

RECENT PROGRESS of RESPIRATORY DISEASES 現代呼吸病進展

主編 鍾南山 府 軍 朱元珏



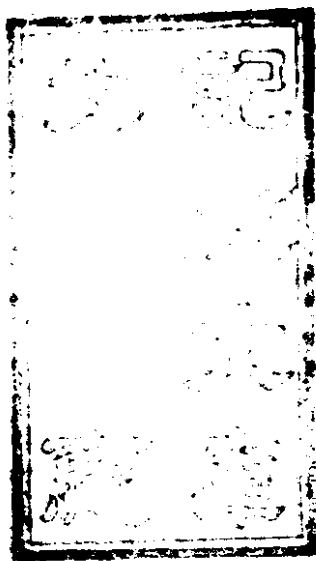
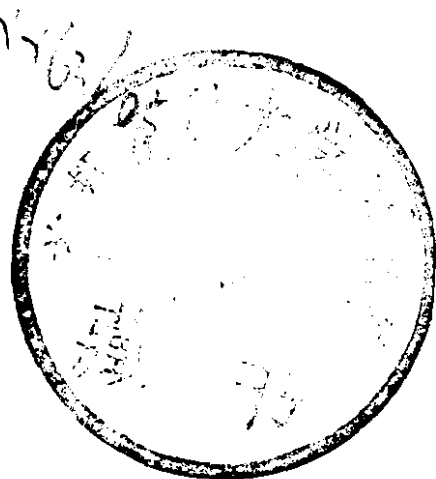
中國醫藥科技出版社

1
R56
ZNS

现代呼吸病进展

RECENT PROGRESS of
RESPIRATORY DISEASES

钟南山 府 军 朱元珏 主编



A0064536

中国医药科技出版社



登记证号:(京)075号

《现代呼吸病进展》编写人员

主 编 钟南山 府 军 朱元珏

编 者 (按姓氏笔画排列)

于润江	邓伟吾	毛宝龄	王贵谦	刘又宁	刘裕昆
刘镜愉	许乙凯	朱元珏	任 华	吕宝璋	纪树国
孙 燕	李龙芸	李锡莹	陈文彬	陈正堂	陈顺存
陈荣昌	陈 萍	张珍祥	张敦华	宋礼章	何 冰
严碧涯	杨 玉	杨秋火	府 军	郑劲平	苗积生
林道平	周 前	周燕发	罗慰慈	候 杰	候显明
候 恕	钟南山	赵鸣武	倪子俞	容中生	徐 军
康晓明	黄念秋	黄席珍	程显声	廖美琳	戴自英

现代呼吸病进展

钟南山 府 军 朱元珏 主编

*

中国医药科技出版社 出版
(北京海淀区文慧园北路甲 22 号)

(邮政编码 100088)

国家建材局情报所印刷厂 印刷

全国各地新华书店 经销

*

开本 850×1168mm 1/32 印张 23½ 插页 1

字数 819 千字 印数 1—4000

1994 年 5 月第 1 版 1994 年 5 月第 1 次印刷

ISBN7-5067-1092-7/R·0975

定价: 36.00 元

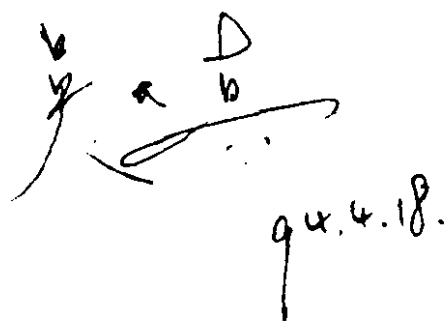
出版者的话

《现代呼吸病进展》的书稿带着纸墨的清香送到我的手里,这部由我国呼吸病学界 48 位在某个专题领域研究有成的老、中、青知名专家共同编著,全面反映我国现代呼吸病学基础理论与临床研究最新进展的作品,是近几年来出版较少的高品位学术专著之一。

图书作为一种特殊的商品正以特殊的方式走向竞争日趋激烈的市场,趋众鹜群的通俗读物如雨后春笋般涌入书民的视野,同类品种重复出版,图书数目急剧增加,搞得出版者空前的忙乱,而一些高水平的学术性专著却因为阳春白雪和者寡,只好退避三舍,这种现象无疑使医药科学技术的发展受到了严重的影响。

在当前新的出版形势下,尤其是科技出版社,通过出版大众化的科普、生活读物取得经济效益,来保证、加强高品位、高质量的科技专著出版,抑或是社会主义市场经济模式下科技著作出版的一条重要途径。从这个意义上说,《现代呼吸病进展》的编辑出版,也是一次有益的尝试。

在《现代呼吸病进展》一书即将面世的时候,我们由衷地感谢全体编著人员为本书付出的辛勤劳动,同时,也恳切地希望各个专业领域的专家学者随时向我们展示自己的研究成果和学术风采,更多地出版一些高水平的学术著作,以满足广大医学工作者的需要。为医药科技事业的发展,为人类的健康共同努力。



Handwritten signature and date: 94.4.18.

序



殷大奎 教授、主任医师，中华人民共和国卫生部副部长，中共卫生部党组成员，中华医学会副会长。1940年生，湖北安陆人，1964年8月毕业于同济医科大学（原武汉医学院）医疗系。曾任华西医科大学副校长及四川省卫生厅副厅长、厅长。先后在国内外发表学术论文60多篇，并多次参加国际国内大型学术会议。主要成果和著作有：机械通气常见并发症的识别和处理；有机磷农药中毒致呼吸衰竭中几个问题的探讨；“FGL-Ⅱ型肺泡气自动收集器”的临床应用；用力呼气肺量图平均通过时间的影响因素和临床意义；肺泡通气量、生理死腔/潮气比率和肺泡-动脉血氧分压差测定及其临床意义；氦气替代氮气测定肺一氧化碳弥散量的研究；《Modern Medicine of China》(Chronic Bronchitis and Chronic Cor Pulmonale) (伦敦，英文版)；《慢性肺心病的防治研究——我国十年研究成果介绍》临床部分(人民卫生出版社)。曾获省科技成果二等、三等奖及省卫生厅科技成果二等奖等。

《现代呼吸病进展》经过众多专家精心编纂，于今出版问世，这是我国呼吸内科史上一件值得庆贺的大事。

科技作为生产力，并作为综合国力的基础，已不断被许多国家所认识和重视，今后国力较量的最核心问题，是争夺科技的优势，而要达到这个目的，获得信息和知识的能力和程度，就成为争夺优势的前提。在扑朔迷离的变革与动荡的表象之下，起支配作用的权力正悄悄地经历着一场革命性的、全面而深刻地转移。美国著名的未来学家阿尔温·托夫勒(Alvin Toffler)继所著《未来的冲击》和《第三次浪潮》后，近期又新著《权力的转移》(Powershift)一书，中心内容是：人们正处在一个权力转移时代；世界将形成一个“创造财富的新系统”；知识的作用日益重要；获得知识最快速者得生存。托夫勒认为，正在到来的新纪元，不论现在看来多么混乱，无序，其中一个最显著的特征就是知识的急剧膨胀与迅速传播。谁握有大量知识，谁就能在未来的世纪中获胜。他还说知识是一种最重要的资本，将成为财富的源泉。知识和信息就是财富，

就是权力。

图书作为在众多信息传递工具中最有力的载体，是人们获得信息知识和技能的重要来源。

这本由钟南山、朱元珏等教授主编、国内 48 名专家参加撰写的专著，内容融基础与临床、理论与实践、传统与现代、经验与教训、国内与国外于一体，系他们从浩如烟海的国内外呼吸内科疾病知识中广搜博采、熬尽心血，遴选出最优秀的部分，是自身长期实践所积累的大量丰富经验和宝贵心得的结晶。也是迄今为止，我所见同类著作中，最具系统性、实践性、科学性、新颖性和权威性的高水平专著。

该书的问世，从一个侧面反映了我国呼吸内科疾病防治形势发生巨大变化的现实，提示着该学科、该领域开始走出了同道们开玩笑时常说的“心脏肥大”、“呼吸衰竭”的窘境，值得庆幸！值得称道！另一方面，该书的出版发行无疑对广大国内专业人员，获得信息、丰富经验、更新知识，以及国外读者进一步了解我国的这个领域的实际水准是大为有益的。

参加这次编撰的 48 名作者中我认识 4/5，一半以上是我 20 年前从事慢支炎、肺心病等呼吸病防治时认识的，有些可以说还相当熟悉，不少人还是我的良师益友。虽然我现在已改医从政了，但共同的专业、事业心和多年的情谊把我和这本书联在一起了，特别是我有幸成为最先受益的第一位读者拜读全书，深深得益，这种复杂的情感和知识使我对该书付梓印行的实际意义及影响，似乎理解和体会得更深刻一点。我愿意将此书推荐给广大读者，我相信，读者们也会和我感受的一样，去祝福它！喜欢它！

最后我还想说一点，就是本书的作者们几乎都是承担着繁重的医疗教学和科研任务的情况，牺牲、挤出那不可多得的业余时间撰写的，他们那种不辞劳苦，辛勤耕耘，殚精竭虑的为事业、为后人、为人民的无私奉献的精神是值得我永远学习的。

殷会

1994.3.27

前 言

呼吸系统疾病是危害我国人民健康的常见病、多发病。就卫生部的统计,在我国 1992 年人群死亡率的前十名病种中,因呼吸系统疾病(不包括肺癌)而死亡者在城市总死亡率中占第 3 位,在农村中占第 1 位。加强呼吸系统疾病的防治研究是我国医务工作者的迫切任务。

随着分子生物学、免疫学、细胞生物化学等基础学科的发展,一些新技术的应用,新疾病的发现及新疗法的推广,呼吸系统疾病的基础与临床研究发展迅速。为了及时反映当前的学术动态,我们组织了国内 48 名专家,共同撰写了《现代呼吸病进展》一书。

《现代呼吸病进展》共有主题 10 篇,专题 53 个章节。在各主题中除传统的专题章节以外,还力求列出近年来较新的研究专题。如在基础研究中有关分子生物学技术在呼吸系统疾病诊治中的应用,自由基、受体学说及呼吸肌疲劳;在新技术中的核磁共振、支气管肺泡灌洗术;在新疾病中的爱滋病、闭塞性细支气管炎并机化性肺炎,及某些职业性和药物性肺病;在新疗法中的肺移植等。

由于当前呼吸系统研究工作日新月异,加之编者水平有限,所以本书虽称《进展》,但仍不免挂一漏万,甚至有错误之处,敬请同道们批评指正。

在编写过程中,得到广州呼吸疾病研究所徐军、冉丕鑫、刘含章、黄海鹭、李敏然等同志悉心进行文字修改及对文章体裁和形式的统一,中国医药科技出版社大力的帮助和支持,使本书得以顺利完稿,在此谨致以诚挚的谢忱。

钟南山 府 军 朱元珏

1993 年 10 月

目 录

第 一 章	分子生物学技术在呼吸系统疾病诊治中的应用	(1)
	· 基因诊断 · 基因探针的制备 · 基因分析 · DNA 重组技术在呼吸系统疾病诊断上的应用 · 基因治疗	
第 二 章	氧自由基与呼吸系统疾病	(12)
	· 氧自由基的产生 · 氧自由基介导组织损伤的机理 · 氧自由基清除剂 · 氧自由基与呼吸系统疾病	
第 三 章	受体理论及其在呼吸病研究中的应用	(20)
	· 受体概述 · 受体平衡失调 · 介质及其受体 · 糖皮质激素受体 · 神经类及其受体	
第 四 章	肺的分泌和代谢功能与临床	(33)
	· 肺内与分泌和代谢功能有关的细胞 · 肺的分泌代谢功能	
第 五 章	呼吸肌肉疲劳的基础与临床研究	(48)
	· 呼吸肌肉的组成及其功能 · 呼吸肌肉无力和疲劳的基础 · 呼吸肌肉功能测定 · 呼吸肌肉无力或疲劳对肺功能的影响 · 呼吸肌肉疲劳的防治 · 呼吸肌肉疲劳研究的意义和展望	
第 六 章	CT 在呼吸系统疾病诊断上的应用	(70)
	· 基础知识 · CT 对呼吸系统疾病的诊断 · CT 在呼吸病诊断中的应用价值与限度	
第 七 章	磁共振成像在呼吸系统疾病中的应用	(89)
	· 磁共振成像基本原理及概念 · 磁共振成像在呼吸系统疾病的应用	
第 八 章	核医学在呼吸系统疾病诊断上的应用	(114)
	· 肺显像的分类、原理及方法 · 临床应用	

第 九 章	纤维支气管镜诊治呼吸系统疾病	(138)
	· 诊断 · 治疗	
第 十 章	支气管肺泡灌洗及其临床应用	(150)
	· 支气管冲洗与支气管肺泡灌洗 · 支气管肺泡灌洗 · BALF 实验检查的临床应用 · BALF 细胞学分析 · BALF 中非细胞性蛋白成分	
第 十 一 章	肺部感染的病原学诊断	(159)
	· 痰标本处理和定量培养 · 下呼吸道标本直接采样 · 免疫学方法在肺部感染诊断中的应用	
第 十 二 章	医院获得性肺炎	(165)
	· 发病机理 · 诊断 · 诊断标准 · 治疗 · 预防	
第 十 三 章	肺部真菌感染	(173)
	· 病原体和发病机理 · 肺部真菌感染的临床表现 · 肺部真菌感染的诊断 · 肺部真菌感染的治疗	
第 十 四 章	军团菌肺炎	(186)
	· 病因 · 流行病学 · 发病机理和病理 · 临床表现 · X 线胸部检查 · 实验室诊断 · 并发症 · 诊断与鉴别诊断 · 治疗 · 预后	
第 十 五 章	艾滋病及其肺合并症	(196)
	· 病原学及流行情况 · 传播方式及实验室发现 · 爱滋病病毒感染及爱滋病的临床表现 · 爱滋病的诊治 · 爱滋病的肺合并症 · 附: 经临床、实验及尸检证实的中国大陆居民首例 AIDS 报告	
第 十 六 章	呼吸系统感染的抗菌药物应用	(207)
	· 常用于呼吸系感染的抗菌药物 · 呼吸系感染的防治及抗菌药物应用 · 抗菌药物的合理应用	
第 十 七 章	肺动脉高压的基础与临床	(240)
	· 肺动脉高压的分类 · 发病机理 · 肺动脉高压的诊断 · 肺动脉高压的治疗	
第 十 八 章	肺血管疾病	(253)
	· 概述 · 肺栓塞 · 原发性肺动脉高压 · 肺静脉堵塞病	

第十九章	肺血管炎	(297)
	• 原发性肺血管炎 • 系统性血管炎 • 可能发生肺血管炎的全身性疾病 • 偶发性肺血管炎	
第二十章	慢性阻塞性肺疾病呼吸衰竭与人工通气中的营养支持	(310)
	• 呼吸衰竭与人工通气患者营养不良发生率、类型及病因 • 营养不良对生理功能及预后的影响 • 呼吸衰竭病人营养状态的评价 • 营养支持疗法的原则 • 呼吸衰竭患者营养疗法的合并症 • 营养疗法的疗效	
第二十一章	肺心病防治的进展	(320)
	• 肺心病的诊断进展 • 肺心病的治疗进展	
第二十二章	慢性肺源性心脏病与多器官衰竭	(326)
	• 病因与发病机理 • 慢性肺心病并发 MOF 的高危因素 • 诊断 • 治疗 • 预后	
第二十三章	炎性介质与哮喘	(334)
	• 炎性细胞与炎性介质 • 炎性介质对气道的作用 • 炎性介质与哮喘 • 小结	
第二十四章	气道高反应性与支气管哮喘	(345)
	• BHR 形成的机理 • BHR 的测定方法 • BHR 与支气管哮喘的关系 • 无症状的 BHR 可发展为哮喘 • 从降低气道高反应性来防治哮喘	
第二十五章	平喘药物的研究进展	(353)
	• 抗炎药 • 支气管扩张药 • 哮喘治疗药物的选择及展望	
第二十六章	茶碱作用机理及临床应用之现状	(362)
	• 前言 • 茶碱作用机理及药理学 • 药效学 • 生物药学及药代动力学 • 临床应用	
第二十七章	重症支气管哮喘的治疗	(380)
	• 哮喘发作严重程度的判定 • 一般治疗原则 • 机械通气的应用 • 吸入氮-氧混合气体对重症哮喘的治疗作用 • 支气管肺泡灌洗	

第二十八章	肺癌标志物及在肺癌诊断中的应用	(389)
	· 蛋白类 · 酶类 · 激素 · 其它标志物及与标志物 相关物质	
第二十九章	肺癌综合治疗的现状	(397)
	· 综合治疗的原则和现状 · SCLC 的综合治疗 · NSCLC 的综合治疗 · 附：京津肺癌综合治疗协作 研究计划（目的 · 方式 · 实验研究 · 临床研究）	
第三十章	小细胞肺癌的多学科治疗	(409)
	· 概述 · SCLC 治疗方案选择的依据 · SCLC 各 种治疗方法的进展 · SCLC 多学科治疗	
第三十一章	非小细胞肺癌治疗进展	(416)
	· 手术及其辅助治疗 · 放射治疗 · 化学治疗 · 其 它局部治疗	
第三十二章	转移性恶性胸腔积液的诊断和治疗	(431)
	· 发病率 · 病理生理 · 症状和体征 · 实验室检查 · 恶性肿瘤转移性胸腔积液诊断和鉴别诊断 · 治 疗	
第三十三章	胸膜间皮瘤	(449)
	· 局限型间皮瘤 · 弥漫型间皮瘤	
第三十四章	非结核分支杆菌肺病	(457)
	· 病原学 · 流行病学 · 感染途径 · 临床表现 · 实 验室及辅助检查 · 诊断 · 鉴别诊断 · 治疗	
第三十五章	肺结核化学疗法进展和动向	(469)
	· 前言 · 肺结核化疗理论的进展 · 肺结核化疗实 施原则的进展 · 肺结核短程化疗的发展 · 肺结核 化疗发展与研究动向 · 展望	
第三十六章	结节病	(482)
	· 病因和发病机理 · 病理形态学变化 · 临床表现 · 胸部影像学检查 · 肺功能检查 · 实验室检查 · 放射性核素显像 · 诊断 · 治疗 · 预后	
第三十七章	间质性肺疾病的诊断技术及其评价	(498)
	· 间质性肺病的概念及分类 · 间质性肺病的诊断	

技术及其评价·结束语

第三十八章	弥漫性肺间质纤维化	(507)
	· 特发性肺间质纤维化·继发性肺间质纤维化	
第三十九章	闭塞性细支气管炎伴机化性肺炎	(518)
	· 概述·BOOP 病理学诊断·临床表现·诊断及鉴别诊断·治疗及预后·结束语	
第四十章	成人型呼吸窘迫综合征发病机理	(524)
	· 参与反应的细胞·参与急性肺损伤的介质·肺表面活性物质·小结	
第四十一章	成人型呼吸窘迫综合征的诊断与治疗	(536)
	· ARDS 诊断进展·ARDS 治疗进展	
第四十二章	睡眠呼吸暂停综合征	(553)
	· 定义及分型·发现情况·病因·发病机理·病理生理改变与临床表现·诊断·治疗·几个特殊问题的考虑	
第四十三章	职业性肺病研究进展	(568)
	· 职业性哮喘·棉尘病·外源性变应性肺泡炎(EAA)·尘肺	
第四十四章	药物引起的肺部疾病	(584)
	· 发病情况·药源性肺病的发病机制·药源性肺病的分类·药源性肺病的诊断·药源性肺病的治疗·药源性肺病的预防	
第四十五章	全身性疾病的肺部表现	(599)
	· 心血管疾病·消化系统疾病·肾脏疾病·血液病·代谢内分泌疾病·结缔组织疾病	
第四十六章	糖皮质激素在呼吸系统疾病中的临床应用	(610)
	· 概述·糖皮质激素的治疗作用机理·糖皮质激素的副作用及其对策·呼吸系统某些疾病中糖皮质激素的应用	
第四十七章	呼吸道的湿化及雾化疗法	(623)
	· 湿化及雾化疗法的病理生理学基础·影响雾粒	

在呼吸系统内沉积及起效的因素·湿化及雾化治疗方法·常用的湿化及雾化药物·雾化治疗的限制及副作用

第四十八章 氧气治疗的进展 (639)

·低氧血症和缺氧·低氧血症或缺氧的原因·氧疗的适应症·呼吸衰竭与氧疗·控制性氧疗·氧疗期间 PaO_2 与 PaCO_2 的变化的规律·氧化效果的评定·氧疗的具体方法、工具和注意事项·氧疗的监护和管理·氧疗的撤离·缓解期氧疗(即家庭氧疗·氧疗的副作用和氧气毒性作用

第四十九章 机械通气的现状及发展趋势 (658)

·通气机的新趋势·机械通气有关的某些基本概念·通气方式·脱机问题

第五十章 呼吸内科重危病者的监护 (682)

·一般概念·通气监护及评估

第五十一章 肺移植 (698)

·历史背景·单侧肺移植·双肺移植·心肺联合移植·肺移植的病理学·免疫抑制剂的应用

第五十二章 咯血的诊断和治疗 (722)

·病因及发病机理·引起咯血的常见疾病分类·大咯血诊断及鉴别诊断·咯血的辅助检查·咯血的治疗·几种特殊咯血

第五十三章 自发性气胸诊疗的进展 (734)

·病因及发病机理·症状和体征·诊断·自发性气胸的治疗

第一章

分子生物学技术在呼吸系统疾病 诊治中的应用



徐 军 40岁,毕业于第一军医大学,师从同济医科大学呼吸内科**段生福**教授和广州呼吸病研究所钟南山教授,获医学博士学位。博士论文“内皮衍生松弛因子/NO和内皮素在低氧肺动脉高压形成中的作用”在国内该研究领域首次应用分子生物学的技术,从基因的角度及分子、细胞、离体器官及整体四个水平,系统地探讨了EDRF和EDCF在低氧肺动脉高压形成中的作用,受到

有关专家的高度评价。

从本世纪六十年代始,生物科学的最大特征是其研究水平已达到分子水平。进入七十年代以来,人类已经能在细胞、亚细胞和分子水平上直接操纵生命。近年来,随着基因载体的发现及其人工构建的成功,细胞融合技术的进一步发展完善,分子生物学技术已经从分子生物学家神秘莫测的实验室步入人类社会,并在逐步向临床实验室过渡,DNA技术在临床诊断和治疗上的应用已成为可能,这一发展将深深影响现代医学的很多方面,不仅包括对单基因遗传疾病和传染诊断,还将包括对许多伴有很强遗传因素的人类常见病基因的研究分析,例如各种自身免疫性疾病、冠心病、癌症和支气管哮喘等。在此基础上必将引起临床上许多疾病治疗战略指导思想和路线上的重大变革。随着基因治疗的日臻完善,许多难治之症和不治之症,不仅仅涉及遗传疾病,而且诸如愈来愈成为人类健康的头号杀手—癌症的治愈都将是可待的。

一、基因诊断

基因是涉及某种蛋白质或酶的遗传上的基本单位。人类染色体的DNA包括着10万左右的基因,这种DNA称为基因组DNA。具体来说,基因应该

是基因组中与合成某一肽链有关的一段 DNA 序列。

根据分子杂交的原理,探测基因的存在、类型和基因的缺陷,进而对疾病做出诊断,就称之为基因诊断。

基因诊断包括两方面:一是对内源异常基因的探测,如前面讲过的某些遗传病的诊断;二是对外源基因的探测,例如病毒感染、细菌感染、寄生虫如疟疾的感染等。欲探测某种基因,通常要涉及两个方面,一是被探测的基因,它存在于细胞核的基因组中,因此必须首先采集细胞,将其基因组 DNA 分离出来,再经必要的处理如酶解成较小的片段,将双链变成单链,然后固定以便进行分子杂交探测,二是需要一个已知的基因探针。无论探测内源基因还是检测外源基因,都必须首先制备出特异的基因探针。基因探针实际上是一段用放射性同位素或非同位素如生物素或酶联标记的,与目的基因互补的 DNA 片段。它的来源主要有两条途径:一是通过提取纯度较高的相应的信使 RNA (mRNA) 反转录成 cDNA,利用 cDNA 与目的基因 DNA 互补,通过分子杂交达到探测目的,这种探针谓之 cDNA 探针。另一条途径是做基因文库,把染色体 DNA 通过超声波打断或限制性内切酶将其不完全水解,得到许许多多随机的片段,选取长度大约在 15~20 千碱基对 (Kb) 左右的 DNA 片段重组到 λ 噬菌体中去,经过体外包装、转染大肠杆菌,在固体培养基上得到很多噬菌斑,然后利用菌斑杂交的方法筛选到含有目的基因的片段。以此作为探针,称基因组探针。作为基因探针的 DNA 有二个基本特性:①必须含有探测所需分析的目的基因序列。②必须能在细菌中大量扩增,从而得到一定数量的 DNA。因此,通过以上途径得到的 DNA 片段需要再做次级克隆到大肠杆菌的质粒中去保存,以便在需要时扩增。cDNA 探针不含内含子序列,且由 mRNA $\rightarrow$ cRNA 得到的是单链,需要再合成双链,才能克隆化。

二、基因探针的制备

制备基因探针是利用 DNA 重组技术进行的。其制备原理和过程简述如下:

(一) 从基因文库分离特异基因

利用 λ 噬菌体作为载体,建立完整基因文库的方法可制备基因组探针。

1. 作为载体的 λ 噬菌体的基因结构特点 在 λ 噬菌体基因中间有一段非必要区段约 15Kb 左右,可以通过内切酶切去,而插入外源 DNA 片段,其左臂主要含有编码噬菌体外壳蛋白的基因,其右臂主要含噬菌体本身复制及使宿主菌溶解等基因,这些基因都是载体所必须的。

2. 重组噬菌体构建的基本过程和原理 (1) 首先要对受体菌进行扩增。(2) 使噬菌体吸附于受体菌再进行扩增。(3) 提取噬菌体 DNA 并鉴定。(4) 限制性内切酶切去中间不必要的部分, 回收左右臂。(5) 制备外源基因: 染色体 DNA 提取→限制性内切酶对 DNA 部分降解→分离纯化。(6) 将载体的 DNA 与外源 DNA 连接。(7) 进行体外包装: 重组后的噬菌体没有感染活性, 必须经过体外包装, 包上外壳蛋白, 才能转染大肠杆菌。所谓体外包装就是给重组 DNA 提供噬菌体的头部和尾部的包装蛋白。(8) 筛选: 经包装后的噬菌体可感染大肠杆菌, 形成噬菌斑。运用原位杂交的方法把各重组子转移到硝酸纤维膜上, 用已知探针 (一般是 cDNA 探针) 来检测哪个噬菌体含有所需的基因。当目的基因克隆株得到以后, 往往需要克隆到大肠杆菌的质粒中去, 才能真正作为基因探针, 即进行次级克隆。(9) 次级克隆: 是将重组噬菌体 DNA 通过特定的限制性内切酶酶解, 得到目的基因片段, 继而重组到经同样酶切的质粒中去。载体质粒一般具有二个抗药性标志, 插入 DNA 破坏了质粒的四环素抗药基因序列, 使质粒对四环素敏感, 对青霉素仍然耐药, 以此作为标记筛选。

(二) 从 mRNA 反转录制备特异 cDNA

1. 总 RNA 提取和 mRNA 的分离。
2. 以 mRNA 为模板, 在逆转录酶的作用下合成 cDNA 单链。
3. 在 DNA 聚合酶 I、S1 核酸酶的作用下, 合成 cDNA 双链。
4. 给载体质粒接上互补的多聚核苷酸接头, 最后把载体与目的基因进行复性和连接, 成为一个重组质粒, 再转化到大肠杆菌中去, 通过筛选, 得到含这个基因的 cDNA 克隆。

含有目的基因片段的重组质粒经重新送入细菌扩增后, 再从细菌中提取质粒 DNA, 然后从重组质粒 DNA 中分离回收含特定基因的 DNA 片段, 再将此片段进行标记才能用于基因探针。一般包括如下几个步骤: ①用限制性内切酶水解含特定基因的重组体质粒 DNA。②用电泳方法把含特定基因的 DNA 片段与质粒 DNA 的其它片段分开。③从电泳凝胶中回收所需的 DNA 片段。

三、基因分析

(一) DNA 分子杂交

将样本 DNA 变性处理后直接吸附在硝酸纤维膜上 (点样), 加入探针, 直接杂交, 谓之斑点杂交。斑点杂交通常是用于探测拷贝数较多的外源基因, 例如微生物的基因。

（二）限制性内切酶酶谱分析

DNA 限制性内切酶能识别特定的碱基顺序，因而能特异地把 DNA 切割成各种一定大小的片段，通过琼脂糖凝胶电泳分离，并用 Southern 印迹法把这些 DNA 片段转移到硝酸纤维薄膜上，再与放射性同位素标记的特异基因探针进行 DNA 分子杂交，经过放射自显影即能显示出相应的 DNA 片段（即酶谱）。将其与正常人的酶谱进行比较，即可鉴定其基因是否缺失或异常，此属分子缺陷的直接测定。直接测定变异只能在已纯化的基因中进行。基因缺陷相应的 DNA 片段序列已清楚的如 α -地中海贫血，基因点突变或个别核苷酸的丢失或插入，如果能引起某一限制酶的切点改变的，如血红蛋白 S 等一类遗传病，均可经该途径进行分析并做出诊断。

（三）限制性片段长度多态性连锁分析

大多数遗传病的缺陷并不发生在酶切位点。许多单基因病或伴有很强遗传成份的常见病的变异还未能鉴定，无法通过直接观察酶切图谱得到诊断，只能利用限制性片段长度多态性连锁分析的方法间接进行测定。

通常在一个引起人类疾病的基因中存在着一些限制性内切酶的多态性位点，由于这些多态性限制性内切酶位点与该基因有密切关系，即所谓高度连锁（Linkage）。位点的多态性产生了限制性酶解 DNA 片段长度的多态性（RFLP）。应用这种限制性片段多态性连锁分析可间接对某一特定分子缺陷疾病做出诊断。这种鉴别是利用能区别两个等位基因的 DNA 标记-DNA 多态性来完成的，而不需考虑特定分子的缺陷。根据 DNA 多态性进行诊断，需要对某特定家庭中的一些成员的 DNA 标记进行计分，以使某一给定标记与该家庭的正常或异常基因相连接。

许多遗传性疾病，特别是与遗传有着密切关系的、属多基因成分与环境因素相互作用导致的心血管疾病，如冠心病、高血压、呼吸系统的支气管哮喘以及癌症等常见病，引起它们异常表型的基因尚不清楚。用遍布大量 DNA 多态标记进行连锁性分析，可以揭示某标记与该表现型间的紧密连接，并能把未知基因定位于特定的染色体或其区段上。例如囊性纤维化（CF）所涉及的特异基因原先是未知的，然而通过与 DNA 标记的连接，得到了定位，最终分离获得 CF 基因。CF 基因分离所运用的这种反向遗传学的分析方法，为那些常见的复杂的遗传分子缺陷病发病机制的最终阐明开辟了新路。

（四）寡聚核苷酸分子杂交技术

人工合成的寡核苷酸探针能与相应的互补 DNA 链杂交。在一定条件下，只有与寡核苷酸探针顺序完全互补时，才能形成稳定的双链。据此，我们可以