



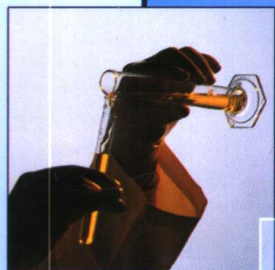
卫生部“十一五”规划教材

全国高等医药教材建设研究会规划教材

全国高等学校教材 ★ 供医学检验专业用

分子生物学 检验技术

第2版



主 编 / 樊绮诗 吕建新



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

全国高等学校教材

供医学检验专业用

分子生物学检验技术

第2版

主 编 樊绮诗 吕建新

主 审 周 新

编 者 (以姓氏笔画为序)

吕建新 (温州医学院)

张吉林 (北华大学医学院)

罗建新 (中南大学湘雅医学院)

范 红 (四川大学华西临床医学院)

郑 芳 (武汉大学医学院)

赵春艳 (大连医科大学)

倪培华 (上海交通大学医学院)

唐冬生 (佛山科学技术学院医学院)

钱 晖 (江苏大学医学院)

黄迪南 (广东医学院)

彭 颖 (温州医学院)

樊绮诗 (上海交通大学医学院)

人 民 卫 生 出 版 社

图书在版编目 (CIP) 数据

分子生物学检验技术/樊绮诗等主编. —2 版. —北京:
人民卫生出版社, 2007. 7

ISBN 978-7-117-08870-1

I. 分… II. 樊… III. 分子生物学-医学检验
IV. R446

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2007) 第 094720 号

本书本印次封底贴有防伪标。请注意识别。

分子生物学检验技术

第 2 版

主 编: 樊绮诗 吕建新

出版发行: 人民卫生出版社(中继线 010-67616688)

地 址: 北京市丰台区方庄芳群园 3 区 3 号楼

邮 编: 100078

网 址: <http://www.pmph.com>

E - mail: pmph@pmph.com

购书热线: 010-67605754 010-65264830

印 刷: 北京蓝迪彩色印务有限公司

经 销: 新华书店

开 本: 787×1092 1/16 印张: 15.5 插页: 1

字 数: 357 千字

版 次: 2003 年 2 月第 1 版 2007 年 7 月第 2 版第 6 次印刷

标准书号: ISBN 978-7-117-08870-1/R·8871

定价(含光盘): 29.00 元

版权所有, 侵权必究, 打击盗版举报电话: 010-87613394

(凡属印装质量问题请与本社销售部联系退换)

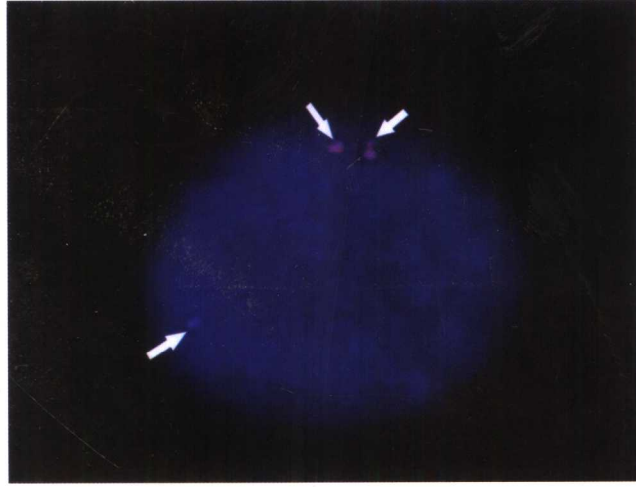


图 8-12 荧光原位杂交检测 21 号染色体

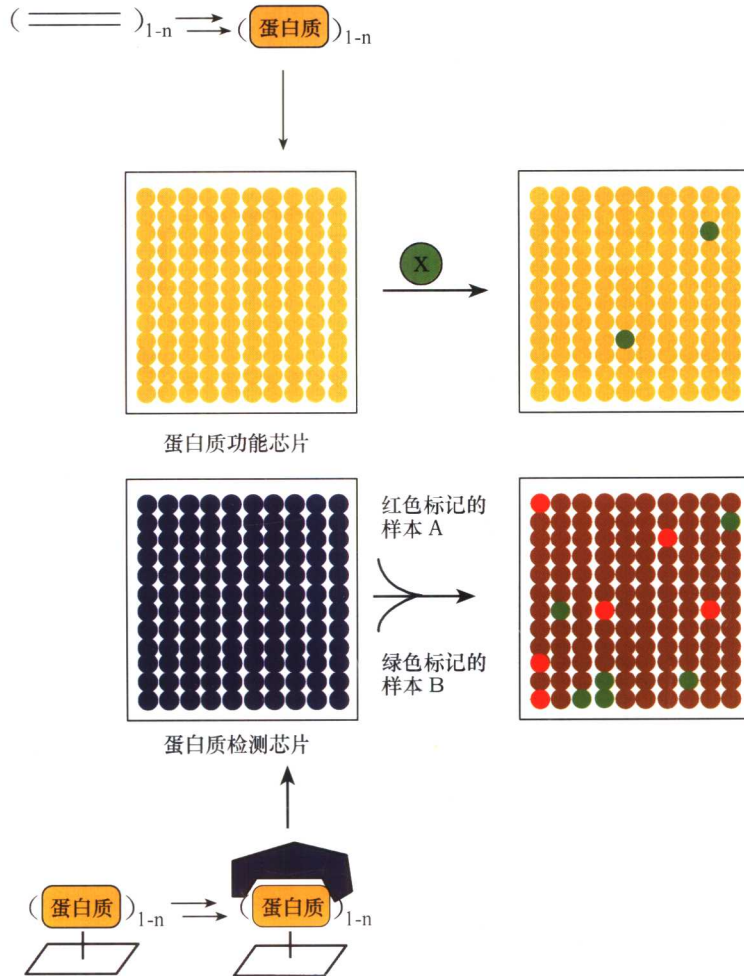


图 10-5 蛋白质功能芯片和蛋白质检测芯片

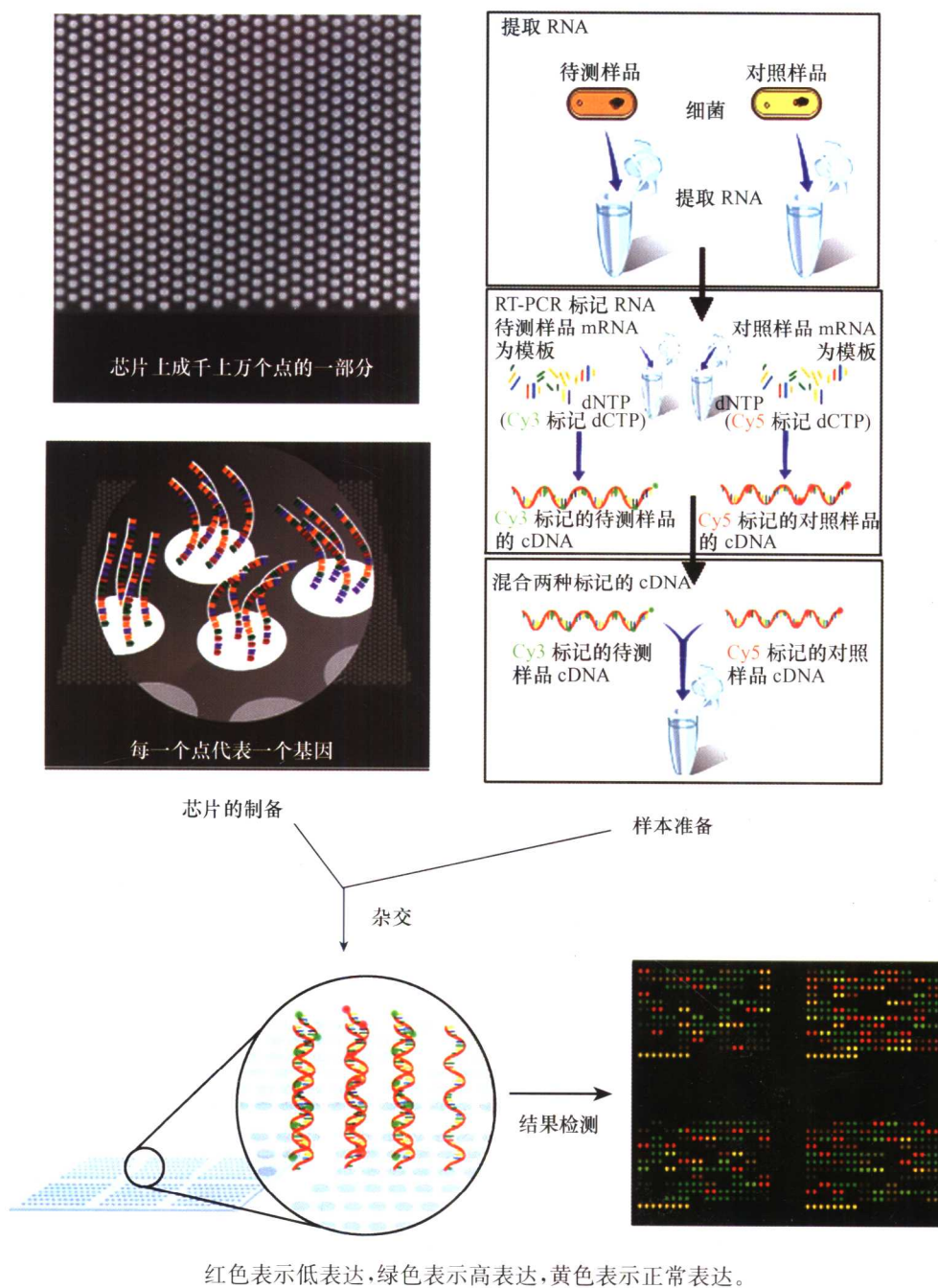


图 10-4 基因表达谱芯片流程示意图

全国高等学校医学检验专业 教材修订说明

由卫生部教材办公室、全国高等医药教材建设研究会规划的上一版医学检验专业本科教材在高等学校使用已4年余,为全国医学检验专业的教学工作起到了重要作用。由于学科进展以及我国检验专业教育改革的需要,决定对本套教材进行第四轮修订,同时修订实验指导,本轮教材根据教学的需要,新增加相配套的教学光盘和习题集。修订中强调在编写内容上一定要符合培养目标的需要,对本轮教材的字数进行了调整和精简;编写形式上有所创新,为便于教学,部分教材尝试了以问题为中心的编写方式。第四轮检验专业本科教材新增《临床检验仪器》和《临床输血与检验实验指导》。

本轮修订的教材共10种

《临床检验基础》第4版	主编	熊立凡	刘成玉
《临床生物化学与检验》第4版	主编	周新	府伟灵
《临床微生物学与检验》第4版	主编	倪语星	尚红
《临床免疫学与检验》第4版	主编	王兰兰	吴健民
《临床血液学与检验》第4版	主编	许文荣	王建中
《临床寄生虫学与检验》第3版	主编	沈继龙	
《分子生物学检验技术》第2版	主编	樊绮诗	吕建新
《临床输血与检验》第2版	主编	高峰	
《临床实验室管理学》第2版	主编	申子瑜	李萍
《临床检验仪器》	主编	曾照芳	洪秀华

与本套教材配套的实验指导共8种

《临床检验基础实验指导》第3版	主编	吴晓蔓
《临床生物化学与检验实验指导》第3版	主编	钱士匀
《临床微生物学与检验实验指导》第3版	主编	吴爱武
《临床免疫学与检验实验指导》第3版	主编	刘辉
《临床血液学与检验实验指导》第3版	主编	管洪在
《临床寄生虫学与检验实验指导和习题集》第3版	主编	汪学龙
《分子生物学检验技术实验指导》第2版	主编	徐克前
《临床输血与检验实验指导》	主编	胡丽华

与本套教材配套的习题集共 8 种

《临床检验基础习题集》

《临床生物化学与检验习题集》

《临床微生物学与检验习题集》

《临床免疫学与检验习题集》

《临床血液学与检验习题集》

《分子生物学检验技术习题集》

《临床输血与检验习题集》

《临床检验仪器习题集》

主编 熊立凡 刘成玉

主编 周 新 府伟灵

主编 邵世和

主编 王兰兰 吴健民

主编 夏 薇

主编 樊绮诗 吕建新

主编 高 峰

主编 曾照芳 洪秀华

前言

分子生物学技术的迅速发展,极大地推动了医学科学的进步,也使临床医学对于疾病的实验室诊断发生了革命性变化。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指导个体化治疗已经不再是陌生的事情。为适应这种快速发展的需要,卫生部医学检验专业教材编审委员会于2001年组织国内数家医学院编写了第1版《分子生物学检验技术》,作为医学检验专业的规划教材。

第1版《分子生物学检验技术》使用以来,受到广大师生的好评,但是仍有一些需要改进之处。由于分子生物学技术的快速发展以及在临床医学中的应用日益广泛深入,为进一步适应医学高等教育深化改革的需要,卫生部医学检验专业教材编审委员会于2006年决定对第1版教材进行再版修改。

本次修改包括部分结构的调整和相关内容的更新,去除了第1版中与其他学科交叉并且与分子生物学检验技术及相关理论无关的内容,使教材结构更合理、内容更精练、重点更突出。第2版教材还引入了近年来发展的新理论、新技术,在注重分子生物学检验技术基础理论和基础知识介绍的同时,使学生了解和学习最新进展和相关内容。

全书由原来的十二章精简为十一章。将原来的第二章和第三章合并为“基因组与基因组学”章,去除了关于朊病毒的相关内容;将原来的第五章和第十章合并为“蛋白质组和蛋白质组学”章;删除了第十二章“细胞凋亡与检测技术”。另外,为介绍分子生物学新知识及其实际应用,本版教材充实了克隆基因的表达及基因干扰的相关内容,并将其单独列为一个章;把第1版教材中的“聚合酶链式反应及其在基因诊断中的应用”扩展为“聚合酶链反应及相关技术”和“分子生物学检验技术的临床应用”两个章;补充介绍了一些目前应用较多的相关技术及这些技术在HIV、SARS、人禽流感病毒和医院获得性感染中的应用等内容。

本版教材遵循注重培养学生的创新思维和自学能力这一主导思想,在每章内容前列出思考题,使学生带着问题学习相关内容,并在学习后通过思考、归纳和总结,能够找到并掌握该章的重点和主要内容,从而能够解答思考题。

参加编写本版教材的12名人员来自全国10所高等院校,他们以高度责任感完成了各自承担的编写任务。本教材在编写过程中得到卫生部教材办公室、上海交通大学

前 言

医学院和广东佛山科学技术学院的大力支持，在此表示感谢；还要感谢上海交通大学医学院检验系刘湘帆硕士和吴蓓颖硕士为本教材的整理和完稿所付出的辛勤劳动；特别要感谢武汉大学医学院周新教授对本教材的最终审阅和把关。

限于编者水平有限，编写时间紧迫，书中难免存在不足，敬请同行专家、使用本教材的师生和其他读者批评指正。

樊绮诗 吕建新

2007 年 3 月

目 录

第一章 绪论	1
第一节 分子生物学检验技术的理论基础	1
一、病原生物基因与人类感染性疾病	2
二、基因变异与单基因病	2
三、基因变异与多基因病	2
四、线粒体基因变异与线粒体遗传病	2
五、肿瘤相关基因与恶性肿瘤	3
第二节 分子生物学检验技术的分析对象	3
一、病原生物基因	3
二、基因变异	4
三、基因多态性	4
第三节 分子生物学检验技术的应用前景	5
第二章 基因组与基因组学	6
第一节 原核生物基因组	7
一、原核生物基因组特征	7
二、质粒	9
三、转座因子	12
第二节 病毒基因组	13
一、病毒基因组特征	13
二、DNA 病毒	15
三、RNA 病毒	20
第三节 真核生物基因组	23
一、细胞核基因组特征	23
二、细胞质基因组特征	30
三、基因组结构与疾病	30
第四节 人类基因组与人类基因组计划	34
一、人类基因组	34
二、人类基因组计划	35
三、功能基因组计划	37

第三章 蛋白质组与蛋白质组学	41
第一节 蛋白质组及其质点的分离与分析	42
一、分离纯化	42
二、分析鉴定	48
第二节 蛋白质相互作用研究	52
一、蛋白质-蛋白质	53
二、蛋白质-核酸	55
第三节 蛋白质数据库及其应用	57
一、蛋白质数据库	57
二、蛋白质数据库应用	58
第四章 肿瘤相关基因	61
第一节 癌基因	61
一、病毒癌基因	62
二、细胞癌基因	63
三、原癌基因激活机制	66
第二节 抑癌基因	68
一、抑癌基因与肿瘤	69
二、抑癌基因失活机制	69
第三节 肿瘤转移相关基因	71
一、肿瘤转移基因	71
二、肿瘤转移抑制基因	72
第四节 肿瘤发生	73
第五节 肿瘤相关基因的检测和评价	74
一、检测策略与主要检测技术	74
二、原癌基因与抑癌基因的检测	74
第五章 核酸的分离与纯化	77
第一节 核酸分离与纯化的设计原则	77
一、材料与方法的选择	78
二、技术路线设计	78
三、鉴定与保存	79
第二节 基因组 DNA 的分离与纯化	81
一、分离与纯化方法	82
二、DNA 片段回收	84
三、方法学评价与质量保证	86
第三节 质粒 DNA 的提取与纯化	87
一、质粒的结构与理化性质	87
二、提取与纯化方法	88

三、质粒 DNA 的回收	90
四、方法学评价与质量保证	90
第四节 RNA 的分离与纯化	91
一、RNA 的制备条件与环境	91
二、总 RNA 的分离与纯化	91
三、mRNA 的分离与纯化	93
第六章 DNA 重组技术	96
第一节 常用工具酶	97
一、限制性内切酶	97
二、DNA 连接酶	98
三、分子克隆中常用的其他酶	99
第二节 常用载体	99
一、质粒载体	100
二、噬菌体载体	102
三、穿梭载体	104
四、人工染色体	106
第三节 DNA 重组与鉴定	106
一、DNA 重组	107
二、重组子筛选与鉴定	111
三、DNA 序列测定	114
第七章 克隆基因表达及基因干扰	118
第一节 外源基因表达	118
一、原核生物表达体系	119
二、真核生物表达体系	122
第二节 表达产物分离、纯化与鉴定	126
一、大肠杆菌重组表达蛋白的分离与纯化	126
二、酵母重组表达蛋白的分离与纯化	127
三、CHO 细胞重组表达蛋白的分离与纯化	127
四、表达产物的鉴定	128
第三节 基因表达干扰技术	129
一、反义核酸技术	129
二、核酶与脱氧核酶	131
三、小干扰 RNA	137
四、微 RNA	142
第八章 核酸分子杂交技术	146
第一节 基本原理与分类	147

一、基本原理	147
二、分类	147
第二节 探针设计与标记	151
一、探针种类选择	151
二、探针长度	153
三、探针标记	153
第三节 分子杂交	157
一、核酸分子与固相介质的结合	157
二、杂交	160
三、信号检测	161
第四节 核酸分子杂交技术应用	164
一、Southern 印迹杂交	164
二、Northern 印迹杂交	165
三、原位杂交	165
四、液相杂交	167
第九章 聚合酶链反应及相关技术	169
第一节 聚合酶链反应	169
一、PCR 原理和反应过程	169
二、PCR 反应体系和反应条件	170
三、PCR 技术质量控制	173
第二节 以 PCR 为基础的相关技术	174
一、反转录 PCR	174
二、巢式 PCR	175
三、定量 PCR	175
四、多重 PCR	179
五、PCR 诱导定点突变	180
六、原位 PCR	181
七、差异显示 PCR	182
八、其他扩增技术	183
第三节 PCR 产物检测	185
一、PCR-RFLP	185
二、等位基因特异性寡核苷酸	185
三、单链构象多态性	186
四、变性梯度凝胶电泳	186
五、融点曲线分析	187
六、PCR 产物序列分析	187
第十章 生物芯片技术	189

第一节 DNA 芯片	190
一、芯片制备	191
二、样品制备	193
三、杂交与结果分析	194
四、基因芯片技术在医学中的应用	194
第二节 蛋白质芯片	196
一、芯片制备	197
二、样品制备	197
三、杂交与结果分析	197
四、蛋白质芯片技术在医学中的应用	198
五、存在的问题	198
 第十一章 分子生物学检验技术的临床应用	200
第一节 样本来源	201
一、病原生物基因组样本	201
二、人类基因组样本	201
第二节 在病原生物基因组相关疾病研究和诊断中的应用	202
一、感染性疾病诊断和治疗监测	202
二、耐药监测与分子流行病学调查	211
三、医院获得性感染监测与控制	211
第三节 在人类基因组相关疾病研究和诊断中的应用	212
一、在单基因病中的应用	212
二、在多基因病中的应用	219
三、在线粒体遗传病中的应用	222
四、在白血病中的应用	224
第四节 在移植配型和个体识别中的应用	225
一、在移植配型中的应用	225
二、在个体识别中的应用	226
 参考文献	229
中英文索引	231

1

第一章

绪 论

自 20 世纪 70 年代以来, 分子生物学作为一门新兴学科得到了突飞猛进的发展, 这种发展以伴随着与多学科的交叉与渗透、其应用范围日益宽广深入为特征。今天, 分子生物学技术已经成为破解生命奥秘、探究疾病现象的最重要的工具和手段之一。医学检验作为一门临床医学中用实验方法和实验技术研究、诊断疾病的学科, 从最初的仅仅观察细胞学、形态学变化, 发展到能检测体液中各种物质(包括蛋白质、糖、酶、激素和脂类等)含量的变化, 再到如今能够对细胞亚结构包括线粒体等细胞器、染色体乃至基因进行分析。因此可以说, 医学检验技术的发展是整个生物学技术发展的缩影, 分子生物学检验技术实际上就是从基因水平解释疾病发生机制、明确疾病诊断、跟踪疾病进程、指导个体化治疗的先进手段, 是整个医学研究和临床医疗环节中实验室所使用的技术体系。

第一节 分子生物学检验技术的理论基础

分子生物学检验技术是以核酸或蛋白质为分析材料, 通过分析基因的结构、表达的变化和由此而导致的基因功能的改变, 为疾病的研究和诊断提供更准确、更科学的信息和依据。因此, 人类的基因结构与功能、基因表达与调控、基因结构和表达的改变与疾病的发生; 当今严重影响人类健康的病原生物体的基因结构特征、感染人类的方式和与人宿主细胞基因发生整合以后引发疾病; 线粒体基因突变导致多组织多系统异常而发生的线粒体遗传病; 癌基因与抑癌基因结构改变和表达异常和其他因素共同作用而导致的恶性肿瘤等, 都是分子生物学检验技术在医学领域中得以广泛应用的理论前提。

一、病原生物基因与人类感染性疾病

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。

二、基因变异与单基因病

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,导致单基因病的发生。

目前已经明确的单基因性状和疾病的种类在 2001 年时已达 1.2 万余种,其中仅一部分致病基因被明确定位,基因结构亦已被阐明。单基因病中发病率较高、研究得较多的疾病包括血红蛋白病、血友病、Duchenne 肌营养不良等,这些疾病的分子缺陷主要是致病基因结构发生了改变,引起编码产物量和质的改变,从而导致基因的功能发生变化。还有一类单基因病的分子缺陷是致病基因中核苷酸三联体重复序列发生高度扩展所致,相关的疾病包括脆性 X 综合征、亨廷顿病 (Huntington disease)、强直性肌营养不良和遗传性共济失调中的几种主要类型等。

三、基因变异与多基因病

多基因病的发病机制十分复杂,遗传因素和环境因素共同起作用。这些病的发生有一定的遗传基础,常表现出家族倾向,但却又不符合一般的遗传方式。多基因病的发病率较高,病情复杂,往往会导致靶器官损伤和并发症,严重危害人类健康。参与多基因病发生的基因被称为疾病的相关基因,是目前的研究重点。如原发性高血压病人血管紧张素转换酶基因、血管紧张素原基因等;2 型糖尿病病人胰岛素基因和胰岛素受体基因、葡萄糖激酶基因等。这些基因的结构或者发生了多态性改变,或者发生了错义突变、无义突变、剪接点突变或碱基缺失等变异。但是由于这些疾病的发生涉及诸多因素,因此某一相关基因的变异不足以解释多基因病的发病机制。

四、线粒体基因变异与线粒体遗传病

线粒体 DNA 突变使线粒体功能发生障碍,直接影响人体组织和细胞的各种生物学功能,导致线粒体遗传病。它具有母系遗传、基因突变具阈值效应以及多系统受累等遗传学特征。目前已证实线粒体 DNA 有 100 多种点突变和 200 多种缺失、插入和

重排与线粒体疾病有关,其中60%的点突变影响线粒体 tRNA,35%影响呼吸链多态亚单位,5%影响线粒体 rRNA。另外,参与细胞氧化磷酸化、参与 mtDNA 的复制-转录-翻译、维持线粒体及其 DNA 结构完整性的细胞核基因突变也会引起线粒体疾病。

五、肿瘤相关基因与恶性肿瘤

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杂的过程。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。

第二节 分子生物学检验技术的分析对象

既然分子生物学检验技术的理论基础是基因与疾病,那么它所分析的对象就是基因,或者说是研究和探讨基因的改变与疾病的关系。归纳之,就是用各种分子生物学技术分析和检测病原生物基因和疾病基因(包括致病基因、疾病相关基因、线粒体基因和肿瘤相关基因)结构和功能的变化以及这些变化与疾病的关系;分析位于基因内或基因外的遗传标志的多态性,研究这种多态性与疾病的关系。

一、病原生物基因

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. 病毒分型 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用菌群失调,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