

DNA 甲基化敏感扩增多态性技术及其在作物遗传研究中的应用

张 燕, 陈 波

(西昌学院, 四川 西昌 615013)

【摘 要】DNA 甲基化是表观遗传修饰的基本方式之一,在调控植物基因表达、抵御逆境胁迫、防御外源基因侵入等方面具有重要作用,随着对DNA 甲基化研究的深入,在AFLP技术基础上衍生的DNA 甲基化敏感扩增多态性技术(MSAP),以其高通量、高多态性、低成本、易操作等优点,在作物遗传育种研究的各个领域得到广泛应用。本文综述了该技术的基本原理与操作,及其在作物遗传研究中的应用现状。

【关键词】DNA 甲基化;MSAP 技术;作物遗传

【中图分类号】Q943 **【文献标识码】**A **【文章编号】**1673-1891(2009)04-0007-05

甲基化是真核细胞DNA 修饰的方式之一,在DNA 序列中可以发生甲基化的位点有腺嘌呤的N-6位、鸟嘌呤的N-7位和胞嘧啶的N-4位以及胞嘧啶的C-5位,其中胞嘧啶的C-5位修饰是最常见的一种甲基化方式,也是目前DNA 甲基化研究的重点和热点。胞嘧啶C-5位甲基化是由S-腺苷甲硫氨酸(SAM)提供甲基基团,在DNA 甲基转移酶(DNA methyltransferases, DNMTs)的作用下,将胞嘧啶(C)甲基化为5-甲基化胞嘧啶(5-mC)的一种化学反应,这种甲基化修饰通常发生在植物基因组中对称的CG位点、CNG(N代表任何核苷酸)位点和不对称CHH(H代表A、C或T)位点,而哺乳动物中几乎都发生在CG位点^[1]。

DNA 胞嘧啶甲基化分析可以针对特定序列,也可以针对全基因组,根据检测的目的可以选择不同的分析方法。甲基化检测的方法大致可以分为三类,第一类以HPLC技术为基础,主要检测全基因组甲基化水平^[2,3];第二类以测序为基础,主要检测特定序列胞嘧啶甲基化位点^[4,5];第三类以PCR技术为基础,既可以分析全基因组甲基化水平,也能分析特异序列的甲基化位点^[6-8]。基于PCR扩增的MSAP技术可以在全基因组范围分析CG和CNG位点甲基

化模式多态性,结合测序分析还可以知道差异位点的序列信息,因此在研究中得到广泛应用。

1 MSAP 技术原理和操作^[9-15]

1.1 MSAP 技术原理

MSAP 技术由 Reyna Lopez 等于 1997 年首次报道,该技术是在 AFLP 技术基础上衍生的基于 PCR 扩增多态性的 DNA 甲基化检测方法,即将标准 AFLP 分析中使用的高频酶 *MseI* 替换成对甲基化位点敏感性不同的一对同裂酶 *HpaII* 和 *MspI*,而其余操作与 AFLP 完全一样。主要操作流程包括基因组 DNA 双酶切、人工接头连接、预扩增、选择扩增、PAGE 电泳、条带统计分析等。其基本原理如图 1 所示。

HpaII 和 *MspI* 都能识别并切割 CCGG 序列,但对该位点胞嘧啶甲基化的敏感性不同,因此可产生不同的 DNA 切割片段来揭示甲基化位点差异。*HpaII* 对于该位点双链内外侧胞嘧啶均甲基化都不能酶切,即不能酶切含^mCCGG、C^mCGG 和 C^mCGG 的位点,但它可以识别仅一条链上胞嘧啶甲基化的位点。而 *MspI* 可以识别 DNA 单链或双链上该位点内侧甲基化的胞嘧啶,但不识别外侧甲基化胞嘧啶,即不能酶切^mCCGG 的位点(如表 1 所示)。

表 1 *HpaII* 和 *MspI* 对 CCGG 位点甲基化敏感性差异

甲基化模式 及相应位点	无甲基化		双链甲基化			单链甲基化	
	CCGG GGCC	C ^m CGG GG ^m CC	^m CCGG GGCC ^m	^m C ^m CGG GGC ^m C ^m	^m CCGG GGCC	C ^m CGG GGCC	^m C ^m CGG GGCC
<i>HpaII</i>	1	0	0	0	1	1	1
<i>MspI</i>	1	1	0	0	1	0	0

注:表中“1”代表该酶能识别并酶切产生片段;“0”代表该酶不能识别并酶切产生片段。

1.2 MSAP 分析的技术流程

1.2.1 高质量 DNA 制备

DNA 提取可以采用 CTAB 法或 SDS 法大量制备,再采用苯酚-氯仿抽提法纯化,然后检测 DNA 质

收稿日期:2009-09-10

作者简介:张 燕(1979-),女,讲师,博士研究生,研究方向为玉米遗传育种。

头 M/H; 另一类是一端是接头 M/H, 一端是接头 E; 第3类是两端都是接头 E。前两类片段的产生都与 CCGG 位点有关, 是检测的目标片段, 而第三类则与 CCGG 位点无关, 属冗余条带。但由于 EcoRI 属于稀切酶, 所以这类带出现频率较低。

(2) 检测位点局限——MSAP 法只能检测全基因组范围内的 CCGG 位点的甲基化变化, 对其他位点的甲基化不能检出, 如其他的 CG 对称位点, 以及 CNG 位点等。

针对以上不足, 可以对 MSAP 技术加以改进, 如多选择几组对甲基化敏感性有差异的同裂酶, 可以增加检测位点的多样性, 进一步提高 MSAP 检测信息量, 尽量全面反映全基因组范围内胞嘧啶 C-5 位甲基化状态。

3 MSAP 技术的应用

3.1 抗逆性研究

MSAP 为研究植物对逆境胁迫的抵御机制提供了一个有力的工具, 不仅可以分析逆境胁迫前后基因组甲基化程度的变化, 还可以通过对甲基化状态变化的位点进行序列分析, 进一步克隆出参与逆境抵御的基因, 为从分子水平研究逆境胁迫机制提供关键信息。李雪林^[10]等研究了不同 NaCl 浓度下棉花幼苗生长及根基因组 DNA 的甲基化水平和变化模式, 结果表明高盐胁迫下, 棉花幼苗根基因组 DNA 甲基化率均明显低于对照, 同时与 MSAP 差异片段高度同源的基因的表达在处理与对照间差异显著。华扬^[11]等采用 MSAP 方法分析了冷胁迫下水稻 9311 叶片 DNA 胞嘧啶甲基化模式变化, 并分离和克隆了一个与水稻 cDNA 高度同源的甲基化差异片段 CIDM7, cDNA 序列为单拷贝, 全长 1422bp, 定位于日本晴 10 号染色体上。杨金兰^[12]等研究表明, 镉胁迫处理引起萝卜基因组甲基化程度的显著提高。申斯乐^[13]等的研究表明高压可导致水稻多种转座元件的激活及甲基化模式的改变。付胜杰^[14]等研究了叶锈菌感染前后, 小麦基因组的甲基化模式差异, 虽然并没有检测到稳定且特异的 DNA 胞嘧啶位点的甲基化模式变化, 但发现研究材料之间存在表观遗传学差异, 可以进一步增加选择引物的数量和同裂酶的对数进行深入研究。

3.2 发育调控与基因差异表达

DNA 甲基化对于植物的生长发育和组织分化具有十分重要的调控作用。通过研究植物在不同发育时期发生的特异的甲基化变化, 有可能找到调控该发育时期器官建成和组织分化的重要基因。陆光远^[15]等采用 MSAP 技术分析了油菜种子萌发时

不同组织和不同发育时期发生的特异性甲基化, 并对部分片段进行了序列分析, 通过比对和数据检索获得了一些可能与油菜种子发育和器官分化有关的基因片段, 为进一步研究油菜生长发育与特异基因表达调控的关系奠定了基础。柳李旺^[16]等分析了萝卜抽薹过程中 DNA 甲基化状态的变化, 结果表明在未现蕾-现蕾-抽薹过程中基因组 DNA 甲基化水平先降低, 随着花茎的伸长 DNA 甲基化水平又逐渐上升。郑鑫^[17]等采用 MSAP 方法研究高活力水稻种子萌发过程中的甲基化与去甲基化变化的规律, 结果表明水稻种子萌发过程中, 同时发生了甲基化与去甲基化作用, 且去甲基化作用先于甲基化作用发生。

3.3 种质资源鉴定

采用分子标记进行种质资源鉴定时, 常用的标记有 RAPD、SSR、AFLP、RFLP、ISSR 等, 这些分子标记都是基于 DNA 序列差异建立的, 但种质资源的遗传差异除了经典遗传学差异外, 还存在表观遗传差异, 以上分子标记都不能检测到表观遗传差异, 因此开发一种能够同时检测 DNA 序列差异和表观遗传差异的分子标记, 是进行有效的资源鉴定的前提。MSAP 是在 AFLP 基础上建立的, 因此不仅具有 AFLP 的特点, 还能检测 DNA 甲基化差异, 可以作为一种分子标记, 进行资源鉴定。洪柳^[18]等对 24 个脐橙品种之间进行 MSAP 分析, 发现在脐橙品种中 DNA 甲基化的发生频率很高。脐橙品种芽变频率高, 可能与 DNA 甲基化的频繁发生密切相关。在所用的 18 对 MSAP 引物中, 有 10 对引物可鉴别出 12 个脐橙品种, 说明 MSAP 是检测脐橙品种之间多态性的有效方法。Noyer J L^[19]等应用 SSR、AFLP、MSAP 等技术对 30 个香蕉品种的遗传分析研究中发现, 尽管品种之间的表型差异极大, 但 SSR 和 AFLP 分析均难以有效鉴别品种差异, 表明品种之间极高的遗传相似性与其单种子起源和营养繁殖方式有关, 而应用 MSAP 分析可以检测出极高的多态性片段, 并根据品种之间的 DNA 甲基化模式的不同有效区分出 30 个品种之间的差异, 表明 MSAP 技术可以比 SSR、ISSR、AFLP 等技术更多检测出基因组中的多态性位点, 在种质资源鉴定方面显示出更高的优越性。

3.4 组织培养材料的鉴定

组织培养在植物品种改良、快速繁殖、基因工程育种等各个方面发挥着重要作用, 但在培养过程中会产生体细胞变异, 导致再生植株性状变异, 严重影响其后续研究。研究表明体细胞变异与表观

遗传的改变特别是 DNA 甲基化密切相关,因此分析组织培养材料的甲基化模式变化显得尤为重要。Joyce S M^[20]等应用 MSAP 技术研究 4 种离体方法培养马铃薯材料 DNA 甲基化的差异,结果表明不同离体培养材料 DNA 甲基化模式存在很大差异,而且叶片形态特性与 DNA 甲基化程度密切相关,并对 4 种离体方法进行了评估,表明 MSAP 技术能够对离体材料培养和保存的遗传稳定性进行准确鉴定。聂丽娟^[21]等采用 MSAP 方法对菊花组织培养继代过程中的 DNA 甲基化情况进行了分析。结果发现,3 个单芽系的组培苗较田间材料均有 DNA 甲基化增加和减少,同时在同一单芽系内的不同次继代个体间也有 DNA 甲基化变化。目前该技术已在豌豆、竹子、高粱、大麦等许多植物离体培养材料种质鉴定中成功应用。

3.5 杂种优势原理研究

杂种优势是作物提高产量、改善产品品质和增强抗逆性的主要途径,它的遗传解释已被讨论近一个世纪,虽然建立很多有关杂种优势解释的理论和假说,但终因杂种优势机理极其复杂,到目前为止尚无定论。近年来,有研究者开始从 DNA 甲基化水平差异来研究杂种优势原理,但研究结果不尽相同。Tsaftaris^[22]等报道了玉米亲本自交系与杂交种在 DNA 甲基化水平上存在差异,表现为 F1 甲基化水平低于其相应亲本。赵欣欣^[23]等采用 MSAP 技术研究了玉米亲本自交系与杂交种的幼苗 DNA 甲基化水平,结果表明有 4 个杂交种的幼苗 DNA 甲基化水平略高于亲本,有 2 个杂交种的幼苗 DNA 甲基化水平略低于亲本。仪治本^[24]等对玉米幼苗的研究以及张美善^[25]等对高粱叶片和胚乳的研究均表明,杂

交种的 DNA 甲基化水平略低于亲本。从以上研究不难看出,采用 MSAP 法研究杂交种与亲本的甲基化水平差异,并以此推断杂种优势原理,难度很大:其一,研究材料不同,差异表现不尽相同;其二,表现的差异不具有统计学意义;其三,该方法仅能部分表现 CCGG 位点甲基化水平,而不能全面反映总体 DNA 甲基化水平。

MSAP 技术优点在于能够分析不同材料相同位点甲基化模式的差异,如果能把这些甲基化模式差异与某个表型性状联系起来,则有可能找到调控这一表观差异的相关基因。在杂种优势研究中,若着眼于整体杂种优势,则应采用 HFLP 等分析总体甲基化水平的方法;若着眼于某一特异性状的杂种优势,如抗逆性、株高、籽粒长度、某种蛋白含量等,则可以采用 MSAP 方法,并结合甲基化模式差异片段的测序、筛选以及生物信息学分析,对这些特异性状的杂种优势进行深入的研究。

4 MSAP 技术的应用前景

甲基化作为植物 DNA 修饰的重要途径,参与了許多生命过程,在调控基因表达、调节生长发育、防御微生物入侵、耐受逆境胁迫等方面起着重要作用,通过研究基因组 DNA 甲基化模式变化,可以深入研究以上过程的调节机制。MSAP 技术自建立以来,在以上各方面均得到了不同程度应用,若与其它分子生物学方法如 DNA 分子遗传标记、DNA 重组技术、DNA 微阵列等方法结合起来进行综合研究,将为在分子水平上揭示调控基因时空特异表达机理建立起有力的技术平台,在杂种优势原理、研究功能基因、改良植物性状、提高植物适应性等方面发挥重要作用。

注释及参考文献:

[1]Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory[J].Genes Dev, 2002, 16 (1) : 6 - 21.
 [2]Johnston JW,Harding K,Bremner DH,et al. HPLC analysis of plant DNA methylation: a study of critical methodological factors[J]. Plant Physiol Biochem, 2005,43:844-853.
 [3]Xu M, Li X, Korbán SS. AFLP-based detection of DNA methylation[J]. Plant Mol Biol Rep. 2000, 18, 361-368.
 [4]Kapoor A, Agarwal M, Andreucci A, et al. Mutations in a conserved replication protein suppress transcriptional gene silencing in a DNA methylation independent manner in Arabidopsis[J]. Curr Biol,2005,15:1912-1918.
 [5]Finnegan EJ, Kovac KA, Jaligot E, et al. The down regulation of FLOWERING LOCUS (FLC) expression in plants with low levels of DNA methylation and by vernalization occurs by distinct mechanism[J]s. Plant J , 2005, 44:420-432.
 [6]Ashikawa I. Surveying CpG methylation at 5'-CCGG in the genomes of rice cultivars[J]. Plant Mol Biol, 2001, 45:31-39.
 [7]Cervera MT, Ruiz-Garcia L, Martinez-Zapater JM. Analysis of DNA methylation in Arabidopsis thaliana based on methylation-sensitive AFLP markers[J]. Mol Genet Genomics, 2002, 268:543-552.
 [8]Liu B, Brubaker CL, Mergeai G, et al. Polyploid formation in cotton is not accompanied by rapid genomic changes[J]. Genome, 2001, 44:321-330.

[9]Reyna-Lopez G E, Simpson J, Ruiz-Herrera J. Differences in DNA methylation patterns are detectable during the

- dimorphic transition of fungi by amplification of restriction polymorphism[J]. *Mol Gene Genet*, 1997, 253(6): 703–710.
- [10]李雪林,林忠旭,聂以春,等.盐胁迫下棉花基因组DNA表观遗传变化的MSAP分析[J].*作物学报*,2009,35(4): 588–596.
- [11]华扬,陈学峰,熊建华,等.水稻冷胁迫诱导的甲基化差异片段CIDM7的分离和分析[J].*遗传*,2005 27(4): 595–600.
- [12]杨金兰,柳李旺,龚义勤,等.镉胁迫下萝卜基因组甲基化敏感扩增多态性分析[J].*植物生理与分子生物学学报*,2007, 33(3):219–226.
- [13]申斯乐,王振伟,单晓辉,等.高压导致水稻变异品系发生甲基化模式及基因组结构的改变[J].*中国科学C辑生命科学*, 2005,35(6):490–496.
- [14]付胜杰,王晖,冯丽娜,等.叶锈菌胁迫下的小麦基因组MSAP分析[J].*遗传*,2009,31(3):297–304.
- [15]陆光远,伍晓明,陈碧云,等.油菜种子萌发过程中DNA甲基化的MSAP分析[J].*科学通报*,2005,50(24):2750–2756.
- [16]柳李旺,宋贤勇,龚义勤,等.萝卜MSAP体系优化与抽薹过程中MSAP分析[J].*江苏农业科学*,2006(6),203–206.
- [17]郑鑫,马晓岗,迟德钊,等.高活力水稻种子萌发过程中DNA甲基化变化的MSAP分析[J].*青海大学学报(自然科学版)*, 2009,127(12):53–56.
- [18]洪柳,邓秀新.应用MSAP技术对脐橙品种进行DNA甲基化分析[J].*中国农业科学*,2005,38(11):2301–2307.
- [19]Noyer J L, Caus S, Tomekpe K, et al. A new image of plantain diversity assessed by SSR, AFLP and MSAP markers[J].*Genetica*,2005,124(1):61–69.
- [20]Joyce S M, Cassells A C. Variation in potato microplant morphology in vitro and DNA methylation [J]. *Plant Cell Tiss Org*, 2002,70(2):125–137.
- [21]聂丽娟,王子成,何艳霞,等.菊花组织培养继代过程中的DNA甲基化变化[J].*园艺学报*,2008,35(11):1689–1694.
- [22]Tasfari A S, Kafka M. Mechanisms of heterosis in crop plant[J].*Journal of Crop Production*,1998,1:95–111.
- [23]Zhao X X, DNA methylation polymorphism in a set of elite maize inbred lines revealed by methylation-sensitive ISSR analysis[J].*Cereal Research Communications*,2006,34(2).
- [24]仪治本,孙毅,牛天堂,等.玉米杂交种及其亲本基因组DNA胞嘧啶甲基化水平研究[J].*西北植物学报*,2005,25(12): 2420–2425.
- [25]Zhang MS, Yan HY, Zhao N,..Endosperm-specific hypomethylation, and meiotic inheritance and variation of DNA methylation level and pattern in sorghum (*Sorghum bicolor* L.) inter-strain hybrids[J]. *Theor Appl Genet*,2007 Jul;115(2): 195–207.

DNA Methylation-sensitive Amplified Polymorphism and Its Application in Plant Genetics

ZHANG Yan, CHEN Bo

(*Xichang College, Xichang, Sichuan 615013*)

Abstract: DNA methylation, the most common DNA modification in eukaryotes, is an important component in epigenetics and plays essential roles in the regulation of gene expression, resistance to biological stress, growth and development in plant. With progress in study on DNA methylation, methylation-sensitive amplified polymorphism (MSAP) is an AFLP-based technique with high-throughput, superiority of generating abundant polymorphism profile, low cost and easy operation for detecting status of DNA methylation. Currently, it has been widely applied in the various fields of plant genetics research. In this paper, the principles, procedures, and application of MSAP in plant genetic studies were summarized. At the same time, the perspective of its application in the future was discussed.

Key words: DNA methylation; MSAP; Plant genetics