

· 综 述 ·

## AFLP——一种 DNA 分子标记新技术

翁跃进

(中国农科院作物品种资源研究所, 北京 100081)

## AFLP——A Novel Technique for DNA Molecular Marker

Weng Yuejin

(Institute of Crop Germplasm Resources, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081)

AFLP(Amplified fragment length polymorphism) 国内译为扩增片段长度多态性, 是 1993 年由荷兰 Keygene 公司科学家 Zabeau Marc 和 Vos Pieter 发明创建的一种 DNA 分子标记新技术, 它不仅具备了其它 DNA 分子标记技术所具有的特点, 多态性丰富, 共显性表达, 不受环境影响, 无复等位效应, 而且还具有带纹丰富, 用样量少, 灵敏度高, 快速高效等特殊优点。一个 0.5mg DNA 样品, 可做 4 000 个反应, 获得 8 万个标记, 650 万条带纹。美国加利福尼亚大学 Mackill David<sup>[7]</sup> 利用 14 份水稻为材料, 比较 AFLP 和 RAPD 两种分子标记的实验结果, 发现 RAPD 方法 21 个引物获得 103 条带纹, 43 个标记, 而 AFLP 方法 18 个引物获得了 529 条带纹, 147 个标记。通过一些实验室和科学家的使用和验证, AFLP 被认为是一种十分理想的、有效的、先进的分子标记<sup>[1-7, 9]</sup>。目前, 不仅在小麦、水稻、玉米、大豆和棉花等主要农作物上得以应用, 而且在蔬菜(番茄、马铃薯、鹰嘴豆)、林木(垂枝桦 *Betula pendula*、辐射松 *Pinus radiata*) 以及植物基因组研究的模式植物拟南芥上广泛应用。

### 1 原 理

AFLP 的原理是基于对植物基因组总 DNA 双酶切经 PCR 扩增后的限制性片段进行选择<sup>[4, 5, 8, 10]</sup>。具体是植物基因组 DNA 经限制性内切酶双酶切后, 形成分子量大小不等的随机限制性片段, 将特定的接头(adapter)连接在这些 DNA 片段的两端, 形成一个带接头的特异片段, 通过接头序列和 PCR 引物 3'末端的识别, 特异性片段经变性, 淬灭和延伸周期性循环而扩增, 最终通过聚丙烯酰胺凝胶电泳分子筛的作用, 将这些特异的限制性片段分离开来。

### 2 流 程

AFLP 流程包括模板准备、片段扩增和凝胶分析这 3 个主要步骤<sup>[4, 5, 8, 10]</sup>, 各步骤具体的过程有: (1) 提取样本的 DNA 经浓度和质量检测后, 针对植物基因组富含 AT 的特点选择 6 个碱基识别位点的限制性内切酶, 通常是 *EcoRI* 或 *PstI* 或 *SacI*, 和 4 个碱基识别位点的限制性内切酶, 通常是 *MseI* 或 *SseI* 在适宜的缓冲系统中进行酶切。(2) 酶切后的限制性片段在 T4 连接酶的作用下与特定的接头相连接, 形成带有接头的特异性片段。(3) 利用磁珠(粉)在 STEC 盐溶液中反复洗脱 2—3 次, 选择带有特定接头的限制性片段。(4) PCR 前扩增。(5) 利用同位素<sup>32</sup>P 或<sup>33</sup>P 标定 PCR 引物。(6) 在 Taq 聚合酶的作用下, 完成 94℃变性 30 秒—65℃淬灭 30 秒—72℃延伸 60 秒 PCR 扩增 36 个循环。(7) PCR 产物变性后在含尿素的聚丙烯酰胺变性胶上电泳。(8) 将电泳后的凝胶转移

吸附到滤纸上,经干胶仪进行干胶处理。(9)在 X 光片上感光,数日后冲洗胶片并进行结果分析。

### 3 应用

AFLP 和其它 DNA 分子标记技术一样,在遗传学和育种学领域具有广泛的应用前景。目前由于 AFLP 技术比较新颖,又受到专利保护(欧洲专利号 EP 0 534 858 A1),所以,其应用仅仅局限于荷兰、美国、德国和英国等少数发达国家的科研单位和高等学府从事非盈利性的研究,其范围包括:

#### 3.1 遗传多样性的研究

美国康耐尔大学的 Blair<sup>(6)</sup>利用 AFLP 技术评价 54 份水稻品种的遗传多样性,研究其系统发育和分类,并与同功酶生化标记及 RFLP 标记比较,发现不仅其结论一致,而且认为 AFLP 对于研究水稻品种的遗传变异和构建基因组图谱更为理想。英国剑桥实验室中国留学生朱嘉辉<sup>(7)</sup>从菲律宾国际水稻所(IRRI)随机选取来源于不同地理生态区的 200 份水稻种质资源研究其多样性,并根据 AFLP 数据结果提出水稻模式核心种质(Model core collection)。比利时 Breynce Peter<sup>(7)</sup>分析拟南芥种内和种间的 22 个群体,1 个反应即可发现大量特异性带纹,不同群体间 50% 以上有多态性,根据相关系数和聚类分析,比较群体间的遗传距离。中国留荷研究生漆小泉(私人通讯)利用 AFLP 技术研究十字花科白菜品种间的遗传多样性,也获得了良好的结果。

#### 3.2 构建遗传图谱

法国 Faye<sup>(7)</sup>一人利用 3 个玉米分离群体仅花费 3 个月的时间专门构建了玉米的 AFLP 遗传图谱,共 1 032 个 AFLP 标记。德国 J. Becker 等人<sup>(1)</sup>则利用春大麦品种 Proctor × Nudinka 杂种 F<sub>1</sub> 创建的双单倍体(Doubles haploid)群体(113 株)确定了 116 个 AFLP 标记,补充到大麦 RFLP 遗传图谱上,分布在大麦 7 个同源群染色体上,其中 1H 18 个,2H 21 个,3H 18 个,4H 21 个,5H 8 个,6H 6 个和 7H 24 个,不仅填补了大麦 RFLP 遗传图谱上 6H 染色体和 2H 及 4H 染色体长臂上的空隔区(Gaps),而且增加了大麦遗传图谱的长度。荷兰 Van Eck Herman<sup>(7)</sup>利用马铃薯构建遗传图谱群体研究 AFLP 标记与 217 个已知的马铃薯形态的、同工酶的和 RFLP 的标记,构建多种标记综合的遗传图谱。荷兰 Keygene 公司 Pot Jerina<sup>(7)</sup>构建了拟南芥高密度的遗传图谱,其中有<sup>33</sup>P 标定的 AFLP 位点 500 个,又补充荧光素标定的位点 200 余个,覆盖了拟南芥的整个染色体组。

#### 3.3 标定基因

美国普渡大学 Ismal Dweikat<sup>(6)</sup>以小麦近等基因系为材料,利用 Keygene 公司生产试剂盒的 9 个 *Pst*I 引物和 8 个 *Eco*RI 引物,定位了抗麦蝇(Hessian fly)基因 H6 和 H16,自行设计 *Pst*I、*Eco*RI 和 *Sac*I 3 种酶切的 10 个引物,其中 4 个引物分别与抗麦蝇基因 H5、H6、H10 和 H16 紧密连锁。加利福尼亚大学<sup>(9)</sup>标记了抗莴苣菌霉(*Bremia lactucae*)基因的 Dm5 和 Dm8。德国 Max-Planck 研究所 K. Mcksem<sup>(2, 9)</sup>报道了他们发现的 3 200 个 AFLP 位点与马铃薯 V 染色体上抗 *Phytophthora infestans* 基因 R1 具有连锁关系,其中 8 个位于 R1 基因的 RFLP 标记 GP21 和 GP147 之间,最近遗传距离仅为 0.8cM。英国 C. M. Thomas<sup>(3)</sup>利用番茄与野生种 *Lycopersicon pennellii* 种间杂交 F<sub>2</sub> 群体发现 42 000 条 AFLP 带纹与番茄抗叶霉病基因 Cf-9 紧密连锁,其中 3 个标记与 Cf-9 基因表现共分离。

#### 3.4 辅助育种

美国 Texas 大学的 Reddy<sup>(7)</sup>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远缘杂交,利用计算机 Genescan672 软件分析 64 个 AFLP 引物实验结果,在杂交后代 F<sub>2</sub> 群体中发现 300 个标记与亲本的长绒和高产性状有关。芬兰 Satu Akermam<sup>(6)</sup>利用 AFLP 技术研究垂枝桦树的 2 个杂交组合后代 30—32 个体,产生 3—12 有意义的多态性带纹,分子量范围在 200—700bp 之间,带纹的分离完全符合孟德尔的遗传规律。美国 Vantoal<sup>(7)</sup>用 AFLP 技术指导大豆回交育种,比较大豆双亲与回交 1 代 C<sub>0</sub> 及回交 2 代 C<sub>1</sub> 的异质程度,平均每个 AFLP 引物产生 10 个多态性标记,10 对 AFLP 引物可以检测出 100 多个位点的纯合或异质程

度。美国生命技术公司的 Lin<sup>(7)</sup> 利用 AFLP 技术研究大豆的数量性状, 发现每个反应均表现大量的多态性带, 每对引物具有高频率 (>90%) 的多态性, 可以作为大豆数量性状的标记。

### 3.5 鉴定品种绘制指纹图谱

AFLP 最适的应用范围, 也是 M. Zabeau 和 P. Vos 申请专利的关键是利用 AFLP 技术鉴定品种的指纹 (Fingerprint), 检测品种的质量和纯度, 辨别真伪, 十分灵敏。著名的美国先锋种子子公司首先引用了 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。法国 Fayc<sup>(7)</sup> 用 1 个 AFLP 引物在玉米 2 个基因型中发现 30 条以上的多态性带纹, 十分适合用于玉米基因型的指纹鉴定。

### 3.6 促进新产品和新兴产业

AFLP 作为新兴的一种 DNA 分子标记技术, 带动了相应学科的研究和发展。Keygene 公司生产的 AFLP 试剂盒在全世界推销; 美国生命技术公司在上海建立了上海技术服务部, 经营和推销 AFLP 的试剂和技术; 美国 Gupta, Manju<sup>(7)</sup> 改进的生物系统 DNA 自动序列仪 ABI377, 专为 AFLP 技术使用; 相应开发的 AFLP 计算机软件 Genescan 672, 可以提供 2.5 倍的信息, 准确的 DNA 分子量, 快速的电泳分析和自动化数据处理。

应该指出, AFLP 技术并非十全十美的技术, 如使用同位素, 对环境和人身安全构成一定的危害; 其实验成本和造价也比较高, 特别是 4 碱基限制性内切酶的价格十分昂贵。但是, 它也在不断发展和完善。美国生命技术公司以及康耐尔大学的 Blair 都利用非放射性化学试剂代替放射性同位素; 美国 Vantool 利用银染技术代替了同位素的使用, 同时还省略了磁珠(粉)选择的过程, 直接进行 PCR 扩增, 都获得了较好的效果。

### 参 考 文 献

- (1) Becker J *et al*, 1995. *Mol. Gen. Genet.*, 249: 65—73.
- (2) Meksem K *et al*, 1995. *Mol. Gen. Genet.*, 249: 74—81.
- (3) Thomas C M, 1995. *The Plant Journal*, 8(5): 785—794.
- (4) Vos P *et al*, 1995. *Nucleic Acids Research*, 23(21): 4407—4414.
- (5) GIBCOBRL, 1995. *Instruction manual AFLPTM analysis system I AFLP starter primer kit.*
- (6) International plant genome conference III January, 1995. San Diego, USA.
- (7) International plant genome conference IV January, 1996. San Diego, USA.
- (8) Keygene AFLP protocol for public release. Version 2.0 March 1994.
- (9) 4th International congress of plant molecular biology. June 19—24. 1994 Amsterdam, Netherland.
- (10) Zabeau M and Vos P, 1993. *European patent application publication number, EP 0534858.*

本文于 1996 年 6 月 12 日收到, 1996 年 8 月 9 日修回。

(上接第 14 页)

### 参 考 文 献

- (1) Berta P, Hawkins J R, Sinclair A H *et al*, 1990. *Nature*, 348: 448.
- (2) Brandt B, Greger V, Yandell D *et al*, 1992. *Am. J. Hum. Genet.*, 51: 1450.
- (3) Haqq C M, King C-Y, Donahoe P K *et al*, 1993. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 1097.
- (4) Hoo J J, Salafsky I S, Lin C C *et al*, 1989. *Am. J. Hum. Genet.(Suppl)*, 45: A73.
- (5) Hua Su, Chris Lau Y F, 1993. *Am. J. Hum. Genet.*, 1993. 52: 24.
- (6) Kawkins J R, 1993. *Hum. Mutat.*, 2: 347.
- (7) Koopman P, Gubbay J, Vivian N *et al*, 1991. *Nature*, 351: 117.
- (8) Nasrin N, Buggs C, Kong X F *et al*, 1991. *Nature*, 354: 317.
- (9) Ogata T, Hawkins J R, Taylor A *et al*, 1992. *J. Med. Genet.*, 29: 226.
- (10) Orita M, Suzuki Y, Sekiya T *et al*, 1989. *Genomics*, 5: 874.
- (11) Pivnick E K, Wachtel S, Woods D *et al*, 1992. *Hum. Genet.*, 90: 308.
- (12) Sinclair A H, Berta P, Palmer M S *et al*, 1990. *Nature*, 346: 240.
- (13) Wilkie A O, Campbell F M, Daubency P *et al*, 1993. *Am. J. Hum. Genet.*, 46: 597.

本文于 1995 年 7 月 18 日收到, 1996 年 5 月 20 日修回。