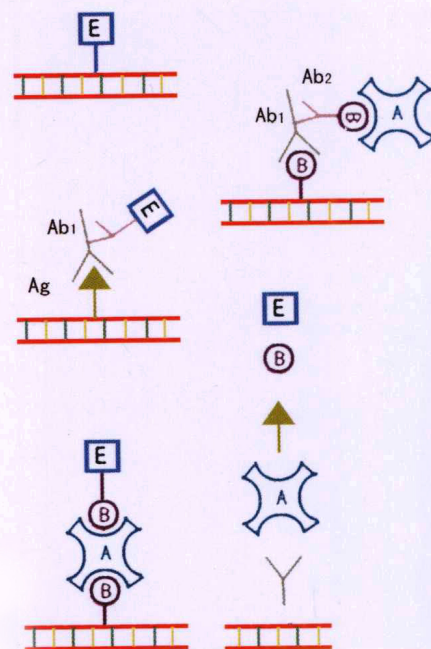




全国高等医药院校医学检验专业规划教材

分子 诊断学

(第2版)



FENZI
ZHENDUAN
XUE

主编 吕建新 尹一兵

 中国医药科技出版社

全国高等医药院校医学检验专业规划教材

分子诊断学

第 2 版

 中国医药科技出版社

内 容 提 要

本书是全国高等医药院校医学检验专业规划教材之一。全书共 14 章。第一章为绪论；第二章至第三章着重叙述基因与基因组、分子克隆等基础理论；第四章至第九章介绍 DNA 测序技术、PCR 技术、核酸分子杂交技术、蛋白质分析技术、生物芯片技术等；第十章至第十四章在探讨分子诊断基本策略与方法的基础上，详细介绍感染性疾病的分子诊断、单基因疾病的分子诊断、复杂基因疾病的分子诊断、移植配型、法医学鉴定、单核苷酸多态性分析以及生物信息学在分子诊断中的应用。本书内容新颖、叙述严谨、文字精炼，并有大量彩图。

本书可供高等院校医学本、专科层次和成人教育（专升本）层次检验专业及其相关专业学生用作教材，也可作为临床检验工作者、继续教育和职称考试的参考用书。

图书在版编目（CIP）数据

分子诊断学/吕建新，尹一兵主编. —2 版. —北京：中国医药科技出版社，2010. 2

全国高等医药院校医学检验专业规划教材

ISBN 978 - 7 - 5067 - 4537 - 6

I. ①分… II. ①吕… ②尹… III. ①分子生物学 - 实验室诊断 - 高等院校 - 教材 IV. ①R446

中国版本图书馆 CIP 数据核字（2009）第 239433 号

美术编辑 陈君杞

版式设计 郭小平

出版 中国医药科技出版社

地址 北京市海淀区文慧园北路甲 22 号

邮编 100082

电话 发行：010 - 62227427 邮购：010 - 62236938

网址 [www. cmstp. com](http://www.cmstp.com)

规格 A4

印张 $16\frac{3}{4}$

字数 402 千字

初版 2004 年 8 月第 1 版

版次 2010 年 2 月第 2 版

印次 2010 年 2 月第 2 版第 1 次印刷

印刷 世界知识印刷厂

经销 全国各地新华书店

书号 ISBN 978 - 7 - 5067 - 4537 - 6

定价 45.00 元

本社图书如存在印装质量问题请与本社联系调换

全国高等医药院校医学检验专业规划教材建设委员会

主任委员 丛玉隆（解放军军医进修学院）

副主任委员（以汉语拼音为序）

樊绮诗（上海交通大学）

胡丽华（华中科技大学）

刘新光（广东医学院）

吕建新（温州医学院）

王 前（南方医科大学）

吴忠道（中山大学）

姚 智（天津医科大学）

尹一兵（重庆医科大学）

委 员（以汉语拼音为序）

陈育民（河北工程大学）

洪秀华（上海交通大学）

胡建达（福建医科大学）

胡翊群（上海交通大学）

李咏梅（北华大学）

刘 辉（大连医科大学）

刘成玉（青岛大学）

吕世静（广东医学院）

王 辉（新乡医学院）

徐克前（中南大学）

姚群峰（湖北中医学院）

张进顺（河北北方学院）

吴俊英（蚌埠医学院）

郑铁生（江苏大学）

秘 书 长 王应泉（中国医药科技出版社）

办 公 室 解秀兰（中国医药科技出版社）

浩云涛（中国医药科技出版社）

王宇润（中国医药科技出版社）

出版说明

全国高等医药院校医学检验专业规划教材是由全国高等医药院校医学检验专业规划教材建设委员会组织规划,全国数十所医药院校积极参与编写和使用,中国医药科技出版社出版的全国性医学检验专业教材。本套教材是国内第一套四色印刷的医学检验专业教材,自2004年出版以来,由于其新颖独到的编排设计、图文并茂的四色印刷、与临床紧密结合的实用性,深受广大教师和学生的欢迎,获得了良好的市场效应,为我国的检验专业本科教育做出了重要贡献。

为适应我国医学检验专业本科教育发展的需要,全国高等医药院校医学检验专业规划教材建设委员会在调研和总结一版教材质量和使用情况的基础上,组织上海交通大学医学院、中山大学医学院、华中科技大学同济医学院、中南大学湘雅医学院、南方医科大学、温州医学院、青岛大学医学院、重庆医科大学、新乡医学院等数十所院校的教师共同进行第二轮规划教材的编写修订工作。

第二轮规划教材的编写修订工作,坚持紧扣教育部、卫生部对医学检验专业本科教育的培养目标,以新的医学检验专业教育纲要为基础,以临床实际需求为指导,着重强调培养目标与用人要求相结合的原则,注重体现“三基”(基本理论、基础知识和基本技能)、“五性”(思想性、科学性、先进性、启发性和适用性)。在继承上一版教材优点的基础上,有以下创新:①新增补《临床检验仪器》和六本配套实验指导教材,让本套教材体系更趋完善;②理论课教材每章前保留学习要点,部分教材章后增加病例分析和小结,加强系统性;③原中英文或英中文对照升级为汉英或英汉名词索引,便于查找;④新增大量彩图,版面设计更美观、更活泼、更趋人性化;⑤实验指导更注重全面提高学生动手能力和综合分析解决问题的能力,所选实验更新、更全、更实用。

该套教材主要供全国高等医药院校医学检验及相关专业的学生使用。全套教材书目如下:

- | | |
|-------------------|----------------------|
| 1. 临床检验基础(第2版) | 2. 临床检验基础实验指导★ |
| 3. 临床生物化学检验(第2版) | 4. 临床生物化学检验实验指导(第2版) |
| 5. 临床血液学检验(第2版) | 6. 临床血液学检验实验指导★ |
| 7. 临床微生物学检验(第2版) | 8. 临床微生物学检验实验指导★ |
| 9. 临床免疫学检验(第2版) | 10. 临床免疫学检验实验指导(第2版) |
| 11. 临床寄生虫学检验(第2版) | 12. 临床寄生虫学检验实验指导★ |
| 13. 分子诊断学(第2版) | 14. 分子诊断学实验指导★ |
| 15. 临床输血检验(第2版) | 16. 临床输血检验实验指导★ |
| 17. 临床实验室管理(第2版) | 18. 临床检验仪器★ |

注:★表示本轮规划教材建设的新增品种。

全国高等医药院校医学检验专业规划教材建设委员会

2010年1月

前言

20 世纪 50 年代, DNA 双螺旋结构模型的提出标志着分子生物学作为一门独立学科的诞生。70 年代以来, 分子生物学已成为生命科学最具有活力的学科前沿领域, 随着分子生物学理论、技术和方法不断地被应用于临床医学, 分子生物学在疾病的预防、预测、诊断、治疗和疗效评价等诸方面发挥着愈来愈重要的作用。分子生物学与临床医学的广泛交叉和渗透, 产生了一个崭新的学科方向——分子医学。70 年代末, 首次利用分子杂交技术检测 β 珠蛋白突变并阐明镰状细胞贫血的分子致病机制, 标志着基因诊断技术的问世。80 年代以来, PCR 技术、核酸杂交技术、DNA 测序技术、芯片技术、生物质谱技术等的发展, 特别是 21 世纪以来, 基因组学、转录组学、蛋白质组学、代谢物组学等的快速崛起, 循证医学和系统生物学观点的引入, 临床检验诊断学赋予了自动化、简便化、分子化、标准化、信息化、安全化、国家化等新的特点, 基因诊断从核酸等生物大分子拓展到基因表达的产物及代谢产物等生物小分子, 并由此发展为分子诊断学。分子诊断学作为分子医学的重要组成, 从研究人体内源性或外源性生物分子和生物分子体系的存在、结构及表达调控的变化, 发展到为疾病病因诊断以及疾病预测提供信息和依据。因此, 分子诊断已迅速发展成为一门具有广阔应用前景并逐渐走向成熟的学科。

鉴于分子诊断技术正在越来越多地被应用于临床检验诊断, 国内大多数高等医学院校医学检验专业也开设了分子生物学检验技术的课程。为了更好地规范《分子诊断学》课程的教学, 2004 年全国高等医药院校医学检验专业规划教材建设委员会组织编写, 中国医药科技出版社出版了《分子诊断学》本科教材, 供高等医学检验专业和医学相关专业使用。5 年来, 经典的分子诊断技术越来越成熟, 许多新技术不断涌现、发展, 并应用于临床检验诊断和医学研究。《分子诊断学》第一版教材中有的内容已陈旧, 不适应快速发展的医学检验教学。中国医药科技出版社组织温州医学院、重庆医科大学、南方医科大学等高校教学与临床一线的教师对第一版教材进行修订。经修订的第二版教材在继续保持第一版教材风格的同时, 将更加注重分子诊断技术的临床应用、近来快速发展的重要技术与应用 (如蛋白质组学研究技术、生物信息学技术等), 以及分子诊断技术的质量与标准化。

全书共十四章。第一章: 绪论。第二章、第三章为基础篇: 着重描述了原核生物基因组、病毒基因组、真核基因组, DNA、RNA 等生物分子分离纯化, 分子克隆等基础理论。第四章至第九章为技术篇: 介绍了核酸分子杂交技术、PCR 技术、DNA 测序技术、蛋白质组学研究技术、生物芯片技术、毛细管电泳技术、变性高效液相色谱分析技术、变性梯度凝胶电泳和温度梯度凝胶电泳技术等。第十章至第十四章为应用篇: 详细介绍了感染性疾病的分子诊断、单基因疾病的分子诊断、复杂基因疾病的分子诊断, 分子诊断在移植配型、法医学鉴定、预防医学、个体化医疗等的应用, 以及生物信息学在分子诊断中的应用。书后附有主要名词的英汉索引。本教材供医学检验专业本科生使用, 也可供相关学科专业的研究生及卫生技术人

员参考。此外，为加强实验技术的教学，有关分子诊断学具体操作技术另编与本教材配套的《分子诊断学实验指导》教材。

分子诊断学是一个正在快速发展的学科，尽管本教材的编写人员均具有丰富的教学和研究工作经验，但由于再版时间仓促，因此免不了仍有疏忽和不足之处，恳切得到广大同仁和读者的批评指正。中国医药科技出版社为策划和组织本教材的再版做了大量的工作，温州医学院、重庆医科大学为本教材第二版的编写提供了诸多的支持和帮助，在此一并表示感谢。

吕建新
2009 年 12 月

目 录

第一章 绪论	(1)
第一节 分子诊断学的概念、任务和特点	(1)
第二节 分子诊断学的发展简史	(1)
第三节 分子诊断的基本策略及其在医学中的应用	(2)
第四节 展望	(4)
第五节 本书概要	(4)
参考文献	(5)
第二章 基因与基因组	(6)
第一节 基因与基因组概论	(7)
一、基因的概念及其发展	(8)
二、基因组与 C 值矛盾	(10)
三、基因组学及其意义	(11)
第二节 真核生物基因组	(13)
一、真核生物基因组的结构与功能特点	(13)
二、人类基因组计划	(17)
三、人类基因组多样性	(19)
第三节 原核生物基因组	(21)
一、原核生物基因组的一般特点	(21)
二、原核生物类核结构	(21)
三、质粒	(22)
四、转座因子	(24)
第四节 病毒基因组	(26)
一、病毒基因组的核酸类型	(26)
二、病毒基因组的大小及碱基组成	(27)
三、病毒基因组的结构与功能特点	(27)
参考文献	(29)
第三章 分子克隆	(30)
第一节 工具酶	(31)
一、限制性核酸内切酶	(31)
二、DNA 聚合酶	(33)
三、DNA 连接酶	(34)
四、碱性磷酸酶	(34)
五、T4 多核苷酸激酶	(34)
六、核酸酶 S ₁	(35)

第二节 载体	(35)
一、克隆载体	(35)
二、表达载体	(39)
三、穿梭载体	(41)
第三节 分子克隆的基本步骤	(41)
一、目的基因的获取	(42)
二、载体的选择	(42)
三、目的基因和载体的连接	(42)
四、将重组 DNA 导入受体细胞	(45)
五、重组体的筛选和鉴定	(46)
第四节 克隆基因的表达	(47)
一、原核生物基因表达的特点	(47)
二、真核生物基因表达的特点	(47)
三、提高克隆基因表达效率的途经	(48)
参考文献	(49)
 第四章 核酸分子杂交技术	(50)
第一节 核酸杂交的基本原理	(50)
一、核酸变性	(51)
二、核酸复性	(52)
第二节 核酸探针	(53)
一、核酸探针的种类	(53)
二、核酸探针的标记	(54)
三、核酸探针的纯化	(59)
四、核酸探针的检测	(60)
第三节 核酸分子杂交的影响因素	(61)
第四节 核酸分子杂交的类型	(62)
一、固相核酸分子杂交类型	(63)
二、液相核酸分子杂交	(67)
参考文献	(68)
 第五章 核酸扩增技术	(69)
第一节 聚合酶链反应技术	(70)
一、PCR 技术原理	(70)
二、PCR 反应体系及其优化	(72)
三、扩增产物检测及分析	(76)
四、常见问题原因分析与处理	(78)
五、PCR 衍生技术	(81)
第二节 荧光定量 PCR 技术	(84)
一、荧光定量 PCR 技术基本原理	(84)
二、荧光定量 PCR 技术	(85)
三、荧光定量 PCR 测定的数据处理	(89)
四、实时荧光定量 PCR 技术的应用	(89)

第三节 其他核酸扩增技术	(89)
一、核酸扩增技术分类与比较	(89)
二、核酸序列依赖性扩增	(90)
三、连接酶链反应	(91)
四、链替代扩增反应	(92)
五、分支 DNA 信号放大系统	(92)
第四节 临床基因扩增检验实验室的管理与质量控制	(93)
一、临床基因扩增检验实验室的规范化设置	(94)
二、操作人员培训	(95)
三、临床基因扩增检验实验室质量保证	(95)
参考文献	(98)
第六章 DNA 序列测定	(99)
第一节 Sanger 双脱氧链末端终止法	(99)
一、测序原理	(99)
二、测序体系	(101)
三、方法特点	(102)
第二节 Maxam - Gilbert 化学降解法	(102)
一、测序原理	(102)
二、测序体系	(103)
三、方法特点	(104)
第三节 其他测序技术	(105)
一、焦磷酸测序技术	(105)
二、杂交测序法	(106)
三、单分子测序技术	(106)
四、24 小时基因组测序设想	(107)
第四节 自动化测序	(107)
参考文献	(108)
第七章 蛋白质组学研究技术	(109)
第一节 蛋白质组学研究技术概述	(109)
第二节 蛋白质组研究的凝胶与非凝胶技术	(111)
一、双向凝胶电泳技术	(111)
二、液相色谱技术	(115)
第三节 生物质谱技术与蛋白质鉴定	(117)
一、质谱的基本原理	(117)
二、生物质谱	(118)
三、蛋白质的鉴定	(120)
第四节 蛋白质相互作用的研究技术	(121)
一、酵母双杂交技术	(121)
二、噬菌体展示技术	(123)
第五节 蛋白质组翻译后修饰分析	(124)
一、磷酸化蛋白质的分析	(124)

二、糖基化蛋白质的分析	(125)
参考文献	(126)
第八章 生物芯片技术	(127)
第一节 基因芯片	(128)
一、芯片微阵列制备	(129)
二、样品的制备及标记	(131)
三、样品与基因芯片的杂交	(132)
四、杂交结果的检测及分析	(132)
五、基因芯片的应用	(133)
第二节 蛋白质芯片	(136)
一、蛋白质芯片的原理	(137)
二、蛋白质芯片的分类	(137)
三、蛋白质芯片的制备及分析	(137)
四、蛋白质芯片的应用	(139)
第三节 组织芯片	(140)
一、组织芯片的分类	(141)
二、组织芯片的制备	(141)
三、组织芯片的应用	(141)
第四节 液相芯片	(141)
一、液相芯片检测技术的原理及特点	(142)
二、液相芯片检测技术的应用	(142)
第五节 缩微芯片实验室	(143)
参考文献	(144)
第九章 用于分子诊断的其他技术	(145)
第一节 毛细管电泳技术	(145)
一、毛细管电泳技术的原理	(146)
二、毛细管电泳法的基本装置	(146)
三、毛细管电泳法分离模式与特性	(146)
四、毛细管电泳的特点	(147)
五、毛细管电泳与凝胶电泳、高效液相色谱的比较	(148)
六、高效毛细管电泳技术在分子诊断中的应用	(148)
七、高效毛细管电泳技术发展趋势	(149)
第二节 变性高效液相色谱分析	(149)
一、变性高效液相色谱分析的基本原理	(149)
二、变性高效液相色谱仪的基本装置	(150)
三、变性高效液相色谱的操作方式及适用范围	(150)
四、变性高效液相色谱主要技术特点	(150)
五、变性高效液相色谱检测在分子诊断中的应用	(151)
第三节 变性梯度凝胶电泳和温度梯度凝胶电泳	(151)
一、变性梯度凝胶电泳和温度梯度凝胶电泳的原理	(152)
二、变性梯度凝胶电泳和温度梯度凝胶电泳的特点	(152)

三、变性梯度凝胶电泳和温度梯度凝胶电泳的主要应用	(153)
参考文献	(153)
第十章 感染性疾病的分子诊断	(154)
第一节 病毒的基因检测	(155)
一、乙型肝炎病毒	(155)
二、丙型肝炎病毒	(158)
三、单纯疱疹病毒	(161)
四、巨细胞病毒	(162)
五、风疹病毒	(163)
六、人乳头瘤病毒	(164)
七、流行性感冒病毒	(165)
八、人类免疫缺陷病毒	(167)
九、冠状病毒	(169)
第二节 细菌的基因检测	(171)
一、结核分枝杆菌	(171)
二、淋病奈瑟菌	(173)
三、O157 型大肠埃希菌	(174)
四、幽门螺杆菌	(175)
五、细菌耐药基因的检测	(176)
第三节 衣原体的基因检测	(178)
一、沙眼衣原体	(178)
二、肺炎衣原体	(179)
第四节 支原体的基因检测	(180)
一、肺炎支原体	(180)
二、解脲脲原体	(181)
第五节 梅毒螺旋体的基因检测	(182)
第六节 原虫的基因检测	(184)
一、弓形虫	(184)
二、溶组织内阿米巴	(184)
三、利什曼原虫	(185)
四、疟原虫	(186)
第七节 真菌的基因检测	(187)
一、念珠菌	(187)
二、新型隐球菌	(188)
三、烟曲霉	(189)
参考文献	(190)
第十一章 单基因遗传性疾病的分子诊断	(191)
第一节 血红蛋白病	(192)
一、珠蛋白基因簇的结构	(192)
二、镰状细胞贫血的分子诊断	(193)
三、地中海贫血的分子诊断	(194)

第二节 肌营养不良症	(197)
一、抗肌萎缩蛋白基因结构	(198)
二、杜氏/贝氏肌营养不良症的分子诊断	(198)
第三节 血友病	(199)
一、A 型血友病及其分子诊断	(199)
二、B 型血友病及其分子诊断	(201)
第四节 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶缺乏症	(202)
一、 $\alpha 1$ -AT 基因结构特征	(202)
二、 $\alpha 1$ -AT 缺乏症的分子诊断	(202)
第五节 其他遗传性疾病	(203)
一、苯丙酮酸尿症及其分子诊断	(203)
二、Wilson 病及其分子诊断	(203)
三、G6PD 缺乏症及其分子诊断	(204)
四、Huntington 病及其分子诊断	(204)
五、脆性 X 综合征及其分子诊断	(205)
六、Leber 遗传性视神经病变及其分子诊断	(205)
参考文献	(206)
第十二章 复杂基因疾病的分子诊断	(207)
第一节 肿瘤分子诊断	(207)
一、白血病和淋巴瘤的分子诊断	(208)
二、乳腺癌的分子诊断	(211)
三、结直肠癌的分子诊断	(212)
第二节 其他复杂基因疾病的分子诊断	(213)
一、糖尿病的分子诊断	(213)
二、家族性高脂血症的分子诊断	(214)
三、高血压的分子诊断	(216)
参考文献	(216)
第十三章 分子诊断的其他应用	(217)
第一节 分子诊断在移植配型中的应用	(217)
一、移植配型	(218)
二、HLA 配型	(218)
第二节 分子诊断在法医物证学中的应用	(220)
一、法医物证鉴定遗传标记的选择	(221)
二、法医物证鉴定常用遗传标记与分子诊断技术	(221)
第三节 分子诊断在预防医学中的应用	(223)
一、在环境卫生学中的应用	(223)
二、在食品卫生学中的应用	(224)
三、在营养学中的应用	(225)
四、在劳动卫生学中的应用	(226)
第四节 分子诊断在个体化医疗中的应用	(226)
一、个体化医疗概述	(226)

二、分子诊断在个体化诊断、个体化预防和个体化治疗中的应用	(227)
三、个体化医疗现状及面临的问题	(230)
参考文献	(231)
第十四章 生物信息学在分子诊断中的作用	(232)
第一节 生物信息学概论	(233)
第二节 生物信息数据库	(233)
一、重要生物信息中心	(233)
二、生物信息数据库	(234)
第三节 数据库检索	(236)
一、生物信息数据库检索	(236)
二、文献检索	(237)
第四节 核酸数据分析	(237)
一、核酸序列的基本分析	(237)
二、核酸序列的比对分析	(238)
三、开放阅读框的分析	(240)
四、基因的电子克隆与定位	(240)
五、引物设计	(241)
六、向数据库提交核酸序列	(241)
第五节 蛋白质数据分析	(241)
一、蛋白质基本性质分析	(241)
二、蛋白质结构预测	(242)
三、蛋白质功能预测	(243)
第六节 生物信息学在医学中的应用	(244)
一、疾病诊断与治疗	(244)
二、药物设计与个体化用药	(244)
三、疾病基因的分离与鉴定	(244)
参考文献	(245)
英汉名词索引	(246)

第一章 绪 论

DNA 双螺旋结构模型和生物中心法则的提出开辟了生命科学的新纪元。在分子生物学的发展过程中, DNA 重组、转基因、蛋白质组学、生物芯片、基因治疗等分子生物学技术不断渗透到医学领域, 对现代医学产生深刻影响。医学科学的研究从整体和细胞水平汇集到分子水平, 对许多疾病的诊断和对病情、治疗的判断亦逐渐进入分子水平。一种全新的临床检验新学科——分子诊断学 (molecular diagnostics), 开始从实验室研究走向临床应用。

第一节 分子诊断学的概念、任务和特点

分子诊断学是以分子生物学理论为基础, 利用分子生物学的技术和方法来研究人体内源性或外源性生物大分子和大分子体系的存在、结构或表达调控的变化, 为疾病的预防、诊断、治疗和转归提供信息和依据。

分子诊断学的主要任务是: 利用基础医学和生命科学的理论和方法, 探讨疾病发生、发展及转归的分子机制; 为整个疾病过程寻求准确、特异的分子诊断指标; 利用分子生物学技术为这些分子诊断指标建立临床实用、可靠的检测方法。

分子诊断的主要特点是: 直接以疾病基因为探查对象, 属于病因学诊断, 对基因的检测结果不仅具有描述性, 更具有准确性; 可准确诊断疾病的基因型变异、基因表型异常以及由外源性基因侵入引起的疾病。

第二节 分子诊断学的发展简史

分子诊断学的发展是与分子生物学的发生发展紧密相关的。1953 年, Watson 和 Crick 提出 DNA 双螺旋结构模型, 成为现代分子生物学诞生的里程碑, 使整个生物学的研究进入分子时代。中心法则的建立, 使分子生物学作为一门学科初步形成了自己的理论体系, 即生物大分子的结构与功能、遗传信息的复制、遗传信息的表达和基因表达的调控。

1978 年, 美籍华裔科学家简悦威 (Yuet Wai Kan) 等应用液相 DNA 分子杂交进行镰形细胞贫血症, 标志着分子诊断学的诞生。随着基因重组技术的建立和基因组研究的发展, 分子诊断学进入初级阶段, 即利用 DNA 分子杂交的方法进行遗传病的基因诊断。

分子诊断学的第二阶段是在 1985 年 PCR 技术的创建之后。PCR 技术由于其操作简便、快捷、适用性强, 已广泛应用于分子诊断学领域。以 PCR 技术为基础, 还衍生出了许多分子诊断方法, 其中比较成熟的方法有: 限制性酶切片段长度多态性分析 (restriction fragment length polymorphism, RFLP), 是检测与特异酶切位点相关突变的简便方法; 等位基因特异性 PCR (allele specific PCR, AS-PCR), 可针对等位基因设计引物, 根据 PCR 产物来鉴定基因型; PCR 单链构型多态性技术 (single strand conformational polymorphism, PCR-SSCP), 可揭

示 PCR 产物序列内的多态性, 等等。另外, 定量 PCR、实时 PCR (real-time PCR, RT-PCR) 可检测患者细胞中 mRNA 的表达量及患者标本中特异的病原体 DNA 或 RNA 的滴度, 实现了诊断从定性到定量的突破。

2001 年 2 月, 随着首张人类基因组序列图谱以及随后其他物种基因组序列的公布, 分子生物学研究进入了基因组与后基因组时代。基因组学、蛋白质组学等方面的巨大技术进步促使分子诊断学随之进入第三个阶段, 即以生物芯片 (biochip) 技术为代表的高通量密集型技术。生物芯片技术具有样品处理能力强、用途广泛、自动化程度高等特点, 具有广阔的应用前景和商业价值, 现已成为整个分子生物学技术领域的一大热点。

根据芯片上的固定的探针不同, 生物芯片包括基因芯片、蛋白质芯片、组织芯片等。它将大量的探针同时固定于支持物上, 一次可以对大量的生物分子进行检测分析; 而且通过设计不同的探针阵列、使用特定的分析方法可使该技术具有多种不同的应用价值, 如基因表达谱测定、突变检测、多态性分析、基因组文库作图及杂交测序。

1994 年以来, 随着二维凝胶电泳等蛋白质分离纯化技术的不断完善, 物质谱技术及生物信息学的发展, 出现了研究蛋白质的新领域——蛋白质组学。蛋白质组学技术具有高灵敏度、高通量、样品量少的优点, 成为寻找新的诊断标志物和药物靶标的强有力工具, 大大促进了分子诊断学科的发展。蛋白质芯片可以实现对复杂样本中多种诊断标志物的小型化和平行化检测, 可以作为肿瘤疾病、遗传性疾病等的筛查工具。

突变检测技术的发展不仅对遗传性疾病的分子基因检测起到了巨大的推动作用, 同时也对遗传药理学的发展提供了帮助。遗传药理学采用突变检测、基因组学、功能基因组学等高通量技术来检测不同个体对于药物的遗传差异性, 预测个体对药物的反应等, 从而建立个体化的药物治疗方案。

第三节 分子诊断的基本策略及其在医学中的应用

从生物中心法则来看, 利用分子诊断技术可以判断疾病基因结构异常或基因表达异常。检测基因的存在和基因结构异常主要通过测定 DNA/RNA 来实现, 其中核酸的分子杂交、PCR 和 DNA 测序三种基本技术及其联合应用仍然是分子诊断的主流技术, DNA 芯片技术也开始逐渐用于疾病的诊断中。基因表达是指基因的转录和翻译, 而检测基因表达的异常, 在转录水平主要是检测 mRNA 的表达的质和量, 常用的方法有 Northern blot、荧光原位杂交、逆转录 PCR、实时荧光定量 PCR、转录谱芯片等; 在翻译水平则以检测蛋白质的质和量来反映核酸表达水平的变化, 常用的方法有 Western blot、免疫组织化学染色、ELISA、酶分析方法、蛋白质芯片等。

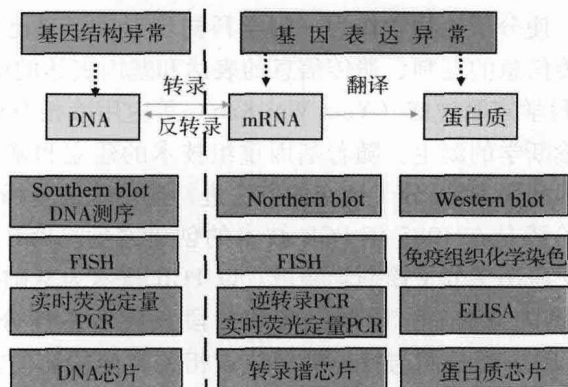


图 1-1 生物中心法则与分子诊断方法

分子诊断技术的不断发展,使分子诊断从传统的 DNA 诊断概念发展到更全面的核酸和蛋白质诊断的新概念;分子诊断的内容也从早期的单一疾病诊断发展到对疾病的易感性判断及提供临床用药指导等医学领域。目前分子诊断的主要应用包括:

1. 感染性疾病分子诊断 病原微生物导致的感染性疾病仍然是严重威胁人类健康的一个重要方面。以前对于这些病原体多采用微生物学、免疫学和血液学相关手段进行检测,但是这些方法不易早期诊断,并受灵敏度和特异性的限制。例如:诊断结核杆菌的感染经典的方法是进行体液标本的培养,不仅周期长,而且阳性率不高;丙型肝炎从感染到抗体出现的“窗口期”较长,用检测抗体的方法很难做到早期诊断。随着各种细菌或病毒等病原体的基因组序列的公布,可以利用分子诊断技术早期、快速、敏感、特异地检测侵入体内的外源性基因(感染性病原体的 DNA 或 RNA)。分子生物学技术不仅可以对微生物感染进行准确的病因学诊断,还可以对感染性病原体进行基因分型和耐药性监测,因此逐渐在人类感染性疾病的临床诊断、流行病学调查、微生物分类分型研究中显示出它独特的功能。

2. 遗传性疾病的分子诊断 目前已发现的人类遗传性疾病达数千种之多,主要分为两大类:符合孟德尔遗传规律的单基因遗传病和不符合孟德尔遗传规律的多基因遗传病(又称多因素性疾病)。传统的遗传性疾病的诊断方法以疾病的表型病变为依据,而表型则易受外界环境的影响,在一定程度上影响了诊断的准确性和可靠性。遗传性疾病的分子诊断是通过分析患者的 DNA、RNA、染色体、蛋白质和某些代谢产物来揭示与该遗传病发生相关的基因、基因型、基因的突变、基因的单倍体型和染色体核型等生物学标记,与传统疾病诊断方法相比,具有更准确可靠和早期诊断的优势,有利于在临床上对遗传型疾病进行早期预防、早期诊断和早期治疗,从而达到减少或控制相关遗传病的发作、减轻症状和改善患者预后的目的。

3. 肿瘤的分子诊断 肿瘤标志在诊断肿瘤、检测肿瘤复发与转移、判断疗效和预后以及人群普查等方面都有较大的实用价值。肿瘤标志分为基因型标志和基因表型标志:基因型标志是指基因本身突变和表达异常,能反映癌前启动阶段的变化;基因表型标志是指基因表达产物异常,表现为其所编码的表达产物合成紊乱,产生胚胎性抗原、异位蛋白等,一般出现较晚。因此,寻找特异性肿瘤基因型标志进行肿瘤基因诊断,对于肿瘤的早期发现和诊断,以及肿瘤的预防和治疗具有至关重要的意义。

4. 个体化医疗 个体化医疗是指针对可能影响患者治疗效果的个体因素(基因)和环境因素,做出适合不同患者的最佳处理和治疗方案。分子诊断学在个体化医疗中发挥了重要角色,包括药物基因组学、药物蛋白质组学以及药物代谢组学。

药物基因组学概念的提出始于 20 世纪 50 年代,是指利用系统性基因组学方法研究基因表达对药物代谢的影响。药物基因组学使用多种技术分析不同个体的基因型别和基因表达信息,并研究不同个体的药物作用差异。目前,药物基因组学的研究重点是通过不同个体基因表达型别来研究药物在细胞内代谢途径,从而在药物化学和基因组学间建立桥梁。

药物蛋白质组学是分子诊断在个体化医疗方面的另外一个重要应用,它主要研究具有不同蛋白质谱的个体对药物的不同反应,从蛋白质组水平找到针对不同患者的最佳治疗方案。药物蛋白质组学包括了对转录后修饰的研究,是基因型和表型之间的链接桥梁,与药物基因组学相比,可以更好地展示不同个体间的差异。在 21 世纪初的几十年时间里,药物蛋白质组学将对分子诊断学产生重要影响。

目前,广泛应用于个体化医疗方面的分子诊断技术主要有 PCR 及其延伸技术如单链构象多态性(SSCP)、RT-PCR、PCR-ELISA 组合等,此外还包括蛋白质组学诊断技术、细胞遗传学技术、单核苷酸多态性(SNP)基因分型等。