

# DNA 分子标记的研究进展及几种新型分子标记技术

关 强<sup>1</sup>, 张月学<sup>2</sup>, 徐香玲<sup>1</sup>, 孙德全<sup>2</sup>, 李绥艳<sup>2</sup>, 林红<sup>2</sup>, 潘丽艳<sup>2</sup>, 马延华<sup>2</sup>

(1. 哈尔滨师范大学生命与环境科学学院, 哈尔滨 150080; 2. 黑龙江省农业科学院草业研究所, 哈尔滨 150086)

**摘要:** 分子标记是继形态标记、细胞标记和生化标记之后发展起来的一种比较理想的遗传标记技术。综述了 DNA 分子标记的类型, 基本原理和特点, 同时还对几种最新出现的分子标记技术作了简要的介绍。  
**关键词:** 新型 DNA 分子标记; RGAs 标记; RMAPD; SRAP; TRAP  
**中图分类号:** Q78      **文献标识码:** A      **文章编号:** 1002-2767(2008)01-0102-03

## Development of DNA Molecular Marker and Several New Types of Molecular Markers

GUAN Qiang<sup>1</sup>, ZHANG Yue-xue<sup>2</sup>, XU Xiang-ling<sup>1</sup>, SUN De-quan<sup>2</sup>, LI Sui-yan<sup>2</sup>,  
LIN Hong<sup>2</sup>, PAN Li-yan<sup>2</sup>, MA Yan-hua<sup>2</sup>

(1. Life and Environmental College, Harbin Normal University, Harbin 150080; 2. Pratacultural Science Institute, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086)

**Abstract:** DNA molecular marker is a comparatively ideal genetic markers developed after the shape marker, cellular marker and biochemical marker. In this paper, the types basic principles and characters were summarized, meanwhile, several new types of molecular markers were introduced which appeared recently.  
**Key words:** DNA molecular marker; RGAs markers; RMAPD; SRAP; TRAP

DNA 分子标记技术研究始于 19 世纪 80 年代, 是指能够反映生物个体或种群间基因组中某种差异的特异性 DNA 片段, 是 DNA 水平上遗传多态性的直接反映, 大多数 DNA 分子标记以电泳谱带的形式表现个体之间的 DNA 差异<sup>[1]</sup>, 是生物分类学、育种学、遗传学和物种起源与进化等研究的重要技术指标之一。DNA 分子标记有以下优点: (1)具有较强的多态性; (2)直接以 DNA 为表现形式。不受环境、季节限制, 不受个体发育阶段的影响, 不存在基因表达与否的问题, 没有组织及器官特异性; (3)许多分子标记表现为共显性; (4)数量的丰富性; (5)表现为“中性”; (6)经济方便和易于观察记录<sup>[2]</sup>。

根据北京农科院王军等<sup>[1]</sup>, 通过检测手段或相关技术, 将分子标记划分为三代四类:

### 1 第一代分子标记技术

以 Southern 杂交为核心的分子标记技术。最具代表性的是发现最早的 RFLP 标记。

RFLP(Restriction Fragment Length Polymor-

phism, 限制性片段长度多态性)是由 Grodzicker 等于 1974 年创建, 80 年代中期发展起来的一种最早的分子标记。RFLP 是由于 DNA 中限制性内切酶酶切识别序列中出现碱基的变异而导致酶切位点的增减所引起的限制性片段长度的差异。基本原理是: 将 DNA 用已知的限制性内切酶消化后, 产生大小不等的 DNA 片段, 电泳分离、Southern 印迹转移到硝酸纤维膜上, 用放射性标记探针与膜上变性 DNA 杂交, 放射自显影, 显示出不同材料的多态性图谱。RFLP 标记呈共显性遗传。该技术步骤繁杂, 工作量大, 且 DNA 的需要量大, 在很大程度上限制了 RFLP 技术的应用<sup>[2]</sup>。

### 2 第二代分子标记技术

第二代分子标记技术主要分为两类。第一类为基于 PCR 的 DNA 分子标记。根据所用引物的差异, 该类标记又分为随机引物 PCR 标记和特异引物 PCR 标记, 随机引物 PCR 主要包括 RAPD 标记和 ISSR 标记等, 特异引物 PCR 包括 SSR 标记和 STS 标记等。第二类为基于 PCR 与限制性酶切技术结合的 DNA 标记。这类标记包括两种类型, 一种是通过限制性酶切片段的选择性扩增来显示片段长度

收稿日期: 2007-05-29  
第一作者简介: 关强(1982-), 男, 黑龙江人, 在读硕士, 从事遗传学研究。E-mail: 120604766@163.com。

的多态性,如 AFLP 标记等,另一种是通过对 PCR 扩增片段的限制性酶切来揭示扩增区段的多态性,如 CAPS 标记等。

## 2.1 基于 PCR 的 DNA 分子标记

2.1.1 随机引物 PCR 标记 (1) RAPD(Random Amplified Polymorphic DNA, DNA 随机扩增多态性):RAPD 是由 Williams 和 Welsh 两个研究小组于 1990 年分别研究提出的一种分子标记,是建立在 PCR 基础上的一种可对整个未知序列的基因组进行多态性分析的 DNA 分子标记技术。以样品 DNA 为模板,以一个人工合成的随机寡核苷酸序列为引物,通过 PCR 非定点扩增 DNA 片段,用凝胶电泳分析扩增产物 DNA 片段的多态性<sup>[3]</sup>。RAPD 具有技术简单、检测迅速、灵敏度高、特异性强、检测容易、DNA 样品用量少的特点,但 RAPD 为显性遗传,存在共迁移问题,并且重复性较差。可将 RAPD 转化为 SCAR 标记,SCAR 通常为显性标记,通过转化可以增加 RAPD 标记的稳定性和信息量<sup>[4]</sup>。(2)ISSR (Inter simple Sequence Repeats,内部简单重复序列):ISSR 分子标记是由 Ziet kiewicz E 于 1994 年创建的,是在微卫星分子标记基础上发展起来的一种分子标记。ISSR 基本原理与 SSR 相似,利用人工合成的 16~18 个核苷酸重复序列作为引物,对 SSR 之间的 DNA 序列进行 PCR 扩增。ISSR 在引物设计上比 SSR 简单得多,不需知道 DNA 序列即可用引物进行扩增,又可以比 RFLP、RAPD、SSR 提供更多的遗传信息,现已在遗传作图、基因定位、遗传多样性、进化、系统发育等研究方面被广泛应用。但 ISSR 作为一种显性标记(部分共显性),多数情况下不能区别一个位点扩增的 DNA 片段,且不同物种 SSR 不同,造成引物在筛选上具有相对的不随机性<sup>[5]</sup>。

2.1.2 特异引物 PCR 标记 (1)SSR(Simple Sequence Repeats,简单重复序列):SSR 分子标记由 Litt M,等于 1989 年创建的。简单重复序列 6~8 个核苷酸的重复序列,分布于整个基因组的不同位置上。由于重复次数的不同及重复程度的不完全造成了每个位点的多态性。根据其两端的保守序列设计一对特异性引物,PCR 扩增,再经聚丙烯酰胺凝胶电泳即可显示不同基因型个体在这个 SSR 位点的多态性<sup>[6]</sup>。(2)STS(Sequence tagged Site,序列标记位点):STS 标记是由 Olson M 于 1989 年创建的,是一种等位点的标记,在不同基因组间具有特异性,它是将 RFLP 标记技术转化为基于 PCR 的方法,通过设计一对长度约 20bp 的特异引物,对基因组 DNA 进行扩增,该方法在设计引物时也需要测序,但是,一旦获得引物,STS 法就变得和 RAPD 一样简单、迅速<sup>[1]</sup>。

## 2.2 基于 PCR 与限制性酶切技术结合的 DNA

## 标记

2.2.1 限制性酶切片段的的选择性扩增来显示片段长度的多态性 (1)AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism, 扩增片段长度多态性):1993 年由荷兰科学家 Zabeau 等创建的 AFLP 分子标记技术,是利用 PCR 技术检测 DNA 多态性的一种方法<sup>[7]</sup>。AFLP 的基本原理是对 DNA 限制性酶切片段进行选择性的扩增。具体操作为基因组 DNA 经限制性内切酶双酶切后,形成分子量大小不等的限制性片段,再将双链人工接头 (artificial adapter) 连接在这些 DNA 片段的两端,形成一个带接头的特异片段,并作为扩增反应的模板,扩增片段经过聚丙烯酰胺凝胶电泳分离检测<sup>[8]</sup>。

2.2.2 对 PCR 扩增片段的限制性酶切来揭示扩增区段的多态性 (1)CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence, 放大剪切序列多态性):CAPS 标记是 1993 年由 Paran 在 RAPD 技术的基础上发展起来的。基本流程是:先作 RAPD 分析,回收 RAPD 片段,克隆和测序,再根据该序列设计特定引物,进行 PCR 扩增,可以鉴定出与原来的 RAPD 片段相对应的单一位点。该标记为共显性遗传。由于 CAPS 标记使用的引物长,因而实验的可重复性高,因此比 RAPD 和其它利用随机引物的方法在基因定位和作图中的应用要好<sup>[2]</sup>。

## 3 基于单核苷酸多态性的 DNA 分子标记

第三代分子标记是基于单核苷酸多态性的 DNA 分子标记,如 SNPs 标记。(Simple Nucleotide Polymorphisms, 单核苷酸多态性)

同一位点的不同等位基因之间常常只有一个或几个核苷酸的差异,从分子水平上对单个核苷酸的差异进行检测具有重要意义。随着计算机和 DNA 芯片技术引入分子生物学领域,研究者可同时对成千上万个克隆测序,用计算机分析数据和显示最终结果。目前,检测 SNPs 标记最常用的方法有两种,①随机扩增 DNA (RAPD)法,②DNA 芯片 (DNA-chip)检测法<sup>[1]</sup>。

## 4 几种新型分子标记

### 4.1 RGAs 标记 (Resistance Gene Analogs, 抗病基因类似物)

RGAs 是用基于抗病基因保守序列设计的引物扩增基因组得到的抗病基因类似序列的新的分子标记。尽管基因间整个序列的同源性不足于用 RFLP 杂交检测,但抗病基因中存在的这些保守区域为在其它植物中进行 PCR 扩增和分离 RGAs 提供了机会<sup>[9]</sup>。

### 4.2 RMAPD 标记 (random microsatellite amp lify

polymorphic DNA, 随机微卫星扩增多态)

利用 RAPD 引物和微卫星上游或下游引物结合, 对基因组 DNA 进行扩增, 探索更有效的揭示所有微卫星及其他 DNA 遗传多态性的方法, 以期获得研究 DNA 多态性的新的分子标记方法。因该方法同时利用随机引物和微卫星引物进行扩增, 暂一定名为随机微卫星扩增多态 DNA<sup>[10]</sup>。

4.3 SRAP (Sequence Related Amplified Polymorphism, 相关序列扩增多态性)

SRAP 标记是基于 PCR 技术的新型分子标记技术, 其原理是利用基因外显子里 G、C 含量丰富, 而启动子和内含子里 A、T 含量丰富的特点设计两套引物, 对开放阅读框架进行扩增。此技术具有简便、稳定、中等产率和容易得到选择条带序列的特点, 在基因组中分布均匀, 适合于不同作物的基因定位、基因克隆和遗传图谱构建<sup>[11]</sup>。

4.4 TRAP 标记 (Target Region Amplified Polymorphism, 靶位区域扩增多态性)

TRAP 是由 H UJG 等于 2003 年从 SRAP 技术改进而来的新型分子标记技术, 其原理是借助大规模测序技术产生的庞大生物序列信息, 利用生物信息学工具和表达序列标签数据库信息设计引物, 对目标候选基因序列区进行 PCR 扩增产生多态性标记。此标记具有操作简单、重复性好、稳定性好、效率高的特点。目前已经成功应用于许多植物的遗传图谱构建、重要性状基因标记、种质资源的多样性研究及分子标记辅助育种等方面<sup>[11]</sup>。

分子标记作为新的遗传标记, 具有比形态标记、

细胞标记和同工酶标记显著的优点, 因此自分子标记诞生短短 20 多年间, 已发展了许多种分子标记技术, 并已被广泛应用于动植物遗传育种、连锁图谱构建、基因定位与克隆和物种鉴定等方面。尽管分子标记有许多优势, 但目前发现的任何一种分子标记均不能满足作为理想的遗传标记的所有要求, 但可以预见, 在不久的将来, 分子标记技术会产生深远的影响。

参考文献:

[ 1 ] 王军, 谢皓, 郭二虎 等. DNA 分子标记及其在谷子遗传育种中的应用[ J ]. 北京农学院学报, 2005, 20(1): 76-80.

[ 2 ] 王晓梅, 杨秀荣. DNA 分子标记研究进展[ J ]. 天津农学院学报, 2000, 7(1): 21-24.

[ 3 ] 邓俭英, 刘忠, 康德贤, 等. RAPD 分子标记技术在蔬菜研究中的应用[ J ]. 种子, 2005, 24(3): 39-42.

[ 4 ] 胡学军, 邱正名, 李金泉. RAPD 分子标记技术及其在十字花科蔬菜研究中的应用[ J ]. 湖北农业科学, 2005(3): 107-110.

[ 5 ] 杨玉玲, 马祥庆, 张木清. ISSR 分子标记及其在树木遗传育种研究中的应用[ J ]. 亚热带农业研究, 2006, 2(1): 18-24.

[ 6 ] 孙琦, 孟昭东, 张发军, 等. SSR 标记在玉米遗传育种中的应用[ J ]. 玉米研究, 2006, 14(1): 37-39.

[ 7 ] 罗培高, 任正隆, 张怀渝, 等. AFLP 分子标记及其在作物遗传育种中的应用与前景[ J ]. 作物研究, 2001, 19(4): 406-410.

[ 8 ] 伍春莲, 孙敏, 王颖, 等. AFLP 分子标记及其在禾本科作物遗传改良中的应用[ J ]. 作物研究, 2001(4): 48-51.

[ 9 ] 钟鸣, 牛永春. DNA 分子标记技术在小麦抗锈病基因研究中的应用[ J ]. 植物保护, 2000(2): 32-35.

[ 10 ] 蓝贤勇, 陈宏, 张永德, 等. 一种新的分子标记方法—随机微卫星扩增多态 DNA (RMAPD)[ J ]. 遗传, 2006, 28(1): 78-84.

[ 11 ] 边银丙, 宋小亚. 几种新型 DNA 分子标记及其在食用菌研究中的应用[ J ]. 食用菌学报, 2006, 13(1): 73-81.

(上接 99 页)

[ 9 ] 严奉伟. 莱籽粕综合提取工艺研究[ J ]. 农业工程学报, 2004, 20(2): 209-212.

[ 10 ] 曾晓波, 吴谋成, 王海英. 丙酮浸提法制取莱籽浓缩蛋白[ J ]. 中国粮油学报, 2001, 16(4): 10-13.

[ 11 ] 王车礼, 史美仁. 莱籽粕脱毒提取莱籽蛋白研究进展 II. 莱籽分离蛋白的制取[ J ]. 中国油脂, 1997, 22(4): 53-56.

[ 12 ] 郭兴凤, 周瑞宝, 谷文英, 等. As1. 398 水解莱籽蛋白的酶水解条件的研究[ J ]. 中国油脂, 2001, 26(1): 50-51.

[ 13 ] 刘玉兰, 董秀云. 莱籽饼粕的生物化学脱毒研究[ J ]. 中国粮油学报, 1994, 9(3): 49-56.

[ 14 ] 熊善柏, 赵思明, 董汉萍, 等. 脱脂油菜饼粕中蛋白质的分步酶水解研究 I. 分离蛋白及其疏水性值的分析[ J ], 中国油料作物学报, 2000, 22(3): 30-34.

[ 15 ] 刘海梅. 脱脂油菜籽饼粕蛋白质分步酶水解研究: 碱性蛋白酶与木瓜蛋白酶分步水解[ J ]. 粮食与油脂, 2002(3): 2-4.

[ 16 ] 张寒俊, 周俊梅, 刘大川. 富硒莱籽分离蛋白的制备工艺研究[ J ]. 河南工业大学(自然科学版), 2006, 27(1): 56-59.

[ 17 ] 王车礼, 史美仁. 温度对莱籽蛋白质及植酸萃取率的影响[ J ]. 天然产物研究与开发, 1997, 9(3): 74-76.

[ 18 ] Darlington H F, Tecsí L, Harris N, et al. Starch granule associated proteins in barley and wheat[ J ]. J. of Cereal Science, 2000, 32(1): 21-29.

[ 19 ] Knoll J, Kujawa M, Schnaak W. 萃取超滤及渗率法制备莱籽蛋白[ J ]. 王斌贵, 李晓明, 译. 中国油脂, 1992(1): 26-30.

[ 20 ] Ghodsvai A, Khodaparast MHH, Vosoughi M, et al. Preparation of canola protein materials using membrane technology and evaluation of meals functional properties[ J ]. Food Research International, 2005, 38(2): 223-231.

[ 21 ] Annadurai G. Design of optimum response surface experiments for adsorption of direct dye on chitosan[ J ]. Bioproc Eng, 2000, 23: 451-455.

[ 22 ] 刘志强. 水相酶解法提取饲用莱籽蛋白新技术[ D ]. 长沙: 湖南农业大学, 2003.

[ 23 ] 胡志和, 庞广昌, 王凤玲, 等. 萃取超滤技术制备食用莱籽蛋白[ J ]. 食品科学, 1991(1): 34-35.

[ 24 ] 刘瑞兴, 董君英. 莱籽蛋白超滤液反冲对超滤膜污染的控制研究[ J ]. 食品科学, 2005, 26(12): 165-168.

[ 25 ] 刘多敏, 徐通杰, 蒋俊杰. 一种用于莱籽粕化学脱毒反应塔: 中国, 90212490 [ P ]. 1990-03-31.