

Clin Chem, 2001, 47: 403-411.

- [11] 杨俊娟, 祖凌云, 孟磊, 等. C 反应蛋白与冠心病危险因素及冠状动脉病变的相关分析[J]. 中国介入心脏病学杂志, 2002, 10(4): 25-27.
- [12] 陆青, 杨海敏. 全血 CRP 测定仪及试剂评估[J]. 上海医学检验杂志, 1999, 14(5): 268-269.
- [13] 洪蕾. 妇科感染中血清 CRP 测定的研究[J]. 江苏医学, 1995, 21(1): 22-24.
- [14] Jaye DL, Waites KB. Clinical applications of C-creative

Protein in pediatrics pediatr[J]. Infect Dis J, 1997, 16(8): 735.

- [15] 魏书珍. 儿科疾病的临床检验[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1995: 679-681.
- [16] 田军, 刘德琼. 肾移植患者血清中多项免疫参考的动态观察[J]. 上海免疫学杂志, 1994, 10(6): 346-348.

(收稿日期: 2010-03-25)

## 基因诊断技术进展

巫晓芳 综述, 刘 充 审校(凉山彝族自治州第一人民医院急诊内科, 四川 西昌 615000)

**【关键词】** 基因诊断; 临床应用; 新进展

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2010.20.068

中图分类号: R446.61

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2010)20-2287-02

基因诊断又称 DNA 诊断或分子诊断, 由于基因的功能与人类疾病密切相关, 通过分子生物学和分子遗传学技术, 直接检测分子结构水平或表达水平是否异常, 从而对疾病做出判断。基因诊断是继形态学、生物化学和免疫学诊断之后的第 4 代诊断技术, 它的诞生与发展得益于分子生物学理论和技术的迅速发展, 更多先进、简便的基因诊断方法也不断涌现。现将基因诊断中常用的分子生物学技术新进展综述如下。

### 1 基因诊断技术的应用

**1.1 分子杂交技术<sup>[1]</sup>** 分子杂交技术包含核酸的分离与纯化、探针的制备和分子杂交 3 个步骤。分子杂交包括 Southern 杂交、Northern 杂交、Dot 杂交和 Western 杂交, 分别用于检测特定的 DNA、RNA 和蛋白质。Southern 杂交、Northern 杂交和 Dot 杂交也称核酸的分子杂交, 其基本原理是具有一定同源性的两条核酸单链在适宜的温度和离子强度下, 根据碱基互补的原则退火形成稳定的异源双链。杂交的过程是高度特异性的, 已知核酸片段作为探针并加以标记, 用于检测。Western 杂交又称免疫学测定, 它与核酸分子杂交的区别关键在于探针的性质, 用于 Western 杂交的探针多为单克隆或多克隆抗体, 是通过抗原抗体反应进行检测的。分子杂交技术可应用于基因克隆的筛选和酶切图谱的制作、基因组中特定序列的定量和定性检测、基因突变分析等方面。

**1.2 PCR 技术** 聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 又称体外基因扩增技术。PCR 的基本原理是人工合成一对 20~30 个核苷酸的寡聚引物。通过和靶 DNA 的变性处理, 在 DNA 聚合酶的作用下, 以靶 DNA 为模板, 合成引物之间的 DNA 片段。这个过程是由温度控制的, 所以 PCR 是一个在引物介导下反复进行热变性、退火、引物延伸 3 个步骤而扩增 DNA 的循环过程。而近些年来, PCR 技术不断发展, 各种方法层出不穷。例如强化 PCR、膜结合 PCR、锚定 PCR、错配 PCR、原位 PCR、彩色 PCR、反向 PCR、不对称 PCR、增效 PCR、定量 PCR 和重组 PCR 等<sup>[2]</sup>。而 PCR 与其他技术相结合形成的新方法使 PCR 技术的实用性得到了延伸、补充和发展<sup>[2]</sup>。

**1.2.1 PCR 产物的限制性片段长度多态性分析 (PCR-RFLPs)** 用 PCR 方法将包含待测多态性位点的 DNA 片段扩增出来, 然后用识别该位点的限制酶来酶解, 根据限制酶片段长度多态性分析作出诊断。

**1.2.2 PCR 结合特异性寡核苷酸探针斑点杂交 (ASO) 根**

据常见的突变体类型, 合成一系列具有正常序列和突变序列的等位基因特异性寡核苷酸和相应的引物, PCR 产物能与正常和突变探针均杂交者为杂合子, 仅与突变探针杂交者为纯合子, 健康人只与正常探针杂交。

**1.2.3 PCR 结合单链 DNA 构象多态性 (SSCP)** 在适当条件下, 单链 DNA 的电泳迁移率不仅与 DNA 的相对分子质量大小有关, 而且与其构象有关, 而单链 DNA 的构象又是由其碱基序列所决定的。双链 DNA 经变性成为单链 DNA, 在非变性聚丙烯酰胺凝胶中电泳, 由于碱基序列发生变化 (至少一个碱基的变化) 就可导致构型的改变, 使泳动速率发生改变, 从而将变异的 DNA 与正常 DNA 区分开来。

**1.2.4 PCR 结合异源双链分析法 (HA)** PCR 扩增产物经加热变性, 形成的 4 条单链 DNA 分子, 在低温下重新形成双链 DNA 分子时, 除原有 2 条同源 DNA 双链外, 还可因正常单链和异常单链序列基本相配而产生 2 条新的异源双链 DNA 分子。异源双链含有不配对区域, 二级结构与同源双链不同, 具有异常泳动特性, 在非变性凝胶上表现为与正常条带位置不同的异常带。

**1.2.5 PCR 结合变性梯度凝胶电泳 (DGGE)** 当双链 DNA 在梯度变性的聚丙烯酰胺凝胶中进行到与 DNA 变性温度 (熔点) 一致的凝胶变性浓度位置时, DNA 发生解旋变性, 此时电泳速度迅速降低。而当解旋的 DNA 链中有一个碱基突变时, 将会影响其电泳速度变化的程度。用 DGGE 分析目的基因的 PCR 产物几乎可以检出所有突变。PCR 技术不仅可用于基因分离、合成、克隆和核酸序列分析, 还可用于突变体和重组体的构建、基因表达调控的研究, 在临床上广泛用于遗传病基因诊断、产前诊断、病原体的检测、肿瘤发病机制的探讨和法医鉴定等各个方面。

**1.3 DNA 测序技术<sup>[3]</sup>** DNA 测序技术主要包括 Sanger 双脱氧链中止法和 Maxam-Gilbert 化学裂解法, 尤以前种方法常用。Sanger 双脱氧链中止法是用放射性同位素标记引物, 用双脱氧核苷酸终止 DNA 链的延伸, 产生长度不等的 DNA 片段, 再由高分辨力的聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 放射至显影读取结果。在各种筛选方法的敏感性和特异性受限时, DNA 测序无疑是突变分析的最重要方法。现在的直接测序方法用四色荧光标记代替了放射性同位素标记, 测序自动化程度大为提高, 操作简便, 但费用高昂。

**1.4 荧光原位杂交技术<sup>[4]</sup>** 荧光原位杂交(fluorescence in situ hybridization, FISH)是用生物素或地高辛等非放射性物质标记探针,根据碱基配对原则进行杂交,并通过荧光素偶联的抗原抗体检测系统,在组织、细胞及染色体上对 DNA 或 RNA 进行定性及定位分析的一种技术。FISH 技术经不断改革和完善,已衍生为一个系列,包括染色体涂染、间期荧光原位杂交、多色荧光原位杂交和 DNA 纤维荧光原位杂交等。FISH 技术在基础和临床都得到了广泛应用,例如基因制图、染色体进化、先天畸形诊断、肿瘤诊断和产前诊断等。

**1.5 免疫组织化学技术<sup>[5]</sup>** 免疫组织化学又称免疫细胞化学,它利用抗体与抗原之间的结合具有高度特异性这一特性,将抗原抗体间的免疫反应引入组织切片或细胞标本中待测抗原或抗体作定性、定位、定量检测。免疫组织化学的全过程包括抗原的提取和纯化、免疫动物或细胞融合、抗体效价检测和纯化、标记抗体、细胞和组织切片的制备、免疫组织化学反应和显色、观察和分析结果等。目前常用的免疫组织化学方法有 3 种:过氧化酶-抗过氧化酶(抗体)复合物(PAP 法)、卵白素-生物素复合物(ABC 法)、链霉亲和素(SABC 法)。免疫组织化学技术可用于病原体、癌基因和抗癌基因及其表达水平等方面的检测。

**1.6 基因芯片技术<sup>[6]</sup>** 基因芯片技术是一种建立在杂交测序基本理论上的全新技术,该技术是将许多特定的基因片段有规律地排列固定于支持物上,然后通过与待测的标记样品按碱基配对原理进行杂交,再通过检测系统对其进行扫描,并用相应软件对信号进行比较和检测,得到所需的大量信息,进行基因高通量、大规模、平行化、集约化的信息处理和功能研究。它的出现,使基因序列测定、基因功能测定等工作的程序得到了极大的简化。基因芯片技术使用了包括光控固相化学合成、激光共聚焦等在内的多项先进技术,试验实现了全部自动化,操作极为简便。该项技术,已经在基因多态性分析、基因表达分析等多方面得到了广泛的应用,并已开始应用于临床诊断。

## 2 基因诊断疾病的分类<sup>[7]</sup>

**2.1 感染性疾病的病原诊断** 例如人乳头瘤病毒、肝炎病毒、结核杆菌、HIV、人类巨细胞病毒、疱疹病毒(EB)、淋病奈瑟菌、幽门螺杆菌、脑膜炎奈瑟菌、螺旋体及疟原虫、弓形虫以及支原体、衣原体、立克次体等的检测。

**2.2 遗传病的基因异常分析** 例如血红蛋白病、苯丙酮尿症、杜氏肌营养不良症等疾病的诊断。

**2.3 各种肿瘤的生物学特性的判断<sup>[8]</sup>** 肿瘤是一类多基因病,其发展过程复杂,临床表现多样,涉及到多个基因的变化,并与多种因素有关,因而相对于感染性疾病及单基因遗传病来说,肿瘤的基因诊断难度较大。主要应用于以下几个方面:(1)肿瘤的早期诊断及鉴别诊断;(2)肿瘤的分级、分期及预后的判断;(3)微小病灶、转移病灶及血中残留癌细胞的识别检测;(4)在判断手术中肿瘤切除是否彻底、有无周围淋巴结转移方面也很有优势<sup>[3]</sup>。

综上所述,与传统诊断方法相比较,基因诊断更灵敏、准确、快捷。而根据对致病基因的了解程度,基因诊断可采用不同的方法。分子诊断未来的发展方向是发挥其在疾病预测、预防 and 个性化治疗中的作用,充分发挥分子诊断在克服耐药性治疗中不可替代的作用<sup>[9]</sup>,同时必须关注分子诊断中的医学伦理和生物安全问题,并加强基因诊断技术的质量控制<sup>[10]</sup>。

## 参考文献

- [1] 单祥年. 临床基因诊断[M]. 南京:南京师范大学出版社, 1999.
- [2] 周郁,周仲毅,周常文. 常用基因诊断技术及其进展[J]. 中国优生与遗传杂志, 2002, 10(5): 128-129.
- [3] 周逢仓,金明. 肿瘤的分子诊断及其研究进展[J]. 安徽卫生职业技术学院学报, 2003, 2(1): 54-56.
- [4] 杜卫东. 现代分子生物学技术系列讲座(原位杂交技术)[J]. 徐州医学院学报, 1995, 15(3): 327-332.
- [5] 李金钢,杜央威,赵新全. 免疫组织化学实验技术研究[J]. 陕西师范大学学报:自然科学版, 2006, 34(3): 145-147.
- [6] 曾争. 基因诊断技术在医学中的应用[J]. 中华检验医学杂志, 2005, 28(7): 764-765.
- [7] 廖明星,周新颖,李晓琴,等. 基因诊断的进展[J]. 现代中西医结合杂志, 2006, 15(17): 2441-2442.
- [8] 殷正丰,温莹浩. 肿瘤分子诊断临床研究进展[J]. 实用肿瘤杂志, 2006, 15(3): 9-11.
- [9] 吕学洗. 分子诊断学[M]. 北京:科学出版社, 2008.
- [10] 李金明. 临床分子诊断质量保证的重要性[J]. 中华检验医学杂志, 2003, 11(7): 7-8.

(收稿日期:2010-06-27)

# 附睾与精子成熟

刘芙君 综述,李建远 审校(烟台毓璜顶医院中心实验室,山东烟台 264000)

**【关键词】** 附睾; 精子成熟; 男性不育

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2010.20.069

中图分类号:R698.2

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2010)20-2288-03

附睾精子成熟的概念最早在 20 世纪由 Young<sup>[1]</sup> 提出,但当时并没有引起明显的反响,并且一直存在着两种不同观点,一种观点认为附睾精子成熟仅是时间依赖性的事件,即认为精子的成熟变化是随着精子在附睾转运过程中随时间推移而发生的,另一种观点认为附睾精子成熟是一个复杂的生理过程,主要受到来自附睾微环境和精子本身因素的影响。直到 20 世纪 60 年代 Bedford<sup>[2]</sup> 和 Orgebin-Crist<sup>[3]</sup> 根据试验明确提出了

附睾精子成熟的理论,睾丸产生精子并不成熟,缺乏运动和精卵结合能力,精子在附睾中的成熟不是自发和时间依赖的,而是通过与附睾分泌蛋白相互作用来完成。附睾液微环境组成随着不同区段而发生复杂和连续的变化。附睾上皮的分泌和吸收活动调节了附睾液的变化也因此决定了精子成熟的微环境<sup>[4]</sup>。

20 世纪末,有关附睾精子成熟研究得到了快速发展,涌现