

## RFLP 和 RAPD 技术

### 概述

DNA 分子水平上的多态性检测技术是进行基因组研究的基础。RFLP(Restriction Fragment Length Polymorphism,限制片段长度多态性)已被广泛用于基因组遗传图谱构建、基因定位以及生物进化和分类的研究。RFLP 是根据不同品种(个体)基因组的限制性内切酶的酶切位点碱基发生突变,或酶切位点之间发生了碱基的插入、缺失,导致酶切片段大小发生了变化,这种变化可以通过特定探针杂交进行检测,从而可比较不同品种(个体)的 DNA 水平的差异(即多态性),多个探针的比较可以确立生物的进化和分类关系。所用的探针为来源于同种或不同种基因组 DNA 的克隆,位于染色体的不同位点,从而可以作为一种分子标记(Mark),构建分子图谱。当某个性状(基因)与某个(些)分子标记协同分离时,表明这个性状(基因)与分子标记连锁。分子标记与性状之间交换值的大小,即表示目标基因与分子标记之间的距离,从而可将基因定位于分子图谱上。分子标记克隆在质粒上,可以繁殖及保存。不同限制性内切酶切割基因组 DNA 后,所切的片段类型不一样,因此,限制性内切酶与分子标记组成不同组合进行研究。常用的限制性内切酶一般是 HindIII, BamH I, EcoR I, EcoRV, Xba I,而分子标记则有几个甚至上千个。分子标记越多,则所构建的图谱就越饱和。构建饱和图谱是 RFLP 研究的主要目标之一。

运用随机引物扩增寻找多态性 DNA 片段可作为分子标记。这种方法即为 RAPD(Random amplified polymorphic DNA, 随机扩增的多态性 DNA)。尽管 RAPD 技术诞生的时间很短,但由于其独特的检测 DNA 多态性的方式以及快速、简便的特点,使这个技术已渗透于基因组研究的各个方面。该 RAPD 技术建立于 PCR 技术基础上,它是利用一系列(通常数百个)不同的随机排列碱基顺序的寡聚核苷酸单链(通常为 10 聚体)为引物,对所研究基因组 DNA 进行 PCR 扩增。聚丙烯酰胺或琼脂糖电泳分离,经 EB 染色或放射性自显影来检测扩增产物 DNA 片段的多态性,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。RAPD 所用的一系列引物 DNA 序列各不相同,但对于任一特异的引物,它同基因组 DNA 序列有其特异的结合位点。这些特异的结合位点在基因组某些区域内的分布如符合 PCR 扩增反应的条件,即引物在模板的两条链上有互补位置,且引物

3'端相距在一定的长度范围之内,就可扩增出 DNA 片段.因此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分布发生相应的变化,而使 PCR 产物增加、缺少或发生分子量的改变。通过对 PCR 产物检测即可检出基因组 DNA 的多态性。分析时可用的引物数很大,虽然对每一个引物而言其检测基因组 DNA 多态性的区域是有限的,但是利用一系列引物则可以使检测区域几乎覆盖整个基因组。因此 RAPD 可以对整个基因组 DNA 进行多态性检测。另外, RAPD 片段克隆后可作为 RFLP 的分子标记进行作图分析。

本实验将学习 RFLP 的酶切,电泳和膜的制作以及 RAPD 技术。探针标记及杂交检测方法请另详见分子杂交技术。

## 第二节 RFLP 技术

### 一、材料

基因组 DNA(大于 50kb,分别来自不同的材料)。

### 二、设备

电泳仪及电泳槽, 照相用塑料盆 5 只, 玻璃或塑料板(比胶块略大) 4 块, 吸水纸若干, 尼龙膜(依胶大小而定), 滤纸, eppendorf 管(0.5ml)若干。

### 三、试剂:

- 1、限制性内切酶(BamH I, EcoR I, HindIII, Xba I)及 10×酶切缓冲液。
- 2、5×TBE 电泳缓冲液: 配方见第一章。
- 3、变性液: 0.5mol/L NaOH, 1.5mol/L NaCl。
- 4、中和液: 1mol/L Tris·Cl, pH7.5/1.5mol/L NaCl。
- 5、10×SSC: 配方见第九章。
- 6、其它试剂: 0.4mol/L NaOH, 0.2mol/L Tris·Cl, pH7.5/2×SSC, ddH<sub>2</sub>O, Agarose 0.8%, 0.25mol/L HCl。

### 四. 操作步骤

#### 1. 基因组 DNA 的酶解

(1) 大片断 DNA 的提取详见基因组 DNA 提取实验,要求提取的 DNA 分子量大于 50kb, 没有降解。

(2) 在 50μl 反应体系中,进行酶切反应:

5 $\mu$ g 基因组 DNA

5 $\mu$ l 10 $\times$ 酶切缓冲液

20 单位 (U) 限制酶(任意一种)

加 ddH<sub>2</sub>O, 至 50 $\mu$ l

(3) 轻微振荡, 离心, 37 $^{\circ}$ C 反应过夜。

(4) 取 5 $\mu$ l 反应液, 0.8% 琼脂糖电泳观察酶切是否彻底, 这时不应有大于 30kb 的明显亮带出现。

[注意] 未酶切的 DNA 要防止发生降解, 酶切反应一定要彻底。

## 2. Southern 转移

(1) 酶解的 DNA 经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳(可 18V 过夜)后 EB 染色观察。

(2) 将凝胶块浸没于 0.25mol/L HCl 中脱嘌呤, 10 分钟。

(3) 取出胶块, 蒸馏水漂洗, 转至变性液变性 45 分钟。经蒸馏水漂洗后转至中和液中和 30 分钟。

(4) 预先将尼龙膜, 滤纸浸入水中, 再浸入 10 $\times$ SSC 中, 将一玻璃板架于盆中铺一层滤纸(桥)然后将胶块反转放置, 盖上尼龙膜, 上覆二层滤纸, 再加盖吸水纸, 压上半公斤重物, 以 10 $\times$ SSC 盐溶液吸印, 维持 18-24 小时。也可用电转移或真空转移。

(5) 取下尼龙膜, 0.4mol/L NaOH 30 秒, 迅速转至 0.2mol/L Tris·Cl, pH7.5/2 $\times$ SSC, 溶液中, 5 分钟。

(6) 将膜夹于 2 层滤纸内, 80 $^{\circ}$ C 真空干燥 2 小时。

(7) 探针的制备和杂交见第九章分子杂交部分。

[注意] 1、 步骤 (2) 中脱嘌呤时间不能过长。

2、 除步骤 (1)、(4)、(5) 外, 其余均在摇床上进行操作。

3、 步骤 (4) 中, 当尼龙膜覆于胶上时, 绝对防止胶与膜之间有气泡发生, 加盖滤时也不应有气泡发生。

4、 有时用一种限制性内切酶不能发现 RFLP 的差异, 这时应该试用另一种酶。

## 第三节 RAPD 技术

## 一、材料

不同来源的 DNA(50ng/ul)。

## 二、设备

PCR 仪, PCR 管或硅化的 0.5ml eppendorf 管, 电泳装置。

## 三、试剂

1、随机引物(10mer) (5umol/L): 购买成品。

2、Taq 酶: 购买成品。

3、10xPCR 缓冲液: 配方见第八章。

4、MgCl<sub>2</sub> : 25mmol/L。

5、dNTP: 每种 2.5mmol/L。

## 四、操作步骤:

1. 在 25ul 反应体系中,加入

模板 DNA 1ul (50ng)

随机引物 1ul (约 5pmol)

10xPCR Buffer 2.5ul

MgCl<sub>2</sub> 2ul

dNTP 2ul

Taq 酶 1 单位 (U)

加 ddH<sub>2</sub>O 至 25ul

混匀稍离心, 加一滴矿物油。

2. 在加热至 90℃ 以上的 PCR 仪中预变性 94℃ 2 分钟, 然后循环: 94℃ 1 分钟, 36℃ 1 分钟, 72℃ 1 分钟, 共 40 轮循环。

3. 循环结束后, 72℃ 10 分钟, 4℃ 保存。

4. 取 PCR 产物 15ul 加 3ul 上样缓冲液(6x)于 2% 琼脂糖胶上电泳, 稳压 50-100 V (电压低带型整齐, 分辨率高)。

5. 电泳结束, 观察、拍照。

[注意] 1、电泳时一般 RAPD 带有 5-15 条, 大小 0.1-2.0kb。

2、特异性的 DNA 带可以克隆作为一个新的分子标记应用。