

分子诊断学

—— 基础与临床

吕学诜 主编



科学出版社

www.sciencep.com

分子诊断学

——基础与临床



人民卫生出版社

分子诊断学

——基础与临床

主 编
副主编
编 委

吕学诜

尤其敏 李 钰 李 晖

(按姓氏笔画为序)

尤其敏 中国科学院北京基因组研究所,杭州优思达生物技术有限公司董事长

王长山 佳木斯大学基础医学院

王宏莹 杭州优思达生物技术有限公司

付成显 佳木斯大学医学检验系

刘 爽 佳木斯大学基础医学院

吕冬霞 佳木斯大学基础医学院

吕佳南 佳木斯大学第一附属医院

吕学诜 佳木斯大学基础医学院

朱金玲 佳木斯大学基础医学院

李 钰 哈尔滨工业大学生命科学与工程系

李 晖 哈尔滨医科大学基础医学院

杜爱林 新乡医学院基础医学院

吴青田 佳木斯大学第二附属医院

张春斌 佳木斯大学基础医学院

张秋迟 佳木斯大学第二附属医院

罗佳滨 佳木斯大学基础医学院

胡 林 温州医学院眼病研究所

赵丽娜 佳木斯大学第二附属医院

赵冰海 吉林大学公共卫生学院

徐高连 杭州优思达生物技术有限公司

蔡 莉 哈尔滨医科大学附属肿瘤医院

樊 红 东南大学遗传学研究中心

科 学 出 版 社

北 京

内 容 简 介

本书共分三篇 24 章,第一篇比较精炼、准确地介绍了分子诊断的遗传学基础知识,可为学习和从事分子诊断的人员打下良好的知识基础;第二篇较为详细地介绍了分子诊断的基本技术,其中包括了很多最新的技术方法,可具体指导分子诊断的工作;第三篇比较全面地介绍了分子诊断的应用,说明分子诊断不仅在疾病的预防和诊断、预后的判断、疗效的监测、健康状况的评价以及疾病预测等领域均具有重要的应用价值,而且对法医学、药学、考古学等领域也有重要意义。

本书可作为相关医学院校的学生、教师、医生、检验师以及从事分子诊断的科研人员的教材或参考书。

图书在版编目 (CIP) 数据

分子诊断学—基础与临床 / 吕学洗主编. —北京:科学出版社,2008
ISBN 978-7-03-022094-3

I. 分… II. 吕… III. 分子生物学—实验室诊断 IV. R446

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2008) 第 073851 号

策划编辑:李国红 / 责任编辑:周万灏 李国红 / 责任校对:钟 洋
责任印制:刘士平 / 封面设计:黄 超

版权所有,违者必究。未经本社许可,数字图书馆不得使用

科 学 出 版 社 出 版

北京东黄城根北街16号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

中国科学院印刷厂印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2008 年 7 月第 一 版 开本:787 × 1092 1/16

2008 年 7 月第一次印刷 印张:23 1/4

印数:1—2 000 字数:648 000

定价:78.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换〈科印〉)

作者简介

吕学诜:男,1938年出生,1959年毕业于北京师范大学生物系,现任佳木斯大学医学遗传学教授,硕士研究生导师。曾任佳木斯医学院院长、佳木斯大学校长、中国遗传学会教育委员会副主任委员、人类遗传学委员会副主任委员、中华全科医学会理事、中国医药生物技术协会理事、黑龙江省中华医学会黑龙江省分会副理事长等。曾发表过80余篇学术论文,参编、副主编、主审过五部学术专著或高校教材。曾获得过黑龙江省科技进步奖、省卫生厅、省教委科技进步奖四项。1993年获国务院政府特殊津贴。

尤其敏:男,1956年出生,1982年毕业于佳木斯医学院医学系,1986年赴加拿大维多利亚大学学习,1993年获生物化学博士学位。1993年6月~1995年3月在美国宾夕法尼亚大学医学院从事基因疗法的研究(博士后)。自1995年以后,尤其敏先后在BD公司(Becton Dickinson & Co.)、摩托罗拉公司(Motorola)生物芯片部和优创公司(Xeotron Corporation)工作,主要从事生物技术的新技术、新产品的研发。尤其敏博士是11项已批准的美国专利和33项世界专利的发明人,另有8项专利申请仍在审批中。2003年5月归国,先后被聘为中国科学院北京基因组研究所客座研究员、温州医学院、佳木斯大学、哈尔滨工业大学生命科学与工程系客座教授以及硕士、博士研究生导师。目前,尤其敏博士与胡林博士等共同创建了杭州优思达生物技术有限公司,任董事长兼总经理。

李 钰:女,1962年出生,1985年毕业于佳木斯医学院医学系,1997年在哈尔滨医科大学获博士学位,1997年9月~1999年9月哈尔滨医科大学公共卫生学院博士后训练,2001年6月~2003年3月美国哈佛大学医学院访问学者。现任哈尔滨工业大学生命科学与工程系系主任、教授、博士生导师/博士后合作导师。李钰博士多年来始终从事分子细胞生物学和遗传学的科研及教学工作,研究论文在国内外专业杂志及重要学术会议上发表近60篇,出版或参与出版著作10余部。先后有多项教学和科研成果获得国家、省部和厅局级奖励。主持国家自然科学基金项目两项,国家自然科学基金国际合作项目一项,黑龙江省自然科学基金和省教委项目各一项。

李 晖:女,1955年出生,1994年在佳木斯医学院获硕士学位,1997年在哈尔滨医科大学获博士学位,1997年9月~1999年12月在哈尔滨医科大学临床药理学博士后流动站训练,2000年1月~2003年1月在美国耶鲁大学细胞与分子生理学系和LSU医学中心作博士后。现任哈尔滨医科大学生物化学与分子生物学教研室副主任、教授、博士生导师。李晖博士自1994年以来一直从事心血管疾病发病分子机制及心肌保护因素的保护作用的研究。先后在国内外专业杂志上发表30多篇研究论文。1999年获黑龙江省科技进步二等奖,2001年获国家教育部科学技术进步二等奖。现主持国家自然科学基金、黑龙江省教育厅海外学人重点项目、黑龙江省自然科学基金项目、黑龙江省卫生厅科技项目、黑龙江省教育厅科技资助项目等七项。

序

分子诊断(molecular diagnosis)是以 DNA、RNA 或蛋白质分子为诊断材料,通过检查人体内源基因或外源(病原体)基因的存在、缺陷或表达异常,对人体状态或疾病做出特异性诊断的方法和过程。随着人类基因组计划和后基因组(蛋白质组)计划的实施,分子诊断学得到了进一步的完善和成熟。分子生物学与现代医学的结合,使实验室诊断已经远远超出了单纯辅助临床诊断的范围,分子诊断学在疾病的预防、预后的判断和疗效的监测、健康状况的评价以及疾病预测等领域,正发挥着越来越大的作用。近年来国内外纷纷成立医学分子诊断中心。

分子诊断学不仅在医学诊断中发挥重大作用,而且在药理学、法医学、考古学及其他相关领域具有重要的作用,这是一门发展迅速、应用前景广阔并逐步走向独立的新兴学科。虽然分子诊断学的研究和应用日益受到人们的重视,但一直以来,缺乏对其进行系统性介绍的书籍。

当我有幸初读吕学洸教授主编的《分子诊断学——基础与临床》书稿后,欣然命笔,成此小段,以表读后心中之喜,并向广大读者积极推荐。相信该书的出版,对我国分子诊断学的发展一定会发挥重要的指导作用。

李璞

于哈尔滨医科大学

2007 年 9 月 2 日

前言

由于分子生物学的迅猛发展,对疾病的认识、诊断、预防和治疗都产生了深刻的影响,对医学科学的进步起了巨大的推动作用。分子生物学技术与医学检验和临床医学的结合,产生了《分子诊断学——基础与临床》。经典的实验室诊断主要有生物化学检验、免疫学检验、血液学检验和微生物学检验等,一般说来,这些诊断方法多是以检出人体疾病或者病原体的表型(phenotype)改变为目的,而通过分子诊断可以检出人体疾病或者病原体的基因型(genotype)及其表达特性。随着人类基因组计划和后基因组(蛋白质组)计划的实施,分子诊断学得到了进一步的完善和成熟。而现代医学的发展,使实验室诊断已经远远超出了单纯辅助临床诊断的范围,在疾病的预防、预后的判断、疗效的监测、健康状况的评价以及疾病预测等领域,正发挥着越来越大的作用。可以毫不夸张地说:分子诊断是具有划时代意义的检测手段,必将对医学的发展产生重大影响。

编写本书的目的是:①力求详细地总结、阐述分子诊断学的基础知识、基本方法与技术及其临床应用,希望建立真正独立的理论体系和更加完善的技术平台,以便推进我国分子诊断学的发展;②结合我们在分子诊断学教学、科研和临床应用中的经验体会,分析分子诊断学发展中的问题及其对策,使其在医学、药学、法医学和考古学等领域发挥更大的作用;③根据世界卫生组织为发展中国家基层医疗单位制定的诊断试剂标准,和我国保证人民群众公平享有基本卫生保健,构建和谐社会的精神,探讨如何研究开发低价、简单、快速、准确的分子诊断试剂和方法的策略、思路及基本技术。

本书共分三篇,第一篇介绍分子诊断的理论基础,包括六章,分别是基因组、蛋白质组学、遗传多态现象、遗传与疾病、表观遗传学、肿瘤分子遗传学;第二篇介绍分子诊断的基本技术,计十章,分别为分子诊断的策略和基本方法、分子诊断样品制备技术、分子克隆技术、核酸分子杂交技术、核酸扩增技术、DNA 测序技术、单核苷酸多态检测技术、生物芯片技术、蛋白质组学技术和生物信息学在分子诊断中的作用;第三篇介绍分子诊断的应用,其中分别介绍单基因疾病的分子诊断、多基因疾病的分子诊断、肿瘤疾病的分子诊断与预测、感染性疾病的分子检测、分子诊断在耐药性研究中的应用、分子诊断在个性化医疗中的应用、分子诊断的其他应用和分子诊断发展中的问题及其对策,计八章。全书共计二十四章。

《分子诊断学——基础与临床》走向成熟是个漫长而艰巨的过程,这正考验着先行者们的才智,煎熬着实践者们的意志,只有经历过时间洗礼和大浪淘沙般历练的事物才可能得以生存和壮大。“宝剑锋从磨砺出,梅花香自苦寒来”这一训示适用于一切事物。而最终受益者将是人民大众。

由于作者水平所限,书中欠妥之处在所难免,敬请批评指正。衷心希望大家共同努力,为分子诊断学的繁荣,为中国和所有发展中国家基层医疗单位开发出更多的低价、简单、快速、准确的分子诊断试剂和方法做出应有的贡献。

吕学说
于佳木斯大学
2007年9月10日

目 录

序	(i)	绪论	(1)
前言	(iii)		

第一篇 分子诊断的理论基础

第一章 基因组	(6)	第四章 遗传与疾病	(48)
第一节 人类基因组	(6)	第一节 遗传病的类型	(48)
第二节 后基因组研究	(8)	第二节 单基因病	(49)
第三节 线粒体基因组	(14)	第三节 多基因病	(53)
第四节 微生物基因组	(17)	第四节 线粒体病	(56)
第二章 蛋白质组学	(20)	第五节 遗传流行病学	(58)
第一节 蛋白质组学概述	(20)	第六节 遗传易感性	(59)
第二节 蛋白质相关研究	(21)	第五章 表观遗传学	(64)
第三节 疾病蛋白质组学	(22)	第一节 表观遗传学概述	(64)
第四节 药物蛋白质组学	(27)	第二节 表观遗传修饰	(65)
第三章 遗传多态现象	(29)	第三节 表观遗传相关疾病	(69)
第一节 遗传多态性	(29)	第四节 表观遗传学展望	(71)
第二节 分子标记	(31)	第六章 肿瘤分子遗传学	(72)
第三节 HLA 多态性	(33)	第一节 肿瘤的遗传性	(72)
第四节 限制性酶切片段长度 多态性	(36)	第二节 癌基因与抑癌基因	(73)
第五节 短串联重复序列	(39)	第三节 肿瘤与细胞周期调控	(76)
第六节 单核苷酸多态性	(41)	第四节 肿瘤转移的分子基础	(77)
第七节 药物遗传多态性	(46)	第五节 肿瘤防治的分子策略	(82)

第二篇 分子诊断的基本技术

第七章 分子诊断的策略和基本方法	(86)	第二节 分子克隆常用工具酶	(110)
第一节 分子诊断的策略	(86)	第三节 分子克隆常用载体	(113)
第二节 分子诊断的基本方法	(89)	第四节 分子克隆的基本步骤	(119)
第八章 分子诊断样品制备技术	(94)	第十章 核酸分子杂交技术	(123)
第一节 检测样品的采集和保存	(94)	第一节 核酸分子杂交简介	(123)
第二节 核酸的分离与纯化	(95)	第二节 核酸探针	(124)
第三节 真核生物 DNA 样品制备 技术	(98)	第三节 核酸分子杂交的基本方法	(128)
第四节 质粒 DNA 样品制备技术	(101)	第十一章 核酸扩增技术	(137)
第五节 真核生物 RNA 样品制备 技术	(102)	第一节 PCR 技术的基本原理	(137)
第六节 蛋白质样品制备技术	(104)	第二节 PCR 技术的基本条件	(138)
第九章 分子克隆技术	(110)	第三节 PCR 技术的主要类型	(141)
第一节 分子克隆技术概述	(110)	第四节 PCR 技术的主要用途	(148)
		第五节 连接酶链反应	(149)
		第六节 核酸恒温扩增技术	(151)

第十二章 DNA 测序技术 ····· (159)	第四节 其他芯片技术 ····· (198)
第一节 DNA 测序技术发展概述····· (159)	第五节 芯片的扫描装置 ····· (200)
第二节 DNA 测序策略····· (159)	第六节 生物芯片的生物信息学 ····· (203)
第三节 DNA 测序主要技术····· (162)	第十五章 蛋白质组学技术 ····· (205)
第四节 其他常用的 DNA 测序系统 ····· (166)	第一节 蛋白质组学研究技术概述 ····· (205)
第五节 DNA 测序新技术····· (168)	第二节 蛋白质组研究的凝胶与 非凝胶技术····· (206)
第六节 DNA 测序技术的应用····· (171)	第三节 生物质谱技术与蛋白质 鉴定····· (212)
第十三章 单核苷酸多态检测技术 ····· (173)	第四节 蛋白质相互作用····· (218)
第一节 SNPs 的筛查策略····· (173)	第五节 蛋白质组翻译后修饰分析 ····· (223)
第二节 凝胶电泳分析技术····· (173)	第十六章 生物信息学在分子诊断 中的作用 ····· (228)
第三节 分子杂交技术····· (175)	第一节 生物信息学概述····· (228)
第四节 荧光共振能量转移····· (176)	第二节 生物信息学在医学中的 应用····· (228)
第五节 荧光偏振法····· (179)	第三节 生物信息数据库····· (229)
第六节 酶学检测技术····· (179)	第四节 中国生物信息数据库····· (234)
第七节 MALDI-TOF 质谱分析····· (181)	第五节 数据库查询和数据库搜索 ····· (235)
第八节 变性高效液相色谱法····· (183)	第六节 核酸与蛋白质序列分析和 功能预测····· (238)
第九节 基因芯片法····· (185)	
第十节 DNA 序列分析技术····· (187)	
第十一节 SNP 检测方法的发展 趋势····· (189)	
第十四章 生物芯片技术 ····· (190)	
第一节 生物芯片概述····· (190)	
第二节 基因芯片····· (191)	
第三节 蛋白质芯片····· (196)	

第三篇 分子诊断的应用

第十七章 单基因疾病的分子诊断 ····· (242)	第十九章 肿瘤疾病的分子诊断与预 测 ····· (275)
第一节 血红蛋白病的分子诊断····· (242)	第一节 肿瘤的分子标志····· (275)
第二节 肌营养不良症的分子诊断 ····· (246)	第二节 肿瘤的分子分类与分期 ····· (281)
第三节 血友病的分子诊断····· (248)	第三节 肿瘤的分子诊断····· (285)
第四节 $\alpha 1$ 抗胰蛋白酶缺乏症的分子 诊断····· (250)	第四节 肿瘤的分子预测····· (290)
第五节 Leber's 遗传性视神经病变 ····· (252)	第二十章 感染性疾病的分子检测 ····· (294)
第六节 其他单基因疾病的分子 诊断····· (256)	第一节 感染性疾病分子诊断的 策略····· (294)
第十八章 多基因疾病的分子诊断 ····· (259)	第二节 感染性疾病分子诊断方法 ····· (296)
第一节 复杂疾病的分子诊断····· (259)	第三节 病毒的分子检测····· (303)
第二节 糖尿病····· (262)	第四节 细菌感染的分子检测····· (310)
第三节 家族性高脂血症····· (264)	第五节 衣原体的分子检测····· (315)
第四节 高血压····· (267)	第六节 支原体的分子检测····· (316)
第五节 支气管哮喘····· (270)	第七节 螺旋体的分子检测····· (317)
第六节 皮肤复杂疾病····· (272)	第八节 原虫的分子检测····· (318)

第二十一章 分子诊断在耐药性研究中的应用	(320)	应用		(343)
第一节 耐药性概述	(320)	第四节 分子诊断在新生儿筛查中的应用		(345)
第二节 耐药基因的检测和分析	(323)	第五节 分子诊断在预防医学检验中的应用		(346)
第三节 耐药菌株的鉴定与分型	(325)	第二十四章 分子诊断发展中的问题及其对策	(348)	
第四节 多药耐药基因的检测和分析	(327)	第一节 分子诊断在感染性疾病应用中的问题和对策	(348)	
第二十二章 分子诊断在个性化医疗中的应用	(331)	第二节 易感基因诊断中的问题和对策	(348)	
第一节 个性化医疗概述	(331)	第三节 肿瘤分子诊断和预测的成就和发展方向	(349)	
第二节 药物基因组学与个体化用药	(331)	第四节 分子诊断的伦理问题	(351)	
第三节 肿瘤的个体化治疗	(333)	第五节 分子诊断的质量管理和标准化	(352)	
第四节 个性化医疗之诊断特征	(335)	第六节 分子诊断的技术问题和发展方向	(353)	
第二十三章 分子诊断的其他应用	(337)	主要参考文献	(357)	
第一节 分子诊断在移植配型中的应用	(337)			
第二节 分子诊断在法医学鉴定中的应用	(339)			
第三节 分子诊断在产前诊断中的				

绪 论

医学检验学 (medical laboratory sciences) 是一门涉及多专业、多学科的边缘性学科,是基础医学与临床医学的桥梁学科,也是临床医学在诊断、治疗、判断预后和预防等方面的实用性学科。由于医学检验学所进行的检验工作均在实验室内完成,所以又称为实验诊断学 (laboratory diagnostics) 或临床检验诊断学 (clinical laboratory diagnostics)。随着分子生物学的迅速发展,医学检验学亦逐渐进入分子水平。

分子诊断学 (molecular diagnostics) 是一门全新的疾病诊断学科,它以分子生物学理论为基础,利用分子生物学的技术和方法来研究人体内源性或外源性生物大分子 (包括 DNA、RNA 和蛋白质) 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。它是一门迅速发展、有广阔应用前景的学科,也是检验医学 (实验诊断学) 的一门极为重要的分支学科。

一、分子诊断学的发展简史

1. 实验诊断学的产生和发展

现代医学中,实验室的检查在诊断工作中起着重要作用。往往提供重要的客观诊断依据,在一些疾病诊断中甚至有决定性的意义。正是由于实验室检查在诊断工作中的重要性。从诊断学中逐步独立出一个新的学科——实验诊断学 (laboratory diagnostics)。实验诊断学主要是运用物理学、化学和生物学等实验技术和方法,通过感官、试剂反应、仪器分析和动物实验等手段,对患者的血液、体液、分泌物、排泄物以及组织细胞等标本进行检验,以获得反映机体功能状态、病理变化或病因等客观资料。实验诊断学运用基础医学的理论和临床技术为临床医学服务,并且逐步形成了以临床细胞学检测、临床生物化学检测、临床微生物学检测、临床免疫学检测为主体的多学科综合实验室,而且它不仅可用于疾病的诊断、鉴别诊断、疗效观察和预后监测,还为制定预防措施提供重要依据。随着基础医学的飞速发展,先进科学技术和实验仪器的广泛应用,实验诊断学的内容不断充实、发展和深化,检测项目范围也不断拓宽,使实验诊断学与临床之间的关系更为密切,尤其是现代化实验技术以微量、快速、自动和组合为特点,将传统的检测手段提

高到现代化科学技术新水平,因而对疾病的诊疗更具有实用价值。

2. 实验诊断学的更名

由于实验诊断学在基础医学和临床医学中的作用越来越重要,实际上不仅在疾病诊断上,而且在患者治疗中也有很多地方需要实验室的配合,有时甚至起着至关重要的作用,如在判断疾病预后、治疗疗效时,实验室检查同样是重要的客观指标。所以从 20 世纪 90 年代以来,国外越来越多采用“Laboratory Medicine”作为本学科的名称,医院中的检验科也往往命名为“Department of Laboratory Medicine”。国际上著名的临床化学组织——国际临床化学联合会 (IFCC) 已正式更名为“International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine”,著名杂志“Clinical Chemistry”也增加了一个副刊名“International Journal of Laboratory Medicine and Molecular Diagnostics”。

我国对“laboratory medicine”中文译名曾有争论,有人按字意直译为“实验医学”或“实验室医学”,但此名词易使人误解。多数人认为译名为“检验医学”更为合适,因为“检验医学”首先不会使人误解为此学科属于医学院的基础学科实验室或医院中的科研实验室。人们都比较明确这是指医院中的检验科,其次人们不会误解为只是一个技术学科,因为这名词说明此学科和医学活动紧紧连在一起,是医学中的一部分。过去我国曾经长期使用医学检验学作为本学科名称,此名称相当于英语的“medical technology”。现在我国医学界已普遍正式使用“检验医学”名称。我国著名的“中华医学检验杂志”已在 2000 年改名为“中华检验医学杂志”。各医学院校也纷纷把有关院系命名为“检验医学院”或“检验医学系”。

因为实验诊断学的快速发展,实验诊断学更名为检验医学,不仅使实验诊断学有了一个恰当的名称,而且更进一步地说明检验医学在医学中的重要地位,在整体医学中具有不可替代的重要作用。

3. 四代实验室诊断技术的发展

实验诊断的历史是从在患者床边用简单的小工具进行个别单项体液检测开始,逐步发展成为组织结构完善的诊断性实验室。但是人们仍

然习惯把早期的细胞学检查(以及体液小检测与微生物检查)、20世纪50年代发展的生化指标分析、60年代兴起的免疫学诊断和70年代末诞生的分子诊断,分别叫做第一、二、三、四代实验室诊断技术。前三代诊断技术的共同点都是以疾病的表型(phenotype)改变为依据,也就是说,长期以来,疾病的诊断主要依据病史、症状、体征和各种辅助检查,如血液学、病理学、免疫学、微生物学、寄生虫学乃至物理学检查等。以细胞形态结构变化、生化代谢产物异常、特定蛋白质分子识别差异等为依据来判断疾病,这属于描述性诊断。然而,上述检查方法都具有其各自的局限性,许多疾病在患者表型的改变即出现症状、体征及生化改变之前就已存在相当一段时间,患者的表型常常在病程的中晚期才出现,从而使得许多疾病未能被及时准确地诊断,延误了治疗良机。而且,受多种因素的影响,在很多情况下患者的表型并不特异,因此,这些诊断方法不能满足临床对疾病早期诊断、早期治疗的需求。人们一直在盼望能找到一种技术,在疾病一旦发生,甚至尚未出现症状、体征及生化改变之前,就能做出诊断。对于某些可能的致病因素,包括食品、水质、环境中存在的病原体,人们也期望能有简单准确的方法及时进行检测。

分子生物学技术的发展使人们渴望已久的上述愿望得以实现,在分子生物学理论和技术发展基础上建立起来的一门全新的诊断技术,就是基因诊断(gene diagnosis)。通过基因诊断可以检出人体疾病或者病原体的基因型(genotype)。基因诊断主要以疾病基因为探查对象,属于病因学诊断,对基因的检测结果不仅具有描述性,更上升到了预测性。

随着人类基因组计划的完成和后基因组计划的实施,基因诊断得到了进一步的完善和成熟。基因诊断的研究范围已从早期对单基因遗传病检测扩大到感染性疾病、多基因遗传病、疾病基因的易感性和耐药性检测等多个领域,并且被广泛应用于产前和早期诊断遗传性疾病,检出感染疾病潜伏期的病原微生物,以及预测和早期发现某些恶性肿瘤。

由于基因表达调控机制和表观遗传学的研究发展,现代基因诊断检测的靶分子除了DNA之外,还包括RNA和蛋白质,因此,狭义的基因诊断(DNA分析)则逐步扩展为相对广义的分子诊断(molecular diagnosis),即包括DNA、RNA、蛋白质分析,那些与疾病密切相关的、可用于进行分子诊断的特定分子异常改变也被称为生物分子标志物。

而现代医学的发展,使实验室诊断已经远远超出了单纯辅助临床诊断的范围,在疾病的预防、预后的判断和疗效的监测、健康状况的评价以及疾病预测等领域,正发挥着越来越大的作用。可以毫不夸张地说:分子诊断是具有划时代意义的检测手段,必将对医学的发展产生重大影响。

4. 分子诊断技术的发展

回顾分子诊断学的发展历史与分子生物学的发展是密不可分的,分子诊断学的发展大致经历了3个阶段:

(1) 使用已知序列的单链核酸片段作为探针去查找各种不同来源的基因组DNA分子中的同源基因或同源序列。核酸探针可用放射性核素、生物素或其他活性物质标记,是能与特定的核酸序列发生特异性互补的已知DNA或RNA片段。根据其来源和性质可分为cDNA探针、基因组探针、寡核苷酸探针、RNA探针等。

(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(biochip)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、组织芯片和芯片实验室等,由于其工作原理和结果处理过程突破了传统的检测方法,不仅具有样品处理能力强、用途广泛、自动化程度高等特点,而且具有广阔的应用前景和商业价值,因此,成为分子诊断技术发展的新阶段。

二、分子诊断的基本类型

分子诊断广泛应用于基础医学、临床医学、法医学和药学中,就其基本的应用领域——疾病诊断可分为以下几种基本类型。

1. 临床分子诊断

医生根据患者病史、症状为明确或排除某一疾病而进行的分子检查。既可以通过直接探查基因的存在状态或缺陷,检测的基因有内源性(即机体自身的基因)和外源性(如病毒、细菌等)两种,前者用于诊断基因有无病变,后者用于诊断有无病原体感染,也可以从基因结构、定位、复制、转录或翻译水平分析基因的功能,从而对人体状态与疾病做出诊断。

2. 症状前分子诊断

主要用于一些遗传病家系或有遗传病倾向的家系中目前未发病,但有高度发病危险人群的诊断,特别适用于一些早期诊断后可进行预防性干预,避免出现严重不良后果的疾病。例如,目前国内悄然兴起的健康检查,就是利用症状前分子诊断,预测个人的健康状况。

3. 产前分子诊断

产前基因诊断又称出生前诊断,主要针对有生育患儿风险夫妇的胎儿进行诊断。对明确诊断为某种疾病的胎儿可采取干预措施,对目前尚无治愈可能的疾病的胎儿可实施选择性流产。产前基因诊断采用的标本常为绒毛膜标本和羊水标本。近年有人采用荧光半定量 PCR 法检测妊娠早期母亲血清中的胎儿游离 DNA,以进行产前诊断。据资料估计,人群中约有 30% 的人受到各种遗传病的危害,而目前绝大多数遗传病尚无有效的治疗方法。因此,只能早期诊断及采取有效的症前积极的预防措施,对可疑的致病基因携带者进行产前基因诊断,是防止遗传病在家庭中再发的关键。

4. 胚胎植入前遗传学诊断

植入前遗传学诊断 (preimplantation genetic diagnosis, PGD) 是辅助生育技术与分子生物学技术相结合而形成的一种产前诊断技术,目的是减少携带遗传疾病的胚胎移植。同时减少孕妇反复流产或引产的痛苦。适用于有生育患儿可能又不愿经产前诊断选择性流产的夫妇。常用的方法是待受精卵分裂至 6~8 个细胞的卵裂球阶段时,取其中 1~2 个细胞进行基因诊断,挑选正常胚胎植入母体。

三、分子诊断学的应用

虽然分子诊断学形成和发展的时间不长,但是在医学中却日益显示出它的强大生命力和技术优势,应用领域越来越广泛。

1. 为疾病的诊断和鉴别诊断提供了更为准确的分子依据

分子诊断的信息可为临床各科提供支持诊断、鉴别诊断和确定诊断更为准确的分子依据。例如,分子诊断对病原微生物的分型(包括亚种/株系)比传统方法不仅省时、省力,而且更为准确。如引起肺结核的分支杆菌,其生长缓慢,经常要培养几周才能得到供生物化学分析、鉴定和株系/亚种分型的纯净培养物。通过传统的培养和生物化学分析方法对其检测和鉴定费时且

费用大,影响医生给予患者最合适的治疗。因为如果不能对细菌进行快速精确的鉴定,医生只能给患者开广谱抗生素,因而易引发无效治疗和细菌耐药性。

2. 开辟了肿瘤诊断的新途径

依靠分子诊断的新技术,开辟了或正在开辟肿瘤诊断的新途径。如肿瘤易感基因的检测、肿瘤相关基因扩增/过表达、突变/缺失的检测、肿瘤相关基因蛋白质水平的检测、表观遗传修饰的检测、染色体微卫星异常分析、端粒酶活性的检测、基因表达图谱分析等。

3. 广泛应用于发病前、肿瘤转移前和疗效的分子预测

分子诊断的意义不仅在于能对某些疾病做出确切诊断,而且正在应用于发病前、肿瘤转移前和治疗前疗效的分子预测。因为许多疾病在患者出现症状、体征及生化改变之前就已存在相当一段时间,恶性肿瘤的某些生物学特性可能就是侵袭转移的预测指标,以及治疗前某些药物对某个体的疗效,这些都可以用分子诊断的方法进行分子预测。

4. 为公共卫生和预防疾病提供资料

在多数发展中国家,有近一半的死亡病例是由传染病所导致,而现有的很多诊断技术存在着操作不便、费用高昂等缺陷。世界卫生组织明确指出,要努力降低成本,广泛使用分子诊断等技术在发展中国家进行流行病学调查,发现传染病的传染源,包括不同菌株或病毒株的血清型或基因型,对于某些可能的致病因素,包括食品、水质、环境中存在的病原体及时进行检测,为防止疾病的传播提供依据。

5. 为临床研究和基础研究提供了新手段

分子诊断不仅可为临床研究提供可靠数据,而且也可为基础研究提供可靠的依据。例如,应用分子诊断中的各种技术和方法,为感染性疾病、呼吸系统疾病、心脏病、消化系统疾病、血液系统疾病、内分泌系统疾病、代谢病、泌尿系统疾病、生殖系统疾病、神经系统疾病、精神病、外科疾病、妇产科疾病、遗传疾病、恶性肿瘤、药物筛选、器官移植等的临床研究和基础研究提供可靠的分子数据和依据。促进研究工作的深入和发展。

6. 为健康普查和健康咨询提供新的服务

通过分子诊断不仅对疾病的诊断和分类更为精细和准确,甚至在发病前就可检查出患病风险,通过对普通人群和“高危人群”进行临床和

实验检查,可以及早发现或预测某些疾病,如糖尿病、冠心病、肝脏病、肾脏病和恶性肿瘤等,便于及早采取有效的防治措施。也可了解社会群体的卫生或健康状况,提高疾病的防治意识和水平。为群体或个体提供健康咨询,以提高健康水平和生活质量。特别对计划生育和优生优育,对避免遗传病的发生和提高人口素质都有深远和现实的意义。

7. 其他应用

分子诊断技术的发展不仅为人类征服疾病提供了有力的帮助,而且为许多生产部门开辟了一个新的广阔的市场。如法医学鉴定、民事鉴定、环境监测、毒理学、药物设计、病原物的检测、食品工业的质量控制,还包括生物多样性的保持、提高产量、提高抗病性、提高产品的营养价值等诸多方面。因此,该技术一经产生,便展示出诱人的发展前景。

四、分子诊断学的发展方向

虽然分子诊断已越来越广泛地渗透至基础医学、临床医学和法医学之中,且已经成为实验医学领域中一个不可替代的重要部分,但在其发展过程中仍将面临诸多问题,因此,分子诊断学的发展定要克服这些问题,走上健康发展的道路,从而真正造福于人类。

1. 不断扩大可进行分子诊断的疾病种类

一方面应用现有的分子诊断技术,不断扩大可进行分子诊断的疾病种类,另一方面更要加强疾病发病的分子机制的研究,利用基因功能研究、表遗传学和分子流行病学的研究成果,不断扩大可进行分子诊断的疾病种类。就目前已经开展的工作而言,临床各科的遗传性疾病、遗传易感性疾病、多种恶性肿瘤、感染性疾病、器官移植反应等都可以用分子诊断的方法加以诊断。

2. 加强常见的复杂性疾病的分子诊断

常见的分子诊断包括肿瘤在内的复杂性疾病的早期诊断和治疗一直是医学界的难题,开发、利用分子诊断的高通量、高新技术对常见病、多发病,特别是一些多基因遗传病如心血管系统疾病、神经精神系统疾病、恶性肿瘤、糖尿病、哮喘等进行快速、准确、早期的分子诊断是当务之急。

3. 增强分子诊断对疾病的预测能力

分子诊断的意义在于不仅能对某些疾病做出确切诊断,也能确定基因与疾病有关联的状态,如对疾病的易感性、发病类型和阶段的

确定等。利用分子诊断对疾病特有的预测能力,加强胚胎植入前遗传学诊断、产前诊断和症状前分子诊断,尤其是对疾病易感基因的定位与检测,从而将人类的遗传缺陷(包括体细胞的遗传缺陷)控制在最早期阶段,并及早进行预防性干预。

4. 通过分子诊断指导和优化临床用药

利用分子诊断检测群体中不同个体对药物的药效和不良反应的分子差异,即通过分子诊断的方法从基因组水平深入认识疾病及药物作用于个体差异的机制,检测个体对药物的特性性(idiosyncrasy),指导和优化临床用药,达到个性化医疗的目的。

5. 通过分子诊断发现和研制更多的新药

利用分子诊断使人们能更精确地在机体上定位药物的分子“标靶”,更细致地了解药物的代谢、转运等动力学分子基础。也使新药研发效率提高、周期缩短。

6. 实施临床实验室分子诊断标准化

临床实验室分子诊断标准化应主要包括以下几个方面。

- (1) 临床标本采集、运送和保存的标准化。
- (2) 临床标本制备处理和提取方法的标准化。
- (3) 检测试剂和方法的标准化。
- (4) 检测结果分析的标准化。
- (5) 标准物质和质控物的应用。

在临床分子诊断标准化诸要素中,标准物质是获得具有可比性结果的前提。试剂方法和工作程序的标准化是不可或缺的要素。

7. 尽早建立符合我国国情的分子诊断监管体系

分子诊断发展迅速,其中蕴藏着巨大的商机。为了安全、有效和合法的实行分子诊断,应当尽早制定一个完善的分子检验的质量控制体系,建立一个符合我国国情的监管体系,有关部门对分子诊断既要鼓励其发展又要严加管理,这才真正有利于疾病分子诊断的健康发展。

8. 积极开发低价、简单、快速、准确的分子诊断试剂和方法

现代医学的检验实验室无论是独立存在的,还是作为医疗保健单位中的一个部门,都是一个拥有大量高新复杂仪器设备的实体部门,而且都配备训练有素的专业技术人员,这些人力、物力的设置,体现了现代医学检验实验室运作中的复

杂性和精密性。也说明了现代医学检验在医学实践中的重要作用。但是,大量高新复杂仪器设备和专业技术人员的配置,无形中也给患者增加了沉重的经济负担。

根据世界卫生组织为发展中国家基层医疗单位制定的诊断试剂标准和我国保证人民群众

公平享有基本卫生保健,构建和谐社会的精神,研究开发低价、简单、快速、准确的分子诊断试剂和方法,是每一个分子诊断学工作者义不容辞的任务。

(吕学训)

第一篇 分子诊断的理论基础

分子诊断(molecular diagnosis)是以 DNA、RNA 或蛋白质分子为诊断材料,通过检查人体内源基因或外源(病原体)基因的存在、缺陷或表达异常,对人体状态或疾病做出特异性诊断的方法和过程。分子诊断学研究涉及分子生

物学、遗传学、病理学、免疫学、生物化学、基因组学、蛋白质组学和生物信息学等众多学科领域,但其最主要的理论基础是现代分子遗传学。本篇将有关分子诊断学的基础知识分六章简要介绍如下。

第一章 基 因 组

基因(gene)是遗传学中最重要概念之一,随着遗传学、分子生物学、生物化学等的进步,基因的概念在不断地修正和发展。基因概念每发展一步都意味着遗传学乃至整个生物学的一次革命和突破。正是基因概念的发展产生了分子诊断学。

基因组(genome)指组成生物所包含的所有遗传物质,也就是细胞核和所有细胞器所包含的基因(gene)。人类基因组草图的公布,标志着现代医学的发展已逐步进入“基因组医学”(genomic medicine)时代。基因组医学是基于人类

及其他生命体基因组为基础的医学研究,也是以人类基因组为基础的生命科学和临床医学的革命,它将对整个 21 世纪产生重大的社会影响和经济效益。

第一节 人类基因组

人类基因组包括细胞核基因组和线粒体基因组(见图 1-1),线粒体基因组 DNA 大约 16.6kb。目前,通常所指的人类基因组特指人类细胞核基因组。



图 1-1 人类基因组

一、人类基因组计划

测序技术的迅速发展,使得对整个人类基因组进行测序成为可能。同时人们认识到人类基因组序列对新药设计、疾病诊断及治疗,以及对生命本质认识的重要意义。虽几经周折,1990 年 10 月 1 日,美国国会正式批准了国际人类基因组计划(human genomic project, HGP),该计划在 15 年内投入 30 亿美元以上的资金进行人类基因组的分析。1993 年修订后的人类基因组计划主要内容包括:构建遗传连锁图、物理图、测序和基因识别;基因组研究技术的建立;模式生物研究信息系统的建立。此外,还有人类基因组研究的社会、法律与

伦理问题,交叉学科的技术训练,技术的转让,研究计划的外延等共九方面的内容。与此同时,意大利、英国、法国、德国、日本等国先后开始启动各自的基因组计划,并各具特色。

1998 年, Celera Genomics 公司组建, 与国际人类基因组计划展开竞争。2000 年, 科学家公布了人类基因组工作草图。2001 年, 由 Celera Genomics 公司的 Craig Venter 带领的小组完成人类基因组测序的报告发表在 *Science* 杂志上, 由 Francis Collins 带领的国际人类基因组计划的报告同时发表在 *Nature* 杂志上。2002 年国际协作组织 Haplo-type Map Project (HapMap) 启动。2003 年国际协作组织宣布人类基因组计划(HGP)阶段性完成(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/guide/>

hunman)。同期为止,包括 HIV、*E. coli* 和 SARS 在内的人类病原生物至少有 27 个基因组已经明确。线虫、果蝇和小鼠等模式生物以及猪、鸡、家蚕和水稻等农牧生物的基因组也相继测序完成。2004 年 10 月 21 日出版的 *Nature* 杂志发表了国际人类基因组测序联盟 (IHGSC) 的“完成人类基因组常染色质测序”的文章,公布了人类基因组精确的序列,标志着人类基因组 DNA 全序列测定的目标已基本达到。

中国的 HGP 始于 1994 年,1998 年 3 月由陈竺领导成立了上海人类基因组中心,10 月改名为中国南方基因中心。同年,成立由国家卫生部牵头的中国人类遗传资源保护中心。1998 年杨焕明和于军领导在中国科学院遗传所,1999 年强伯勤领导在北京先后成立了中国科学院北京人类基因组中心和北方人类基因组中心。1999 年 9 月中国正式加入人类基因组计划国际协作组织,负责测定人类基因组全部序列的 1%,成为参与这一计划的唯一发展中国家,并于 2000 年 4 月底提前高质量地完成了所承担的 1% 人类基因组的工作框架图。

人类基因组计划 (HGP) 通常指的是人类基因组的序列图谱。实际上人类基因组计划是一

个宏大的系统工程,既包括通常意义上的序列图谱,也包括其准备性工作及其延伸工程。具体地说,人类基因组的基本任务可以概括为 4 张图谱的绘制,即遗传图谱、物理图谱、序列图谱和基因图谱。其中前两张图谱是进行大规模测序的基础,而基因图谱则是序列图谱的延伸,是人类基因组计划的目的所在,如果没有基因图谱的研究,序列图谱将仅仅是一系列昂贵而毫无意义的符号。而事实上它所确定的最终目标还远未实现,初步结果也并没有立即的临床和经济价值。但是它为遗传学研究提供了大量全新的资源,建立了基于信息技术的新生物学。人类基因组学在基因组的生物学功能研究、基因组学与人类健康方面的研究才刚刚启动。

二、人类基因组的一般结构

人类结构基因主要为断裂基因。组成人类基因组序列最主要成分为非编码序列 (图 1-2)。人类基因组规模约 30 亿碱基对。人类基因组的结构基因规模约 2~3 万,编码约 10 万个蛋白质。人类结构基因约 60% 有剪接异构体,估计 80% 人类蛋白质由剪接异构体编码。

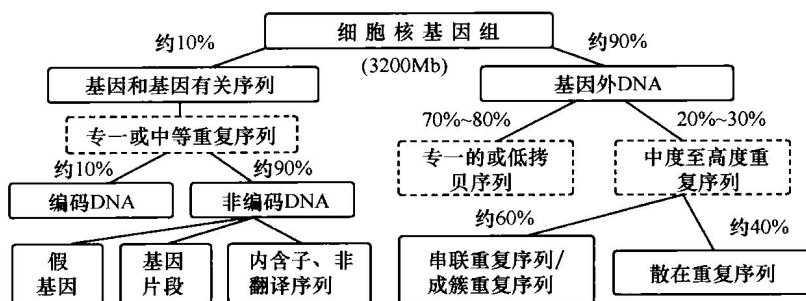


图 1-2 人类细胞核基因组

随着人类基因组测序的完成,已经知道编码蛋白质的外显子 (exon) 仅占基因组的 1%, 内含子 (intron) 约为 24%。基因间的 DNA 序列约占 22%, 重复序列约占 53%; 重复序列中可移动重复序列 (转座子) 约占 45%, 简单重复序列约占 3%, 大重复片段约占 5%。转座子绝大部分为失去转座功能的序列, 其可能是转座的遗迹, 具体意义还不明确。

高等生物的基因组 90% 以上都是非编码序列, 是中性或近中性进化中产生的“垃圾” (junk)。近两三年, 科学界对垃圾 DNA 的讨论日益增多, 各种观点层出不穷, 人们开始重新审

视这些“垃圾”, 发现它们并非垃圾, 而是宝物。例如: 可移动重复序列具有整合到基因组新位点的能力, 特别是其中的逆转录转座子, 它们在基因组中的数量随进化而增加, 在低等真核生物中只有 3% 以下, 而在哺乳动物中几乎占一半。其中一个叫做 L1 序列的转座子, 大约每 50 个人基因组中就有一个新的 L1 序列插入, 它具有修复双链 DNA 的功能, 可帮助它前后的基因移动并插入到基因组其他位置, 可通过它包含的反义启动子改变基因的表达, 还能变成编码蛋白质的基因序列的一部分。Alu 序列是另一个逆转录转座子, 其 300 碱基对的重复单元以 140 万份拷贝