

<http://www.gzsums.edu.cn/网络资源/教学资源/分子医学实验室/>

<http://202.116.111.249/>

分子医学概论

周俊宜

zhoujy@mail.sysu.edu.cn

分子医学进展

教学内容

分子医学概论;端粒与端粒酶

细胞周期中的信号转导调控

血管增生的平衡调节

细胞凋亡;肿瘤转移的分子机制

上皮细胞恶性转化的分子机制

细胞信号转导:基因调控和肿瘤

干细胞与再生医学

蛋白质组学

教师

周俊宜

刘 强

高国全

李 隽

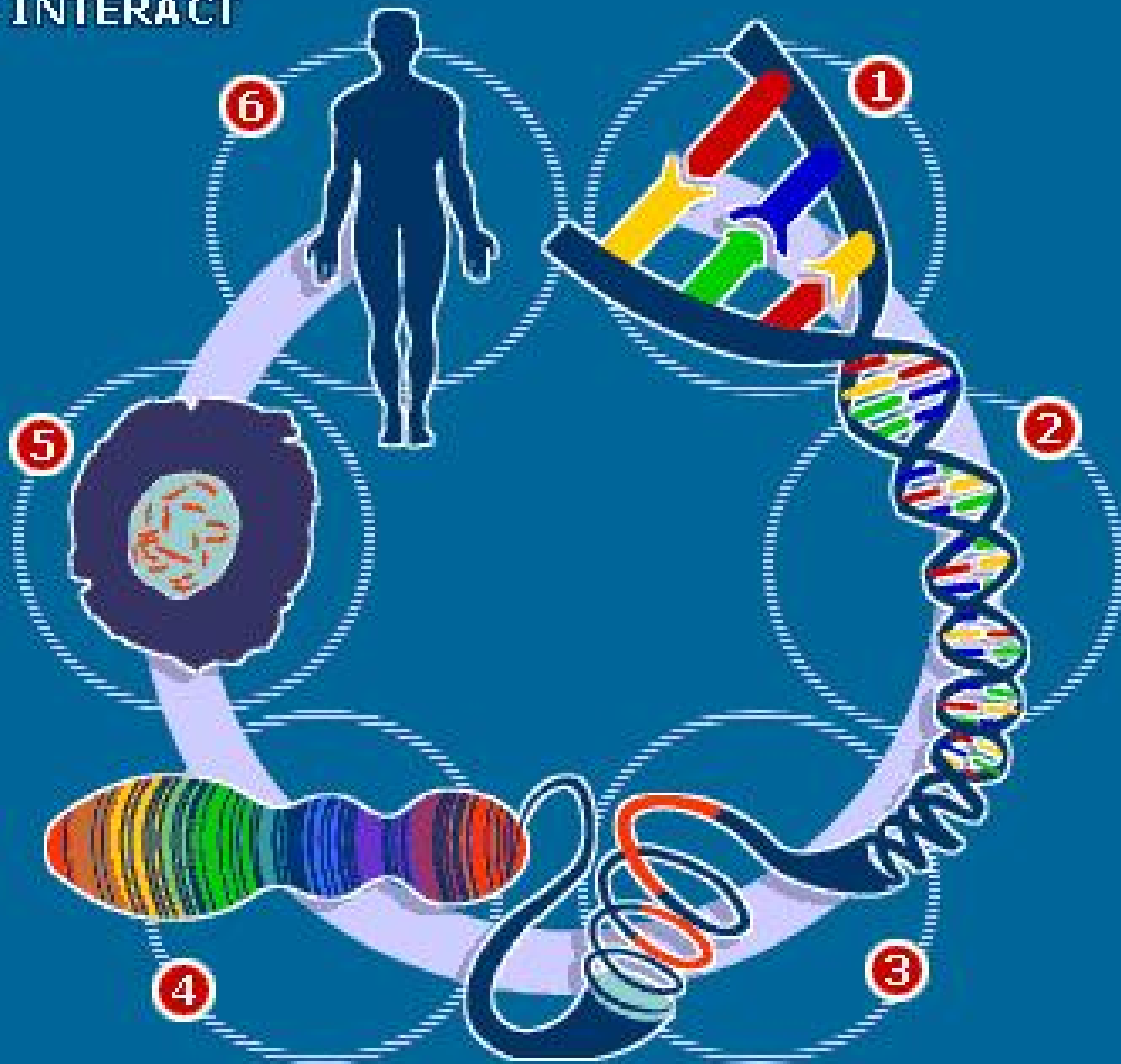
曾木圣

黎孟枫

项 鹏

黎明涛

INTERACT



1994年2月，美国国立卫生研究院（NIH）



卡普（Karp），布罗德（Broder）



《癌研究》



“分子医学的新方向”

1995年，美国



《分子医学》杂志正式创刊



标志着现代生物医学进入分子医学新阶段

分子医学

从基因的角度重新认识疾病，运用基因技术预防、诊断和治疗疾病。

目前基因技术大多数尚待完善，前景却未可限量。

分子医学与传统医学的主要不同在于前者对疾病的认识和操作都是在分子和基因水平上进行的，关联到伦理、道德、法律、社会等问题。

分子医学研究



The diagram features a central title '分子医学研究' (Molecular Medicine Research) in a red box at the top. Two dashed arrows point downwards from the bottom corners of this box. The left arrow points towards the '研究内容' (Research Content) section, and the right arrow points towards the '研究技术' (Research Technology) section.

研究内容:

疾病的分子机理

疾病的基因诊断

疾病的基因治疗

疾病的基因预防

研究技术:

基础生化技术

核酸技术

蛋白质技术

细胞技术

动物实验技术

前沿技术

分子文库技术

分子突变谱技术

表达谱技术

生物信息技术

干细胞技术

.....

分子医学研究内容

1 疾病的分子机理

探索疾病的原因，是有效治疗疾病的前提。

目前，医学对某些还缺少有效的治疗方法，就是因为对病因缺乏深入的认识。

基因科学的发展，为人类从细胞内部的微观生理学和分子生物学水平上寻找病因提供了新的思路。

尿黑酸症

尿液 $\xrightarrow{\text{接触空气}}$ 黑色



tyrosine $\longrightarrow$ 尿黑酸 $\xrightarrow{\text{尿黑酸氧化酶}}$ 氧化分解



常染色体隐性遗传病 $\longrightarrow$ 先天性缺乏尿黑酸氧化酶基因表达

1949年波林发现镰刀型细胞贫血症（病人的红细胞为镰刀形）与血红蛋白结构异常相关。

正常成人Hb (HbA) β 亚基

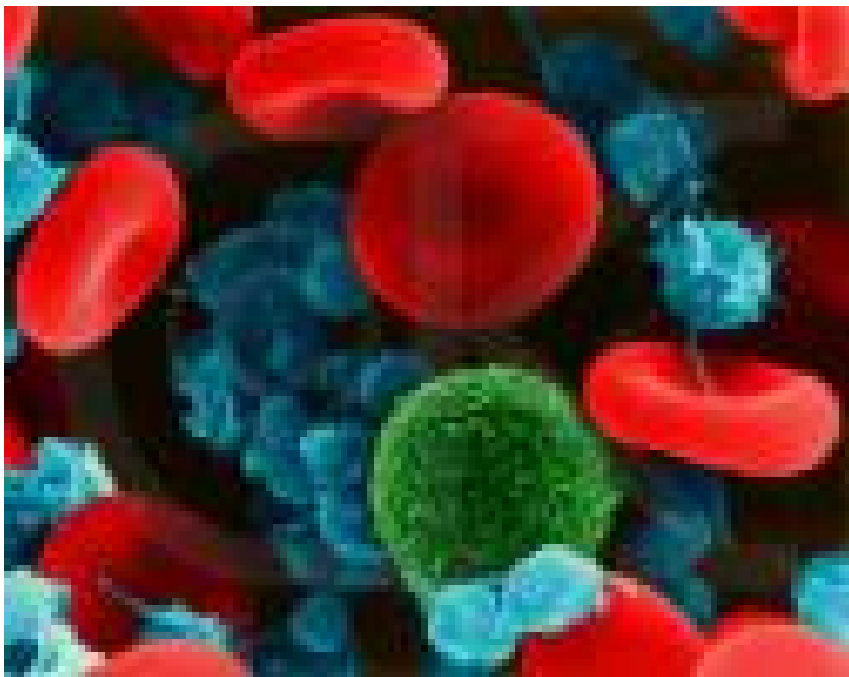
肽链 N-val · his · leu · thr · pro · glu · glu · · · · · C

基因 _____ CTC _____
 _____ GAG _____

镰形红细胞贫血病人Hb (HbS) β 亚基

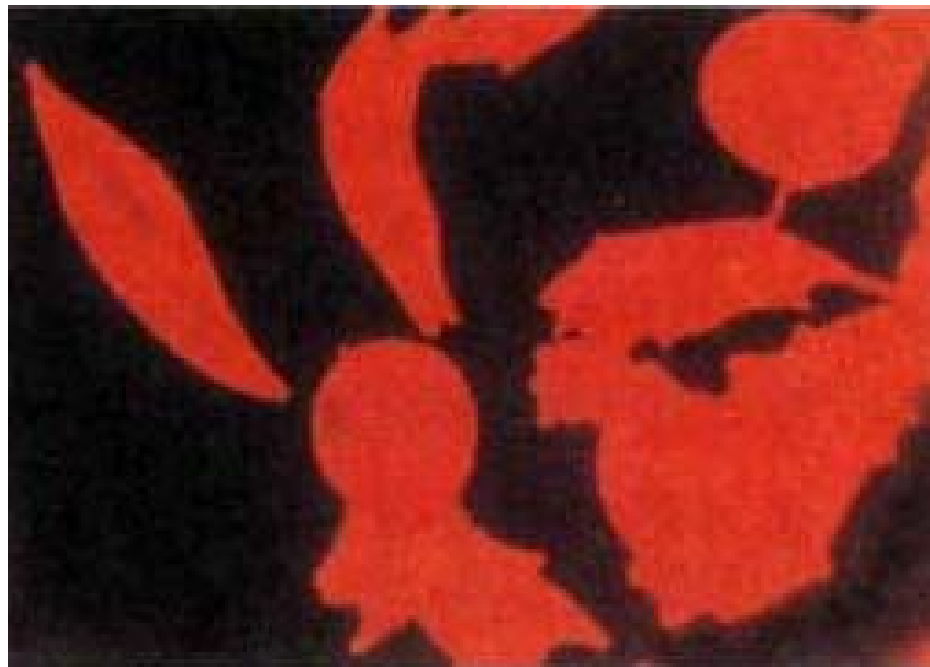
肽链 N-val · his · leu · thr · pro · val · glu · · · · · C

基因 _____ CAC _____
 _____ GTG _____



正常血细胞

镰形红细胞

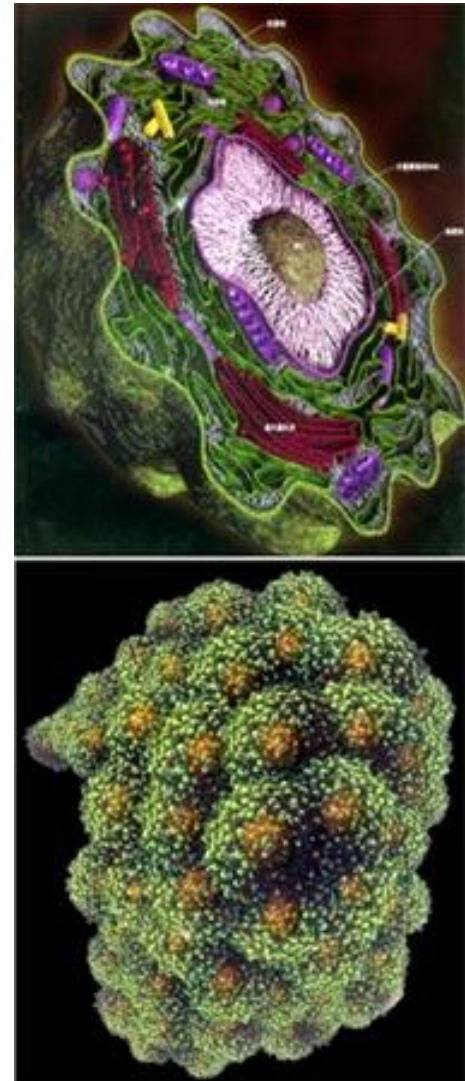




英国女王维多利亚。她带有**血友病基因**，并将其传给了她的儿女。血友病是一种遗传性凝血障碍疾病，患者可能因很小的伤口而出血不止导致死亡。血友病在女性一般表现为隐性遗传，较少发病，但会传给后代；在男性则表现为显性遗传，显示出病症。维多利亚女王在科堡主持的一次欧洲王室成员集会，与会者有17人是她的后裔，其中有她的孙女亚历山德拉（21），她同俄国沙皇尼古拉二世结婚，导致他们的儿子患有血友病。



美国毕晓普和瓦慕斯等人的研究表明：动物体内的癌基因不是来自病毒，而是由于在动物的正常细胞基因中本来就存在一个庞大的癌基因族，正常情况下这些**原癌基因**是不活跃的，但当受到病毒入侵或遇到物理、化学等因素作用时，就可能被激活，突变为癌基因。这也就解释了化学污染、吸烟、放射线辐射等因素致癌的原因。



2 疾病的基因诊断

从广义上讲，大多数疾病都可以从**遗传物质的变化**中寻找出原因。而从技术上看，只要找到了与疾病相关的基因，基因诊断便立即可以实现。随着“人类基因组计划”的进程，将大大加快**疾病相关基因**的发现与克隆，基因诊断将成为疾病诊断的常规方法。

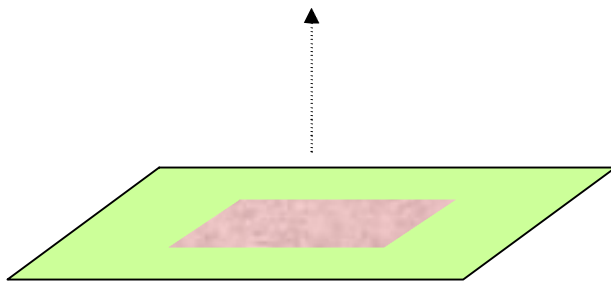
单基因疾病的诊断：一般可在临床症状出现之前作出诊断，不依赖临床表型。

有遗传倾向的疾病：易感基因的筛查，如高血压，冠心病，肥胖等。

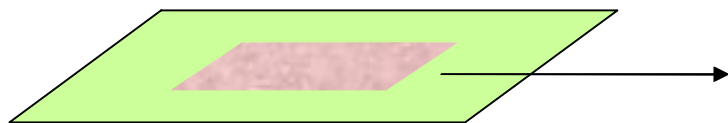
外源性病原体：如病毒、细菌、寄生虫等引起的传染病。

美国前副总统汉弗莱(Humphrey)

在1967年发现膀胱内有一肿物，病理切片未发现癌细胞
良性“慢性增生性囊肿”，未进行手术治疗。



九年后，他被诊断为患有“膀胱癌”，两年后死于该病。



P53抑癌基因

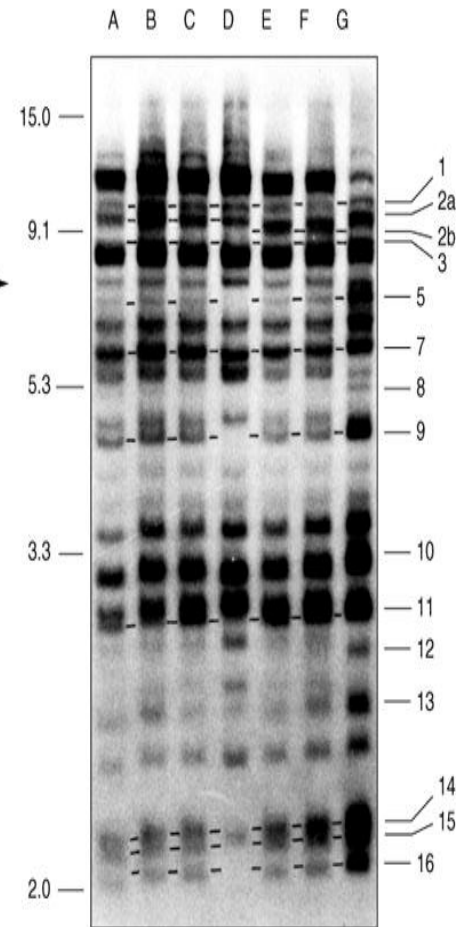
1994年，研究者用灵敏的PCR技术对上述汉弗莱1967年的病理切片进行了P53抑癌基因检查，发现那时的组织细胞虽然在形态上还没有表现出恶性变化，但其**P53基因的第227个密码子**已经发生了一个核苷酸的突变。就是这个基因的微小变化，使其抑癌功能受损，导致九年后细胞癌变的发生。这说明，在典型症状出现之前的很长时间，细胞癌变的信息已经在基因上表现出来了

DNA指纹

Copyright © The McGraw-Hill Companies, Inc. Permission required for reproduction or display.
 Autoradiograph



Blot is removed,
 washed, and exposed
 to X-ray film.



In each genomic DNA sample, the *H2K* probe hybridizes to all 20–30 related major histocompatibility genes present within the mouse genome.

3 疾病的基因治疗

基因疗法，即是通过基因水平的操作来治疗疾病的方法。

体细胞基因治疗

1. 直接法 即将外源性功能基因以逆转录病毒、质粒载体或脂质体类包囊，或以裸露DNA的形式直接注入体内，让基因在体内表达。
2. 间接法 即将受体细胞（例如淋巴细胞、骨髓干细胞、皮肤或纤维细胞等）在体外培养导入外源性功能基因，然后把这种经遗传修饰的受体细胞输回或移植入患者体内，让外源基因表

生殖细胞基因治疗

以校正生殖细胞的缺陷为目标，所产生的性状可代代相传。

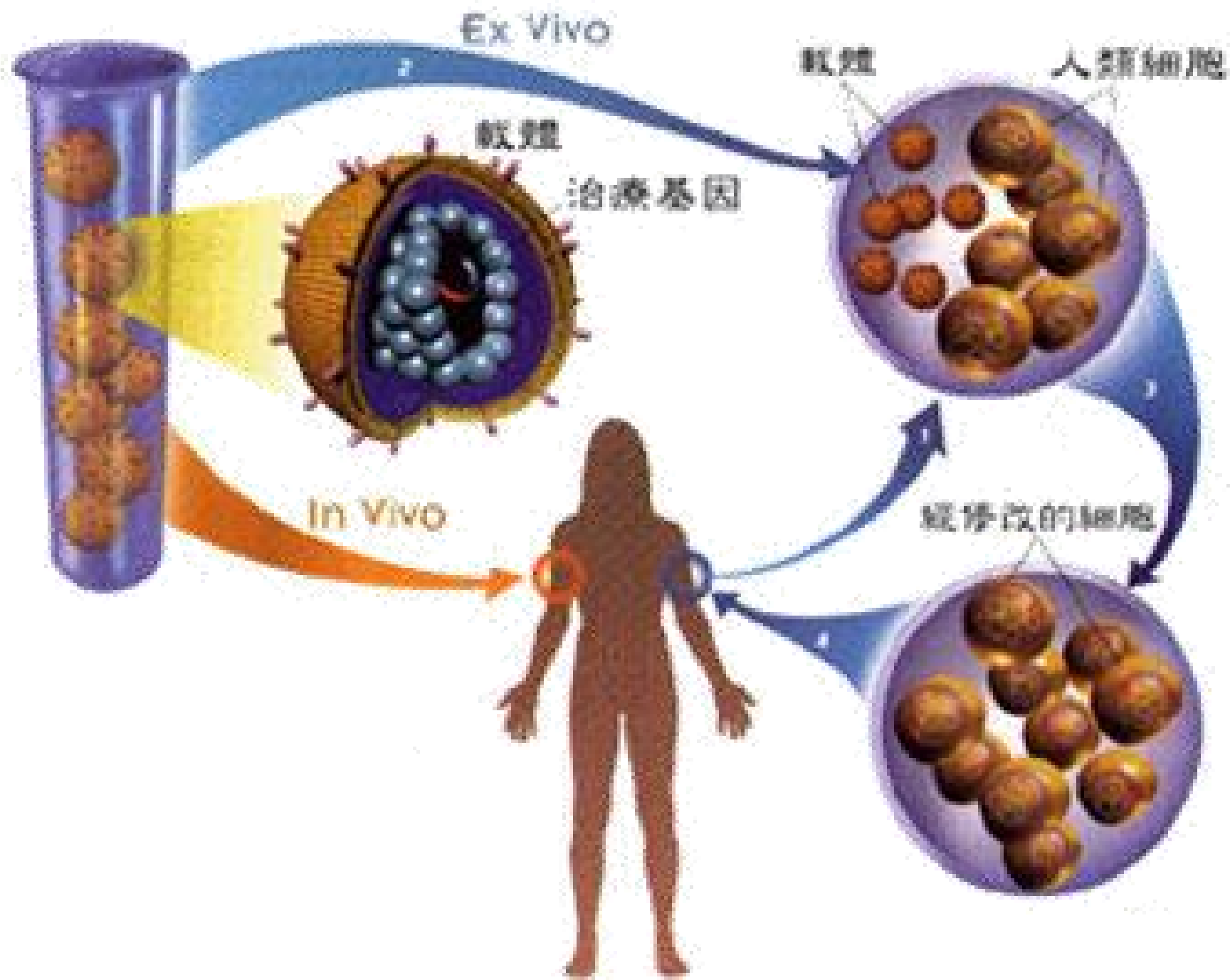


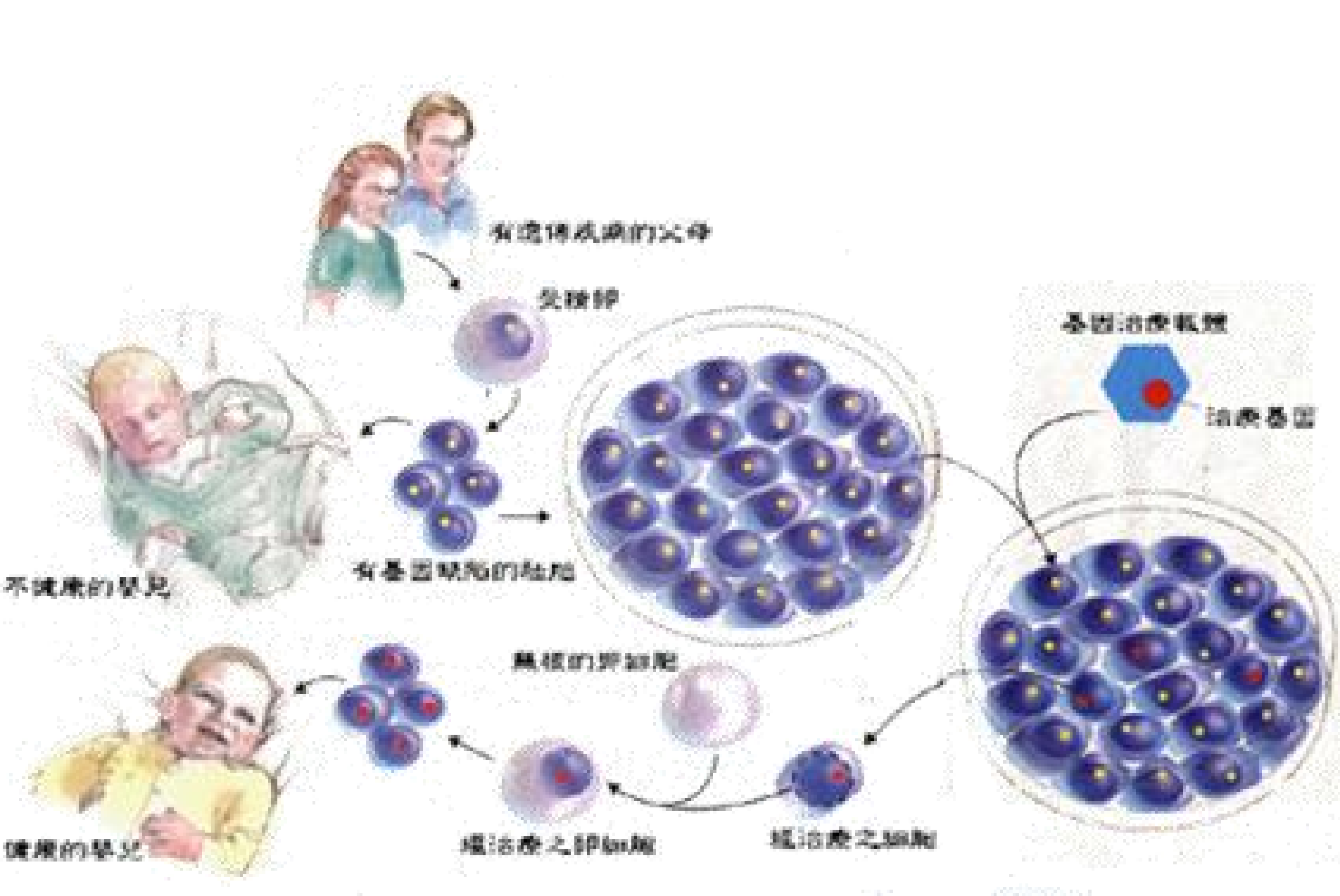
美国医学家W·F·安德森等人对腺甘脱氨酶缺乏症（**ADA缺乏症**）的基因治疗，是世界上第一个基因治疗成功的范例。

1990年9月14日，安德森对一例患ADA缺乏症的4岁女孩**谢德尔**进行基因治疗。这个4岁女孩由于遗传基因有缺陷，自身不能生产ADA，先天性免疫功能不全，只能生活在无菌的隔离帐里。他们将含有这个女孩自己的白血球的溶液输入她左臂的一条静脉血管中，这种白血球都已经过改造，有缺陷的基因已经被健康的基因所替代。在以后的10个月内她又接受了7次这样的治疗，同时也接受酶治疗。经治疗后，免疫功能日趋健全，能够走出隔离帐，过上了正常人的生活。



谢德尔，1999





异基因脐血干细胞
移植治疗手术。

78天后,代表肌肉萎缩情况的肌酸磷酸激酶从6800降到一两千;移植前DMD基因第19号外显子缺失,移植后45天、73天两次检测DMD基因均已恢复正常,缺失的19号外显子已经显现出来!



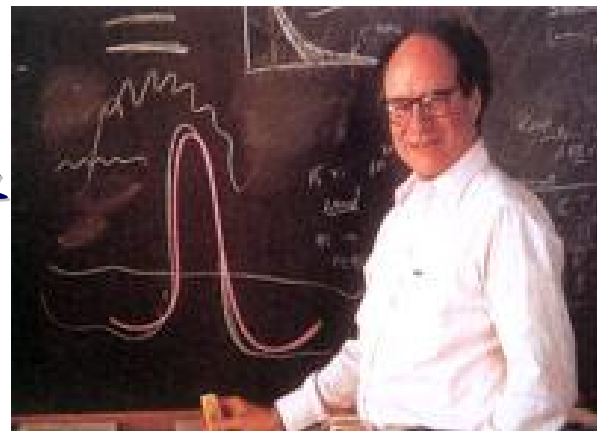
全球首例接受基因治疗的神经肌肉
遗传病患者经过了79天考验。



深圳市赛百诺基因技术有限公司研制开发的抗癌新药——“重组人p53腺病毒注射液”（商品名“今又生”），10月16日获得国家仪器药品监督管理局颁发的新药证书。

糖尿病是患者胰腺不能正常分泌**胰岛素**，引起血糖过高而至，其死亡率仅次于癌症和心脏病。全世界的糖尿病患者已达数千万人。20世纪初，医生们就采用胰岛素治疗糖尿病。但胰岛素以往主要靠从牛、猪等大牲畜的胰脏中提取，一头牛的胰脏或一头猪的胰脏只能产生30毫升的胰岛素，而一个病人每天则需要4毫升的胰岛素，胰岛素产量远远不能满足需要。

1978年，美国化学家**W·吉尔伯特**研究小组，利用重组DNA技术成功地使大肠杆菌生产出胰岛素。



干扰素是两位美国科学家在1957研究病毒的干扰现象时发现的一种抗病毒的特效药。干扰素本是我们身体内部少数几种能抵御病毒的天然防御物质之一，是在病毒入侵细胞以后从仍然健康的细胞中自然产生的。但人体内产生的干扰素数量非常小，所以当时生产的干扰素数量很少而十分昂贵。

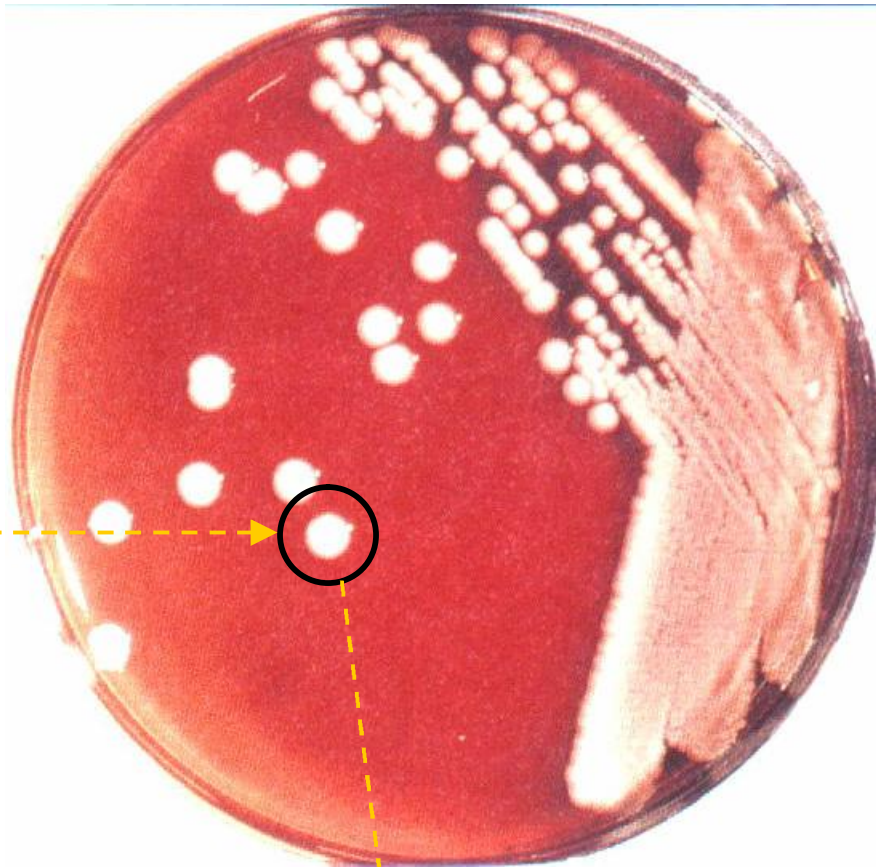
过去，用白细胞生产干扰素，每个细胞最多只能产生100~1000个干扰素分子；而用基因工程技术改造的大肠杆菌发酵生产，在1~2天内，每个菌体能产生20万个干扰素分子。



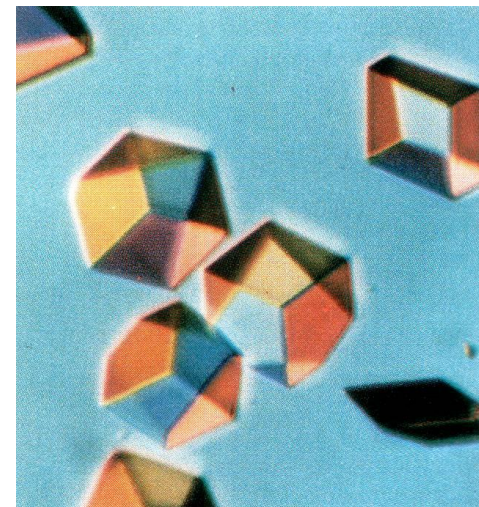
人类胰岛素 Human Insulin



Kleismith & Kish (1995) *Cell and Molecular Biology*, p. 115



Stryer (1995) *Biochemistry*, p. 119



目标基因剪接



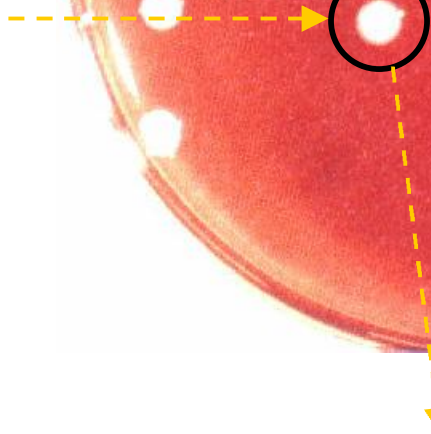
基因接入载体



送入宿主细菌



挑出所要群落



探针 Probe

互补 DNA
专一性抗体

得到纯系转殖菌株



大量培养生产



4 疾病的基因预防

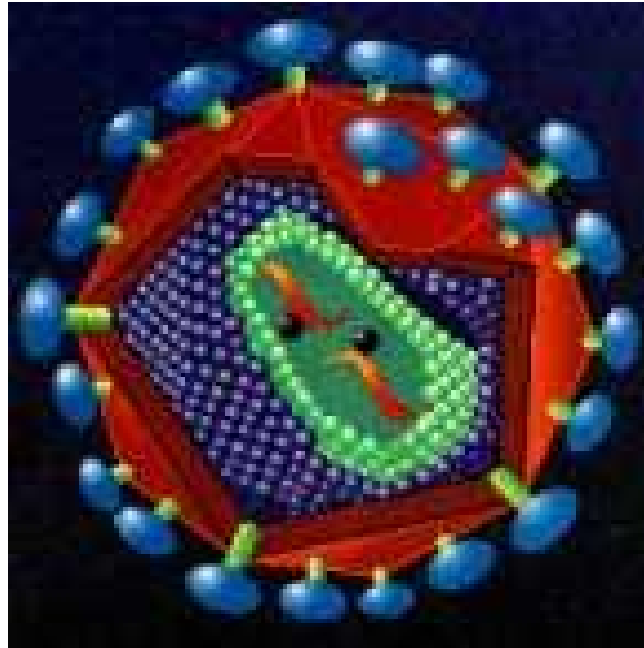
基因疫苗

1990年沃尔夫（Woff）等发现，将带有甲型流感病毒核蛋白编码基因的质粒注射到小鼠肌肉内，可使小鼠能经受致死剂量的甲型流感病毒的攻击。

裸露的DNA通过注射、滴鼻和肠道也进入细胞，并使之获得保护性免疫。这种具有疫苗作用的裸露DNA称之为“基因疫苗”（gene vaccine）。

整株疫苗 → 成分疫苗 → 基因疫苗

基因疫苗：能够编码某种特异性抗原并在人体或动物体细胞内表达这种抗原的DNA或RNA等。因DNA分子较RNA性质稳定、可操作性强，所以，目前研究最多的是DNA疫苗，由于此疫苗不需任何化学载体，故又称为**裸露DNA疫苗 (naked DNA vaccine)**。



爱滋病基因疫苗

解决基因疫苗对人体的安全性和效力问题，

(1) 须用与人类疾病相关的**动物模型**证实其效果；

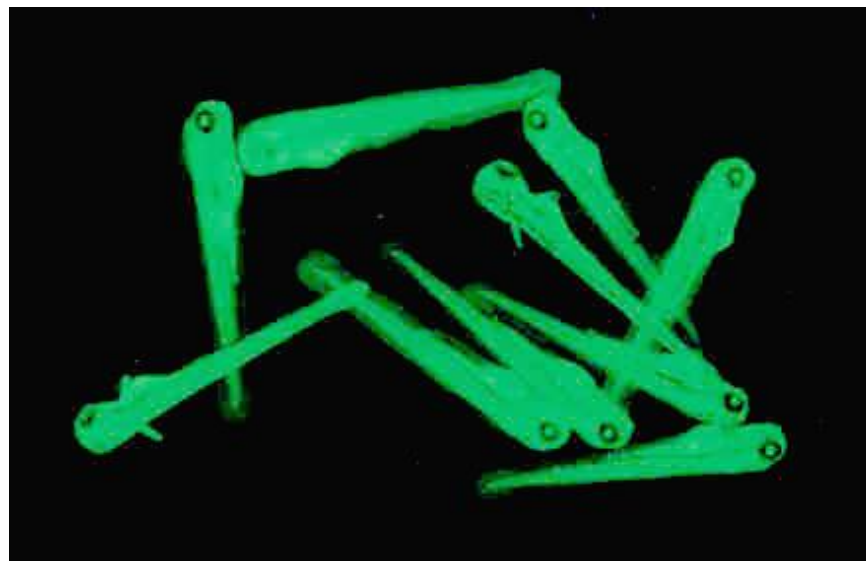
(2) 确证所注射的DNA**不与宿主细胞基因组DNA整合**，这是确保DNA疫苗遗传学安全性的重要指标之一；

(3) 需要近期和长期的**临床试验**以明确其毒副作用和免疫保护效果。

抗老化转殖兰花



荧光基因转殖鱼



抗虫基因转殖烟草



基因转殖羊

分子医学研究 技术

基因

基因表达

基因获取

基因检测

基因重组

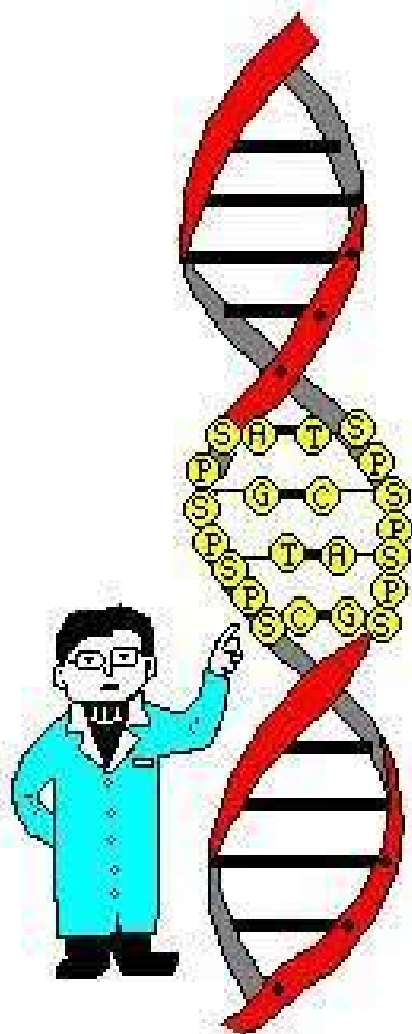
基因标记

基因探测

基因表达

蛋白质

经典技术体系



分子文库技术

突变谱技术

表达谱技术

干细胞技术

生物信息技术

新技术体系

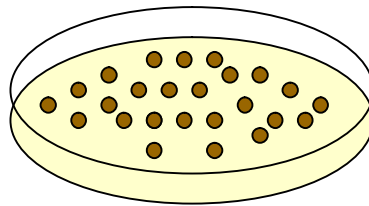
经典技术体系

获取目标基因

PCR法

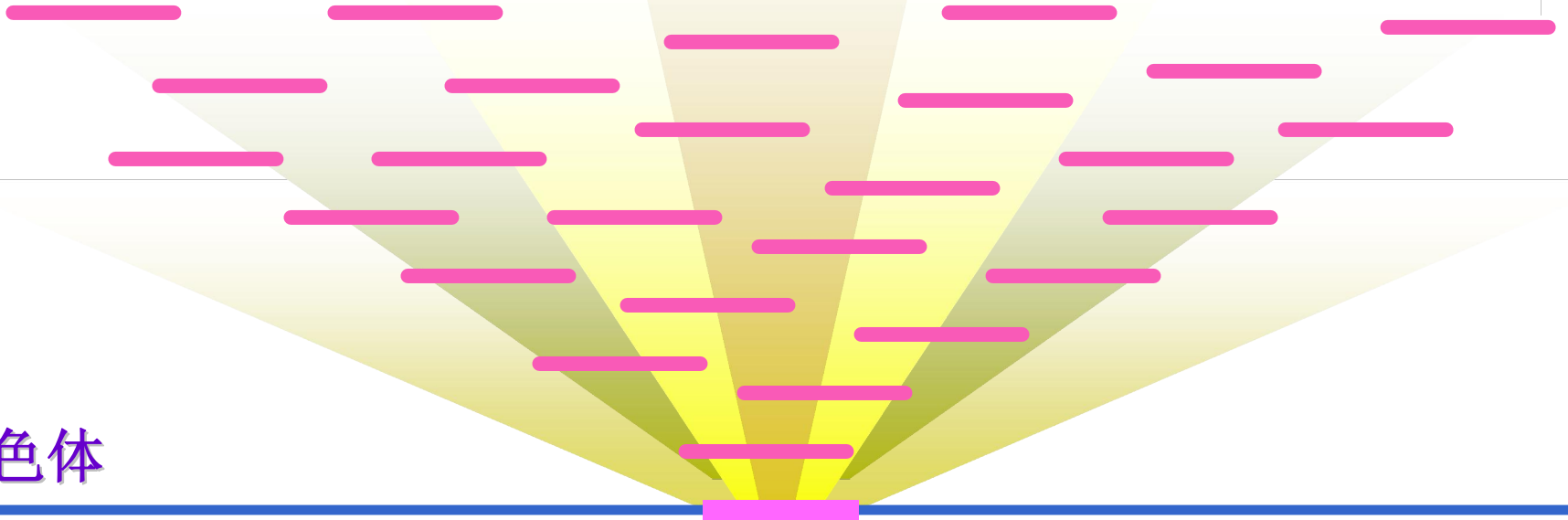
基因文库法

化学合成法



基因文库

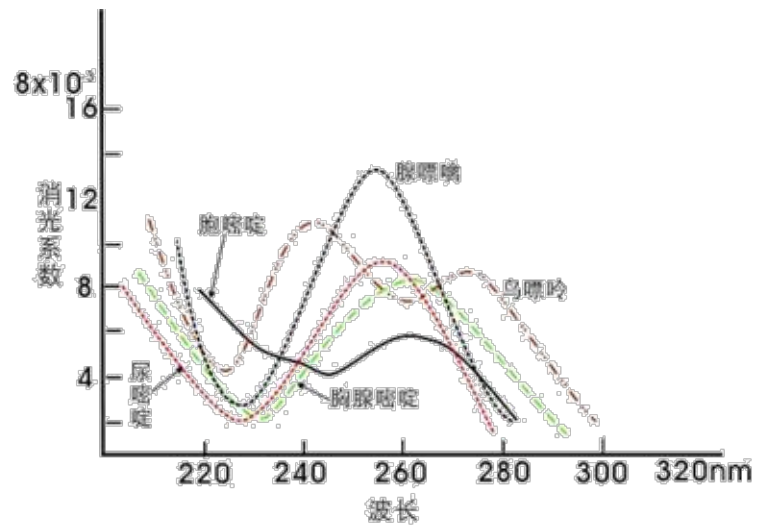
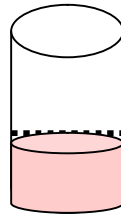




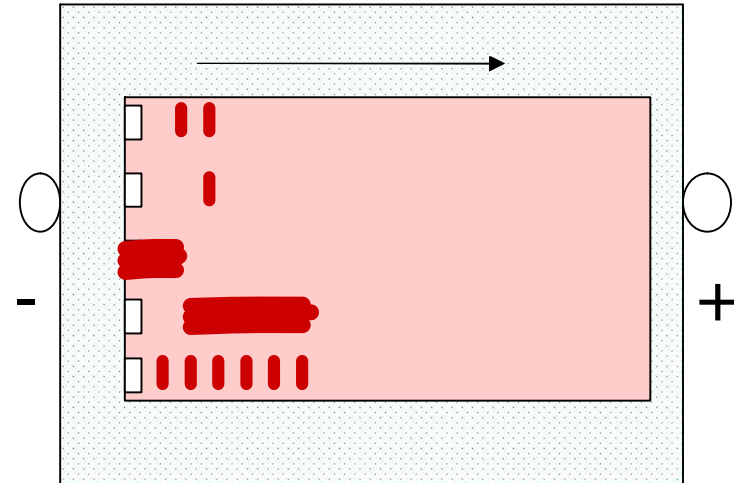
染色体

PCR 可以把 指定的基因片段 数量指数放大

核酸检测和鉴定



各种碱基的紫外吸收光谱 (pH 7.0)



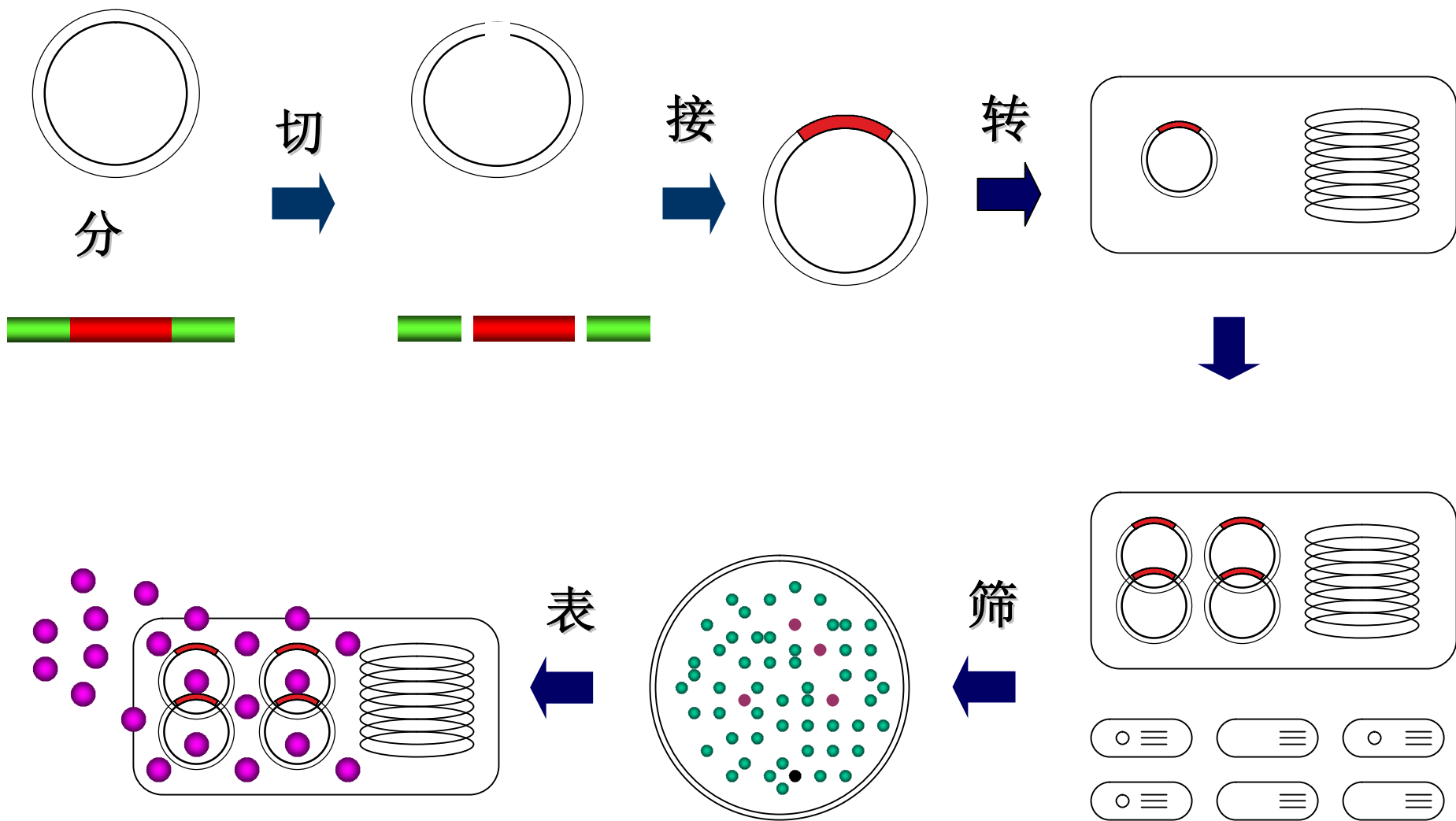


核酸蛋白分析仪



凝胶成像分析系统

基因重组和基因表达



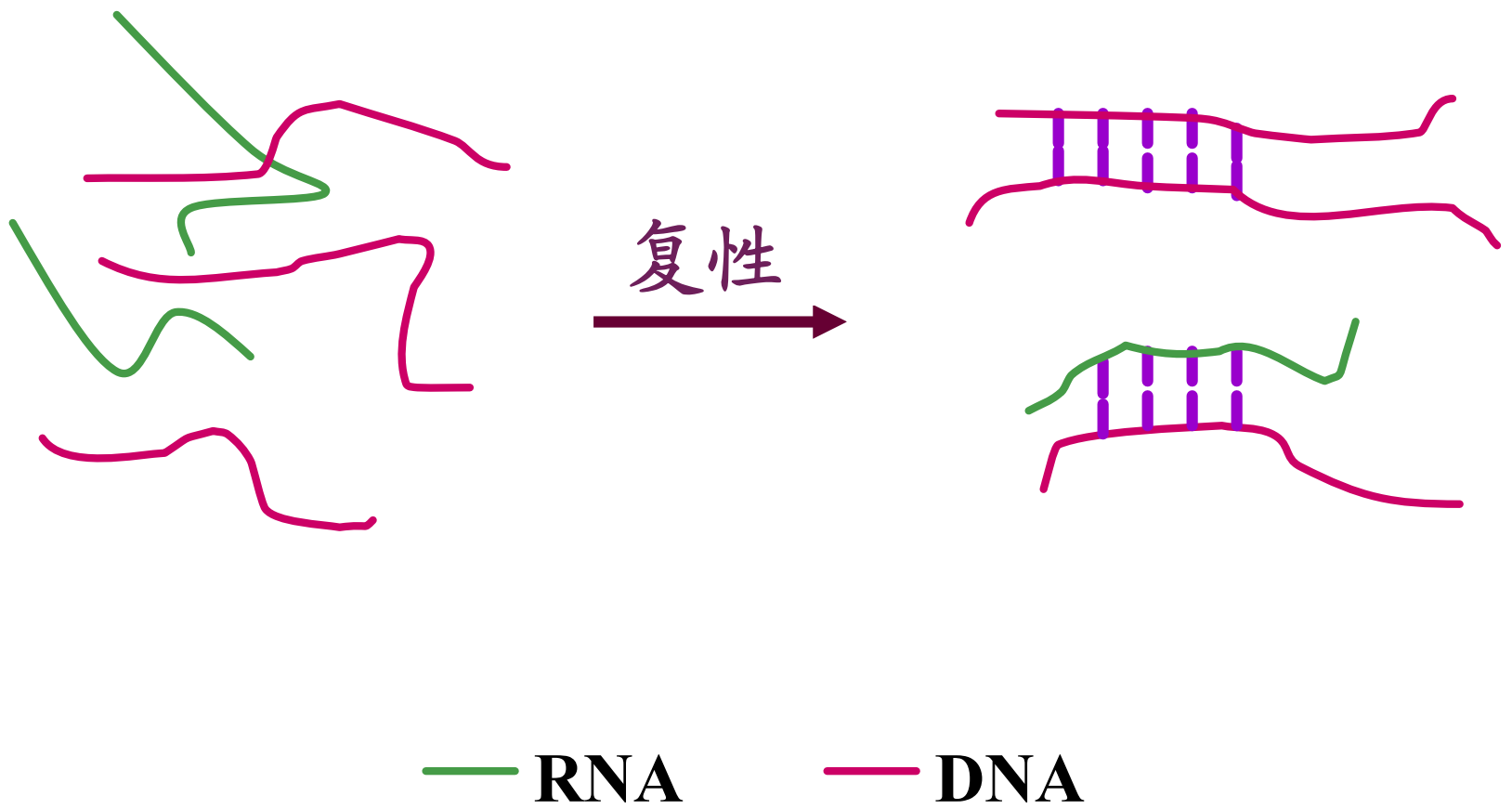




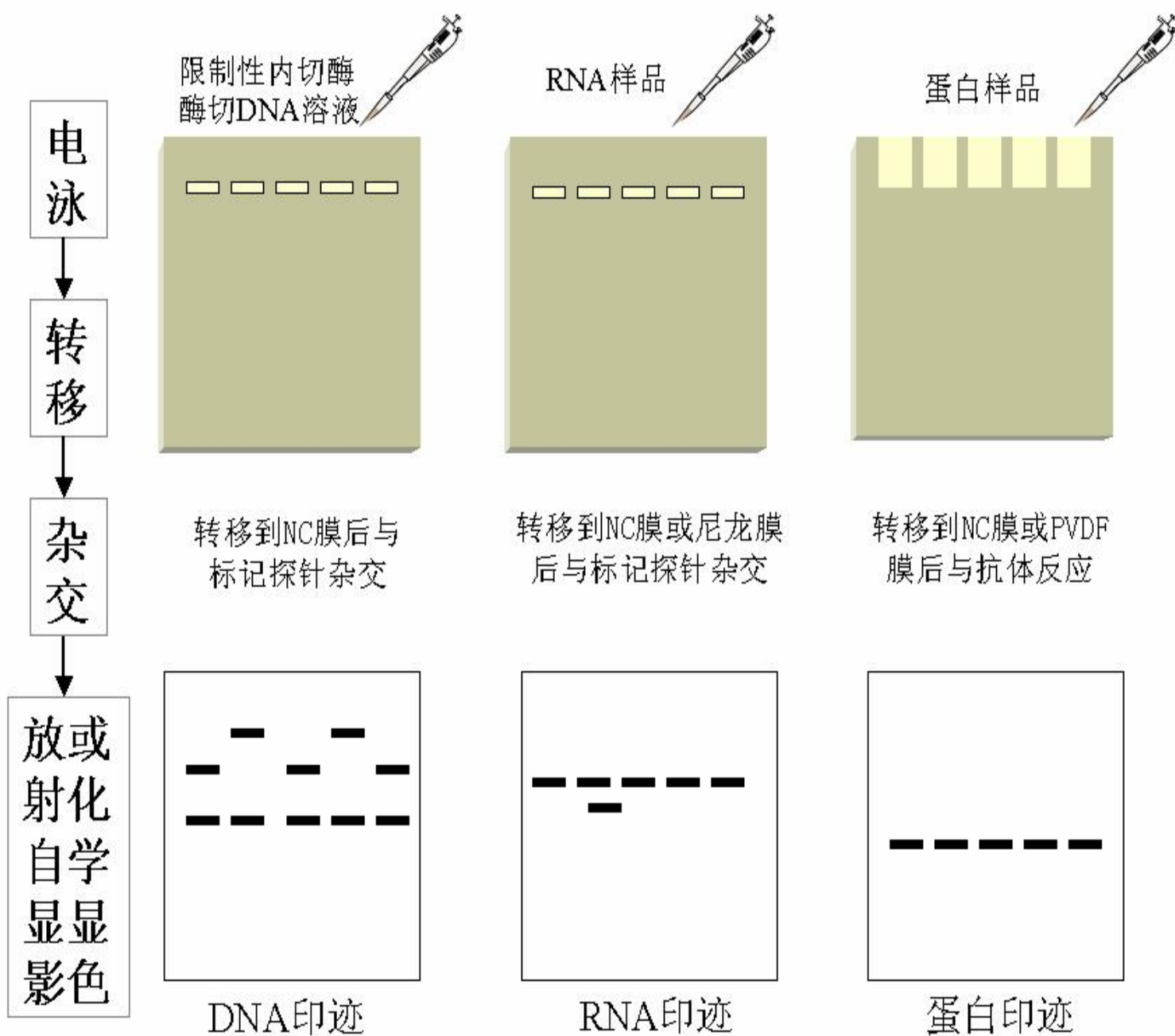


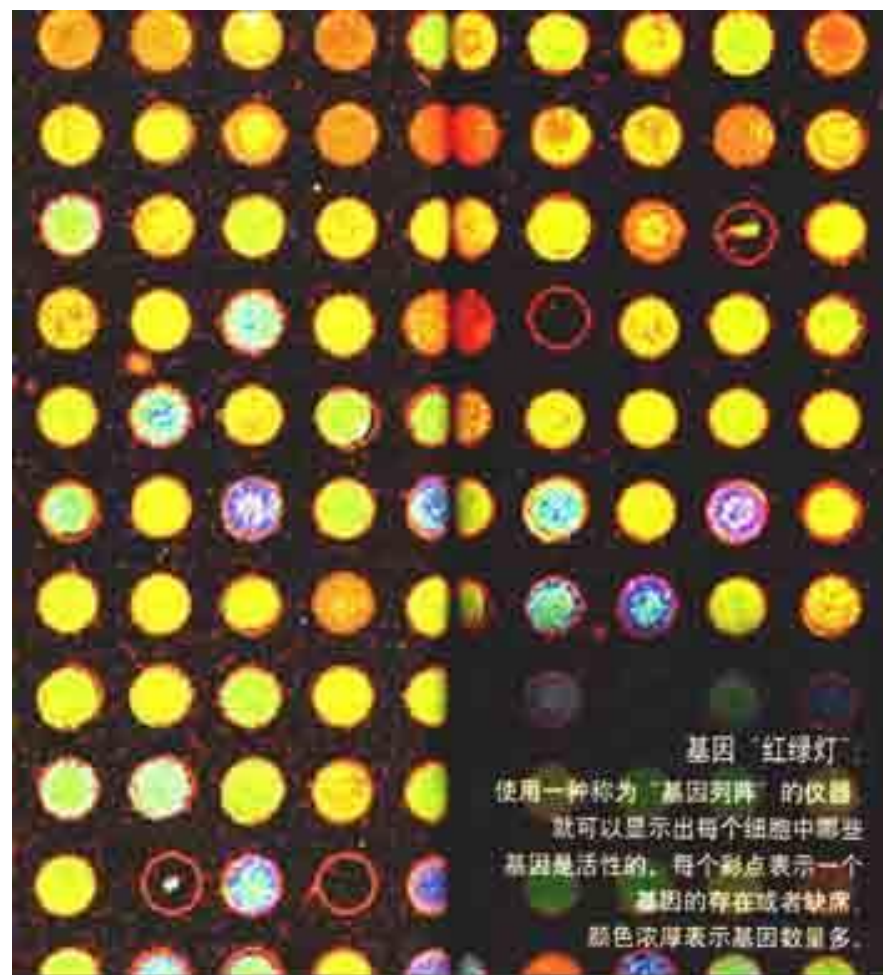
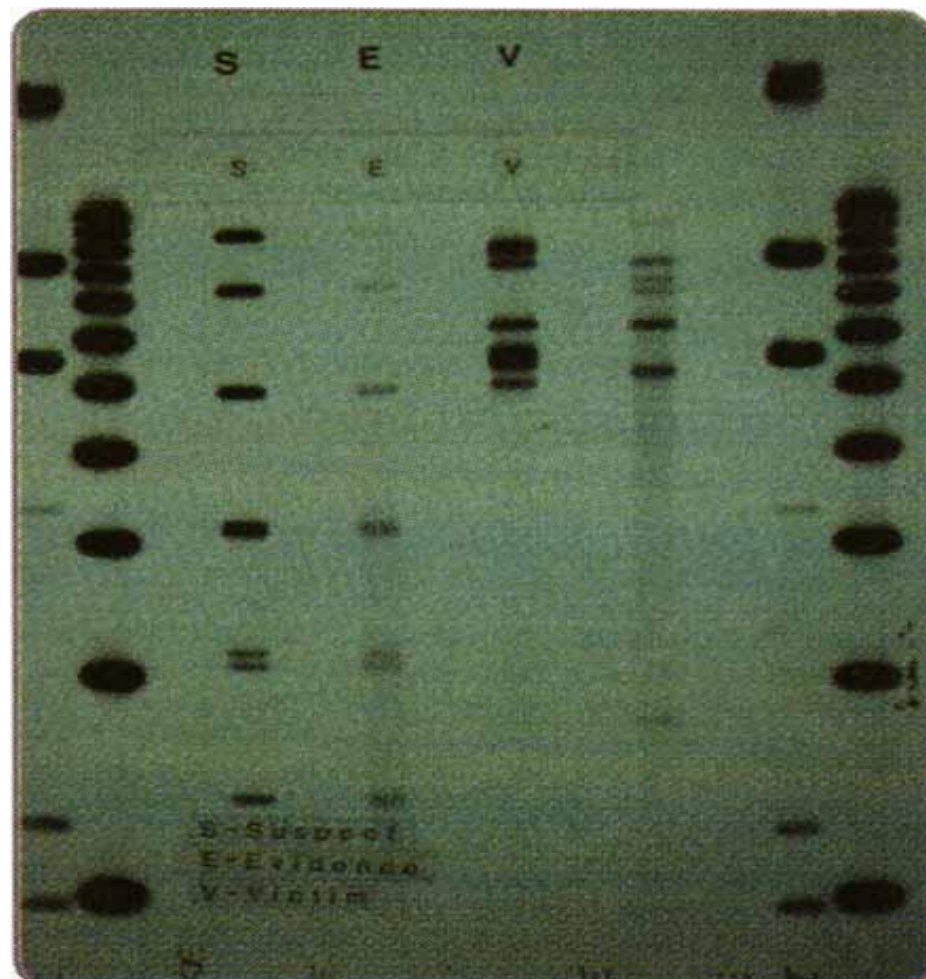


基因探针与标记



三种印迹技术的比较





后基因组时代的

分子研究技术

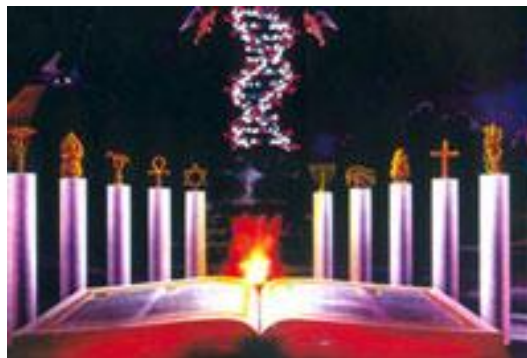
生物信息技术

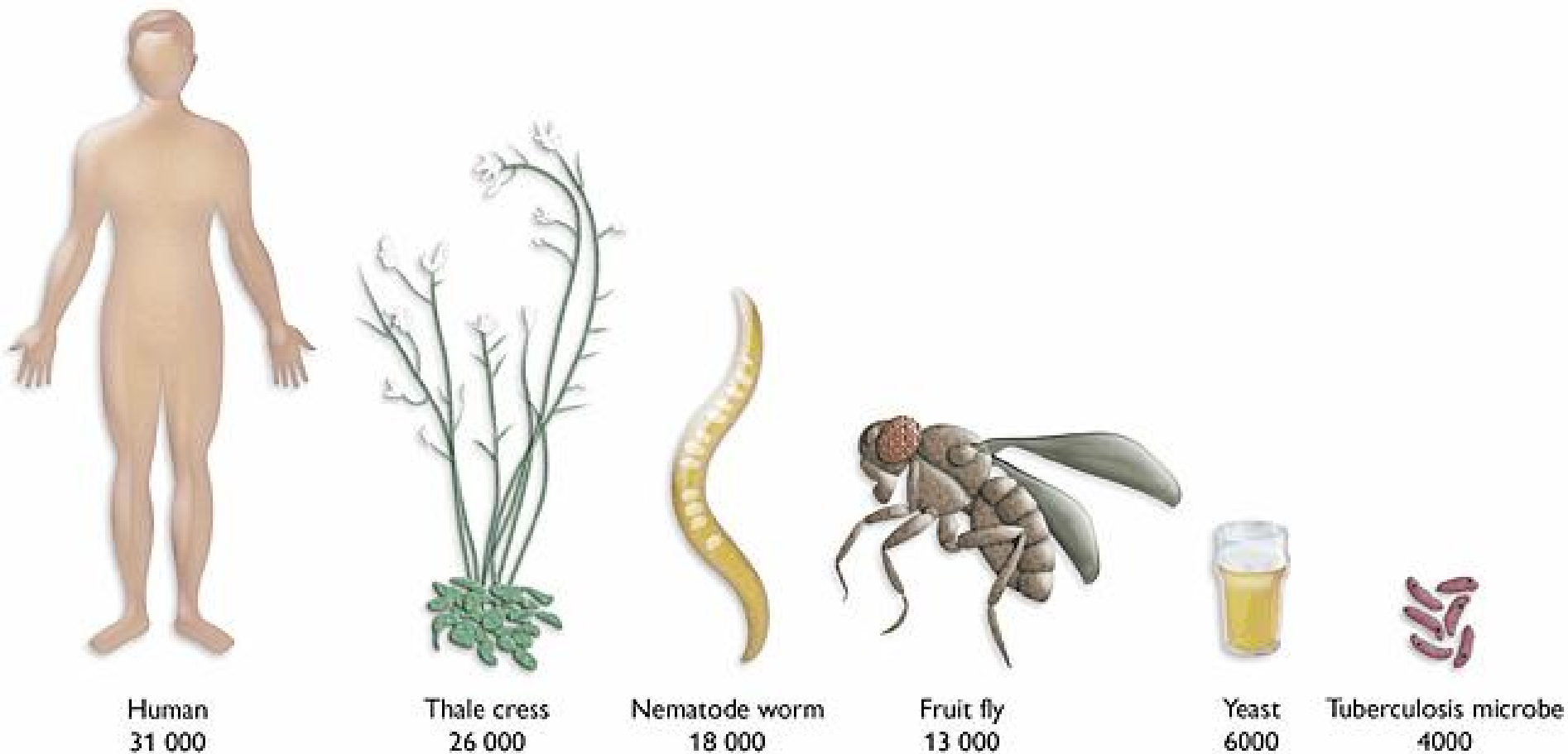
生物信息学 (bioinformation)

是一门伴随着基因组研究而产生的交叉学科。广义地说，它是从事与基因组研究有关的生物信息的获取、加工、储存、分配、分析和解释的一门学科。这个定义包含两层意思，即对海量数据的收集、整理以及对这些数据的应用。

解读生命的“天书”---人类基因组计划

방 基因组，指的是生物体内的所有DNA，包括它的基因。人类基因组计划要测定的是人体23对染色体中的所有DNA的序列，它由31.647亿个碱基对组成，共有3万至3.5万个基因。换句话说，生命天书是由30多亿个字写成的，如果将这30多亿字排版到一张报纸上，那么大约需要20万页纸才能排完这部巨著。由此可以想见，读取这部巨著所要耗费的时间将是如此的惊人。





随着主要模式生物的基因组测序完毕,在测序基因组之后——
功能基因组学: 基因功能分析, 进化分析, 比较基因组分析等.

分子文库



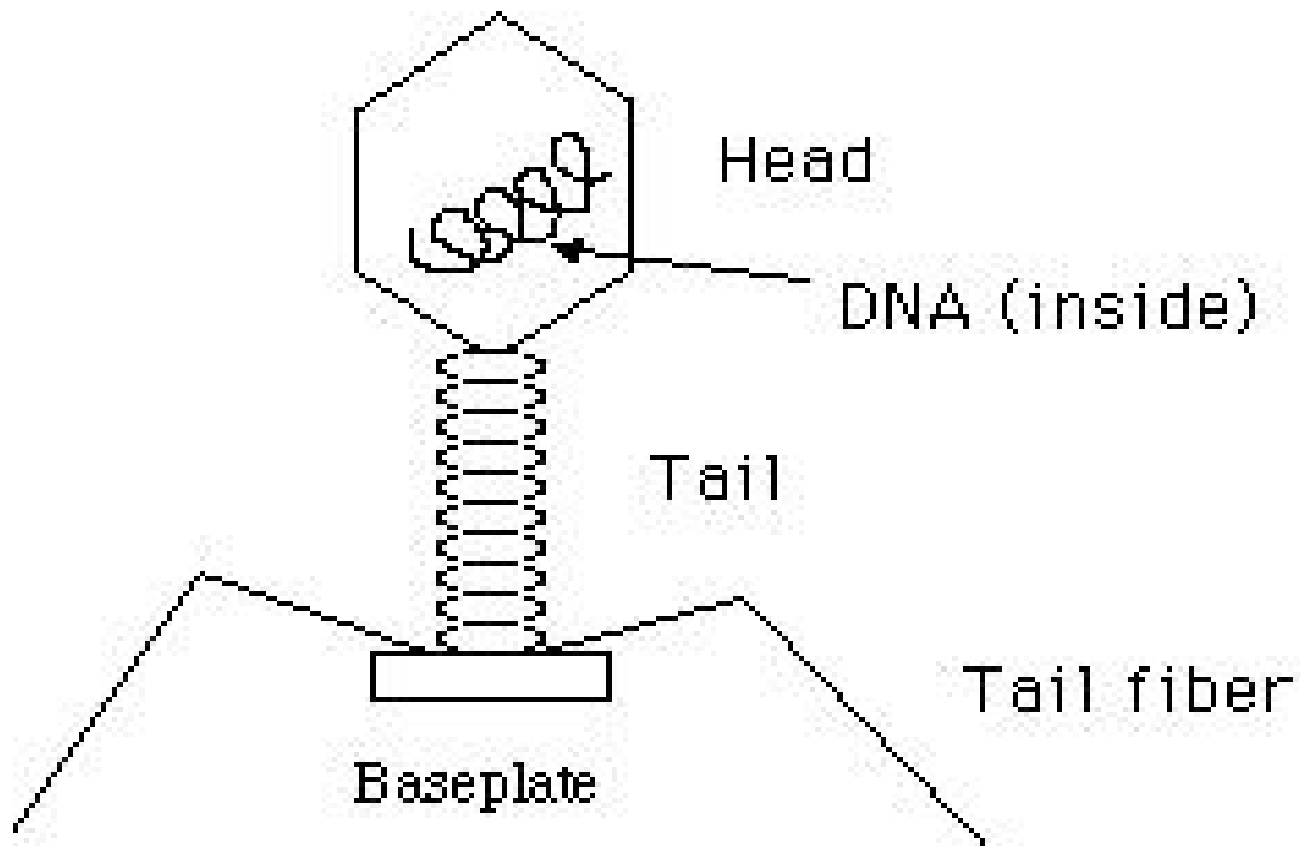
基本策略

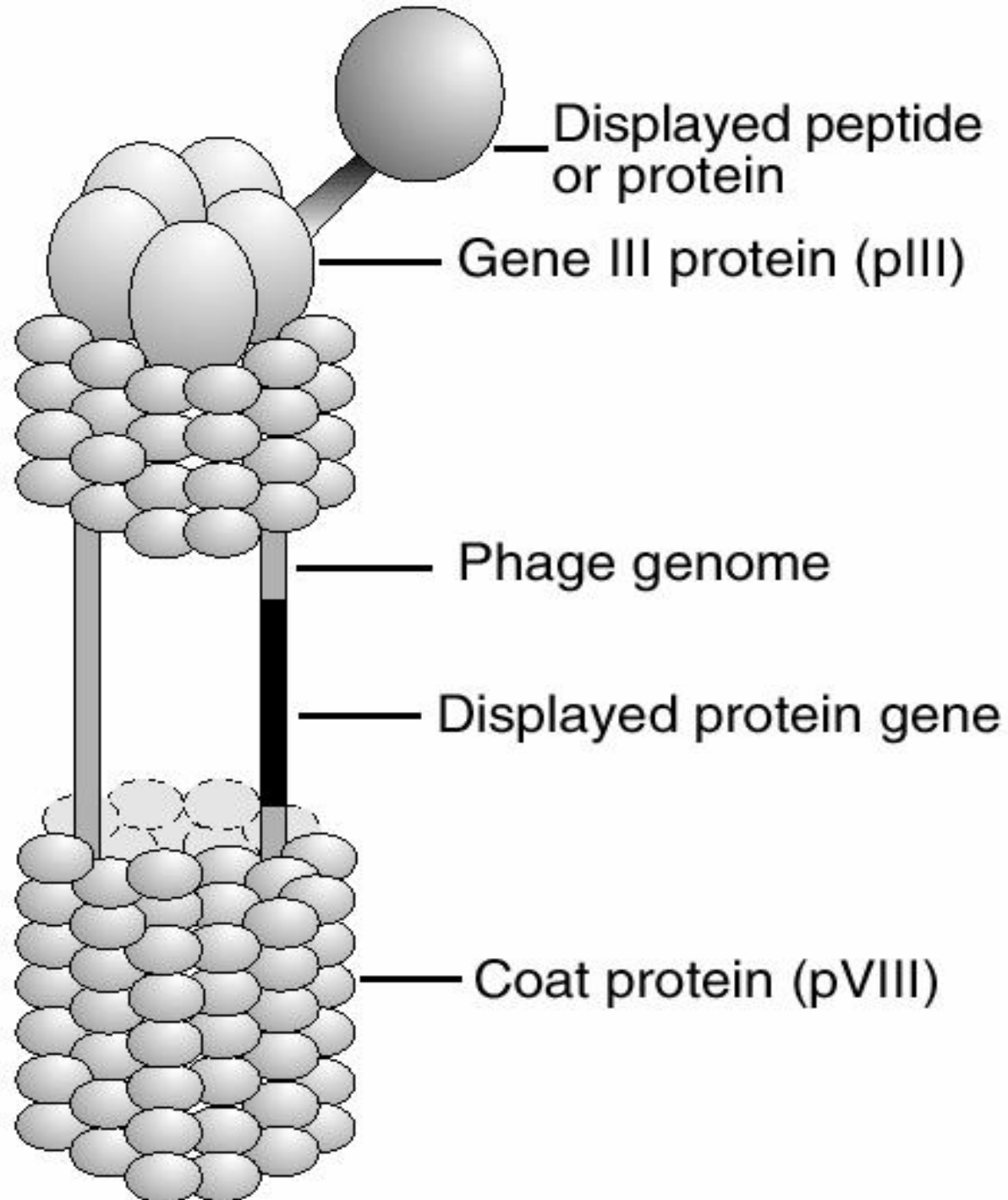
基于抗原抗体反应的筛选
基于核酸杂交的筛选
构建不同的文库

基因文库

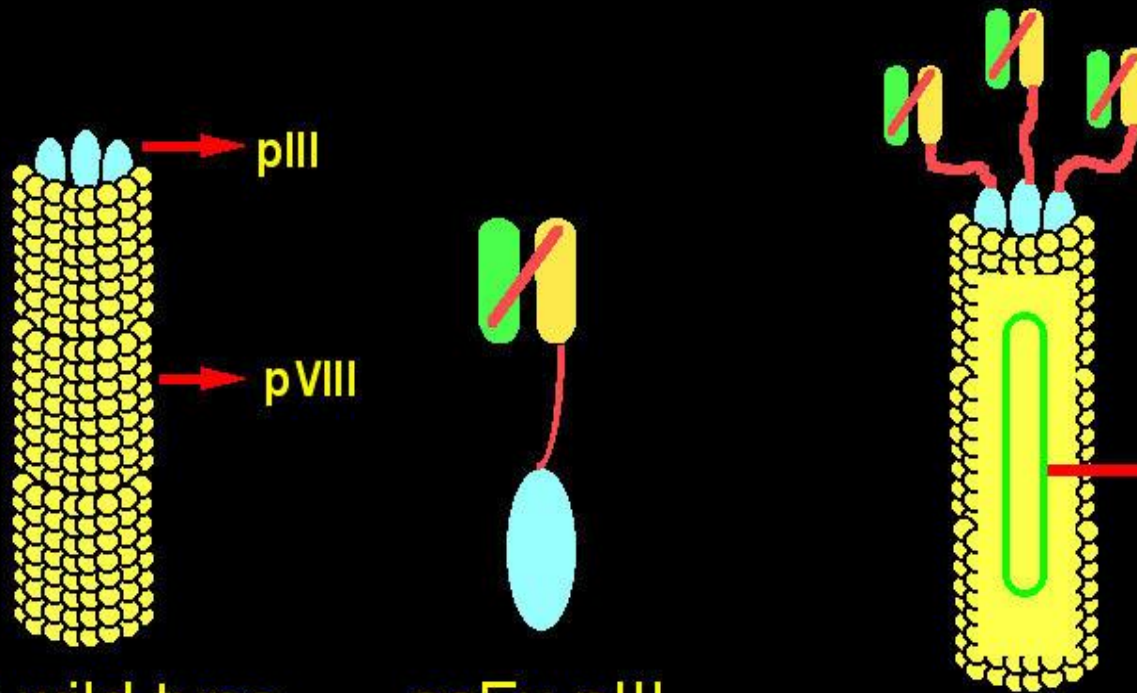


噬菌体展示技术





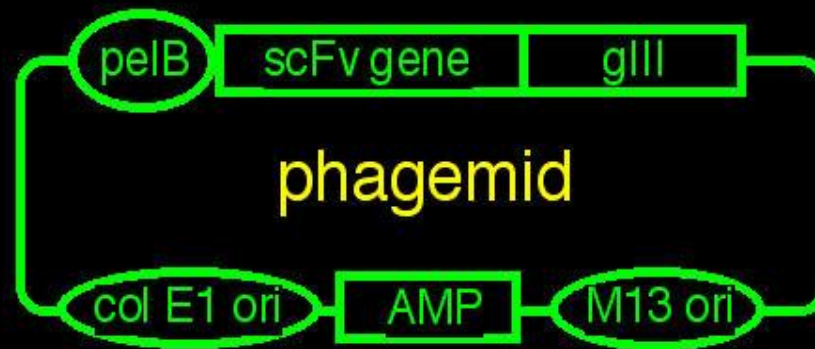
PHAGE DISPLAY TECHNOLOGY



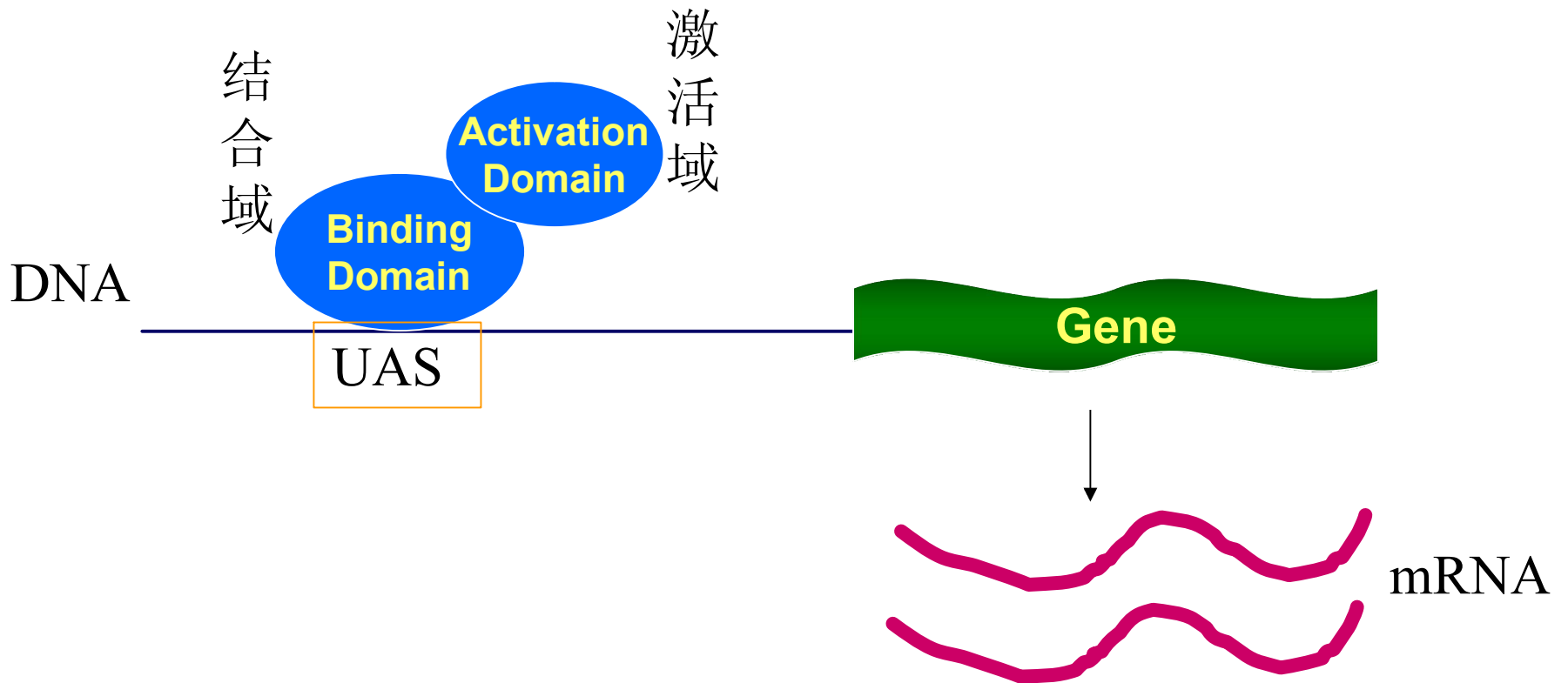
M13 wild type
bacteriophage

scFv-pIII
fusion protein

phage antibody

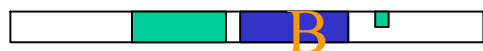
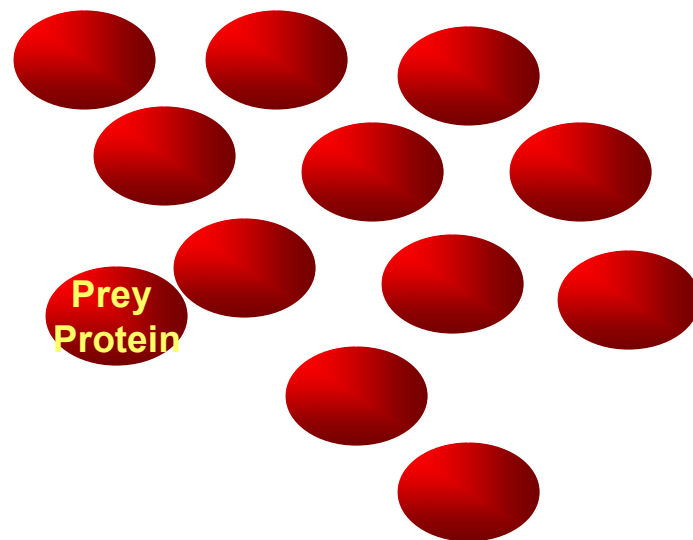
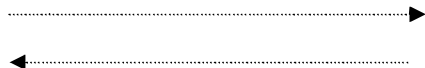


酵母双杂交系统

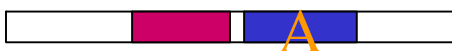


蛋白质相互作用

Bait
Protein



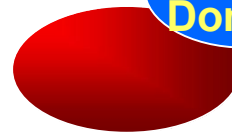
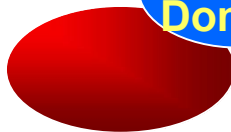
Bait
Protein
Binding
Domain

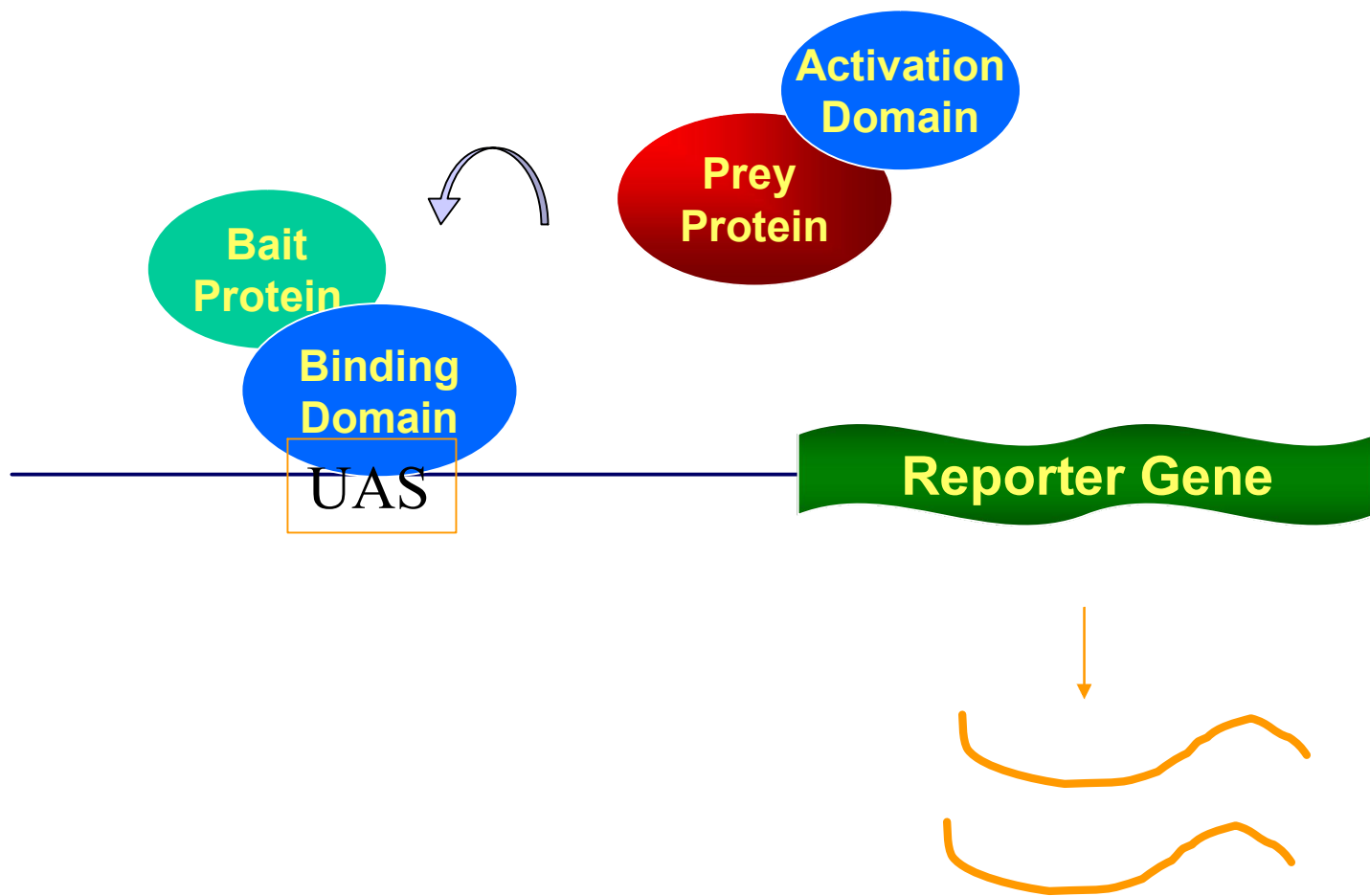


Activation
Domain

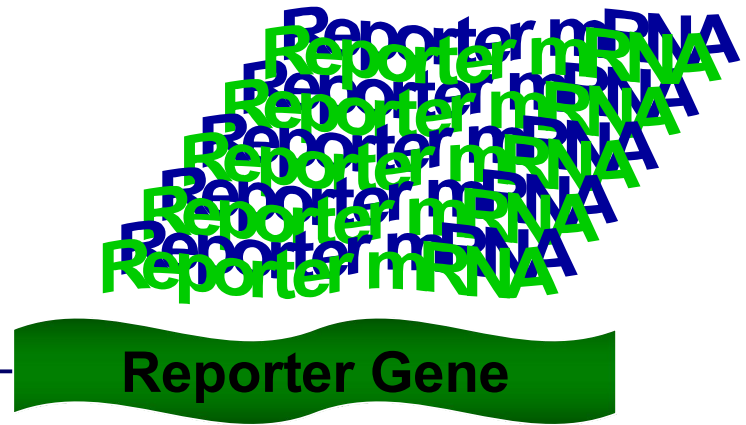
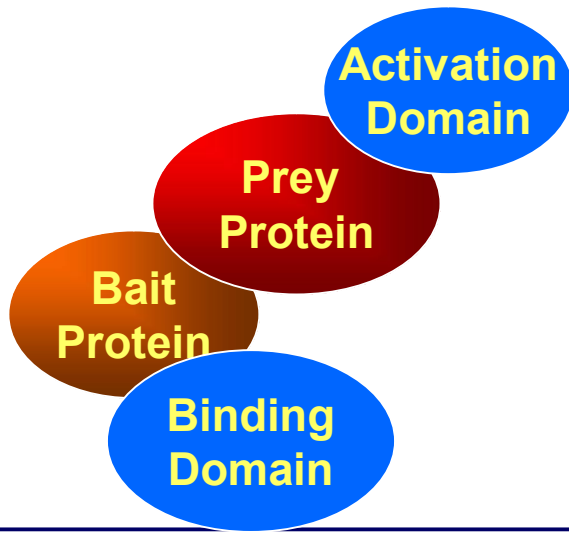


Activation
Domain





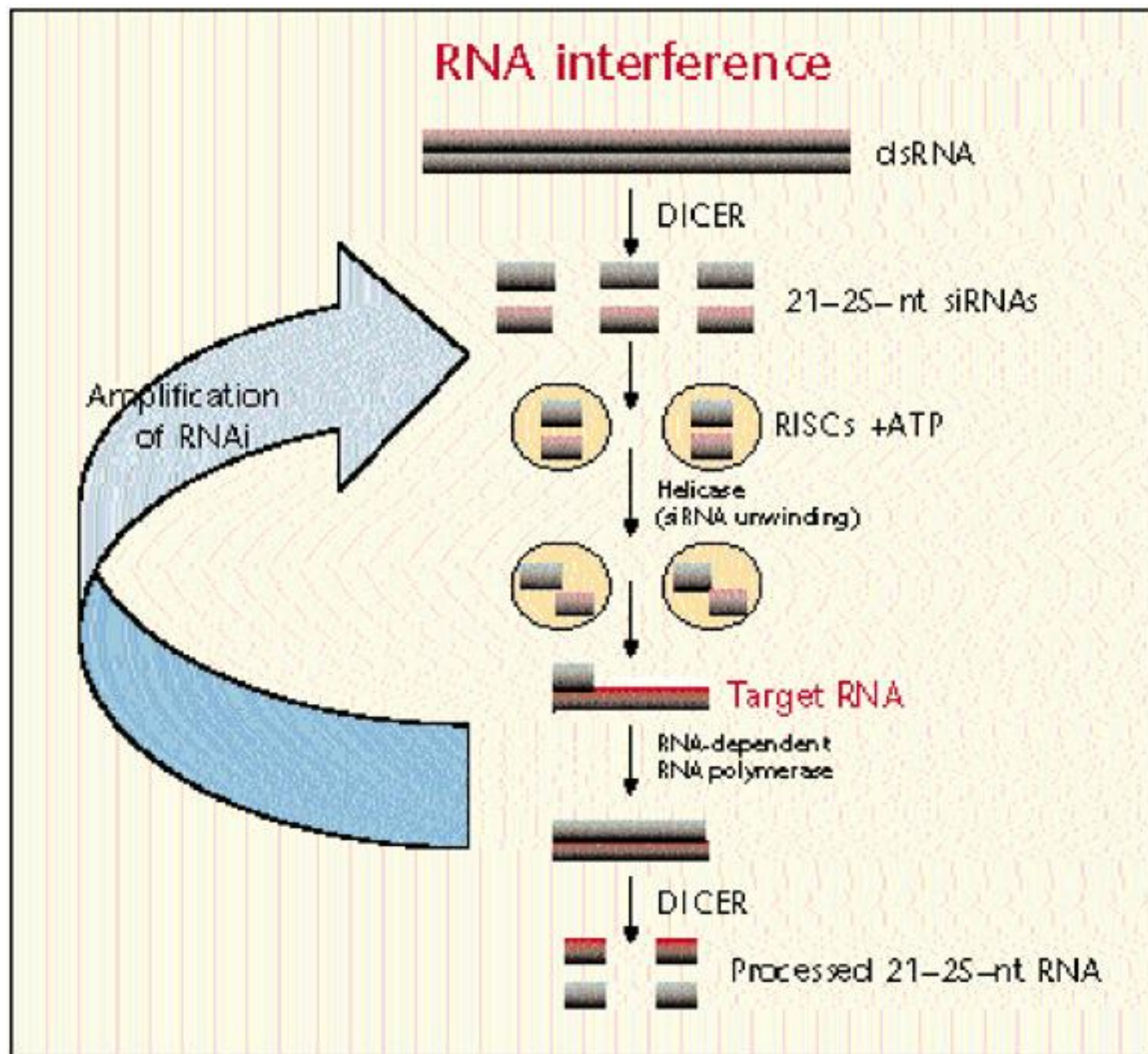
双杂交系统



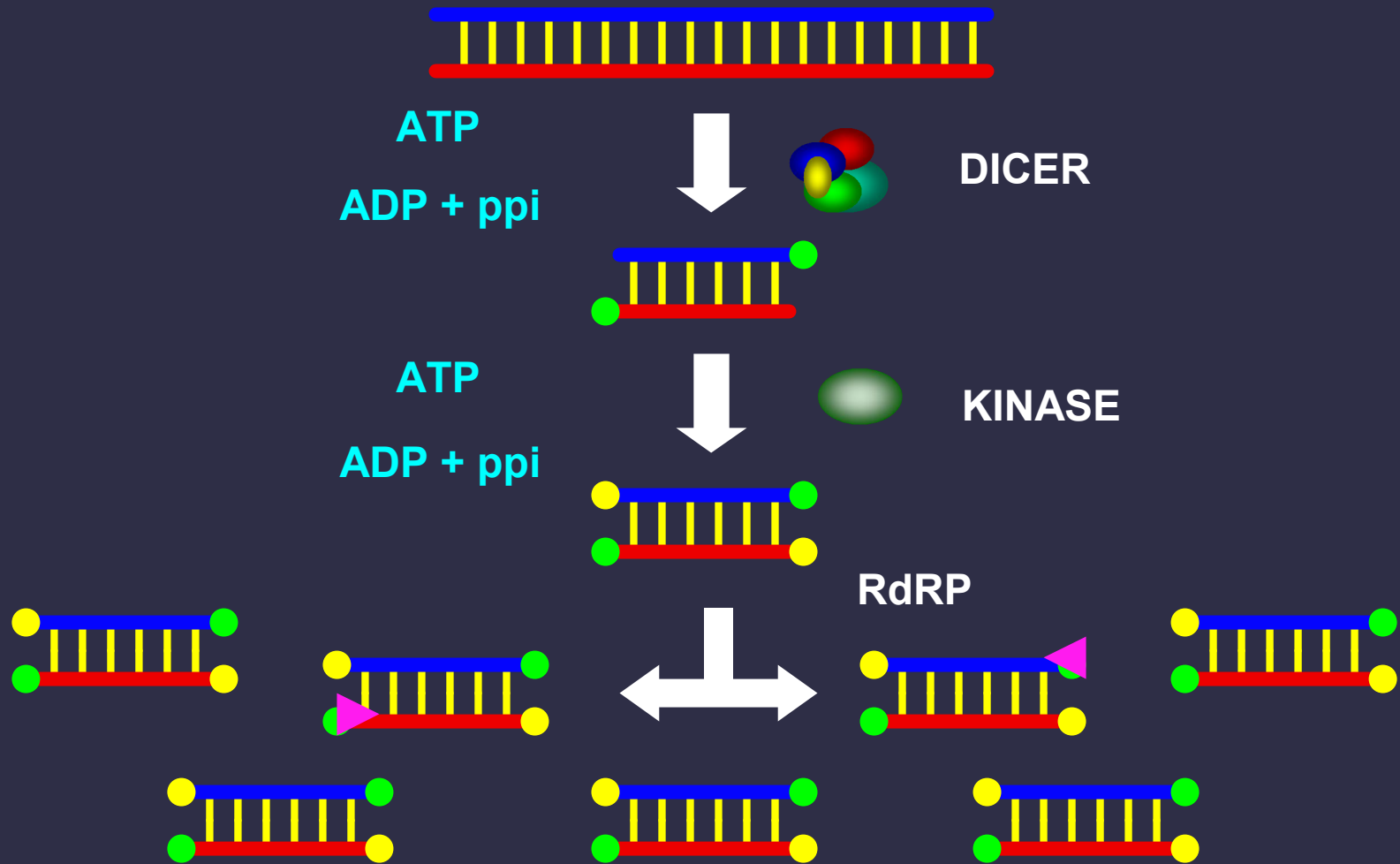
突变谱

Kamath (Nature, 2003, 421: 220) 利用
RNAi 技术 阻断了线虫19757个基因中的16757
基因, 并分析了相应的表型。

RNAi 技术

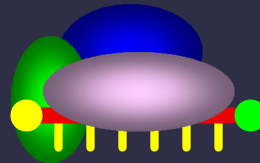
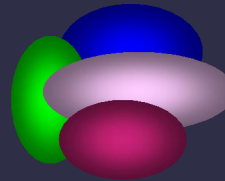


Initiation Step



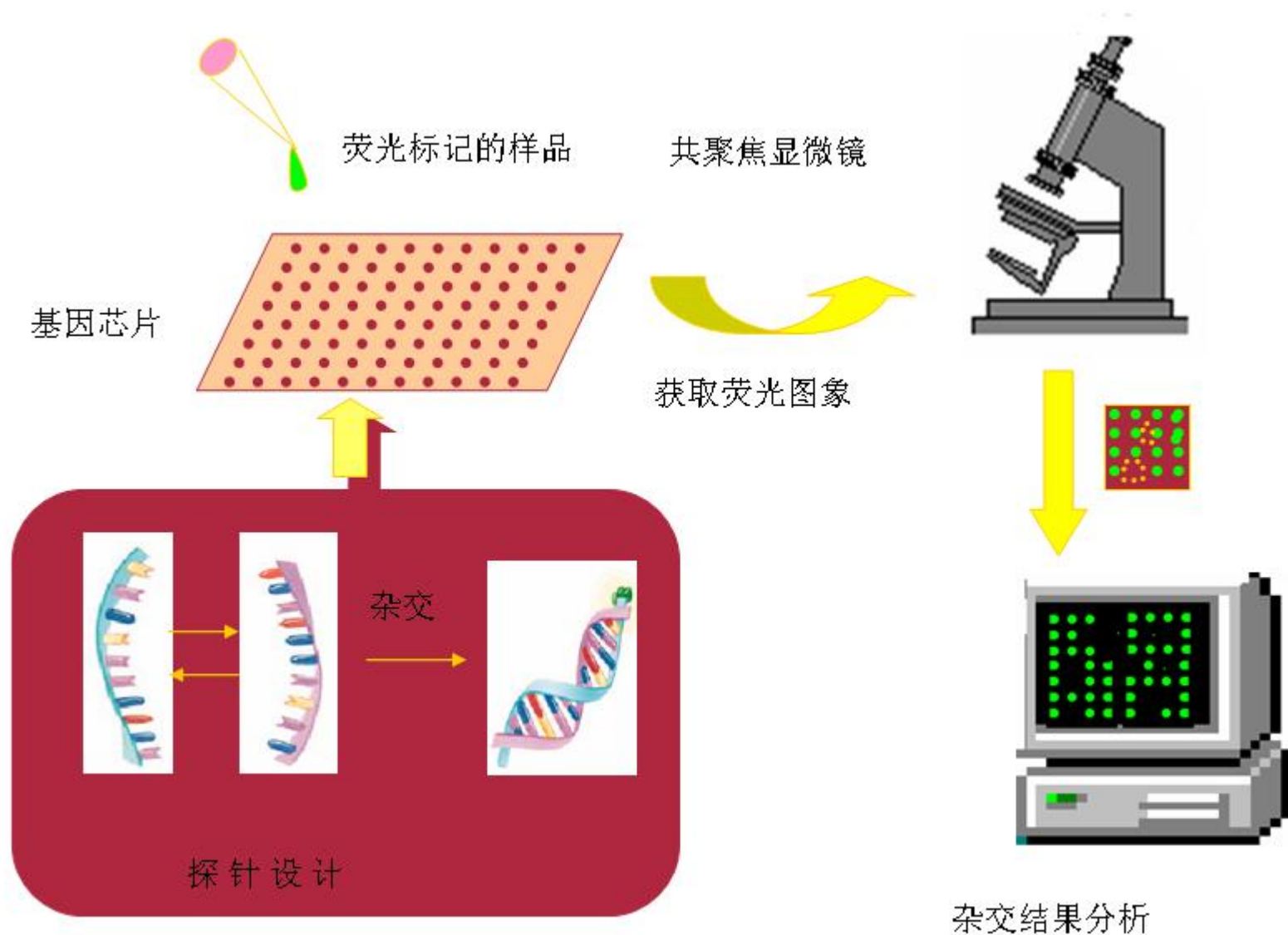
Effector Step

- siRNA binding
- siRNA unwinding
- RISC activation



表达谱

生物芯片



DNA芯片的应用例子虽形形色色，基本原理却是共通的。



1厘米

1厘米

1

例如欲分类多达24-50种白血病的类型时，可将与病因相关的DNA贴在附于薄玻片的聚合物（polymer）上，预先制造芯片。

2

将在患者白血病细胞中表现的mRNA信息预先转换为DNA，附上成为色素作用目标的（标识物质）后，在芯片上流动。

成为色素作用目标的标识的标识物质

携带患者信息的DNA

3

携带患者信息的DNA，仅与芯片上的互补DNA结合；之后再让与目标部分结合的色素流过。芯片上只有与色素结合的部分会发色。

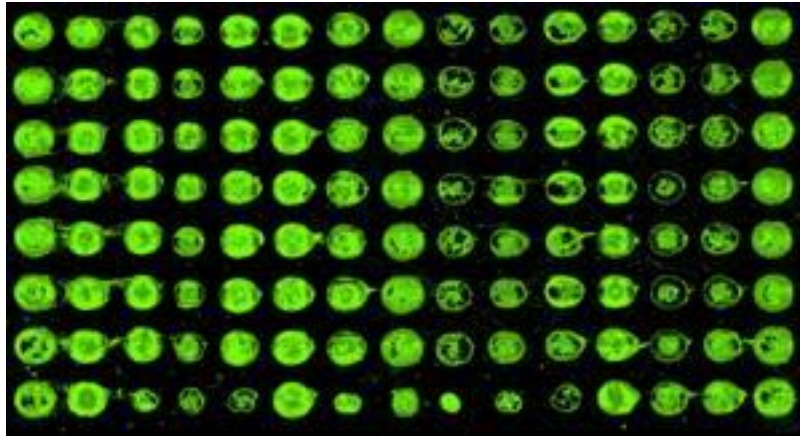
4 分析芯片上的发色部分，察明究竟是那种基因，可发现白血病的类型、有效药等资料。

发色部分

未发色部分

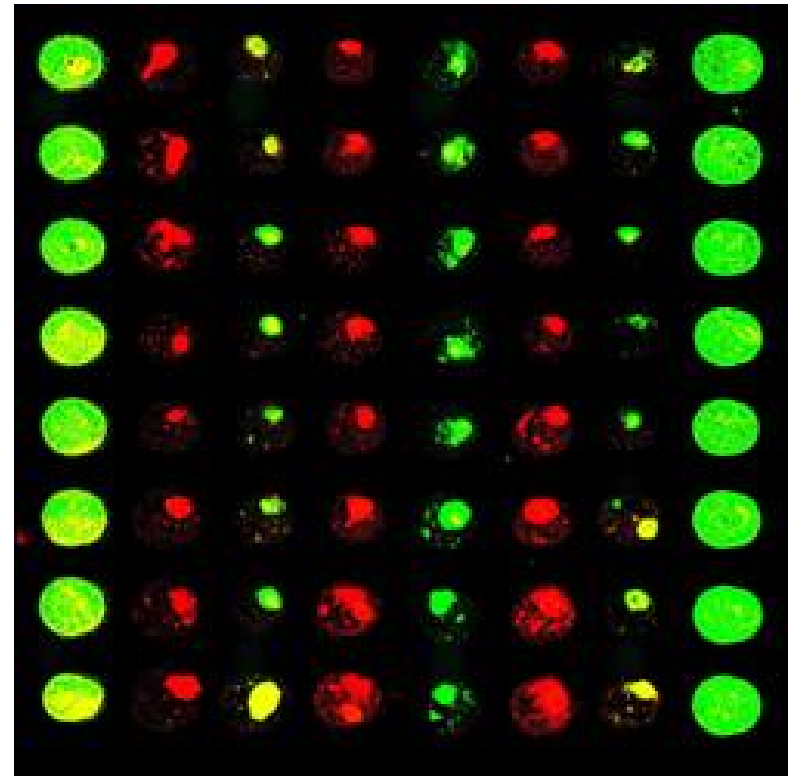
与目标部分结合的色素

Medium-density DNA microarray fluorescence images



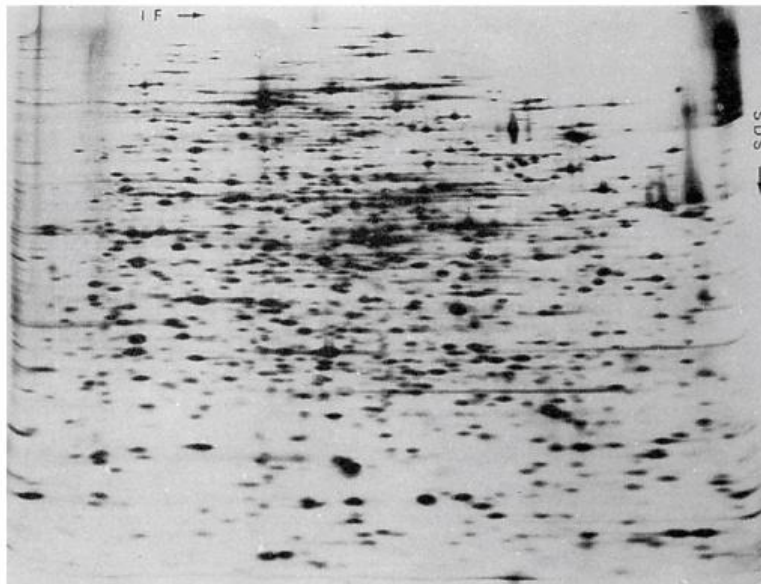
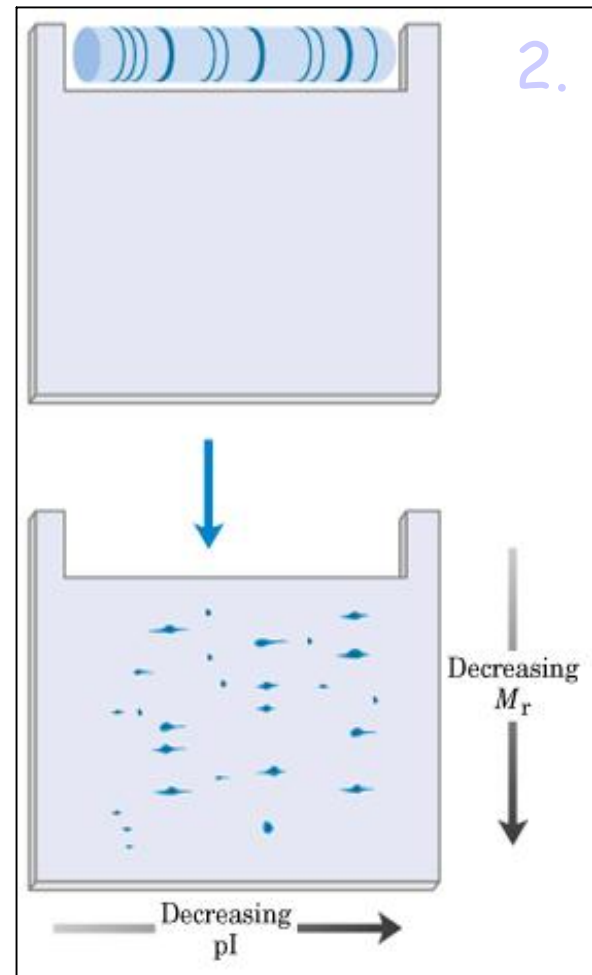
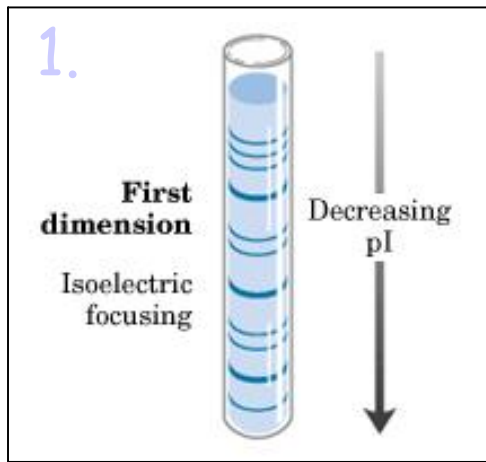
Array Area: 0.6 cm x 0.3 cm

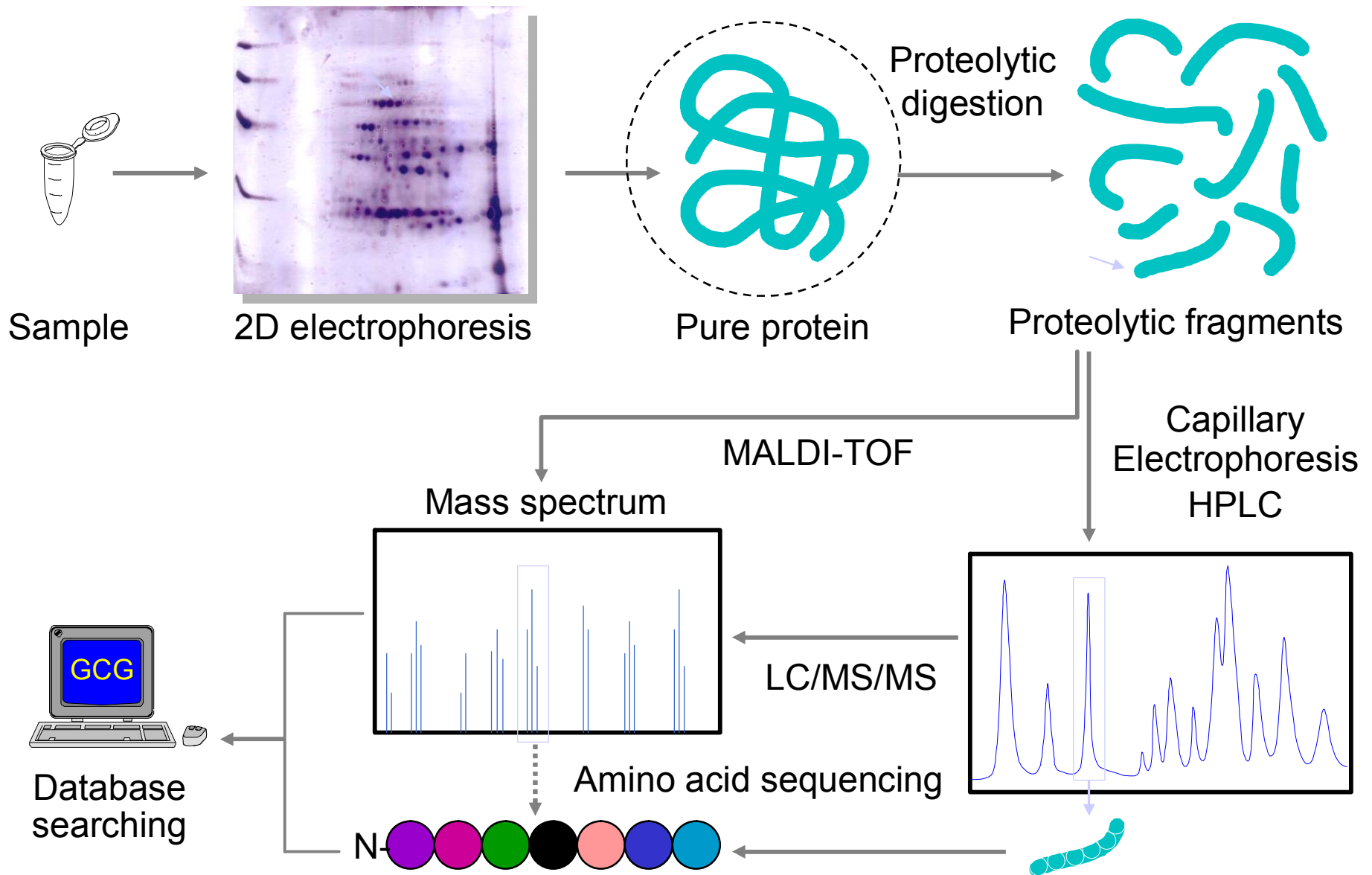
- DNA array with a distance of 400 μm of center-to-center
- SYBR stains ssDNA probe (Up)
- Cy5 (red) and Fluor X (Green) stain immobilized DNA probes (Right)

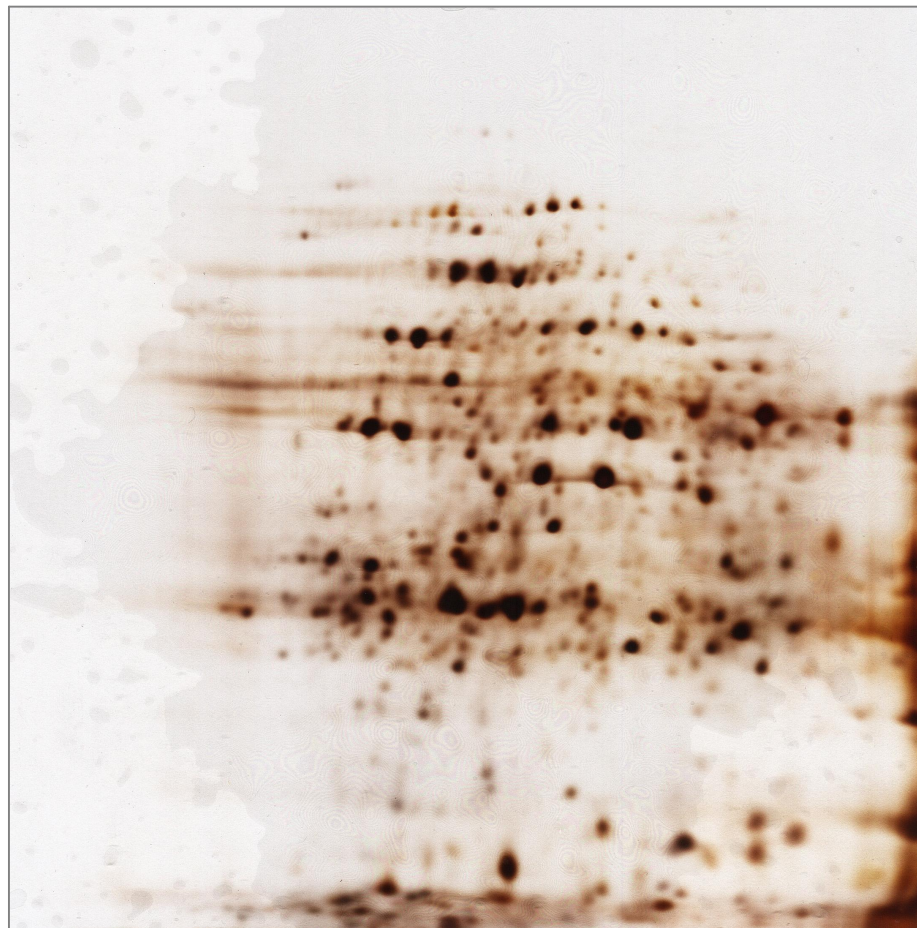
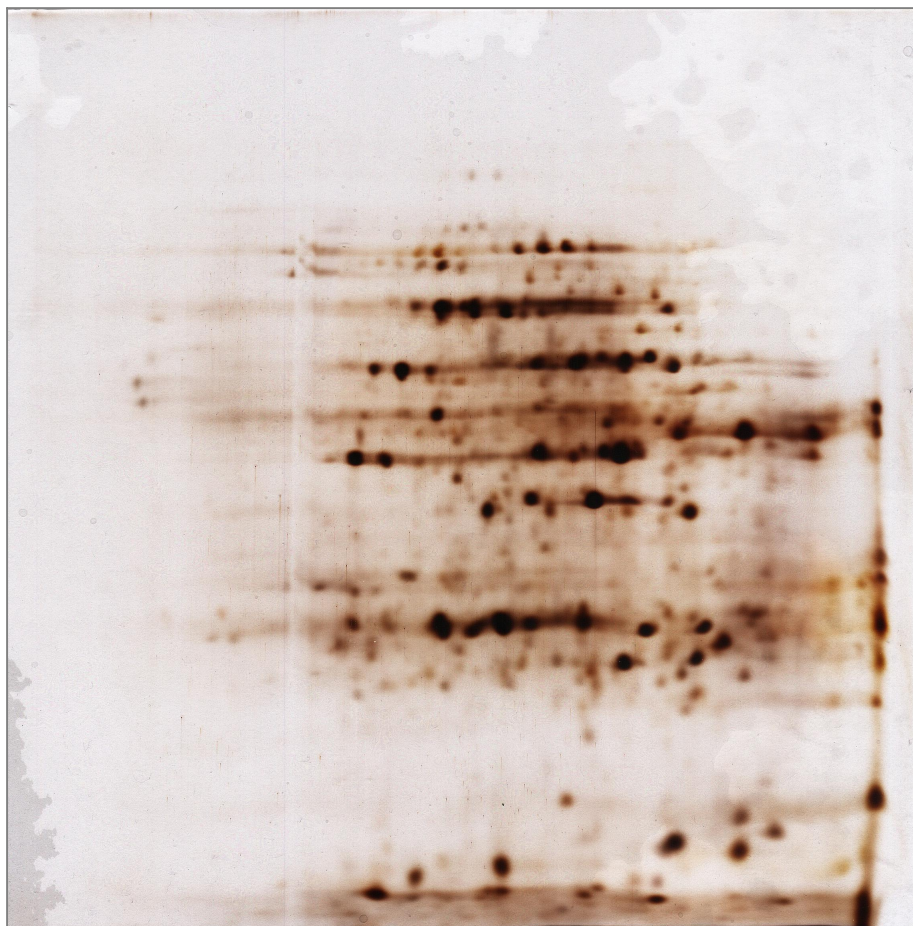


蛋白质组学

2D electrophoresis







转基因生物和动物 克隆技术

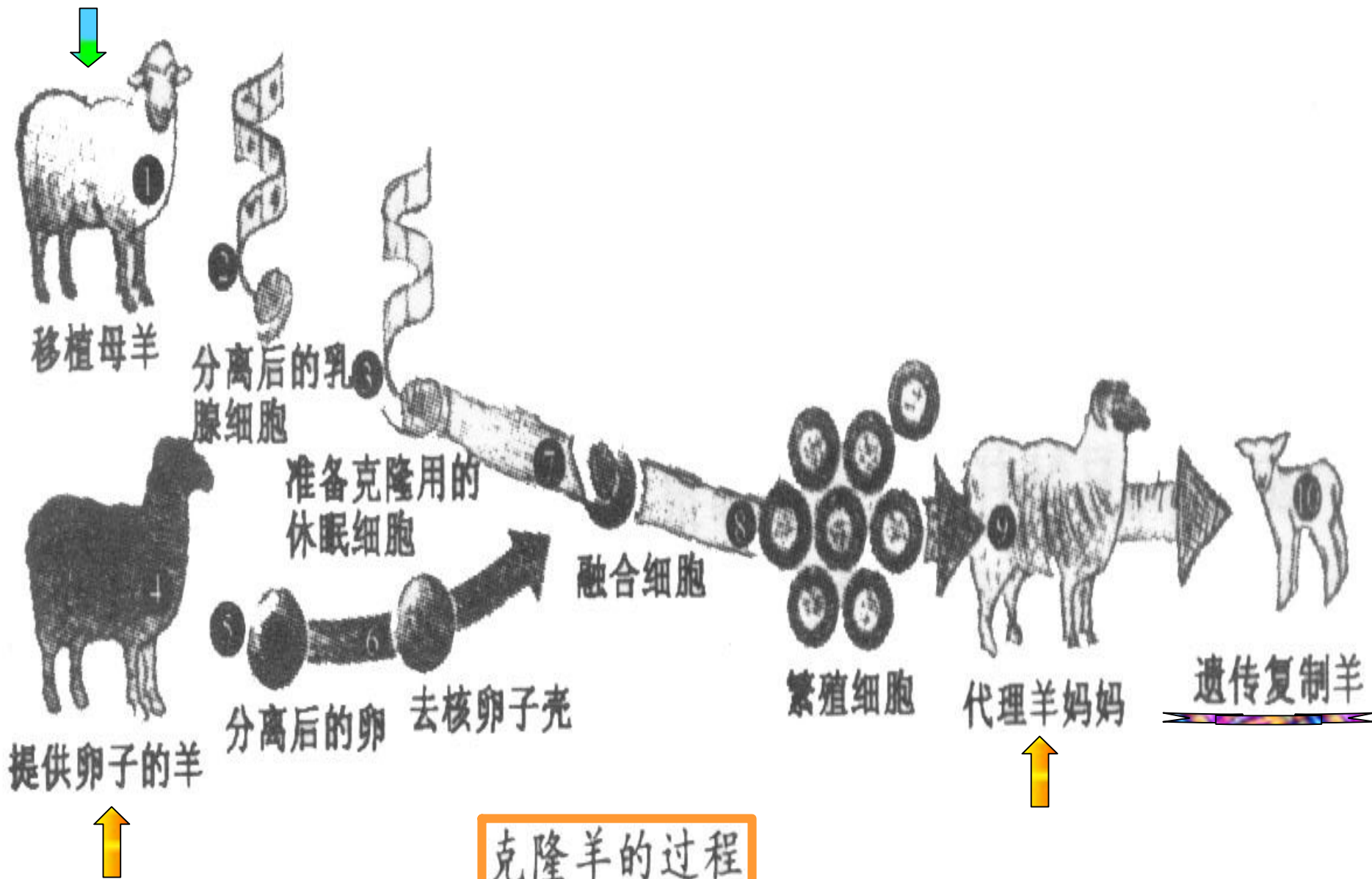
转基因生物是指用实验方法导入的外源基因在染色体基因组内稳定整合并能遗传给后代的一类动物。

自从1982年Palmiter等首次将大鼠生长激素基因导入小鼠受精卵雄性原核中，获得了个体比对照组大一倍的转基因“**超级小鼠**”以来，这项高新技术受到各国重视，发展迅速，取得不少突破，全世界已申请的工程动物专利达到80多项。

囊性纤维变性是一种遗传病，患者体内会产生粘稠的粘液，阻塞肺部、胰腺和消化器官的内部通道，大约有一半的患者活不过30岁。英国PPT公司培育了植入人体基因的克隆羊，羊奶中含有能够治疗囊性纤维变性的人体蛋白。

维尔莫特所在的研究所曾向德国一家药厂出售一头这样的转基因羊，获得50万英镑。





分子生物学的最大弱点

过于微观化，容易勿视整体。生物遗传受多种内外环境因素的影响，在获得大量微观资料后，必然要回到整体水平进行综合研究。

——个体与体系、体外与体内