

文章编号:1003-8701(2013)04-0021-04

MSAP 技术及其在玉米遗传育种上的研究进展

于丽丽, 祁新*

(吉林农业大学农学院, 长春 130118)

摘要: DNA 甲基化是生物基因组最常见,也是最重要的表观遗传修饰形式之一,随着对 DNA 甲基化研究的不断深入,由 AFLP 技术发展而来,基于 PCR 检测的 DNA 甲基化敏感扩增多态性(MSAP)技术,凭借其应用广泛,操作简便等优点成为检测 DNA 甲基化水平的有力工具。目前已被广泛应用于种质资源鉴定、品种改良、基因表达调控等许多领域。本文对 MSAP 技术的原理、操作流程及其在玉米遗传育种研究中的各项研究进展进行了综述,并对该技术今后的应用前景进行了展望。

关键词: DNA 甲基化; DNA 甲基化敏感扩增多态性(MSAP); 玉米

中图分类号: S513.035.3

文献标识码: A

Methylation-Sensitive Amplified Polymorphism and Its Research Progress on Maize Genetic Breeding

YU Li-li, QI Xin*

(College of Agronomy, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China)

Abstract: DNA methylation is one of the most important and common modifications in epigenetics. With progress of the studies on DNA methylation, methylation-sensitive amplified polymorphism (MSAP), which is developed from AFLP technology and basing on the PCR technology, has been an effective means for detecting DNA methylation levels because of its wide range of applications and simple of operation. It has been widely applied to many fields currently, such as germplasm identification, variety improvement and regulation of gene expression. In this paper, the principles and operational processes of MSAP technology and applications of MSAP in maize genetics and breeding were summarized. Also the future of applications prospects of MSAP technology was carried out.

Keywords: DNA methylation; MSAP; Maize

表观遗传学的概念在 1942 年由著名生物学家 Waddington^[1]首次提出,并被定义为“基因与环境的互动导致表型的出现”。虽然表观遗传学提出之初由于缺乏合理的机理性并没有被大多数人所接受,但近年来,科学家们从各个领域对表观遗传展开了新的研究,Wu 等^[2]提出在不改变基因组序列的前提下,修饰 DNA 与组蛋白,以此来达到调控基因表达的目的。其中 DNA 甲基化是最早发现

的修饰途径之一,也是真核生物基因组中最常见的一种表观遗传修饰形式。是 DNA 经过复制后,由 DNA 甲基转移酶(DMT)催化,将 DNA 分子腺嘌呤碱基或胞嘧啶碱基与 S-腺苷酰-L-甲硫氨酸(SAM)上的甲基基团连接到一起,并对 DNA 进行修饰的过程。其中胞嘧啶的 C-5 位修饰是 DNA 甲基化最常见的一种方式,也是目前研究 DNA 甲基化的重中之重^[3-4]。Bird 等^[5-6]认为 DNA 甲基化是表观遗传调控的基础,能够对染色质的组织方式进行调节。DNA 甲基化能引起生物染色质结构、DNA 构象、DNA 稳定性及 DNA 与蛋白质相互作用方式的改变,从而控制基因表达。目前,对于 DNA 甲基化水平的检测方法,国内外都在研

收稿日期:2012-10-29

基金项目:吉林省科技发展计划项目(20100208)

作者简介:于丽丽(1988-),女,在读硕士,研究方向为玉米遗传育种。

通讯作者:祁新,男,博士,教授,E-mail: qixin305@163.com

究过程中逐渐完善。主要分为基因组整体水平甲基化分析、特异性位点的 DNA 甲基化检测和甲基化新位点寻找等几个方面^[7]。其中,MSAP(DNA 甲基化敏感扩增多态性)由于其简便性与通用性成为较为常用的方法之一。

1 MSAP 技术的原理及操作

1.1 MSAP 技术的原理

MSAP 技术于 1997 年由 Reyna Lopez 等^[8]首次提出,在成功用于检测二形真菌的 DNA 甲基化之后,该技术被陆续应用于许多植物的 DNA 甲基化检测。

MSAP 技术是从同裂酶应用于 AFLP 的基础上发展而来的,它与 AFLP 同样基于 PCR 扩增多态性,不同的是 MSAP 技术利用两种识别 CCGG 序列的同裂酶 *HpaII* 和 *MspI* 替换了 AFLP 分析中识别 4 碱基的内切酶 *MseI*。两种同裂酶分别与一种对 DNA 甲基化不敏感,且能识别 6 个碱基序列的稀切酶 *EcoRI* 配对,之后共同对全基因组的 DNA 序列进行双酶切及特异性扩增。由于 *HpaII* 和 *MspI* 两种同裂酶对 DNA 甲基化的敏感程度不同,*HpaII* 只能识别 DNA 单链上的胞嘧啶甲基化位点,对于 DNA 双链在 CCGG 位点的胞嘧啶都发生甲基化的情况不能识别,即对于含有^mCCGG、C^mCGG 和 C^mC^mCGG 的位点均不能酶切。而 *MspI* 能够识别基因组 DNA 单链或双链该位点内侧的甲基化胞嘧啶,不识别外侧甲基化胞嘧啶,不能酶切^mCCGG 位点。因此,即使相同的序列也可以扩增出不同的谱带,根据扩增后的带型,就可以分析 DNA 甲基化的整体水平及 DNA 的甲基化程度^[9-13]。

1.2 MSAP 技术的操作流程

首先采用 CTAB 法或 SDS 法提取大量 DNA,提纯并检测其浓度后,稀释备用;再分别用 *EcoRI/HpaII* 和 *EcoRI/MspI* 两组酶组合对基因组 DNA 进行双酶切,得到不同的酶切片断后连上相应的限制性内切酶的接头,然后进行 PCR 扩增,PCR 扩增需要进行两次。预扩增可以减少选择性碱基的错配和纯化模板,扩增引物按接头序列设计,以 DNA 酶切片断为模板,预扩增完成后,将产物稀释,再加入带有选择性碱基的引物,以此为模板进行选择性的扩增;选择性扩增产物要进行聚丙烯酰胺凝胶电泳,最后采用银染法处理胶板,统计和分析 DNA 条带。*EcoRI/HpaII* 和 *EcoRI/MspI* 泳道的每条带各代表一个酶切识别位点。若

EcoRI/HpaII、*EcoRI/MspI* 泳道均有带,则表示该位点发生单链外侧甲基化或双链均无甲基化;若 *EcoRI/HpaII* 泳道无带、*EcoRI/MspI* 泳道有带,则表示该位点发生了双链内侧甲基化;若 *EcoRI/HpaII*、*EcoRI/MspI* 泳道均无带,则表示该位点发生了双链外侧甲基化;若 *EcoRI/HpaII* 泳道有带、*EcoRI/MspI* 泳道无带,则表示该位点发生了单链内侧甲基化^[14-18]。

2 MSAP 技术在玉米上的应用

2.1 玉米杂种优势的预测及应用

作物间杂种优势自提出以来,对于禾谷类作物的生长发育和产量性状起着非常重要的作用,其作用机理也一直是研究的热点。MSAP 技术的成功应用补充了杂种优势在研究机理方面的空缺,同时也一定程度弥补了其在预测应用方面的不足。自 Xiong^[19]1999 年首次应用 MSAP 技术研究了水稻亲本与杂种一代的 DNA 甲基化联系与差异,发现不同位点甲基化程度有所不同,对杂种优势分别表现出正负效应,并且发现特异位点的甲基化水平的变化与 F₁ 代杂种优势显著相关,由此证明了通过 MSAP 技术可以有效预测杂种优势后,对于 MSAP 与作物杂种优势预测及应用的研究陆续展开。仪治本等^[20]通过 MSAP 技术分析比较了 2 个玉米杂交种及其亲本的胞嘧啶甲基化水平,发现杂交种相比亲本的甲基化模式,分别表现为去甲基化、次甲基化和超甲基化,杂种一代与亲本的甲基化程度发生了很大的改变与调整,杂交种通过这种调整,对杂种优势的相关基因进行表达调控,形成 F₁ 代的杂合性。XX Zhao 等^[21-22]采用 MSAP 技术检测分析了玉米杂交种及其后代的 DNA 甲基化水平,结果表明,玉米亲本的表现遗传性状与大部分杂交种对比具有一定遗传性,证明玉米 DNA 甲基化水平的变化可能在很大程度上反映和影响着杂种优势的结果。之后又提出甲基化水平的差异导致了基因组序列的多样性,甲基化模式的重建与玉米杂种很可能存在着很大的相关性。尹祥生^[23]在对 5 份玉米自交系及其组成的 10 个杂交组合的研究中,通过 MSAP 技术检测 DNA 甲基化水平,发现在杂交过程中,子代的甲基化水平降低,非甲基化水平升高,10 个杂交组合在 CCGG 位点上的甲基化水平呈现一定规律,全甲基化在亲本和子代中的分布表现为 9 个组合子代低于亲本,1 个组合子代高于亲本,半甲基化在亲本和子代中的分布却各不一样。X Qi 等^[24]通

过应用 MSAP 技术对 12 个玉米自交系及其组配的 132 个完全双列杂交组合 F_1 代进行胞嘧啶甲基化差异分析,首次在表观遗传水平上探讨了 DNA 甲基化与玉米产量杂种优势之间的关系。综合研究表明,杂交种的产量杂种优势和双亲的 CHG 甲基化水平呈正相关,且高于中亲优势。同时提出玉米亲本在 CHG 甲基化的差异很有可能成为划分杂种优势群体的一种分子标记,这对玉米杂种优势的预测及机理研究非常重要。W Yang 等^[25]通过对 11 个玉米自交系进行 MSAP 分析,对比在杂种 F_1 代表现出杂种优势的 4 个农艺性状,发现其中 CCGG 位点上的 CHG 甲基化水平高低与穗行数杂种优势水平呈正相关,而与行粒数呈负相关,并指出亲本特异性的甲基化模式变化与影响玉米产量的性状的杂种优势水平之间存在一定作用与反作用,这对进一步进行玉米杂种优势预测有利。

2.2 玉米抗逆性研究

近年来,关于 DNA 甲基化稳定生物基因组功能,提高生物抗逆性方面的研究备受重视。MSAP 为此项研究提供了有效可靠的工具,目前,在水稻、小麦、高粱等禾谷类作物中的应用也屡见不鲜^[26-28],前人在玉米方面也做了大量研究。Josphert N.K 等^[29]采用 MSAP 技术,在铝胁迫及低 pH 值胁迫下,对耐铝性自交系及铝敏感自交系进行 DNA 胞嘧啶甲基化水平的检测,分析 CCGG 超甲基化和低甲基化水平,结果显示变化范围为总甲基化水平 1.5%~15%,其中包括与铝毒相关的 CG 水平上的变化为 4.75%~5.30%,CNG 水平上的变化为 6.76%~7.31%。这一结果为培育表达耐铝基因杂种优势的基因型有所帮助,并且,从表观遗传学的角度为酸性土壤耐铝育种的研究提供了理论基础。MP Tan^[30]对玉米幼苗在渗透压和盐胁迫的条件下进行 DNA 甲基化分析,利用 MSAP 技术成功获得 25 个不同扩增片段的序列,通过叶片特定 MSAP 片段证明渗透胁迫诱导反转录转座子的甲基化水平变异。在盐胁迫下,玉米根部内含子甲基化水平显著下降,叶片的去甲基化表达小幅上升,即盐胁迫下,玉米幼苗 DNA 甲基化程度和去甲基化程度与玉米抗性存在正负关联,甲基化程度与模式的变化在玉米应激反应中起了不容忽视的作用。杨光^[31]应用 MSAP 技术,在 6 个冷胁迫不同的时间对玉米幼苗进行甲基化水平分析,并指出冷胁迫后,转座子可能被激活,进而 DNA 甲基化水平和模式发生变异,以适应逆境,这为今后利用抗

冷基因,进一步改良玉米抗冷性提供了理论基础。

2.3 玉米发育调控与基因表达差异

DNA 甲基化在植物生长发育和基因表达方面都具有十分重要的调控作用,在不同条件下的植物发育过程中,通过 MSAP 技术大规模分析植物 DNA 甲基化水平,进而达到控制基因表达,调控植物发育分化的目的,也是近几年的研究热点。Yanli Lu^[32]对玉米雄穗、苞叶、穗位叶进行了 MSAP 分析,发现 DNA 全甲基化水平苞叶最高,雄穗最低,不同的甲基化水平可能与各组织中特定的基因表达有关。同时提出,甲基化水平的上升或下降会随着玉米的生长过程和环境变化而变,启动子或编码区的甲基化水平可能影响基因转录效率,以应对内部变化和外部环境。YL Lu 等^[33]检测了两组 C 型细胞质雄性不育系及其保持系的幼苗和雄穗,通过 MSAP 分析其甲基化水平之后,看出两组不育系在 MSAP 比率上和甲基化水平上均高于相应的保持系,在对 C-CMS 雄性不育系和保持系的雄穗分析中发现 4 种不同类型甲基化模式(特异位点甲基化、去甲基化、次甲基化、超甲基化),这种多态性与 C 型细胞质雄性不育系之间存在必然联系。李盼^[34]分析了玉米茎节在伸长过程中各时期的甲基化水平,发现 DNA 甲基化水平在不同自交系间相同时期及相同自交系间不同时期均不相同,全基因组的甲基化水平随植物的生长发育进程而提高,与玉米生长发育时期的调控密不可分。

3 MSAP 技术的应用前景

植物的许多生命过程都必须有 DNA 甲基化的参与和调控,它在遗传育种、基因表达、抗性筛选等多方面起到不容忽视的作用。尽管 MSAP 技术由于条带冗余、检测位点受限,有一些不足之处,但这项技术操作简便,且具有很大的通用性,可用于 DNA 序列背景未知的生物,因此它的出现无疑为 DNA 甲基化的检测提供了更方便简捷的工具。目前,MSAP 技术已经在许多方面得以应用,未来经过逐步的研究改良与补充,相信它会在更多领域做出相应贡献。

参考文献:

- [1] Waddington C H. Canalization of development and the inheritance of acquired characters[J]. Nature, 1942(150): 563-565.
- [2] Wu C T, Morris J R. Genes, genetics and epigenetics: a correspondence[J]. Science, 2001, 29(3): 1103-1105.
- [3] 张燕,陈波. DNA 甲基化敏感扩增多态性技术及其在作物遗传研究中的应用[J]. 西昌学院学报, 2009, 23(4): 7-11.

- [4] 刘 宝 . 表观遗传变异与作物遗传改良[J] . 吉林农业大学学报 ,2008 ,30(4) :386-393 .
- [5] Bird A P. DNA methylation patterns and epigenetic memory [J] . Genes Dev, 2002(16): 6-21 .
- [6] Jaenisch R, Bird A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals [J] . Nat Genet, 2003, 33(S): 245-254 .
- [7] 顾婷婷,张忠明,郑鹏生 . DNA 甲基化检测方法回顾和评价 [J] . 中国妇幼保健研究 ,2006(6) :555-560 .
- [8] REYNA-LOPEZ G E, SIMPSON J, RUIZ-HERRESA J. Differences in DNA methylation patterns are detectable during the dimorphic transition of fungi by amplification of restriction polymorphisms[J] . Mol. Gen. Genet, 1997(253): 703-710 .
- [9] 韩雅楠,赵秀娟,蔡 禄 . MSAP 技术在植物抗逆性方面的应用[J] . 生物技术通报 ,2010(6) :71-74 .
- [10] 李卫国,常天俊,龚红梅. MSAP 技术及其在植物遗传学研究中的应用[J] . 生物技术 ,2008(1) :83-87 .
- [11] Xiaoqiang Chen, Yi Ma, Fang Chen, et al. Analysis of DNA methylation patterns of PLBs derived from Cymbidium hybridium based on MSAP [J] . Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2009, 98(1): 67-77 .
- [12] Ezio Portis, Alberto Acquadro, Cinzia Comino, et al. Analysis of DNA methylation during germination of pepper (*Capsicum annuum* L.) seeds using methylation-sensitive amplification polymorphism (MSAP) [J] . Plant Science, 2004, 166 (1): 169-178 .
- [13] Yonghong Duan, Jin Qian, Yi Sun, et al. Construction of methylation linkage map based on MSAP and SSR markers in Sorghum bicolor (L.) [J] . IUBMB Life, 2009, 61(6): 663-669 .
- [14] A.H. Sha, X.H. Lin, J.B. Huang, et al. Analysis of DNA methylation related to rice adult plant resistance to bacterial blight based on methylation-sensitive AFLP (MSAP) analysis [J] . Molecular Genetics and Genomics, 2005, 273(6): 484-490 .
- [15] Jaligot E, Beul   T, Baurens F-C, et al. Search for methylation-sensitive amplification polymorphisms associated with the "mantled" variant phenotype in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) [J] . Genome, 2004, 47(1): 224-228 .
- [16] S. Y. Park, H. N. Murthy, D. Chakrabarty, et al. Detection of epigenetic variation in tissue-culture-derived plants of *Doritaenopsis* by methylation-sensitive amplification polymorphism (MSAP) analysis [J] . In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant, 2009, 45(1): 104-108 .
- [17] C F Marfil, R W Masuelli, J Davison, et al. Genomic instability in *Solanum tuberosum* × *Solanum kurtzianum* interspecific hybrids [J] . Genome, 2006, 49(2): 104-113 .
- [18] Yun Jung Oh, Hee Chung, Jae Gyeong, et al. YuNewly developed MSAP analysis reveals the different polymorphism patterns in transgenic tobacco plants with the dsRNA MET1 gene [J] . Plant Biotechnology Reports, 2009, 3(2): 139-145 .
- [19] Xiong L Z, Xu C G, Maroof M A, et al . Patterns of cytosine methylation in an elite hybrid and parental lines, detected by a methylation-sensitive amplification polymorphism technique [J] . Genet, 1999 , 261(3) : 439-446 .
- [20] 仪治本, 孙 毅, 牛天堂, 等. 玉米杂交种及其亲本基因组 DNA 胞嘧啶甲基化水平研究 [J] . 西北植物学报 ,2005 ,25 (12):2420-2425 .
- [21] Zhao, X., E. Jia, W. Yang, et al. DNA methylation polymorphism in a set of elite maize inbred lines revealed by methylation-sensitive ISSR analysis [J] . Cereal Res. Commun, 2006 (34): 879-886 .
- [22] X X Zhao, Y Chai, B Liu. Epigenetic inheritance and variation of DNA methylation level and pattern in maize intra-specific hybrids [J] . Plant Science, 2007, 172(5): 930-938 .
- [23] 尹祥生 . 玉米自交系及其杂种 F₁ 代的甲基化研究 [D] . 四川农业大学 ,2010 .
- [24] X Qi, ZH Li, LL Jiang, et al. Grain-Yield Heterosis in *Zea mays* L. Shows Positive Correlation with Parental Difference in CHG Methylation [J] . Crop Sci, 2010(50): 2338-2346 .
- [25] W Yang, XM Yu, WG Yang, et al. Parental epigenetic difference in DNA methylation-level may play contrasting roles for different agronomic traits related to yield heterosis in maize [J] . African Journal of Biotechnology ,2011 ,10(46): 9253-9263 .
- [26] 华 扬, 陈学峰, 熊建华, 等 . 水稻冷胁迫诱导的甲基化差异片段 CIDM7 的分离和分析 [J] . 遗传 ,2005 ,27(4): 595-600 .
- [27] 付胜杰, 王 晖, 冯丽娜, 等 . 叶锈菌胁迫下的小麦基因组 MSAP 分析 [J] . 遗传 ,2009 ,31(3) :297-304 .
- [28] Josphert N. Kimatu, Moussa Diarso, Congdi Song, et al. DNA cytosine methylation alterations associated with aluminium toxicity and low pH in Sorghum bicolor [J] . African Journal of Agricultural Research , 2011, 6(19): 4579-4593 .
- [29] Josphert Ngui Kimatu. 铝胁迫诱导玉米 DNA 甲基化变异及其与铝毒性耐性基因型间差异的可能关系研究 [D] . 东北师范大学 ,2010 .
- [30] Ming-pu Tan. Analysis of DNA methylation of maize in response to osmotic and salt stress based on methylation-sensitive amplified polymorphism [J] . Plant Physiology Biochemistry, 2010, 48(1): 21-26 .
- [31] 杨 光 . 玉米苗期冷响应分子机理的研究 [D] . 吉林大学 ,2010 .
- [32] Yanli Lu, Tingzhao Rong, Moju Cao. Analysis of DNA methylation in different maize tissues [J] . Journal of Genetics and Genomics, 2008(35): 41-48 .
- [33] YL Lu, YX Liu, J Wang, et al. Variation and patterns of DNA methylation in maize C-type CMS lines and their maintainers [J] . Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology, 2010 , 19(1): 43-50 .
- [34] 李 盼 . 玉米茎节伸长过程的 DNA 甲基化分析及基因初步定位 [D] . 河北农业大学 ,2012 .