

YIXUE YICHUANXUE

医学遗传学

(第二版)

● 上海医科大学出版社

前 言

《医学遗传学》(第一版)出版至今已有5个多年头了,这5年多来,医学遗传学随着分子生物学理论和技术的发展与进步也发生了翻天覆地的变化。许多影响人类健康的遗传病如Huntington舞蹈病、Wilson病的基因被克隆;许多新的方法和技术如聚合酶链反应(PCR)、荧光原位杂交(FISH)被广泛地应用于遗传病的临床诊断及产前诊断中,从而使遗传病的预防大大前进了一步;在这其间,我国颁布并实施了《母婴保健法》,从而为促进人群的健康,减少遗传残疾提供了法律保障。所有这些,对临床医学工作者提出了新的、更高的要求,即我们应具备什么样的知识体系去迎接21世纪分子医学新时代的到来?

本书旨在从遗传学的基本理论与方法入手,阐明与临床医学相关的众多重大的遗传学问题。与第一版相比,第二版作了以下变动:①在内容上,力求反映近年来的最新成果;②在结构上,应广大读者要求改为16开本;③在章目上,我们增加了“行为遗传学”、“发育遗传学”、“遗传咨询”等章节,同时对部分章节也进行了增删;④更新了60%左右的插图。

参加本书编写工作的除上海医科大学的老师外,还有遵义医学院的王大忠博士、曾令媛老师,镇江医学院的金洁老师。在此,对他们的辛勤工作谨表衷心感谢。

本书在第二版编写过程中,还得到许由恩教授、李采娟教授的指导与审阅,陈秀珍教授甘为人梯,从主编的位置退下来,担任了本版的主审,在此表示崇高的敬意。

医学遗传学仍处于方兴未艾的发展阶段,希望第二版的《医学遗传学》能为今后的第三版打下较好的基础,更欢迎读者赐教,以求进步。

左 伋 张克雄

1997年12月于上海

目 录

第一章 医学遗传学概论	1
第一节 医学遗传学的任务和范畴	1
第二节 遗传病概述	2
第二章 医学遗传学研究方法学	8
第一节 遗传病研究的策略	8
第二节 分子克隆、基因操作与突变基因检测	10
第三节 人类基因定位、基因作图及连锁分析	23
第三章 基因及其特性	38
第一节 基因的概念	38
第二节 基因的化学本质	39
第三节 人类基因组的一般特点	42
第四节 基因的生物学特性	44
第四章 基因突变	52
第一节 基因突变的一般特性	52
第二节 诱发基因突变的因素	53
第三节 基因突变的分子机制	55
第四节 DNA 损伤的修复	58
第五节 基因突变导致蛋白质功能改变	60
第六节 基因突变引起性状改变的机制	66
第五章 突变基因的遗传方式	71
第一节 系谱与系谱分析法	71
第二节 单基因遗传	71
第三节 两种单基因性状伴随遗传	81
第四节 孟德尔经典遗传方式的补充	82
第五节 多基因遗传	84
第六章 突变基因在群体中的行为	94

第一节 群体	94
第二节 Hardy-Weinberg 遗传平衡	96
第三节 一些因素对遗传平衡的影响	99
第四节 遗传负荷	104
第五节 基因突变率的计算	104
第七章 突变基因引起的疾病	107
第一节 分子病	107
第二节 先天性代谢缺陷	125
第八章 线粒体遗传及线粒体疾病	132
第一节 人类线粒体基因组	132
第二节 线粒体遗传系统的特点	134
第三节 人类线粒体疾病	136
第九章 人类染色体	142
第一节 人类染色体	142
第二节 染色体分组、核型与显带技术	144
第十章 染色体畸变	154
第一节 染色体畸变发生的原因	154
第二节 染色体数目异常及其产生机制	155
第三节 染色体结构畸变及其产生机制	158
第十一章 染色体畸变引起的主要疾病	161
第一节 染色体病发病概况	161
第二节 染色体病	165
第三节 染色体异常携带者	179
第十二章 肿瘤发生的遗传学问题	181
第一节 肿瘤发生的遗传现象	181
第二节 癌基因	183
第三节 肿瘤抑制基因	186
第四节 结肠癌的研究与肿瘤的多步骤发生	188
第十三章 与临床免疫有关的遗传学问题	190
第一节 红细胞抗原遗传与临床	190
第二节 白细胞抗原遗传与器官移植	192
第三节 HLA 和 ABO 血型与疾病的关联	194

第四节	原发性免疫缺陷症	196
第十四章	药物与遗传	197
第一节	药物代谢与遗传因素	197
第二节	毒物反应与遗传	207
第十五章	个体发生的遗传学	209
第一节	个体发生的分子遗传学研究	209
第二节	体外受精与胚胎移植	212
第三节	双生与多生及其发育遗传研究	212
第四节	先天畸形	214
第五节	致畸剂	215
第十六章	遗传咨询	217
第一节	遗传咨询的临床基础	217
第二节	遗传病的复发危险率	218
第三节	遗传病的群体筛查	220
第十七章	遗传病的诊断	222
第一节	遗传病诊断的主要内容	222
第二节	遗传病的产前诊断	225
第十八章	遗传病的治疗	233
第一节	遗传病治疗的原则问题	233
第二节	传统的遗传病治疗方法	234
第三节	转基因治疗	239
第十九章	行为与遗传	242
第一节	行为遗传学研究的对象	242
第二节	行为遗传学研究的方法	243
第三节	行为的遗传方式	244
第四节	行为的遗传	245
第二十章	遗传与优生	249
第一节	优生与优育	249
第二节	我国推行的优生措施	252
第三节	优生工作的发展情况	256
第四节	遗传咨询与优生	258
第五节	孕期保健与优生	258

第一章 医学遗传学概论

第一节 医学遗传学的任务和范畴

一、医学遗传学是研究人类疾病与遗传的关系,进而达到控制人类疾病之目的的一门学科

随着医学科学的发展,医学家们发现在实践中所遇到的一些问题(如某些疾病的病因、发病机制、病变过程、预防和诊治等)需要用遗传学的理论才能得以解决。例如为什么有高血压家族史的人更易患高血压病?第一胎生了一个有先天缺陷的婴儿,第二胎的再发危险性有多大,是否可以再生第二胎?先天愚型(一种由于染色体异常而引起的痴呆症)是如何发生的,它在新生儿中出现的机会为什么随母亲年龄的增大而增加?这类疾病能不能得到有效的根治?怎样才能预防这类疾病的发生而达到优生之目的?如此等等。随着人口的不断增加,不少国家都采取了控制人口的措施,使人们在少生的同时更渴望得到优生;另一方面,原先严重威胁人类的烈性传染病已基本得到控制,更使与遗传有关的一些疾病在临床医学中处于突出地位。这些都将会使医师们在临床工作中遇到越来越多的遗传学问题。因此在大力普及遗传学知识的同时,必须强调临床工作者学习遗传学理论和方法的重要性。

简单地讲,上述这些与人类遗传密切相关的疾病称为遗传病(genetic disease)。医学遗传学(medical genetics)是用人类遗传学(human genetics)的理论和方法来研究这些遗传病从亲代传至子代的特点和规律、起源和发生、病理机制、病变过程及其与临床关系(包括诊断、治疗和预防)的一门综合性学科。新近也有人将侧重于遗传病的预防、诊断和治疗等内容划归为临床遗传学(clinical genetics)的范畴,而医学遗传学则侧重于遗传病的基础研究。

前已述及,医学遗传学是以人类遗传学为基础的,它们都是以人为研究对象,这是它们的共同点。不同的是,人类遗传学主要从人种和人类发展史的角度来研究人的遗传性状,例如人体形态的测量以及人种的特征,同时广泛地研究形态结构、生理功能上的变异,例如毛发的颜色、耳的形状等。在临床上,这些变异并不干扰或破坏正常的生命活动,其临床意义不大。而医学遗传学往往是从医学角度来研究人类疾病与遗传的关系。因此,医学遗传学也可以说是一门由遗传病这一纽带把遗传学和医学结合起来的边缘学科。

二、医学遗传学也是一门由许多分支学科组成的综合性学科

构成人类遗传学的众多分支学科在用于遗传病研究时,也构成了医学遗传学的主要内容,主要有:

1. 生化遗传学(biochemical genetics) 这是一门研究遗传物质的理化性质、蛋白质的生物合成及其代谢调控、基因突变的机制以及由于基因突变所产生的代谢缺陷(即基因病)的学科。近年来,由于分子遗传学(molecular genetics)理论和技术的广泛应用,不仅使人们对人

类正常及病理性状的遗传本质有了进一步的认识,而且也为基因病的诊治打下了一定的基础。

2. 细胞遗传学(cytogenetics) 它把遗传学的研究和细胞学的研究结合了起来,从细胞学的角度,主要是从染色体的结构和行为来研究染色体病的遗传机制及其规律。随着物理化学技术的不断引用,细胞遗传学将对染色体的分子结构及其缺陷作出更多的探索,从而为降低群体中染色体病的发生率而服务。

3. 免疫遗传学(immunogenetics) 主要研究抗原、抗体、补体及干扰素等免疫活性物质的遗传控制,以及正常和异常免疫反应的遗传机制及遗传方式。它的研究为临床实践中的输血、器官移植和遗传性免疫缺陷症提供了理论基础。

4. 遗传流行病学(genetic epidemiology) 也称临床群体遗传学(clinical population genetics),它应用群体遗传学的方法,研究和分析遗传病在人类群体的分布规律及行为,辨析遗传因素和环境因素在疾病发生中的作用,为遗传病的群体监控和预防制定适当的对策和措施。

5. 体细胞遗传学(somatic cell genetics) 它是以人类体外培养的二倍体细胞为材料,研究DNA复制、基因突变、基因调控、肿瘤细胞形成机制等遗传学基本问题的一门学科。这一学科的研究,不仅在理论上具有重要意义,也为遗传病的诊断开辟了新途径。

6. 药物遗传学(pharmacogenetics) 也称药理遗传学,是遗传学和药物学结合而发展起来的边缘学科,主要研究遗传学因素对人体药物反应能力在个体间的影响。它对于临床工作中的合理用药,减少不良反应,达到有效的治疗目的起着十分重要的作用。近年来,这一学科还得到了进一步扩展,形成了以研究群体中不同基因型个体对各种环境因素的特殊反应及适应特点为主要内容的生态遗传学(ecogenetics)。

7. 辐射遗传学(radiation genetics) 研究电离辐射对人类遗传的效应及其规律,并就辐射对人类的遗传风险作出评估,从而建立有效的措施,保护人类免受辐射的损害。

8. 肿瘤遗传学(cancer genetics) 它着重研究肿瘤发生、发展的遗传学原理。近年来,由于癌基因和抗癌(或抑癌)基因的广泛而深入研究,使肿瘤的遗传学得到了迅速的发展,肿瘤这一危害人类的一大疾患可望得到有效的诊治和预防。

9. 行为遗传学(genetics of behavior) 研究遗传因素对人类行为影响的学科称为行为遗传学,它将逐步揭示人类行为的本质,充分发挥人类潜能,更好地为社会生活服务。

10. 优生学(eugenics 或 health birth) 它以医学遗传学为基础,研究并提出有效的社会措施,以降低人群中有害基因的频率,逐步消灭有害基因、保持和增加有利基因频率并创造条件促进优秀素质的充分发展,进而改善人类素质。

第二节 遗传病概述

一、任何疾病的发生都可视为遗传与环境共同作用的结果,但在不同的疾病中它们所起的作用不一

人类的一切正常或异常的性状综合起来看都是遗传与环境共同作用的结果,但它们在每一具体性状的表现上可能不尽相同,可归纳为:

1. 完全由遗传因素决定发病,看不出环境因素的作用 但是,这类疾病的发生并非与环境因素无关,只是看不出什么特定的环境因素是发病所必需的,例如单基因遗传病中的先

天性成骨不全症、白化病、血友病 A 以及一些染色体病等。

2. 基本上由遗传决定,但需要环境中一定诱因的作用 例如单基因遗传病中的苯丙酮尿症,在 30 年前人们只知道它与遗传有关,现在知道吃了含苯丙氨酸量多的食物才诱发本病;蚕豆病除有遗传基础外,吃了蚕豆以后才诱发溶血性贫血。

3. 遗传因素和环境因素对发病都有作用,在不同的疾病中,其遗传度各不相同 也就是说,遗传因素对发病作用的大小是不同的。例如在唇裂、腭裂、先天性幽门狭窄等畸形中,遗传度都在 70% 以上,说明遗传因素对这些疾病的发生较为重要,当然环境因素也是不可缺少的。精神发育障碍、精神分裂症等疾病也是如此。另一些病,例如在先天性心脏病、十二指肠溃疡、某些糖尿病等的发生中,环境因素的作用比较重要,而遗传因素的作用较小,遗传度不足 40%,但是就其发病来说,也必须有这个遗传基础。还有一些病例如脊柱裂、无脑儿、高血压病、冠心病等的发病,遗传因素和环境因素都相当重要,遗传度约 50% ~ 60% 左右。

上述这类疾病过去在临床上常常说有一定的遗传因素(体质或素质),近年来的研究表明,它们所具有的就是多基因的遗传基础,这一类疾病是目前医学科学研究的重点之一。

4. 发病完全取决于环境因素,与遗传基本上无关 例如烧伤、外伤等的发生与遗传因素无关。

二、遗传病以遗传物质的突变为发病基础,具有先天性、家族性等特点

1. 遗传病的概念 遗传病或遗传性疾病是指其发生需要有一定的遗传基础,通过这种遗传基础,按一定的方式传于后代的疾病。应该说明,由亲代传递到后代的是遗传性疾病的遗传信息,后代按照这种遗传信息发育形成遗传疾病。因此,传递的并非现成的疾病,只是某种疾病的发病基础。

遗传性疾病除了上面讲过的遗传物质基础外,在临床上尚有下列特点:①患者在亲祖代和子孙中是以一定数量比例出现的(即患者与正常成员间有一定的数量关系);②该病不延伸至无血缘关系的个体,就是说,如果某些疾病是由于环境因素致病,在一代中应该按“水平方式”出现,如果是遗传性的,一般则以“垂直方式”出现,这在显性遗传方式的病例中特别突出;③如果是遗传性疾病,单卵双生比异卵双生同时患病的机会大得多。

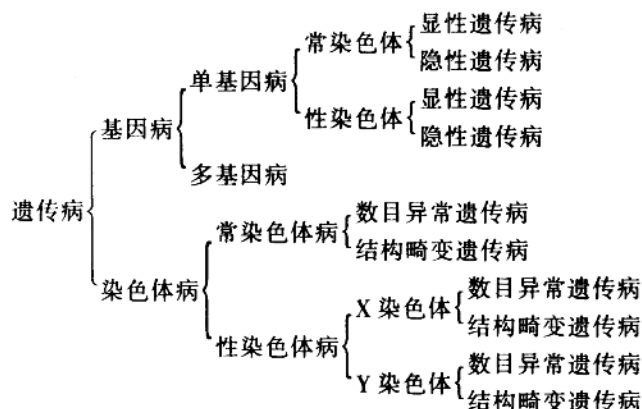
2. 遗传病的特点 遗传病往往有先天性、家族性等特点。所谓先天性是指生来就有的,如白化病是一种常染色体隐性遗传病(详见后),婴儿刚出生时就表现有“白化”症状。但不是所有的遗传病都是先天性的,如 Huntington 舞蹈病是一种典型的常染色体显性遗传病,但它往往在 35 岁以后才发病。反过来,先天性疾病也有两种可能性,即有些先天性疾病是遗传性的,如白化病;有些则是获得性的,如妇女妊娠时因风疹病毒感染,致胎儿患有先天性心脏病,出生时虽然具有心脏病,但这不是遗传的。家族性是指疾病的发生所具有的家族聚集性。遗传病常常表现为家族性,如上述的 Huntington 舞蹈病常表现为亲代与子代间代代相传;但不是所有的遗传病都表现为家族性,如白化病在家系中很可能仅仅是偶发的,患儿父母亲均为正常。反过来,家族性疾病可能是遗传的,如 Huntington 舞蹈病;但不是所有的家族性疾病都是遗传性的。如有一种夜盲症(即当光线比较弱时,视力极度降低的一种疾病)是由于饮食中长期缺乏维生素 A 所引起的。如同一个家庭饮食中长期缺乏这种物质,则这个家庭中的若干成员就有可能出现夜盲症。这一类家族性疾病是由共同环境条件的影响,而不是出自遗传原因,如果在饮食中补充足够的维生素 A 后,全家病员的病情都可以得

到改善。所以说,由于维生素缺乏所引起的夜盲症,尽管表现有家族性,但它不是遗传病。

总之,对于医学工作者来说,掌握一定的医学遗传学知识,将有助于在工作中对遗传病的正确认识,以便采取相应的诊断、治疗和预防措施。

三、人类遗传病按照遗传物质的突变方式及传递规律进行分类

人类遗传病的种类繁多,据统计,目前每年新发现的遗传性综合征有 100 种左右;面对种类如此众多的遗传病,科学家们做了以下分类:



本书是以此分类进行描述的,但在临床上,人类遗传病多按人体系统分类。

1. 单基因病 单基因病是由单基因突变所致。这种突变可发生于两条染色体中的一条,由此所引起的疾病呈常染色体(或性染色体)显性遗传;这种突变也可同时存在于两条染色体上,由此所引起的疾病呈常染色体(或性染色体)隐性遗传。这类单基因病较少见,发生率较高时也仅为 1/500,但由于其遗传性,因而危害很大。除了细胞核基因的突变外,细胞质中的线粒体 DNA 突变也会导致疾病的发生,如 Leber 视神经病,但应该认为这类疾病是一种特殊类型的单基因病。

2. 多基因病 多基因病包括那些有一定家族史但没有单基因性状遗传中所见到的系谱特征的一类疾病,如先天性畸形及若干人类常见病(高血压、糖尿病、哮喘、癫痫、精神分裂症、智能发育障碍等等)。环境因素在这类疾病的发生中起不同程度的作用。

3. 染色体病 染色体病是指染色体结构或数目异常引起的一类疾病。从本质上说,这类疾病涉及一个或多个基因结构或数量的变化,因此其对个体的危害往往大于单基因病和多基因病,其中最常见的染色体异常为 21 三体,即 Down 综合征。

表 1-1 列举了一些遗传病及其遗传方式和发生率。

四、遗传病在医学实践中的一些问题

1. 医生如何确定患者所患疾病是否有遗传性 遗传病患者(与非遗传病患者一样)在向医师主诉自己的病症时只能说明其某些感觉上异常,而不能告诉医生其什么基因有什么异常,因此,需要医师正确地区分患者所患疾病是不是一种遗传病。这并不是一个简单的问题,它不仅需要医师具有丰富的临床经验、全面的遗传学知识,还需要足够的实验室技术来辅助诊断;近年来,计算机软件被开发用于遗传病的诊断,为医师确定患者所患疾病是否具有遗传性提供了有力的手段,从而使遗传病患者及亲属能得到有效的医学处理。

表 1-1 常见遗传病的遗传方式及发生率

疾 病	遗传方式	发 生 率
单基因遗传病		
腺苷脱氨酶缺乏症	AR	少见
α_1 -抗胰蛋白酶缺乏症	AR	1/3 000 ~ 1/20 000
囊性纤维变性	AR	1/2 000; 亚洲人极罕见
Duchenne 肌营养不良症	XR	1/3 000 ~ 1/3 500
家族性高胆固醇血症	AD	1/500
脆性 X 综合征	XL	男性: 1/500; 女性: 1/2 000 ~ 1/3 000
葡萄糖-6-磷酸酶缺乏症	XR	男性: 1/4 ~ 1/20
血友病 A	XR	男性: 1/10 000
Huntington 舞蹈病	AD	4 ~ 8/100 000
强直性肌营养不良症	AD	1/10 000
神经纤维瘤 I 型	AD	1/3 000 ~ 1/5 000
成骨不全	AD	1/15 000
苯丙酮尿症	AR	1/5 000
视网膜母细胞瘤	AD	1/14 000
镰状细胞贫血	AR	部分种族: 1/400
珠蛋白生成障碍性贫血	AR	常见
Wilms 瘤	AD	1/10 000
Tay-Sachs 病	AR	1/3 000
染色体疾病		
Down 综合征	47, + 21	1/800
18 三体综合征	47, + 18	1/8 000
13 三体综合征	47, + 13	1/25 000
Klinefelter 综合征	47, XXY	男性: 1/1 000
Turner 综合征	45, X	女性: 1/5 000
XXX 综合征	47, XXX	女性: 1/1 000
XYY 综合征	47, XYY	男性: 1/1 000
Prader-Willi 综合征		1/10 000 ~ 1/25 000
多基因遗传病		
唇裂	不明	1/250 ~ 1/600
先天性心脏病	不明	1/125 ~ 1/250
神经管缺陷	不明	1/100 ~ 1/500
糖尿病	不定	成人: 1/10 ~ 1/20
冠状动脉粥样硬化性心脏病	不定	特定人群: 1/15
肿瘤	不定	总: 1/3
线粒体疾病		
Leber 视神经病	细胞质遗传	罕见

注: AR 为常染色体隐性遗传; AD 为常染色体显性遗传; XL 为 X 连锁遗传; XR 为 X 连锁隐性遗传

2. 再发风险率 再发风险率(recurrence risk)是遗传病在临床医学中常遇到的问题之一。所谓再发风险率,是指病人所患的遗传性疾病在家系亲属中再发生的风险率。然而影响再发风险率的因素较多,因此人们很难对遗传病的再发风险率制订出一个标准。例如:一方面,Huntington 病是一种常染色体显性遗传病,按理论推测,患者子女的再发风险率为

50%,但本病的发病年龄多在35岁以后,因此,随着子女年龄的增长,再发风险率也逐渐下降,通过建立年龄与再发风险率的发病曲线,可以得到不同年龄个体的再发风险率。另一方面,任何一种遗传病都有一个群体风险率的基线(baseline),即任何一次妊娠所生子女其群体风险率有些是根据疾病的遗传方式决定的,有些是基于经验概率得到的(表1-2)。

表1-2 群体中某些疾病发生的风险率

疾 病	风 险 率
出生时即表现出先天性异常	1:30
严重的身体或智能残疾	1:50
自发流产	1:8
死胎	1:125
围生期死亡	1:150
出生后一周到周岁以内死亡	1:200
夫妇不育	1:6 ~ 10

3. 遗传性疾病的群体负荷 这里所说的负荷是指遗传病在群体中的严重程度,通常用发生率来表示,发生率越高,群体中的遗传有害性越高,人类需要的对应措施越多,也可以说是负荷也越大。表1-3所列是几类遗传病的群体发生率。

表1-3 遗传性疾病的群体发生率

疾 病	发 生 率 (%)
单基因缺陷	
常染色体显性遗传病	0.14
常染色体隐性遗传病	0.17
X连锁遗传病	0.05
小 计	0.36
染色体缺陷	0.19
多基因遗传病	
先天性疾病	2.3
其他疾病	2.4
小 计	4.7
尚未归类的遗传病	0.12
总 计	5.37

4. 遗传病与医学伦理 医学伦理学的基本原理同样适用于医学遗传学中。但遗传病有其自身的特征,即遗传性,因此,一些问题需要特别牢记。

第一,遗传性疾病的产前诊断问题。这包括:①产前诊断技术上的安全性;②产前诊断实施后对患病胎儿的医学措施的“合法性”、“合理性”、“可靠性”、“安全性”等等。

第二,遗传病的症状前诊断问题。这涉及:①是否有有效的医学措施使症状前患者免受“未来”疾病的困扰;②个人隐私问题。

第三,基因诊断及基因治疗问题。这包括:①基因诊断、基因治疗在技术上的安全性问题;②诊断及治疗措施的“合法性”、“合理性”等问题;③基因治疗措施对人类基因组的安全控制问题等等。

宗教、伦理、道德也都是遗传病临床实践中需要重视的问题。

(左 俊)

第二章 医学遗传学研究方法学

相对来说,遗传学是一门年轻的学科,与医学相结合的医学遗传学研究也只是从本世纪初才开展得较多。Galton 在黑尿病患者的尿中分离出黑尿酸,提出了先天性代谢缺陷的概念。Pauling(1949 年)对镰状细胞贫血患者血红蛋白进行电泳分析后,推论这是分子结构异常所致,Ingram(1956 年)的工作证实了镰状细胞贫血患者血红蛋白分子中,一条 β 链 N 端第 6 位氨基酸由各氨酸变为谷氨酸,就会导致上述电泳行为的异常。这一时期围绕“一个基因一种酶学说”进行了很多关于酶缺陷而引起代谢病的生化遗传学研究。体外细胞培养技术的建立使研究工作者在体外对遗传病体细胞和健康人细胞进行培养研究,并产生了体细胞遗传学。分子遗传学是在 Watson 和 Crick DNA 双螺旋模型的提出、限制性内切酶的发现等基础上形成的。通过对人的基因或 DNA 直接分析的研究开创了医学遗传学的新纪元,大大推动了对遗传病的病理、诊断、治疗和预防的科学研究与实践。本章以医学遗传学的定义或目标为核心,重点介绍了现代遗传学的研究方法。

第一节 遗传病研究的策略

一、遗传病研究的策略

医学遗传学以遗传病为研究对象,那么对遗传病研究的策略也就要围绕遗传病的病理、诊断、治疗和预防等内容来进行。对临床上已经发现并明确的遗传病,首先要进行遗传规律的研究,是常染色体遗传或性染色体遗传,显性遗传或隐性遗传,单基因遗传还是多基因遗传。然后就要寻找此遗传病是否有可检测到的生化指标或蛋白质异常,或者这个遗传病总是和某一性状共分离(cosegregation)等以决定对致病基因进行定位和克隆的策略,因为只有真正从基因组中彻底分离出致病基因,才能从根本上研究遗传病的病理基础。随着人类基因组(human genome)研究的日新月异,多态遗传标记的覆盖已经越来越密集,已发现有 2 万余个短串重复序列(short tandem repeat, STR),即平均 100 ~ 200kb 就有一个 STR 位点,这就大大方便了遗传病致病基因定位克隆(position cloning)的进行。

目前临床上一个复杂的问题就是遗传异质性(genetic heterogeneity)的存在。即临床表型或症状表现相似或相同,却由不同基因缺陷引起的,而且往往加上发病年龄的差异、临床进行性发展的程度和累及范围会使问题更加复杂化。如常染色体显性遗传的脊髓小脑共济失调(ADSCAs)已经定性了 5 个不同的遗传亚型,分别由不同基因引起,但临床上具有难以鉴别的相似症状。这种症状重叠的情况还可发生在完全不同的遗传病之间,例如神经肌肉系统的很多遗传病就存在这种情况,因为大多数都有肌肉与神经系统表现上的症状,这样在作遗传规律研究及基因定位克隆时要仔细鉴别,特别是要尽量收集一个大家系的所有成员

和所有患者进行研究,因为这个大家系的患者都是同一个基因座位的突变,并且来自于一个共同的祖先。由于分离基因或克隆基因是在正常健康人的基因组中进行的,所以在用人类基因作图(human gene mapping)的方法(第三节)和分子克隆技术克隆到目的基因后,一方面要研究正常基因的 DNA 序列及可能编码的功能蛋白,另一方面是检测在病人中这个基因是不是突变的,正常人群中此基因是否正常,如果正常,那么就可以更肯定克隆基因的正确性。在分离到正常目的基因及得到核苷酸序列后,往往不了解它的功能,这个时候可以将基因的序列[往往是 cDNA(见第二章第三节)序列]或可能的编码蛋白质的序列与基因库中已发现并定性的基因或蛋白质进行同源性比较,因为功能类似的基因或蛋白质在序列上存在同源性。也可以与原核生物、真核生物的酵母、线虫、小鼠等已定性的基因或蛋白质进行同源性比较,以推测克隆出的目的基因的可能功能。此外,也要进行人群中此遗传病基因座位上突变基因异常结构的调查与研究,这对了解这种遗传病的病理机制很重要,另外可以将调查的结果直接应用于基因诊断的实践。

在人类基因组计划的基因克隆过程中,有时会分离到一个新的基因,而不了解它的功能和它所对应的遗传病,特别是在 cDNA 快速克隆技术中。cDNA 快速克隆技术首先是建立组织特异性表达的 cDNA 文库,然后再进行基因的分离。如可以建立大脑组织特异的 cDNA 文库、肌肉组织特异的 cDNA 文库等。在用此方法分离到一个表达基因但尚不知其功能和相对应遗传缺陷和遗传病时,可以用同源重组(homogeneous recombination)的方法剔除(knock-out)小鼠中的对应基因,做成转基因小鼠(transgenic mice),然后观察其会出现什么性状异常或生理变化,借此推理正常基因的功能和其改变时对应的遗传病。

在一开始对基因定位的实践中往往是先知道某个蛋白质或酶,然后主要用杂种体细胞的方法进行定位,并从基因组中分离此基因。但许多遗传病检测不到或很难发现其异常的蛋白,给基因克隆工作带来很大困难。利用人类基因组限制性片段长度多态性(RFLPs)的遗传多态作家系的连锁分析,对 Huntington 舞蹈病进行了基因定位并分离克隆了此基因,这是第一次直接从基因组入手定位克隆基因获得成功,使研究人员充满信心,在此之后作了大量人基因水平或染色体上 DNA 遗传多态标记的研究,并对一系列遗传病基因的克隆取得了成功。像这种直接从 DNA 开始再到蛋白质的研究过程被称为反向遗传学(reverse genetics)

二、遗传病基因克隆的目的

所克隆的基因除了用于研究此遗传病的病理机制及研究医学的基础科学外,另外就是要将其应用于对遗传病的诊断和预防。在实践中经常碰到这样的问题:如临床上仅靠常规诊断不能确诊的疾病;有某种晚发的遗传病家族史的个体进行是否会发病的诊断,即症状前诊断,以便在发病以前采取一定的医疗措施;另外还有比较常见的遗传咨询工作中对有遗传病家族史的家庭中可能要作的妊娠妇女的产前诊断,特别是常染色体显性遗传病,就要检查胎儿是否携带了突变基因,因为只要有一个突变的等位基因往往就会发病。在作基因诊断前,往往先要调查整个人群中此基因突变的结构主要有哪些类型,因为某些遗传病在某个特定人群中可能有主要的突变型,甚至几乎全为一种突变型或少量的几种突变型,这样可以采用针对性的诊断方法,既可以简化诊断的过程又可以得到相当准确的诊断,特别是对一些基因比较大的情况,尤其如此。对这些巨大基因的诊断还要考虑采取与其紧密连锁的 DNA 多态标记,这样在家系中用连锁分析的方法直接检测结构简单的遗传标记就可以达到诊断目的。在遗传病基因定位克隆过程中,在将致病基因缩小到很小范围内还未完全克隆时,其两

侧的遗传标记往往已被应用于症状前诊断及产前诊断。

三、对遗传病最重要的一点就是要做好预防工作,以防为主

目前世界各国大多建立了区域性的遗传医学中心或医学中心从事这方面的工作。因为遗传病患儿的出生,不仅对家庭、社会甚至整个国家的人口素质都带来相当大的负荷,而且对已出生的遗传病患儿的的治疗又十分困难。目前虽然已取得了像 ADA 缺陷基因治疗等一些可喜进展,但现在看来基因治疗的适应证还比较窄,而且还有很多技术问题有待进一步解决。此外,在对遗传病患者进行基因治疗的举措上,仍有相当大的意见分歧,这是有些学者从基因治疗可能给人类或生物界带来的负面影响来考虑的。

第二节 分子克隆、基因操作与突变基因检测

现代医学与人类遗传学的一个主要目的就是研究分子水平或基因水平的变化与遗传病发生的关系,进而应用于对遗传病的诊断与治疗。从 20 世纪 70 年代中期以来,由于分子克隆与基因技术和方法的建立与发展,给生命科学领域的研究带来了革命性变化,从整体组织、细胞水平深入到分子水平,并且将整体组织、细胞水平的病理变化与分子水平的变异联系起来。在遗传病的研究方面,可以在实验室从人类基因组中分离基因,进行人类基因或 DNA 分子的体外操作与克隆致病基因,并对遗传病患者及尚未发病者进行基因诊断。到本世纪末,人类对遗传病的基因治疗方面也将取得更大的进展。

一、分离一段感兴趣的 DNA 序列是分子克隆的核心步骤

分子克隆的核心步骤就是分离一段感兴趣的 DNA 序列,并使其能在另一种生命体中大量复制与拷贝,这种生命体一般为能快速持续生长的细菌,这样就可以得到大量纯净的目的

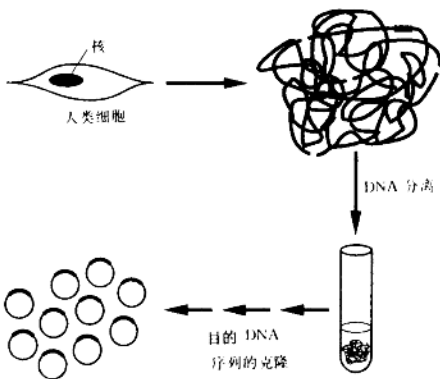


图 2-1 分子克隆的基本原理

DNA 分子以用于对它的详尽分析与研究(图 2-1)。产生特定 DNA 序列的无穷拷贝(克隆)是重组 DNA 技术(recombinant DNA technology)及其在人类与医学遗传学应用的基础。重组 DNA,顾名思义就是将人类或其他生命体的目的 DNA 与细菌或其他生命体的能在实验室进行无限复制的 DNA 分子进行连接与组合后产生的新的 DNA 分子。

1. 限制性内切酶 对分子克隆技术的一个主要贡献就是在本世纪 70 年代初发现的由细菌产生的限制性内切酶(restriction endonuclease),它可以识别 DNA 双

链的特定序列并在识别位点或其附近将 DNA 切断。例如,限制性内切酶 EcoR I 可以识别 6 个碱基对的特定序列

5'GAATTC3'

3'CTTAAG5'

限制性内切酶 EcoR I 与 DNA 双链分子相互作用,在此识别序列的 G 与相邻 A 之间产生

个切口,这样 DNA 双链发生断裂并形成 一个粘性末端(图 2-2)。这种粘性末端在下一步的 DNA 重组中是很有用的。现已发现了几百种限制性内切酶,每个酶对应特定的识别序列,表 2-1 列出了常用的几个工具酶。限制性内切酶的识别序列大多为 4~6 个碱基对,有些为比较长的序列。而且识别序列多数为回文对称 (palindromes)的,即两条链从 5'到 3'有相同的序列。

用限制性内切酶切割 DNA 分子可产生特征性的 DNA 片段,这在重组 DNA 技术中主要有两个方面的应用。第一,可以研究生命体基因组的结构组成。例如,一个基因组 DNA 样品经 EcoR I 酶切后产生众多的 DNA 片段,大小从几个碱基对到一百万个碱基对,按理论推测,如果 DNA 序列是随机分布的话,对于 6 个碱基对识别序列在基因组中应是每隔 4 600 碱基对(约 4kb)就会有一个识别序列,但识别序列在基因组中实际上并不是

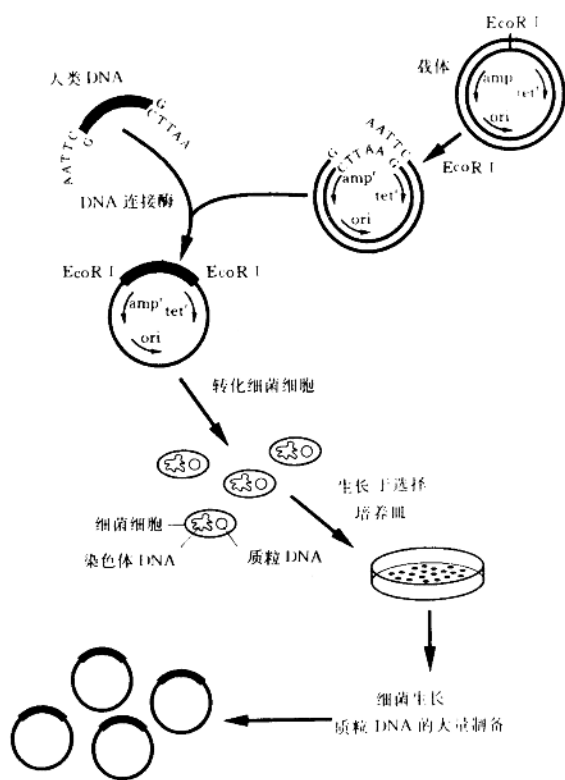


图 2-2 将一段人类 DNA 片段克隆入质粒载体的过程

应 是 每 隔 4 600 碱 基 对 (约 4kb) 就 会 有 一 个 识 别 序 列 , 但 识 别 序 列 在 基 因 组 中 实 际 上 并 不 是

表 2-1 一些限制性内切酶及其识别序列

限制性内切酶	来 源	识 别 序 列
BamH I	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> H	5' - G [*] GATC C - 3' 3' - C CTAG [*] G - 5'
EcoR I	<i>Escherichia coli</i> RY13	5' - G [*] AATT C - 3' 3' - C TTAA [*] G - 5'
Hae III	<i>Haemophilus aegyptius</i>	5' - GG [*] CC - 3' 3' - CC [*] GG - 5'
Hind III	<i>Haemophilus influenzae</i> R ₄	5' - A [*] AGCT T - 3' 3' - T TCGA [*] A - 5'
Not I	<i>Nocardia otitidis-cavarium</i>	5' - GC [*] GGCC GC - 3' 3' - CG CCGG [*] CG - 5'
Sau3A	<i>Staphylococcus aureus</i> 3A	5' - [*] GATC - 3' 3' - CTAG [*] - 5'
Sst II	<i>Streptomyces starford</i>	5' - CC GC [*] GG - 3' 3' - GG [*] CG CC - 5'

注: “*”表示限制性内切酶的切割位点

随机分布的。通过这种方法可以了解基因组中不同域的特定碱基构成或 DNA 序列的情况。在遗传病基因突变的研究中也应用了这种方法,例如,正常基因中有某一个限制性内切酶的识别序列,用此酶酶解时会产生特定的 DNA 片段,但当基因点突变发生在此酶的识别序列上时,此限制酶便不能切割 DNA 而得不到特征性的 DNA 分子。据此,可进行遗传病基因突变的检出、遗传病的基因诊断。第二,用 EcoR I 酶酶解后的所有 DNA 分子均有相同的单链性末端,这样经过 EcoR I 消化的任意两个 DNA 分子均可以通过粘性末端互补的 4 个碱基,在 DNA 连接酶(DNA ligase)的作用下连接为一个完整的重组 DNA 分子,这两个 DNA 分子可以是不同来源的。许多限制性内切酶产生的为粘性末端,有些酶在 DNA 两条链的相同位置产生切割,这样会得到一个平末端,DNA 连接酶同样可以连接这些分子。

以下介绍一些分子克隆(molecular cloning)的常用术语:

(1) cDNA(complementary DNA):在逆转录酶(reverse transcriptase)作用下,以信使 RNA(messenger RNA, mRNA)为模板而合成的互补 DNA。常用的为单链拷贝或它的双链衍生物。常用在“一个 cDNA 克隆”、“一个 cDNA 文库”或“分离一个 cDNA”语句中。

(2) 克隆(clone):含有目的基因或 DNA 序列的一个重组 DNA 分子。用作动词时表示产生这样的分子。常用作“分离一个克隆”或“克隆一个基因”。

(3) 宿主(host):分离与繁殖一个重组 DNA 分子的生命体。如大肠杆菌 *Escherichia coli*, 酵母 *Saccharomyces cerevisiae*, 常用在“所用宿主是什么?”的语句中。

(4) 杂交(hybridization):两个互补的核苷酸单链配对结合形成一个双链分子。常用于“探针与基因杂交”。

(5) 插入(insert):一个人类 DNA 片段重组进一个特定载体。常用作动词。

(6) 文库(library):含有目的基因、cDNA 或 DNA 片段的一群重组 DNA 克隆。原则上,一个文库包含特定细胞、组织或染色体的所有 DNA 序列。常用于“一个肌肉组织的 cDNA 文库”或“一个人类基因组文库”。

(7) 连接(ligation):两个双链 DNA 分子在 DNA 连接酶(DNA ligase)作用下形成完整的磷酸二酯键。连接是产生重组 DNA 分子的基本步骤。用法如“DNA 片段被连接”。

(8) 探针(probe):一个克隆的 DNA 或 RNA 分子,用放射性同位素或其他可检测的物质进行标记,以进行分子杂交。“probe”一词也被用作动词,作“探测”讲。用法如“ β -珠蛋白探针”或“探测一个病人的 DNA”。

(9) 限制性内切酶(restriction endonucleases 或 restriction enzymes):能识别特定的 DNA 双链序列并能在识别序列或其附近处切割此 DNA 的酶。用法如“限制性内切酶消化”或“限制性内切酶 EcoR I”。

(10) Southern 印迹(Southern blot):DNA 被限制性内切酶消化,电泳分离后被转移到一张膜上的方法。首先是由 Southern 发展起来的技术,因而得名。产生这张膜并与特定探针杂交的整个过程亦被称为“Southern blot”。举例如“用 Southern 印迹转移 DNA”、“作 Southern 杂交”。

(11) 载体(vector):已克隆入目的基因或其他 DNA 片段的 DNA 分子,它可以在特定宿主中进行复制。如质粒(plasmid)、 λ 噬菌体(bacteriophage lambda)、柯氏质粒(cosmid)及酵母人工染色体(yeast artificial chromosome, YAC)。举例如“柯氏质粒载体”。

2. 载体 一个载体(vector)就是能在宿主细菌或酵母细胞中自我复制的 DNA 分子,并