

中药材 DNA分子标记研究的技术问题

II . RAPD实验技术和方法学论述

郭宝林¹,戴 波²

(1. 北京中医药大学 中药鉴定室,北京 100094; 2. 云南大学,云南 昆明 650091)

摘要: 主要根据作者的经验,对 RAPD实验技术中的扩增仪及扩增程度、DNA模板浓度及纯度、引物的种类与浓度、Taq酶、缓冲系统、Mg²⁺、dNTP的浓度、设立空白对照、扩增产物鉴定、条带统计和同源性认定、RAPD反应程序标准化等问题进行了论述,其中降解了的DNA模板在不同的浓度时会产生不同的扩增式样,国产Taq酶的不同批次间会产生较大的扩增差异为首次报道,并提供了获得清晰条带的电泳策略。概述了RAPD的主要特点和适用范围。

关键词: RAPD技术; DNA模板; Taq酶

中图分类号: R282.1 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2002)02-0178-03

Some technical problems in studies on DNA markers of Chinese materia medica

II Discussing on RAPD technology and methodology

GUO Bao-lin¹, DAI Bo²

(1. Laboratory of Chinese Materia Medica Identification, Beijing University of TCM, Beijing 100094, China;

2. Yunnan University, Kunming Yunnan 650091, China)

Key words RAPD technique; DNA model; Taq enzyme

RAPD 是 DNA 随机扩增多态性 (random amplified polymorphism DNA) 的简称,创立于 20 世纪 90 年代,是目前中药研究者最常使用的 DNA 标记技术,其原理不再详述。RAPD 标记的多态性从理论上来源于:① 由于 RAPD 产生的条带的长度范围一般在 200~2 000 bp,当一个大的 DNA 片段插入两个引物结合位点之间时,该段 DNA 变得太长而难以扩增导致条带消失;② 在一个或两个引物结合位点产生缺失或插入,使得引物结合位点缺失而导致条带消失;③ 在引物结合位点上一个核苷酸替换也影响引物的退火而导致多态性片段的得失或改变片段大小;④ 小段 DNA 的插入或缺失使得扩增出的条带长度有所变化。

在实际工作中发现的长度差异极少能观察到,条带存在(位点 A)或缺失(位点 a),作为等位基因,在纯合(AA)及杂合(Aa)的情况下,扩增片段均可见,而只有当片段缺失时才揭示隐在的基因型。即 RAPD 一般不能区分纯合(AA)与杂合(Aa)基因型,故而 RAPD 是显性性状。

1 主要技术问题

1.1 扩增仪及扩增程序: RAPD 区别于一般 PCR 的特点是引物较短,因此退火温度一般在 35℃~40℃,40℃以上会抑制 PCR 产物^[1],有时为了增加产物的特异性会增至 45℃,此时仅有极少量结合力极强的带出现,而在 36℃以下,小于 1℃的变化会得到完全不同的扩增式样^[2],由于引

物与模板结合力较弱,在退火之后,一般不可直接置于延伸温度 70℃~72℃下,否则引物会失去与模板的结合,故而常用的水浴式 PCR 仪不太适于 RAPD 研究,在逐渐升温的金属模块 PCR 仪中,升温速度便成为 PCR 仪的重要技术参数。在实验过程中,为得到良好扩增结果,调整升温速度也作为重要的考虑因素,同时,因使用不同的 PCR 仪和不同实验过程使用不同的升温速度调整值将得到缺乏可比性的结果。

1.2 DNA 模板浓度及纯度: 基于 PCR 的 RAPD 技术,要求反应模板尽量少含影响扩增的杂质,对于植物材料多糖与多酚等次生物质必须尽可能去除^[3],但一般不必进行氧化铯梯度离心或使用纯化试剂盒。

一般认为在每个 PCR 反应中,5~500 ng 的模板量能提供完全一样的扩增结果。低浓度的 DNA (例如 pg 水平的 DNA) 会影响 RAPD 式样,浓度很高时很多带会丢失或整个扩增呈弥散状或完全得不到扩增带^[4],一般认为模板浓度为 1~10 ng/μL 的范围内有最佳扩增^[5],作者发现 0.2~1 ng/μL 效果较好,最佳的模板浓度范围取决于研究类群与模板纯度,在 DNA 模板不很纯情况下,宁可使用有效浓度范围内的最低极限,使抑制 Taq DNA 聚合酶活性因子的影响降到最小。另外,作者还发现降解了的模板 DNA 对模板浓度很敏感,即不同的浓度会出现不同的扩增式样,其影响程度还在研究考察中,因此 RAPD 技术在研究古老材料,或

因各种原因 DNA 发生降解的材料(如中药材)时可能受到一定限制。

1.3 引物的种类与浓度: 有极其大量的引物种类可供实验时选择, Fritsch 等^[6]用了 400 号不同的引物研究了植物 3 个亲缘关系较远的属, 得出的结论是引物的扩增力(即扩增带的有无、多少和强弱)与 DNA 来源大体上是无关的;汪小全等^[7]和邹喻苹等^[8]也发现类似的结果, 用这些结果暗示基因组 DNA 序列相当保守, 在一个类群能扩增的引物有 70% 的可能在其他类群中能扩增。作者用上海生工合成的引物 S1~S40 对多种材料进行了扩增, 统计发现有 50% 的引物在所有类群中可得到扩增, 17% 的引物至少在一种材料中可得到多态性扩增, 在多数材料中有良好多态性结果的引物有 16 个, 它们分别是 S4 S10 S11 S12 S17 S18 S27 S28 S34 S42 S43 S201 S224 S227 S276

引物的通常浓度是 0.1~2.0 $\mu\text{mol/L}$ ^[9], 这时大多数引物能产生 6~12 条扩增带, 浓度太低不能扩增, 浓度太高产生新的扩增带^[4,10], 不同实验室有自己习惯使用的浓度, 但只要在通常范围内影响不显著, 如作者实验室使用量 15 ng/25 μL (相当于 0.2 $\mu\text{mol/L}$)。

1.4 Taq 酶: 不同厂家、不同商标的 Taq 酶的纯度、聚合效率有差别, 因而常常会给出不同的 RAPD 产物, 因此一次实验最好中途不要换酶。中国医学科学院基础所、中国科学院遗传所、复旦大学、华美生物工程公司、中国农业大学、上海生工等许多单位生产的 Taq 酶均可使用。但作者发现同一公司、同一商标的酶, 在不同的批次间扩增效果上有差异, 甚至有很大的差异, 这可能是因为国产酶质量相对不稳定, 国外未见类似报道。Taq 酶的品牌是引起 RAPD 结果缺乏可比性的主要原因之一。

在 RAPD 中酶的用量大都是每反应 0.5~1 U(25 μL), 用量与酶来源有关, 有时可达 2.5 U, 用量过多会产生非特异性扩增。

1.5 缓冲系统、 Mg^{2+} 、dNTP 的浓度: RAPD 实验使用一般的 PCR 反应缓冲体系, 但对其中的 Mg^{3+} 浓度敏感, RAPD 反应需要 Mg^{3+} 浓度一般较高, 每次 RAPD 实验也需确定扩增反应的最佳 Mg^{3+} 浓度, 常用于 RAPD 的 Mg^{3+} 浓度为 2 mmol/L。

dNTP 是 PCR 的原料, 浓度太高产生错误掺入, 浓度太低影响产率, RAPD 使用的 dNTP 浓度较一般特异性扩增为高, 推荐使用 100~200 mmol/L。

BSA(牛血清白蛋白)常用于保护 Taq 酶的活性, 得到更清晰的条带, 是药材 RAPD 扩增体系中的常用组分, 参考终浓度 0.1 mg/ μL 。

1.6 设立空白对照: RAPD 实验过程中, 每次扩增反应设立不加模板的空白对照十分必要, 这样可以排除实验操作过程中空气、实验器皿或是试剂及操作者带来的污染。在空白中少量带的出现也很常见, 原因是 Taq 酶来自嗜热水生菌, 经生物工程制备并提纯, 在此过程中难免在酶液中含有少量工程菌的 DNA, 使得在不加反应样本模板的情况下也出现扩

增, 这样的带在多样中出现时带型统计应予以排除。

1.7 扩增产物鉴定: 根据 RAPD 产物的长度(一般 100~2 000 bp), 使用 1.4%~1.5% 的琼脂糖凝胶电泳进行分离, 在恒定电压(小于 5 V/cm)下泳动, 使 DNA 分子量标准完全展开后结束电泳。为了不同重复实验易于比较, 每次的电泳泳动距离要相对固定。溴化乙锭可加入琼脂糖中, 但由于溴化乙锭常带正电荷, 电泳过程中会向负极泳动, 长时间电泳之后, 前排胶孔的样本的小分子量带变得模糊不清, 可以采取下列办法解决: ①配更长的胶, 前面部分不上样; ②在两排胶孔上样时, 电泳一半时间后将凝胶从上排胶孔处割开, 前后两块交换放置继续电泳(这时要注意样本顺序); ③采取配胶时不加溴化乙锭, 而电泳后再用溴化乙锭稀溶液染色。

1.8 条带统计和同源性认定: 对 RAPD 实验得到的不同样本的共迁移条带(即相对应于模板 DNA 的相应位点)可进行 0 或 1 的统计, 有两种策略: 一种是有带(不论强带或弱带), 证明位点存在记为 1, 无带证明位点缺失记为 0; 另一种策略是强带记为 1, 弱带和无带记为 0, 该方法的缺点是强带比弱带强多少时才作不同的判别, 有时难以把握, 有一些个人经验。但无论选择何种方法, 在整个实验中要固定一个原则, 这两种方法在进行多样性分析或亲缘关系探讨时, 在数据量大的情况下会得到同样的结果。

RAPD 检测的是扩增条带的长度差异, 作者认为, 在属种内和居群内, 特定大小的 RAPD 片段具有序列同源性和遗传相关性的假设是普遍有效的, 但事先对于所研究对象的进化速率及亲缘关系最好有一个估计, 尽可能避免由于关系远而致共迁移条带的同源性不好, 使统计结果出现较大偏差。如果实验需要知道确切同源性, 可进一步用杂交实验来实现^[11]。

总之, 在进行带型统计时, 无法明确认定弱带或无带, 或由于不同样本出现了极为相近迁移率的带型而无法判定为不同的位点时, 这样的位点宁可弃之不用, 以减少统计结果的噪音。

1.9 RAPD 反应程序标准化: RAPD 对反应条件的敏感性和不同实验室间结果没有互通性的问题是影响 RAPD 方法声誉的重要原因, 但由于该方法十分方便实用, 仍是目前使用最为广泛的 DNA 标记, 因而有关 RAPD 实验程序标准化的呼吁也越来越强烈。

国际植物遗传资源研究所(IPGRI)对许多农作物列出了标准的、国际上认可的描述实验条件和结果的表格, 即一种提供 Genbank 的样品数据表^[5,12], 对 RAPD 过程中反应的化学组成、PCR 热循环仪的生产厂家与型号、热循环的温度程序、RAPD-PCR 片段的分析、RAPD 结果的展示等项都有详细的规定。作者认为有关 RAPD 的实验论文也应给出这些参数的更为详细的值, 以便其结果有可能被其他实验室重复以及有利于方法上的推广, 其中除一般文献提及的数据外, 还应给出 DNA 检测方法的详细过程、反应体系中 DNA 模板的量(ng)和体积(μL)、Taq 聚合酶的生产厂家和商标(甚至批号)、扩增引物的序列、热循环仪退火到延伸之间的

变温速率等。

作者在进行中药 DNA 标记的实验中,使用了固定的 DN A模板量、Taq 酶种类和反应各组分浓度、固定的循环程序、固定的电泳条件及相对固定的引物群,在参照 PE 公司的 PE9600热循环仪退火与延伸变温速率为 1.3℃ /s的情况下,调整国产 PCR仪为相近速率,也得到了重现性较好的结果,现已经用这些固定条件对淫羊藿、薯蓣、厚朴、丹参、芍药、黄芩、牛膝等进行了研究,均得到好的结果。所有从事 RAPD研究的人员都有体会,RAPD实验条件的摸索是十分费时的过程,当一切条件确定之后,工作已经完成了 80%,有一种标准化的固定条件,研究工作大大简化。

2 特点和适用范围

2.1 RAPD可提供的信息量几乎是无限的,因为可选择的随机引物数十十分巨大。

2.2 RAPD是完全随机扩增,不需要知道研究对象的序列背景。

2.3 只需要 ng(甚至 pg)级的 DN A模板量,DNA 模板也不需要氯化铯梯度离心或特殊的纯化试剂盒纯化。

2.4 技术简单易行,根据作者的经验,如果材料 DNA 提取顺利,对于 40~ 60个样本的 RAPD研究,只需 2个月即可完成(前提是本实验室已有成熟固定的方法)。

2.5 RAPD是显性遗传标记,不能识别纯合子和杂合子,使得等位基因频率无法评估,同样在用分离的 F2代构建遗传图谱时,也会失去有价值的信息,因而并不是构建遗传图谱最佳 DN A标记,但方法上快速便捷,因而应用 RAPD标记构建遗传图谱已十分普遍。

2.6 RAPD方法不同实验室间互通性差,影响因素多样化,但在不需要实验室间相互交流的工作中,如居群遗传多样性估计,类群间亲缘关系的探讨等,在进行大量的位点研究后,其变异比率趋向于饱和,即使用不同的引物,得到完全不同的条带,经统计其结果应是相同的(或相似的),出现偏差应归于不同的取样原则和 RAPD方法本身的局限,而非实验参数和操作过程。

2.7 最适合于种下水平遗传型检测,包括野生天然居群的遗传结构分析、种质资源的评估、栽培植物品种的鉴定等。当 RAPD用于研究种间甚至属间等较高群间的系统关系时,由于类群间积累的变异过多,对扩增产物不进行同源性分析的前提下,其结果可能与真实的系统关系相左,而且采样策略也面临挑战,用一个个体代表一个种或用一个种代表一个属

都可造成结果的极大偏差,因此 RAPD技术在探讨种间关系时也只是适合物种数目不多的属,包括几个近缘种的复合体、属下物种数不多的组以及与栽培品种密切相关的物种等,在这样的范围内便于居群采样。

2.8 RAPD用于评估亲缘关系时,由于 RAPD位点本身不具任何功能意义,这些位点的进化速率、选择压力均未知,只能从相似性系数或遗传距离作表证分析,得到的树系图不能反映类群间的系统发育关系。

参考文献:

[1] Williams J G K, Kubelik A R, Livak K J. DN A polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers [J]. Nucl Acid Res, 1990, 18: 6231-6235.

[2] Penner G A. RAPD analysis of plant genomes [A]. Jauhar P P. Methods of genome analysis in plants [C]. New York: CRC Press, 1996.

[3] 郭宝林,李家实,阎玉凝. 中药材 DNA 分子标记研究的技术问题 I. 植物药基因组 DNA 的提取 [J]. 中草药, 2000, 31 (12): 951-954.

[4] 邹喻苹,蔡美琳,王晓东. 古代“太子莲”及现代红花中国莲种子资源的 RAPD 分析 [J]. 植物学报, 1998, 40(2): 163-168.

[5] 邹喻苹,葛颂,王晓东. 系统与进化植物学中的分子标记 [M]. 北京: 科学出版社, 2001.

[6] Fritch P. Constancy of RAPD primer amplification strength among distantly related taxa of flowering plants [J]. Plant Mol Biol Rep, 1993, 11: 10-20.

[7] 汪小全,邹喻苹,张大明,等. 银杉遗传多样性的 RAPD 分析 [J]. 中国科学 (C 辑), 1996, 26(5): 436-441.

[8] 邹喻苹,汪小全,雷一丁,等. 几种濒危植物及其近缘类群总 DN A 的提取和鉴定 [J]. 植物学报, 1994, 36(7): 528-533.

[9] Weishing K, Nybom H, Wolff K, *et al.* DN A fingerprinting in plants and fungi [M]. Boca Raton: CRC Press, 1995.

[10] 裴颜龙,邹喻苹,尹蓁,等. 矮牡丹与紫斑牡丹 RAPD 分析初报 [J]. 植物分类学报, 1995, 33(4): 350-356.

[11] Lanner C, Bryngelsson T, Gustafsson M. Genetic validity of RAPD markers at the intra-and inter-specific in wild *Brassica* species with $n= 9$ [J]. Theor Appl Genet, 1996, 93: 9-14.

[12] Lowe A J, Hanotte O, Guarino L. Standardization of molecular genetic techniques for the characterization of germplasm collections: the case of random amplified polymorphic DN A (RAPD) [J]. Plant Genet Resour News1, 1996, 107: 50-54.

[13] Reiter R S, Williams J G K, Feldmann K A. Global and local genome mapping in *Arabidopsis thaliana* by using recombinant inbred lines and random amplified polymorphic DN As [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1992, 89: 1477-1481.

亲脂性葡聚糖凝胶 LH-20

本品以葡聚糖凝胶 G-25为基质,经羟丙基化后所得,集凝胶过滤、分配色谱和吸附层析于一体,适合用有机溶剂分离的亲脂性小分子化合物纯化,能将结构性能非常相近的有机物得以分离,尤其适合中草药中具有生理活性有效成分的分离,如多酚类黄酮、胆固醇、脂肪酸、激素、维生素等。多年来我院从事葡聚糖凝胶系列产品生产,产品性能达到国外同类产品水平。欢迎大家来电来函,我们将提供性能稳定的合格产品。目前我们还生产葡聚糖、琼脂糖类离子交换剂等产品。

单位: 上海医药工业研究院
地址: 上海市北京西路 1320号 电话: (021) 62479808转 475分机 传真: (021) 62791715转徐伟收
E-mail: xrwk@ 263.net 邮编: 200040 联系人: 王芝祥 徐伟