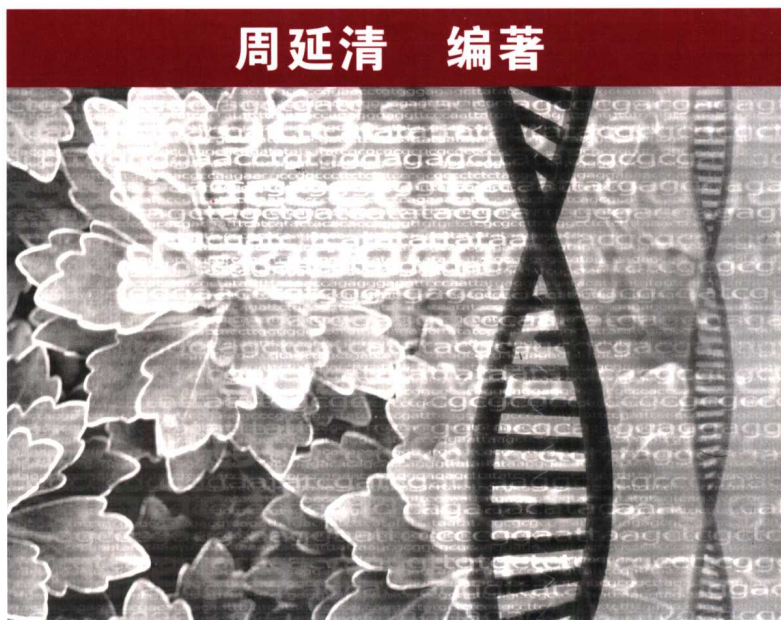


生物实验室系列

DNA分子标记技术 在植物研究中的应用

周延清 编著



Chemical Industry Press



化学工业出版社
现代生物技术与医药科技出版中心

生物实验室系列

DNA 分子标记技术 在植物研究中的应用

周延清 编著



化学工业出版社
现代生物技术与医药科技出版中心

· 北 京 ·

(京)新登字 039 号

图书在版编目(CIP)数据

DNA 分子标记技术在植物研究中的应用/周延清编著.
北京:化学工业出版社,2005.4

(生物实验室系列)

ISBN 7-5025-6863-8

I. D… II. 周… III. 脱氧核糖核酸-遗传标记-
应用-植物学 IV. ①Q523②Q943

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2005) 第 027635 号

生物实验室系列

DNA 分子标记技术在植物研究中的应用

周延清 编著

责任编辑:郎红旗 梁静丽

责任校对:洪雅姝

封面设计:关 飞

*

化 学 工 业 出 版 社 出版发行
现代生物技术与医药科技出版中心

(北京市朝阳区惠新里 3 号 邮政编码 100029)

发行电话:(010) 64982530

<http://www.cip.com.cn>

*

新华书店北京发行所经销

大厂聚鑫印刷有限责任公司印刷

三河市东柳装订厂装订

开本 720mm×1000mm 1/16 印张 17 $\frac{1}{4}$ 字数 320 千字

2005 年 5 月第 1 版 2005 年 5 月北京第 1 次印刷

ISBN 7-5025-6863-8/Q·145

定 价:39.00 元

版权所有 违者必究

该书如有缺页、倒页、脱页者,本社发行部负责退换

出版者的话

21 世纪是生命科学的世纪，这已成为人们的共识。

生命科学随着人类对自身和自然的认识、探索而萌芽，随着人类生产和科学实践的进步而发展。现代生命科学包括生物学、医学、农学等传统学科领域，以及生物学、生物技术与环境科学乃至社会科学等其他学科相互渗透、交叉而产生的新型学科体系。20 世纪后叶现代生物科学尤其是分子生物学取得了一系列突破性成就，使得生命科学在自然科学体系中的位置发生了革命性的变化，成为 21 世纪的带头学科。人们对生命科学也寄予了无限的期望，希望能够解决人类社会所面临的人口膨胀、资源匮乏、疾病危害、环境污染和生态破坏等一系列重大问题。

回顾生命科学的发展历程，实验技术一直起着非常重要的促进作用。如 17 世纪 Leeuwenhoek 等人发明并应用显微镜技术，直接催生了“细胞学说”的建立和发展；1973 年 Cohn 和 Boyer 完成了 DNA 体外重组实验，标志着基因工程的肇始；1988 年 Kary Mullis 发明的 PCR 技术甚至使生命科学产生了飞跃性的发展。可以说，生命科学无时无刻离不开实验，实验是开启神奇的生命王国大门的钥匙。没有实验技术的不断进步，也就没有生命科学今天的巨大发展；同时，生命科学的发展又对实验技术提出了更高的要求，进一步刺激了后者的不断进步。生命科学正是在“实验催生和验证着基础理论，理论指导和发展的实验技术”的不断循环中从必然王国走向自由王国。

工欲善其事，必先利其器。为了有助于生命科学工作者更多地了解相关实验技术和仪器设备，更好地设计实验方案，更有效地开展实验过程，更合理地处理实验结果，化工出版社组织出版了“生物实验室系列图书”。系列图书在整体规划的基础上，本着“经典、前沿、实用，理论与技术并重”的原则组织编写，分批出版。

在题材上，系列图书涵盖综合实验技术和单项实验技术两个方面。其中综合实验技术既有以实验目的为题，如“蛋白质化学分析技术”，内容纵向覆盖多项实验技术；也有以某一生命学科领域的综合实验技术为题，如“发酵工程实验技术”、“生物化学实验技术”等。

而单项实验技术则以深入介绍某一专项技术及其应用为主，在阐述其基本原理的基础上，横向介绍该项技术在多个领域的应用，如“双向电泳技术”、“流式细胞术”等。

在内容上，系列图书主要有以下两个显著特点。一是强调先进性——除了系统介绍常用和经典实验技术以外，特别突出了当前该领域实验手段的新理论、新技术、新发展，为国内专业人员起到借鉴和引导作用。二是强调可操作性——对于每一项实验技术，系统介绍其原理方法、设备仪器和实验过程，让读者明了实验的目的、方案设计以及具体步骤和结果处理，以期起到实验指南的作用。

本系列图书坚持质量为先，开拓国内和国际两个出版资源。一方面，约请国内相关领域兼具理论造诣和丰富实验室工作经验的专家学者编著；另一方面，时刻关注国际生命科学前沿领域和先进技术的进展，及时引进（翻译或影印）国外知名出版社的权威力作。

“生物实验室系列图书”的读者对象设定为国内从事生命科学及生物技术和相关领域（如医学、药学、农学）的专业研究人员，企业或公司的生产、研发、管理技术人员，以及高校相关专业的教师、研究生等。

我们殷切希望“生物实验室系列图书”的出版能够服务于我国生命科学的发展需要，同时热忱欢迎从事和关心生命科学的广大科技人员不仅对已出版图书提供宝贵意见和建议，也能对系列图书的后续题目设计贡献良策或推荐作者，以便我们能够集思广益，将这一系列图书沿着可持续发展的方向不断丰富品种，推陈出新。

谨向所有关心和热爱生命科学，为生命科学的发展孜孜以求的科学工作者致以崇高的敬意！

祝愿我国的科技事业如生命之树根深叶茂，欣欣向荣！

化学工业出版社

现代生物技术与医药科技出版中心

前 言

近年来,分子生物学的快速发展使生命科学的研究产生了许多新的领域和先进有效的技术方法。DNA 分子标记技术就是其中之一。它自诞生至今不过十几年的时间,却在基础理论和实际应用等方面取得了骄人的成绩,并且仍然处在不断发展之中。可以预期不久的将来 DNA 分子标记技术的发展与应用将会给生命领域的研究带来重大的变革。

由于教学和实验研究之需,笔者查阅和收集了大量有关 DNA 分子标记技术方面的资料,进行了 RAPD 和 ISSR 标记技术的应用研究。与此同时,笔者及同行发现这些资料零散地或者以个论形式出现在与生命科学相关的书刊中,但缺少专门系统论述 DNA 分子标记技术的著作,给了解、学习掌握和研究使用 DNA 分子标记技术的人员带来极大的不便与困难。因此,笔者在相关专家的支持与帮助下,结合自己的研究实际,着手编著一本 DNA 分子标记技术的图书,意在总结自己多年研究及教学工作的同时,为此领域的发展尽一份绵薄之力。

本书与市场上现有的相关图书相比,其使用范围广,适合的读者群大,不只是局限在系统与进化植物学或作物分子标记辅助育种领域,而是适用于整个植物学范围内的所有分支学科,并适合相关学科的学生、教师、科技工作者和管理者阅读。每一章的基本原理、方法和操作要点等也适合于所有生命学科领域的研究。同时,原理、方法与应用以及实例等内容编排合理、结构紧凑,便于理论与实际结合,即使初学者也能按照其进行操作实验。因此,本书中的技术方便使用,可操作性强;不仅含有常见的 DNA 分子标记类型,还写入了 SNP、EST 和靶位区域扩增多态性等分子标记技术。书中结合笔者的教学与研究工作,列举了相关研究成果及实例;同时将本室研究人员王娜、田苗苗和牛敬媛等参与完成的大豆、地黄和山药的 RAPD 和 ISSR 标记技术分析的结果收入本书的有关章节。本书

将编写过程中的相关参考文献附于章后，便于读者进一步查阅。

本书在编写过程中，受到了博士生导师贾敬芬教授的指导、鼓励和支持，得到了生物技术陕西省级重点实验室的教师和同学，以及华美生物工程公司博士后工作站的职工和研究生的大力帮助。另外，本书参考了一些出版物中的相关图表，在此一并对同行及参考其资料的作者表示衷心感谢！

由于笔者水平有限，撰写统稿中难免存在疏漏和不妥之处，恳切希望广大读者、专家批评指正，提出宝贵意见和建议。

周延清

2005年4月

内 容 提 要

本书主要阐述了 RAPD、RFLP、SCAR、AFLP、SSR、AP-PCR、ISSR、EST、SNP、STS、RBM、SRAP 和 TRAP 等 DNA 分子标记技术的概念、原理、操作流程、优缺点、操作要点,以及它们在植物学研究中遗传连锁图谱的构建、遗传多样性分析、种质资源鉴定、基因定位、亲缘关系分析、性别鉴定、基因克隆、基因表达和分子标记辅助选择育种等方面的应用。介绍了植物基因组 DNA、线粒体 DNA 和叶绿体 DNA 的提取纯化、检测方法及操作要点,涵盖了相关领域的最新研究成果和实例。

本书强调基础理论和实际技术相结合,图文并茂;注重语言的科学性与通俗性,知识的先进性与系统性;体现了内容新颖、信息全面、生命科学及其各分支科学的交叉与融合的特点。可供大专院校生物科学、生物技术、分子生物学、遗传学、分子生态学与进化、细胞生物学等专业的教师和学生、科研及技术人员、中学生物教师和管理工作者等使用和参考。

目 录

第一章 DNA 分子标记技术导论	1
一、DNA 分子标记发展简史	2
二、DNA 分子标记的特点	3
三、DNA 分子标记技术类型	4
四、主要 DNA 分子标记多态性的分子基础	5
五、DNA 分子标记技术的应用	7
参考文献	7
第二章 植物 DNA 的提取与检测	9
第一节 植物 DNA 提取方法	9
一、植物组织器官 DNA 的提取方法	10
二、植物细胞器 DNA 提取方法	30
三、植物组织器官和细胞器共用的 DNA 提取方法	
——CsCl 密度梯度超离心 DNA 提取法	34
第二节 植物 DNA 的定量和纯度测定	42
一、紫外光谱分析	43
二、EB 荧光分析	44
三、琼脂糖凝胶电泳分析	45
四、荧光测定分析	46
五、二苯胺显色法测定 DNA 含量	46
参考文献	47
第三章 限制性片段长度多态性标记技术	50
第一节 RFLP 标记技术的原理与操作	50
一、RFLP 标记技术的原理	50
二、RFLP 标记技术的操作步骤	53
三、操作要点	55
四、RFLP 标记技术的特点	56
第二节 RFLP 标记技术的应用	57
一、构建遗传图谱	57
二、基因定位	58

三、遗传多样性和物种亲缘关系	59
四、种质鉴定和遗传背景分析	74
参考文献	76
第四章 随机扩增多态性 DNA 标记技术和任意 PCR 标记技术	79
第一节 随机扩增多态性 DNA 标记技术	79
一、引言	79
二、RAPD 标记技术的概念和原理	79
三、RAPD 标记技术的特点	80
四、RAPD 标记技术操作	81
五、RAPD 标记技术转变为 SCAR 标记技术	85
六、RAPD 标记技术的应用	94
第二节 任意引物 PCR 标记技术	108
一、引言	108
二、AP-PCR 标记技术的概念和原理	108
三、AP-PCR 标记技术的特点	110
四、AP-PCR 标记技术的操作步骤	110
五、AP-PCR 标记技术的应用	111
参考文献	127
第五章 简单重复序列标记技术和简单重复序列间区标记技术	131
第一节 简单重复序列标记技术	131
一、引言	131
二、SSR 标记技术的概念和原理	131
三、SSR 标记技术的特点	132
四、SSR 标记技术的操作步骤	133
五、SSR 标记技术在大豆研究中的应用	136
第二节 简单重复序列间区标记技术	143
一、引言	143
二、ISSR 标记技术的原理	143
三、ISSR 标记技术的特点	144
四、ISSR 标记技术的操作步骤	145
五、ISSR 标记技术的应用	146
参考文献	156
第六章 扩增片段长度多态性标记技术	162
第一节 扩增片段长度多态性标记技术的原理	162
一、引言	162

二、AFLP 标记技术的原理	162
第二节 AFLP 标记技术的特点	164
一、AFLP 标记技术的优点	164
二、AFLP 标记技术的缺点	166
第三节 AFLP 标记技术的操作	166
一、AFLP 标记技术的关键	166
二、AFLP 标记技术的核心试剂和引物	168
三、AFLP 标记技术的操作步骤	168
四、AFLP 标记技术的注意事项	170
第四节 AFLP 标记技术的发展	170
一、限制性内切酶的组合	171
二、AFLP 多态性的检测方法	172
三、基于 AFLP 标记的 RNA 指纹的发展	172
第五节 AFLP 标记技术的应用	172
一、遗传连锁图谱的构建	173
二、亲缘关系和遗传多样性研究	174
三、种质资源鉴定	178
四、分子标记辅助选择育种	181
五、基因表达和基因克隆	181
参考文献	182
第七章 表达序列标签标记技术与单核苷酸多态性标记技术	186
第一节 表达序列标签标记技术	186
一、引言	186
二、EST 标记技术的原理	187
三、EST 标记的产生过程	188
四、EST 标记技术的特点	190
五、EST 数据库	191
六、EST 标记技术的应用	196
第二节 单核苷酸多态性标记技术	201
一、引言	201
二、SNP 标记技术的原理	202
三、SNP 标记技术的特点	203
四、SNP 研究的内容和检测方法	204
五、SNP 标记技术的应用	207
参考文献	213

第八章 DNA 分子标记辅助选择育种技术	217
第一节 生物性状及其分子标记方法	217
一、生物性状及其类型	217
二、质量性状的分子标记方法	218
三、数量性状的分子标记方法	219
第二节 遗传连锁图谱的构建与 MAS 的选择	227
一、遗传连锁图谱的构建	227
二、MAS 的选择方法及其原理	233
第三节 DNA 分子标记辅助选择育种技术的特点	234
第四节 分子标记辅助选择育种技术的应用	236
一、抗病基因的 MAS	236
二、抗虫基因	240
三、MAS 与抗性基因累积	241
四、数量性状的 MAS	241
参考文献	247
附录一 DNA 分子标记数据的处理与分析软件	249
参考文献	262
附录二 核酸常用数据换算	264
附录三 常用试剂与缓冲液的配制	266

第一章 DNA 分子标记技术导论

遗传多样性是遗传信息的总和。一般所说的遗传多样性是指种内的遗传多样性，或者称为遗传变异，即种内不同群体之间或者一个群体内不同个体的遗传变异的总和。但是，这些变异在自然选择和人工选择的基础上符合孟德尔遗传规律，而遗传标记就是表示遗传多样性的有效手段。但在学科发展的不同时期遗传标记的手段不同，先后发展的分子标记方法也不同。

遗传标记 (genetic marker) 是指可追踪染色体、染色体某一节段或者某个基因座在家系中传递的任何一种遗传特性。它具有两个基本特征，即可遗传性和可识别性。因此，生物中任何有差异表型的基因突变型均可作为遗传标记。遗传标记在遗传学的建立和发展过程中具有举足轻重的作用，同时也是生物遗传育种的重要工具。随着遗传学的不断发展，遗传标记的种类和数量也不断增加。迄今，遗传标记主要分为 4 种类型，即形态标记 (morphological marker)、细胞学标记 (cytological marker)、生化标记 (biochemical marker) 和分子标记 (molecular marker)。其中，前三种遗传标记都是以基因表达的结果 (表现型) 为基础的，是对基因的间接反映；而 DNA 分子标记则是 DNA 水平遗传变异的直接反映。

目前，在植物学中所使用的遗传标记同样主要有形态标记、细胞学标记、生化标记和分子标记 4 种类型。

形态标记是植物的外部形态特征。形态主要包括肉眼可见的外部特征，如：矮秆、紫鞘、卷叶等；也包括色素、生理特性、生殖特性、抗病虫性等有关的一些特性。形态标记具有简单直观、经济方便等优点。但形态标记的数量在多数植物中是很有限的，多态性比较差，表型易受环境影响，还有一些标记与不良性状的基因连锁。而且，形态标记的获得需要通过诱变、分离纯合的过程，周期较长。有些形态标记 (如花色) 在植物发育晚期才出现，不容易计数。在植物育种中，由于基因的多效作用，一个目标形态标记会影响其他形态标记或者目的性状。另外，形态标记的应用还受其有限数量的限制，不适于需要完整的基因组测试的数量性状位点分析。因此，形态标记在作物遗传育种中的作用是有限的。

细胞学标记的是植物细胞染色体的变异。它包括染色体核型 (染色体数目、结构、随体有无、着丝粒位置等) 和带型 (C 带、N 带、G 带等) 的变

化。与形态标记相比，细胞学标记的优点是能进行一些重要基因的染色体或染色体区域定位。但细胞学标记材料需要较多的人力和花费较长的时间来培育，难度很大；同时某些植物物种对染色体变异反应敏感；还有些变异难以用细胞学方法进行检测。因此，到目前为止，真正应用于作物遗传育种研究中的细胞学标记还很少。

生化标记主要包括同工酶和等位酶标记。此法是主要依据部分化学成分，尤其是根据对有效成分的化学分析将药用植物进行标记和分类的方法。同工酶是指由一个以上基因座位编码的酶的不同形式，而等位酶是指由一个基因座位的不同等位基因编码的酶的不同分子形式。分析方法是在植物组织的蛋白质粗提物中，通过电泳和组织化学染色法将酶的多种形式转变成肉眼可辨的酶谱带型。与形态标记和细胞学标记相比，生化标记具两个方面的优点：一是表现近中性，对植物经济性状一般没有大的不良影响；二是直接反映了基因产物差异，受环境影响较小。但目前可使用的生化标记数量还相当有限，且有些酶的染色方法和电泳分离技术有一定难度，因此，其实际应用受到一定限制。

分子标记 (molecular marker) 是以生物大分子的多态性为基础的一种遗传标记。广义的分子标记是指可遗传的且可检测的 DNA 序列或蛋白质。蛋白质标记包括种子贮藏蛋白质和同工酶。狭义的分子标记只是指 DNA 分子标记 (DNA molecular markers)。现在 DNA 分子标记的定义的界定已经被广泛采纳，本书中的分子标记亦指 DNA 分子标记。

一、DNA 分子标记发展简史

遗传标记原用于遗传作图，确定染色体上基因顺序。1913 年，Alfred H. Sturtevant 使用六个形态标记构建了第一个果蝇遗传图谱。1923 年，Karl Sax 发现菜豆数量性状（种子颜色和大小）和数量性状位点之间的遗传连锁。从此，遗传标记由形态标记发展到同工酶又到 DNA 分子标记。

DNA 分子标记是指能反映生物个体或种群间基因组中某种差异特征的 DNA 片段，它能够直接反映基因组 DNA 间的差异。DNA 分子标记在分子生物学的发展过程中诞生和发展。1974 年，Grozdzicker 等人在鉴定温度敏感表型的腺病毒 DNA 突变体时，利用经限制性内切酶酶解后得到的 DNA 片段的差异，首创了 DNA 分子标记，即第一代 DNA 分子标记——限制性片段长度多态性标记 (restriction fragment length polymorphism, RFLP)。1980 年，Botstein 等人发现 RFLP 标记技术是构建遗传连锁图的好方法。1983 年，Solier 和 Beckman 最先把 RFLP 应用于品种鉴别和品系纯度的测定。从此以后，

RFLP 标记技术用于许多植物完整遗传图的构建。DNA 分子标记也随之迅速发展。1982 年, Hamade 发现了第二代 DNA 分子标记——简单序列重复标记 (simple sequence repeat, SSR)。1990 年, Williams 和 Welsh 等发明了随机扩增多态性 DNA 标记 (randomly amplified polymorphic DNA, RAPD) 和任意引物 PCR (arbitrary primer PCR, AP-PCR)。1991 年 Adams 等人建立了一种相对简便和快速鉴定大批基因表达的技术——表达序列标签 (expressed sequence tag, EST) 标记技术。1993 年, Zabeau 和 Vos 发明了扩展片段长度多态性标记 (amplified fragment length polymorphism, AFLP)。1994 年, Zietkiewicz 等发明了简单重复间序列标记 (inter-simple sequence repeat, ISSR)。1995 年, Velculescu 等发明了基因表达系列分析技术 (serial analysis of gene expression, SAGE)。1998 年, 在人类基因组计划的实施过程中, 第三代分子标记——单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 标记诞生了。2001 年美国加州大学蔬菜系的 Li 和 Quiros 博士提出了基于聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 的相关序列扩增多态性 (sequence-related amplified polymorphism, SRAP) 标记。2003 年, 美国农业部北方作物科学实验室的 Hu 和 Vick 又提出了基于 PCR 的靶位区域扩增多态性 (target region amplified polymorphism, TRAP)。目前, DNA 分子标记已经发展到几十种。

二、DNA 分子标记的特点

利用分子标记技术进行科学研究时, 科研工作者首先要根据自己所要解决的问题和所要研究的生物类群的遗传背景选择理想的分子标记。严格地说, 理想的分子标记必须达到以下几个要求: ①具有高的多态性; ②共显性遗传, 即利用分子标记可鉴别二倍体中杂合基因型和纯合基因型; ③能够明确辨别等位基因; ④分布于整个基因组中; ⑤除特殊位点的标记外, 要求分子标记均匀分布于整个基因组; ⑥选择中性 (即无基因多效性); ⑦检测手段简单、快速 (如实验程序易自动化); ⑧开发成本和使用成本尽量低廉; ⑨在实验室内和实验室间重复性好 (便于数据交换)。然而, 目前发现的任何一种分子标记均不能满足以上所有要求。

DNA 分子标记虽然也不能满足理想的分子标记所需的上述 9 项要求, 但是, 与形态标记、细胞学标记和生化标记相比, 它却具有许多明显的优越性。具体表现为: ①直接以 DNA 的形式表现, 在生物体的各个组织、各个发育阶段均可检测到, 不受季节、环境限制, 不存在表达与否等问题; ②数量极多, 遍布整个基因组, 可检测的基因座位几乎是无限的; ③多态性高, 自然界存在许多等位变异, 无需人为创造; ④表现为中性, 不

影响目标性状的表达；⑤许多标记表现为共显性的特点，能区别纯合体和杂合体。DNA 分子标记的所有这些特性，奠定了它具有广泛应用性的基础。

不同的 DNA 分子标记既具有上述一些共同特性又具有其各自独特的技术特点。表 1-1 比较了几种常用的分子标记的特点。

表 1-1 常用分子标记技术特性的比较

标记类型	RFLP	RAPD	ISSR	SSR	VNTR ^①	AFLP	SNP	Indel ^②	EST
DNA 用量	5~10μg	1~100ng	25~50ng	50~120ng	5~10ng	1~100ng	≥50ng	50ng	1~100ng
DNA 质量	高	低	低	中高	高	高	高	高	高
基因组分布	低拷贝编码序列	整个基因组	整个基因组	整个基因组	整个基因组	整个基因组	整个基因组	整个基因组	功能基因区
可检测基因座位数	1~3	1~10	1~10	多数为 1	10~100	20~200	2	2	2
遗传特点	共显性	多数共显性	共显性/显性	共显性	共显性	共显性/显性	共显性	共显性	共显性
多态性	中等	较高	较高	高	较高	较高	高	低	高
引物/探针类型	基因组 DNA/DNA 特异性低拷贝探针	9~10bp 随机引物	16~18bp 特异引物	14~16bp 特异引物	DNA 短片段	16~20bp 特异引物	AS-PCR 引物	22~25bp 特异性引物	24bp 寡聚核苷酸引物
技术难度	高	低	低	低	中等	中等	高	低	高
同位素使用	常用	不用	不用	可不用	常用	常用	不用	不用	不用
可靠性	高	低/中等	高	高	高	高	高	高	高
所用时间	多	少	少	少	多	中等	多	少	多
实验成本	高	较低	较低	中等	高	较高	高	中等	高

① VNTR 表示重复可变串联重复标记的方法。

② Indel 为插入/缺失多态性标记技术。

三、DNA 分子标记技术类型

能提供分子标记的分子生物学技术称为分子标记技术。DNA 分子标记大多以电泳谱带的形式表现。基于 DNA 分子标记的分子标记技术大致可分为五大类（表 1-2）。但是，其中也存在着交叉，例如，第三类“以重复顺序为基础的标记技术”中的微卫星 DNA 标记也可以归于第二类“以 PCR 为基础的分子标记技术”。

表 1-2 主要的分子标记技术

以 Southern 杂交为基础的分子标记技术	
①	限制性内切酶片段长度多态性标记(restriction fragment length polymorphism,RFLP)
②	单链构象多态性 RFLP(single strand conformation polymorphism-RFLP,SSCP-RFLP)
③	变性梯度凝胶电泳 RFLP(denaturing gradient gel electrophoresis-RFLP,DDGGE-RFLP)
④	原位杂交(<i>in situ</i> hybridization)
以 PCR 为基础的分子标记技术	
①	随机扩增多态性 DNA(randomly amplified polymorphic DNA,RAPD)
②	序列标记位点(sequence tagged site,STS)
③	序列特征化扩增区域(sequence characted amplified region,SCAR)技术
④	随机引物 PCR(random primer-PCR,RP-PCR)
⑤	任意引物 PCR(arbitrary primer-PCR,AP-PCR)
⑥	寡核苷酸引物 PCR(oligo primer-PCR,OP-PCR)
⑦	单链构象多态性 PCR(single strand conformation polymorphism-PCR,SSCP-PCR)
⑧	小寡核苷酸 DNA 分析(small oligo DNA analysis,SODA)
⑨	DNA 指纹技术(DNA fingerprinting,DAF)
⑩	扩增的限制性内切酶片段长度多态性(amplified fragment length polymorphism,AFLP)
⑪	相关序列扩增多态性(sequence-related amplified polymorphism,SRAP)
⑫	靶位区域扩增多态性(target region amplified polymorphism,TRAP)
⑬	插入/缺失多态性(insertion/deletion polymorphism,Indel 或 I/D)
以重复顺序为基础的标记技术	
①	卫星 DNA(satellite DNA);重复单位为几百至几千碱基对
②	微卫星 DNA(microsatellite DNA);重复单位为 2~5 个碱基对
③	小卫星 DNA(minisatellite DNA);重复单位大于 5 个碱基对
④	简单重复序列(simple sequence repeat,SSR)或简单序列长度多态性(simple sequence length polymorphism,SSLP)
⑤	短重复序列(short repeat sequence,SRS)
⑥	串珠式重复序列(tandem repeat sequence,TRS)
以 mRNA 为基础的分子标记技术	
①	差异显示(differential display,DD)
②	逆转录 PCR(reverse transcription PCR,RT-PCR)
③	差异显示逆转录 PCR(differential display reverse transcription PCR,DDRT-PCR)
④	特征性分析(representative difference analysis,RAD)
⑤	表达顺序标签(expressed sequence taqs,EST)
⑥	序标位(sequence tagged sites,STS)
⑦	基因表达系列分析技术(serial analysis of gene expression,SAGE)
以单核苷酸多态性为基础的分子标记技术	
单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism,SNP)	

四、主要 DNA 分子标记多态性的分子基础

DNA 分子标记的多态性的产生有其分子基础。图 1-1 显示了几种主要的 DNA 分子标记的多态性分子基础。