

AFLP 标记技术的发展和完善

The Advancement of AFLP Technology

李 韬

LI Tao

教育部植物功能基因组学重点实验室,江苏省作物遗传生理重点实验室,扬州大学 扬州 225009

Key Laboratory of Plant Functional Genomics, Ministry of Education; Jiangsu Provincial Key Lab of Crop Genetics and Physiology, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China

摘 要 AFLP 标记技术自诞生以来,由于集成高效性、高通量、无需知道序列信息等诸多优点而在分子生物学研究中得以广泛应用。近年来,研究人员对该技术进行了不断的优化和完善,并由之衍生出多种相关技术,不仅能区分纯合子和杂合子,还能够将感兴趣 AFLP 条带进行位点特异性标记的高效转化,从而有利于进行大规模单位点检测和基因克隆,检测技术更趋高效。重点评述近年来“常规”AFLP 技术向更高通量、更加高效和信息完全 AFLP 技术的转化和发展,了解这些变革对高效利用 AFLP 技术实现研究目标具有重要的意义。

关键词 AFLP, 衍生技术, 进展和完善

中图分类号 Q78 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2006)05-0861-05

Abstract AFLP technology has been widely used in molecular biology due to its integration of several advantages of high throughput, high efficiency and requiring no sequence information, etc. Great changes have been achieved in recent years in AFLP-related technologies and platforms. There are several AFLP-expanded technologies available. These improved technologies are capable of distinguishing the heterozygote from the homozygote and of converting any AFLP band of interest, without much effort, into locus-specific markers, which can be deployed for massive locus detection and for gene isolation. This review focuses on these favorable changes from conventional AFLP technology into more effective and more practicable AFLP-related ones. Understanding these advancements and AFLP-expanded technologies will facilitate the achievement of our research goals.

Key words AFLP, AFLP-expanded technologies, advancements

AFLP(Amplified Fragment Length Polymorphism, AFLP)标记技术自 Vos *et al.*^[1]发明以来,由于具有覆盖面广、高保真性、高效性、高分辨率、所需 DNA 量少、事先毋需知道序列的任何信息、可在全基因组产生标记、其标记的分离遵循孟德尔遗传规律等优点,已被广泛用于生物多样性研究、种属特异性鉴定、分类和进化研究、构建遗传连锁图谱和物理图谱、轮回育种的背景选择、研究基因表达与调控、基因克隆、甲基化研究、单核苷酸多态性(SNP)发掘以及转座

子研究等方面。但是 AFLP 标记技术也有局限性,自诞生后技术本身也在不断的发展和完善,并由之衍生出许多相关技术。因此本文将重点述评 AFLP 标记技术的发展和完善,为研究人员高效利用该技术实现研究目标提供一定的参考。

1 AFLP 的几种衍生技术

1.1 SADF-AFLP——单限制性酶切 AFLP

其基本原理是,采用单限制性酶对基因组 DNA

或 cDNA 进行消化,而非常规的双酶切,并且使酶切和连接在同一反应体系中进行,选择性扩增产物在琼脂糖凝胶电泳后即可进行分离检测^[2]。对于基因组相对简单的生物,利用单限制性酶切 AFLP 快速而且重复性好,但对于基因组复杂的生物,由于琼脂糖胶的分辨率较低,往往受到一定的限制。

1.2 SD-AFLP——二次消化 AFLP

SD-AFLP 起初是为了甲基化状态的遗传稳定性而建立的^[3],该方法首先采用单一限制性内切酶如 *Mse* I 消化基因组 DNA 或 cDNA 并连接接头,接着用无选择性碱基引物进行扩增,产生了没有甲基化 C 残基的模板,扩增产物再经对甲基化敏感的内切酶如 *Pst* I 进行二次消化,然后接相应接头,接着用带有选择性碱基的标准 AFLP 引物进行第二次扩增,其产生的带型与标准 AFLP 所产生的带型进行比较,原来在 *Pst* I 位点包含有甲基化的 C 残基经过初始的无选择性碱基引物扩增后可以被 *Pst* I 二次消化,而标准 AFLP 的原始模板在 *Pst* I 位点被甲基化了的 C 残基则不能被 *Pst* I 消化。

1.3 TE-AFLP——三限制性酶切 AFLP

TE-AFLP 是 van der Wurff *et al.*^[4]报道的一种基于 AFLP 技术一种新的指纹技术。其基本原理是用三种限制性内切酶切割基因组 DNA,一种多切点酶,两种稀有切点酶,因此叫做 TE-AFLP(three endonuclease AFLP)。该技术应用三种限制性内切酶和两组接头在单一的缓冲体系中对基因组 DNA 酶切和连接来研究 DNA 片段多态性。这种方法与传统的双酶切 AFLP 技术相比由于多了一个酶切位点,其分辨效力增加了,而扩增的总带数反而减少,比常规 AFLP 带数减少大约 20% 左右。由于该方法采用了酶切连接同步进行和一步 PCR 反应,省去了预扩增步骤,使得分析速度和成本都低于常规 AFLP 分析方法,特别适用于复杂基因组的分析,操作简单、省时。

1.4 Substracted AFLP——差减 AFLP

为解决 AFLP 中样品间共同片段对多态性片段识别的干扰,Chai J-F *et al.*^[5]将差减抑制杂交原理^[6]和 AFLP 标记技术^[1]相结合,建立了一种“减法 AFLP 标记技术”,基本原理是将 Tester DNA 和 Driver DNA 分别双酶切并和接头连接,进行预扩增,将预扩产物纯化后作模板,再行酶切连接,然后进行两轮差减抑制杂交,再将差异片段纯化后进行预扩和选扩。他们运用该技术对小麦中的外源染色体片段进行了标记。该法的优点是能够显著减少样品间的共同扩增

片段,在非变性聚丙烯酰胺凝胶上带型差异明显,多态性片段容易分辨,但该方法也存在明显的缺点,其操作步骤非常繁琐、流程长且成本高。

1.5 Microsatellite-AFLP——微卫星 AFLP

Microsatellite AFLP,又称 SAMPL(selective amplification of microsatellite polymorphic DNA),这是将 RAMP(randomly amplified microsatellite polymorphism)微卫星引物和选择性 AFLP 随机引物相结合的一种指纹技术,能够扩增含有简单序列重复域(SSR)的限制性片段,产生高频率的共显性标记,该技术整合了 SSR 标记共显性和 AFLP 标记带型丰富的特点,能够揭示更多的遗传信息,可靠性高、假阳性较低^[7,8]。RAMP 引物由 5'端铆钉序列和 3'端重复域序列构成,而扩增区段是 RAMP 引物结合区和选择性扩增 AFLP 引物结合区之间的序列。产生的指纹因 AFLP 选择性碱基组成、RAMP 引物的 5'端铆钉序列和 3'端重复域序列的不同有所差异。该技术也无需事先知道序列信息就能够扩增简单序列重复域,进一步丰富了 AFLP 指纹技术,可以对目标生物快速的进行常规的分子检测,因此也是一种值得尝试的强有力作图工具。

1.6 cDNA-AFLP——互补 DNA-AFLP

Bachem *et al.*^[9]将 AFLP 技术应用于 mRNA 表达差异分析,发展了一种 mRNA 指纹图谱技术,即 cDNA-AFLP 技术。基本原理是将分离纯化的 mRNA 反转录成 cDNA 第一链,再以第一链为模板合成双链 cDNA,然后以此双链 cDNA 为模板进行酶切连接、预扩和选扩,最后找到差异表达的片段。该技术保留了 AFLP 技术的可靠性与高效性,可广泛地应用于植物生长发育过程基因分离与表达特性的研究。该法比较灵敏和可靠,不需要知道基因或 EST 的任何序列信息,一次能够分析大量差异表达的基因,并能够检测出低丰度表达的转录本。自从其诞生以来,许多研究者将此法用于基因的差异表达谱分析以及差异表达基因的克隆。但该法的主要局限性在于不易分离到全长序列。

2 相对低通量和信息不完全 AFLP 技术向高通量、信息完全技术的转化

2.1 由同位素标记、生物素标记技术、银染技术向荧光标记技术的转化

同位素标记(通常是³²P 或³³P)技术比较灵敏,相当一部分实验室仍采用同位素标记,其最大的缺点就是具有放射性,由于同位素的不安全因素,现

在部分实验室采用生物素标记(如地高辛)代替同位素标记,其灵敏性略低于或相当于同位素,其优点是没有放射性,对人体不会造成伤害,但采用生物素标记流程较长,步骤比同位素标记繁琐,而且成本也高。银染 AFLP 是将扩增产物经过变性聚丙烯酰胺凝胶电泳后,用银染方法代替放射性标记进行多态性的检出。虽然 Chalhoub *et al.*^[10]认为银染 AFLP 技术与同位素标记一样可靠,均能得到清晰的条带,但我们的研究表明,银染技术一般来说灵敏性小于同位素标记和生物素标记,不过比同位素标记操作安全且成本较低,对人体的伤害较小(银染过程所用的甲醛也有毒害),其缺点是流程也比较长,稳定性较差,染色和显色反应受环境温度、染色和显影时间及温度、染色液和显影液的组成等多种因素的影响,但如果操作熟练,并且能够在温度相对恒定的条件下操作,仍能够取得很好的效果(李韬,未发表结果)。由于 AFLP 扩增带比较多,采用上述三种方法不易做到高通量,即每块序列胶只能利用 1 次,每个泳道无法重复上样。荧光标记技术最大的好处是可以做到高通量,通常采用 1~4 色荧光标记(通常为 VIC, FAM, PET 和 NED),荧光强度 VIC = FAM > NED > PET,可同时检测 1~4 种不同标记来源的模板或标记引物的扩增情况。但该方法需要借助自动测序仪电泳装置(如 3700、ABI 或 LICOR)分离扩增片段。其优点是简便快速,但设备昂贵,标记费用成本很高。对于基因组简单的生物,应用单限制性酶切基因组 DNA 扩增产物经含溴乙锭的琼脂糖凝胶电泳后即可得到分离。

2.2 AFLP 指纹图谱库的建立、相关数据包的开发和自动化

Yan *et al.*^[11]建立了一个大型的 AFLP 数据处理软件包,也是类似于核酸数据库概念的一个 AFLP 指纹图谱数据库,包含有 AFLP 指纹资料的最基本信息,包括使用的技术、限制性内切酶和引物组合、模板来源、带的大小、相对强度、释义、处理原始标记数据的算法、带的集成和指纹图谱的比较等等。

由于 AFLP 扩增的带比较多,如果群体较大和选用的引物较多,靠人工判读和处理凝胶图像数据非常费时,而且容易出错,现在已开发出许多专门针对 AFLP 的数据处理包,仅 LI-COR 公司就开发出 Gene ImagIRTM、SAGA^{MX}和 AFLP QuantarTM Pro 三种不同的软件,可以对 AFLP 图谱进行编辑和自动分析,很大程度上解决了数据分析的瓶颈制约。AFLPQuantarTM Pro^[12]功能非常强大,可对近红外、同

位素标记和荧光标记产生的 AFLP 指纹图谱进行高通量和准确的分析,能够自动校正由于背景、电泳和上样差异造成的误差,剔除假阳性条带,并通过内标将单一条带校正到同一迁移率。该软件包还有一个强大的功能,它可以通过量化带的强度进行表达谱分析以及区分纯合子和杂合子,即将显性标记转化成共显性标记。

AFLP 技术越来越多地应用于序列已知生物类型或 BAC 克隆的情况,Stephane *et al.*^[13]开发的 AFLP 指纹图谱模拟软件 AFLPinSilico 可以模拟 cDNA 和 DNA 序列,产生虚拟的 AFLP 指纹图谱,可以对 AFLP 片段进行高通量鉴定。该软件可以建议选择更合适的内切酶组合,产生大小适于扩增的片段(< 3000bp),而不需要人工通过实验尝试不同的内酶切组合。如果给定内切酶组合和 AFLP 选择性引物,则 AFLP 的带型、迁移率、扩增带在染色体上的位置、序列、数目和大小及是否含有开放阅读框(ORF)均可自动给出,从而能够大大缩短实验进程(<http://www.psb.rug.ac.be/bioinformatics/AFLPinSilico.html>)。

硬件方面:GELSCAN3000、ABI DNA Analyzer、API 系列、LI-COR DNA 分析系统等分析仪器在 AFLP 研究中的应用也日益广泛。LI-COR 的 Odyssey 红外荧光扫描成像系统还可将 AFLP 电泳条带回收。总之,从硬件系统到软件的开发和应用极大地促进了本来功能就比较强大的 AFLP 指纹技术在植物、动物和微生物领域更加广泛的应用。

2.3 AFLP 显性标记向共显性标记的转化

尽管 AFLP 标记技术有很多优点,但其最明显的不足之处是绝大部分表现为显性标记,共显性标记频率仅为 4%~15%^[14,15]。显性标记是一种信息不完全标记,即通过凝胶或荧光标记的方法只能记录染色体特定位置带的有或无,无法区分纯合子和杂合子,因而会丢失很多遗传信息,无法估计等位基因频率^[6],直接影响构建标记遗传图或数量性状基因(QTL)图以及标记辅助选择(MAS)的效率和精度^[17-19]。Hans-Peter *et al.*^[20]提出了专门将 AFLP 显性标记转化为共显性标记的正态分布混合模型方法,其基本原理是通过度量 AFLP 扩增带的强度或光密度值,并进行统计处理,从而区分分离群体中特定个体在某一位置点基因型是纯合还是杂合。对于一个 F₂ 个体来说,有 3 种可能的标记基因型,AA/Aa/aa,理论上讲标记基因型 AA 的带强度是 Aa 的 2 倍。但带的强度可能受多种因素的影响,如电泳过程和样品上样量等,因此 Jansen *et al.*^[21]将 Hans-Peter *et al.*

$af^{[20]}$ 的方法和模型做了进一步修正和完善,对于 F2 群体来说,某标记基因型则存在 5 种可能,分别为 AA/NOT aa/Aa/NOT AA/aa,在进行作图分析时则排除两种不能确定的情形,NOT aa 和 NOT AA。Anja *et al*^[19]在对控制小麦赤霉病的 QTL 作图时发现,如果按显性标记处理数据,单一环境条件下总共发现了 7 个 QTL,可解释的表型变异率为 11.1% ~ 44.6%;如果按共显性标记处理数据,除了能检测到上面 7 个 QTL 位点外,还检测到了另外 12 个 QTL 位点,且可解释的表型变异率提高到 36.3% ~ 55.7%。可见如果能够将 AFLP 标记转化为共显性标记,可进一步提高 AFLP 技术在进行连锁分析、数量基因作图、标记辅助选择等方面的功效。Gregory *et al*^[22]则通过 AFLP 与 SSCP 相结合的方法来对 AFLP 指纹进行共显性标记分析。Mueller *et al*^[16]认为利用详细的系谱资料信息可以将 AFLP 显性标记转化为共显性标记。AFLP 的衍生技术 Microsatellite-AFLP^[7,8]也可产生高频率的共显性标记,该技术整合了 SSR 标记共显性和 AFLP 标记带型丰富的特点,能够揭示更多的遗传信息。AFLP 分析软件包 AFLP QuantarTM Pro 则已经整合了将 AFLP 标记位点自动转化成共显性标记的功能^[12]。通过银染检测的 AFLP 技术,目前尚难以通过已有软件或按照 Jansen *et al*^[21]及 Hans-Peter *et al*^[20]的方法和模型区分杂合子或纯合子,因为银染流程长,影响因素多,因此采用 Microsatellite-AFLP 进行共显性分析,可能是一种不错的选择。

2.4 AFLP 标记向位点特异性标记(SCAR 或 CAPS)或等位基因特异性标记(SNP)的转化

由于 AFLP 很难或不适合于进行大规模单位点检测、标记辅助选择和图位克隆,因此很有必要对重要的标记进行位点特异性标记的转化,以便进行快速和高通量检测和分析,如转化成 STS (sequence tagged site)^[23]、CAPS (cleaved amplified polymorphic site)^[24]、SCAR (sequence characterized amplified region)^[25,26]和 SNP (single nucleotide polymorphism)^[27]标记。AFLP 标记转化成位点特异性标记通常有以下几种方法:其一,通过回收-克隆-测序-设计特异引物的方法;当多态性位点不在端部且目的扩增片段较长时,该法容易成功。其二,当多态性位点在扩增片段端部时,很难直接转化,往往采用巢式 PCR 法(Nested PCR);其三, AFLP 是基于酶切和扩增的技术,其多态性若因酶切部位碱基的替换造成,而不是由长度差异造成,则很难直接借助 AFLP 片段本身

的序列信息设计特异引物进行特异性标记转化,但可通过序列本身设计上游或下游引物,另一引物可为随机引物或 SSR 等特异引物,然后在未经酶切的完整基因组中扩增跨酶切位点识别区的序列,找到造成多态的 SNP 位点,然后再据此设计特异性引物。设计位点特异性引物需要 AFLP 目的条带的序列信息,而特异引物的设计除了能够检测特异性位点外,最好能够分辨同一位点内的等位基因之间的差异,通常的做法是对位点内已知等位基因进行测序,然后找出等位基因特异性单位点多态性(SNP)。标记的转换从技术上来讲似乎比较简单,但是由于共迁移带的影响、背景扩增条带的干扰和扩增片段偏短, AFLP 标记转化为位点特异标记或等位基因特异性标记时往往比较费时且成本也高,大多不易转化成功。因此成功转化首先需要克服两大主要障碍:其一,从序列胶上回收目的片段时排除背景带和共迁移带的干扰,否则回收的条带经二次扩增时,会产生很多条带,无法确定目的条带(李韬,未发表结果);其二,解决扩增片段偏短的问题,因为片段太短不易找到合适的引物,也不易在片段内部发现多态性位点,而内部多态性位点可用来区分等位基因^[25]。为此,Brugmans *et al*^[27]提出了一种基于 AFLP 的微型测序的转化方法(AFLP-mediated mini-sequencing),该法整合了多种技术,能够对感兴趣 AFLP 扩增条带进行高效和可靠转化,其基本流程见图 1。

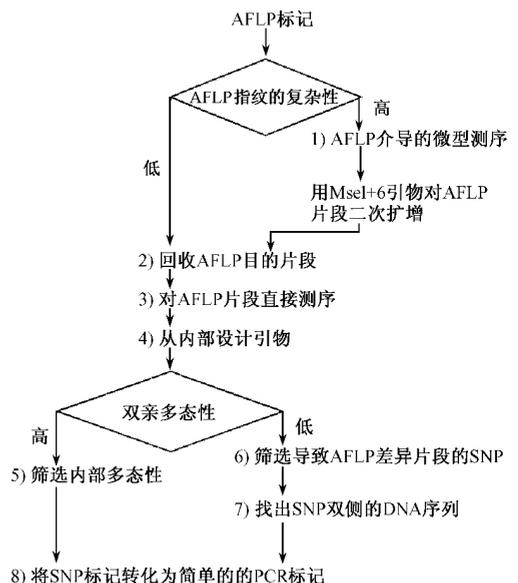


图 1 AFLP 标记转化为位点特异性标记流程图

Fig. 1 Flowchart of converting any AFLP marker into a single

locus PCR-based marker assay

