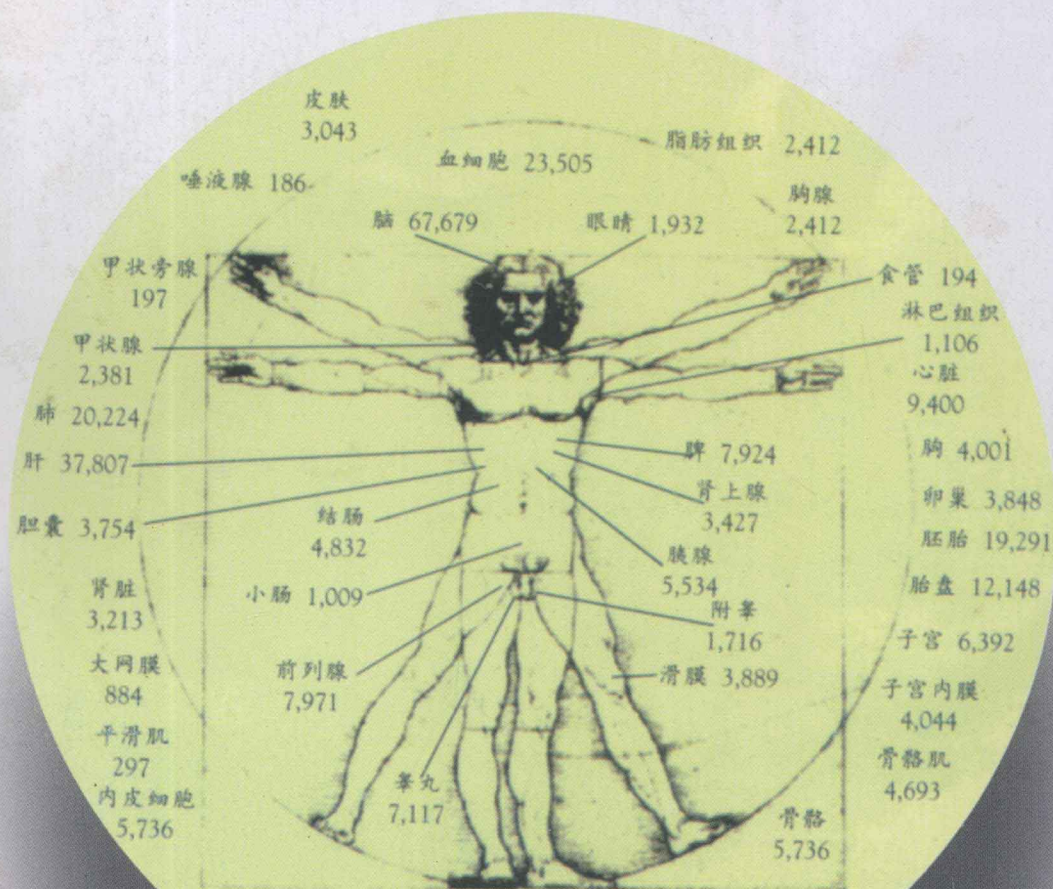


CLINICAL GENE DIAGNOSIS

临床基因诊断

单祥年/主编

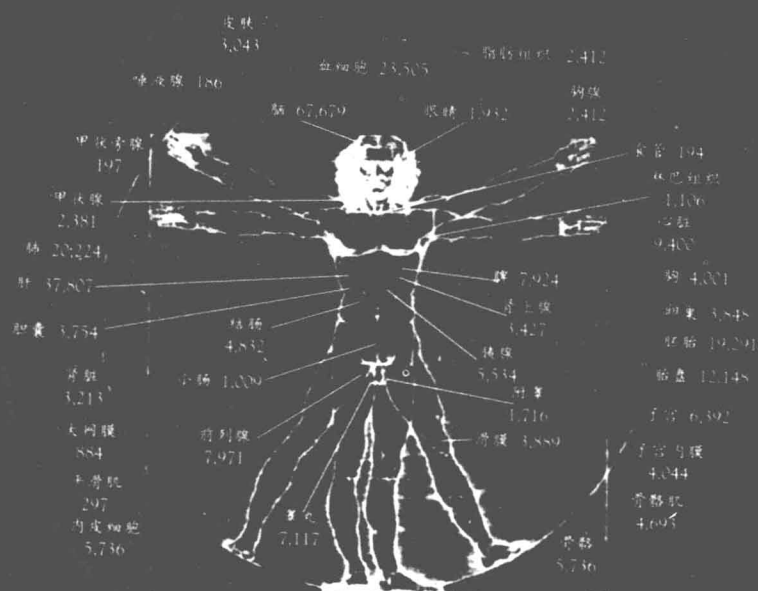


*: 数字代表各组织器官细胞内所表达的基因数目

临床基因诊断

CLINICAL GENE DIAGNOSIS

单祥年 / 主编



注：数字代表各類组织器官细胞内所表达的基因数目

南京师范大学出版社

图书在版编目(CIP)数据

临床基因诊断/单祥年主编. —南京: 南京师范大学出版社, 1999

ISBN 7-81047-391-3/R·6

I. 临… II. 单… III. 基因-诊断 IV. R446.9

中国版本图书馆 CIP 数据核字(1999)第 15726 号

南京师范大学出版社出版发行

(江苏省南京市宁海路 122 号 邮编 210097)

江苏省新华书店经销 扬中市印刷厂印刷

*

开本 787×1092 1/16 印张 19.75 字数 506 千

1999 年 10 月第 1 版 1999 年 10 月第 1 次印刷

印数 1-3000

定价:30.00 元

(南京师大版图书若有印、装错误可向承印厂退换)

主 编 单祥年

副主编 (按姓氏笔划)

严 明 郑 杰 张丽珊

张建琼 黄培林

编 者 (按所编章节顺序)

单祥年 鲁晓瑄 黄 鹰 何友吉

张锡然 潘秀娟 宗 卉 黄培林

武景阳 张丽珊 周晓雷 张建琼

严 明 聂刘旺 史庆华 苏占海

郑 杰

作 者 的 话

近年来基因诊断在国内各大医院和医学科研部门已经陆续开展,随着医学分子生物学的发展,特别是人类基因组计划的顺利实施,这类技术将会越来越广泛地应用于临床,从基因型推断表现型,实现人类各种疾病的基因诊断已经指日可待。在不久的将来,人们可以根据自己的DNA“芯片”检测自己可能发生的疾病。生命科学来自基因,基因是生命活动的基础,只有从基因出发,才能理解人类的生、老、病、死。因此,下一世纪基因诊断和基因治疗将会成为医院临床中的日常事务性工作,人类将进入名副其实的基因时代——Nothing can be understood in Life Sciences, except in the light of Gene。

分子生物学的迅速发展,要求广大临床医生以及医学本科学生尽快掌握DNA重组的原理和技术方法,以便能跟上形势的发展,更好地为患者服务。我院领导和教务处瞄准了这一发展趋势,即时地提出了要首先在检验专业本科生中开设“临床基因诊断学”选修课,并责成我们撰写教材。作为多年从事这方面研究的教师,我们也就义不容辞地接收了这一任务,并在铁道部和学院的资助下,使本书得以顺利出版。

本书编写是从教科书和参考书兼容的考虑出发,既有基本理论部分,又有详尽的实验(检验)操作步骤,更注重最新理论和技术的进展。因此可以作为医学本科生或短训班学生的教科书,又可作为从事医学分子生物学研究和临床工作者的参考书。在本书的编写过程中,得到我的同仁的全力支持,尽管他(她)们的教学、科研任务十分繁忙,但还是抽出大量时间查阅资料并撰写成文。我的博士生和硕士生对本书的出版更是化费了大量的时间和心血,尽管他(她)们的学位论文的研究工作十分繁重,有的还在国外进修或完成学位论文的研究内容,但都积极投入到本书的撰写过程中,在本书出版之际,谨向他们表示深深的谢意。

限于编著者的水平,加之医学分子生物学发展太快,新理论、新技术、新方法不断涌现,所以本书内容难免有挂一漏万之憾,有些内容作者编写时可能是先进的,但由于出版周期的限制,也许到读者手中已是“昨日黄花”。好在我们编写过程中注意了这个问题,尽可能将基本原理阐述清楚,使读者在以后的学习、工作中遇到新理论、新技术时不至于一无所知,因为任何新的理论和技术都是在原有的基础上发展起来的,因此只要掌握本书的基本内容我们相信能使读者达到举一反三的效果。

在本书内容中如有错误不当之处,祈请读者鉴谅并指正。

单祥年

一九九九年九月于南京铁道医学院

临床基因诊断学

作者的话

绪 论	(1)
第一节 遗传病的基因诊断	(1)
第二节 肿瘤的基因监测	(1)
第三节 动态突变与基因诊断	(3)
第四节 传染性疾病的基因诊断	(3)
第五节 基因诊断中的新技术和新方法	(4)
第六节 人类基因组计划与基因诊断	(8)

第一篇 临床基因诊断中常用的分子生物学技术

第一章 分子杂交技术	(13)
第一节 核酸的分离与纯化	(14)
第二节 探针的制备	(18)
第三节 分子杂交	(29)
第二章 PCR 技术	(50)
第一节 PCR 技术的发展及工作原理	(50)
第二节 PCR 技术的特点	(52)
第三节 PCR 技术的种类	(52)
第四节 临床上常用的 PCR 检测操作步骤	(58)
第五节 PCR 反应条件的选择及优化	(64)
第六节 PCR 扩增中常见的问题及对策	(66)
第三章 PCR-SSCP 技术	(69)
第一节 PCR-SSCP 技术的原理及方法	(69)
第二节 影响电泳结果的因素	(71)
第三节 PCR-SSCP 技术的应用和局限	(72)

第四章 DNA 测序技术	(74)
第一节 DNA 序列测定的原理	(74)
第二节 Sanger 法 DNA 测序的条件	(77)
第三节 变性聚丙烯酰胺凝胶和高压电泳系统	(79)
第四节 常用的 DNA 测序系统	(85)
第五章 FISH 技术及其应用	(97)
第一节 FISH 技术的原理及方法	(97)
第二节 FISH 技术在人类疾病诊断中的应用	(99)
第六章 转基因技术	(104)
第一节 转基因动物的诞生及其原理	(104)
第二节 常用的基因转移技术	(105)
第三节 转基因的检测	(110)
第四节 转基因在医学中的应用	(115)
第五节 转基因动物研究中存在的问题	(118)
第七章 免疫组织化学技术在临床基因诊断中的应用	(120)
第一节 免疫组织化学原理及技术	(120)
第二节 免疫酶组织化学技术	(121)
第三节 免疫组织化学在分子生物学中的应用	(128)
第八章 其他基因突变检测技术	(138)
第一节 根据构象变异进行突变检测	(139)
第二节 蛋白截短技术(PTT)	(144)
第三节 切割突变法	(149)
第四节 其他用于临床诊断中的基因突变检测方法	(150)

第二篇 临床基因诊断

第九章 常见遗传病的基因诊断	(157)
第一节 造血系统疾病	(158)
第二节 神经肌肉系统疾病	(166)
第三节 泌尿系统疾病	(171)
第四节 先天性代谢病	(173)
第五节 心血管系统疾病	(179)
第六节 呼吸系统疾病	(182)
第七节 肿瘤	(182)

第十章 复杂疾病的遗传分析及基因诊断	(189)
第一节 复杂疾病的遗传特点.....	(190)
第二节 复杂疾病相关基因定位、克隆的策略和范例	(191)
第三节 复杂疾病基因诊断的研究进展.....	(202)
第十一章 病原微生物的基因诊断	(208)
第一节 致病性病毒的基因诊断.....	(210)
第二节 致病性细菌的基因诊断.....	(227)
第三节 致病性支原体、衣原体、螺旋体的基因诊断.....	(233)
第十二章 非损伤性产前诊断	(238)
第一节 母体循环血中分离胎儿细胞的产前诊断.....	(238)
第二节 母体血清生化指标的产前诊断.....	(246)
第十三章 性别决定基因及相关综合征的基因诊断	(249)
第一节 寻找 TDF 的艰难历程	(249)
第二节 SRY 基因的结构及进化	(251)
第三节 SRY 基因的表达及其编码蛋白质的作用机理	(252)
第四节 SRY 基因的缺失和突变	(253)
第五节 SRY 的相关基因	(253)
第六节 性别决定的调控系列模式.....	(254)
第七节 与 SRY 基因相关的疾病	(254)
第八节 性别发育异常的基因诊断.....	(256)
第十四章 线粒体遗传病及其诊断	(262)
第一节 线粒体 DNA 的结构、功能和特征	(262)
第二节 常见的线粒体病.....	(265)
第三节 mtDNA 突变所引起疾病的诊断	(272)
第十五章 微卫星 DNA 多态性及其在遗传病诊断中的应用	(274)
第一节 微卫星 DNA 的分子生物学特征及产生机制	(274)
第二节 应用微卫星 DNA 标记诊断遗传病的方法	(276)
第三节 微卫星 DNA 标记在遗传病诊断中的应用	(279)
第十六章 错配修复基因与肿瘤的发生及临床基因检测	(283)
第一节 原核生物的 DNA 错配修复系统	(283)
第二节 人类 DNA 的错配修复系统	(284)
第三节 人类 DNA 错配修复系统缺陷与肿瘤	(286)

第四节	人类错配修复基因突变的检测·····	(289)
第五节	人类错配修复系统研究展望·····	(291)
第十七章	肿瘤微转移的分子检测·····	(293)
第一节	标本采集及检测方法·····	(293)
第二节	大肠癌微转移的分子检测·····	(294)
第三节	前列腺癌微转移的分子检测·····	(298)
第四节	黑色素瘤微转移的分子检测·····	(301)

绪 论

基因诊断(Gene Diagnosis)是近年来临床医学中发展十分迅速的一类崭新的诊断技术,它依托于 DNA 重组技术,直接从 DNA 水平检测人类疾病的突变基因或病原体基因,从基因型诊断表现型,因此又称为逆向诊断。与传统的表型诊断相比较,基因诊断更准确、快捷,而且它还可以对传统的诊断方法进行诊断敏感性和诊断标准的评价,从而最终代替某些已有的诊断方法或促进一些诊断方法的改进或在某些特殊的病种中补充已有的诊断技术。因此自 1978 年 Kan 第一次成功地实现了对镰状细胞贫血病进行产前基因诊断以来,经二十年的发展,目前这一技术正以排山倒海之势压向了医学界,从而对传统的诊断技术提出了挑战,并以它特有的准确性、预测性受到临床医生的青睐。

第一节 遗传病的基因诊断

基因诊断起始于遗传病,特别是单基因遗传病,因为这类疾病在人类基因组中往往只有一个拷贝,基因中只要有一个或少数碱基的变化就会导致疾病的发生,因此检测它们的基因变化比肿瘤和其他复杂疾病要容易得多,可以不受其他因素的干扰,所以目前在人类 10 000 多种单基因遗传病中有相当一部分可以进行现症病人、症状前或产前基因诊断。而多基因病(约占人群中 15%~20%)由于其发病原因常涉及两个以上的基因,因此检测起来就比较复杂。但是近年来随着医学分子生物学的发展,人们已认识到在多基因遗传病中并不是每一个基因所起的作用都是均等的,而是有起主导作用的基因(称之为易感性主基因),如高血压、哮喘、糖尿病等常见的多基因病已发现并克隆了可能为主基因的候补基因。在不久的将来有望对这类复杂疾病的基因诊断有所突破。遗传病中还有一类称为染色体畸变病,目前已认识的人类染色体畸变有几千种。常见的称为染色体畸变综合征的有 100 余种,以往的诊断方法主要靠细胞遗传学方法,即在细胞水平上进行鉴别诊断。近年来随着荧光原位杂交(Fluorescence *in situ* Hybridization, FISH)技术的成功应用,特别是染色体特异区段探针的应用,可以通过细胞和分子水平相结合的方法鉴别染色体的数目和结构畸变,尤其是 FISH 技术在间期核和精子研究中的应用,为染色体畸变诊断开辟了新的领域,也为临床诊断提供了又一新的简便的方法。线粒体遗传病的研究近年来发展得也非常快,在短短的十年中已发现有 100 余种疾病与线粒体 DNA 突变有关,目前已通过 PCR、PCR-SSCP、DNA 测序等手段对 Leber 氏病、线粒体心肌病、帕金森氏病、糖尿病、药物致聋等与线粒体基因突变相关的疾病成功地实现了基因诊断。随着研究的深入,预计与线粒体基因突变相关的疾病还会有新的发现。

第二节 肿瘤的基因监测

肿瘤由于其危害性和难治性是最受人们关注的,因此肿瘤的分子生物学是近年来发展最

快的学科之一。肿瘤的病因一直是人们关注的焦点,而癌基因的发现及其与肿瘤发生的相关性研究,使得这一领域获得关键性的突破。1911年 Rous 首次在鸡肉瘤中发现了可以致癌的病毒,1970年又从一株有转化能力的鸡肉瘤缺失突变株中分离到一个逆转录病毒基因,称为 V-src 基因,这就是最早发现的病毒癌基因。1976年 Stechelín 用 V-src 基因作探针发现鸟、鱼及哺乳动物细胞中有其同源的 DNA 序列,称为 C-src,以后在人的细胞中也发现了 C-src,这就是最早发现的细胞癌基因,也称为原癌基因。迄今为止,已准确定位的癌基因达九十多个,这些原癌基因对人类的生长发育、细胞分化是十分重要且必不可少的,如有的细胞癌基因产物是生长因子(Growth Factor),有的细胞癌基因是细胞生长因子受体,有的细胞癌基因产物是酪氨酸激酶等等。但是一旦它受到生物、化学、物理等因子的作用被激活或过度表达,就变成了癌基因,又称为转化基因,所谓转化即激活后的癌基因具有转化 NIH/3T3 细胞癌变的能力。80年代以后,人们一直在潜心研究人类各种肿瘤与癌基因的关系,试图找到特异性的癌基因与肿瘤发生的相关性,试图达到像诊断单基因遗传病那样对肿瘤进行针对性的基因诊断。但是随着研究的深入,科学家们发现几乎所有的肿瘤都不是单一基因在起作用,往往是多个癌基因的协同作用,而且在肿瘤发展的不同阶段,常常有不同的癌基因在起作用,比如 Ras 家族、p53、p16 往往在多种肿瘤中被激活或过度表达,说明它只是这些肿瘤发生的原因之一,这就给肿瘤的基因诊断带来了一定的困难。尽管如此,人们还是找到了一些规律,如卵巢癌中常见 C-myc 基因的激活,在 60% 胃癌中发现有 p53 基因突变或杂合性丢失(Loss of Heterozygote, LOH),肝癌中的 N-ras 的激活,乳腺癌中的 BRCA1、BRCA2 的突变等等。这些癌基因的突变与肿瘤的相关性研究,为肿瘤的病因学、临床分型和预后提供了有价值的依据,也为肿瘤的诊断提供了重要的参考指标。

抑癌基因的发现及其在肿瘤发生中的重要作用是近年来肿瘤分子生物学中又一研究热点。所谓抑癌基因即在正常情况下(野生型)这类基因能抑制细胞恶变和肿瘤的生长,当它的一对等位基因均丧失功能或失活时,形成隐性纯合状态时就失去了抑制肿瘤发生的作用,所以也称隐性癌基因(Recessive Oncogene)。最早被定名为抑癌基因的是 Rb 基因,1983年 Cavenee 等人在视网膜母细胞瘤中首次发现 13 号染色体上有 4.3 kb DNA 片段的杂合性丢失,1986年 Friend 分离并克隆了 Rb 基因,进一步研究表明 Rb 基因是一种隐性突变,患者往往是 Rb- / Rb-、Rb- / -、- / -,而带有野生型和突变型杂合性个体 Rb+ / Rb- 不发病,表明野生型 Rb 是一个显性的抑癌基因,它的一对等位基因的纯合突变或缺失将导致患视网膜母细胞瘤。自那以后近十多年来已陆续发现了十余种抑癌基因,其中比较重要的又称为广谱的抑癌基因,除 Rb 外还有 p53、p16、p15、p21、p27 等基因以及近期发现的 STAT 基因等,这些基因往往和细胞周期的调控有关,一旦它们突变或失活将导致细胞的增殖失控,这正是肿瘤形成中的重要特征之一。抑癌基因同样是机体内不可缺少的基因,正常情况下,它们参与生命活动,如近期发现的 STAT 基因,它的产物是细胞内信号传导和转录激活因子,突变或失活将有可能导致细胞癌变。

此外,近年来还发现了一些与肿瘤转移相关的基因如 nm23H1、TIMP2 等,在肺癌、乳腺癌、结肠癌、肾癌细胞中均检测到 nm23H1 的缺失与肿瘤转移相关。TIMP2 基因则在转移的乳腺癌细胞中发现有缺失,说明这些基因的突变与肿瘤转移密切相关,所以把它们定名为肿瘤转移抑制基因(Tumor Metastasis Suppressor Gene)。检测肿瘤抑制基因和肿瘤转移抑制基因的突变同样对肿瘤的发生及临床诊断、治疗、预后有其重要的价值。

总之,癌症发生是一个多步骤、多阶段的过程。在这些进程中,一方面是细胞癌基因的激

活,促进细胞增殖,使正常细胞变为恶性,另一方面是抑癌基因的突变或失活,使细胞恶变,无限制地增殖,最后则有可能是肿瘤转移抑制基因的突变或缺失导致肿瘤转移,无疑这个过程是相当复杂的,牵涉到的因素相当多,也绝非只检测某几个基因就能做出明确诊断,因此本书没有将肿瘤的基因诊断专门列出,而把它放在有关章节中分别进行描述。

第三节 动态突变与基因诊断

小卫星 DNA 和微卫星 DNA 不稳定,是近年来在遗传病和肿瘤的研究中又一十分引人注目的成就。人们把人类基因组中少数核苷酸重复拷贝数的变化总称为动态突变。在人和动物及部分微生物基因组中,存在一些由寡核苷酸串联重复排列而成的 DNA 序列,构成数量可变的串联重复顺序(Various Number of Tandom Repeat, VNTR),其中重复顺序在 6~70 bp 的称为小卫星 DNA(Minisatellite DNA),重复顺序在 1~6 bp 的称为微卫星 DNA(Microsatellite DNA)。由于小卫星 DNA 和微卫星 DNA 在人基因组中出现的数目和频率不同,而表现出多态性,这可以通过 RFLP、PCR 检出,亦可作为有效的遗传标记用来研究它们和遗传病及肿瘤的连锁关系。法医学上的 DNA 指纹也是根据这些动态突变在人群中的差异而鉴别罪犯的。在人类遗传性疾病中已发现许多种类与微卫星 DNA 有连锁关系,如在脆性 X 综合征中,FMR-I (Fragile Mental Relardation-I)基因中的 CGG 顺序在正常人中重复次数一般不超过 60 次,而携带者有 60~100 次,患者则在 100 次以上;Huntington 氏舞蹈病患者 CAG 重复顺序往往超过 35 次,而正常人则在 30 次上下。

近年来,在染色体遗传病中人们利用微卫星 DNA 在人群中的多态性来鉴别多体型患者中多余染色体(如三体)的来源。其基本原理是根据人基因组 DNA 中广泛分布着微卫星 DNA 的短串联重复序列,它们不仅数量多、信息量大而且在上下代间的传递遵循孟德尔遗传规律,因此,它为非整倍体患者中的超数染色体的来源研究提供了可靠的遗传标记。并可通过简单的 PCR 扩增、PAGE 电泳、硝酸银染色,得出可靠的结论。微卫星 DNA 变化与肿瘤的关系更是引起人们的极大兴趣,Peltomaki 发现遗传性非息肉性结肠直肠癌(HNPCC)与微卫星 DNA 存在密切相关性,如他们用 D2S123 微卫星 DNA 标记检测 HNPCC,发现有高度的不稳定性,在散发肿瘤如结肠癌、子宫内膜癌、乳腺癌、卵巢癌等也相继发现有微卫星 DNA 的不稳定现象存在。此外,近年来发现并被克隆的 6 个错配修复基因也与微卫星 DNA 不稳定相关,有证据表明一些肿瘤中的微卫星 DNA 不稳定可能是错配修复基因发生突变缺陷所致。这些新的发现为肿瘤的鉴别诊断提供了又一个新的途径。

第四节 传染性疾病的基因诊断

传染性疾病主要是由于病原体的感染而导致的各种疾病,病原体主要为真核生物、原核生物和非细胞型生物三大类,由于这一类疾病的病因比较明确,只要找到病原体的种类即可做出诊断,因此应用 PCR 技术即可满足这一要求。正因为如此,从 80 年代后期开始在短短的十多年中通过 PCR 技术检查传染性疾病的方法迅速在临床上推广开来。这是因为传统的诊断技术主要依赖于血清学、病原体的培养和分离,以及感染后的细胞形态学进行诊断,费时费力,且容易出现假阳性、假阴性,而 PCR 技术具有快速、省力、相对准确等优点。目前在临床上已开展的主要是以肠道、呼吸道、性病中的病原体检测为主,尤其是性病病原体的检查开展单位

最多,其次是各种肝炎病毒。据不完全统计,目前在临床上已开展的各种病原体基因诊断种类有 60 余种,这里不包括一些病原体的血清型和亚型的分型检测。由于 PCR 灵敏度高,可以在 10^6 个细胞中检测出一个被病毒感染的细胞,另外某些相似病原体基因组 DNA 的同源性比例相当高,加上操作中的不慎,检测结果很容易产生交叉污染或假阳性,近几年来一些单位已注意到这个问题,多采用套式 PCR(Nested PCR)进行检测,但这还不能从根本上杜绝假阳性和假阴性的出现。因此在本书中特别介绍了 PCR 和原位杂交同步进行以及 PCR 产物和固定探针反向杂交技术,可解决 PCR 产生的交叉污染和假阳性的问题,提高检测的可信度。另外一个问题就是有些病原体如人乳头瘤病毒、巨细胞病毒、肝炎病毒的基因组感染人体后有潜伏期而且会整合到人的基因组中,一般情况下不发病,一旦被感染的个体由于某种原因免疫功能降低或紊乱则会导致入侵的病原体发作,产生临床症状。因此如果只检测病原体的基因组 DNA 会发现人群中感染率非常高,而大部分人又不表现临床症状。在这种情况下需要确定病原体感染量的问题,进行定量检测,或者和血清学检测中的 IgM 配伍检测,可判断该病原体和临床症状的相关性。

第五节 基因诊断中的新技术和新方法

随着分子生物学的发展,除了传统的 Southern、Northern、Dot、Western blotting 等分子杂交技术,DNA 测序技术以及 PCR 体外扩增技术等已被广泛地应用外,新的检测基因突变技术也在不断地涌现。在 PCR-SSCP(Polymerase Chain Reaction-Single Strain Conformation Polymorphisms, PCR-SSCP)的基础上,应用变性梯度凝胶电泳(Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, DGGE)检测基因突变现已有专门的仪器问世。针对一些较大的基因用以往的方法难以检测全基因的突变状况,1993 年 Poest 等人在检测 DMD 基因(2 300 kb)时设计了一种称之为蛋白截短测试技术(Protein Truncation Test, PTT)顺利地检测了以终止密码子提前出现为主的 DMD 基因突变,这一技术设计了一套体外翻译系统使 PCR 扩增产物在体外翻译成蛋白质,如发生由于无义突变、插入或缺失引起的终止密码子的提前出现而导致基因编码的蛋白质被截短了,与正常的蛋白质对照就可发现该基因有无发生无义突变,目前这一技术已用于 DMD、APC(家族性腺瘤息肉)、BRCA1、BRCA2 和错配修复基因 hMSH₁、hPMSH₁ 等基因突变的检测中,它可以由原来一般只能检测基因内几百到一千 bp 左右的片段扩大到 5 kb 左右的范围。此外前面提到的 FISH 技术,发展得也很快,现在已由原来的单色荧光发展到多色荧光进行探针标记,通过不同的滤光片组合进行观察,杂交信号可呈现不同的颜色,能同时观察多种染色体畸变。1995 年,Speicher 等人设计了一套特殊的激光镜和计算机软件系统,可同时显示 27 种不同颜色标记的全套人基因组 24 条染色体涂染探针杂交结果的彩色核型。这种技术被称为 M-FISH,该技术在国外已广泛地应用于染色体数目和结构异常的检测、标记染色体的识别、多个不同基因和 DNA 序列的染色体定位、物理图谱的制作、基因缺失和扩增的检测、研究染色体的进化以及不同种属同源性的比较等方面。

比较基因组杂交(Comparative Genomic Hybridization, CGH)是 FISH 技术应用研究中的又一新的创举。在 FISH 应用研究中人们发现尽管它非常敏感,特异性强,但都依赖于和已知探针进行杂交,对来源不清的异常染色体或染色体片段难以寻找已知的探针,如用常规的染色体涂染探针,每次只能显示一条或几条染色体,必须逐一进行杂交,这样不仅工作量大,费用高,而且对于整个基因组来说,确定未知特定区域的扩增或重复对于大规模的 FISH 技术来说几

乎是不可能的。如用逆向染色体涂染需分离异常的染色体或染色体微小片段,在技术上有一定难度。1992年由Kallioniemi建立的CGH技术,通过直接进行基因组DNA比较来检测遗传物质的缺失和重复,为进行基因组不平衡遗传物质的研究提供了新的手段。它的基本原理是把肿瘤或病人基因组DNA(Test DNA)与正常人基因组DNA(Reference DNA)分别用切口平移技术标记上不同的非同位素,并以1:1混合制备成混合探针,然后与正常人染色体标本进行荧光原位抑制杂交(Chromosome *in situ* Suppression, CISS),杂交后分别用不同的荧光物质进行检测。通常肿瘤的DNA用异硫氰酸荧光素(Fluorescein Isothiocyanate, FITC)标记成绿色,参照基因组DNA用四甲基碱性蕊香红异硫氰酸(Tetramethyl Rhodamine Isothiocyanate, TRITC)标记成红色,杂交后每一染色体或染色体片段的两种荧光强度的比值即反映两基因组DNA中同源序列的相对拷贝数。当绿红比值等于0.5时为单体,1时为双体,1.5时为三体等。CGH技术是FISH技术的一个重大飞跃,它突破了原先对FISH探针为一点或一个区的理解,将该技术覆盖面扩大到整个基因组,使其应用前景更为广阔。

在肿瘤的基因检测中,近来发现CD44的剪接重组子在人类一些肿瘤中有高度表达,可作为某些肿瘤的分子标记而进行监测。CD44是一种细胞粘附分子,具有多种生物学功能。1997年Goodison研究发现人的CD44基因含有19个外显子,全长50 kb。CD44基因按外显子表达方式分为两类,一类是构成性外显子,另一类是剪接性外显子,构成性外显子有10个,转录片段存在于所有CD44转录子中,而9个剪接性外显子则有选择性地剪接存在于CD44转录子中。当细胞癌变时,由于丧失了正常外显子的剪接调控,高频出现异常转录子,现已发现外显子的5/7和5/11连接的CD44转录子常见于结肠恶性肿瘤,在乳腺癌、胃癌和它的转移肿瘤中常常有CD44剪接重组子的过度表达,因此可以将CD44剪接重组子的异常转录作为这些肿瘤的特征性标记在基因水平上进行监测诊断。

在病原体的检测中,由于常规的一次性PCR容易出现假阳性,一般都要求通过分子杂交验证PCR产物,提高扩增产物的可信度,而以往的分子杂交需要合成在扩增片段长度内的特异性探针,并应用同位素或非同位素标记后和PCR产物杂交,在操作上分两步进行,很繁琐,大大降低了PCR方法的优越性,而且很难推广到临床,因此人们一直在潜心研究如何一次性完成PCR扩增和分子杂交。1997年美国PE公司设计了一种PCR和原位杂交同步进行的方法,它的基本原理是在PCR扩增片段内设计一个寡核苷酸探针,然后在探针的5'端偶联上5'-羧基荧光素(FAM),在探针的3'端接上4-甲基-6-羧基罗丹明(TAMRA),当这一特异性内探针DNA完整时TAMRA可抑制FAM发出荧光,而在PCR扩增时5'端引物(PCR引物应在内探针两侧)延伸过程中由于Taq酶有5'到3'的外切酶活性可以切开预先杂交上去的内探针DNA,一旦这内探针被切碎后TAMRA就不能抑制FAM而发出荧光,因此可将PCR产物在荧光分光光度计上检测,如发出荧光则表明有靶DNA片段,这样可达到PCR和原位杂交同步完成的目的,而且还可以通过特殊的仪器或制出标准曲线来进行定量检测。此外,通过微孔板固定寡核苷酸探针,然后与PCR产物杂交(被称为反向杂交),近年来已用于临床。它的基本原理是将PCR上游引物5'端接上生物素,将内探针置于微孔板内,将带有生物素标记的变性后的PCR产物和微孔板内已变性的内探针杂交,然后加入酶标亲和素,在TMB中显色,这种方法也可达到PCR产物和原位杂交同时进行的目,而且通过偶联酶对信号的放大,还可提高检测的灵敏度。上述这两种方法将基因的体外扩增和分子杂交一次性完成,大大地提高了PCR产物的可靠性,而且不降低灵敏度,保持快速检测的优点,是一种很有推广价值的方法。

1997年Nilsen发表了3 DNA dendrimer结构,它的独特结构和特性立即引起了许多分子

生物学家的高度关注,并着手将 3 DNA dendrimer 用于分子杂交实验和临床分子检测。

Dendrimer 来源于希腊词“tree”,含意是高度分支状的化学分子,是由天然的或人工合成的单体分子(亚单位)连接而成。3 DNA dendrimer 由 DNA 单体构成,正如名称所示。每一个 3 DNA 单体都是由两条 DNA 链组成,在两条链的中间部位都有一个互补的区域。当两条单链复性时形成一个中间双链的“腰”,两边连着四条单链的“臂”,这种结构就是 3 DNA dendrimer 单体。3 DNA dendrimer 是从一个起始单体构建而来,第二种单体的臂通过复性连接到起始单体的臂上,这一来产生了一个一层(One-layer)的 3 DNA dendrimer(5 个分子),表面带有 12 条自由臂;第三种单体通过同样的方式连接上去形成二层 3 DNA dendrimer,自由臂增长到 36 个(17 个分子),三层具有 108 个自由臂(53 个分子),四层有 324 个自由臂(161 个分子),五层有 972 条自由臂(485 个分子),六层有 2 916 条自由臂(1 457 个分子)。六层及以下的 3 DNA dendrimer 在溶液中均为球形。最基本的 3 DNA dendrimer 分子由 161 个单体分子组成(约 32 000 个碱基)的四层 3 DNA dendrimer。

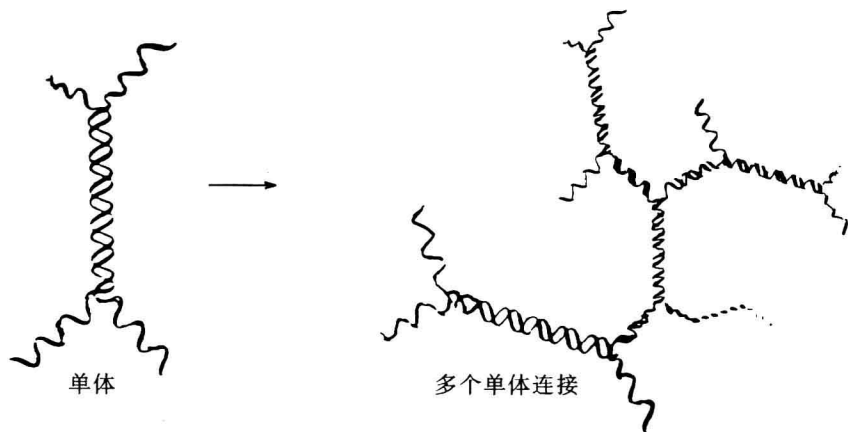


图 1 3 DNA dendrimer 的基本结构

3 DNA dendrimer 在分子杂交和临床分子检测过程中作为一个多重标记的核心起到信号放大作用。3 DNA dendrimer 表面的自由臂有两种类型: a^+ 和 c^+ 。 a^+ 可以同特异性的靶目标 DNA(或 RNA)(也可以间接通过一个既和靶目标作用又和 a^+ 同时作用的寡核苷酸探针 a^-) 相结合; c^+ 可以同带有标记物(放射性磷、生物素或地高辛)的寡核苷酸 c^- 相结合。以基本的四层 3 DNA dendrimer 为例,它同时具有 162 条同样的 a^+ 和 c^+ 臂,就这一球形分子来说其表面将携带 162 条同靶序列作用的寡核苷酸探针,这个探针一端和 a^+ 臂以碱基互补连接,另一端与标本中的靶 DNA 或 RNA 杂交,这就大大地增加了同靶序列作用的机会;另外的 162 条臂即 c^+ 臂,可以携带 162 条标记物(如生物素、地高辛等),使 a^+ 臂上的寡核苷酸探针与标本中的靶序列的杂交信号可放大 162 倍。如果使用的是 6 层 3 DNA dendrimer,将会增加信号强度 1 500 倍左右。

理论上 PCR 所达到的灵敏度为 $fg(10^{-12}g)$,但实际上到 100 fg 时由于模板量过低就已经出现了非特异性扩增。而 Vogelbacker 报道用 3 DNA dendrimer 结合寡核苷酸探针在 $1 \mu g$ DNA 中可检测出单拷贝 EB 病毒 DNA,灵敏度可达 $fg(10^{-12}g)$ 级,不低于 PCR。因此不必用放射性同位素标记,同时特异性却高得多,不会出现假阳性或假阴性。

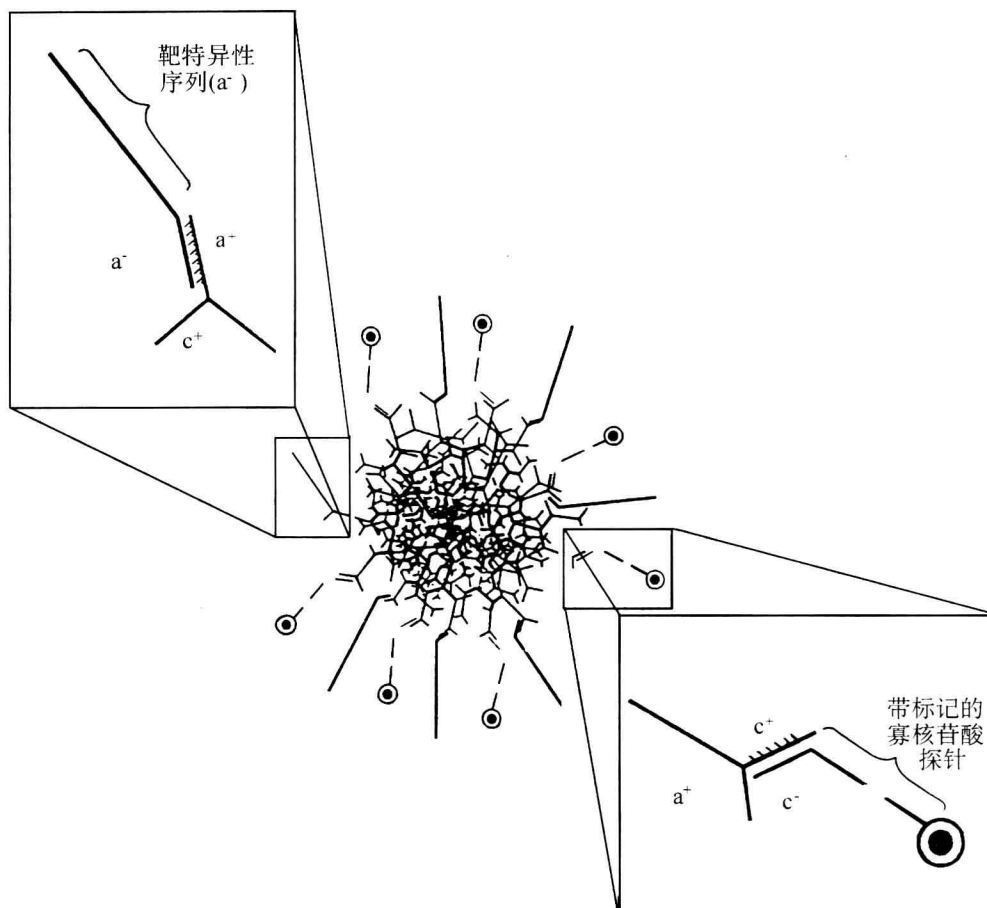


图 2 3 DNA dendrimer 杂交原理示意图

尤其值得注意的是,运用 3 DNA dendrimer 进行分子杂交(只要用简单的斑点杂交即可),所采用的试剂设备、样品处理方法、杂交和洗膜条件与普通的分子杂交完全一样,如用发光生物素标记可直接进行观察,不需要特殊的处理步骤,适用于大量的临床标本检测,尤其适用于各种病原体的检测。

产前基因诊断,一直是倍受遗传学家和医学工作者重视的一种诊断技术,因为它能减少患者的出生,减轻家庭和社会负担,为提高人口素质作出贡献。以往产前诊断主要依赖于羊水、绒毛和脐带血,少数依靠胎儿镜采集标本,这些方法都属侵入性操作,均可能对胎儿和孕妇产生一定的损伤。1992 年 Ganshirt 等人发明了磁性激活细胞分类技术,成功地对进入母体的胎儿细胞进行了分类研究。1996 年 Chang 等人又进一步发展了这一技术,他们成功地分离了胎儿有核红细胞,并对镰形细胞贫血和 β 地中海贫血患儿实施了产前基因诊断,为此《Nature Genetics》还专门发表了评论文章,认为人类迈入了非损伤性产前基因诊断的时代。这一方法的基本原理是应用活化的磁性小珠和磁性化的细胞分类柱分离母体外周血中有核红细胞,然后

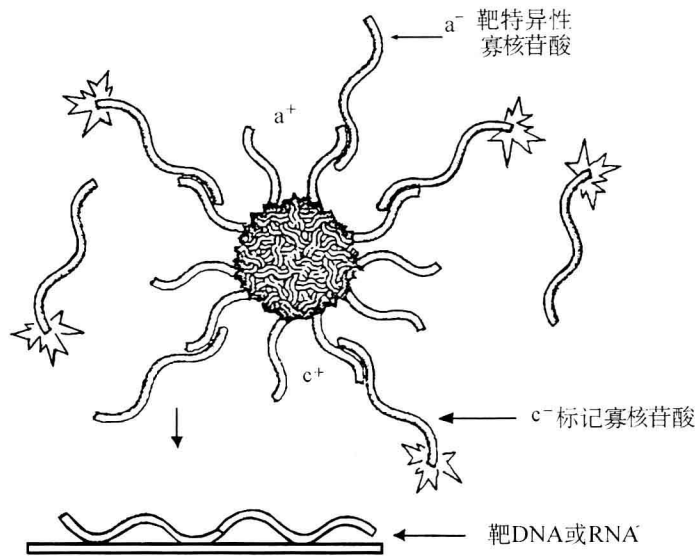


图3 3 DNA dendrimer 作用示意图

用只在胚胎发育 12 周以前(此时红细胞有核)才表达的血蛋白 ζ 基因产物制备的 ζ 球蛋白单克隆抗体,经抗体逐级放大染色后,可特异性识别胎儿有核红细胞,然后在显微镜下分离,进而进行生化、染色体或基因检测。这就排除了母体细胞或存留的胎儿淋巴细胞的干扰,确实反映了正在怀孕的胎儿的真实情况,为产前诊断提供了一个非侵入性的、无损伤的易为孕妇及家庭接受的新方法。

由于分子生物学方法革新太快,今天认为先进的方法很可能在 1~2 年之后又被更为优越的方法所代替,所以这里不打算将目前作者认为是好的方法作一一介绍,只将近 2 年来新的被大家所接受的优势明显的方法推荐给读者。

第六节 人类基因组计划与基因诊断

人类基因组计划(Human Genome Project, HGP)是 20 世纪 90 年代初开始的全球范围的全面研究人类基因组的重大科学项目。它由美国诺贝尔奖金获得者 Dulbecco 在 1986 年首先提出,几经学术界热烈争论,后获得美国国会批准,并由美国国立卫生研究院(NIH)和能源署(DOE)负责执行。各国政府和学术界对这一计划予以高度的关注,并积极地参与了这一计划的研究,国际上还专门成立了人类基因组机构(Human Genome Organization, HuGO)。我国也有许多科学家参加这个组织,并在政府的支持下成立了我国人类基因组计划研究协作组,于 1998 年在上海成立了国家基因组研究中心。

这一宏伟计划的基本内容和目标是建立人类基因组的结构图谱,即遗传图(Genetic Map)、物理图(Physical Map)和序列图(Sequence Map)并在制图测序的基础上鉴定人类的基因,绘出人类的基因图(Gene Map)。预计从 1990 年到 2005 年总共花 15 年的时间完成这一计划。到那时可以将人类基因组总长度为 1 米、由 30 亿个核苷酸组成的序列图搞清楚。在不久