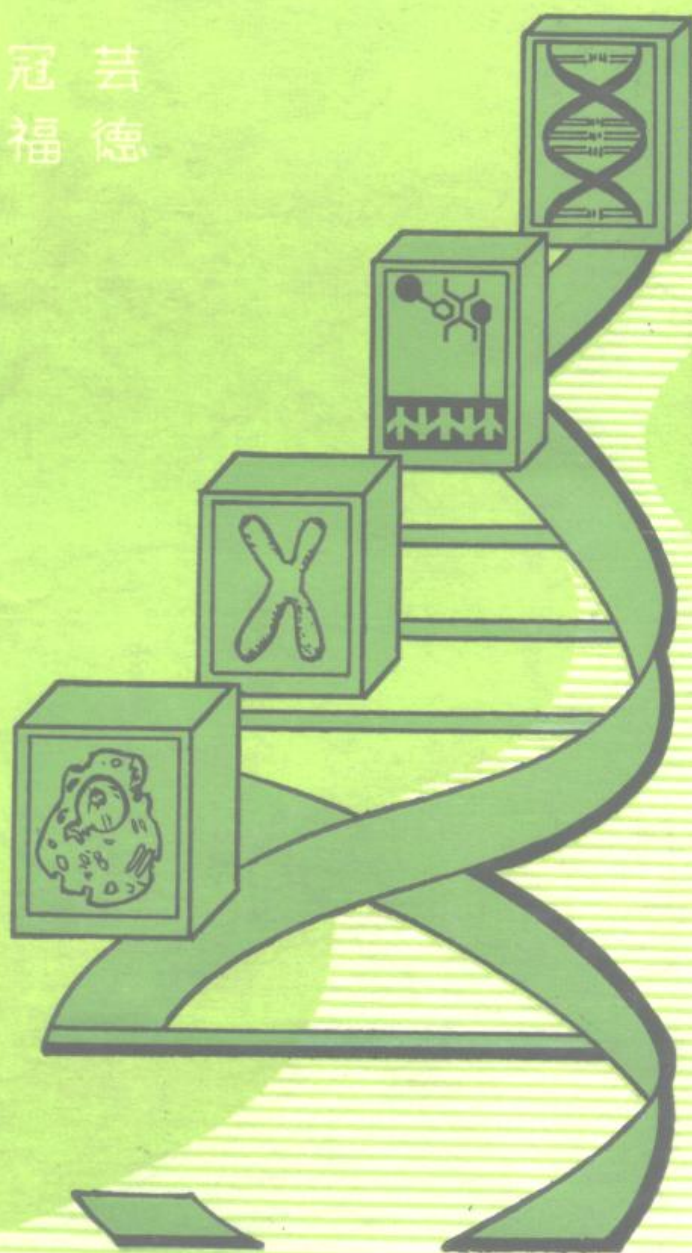


基因诊断 技术及应用

主 编 吴 冠 芸
方 福 德



北京医科大学 联合出版社
中国协和医科大学

基因诊断技术及应用

中国协和医科大学

96555

基因诊断技术及应用

吴冠芸 方福德 主编

北京医科大学
中国协和医科大学联合出版社

〔京〕新登字147号

21/00/36

基因诊断技术及应用

吴冠芸 方福德 主编

责任编辑：袁 钟

*

北京医科大学
中国协和医科大学联合出版社出版

北京昌平星城印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行

*

787×1092毫米 1/16 15.25印张 369千字

1992年9月第1版 1992年9月北京第1次印刷

印数：1—5000

ISBN 7-81034-138-3/R·138

定价：13.60 元

本书顾问 罗会元

参加编写人员

(按姓氏笔画顺序)

马生林	方炳良	方福德	王恩洪
王黎明	左 瑾	司静懿	刘妙良
刘国仰	刘敬忠	沈 岩	吴冠芸
李 昆	陈保生	张俊武	袁丽芳
阎伦飙	黄尚志	琦祖和	

序 言

医学科学的发展使人们已能有效地控制传染病与营养性疾病。在发达国家中,由于这两类疾病的发病率明显下降,遗传患病率相对上升。在北美洲的大医院中,30%的儿科住院病人是因患遗传病或遗传因素起重要作用的疾病而入院的。由于医疗卫生条件的改善和这种疾病谱的变化,该类疾病在我国大城市中也已出现。随着我国科学技术、经济文化的进一步发展,这一趋势必将越来越明显,且将逐渐扩大到农村的广大地区。

所有疾病(外伤性疾病除外)都是遗传因素(或内因)与环境因素(或外因)相互作用的结果,但两者所起作用的程度,随病种而异。遗传因素在某些疾病中起主要的作用,如血友病、白化病、苯丙酮尿症等。在另一些疾病中,如糖尿病、高血压、冠心病、精神分裂症、肿瘤等,除遗传因素外,环境因素也起重要的作用。这些属多因子病或多基因病。在传染病与营养性疾病中,环境因素则起主导的作用。

大多数遗传病的发病率较低,多基因病除外;然而遗传病种类繁多,因此总数却举足轻重。仅仅单基因病就有4 000多种,染色体病有100多种,多基因病也不少于100种。随时间的转移,还会发现更多的遗传病,遗传病的重要性将日益明显。

绝大多数的遗传病目前还没有有效的治疗方法,预防就特别重要。若能在妊娠早期诊断出胎儿是否患病,对患病胎儿行人工流产,即可防止患儿出生。对高风险妊娠进行产前诊断,辅以人工流产,已证明是一种有效预防严重危害健康的遗传病的措施。

羊水细胞与绒毛组织皆源自胎儿,采集的方法相对简易安全,是产前诊断最常用的材料。胎儿的染色体病可通过对它们的核型分析,做出诊断。某些基因在这些细胞中有所表达,可检出它们的产物,如溶酶体水解酶,通过酶活性测定就可以对它们做出产前诊断。但大多数的致病基因在这些细胞中不表达,不可能用常规的方法做出产前诊断。

近十余年来,由于重组DNA技术的问世,分子遗传学得到蓬勃发展。人们对许多遗传病的认识,已深入到基因水平。这不但对遗传病的诊断与预防已起到重大的作用,对治疗也将取得突破性进展。这就是基因诊断与基因治疗。

原则上讲,只要有适当的基因探针(不论是克隆到的基因或基因片段,或是与致病基因紧密连锁的单拷贝DNA片段),就可以对任何一种单基因病进行基因诊断,不论该致病基因是否有所表达、基因产物是否已知。这对于产前诊断特别有价值。这也是为什么基因诊断有巨大的潜力。最近发展的寡核苷酸探针与聚合酶链反应使基因诊断更简便可靠。

基因诊断是一种强有力的诊断方法。目前基因诊断不但已用于产前诊断,也已用于症状前诊断;不但用于单基因病,还用于多基因病、肿瘤、微生物感染、寄生虫病等等。它对医学将起不可估量的影响。所有医学工作者对它应有所了解。

本书对此一迅速发展的领域作了精简扼要的介绍,它结合国情,涉及面广,内容丰富新颖,既有理论又有实验内容,由于撰写者全为第一线工作者,所介绍的方法,皆切实可行;其中的注意事项,更系既往经验教训的结晶,因此必能帮助读者从速建立所需的方法,值得广大同仁一读。

罗会元

一九九一年十二月

前 言

基因诊断是一种新的临床诊断方法，顾名思义，是在基因水平上对疾病或人体状态进行诊断（包括产前诊断）。它是近十余年来分子生物学、分子遗传学和基因工程技术迅速发展给医学带来的一项重要成果。由于这些高新学科和技术所具有的先进性、精确性和更新快等特点，使基因诊断技术不断改进，日臻成熟，其应用范围也在不断扩大。现在可以说，尽管基因诊断技术问世只有很短历史，但已形成自己的特点和优势，而且这些特点和优势在许多场合具有不可替代性。临床医生和科研人员一旦掌握了基因诊断的原理和技术，手中就多了一种有效工具，若将基因诊断与其它诊断技术结合起来，互补相长，对付疾病会更加有力。

由于基因诊断系新事物，其技术本身仍处于继续发展过程之中，其面貌日新月异，它的发展潜力是巨大的，应用将越来越广，重要性将越来越突出。有鉴于此，我们觉得及时把国内外在这一领域中的最新研究和应用成果介绍给国内临床工作者、科研工作者和感兴趣的读者，以帮助和促进开展有关工作，为防病治病和保障健康服务，实为必要和迫切。

所幸的是，在我国北京、上海等大城市已经有一批科研与临床工作者及时地跟上国际发展的步伐，积极地开展了基因诊断工作并取得了可喜的成绩。参加本书编写工作的同志都是在第一线上从事这方面工作的专家，他们熟悉和掌握国际动态，具有较多的实际经验。因此他们撰写的书稿为读者提供了可靠的科学内容，使本书的质量得到了确实保证。罗会元教授对本书的编写工作给予了关心和帮助，并特为之作序。我们衷心感谢他们为此而付出的辛勤劳动。

为了系统地介绍基因诊断的理论、技术和应用，本书安排了四篇内容。第一篇总论，总的介绍了基因诊断的原理、技术、现状和发展趋势。由于遗传病对人口素质和社会经济的影响甚大，其中不少迄今尚未找到可资利用的表型改变，难以用通常的方法诊断，基因诊断在此则大有用武之地。因此在第二篇中我们用了16章的篇幅专门介绍基因诊断在各种遗传性疾病中的应用原理和实例。这些遗传病都是比较常见的和严重的，有的在我国流行较广。如果所介绍的技术能得到推广，将可产生良好的社会效果。

由于疾病谱的改变，一些重大疾病如恶性肿瘤、艾滋病、心血管疾病和某些病毒性疾病（如乙型肝炎和乳头瘤病毒病等）正在困扰着人类，成为当今医学难题。这些疾病对医学的主要挑战是能否寻找到有效的防治方法，基因诊断可以在其中起重要作用。本书第三篇就是介绍基因诊断技术如何在重大疾病的早诊早治、疗效判断、鉴别诊断、分期分型、预测预后中发挥作用的。此外，本篇还介绍了基因诊断在寄生虫病和法医学中的应用。

第四篇介绍基因诊断的实验技术和操作方法，内容翔实，注重实用，其中既有常规的基本技术也有最新技术，如聚合酶链反应（PCR）技术。由于这些技术都是重要的，不宜偏废，故在本篇中均得到充分介绍。

为了便于读者参考，我们从文献资料中搜集部分常用的基本数据列于附录中。

我们希望，本书的出版能对我国临床医学和有关的科研工作作出一点贡献。但是，由于学识水平和经验所限，不足之处在所难免，恳请读者批评指正。

最后，我们要感谢中国企业投资协会科技开发部对本书出版的大力支持。

吴冠芸 方福德

一九九一年十月十二日于北京

目 录

第一篇 总论	(1)
第一章 基因与基因诊断	(1)
一、基因诊断的定义	(1)
二、基因诊断的基本原理	(1)
三、基因诊断的特点	(4)
四、基因诊断的临床意义	(5)
第二章 基因诊断的途径和技术	(5)
一、基因诊断的途径	(5)
二、基因诊断的技术和方法	(7)
三、基因探针	(9)
第三章 基因诊断的现状和展望	(12)
一、基因诊断技术的发展	(12)
二、基因诊断在遗传病中的应用	(13)
三、基因诊断在癌症中的应用	(16)
四、基因诊断在感染性疾病中的应用	(17)
五、多基因病的基因诊断	(18)
六、其它应用	(18)
第二篇 基因诊断在遗传病中的应用	(19)
第一章 α 地中海贫血	(19)
一、 α 珠蛋白基因簇	(19)
二、 α 地中海贫血的分子缺陷	(20)
三、 α 地中海贫血的基因诊断	(23)
第二章 β 地中海贫血	(27)
一、 β 珠蛋白基因结构	(27)
二、 β 地中海贫血的分子基础	(28)
三、 β 地中海贫血基因的人群特异性	(30)
四、 β 地中海贫血的产前诊断	(30)
第三章 甲型血友病	(34)
一、FⅧ基因及其蛋白质的结构	(35)
二、甲型血友病的基因缺陷	(35)
三、甲型血友病的基因诊断	(37)
第四章 乙型血友病	(41)
一、FⅨ基因及其蛋白质结构	(41)
二、乙型血友病的基因缺陷	(42)
三、基因诊断	(45)

第五章 苯丙酮尿症	(47)
一、苯丙氨酸羟化酶基因及其多态性	(48)
二、PKU突变基因分析	(49)
第六章 Duchenne型与Becker型肌营养不良症	(51)
一、DMD基因的结构及表达产物	(51)
二、DMD基因的突变特征	(55)
三、DMD/BMD的基因诊断	(55)
第七章 视网膜母细胞瘤	(61)
一、RB易患基因的多态性分析	(62)
二、突变基因的检测	(64)
第八章 成人型多囊肾病	(65)
一、临床表现与并发症	(65)
二、APKD的分子遗传学	(65)
三、APKD的基因诊断	(68)
四、APKD的遗传异质性	(70)
第九章 囊性纤维变	(71)
一、CF基因的分离	(71)
二、CF基因及其蛋白质的结构	(73)
三、CF的分子机理	(73)
四、CF的基因诊断	(74)
第十章 单纯性生长激素缺乏症	(75)
一、人类生长激素基因簇的组成及GH1基因结构	(76)
二、单纯性生长激素缺乏症的分类及其分子机制	(76)
三、IGHD-1A型患者的临床表现	(77)
四、GH1基因缺失的检测	(77)
第十一章 Wilson's病	(79)
一、WD基因定位	(79)
二、WD基因分析	(80)
第十二章 亨廷顿氏病	(82)
一、基因定位	(82)
二、基因诊断	(82)
第十三章 脆性X-综合征	(85)
一、临床特征及遗传特点	(85)
二、脆性X-综合征的细胞学分析	(86)
三、脆性X-综合征的基因定位	(86)
四、基因诊断	(87)
第十四章 自毁容貌综合征与家族性淀粉样蛋白多发性神经病	(89)
一、自毁容貌综合征	(89)
二、家族性淀粉样蛋白多发性神经病	(91)

第十五章 嗜睡症与情感性精神病·····	(92)
一、嗜睡症或阵发性睡眠症·····	(92)
二、情感性精神病或情感障碍·····	(93)
第十六章 性别检定·····	(94)
第三篇 基因诊断在其它疾病中的应用·····	(98)
第一章 肿瘤·····	(98)
一、基因重排与淋巴样肿瘤的基因诊断·····	(98)
二、基因重排与慢性粒细胞白血病的诊断·····	(103)
三、肿瘤异质性的分子基础: 基因表达图谱分析法用于肿瘤分类分期·····	(107)
四、基因放大与乳腺癌的预后·····	(109)
五、原位杂交技术在肿瘤病理诊断中的应用·····	(111)
第二章 病毒感染性疾病·····	(113)
一、乙型肝炎·····	(113)
二、艾滋病·····	(122)
三、人乳头瘤病毒感染·····	(127)
第三章 高脂蛋白血症·····	(132)
一、血浆脂蛋白、载脂蛋白及其与心血管疾病的关系·····	(132)
二、载脂蛋白基因结构变异的检测和临床意义·····	(137)
三、应用聚合酶链反应鉴定载脂蛋白的遗传变异及其与疾病的关系·····	(139)
第四章 寄生虫病·····	(140)
一、寄生虫病DNA诊断的原理和特点 ·····	(140)
二、疟疾的DNA诊断 ·····	(141)
三、利什曼原虫病的DNA诊断 ·····	(142)
四、锥虫病的DNA诊断 ·····	(144)
五、丝虫病的DNA诊断 ·····	(144)
六、血吸虫病的DNA诊断 ·····	(145)
七、其它应用·····	(146)
第五章 DNA指纹分析在法医学中的应用 ·····	(146)
一、DNA指纹个体特异性的分子基础 ·····	(147)
二、DNA指纹分析所采用的方法 ·····	(147)
三、DNA指纹分析技术在法医科学中的应用 ·····	(149)
四、几个有关的技术问题·····	(150)
第四篇 基因诊断的实验技术·····	(153)
第一章 基因探针的制备·····	(154)
一、质粒DNA的提取 ·····	(154)
二、DNA片段的分离纯化 ·····	(158)
三、DNA的同位素标记 ·····	(162)
四、非放射性标记·····	(168)
第二章 人染色体DNA的制备 ·····	(175)

一、白细胞DNA的提取	(176)
二、绒毛及羊水细胞DNA的提取	(178)
三、脾、肝及胎盘DNA的提取	(179)
第三章 DNA的限制性内切酶降解	(180)
一、限制性内切酶的性质	(180)
二、试剂	(182)
三、方法	(182)
四、注意事项	(182)
五、影响内切酶活性的常见因素	(183)
第四章 DNA片段的电泳分离	(184)
一、琼脂糖凝胶电泳	(184)
二、聚丙烯酰胺凝胶电泳	(188)
第五章 DNA的固相杂交	(190)
一、Southern印迹杂交	(191)
二、DNA琼脂糖凝胶原位杂交	(196)
三、放射自显影技术	(197)
第六章 脉冲场凝胶电泳技术	(199)
一、方法学原理	(199)
二、DNA长度标准	(199)
三、哺乳动物染色体长度DNA制备及酶解	(200)
四、脉冲场电泳	(201)
五、电泳后DNA的Southern转移及杂交	(203)
第七章 聚合酶链反应技术	(203)
一、PCR技术	(203)
二、PCR结合斑点杂交检测基因点突变	(206)
三、PCR结合酶解进行RFLP基因连锁分析	(208)
四、多重PCR	(209)
五、PCR产物的直接测序	(211)
附录	
附录一、DNA常用数据	(214)
附录二、核苷酸的物理性质	(214)
附录三、常用试剂母液的配制	(214)
附录四、常用缓冲液的配制	(217)
附录五、酸与碱的浓度	(218)
附录六、玻璃与塑料器皿的硅化	(219)
附录七、透析袋的处理	(219)
附录八、葡聚糖 (sephadex) 的处理	(220)
附录九、几种常用同位素的数据	(220)
附录十、DNA片段长度标准物	(221)

附录十一、限制性内切酶的识别序列.....	(222)
附录十二、限制性内切酶反应缓冲液用表.....	(224)
附录十三、DNA与RNA的定量	(226)
附录十四、核酸溶液的浓缩.....	(227)
附录十五、遗传密码.....	(229)
附录十六、RFLP 探针及所测RFLP位点的命名.....	(230)

第一篇 总 论

基因诊断是近年来分子生物学与分子遗传学取得巨大进步的结晶，它是在人们对基因的结构与功能以及基因表达与调控等生命本质问题的认识日益加深的基础上产生的。由于基因诊断属于全新内容、全新技术和全新概念的诊断方法，开创了疾病诊断学的新篇章，因而受到了广泛重视和应用，已经并正在继续取得进展，成绩斐然。本篇将从总的方面简要介绍与基因诊断有关的一些基本概念和基本情况。

第一章 基因与基因诊断

一、基因诊断的定义

传统的疾病诊断方法大致有三种：一是临床学诊断；二是血清学诊断；三是生化学诊断。以上诊断方法都是以疾病的表型改变为依据的。现已知道，表型的改变在很多情况下不是特异的，出现的时间往往较晚，因此造成了不能明确诊断和延误病情的困难。由于这些原因，加之晚近关于基因的分子生物学知识迅速积累，大家已经清楚作为生命的物质基础的基因的改变会导致各种表型的改变，进而引起疾病发生。因此，直接探查基因的存在和缺陷，从而对人体状态和疾病作出诊断，这就是基因诊断。在文献中，不少作者也把基因诊断叫做DNA诊断或DNA探针技术或基因探针技术。基因诊断的探测目标及与其它诊断方法的区别示于图1-1-1中。

基因诊断的探测目的物除DNA(基因)外，还包括mRNA，因为mRNA是基因的转录产物，能与DNA探针进行分子杂交。

基因诊断不仅能对某些疾病作出确切的诊断，如确定有遗传病家族史的人或胎儿是否携带致病基因等，也能确定与疾病有关联的状态，如对疾病的易感性；发病类型和阶段；是否具有抗药性等等。

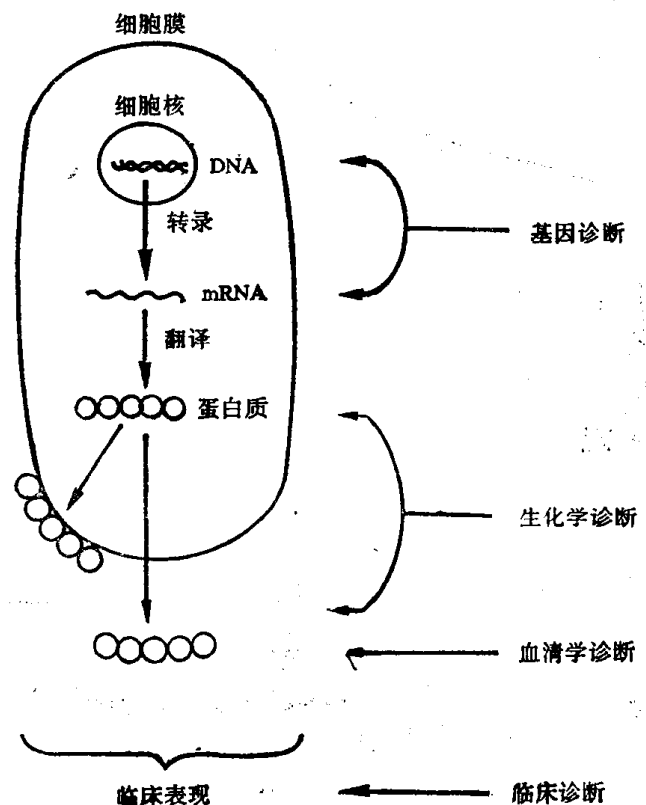


图1-1-1 基因诊断的物质基础及与其它诊断方法的区别

二、基因诊断的基本原理

总的来说，基因诊断的基本原理是运用现代分子生物学和分子遗传学方法检查基因的结

构及其表达功能是否正常。基本的方法是利用 DNA 探针与靶基因形成分子杂交的状况作为各种分析的依据。为了说明这些问题，必须先了解人类基因、基因组织和基因组的一些基本性质。

(一) 人类基因、基因组织和基因组

基因有两种常用的概念，这就是：(1) 遗传学概念。在这个概念中，基因代表生物的遗传物质，是遗传的基本功能单位；(2) 分子生物学概念。这个概念指明基因是 DNA 双螺旋链上的一段，它负载着一定的遗传信息，并可在特定条件下表达这种信息，变成特定的生理功能。研究基因的结构与功能的关系属于这个概念范畴。

人类基因的平均长度约为 $1 \sim 1.5 \text{ kb}$ (千碱基对)，它们编码一条肽链(功能蛋白)、rRNA (核糖体RNA) 或 tRNA (转运RNA)，分别叫蛋白质基因、rRNA 基因和 tRNA 基因。此外，还有一类基因不编码任何东西，但具有重要的调节功能，叫调节基因。在理论上，基因诊断涉及上述所有类型的基因，不过现在通常是针对蛋白质基因而言。

人类蛋白质基因包含五个区域：(1) 外显子(exon)；(2) 内含子(intron)；(3) 前导区，位于编码区上游，相当于 mRNA 5' 端非编码区(非翻译区)；(4) 尾部区，位于 mRNA 3' 端非翻译区；(5) 调控区，包括启动子和增强子等。编码一个蛋白质的 DNA 顺序在基因上是不连续的，被内含子所隔开。内含子也叫插入序列，它们的功能还不很清楚。蛋白质的编码区称为外显子。这些不同功能的基因区域在 DNA 分子中的分布情况称为基因组织(gene organization)。

人体全部基因都组合在一起叫基因组，它包含于一个全长 DNA 分子之中，这个 DNA 分子就叫基因组 DNA。用细胞遗传学方法可以看到，基因组 DNA 包含在细胞染色体中，体细胞核内含有 23 对染色体，性细胞核内只含有 23 条染色体，比体细胞少一倍，故称体细胞为二倍体细胞，性细胞为单倍体细胞。一对染色体中两条染色体所含基因种类、数目和位置都相同，同一位点的基因及其变异体叫等位基因。等位基因中有一个异常者称为病态杂合子，两个异常者则称为病态纯合子。这些概念在遗传病的基因诊断中经常会用到。

人基因组存在三种类型的基因组合，它们是：(1) 高度重复序列。基因序列在基因组中出现次数在 10^6 次以上属于此列，如卫星 DNA。这些高度重复序列 DNA 的浮力密度同主体 DNA 有区别，故在密度梯度超离心时独立于主体 DNA 而自成一个峰，卫星 DNA 的名称就是由此而来。(2) 中等重复序列。基因重复次数在 $10^3 \sim 10^5$ 次之间，如 rRNA 基因和 tRNA 基因，还有组蛋白基因等，均属此范畴。这些基因之所以重复次数如此高，是因为它们的蛋白质产物在机体内消耗量和需求量很大，增加基因拷贝数以适应这种特殊需要是比较有效的途径。(3) 单拷贝基因。一般出现次数仅为一次或几次，绝大多数蛋白质基因属此类基因。上述三种类型基因在基因组中相间排列，构成了五花八门的基因组结构。

基因组合的另一常见现象是，有些结构与功能上相关的基因会聚集在一起，形成基因簇，如人类 α 和 β 珠蛋白基因簇等。

还有一种基因组合的类型是不同基因间发生重排。基因重排的方式和后果多种多样。

(二) 基因的表达与突变

基因表达主要是指遗传信息由基因经信使 RNA (mRNA) 传递给蛋白质的过程。基因经转录先合成 mRNA 的前体 hnRNA (高分子核不均一 RNA)。在人细胞中，hnRNA 必须经过切接加工，切除内含子部分，再拼接成 mRNA (图 1-1-2)。mRNA 在核糖体、tRNA 及有关

酶和蛋白因子参与下合成肽链。蛋白质是基因表达的最终产物。在表达过程中机体将各种基因型表达为与之相对应的各种表型。无数事实已经证明，在基因的所有结构区域和表达过程的每个环节，都有可能发生异常的改变。基因诊断的目的就是要发现这些异常改变及其与人体状态或疾病的关系。

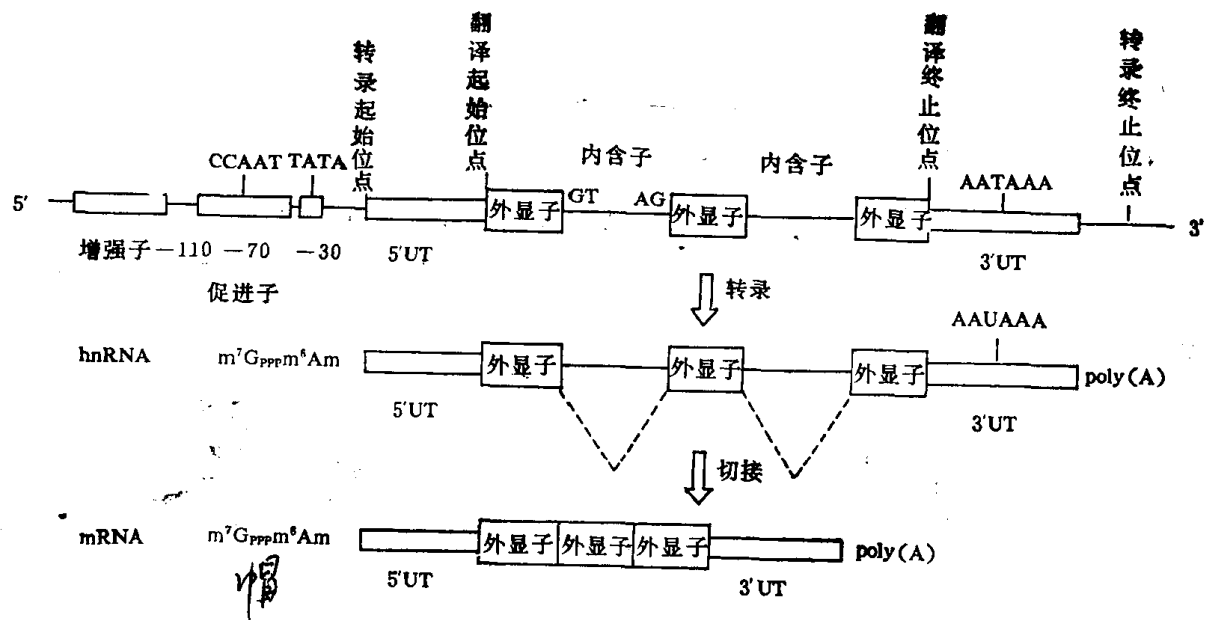


图1-1-2 真核生物蛋白基因的结构和表达示意图
UT非翻译区

基因在内外环境某些因素的影响下可能会发生突变。基因突变有时是生物进化的需要，但在很多情形下却会造成不良后果。基因突变可按不同的原理来分类，就基因结构的改变而言，有以下几种类型：

1. 大片段缺失或插入突变。如 α 地中海贫血绝大多数是由于 α 珠蛋白基因缺失所致（详见第二篇第一章）。有的甲型血友病则在外显子14中出现2~4kb的插入片段。

2. 在基因编码序列中缺失或插入几个碱基，引起阅读框架位移。发生这种突变有的会生成终止密码使翻译提前终止，有的将使产生的蛋白产物的氨基酸序列完全改变，形成无功能的蛋白质或极不稳定的蛋白质。

3. 点突变。按其性质可分为两类：错义突变和无意义突变。错义突变系基因结构中某个碱基为另一种碱基所取代，导致蛋白质分子中相应位置氨基酸的改变。此种突变的后果严重与否取决于突变位置和对蛋白质功能影响的程度。如Constant Spring病例中 α 珠蛋白基因的点突变发生在相当于终止密码处，这使合成的 α 珠蛋白链不能在正确的地方终止，而合成了比正常肽链长几十个氨基酸的肽链，引起严重后果。无意义突变是在基因编码区发生点突变后形成了终止密码，使翻译过程提前终止，导致合成的肽链变短。这种点突变往往产生严重的病情。

（三）核酸分子杂交概念

DNA是由四种碱基（腺嘌呤A、鸟嘌呤G、胞嘧啶C和胸腺嘧啶T）与核糖-磷酸主链连接而成的双螺旋大分子，其双螺旋结构由按碱基配对原则（A-T、C-G）形成的氢键来维

持。从细胞和组织提取出来的DNA系天然态双链，若将DNA溶液经加热处理或碱处理，氢键可被打开，双链DNA解开成为两条单链，这个过程叫DNA变性。热变性时，DNA分子50%解链时的温度称为熔点（ T_m ），DNA的 T_m 值通常在70~85°C之间。DNA热变性后若迅速冷却，每条链形成自身卷曲，部分区域形成链内双螺旋，不能恢复原始双链状态。若缓慢冷却，则可重新恢复原始双链状态。碱变性后经中和处理消除碱性环境后，也能使两条单链DNA恢复原始双链。DNA变性后的这种恢复原状的过程称为复性（图1-1-3），也叫退火。两条互补单链DNA复性变为双链DNA的现象称为核酸分子杂交。核酸分子杂交不仅仅可以在两条互补DNA链之间进行，也可在互补的DNA和RNA链之间进行。如果把单链DNA

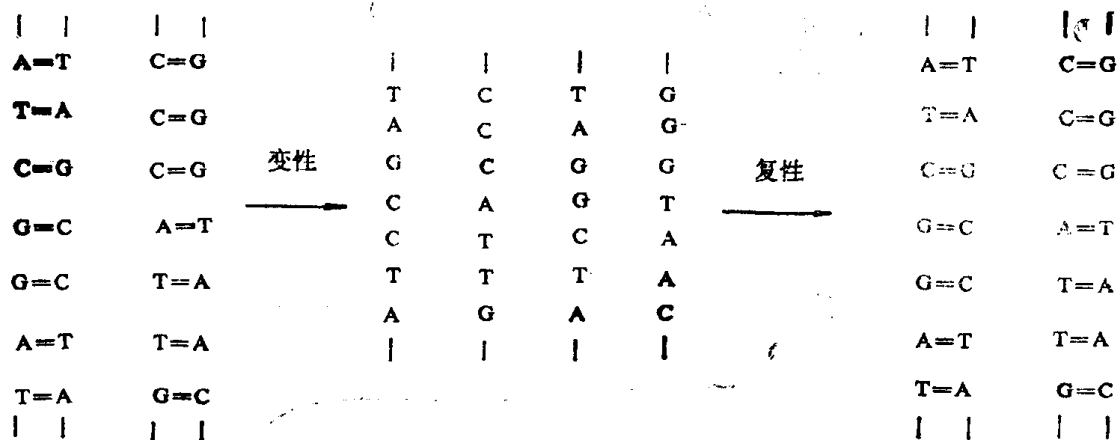


图1-1-3 核酸的变性与复性

或RNA用合适的标记物（如放射性同位素）予以标记，当作探针，进行杂交反应，并用合适的方法（如自显影术）把标记物检测出来，也就把发生分子杂交这一事实肯定下来了。同时由于标记探针是预先知道的基因片段或特定序列，就可推定与之杂交的核酸链是与探针为同源片段或序列。利用这一性质可作各种基因探查，是基因诊断技术的理论基础。由上述可知，如果我们手中掌握足够多的基因探针，分子杂交所能探测的对象和范围将大大扩展。

三、基因诊断的特点

基因诊断由于以基因为探查对象，因而具有一些其它诊断方法所没有的特点，主要有：

1. 以探测基因为目标，属于“病因诊断”，针对性强。又由于其应用的技术以分子杂交为基本原理，故具有很高的特异性。
2. 由于基因探针具有能十分敏感和精确地被检测出来的“标记”，故诊断灵敏度相当高，待测标本只需微量，目的基因只需pg水平。
3. 由于基因探针可为任何来源、任何种类，其探针序列可为已知亦可为未知，其检测目标可为一个特定基因亦可为一种特定的基因组合，可为内源基因亦可为外源基因，所以适应性强，诊断范围广。
4. 被检测的基因是否处于活化状态对基因诊断来说并不重要，因此可对那些具有组织和分化阶段表达特异性的基因及其异常进行检测和诊断。
5. 在感染性疾病的基因诊断中，不仅可检出正在生长的病原体，也能检出潜伏的病原体，既能确定既往感染，也能确定现行感染。对那些不容易体外培养（如产毒性大肠杆菌）

和不能在实验室安全培养（如立克次体）的病原体，基因诊断将使临床实验室大大扩大诊断范围。

四、基因诊断的临床意义

人体疾病状态可以体现在不同层次和不同方面，根据分子遗传学基本法则，基因是根本的决定因素。过去由于人们对基因的分子生物学性质了解不多，只能从表型上考虑诊断方法。近年来由于对基因的结构与功能的认识日益增加，为对那些重要的疾病进行基因诊断创造了条件。由于基因诊断直接瞄准病理基因（致病基因），不仅可以更准确地对各种临床状态和疾病作出诊断，而且有助于搞清病因和病理基因的突变类型，从而更好地了解发病过程和机理，并有可能从实质上对一些疑难疾病进行分类分型，更好地指导和改进治疗，提供制订新的治疗方法和方案的依据，特别是对正在兴起的新一代治疗方法——基因治疗，更是如此。

人口质量是国力的根本性因素。我国是世界人口大国，人口质量同样面临严峻形势。据统计资料表明，我国现有残疾人5000万，其中相当数量是先天畸形（包括先天愚型）和遗传性疾病。由于边远地区和某些农村近亲结婚率高，先天畸形和遗传病的发病率仍呈上升趋势，因此广泛地开展这些疾病的产前基因诊断，杜绝患儿出生，降低发病率，具有重大的、现实的社会意义和经济意义。

随着工业化程度的提高，环境污染和文明病日趋严重，使疾病谱发生显著改变，一些重大疾病（如心脑血管病和癌症等）的发病率和死亡率明显增高，基因诊断技术在诊断这些疾病和判断易感性因素、预告发病等方面可以发挥作用，从而为制订对这些疾病的预防对策和措施作出贡献。

采用DNA探针技术检测感染性流行病原体能够得到直接、可靠的结果，探知不同病原体之间的同源性，为流行病学调查提供可靠资料。因此基因诊断在预防医学中可以大有作为。

目前器官移植（包括骨髓移植）的主要难题是如何解决机体对移植物的排斥反应。采用免疫抑制剂法颇多毒副作用，理想的预防办法是在手术前进行组织配型。基因诊断技术能够分析和显示基因型（如RFLP型及限制酶谱型等），更好地完成组织配型，从而提高器官移植的成功率。

随着基因诊断技术的进一步发展，其在临床上的应用必定会有更大的扩充。

第二章 基因诊断的途径和技术

一、基因诊断的途径

基因诊断的途径主要有三种，即基因突变的检测、连锁分析和mRNA探测，总结于表1-2-1中。采取哪一条途径主要取决于对致病基因及其分子病理学的了解程度和致病基因本身突变类型的复杂性。

（一）基因突变的检测

如果致病基因的某种突变类型与发病具有直接的因果关系，检测这种基因突变以作诊断依据是最理想的途径。对致病基因已经完全了解或部分了解，分子机制完全清楚或部分清楚

表1-2-1 基因诊断的途径

途 径	基因突变检测	连锁分析	基因转录产物探测
内 容	大片段缺失 大片段插入 小片段缺失和插入点突变： 只有一种类型的点突变 突变类型很多但只有一二种占优势 发生在限制酶识别位点上，使酶切位点消失 发生在隐蔽位点上使酶切位点增加	限制性片段长度多态 性家系连锁分析 连锁不平衡	mRNA 检测

但已有规律可循的，可采取直接检测基因内的突变。

(二) 基因连锁分析

在临床实际中，利用检测突变作基因诊断，适用病种比较有限，主要原因是：(1) 致病基因可在任何位点上产生突变，致使同一种疾病有不同的突变类型；(2) 不少致病基因虽已知道其在染色体上的位置，但并未克隆出来，对其基因结构和分子机制毫无所知；(3) 有的致病基因尚未确定。由于这些原因，多数遗传病不能采用突变检测途径，而需采用基因连锁分析。

连锁是指同一条染色体上相邻近的基因一起被遗传，可以作为遗传标志，这样只要鉴定后者的存在，就可以判断受检者是否带有致病基因。连锁分析主要是应用限制酶片段长度多态性 (RFLP) 为遗传标志，进行家系分析。在人类基因组中，平均约 200 个碱基对可发生一对变异 (称为中性突变)，中性突变造成了序列上的多态性，不少序列多态性发生在限制酶识别位点上，产生了限制酶酶切位点的多态性。用该限制酶水解 DNA 就会产生长度不同的片段，称为限制酶片段长度多态性。在人类基因组 DNA 中，中性突变可发生在编码序列，也可发生在非编码序列，编码序列由于负责特定的功能，在进化过程中形成了较强的保守性以适应较高的自然选择压力。相反，非编码序列选择压力较小，故较少保守性，中性突变发生频率较高，并可在群体中稳定地遗传下来，因而成为一种遗传标志。通过家系分析有可能区分双亲的两条染色体，确定其中哪条具有正常基因，哪条带有有缺陷的致病基因。如果双亲的染色体能够完全区分，基因诊断率可达 100%。如果双亲中只有一方的染色体能够区分，则只能做出 50% 的排除诊断。所以连锁分析也具有一定的局限性，就是说，进行基因连锁分析必须具备一些先决条件：(1) 家系中的关键成员 (父母) 为 RFLP 杂合子，这样才可能区分两条同源染色体。X 连锁的遗传病只要母亲为某一 RFLP 杂合子即可；(2) 子代中存在患病的纯合子，这样才能确定致病基因与哪条染色体的 RFLP 共同遗传；(3) 任何一种遗传病，单独使用一种 RFLP，均有相当一部分父母的染色体无法区分。所以需要联合使用若干种 RFLP 和相应的探针，以提高诊断率；(4) 受检的亲代必须为生物学意义上的亲代。除此之外，连锁分析也存在一定的错误率，这除了人为差错因素外，也与 RFLP 连锁分析方法本身的差错程度有关。在减数分裂中间，一对染色体的某些区域可发生重组或交换，从而使得原先共同遗传的 DNA 突变与 RFLP 发生分离，这种情况下作出的连锁分析结果就会发生错误。诊断的错误率可以以 DNA 标志与疾病的共遗传程度来估计，重组率高于 5% 的连锁探针不宜采用。事实表明，除个别情况外，由于染色体重组所致的错误诊断率小于 1%，因此，RFLP 连锁分析通常是可靠的。