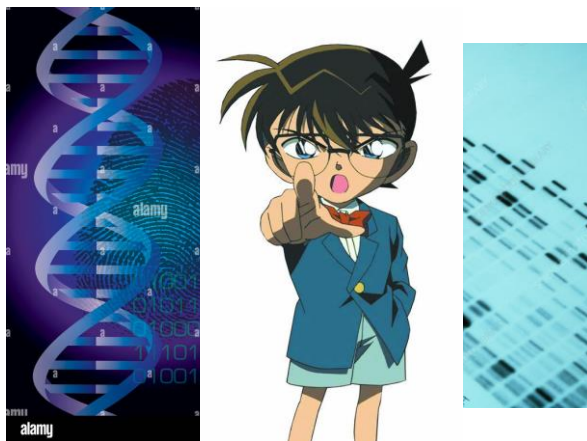


第三章 分子标记技术

第一节 遗传标记

第二节 DNA分子标记的主要类型

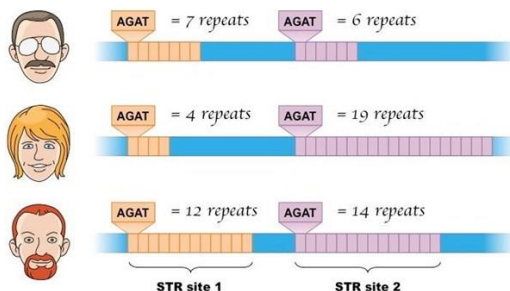
第三节 分子标记的应用



为何可以根据DNA来进行破案？

遗传指纹/DNA指纹图谱

DNA 指纹图谱反映的是基因组中高变区，由多个位点上的等位基因所组成的图谱必然具有很高的变异性。DNA指纹图谱在个体或群体之间表现出高度的变异性，即不同的个体或群体有不同的DNA 指纹图谱。



第一节 遗传标记

遗传标记

- 有可以识别的标记，才能确定目标的方位及彼此之间的相对位置。
- 构建遗传图谱就是寻找基因组不同位置上的特征标记。
- 包括：
 - 形态标记
 - 细胞学标记
 - 生化标记
 - DNA分子标记

多态性(polymorphism)

所有的标记都必须具有多态性！

多态性：不同的存在形式 or 相对差异。

- ❖ 花色：白色、红色
- ❖ 株高：高、矮
- ❖ 血型：A、B、O型
- ❖ 淀粉：糯、非糯

所有多态性都是基因突变的结果！

形态标记

- 形态性状：株高、颜色、白化症等
- 又称表型标记
- 数量少
- 很多突变是致死的
- 受环境、生育期等因素的影响



细胞学标记

- ❖ 明确显示遗传多态性的染色体结构特征和数量特征。

染色体的核型

染色体的带型

染色体的结构变异

染色体的数目变异

- ❖ 优点：不受环境影响
- ❖ 缺点：数量少、费力、费时、对生物体的生长发育不利

生化标记

- ❖ 又称蛋白质标记
- 利用蛋白质的多态性作为遗传标记。
- 如：同工酶、贮藏蛋白
- ❖ 优点：数量较多，受环境影响小
- ❖ 缺点：受发育时间的影响
 - 有组织特异性
 - 只反映基因编码区的信息

★ DNA分子标记

简称分子标记，以DNA序列的多态性作为遗传标记。

优点：

- ❖ 不受时间和环境的限制
- ❖ 遍布整个基因组，数量无限
- ❖ 不影响性状表达
- ❖ 自然存在的变异丰富，多态性好
- ❖ 共显性，能鉴别纯合体 and 杂合体
- ❖ 检测手段简单、迅速

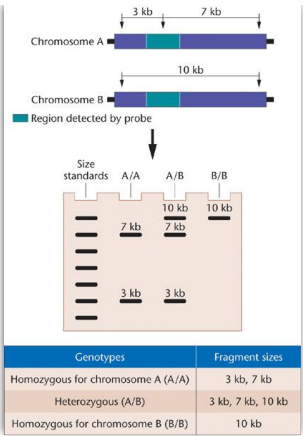
- I. 基于DNA-DNA杂交的DNA标记
- II. 基于PCR的DNA标记
- III. 基于PCR与限制性酶切技术的DNA标记
- IV. 基于单核苷酸多态性的DNA标记

第二节 DNA分子标记的主要类型

I. 基于DNA-DNA杂交的DNA标记

限制性片段长度多态性
(restriction fragment length polymorphism, RFLP)

- ❖ DNA序列能或不能被某种限制性核酸内切酶酶切，相当于一对等位基因的差异。
- ❖ 如有两个DNA分子，一个具有某一种酶的识别序列和酶切位点，而另一个没有，酶切后形成的DNA片段长度就有差异，即多态性。
- ❖ 可将RFLP作为标记，定位在基因组中特定位置上。
- ❖ 人类基因组中有10⁵个RFLP位点，每一位点只有两个等位变异(等位基因)。



RFLP分析

- ◆ RFLP标记的优点：
 - ◆ 大多为共显性；
 - ◆ 标记的重复性和稳定性好。
- ◆ RFLP标记的缺点：
 - ◆ 实验操作较复杂，检测周期长，成本高，不适于大规模的分子育种；
 - ◆ 检测中要利用放射性同位素，易造成污染；
 - ◆ 非放射性标记法价格高、杂交信号弱，灵敏度低。

II. 基于PCR的DNA标记

微卫星(microsatellite)标记

❖ 微卫星又称为简单重复序列 (simple sequence repeat, SSR) 或短串串联重复序列 (short tandem repeat, STR)。

❖ 这种重复序列的重复单位很短，常常只有2个、3个或4个bp。

❖ 如一条染色体TCTGAGAGAGACGC；另一条染色体TCTGAGAGAGAGAGAGACGC，就构成了多态性。

❖ 水稻中大约有20000个SSR标记。

NATURE VOL. 314 7 MARCH 1985

ARTICLES

87

Received 29 September 1984; accepted 7 January 1985.

1. Berglund, R. & Cawley, S. C. *Schilling, J.-G., Tassone, D. L. & Olson, P. Nature* **305**, 279-279 (1983).
2. Kallunki, J. M. & Rine, N. M. *Gene* **100**, 111-112 (1979).
3. Olson, P., Yoon, D. A. & Berglund, R. *J. genotyp. Res.* **90**, 421-424 (1984).
4. Olson, P. *J. Nature* **306**, 208-211 (1983).
5. Olson, P. *J. genotyp. Res.* **90**, 1082-1084 (1984).
6. Olson, P. *J. Nature* **306**, 42-45 (1983).
7. Schilling, J.-G. *Nature* **302**, 565-571 (1978).
8. Hart, S. R., Schilling, J.-G. & Powell, S. L. *Nature* **246**, 104-107 (1973).
9. Hart, S. R., Talmont, M. & Schilling, J.-G. *Science* **190**, 141-143 (1975).
10. Schilling, J.-G. & Van Nieuwen, A. *Gene* **36**, 1-14 (1974).
11. Morgan, W. J. *J. genotyp. Res.* **85**, 515-520 (1978).
12. Schilling, J.-G., Morgan, W. J. & Thomas, J. P. *J. genotyp. Res.* **87**, 559-569 (1982).
13. Yoon, D. A. & Schilling, J.-G. *J. genotyp. Res.* **87**, 571-574 (1982).
14. Yoon, D. A., Schilling, J.-G. & Waggoner, D. G. *Nature* **306**, 416-417 (1983).
15. Schilling, J.-G., Thompson, G., Kallunki, R. & Hamilton, S. *Nature* **313**, 157-158 (1985).
16. Visk, G. E. *J. genotyp. Res.* **87**, 938-939 (1984).
17. Schilling, J.-G. *et al.* *Am. J. Sci.* **283**, 719-720 (1985).
18. Nussenzweig, E. G. & Schilling, J.-G. *Constr. Molec. Biol.* **45**, 209-223 (1984).
19. Schilling, J.-G. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**, 322 (1983).
20. Schilling, J.-G., Volz, R. & Berglund, R. *Trans. Am. Genet. Soc.* **104**, 405 (1980).
21. Morgan, W. J. *The Gene* **5**, 445-447 (1981).
22. Morgan, W. J. *Transposition* **94**, 123-139 (1983).
23. Olson, P. A. *Transposition* **94**, 140-142 (1983).
24. Olson, P. A. *J. genotyp. Res.* **89**, 910-919 (1984).
25. Morgan, W. J. & Schilling, J.-G. *J. genotyp. Res.* **85**, 531-534 (1978).
26. Yoon, D. A. *Gene* **36**, 209-213 (1974).
27. Anderson, R. N., McKinnon, M. & Schilling, J.-G. *Environ. Biol. Fish.* **18**, 391-407 (1977).
28. Waggoner, D. G., Volz, R. & Schilling, J.-G. *Trans. Am. Genet. Soc.* **104**, 423 (1981).
29. Roberts, M. L. & Schilling, J.-G. *PNAS* **82** (in the press).

Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA

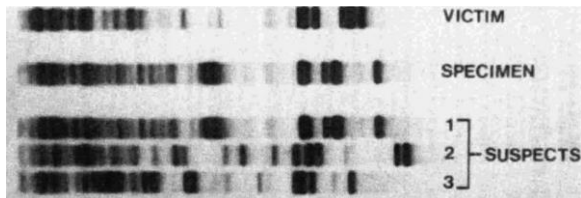
Alec J. Jeffreys*, Victoria Wilson* & Swee Lay Thein†

* Department of Genetics, University of Leicester, University Road, Leicester LE1 7RH, UK.

† MRC Molecular Haematology Unit, Nuffield Department of Clinical Medicine, John Radcliffe Hospital, Headington, Oxford OX3 9DU, UK.

The human genome contains many dispersed tandem-repetitive 'minisatellite' regions detected via a shared 10-15-base pair 'core' sequence similar to the generalized recombination signal (x) of Escherichia coli. Many minisatellites are highly polymorphic due to allelic variation in repeat copy number in the minisatellite. A probe based on a tandem-repeat of the core sequence can detect many highly variable loci simultaneously and can provide an individual-specific DNA 'fingerprint' of general use in human genetic analysis.

Who killed Cock Robin?



ONATURE

NATURE VOL. 316 4 JULY 1985

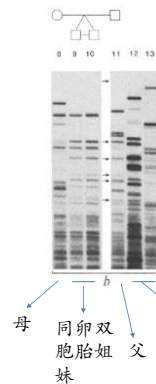
Individual-specific 'fingerprints' of human DNA

A. J. Jeffreys*, V. Wilson* & S. L. Thein†

* Department of Genetics, University of Leicester, University Road, Leicester LE1 7RH, UK.

† MRC Molecular Haematology Unit, Nuffield Department of Clinical Medicine, John Radcliffe Hospital, Headington, Oxford OX3 9DU, UK.

Simple tandem-repetitive regions of DNA (or 'minisatellites') which are dispersed in the human genome frequently show substantial length polymorphism arising from unequal exchanges which alter the number of short tandem repeats in a minisatellite¹⁻³. We have shown previously that the repeat elements in a subset of human minisatellites share a common 10-15-base-pair (bp) 'core' sequence which might act as a recombination signal in the generation of these hypervariable regions⁴. A hybridization probe consisting of the core repeated in tandem can detect many highly polymorphic minisatellites simultaneously to provide a set of genetic markers of general use in human linkage analysis⁵. We now show that other variant (core), probes can detect additional sets of hypervariable minisatellites to produce somatically stable DNA 'fingerprints' which are completely specific to an individual (or to his or her identical twin) and can be applied directly to problems of human identification, including parenthood testing. Three human minisatellites, termed 31.5, 33.6 and 33.15, each comprised of tandem repeats of various versions of the core sequence, have been cloned previously and characterized⁶ (Fig.

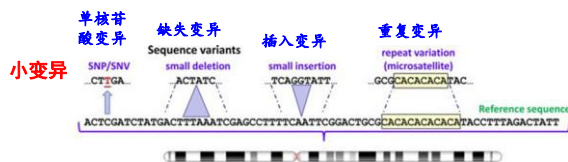


DNA序列变异的类型

讨论:

DNA为何可以作为“指纹”？

不同的个体间DNA序列存在差异 (变异variation)！



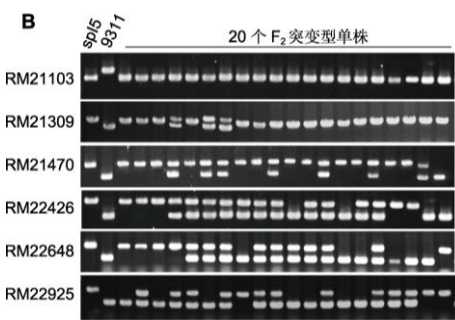
大变异

不同个体/群体间的DNA差异

变异 (variation)

即为多态性 (polymorphism)

个体间基因的核苷酸序列存在的碱基组成或长度上的差异性,可以分为两类,即DNA残基组成多态性和长度多态性。



◆ SSR标记的优点:

- ◆ 共显性标记, 可鉴别杂合子和纯合子;
- ◆ DNA样品量少, 对DNA质量要求不苛刻;
- ◆ 重复性好, 可靠性高;
- ◆ 具有大量的等位差异, 多态性十分丰富。

◆ SSR标记的缺点:

- ◆ 必须知道重复基序两端的DNA序列信息。如不能直接从DNA数据库查寻, 则首先必须对其进行测序, 再设计引物, 开发成本高。

III. 基于PCR与限制性酶切技术

酶切扩增长度多态性 (CAPS)

对PCR扩增片段的限制性酶切来揭示被扩增区段多态性。

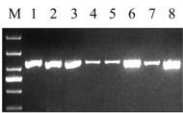


图2 HaeIII酶对引物con259在8个品种中的PCR扩增产物的酶切结果
注: M: DL1000 marker; 1~8: 1~8号品种PCR产物的电泳条带; 9~16: 8个品种PCR产物的酶切结果

◆ CAPS标记的优点:

- ◆ 引物与限制性内切酶组合很多;
- ◆ 共显性;
- ◆ 所需DNA量少;
- ◆ 结果稳定可靠;
- ◆ 操作简便、快捷、自动化程度高。

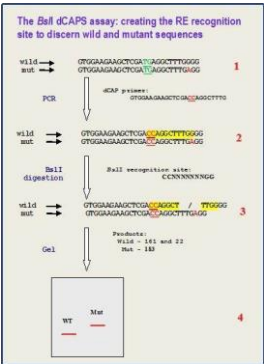
◆ CAPS标记的缺点:

- ◆ 在多倍体中应用有局限;
- ◆ 限于突变位点能产生或破坏限制酶识别位点。

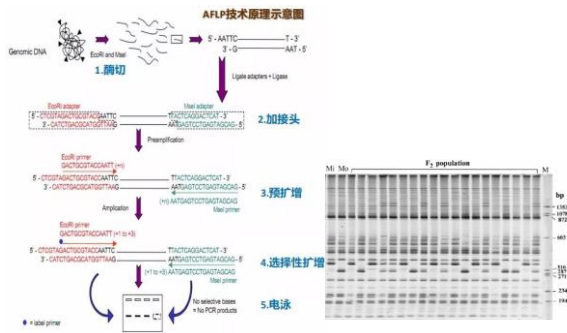
dCAPS标记

CAPS标记衍生的分子标记, 通过引物引入错配碱基, 从而构建或去除限制性内切酶识别位点。

dCAPS没有CAPS对限制性内切酶的限制, 几乎所有SNP都可转化为dCAPS标记。



扩增限制性内切酶片段长度多态性 (AFLP)



◆ AFLP标记的优点：

- ◆ 可靠、高效，可在一个反应内检测大量限制性酶切片段；
- ◆ 显性/共显性；
- ◆ 不需要标记开发成本；
- ◆ 不需要基因组DNA序列信息；
- ◆ 只需很少量DNA。

◆ AFLP标记的缺点：

- ◆ 对基因组DNA样品质量要求高；
- ◆ 多数情况采用银染，费时耗财；
- ◆ 在染色体上不均匀分布，常在着丝粒附近高度聚集；
- ◆ 目前仍受专利保护，试剂盒较贵。

IV. 基于单核苷酸多态性

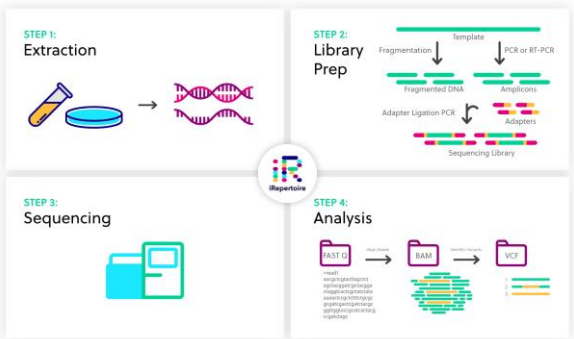
SNP标记

- Single nucleotide polymorphism
- 单核苷酸多态性
- DNA分子中单个核苷酸的变异。
- SNP：DNA分子中碱基替换形成的。
- SNP在基因组中大量存在！人类基因组中有142万个SNP标记！水稻有170万个！

SNP标记的优点：

- ◆ 数量多、覆盖密度大；
- ◆ 一般仅2个等位基因，分型简单；
- ◆ 遗传稳定性强；
- ◆ 多态性丰富。

基于二代测序技术 (NGS) 基因组测序技术



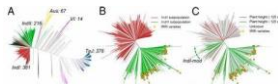
第三节 分子标记的应用

(1) 分子标记与资源评价

分子标记技术主要应用：

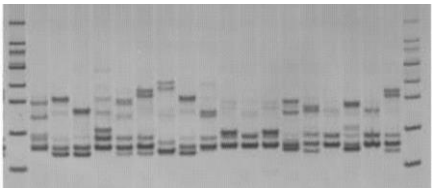
- (1) 分子标记与资源评价；
- (2) 分子标记与品种鉴别；
- (3) 分子标记与基因定位；
- (4) 分子标记辅助选择与作物改良。

- ◆ 分子生物学技术的快速发展为遗传多样性检测提供了更直接、更精确的方法，即直接检测DNA本身序列变化。
- ◆ 由于避免了根据表型来推断基因型时可能产生的各种问题，DNA分析方法成为目前最有效的遗传分析方法。
- ◆ 来自DNA的遗传标记几乎是无穷尽的，克服了其他类型遗传标记数量有限的不足。



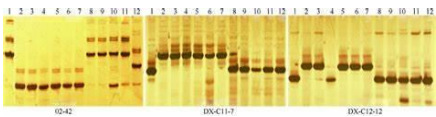
(2) 分子标记与品种鉴别

传统通过鉴定作物农艺性状进行品种鉴别具有局限性。
DNA指纹图谱：能够鉴别生物个体之间差异的DNA电泳图谱。该方法具有高度的个体特异性和环境稳定性，用途广泛。

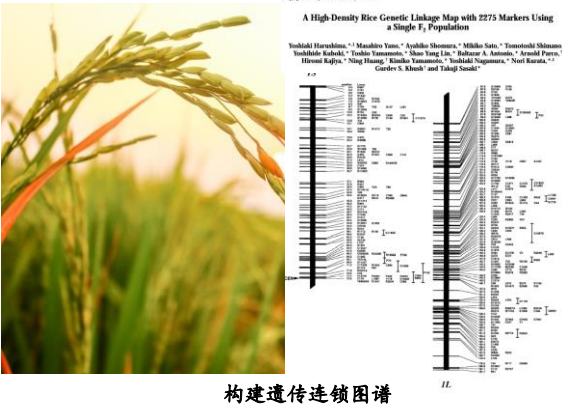
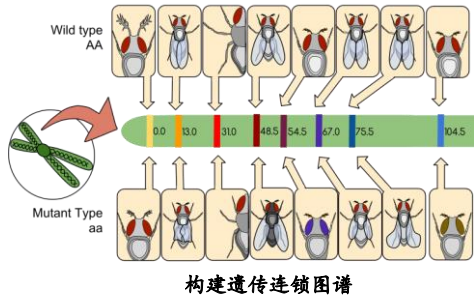


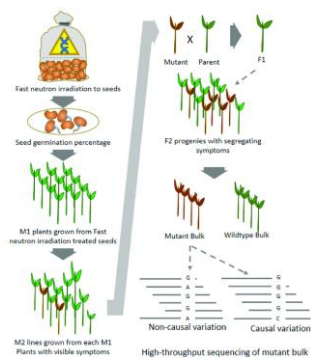
- ◆ 品种鉴定与知识产品保护；
- ◆ 品种纯度和真实性检测；
- ◆ 品种亲缘关系和分类研究。

植物新品种测试(DUS)：对申请保护的植物新品种通常要进行**特异性(distinctness)**、**一致性(uniformity)**和**稳定性(stability)**的栽培鉴定试验或室内分析测试。

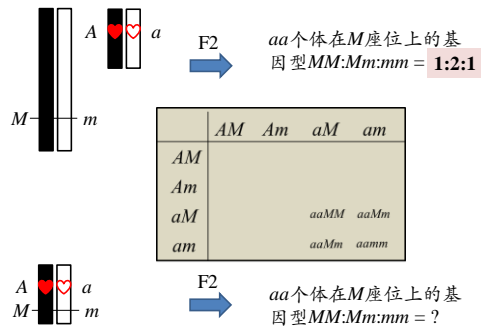


(3) 分子标记与基因定位



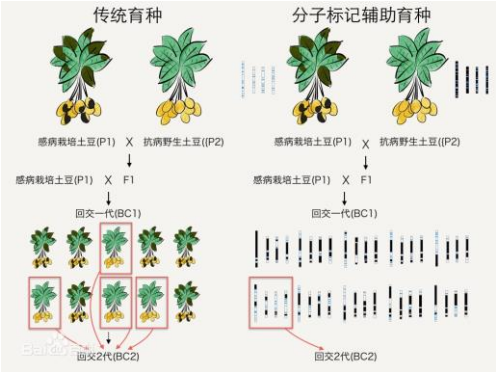


基因/QTL定位



基因/QTL定位

(4) 分子标记辅助选择与作物改良



分子标记辅助选择 (MAS, Marker Assisted Selection)：是指通过分析与目标基因紧密连锁的分子标记的基因型，借助分子标记对目标性状基因型进行选择。

分子标记辅助育种**缩短育种年限，加快育种进程，提高了育种效率**，克服了很多常规育种方法中的困难。

前提条件：易于检测的紧密连锁的分子标记！