



全国高等医药院校医学检验专业“十二五”规划教材

供医学检验等专业使用

郑芳 陈昌杰 ◆ 主编



临床分子诊断学

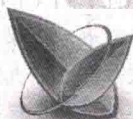
..... .

LINCHUANG FENZI ZHENDUANXUE



华中科技大学出版社

<http://www.hustp.com>



全国高等医药院校医学检验专业“十二五”规划教材

供医学检验等专业使用

临床分子诊断学

主 编 郑 芳 陈昌杰

副主编 梁 统 张 展 常晓彤

编 者 (以姓氏笔画为序)

马 佳 蚌埠医学院
王秀青 宁夏医科大学
伊正君 潍坊医学院
刘忠民 广州医科大学
庄文越 北华大学
邢少姬 包头医学院
张 红 成都医学院
张 展 郑州大学第三附属医院
张琳琳 郑州大学第三附属医院
李 猛 潍坊医学院
陈昌杰 蚌埠医学院
周 静 赤峰学院医学院
郑 芳 武汉大学医学部
姜 勇 吉林医药学院
常晓彤 河北北方学院
梁 统 广东医学院
熊陈岭 武汉大学医学部
蔡 贞 南方医科大学南方医院
编辑秘书
熊陈岭 武汉大学医学部



华中科技大学出版社

<http://www.hustp.com>

中国·武汉

内 容 简 介

本书是全国高等医药院校医学检验专业“十二五”规划教材。

本书充分结合了分子诊断学基本理论和技术以及当今国际分子诊断学在临床应用的最新成果。全书共分为十三章,主要包括分子诊断学基本理论和技术以及分子诊断技术的临床应用两大部分。前九章主要介绍临床分子诊断学的基本概念、基本理论、基本知识和技术;第十章至第十三章主要介绍分子诊断技术的临床应用,重点阐述分子诊断技术在感染性疾病、遗传性疾病、肿瘤、产前诊断以及法医鉴定等领域的应用。

本书主要作为高等医药院校医学检验等专业的教材,也可作为临床工作人员的参考书。

图书在版编目(CIP)数据

临床分子诊断学/郑芳,陈昌杰主编. —武汉:华中科技大学出版社,2014.5
ISBN 978-7-5680-0076-5

I. ①临… II. ①郑… ②陈… III. ①分子生物学-实验室诊断-医学院校-教材 IV. ①R446

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2014)第 100156 号

临床分子诊断学

郑 芳 陈昌杰 主编

策划编辑:荣 静

责任编辑:熊 彦

封面设计:范翠璇

责任校对:祝 菲

责任监印:周治超

出版发行:华中科技大学出版社(中国·武汉)

武昌喻家山 邮编:430074 电话:(027)81321915

录 排:华中科技大学惠友文印中心

印 刷:华中理工大学印刷厂

开 本:787mm×1092mm 1/16

印 张:19 插页:1

字 数:462 千字

版 次:2014 年 7 月第 1 版第 1 次印刷

定 价:48.00 元



本书若有印装质量问题,请向出版社营销中心调换
全国免费服务热线:400-6679-118 竭诚为您服务
版权所有 侵权必究

全国高等医药院校医学检验专业 “十二五”规划教材

编委会

主任委员 尹一兵 徐克前

委员(按姓氏笔画排序)

王庆林 湖南师范大学医学院
王晓娟 佛山科学技术学院医学院
尹一兵 重庆医科大学
刘永华 包头医学院
刘晓斌 延安大学医学院
权志博 陕西中医学院
邢艳 川北医学院
阮萍 绍兴文理学院医学院
吴俊英 蚌埠医学院
吴晓蔓 广州医科大学
张展 郑州大学第三附属医院
李艳 吉林医药学院
肖露露 南方医科大学南方医院
陈昌杰 蚌埠医学院

陈育民 河北工程大学医学院
郑芳 武汉大学医学部
姜儂 中山大学中山医学院
胡志坚 九江学院临床医学院
赵建宏 河北医科大学
夏薇 北华大学
徐克前 中南大学湘雅医学院
贾天军 河北北方学院
陶元勇 潍坊医学院
陶华林 泸州医学院
高荣升 佳木斯大学检验医学院
梁统 广东医学院
曾照芳 重庆医科大学

总序

ZONGXU

2011年《国家中长期教育改革和发展规划纲要(2010—2020年)》的颁发宣告新一轮医学教育改革的到来。教育部要求全面提高高等教育水平和人才培养质量,以更好满足我国经济社会发展和创新型国家建设的需要。近年来,随着科学技术的进步,大量先进仪器和技术的采用,医学检验也得到飞速发展。医学检验利用现代物理的、化学的、生物的技术和方法,为人类疾病的预防、诊断、治疗以及预后提供重要的信息。它在临床医学中发挥着越来越重要的作用。据统计,临床实验室提供的医学检验信息占患者全部诊疗信息的60%以上,因此医学检验已成为医疗的重要组成部分,被称为临床医学中的“侦察兵”。基于此,国家教育部2012年颁布的专业目录将医学检验专业人才培养定位于高水平医学检验技术人才的培养。

这些转变都要求教材的及时更新,以适应新形势下的教学要求和临床实践。但是已经出版的医学检验教材缺乏多样性、个性和特色,不适应新的教学计划、教学理念,与临床实践联系不够紧密。已出版的相关教材与新形势下的教学要求和人才培养不相适应的矛盾日益突出,因此,加强相关教材建设已成为各相关院校的目标和要求,新一轮教材建设迫在眉睫。

为了更好地适应医学检验专业的教学发展和需求,体现最新的教学理念,突出医学检验的特色,在认真、广泛调研的基础上,在医学检验专业教学指导委员会相关领导和专家的指导和支持下,华中科技大学出版社组织了全国40所医药院校的近200位老师编写了这套全国高等医药院校医学检验专业“十二五”规划教材。本套教材由国家级重点学科的教学团队引领,副教授及以上职称的老师占85%,教龄在20年以上的老师占70%。教材编写过程中,全体参编人员进行了充分的研讨,各参编单位高度重视并大力支持教材的编写工作,各主编及参编人员付出了辛勤的劳动,这确保了本套教材的编写质量。

本套教材充分反映了各院校的教学改革成果和研究成果,教材编写体系和内容均有所创新,在编写过程中重点突出以下特点。

(1) 教材定位准确,体现最新教学理念,反映最新教学成果,紧密联系最新的教学大纲和临床实践,注重基础理论和临床实践相结合,体现高素质复合型人才的要求。

(2) 适应新世纪医学教育模式的要求,注重学生的临床实践技能、初步科研能力和创新能力的培养。突出实用性和针对性,以临床应用为导向,同时反映相关学科的前沿知识和发展趋势。

(3) 实验课程教材内容包括基础实验(基础知识、基本技能训练)、综合型实验、研究创新型实验(以问题为导向性的实验)等,所选实验项目内容新、代表性好、实用性强,反映新技术和新方法。



(4) 实现立体化建设,在推出传统纸质教材的同时,很多教程立体化开发各类配套电子出版物,打造为教学服务的共享资源包,为学校的课程建设服务。

本套教材得到了医学检验专业教学指导委员会相关领导专家和各院校的大力支持与高度关注,我们衷心希望这套教材能为高等医药院校医学检验教学及人才培养作出应有的贡献。我们也相信这套教材在使用过程中,通过教学实践的检验和实际问题的解决,能不断得到改进、完善和提高。

全国高等医药院校医学检验专业“十二五”规划教材
编写委员会

前言

QIANYAN

为适应信息化社会和新世纪医学检验技术教育的要求,基于课程目标多层次和教学对象多元化的现状,《临床分子诊断学》教材充分结合了分子诊断学基本理论和技术以及当今国际分子诊断学在临床应用的最新成果。每章均设置了“知识链接”模块,既方便学有余力的本科生扩展课外知识,也不会给课堂学习增加负担,还利于本课程的深入学习。此外,也在实现本科教材的趣味化方面进行了尝试,为使教材生动和有吸引力,在部分章节中以病例或故事开始阐述,旨在调动学生的学习积极性。

全书共分为十三章,主要包括分子诊断学理论和分子诊断技术的临床应用两大部分。前九章主要介绍临床分子诊断学的基本概念、基本理论、基本知识和技术;第十章至第十三章主要介绍分子诊断技术的临床应用,重点阐述分子诊断技术在感染性疾病、遗传性疾病、肿瘤、产前诊断以及法医鉴定等领域中的应用。

本书主要供高等医药院校医学检验及相关专业本科和成人教育(专升本)各层次学生使用,也可作为医学系本科生和研究生必修课或选修课教材,还可作为临床检验工作者继续教育的参考用书。

在本教材编写中,得到了武汉大学、蚌埠医学院等全国 14 所高等医药院校的关心和支持,教材副主编梁统教授、张展教授、常晓彤教授为教材的编写做了大量认真细致的组稿、定稿和审稿工作,各位编委完成了许多撰稿和审稿工作,为教材的出版付出了艰辛的劳动。在此一并表示真诚的感谢!

虽然本教材编者已经尽心尽力、认真负责地完成了编写工作,但由于时间和能力有限,难免存在缺憾,不妥之处恳请使用本教材的广大读者提出宝贵意见,以便再版时完善。

郑芳 陈昌志

目录

MULU

第一章 绪论	/ 1
第一节 临床分子诊断学的概念和学科发展	/ 2
第二节 临床分子诊断学的应用	/ 5
第三节 临床分子诊断学的展望	/ 8
第二章 基因组及蛋白质组	/ 11
第一节 基因组	/ 12
第二节 蛋白质组	/ 28
第三章 生物信息学	/ 39
第一节 生物信息学	/ 39
第二节 常用生物信息学软件	/ 47
第四章 核酸与蛋白质的分离与纯化	/ 56
第一节 核酸分离与纯化的基本原则及技术路线	/ 56
第二节 DNA 的分离与纯化	/ 60
第三节 RNA 的分离与纯化	/ 68
第四节 蛋白质的分离与纯化	/ 71
第五章 核酸扩增技术	/ 79
第一节 聚合酶链式反应	/ 79
第二节 PCR 产物的不同检测技术	/ 85
第三节 衍生的 PCR 技术	/ 89
第四节 临床基因扩增实验室的质量控制	/ 102
第六章 核酸分子杂交技术	/ 112
第一节 核酸分子杂交	/ 112
第二节 核酸探针	/ 122
第三节 杂交信号的检测	/ 130
第四节 荧光原位杂交	/ 133
第七章 生物芯片技术	/ 140
第一节 生物芯片的概念和分类	/ 140
第二节 DNA 芯片	/ 141
第三节 蛋白质芯片	/ 150
第四节 芯片实验室	/ 153
第八章 核酸测序技术	/ 159



第一节	第一代测序技术	/ 159
第二节	第二代测序技术	/ 163
第三节	第三代测序技术	/ 168
第九章	分子克隆技术	/ 171
第一节	分子克隆的工具	/ 171
第二节	重组基因的导入策略	/ 182
第三节	重组子的鉴定	/ 184
第十章	感染性疾病的临床分子诊断	/ 187
第一节	病毒性疾病的临床分子诊断	/ 188
第二节	细菌性疾病的临床分子诊断	/ 195
第三节	特殊病原体的临床分子诊断	/ 202
第四节	医院感染的临床分子诊断	/ 206
第十一章	遗传性疾病的临床分子诊断	/ 211
第一节	单基因遗传病的临床分子诊断基本流程	/ 211
第二节	多基因遗传病的关联分析	/ 222
第三节	线粒体疾病的临床分子诊断	/ 228
第十二章	肿瘤的临床分子生物学检验	/ 235
第一节	肿瘤相关基因	/ 236
第二节	肿瘤的临床分子生物学检验	/ 241
第三节	临床分子诊断在肿瘤个体化医疗中的应用	/ 253
第十三章	分子诊断技术的其他临床应用	/ 261
第一节	分子诊断技术在移植配型中的应用	/ 262
第二节	法医鉴定中的应用	/ 268
第三节	产前诊断	/ 277
中英文名词对照		/ 286
参考文献		/ 291

第一章 绪论

学习目标

掌握:临床分子诊断学的概念。

熟悉:临床分子诊断学的应用。

了解:临床分子诊断学的应用前景。

案例分析

今天,雷弟博士的同行兼好友介绍了一个病例,说他们医院整形外科诊室新来了两位患者。这两位患者是一对姐妹,但其女性的第二性征都不明显,相反她们嗓音粗哑,有喉结,体内的总睾酮水平远远高于普通男性,超声未见睾丸仅见幼稚的子宫和卵巢,外生殖器也表现出两性畸形。染色体核型分析的结果提示两名患者的核型是46,XX。患者要求进行整形手术。然而,摆在整形外科手术医生面前的问题是“整形为男性还是女性对患者更合适?”对患者的基因检测发现两名患者的父母虽然不是近亲,却都不幸是21-羟化酶基因不同突变的携带者。两名患者均继承了父母双方各一个突变,成为复合杂合突变患者,导致21-羟化酶活性严重低下,雄激素前体物质代谢障碍,雄激素堆积。女性患者出生即表现出两性畸形和雄激素增高的症状和体征,属于假两性畸形。鉴于这种情况,虽然患者有整形成为男性的强烈愿望,医生还是建议其整形为女性。

以上介绍了一个单基因遗传病“临床分子诊断”的典型例子,帮助医生选择了一种适合患者的手术模式,也为明确患者的诊断及选择后续的治疗方案提供了重要的根据和线索。实际上这种假两性畸形基因突变的携带者(也就是患者的父母),如果进行临床分子诊断的筛查,并且在妊娠期进行产前的分子诊断,同时在胚胎期就对患儿进行早期干预,可以预防疾病的发生。运用临床分子诊断技术可以改变患者自身和家庭的命运。

其实,“临床分子诊断学”并不仅仅局限于以上的单基因遗传病的分子诊断,它目前已经广泛地应用到感染性疾病的病原体和耐药性检测、肿瘤的个体化医疗、亲子关系鉴定和移植配型等医学领域中,而且随着科技的进步,其应用领域还在不断地扩展。今天,就让我们来学习这门“临床分子诊断学”,并尽力推动该学科在临床的实践,以帮助更多的患者。



知识链接

单基因遗传病

单基因遗传病是单个基因发生突变导致的疾病。据在线《人类孟德尔遗传》(OMIM) 统计,有超过 6000 种人类疾病是由于单个基因的缺陷引起的。常见单基因遗传病的遗传方式符合孟德尔遗传规律。通常在罹患单基因遗传病的家族成员中,后代是否会患病也可通过检测基因突变来预测。导致人类患上单基因遗传病的因素常常是某一个等位基因的突变造成的。单基因遗传病可通过多种遗传方式由患者传递给其后代,见图 1-1 和图 1-2。

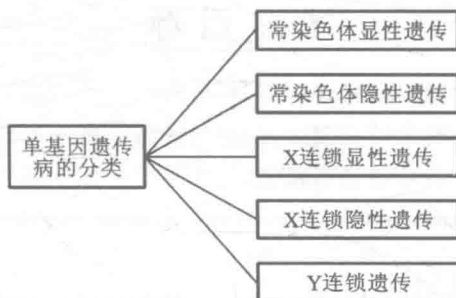


图 1-1 单基因遗传病按不同遗传方式分类

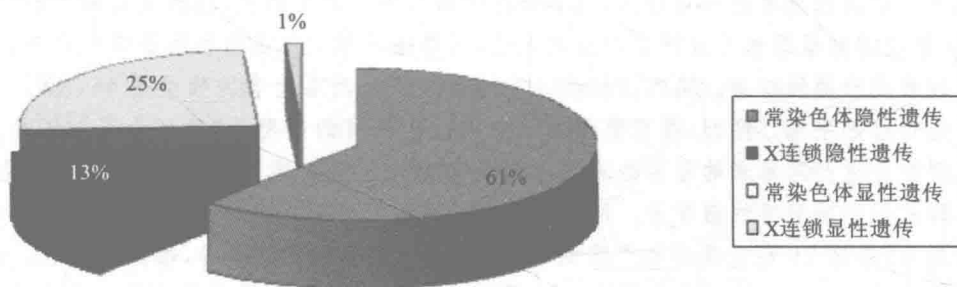


图 1-2 单基因遗传病不同遗传方式的比例



第一节 临床分子诊断学的概念和学科发展

一、临床分子诊断学的概念

临床分子诊断学是以分子生物学的理论为基础,采用分子生物学的方法和技术检测人体内的生物大分子的变化,从而为疾病的早期预警、诊断、治疗和预后提供辅助手段的应用科学。

临床分子诊断学的研究对象是在临床上影响健康或疾病状态的生物大分子,寻找其致

病的分子机制,从而建立临床诊断、治疗监测和预后评估的辅助分子诊断方法。

分子诊断相比临床常用的细胞学检验、生化检验、免疫学检验等的区别在于,前者是从基因型的角度检测疾病发生、发展的规律,后者均是从疾病的表型出发研究疾病的致病机制;由于表型的诊断往往预示着疾病的中晚期,而基因型的诊断能够在疾病发生前预测疾病的可能性,实现疾病的预警和早期干预。

二、临床分子诊断学的学科发展

临床分子诊断学来源于分子生物学,是分子生物学的临床应用学科。临床分子生物学的学科发展还要从分子生物学谈起。

分子生物学是分子水平的生物学,是在分子水平研究生命现象的科学,它研究的是生物大分子如核酸与蛋白质的结构、功能和生物大分子之间的相互作用。在分子生物学的学科发展史上,有几件大事(图 1-3)。首先是 19 世纪后期法国学者 Louis Pasteur 发现了细菌。随后 20 世纪初期,Buchner 兄弟发现酵母的无细胞提取液可以使糖发酵,人们开始认识到更细分的细胞成分也可能完成细胞的功能。接着,又发现了许多在细胞生命活动中起重要作用的酶和其他蛋白质大分子,开启了分子生物学的新纪元。第二件大事是 1953 年 Watson 和 Crick 提出的 DNA 双螺旋结构,阐释了 DNA 复制的原理,使人们认识到 DNA 而非蛋白质,才是遗传物质的载体。此后对 DNA 的研究成为分子生物学研究的热点,促使了遗传密码的破译。第三件大事是 1978 年 DNA 重组技术的问世。最初是 DNA 重组技术的一系列基础材料例如 DNA 聚合酶、RNA 聚合酶、逆转录酶、mRNA 和质粒等被发现。然后建立了 DNA 重组子的导入技术,标志着基因工程技术时代的到来。科学家利用 DNA

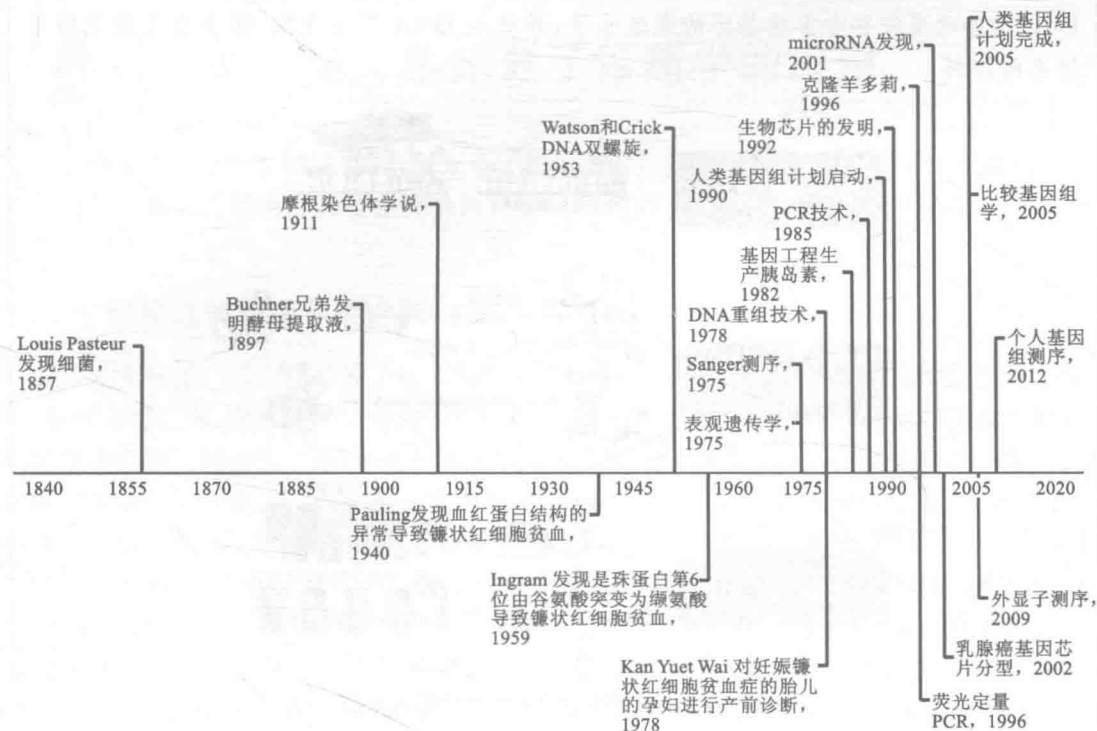


图 1-3 分子生物学和临床分子诊断学大事记



重组技术合成人工胰岛素救治糖尿病,生产单克隆抗体,建立疾病血清学诊断、预防和治疗的方法。

如果说细胞遗传学的染色体核型分型技术仅仅能够检测染色体数目和结构的大的改变,分子生物学领域的比较基因组杂交技术则能够将疾病的缺陷基因准确地定位到染色体短臂或长臂的某区某带。21 世纪人类全基因组计划启动和完成,第一次全面地描绘了人类遗传物质的蓝图,使检测疾病致病基因的单个碱基的改变成为可能。如今高通量测序技术的发展和人类全基因组测序仪的出现,实现了在一天内检测一个个体全部基因组的 DNA 碱基序列的梦想,这意味着基因组测序技术正在走进临床实践,逐步“飞入寻常百姓家”。

对基因的研究揭示了基因对表型的重要指导作用,而表观遗传学将环境对遗传物质的影响揭示开来。表观遗传学的主要研究对象也是核酸等生物大分子,它是指 DNA 序列在不发生改变的情况下,可以影响表型变化并通过体细胞遗传的现象,也称为后生遗传。表观遗传学研究使人们意识到人工辅助生育向卵细胞胞质中注射精子出生的儿童,由于介入了表观遗传学的关键发育期,患遗传病 Prader-Willi 和 Angleman 综合征的概率升高。

知识链接

表观遗传学

表观遗传学(epigenetic)是指 DNA 序列在不发生改变的情况下,可以影响表型变化并通过体细胞遗传的现象,也称为后生遗传。目前表观遗传学的研究主要包括 DNA 共价修饰和组蛋白修饰、染色质重塑和非编码 RNA 调控(如 miRNAs 调控作用),见图 1-4。这些改变往往会影响基因的表达水平,并受到 DNA 甲基化酶、组蛋白乙酰化酶等因素的控制。

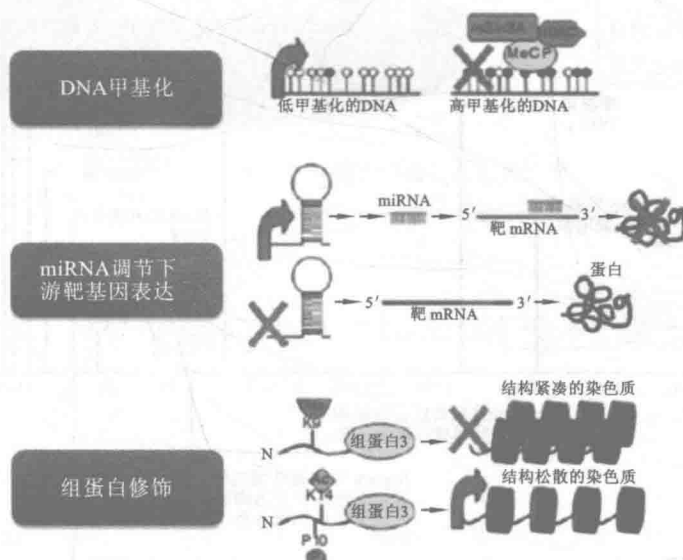


图 1-4 表观遗传学目前主要的研究内容

在这样一个分子生物学理论和技术大爆炸的时代,对分子生物学理论和技术的需求应运而生,从而产生了临床分子诊断学。镰状红细胞贫血症的分子诊断是分子生物学在临床应用的首个例子,也是临床分子诊断学的奠基石。镰状红细胞贫血顾名思义,是以红细胞变形为镰状为特征的常见贫血病。这种镰状的红细胞不具备正常红细胞的功能,导致患者出现严重的贫血。1940年 Pauling 发现镰状红细胞贫血症的病因是血红蛋白结构的异常,1959年 Ingram 则进一步发现这一异常的原因是珠蛋白第6位氨基酸由谷氨酸突变为缬氨酸。1978年华裔科学家 Kan Yuet Wai 利用 DNA 多态性与致病基因的相关性,第一次对妊娠镰状红细胞贫血症胎儿的孕妇成功地进行了产前诊断,此举开创了临床分子诊断学的时代。从此,分子诊断成为疾病诊断和治疗监控的重要辅助手段。

随着1985年PCR技术和1996年美国ABI公司建立的荧光定量PCR的问世,分子生物学技术更加普遍地应用到医学领域。感染科医生需要进行病毒和细菌的荧光定量PCR检测以明确患者的感染状况和监测治疗效果。20世纪90年代发明的生物芯片使得内科医生可以采用基因芯片技术对患者进行分类,评价患者对药物的敏感性和代谢动力学,以确定用药策略和药物剂量。放化疗科的医师通过对肿瘤发生通路上靶向标志物的基因测序预测患者的药物反应,估计化疗药物耐药性产生的可能性,确定不同的治疗方案;遗传学家们更需要分子诊断学技术对遗传病进行基因诊断,明确疾病的病因以便于开展产前诊断和早期预防。

所有这些分子生物学技术在临床辅助诊断领域的应用所涉及的理论和技术,都可以称为临床分子诊断学。



第二节 临床分子诊断学的应用

在临床分子诊断学领域,医学和分子生物学的结合使得医学研究上升到全新的分子水平。医学逐渐自此呈现出从经验决策向科学决策的转变,从疾病表型的研究深入到基因水平。

一、病原体的临床分子诊断

首先被临床广泛应用的分子诊断技术是对病原微生物的检测。许多病原微生物如病毒、结核分枝杆菌、衣原体等的分离和培养都存在一定的难度,对其抗体的检测又存在窗口期的检测限制。所谓窗口期,是指病毒或其他病原体侵入机体以后,机体需经过一段时间才能产生对应的抗体。这段时间病原体已经在体内存在,却检测不到抗体,称作窗口期。在这一时期,病原体的检测要大大地依赖于对病原体核酸的检测。利用病原体和人体基因组序列的差异,采用敏感的PCR技术检测病原体微生物基因组,不仅可以明确病原体的载量,结合其他的核酸分析技术如测序,而且可以明确病原体的基因型,分析病原体的耐药性和致病强度。目前临床实验室开展较多的病原体检测项目就是乙肝病毒的荧光定量PCR检测,不仅可以明确乙肝病毒的载量,评估抗病毒治疗的效果,而且可以进行乙肝病毒的基因分型和耐药性分析。而对人类乳头瘤病毒(HPV)的分型检测,是判断病原体致病毒力的案例,可以辅助妇瘤科医师对感染不同型别的HPV患者采用不同的随访和复查方案。



二、肿瘤的个体化医疗相关诊断

肿瘤性疾病由于其发病机制复杂,异质性强,致死率高,一直是医学领域的难点和重点。对遗传背景明确的肿瘤如家族性乳腺癌、大肠息肉病,可以采用早期分子诊断和手术干预,来预防肿瘤的发生。而其他一些散发的肿瘤,也已经发现了其某些共通的发病通路。然而即使是同一种类型的肿瘤,在不同的患者身上发生的机制也是不同的,而且患者对化疗药物的代谢机制和能力也不一样。以放化疗为主的肿瘤性疾病的治疗手段,对人体的正常机能有很大的损伤,甚至有不少的患者死于过度治疗引起的并发症而非肿瘤本身。医师需要尽快地确定对患者有益的治疗方案,以免延误病情。因而患者需要区别对待,给予“量体裁衣”式的治疗方案。然而如何评判化疗药物的有效性呢?分子诊断技术通过对肿瘤患者外周血和肿瘤组织特定基因的分型,能够预测患者对化疗药物的不良反应和治疗效果,为临床医师选择治疗方式提供帮助。如鉴于表皮生长因子受体(epithelial growth factor receptor, EGFR)通路在肿瘤性疾病的发病机制中所起的关键作用,通过检测 EGFR 的表达水平和基因突变,并基于 EGFR 基因不同的突变位点对药物的敏感性不同,有的突变是对药物敏感,有的突变容易导致耐药,建议调整药物剂量或换药。

三、遗传性疾病的临床分子诊断学

遗传性疾病(简称遗传病)一直以来是被临床医生忽略的一个领域,因为遗传性疾病大都没有好的治疗方法,进行疾病的分子诊断和后期的预防有一定的难度。

在大家系中采用连锁分析的方法可以定位疾病的致病基因位点,甚至在致病基因不明确的情况下,根据家系中患者共有的单体型(单倍型)对个体患病与否做出准确的判断。在遗传学上有多个这样的例子,X染色体隐性遗传的进行性肌营养不良的诊断就常常采用这一方法。通过对先证者(第一个患者)X染色体单体型分析明确致病的那条X染色体,对其他的个体通过X染色体单体型分析,就可以明确诊断。然而由于现代社会的家庭小型化,以往的遗传病大家系已经很少见了。连锁分析由于目前的家庭小型化而无法施展。

知识链接

连锁分析,单体型

连锁分析:基因定位克隆方法的核心内容。它是基于家系的研究,先采用遗传标记(STR或SNP),对家系中的成员进行基因分型(genotyping),随后运用统计方法估算家系中遗传标记是否与疾病共分离(图1-5)。根据孟德尔遗传规律中的分离率,如果同一染色体上的遗传标记和致病基因位点不连锁,那么遗传标记与致病基因位于同一单倍体或不同单倍体的机会各占一半,反之则提示存在连锁。只要家系足够大可提供足够的遗传信息,按孟德尔遗传规律传递的疾病就可以实现致病基因的定位。

单体型:每个基因的一整套单等位基因组成的一个基因型,或者一条染色体上紧密连锁的两个或两个以上的遗传标记组成的基因型,通常作为一个遗传单位传递给后代(图1-6)。

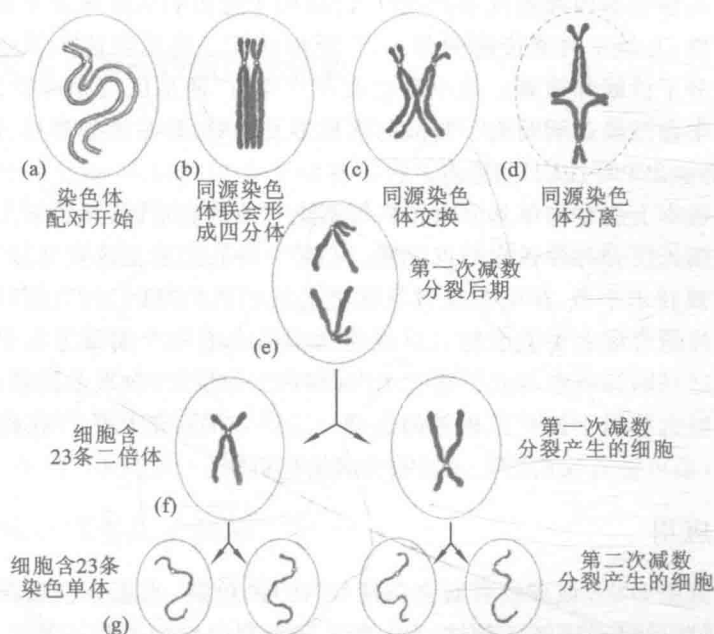
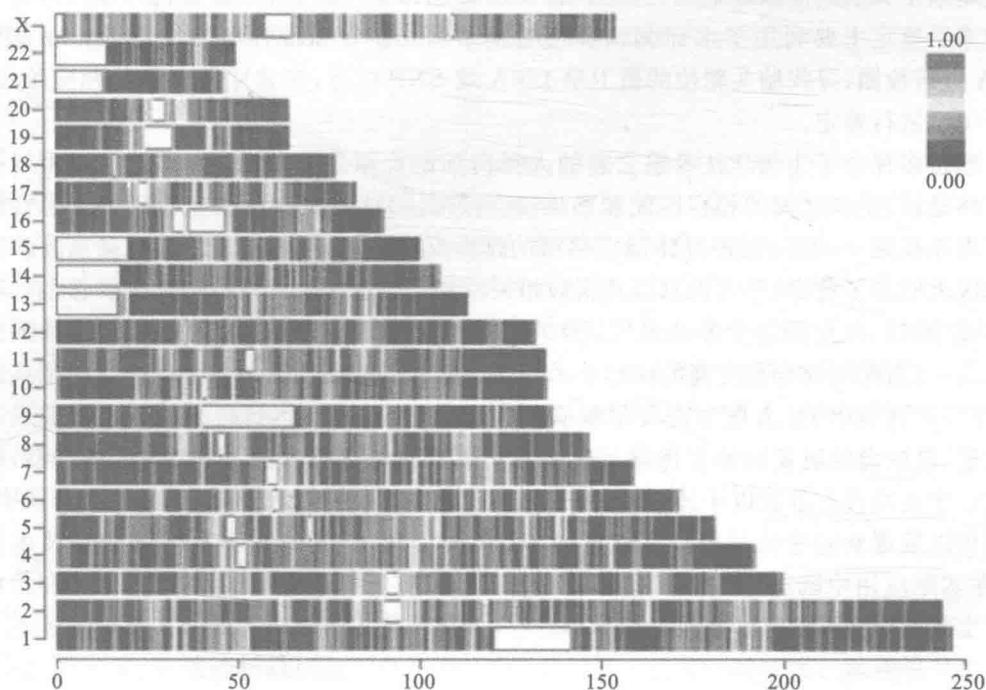


图 1-5 连锁分析原理图

图 1-6 *Nature* 杂志染色体单体型示意图

注: LD 值越大的区域越可以作为一个整体(单体型)遗传。



幸运的是,到目前为止大多数单基因遗传病都已经明确其致病基因。于是针对小型家系和散发患者的候选基因筛查技术,也被广泛应用于遗传病的临床分子诊断。然而这种工作模式的有效性,有赖于对遗传病的深入、广泛地认识。我国在这一领域的突出贡献是对地中海贫血的分子诊断和筛查。地中海贫血在广东、广西地区有很高的发病率,我国的遗传病分子诊断学者已经逐渐明确了我国的常见多发突变,针对这些常见多发突变设计的检测方法,可以筛查出 90% 以上的患者。

然而由于基本上所有的单基因遗传病都不止一种致病基因,其致病的突变形式也多种多样,有缺失、插入还有各种各样的点突变。在某个种族的常见致病基因不明确的情况下,利用现有的常规技术手段,去寻找某种特定遗传病的致病基因位点,需针对疾病可能的候选基因的不同片段合成上十条引物。对遗传病家系中的每个成员进行 PCR 扩增再测序。一个家系的候选基因筛查常常要扩增上千次,存在工作量大、效果差的缺点,大约有 1/3 的家系在已知的候选基因上找不到相关的突变。这一方面可能因为存在尚不清楚的疾病致病基因,另一方面可能有我们所不知道的疾病发病机制。

四、其他应用

通过对微卫星 DNA 或单核苷酸多态性(SNP)的检测,临床分子诊断还被用于个体的基因分型,从而被运用于法医学领域。对个体基因型的检测可以判断生物检材的个体归属,个体之间的血缘关系,如亲子关系或亲戚关系。随着经济的快速发展,在孩子出生之前就确定亲子关系的需求越来越大,尤其在发达的地区和国家,增长趋势较为显著。目前的产前亲子鉴定主要利用羊水穿刺或者绒毛膜穿刺及脐带血取样等方法获取胎儿基因组 DNA 进行检测,寻找胎儿靶位的微卫星 DNA 或 SNP 位点,对比胎儿亲属的相应位点,对亲子关系进行鉴定。

通过多种分子生物学技术建立起的人类白细胞抗原(HLA)基因分型技术,可以提高器官移植供、受体之间的相容匹配和移植物存活率。HLA 是迄今为止发现的多态性最高的基因系统之一,它与同种异体器官移植的排斥反应密切相关,而且该基因的高度多态性在法医上的亲子鉴定、个人识别以及疾病相关性和人类进化研究方面也起重要作用。在器官移植中,HLA 配型是十分必要的,HLA 相容性程度是决定移植物能否长期存活的主要因素之一,而配型吻合程度高的移植手术成功的概率普遍高于吻合程度低的。临床实践表明,在器官移植中 HLA 配型需要尽量满足高分辨分型,只有达到高分辨分型才能提高配型效果,使患者的康复更加有保障。现在基于高通量测序技术的 HLA 高分辨配型,仅仅通过一次实验可获取数以千计样本的 HLA 序列数据,并达到 HLA 分型的最高分辨率,同时还可以发现新的等位基因。高通量的 HLA 分型技术,其成本不及传统分型技术的一半,在实际应用中既能避免多次配型带给患者的经济负担和精神压力,也为配型和治疗节约了宝贵的时间。



第三节 临床分子诊断学的展望

虽然临床分子诊断学逐渐形成其完善的理论和知识体系,也已经在临床医学的很多方