

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200510032422.8

[51] Int. Cl.
C12Q 1/68 (2006.01)
C12P 19/34 (2006.01)
C12N 15/11 (2006.01)

[43] 公开日 2006 年 8 月 9 日

[11] 公开号 CN 1814787A

[22] 申请日 2005.11.24
[21] 申请号 200510032422.8
[71] 申请人 中国农业科学院麻类研究所
地址 410205 湖南省长沙市咸嘉湖西路 348 号
[72] 发明人 揭雨成 蒋彦波 周建林 张 健

[74] 专利代理机构 长沙永星专利事务所
代理人 周 咏 林毓俊

权利要求书 5 页 说明书 14 页 附图 5 页

[54] 发明名称
苧麻微卫星 DNA 标记

[57] 摘要
本发明涉及一种苧麻的 DNA 分子遗传标记，提供了 15 个苧麻微卫星位点的 DNA 序列及扩增上述 15 个苧麻微卫星位点的引物序列和扩增方法，15 个苧麻微卫星位点用于苧麻品种分类、遗传关系分析和标记辅助育种，重复性好，是一种可靠有效的分子标记。

1. 一种苧麻微卫星标记, 其特征在于, 所述微卫星标记的编号分别为 BN19、BN20、BN21、BN22、BN23、BN24、BN25、BN26、BN27、BN28、BN29、BN30、BN31、BN32、BN33 其核苷酸序列是:

BN19:

taaattgtga aggccatttt gggccttcac tttgttgaat gccaaccca tttatgggcc	60
taacagcaag aaagctgtga aggctatttt cgaccttggt ctagcgctc ataagtggct	120
aacgcccatt tgtatcttgg ccaaagtgtg aagaaggcct tgaacctagt agtgggccac	180
ttaattactc aaagagagag agagagagag agagagagag agagagagag agagagagag	240
agagagagag agagagagag agagagagag aggggttttc tgagatgggc tagctcaaag	300
tcaggtgggc ctggcgttgg cccgaaatga ccaaactcga cccgaccgg aagtgaccaa	360
cctcgggtca agaagtgaca cgtggacaga agtacctaac tgtcagctc aggtaatttc	420
atggaagtgg ataaagaaac agagagagag agagagcgcg agatttttagc gccttttaac	480
cagacacaac cgttccaagt tttgaaaagc gctataaggg tgaatctgct ccacgacaga	540
ttcgatttca tcattacttt cgaacccaaa agacttcaat tgacgaaagc cttctttatc	600
taattgataa acaatatattt tgacaccgc aaatccatat aagtgaata cttcagattt	660
tttcacgatac attt	674

BN20:

taaggcttgt tggacctcca agtgagtccc taatacttat tataatatat tatatgttca	60
aatactcagt tgggatcaaa acaactttgt tagagtcgct tcggagccaa aaaactattt	120
tgaaggctat atttcgacaa aactagttat aacgatttac tttttgcgcg aaataaattt	180
ttaagcttgg agtagtcaag agtggttgaa gctctaacca ctagagattt tgagaagcgc	240
acagtatgag cgaaaatggg cttgtgggtt ttggtgtaga tggcaaagga aggtgaagaa	300
caagcgtaga atgtcgaagc agagaacgcc atcgaagggg agagagagag agagagagag	360
agagagagag agagagagag agagagagag aattctagaa aatctcttac ttgcttttta	420
cttgtaatct ccagattagc aaagtcgaca cgtggcgcaa cggacatccc gagttgggat	480
accagtcac gtgcctcacg tgaagttggg acaaaatttt gtcccaacat ttacatttag	540
cataagatag tgttactgtg atatccgat t	571

BN21:

caagtgaata tcaagcatat agcttcttct tttctctctc cgtttccett tttccettct	60
tttcaggaca tttcagatac tttctggttt tatccaatgt tgcacaaaag aaaatatgat	120
tcactaacat gtcaatacgg gaaagagaac tcaatcaaat caaatcaaat caaacgatat	180
cacagacaac aatcacgtat catgaattac tggtcacaca tattcttgtg atagtcaaga	240
ctagatcaag aaatcatgca ttttcctttt atacatagca gagaaaacct tagacttgta	300
tatatgtctg tgtgtgtgtg tgtgtgtgag agagagagag agagagagag agagagagag	360
agagagagag agagagagag agaattttgc acgtaactgg caataattgg ccgtgtattc	420

caaaaaactt ggaaaatgaa ggcatagcca aaagcatctt caatcttcat ctccggggtc 480
gattggtaat ttacacaate ttcttcttat gatatgttat tgtttgatca aagaaatttt 540
atgttgaacg atttttcatt gctgtttata acttcaggga aattacagaa atggacgctt 600
catgtctga ttatgattat catctttacc ctttgaccag cttgcagatt ggg 653

BN22, BN23, BN24:

taataataaa caataataat aataataata atcacctagc actggggact cttctgggta 60
gctggggctc gagctcagt ggcaagccca ggaagccatt gaagcggtcg aaggtcacgt 120
gcgacacgtg cctgacctct gtgggccagc tgatctccaa cgccgacgac gaccccgacg 180
ccgacgccga cgacgacgtc gacgacacgt cgtctctctc gacgctgcat gtgactatgg 240
acttctcag agccgtcacc agcacatcca cgatcgcgaa ctgatgagag ccattgccgt 300
cgtctctgcc attatcgccg ccgtggtaaa gccgagcctt gctgctaaac ggcgtcgtca 360
cgggggttgta caacgcctcg tcttcgccgt ctctgtacaa ttcgttctcc gactcttctt 420
cttcttcttc ttcttcttcg tcggattctt gtctgtctat gaagataggg ctgggtgggg 480
ccgtgttgaa ctcggcgagc ccgcaagatt ttgaccggaa aagccgagtc atggcgagag 540
gtcaagatca gagaaaccaa aacagagtag tgtttgtgtg tttgatttgt tttgagagtt 600
gagagagaga gagagagaga gagagagaga gagagagaga gagagagaga gagagagaag 660
agccggcctt ggaagaaaca agaaggagaa gagaaaagct tgatttttcc aagctaaaac 720
gtaaggtaac ttagccagct tttcttatag tttgagtttt 760

BN25:

taacaactca ccactgtgat ggaccaattg actcatcgtc aacagaatga ttgatcggtc 60
cactttacaa cgatcggtcg gctccttgca atgaccgatt ggtccagttg gctcgtcacc 120
gacatgatga cgagttgggt ctccttctca acgttagatt ggctcgcttt ctggccacca 180
acataatgat taaataaatt ttattctctc tcaactcata ccaataatta cttcacaaat 240
atcatttttc tacttctttt atcttttctc tctaggtctt ctctttcttc cgatcttctt 300
tcttttctct ctctctctct ctctctctct ctctctctct ctctctctgg aattctcgct 360
ccctctctgt ttcatctctc acactctccc tctctctcat atctgctctg atcactatac 420
aacgggggtta gactttggag tttgaatatg ttattacgct tgatgttggc tgttctctct 480
tctaagctca aaactgaaat actttttttt ttactggtat tgatagaat 529

BN26:

taacccaact caagctgaag aaacttattc aatggtcacc gctaaccgct tttggtccca 60
aatctttggg gttgcttttt ccaataaacg ttggttacat ttctttatgt tatttgtacc 120
agtcactggg ttatggatga gtgctcttgg agtagtcggg ctggctttga atctacgtgc 180
ctatgacttc gtttctcaag aaatccgtgc agcggagat cctgaatttg agactttcta 240
cacaaaaaat atcctcttaa tttgttgttt gtgtgtcagt gtttgttggtg atttcagggg 300
agacagagag agagagagat tgtgagaaag agaaagagag agagagagat gaaagtgaag 360
gctgaattat tggaaagata gatacagaga catgtcgttt gtgggttctg agtttggaatt 420
ggttgagata taatcatgcc ggccaatggc aatcacggaa agtttagttt tt 472

BN27:

taagatgtac caaagaaatt ggggggcccag agaagcaca gagagaggct aatctggaca	60
taagaaccccc caacactttg gaagtggaaat caatatatgc ctctagaaca aagccatcaa	120
gaaatcgatc atcagatctc aaacccttga agccgaaagg agaggcattt atactcaacc	180
cacgcacaca gagccaaaat gaaaattgct ttacaccaaa gagagagaga gagagggagt	240
aatgattcga ggcttagtga agagtagagt tgtgaaggat atttataggg tggcctaaaa	300
ccctaggttg tgaacgatgc tgagaagata tcagctgc	338

BN28:

acaaaacctc cccaatcaat ttcaagtttg gaggccgacg atggtgaggt ggatggctgc	60
ggcggctgtg cgattttcgg catagtccga cagtttccga tgacaaacca ctgctcaaaa	120
tattcctctc gtcgagagct ttccaacggt accaagtatg catcaatcgg acttaggatg	180
agaaagtat gagtgttcga attttgaaga atttttgaaa aaaataattg aggagagaaa	240
gagaattcga atttagagaa gaaagagaga gagggtgaca gaaatagggg gaagaagaag	300
aagaaaagga aaagaaaagg ggaaaaagaa aaagaaaaag tgatgtaatg ggttggtgag	360
tgtatt	366

BN29:

taatcatcaa tccatgtcgt tttcagcctt gccgtttctt cagtaggtct cacttgttct	60
ctaattgtcg ttttcacgtc tccttcgaca acaaaaacga cacgtcgttt acatcccccg	120
ctctcgcagc ctcaaaaacc ccaaaaaacc ccaacaaatc tccttcggcg tttagcttct	180
cagattgaga cacagagaga gagagagaga gagagagaga gagagagagg agagagagag	240
aggggtgggt cagtacatgt ggcagattcg cacgtgcctc tttgtgccct tggaaaatgc	300
ccaaaattag cacttggcct ctgcaaaaac tagtactttg agttgagcaa catatatgaa	360
ttcacatttc cacgctaata cactatcttt cctattatct cttaaaagaa ataaaaaaaa	420
tttcctaaat acgaaggac aattttcatt gaaactacga taaatcaatg ttcctagaca	480
tttgttgttg caaataccaa acataatcac tttcttcacc tcttgcatct tgaatttct	540
tt	542

BN30:

taagaaagac ttttttgac caaatgatc atatcataca ttagtcaact tgattttgat	60
aaaatcaagg agcttggcat ttgaagaata gttctatatg tactactttt ttttagaaa	120
aaaatgtgat tgactttgat ataattaaac atttataaac cttttgaatt agcagagaaa	180
agggcagttg gttattattg agctagctca atacagtttg gtcaggctga gaaaattggc	240
gatataagta gatataat tttacctata ataagtcata ggcaaatgat gcactaaacg	300
caaatttcca agatgattta aggggtccaa atccttttat acttaggtga gtttttagag	360
agagtttcac ttgtgtcttt ctctctctct ctctctctct ctctctctct ctctctctct	420
ctctatctct ataccattt acagctccat tttctttatg aatgaatgtt gacgcacgct	480
ttcacctaac tctgctttct aatctaaaat caagattgga agagttttat gttttctttt	540
tcgacttcta gagataacat ttttttggg tattgcgtat gatgattgga tataaatgtt	600
gactttttta agggcttttt ttggcaccga aatgactatg gcgaagtgtt ttgatccca	660

aatgagtgtt 670

BN31:

taaaaaatgg agacaccatt atcatctaaa attcgaagaa aattcaaaag cagtgcacagg 60
 agttgtagac ttacacccat acgtttgccc ttgcctccag ccagaagaat gaccgaaacg 120
 cttttttcct ttactaaacc aaccttttca gcagaacaac aaaccaacaa acttggcttt 180
 gaaccaactc ttccacgtct cactgcacgc ccaacaattg caagaccatg taaagattca 240
 gaatctattht aggaaaacag accaaaaaaa aaaaaaaggg gactacttgc ctgggaatgg 300
 aagattgaaa tgcggaagtg tgtgagaaag agggatagtc ctcacatcgg aagaaaaagc 360
 agaaaagggtg aggtcagac ggagagtggg agtgggtatg gccatatctg ttttagtgtht 420
 ttcggattgg aagtggcatt cactgccact gctgactttg atacgcagag cacaacgcaa 480
 cacagaatga agttcgggcg gcgatggatg gcttggggtht tctcgagacg atgggcgggtg 540
 gtcggagggg aaggtacgcc gcgattctca gcggcagagg cgacggcgtht cggcagtgat 600
 tttgggtggt tcaatthtgg gthtctctcg gaaaaagatg gcggtgaccg actthtgthc 660
 cggcagthtgg ataacaaaga tcgagagaga gagagagaga gagagagaga gagagtgagt 720
 acgtgtthcc tggaaagtagt agthtctctg gaggcgacag ccgaggcgat cgatggctthg 780
 gccggtctcg cggatccaga atccgacggt gtaggttgct ttgcccag tcccatctta 840
 gcgagctcgg agtcgtcgtc thcagthggg atthtaggtth ctgagthcaa cagaccaaga 900
 thtthgattth gggagaagag aatgatacc cgagaaagcg ggggattggg gtataaaacg 960
 acgactcacc ggtcgtggat gthtthttht gacaattacg tgattcccat thtaccaggg 1020
 gacgaattca tctatcctaa agatthcgta ccgactcaat tcaactthg 1068

BN32:

taatcgcctt actagthgct gtactgatat actthggagc gaagaaaaga aaaatgatca 60
 agctcaagga gaaattcttht gtagaaaatg gaggatthgat gttacaacaa caactthgcta 120
 gtagaagacc agtcgagacg acaaaaatat thtctgagga cgaactgaga agcgccacaa 180
 acaattacca ccaaagaga gthtctaggag aaggaggatth tggaaatagth tataaaggaa 240
 taththccaga tcaaagggtth gthtgaatta ataacacctc aaaaaagctc agaaaaaaa 300
 aaaaaccaga aaccaaathc atgththgtht gagagagaga gagagaggga gagagagaga 360
 gagagagaga gagagagthc aagthctctth gthctcttac gccagctctc gacacgthc 420
 ctcatggggt thtctatthc thctctcath thctcatgct thgctthggc ththgctthc 480
 ccaathththc thctgthaaca thctctctatth caaaataathc thcatthgth gatathcaat 540
 caaaagaaga ggcgctatthg thtaththgth thctactgthc aaathctacg cgtatathgta 600
 cgcacatgaa aatgtatthg agthattath gcgthattth taagtgaga 649

BN33:

attctctctc thcaaaggta aagthtctct thctctctct thctththth thtctgtga 60
 atgtatagta atggaatgaa thtcaagaaa ccatgctcat gcaagthctg cgatgatagth 120
 thtggthgacg ggtthcgctth ctgthctctth agththtgthc gaaththgca ththcgtagg 180
 cattctthgag ggtcggagag tagthgattgg agathctagth thcggtaatg gcggtctth 240
 aggtthctact thctgattgth ggtthththth thgtatggthg ththcgthgth gththggatc 300

tgtgggaaat tttggatttt ttttgg

326。

2. 根据权利要求 1 所述的苧麻微卫星标记, 其特征在于所述 BN19、BN20、BN21、BN22-23-24、BN25、BN26、BN27、BN28、BN29、BN30、BN31、BN32、BN33 十五个位点的引物序列为:

BN19-F: GCT AAC GCC CAT TTG TAT CTT G

BN19-R: GGC CCA CCT GAC TTT GAG C

BN20-F: TGG CAA AGG AAG GTG AAG AAC AAG

BN20-R: TGA GGC ACG TGA CTG GGT ATC C

BN21-F: AGA TGC TTT TGG CTA TGC

BN21-R: TCA AAC GAT ATC ACA GAC AAC

BN22-F: GCC CAG GAA GCC ATT GAA GC

BN22-R: GAC GAC GGC AAT GGC TCT CA

BN23-F: TGC CGT CGT CTC TGC CAT TAT CG

BN23-R: GCC CCA CCC AGC CCT ATC TTC A

BN24-F: CTT CTT CGTCGG ATT CTT GTT C

BN24-R: GCT TTT CTC TTC TCC TTC TTG TTT

BN25-F: CTC TCT CAA CTC ATA CCA ATA AT

BN25-R: AGA GAA CAG CCA ACA TCA A

BN26-F: CGT GCC TAT GAC TTC GTT TCT C

BN26-R: TTT CCA ATA ATT CAG CCT TCA CTT

BN27-F: GGA CAT AAG AAC CCC CAA CAC T

BN27-R: GGC CAC CCT ATA AAT ATC CTT CAC

BN28-F: TTC CGA TGA CAA ACC ACT GCT

BN28-R: ACA CTC ACC AAC CCA TTA CAT CAC

BN29-F: CTT GCC GCT TCT TCA GTA GGT CTG

BN29-R: GGC ATT TTC CAA GGG CAC AA

BN30-F: AAT TAG CAG AGA AAA GGG CAG TT

BN30-R: AAA GCG TGC GTC AAC ATT CA

BN31-F: AAG GTA CGC CGC GAT TCT C

BN31-R: TGG GCA AAG CAA CCT ACA CC

BN32-F: CGC CAC AAACAA TTA CCA CCA A

BN32-R: AAT AGG ACA ACC CCA TGA GAG CAC

BN33-F: AAG GTA AAG TTT CTC TCT CTC TC

BN33-R: AGA ATC TCC AAT CAC TAC CTT

苧麻微卫星 DNA 标记

技术领域

本发明涉及分子标记技术，具体涉及一种苧麻的 DNA 分子遗传标记。

背景技术

微卫星（又称为简单重复序列，SSR）是由 1~6 个核苷酸组成的短序列串联重复多次而组成的一段 DNA，广泛分布于真核基因组中。微卫星序列两侧有保守的 DNA 序列，根据其两侧的保守序列设计引物，可用 PCR 扩增出微卫星位点的序列。由于微卫星中重复单元的重复的次数不同，因而扩增出的微卫星序列的长度呈现多态性（即 SSRLP 或 SSR）。由于其具有多态性丰富、重复性高、共显性遗传等优点，被广泛应用于遗传图谱的构建、基因定位、遗传关系分析，品种鉴定等领域。如用微卫星标记分析苧麻品种的亲源关系（Zhou 等，2005，Progress in Natural Science, 15: 137-142）、用微卫星 DNA 标记进行猪品种分类的专利申请“适于猪品种分类的猪微卫星 DNA 标记”（公开号 CN 1370834A）。

苧麻（又称为“中国草”，种名为 *Boehmeria nivea*(L.)Gaud）属于荨麻科苧麻属，是我国重要的纤维经济作物。苧麻的品种分类、遗传关系分析等一般是根据形态、生理指标进行，准确度低、且受生长季节、发育时期等的限制。苧麻的分子标记的研究起步较晚，有研究者尝试用 RAPD（随机扩增多态性 DNA）标记进行了苧麻品种亲源关系分析，取得了成功（郭安平，RAPD.湖南农业大学博士学位论文，1999.）。但是，RAPD 标记在绝大多数情况下是显性标记，不能区别纯合基因型与杂合基因型。如何解决苧麻品种分类、遗传关系分析中存在的准确度低及受生长季节、发育时期限制的问题，是开展苧麻研究迫切需要解决的技术。

发明内容

本发明旨在分离克隆微卫星 DNA 标记，建立苧麻的微卫星 DNA 的技术体系并利用这些分子标记进行品种分类、遗传关系分析和辅助育种。

实现上述发明目的的技术方案包括苧麻（CT/AG）_n 微卫星富集文库的构建、含微卫星序列的阳性克隆的筛选及测序，得到 15 个含有（CT/AG）_n 微卫星克隆，确定了 15 个多态性丰富的微卫星标记 BN19、BN20、BN21、BN22、BN23、BN24、BN25、BN26、BN27、BN28、BN29、BN30、BN31、BN32、BN33；BN19 为 674 个核苷酸、BN20 为 571 个核苷酸、BN21 为 653 个核苷酸、BN22、BN23、BN24 均为 760 个核苷酸、BN25 为 529 个核苷酸、BN26 为 472 个核苷酸、BN27 为 338 个核苷酸、BN28 为 366 个核苷酸、BN29 为 542 个核苷酸、BN30 为 670 个核苷酸、BN31 为 1068 个核苷酸、BN32 为 649 个核苷酸、BN33 为 326 个核

甘酸。

附图说明

图 1 是用 BN19 位点的特异性引物扩增 25 个苧麻品种 DNA 的 PAGE 电泳图

图 2 是用 BN20 位点的特异性引物扩增 25 个苧麻品种 DNA 的 PAGE 电泳图

图 3 是用 BN21 位点的特异性引物扩增 25 个苧麻品种 DNA 的 PAGE 电泳图

图 4 是用 BN22 位点的特异性引物扩增 25 个苧麻品种 DNA 的 PAGE 电泳图

图 5 是用 BN23 位点的特异性引物扩增 25 个苧麻品种 DNA 的 PAGE 电泳图

图 6 是用 BN24 位点的特异性引物扩增 25 个苧麻品种 DNA 的 PAGE 电泳图

图 7 是用 BN25 位点的特异性引物扩增 25 个苧麻品种 DNA 的 PAGE 电泳图

图 8 是用 BN26 位点的特异性引物扩增 25 个苧麻品种 DNA 的 PAGE 电泳图

图 9 是用 BN27 位点的特异性引物扩增 25 个苧麻品种 DNA 的 PAGE 电泳图

图 10 是用 BN28 位点的特异性引物扩增 25 个苧麻品种 DNA 的 PAGE 电泳图

图 11 是用 BN29 位点的特异性引物扩增 25 个苧麻品种 DNA 的 PAGE 电泳图

图 12 是用 BN30 位点的特异性引物扩增 25 个苧麻品种 DNA 的 PAGE 电泳图

图 13 是用 BN31 位点的特异性引物扩增 25 个苧麻品种 DNA 的 PAGE 电泳图

图 14 是用 BN32 位点的特异性引物扩增 25 个苧麻品种 DNA 的 PAGE 电泳图

图 15 是用 BN33 位点的特异性引物扩增 25 个苧麻品种 DNA 的 PAGE 电泳图

具体实施方式

1: 苧麻(CT/AG)。微卫星富集文库的构建

(1) 按郭安平等方法(参见郭安平, 1997, 中国麻作, 19: 4-10)提取苧麻基因组 DNA。用限制性内切酶 Mse I 酶切苧麻基因组 DNA, 酶切产物在 1.2% 琼脂糖凝胶上电泳, 紫外光下切下 300-1000bp 大小的 DNA 片段并用凝胶回收试剂盒(购自 Qiagen 公司)纯化回收的酶切产物。

(2) 将碱基互补的寡核苷酸 PHC-1 (5' -AGATGGAATTCGTACACTCGT-3') 和磷酸化的寡核苷酸 PHC-2 (5' -phos-TAACGAGTGTACGAATTCATCT-3') 等摩尔混合, 95℃变性 5 分钟, 60℃退火 1 小时, 形成具有 MseI 粘性末端的接头。

(3) 将酶切产物和接头用 T4DNA 连接酶连接。连接产物用等体积的酚/氯仿/异戊醇 (25: 24: 1) 抽提一次, 离心收集上清液。在上清液中加 0.3M 醋酸钠 (pH5.2) 和 2 倍体积的无水乙醇沉淀, 70%乙醇清洗一次, 真空抽干 DNA 后溶于 50μl 无菌水中。

(4) 用生物素标记的寡核苷酸探针 (CT)₁₅ 与连接产物 DNA 片段杂交。具体操作为: 在总体积 100μl 杂交液 (6×SSC, 0.1%SDS) 中加入 500ng 连接产物和 100pmol 生物素标记的

寡核苷酸探针，并在 95℃ 下变性 10min，60℃ 杂交 1 小时。

(5) 加入 100μl (10μg/μl) 磁珠(Dynabeads M-280, 购自 Dynal Biotech 公司)，并在室温放置 30 分钟。

(6) 用磁铁吸附磁珠，弃上清。磁珠用 400 μl 洗涤缓冲液 (6×SSC, 0.1% SDS) 在 60℃ 下洗涤 15 分钟，然后在室温下用分别用 2×SSC 和 1×SSC 溶液洗涤两次，并弃上清。

(7) 最后加入 50 μl 无菌水，在 90℃ 下保温 10 分钟，小心吸取上清，上清液即为含有 (GA)_n 重复序列的单链 DNA 片段。以 PHC-1 为引物，以单链 DNA 片段为模板进行 PCR 扩增获得双链目的片段。

(8) 将扩增产物纯化后连接到 pMD18-T 载体 (购自大连宝生物公司) 上，然后将连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞，转化菌液涂抹在含有 IPTG 和 X-gal 的 LB 固体培养基平板上进行蓝白斑筛选。

2. 含微卫星序列的阳性克隆的筛选、测序及微卫星引物的设计

(1) 挑取白色菌落并接种到 3 ml LB 培养液中，于 37℃ 培养过夜，然后提取质粒。

(2) 质粒 DNA 为模板，采取 PIMA 方法 (参见 Lunt 等, 1999, Molecular Ecology, 8: 891-894) 筛选含有 (CT/AG)_n 微卫星序列的阳性克隆。

(3) 将阳性克隆测序，分析是否含有 (CT/AG)_n 重复序列。通过测序，共得到了 16 个含 (CT/AG)_n 微卫星序列的阳性克隆。

(4) 根据微卫星重复序列两侧的保守序列设计引物。

3. 利用苧麻微卫星 DNA 标记分析苧麻品种间的遗传差异

将上述微卫星标记用于 25 个苧麻品种的分类，确定了 15 个多态性丰富、适于苧麻品种分类的微卫星标记 BN19、BN20、BN21、BN22、BN23、BN24、BN25、BN26、BN27、BN28、BN29、BN30、BN31、BN32、BN33 (表 1)。具体操作过程如下：

(1) 按郭安平等方法 (参见郭安平等, 1997, 中国麻作, 19: 4-10) 提取各个苧麻品种的 DNA 作为模板，进行 PCR。

(2) 分别用 BN19、BN20、BN21、BN22、BN23、BN24、BN25、BN26、BN27、BN28、BN29、BN30、BN31、BN32、BN33。15 个位点的 15 对引物 (引物序列见表 1) 扩增这 25 个品种苧麻的 DNA。

(3) 将 PCR 产物在 6% 变性聚丙烯酰胺上电泳，然后进行银染并拍照，得到图 1-18。

(4) 结果分析：每个样品的扩增条带按有或无记录，扩增条带存在时赋值为 1，否则赋值为 0。采用 SPSS10.0 for windows 统计分析软件中的系统聚类分析程序，距离测量选用相

关系数距离法，用类间平均连锁法（Between-groups linkage）进行聚类分析并建立系统树。

具体分析方法参见《系统与进化植物学中的分子标记》（邹喻苹、葛颂、王晓东编，科学出版社，2001年）中的方法进行。

由附图 1-15 可看出，本发明的 15 个微卫星点的序列长度在供试的 25 个品种中都出现多态性，由此可见，本发明的这 15 个微卫星标记能用于苧麻的品种分类和遗传关系分析。

表 1 引物特性表：引物序列，退火温度，片段大小

位点	基序	引物序列 (5'→3')	产物 大小 (bp)	退 火 温度 (℃)
BN19	(AG) ₄₀	F: GCT AAC GCC CAT TTG TAT CTT G R: GGC CCA CCT GAC TTT GAG C	194bp	60℃
BN20	(GA) ₂₈	F: TGG CAA AGG AAG GTG AAG AAC AAG R: TGA GGC ACG TGA CTG GGT ATC C	218bp	64℃
BN21	(CT) ₂₈ (AC) ₉	F: AGA TGC TTT TGG CTA TGC R: TCA AAC GAT ATC ACA GAC AAC	290bp	51℃
BN22	(GAC) ₃ C(CCGACG) ₃ (ACG) ₂	F: GCC CAG GAA GCC ATT GAA GC R: GAC GAC GGC AAT GGC TCT CA	216bp	64℃
BN23	(CT) ₂ (TCT) ₇ (TCG) ₂	F: TGC CGT CGT CTC TGC CAT TAT CG R: GCC CCA CCC AGC CCT ATC TTC A	187bp	69℃
BN24	(GA) ₂₉ (AG) ₂	F: CTT CTT CGTCGG ATT CTT GTT C R: GCT TTT CTC TTC TCC TTC TTG TTT	269bp	58℃
BN25	(CT) ₂₁	F: CTC TCT CAA CTC ATA CCA ATA AT R: AGA GAA CAG CCA ACA TCA A	273bp	51℃
BN26	(GA) ₇ T(TG) ₂ (GAGAAA) ₂ (GA) ₇	F: CGT GCC TAT GAC TTC GTT TCT C R: TTT CCA ATA ATT CAG CCT TCA CTT	201bp	60℃
BN27	(AG) ₈	F: GGA CAT AAG AAC CCC CAA CAC T R: GGC CAC CCT ATA AAT ATC CTT CAC	240bp	61℃
BN28	(GAA) ₅	F: TTC CGA TGA CAA ACC ACT GCT R: ACA CTC ACC AAC CCA TTA CAT CAC	282bp	60℃
BN29	(AC) ₂ (AG) ₁₈ (GA) ₆	F: CTT GCC GCT TCT TCA GTA GGT CTG R: GGC ATT TTC CAA GGG CAC AA	274bp	64℃
BN30	(CT) ₂₂	F: AAT TAG CAG AGA AAA GGG CAG TT R: AAA GCG TGC GTC AAC ATT CA	316bp	60℃
BN31	(GA) ₁₆	F: AAG GTA CGC CGC GAT TCT C R: TGG GCA AAG CAA CCT ACA CC	277bp	61℃
BN32	(GTT) ₂ (GA) ₈ GG(GA) ₁₄	F: CGC CAC AAACAA TTA CCA CCA A R: AAT AGG ACA ACC CCA TGA GAG CAC	267bp	63℃
BN33	(TC) ₉	F: AAG GTA AAG TTT CTC TCT CTC TC R: AGA ATC TCC AAT CAC TAC CTT	217bp	51℃

表 1 中 F 表示 5' 端引物，R 表示 3' 端引物。

本发明提供了 15 个苧麻微卫星位点的 DNA 序列及扩增上述 15 个苧麻微卫星位点的引物序列和扩增方法，15 个苧麻微卫星位点用于苧麻品种分类、遗传关系分析和标记辅助育种，重复性好，是一种可靠有效的分子标记。

序列表

<110> 中国农业科学院麻类研究所

<120> 苧麻微卫星 DNA 标记

<160> 13

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 674

<212> DNA

<213> 苧麻 (*Boehmeria nivea*(L.)Gaud)

<220>

<221> 重复单元

<222> (193)..(272)

<220>

<221> 重复单元

<222> (441)..(456)

<400> 1

taaattgtga aggccatttt gggccttcac tttgttgaat gccaaccca ttatgggcc	60
taacagcaag aaagctgtga aggctatfff cgaccttggt ctagcgctc ataagtggct	120
aacgccatt tgtatcttgg ccaaattgtt aagaaggcct tgaacctagt agtgggccac	180
ttaattactc aaagagagag agagagagag agagagagag agagagagag agagagagag	240
agagagagag agagagagag agagagagag aggggttttc tgagatgggc tagctcaaag	300
tcaggtgggc ctggcgttgg cccgaaatga ccaaactcga cccgaccgg aagtgaccaa	360
cctcgggtca agaagtgaca cgtggacaga agtacctaac tgtcagctc aggtaatffc	420
atggaagtgg ataaagaaac agagagagag agagagcgcg agatfftagc gcctffaac	480
cagacacaac cgttccaagt ttgaaaagc gctataaggg tgaatctgct ccacgacaga	540

ttcgatttca tcattacttt cgaacccaaa agacttcaat tgacgaaagc cttctttatc	600
taattgataa acaatatattt tgacacccgc aaatccatat aagtgaata cttcagattt	660
tttcacgatc attt	674

<210> 2
 <211> 571
 <212> DNA
 <213> 苎麻 (Boehmeria nivea(L.)Gaud)

<220>
 <221> 重复单元
 <222> (340)..(411)

<400> 2	
taagccttgt tggacctcca agtgagtcce taatacttat tataatatat tatatgttca	60
aatactcagt tgggatcaaa acaactttgt tagagtcgct tcggagccaa aaaactattt	120
tgaaggctat atttcgacaa aactagttat aacgatttac tttttgcgcg aaataaattt	180
ttaagcttgg agtagtcaag agtggttgaa gctctaacca ctagagattt tgagaagcgc	240
acagtatgag cgaaaatggg cttgtgggtt ttggtgtaga tggcaaagga aggtgaagaa	300
caagcgtaga atgtcgaagc agagaacgcc atcgaagggg agagagagag agagagagag	360
agagagagag agagagagag agagagagag aattctagaa aatctcttac ttgcttttta	420
cttgtaatct ccagattagc aaagtcgaca cgtggcgcaa cggacatccc gagttgggat	480
accagtcac gtgcctcacg tgaagttggg acaaaatttt gtcccaacat ttacatttag	540
cataagatag tgttactgtg atatccgat t	571

<210> 3
 <211> 653
 <212> DNA
 <213> 苎麻 (Boehmeria nivea(L.)Gaud)

<220>

<221> 重复单元
<222> (32).. (36)

<220>
<221> 重复单元
<222> (309).. (328)

<220>
<221> 重复单元
<222> (328).. (363)

<400> 3
caagtgaata tcaagcatat agctttcttct ttctctctct cgtttccctt ttcccttct 60
tttcaggaca tttcagatac ttcttggttt tatccaatgt tgcacaaaag aaaatatgat 120
tcactaacat gtcaatacgg gaaagagaac tcaatcaaat caaatcaaat caaacgatat 180
cacagacaac aatcacgtat catgaattac tggtcacaca tattcttgtg atagtcaaga 240
ctagatcaag aaatcatgca ttttcctttt atacatagca gagaaaacct tagacttgta 300
tatatgtctg tgtgtgtgtg tgtgtgtgag agagagagag agagagagag agagagagag 360
agagagagag agagagagag agaattttgc acgtaactgg caataattgg ccgtgtattc 420
caaaaaactt ggaaaatgaa ggcatagcca aaagcatctt caatcttcat ctccggggtc 480
gattggtaat ttacacaatc ttcttcttat gatatgttat tgtttgatca aagaaatttt 540
atgttgaacg atttttcatt gctgtttata acttcaggga aattacagaa atggacgctt 600
catgtcctga ttatgattat catctttacc ctttgaccag cttgcagatt ggg 653

<210> 4
<211> 760
<212> DNA
<213> 苎麻 (Boehmeria nivea(L.)Gaud)

<220>
<221> 重复单元
<222> (601).. (658)

<400> 4

taataataaa caataataat aataataata atcacctagc actggggact cttctgggta	60
gctggggctc gagctcagtg ggcaagccca ggaagccatt gaagcggtcg aaggtcacgt	120
gcgacacgtg cctgacctct gtgggccagc tgatctccaa cgccgacgac gaccccgacg	180
ccgacgccga cgacgacgtc gacgacacgt cgtctctctc gacgctgcat gtgactatgg	240
acttcctcag agccgtcacc agcacatcca cgatcgcgaa ctgatgagag ccattgccgt	300
cgtctctgcc attatcgccg ccgtggtaaa gccgagcctt gctgctaaac ggcgtcgtca	360
cggggttgta caacgcctcg tcttcgccgt ctctgtacaa ttcgttctcc gactcttctt	420
cttcttcttc ttcttcttcg tcggattctt gtctgtctat gaagataggg ctgggtgggg	480
ccgtgttgaa ctcggcgagc ccgcaagatt ttgaccgaa aagccgagtc atggcgagag	540
gtcaagatca gagaaccaa aacagagtag tgtttgtgtg tttgatttgt tttgagagtt	600
gagagagaga gagagagaga gagagagaga gagagagaga gagagagaga gagagagaag	660
agccggcctt ggaagaaaca agaaggagaa gagaaaagct tgatttttcc aagctaaaac	720
gtaaggtaac ttagccagct tttcttatag tttgagtttt	760

<210> 5

<211> 529

<212> DNA

<213> 苧麻 (Boehmeria nivea(L.)Gaud)

<220>

<221> 重复单元

<222> (306)..(347)

<400> 5

taacaactca ccaactgtgat ggaccaattg actcatcgtc aacagaatga ttgatcggt	60
cactttacaa cgatcggtcg gctccttgca atgaccgatt ggtccagttg gctcgtcacc	120
gacatgatga cgagttgggt ctccttctca acgttagatt ggctcgcttt ctggccacca	180
acataatgat taaataaatt ttattctctc tcaactcata ccaataatta cttcacaat	240

atcatttttc tactttcttt atctttttctc tctaggtctc ctctttcttc cgatcttctt	300
tcctttctct ctctctctct ctctctctct ctctctctct ctctctctgg aattctcgct	360
ccctctctgt ttcattctctc acactctccc tctctctcat atctgctctg atcactatac	420
aacggggtta gactttggag tttgaatatg ttattacgct tgatgttggc tgttctctct	480
tctaagctca aaactgaaat actttttttt ttactggtat tgatagaat	529

<210> 6
 <211> 472
 <212> DNA
 <213> 苧麻 (Boehmeria nivea(L.)Gaud)

<220>
 <221> 重复单元
 <222> (305).. (318)

<220>
 <221> 重复单元
 <222> (335).. (348)

<400> 6	
taaccaact caagctgaag aaacttattc aatggtcacc gctaaccgct ttggtccca	60
aatctttggg gttgcttttt ccaataaacg ttggttacat ttctttatgt tatttgacc	120
agtcactggt ttatggatga gtgctcttgg agtagtcggt ctggctttga atctacgtgc	180
ctatgacttc gtttctcaag aaatccgtgc agcggaagat cctgaatttg agactttcta	240
cacaaaaaat atcctcttaa tttgttggtt gtgtgtcagt gtttgtggtg.atttcagggg	300
agacagagag agagagagat tgtgagaaag agaaagagag agagagagat gaaagtgaag	360
gctgaattat tggaaagata gatacagaga catgtcgttt gtgggttctg agttggaatt	420
ggttgagata taatcatgcc ggccaatggc aatcacggaa agtttagttt tt	472

<210> 7
 <211> 338
 <212> DNA

<213> 苧麻 (*Boehmeria nivea*(L.)Gaud)

<220>

<221> 重复单元

<222> (220)..(235)

<400> 7

taagatgtac caaagaaatt ggggggccag agaagcaca gagagaggct aatctggaca	60
taagaacccc caacactttg gaagtggaat caatatatgc ctctagaaca aagccatcaa	120
gaaatcgatc atcagatctc aaacccttga agccgaaagg agaggcattt atactcaacc	180
cacgcacaca gagccaaaat gaaaattgct ttacaccaa gagagagaga gagagggagt	240
aatgattcga ggcttagtga agagtagagt tgtgaaggat atttataggg tggcctaaaa	300
ccctaggttg tgaacgatgc tgagaagata tcagctgc	338

<210> 8

<211> 366

<212> DNA

<213> 苧麻 (*Boehmeria nivea*(L.)Gaud)

<220>

<221> 重复单元

<222> (264)..(273)

<220>

<221> 重复单元

<222> (291)..(300)

<400> 8

acaaaacctc cccaatcaat ttcaagttg gaggccgacg atggtgaggt ggatggctgc	60
ggcggctgtg cgattttcgg catagtccga cagtttccga tgacaaacca ctgctcaaaa	120
tattcctctc gtcgagagct ttccaacggt accaagtatg catcaatcgg acttaggatg	180
agaaagttat gagtgttcga attttgaaga atttttgaaa aaaataattg aggagagaaa	240
gagaattcga atttagagaa gaaagagaga gagggtgaca gaaatagggg gaagaagaag	300

aagaaaagga aaagaaaagg ggaaaaagaa aaagaaaaag tgatgtaatg ggttggtgag 360

tgtatt 366

<210> 9

<211> 542

<212> DNA

<213> 苎麻 (Boehmeria nivea(L.)Gaud)

<220>

<221> 重复单元

<222> (194)..(229)

<220>

<221> 重复单元

<222> (230)..(241)

<400> 9

taatcatcaa tccatgtcgt tttcagcctt gccgtttctt cagtaggtct cacttgttct 60

ctaattgtcg ttttcacgtc tccttcgaca acaaaaacga cacgtcgttt acatcccccg 120

ctctcgcagc ctcaaaaacc ccaaaaacc ccaacaaatc tccttcggcg tttagcttct 180

cagattgaga cacagagaga gagagagaga gagagagaga gagagagagg agagagagag 240

agggggtgggt cagtacatgt ggcagattcg cacgtgcctc tttgtgccct tggaaaatgc 300

ccaaaattag cacttgccct ctgcaaaaac tagtactttg agttgagcaa catatatgaa 360

ttcacatttc cacgctaata cactatcttt cctattatct cttaaagaa ataaaaaaaa 420

tttccaaaat acgaaggaac aattttcatt gaaactacga taaatcaatg ttcctagaca 480

tttgtttgtg caaataccaa acataatcac tttcttcacc tcttgcattt tgaatttcct 540

tt 542

<210> 10

<211> 670

<212> DNA

<213> 苎麻 (Boehmeria nivea(L.)Gaud)

<220>

<221> 重复单元

<222> (380)..(423)

<400> 10

taagaaagac tttttttgac caaaatgac atatacata ttagtcaact tgattttgat	60
aaaatcaagg agcttggcat ttgaagaata gttctatatg tactactttt ttttagaaa	120
aaaatgtgat tgactttgat ataattaaac attataaac cttttgaatt agcagagaaa	180
agggcagttg gttattattg agctagctca atacagtttg gtcaggctga gaaaattggc	240
gatataagta gatataat tttacctata ataagtcata ggcaaatgat gcactaaacg	300
caaatttcca agatgattta agggtcctaa atccttttat acttaggtga gtttttagag	360
agagtttcac ttgtgtcttt ctctctctct ctctctctct ctctctctct ctctctctct	420
ctctctctct atatacattt acagctccat tttctttatg aatgaatgtt gacgcacgct	480
ttcacctaac tctgctttct aatctaaaat caagattgga agagttttat gttttctttt	540
tcgacttcta gagataacat tttttttggg tattgcgtat gatgattgga tataaatgtt	600
gactttttta agggcttttt ttggcaccga aatgactatg gcgaagtgtt ttgatccca	660
aatgagtgtt	670

<210> 11

<211> 1068

<212> DNA

<213> 苧麻 (Boehmeria nivea(L.)Gaud)

<220>

<221> 重复单元

<222> (683)..(714)

<400> 11

taaaaaatgg agacaccatt atcatctaaa attcgaagaa aattcaaaag cagtgcacgg	60
agttgtagac ttacacccat acgtttgccc ttgcctccag ccagaagaat gaccgaaacg	120

cttttttctt ttactaaacc aaccttttca gcagaacaac aaaccaacaa acttggttt	180
gaaccaactc ttccacgtct cactgcacgc ccaacaattg caagaccatg taaagattca	240
gaatctattht aggaaaacag accaaaaaaa aaaaaaagg gactacttgc ctgggaatgg	300
aagattgaaa tgcggaagtg tgtgagaaag agggatagtc ctcacatcgg aagaaaaagc	360
agaaaaggth aggcacagac ggagagtggg agtgggtatg gccatatctg ttttagtgth	420
ttcggattgg aagtggcatt cactgccact gctgactthg atacgcagag cacaacgcaa	480
cacagaatga agttcgggcg gcgatggatg gcttggggth tctcgagacg atgggcggtg	540
gtcggagggg aaggtacgc gcgattctca gcggcagagg cgacggcgth cggcagtgat	600
tttgggtggt tcaatthtgg gthtctctcg gaaaaagatg gcggtgaccg actthgttgc	660
cggcagthtg ataacaaaga tccagagaga gagagagaga gagagagaga gagagtgagt	720
acgctgtthc tggaagtagt agthtctthg gaggcgacag ccgaggcgat cgatggctth	780
gccggtctcg cggatccaga atccgacggt gtaggttgct ttgccc aaag tccatctta	840
gcgagctcgg agtcgtcgtc thcagtgggg atttaggtth ctgagtcaaa cagaccaaga	900
thttgattthc gggagaagag aatgatacc cgagaaagcg ggggattggg gtataaaacg	960
acgactcacc ggtcgtggat gththththt gacaattacg tgattcccat thtaccaggg	1020
gacgaattca tctatcctaa agattccgta ccgactcaat tcaacttg	1068

<210> 12

<211> 649

<212> DNA

<213> 苧麻 (Boehmeria nivea(L.)Gaud)

<220>

<221> 重复单元

<222> (331).. (346)

<220>

<221> 重复单元

<222> (349).. (376)

<400> 12

taatgcctt actagttgct gtactgatat acttgggagc gaagaaaaga aaaatgatca	60
agctcaagga gaaattcttt gtagaaaatg gaggattgat gttacaacaa caacttgcta	120
gtagaagacc agtcgagacg acaaaaatat tttctgagga cgaactgaga agcgccacaa	180
acaattacca ccaaaagaga gttctaggag aaggaggatt tggaatagtg tataaaggaa	240
tatttccaga tcaaagggtt gttgcaatta ataacacctc aaaaaagctc agaaaaaaaa	300
aaaaaccaga aacccaaatc atgtttgttt gagagagaga gagagaggga gagagagaga	360
gagagagaga gagagagtcc aagtctcttt gtccttctac gccagcctct gacacgtgct	420
ctcatggggt tgtctattc tcattctatc tcattcatgt tggccttggc ctttgccttc	480
ccaatttttc ctctgtaaca ctcttctatt caaaataatc tcattattgt gatattcaat	540
caaaagaaga ggcgctattg tttatttggt ttcatactgc aaattctacg cgtatatgta	600
cgcacatgaa aatgtattag agttattatt gcgttattta taagtgaga	649

<210> 13

<211> 326

<212> DNA

<213> 苎麻 (Boehmeria nivea(L.)Gaud)

<220>

<221> 重复单元

<222> (26)..(43)

<400> 13

attctctctc ttcaaaggta aagtttctct ctctctctct ctctttttt ttttctgtga	60
atgtatagta atggaatgaa tgtcaagaaa ccatgctcat gcaagttctg cgatgatagt	120
tttggtgacg ggtttcgctt ctgttctctt agtttgtgcc gaatttagca ttttcgtagg	180
catttcttag ggtcgaagg tagtgattgg agattctagt ttcggtaatg gcggatcttt	240
aggttctact ctctgattgt ggtttttttc tgtatggttg tgttcgttgc gtgttggatc	300
tgtgggaaat tttggatttt ttttgg	326

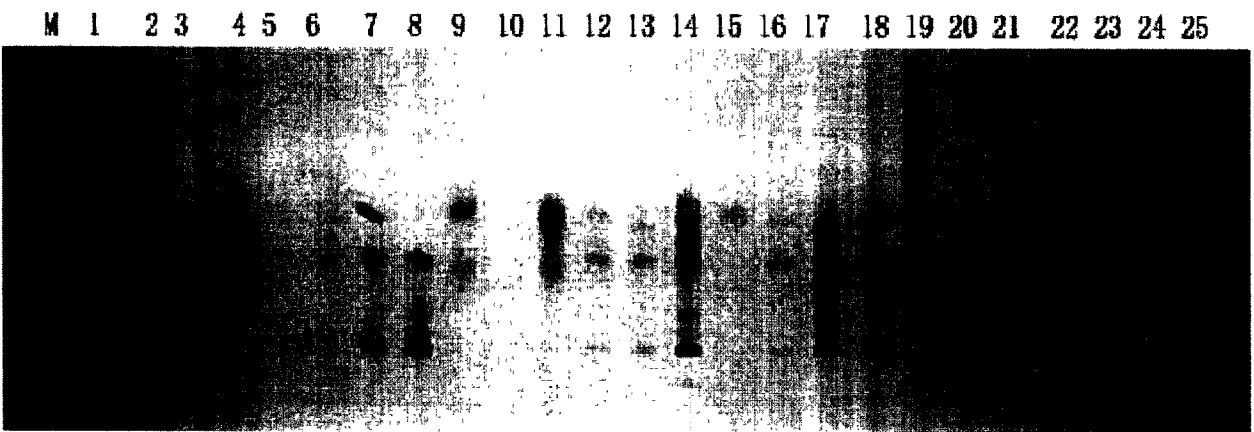


图 1

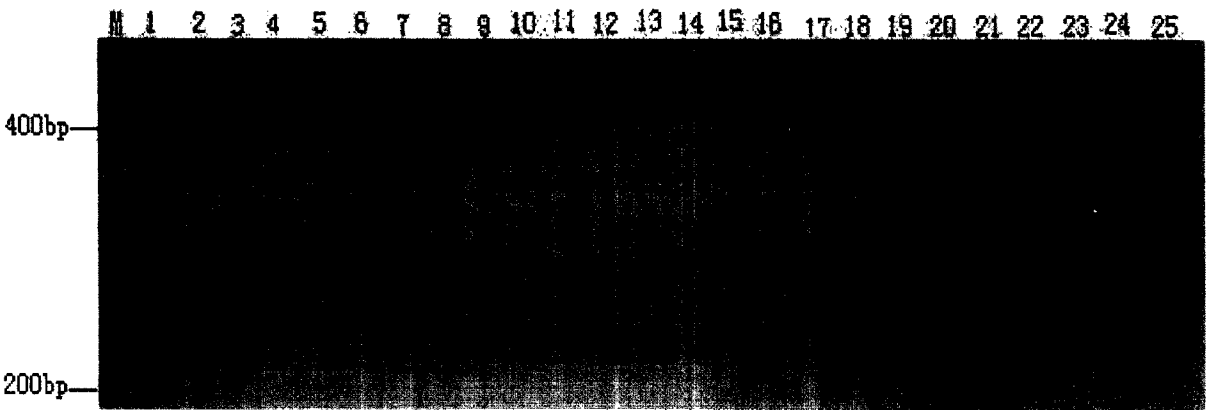


图 2

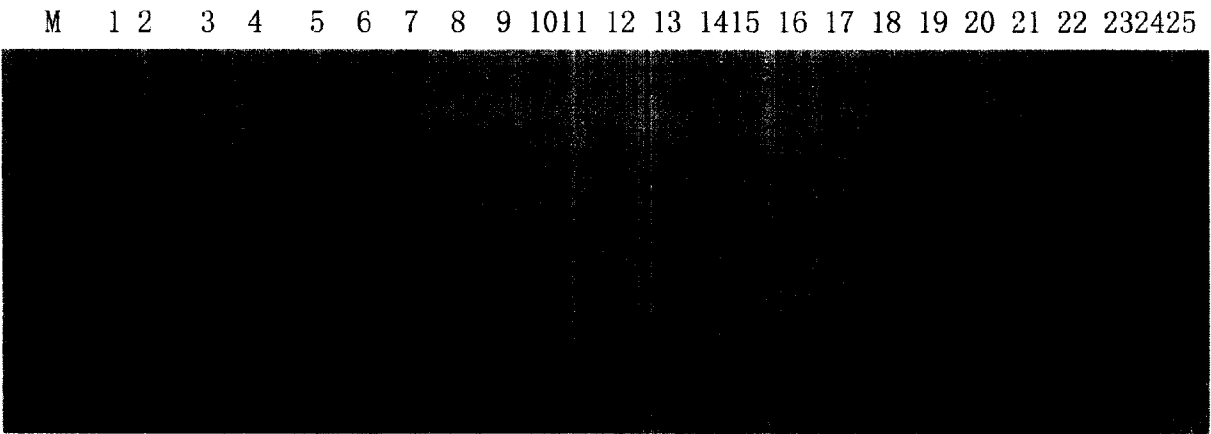


图 3

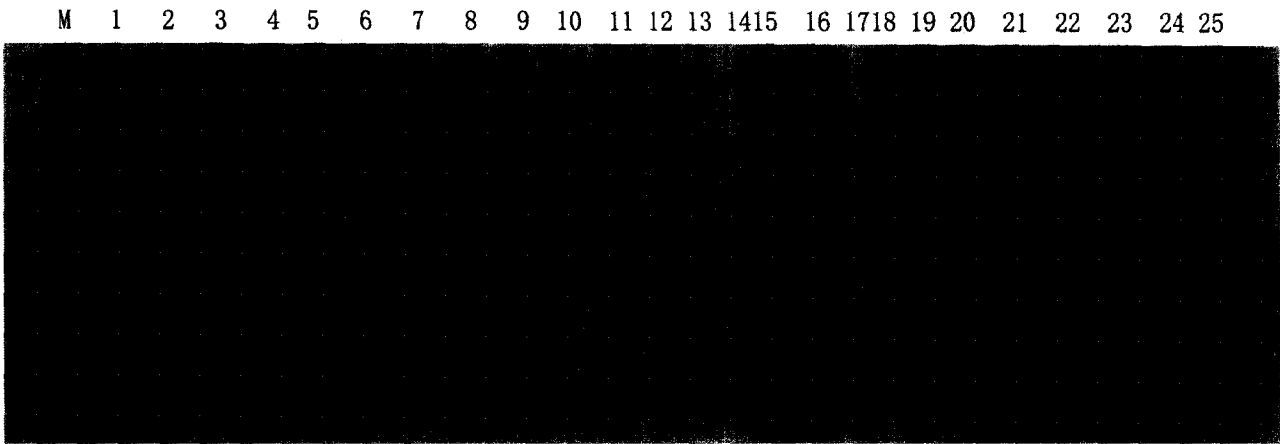


图 4

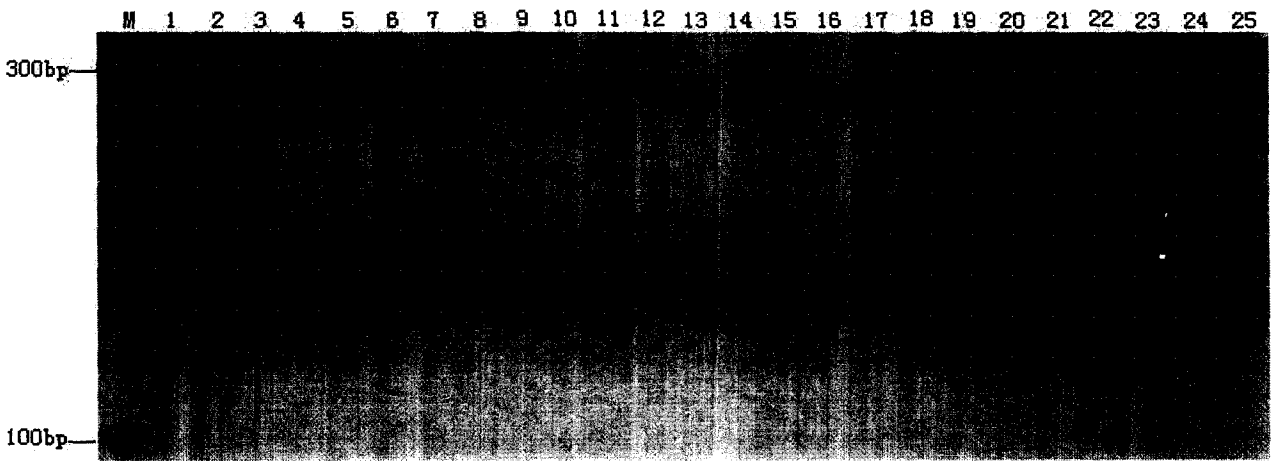


图 5

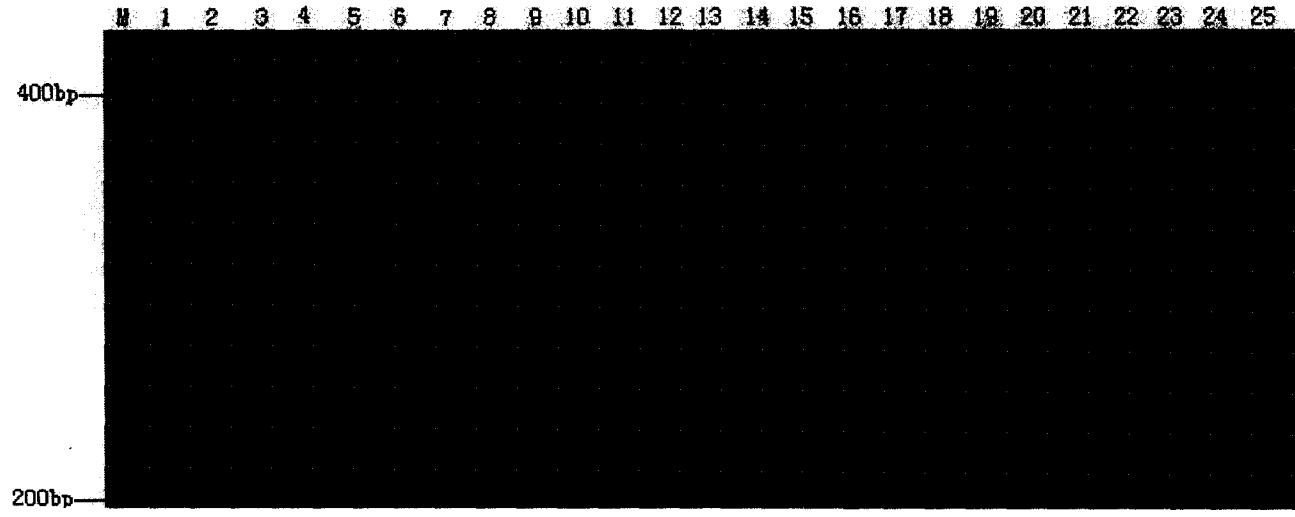


图 6

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25



图 7

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25

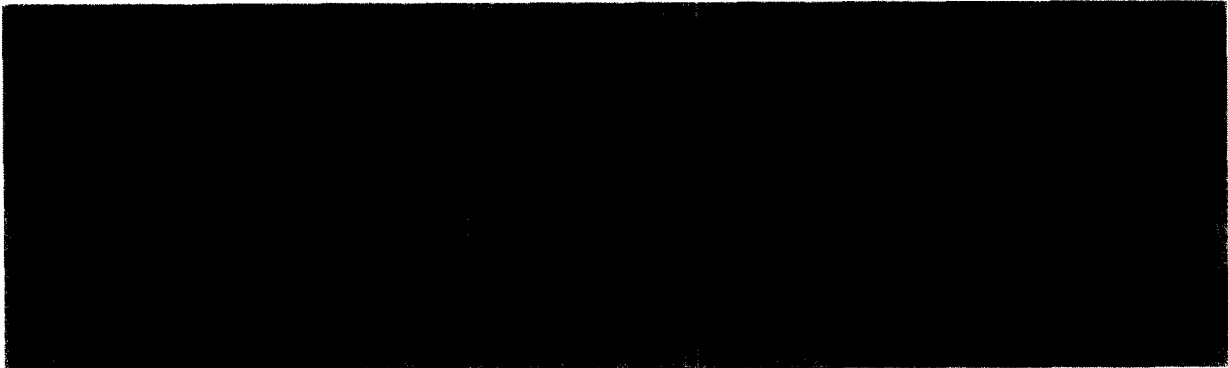


图 8

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25

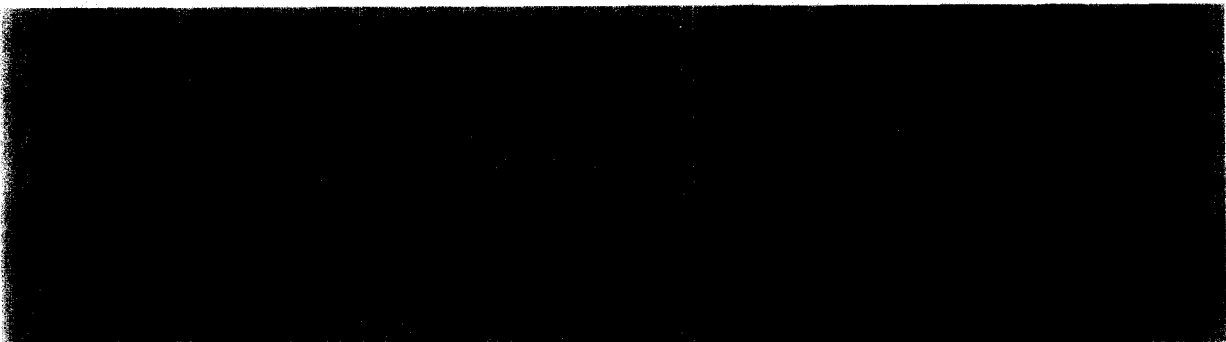


图 9

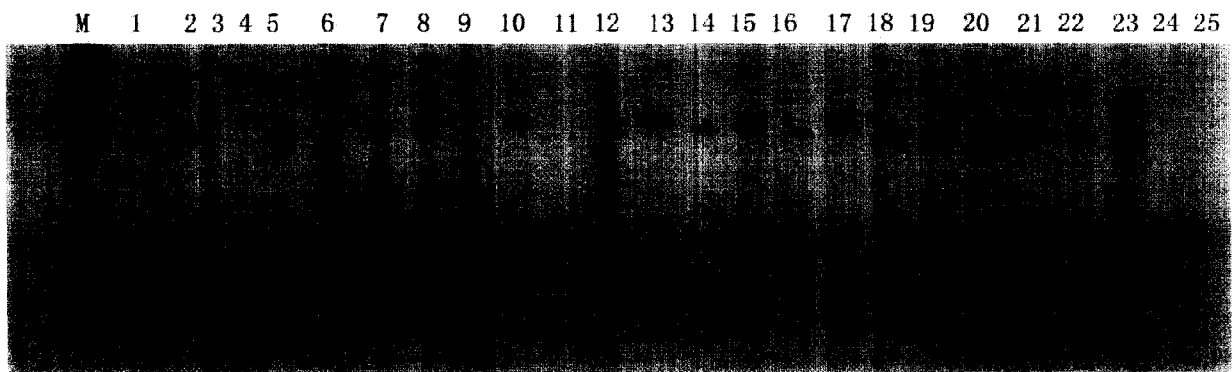


图 10

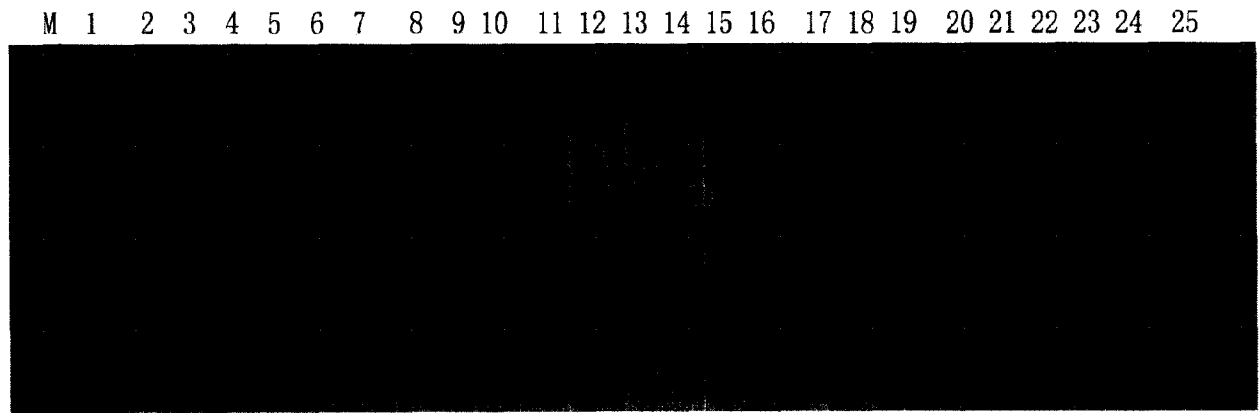


图 11

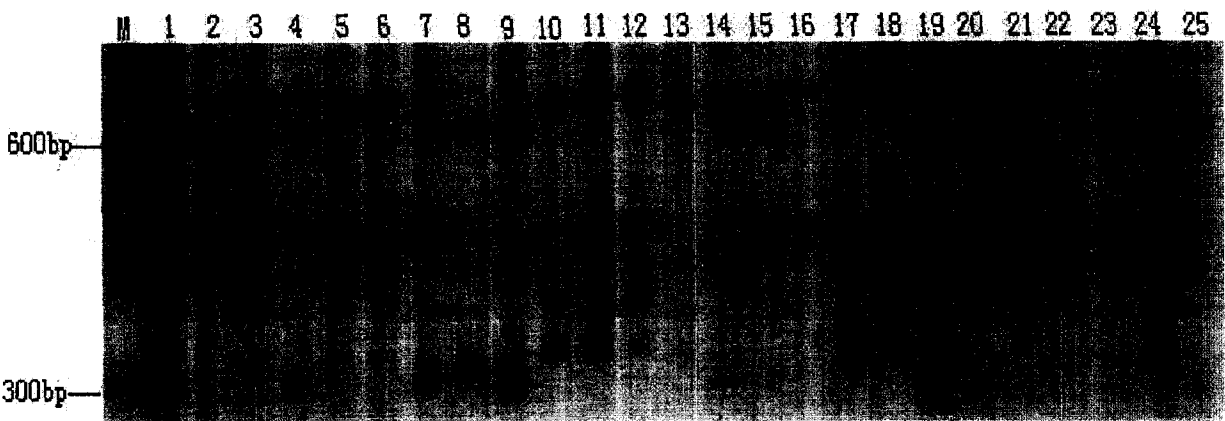


图 12

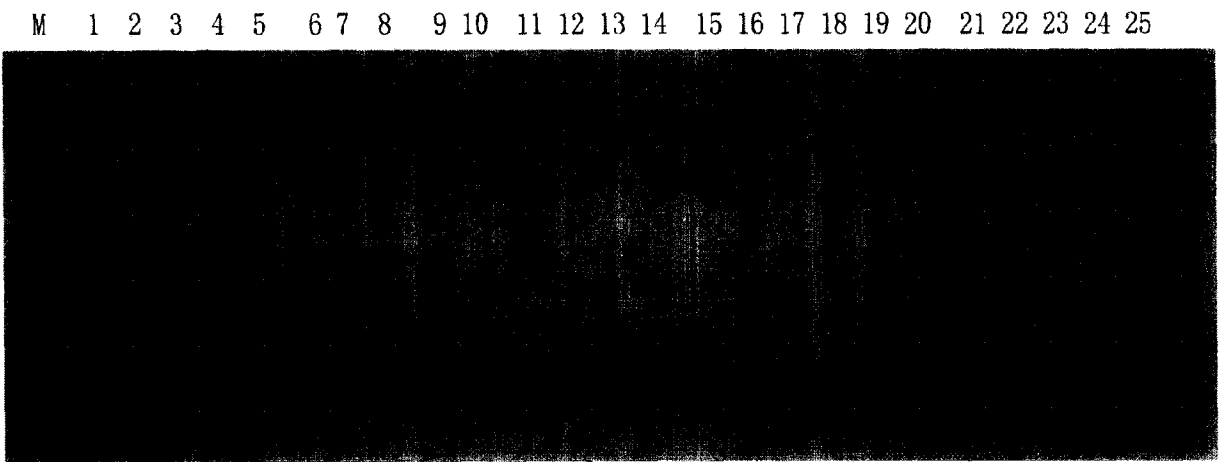


图 13

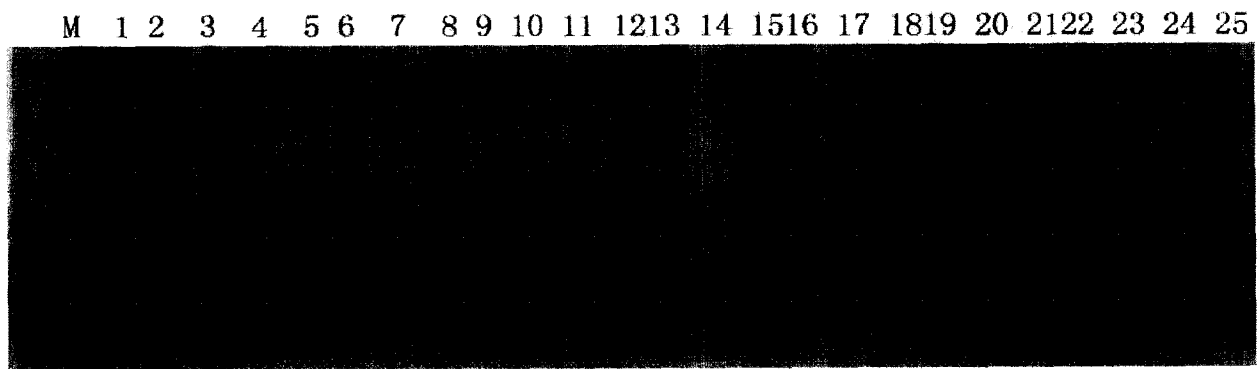


图 14

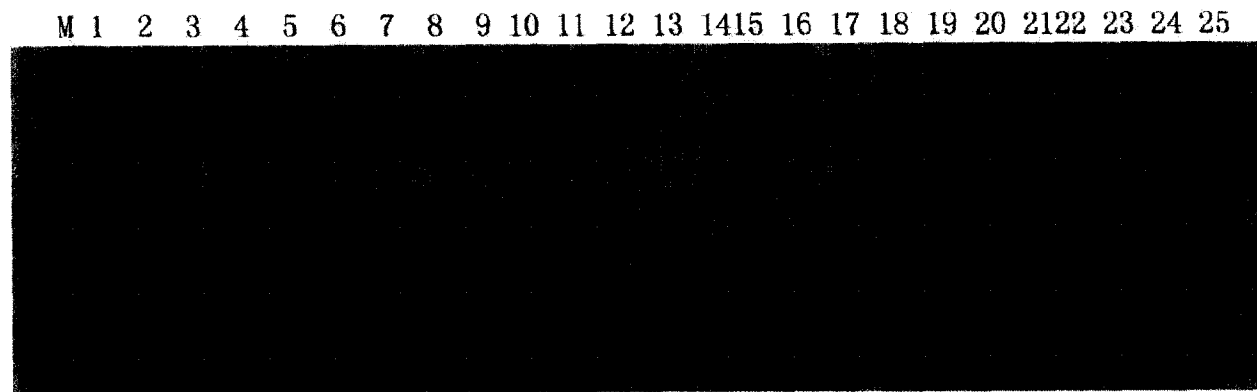


图 15