



黄宪章 胡波 邓建平 鞠萍 主编

FENZI SHENGWUXUE JIANYAN JICHU YU LINCHUANG

分子生物学 检验基础 与临床

湖北长江出版集团

湖北科学技术出版社

分子生物学检验基础与临床

主 编 黄宪章 胡 波 邓建平 鞠 萍
副主编 向环英 任吉勇 庄俊华 杨万勇
罗招凡 周宇麒 胡 凯 熊传银
编写者 (按姓氏笔画顺序)

尹 中 邓建平 任吉勇 向环英
庄俊华 李 玺 吴 敏 罗招凡
杨万勇 周宇麒 周光泉 胡 波
胡 凯 姚振国 黄妩姣 黄宪章
熊传银 熊传郑 鞠 萍

湖北长江出版集团
湖北科学技术出版社

图书在版编目(CIP)数据。

分子生物学检验基础与临床/黄宪章等主编. —武汉:湖北科学技术出版社, 2006.2

ISBN 7-5352-3468-2

I. 分… II 黄… III. 分子生物学—医学检验

IV. R 446

中国版本图书馆CIP数据核字(2005) 第108944号

分子生物学检验基础与临床

© 黄宪章 胡波 主编
邓建平 鞠萍

策 划: 冯友仁
责任编辑: 冯友仁

封面设计: 戴 旻

湖北长江出版集团

出版发行: 湖北科学技术出版社

电话: 87679468

地 址: 武汉市雄楚大街268号湖北出版文化城B座12-13层

邮编: 430070

印 刷: 武汉贝思印务设计有限公司

邮编: 430070

787毫米×1092毫米

16开

16.75印张

420千字

2006年2月第1版

2006年2月第1次印刷

ISBN 7-5352-3468-2/R · 810

定价: 35.00元

本书如有印装质量问题 可找承印厂更换

前 言

分子生物学技术的发展突飞猛进,并对医学科学的进步产生了巨大的推动作用。人类对疾病的诊断,不再限于检测体液中蛋白质类、糖类或其他物质浓度,而是可以在DNA水平上对受检者某一特定基因进行分析和检测,从而达到对疾病的特异性诊断、追踪疾病的发展过程、对感染的病原生物进行鉴别、分类及筛选有效的治疗药物等。关于分子生物学技术与医学检验和临床关系的专著不多。本书主要介绍了分子生物学检验的基础,以及在遗传性疾病、感染性疾病、恶性肿瘤及其他相关疾病中的临床应用,使人们学会更多地用系统、整体的观点去考虑诸如生命、衰老、癌症等重大的生物学问题,对分子生物学技术在疾病的诊断、预防和治疗方面的重大作用的理解也更加深入。

全书共十六章。第一章绪论;第二章至第七章为分子生物学的基本原理及技术,分别介绍了分子生物学的重要研究方法和技术;目的基因的获得、重组质粒的构建、筛选、表达与调控;核酸杂交与PCR技术在当前分子生物学检验中的应用;第八章至第十四章分别介绍了分子生物学检验技术在人类白细胞抗原、肿瘤、感染性疾病、呼吸系统、消化系统、心血管疾病及产前诊断方面的应用;第十五章至第十六章介绍了重组DNA技术及蛋白质组学在医学中的应用。

参加该书编写的有中山大学、广州中医药大学、黄石市部分医院等单位。编者都是从事基因诊断的科研人员和临床检验医生,他们以高度的责任感和使命感完成了各自承担的编写任务。本书在很大程度上得益于国内外专家发表的论文、出版的著作和取得的成果,没有前人和今人知识的积累就不可能有本书的问世。编者对本书引用的国内外认识或不认识的科学家们表示敬意,对他们提供的资料表示感谢。

本书编写过程中,得到了广州中医药大学DME中心国家“863”课题组负责人梁伟雄教授的大力帮助,在此深表感谢。

由于编者学识有限,不妥之处在所难免,敬请批评指正。

编 者

2006年2月于广州

目 录

第一章 绪论	1
第一节 感染性疾病和肿瘤的分子诊断.....	2
第二节 单基因病和多基因病的分子诊断.....	3
第三节 基因诊断的常用技术.....	3
第四节 分子诊断面临的问题.....	5
第二章 现代分子生物学的重要研究方法和技术	7
第一节 重组 DNA 技术.....	7
第二节 同源重组的机制.....	8
一、断裂重接和异源双链.....	8
二、枝链迁移.....	9
三、碱基对的错配及消除.....	9
四、DNA 分子的配对.....	10
第三节 基因沉默与基因敲除.....	10
一、基因沉默.....	11
二、基因敲除.....	13
第四节 基因表达差异分析.....	14
一、传统研究基因表达差异的方法.....	14
二、差异展示技术.....	15
三、代表差异分析技术.....	15
四、基因表达系列分析技术.....	16
五、生物芯片技术.....	16
第三章 目的基因的获得	18
第一节 从原核生物获取目的基因.....	18
一、大肠杆菌的基因.....	18
二、用转导噬菌体分离宿主菌的基因.....	19
第二节 从真核生物获取目的基因的常用方法.....	19
一、化学合成法.....	20
二、聚合酶链反应.....	20
三、基因组 DNA 文库.....	21

四、cDNA 文库·····	22
第三节 目的基因序列测定·····	25
一、目的基因序列测定的意义·····	25
二、目的基因测序方法·····	26
三、长链 DNA 测序的策略·····	27
第四章 重组载体的构建与筛选·····	29
第一节 克隆载体的基本结构和功能·····	29
一、基本结构·····	29
二、功能·····	31
三、克隆载体的种类·····	32
四、表达载体的种类·····	38
第二节 重组载体的构建·····	39
一、凝胶电泳·····	39
二、目的基因和载体的限制性内切酶酶切的设计和应用·····	40
三、目的基因和线状载体 DNA 片段的分离和回收·····	41
四、目的基因与载体的连接策略·····	41
五、重组载体导入相应细胞·····	42
六、重组 DNA 细胞的筛选·····	43
第五章 外源基因在宿主细胞中的表达与调控·····	46
第一节 原核基因表达的调控·····	47
一、原核生物的顺式作用元件和转录调控蛋白·····	47
二、翻译的可调控性及调控方式·····	49
第二节 真核生物基因表达的调控·····	51
一、真核生物基因表达调控的分子机制·····	51
二、DNA 和染色质结构对转录的调控·····	55
三、转录起始的调控·····	56
四、转录后的调控·····	56
五、翻译的可调控性及调控方式·····	58
六、翻译后加工的调控意义·····	58
第三节 外源基因的表达·····	59
一、外源基因的表达系统·····	59
二、外源基因高效表达的措施·····	61
第六章 核酸分子杂交技术·····	63
第一节 核酸分子杂交的基本原理·····	63
一、DNA 变性与复性·····	64

二、杂交体系的建立	66
三、影响杂交的因素	66
第二节 核酸探针	67
一、探针的种类	68
二、标记物	69
三、标记方法	69
四、探针的纯化	71
第三节 核酸分子杂交的基本方法	71
一、Southern 印迹杂交	72
二、Northern 印迹杂交	75
三、Western 印迹杂交	75
四、斑点及狭缝印迹杂交	76
五、原位杂交	76
六、液相杂交	77
第七章 聚合酶链反应	79
第一节 PCR 的原理	79
一、PCR 原理简介	79
二、PCR 的七种基本成分	80
三、PCR 引物设计	82
四、模板的制备	83
第二节 PCR 基本反应	83
一、以 DNA 为模板的反应	83
二、以 RNA 为模板的反应	83
三、PCR 产物的积累规律	83
四、PCR 反应的自动化	84
五、PCR 反应条件的控制	84
第三节 PCR 的污染及对策	86
一、实验室空间	87
二、操作和进行 PCR 的规则	87
三、溶液和设备的去污染	87
四、PCR 实验中应注意的事项	88
第四节 PCR 技术的主要类型	88
一、反转录 PCR	89
二、筑巢 PCR	89
三、共享引物 PCR	89

四、多重 PCR	90
五、不对称 PCR	90
六、锚定 PCR	90
七、反向 PCR	90
八、彩色 PCR	90
九、原位 PCR	91
十、差异显示 PCR	91
十一、重组 PCR	92
第五节 定量 PCR	92
一、内参照定量 PCR	93
二、竞争 PCR 作 mRNA 定量	93
三、酶标记定量 PCR	94
四、荧光素标记的定量检测	95
五、定量 PCR 技术的应用	98
第六节 PCR 技术的主要用途	99
一、目的基因的克隆	99
二、基因的体外突变	99
三、DNA 和 RNA 的微量分析	100
四、DNA 序列测定	100
五、基因突变分析	100
第七节 连接酶链反应	100
一、LCR 的基本原理	100
二、LCR 产物的检测	101
三、影响 LCR 的重要因素	101
四、LCR 技术的扩展	101
第八节 RNA 的体外扩增	102
一、基本原理	102
二、产物的检测	103
三、RNA-PCR 技术的特点和应用	103
第八章 HLA 的检测与应用	104
第一节 人类主要组织相容性复合体	104
一、HLA 复合体结构特征	104
二、HLA 复合体遗传特征	106
第二节 人类主要组织相容性抗原	107
一、HLA 抗原的分子结构	107

二、HLA 抗原的表达及其调控	109
第三节 HLA 分型技术	111
一、血清学分型	111
二、细胞学分型	112
三、基因分型	112
第四节 HLA 与医学的关系	116
一、HLA 与疾病相关性	116
二、HLA 抗原表达异常与疾病的关系	117
三、HLA 与器官移植	118
四、HLA 与输血	119
五、HLA 与法医	119
第九章 肿瘤疾病的基因诊断	120
第一节 肿瘤的发生与基因	120
一、癌基因	120
二、抑癌基因	122
三、肿瘤的发生与多重基因变化	124
第二节 基因诊断在肿瘤研究中的意义和应用	125
一、肿瘤易感基因的检测	125
二、肿瘤的早期诊断和筛检	125
三、肿瘤的分类	126
四、肿瘤的预后判断	126
五、肿瘤的预后监测	126
六、肿瘤的治疗	126
第三节 肿瘤的基因诊断方法	127
一、肿瘤基因诊断的策略	127
二、肿瘤基因诊断的原理和方法	127
三、肿瘤基因诊断的具体方法	128
第四节 临床常见肿瘤疾病相关基因的检测	133
一、ras 癌基因的检测	133
二、抑癌基因 p53 的检测	134
三、其他基因的检测	134
第十章 感染性疾病的基因诊断	136
第一节 感染性疾病基因诊断的策略	136
一、一般性检出策略和方法	136
二、完整检出策略和方法	137

第二节 病毒性肝炎的基因诊断	137
一、肝炎病毒及其基因	138
二、病毒性肝炎的基因诊断	142
三、细菌性疾病的基因诊断	146
四、寄生虫疾病的基因诊断	150
第十一章 呼吸系统疾病的基因检测	153
第一节 肺癌与基因异常	153
一、概述	153
二、肺癌的基因异常	154
第二节 慢性阻塞性肺疾病与基因异常	156
一、概述	156
二、慢性阻塞性肺疾病与基因异常	157
第三节 支气管哮喘与基因异常	158
一、概述	158
二、支气管哮喘与基因异常	159
第四节 特发性肺纤维化与基因异常	160
一、概述	160
二、肺纤维化症与基因异常	161
第五节 囊性纤维化与基因异常	163
一、概述	163
二、囊性纤维化与基因异常	163
第六节 肺部感染性疾病的基因诊断	164
一、肺结核病	164
二、支原体肺炎	165
三、人巨细胞病毒肺炎	165
第七节 呼吸系统疾病与基因治疗	166
一、囊性纤维化和 α_1 AT 缺乏症	166
二、恶性肿瘤	167
三、其他	168
四、载体的开发状况	168
第八节 呼吸系统疾病与基因芯片	169
一、基因芯片简介	169
二、基因芯片在部分呼吸系统疾病中的研究应用现状	169
第十二章 消化系统疾病的基因检测	172
第一节 消化道肿瘤与基因异常	172

一、概述	172
二、消化肿瘤的基因诊断与基因治疗	174
第二节 消化道感染性疾病与基因异常	176
一、病毒性肝炎	177
二、幽门螺杆菌感染	179
第三节 消化系统遗传疾病与基因	184
第十三章 心血管疾病的基因检测	185
第一节 心血管疾病基因检测的常用分子生物学技术	185
一、基因克隆	185
二、多聚酶链反应	186
三、基因转移技术	187
四、基因打靶技术	188
五、反义核酸技术	189
六、候选基因关联研究	190
七、定位克隆	190
八、动物模型	191
九、单倍型	191
十、节俭基因型	192
十一、MS 分析方法	192
第二节 心血管疾病及其基因	193
第三节 心血管疾病基因单核苷酸多态性的检测	197
第四节 基因表达芯片对心血管疾病的检测	200
第五节 载脂蛋白基因异常表达与高脂血症和动脉粥样硬化	202
第六节 载脂蛋白表型及基因型的检测	208
一、载脂蛋白(a)表型	208
二、载脂蛋白E表型	210
三、载脂蛋白B基因多态性的检测	211
四、载脂蛋白CⅢ基因型检测	212
第十四章 产前诊断的基因检测	214
第一节 含有胎儿遗传信息的细胞成分及其种类	214
第二节 产前诊断的技术	215
第三节 基因检测技术	217
第四节 产前诊断的内容	219
一、染色体病	219
二、单基因遗传病	224

三、宫内感染疾病	225
第十五章 重组 DNA 技术及其应用	230
第一节 重组 DNA 技术的应用	231
一、重组 DNA 技术在医学上的应用	231
二、重组 DNA 技术在农业上的应用	233
三、基因工程在环境保护中的应用	236
第二节 基因工程抗体	236
一、抗体工程技术	237
二、基因工程抗体的应用	238
第十六章 蛋白质组学及其在医学上的应用	240
第一节 蛋白质组学研究的相关技术	240
第二节 蛋白质组学在医学中的应用	243
一、在肿瘤中的应用	243
二、在中枢神经系统疾病(CNS)中的应用	246
三、在心血管疾病中的应用	247
四、在感染性疾病中的应用	248
五、在精神疾病中的应用	249
六、在抗体工程中的应用	249
七、在药物开发中的应用	250
八、其他	250
参考文献	253

第一章 绪 论

自 1953 年 Watson 和 Crick 提出脱氧核糖核酸的双螺旋结构模型,到 1990 年人类基因组计划的正式启动,以及 10 年后的 2001 年 2 月,科学家们宣布完成人类基因组的全部序列图的半个世纪中,生命科学领域取得了惊人的进步和发展。DNA 重组技术、转基因技术、基因组学、蛋白组学、基因治疗、生物芯片等技术已经应用到医学领域,对疾病的认识、诊断、预防和治理都产生深刻的影响,这些发展和进步给现代医学带来了福音。

随着遗传学技术的不断发展,医学实验诊断学中诞生了一个新的组成部分——分子诊断学(molecular diagnostics),即基因诊断。基因诊断是在 DNA 水平上对受检者某一特定基因进行分析和检测,从而达到对疾病的特异性诊断。基因诊断诞生于 1976 年,当时美国加州大学旧金山分校的华裔科学家 Y.W-KAN 采用液相 DNA 分子杂交技术,在世界上首次完成了对 α -地中海贫血的基因诊断。基因诊断分直接基因诊断和间接基因诊断,直接基因诊断是当致病基因已分离和 DNA 序列已知时,通过 PCR 等技术对受检者的特定基因片段进行检测,以显示其缺失、插入等核苷酸序列的变化,直接作出分子病理诊断;间接基因诊断是主要利用连锁分析的方法,即通过分析疾病相关基因的多态性遗传标记或对其转录物 mRNA 的检测来诊断疾病。随着人类基因图谱的完成,对功能基因组研究的深入,我们会更加明确疾病与健康的分子机制,更好地区分那些临床无法辨别是疾病本身还是因为环境的变化而引起的改变,如肥胖和高血压等。通过定位克隆与定位候选克隆,很多人类重要疾病的致病基因和相关基因已被发现,如 Huntington 病、杜氏肌营养不良、囊性纤维变性、新生儿癫痫、秃发和耳聋等。近年来还成功地克隆了肥胖基因(obesogene),同时,利用定位克隆技术,通过候选基因和全基因组扫描两种方法,研究人员在原发性高血压、肥胖等复杂疾病的相关基因研究方面也有了一定的进展。目前,已能应用分子生物学有关技术,如限制性片段长度多态性连锁分析、DNA 斑点杂交和 DNA 测序等,直接对受检者的基因组 DNA 和 mRNA 进行研究,克隆和分离特定的 DNA 片段,直接作出分子病理诊断,现已能对血液、消化、内分泌、泌尿和神经系统数百种遗传病作出基因诊断。基因诊断不仅能够明确个体是否患病,更重要的是能揭示个体是否带有致病基因的杂合子,是否对某些疾病具有易感性或抵抗性等。同时,过去一度无法清楚其遗传背景的疾病,如自身免疫性疾病,将通过人类基因组计划(HGP)提供的分子生物学工具明确多因素遗传特征背景下相关 DNA 的变化情况。由于很多遗传病在症状出现前无法通过常规检查来确认,基因诊断可以通过对被检者的 DNA 分析来确诊是否具有某种疾病基因,从而在发病前采取某些有效的预防或治疗措施,如应用 DNA 芯片技术,即将核酸分子按一定顺序排列在集成电路板上,利用核酸杂交原理、集成电路计算机和激光共聚焦扫描等技术测定待测分子的结构,其操作越趋成熟简单,可应用于大规模的产前诊断,将会大大减少遗传病儿的出生率。此外,应用定量 PCR 技术对感染性疾病微量病原体(如衣原体、结核菌、病毒和某些细菌等)DNA 的检测,对早期、快速和准确的病原学诊断有重要的临床意义。因此,分子诊断学已

经成为检验医学(实验诊断学)的一个重要组成部分。下面将介绍分子诊断在致病微生物基因检测、遗传性疾病基因检测和肿瘤基因检测中的应用。

第一节 感染性疾病和肿瘤的分子诊断

与遗传性疾病致病基因检测和肿瘤基因检测相比,病原微生物基因检测在我国开展得更普遍。一些大、中型医院已能通过定性或定量检测致病微生物的核酸(DNA 或 RNA),从而快速地诊断发病率较高的病毒性肝炎、性传播性疾病等。目前政府有关部门针对前几年出现的问题加强了监督和管理力度,在试剂开发、临床考评、实验室场地和设备以及操作人员资格培训等方面制定了相应的规定和措施,使其逐步走上了健康发展的道路。

设备和技术的进步促进了病原体核酸的检测朝定量、更特异和自动化方向发展。目前国际上较为成熟的仪器和技术主要有 Roche 公司 COBAS AMPLICON 检测系统和荧光定量 PCR 技术,前者的检测原理基于 PCR-ELISA,即用生物素标记扩增所需的引物,使扩增产物带有生物素标记。在仪器的检测子系统中,PCR 产物用类似 ELISA 的方法检测:先用特异性寡核苷酸探针包被的磁珠与带有生物素的扩增产物进行杂交、洗涤,然后加入连接辣根过氧化酶的亲和素与之结合,洗涤后加入底物四-甲联苯胺显色,读取吸光度值。根据这一原理,只要在反应系统中加入一个已知拷贝数的定量标准品,该系统便可对本标本进行定量检测。由于 COBAS AMPLICON 系统具高敏感性和高特异性,且自动化程度较高,因此,该系统及相关试剂已获美国 FDA 的认证许可。中国食品药品监督管理局亦已批准其在国内上市,成为一些病原微生物核酸检测的金标准。

荧光定量 PCR 技术是另一种可对病原微生物核酸进行定量检测的技术。荧光定量 PCR 仪是一类带有激发光源和荧光信号检测系统的热循环仪,其通过荧光染料或荧光标记的特异性探针,对 PCR 过程中的产物量进行实时监控。在反应系统中加入已知浓度的标准品绘制标准曲线,据此可推算出被检查样本的初始模板浓度。荧光定量 PCR 技术的核心是荧光标记技术,常用的有水解探针(Taqman probe)、杂交探针,也称荧光共振能量转移(fluorescent resonance energy transfer, FRET)、分子信标(molecular beacon)和 SYBR-Green 1 结合染料等。目前较为成熟且已用于临床常规检测的荧光定量 PCR 仪主要是 ROCH 公司生产的 Light Cycler, PE 公司生产的 7700 和 Bio Rad 公司生产的 iCycler 等。

分子生物学技术除能检测病原微生物以诊断疾病以外,还可广泛应用于细菌耐药性的监测,如耐药基因的检测和耐药性菌株的基因鉴定,这些方法已成为有效地研究和解决细菌耐药性发生和传播的有用工具。

肿瘤是由于遗传物质(肿瘤相关基因)发生突变所致的疾病,不过事实上只有 0.1%~10% 的病人是由于遗传了亲代突变基因而发生肿瘤,大部分肿瘤病人是由于体细胞突变而发生肿瘤。与单基因遗传病不同的是,一些肿瘤相关基因的突变只是增加了对肿瘤的易感性而并不一定马上产生肿瘤,肿瘤的发生是一多因素、多步骤的过程。对于肿瘤的诊断主要依靠病人的病史、临床体征、影像学和病理学检查,而实验室检查还是作为辅助诊断。目前,用 PCR 技

术定量检测缓解期白血病人外周血中微量残留的融合基因片段,是一个评判治疗效果、监测肿瘤复发的有效指标。另有报道显示,在消化道肿瘤病人外周血中定量检测肿瘤标志物癌胚抗原(CEA)基因的表达,亦是监测肿瘤早期转移和判断预后的一个良好标志。这些研究已在临床上实际应用,显示了肿瘤相关基因检测的临床意义。

(胡波)

第二节 单基因病和多基因病的分子诊断

随着基因定位与克隆技术的日趋成熟,被克隆的疾病基因数目越来越多,无疑为疾病的基因诊断“送来了礼物”。经过 10 余年的完善和努力,发达国家基因诊断已十分系统和普遍地用于孟德尔遗传病(单基因病)的诊断和遗传咨询,如发病率较高的血红蛋白病、迪谢内肌营养不良、甲型血友病、囊性纤维化病及脆性 X 综合征等。由于对这些疾病进行了常规的基因检查,能够检出病人家系中的致病基因携带者或高危个体,有效地降低了这些疾病的发病率。我国一些实验室已对迪谢内肌营养不良、甲型血友病等建立了完善的分子诊断体系,在诊断病人、判断携带者和产前基因诊断方面收到显著的社会效益。此外,对一些发病率相对较高的常染色体连锁遗传病的致病基因的检查也在很大程度上帮助临床医师明确了诊断。对于一些遗传异质性较高的疾病,如遗传性共济失调、肢带型肌营养不良、糖原累积症等,致病基因的分子诊断为这些疾病的分类提供了遗传学基础和依据。

多基因病(或称多因子病)大多为常见病,如高血压、糖尿病、风湿病、消化性溃疡等,具有一定的遗传因素,家庭发病率高于人群发病率,但其发病都以一定的环境条件为诱因,遗传因素在其中所起的作用程度各异,这些疾病的遗传因素是若干易感基因微小作用的累加。因此,某一易感基因结构上的变化不足以导致疾病产生。对于多基因病的诊断,目前仍主要依靠疾病的表型诊断,如测量血压、测定血糖等。有科学家提出,人类基因组多态性是将来多基因病基因诊断的基础,可以预见,易感基因多态性的检测将帮助我们理解多基因病发生的机制,有助于我们对疾病实行诊断和分类。临床医师甚至可以根据病人易感基因的多态性设计有效的、个体化的治疗方案。

(胡波)

第三节 基因诊断的常用技术

为遗传疾病提供基因诊断只有 20 余年时间。开始是在少数的实验室开展,而目前已成为一项成熟的日常工作,正是高速发展的基因疾病的发现以及特殊 DNA 检测技术的发展使这种转变成为可能。其常用技术包括:

1. 核酸杂交技术

主要有斑点杂交(Dot hybridization)、DNA 转印(Southern blot)、RNA 转印(Northern blot)、原位杂交(in situ hybridization)等,其主要原理是利用核酸分子变性与复性的理化性质。主要步骤为探针制备(包括基因克隆、核酸标记)、核酸纯化、内切酶消化、核酸电泳、转移、杂交、自显影或显色等。由于操作复杂,费时,基因克隆难度较大,实验成本较高,故临床推广尚有困难。

2. 核酸扩增技术

主要指聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR),此 PCR 技术因操作简便、快速、灵敏度高、特异性好等,成为医学实验室接受最快,应用最多的分子生物学技术之一。现已有多重 PCR、巢式 PCR、二次 PCR、逆转录 PCR、夹心 PCR 等十几种技术,可用于基因克隆、探针制备、DNA 序列分析等。其主要原理为在了解 DNA 一级结构基础上设计引物,DNA 多聚酶可识别并结合引物,以单链 DNA 为模板,dNTP 为底物,合成其互补链。通过反复变性,反复合成互补链的过程,达到 DNA 扩增的目的。

3. 基因分析

基因分析是限制性内切酶、核酸电泳、转印技术、探针杂交技术的综合应用,多用于临床遗传性疾病的基因诊断。对已明确的遗传缺陷基因,可将纯化的正常人和病人 DNA,同时用限制性内切酶切成片段,经电泳分离、转印、探针杂交等找到目的基因。对原发基因缺陷尚不清楚者,可用核酸限制性片段长度多态性(RFLP)分析,RFLP 指同源染色体等位基因中限制性内切酶的切点改变,造成切出片段的差异(限制性片段长度多态性),这种切点处碱基突变,不影响该处的基因功能,但 RFLP 可能与致病基因有连锁关系,用于基因缺陷性遗传病的间接诊断。

4. 基因芯片技术

基因芯片技术是近年来迅速发展起来的一项重要的 DNA 分析技术,它将核酸样品制备、核酸扩增和定性定量检测等一系列繁琐的过程连续化和微型化,使其高度集中在一块数英寸大的固相支持物上,用于进行基因表达和突变的检测及 DNA 序列分析,可极大地提高 DNA 分析速度和简化其分析过程。基因芯片具有下列显著的优点:

- (1) 实现分析过程的高度自动化,提高分析速度。
- (2) 减少样品及化学用品用量。
- (3) 极高的多样品处理能力。
- (4) 防止污染,有效地排除外界因素的干扰。

在基因突变和多态性的检测方面,基因芯片技术具有高度的分辨率。Lipshutz 应用基因芯片对 HIV 病毒的蛋白酶基因和反转录酶基因突变情况进行筛选,基因芯片发现 HIV 患者中 HIV-1 clade 蛋白酶多态性与 Sanger 法测序的结果一致性高达 98%。在 DNA 序列分析方面,基因芯片技术具有高度的准确率。Chee 等将 135 000 个寡核苷酸探针固定在硅化的玻璃片上制作成 DNA 芯片,对人类线粒体基因进行测序,发现其准确率达到 99%。Hacia 等也通过对猩猩、大猩猩、黑猩猩的同源基因外显子序列比较分析,证实基因芯片技术对扫描进化保守序列特别有利。

在基因表达研究方面,采用基因芯片技术只需很少的样品便能提供有关差异表达的信息,从而为疾病诊断和筛选带来极大便利。Shoemaker 等将基因芯片用来确定新近发现的酵母基因的生物功能,由此发明了分子条形码技术,利用这种技术可定量地分析复杂的核酸混合物。在速度及产生的数据量方面,基因芯片作为测序方法具有显著优点。Wikman 等用经典技术测

序的膀胱癌组织标本来评价 p53 基因芯片,证实其具有不受来自病理和非病理模板混合物干扰的优点,可从含有 99%野生型的疾病组织中检测出仅含 1%的靶,而经典方法为了准确检测出突变,病理组织至少需达 30%。基因芯片技术提高了敏感性,对每一含特异性寡核苷酸的点检测其独特序列,可能是野生型,也可能是突变型。因此野生型污染不干扰突变型的检测,反之亦然。基因芯片也具有一定的局限性。Wikman 与 Ahrendt 等的研究表明基因芯片不能检测移码突变(p53 基因中的插入或缺失),而这种移码突变占有所有已知 p53 基因突变的 10%~20%。Wikman 等在其研究中也发现有必要对芯片方法加以改进。如改进杂交条件,使芯片均匀振动以获得均一的着色。改进数据评价或固定界限值以避免错误结果(假阳性和假阴性)。

5. 基因扫描方法

基因扫描方法能帮助研究者和临床医师确定基因中是否存在突变。该方法不能确定突变的精确位置和类型,但能提供基因所在区域的信息。若接着再做 DNA 测序,便可知道突变的精确位置和类型。扫描技术已广泛应用,其中包括异源双链体分析、单链构象多态性、变性梯度电泳和凝胶电泳以及化学裂解方法。目前已有商品名为 PASSPORT™ 的突变扫描法上市。该方法包括 PCR 扩增,通过 PCR 产物与野生型参考 DNA 杂交形成异源双链(该步通过简单的混合和加热来完成),然后(若突变存在)可由 T4 酶核酸内切酶 VII~VI 形成任意异源双链的酶切片段。该酶能切割错配附近的 DNA 链,通常为 3~6bp 范围。再将切割产物进行电泳检测,测出的切割片段数目与可能的突变数目相对应(每一异源双链中最多可检测出 5 个)。Ingans 等用结直肠癌 DNA 标本的 p53 作模式考察本法的敏感性、特异性和定位的准确性。他们并用手工法检测放射性和荧光自动测序法。其结果令人鼓舞,敏感性和特异性可与直接 DNA 测序相比,但该方法的敏感性和特异性也不是 100%。PASSPORT™ 方法的敏感性为 92%~100%,特异性为 85%~91%。

总之,在目前基因分析的新方法中,基因扫描提高了基因分析的效率,可代替目前使用效率低的方法;基因芯片可快速检查存在突变的大量基因组区域,且该方法的进一步改进和成本的降低有望使其常规化。

(向环美 胡波)

第四节 分子诊断面临的问题

虽然分子诊断已越来越广泛地渗透至临床医学中,成为实验领域中一个不可替代的重要部分,但其在发展过程中将面临以下几个问题。

美国《分子诊断学》杂志于 2001 年发表了一篇题为“*The FDA is coming! The FDA is coming!*”的文章,传递了美国 FDA 将要干预疾病基因分子诊断的信息。FDA 将着重评估实验室自行设计的方法(in-house-developed genetic tests)和实验室资质等,并对方法原理、实验步骤、使用指征、报告格式、结果、标本、临床有效性等因素进行论证,同时在全美建立一个完善的遗传检验的质量控制体系,规定报告模式和反馈给被检者的信息范围。专家强调,实施这一计划