

# RAPD 技术及其在藻类学研究中的应用

## RAPD TECHNIQUES AND ITS APPLICATION IN PHYCOLOGICAL STUDY

赫英俊 段德麟

(中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

近年来,分子标记技术在海洋生物研究领域中的应用取得了很大的发展,尤其是以 PCR (Polymerase Chain Reaction) 技术为核心的 RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) 标记方法在藻类学研究中得到了较广泛的应用。RAPD 技术是由美国杜邦公司的 Dr. Williams 等和美国加利福尼亚生物研究所的 Welsh 等于 1990 年几乎同时报道的一种 DNA 分子标记技术。该技术一经出现,便以其简便、快速、高效和灵敏等特点引起广大生命科学工作者的极大兴趣。目前,已在生命科学的许多领域中得到富有成效的运用<sup>[1]</sup>。文献检索结果表明,以 RAPD 标记为主要研究手段的论文多于 1 000 篇,足见其应用之广泛。在分子标记技术应用于藻类学的研究中,与 RAPD 技术相关的应用报道日益增多。本文就 RAPD 标记技术的原理、特点以及在藻类学中的应用方面作简要论述。

### 1 RAPD 方法的原理

RAPD 意指随机扩增多态性 DNA,它通常以一个 10 碱基的任意序列的寡核苷酸片段为引物,在未知序列的基因组 DNA 上进行随机的 PCR 扩增。在基因组上,某一引物可以与 DNA 中多个位点互补结合。当这些引物在基因组 DNA 某一区域上具有反向平行的两个结合

位点,并且这两个位点之间的距离是 PCR 能够扩增的区域时,那么该 DNA 片段就可以被扩增出来。通常在基因组中有多少这样的位点,一次 RAPD 反应就能扩增出多少个 DNA 片段。扩增出的 DNA 片段可用琼脂糖凝胶电泳进行分离,并经溴化乙锭专一性染色后进行观察和记录。

通过 RAPD 技术检测出的多态性的理论依据主要有如下几方面: (1) 在两个退火位点之间插入了一个大的片段而使原来的片段太大而不能扩增,从而失去这个位点; (2) 引物的两个退火位点之间失去一个携带的 DNA 片段也导致一个位点的丢失; (3) 在两个退火位点之间发生碱基突变而影响到所在位点上引物的退火而导致多态性片段的得失; (4) 小片段的插入或缺失会改变扩增片段的大小,从而产生共显性 RAPD 片段,但实际上片段大小的改变很难见到。

### 2 RAPD 标记技术的特点

#### 2.1 无需预先知道供试基因组的有关 DNA 序列,多态性高,信息量大

RAPD 标记通常以单个 10 碱基的寡核苷酸片段作为引物对基因组 DNA 进行随机扩增,不需预先知道基因组中某一特定的 DNA 序列。理论上任意 10 碱基的引物有  $4^{10}$  种,如果在 RAPD 标记中使用双

引物组合,更可有接近于  $4^{10} \times 4^{10} / 2$  种组合,因此可以说可供选择的引物几乎是无限的,所得到的信息也几乎是无限的。RAPD 标记在引物结合区的单碱基突变往往就可以导致扩增带型的变化,因此,用 RAPD 标记可以检测到单碱基的突变,多态性很高。另外,RAPD 扩增所用的引物是任意序列的寡核苷酸片段,因此理论上可以覆盖到基因组的任何位置,可以弥补其他标记所覆盖不到的基因组区域。

#### 2.2 RAPD 标记为显性标记,符合孟德尔遗传规律

在杂交体系中,RAPD 片段在  $F_1$  代表现为两个亲本扩增片段的叠加, $F_2$  代表发生分离,符合孟德尔遗传规律。它所揭示的遗传变异是核苷酸的碱基变化的结果,改变了引物的结合位点或是在扩增范围内有突变(大片段的插入或缺失)都会导致扩增产物缺失,因此 RAPD 标记是一种显性标记,它不能区分纯合体(AA)和杂合体(Aa)基因型,这是 RAPD 标记的主要缺陷。但在一些单倍体群体的后代中,如苔藓、真菌、海带等一些海藻的配子体,银杏尚未受精的胚珠

\* 国家 863 计划资助项目 819-03-02 号;中国科学院海洋研究所调查报告第 4094 号。  
收稿日期:2000-06-24;  
修回日期:2000-07-11



等, RAPD 标记 (Aa) 在子代中将表现为 1:1 的分离比例, 显性标记直接为 A。因此, 在单倍体群体的标记研究中, RAPD 标记直接表现为共显性。

### 2.3 快速、高效、简便

RAPD 只需一台 PCR 扩增仪和一套电泳设备即可进行检测, 无需克隆, 杂交等复杂操作, 无需使用同位素或其他非放射性标记, 所用引物也已商品化, 一个反应所需的 DNA 量也极少, 只需几 ng, 操作起来相对于其他标记方法要容易得多, 更适宜于群体研究与分析。

## 3 RAPD 标记技术在藻类学中的应用

自 90 年代以来, RAPD 标记技术以其独特的优点, 已广泛应用于动、植物的遗传育种、基因诊断、种群遗传学、生物系统与进化等研究中。但 RAPD 标记在藻类学中的应用尚不如高等植物开展得深入和广泛, 现就其在藻类学研究中应用的几个方面作一简要论述。

### 3.1 遗传变异分析

Alberto 等<sup>[4]</sup>用 RAPD 标记研究了石花菜 (*Gelidium sesquipedale*) 的 3 个自然种群的遗传相似性, 认为 RAPD 遗传标记对石花菜的遗传相似性分析有意义。Dutcher 等 1994 年用 RAPD 标记技术对红藻中的紫菜 (*Porphyra*) 的 3 个种进行了鉴定, 用该技术可以区分异源和同源的品系。另外, Coyer 等<sup>[4]</sup>对褐藻 (*Postelsia palmaeformis*) 的遗传变异进行了分析, 能有效地区分个体之间的差异。Kuang 等<sup>[5]</sup>和 Song 等<sup>[6]</sup>对中国养殖和野生的紫菜 (*Porphyra*) 进行了研究, 能够区分同源和异源的细胞系。从这些研究可以看出, RAPD 标记技术对于海藻遗传变异的研究十分有效。

### 3.2 用于经济海藻的种质鉴定和辅助育种工作

海带、裙带菜、紫菜、江蓠等海藻具有重要的经济价值, 已形成生产规模。但目前在这些经济海藻的育种工作中, 仍然以混合系栽培为主, 没有建立起完整的良好鉴定、选育体系, 造成了育苗和养殖的不稳定性。近年来, 利用 RAPD 标记技术对经济海藻的种质鉴定和辅助育种的工作逐渐开展起来。Patwary 等 1994 年应用 RAPD 标记对石花菜 (*Gelidium wighamii*) 的杂种优势进行了研究, 将杂交后代的杂种和纯种区分开, 比较分析证实, 杂种生长速度比对照组的四分孢子体快 9.5%~130%, 显示出较强的杂种优势。贾建航等 2000 年应用 RAPD 分子标记技术对我国紫菜生产上常采用的细胞系做了种质鉴定工作, 作者也应用 RAPD 分子标记技术对我国海带栽培中常见的细胞系进行了鉴定工作(待发表)。这为应用分子标记技术对经济海藻种质鉴定和辅助育种提供了帮助。

### 3.3 构建遗传图谱

遗传图谱的构建是当前分子遗传学研究的热点。RAPD 标记由于其快速、高效, 因此有利于构建高密度的遗传图谱。Beau mont 1996 年报道, 在多种农作物和其他高等植物中已应用 RAPD 标记单独或在原有图谱的基础上构建了遗传图谱。在藻类研究领域, Haring 等 1996 年为了研究雌雄异株的绿藻 (*Chlamydomonas eugametos*) 的与性别相关的一些性状, 构建了一个具有 15 个 RAPD 标记, 3 个形态学标记和一个 RFLP 标记的部分连锁图谱。这为运用遗传图谱研究与性相关的性状, 及以遗传图谱为基础克隆有关基因的工作打下基础。

### 3.4 存在的问题和解决方法

虽然 RAPD 标记有许多优点, 但是也存在着许多问题, 其中之一就是 RAPD 的重复性问题。

RAPD 对反应条件很敏感, 主

要由于所用引物很短, 与模板的结合不是很稳定, 扩增时受到多种因素的影响, 包括模板的浓度与纯度, 引物与 dNTP 的用量, MgCl<sub>2</sub> 的浓度, 缓冲系统的种类与 pH 值, Taq 酶的来源与用量, 扩增程序等, 这些因素都可能影响到 RAPD 扩增的样式。

解决 RAPD 重复性的问题的办法, 一是将 RAPD 全部过程尽可能标准化, 从作者的实验结果来看, RAPD 的重复性问题没有如当初想象得那么严重。在作者对海带配子体细胞系 RAPD 标记的研究中, 将各种条件都标准化后, 两批材料的结果基本一致(结果待发表)。汪小全等 1996 年也探讨了 RAPD 应用于遗传多样性和系统学研究中的方法学问题, 他们也认为, 采用相同的 PCR 流程在同一型号的 PCR 仪上运行, 结果具有很好的重复性。

解决 RAPD 重复性的问题的办法之二是先用 RAPD 标记技术对问题进行研究, 筛选出有意义的 DNA 片段, 如与某一性状紧密连锁的 RAPD 片段, 然后将该片段转换成可靠的和操作简单标记。Paran 等于 1993 年发展了一种新型的分子标记技术称为 SCAR (Sequence Characterized Amplified Region), 它是建立在 RAPD 技术基础之上的、更为可靠的分子标记技术。这种标记通常是对感兴趣的片段进行克隆和测序, 通过序列分析设计出一对较长的特异引物, 用该引物将原来感兴趣的 RAPD 片段专一地扩增出来。这些扩增出的 SCAR 片段或者维持原来的 RAPD 片段的显性行为, 或者转换为共显性标记。

相对于 RAPD 标记, SCAR 标记是一个特异的 PCR 扩增, 对反应条件不敏感, 因而得到可靠的和重复性好的扩增产物。虽然 SCAR 标记工作量较大, 但是 SCAR 标记有许多优点, 因此将有意义的 RAPD 片

段转换成 SCAR 标记,有助于研究的深入,如在大豆抗病基因研究中的应用<sup>[2]</sup>。目前,将特异的 RAPD 标记转换成 SCAR 标记的工作已经在紫菜和海带中取得了一定进展,这将对我国经济海藻的种质资源鉴定,目的基因的筛选与定位具有重要意义,为实现我国海藻栽培的良

种化提供坚实的科学依据。

#### 主要参考文献

- 1 刘继红,胡春根。生命的化学,1998,18(1):33~35
- 2 邹继军等。科学通报,1999,44(23):2 544~2 550
- 3 Alberto F. *et al.*. *J. Phycol.*, 1997, 33:706~710

- 4 Coyer J. A. *et al.*. *J. Phycol.*, 1997,33: 561~568
- 5 Kuang M. *et al.*. *Chin. J. Oceanol. Limnol.*, 1998,16(suppl.):140~145
- 6 Song L. S. *et al.*. *Chin. J. Oceanol. Limnol.*, 1998,16(3):237~242

(本文编辑:张培新)