

新的遗传标记技术——RAPD 及其在遗传分析中的应用

TECHNIQUE OF NEW GENETIC MARKER——RAPD AND ITS APPLICATION IN GENETIC ANALYSE

刘旭东 相建海

(中国科学院海洋研究所实验海洋生物学开放实验室 青岛 266071)

生物的系统分类、物种的起源和进化、种群遗传结构考查以及生物多样性分析等研究都涉及到遗传分析,遗传分析需要有效的遗传标记。所谓的遗传标记是指生物体所特有的性状或物质,能够稳定地遗传,可以反映生物的个体和群体的特征,是生物个体或群体间遗传差异的客观表征。海洋生物资源开发利用的研究是当前的热门课题,无论是海洋生物资源多样性的检测、监控和保护,还是海洋渔业资源的管理、开发和持续利用,以及海水增殖的鱼、虾、贝、藻的种质管理、保存和遗传改良等,都离不开准确可靠的遗传分析。90年代兴起的遗传标记技术——RAPD为遗传分析提供了新的、有效的工具,已在许多领域得到广泛而富有成效的应用。RAPD技术的迅速发展也引起从事海洋生物科学研究人员的日益关注和浓厚的兴趣。本文就RAPD技术的发展、特点及其应用作一简要综述。

1 遗传标记技术的发展和 RAPD 的诞生

遗传分析中最早利用的遗传标记是生物的各种外部表现性状。直到70年代中后期,所利用的遗传标记还主要是生理缺陷类型、细胞表面抗原类型、多态性蛋白和同工酶等,而这些遗传标记都是间接地而不是直接地揭示遗传物质本身,而且易受到环境因素变化和发育状况的影响,因而其灵敏度、准确性和可信度受到不同程度的限制。

分子生物学技术的飞速发展给生命科学的研究注入了新的生机活力,新的遗传标记不断地被发现、开发和利用。70年代末80年代初遗传学家们发现了第一个DNA分子水平上的遗传标记,即DNA的限制性内切酶酶切片段长度多态性(Restriction Fragment Length Polymorphisms, RFLPs),之后,RFLPs被迅速广泛地应用于遗传分析的许多方面。RFLPs相对于以前的遗传标记有许多优点,它是直接在DNA水平上揭示遗传的本质,但仍有其不足之处,大多数的RFLPs位点多态信息含量低,且过于依赖于内切酶的选用。80年代中期,Jeffreys

等^[1]发现了另一种DNA分子水平的遗传标记,即DNA指纹图谱(DNA fingerprint)。DNA fingerprint以其高变异性、高分辨率等特点被成功地应用到法医学上的刑事案犯的确认和谱系确定等等当中,成为当今最先进的遗传标记系统之一。然而DNA指纹技术由于操作过程复杂、技术难度大以及花费高等原因,其普及特别是在样品数量较多的遗传分析中的应用有很大的局限性。

80年代中后期由美国Cetus公司和加尼福尼亚大学联合创立的多聚酶链式反应(Polymerase Chain Reaction, PCR)——DNA体外扩增新技术给遗传学乃至整个生命科学的研究带来了划时代的变革,它问世即迅速被广泛应用到生命科学研究的各个领域。RAPD(Random Amplified Polymorphic DNA)即随机扩增多态性DNA,这一由Williams^[17]和Welsh^[18]领导的两个科研小组在1990年几乎同时独立创立的遗传标记新技术就是PCR技术卓有成效的应用。他们发现:以任意的寡核苷酸(>5bp)作引物对基因组DNA进行PCR扩增,扩增产物的电泳图谱表现出高度的变异性,这一技术有的学者称之为AP-PCR(Artitrarily Primered PCR),但文献中目前多采用RAPD一词。RAPD技术一出现便以其简便、快速、高效和灵敏度高等特点而引起广大生命科学工作者的极大兴趣。

2 RAPD 的原理及其特点

2.1 原理

RAPD是建立在PCR技术基础上的新颖的分子遗传标记,它的原理是利用一系列(通常是数百个)不同的随机排列的十碱基(或九个碱基)的寡核苷酸单链为引物,以研究对象的基因组DNA为模板进行PCR扩增,通过扩增产物DNA片段的多态性来检测基因组DNA的多态性。

收稿日期:1995年5月23日

RAPD 所用的一系列引物其序列各不相同,但对于每一个特定的引物来讲,它同目标基因组的 DNA 序列都有其特定的结合位点、扩增 DNA 特定的区域片段,如果基因组的这些区域发生 DNA 片段或碱基的插入、缺失等突变,就可能导致这些特定结合位点、扩增片段发生相应的变化,而使 RAPD 扩增产物在琼脂糖或聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱中 DNA 带数增加、减少或片段长度发生相应变化,从而可以检测出基因组 DNA 在这些区域的多态性。

2.2 特点

2.2.1 无需预先知道受试基因组 DNA 序列。RAPD 标记能够覆盖整个基因组,它不象 RFLP 检测时受到探针数目的限制,因为随机引物可以大量合成,同时 RAPD 引物无种属界限,同一套引物可以适用于任何生物的研究,因此它具有更广泛的实用性和通用性。

2.2.2 分辨率高,能够迅速提供遗传分析中大量的遗传标记。由于 RAPD 引物原则上可能任意增加,因此可以找到任何一个个体的 RAPD 标记。目前美国 Operon 公司商售的 10bp 引物试剂盒已有 92 种,每种试剂盒包括 20 种引物,必要的话还可以合成新的引物种类,因此 RAPD 技术在寻找遗传标记方面有着巨大的潜力。

2.2.3 实验过程中不需要进行分子杂交、Southern 转移等一系列繁琐操作,因此程序简单灵敏,且只需极少量的基因组 DNA,因而省时省力。

2.2.4 RAPD 技术无需借助于有伤害性的放射性同位素,减少了对操作人员的危害。

3 RAPD 的应用

3.1 基因定位和分离

遗传分析和遗传育种中常常需要对某个或某些重要的基因进行克隆分离,例如在农作物遗传改良中优势性状和抗逆性状基因的筛选等。要分离一个基因,如用常规的方法要预先知道该基因的表达产物(RNA 或蛋白质),而往往对所分离的目的基因信息并不知道,这就给基因的分离带来了极大的困难。遗传标记技术的发展为基因的分离提供了另一条可行的途径,即建立相关的遗传连锁图谱,利用遗传标记在遗传连锁图上定位目的基因。遗传分析和遗传育种中利用遗传标记定位基因,首先要找到与目的基因紧密连锁的遗传标记,其次是检测的方法一定要方便、简单、快速和低消费。形态标记和同工酶标记由于数量有限,利用其寻找与目的基因紧密连锁的遗传标记难度很大;利用 RFLPs,Paran^[16]和

Zamir^[13]分别在莴苣和马铃薯上建立了与抗病基因紧密连锁的分子标记,Young 等^[20]也利用 RFLPs 标记定位了蕃茄的抗病毒病基因 Tm-2a。但是由于 RFLPs 检测费时、费力且价格昂贵,所以用于育种实践受到很大的限制。RAPD 标记弥补了上述的不足,即其可以覆盖整个基因组,能迅速提供大量的遗传标记,而且其检测程序简单、快速、灵敏度高且花费低,又不受环境条件和发育状况的影响,为基因定位和分离提供了十分有用的遗传工具。目前 RAPD 用于基因定位和分离在植物特别是农作物上的进展比较快。Martin 等^[15]通过 RAPD 分析从蕃茄中分离了与抗假单胞菌 *Pseudomonas* 的基因紧密连锁的 DNA 片段,并将其定位于连锁图中,为进而分离抗性基因奠定基础;同样,Paran 等^[16]用 RAPD 方法定位了莴苣抗霜霉病的基因。我国学者在这方面的研究也取得了很好的进展。陆军等^[7]应用 RAPD 标记快速鉴定了水稻的抗瘟病基因,首次发现了一个抗稻瘟病品系水稻中的与抗性基因连锁的 RAPD 片段 p286-350bp;朱立煌等^[4]用 RAPD 标记并结合 DH 群体分池法,发现了与窄叶青 8 号的抗稻瘟病的基因连锁的分子标记;毛龙等^[3]、王京兆等^[2]分别在小麦抗锈条病和水稻光敏核不育研究中报道了类似的工作。

遗传育种在农作物的改良中取得了很大的成就,动物上也有了可喜的进展。选育是遗传改良的重要途径,传统的选育方法,盲目性较大,遗传标记辅助选育可大大增加育种的强度和育种方向,加快育种进程,这是当前国际间非常重视并可望有所突破的研究领域,RAPD 以其本身所有的诸多优越性将发挥重要的作用。

无论是辐射、杂交还是转基因育种,对射线处理、杂交及外源基因转入后后代基因组的变化了解很少,只能凭借后代表型加以判断,给选育带来很大困难。RAPD 技术问世以后,为这些问题的解决提供了转机。陆军等^[8]利用 RAPD 技术成功地检测了水稻辐射诱变和自然突变过程中基因组的变化;雷勃钧等^[9]用 RAPD 对外源高蛋白野生大豆总 DNA 导入栽培大豆作了分子生物学验证;陈洪等^[6]利用 RAPD 技术在 DNA 水平上探讨了外源精子对异育银鲫激发的后代的基因组的影响,开创了 RAPD 技术在鱼类育种方面的先例。

3.2 在遗传多样性分析和系统分类与进化研究中的应用

RAPD 分析中所需的样品量极少,其操作程序简单易行,实验周期短,因而可以进行数量较多的样品的分析。利用一套引物可得到不同种属、品系、群体甚至是个体的大量的 RAPD 分子标记,并可借助于计算机进行系统分析,所有这些特点,使得 RAPD 在群体遗传学、遗传

海洋科学

多样性分析和系统分类与进化研究中发挥重要作用。

3.2.1 RAPD 标记可用于生物的分类鉴定。目前 RAPD 已被广泛应用在鉴别、鉴定不同的属、种、亚种和品系。一个非常成功的例子是 Crowhurst 等^[21]用该技术对两个真菌品系作了分类学方面的鉴定,解决了经典真菌分类学上的一个难题;我国学者鲍晓明等^[10]也利用 RAPD 技术鉴定了两个小冰麦易位系。

3.2.2 RAPD 可用于研究生物的系统发育和进化、亲缘关系,特别是在种内水平上,为分子进化和系统分类研究提供了十分有利的工具。Halward 等^[22]用 RAPD 研究了花生各品种之间在进化上的关系;我国的庄炳昌等^[5]利用 RAPD 探讨了我国南北方野生和栽培大豆的起源和演化关系;昆明动物所的王文等^[1]应用 RAPD 技术检测了云南 4 个少数民族的 DNA 多样性,并进而分析了 4 个民族间的亲缘关系。

3.2.3 RAPD 标记可应用于群体遗传学研究,检测种群内种群间的遗传多样性水平,并为种群识别提供可靠的遗传标记。Chalmers 等^[19]利用 RAPD 技术分析了 *Gliricidia* 的两个种的不同种群内和种群间的遗传变异水平;Bardakci 等则用该技术评估了罗非鱼 *Tilapia fish* 的种群内种群间的遗传变异度。澳大利亚的 Garcia^[12]等尝试在斑节对虾中利用 RAPD 分析不同地理群体间的遗传多态性,并就其在虾类选育中的应用作了初步探讨。目前 RAPD 应用在群体遗传学研究中还刚刚起步,相信由于其相对于同工酶、RELPs 等所特有的优点,将会发挥越来越大的作用,特别是对于同工酶等的应用有限制的种类,其作用会越来越突出。象在海水虾类,由于由同工酶所揭示的种内水平上的遗传差异水平非常低, RAPD 有可能作为比同工酶更加灵敏的遗传标记,而在虾类物质资源遗传学研究中就有着很好的应用前景。

当然, RAPD 作为一种崭新的技术必然有尚不完善

的地方,但随着技术的不断发展和更多应用,这一新技术也会越加完善,应用也将越加广泛。

参考文献

- [1] 王 文等, 1994. 科学通报 39(20): 1 090~1 093.
- [2] 王京兆等, 1995. 遗传学报 22(1): 53~58.
- [3] 毛 龙等, 1994. 科学通报 39(22): 2 088~2 090.
- [4] 朱立煌等, 1994. 中国科学(B) 24(10): 1 048~1 052.
- [5] 庄炳昌等, 1994. 科学通报 39(23): 2 178~2 180.
- [6] 陈 洪等, 1994. 科学通报 39(7): 661~663.
- [7] 陆 军等, 1994. 科学通报 39(22): 2 103~2 105.
- [8] 陆 军等, 1993. 科学通报 38(23): 2 181~2 182.
- [9] 雷勃钧等, 1994. 中国科学(B) 24(6): 596~601.
- [10] 鲍晓明等, 1993. 遗传学报 20(1): 81~87.
- [11] A. J. Jeffreys *et al.*, 1985. *Nature* 314: 67-73.
- [12] D. K. Garcia *et al.*, 1995. *Aquaculture* 130: 137-144.
- [13] D. Zamir *et al.*, 1988. *Mol. Gen. Genet.* 213: 254.
- [14] F. Bardakci *et al.*, 1994. *Heredity* 73: 117-123.
- [15] G. B. Martin *et al.*, 1991. *Proc. Natl. Acad. Sci., U. S. A.* 88: 2 336-2 340.
- [16] I. Paran *et al.*, 1991. *Genome* 34: 1 021-1 026.
- [17] J. G. K. Williams, *et al.*, 1990. *Nucleic Acids Res.* 18: 6 531-6 535.
- [18] J. Welsh, *et al.*, 1990. *Nucleic Acids Res.* 18: 7 213-7 218.
- [19] K. J. Chalmers *et al.*, 1992. *Heredity* 69: 465-472.
- [20] N. D. Young *et al.*, 1980. *Genetics* 120: 579-585.
- [21] R. N. Crowhurst *et al.*, 1991. *Current Genetics* 20: 391-396.
- [22] T. Halward *et al.*, 1992. *Plant Molecular Biology* 18: 315-325.