



UNIVERSIDAD
POLITECNICA
DE VALENCIA

Marcadores moleculares basados en PCR: Marcadores RAPD

(Random amplified polymorphic DNA).

Fragmentos de ADN polimórficos amplificados al azar

Apellidos, nombre	Picó Sirvent, María Belén (mpicosi@btc.upv.es) Pérez de Castro, Ana María (anpede1@btc.upv.es)
Departamento	Departamento de Biotecnología
Centro	Universidad Politécnica de Valencia



1. Resumen de las ideas clave

Aparte de la secuenciación, existen distintos métodos para identificar variaciones en la secuencia de ADN, variaciones que resultan de utilidad como marcadores genéticos. Los métodos más utilizados son los basados en la reacción de amplificación en cadena de la polimerasa (PCR, *Polymerase chain reaction*). En este artículo se describen los marcadores RAPD (*Random amplified polymorphic DNA*), también conocidos como *rapids*, uno de los sistemas más rápidos y sencillos de identificación de polimorfismos de ADN mediante PCR. Como su nombre indica, estos marcadores detectan mutaciones amplificando aleatoriamente fragmentos del genoma. Para ello, emplean cebadores de secuencia corta y arbitraria, por lo que su aplicación no requiere un conocimiento previo de la secuencia del organismo a analizar. Por su rapidez, sencillez y bajo costo son los marcadores elegidos para numerosos estudios de diversidad, sobre todo en especies no modelo en las que no se dispone de información previa de secuencia. Además, puesto que presentan herencia mendeliana, pueden emplearse en estudios de cartografía. Los marcadores RAPD se han utilizado con éxito en diversas especies con fines de mejora animal o vegetal y para el análisis de poblaciones de microorganismos. En este artículo se incluye una breve revisión teórica y una explicación práctica detallada del procedimiento. Con la explicación planteada se pretende facilitar el aprendizaje de este sistema de marcadores al alumno de Ciencias de la vida (Agronomía, Biología, Veterinaria, Medio ambiente, Biotecnología..), tanto a nivel teórico como práctico.

2. Objetivos

Una vez que el alumno haya leído con detenimiento este documento y respondido a las cuestiones planteadas a lo largo del mismo, será capaz de:

1. Describir y explicar los fundamentos básicos de la detección de polimorfismos mediante marcadores RAPD.
2. Dar ejemplos y aplicaciones de esta técnica en diversos campos.
3. Diseñar y desarrollar-aplicar un experimento de este tipo.
4. Analizar e interpretar resultados obtenidos.

3. Introducción

Los marcadores RAPD, pronunciado *rapids*, (*Random amplified polymorphic DNA*) son un sistema de detección de polimorfismos en la secuencia de ADN, basado en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)¹.

Cuando amplificamos por PCR un fragmento de ADN específico solemos emplear dos cebadores distintos, de secuencia complementaria a sus dos extremos, lo que implica el conocimiento previo de la secuencia a amplificar. Los marcadores RAPD se basan en una sencilla estrategia que permite obviar este requerimiento. En la PCR se emplea un único cebador, corto y de secuencia arbitraria. Se utilizan ciclos de hibridación del cebador a baja temperatura para amplificar un conjunto de fragmentos genómicos. Tras la amplificación, los fragmentos se separan por su tamaño mediante electroforesis



en gel. De esta forma, en cada PCR se amplifica un conjunto de fragmentos distribuidos aleatoriamente por el genoma del individuo analizado. Todos ellos tienen en común que se encuentran flanqueados por la secuencia del cebador empleado, en orientación directa y reversa-complementaria, respectivamente.

La separación mediante electroforesis en gel de los fragmentos amplificados genera un patrón multibanda, característico de cada uno de los individuos analizados. Si entre dos individuos existe polimorfismo, es decir variación en la secuencia, en alguna de las zonas de unión del cebador empleado, este polimorfismo puede resultar en un fallo de amplificación de alguno de los fragmentos y producir un patrón multibanda diferencial entre ambos individuos. También las inserciones y deleciones entre sitios de unión del cebador resultan en la amplificación de fragmentos de tamaño diferencial.

Los marcadores RAPD se utilizaron por primera vez en 1990, en varios organismos (humanos, distintas especies vegetales y microorganismos)², describiéndose como una alternativa a los marcadores de tipo RFLP (*Restriction fragment length polymorphism*), los más empleados en la época para la construcción de mapas genéticos y cartografía de genes de interés. Para la detección de polimorfismos de tipo RFLP solían utilizarse clones genómicos de copia única o bajo número de copias, de secuencia desconocida. Los requerimientos de cantidad y calidad de ADN y las dificultades de visualización del polimorfismo mediante *Southern blot* convertían a los RFLP en marcadores incompatibles con un análisis a media o gran escala, requerido para muchas aplicaciones. Los polimorfismos RAPD se heredan de forma mendeliana y pueden emplearse para construir mapas genéticos, además de para detección de variabilidad. El hecho de que este tipo de marcadores no requieran ningún conocimiento previo de la secuencia del organismo con el que se está trabajando los convertía en una alternativa económica y rápida para muchas aplicaciones.

Desde su desarrollo, el análisis con marcadores RAPD se ha convertido en una técnica ampliamente utilizada con diferentes objetivos, en humanos, animales, plantas o en microorganismos^{3, 4, 5, 6, 7, 8}. A continuación se explican los pasos del procedimiento con detalle.

4. Desarrollo

Para entender y aplicar los marcadores RAPD es necesario tener conocimientos previos de Genética y técnicas de Genética Molecular (PCR y electroforesis). El contenido que se va a presentar facilitará que el alumno utilice estos conocimientos previos para el desarrollo de esta estrategia simple y económica de análisis de la variación. Aplicando dicha técnica podrán descubrirse mutaciones en plantas, animales y humanos, relacionadas con características de interés en los sectores de la agronomía, medio ambiente, la producción animal o la medicina. Los resultados obtenidos hasta la fecha demuestran la utilidad de esta metodología: estudios de variación en humanos, microorganismos, plantas y animales, análisis epidemiológicos de patógenos de plantas o animales, construcción de mapas genéticos e identificación de marcadores ligados a características de interés^{3,4,5,6,7,8}.



El contenido se ha estructurado describiendo los pasos a llevar a cabo para identificar estos marcadores, destacando los principales factores a tener en cuenta en cada uno de ellos. Se describen los fundamentos básicos de cada paso, planteándose cuestiones relevantes al final de cada uno para validar lo aprendido. Al final se presenta un esquema resumen que permite confirmar el aprendizaje de la globalidad del proceso. El alumno se puede apoyar durante el proceso de aprendizaje en los trabajos citados durante el desarrollo del mismo.

PASO 1. Obtención del ADN genómico. Requerimientos de cantidad y calidad

Los marcadores RAPD se analizan habitualmente empleando ADN genómico, aunque también puede emplearse ADN cloroplástico o mitocondrial. El ADN puede proceder de cualquier organismo. Aunque no es necesaria gran cantidad, sí es recomendable trabajar con ADN de calidad, limpio y de peso molecular elevado. La baja calidad del ADN es uno de los motivos más frecuentes de obtención de patrones RAPD poco precisos. Para maximizar la reproducibilidad de esta técnica es importante utilizar métodos de extracción que resulten en ADN puro y poco degradado. Es recomendable realizar algunas pruebas con distintos métodos de extracción para seleccionar el más adecuado para cada organismo y tejido. Se debe cuantificar el ADN genómico y visualizarlo en un gel antes de la reacción, para comprobar que no está degradado. En ocasiones si la calidad del ADN no es muy buena puede mejorarse la precisión del marcador disminuyendo o aumentando la concentración. La concentración óptima puede variar con el método de extracción empleado. Suelen emplearse cantidades entre 5 y 50 ng de ADN por reacción, variando la cantidad óptima también entre distintos organismos. En cada caso, es necesario poner a punto el procedimiento, probando un rango de concentraciones para seleccionar la que resulte en el patrón de bandas más útil para nuestros objetivos.

Durante el análisis de marcadores RAPD es necesario tener precaución con las contaminaciones. Cualquier contaminación de nuestra muestra con ADN de otro individuo/organismo puede provocar la aparición de un patrón de bandas diferencial, conduciendo a un resultado erróneo. Para evitar las contaminaciones se recomienda utilizar puntas y pipetas estériles, puntas con filtro y nuevas alícuotas de las soluciones *stock* en cada ensayo.

Importante: Disponer de un ADN de buena calidad no es imprescindible para generar un patrón RAPD, pero si para que éste sea reproducible. Un ajuste previo de la concentración óptima producirá también mejores patrones de bandas. Para comparar patrones obtenidos en distintas muestras es conveniente que hayan sido extraídas con el mismo sistema.

Ejemplo: En la Figura 1 se muestran los patrones multibanda obtenidos con la metodología RAPD en distintos organismos en el primer trabajo en el que se describió esta técnica ², demostrándose su amplio espectro de aplicación.

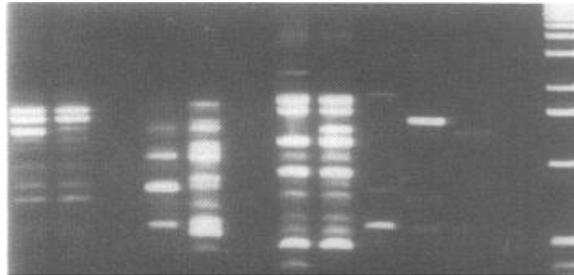


Figura 1. Patrones RAPD obtenidos en distintos organismos: ADN humano (1,2) (con el cebador 5'-ACGGTACACT-3'), ADN de maíz (4,5) (con el cebador 5'-GCAAGTAGCT-3'), ADN de soja (7,8) (con el cebador 5'-CGGCCCTGT-3') y ADN de *Neurospora crassa* (10,11) (con el cebador 5'-CACATGCTC-3'). Las carreras 3, 6, 9 y 12 contienen controles sin DNA genómico. Los fragmentos se han separado mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1,4%. Figura tomada de Williams et al., 1990²

**¿A que se pueden deberse las bandas que se observan en la carrera control 9?
¿Cómo podrías evitarlas? ¿Podrías dar alguna explicación al menor número de
bandas en las carreras 10 y 11?**

Ejemplo: En la Figura 2 se observan los patrones RAPD obtenidos en 3 organismos distintos con el mismo cebador, variando las concentraciones de ADN

E. coli lechuga trucha

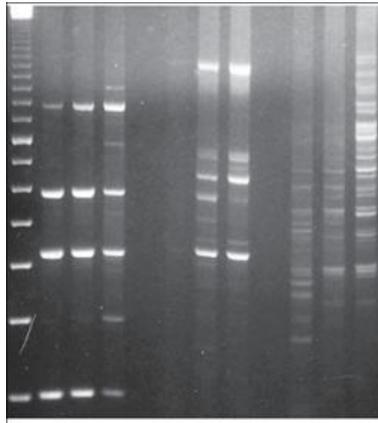


Figura 2. Patrones RAPD obtenidos a partir de la amplificación de ADN genómico de *E. coli*, lechuga y trucha, utilizando 3 concentraciones de ADN diferentes (1, 10 y 100 ng). Esta prueba de concentraciones se incluye en el kit comercial Ready-To-Go RAPD Analysis Kit (GE Healthcare)⁹.

¿Por qué se observan patrones de bandas diferentes en las 3 últimas muestras si se está analizando el mismo individuo?

PASO 2. Selección de los cebadores

Para cada reacción RAPD se utiliza únicamente un cebador de secuencia aleatoria. El tamaño del mismo puede variar, pero los mejores resultados se han descrito con cebadores de 10 bases. Los cebadores empleados suelen cumplir los mismos requisitos que los cebadores empleados en reacciones PCR específicas, en cuanto al contenido en GC, en torno al 60%, y a la ausencia de



estructuras secundarias que dificulten su funcionamiento durante la amplificación. Puesto que durante la reacción PCR se utilizan temperaturas de hibridación de cebadores bajas, las reacciones suelen ser bastante sensibles a la concentración de cebador. Concentraciones de cebadores diferentes pueden resultar en la generación de patrones de bandas diferentes. Normalmente un exceso de cebador puede resultar en la amplificación de bandas de bajo peso molecular, mientras que concentraciones bajas pueden resultar en patrones de bandas compuestos preferentemente por bandas de alto peso molecular. Existen kits comerciales que proporcionan lotes de cebadores adecuados para el análisis en diversas especies⁹.

Ejemplo: En la figura 3 se observan patrones de bandas RAPD generados utilizando el mismo cebador en distintos organismos procariontas

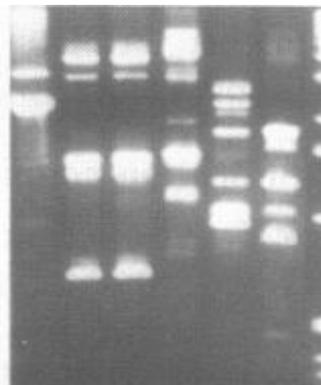


Figura 3. Patrones RAPD obtenidos a partir de ADN de 3 cepas de *Escherichia coli* (1,3), *Listeria monocytogenes* (4), *Staphylococcus aureus* (5) y *Salmonella typhimurium* (6) amplificados con el cebador 5'-TCACGATGCA-3'. Los fragmentos se han separado mediante electroforesis en un gel de agarosa de 1,4%. Figura tomada de Williams et al., 1990²

¿Por qué puede emplearse el mismo cebador para amplificar ADN de distintos organismos? ¿Podrías indicar la secuencia de los extremos de los fragmentos que se amplificarían en una de las reacciones de la figura 3? ¿Por qué el problema de la contaminación es más importante en los marcadores RAPD que en otro tipo de marcadores basados en PCR?

P
a

PASO 3. Reacción de amplificación

La reacción de amplificación RAPD puede optimizarse para cada organismo. A modo de ejemplo se ofrecen las condiciones de reacción empleadas por el grupo de Mejora de Cucurbitáceas del COMAV de la UPV para analizar la variabilidad de la especie *Cucurbita maxima*¹⁰: Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen total de 25 μ l, utilizando 20 ng de ADN genómico y una concentración 200 μ M de dNTPs, 1,5 mM de MgCl y 0,3 μ M del cebador, con una unidad de *Taq* polimerasa. La amplificación se llevó a cabo utilizando 5 min de desnaturalización a 94°C seguidos de 50 ciclos de:



- 1 min desnaturalización a 94°C
- 1 min de hibridación de cebadores a 35°C
- 2 min de elongación a 72°C

Seguidos por un ciclo final de elongación a 72°C

En cada caso suele partirse de un protocolo estándar, que va siendo modificado para optimizar los resultados obtenidos. Durante la puesta a punto de la reacción con algunas combinaciones cebador/ADN pueden aparecer patrones poco discretos, *smear*, que pueden convertirse en patrones discretos disminuyendo la concentración de *Taq* polimerasa o de ADN genómico, variando la concentración de magnesio o cambiando las condiciones de los ciclos de amplificación. Después de la amplificación el patrón de bandas se visualiza mediante electroforesis en gel. Aunque pueden emplearse geles de acrilamida de mayor resolución, lo más frecuente es utilizar geles de agarosa y tinción con bromuro de etidio o algún colorante fluorescente. La utilización de geles de agarosa va en consonancia con los bajos requerimientos de esta técnica en infraestructura: basta con un laboratorio simple equipado con un termociclador y un equipo de geles de agarosa para llevar a cabo un análisis RAPD. La principal limitación del empleo de estos geles es su baja resolución, que puede llevar a considerar dos bandas que difieren ligeramente en su longitud como bandas del mismo tamaño. Este problema se minimiza con el empleo de geles de acrilamida, pero incluso con este polímero de mayor resolución la identidad de migración no supone identidad de secuencia y podemos estar considerando dos bandas que migran a la misma distancia como procedentes de la amplificación del mismo *locus* cuando proceden de distintos *loci*.

Ejemplo: En la figura 4 se muestra el polimorfismo RAPD identificado en un conjunto de variedades de *Cucurbita maxima*, visualizado en un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio.

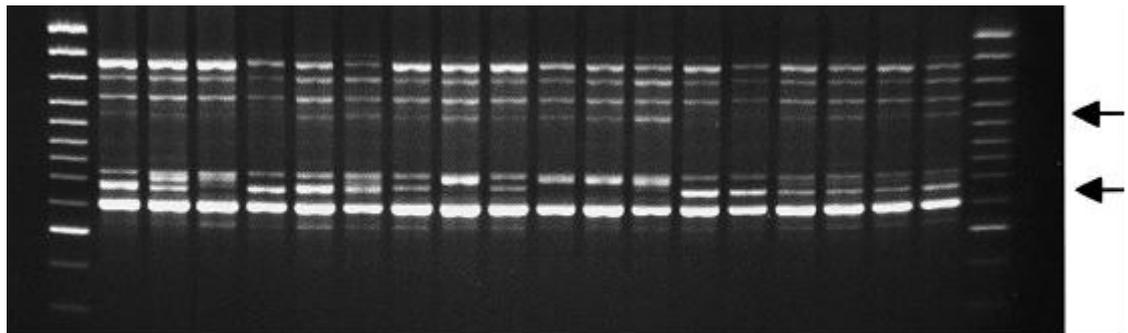


Figura 4. Patrón RAPD de 18 variedades tradicionales españolas de la especie *Cucurbita maxima*. El patrón obtenido con un único cebador muestra dos fragmentos polimórficos que permiten agrupar las variedades según su similitud genética. Figura tomada de Ferriol et al., 2003 ¹⁰

Ejemplo: En la figura 5 se muestra el polimorfismo RAPD identificado en un conjunto de cepas bacterianas visualizado en un gel de acrilamida teñido con plata.

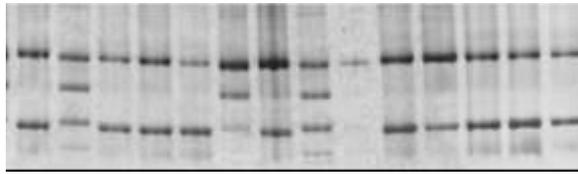


Figura 5. Patrón RAPD de distintas cepas de *Haemophilus ducreyi* de Tanzania, Senegal, Tailandia, Europa y Norte America. Los patrones permiten diferenciar 3 grupos de cepas por su similitud genética.

¿Cuáles son las limitaciones del empleo de geles de agarosa para separar fragmentos RAPD? ¿Pueden resolverse totalmente empleando para la separación de los fragmentos geles de acrilamida?

PASO 4. Origen del polimorfismo y análisis de los resultados

Los patrones polimórficos detectados empleando marcadores RAPD pueden tener orígenes diversos. Por ejemplo, la ocurrencia de una o varias mutaciones puntuales en la zona de unión del cebador puede conducir a la no amplificación de uno de los fragmentos:

Ejemplo: El fragmento polimórfico de menor tamaño que se señala en la Figura 4 fue amplificado con el cebador 5'TGCCGAGCTG 3'. Aunque desconocemos su secuencia tenemos información acerca de la secuencia de sus extremos:

```
5'TGCCGAGCTGXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXCAGCTCGGCA3'
3'ACGGCTCGACXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXGTCGAGCCGT5'
```

Una mutación puntual, como la mostrada en la siguiente secuencia podría llevar a un fallo en la amplificación de este fragmento

```
5'TGCCGAGCTGXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXTAGCTCGGCA3'
3'ACGGCTCGACXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXATCGAGCCGT5'
```

Este fallo en la amplificación resultaría en el polimorfismo que se observa, por ejemplo, entre las muestras 2 y 3 del gel mostrado. Puesto que el polimorfismo suele aparecer como presencia-ausencia de banda, los RAPD se interpretan habitualmente como marcadores dominantes. Así, no permiten distinguir individuos homocigotos de individuos heterocigotos.

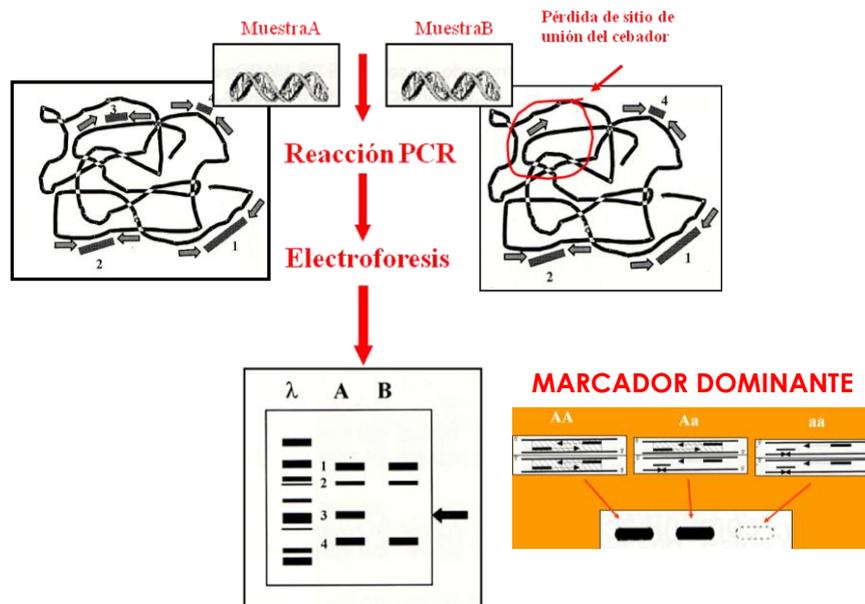
Por ejemplo, para estudios de variabilidad se suelen analizar los patrones de bandas transformándolos en matrices de presencia o ausencia y empleando coeficientes de similitud o disimilitud genética y análisis cluster. La metodología de análisis se puede revisar en el polimedia (<http://polimedia.upv.es/visor/?id=9484e053-c23e-5146-89a0-50289a40a7f6>)

Tras entender el fundamento de cada uno de los pasos anteriores, estamos en situación de interpretar los resultados obtenidos. Podemos comprobar nuestro aprendizaje contestando a la siguiente pregunta.

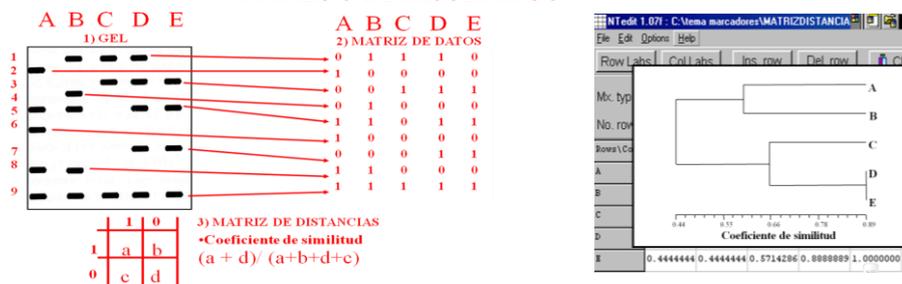
¿Cómo afectaría una variación entre individuos que consistiera en una inserción o delección en la región comprendida entre dos sitios de unión del cebador? ¿Podrías dibujar el patrón de bandas que generaría?

5. Resumen de la metodología RAPD

A lo largo de este objeto de aprendizaje hemos visto los pasos para utilizar los marcadores RAPD para la identificación de variación de distintas especies



ANÁLISIS DE RESULTADOS



Ventajas: sistema sencillo, rápido y económico, con bajos requerimientos de infraestructura, formación de personal e información previa de secuencia.

Inconvenientes: interpretación dominante, falta de reproducibilidad si no se ajustan bien las condiciones, limitaciones en la estima de la similitud o disimilitud genética.

Para comprobar qué realmente has aprendido lo explicado, selecciona una especie, un objetivo de estudio y utiliza los marcadores RAPD para la consecución del mismo



6. Bibliografía

- ¹ Mullis, K. (1990). The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American* April 56-65.
- ² Williams, J.C; Kubelik, A.R; Livak, K.J; Rafalski', J.A; Tingey1, S.V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers *Nucleic Acids Research*, 18, 22¹
- ³ Buso, G.S.C.; Rangel, P.H; Ferreira, M.E. (1998). Analysis of genetic variability of South American wild rice populations (*Oryza glumaepatula*) with isozymes and RAPD markers. *Molecular Ecology* 7:107-117
- ⁴ Moretzsohn, M.C.; Nunes, C.D.M.; Ferreira, M.E.;Grattapaglia, D. (2000). RAPD linkage mapping of the shell thickness locus in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) *Theor. Appl. Genet.* 100:57-62
- ⁵ Koh, M.C; Lim, C.H; Chua, S.B.; Chew, S.T.; Phang, S.T.W. (1998). Random amplified polymorphic DNA (RAPD) fingerprints for identification of red meat animal species,48:275-285
- ⁶ Motazedian, H; Noyes, H.; Maingon, R; (1996).aa The Use of Random Amplified Polymorphic DNA for the Identification of Parasites from Vertebrates and Invertebrates *Experimental Parasitology* 83, :150-154
- ⁷ Deb, P; Klempan, T.A; O'Reilly, R; Singh, S.M. (1999). Search for retroviralrelatedDNA polymorphisms using RAPD PCR in schizophrenia. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1453,;216-220.
- ⁸ Lee, J.C; Chang J.G. (1994). Random amplified polymorphic DNA polymerase reaction (RAPD-PCR) fingerprint in forensic species identification. *Forensic Science international* 67-2:103-107.
- ⁹ Ready-To-Go RAPD Analysis Beads. (2006). Product Booklet. <http://www.gehealthcare.com/lifesciences> GE Healthcare UK Limited.
- ¹⁰ Ferriol, M.; Pico, B.; Nuez, F. (2003). Genetic diversity of some accessions of *Cucurbita maxima* from Spain using RAPD and SBAP markers. *Genetic resources and crop evolution*, 50,3: 227-238