

RAPD 标记稳定性的影响因素探析*

陈宏^{1,2}, 孙维斌¹, 雷初朝¹, 王敏强³

(1 西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西省分子农业生物学重点实验室, 陕西 杨陵 712100;

2 徐州师范大学 生物技术研究所, 江苏 徐州 221009; 3 烟台大学 化学生物理工学院, 山东 烟台 264005)

[摘要] 结合近年来 RAPD 标记研究中存在的一些技术问题, 详细分析了影响 RAPD 标记可重复性和稳定性的几种因素, 包括引物的种类、长度、浓度, DNA 的质量和浓度, 扩增条件以及操作技术等。并结合研究工作, 说明了在进行生物遗传分析时, 必须进行 RAPD 方法的优化和标准化, 才能够得到可靠、正确的结果。

[关键词] RAPD 标记; 影响因素; 可重复性; 稳定性; 优化

[中图分类号] Q 781

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2003)05-0139-04

PCR (polymerase chain reaction) 技术人们已很熟悉, 是由 Genus 公司发展, 并由 Saiki 等^[1]于 1985 年第一次在“Science”上发表。接着, 在此基础上发展了 4 种随机引物方法, 即 RAPD (random amplified polymorphic DNA) 法, AP-PCR (arbitrary primed polymerase chain reaction) 法, DAF (DNA amplification fingerprint) 法和 AFLP (amplified fragment length polymorphism) 法。4 种方法的基本逻辑相同, 但在引物长度、PCR 条件、片段的区分及检测技术上有别。由于 RAPD 技术的许多优点, 如短的制备时间, 微少的 DNA 需要量, 产物的非放射性检测和不需预先的序列信息, 使得近年来 RAPD 标记的应用领域不断扩大。然而, 关于 RAPD 标记的可重复性、稳定性及技术上应注意的问题时常有人提及, 并问到有哪些因素影响其效果, 是否限制其应用, 如何克服等。为此, 结合作者的研究工作, 对 RAPD 标记的影响因素作一探讨分析。

1 RAPD 标记的技术特点

要回答 RAPD 标记的影响因素问题, 必须先从 RAPD 的技术特点说起。RAPD 技术与 PCR 一样, 是一个酶促链式反应, 理论上可无限扩增 DNA。因此对于一个基因组的特定 DNA 序列的证明具有很高的敏感性, 使得 DNA 分析方法快速和灵敏, 与其他方法相比, 需要相对少的实验设备和少的费用。

RAPD 技术反应的原理与细胞内 DNA 在模板

上复制的原理一致。酶需要一个引物, 即一个与模板链互补杂交和由聚合酶开始的核酸分子。在体外应用合成的随机寡核苷酸引物, 一般为 9 个或 10 个碱基寡聚物作引物进行 DNA 扩增。

RAPD 技术由 3 个不同温度的反应步骤连续循环所组成。第一步, 欲扩增 DNA 双链的变性, DNA 双链在 90~95℃ 加热变成单链, 快速冷却阻碍了单链 DNA 的重新结合。第二步, 退火, 随机寡核苷酸引物互补地靠在 DNA 模板链的目标位置上。退火温度通常在 35~39℃^[2], 但也有在 40~45℃^[2-4], 对于理想的 RAPD 技术条件按经验必须优化。退火温度依赖于所用引物的长度和核苷酸序列以及引物序列与 DNA 目标序列的同源性^[5]。RAPD 技术的第三步是模板链的复制, 温度提高到 DNA 聚合酶最适的反应温度 (72℃)。每经 1 个循环, 使扩增的 DNA 片段量增加 1 倍, 它们再作为下一个循环中的模板。当反应的循环次数为 n 时, 分子的数量按照公式 2^n 增加。比如, 45 个循环后, 扩增的分子提高到 3.5×10^{13} 。但实际上, 在 PCR 反应中, 当扩增的量达到一定时, 增加的幅度变得缓慢或不再增加了。

将具有随机序列的单个寡核苷酸 (如, 10mer) 用作引物, 接合到目标基因组上, 通过 PCR 扩增两者之间的片段。扩增片段描述了 DNA 标记的成分, 这个 DNA 标记被用于不同分类水平上基因组的识别^[6]。通常一个特定引物产生 2~20 个可评价的片

* [收稿日期] 2002-10-10

[基金项目] 国家“863”计划项目 (2001AA 243052); 国家自然科学基金项目 (30070551); 农业部出国回归人员择优活动基金 (1999-1D); 国家杨凌生物技术育种中心项目 (1999-6)

[作者简介] 陈宏 (1955-), 男, 陕西西安市人, 教授, 博士生导师, 主要从事动物分子生物技术与遗传育种研究。

段, 这些片段或者是多态的, 或者是单态的。这些产物按大小通过电泳分开, 用 Bisbenzimidazole 或 EB 染色的凝胶检测。

目前, RAPD 标记已广泛应用于生态和群体生物学中对个体、品种和物种有争议的问题的识别, 以及动植物的育种和交配体制的研究, 生物亲缘关系分析及家畜经济性状遗传标记和辅助选择的研究等方面。为了更好地利用这一标记, 对其影响因素必须倍加注意。

2 RAPD 标记影响因素探析

在 RAPD 标记应用中, 人们关注 RAPD 标记的核心是它的可重复性问题, 其次是扩增产物量的问题, 这两个问题都会影响分析的准确性。由于众多因素的影响和现有技术上的不完善, 对以上两方面都会产生影响, 然而 RAPD 标记的确具有潜在的应用可能性。用特殊寡核苷酸引物扩增的片段依赖于特殊的反应条件^[7], 但反应的参数不一致时, 带谱常常发生变化。因此, 在进行 RAPD 扩增之前, DNA 扩增的条件首先需要优化, 最终可以实现扩增可重复的 RAPD 图谱。

2.1 DNA 分离的方法

模板 DNA 的质量影响 RAPD 指纹图谱。不同方法所获得的 DNA 质量可能不同, 所以, DNA 制剂间的差异是 RAPD 图谱不可重复性的主要原因^[8]。

许多学者报道, 酒精沉淀后用不同方法获得的来自同一基因组的 DNA 产生不同的 RAPD 指纹图谱。他们发现, 用玻璃钩勾起的 DNA 能够产生高重复性的带谱, 而通过离心机收集到的 DNA 导致 RAPD 指纹图谱的多变性。其原因是通过离心得到了很短的 DNA 片段, 这些短的 DNA 片段可能作为反应中的引物使用。所以, DNA 的分离方法对于 RAPD 分析特别重要。在作者的研究中, 使用了玻璃钩勾起的方法, 于是在所有样品中保证了 RAPD 图谱的可重复性。

2.2 DNA 的浓度

在 PCR 反应中加入合适的 DNA 量对于产生一个富含信息的 RAPD 指纹是必要的。只有理想的 DNA 浓度才能产生可重复性的 RAPD 指纹, 这必须通过试验来确定。在作者的研究中, 对于 RAPD 扩增进行了不同 DNA 浓度的测验, 过低或过高的 DNA 浓度均导致没有扩增产物, 即使在 DNA 的浓度界限附近可得到扩增产物, 但其表现出扩增片段

的大小、数目及带强度的差异。不同的 DNA 浓度对于不同的引物, 其扩增结果也是不同的。在应用引物 Gen 60-3 时, 50, 100, 600 和 800 ng DNA 没有扩增产物, 而仅在 200 和 400 ng DNA 组有扩增产物。然而, 在应用引物 Gen 80-1 时, 100, 200, 400, 600 和 800 ng DNA 浓度都有较好的扩增结果。这表明, 扩增效果不仅仅依赖于 DNA 量, 而且也依赖于所使用的引物。根据 DNA 浓度的测定结果, 在后来的研究中, 每一个 PCR 反应中用 200 ng DNA 都取得了很好的结果。所以, 要获得恒定的带纹, 需选择理想的 DNA 浓度, 以便用于进一步的研究。

Ellsworth 等^[7]报道, 在 RAPD-PCR 中不同的 DNA 浓度会导致图谱的改变, 随着模板 DNA 浓度的增加, 扩增产物不断减少, 然而, 在一定的 DNA 浓度界限内可获得可重复的扩增。从中同样得出, 通过试验获得理想的 DNA 浓度是重要的。

2.3 引物的选择

Gen 60 和 Gen 80 族引物的碱基组成不同, 前者 AT 含量为 40%, 而后者 AT 含量为 20%。在作者研究的预试验中, 分别用 2 种不同的引物扩增了 6 个动物种(牛、绵羊、山羊、猪、马和鱼)的 DNA, 以测验这 2 种引物(Gen 60 和 Gen 80), 结果表明, Gen 80 比 Gen 60 产生了较多的 RAPD 指纹带。这种现象与不同探针对于特定物种产生不同的 DNA 指纹的情况相类似。产生多而且清晰带纹的引物也具有较高的揭示多态性的潜力。所以, 对于特定生物的遗传分析来说, 必须选择合适的引物, 从中得出每一个随机引物需要一个理想的扩增条件。曹顶国等^[9]和刘德武等^[10]认为, RAPD 分析中所用引物的数目和所分析的样本数亦影响鉴定结果。一般来说, 一定数量的引物(至少用 13 个引物)和样本数(10~15 个个体已基本可以反应群体的遗传信息, 如果要求准确性较高, 应适当增加样本数)基本能保证 RAPD 分析的准确性。

2.4 引物的浓度

按许多学者的经验, 每个反应所使用的引物浓度为 $1 \mu\text{mol/L}$, 这个浓度能获得很好的扩增效果。引物的浓度主要影响带的出现和强度。当在相对恒定的模板 DNA 浓度时, 引物量的变化, 扩增效率与扩增片段的大小有一个清楚的关系, 但在引物浓度较高时, 会产生小片段($< 500 \text{ bp}$), 而在引物浓度低时, 大的片段很容易被扩增^[12]。

2.5 扩增的条件

扩增条件涉及 PCR 所用的程序: 变性、复性和

扩增的温度、时间以及循环的次数。理论上扩增能够无限制地长期进行,但实际上受各种因素的限制^[6]。当循环次数少时,扩增产物的量对于某种分析太少,当循环次数过多时,扩增的量不再增加。通常扩增在30~45个循环。

变性的温度和时间能够影响扩增效果。在作者的实验中,曾有94和95 2种变性温度被测验,结果在94 时取得了较好的扩增结果。Bielawski等^[11]对于Streifenbrasse的DNA测定了不同的变性时间(60, 30, 10和5 s),结果表明一些扩增产物的强度随变性时间的减少而增加,这个结果与Yu等^[12]的结果相一致。然而,随着变性时间的减少会出现错误的扩增,比如,高分子量的带不再出现了。所以他们认为,30 s的变性时间对于RAPD图谱较好,一个太短的变性时间对于大基因组DNA分子的变性是不充分的。在大部分发表的文献中,通常应用94 的变性温度和30 s的变性时间。

不同的退火温度和时间也导致扩增产物大小上的差异^[7,11]。虽然带谱随着退火温度而改变,但在退火温度与片段大小和扩增效率之间没有明显的直线关系。在作者的试验中,37 和42 2个退火温度被测验,42 获得了较好的结果。Bielawski等^[11]对于Streifenbrasse DNA的扩增测定了不同的退火时间(5, 30和60 s),认为应该选择30 s的退火时间,因为这样所产生的带谱是恒定的。然而,在大部分发表的文献中采用了1 min的退火时间。通常,一个理想的退火温度也依赖于所用引物的长度和核苷酸序列^[5]。所以,理想的退火温度需通过试验来确定。

Bielawski等^[11]的试验证明,不同的延长时间(30, 60, 120 s)会导致带谱的差异。扩增产物最大片段的大小和强度随延长时间的加长而增加。大多学者在试验中应用了2 min的延长时间。

2.6 PCR仪

由于各种PCR仪在技术参数上的差异,也会导

致一定RAPD带谱的改变。一些研究者测验了PCR仪对带谱可重复性的影响并发现,所用4个引物中的1个因PCR仪而改变了扩增产物^[13,14]。这表明不同的引物对于技术的边缘条件有不同的敏感性。因此,许多学者认为,在不同PCR仪中产生一致性带谱的引物可选择用于不同实验室数据的比较。产生变异带谱的引物,用它在同一台仪器产生一致性的带谱时,能够在一个实验室内部使用。不过,近年来,科学技术的发展使PCR仪生产技术和工艺不断提高,有可能从根本上解决这一问题。

2.7 操作技术和方法

任何一个实验都需要熟练的操作技能,否则不可能得到理想的实验结果,在分子生物学实验中尤其如此。在RAPD实验中,一些细微的技巧如果不注意也会影响RAPD带纹图谱,尤其对于初学者。所以,一般初次进入实验室的实验人员,必须进行一定的技术训练,掌握其基本技能和方法。由于配制RAPD反应混合物都是微量操作,稍不注意,加的量就不正确,从而影响RAPD标记结果。在研究生的分子遗传学实验中,大家都用相同的试剂、药品,按相同的实验程序、方法操作,但常会得出不同的结果。这说明,科学、规范且熟练的实验操作,对于RAPD标记的应用也是很必要的。

3 小结

了解了RAPD标记的技术特点与影响因素后,作者认为优化RAPD标记的途径为:提取高质量的模板DNA,选择理想的DNA浓度,选择合适的引物及引物数目和所分析的样本数,确定合适的引物浓度,具备稳定的扩增条件以及熟练的操作技术等,这些都是保证RAPD扩增产物的可重复性和稳定性的先决条件。如果能严格地按上述方法进行RAPD实验,就一定能够得到可靠的、正确的实验结果。

[参考文献]

- [1] Saiki R K, Scharf S J, Faloona F, et al Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia[J]. Science, 1985, 230: 1350- 1354
- [2] Landry B S, Dextraze L, Boivin G Random amplified polymorphic DNA markers for DNA fingerprinting and genetic variability assessment of minute parasitic wasp species (Hymenoptera: Mymaridae and Trichogrammatidae) used in biological control programs of phytophagous insects[J]. Genome, 1993, 36: 580- 587.
- [3] Neto E D, Souza C P, Rollinson D, et al The random amplification of polymorphic DNA allows the identification of strains and species of schistosome[J]. Molecular and Biochemical Parasitology, 1993, 57: 83- 88

- [4] Procunier J D, Fernando M A, Barta J R. Species and strain differentiation of *Emeria* spp. of the domestic fowl using DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers[J]. Parasitology Research, 1993, 79: 98- 102
- [5] Hanke M. Die Polymerase Kettenreaktion in Molekularbiologie und Medizin[J]. Bioform, 1992, 10: 348- 351.
- [6] Hadrys H, Balik M, Schierwatter B. Application of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology[J]. Molecular Ecology, 1992, 1: 55- 63
- [7] Ellsworth D L, Rittenhouse K D, Honeycutt R L. A rtifactual variation in randomly amplified polymorphic DNA banding patterns[J]. Bio Feed Back, 1993, 14: 214- 216
- [8] Micheli M R, Bova R, Rascale E, et al Reproducible DNA fingerprinting with the random amplified polymorphic DNA (RAPD) method [J]. Nucleic Acids Research, 1994, 22: 1921- 1922
- [9] 曹顶国, 杜立新, 李淑青. 4 个绵羊品种随机扩增多态DNA 分析[J]. 中国畜牧杂志, 2002, 38(2): 12- 14
- [10] 刘德武, 杨关福, 李加琪, 等. 用 RAPD 标记分析 6 个品种猪的群体遗传结构[J]. 畜牧兽医学报, 2002, 33(1): 18- 22
- [11] Bielawski J P, Noack K, Pumo D E. Reproducible Amplification of RAPD markers from vertebrate DNA [J]. Bio Techniques, 1995, 18: 860- 865
- [12] Yu K, Pauls K P. Optimization of the PCR program for RAPD analysis[J]. Nucleic Acids Res, 1992, 20: 2606
- [13] MacPherson J M, Eckstein P E, Scoles G J, et al Variability of the random amplified polymorphic DNA assay among thermocyclers, and effects of primer and DNA [J]. Molecular and Cellular Probes, 1993, 7: 293- 299
- [14] He Q H, Viljanen M K, Mertsola J. Effects of thermocyclers and primers on the reproducibility of banding patterns in randomly amplified polymorphic DNA analysis[J]. Molecular and Cellular Probes, 1994, 8: 155- 160

Discussion and analysis of influence factors on RAPD marker stability

CHEN Hong^{1,2}, SUN Wei-bin¹, LEI Chu-zhao¹, WANG Min-qiang³

(1 College of Animal Science and Technology, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry,

Shaanxi Key Laboratory of Agricultural Molecular Biology, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 Institute of Biotechnology, Xuzhou Normal University, Xuzhou, Jiangsu 221009, China;

3 College of Chemistry, Biology and Engineering, Yantai University, Yantai, Shandong 264005, China)

Abstract: In this paper, some factors having influence on reproducibility and stability of RAPD marker were analyzed in the combination of some existing problems of RAPD marker research in recent years. Those factors included sort, length and concentration of primers, quality and concentration of DNAs, conditions of amplification as well as manipulative techniques and so on. It was indicated that optimization and standardization of RAPD method is a precondition in genetic analysis of organisms, so that reliable and accurate results can be obtained.

Key words: RAPD marker; influence factor; reproducibility; stability; optimization