

现代检验诊断新技术 (二十)

□ 天津市公安医院教授 王金良

基因的体外扩增试验

标准位置进行重新拍摄。“加拍”是要付钱的,而“重拍”如果是院方的原因则是不应付钱的;且“重拍”因上述种种原因在国内外都是允许的。谈远了。当老刘下决心拍气管体层摄影时却要预约后才能进行检查。摄影时花了钱不算,还趴在摄影床上足足有半个小时。大夫倒是挺负责任,当机架在头上转动时大夫还让他“大口吸气”、“屏住气”,就这样反复好几次:拍一张,大夫去暗室洗一张,等大夫看到片子后再来拍一张,再去洗……就这样一次次,老刘躺在床上还不敢动,一把老骨头实可谓“受罪”,可结果出来却是阴性。现在可不这样繁琐了,就利用计算机 X 线摄影窗的动态范围的特点,可一次曝光后根据需要调制出肋骨、气管、肺的不同影像特征。

老顾因胸椎疼痛来院拍片,要是利用传统 X 线摄影,一次成像只能得到椎体部分,而肺内因摄影需要条件偏高无法观察。可是利用计算机 X 线摄影,扩大了影像的动态范围,发现病人右上肺有一黄豆大小的占位,诊断为肺癌,实可谓“歪打正着”。类似的还有:一位颈椎不适的病人在其他医院进行传统 X 线颈椎拍片时未发现异常,而到了另一家医院进行计算机 X 线摄影后,大夫利用窗宽技术发现其项韧带钙化,为其找到了毛病。一位外伤患者在放射科进行了胸部 X 线摄影后,又来到 CT 室里进行头颅 CT 扫描。人还没有回到急救中心,这时影像科大夫、急诊室大夫便可分别在各自的阅片室内同时利用高分辨率显示器观看患者的胸片及 CT 片,大大缩短了照片因显影、定影、水洗、送片所需要的时间。这就是计算机 X 线摄影的医学影像网络。

基因是遗传的基本结构和功能单位,是遗传信息的物质基础。基因位于细胞核的染色体和核外的线粒体内,是双螺旋结构的去氧核糖核酸(DNA)。DNA 由多个核苷酸组成。每个核苷酸由碱基、磷酸、去氧核糖组成。碱基有 4 种,即鸟嘌呤(G)、腺嘌呤(A)、胞嘧啶(C)和胸腺嘧啶(T),它们之间连接的顺序就是碱基序列,即是遗传密码。它决定着细胞合成的蛋白质和细胞的各种功能,保持遗传的特征不变。

如今,人体的全部基因序列,即 3.2 亿个核苷酸的排列顺序已经搞清,已绘制出全部基因序列图。这是通过国际合作对医学科学的划时代的重大突破。下一步就是要搞清每个基因的功能。

基因在人体内复制、扩增可以保持细胞的正常功能,延续其遗传特性;用人工的方法在体外扩增特定的基因可以用来发现基因的变异和缺陷,用来诊断先天性遗传缺陷,即基因缺陷病。可以用来发现肿瘤,可以用来扩增微生物的特定基因来快速诊断微生物感染,可以了解药物作用在哪些基因位置,实现个体化治疗。还可以确定个体的基因差异,从而用来做亲子鉴定或确认罪犯。因此,体外基因扩增是分子检测技术的一大突破,它是 1966 年获得诺贝尔奖的高新技术。

体外基因扩增试验是怎样实现的呢?现以最有代表性的试验——聚合酶链反应为例加以说明。

一、首先要确定需扩增的靶 DNA,要明确它的核苷酸序列,即 ATGC 的排列顺序,并将它从细胞中分离提取出来。

二、用加热(80℃~90℃)变性的办法使靶序列的 DNA 双链解开成单链。

三、人工合成一对引物,大约 30 个核苷酸,使它的序列与一段特异的靶序列互补(即 A-T, G-C),降温至 65℃左右,此引物与单链结合成互补双链,称为复性,也称退火。

四、在加入的耐热核酸酶的作用下,于 70℃左右,4 种核苷酸按照靶 DNA 的序列逐个连接到引物上,如此形成了与靶 DNA 完全互补的一条链,又成为双链。这过程称为延伸。另一条单链也如此进行,于是原来的 2 条链变成了 4 条。

五、再进行同样的循环,使 4 条链变成 8 条。如此进行约 30 个循环,在理论上可以将靶序列扩增一千万个,至少也有几百万个。扩增出来的 DNA 链的长度完全一致,经过电泳可集中在一个部位,用核酸染料染色后可用肉眼观察出来,可以判定有无目的基因及其性质。

体外的基因扩增技术有许多种,扩增的目的和效率也有不同。聚合酶链反应是应用最广泛的一种,它是先进的高新技术,需要一定的条件和技能才能开展。我国卫生部已经制定了聚合酶链反应的管理条例,只有经过考核的实验室和有上岗证的合格人员才能开展此项检验。