

RAPD 技术及其在动物遗传育种中的应用

张丕燕 谢 庄 刘红林 陈 杰

(南京农业大学动物科技学院, 南京 210095)

摘要 RAPD 技术是在 PCR 基础上发展起来的一种 DNA 多态性检测技术, 已广泛应用于基因组研究的各个领域。本文概述了 RAPD 反应的原理、特点, 总结了其在遗传多样性检测、亲缘关系鉴定、遗传连锁分析和数量性状的辅助标记选择等方面的应用, 并肯定了 RAPD 在动物遗传育种领域的应用前景。

关键词 RAPD 遗传多样性 遗传连锁分析 亲缘关系 辅助标记选择

1 前言

七十年代以来, 分子生物学技术开始迅速发展, 1980 年, Botstein 提出 DNA 限制性片段长度多态性 (RFLP) 可以作为遗传标记, 从此开创了直接应用 DNA 多态性发展遗传标记的新阶段。八十年代后期, DNA 多聚酶链式反应 (PCR) 的发展, 使直接扩增 DNA 的多态性成为可能, 在此基础上, 产生了多种新型分子标记, 诸如扩增片段长度多态性 (AFLP)、串联重复序列 (VNTR)、单链构型多态性 (PCR-SSCP) 等, RAPD 是其中较为突出的一种。

RAPD 即随机扩增多态性 DNA (Random Amplified Polymorphic DNA), 是由 Williams 和 Welsh 在 1990 年各自独立发现的一种 DNA 多态检测技术^[1, 2]。该技术自问世以来, 以其简便、经济、快捷、且无须事先了解物种的相关分子生物学信息等特点, 迅速渗透到基因组研究的各个领域, RAPD 技术目前已广泛应用于系统发育研究、动植物物种鉴定、群体遗传分析、基因图谱构建、以及疾病诊断等诸多领域。本文拟就 RAPD 技术研究现状及其在动物遗传育种领域中的应用作一概述。

2 RAPD 反应原理和特点

随机扩增多态性 DNA 是在 PCR 的基础上发展起来的, 它以一系列不同的, 以少数碱基组成的随机核苷酸序列作引物, 对样本基因组 DNA 进行 PCR 扩增, 每个 RAPD 片段的产生要求在可扩增范围内 (0.1—3kb) 存在与引物匹配的反向互补序列, 引物结合位点 DNA 序列的改变以及两扩增位点之间, 碱基的缺失、插入或置换都能导致扩增片段的数目和长度的差异, 最后经琼脂糖凝胶电泳分离和 EB

染色来检测 DNA 片段的多态性。

RAPD 继承了 PCR 技术效率高, 样品用量少, 灵敏度高, 检测容易等优点, 同时又有其独到之处。首先, RAPD 反应引物是随机排列的, 无需专门设计, 且引物较短 (一般为 9 - 20bp), 这使得 RAPD 技术甚至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, 并通过统计分析和分类研究提供分子生物水平的证据。这是其它此类研究所无法比拟的。再者 RAPD 技术可以直接对所检测的 DNA 多态性进行分析, 省去了许多诸如制备克隆, 同位素标记, Southern 印迹, 分子杂交等繁杂的预备性工作。另外 RAPD 反应要求退火温度较常规 PCR 要低, 一般为 36℃, 以保证短核苷酸引物与模板 DNA 的稳定结合。

RAPD 反应较易受到各种因素的干扰, 无论是引物、模板 DNA、DNA 多聚酶、还是退火温度都可能严重影响其反应结果, 导致电泳图谱中弥散状背景的产生、扩增产物的消失以及电泳谱带位置的改变, 这些现象都可能成为 RAPD 反应的重复性差, 稳定性不佳的直接原因。目前, 多从以下几个方面考虑来提高反应的稳定性。1. 规范操作, 反应体系的组成成份力求一致, 尽快可能地使 RAPD 反应标准化。2. 提高扩增片段的分辨率。就这方面来讲, 用 PAGE 电泳和银染法检测优于琼脂糖凝胶电泳。荧光 RAPD 法 (Fluorescent RAPD) 是用荧光素标记引物, 并用 4% 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 对提高 RAPD 的稳定性极为有效^[3]。Valentini 认为毛细管区域电泳法 (capillary zone electrophoresis) 是一种更加灵敏、准确和经济的检测手段, 同样条件下, 可以获得更多的 RAPD 扩增片段^[4]。3. 将 RAPD 标记

转化为 SCAR (Sequence characterized amplified region) 标记后,再进行常规的 PCR 分析,可以提高反应的稳定性、可靠性^[5]。

3 RAPD 技术在动物遗传育种上的应用

3.1 品种品系遗传多样性分析

兰宏等对 6 只笼养滇金丝猴 (*Rhinopithecus bieti*) 进行了随机扩增多态性 DNA 及遗传多样性分析,结果显示,滇金丝猴群体的遗传多样性很低,他认为,贫乏的遗传多样性使目前处于濒危境地的滇金丝猴生存情况更加危险,同时其本身也可能是造成目前滇金丝猴濒临灭绝的原因之一,为此他提出了让遗传距离较远的个体间进行交配的笼养繁育计划^[6]。许多学者认为,家畜遗传多样性的丢失比野生物种多样性的丢失对人类的损害更大。Bardin 对 7 个不同的牛的品种之间和各品种内的遗传变异进行了分析,结果表明,人为的选择降低了品种之间和品种内的遗传多样性^[7]。*Bos taurus* 是一种珍稀的抗锥虫病的非洲牛品种,*Bos indicus* 基因的引入很可能威胁到该种质资源,为此,Teale 利用 RAPD 技术扩增出 *Bos indicus* 品种特异性片断,为该品种基因渗入的检测提供了一种方便、可靠、有效的工具^[8]。RAPD 技术自产生之日起,即在生物种群区分和鉴定方面显示了巨大的潜力和优势。尤其 RAPD 分析可以在对物种基因组没有任何分子生物学资料的情况下很方便地对其进行 DNA 多样性分析,可以预见,RAPD 技术将会在种质资源的监测和估测动物遗传多样性方面发挥更大的作用。

3.2 群体遗传结构及亲缘关系分析

由于 RAPD 标记位点多,大量随机引物的使用,使 RAPD 标记覆盖物种的整个基因组,一套完整全面的 RAPD 资料能够反应出品种(间)的亲缘关系及系统发育情况。Smith 对四个鸡的品种和两个火鸡品系进行了 RAPD 分析,用筛选出的 42 个引物成功地扩增出鸡和火鸡的特异性 DNA 片段并计算出群间遗传距离,绘出的遗传关系树状图与种群间的系统发育关系相一致,该结果为 RAPD 技术在家禽群体遗传关系中的应用提供了证据^[9]。Zhang 扩增了鸡的三个品系的 DNA 池,并计算了品系间的条带共享率和遗传距离,结果表明池 DNA 的 RAPD 分析可用于鸡品系间遗传距离的计算^[10]。为了区分洛岛红鸡和白来航鸡两个近交系,Wei 用 120 个随机引物扩增了 22 个 RAPD 片断,其中有 2 个性连锁标记^[11]。

Kantanen 用 RAPD 方法对 5 个品种的牛和 2 个品种的羊,分别用 11 和 13 个引物探讨了品种内的遗传变异,羊和牛分别发现了 7 和 3 个多态性标记,相似系数的计算表明,羊比牛具有更高的纯合度,三个牛的品种间(内)的变异程度不大^[12]。Gwakisa 用 141 个随机引物对三个瘤牛品种的池 DNA 进行扩增,随后用筛选的两个品种特异性引物分别对每个品种的个体进行扩增,结果显示,品种内比品种间具有更高的条带共享率(Bandsharing)他还利用 ILO1065 引物检测到一个长 1.1kb 的瘤牛特异性标记^[13]。Mel'nikova 对 5 个家羊品种、盘羊(亚洲野羊)和莫夫隆羊(非洲野羊)的 RAPD 分析显示,家羊和盘羊具有很大的相似性,分析认为,这可能由于在驯养区偶然发生了家羊和野羊的杂交^[14]。Ezer AD 分析了 7 个狗品种的 RAPD 资料,他认为 RAPD 技术能够产生鉴别狗品种的 DNA 指纹图谱,能为基因作图提供遗传标记^[15]。比较了几种 DNA 技术的应用后,Glazko 认为 RAPD-PCR 方法是揭示动物品种间(内)遗传多态性快捷、有效的分析技术^[16]。国内,RAPD 也已广泛用于家畜家禽的亲缘关系分析和群体遗传研究,RAPD 标记目前被认为是一种最有前途的群体遗传标记。

3.3 遗传连锁分析和基因定位

Williams 提出 PARD 分析方法时就曾指出,RAPD 标记适合群体遗传学研究和基因定位^[1]。利用它可快速寻找两组 DNA 样品多态性差异,进而得到与此差异区域相连锁的 DNA 标记,RAPD 尤其为缺少其它遗传标记的物种构建基因图谱提供了有力的遗传分析工具。该技术首先在植物的遗传研究中得到迅速、广泛的应用,Martin G.B. 构建了番茄的近等位基因系(Nearly isogenic line),将三个抗 *pto* 基因定位于 RFLP 连锁图上^[17]。Michelmore 采用混合分离分析(Bulked segregation analysis BSA)法,找出三个 RAPD 标记同 Dm5/8 抗性基因连锁,经过 RFLP 分析把该基因定位于莴苣 RFLP 连锁图上^[18]。

1994 年,Levin 以 East Lansing 参照群为基础构建的鸡遗传图谱包含有 98 个遗传标记,其中 RAPD 标记 42 个(其余有 8 个经典标记,26 个 RFLP 标记和 22 个 CRI 标记)^[19]。他还利用回交作图群体将 13 个 RAPD 标记定位于 Z 染色体上,这些标记分布在整个 Z 染色体上,几乎与该染色体有关的所有经济性状相连锁。他认为,类似的方法还可用于 W 染色体和其它畜禽性染色体的遗传作图^[20]。1995 年,Cheng HH et al 又将 86 个微卫星标记,16 个

RAPD 标记和 24 个 CR1 标记增加到 East Lansing 图谱上,他指出,RAPD 标记和 CR1 标记在其它群体中虽然没有广泛应用,但在将微卫星标记整合入高饱和度的基因图谱时,是有利用价值的。至此,East Lansing 图谱的遗传标记有 273 个之多,32 个连锁群覆盖范围达到 1402cM,平均标记间距为 6.7cM^[21]。

在国际羊基因组作图研究(International Mapping Flock IMF)中,Cushwa WT et al 用 131 个引物对八个全同胞 IMF 家系进行 RAPD 扩增,筛选和定位了 45 个 RAPD 标记,分布于 17 条常染色体和一对性染色体上,检测结果表明,RAPD 分析是鉴别多态性的一种有效方法,能够用于构建羊的遗传图谱^[22]。有研究者认为,鉴于已克隆的猪基因数目和对猪基因组核苷酸顺序的了解相对较少,RAPD 及其染色体定位有可能在猪多态性 DNA 和在猪中构建被称之为不同国家、不同实验室通用语言的顺序示踪位点(sequence tagged sites)和(或)顺序示踪小卫星位点(sequence tagged microsatellite sites)物理图谱等研究中发挥作用。

如今,靠一种遗传标记无法完成的基因定位,能通过结合 RAPD 或其它一种或几种分子标记的综合应用得以实现,几种标记同时应用,可以互相验证,使基因定位更加准确。RAPD 在基因组研究方面表现出其独到的特点和优势,为增加 RFLP 连锁图某一特定区域 DNA 标记的密度创造了条件,为畜禽的遗传图谱和物理图谱的整合奠定了基础。

3.4 数量性状的辅助标记选择

家畜禽分子遗传标记连锁图谱的迅速发展,使系统寻找和定位数量性状基因位点(Quantitation Trait Locus QTL)成为现实,借助 DNA 标记对家禽进行辅助育种,即标记辅助选择(Markers Assisted Selection MAS)已成为动物遗传育种研究工作中的一个热点。据估计,在家系内,对用于后裔测定的个体先使用标记进行预选再进行后裔测定,可以提高 10—50% 的选择反应;在家系间,应用综合多个标记和性状信息的选择指数,可提高选择反应 50—200%。目前,可用于 MAS 的分子遗传标记主要有 RFLP、RAPD、AFLP、VNTR 等。已有报道发现与 QTL 紧密连锁的 RAPD 标记。Horvat and Medrano 用 888 个 RAPD 引物在小鼠特异性基因组中间序列上筛选到与提高体重和成熟体积的主基因位点——快速生长位点(hg)连锁的 RAPD 标记^[23]。Wei R 利用 RAPD 技术对洛岛红近交系与白来航的

杂交群进行了研究,共检测到 16 个 RAPD 标记,其中 14 个位于常染色体,2 个为性连锁,他指出这些标记可用于今后产蛋性状的 QTL 检测^[24]。谢新民利用 RAPD 和通用线性模型首次对猪平均日增瘦肉量分子标记进行探讨,结果表明,RAPD 带纹在个体之间存在着明显的多态性,并筛选出引物 S₃₅的扩增产物在相对分子量为 1375—1904 碱基对之间有两条多态性带纹对猪的日瘦肉量存在显著效应,研究者认为 RAPD 技术有望用于日增瘦肉量的标记辅助选择,特别是特定候选基因(如生长激素基因)的多态性检测将更有意义^[25]。

4 结束语

综上所述,RAPD 技术尽管存在着稳定性、重复性欠佳等不尽如人意之处,这无疑使其应用受到限制,但它方便、快捷、及多态性丰富等优点却是其它分子遗传标记无法比拟的,随着分子技术的发展,相信 RAPD 技术的缺陷或被克服,或通过其它途径完善,从而使其发展成为一种成熟的遗传分析手段而更适于推广应用。在动物遗传育种领域,尤其是遗传多样性研究和畜禽群体遗传分析等工作中,RAPD 分析已经成为一种常规的分子标记手段。RAPD 标记和其它遗传标记相结合,使畜禽遗传图谱的密度和质量不断提高,促进了高密度遗传连锁图谱的研制。鉴于其简便、快捷、经济等优点,RAPD 技术在动物遗传育种乃至整个生物学领域仍将发挥其它分子标记难以替代的作用。

参考文献

- [1] Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, et al, Nucl Acid Res, 1990, 18: 6531 - 6535
- [2] Welsh J, McClelland M, et al, Nucl Acid Res, 1990, 19: 7213 - 7218
- [3] Corley-Smith GE, Lim CJ, Kalmar GB, et al, Bio Techniques, 1997, 22: 689 - 690
- [4] Valentini A, Timpero AM, Cappuccio I, Electrophoresis, 1996, 17(10): 1553 - 1554
- [5] Gutierrez-Adan A, Cushwa WT, Anderson GB, et al, Anim Genet, 1997, 28(2): 135 - 138
- [6] 兰宏, 张文艳, 王文, 中国科学(C 辑), 1996, 26(3): 244 - 249
- [7] Bardin MG, Bandi C, Cominici S, et al, Anim Genet, 1994, 25 (Suppl. D): 29
- [8] Teale AJ, Wambugu J, Gwakisa PS, et al, Anim Genet, 1995, 26 (4): 243 - 248
- [9] Smith EJ, Jones CP, Bartlett J, et al, Poultry Science, 1996, 75: 579 - 584

(下转第 51 页)

Contribution of Prolines to Protein Thermostability

Zhu Guoping^{1,3} Teng Maikun^{1,2} Wang Yuzhen¹

(¹Department of Molecular Biology and Cell Biology, and ²the Key Lab of Structure Biology of USTC, CAS, School of Life Science, University of Science and Technology of China, Hefei 230026)

Abstract Thermostability of enzymes can be altered by single amino acid substitution. Prolines play very specific roles in protein secondary structure and heat stability. They prefer α -turns and random coils, but are rarely found in α -helices and β -sheets. Improvement in thermostability of enzymes by protein engineering may introduce Pro at suitable α -turns and random coils. The rigid pyrrolidine ring can make the conformation of surroundings to be more reasonable by reducing the backbone unfolding entropy of proteins. This new prolines theory will be improved and become perfect.

Key words Proline, Secondary structure, Thermostability, Protein engineering

(接第 54 页)

- [10] Zhang X. Mcdaniel GR. Giambrone JJ. , *Poult Sci* ,1995 ,74 : 1253 - 1258
- [11] Wei R. Dentine MR. Bitgood JJ. , *Anim Genet* ,1997 ,28 (4) : 291 - 294
- [12] Kantanen J. Vilkki J. Elo K. et al , *Anim Genet* ,1995 ,26 (5) : 315 - 320
- [13] Gwakisa PS. Kemp SJ. Teale AJ. , *Anim Genet* ,1994 ,25(2) :89 - 94
- [14] Mel'nikova MN. Grechko VV. Mednikov BM. ,1995 ,31 (8) : 1120 - 1231
- [15] Ezer AD. Williams RW. Goldwitz D. J. *Hered* ,1996 ,87 :450 - 455
- [16] Glazko VI. Domanskii NN. Sozinov AA. , *Tsitol Genet* ,1998 ,32 (5) :80 - 93
- [17] Martin G.B. et al , *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* ,1991 ,88 :2336 - 2340
- [18] Michelmore R. W. et al , *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* ,1992 ,94 : 896 - 901
- [19] Levin I. Santangelo L. Cheng HH. et al , *J. Hered* ,1994 ,85 :79 - 85
- [20] Levin I. Crittenden LB. Dodgson JB. , *Genomics* ,1993 ,16 (1) : 224 - 230
- [21] Cheng HH. Levin I. Vallejo RL. et al , *Poult Sci* ,1995 ,74 (11) : 1855 - 1874
- [22] Cushwa WT. Dodds KG. Crawford AM. et al , *Mamm Genome* , 1996 ,7(8) :580 - 585
- [23] Horvat S. Medrano JF. , *Proceedings of fifth world congress on genetics applied to livestock production* ,1994 ,21 :41
- [24] Wei R. , *Proceeding of fifth world congress on genetics applied to livestock production* ,1994 ,21 :71
- [25] 谢新民,施启顺,柳小春等, *湖南农业大学学报* ,1998 ,24 (2) :143 - 147

RAPD Analysis Technique and It's Application to The Studies on The Animal Genetics and Breeding

Zhang Piyan Xie Zhuang Liu Honglin Chen Jie

(College of Animal Science and Technology ,Nanjing Agricultural University ,Nanjing 210095)

Abstract Random amplified polymorphic DNA (RAPD) ,a polymerase chain reaction based technique testing DNA polymorphisms ,has been widely used in genome research. In the field of animal genetics and breeding , RAPD technique provides a powerful tool for detection of gene diversity of populations and analysis of genetic relationship. It also can be used for analysis of linkage between RAPD markers and quantitative trait loci (QTL) and Markers Assisted Selection (MAS) . Theory and features of RAPD were also discussed in this paper. According to the authors ,RAPD technique has good perspective.

Key words RAPD ; Gene Diversity ; Genetic Relationship ; Linkage Analysis ; MAS