

# 一种提高 RAPD 技术扩增效率的有效方法

傅俊江<sup>1</sup>, 李麓芸<sup>1</sup>, 徐湘<sup>2</sup>, 王智<sup>2</sup>, 唐果<sup>2</sup>, 尹长民<sup>2</sup>, 卢光<sup>1</sup>

(1. 湖南医科大学人类生殖工程研究室, 长沙 410078; 2. 湖南师范大学生命科学学院动物系, 长沙 410006)

**摘要:** RAPD 技术是由 Williams 等于 1990 年首先创立的一种 DNA 分子标记技术。但是由于低的退火温度和短的引物序列等原因, 常常使得 RAPD 技术的分辨率和可重复性低。本文介绍一种通过延长从退火到延伸的 ramp 时间, 提高 RAPD 产物的分辨率和产量, 由此提高 RAPD 技术的扩增效率的有效方法。

**关键词:** RAPD; 蜘蛛; ramp 效率; 指纹

中图分类号: Q751

文献标识码: A

文章编号: 0253-9772(2000)04-0251-02

## An Improved Method for Increasing the Efficiency of the Technique of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)

FU Jun-jiang<sup>1</sup>, LI Lu-yun<sup>1</sup>, XU Xiang<sup>2</sup>, WANG Zhi<sup>2</sup>, TANG Guo<sup>2</sup>, YIN Chang-min<sup>2</sup>, LU Guang-xiu<sup>1</sup>

(1. Human Reproductive Engineering Laboratory, Hunan Medical University, Changsha 410078, China;

2. Department of Zoology of Life Science College, Hunan Normal University, Changsha 410081, China)

**Abstract:** The random amplified polymorphic DNA (RAPD) is a technique of DNA molecular marker, which was first established by Williams in 1990. The resolution and repetition is low because of the low annealed tempture and short primers in the RAPD. In this paper we introduce an improved method for increasing the efficiency of the technique of RAPD by prolonging the ramp time from annealing to extension and increasing the resolution and production.

**Key words:** RAPD; spider; ramp; efficiency; finger printing

RAPD 技术是由 Williams 等<sup>[1]</sup>于 1990 年首先创立的一种 DNA 分子标记技术。它是利用单一的 10 个碱基的寡核苷酸

作为引物,对基因组 DNA 进行 PCR 扩增,这些扩增产物 DNA 片段的多态性反映了基因组相应区域的 DNA 多态性。它一产

生便得到了广泛的注意,并在动物、植物、人和微生物的遗传多样性检测、基因定位、品系(克隆)鉴定、医学鉴定、系统演化、遗传图谱的构建等方面得到了广泛应用<sup>[2,3]</sup>。但是由于低的退火温度(36℃)和短的引物序列(10碱基)等原因,常常使得 RAPD 技术的分辨率和可重复性低。本文介绍一种通过延长从退火到延伸的 ramp 时间,提高 RAPD 产物的分辨率和产量,由此提高 RAPD 技术的扩增效率的有效方法。

## 1 材料和方法

### 1.1 DNA 提取

蜘蛛肢体或小鼠组织用 70% 的酒精擦洗干净,取 1~2 克放入含有 1 ml 的 1× 核裂解缓冲液的匀浆器中,匀浆后,倒入 10ml 离心管中,再用 2ml 1× 核裂解缓冲液冲洗匀浆器后也倒入,然后在离心管中加入 300 $\mu$ l SDS(10%) 和 10 $\mu$ l 蛋白酶 K(20mg/ml),55℃ 消化 5 小时或 37℃ 消化过夜,应用常规酚/氯仿抽提法提取 DNA<sup>[4]</sup>。

### 1.2 PCR 扩增

10 $\mu$ l 反应体系中包含如下成分:蜘蛛模板 DNA 0.6 $\mu$ l 约 20ng, 2.5mmol/L dNTP 1 $\mu$ l, 25mmol/L Mg<sup>++</sup> 0.8 $\mu$ l, 10× 缓冲液 1 $\mu$ l, 10 $\mu$ mol/L 引物 0.2 $\mu$ l(S60 序列为:ACCCGGTCAC), *Taq* DNA 聚合酶 0.15 $\mu$ l(4U/ $\mu$ l)(均购自上海生工公司)。在 GenAmp9600(PE9600, 美国 PE 公司产) PCR 扩增仪上完成 PCR 扩增,具体条件如下:95℃ 预变性 1 分钟 30 秒后,94℃ 40 秒,36℃ 1 分 30 秒,72℃ 1 分 30 秒,共完成 40 个循环,72℃ 延伸 5 分钟,最后置 4℃ 保温。其中从退火到延伸的 ramp 时间分别为 0 分钟(标准的最大加热率为 1℃/秒)、3 分钟(即 0.2℃/秒)、5 分钟(即 0.13℃/秒)、7 分钟(即 0.086℃/

秒)和 9 分钟(即 0.067℃/秒)。

### 1.3 电泳检测

每管中加入 6× 加样缓冲液 2 $\mu$ l,混匀后点样于 2% 的琼脂糖凝胶(0.5 $\mu$ g/ml EB),100V 电泳 40 分钟,紫外透射仪观察结果并照相。

## 2 结果与讨论

各个从退火到延伸的 ramp 时间的 PCR 结果见图 1,从图中可以看出,随着 ramp 时间的延长(0、3、5、7、9 分钟),PCR 产物的量(主要是大片段 DNA)和 DNA 条带数(特别是在 3 分钟)也相应增加。从而提高了 RAPD 技术的分辨率、产量和可重复性。但是并不是 ramp 时间愈长效果愈好。从我们的结果可以看出,ramp 时间为 3 分钟,也就是说以 0.2℃/秒的速度上升,其 DNA 产量和条带数最多,而再延长其时间,虽然大片段 DNA 的产量提高了,但小片段 DNA 的产量并未提高。这可能是延长了 ramp 时间,小片段的优先扩增受到抑制,而大片段反而优先扩增了。这是由于引物和 dNTP 等的浓度有限,从而使小片段扩增受到了影响。

影响 RAPD 技术的分辨率和可重复性低的因素有许多,如模板质量和浓度、短的引物序列、PCR 循环的次数、基因组 DNA 的复杂性、技术设备、以及其它一些因素等,都可影响 RAPD 技术在基因组成分并不十分清楚的各种动植物中的遗传多样性研究。

我们在应用 RAPD 技术研究蜘蛛的系统演化和小鼠 DNA 的指纹分析中发现,在其它条件不变的情况下,如果适当延长从退火到延伸的 ramp 时间,则既可提高 RAPD 产物的产量,也可增加 DNA 条带数(这里主要是指在 3 分钟时)。因此,它对于提高 RAPD 技术的可重复性和分辨率均有一定的帮助。它对于那些难扩增甚至不能扩增的引物使用该法也有可能扩增出特异性的 DNA 条带。可能的原因是,由于适当延长了从退火到延伸的 ramp 时间,有利于引物和模板 DNA 的结合,同时低的加热速度又有利于增加引物与模板 DNA 复合物结合的稳定性,避免引物从模板上掉下来,从而增加了 PCR 产物的产量和条带数。

## 参考文献:

- [1] Williams, *et al.* DNA Polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers[J]. *Nucleic Acids Res*, 1990, 18: 6531 ~ 6535.
- [2] Welsh J, *et al.* Polymorphisms generated by arbitrarily primed PCR in the mouse: application to strain identification and genetic mapping [J]. *Nucleic Acids Res*, 1991, 19: 303 ~ 306.
- [3] 吕雪梅,等. 蛋鸡系 RAPD 变异及其与杂种优势关系的分析 [J]. *遗传*, 1999, 21(1): 8 ~ 10.
- [4] 王智,等. 一种供 RAPD 分析用蜘蛛模板 DNA 的快速提取方法 [J]. *生命科学研究*, 1999, 3(3): 268 ~ 270.



图 1 DNA 模板在不同 ramp 时间下的指纹图

M. 示  $\lambda$ DNA 用 *Eco*RI/ *Hind*III 双酶切的 DNA 分子量大小标记; 1~5. 示 ramp 时间分别为 1、3、5、7、9 分钟的 DNA 指纹图(注意不同 ramp 时间的 DNA 指纹条带的数目多少和亮度均不同)。

Fig. 1 The finger printing of DNA templete at the different ramp time M: indicate DNA molecular size marker cut the  $\lambda$ DNA with *Eco*RI/ *Hind* III; Lane 1~5, indicate the DNA finger printing at ramp time 1, 3, 5, 7, 9 respectively( pay attention to the number and brightness of DNA fingerprinting at the different ramp time ).