

甜菜 DAMD-PCR 体系的建立及优化

兴旺^{1,2,3}, 童乐怡¹, 孙燕红¹, 马龙彪^{1,2,3}, 吴则东^{1,2,3}

¹黑龙江省普通高校甜菜遗传育种重点实验室/黑龙江大学, 哈尔滨 150080;

²中国农业科学院甜菜研究所/黑龙江大学农作物研究院, 哈尔滨 150080;

³中国农业科学院北方糖料作物资源与利用重点开放实验室, 哈尔滨 150080)

摘要:为了建立甜菜 DAMD 扩增体系,以期利用 DAMD 引物应用于甜菜品种指纹图谱的构建及分子标记辅助育种。本实验利用单因素变量的方法对甜菜 DAMD 体系进行优化。同时选用 12 个甜菜品种,利用优化的体系对 25 条 DAMD 引物进行扩增。获得甜菜的最适 DAMD 体系:总体积为 20 μL , 包含模板 DNA 10~80 ng、0.75 U 的 DNA 聚合酶、0.2 μL 的 dNTPs (2.5 mmol/L each) 以及 2.0 μL 的引物 (10 $\mu\text{mol/L}$)。同时 25 条引物均扩增出了清晰条带,除了个别引物多态性较差外,其余引物多态性都非常丰富,其中引物 62H(-) 就可以把实验中用到的 12 个甜菜品种全部区分开。由此可见, DAMD 引物的扩增效率很高,并且扩增结果稳定,条带清晰,非常适合甜菜品种指纹图谱的构建及遗传多样性分析。

关键词:甜菜; DAMD; 体系优化; 指纹图谱; DNA

中图分类号: S566.3

文献标志码: A

论文编号: casb17040113

Construction and Optimization of DAMD-PCR in Beet

Xing Wang^{1,2,3}, Tong Leyi¹, Sun Yanhong¹, Ma Longbiao^{1,2,3}, Wu Zedong^{1,2,3}

¹Key Laboratory of Sugar Beet Genetic Breeding/Heilongjiang University, Harbin 150080; ²Sugar Beet Research Institute of Chinese Academy of Agricultural Sciences/Crop Academy of Heilongjiang University, Harbin 150080;

³Key Laboratory of North Sugar Crop Resource and Utilization, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150080)

Abstract: To establish a beet DAMD amplification system and apply DAMD primer in construction of beet varieties fingerprint and molecular marker assisted breeding, this experiment optimized the beet DAMD system by using the single factor variable method. 12 beet varieties were chosen; the optimized system was used to amplify 25 DAMD primers. The optimum DAMD system of beet was as following: a total volume of 20 μL , template DNA 10–80 ng, 0.75 U of DNA polymerase, 0.2 μL of dNTPs (2.5 mmol/L each) and 2.0 μL of primers (10 $\mu\text{mol/L}$). At the same time, 25 primers were all amplified out of the clear bands, and except individual primers whose polymorphism was poorer, the other primers had very abundant polymorphism. The primers 62 H(-) could distinguish all 12 beet varieties. Thus, DAMD primers had high amplification efficiency, the amplification result was stable and the bands were clear, so DAMD primers were very suitable for the construction of fingerprint and the genetic diversity analysis of beet.

Key words: beet; direct amplification of mini satellite DNA by PCR; system optimization; fingerprinting; DNA

基金项目:国家糖料现代农业产业技术体系甜菜高品质品种改良岗位专项基金“国家现代农业产业技术体系建设项目东北区育种岗位专家”(CARS-210104);农业部物种资源保护费项目“(甜菜种质资源收集鉴定编目繁种保存与利用)”(1120162130135252026);科技部、财政部国家科技基础条件平台项目“国家甜菜种质资源平台”(NICGR2016-017)。

第一作者简介:兴旺,女,1986年出生,黑龙江哈尔滨人,助理研究员,博士,研究方向:种质资源和作物遗传育种。通信地址:150080 黑龙江省哈尔滨市南岗区黑龙江大学农学楼 320, Tel: 0451-57314892, E-mail: xwhlju@163.com。

通讯作者:吴则东,男,1972年出生,黑龙江依兰人,副研究员,博士,主要从事甜菜遗传及分子育种的研究。通信地址:150080 黑龙江省哈尔滨市南岗区黑龙江大学农学楼 318, Tel: 0451-86604561, E-mail: 331056376@qq.com。

收稿日期:2017-04-18, **修回日期:**2017-06-16。

0 引言

甜菜是世界上重要的糖料作物之一,甜菜糖的产量大约占到世界食糖总量的25%,中国的甜菜糖厂都分布在北方,据统计,2016年中国生产加工的糖厂共23家,分别分布在新疆、内蒙古、黑龙江和甘肃4个省份,2016年中国甜菜播种面积16.87万hm²。随着国家供给侧结构改革的推进,玉米种植面积的减少,甜菜的种植面积会逐渐增加。目前甜菜生产上面临的一个问题就是品种鉴别,由于甜菜的遗传基础比较狭窄,采用传统的形态学方法很难鉴别,而且耗费时间也长。而分子标记技术在鉴定品种纯度以及指纹图谱的构建上则发挥着越来越重要的作用,目前已经有多种分子标记技术应用到了作物的指纹图谱构建及遗传多样性分析上,如RAPD^[2]、AFLP^[3]、SRAP^[4]、SSR^[5]、SNP^[6]以及DAMD^[7]等。DAMD(Direct Amplification of Minisatellite DNA by PCR)是利用PCR直接扩增串联

重复序列可变区,1993年由Health等^[8]提出,目前已经广泛应用于多种动植物,如黄瓜^[9]、甜瓜^[10]、小麦^[11]以及鼠尾草^[12]等等的指纹图谱构建,但目前DAMD引物尚未有在甜菜上进行应用的报道。

本研究以12份甜菜品种为材料,以小卫星DNA核心序列为引物,利用单一变量因素建立甜菜的DAMD反应体系,并利用确定的反应体系对适合甜菜品种扩增的DAMD引物进行筛选,以开发出适合甜菜品种指纹图谱构建的DAMD引物,为将来利用DAMD分子标记建立甜菜品种的指纹图谱打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料

实验中用到的甜菜品种分别来自于德国的KWS公司、德国的斯特儒博公司、美国的BETASEED公司、丹麦的麦瑞博公司以及瑞士的先正达种子公司,所有品种的名称及编号见表1。

表1 甜菜品种名称及其编号

品种编号	品种名称	品种来源	品种编号	品种名称	品种来源
1	KWS0149	KWS公司	7	KWS9149	KWS公司
2	KWS2463	KWS公司	8	KWS5145	KWS公司
3	ST13092	斯特儒博公司	9	KWS4121	KWS公司
4	SD13829	斯特儒博公司	10	MA3018	麦瑞博公司
5	HI0544	先正达公司	11	HI0871	先正达公司
6	Beta356	BetaSeed公司	12	MA097	麦瑞博公司

1.2 实验方法

1.2.1 甜菜基因组DNA的提取 实验中用到的甜菜品种播种于黑龙江大学甜菜改良中心的温室中,苗期每个品种取5株混合,利用CTAB法提取甜菜基因组DNA^[13],最后用核酸蛋白测定仪检测提取的DNA浓度和纯度,并稀释到10 ng/μL的工作液备用。

1.2.2 DAMD引物来源及反应体系的优化 引物来源:实验中用到的引物均来自于文献^[14-18]。

反应体系的优化:参考其他反应体系^[9],建立甜菜

DAMD的原初反应体系,20 μL反应体系中包含10×PCR buffer 2 μL, 0.4 μL dNTPs (2.5 mmol/L each), 10 μmol/L的引物2 μL, 2.5 U/μL的Taqase 0.4 μL, 10 ng/μL的模板DNA 2.5 μL。在此基础上设置单因素变量实验,最终用灭菌的去离子水将反应体系补充到20 μL,处理结果见表2。

1.2.3 甜菜DAMD扩增程序与电泳 DAMD扩增程序采用94℃变性4 min;然后35个循环,94℃变性40 s, 55℃退火40 s, 72℃延伸40 s;最后72℃延伸5 min。

表2 单因素变量处理

药品名称	原初体系	单因素变量							
		1	2	3	4	5	6	7	8
dNTPs (2.5 mmol/L each)	0.4	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8
Primer (10 μmol/L)	2	0.5	1	1.5	2	2.5	3	3.5	4
Taqase (2.5 U/μL)	0.4	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8
DNA模板	2.5	0.5	1	1.5	2	2.5	3	3.5	4

PCR 结束后, 扩增产物加入 1×Loading buffer, 利用平板离心机离心 3 min, 用 6% 的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳对扩增产物进行分离, 快速银染法染色^[20], 用数码相机进行拍照。

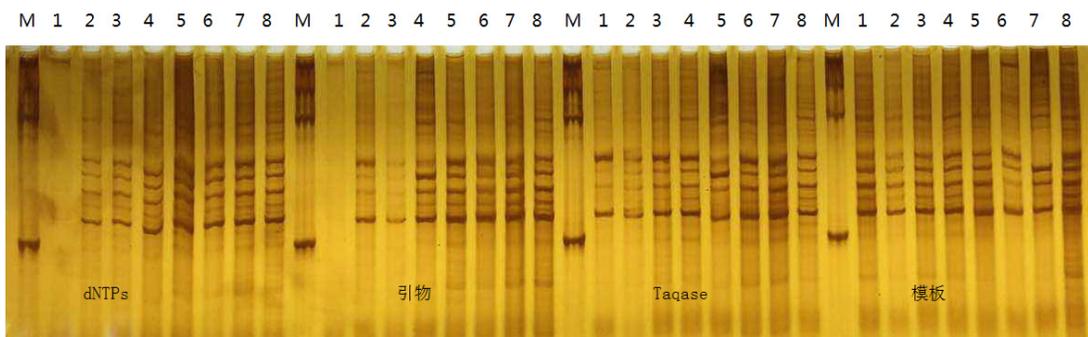
2 结果与分析

2.1 不同成份浓度对甜菜 DAMD 扩增反应的影响

2.1.1 dNTPs 浓度对甜菜 DAMD 扩增反应的影响 利

用 1 号品种和引物 URP2R 进行甜菜 DAMD 体系的优化, 实验重复 2 次, 实验结果见图 1。

从图 1 可以看出, 在 20 μL 反应体系中, 加入 0.2~0.8 μL 的 dNTPs 均能扩增出清晰的条带, 并且条带之间没有差别, 而加入 0.1 μL 的 dNTPs 则没有扩增条带, 因此从节约的角度考虑, 选择 20 μL 体系中加入 0.2 μL dNTPs 作为甜菜 DAMD 反应体系的最佳浓度。



M 为标准分子量, 1~8 为同一变量不同浓度, 浓度与表 2 对应

图 1 4 种单因素变量对甜菜 DAMD 扩增产物的影响

2.1.2 引物浓度对甜菜 DAMD 扩增反应的影响 从图 1 第 2 部分可以看出, 当 20 μL 体系中加入 0.5 μL 引物时, 几乎没有扩增条带的产生, 加入 1.0 μL 和 1.5 μL 时, 虽然有扩增条带, 但条带不是很清晰, 只有达到 2.0 μL 引物时, 才产生清晰的扩增条带, 且随着引物浓度的增加, 扩增条带没有任何差异, 故选择 20 μL 体系中加入 2.0 μL 引物作为甜菜 DAMD 扩增反应的最佳浓度。

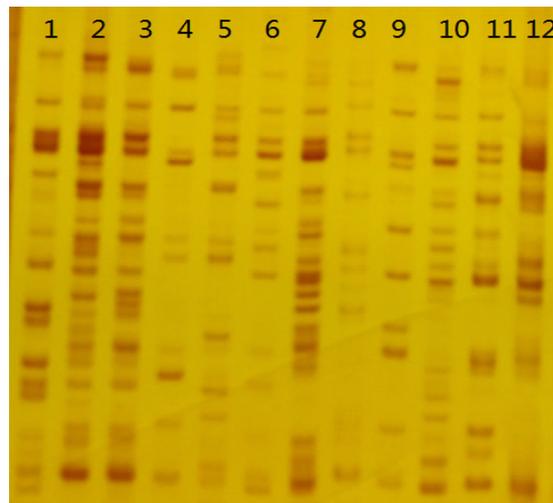
2.1.3 Taqase 浓度对甜菜 DAMD 扩增反应的影响 从图 1 第 3 部分可以看出, 在 20 μL 体系中加入 Taqase 从 0.25 U 到 2 U 都能够扩增出条带, 但 0.25 U 和 0.5 U 扩增的个别条带比较模糊, 因此在考虑节约和不影响扩增效果的情况下, 20 μL 扩增体系中选择 0.75 U 作为甜菜 DAMD 扩增反应的最佳浓度。

2.1.4 DNA 模板浓度对甜菜 DAMD 扩增反应的影响 从图 1 第四部分可以看出, 20 μL 反应体系中加入 DNA 模板从 10 ng 到 80 ng 均扩增出清晰的条带, 因此可以认为模板浓度在 10~80 ng 之间对扩增结果没有影响。

2.2 甜菜 DAMD-PCR 体系的验证

利用 12 个甜菜品种对 25 条 DAMD 引物进行扩增, 结果表明 25 条引物均扩增出了清晰条带, 出了个别引物多态性较差外, 其余引物多态性都非常的丰富, 非常适合甜菜品种指纹图谱的构建, 单个引物扩增多态性条带最多的是 62H(-), 共扩增多态性条带 25 条,

图 2 为引物 62H(-) 对 12 个甜菜品种的扩增结果, 从图中可以看出, 引物 62H(-) 多态性非常的丰富, 只需要一条引物就可以完全将 12 个甜菜品种区分开。



其中 1~12 对应的品种编号与表 1 相同

图 2 引物 62H(-) 对 12 个甜菜品种的扩增结果

3 讨论与结论

利用单因素变量优化甜菜 DAMD 体系, 最终确定了甜菜最适 DAMD 扩增体系为 20 μL 反应体系中包含模板 DNA 10~80 ng、0.75 U 的 DNA 聚合酶、2.5 mmol/L each 的 dNTPs 0.2 μL 以及 2.0 μL 的引物 (10 μmol/L)。胡建斌等^[9]构建了黄瓜 20 μL 的 DAMD

反应体系其中包括 0.25 mmol/L dNTPs、1.2 U *Taq* 酶、2.0 μ mol/L 引物和 10~80 ng 模板 DNA, 与其相比在 *Taq* 酶的使用上有所节省, 但由于每个作物有着自己独特的性质, 所以在体系建立上也有所差别, 本研究首次建立了甜菜 DAMD 体系, 增添了甜菜引物研究类别。同时利用 12 个甜菜品种及优化的体系对 25 条 DAMD 引物进行扩增, 25 条引物均扩增出了清晰的条带, 其中有 2 个引物多态性较差外, 其余引物多态性都非常丰富, 其中引物 62H(-) 就可以把 12 个甜菜品种全部区分开, 说明 DAMD 引物的扩增效率很高, 非常适合甜菜品种指纹图谱的构建。另外由于 DAMD 引物 G 和 C 的含量比较高, 而且碱基数一般都在 15 个以上, 使用的退火温度较高, 所以扩增的重复性要高于 RAPD, 具有很好的稳定性。

甜菜 DAMD 体系的建立为 DAMD 在甜菜上进行应用提供了可能, 同时进行 DAMD 引物的筛选, 拓宽了甜菜引物应用面, 为甜菜品种的指纹图谱构建、遗传多样性分析以及其他分子标记辅助育种提供了新的思路, 将来随着 DAMD 引物开发的增多, DAMD 分子标记技术会在甜菜分子标记辅助育种上发挥越来越大的作用, DAMD 引物除用于甜菜指纹图谱构建外, 今后还可尝试进行关联分析等研究。

本研究借鉴 DAMD 在其他作物上的应用, 最终确定了 DAMD 在甜菜应用中的最适体系, 体系总体积为 20 μ L, 包含模板 DNA 10~80 ng、0.75 U 的 DNA 聚合酶、0.2 μ L 的 dNTPs (2.5 mmol/L each) 以及 2.0 μ L 的引物 (10 μ mol/L), 同时从 25 对 DAMD 引物中筛选出 23 对多态性好的引物, 其中引物 62H(-) 可以把 12 个甜菜品种全部区分开, 23 对引物均可用作甜菜指纹图谱构建。

参考文献

- [1] 吴则东, 王茂芊, 吴玉梅, 等. 32 个甜菜品种指纹图谱构建与遗传多样性分析[J]. 中国农学通报, 2015, 31(12): 169-174.
- [2] 刘叔倩, 马小军, 郑俊华. 银杏不同变异类型的 RAPD 指纹研究[J]. 中国中药杂志, 2001, 26(12): 822-825.
- [3] 乔勇, 赵锦, 杨海旭, 等. 21 个枣品种(系)的 AFLP 指纹分析[J]. 植物遗传资源学报, 2009, 10(2): 205-210.
- [4] 高建明, 罗峰, 裴忠有, 等. 甜高粱重要种质材料的 SRAP 指纹分析[J]. 华北农学报, 2010, 25(2): 93-98.
- [5] 段艳凤, 刘杰, 卞春松, 等. 中国 88 个马铃薯审定品种 SSR 指纹图谱构建与遗传多样性分析[J]. 作物学报, 2009, 35(8): 1451-1457.
- [6] 王大莉. 香菇栽培品种 SNP 指纹图谱库的构建[D]. 武汉: 华中农业大学, 2012.
- [7] 王掌军, 王建设, 刘玲, 等. 直接扩增甜瓜小卫星 DNA 指纹图谱[J]. 华北农学报, 2006, 21(3): 77-80.
- [8] Heath D D, Lwama G K, Devlin R H. PCR primed with VNTR core sequences yields species specific patterns and hypervariable probes[J]. Nucleic Acids Research, 1993, 21(24): 5782.
- [9] 胡建斌, 张帆, 李贞煌, 等. 黄瓜 DAMD 反应体系的建立及种质遗传资源研究[J]. 西北植物学报, 2010(04): 652-658.
- [10] 王掌军, 王建设, 刘生祥, 等. 甜瓜 DAMD 反应体系优化及指纹图谱分析[J]. 农业科学研究, 2006(02): 9-14.
- [11] Somers D J, Zhou Z, Bebeli P J, et al. Repetitive, genome-specific probes in wheat (*Triticum aestivum* L. em Thell) amplified with minisatellite core sequences[J]. Theoretical and Applied Genetics, 1996, 93(5): 982-989.
- [12] Ince A G, Karaca M. Species-specific touch-down DAMD-PCR markers for *Salvia* species[J]. Journal of Medicinal Plant Research, 2012, 6(9): 1591-1595.
- [13] 胡根海, 喻树迅. 利用改良的 CTAB 法提取棉花叶片总 RNA[J]. 棉花学报, 2007, 19(1): 69-70.
- [14] Zhou Z, Bebeli P J, Somers D J, et al. Direct amplification of minisatellite-region DNA with VNTR core sequences in the genus *Oryza*[J]. Theoretical and Applied Genetics, 1997, 95(5): 942-949.
- [15] Kang H W, Park D S, Go S J, et al. Fingerprinting of diverse genomes using PCR with universal rice primers generated from repetitive sequence of Korean weedy rice[J]. Molecules & Cells, 2002, 13(2): 281.
- [16] Winberg B C, Zhou Z, Dallas J F, et al. Characterization of minisatellite sequences from *Oryza sativa*[J]. Genome, 1993, 36(36): 978-983.
- [17] Murray M J, Haldeman B A, Grant F J, et al. Probing the human genome with minisatellite-like sequences from the human coagulation factor VII gene[J]. Nucleic Acids Research, 1988, 16(9): 4166.
- [18] Jeffreys A J, Wilson V, Thein S L. Individual-specific 'fingerprints' of human DNA[J]. Nature, 1985, 316(6023): 76.
- [19] 罗霆, 杨海霞, 岑华飞, 等. SCoT 分子标记在割手密遗传图谱构建中的应用[J]. 植物遗传资源学报, 2013, 14(4): 704-710.
- [20] 王凤格, 赵久然, 郭景伦, 等. 一种改进的玉米 SSR 标记的 PAGE/快速银染检测新方法[J]. 农业生物技术学报, 2004, 12(5): 606-607.