

随机引物在分子生物学研究中的应用

刘春宇 张春玲¹⁾ 夏家辉

(湖南医科大学医学遗传学国家重点实验室, 长沙 410078)

摘要 随机引物指非特异序列的寡聚核苷酸作为 DNA 合成过程中的引物, 是相对于特异引物的概念。90 年代它与 PCR 技术结合衍生了几项新技术: 采用不同长度随机引物进行 DNA 指纹分析而衍生出的 RAPD、AP-PCR 及 DAF 方法; 进行 mRNA 多态分析的“差异显示”; 以及 rPCR, T-PCR 等技术。以 RAPD 为例介绍了随机引物 PCR 的技术特点及其在分子生物学研究中的应用。

关键词 随机引物, 任意引物, PCR, 分子生物学

随着分子生物学研究的深入和发展, 新技术不断涌现, 为新的研究领域的开拓和重大发现的产生创造了必要条件。

在分子生物学的研究中有许多实验技术涉及 DNA 的合成, 例如分子杂交中探针标记; 聚合酶链式反应 (PCR) 技术; 某些 DNA 序列测定的方法等。在这些技术中, 都需要一段寡聚核苷酸片段 (即引物) 作为 DNA 合成中新链生成的起始, 在 DNA 聚合酶的催化作用下完成新链的合成。人们已在反应条件、DNA 聚合酶修饰等方面进行了大量的改进工作, 使有关技术日臻完善, 随机引物的引入又为分子生物学研究拓展出一片新天地。

所谓随机引物 (random primer, arbitrary primer 或 non-specific primer), 是指使用非特异序列的寡聚核苷酸作为 DNA 合成过程中的引物。它与一般常用引物的区别就在于其随机性, 或者说是与特异引物 (specific primer) 相对的概念。这有两个方面的含义: a. 核苷酸的排列顺序是随机的; b. 所用引物的序列与模板链 DNA 的序列无直接相关性。因此, 随机引物既可以是人工随机合成的; 也可以是任意选取的 (如 Kpn-R、pBS 反向测序引物等)。既可以是已知序列的单引物, 也可是未知序列的引物群。

随机引物的应用最早可追溯到 1983 年

Feinbeig 等^[1]开创的核酸探针标记方法, 目前应用已十分广泛。它采用 DNA 酶消化小牛胸腺 DNA (或鲑精 DNA) 产生的大量 6~12 碱基单链 DNA (混合物), 或 DNA 合成仪上合成的八聚体集群, 作为 DNA 标记链的合成引物。这就是大多数公司产品目录中的随机引物 (random primer)。这种短而不均一的寡聚核苷酸在模板中出现互补序列的几率很大, 因此可以与待标记 DNA 的众多位置发生结合, 引导标记链的合成, 从而得到比活度非常高的标记探针。

1 随机引物与 DNA 指纹

从 1990 年开始, 随机引物的应用发生了重要的变革。Welsh 等^[2]建立了将随机引物与 PCR 技术相结合, 用于复杂基因组 DNA 指纹分析的任意引物-PCR (arbitrary primer-PCR, AP-PCR) 方法。同年, Williams 等^[3]定型了名为随机扩增的多态性 DNA (random amplified polymorphic DNA, RAPD) 的方法。AP-PCR 与 RAPD 并无本质的区别, 但人们在实际研究中采用以上两种方法时, 所用的引物、反应条件与技术命名上存在一些差异。其中最主要的区别在引物, AP-PCR 一般用长于

¹⁾湖南农业大学生物技术系, 长沙 410128。

收稿日期: 1995-12-14, 修回日期: 1996-04-22

20mer 的“任意选取的”引物(如 Kpn-R、pBS 反向测序引物等),而 RAPD 多用人工随机合成的 9~10mer 长的引物(单一引物的序列是唯一确定的)。当然这些区别也并不是绝对的,也有人采用较长(17~57 mer)的引物,仍称其方法为 RAPD。引物采用更短的寡聚核苷酸又如何呢?1991 年,Caetano-Anollés 等^[4]采用 5~21 碱基的引物进行 PCR 扩增,名之为 DNA 扩增指纹(DNA amplification fingerprinting, DAF)。因为引物短,PCR 的条件更为松弛。

比较 DAF、RAPD 与 AP-PCR,可以看出:采用随机引物与 PCR 技术相结合,可以简便地得到与基因组直接相关的指纹图谱。Caetano-Anollés 同时提出了“指纹裁剪(fingerprint tailoring)”的概念,即根据研究的目的,选用不同的引物(包括 G+C 含量、引物长度等的差异),得到复杂程度不同的指纹图谱。如较简单的图谱用于遗传作图,而复杂的用于基因型分类(genotyping)。

在以上三种技术中,RAPD 具有 AP-PCR 和 DAF 的共性,并且得到了更广泛的应用。有关 AP-PCR 的工作主要仍由 Welsh 小组进行着,而做更短引物(短于 9 mer)的 DAF 的报道较少。下面以 RAPD 为代表来简要介绍一下随机引物与 PCR 技术的结合:

RAPD 技术的操作流程比较简单:提取模板 DNA,以适当量的耐热 DNA 聚合酶、dNTPs、 Mg^{2+} 、缓冲液以及单一随机引物配制反应体系,按适当的调温程序进行 PCR 循环。在反应完成以后,将扩增产物进行电泳,电泳过程中各大小不同的扩增片段分离开来,形成一定的“指纹图谱”。在 PCR 条件相同的情况下,这种图谱仅随着 DNA 模板(所研究的基因组)与采用引物的不同组合而发生变化。也就是说,一定条件下得出的“图谱”差异直接反映基因组的歧异,因此可以作为一种重要的多态性标记使用。

PCR 技术已为大多数人所熟悉,随机引物用于 PCR 时有一些特殊之处:常规 PCR 一

般采用长 20 碱基以上的引物,而 RAPD 的引物较短,因此其扩增条件较松弛。首先,退火温度较低,一般在 30~50℃ 之间。其次,采用较高的镁离子浓度,一般在 1.5~2.0 mmol/L。另外,RAPD 多采用单一引物(普通 PCR 引物总是成对使用的),它与模板 DNA 的互补双链上相邻的区段同时杂交,引导介于二者之间新链的合成。这种引导的实现,关键就在于引物的“短”和“非特异性”,加上扩增条件较松弛,使之可能在庞大的基因组中较容易找到基本互补的区段并与之结合。

随机引物引导 PCR 虽然只需单一引物即可完成,但也有使用成对引物的例子。1991 年,Welsh 等^[5]在他的 AP-PCR 中成对地采用寡核苷酸引物研究小鼠的 DNA 指纹,发现不仅成对引物得出的图谱不同于单个引物,而且成对引物扩增出的产物中有一半以上的片段与单独使用其中之一种引物的产物不同。这样使得检出的多态性大大提高。

从目前已发表的文献来看,RAPD 技术主要用于研究生物的遗传多态性,进行群体遗传研究^[6];种属分类、亲缘关系分析,物种起源鉴定^[7];与经典遗传学方法或近等基因系(near-isogenic lines, NIL)、混合分离个体分析法(bulked segregant analysis, BSA)相结合,做某些特定基因的标记^[8];连锁图谱(遗传图谱)构建^[9];此外还用于基因组比较,以分析特殊核型^[10]或外源遗传物质导入的诱变机制^[11]等。大量的实践证明,RAPD 不仅具备了常规 PCR 技术的快速、安全、简便、灵敏度高的特点,而且由于其引物的通用性,使我们可以在对研究材料的基因组序列不了解的条件下开展工作,大大缩短了研究周期。

无论 RAPD 这一类的方法(含 AP-PCR、DAF)具体用于何种目的,都是建立于一个基础上:DNA 指纹图谱所反映的多态性。通过这种多态性进行生物不同品系的区分;利用这种多态性来完成基因的标记,丰富 RFLP 构建的遗传图谱;通过多态性间的相关性来分析生

物间的遗传关系和进化关系等等。反映并依赖多态性,这一基本特征在 RAPD (随机扩增的多态性 DNA) 和 DAF (DNA 扩增指纹) 的名称中都已充分体现。因此,为提高分析反映的多态程度,以上技术又有了多种不同的改进型,如采用聚丙烯酰胺凝胶电泳代替普通琼脂糖凝胶电泳,同位素或荧光标记扩增产物代替溴乙锭染色,都能得到更丰富的多态性。

生物中的多态性不仅体现于生物遗传进化中,在个体发生、发育过程中也有基因表达上的多态性 (mRNA 的多态性)。这种多态性的分析 (或说是组织特异表达基因的搜寻) 最常用的有差减杂交等方法,随机引物进入该研究领域后,又诞生了一项新技术: 差异显示法 (differentiation display, DD)。

1992 年 Welsh 等^[12]在长期 AP-PCR 技术研究的基础上开展了 RNA 指纹的工作。他们采用单一任选的引物引导 cDNA 的双链合成及其后的 PCR,同位素标记扩增产物后在测序胶中电泳而得到 RNA 的指纹图谱。同年, Liang 等^[13]发展了“差异显示法”,是一种将锚定的 cDNA 扩增与 RAPD 结合的 RNA 指纹技术。他们采用一组锚定引物 (如 gT15 (A/C/G) N 等) 之一引导逆转录而得到初步分组的 cDNA,再以 10mer 随机引物与锚定引物结合,进行再扩增。产物经电泳分析,得到 cDNA 指纹图谱,通过比较可找出、克隆并分析表达差异的 cDNA,采用此技术每天最少可以筛查约 10 000 条 cDNA 带。日本学者 Kaoru 等通过长期记忆与短期记忆的差异显示分析,找到了一个与长期记忆相关的基因 Ag2。有些学者应用 DD 进行肿瘤相关基因的研究并获得有价值的信息。

随机引物用于指纹图谱研究 (无论是 RAPD、AP-PCR、DAF 还是 DD) 也有其局限性,其中最重要的是结果的重复性与实验条件密切相关,甚至使用的耐热 DNA 聚合酶、PCR 仪来源不同都直接影响实验结果。造成不同实验室得到的结果可能缺乏较好的可比性。这就要求研究者在运用这一技术时充分考

虑不同批次实验的条件一致,同时应将研究的重点放在同一条件得出的结果的应用上。

2 随机引物的其他用途

人们已将随机引物用于构建基因文库、筛选阳性克隆及大范围基因组的扩增等诸多方面。

a. 对 RNA 的 5' 或 3' 端进行扩增、克隆。Fritz 等^[14]设计的逆转录引物即是一种“局部随机引物” (一段与模板序列特异互补,另有一段 (通常长 6 mer) 为随机序列), 3' 端加有一个随机的六核苷酸序列,用于对位于 RNA 3' 端但又远离 polyA 尾的未知序列的扩增。Harvey 等^[15]采用随机六聚体作为 cDNA 合成的引物,得到 cDNA 的第一链,经过多腺苷酰化后,与 RACE (rapid amplification of cDNA ends)^[16]技术结合,完成低丰度转录本条件下对 5'-cDNA 的分离,称之为 random primer RACE。

b. 对低丰度 RNA 扩增、克隆,构建 cDNA 文库。Froussard 提出的 random-PCR (rPCR)^[17]采用的引物为 3' 带有随机六聚体的长 26 mer 的“局部随机引物”,此引物用于引导 cDNA 第一链的合成及对 cDNA 的扩增。可以用于从低丰度 RNA 转录本扩增出较完整的 cDNA 群体。

c. 快速扩增与已知序列相邻的未知序列。在基因组研究中常有部分序列已知,而相邻目的序列未知的情况,如 B 和 T 淋巴细胞的抗原受体基因,它由一段已知序列的恒定区和一段未知序列的可变区组成。Williams 等^[18]1992 年采用局部随机引物,对 T 细胞抗原受体的 cDNA 进行扩增,扩增产物用于克隆和测序。

e. 与染色体显微切割相结合,对基因组文库中相对于染色体特定区域的克隆进行分离、筛选的方法。Wesley 等^[19]将果蝇的多线染色体显微切割片段作为模板,使用局部随机引物 (5'-TTGCGGCCGCATTNNNTTC-3', 其中 4 至 7 位为随机核苷酸), PCR 扩增片段

标记后作为探针, 筛选文库, 检出与切割目的区段相关的克隆.

f. Grothues 等^[20] 利用一组 5' 端恒定 (17 bp), 3' 端完全随机 (9~15 bp) 的引物群, 对从 400 bp DNA 片段至 40 Mb 基因组 (如显微切割的片段) 的进行特异性扩增, 并命名该技术为 Tagged random primed-PCR (T-PCR). 据称该技术在同类技术 (如 DOP-PCR 等) 中具有更多的优点.

通过以上对随机引物应用的综述, 我们可以看出, 随机引物与 PCR 技术的结合为现代分子生物学的研究创造了更为便利的条件. 而创造性地使用随机引物, 有可能得到意想不到的收获.

参 考 文 献

- 1 Feinberg A P, Vogelstein B. *Anal Biochem*, 1983; **132**: 6
- 2 Welsh J, McClelland M. *Nucleic Acid Res*, 1990; **18** (24): 7213
- 3 Williams J G K, Kubelik A R, Livak K J *et al.* *Nucleic Acid Res*, 1990; **18** (22): 6531
- 4 Caetano-Anollés G, Bassam B J, Gresshoff P M. *Bio/technology*, 1991; **9** (6): 553
- 5 Welsh J, McClelland M. *Nucleic Acid Res*, 1991; **19** (19): 5275
- 6 Haymer D S, McInnis D O. *Genome*, 1994; **37** (2): 244
- 7 Williams C L, Goldson S L, Baird D B *et al.* *Heredity*, 1994; **72** (Pt 4): 412
- 8 Michelson R W, Paran I, Kesseli R V. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991; **88**: 9828
- 9 Postlethwait J H, Johnson S L, Midson C N *et al.* *Science*, 1994; **264** (5159): 699
- 10 鲍晓明, 黄百渠, 李松涛等. *遗传学报*, 1993; **20** (1): 81
- 11 雷勃钧, 李希臣, 卢翠华等. *中国科学 (B 辑)*, 1994; **24** (6): 596
- 12 Welsh J, Chada K, Dalal S S *et al.* *Nucleic Acid Res*, 1992; **20** (19): 4965
- 13 Liang P, Pardee A B. *Science*, 1992; **257**: 967
- 14 Fritz J D, Greaser M L, Wolff J A. *Nucleic Acid Res*, 1991; **19** (13): 3747
- 15 Harvey R J, Darlison M G. *Nucleic Acid Res*, 1991; **19** (14): 4002
- 16 Frohman M A, Martin G B. *Technique*, 1989; **1**: 165
- 17 Froussard P. *Nucleic Acid Res*, 1992; **20** (11): 2900
- 18 Williams W V, Sato A, Rossman M *et al.* *DNA Cell Biol*, 1992; **11** (9): 707
- 19 Wesley C S, Ben M, Kreitman M *et al.* *Nucleic Acid Res*, 1990; **18** (3): 599
- 20 Grothues D, Cantor C R, Smith C L. *Nucleic Acid Res*, 1993; **21** (5): 1321

Application of Random Primers in the Research of Molecular Biology. Liu Chunyu, Zhang Chunling¹⁾, Xia Jiahui (*Hunan Medical University, National Laboratory of Medical Genetics, Changsha 410078, China;*¹⁾ *Hunan Agriculture University, Department of Biotechnology, Changsha 410128, China*).

Abstract Random or arbitrary primers, in contrast with common specific primer, refer to the non-specific oligonucleotides used as primers in DNA synthesis. In 1990's several new techniques were developed as a result of combination of random primers and PCR. RAPD, AP-PCR and DAF by random primers with different length were used for DNA fingerprinting. Differential display was used for polymorphism analysis of mRNA. rPCR, T-PCR and so on derived from application of random primers were discussed too. The technique characters and applications in molecular biology research of random primed PCR were introduced particularly in RAPD.

Key words random primer, arbitrary primer, PCR, molecular biology