

# 第1章

## 如何在分子水平研究生命

### 问题讨论

1. 为什么要从分子水平研究生命？
2. 如何从分子水平研究生命？

生物化学与分子生物学是在分子水平上研究生命的科学，是人类探索生命的知识结晶和有力武器。生物化学与分子生物学的完整体系不仅包括其理论体系，还包括其技术体系。该学科的快速发展在很大程度上得益于一系列实验技术的创新和仪器设备的发明，如 DNA 重组技术、核酸分子杂交技术、PCR 技术、转基因技术、基因打靶技术、DNA 芯片技术、基因测序技术、蛋白质组学技术等，这些技术本身构成了生物化学与分子生物学的重要内容。生物化学与分子生物学实验技术以生物分子为研究对象，通过各种手段对其理化性质、组成结构、功能活性以及在生命活动中的作用进行研究，因此也称分子实验技术（experimental techniques of the molecular）。

### 第1节 分子实验技术简史

早在 19 世纪 30 年代，李比希（J. von Liebig）就将定量分析技术用于生物体的研究。20 世纪 20 年代，微量分析技术用于生物分子的研究，促进了维生素、激素和辅酶的发现。30 年代，福林（J. A. Folin）和吴宪先后建立了血糖分析、蛋白质含量分析、氨基酸测定等方法，这些方法至今仍在使用。

1923 年，斯维贝格（T. Svedberg）制成了世界上第一台相对离心力（relative centrifugal force, RCF）5000g 的新型离心机，他用这台离心机准确测定了血红蛋白等复杂蛋白质的分子量，开启了用离心机分离生物大分子的先河，为此，他获得了 1926 年的诺贝尔化学奖。为了纪念这位超离心技术的奠基人，人们将大分子沉降系数（sedimentation coefficient, S）的基数（ $10^{-13}$  s）命名为 1 个 Svedberg 单位（ $1S=1 \times 10^{-13}$  s）。

1809 年，列依斯（Ре́йсе）首次发现电泳现象。1909 年，米凯利斯（L. Michaelis）首次将胶体颗粒在电场中的移动现象称为电泳（electrophoresis）。1937 年，提塞留斯（A. W. K. Tiselius）对电泳仪器做了改进，制成“提塞留斯电泳仪”，建立了研究蛋白质的移动界面电泳方法，并首次证明血清蛋白包括白蛋白及  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  球蛋白。由于在电泳技术方面做出的开拓性贡献，提塞留斯获得了 1948 年的诺贝尔化学奖。1948 年，维兰德（H. Wieland）和费舍尔（H. Fischer）发展了以

滤纸作为支持介质的电泳方法,对氨基酸进行分离。1949年,鲍林(L. C. Pauling)等用电泳法证明镰形红细胞贫血是因为有异常血红蛋白的存在,据此引入分子病(molecular disease)的概念。1950年,杜若姆(E. L. Durrum)用纸电泳(paper electrophoresis)进行各种蛋白质的分离,开创了利用各种固体物质(如滤纸、醋酸纤维素薄膜、琼脂凝胶、淀粉凝胶等)作为支持介质的区带电泳方法。1959年,雷蒙德(S. Raymond)和温特劳布(L. Weintraub)利用人工合成的凝胶作为支持介质,创建了聚丙烯酰胺凝胶电泳方法,极大提高了电泳的分辨率,开创了电泳技术的新时代。至今聚丙烯酰胺凝胶电泳仍是对蛋白质、多肽、核酸等生物大分子使用最普遍、分辨率最高的分析鉴定技术,是检验生化物质纯度的标准分析鉴定方法,被看作是对生物大分子进行分析鉴定最准确也是最后的手段(last check)。1969年,韦伯(K. Weber)应用SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳测定了蛋白质的分子量。1981年,乔根森(J. W. Jorgenson)和卢卡奇(K. D. Lukacs)首先在75 μm内径毛细管柱内用高电压进行电泳,建立了高效毛细管电泳(high performance capillary electrophoresis, HPCE)技术。1984年,寺部清毅(S. Terabe)等建立了胶束毛细管电动力学色谱方法。1987年,赫尔特(S. Hjerten)建立了毛细管等电聚焦电泳(capillary isoelectric focusing, CIEF),寇恩(A. Cohen)和卡尔格(B. Karger)建立了毛细管凝胶电泳。1988年出现了第一批毛细管电泳仪器。由于HPCE高效、快速、经济,适用于多肽、蛋白质(包括酶和抗体)、核苷酸以及DNA的分离分析,短短几年内得到了迅速发展。HPCE是经典电泳技术和现代微柱分离技术相结合的产物,是一种可以自动化操作的高效分离技术。

1961年,霍尔(B. D. Hall)和施皮格尔曼(S. Spiegelman)建立DNA-RNA分子杂交法。分子杂交技术与电泳技术相结合,形成了新的实验技术——印迹(blotting)技术。1975年,萨瑟恩(E. M. Southern)利用凝胶电泳分离DNA片段,然后将DNA片段转移到硝酸纤维素膜上,利用DNA-RNA杂交检测特定的DNA片段,创立“Southern印迹法”。尔后人们用类似的方法,对RNA和蛋白质进行印迹分析,对RNA的印迹分析称为“Northern印迹法”,对单向电泳后的蛋白质进行印迹分析称为“Western印迹法”,对双向电泳后的蛋白质进行印迹分析称为“Eastern印迹法”。

1935年,赫维西(G. Hevesy)制得人工放射性磷,奠定了放射性同位素示踪技术的基础,这使他获得1943年的诺贝尔化学奖。同年,舍恩海默(R. Schoenheimer)和瑞顿伯格(D. Rittenberg)将同位素示踪用于糖类及脂类物质的中间代谢的研究。1942年,舍恩海默出版《身体成分的动态》,该书大量采用<sup>2</sup>H、<sup>15</sup>N、<sup>18</sup>O、<sup>14</sup>C等重同位素示踪的方法追踪代谢途径,从而得出体内物质不断变化更新的动态概念。放射性同位素示踪技术在20世纪50年代有了很大发展,为阐明各种生物分子的代谢过程起了关键作用。

1940年,马丁(A. J. P. Martin)和辛格(R. L. M. Synge)建立色层析法,后来又发展为纸层析及分配层析,并应用于分析氨基酸,他们因此获得1952年的诺贝尔化学奖。1949年,斯坦(W. H. Stein)和穆尔(S. Moore)报告了用淀粉柱区带层析测定β-乳球蛋白的全部氨基酸组成。40年代,层析技术有了很大发展,成为分离生物分子的关键技术;60年代,层析技术又有了重大进展。1968—1972年,安芬森(C. B. Anfinsen)建立了亲和层析(affinity chromatography, AC)技术,开辟了层析技术的新领域。

1949—1950年,桑格(F. Sanger)发展了2,4-二硝基氟苯法,埃德曼(P. Edman)发展了异硫氰酸苯酯法鉴定肽链的N-末端。1953年,桑格研究出蛋白质序列的测定方法。1958年,斯坦、穆尔和斯帕克曼(D. H. Spackman)设计出氨基酸自动分析仪,加快了蛋白质的分析工作。1967年,埃德曼和贝格(G. Begg)建成多肽氨基酸序列分析仪。1973年,穆尔和斯坦又设计出氨基

酸序列自动测定仪，大大加快了多肽一级结构的测定。

1975年，桑格建立DNA碱基序列的分析方法并不断加以改进，1977年完成了Φ-X174噬菌体全部5400个碱基序列的分析。1976年，马克萨姆(A. M. Maxam)和吉尔伯特(W. Gilbert)建立了快速测定大片段DNA序列的化学法。1977年，桑格提出应用链终止抑制法测定DNA序列。随后，DNA序列测定仪、DNA合成仪等相继问世。1985年，史密斯(M. Smith)等报道了DNA测序中应用荧光标记取代同位素标记的方法。桑格在大分子测序方面做出了杰出贡献，他曾经两次荣获诺贝尔化学奖，1958年因为确定了胰岛素的分子结构获奖，1980年又因为设计出测定DNA核苷酸排列顺序的方法而与吉尔伯特和伯格(P. Berg)共同获奖。

### 人物介绍

#### 弗雷德里克·桑格

1918年8月13日弗雷德里克·桑格(Frederick Sanger)出生于英国格罗斯特郡的一个普通村庄，1939年，在剑桥大学圣约翰学院获得自然科学学士学位。1943年，完成博士论文《赖氨酸的代谢》获哲学博士学位，毕业后留校工作并开始研究胰岛素。桑格非常腼腆，不善言谈，不喜欢表现自己，讲课乏味，也不擅长沟通与合作，既无领导能力，又不会筹措科研经费，仅从事一些不需大量经费的研究项目，长期默默无闻，有几位助手因为耐不住寂寞离他而去。

桑格认为，项目少反而使自己免受干扰，也不必分心面对多种选择，可以一心一意地把所能做的唯一研究课题进行到底。桑格经过多年研究，终于找到一种试剂——2,4-二硝基氟苯，给蛋白质一端的氨基酸着色、切割，然后用纸色层分离法测定氨基酸，测定胰岛素的分子结构。后来，此试剂被广泛用于确定标记氨基酸的氮端和碳，被称为“桑格试剂”。他应用逐段递增的方法，花费了10年心血测定了胰岛素的一级结构。1955年，桑格公开发表了胰岛素的全序列，这是人类历史上第一次完整测定蛋白质中氨基酸的顺序，为以后人工合成蛋白质奠定了基础。1965年9月17日，世界上第一个人工合成的蛋白质——牛胰岛素在中国诞生了。消息传出，引起强烈反响。1966年4月召开鉴定会，许多科学家看到论文后纷纷来信来电祝贺，称赞中国作出了一项“可得诺贝尔奖”的工作。1966年8月1日在华沙召开的欧洲生物化学联合会第3次会议上，中国人工合成胰岛素成了会议的中心话题。桑格特别兴奋地说：“中国合成了胰岛素，也解除了我思想上的一个负担。”因为有人一直怀疑他在10年前测出胰岛素一级结构的部分顺序。



研究大分子的空间结构离不开电子显微镜技术和X射线衍射技术。1932年，克诺尔(M. Knoll)和鲁斯卡(E. Ruska)制成世界上第一台电子显微镜模型，后来鲁斯卡对模型做了改进，这就是现代电子显微镜的原型，电子显微镜打开了人类观察微观世界的窗口。1938年，阿斯伯里(W. T. Asbury)等对核酸进行了X射线研究；伯纳尔(J. D. Bernal)等对糜蛋白酶进行了X射线研究。以后，肯德鲁(J. C. Kendrew)利用X射线衍射技术测定了肌红蛋白的结构，佩鲁兹(M. F. Perutz)分析了血红蛋白的结构，他们二人因此获得1962年的诺贝尔化学奖。同年，威尔金斯(M. H. F. Wilkins)用X射线衍射技术证实了DNA的双螺旋模型，与沃森(J. D. Watson)和

克里克 (F. H. C. Crick) 分享了当年的诺贝尔生理学或医学奖。1965 年, 菲利普 (D. Phillips) 首次用 X 射线衍射技术阐明了鸡蛋清溶菌酶的三维结构。1969 年, 霍奇金 (D. M. C. Hodgkin) 获得 0.28 nm 分辨率的胰岛素晶体结构的分析结果。1970 年和 1974 年, 梁栋材等先后完成了 0.25 nm 和 0.18 nm 分辨率的牛胰岛素分子结构的分析工作。1980 年, 安德森 (C. Anderson) 和麦凯 (D. B. McKay) 利用 X 射线分析法测定了两种 DNA 结合蛋白质的结构。1989 年, 约翰逊 (J. E. Johnson) 等用 0.30 nm X 射线分析法测定了一种二十面体病毒中蛋白质-RNA 的相互作用。

1943 年, 钱斯 (B. Chance) 首次将灵敏的分光光度法用于酶-底物反应相互关系的研究。20 世纪 60 年代, 各种仪器分析方法用于生物化学研究取得很大的发展, 如高效液相色谱 (high performance liquid chromatography, HPLC) 技术, 红外光谱 (infrared radiation, IR)、紫外光谱 (ultraviolet spectrum, UV)、圆二色等光谱技术, 磁共振 (nuclear magnetic resonance, NMR) 技术等。

20 世纪 70 年代, 阿伯尔 (W. Arber)、史密斯 (H. O. Smith) 和内森斯 (D. Nathans) 发现并纯化了限制性核酸内切酶, 这为后来的重组 DNA 技术奠定了基础, 他们 3 人因此获得 1978 年的诺贝尔生理学或医学奖。1972 年, 伯格把猴细胞病毒 SV40 的 DNA 与  $\lambda$  噬菌体的 DNA 在体外重组成功。1973 年, 寇恩 (S. N. Cohen) 将外源 DNA 片段插入大肠杆菌质粒后产生嵌合质粒, 当嵌合质粒重新导入大肠杆菌时仍具有功能, 这成为外源基因导入细菌的主要方法, 从此开创了基因工程 (genetic engineering)。80~90 年代, 基因工程技术进入辉煌发展的时期。

1984 年, 柯勒 (G. J. F. Kohler)、米尔斯坦 (C. Milstein) 和杰尼 (N. K. Jerne) 由于发展了单克隆抗体技术, 完善了极微量蛋白质的检测技术而获得诺贝尔生理学或医学奖。1985 年, 穆利斯 (K. Mullis) 等建立了聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 技术, 使一向昂贵、繁杂的分子生物学实验能够在比较简易、经济的条件下有效地开展, 这是基因分析技术的重大突破, 对于生物化学与分子生物学的研究具有划时代的意义。这一技术在很短的时间里风行全球, 在众多学科领域被广泛采用。穆利斯因此获得 1993 年的诺贝尔化学奖。

## 第 2 节 分子实验技术体系

分子实验技术是在具体研究工作中建立起来并不断得到完善。从早期个别零散的实验方法, 经过不断发展, 形成了完整的实验技术体系。

分子实验技术按其研究目的和特点可分为四个层次: 第一层次是对生物分子进行分析鉴定; 第二层次是对生物分子进行人工合成; 第三层次是对生物分子进行人工改造; 第四层次是对生物分子进行功能研究。

### 一、生物分子的分析鉴定

不同的生物分子具有不同的理化性质, 据此可以对其进行分离制备和分析鉴定, 具体方法又可分为 5 类: ①根据生物分子大小不同, 可采用凝胶过滤法、超滤法、超速离心法、SDS 电泳法等。②根据生物分子荷电不同, 可采用等电聚焦电泳法、离子交换层析法等。③根据生物分子吸收光谱和放射性不同, 可采用分光光度法 (包括紫外光、红外光、荧光)、X 射线结构分析法、共振法 (包括电子顺磁共振、电子自旋共振、磁共振)、放射性同位素示踪法、放射免疫分析法等。④根据生物分子疏水相互作用或氢键形成的引力不同, 可采用反相高效液相层析法、分子杂交法等。⑤根据生物分子特异相互作用不同, 可采用亲和层析法、免疫化学分析法等。

## 二、生物分子的人工合成

不同的生物分子具有不同的组成和结构，在搞清楚生物分子结构的前提下，可以对其进行人工合成。1828年，乌勒（F. Wohler）用氨及氰酸铅合成了第一个有机化合物——尿素；1953年，杜维尼奥（V. du Vigneaud）合成了第一个多肽——催产素（oxytocin）；1965年，中国人合成了第一个蛋白质——牛胰岛素；1981年，中国人合成了第一个核酸——酵母丙氨酸 tRNA。这标志着人们不仅可以合成生物小分子，也可以合成生物大分子，尤其是合成生物大分子是极富挑战性的工作。例如，合成牛胰岛素就花了7年时间。1963年，梅里菲尔德（B. Merrifield）提出固相合成法，并于1969年人工合成了具有酶活性的牛胰核糖核酸酶。这一方法后来成为合成中等大小多肽的常用方法，在此基础上设计出多肽合成的自动装置，梅里菲尔德因此获得1984年的诺贝尔化学奖。现在氨基酸序列分析和序列合成、核苷酸序列分析和序列合成已经实现自动化。

## 三、生物分子的人工改造

生物分子的结构与功能有着密切的关系，尤其是生物大分子的组成和结构非常复杂，是长期自然进化的产物，对其进行改造，有可能使之产生新的功能。基因工程的兴起使人们可以按照预先的设计对DNA进行剪切拼接，将其引入细胞中进行克隆表达。基因工程是重组DNA技术的产业化设计与应用，包括上游技术和下游技术两大部分。上游技术即重组DNA技术，主要是基因重组、克隆和表达的设计与构建；下游技术主要是基因工程菌或细胞的大规模培养以及基因产物的分离纯化。从20世纪70年代开始，基因工程的发展已经有四代：第一代是经典基因工程，主要是使蛋白质或多肽基因进行高效表达。第二代是蛋白质工程（protein engineering），主要是通过基因的定向诱变使之表达出具有特殊功能的蛋白质。第三代是代谢工程（metabolic engineering），主要是利用基因工程技术定向改造细胞的代谢途径，以改善产物的形成和细胞的性能。第四代是基因组工程（genome engineering），主要是进行基因组或染色体的转移，也称染色体工程（chromosome engineering）。

蛋白质工程是基因工程的一部分，是基因工程发展的第二代。蛋白质工程与经典基因工程虽然密不可分，但两者也有区别。经典基因工程是通过基因操作把外源基因转入适当的生物体内并在其中进行表达，它的产品是该基因编码的天然蛋白质；蛋白质工程是根据蛋白质的精细结构与功能之间的关系，利用基因工程的手段，按照人类自身需要，定向改造天然的蛋白质，甚至创造出自然界不存在的新的蛋白质。蛋白质工程可以根据对分子预先设计的方案，通过对基因进行改造，来实现对它所编码的蛋白质进行改造。天然蛋白质都是通过漫长的进化过程形成的，蛋白质工程相当于人为加快了进化过程，其产品已不再是天然的蛋白质，而是经过改造的具有人类所需优点的蛋白质。

经典基因工程通常只涉及少量基因的改造。例如，将编码某种蛋白质药物的单一基因转入酵母，然后利用该酵母发酵生产该药物。代谢工程则涉及大范围的基因改变。例如，要在大肠杆菌中生产某种代谢产物——紫杉醇，必须把相关途径一系列酶的基因全部导入大肠杆菌，并且敲除大肠杆菌中原有的不必要的和有害的代谢途径，以构建出一整套大肠杆菌中原本没有的紫杉醇代谢途径，使大肠杆菌能够生产紫杉醇。因此，代谢工程还是属于基因工程，只是改变基因的量非常大。

染色体工程是对染色体（基因组）进行设计和工程改造的一项综合性技术。染色体是基因的载体，将染色体切成片段进行重新组合，构成新的“人工染色体”。如果将这种人工染色体转移到

其他物种的细胞内, 培养成的生物体就称为“转染色体生物”。转染色体技术不同于转基因技术, 前者是将人工染色体整合到宿主细胞内; 后者是将单个基因植入宿主的基因组内。两者所产生的生物效应有着本质差别, 前者可以改造宿主生物的整体生理功能, 后者只能改变宿主生物生理活动的某一环节或某一种蛋白质产品。转染色体技术比克隆技术更进一步, 克隆是同一物种体细胞核移植后的无性生殖, 产生的是同一个体的复制品; 而转染色体技术则是将人工染色体转移到另一物种的去核细胞内, 产生人造新物种。如果将人的染色体或染色体片段转移到其他生物细胞内, 形成的“人源化生物”就能表达人的某些生理活动和表型。如果将人的一群相关基因转移到其他生物体内, 该生物就能产生具有人类特点的生物分子、细胞、组织或器官。从人源化生物中可以获得人类可以接受的细胞、组织甚至器官, 移植后不会产生排斥反应; 也可以获得用作药物的抗体、白蛋白和胰岛素等产品。通过转染色体工程, 人类就为自己建立了细胞、组织和器官的生产工厂。

#### 四、生物分子的功能研究

各种生物分子都有其特殊的功能, 搞清楚它们的功能是生物化学与分子生物学的基本任务。在基因组时代, 大规模基因组测序计划的实施使人们对于包括人类在内的许多生物基因组的结构有了整体了解, 但这仅仅是认识基因组功能的一个起点。因为 DNA 序列信息并不能预测: ①基因表达产物是否被翻译或何时被翻译; ②基因产物的含量; ③翻译后修饰的程度; ④基因剔除或过表达的影响; ⑤遗留的小基因或 <300 bp 的开放阅读框 (ORFs) 的出现; ⑥多基因的表型。此外, 还有转录后加工、翻译调节以及翻译后加工等问题。鉴于基因组研究的局限性, 1994 年澳大利亚麦考瑞 (Macquarie) 大学的威尔金斯 (M.Wilkins) 和威廉姆斯 (K.Williams) 等在意大利的一次科学会议上首次提出了蛋白质组 (proteome) 概念。蛋白质组学主要是对基因组表达的全套蛋白质进行定量测定, 对基因调节进行动态描述, 进而阐明基因表达调控的机制。蛋白质组研究技术并非从零开始, 它是已有 20 年历史的蛋白质 (多肽) 图谱和基因产物图谱技术的一种延伸。目前对蛋白质组的分析工作有两个方面: 一方面是得到正常生理条件下的机体、组织或细胞的全部蛋白质的图谱, 相关数据作为待测机体、组织或细胞的二维参考图谱和数据库; 另一方面是比较分析在改变生理条件下蛋白质组所发生的变化。目前蛋白质组研究技术主要有: ①用于蛋白质分离的技术, 如双向凝胶电泳 (two-dimensional gel electrophoresis, 2-DE)、双向高效柱层析等。②用于蛋白质鉴定的技术, 如质谱技术、凝胶图像分析、蛋白质和多肽的 N-端、C-端测序以及氨基酸组成分析等。③用于蛋白质相互作用及作用方式研究的双杂交系统。④用于分析大量数据的生物信息学等。

近年来, 各种生物分子间的相互作用逐渐得到重视, 因为细胞的各种生理活动都是以这种相互作用为基础的。要认识基因的功能, 必然要涉及基因表达的产物蛋白质, 而蛋白质的功能往往体现在它与其他大分子的相互作用。因此, 研究蛋白质与蛋白质的相互作用以及蛋白质与核酸的相互作用, 对于揭示生物大分子的功能, 进而揭示生命的奥秘无疑是一个突破口。与之有关的技术主要有酵母双杂交和噬菌体展示技术、核酸适体技术、生物信息学方法、蛋白质芯片技术以及纳米技术等。

今天, 探求生命奥秘的中心课题仍然是研究生物大分子。分子实验技术已经形成了一整套研究方法, 从生物大分子分离纯化制备到定性定量研究, 从序列测定到结构分析, 从理化性质分析到功能确定, 从单个大分子到大分子间的相互作用, 都有一系列技术方法可供选择。例如, 生物大分子的分离纯化与制备, 可以选择离心技术、电泳技术、层析技术、透析技术、超滤技术以及外源基因

表达（原核或真核）等；生物大分子的定性研究，可以选择 PCR 与 RT-PCR、DNA 测序以及蛋白质组学技术等；生物大分子的定量与半定量研究，可以选择紫外分光技术、定量 PCR 技术、免疫印迹分析（Western blot）、定量电泳、Southern 印迹（Southern blot）技术与 Northern 印迹（Northern blot）技术等；基因与蛋白质的功能确认，可以选择基因转导、基因剔除技术、转基因技术、RNAi 技术等。为了使这些技术实现高效自动化，既灵敏精确又重复性好、特异性高，人们设计了一系列由微机控制的高性能仪器，使这些技术日臻完美。必须强调指出的是，虽然技术方法是重要的，但更重要的是精巧的实验设计，只有巧妙地利用各种实验技术，才能达到预期的研究目的。

### 第3节 分子实验技术应用

20 世纪以来，分子实验技术不断取得突破。例如，20 年代超离心技术建立；30 年代电子显微镜技术兴起；40 年代电泳技术奠基，层析技术迅速发展；50 年代放射性同位素示踪技术应用；60 年代各种仪器分析方法用于生物化学研究；70 年代基因工程技术取得突破；80 年代 PCR 技术异军突起；90 年代大规模基因组测序计划开始实施；21 世纪头 10 年蛋白质组技术方兴未艾。这些实验技术极大地促进了生物化学与分子生物学学科的发展，丰富了学科的内容。

分子实验技术的发展使生物化学与分子生物学的研究领域不断拓宽，从基因组时代（genome era）到后基因组时代（post-genome era），从基因组学（genomics）到蛋白质组学（proteomics），无不有赖于分子实验技术的贡献。如果没有 DNA 序列分析技术，就不可能实施人类基因组计划；如果没有基因芯片技术，就不可能全面了解基因表达的规律；如果没有二维电泳和质谱技术的黄金组合，就不可能开展蛋白质组学研究。

#### 一、电泳技术在临床检验中的应用

分子实验技术不仅广泛用于生命科学各个领域的基础研究，也广泛用于医学研究以及临床疾病的诊断。例如，电泳技术在临床检验中就发挥着重要作用。新鲜血清经电泳后可以精确反映患者血清蛋白质的概貌，对于许多疾病的诊断都有参考价值。如急性炎症时可见  $\alpha_1$  和  $\alpha_2$  区百分率升高；肾病综合征或慢性肾小球肾炎时可见白蛋白下降、 $\alpha_2$  和  $\beta$  球蛋白升高；缺铁性贫血时由于转铁蛋白的升高而呈现  $\beta$  区带增高；慢性肝病或肝硬化呈现白蛋白显著降低、 $\gamma$  球蛋白升高 2~3 倍。对单一克隆浆细胞异常增殖所产生的无抗体活性均一的免疫球蛋白称为 M 蛋白（monoclonal protein），由 M 蛋白所导致的一系列疾病（如多发性骨髓瘤、巨球蛋白血症、重链病、游离轻链病、半分子病、良性单株丙种球蛋白血症和双 M 蛋白血症等）已不罕见。血清蛋白电泳是诊断这类疾病的首选方法，对其早期诊断、疗效观察以及预后判断均有十分重要的意义。电泳技术与免疫技术相结合，大大扩大了其临床应用的范围。免疫电泳技术的种类很多，如对流免疫电泳、火箭免疫电泳、电免疫扩散等。在各种免疫电泳基础上，又不断派生出一些新的技术。1969 年阿尔珀（Alper）与约翰逊（Johnson）推荐的免疫固定电泳是一种包括琼脂糖凝胶蛋白电泳和免疫沉淀两个过程的操作，是免疫沉淀反应的一种混合技术，检测标本可以是血清、尿、脑脊液或其他体液。

#### 二、DNA 重组技术在医药卫生领域的扩展

DNA 重组技术和建立在 DNA 重组技术之上的基因工程，在 40 多年的发展中已经取得了丰硕的成果，尤其是在医药卫生领域得到广泛应用，包括活性多肽、蛋白质和疫苗的生产，疾病发生机制研究以及诊断和治疗，新基因的分离以及环境监测与净化等，都要应用 DNA 重组技

术。许多活性多肽和蛋白质具有治疗和预防疾病的作用, 由于在组织细胞内产量极微, 所以采用常规方法分离制备很难满足临床需要。基因工程则突破了这一局限性, 能够大量生产这类多肽和蛋白质。迄今已成功生产出治疗糖尿病的胰岛素、治疗血癌和某些实体肿瘤的干扰素、治疗侏儒症的生长激素、治疗肢端肥大症和急性胰腺炎的生长激素释放抑制因子等 100 多种产品。抗生素在治疗疾病中的作用是不言而喻的, 但是用传统方法发现新抗生素的概率越来越低, 现在采用 DNA 重组技术已获得数十种基因工程“杂合”的抗生素, 为寻找开发新的抗生素开辟了广阔途径。

利用基因工程可将抗原的 DNA 导入活的微生物中, 这种微生物在受免疫刺激后的宿主体内生长可产生弱毒活疫苗, 具有抗原刺激剂量大、持续时间长等优点。目前正在研制的基因工程疫苗就有数十种之多, 其中有针对各种细菌的疫苗 (如麻风杆菌、百日咳杆菌、淋球菌、脑膜炎双球菌等), 也有针对各种病毒的疫苗 (如甲型肝炎病毒、乙型肝炎病毒、巨细胞病毒、单纯疱疹病毒、流感病毒、人体免疫缺陷病毒等)。我国乙肝病毒携带者和乙肝患者人数多达 2 亿, 面对严峻的现实, 我国科学家成功研制出乙肝疫苗, 取得了巨大的社会效益和经济效益。抗体是人体免疫系统防病抗病的主要武器, 20 世纪 70 年代建立的单克隆抗体技术在防病抗病方面虽然发挥了重要作用, 但由于人源性单抗很难获得, 单抗在临床上的应用受到限制。近年来科学家采用 DNA 重组技术获得了人源性抗体, 这种抗体既可保证它与抗原结合的专一性和亲和力, 又能保证正常功能的发挥。目前, 已有多种这样的抗体进行了临床试验, 为一些用常规方法难以治疗的疾病患者带来了福音。例如, 乳腺癌是威胁妇女健康的主要恶性肿瘤, 研究表明, 人表皮生长因子受体-2 (human epidermal growth factor receptor-2, HER-2) 的过度表达与乳腺癌呈正相关, 目前利用基因工程技术研制的抗 HER-2 人源化单抗治疗乳腺癌已进入 III 期试验。支气管哮喘是儿童最常见的慢性呼吸道疾病之一, 引起哮喘发病的关键环节之一是血清特异性 IgE 水平增高。因此, 如何降低哮喘患者体内的特异性 IgE 水平成为哮喘防治的重点, 目前抗 IgE 人源化单抗治疗哮喘病已进入 II 期试验。

### 三、基因诊疗技术在未来医学的前景

基因诊断技术是建立在核酸分子杂交、聚合酶链反应、DNA 序列分析、基因芯片等技术之上的第四代诊断技术。目前, 基因诊断技术已经进入临床服务, 其应用的范围也在不断扩大。从临床诊断到血清诊断, 从生化诊断到基因诊断, 每一代新的诊断技术的出现, 都使诊断水平大幅提高。基因诊断在三十余年的时间里已经取得长足进步, 其实用性不断提高。基因诊断技术不仅能够诊断疾病, 而且能够预测疾病、指导用药、评价疗效。从理论上讲, 几乎所有的疾病都与基因有直接或间接的关系, 因此都能从基因水平进行诊断和预测。

基因治疗技术开辟了治疗疾病的新途径, 代表了疾病治疗的发展方向。传统医学并不能解决基因的问题, 因此目前对很多严重危害人类健康的疾病 (如肿瘤、糖尿病、动脉粥样硬化、冠心病、高血压、精神分裂症等) 仍然缺乏有效的办法。要治疗这些疑难疾病, 只能从基因水平入手, 根据基因与疾病的关系设计治疗方案。基因治疗是通过 DNA 重组技术创建具有特定功能的基因重组体, 导入人体靶细胞以矫正或置换致病基因的治疗方法, 是以改变遗传物质为基础的生物医学治疗。在此过程中, 目的基因被导入靶细胞内, 并与宿主细胞染色体整合成为细胞基因组的一部分, 或不与宿主细胞的染色体整合而独立于染色体之外, 但可在宿主细胞内表达, 从而达到治疗目的。目前已有 100 多个基因治疗方案处于临床试验阶段, 随着基因治疗技术的发展, 基因治疗的目标和范围也在拓宽, 从最初的用正常基因替代突变基因, 扩展到利用基因转移技术, 将各

种各样的目的基因（包括正常的、改组的，甚至病毒基因）转入人体，以达到治疗疾病的目的。从广义上说，凡是采用分子实验技术在核酸水平上对疾病进行治疗都属于基因治疗。

#### 四、动物模型在医学研究中的重要地位

人类各种疾病的发生发展过程十分复杂，一般也不允许在人体上试验，建立动物模型（animal model）是现代医学研究人类疾病的有效手段。转基因（transgene）和基因打靶（gene targeting）技术为建立人类疾病动物模型提供了新方法，对现代医学的发展极为重要。

自古以来，人类就有意识地对某些动物进行研究，并将研究结果用于解释人类疾病，但对动物模型进行系统、深入地研究却是近百年之事。用于研究的动物种类繁多，常用的主要有低等动物，如线虫（nematodes）和果蝇（drosophila）；低等脊椎动物，如斑马鱼（zebrafish）和非洲爪蟾（laevis）；高等哺乳类，如鼠、狗、马、牛及某些灵长类动物。其中，小鼠（mice）是最常用的动物。小鼠具有与人类相似的遗传、解剖和生理特征，其基因组与人类基因组有99%的相似性。小鼠个体小、繁殖能力强、生命周期短、养殖成本低，这些特点是大型哺乳动物所不具备的。对小鼠的系统研究始于20世纪初，目前已建立了数十种纯系和杂交品系，培育出数千种经遗传修饰后的小鼠，这对研究基因在各种不同遗传背景中的功能提供了有利条件。因此，动物模型的建立和研究成为后基因组时代的又一重点。

转基因鼠基因组中携带有外源基因，这些基因往往由特定的启动子（promoter）和增强子（enhancer）控制，表达量比内源基因高，易于研究这些基因在整体动物中的功能。1984年，哈佛大学莱德（P. Leder）教授将癌基因 *myc* 转入小鼠，使其在乳腺特异表达，结果小鼠在特定时期内产生乳腺癌，由该技术产生的小鼠模型至今仍被广泛使用。1986年，英国埃文斯（M. Evans）建立了鼠胚胎干细胞；1987年，美国卡佩奇（M. Capecchi）和史密西（O. Smithies）对鼠胚胎干细胞进行基因打靶首获成功，他们3人获得了2007年的诺贝尔生理学或医学奖。基因打靶包括基因敲除（knock-out）和敲入（knock-in）。基因敲除一般指使基因失去功能，而基因敲入主要指引入特异型的突变。例如，通过外源DNA与染色体DNA之间的同源重组引入突变。自1989年第一只携带次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖转移酶（hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase, HGPRT）突变基因的小鼠问世以来，目前至少建立了4000余种小鼠突变品系。从理论上讲，基因打靶技术可将所有基因逐一敲除，并建立所有由单一基因突变导致的人类遗传病的全部动物模型。

目前，转基因动物模型主要用于研究疾病的发病机制，检测新的治疗方案，进行药效评价和药物筛选。

综上所述，分子实验技术在医学领域中有着广泛应用的空间。培根有一句名言：“没有实验，任何新的东西都不能深知。”无论是探索生命，还是呵护生命；无论是从事生命科学的基础研究，还是从事临床服务，分子实验技术都是必备的。尤其是21世纪的医学生，仅学习传统医学是不够的，必须认真学习掌握分子实验技术，才能在未来的医学领域中有立足之地，分子实验技术是打开未来医学之门的钥匙。

（王玉明）