

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。他们用一种吡啶染料芥子嗪吡因 (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) 发现用与芥子嗪吡因类似的喹吡因 (quiancrine) 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、芥子嗪吡因 (quinacrine mustard) 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 ℃ 25 ℃ 35 ℃ 处理烟草悬浮培养液, 结果在低温 (13 ℃) 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 ℃) 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 Watson 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。

标记数量极多，遍及整个基因组。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。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 characteried 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；表现为共显性(codominance)，能够鉴别出纯合基因型或杂合基因型；遍布整个基因组，且分布均匀；实验程序易自动化，检测手段简单、快速，成本较低；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。

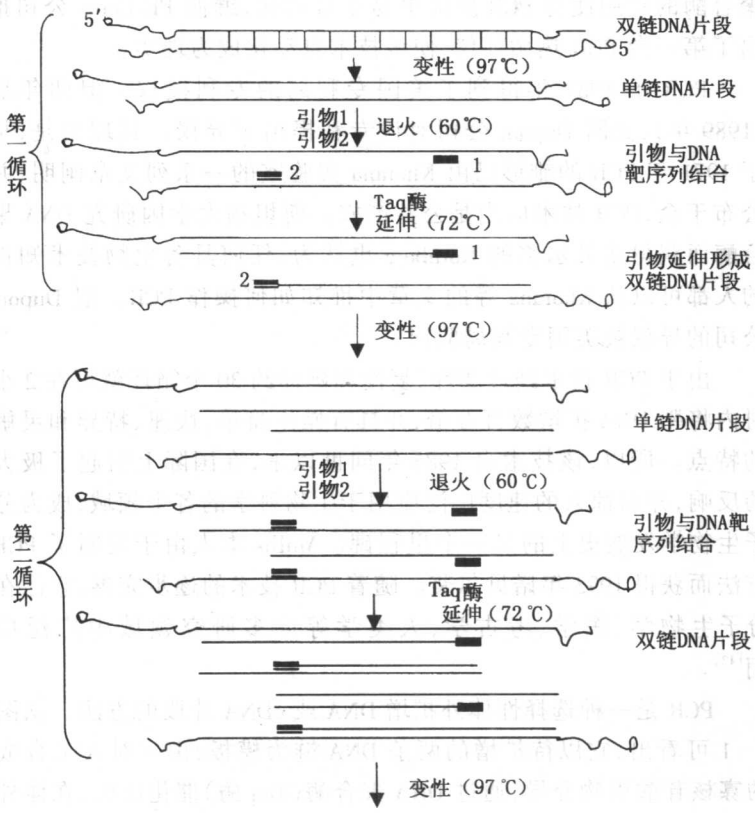
PCR 是一种在体外模拟自然 DNA 复制过程的核酸扩增技术，即无细胞分子克隆技术。开始科学家们使用大肠杆菌 DNA 聚合酶 Klenow 来扩增人类基因组中的特异片段。由于该酶不耐热，因此每次加热变性 DNA 后都要重新补加 Klenow 酶。在操作多份标本时，这一过程耗时、费力，且易出错。1988 年 R. K. Saiki 等^[11]从嗜热菌 *Thermus aquaticus* (Taq) 中分离出热稳定性 DNA 聚合酶 (Taq DNA 聚合酶)。该酶虽然在 90 以上合成 DNA 的能力有限但是

在高温时仍较稳定，而且不会发生不可逆变性。在一个 PCR 预备试验中，每次循环时的上限温度为 95（试管内）处理 20 s 则循环 50 次后 Taq DNA 聚合酶仍可保持 65% 的活性。耐热 Taq DNA 聚合酶的应用使得 PCR 反应更易于自动化，继而 PE-Cetus 公司推出了第一台 PCR 热循环仪，使该技术自动化成为现实。

PCR 于 1987 年得到了美国专利局的专利授权。但两年后 (1989 年)，美国 Dupont 公司对该专利提出了异议。其理由是，早于 1971 年 PCR 的雏形已由 Khorana 实验室的一系列文章阐明，并公布于众，PCR 技术应当是公共产权。斯坦福大学因研究 DNA 聚合酶而获得诺贝尔奖的 Kornberg 也认为，任何具备生物技术知识的人都可以从 Khorana 等的文章中推知如何操作 PCR。但 Dupont 公司的异议被美国专利局驳回。

由于 PCR 技术经过变性、复性和延伸约 30 个循环就可在 2 小时内将靶 DNA 扩增数百万倍，并具有操作简单、快速、特异和灵敏的特点。所以，该技术自 1985 年问世以来，在国际上引起了极大的反响，并以惊人的速度广泛应用于生物科学的各个领域，成为分子生物学发展史上的又一个里程碑。Mullis 本人由于发明了 PCR 方法而获得 1993 年诺贝尔奖。随着 PCR 技术的逐步完善，它已在分子生物学、医学、考古学、人类学等许多研究领域广泛应用^[12]。

PCR 是一种选择性体外扩增 DNA 或 cDNA 片段的方法。从图 1-1 可看出，它以待扩增的两条 DNA 链为模板，由一对人工合成的寡核苷酸引物介导，通过 DNA 聚合酶 (Taq 酶) 催化反应，在体外成百万倍地扩增一段目的序列。其特异性是由两个人工合成的引物序列决定的。所谓引物就是与待扩增 DNA 片段两翼互补的寡聚核苷酸。待扩增 DNA 模板加热变性后，两引物分别与两条单链 DNA 下游 3' 端序列特异复性。此时，两引物的 3' 端相对，5' 端相背。在合适条件下，由 Taq 酶或其他 DNA 聚合酶催化引物引导



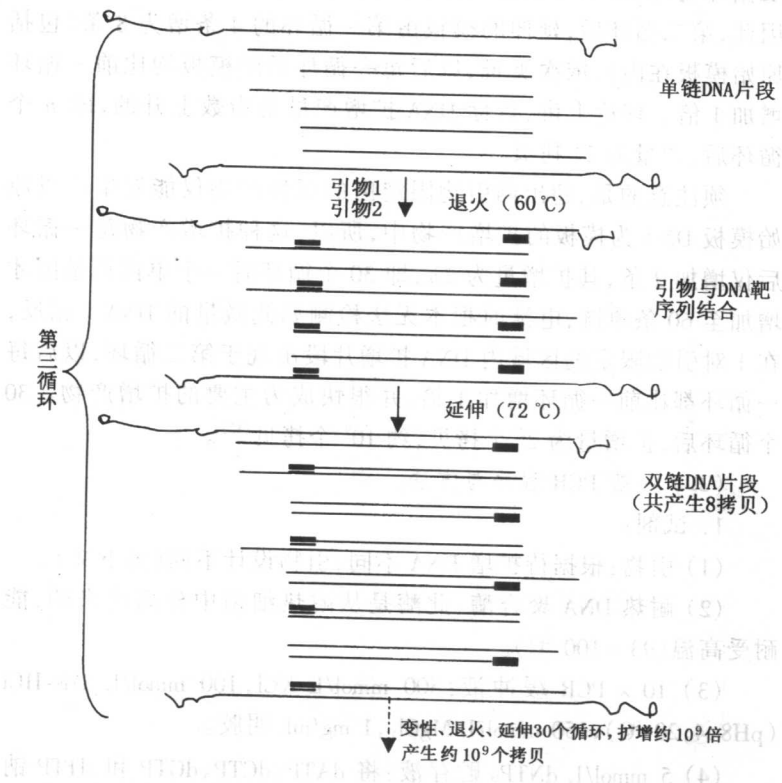


图 1-1 PCR 原理流程图

DNA 新链的合成，即引物的延伸。上述过程是由控制温度实现的。这种热变性—复性—延伸的过程就是一个 PCR 循环（图 1-1）。PCR 就是在合适条件下不断重复这种循环。延伸的产物经第二循环变性后，又与引物互补，作为引物引导 DNA 合成的新模板。因此，第二循环后，延伸的模板由第一循环的 4 条增为 8 条（包括原始模板在内），依次类推，以后每一循环后的模板均比前一循环增加 1 倍。理论上讲，目标 DNA 扩增产量是指数上升的，即 n 个循环后，产量为 2^n 拷贝。

须注意的是，超出两引物限定区的延伸产物仅能发生在以原始模板 DNA 为模板的扩增产物中，所以，这种扩增产物每一循环后仅增加 2 条，其扩增量为 $2n$ 即 30 个循环后一个单拷贝基因才增加至 60 条单链，电泳时根本无法检测如此微量的 DNA。相反，在 1 对引物限定的区域内 DNA 扩增片段出现于第二循环，以后每一循环都比前一循环增加 1 倍，并很快成为主要的扩增产物。30 个循环后，扩增量为 2^{29} 个拷贝 约 10^9 个拷贝^[12]。

（二）一般 PCR 程序与方法

1. 试剂：

（1）引物：根据待扩增 DNA 不同，引物设计不同（见下文）。

（2）耐热 DNA 聚合酶：此酶是从耐热细菌中分离出来的，能耐受高温（93~100℃）。

（3）10 × PCR 缓冲液：500 mmol/L KCl, 100 mmol/L Tris-HCl (pH8.4, 20℃), 150 mmol/L MgCl₂, 1 mg/mL 明胶。

（4）5 mmol/L dNTPs 贮存液：将 dATP、dCTP、dGTP 和 dTTP 钠盐各 100 mg 合并，加入 3 mL 灭菌去离子水溶解，用 NaOH 调 pH 到中性 分装 300 μL，于 -20℃ 保存。dNTP 浓度最好用 UV 吸收法精确测定。另外，现在已有中性 dNTPs 溶液商品供应（Sigma 公司、Simgon 公司和 Pharmacia 公司等）。

（5）DNA 模板制备试剂：不同 DNA 标本所需试剂不同，根据

具体情况而定（见后续有关章节）。

2. 操作程序:PCR 操作程序基本相同,只是根据引物与靶序列的不同,选择不同的反应体系与循环参数。基本的操作是将 PCR 反应必需成分加入一微量离心管中,然后置于一定的循环参数条件下进行循环扩增。每个实验室或每个研究者可有不同的操作方法,但须遵守一定的操作规范,才能保证试验结果有可比性和参考价值。基本程序操作如下:

(1) 向一微量离心管中依次加入:

10 × PCR 缓冲液	1/10 体积
dNTPs	各 200 μmol/L
引物	各 1 μmol/L
DNA 模板	10 ² ~ 10 ⁵ 个拷贝
ddH ₂ O	补至终体积 (终体积 50 ~ 100 μL)

混匀后 离心 15 s,使反应成分集中于管底。

(2) 加石蜡油 50 ~ 100 μL 于反应液表面以防蒸发。将反应管置于 97 变性 6 min。

(3) 冷却至延伸温度 72 时,加入 1 ~ 5 U Taq DNA 聚合酶,在此温度下作用 1 min。

(4) 于变性温度下,使模板 DNA 变性适当时间。

(5) 在复性温度 60 下,使引物与模板杂交一定时间。

(6) 在延伸温度 72 下,使复性的引物延伸合适的时间。

(7) 重复 (4)~(6) 步骤 25 ~ 30 次 每次即为一个 PCR 循环。

(8) 微量琼脂糖凝胶电泳检查扩增产物。

合适的 PCR 引物,能使其有效地扩增模板 DNA 序列。引物质量的优劣直接关系到 PCR 的特异性及成功与否,是 PCR 的关键所在。PCR 引物质量优劣则取决于核苷酸序列的设计。对引物的设计不可能有一种包罗万象的规则确保 PCR 成功,但通过计算机的帮助,并遵循以下原则,则有助于引物的设计。

长度：寡核苷酸引物的长度为 15 ~ 30 bp，一般为 20 ~ 27 bp。

G + C 含量：G + C 含量一般为 40% ~ 60%。使 T_m 值接近 72℃，达到复性的最佳条件。

碱基的随机分布：引物中四种碱基的分布最好是随机的，不要有聚嘌呤或聚嘧啶存在。尤其 3'端不应有超过 3 个连续的 G 或 C 因为这样会使引物在 G + C 富集序列区错误引发。

④ 避免引物互补：引物自身不应存在互补序列，否则引物自身会折叠成发夹状结构，或引物本身复性。引物自身连续互补碱基不能大于 3 bp。同时，两引物之间也不能有互补性，尤其应避免 3'端的互补重叠以防引物二聚体的形成。一对引物间不应多于 4 个连续碱基有同源性或互补性。

引物末端的修饰：由于引物的延伸是从 3'端开始的，因而 3'端不能进行任何修饰。引物的 5'端则可以被修饰而不影响扩增的特异性。引物 5'端修饰包括：加酶切位点；标记生物素、荧光素、地高辛、 Eu^{3+} 等；引入突变位点，插入与缺失序列和引入启动子序列等。

密码子的简并：在扩增编码区域，引物 3'端不要终止于密码子的第 3 位，因密码子的第 3 位易发生简并，会影响扩增特异性与效率。

引物的特异性：引物与非特异扩增序列的同源性不要超过 70%或有连续 8 个互补碱基同源。

(三) PCR 条件的优化

由于 PCR 的反应成分之间（尤其是引物和 DNA 样品之间）存在着非常复杂的相互作用，影响扩增反应专一性的因素很多，而且这项技术的应用范围很广泛，因此，不可能有一套对所有情形都最适宜的扩增条件。但在多数情况下，采用上述条件，常常能获得满意的结果。在特定试验中对反应参数加以修改也是必要的，这样

才能获得专一性强、产量高的 PCR 反应结果。

1. 待扩增的模板核酸：PCR 反应的模板可以是 DNA 或 RNA（先反转录为 cDNA），模板加入量一般为 $10^2 \sim 10^5$ 个拷贝。核酸标本来源可以不同，但无论标本来源如何，待扩增核酸都必须纯化，主要使核酸标本中不含 DNA 聚合酶抑制剂。扩增靶序列的长度根据不同目的而定，一般用于检测 DNA 多态性的扩增片段长度为 500 bp 以内，以 100 ~ 300 bp 为好。这里需要注意的是，RNA 的扩增须首先逆转录成 cDNA 后才能进行正常 PCR 循环。

2. 引物的质量：合成的引物必须经聚丙烯酰胺凝胶电泳或反向高压液相层析（HPLC）纯化。因为合成的引物中会有相当数量的“错误序列”，其中包括不完整的序列和脱嘌呤产物以及可检测到的碱基修饰的完整链和高分子量产物，这些序列可导致非特异扩增和信号强度的降低。因此，PCR 所用引物质量要高，且须纯化。

3. 引物的用量：一般 PCR 反应中引物的终浓度为 0.2 $\mu\text{mol/L}$ 。在此范围内，PCR 产物量基本相同。但引物低于 0.2 $\mu\text{mol/L}$ 时，则产物量降低。引物浓度过高，会促进引物的错误引导而合成非特异产物，还会增加二聚体的形成。非特异产物和引物二聚体也是 PCR 反应的底物，与靶序列竞争 DNA 聚合酶、dNTPs 底物，从而使靶序列的扩增量降低。

4. 缓冲液：目前最为常用的缓冲体系为 10 ~ 50 mmol/L Tris - HCl (pH8.3 ~ 8.8, 20)。Tris 是一种双极性离子缓冲剂。PCR 缓冲液的变化通常会影响到扩增结果，特别是 MgCl_2 ，其浓度对扩增作用的专一性和扩增量有重大影响。改变 MgCl_2 的浓度可以进一步提高反应的专一性，这主要是通过提高反应的严谨性或影响酶活性等来实现的。

5. 其他：通过调节退火时的温度，可以在一定程度上控制退火过程的严谨性。尽量缩短退火和延伸过程的时间，将会减少由

过剩 DNA 聚合酶导致的错误启动和延伸作用的机会。降低引物和聚合酶的浓度也将减少错误启动（尤其是导致形成二聚体）的发生。扩增染色体 DNA 时至少需 25 ~ 30 个循环，如在第 15 个循环后补加一些 Taq 酶会获得更好的扩增效果。

（四）PCR 的应用

PCR 技术具有简便、快速、灵敏度极高、特异性强等优点。因此，PCR 技术广泛地用于分子生物学研究、传染病的早期快速诊断、遗传病的诊断、癌细胞与癌基因的检测、法医学鉴定、考古学研究及性别鉴定等。在植物分子生物学研究领域，PCR 主要用于以下几个方面。

1. PCR 用于基因克隆与分离：在 PCR 引物中附加酶切位点，扩增的 DNA 经酶切后，可直接克隆到质粒或 M13 噬菌体载体中。这种方法比构建噬菌体质粒文库、重组克隆的筛选和酶切图谱制作以及亚克隆等方法简单得多，快得多。但这种方法需预先知道目的片段两翼或其附近的序列。除加酶切位点外，PCR 产物还可以进行钝端克隆，或用一种称为无连接酶亚克隆（ligase-free subcloning, LFS）法进行克隆。用 PCR 法获得待克隆的目的片段时，可采用任何标准化的方法进行扩增。须指出的是，扩增循环数应尽量少，一般限定在 25 ~ 30 个循环内。因为这可减少因 PCR 平台期所产生的非特异扩增产物的干扰。有人也曾将 T71 噬菌体的启动子区掺入到扩增 DNA 片段的末端，从而使 DNA 片段在体外就可利用噬菌体的 RNA 聚合酶进行转录，而不需要通过复杂的克隆过程。

2. PCR 用于 DNA 的序列分析：PCR 技术还可直接用于 DNA 序列分析。它与传统方法有很大的不同。它直接从基因组或克隆片段中制备测序模板，比以前的细胞依赖性 DNA 扩增方法更为有效，完全避免了细菌培养、模板提取这些重复性操作。它与自动测序技术相结合后成为一种最快、最有效的测定核苷酸序列的方法。

PCR 产物可以克隆到载体内进行测序，或不用克隆而直接进行测序。由于亚克隆费时，且有可能造成序列错误，因此，目前大部分 PCR 测序工作致力于产物的直接测序。与 PCR 片段克隆到质粒或病毒载体内进行测序相比，直接测序法有两大优点：第一，易于标准化与自动化，因为该方法不依赖于生物体；第二，更快速，更可靠。Taq DNA 聚合酶由于有错误掺入的问题，产物直接测序往往需测定几份 PCR 产物，因此，为弥补 Taq DNA 聚合酶的缺陷而进行的多份重复测序为该法的可靠性提供了保证。Gyllensten 等(1988)曾成功地用 PCR 扩增并分离出自人类亮氨酸 DQ α (human leucocyte antigen, DQ α 简称 HLA-DQ α) 基因座上的等位变异子，并直接测定了 HLA-DQ α 基因座单链 DNA 的序列。

3. PCR 用于生物进化研究：扩增 DNA 的快速测序可直接获得可比较的资料，而无须进行费时费力的克隆。这一技术在群体生物学中不仅可用于物种起源的研究，还可用于物种基因进化的研究。自 1962 年 Zuckerkandl 和 Pauling 提出蛋白质序列和基因序列的比较可以像分子钟一样用于标志现存物种分化的时间以来，各种生化方法被用于系统发育的研究。同功酶的电泳分析、免疫学比较、蛋白质序列分析、DNA-DNA 杂交、核糖体 RNA 序列分析先后被广泛地应用，为生物进化学做出了重要贡献。但这些技术大多有局限性，因为它们都是间接估计而不是直接测定序列的差别。而近年来的筛选克隆文库、制作克隆子的图谱及测序虽然是直接测定序列的差别，但所需的工作量非常大，以至不可能对待测物种进行更多的个体检测。聚合酶链反应克服了用于进化研究的传统 DNA 分析法的局限性。序列的快速扩增使在 DNA 序列水平上进行大量的种群研究成为可能。单链扩增能对几十或几百个个体进行快速测序而不经以前所需的繁琐的克隆步骤。一旦得到了一组具有代表性的序列数据，可用更方便而简单的分析方法，如用等位基因寡聚核苷酸探针来获得等位基因的序列数据。由序列分析

中得出的数据可为各种类群的生物提供一个共同的系统发育框图。Thomas及助手通过保存标本的皮肤 mtDNA 扩增研究了 70 年内的一系列啮齿动物类群。另外，对进化速度较快的基因（如线粒体细胞色素 *b* 基因）的扩增和 DNA 测序可提供不同个体间的许多差异信息，并且可产生比同工酶分析和限制性内切酶图谱分析分辨力更好的结果。Vigilant 等选择高度变异的线粒体 DNA (mtDNA) 区作为 PCR 扩增的靶分子，从 15 名 Kung 人群（南非一种过着与世隔绝的生活的人群）和其他人群发根中扩增 mtDNA 测序后构建成了这些人群 mtDNA 的发生树^[12]。这一研究为关于人类线粒体 DNA 发生树起源于非洲之说提供了有力的证据。

4. PCR 用于分子分类学：利用核酸序列数据分析进行分类研究所达到的分辨率是其他方法无法比拟的。但在过去，序列比较数据的积累过程是十分繁琐的。由于利用 PCR 技术可快速获得序列资料，并可直接进行序列间差异的比较，而不需进行杂交、电泳或分析细胞核或细胞器 DNA 的限制图谱。更为重要的是，利用该技术获得的序列资料，不仅可以对现代生物进行分类学研究，亦可对已灭绝物种与现代物种间的关系进行研究。因为只要有靶序列的几个分子，扩增就可以完成。许多以前很难进行分子分类分析的样品都可以使用。有人曾用 PCR 技术获得两种灭绝动物——斑驴和袋狼的序列资料，得出灭绝袋狼与其他澳大利亚食肉有袋动物同样的结论^[12]。这是首例利用 PCR 对博物馆保存的标本进行分子分类工作的报道。还有人在佛罗里达泥炭沼泽中保存了 7000 年的脑 DNA 中发现其含有一个在现存土著美洲人中不存在的 mtDNA 特殊类型。这为人们利用现代分子生物技术将古代人群与现代人群进行比较提供了一定的理论基础。由 PCR 技术所提供的快速测序法，促进了分子数据在各种分类研究中的应用，也促使分子分类学的范围大大扩展^[12,13]。

素有“化石”之称的 rRNA 在分子分类中是用于分析的首选模

板序列，通过分析 rRNA 可比较界或门分类水平上的生物。用 PCR 扩增的 rRNA 已越来越广泛地应用于不同物种的遗传聚类分析。Bruns 等扩增和测序了线粒体 rRNA 基因，并证明了根须腹菌属（腹菌科）内的腹菌与牛肝菌属蘑菇非常近缘。这两种菌依其形态特征被划分在牛肝菌科的不同位置，而用 PCR 扩增的线粒体 rRNA 基因在测序后的遗传聚类分析表明，根须腹菌属与牛肝菌属有共同的祖先，根须腹菌属已经历了一个快速形态进化过程，使之形成地下腹菌的生活方式。Young 等在研究一些具有豆科植物的固氮共生根瘤菌和紫色光养菌两种菌共同特征的细菌时，通过对 PCR 产物 rRNA 进行测序与遗传聚类分析，证明这些菌和根瘤菌、紫色光养菌归为一个属^[12]。

5. PCR 用于基因表达和外源基因追踪的检测：PCR 技术除了应用于遗传变异的分析外，它还是检测基因表达的有效方法。这种 PCR 是通过用反转录酶从一个 mRNA 转录子上合成 cDNA 作为 PCR 模板来完成的。现在这种方法已经在许多研究中用来检测一些特殊细胞株中罕见的 mRNA 分子。最近，已报道了特异 mRNA 转录子的定量分析。这种方法是在引物中掺入噬菌体启动子，这样就可以从扩增 DNA 片段上合成出 RNA 的转录子。通过在合适的引物中引进翻译起始信号，可在体外翻译这些 RNA 拷贝。另外，在外源基因追踪的研究中，PCR 技术不仅能简单快速地检测目的基因是否导入植株，而且还可检测导入目的基因的完整性。

除常规 PCR 之外，近来又发展出了诸如不对称 PCR、复合 PCR、反向 PCR 等适合不同目的要求的 DNA 体外扩增方法。随着 PCR 技术的日臻完善，其应用范围必将更加广泛。

三、植物分子标记常用技术系统概述

（一）限制性扩增片段长度多态性（RFLP）

RFLP 是最早发展的分子标记技术。这是一项利用放射性核素（通常用 ³²P）或非放射性物质（如地高辛）标记探针，与转移于支