

直接扩增甜瓜小卫星 DNA 指纹图谱

王掌军^{1,2}, 王建设¹, 刘 玲¹, 刘生祥², 陈素生², 许 勇¹, 王永健¹

(1. 国家蔬菜工程技术研究中心, 北京 100089; 2. 宁夏大学 农学院 宁夏 银川 750021)

摘要:以小卫星 DNA YNZ22 核心序列为引物, 甜瓜 DNA 为模板, 在甜瓜上研究了直接扩增小卫星 DNA(DAMD)的优化反应体系, 结果表明: 在 20 μ L 的反应体系中, 5 种主要成分 Taq DNA 聚合酶、 Mg^{2+} 、引物、模板 DNA 和 dNTPs 的最适浓度分别为 1U, 2.5 mmol/L, 0.5 mmol/L, 30 ng, 5 mmol/L。在优化的 DAMD-PCR 反应体系下, 利用该引物在 28 个甜瓜品种上构建了直接扩增小卫星 DNA(DAMD)的指纹图谱, 分析结果表明, 该引物在 28 个甜瓜品种上共扩增出 13 位点, 其中 9 位点具有多态性, 多态性条带比率为 69%, 可一次性从 28 个甜瓜品种中鉴别出其中的 21 个, 鉴别率高达 75%。

关键词: 甜瓜; 小卫星 DNA; 指纹图谱

中图分类号: S652 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2006)03-0077-04

Direct Amplification Minisatellite DNA Fingerprinting on Melon (*Cucumis melo* L)

WANG Zhang-jun^{1, 2}, WANG Jian-she¹, LIU Ling¹, LIU Sheng-xiang², CHEN Su-sheng²,
XU Yong¹, WANG Yong-jian¹

(1. National Engineering Research Center for Vegetables, Beijing 100089, China;

2. Agricultural College of Ningxia University, Yinchuan 750021, China)

Abstract: The optimal reaction of DAMD (Direct Amplification of Minisatellite DNA by PCR) in melon was studied with a minisatellite primer YNZ22 and melon template DNA. The results showed that the optimum concentration of five important components i. e. Taq DNA polymerase, Mg^{2+} , primer, template DNA and dNTPs in 20 μ L reaction system were 1U, 2.5 mmol/L, 0.5 mmol/L, 30 ng, 5 mmol/L respectively. The minisatellite DNA fingerprinting of 28 melon cultivars were established by using optimum system with primer YNZ22. The primer could produce 13 bands, and 9 bands were polymorphic bands, the percentage of polymorphic bands (PPB) was 69%. The primer could identify 21 of 28 cultivars at once, its identification rate was 75%.

Key words: *Cucumis melo*; Minisatellite DNA; Fingerprinting map

甜瓜是深受人们青睐的重要果品之一。由于鉴定的形态标记和同工酶标记的数量十分有限, 制约了甜瓜经典遗传与育种科学研究的发展^[1]。20 世纪 80 年代, 特别是 90 年代以来, 利用 RAPD, RFLP, AFLP 和 SSR 等分子标记, 使甜瓜种质资源遗传多态性分析、重要园艺性状基因的分子标记、基因组分子图谱的构建等研究取得了长足的发展^[2~7]。随着研究工作的深入, 仍然需要开发高效揭示甜瓜品种遗传差异的新型分子标记。

小卫星 (Minisatellite) DNA 是高效揭示生物遗传差

异的重要分子标记之一, 由一些重复单位在 10~70 bp、长度从几百个到几千个碱基组成的串联重复序列^[8~10]。人类、动物和植物基因组富含小卫星区域^[11], 小卫星位点按照孟德尔规律稳定地遗传和分离^[12], 已应用于人类、动物和植物的种质资源多态性分析、品种诊断、基因标记和遗传图谱构建^[13, 14]。然而, 从基因组文库中分离小卫星 DNA 是一件非常艰苦的工作。为此, Heath 等以已发表的小卫星 DNA 核心序列为引物, 通过 PCR 直接扩增串联重复序列可变区, 建立了 DAMD 标记技术, 以研究其他物种的 DNA 指纹

收稿日期: 2005-07-23

基金项目: 国家 863 高科技发展计划项目 (2002AA244021); 北京市重大科技合同项目 (H022020130130)

作者简介: 王掌军 (1978-), 男, 甘肃天水人, 硕士, 主要从事分子遗传育种研究工作; 王建设为通讯作者。

图谱^[15]。在植物上先后在小麦和水稻中构建了直接扩增小卫星 DNA 的指纹图谱^[11, 16-17]。在果菜植物上迄今未见报道。

本研究以 28 个甜瓜品种为材料,以小卫星 DNA YNZ22 核心序列为引物,在建立优化的 DAMD-PCR 反应体系的基础上,构建了直接扩增甜瓜小卫星 DNA 的指纹图谱,旨在开发和利用高效揭示甜瓜品种遗传差异的新型分子标记。

表 1 供试材料名称、形态分类及来源

Tab. 1 Origination and classification of cultivars of melon

编号 No.	品种名称 Name of variety	形态分类 Shape sort	来源 Source	编号 No.	品种名称 Name of variety	形态分类 Shape sort	来源 Source
1	4A901	无网纹	北京	15	3A832	网纹	新疆
2	PI414723	野生甜瓜	印度	16	3A829	网纹	新疆
3	4A914	无网纹	俄罗斯	17	雪蜜红	无网纹	新疆
4	黄河蜜	无网纹	甘肃	18	4A1573	网纹	新疆
5	4A932	无网纹	韩国	19	4A1569	网纹	新疆
6	黄金蜜	无网纹	山东	20	红玉	无网纹	新疆
7	4A1355	无网纹	甘肃	21	皇后	网纹	新疆
8	金蛋子	无网纹	甘肃	22	4A1588	网纹	以色列
9	白兰瓜	无网纹	韩国	23	3A823	网纹	新疆
10	3A271	无网纹	内蒙	24	3A825	网纹	新疆
11	4A1282	无网纹	内蒙	25	黄花蜜	无网纹	新疆
12	4A1345	无网纹	台湾	26	小金丽	无网纹	新疆
13	4A1344	无网纹	内蒙	27	马炮	野生甜瓜	河北
14	3A827	网纹	新疆	28	2A737	无网纹	荷兰

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取 每份材料随机取 10 粒种子,在温室催芽播种,苗期每株取等量叶片混合,采用 CTAB 方法提取基因组 DNA^[18-19]。

1.2.2 甜瓜 DAMD-PCR 反应体系的优化 以甜瓜 DNA 为模板,小卫星 DNA YNZ22 核心序列为引物 (CTCTGGGTGTGCTGC)^[20],优化 DAMD-PCR 反应体系,即以前人确定的反应体系为基础,在保持其他因素一致的前提下,变化单一因子,每选出一个参数,以其优化用量代替基础用量,从而筛选最优参数。基础反应体系为 20 μ L,扩增缓冲液 1 \times ,模板 DNA 为 20 ng,引物浓度为 0.25 mmol/L, dNTP 浓度为 2.5 mmol/L, MgCl₂ 浓度为 2.0 mmol/L, TaqDNA 聚合酶为 1 U,最后用蒸馏水补充到 20 μ L。

1.2.3 甜瓜 DAMD 指纹图谱的构建 利用优化的 DAMD 体系,以小卫星 DNA 核心序列 YNZ22 为引物,28 份甜瓜品种 DNA 为模板,进行 PCR 扩增,构建 28 份甜瓜品种的 DAMD 指纹图谱。

1.2.4 甜瓜 DAMD-PCR 扩增条件与电泳 DAMD 扩增条件为:94 $^{\circ}$ C 2 min; 94 $^{\circ}$ C 45 s, 56 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1.5 min, 35 个循环;72 $^{\circ}$ C 7 min;最后保存在 4 $^{\circ}$ C。扩增产物在 1 \times TBE、电压 4~5 V/cm、2.0%琼脂糖凝

1 材料和方法

1.1 材料

试验在国家蔬菜工程技术研究中心进行。供试的 28 份品种由该中心生物技术室单倍体育种组提供(表 1),其中网纹甜瓜 9 份,无网纹甜瓜 17 份和野生甜瓜 2 份。

胶(含 50 μ g/mL 溴化乙锭)中电泳 100 min,在 KD-SID120 成像系统中进行图片扫描和图片处理。

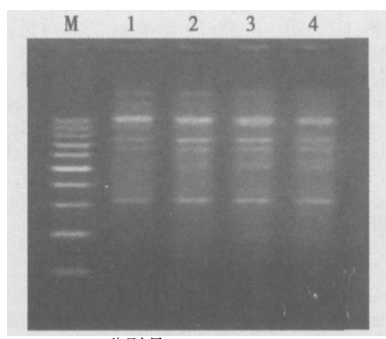
2 结果与分析

2.1 直接扩增甜瓜小卫星 DNA 反应体系的优化

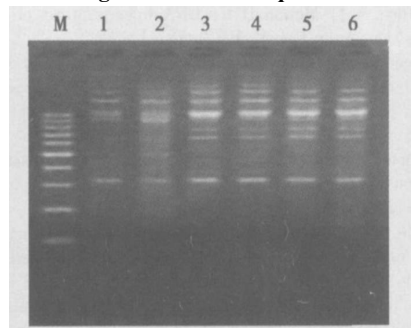
2.1.1 Mg²⁺ 与 Taq DNA 聚合酶对直接扩增甜瓜小卫星 DNA 的影响 Mg²⁺ 对 Taq DNA 聚合酶非常敏感,在同一镁离子浓度下, TaqDNA 聚合酶用量对小卫星反应影响基本一致。Taq DNA 聚合酶浓度梯度设定为 0.5, 1, 1.5 和 2 U,从图 1 可以看出,20 μ L 反应体系中 Taq DNA 聚合酶用量为 0.5 U 时主带不清晰,并且出现的带少;1 U 和 1.5 U 时扩增产物量适中,条带清晰;2 U 时,虽然扩增产物量较足,但是出现了弥散现象。Taq 聚合酶是扩增小卫星反应中非常关键的因素,考虑到试验效果和用量,最终确定 Taq DNA 聚合酶的用量为 1U。Taq 聚合酶的用量确定后, Mg²⁺ 设定为 1.5, 2.0, 2.25, 2.5, 2.75, 3.0 mmol/L 6 个浓度梯度,其结果见图 2,从图 2 可以看出:随着 Mg²⁺ 浓度的提高主带亮度增强,扩增条带数减少,比较弱的带消失,在 Mg²⁺ 浓度为 2.5 mmol/L 时,带型较为稳定且亮度适宜。

2.1.2 引物和模板 DNA 对直接扩增甜瓜小卫星

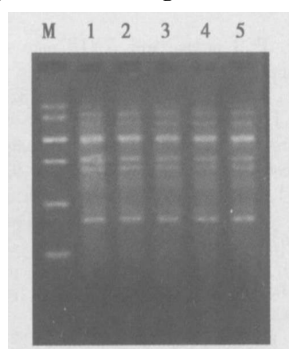
DNA 的影响 从图 3 可以看出,在 20 μ L 反应体系中,在同一引物浓度下,模板 DNA 设定为 5, 10, 20, 30, 40 ng 5 个剂量,用量在 5 ~40 ng 之间对小卫星扩增产物影响不大,但是 30 和 40 ng 时,主带较用量小时亮度增强,最后确定 30 ng 模板是小卫星反应较为适宜的用量。引物对小卫星扩增反应的影响图 4 所示:引物浓度在 0.125 和 0.25 mmol/L 时,条带数少且亮度很淡;0.5 mmol/L 时扩增产物清晰,效果最优;在 0.675, 0.8 mmol/L 时,比较暗淡的带出现了弥散现象。



1~4 分别是 0.5, 1.0, 1.5, 2 U;
M. 200~2000 bp Ladder
图 1 Taq DNA 聚合酶的影响
Fig. 1 Effect of Taq DNA



1~6 分别为 1.5, 2.0, 2.25, 2.5, 2.75, 3.0 mmol/L;
M. 200~2000 bp Ladder
图 2 Mg^{2+} 浓度的影响
Fig. 2 Effect of Mg^{2+} concentration

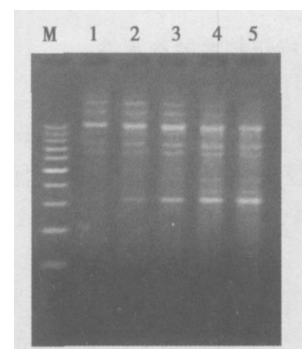


1, 2, 3, 4, 5 表示的浓度依次是 5, 10, 20, 30, 40 ng
M. 200~2000 bp Ladder
图 3 DNA 浓度的影响
Fig. 3 Effect of DNA concentration

2.1.3 dNTPs 对直接扩增甜瓜小卫星 DNA 的影响

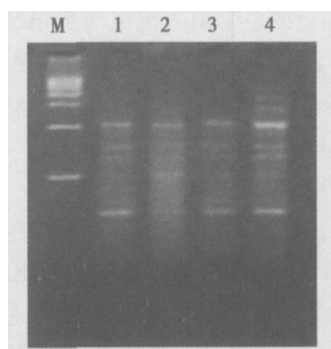
从图 5 看出,在设定的 dNTPs 浓度范围内,主带随着 dNTPs 浓度的增加而增强,并且在不同浓度下,出现条带的大小也不一,在 1.25, 2.50, 3.75 mmol/L 时,扩增的条带数目少、条带普遍暗淡;在 5 mmol/L 浓度下,条带数增多,亮度加强,最终确定 dNTPs 浓度为 0.5 mmol/L。

据此建立了甜瓜优化 DAMD-PCR 反应体系:20 μ L 反应体系中,1 \times Reaction Buffer, 模板 DNA 30 ng, 引物浓度 0.5 mmol/L, Taq DNA 聚合酶 1U, Mg^{2+} 2.5 mmol/L, dNTP 5 mmol/L。



1~5 分别代表的浓度是 0.125, 0.25, 0.5, 0.675, 0.8 mmol/L;
M. 200~2000bp Ladder
图 4 引物浓度的影响
Fig. 4 Effect of primer concentration

Fig. 4 Effect of primer concentration

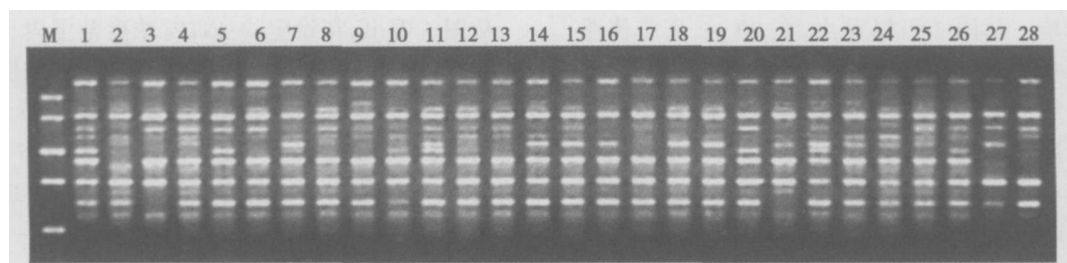


1, 2, 3, 4 所表示的量依次是 1.25, 2.5, 3.75, 5.0 mmol/L;
M. 200~2000bp Ladder
图 5 dNTP 浓度的影响
Fig. 5 Effect of dNTP concentration

Fig. 5 Effect of dNTP concentration

2.2 甜瓜 DAMD 指纹图谱的构建

在优化 DAMD 体系的基础上,以 28 份甜瓜品种 DNA 为模板,利用引物 YNZ22 直接扩增小卫星 DNA 指纹图谱,结果如图 6 所示。在 28 个甜瓜品种上均能扩增出清晰的条带,扩增片段大小在 400 ~2200 bp 之间,而且扩增结果稳定、重复性很好。在 28 个甜瓜品种上共检测出 13 个扩增位点,其中 9 个具有多态性,多态性比率为 69%。聚类分析结果表明,13 个位点能将 28 份甜瓜品种中的 21 份一次性区分开来,区分率高达 75%,充分体现了引物 YNZ22 直接扩增甜瓜小卫星 DNA 在甜瓜品种鉴定中的高效性。



M 分子量大小从下往上依次是 400, 700, 1000, 1500, 2000 bp

图 6 引物 YNZ22 对甜瓜种质资源的小卫星指纹图谱

Fig. 6 DAMD-PCR fingerprinting of melon germplasms based on the primer YNZ22

3 讨论

3.1 DAMD 标记技术的稳定性

DAMD 标记的稳定性在一定程度上受 PCR 反应的多种因素影响, 如 Mg^{2+} , dNTPs, Taq DNA 聚合酶, Primer 和模板 DNA 浓度的影响。优化 DAMD-PCR 反应体系, 对确保扩增小卫星 DNA 结果的稳定性十分必要。本试验利用建立的优化 DAMD 反应体系, 以小卫星 DNA YNZ22 核心序列为引物, 在 28 份甜瓜品种上直接扩增小卫星 DNA, 重复试验的结果表明, DAMD 标记分析结果的稳定性很好。另外, 与 RAPD 标记相比, DAMD 标记稳定性好的原因之一是 DAMD 引物的碱基数比 RAPD 引物多很多, 因此, DAMD 标记的引物退火温度一般情况下都高于其解链温度, 而 RAPD 标记的引物退火温度则相反。退火温度高, 非特异性扩增少, 因此, DAMD 标记分析结果的稳定性比 RAPD 标记好。

3.2 DAMD 标记技术的优越性

由于小卫星区域普遍存在于真核生物基因组中, 而且变异丰富, 因此, 在品种间 DAMD 标记检测遗传差异的效率较高。本试验不仅证明了小卫星 DNA YNZ22 核心序列引物在甜瓜上直接扩增小卫星 DNA 标记的稳定性, 而且检测品种间遗传差异的效率很高, 它在 28 个甜瓜品种上共扩增出 13 个位点, 其中 9 个位点具有多态性, 多态性条带比率达 69%, 品种区分率高达 75%, 体现了它在甜瓜品种诊断方面的高效性。在小麦中, Somers 等研究认为小卫星探针检测品种遗传差异的效率高于 AFLP^[19]。

参考文献:

- [1] Pitrat M. Gene list for *Cucumis melo* L [J]. Cucurbit Genet Coop Rep, 1994, 17: 135—148.
- [2] Neuhausen S L. Evaluation of restriction fragment length polymorphism in *Cucumis melo* [J]. Theor Appl Genet, 1992, 83: 379—384.

- [3] Katzir N. Length polymorphism and homologies of microsatellites in several Cucurbitaceae species [J]. Theor Appl Genet, 1996, 93: 1282—1290.
- [4] 刘万勃, 宋明. RAPD 和 ISSR 标记对甜瓜种质资源遗传多样性的研究 [J]. 农业生物技术学报, 2002, 10 (3): 231—236.
- [5] Patrick W. Identification of a randomly amplified polymorphic DNA marker linked to the Fom 2 Fusarium wilt resistance gene in muskmelon MR-1 [J]. Molecular Plant Pathology, 1995, 85(10): 1245—1249.
- [6] Patrick W. Development of sequence-specific primers that amplify a 1.5 kb DNA marker for race 1 Fusarium wilt resistance in *Cucumis melo* L. [J]. Hortsci, 1993, 8(2): 291—292.
- [7] Baudracco-Arnas M, Pitrat S. A genetic map of melon (*Cucumis melo* L.) with RFLP, RAPD, isozyme, disease resistance and morphological markers [J]. Theor Appl Genet, 1996, 93: 57—64.
- [8] Jeffreys A J, Wilson V, Thein S L. Hypervariable “minisatellite region” in human DNA [J]. Nature, 1985, 314: 67—73.
- [9] Jeffreys A J, Morton D B. DNA fingerprintings of dogs and cats [J]. Anim Genet, 1987, 18: 1—15.
- [10] Georges M, Gunawardana A, Threadgill D W, et al. Characterization of a set variable number of tandem repeat markers conserved in bovidae [J]. Genomics, 1991, 11: 24—32.
- [11] Zhou Z, Bebeli P J. Direct amplification of minisatellite-region DNA with VNTR core sequences in the genus *Oryza* [J]. Theor Appl Genet, 1997, 95: 942—949.
- [12] Broun P, Tanksley S D. Characterization of tomato DNA clones with sequence similarity to human minisatellites 33.6 and 33.15 [J]. Plant Mol Biol, 1993, 23: 231—242.
- [13] Julier C, Gouyon D D, Georges M, et al. Minisatellite linkage maps in the mouse by cross-hybridization with human probes containing tandem repeats [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1990, 87: 4585—4589.
- [14] Dvor Sharon, Avital Adato, Samir Mhameed, et al. DNA Fingerprints in Plants Using Simple-sequence Repeat and Minisatellite Probes [J]. Hort Science, 1995, 30 (1): 109—112.
- [15] Heath D. PCR primed with VNTR core sequences yields species specific patterns and hypervariable probes [J]. Nucleic Acid Research, 1993, 21(24): 5782—5785.
- [16] Somers D J, Zhou Z. Repetitive, genomic-specific probes in wheat (*Triticum aestivum* L. em Thell) amplified with minisatellite core sequences [J]. TAG, 1996, 93: 982—989.
- [17] Bebeli P J, Zhou Z. PCR primers with minisatellite core sequences yields DNA fingerprinting probes in wheat [J]. TAG, 1997, 95: 276—283.
- [18] Rowland L J, Nguyen B. Use of PEG for purification of DNA from leaf tissue of woody plant [J]. Bio Techniques, 1993, (14): 735—736.
- [19] 文传浩, 段昌群, 郭涛, 等. 一种简单、快捷植物 RAPD 分析 DNA 提取方法 [J]. 云南大学学报 (自然科学版), 2000, 22(5): 392—393.
- [20] Zavodna M, Kraic J. Differentiation between closely related lentil (*Lens culinaris* Medik.) cultivars using DNA markers [J]. Seed Sci and Technol, 2000, 28: 217—219.