

糙皮侧耳的 AFLP 分析及多态性片段的鉴定

专业 遗传学

硕士生 孟宇

指导教师 张义正 教授

摘 要

侧耳 (*Pleurotus*) 属于白腐真菌类, 除了具有食用价值外, 因其可以通过分泌木质素降解酶、漆酶等从而有效地氧化木质素和芳香族污染物, 最终将其矿化为二氧化碳和水, 因此在生物制浆, 纸浆生物漂白, 环境保护, 节约能源等方面有重要的研究意义和应用价值。糙皮侧耳 (*Pleurotus ostreatus*) 为侧耳属的模式种, 代表着该属的主要形态特征。目前本实验室已经进行了有关于侧耳菌产生木质素降解酶的活性及产量等的研究, 并筛选出了相应的木质素降解酶高产菌株。

本论文开展了以下几方面进行了研究并获得了相应结果: 1. 为了在较短时间内获得大量菌丝体以提取总 DNA, 对糙皮侧耳的不同培养条件进行了对比。初步确定了该真菌的最佳液体培养条件为 CMA 液体培养, 最适培养温度为 25℃。2. 对糙皮侧耳的 AFLP 分析条件进行了筛选和优化, 发现 E-3/M-3 引物组合扩增获得的片段数量最多, 清晰度高, 片段大小分布也较均匀, 其中又以引物对 E-AGC/M-CAT 和 E-AGC/M-ACC 得到的扩增效果最好, 是最适合做糙皮侧耳 AFLP 分析的引物组合。3. 制作了糙皮侧耳的 AFLP 指纹图谱, 对其中的多态性片段进行了统计和分析, 发现菌株 P17 和杂 3 相似性程度最高, 达到了 81%; 菌株侧 5 与其它糙皮侧耳菌株亲缘关系相对最远。4. 回收并克隆了部分菌株的多态性片段, 完成了其中两条片段的序列测定和分析, 两条片段的大小分别为 1099bp 和 679bp。确定大小为 1099bp 的片段上具有一个阅读框。将这两条片段用 BLAST 与本实验室已有的木质素降解模式菌—黄孢原毛平革菌全基因组进行序列比对, 未发现有同源性的片段; 再输入 Gene

AFLP Fingerprinting Analysis of *Pleurotus ostreatus* and Sequence Identification of The Polymorphic AFLP fragments

Major: Genetics

Master: Meng Yu

Supervisors: Prof Zhang Yizheng

Abstract

Pleurotus belongs to white-rot fungi. In addition to its value on edible, *Pleurotus* can secrete ligninolytic enzymes, laccases to oxidatively cleave lignin and aromatic pollutants. These enzymes are greatly potential in bio-pulping, bio-bleaching of pulp and treatment of environmental pollutants, etc. *Pleurotus ostreatus* which delegate the main characteristic of genus *Pleurotus* is the mode of the genus. Research in our laboratory have screened out some *Pleurotus* strains with high yield of ligninolytic enzymes, analyzed the activity and output of ligninolytic enzymes.

Studies were carried out in the following 5 aspects and corresponding results were obtained. Firstly, the optimal submerged culture and growth conditions for *P. ostreatus* were screened. It was shown that the best medium for *P. ostreatus* is CMA culture and the temperature is 25°C. Secondly, conditions of the AFLP fingerprinting analysis for *P. ostreatus* were tested and then 14 strains of *P. ostreatus* from different areas were analyzed with AFLP method. The results showed that the primer pairs E-3/M-3 especially E-AGC/M-CAT and E-AGC/M-ACC could give more amplified DNA fragments than others. Thirdly, from the fingerprinting map of the primer pair E-AGC/M-CAT, 184 clear and stable DNA bands were demonstrated, including 101 polymorphous bands that are accounted for 54.89%. Fourthly, the fragments of the strain *P. ostreatus* 8101 with

AFLP fingerprinting analysis were successfully purified and cloned in pMD18-T Vector. Then, two purified fragments were sequenced. Finally, The genetic distance of 14 strains was calculated and its dendrogram was performed based on AFLP data from 10 E-3/M-3 primer pairs.

Key words: *Pleurotus ostreatus* DNA fingerprinting map genetic diversity
polymorphic fragment AFLP phenrogram analysis

致 谢

在即将完成我的学业之际，我谨向这三年来在学习、研究及生活上给予我指点和帮助的每一位老师、同学和朋友们表示深深的感谢！

这篇论文是在导师张义正教授的悉心指导下完成的，在此首先向张老师表示衷心的感谢。张老师对科学事业执着追求的精神，对学习和科研上的严谨态度，使我在学业上获益良多；张老师对我的严格要求和谆谆教诲，也将是我今后人生道路上永远的财富。

在三年来的学习研究过程中，我得到了王海燕副教授、程昌凤副教授、刘德明副教授、赵云副教授、向永录老师的多方指导和启迪，在此表示真挚的谢意。

此外，我要特别感谢冯宗云师兄的大力相助；感谢师兄蒋昌顺、肖璐、孙迅、王刚、江鸣峰、董佳里、师弟汪松虎、王小强以及分子生物学实验室其他成员的技术支持和实验经验交流。

感谢廖问陶同学、王海力同学、胡国库同学、李昕同学、余风燕同学、牛冬云同学、王丽焕同学、巫雪燕同学、沈翼同学及其他同学给予我的各种关心、支持和爱护，对你们的帮助我会点滴铭记于心，永远不会忘记。

最后，感谢一直无私关爱、理解并支持我的家人。谨将此论文献给一直给予我巨大支持的父母和姐姐！

孟 宇

2003年5月

第一章 糙皮侧耳的生长速率比较和鉴定

摘 要

本研究选取 14 株不同产地、不同生长速度的糙皮侧耳菌株, 经由 PDA 固体培养和 CMA 液体培养对比, 以期获得能快速、大量产生糙皮侧耳菌丝体并无培养基杂质的方法。此外, 还对不同菌株的生长速度及影响糙皮侧耳生长的因素进行了分析比较, 初步鉴定了其中的快生型、慢生型菌株。经研究发现闽 31 生长速度最快; 义平、AX3、农大 11 等为生长较快的菌株; 佛罗里达、P17 生长速度最慢。为下一步 AFLP 分析种间多态性提供了良好的供提取总 DNA 用的模板, 并预期为分子生物学比较不同菌株多态性的实验结果提供形态学、生理学上的对照。

关键词: 糙皮侧耳 AFLP 多态性分析

1 引言

侧耳 (*Pleurotus*) 属于白腐真菌类; 糙皮侧耳 (*Pleurotus ostreatus*) 为侧耳属的模式种, 代表着该属的主要形态特征^{[26] [37]}。其主要分布在温带到亚热带地区, 生长迅速, 产量高, 味道鲜美, 营养丰富, 食用价值很高, 在世界各地广为栽培^[26]。除食用价值外, 本身还参与了自然界中木质素降解过程^[4]。

木质素是植物木质纤维素的主要成分之一, 它是植物细胞胞间层和初生壁的主要填充物, 其产量是仅次于纤维素的最为丰富的有机物, 通常在木质细胞中占 15-30%。从化学结构来看, 针叶树的木质素主要由松柏醇的脱氢聚合物构成愈创木基木质素; 阔叶树的木质素由松柏醇和芥子醇的脱氢聚合物构成愈创木基——紫丁香基木质素; 而草本植物则是由松柏醇、芥子醇和对香豆醇的脱氢聚合物和对香豆酸组成^{[10] [25]}, 从而使木质素成为结构复杂、稳定、多样的且难于被微生物降解的生物大分子物质。植物的生物质, 主要由木质素、纤

纤维素和半纤维素互相嵌和而成。木质素以衬质包裹着纤维素和半纤维素，且木质素沉积或填充于纤维素构成的微晶纤维中，这些都阻碍了纤维素的生物降解和利用。因此，木质素难于进行生物降解已经成为有效转化地球上最大可再生碳源即纤维素和半纤维素的重大障碍，进而成为地球生物圈中碳素循环的障碍^[24]。农作物秸秆因其含有大量的纤维素和半纤维素，产量丰富，现正在成为继木材之后的又一大造纸原料，同时还可以作为轻化工和清洁能源的原料。高温高压强碱法去除木质素是目前工业制备纤维素材料的主要手段，也是制浆造纸工业污染的主要来源和高能耗的关键，特别是以植物秸秆为原料的化学制浆工业所排出的黑液对环境危害尤大。通过酶法降解木质素的生物制浆工艺，有助于这一难题的解决^{[4][5]}，对改善生态环境，保护森林也同样具有重要作用。

现已知自然界参与木质素降解的微生物种类有真菌、放线菌和细菌，而真菌是最重要的一类。目前已发现的可降解木质素的真菌有苍烟管菌 (*Bjerkandera*)^{[9][13][21]}、香菇 (*Lentinula*)^[6]、射脉菌 (*Phlebia*)^{[8][15]}、平革菌 (*Phanerochaete*)^{[3][7][18][19][23]}、灵芝菌 (*Ganoderma*)^[16]、侧耳菌 (*Pleurotus*)^{[4][16][17][21]}、多孔菌 (*Polyporus*)^{[16][17]}、密孔菌 (*Pycnoporus*)^[14]、栓菌 (*Trametes*)^{[2][11][12]}等。根据真菌降解木质素时木材的变化，将其分为白腐真菌 (white-rot fungi)、褐腐真菌 (brown-rot fungi) 和软腐真菌 (soft-rot fungi)，其中大型担子真菌——白腐菌是目前已知的自然界中对木质素具有最强降解能力的一类真菌，它们也是已知唯一的在纯培养条件下能够将木质素最终矿化的微生物，它们还具有降解环境污染物的能力。虽然褐腐菌、软腐菌、放线菌和细菌也能在木质素降解过程中发挥一定的作用，但一般认为它们仅起二次性作用^[25]，因此白腐菌已成为研究木质素降解的首选微生物。它们可以通过分泌木质素过氧化物酶 (Lignin peroxidases, LiPs)、漆酶 (Laccases, Lacs)、锰过氧化物酶 (Manganese - dependent peroxidases, MnPs) 等从而有效地氧化木质素和芳香族污染物^[10]，最终将其矿化为二氧化碳和水，因此在生物制浆，纸浆生物漂白，环境保护，节约能源等方面有重要的研究意义和应用价值^[31]。

目前已有关于侧耳菌产生木质素降解酶的活性及产量等研究报道，并筛选出了相应的木质素降解酶高产菌株。本研究在此基础上选取 14 株糙皮侧耳，通过对其在固体和液体培养基上的不同条件下生长速率进行了对比，以在最短

时间内获得最多的培养产物，为进一步的研究提供大量的 DNA 样品。

2 材料与方法

2.1 菌株

实验菌株为 14 个未进行过原生质体融合的糙皮侧耳菌株：农大 11 (*P. ostreatus* Nongda11)、义平 (*P. ostreatus* Yiping)、佛罗里达 (*P. ostreatus* Florida)、AX3 (*P. ostreatus* AX3)、CCEF89 (*P. ostreatus* CCEF89)、8101 (*P. ostreatus* 8101)、闽 31 (*P. ostreatus* Min31)、杂优一号 (*P. ostreatus* Zayou No.1)、P17 (*P. ostreatus* p17)、侧 5 (*P. ostreatus* Ce5)、矮抗 558 (*P. ostreatus* Aikang558)、中蔬 10 号 (*P. ostreatus* Zhongshu No.10)、P46 (*P. ostreatus* P46)、杂 3 (*P. ostreatus* Za3)。所有实验菌株均购自四川省农科院菌种室。对照用黄孢原毛平革菌 1767 (*Phanerochaete chrysosporium* BKM-F1767)，由本实验室保存。

2.2 主要仪器

HPS-160 二层摇床，LRH-250A 生化培养箱。

2.3 培养基

PDA 培养基^[27] (1L):

去皮马铃薯	200g
蔗糖	20g
琼脂	1.5-20g
水	加至 1000mL
pH	自然

马铃薯去皮，切成块煮沸 30min，然后用纱布过滤，再加蔗糖和琼脂，加水至 1000 mL，121℃灭菌 20min。

CMA 培养基^[32] (1L)

MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5g
KH ₂ PO ₄	0.46g

K ₂ HPO ₄	1.0g
蛋白胨	2.0g
酵母膏	2.0g
葡萄糖	20.0g
琼脂	20.0g
浓 HCl	0.05mL
加水至	1000mL

121℃灭菌 20min。

2.4 菌株的培养

菌种的培养和保存, 将菌种接种于 PDA 斜面上, 25℃培养, 4℃冰箱保存, 6 个月转管一次。

2.4.1 固体培养基上生长速率对比实验

将待试菌分别接种于 PDA 培养基斜面上活化, 再将活化后的菌株接种于铺玻璃纸的 PDA 培养基平板上, 25℃加光照静置培养, 24h 后开始每隔 1d 记录其生长速度。

2.4.2 液体培养基上生长速度对比实验^[33]

在无菌条件下以大号打孔器在 PDA 培养基平板上取 1.0cm² 菌丝体接种于 100mL CMA 液体培养基中; 25℃-26℃, 200rpm 加光照摇瓶培养 120h。称取菌体重量。

2.4.3 不同温度对糙皮侧耳的生长速度影响^[33]

选取闽 31、义平、8101、矮抗 558、P17、佛罗里达共 6 株糙皮侧耳, 接种于 100mL CMA 液体培养基, 分别于 20℃、25℃、30℃下 200rpm 摇瓶培养 120h, 称取菌体重量。

3 结果

3.1 不同菌株在固体培养基上生长速率对比

根据不同菌株生长速度间有明显差异,记录其在平板上出现菌丝体的时间和菌丝体铺满平板时间,初步鉴定快生和慢生型菌株。实验结果见表 1.1。

表 1.1 不同菌株在固体培养基上生长速度比较

菌株	1d	2d	3d	4d	5d	6d	7d	8d
农大 11	*	+	+	++	++	+++	++++	++++
义平	*	+	+	++	++	++	+++	++++
佛罗里达	*	+	+	++	++	++	++	+++
AX3	+	+	++	++	+++	+++	++++	++++
CCEF89	*	+	+	+	++	++	+++	++++
8101	*	+	+	++	+++	+++	++++	++++
闽 31	+	+	++	++	+++	++++	++++	++++
杂优 1 号	*	+	+	+	++	++	+++	++++
P17	*	+	+	+	++	++	++	++
侧 5	*	+	+	++	++	+++	+++	++++
矮抗 558	*	+	+	++	++	+++	+++	++++
中蔬 10 号	*	+	+	++	++	+++	++++	++++
P46	*	+	++	++	++	+++	+++	+++
杂 3	*	+	++	++	+++	+++	+++	+++
1767 (对 照)	+	++	++	+++	++++	++++	++++	++++

*未出现菌丝体; + 出现菌丝体; ++ 菌丝体覆盖一半平板; +++ 菌丝体基本覆盖平板;

++++ 菌丝体完全覆盖平板

平板覆盖实验结果显示: 闽 31 生长速度最快, 农大 11、AX3、侧 5 也是生长较快的菌株。相反, P46、P17、佛罗里达生长速度较慢。对照菌——黄孢原毛平革菌 1767 生长速度较糙皮侧耳整体速度更快一些。

3.2 不同菌株在液体培养基上生长速度对比

各菌株在 0-48h 为其适应期, 接种菌丝体摇瓶后呈球状; 48h-96h 为增殖生长期, 菌丝体生长数量显著增加, 体现为球状菌丝体个数大大增加; 96h-120h 为稳定生长期, 球状菌丝体明显增大。实验结果见表 1.2。

表 1.2 不同菌株在液体培养基上培养 120h 后菌体重量

菌株	农大 11	义平	佛罗里达	A X 3	CC EF 89	81 01	闽 31	杂优 1 号	P1 7	侧 5	矮抗 558	中蔬 10 号	P4 6	杂 3
重量 (g)	1.41	1.89	0.44	1.82	0.92	1.45	2.13	1.07	0.29	1.06	1.21	0.88	0.73	0.85

液体培养实验结果进一步证实: 闽 31、AX3、义平为生长较快的品种, P17、佛罗里达生长较慢。在后期进一步的实验中要达到同样的菌体重量 (以 2.0g 为标准), 生长较快菌株只需要 120-168h, 而生长较慢菌株则需要 192-240h, 差异较为明显。

3.3 不同温度对糙皮侧耳的生长速度影响

以 20℃、25℃、30℃ 三组温度培养 120h, 观察不同菌株在液体培养中的生长速度, 获得的生物量见表 1.3。

表 1.3 不同温度下糙皮侧耳的生长量对比

菌株	闽 31	义平	8101	矮抗 558	佛罗里达	P17
20℃	1.82g	1.65g	1.31g	1.11g	0.29g	0.15g
25℃	2.13g	1.89g	1.45g	1.21g	0.44g	0.29g
30℃	1.99g	1.77g	1.29g	1.04g	0.31g	0.19g

由此可知, 糙皮侧耳的最适生长温度仍然和大多数真菌一样为 25℃。

4 讨论

4.1 不同培养基获得产物效率比较

本实验为在较短时间内获得大量的糙皮侧耳菌丝体，先后采用了 PDA 铺玻璃纸固体平板培养及 CMA 液体培养两种方法。两者相较而言，后一种方法获得糙皮侧耳产物的速度快，产量大，为下一步提取糙皮侧耳总 DNA 打下了良好基础。前一种方法为以往文献报道的常用方法，其优点是真菌菌丝体可以生长在玻璃纸上，获取产物时直接从玻璃纸上分离即可。这样非常方便且不会掺杂培养基。但是该方法菌株生长较缓慢，产量很低；通常一个平板需培养 8d 左右才能获得 0.05g-0.1g 菌丝体，不能满足本实验提取总 DNA 的产物要求。所以，本实验最终采用了 CMA 液体培养方法获得待测菌株产物。

4.2 其他条件对糙皮侧耳培养的影响

本实验对其他培养条件进行了比较：（1）CMA 液体培养基中添加少量玻璃珠进行摇瓶培养，可以明显加快菌株的增殖速度。这是利用玻璃珠在摇瓶时可以适当增加菌丝体与之的碰撞机会，加快菌丝体的分裂增殖，并为菌丝体最初的生长提供依附点。（2）糙皮侧耳的液体培养，通氧量也是比较重要的影响因素之一，摇瓶速度和装液量都不同程度对液体培养糙皮侧耳的产量有影响。经对菌株摇瓶实验对比，采用 250mL 三角瓶装培养液 100mL；前 48h 摇瓶速度 180rpm，后 72h-120 h 摇瓶速度 220rpm，生长效果最佳。

小 结

1. 采用 PDA 和 CMA 培养基, 对 14 个不同产地的糙皮侧耳菌株生长速度进行了初步比较。经鉴定可知, 闽 31、义平、AX3 为快生型的品种; 8101、矮抗 558、杂优 1 号、侧 5、中蔬 10 号、CCEF89 等次之; 佛罗里达、P17 为慢生型品种。

2. 通过不同培养基、培养温度、通氧量等对比实验, 确定了本实验糙皮侧耳的最适培养方式为液体培养, 糙皮侧耳的最适液体培养条件为: 25℃下, 250mL 三角瓶装 CMA 液体培养基 100mL, 前 48h 摇瓶速度 180rpm, 后 72h-120 h 摇瓶速度 220rpm, 光照培养。

第二章 糙皮侧耳的 AFLP 指纹分析及分析条件的优化

摘 要

首先对糙皮侧耳的 AFLP 分析条件进行了优化, 然后利用优化条件对 14 个来自我国不同地区的糙皮侧耳(*Pleurotus ostreatus*)菌株进行了 DNA 指纹图谱分析。结果表明, 在合成的 14 条引物的不同组合中, 引物对 E-3/M-3 可以产生较多的 DNA 多态片段, 特别是 E-AGC/M-CAT 效果最好, 利用此对引物共获得 184 条 DNA 扩增带, 多态性条带 101 条, 占 54.89%。在此基础上, 用 UPGMA 方法对所获数据进行聚类分析, 计算得出不同菌株之间的遗传距离, 绘制了指纹分析树状图。

关键词: 糙皮侧耳 AFLP 分析 DNA 指纹图谱 聚类分析

1 引言

AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) 是 1992 年由荷兰科学家 Zabeau 和 Vos 发展起来的一种检测 DNA 多态性的新方法^[22]。它是在 RFLP 和 RAPD 的基础上发展起来的, 是 RFLP 和 RAPD 的结合, 它克服了二者各自的缺点, 而集中了二者的长处。它既有 RFLP 的可靠性, 也具有 RAPD 的方便性^[20]。由于它具有重要的实用价值, 一出现就被 Keygene 公司以专利形式买下。由于 AFLP 较其它分子标记有着明显的优越性, 因此迅速传播开来, 尽管它已受到了专利保护, 但世界上很多实验室都在努力探索在自己的研究中应用 AFLP 技术。因此 Zabeau 和 Vos 不得不将其专利解密, 并以论文形式正式发表出来^[22]。AFLP 被认为是迄今为止最有效的分子标记之一, 不管所研究的基因组 DNA 有多么复杂, 从理论上讲, 用 AFLP 方法都可以检测出任何 DNA 之间的多态性^[30]。

AFLP 反应程序主要包括模板 DNA 制备, 酶切片段扩增、凝胶电泳和聚类分析 3 个步骤:

1. 模板 DNA 制备。在进行 AFLP 分析时, 首先要制备高分子量(HMW)基因组 DNA。然后用两种限制性内切酶酶切, 通常一种酶的识别位点是 6 个碱基, 另一种是 4 个碱基, 如 *EcoRI* 和 *MseI*。选择这样两种酶共同酶切可以产生比较小的酶切片段, 经过 PCR 反应扩增出的 DNA 片段长 100-1500bp。HMW 基因组 DNA 的成功制备和避免部分降解是 AFLP 成功的关键, 在制备过程中要特别注意避免核酸酶及各种失活物质的污染。

DNA 酶切完成后, 经加热使限制性内切酶失活, 再把酶切片段连结到特定的接头(adapter)上, 形成扩增反应的模板。经过连接反应, 接头和基因组 DNA 酶切片段的粘性末端之间进行碱基配对并接连在一起, 该接头及其毗邻的酶切位点这段共同顺序就存在于所有限制性酶切片段的两端, 成为以后进行 PCR 扩增时引物的结合位点。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。已有报道使用过的 6 碱基内切酶接头, 除 *EcoRI* 外, 还有 *PstI* 接头和 *SacI* 接头; 4 碱基内切酶接头除 *MseI* 外, 还有 *Taq I* 接头和 *SseI* 接头。

2. 酶切片段的扩增。在酶切片段中接上去的接头及其毗邻的酶切位点序列就成为以后 PCR 扩增时引物结合的位点。在 AFLP 反应中, 引物的 3' 末端有 1~3 个选择性核苷酸序列。酶切片段结合位点中能够与引物上的选择性核苷酸适当配对, 被识别后用作模板而选择性地扩增出来。AFLP 引物是一种人工合成的单链寡核苷酸, 一般长度为 18-20 个核苷酸。由核心序列(Core)、内切酶位点特异序列(ENZ)和选择性核苷酸序列(EXT)三部分组成。在 AFLP 引物中, 3' 末端上选择性核苷酸数目的多少决定了 AFLP 扩增产物的多少。实验中可根据基因组 DNA 的大小确定引物末端所需的选择性核苷酸数目。一般大于 10^8 bp 的基因组 DNA 可以用 3 个选择性核苷酸; $10^5 \sim 10^8$ bp 的基因组 DNA 可以用 2 个选择性核苷酸。其它 6 碱基内切酶引物与 *EcoRI* 引物类似, 4 碱基内切酶引物与 *MseI* 引物类似, 只是各自的内切酶位点特异序列彼此不同。

3. 扩增反应的条件。酶切片段要经过连续 2 次 PCR 扩增, 通过这样两步扩增反应使产生的扩增结果更清楚、重复性更好。第 1 次 PCR 扩增被称为预扩增反应(Pre-amplification), 所用的 AFLP 引物只含有 1 个选择性核苷酸, 选

择扩增性能较差,因此大量的扩增产物在凝胶中往往形成连续的一片。预扩增反应条件与常规 PCR 反应条件大致相同。预扩增反应的产物经过大量稀释后用作第 2 次扩增反应(即选择性扩增反应, Selective amplification)的模板。选择性扩增反应所用的引物中选择性核苷酸数目的多少是决定扩增产物多少的主要因子。另外,引物中用作选择性核苷酸的 G 和 C 含量也对扩增出的产物数目有较大影响。一般而言, G 和 C 含量越高,扩增出的产物数目越少。选择性扩增的反应条件与普通 PCR 有所不同,主要不同之处是复性温度,它是采用温度梯度 PCR,其 PCR 开始于高温复性(一般采用 65℃,比常规 PCR 反应的复性温度高 10℃)以期获得最佳选择性。以后复性温度逐步降低,一直降到复性效果最好的温度(一般是 56℃),然后保持在这个温度下复性,完成其余的 PCR 循环周期。

扩增产物的凝胶电泳分析。选择性扩增产物一般在 5%~6%的变性聚丙烯酰胺凝胶(PAGE 序列分析胶)或 2%琼脂糖凝胶上经过电泳分离,形成 DNA 指纹,凝胶再经过聚类分析软件进行结果分析。

侧耳 (*Pleurotus*) 属于白腐真菌类,除了具有食用价值外,因其可以通过分泌木质素降解酶、漆酶等从而有效地氧化木质素和芳香族污染物,最终将其矿化为二氧化碳和水,因此在生物制浆,纸浆生物漂白,环境保护,节约能源等方面有重要的研究意义和应用价值^[31]。糙皮侧耳(*Pleurotus ostreatus*)为侧耳属的模式种,代表着该属的主要形态特征^{[26] [37]}。目前已有关于侧耳菌产生木质素降解酶的活性及产量等研究报告^{[29] [35]},并筛选出了相应的木质素降解酶高产菌株^[36]。目前有关侧耳的 AFLP 分析未见报道。本研究意在制作糙皮侧耳的指纹图谱,利用其遗传多样性为进一步研究已选育出的高产木质素降解酶菌株,克隆高效表达的木质素降解酶基因提供分子标记。

2 材料和方法

2.1 实验材料

实验菌株为 14 个未进行过原生质体融合的糙皮侧耳菌株,详见第一章。

实验使用的 *Mse* I、*Eco*R I 购自上海生工(Sangon)公司,dNTP、T4 DNA 连接酶、Taq DNA 聚合酶购自大连宝生物工程公司,所使用引物由北京赛百盛

公司合成。

2.2 主要实验仪器

UV-265 可见紫外分光光度计 (日本 Shimadzu Inc.); PTC-100™ PCR 扩增仪 (Programmable Thermal Controller, 美国 M J. Research. Inc.); UVPs GDS8000 型凝胶分析系统 (Gel Documentation and Analysis System)

2.3 实验方法

2.3.1 模板 DNA 的提取

模板 DNA 的制备按已述方法^[1]进行。获得模板 DNA 后, 经紫外分光光度计、琼脂糖凝胶电泳检测合格后, 调整浓度为 $300\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 备用。

2.3.2 模板 DNA 的酶切

每个 DNA 样品酶切混合液总体积为 $20 \mu\text{L}$, 包括: 模板 DNA 500ng , $10 \times$ buffer $2.0 \mu\text{L}$, *EcoR* I 2.0U , 37°C 保温酶切 3h , 70°C 保温 15min 终止反应。DNA 片段纯化后再加入 *Mse* I 2.0U , $10 \times$ buffer $2.0 \mu\text{L}$, 65°C 保温酶切 3h , 80°C 保温 20min 终止反应, -20°C 保存。

2.3.3 DNA 片段和接头的连接

每个样品反应体积为 $50 \mu\text{L}$, 包括: 双酶切模板 DNA 500ng , $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ *Mse* I 接头 $2.0 \mu\text{L}$, $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ *EcoR* I 接头 $2.0 \mu\text{L}$, T4 DNA 连接酶 2.0U , $10 \times$ buffer $5 \mu\text{L}$, 18°C 连接 2h 。取连接产物 $10 \mu\text{L}$, 按 1:10 比例用 TE buffer 稀释后用于预扩增反应。其余的 -20°C 保存。

2.3.4 AFLP 预扩增反应

参考 GIBCO-BRL 公司的真菌 AFLP 试剂盒说明, 采用不含选择性碱基 (+0) 的预扩增引物, 每个样品反应体积为 $51 \mu\text{L}$, 包括: 模板 DNA $5.0 \mu\text{L}$, $100 \text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ Primer E-0 $1.0 \mu\text{L}$, $100 \text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ Primer M-0 $1.0 \mu\text{L}$, *Taq* DNA 聚合酶 2.0U , $10\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ dNTP $1.0 \mu\text{L}$, $10 \times$ PCR buffer $5.0 \mu\text{L}$, $250 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MgCl_2 $5.0 \mu\text{L}$, dd H_2O $32 \mu\text{L}$ 。

反应条件：94℃变性 30s，56℃退火 30s，72℃延伸 60s，共 20 个循环。预扩增反应后，取 3 μL 反应产物按 1:50 用 TE buffer 稀释作为选择性扩增反应模板。其余的-20℃保存。

2.3.5 AFLP 选择性扩增反应

经反复对比验证，本研究采用 3+3 引物组合，即 EcoR I 和 Mse I 选择性扩增引物均含 3 个选择性碱基。每个样品反应体积为 20 μL，包括：模板 DNA 5.0 μL, 100ng. μL⁻¹ Primer- E 0.4 μL, 100ng. μL⁻¹ Primer- M 0.4 μL, Taq DNA 聚合酶 1.0U, 10mmol . μL⁻¹ dNTP 0.4 μL, 10×PCR buffer 2.0 μL, 250 mmol . L⁻¹ Mg Cl₂ 2.0 μL。

采用梯度 PCR 方法，其反应条件为：起始反应温度 94℃ 变性 30s，68℃ 退火 30s，72℃ 延伸 60s；以后每个循环中的退火温度逐次降低 1℃，经 13 个循环后降至 56℃，其余条件不变，再进行 23 个循环。

2.3.6 扩增产物的凝胶分析

扩增 DNA 用 2%琼脂糖凝胶电泳，0.5%溴乙锭溶液染色，GDS 照相。

3 结果

3.1 模板 DNA 制备及酶切

模板 DNA 参照文献^[1]的方法制备。与其他已见报道的真菌基因组 DNA 制备方法相比，按该方法提取的基因组 DNA 速度较快，带清晰，无降解，无 RNA 污染；说明这种方法更适合于糙皮侧耳基因组。经紫外分光光度计测定结果 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值在 1.8 左右，DNA 纯度较高，完全能满足 AFLP 分析的要求。

按 AFLP 分析要求采用了常见酶切位点酶 (*EcoR* I) 和稀有酶切位点酶 (*Mse* I) 双酶切。*EcoR* I 的最佳酶切温度为 37℃，但 *Mse* I 的最佳酶切温度为 65℃，在 37℃时仅有 10%的酶活。所以本实验对同时双酶切和单酶切-沉淀-单酶切方式进行了对比，从电泳结果来看后者酶切更为彻底。酶切产物片段大小分布在 50-1600bp 之间，符合 AFLP 分析对酶切片段大小的要求。

3.2 模板 DNA 片段与接头的连接

模板 DNA 片段 EcoR I、Mse I 接头混合，16℃连接过夜。连接效率的高低主要取决于 T4 DNA 连接酶的活性。用 2U 比用 1U T4 DNA 连接酶的连接效果好，主要体现在连接物预扩增效果较好。EcoR I、Mse I 接头序列如下^[34]：

EcoR I 接头：5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3'
3'-CATCTGACGCATGGTTAA-5'

Mse I 接头：5'-GACGATGAGTCCTGAG-3'
3'-TACTCAGGACTCAT-5'

3.3 糙皮侧耳 AFLP 反应条件的优化

本实验的预扩增反应采用不带选择性碱基的 E-0 和 M-0 为引物。其序列如下：

E-0 的碱基序列为 5'-GACTGCGTACCAATTC-3'
M-0 的碱基序列为 5'-GATGAGTCCTGAGTAA-3'

凝胶电泳结果显示，预扩增片段呈弥散型，分布范围在 100-1500bp 之间，扩增信号强，各样品间一致性较好，实验结果见图 2.1。为选择性扩增提供了理想的模板，同时也说明前述的基因组 DNA 的提取、酶切、连接是符合实验要求的。

在选择性扩增反应中，一般认为 EcoR I /Mse I 组合适用于较小的基因组，通常较好的真菌的引物组合为 E-2/M-1 的组合形式。所使用的选择性扩增引物是在预扩增反应使用引物的 3' 端再增加 1-3 个选择性碱基，即：

EcoR I 引物 5'-GACTGCGTACCAATTC NNN-3'
Mse I 引物 5'-GATGAGTCCTGAGTAA NNN-3'
(其中 N 表示任何碱基，数量为 1-3 个)

在本实验中，对多种引物组合的扩增效率进行了比较，以获得糙皮侧耳

AFLP 扩增的最佳引物方案。部分引物扩增效率对比实验结果见图 2.2。结果表明：E-3/M-3 引物组合扩增获得的片段数量最多，清晰度高，片段大小分布也较均匀。引物 E-2/M-0、E-2/M-1 及 E-2/M-3 组合所得的扩增片段均存在效果较差，片段区域分布不均等问题。在改变了 DNA 提取方法，加长酶切时间，改变扩增反应的复性温度等实验条件后，最终最佳效果仍然为 E-3/M-3 组合方式，这可能与作为大型真菌的侧耳菌基因组大小，及本身的核苷酸组成特异性有关。

该图显示，对糙皮侧耳菌株农大 11 和 8101 使用不同引物获得的扩增结果均可分为 3 类：第 1 类是第 2、3、9、10 道，使用引物组合为 E-2/M-1；第 2 类是第 4、5、11、12 道，使用引物组合为 E-2/M-3；第 3 类是 6、7、13、14 道，使用引物组合为 E-3/M-3。这 3 类引物的扩增效率总体呈梯度增长的形式，第 1 类引物组合扩增出的片段极少；第 2 类引物组合扩增出的片段数目部分较多，但是总体效果来看扩增效率不稳定，且分布也不均匀；第 3 类引物组合获得的片段最多，分布也较均匀。因此，本实验最终选择了 E-3/M-3 的引物组合形式。

进一步对任意的 E-3/M-3 引物组合所获扩增效果进行了比较，实验结果见图 2.3 - 图 2.9。发现 E-AGC/M-CAT 和 E-AGC/M-ACC 扩增效果最佳，E-ACG/M-CAT、E-AGC/M-CTC 其次。

3.4 糙皮侧耳的 AFLP 分析

用 E-3/M-3 引物对 14 个糙皮侧耳基因组 DNA 的限制酶切片段进行选择性的扩增，获得了清晰的 DNA 指纹图谱，片段大小在 150~1500bp 间。使用 E-AGC/M-CAT 扩增的实验结果见图。该指纹图谱扩增条带清晰可辨，信号强，扩增强度基本一致，扩增片段密度比较均匀，无背景干扰。我们可以将该图分为 3 个区域：I 区为大片段区，分布范围为 1500bp-600bp，该区多态性最强；II 区为 600bp-200bp，该区多态性较 I 区有所减弱；III 区为 200bp 以下，该区多态性最低。

选用该对引物进行的选择性扩增共获得 184 条条带，其中共有条带 83 条，这可能是侧耳属的基本带；获得多态性条带 103 条，多态性比率为 54.89%，

说明糙皮侧耳具有很大的遗传多样性。图 2 的结果列于表 1。但每一个品种都有其特异性条带或特异性缺失条带与其他种类相区分,这些特异带或缺失带可能可以作为识别不同菌株的分子标记。如在不同引物对组合获得的扩增结果中,均发现侧 5 的特异带(特异性缺失带)最多,数目远高于其他参比菌株,表明其在亲缘关系上与其他品种关系较远,这可能是由于它与其它菌种的基因交流相对较少所造成的。而义平、闽 31 所获得的绝大多数条带均相同,特异性条带相对最少,说明了这两个品种的亲缘关系很近,且在一定程度上反映了两者间的比较频繁的基因交流。

表 2.1 糙皮侧耳菌株的特异性 DNA 条带统计

<i>P. ostreatus</i> 菌株名称	扩增带数	特异性条带数	多态性比率
农大 11	16	2	
义平	17	1	
佛罗里达	11	1	
AX3	12	1	
CCEF89	8	0	
8101	13	0	
闽 31	10	1	54. 89%
杂优一号	13	0	
P17	11	0	
侧 5	13	4	
矮抗 558	14	1	
中蔬 10 号	16	3	
P46	13	1	
杂 3	17	1	
共计	184		

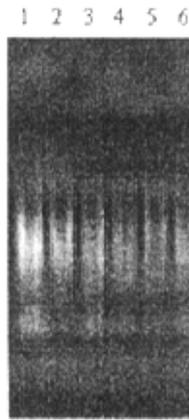


图 2.1 部分糙皮侧耳样品预扩增产物电泳结果

采用末端不带选择性碱基的 E-0/M-0 为引物。

- 1 农大 11 2 8101 3 义平
4 AX3 5 杂优 1 号 6 矮抗 558

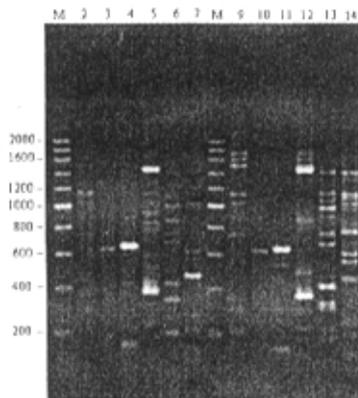


图 2.2 不同引物的 AFLP 扩增结果比较

M 为 DNA 梯度 Marker, 200bp-2000bp

第 2-7 和 9-14 道为 DNA 样品农大 11 和 8101

使用引物顺序为: 2/9 E-AC/M-T 3/10 E-AA/M-G

4/11 E-AA/M-ACC 5/12 E-AC/M-CAG

6/13 E-AGC/M-CAT 7/14 E-AGC/M-CAA

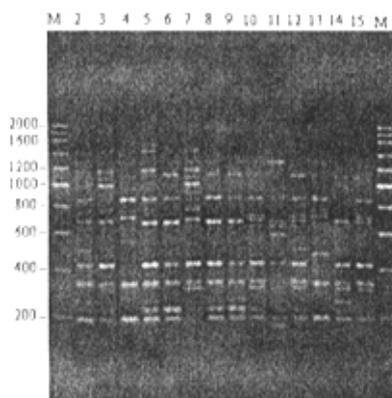


图 2.3 引物对 E-AGC/M-CAT 获得的糙皮侧耳 AFLP 指纹图谱

M 为 DNA 梯度 Marker, 200bp-2000bp

第 2-15 道为侧耳样品扩增结果: 2 农大 11 3 义平

4 佛罗里达 5 AX3 6 CCEF89 7 8101

8 闽 31 9 杂优 1 号 10 P17 11 侧 5

12 矮抗 558 13 中蔬 10 号 14 P46 15 杂 3

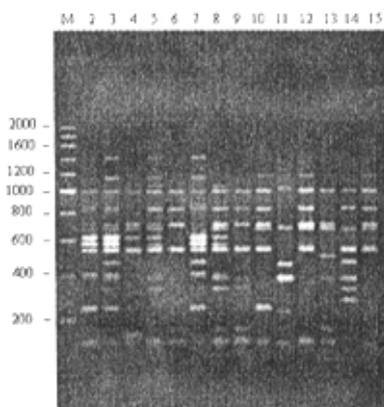


图 2.4 引物对 E-AGC/M-ACC 获得的糙皮侧耳 AFLP 指纹图谱

M 为 DNA 梯度 Marker, 200bp-2000bp

第 2-15 道为侧耳样品扩增结果: 2 农大 11 3 义平

4 佛罗里达 5 AX3 6 CCEF89 7 8101

8 闽 31 9 杂优 1 号 10 P17 11 侧 5

12 矮抗 558 13 中蔬 10 号 14 P46 15 杂 3

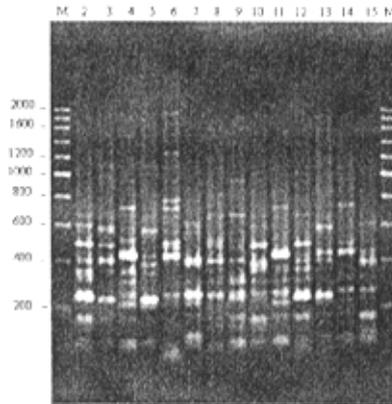


图 2.5 引物对 E-ACG/M-CAT 获得的糙皮侧耳 AFLP 指纹图谱

M 为 DNA 梯度 Marker, 200bp-2000bp

第 2-15 道为侧耳样品扩增结果: 2 农大 11 3 义平
 4 佛罗里达 5 AX3 6 CCEF89 7 8101
 8 闽 31 9 杂优 1 号 10 P17 11 侧 5
 12 矮抗 558 13 中蔬 10 号 14 P46 15 杂 3

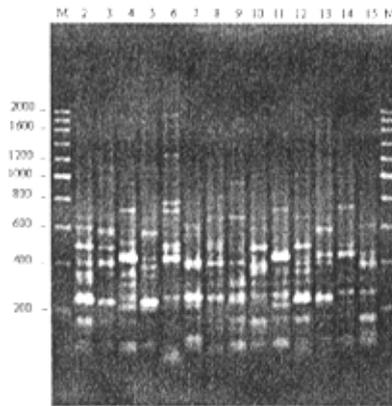


图 2.6 引物对 E-AGC/M-CTC 获得的糙皮侧耳 AFLP 指纹图谱

M 为 DNA 梯度 Marker, 200bp-2000bp

第 2-15 道为侧耳样品扩增结果: 2 农大 11 3 义平
 4 佛罗里达 5 AX3 6 CCEF89 7 8101
 8 闽 31 9 杂优 1 号 10 P17 11 侧 5
 12 矮抗 558 13 中蔬 10 号 14 P46 15 杂 3

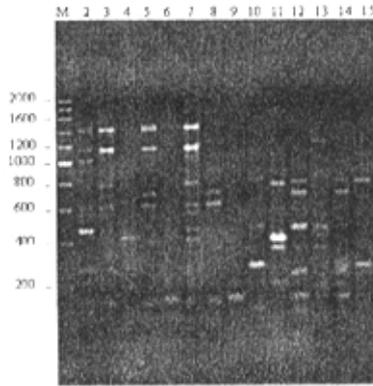


图 2.7 引物对 E-AGC/M-CAA 获得的糙皮侧耳 AFLP 指纹图谱

M 为 DNA 梯度 Marker, 200bp-2000bp

第 2-15 道为侧耳样品扩增结果: 2 农大 11 3 义平
 4 佛罗里达 5 AX3 6 CCEF89 7 8101
 8 闽 31 9 杂优 1 号 10 P17 11 侧 5
 12 矮抗 558 13 中蔬 10 号 14 P46 15 杂 3

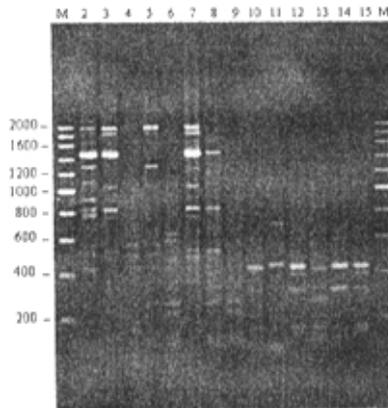


图 2.8 引物对 E-AGC/M-CAC 获得的糙皮侧耳 AFLP 指纹图谱

M 为 DNA 梯度 Marker, 200bp-2000bp

第 2-15 道为侧耳样品扩增结果: 2 农大 11 3 义平
 4 佛罗里达 5 AX3 6 CCEF89 7 8101
 8 闽 31 9 杂优 1 号 10 P17 11 侧 5
 12 矮抗 558 13 中蔬 10 号 14 P46 15 杂 3

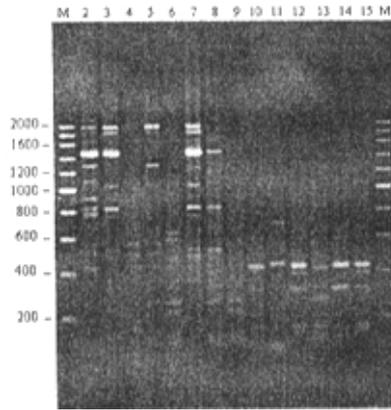


图 2.9 引物对 E-ACG/M-CAG 获得的糙皮侧耳 AFLP 指纹图谱

M 为 DNA 梯度 Marker, 200bp-2000bp

第 2-15 道为侧耳样品扩增结果: 2 农大 11 3 义平

4 佛罗里达 5 AX3 6 CCEF89 7 8101

8 闽 31 9 杂优 1 号 10 P17 11 侧 5

12 矮抗 558 13 中蔬 10 号 14 P46 15 杂 3

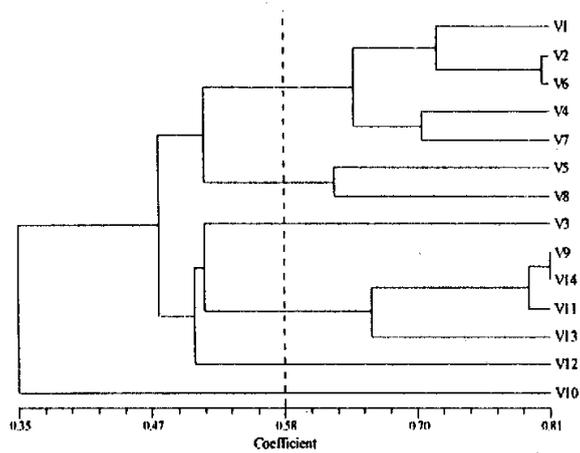


图 2.10 糙皮侧耳的指纹图谱数值分析树状图

V1 农大 11, V2 义平, V3 佛罗里达, V4 AX3, V5 CCEF89, V6 8101,
 V7 闽 31, V8 杂优一号, V9 P17, V10 侧 5, V11 矮抗 558, V12 中蔬 10 号,
 V13 P46, V14 杂 3.

3.5 糙皮侧耳亲缘关系分析

使用 NTSYS2.0 分析软件对所获数据进行聚类分析。条带存在记为 1, 条带缺失记为 0, 采用 DICE 系数对 14 个糙皮侧耳菌株的 PCR 产物进行相似性系数计算, 再使用 UPGMA 法(Un weighted Pair Group Method Using Arithmetic Average) 获得 AFLP 指纹图谱分析树状图, 见图 2.10。

从图 2.10 可以看出, 侧 5 最早与其他样本分开, 表明它与其他糙皮侧耳亲缘关系相对较远, 这与侧 5 本身是 14 个样品中唯一的耐高温菌株这一生理特点相符, 所以这种较大差异可能是侧 5 是耐高温品种的一个分子依据。除侧 5 外, 其他样品可以分为 4 组。第 1 组为农大 11、义平、8101、AX3 和闽 31, 为快生型菌株组, 与第一章所测定的 AX3、闽 31 和义平为生长速度最快的菌株这一表型性状相符合。另外, 义平和闽 31 的地理分布区重叠, 形态相近, 这也与聚类分析树状图符合。说明 AFLP 指纹分析对相关性较高的菌株分群具有一定的参考价值。第 2 组为 CCEF89 和杂优一号。第 3 组为佛罗里达、P17、杂 3、矮抗 558 和 P46, 其中 P17 和杂 3 的相似性系数最高, 达到了 81.2%, 表明这两个品种具有较高的相关性。中蔬 10 号自成一组, 说明它与其他种亲缘关系较远。

4 讨论

4.1 影响糙皮侧耳 AFLP 分析的因素

有很多因素会影响 AFLP 的分析效果, 其中 DNA 的质量是该分析的关键。此外, 酶切是否彻底、连接的效果及模板 DNA 受外来污染等也会直接影响到 AFLP 的分析结果。酶切不充分, 容易产生假阳性, 重复性差, 出现高分子量的带多, 这样的结果不能代表 DNA 的多态性^[20]。连接不完全则导致引物极少与底物相匹配, 易使实验失败。模板 DNA 受外来污染会导致假阳性或假阴性。预扩增是检测酶切和连接的必要手段, 预扩增片段如范围窄而小说明酶切不完全或连接效率低, 不能作为模板使用。本实验预扩增反应产物大小为 100bp-1500bp, 产物量较大, 种间一致性较好。选择性扩增的主要影响因素为 Taq DNA 聚合酶的质量, Taq DNA 聚合酶活性强, 信号扩增就随之增强, 反之减弱。本实验中较以往文献适当加大了 Taq DNA 聚合酶的用量, 以保证最

佳扩增效果。此外，本实验对同一样本进行多次重复检测，结果表明，其电泳谱带完全相同，说明接头、扩增反应模板在一定范围内变动，扩增结果不受影响。本实验采用 2%琼脂糖凝胶电泳代替 5%聚丙烯酰胺凝胶电泳，虽然其分辨率不高，但可以减少一些难以确定的弱带，提高弱带的读取率。此外，为了避免图谱模糊，较以往文献适当提高了选择性扩增的初始复性温度，以获得最佳选择性，但还是存在扩增产物中有少量大小接近的片段分离效果不够好。

4.2 AFLP 分析在糙皮侧耳研究中的应用前景

糙皮侧耳（俗称平菇），属于侧耳属，是我国最大的食用菌类之一，不仅在不同品种间存在形态差异，而且易和韧伞属的凤尾菇韧伞、侧耳属的其他几种食用菌在形态上发生混淆^[26]。对糙皮侧耳进行 AFLP 分析确立其指纹图谱将有助于从分子生物学角度准确识别菌种，有效利用不同糙皮侧耳品种的优势，进一步开发其栽培价值，促进生产的发展。

利用 AFLP 分析研究糙皮侧耳不仅可以探究品种之间的亲缘关系和揭示其进化演变的联系，还可以进一步进行基因定位等，如为研究糙皮侧耳高产木质素降解酶基因提供分子标记等。

小 结

1. 利用 AFLP 技术建立了糙皮侧耳的 DNA 指纹图谱。并进一步通过聚类分析，证实了 AFLP 指纹分析与表型性状分析的一致性。其中某些菌株扩增出的多态性片段，体现了该菌株的独有生理特性。
2. 在已报道适合真菌进行 AFLP 分析的实验条件基础上，针对糙皮侧耳的基因组大小和特点对 AFLP 引物、反应温度进行了筛选和优化。经对比发现 E-3/M-3 为最适合糙皮侧耳的引物组合，其中引物对 E-AGC/M-CAT、E-AGC/M-ACC 扩增效果最好。选择性扩增的最适初始退火温度为 68℃，以后每个循环退火温度依次下降 1℃，13 个循环后降至 56℃；同时保持其他反应条件不变，在此条件下获得的选择性最佳。

第三章 AFLP 多态性片段的分析

摘 要

本研究在摸索和优化了糙皮侧耳 AFLP 分析体系的基础上, 发展了多态性 AFLP 产物的克隆方法。将部分 AFLP 选择性扩增片段直接进行纯化回收, 与 pMD18-T Vector 连接后, 转入 *Escherichia. coil*, 通过菌落 PCR 和常规提取重组子质粒为模板的 PCR 检测后, 选取其中两个多态性片段进行了序列测定。经序列分析发现其中一个多态性片段中包含了阅读框。

关键词: AFLP 片段 糙皮侧耳 序列分析

1 引言

前文已述, DNA 指纹技术 (DNA fingerprinting technique) 在遗传连锁图的绘制和鉴定与目标基因连锁的分子标记中起着重要作用。AFLP 是在 RFLP 和 RAPD 的基础上发展起来的最新的 DNA 指纹技术之一^[22], 它从原理上结合了 RFLP 和 RAPD 的优点, 通过对基因组 DNA 的限制性酶切片段进行选择性的扩增而揭示多态性。AFLP 技术自 1995 公布以来, 以其稳定性和强有力的多态检出率而受到分子生物学家们的关注, 迅速得到了广泛的应用^[30]。

作为新一代的 DNA 指纹技术, AFLP 能够检测样品间的细微差别而显示多态性, 这些多态性 AFLP 产物经分离和克隆后, 能在更深入的遗传学研究中发挥更大的作用。目前已有对水稻、玉米等作物的 AFLP 多态性片段进行回收和鉴定的报道。前文已述, 本实验室已经选育出木质素降解酶的高产糙皮侧耳菌株, 本研究对高产菌株的多态性片段进行回收并测序, 以便进一步筛选控制高产木质素降解酶的基因相关的分子标记。

2 材料与方 法

2.1 实验材料

糙皮侧耳(*P. ostreatus*)菌株 8101, *E. coil* JM-109。

2.2 主要实验仪器及试剂

主要仪器：同第二章。

主要试剂：pMD18-T Vector 购自大连 TAKARA 公司，*Taq* DNA 聚合酶、柱式 PCR 产物回收试剂盒购自上海上海生工公司，其他试剂为国产分析纯试剂。

2.3 培养基

LB 培养基^[28] (1000mL):

Triton 10g

Yeast 5g

NaCl 10g

用 5mol/L NaOH 调节 pH 为 7.0

加 dH₂O 定容至 1000mL。121℃高压灭菌 20min。

LM 平板^[28]:

在 LB 培养基中加入琼脂糖，使其终浓度为 1.6%，制备平板时加入 AP，使终浓度为 75 μg/mL。

SOB 培养基^[28] (300mL):

Triton 6g

Yeast 1.5g

5M NaCl 0.6mL

2M KCl 0.375mL

100× Mg²⁺ 3mL

NaOH 调节 pH 至 7.0

加 dH₂O 定容至 300mL。

SOC 培养基:

在 SOB 培养基高压灭菌后冷却至 60℃ 以下时加入 20mL 无菌的 1mol/L 葡萄糖溶液, 使终浓度为 20mmol/L。

2.4 实验方法

2.4.1 PCR 产物的纯化

采用上海生工 UNIQ-10 柱式 PCR 产物纯化试剂盒纯化。

2.4.2 多态性 DNA 片段的克隆

2.4.2.1 感受态细胞的制备^[28]

菌种的活化: 取单菌落接入 2mL LB, 37℃ 培养过夜, 再划平板, 再取单菌落接入 2mL LB 过夜培养。

转移过夜培养的菌液 0.5mL 于 50mL SOB 培养液中(于 250mL 三角瓶中), 置摇床上 18℃ 剧烈震荡培养 18-24h, 测得 $A_{600}=0.6$ 。取出三角瓶冰浴 10min, 转移菌液至 50mL 离心管中, 4000rpm 离心 9min。沉淀悬浮于冰冻的 15mL TB 缓冲液中, 冰浴 10min, 2000rpm 离心 15min。沉淀再次悬浮于 4mL TB, 加 250 μ L 冰冻的 DMSO, 轻摇混匀, 终浓度为 7%。冰浴 15min, 分装每一 EP 管 600 μ L, 液氮保存 5min 以上。

2.4.2.2 连接

反应体系共 10 μ L, 包括: 4 μ L 纯化 PCR 产物, 1 μ L pMD18-T Vector, 5 μ L 连接液。16℃ 反应 45min, 全量转化至 *E. coli* JM109 感受态细胞中。pMD18-T Vector 结构图见图 3.1。

2.4.2.3 转化^[28]

小心取出感受态细胞冰浴融化, 每一 EP 管分装 200 μ L, 冰浴。将 1-10 μ L 质粒或连接 DNA (连接 DNA 要稀释 5 倍, 质粒只需 1 μ L) 与融化细胞混合, 冰浴 30min。放入 45℃ 热水浴中热冲击 30s, 继续冰浴。加入 800 μ L SOC 混合, 37℃ 震荡培养 60min。4000r/5min, 吸尽上清, 溶沉淀于 50 μ L ddH₂O 中, 涂布于 LM (含 AP 50 μ g/mL) 平板过夜培养。

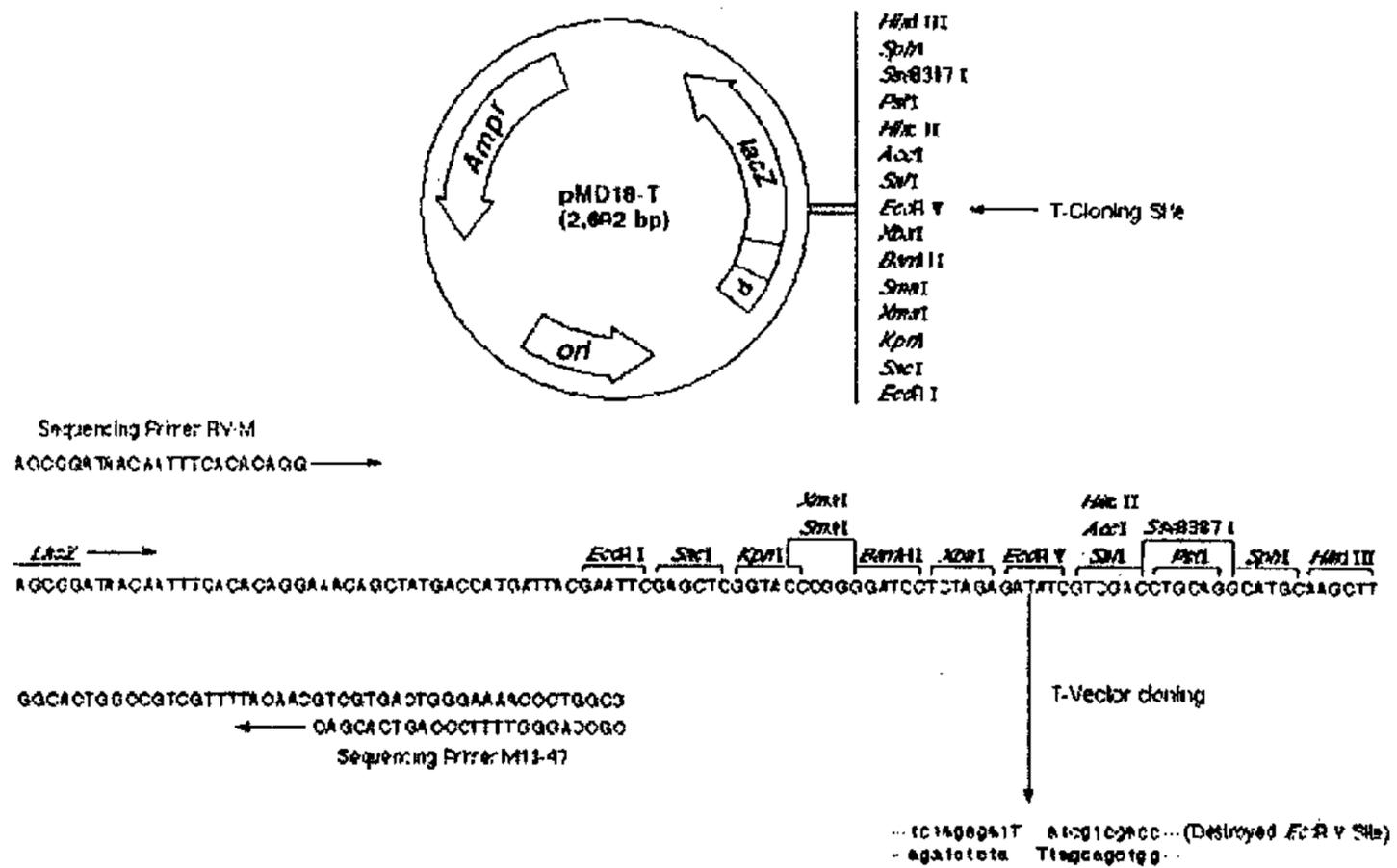


图 3.1 pMD18-Tvector 结构图

2.4.3 菌落 PCR 快速检测^[28]

用牙签挑取重组子菌落，迅速与不含 *Taq* DNA 聚合酶的 PCR 扩增缓冲液混合后，再加入 *Taq* DNA 聚合酶，先在 94℃ 高温温育 5min，然后 94℃ 变性 30s，56℃ 退火 30s，72℃ 延伸 60s，循环 30 次，最后再 72℃ 延伸 5 min。每个反应体系 10 μL，包括：10×PCR buffer 1.0 μL，*Taq* DNA 聚合酶 1.0 U，10mmol·L⁻¹ dNTP 0.2 μL，250 mmol·L⁻¹ Mg Cl₂ 1.0 μL，ddH₂O 7.6 μL。

2.4.4 质粒的提取及 PCR 重新扩增

将菌种接种于 2ml LB 培养基中，37℃ 震荡过夜培养。取 1.5ml 培养基于 1.5 或 2ml EP 管中，离心 10,000rpm 离心 30s，吸尽上清，加入 Sln1 100 μL 混匀（混匀后溶液应变混浊）。再加入 Sln2 200 μL，混匀（溶液应变清，未澄清的 EP 管倒置，避免剧烈震荡）。最后加入 Sln3 150 μL，颠倒混匀（溶液不再粘稠）。4℃ 放置 10min，10,000rpm 离心 5min（先摇匀再放入离心机）。上清

用 2 倍体积无水乙醇沉淀, 4℃放置 25min (或-20℃15min); 10,000rpm 离心 3min, 去上清后沉淀溶于 100 μ L dd H₂O, 37℃15min。加 ddH₂O 至 200 μ L, 加 1/10 体积 3mol/L KAC, 2 倍体积无水乙醇, 于-20℃沉淀 25min。10,000rpm 离心 5min, 70%乙醇洗涤, 彻底干燥。加 50 μ L ddH₂O 溶解沉淀。

以提取质粒为模板, 进行 PCR 反应, 循环条件同菌落 PCR 检测。每个反应体系为 10 μ L, 包括 10 \times PCR buffer 1.0 μ L, *Taq* DNA 聚合酶 1.0 U, 10mmol . μ L⁻¹ dNTP 0.2 μ L, 250 mmol . L⁻¹ Mg Cl₂ 1.0 μ L, ddH₂O 7.6 μ L。

2.4.5 序列测定

随机选取两条大小约为 1100bp 和 700bp 的片段, 由上海生工公司进行了序列测定。

3 结果

3.1 菌落 PCR 检测结果

菌落 PCR 是利用在常规 PCR 前, 将菌体 PCR 反应混合液加热煮沸几分钟, 使 DNA 模板从细菌细胞中释出, 并使核酸酶和蛋白酶失活。然后经 PCR 反应 30 个循环扩增后再用琼脂糖电泳观察鉴定。这样, 很多的菌落就能同时被分析。菌落 PCR 较以往用提取质粒-双酶切-电泳来鉴定重组子的方法, 工作量大大减少。本实验用该方法检测了 90 个重组子, 部分实验结果见图 3.1。由图上可以看出, 糙皮侧耳菌株 8101 原有的 13 条 AFLP 扩增产物, 大部分成功的经试剂盒回收并克隆到了 pMD18-T Vector 中。

3.2 以重组质粒为模板重新 PCR 扩增检测多态性产物

经由琼脂糖电泳鉴定的部分实验结果见图 3.3。实验结果与菌落 PCR 实验结果相符, 即: 糙皮侧耳菌株 8101 的大部分 AFLP 扩增产物成功的克隆到了 pMD18-T Vector 中, 回收片段大小的范围从 200bp 到 1500bp 左右。

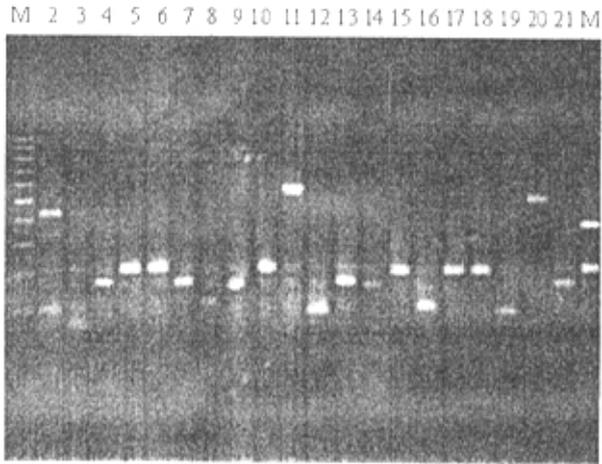


图 3.2 用菌落 PCR 检测回收片段的部分结果

M 为 DNA 梯度 marker, 200-2000bp.

2-21 道为用引物对 E-AGC/M-CAT 重新扩增重组子的部分结果。

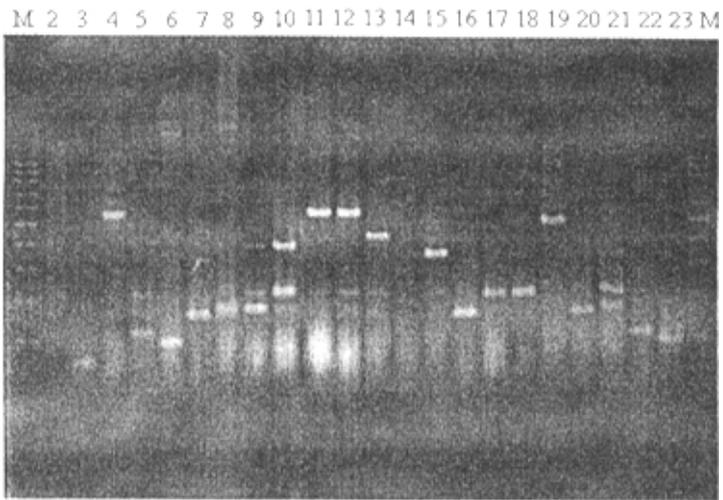


图 3.3 以重组质粒为模板重新扩增多态性产物部分结果

M 为 DNA 梯度 marker, 200-2000bp.

第 2 道为 8101AFLP 选择性扩增结果对照。

第 3-23 道为以引物对 E-AGC/M-CAT 重新扩增回收片段结果。

3.3 回收片段测序结果及分析

经比对,选取了大小为 1100bp 和 700bp 的两条多态性产物进行序列测定。经测定,其序列分别如下:

片段 1 (1099bp)

GACTGCGTACCAATTCAGCAGGATCATCGACTATACAACACAGCGG
CTATGTTTCATAGCGGTGTTGAGATTACGCAGGTCCTACCATCACCGATG
AAAACCTAAGTTACTCGGTGCGTCTCATGATCATAATACTTCAACGTTTCAT
CCATTCCTAACCCACACCCTTAGACGGACAGTAGCTATGTCCCCTCGATT
ACTCATGAGTCATCAGATACGGAATCTGGGGTGAGCCTTGTCCCTCACTT
ACACTCATGCTTAGAATTGACTTGATTGGAAGGAAATGTCCGTCGAAGAT
GATCCCGACGTAGCCGAAGAACAGTCAAGCGCCGAGCAGCCAGGGGCG
TCGTCCAATGTAGGTACCTTCAGATGCACAATCGCCCTGCACTCATGGAA
CCGATAGGCTCACGCGCAGAGCCATGCCATCCAGGAGAGACGAACATG
GGTCAGGTATGTAGTCATCAACAACATAATTGCTGAGCGTCTGATCGATT
GTCCACGAGCGAGGGGATAACGTATTCACGATCCTCCTCAAGATCAAGA
GACGAGGTCAAACCTCCAACCTGGTCAGGATCATCCCCAAGTGTAGGTTGC
CTTCAGCTATGCGTCGGTCAACCACTCAATAGGTTTCATTCATTCACGCAG
TACGGGTCATATGATGACGAAGACATGGATCAGGTAAGTTGTTAGCCGCA
GCACGGTTGCTGTGCATTGACCACGACCAAAGGACATACCCGCGACACG
CAGGGACTTTATCGAGGTGACGCGGTGCATAGGGGACCTATCTACTGCCA
TCCACGAATCATCAAACATAAGCCAGCAAATACTTGATGCACTGCTTTCC
GAGCGACGGTCAAATAGCGGTACACCCCCCTCTCGAGGACGTTTGGAC
GCAGGACAGGAAGCGTCGGGGAGGGGGATTACGACGCCGACGATGACG
ATGCTCCTGGACCTCGTTTGACAGGACCTCGGAAGCGACGTAGCGCAAG
GGACAACCAACTTGCGGTGAGCGTCAGCAAGGCCCTTGTTTGCTGGATG
TTGATCTTCATCAGGAGGACGTAAGATCACACACAAGAAACCTTGATGTT
ACTCAGGACTCATC

片段 2 (679bp)

GACTGCGTACCAATTCAGCCTCGAAAACGCGTCTTTTGACAAGGTGGTACTATAGCT
ATCGAAAAAGATGCATTTGACCCACATTTCTATCTAACCTGTCGCGAATGGGGCAG
GTCAAGGTCGACCATCATATGCAGGCTGTCCGGCCAGTGAGTAATGACATTGGGCGT
TGGGGCAACTCGCCAACTGATGTTACGAAGGCCAACGACGCCACCCAGATATTTGA
GAGGAGGCAGCGTGCAGAAGAGGAAGCTTTCTCCTCACAGCATCAGACCGGGCGC
ATCGACGCCTACTCACTACCGACCTCCTCGATGCACGTAAATCATGTA CTCTCCTT
CCGACATTCGCCAACTCGCCGAAAAGTATCGCATGGACCCAAGCGTCGTCGAGGAG
TTGTCGCGCAGCGTGAATAGTCCAAGTGTTGATAGAAATAGGGTGAGGACGGAGAT
AGGGAAGGATGGAGAGGAACTTGTTTCGGTCACTGTGAGCGCAACTAATCCCTGGA
TTGCAGAGGATGTGATTTTGACATGAGTTAGGCTGCTTGGATCAATCCTCCCATAGC
ACGTCGGTGACGAATGGGACCGCTACCCCAGTGTGATGGCTTGCAGCATCTAGAAC
GGACATTCTGCTGAACCCACCTCTTCTACATGAAAAGGCATGTTACTCAGGACTCAT
C

通过 ORF Finder 在片段 1 中找到了一个 400bp 左右的阅读框，其序列如下：

106 atg ggg cag gtc aag gtc gac cat cat atg cag gct gtc cgg cca
M G Q V K V D H H M Q A V R P
151 gtg agt aat gac att ggg cgt tgg ggc aac tcg cca act gat gtt
V S N D I G R W G N S P T D V
196 acg aag gcc aac gac gcc acc cag ata ttt gag agg agg cag cgt
T K A N D A T Q I F E R R Q R
241 gca gaa gag gaa gct ttc tcc tca cag cat cag acc ggg cgc atc
A E E E A F S S Q H Q T G R I
286 gac gcc tac tca ctc acc gac ctc ctc gat gca cgt aaa tca tgt
D A Y S L T D L L D A R K S C

```

331 act tct cct tcc gac att cgc caa ctc gcc gaa aag tat cgc atg
      T S P S D I R Q L A E K Y R M
376 gac cca agc gtc gtc gag gag ttg tgc cgc agc gtg aat agt cca
      D P S V V E E L S R S V N S P
421 agt gtt gat aga aat agg gtg agg acg gag ata ggg aag gat gga
      S V D R N R V R T E I G K D G
466 gag gaa ctt gtt tgc gtc act gtg agc gca act aat ccc tgg att
      E E L V S V T V S A T N P W I
511 gca gag gat gtg att ttg aca tga 534
      A E D V I L T *

```

将这两个片段输入 Gene Bank 中进行比对，用 BLAST 进行同源性检索，未发现与它同源的较长的序列。此外，与黄孢原毛平革菌全基因组进行比对，也未发现有较长的同源序列。

4 讨论

1. 回收多态性片段的克隆

从菌落 PCR 和常规 PCR 检测结果来看，均不同程度存在非特异性扩增的情况。在提高了退火温度（至 56℃）后，情况有所改善但仍无法完全避免。另有少数 PCR 结果显示有两条或两条以上较强的扩增片段，这可能有两种原因：1.是由于回收 AFLP 多态性片段时，部分片段发生了串联，转入质粒后重新 PCR 检测就会出现多带现象。2.是由于 PCR 反应中退火温度仍然过低导致的非特异性扩增。

2. 序列测定及分析

完成回收片段的序列测定后，经由 BLAST 比对，未发现与其同源性较高的序列，这可能是由于目前仅随机选取了其中两条回收片段进行测定而没有更进一步进行全部多态性片段的序列测定和分析。

小 结

回收并克隆了糙皮侧耳菌株 8101 的两条 AFLP 多态性片段。经序列测定，两条片段的大小分别为 1099bp、679bp。再经序列分析，发现在片段 1(1099bp) 中存在一个 400bp 左右的阅读框。将这两条片段的序列输入 Gene Bank 及和本实验室已有的黄孢原毛平革菌全基因组用 BLAST 比对，均未发现有与糙皮侧耳同源性较高的片段。

参考文献

1. Alic M, J R Kornegay, D Pribnow and M H Gold. 1989. Transformation by complementation of an adenine autotrophy of the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 55 (2): 406-411.
2. Blanchette R A, A R Abad, R L Farrell and T D Leathers. 1989. Detection of lignin peroxidase and xylanase by immunocytochemical labeling in wood decayed by basidiomycetes. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 1457-1465.
3. Burdsall H H and E Eslyn. 1974. A new *Phanerochaete* with a *chrysosporium* imperfect state. *Mycotaxon.* 1: 123-133.
4. Camarero S, S Sarkar and F J Ruiz-Duenas. 1999. Description of a versatile peroxidase involved in the natural degradation of lignin that has both manganese peroxidase and lignin peroxidase substrate interaction sites. *J. Biol. Chem.* 274: 10324-10339.
5. Camarero S, J M Barrase, M Pelgyo *et al.* 1998. Evaluation of *Pleurotus* species for wheat-straw Biopulping. *J. Pulp Paper Sci.* 24: 197-203.
6. Forrester J T, A C Grabski, C Mishra, B D Kelley, W N Strickland, G F Leatham *et al.* 1990. Characterization and N-amino acid sequence of a manganese peroxidase purified from *Lentinula edodes* cultures grown on a commercial wood substrate. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 13: 357-365.
7. Glenn J K and M H Gold. 1985. Purification and characterization of an extra cellular Mn(II)-dependent peroxidase from the lignin degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch. Biochem. Biophys.* 242: 329-341.
8. Hataka A I, T K Lundell, A L M Tervila-Wilo and G Brown. 1991. Metabolism of non-phenolic *p*-4 lignin model compounds by the white-rot fungus *Phlebia radiata*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 36: 270-277.
9. Heifling A, M J Martinet, M Bergbauer and U Azewzyk. 1998. Purification and characterization of peroxidase from the dye-decolorizing fungus *Bjerkandera adusta*. *FEBS. Microbiol. Lett.* 165: 43-50.
10. Higuchi T H. 1982. Biodegradation of lignin: biochemistry and potential applications. *Expertia.* 38: 159-166.

11. Johansson T, K G Welinder and P O Nyman. 1993. Isozyme of lignin-peroxidase and manganese(II) peroxidase from the white-rot basidiomycete *Trametes versicolor* II: partial sequences, peptide maps, and amino acid and carbohydrate compositions. Arch. Biochem. Biophys. 300: 57-62.
12. Johansson T and P O Nyman. 1993. Isozyme of lignin-peroxidase and manganese(II) peroxidase from the white-rot basidiomycete *Trametes versicolor* I: Isolation of enzyme forms and characterization of physical and catalytic properties. Arch. Biochem. Biophys. 300:49-56.
13. Master J and J A Field. 1998. Characterization of a novel manganese peroxidase-lignin peroxidase hybrid isozyme produced by *Bjerkandra* species strain BOS55 in the absence of manganese. J. Biol. Chem. 273: 15412-15417.
14. Nerud F and Z Misurcova. 1991. Ligninolytic properties of different white-rot fungi. Biotechnol. Lett. 13: 657-660.
15. Niku-Paavola E L, E Karhunen, P Salola and V Raunio. 1988. Ligninolytic enzymes of the white-rot fungus *Phlebia radiata*. Biochem. J. 254: 877-884.
16. Orth A B, D J Royer and M Tien. 1993. Ubiquity of lignin degrading peroxidases among various wood-degrading fungi. Appl. Environ. Microbiol. 59: 4017-4023.
17. Orth A B, M Denny and M Tien. 1991. Overproduction of degrading enzyme by an isolate of *Phanerochaete chrysosporium*. Appl. Environ. Microbiol. 57: 2591-2596.
18. Tien M and C P Tu. 1987. Cloning and sequencing of a cDNA for ligninase from *Phanerochaete chrysosporium*. Nature. 326: 520-523.
19. Tien M and T K Kirk. 1983. Lignin-degrading enzyme from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium* Burds. Science. 221: 661-663.
20. Vos P, Hogers R, Bleeker M *etal.* 1995. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Research. 23 (21): 4407~4414
21. Waldner R, M S A Leisola and A Fiechter. 1988. Comparison of ligninolytic activities of selected white-rot fungi. Appl. Microbiol. Biotechnol. 29: 400-407.
22. Zabeau M and Vos P. 1993. Selective restriction fragment amplification, a method for DNA fingerprinting. European Patent Application 94202629.7. (publication

- No:05348A1). Paris: European Patent Office.
23. Zhang YZ, G J Zylstia, R H Oslen and C A Reddy. 1986. Identification of cDNA clones for ligninase from *Phanerochaete chrysosporium* using synthetic oligonucleotide probes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 137: 649-656.
 24. Zeikus J G. 1981. Lignin metabolism and the carbon cycle: polymer biosynthesis, biodegradation and environmental recalcitrance. In *advances in Microbiol Ecology*. Alexander. M. Plannum Press, NY. 5: 211-243.
 25. Zimmermann W and P Broda. 1988. Conventional and high-performance size-exclusion chromatography and gramineos Lignin-carbohydrate complex. *Method Enzymol.* 161: 191-199.
 26. D. N. 佩格勒, 姚一建. 1998. 凤尾菇与平菇的鉴别及其分类地位. *云南植物研究*. 03: 305~310.
 27. 范秀容, 李广武, 沈萍. *微生物学实验(第二版)*. 1989. 北京: 高教出版社. 1-319.
 28. J. 萨姆布鲁克, D. W. 拉塞尔. 2002. *分子克隆实验指南(第三版)*. 北京: 科学出版社. 1-1949.
 29. 刘尚旭, 董佳里, 张义正. 2000. 糙皮侧耳木质素降解酶的比较研究. *四川大学学报(自然科学版)*. 04: 594-598.
 30. 王斌, 翁曼丽. 1996. AFLP 的原理及其应用. *杂交水稻*. 5: 27-30.
 31. 王佳玲, 余惠生, 付时雨. 1998. 白腐菌漆酶的研究进展. *微生物学通报*. 25: 233-236.
 32. 王谦, 冀宏, 汪虹. 1999. 香菇的发酵研究及相关检测. *食用菌学报*. 6(1): 1-4.
 33. 王谦, 闫蕾, 王永利, 张永健. 2002. 金顶侧耳的深层液体培养及相关检测. *菌物系统*. 21(1): 102-106.
 34. 吴敏生, 戴景瑞. 1998. 扩增片段长度多态性(AFLP)——一种新的分子标记技术. *植物学通报*. 15(4): 68-74.
 35. 谢君, 任路, 李维, 孙迅, 张义正. 2000. 白腐真菌液体培养基产生木质纤维素降解酶的研究. *四川大学学报(自然科学版)*. S1: 161-166.
 36. 谢君, 孙迅, 任路, 张义正. 2001. 侧耳菌与粗毛栓菌在麦草培养基中产生木质纤维素降解酶的研究. *生物工程学报*. 09: 575-578.
 37. 郑儒永, 魏江春, 胡鸿钧. 1999. *孢子植物名词及名称*. 北京: 科学出版社. 1-961.

AFLP 分子标记的研究发展与应用

1 分子标记的产生和发展

DNA 分子标记是指在 DNA 分子水平上,通过一定方式或特殊手段来反应生物个体之间或种群之间具有差异性状 DNA 片段。RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism 限制性片段长度多态性)、RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA 随机扩增多态性 DNA)、SSR (Simple Sequence Repeat 简单重复序列)、AFLP (Ampified Fragment Length Polymorphism 扩增片段长度多态性) 是目前最普遍使用的四种分子标记,因而它们被合称为新一代分子标记。一般来说,分子标记可以分为两类,即 PCR 途径(如 RAPD、SSR、AFLP)和非 PCR 途径(如 RFLP)。

最近十多年来,分子生物学得到了迅速的发展,DNA 分子标记的研究十分活跃。这些分子标记为物理图谱的构建、DNA 指纹分析、基因定位以及作物育种等方面的研究提供了有效的方法,并渗透到生物学的相关科学,使相关科学得到了飞跃性的发展。因此,新一代分子标记具有重要的使用价值和广阔的应用前景。如:在过去几十年里,遗传育种科学发生了巨大变化,对世界粮食生产产生了很大影响。在这期间,优良品种的贡献在农作物增产总额中占到 30-40%。传统的育种方法育成一个新品种往往需要许多时间(6-7 代),甚至长达 10 年,大大延缓育种进程,不利于粮食生产。而近十年来分子遗传学对遗传育种技术产生了巨大影响,大量的分子标记技术用于遗传育种,例如基因组分析、基因克隆、品种鉴定、外源基因导入。

分子标记研究的关键是建立饱和的遗传图,饱和的遗传图对于定位克隆极其重要^{[16][23]}。最早的分子标记技术是 RFLP 技术^[5],目前已经构建了大批的 RFLP 图谱。做图的目的之一是染色体步行,染色体步行要求 2 个条件:(1)是目标基因附近有紧密连锁的 DNA 标记,(2)是知道这些标记与目的基因的位置,一旦建立与目的基因紧密连锁的分子标记图,就可以找到染色体步行的起始点,从而进行定位克隆。RFLP 的结果稳定可靠,重复性好,特别适应于

建立连锁图，例如水稻 RFLP 连锁图的建立。RFLP 比较作图进一步揭示了在主要粮食作物中，RFLP 标记在染色体上的排列具有类似的顺序。因此，RFLP 自出现至今虽然已有 10 多年了，但它仍是当今应用最广泛的一种分子标记。但是，RFLP 必须经过滤膜转移和 Southern 杂交，费时、费力、周期长。另外，RFLP 对 DNA 多态性检出的灵敏度不高，难以分析大量的 DNA，而且遗传图饱和度低，RFLP 连锁图上还有很多大的空间区，分子标记间距离比较大，不利于定位克隆^[25]，这限制了它的进一步发展。

PCR 对分子标记技术的发展产生了巨大的推动作用，迄今所用的分子标记技术尽管可以分为多种类型，其实除了以传统的 Southern 杂交为基础的 RFLP 外，其它各类分子标记都涉及 PCR。1990 年以来，发展了 RAPD、DAF、AP-PCR (Caetano-Anolles, 1991; Welsh 和 Mc-Clelland, 1990; Williams, 1990) 等技术，这些方法主要根据 PCR 技术，用随机引物扩增 DNA，在不需知道 DNA 序列情况下，产生 DNA 片段的指纹模式。RAPD 就是以随机引物为模板通过 PCR 扩增进行 DNA 多态性研究的，与 RFLP 相比，它较便宜，方便易行，非常灵敏，DNA 用量少，而且不需要同位素，安全性好。继 RFLP 之后，RAPD 是应用最为广泛的，特别是在寻找与目的基因连锁的分子标记方面。

近年来报道了大量的与各种目的基因连锁的 RAPD 标记。近来西红柿 Pto 基因和水稻 Xa21 基因的成功分离就是首先找到了与目的基因紧密连锁的 RAPD 标记，然后通过 MBC (Mapbasedcloning) 方法克隆了目的基因^{[27][40]}。但是 RAPD 最大的缺点是它对反应条件非常敏感，受条件影响很大，因此对设备、条件及操作的要求都很严格，如果达不到要求，稳定性和重复性就难保证，从而限制了其应用。

AFLP 是在 RFLP 和 RAPD 的基础上发展起来的。它是 RFLP 和 RAPD 的结合，但不是笼统的结合，它克服了二者各自的缺点，而集中了二者的长处。它既有 RFLP 的可靠性，也具有 RAPD 的方便性。它方便快捷，只需要极少量 DNA 材料，不需要 Southern 杂交，不需要预先知道 DNA 的顺序信息，实验结果又稳定可靠，可以快速获得大量的信息；AFLP 产物呈典型的孟德尔方式遗传；因此 AFLP 称为最有力的分子标记或下一代分子标记。不管所研究的基因组 DNA 有多么复杂，理论上讲，用 AFLP 方法都可以检测出任何 DNA 之间的多

态性。它可以应用于一般分子标记的所有应用范围，自从其问世以来，已广泛用于基因鉴定、基因作图、基因表达等方面。

2 几种主要分子标记的基本原理及步骤

2.1 RFLP 的原理及步骤

RFLP 是 Grodzicker 于 1974 年创立，碱基的改变和染色体结构的变化导致生物个体或种群之间 DNA 片段酶切位点的变化，用限制性内切酶切割改变的 DNA 则产生长短、种类、数目不同的限制性片段。这些片段经聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后，在凝胶上呈现不同的带状分布，具有差异性的 DNA 片段可通过 Southern 杂交检测出来。电泳所得 DNA 片段，对于分子量较小的可以经 EB 染色后直接在紫外灯光下观察，若选择靶 DNA，则将在凝胶上呈带状分布的 DNA 通过 Southern 转移到 NC 膜或尼龙膜上，再利用探针进行 Southern 杂交后，洗去多余探针，经放射自显影即可得到靶 DNA。

RFLP 技术的主要步骤包括：限制性内切酶切割、聚丙烯酰胺凝胶电泳、Southern 转移和杂交、放射自显影。

2.2 RAPD 的原理及步骤

1990 年 Williams 等人创立了 RAPD，这一分子标记建立在 PCR 基础之上，使用一系列具有 10 个碱基的单链随机引物，对基因组的 DNA 全部进行 PCR 扩增以检测多态性。由于整个基因组内存在众多反向重复序列，因此需对每一随机引物单独进行 PCR，单一引物结合在反向重复序列上在其之间的区域内，若遗传特性发生变化，经 PCR 扩增后，则导致一系列 PCR 产物表现其差异性。由于使用一系列引物，几乎整个基因组差异就会显露出来，经聚丙烯酰胺或琼脂糖凝胶电泳分离后，通过 EB 染色或放射自显影就可检测出被扩增的 DNA 多态性。

其主要反应步骤为：首先将获得引物进行高温变性，通常为 95℃ 条件下进行，加入 PCR 反应体系和一系列引物，然后在 35-45℃ 条件下进行低温退火处理，单链引物与模板 DNA 进行配对结合，最后在 72-75℃ 条件下进行适温延伸反应，这时引物在 *Taq* DNA 聚合酶作用下以引物的 3' -OH 为起始进行合

成，一个循环结束再进行下一次循环，每一单链引物重复 20-30 个循环后，更换另一单链引物进行 PCR 扩增。切勿将两个或几个引物同时加入 PCR 反应体系，否则达不到 RAPD 的目的。

2.3 SSR 技术的原理及步骤

SSR 技术，又名微卫星 (Microsatellite) 技术。1989 年 3 个独立的研究小组几乎同时建立了这一技术，并且证实它作为位点特异遗传标记具有巨大潜力。SSR 技术的特点是：呈共显性遗传；在数量方面没有生物学上的限制；其标记带型简单，记录的条带一致、客观、明确；采用 PCR 技术进行检测只需少量 DNA 样品，且质量要求不高，即使是部分降解的样品也可进行分析；每个位点均有许多等位形式；另外，它还具有多态性高、实验程序简单等优点。

SSR 技术的生物基础一般而言，在生物体的整个基因组中并不是每个位点的基因都能表达，只有一小部分(大约 10%)参与生物体的功能和结构的表达。即：每一个位点的基因都有相应的产物，这部分基因被称作编码基因或结构基因，另一部分基因由或长或短的碱基序列以不同的重复数目组成，分布于整个基因组中。这些重复序列不含有蛋白质合成的遗传信息，不能转录和翻译。因此，这些序列在生物进化过程中通常没有被选择，即使在同一物种内非亲缘关系个体间基因序列亦有巨大差异。同时由于其重复性，可产生大量的可描述的有差异的 DNA 位点，可以帮助人们从 DNA 分子水平上认识品种及个体间的遗传差异。

实验步骤如下：提取目标物种的基因组 DNA，用 RE 切成均匀的小片段进行凝胶电泳，回收大小为 300-500bp 的片段。把回收片段克隆放大，用标记探针杂交，筛选出含重复序列的克隆并对其测序证实重复序列的存在。对重复序列 PCR 扩增 (用片段两端区域设计的引物)，然后对少量样本进行预试验，挑选出重复性好，具有多态性的微卫星位点。

由于 SSR 技术主要针对 VNTRs 进行分析，因此，一般用于亲子鉴定、个体识别。

2.4 AFLP 的发展、基本原理和步骤

AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) 是 1992 年由荷兰科学家 Zabeau 和 Vos 发展起来的一种检测 DNA 多态性的新方法。由于它具有重要的实用价值, 一出现就被 Key gene 公司以专利形式买下。由于 AFLP 较其它分子标记有着明显的优越性, 因此迅速传播开来, 尽管它已受到了专利保护, 但世界上很多实验室都在努力探索在自己的研究中应用 AFLP 技术。因此 Zabeau 和 Vos 不得不将其专利解密^[63], 并以论文形式正式发表出来^[53]。

与 RFLP 类似, AFLP 也是通过限制性内切酶片段的不同长度检测 DNA 多态性的一种 DNA 分子标记技术。但 AFLP 是通过 PCR 反应先把酶切片段扩增, 然后把扩增的酶切片段在高分辨率的顺序分析胶上进行电泳, 多态性即以扩增片段的长度不同被检测出来。实验中酶切片段首先与含有与其共同粘末端的人工接头连接, 连接后的粘末端顺序和接头顺序就作为以后 PCR 反应的引物结合位点。在实验中, 根据需要通过选择在末端上分别填加了 1-3 个选择性核苷的不同引物组合, 就可以达到选择性扩增的目的。这些选择性核苷酸使得引物能选择性地识别具有特异配对顺序的内切酶片段, 进行结合, 从而导致特异性扩增。

AFLP 的基本反应程序主要包括: 模板 DNA 制备, 酶切片段扩增及凝胶电泳分析 3 个步骤, 其实验过程见图 1。

2.4.1 模板 DNA 制备

在进行 AFLP 分析时, 首先要制备高分子量 (HMW) 基因组 DNA, 然后用两种限制性内切酶酶切, 通常一种酶的识别位点是 6 个碱基, 另一种是 4 个碱基, 如 *EcoRI* 和 *MseI*, 选择这样两种酶共同酶切可以产生比较小的酶切片段, 经过 PCR 反应扩增出的产物主要在 1kb 左右, 范围可能在 100-1500bp。HMW 基因组 DNA 的成功制备和避免部分降解是 AFLP 成功的关键。在制备过程中要特别注意避免核酸酶及各种失活物质的污染。在用限制性内切酶酶解时, 一定要彻底。

DNA 酶切完成后, 经加热使限制性内切酶失活, 再把酶切片段连结到特定的接头(adapter)上, 形成扩增反应的模板。经过连接反应, 接头和基因组 DNA 酶切片段的粘性末端之间进行碱基配对并接连在一起, 该接头及其毗邻

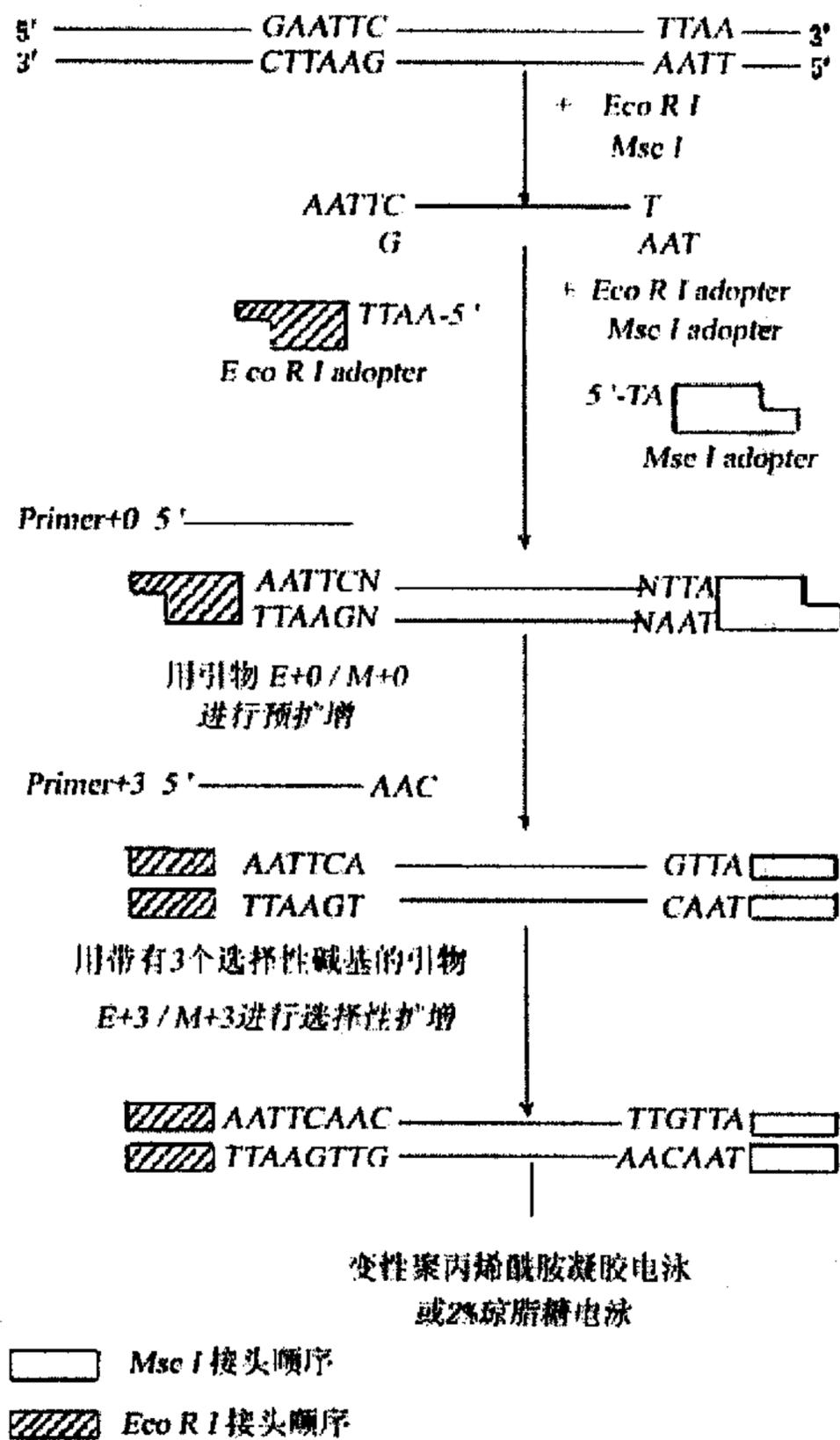


图1 AFLP 反应过程示意图

的酶切位点这段共同顺序就存在于所有限制性酶切片段的两端,成为以后进行PCR 扩增时引物的结合位点。

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，由核心顺序和内切酶位点特异顺序两部分组成。因为在绝大多数真核生物基因组 DNA 中，*EcoR* I 总是给予可靠的酶切结果，价格又很便宜，而 *Mse* I 可以产生比较小而稳定的酶切片段。因此，目前商品出售的 AFLP 试剂盒中用的是 *EcoR* I 接头和 *Mse* I 接头，其序列如下：

EcoR I adapter: 5' -CTCGTAGACTGCGTACC-3'
 3' - CATCTGACGCATGGTTAA -5'

Mse I adapter: 5' -GACGATGAGTCCTGAG -3'
 3' - TACTCAGGACTCAT -5'

目前，已有报道使用过的 6 碱基内切酶接头，除 *EcoR* I 外，还有 *Pst* I 接头和 *Sac* I 接头，4 碱基内切酶接头除 *Mse* I 外，还有 *Taq* I 接头和 *Sse* I 接头。

2.4.2 酶切片段的扩增

在酶切片段中接上去的接头及其毗邻的酶切位点顺序就成为以后 PCR 扩增时引物结合的位点，形成扩增反应的模板。在 AFLP 反应中，引物的 3' 末端有 1-3 个选择性核苷酸顺序。酶切片段结合位点中能够与引物上的选择性核苷酸适当配对的，就被识别并用作模板而选择性地扩增出来。AFLP 引物是一种人工合成的单链寡核苷酸，一般长度为 18-20 个核苷酸。由核心顺序 (CORE)、内切酶位点特异顺序 (ENZ) 和选择性核苷酸顺序 (EXT) 三部分组成。下面以目前常用的 *EcoR* I 引物和 *Mse* I 引物为例说明各部分的组成，图中 N 代表 1-3 个核苷酸。

	CORE	ENZ	EXT
<i>EcoR</i> I Primer:	5' -GACTGCGTACC	AATTC	NNN-3'
<i>Mse</i> I Primer:	5' -GATGAGTCCTGAG	TAA	NNN-3'

在 AFLP 引物中，3' 末端上选择性核苷酸数目的多少决定了 AFLP 扩增产物的多少。实验中可根据基因组 DNA 的大小确定引物末端所需的选择性核苷酸数目。一般大于 10⁸ bp 的基因组 DNA 可以用 3 个选择性核苷酸；10⁵-10⁸ bp 的基因组 DNA 可以用 2 个选择性核苷酸，文献中常提到的 +3 或 +2 就是表示在引物 3' 末端的选择性核苷酸数目分为 3 或 2。其它 6 碱基内切酶引物与

EcoR I 引物类似, 4 碱基内切酶引物与 Mse I 引物类似, 只是各自的内切酶位点特异顺序彼此不同。目前作为商品出售的 AFLP 选择性扩增引物只有两种, 即 EcoR I 引物和 Mse I 引物。

扩增反应的条件: 酶切片段要经过连续 2 次 PCR 扩增, 通过这样两步扩增反应使产生的扩增结果更清楚、重复性更好。第 1 次 PCR 扩增被称为预扩增反应(Pre-amplification), 所用的 AFLP 引物只含有 1 个选择性核苷酸, 选择扩增性能较差, 因此大量的扩增产物在凝胶中往往形成连续的一片。预扩增反应条件与常规 PCR 反应条件大致相同。

预扩增反应的产物经过大量稀释后用作第 2 次扩增反应(即选择性扩增反应, Selective amplification)的模板。选择性扩增反应所用的引物中选择性核苷酸数目的多少是决定扩增产物多少的主要因子。

目前在植物基因组 DNA 的 AFLP 分析中, 选择性扩增反应所用的引物一般含有 3 个选择性核苷酸顺序。在这种情况下, 每个样品扩增产物数目平均在 50 个左右, 范围为 10-100 个。另外, 引物中用作选择性核苷酸的 G 和 C 含量也对扩增出的产物数目有较大影响。一般而言, G 和 C 含量越高, 扩增出的产物数目越少。当然, 所分析的基因组 DNA 越大, 扩增出的产物数目也相应较多, 其 DNA 指纹图也较复杂。

选择性扩增的反应条件与普通 PCR 有所不同, 主要不同之处是复性温度, 它是采用温度梯度 PCR。其 PCR 开始于高温复性(一般采用 65℃, 比常规 PCR 反应的复性温度高 10℃) 以期获得最佳选择性。以后复性温度逐步降低, 一直降到复性效果最好的温度(一般是 56℃), 然后保持在这个温度下复性, 完成其余的 PCR 循环周期。

2.4.3 扩增产物的凝胶电泳分析

选择性扩增产物一般在 5%-6%的变性聚丙烯酰胺凝胶(PAGE 序列分析胶)或是 2%琼脂糖凝胶上经过电泳分离, 形成 DNA 指纹, 凝胶经过干燥、放射性自显影后即可进行结果分析。

3 AFLP 分子标记的优缺点

3.1 AFLP 分子标记的优点

AFLP 用作分子遗传标记的优点主要有列几点^{[32][54]}：AFLP 技术基于 PCR，因此快速、经济简便，可同时对随机分布在染色体上的许多不同的 DNA 区域(多位点)进行分析。在试验条件优化后，一个研究者可以在一个月内分析几千个位点，而且 30%的位点是多态的。

同 RAPD 一样，不需要预先知道所要扩增 DNA 的序列，适合对遗传背景了解不多的种类进行分析。不论来源和复杂性如何，任何 DNA 都可得到 AFLP 的指纹图谱。再者 AFLP 模板需要的数量较少，即使部分降解的样本仍然可以使用。因此，AFLP 可以应用到例如大型或小型的昆虫这样的领域中。在昆虫中只要抽提到总 DNA 就可进行 AFLP 分析。

与 RAPD 相比，AFLP 对基因组的扩增是在强制基础上的选择性扩增，是双引物扩增酶切片段，扩增是在较高的退火温度下(如 56℃)进行的，扩增结果重复性较好，AFLP 标记实验室之间的重复率可以在 99.4%以上，类似于微卫星的重复率^[20]。RAPD 扩增对模板浓度是较敏感的，而 AFLP 对模板的浓度是不敏感的，在很大浓度范围内扩增结果没有变化，再者 AFLP 引物与模板的错配和产物的统计错误都大大低于 RAPD，因此 AFLP 重复性和可靠性都比 RAPD 等随机引物扩增技术要高，可以预见 AFLP 可能会取代 RAPD 等随机引物扩增技术应用在生物遗传进化方面的研究中。

AFLP 具有较高的分辨率。通过引物的组合可以扩增出许多产物，例如在复杂基因组中，两种内切酶每次组合就能够扩增 10 万条带，而每一个 AFLP 反应仅选择其中的 10-100 条带进行扩增。这些 AFLP 标记中至少有部分标记位于变异的区域，因此可以展示种群内微小的遗传变异，并可以用测序凝胶来区分 AFLP 扩增带间的单个核苷酸的差异。

AFLP 可以获得高密度的标记，而且少部分 AFLP 标记(占 4%-15%)是共显性的，与其它遗传标记例如 RFLP 和 SSR 相比，AFLP 具有最高的信息含量^[60]。众多研究者对四大分子标记 AFLP、SSR、RAPD、RFLP 进行了比较，认为 AFLP 具有最高的有效复合比(Effective Multiplex Ratio, EMR)，SSR 具有最高的期望异质性(Expected Heterozygosity)。1995 年 7 月 30 日美国园艺学会第 92 届年会的与会专家一致认为当今世界上四大分子标记系统综合效用大小顺

序应该是 AFLP>SSR>RAPD>RFLP^[74]。因此 AFLP 更适宜于遗传连锁图谱的构建。AFLP 分子标记与其他分子标记主要特点比较见图 2^[32]。

表 1 几种常用分子标记的主要特点比较

	AFLP	MAAP	SSR	RFLP	等位酶	序列分析
获变异信息数量	高	高	高	高	低	以序列而定, 中-低
获重复性程度	高	低, 可变	高	高	高	高
遗传变异分辨率	高	中等	高	高	中等	中等
操作难易度	中等	简易	困难	困难	简易	困难
获标记时间	短	短	长	长	短	长
标记显性特点	显性, 较少部分是共显性	显性, 很少是共显性	共显性	共显性	共显性	共显性
起步费用	低	低	高	中	低	高
每样本费用	中	低	低	高	很低	高
每天分析样本数	50	50	50	20	50	20
样本需求水平	中	低	低-中	低	高	高
操作自动化	高	高	高	困难	困难	高
同位素应用	是/否	否	是/否	是/否	否	是/否

注: MAAP 包括了 RAPD、DAF、AP-PCR 三种技术

3.2 AFLP 分子标记的局限性

虽然 AFLP 是目前效率最高的分子标记之一, 但是 AFLP 也有其缺点。与 RAPD 等显性标记相似, AFLP 产生的标记多数是显性的, 因此不能区分某一

位点是杂合体还是纯合体。与共显性标记相比,不能更好地估算种群遗传的变异,对种群遗传结构的分析不能提供更多的统计信息。在分析自然种群遗传结构时,AFLP假定AFLP位点都处于Hardy-Weinberg平衡,但是此假定常是站不住脚的。实际上有些AFLP位点是不处于Hardy-Weinberg平衡^[61],用这些位点来估算种群遗传变异就会得到较大的误差。

从技术上与RAPD相比,仍然是比较复杂,需要酶切、接头连接、预扩增和扩增等几个步骤。试验操作技术要求较高。经常使用对人体有害的放射性同位素来检测产物。

当个体之间的序列同源性低于90%时,AFLP将会在个体之间得到很少相同的带,因此AFLP不适宜于亲缘关系很远的物种,一般来说AFLP适于种下的研究。而在个体之间同源性很高时,只有极少的序列存在变异,AFLP仍然不能检测到这些序列的差异。

在进行AFLP分析时,对基因组DNA的质量有较高的要求,不能含内切酶的抑制剂,因为基因组DNA需要完全酶切,这也是AFLP分析的先决条件,如果酶切和连接不完全,可能会扩增出被认为是多态性的带,导致错误的分析结果。在消化时间足够长的情况下,基因组DNA酶切不完全可能是基因组DNA中含有酶的抑制剂例如残留酚、多糖等。

4 AFLP 分子标记的改进和发展

为了尽可能地克服AFLP的缺点,人们又对AFLP技术进行了某些改进,例如不使用同位素^{[8][36]},对某些步骤进行增减^[43]等。同时,人们又以AFLP为基础,发展了许多相关的技术,这些技术主要有以下几个。

4.1 扩增片段长度随机多态性 (AFRP) 和微卫星 AFLP (SAMPL)

扩增片段长度随机多态性(Amplified Fragment Random Polymorphism, AFRP)。AFRP是利用一个AFLP选择引物和一个随机引物进行扩增。为了提高AFLP共显性标记的比例,人们又发明了其它技术例如微卫星AFLP或者称为选择扩增的微卫星多态DNA(Selective Amplification of Microsatellite Polymorphic DNA, SAMPL)^[56]。此技术与AFLP相似,使用的模板是AFLP预

扩增的产物。但在第二次扩增中使用一个与 AFLP 不同的引物, 即 SAMPL 引物, SAMPL 引物是根据植物中复合微卫星序列而设计的。引物含有混合微卫星序列(含有两个短小重复序列), 每个重复序列有两个核苷酸组成, 整个引物长度为 18-20 个核苷酸, 并用放射性同位素标记。放射性标记的 SAMPL 引物与复合微卫星的连接区域序列互补, 因此可以在不知道微卫星侧翼序列的情况下扩增模板 DNA 中微卫星位点, 扩增的片段是从 SAMPL 引物到 AFLP 引物之间的片段, 此片段中含有微卫星序列。由于 SAMPL 技术可以扩增微卫星位点, 从而增加了共显性标记的比例。

4.2 直接扩增长度多态性 (DALP)

应用在动物中的类似技术是直接扩增长度多态性(Direct Amplification of Length Polymorphisms, DALP)^[13]。DALP 不需要酶切连接等步骤, 扩增是用 M13 测序通用引物, 只是正向引物的 5' 端共有 M13 序列还在其 3' 端加 2-4 个核苷酸的选择序列。反向引物是 M13 测序引物, 扩增也是分两步, 第 2 次扩增与第 1 次不同在于使用的引物不同。DALP 的产物可以直接测序, 通过比较扩增产物的有无、片段大小来研究动物的进化。

4.3 序列特征扩增 (SCARs)

序列特征扩增(Sequence Characterized Amplified Regions, SCARs)^[59]。最初是在 RAPD 的基础上发展起来的, 其基本步骤是先进进行 RAPD 分析, 然后把遗传的 RAPD 片段(与目的基因连锁的 RAPD 片段)进行纯化、克隆和测序; 根据 RAPD 片段两末端的序列设计特殊位点引物, 再进行 PCR 特异扩增, 这样可以把与原 RAPD 片段相对应的单一位点鉴定出来, 此位点就称为 SCAR。SCAR 比 RAPD 有更高的重复性, 标记是共显性的。SCAR 主要缺点是如果仅仅是由于引物结合位点处某个或一些核苷酸的错配而导致某些 RAPD 带的多态性, 而这些多态性的带除在引物结合位点外其余部分序列没有差异, 那么选择这些带进行 SCAR 分析时, 可能得到没有差异的结果。由于 AFLP 同 RAPD 一样都是显性标记, 因此 AFLP 也可以进行 SCAR 研究。

4.4 TE-AFLP 技术(Three Endonuclease - AFLP)

TE-AFLP 技术(Three Endonuclease - AFLP)^[49]。是用三种而不是两种内切酶进行酶切。基因组 DNA 酶切后,加入接头连接,但不提供与密切酶互补的的接头。由于加入了第 3 种酶使得 AFLP 降低了带数,具有更高的分辨率,对研究复杂的基因组更加方便。同时 TE-AFLP 分析可以减少试验时间,降低试验费用。

对于 AFLP 相关技术的发展,相信随着分子生物学技术的进步,人们会不断地推出以 AFLP 技术为基础的其它标记,最大限度地克服其缺点,充分发挥其优点。

5 AFLP 分子标记的应用领域及取得的进展

5.1 AFLP 分子标记的应用领域

5.1.1 遗传多样性和种质鉴定

AFLP 的最适应用范围,也就是 M.Zabeau 和 P.Vos 申请专利的关键,是利用 AFLP 技术鉴定品种指纹(Finger print),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,建立它们的指纹档案,保护品种专利。法国 Faye^[79]用 1 个 AFLP 引物组合在玉米 2 个基因型中发现了 30 多条多态性区带,这表明 AFLP 非常适合用于玉米基因型的指纹鉴定。

Zabeau 实验室的 Thomas 等人通过对 F2 群体进行集群聚类分析(BSA),从 42000 个 AFLP 位点中找到了 3 个与西红柿叶霉病抗性基因 Cf-9 连锁并表现为共分离的 AFLP 标记^[47],并以这些标记为起点,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,这正是 AFLP 突出的优点。

美国康耐尔大学的 Blair^[78]利用 AFLP 技术对 54 份水稻品种的遗传多样性进行了分析,研究其系统发育和分类,并与用同功酶研究得出的结果进行了比较,发现不仅其结论一致,而且认为 AFLP 对研究水稻品种的遗传变异和构建基因组图谱十分理想。朱嘉辉^[78]从 2000 份水稻种质资源中随机选取来源于不

同生态区域的 200 份材料, 用 AFLP 技术研究其多样性, 并根据分析结果提出水稻模式核心种(Modelcore collection)假说。比利时的 Breyne Peter^[78]分析了拟南芥种内和种间的 22 个生态型, 发现 1 个反应即可发现大量特异性区带, 在所有检测的区带中 50%以上在不同的生态型中表现出多态性。

5.1.2 遗传作图

很久以来, 科学家希望利用遗传图和遗传标记来加速植物育种进程, 自 1980 年, Botstein 等提出用 RFLP 构建人的遗传图谱^[5]以来, 现已构建了许多生物的 RFLP 图, 但大多数图的密度很低, 因此需要构建高密度的遗传图。

高密度遗传图在基础研究和应用研究方面具有很多功能: ①它们是染色体步行的关键工具。为了克隆一个基因(利用染色体步行), 必须找到一个与目的基因紧密连锁的分子标记, 这样才能提供一个步行的起始点, 而高密度遗传图可以为染色体步行提供起始点; ②高密度遗传图在育种上有直接的应用。它们至少可确定一个与任何目的基因紧密连锁的分子标记, 利用这些连锁标记, 在育种计划中就可以根据图选择目的基因^{[6] [45]}; ③高密度遗传图使基因组完全被分子标记覆盖(即无很大的标记空隙)。这一点对于检测数量性状基因(QTL)尤为重要^[22]。除了利用 RFLP 分子标记遗传做图外, 人们还利用 RAPD 技术做图, 但 RAPD 技术重复性差, 在一次实验中不能得到大量的多态性 DNA 片段, 因而也限制了其应用。1992 年, Zabeau 等^[63]发明了 AFLP 技术, 其技术重复性好, 且在一次实验中可观察到大量的 DNA 多态性片段。AFLP 不仅能缩小抗病基因与连锁标记之间的距离, 而且在 RFLP 遗传图上, 可增加染色体末端标记和填充 RFLP 空隙, 不干扰 RFLP 标记簇^[4]。因而 AFLP 可以构建高密度的遗传图。

近几年来, 植物遗传学家和育种家已着手构建重要作物的 AFLP 图, 或在 RFLP 图上补充 AFLP 标记以构建饱和的遗传图。法国 Faye C.^[79]报道他们以 1 个人只花费 3 个月的时间就构建了玉米 AFLP 图谱, 共有 1032 个 AFLP 标记。荷兰 Key gene 公司 Pot Jerina 与 PE 公司合作构建了拟南芥菜高密度的 AFLP 图谱, 含有 700 多个 AFLP 位点。

Colwyn 等^[12]在构建番茄 AFLP 图时, 利用分离群体和 728 个引物, 从

42000 AFLP 片段筛选了 3 个 AFLP 标记, 并将其定位在番茄第 1 条染色体短臂上。在这次实验中, 每个引物组合产生 58 个 AFLP 片段, 33.3% 有多态性。Meksem 等^[30]在马铃薯 RFLP 图谱上添加 AFLP 标记, 利用分离群体和 108 个引物组合, 从 3200 AFLP 片段中发现有 29 个与马铃薯第 5 染色体 R_1 基因 (R_1 基因是抗 *Phytophthora infestans* 特异小种的基因) 连锁的 AFLP 标记, 并将其定位在第 5 染色体上。Ballvora 等^[3]利用马铃薯的分离群体和 144 个引物组合, 进行 AFLP 分析, 每个引物组合平均产生 100 个 AFLP 片段, 38% 有多态性, 从 5500 个多态性位点, 发现 2 个 AFLP 标记, 并将其定位在马铃薯第 7 条染色体上。在大麦上, Becker 等^[78]利用双单体, 将 118 个 AFLP 标记定位在大麦 RFLP 图上, 这 118 个 AFLP 标记分布在大麦所有染色体上。有趣的是, AFLP 标记很少干扰 RFLP 标记簇, 而是成群地分布在 RFLP 标记附近, 大大增加了遗传图的饱和度。在水稻上, Cho 等^[10]利用一套近等基因系, 只用 2 个引物组合, 就找到 2 个 AFLP 标记, 并分别将它们定位到第 1、第 9 染色体上。随着 AFLP 技术的进一步完善, 许多植物已经有了 AFLP 图。

5.1.3 利用 AFLP 快速鉴别与目的基因紧密连锁的分子标记

定位克隆技术是分离未知产物基因的重要技术, 基本前提是基因定位, 然后以紧密连锁的分子标记为起点, 通过染色体步行, 最终克隆基因。所以要克隆基因, 必须鉴别与目的基因相连锁的分子标记。

近年来, 一种新的称为分群分析法 (Bulk Segregate Analysis, BSA) 的方法已发展起来, 用于鉴定与目的基因连锁的分子标记。Arnheim 等于 1985 年开始提出这种方法^[2], 但它是用 RFLP 来做, 用 RFLP 的缺点是找出多态性的效率比较低。Meijer 和 More 等^[29]用这种方法找到三个与莴苣霜霉抗性基因相连锁的 RAPD 标记, 但 RAPD 方法的效率也不是很高。

Colwyn 等^[12]提出用 AFLP 技术来筛选某一性状的连锁标记。利用 BSA 方法, 即利用两个独立的分离群体的各个个体的 DNA 的混合样品, 这两个分离群体只有个性状有差别或是同一性状的两个极端类型, 这样就等于人为地产生了一个近等基因系。Colwyn 等很快找到三个与番茄抗性基因 Cf-9 紧密连锁的 AFLP 标记。Ballvora 等^[3]也利用 BSA 法, 进行 AFLP 分析, 找到了与抗线

虫基因紧密连锁的 AFLP 标记。美国普渡大学 Dweikat I.^[78]以小麦近等基因系为材料, 通过 AFLP 分析定位了抗麦蝇(Hessianfly)基因 H6 和 H9。德国 Max-Planck 研究所发现了马铃薯 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 0.8cM。我国中科院遗传所王斌等^[78]用 AFLP 方法对光温敏核不育水稻及其可育恢复突变体进行了多态性分析, 找到了与其不育基因连锁的分子标记, 并用 AFLP 方法对多种作物的多态性进行了比较研究。

5.1.4 AFLP 辅助的选择育种

今天的作物品种是多年直接选择和间接选择的结果, 随着有关的品种或种中理想性状的转移, 品种逐步得到改良, Tanksley^[44]认为这一过程需要用带理想性状的材料与需改良的品种相杂交, 再经过选择获得。而在植物轮回选择育种过程中, 亲本基因组对于子代的品种种质贡献是不同的, 这对于选择是一个很重要的问题, 利用 AFLP 技术有助于克服早期选择的盲目性。

美国农业部土壤排水研究站的 Vantori^[50]等研究了大豆回交选择过程中, 亲本基因组 DNA 对于子代的贡献。他们选择了 30 个材料, 其中 6 个亲本材料(2 个亲本是本地适应性品种, 4 个是外地品种), 14 个第一次回交选择的材料, 10 个第二次回交选择的材料。利用一对引物, 进行 AFLP 分析, 研究结果发现, 经过 2 次回交选择, 2 个适应性亲本在后代的基因组中占 75%, 而 4 个外地品种只占后代基因组成分的 25%。平均每对 AFLP 引物可以产生 10 个多态性标记, 10 对 AFLP 引物可检测出 100 个位点的纯合或异质程度。这个试验表明, 根据 AFLP 标记, 可以进行回交选择, 可以跟踪基因的转移情况, 如果 AFLP 标记与要选择的基因紧密连锁, 这样就可以在早期筛选植物分离群体中含目的基因的植株。

美国 TexasA&M 大学的 Reddy^[78]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 Genescan 672 软件分析 64 个 AFLP 引物的扩增结果, 在杂交后代 F2 群体中发现 300 个标记与亲本的长绒和高产性状有关。美国生命技术公司的 Liu J. J.^[78]利用 AFLP 技术研究大豆的数量性状, 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。

5.1.5 利用 AFLP 技术研究基因表达与调控

基因的表达, 首先要转录出 mRNA, 再翻译成蛋白质, 而后控制生物代谢过程。研究基因表达的传统方法是利用 cDNA 文库筛选和 Northern 杂交, 但这种方法不能同时比较植物发育的不同时期^[28]。近年来已经利用 AFLP 衍生的 cDNA -AFLP 技术, 来研究基因表达。

在过去, 人们研究了编码主要贮藏蛋白的基因, 并分离了与淀粉合成有关的基因, 但是, 人们不知道块茎器官发生的基因表达及调控过程。Christian 等^[11]采用 cDNA AFLP 技术研究了马铃薯块茎发育过程基因表达。利用 3 个引物组合, 进行块茎发育不同时期(1-10d)的 cDNA AFLP 分析, 得到了 2 个块茎特异转录的片段 TDFs (TDF₅₃₁ 和 TDF₅₃₆), 2 个 TDFs 片段是与决定块茎形成的关键基因 *lox* (脂肪氧合酶)高度同源的, 这一点已由序列分析证实。经 Northern 杂交, 发现这两个 TDFs 具有差异表达模式, TDF₅₃₁ 在 0-2d 低水平表达, 然后稳定增加, 到第 10d 达到高峰, TDF₅₃₆ 在第 6d 表达, 而后增加。到第 10d 达到高峰。而且 TDF₅₃₁ 和 TDF₅₃₆ 在块茎中表达最高, 但在根、茎、叶中没有表达。这表明 AFLP 研究基因表达是非常有效的方法, 可同时比较植物发育的不同时期以及分离某些重要基因。

5.1.6 分类和进化研究

品种间存在较多的形态差异, 这些差异在农业上很重要, 也是致力于系统发育关系研究的分类学家所关注的。过去, 人们利用 RFLP 技术进行分类及进化研究^{[39] [52]}, 但 RFLP 技术比较费时, 需大量探针。现在, 由于 AFLP 技术可在一次实验中同时检测到更多的多态性片段, 有助于遗传差异的更完全综合和在相似群进一步分类, 因而用于鉴定不同品种, 进行分类和研究。Smith^[38]等通过 AFLP 分析对 44 个玉米自交系进行了聚类分析, 揭示了玉米自交系间的联系。Rolf 等^[35]利用 AFLP 技术, 对 24 个马铃薯胞囊线虫进行了分类。这些作者认为 AFLP 技术与 RFLP、RAPD 技术产生相似的分类, 但 AFLP 技术比 RFLP、RAPD 技术更容易。

5.2 应用 AFLP 分子标记取得的研究进展

5.2.1 AFLP 技术在微生物方面的研究进展

5.2.1.1 用于细菌的分型和分类

自 Zabeau, Vos 建立 AFLP 技术^[63]以来,其在细菌的分型和分类方面的应用越来越多。Valsangiacom 等^[48]首先成功地将 AFLP 技术应用于嗜肺军团菌的分子分型。他们采用单酶切,对来自环境和病人的军团菌进行研究,证实了 AFLP 分型具有快速、有效和重现性好的优点。随后, AFLP 相继用于大肠杆菌、根瘤土壤杆菌^[24]、表皮葡萄球菌^[37]、单核细胞增生李斯特氏菌等^[1]的分型。Janssen 等^[17]利用 AFLP 技术对总共 147 个菌株(包括黄杆菌属、气单胞菌属、梭状杆菌属、不动杆菌属、假单胞菌属和弧菌属)进行了分析,他们采用了双酶切,一条引物用放射性标记,在 5%的聚丙烯酰胺凝胶上电泳得到了 30-50 个 80-550bp 的可见片段。经高分辨的扫描仪扫描和计算机辅助分析,得到了其相似性系数。并认为 AFLP 技术可以在亚属的水平上对细菌进行分类和鉴定,且分析结果与 DNA-DNA 杂交、细胞脂肪酸分析法分析结果都具有较好的一致性。进一步研究表明, AFLP 技术在区别高度相关的菌株(属于同一个种或同一个生物型的菌株)方面颇具潜力。Stephen 等^[42]利用 AFLP 技术对 138 株弯曲杆菌进行分析,揭示了其分类与流行病学的关系。

5.2.1.2 用于微生物的鉴定

细菌感染是全世界致病率和死亡率的一个重要的因素,对其快速准确的鉴定至关重要的。菌株的鉴别可以帮助选择治疗方案。Velappan 等^[51]利用酶切 AFLP 方法对芽胞杆菌属(炭疽芽胞杆菌、蜡样芽胞杆菌、苏云金芽胞杆菌)、大肠杆菌、耶尔森氏菌和金黄色葡萄球菌进行菌株的鉴定,通过仔细的选择 AFLP 引物获得很高的重复性和敏感性,证明了 SE (Single enzyme) AFLP 在病原菌的鉴定上具有很大的价值。Gibson 等^[14]利用 AFLP 技术,也用单酶切的方法鉴定了来自 28 个病人的 46 株幽门螺杆菌,得到的 AFLP 图谱可以区分来自不同个体的菌株,同时证实一些家庭成员所分离菌株存在共同来源。与其它基因鉴定方法相比较, AFLP 具有快速简便、结果可重复、分辨力高的特点。

AFLP 技术也同样运用于真菌的分类和鉴定方面。如酵母在形态和生理的特征不同仍是其分类的主要依据,然而随着分子生物技术的发展,一个基因一个突变否定了很多特征,使得生物学种的概念在酵母分类上受到限制。且用杂交来研究酵母变得非常困难,并且不适合酵母的日常鉴定。而一些 DNA 分子方法如染色体组型、RFLP 和 PCR 等技术用于酵母的研究,都有一定的局限性。近来, Miguel de Barros Lopes 等人^[31]在分析酵母的一些商业菌株、参比菌株和酒类分离菌株的遗传差异,结果表明 AFLP 技术与传统的生理方法,半特异 PCR 和 26S rRNA 分析的结果是一样的,表明 AFLP 技术鉴定菌株的可靠性。进一步研究,发现用基因内区引物 PCR 技术不能区分来自同种酒但不同年份分离得到的 *Saccharomyces bayanus* 菌株 AWRI1266 和 AWRI948; 而用 AFLP 技术却能轻易地将其辨别,表明 AFLP 技术在辨别真菌菌株方面具有较高的分辨能力。

5.2.1.3 用于基因多样性和流行病学的调查

细菌为单细胞微生物,其基因易发生突变、移位等。了解其基因的多态性对流行病学的调查具有重要意义。Jiang 等^[18]利用 AFLP 技术采用双酶切对 20 年来在霍乱暴发期间取自于不同地点的临床和环境的 74 株霍乱弧菌进行了分析。其结果表明了霍乱弧菌基因多样性。大量霍乱的流行是由独立进化的致病性霍乱弧菌引起,环境中非致病的霍乱弧菌也可以成为下次流行中的致病菌。Terefework 等^[46]利用荧光 AFLP 技术分析山羊豆根瘤菌基因的多样性,进一步证实了 AFLP 技术在基因多样性分析中的应用。它能更好地鉴别微生物,在流行病学的监测中能迅速证明病原菌。对那些关系亲近的物种来说, AFLP 能根据基因距离推断出种系关系。

5.2.1.4 用于衣原体、真菌等的全基因组分析

Meijer 等^[29]利用 AFLP 分析了 19 株肺炎衣原体、21 株沙眼衣原体、6 株鸚鵡热衣原体和一株羊群衣原体基因组之间的关系。发现 19 株肺炎衣原体基因组指纹图相同,而来自人、鼠和猪的沙眼衣原体互不相同,鸚鵡热衣原体可分为长尾鸚鵡型、鸽型和猫科型三种。羊群衣原体与其它衣原体均不相同。并

证明了 AFLP 技术在用于衣原体分型方面优于其它全基因分型方法,它具有所需模板少、结果可靠、灵敏度高的特点。Jullian 等^[21]利用 AFLP 技术进行了植物真菌病的分析。也获得了很好的效果。在大型真菌方面:贾建航等^[69]利用 AFLP 技术对香菇的空间诱变体和原菌种建立了指纹图谱,为食用菌的空间变异提供了了分子生物学证据。孟宇等^[73]用 AFLP 技术建立了糙皮侧耳的指纹图谱,对不同产地的侧耳菌株进行了亲缘关系分析并回收了部分多态性产物做进一步研究。

5.2.2 AFLP 技术在植物学方面的研究进展

5.2.2.1 绘制指纹图进行品种鉴定

与 RAPD、RFLP 比较, AFLP 法构建的指纹图谱具有重复性好、灵敏度高的优点,展示了 AFLP 技术特别适合品种鉴定的应用价值和广阔前景。周志勇等^[83]采用双酶切的方法,将 AFLP 技术应用于人参、西洋参基因组指纹图谱,发现二者在遗传上有较近的亲缘关系,但引种到我国吉林的西洋参与西洋参基因组 DNA 相比有一定变异。证明了 AFLP 分子标记技术有望成为一种独立的、确实可行的手段,用于人参、西洋参及其他药用植物品种的鉴别。祝军等^[84]用这一技术绘制了我国 25 个重要苹果品种的 AFLP 指纹图谱,作为不同品种间的鉴别标签,区分供试的所有 25 个重要的苹果品种,其中包括红富士 短枝红富士、金冠 金矮生、元帅 新红星和旭威赛克 4 对突变系品种。周春玲等^[83]利用 AFLP 技术绘制了菊属植物的指纹图谱,比较了栽培菊花和野生近缘种之间、栽培菊花种之间的亲缘关系远近及相似性系数,区分了滁菊、毫菊、甘菊、毛华菊、菊花脑等品种。利用 AFLP 进行品种鉴定也同样已经运用于其它一些重要的经济花卉如牡丹、长绿杜鹃、萱草等。

5.2.2.2 构建遗传图谱及基因定位

AFLP 结合 BAS (分群分析法)可进行基因的快速定位。Ballvora^[3]利用 AFLP 技术结合 BSA 法精确定位了马铃薯的根包囊线虫抗病基因 Grol。AFLP 技术能找出因基因枪法或完整细胞电穿孔而产生的转基因大米中发生的隐藏的基因改变^[34]。

Dewikat 等^[72]以小麦近等基因系为材料定位了小麦抗麦蝇基因 H6 和 H16, 并分别找到了 H5、H6、H10、H16 紧密连锁的 AFLP 标记。Van der vort^[76]等用 AFLP 技术定位土豆孢囊线虫的抗性基因, Qi 等和 Beeker 等^[76]在小麦以及 Keim 等^[76]先后在大豆等多种农作物中建立了高密度的 AFLP 标记遗传图。白建荣等^[64]分析了栽培小麦和簇毛麦的 AFLP 图谱变化, 以用 AFLP 分子标记鉴定带有抗白粉病的小麦易位系。何光华等^[67]对野败型杂交水稻恢复基因的 AFLP 标记进行了研究。陈万权等^[65]利用 AFLP 分析将大麦部分抗性品种 Vada 对叶锈病的 4 个数量抗性基因分别定位在 1, 2, 6, 7 上离短臂末端分别为 79cM, 186 cM, 58 cM, 117 cM 处。熊立仲等^[81]在水稻中用 AFLP 分析, 并绘制了一张含 612 个分子标记位点的遗传连锁图。X. Qi 等^[58]用 AFLP 标记在大麦中构建了高密度分子图谱。发现在重复序列中只要有一个碱基对缺失或插入, AFLP 技术就能检测出。Charles. W. Stuber 等^[9]用 AFLP 技术对杂种优势进行了遗传学因素的研究。结果认为杂种优势不仅由基因的超显性所致, 其中的 QTL 的影响是一个不可忽略的因素。Paul Keim 等^[33]用 AFLP 技术对大豆作连锁图时发现要是某一标记与另一标记的距离小于 35 cM 且这一标记的插入不会引起距离的显著变化, 则该标记将永久的插入连锁框架图中。X. Qi 等^[57]在许多研究者试图用 SSR 对大麦作图难以实现的情况下用 AFLP 技术对其作图取得了较为理想的成功。Yong 等^[62]用该技术对水稻基因组中具体的变异标记进行了克隆。

果树作为重要经济作物其遗传高度杂合, 且大多数自交不亲和, 所以很难获得纯系, 也就难以获得合适的群体。果树作物的遗传图谱发展迅速主要得益于双假测交理论的提出和分子标记技术的发展。目前, 苹果、桃、柑橘、梨、葡萄、香蕉等主要果树作物都具有了遗传连锁图谱。Lu 等^[26]用一个 F2 群体构建了桃砧木 AFLP 遗传连锁图 153 个标记, 分布在 15 个连锁群, 覆盖 1297cM, 平均图距 9.1cM。AFLP 标记在两个芒果品种(Keitt × Tommy)杂交 F1 代呈孟德尔分离的标记占 53.99%, 适合于进一步构建遗传连锁图^[65]。在不同基因型和作图群体中, AFLP 标记的同源性得到一定程度的证实^[55], 因而在整合遗传连锁图谱上潜力很大, Sosinski 等^[41]整合了桃的来自 3 个不同群体的遗传图谱, 其中主要是 AFLP 标记。

5.2.2.3 辅助育种

AFLP 标记能灵敏的检测到作物品种或亲本间的遗传关系,对亲本进行分类从而在育种实践中指导亲本的选配、增加育种工作的预见性,避免传统育种的盲目性。另外,由于 AFLP 标记能稳定、快速和准确的检测作物基因组 DNA 的差异,利用该标记进行检测,打破目标基因和不利基因之间的紧密连锁,选择具有目标基因又不具有不利基因的新种质资源,对农作物改良有其十分重要的意义,尤其是在遗传基础相对狭窄的作物如小麦等具有十分广阔的前景。同时 AFLP 为保护种子权,法院裁决有关种子方面的纠纷也提供了强有力的工具。

目前, AFLP 标记在作物育种中已得到广泛的应用。吴敏生等^[80]用 AFLP 标记对玉米杂交种产量,产量杂种优势进行了预测,发现当自交系关系相互间较远时;分子标记遗传距离与产量、杂种优势不相关,只有当亲缘关系很近时,才表现出相关。同时他们还采用 AFLP 标记对玉米自交系进行聚类分析将 17 个自交系划分为六类。可见 AFLP 的出现为杂种优势群的划分提供了一个新的方法。邵映田等^[75]用 AFLP 标记找到了小麦抗条锈病基因 Yr10 的特异条带,该标记可用于 Yr10 基因的快速、有效、准确的检测。白建荣^[64]等对 4 个小簇麦及亲本和抗源供体簇毛麦进行了 AFLP 分析,确定了 4 个小簇麦是均含有一段簇毛麦 DNA 的易位系。表明 AFLP 也是一种准确、快速鉴定易位系的有效方法。侯磊等^[68]找到了鉴别珍汕 97 不育系与保持系细胞质的 AFLP 标记。

5.2.3 AFLP 技术在动物方面的研究进展

5.2.3.1 构建遗传图谱

遗传图谱的构建是遗传学研究的一个重要的领域,是对基因组进行系统性研究的基础,也是动植物遗传育种和人类遗传病诊断的依据,将使标记辅助选择技术的应用成为现实,从而可能从根本上改变传统的育种方法,进一步改良家禽品种和大幅度提高家禽生产效率。构建高饱和度的遗传图谱有助于对一些重要经济价值的基因进行定位和克隆,加速优良品种的培育,缩短育种时间。因传统的遗传标记如形态标记(Morphological marker)、细胞标记(Cytological

marker)、生化标记(Biochemical marker)等构建遗传图谱,分辨率较低,标记少,图距大,饱和度低,应用价值十分有限。随着分子生物学的发展,使利用 DNA 水平上的变异作为遗传作图成为可能,从而诞生了一种现在被广泛使用的重要的 DNA 分子标记。目前应用于构建动植物遗传图谱的分子标记主要有 RAPD、AFLP 等。而 AFLP 技术具有 RFLP 的可靠性和 RAPD 的简便灵敏性,并且不需要知道基因组序列等优点,广泛应用于植物基因组图谱的构建。由于商品出售的 AFLP 试剂盒主要都是针对植物的,故 AFLP 技术在动物上的应用还不多,但其是一种十分理想和有效的遗传标记。

Thomas 等^[71]利用 AFLP 植物基因图谱试剂盒构建了尼罗罗非鱼的遗传图谱,筛选出 12 个 AFLP 引物,共产生了 112 个 AFLP 标记,证实了利用 AFLP 技术构建动物高密度遗传连锁图的可行性。AFLP 技术在动植物的遗传连锁图谱的构建方面已开展了许多工作。近来,AFLP 技术在海洋动物中的应用也已开展,如用于虹鳟遗传连锁图谱的构建以及鲑鱼的遗传分析等。

5.2.3.2 遗传多样性的研究

随着分子遗传学技术的发展,对遗传变异的分析已经从表型、蛋白质多态性深入到 DNA 分子水平,利用 DNA 多态性能更全面、准确地分析种群的遗传变异,还可以进行种群亲缘关系分析,即计算种群间的遗传距离。

家蚕是一种重要的经济昆虫,以生产茧丝出口为国家创造外汇,因此利用分子标记技术研究家蚕多态性,对寻找有重要经济价值的基因资源具有极其重要的经济价值。万春玲等人^[77]在用 AFLP 技术对植物遗传多态性研究的基础上,将 AFLP 技术用于家蚕的遗传多态性研究。结果发现在家蚕中同样具有丰富的 AFLP 标记的多态性。由此表明,AFLP 技术亦适合研究家蚕等昆虫类动物的遗传多样性。AFLP 技术还可以用于鱼类遗传多样性分析,Z. Liu 等于 1998 年利用 8 个引物组合用于分析 Catfish 的遗传多样性^[71],发现在 Channel Catfish 种内的多态性较低,而在 Channel Catfish 和 Blue Catfish 种间的多态性却很高,有 38.6%-75.7%的多态性,每个引物组合能产生 70-200 以上条带。

Cervera 等^[7]对粉虱(*Bemisia*)3 个种和 9 个参考生物型的 13 个种群进行了 AFLP 研究,共得到 354 条多态带,结果表明 *B.tabaci* 的生物型可以聚类在一

起, 聚类形成 4 个分支, 其间的最小相似性指数为 0.32, 而与其它的两个种的相似系数是 0.07。此结果与以前 RAPD 所得的结果相似。

5.2.3.3 动物的性别鉴定

Griffiths 等人^[71]1999 将 AFLP 技术用于鱼类性别鉴定, 并且在 Three-spined Stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) 中分离到了两个与性基因紧密连锁的 AFLP 标记, 采用 Gal F/Gal R 引物组合, 用于刚产生鱼苗(年龄<1 天)性别鉴定, 虽然没有形态学特征的支持, 仍然得到了鉴别雌性和雄性的染色体带型的比例约为 50/50(N=224, Female=118, Male=126), 表明引物组合 Gal F/Gal R 具有极高的灵敏度, 可以用于微小组织进行性别鉴定, 同时也可以用于活动物的性别鉴定。在一些种的遗传性鉴别中, AFLP 可以识别 XY 或 WZ 性染色体, 与用核型分析或通过育种鉴别的结果是一样的, 并且比它们更简便快速。由于一些种的性特异 DNA 序列非常小, 以至不能用细胞学的方法来进行性别鉴定, 而采用 AFLP 技术却能成功地进行性别鉴定。AFLP 技术虽然在一些硬骨鱼中获得了与性基因紧密连锁的 AFLP 标记, 但由于一些种的性鉴别机制不同而不能用于整个硬骨鱼类。目前, AFLP 技术还可以用于虾类和鸟类的性别鉴定^[15]。

5.2.3.4 基因定位及克隆

大多数代表重要经济价值的性状, 如产量、品质、成熟期等表现为数量性状的遗传特点, 受到数量基因座位(QTL)和环境因子的共同作用。传统的数量性状将控制数量性状大多基因作为一个整体, 无法确定 QTL 的数目, 单个 QTL 的遗传特征及其在染色体上的位置。随着分子遗传技术的进步, AFLP 标记将各种动物(家禽、鱼类、海洋动物等)的遗传图谱研究推向实用化, 通过基因定位, 将一些控制表型性状的基因定位于某一染色体特定区域, 并测定基因在染色体上线性排列的顺序和相互间的距离。特别是人类基因组计划(HGP)的实施, 大大地推进了对动物的基因作图工作。目前已有报道利用 AFLP 标记构建了家禽、牛、羊、猪、鱼等动物的连锁图谱^[71], 找到目的基因的侧翼紧密连锁的 AFLP 标记, 然后利用这些标记筛选大片段的 DNA 文库, 得到与分子

标记有关的克隆，继之分离到目的基因，如抗病基因。

6 结语

许多年来，人们一直希望能定向地改变生物的某些性状，定向克隆某些基因，将某些生物的优良基因定向导入另一生物中。AFLP 分子标记的问世和发展为定向地对动、植物进行遗传操作和改良，提供了可能性，在今后的几年中，AFLP 技术将日益成为遗传学家和分子生物学家手中的有效工具。AFLP 可以加速获取重要基因的进程，AFLP 与 BSA(分群分析法)结合，可以更快找到与目的基因紧密连锁的分子标记，以 AFLP 标记为起点，通过染色体步行或更新的技术，定位克隆某些重要基因。在过去几年里，利用定位克隆方法已克隆了许多基因。AFLP 的进一步发展，必将克隆更多的基因，包括许多功能未知的基因。AFLP 分子标记也将是数量性状基因(QTL)研究的有效工具，当已知的显著表型突变型的简单等位基因已在图上定位时，这种分析就可简化 QTL 的鉴定，并可对 QTL 实施操纵。进行许多育种的目的是将基因从一个亲本转移到另一个亲本，传统方法是采用回交，有很大的局限性。而用 AFLP 方法，可以跟踪外源基因，克服回交的缺点。AFLP 技术现在正逐渐与已有的育种程序结合起来，育种进程势必将因此大大加快，AFLP 技术也很可能成为商业育种中尽快取得经济效益的一种技术。此外，AFLP 分子标记技术还将在生物多样性、系统发育、基因表达、微生物鉴定、杂种优势预测等与遗传和育种有关的领域作出贡献。

参考文献

1. Aarts HJM, Hakemulder LE, Van Hofe AMA *etal.* 1999. Genomic typing of listeria monocytogenes strains by automated laser fluorescence analysis of amplified fragment length polymorphism fingerprinting pattern. IJFM. 95-102.
2. Arnheim N, Strange C, Erlich H. 1985. The bulk segregate analysis based on RFLP mapping. Proc Natl Acad, USA. 82: 6970-6974.
3. Ballvora A. 1995. Marker enrichment and high-resolution map of the segment of potato chromosome VI 1 harboring the nematode resistance gene Grol. Mol Gen Genet. 249(1): 82-90.
4. Beeker J, Vos P, Kuiper M *etal.* 1995. Combined mapping of AFLP and RFLP markers in barley [J]. Mol Gen Genet. 249(1): 65-73.
5. Botstein D R, White R L, Skolnick K and Davis R W. Construction of a genetic map in man using restriction fragment length polymorphism. 1980. Am J Hum Genet. 32: 314-331.
6. Burr B *etal.* 1983. Genetic Engineering. New York: Plenum press, 5: 45-49.
7. Cervera M T, Cabezas J A, Simon B *etal.* 2000. Genetic relationships among biotypes of *Bemisia tabaci* based on AFLP analysis. Bull Entomol Res. 90(5): 391-396.
8. Chalhoub B A, Thibault S, Laucou V, Rameau C, Hofte H, Cousin R. 1997. Silver staining and recovery of AFLP amplification products on large denaturing polyacrylamide gels. Biothchniques. 22(2): 216-220.
9. Charles, Wsruber Stephen, E Lincoln David *etal.* 1992. Identification of genetic factors contributing to heterosis in a hybrid from two elite maize inbred lines using molecular markers. Genetic. 132: 823-839.
10. Cho Yong-gu, Blair M W, Panaud O. 1996. Level of polymorphism and gentic mapping of AFLP markers. Genome. 39(2): 372-378.
11. Christian W B, Bachem R S, Steef M. 1996. The Plant Journal. 9(5): 745-753.
12. Colwyn M T, Vos P, Zabeau M. 1995. Molecular mapping of potato chromosomes. The Plant Journal [J]. 8(5): 785-794.
13. Desmarais E, Lanneluc I, Lagnel J *etal.* 1998. Direct amplification of length

- polymorphisms (DALP), or how to get and characterize new genetic markers in many species. *Nucleic Acids Res.* 26(6): 1458-1465.
14. Gibson J R, Slater E, Xerry G, *etal.* 1998. Use of an amplified fragment length polymorphism technique to fingerprinting and differentiate isolates of *Helicobacter pylori*. *J. Clin. Microbiol.* 36: 2580-2585.
 15. Giffiths R *etal.* 1999. Cloning and mapping of variety-specific genomic DNA sequences: amplified fragment length polymorphism (AFLP) from silver stained polyacrylamide gels [J]. *Molecular Ecology.* 8: 671-674.
 16. Heun M *etal.* 1991. A restriction fragment length polymorphism map for *Neurospora crassa*. *Genome.* 34: 437-447.
 17. Janssen P, Coopman G, Huys J *etal.* 1996. Evaluation of the DNA fingerprinting method.
 18. AFLP as a new tool in bacterial taxonomy. 1996. *Microbiology.* 142: 1881-1893.
 19. Jiang S C, Matte M *etal.* 2000. Genetic diversity of clinical and environmental isolates of vibrio cholerae determined by amplified fragment length polymorphism fingerprinting. *Applied and Environmental Microbiology.* 66(1): 148-153.
 20. Jones C J. 1997. Reproducibility testing of RAPD, AFLP and SSR markers in plants by a network of European laboratories. *Mol Breed.* 3: 381-390.
 21. Julian M C, Acero J, Salazer O *etal.* 1999. Mating typing correlated molecular markers and demonstration of heterokaryosis in the phytopathogenic fungus *Thanatephorus cucumeris* AGI-IC by AFLP DNA fingerprinting analysis. *Journal of Biotechnology.* 67: 49-56.
 22. Lander E S, Botstein D R. Restriction fragment length polymorphism can differentiate among U S maize Hybrids. 1989. *Genetics.* 121: 185-199.
 23. Lander E S, Green P. 1987. Development of the DNA fingerprinting method. *Genomics.* 1: 174-181.
 24. Lin J J, Kou J, Ma J *etal.* 1996. A PCR based on DNA fingerprinting technique: AFLP for molecular typing of bacteria. *Nucleic Acids Research.* 24(18): 3649-3650.
 25. Luo L J *etal.* 1998. RFLP mapping and race specificity of bacterial blight resistance genes (QTLs) in rice. *Science In China.* 41(5): 542-547.

26. Lu Z X *etal.* 1999. The application of AFLP fingerprinting in Peach. *Theor Appl Genet.* 99: 1-2, 115-122.
27. Martin G B *etal.* 1993. Map based cloning of protein kinase gene conferring disease resistance in tomato. *Science.* 262: 1432-1436.
28. McClelland M, Mathieu D F, Welsh J. 1995. *Trends Genet.* 11: 242-246.
29. Meijer A, More S A, Savelkoul P H M *etal.* 1999. Genomic relatedness of chlamydia isolates determined by amplified fragment length polymorphism analysis. *Journal of Bacteriology.* 181(15): 4419-4475.
30. Meksem K *etal.* 1995. *Mol Gen Genet,* 249(1): 74-81.
31. Miguel de Barros *etal.* 1999. *Int J Systematic bacteriology.* 49: 915-924.
32. Mueller U G, Wolfenbarger L L. 1999. AFLP genotyping and fingerprinting. *Trends Ecol.* 14(10): 389-394.
33. Paul Keim, James M Schpp, Steven E Travis *etal.* 1997. A high density soybean genetic map based on AFLP markers. *Cell Biology & Molecular Genetics.* 37: 537-543.
34. Ridout C J, Donini P. 1999. Use of AFLP in cereals research. *Trends in Plant.* 4(2): 76-79.
35. Rolf T F. 1996. *Molecular-plant- microbe-interactions.* 9: 47-54.
36. Roman B L, Pham V N, Bennett P E *etal.* 1999. Non-radioisotopic AFLP method using PCR primers fluorescently labeled with Cy5. *Biotechniques.* 26(2): 236-238.
37. Sloos J H, Janssen P, Boven C *etal.* 1995. AFLP™ Typing of staphylococcus epidermidis in multiple sequential blood cultures. *Res Microbiol.* 149: 221-228.
38. Smith J S C, Zabeau M, Wright S. 1993. Associations among inbred lines as revealed by RFLP and amplified fragment length polymorphism (AFLP). *Maize Genetics Cooperation Neusletter.* 67: 62-64.
39. Song K M, Osborn T C, Williams P A. 1988. *Theor Appl Genet.* 75: 784-794.
40. Song W Y *etal.* 1995. A receptor kinas like protein encoded by the rice disease resistance gene, Xa21. *Science.* 270: 1804-1806.
41. Sosinski B *etal.* 1998. A high-density genetic map of peach based on AFLP markers. *Acta Hort.* 465: 61-68.
42. Stephen L W, Harrington C S. 2000. Identification of taxonomic and epidemiological

- relationships among *Campylobacter* species by numerical analysis of AFLP profiles. *FEMS Microbiology Letters*. 193: 161-169.
43. Suazo A, Hall H G. 1999. Modification of the AFLP product applied to honey bee (*Apis mellifera* L) DNA. *Biotechniques*. 26(4): 704-705.
 44. Tanksley S D. 1982. Comparative linkage maps of the rice and maize genomes. *Plant Mol Biol Rep*. 1: 3-8.
 45. Tanksley S D *et al.* 1989. Rapid identification of markers linked to a pseudomonas resistance gene in tomato by using random primers and near- isogenic lines. *Bio-technology*. 7 :257-264.
 46. Terefework Z, Kaijalainen S, Lindstrom K. 2001. AFLP fingerprinting as a tool to study the genetic diversity of *Rhizobium galegae* isolated from *Galega orientalis* and *Galega officinalis*. *Journal of Biotechnology*. 91: 169-180.
 47. Thomas C M *et al.* 1995. Identification of amplified restriction fragment polymorphism (AFLP) markers tightly linked to the tomato Cf-9 gene for resistance to *Cladosporium fulvum*. *The Plant Journal*. 8(5): 785-794.
 48. Valsangiacomo C, Baggi F, Gaia V *et al.* 1995. Use of amplified fragment length polymorphism in molecular typing of legionella pneumophila and application to epidemiological studies. *J Clin Microbiol*. 33: 1717-1719.
 49. Van der Wuff A W, Chan Y L A *et al.* 2000. TE-AFLP: combining rapidity and robustness in DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res*. 28(24): E105.
 50. Vantoai T T, Peng J. 1996. Optimization of slive-staining AFLP technique for soybean (J). *Soy Gen News*. 23: 206-209.
 51. Velappan N, Sondgrass J L, Hakovirta J R *et al.* 2001. Rapid identification of pathogenic bacteria by single-enzyme amplified fragment length polymorphism analysis. *Diagnostic Microbiology and Infections Disease*. 39: 77-83.
 52. Verrier E, Colleau J J, Foulley J L. 1990. *Theor Appl Genet*. 79: 833-840.
 53. Vos P *et al.* 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*. 23(21): 4407-4414.
 54. Vos P, Kuiper M. 1997. AFLP analysis in: Caetano Anolles G, Gresshoff P *Meds. DNA*

- Markers: Protocol, Applications and Overviews. 115-131.
55. Waugh R *et al.* 1997. *Mol Gen Genet.* 255(3): 311-321.
 56. Witsenboer H, Vogel J, Michelmore R W. 1997. Identification, genetic localization, and allelic diversity of selectively amplified microsatellite polymorphic loci in lettuce and wild relatives (*Lactuca spp*). *Genome.* 40(6): 923-936.
 57. Qi X, P Lindhout. 1997. Development of AFLP markers in barley. *MOL Gen Genet.* 254: 330-336.
 58. Qi X, P Stam, P lindhout. 1998. Use of locus-specific AFLP markers to construct a high-density molecular map in barley. *Theor Appl Genet.* 96: 376-384.
 59. Xu M, Huaracha E, Korban S S. 2001. Development of sequence characterized amplified regions (SCARs) from amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers tightly linked to the *Vf* gene in apple. *Genome.* 44(1): 63-70.
 60. Xu Z Y, Chang R Z *et al.* 2000. Comparison of the different DNA molecular markers on the polymorphic information content. *J Plant Genetic Resources.* 4(1): 41-46.
 61. Yan G, Romero-Severson J, Walton M *et al.* 1999. Population genetics of the yellow fever mosquito in Trinidad: comparisons of amplified fragment length polymorphism (AFLP) and restriction fragment length polymorphism (RFLP) markers. *Mol Ecol.* 8(6): 951-963.
 62. Yong Gu Cho, Matthew W Blair, Olivier Panaud *et al.* 1996. Cloning and mapping of variety-specific rice genomic DNA sequences: amplified fragment length polymorphism (AFLP) from silver-stained polyacrylamide gels. *Genome.* 39: 373-378.
 63. Zabeau M and Vos P. selective restriction fragment amplification: a gene method for DNA fingerprinting. European patent Application 92402629.7 (Publication No. 0534858A1). Eurppean Patent Office, Paris.
 64. 白建荣, 刘润堂, 郭秀荣等. 2000. 用 AFLP 标记鉴定带有簇毛麦抗白粉病基因的小麦易位系. *华北农学报.* 15(4): 29-34.
 65. 陈万权, 漆小泉, R E Niks. 1999. 利用 AFLP 遗传连锁定位大麦苗期对叶锈病的部分抗性基因. *遗传学报.* 26(6): 690-694.
 66. 房经费, 章镇等. 2000. AFLP 标记在两个芒果品种间杂交 F1 代的多态性及分离方式. *中国农业科学.* 33(3): 19-23.

67. 何光华, 裴炎, 杨光伟等. 2000. 野败型杂交水稻恢复基因的 AFLP 标记研究. 遗传学报. 27(4): 304-310.
68. 侯磊, 杨光伟, 何光华等. 2000. 水稻胞质雄性不育系珍汕 97A 及其保持系的 AFLP 标记及序列分析. 植物学报. 42(6): 591-594.
69. 贾建航, 李传友, 金德敏, 李莉云, 王斌, 翁曼丽. 1999. 香菇空间诱变体的分子生物学鉴定研究. 菌物系统. 18(1): 20-24.
70. 林红, 夏德全等. 2000. 遗传连锁图谱及其在鱼类遗传育种中的应用. 中国水产科学. 7(1): 95-98.
71. 吕振岳, 周达名, 黄东东. 2001. AFLP 标记在微生物和动物中的应用. 生物技术通报. 6: 18-22.
72. 马浙新, 周荣华, 董玉琛等. 1999. 小麦抗条锈病基因定位及分子标记研究进展. 生物技术通报. 1(1).
73. 孟宇, 蒋昌顺, 廖问陶, 张义正. 2003. 糙皮侧耳的 AFLP 分析. 遗传学报. 待发表.
74. 缪颖. 1999. AFLP 分子标记及其应用. 亚热带植物. 28(2): 55-60.
75. 绍映田, 牛永春, 朱立煌等. 2001. 小麦抗条锈病基因 Yr10 的 AFLP 标记. 科学通报. 46(8): 669-672.
76. 万春玲, 谭远德. 1999. AFLP 的一种改进方法. 南京师范大学学报(自然科学版). 22(2).
77. 万春玲, 谭远德, 朱玉芳等. 1999. AFLP 标记在研究家蚕遗传多态性方面的应用. 生物技术. 9(5).
78. 王斌等. 1996. AFLP 在作物品种多态性研究中的应用. 科学通报. 6:36-41.
79. 王斌, 翁曼丽. 1996. AFLP 的原理及其应用. 杂交水稻. 5: 27-30.
80. 吴敏生, 戴景瑞. 2000. AFLP 标记与玉米杂交产量、产量杂种优势的预测. 植物通报. 42(6): 600-604.
81. 熊立仲, 王时平, 刘克德等. 1998. 微卫星 DNA 和 AFLP 标记在水稻分子标记连锁图上的分布. 植物学报. 40(7): 605-614.
82. 周春玲, 戴思兰. 2002. 菊属部分植物的 AFLP 分析. 北京林业大学学报. 24(5): 70-75.
83. 周志勇, 周刚, 周肆清等. 2000. AFLP 法构建人参、西洋参基因组 DNA 指纹图谱. 药学学报. 35(8): 626-629.
84. 祝军等. 2000. 苹果 AFLP 分析体系的建立. 园艺学报. 27(2): 102-106.

在读期间发表及待发表论文

1. 孟宇, 蒋昌顺, 廖问陶, 张义正. 糙皮侧耳的 AFLP 分析. 遗传学报. 2003.(已录用)

声 明

本人声明所呈交的学位论文是本人在导师张义正教授的指导下进行的研究工作及取得的研究成果。据我所知,除了文中特别加以标注和致谢的地方外,论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果,也不包含为获得四川大学或其他教育机构的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示谢意。

本学位论文成果是本人在四川大学读书期间在导师指导下取得的,论文成果归四川大学所有,特此声明。

张义正
孟 宇