

综 述

分析基因组 DNA 多态性的 RAPD 技术 在水产生物技术研究中的应用前景

THE PROSPECTS FOR APPLICATION OF THE RAPD TECHNIQUE TO ANALYSYS GENOMIC DNA POLYMORPHISM IN FISHERIES BIOTECHNOLOGY

邱高峰

Qiu Gao-feng

(上海水产大学渔业学院, 200090)

(Fisheries College, SFU, 200090)

关键词 基因组 DNA, RAPD 技术, 水产生物技术**KEYWORDS** genomic DNA, RAPD technique, fisheries biotechnology

分子生物学技术不仅使生物科学自身的发展进入了历史新纪元,而且还渗透到医学、农业、工业和环保等诸多领域,带来了一场科学革命。水产养殖业作为我国大农业中的一个重要组成部分,已经建立了庞大的产业结构,年水产养殖总产量已连续几年跃居世界榜首。但是我们还必须清醒地认识到,目前的水产养殖业始终未能摆脱传统的产业模式,生物技术特别是分子生物学技术在水产养殖生产和研究中的应用还十分有限,其中除了水产生物繁殖周期等本身生物学特性、研究基础薄弱和投入经费少等因素限制外,某些技术本身的高尖端性和复杂性也影响了其推广和普及。因此,简便、快速和费用低的技术就明显具有更大的优势和潜力。RAPD 技术正是这样一项分子生物学技术,尽管它的诞生时间不长,但在陆生动、植物以及人类的基础遗传学和应用遗传学研究领域已得到广泛应用[Black 等,1992;Hu 等,1991;Klein-Lankhorst 等,1991;Welsh 等,1990;Wilkerson 等,1993;王京兆等,1995;李松涛等,1995;张忠廷等,1994;曹家树等,1995],而在水产生物技术研究中的应用至今未见报道。本文拟对这一技术的原理与方法及其在水产生物技术研究中的应用前景作一介绍和展望,期望引起水产同行们及有关专家的关注和兴趣。

1 RAPD 技术的原理及方法学

RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) 即随机扩增多态 DNA。这项技术由美国杜邦公司的 Williams 等[1990]首先命名并推出,因为它是在 DNA 聚合酶链式反应(Polymerase Chain Reaction, PCR)技

术的基础上发展起来的,故又称为 RAPD-PCR 技术,主要用于检测基因组 DNA 的多态性。与 PCR 技术的原理相似,RAPD 技术也是利用 DNA 聚合酶,模仿细胞内 DNA 复制过程,在 DNA 模板、4种脱氧核糖核苷酸及镁离子存在的条件下,由引物诱发的一系列聚合反应,具体包括模板 DNA 热变性、引物退火和引物延伸三个步骤(图1),但 PCR 用于体外扩增的引物是根据目的基因两侧的已知序列设计的,因此具有特异性,而 RAPD 使用的引物则是随机设计的,即并非事先依据所要扩增的目的基因两侧已知核酸序列设计,故称随机引物,它与模板 DNA 某一互补序列的结合完全是随机的,而且使用的引物仅一种核苷酸序列,即单个引物,与 PCR 中使用的上下游引物(具有不同的核苷酸序列)不同。

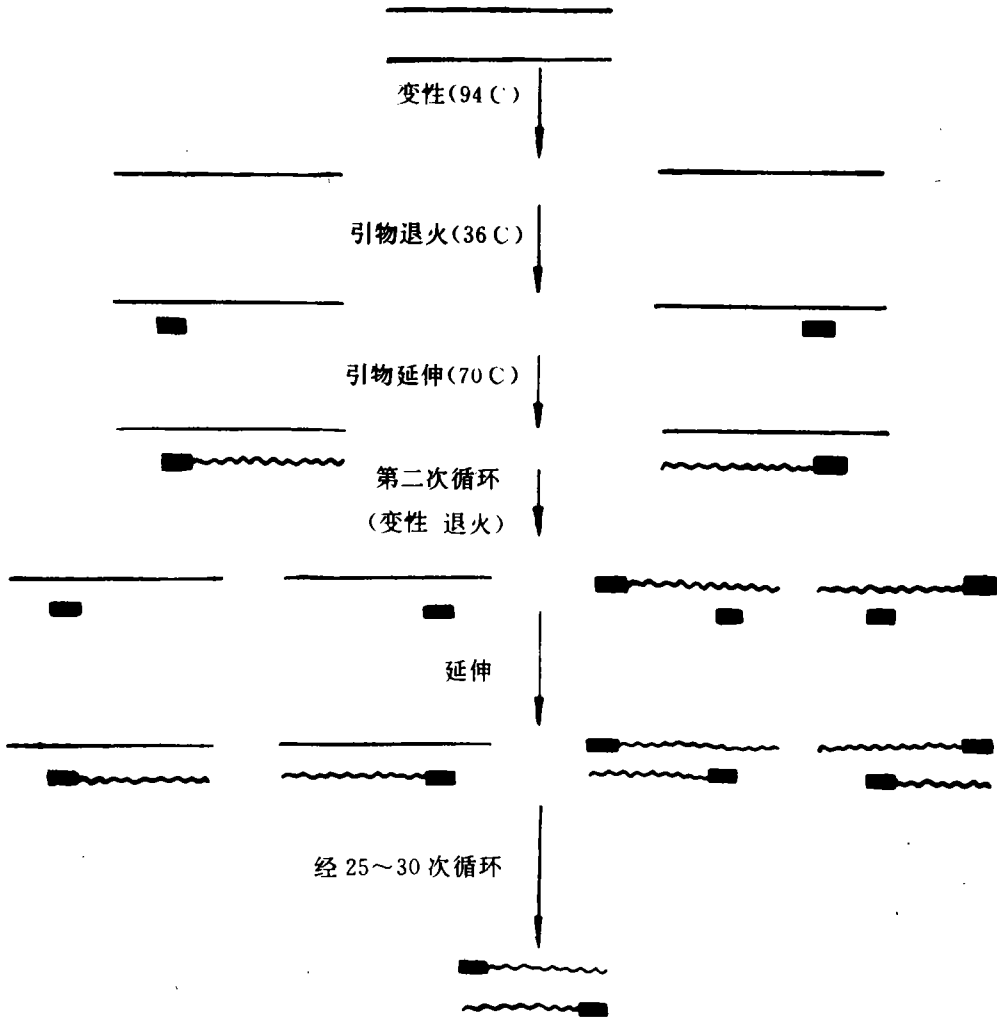


图1 RAPD 技术原理示意图

Fig. 1 The scheme of principle of RAPD technique

■ 引物; —模板 DNA; ~~~扩增的 DNA 片段。

如图1所示,模板 DNA 双螺旋在高温(94°C)下被打开,双链 DNA 变性解离形成单链 DNA,退火时(36°C)若某个引物的核苷酸序列与模板 DNA 两条链上各有一区段或几个区段的互补序列,引物分别结合到模板 DNA 的两条不同的 DNA 链上,以引物为起点,进行5'→3'方向的 DNA 链延伸,完成一个 PCR 循环,经

过25—30次循环,引物之间的DNA片断数量可扩增达到 $2 \times 10^{6-7}$ 拷贝。当基因组的DNA某些区域发生片断插入、缺失或碱基突变时,引物与模板DNA链的结合位点分布发生相应变化,从而导致PCR产物在数量和分子量上随着相应改变,这种改变通过琼脂糖凝胶电泳和溴乙锭染色,即可直接于紫外灯下检测出来,从而可用于基因组DNA多态性分析。

由于RAPD使用的是单个随机引物,故引物在DNA模板链上的结合位点及其之间的距离是事先无法确定的,倘若两个结合位点之间距离过长(大于3 kb),超出PCR所能扩增的有效长度范围,扩增就难以实现。一般来讲,只有引物结合位点之间距离在小于3 kb范围内才是有效的。此外倘若引物仅与模板DNA双链中的一条链上具有一段互补核苷酸序列,即引物只能与一条DNA模板链结合,则PCR第1次循环合成的新链就不可能存在与引物互补的核苷酸序列,新链就无法成为模板而进行第2次PCR循环,从而失去了PCR扩增本意,经30次循环后仅能合成30条链,达不到指数式扩增的目的(电泳无法检测出来)。以上两个因素似乎限制了DNA片断的扩增,但RAPD通过缩短引物长度(10 bp)和采用一系列序列各不相同的引物(20—200个),从而大大增加了引物与模板DNA结合的概率,既保证了扩增的实现,又使检测区域扩大到几乎覆盖整个基因组,从而提供了更为丰富的DNA多态性。

2 RAPD 技术在水产生物技术研究中的应用前景

2.1 水产生物基因组 DNA 遗传多态性检测

自本世纪70年代以来,鱼类、虾类和贝类等水产生物的遗传多态性检测主要采用蛋白质电泳分析技术,特别是等位基因酶(allozyme)技术在水产生物的群体遗传学、品系鉴定及育种学等方面得到广泛应用[Avisé, 1974; Allen, Jr. 等, 1982; Bailey 等, 1970; Dando, 1974; Fisher 等, 1980; Lester, 1979; 朱蓝菲, 1982; 朱蓝菲等, 1983]。蛋白质电泳技术虽然反映了DNA水平的差异,但它仅仅是对基因产物的分析,即检测的是基因的表现型,在转录和转译区域上的小序列变化不可能改变蛋白质的功能或电泳的迁移率,故对于等位基因杂合度(heterozygosity)低,亲缘关系较近的类群,利用蛋白质电泳分析难以测定出遗传差异,而且要获得可靠的群体统计数据,必须检测大量样品,因此在应用上有它的局限性。随着分子生物学技术的发展,使直接测定基因组DNA的差异成为可能,不仅结果直接可靠,而且灵敏度高。在RAPD技术推出之前,基因组DNA多态性检测主要采用如下二种方法:①DNA序列多态性(sequence polymorphism);②限制性片段长度多态性(restriction fragment length polymorphism, RFLP)。方法①中的DNA测序工作繁琐,费时费力,费用也昂贵,故未被广泛应用;RFLP技术利用限制性内切酶酶切位点的不同而产生不同长度的酶切片断(RFLPs),若基因组中核苷酸序列发生变化,酶切位点随之相应改变,RFLPs在数目和长度上的变化通过探针杂交便可检测出来。目前在鱼类研究中报道得最多的是线粒体DNA(mtDNA)的RFLPs分析[Graves 等, 1984; Thomas 等, 1986; 陈关君等, 1984; 张四明等, 1992; 宋平等, 1994; 晏勇等, 1994; 樊连勇等, 1994],因为线粒体基因组小,分子量仅15—18 kb,故其限制性内切酶片段数量相对较少,易于通过电泳分离,在紫外灯下便可检测出来,用于构建mtDNA限制性内切酶酶切物理图谱,但限制性酶类价格比较昂贵,而且mtDNA的进化速度比同工酶慢,短期间引起的基因频率的变化在mtDNA水平上不一定反映得出来[李思发, 1993]。而采用基因组DNA的RFLPs分析,因基因组比较庞大,一个基因组利用限制性内切酶酶切片产生的DNA片段可达几百万个,在电泳凝胶上的DNA片段大小排列是一系列连续的斑点,即不能被直接检测出来,目前已获得的鱼类DNA克隆及其探针还十分有限,无法应用探针杂交法进行DNA指纹图谱(DNA/fingerprinting)分析,近年来使用哺乳类的重复序列、噬菌体M₁₃核酸探针以及人工合成的寡聚核苷酸片段探针进行DNA指纹图分析[Field 等, 1989; Georges 等, 1988; Wirgin 等, 1991; 方盛国等, 1993],取得了一定的进展,但要在大群体中检测出大量的RFLPs或寡聚核苷酸片段(OPs),成本非常昂贵,而且需要使用同位素标记,操作不便。制作程序包括DNA分离、酶切消化、电泳、Southern印渍、杂交和放射自显影,既费时,劳动强度又大。而采用基因组DNA的RAPD分析技术不需要知道基因组本身的特异核苷酸序列,DNA多态片段经PCR扩增后,直接通过电泳分离后在紫外线下便可识别,不需要制备同位素探针,省去了Southern印渍和分子杂交过程,降低了成

本,同时 RAPD 技术由于使用了一系列随机引物,使多态性更加丰富,克服了同工酶位点偏少的缺点,只需少量组织 DNA(纯度要求不高)作为模板,即可通过 PCR 技术扩增出多态性片段,这对于研究稀有种,濒危种以及取样困难的种类具有更大适用性。因此 RAPD 技术与其它同类技术相比较具有简便、快速、费用低和实用性强等优点,值得在水产生物技术研究中推广应用。

2.2 养殖品系的鉴定、遗传选育及杂交亲本的选择

品种的优劣,直接关系到水产养殖生产的产量和质量。与世界其它国家一样,我国目前水产养殖种类大多是没有经过系统遗传选择的,传统的选育工作周期长,主要依靠表现型来判断基因型,杂交育种也是选用亲代性状的遗传标记(孟德尔式遗传标记)作为后代获得遗传性状的依据,但许多个体的表现型和性状因受到环境因素的影响,并不能很好代表基因型[楼允东等,1989],故必须根据连续几代的表现型才能确定被选遗传性状的可靠性。生化标记技术(蛋白质、等位基因酶标记技术)的引入使选育工作前进了一步,但在应用上尚有一定局限性(如 2.1 所述)。基因组 DNA 的 RAPD 技术提供了丰富的 DNA 多态性,通过 PCR 扩增的 DNA 多态性片断完全遵循孟德尔式遗传规律,从而为在短时间内建立个体及群体间的 DNA 分子遗传标记提供了方便,利用分子标记可以区分不同基因型的个体和群体。缩短了年年重复选育的工作周期,同时若能找到不同基因型与某些经济性状的相关性,即可直接选出经济性状优良的个体和群体,从而大大减少了工作量。节省了选育时间。同样在杂交亲本的选择中,野生种群与养殖种群的识别以及杂交后代的鉴定亦可通过分子标记来完成。

2.3 基因定位与克隆

鱼类等水产生物的基因定位与克隆工作进行得很少,对其基因组结构的认识还相当肤浅,已分离的有价值的鱼类基因屈指可数[Davies 等,1984; Yuan Lin 等,1981; 朱作言等,1990; 蒋耀青等,1990; 宋诗铎等,1989,1992]。对许多有重要经济价值的基因位置和结构等现仍一无所知,应用常规的克隆方法因 DNA 探针数量有限而使其工作进展缓慢,倘若能用非整倍性材料(单倍体或三倍体)的剂量效应,以 RAPD 的多态性片段作为分子标记,找到它们与某些有价值基因的连锁关系,制作基因连锁遗传图,便可将这些基因定位于染色体上,采用染色体定位克隆技术就有望克隆到这些富有经济价值的基因,从而为基因克隆开辟了新途径,特别是抗病基因的克隆,对于从本质上防治鱼病和虾病具有重要意义。

2.4 物种分类与分子进化

许多水产生物分类及系统演化关系问题至今仍悬而未决。形态上差别甚小的物种仅依靠形态学特征很难把它们相互区别开来,故在分类学上常引起争议,其次是某些水产生物的幼体,如对虾幼体,其外部形态也没有显著差异,难以把不同种的幼体分开,这给水产养殖生产及幼体的资源数量监测和预报工作带来了困难。近年来,利用 mtDNA 分析技术对金枪鱼属(*Thunnus*)内的不同物种及蓝鳃鱼(*Lepomis macrochirus*)亚种之间进行了分类研究[Avise 等,1984]取得了一定效果。然而必须指出的是,mtDNA 与维持生殖隔离的基因是没有密切关系的,即 mtDNA 能突破分类学上物种的屏障,因此使用 mtDNA 进行分类必须十分慎重!最好根据细胞核基因来确定物种。RAPD 技术通过分析核基因组 DNA 的多态性,应用于分类学研究结果可靠,同时可避免形态分类中趋同进化的干扰,对于从 DNA 分子水平揭示物种之间的系统演化关系研究分子进化具有十分重要的意义。

3 结语

综上所述,基因组遗传图谱的构建无论在遗传学、育种学还是在分类学和生物进化等研究中都具有重要应用价值。近年来许多国家投入大量人力物力,利用 RFLP 技术对陆生农业经济作物进行了基因组遗传图谱的构建工作,一些有重要经济价值的基因得以定位和克隆,为加快优良品种培育和分子育种打下了基础。相比之下,水产生物特别是经济价值大的水产养殖对象的基因组遗传图谱研究工作尚属空白,表现型性状与分子标记相关性的研究也未见报道。其原因是可供 RFLP 基因作图的探针太少,RAPD 技术的诞生,将不仅可为检测基因组 DNA 多态性带来方便,而且其扩增的 DNA 多态性片段还将有可能作为 RFLP 分析用的探针,进行基因组作图,同时为 RFLP 作图提供了更为丰富的标记。因此,如果说 RFLP 标记作为第一代分子标记,使

人类对物种遗传变异的研究从传统的基因型水平上升到直接检测基因组DNA序列差异水平,那么RAPD作为新一代的分子标记,以其简便、快速和费用低的独特优势,将把基因组DNA分析扩展到分子遗传背景知之甚少的所有物种,加速其遗传图谱的构建进程,这是其它同类技术难以比拟的,它在水产生物技术研究中的应用也将越来越广泛。

本研究获得上海市高等学校青年教师学术基金资助。

参 考 文 献

- [1] 王京兆等,1995.用RAPD方法分析水稻光敏核不育基因.遗传学报,22(1):53-58.
- [2] 方盛国等,1993.LZF-I探针及草鱼等三种鱼类的DNA指纹图的初步研究.四川师范大学学报,16(5):79-82.
- [3] 朱作言等,1990.鲤鱼和草鱼基因文库的构建及其生长激素基因和肌动蛋白基因筛选.水生生物学,14:176-178.
- [4] 朱蓝菲,1982.几种鲤科鱼类及杂交的乳酸脱氢酶同工酶的比较.水生生物学集刊,7(4):539-545.
- [5] 朱蓝菲等,1983.20种鲤科鱼类同工酶的表型分析及有关进化问题的探讨.水产学报,7(2):145-152.
- [6] 李思发,1993.主要养殖鱼类种质资源研究进展.水产学报,17(4):344-358.
- [7] 李松涛等,1995.用新的分子标记(RAPD)分析小麦抗白粉病基因Pm42的近等位基因系.遗传学报,22(2):103-108.
- [8] 宋平等,1994.鲢鳙鱼线粒体DNA的九种限制性内切酶切图比较.水产学报,18(3):30-31.
- [9] 宋诗铎等,1989.鲑鱼泌乳素cDNA的分子克隆和序列分析.遗传学报,16:374-380.
- [10] ——,1992.鲑鱼生长激素cDNA的分子克隆和序列分析.遗传学报,19:305-310.
- [11] 陈关君等,1984.鲤鱼肌细胞线粒体DNA的限制性内切酶切图谱比较.遗传学报,11:141-146.
- [12] 张四明等,1992.方正银鲫、白鲫线粒体DNA限制性内切酶酶切片段比较.水产学报,16:120-129.
- [13] 张忠廷等,1994.RAPD在水稻温敏核不育研究的应用.遗传学报,21(5):373-378.
- [14] 周宗汉等,1983.血清乳酸脱氢酶同工酶圆盘电泳分离法在鱼类分类工作中的应用.动物学杂志,5:33-35.
- [15] 晏勇等,1994.草鱼线粒体DNA限制性内切酶分析.淡水渔业,24(3):30-31.
- [16] 曹家树等,1995.白菜及其相邻类群基因组DNA的RAPD分析.园艺学报,22(1):47-52.
- [17] 蒋耀青等,1990.鱼类抗冻蛋白的研究I黄盖蝶抗冻蛋白基因cDNA的克隆及其在大肠杆菌中的表达.遗传学报,17:202-210.
- [18] 楼允东等,1989.鱼类育种学,23-27.百家出版社(沪).
- [19] 樊连勇等,1994.鲢鱼线粒体DNA的限制性内切酶图谱.武汉大学学报(自然科学版),1(1):121-125.
- [20] Allen, S. K. Jr. et al., 1982. Induced triploidy in the soft-shell clam; cytogenetic and allozymic confirmation. *J. Hered.*, 73:421-428.
- [21] Avise, J. C., 1974. Systematic value of electrophoretic data. *System Zool.*, 23(1):466-481.
- [22] Avise, J. C. et al., 1984. Characterization of mitochondrial DNA variability in a hybrid swarm between subspecies of bluegill sunfish (*Lepomis machrochirus*). *Evolution*, 38:931-941.
- [23] Bailly, J. C. et al., 1970. Multiple forms of supernatant malate dehydrogenase in salmonid fishes. *J. Biol. Chem.*, 245:5927-5940.
- [24] B¹ k, W. C. et al., 1992. Use of the random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD-PCR) to detect DNA polymorphisms in aphids (Homoptera:Aphididae). *Bull. Entomol. Res.*, 82:151-159.
- [25] Dando, P. R., 1974. Distribution of multilocus isomerase in teleostean fishes. *Comp. Biochem. Physiol. B*, 47:663-669.
- [26] Davies, A. L. et al., 1989. Antifreeze protein genes of the winter flounder. *Biol. Chem.*, 259(14):9241-9247.
- [27] Fields, R. et al., 1989. DNA fingerprinting in rainbow trout detected by hybridization with DNA of bacteriophage M₁₃. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 118:78-81.
- [28] Fisher, S. E. et al., 1980. Evolution of five multilocus isozyme system in the chordates. *Genetic*, 52/53:73-85.
- [29] Georges, M. et al., 1983. DNA fingerprinting in domestic animals using four different minisatellite probes. *Cytogenet. Cell Genet.*, 47:127-131

- [30] Graves, J. E. *et al.*, 1984. Close genetic similarity of Atlantic and Pacific skipjacks tuna (*Katsuwonus pelamis*) demonstrated with restriction endonuclease analysis of mitochondrial DNA. *Mar. Biol.*, **79**:315—319.
- [31] Hu, J. *et al.*, 1991. Identification of broccoli and cauliflower cultivars with RAPD markers. *Plant Cell Reports*, **10**:505—511.
- [32] Klein-Lankhorst, R. M. *et al.*, 1991. Isolation of molecular markers for tomato (*L. esculentum*) using random amplified polymorphic DNA (RAPD). *Theor. Appl. Genet.*, **83**:108—114.
- [33] Lester, L. J., 1979. Population genetics of penaeid shrimp from the Gulf of Mexico. *J. Hered.*, **70**:175—180.
- [34] Thomas, W. K. *et al.*, 1986. Mitochondrial DNA analysis of Pacific salmonid evolution. *Can. J. Zool.*, **64**:1058—1064.
- [35] Welsh, J. *et al.*, 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.*, **18**:7213—7218.
- [36] Wilkerson, R. C. *et al.*, 1993. Random amplified polymorphic DNA markers readily distinguish cryptic mosquito species. *Insect Mol. Biol.*, **1**:205—211
- [37] Williams, J. G. K. *et al.*, 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.*, **18**(22):6531—6535
- [38] Wirgin, I. I. *et al.*, 1991. Use of DNA fingerprinting in identification and management of a striped bass population in the southeastern United States. *Trans. Am. Fish. Soc.*, **120**:270—282.
- [39] Yuan Lin *et al.*, 1981. Molecular cloning and characterization of winter flounder antifreeze cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**(5):2825—2829.