

基因扩增

郑怀竞 主编

北京医科大学
中国协和医科大学
联合出版社

临床检验 指南



5.1

5.1

R446.1
2HJ

716116

基因扩增临床检验指南

主编 郑怀竞

编委 (依姓氏笔划排列)

李全贞 李金明 李振勇 何蕴韶

张 正 钟 平 郑怀竞 贾弘禔

黄道培



北京医科大学
中国协和医科大学 联合出版社



A0289557

(京)新登字 147 号

图书在版编目 (CIP) 数据

基因扩增临床检验指南/郑怀竞主编. - 北京: 北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 1998.4

ISBN 7-81034-812-4

I. 基… II. 郑… III. 基因扩增 - 临床医学 IV. R446

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (98) 第 03178 号

JYINKUOZENG LINCHUANGJIANYAN ZHINAN

责任编辑: 冯晓燕

责任印制: 张京生

北京医科大学
中国协和医科大学 联合出版社出版发行

(100083 北京学院路 38 号 北京医科大学院内)

泰山新华印刷厂莱芜厂印刷 新华书店经销

※ ※ ※

开本: 850×1168 1/32 印张: 6 字数: 155 千字

1998 年 4 月第 1 版 1998 年 4 月山东第 1 次印刷 印数: 1-2200 册

定价: 13.50 元

序

随着分子生物学的迅速发展,越来越多的分子生物学技术应用用于临床医学。聚合酶链反应(PCR)技术大概是我国目前应用最多的分子生物学方法。不仅城市大中型医院,就是某些地区的基层医院实验室都在广泛应用 PCR 技术,开展多达数十种项目的检测。虽然从理论上说此项技术有可能用于遗传、传染、肿瘤等多种疾病的诊断,但这只是开始阶段,PCR 技术还有待不断的完善和成熟。首先在技术上,目前我国临床实验室所用方法基本上直接来自科研实验室,差异很小,而这两类实验室无论在客观条件上,还是在管理、人员素质上都有明显不同,必须发展适应医院条件的 PCR 技术。正如本书中所介绍的 FDA 文件所要求的,对患者收费用于临床诊断的试剂盒必须配合使用探针以保证 PCR 检测的特异性,此外还要有可靠的防污染措施等。其次是 PCR 的临床实际应用价值需要进一步探讨,不能说目前 PCR 技术就能取代经典的微生物学方法和技术。在 FDA 文件中提出要正确地评价 PCR 的临床应用价值,应与经典的微生物学方法进行比较,并以后者作为金标准。

这样如何加强对医院实验室 PCR 技术的管理已成为我国医院实验室管理中的一个重要问题,希望本书的出版能在这方面作出应有的贡献。

杨振华

卫生部临床检验中心

1998 年 1 月

目 录

1 核酸的生物化学	贾弘提 (1)
1.1 核酸概述	(2)
1.2 核酸的分子组成	(3)
1.3 核酸的分子结构	(8)
1.4 核酸的理化性质	(21)
1.5 DNA 的生物合成	(25)
1.6 RNA 的生物合成	(37)
2 PCR 技术的基础知识	李全贞 何蕴韶 (46)
2.1 基本原理和方法	(47)
2.2 PCR 条件的选择	(48)
2.3 RT-PCR 原理和方法	(52)
2.4 PCR 扩增产物的分析	(55)
3 PCR 实验室的设置及防污染	黄道培 (63)
3.1 PCR 的放大倍数和每个 PCR 循环的平均效率	(63)
3.2 临检 PCR 实验室所面临的传染问题	(64)
3.3 适用于国情的临检 PCR 实验室的基本设置	(65)
3.4 防污染的物品和必要措施	(68)
4 PCR 技术操作规程示例	张正 (73)
4.1 结核杆菌的 PCR 操作规程	(74)
4.2 丙型肝炎病毒 (HCV) RNA RT-PCR 操作规程	(76)
5 PCR 技术在临床检测中存在的问题分析	李振勇 (82)

5.1	实验室仪器设备	(82)
5.2	实验室布局不合理引起的污染问题	(85)
5.3	PCR 操作中存在问题分析	(87)
5.4	简单问答	(91)
6	基因扩增技术 (GAT) 实验室质量管理	郑怀亮 (94)
6.1	范围	(95)
6.2	引用标准	(95)
6.3	定义与缩写	(95)
6.4	组织和管理	(95)
6.5	质量体系	(96)
6.6	人员	(97)
6.7	实验室设施和环境	(98)
6.8	仪器	(98)
6.9	校准	(99)
6.10	检验方法	(100)
6.11	样本的处置	(101)
6.12	记录	(102)
6.13	报告	(103)
6.14	分包	(103)
6.15	外部支持服务和供应	(103)
6.16	抱怨	(104)
	附: GB/T 15481 - 1995 “校准和检验实验室能力的通用要求”	(105)
7	基因扩增技术的室间质量评价和室内质量控制	郑怀亮 李金明 (118)
7.1	室间质量评价	(118)
7.2	室内质量控制	(125)
8	有关 PCR 技术临床检验的法规	钟平编译 (139)
8.1	聚合酶链反应技术检测核酸序列临床实验室使用指南	(139)
8.2	聚合酶链反应技术体外检测核酸序列诊断产品评价指南	(158)

9	PCR 技术的新进展	黄道培 (174)
9.1	PCR 技术在以核酸为基础的临检中的地位	(174)
9.2	国外用于临检的 PCR 技术的发展	(175)
9.3	其它 DNA 探针技术	(180)

1 核酸的生物化学

贾弘提

核酸是一类生物信息高分子化合物。核酸自它首次被从细胞中分离出来，经历了大约一百年的历史，直至本世纪中期以后科学家们对核酸结构和功能的认识才取得了飞跃的发展。1953年 Watson 和 Crick 提出了脱氧核糖核酸（DNA）双螺旋结构模型，极大地推动了核酸生物化学、分子生物学及分子遗传学等各类生命学科的发展。这些学科的发展为未来医学和工农业产业革命奠定了基础。例如，近年来迅速兴起的分子生物学及其领域内的各项技术，如基因工程等正是在现代生物化学（核酸和蛋白质结构与功能研究）基础上发生和发展的。分子生物学的崛起为人类揭示生命现象的本质、健康与疾病的关系，为未来分子医学和工农业生产的发展提供了崭新的技术手段，并为生物技术产业发展开辟了新的领域。

在认识核酸化学结构的基础上，学习遗传信息传递的基本知识具有重要意义。DNA 是遗传的重要物质基础，DNA 分子经 DNA 复制将亲代 DNA 的遗传信息传递给子代 DNA；以 DNA 分子为模板、经 RNA 转录将 DNA 的遗传信息抄录到 mRNA 分子中；继而以 mRNA 为模板进行蛋白质翻译时，mRNA 分子中的核苷酸序列又决定着合成蛋白质的氨基酸的序列。通过转录和翻译，基因的遗传信息从 DNA 传递给蛋白质，蛋白质决定遗传表型，这就是基因表达。基因表达是在复杂机制控制下进行的，基因表达调控已成为当前生命科学研究的热门领域。由于篇幅所限，本章只介绍与核酸生物化学直接相关的内容，包括核酸的化学结构及

其合成代谢（复制和转录），关于蛋白质翻译及基因表达调控内容不在此讨论。

1.1 核酸概述

1.1.1 核酸的发现

1869 年瑞士青年学者 Friedrich Miescher 首次从脓细胞核中分离出一种含磷化合物，并命名为“核素”（nuclein）。后来证明“核素”属酸性化合物，故更名为“核酸”（nucleic acid）。本世纪头十年研究揭示，核酸和蛋白质一样也是多聚化合物，核苷酸（nucleotide）是组成核酸的单体。因此，核酸又称为多聚核苷酸（polynucleotides）。核酸是动物细胞、植物细胞和微生物细胞的共同组成成分，甚至比单细胞还小的病毒颗粒都含有核酸。在真核生物中，核酸在细胞核和细胞质共同存在。以前认为，细胞间质或细胞外液中没有核酸存在，但近来研究发现细胞外液（包括血浆）也有少量寡聚核苷酸存在。无论是存在于真核还是原核细胞中的核酸，只有小部分以游离状态存在，大部分与蛋白质或氨基酸结合成复合物；至于无细胞结构的病毒，则是由核酸和蛋白质组成的核蛋白颗粒。只是病毒不同，所含核酸不同。

1.1.2 核酸的分类

核酸可分为脱氧核糖核酸（deoxyribonucleic acid, DNA）和核糖核酸（ribonucleic acid, RNA）两类。以前，人们一直认为 DNA 和 RNA 分别属于动物和植物；直至本世纪 40 年代发现两类核酸在动物和植物体内都有存在。一种病毒或含 DNA、或含 RNA，故有 DNA 病毒和 RNA 病毒之分。在真核细胞，98% 以上的 DNA 与组蛋白组成染色质，存在于细胞核，细胞质内的 DNA 主要存在于线粒体中。RNA 则仅 10% 存在于细胞核，90% 存在于细胞质中。根据分子结构和功能不同，RNA 又可分为核蛋白体 RNA（ribosomal RNA, rRNA）、信使 RNA（messenger RNA, mRNA）和转运 RNA（transfer

RNA, tRNA) 三种主要类型和其它种 RNA (如小核 RNA)。

在化学结构上, 两类核酸都含有磷酸、戊糖和碱基。DNA 与 RNA 的主要区别就在于: DNA 所含的戊糖成分为 2-脱氧核糖 (2-deoxyribose, dR), 而 RNA 为核糖 (ribose, R); 在碱基成分中, DNA 含胸腺嘧啶 (thymine, T), 而 RNA 含尿嘧啶 (uracil, U)。但后一区别并不是绝对的, 例如, tRNA 中也含有少量 T。

1.1.3 核酸的功能

遗传是生物界的普遍现象和生命的基本特征之一。继本世纪 30 年代 Frederick Griffith 发现“转化”现象, 1944 年 Oswald Avery 及其同事首次证明, 基因 (gene) 就是由具有转化功能的 DNA 组成。1952 年, Alfred Hershey 和 Martha Chase 采用同位素示踪技术直接证明了 Avery 等的发现——DNA 是遗传的物质基础。DNA 在 RNA 和蛋白质分子的参与下, 将储存的遗传信息复制、传递给子代, 这就是“种瓜得瓜, 种豆得豆”的道理。因此, 核酸与生物的生长和发育、遗传和变异有密切的关系。核酸与蛋白质一样, 同是生命的重要物质基础。

1.2 核酸的分子组成

1.2.1 元素组成

核酸 (DNA 和 RNA) 分子除含有 C、H、O、N 四种元素外, 还含有大量 P, P 的含量约为 9% ~ 10%。由于各种核酸分子中 P 的含量比较接近或恒定, 故在测定组织中的核酸含量时通过测定 P 的含量来计算生物组织核酸的含量。

1.2.2 核酸的基本结构单位——核苷酸

将核酸逐步水解, 可得到多种产物。首先得到的是单核苷酸 (nucleotide), 后者可进一步水解成核苷 (nucleoside) 和磷酸, 核苷还可水解成戊糖 (核糖和脱氧核糖) 和含氮碱 (嘌呤碱和嘧啶碱) 基。现将两类核酸水解的主要最终产物列于下表:

表 1-1 核酸水解后的主要最终产物

	RNA	DNA
磷酸	磷酸 (P)	磷酸 (P)
戊糖	D-核糖 (R)	D-2 脱氧核糖 (dR)
碱基	腺嘌呤 (A) 鸟嘌呤 (G) 胞嘧啶 (C) 尿嘧啶 (U)	腺嘌呤 (A) 鸟嘌呤 (G) 胞嘧啶 (C) 胸腺嘧啶 (T)

1.2.2.1 含氮碱

核酸分子中的碱基为嘌呤碱 (purine) 和嘧啶碱 (pyrimidine) 的衍生物。核酸分子中的嘌呤碱主要是腺嘌呤 (adenine, A) 和鸟嘌呤 (guanine, G) 两种。核酸中的嘧啶碱主要是胞嘧啶 (cytosine, C)、尿嘧啶 (uracil, U) 和胸腺嘧啶 (thymine, T) 三种。T 主要存在于 DNA 分子中, U 则只存在于 RNA 分子中。两类核酸所含的嘌呤类和嘧啶类化合物的结构式及数字标号如下:

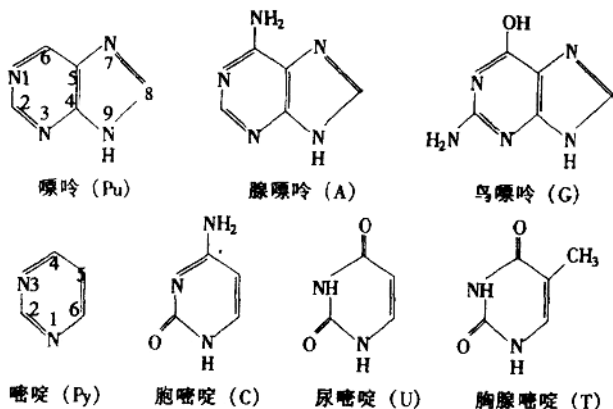


图 1-1 嘌呤类和嘧啶类化合物结构式

嘌呤和嘧啶均可发生酮——醇式互变异构现象, 生理 pH 环

境下以酮式为主。两类碱基中均含有共轭双键，故对 250 ~ 280nm 紫外线有较强的吸收作用，在 260nm 吸收最强。

核酸分子中除常见的 A、G、C、U 和 T 等碱基外，在某些 RNA 分子、特别是 tRNA 中还含有少量其它碱基，称为“稀有碱基”或“微量碱基”，如甲基腺嘌呤、甲基鸟嘌呤、黄嘌呤、次黄嘌呤和二氢尿嘧啶等（图 1-1）。

1.2.2.2 戊糖类

核酸中的戊糖有两类，即 *D*-核糖和 *D*-2-脱氧核糖。*D*-核糖存在于 RNA 中，*D*-2-脱氧核糖存在于 DNA 中。两种核糖的结构式及其碳原子编号如下：

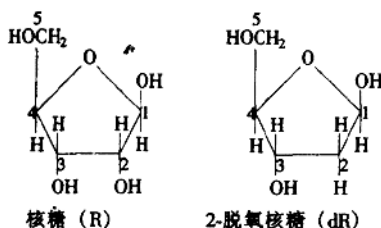


图 1-2 两种核糖结构式

1.2.2.3 核苷

碱基与戊糖缩合后生成的化合物称核苷。嘌呤 N-9 与核糖 C-1' 以糖苷键相连，形成嘌呤核苷，如腺嘌呤苷 (adenosine, AR) 和鸟嘌呤苷 (guanosine, GR)。嘧啶 N-1 与核糖 C-1' 以糖苷键相连，形成嘧啶核苷，如尿嘧啶苷 (uridine, UR) 和胞嘧啶苷 (cytidine, CR)。嘌呤或嘧啶在同样部位、同样方式与脱氧核糖以 N-C 糖苷键连接形成各种脱氧核苷，如脱氧腺苷 (deoxyadenosine, AdR) 和脱氧胸苷 (deoxythymidine, TdR) 等。下面是部分核苷的结构：

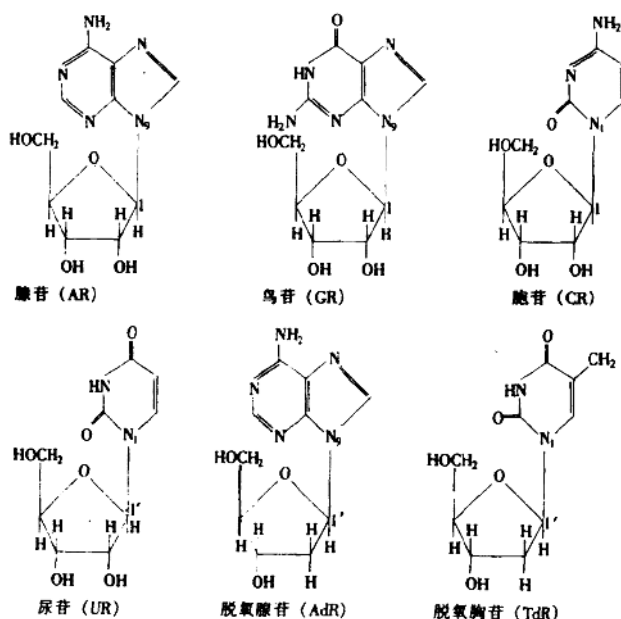


图 1-3 部分核苷结构

由“稀有碱基”形成的核苷称“稀有核苷”，如次黄嘌呤核苷等。还有一种假尿嘧啶苷 (pseudouridine, ψ) 是尿嘧啶 C-5 与核糖 C-1' 以 C-C 糖苷键连接而成。

1.2.2.4 核苷酸

核苷分子中核糖的羟基与一分子磷酸以磷酸键相连形成的化合物为核苷酸 (nucleotide)。核糖核苷的戊糖有三个游离羟基，可形成三种核苷酸：2'-、3'-和 5'-核糖核苷酸。脱氧核糖核苷的戊糖只有两个游离羟基，只能形成两种核苷酸：3'-和 5'-脱氧核糖核苷酸。在生物体内核酸分子中的核苷酸都是 5'-核苷酸。现

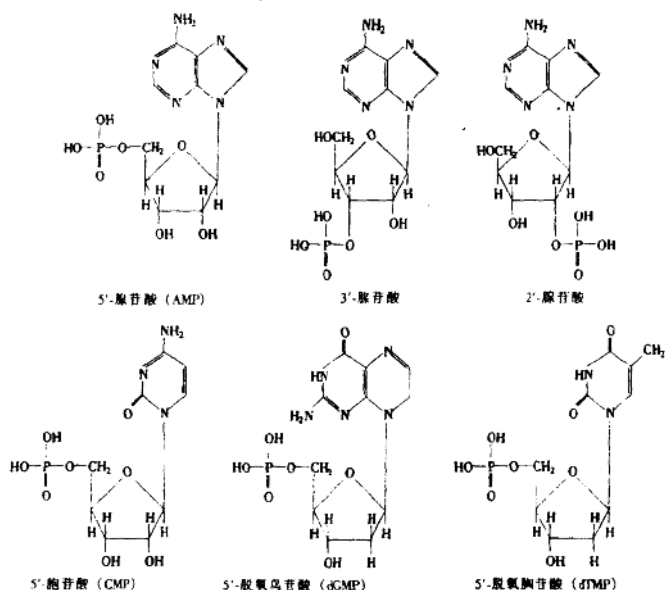


图 1-4 2'-、3'-和 5'-核苷酸结构式

择几种核苷酸的结构式列于图 1-4。

5'核苷酸组成方式为碱基-核糖-磷酸, 称一磷酸核苷或核苷一磷酸(nucleoside monophosphate, NMP), 如一磷酸腺苷(AMP)、一磷酸鸟苷(GMP)、一磷酸胞苷(CMP)和一磷酸尿苷(UMP)等。如果 5'-核苷酸中的戊糖被脱氧核糖取代, 组成方式为碱基-脱氧核糖-磷酸, 那么在核苷酸命名时在核苷名称前面加上“脱氧”二字, 如一磷酸脱氧腺苷(dAMP)、一磷酸脱氧鸟苷(dGMP)、一磷酸脱氧胞苷(dCMP)和一磷酸(脱氧)胸苷(dTMP 或 TMP)。核糖核苷酸是构成 RNA 的基本单位, 脱氧核糖核苷酸是构成 DNA 的基本单位。

一磷酸核苷除组成核酸外,在体内也有以游离形式存在的。此外,体内还有多磷酸核苷酸,如二磷酸核苷(NDP)和二磷酸脱氧核苷(dNDP),三磷酸核苷(NTP)和三磷酸脱氧核苷(dNTP)。现以腺苷和脱氧腺苷为例,表示其多磷酸化合物结构如下:

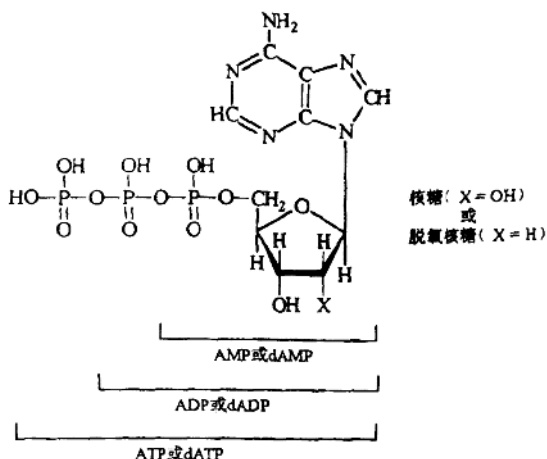


图 1-5 腺苷或脱氧腺苷一磷酸、二磷酸和三磷酸化合物结构式
多核苷酸化合物在体内参与核酸合成和能量代谢,具有重要生理意义。除上述核苷酸,体内还有其它形式的核苷酸,这里不多叙述。

1.3 核酸的分子结构

1.3.1 核酸中核苷酸的连接

单核苷酸通过 3'、5'磷酸二酯键,即一个单核苷酸的戊糖 C-5'上的磷酸以磷酸键与另一核苷酸戊糖的 C-3'相连,形成多聚核苷酸链 (polynucleotides),其结构如图 1-6 所示。

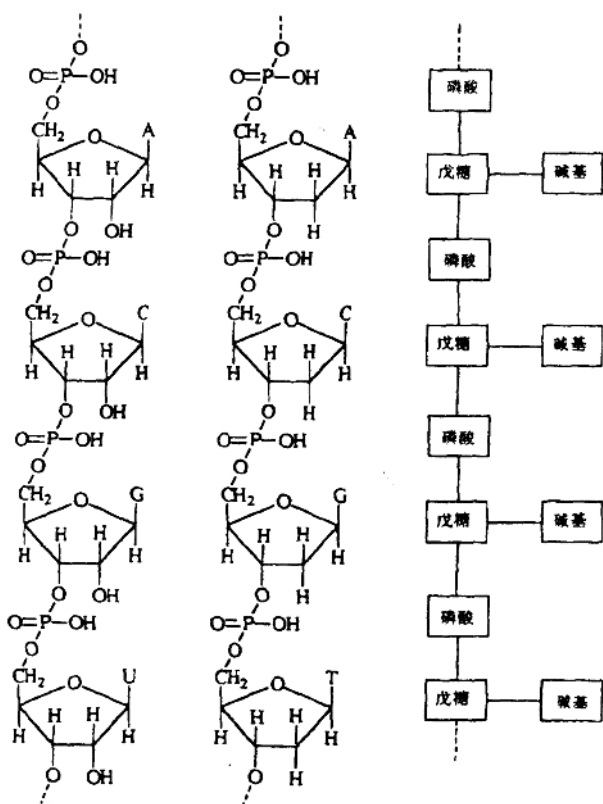


图 1-6 RNA (左) 和 DNA (中) 分子中多核苷酸链结构

在多聚核苷酸链中，链的骨架由戊糖基和磷酸基构成。核苷酸链一端核苷酸戊糖的 5' 磷酸不再与其它核苷酸相连，称为 5' 磷酸端，或 5' 末端。同样，核苷酸链另一端的核苷酸戊糖 3' 羟基也是游离的，称为 3' 羟基端，或 3' 末端。因此，核苷酸链是有方向

性的。DNA 分子是由方向相反、碱基互补的两条多核苷酸链组成，RNA 分子则是由一条多核苷酸链组成。因此，核酸分子也是有方向性的。

核酸分子的一级结构就是指多核苷酸链中从 5' 端到 3' 端核苷酸的排列顺序，通常称核苷酸序列 (sequence)。DNA 分子由两条多核苷酸链组成，通常文献公布的 DNA 序列往往是编码链 (coding strand)，即与模板链 (template strand) 互补的多核苷酸链的序列。表示一个核酸或多核苷酸链序列的方法有很多种。由于核酸分子结构除了两端和碱基排列顺序不同外，其它均相同。因此，在核酸分子的一级结构表示方法中，仅须注明一个核酸分子的 5' 端和 3' 端，末端有无磷酸基和羟基，以及核酸分子中的碱基序列即可。如未特别注明方向，一般约定从左至右书写的碱基序列代表从 5' 端到 3' 端的碱基序列 (图 1-7)。

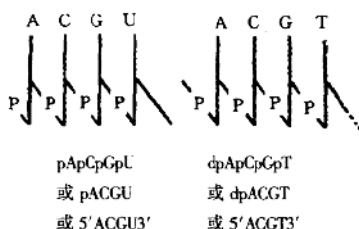


图 1-7 多核苷酸链或核酸分子中碱基序列表示法

1.3.2 DNA 的分子结构

DNA 分子巨大，含核苷酸数量极多，要分离完整的 DNA 分子并测定出其一级结构的全部核苷酸序列极其困难。由于生物遗传信息储存于 DNA 的核苷酸序列之中，如果能搞清楚各种生物体的 DNA 的一级结构，人们对生命活动本质的认识必将大大前进一步。近年来由于重组 DNA 工艺学 (recombinant DNA technology) 的发展和人类基因组规划 (human genome project) 的实施，目前已分离出上万个基因 (DNA 片段) 和编码序列的分子克隆 (DNA 和 cDNA