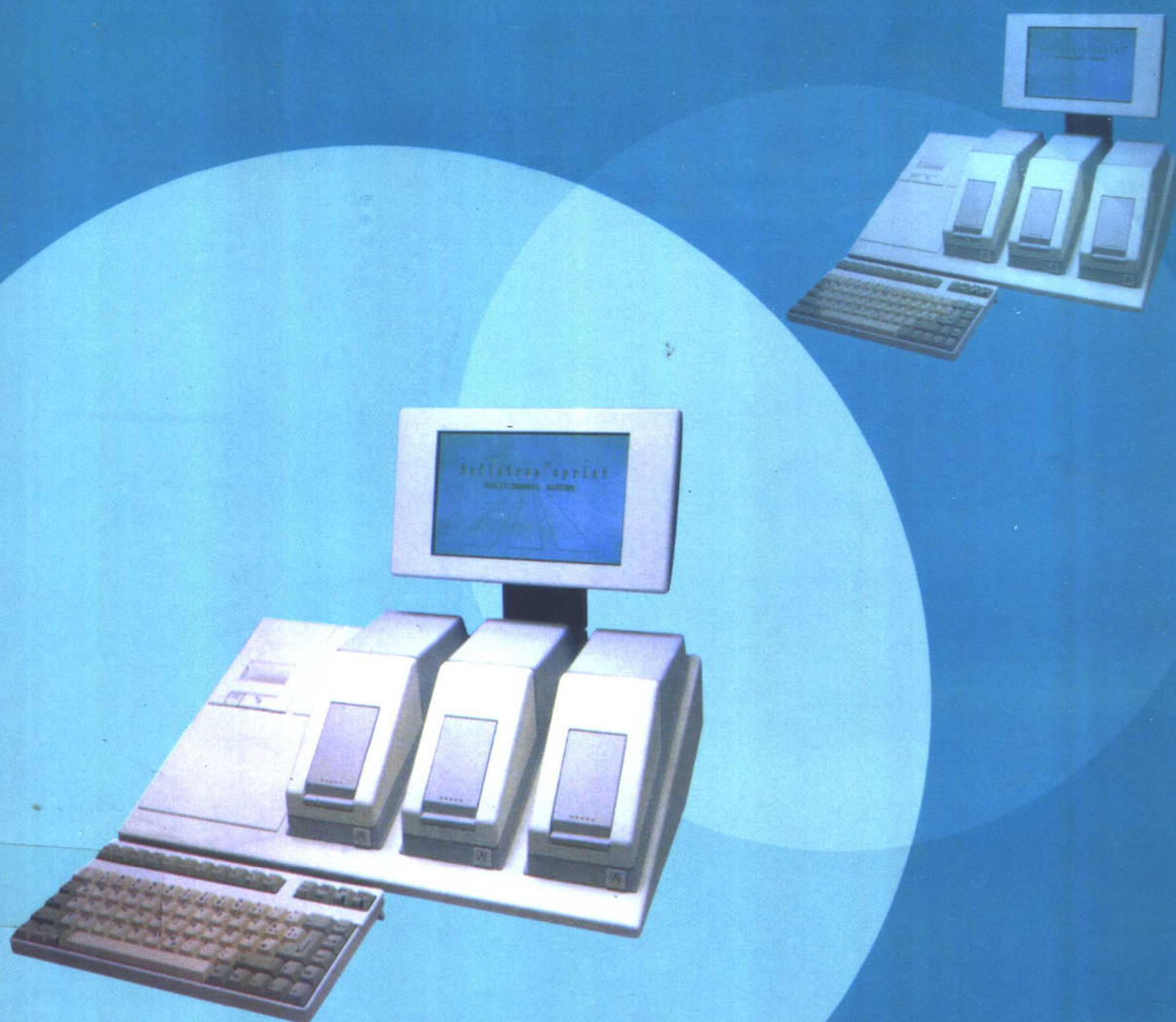


检验医师继续教育教材

医学实验诊断学进展

(卷二 临床基因诊断)

主编 武建国 童明庆



东南大学出版社

检验医师继续教育教材

医学实验诊断学进展

(卷二 临床基因诊断)

主 编： 武建闾 童明庆
副主编： 李晓军 潘世扬 李芳秋 许 斌
顾 问： 刘恭植 顾可梁 王毓三 张庭卿 贺福如
主要编写者 (按姓氏笔画排序)
齐 名 王惠民 许 斌 王卫萍 王艾丽
许家仁 司峻岭 江淑芳 汪俊军 李 克
孙南雄 赵建华 李芳秋 李晓军 周向阳
程 梅 崔英霞 武建国 邵海枫 虞 伟
秦良谊 张春妮 张 明 张智弘 易广才
赵智凝 杨瑞宁 黄佩琚 黄学忠 童明庆
潘世扬 强宏娟 秦卫松

东南大学出版社

内 容 提 要

本书由江苏省医学会检验专业委员会组织从事基因诊断的有关专家撰写;是《医学实验诊断学进展》(卷一检验科主任必读)的姊妹篇。本书共四十九章,主要内容包括基因诊断实验室的建立、质量管理、标本的收集与处理、相关仪器和各种最新技术的介绍,也包括心血管病、内分泌疾病、传染病、血液病、肿瘤、遗传病、神经及神经肌肉疾病的基因诊断现状与进展。

本书是检验医师继续教育教材,也可供医学院校师生和医学实验研究人员参考。

图书在版编目(CIP)数据

医学实验诊断学进展:临床基因诊断. 第二卷/武建国,童明庆主编;李晓军等编. —南京:东南大学出版社, 2002.5

ISBN 7-81050-969-1

I. 医... II. ①武...②童...③李... III. ①基因-探针诊断②基因-探针诊断-实验室 IV. R446.9

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2002)第 026540 号

东南大学出版社出版发行
(南京四牌楼 2 号 邮编 210096)

出版人:宋增民

江苏省新华书店经销 南京玉河印刷厂印刷
开本:787mm×1092mm 1/16 印张:26.5 字数:658.3 千字

2002 年 5 月第 1 版 2002 年 5 月第 1 次印刷

印数:1—3000 定价:45.00 元

(凡因印装质量问题,可直接向发行科调换。电话:025-3792327)

前言

江苏省医学会检验专业委员会在 2000 年 5 月编纂出版了一本检验医师继续教育教材《医学实验诊断学进展》(卷一 检验科主任必读)。在该书的前言中,我们向读者通报说:本书的“第二卷(重点是基因诊断)已在筹备中”。经过近 2 年的努力,这本书终于付印了。这是一件十分令人欣慰的事,因为我们实现了对读者的承诺。

基因诊断已经逐步走向成熟。它正在不断地从实验研究走向临床应用。在可预见的将来,它将成为医学实验诊断的主要手段而应用于临床。因此,从现在开始,每一位在医学检验第一线工作的高、中、初级职称的技术人员,都必须从基因诊断的理论和技術方面不断充实自己,迎接挑战。

这本书是由从事医学检验的人员编写的,也是给检验人员看的。因此,它的内容既包括基因诊断实验室的建立、质量管理、标本的收集与处理、相关仪器和各种最新技术的介绍,也包括心血管病、内分泌疾病、传染病、血液病、肿瘤、遗传病、神经及神经肌肉疾病的基因诊断现状与进展,使读者不仅能通过阅读此书,熟悉基因技术进入临床常规检验所必需的各种要素,也可使读者了解这一技术在临床应用的近况和远景。本书最后一章是“基因治疗”,本与基因诊断无关,但考虑到基因治疗方兴未艾,从事基因诊断的人也有所涉及,对相关内容有一概括了解也是十分必要的。

本书系集体创作,作者或为硕士、博士,或为有高级职称的专家,大都有从事基因诊断的实际体会,所撰写的内容,多为本身的经验或工作总结。其中第一章、第十二章至第十八章、第二十一、二十二章、第二十七、二十八章、第三十八章、第四十二章和第四十九章为文献综述,是自 Coleman WB 和 Tsongalis GJ 1997 年主编的 *Molecular Diagnostics (For the Clinical Laboratorian)*, Humana Press 一书的有关章节编译的。有些地方,根据国情和最新进展作了一些调整。文中所用的图也大部分引自该书。为使读者便于查找文献,保留了该书中有关的参考文献。该书是旅美学者方宇女士惠赠的,在此谨向她表示衷心的感谢。

生命给人努力的机会很多,但给人成功的机会极少。我们衷心希望每一位能读到本书的同志,把握机遇,在基因诊断领域中显露身手,在历史的螺旋式运动中留下自己的足迹。

武建国 童明庆
2002 年 1 月 26 日

目 录

第一章	临床实验诊断学的历史回顾	齐 名(1)
第二章	临床基因诊断实验室的建立	许 斌(8)
第三章	临床分子生物学实验室的质量保证	童明庆(16)
第四章	临床 PCR 测定的室间质量评价	许 斌(23)
第五章	核酸标本的采集、保存和提取	程 梅(26)
第六章	基因扩增仪器简介	王惠民(31)
第七章	PCR 原理及其相关技术	赵建华(36)
第八章	PCR 反应条件的优化	秦良谊(51)
第九章	两种新的定性和定量 PCR 检测系统	潘世扬 赵 毅(56)
第十章	随机引物 PCR 用于细菌分析	潘世扬(62)
第十一章	PCR 产物的直接测序	潘世扬(65)
第十二章	核酸基本操作技术	李芳秋(70)
第十三章	核酸印迹技术	司峻岭(88)
第十四章	DNA 扩增技术	武建国(108)
第十五章	基因表达分析的定性和定量 PCR	王卫萍(118)
第十六章	以 PCR 为基础的基因突变检查方法	周向阳(131)
第十七章	核酸原位杂交与扩增技术及其临床应用	崔英霞(149)
第十八章	心血管疾病的分子发病机制	张春妮(160)
第十九章	低密度脂蛋白受体基因敲除鼠模型的建立	张春妮(175)
第二十章	心脑血管病患者胆固醇酯转运蛋白 II4A、D442G 基因突变频率分析	强宏娟(178)
第二十一章	内分泌疾病的分子生物学进展	汪俊军(180)
第二十二章	感染性疾病的分子生物学诊断技术	邵海枫(188)
第二十三章	结核杆菌的临床分子生物学检测	李芳秋(203)
第二十四章	人乳头瘤病毒的分子生物学检测	易广才(210)
第二十五章	细菌和病毒耐药基因的检测	童明庆 赵旺胜(218)
第二十六章	病毒性肝炎的基因诊断进展	孙南雄(228)
第二十七章	人类肿瘤疾病的分子突变	王艾丽 司峻岭(234)
第二十八章	血液系统肿瘤的分子遗传学和诊断	秦卫松(251)
第二十九章	白血病的基因诊断	许家仁(268)
第三十章	ALL 微小残留病变的基因诊断	黄佩琚 潘世扬(297)
第三十一章	妊娠中肾细胞因子与肿瘤	李 克(285)
第三十二章	原始神经外胚层瘤和尤文肉瘤分子病理学进展 张智弘 潘世扬 范钦和(289)	

第三十三章	鼻咽癌的临床实验诊断进展	张 明 潘世扬 童明庆(294)
第三十四章	肝癌的基因诊断	黄学忠(301)
第三十五章	肝癌基因诊断的进展	赵智凝 潘世扬 童明庆(310)
第三十六章	前列腺特异膜抗原的研究现状	王卫萍(320)
第三十七章	人类染色体 G 显带、精液有核细胞及精子间期细胞核的 FISH 检测	崔英霞(323)
第三十八章	分子遗传学概况	虞 伟(326)
第三十九章	苯丙酮尿症及其基因诊断	秦良谊(334)
第四十章	基因组印记与基因组印记病	崔英霞(338)
第四十一章	HLA 基因分型技术	潘世扬(343)
第四十二章	神经及神经肌肉疾病的分子生物学基础	李晓军(350)
第四十三章	人钙调素基因表达的研究及应用	李晓军(360)
第四十四章	亲环素的分子生物学研究	李芳秋(366)
第四十五章	穿孔素的分子生物学研究	李芳秋 秦卫松 周向阳(374)
第四十六章	肥胖基因产物——leptin 的研究现状	江淑芳(380)
第四十七章	人 CD5 ⁺ B 细胞及 CD5 mRNA 表达水平的研究	杨瑞宁 李芳秋 江淑芳(384)
第四十八章	基因芯片在常规临床检验中的应用	浩 源(392)
第四十九章	基因治疗	齐 名(401)

第一章 临床实验诊断学的历史回顾

在这世纪之交的历史性时刻,回眸那些在科学与社会的发展进程中曾经对现代医学实验诊断学产生过影响的重大事件,展望未来的机遇和问题,将给人深刻的启迪。本章不可能对所有现代实验诊断学发生过影响的医学事件和社会事件都一一进行讨论和评价,而且由于作者的视角可能带有 20 世纪的偏见,或许会给某些事件以不恰当的过高褒扬。不过,作者确信实验诊断学从一开始就围绕着一主干线发展的。因此,作者将目光集中在这条主干线上的重大事件,借以了解实验诊断学在医学实践中形成目前地位的过程和原因。

实验诊断学的历史是从个别单项操作开始,逐步发展成为组织结构完善的诊断性实验室。起初,检验是在患者床边用简单的小工具进行的,即时报告结果,并提出诊断意见。检验项目的选择、操作和对结果解释都由一个开业医师说了算。在整个检验过程中没有任何专业的实验人员参与和协助。各个开业医师之间也几乎没有相互交流,因为所做的检验项目和操作方法关系到个人的地位,他们的收入取决于诊断的技巧和成功的治疗效果。

现代的医学检验实验室无论是独立存在的,还是作为医疗保健单位中的一个部门,都是一个拥有大量高新复杂仪器设备的实体部门,每天有成百上千件标本在这里进行多项检测。除为患者服务外,还接受教学和科研任务。现代医学检验实验室都配备有训练有素、不同分科的技术人员,他们有能力处理在诊断性检测各个环节中出现的问题。这些人力、物力的设置,体现了现代医学检验实验室运作中的复杂性和精密性。目不暇接的学术组织、学术会议、专业期刊,使得信息交流既方便又充分,即使是为了保证某一项检测项目的可靠水准,这种信息交流也是必要的。早年,最初的实验检测是靠魔术般的结果招徕生意、获取利益,而现代医学检验已转变为以医学科学实践为惟一宗旨,并正处于变化多端的状态中,面临许多任务和问题。例如,既要直接为患者进行检测、解决各种疑难问题,又要有经济效益、符合多项规章制度和接受严格的财务审查。其实,诊断实验室刚一问世,除财务审查外,这些任务就差不多都已经存在了,只是由组织机构健全的实验室取代了个体开业医师,但仍然是直接以患者为对象,并解决疑难问题的方式。以往很少有人提及诊断性检测项目的合理性问题,而当前已有各种专门机构除负责核算实验室的效益外,还采用抽样检查的方式来评估检测质量和检测结果的可靠性。

现代医学检验实验室是各个历史阶段发展积累的结果,其进一步发展必须具备符合历史发展和当代需要的条件。无论过去还是现在,技术力量都是推动医学发展的主要因素,这方面令人喜忧参半。一方面对疾病的认识和治疗需要依赖那些靠技术进步才能生产高新的技术工具,另一方面技术方法的更新又带来了高昂的医疗费用问题;而其他需要处理的社会问题和伦理问题,与过去相比更是与日俱增。血管造影、CT、器官移植、DNA 分析等,只不过是当代医师们认为值得做、但价格昂贵的几个例子。哪些是患者需要、何时需要、做哪些项目以及结果如何处理,这都是困扰 20 世纪医学检验实验室的问题。随着现代技术的发展,还取消了许多原来基层医师应该做和能做的检验项目。由于需要专门技能和价值不菲的仪器,致使基层医师们不可能再从事检验技师的工作了。必须正视的第二个问题是后勤保障问题。实验室检测工作的流程必须顺畅缜密,这包括样本的采集和保存、检测、报告等环节。每个环节无论对患者还是对医师,都应该是既简便又快速。因此,医

学检验实验室工作的运转对后勤保障系统的依赖性提高了。起初,样本都是人工送到实验室的接受地点的,以后逐渐发展成为多点采样、传送服务、机械化处理和电子化报告。当然,后勤保障还牵涉到经济核算问题。影响经济核算的因素有二:一是检测实验室的收费标准必须被开申请单的医师们认为是可行的,所开展的检验项目应该使医师本人不必为他们所申请的检验项目贴补费用,或不致因为他们所申请的检验项目而明显地减少收入。二是必须有一套完善的体制来支持实验室检测的费用。作为 20 世纪的社会改革计划之一,覆盖面广的、完善的社会保险体制使患者无需承担医疗保健的费用。由于对实验室检测项目未加一定的限制条件,由保险公司付款的体制促进了检验技术条件的提高,并使检验服务扩展到大部分人口中。这项优惠政策,使得每个实验检测中心都有可能拥有最新的技术条件,并且每个人都有可能享用这些条件。

一、早期的医学检验学

很早以前,有些人(并不一定是医师)为了尽可能地判断人们的健康状况,开设了一些用于了解患者病情的实验室。当时的诊断和处置都不是很准确的,也没有严格的科学依据。早期实验室的发展实际上是由各种不同思想体系的混杂产物推动的,如奉献精神、名利思想、占有欲望等,既有科学思想,又有哲学理论,还有宗教戒律。当然,不能就此认为实验室建立来自庸医的骗术或异端邪说,其中有医学科学价值的部分逐渐成为正统的医学诊断学基础,而临床诊断实验室也就成为医学诊断学的组成部分。

在古代,施行损伤性的检查步骤是非法的,这是当时医师们所面对的重大困难。医师可以观察和触摸患者,但只能从患者体内自然排出物作为检验样本。由于受这些限制,故在很长一段时间内尿液是惟一可供检验的样本。早在公元前 4 000 年,亚述人和巴比伦人就曾利用尿液来诊断疾病。古代埃及人根据妇女的尿液能否使种子发芽来判断妊娠,印度医师记述了尿洒到地上因有甜味能招引黑蚂蚁,Hippocrates(希腊医师,公元前 460 ~ 355)曾记述了患者尿液的颜色,并注意长期肾病患者的尿液有很多泡沫。在此后的 600 年中,尿液检查的进展很缓慢。Galen(希腊医师,公元 129 ~ 200)提出尿液是从血液中滤出的,因而可以提示疾病的种类和部位。这两位著名医师对尿液的观点为尿液分析或后来所谓的尿液检查法(uroscopy)奠定了基础,并在其后的 9 ~ 10 个世纪中一直被沿用。

大约在公元 800 年前后,Theophilus Protospatharius 撰写发表了第一篇关于尿液的论文。文中描述了第一个检查尿液的化学试验,将肾病患者的尿液经蜡烛的火焰加热后变成混浊状。其他医师重复这一工作,并用酸代替加热也取得了同样的结果。几个世纪以后,人们才鉴定出那些混浊的沉淀物质就是蛋白质。此后,有人对尿液样本的成分进行了观察。早在 10 世纪时,Avacinna 就注意到晨尿与下午尿的区别,年龄、食物、药物对尿液成分都有影响。到 11 世纪时,人们已认识到清晨第一次尿是供检验的最好样本,并提出应收集 24 小时尿进行检测,尿样要避免避热。正因为尿液分析逐步受到重视,Gilles de Crobeil 发明了一种称为 matula 的细颈玻璃瓶,形状像倒置的膀胱,专门用于检查尿液。当时以为把这种瓶子靠近身体有病部位时,瓶子中所盛尿液就会沉淀并失去颜色。这种尿液分析瓶是最早的一件医学检验设备,现代这种瓶子依然非常常见,一望便知是实验室用品,所以成为医学标志徽图案的组成部分。

随着尿液分析法的逐渐发展,不断出现为了各种目的新增的检查项目,并使检测过程简易化。其中一个称为“测尿盘(urine wheel)”的工具,其实是一个彩图,类似于现代测量工具包中的标尺,将尿液的颜色与“测尿盘”上的颜色比较,作为相应的疾病诊断和解释。继之尿液检查很快

就表现出巨大的活力。没有任何主诉患者的尿液源源不断地送给医师,希望医师能提出诊断和治疗意见。果然不负重望,尿液检查对吸毒者能作出很肯定的结论。倘若一位开业医师能开展的尿液检查项目比别人多,那么他的名声地位就会更加显赫。但也有些尿液分析者对尿液的解释远远超出所观察到的内容,而受到社会舆论责难。在此期间,Joannes Actuarius 正抓住时机着手撰写了一本有关尿液解释局限性的著作,因而也依靠尿液分析获得一笔可观的收入。首先他在书中提出警告,无论尿液检查的结果做得多么好,决不能代替对其他临床表现的观察。但人们并未因此怀疑尿液检查结果。蛋白尿症(即使尚未查出尿蛋白)、1型糖尿病、血尿、感染、脱水和某些肝疾病,都是通过尿液检查而确诊,当然,发现某种疾病与尿液中特定成分的关联可能要花费上百年的时间。尽管如此,尿液检查确实是一个最早开展的、有价值的实验诊断技术。

早期的医师在诊断疾病时,只能对可直接获取的体液进行研究。回顾这些历史事实,使我们能从医学检验学的发展过程中得出若干结论。首先,医学检验学的发展是从单纯的肉眼观察发展到使用某些工具和设备的过程。倘若肉眼观察即发现了问题,那就应该再用其他方法来确定其中有问题的组分。第二,为适应医学检验的专门需要,各种仪器设备逐渐应运而生。起初,这些设备主要是小型的、手提式的,但后来要做一些试验如蒸馏、沉淀和蒸发,就需要一个固定专用的地方,有利于患者将尿液样本送检。这就是最早的门诊患者实验室的雏形。第三,随着尿液检查逐渐成为常规项目,某些正规医疗机构中的成员就开始考虑如何筹建医学检验实验室。

二、过渡时期的医学检验学

医学检验学的进展需要技术的进步和有才干的人员。当科学技术发展到一定水平时,就会突破本领域界限而与其他领域融合。因而出现了两个具有历史意义的事件,即移动式打字机和印刷术的发明。这两项发明有力地促使信息迅速在众多的学者中传播,同时使研究者才有可能与同行们合作进行实验,研究的资料也才能与别人共享,最终使无根据的推论失去了市场。各种形式的教育推动了科研的发展,而教育需要适宜的环境,宗教改革运动正好为教育提供了这种环境。人们开始追求更多的个性自由,陈腐的观念逐渐被破除,终于使思想受限制、受禁锢的时代过去了。在这个伟大的变革时代,许多受过一定教育和有独立个性的人物大有作为。如现代解剖学的奠基人 Andreas Vesalius(1514~1564)就是这样的一位杰出的代表人物。他是第一位对人体进行精细解剖,并以文字和图解的形式介绍解剖学知识的学者。他所从事的工作的伟大意义在于首次实现从动物解剖向人体解剖的过渡,使精细解剖学知识迅速在解剖学、组织学和动物学研究中得到应用,并显著地推动了这些学科的发展。另一位代表人物是 Giovanni Battista Morgagni,他是 Vesalius 的继承人,他将局部解剖与临床病史相结合来阐述病理解剖学,这是有案可稽的现代病理学的开端。

到了17世纪,实验医学(science of laboratory medicine)开始初见端倪,有些特征一直保留至今。供研究和开发用家庭作坊式的实验室在住宅区中建立,并配备了供检测和诊断用的仪器设备,如温度计和比重计。伽利略虽已在16世纪末就发明了温度计,但直到17世纪才真正用于患者测量体温。其间的争论焦点主要是何种液体最适宜显示温度的细微变化,并最适合于校准温度计。当时尽管有这样或那样的问题,但有些医师很快意识到用温度计定量测量体温远比用手摸患者的额部更准确。然而对另一些医师来说,应用体温计所带来的问题更多,经过一番唇枪舌战后,对体温计使用的争论渐归平静。直至19世纪,有的问题解决了,有的问题忽略不计,体温计终于成为医院测量体温的仪器。至于体温对疾病诊断和预后的意义亦被写进许多论文中,并发表在主要的医学刊物上。相对而言,因比重计体积小巧,结果可信,出诊时可被带到患者家中

使用,尿比重成了尿液检验中经久不变的指标之一。简易可信的比重计正迎合了一般开业医师的需要,故比较顺利地被医师们所接受。

随着时间推移,家庭作坊式实验室中的设备越来越先进,检测方法越来越精细。值得一提的是炼丹术逐步让位于有机化学,后者涵义是“有生命的有机体的化学”。1828年,当尿素被合成以后,有机化学成为含碳化合物的化学。随后,更多的有钻研精神的化学家兼医师们开始参与对体液化学的研究。Paracelsus(瑞士医师,1493~1541年)及其后的Willis(英国解剖学家、医师,1621~1675年)都曾提议对尿液进行化学分析。他们认为将尿液的组成成分分离出来,对于诊断和预后判断会有更大意义。历史总是这样,每一个新学说的出现总会有反对者,但由于研究者的执着和有临床指导意义的成果,这种努力终于得到广泛的认可。

正是在这种富于理性的探索中,积极主动地研究逐步取代了被动的观察。Robert Boyle(英国物理学家,1628~1691年)在这一潮流中开始了血液检查。他在尿液化学分析的基础上开始对人的血液进行化学分析。但Boyle的不足之处在于他本人不是医师,所以他没有机会对患者的血液进行分析,但他认为对健康人进行血液化学分析的结果,使得对患者的血液分析更容易进行。Boyle肯定是最早的“正常参考范围”概念的倡导者。这一概念被法国医师Raymond de Vieussens(1614~1715年)继承并推广使用,他为大批各种不同情况的人群进行了血液化学分析,包括正常人、患者、男性、女性以及不同性格特点的人。这些对特定人群的研究在当时是独树一帜的。由于诊断性的检测方法对血和尿进行化学分析达到了一定的可信性,并应用这些结果来为患者诊断,于是一批实验室开始建立起来,实验检测的技能也和实验方法及实验结果一样受到人们的重视和青睐。

三、初期的现代医学检验学

化学作为一门科学,在18世纪和19世纪初期获得了迅速发展。糖尿病是医学化学家深入研究的课题。内科医师如John Rollo和William Cruikshank证实了糖尿病患者尿中是否含有糖取决于其病情的程度。他们认为通过检测患者尿液中的糖可以监控病情。当时由于传统观念的限制,大多数开业医师往往想不到作为常规检查。不过,人们从那时开始就认识到,应通过反复检测尿糖来监控糖尿病的病情变化。

1827年,Richard Bright(英国医师,1789~1858年)发表了《医学病例报告》(Report of Medical Cases)一书,书中描述了水肿患者尿中有清蛋白,而体腔和组织间隙中积存了许多浆液。Bright发现,器官解剖结构的损伤与水肿的发生有关,于是提出了体液中的化学改变与器官的解剖结构改变之间的联系。由于他首先发现了这种联系,所以就将具有水肿和尿蛋白的一类疾病命名为Bright病。Bright的这项发现,无疑使人们更加确信体液样本检测对疾病诊断的重大意义。不过,当时的检测是很简单的,只是将尿加热,观察是否有白色沉淀物形成,结果可提示有肾病的存在。因实验方法本身并不完善,很多人在做这项检测时常常得到相互矛盾的结果。某些“清蛋白类”物质只有加入某种化学试剂后才能沉淀,而另一些正常人的尿也会出现沉淀。由于上述这些问题及其不同意见,Bright的清蛋白检测方法长时间未被认可而不能在医学诊断中使用,然而实验室检查的原理毕竟会不断地拓展着临床医师的眼界,给他们增添了一只眼睛,从而使实验室检查方法和项目呈几何级数形式发展。到19世纪上半叶,医学实验诊断学发展越来越快,应用越来越广泛,利用实验室检查来诊断疾病已司空见惯。

Gabriel Andral(法国医师,1797~1876年)对这方面工作做出了重要贡献。他认识到体液化学分析的重要意义,并有效地说服了当时的医学界增加这方面的研究。他坚信,化学检测和显微

镜检查对于人体内的液相成分乃至固相成分都有重大价值。他所著的《病理血液学》(Pathological Hematology)记载了健康人和各种患者的血液化学分析、显微镜检查和肉眼观察的结果。他测定并计算了血液中的主要成分,并证实了贫血患者红细胞减少,而蛋白尿患者血浆清蛋白减少。他充满热情的工作获得了令人钦佩的成果,以致很多人紧步其后尘从事类似的研究工作。如对糖尿病患者的血糖和痛风患者血尿酸的研究确令世人瞩目。

血液病学首先从 Andral 工作中获益。在医学书刊中,医师们讨论红细胞定量计数板的研制及其在贫血诊断中的应用。所有这些检验包括对体液的化学检测和血液的显微镜检查,之所以能迅速发展的一个重要原因,是因为当时人们仍然以为放血疗法是一种治病的方式。这些新的检查方法,使人们对诸如贫血这样的疾病了解得更多,从而认识到采用放血疗法来治疗贫血显然是很不恰当的。血液可以用作实验研究的材料,但不应该白白地放掉。19 世纪下半叶是医学检验方法硕果累累的时代,名目繁多的检验方法如雨后春笋般地涌现,乃至临床医师在选择检测项目时竟不知孰优孰劣。新检验方法的常规使用主要有两个障碍,一是耗费时间,二是需要一定的仪器设备。医师们往往抱怨说他们没有时间来做这些实验,而且缺乏做这些实验所需要的专业知识,于是出现了很多问题。

化学成为医学各科都需要的重要工具。Paul Ehrlich(德国细菌学家,1854~1915 年)用化学染料检测尿液以诊断伤寒,用苯胺染色来区分不同类型的白细胞,从胃管中抽吸出胃内容物进行化学分析,以研究胃病等等。

当时的医学文献中充满了对各种检验方法的讨论,如新方法的长处以及老方法的缺点。在整个 19 世纪,诊断实验室是从两个方面同时得到发展,即学术方面和管理政策方面的发展。起初,医学学校(medical school)不具有大学(university)的地位,进入 19 世纪后,医学学校才有了相当于“学院”(college)的地位。大约与此同时,医用化学(medical chemistry)从化学中分离出来,其范围大体相当于现代的普通化学或有机化学。因为有机化学被认为是更纯粹的科学,因而更倍受尊重,而生理化学(physiological chemistry)则成为生理学的一个组成部分,不具有自身独立的学术地位。但有一个令人瞩目的例外,德国巴登符腾堡州的 Tübingen 大学在 1845 年设立了生理化学主席的位置,首任此职的是 Julius Schlossberger,负责医学系中所有的化学教学,接替他的是 Felix Hoppe-Seyler。由于他们的才干和建树,该位置一直延续到 20 世纪初,以后担任该职的都是有机化学家或生理化学家。在别的大学中没有类似的专业结构位置。直到美国的医学院中设立了生理化学的课程后,生理化学的地位才稳固起来。在美国,第一个生理化学实验室是 1874 年于耶鲁大学的 Sheffield 理学院(scientific school)里,在 Russell H. Chittenden(美国生理化学家,1856~1943 年)指导下建立的,随后在美国其他各主要大学中也迅速地建立起类似的实验室。在当时的美国大学里,系的机构负责教学、指导科研、向有学位证明的申请人授予专业职称,这些系成为大学及其以后医学院的组成部分。对医学生的实验操作技能,是在前期教育和医学教育的生物学和化学实验室中完成。19 世纪美国医学的另一重大进展是医院的出现。到 19 世纪中叶,医院中已设置专门实验室进行尿液分析,并为开展实验室工作拨出了一定的经费。送检的标本数量最多的是尿液。据记载,在当时著名的 Eastern 医院中尿液分析已成常规。到 19 世纪末,医院又增设了病房实验室。后者与主实验室相比,规模较小,开展的项目较少。这种小实验室更接近患者,可由临床医师和病房工作人员操作,可缩短获得检验结果的时间。实际上这两种实验室都在发展中,都需要一定的财力支持来维持其运作。

医院中的检验工作人员逐渐专业化, Otto Folin(美国生理化学家,1867~1934 年)和 William

Osler(加拿大医师)两位医师在这方面起了重要作用。Folin 在 1908 年的讲演中提议,实验室应当以医院为基础,应由受过专业训练的生理化学家操作;而 Osler 则肯定地指出:实验室对临床医师而言具有不可低估的价值。当医师由于倡导并参与实验室检测而在学术界成为有影响、有地位的人物时,检验实验室在医院中的地位就随之持久地稳定下来。随着检验实验室在医院中建立和发展,各个医院都开始考虑如何向患者提供更为完善的服务。从对 20 世纪初几家医院记录的综述报告中发现,即使大多数患者并没有做尿液检查指征,但都做了检查。这些尿液检查方法不断被改进,直至今今天有些检测项目还在常规地开展。检测血液和其他体液的新项目也相继建立。许多闻名遐迩的医师名字都与临床医学实验室(clinical laboratory medicine)有联系,如 Folin、Benedict(美国生理学家,1884 ~ 1936 年)、Garrod(英国医师,1858 ~ 1936 年)、Koch(德国细菌学家,1843 ~ 1910 年)、van Slyke(美国生物学家)和 Ehrlich,他们当中的大多数就是这个时期崭露头角的。这是一个临床实验医学硕果累累的时代,很多新的研究成果被转化为临床诊断的检验项目。

糖尿病被研究了好几百年,总希望能找到较好的治疗途径。从美国宾夕法尼亚州医院保存的一些记录表明,当时尿糖测定已被用于监控糖尿病患者的治疗过程。糖尿病的治愈标准是尿糖阴性,因而必须每天检测尿糖。这是首次用实验室检测来监控治疗过程的记录。当胰岛素被发现后,由于监控胰岛素水平比较困难,故对糖水平的监控就显得更为重要。胰岛素制剂有不同的纯度,体外因素(如锻炼和节食)也能影响糖的水平,这就使胰岛素的使用剂量调整非常困难。测定血糖虽是一种可取的方法,但比较麻烦,所以定时测尿糖便成为常规项目。

新方法不断建立,并应用于临床为患者服务,然而新项目的增加至少带来了两个明显的问题,这些问题不断地困扰着临床检验实验室。首先,工作量不断增加,而且这种势头只增不减。第二,许多检测项目做起来既复杂又烦人。由于方法不够精确,故检验结果常有明显的出入。为此,Leonard Skeggs 提出了一个局部的解决办法,他首创了一种连续流式分析仪(continuous-flow analyzer)作为实验室用的组合装置。该项设计是用机械性重复操作取代手工操作,既能提高实验室所承担的工作量,又增加检测的精确性。检验的自动化已经历了好几代更新,才有今天现代化实验室,各种实验技术操作都靠自动化仪器完成。

四、新时代的医学检验学

在 21 世纪来临之际,临床诊断实验室也进入一个新的时期。各种形式的生物检测技术是现代临床实验室中飞速发展的崭新领域。从 1865 年孟德尔的植物杂交试验到今天的人类基因组计划,分子生物学正以挑战性的新姿态进入临床检验实验室。如同过去那样,研究成果正转化为可开展的临床诊断项目。由于分子生物学与多学科交叉协同,故它的发展比其他任何学科更快。孟德尔当年是用代数方法描述遗传单位,是以数学方式而不是以生物学方式对遗传学进行讨论。以后,所有科学都对分子生物学的形成和发展起着重要的推动作用。例如,1923 年 Richard Altman 分离出无蛋白的核酸,Fred Griffith 将非致病性细菌转化为致病性细菌的试验;1940 年,Osward Avery 在发生学上具有划时代意义的重大发现,Max Delbrück 和 Erwin Schrödinger 所提出的理论化学原理,使自然科学原理得到更广泛的应用,James Watson 和 Francis Crick 用数学方法推导出完整的 DNA 结构。作为一门基础科学,分子生物学的实验技术凝聚了很多科学家的心血。

相对于临床诊断实验室的全部发展历史而言,分子生物学扩展其可应用的信息范围刚刚开始。我们在本书中将临床诊断实验室的本质加以阐述。现代检验实验室能够检测那些已知与化学、血液学或病理解剖学相关的事件,而分子生物学使检验实验室有望成为预测性的,即现在

就能对将来可能发生的事件做出报告。这与根据血糖升高作出糖尿病的诊断完全不同,而分子生物学的新技术能作出患者已处于某种疾病危险的预测报告,使伦理学建议和遗传学咨询成为临床诊断实验室工作中不可缺少的部分。预防医学也从分子生物学新技术中获益非浅。如家族史提示某家族对某种特定疾病具有高度危险,实验室诊断能够指出该家族某个成员并无患该病的危险性,或指出该家族中确实有高度危险性的成员,其医疗措施就可早期介入,可以节省医疗费用,这对那些需要控制的人们来说具有明显的经济效益。

综上所述,可见医学检验实验室是在不断前进与挫折中发展。近年来,标本数量每年都在急剧上升,明显地超过了预计的以诊断为目的所需要的数量。原因之一可能是从20世纪中叶起,工薪阶层中的大部分人都能享受到公费医疗。在这种体制下,医院在提供医疗保健服务时几乎不用考虑费用了,因为这些费用都归单位支付。这就使得检验实验室处于盈利的位置。开展的项目越多,经济收入也越多。控制医疗费用并不能得到奖励,而且事实上,存在着多开展检测项目,就能多用人员,多购买仪器设备,这就导致了医学检验实验室工作量的大幅度增加。每项检测的费用虽然下调了,但由于检测项目增加了,以致总的检验费用还是增加了。随着新技术日趋成熟、稳定,紧接着就可能出现财政方面的矛盾,即一项新的检测项目费用可能比以前做多项老项目的费用还高。但早期明确诊断、早期医疗介入和遗传咨询,还是可以减少长期医疗保健的总费用,效益就是以这样的方式体现出来的。

参 考 文 献

1. Haber MH. Pisse prophecy: a brief history of urinalysis. Clin Lab Med. 1988, 8;415 - 430.
2. Rubln LP. A young woman taken to the doctor by her family. Mezzotint by Johann Andreas Pfeffel after an original painting by Jan Josef Horemans. J Hist Allied Sci. 1981, 36;488 - 489.
3. White WL. A new look at the role of urinalysis in the history of diagnostic medicine. Clin Chem. 1991, 37; 119 - 125.
4. Camec CNB. Imhotep to Harvey: Backgrounds of Medical History. Milford House, Boston, 1973.
5. Flint A. Remarks on the thermometer in diagnosis and prognosis, in Technology and American Medical Practice. 1880 - 1930, Howell JD ed, Garland Publishing. New York, 1988, 1 - 14.
6. Caraway W. The scientific development of clinical chemistry to 1948. Clin Chem. 1973, 19;373 - 383.
7. Reiser SJ. Medicine and the Reign of Technology. Cambridge University Press, Cambridge, 1978.
8. Howell JD. Technology in Hospital. The Johns Hopkins University Press, Baltimore, 1995.
9. Kohler RE. From Medical Chemistry to Biochemistry. Cambridge University Press, New York, 1982.
10. Chittenden RH. The Development of Physiological Chemistry in the United State. The Chemical Catalog Company, New York, 1930.
11. Meltes S. First call for clinical chemists in U. S. Clin Chem. 1983, 29;1852 - 1853.
12. Lewis L. Leonard Skeggs - a multifaceted diamond. Clin Chem. 1981, 27;1465 - 1468.
13. Miclos DA, Freyer GA. Themes in the development of DNA science, in DNA Science - A First Course in Recombinant DNA Technology. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1990, 4 - 9.
14. Blackburn MG, Gait MJ, eds. Introduction and overview, in nucleic Acids in Chemistry and Biology. IRL Press at Oxford University Press, 1990, 3 - 4.
15. Kay LE. The Molecular vision of life, Caltech, The Rockefeller Foundation, and the Rise of the New Biology. Oxford University Press, New York, 1993.

(齐 名)

第二章 临床基因诊断实验室的建立

一、建立临床基因诊断实验室的原则

1. 由省卫生行政部门依据区域卫生规划和临床需要进行统一部署,以省辖市为中心建立临床基因诊断实验室。

2. 建立实验室的单位应为三级医院及部分二级甲等医院,原则上一个省辖市建2~3个实验室。

3. 一个医疗单位只允许建一个收费临床基因诊断实验室。

二、建立临床基因诊断实验室的条件

(一) 人员

专业主管应具备本科以上学历、中级以上职称、从事本专业工作2年以上者;操作人员必须持证上岗。因此,上岗前必须进行培训。

1. 培训目的 使被培训人员掌握临床基因诊断基础理论知识、规范化操作方法、实验室防污染措施和了解基因诊断的进展。

2. 培训实施单位 由省临床检验中心组织实施。

3. 上岗证审批发放

(1) 对临床基因诊断培训合格的技术人员,由省卫生厅负责审批发放上岗证。

(2) 上岗证有效期3年,技术人员应定期接受再培训。

4. 培训教材和教学

(1) 临床基因诊断培训教材由临床基因诊断专家组负责编写。

(2) 培训计划和实施由临床基因诊断专家组负责完成。

(二) 环境

实验室面积不少于40 m²,无尘、无强磁场干扰及同位素污染。不得与其他实验室混用,必须有明显的生物危险标志和禁止无关人员进入的标志,保证实验室工作人员身体健康。

实验室按其功能分为四个独立的、有间隔的工作区。

1. 试剂准备区 面积不少于10 m²。

2. 样品处理区 面积不少于10 m²。

3. 基因扩增区 面积不少于6 m²。

4. 产物分析区 面积不少于14 m²。

人员及物品只能按1区到4区单向流动,不得反向。

(三) 仪器设备

实验室各区域有各自专用的实验设备和仪器,包括工作服、一次性消耗品、办公用品等,有

明显的标识或颜色标识,绝对不能混用。

1. 试剂准备区 超净台(或防污染罩),电子天平,台式离心机,振荡器,一套移液器和一次性带滤芯的枪头,冰箱。

2. 样品处理区 超净台(或防污染罩),普通天平,台式低温高速离心机,振荡器,抽吸器,水浴箱,一套移液器和一次性带滤芯的枪头,冰箱。

3. 基因扩增区 基因扩增仪,台式离心机,一套移液器和一次性带滤芯的枪头。

4. 产物分析区 振荡器,台式离心机,抽吸器,水浴箱,一套移液器和一次性带滤芯的枪头,冰箱,酶标仪及洗板机(PCR-ELISA 时使用)。

三、建立仪器使用的标准操作程序(SOP)

(一) 加样器校准标准操作程序(SOP)

1. 目的 保证加样器加样的准确性。

2. SOP 的变动 本 SOP 的改动,可由任一使用它的工作人员提出,并报经室负责人、科主任批准签字。

3. 使用加样器范围 各种品牌和型号的固定、可调和多通道加样器。

4. 校准方法

(1) 校准环境和用具要求:①室温:20~25℃,测定中波动范围不大于 0.5℃。②电子天平:放置于无尘和无震动影响的台面上,房间尽可能有空调。称量时,为保证天平内的湿度(相对湿度 60%~90%),天平内应放置一装有 10 ml 蒸馏水的小烧杯。③小烧杯:5~10 ml 体积。④测定液体:温度为 20~25℃的去气双蒸水。⑤选择校准体积:拟校准体积;加样器标定体积的中间体积;最小可调体积(不小于拟校准体积的 1%)。若为固定体积加样器,则只有一种校准体积。

(2) 校准步骤:①将加样器调至拟校准体积,选择合适的吸头;②调节好天平;③来回吸吹蒸馏水 3 次,以使吸头湿润,用纱布擦干吸头;④垂直握加样器,将吸头浸入液面下 2~3 mm 处,缓慢(1~3 秒)一致地吸取蒸馏水;⑤将吸头离开液面,并靠管壁,去掉吸头外部的液体;⑥将加样器以 30°角放入称量烧杯中,缓慢一致地将加样器压至第一档,等待 1~3 秒,再压至第二档,使吸头里的液体完全排出;⑦记录称量值;⑧擦干吸头外面液体;⑨按上述步骤称量 10 次;⑩取 10 次称量值的均值,作为最后加样器吸取的蒸馏水重量;⑪按校准结果调节加样器。

(二) 核酸扩增标准操作程序(SOP)

1. 目的 确保靶核酸扩增的准确性和有效性。

2. SOP 的变动 本标准操作程序的改动,可由任何使用它的工作人员提出,并报经室技术负责人、中心负责人批准签字。

3. 本 SOP 适用范围 核酸扩增。

4. 标准操作

(1) 核酸的扩增在后 PCR 区基因扩增室内进行。

(2) 反应管在样品制备室加入模板并混匀后带入该室,不再开盖;除非需在此进行操作。

若为巢式 PCR,第一次扩增的模板必须在本室从反应管中取出,并加入另一只反应管中,此操作不可返回扩增前区进行。

(3) 必须设立阴、阳性对照和质控,置于被检测临床标本之后同步扩增。

(4) 依据不同检测项目要求设定 PCR 工作程序,并备案记录;未经专业主管允许,不得随意更改。

(5) 扩增条件不一致的检测项目,不得一起扩增。

(6) 每月定期对扩增仪的温度等参数进行一次检测,并应有详细记录。

(7) 保持室内空气流通,当实验完毕后,应清洁、消毒工作台面。

四、试剂盒的选择与质检

(一) 试剂盒分类与组成

1. 核酸扩增方法 PCR、RT-PCR、转录依赖的扩增(TMA)、连接酶链反应(LCR)、链替代扩增(SDA)等。

2. PCR 检测方法 PCR-ELISA、PCR-膜上杂交(杂交梳)、荧光定量分析(TagMan、AmpliSensor、LightCycler、分子信标等)

3. 试剂盒 由核酸提取液、扩增试剂、检测试剂组成。

(二) 影响因素

1. 内在因素

(1) 引物及探针的纯度:A260/280 应 >2 或电泳时只有一条带。

(2) 缓冲液及 dNTP:缓冲液的 Mg^{2+} (或 Mn^{2+}) 的浓度及 pH;dNTP 的浓度。酶浓度及活性。

(3) 提取液:核酸提取的效率;核酸提取的简便性。

(4) 方法学设计:终产物的检测如 PCR-ELISA、杂交梳、半定量荧光分析法等;即时检测如定量荧光分析法。

2. 外在因素

(1) 运输:低温冷藏运输。

(2) 贮存:试剂盒的有效期一般为 6 个月,扩增试剂于 -20°C 下贮存,产物检测试剂于 $2\sim 8^{\circ}\text{C}$ 贮存。

(三) 质检

1. 包装 ①外包装:厂名厂址、检测项目、批准文号、批号和有效期等。②内包装:试剂瓶完整性、真空包装完整性、试剂品种完整性、有使用说明书等。

2. 考核盘 PCR 试剂的考核盘(Panel)由 20 份左右的原血清阴、阳性样本、2~3 份纯化核酸(DNA/RNA/cDNA)样本以及 3~5 份系列稀释阳性样本所组成。

(四) PCR 试剂盒的选用原则和办法

1. 原则 ①根据使用目的(治疗目的或监测目的);②根据所在实验室的技术特点;③根

据所在医院患者的承受能力。

2. 办法 ①参考试剂生产部门的信息广告;②参考同行对有关试剂盒的使用效果;③参考有关机构的综合评价(质检报告或 EQA 报告)。

五、实验室质量管理与规章制度

(一) 实验室规章制度

应建立工作人员岗位责任制、各分区规章制度,如基因扩增室规章制度。

1. 实验人员进入本室须穿本室专用黄色工作服,实验中须戴手套,手套需经常更换。
2. 每天实验开始前,清洁实验室和实验台,并应打开紫外线灯消毒 30 分钟。
3. 使用本室专用的、经灭菌处理的加样器和带滤芯的吸头。
4. 需在此进行操作的,如巢式扩增,第一次扩增的模板必须在本室内从反应管中取出,并加入另一只反应管中,此操作不可返回扩增前区进行。
5. 非全封闭性操作(即需开启反应管),应打开排风扇 24 小时排气,保持室内空气负压状态。
6. 使用本室专用的记录本和笔,做好实验记录。
7. 使用过的离心管、吸头须置于 1 mol/L HCl 溶液中浸泡,消毒后方可丢弃。
8. PCR 扩增室的物品不得带入扩增前区。
9. 实验完毕,要整理、清洁工作台面,打开紫外线灯消毒。

(二) 实验室质量管理总则

1. 质量管理的历史 实验室质量管理经历了三个阶段,即从 20 世纪 50 年代的统计学质量控制模式到 80 年代的 GLP 管理,进入 90 年代则依据 ISO 9000 族标准进行全面质量管理。医学检验实验室引用的标准为 ISO/IEC 导则 25,即我国等同采用的国家标准 GB/T 15481 - 1995“标准和检验实验室能力的通用要求”。

(1) 质量控制(quality control, QC):为达到质量要求所采取的技术操作和统计学活动、室内质控和室间质评活动,有六个步骤:确定控制对象→规定控制标准→确定检验方法→进行实际检测与获得实际数据→说明实际数据与规定标准之间的差异→提出相应改进措施。

(2) 良好的实验室实践准则(good laboratory practice, GLP):GLP 强调从样品收集到报告发出后解释的全过程质量管理,包括检验方法的质量水平和质量控制等内容,有以下几个步骤:技术人员的组成及培训→技术人员的管理→实验工作的组织管理→实验室的环境条件→实验方法及实验操作说明→设备、试剂、消耗品质量保证→样品收集、预处理、检验过程和试验结果报告程序的质量保证。质量保证(quality assurance, QA):为了提供足够的信任,并使产品或服务能够满足质量要求,包括使实验室管理者信任的内部质量保证和使服务或上级领导信任的外部质量保证。

(3) ISO 9000 族质量体系及质量认可制度:ISO 9000 是深化了 GLP 的全面质量管理理念,统一了各国存在差异的 GLP 标准,并以各种标准文件规定了质量活动的行为。随着 ISO 9000 通用标准在实验室的建立,将逐步实现实验室的认可制度。

2. 质量体系 为了对影响检验报告质量的技术、管理、人员、仪器等因素予以有效的控