第3章 分子医学基础

第1节 分子医学发展史

应用分子生物学、基因组学、蛋白质组学和遗传学解决医学研究与临床问题的新兴学科，被称为分子医学。分子医学正在发生着日新月异的变化，它掀起了一场临床医学的革命，将从根本上改变我们对疾病病因、分类、诊断及治疗的认识。以往我们对一个疾病做出临床诊断主要根据临床特征，以及不尽完善的各种实验室检查，很少考虑遗传对疾病的影响。毋庸置疑，分子医学革命已使很多医师感觉到有些力不从心。即使对分子医学及其影响有所了解的人，也认为这是一门专业性十分强的学科，目前对日常的临床实践用处不大。事实上，这种看法是片面的。越来越多的证据表明，完全不受基因影响的临床疾病很少。本章简要介绍分子医学基本知识及对心血管病的影响，并主要侧重于对外科方面的影响。希望通过本章基本知识的介绍，能更好地为患者服务。

分子医学可追溯到1871年发现核蛋白（nucleoprotein）的年代，当时认为这种蛋白是酸性物质，故取名叫核素（nuclein），尔后改称为核酸。1944年发现肺炎球菌的遗传信息位于DNA内，6年之后证明DNA内碱基腺嘌呤（adenine，缩写为A）与胸腺嘧啶（thymine，T）数相等，鸟嘌呤（guanine，G）与胞嘧啶（cytosine，C）数量相等。20世纪50年代，弗兰克林（Rosalind Franklin）与威尔金斯（Maurice Wilkins）研究X线晶体衍射的工作以及沃森（James Dewey Watson，1928出生）与克里克（Francis Harry Compton Crick，1916出生）的努力，证明DNA是双螺旋结构，进行复制时双链解开。1956年发现DNA 聚合酶，能够合成小段双链DNA。沃森等的发现使DNA的研究进入了一个新的时代。为此，1962年诺贝尔生理学或医学奖颁给了克里克与沃森以及威尔金斯三位科学家。20世纪60年代发现与阐明了细胞核通过信使 RNA（mRNA）与细胞质内蛋白合成体系联系，并把染色体以外的DNA叫“质粒”，后者被生物工程界广泛应用，即“载体”。在这一时期，人们搞清了氨基酸是由三个核苷酸组成的密码子编码[1-3]。

科学技术进步推动了分子医学的发展。1970年，特曼（Howard Martin Temin）与巴尔的摩（David Baltimore）发现从“DNA→RNA →蛋白”这条被公认的信息通路，在反转录病毒中行不通，这一发现帮助科学家发现了反转录酶，使遗传工程以RNA为模板复制DNA变成现实。以此方法合成的DNA叫互补DNA（cDNA）。反转录酶的发现，使我们了解到为何某些病毒能把自己的遗传信息整合到宿主基因组。这项成就使特曼和巴尔的摩两位研究者以及他们的老师杜尔贝科（Renato Dulbecco）共享了1975年诺贝尔生理学或医学奖。

限制性内切酶与连接酶：20世纪60年代后期及70年代早期，人们相继发现了很多不同种类的限制性内切酶，能够使科技人员像用剪刀一样，在DNA特定位点，把DNA 剪成所需要的片段。同时用DNA连接酶能把DNA片段连接起来。这些发现把我们带入了DNA重组时代。1973年，科恩（Stanley

Norman Cohen）等发现可以把外源DNA插入病毒质粒中去，且质粒感染细菌后，插入的DNA也随细菌的增殖而增殖。使用该方法能够同时无限制地扩增外来DNA片段，由此产生了“基因克隆技术”，第一个被克隆的真核细胞基因是1976年完成的兔β-球蛋白基因[1-3]。

DNA探针：20世纪60年代，人们已经了解到DNA是双链螺旋结构，在一定条件下可以解链，也可以重新复链。DNA双链的形成遵循严格的A/T、G/C配对原则。因此，了解一条链的序列，便可了解另一条链的结构。DNA探针就是选择一段DNA并将其标记，标记的这段DNA能够通过杂交（碱基互补）与特定的DNA区域结合，由此而识别出这一段特定的DNA结构。1975年，萨瑟恩（Edward M. Southern）把DNA转移到固体支持膜上，使杂交在膜上进行，即把DNA用限制性内切酶切开，转到膜上，发明了目前常用的Southern印迹技术[1-3]。

基因结构与功能：1975—1977年，两种DNA测序方法的建立，对DNA结构有了更好的了解，使桑格（Frederick Sanger）与罗伯茨（Walter Gilbert）以及贝格（Paul Berg）获得1980年诺贝尔奖。1977—1978年，罗伯茨等又发现基因的结构不是连续的，中间有内含子（intron）将其隔开；罗伯茨与夏普（Phillip Allen Sharp）发现了编码氨基酸的基因序列，叫外显子（exon）。转录过程中能够剪除内含子，使外显子连到一起，这一发现使他们获得了1993年的诺贝尔奖。1995年诺贝尔生理学或医学奖授予刘易斯（Edward B. Lewis）、尼斯林-沃哈德（Christiane Nusslein-Volhard）及威斯乔斯（Eric Wieschaus），以表彰他们在早期胚胎发育遗传机制方面的卓越贡献。

基因多态：20世纪70年代中期，发现人群中间每个人DNA长度有差异，如果人群中频率超过1%即叫基因多态（polymorphism），现在基因多态与基因突变被统称为遗传变异。20世纪80年代人们提出用DNA多态作标记，构建基因组图谱诊断疾病和进行群体遗传学研究。

生物工程：把外源DNA整合到宿主细胞，在体外产生蛋白，使基因重组技术进入商业化。1976年世界上第一个生物工程公司基因泰克公司（Genentech Inc），在美国加利福尼亚州诞生，人胰岛素成为第一个于1982年正式上市的基因工程药物，20世纪80年代产生了转基因动物，1988年第一个转基因动物专利获准[1-3]。

近期进展：人们通过功能、定位克隆及基因突变分析，找到一些致病基因，进行了大量基因治疗的尝试，为疑难疾病的诊断与治疗带来了曙光。聚合酶链反应（polymerase chain reaction，PCR）技术，成为分子生物学研究中最常用的技术手段。DNA多态分析为寻找疾病易感基因及药物敏感性与毒性指明了方向，并产生了一门新的学科——基因组药理学。

第 2 节　DNA、RNA 与 cDNA

DNA为脱氧核糖核酸，系双链大分子，储存着有机体的遗传信息。分离DNA需要有核细胞、蛋白酶（多用蛋白酶K）消化破坏细胞膜与蛋白及化学物质，把核酸从中分离出来。

DNA经过转录合成RNA，再经过翻译形成肽链，经过内质网和高尔基体加工后成为有一定空间结构的蛋白质。mRNA经过反转录形成cDNA（complementary DNA，指互补于mRNA的DNA分子）。

DNA的来源：①所有生物体的各种有核细胞（所含基因组DNA序列相同）。为方便采集，通常DNA来源于循环中的有核血细胞，10 mL血液可分离出大约DNA 250 μg。具体步骤为分离有核细胞后，细胞再被蛋白酶消化，分离出细胞核，再用酚、氯仿把DNA分离出来。②唾液中的脱落细胞。③头发根部的细胞，均可用作DNA的来源[1-3]。

DNA的双链结构：①一级结构：核苷酸排列顺序，即碱基排列顺序。②二级结构：即双螺旋模式。两条链平行/反向，两个方向，两链之间剪辑链接。A，T有两个氢键；G，C有三个氢键。核酸一圈：

10个碱基对，螺距3.4 nm；二级结构记忆口诀：结构独特双螺旋，单链排列反平行，碱基互补氢键配，头5尾3顺到底。③三级结构：超螺旋。

脱氧核酸的5′与3′碳原子上连着核酸骨架，每条链末端5位碳上的磷酸基称为5′末端，3位碳上的磷酸基称为3′末端。

正义链：遗传信息以核苷酸碱基A、T、G、C形式从5′到3′方向排列。

反义链：正义链的对应序列，A与T，C与G配对。

如，正义链（起始）5′-ATG-GGT-TCT-GTT-GCT-GCT-TGG-TAA-3′（终止）；反义链（起始）3′-TAC-CCA-AGA-CAA-CGA-CGA-ACC-ATT-5′（终止）[1-3]。

基因是产生一条多肽链或功能RNA所需的全部核苷酸序列；基因具有双重属性：物质性（存在方式）和信息性（根本属性）。基因携带生、老、病（健康）、死，种族、血型、孕育等过程的全部遗传信息，同时也是应对环境变化，决定生命健康的内在因素[1-3]。

遗传密码：以三个核苷酸为一个密码子，编码一种氨基酸。起始密码子为ATG，终止密码子为TAA、TAG、TGA。合成一个肽由不同的密码子所编码，开始与终止也受到密码子的控制。肽链合成开始：起始信号，终止密码为UAA、UAG、UGA。信号肽：由信号密码所编码，信号密码子位于成熟 mRNA5′端起始密码之后。因此信号肽是蛋白质合成中最先被翻译的氨基酸序列。任何密码上的单个核苷酸碱基的变异都有可能导致某些疾病的遗传易感性增高（多基因疾病）或导致遗传病（单基因疾病）。因此，遗传密码需从正义链解读。RNA 是以DNA 反义链为模板合成的核糖核酸。若需要合成RNA序列，则应以DNA 反义链为模板。RNA与DNA不同的是，RNA是单链。RNA 的尿嘧啶（U）取代DNA中的胸腺嘧啶（T）。提取RNA时需要抑制RNA酶分解，提取过程复杂、严格，避免RNA分离提取过程中RNA的降解。

RNA 具有组织特异性，相关的RNA只能从该基因转录活性高的组织中获得。mRNA仅含有重要的外显子遗传信息，无内含子，用在重组DNA技术上更为方便。以mRNA 为模板，合成一段与该段mRNA 互补的核苷酸序列，并以此为模板再合成一条互补序列成为双链，即为cDNA。cDNA仅含编码序列，无非编码序列。

DNA探针：DNA 双链结构及碱基互补配对的特征，使我们能够选择某一段单链DNA作为探针，使之与另一段亦为单链的互补DNA片段结合，通过已知的探针序列推断另一段与之结合的DNA 序列。由于DNA 双链结构是由氢键结合在一起的，可用热变性法及氢氧化钠处理使之解链，热变性的DNA溶液经缓慢冷却或氢氧化钠处理的DNA溶液的pH恢复，两条解链的互补单链DNA重新缔合；即“退火”重新形成双链结构。DNA探针与DNA探针、靶DNA片段与靶DNA 片段、DNA探针与靶DNA片段均可在一定条件下形成双链。如果用放射性P（磷）标记DNA探针，则DNA探针与靶DNA片段的结合可通过放射自显影检测。也可用一些化学物质标记探针，以避免核素带来的环境污染。

DNA探针有3种类型：cDNA、基因组DNA 与寡核苷酸。cDNA探针用反转录酶以RNA 为模板合成，只含外显子序列。基因组DNA 可来自任何DNA片段，可以处在内含子与外显子交界处或未知功能、未知定位的片段。寡核苷酸探针通常很短，仅20～30个碱基，可根据需要合成[1-3]。

RNA探针：由质粒载体产生，用来检测RNA。为避免混乱，探针有统一命名，如D19S51，即人19号染色体51节段。探针pTD[3-21]黏质粒，TD即T. Donlon，是制备此探针科学家的名字。探针标记通常用放射性磷或非核素化学物质。标记方法有随机引物标记法、切口平移标记法、末端标记法。非核素标记法（化学物质比色法）的敏感性较核素标记法低。化学发光底物比色法标记探针虽然较贵，但准确性与敏感性均较高，故应用越来越广泛。若检测基因组DNA，则寡核苷酸探针并不是一种好方法，因其长度太短、非特异结合较多，但用于扩增DNA片段十分有效[1-3]。

第 3 节　人类基因组

一、遗传信息

人类基因组由60亿个核苷酸以双链螺旋脱氧核糖核酸（DNA）分子的形式组成，这些遗传信息编码人体的基本结构并控制机体的功能运行。遗传信息由4种碱基组成，即A（腺嘌呤）、T（胸腺嘧啶）、C（胞嘧啶）、G（鸟嘌呤）。遗传信息就是指核酸中碱基的排列顺序，在双链螺旋DNA分子中以线形序列排列，两条链互补，一条链的核苷酸与另一条链的核苷酸配对，如A与T配对，G与C配对。遗传信息的破译以3个碱基为一组，每3个碱基组成一个密码子（codon），编码一种氨基酸。蛋白质由20种氨基酸组成。由基因编码的特异氨基酸线性序列在细胞内的多核糖体（polyribosomes）上组装，最后折叠成二级结构，发挥蛋白质的功能。

蛋白质合成过程首先以DNA中的核苷酸序列为模板合成mRNA，由mRNA指导翻译成线形氨基酸序列（图3-3-1）。控制遗传信息的表达是调控蛋白质合成的关键步骤，后者调控着细胞功能。因此，遗传信息指导蛋白质合成，蛋白质则调节细胞功能。

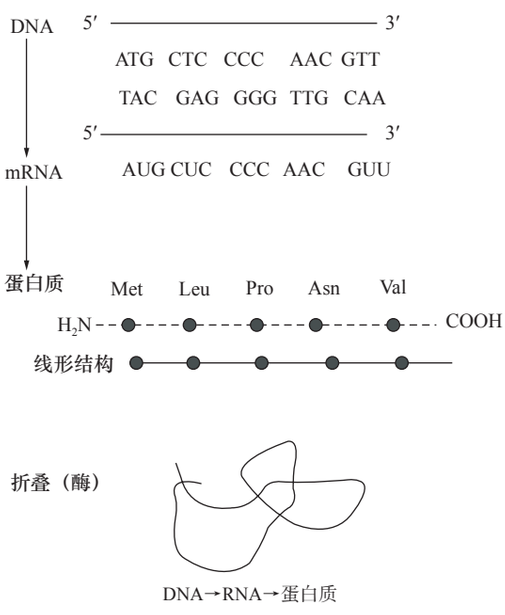

图3-3-1　信息通路

AUG编码蛋氨酸为起始密码子。

Met：蛋氨酸；Leu：亮氨酸；Pro：脯氨酸；

Asn：天冬氨酸；Val：缬氨酸。

二、人类基因组中遗传信息的含量

人类基因组含有32亿个核苷酸对组成，由4个代表不同碱基的字母ATGC组成（A腺嘌呤、T胸腺嘧啶、G鸟嘌呤、C胞嘧啶），以3个碱基为单位组成密码子储存遗传信息，每个密码翻译成一个氨基酸，由氨基酸组成蛋白。

用人类基因组遗传信息指导合成细胞功能所需的蛋白质。这一过程的起始信号（诱导信号）告诉机体细胞需要某种蛋白导致特异基因表达，并指导合成所需蛋白质，但目前我们对此过程的了解甚少。在染色体找到正确的基因后，合成蛋白质所必需的信息被转录成mRNA，如同在图书馆内找到相关信息并复印所需内容。mRNA再翻译成蛋白质，有时大的蛋白质由几条链构成，每条链由一个基因所编码，因此有多个基因参与。细胞可在数秒内找到自己所需的基因，于数分钟内合成新的蛋白质。人类基因组基本稳定。虽然基因重组、突变、自然选择都会改变人类基因组的组成，但这些都是罕见的事情。

遗传密码：蛋白质如同一个房子，氨基酸如同砖块，房子是由砖砌起来的，蛋白质是由氨基酸组成的。氨基酸的合成与组装均由RNA指导下完成。从DNA转录成RNA，T被U取代。4种核苷酸，3个为一个密码子，故有64种组合。有些氨基酸由一个以上的密码子编码，如UUU（编码苯丙氨酸），CUC、CUA、CUC三个密码子均编码亮氨酸，这是一种保护机制，如CUC中的C突变成A，CUA仍然编码亮氨酸，保证了蛋白质的氨基酸序列不发生改变。

三、基因解剖图谱

20世纪医学院的学生都在学习人体解剖、组织学。进入21世纪，随着对人类基因组学结构与功能的更深一步了解，医学生除应学习人体解剖及组织学之外，还应学习基因组解剖学及基因组功能学，以便能更好地服务于人类健康与患者。

（一）基因的定义

基因由外显子（exon）与内含子及5′端调控部分组成。外显子序列转录成RNA，依次再翻译成蛋白质。内含子序列并不编码氨基酸，其功能目前尚不明确。细菌及其他简单生物的基因序列无内含子。人类基因从DNA转录成RNA时，内含子与外显子均被转录，mRNA的成熟，需经过转录后加工修饰，即内含子转录的序列被剪掉，仅保留外显子转录的那一部分RNA为成熟的mRNA。分析DNA序列是否含有基因，首先要找到开放读码框架（ORF），ORF即一段较长的DNA序列，其后被终止密码子（UUA、UAG、UGA）断开。寻找ORF可从DNA序列的任意第1个字母开始读起，看是否会在其后的序列中发现终止密码子。若没有找到，则再从第2个字碱基开始、第3个碱基开始，依次进行。如果都不是ORF，大约每30 个碱基会遇到一个终止密码子。若从一个内含子或非编码序列的基因交界区开始，则很难找到正确的ORF。若找到ORF，且在ORF之前能够同时发现Kozak 结构及终止密码子，则可确定是ORF。其他基因结构如TATA boxes，长的终止重复序列（poly A尾巴），限制性内切酶酶切位点，都有利于确定找到的序列是否是一个完整的基因。接下来的问题就是找到的基因编码什么样的蛋白质、表达是如何调控的、在哪些组织表达、功能如何等。

（二）基因组的物理图谱

前面提到一个基因的解剖图谱，如ORF、增强子、外显子、内含子，只能帮助我们理解基因如何发挥功能，并没有给我们一个立体的图像。基因有多长？基因组结构如何？ 了解基因组的物理图谱十分重要，因为人体细胞核只有数微米大小，却能装下数米长的DNA。正如把数十万乃至数百万公里长的绳子装到一个十几平方米的房间内，且要在数秒钟内从这条绳子上的任何位点能找到所需的一个基因（仅为绳长的数百万分之一）。正视我们所尚未了解的东西，与正视我们已经了解的东西一样重要。DNA在细胞核内，以四级结构分层折叠，包装存放。目前我们尚不了解为何细胞能在很短的时间内完成这么复杂的工程；当细胞需要其中某一段时，是如何完成定位并找到这一段，又是如何快速将双链打开、阅读，然后再关闭上。

四、基因的表达与调控

基因由编码氨基酸的核苷酸序列以及调控基因表达的序列组成。细胞分裂从细胞核内基因组全部DNA复制开始，细胞功能的调控则是通过改变基因表达来实现。基因表达包括DNA复制、DNA 序列转录成RNA、RNA通过剪接被加工成mRNA、mRNA在核糖体翻译成多肽链、后者再经加工成空间结构不同的蛋白质。

（一）DNA复制

细胞分裂，从胎儿发育到成人，遗传信息均应严格地进行复制，传给子代细胞。人的DNA复制需要6～12 h。细胞分裂间期是真核细胞进行有丝分裂或减数分裂的准备时期，在分裂间期细胞完成DNA分子的复制和有关蛋白质的合成。细胞分裂间期的时间要远远长于细胞分裂期。间期常分为G_1，

S，G_2三个时期。有丝分裂间期是有丝分裂全部过程重要准备过程，是一个重要的基础工作。G_1期：合成RNA和核糖体及复制所需酶。S期（DNA合成期）：主要是遗传物质的复制，DNA和组蛋白组成核小体结构。新的组蛋白也是在此期合成。G_2期：有丝分裂的准备期，主要是RNA和蛋白质（包括微管蛋白等）的大量合成。

DNA复制步骤：双链DNA螺旋解链，这一过程由数个酶的催化完成。DNA解旋酶（helicase）负责双链DNA分子的解旋，DNA聚合酶催化合成新的DNA双链。

人类基因组，每6～12小时必须精确复制64亿个碱基对，速度不但要快，而且十分准确，任何差错都会造成永久性突变。从受孕时受精合子开始，到成长至体重70 kg的成人，将进行约10^{15}次DNA复制。细胞周而复始地分裂增生，满足机体生长及修复所需。每次DNA直接复制的误差是万分之一左右，但机体有错误校正系统，以保证误差在最低限度，这些机制可使实际误差在千万分之一。即每次细胞分裂整个基因组大约有60个拷贝错误，但很多误差发生在非编码区。就总体而言，每个细胞所需要的基因数目较少，故不影响基因功能。正如北京图书馆全部藏书中，仅有60个字拼写错误，就每一位读者来说，遇到错误及被误导的机会极少。

（二）基因表达

基因表达指基因序列翻译成一个蛋白质产物。激活基因是启动这一过程的关键步骤。正如前所述，基因5′端有很多调控序列，比较重要的有启动子（promoter）、增强子（enhancer）等。基因激活通常是一个诱导蛋白与位于基因5′端的启动子结合，把基因激活，转录mRNA，合成蛋白质。基因调控的一个常见机制是负反馈机制，即当蛋白质合成增多，基因表达停止。这种“开/关”机制维持了基因表达产物的平衡，保证了细胞功能处于一种动态的平衡。

细胞外的信号能够与细胞膜上的受体结合，激活一些与受体有关的激酶（如酪氨酸激酶）及一系列细胞质内蛋白及其他分子，然后通过细胞质到达细胞核，或直接通过与特定基因的启动子结合，或通过作用于另外的诱导蛋白（转录因子），调节有关基因的表达控制“开/关”。有些分子可直接进入细胞内，迁移到细胞核，调节基因的表达。细胞膜受体数量本身受基因的调控，当基因下调时，细胞膜受体数量减少，直到消失，此时细胞对相应的细胞外信号不反应。

基因表达步骤：转录，即DNA转录成mRNA，此过程在细胞核内进行。当诱导蛋白结合到基因临近第1个外显子5′末端的启动子后，5′末端开始解旋，DNA双链解开，形成两条单链。以DNA单链为模板，以碱基互补的原则（A/U，C/G）合成新的RNA链。这条RNA链是DNA链的仿真拷贝（互补链），所不同的是DNA链中A的对应碱基为T，在RNA中T被U所取代，RNA中不含T。

在细胞核内转录完成之后，RNA转移到细胞质，进行加工整理，由内含子转录，不编码氨基酸的部分序列被剪掉。在每个外显子起始与结束的部位存在“剪接受体”与“剪接供体”序列，这有助于酶的识别与剪接。最后再在RNA分子5′端加上“帽”（如甲基化），在尾部加上多聚腺苷酸即生成所谓的成熟mRNA。

翻译：以基因DNA为模板，转录生成的mRNA，两者碱基严格互补即mRNA携带了基因DNA的遗传信息；mRNA分子上的碱基排列顺序决定了遗传密码的排序，也就决定了氨基酸的排列顺序。mRNA遗传密码排列顺序翻译成多肽链的氨基酸排列顺序，组装成蛋白质。这一过程在细胞质的核糖体中进行。RNA分子上每3个核苷酸组成一个密码子，每个密码子携有一个运载分子叫转运RNA（tRNA），一端与mRNA上的密码子匹配，另一端载有一个氨基酸，每个密码子有其特异的tRNA，每种tRNA只载有一种特异的氨基酸。核糖体沿mRNA移动，每次加上一个氨基酸，合成一条氨基酸链称“肽”，直到移动到终止密码子，肽链合成终止，mRNA与核糖体分离，使用过的mRNA很快降解。合成的肽亦与核糖体分离，折叠成Ⅱ级、Ⅲ级结构。有些蛋白质翻译后再加工修饰，如加上糖基，变成糖蛋白。

（三）基因表达的调控

基因表达调控非常复杂，可发生在基因表达的不同阶段，如在转录水平，基因第1外显子5′末端的上游存在一些特异序列，如启动子、TATA序列，有利于RNA聚合酶结合，控制转录速率。其余结构如增强子距基因更远，亦参与基因表达调控。

五、反义寡核苷酸

反义寡核苷酸通常是人工合成的15～30个碱基对长的DNA，是某种mRNA 分子一段序列的互补序列，能够与mRNA分子上的相对应序列结合，产生一段小的双链结构，从而封住这段序列，使mRNA 不能译成蛋白质。同时细胞把mRNA双链视为异己，这种双链RNA 很快即被核苷酶H所分解掉。如果细胞质内存在大量的反义寡核苷酸，则细胞中mRNA的翻译即会终止。人们现已利用反义寡核苷酸的这一特性，阻止一些不希望表达的基因（如癌基因）的表达。同时用反义寡核苷酸可以研究新基因功能，观察阻断后的细胞功能变化。

反义寡核苷酸的特性展示了其临床应用的前景，如抗病毒、抗肿瘤等。但其结构极不稳定，在血或细胞内可很快被破坏，且分子量大（5 000～15 000），很难进入细胞，限制了其应用。为满足临床需要，还需加大研究力度，克服这些困难。

第 4 节 细胞分子生物学技术简述

一、PCR（聚合酶链反应）

要获得目的DNA或RNA片段，可通过PCR的方法对目的序列进行扩增并使之达到一定量。这一过程需要DNA或RNA标本、寡核苷酸引物、DNA聚合酶、4种核苷酸混合液、温度循环装置（PCR仪）。

PCR是基因重组技术及基因分析中最常用的单项技术。这项技术由穆利斯（Kary Mullis）于1983年建立，1987年发表，1993年他因此获得诺贝尔奖。PCR工作原理是，选择一段DNA（目的片段），通常为100到数千个碱基长，周而复始地对此段DNA进行合成扩增，使这一目的片段成为主要成分，便于分析和利用。

（一）PCR基本步骤

（1）双链DNA变性成单链（通常用加温方法），此单链DNA成为合成新DNA链的模板。

（2）引物与靶序列两末端杂交，引物是特异的寡核苷酸，与靶DNA或RNA序列互补，通常加入的引物量远远高于模板量，故引物不会成为扩增过程中的限制因素。

（3）加入4种核苷酸碱基即dATP、dCTP、dGTP及dTTP，以及聚合酶，通常是Taq酶。Taq酶耐热，在温度变性阶段不影响酶的活性。

以上是PCR的一个循环。经一个循环后，单链DNA靶片段变成双链，周而复始，每个循环都有新的DNA目的片段合成，模板扩增的倍数为2^n，如20个循环后模板成为2^{20}。

（二）PCR方法

1. 引物 为两小段人工合成的DNA，一般长20 bp左右，作为引物。

2. 游离单核苷酸 将过量的游离单核苷酸与引物共同加入目标DNA样品，再加上热稳定的聚合

酶Taq酶，催化DNA的合成。

3. 变性　95℃，使DNA双链解开，成为两条单链。

4. 退火　55℃左右，使引物与目标DNA片段的碱基互补区域互补杂交。

5. 延伸　75℃左右，Taq 酶促进DNA 的合成，从双链形成的部位开始，即引物与DNA 单链结合的部位，大约每秒合成20 个核苷酸，几分钟就可使链长达1 000 bp左右。

95℃→55℃→75℃是第一个循环。第二个循环温度又从95℃开始，全部DNA解链成为单链，温度再回到55℃，引物与目的DNA杂交，75℃ DNA合成。如此周而复始，共进行20～30个循环，大约合成100万条目的DNA。

二、基因检测

（一）DNA检测

需要DNA、限制性内切酶、电泳、Southern印迹、DNA探针、放射自显影。限制性内切酶能识别特异碱基序列。

Southern印迹是一种检查DNA变异的方法。

第一步，从人组织和外周血细胞中提取DNA，再用限制性内切酶把DNA切成100～20 000 个碱基对（bp）长的数以万计的片段，用氢氧化钠处理使其解链并变成单链，通过凝胶电泳把这些片段按大小进行分离。在胶条上，小片段比大片段移动得更快，走在胶床的最前端，用EB染色，于紫外光下观察。

第二步，把DNA从胶床上转移到一种膜上（尼龙或者醋酸纤维素膜），这种方法是Southern发现的，故取名Southern 印迹。

第三步，探针是一段与需要检测目的DNA的互补链。此探针用核素（或非核素）标记，与膜上的DNA杂交。

第四步，洗脱掉未结合的探针，然后把膜放到X线片上进行曝光。洗片后X线片上出现可见的条带，即为所感兴趣的DNA 条带。

通过比较正常组织与异常组织（细胞）间条带的差异来诊断某些疾病，此种方法存在的问题是非特异杂交。避免非特异杂交的方法：用其他种属DNA 与膜先杂交（如常用的鲑精DNA），杂交后用严格条件洗脱，如高温65℃、低盐溶液，使互补碱基间随机形成的氢键断裂。

用Southern印迹方法检查DNA分辨率的上限为30～40 kb，下限为100～200 bp。

（二）RNA检测

RNA 长度可用Northern印迹方法检测RNA，峰度特低的RNA，可用S1 mapping或RNase保护分析方法检测，使RNA探针与RNA形成的双链不被S1核酸酶或RNase破坏。

mRNA降解十分快，从多核糖体上解离后在细胞内质网中可很快被降解，所以提取分离RNA比DNA要复杂、困难得多，Northern印迹亦比Southern印迹难。分析细胞RNA有助于了解基因目前的表达状况。

（三）蛋白检测——Western 印迹

Western印迹是与Southern印迹与Nothern印迹类似的分析蛋白的方法，它结合了免疫方法，使蛋白先通过凝胶电泳，并根据分子量大小进行分离，转到膜上，然后根据抗原抗体反应原理，用抗体与之杂交、染色，观察比较蛋白条带。

（四）斑点印迹

将DNA、RNA或蛋白直接点到膜上，省去电泳步骤，直接与探针进行杂交，这种方法叫斑点杂交（dot blot）。

（五）原位杂交（in situ hybridization）

标记核酸探针直接与细胞或组织中的核酸杂交，叫原位杂交。杂交的目的核酸可以是DNA，也可以是RNA。与Northern印迹及Southern印迹不同的是，此时的DNA、RNA仍在细胞或组织中，杂交后直接观察。

（六）免疫组织化学

使用某种标记的特异抗体，直接与组织或细胞中的抗原结合，通过这种方法，可直接观察在蛋白水平的基因表达情况。与Western印迹的不同是，后者已将蛋白抽提出来，而免疫组织化学是目的蛋白仍在细胞或组织中。

（七）DNA测序

测序分为手工和自动两种方法。手工方法包括化学降解法和二脱氧链终止法。自动测序采用美国PE公司的ABI 377 DNA测序仪进行。

三、基因突变检测方法

（一）DNA缺失

DNA缺失检查方法：小的缺失用PCR 方法，较大缺失用Southern印迹方法，最大缺失用脉冲场胶电泳（PFGE）或荧光原位杂交（FISH）。

（二）点突变

点突变DNA测序用PCR方法。

四、染色体分析

此为分析染色体形态结构、数量是否有变化。

五、定位克隆

定位克隆是根据目的基因在染色体上的位置而不是功能特征来分离克隆基因。

六、细胞计量分析

细胞是生命获得的基本单位、独立生存的生命实体、获得生命状态全部特点的最小单位，是组成生物体的结构和功能的基本单元。单细胞分析技术则是分析单个细胞的DNA变化，如染色体异常或染色体数目改变。细胞分析技术常用的有单细胞测序、流式细胞计数及影像细胞计数方法。

因为细胞是生物体和生命活动的基本单位，揭示一些生命活动规律，就必须要以细胞为研究基础。但是，研究细胞群体获得的信息存在很多局限性与弊端，因为生物体内的组织具有不均匀性，单个细

胞之间变异性更大。单细胞研究，能够掌握更全面的细胞信息，以便深入探讨以往群体分析中平均结果，对个别信息掩盖的局限性。单细胞分析的引入对于疾病的早期预防和诊断有重要意义。对生命活动规律和本质的探索、疾病的诊断与治疗、药物的筛选与设计等都具有十分重要的意义。自微流控芯片面世以来，以其微型化、集成化、自动化和便携化等优势越来越多地应用在细胞分析领域。

单细胞分析：即单细胞测序，应用毛细管电泳电化学检测、毛细管电泳激光诱导荧光检测、单细胞质谱分析、单细胞微流控分析、单细胞图像分析、单细胞纳米技术、单细胞测序技术等。

微流控芯片（microfluidic chip），又称微全分析系统（micro total analysis system，μ-TAS）或者芯片实验室（lab-on-a-chip），指把化学和生物等领域中所涉及的样品制备、反应、分离、检测及细胞培养、分选、裂解等基本操作单元集成或基本集成到一块几平方厘米（甚至更小）的芯片上，由微通道形成网络，以可控流体贯穿整个系统，用以取代常规化学或生物实验室的各种功能的一种技术平台。

流式细胞术工作原理是在细胞分子水平上通过单克隆抗体对单个细胞或其他生物粒子进行多参数、快速的定量分析。它可以高速分析上万个细胞，并能同时从一个细胞中测得多个参数，具有速度快、精度高、准确性好的优点，是当代最先进的细胞定量分析技术之一。

七、基因重组技术

基因重组又称“遗传工程”、基因克隆、DNA 重组。病毒携带克隆的DNA 片段感染人体细胞后，可影响人体细胞基因的表达。能够携带外源DNA 的病毒，称之为“载体”，这一过程叫“转染”。基因重组的基本步骤如图3-4-1。

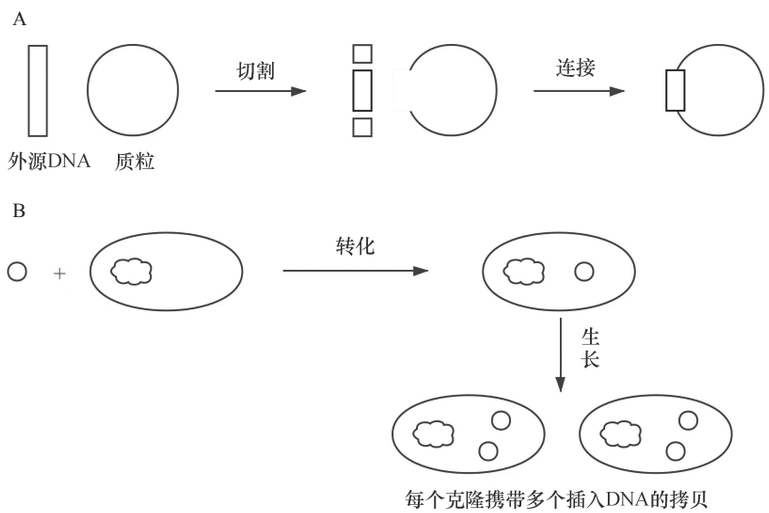

图3-4-1　基因重组的基本步骤

A．把外源DNA 插入载体；B．把重组载体整合到细菌细胞。

第 5 节　遗传病简述

一、遗传病分类

（1）单基因病：主要指由一对等位基因突变导致的疾病，主要由显性基因和隐性基因突变所致。