

AFLP — nowa metoda badawcza w genetyce roślin

Waldemar Marczewski
Zakład Genetyki i Syntezy
Materiałów Wyjściowych
Instytut Ziemniaka
Młochów

1. Wprowadzenie

Markery DNA stały się w ostatnich latach ważnym narzędziem w genetycznych badaniach roślin (1-3). Trzy podstawowe rodzaje markerów DNA: RFLP (*restriction fragment length polymorphism*), RAPD (*random amplified polymorphism DNA*) i sekwencje mikrosatelitarne różnią się sposobem identyfikacji polimorfizmu DNA. Markery RFLP okazały się szczególnie użyteczne w tworzeniu map genetycznych (4-6). Identyfikacja markerów RAPD stała się przydatna w badaniach wewnątrz i międzygatunkowego pokrewieństwa genetycznego (7,8). Natomiast markery mikrosatelitarne są wykorzystywane w badaniach alleli genetycznych (6).

Podstawą metody RFLP jest trawienie DNA enzymami restrykcyjnymi i identyfikacja fragmentów restrykcyjnych przy zastosowaniu specyficznych sond molekularnych. Natomiast przy identyfikacji markerów mikrosatelitarnych i RAPD stosuje się łańcuchową reakcję polimerazy (PCR — *polymera-*

se chain reaction). Metoda AFLP (*amplified fragment length polymorphism*) obejmuje obie te techniki. W badaniu polimorfizmu DNA stosuje się technikę selektywnej amplifikacji fragmentów restrykcyjnych (SRFA — *selective restriction fragment amplification*) (9). W przeciwieństwie do RFLP, w metodzie AFLP wymagana jest bardzo mała ilość wyjściowego DNA (10). Ponadto powtarzalność metody AFLP jest zdecydowanie większa niż metody RAPD (11).

Termin AFLP wprowadzono przez analogię do metody RFLP. Ponieważ metoda AFLP odzwierciedla obecność lub brak amplifikowanych fragmentów restrykcyjnych, a nie różnice w ich długości, jak w metodzie RFLP, autorzy metody sugerują stosowanie nazwy AFLP jako akronimu (10).

2. Procedura AFLP

Procedura AFLP obejmuje trzy etapy:

- 1) trawienie DNA i przyłączenie do fragmentów restrykcyjnych 10-30-nukleotydowych sekwencji DNA, tzw. adapterów (*adapters*);
- 2) selekcję amplifikowanych fragmentów restrykcyjnych;
- 3) identyfikację amplifikowanych fragmentów restrykcyjnych.

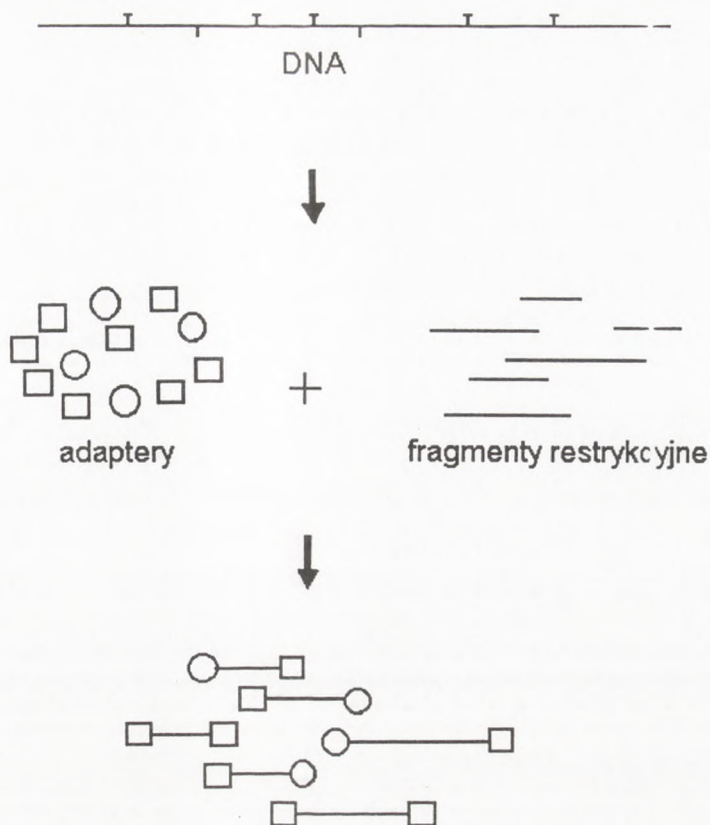
Trawienie DNA odbywa się przy użyciu dwóch enzymów restrykcyjnych, różniących się częstością występowania dla nich miejsc restrykcyjnych w łańcuchu DNA. Pierwszy enzym trawi DNA z małą częstością (*rare-cutting enzyme*, np. EcoR I), natomiast drugi trawie DNA z dużo większą częstością (*frequent-cutting enzyme*, np. Mse I). Produktami trawienia są fragmenty DNA o długości przeważnie mniejszej niż 500 par zasad. Do fragmentów restrykcyjnych dołączane są adaptory (rys. 1). Adapter składa się z dwóch części: sekwencji rdzeniowej (*core sequence*) o długości kilkunastu nukleotydów oraz sekwencji specyficznej, o układzie nukleotydów miejsca restrykcyjnego (*enzyme-specific sequence*).

Na podstawie sekwencji adapterów syntetyzowane są startery AFLP. Każdy starter składa się z trzech części:

- 1) region rdzeniowy przy końcu 5';
- 2) środkowa część odpowiadająca sekwencji miejsca restrykcyjnego;
- 3) część selekcyjna przy końcu 3'.

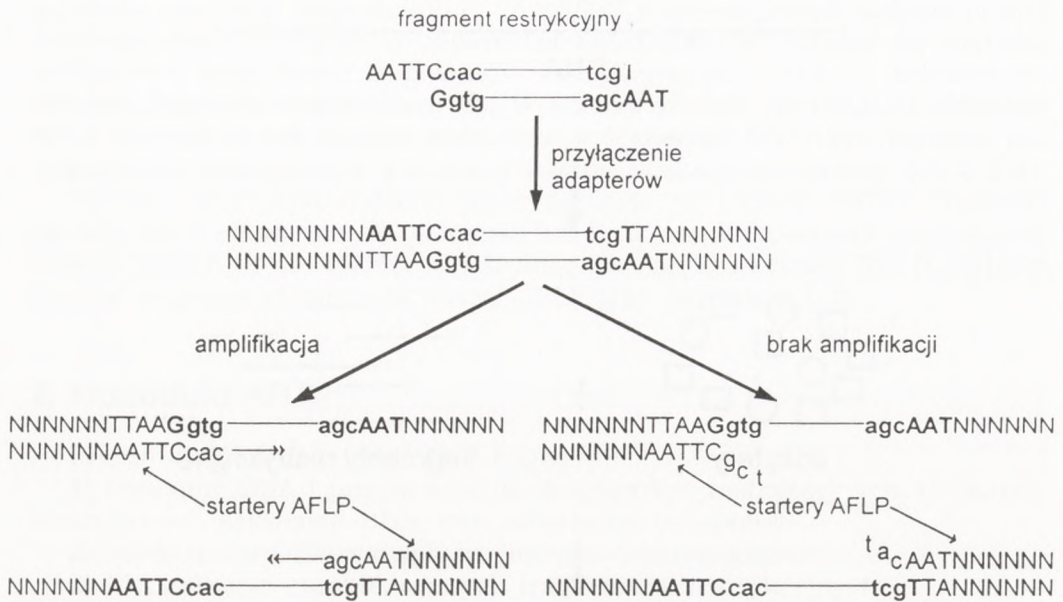
Dwie pierwsze części odzwierciedlają układ nukleotydów w sekwencji odpowiedniego adaptera. Natomiast część selekcyjna składa się z 1 do 4 nukleotydów i pełni główną rolę w selekcji amplifikowanych fragmentów restrykcyjnych.

Standardowo procedura AFLP obejmuje dwie reakcje amplifikacji. Amplifikację wstępną (*selective preamplification*), przeprowadza się stosując startery z jednym nukleotydem w części selekcyjnej. Pierwszy starter hybryduje do adaptera przyłączonego do fragmentu DNA w miejscu restrykcyjnym dla enzymu tnącego DNA z mniejszą częstością (EcoRI). Drugi starter przyłącza się do adaptera posiadającego sekwencję miejsca restrykcyjnego dla enzymu trawiącego DNA z większą częstością (MseI). Amplifikacja fragmentu restrykcyjnego następuje tylko wtedy, gdy układ nukleotydów selekcyjnych ma



Rys. 1. Schemat trawienia DNA enzymami restrykcyjnymi EcoRI (I) i MseI (T) oraz przyłączenie adapterów EcoRI (O) i MseI (□).

swój odpowiednik w końcowych nukleotydach danego fragmentu DNA. Amplifikacja wstępna jest pierwszą selekcją fragmentów EcoRI-MseI. W następnej selekcji fragmentów restrykcyjnych (SRFA) preparatem wyjściowym są produkty amplifikacji wstępnej. Stosowane są inne parametry reakcji PCR (10), a analogiczne startery posiadają standardowo 3 nukleotydy w części selekcyjnej (rys. 2). Ponadto jeden starter jest wyznakowany izotopem ^{33}P lub ^{32}P . Preferowane jest stosowanie izotopu ^{33}P z uwagi na wyraźniejsze prążki identyfikowanych fragmentów DNA. Fragmenty DNA wyselekcjonowane w drugiej reakcji amplifikacji są identyfikowane elektroforetycznie w warunkach denaturujących na 5% żelu poliakrylamidowym (12) po 1-2 dniach ekspozycji autoradiogramu. Cho i wsp. (13) wskazują na możliwość identyfikacji produktów amplifikacji metodą srebrową. Firma Perkin-Elmer proponuje automatyzację metody AFLP przez wykorzystanie fluorescencyjnej analizy amplifikowanych fragmentów oraz sekwencjonera DNA lub elektroforezę kapilarną (14). Ilość amplifikowanych fragmentów DNA może być w pewnym



Rys. 2. Schemat amplifikacji i braku amplifikacji fragmentu restrykcyjnego EcoRI-MseI metodą AFLP przy zastosowaniu trzech nukleotydów selekcyjnych (nie przedstawiono amplifikacji wstępnej). Oznaczenia: pogrubionym drukiem, z dużej litery — sekwencje miejsc restrykcyjnych dla enzymów EcoRI (z lewej) i MseI (z prawej); pogrubionym drukiem, z małej litery — układ nukleotydów selekcyjnych fragmentu restrykcyjnego; zwykłym drukiem, z dużej litery — schematycznie (NNN) części rdzeniowe adapterów i starterów EcoRI i MseI oraz części specyficzne, o układzie nukleotydów miejsc restrykcyjnych; zwykłym drukiem, z małej litery — układ nukleotydów w części selekcyjnej starterów EcoRI i MseI.

zakresie regulowana przez stosowanie różnych enzymów restrykcyjnych, zmianę ilości lub używanie zmodyfikowanych nukleotydów w części selekcyjnej startera.

Każda zasada selekcyjna startera AFLP odpowiada za 4-krotne zmniejszenie liczby amplifikowanych fragmentów restrykcyjnych, zgodnie ze wzorem:

$$\frac{2R}{4^{2n}}$$

gdzie: R — oznacza liczbę miejsc restrykcyjnych dla enzymu trawiącego DNA z mniejszą częstością

n — oznacza liczbę nukleotydów selekcyjnych dla każdego startera

Zakładając, że istnieje 100 000 miejsc restrykcyjnych dla enzymu EcoRI w łańcuchu DNA oraz 1, 2 lub 3 nukleotydy selekcyjne w każdym starterze, to odpowiednio 12 500, 781 lub 49 fragmentów DNA będzie amplifikowanych w reakcji PCR. W praktyce jednak liczba amplifikowanych fragmentów dla

każdej kombinacji starterów różni się od wartości teoretycznej. Dla 3 nukleotydów w części selekcyjnej startera ich liczba może wynosić od 10 do 200.

Zgodnie z oryginalną procedurą (9) adapter EcoRI posiada przyłączoną na końcu 5' biotyne. Umożliwia to oddzielenie fragmentów restrykcyjnych EcoRI-MseI od fragmentów MseI-MseI przy zastosowaniu specjalnych streptoawidynowych kulek jeszcze przed przeprowadzeniem amplifikacji wstępnej. W zmodyfikowanej wersji (10) etap ten został pominięty dzięki zastosowaniu parametrów amplifikacji powodujących efektywniejsze powielanie fragmentów EcoRI-MseI niż fragmentów MseI-MseI.

3. Zastosowanie metody AFLP

Metoda AFLP może być z powodzeniem stosowana w badaniach DNA niezależnie od stopnia złożoności genomu. Skuteczność metody w identyfikacji tzw. *fingerprints* stwierdzono zarówno dla DNA faga λ (48 451 par zasad) jak i dla DNA człowieka (3 miliardy par zasad) (10). W porównaniu z metodą RFLP, gdzie na podstawie jednej reakcji hybrydyzacji można uzyskać informację o kilku genetycznych loci, metoda AFLP umożliwia zidentyfikowanie 100-200 loci w jednym cyklu badań. Dzięki temu w bardzo krótkim czasie możliwe jest przebadanie polimorfizmu tysięcy genetycznych loci (15). W badaniach roślin metodę AFLP zastosowano do tworzenia tzw. gęstych map genetycznych genomu (6,11) lub jego fragmentów (15,16), a także do analizy ekspresji genów (17).

Autor dziękuje drowi Jerzemu Syllerowi i dr Ewie Zimnoch-Guzowskiej za uwagi i dyskusję. Praca finansowana z grantu KBN 6 PO4B 006 08.

Literatura

1. Tanksley S. D., Young N. D., Paterson A. H., Bonierbale M. W., (1989), *Bio/technology*, 7, 257-264.
2. Rafalski J. A., Tingey S. V., (1993), *Trends of Genetics*, 9, 275-280.
3. Marczewski W., (1995), *Postępy Biochemii*, 41(4), 237-243.
4. Gebhardt C., Ritter E., Debner T., Schachtschabel U., Walkemeier B., Uhrig H., Salamini F., (1989), *Theor. Appl. Genet.*, 78, 56-75.
5. Young N. D., Kumar L., Menancio-Hautea D., Danesh D., Talekar N. S., Shanmugasundaram S., Kim D.-H., (1992), *Theor. Appl. Genet.*, 84, 839-844.
6. Becker J., Vos P., Kuiper M., Salamini F., Heun M., (1995), *Mol. Gen. Genet.*, 249, 65-73.
7. Thormann C. D., Ferreira M. E., Camatgo L. E. A., Tivang J. G., Osborn T. C., (1994), *Theor. Appl. Genet.*, 88, 973-980.
8. Heun M., Murphy J. P., Phillips T. D., (1994), *Theor. Appl. Genet.*, 87, 689-696.
9. Zabeau M., Vos P., (1993), *European Patent Application*, publication no.: EP 0534858-A1, No. 92402629.7.
10. Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., van der Lee T., Homes M., Frijters A., Pot J., Peleman J., Kuiper M., Zabeau M., (1995), *Nucleic Acid Res.*, 18, 23(21), 4407-4414.

11. van Eck H.J., van der Voort J.R., Draaistra J., van Zandvoort P., van Enckevort E., Peleman J., Jacobsen E., Helder J., Bakker J., (1995), *Mol. Breeding*, 1, 397-410.
12. Maxam A. M., Gilbert W., (1980), *Methods Enzymol.*, 65, 499-560.
13. Cho Y. G., Blair M. W., Panaud O., McCouch S. R., (1996), *Genome*, 39, 373-378.
14. Perkin-Elmer, (1996), in: *AFLPTM Plant Mapping Kit*, (775601-001).
15. Meksem K., Leister D., Peleman J., Zabeau M., Salamini F., Gebhardt C., (1995), *Mol. Gen. Genet.*, 249, 74-81.
16. Ballvora A., Hesselbach J., Niewohner J., Leister D., Salamini F., Gebhardt C., (1995), *Mol. Gen. Genet.*, 249, 82-90.
17. Bochem C. W. B., van der Hoeven R. S., de Bruijn S. M., Vreugdenhil D., Zabeau M., Visser G. F., (1996), *Plant J.*, 9(5), 745-753.

AFLP — a new method in plant genetics

Summary

A new method called AFLP is presented. The technique involves three steps: restriction of the genomic DNA and ligation of adapters, selective PCR amplification of the restriction fragments, identification of the amplified restriction fragments. The AFLP method is a very powerful DNA fingerprinting technique for DNAs of any origin or complexity.

Key words:

AFLP, polymerase chain reaction, plant genetics.

Adres do korespondencji:

Waldemar Marczewski, Zakład Genetyki i Syntezy Materiałów Wyjściowych, Instytut Ziemniaka, Młochów, 05-832 Rozalin.