

AFLP 技术原理及其在植物研究中的应用

关德军 (安庆师范学院生命科学系, 安徽安庆 246011)

摘要 AFLP 是检测 DNA 多态性的一种分子标记技术, 对其原理、方法与特点进行了介绍, 并综述其在植物遗传多态性、基因定位及遗传图谱构建和分子育种等方面的现状和应用前景。

关键词 AFLP; 分子标记; 应用

中图分类号 Q789 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2006)15-3625-02

Principle of AFLP and its Application in Plant

GUAN De-jun (Department of Life Science, Anqing Normal University, Anqing, Anhui 246011)

Abstract AFLP (Amplified fragment length polymorphism) is a newly developed technique for DNA fingerprinting. The principle, method and characteristics of AFLP marker were briefly described. Its application in genetic polymorphism analysis, systematic development research, gene localization and molecular marker manipulation were also reviewed.

Key words AFLP; Molecular marker technique; Application

PCR 技术的出现是 DNA 遗传分析的一场革命, 以 PCR 为基础的 DNA 指纹技术大大加快了人类研究生物遗传多样性的步伐, 为不同来源和不同复杂程度基因组的分析提供了有力的工具。由 Zabeau 等^[1] 1992 年创立的 AFLP (Amplified fragment length polymorphism) 技术是国际上最新的 DNA 指纹技术。该技术是在 PCR 技术和 RFLP 标记技术基础上发明的 DNA 指纹技术。该技术兼有 RFLP 标记技术的可靠性和 PCR 技术的高效性, 而且快速、灵敏、稳定, 所需 DNA 量少, 多态性检出效率高、重复性好, 不管所研究的基因组 DNA 有多么复杂, 用该方法都可以检测出任何 DNA 之间的多态性等优点。所以该标记技术被认为是一种有效和先进的分子标记, 被认为是第 2 代分子标记, 现已被广泛用于遗传图谱构建、遗传多样性研究、基因定位和品质鉴定等方面^[2,3]。

1 AFLP 原理和技术流程

1.1 AFLP 选择性扩增原理 基因组 DNA 经过限制性内切酶消化后, 产生粘性末端。使用人工合成的短的双链接头 (artificial adapter), 该接头一端具有同样的内切酶识别粘性末端, 互补连接后成为 DNA 模板。接头和与接头相邻的酶切片段的几个碱基序列作为引物的结合位点^[4]。引物由 3 部分组成: 核心碱基序列 (core sequence, CORE), 该碱基序列与人工接头互补; 特异性酶切序列 (enzyme specific sequence, ENZ); 引物 3' 端选择性碱基 (selective extension, ENI)。选择性碱基延伸到酶切片段区, 这样就只有那些两端序列能与选择碱基配对的限制性酶切片段被扩增。

另外, 通过选择在末端分别添加了 1~3 个选择性核苷酸的不同引物, 可以达到选择扩增的目的。这些选择性核苷酸使得引物选择性地识别具有特异配对序列的内切酶酶切片段, 并与之结合, 实现特异性扩增。

1.2 AFLP 技术流程

AFLP 分析过程包括 3 个步骤:

(1) DNA 酶切及人工接头的连接 (Restriction of the DNA and ligation of digonucleotide adapters)。AFLP 技术革新成功的关键在于 DNA 的充分酶切, 所以对模板质量要求较高, 避免其他 DNA 污染和抑制物质的存在。通过热变性对内切酶进

行灭活处理, 然后在 T4 连接酶作用下进行接头连接反应。AFLP 接头是一种人工合成的双链 DNA, 一般长度是 14~18 个核苷酸, 目前试剂盒中的接头是 EcoRI 接头和 MseI 接头, 其中报道的 6 碱基内切酶接头还有 PstI 接头和 SacI 接头; 4 碱基内切酶接头还有 TaqI 接头和 SseI 接头。

(2) 限制性片段的 selectively 扩增 (Selective amplification of sets of restriction fragments)。选择性扩增前, 首先用单选择碱基的引物进行预扩增反应, 预扩增产物稀释后用于选择性扩增反应。采用这种两步法为以后的分析提供大量的模板, 同时对模板起到选择性纯化的作用, 从而使产生的指纹图谱更清晰和具有更好的重复性。

(3) 扩增产物凝胶电泳分析 (Gel analysis of the amplified fragments)。扩增产物通常在 4%~6% 的变性聚丙烯酰胺凝胶上分离, 然后根据引物的标记物质进行相应的产物检测; 也可以采用同位素 ($r\text{-}^{33}\text{P}$) AIP, T^4 -DNA 连接酶进行末端标记; 还可以采用生物素标记。由于 AFLP 是扩增反应, 所以产生的 DNA 量用银染法 (silver-staining AFLP) 也足以得到较高的分辨率。

2 AFLP 技术的应用

AFLP 结合了 RFLP 和 RAPD 各自的优点, 它方便快捷, 只需要极少量 DNA 材料, AFLP 产物是典型的孟德尔方式遗传, 因此 AFLP 被称为最有力的分子标记或下一代分子标记。目前 AFLP 标记技术在植物育种遗传标记方面应用最广, 主要在植物分子遗传连锁图谱、遗传多样性研究、作物育种辅助选择及基因表达和基因克隆定位等方面的研究应用。

2.1 构建遗传图谱 英国 Mackill 等^[5] 比较了 RAPD、SSR 及 AFLP 在水稻多态性检测中的有效性, 结果表明就检出多态性的百分比而言 SSR 居首位, AFLP 和 RAPD 次之, 都远远高于 RFLP。由于 AFLP 可分析的总数目相当于在他们的实验中平均每块胶板中可以找出 8 个多态产物, 而且实践证明在 AFLP 多态产物中可以定位于图谱上的部分所占的比例相当高, 因此很适用于构建遗传图谱。Meksem 等^[6] 在马铃薯 RFLP 的分子遗传连锁图谱基础上, 用 AFLP 分析获得了 3200 个 AFLP 片段, 找到了 29 个 AFLP 标记与马铃薯第 5 染色体上 R1 基因紧密连锁。

2.2 分子标记辅助选择育种 分子标记辅助选择是现代分

子生物学与传统遗传育种的结合点,借助分子标记可在DNA水平上对育种材料进行选择,从而达到作物产量、品质和抗性 etc 等综合性状的高效改良。育种测出100个位点的纯合或异质程度。美国生命技术公司的Lin J J^[7]利用 AFLP 技术研究大豆数量性状时,发现每个反应都可检查出大量的多态性区带,每对引物都具有高频率(>90%)的多态性,可以作为大豆数量性状的标准。

2.3 遗传多样性和种质资源鉴定 AFLP 标记是进行种质亲缘关系分析和检测种质多样性的有效工具,可以确定亲本之间的遗传差异和亲缘关系,从而确定亲本间的遗传距离,并进而划分杂交优势,提高杂种优势潜力。2003年,易干军等^[8]用2对引物组合 EcoRI/ACT + MseI/CTT 和 EcoRI/ACT + MseI/CTC 对46份龙眼材料进行 AFLP 分析,共得到扩增位点111个,其中多态性位点103个,多态性比例达92.169%,区分率达100%。对 AFLP 扩增结果进行聚类分析,根据相似系数0.176的水平将46份龙眼品种(系)分为11个品种群。

Zabeau 实验室的 Thomas 等^[9]通过对 F2 群体进行集群聚类分析(BSA),从42000个 AFLP 位点中找到了3个与番茄叶霉病抗性基因 Cf-9 连锁并表现为共分离的 AFLP 标记,并以此标记为起点通过 MBC 方法已将 Cf-9 基因克隆。应该指出的是:完成42000个位点分析对于 RFLP 和 RAPD 分析而言是相当大的工作量,但对 AFLP 分析而言只要10多块胶板即可完成,每块胶板可以比较几千个 AFLP 位点,信息量很大,这是 AFLP 突出的优点。

2.4 基因表达和基因克隆

用 AFLP 研究基因表达是非常有效的方法,并可应用于分离某些重要基因。Kojima 等^[10]通过比较中国春与 Q 基因缺体 q5 的 mRNA AFLP 指纹,在256个引物组合产生的12200个片段中,筛选到92个差异片段,Northern blotting 及 Southern blotting 分析表明,16个片段在中国春中有特异的和相对较强的转录信号,发现与 Q 基因紧密连锁的一个克隆 pTaQ22 在花形态发育中有特异的功能,并克隆了位于5A长臂上控制穗形及种子脱粒性状的 Q 基因。

美国普渡大学的 Dweikat 以小麦近等基因系为材料,通过 AFLP 分析定位了抗麦蝇(Hessian fly)基因 H6 和 H9。德国 Max-Planck 研究所^[11]发现了马铃薯 V 染色体上7个与抗晚

疫病的基因 R1 连锁的 AFLP 标记,其中距 R1 最近的1个标记与 R1 的遗传距离只有0.8 cM。在水稻中,Caicedo 等^[12]利用一套近等基因系,只用2个引物组合就找到了2个 AFLP 标记,并分别将它们定位到第1染色体和第9染色体上。

3 小结

AFLP 已是世界上公认的最有效的分子标记技术,其快速、可靠、稳定的技术优点使它在分子生物学和遗传育种基础理论研究和实际运用中发挥着越来越重要的作用。技术上已经成熟的银染 AFLP 技术可以代替使用放射性同位素,从而避免造成危害,该方法可以检测种和种以上水平的差异,具有广阔的应用前景。但是,AFLP 的费用是昂贵的,只要启动这项工作就需要大量的资金,而且实验涉及面广,要求技术比较全面,对操作人员素质要求也高。

参考文献

- [1] ZABEAU M, VOS P. Selective restriction fragment amplification: a general method for DNA fingerprinting: Paris, European Patent Application 92402629.7 [P]. 1993.
- [2] 王斌,翁曼丽. AFLP 的原理及其应用[J]. 杂交水稻,1996(5):27-30.
- [3] 翁跃进. AFLP——一种 DNA 分子标记新技术[J]. 遗传,1996,18(6):29-31.
- [4] 周廷清. DNA 分子标记技术在植物研究中的应用[M]. 北京:化学工业出版社,2005:174-182.
- [5] MACKILL DI, DOHNES J T, ROWER H, et al. Level of polymorphism and genetic mapping of AFLP markers in rice[J]. Genome, 1996,39(5):969-971.
- [6] MEKSEM K, MONEY T, READER S, et al. AFLP fingerprinting reveals pattern differences between template DNA extracted from different plant organs[J]. Genome, 1997,249:74-81.
- [7] LIN J H, JHU, GLRNB, HABUY, et al. Identification of molecular markers in soybean comparing RFLP, RAPD and AFLP DNA mapping techniques[J]. Plant Molecular Biology Reporter, 1996,14(2):156-169.
- [8] 易干军,于晓英. 应用 AFLP 进行香蕉品种(系)的鉴定与分类[J]. 果树学报,2002,19(4):247-251.
- [9] THOMAS C M, BACHEMC, VAROTTOS, et al. Identification of amplified restriction fragment polymorphism (AFLP) markers tightly linked to the tomato Cf-9 gene for resistance to *Cladosporium fulvum*[J]. The Plant Journal, 1995,8(5):785-794.
- [10] KOJIMA T, HABUY, IIDA S, et al. Direct isolation of differentially expressed genes from a specific chromosome region of common wheat: application of the amplified fragment length polymorphism based mRNA fingerprinting (AMF) method in combination with a deletion line of wheat[J]. Mol Gen Genet, 2000,263(4):635-641.
- [11] 王斌. AFLP 在作物品种多态性研究中的应用[J]. 科学通报,1996(4):45-50.
- [12] CAICEDO A L, GATTAN E, JUWANA H, et al. AFLP fingerprinting of *Phaseolus lunatus* L. and related wild species from South America[J]. Crop Science, 1999,39:1497-1507.