

# 萝卜-甘蓝型油菜中萝卜基因组的 RAPD 与 dpRAPD 分析效率研究

丁云花<sup>1</sup>, Holger Budahn<sup>2</sup>, 简元才<sup>1</sup>, Herbert Peterka<sup>2</sup>

(1. 北京蔬菜研究中心, 北京 100089; 2. 德国栽培作物育种研究中心, Quedlinburg D-06484)

**摘要:**应用 RAPD 与 dpRAPD 方法鉴定萝卜-甘蓝型油菜中萝卜基因组, 筛选了 140 条随机引物。结果表明, 平均每条引物(组合)能产生的萝卜基因组特异标记数 dpRAPD 高于 RAPD, 分别为 1.69 和 1.33; 在 dpRAPD 扩增产物中有 77.6% 谱带清晰易辨, 略高于 RAPD(75.4%)。两者所检测到的萝卜基因组标记大部分为各自特异的扩增产物。由于结合了荧光标记引物, dpRAPD 反应产物可在 Genetic Analyzer 上分离检测, 因此能检测到 100 bp 以下的小片段 DNA。

**关键词:** RAPD; dpRAPD; 聚丙烯酰胺凝胶电泳; 银染

**中图分类号:** S634.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7091(2004)02-0020-04

## Efficiency of RAPD and Double Primer (dp)RAPD for Detection of Radish-genomic Components in Raphanobrassica

DING Yun-hua<sup>1</sup>, Holger Budahn<sup>2</sup>, JIAN Yuan-cai<sup>1</sup>, Herbert Peterka<sup>2</sup>

(1. Beijing Vegetable Research Center, Beijing 100089, China;

2. Federal Centre for Breeding Research on Cultivated Plants, Quedlinburg D-06484, Germany)

**Abstract:** Normally, a single 10-mer oligonucleotide primer is used in a RAPD amplification. However, if pairs of two primers are used, theoretically more fragments should be amplified. In this experiment, we used 140 decamer primers to screen molecular markers specific for individual radish chromosomes in Raphanobrassica, both individually and in pairs (here named dpRAPD) with three fluorescence-labelled primers: OPD11FAM, OPG19Tet and OPH15Hex. On the average, each single primer generated 1.3 chromosome-specific markers in RAPD, while each pairwise combination of primers generated 1.7 markers in dpRAPD. The percentage of excellent and good bands in dpRAPD (78%) was higher than for RAPD (75%). It was found that the majority of dpRAPD bands are different from original RAPD bands. Fragments with length under 100 bp which are difficult to be identified by polyacrylamide or agarose gel electrophoresis are detectable using Genetic Analyzer. It was shown that dpRAPD is a useful complement to classical RAPD analysis.

**Key words:** RAPD; dp RAPD; Polyacrylamide gel electrophoresis; Silver staining

为了将萝卜中对根结线虫的抗性转移到甘蓝型油菜, Peterka H 等通过种间杂交、回交方法得到一整套甘蓝型油菜的萝卜染色体附加系。在此基础上, Moussa M A A<sup>[1]</sup> 构建了萝卜分子遗传图谱, 包括 9 个连锁群, 并把含抗根结线虫基因的染色体 D

定位在其中的一个连锁群。为进一步明确萝卜其余 8 条染色体与连锁群的关系, 需要运用 RAPD 方法筛选更多的多态性标记。Welsh 等<sup>[2]</sup> 曾对 RAPD 方法进行改进, 在 PCR 扩增体系中应用双引物组合, 发现扩增谱带增加, 扩增片段减小。在本研究中, 我

收稿日期: 2004-02-15

作者简介: 丁云花(1971-), 女, 浙江义乌人, 助理研究员, 主要从事甘蓝类蔬菜遗传育种研究工作。

们在 RAPD 扩增体系中加入由荧光标记引物与非荧光标记引物组合的双引物进行 RAPD 反应(称之为 dpRAPD), 比较其与经典 RAPD 之间在多态性、扩增谱带清晰程度以及检测范围等方面的差异, 期望寻找一条更有效、更节俭的实用方法。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

萝卜亲本 A24/2 和 A107/1(记为  $P_1$  和  $P_2$ ), 甘蓝型油菜亲本 A3/1 和 A246/1(记为  $P_3$  和  $P_4$ ), 以及 8 个标准系: St.1(含萝卜染色体 B, D, E); St.2(含萝卜染色体 E, G, I); St.3(含萝卜染色体 A, B, F); St.4(含萝卜染色体 D, G, H); St.5(含萝卜染色体 F, H, I); St.6(含萝卜染色体 B, C, F); St.7(含萝卜染色体 A, C, H); St.8(含萝卜染色体 A, E, I)。

### 1.2 方法

**1.2.1 DNA 提取** DNA 提取方法参照 Dellaporta 等的设计<sup>[3]</sup>。DNA 浓度用分光光度计(Ultrospec 2000, Pharmacia Biotech)在 260 nm 测定, 最终浓度调整为 8 ng/ $\mu$ L。

**1.2.2 RAPD 反应体系** RAPD 反应条件参考 Williams 等<sup>[4]</sup>的设计, 略作改动。反应体系为 8  $\mu$ L: 16 ng 基因组 DNA, 1  $\times$  PCR buffer (10 mmol/L Tris - HCl, pH 8.3, 50 mmol/L KCl), 2.5 mmol/L  $MgCl_2$ , 0.25 mmol/L dNTP (dATP, dCTP, dGTP 和 dTTP), 0.1 U Taq DNA polymerase (InVitek), 0.4 mmol/L primer, dd  $H_2O$  补齐 8  $\mu$ L, 混匀, 离心收集。在 PCR 扩增仪(PCR System 9700, PE)上进行反应, 反应程序: 94  $^{\circ}C$  变性 5 min, 94  $^{\circ}C$  变性 30 s  $\rightarrow$  36  $^{\circ}C$  退火 30 s  $\rightarrow$  72  $^{\circ}C$  延伸 1 min, 45 个循环后, 95  $^{\circ}C$  变性 5 min, 然后在 4  $^{\circ}C$  保存。本实验中引物均购自 Operon 公司。

**1.2.3 dp RAPD 反应体系** 反应条件基本同上, 只在引物加入上有所差异, 在 dp RAPD 反应中同时加入荧光标记引物和非荧光标记引物。其中荧光标记引物有 3 种: OPD11FAM, OPG19Tet 和 OPH15Hex。

**1.2.4 扩增产物的分离与显色** RAPD 反应中, 扩增产物通过聚丙烯酰胺凝胶电泳分离。电泳在 1  $\times$  TBE 缓冲液中先做 40 W, 50  $^{\circ}C$  预电泳 10 min, 然后调整至 100 W, 50  $^{\circ}C$  电泳 2 h。

分离后的 DNA 片段采用 Bassam 等<sup>[5]</sup>的银染法显色。用 10% 醋酸固定 10 min, 然后蒸馏水漂洗

3 次, 每次 3 min, 再在 0.2%  $AgNO_3$  (含甲醛) 溶液中染色 30 min, 再转入 6.0%  $Na_2CO_3$  (含甲醛和硫代硫酸钠) 显色, 直至出现清晰的 DNA 条带, 再放入 10% 醋酸终止反应, 最后于蒸馏水中漂洗后取出风干。

dp RAPD 反应中, 经 PCR 扩增后, 取其中的 1  $\mu$ L 扩增产物在 Genetic Analyzer (ABI Prism 310) 上进行分析, 剩余部分按上述方法进行聚丙烯酰胺凝胶电泳分离。

## 2 结果与分析

### 2.1 RAPD 与 dpRAPD 检测多态性标记频率

本实验采用了从 OPA ~ OPE、OPK 及 OPL 7 组共 140 个随机引物, 应用萝卜-甘蓝型油菜标准系筛选萝卜基因组的特异性标记。在 RAPD 分析中, 每个扩增反应使用单个随机引物; 在 dpRAPD 分析中, 每个反应使用一个随机引物结合三个荧光标记引物中的一个进行双引物扩增。

表 1 RAPD 与 dpRAPD 反应扩增产生的萝卜染色体特异标记数量

引物组	RAPD	dpRAPD		
		+ OPD11FAM	+ OPG19Tet	+ OPH15Hex
OPA	24	47	34	37
OPB	14	37	30	—
OPC	21	59	29	—
OPD	20	34	35	—
OPE	57	49	36	—
OPK	27	32	34	23
OPL	24	20	22	18
总计	187	278	220	78
			576	
占总数比率(%)	1.33	1.98	1.57	1.30
			1.69	

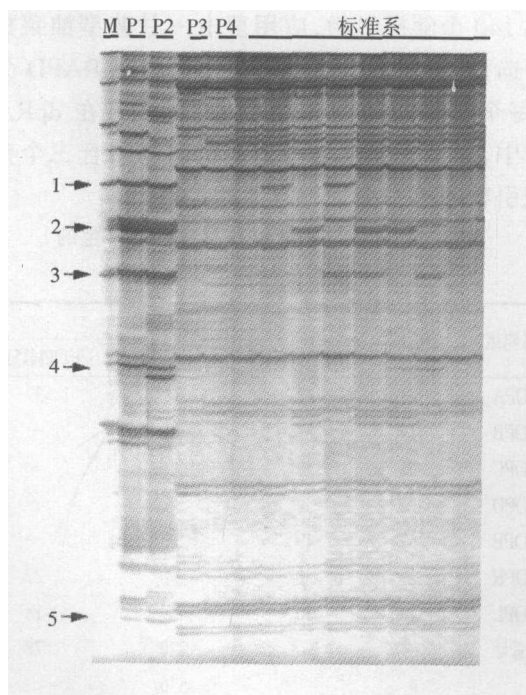
注: 表中“—”指无该组合

在 RAPD 分析中, 共得到 187 条萝卜染色体特异谱带, 平均每个随机引物产生 1.33 个特异标记。在 dpRAPD 分析中, 共得到 576 条萝卜染色体特异谱带, 平均每个随机引物组合产生 1.69 个特异标记。其中与 OPD11FAM 结合的组合产生特异标记的频率最高, 每组合平均为 1.98 个标记; 其次是与 OPG19Tet 结合的引物组合, 平均每个组合产生 1.57 个标记; 只有与 OPH15Hex 结合的组合产生特异标记的频率(1.30)略低于 RAPD 分析(1.33, 见表 1)。说明采用双引物组合的 dpRAPD 方法比 RAPD 方法产生更多的多态性标记, 而且其数量与

不同的引物组合有关。

## 2.2 特异带的质量

根据电泳和银染结果,将所获得的特异标记按谱带的强弱、相邻两条带的距离分成很好、好、差3类。其中很好指带型清晰、相邻带距离较远,最容易辨析的标记,如萝卜G染色体标记OPA09 + OPD11FAM-500, F染色体标记OPA09 + OPD11FAM-447和H染色体标记OPA09 + OPD11FAM-401;好指带型清晰或相邻带距离较远,能比较容易辨认的标记,如萝卜C染色体标记OPA09 + OPD11FAM-338;差指带型很弱而且相邻谱带紧挨,不易分辨的标记,如萝卜F染色体标记OPA09 + OPD11FAM-225(图1)。



1.OPA09 + OPD11FAM-500(G); 2.OPA09 + OPD11FAM-447(F);  
3.OPA09 + OPD11FAM-401(H); 4.OPA09 + OPD11FAM-338(C);  
5.OPA09 + OPD11FAM-225(F)

图1 引物组合 OPA09 + OPD11FAM 扩增的萝卜染色体特异标记

据统计,RAPD方法所获得的187条萝卜染色体特异标记中,有141条属于很好或好,占总数的75.4%;而dpRAPD方法所产生的576条萝卜染色体特异标记中,有447条属于很好或好,占总数的77.6%,略高于RAPD方法。说明dpRAPD方法扩增产生的特异带质量相对较高(表2)。

## 2.3 dpRAPD产生的特异标记与相应的RAPD标记的重复率

比较dpRAPD与相应的RAPD标记,如果两个

标记的分子大小相同,并且为同一条染色体所特有,则它们被视为相同标记。在与OPD11FAM组合产生的278个dpRAPD标记中,有19个与相应单引物产生的RAPD标记相同,其重复率为6.8%;与OPG19Tet组合所得的220个dpRAPD标记中有41个与相应的RAPD标记相同,重复率18.6%;与OPH15Hex组合所得的78个dpRAPD标记中,有9个为重复标记,重复率为11.5%。从总体上看dpRAPD与相应的RAPD标记重复率为12%,表明dpRAPD方法能扩增出更多与相应RAPD不同的特异片段,可以大大提高标记效率。

表2 RAPD与dpRAPD方法产生特异标记质量比较

引物组	RAPD			dpRAPD		
	很好	好	差	很好	好	差
OPA	5	14	5	37	42	39
OPB	2	6	6	27	33	7
OPC	6	9	6	33	33	22
OPD	8	10	2	28	36	19
OPE	23	21	13	30	36	19
OPK	13	5	9	32	32	25
OPL	11	8	5	22	26	12
总计	68	73	46	209	238	129
占总数百分率(%)	75.4%	24.6%		77.6%	22.4%	

## 2.4 扩增片段大小

在RAPD分析中,由于绝大多数扩增片段大于200 bp,其扩增产物采用聚丙烯酰胺凝胶电泳分离的时间通常为3 h。而用同样的方法分离dpRAPD扩增产物,小于200 bp的片段就不容易检测得到,但如果电泳时间改为2 h,则会有更多的、分子大小介于100~200 bp的片段检测到。这说明与RAPD分析相比,dpRAPD方法扩增的DNA片段更小。

## 2.5 应用Genetic Analyzer进行dpRAPD分析

在dpRAPD反应中由于加入了荧光标记引物,其扩增产物有的两端都带有荧光标记,有的只在一端带荧光而另一端无荧光,有的两端均不带荧光。在聚丙烯酰胺凝胶电泳中,经银染显色后,dpRAPD反应的所有扩增产物都能检测到,而在Genetic Analyzer上只有带荧光的扩增产物才能检测到,它以峰状显示多态性。如利用引物组合OPA09 + OPD11FAM扩增的产物在Genetic Analyzer上分析得到萝卜H染色体的特异标记OPA09 + OPD11FAM-397、F染色体的特异标记OPA09 + OPD11FAM-444以及G染色体的特异标记OPA09 + OPD11FAM-498(图2),在图1中,这些标记以谱带状显示。用Genetic Analyzer分析扩增片段,分子

大小更精确,理想的检测范围为 35~500 bp,因此,在 dpRAPD 分析中若结合聚丙烯酰胺凝胶电泳和 Genetic Analyzer,则对 PCR 扩增产物的检测范围可扩大到 35~2 000 bp。

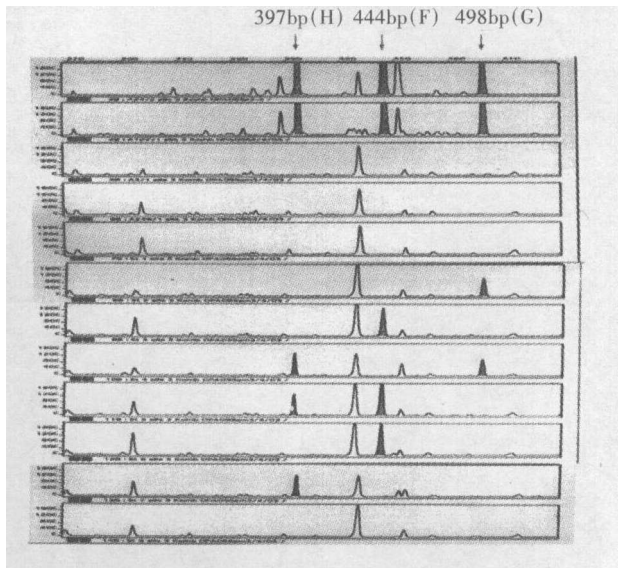


图 2 引物组合 OPA09 + OPD11FAM 扩增产物在 Genetic Analyzer 上分析结果

### 3 讨论

近 20 多年来,分子标记技术研究发展很快。在多种分子标记中,RAPD 技术因其操作简便、快速、成本相对较低等优点而被广泛应用于多个领域,如种质资源的鉴定、分类与保存、遗传多样性研究、品种纯度鉴定、突变检测、遗传图谱的构建、基因的标记与定位克隆、基因组比较等。在 RAPD 方法基础上,本文采用了与荧光标记结合的双引物扩增方法分析萝卜-甘蓝型油菜中萝卜基因组,结果表明其分析效率高于经典的 RAPD 方法,提高了试剂的利用率。在实际研究中,根据实验需要可自由组合任何两个随机引物。假设有  $N$  个引物,在 RAPD 方法中只能得到  $N$  个分析结果,而 dp RAPD 则能组合成  $N(N-1)/2$  个引物对,也就能得到  $N(N-1)/2$

个结果。因此,在遗传指纹分析中 dpRAPD 方法可以获得更多的信息。

从实验结果看,不同引物组合对分析的效率有影响。OPD11 的引物组合检测到的萝卜染色体特异标记频率最高,而 OPG19 的引物组合扩增谱带与相应的 RAPD 扩增谱带重复最多。但本实验使用的引物数目有限,这种差异到底有多大,还需进一步证明。

比较 dpRAPD 与相应的 RAPD 特异扩增产物,平均只有 12% 重复,重复率很低。Welsh 等<sup>[6]</sup>也发现类似情况,他们认为可能是由于在 PCR 扩增时小片段在延伸中比大片段更有效。另外,双引物组合中的一个引物标记荧光后,其 RAPD 扩增产物也能在 Genetic Analyzer 上进行分析。而 Genetic Analyzer 一次可同时分析 3 个由不同荧光标记的引物组合扩增的产物,与经典 RAPD 分析比较,大大节省了时间。

### 参考文献:

- [1] Moussa M A A. Polymerase chain reaction (PCR) - based marker analyses for the genome and nematode resistance QTL(s) in *Raphanus sativus*[D]. Assiut: The University of Assiut, 2004.
- [2] Welsh J, McClelland M. Genomic fingerprinting using arbitrary primed PCR and a matrix of pairwise combinations of primers[J]. *Nucleic Acids Research*, 1991, 19: 5275 - 5279.
- [3] Dellaporta S L, Wood J, Hicks J B. A plant molecular DNA miniprep version [J]. *Plant Mol Biol Rep*, 1983, 1: 19 - 21.
- [4] Williams J G K, Kubelik A E, Levak K J, et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers[J]. *Nucleic Acids Research*, 1990, 18: 6531 - 6535.
- [5] Bassam B J, Caetano - Anolles G. Silver Staining of DNA in Polyacrylamide Gels[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 1993, 42: 181 - 188.