

学校编码：10384

分类号\_\_\_\_\_密级\_\_\_\_\_

学 号：200126008

UDC\_\_\_\_\_

厦 门 大 学  
硕 士 学 位 论 文  
坛紫菜微卫星的分离及其在紫菜遗传多  
样性研究中的应用

Isolation of microsatellite markers from *Porphyra  
haitanensis* and their application in genetic  
diversity of *Porphyra*

姚 继 承

指导教师姓名：陈奕欣 教 授

方文珍 副教授

专 业 名 称：动物学

论文提交日期：2004 年 10 月 10 日

论文答辩日期：2004 年 10 月 13 日

学位授予日期： 年 月 日

答辩委员会主席：陈昌生 教授

评 阅 人：陈昌生 教授

郑文竹 教授

2004 年 10 月

## 厦门大学学位论文原创性声明

兹呈交的学位论文，是本人在导师指导下独立完成的科研成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体的研究成果，均在文中以明确的方式标明。本人依法享有和承担由此论文而产生的权利和责任。

声明人（签名）：

年 月 日

## 目 录

中文摘要.....	1
英文摘要.....	3
一、前言.....	5
1 遗传标记技术概述.....	5
2 微卫星的简介.....	6
2.1 微卫星的发现.....	6
2.2 微卫星的定义、特征及分类方法.....	8
2.3 微卫星长度的多态性.....	8
2.4 微卫星方法的优点.....	9
3 微卫星分析的一般流程.....	10
3.1 微卫星序列的获得.....	10
3.2 微卫星引物的设计.....	11
3.3 微卫星引物的 PCR 扩增.....	12
3.4 扩增产物的进行检测.....	12
4 微卫星标记的应用.....	12
4.1 用于遗传疾病的诊断.....	12
4.2 用于构建遗传图谱.....	13
4.3 用于种质鉴定.....	13

---

4.4 用于基因定位及分子标记辅助育种.....	14
5 分子标记技术在紫菜研究中的应用.....	14
6 本课题的研究目的及意义.....	15
二、材料与方法.....	17
1 实验材料.....	17
1.1 紫菜样品.....	17
1.2 菌株.....	17
1.3 质粒.....	17
2 实验仪器.....	18
3 药品及试剂.....	19
3.1 常用试剂.....	19
3.2 限制性内切酶及工具酶.....	19
3.3 核酸分子量标准.....	19
3.4 试剂盒.....	19
3.5 主要培养基.....	19
3.6 主要溶液及配方.....	19
4 实验方法.....	21
4.1 坛紫菜部分小片段基因组文库的构建.....	21
4.2 含有微卫星的阳性克隆的筛选.....	25

4.3 引物的设计与合成.....	28
4.4 微卫星分析.....	28
<b>三、结果与分析.....</b>	<b>31</b>
<b>1 部分小片段基因组文库的构建及阳性克隆的筛选.....</b>	<b>31</b>
1.1 基因组 DNA 的提取及酶切结果.....	31
1.2 pUC18 质粒的提取及酶切结果.....	31
1.3 阳性克隆的筛选与鉴定.....	32
<b>2 含有微卫星的阳性克隆的筛选及分析.....</b>	<b>34</b>
2.1 探针的制备及标记效率的检测.....	34
2.2 原位杂交的结果.....	35
2.3 阳性杂交斑的酶切鉴定.....	36
2.4 测序及分析.....	38
<b>3 微卫星引物的设计与合成.....</b>	<b>40</b>
<b>4 微卫星分析.....</b>	<b>41</b>
4.1 PCR 扩增.....	41
4.2 信息矩阵及等位基因数目.....	43
4.3 样品间的遗传相似系数与聚类图谱.....	45
4.4 标记条带.....	47
<b>四、讨论.....</b>	<b>48</b>
<b>1 坛紫菜部分小片段基因组文库的构建及阳性克隆的筛选.....</b>	<b>48</b>

2 含有微卫星的阳性克隆的筛选.....	50
3 微卫星分析.....	51
3.1 PCR 扩增产物的 PAGE 检测.....	51
3.2 坛紫菜种质资源遗传多样性.....	53
3.3 微卫星标记.....	55
小结与展望.....	56
参考文献.....	57
攻读硕士期间发表的论文和参加的课题.....	66
致谢.....	67
附录	

厦门大学博硕士学位论文摘要库

## Content

<b>Abstract in Chinese</b> .....	1
<b>Abstract in English</b> .....	3
<b>Introduction</b> .....	5
<b>1 The genetic markers</b> .....	5
<b>2 Microsatellite (simple sequence repeats, SSRs)</b> .....	6
2.1 Discovery of SSRs.....	6
2.2 Definition and characterization of SSRs.....	8
2.3 Length polymorphism of SSRs.....	8
2.4 Advantage of SSRs technique.....	9
<b>3 Procedure of SSRs analysis</b> .....	10
3.1 Isolation of SSRs DNA.....	10
3.2 Design of primers for SSRs PCR.....	11
3.3 Amplification of SSRs.....	12
3.4 Detection of amplification results.....	12
<b>4 Applications of SSRs markers</b> .....	13
4.1 Diagnose the genetic diseases.....	13
4.2 Construction of genetic map.....	13
4.3 Identification of germplasm.....	14

4.4 Gene location and molecular markers assistant breeding	14
5 The application of <i>Porphyra</i> molecular markers in genetics and breeding	14
6 The goal of this research	15
Materials and methods	17
1 Materials	17
1.1 <i>Porphyra</i> samples	17
1.2 Bacterial strain	17
1.3 Plasmids	17
2 Experiment instruments	18
3 Reagents	19
3.1 Common reagents	19
3.2 Restriction endonucleases and others enzymes	19
3.3 DNA markers	19
3.4 Kits	19
3.5 Cultural medium	19
3.6 Solutions	19
4 Methods	21
4.1 Construction a small fragment library of <i>Porphyra hai tanensis</i>	21



4.2	Identification of positive clones containing SSRs.....	26
4.3	Design and synthesis the primers.....	28
4.4	Analysis the PCR products .....	28
	<b>Results and analysis.....</b>	<b>31</b>
1	<b>The results of small fragment library and screening of positive clones.....</b>	<b>31</b>
1.1	DNA extraction and digested.....	31
1.2	PUC18 DNA extraction and digested.....	31
1.3	Isolation and characteratation of positive clones.....	32
2	<b>Screening and analysis of positive clones containing SSRs ..</b>	<b>34</b>
2.1	Probe and detection of labeling efficiency.....	34
2.2	In situ hybridization.....	35
2.3	Identification of positive clones.....	36
2.4	Sequencing and analysis of positive hybridization blots.	38
3	<b>Design and synthesis of primers.....</b>	<b>40</b>
4	<b>Analysis the PCR products.....</b>	<b>41</b>
4.1	Electrophoresis .....	41
4.2	Information matrix and the number of DNA bands.....	43
4.3	Similarity of coefficient matrix and dendrogram of the 9	

samples. . . . .	43
4.4 Specific DNA bands. . . . .	47
<b>Discussion. . . . .</b>	<b>48</b>
1 Analysis of small-sized library and screening of the positive clones. . . . .	48
2 Analysis of screening the positive clones containing SSRs. . . . .	50
3 Analysis of SSRs amplification. . . . .	51
3.1 PAGE electrophoresis analysis. . . . .	51
3.2 Genetic diversity of <i>Pophyra hai tanensis</i> . . . . .	53
3.3 Application of SSRs in genetic diversity. . . . .	55
<b>Conclusion and prospect. . . . .</b>	<b>56</b>
<b>References. . . . .</b>	<b>57</b>
<b>The papers published and the subjects attended during the period of study for master degree. . . . .</b>	<b>66</b>
<b>Acknowledgements. . . . .</b>	<b>67</b>
<b>Appendix</b>	

## 摘要

坛紫菜是一种营养价值很高的海藻，在福建省有悠久的栽培历史。运用分子生物学技术分析坛紫菜种质资源的遗传多样性，寻找相关的分子标记，可以指导培育实践，加快育种进程。

本实验首先构建了部分坛紫菜小片段基因组文库，从中筛选到 1500 左右个阳性克隆，在 215 个阳性克隆中筛选到 4 个微卫星位点。选择其中的 2 个微卫星位点 ATN4 和 GAN5 以及从 GeneBank 里搜索的江蓠的 3 个微卫星位点 AJ512812、AJ512806 和 AJ512804 对 9 个紫菜样品 (LYG、RD、CS、GL1、DXY、BBD、JJS、NH 和 LSD) 进行 PCR 扩增。5 个微卫星位点共检测到 31 个 DNA 条带，其中条带最多的位点是 AJ512812，有 12 条；条带最少的位点是 AJ512804，只有 1 条带，其它位点扩增的条带数在 4~8 之间。在所有的 31 条带种有 26 条具有多态性，占条带总数的 83.9%。根据微卫星检测的结果，采用类间平均连锁法 (Between groups linkage) 对各样品间的 Nei 氏遗传相似系数进行聚类分析。分析结果显示野生坛紫菜样品 NH、JJS 和 LSD 之间的遗传相似系数最高，达到 96.8%；坛紫菜各样品间的遗传相似系数在 58.1%~96.8% 之间，不同海区、栽培样品与野生样品之间存在很大的遗传差异。这表明坛紫菜的种质资源遗传多样性丰富，将为坛紫菜良种选育奠定基础。从聚类树状图可以看出，9 个紫菜样品共聚成两大类，坛紫菜样品 NH、JJS 和 LSD 首先聚为一类，再和其它 4 个种坛紫菜样品聚集，条斑紫菜样品 LYG 和 RD 先聚在一起，最后与坛紫菜样品相聚。不同海区的两种养殖坛紫菜 CS 和 GL1 之间的遗传距离甚至大于坛紫菜与条斑紫菜之间的遗传距离，说明地理环境不同会造成紫菜在遗传上的较大差异，有时甚至大于种间的遗传距离。

5 个微卫星位点在 9 个紫菜样品中共扩增出 6 个特异性条带。条斑紫菜

LYG 的特异性条带 ATN4-1140 和 ATN4-175；养殖坛紫菜 CS 的特异性条带 AJ512812-1214、AJ512812-168、AJ512806-404 和 AJ512806-313。这些特异性条带在多次重复实验中能够稳定出现，有可能作为该样品的特异性遗传标记。对这些特异性的条带进一步进行研究，分析它们与优良生产性状间是否存在相关性，为坛紫菜的遗传育种工作提供资料。

关键词：坛紫菜；微卫星；遗传标记

厦门大学博硕士论文摘要库

## Abstract

*Porphyra hai tanensis* is seaweeds of high nutritive value, and it has a long history of culture in Fujian province.

In this thesis, we first constructed a small-size genomic library of *P. hai tanensis* and got 1500 positive recombinants. Among which we obtained 4 microsatellite sequences from 215 positive clones. Choosing 2 of the microsatellite loci in *P. hai tanensis* and 3 microsatellite loci of *Gracilariaopsis* (AJ512812, AJ512806 and AJ512804) from GenBank as primers. 9 DNA samples (LYG, RD, CS, GL1, DXY, BBD, JJS, NH and LSD) of *Porphyra* were amplified, and a total 31 DNA bands were detected. AJ512812 amplified 12 DNA bands were the most while AJ512804 only amplified 1 DNA bands, which was the least of them. Among 31 DNA bands, 83.9% were polymorphic. The data was analyzed by means of Nei's similarity coefficient, and a phenogram was constructed by using between groups linkage method. The result showed that the similarity coefficient of the 7 *P. hai tanensis* from 58.8% to 96.8%. The highest similarity coefficient is 96.8% which among 3 wide *P. hai tanensis*. The results indicated a high genetic variations of *P. hai tanensis*, and make a genetic foundation for excellent breed select.

According to the dendrogram we can find that the 9 *Porphyra* were divided into two teams. The 7 *P. hai tanensis* samples had closely relationship in the same team and the 2 *P. yezoensis* had closely relationship. However Nei's genetic distance between CS and GL1 was larger than that between *P. hai tanensis* and *P. yezoensis*. It indicated that different geographical localities where the sample were

collected tend to make the genetic diversity more obviously, sometimes it maybe the distance between two species.

In this thesis, we obtain 6 specific bands, ATN4-1140 and ATN4-168 of *P. yezoensis* LYG ; AJ512812-1214、AJ512812-360、AJ512806-404 and AJ512806-313 of excellent strain CS of *P. hai tanensis*.

We repeated the experiment for several times and these specific bands appeared stable. Forther study on the linkage between specific bands and excellent trait will be hopefully for molecular genetic breeding of *P. hai tanensis*.

Keyword: *Porphyra hai tanensis* ; Microsatellite ; Genetic marker

## 一、前言

### 1 遗传标记技术概述

遗传标记<sup>[1][2]</sup> (Genetic makers) 是指用来区分不同的个体或群体, 能够稳定遗传的物质或性状。它是基因型的特殊的易于识别的表现形式, 是生物分类学、育种学、遗传学和物种起源与进化等研究的主要技术指标之一。理想的遗传标记主要应具备以下几条标准<sup>[3][4]</sup>: 1) 具有较强的多态性; 2) 表现为共显性; 3) 选择中性(即无基因多效性); 4) 对主要的性状无影响; 5) 经济方便易于观察记载。

随着生物学技术的不断发展, 遗传标记技术也随之不断发展, 最早的遗传标记是形态标记 (Morphological markers)<sup>[5][6][7]</sup>, 仅限于易于识别的形态、生理和生化特性, 如颜色、形状、大小、生理功能缺陷等。

20 世纪 60 年代开始, 随着电泳技术的发展, 多态蛋白作为遗传标记在研究中得到广泛的应用, 但由于可分析的蛋白种类少、变异性低, 限制了蛋白质作为遗传标记的发展和应用<sup>[3]</sup>。以上标记方法都属于基因表达型的标记, 易受环境条件和发育阶段的影响, 可以利用的多态位点少, 存在很大的局限性。后来在显微镜技术的支持下诞生了细胞学标记 (Cytological markers)<sup>[8]</sup>, 该标记是指染色体核型 (染色体的数目、大小、着丝粒的位置等) 和带型 (G 带、C 带、N 带等) 的标记。

从 20 世纪 80 年代开始, 由于 DNA 重组、限制性内切酶消化、分子杂交、DNA 序列快速分析、PCR 等一系列分子生物学实验技术的建立, 人们能够比较方便的分析检测遗传物质 DNA 的多态性, 从而出现了多种多样的建立在 DNA 水平上的分子遗传标记 (Molecular genetic markers)<sup>[2][8]</sup>。分子遗传标记突破了表达型标记的局限性, 其变异只来源于 DNA 序列的差异, 具有稳定性高、受环境影响较小、信息含量高、不同层次和类群之间广泛可比等优势, 因而成为遗传标记中又一个强有力的工具。

在人类基因组计划的推动下,分子遗传标记的研究与应用得到了迅速的发展。已经建立了限制性酶切片段长度多态性(Restriction fragment length polymorphism, RFLP)<sup>[9]</sup>、单链构型多态性(Single strand conformation polymorphism, SSCP)<sup>[10]</sup>、小卫星 DNA(Minisatellite DNA)<sup>[11]</sup>、微卫星 DNA(Microsatellite DNA)<sup>[12]</sup>、随机扩增多态性 DNA(Random amplified polymorphic DNA, RAPD)<sup>[13][14]</sup>、扩增片段长度多态性(Amplified fragment length polymorphism, AFLP)<sup>[15]</sup>、线粒体 DNA(Mitochondrial DNA, mtDNA)<sup>[16]</sup>、表达序列标签(Expressed sequence tags, ESTs)<sup>[17]</sup>等技术。表 1 简单概括了目前常用的分子标记技术的原理及其优缺点。

## 2 微卫星的简介

### 2.1 微卫星的发现

生物学家在 20 世纪 70 年代就已经知道真核基因组中存在着短串联重复位点,但直至 1982 年 Hamada<sup>[12]</sup>等发现从酵母到脊椎动物中的多拷贝多聚(TG)<sub>n</sub>时,这些序列的数目之大和存在之广泛才显现出来。这一发现后来被 Tautz 和 Renz<sup>[18]</sup>所证实:它们用不同微卫星序列与不同有机体中的基因组 DNA 杂交发现存在着许多类型的简单重复序列。1985 年,Jeffreys<sup>[19]</sup>等发现了人基因组中有更长重复单元的串联重复序列,即小卫星 DNA(Minisatellites)。与微卫星一样,小卫星的串联重复单位的数目也显示出可变性,因此二者被统称为可变数目串联重复位点(Variable number of tandem repeats, VNTRs)<sup>[20][21]</sup>。但在应用方面,小卫星明显逊于微卫星。



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](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库