

基因诊断的分子生物学基础

智银资本行业研究报告

邮箱：zyzb@sz-zhiyin.com



智银资本
ZhiYin Capital

1

概述

2

核酸分子杂交技术

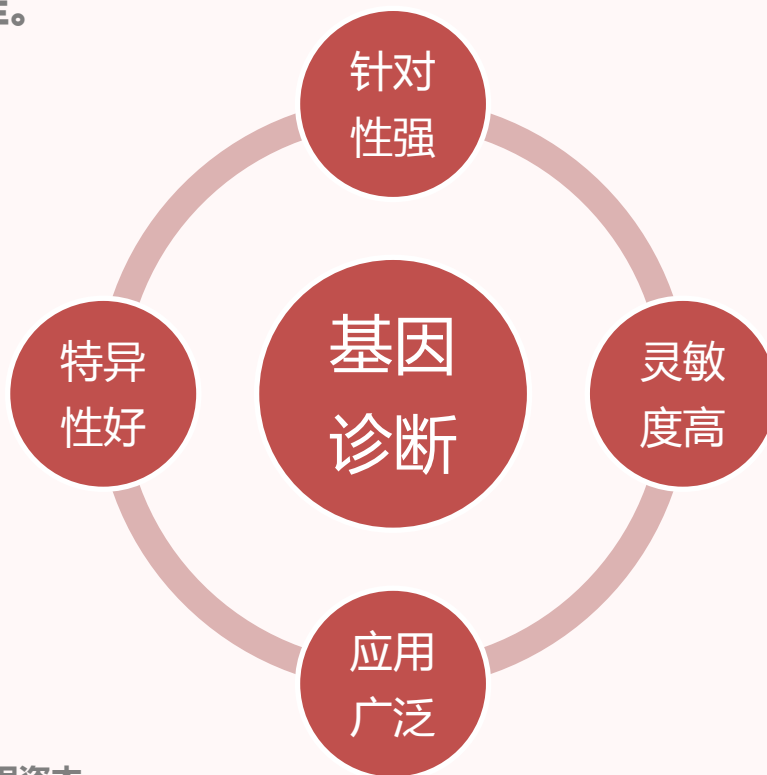
3

PCR及其衍生技术

4

DNA序列测定技术

基因诊断 (gene diagnosis) 是利用现代分子生物学技术，从DNA/RNA水平进行检测，分析体内致病基因的存在、变异和表达等状态，从而对疾病作出诊断的过程。



资料来源：《医学分子生物学》，智银资本

(1) 对基因突变的检测

- 点突变的检测：如对已知突变位点进行的产前诊断
- 大片段核苷酸丢失或插入的检测：如Duchenne肌营养不良的诊断
- 基因重排的检测：如Burkitt淋巴瘤是8#染色体的c-Myc基因转移至14#染色体的免疫球蛋白重链基因调控区
- 基因扩增的检测：如乳腺癌中成纤维细胞生长因子基因家族的扩增可达100+拷贝

(2) 对基因表达异常的检测：主要检测mRNA水平的表达

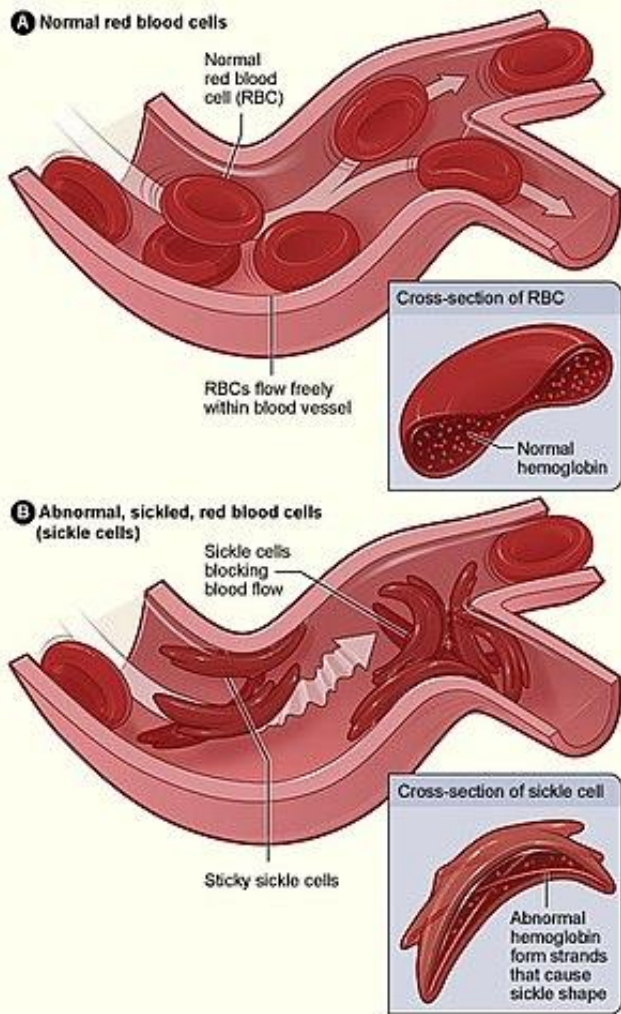
(3) 对病原体基因的检测：如HIV、HPV、乙肝病毒等的基因诊断

➤ 随着技术的革新和方法的普及，现实中通常采用多种方法联合的检测手段。

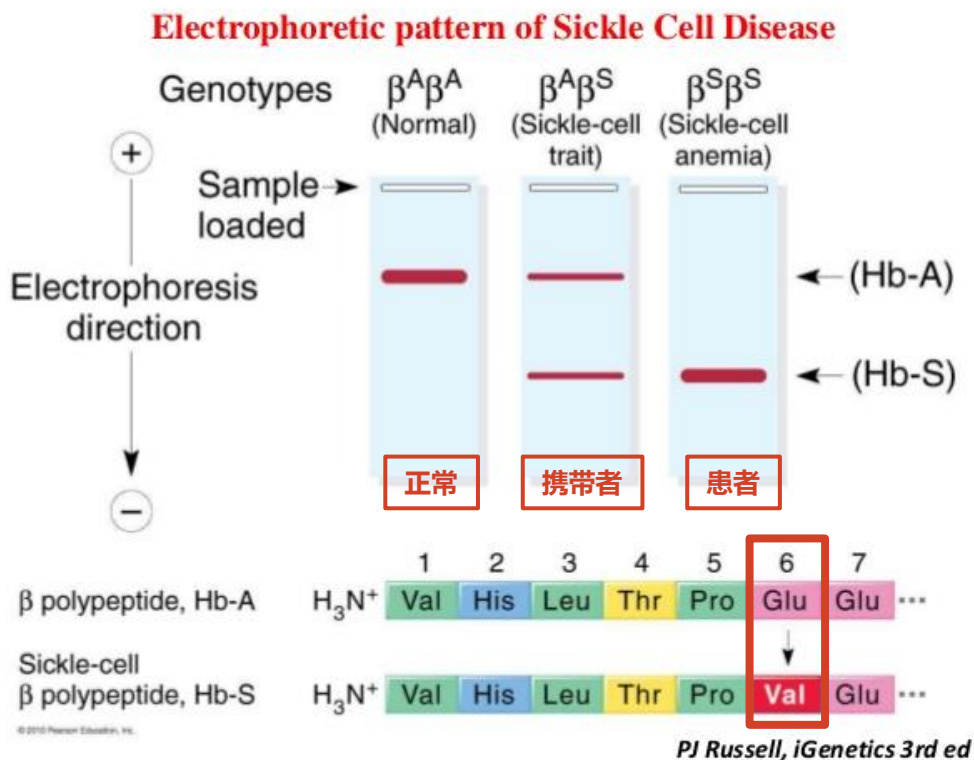
资料来源：《医学分子生物学》，智银资本

1.3.1

基因诊断的临床应用：遗传病的基因诊断



- **镰状红细胞贫血 (Sickle-cell anaemia, SCA)** : 常见的遗传病之一， β -肽链6#谷氨酸被缬氨酸所代替，构成镰状血红蛋白 (Hb-S)，替代正常Hb-A。



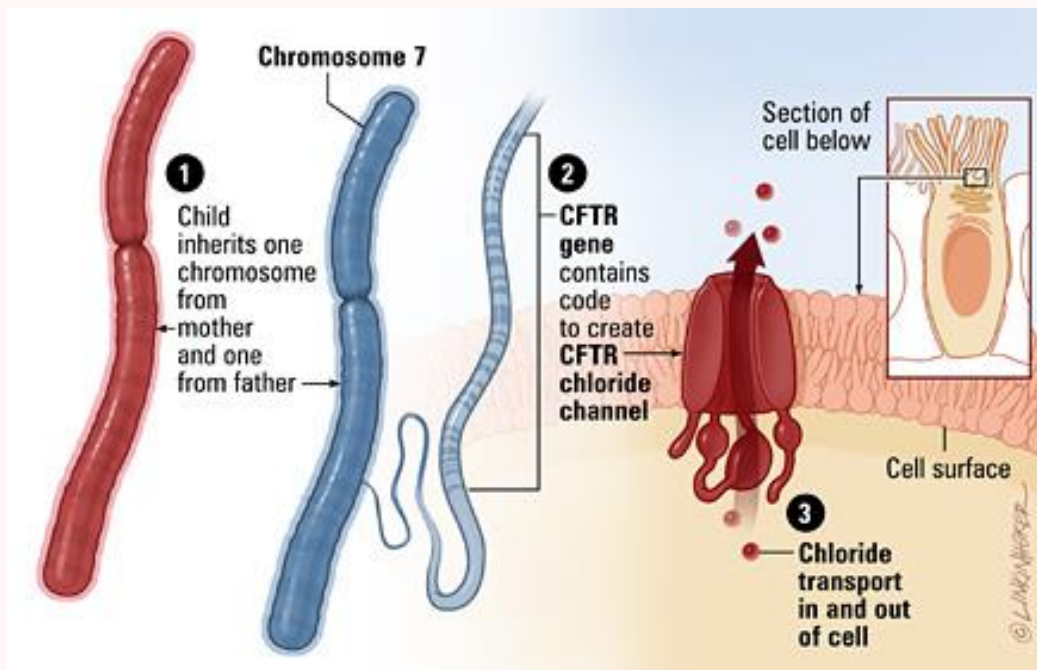
资料来源：《医学分子生物学》，智银资本

1.3.2

基因诊断的临床应用：遗传病的基因诊断

- **囊性纤维化**：囊性纤维化穿膜传导调节器（CFTR）是一个含有1480个氨基酸残基的蛋白质，对跨膜转运调节起重要作用。CFTR基因突变，可引起呼吸系统、胃肠道、肝胆系统及生殖道等上皮细胞的离子转运异常，最终可致囊性纤维化。

CFTR基因存在1000多种突变形式，不同突变形式的诊断对治疗起到重要作用。

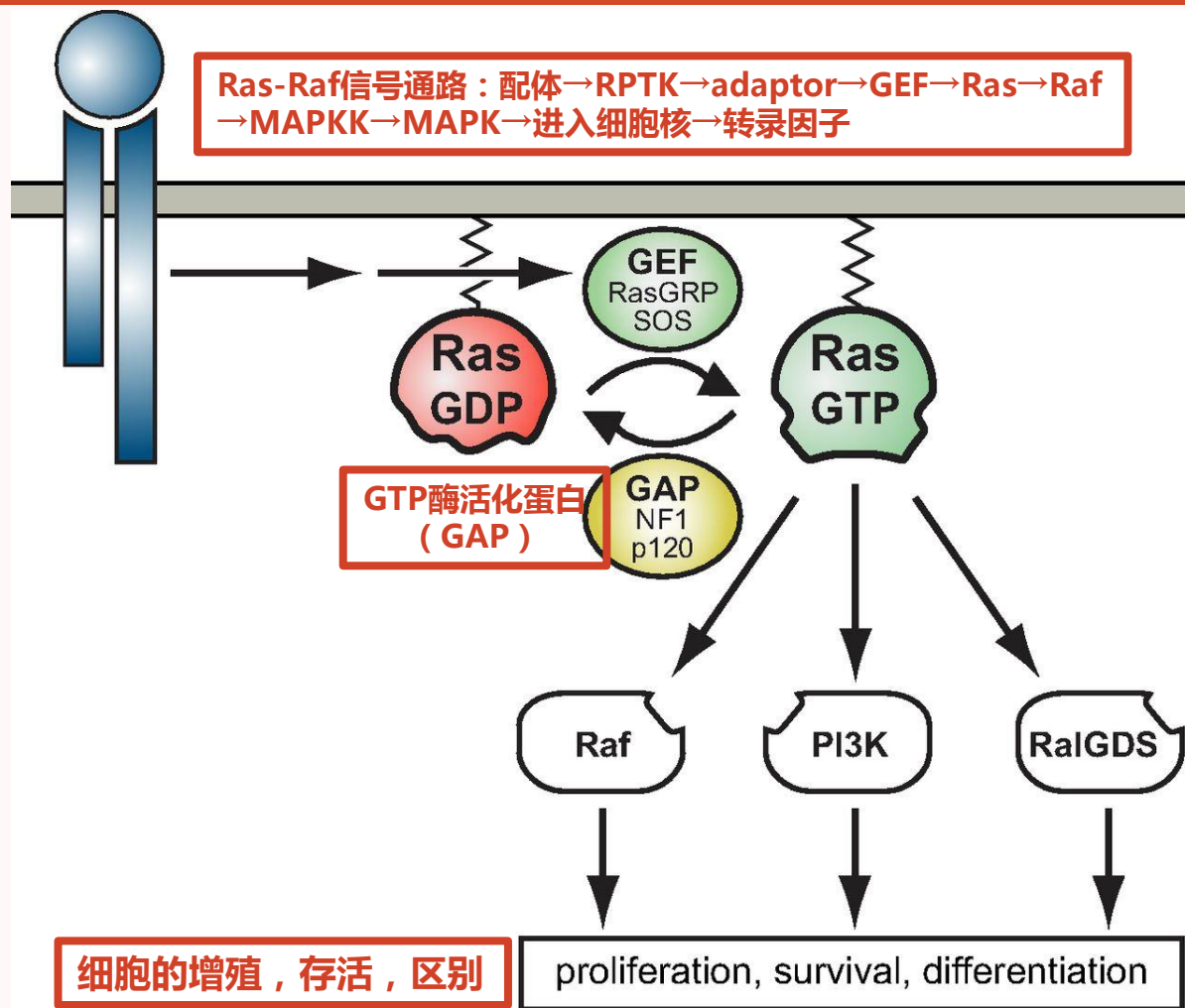


资料来源：《医学分子生物学》，智银资本

1.4.1

基因诊断的临床应用：肿瘤的基因诊断

- **检测原癌基因**：Ras蛋白是原癌基因Ras的表达产物，是Ras-Raf信号通路的重要成员，该通路被激活可导致细胞增殖。如Ras基因发生突变，使Ras蛋白失去GTP水解酶活性，GTP不能及时水解，该信号通路会持续激活，导致细胞增殖。该突变可引起泌尿系统肿瘤和淋巴细胞白血病。

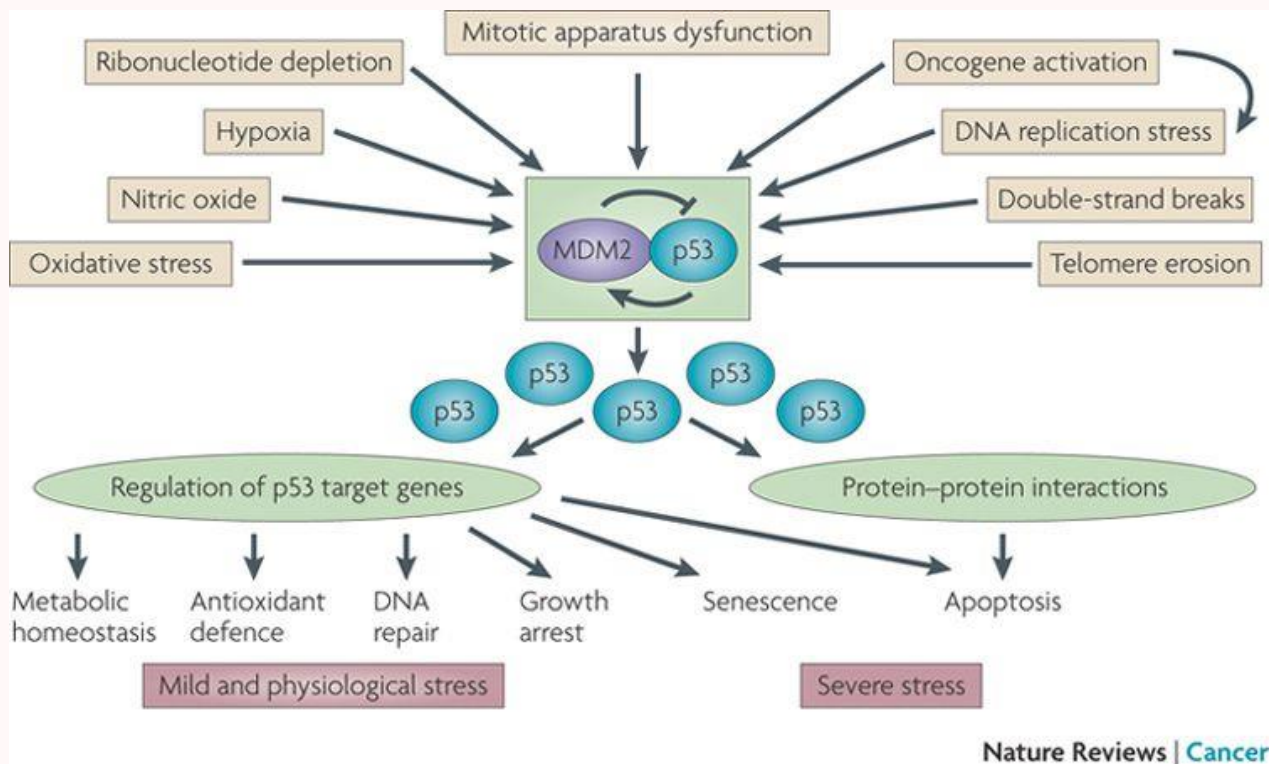


资料来源：《医学分子生物学》，智银资本

1.4.2

基因诊断的临床应用：肿瘤的基因诊断

- **检测抑癌基因**：p53基因位于17#染色体，p53蛋白是DNA结合蛋白，也是转录活化因子，在应答DNA损伤时常引起细胞周期紊乱。50%-60%的恶性肿瘤均与该基因有关，检测p53编码区的错义突变、单碱基插入和缺失等变异，可实现癌症早筛。



资料来源：《医学分子生物学》，智银资本

1

概述

2

核酸分子杂交技术

3

PCR及其衍生技术

4

DNA序列测定技术

- 核酸分子杂交 (molecular hybridization of nucleic acid) 是指不同来源的核酸单链在退火 (复性) 时能以碱基配对的方式重新形成双链。
- 该杂交反应既可以在两条DNA单链间形成 , 也可以在RNA与DNA单链间形成 , 其实质是核酸的变性与复性。
- 不完全互补的两条核酸单链也能杂交结合 , 但碱基互补程度越高或互补区段越长 , 双链之间的结合也就越牢固。

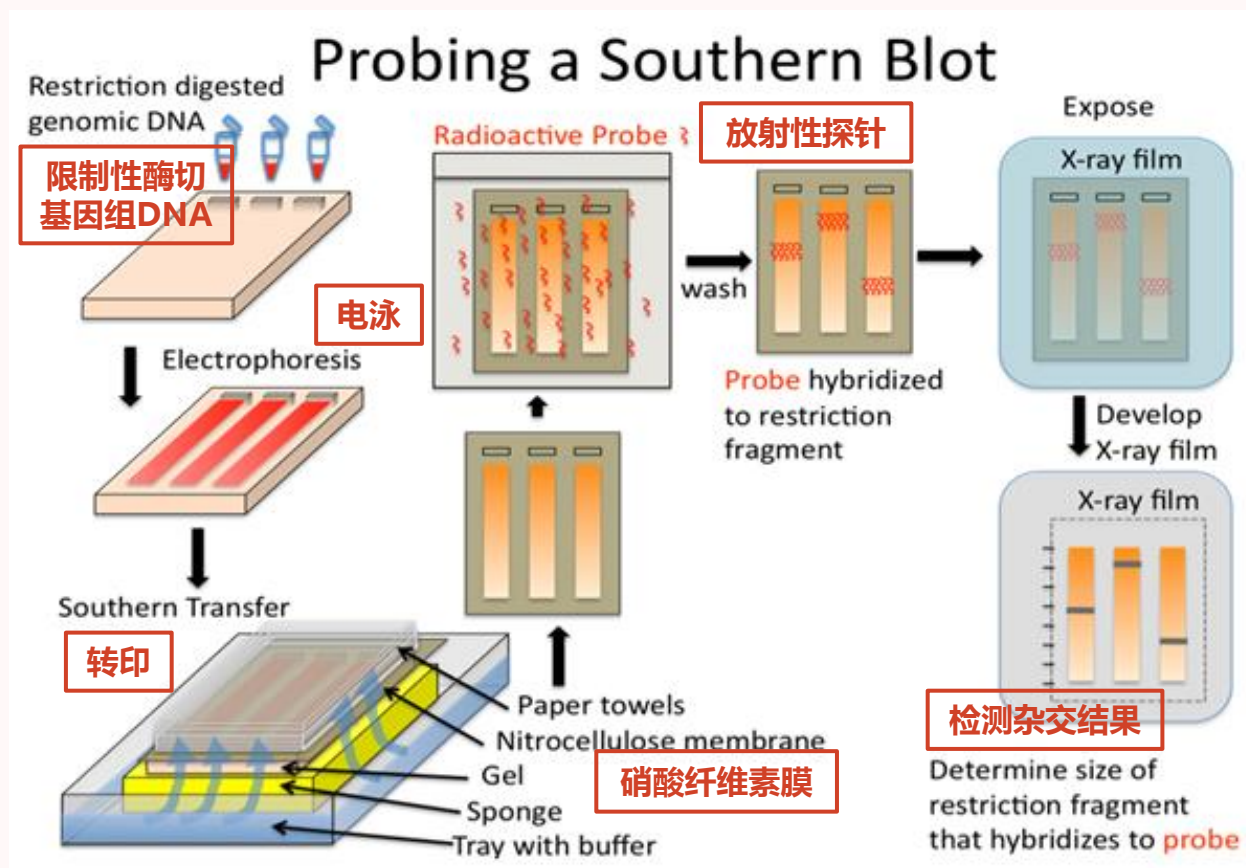


资料来源：智银资本

2.2

Southern blot

- 利用标记的探针
(probe) 与转印膜上靶DNA片段进行杂交的技术，检测DNA片段中是否存在与探针同源的序列；
- 杂交过程具备**高度特异性**，可根据所使用的探针（序列已知）进行特异性序列检测。

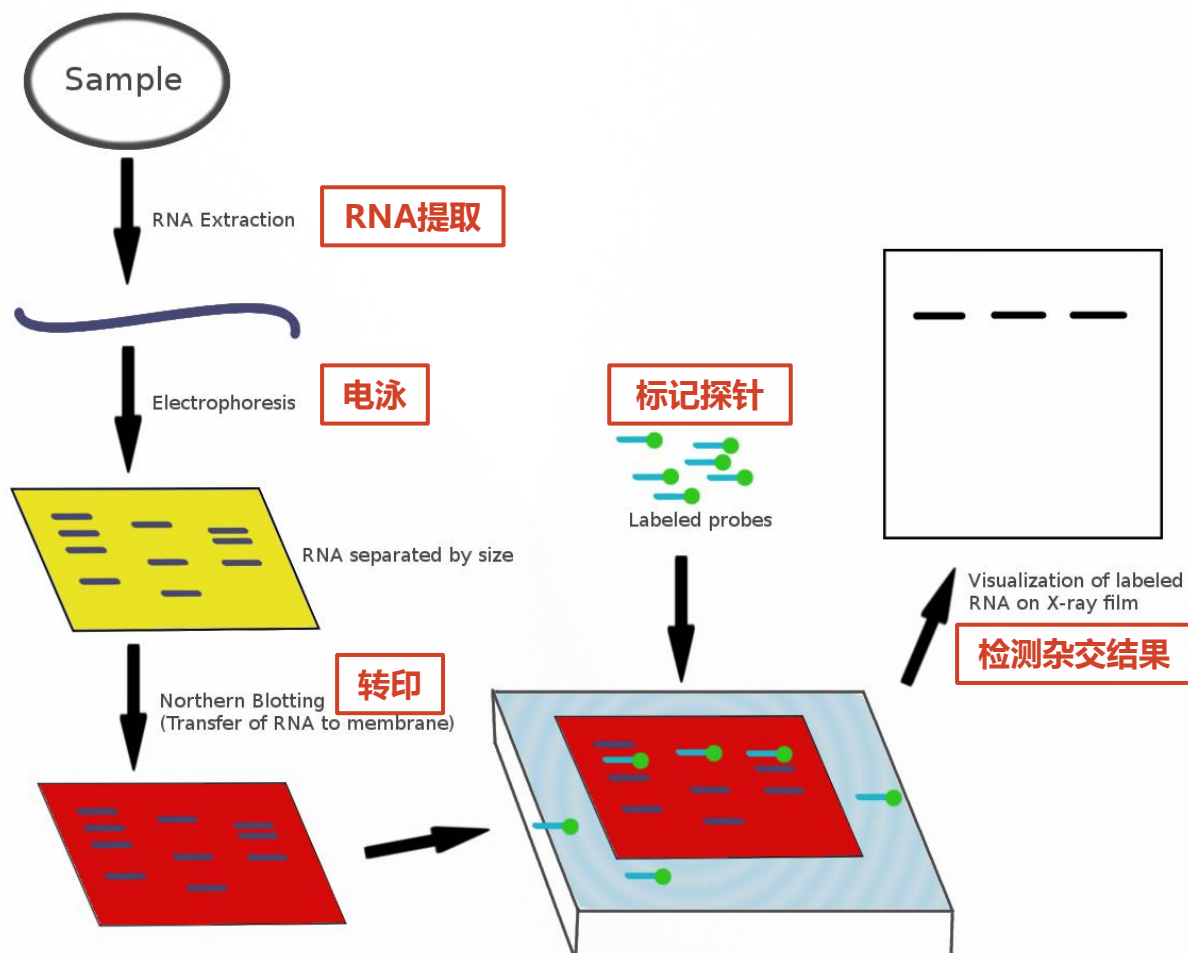


资料来源：智银资本

2.3

Northern blot

- 通过探测样品中的RNA（或隔离的mRNA）来研究基因表达；
- 主要用于检测**基因结构改变**以及在**RNA水平的基因表达异常**，进而推测基因启动区碱基序列是否改变或是否转录异常；
- 操作原理和过程与Southern blot类似。



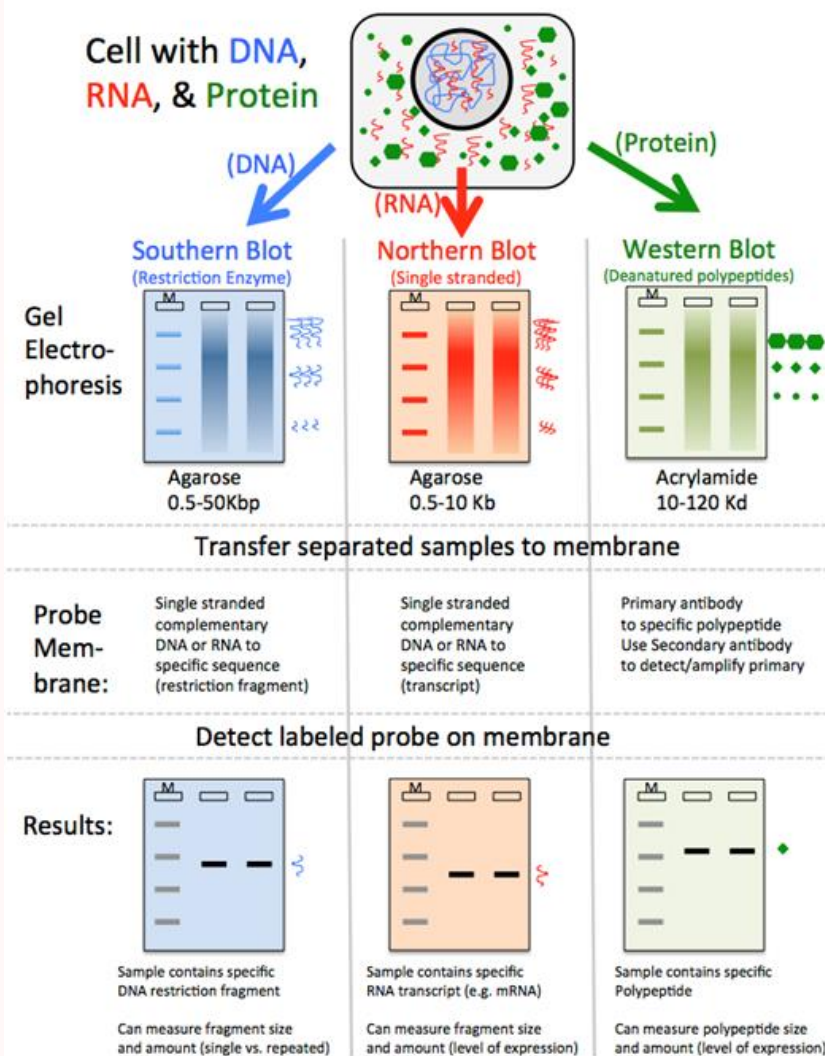
资料来源：智银资本

2.4

Southern/DNA, Northern/RNA, Western/Protein

	Southern blot	Northern blot	Western blot
检测对象	DNA	RNA	蛋白质
电泳介质	琼脂糖	琼脂糖	丙烯酰胺
分离范围	0.5-50kbp	0.5-10kb	10-120kd
探针	被标记的特定序列的核酸片段	被标记的特定序列的核酸片段	一级抗体与多肽结合，二级抗体用于显色检测一级抗体
检测结果	包含特定DNA序列片段；能同时检测大小和数量	包含特定RNA转录片段；能同时检测大小和数量	包含特定多肽的蛋白质；能同时检测多肽的大小和数量

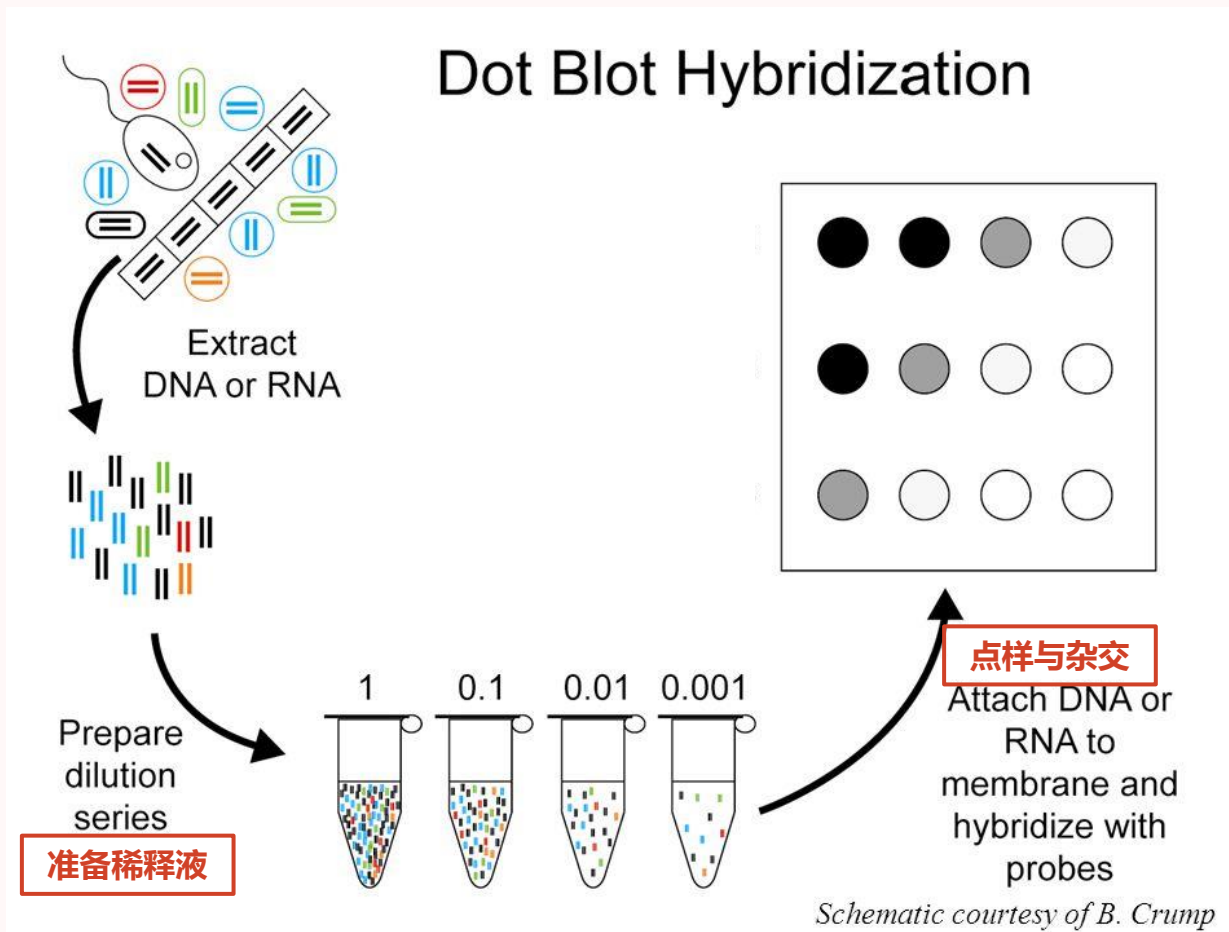
资料来源：公开资料整理，智银资本



2.5

Dot blot

- 无需电泳，将RNA/DNA样本变性后直接点样于固相支持物上，然后与标记的探针进行杂交，常用于特定基因及其表达产物的定性与定量研究；
- 反向斑点印迹（reverse dot blotting，EDB）：现将探针点样于固相支持物上，再用标记的样本进行杂交。

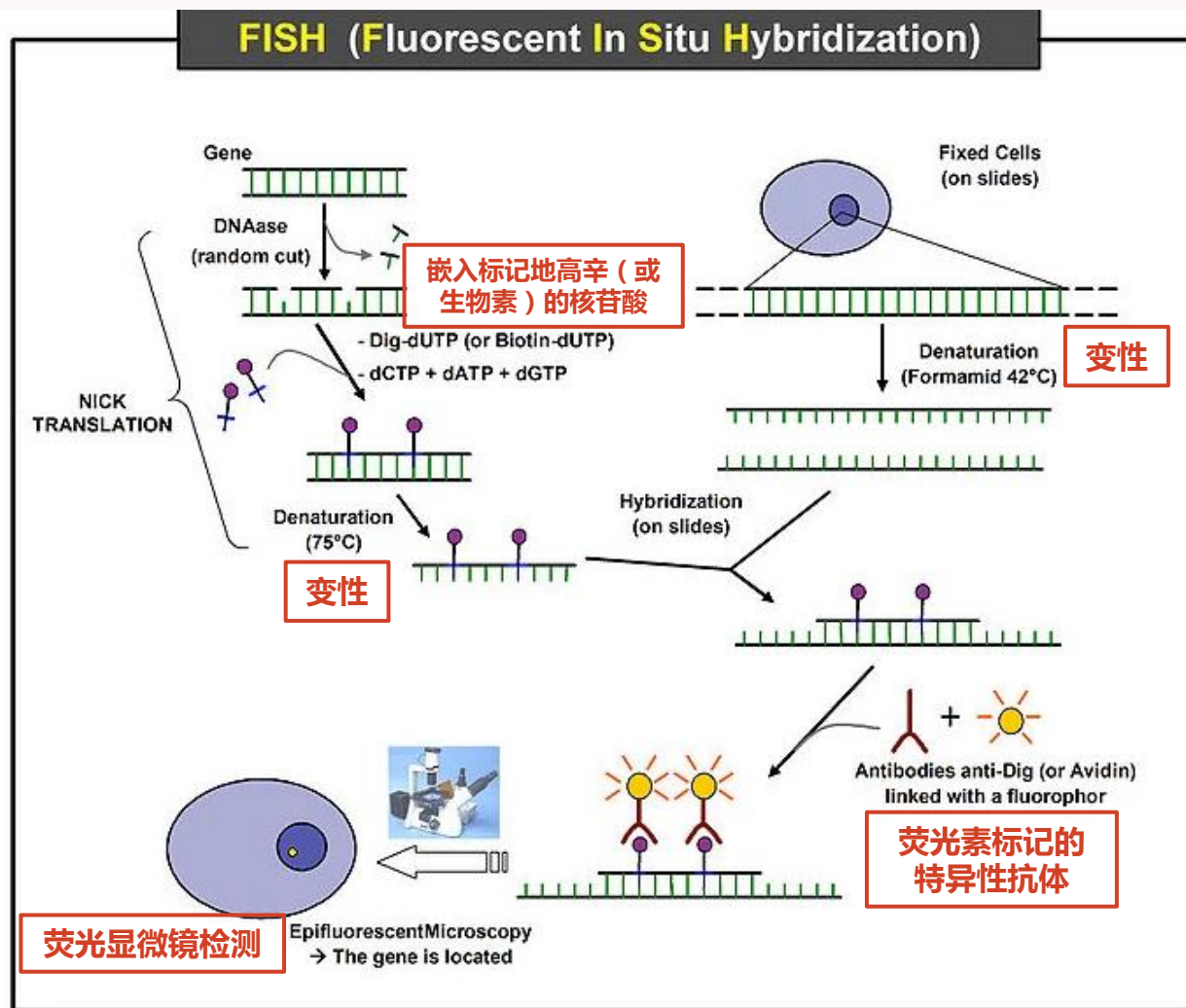


资料来源：智银资本

2.6

荧光原位杂交 (FISH)

- 荧光原位杂交
(fluorescence in situ hybridization , FISH)
将荧光素标记的DNA片段与染色体或染色质杂交，用于**基因定位研究**。
- FISH技术可检测特定基因片段的缺失、扩增与**重排**，也可用于对遗传病及肿瘤的**诊断和分型**。



资料来源：智银资本

1

概述

2

核酸分子杂交技术

3

PCR及其衍生技术

4

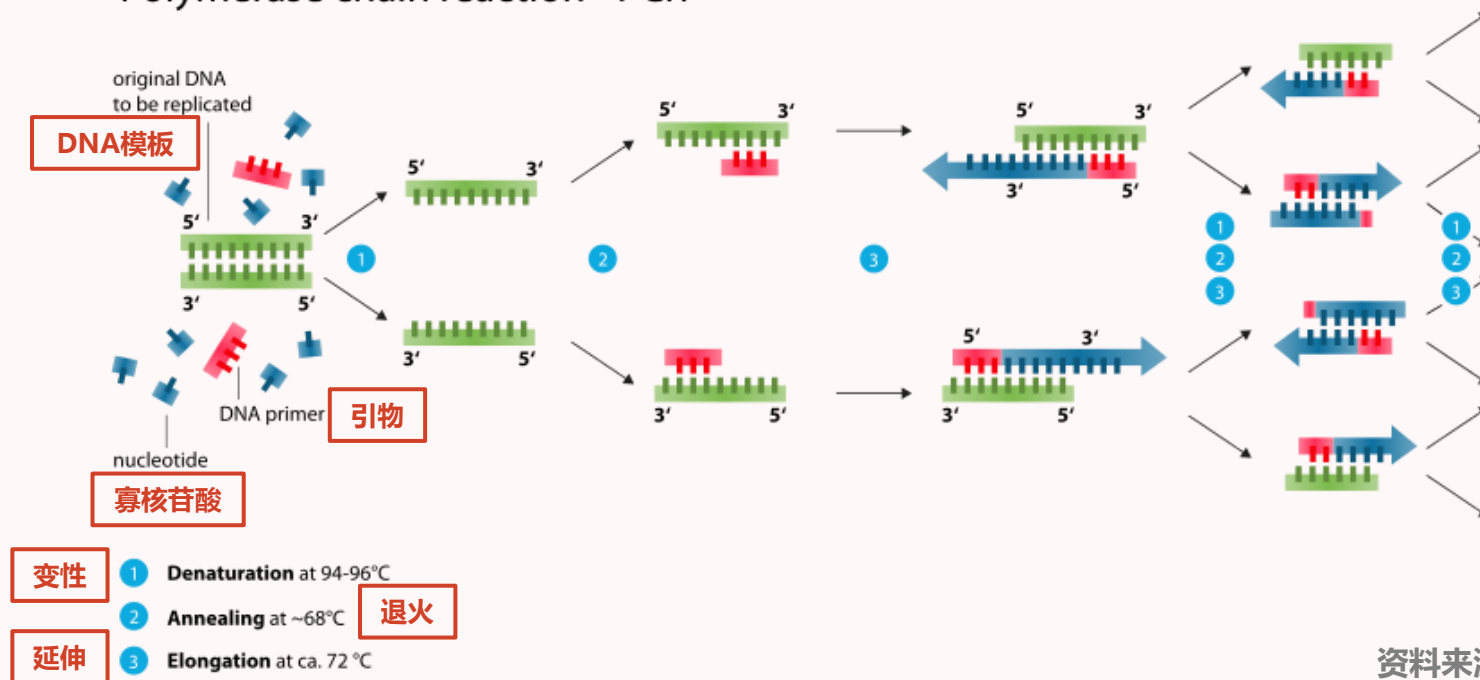
DNA序列测定技术

3.1

PCR技术的基本原理

- 以DNA分子为模板，加入与待扩增片段两侧序列互补的一对特异寡核苷酸链作引物（primer），在耐热DNA聚合酶的催化下，分别合成两条新的DNA互补链；
- 每一个反应周期包括变性、退火、延伸，多次重复这一周期性反应过程，结果使两个引物之间的DNA片段拷贝数以几何级数增加。

Polymerase chain reaction - PCR



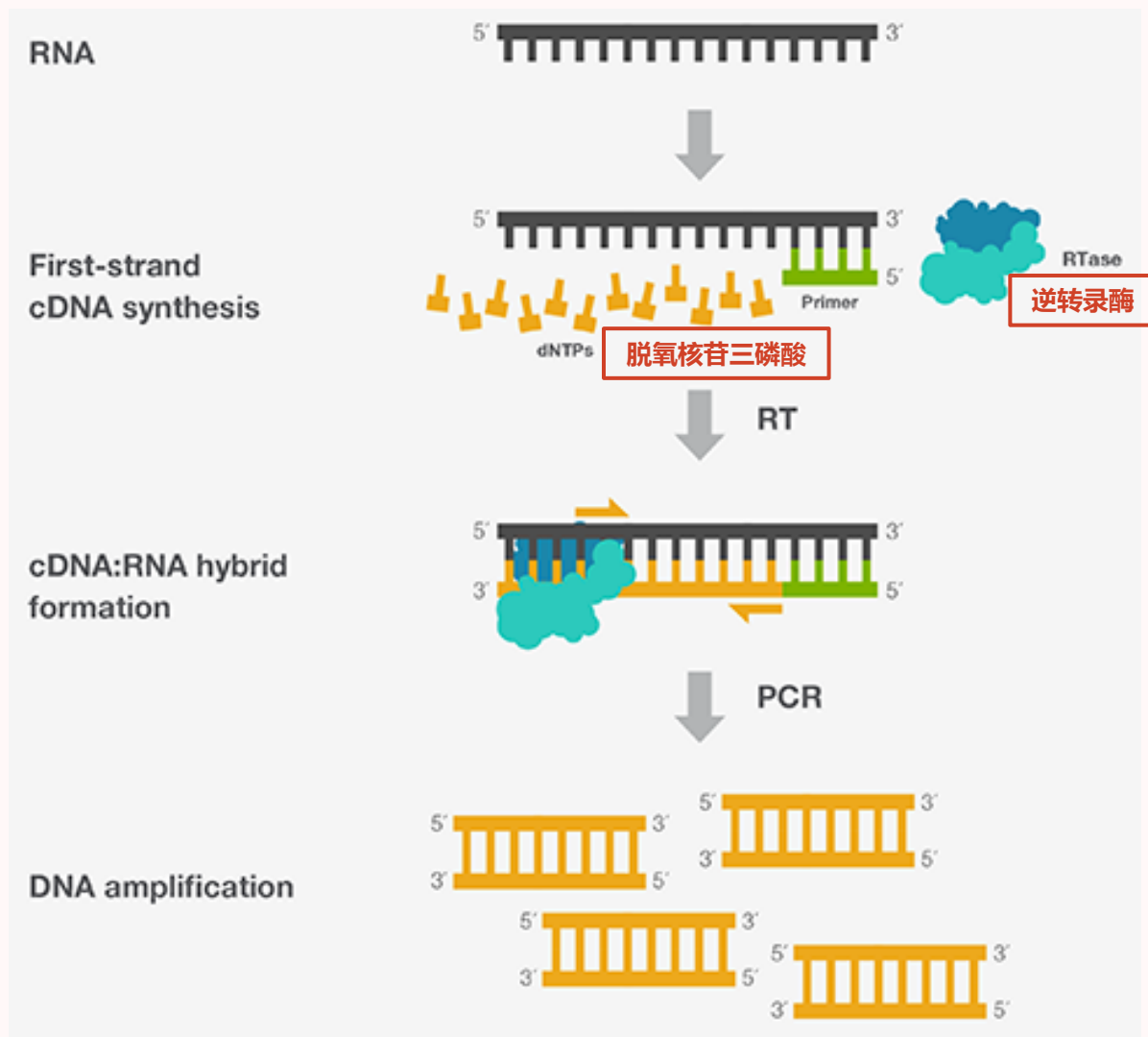
资料来源：智银资本

3.2

反转录PCR (reverse transcription PCR , RT-PCR)

- 反转录PCR以RNA为模板，先反转录生成cDNA，再对cDNA进行PCR扩增；
- 作为模板的RNA可以是总RNA、mRNA或体外转录的RNA产物，关键是**确保RNA中无RNA酶和gDNA的污染**；
- 可分为一步法（病毒检测）和两步法（mRNA解析）；
- 常用于从组织或细胞中**获取目的基因、检测基因结构以及研究mRNA表达水平**。

资料来源：智银资本



3.3

实时定量PCR (real-time quantitative PCR , RT-qPCR)

- 与常规PCR相比，无需电泳，通过**荧光信号积累**实时直观地监测整个PCR反应进程。

Molecular Beacon/分子信标模式



PNA probes

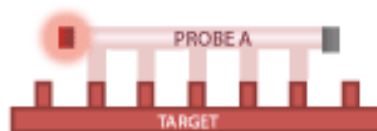
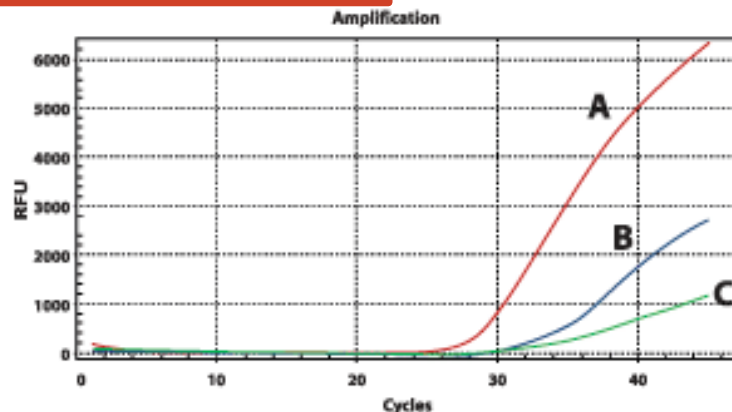
荧光基团

淬灭基团

由于这两个基团
靠得很近，没有
荧光信号产生



DNA templates



荧光基团远离淬灭基
团并释放荧光信号

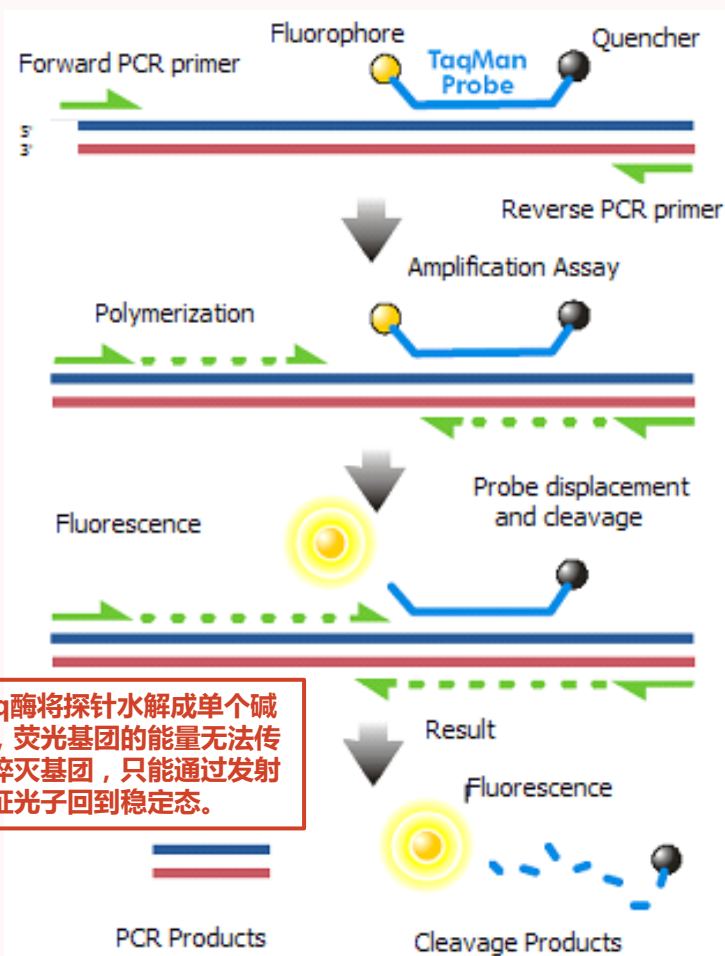


资料来源：智银资本

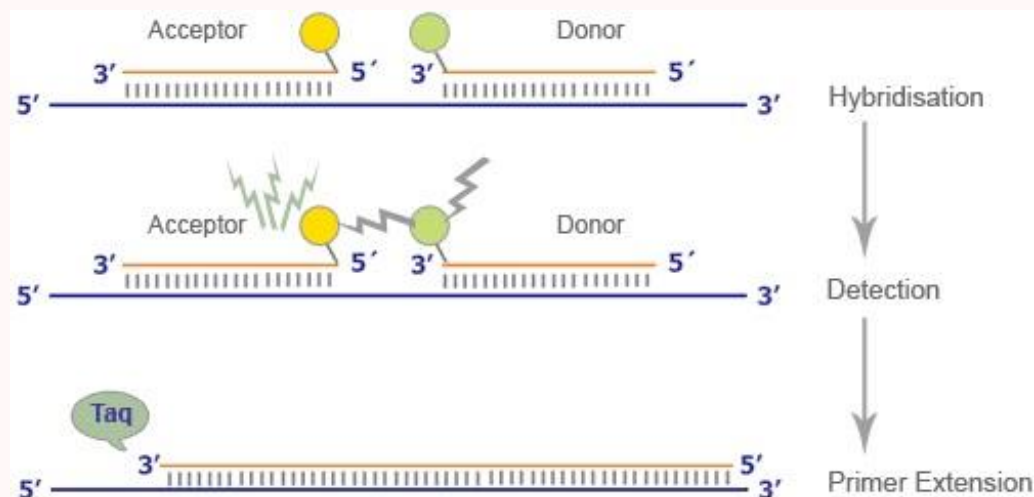
3.3

实时定量PCR (real-time quantitative PCR , RT-qPCR)

TaqMan Probe模式



Hybridization Probe/杂交探针模式



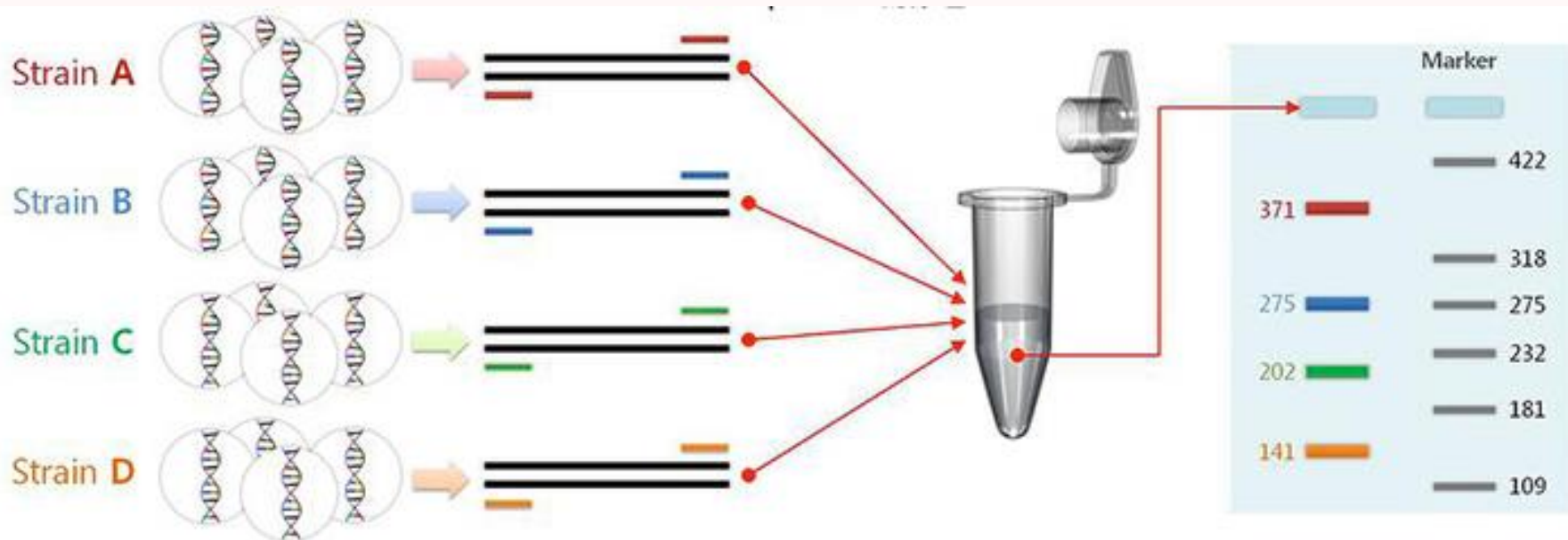
两个探针，一个探针3'碱基上结合感光基团 (Donor)，另一个探针5'碱基上结合荧光基团 (Acceptor)。当两个探针特异性结合到模板上时，Donor接受激发光得到能量，并将能量传递给 Acceptor，Acceptor通过发射特征光子回到稳定态。

资料来源：智银资本

3.4

多重PCR (multiplex PCR)

- 在同一反应体系中加入二对以上引物，**同时扩增出多种核酸片段的PCR反应**，其反应原理、反应试剂和操作过程与一般PCR类似；
- 多重PCR主要用于多种病原微生物的同时检测或鉴定某些病原微生物、某些遗传病及癌基因的分型鉴定。

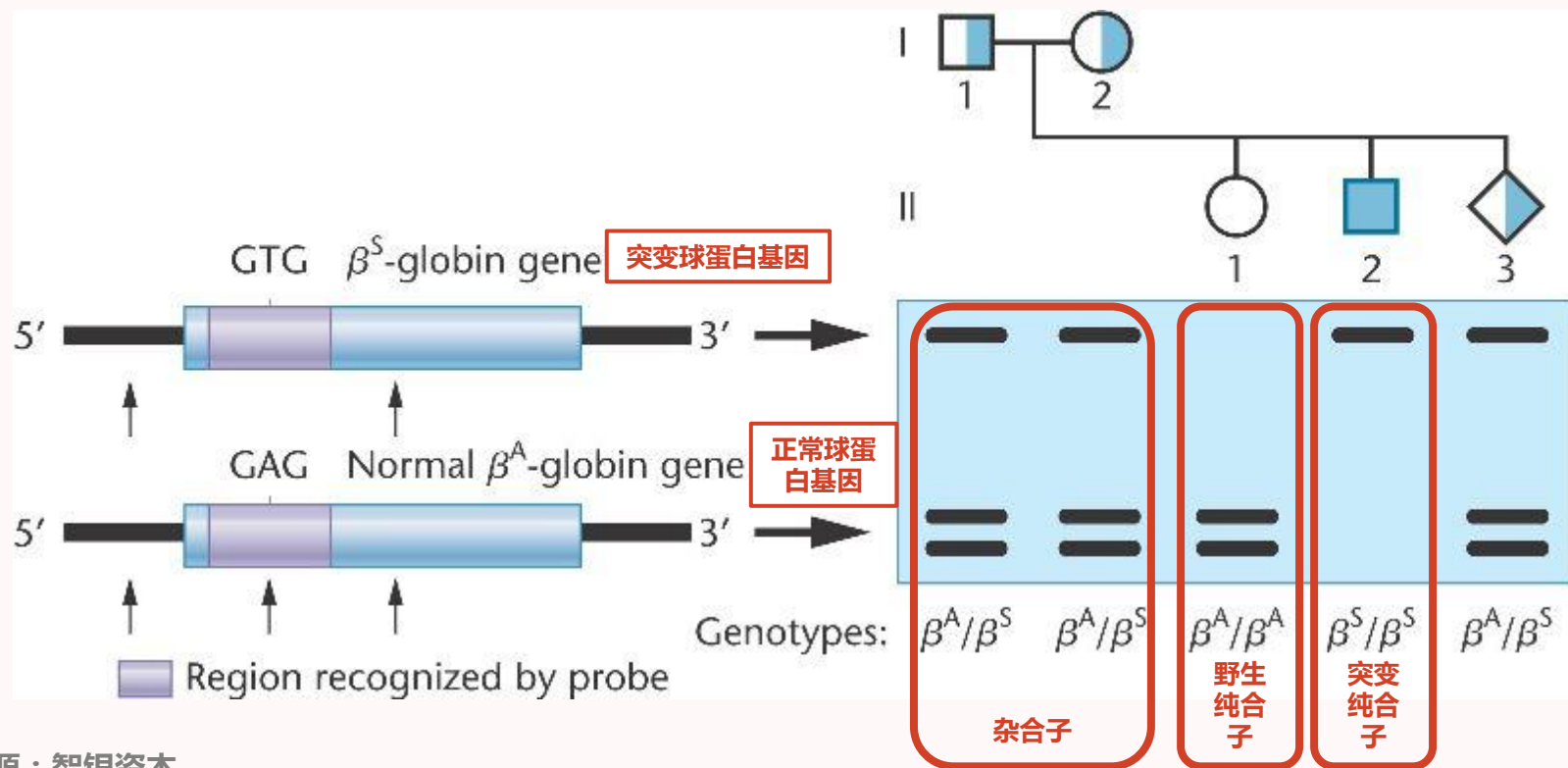


资料来源：智银资本

3.5

PCR等位基因特异寡核苷酸探针杂交 (PCR-ASO)

- 根据**已知基因突变位点**的碱基序列，设计和制备野生型或突变型基因序列互补的**两种探针**，与被检测者样品中的DNA分子进行杂交；根据样品与这两种探针杂交信号的强弱，确定判断样品是野生纯合子、突变纯合子或杂合子。



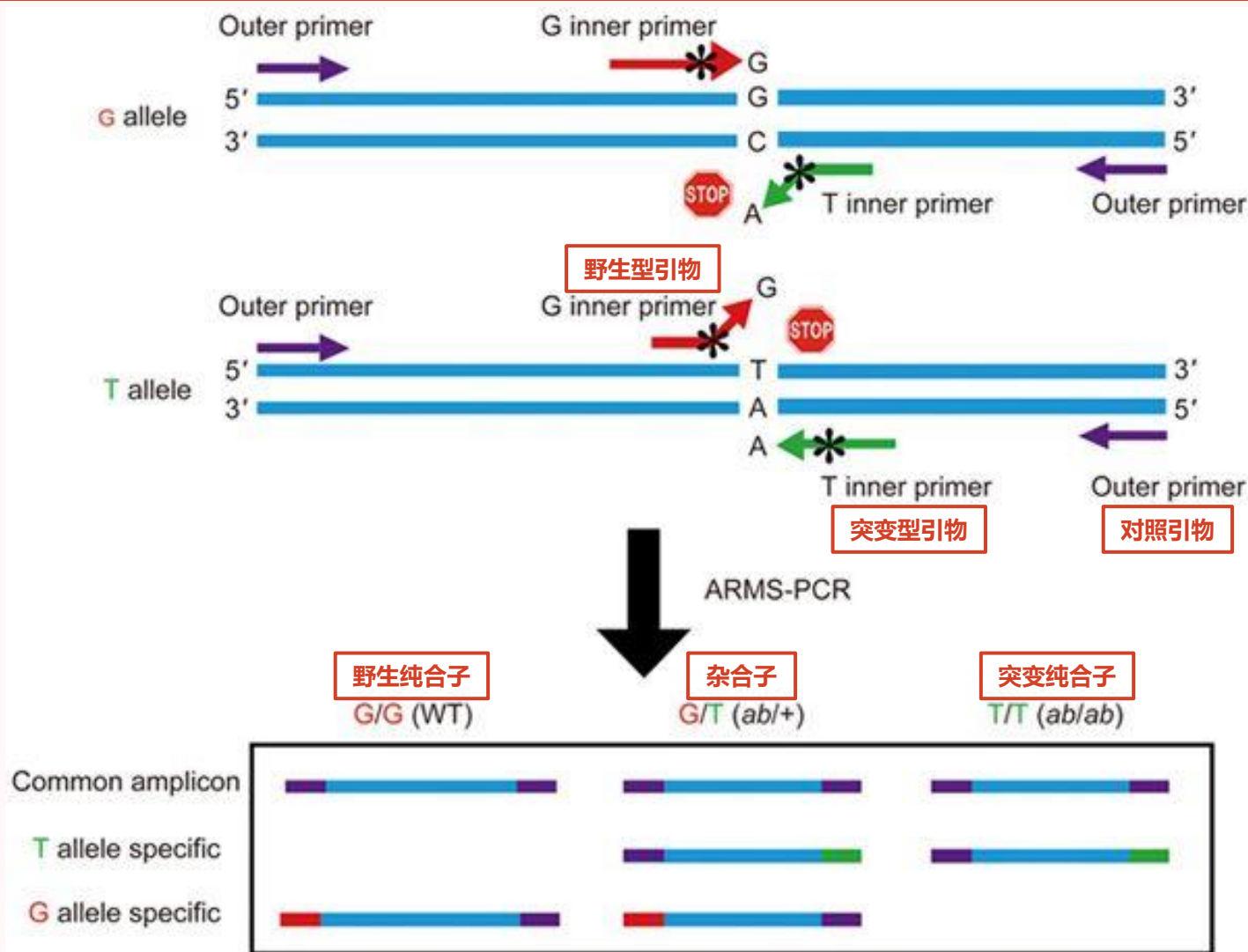
资料来源：智银资本

3.6

PCR扩增抗拒突变系统 (ARMS-PCR)

- 当引物3' 末端与模板5' 末端存在错配时，可引起扩增产物的急剧减少；
- 通过设计适当的引物，使正常模板引物扩增正常等位基因，突变模板引物扩增突变基因；进而通过PCR扩增直接达到区别野生型和突变型的目的。

资料来源：智银资本



1

概述

2

核酸分子杂交技术

3

PCR及其衍生技术

4

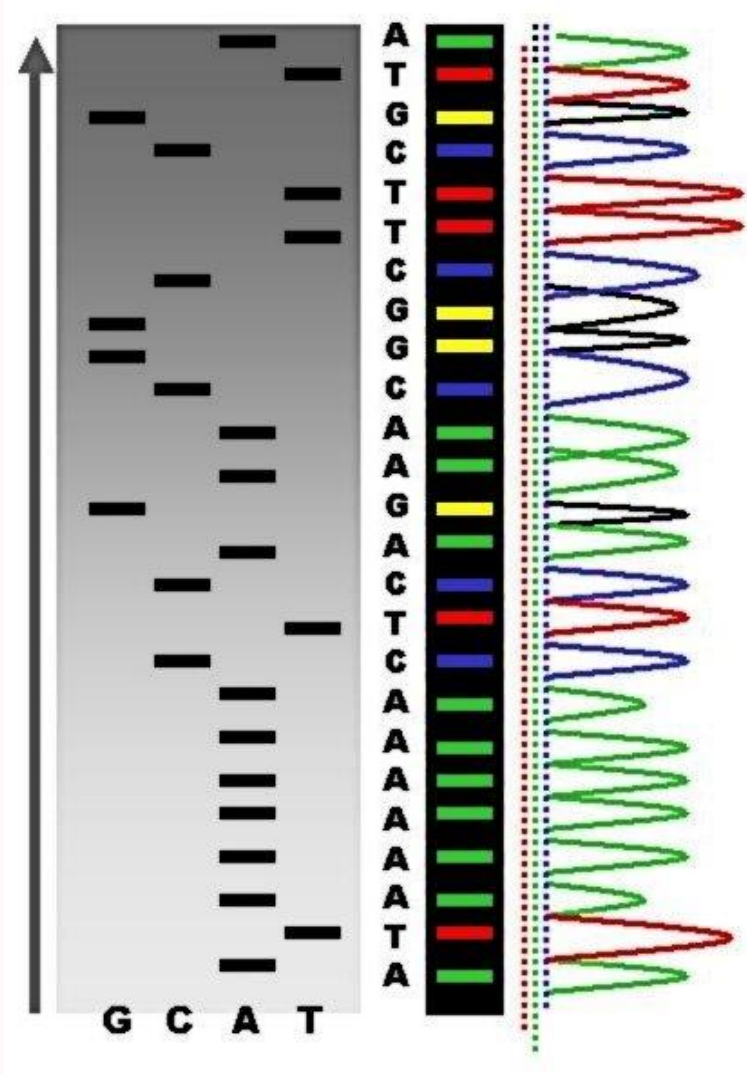
DNA序列测定技术

4.1

DNA序列测定 (DNA sequencing)

- **DNA序列测定 (DNA sequencing)** 是确定DNA片段的全序列，是目前确定基因突变和检测基因变异最准确可靠的方法。
- 利用测序信息，能够识别基因的变化，基因与疾病和表型的关联，并确定潜在的药物靶点。
- **人类基因组计划 (Human Genome Project , HGP)** 于1990年正式启动，2006年完成；其宗旨在于测定组成人类染色体 (22+X+Y) 中所包含的六十亿对组成的核苷酸序列，从而绘制人类基因组图谱，并且辨识其载有的基因及其序列，达到破译人类遗传信息的最终目的。

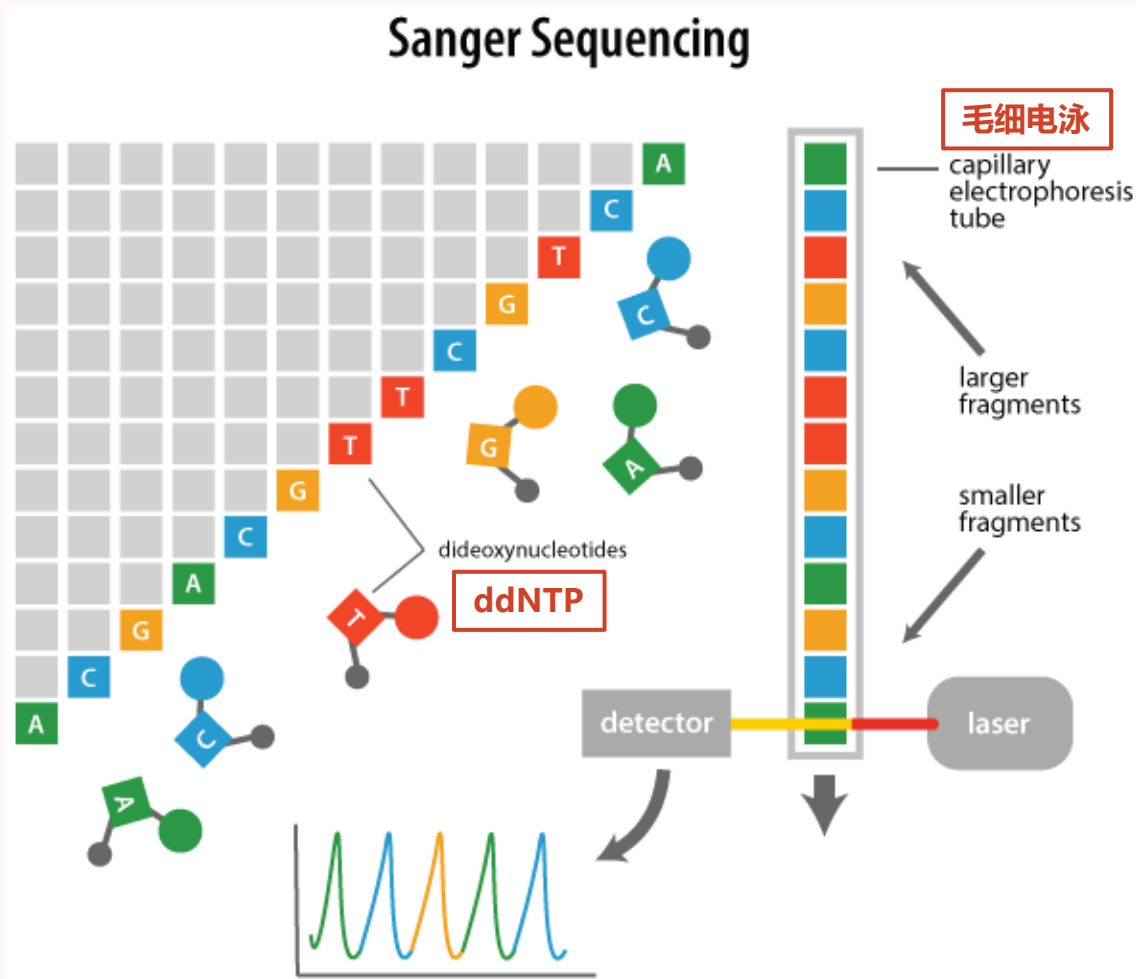
资料来源：维基百科，智银资本



4.2

Sanger测序法 (Sanger sequencing)

- Sanger测序法，又称双脱氧链终止法 (dideoxy chain-termination method)，反应核心在于使用的**ddNTP**：由于**缺少3'-OH基团**，不能与另一个dNTP连接形成磷酸二酯键，可中止DNA链的延伸。此外，ddNTP上连接有**放射性同位素或荧光标记基团**，因此可被自动化仪器或凝胶成像系统所检测到。

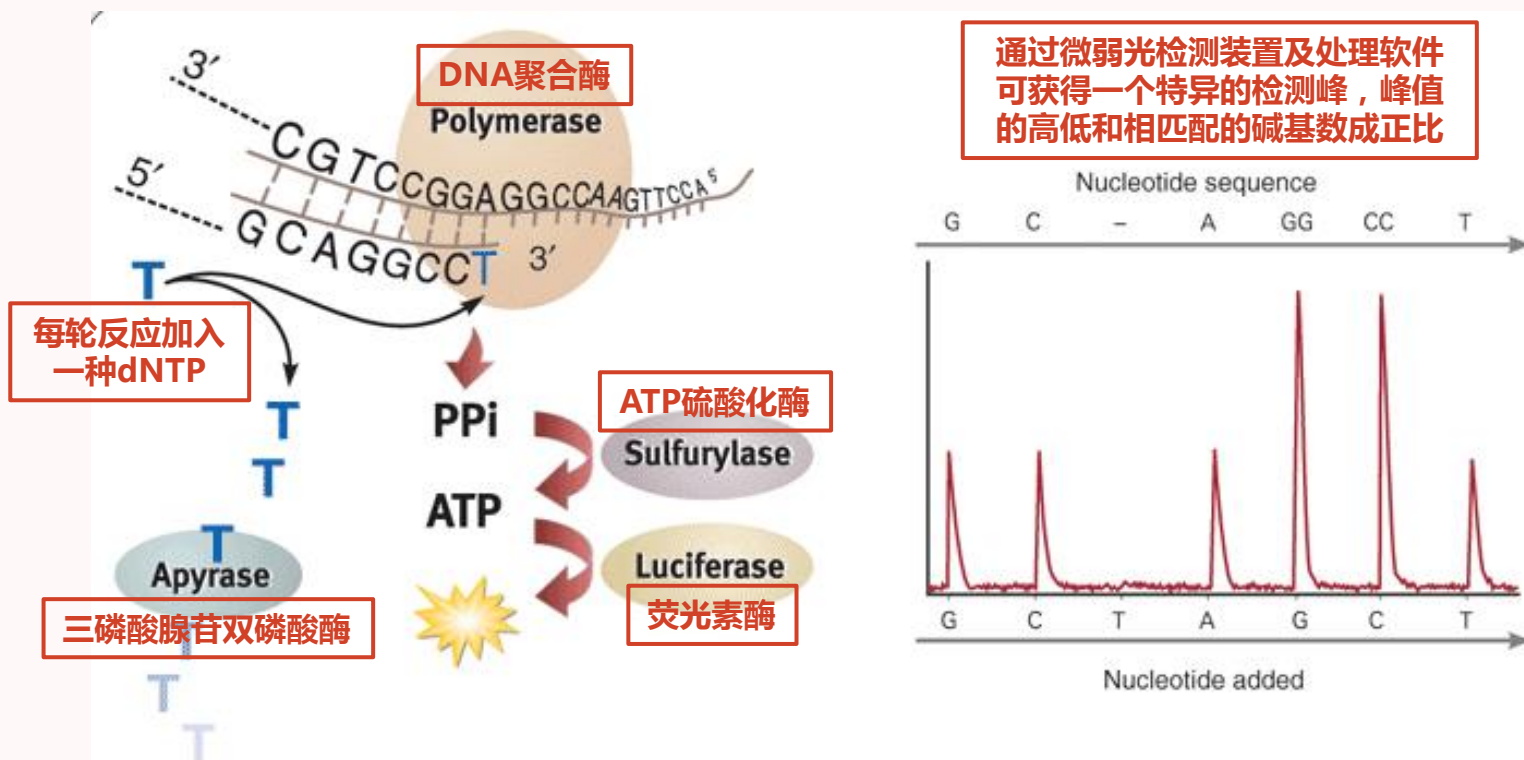


资料来源：abm Inc.，智银资本

4.3

焦磷酸测序法 (Pyrosequencing)

- 焦磷酸测序法适于已知的短序列，其可重复性和精确性能与Sanger测序法相媲美，但速度却大幅提高。其原理为酶级联化学发光反应，具体而言，每一个dNTP的聚合均会释放一次荧光信号，通过检测荧光的信号强度，达到实时测序的目的。



资料来源：Roche，智银资本

4.4

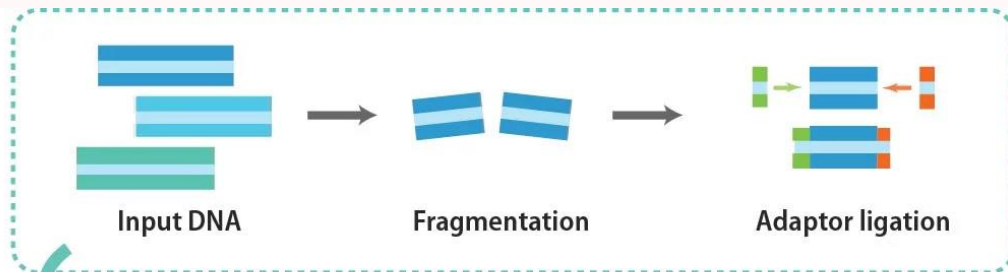
边合成边测序 (Sequencing by Synthesis, SBS)

- Illumina的边合成边测序 (SBS) 是目前世界上最成功且最广泛使用的NGS技术。
- 当每个dNTP加入时，**对荧光标记的可逆终止子进行成像**，随后切割以利于后续加入；**在每个测序循环中，所有四种可逆终止子结合的dNTP都存在。**

资料来源：Illumina，智银资本

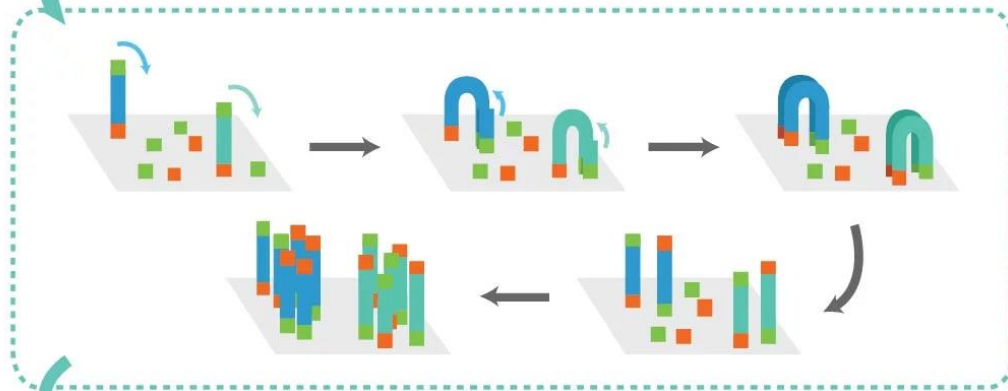
1 Library Preparation

文库制备



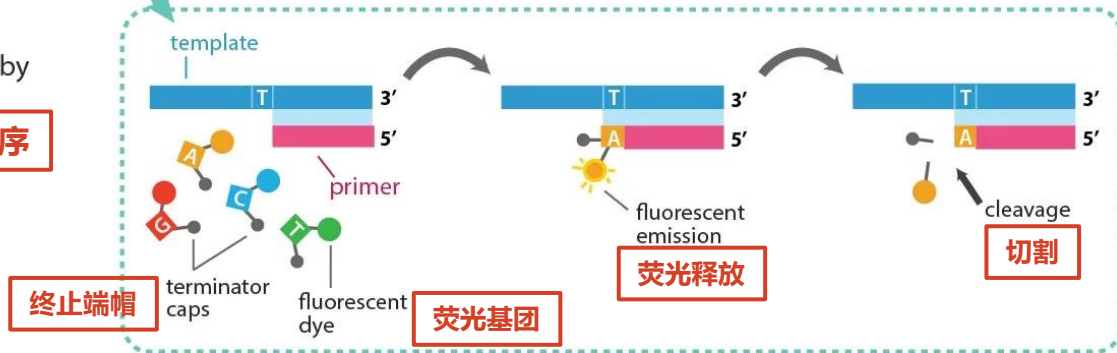
2 Bridge PCR

桥式PCR



3 Sequencing by Synthesis

边合成边测序

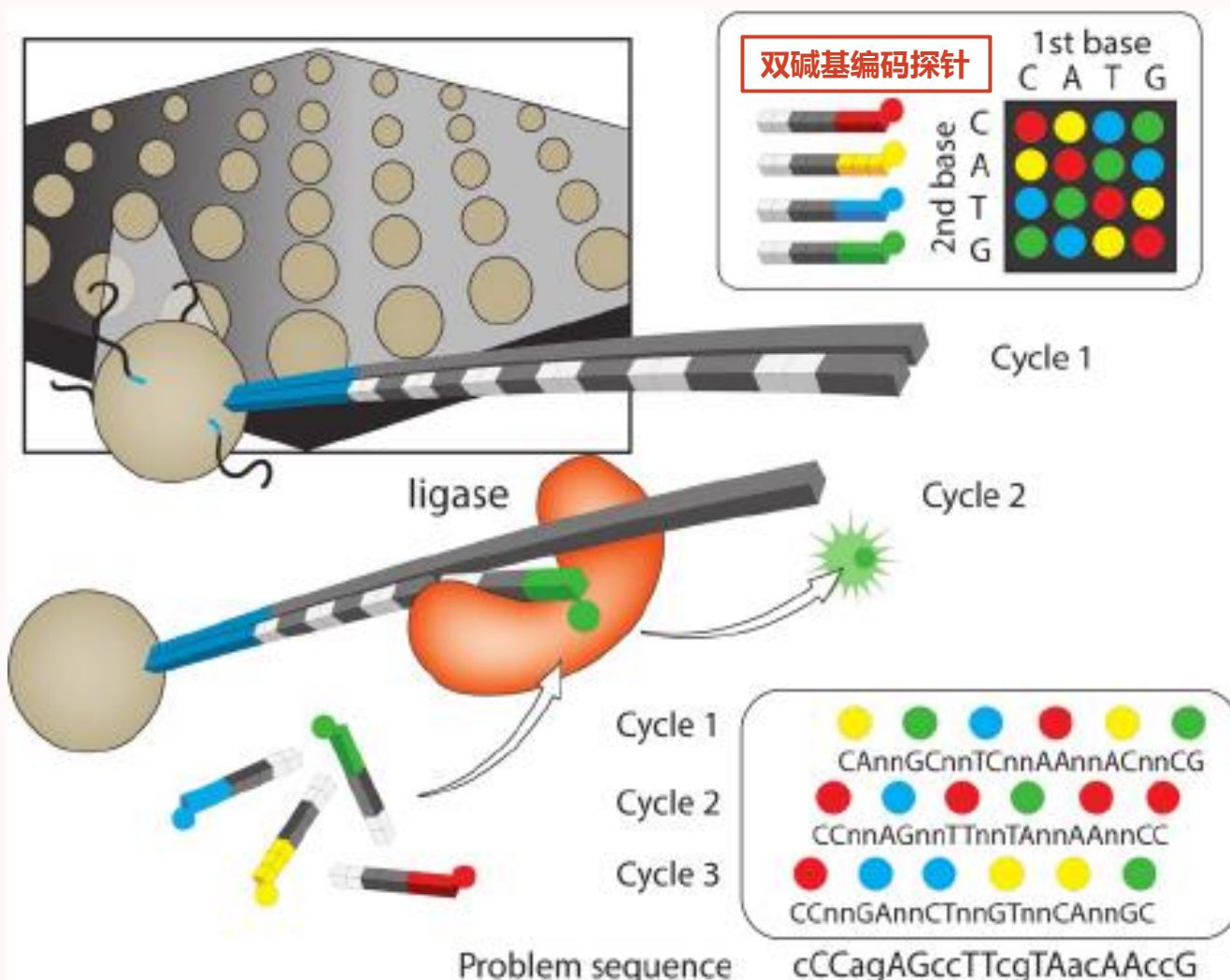


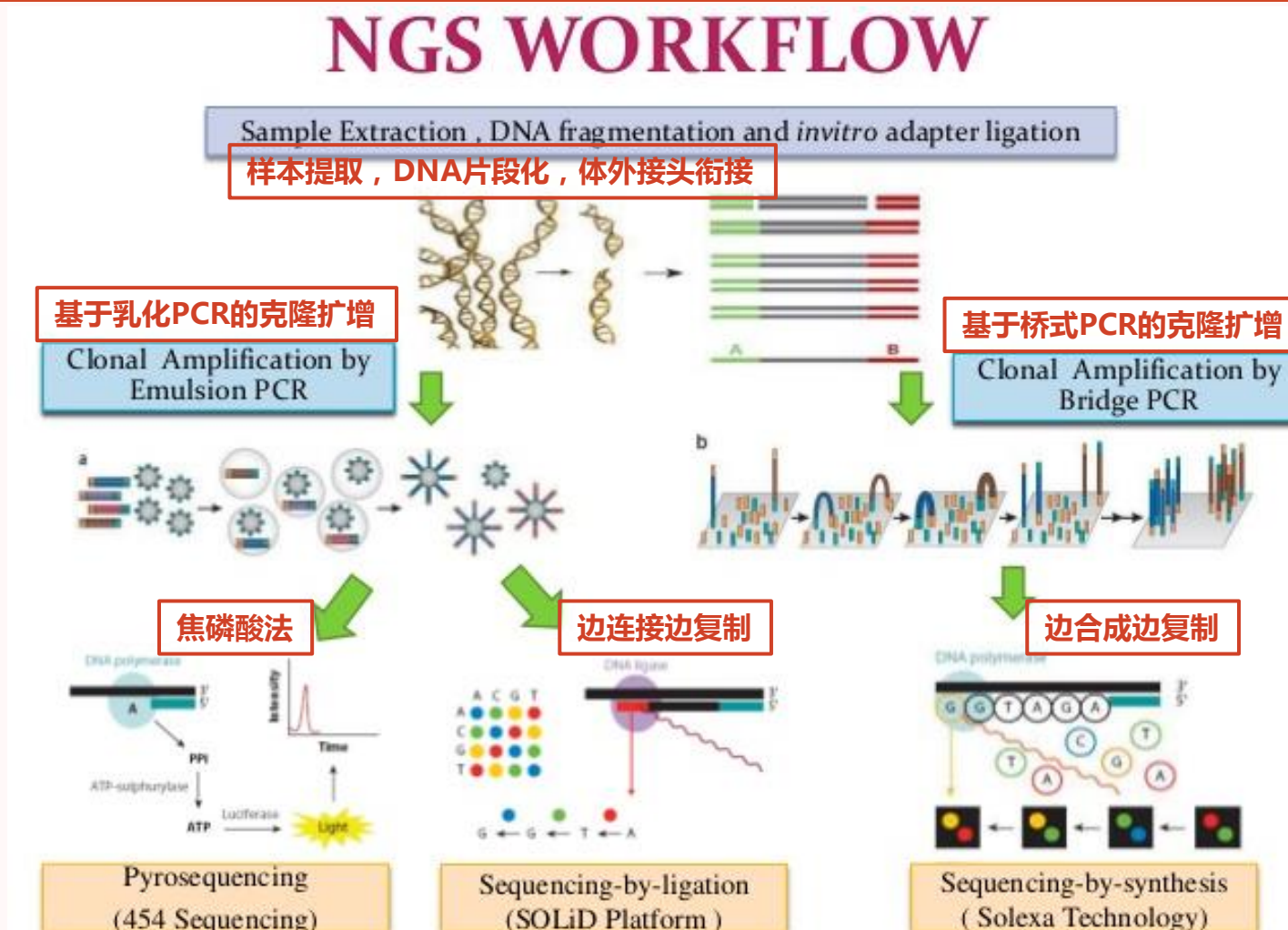
4.5

边连接边测序 (Sequencing by Ligation , SBL)

- SBL中，带有荧光基团的探针与DNA片段杂交并且与临近的寡核糖核酸连接，通过荧光基团的波长来判断碱基序列。
- SOLiD平台使用**双碱基编码的探针**，每四种组合使用一种荧光信号（共四种）；其测序过程由一系列的结合，连接，图像获取以及切割的循环组成。

资料来源：SOLiD，智银资本





资料来源：智银资本

4.7

常见测序方法对比

	单分子实时测序 (Pacific Bio)	离子半导体 (Ion Torrent)	边合成边测序 (Illumina)	边连接边测序 (SOLiD)	焦磷酸测序 (454)	链终止法 (Sanger)
读长	平均5,500bp- 8,500 bp, 最大 可超过30,000	最大400bp	50-300bp	50+35或 50+50bp	700bp	400-900bp
精确度	连续测序 99.999%, 单一测序87%	98%	98%	99.9%	99.9%	99.9%
每次运行可获取 读段数	约400兆碱基	最大8000万	最大30亿	12亿-14亿	100万	N/A
每次运行耗时	0.5-2小时	2小时	1-10天	1-2周	24小时	20分钟-3小时
每百万碱基所耗 成本 (美元)	\$0.33-\$1.00	\$1	\$0.05-\$0.15	\$0.13	\$10	\$2400

数据来源：Nature Reviews Genetics volume 17, pages 333–351 (2016)，智银资本

免责声明

1. 本报告仅供智银资本（以下简称“本公司”）的客户使用，本公司不会因接收人收到本报告而视其为客户；
2. 本报告是基于本公司认为可靠的已公开信息，但本公司不保证该等信息的准确性或完整性。本报告所载的资料、工具、意见及推测只提供给客户作参考之用，并非作为或被视为出售或购买证券或其他投资标的的邀请或向人作出邀请；
3. 客户应当认识到有关本报告的相关推荐等只是研究观点的简要沟通，需以本公司<http://www.sz-zhiyin.com>/网站刊载的完整报告为准；
4. 本报告所载的资料、意见及推测仅反映本公司于发布本报告当日的判断，本报告所指的证券或投资标的的价格、价值及投资收入可能会波动。在不同时期，本公司可发出与本报告所载资料、意见及推测不一致的报告；
5. 客户应当考虑到本公司可能存在可能影响本报告客观性的利益冲突，不应视本报告为作出投资决策的惟一因素。本报告中所指的投资及服务可能不适合个别客户，不构成客户私人咨询建议。本公司未确保本报告充分考虑到个别客户特殊的投资目标、财务状况或需要。本公司建议客户应考虑本报告的任何意见或建议是否符合其特定状况，以及（若有必要）咨询独立投资顾问；
6. 在任何情况下，本报告中的信息或所表述的意见并不构成对任何人的投资建议。在任何情况下，本公司不对任何人因使用本报告中的任何内容所引致的任何损失负任何责任；
7. 若本报告的接收人非本公司的客户，应在基于本报告作出任何投资决定或就本报告要求任何解释前咨询独立投资顾问；
8. 本报告的版权归本公司所有。本公司对本报告保留一切权利。除非另有书面显示，否则本报告中的所有材料的版权均属本公司。未经本公司事先书面授权，本报告的任何部分均不得以任何方式制作任何形式的拷贝、复印件或复制品，或再次分发给任何其他人，或以任何侵犯本公司版权的其他方式使用。所有本报告中使用的商标、服务标记及标记均为本公司的商标、服务标记及标记。

Thank You



公司官网



微信公众号



智银资本
ZhiYin Capital

<http://www.sz-zhiyin.com>