大地推动了我国高等医学检验教育的发展。

2012 年,教育部颁布了新的《普通高等学校本科专业目录》,原有的五年制医学检验专业(归属临床医学与医学技术类,授予医学学士学位),统一调整为四年制医学检验技术专业(归属新单独设立的医学技术类,授予理学学士学位)。因此,医学检验专业的学科内涵发生了根本的转变,在培养过程中更加注重技术属性。

为了顺应医学教育综合改革的发展趋势,推动我国医学检验技术专业的发展和学科建设,针对四年制医学检验技术专业人才的培养目标和培养模式,贯彻四年制教育思想,体现适合四年制教学需求的课程体系建设,教育部高等学校教学指导委员会医学技术类专业教学指导委员会、全国高等医学院校医学检验专业校际协作理事会、全国高等医药教材建设研究会、人民卫生出版社在全国广泛调研的基础上,共同决定成立全国高等学校医学检验技术专业教学教材建设指导委员会,并根据教育部确定的四年制医学检验技术专业教学标准,启动全国高等学校医学检验专业第六轮暨医学检验技术专业第一轮规划教材的编写修订工作。

本轮教材的修订和编写特点如下:

1. 创新教材体系,促进学科发展 本套教材兼具医学检验专业第六轮教材修订与医学检验技术专业首轮教材编写的双重任务,成为切实推进医学检验高等教育学科发展方向、体现四年制课程体系与教学方法的改革成果、着力培养医学检验技术类人才的重要抓手与载体。教材的创新建设,在满足当前教学需求的同时,承担起推动整个学科发展的重要作用。

2. 明确培养目标,突出专业特色 为适应新一轮教育改革、国家经济发展和社会需要,医学检验技术专业的培养目标是旨在培养品德高尚、基础扎实、技能熟练、素质全面的德、智、体、美全面发展的应用型医学检验专门人才。因此,针对新的培养目标,本套教材的编写充分借鉴了国内外精品教材按检测项目、检测技术为主线的编写模式,充分体现本专业基本理论、基本知识和基本技能,在不遗漏重要知识点的基础上,摒弃既往教材编写中求多求全的痼疾,突出“医学检验技术专业”的学科特色。同时,通过创新编写模式与优化内容编排,加强对学生自主学习与创新能力、解决问题能力的培养。

3. 坚持编写原则, 确保教材质量 在整套教材编写的过程中, 始终坚持本科教材“三基、五性、三特定”的编写原则, 始终坚持科学整合课程、淡化学科意识、实现整体优化、注重系统科学、保证点面结合的编写理念, 以确保教材编写质量。同时, 为配合学制改革与学时压缩, 进一步精简教材字数, 突出重点, 强调理论与实际相结合。

4. 优化编写团队, 树立精品意识 技术类专业人才的培养, 既需要学校教师的理论讲授, 又需要临床一线专家的实践经验。因此, 本套教材在编写队伍的组建上, 不但从全国各高等院校遴选具有长期从事医学检验教学的一线教师, 同时还注意吸收医院检验科具有实践经验的临床专家参与编写, 在确保教材理论概念清晰的同时, 使内容更加贴近临床检验实践。

5. 完善配套教材, 提升数字出版 为满足教学资源的多样化, 实现教材系列化、立体化建设, 本轮理论教材均配有丰富的网络增值服务及配套的学习指导与习题集, 大部分核心课程还配有相应的实践指导, 方便教师教学与学生自主学习。

6. 加强版式设计, 提升阅读兴趣 本套教材通过设置丰富多样的编写模块, 大开本、双色排版方式, 以及便于记录随堂笔记的页边空白等, 在方便教学的同时提高学习效率、提升阅读体验。尤其是理论教材中的章前问题、章后小结, 实践指导中的自主创新性试验, 学习指导与习题集中的学习目标等, 将各专业知识融会贯通。

本套医学检验技术专业教材共有 10 种理论教材和 17 种配套教材。为满足教学需求, 本次将寄生虫学相关的检验技术并入《临床基础检验学技术》, 并增加《临床医学概要》。本套教材均为“十二五”普通高等教育本科国家级规划教材、国家卫生和计划生育委员会“十二五”规划教材, 并将于 2015 年春季陆续出版发行。希望全国广大院校在使用过程中能够多提供宝贵意见, 反馈使用信息, 以逐步修改和完善教材内容, 提高教材质量。

全国高等学校医学检验专业第六轮暨医学检验技术专业第一轮 规划教材 目录

理论教材目录

序号	书名	主编	副主编
1	临床生物化学检验技术	尹一兵 倪培华	刘新光 陈筱菲 徐克前 左云飞
2	临床微生物学检验技术	刘运德 楼永良	王 辉 孙自镛 吴爱武
3	临床免疫学检验技术	李金明 刘 辉	邵启祥 王 辉 吴俊英
4	临床血液学检验技术	夏 薇 陈婷梅	王霄霞 岳保红 覃 西
5	临床分子生物学检验技术	吕建新 王晓春	周 钦 黄 彬 钱 晖
6	临床基础检验学技术	许文荣 林东红	李 山 郑 磊 丁 磊
7	临床输血学检验技术	胡丽华	王学锋 阎 石
8	临床检验仪器与技术	樊绮诗 钱士匀	贺志安 郑峻松 郑 芳 姜晓峰
9	临床实验室管理	杨 惠 王成彬	潘世扬 李 艳 张莉萍
10	临床医学概要	陈尔真 刘成玉	府伟灵 李 艳

实验指导目录

序号	书名	主编	副主编
1	临床生物化学检验技术实验指导	倪培华	赵云冬 梅传忠
2	临床微生物学检验技术实验指导	楼永良	邵世和 张玉妥
3	临床免疫学检验技术实验指导	刘 辉	
4	临床血液学检验技术实验指导	陈婷梅	
5	临床分子生物学检验技术实验指导	王晓春	赵春艳 王志刚
6	临床基础检验学技术实验指导	林东红	刘成玉 吴晓蔓
7	临床输血学检验技术实验指导	胡丽华	

学习指导与习题集目录

序号	书名	主编	副主编
1	临床生物化学检验技术学习指导与习题集	陈筱菲	
2	临床微生物学检验技术学习指导与习题集	吴爱武	罗 红
3	临床免疫学检验技术学习指导与习题集	王 辉	
4	临床血液学检验技术学习指导与习题集	王霄霞	
5	临床分子生物学检验技术学习指导与习题集	钱 晖	郑 芳
6	临床基础检验学技术学习指导与习题集	丁 磊	
7	临床输血学检验技术学习指导与习题集	张循善	
8	临床检验仪器与技术学习指导与习题集	郑 芳	
9	临床实验室管理学习指导与习题集	王成彬	杨 惠 李 艳
10	临床医学概要学习指导与习题集	刘成玉	

第一届全国高等学校医学检验技术专业 教学教材建设指导委员会

主任委员

樊绮诗 尹一兵

副主任委员

吕建新 刘运德 许文荣 杜 贤

委 员 (以姓氏笔画为序)

王 辉(女) 王 辉 王兰兰 王晓春 毕胜利
刘 辉 刘新光 李 山 李 艳 李 燕 杨 晋
杨红英 杨国珍 吴俊英 张 展 张进顺 林东红
郑 磊 郑峻松 胡丽华 姜 悦 姜晓峰 钱士匀
郭晓临 康熙雄 续 薇 谢鑫友 潘世扬 魏 军

秘 书

倪培华 陈婷梅 邬 洁

分子生物学技术的迅速发展,有力地助推着临床医学向预测医学(predictive medicine)、预防医学(preventive medicine)、个性化医学(personalized medicine)和参与医学(participated medicine)为特征的现代医学发展,使临床医学对于疾病检验诊断的理念与方法发生了革命性变化。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、检测感染人类的病原生物以及根据基因多态性分析进行疾病的风险预测、个性化用药的有效性与安全性评价等已经不再是陌生的事情。为适应这种快速发展的需要,原国家卫生部医学检验专业教材编审委员会于2001年组织医学院校编写第1版《分子生物学检验技术》,作为医学检验专业的规划教材,并于2007年修订出版第2版《分子生物学检验技术》,2012年2月修订出版第3版教材并更名为《临床分子生物学检验》。

第2版《分子生物学检验技术》教材,引入了第1版教材出版以来分子生物学检验技术的新发展,更加注重对分子生物学检验技术的基础理论和基础知识的介绍。第2版教材使用5年中,深受广大师生的好评。但由于分子生物学新技术不断涌现,知识更新极其迅速,分子生物学技术在医学实验室的应用日益广泛和深入,因此迫切需要对第2版教材进行再次修订。为使医学检验专业整套教材名称统一,《分子生物学检验技术》教材从第3版起更名为《临床分子生物学检验》。

第3版教材修订后,教材由原来的十一章扩展到十七章,其结构更合理、内容更系统、重点更突出,与临床更加贴近。第一章“核酸与分子标志物”是在原第二章“基因组与基因组学”的基础上增加了核酸分子标志物等内容;第三章“核酸扩增技术”在原第九章“聚合酶链反应及相关技术”的基础上增加了临床基因扩增检验的质量管理等新内容;第六章“蛋白质组学技术”在原第三章“蛋白质组与蛋白质组学”的基础上取舍精练了内容,并着重介绍了其相关技术;将“核酸序列分析”、“生物信息技术”、“药物相关基因检测”的内容分别独立成章。将原第十一章“分子生物学检验技术的临床应用”拆分扩展为“病毒感染的分子生物学检验”、“细菌感染的分子生物学检验”、“真菌与其他病原体的分子生物学检验”等。由于本次教材修订中增编了配套的实验教材,因此将原第五章“核酸的分离与纯化”、第六章“DNA重组技术”及第七章“克隆基因表达及基因干扰”等移入实验教材。

2012年国家教育部颁发了新的《普通高等学校本科专业目录》,将医学检验专业更名为医学检验技术专业,归入医学技术类专业,学制统一为四年制,授予理学学士学位。这对医学检验技术专业人才培养又提出了新的要求。为适应四年制医学检验技术专业教学,全国高等医药教材建设研究会、人民卫生出版社率先成立全国高等学校医学检验技术专业教学教材建设指导委员会,组织编写医学检验技术专业第一轮规划教材,《临床分子生物学检验技术》系本套规划教材中的一本。本教材在第3版《临床分子生物学检验》教材的基础上,力求在注重基础理论和基础知识的同时注重技术的临床应用及临床价值,使学生在学习中培养更丰富、更准确、更可信的检验服务临床的意识与能力,了解新技术进展和技术应用,为以后进一步的研究和发展打好基础。

参加本教材编写的 19 名教授, 来自全国 18 所高等院校, 他们均活跃在教学和临床工作一线, 他们以高度的责任感完成了所承担的编写任务。本教材在编写过程中得到国家卫生和计划生育委员会教材办公室、温州医科大学、江苏大学的大力支持, 在此一并表示感谢; 温州医科大学检验医学院金晶副教授担任本教材编写委员会秘书, 为本教材的整理和完稿做了大量的工作; 温州医科大学检验医学院研究生杜璟、张涛、马胤、潘飞燕、孙大燕、陈肖皖、何甜甜、高维、包云、毛婷婷、叶致含等为本教材绘制插图和(或)校稿, 在此一并致谢。

尽管各位编委尽了最大的努力, 但限于水平有限、编写时间紧迫, 书中难免存在疏漏和不足, 敬请各位同行专家和使用本教材的师生以及其他所有读者批评指正。

吕建新 王晓春

2015 年 1 月

目 录

第一章 绪论	1
第二章 临床分子生物学检验标志物	9
第三章 临床标本处理与分离纯化技术	27
第四章 核酸杂交技术	36
第五章 核酸体外扩增及定性检测技术	57
第六章 核酸实时定量检测技术	73
第七章 核酸序列分析	84
第八章 蛋白质组学技术	99
第九章 分子生物学检验新技术	113
第十章 病毒病的分子生物学检验	121
第十一章 细菌感染性疾病的分子生物学检验	138
第十二章 真菌及其他感染性疾病的分子生物学检验	151
第十三章 单基因遗传病的分子生物学检验技术	162
第十四章 染色体病的分子生物学检验技术	183
第十五章 线粒体病的分子生物学检验技术	199
第十六章 肿瘤的分子生物学检验技术	216
第十七章 药物代谢与毒副作用相关基因的分子生物学检验技术	238
第十八章 移植配型及个体识别的分子生物学检验	246
第十九章 胚胎植入前分子生物学检验技术	254
第二十章 临床分子生物学检验质量控制	260
参考文献	272
中英文名词对照索引	274

第一章

绪论

第一节 临床分子生物学检验技术的发展

一、从分子生物学到临床分子生物学检验

二、临床分子生物学检验技术的发展

第二节 临床分子生物学检验技术应用

一、病原生物基因组

1. 菌种鉴定
2. 确定病毒感染和病毒载量
3. 病毒分析
4. 细菌耐药监测和分子流行病学调查

二、基因变异

1. 致病基因的分子缺陷
2. 线粒体基因突变
3. 肿瘤相关基因
4. DNA 重排形成融合基因

三、基因多态性

1. 基因定位和遗传病相关性分析

2. 药物代谢酶与血药浓度

3. 疾病诊断和遗传咨询

4. 多基因病的研究

5. 器官移植配型和个体识别

四、循环游离核酸

1. 循环游离核酸与肿瘤

2. 游离核酸与产前诊断

3. 循环 microRNA 与肿瘤诊断

第三节 临床分子生物学检验发展与应用

一、临床分子生物学检验与感染性疾病诊断与治疗

二、遗传性疾病的临床分子生物学检验

三、肿瘤的临床分子生物学检验

四、临床分子生物学检验与个体化医学

第一节 临床分子生物学检验技术的发展

20 世纪 50 年代, Watson 和 Crick 提出了 DNA 双螺旋结构, 开创了现代分子生物学学科, 为揭开人类生命现象的本质和疾病机制奠定了基础。目前, 分子生物学成为生命科学中发展最快的领域, 特别是其与诸多的学科正在进行愈来愈广泛的交叉, 因而分子生物学已成为主导 21 世纪生命科学的前沿学科。分子生物学以探索生命现象本质为目的, 以研究生物分子(biomolecule)的结构与功能为对象, 以基因组、转录组、蛋白质组、代谢组等组学为路径。特别是 21 世纪以来, 以分子克隆、基因扩增、基因测序、基因敲除、印迹杂交、生物芯片、双向电泳等为代表的分子生物学技术的迅速发展, 为破解生命奥秘、探究疾病现象等奠定了扎实的基础。

一、从分子生物学到临床分子生物学检验

分子生物学理论与技术与临床医学各个学科领域交叉、渗透、融合, 逐渐形成了从分子水平研究解决临床诊断与治疗问题。特别是进入 21 世纪后的短短十几年来, 无论是疾病发生发展机制的阐明、患病风险的预测与评价, 还是疾病的早期诊断和个体化医疗的开展, 都愈来愈依靠和依赖分子生物学。分子生物学已成为推动临床医学向着以预测医学

(predictive medicine)、预防医学(preventive medicine)、个体化医学(personalized medicine)和参与医学(participant medicine)等为特征的现代医学发展的重要推手。临床分子生物学(clinical molecular biology)由此被赋予了丰富的和特定的内涵。

临床分子生物学检验是临床分子生物学的重要组成部分,分子生物学技术应用于临床医学检验与诊断的实践,使临床医学检验技术从细胞形态学水平、代谢与酶学水平、免疫血清学水平发展到基因分子水平,并有力地推动临床医学检验从以疾病为中心向以健康为中心转化、以标本为中心向以患者为中心转化、以数据为中心向以信息的临床为中心转化发展。

临床分子生物学检验技术的主要任务是寻找分子生物学检验标志物(biomarker),建立分子生物学检验标志物的检验技术与方法(项目),并进行方法学评价和临床意义评价,开展分子生物学检验技术的质量控制和质量管埋。分子生物学检验标志物在疾病发生发展过程中、在疾病预防干预过程中、在疾病治疗过程中的变化趋势、变化规律、变化范围等存在诸多的复杂性,如微量级水平、多态性分布、时相性表达、多元化调控等。临床分子生物学检验技术只有以追求高灵敏度、高特异性、高通量化、高自动化来适应和满足分子生物学标志物的检验。

二、临床分子生物学检验技术的发展

临床分子生物学检验技术的发展大致经历了四个阶段。

1976年,著名的美籍华裔科学家简悦威(Yuet Wai Kan)等人首先应用液相DNA分子杂交(molecular hybridization)技术,成功地进行了 α -地中海贫血的产前诊断,开创了临床分子生物学检验的先河。这一阶段主要以导致遗传病的基因突变位点为靶标,以DNA分子杂交为核心技术。由于已知的遗传病致病突变位点了解不多以及方法的灵敏度等问题,无论是实验室研究还是临床应用均受到很大的限制。

1985年,聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)技术的创建,可以在普通实验室条件下大量扩增靶DNA序列,由此突破了在以往科学研究和检验诊断中难以获得大量的靶DNA片段之瓶颈。PCR技术成为临床分子生物学检验第二阶段的核心技术,并以PCR技术为基础,衍生出了许多检测技术和方法,其中比较成熟的技术方法有:PCR-限制性核酸内切酶片段长度多态性分析(PCR-RFLP),是检测与特定的限制性核酸内切酶酶切位点相关突变的简便方法;等位基因特异性PCR,可针对等位基因设计特异性引物,根据PCR产物鉴定基因型;PCR-单链构象多态性技术(PCR-SSCP),可以揭示PCR产物序列内的多态性位点等。特别是1996年定量PCR(quantitative PCR, Q-PCR)技术的出现,通过实时定量PCR(real-time quantitative PCR)可对细胞中或循环体液中的DNA和RNA的拷贝数(即模板数)进行定量测定,不仅为研究基因转录作用及转录调控提供了有效的方法,而且为检测宿主细胞内病毒DNA或RNA的载量以评价其复制状态或药物作用效果提供了方法,也为产前基因诊断提供了有效的无创方法。PCR技术由于其特异性高、灵敏度高、操作简便快捷、适用性强等特点,在临床分子生物学检验中得到极为广泛的应用。

临床分子生物学检验发展的第三个阶段的核心技术是以生物芯片(biochip)技术为代表的高通量密集型技术。根据芯片上固定的探针不同,生物芯片可以分为基因芯片、蛋白质芯片、组织芯片等。传统核酸分子杂交,如Southern blot、Northern blot、反向点杂交(RDB)等技术均存在技术复杂、自动化程度低、检测目的分子数量少、通量低等不足,而生物芯片技术是将极其大量的探针同时固定和支持物上,所以一次可以对大量的生物分子进行检测分析;而且通过设计不同的探针阵列、使用特定的分析方法可使该技术具有多种不同的应用价值,如基因表达谱测定、突变检测、多态性分析、基因组文库作图及杂交测序。生物芯

片技术是 20 世纪 90 年代中期以来影响最深远的重大科技进展之一,它在工作原理和样品结果处理过程方面突破了传统的检测方法,具有样品处理能力强、用途广泛、自动化程度高等特点,具有广阔的应用前景和商业价值。2011 年,我国国家食品药品监督管理局批准英国的一款微阵列芯片检测仪和美国的一款微阵列基因芯片分析系统可用于临床实验室,标志着检验科利用芯片技术开展分子生物学检验的新时代的到来。

日趋成熟的 DNA 测序(DNA sequencing)技术和生物质谱(mass spectrometry)技术是临床分子生物学检验发展到第四阶段的核心技术。

DNA 序列测定可以为临床疾病的分子诊断提供最精确的判定依据,已成为临床分子生物学检验的基本技术之一。第一代测序技术以双脱氧核苷酸末端终止法为主要工作原理,其测序速度慢、有效测序片段短、全基因组测序费用高。因此,第一代测序技术比较适合于测定单个基因序列和较短的 DNA 序列。以焦磷酸测序、合成测序和芯片测序三大技术平台为主要代表的第二代测序技术,使 DNA 测序进入了高通量、大规模、低成本的时代,为测序技术广泛用于临床奠定了基础。2014 年 6 月,我国国家食品药品监督管理局批准两款国产二代测序仪,意味着二代测序技术将应用于分子生物学检验。近年来,新一代测序技术——单分子实时测序技术,可使测序的速度更快、测序的成本更低,有望实现 1000 美元甚至更低的价格完成人类个体的全基因组 DNA 的序列测定,到那时基于临床分子生物学检验技术的个体化医学将成为现实。

生物质谱技术则以被测对象的分子量和所带电荷数为基础进行定性和定量分析,具有高分辨率和高灵敏度,可快速、准确地检测微量核酸、蛋白质以及代谢产物,而且可以动态分析变化过程,通过与气相色谱联用(GC-MS)或与液相色谱联用(LC-MS)或质谱串联(MS-MS)进一步提高分辨率和灵敏度,因此其在临床分子生物学检验中具有广阔的前景。

第二节 临床分子生物学检验技术应用

从广义上来讲,应用到临床的分子生物学检验标志物包括基因组 DNA、各种 RNA、蛋白质和各种代谢产物,但目前临床分子生物学检验的标志物主要以核酸(DNA 或 RNA)为主。

以 DNA 为靶标的临床分子生物学检验,主要包括:个体基因组特征性 DNA 片段(如病原菌 DNA、致病基因和疾病相关基因位点、DNA 指纹等)的鉴定,基因(组)拷贝数的测定,基因组 DNA 多态性位点的检验分析,基因组 DNA 突变的检验分析,基因组 DNA 中基因表达的各种调控元件(启动子、沉默子、增强子)的检验分析,基因组 DNA 微小缺失的检验分析,基因组 DNA 甲基化程度的检验分析,线粒体基因组 DNA 拷贝数测定与突变的检验分析,外周血游离循环 DNA 的检测等。

以 RNA 为靶标的临床分子生物学检验技术,主要包括:RNA 病毒基因组序列测定及其拷贝数测定,基因转录产物 mRNA 水平的检测、疾病相关的各种微小 RNA(microRNA, miR)的检验分析,长片段非编码 RNA 的检测(long non-coding RNA, lncRNA),外周血游离循环 RNA 的检测等。

蛋白质分子标志物的检测主要包括:癌胚抗原 CEA、胰 CA19-9、CA724、CA153、CA125 等 CA 系列的检测,白蛋白、 α_1 -球蛋白、 α_2 -球蛋白、 β 球蛋白和 γ 球蛋白等血浆蛋白的测定,病原体感染后抗体谱(如肺炎支原体 IgM 测定、肺炎衣原体 IgM 测定、合胞病毒 IgM 抗体测定、腺病毒抗体 IgM 测定、流感病毒抗体 IgM 测定、副流感病毒抗体 IgM 测定、细胞毒素相关蛋白 CagA、空泡毒素相关蛋白 VacA、尿素酶 Ure、热休克蛋白 Hsp60、硝基还原酶 RdxA)的检测等。目前,蛋白质靶标检测主要以免疫学方法为主,但是随着蛋白质组技术

和新型检测技术的发展,如纳米生物传感器和蛋白质芯片技术等,分子生物学技术将在蛋白质靶标发现和检测中发挥重要的作用。

以代谢物为靶标的临床分子生物学检验,主要包括诸如脂肪酸代谢、氨基酸代谢、有机酸代谢等“第二代”新生儿先天性/遗传性疾病的筛查,细胞色素 CYP 等药物代谢酶的检验分析等。

基因组 DNA、RNA、蛋白质、代谢物等都可以作为临床分子生物学检验的靶标,尽管各种类型的靶标各有特色,但是基因组 DNA 靶标更具有优点,其不仅位于基因信息链的最上游,在大多情况下可以决定其下游 RNA、蛋白质、代谢物等变化,而且其在体内最为稳定、最容易反映个体的早期变化。因此,基因组 DNA 靶标是目前临床分子生物学检验最常用的分子靶标。

一、病原生物基因组

1. 菌种鉴定 用 PCR 产物直接测序和 PCR-DNA 探针杂交等技术可以快速和准确地用于结核杆菌菌种的鉴定。与传统的培养法相比,可大大缩短检测所需的时间,更加符合临床及时救治病人的需要。

2. 确定病毒感染和病毒载量 荧光定量 PCR、支链 DNA 和核酸序列依赖扩增等技术可以对病毒感染病人血清中的病毒种类和载量进行测定,是明确感染源、判断病情及传染性、监测临床疗效的客观和有效指标。

3. 病毒分析 病毒基因组的变异常引起病毒生物学性状的改变,从而导致感染机制的变化和血清学检测指标的改变。不同的病毒基因型可产生不同的临床症状和预后,基因变异使病毒产生变异株,从而在临床用药时产生耐药性。因此病毒基因和变异株的检测是当前预防和治疗病毒感染(包括乙型肝炎病毒)的重要环节。

4. 细菌耐药监测和分子流行病学调查 抗生素的大量使用使菌群失调,机体微生态的平衡遭到破坏。用随机扩增多态性 DNA、核酸序列依赖扩增等技术进行耐药基因的分型和同源性分析对选择治疗方案、控制病原菌的感染传播和暴发流行有指导价值。分子生物学技术还可用于追踪和控制传染源及可能的传播途径,确定病人反复感染是源于复发还是再感染等。

二、基因变异

1. 致病基因的分子缺陷 单基因病致病基因的检测是诊断这类遗传性疾病最可靠的实验手段。用 DNA 印记技术、PCR 或其相关技术、突变检测技术、基因表达产物量分析等技术可以确定疾病的分子缺陷,达到明确诊断疾病的目的。比如 F VIII 基因中检测到 22 号内含子倒位可以诊断血友病 A; DMD 基因中检测到外显子缺失可以诊断 DMD 和 BMD; 珠蛋白基因突变可以诊断珠蛋白合成障碍性贫血等。基因水平的检测和分析已是目前诊断这类疾病的常规技术。

2. 线粒体基因突变 由于 mtDNA 点突变是线粒体遗传病最主要的分子机制,因此用 PCR 技术和突变检测技术对相应线粒体基因作突变检测和筛查是寻找 mtDNA 点突变的有效手段,对于诊断线粒体遗传缺陷及功能障碍有重要价值。如肌阵挛性癫痫和破碎红纤维病伴有线粒体 tRNA^{Lys} 基因突变(A8344G),用突变检测技术检测此突变可以明确诊断。线粒体基因突变还是糖尿病等疾病重要的分子缺陷,因此线粒体基因分析也是研究糖尿病的重要内容。

3. 肿瘤相关基因 虽然肿瘤的诊断主要依靠病人的病史、体征、生物物理学和病理学等检查,但分子生物学技术已经广泛地用于肿瘤相关基因的研究,包括基因结构的改变、癌

基因激活和抑癌基因失活的机制、信号传导通路中相关分子的变化等。这些研究使我们从基因层面更深入地理解肿瘤的发生机制、了解肿瘤浸润、转移与基因改变的关系,也成为寻找肿瘤治疗靶点的突破口。

4. DNA 重排形成融合基因 白血病发生的分子机制之一是染色体发生断裂、易位,使基因发生重排而形成融合基因,因此融合基因成为白血病的分子标志。病人外周血中融合基因的检测已经成为确定白血病类型和判断病情的有效指标,尤其是对治疗后病人血液中残留的融合基因(微小残留)做定量分析,更有助于评估治疗方案的有效性和估计病情预后。

三、基因多态性

基因多态性分析是基因组研究的重要手段,数年前完成的举世瞩目的人类基因组计划即是用分析遗传标志的多态性作为研究的主要手段。

1. 基因定位和遗传病相关性分析 通过分析遗传标志的多态性,说明遗传标志和易感基因之间存在连锁关系,从而将致病基因定位于染色体的特定区域。分析遗传标志的多态性还可以推测所研究的遗传标志和某个遗传病易感位点之间的因果关系,也即遗传标志与疾病的关联程度。

2. 药物代谢酶与血药浓度 药物代谢速度与血药浓度密切相关,在不同种族人群中、在同一种族不同人群中,细胞色素 P-450 基因(CYP)存在不同的多态性,正是这些多态性决定了 CYP 的酶活性,并因此控制着药物代谢速度。检测这些多态性可用来预测这个酶对于药物代谢的敏感性和代谢速率。

3. 疾病诊断和遗传咨询 单基因遗传性疾病的分子诊断除了对先证者等病人进行基因缺陷的分析以外,还需要对家系中其他成员进行疾病风险评估。当孕妇为携带者时,还必须对未出生的胎儿进行产前诊断,以明确其是否患病。通过分析基因内或基因外的多态性标志位点并判断这些标志位点与致病基因是否存在紧密的连锁关系而达到诊断的目的。

4. 多基因病的研究 分子生物学技术在多基因病中的应用主要是检测相关基因的多态性。多态性分析有助于了解疾病的发生机制、疾病的分类、靶器官损伤情况、指导个体化用药和评估病情预后等。但是,目前分子生物学检验技术尚不是诊断多基因病的主要实验手段。

5. 器官移植配型和个体识别 器官移植前 HLA 配型也已从研究初期的用血清学分型方法分析 HLA 抗原发展到用分子生物学方法分析 HLA 等位基因多态性。目前法医学中犯罪嫌疑人的识别和日常生活中亲缘关系的确定也是通过分析被检个体遗传标志的多态性而实现的。

四、循环游离核酸

循环游离核酸是存在于人体体液中的细胞外游离状态的核酸,包括游离 DNA 和游离 RNA,与生理和病理状态下的细胞代谢密切相关。循环 DNA 和 RNA 水平的检测在产前诊断、恶性肿瘤早期诊断和病程监测等方面具有十分重要的意义。最近还发现在血浆中存在稳定的 microRNA,也可以作为潜在的分子标志物。

1. 循环游离核酸与肿瘤 在 1989 年,Stroun 等人首先对肿瘤患者体内的游离循环 DNA 的序列进行了检测,随后在肿瘤患者游离循环 DNA 中检测到了 K-ras、N-ras、p53、APC 等癌基因和抑癌基因的突变。后来又发现癌症患者在接受化疗后,其游离循环 DNA 的浓度会下降,而发生肿瘤转移的患者游离循环 DNA 水平明显高于无转移者,因此游离循环 DNA 可以对肿瘤治疗和病程进行监测,是潜在的肿瘤早期诊断和预后判断的分子标志物。

2. 游离核酸与产前诊断 孕妇外周血中的游离 DNA 是开展无创性产前诊断较佳的分子标志物,在怀孕后 5 周即可检测到,大概占到总的循环 DNA 的 3%~6%,这些游离 DNA 主要来源于滋养层细胞,可用于胎儿性别鉴定、非整倍体检测和单基因遗传病的检测等。2006 年,又发现在孕妇外周血中还存在胎儿的 RNA,这些游离 RNA 性质稳定,与胎儿游离 DNA 相比,胎儿游离 RNA 可排除母血浆中大量母体 DNA 的背景干扰,且不受性别标志物或父源性遗传标志物限制,临床应用优于胎儿游离 DNA,可以用来对胎儿染色体畸变进行产前诊断。

3. 循环 microRNA 与肿瘤诊断 microRNA 与肿瘤的发生、发展有着极为密切的关系,基于 microRNA 在肿瘤中表达失调,且具有组织特异性,而在血液中有异常高的稳定性等特点,研究推测 microRNA 可能是理想的基于血液的肿瘤生物标志物,并在肝癌、肺癌、肠癌、卵巢癌和白血病等多种恶性肿瘤中得到证实。

第三节 临床分子生物学检验发展与应用

临床分子生物学检验技术以生物分子为靶标,以基因的结构变化、基因表达变化和由此而导致的基因功能的改变为主线,以分子杂交技术、PCR 技术和 DNA 测序技术、芯片技术、双向电泳技术、色谱-质谱技术、医学生物信息学技术等组学技术为核心技术,其应用范围日益宽广。从经典的以基因突变检测为靶标的遗传性代谢病的检验诊断,到以病原微生物基因组及其拷贝数检测为靶标的感染性疾病的检验诊断,再到以疾病全基因组关联性分析检测 SNPs 为靶标的疾病风险分析与疾病及耐药性的检验诊断等。临床分子生物学检验的领域已经从单一的病因检验诊断拓展到包括疾病的风险预测、病因分析、病情程度评判、疗效评价、预后评估等在内的综合检验诊断。临床分子生物学检验方法已经从定性到定量、从低通量到高通量、从手工到自动化的方法发展,从而实现灵敏度、特异性的提高,以及实现快速、早期检验诊断。临床分子生物学检验的质量控制体系也从无到有、从实验室内质控到实验室间的质量评价,保障临床分子生物学检验结果的真实、可靠、准确、有效。

临床分子生物学检验对感染性疾病、遗传性疾病、肿瘤等复杂性疾病的诊断与治疗发挥着愈来愈重要的作用。

一、临床分子生物学检验与感染性疾病诊断与治疗

严重影响人类健康的病原生物包括结核杆菌、肝炎病毒、人类免疫缺陷病毒、SARS 相关冠状病毒、人禽流感病毒和原虫等,目前受到广泛关注。对于这些病原生物基因和基因组的研究已经成为消灭病原生物、控制人类感染性疾病的重要内容,耐药机制的研究也成为当前控制耐药性和医院获得性感染的重要课题。病毒感染宿主的方式主要有两种:①病毒感染宿主细胞后,病毒 DNA 直接在细胞内复制;②病毒基因与宿主细胞染色体发生整合而使宿主染色体基因结构发生改变。另外,病毒还很容易发生变异,这是由于它在复制过程中所需要的 RNA 聚合酶和反转录酶缺乏校正功能,因此在慢性持续性感染过程中发生自然变异,成为诊断、预防和治疗中十分棘手的问题。

感染性疾病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主要是依靠病原学及免疫学方法检测,但是这些方法受灵敏度和特异性的限制,使得感染性疾病的诊断受到限制。随着各种病原体基因结构的阐明,利用分子生物学检验技术早期、快速、敏感、特异地检测感染性病原体本身(RNA 或 DNA)成为可能。分子生物学技术不仅可以对微生物感染作出确诊,还可以对感染性病原体进行分型和耐药性监测,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强大的功能。

二、遗传性疾病的临床分子生物学检验

基因组结构就是指基因组 DNA 中不同功能片段在整个基因组中的分布。基因结构的改变不一定导致基因功能的异常,只有当致病基因的核苷酸发生缺失、插入、倒位、易位、点突变等结构变化,并且这种变化又改变了基因的编码序列或影响了基因的调控序列时,基因的功能才发生异常,导致疾病发生。

目前已发现的人类遗传疾病达数千种之多,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(又称复杂性疾病)。传统的检测方法以疾病的表型为依据,而表型则易受外界环境的影响,在一定程度上影响了诊断的准确性和可靠性。而遗传性疾病的检测是通过患者的 DNA、RNA、染色体、蛋白质和某些代谢产物来揭示与遗传病发生相关的基因、基因型、基因的突变、基因的单倍体型和染色体核型等生物学标记,与传统疾病检测方法相比具有更准确可靠和早期诊断的优势,有利于在临床上对遗传性疾病进行早期预防、早期诊断和早期治疗、从而达到减少或控制相关遗传病的发作、减轻症状和改善患者预后的目的。

三、肿瘤的临床分子生物学检验

正常细胞受到物理、化学和生物因素等致癌因子的作用,经多次打击和多阶段变化而形成肿瘤,因此肿瘤的发生是由多种致癌因素综合作用的结果,也说明从正常细胞转化为恶性肿瘤细胞是一个复制的过程。与肿瘤发生相关的基因称为肿瘤相关基因,包括癌基因和抑癌基因。癌基因包括病毒癌基因和细胞癌基因,它们具有潜在诱导细胞恶性转化的特征。癌基因的激活机制包括基因的点突变、甲基化程度降低、基因扩增、染色体易位等。染色体易位使基因发生重排,形成融合基因,成为多种类型白血病的特异性分子标志。癌基因激活后使基因编码产物的结构和功能发生变化和(或)表达量增加,导致细胞恶性增生。抑癌基因是存在于正常细胞内的一类可以抑制细胞生长的基因,具有潜在的抑癌作用。当抑癌基因发生突变、缺失或失活时,可引起细胞恶性转化而导致肿瘤发生。

肿瘤标志在诊断肿瘤、检测肿瘤复发与转移、判断疗效和预后以及人群普查等方面都有较大的实用价值。肿瘤标志分为基因型标志和基因表型标志。基因型标志是指基因本身突变和表达异常,能反映癌前启动阶段的变化;基因表型标志是指基因表达产物表达和调控异常,表现为其所编码的表达产物合成紊乱,产生胚胎性抗原、异位蛋白等,一般出现较晚。因此,寻找特异性肿瘤基因型标志进行肿瘤基因检测,对于肿瘤的早期发现和诊断,以及肿瘤的预防和治疗具有至关重要的意义。

四、临床分子生物学检验与个体化医学

个体化医学是现代医学的核心目标,个体化医学包含个体化诊断与个体化治疗两个部分,个体化诊断是个体化治疗的基础,个体化治疗是个体化诊断的目的。目前,基于药物遗传学和药物基因组学的个体化分子生物学检验,如细胞色素 P450 酶系的基因多态性的检测,可以指导个体的用药剂量;线粒体 12S rRNA A1555G 和 C1494T 突变可以指导氨基糖苷类药物的使用,携带这两个突变位点的个体禁用此类药物;HER2 的检测可以指导抗肿瘤药物赫赛汀的临床使用,可以避免 HER2 阴性的患者使用该药带来的不必要的经济负担和耽误治疗时间。虽然基于个体化分子生物学的个体化治疗已经取得了不少的成功案例,但实现个体化医学目前尚存在诸多问题,如基因突变与疾病相关性,同种遗传标志物在不同人群中应用的差异性问题,多种遗传标志物对同一个体共同预测效应及协同性问题,环境因素与遗传风险相互作用的复杂性等问题。这些问题的解决依赖于包括芯片技术、