

分子诊断:诊断遗传病的精确方法

Molecular Diagnosis: An Accurate Method of Diagnosing Genetic Diseases

张 晶

(上海市儿童医院 上海 200040)

陈云弟

(上海市儿童医院,上海第二医科大学博士研究生 上海 200040)

疾病诊断通常有 3 种方法:临床诊断、血清诊断和生化诊断。这些都是根据症状来判断病因,属于表型诊断。表型改变有时不特异,有时出现较晚,常常造成不能确诊或延误时机的情况。因为表型是由基因型决定的,直接检测基因(DNA)或其转录物(mRNA)是否存在、是否有缺陷也可诊断疾病,这就是分子诊断(又称基因诊断)。分子诊断是当前诊断遗传病最精确的方法。

除多基因病外,大多数遗传病的发病率都较低。但是遗传病种类繁多(已知单基因病 4 000 多种,多基因病约 750 种,染色体病 100 多种),患者总数相当可观;而且随着生活条件的改善,疾病谱也在发生变化,遗传病的相对发病率日益升高。绝大多数遗传病目前还没有有效的治疗方法,但是,通过分子诊断,减少高危婚配和预防患儿的出生已被证明是预防遗传病的有效措施之一。分子诊断不仅适用于遗传病,也适用于传染病和癌症。其对鉴别诊断、分期分型早诊早治、疗效判断和预测预后均有重大意义。此外,分子诊断在动植物育种和法医鉴定等领域中也有广泛应用。可以说,分子诊断学是现代医学的一个重要而又充满活力的分支,有重大的社会、经济价值。今天,分子诊断发展迅速,无论在策略、时机还是方法上,都已焕然一新。它在未来的基因医学中必将占据重要地位。

一、策 略

1. 从蛋白质入手

这是一种比较早期的策略。首先分析异常基因的产物(蛋白质)并弄清它是如何引起临床症状的;在纯化了该蛋白以后,测定其氨基酸序列,据此合成寡核苷酸探针,从基因组文库中筛选其编码基因,或者制成抗体,从 cDNA 文库中筛选相应克隆;然后通过 DNA 序列分析确定导致疾病的分子缺陷。这种策略是由蛋白质至核酸,由表型至基因型的。根据这一策略,我们弄清了大部分分子病、遗传

性代谢缺陷病如白化病、苯丙酮尿症和镰形细胞贫血等的分子缺陷。现在,生化缺陷已知的遗传病的基因大多数已被克隆。遗憾的是,循此策略至今,我们对人类遗传病生化机理的了解仍太少、太肤浅,80~90%遗传病的表型特征或生化缺陷仍未探明。因此这一策略现在已不大采用。

2. 从 DNA 入手

根据遗传图和物理图,通过连锁分析及特异性染色体异常,可以确定某一致病基因的染色体定位。通过在该区域内搜索、分离致病基因,并比较正常和异常基因的差别,就可找出导致遗传病的分子缺陷,进而阐明正常和异常基因产物(蛋白质)的生理功能和病理效应。这一策略是由 DNA 至蛋白质,故曾被称为逆向遗传学,是当前分子诊断的主要方式。

这一策略的关键是遗传标记。最早采用的标记是蛋白质或免疫学标记,如 ABO 血型位点标记、HLA 位点标记等。但与 DNA 标记相比,蛋白质多态性种类少、信息量低,故应用价值不大。DNA 标记主要有两类:限制性片段长度多态性(RFLP)和可变数目串联重复顺序(VNTR,包括短串联重复顺序,STR)。著名的杜氏肌营养不良基因、亨廷顿舞蹈病基因等近 400 个基因就是根据 RFLP 连锁分析克隆的。VNTR 是基因组中一些 6~70bp 的短核苷酸片段重复数目的个体差异。其中 2~7 个碱基的重复,如(CA)_n、(TC)_n 等称为 STR。它们在进化上不受选择的影响,重复数目变化大,具有高度多态性。曾根据 STR 连锁分析,定位了 Wilms 瘤基因和同性恋相关基因等。

人类基因组计划提供了越来越详尽的遗传图和物理图,这些数据已成功地用于研究多基因病,如近来大肠癌易感基因、乳腺癌易感基因、肥胖基因的克隆,哮喘、糖尿病基因的定位。使用近 400 个遗传标记进行的全基因组扫描,已在 I 型糖尿病的基因定位上作出了有意义的尝试,将成为克隆复杂性状相关基因的重要方法之一。

3. 从候选基因入手

随着人类基因组计划的进展,功能未定基因、全长 cDNA、可表达序列标签等越来越多,导致了分子诊断的另一种策略:将某一疾病基因初步定位后,以该区域中已克隆的无名基因、cDNA 等为候选者,根据定位结构是否相同来鉴定疾病相关基因;或者根据某一疾病的已知病理、生理知识,将功能可能相关的已克隆基因作为候选者,直接进行致病基因的筛选与鉴定。此法效率很高,有所谓“3 分钟克隆一个基因”之说,用此法克隆的基因已达 50 多个。

4. 从正常基因和致病基因的差异入手

大多数遗传病如重度肥胖、哮喘、糖尿病、高血压、冠心病、风湿病、精神分裂症和多种自身免疫病等,都是多种基因与复杂环境因素相互作用的结果。已知人类有 1 300 多种性状(包括遗传病)与多种基因有关。这些疾病相关基因的变异对人类的致病作用就像数量性状的基因对人类表型的作用一样,是十分微妙的。

搜寻复杂性状相关基因的基本思路,是从寻找正常人与病人之间表达状态有差异的基因入手,分离鉴定疾病相关基因,确定导致该病的分子缺陷。基于这一策略的技术主要是 1993 年建立的差示 PCR(ddPCR),其优点在于既不用事先知道基因的功能或定位,也不受基因的数目及其相互作用方式的影响。它使我们看到了对复杂遗传病进行分子诊断的曙光。

二、时 机

1. 症状出现前

症状前诊断对受检者的婚育有指导意义。有些遗传病如亨廷顿舞蹈病,患者在青少年时期表现正常,成年后才发病。等到患者自知患病时往往已经生儿育女,不自觉地就把致病基因传给了下一代。如果能早期对潜在患者的亨廷顿基因进行检测,即可在症状出现之前确诊。出现症状前诊断后,再结合潜在患者的新生儿筛查,最能体现此种诊断的价值。

2. 婴儿出生前

羊水细胞与绒毛组织皆源自胎儿,采集方法相对简易、安全,是产前诊断最常用的材料。胎儿的染色体病可通过对染色体作核型分析或荧光原位杂交来诊断。有的基因在这些细胞中有表达,可检出它们的产物,如溶酶体水解酶,通过酶活性测定就可以作出产前诊断;但大多数致病基因在这些细胞中不表达,故不能用常规方法检测,只能进行分子诊断。产前诊断可在胎儿出生前判断他是否携带致病基因,以此预防患有严重遗传病的胎儿出生。这对提高人口素质有重要意义。产前诊断技术已经成

熟,是当前分子诊断的主要方面。

3. 胚胎着床前

着床前诊断是在胚胎着床前对卵裂期胚胎的几个甚至单个卵裂球或极体(极体的遗传组成与未受精卵一样)进行检测,从而判断胚胎是否携带致病基因。体外受精和胚胎移植时,着床前诊断可以从体外受精所得的众多胚胎中选择一个完全正常的,使之从着床起即开始自然地妊娠。与产前诊断相比,着床前诊断把遗传病控制在胚胎发育的最早阶段,避免了产前诊断阳性后再流产病儿所带来的痛苦,在伦理上更易于接受;另外,着床前诊断可以使有遗传病风险的夫妇得到完全健康的后代,而产前诊断对于携带致病基因的胎儿往往予以保留,胎儿后代仍有患遗传病的风险。分子诊断是分子遗传学与医学相结合的产物,着床前诊断则是基因工程与胚胎工程相结合的产物,它是分子诊断的发展方向之一。

三、方 法

1. 检测 DNA

核酸分子杂交和聚合酶链反应(PCR)是检测 DNA 的两大基本技术。分子杂交重复性好,但必须使用放射性核素,代价不菲,难以在临床上推广应用。PCR 技术可模拟细胞核内 DNA 复制的天然过程,可在 3~4 个小时内使目的基因扩增上百万倍,达到肉眼可见的量,不需要放射性核素辅助就能分析基因结构,大大提高了分子诊断的灵敏度,在临床实践中被广泛应用。这两种技术分别与分子生物学其他技术相结合,形成了一系列 DNA 诊断方法,如限制性内切酶酶谱分析、RFLP 连锁分析、STR 连锁分析、单链构象多态性分析(SSCP)和 DNA 序列测定等,可用来检测点突变、缺失和插入等变异,以及特定 DNA 序列的拷贝数。

2. 检测动态突变

上述导致遗传病的基因突变(点突变、缺失、重复、倒位等)的突变率相对稳定(约 10^{-6}),称为静态突变。最近发现一些神经肌肉系统遗传病是由基因内部或侧翼序列的三核苷酸重复过度扩增,拷贝数超过正常范围引起的,这种突变的突变率与重复序列的拷贝数正相关。由于拷贝数随着世代传递而不断增多,突变率也越来越高,因此称为动态突变。迄今发现的动态突变遗传病有亨廷顿舞蹈病、脆性 X 综合症、延髓脊髓肌萎缩等 9 种,其最大特点是发病年龄逐代提前,临床表现逐代加重。

虽然动态突变是一种新发现的遗传病病因,但是其分子诊断方法非常简明。由于正常人、携带者和患者的三核苷酸重复数虽依次增多,但各有一定范围,一般不重叠,因此只要测定受检者三核苷酸

重复的拷贝数,即可确诊。

3. 检测 RNA

遗传病的发生不仅与基因结构的缺陷有关,而且与转录过程中的差错有关。因此,分子诊断既可以通过检测 DNA,也可以通过检测 RNA 来进行。DNA 诊断可分析基因的结构是否有缺陷,而 RNA 诊断可分析基因的表达(功能)是否有缺陷。

RNA 诊断以 mRNA 为材料,分析基因的功能,即检测基因是否转录、转录物(mRNA)是否正常,以及转录效率的高低等。由于 mRNA 不如 DNA 稳定,所以常常用逆转录(RT)反应把 mRNA 转换成 cDNA,RT-PCR 技术不仅解决了 RNA 的稳定性问题,而且对样品进行了放大,十分灵敏,是 RNA 诊断的主要方法。常用的 RNA 诊断方法有 ddPCR、RNA 杂交、引物延伸法等。RNA 诊断可以对 mRNA 进行定量检测,检测其剪接加工的缺陷以及外显子变异等,并可用于基因治疗效果的检测。

4. 荧光原位杂交

染色体病是由于染色体组成倍地增减,或者个别染色体整条地增减,或者染色体个别节段的增减、错位和颠倒等引起的。染色体异常涉及染色体的较大范围,影响许多基因,与基因突变常局限于 1 个基因内部的细微变化不同。荧光原位杂交(FISH)是诊断染色体病最适宜的方法。

FISH 是一种直接在细胞核中或染色体上确认 DNA 序列的有无及其位置的技术,即探针用荧光物质标记后与染色质直接杂交,经染色体显示后辨别探针所在的部位。当今 FISH 技术的定位范围已达到整条染色体;多色 FISH 技术可使细胞核中的全部 24 种染色体各自显示不同颜色,清楚地展示复杂易位的情形;全周期 FISH 技术已从显示玻片上的中期、间期染色体达至显示悬液中间期 DNA 三维结构;光谱核型分析已实现自动化。FISH 技术已广泛应用于肿瘤、遗传病的分子诊断和产前诊断,大有取代常规染色体分析技术之势。

四、未 来

随着与其他学科和技术如发育生物学、妇产科学、信息处理技术和成像技术等相互交叉和渗透,分子诊断正朝着灵敏、准确和无创伤的方向发

展。其中最主要的 3 个方向是:人类基因组计划、着床前诊断和通过分析母体外周血中的胎儿细胞进行产前诊断。其中对分子诊断影响最大的是人类基因组计划。

1. 人类基因组计划

杜伯克 1986 年在《自然》杂志上首次阐述了测定人类基因组全序列的意义,这篇文章后来被誉为“杜伯克标书”。经过 4 年的激烈辩论,美国于 1990 年正式启动人类基因组计划。其他各发达国家随后也紧紧跟上。

人类基因组计划将为我们提供 4 套数据,即遗传连锁图、物理图、DNA 序列和 cDNA 序列。遗传图和物理图的构建是为了给 DNA 序列测定提供方便。DNA 测序计划用 15 年,预计可以稍稍提前。cDNA 是基因组中编码基因(占 2~5%)的部分,测定 cDNA 序列是鉴定基因的一个捷径。由于基因表达有时间和空间(组织)特异性,有人提出可以绘制在正常和特定生理条件(如受外源性病原体、药物、食物及精神刺激)及病理情况下表达的全基因时空图,由此可望建立一门全新的医学——基因医学。

人类基因组计划的这 4 套数据被誉为分子水平上的人体解剖图,它将为彻底阐明人类遗传病的分子机理及其诊断、预防和治疗提供全面的科学依据。

2. 后基因组时代

人类基因组计划的完成指日可待,因此有人乐观地预言后基因组时代即蛋白组(proteome)时代正在到来。在后基因组时代,研究的重点将是真正意义上的破译人类基因组,即鉴定基因及其功能。在弄清人体所有基因及其相互作用关系之后,分子诊断将进入一个更高境界:每个人一出生都将会有 1 张基因卡,作为个人保健和治病防病的遗传信息档案,还可预测他今后的健康状况,甚至有可能对其某些基因的表达及时作出适当调整,以达到提高其生活质量的目的。这项艰巨的任务,预计将耗时 1 个世纪之久。对于我国科学家来说,如何把握时机,充分利用我国遗传病病种资源多的优势,发展我国的分子诊断学和遗传病治疗学,是一个值得关注的问题。可喜的是,我国科学家对此已有了清醒的认识并正尽己所能奋力赶上。

(责任编辑 肖庆山)

(上接第 53 页)

产业,皮革工业也列在其中,这引起了各级政府有关部门的高度重视,并且专门制定和颁布了政策法规,禁止外商投资对环境造成污染及损害和破坏自然资源的项目。因此,在皮革制造领域从事合资合

作活动,必须严格执行政府的政策法规,把环境保护放在突出的位置,并应力争避开人多地少和污染严重的东部沿海地区,而到地广人稀的中西部地区选择项目和地址。

(责任编辑 肖庆山)