

文章编号 :1003-8701(2005)06-0029-05

AFLP 分子标记技术及应用研究进展

王青山¹,李葱葱²,王晶²,王丹²,张明²

(1.中国热带农业科学院橡胶研究所,海南 儋州 571737;

2.吉林省农业科学院生物技术研究中心,吉林 公主岭 136100)

摘要:扩增片段长度多态性技术(AFLP)是一项新发展的分子标记技术,它基于选择性扩增完全酶切消化后的基因组 DNA 片段,包括酶切与连接、选择性扩增和检测分析 3 个步骤。该技术综合了 RFLP 的可靠性和 RAPD 的高效性,可适用于任何来源和各种复杂度的 DNA。在此论述了该技术的基本原理、特点和技术流程,及近年来的发展与应用研究。

关键词:AFLP;分子标记;应用

中图分类号:Q7

文献标识码:A

近 10 年来,现代分子生物学技术的迅猛发展,尤其是 PCR 的出现,引起了 DNA 遗传分析的一场巨大革命。以 PCR 为基础的 DNA 指纹技术大大加快了人类研究遗传多样性的步伐,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 1992 年创立的 AFLP (Amplified fragment length polymorphism)技术^[1]是目前国际上最新的 DNA 指纹技术。该方法结合了 RFLP(Restriction fragment length polymorphism)技术和 RAPD(Random amplified polymorphic DNA)技术的特点,可获得多态性图谱^[2]。AFLP 具有重要的实用价值,1993 年就被 Keygene 公司以专利形式买下,并注册于欧洲专利局。Zabeau 和 Vos 于 1995 年以论文形式发表^[3]。

现有的分子标记技术大体上可以分为两类:以分子杂交为基础的分子标记,其代表性技术是限制性片段长度多态性(RFLP);以 PCR 为基础的分子标记,如随机扩增多态性 DNA(RAPD)、序列特异性扩增区(SCAR)、简单串联重复序列(SSR)和扩增片段长度多态性(AFLP)等^[4]。其中 AFLP 技术结合了 RAPD 和 RFLP 的特点,既具有 PCR 的高效性、安全性和方便性的特点,又具有 RFLP 可靠性好、重复性高的优点,不需要了解基因组信息,且只需少量纯化的基因组 DNA 即可对整个基因组 DNA 酶切片段进行选择性的扩增,适合于所有基因组的检测。它被广泛应用于动植物的遗传多样性研究、品系分析、抗性育种、动物近交系选育、疾病诊断和生态分析^[5]等各个方面。

1 AFLP 的原理和技术流程

1.1 AFLP 技术的基本原理

AFLP 的基本原理^[6]是对基因组总 DNA 酶切后经 PCR 进行选择性的扩增,随后将特定的接头连接在这些 DNA 片段的两端。接头序列和邻近的限制性酶切位点序列作为引物结合位点,然后用特定引物进行 PCR 扩增,最后通过聚丙烯酰胺凝胶电泳分离扩增的特异限制片段。利用一套特定的引物在未知 DNA 序列的情况下,可在 1 次单个反应中检测大量片段。AFLP 扩增可获得在某一品种出现而在另一品种不出现的特定 DNA 谱带^[7]。因此,通过限制性酶切和 PCR 扩增后得到的 DNA 多态性可作为一种分子标记。进行 AFLP 分析既可采用单酶切^[8]也可采用双酶切。为了使酶切片段大小分布均匀,一般采用双酶切,一种是切割位点多的识别 4 个碱基序列的内切酶(如 Mse I),一种是切割位点少的识

收稿日期:2005-09-23

作者简介:王青山(1979-),男,中国热带农业科学院橡胶所研究生,研究方向为种质资源开发利用。

别 6 个碱基序列的内切酶(如 *EcoR* I)。因而 AFLP 反应过程中产生的主要是两个酶共同酶切的片段,其片段长度一般小于 500 bp,在 AFLP 反应中可被优先扩增,产物可被很好的分离。AFLP 接头和引物都是由人工合成的双链核苷酸序列。AFLP 引物包括 3 部分:5'端的与人工接头序列互补的核心序列(CORE)、限制性内切酶特定序列(ENZ)和 3'端的带有选择性碱基的粘性末端(EXT)。其中 AFLP 接头的设计(包括核心序列和酶特定序列)是关键之处。AFLP 接头一般是长度为 14~18 个核苷酸的双链 DNA,常用的多为 *EcoR* I 和 *Mse* I 接头,接头和与接头相邻的酶切片段的碱基序列是引物的结合位点^[9]。由于引物的核心序列与接头部分相对应,因此两者遵循相同的设计原则:①具有合适的 C、G 含量,一般 C+G 的含量大于 50%;②限制性片段与对应的接头连接应保证原限制性内切酶位点不得恢复;③接头不进行磷酸化,避免接头间自连接。扩增产物的多少主要取决于引物 3'末端选择性碱基的数目及核苷酸组成。理论上,每增加 1 个选择性碱基,将只扩增限制性片段的 1/4,而在两个引物上都有 3 个选择性碱基的情况下,则获得 1/4096 的片段。一般情况下,选择性碱基数不超过 3 个,大于 10⁶ bp 的基因组 DNA 可选用 3 个选择性碱基,10⁵~10⁶ bp 的基因组 DNA 可用 2 个选择性碱基。

1.2 AFLP 标记的技术流程

1.2.1 模板 DNA 的制备

首先提取基因组 DNA,经浓度和纯度检测后用 6 个碱基识别位点的内切酶和 4 个碱基识别位点的内切酶进行酶切,产生 3 种类型的酶切片段,如 *EcoR* I/*Mse* I 酶切形成 *EcoR* I-*Mse* I 片段、*EcoR* I-*EcoR* I 片段和 *Mse* I-*Mse* I 片段,实验证实扩增产物主要是 *EcoR* I-*Mse* I 片段。充分酶切后的 DNA 片段在 T₄ 连接酶作用下与两种内切酶相应的接头相连接,形成带接头的特异片段,即模板 DNA。

1.2.2 PCR 扩增

一般酶切片段要进行两次连续的 PCR 扩增,以提供大量的模板,并产生清晰、重复性高的扩增结果。第 1 次扩增为预扩增,扩增所用的引物 3'端有 1 个选择性碱基。预扩增产物经稀释后接着进行第 2 次选择性扩增,使所需模板量不受限制。所用引物 3'端有 3 个选择碱基的延伸,通过 3 个选择碱基的变换获得丰富的 DNA 片段。

1.2.3 扩增产物的分离与检测

扩增产物一般在 4%~6%的变性聚丙烯酰胺凝胶上电泳,然后根据引物的标记物质进行相应的产物检测。检测方法主要包括放射自显影检测、银染检测和荧光检测等^[10]。

1.2.4 结果分析

应用放射自显影、银染和荧光测序仪等方法显示结果。通过 GeneScan Gelcompar BandScan 和 NTSYSpc21 等软件进行数据分析^[11,12]。

2 AFLP 技术的特点

2.1 DNA 需要量少,检测效率高

AFLP 分析仅需要少量的 DNA,且部分降解的样品也可用来分析,但样品必须没有扩增的抑制物存在。1 个 0.5 mg 的 DNA 样品可做 4 000 个反应。Ervera 等(1998)仅用 2 个 AFLP 引物组合就揭示了从西班牙收集到的 67 个不同葡萄样品间的遗传相似性^[13]。

2.2 可靠性好,重复性高

AFLP 分析基于电泳条带的有或无,高质量的 DNA 和过量的酶可以克服因 DNA 酶切不完全而产生的失真,同时由于它采用的是特定的引物,且退火温度高,使假阳性降低,因而其分析具有很强的重复性和可靠性。

2.3 多态性高

AFLP 分析可以通过改变限制性内切酶和选择性的碱基种类与数目调节扩增的条带数,具有较强的多态分辨能力^[14]。李传友^[15]将 AFLP 标记与 RFLP 标记和 RAPD 标记进行了比较,认为鉴别多态的功能顺序是 AFLP>RAPD>RFLP。

2.4 稳定的遗传性

AFLP 分子标记是显性标记,能检测整个基因组的遗传变异,在后代的遗传和分离中遵循孟德尔定律,可作为物理图谱和遗传图谱的联系桥梁,用于构建基因组高密度连锁图谱。种群的 AFLP 标记位点遵循 Hardy-veiberg 平衡^[16]。

2.5 易操作且样品适应性广

AFLP 标记技术易于操作,适用性广,尤其适合于一些多态性低或特定品种的遗传研究和连锁图谱的构建。AFLP 技术适用于任何来源和各种复杂度的 DNA。如基因组 DNA、cDNA、mRNA、质粒、某一个基因或基因片段,且未知这些 DNA 序列特征,用同样一套限制酶,接头引物可对不同生物 DNA 进行标记研究。

2.6 聚类敏感、定位专一

AFLP 图谱比 RFLP 图谱聚类要显著得多(Backet J, et al, 1995),在可分辨的长度范围内,不同长度的等位基因可共显与同一胶上,其标记是显性标记,在重复序列中小的变异,诸如 1 bp 染色体片段缺失或插入也能被检测出来。如果 AFLP 扩增产物在凝胶中具有相同的移动性,那么这些产物很可能同质而基因位点专一。

3 AFLP 标记技术的发展

3.1 限制性内切酶的选择应用

内切酶的选择决定了接头和引物的设计、扩增条件的设定及扩增形成 DNA 片段的数目。经典的 AFLP 技术应用两种内切酶;一种是识别 6 个碱基的内切酶,一种是识别 4 个碱基的内切酶。然而近年来,一些研究者对 AFLP 技术进行了优化和简化,使其快捷方便而且多态检出率高。Habu 等选用了 1 个限制性内切酶来筛选 mRNA 样品的基因表达差异。虽然单酶切 AFLP 法敏感性不如双酶切,但由于其快捷方便的特点,同样也可以得到好的结果^[17,18]。Suazo 等在使用 AFLP 标记技术时,用单酶切消化基因组,并只进行 1 次 PCR 扩增得出了准确的结果。目前也有研究者采用三酶切法进行 AFLP 标记。Waugh 等应用 3 种限制性内切酶消化基因组 DNA,产生的限制性片段只与两种选择性接头连接,检测结果证实比两种内切酶组合具有更高的分辨力,能运用于更为复杂的基因组分析。

3.2 引物的标记与结果显示

引物标记已从同位素标记发展到目前的荧光标记,用无污染的荧光染料代替放射性同位素进行标记得到的片段,可用自动化测序仪进行检测。该方法较传统方法可获得更多的信息,是 AFLP 技术的一大进步。荧光标记减少了同位素对人体的损害,同时结果分析更加准确,但是研究费用仍然很高。也有研究报道不标记引物,扩增产物经聚丙烯酰胺凝胶电泳后通过银染显示结果,虽无同位素危害,但染色步骤繁琐^[19]。

3.3 结果分析

AFLP 扩增产物形成的 DNA 指纹,采用已知长度的恒定片段作为标准对照可把不同的凝胶电泳结果进行比较。电泳结果通过扫描进行数字化图像分析,更为先进的是应用荧光自动测序仪分析。目前可以应用很多软件对 AFLP 电泳分析,并且这些软件大多数已经商品化,如 GeneScan 软件、GelCompae 软件和 Quantar 等^[20,21]。

4 AFLP 技术应用研究

AFLP 结合了 RFLP 和 RAPD 各自的优点,方便快捷,只需极少量 DNA 材料,不需 Southern 杂交,可在对物种无任何分子生物学研究基础上构建指纹图谱,被称为最有力的分子标记或下一代分子标记。

4.1 构建指纹图谱、鉴定种质或品种

虽然 AFLP 技术问世较短,但已进行了一些物种 AFLP 指纹图谱的研究。Fayc 用 1 个引物在玉米 2 个基因型中发现了 30 条以上的多态性条纹,十分适合与玉米基因型的指纹鉴定^[22]。美国先锋种子首先引用 AFLP 技术用于玉米自交系和杂交种的鉴定工作,建立指纹档案,保护品种专利。张扬

等(2005年)应用 AFLP 技术分析广东稻瘿蚊不同生物型种群的结果表明 ,AFLP 方法对稻瘿蚊 DNA 扩增出丰富的指纹带^[23]。

4.2 遗传多样性研究

品种之间的遗传变异是系统发育研究和分类研究的基础。动植物标本经 AFLP 扩增形成丰富的 DNA 指纹 ,可以获得多达 150 个位点特异性片段 ,能够充分反映遗传多样性的变化。根据 AFLP 片段的差异进一步进行多态性分析、遗传距离检测及判定物种起源和标记基因型等具有重要价值。美国康耐尔大学的 Blair 利用 AFLP 技术对 54 份水稻品种进行遗传多样性分析 ,研究其系统发育和分类 ,并与同工酶生化标记及 RFLP 标记相比较 ,发现结论一致。中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*) AFLP 分子标记遗传连锁图谱构建最近也取得了进展 ,岳志芹等(2004)获得了中国明对虾密度的遗传连锁图谱 ,其中 ,父本 74 个分子标记 ,25 个连锁群 ,母本 66 个分子标记 ,22 个连锁群^[24]。

4.3 基因定位及辅助育种

由于 AFLP 技术具有强有力的多态性检出能力 ,通过比较种群内和种群间的 AFLP DNA 指纹差异 ,可进行基因的快速定位 ,并能进一步将其分离出来。目前 ,已经精确定位了马铃薯的根孢囊线虫抗病基因。Maria Teresa Cervera 等以美洲黑杨为材料 ,根据分群法建立感病基因池和抗病基因池 ,通过 AFLP 分析 ,找到了 3 个与抗病基因紧密连锁的 AFLP 标记^[25]。

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 ,借助分子标记可以对育种材料从 DNA 水平上进行选择 ,从而达到作物产量、品质和抗性等综合性状的高效改良。利用共迁移的方法可寻找与性状连锁的分子标记 ,一旦鉴定出与目标性状如马铃薯线虫抗性相连锁的分子标记 ,就可在短期内对所有预期的基因型进行筛选 ,从而在早期判断育种材料的抗性时 ,缩短育种周期^[26-27]。Reddy 用 AFLP 技术指导棉花育种 ,把长绒的海岛棉与高产的陆地棉进行杂交 ,在 F₂ 群体中发现 300 个标记与亲本的长绒和高产性状有关。试验表明 ,根据 AFLP 标记可以进行轮回选择 ,并跟踪基因的转移情况。另外 ,有研究表明 ,如果 AFLP 标记与要选择的基因紧密连锁 ,还可以在植物分离群体中早期筛选含目的基因的植株。

5 结束语

AFLP 技术作为一种新出现的分子技术也有其局限性 ,如对技术操作要求相对较高 ,DNA 纯度要求严格 ,且药品费用高 ,扩增时还会有假阳性和假阴性结果以及凝胶背景杂乱等缺点 ,但该技术综合了 RFLP 和 RAPD 技术的优点 ,准确性和灵敏度都很高 ,问世近 10 年来 ,倍受分子生物学家的青睐。随着其技术的不断进步和完善 ,AFLP 分析的效率会进一步提高 ,并在构建遗传图谱、种质鉴定、遗传多样性研究、基因定位和基因的克隆和序列分析中发挥出重要作用。

参考文献 :

- [1] Zabeau M et al. European Patent[P]. 0535 858A1, 1993, (3): 31.
- [2] 缪颖. AFLP 分子标记及其应用[J]. 亚热带植物通讯, 1999, 28(2): 55-60.
- [3] Vaneechoutte M. DNA fingerprinting techniques for microorganisms. A proposal for classification and nomenclature[J]. Mol Biotechnol, 2001, 6(2): 115-142.
- [4] Naqvin I, Chattoo, BB. Development of a sequence characterized amplified region (SCAR) based indirect selection method for a dominant blast-resistance gene in rice[J]. Genome, 2001, 39: 26-30.
- [5] 吴丰春, 魏鸿. 应用 AFLP 技术对不同品系小鼠进行遗传检测的初步研究[J]. 第三军医大学学报, 2001, 23(6): 650-651.
- [6] 郑成木. 植物分子标记原理与方法[M]. 海南: 华南热带农业大学出版, 2002, 85-87.
- [7] WAN Ch L, TAN Y D. An improvemental ental method of AFLP[J]. Journal of Nanjing Normal University. 1999, 22(2): 87-91.
- [8] powell W, et al. The comporison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR Markers for germplasm analysis[J]. Molecular Breeding, 1996, 2(3): 225-238.
- [9] 王斌, 翁曼丽. AFLP 的原理及其应用[J]. 杂交水稻, 2003, (5): 27-30.
- [10] 郑先元, 等. AFLP 分子标记技术的发展[J]. 生命的化学, 2003, 23(1): 65-67.
- [11] 李珊, 等. AFLP 分子标记及其应用[J]. 西北植物学报, 2003, 23(5): 830-836.
- [12] Tracy, M. AFLP-based Mrna fingerprinting Nucl[J]. Acid. Res. 2004, 24(13): 261-267.

[13] 苟本富,邹国林. AFLP 分子标记技术及其应用研究进展[J]. 喻西学院学报, 2002, 15(1): 23-29.

[14] 熊立仲,等. 微卫星 DNA 和 AFLP 标记在水稻分子标记连锁图上的分布[J]. 植物学报, 2002, 40(7): 605-614.

[15] 李传友,等. 光敏核不育水稻等位突变的 AFLP 分析[J]. 生物工程学报, 2000, 16(1): 91-95.

[16] 朱伟铨,王义权. AFLP 分子标记技术及其在动物学研究中的应用[J]. 动物学杂志, 2003, 38(2): 101-106.

[17] 万春玲,等. AFLP 标记在研究家蚕遗传多样方面的应用[J]. 生物技术, 1999, 9(5): 4-9.

[18] Piepho H P, Koch G. codominant analysis of banding data a dominant marker system by normal mixtures[J]. Genetics, 2000, 155(3): 1459-1468.

[19] 朱伟铨,王义权. AFLP 分子标记技术及其在动物学研究中的应用[J]. 动物学杂志, 2003, 38(2): 101-106.

[20] 李传友,等. 光敏核不育水稻等位突变的 AFLP 分析[J]. 生物工程学报, 2000, 16(1): 91-95.

[21] Yan G, et al. Population genetics of the yellow fever mosquito in Trinidad; comparisons of amplified fragment length polymorphism(AFLP) and restriction fragment length polymorphism(RFLP) marks Mol Ecol. 1999, 8(6): 951-963.

[22] Habu Y, et al. Amplified restriction fragment length polymorphism based mRNA fingerprinting using a single restriction enzyme that recognize a 4 bp sequence Biochem Biophys Res Commun. 2000, 234(2): 516-521.

[23] 张 扬,等. 应用 AFLP 分析广东稻瘿蚊不同生物型 DNA 指纹[J]. 广东农业科学, 2005, 4(1): 60-64.

[24] 王伟继,等. AFLP 分子标记技术的发展及其在海洋生物中的应用[J]. 海洋水产研究, 2005, 26(1): 80-85. (参考文献 25-27 略)



(上接第 12 页)

表 4 节水灌溉和常规灌溉产量及用水量比较

处 理	移栽—分蘖 (m ³ /667m ²)	分蘖—出穗 (m ³ /667m ²)	出穗—成熟 (m ³ /667m ²)	全生育期 (m ³ /667m ²)	节水量 (m ³ /667m ²)	产 量 (kg/hm ²)	节水率 (%)
节水灌溉	150	250	165	565	100	8 560	15.0
常规灌溉	185	295	185	665		8 450	—

2.4 管理节水效果分析

2002~2003 年,对装卡井与常规井稻田用水量进行了比较,安装 IC 卡的机井 2 年平均用水量为 513.3 m³/667 m²,常规井用水量 538.0 m³/667 m²,节水率 4.3%~4.9%,因此,在使用机井水种稻的地区,建议采用此方法,不仅可以节约用水,还能延长电机使用寿命,降低种稻成本。

2.5 工程节水效果分析

在节水灌溉条件下,对“U”型水泥槽灌水渠道的用水量和普通灌水渠道的用水量进行了调查,结果表明,由于水泥灌水渠减少了渠道渗漏,而且水流速快,2002 年和 2003 年“U”型水泥渠平均用水量 475 m³/667 m²,普通渠用水量为 579.5 m³/667 m²,用水量比普通渠道明显减少,节水率达 18%以上,节水效果明显。但由于成本高,有条件的地区可以推广应用。

3 结 论

随着水资源日益匮乏,采取科学的灌溉方法,最大限度地节省灌溉用水,提高水的利用效率是目前稻作生产面临的重大课题。节水稻作是有效利用水资源的可行途径之一。本研究通过对免耕轻耙、节水灌溉与普通灌溉法的比较明确了免耕轻耙、节水灌溉以及管理节水、工程节水措施对节约灌溉用水均有明显效果,其中免耕轻耙和节水灌溉节水率尤为突出。各地稻区可因地制宜推广应用。虽然节水稻作内容不少,但农艺节水,即把节水栽培措施应用于水稻的整个生育过程仍是最重要的内容。发展节水稻作,对于实现水稻生产可持续发展,保障我国粮食安全均具有重要意义。

参考文献:

[1] 王一凡,等. 北方节水稻作[M]. 沈阳:辽宁科学技术出版社,2000.

[2] 何庆富,等. 水稻免耕直播栽培技术探析[J]. 中国稻米, 2001, (3): 24-25.

[3] 张满利,等. 水稻无水层栽培初探[J]. 垦殖与稻作, 2004, (1): 21-23.

[4] 张含生,等. 井灌水稻节水增温技术[J]. 垦殖与稻作, 2005, (2): 21-22.

[5] 陈伯全,等. 水稻节水灌溉技术的研究[J]. 吉林农业科学, 2004, 29(6): 16-18.