维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253－3626(2001)04－0436－03

RAPD 的建立及优化研究

蒲淑萍[1],王 希[2],段昌柱[1]

(1.重庆医科大学基础医学院生物学教研室 重庆 400016;2.重庆职工医学院生物学教研室 重庆 400050)

【摘 要】目的:建立优化的 RAPD 反应条件,为进一步进行遗传监控研究奠定基础。方法:按常规方法制备小鼠基因组 DNA,在一定的 RAPD－PCR 反应条件下分别改变各组份浓度及退火温度。扩增产物在含溴化乙锭的 1.5% 琼脂糖凝胶中电泳,紫外透射仪上观察照相。结果:当 Mg^{2+} 浓度为 1.5mmol/L,4 种 dNTPs 各为 150μmol/L,Taq 酶为 1.5U,引物为 0.2mol/L,模板 DNA 为 50ng,退火温度为 38℃,RAPD－PCR 扩增效果好。结论:在优化的条件下规范操作,RAPD 的稳定性、重复性好。

【关键词】RAPD;基因组 DNA;优化反应条件

【中国图书分类法分类号】R394.33 【文献标识码】B 【收稿日期】2001－01－03

Screening the optimized condition of RAPD－PCR

PU Shu－ping, et al

(Department of Biology, College of Basic Medical Sciences, Chongqing Medical University)

【Abstract】 ***Objective***: To establish the optimized RAPD－PCR reaction conditions for further genetic monitoring study. ***Methods***: Altering the concentrations of the reaction components and the annealing temperature of RAPD－PCR, PCR products from RAPD were electrophoretically separated in agarose gels and banding profiles were visualized by ethidium bromide staining. ***Results***: RAPD－PCR reactions were performed in duplication with 50ng of genomic DNA, 150μmol/L each dNTP, 0.2μmol/L primer, 1.5mmol/L magnesium chloride, 1.5 units of Taq polymerase, annealing at 38℃. Under these conditions RAPD method is stable and reproducible. ***Conclusion***: The optimized RAPD－PCR reaction conditions were established in this study.

【Key words】 Random amplified polymorphic DNA(RAPD); Genomic DNA; Optimal reaction conditions

1990 年 Williams[1] 和 Welsh[2] 等几乎同时将随机引物与 PCR 技术结合,用于复杂基因组 DNA 指纹分析,Williams 等称之为随机扩增多态 DNA(random amplified polymorphic DNA, RAPD)分析,Welsh 等称之为 AP－PCR(arbitrarily primed PCR)。RAPD 与 AP－PCR 并无本质的区别,均为一种基于 PCR 方法,应用单一引物的 DNA 多态检测技术。该技术利用一系列单一的碱基序列随机排列的短寡核苷酸为引物,对基因组 DNA 进行 PCR 扩增,每一引物同基因组 DNA 序列有其特定的结合位点,如果基因组在这些区域发生 DNA 片段插入、缺失或碱基突变,就可能导致这些特定结合位点的分布发生相应的变化,从而使扩增产物增加、缺少或发生分子量的改变,形成多态 DNA 片段,通过对 PCR 扩增产物的检测即可找到基因组 DNA 在这些区域的多态性。RAPD 技术的特点之一是使用随机引物,通过一系列引物可检测到覆盖整个基因组范围的遗传改变,而无须预先了解被测基因组相关分子生物学信息。另一显著的优点在于 RAPD 技术相对简单、快捷、实验成本较低,加之有大量商品化的 RAPD 引物,可对任何生物的遗传变异进行基因分型;其最大特点是能自动进行基因型鉴定[3,4]。因而自它诞生至今,这项技术在国内外已广泛应用于动植物种系鉴定、遗传分析、连锁图的构建、疾病诊断、基因分离等[5]。随机引物法亦已用于检测大肠癌、卵巢癌、肺癌、皮肤癌、脑膜瘤等的基因组不稳定性及分离差异 DNA 片段,并将其克隆和定位[6]。RAPD 反应非常灵敏,但稳定性、重复性不太令人满

作者介绍:蒲淑萍(1962－),女,重庆江津人,讲师,硕士。主要研究方向:动物及人类疾病遗传学

维普资讯 http://www.cqvip.com

意。为了克服这一缺陷,本研究对 RAPD－PCR 反应的各项组份,诸如模板 DNA、Taq 酶、镁离子、引物、dNTP 等进行浓度梯度比较实验,以期建立最优反应条件。同时使用同一 PCR 仪,同一公司生产的 Taq 酶,获得稳定性、重复性良好的扩增产物。

1 材料与方法

1.1 材料

C_{57}BL/6J 小鼠购自重庆医科大学实验动物中心,取小鼠肝脏组织备用。

1.2 试剂与引物

10×buffer、Taq DNA 聚合酶、$MgCl_2$、dNTP 均为上海生物工程公司产品。

随机引物为美国 Operon Technologies 公司产品,每一引物为 10 个碱基的寡聚核苷酸,实验用引物为 AB－0320－Kit2 － 2 即(AB2 － 2): GGTGCGGGAA; AB7 － 1: CAAAGGGCGG; AB8 － 12: GACGCGAACC; AB9 － 7: TCGCTGCGGA 等。

1.3 基因组 DNA 的制备

取小鼠肝脏组织适量,加少量液氮研碎,按常规方法加入消化液(10mmol/L Tris－HCl, pH8.0, 100mmol/L EDTA, 0.5% SDS, 20μg/ml RNase, 100μg/ml 蛋白酶 K)消化,用酚、氯仿提取 DNA,乙醇沉淀,TE 溶解,置 4℃冰箱备用。

1.4 PCR 仪:美国 PE2400 型

1.5 RAPD－PCR 反应条件及扩增程序

参照 Williams[1]等的方法稍作修改后进行。反应总体积为 25μl,其中含 2.5μl 10×buffer(10mmol/L Tris－HCl, pH 8.3, 50mmol/L KCl, 0.001% 明胶), 1.5mmol/L $MgCl_2$, 150μmol/L dNTP,随机引物 0.2μmol/L, 25－50ng 基因组 DNA, Taq DNA 聚合酶 1.5 个单位。反应程序为:94℃预变性 2min;94℃变性 1min, 38℃复性 1min, 72℃延伸 2min, 40 个循环后,72℃延伸 10min。在以上条件下,分别改变退火温度、模板 DNA 浓度、dNTP 浓度、$MgCl_2$ 浓度、Taq 酶浓度、引物浓度,每次仅改变一个 PCR 参数,并保持其它条件不变。扩增产物在含溴化乙锭的 1.5% 琼脂糖凝胶中电泳,紫外透射仪上观察照相。

2 结果与讨论

虽然 RAPD 技术有许多其它分子生物学技术无法比拟的优点[7,8],由于 RAPD 技术是以 PCR 技术为基础,加之短引物的使用及其在扩增过程中不完全配对,影响最终产物获得的因素较多,其中最重要的是 Mg^{2+}、dNTPs、引物、模板 DNA 浓度和退火温度。实验结果表明,当 Mg^{2+} 浓度为 1.5mmol/L, 4 种 dNTPs 各为 150μmol/L, Taq 酶为 1.5U,引物为 0.2μmol/L, 模板 DNA 为 50ng, 退火温度为 38℃,扩增效果较理想。经大量实验证明,在此条件下规范操作,RAPD 的稳定性、重复性好。

2.1 退火温度对 PCR 的影响

实验中分别设置 35℃, 38℃, 40℃, 42℃, 45℃退火,温度过低(35℃)则特异性差,背景深;温度过高(45℃),扩增带减少、变弱,扩增效率低。在保证扩增效率的同时又要达到增强特异性的目的,我们认为 38℃较适宜。退火温度较低,能保证短核苷酸引物与模板的稳定配对,同时也允许了适当的错配,以扩大引物在基因组 DNA 中配对的随机性。

2.2 Mg^{2+} 浓度对 PCR 的影响

Mg^{2+} 直接影响聚合酶的活性,它使双链 DNA 的 Tm 值增加, Mg^{2+} 与 dNTPs 形成的复合物才是聚合酶作用的底物,因此 Mg^{2+} 浓度对 PCR 扩增的效率和特异性具显著影响[7]。实验中分别以 0.5mmol/L、1.5mmol/L、2.0mmol/L、2.5mmol/L、3.0mmol/L 的 Mg^{2+} 浓度进行扩增,结果如图 1,浓度高则出现非特异扩增,背景深;过低则酶活性显著下降。由于反应混合物的模板 DNA、引物、dNTPs 等均可结合 Mg^{2+},从而降低其游离浓度,特别是过量的 dNTPs 使其大量减少,导致 PCR 产物减少。从实验结果可知 1.5～2.0mmol/L 的 Mg^{2+} 浓度其扩增效率和特异性较理想。

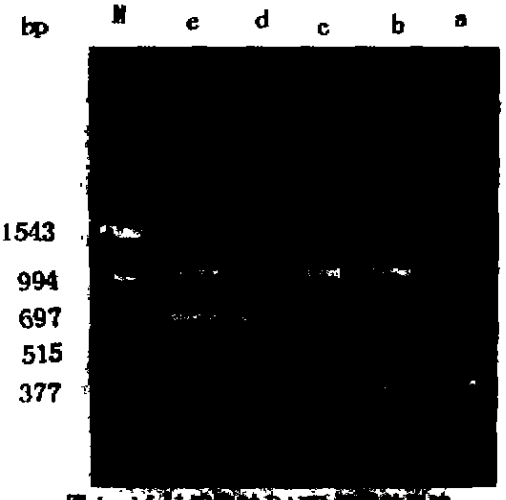


图 1 Mg^{2+} 浓度对 RAPD 扩增的影响

a. 0.5mmol/L b. 1.5mmol/L c. 2.0mmol/L
d. 2.5mmol/L e. 3.0mmol/L
(M: Marker)

2.3 dNTPs 浓度对 PCR 的影响

dNTPs 是 PCR 反应的底物,其浓度过低则反应

维普资讯 http://www.cqvip.com

速度和产量下降,过高则特异性下降。实验中 dNTPs 的浓度分别为 50μmol/L、100μmol/L、150μmol/L、200μmol/L、250μmol/L(图 2)。在 100～250μmol/L 之间扩增效果较好,故选择 150μmol/L 用于实验。

2.4 Taq 酶浓度对 PCR 的影响

如图 3,25μl 反应体系中 Taq 酶的用量分别为 0.5U、1.0U、2.0U、3.0U、4.0U,当 Taq 酶为 0.5U 时,PCR 产物量极少,Taq 酶为 3U 以上时,出现了弥散状背景,非特异产物增加,Taq 酶为 1～2U 时效果较好。

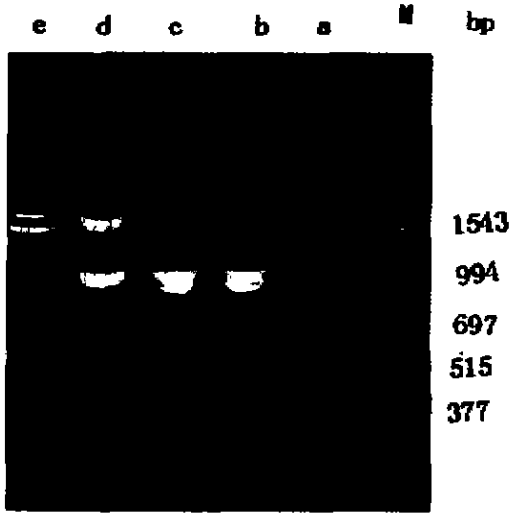


图 2 dNTPs 浓度对 RAPD 结果的影响

a. 50μmol/L b. 100μmol/L c. 150μmol/L
d. 200μmol/L e. 250μmol/L
(M:Marker)

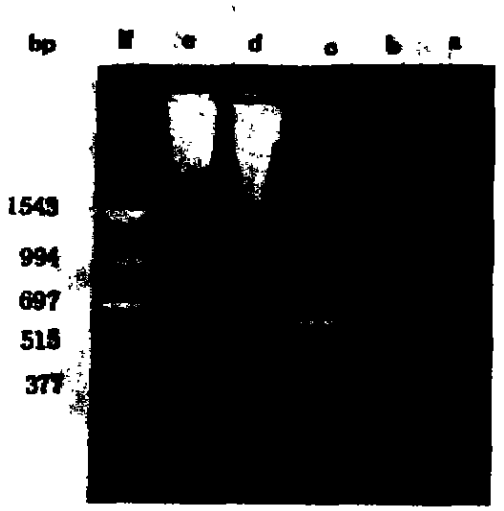


图 3 Taq 酶浓度对 RAPD 结果的影响

a. 0.5U b. 1.0U c. 2.0U
d. 3.0U e. 4.0U
(M:Marker)

2.5 模板 DNA 浓度对 PCR 的影响

模板 DNA 用量从 50ng 至 800ng,扩增结果基本一致(图 4)。模板 DNA 用量在十倍左右范围内变动都不会影响扩增结果,说明 RAPD 对模板浓度要求不十分严格。但本实验证明若模板 DNA 降解严重或质量太差(如含杂质过多,DNA 提取过程中残留的蛋白酶、核酸酶、SDS、酚、氯仿等,可抑制 Taq 酶活性),出现扩增产物减少,背景弥散或无扩增产物[9]。为了避免模板严重降解,在提取 DNA 时应尽量避免剧烈或不恰当的操作,以便获得大分子量的模板。实验中也曾用高浓度的基因组 DNA 作为模板,结果扩增产物很少或无扩增产物,这是因为模板 DNA 量大,其中抑制物量也可能增加,致使扩增效率下降。同时反应空间过分拥挤可能也不利于效率的提高。在对肿瘤与其相应正常组织、不同个体、不同品系间进行比较时模板浓度应尽量保持一致。

2.6 引物浓度对 PCR 的影响

引物浓度过低时会影响产量,过高时一则浪费,二则会出现非特异扩增[9]。实验中引物浓度梯度为 0.1μmol/L、0.2μmol/L、0.4μmol/L、0.6μmol/L、0.8μmol/L)。0.2μmol/L 引物浓度最适宜。

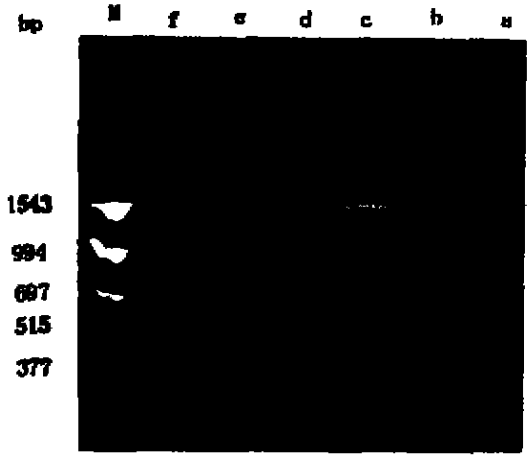


图 4 模板 DNA 浓度对 RAPD 结果的影响

a. 50ng b. 100ng c. 200ng d. 400ng
e. 600ng f. 800ng
(M:Marker)

总之,进行 RAPD 实验时应尽量保持实验用品的一致性,如使用同一批次的 TaqDNA 聚合酶及同一台 PCR 扩增仪等。建立最优反应条件,严格规范操作,可获得重复性、稳定性好的实验结果。

(下转第 442 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

染性休克的病理变化的后期阶段起着重要的作用，在这一过程中可能属于后期细胞因子，与该病理变化严重程度及其预后密切相关。本研究结果提示，当 E－STL＜150ng/ml，IL－10＜19pg/ml 时，有感染进一步加重的可能；E－SLT＞328ng/ml，IL－10＞40pn/ml 时，患者预后不良，甚至有死亡的可能。因此，我们认为同时测定 IL－10 和 E－SLT 血清水平在反映感染或感染性休克严重程度和预后上具有一定的价值和意义。

本研究表明，sCD_{14} 和 TNF－α 在术后并发严重感染的早期病理过程中起着重要的作用，与早期感染密切相关；IL－10 和 E－SLT 可能在感染病理变化过程的后期起着重要的作用，属后期细胞因子，与感染严重程度密切相关。E－SLT、IL－10 和 sCD_{14} 是反映术后并发感染病人病情变化和预后的可靠指标之一。

参 考 文 献

[1] Clauser MP, Zaneitti G, Baumgartner JD, et al. Sepsis shock: pathogenesis[J]. Lancet, 1991; 338: 732－736.

[2] Ulevitch RJ, Tobias PS. Receptor－dependent mechanisms of cell stimulation by bacterial endotoxin[J]. Annu Rev Immunol, 1995; 13: 437－457.

[3] Wright SD, Ramos RA, Toblas PS, et al. CD_{14}, a receptor for complexes of lipopoly saccharide (LPS) and LPS binding protein[J]. Science, 1990; 249: 1431－1433.

[4] Bevilacqua MP, Stengelin S, Gimbrane MA, et al. Endothelial leukocyte adhesion molecule－1: an inducible receptor for neutrophils related to complement regulatory protein and lectin[J]. Science, 1989; 243: 1160－1165.

[5] Bogdan C, Vodovotz y, Nathan C. Macrophage deactivation by interleukin－10[J]. J Exp Med. 1991; 174: 1549－1555.

[6] Bussolati B, Mariano F, Montrucchio G, et al. Modulatory effect of interleukin－10 on the production of platelet－activating factor and superoxide anion by human leukocytes[J]. Immunology. 1997; 90: 440－447.

[7] Kasama T, Strieter RM, Lukacs NW, et al. Regulation of neutrophil－derived chemokine expression by IL－10[J]. J Immunl. 1997; 152: 3559－3569.

[8] Hickey MJ, Issekutz AC, Reinhardt PH, et al. Endogenous interleukin－10 regulates hemocynamic parameters, leukocyet－endothelial cell interactiions, and microvascular permeability during endotoxemia[J]. Circs Res. 1998; 83: 1124－1131.

(上接第 438 页)

参 考 文 献

[1] Williams JG, Kubelik AR, Liavk KJ, et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers[J]. Nucleic Acids Res, 1990; 18: 6351－6535.

[2] Welsh J and McClell and M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers[J]. Nucleic Acids Res, 1990; 18: 7213－7218.

[3] McClell and M and Welsh J. DNA fingerprinting by arbitrarily primed PCR[J]. PCR Meth Appl, 1994; 4: s59－s65.

[4] Del Tufo JP and Tingey SV. RAPD assay－a novel technique for genetic diagnostics[J]. Meth Mol Biol, 1994; 28: 237－241.

[5] 常 青，周开亚，王义权，等. 太湖猪遗传多样性和系统发生关系的 RAPD 分析[J]. 遗传学报，1999; 26(5): 480－488.

[6] Ong TM, Song B, Qian HW, et al. Detection of genomic insterbility in lung cancer tissue by random amplified polymorphic DNA analysis[J]. Carcinogenesis, 1998; 19(1): 233－235.

[7] Corley－Smith GE, Lim CJ, Kalmar GB, et al. Efficient detetion of DNA polymorphisms by fluorescent RAPD analysis [J]. Bio Techniques, 1997; 22: 680－689.

[8] Benter T, Papadopoulos S, Pape M, et al. Optimization and reproducibility of random amplified polymorphic DNA in human[J]. Analyt Biochem. 1995; 230: 92－100.

[9] Muralidharan K, Wakeland EK. Concentration of primer and template quatitatively affects products in random amplified polymorphic DNA PCR[J]. Bio Techniques, 1993; 14: 352－364.