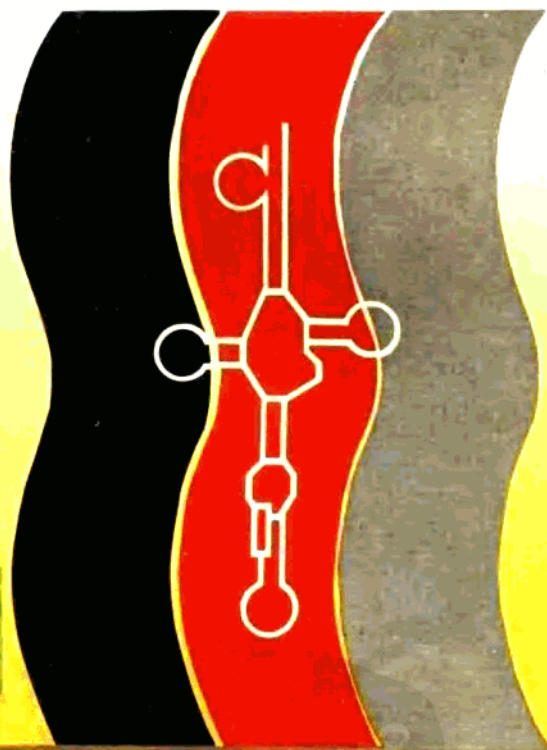


# 基因治疗学与基因诊断学

## —— 临床分子生物学ABC

卢侃 主编



东南大学出版社

主 编 卢 侃

副主编 陈亚利 卢 力 王卫萍 周晓明

编 者

薛京伦 卢大儒

复旦大学

范必勤 江金益

江苏农科院

高翼之

南京铁道医学院

徐贤秀

南京大学

姚 堃

南京医科大学

刘全海

上海医药工业研究院

A. E. PEGG

美国宾州大学

卢 力

美国约翰霍甫金斯大学

李小苏

美国马里兰大学

范丽安

上海免疫研究所

G. Inesi

美国马里兰大学

周晓明

江苏肿瘤医院

祝光九 吉 农 陈亚利

南京军区南京总医院

祁晓平 王卫萍 赵 权

张景红 李晓军 卢 侃

编排校

陈根达 刘启成 周士彦

南京军区南京总医院

石 东 陆雪勤 邹忠强

# 前 言

12年前我院已开始与地方单位合作,从人胚与胎盘提取脱氧核糖核酸制成静脉注射剂对21三体取得一定的成效。论文发表后,引起国际科技界的重视并被《化学文摘》(CA)收录。但当时还没有达到今天的基因治疗学水平。近年来,许多医技人员在极为困难的手工操作条件下完成了大量基因诊断的技术探索,并应用于临床,目前全院已有六个PCR项目取得成果。

临床分子学的强大生命力在于它的临床应用。PCR诊断技术具有又快又准确的效果,基因治疗肿瘤(如黑色素瘤)、遗传病(如ADA-腺嘌呤核苷去氨酶缺乏、凝血第八因子缺乏等)取得意外的成功,且几乎没有副作用。这些成果引起广大医学科技工作者极大的兴趣。他们急切盼望系统学习临床分子生物学的有关知识和技术。

我们意识到,今天已是临床分子生物学以基因诊断学与基因治疗学为内容的科学茁壮生长的时代,及时引进、学习临床分子生物学的理论知识和技术经验,必将取得积极的临床成果。因此,决定为全院中青年科技干部举办一期“临床分子生物学—基因诊断与基因治疗学习班”。黎磊石副院长亲自设计这个学习班的教学大纲。

高翼之教授撰写了PCR与基因治疗学在临床科的应用;徐贤秀教授撰写了DNA杂交和转基因动物与基因疗法,并编写了实验内容;范丽安主任撰写了MHC;姚堃教授撰写了细胞因子;我院卢侃同志撰写了概论与基础知识、临床分子生物学在病理生理学中的应用,并为各章编写了习题和复习题,还负责定稿,在此对他们的辛勤劳动表示由衷的谢意!

在学习班讲稿的基础上进行了修订,现在终于以一本书的形式与读者见面了。

本书简明扼要地介绍了临床分子生物学在国际和我国发展的现状,内容反映了该学科领域的最新水平,为临床工作者提供了入门捷径。相信本书也同样适合我国广大医技工作者的需要。我们愿为医学技术革命鸣锣开道,谨以此书抛砖引玉。由于时间比较匆促,难免有不完善或不当之处,尚祈同行专家和广大读者不吝赐教!

编者

于南京军区南京总医院

1992.12.17

# 目 录

1 临床分子生物学概论 .....	(1)
1.1 临床分子生物学定义 .....	(1)
1.2 临床分子生物学的发展简史 .....	(4)
1.3 Why me 问题 .....	(6)
1.4 为什么要学习第三阶段医学(M3) .....	(7)
1.5 医院面临进入 M3 时代 .....	(10)
习题 .....	(10)
2 临床分子生物学基础知识 .....	(11)
2.1 概述 .....	(11)
2.2 分子 .....	(12)
2.3 染色体 .....	(21)
2.4 基因 .....	(24)
2.5 核糖核酸(RNA) .....	(26)
2.6 病毒超分子 .....	(27)
2.7 蛋白质分子不是中心法则的终端 .....	(35)
3 核酸分子杂交 .....	(45)
3.1 概述 .....	(45)
3.2 探针的制备 .....	(45)
3.3 核酸分子杂交过程 .....	(46)
3.4 核酸分子杂交的应用 .....	(47)
习题 .....	(49)
4 聚合酶链反应 .....	(52)
4.1 PCR 发明的历史背景 .....	(52)
4.2 PCR 的基本方法 .....	(53)
4.3 PCR 技术应用的进展 .....	(54)
4.4 PCR 典型操作配方 .....	(64)
4.5 非典型 PCR 方案——基因表达检出 .....	(65)
4.6 PCR 的一些实际问题 .....	(67)
4.7 PCR 自动化 .....	(69)
习题 .....	(71)
附录:聚合酶链反应 P600 系统 .....	(72)

<b>5 转基因生物与基因治疗学的基本框架</b> .....	(81)
5.1 基本框架.....	(81)
5.2 基因转移技术的大致过程.....	(83)
5.3 动物细胞培养是基因治疗第一步.....	(89)
5.4 寡核苷酸的化学合成与反义技术.....	(95)
5.5 基因治疗学中的逆转录病毒.....	(102)
<b>6 管家基因是基因治疗学的主要目标基因</b> .....	(113)
6.1 管家基因.....	(113)
6.2 癌基因.....	(119)
6.3 抑癌基因.....	(122)
6.4 管家基因“生物物理行为”对基因治疗学的启示:染色体巡查技术.....	(131)
<b>7 基因操作</b> .....	(154)
7.1 常用基本方法.....	(154)
7.2 噬菌体 DNA 制备和分析.....	(159)
7.3 质粒 DNA 制备和分析.....	(164)
7.4 动物线粒体 DNA 制备.....	(169)
7.5 定点突变.....	(170)
7.6 RNA 提取和分析.....	(171)
7.7 基因表达蛋白的分析.....	(174)
7.8 多聚酶链式反应.....	(177)
7.9 附    录.....	(177)
<b>8 基因治疗研究的技术路线</b> .....	(180)
8.1 概述.....	(180)
8.2 基因转移方法.....	(180)
8.3 临床方案.....	(190)
<b>9 细胞因子及其有关基因</b> .....	(196)
9.1 细胞因子的研究概况.....	(196)
9.2 重要的细胞因子.....	(199)
9.3 CK 基因及 CK 受体基因.....	(202)
9.4 抗细胞因子抗体的研究.....	(204)
<b>10 分子生物学在肾脏病学中的应用</b> .....	(211)
10.1 肾脏病的免疫遗传学研究.....	(211)
10.2 细胞因子与肾小球细胞和基质.....	(214)
10.3 肾小球疾病的分子生物学研究.....	(218)

10.4	肾小管间质损害的分子生物学研究	(221)
10.5	肾功能衰竭与透析、肾移植	(225)
<b>11</b>	<b>临床放射分子生物学</b>	(228)
11.1	癌基因表达与放射敏感性	(228)
11.2	分子生物学技术在放射治疗中的应用	(230)
11.3	乏氧细胞增敏剂与放射治疗	(232)
11.4	DNA 辐射损伤的修复与放射防护剂	(234)
11.5	临床放射生物学数学模型	(236)
<b>12</b>	<b>胚胎工程</b>	(240)
12.1	胚胎体外操作的发展简史	(240)
12.2	体外受精和胚胎移植技术	(241)
12.3	显微授精技术	(249)
12.4	显微授精所需仪器和设备	(257)
12.5	转基因动物技术	(259)
<b>13</b>	<b>基因治疗学的基本信息库</b>	(274)
13.1	概 述	(274)
13.2	Ig 基因及 CDn 基因	(275)
13.3	Ig 超族及其基因与进化	(289)
13.4	MHC 分子及其基因	(296)
13.5	Ig 超族的基因治疗学	(302)
13.6	附件——组织相容性抗原(1991 年命名)	(308)
<b>14</b>	<b>发展临床分子生物学的战略与研究工作的短线热点</b>	(318)
14.1	中国发展临床分子生物学的思考	(318)
14.2	研究工作的短线热点	(320)
<b>15</b>	<b>基因诊断学与基因治疗学中的瓶颈问题</b>	(325)
15.1	人基因组科学	(325)
15.2	基因治疗的一般策略	(326)
15.3	恶性肿瘤基因治疗靶基因的选择	(327)
15.4	小结与展望	(328)

# 1

## 临床分子生物学概论

### 1.1 临床分子生物学定义

临床医学是面对患者的那一部分医学。与它并存于医学这一概念中的,尚有其它如基础医学、预防医学、康复医学等学科。医学是生物学的一部分,因为医学是专门针对几亿种生物的一种—人类,即研究人类生老病死的一门科学。

临床分子生物学是分子生物学面对患者的那一部分。

分子生物学是用分子的观点,用数理化学中研究分子的理论、技术与方法,立足于分子的行为而构造的数学模型等技巧,去研究生命现象的一门科学。

请注意!生物学本身是由生物数学、生物物理、生物化学三个元素组成的集合。因此,不存在根本不同于数学、物理、化学方法的生物学方法,同样也不存在根本不同于数学、物理、化学方法的医学方法。过去习惯“描述”(文字的与图画的)的生物医学仅是生物医学的初级阶段,而当今生物医学的大部分已经离开了初级阶段。

什么是“面对个别患者”?这里包含着一个动力学的概念。其内涵不断地随着医学的进步而增加。近年来,从基础医学向临床转移的技术急剧增加,这是技术领域中的动力学。另外,作为基础医学的观点与概念,几乎可以说没有什么不能直接用于诊断与治疗的。从这个意义上说,一个高水平的临床医师在实践中会随时运用基础医学,乃至生物学的各种观点与理论。

临床上不能总是依靠那些传统的技术和

方法去诊治疾病。随着生物学理论和技术的发展,必需创造出新的、立足于分子生物学的理论和技巧,既改造又发展传统医学理论。也就是说采用两面夹击手段,以创造出临床上迫切需要的新的诊断方法和治疗方法,于是基因治疗学和基因诊断学应运而生,并由它们构成了临床分子生物学,开始解决一些“不治之症患者”所迫切需要解决的问题。

许多人对分子生物学与生物化学混淆不清。这是因为生物化学与生物物理、生物数学比较,它较为初级;许多生物物理要求生物化学先行,而生物数学又要求生物物理先行。任何一项生物化学技术一出现就被各医院生化科所采用,而生物物理与生物数学技术虽尚未被人们所普遍认识,然而在发达国家则深受重视的。总之,临床分子生物学是以人的生老病死中的实际问题为研究目标,在深层次上以分子(尤其是DNA)为对象来开展诊断与治疗的。因此,临床分子生物学与生物化学、生物物理学、生物数学密切相关。

当然,临床生物化学中也有分子的概念,但它不一定要运用分子生物学中心法则(DNA→RNA→蛋白质)这一动力学过程去剖析问题。若不用中心法则及其发展规律去观察疾病的发展变化,认识是不可能深刻的。既不可能在基因水平上作出诊断,更不可能从基因水平上去进行治疗。可以武断地说,若不从基因治疗学上去治疗疾病,那么能够治疗的疾病种类极其有限!因为疾病种类与患者人数毕竟不是一回事。因此,对当今一些难

治的疾病只能从基因治疗学上找出路。从这个意义上说,许多临床生物化学既没从“分子之所以为分子”(信息传输及更基本的亚分子水平的机理),又没以分子与分子之间的关系(特别是蛋白质对 DNA 的影响)去认识、解释和诊断疾病,更不会以分子生物学手段去治疗疾病。实际上临床生化工作者并没有从分子生物学水平去认识发病机理,真正发展着的临床分子生物学必将更多地引入量子生物学,以及在医疗实践中引入分子统计物理学来进行诊断与治疗。这一点正在发展,但尚未成为现实。如目前对糖尿病的诊断仅仅靠测定血糖,而没有运用分子生物学的中心法则去检测患者有关糖尿病的基因。临床用胰岛素或降糖灵治疗,这乃是传统疗法中使用了一些算术方法而已,均不能看成是临床分子生物学。只有用胰岛素受体的基因疗法来治疗糖尿病,才是名符其实的临床分子生物学。

其实,临床免疫学与临床分子生物学的区别是十分困难的。仅仅去检查某一抗原的抗体或某一抗体的抗原,测定肿瘤的 Marker,不全属于临床分子生物学。因为这些检查并没有企图把抗体与抗原分子与整个疾病发展动力学联系起来。要做到这一点,必须从由 DNA→RNA→蛋白质来认识免疫问题。例如,中国医学科学院血液病研究所万景华应用多聚酶链反应(PCR)快速诊断克隆性 B 淋巴细胞增殖性疾患,就是典型的临床分子生物学。因为他的着眼点是 Ig 基因重排,即不是看免疫球蛋白 Ig,而是看它的基因。过去分子生物学技术,利用基因探针虽可测定 Ig 或 T 细胞受体基因重排,但此技术必须经过非临床实验室的复杂手续,既费时又费事,实际上这还不是临床分子生物学。当前用多聚酶链反应测定 B 淋巴细胞肿瘤性疾患单克隆起源的方法,直接剖析了免疫球蛋白基因。例如,在这条基因结构中,我们常运用这些关于免疫球蛋白本身的概念,才知道在 B

淋巴细胞分化过程中 Ig 与之相对应的可变区(V 区)、多样区(D 区)、连接区(J 区)和恒定区(C 区)都随机地进行了重排。这与物理化学及传统生物化学教科书上对 DNA 的叙述发生严重的矛盾。经过重排后的 DNA 序列,对每一种 B 淋巴细胞而言都是独特的,即使在电子显微镜下也看不到有何区别。正常人约有百万种抗体,也就有百万种重排。这种重排区域虽然根据 Ig 不同而各不相同,但仍保留着充分保守的序列。所以,万景华等人根据对 17 例的正常人 Ig 基因结构中 V 区和 J 区 DNA 序列的分析,找出重排区二侧具有共性的序列,设计并合成了相应的寡核苷酸引物,一共三种:

1. Fr3A 来自 V 区第三个框架区域(Frame-work)的序列:5'ACACG GC(C/T)(G/C) T GTA TT ACTGT 3'

2. LJH<sup>-</sup> 来自 J 区的碱基序列:5'TGAGGAGACGCTGACC 3'

3. VLJH<sup>-</sup> 来自 J 区的碱基序列:5'GTGACCAGGGTNCCTTGGCCCCAG 3'

(其中 N 可以是 A, G 或 T, 或 C)

万景华用这一引物使重排的基因区域在一对寡核苷酸引物引导下扩增,在 PCR 过程中产生了各种各样长度的基因 DNA 产物,在电泳中形成由无数条带组成、染色均匀的弥漫带,而在 B 淋巴细胞恶性增殖性疾病中,因其起源于单个恶性淋巴细胞,故具有单一的 Ig 基因重排形式,经 PCR 扩增后电泳,可获得对此淋巴瘤特异的独特条带。从这一具体例子中可以看出,临床免疫学与临床分子生物学中的密切联系与区别。

整个医学的历史都反映了当时人们对生命、对衰老、对疾病、对死亡的认识,并积极地对疾病进行诊断和治疗,也就是说在不同层次上发展着整个医学。至今,可以粗略地将全部医学史分成三大段,即命名为“整体现象上的第一阶段医学(M1)”、“系统、器官、组织、细胞层次上的第二阶段医学(M2)和目前正



在蓬勃发展的基因研究水平上, DNA→RNA→蛋白质与蛋白质核酸相互作用, 以及它们与环境相互作用水平上的第三阶段医学(M3)。

从前面所列举的 B 淋巴细胞基因重排在恶性疾病中的作用, 尤其是我们所设计的引物序列上的那一段, 它成为有一定意义的机理与信息, 从而可以看出 M3 与 M2 的不同。DNA 序列的“有意义”一段称为 Motif (这并非专门名词, 意即主旋律、基本机理序列, 可译为“基序”)。M3 医学时代立足于基序的行为。所以, M1 立足于整体; M2 立足于细胞; M3 立足于基序。然而有一点十分重要, 这就是“即使基序也离不开整体”。这就是本书为什么有很大部分是在“病理生理学上的应用”的道理。即使基因治疗学也往往要用手术获取 TIL (肿瘤浸润淋巴细胞), 就是基因诊断也往往从静脉取血。故不是不要一般的生化操作, 而是更需要细胞分离与近代电子仪器相结合。

从总体现象上进行解释, 不可避免地要较多地运用哲学思辨, 这是第一医学时代(即 M1)。这个层次的医学著作的代表是黄帝内经。这种医学的产生与人类的产生同时出现, 5 000~6 000 年前中国黄河下游大汶口出土

的陶器中, 二三十种符号无不与生老病死有关。商代(4 000 年前)甲骨文极度繁荣, 其中已有医学文献。所以, 应当认为 M1 的医学代表中国是传统医学; 外国是公元前 460~377 年的 Hippocrates。

M2 的开始是 1514~1564 年的 Vesalius Andreas (Andre Vesal) (比利时人), 他的经典著作是一本《人体的构造》(De humani corporis fabrica), 它标志着 M2 的诞生。

从 M2 的诞生到 M2 的繁荣经历了三四百年。这个繁荣的里程碑是 R. Virchow (1821~1902) 奠定的, 他的名言是“细胞来自细胞”(Omnis Cellula e Cellula)。他认为人体是细胞的王国, 他一生全用显微镜, 以染色组织切片来描述细胞、组织、器官的疾病, 他的结论给疾病治疗以启示。其实他奠定了 M2 的基本观点。他主编了历史上最具现代 M2 形式的杂志: Archiv fuer Pathologische Anatomie u. Physiologie u. fuer klinische Medizin。故当今众多的临床医师在工作中的思维方式仍然是 Virchow 式的。

直至 1985 年多聚酶链式反应(PCR)发明后建立的医学, 包括临床医学在内, 是第三医学时代的开始(简称 M3)(表 1-1)。从此

表 1-1 M1、M2、M3 比较

	M1	M2	M3
起始	6000 年前	1514~1564	1985
繁荣	2000 年前	1821~1902	2000~
代表人物 或著作	黄帝内经 (医经七家与经方十一家)	Vesalius Virchow	Mullis Saiki Friedmann
基本论点	用自然语言来解释 生老病死, 以哲学行事	用细胞、组织及器官的 语言解释生老病死(XCT, ECT, MRI 生化数据)	用分子语言首先是 DNA 分子 语言解释生老病死。所谓分子 语言是较高的数学语言
代表治疗手段	草药、矿物药与 动物药、针灸	手术, 化学药物。 理疗, 放疗	基因疗法, 基因工程产品 生物药物
对临床中预防 措施的影响	养病与养生的哲学思辨 由此而产生对传染疾病 的预防, 如种牛痘	大量针对细胞组织的免疫 手段, 疫苗与血液生物制品 许多营养成分的发现应用	基因水平的早期诊断分子探针 疾病倾向性(Proness)诊断

临床分子生物学正进入繁荣时代,预计这个大繁荣期开始于公元 2000 年左右。因此,从定义上看,临床分子生物学因 PCR 的诞生而诞生。它已正式进入临床面对个别患者,成为实际应用的分子生物学。它将因引入高度自动化的技术而迅猛发展,是医学第三代的标志。基因疗法是临床分子生物学理论在治疗上的具体应用。三个医学时代的比较见表 1

- 1。

很显然, M1 对 M2 兼容, M2 对 M3 兼容,而 M3 对 M2 则增加了内涵。

总之,医学是生物学的一个子集,生物学是数理化这个大集合中的一个子集。分子生物学也是生物学的一个子集,临床医学是医学的一个子集。临床分子生物学是分子生物学与临床医学相互交织的一门学科。

## 1.2 临床分子生物学的发展简史

分子生物学一词始于 1950 年,它是 Astbury 在他的 Harvey 学术报告会上第一次使用的一个名词。Astbury 是用 X 线衍射研究三维的蛋白质晶体结构的人。J. C. Kendrew 及 J. D. Bernal 都持同一观点。所以,1950 年就在全世界明确了分子生物学与生物化学的区别。其实 1900 年就认识到蛋白质是小分子的线形聚合物。它们以共价键相连接的观点于 1925 年即已明确,以此取代了缔合物的概念。

1840 年,血红蛋白就已被结晶出来。1909 年出版了血红蛋白的结晶学专著。既可结晶必有三维结构。1955 年 Sanger 已把胰岛素的共价结构全部阐明。60 年代世界上第一次合成蛋白质的是中国。这一切是分子生物学历史中的大事。但是,走向临床的目标似仍遥远。Sanger 实现的仅是分子水平上的解剖刀,还缺少分子水平上的放大镜、显微镜。

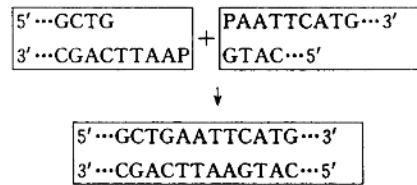
围绕这一行动首先是脱氧核糖核酸 (DNA) 的重组 (Berg DE, 1973),而这件事依赖于核酸内切酶的发现。

DNA 重组打开人类对生命认识的大门,因而也在原则上打开了人类对生老病死的认识之窗。只有可操作才是可认识。

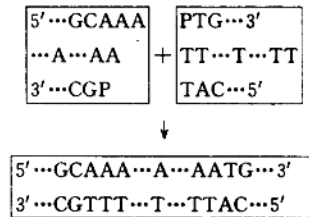
在 M2 时代,外科医师可以对人的活体进行切割与整形, DNA 在限制性内切酶下切

割有定位的特征,也是有目的的切割。而重组的实现就是整形外科在分子水平上的实现。重组的关键就是拼接 (Splicing)。有以下三种:

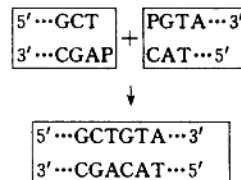
### 1. 粘性末端的使用



### 2. dA dT 相联



### 3. 平结合 (非重叠结合, Butt joins)



在发现拼接的同时,又发现了细菌质粒或一些病毒复制与整合的基因,或其它 DNA 序列是成簇存在的(*clustered*)。所以,可以作为“单位结构”成为其它 DNA 的载体去复制或整合。

以上是基因工程决定性突破中的三项发明,还有第四项发明。

华人 Chang, A. C. Y 和 Hsu L. 在 1972 年与 Cohen 一起在 PNAS 上发表了把比较大片的 DNA 引入活细胞(大肠杆菌),这就完成了分子生物学的一项进步。这四项发明联系起来实现了如下四大行动:

1. 从一个人(或任一种生物)复杂的基因组中分离出单一的、个别的 DNA 组分,个别地引入一个单细胞(与一个合适的可增殖的载体相耦合)。

2. 扩大好几个数量级。因为这个被引入新 DNA 的细胞(*Transformed Cell*)自己无性繁殖即克隆生长,而使引入的 DNA 也跟着增多几个数量级。这种增长起了一个放大的作用!

3. 为研究复杂基因组提供了一个单一、个别的 DNA 表达与控制功能的机会。

4. 为临床医学服务,建立 DNA 重组或基因工程药物制造厂。

这是临床分子生物学的前奏。从 1973 年到 1985 年的准备工作阶段,就完成了 DNA 合成、DNA 改造、DNA 检测的自动化仪器,并为 1986 年的 PCR 出现创造了条件。凭借电子计算机元件—处理器的智能化,使过去不适合临床的学院式研究变成了临床可行的技术。

Cetus 公司已将目光瞄准这一当时呈由短平快出成果的研究课题。由 K. B. Mullis 首创 DNA 聚合酶链式反应扩增技术,扩增了百万倍。所以说它是分子水平上的显微镜或电子显微镜。关键在利用耐热的 DNA 聚合酶 Taq DNA polymerase,代替了最早使用的不合适的酶,而我们可能不知道,这种 Taq

DNA 聚合酶却是来源于 20 年前美国黄石公园的温泉中分离的一种称为 *T. aquatilis* YTI 的细菌。尔后由该菌纯化出这种酶。此外,在嗜热脂肪芽孢杆菌(*B. stearothermophilus*)及其它几种耐热菌和古细菌中也可分离出这种酶。这类细菌的生活很怪,可以在 70~75℃ 下生长!

这种酶的热稳定性极强,甚至在 90℃ 中放 40 min,或在 97.5℃ 中放 5~6 min 仍有 50% 的活性。这种特性使操作简单,并促使这种酶反应走出象牙塔,而进入医院中,面面临床。

一次性加入的酶即可满足全过程。

用微处理器控制温度,只要先把全部材料混匀,反应自动进行。

75~80℃ 时,每一个酶分子在每秒钟可完成 150 个单核苷酸的渗入。PCR 每一周期需数 min。所以,一般常用 20~30 个周期就可实现数百万倍扩增反应,且在数小时内完成。它可快速地实现:①基因分离(1~2 周,而染色体 DNA 库法则需几个月);②突变体构建(数天,而 M2 法需 30~60 d);③DNA 测序(比克隆、培养扩增、纯化快);④用隧道显微镜观察 DNA。

PCR 实现了医学的 pg 时代!而放射免疫法仅实现 ng 时代。因 PCR 可以将 DNA 由 pg 扩增到 μg。它可以为单一细胞进行 DNA 定型。

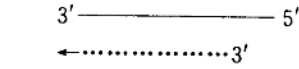
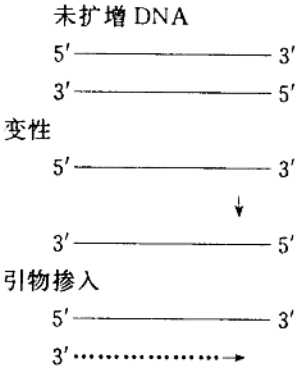
总之,1985~1987 年人类医学进入了一个 M3 新时代,新一代的维尔和即将出现。

PCR 是体外酶促合成、复制特异 DNA 片段的方法,由高温变性、低温退火(带上各自的引物:引物是 15~30 个碱基,G+C 含量为 50% 的寡核苷酸小片,应尽量避免数个嘌呤或嘧啶的连续排列。避免有引物内部二级结构出现的可能,尤其 3' 端)及适温延伸组成 1 个周期,循环进行:高温→低温→适温。

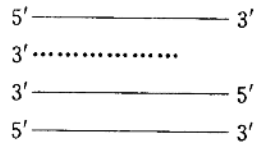
人工合成的两个寡聚核苷酸引物,在低

温下分别与目的片段两侧的两条链互补结合。

PCR 可简单列出以下步骤: DNA 聚合酶在 72 C 下将单核苷酸从引物 3' 端开始掺入, 沿模板 5'→3' 方向延伸, 系反复进行, 如下所示。



适温延伸



继续 20~30 个周期。

每一周期所产生的 DNA 均能成为下一循环的模板, 所以每一次 PCR 以指数方式增加。理论上增加  $10^9$ , 实际上至少扩增  $10^5$ , 一般为  $10^5 \sim 10^7$ 。

人类文化上这一大进步 1989 年由 Methods Engymol 加以总结, 发表在科学杂志 (Science) 上。

### 1.3 Why me 问题

临床上常见患者问医师: “我为什么生这种病?” 这些问题越来越难回答。这说明 M2 时代存在人类知识的不足之处。在临床上有些患者提出更实际的问题, “为什么同样治疗我不成功, 而另一患者却成功了?” 同样难以回答。

现代社会, 因细菌感染及寄生虫感染而引起的死亡大幅下降。而原来少见的疾病已变为常见病。现在 100 人中有 1 人患癌症 (1992), 而且癌症患者每 10 年增加原值的 0.5 倍! 世界上艾滋病病毒感染极难控制。自身免疫疾病与代谢遗传病均有基因失常。精神病在大多数病种里已找到基因定位。所谓退行性疾病组合 ADG (动脉粥样硬化、糖尿病、痛风) 已可认为是良性肿瘤! 国际上大量的医学研究论文却被许多人感到难以看出它的临床价值。而回顾历史, 即使细菌感染, 也因人而异, 各人症状也不同。

世界上有四大名著, 专门介绍 Why me

问题。

1982 年佐尔特·哈尔桑伊的《遗传预测》, 副标题是 (在那双螺旋的更深处), 此书论述了预测、健康和行为三大问题。实际上此书已把 M3 时代要解决的问题基本上都已提到, 对精神病的基因背景有详细的介绍。书中对基因与药物, 基因与人格, 基因与职业、婚姻的关系均作了较全面的讨论, 可以看到 M3 时代人类生活方式必有重大改变, 并直接提到医学的将来问题。指出基因检查将要改造预防医学, 针对组织相容性抗原 (HLA) 做了全面的讨论。指出电子计算机如何通过临床分子生物学干预人生。

1988 年罗赛·马克基的《遗传纵横》, 副标题是 (现代遗传学的故事), 此书已在 PCR 基础上介绍了医学革命, 回答了 Why me 问题如何才能对一个患者一个患者地出报告, 并回答了基因疗法必将成功的理由。M3 有可能提出对人类的设计, 即更强壮、更聪明、

更美丽的人类将以指数增长。

1989年,出版了里查德·道金斯《自私的基因》的新版本。该书第一版于1976年出版。为什么说基因是自私的?此书完全从个人的立场看待基因的行为。基因是不朽的。每一代人作为个人都不能永生,都会死去。为什么?自从原生动、原生植物转变为后生物(Metazoa,或Metaphyte),个体死亡均不可避免,但换来的是基因的进步,整个生命的进步。这种进步在人体上越来越快!越来越明显!

• 基因有极大的冗余性。为了保护它的稳定增长,作者从对策论的观点讨论人为什么会死的问题,从而得出这个正统的新达尔文主义的结论。

人存在的理由是什么?是这本书的一个主题。生病而死就是失去了这个理由。这也是Why me问题。

为什么生物存在“性”?为什么人类的“性爱”有如此重要的DNA→RNA→蛋白质的并行机理,上千条的化学反应为性爱铺平道路。而在这条道路上引出了乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌与子宫癌等许多癌症,并且这一切在下丘脑乃至大脑皮质的活动上有许多基因决定的结构与功能,甚至表述为基因对社会构成的影响:如攻击与爱抚,合作与性虐待的代谢背景。在道金斯这本书中紧紧地围绕着

Why me的问题特别地讨论了对基因的解释,这在PCR广泛推广之后会对临床乃至社会带来惊人冲击,已可见端倪。

因为整个生物界均使用ATGC这样的编码,可见进化论已从临床分子生物学观念上得到深入,亦为基因疗法带来大自然临床分子生物学的载体,如人工合成病毒或是M3时代中草药机理的基因形式。拯救一个人的生命原本谈不上是自私,生物进化要求人类更强壮、更智慧、更美丽。这就是善。

1990年路易丝·文格森(Lois Wingerson)出版了《基因图解—基因组研究计划与医学的将来》[Mapping Our Genes (The Genome Project and the Future of Medicine)]一书。该书最彻底地向每一个普通人解释医学大革命即将到来。作者指出,当前社会上绝大多数人不知道医学将要发生天翻地覆的变化。这不是那些理论生物学家和田野中、畜牧场上的遗传学家的工作记录,而全是临床医师研究的狂热行为。这本书收录了25名有远见卓识医师的动人传记,他们是新一代医学的典范,密切关注基因治疗学;他们精通PCR操作,懂得染色体图上基因定位,热切地探索DNA与RNA及蛋白质序列中的主旋律(Motif)是什么意思,以及与疾病的治疗有何关系。这就是下一个时代医学—M3所要研究的主要问题。

## 1.4 为什么要学习第三阶段医学(M3)?

因为M3极大地改善了M2。下面介绍一个根据M3看待生老病死的基本框架,我们将图1-1称为基本盒形图。疾病的发生在很大程度上决定于基因。罗伯特·科和(Koch)口服一试管的霍乱弧菌培养液而不生霍乱就是一例。基因的医学检验单位很小,称为pg,临床千万篇基因论文将在未来的10年中出现。

M2的许多治疗方法包括外科手术、各类药物、各科理疗、放疗、免疫疗法、激光等,有多少是在基因水平上起作用的呢?预计在近10年中将有千万篇论文重新回答这些问题,而其主要技术是PCR。

人之所以长成人这个样子,不是不能回答的。耗散结构理论已经作了原则的回答。M3的实验数据将象填空白一样为耗散结构

理论所驾驭。回答了这个问题也就回答了一切病理学形态变化的问题。细胞间通讯规定了形态生成的数学规律。这些非线性方程组解的几何形式就是美丽的人体与丑恶的病态，而细胞通讯则完全由基因与外界环境交互所决定。这就是 M3 的基础医学。

由于 M3 的诊断技术，尤其是同位素与磁共振(MRI)成像的联用，将结果在计算机上用耗散结构理论来计算，便可得出一个针对个人的诊断——在基因水平与生活史水平上的诊断，这在 2000 年就要实现。

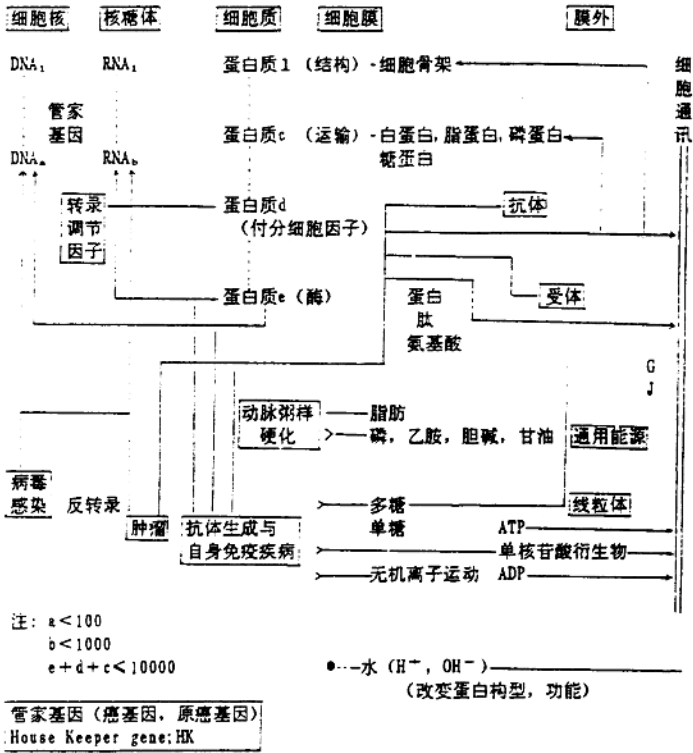


图 1-1 基本盒形图  
(基因、细胞与环境的基本关系)

为什么要学习 M3? 为了重建一个临床医学, 它不同于 M2 临床医学! 可以断言: 2000 年 M3 的繁荣时代来到之后, 回首 M2, 就会如 M2 时代里看 M1 一样。

在医师的再教育上要抓高、新、尖, 在科学技术的开发上要抓短、平、快。倘若二者结合, 一定可达到更高的诊断水平, 取得更好的治疗效果。由于许多原因不明之症已被揭示,

故许多不治之症将成为可治。所谓基因疗法即着眼于基因的治疗。它含有两层意思。一层是许多教科书上记载的传统疗法,其作用机理将作大幅度修改。因为有大量的疗法一定是作用于基因及基因的调控。如肿瘤化疗可能是作用于受转移部位的细胞副分泌,并与改造全身基因分布有关;地高辛是否改变了心肌细胞的基因表达?此外,一切抗生素都作用于微生物基因这已是众所周知的事实。大量抗炎药物、激素也已知作用于基因或多基因,自身免疫性疾病与动脉硬化性疾病、糖尿病、传染病尤其是病毒感染,是否都要着眼于治疗基因或多基因?作用于受体的基因是否是精神病抗抑郁药的根本作用机理?嘌呤嘧啶也是嘌呤!或作用于基因调控的RNA与蛋白质分子上?

另一层是用基因或多基因作为药物,这就要求合成基因的机器大型化。因为管家基因的序列大多已弄清楚,许多疾病涉及的基因变化也均已明白。因此,完全可以向人体引入基因。输入免疫因子还不如输入它们的基因!这些管家基因是当今大量基础医学的研究成果。中国人 Wang L. H 在这个领域中享有盛名。

1. 酪氨酸激酶的 HK 基因族:abl,erbA,erbB, fps/fes, fgr, kit, pim-1, ros, src, yes 共 11 种,许多是甾体激素受体的原本。

2. 蛋白激酶有关 HK 基因族:mos, raf (c-raf-1, A-raf 等涉及病毒的 raf)与生长因子有关,影响纤维母细胞造血细胞 gag-mil, gag-raf, 与 LTR-c-raf 蛋白的丝氨酸/苏氨酸特异性蛋白激酶活性。此基因能改变细胞性能,是极有临床应用前途的。

3. ras HK 基因族:ras (C-H-ras-1, C-H-ras-2),这对肺癌、大肠癌、膀胱癌、胃癌、神

经母细胞瘤、纤维肉瘤、畸胎瘤、胰腺癌…可能是最佳的药物!它的“活化”是癌的生成,故是它的“原形”。

在控制细胞转化成癌细胞的斗争中,这种 HK 基因的蛋白产物是一种含镁的蛋白 p-21。p-21 可能是一种极有前途的药物!可以与 GTP, GDP 相结合。它不仅与进化有关,而且与分化完成的程序有关,与  $Ca^{2+}$  的释放有关,与 pH 在细胞内的变化有关。它与 Ip3, G 蛋白有密切关系。因此,它与心血管疾病、精神神经系统疾病的治疗有极大关系。

4. 细胞核的蛋白质有关 HK 基因族:fos, myb, myc, myc 匣基因, ski, p53 基因。

5. 生长因子 HK 基因族:sis, p28<sup>m</sup> 与 pdGF 密切相关,因而 sis 对血小板疾病、心血管和脑血管疾病有治疗价值。

6. 未确定功能的 HK 基因:bcl, 对 Burkitt 淋巴瘤可能有疗效。ets, 直接控制染色体行为:int, rel 与 p59 有关,对免疫性疾病有疗效;在 B 细胞、T 细胞受到损伤的疾病中可能有疗效。

7. 新 HK 基因:B-lym, mcf-2, met, dbl, ret, trk, mas, hst, lca, mel, raf, 它们大多已明确了序列,可以合成作药物。所以,一个庞大的基因疗法正在开发中。早在 1985 年 Theodore Friedmann 就提出了向人体引入基因以治疗疾病的技术方案:①微注射;②裸 DNA 可借助化学药物被机体摄入;③脂质体;④与细菌质粒合用;⑤利用电泳导入人体;⑥利用病毒作载体送入人体。如腺病毒、SV40、多瘤病毒、BPV、疱疹病毒、逆转录病毒、痘病毒,预测对肿瘤病毒治疗最有前途。

8. 利用超声、电、光以及微爆炸(基因枪)、逼近原则,要求与(内窥镜下)外科手术相结合。

## 1.5 医院面临进入 M3 时代

倘若一个医院把短平快当作抓科研成果的方案,那么面对今日所见 M3 应当如何运行?

人才培育是第一步。要有专业队伍,要有展开的不断普及技术的交叉培训大布局。人才是否优秀要由人才自己来证明,人才培育的着眼点不仅短平快,而且要高新尖。

器材投入不可少,要引进以下设备:① DNA 提取仪;② DNA 合成仪;③ DNA 扩增仪;④ DNA 序列分析仪;⑤ 计算机化 DGGE 仪(变性梯度凝胶电泳仪带计算机)。这是硬件,还有软件,否则仍是学院式研究格局。

因为 M3 的临床开发要有快速信息和灵活的试剂供应,与最新操作技艺的快速交流。所以,在医院内要实行有领导、有组织的发挥积极性机制,在医院外有广泛的国内外信息咨询(与物质借用)机构。要与世界上该领域中约有 10 大公司挂钩,尤其是 Cetus 公司,并与国内京、沪、宁、穗、汉等五大城市的公司、研究机构要有能解决实际问题的松散联盟。

软件的最高原则是紧密结合临床。要建立向社会开放的专门实验室。一是由科学本身规律决定的实际成果苗头,向临床科辐射的课题;二是由临床实践提出的课题。应以前者为主,因为前者是可能,后者是必要。必要需服从可能。

医院毕竟是医院,而不是研究所。但医院兼有研究所的部分作用,应从临床诊断、治疗入手,有目的、有计划地进行。时不我待,莫失

良机。

上面列出的是每个较大的医院均可争取的设备,尤其是我国。现阶段应当着手短平快的开发,参考国外的仪器,利用国产的元件及部分的国外元件,组装生产适应我国市场需要的扩增仪、DNA 提取仪、合成仪、DNA 序列分析仪,利用国产计算机安装 DGGE 仪。即使广大农村,也可使用二支恒温水浴进行 PCR,这在国外早有文献报道。事实上,在国内一些大医院,首先开展工作时都是如此。南京军区总医院有 3 个年轻人就是这样起步和逐步完善的。

(卢侃,卢力, A. E. PEGG, G. Inesi)

### 习 题

1-1 一患者 65kg,测得化学组成为水 42%,蛋白质 15%,DNA 0.2%,RNA 0.4%,脂肪 18%,糖 9%,矿物质 5.4%,其中有机分子 10%。已知分子量的近似值:

蛋白质	$10^4 \sim 10^5$
DNA	$10^6$
RNA	$10^5$
脂肪	$10^{2-3}$ 中小有机分子 $10^3 \sim 10^2$
糖	$10^2$
矿物质	$10^{1-5}$

试估算此人体内有多少分子(亚弗加德多常数为  $6.02217 \times 10^{23}$ )?

2-2 在您的本科临床或面对临床的实践中,您认为在眼前符合短平快原则的开发课题是什么?最低硬件要求是什么?最低软件要求是什么?



# 2

## 临床分子生物学基础知识

### 2.1 概述

本章将针对基因治疗学与基因诊断学的要求,简略地提出许多当代生命科学关注的概念,如 DNA、RNA、蛋白质、病毒与细胞的基本概念。为什么许多以前认为无联系的概念现在却发生了关联,而且由此提出了许多更深刻的问题——也就是矛盾。因此,千万不要将此书当作教科书。例如, DNA 作为一个高分子,它的单体是脱氧核糖核苷酸,它们在物理化学中单体与单体是由共价键接合在一起的。所谓共价键,其“共有电子”是它们的基本规律。分子生物学目前正集中注意于基因的漂浮,它便是原癌基因活化的一个重要机理,也与重排现象有密切的关系。这正是动脉粥样硬化与肿瘤形成的共同分子机理。但是,在物理化学上共价键是不允许漂浮的,而“非同分异构”的重排被认为是一种化学反应。

那么,为什么漂浮基因的发现者在年老时方获得了诺贝尔奖金(可见也是历经了波折的),并没有人指出这是“错误”的。因为那时的漂浮基因(又称转座子, transposome)仅仅在遗传学家内流传,而是由生物学家反复试验证实其存在,而一旦与 DNA 分子的物理化学(例如, 1974 年的 V. A. Bloomfield 等的 Physical Chemistry of Nucleic Acids)的基本概念相对照,就会发现:若把漂浮基因或重排看成是一个巨型高分子一段与另一段的非特殊理由下的重排与重组或流动,那是一个“错误”。因此,很明显将原属于不同学科中的概念相串接,一定会发现许多“错误”或“象是有些话没有说完”。而近 10 年的科学史告诉人们,如把看来遥远的数学、物理与化学、医学实践中的难题相嫁接,就会发现正是这

些“错误”才造成临床分子生物学上的大进展。例如,正是这个共价键不可漂浮的“错误”到了 1990 年 S. A. Narang 所编辑的《蛋白质工程、蛋白折叠的操作》一书中明确指出,分子生物学的中心法则(DNA→RNA→蛋白质)到了蛋白质的折叠时就已陷入了迷雾。他本人则专攻这一难题:合成转座子,并且明确指出这是基因疗法的研究方向。

为了使读者对这种“错误”有一个深刻的认识,现直接引用他的原话如下:

Transposable genetic element are specific DNA sequences that can move from one location to another on the host chromosome. In general this transposition involves replication of the genetic elements (... 1977 ...1986). .....

One of the most important uses of synthetic transposable elements would be the manipulation of eukaryotic genes in vitro; amplified genes can be put back into eukaryotic genomes, a technique of gene therapy.

读者带着这个概念来研究当今医学最前沿的问题,即 DNA 分子的共价键与漂浮基因(mcclintock)之间有多么深刻的矛盾,发现其实这就是今日物理化学与肿瘤、心血管疾病临床之间的“矛盾”。

“矛盾”是认识中的现象。大自然本身不会犯什么“错误”,实际上发现这些“没有说完的话”的背后,是当今科学家正试图奋发解决的“问题”。因此,恳请读者放弃阅读教科书的习惯,因为在那里仿佛没有“错误”,没有“矛盾”,其实在那里正丢失了科学进步的契机,