

学校编码：10384

密级_____

学号：22320141151367

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

对虾科 15 种虾类的系统发育分析及 DNA 条形码研究

Phylogeny and DNA barcodes of 15 species in Penaeidae

易 啸

指导教师姓名：苏永全 教授

专 业 名 称：海洋生物学

论文提交日期：2017 年 6 月

论文答辩时间：2017 年 6 月

2017年6月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下，独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果，均在文中以适当方式明确标明，并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范（试行）》。

另外，该学位论文为（ ）课题（组）的研究成果，获得（ ）课题（组）经费或实验室的资助，在（ ）实验室完成。（请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称，未有此项声明内容的，可以不作特别声明。）

本人声明该学位论文不存在剽窃、抄袭等学术不端行为，并愿意承担因学术不端行为所带来的一切后果和法律责任。

声明人（签名）：

指导教师（签名）：

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文(包括纸质版和电子版)，允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

()1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于
年 月 日解密，解密后适用上述授权。

()2.不保密，适用上述授权。

(请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。)

声明人(签名)：

年 月 日

目录

摘要.....	I
Abstract.....	III
缩略语中英文对照.....	VI
第一章 绪论.....	1
1.1 分子系统学概述及其研究方法.....	1
1.1.1 分子系统学概述.....	1
1.1.2 分子系统学研究方法.....	2
1.2 DNA 条形码研究概述.....	5
1.2.1 DNA 条形码 (DNA Barcoding) 原理.....	5
1.2.2 DNA 条形码标准序列的选择.....	6
1.2.3 分析流程.....	8
1.2.4 DNA 生物条形码技术的优势.....	9
1.2.5 DNA 生物条形码技术的局限性.....	9
1.2.6 DNA 条形码在水生生物分类鉴定中的应用.....	10
1.3 对虾的种质资源及系统发育学研究进展.....	12
1.3.1 对虾科虾类的一般形态特征.....	12
1.3.2 对虾科虾类的分类学.....	12
1.3.3 对虾科虾类的分布情况.....	13
1.3.4 对虾科分子系统学研究概况.....	15
1.3.5 本研究的目的意义.....	17
第二章 基于核基因 DNA 序列的变异分析 15 种虾类的系统发育关系.....	18
2.1 材料.....	19
2.1.1 实验材料.....	19
2.1.2 主要仪器.....	21
2.1.3 主要试剂.....	21
2.1.4 主要溶液配制.....	22
2.2 方法.....	22
2.2.1 基因组 DNA 提取.....	22
2.2.2 PCR 扩增.....	23
2.2.3 TBE 琼脂糖凝胶电泳检测.....	23
2.2.4 TAE 回收凝胶电泳检测.....	24
2.2.5 PCR 产物的回收和纯化.....	24
2.2.6 序列测定.....	24
2.2.7 数据分析.....	25
2.3 结果.....	28
2.3.1 15 种虾类的 <i>NaK</i> 基因和 <i>PEPCK</i> 基因序列特征及其变异.....	28
2.3.2 分子系统树.....	29
2.4 讨论.....	30
2.4.1 序列的选择.....	30
2.4.2 15 种虾类的分子系统进化.....	31
第三章 15 种对虾的 DNA 条形码.....	47

3.1 材料.....	47
3.1.1 实验材料.....	47
3.1.2 主要仪器.....	47
3.1.3 主要试剂.....	47
3.1.4 主要溶液配制.....	47
3.2 方法.....	47
3.2.1 基因组 DNA 提取.....	47
3.2.2 PCR 扩增.....	47
3.2.3 TBE 琼脂糖凝胶电泳检测.....	48
3.2.4 TAE 回收凝胶电泳检测.....	48
3.2.5 PCR 产物的回收和纯化.....	48
3.2.6 序列测定.....	48
3.2.7 数据分析.....	48
3.3 结果.....	49
3.3.1 15 种虾类的 COI 基因序列的特征及其变异.....	49
3.3.2 分子系统树.....	50
3.4 讨论.....	50
3.4.1 序列的选择.....	50
3.4.2 DNA 条形码鉴别虾类的潜在效用.....	51
第四章 结语.....	57
参考文献.....	59
致谢.....	67

Content

Abstract in Chinese.....	I
Abstract in English	III
List of abbreviation.....	VI
Chapter 1 Introduction.....	1
1.1 Outline of molecular systematics and its research methods	1
1.1.1 Outline of molecular systematics.....	1
1.1.2 Methods of molecular systematics.....	2
1.2 Overview of DNA barcoding research.....	5
1.2.1 principle of DNA barcoding.....	5
1.2.2 The selection of the DNA barcoding standard sequence	6
1.2.3 Analysis process.....	8
1.2.4 The main Advantages of DNA barcoding.....	9
1.2.5 The limitations of DNA biocoding technology.....	9
1.2.6 The applications of DNA barcoding in aquatic taxonomy.....	10
1.3 Progress in the research of the germplasm resources and phylogenetics of penaeid shrimps.....	12
1.3.1 The morphology of shrimps in Penaeidae	12
1.3.2 The <u>taxonomy of shrimps</u> in Penaeidae.....	12
1.3.3 The distribution of shrimps in Penaeidae.....	13
1.3.4 Phylogenetics of Penaeidae	15
1.3.5 The purpose and meaning of this study.....	17
Chapter 2 Phylogeny of Penaeid Shrimps Inferred from Nuclear Protein-coding Genes	18
2.1 Material	19
2.1.1 Experimental materials.....	19
2.1.2 Instruments.....	21
2.1.3 Reagents	21
2.1.4 Solution preparation.....	22
2.2 Methods.....	22
2.2.1 Extraction of genomic DNA	22
2.2.2 PCR amplification.....	23
2.2.3 TBE agarose gel electrophoresis	23
2.2.4 TAE Recovery gel electrophoresis test.....	24
2.2.5 Recovery and purification of DNA	24
2.2.6 Sequencing	24

2.2.7 Data Analysis.....	25
2.3 Results.....	28
2.3.1 Sequence characteristics and their variation of <i>NaK</i> gene and <i>PEPCK</i> gene from 15 shrimps.....	28
2.3.2 Molecular Phylogenetic tree.....	29
2.4 Discussion.....	30
2.4.1 The selection of sequences.....	30
2.4.2 Molecular Phylogenetic evolution of 15 shrimps.....	31
Chapter 3 DNA barcodes of Penaeidae.....	47
3.1 Material.....	47
3.1.1 Experimental materials.....	47
3.1.2 Instruments.....	47
3.1.3 Reagents.....	47
3.1.4 Solution preparation.....	47
3.2 Methods.....	47
3.2.1 Extraction of genomic DNA.....	47
3.2.2 PCR amplification.....	47
3.2.3 TBE agarose gel electrophoresis.....	48
3.2.4 TAE Recovery gel electrophoresis test.....	48
3.2.5 recovery and purification of DNA.....	48
3.2.6 Sequencing.....	48
3.2.7 Data Analysis.....	48
3.3 Results.....	49
3.3.1 Sequence characteristics and their variation of COI about 15 shrimps.....	49
3.3.2 Molecular Phylogenetic tree.....	50
3.4 Discussion.....	50
3.4.1 Option of sequences.....	50
3.4.2 potential utility of DNA barcoding in distinguishing shrimps.....	51
Chapter 4 Summary.....	56
References.....	58
Acknowledgments.....	66

摘要

通过 PCR 扩增并测序, 获得并分析了对虾科 (Penaeidae) 15 个种类的线粒体基因组 (mtDNA) 中细胞色素 C 氧化酶亚基 I 基因 (COI) 部分序列, 分析了基于 COI 基因的 DNA 条形码在鉴别对虾科虾类中的应用。并应用核蛋白编码基因 PEPCK 基因和 NaK 基因对对虾科 15 种虾类的分子系统进化进行了研究, 主要结果如下:

1、在对虾科 15 种虾类 137 个个体的长度为 634bp 的 COI 基因部分序列中, 共检测到了 324 个多态位点, 其中有 235 个简约信息位点。基于 COI 基因序列的对虾科 15 个种类 DNA 条形码研究结果显示, 对虾科物种的种间遗传距离平均值是 0.223, 是种内平均遗传距离 (0.0185) 的 12 倍以上, 符合 Hebert 提出的利用 COI 基因序列有效鉴别物种的标准。所构建的分子系统树表明, 基于 COI 基因的 DNA 条形码适用于对虾科物种的分类鉴别。

2、15 种虾类的 PEPCK 基因序列长度为 549bp, 存在碱基的插入和缺失, 在 549bp 碱基中, 共检测到 204 个多态位点, 简约信息位点 163 个。基于 PEPCK 基因所构建的 MP、ML 和 NJ 系统发育树的分支结构图的拓扑结构基本一致, MP、ML 和 NJ 系统发育树中同种虾类的不同个体都聚在了一起, 不同物种之间的界限都十分清晰。9 个属的对虾可以分为 3 个进化枝。第一个进化枝的结构为: 对虾属 (*Penaeus*) 的短沟对虾 (*P.semisulcatus*) 和斑节对虾 (*P.monodon*) 聚成一支, 然后再与明对虾属 (*Fenneropenaeus*) 的长毛明对虾 (*F.penicillatus*) 聚成一支, 再与滨对虾属 (*Litopenaeus*) 的凡纳滨对虾 (*L.vannamei*) 聚成一支。另外, 沟对虾属 (*Melicertus*) 的宽沟对虾 (*M.latisulcatus*) 与囊对虾属 (*Marsupenaeus*) 的日本囊对虾 (*M.japonicus*) 聚成一支, 最后这两支聚成一枝进化枝。第二个进化枝的结构为: 新对虾属 (*Metapenaeus*) 的周氏新对虾 (*M.joyneri*) 和刀额新对虾 (*M.ensis*) 聚成一支, 另外, 仿对虾属 (*Parapenaeopsis*) 的角突仿对虾 (*P.cornuta*) 和中华仿对虾 (*P.sinica*) 先聚成一支, 然后与鹰爪虾属 (*Trachypenaeus*) 的鹰爪虾 (*T.curvirostris*) 聚成一支。最后, 这两支聚成第二枝进化枝。第三个进化枝由赤虾属 (*Metapenaeopsis*) 的对虾组成, 其结构为: 戴氏赤虾 (*M.dalei*) 和须赤虾 (*M.barbata*) 先聚成一支, 然后再与高脊赤虾 (*M.lamellata*) 聚成一支, 最后再与音响赤虾 (*M.stridulans*) 聚成第三枝进化枝。研究结果支持 Burkenroad(1983)提出的将对虾

科分成 3 个群体的设想。

3、15 种虾类的 *NaK* 基因序列长度为 465bp, 存在碱基的插入和缺失, 在 465bp 碱基中, 共检测到 114 个多态位点。简约信息位点 102 个。基于 *NaK* 基因所构建的 MP、ML 和 NJ 系统发育树的分支结构图的拓扑结构基本一致。除了 MP 系统发育树中新对虾属的周氏新对虾和刀额新对虾在树中的位置与 ML 和 NJ 树中的位置不一致外, 同种虾类的不同个体都聚在了一起, 不同物种之间的界限都十分清晰, 聚类关系基本上与形态学分类一致。除新对虾属外的 8 个属的对虾可以分成 3 个进化枝。第一进化枝的结构为: 对虾属的斑节对虾和长毛明对虾聚成一支, 然后与对虾属的短沟对虾聚成一支, 再与滨对虾属的凡纳滨对虾聚成一支。另外, 沟对虾属的宽沟对虾和囊对虾属的日本囊对虾聚成一支, 这两支最终聚成一枝进化枝。第二进化枝的结构为: 仿对虾属的角突仿对虾和中华仿对虾聚成一支, 再与鹰爪虾属的鹰爪虾聚成第二枝进化枝。第三枝进化枝由赤虾属的对虾组成, 在 ML 和 MP 树中其结构为: 音响赤虾和须赤虾聚成一支, 戴氏赤虾和高脊赤虾聚成一支, 而后两支聚成第三枝进化枝。在 NJ 树中其结构为: 须赤虾与音响赤虾聚成一支, 然后与高脊赤虾聚成一支, 最后再与戴氏赤虾聚成第三枝进化枝。新对虾属在 MP、ML 和 NJ 树中的位置不一致, 在 ML 和 NJ 树中, 它位于三支进化枝的外部, 位于进化树中最先起源的位置。而在 MP 树中, 新对虾属与对虾属、明对虾属、滨对虾属、沟对虾属以及囊对虾属组成了第一枝进化枝。研究结果支持 Burkenroad(1983)提出的将对虾科分成 3 个群体的设想。

关键词: 对虾科 (Penaeidae); 系统进化学; *PEPCK* 基因; *NaK* 基因; *COI* 基因; DNA 条形码 (DNA barcode)

Abstract

By PCR amplification and sequencing, the cytochrome c oxidase subunit I (*COI*) partial gene of 15 species in penaeid were acquired and used to study its potentiality as DNA barcodes to distinguish shrimps. The two nuclear Protein-coding genes *PEPCK* and *NaK* are used to study the phylogenetic relationships of 15 penaeid shrimps (Penaeidae). The main results are shown as follows:

1: In 137 samples of 15 species in penaeid shrimps (Penaeidae), the 634bp *COI* partial sequence contains 324 Variable sites, and 235 are parsimony sites. DNA barcodes based on mitochondrial *COI* gene sequences were developed to classify the species in *Penaeidae* family. The average Kimura-2-parameter (K2P) distance of pairwise-species reached to 0.223 which was 12 times as much as those of intra-species (0.0185). The result of phylogenetic tree confirmed that the DNA barcode could be used in species classification and identification in *Penaeidae*.

2: The length of *PEPCK* genes of 15 species in penaeid shrimps is 549bp, Insertion and deletion are existed in the sequence, there are 204 Variable sites, and 163 are parsimony sites. The topology of MP、ML and NJ phylogenetic tree based on *PEPCK* gene are similar. Different samples of the same species are cluster together by clear boundary. 9 genus shrimps can be divided into 3 clades. In the first clade, *P.monodon* of Genus *Penaeus* cluster with *P.semisulcatus* of Genus *Penaeus*, and then it cluster with *F.penicillatus* of Genus *Fenneropenaeus* and *L.vannamei* of Genus *Litopenaeus* gradually, on the other hand, *M.latisulcatus* of Genus *Melicertus* are cluster with *M.japonicus* of Genus *Marsupenaeus* as a clade, this two clade finally cluster together as the first clade. In the second clade, *M.joyneri* of Genus *Metapenaeus* cluster with *M.ensis* of Genus *Metapenaeus* as a clade, moreover, *P.cornuta* of Genus *Parapenaeopsis* are cluster with *P.sinica* of Genus *Parapenaeopsis*, and then it cluster with *T.curvirostris* of Genus *Trachypenaeus* formed a clade, this two clade cluster together formed the second clade. third clade is formed by shrimps of Genus *Metapenaeopsis*, at first *M.dalei* cluster with *M.barbata*, and then it cluster with *M.lamellata*, finally, it cluster with *M.stridulans*

formed the third clade. The results of this study support presumption that divided Penaeidae into three group suggested by Burkenroad in 1983.

3. The length of *NaK* gene of 15 species in penaeid shrimps is 465bp, Insertion and deletion are existed in the sequence, there are 114 Variable sites, and 102 are parsimony sites. The topology of MP、ML and NJ phylogenetic tree based on *NaK* gene are similar, except the position of Genus *Metapenaeus* in MP phylogenetic tree are different with its position in ML and NJ phylogenetic tree. Different samples of the same species are cluster together by clear boundary, the phylogenetic relationship are consistent with the taxonomic relationship based on morphology. Except Genus *Metapenaeus*, the other 8 genus shrimps can be divided into 3 clades. The topology of the first clade is: *P.monodon* of Genus *Penaeus* and *F.penicillatus* of Genus *Fenneropenaeus* are cluster into a clade, and then it cluster with *P.semisulcatus* of Genus *Penaeus* and *L.vannamei* of Genus *Litopenaeus* gradually. moreover, *M.latisulcatus* of Genus *Melicertus* are cluster with *M.japonicus* of Genus *Marsupenaeus* as a clade. the two clade finally cluster into the first clade. The topology of the second clade is: *P. cornuta* of Genus *Parapenaeopsis* are cluster with *P. sinica* of Genus *Parapenaeopsis*, and then it cluster with *T. curvirostris* of Genus *Trachypenaeus* formed the second clade. The third clade consist of shrimps from Genus *Metapenaeopsis*, the topology in ML and MP phylogenetic tree are same: *M. barbata* cluster with *M. stridulans*, *M. dalei* cluster with *M. lamellata*, the two branch formed the third clade. While the topology in the NJ phylogenetic tree share some difference: *M. barbata* cluster with *M. stridulans*, and then it cluster with *M. lamellata*, finally, it cluster with *M. dalei* and formed the third clade. The position of Genus *Metapenaeus* are different in MP、ML and NJ phylogenetic tree, in the ML and NJ tree, it is at the root of the phylogenetic tree, while in the MP phylogenetic tree, Genus *Metapenaeus* and Genus *Penaeus*、*Fenneropenaeus*、*Litopenaeus*、*Melicertus* and *Marsupenaeus* formed the first clade. The results of this study support presumption that divided Penaeidae into three group suggested by Burkenroad in 1983.

Key Words: Penaeidae; Phylogenetics; *PEPCK* gene; *NaK* gene; *COI* gene, DNA barcode

厦门大学博硕士学位论文摘要库

缩略语中英文对照

缩写	英文	中文
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism	扩增片段长度多态性
BOLD	THE BARCODE OF LIFE DATA SYSTEM	生命条码数据系统
Bp	Base pair	碱基对
COI	Cytochrome c oxidase I	细胞色素氧化酶 I
dNTP	Deoxyribonucleoside triphosphate	脱氧核糖核苷三磷酸
EB	Ethidium bromide	溴化乙啶
EDTA	Ethylene diamine tetraacetic acid	乙二胺四乙酸
LB	Luria-Bertani medium	LB 培养基
MP	Maximum parsimony	最大简约法
ML	Maximum Likelihood	最大似然法
NaK	sodium-potassium ATPase a-subunit	钠钾腺苷三磷酸酶 α 亚基
NCBI	National Center for Biotechnology Information	美国国家生物信息中心
NJ	neighbor joining	邻接法
PCR	Polymerase chain reaction	聚合酶链式反应
PEPCK	Phosphoenolpyruvate carboxykinase	磷酸烯醇丙酮酸羧激酶
RAPD	random amplified polymorphic DNA	随机扩增多态性 DNA 标记
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism	限制性内切酶片段长度多态性
SSR	Single nucleotide polymorphism	单核苷酸多态性
TAE	Tris-acetic acid-EDTA	Tris-乙酸 EDTA 缓冲液
TBE	Tris-boric acid-EDTA	Tris-硼酸 EDTA 缓冲液
Tris	Tris (hydroxymethyl) aminomethane	三(羟甲基)氨基甲烷
UPC	Unniversal Product Code	通用商品代码

第一章 绪论

1.1 分子系统学概述及其研究方法

1.1.1 分子系统学概述

分子系统学 (Molecular Systematics) 是一门综合性的学科, 在最近的 30 年间经历了迅速的发展, 分子系统学主要从分子的角度对生物的遗传多样性、分类、系统发育以及进化等方面进行研究, 它的主要研究目的是通过研究生物的遗传多样性从而保护生物多样性。分子系统学的研究对了解生物进化的历程以及机理有着重要的意义。

分子系统学的理论基础是: 系统学、分子生物学、遗传学以及分类学。它的研究手段是以分子生物学、生物化学, 使用仪器分析技术进行分析, 分子系统学涉及学科广, 是一门交叉性的研究学科(徐宏发, 2001)。由于研究方法的不同以及研究方法的发展, 可以将分子系统发育学的发展阶段分成 3 个时期。

时期 I: 20 世纪 50 至 60 年代, 主要通过检测和分析蛋白质之间的差异进行分子系统学的研究。Smithies(1955)发明淀粉凝胶电泳技术, 为人们使用蛋白质研究分子系统学打下了基础, 而后研究人员陆续将此技术应用于研究中, Goodma(1963)为了探究人类与灵长类动物的关系, 分析了他们血清蛋白之间的差异, 取得了很好的研究结果。为了探究自然界中的动物群体中是否存在着大量的遗传变异, Hubby 等 (1965) 基于同工酶电泳技术开展研究, 结果表明自然界中的动物的群体存在着大量的遗传变异。在这一时期内, 研究分子系统学的主要技术是等位酶和同工酶电泳技术, 基于这些技术取得了很多重要的成果。

时期 II: 随着核酸研究技术的发展, 20 世纪 70 年代, 分子系统学的研究主要以分析核酸的方式进行。至 70 年代末期, 基于 mtDNA 的限制性片段长度多态性技术的出现, 使得研究的进程得到发展, 研究人员将这种技术应用于研究脊椎动物和无脊椎动物的种群结构, 至 80 年代末期时 mtDNA 已经成为动物分子系统学研究中的一种使用广泛的分子工具。

时期 III: 进入到 80 年代, 出现了一系列新颖的技术, 例如扩增片段长度多态性技术、随机扩增多态性 DNA 技术和 DNA 指纹图谱技术等。这些技术的基础是多聚酶链式反应 (PCR) 和 Southern 杂交技术, 这些技术的出现, 极大地推动了分子系统学研究的进展。之后再出现的技术如核酸测定技术以及微卫星

DNA 指纹图谱技术, 是 DNA 水平分子系统学研究飞速发展的标志, 为这一时期大量的显著性成果的获得提供了很大的帮助。

1.1.2 分子系统学研究方法

分子系统学的研究目前采用的方法主要有蛋白质水平的分子标记和 DNA 水平的分子标记。

1.1.2.1 蛋白质水平的标记与检测

1.1.2.1.1 异型酶电泳

异型酶指的是等位酶编码基因所产生的不同形态的酶。这些酶有一条或数条多肽链组成, 20 种常见的氨基酸组成多肽链, 其中存在带正电荷和负电荷的氨基酸, 因此, 拥有不同数量氨基酸的多肽链可能会带有不同的净电荷。将酶的提取物放入到电荷场中, 根据它们所带的净电荷的不同, 他们在电场中的迁移速度也不同, 因此异型酶分子得到分离, 这可以通过组织生化染色过程观察到, 由此能够检测到不同等位基因的存在。20 世纪 60 年代末和 70 年代初, 关于异型酶电泳的研究开始兴起, 目前已有非常多的数据可用于分析。根据电泳所用的介质(淀粉、聚丙烯酰胺、琼脂糖和醋酸纤维素)不同, 可将酶电泳方法分为 4 种常用的酶电泳法。酶电泳法的优点在于: 酶电泳花费较低并且速度快, 对于基因多样性检测较为敏感, 另外, 它具有共显性的本质并且对于范围很广的物种具有通用的使用标准。等位基因的存在与否以及等位基因的相对频率可用于检测基因差异和鉴别种群、物种以及更高分类单元间的基因差异。但是异型酶电泳也存在着缺点: (1) 可用的异型酶位点较少阻碍了其在大规模基因图谱构建上的使用; (2) 不能从小块的组织中获取到基因型信息; (3) 实验需要新鲜的组织; (4) 许多酶都有组织特异性表达的特点; (5) 由于不是所有的核苷酸变化都会导致氨基酸的变化, 因此这种技术只能检测到一小部分(通常小于 25%)的基因变异。并且不是所有在酶中氨基酸的变化会导致酶在电泳时会产生可见的电泳变化差异。

1.1.2.1.2 蛋白质立体结构测定

目前有一种新的技术可用于获取分子系统学信息: 测定蛋白质的立体结构。黄京飞等(1997)通过测定和计算 11 种高等动物的肌红蛋白和血红蛋白的三维结构的分维数据, 根据它们之间的相似性建立了 11 种动物血红蛋白和肌红蛋白

的分子系统进化树, 研究表明通过蛋白质立体结构而获得的实验结果与研究蛋白质的一级结构所获得的实验结果一致。使用蛋白质立体结构研究系统发育关系的优点是: 由于蛋白质的立体结构在进化上相较于一级结构更为保守, 因此根据蛋白质立体结构所建立的系统发育关系的结果更为可靠, 但是清楚的了解蛋白质一级结构也是使用蛋白质立体结构研究物种系统发育关系的前提基础。使用蛋白质立体结构研究系统发育关系的缺点是: 由于获取纯结晶的蛋白样品的过程非常复杂, 期间所用的分析仪器精密昂贵, 实验过程在一般的实验室难以完成, 因此限制了蛋白立体结构分析在分子系统发育学上的应用。随着技术的不断进步, 获取纯结晶的蛋白的过程会变得更加简单, 并且分析仪器也会引进到一般实验室中, 相信蛋白质立体结构分析在分子系统发育学上的应用会越来越广泛。

1.1.2.2 DNA 水平的标记与检测

1.1.2.2.1 限制性内切酶片段长度多态性技术 (restriction fragment length polymorphism, RFLP)

RFLP 是第一种被群体生物学家 Parker (1998) 所使用的 DNA 分子标记。RFLP 的原理是使用一种限制性内切酶在 DNA 链的特定位置进行剪切, 随后产生许多的不同大小的 DNA 分子片段, DNA 分子经过溴化乙锭染色后在凝胶电泳后可以观察到 DNA 分子的差异。对于小分子 DNA, 例如线粒体 DNA 来说, 使用限制性内切酶可以产生许多的 DNA 片段。对于 RFLP 结果的分析方法有 2 种, 一种方法是片段分析, 通过分析片段的存与在否对结果进行评测。这种方法假定凝胶中相同大小的 DNA 片段是同质的, 但是由于实际上存在凝胶中多片段可以组成单一条带, 因此, 这种假设是错误的。另外, 由于不同的酶切位点也许也会产生相似的条带图谱, 因此结果并不可靠。另一种方法是分析限制性酶切位点的存与在否, 从而能够得出精确的结果。

1.1.2.2.2 随机扩增多态性 DNA (random amplified polymorphic DNA, RAPD)

RAPD 是通过 PCR 技术随机扩增不可知位点。这种方法非常简单、迅速而且便宜, 并且会产生很高的多态性, 它不需要目标片段的任何信息, 仅从少量的 DNA 片段中就能产生很多的基因标记。使用随机序列的寡核苷酸引物通过 PCR 产生 RAPD 分子标记。由于互补引物退火位点的不同而导致的基因差异会导致 RAPD 图谱的差异, 引物一般是 10bp 的长度 (Williams, 1990)。等位基因的差

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库