

Z W F Z B J Y L Y F F

植物分子标记 原理与方法

郑成木 主编 ■
湖南科学技术出版社 ■



Z W F Z B J Y

植物分子标记 原理与方法

主 编: 郑成木

副主编: 张汉尧

湖南科学技术出版社

植物分子标记原理与方法

主 编：郑成木

责任编辑：刘奇琰

出版发行：湖南科学技术出版社

社 址：长沙市湘雅路 280 号

<http://www.hnstp.com>

印 刷：湖南省长沙国防科大印刷厂

(印装质量问题请直接与本厂联系)

厂 址：长沙市砚瓦池正街 47 号

邮 编：410073

出版日期：2003 年 3 月第 1 版第 1 次

开 本：850mm × 1168mm 1/32

印 张：9

字 数：230000

书 号：ISBN 7-5357-3656-4/Q·64

定 价：15.00 元

(版权所有·翻印必究)

前 言

通过比较 DNA (或 cDNA) 的酶切或 PCR 扩增片段的电泳图谱, 分析生物不同物种、品种 (或小种) 乃至个体之间遗传物质基础的异同, 寻找与特定性状 (基因) 相关的 DNA 分子标记, 已成为当今生命科学研究中广泛应用的一项新技术。分子标记技术在植物遗传育种研究中的应用领域日益拓展, 尤其在辅助选择育种上已取得不少可喜成果, 备受植物遗传育种学家的青睐。

本书较系统地介绍了目前常用的主要分子标记技术的原理与方法, 并融入了作者在植物分子标记科学研究和教学方面的一些实际工作经验。因此, 本书对从事植物遗传育种、植物生理生化、植物保护等植物科学研究与教学工作者具有一定的参考价值, 也可供生命科学类的大中专学生及研究生阅读参考。

本书共分为 8 章。郑成木撰写第一章, 并负责全书的统稿; 莫饶撰写第二章; 张汉尧撰写第三章, 并协助全书的统稿; 罗安定撰写第四章; 曾丽娟撰写第五章和第八章; 黄东益撰写第六章; 黄贵修撰写第七章。本书部分插图由朱稳绘制。限于作者的水平, 书中错漏之处, 恳请读者批评指正。

编 者

2002 年 5 月

目 录

第一章 绪论	1
一、遗传标记的类型及发展	1
二、分子生物学发展史上的里程碑——PCR	6
三、植物分子标记常用技术系统概述	17
第二章 RFLP 技术	25
第一节 RFLP 的产生和发展	25
第二节 RFLP 的基本原理	26
一、DNA 碱基顺序的自然变异	26
二、限制性内切酶	27
三、限制片段长度多态性的产生	29
四、Southern 印迹转移及杂交	31
五、探针及其制备	32
六、RFLP 的遗传标记	37
七、应用 RFLP 进行 QTL 分析与辅助育种	37
第三节 RFLP 的方法与步骤	40
一、DNA 的分离	40
二、酶切	42
三、琼脂糖凝胶电泳	44
四、Southern 印迹转移 (碱法)	44
五、DNA 杂交及放射自显影	45
六、X 线胶片上 RFLP 图谱的分析	48
七、非放射性探针的 RFLP 检测	49

八、溶液配制	51
第四节 RFLP 技术的应用	54
一、遗传学图构建	55
二、基因定位	56
三、数量性状基因定位 (QTL) 分析	57
四、异源染色体 (质) 鉴定	58
五、遗传多态性分析	59
六、分类和进化研究	60
七、细胞质遗传研究	62
八、其他方面的应用	63
第三章 RAPD 技术	68
第一节 RAPD 的产生与发展概述	68
第二节 RAPD 的基本原理和方法	70
一、RAPD 的基本概念和原理	70
二、RAPD 技术分析的几种方法和途径	71
三、RAPD 产物分析中的一些问题	76
四、RAPD 的优、缺点及弥补方法	78
第三节 RAPD 反应的影响因子	80
一、Taq 酶的影响	80
二、镁离子浓度的影响	81
三、扩增反应温度和时间的影响	82
四、循环周期的影响	84
五、引物的影响	85
六、dNTPs 浓度的影响	86
七、DNA 的影响	86
第四节 RAPD 的基本实验程序	87
一、RAPD 的基本实验步骤	87
二、RAPD 实验可能遇到的问题、原因及对策	92

三、注意事项	93
第五节 RAPD 数据的统计分析	95
一、多态位点比例和位点平均杂合度	95
二、基因相似系数 (genotypic similarity)	96
三、Shannon 多样性指数	96
四、遗传距离指数 (genetic distance index)	98
五、Jaccard 系数	99
第六节 RAPD 技术的应用	100
一、品种、品系的指纹图谱的绘制	100
二、种质资源遗传多样性研究	101
三、遗传学图的构建	102
四、新遗传资源的鉴定	102
五、目标基因的定位与分离	103
六、其他方面的应用	104
第四章 AFLP 技术	111
第一节 AFLP 技术的产生和发展	111
第二节 AFLP 的基本原理	112
一、AFLP 的基本原理	112
二、AFLP 的主要影响因素	115
三、AFLP 技术的优、缺点	118
第三节 AFLP 的实验操作	119
一、仪器设备 (不包括 DNA 提取及纯化)	120
二、药品试剂 (不包括 DNA 提取及纯化)	120
三、DNA 提取及纯化	121
四、AFLP 反应基本程序	122
五、电泳分离	126
六、银染程序	127
七、AFLP 放射性同位素检测基本程序	128

八、AFLP 荧光标记检测基本程序	128
九、AFLP 实验要点	129
十、AFLP 实验可能遇到的问题、原因及对策	131
第四节 AFLP 的应用	133
一、构建指纹图谱, 鉴定品种或种质	134
二、遗传多样性研究	135
三、遗传学图的构建	135
四、鉴别与目的基因紧密连锁的分子标记	136
五、辅助育种	137
六、研究基因表达与调控	137
附 录 有关试剂的配制	138
第五章 SSR 技术	145
第一节 SSR 技术的产生与发展	145
第二节 SSR 的基本原理	147
一、SSR 的基本结构	147
二、SSR 的频率	147
三、SSR 标记引物的来源	149
四、SSR 位点的电泳分离与检测	150
五、SSR 位点的分析与数据处理	151
六、SSR 标记的优、缺点	152
第三节 方法和步骤	152
一、DNA 的提取	153
二、DNA 的纯化	153
三、PCR 反应及电泳分离	154
四、银染法检测	155
五、附录	157
第四节 SSR 标记技术的应用	159
一、基因定位	159

二、多态性分析	160
三、追踪亲本遗传物质在杂交后代中的遗传动态	161
四、微卫星 DNA 作图	162
五、指纹图谱构建	163
六、数量性状基因位点 (QTL) 分析	164
七、种质资源的保存与利用	164
第六章 GISH 和 FISH 技术	169
第一节 GISH 和 FISH 技术的产生与发展	169
第二节 GISH 和 FISH 技术的原理和影响因素	172
一、基本原理	172
二、GISH 或 FISH 探针的制备	173
三、GISH 或 FISH 的影响因素	176
第三节 GISH 和 FISH 的操作方法	180
一、仪器用品	181
二、植物染色体标本的制备	182
三、基因组 DNA 的提取及探针标记	185
四、核酸的变性、杂交、冲洗及检测	188
五、原位杂交及检测的具体操作程序 (非放射性标记 探针的原位杂交及检测程序	190
六、原位杂交要点	198
七、植物染色体原位杂交出现的问题及解决措施	199
第四节 GISH 和 FISH 的应用	202
一、基因定位	202
二、染色体结构变异的分析	203
三、基因组的结构和进化的研究	203
四、基因组的空间分布	204
五、遗传转化材料的鉴定	205
附 录 有关试剂的配制	205

一、染色体标本制备试剂	205
二、CTAB 缓冲液的配制	206
三、探针标记的试剂	206
四、斑点杂交检测试剂	207
五、原位杂交及检测的试剂	207
第七章 mRNA 差异显示技术	213
第一节 mRNA 差异显示技术的产生与发展	213
第二节 mRNA 差异显示技术的原理	214
一、基本原理	214
二、基本实验程序	216
三、mRNA 差异显示技术的优、缺点	218
第三节 mRNA 差异显示技术的方法与步骤	220
一、仪器设备	221
二、药品试剂	221
三、操作程序	223
四、要点和难点解答	230
第四节 mRNA 差异显示技术的改进	232
一、植物组织高纯度 RNA 的制备	232
二、引物设计及 PCR 参数的优化	234
三、差异条带的分离与回收	237
四、Northern 杂交及 cDNA 探针的克隆	239
五、全基因的完整筛选	240
六、mRNA 差异显示技术与其他分子生物学技术 的结合	241
第五节 mRNA 差异显示技术的应用	243
一、分析基因表达的差异	243
二、寻找遗传标记	245
三、分离特异表达的基因	246

四、检查 cDNA 文库的质量	247
五、鉴定种属特异性	248
第八章 其他分子标记技术	254
第一节 抑制消减杂交法	254
一、抑制消减杂交法的原理	254
二、抑制消减杂交法的步骤	255
第二节 消减杂交法	257
一、消减杂交法的原理和步骤	257
二、cDNA 文库的构建	258
第三节 代表性差异分析法	262
一、代表性差异分析法的原理	262
二、tester 和 driver DNA 样品扩增子的制备	262
三、杂交和扩增	263
第四节 SSH、SH、RDA 的应用及其优、缺点	265
一、SSH、SH、RDA 的应用	265
二、SSH、SH 和 RDA 的优、缺点	269

第一章 绪 论

一、遗传标记的类型及发展

遗传标记(genetic markers)是研究生物遗传变异规律及其物质基础的重要手段。长期以来,遗传育种学家通过各种宏观或微观的遗传标记来研究生物的遗传和变异现象,揭示其内在的规律,并以此指导或辅助动植物育种,取得了累累硕果。遗传标记方法主要有4种类型,即形态标记(morphological markers)、细胞学标记(cytological markers)、生化标记(biochemical markers)和分子标记(molecular markers)。

(一) 形态标记

形态标记是以植物的外部特征,如株高、穗长、粒色、花色、粒重等宏观性状作为遗传研究的标志。早在1864年,孟德尔就曾以豌豆的花色、种子形状、子叶颜色、豆荚形状、豆荚(未成熟的)颜色、花序着生部位和株高7个不同的形态标记为对象,进行豌豆杂交实验,对杂交后代进行分析研究,得出了著名的分离和独立分配规律^[1],为遗传学的诞生奠定了基础。形态标记具有简单直观的特点,直到现在仍是遗传学研究和选择育种常用的经典方法。但是形态标记数量少,易受环境条件影响,因此,形态标记的可靠性较低,在遗传育种研究中的应用有很大的局限性。

(二) 细胞学标记

染色体(或染色质)是生物最重要的遗传物质载体。几乎在所有的真核生物细胞中,用光学显微镜或电子显微镜都可以看到染色体的存在。各个物种的染色体都有特定的形态特征。在细胞分

裂的过程中,染色体的形态和结构表现出一系列规律性的变化,其中以有丝分裂的中期和早后期表现得最为明显和典型。因为这个阶段染色体收缩到最粗、最短的程度,并且从细胞的极面上观察,可以看到它们分散地排列在赤道板上,所以通常都以这个时期进行染色体形态的识别和研究。

最初的细胞学标记主要是指染色体的核型包括染色体数目、大小、随体、着丝点位置等。而染色体显带(chromosome banding)是20世纪60年代后期发展起来的一项细胞学技术^[2],它借助于一套特殊的处理程序,使染色体显出深浅不同的带纹。染色带的数目、位置、宽窄与浓淡具有相对的稳定性,从而在原来染色体形态的基础上,又增添了一类新的标记,可以作为识别染色体的重要依据。

第一个成功地使用染色体显带的是 T. Caspersson(1969)和他的同事。他们用一种吖啶染料芥子喹因(quinacrine mustard)处理某些植物和动物中期染色体,把制片放在荧光显微镜下观察,发现在紫外光照射下,每一条染色体都呈现出明暗不同的带纹。不久 C. D. Vosa(1970)发现用与芥子喹因类似的喹因(quinacrine)处理,也能使植物染色体显带。与此同时, M. L. Pardue(1970)发现老鼠的染色体经过一定的化学处理,用吉姆萨(Giemsa)染料染色,可使着丝粒周围的异染色质特异显色。在此基础上,徐道觉等创立了C带技术^[2]。起初,C带专指着丝粒区异染色质带。后来发现,其他部位的异染色质也同样显带,因而C带就代表了组成型异染色质带(constitutive heterochromatin band)。随着Giemsa染色前处理程序的变化,染色体可以显示不同的带纹。除了C带以外,还有G、R、Q、N、T等带型。

由于染色体技术的发展,可以更准确地鉴定染色体。通过蛋白酶或酸、碱、盐等化学因素或温度变化等物理因素处理染色体,然后用Giemsa、芥子喹因(guinacrine mustard)等染料进行染色,可使各对染色体上表现出不同的染色带型或荧光域,因而可以在经

典的核型分析 (analysis of karyotype) 基础上, 进一步根据染色体的带型更精细地分析染色体, 故称为染色体带型分析 (banding analysis)。

(三) 生化标记

生化标记主要指同工酶等。同工酶是基因的直接表达产物。1959 年, Market 和 Moller 阐述了乳酸脱氢酶的多种存在形态, 并首先提出了同工酶 (isozyme) 的概念。随着对同工酶的结构功能、基因表达、染色体基因定位等研究的深入展开, 它在植物遗传育种中的应用也越来越引人关注。用同工酶研究小麦、玉米、水稻、大豆、烟草等的进化, 均获得了与经典遗传学研究相一致的结果, 并成功地应用于研究、鉴定各类植物种质资源的地理起源、分类等^[3]。用同工酶研究细胞分化, 组织、器官的生长发育习性以及形态建成等方面也取得了重大进展。近年来, 在植物遗传育种研究领域里, 进一步研究了不同同工酶基因位点与植物的生物学特性、产量性状、抗病性、抗逆性以及产品的品质等数量性状、质量性状的连锁关系或相关性, 同时还研究了这些连锁关系或相关性在植物育种过程中的应用。1971 年 Nei 根据酶、蛋白质电泳迁移率与种间差异的相关性, 用统计学方法对同工酶蛋白质电泳谱带的迁移进行数据处理, 计算种群内基因的多型性, 种群间的不同基因频率及每个位点不同基因的总数, 求得遗传相似系数^[4]。McCune (1969), 进行矮生豌豆生长实验时发现, 其生长速度与过氧化物酶活性成反比, 即生长缓慢时, 过氧化物酶活性较高。Liang (1977)、周人纲 (1983) 报道, 高粱、小麦、玉米伸长节间的过氧化物酶活性与株高呈负相关, 且过氧化物同工酶在高生和矮生品种间有显著差异。De Jong (1968) 用不同温度 13 °C、25 °C、35 °C 处理烟草悬浮培养液, 结果在低温 (13 °C) 条件下, 细胞质体以及线粒体中过氧化物酶的活性明显高于高温 (35 °C) 处理的细胞, 而且同工酶酶带也较多。马国华等 (1992) 报道, 用稻瘟病菌 (*Pyricularia oryzae*) 菌种 ZC₁₅, 分别

给水稻抗病和感病品种接种,发现感病品种比对照的过氧化物酶活性增加少,且不同品种的过氧化物酶活性与病情指数呈负相关。Hunter(1971)分析了 105 个玉米杂交组合及其亲本中的 6 种同工酶,提出同工酶的差异指数可以用来预测一般配合力^[5]。在番茄(Xpucmba 等,1973)、高粱(张维强,1981)等作物中同工酶与作物杂种优势存在一定的相关性^[6]。总之,同工酶作为一种遗传标记应用于植物育种取得了一定的进展。

总的说来,生化标记虽然具有一定的多态性,但其标记数有限,无法满足大量遗传基础变异研究和辅助育种的需要。

(四) 分子标记

广义的分子标记(molecular marker)是指可遗传并可检测的特定 DNA 序列、RNA 或蛋白质。蛋白质标记包括种子贮藏蛋白、同工酶及等位酶等。同工酶是指由一个以上基因位点编码的不同分子形式的酶。等位酶是指由同一基因位点的不同等位基因编码的不同分子形式的酶。狭义的分子标记仅指 DNA(或 RNA)标记,而这个界定现在被广泛采纳。本书所讨论的分子标记也只涉及核酸标记范畴。人类对核酸研究已有 100 多年的历史。早在 1869 年,瑞士医生 Miescher 就开始了核酸的研究。到 1930 年人们才提出两种核酸(RNA 和 DNA)的概念。从此,人们对其化学组成、结构及其功能进行了深入研究。1953 年 Waston 和 Crick 提出了 DNA 双螺旋结构及其半保留复制模型,继而得到了证明。之后,对基因的 DNA 序列及其表达和调控等方面的研究取得了长足进展。20 世纪 60 年代中期,从细胞中分离基因的工作拉开了基因工程的序幕。60 年代末和 70 年代初,人们主要致力于研究基因的体外分离技术。1980 年 Bostein 将生物个体之间 DNA 序列的差异作为标记用于遗传作图,从此开创了在 DNA 水平上研究遗传变异的新阶段。近 10 年来,在人类基因组研究计划(Human Genome Project,简称 HGP)的推动下,分子标记的研究与应用得到了迅速的发展。与

上述 3 种标记相比,分子标记具有以下优越性:①直接以核酸作为研究对象,在植物体的各个组织、各个发育时期均可检测,不受季节、环境限制,与发育时期无关,可用于植物基因型的早期选择。②标记数量极多,遍及整个基因组。③多态性高,由于自然存在着许多等位变异,不需专门创造特殊的遗传材料。④有许多分子标记表现为共显性(codominance),能够鉴别出纯合基因型与杂合基因型,可提供完整的遗传信息^[7]。当前分子标记已应用于诸多生命科学研究领域,如作物遗传资源及育种研究,分别被称为分子种质资源鉴定(molecular germplasm diagnostics)和分子标记辅助育种(molecular plant breeding 或 molecular-assisted breeding)。

目前,分子标记技术(这里指 DNA 或 cDNA 分子水平上的多态性检测技术)已有限制性长度片段多态性(restriction fragment length polymorphisms, RFLPs)、随机扩增多态性 DNA(random amplified polymorphic DNA, RAPD)、扩增片段长度多态性(amplified fragment length polymorphisms, AFLPs)、简单重复序列 SSRs(simple sequence repeats, SSR)、染色体或基因组原位杂交(genomic in situ hybridization, GISH)、mRNA 差别显示(mRNA differential display, mRNA DD)、抑制消减杂交法(suppression subtractive hybridization, SSH)、消减杂交法(subtractive hybridization, SH)、代表性差异分析法(representation difference analysis, RDA)、任意引物 PCR(arbitrary-primer PCR, AP-PCR)、DNA 扩增指纹(DNA amplified fingerprinting, DAF)、单引物扩增反应(single primer amplification reactions, SPARs)、顺序表达位点扩增(sequenced characterized amplified regions, SCARs)、加锚微卫星寡核苷酸(anchored microsatellite oligonucleotides, AMO)、单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)、序列标签位点(sequence-tagged site, STS)^[8,9]等。

以上各种类型的遗传标记方法有其各自的优、缺点,在特定的研究领域中都有不可替代的作用。但从总体上看,理想的遗传标

记应具备以下几条主要标准:①具有较强的多态性;②表现为共显性(codominance),能够鉴别出纯合基因型或杂合基因型;③遍布整个基因组,且分布均匀;④实验程序易自动化,检测手段简单、快速,成本较低;⑤结果重复性好,便于数据交换^[9]。

二、分子生物学发展史上的里程碑——PCR

PCR 体外扩增技术是近年来分子生物学领域的一项重大技术突破,它给整个分子生物学研究方法带来了一次重大的革命,它的广泛应用极大地促进了生命科学的发展。PCR 的出现使得原先难以检测到的单拷贝 DNA 产生的差异扩增数百万倍乃至上亿倍而得以检测。它是绝大多数以核酸作为研究对象的分子标记技术的基础,在分子标记研究上具有至关重要的作用。

(一) PCR 的发明及其基本原理

Khorana 及其同事于 1971 年曾发表文章指出:“经过 DNA 变性,与合适引物杂交,用 DNA 聚合酶延伸引物,并不断重复该过程便可克隆 tRNA 基因。”这是核酸体外扩增最早的设想。但由于当时很难进行测序和合成寡核苷酸引物,而且当时(1970 年)由于 Smith 等发现了 DNA 限制性内切酶,使体外克隆基因成为可能。所以, Khorana 等的早期设想未引起人们的重视。直到 1985 年,美国 PE-Cetus 公司的人类遗传研究室 Mullis 等人才发明了具有划时代意义的聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)^[10],使人们梦寐以求的体外无限扩增核酸片段的愿望成为现实。

PCR 是一种在体外模拟自然 DNA 复制过程的核酸扩增技术,即无细胞分子克隆技术。开始科学家们使用大肠杆菌 DNA 聚合酶 Klenow 来扩增人类基因组中的特异片段。由于该酶不耐热,因此,每次加热变性 DNA 后都要重新补加 Klenow 酶。在操作多份标本时,这一过程耗时、费力,且易出错。1988 年, R. K. Saiki 等^[11]从嗜热菌 *Thermus aquaticus* (Taq) 中分离出热稳定性 DNA 聚合酶(Taq DNA 聚合酶)。该酶虽然在 90 ℃ 以上合成 DNA 的能力有限,但是