

RAPD 技术的标准化问题^{*}

汪永庆 徐来祥^{**} 张知彬^{***}

(中国科学院动物研究所农业害虫鼠综合治理研究国家重点实验室 北京 100080)

关键词 RAPD;可靠性 标准化

中图分类号 Q781 文献标识码 A 文章编号 10250-3263(2000)04-57-04

The Standardization of RAPD

WANG Yong-Qing XU Lai-Xiang ZHANG Zhi-Bin

(National Key Laboratory of Integrated Management of Pest Insects and Rodents,

Institute of Zoology, The Chinese Academy of Sciences Beijing 100080, China)

Key words RAPD; Reliability; Standardization

1985年PCR技术的出现^[1],是分子生物学方法学上一次里程碑性质的革命,极大地推进了分子生物学所涉及的多学科的发展,给生命科学带来了巨大的变革。伴随着该技术的出现,与之相结合的一批新技术相继出现,RAPD(random amplified polymorphic DNA,随机扩增多态性DNA)就是其中较引人注目的一项技术。

RAPD技术是由Williams等^[2]首先创立的一种DNA分子标记技术,它以PCR技术为基础,由一系列人工随机合成的寡核苷酸单链(一般为10个bp)为引物,以所研究的基因组DNA为模板进行PCR扩增,如果引物与某一片段的模板DNA具有互补的核苷酸序列,该引物就会结合到单链模板DNA上。引物结合位点若在模板DNA的两条链上有互补的位置,且引物3'端相距在一定长度范围内(约2000bp),就可以 2^N 方

式(N 为循环次数)扩增出DNA片段。扩增产物通过聚丙烯酰胺或琼脂糖凝胶电泳,经EB染色检测多态性。这些扩增DNA片段的多态性就反映了基因组DNA相应区域的多态性。

RAPD技术建立在PCR技术的基础上,因此具有效率高、样品用量少、灵敏度高、特异性强和检测容易等优点^[3-5]。与其它DNA多态性分析方法相比,RAPD还有其独特的优点^[6,7]。

^{*}国家自然科学基金重点项目(No.39730090)和中科院项目(KZ951-B1-106,STZ-1-05);

^{**}现工作单位:曲阜师范大学生物学系;

^{***}通讯联系人;

第一作者介绍:汪永庆,男,32岁,博士研究生,研究方向:分子生态学,E-mail:wangyq@panda.ioz.ac.cn;

收稿日期:1999-12-27,修回日期:2000-05-20

第一, RAPD可以在对物种没有任何分子生物学研究的情况下,对其进行DNA多态性分析,构建这些物种的基因指纹图谱,并通过统计学分析为遗传分析和分类研究提供DNA分子水平的证据。这是其它方法(如RFLP等)进行此类研究所不能达到的。

第二, RAPD技术可以直接对生物基因组DNA多态性进行分析,省去了应用RFLP和DNA指纹图谱法等进行DNA多态性分析的预变性工作,如制备克隆、多态性筛选、同位素标记、Southern印迹、分子杂交等步骤,而且DNA用量极少。

第三,由于RFLP技术所用引物为人工定序合成,可以用于不同生物基因组的分析。相对而言, RFLP标记具有种族特异性,不能广泛使用。因此, RAPD引物可以大规模生产形成商品化,这大大降低了研究费用。

第四,较之常规的PCR反应, RAPD反应更容易程序化。

由于RAPD技术独到的检测方式,以及高效、快速、简便的特点,使RAPD作为一种DNA分子标记技术,从技术建立至今仅十年的时间,在动物、植物和微生物的遗传多样性检测,品系鉴定,医学诊断,基因定位,遗传标记,基因图谱构建和基因遗传作图,亲缘关系和系统进化的研究等方面得到广泛的应用^[8~19]。

但是, RAPD技术也有其局限性^[20~22],主要是:第一,影响RAPD反应的因素很多,条件稍有变化,结果就不稳定,这使得实验结果的可靠性和重复性值得怀疑。第二, RAPD结果不全是共显性,不能分析基因型,只能表示样品是否有差异,无法分析产生差异的原因。对于第二点,可以借助其它的实验手段(如同工酶)进一步研究^[23]。本文根据文献及我们实验室的经验,对RAPD实验的可靠性和重复性问题进行全面综述,并提出相应的解决办法。

RAPD的重复性是指同一人不同次PCR扩增结果是否一致,对同一实验材料不同实验室之间结果是否一致。影响RAPD稳定性的因素很多,大致可分为两大类。

(1) PCR反应体系中各种影响因素,如模板质量、模板浓度、 Mg^{2+} 浓度、dNTP浓度、引物G+C含量、引物浓度、*Taq* DNA酶用量及其纯度。

(2) 外部因素,包括所用PCR仪的性能、循环次数、温度设置、凝胶电泳的类别和胶的质量等。

下面对以上各项因素分别进行讨论。

1 内部因素

1.1 DNA模板质量 Smith等^[24]和 Caetano-Anolles

等^[25]发现,当DNA模板的最适浓度确定后,各种方法提取的DNA均能获得一致的扩增结果。模板中少量的蛋白质和RNA对扩增结果无影响。本实验室也发现模板中一定量的蛋白质不影响扩增结果,模板降解程度不大(绝大部分分子大于10 kb),不影响扩增结果。由此可见, RAPD对模板的质量要求不高,为提高效率,可以采用一些简单快速的基因组DNA提取方法。

1.2 DNA模板的浓度 从文献看, DNA模板浓度的适宜范围较大。Devos和Gal^[26]的研究结果显示在200~400 $\mu\text{g/L}$ 间可获得一致结果。Ellsworth等认为模板的最适浓度为12~14 mg/L ^[27]。陈永久等^[20]的实验结果显示当模板DNA浓度变化较大时,不同浓度之间的扩增结果有差异。总之,模板DNA的用量有一个适宜的变动范围,这个范围往往较大,所以,制备模板DNA时,在一开始就应达到不同样本之间浓度的统一,在进行正式PCR扩增之前,都应做DNA模板浓度梯度实验,来选取最佳的模板浓度。

1.3 $MgCl_2$ 浓度 Mg^{2+} 是*Taq* DNA聚合酶实现其聚合反应所必需的。 Mg^{2+} 的浓度对反应的特异性和扩增效率都有影响。 Mg^{2+} 浓度过高会使非特异性扩增产物增加,过低则使扩增产物减少。目前较为一致的看法是 $MgCl_2$ 在反应体系中的终浓度应为2 mmol/L 左右。

1.4 dNTP浓度 较为一致的结论是100 $\mu\text{mol/L}$ 的反应体系浓度。

1.5 引物设计及浓度 RAPD所用引物尽管是随机引物,也有一些引物设计的准则。Yu和Pauls^[28]认为G+C含量高于60%对RAPD有较好作用,信号较强的带明显增加。另一方面,引物最后4个3'端核苷酸碱基有较高的G+C含量对RAPD扩增也有利。一般认为引物浓度在1~1.5 $\mu\text{mol/L}$ 之间为最佳浓度,超过此范围常表现出缺乏扩增产物^[29,30]。

1.6 *Taq* DNA聚合酶的用量及纯度 *Taq*酶的用量对反应的结果有很大影响。酶量过大,特异性减少,扩增产物的电泳呈弥散状。实验表明,在25 μl 反应体系中,酶的用量在0.5~2U时可以得到可重复的清晰条带,采用1U的结果较好^[28,29]。另外,使用同一商标的*Taq* DNA聚合酶对获得重复性结果是必需的。不同厂家的*Taq*酶扩增的RAPD结果有差异^[20],这可能是由于不同厂家从不同的菌株上分离的*Taq* DNA聚合酶活性上有差异。用于RAPD的引物一般为10 bp,比一般PCR扩增所用引物要短,加之RAPD反应较低的退火温度,使随机性增大,对污染更敏感。在正式实验之前,一定要对*Taq* DNA聚合酶的纯度进行检测,分

别用不同引物做空白对照反应。*Taq* 酶应不含任何细菌 DNA,这就要求生产厂家严格生产,但有时却难以达到,而 *Taq* 酶的污染直接影响到实验的真实性。根据我们的实验结果,由于 *Taq* DNA 聚合酶的纯度不同,在其它条件完全相同时,可以得出完全不同的实验结果,这也是不同实验室之间结果不能重复的一个重要原因。因此做 RAPD 时,在开始实验之前,预先对 *Taq* 酶的纯度进行验证是完全必要的。通常的做法就是用多个不同引物进行多次空白对照实验,这是因为引物与污染物之间也有一个匹配问题,往往用某一个或少数几个引物很难发现污染。

1.7 PCR 反应体积 Lowe^[22]认为 RAPD-PCR 的反应体积如果低于 25 μ l,一般将不会得到好的重复性结果,为了节约开支,多采用 25~50 μ l 的反应体积。

2 外部因素

2.1 PCR 仪 陈永久^[20]的实验结果显示,不同仪器获得的 RAPD 结果有差异,表现为一些弱带的增减,但差异不很显著。不同 PCR 仪之间在性能上的主要区别在于其临界温度之间的梯度时间,较先进的仪器有较快的温度变化率;另一个问题是达到设定温度后,温度波动幅度的大小,波动幅度越小则仪器性能越好。在同一实验中和对同一实验对象应尽量使用同一台仪器或同一型号的仪器。

2.2 RAPD-PCR 反应的程序设置 Williams 等^[2]最早提出的温度设计为 94 $^{\circ}$ C 1 min, 36 $^{\circ}$ C 1 min 和 72 $^{\circ}$ C 2 min,这个设计至今仍然是最常规的方案。但如果缩短各反应时间,PCR 扩增效果依然很好,而且减少 94 $^{\circ}$ C 变性时间,*Taq* 聚合酶的活性会有效地增加^[28]。不同研究者所用循环数有些变化,但目前常见的多用 45 次循环。

2.3 RAPD 片段的检测 经 PCR 后的结果必须通过分离加以检测,分离的方法通常用电泳,最常用的电泳是琼脂糖凝胶电泳。各泳道片段移动的相对速率与胶的质量和纯度有关,电泳缓冲液对带的清晰度也有影响,这些因素都应加以注意。另外聚丙烯酰胺凝胶电泳也用来分离 RAPD 片段。这种电泳能够把较小的 DNA 片段分离开,特别有助于区分较多的片段。通过银染可以增进敏感性^[31]。因此,选择用于分离 RAPD 片段的电泳类型、凝胶浓度及化学组分都是很重要的。

2.4 结果的整理分析 电泳的结果要准确的加以记录。通过标准分子量计算每条扩增片段的大小,再将每个引物每个样品各条带的有无确切地记录在表格上,每个样本作为横行,而每个 RAPD 片段作为纵行,

在数据资料矩阵中,用 '1' 表示有这一片段,用 '0' 表示无这一片段,缺失的资料用 '*' 号标出。

3 结论

RAPD 技术作为一项重要的分子标记技术,大量应用于生物学的各个领域。其它常用的分子标记技术还有 RFLP, AFLP, Microsatellite DNA 等。我们分别用 RFLP, RAPD, AFLP 及 Microsatellite DNA 作为关键词,通过 Institute for Scientific Information 出版的 Reference Update 系统,对 1996~1998 年文献进行检索,结果与 RFLP 有关的文献有 641 篇,与 RAPD 有关的文献有 573 篇,与 AFLP 有关的文献有 92 篇,与 Microsatellite DNA 有关的文献有 26 篇。这从一个侧面反映了 RAPD 应用的广泛程度。

我们对 1997 年以来发表于《科学通报》、《动物学报》、《遗传学报》和《遗传》上有关 RAPD 方面的研究论文做了一次统计。总共 20 篇,其中注明 PCR 仪生产厂家及型号的有 11 篇,注明引物生产厂家的有 16 篇,注明 *Taq* 酶生产厂家的有 8 篇,注明 PCR 缓冲液成分的有 14 篇,注明 PCR 反应条件的有 19 篇,注明引物浓度和 *Taq* 酶用量的各有 18 篇,注明 dNTP 浓度和模板浓度的各有 17 篇,注明 Mg^{2+} 浓度的有 15 篇,注明做对照反应的仅有 3 篇。几乎没有一篇文章注明所有可能影响 RAPD 的因素。如果一篇研究论文在文章中不注明这些有可能影响 RAPD 实验结果的因素,那么不同实验室之间的结果就难以互相比较和交流。因此我们认为为使 RAPD 分析结果更可靠,不同实验室之间结果具有可比性,应该努力使 RAPD 反应标准化。这种标准化应包括实验过程的标准化和论文撰写的标准化。实验过程的标准化要求在实验中首先摸索出 RAPD 反应体系中各组分的适宜浓度,在整个实验中应务必使前后各次反应的各组分的来源和浓度保持一致,尽可能使用同一台 PCR 仪,仪器的参数设置应前后一致,凝胶电泳的类型及统计数据的标准应前后一致。论文的标准化要求在论文中尽可能注明各种与 RAPD 有关因素的详细情况。这样 RAPD 的结果才具有可重复性和可靠性。我们相信随着 RAPD 标准化的不断提高,RAPD 技术的应用会更加广泛。

参 考 文 献

- [1] Mullis, K. B., F. A. Fallona. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymol.*, 1987, 155: 335~350.
- [2] Williams, J. G. K., A. R. Kubelik, K. J. Livak *et al.* DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are

- useful as genetic markers. *Nuc. Ac. Res.*, 1990, **18**: 6 531~6 535.
- [3] 李常保, 宋建成. RAPD 标记与作物改良. 生物技术通报, 1999, **10**(6): 20~29.
- [4] 鲁亮, 归鸿. RAPD 技术的特点及其在昆虫分类中的应用. 昆虫学报, 1995, **38**(1): 117~122.
- [5] Jain, A., S. Bhatia, S. S. Banga *et al.* Potential use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) technique to study the genetic diversity in Indian mustard (*Brassica juncea*) and its relationship to heterosis. *Theor. Appl. Genet.*, 1994, **88**: 116~122.
- [6] Heun, M., J. P. Murphy, T. D. Phillips. A comparison of RAPD and isozyme analysis for determining the genetic relationships among *Avena sterilis* L. accessions. *Theor. Appl. Genet.*, 1994, **87**: 689~696.
- [7] Chalmers, K. J., R. Waugh, J. I. Sprent *et al.* Detection of genetic variation between and within populations of *Gliricidia sepium* and *G. Maculata* using RAPD markers. *Heredity*, 1992, **69**: 465~472.
- [8] 宋林生, 相建海, 李晨曦等. 用 RAPD 标记研究对虾属六个种间的亲缘关系. 动物学报, 1998, **44**(3): 353~359.
- [9] 沈曦, 周开亚, 王义权. 中国蝮属蛇类的 RAPD 分析. 动物学报, 1999, **45**(1): 40~48.
- [10] 魏伟, 王洪新, 胡志昂等. 毛乌素沙地柠条群体分子生态学初步研究: RAPD 证据. 生态学报, 1999, **19**(1): 16~22.
- [11] 孙致良, 张超良, 金德敏等. RAPD 技术在玉米自交系亲缘关系研究中的应用. 遗传学报, 1999, **26**(1): 61~68.
- [12] 廖翔华, 伦照荣. 寄生在中国草鱼、鲤鱼和馬口鱼的头槽绦虫的分类和亲缘关系. 科学通报, 1998, **43**(10): 1 073~1 076.
- [13] 吕雪梅, 杨克福, 张细权等. 蛋鸡品系 RAPD 变异及其与杂种优势关系的分析. 遗传, 1999, **21**(2): 24~28.
- [14] Bassam, B. J., G. Caetano-Anolles. DNA amplification fingerprinting of bacteria. *Appl. Microbiol. Biotech.*, 1992, **77**: 321~341.
- [15] Bai, D., J. Brandle, R. Reeleder. Genetic diversity in North American ginseng (*Panax quinquefolius* L.) grown in Ontario detected by RAPD analysis. *Genome*, 1997, **40**: 111~115.
- [16] Comincini, S., M. Sironi, C. Bandi *et al.* RAPD analysis of systematic relationships among the Cerridae. *Heredity*, 1996, **76**: 215~221.
- [17] Garner, K. J., J. M. Slavicek. Identification and characterization of a RAPD-PCR marker for distinguishing Asian and North American gypsy moths. *Insect Molecular Biology*, 1996, **5**: 81~91.
- [18] Sommerfeldt, A. D., J. D. D. Bishop. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis reveals extensive natural chimerism in a marine protochordate. *Molecular Ecology*, 1999, **8**: 885~890.
- [19] Wilkie, S. E., P. G. Isaac, R. J. Slater. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers for genetic analysis in *Allium*. *TAG*, 1993, **86**: 497~504.
- [20] 陈永久, 张亚平. 随机扩增多态 DNA 影响因素的研究. 动物学研究, 1997, **18**(2): 221~227.
- [21] 汪小全, 邹喻苹, 张大明等. RAPD 应用于遗传多样性和系统学研究中的问题. 植物学报, 1996, **38**(12): 954~962.
- [22] Lowe, A. J., O. Hanctte, L. Buarino. A standard molecular genetic technique used in identify of germplasm resource: random amplified polymorphic DNA (RAPD). *Plant Genetic Resources Newsletter*, 1996, **107**: 50~54.
- [23] Alfred, E. S., X-R. Wang, M-Z. Lu. Empirical assessment of allozyme and RAPD variation in *Pinus sylvestris* (L.) using haploid tissue analysis. *Heredity*, 1996, **76**: 412~420.
- [24] Smith, J. J., J. S. Scotterraig, J. R. Leadbetter *et al.* Characterization of random amplified polymorphic DNA (RAPD) products from *Xanthomonas campestris* and some comments on the use of RAPD products in phylogenetic analysis. *Mol. Phylogen Evol.*, 1994, **3**: 135~145.
- [25] Caetano-Anolles, G., B. J. Bassam, P. M. Gresshoff. DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers. *Biotechnology*, 1991, **9**: 553~557.
- [26] Devos, K. M., M. D. Gale. The use of random amplified polymorphic DNA markers in wheat. *TAG*, 1992, **84**: 567~572.
- [27] Ellsworth, D. L., K. D. Rittenhouse, R. L. Honeycutt. Artfactual variation in randomly amplified polymorphic DNA banding patterns. *Biotechniques*, 1993, **14**: 214~217.
- [28] Yu, K. F., K. P. Pauls. Optimization of the PCR program for RAPD analysis. *Nucleic Acids Research*, 1992, **20**: 2 606.
- [29] Bardin, M. G., C. Bandi, S. Comincini *et al.* Rapid analysis of genetic diversity in cattle populations using amplification of bulked genomic DNA samples. *Animal Genetics*, 1994, **25**(Suppl. 1): 29.
- [30] Mailer, R. J., R. Scarth, B. Fristensky. Discrimination among cultivars of rapeseed (*Brassica napus* L.) using DNA polymorphisms amplified from arbitrary primers. *TAG*, 1994, **87**: 697~704.
- [31] Dweikat, I., S. Mackenzie, M. Levy *et al.* Pedigree assessment using RAPD-DGGE in cereal crop species. *Theor. Appl. Genet.*, 1993, **85**: 497~505.