

## 第二十三章 分子诊断及其临床应用

### 第一节 常用的分子生物学技术

1. 核酸扩增技术：PCR、等温扩增技术
2. 核酸分子杂交技术：FISH、Southern、Northern、dot blotting;
3. 核酸序列分析技术：DNA 测序：NGS;
4. 连接酶链反应（LCR）;
5. 单链构象多态性分析（SSCP）;
6. 限制性片段长度多态性分析（RELP）;
7. 单核苷酸多态性分析（SNP）;
8. 基因芯片技术（gene chip）:  
优生优育：耳聋基因  
疾病诊断：  
器官移植：HLA 分型  
病原体诊断：  
环境影响：过敏相关基因  
法医学：
9. 基因诊断的含义：  
检测遗传物质（DNA、RNA）  
应用于：
  - 1) 感染性病原体诊断：HBV、HPV
  - 2) 先天遗传性疾病
  - 3) 基因突变性疾病
  - 4) 产前诊断
  - 5) 亲子鉴定和法医物证

### 第二节 常见疾病的分子诊断

1. 感染病的分子诊断：病毒、细菌等病原微生物
2. 遗传性疾病的分子诊断：地中海贫血
3. 肿瘤分子诊断：  
癌基因：bcr-abl（CML）--Ph 染色体  
原癌基因：ras、myc  
抑癌基因：P53
4. 新冠肺炎病原体诊断：COVID-19 病原体 SARS-CoV-2 核酸检测
  - ✓ 什么是核酸检测？  
核酸诊断就是针对核酸序列的检测和分析。  
针对感染性疾病病原体核酸：最直接、最有效，**直接检测病原体组成成分，判断是否存在病原体感染。**  
常见的核酸检测方法：PCR、基因测序、分子杂交、基因芯片等，**传染病病原体检测以 taqman-qPCR（实时荧光定量 PCR）最为常见。**
  - ✓ 什么是 PCR 核酸检测？  
实时荧光定量 PCR：  
通过超顺磁性颗粒富集核酸，实现样品高纯度，核酸完整，纯化总核酸  
PCR 反应体系中加入荧光基团，利用荧光信号积累实时监测整个 PCR 进程，原体系中 1 拷贝的基因，经过 40 轮**指数扩增**，荧光信号增长到 1000 亿（12 次方）

- ✓ 病毒核酸检测系统工作流程（荧光定量 PCR）
  - 样本手动加样 3-5min
  - 自动化核酸提取纯化 25min
  - 手动排枪加样 1-2min
  - PCR 扩增 DNA 检测<70min RNA 检测< 80min

- ✓ 核酸检测的相关概念

RT-PCR: reverse transcription PCR, RT-PCR real-time PCR

Ct 值 cycle threshold, Ct

定性还是定量？

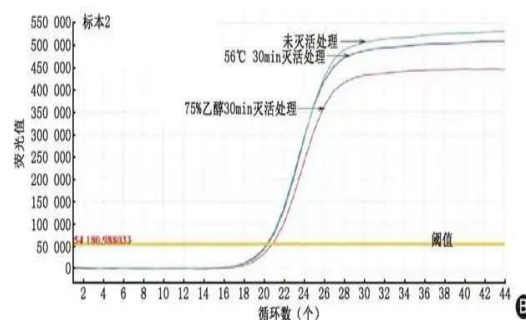
- ✓ 影响核酸检测灵敏度的因素

核酸样本的采集：包括病毒丰度、转移和运输等；

**核酸的提取效率：RNA 易降解；**

**核酸检测方法的优化：合适的引物、好的反应体系、优化的反应条件、抑制剂的去除等；**

先进的技术：数字 PCR(dPCR), 双重扩增技术、巢氏 PCR、滚环扩增(rolling circle amplification,RCA) 等。



### 第三节 个体化治疗与分子诊断

1. 药物代谢相关基因检测：氯比格雷与 CYP2C19 基因；
2. 药物靶点相关的基因多态性检测：

- 1) 与一般化疗药物疗效相关的基因检测：
- 2) 分子靶向药物疗效相关的基因：

结直肠癌：KRAS、BRAF

非小细胞肺癌：EGFR

乳腺癌：Her-2、PI3KCA、BRCA1、BRCA2

#### ➤ 分子诊断在诊断学中的地位

- 1) 单基因病具有明确诊断意义：
- 2) 病原微生物学诊断“**金标准**”：
- 3) 遗传易感性判断：
- 4) 敏感性和特异性均较高：
- 5) 对于疾病的治疗和某些药物的代谢具有指导意义。

### 思考题

1. 基因检测的标本如何留取？
2. 新冠病毒 COVID-19 核酸检测假阴性的原因？

### 重点：

1. 常用的分子生物学技术有哪些？ PCR 、NGS、基因芯片
2. 分子诊断的临床应用？
3. 分子诊断在个体化医疗中的作用？ 举例说明。