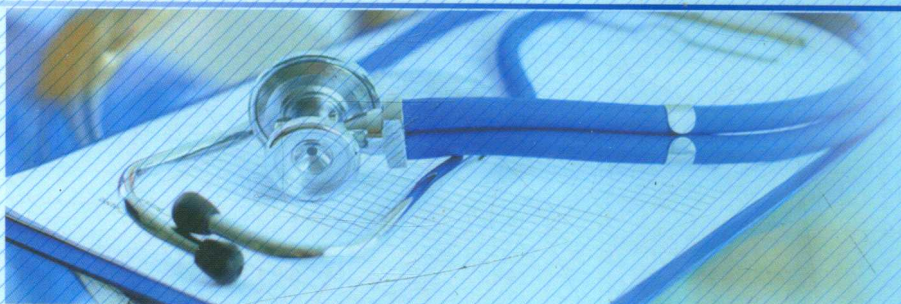


TE-PEMIC慢病绿色预防医疗体系丛书

总主编 张积仁 郑静芬

基因突变 与慢病防控

主 编 张积仁 岑东芝



科学出版社

TE-PEMIC 慢病绿色预防医疗体系丛书

总主编 张积仁 郑静芬

基因突变与慢病防控

主编 张积仁 岑东芝

科学出版社

北 京

内 容 简 介

本书内容主要包括两部分。①基因突变总论：基因突变的定义、分类、特点及影响，基因突变检测方法，基因突变对蛋白质功能的影响，基因突变文献检索方案及相关数据库介绍；②基因突变与慢病防控部分：分别讨论了肿瘤、代谢性疾病、神经系统疾病和免疫系统疾病等慢病与基因突变的关系，同时运用生物信息学检索技术对相关主题的研究文献统计分析，并重点讨论了重金属、农药等污染因素在基因突变与慢病发生中的危害。

本书深入浅出，通俗易懂，可满足不同层次读者的需求，既可作为基因突变、慢病防控的科普读物，也可作为临床工作者与科研人员文献检索的参考书。

图书在版编目(CIP)数据

基因突变与慢病防控 / 张积仁, 岑东芝主编. —北京: 科学出版社, 2018.5

(TE-PEMIC 慢病绿色预防医疗体系丛书 / 张积仁, 郑静芬主编)

ISBN 978-7-03-057351-3

I. ①基… II. ①张… ②岑… III. ①点突变 - 关系 - 慢性病 - 防治 - 研究 IV. ①R394 ②R4

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2018) 第 091556 号

责任编辑: 杨卫华 康丽涛 / 责任校对: 张小霞

责任印制: 赵 博 / 封面设计: 龙 岩

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>

北京画中画印刷有限公司 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2018 年 5 月第 一 版 开本: 787×1092 1/16

2018 年 5 月第 一 次印刷 印张: 10 1/2

字数: 225 000

定价: 98.00 元

(如有印装质量问题, 我社负责调换)

《基因突变与慢病防控》编写人员

- 主 编 张积仁 岑东芝
- 副主编 李许锋 姜兆静 任来阳 张洁霞 陈梦鳞
- 编 者 (以姓氏汉语拼音为序)
- 蔡 睿 南方医科大学
- 岑东芝 广州医科大学附属第三医院
- 陈 洁 南方医科大学
- 陈梦鳞 广州万德基因医学科技有限公司
- 董欣敏 内蒙古自治区肿瘤医院
- 黄凯玲 广州万德基因医学科技有限公司
- 姜兆静 南方医科大学珠江医院
- 乐小兵 广州万德基因医学科技有限公司
- 李许锋 清华大学社会科学学院经济学研究所
- 刘艳卉 广州万德基因医学科技有限公司
- 骆颖筠 广州万德基因医学科技有限公司
- 任来阳 广东省靶向肿瘤干预与防控研究院
- 史晓舜 南方医科大学南方医院
- 宋千成 南方医科大学
- 孙 瑶 深圳市宝安区中心医院
- 王金婷 南方医科大学
- 吴 婧 贵州省人民医院
- 阳 帆 湘南学院
- 张积仁 广东省靶向肿瘤干预与防控研究院
- 张洁霞 广州医科大学附属第一医院
- 张园园 广东省靶向肿瘤干预与防控研究院
- 郑静芬 广东省靶向肿瘤干预与防控研究院

前言

基因突变是基因组 DNA 分子发生的突然的、可遗传的变异现象，变异给了自然以选择的机会，变异使一个物种产生各种各样的性状，优胜劣汰，适者生存。突变是随机的，正常情况下突变频率很低，但在如放射性辐射、致癌物等不利条件刺激下，突变频率会大大升高。

约翰霍普金斯大学于 2015 年发表在 *Science* 上的研究结果显示，2/3 癌症的发生是由自身基因突变引起的，而不是因为生活方式。恶性肿瘤的形成是一个长期多因素导致的分阶段过程，多个基因发生转变，包括几个癌基因突变和两个或更多肿瘤抑制基因失活，以及凋亡调节和 DNA 修复基因的改变。炎症是机体受病原体或潜在有害物质入侵后引起的先天性反应。2015 年发表在 PNAS 上的研究结果揭示，免疫系统在抵御感染过程中可自行创建 DNA 突变，从而引发癌症。自身免疫性疾病的直接发病原因因为免疫系统对自身抗原产生的免疫反应。造成自身免疫性疾病的最初原因可能为类自身抗原的病原诱导，也可能是细胞分裂、分化过程中基因发生突变，造成表达产物结构的变化，从而引起自身免疫反应。近年，随着分子生物学技术的飞速发展，人们也发现遗传性内分泌代谢性疾病的分子基础是相关基因发生突变，越来越多的致病基因被发现，人们对此类疾病的理解逐步深入，同时也为慢病的风险预警、风险干预、临床诊断和个体化治疗提供了快速准确的技术平台。

本书检索了美国国立医学图书馆（NLM）开发的 PubMed 数据库，以及基于 PubMed 的 GoPubMed、PALM-IST、OMIM 数据库，并对检索的文献进行了进一步文本分析，突出文献研究的时间、地域趋势，寻找每种疾病常见的突变基因，分析部分基因常见的涉及的疾病及信号通路，还分析了每种疾病涉及的突变基因产物的相互作用，以便读者从全局把握相关的突变基因研究，同时也为读者提供了生物医学信息的技术和手段，不断增加、完善分子医学技术领域的新知识，使其更加全面、客观和科学地理解基因突变与慢病防治的意义和临床价值。

张积仁

2018 年 1 月

目 录

第一篇 基因突变总论

第一章 基因突变概述	3
一、基因突变的定义与发展	3
二、基因突变的分类与机制	3
三、基因突变的特点	4
四、影响基因突变的因素	6
五、基因突变的意义与危害	7
第二章 基因突变检测方法	8
一、PCR-SSCP	8
二、突变体富集 PCR	9
三、实时荧光定量核酸扩增检测系统	9
四、数字 PCR	9
五、DNA 芯片	9
六、原位杂交法	10
七、桑格测序法	10
八、高通量测序	11
第三章 基因突变对蛋白质功能的影响	12
一、代谢酶类与基因突变	12
二、激素类与基因突变	13
三、受体 / 通道类相关蛋白与基因突变	15
四、信号转导相关蛋白与基因突变	17
五、细胞周期相关蛋白与基因突变	18
六、其他功能蛋白与基因突变	18
第四章 文献检索与文献聚类分析	20
一、文献检索与 PubMed 数据库	20
二、文献聚类分析	21
三、PALM-IST 简介	22
四、STRING 简介	23
第五章 基因突变主要相关数据库	24
一、肿瘤基因体细胞突变数据库: COSMIC	24

二、易感基因研究与 GWAS 数据库	24
三、人类孟德尔遗传疾病数据库: OMIM	25

第二篇 恶性肿瘤与基因突变

第六章 肿瘤的靶向用药治疗	29
第七章 肿瘤的免疫治疗	33
一、CAR-T 细胞疗法	33
二、免疫检查点抑制	33
三、小分子 IDO 抑制剂	35
第八章 恶性肿瘤与基因突变	36
一、鼻咽癌与基因突变	36
二、肺癌与基因突变	38
三、消化系统肿瘤与基因突变	40
四、乳腺癌与基因突变	54
五、妇科肿瘤与基因突变	56
六、肾透明细胞癌与基因突变	61
七、恶性淋巴瘤与基因突变	63
八、血液系统肿瘤与基因突变	65
九、胶质瘤与基因突变	70
十、恶性黑色素瘤与基因突变	72
第九章 肿瘤相关的突变基因	76
一、TP53	76
二、EGFR	78
三、KRAS/ HRAS/ NRAS	80
四、BRCA1	81
五、BRCA2	83
六、APC	85
七、ERBB2	86
八、NF1	88
九、MAP2K1	90
十、IDH1	91
十一、PIK3CA	93
第十章 基因突变与患癌风险分子预警	95
一、乳腺癌和卵巢癌的高危人群	95
二、基因测序揭示 12 种癌症的遗传易感性	96

三、乳腺癌易感基因 BRCA1 和 BRCA2 影响其他癌症的形成	97
-----------------------------------	----

第三篇 慢病与基因突变

第十一章 慢病风险分子预警	101
第十二章 感染与慢性炎症	103
一、EB 病毒感染与鼻咽癌易感	103
二、幽门螺杆菌感染与胃黏膜慢性炎症	105
三、病毒感染与病毒性肝炎	107
四、人乳头瘤病毒感染与宫颈上皮内瘤变	111
第十三章 代谢性疾病与基因突变	115
一、肥胖与基因突变	115
二、糖尿病与基因突变	117
三、高脂血症与基因突变	120
第十四章 神经系统疾病与基因突变	124
一、帕金森病与基因突变	124
二、阿尔茨海默病与基因突变	127
第十五章 免疫性疾病与基因突变	130
一、类风湿关节炎与基因突变	130
二、系统性红斑狼疮与基因突变	131

第四篇 环境污染与基因突变

第十六章 重金属污染与基因突变	137
一、相关综述	137
二、相关文献检索与分析	139
第十七章 农药污染与基因突变	142
一、相关综述	142
二、相关文献检索与分析	146
参考文献	149
附录 TE-PEMIC 慢病绿色预防医疗体系	150
一、TE-PEMIC 慢病绿色预防医疗体系建立的依据	150
二、TE-PEMIC 慢病绿色预防医疗体系使用的分子标准	155
三、TE-PEMIC 慢病绿色预防医疗体系的应用	156

第一篇

基因突变总论



第一章 基因突变概述

一、基因突变的定义与发展

基因组 DNA 发生的突然的、可遗传的变异现象，称为基因突变（gene mutation）。从分子水平看，基因突变是指基因在结构上发生碱基对组成或排列顺序的改变。

基因虽然十分稳定，能在细胞分裂时精确地复制，但这种稳定性是相对的。在一定条件下基因也可以从原来的存在形式突然改变成另一种新的存在形式，即在一个位点上突然出现一个新基因，代替了原有基因，这个基因叫作突变基因。于是后代的表现中也就突然地出现祖先从未有的新性状。一个基因内部可以遗传的结构改变，又称为点突变，通常可引起一定的表型变化。广义的突变包括染色体畸变，狭义的突变专指点突变。

基因突变首先由摩尔根于 1910 年在果蝇中发现。马勒于 1927 年、斯塔德勒于 1928 年分别用 X 线等在果蝇、玉米中最先诱发了突变。1947 年奥尔巴克首次使用了化学诱变剂，用氮芥诱发了果蝇的突变。1943 年卢里亚和德尔布吕克最早在大肠埃希菌中证明噬菌体抗性的出现是基因突变的结果，接着在细菌对链霉素和磺胺药的抗性方面获得同样的结论。于是基因突变这一生物界的普遍现象逐渐被充分认识，基因突变的研究也进入了新的时期。1949 年光复活作用被发现后，DNA 损伤修复的研究也迅速推进。这些研究结果说明基因突变并不是一个单纯的化学变化，而是一个和一系列酶的作用有关的复杂过程。1958 年 S. 本泽发现噬菌体 T4 的 r II 基因中有特别容易发生突变的位点——热点，指出一个基因的某一对核苷酸的改变和它所处的位置有关。1959 年佛里兹提出基因突变的碱基置换理论，1961 年克里克等提出移码突变理论。随着分子遗传学的发展和 DNA 核苷酸顺序分析等技术的出现，人们已能确定基因突变所带来的 DNA 分子结构改变的类型，包括某些热点的分子结构，并已经能够进行定向诱变。

二、基因突变的分类与机制

基因突变可以是自发的，也可以是诱发的。自发产生的基因突变型和诱发产生的基因突变型之间没有本质的区别，基因突变诱变剂的作用也只是提高了基因的突变率。按照表型效应，突变型可以分为形态突变型、生化突变型及致死突变型等。这样的区分并不涉及突变的本质，而且也不严格。因为形态突变和致死突变必然有其生物化学基础，所以严格地讲一切突变型都是生物化学突变型。根据碱基变化的情况，基因突变一般可分为碱基置换（base substitution）突变和移码突变（frameshift mutation）两大类。

1. 碱基置换突变

碱基置换突变指 DNA 分子中一个碱基对被另一个不同的碱基对取代所引起的突变，也称为点突变（point mutation）。点突变分为转换和颠换两种形式。如果一种嘌呤被另一种嘌呤取代或一种嘧啶被另一种嘧啶取代则称为转换（transition）。嘌呤取代嘧啶或嘧啶取代嘌呤的突变则称为颠换（transversion）。由于 DNA 分子中有 4 种碱基，故可能出现 4 种转换和 8 种颠换。在自然突变中，转换多于颠换。碱基对的转换也可由一些化学诱变剂诱变所致。

2. 移码突变

移码突变指 DNA 片段中某一位点插入或丢失一个或几个（非 3 或 3 的倍数）碱基对时，造成插入或丢失位点以后的一系列编码顺序发生错位的一种突变。它可引起该位点以后的遗传信息都出现异常。发生移码突变的基因在表达时可使组成多肽链的氨基酸序列发生改变，从而严重影响蛋白质或酶的结构与功能。吡啶类诱变剂如原黄素、吡啶黄、吡啶橙等由于分子结构比较扁平，能插入 DNA 分子的相邻碱基对之间。如在 DNA 复制前插入，会造成 1 个碱基对的插入；若在复制过程中插入，则会造成 1 个碱基对的缺失，两者的结果都引起移码突变。

（1）缺失（deletion）突变：基因也可以因为较长的 DNA 片段缺失而发生突变。缺失的范围如果包括两个基因，那么就好像两个基因同时发生突变，因此又称为多位点突变。由缺失造成的突变不会发生回复突变，所以严格地讲，缺失应属于染色体畸变。

（2）插入（insertion）突变：一个基因的 DNA 中如果插入一段外来的 DNA，那么其结构便被破坏而导致突变。大肠埃希菌的噬菌体 Mu-1 和一些插入顺序（IS）及转座子都是能够转移位置的遗传因子，当它们转移到某一基因中时，便使这一基因发生突变。许多转座子上带有抗药性基因，当它们转移到某一基因中时，一方面引起突变，另一方面使这一位置上出现一个抗药性基因。插入的 DNA 分子可以通过切离而丢失，准确的切离可以使突变基因回复成为野生型基因，这一事件的出现频率并不因诱变剂的处理而提高。

三、基因突变的特点

不论是真核生物的突变还是原核生物的突变，也不论是什么类型的突变，都具有普遍性、随机性、低频性和可逆性等共同的特性。

1. 普遍性

基因突变在自然界各物种中普遍存在。不论是真核生物还是原核生物，均有基因突变的发生。

2. 随机性

摩尔根在饲养的许多红色复眼果蝇中偶然发现了一只白色复眼果蝇。这一事实说明

基因突变的发生在时间、在发生这一突变的个体、在发生突变的基因上都是随机的。之后在高等植物中所发现的无数突变都说明基因突变的随机性,在细菌中则情况较为复杂。在含有某一种药物的培养基中培养细菌时往往可以得到对于这一药物具有抗性的细菌,因此曾经认为细菌抗药性的产生是药物引起的,是定向的适应而不是随机的突变。卢里亚、德尔布吕克及莱德伯格等又进一步证实抗药性的出现不依赖于药物的存在,而是随机突变的结果,只是通过药物将它们检出而已。

3. 低频性

在第一个突变基因被发现时,不是发现了若干白色复眼果蝇,而是只发现一只,说明突变是极为稀有的,也就是说野生型基因以极低的频率发生突变。在有性生殖的生物中,突变率是每一配子发生突变的概率,也就是用一定数目配子中的突变型配子数表示。在无性生殖的细菌中,突变率是每一细胞世代中每一细菌发生突变的概率,也就是用一定数目的细菌在分裂一次过程中发生突变的次数表示。据估计,在高等生物中, $10^5 \sim 10^8$ 个生殖细胞中才会有1个生殖细胞发生基因突变。虽然基因突变的频率很低,但是当—一个种群内有许多个体时,就有可能产生各种各样的随机突变,足以提供丰富的可遗传的变异。

4. 可逆性

野生型基因经过突变成为突变型基因的过程称为正向突变。正向突变的稀有性说明野生型基因是一个比较稳定的结构。突变基因又可以通过突变而成为野生型基因,这一过程称为回复突变。回复突变是难得发生的,说明突变基因也是一个比较稳定的结构。但是,正向突变率总是高于回复突变率,这是因为一个野生型基因内部的许多位置上的结构改变都可以导致基因突变,但是一个突变基因内部只有一个位置上的结构改变才能使它恢复原状。

5. 少利多害性

一般基因突变会产生不利的影响,被淘汰或是死亡,但有极少数会使物种增强适应性。

6. 不定向性

如控制黑毛的A基因可能突变为控制白毛的 a^+ 或控制绿毛的 a^- 基因。

7. 有益性

一般基因突变是有害的,但是有极为少数的突变是有益突变。例如,一只鸟的嘴巴很短,突变后嘴巴变长,这样会容易捕捉食物或饮水。一般基因突变后身体会发出抗体或其他修复体进行自我修复,但有些突变是不可回转的。突变可能导致立即死亡,也可以导致惨重后果,如器官无法正常运作、DNA严重受损、身体免疫力低下等。如果是有益突变,可能会发生奇迹,如身体中特殊变种细胞可保护器官和身体,或在一些没有骨

骼保护的部位长出骨骼。基因与 DNA 就像是每个人的身份证，可它又是一个人的先知，因为它决定着个体衰老、病变、死亡的时间。

8. 独立性

某一基因位点的一个等位基因发生突变并不影响另一个等位基因，即等位基因中的两个基因不会同时发生突变。①隐性突变：当代不表现，F 代表现。②显性突变：当代表现，与原性状并存，形成镶嵌现象或嵌合体。

9. 重演性

同一物种不同个体之间可以多次发生同样的突变。

四、影响基因突变的因素

突变是一系列变化的结果。影响这一系列变化的任何一个环节的因素都会对突变型的产生有一定的影响，主要包括外部因素及内部因素。外因主要包括以下 3 类：①物理因素：X 线、激光、紫外线、 γ 线等；②化学因素：亚硝酸、黄曲霉素、碱基类似物等；③生物因素：某些病毒和细菌等各种类型的诱变剂。内因主要是指在 DNA 复制过程中，基因内部脱氧核苷酸的数量、顺序、种类发生局部改变，从而使遗传信息发生改变。

诱变剂接触 DNA 以前必须首先进入细胞才能诱发突变。高等植物对于紫外线的诱变作用较不敏感的原因是紫外线不易穿透细胞壁。化学药品的渗透和细胞膜的结构有很大的关系。鼠伤寒沙门菌有一个改变细胞膜成分的突变型，它使细胞膜对于许多药物的渗透性增强，从而提高了细胞对许多化学诱变剂的敏感性。细胞中的酶可以破坏进入细胞的诱变剂，从而减弱诱变效果，如过氧化氢酶可以减弱过氧化氢的诱变效果。一些没有诱变作用的物质也可以因为细胞中酶的活化作用而转变为诱变剂，这些物质称为前诱变剂，如陆蕙酮本身没有诱变作用，但可以通过肝脏中羟化酶的作用而转变为诱变剂海蕙酮。

诱变剂接触 DNA 以后，能使 DNA 发生局部损伤，这些损伤如果未经修复，便可阻碍 DNA 的复制而造成细胞死亡。修复 DNA 损伤的机制有两类：一类称为无误修复，它使 DNA 恢复原状但不带来突变；另一类称为易误修复或错误倾向修复，它使 DNA 复制继续进行，但也常同时带来基因突变。细胞中有关 DNA 损伤修复的酶活性的改变可以改变细胞对诱变剂的杀伤作用或对诱变作用的反应。由于基因突变而使不论哪一种有关 DNA 损伤修复的酶失活时，都必然导致细胞对于紫外线或其他诱变剂的杀伤作用变得更为敏感。但就诱变结果来讲，则要看该酶是涉及无误修复，还是易误修复。如果属于前者，那么有关的基因发生突变时将使突变更易发生；如果属于后者，那么有关的基因发生突变时将使突变更不易发生，因此这些突变型分别称为增变基因和抗变基因。在大肠杆菌噬菌体 T4 中，基因 43 编码 DNA 多聚酶。基因 43 的突变型有两种，一种是增变基因，其 DNA 多聚酶的核酸外切酶活性和多聚酶活性之比小于野生型 DNA 多聚酶；另一种是抗变基因，其 DNA 多聚酶的核酸外切酶活性和多聚酶活性之比大于野生型 DNA 多

聚酶。在其他生物如大肠杆菌、酵母菌和一些真核生物中也曾发现增变基因。

五、基因突变的意义与危害

基因突变可以发生在发育的任何时期,通常发生在 DNA 复制时期,即细胞分裂间期,包括有丝分裂间期和减数分裂间期;同时基因突变和 DNA 复制、DNA 损伤修复、癌变和衰老都有关系,基因突变也是生物进化的重要因素之一,所以研究基因突变除了本身的理论意义以外还有广泛的生物学意义。基因突变是新基因产生的途径,是生物变异的根本来源,是生物进化的原始材料,为遗传学研究提供了突变型,为育种工作提供了素材,是新物种产生的条件,在物种进化和良种选择时具有重要意义,所以它在科学研究和生产方面具有一定的实际意义。

基因突变对突变个体本身来讲绝大多数是有害的,因为现有的生物基本上都适应了现在的环境。但是环境是可变的,如果生物不变,那就很可能被淘汰。所以,对整个生物群体来说,突变使群体不致灭亡。环境不断地改变,生物的突变也就逐渐被保存积累,最终,生物的面貌与祖先完全不同,因此基因突变是生物进化的内因及主要动力。

根据基因突变对机体影响的程度,可分为下列几种情况:①变异后果轻微,对机体不产生可察觉的效应,从进化观点看,这种突变称为中性突变;②造成正常人体生物化学组成的遗传学差异,这种差异一般对人体并无影响,如血清蛋白类型、ABO 血型、HLA 类型及各种同工酶型,但在某种情况下也会发生严重后果,如不同血型间输血、不同 HLA 型间的同种移植产生排斥反应等;③可能给个体的生育能力和生存带来一定的好处,如 HbS 突变基因杂合子比正常的 HbA 纯合子更能抵抗恶性疟疾,有利于个体生存;④产生遗传易感性 (genetic susceptibility);⑤引起遗传性疾病,导致个体生育能力降低及寿命缩短,这包括基因突变致蛋白质异常的分子病及遗传性酶病。据估计,人类有 50 000 个结构基因,正常人的基因座位处于杂合状态的可占 18%,一个健康人至少带有 5~6 个处于杂合状态的有害突变,这些突变如处于纯合状态就会产生有害后果;⑥致死突变,造成死胎、自然流产或出生后夭折等。

第二章 基因突变检测方法

对于基因突变的研究已成为当今生命科学领域研究的热点之一，检测方法也随之迅速发展。对于基因突变的检测，1985 年以前，利用 Southern 印迹法，可以筛选出基因的缺失、插入和移码重组等突变形式。对于用该法不能检测的突变，只能应用复杂、费时的 DNA 序列测定分析方法。

聚合酶链式反应（polymerase chain reaction, PCR）（图 1-2-1）是突变研究中最重大的发明，使基因突变检测有了长足的发展，目前几乎所有的基因突变检测分子诊断技术都是建立在 PCR 基础之上，并且由 PCR 衍生出的新方法不断出现，目前已达 20 余种，自动化程度也越来越高，分析时间大大缩短，分析结果的准确性也有了很大的提高。

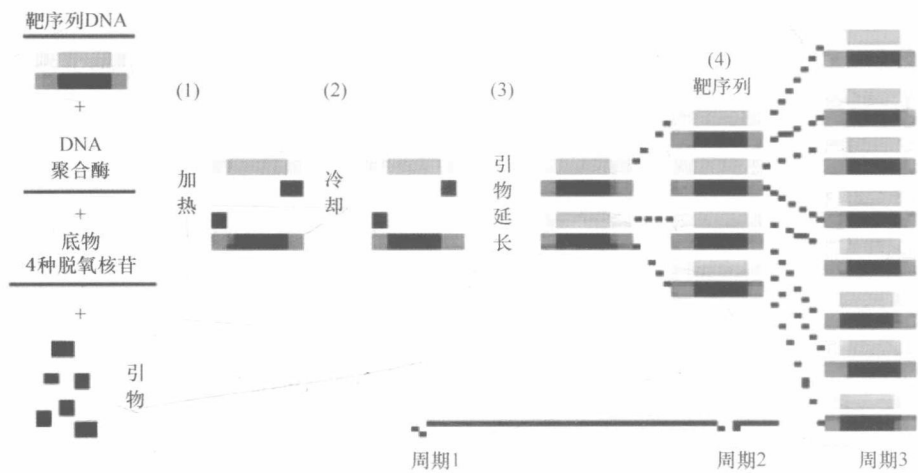


图 1-2-1 PCR 原理

下面介绍几种 PCR 衍生技术及传统的突变检测方法。

一、PCR-SSCP

在非变性聚丙烯酰胺凝胶上，短的单链 DNA 和 RNA 分子依其碱基序列不同而形成不同构象，一个碱基的改变将影响其构象而导致其在凝胶上的移动速度改变，此方法称为 PCR-SSCP 法。其基本原理为单链 DNA 在中性条件下会形成二级结构，这种二级结构依赖于其碱基组成，即使有一个碱基不同，也会形成不同的二级结构而测出不同的迁移率。由于该法简单快速，因而被广泛用于未知基因突变的检测。

二、突变体富集 PCR

突变体富集 PCR (mutant-enriched PCR) 的基本原理是利用 ras 基因家族某个密码子部位存在已知的限制性内切酶位点, 如 K-ras 基因第 12 密码子的 *Bst*NI 位点, 第 13 密码子的 *Bgl*I、II 位点, 用连续两次的巢式 PCR 来扩增包括 K-ras 第 12、13 密码子的 DNA 片段, 在两次扩增反应之间用相应的内切酶消化扩增的 DNA 片段, 野生型因被酶切而不能进入第二次 PCR 扩增, 而突变型则能完整地进入第二次 PCR 扩增并得到富集的产物。

三、实时荧光定量核酸扩增检测系统

实时荧光定量核酸扩增检测系统 (real-time quantitative PCR detecting system, QPCR), 也称为实时定量基因扩增荧光检测系统。QPCR 是当今临床应用最多的核酸分子诊断技术, 已被美国食品药品监督管理局 (FDA) 认可。

突变扩增阻滞系统 (amplification refractory mutation system, ARMS) 已成为国际上肿瘤个体化分子检测最重要的技术之一, 其在临床应用中的优势已被业内专家广泛认可。ARMS 利用特异引物对突变靶序列进行高精度 PCR 扩增放大, 与此同时, 利用探针对扩增产物进行检测, 在实时荧光定量 PCR 平台上实现对样品 DNA 中稀有突变的检测, 以达到对基因突变检测的高特异性和高灵敏度。

四、数字 PCR

数字 PCR (digital PCR, dPCR) 是一种核酸分子绝对定量技术。定量 PCR 是依靠标准曲线或参照基因来测定核酸量, 而数字 PCR 则能够直接数出 DNA 分子的个数, 是对起始样品的绝对定量, 因此特别适用于依靠 Ct 值不能很好地分辨的领域: 拷贝数变异、突变检测、基因相对表达研究 (如等位基因不平衡表达)、二代测序结果验证、miRNA 表达分析、单细胞基因表达分析等。

20 世纪末, Vogelstein 等提出数字 PCR 的概念, 通过将一个样本分成几十到几万份, 分配到不同的反应单元, 每个单元最多包含一个拷贝的目标分子 (DNA 模板), 在每个反应单元中分别对目标分子进行 PCR 扩增, 扩增结束后对各个反应单元的荧光信号进行统计学分析。

五、DNA 芯片

DNA 芯片 (DNA chip) 技术是 20 世纪 90 年代后发展的一项 DNA 分析新技术, 它集合了集成电路计算机、激光共聚焦扫描、荧光标记探针和 DNA 合成等先进技术, 可用于基因定位、DNA 测序、物理图谱和遗传图谱的构建等。在基因突变检测方面, DNA 芯片也有广阔的前景, 其基本原理为将许多已知序列的寡核苷酸 DNA 排列在 1 块集成电路板上, 彼此之间重叠 1 个碱基, 并覆盖全部所需检测的基因, 将荧光标记的正常 DNA 和突变 DNA 分别与 2 块 DNA 芯片杂交, 由于至少存在 1 个碱基的差异, 正常和突变的