

RAPD 技术的特点及其在昆虫分类中的应用

鲁 亮 归 鸿

(南京师范大学生物系 南京 210024)

摘要 随机扩增的多态性 DNA(RAPD) 技术, 是近年来发展起来的一项 DNA 分子水平上的大分子多态检测手段。由于它具有简捷、灵敏、对材料要求不高、取材少、成本低等优点, 备受人们青睐, 在遗传学、分子进化、生物分类等领域被广泛地运用。在昆虫分类的过程中, 由于昆虫的种类繁多, 形态、生态差异很大, 许多在其它领域被广泛运用的分子生物学技术不能在昆虫分类中充分发挥作用。同时在昆虫分类中出现的一些问题却又需要用涉及遗传本质的分子生物学技术进行探讨和研究。本文就 RAPD 技术的特点及其在解决昆虫分类中的问题时的优势作一简介。

关键词 随机扩增的多态性 DNA, 昆虫分类

分子生物学技术和生化技术的不断发展和完善, 为分类学、系统学研究提供了许多新的方法。同工酶电泳、蛋白质序列分析、核酸序列分析、核型分析、DNA 杂交、DNA 限制性内切酶图谱、DNA 指纹等技术已经在分类研究和系统演化研究中被广泛应用, 同时一系列的统计分析方法也在不断完善。

昆虫占动物界中的绝大多数, 在昆虫分类和系统演化研究中也大量使用分子生物学技术和生化技术, 使用得较多的当推同工酶电泳技术、核型分析技术和 DNA 杂交技术。但由于昆虫和其它动物的差异, 使有些技术不能被广泛使用, 优点难以施展, 对昆虫分类和系统分类不能发挥很大的作用。随机扩增的多态性 DNA 技术 (random amplified polymorphic DNA, RAPD) 因为简捷、灵敏、对材料要求不高等特性, 很适于昆虫分类和系统演化研究的特点, 已经开始在昆虫分类中得到运用。可以预料, 随着技术手段和统计分析方法的完善, 这项技术将在昆虫分类和系统演化的研究中发挥巨大的作用。

1 RAPD 技术的特点

RAPD 技术是 1990 年由 Williams^[1] 和 Welsh^[2] 两个研究小组同时发展起来的一项 DNA 分子水平上的大分子多态检测技术。因为它的简便、快捷等特点, 使它迅速被用于基因组的多样分析, 主要用于物种亲缘关系和系统分类的研究。

RAPD 技术的基础是聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR)。它利用两种特定序列的引物和耐高温的 *Taq* DNA 多聚酶扩增两个序列之间的 DNA 单链片段。首先, 加热使 DNA 双链解链, 然后引物和靶 DNA 退火, 这时两个特定序列的引物

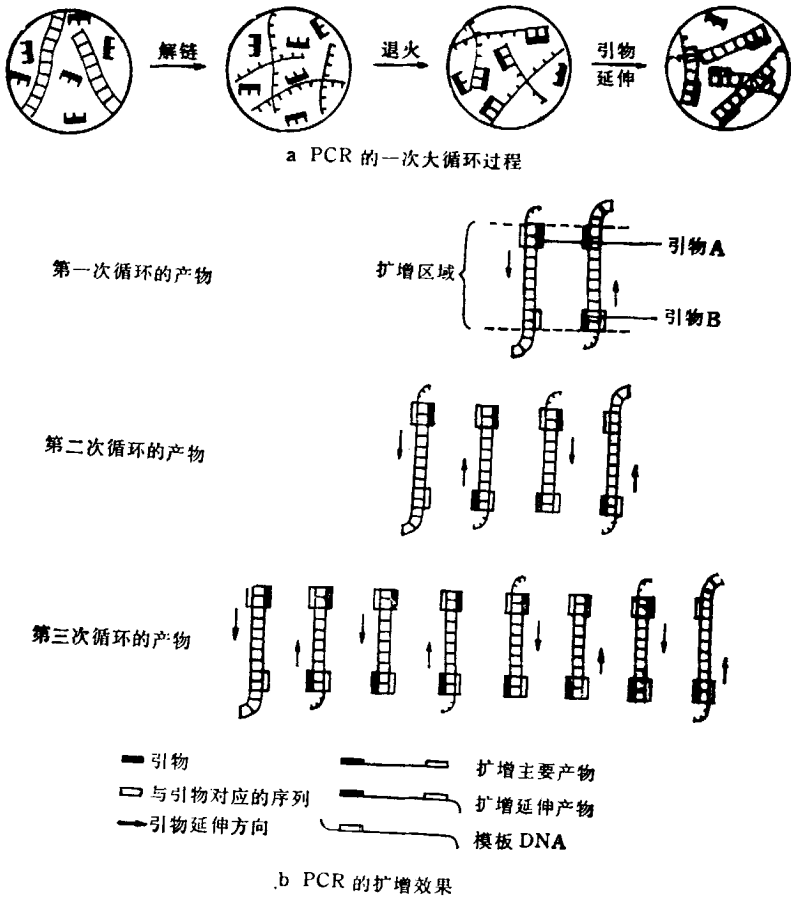


图 1 PCR 过程示意图

分别和两条单链 DNA 分子上的相应序列结合,然后在 *Taq* DNA 多聚酶的催化下,分别合成一段子链(图 1:a)。引物 A 合成的子链中包含与引物 B 对应的序列,引物 B 合成的子链包含与引物 A 对应的序列。这两条子链在第二次循环时又作为靶链,两个引物分别和它们结合,又各合成一段子链。这段子链就是所需的扩增产物。第二次循环产生的子链又是下一次循环反应的模板,如此循环,扩增产物以几何级数增加(图 1:b)。从理论上讲,如果循环 n 次,那么最终扩增产物将是原来的 $(1 + k)^n$ 倍,其中 k 为扩增效率。由于 PCR 技术可以使 DNA 片段成千上万的扩增,所以,PCR 技术大大扩展了分子生物学技术的使用范围,几个细胞、动植物标本的碎片,甚至几十万年前的化石,只要其中有特定的 DNA 片段,就可以将该 DNA 片段扩增,然后用其它分子生物学技术检测分析,推断它和其它生物的关系。

1990 年,Williams 等^[2]着眼于 PCR 技术的优势,并在此基础上发展了 RAPD 技术。他们进行这一工作的理论依据是:不同物种的基因组中与引物相匹配的碱基序列的空间位置和数目都有可能不同,所以,扩增产物的大小和数量也有可能不同,这些差异可

以通过凝胶电泳显示出来。这种扩增产物的多态性本身可以用于分类研究和系统推测,也可以和其它分子生物学技术(如 DNA 指纹、DNA 杂交等)相结合。基于这种理论,Williams 将通常 PCR 扩增中使用的两个特定序列的引物改为单一的由 10 个碱基构成的随机序列引物,并运用大量不同序列的引物进行扩增,使 DNA 多态性充分展现。

Williams 巧妙的思路使 RAPD 技术表现出独到的特点和优势。第一, RAPD 技术可以在对物种没有任何分子生物学研究的情况下,对物种的基因组进行 DNA 片段多态性分析,并结合其它方法,通过统计分析,确定其在系统演化中和分类中的地位。第二,由于 RAPD 技术的引物种类很多(目前,美国 Operon 公司可提供 800 种;中国科学院遗传研究所可提供 500 种),运用上百种的引物,可以对整个基因组进行地毯式多态分析,两个基因组之间的微小差异也能被反映出来。第三, RAPD 技术的引物大规模地生产,大大降低了分子生物学的成本。

RAPD 技术一出现,就引起了广泛的注意,并在许多领域得到运用。Welsh^[9]用三个引物对白鼠的 8 个品系进行 DNA 多态性分析,构建了 8 个品系的指纹图谱用于不同品系的鉴别和分析。Shuichi 等^[10]研究了水稻 11 个品系的 RAPD 扩增片段的多态性,并得出了 11 个品系的相对遗传距离;Halward 等^[11]用 RAPD 技术研究了花生各品系之间在进化上的关系;鲍晓明等^[6]用 RAPD 技术鉴定了两个抗锈病的小冰麦易位系。在广泛运用的同时,有关 RAPD 技术反应机制的研究也很多^[7,8]。这一系列的运用研究表明, RAPD 技术这一新兴的分子生物学方法在生物分类和系统演化研究中,特别在小的分类单位内是可以广泛运用的。

2 昆虫分类中的一些难题

长期以来,研究昆虫分类都是以外部形态为依据,因为外部形态比较直观,容易操作。在长期的实践中,人们逐渐将昆虫的几个部分的形态作为分类的标准,如:触角、口器、翅脉、生殖器等。这些分类依据在大的分类单位内能清晰地反映一个物种的分类地位,而在小的分类单位,如属、族、种团内,则很难确定物种的分类地位,对于种群、生态型的研究更是无能为力。寻找更精细的分类特征,如局部刚毛的形态、分布等,则容易将一些非遗传稳定的性状当做分类特征,而且随着昆虫生态学、行为学等的研究进展,在同一形态种内有可能发现多个行为种、近缘种。关于这种情况的报道很多,如冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae* Giles 复合体由六个形态很相似、但没有基因流动的种组成,它们之间的关系可以用杂交后代的孵化率和繁殖能力来区分^[9]。直翅目中有些形态种根据它们的鸣声频率可以分成许多行为种,因为直翅目昆虫靠鸣声频率来寻找配偶,因此造成生殖隔离^[10]。这些问题是形态分类力所不及的。

现代遗传学表明,物种的遗传性状都是由基因决定的。基因的变异不仅体现在外部形态的变异上,还体现在体内蛋白质分子结构的变化上。而基因的变异是由于 DNA 分子中碱基序列的变化造成的。因此,在生物分类和系统演化的研究中,人们采用分子生物学技术和生化技术,以 DNA 分子或其它大分子为材料进行研究,希望从根本上解决形态分类不能解决的问题。

在昆虫分类和系统研究中也是如此,常用的手段是同工酶电泳、核型带型分析、DNA 杂交等技术。这些技术,对更详细地研究昆虫分类,尤其是小分类单元内的系统研究起了

很大的作用,对形态分类起了很大的补充。但是可以发现,大量的昆虫分子生物学研究集中于少数双翅目、直翅目、鞘翅目、鳞翅目和蜚蠊目等卫生昆虫、经济昆虫和一些大型昆虫,而这些昆虫只占昆虫纲相当小的一部分。分析其中原因,除了这些昆虫和人类关系较为密切外,还可以发现:第一,由于昆虫的种类繁多,现有的大量的分类工作还是在野外采集的基础上进行的。在野外对标本的保存只能是较简单的毒杀或浸制,这些方法保存的标本,只能用于形态分类,而不能采用已有的分子生物学技术进行分析,所以,现在分子技术和生化技术的对象大都集中于容易采集的大型昆虫或人工饲养的卫生昆虫、经济昆虫,其它领域一直只是一些零星的工作。第二,对昆虫分类的研究由来已久,已经采集了大量的标本、命名了大量的模式种。用分子生物学技术研究昆虫分类和系统演化,不能对这些标本和模式种视而不见,因为这些模式种构成了昆虫系统分类的基础和框架;但是现有的分子生物学技术对这些几十年前乃至几百年前的标本却无能为力。如果重新采集地模标本进行分子生物学分析,无论是工作量,还是研究费用都是相当惊人,也是无法承受的。

3 RAPD 应用于昆虫分类的前景

面对昆虫分类的难题,一种简捷、快速、成本低的方法肯定是受欢迎的。RAPD 技术正符合这种要求,所以它很快被昆虫分类学家运用到实际工作中。

Black IV 等^[14]首先将 RAPD 技术用于四种蚜虫的鉴别比较。他们采用了四种 10 个碱基的随机引物对四种蚜虫进行了 RAPD 反应,检测它们扩增产物的多态性,结果表明,根据电泳图谱能明确地区别四个种。Black IV 等还检测了种内不同生物型之间以及同一生物型内不同个体扩增产物的多态性、种群内不同个体之间扩增产物的多态性,另外,他们还用 RAPD 技术检测和鉴定了蚜虫体内的两种寄生蜂。对于 RAPD 技术的重复性、可靠性以及在实际工作中的一些优点和局限,Black IV 等也作了很有价值的讨论。Kambhampiti 等^[12]将 RAPD 技术用于鉴定和区别蚊子的种和种群,这些工作都证明 RAPD 技术在昆虫分类中有广泛的运用价值。

分析 Black IV 等人的工作并结合 PCR 技术的特点,我们能发现在昆虫分类和系统演化的研究中运用 RAPD 技术有以下几个优点:

第一,RAPD 技术是一种对材料要求低、操作简便、成本相对较低的分子生物学方法。人们在采集昆虫的时候,可以用简单常用的方法将标本固定下来,在做形态分类的同时分析标本之间的 DNA 分子多态的关系,从而为形态分类的结论提供有力的旁证,或得出形态分类不能得出的结论。另外,RAPD 技术能利用前人采集的标本进行 DNA 分子多态分析^[12],这样可以极大的扩展昆虫分类和系统演化的分子生物学研究范围,有助于建立正确和完善的分类体系、推测正确的系统演化树。

第二,RAPD 技术所需材料的量很少,便于对大量的小型昆虫进行研究。在昆虫纲中,昆虫的体型变化很大,大到几十厘米小到不足一毫米。大型的昆虫,无论是做分类还是做其它分子生物学技术分析都比较便利。而很小的昆虫,则都不容易。但对于 RAPD 技术,几个细胞的 DNA 量就绰绰有余。Black IV 在他的文章中着重介绍了 RAPD 技术的这个优点,同时他对蚜虫体内寄生蜂的检测和鉴定很好地证明了这一点。

第三,使用大量的 RAPD 引物,将使 DNA 分子多态性分析非常灵敏。由于 RAPD 技术可以对整个基因组作地毯式的多态分析,所以其灵敏程度可以与 DNA 序列分析和

DNA 指纹媲美,可分析的领域扩展到种内不同种群、不同生物型、不同品系、不同家系之间的关系,同时, RAPD 技术还可以和其它 DNA 分子技术结合,进行其它方法的检测。这样,就大大扩展了分子生物学技术的应用范围,将对形态分类和系统推测产生很大的促进作用。

第四,采用 RAPD 技术对不同种群、不同生物型、不同品系的个体进行广泛的多态分析以后,通过统计分析,从大量的引物中找出关键的引物,从不同的电泳谱带中找出关键的谱带,可以建立一套检索系统。对于一个不知道分类地位的标本,可以用关键的引物进行 PCR 反应,根据得到的电泳图谱再进行统计分析,就可以基本准确的计算出这个标本的分类地位(主要在较小的分类单位内)。当然,希望得出的结果和统计方法是有密切的关系的,比如,检查一个标本的种间地位和种内地位所用的统计方法是不一样的。Black IV 等在研究按蚊两个亚种间 11 个不同品系间的 RAPD 扩增产物电泳图谱以后,建立了一个数据库,然后用四种统计方法计算一些标本的分类地位,得出的结果很令人满意,运用判别分析,种间计算正确率达 100%,亚种间计算正确率达 82%。用相似性指数分析,可以判断到种群水平^[43]。由此可见, RAPD 技术不仅可以快速的检测 DNA 的多态性,还能够通过统计分析建立一套灵敏准确的检索系统。这个特点尤其适合于种类繁多的昆虫的研究。

综上所述可以看出, RAPD 技术在昆虫分类和系统演化的研究中有着广泛的应用前景,而且它的前景随着技术和统计方法的完善将变得更加广阔。

参 考 文 献

- 1 Williams, J. G. K., Kubelik, A. R., *et al.* DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl. Acids Res.* 1990, **18**(22):6531—6535.
- 2 Welsh, J., McClelland, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucl. Acids Res.* 1990, **18**(24):7213—7218.
- 3 Welsh, J., Petersen C., McClelland, M. Polymorphism generated by arbitrarily primed PCR in the mouse: application to strain identification and genetic mapping. *Nucl. Acids Res.* 1991, **19**(2): 303—306.
- 4 Shuichi, F., Kazuyoshi, H., *et al.* Use of random amplified polymorphic DNAs (RAPDs) for identification of rice accessions. *Jpn. J. Genet.* 1992, **67**:243—252.
- 5 Halward, T., Stalker, T., *et al.* Use of single-primer DNA amplifications in genetic studies of peanut (*Arachis Hypogaea* L.). *Plant. Mol. Biol.* 1992, **18**(2):315—326.
- 6 鲍晓明,等. RAPD 技术鉴定两个小冰麦易位系. *遗传学报*, 1993, **20**(1): 81—87.
- 7 杨树青,等. 单引物 PCR 扩增的 DNA 分子模式. *复旦学报(自然科学版)*, 1992, **31**(2): 193—199.
- 8 Caetano-Anolles, G., Bassam, B. J., *et al.* Primer-template interactions during DNA amplification fingerprinting with single arbitrary oligonucleotides. *Mol. Gen. Genet.* 1992, **235**:17—65.
- 9 缪建吾,等. 中国赫坎按蚊类群的六个种的杂交和染色体的观察, *动物学研究*, 1988, **9**(3): 231—236
- 10 Hoy, R. R., Paul, R. C. Genetic control of song specificity in crickets. *Science*, 1973, **180**:82—83.
- 11 Black IV, W. C., *et al.* Use of the random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD-PCR) to detect DNA polymorphisms in aphids. *Bull. Entomol. Res.* 1992, **82**:151—159.
- 12 Kambhampati, S., Black IV, W. C., *et al.* Random amplified polymorphic DNA of mosquito species and populations (Diptera: Culicidae): Techniques, statistical, analysis, and applications. *J. Med. Entomol.* 1992, **29**(6):939—945.
- 13 Ballinger-Crabtree, M. E., Black IV, W. C., *et al.* Use of genetic polymorphisms detected by the Random-Amplified Polymorphic DNA Polymerase Chain Reaction (RAPD-PCR) for differentiation and identification of *Aedes aegypti* subspecies and populations. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1992, **47**(6):893—901.

THE PECULIARITY OF RAPD AND ITS APPLICATION TO INSECT TAXONOMY

LU LIANG GUI HONG

(Department of Biology, Nanjing Normal University Nanjing 210024)

Abstract Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD), which has been developing since 1990, is a molecular approach to reveal DNA polymorphism. It is believed that this approach is valuable in studies involving genetics, molecular evolution, taxonomy et al. because of its advantages, such as simplicity, sensitivity, cheapness and, the most important, lower requirement of materials.

In the field of insect taxonomy, the molecular approaches which are valuable in other fields can not be used widely due to polymorphism of insects. The obstacle to the progress of insect taxonomy should better be overcome by molecular approaches which relate to DNA. Now, RAPD is considered to be an effective key. In this paper, the peculiarity of RAPD and its superiority in insect taxonomy are discussed.

Key words random amplified polymorphic DNA (RAPD), insect taxonomy