

中华人民共和国林业行业标准

LY/T 2745—2016

仁用杏品种鉴定技术规程 SSR 分子标记法

Identification of kernel-using apricot cultivars—SSR marker method

2016-10-19 发布

2017-01-01 实施

国家林业局 发布



目 次

前言	I
1 范围	1
2 术语和定义	1
3 原理	1
4 仪器设备与主要试剂、耗材	2
5 溶液配置	2
6 核心引物	2
7 操作步骤	2
8 指纹比对	3
9 结果判定	4
附录 A (资料性附录) 仪器设备与主要试剂、耗材	5
附录 B (资料性附录) 溶液配置	6
附录 C (规范性附录) 核心引物	8
附录 D (资料性附录) 仁用杏品种 SSR 指纹图谱鉴定报告书	10
参考文献	11

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由中国林业科学研究院提出。

本标准由国家林业局归口。

本标准起草单位：中国林业科学研究院经济林研究开发中心、北京林业大学。

本标准主要起草人：傅大立、刘梦培、秦玥、朱高浦、赵罕。

仁用杏品种鉴定技术规程

SSR 分子标记法

1 范围

本标准规定了利用简单重复序列 (Simple sequence repeats, SSR) 分子标记法鉴定仁用杏 (*Armeniaca cathayana* D. L. Fu et al.) 品种的技术规程。

本标准适用于仁用杏品种的 SSR 分子指纹比对鉴定。

2 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

2.1

待检品种 test cultivar

待鉴定的仁用杏品种,由送检人提供。

2.2

对照品种 comparing cultivar

用于与待检品种进行指纹比对的若干品种(待检品种为新品种,则对照品种为近似品种;待检品种为假冒品种,则对照品种为真品种),由送检人或他人提供。

2.3

核心引物 core primer

扩增产物具有高度的稳定性和一致性(没有干扰谱带),并具有较强的鉴别能力,可以用于建立仁用杏指纹比对的人工合成引物。

2.4

指纹图谱 SSR fingerprint

采用 SSR 核心引物(或相当于核心引物)扩增出的待检品种和对照品种的 DNA 片段,通过聚丙烯酰胺电泳或毛细管电泳,得到不同大小的 DNA 片段图谱。

2.5

指纹比对 SSR fingerprinting

将待检品种与对照品种的 SSR 指纹图谱进行比对,分析待检品种与对照品种的 SSR 指纹是否具有差异,并确定其大小。

3 原理

简单重复序列分子标记(SSR),通常又称为“微卫星标记”,分布于仁用杏整个基因组的不同位置,不同品种每个位点上重复单位的数量可能不同,因而形成 SSR 标记的多态性。由于每个简单重复序列两端的序列是高度保守的单拷贝序列,因此可根据其两端的序列设计特异引物,利用 PCR 技术对两条引物间的 DNA 重复序列进行扩增,通过电泳分离得到大小不同的扩增产物片段,经荧光染料标记加以区分。因此,根据 SSR 位点的多态性,利用 PCR 扩增和电泳技术可以鉴定仁用杏品种。

4 仪器设备与主要试剂、耗材

仪器设备及试剂参见附录 A。

5 溶液配置

溶液配制方法参见附录 B。

6 核心引物

核心引物相关信息见附录 C。

7 操作步骤

7.1 样品准备

取待测品种和对照品种的新鲜、幼嫩、健康叶片各 1 片,分别做好标记,置于超低温冰箱保存。

7.2 DNA 提取

7.2.1 待测品种和对照品种的 DNA 提取,采取以下步骤:

- a) 把叶子样品放入研钵中,加入液氮迅速研磨至细微颗粒状,取 0.5 g 左右放入盛有 1 100 μL DNA 提取液的 2 mL 离心管中,加入 β -巯基乙醇 20 μL ,颠倒离心管混匀;65 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴 1 h,期间每隔 10 min 震荡混匀一次,剩余叶片样品用锡纸包裹放在液氮冰箱超低温保存;
- b) 加入氯仿、异戊醇混合液(24:1)800 μL ,静置 10 min~15 min 后,常温 12 000 r/min 离心 15 min,取上清液于新的 2 mL 离心管中,重复该步骤两次;
- c) 向上清液加入-20 $^{\circ}\text{C}$ 预冷的无水乙醇 1 000 μL ,轻轻颠倒离心管混匀,于-20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱静置 1 h 以上;
- d) 将离心管取出,于 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 转速下离心 12 min,弃上清液,70%乙醇洗涤沉淀物 2 次,无水乙醇洗涤 2 次,室温风干(10 min 左右);
- e) 加 100 μL 去离子水充分溶解 DNA 后,加 10 mg/mL 的 RNase 酶 1 μL ,37 $^{\circ}\text{C}$ 温浴 1 h;
- f) 将离心管取出,于 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 转速下离心 12 min,弃上清液,70%乙醇洗涤沉淀物 2 次,无水乙醇洗涤 2 次,室温风干(10 min 左右);
- g) 室温风干的 DNA,溶于 100 μL TE 缓冲液中;
- h) 提取的 DNA 通过 1.0%琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计测定质量和浓度后,用 TE 缓冲液稀释至 50 ng/ μL 存放于-20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱备用。

7.2.2 若采用试剂盒法提取 DNA,需按照试剂盒的说明进行提取,并按照 8.2.1 步骤 h)的方法存放。

7.3 PCR 扩增

7.3.1 PCR 反应体系

采用聚丙烯酰胺凝胶电泳检测时,PCR 反应体系为:总体积 20 μL ,其中 9 μL Premix TaqVersion 2.0,1 μL 正向引物(10 $\mu\text{mol/L}$),1 μL 反向引物(10 $\mu\text{mol/L}$),1.5 μL DNA 模板(20 mg/L),7.5 μL ddH₂O。

采用毛细管电泳检测时,PCR反应体系为:总体积 20 μL ,其中 0.2 μL Taq DNA 聚合酶 (20 U/ μL), 2 μL 的 10 \times PCR buffer, 0.4 μL dNTP(200 $\mu\text{mol/L}$), 0.3 μL 正向引物(20 $\mu\text{mol/L}$,其 5' 端饰有 FAM 或其他荧光标记), 0.3 μL 反向引物(20 $\mu\text{mol/L}$), 2 μL DNA 模板(50 ng/ μL), 14.8 μL ddH₂O。

7.3.2 PCR 反应程序

采用聚丙烯酰胺凝胶电泳检测时,PCR反应程序为:循环体系 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 4 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 40 s, 53 $^{\circ}\text{C}$ 退火 40 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 80 s,35 个循环;最终 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

采用毛细管电泳检测时,PCR反应程序为:循环体系 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,54 $^{\circ}\text{C}$ 退火 35 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 40 s,共 35 个循环;最终 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 3 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

7.4 PCR 扩增产物检测

7.4.1 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE)检测

7.4.1.1 玻璃板处理,将聚丙烯酰胺垂直电泳槽中的凝胶玻璃板用自来水和去离子水依次清洗干净晾干后,用无水乙醇擦拭干净,并用剥离硅烷擦拭均匀,干燥。

7.4.1.2 玻璃板组装,将塑料隔条整齐放在无凹槽玻璃板两侧,盖上凹槽玻璃板,夹子夹紧固定在凝胶板上。

7.4.1.3 灌胶,取 100mL 8%非变性聚丙烯酰胺凝胶溶液,灌入到玻璃胶室,待胶室灌满后,在凹槽处将鲨鱼齿朝外轻轻插入样品梳,在室温下聚合 1 h 以上。

7.4.1.4 上样与电泳,拔出样品梳,冲洗凹槽处残余的胶,将玻璃板与电泳槽组装,在正极槽(下槽)和负极槽(上槽)加入 1X TBE 缓冲液,每一个加样孔加入 5 μL ~6 μL 混合样品(扩增产物与含有 GelRed 染料的溴酚蓝上样缓冲液比例为 3:1)及 DNA Marker, 120 V 电泳 3 h,指示剂接近胶板底部时,结束电泳。

7.4.1.5 拍照,电泳结束后,自来水冲洗玻璃板双面,预冷,剥下凝胶,清水冲洗后,直接放入全自动紫外与可见分析装置拍照。

7.4.2 毛细管电泳(capillary electrophoresis)检测

将去离子甲酰胺溶液与 LIZ500 分子量内标按 100:1 的体积比混匀后,取 9 μL 加入上样板中,再加入 1 μL 稀释 10 倍的 PCR 扩增产物。然后使用 ABI3730XL 测序仪进行毛细管电泳,得到毛细管电泳原始数据。

8 指纹比对

8.1 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳比对

根据待测品种与对照品种的 SSR 显带位置,进行指纹比对,确定是否有差异,并根据标准 DNA 分子量大小的位置与分析样品的位置比较分析,确定待测品种和对照品种的片段大小。

8.2 毛细管电泳比对

利用 GeneMarker 中的 Fragment(Plant)片段分析软件对毛细管电泳原始数据进行分析,根据待测样品与对照样品的谱带位置进行指纹比对,确定是否具有差异;并根据各泳道内分子量内标的位置与各样品峰值的位置比较分析,确定待测品种和对照品种的片段大小。

8.3 数据记录

数据记录采用统一格式,即:引物名称,等位基因 1 大小,等位基因 2 大小。不同引物可用/间隔。

示例 1: 长城 1 号:BPPCT002,168,206/Pchgms4,158,176/…。

示例 2: 白玉扁:BPPCT002,164,174/Pchgms4,158,176/…。

9 结果判定

9.1 判定方法

将待测品种与对照品种的 SSR 指纹比对结果进行分析,若待测品种与对照品种有等位基因不同的位点,则依据该位点及其等位基因的不同,判定两者为不同品种;若待测品种与对照品种全部位点等位基因均相同,则判定两者为 SSR 指纹完全相同的品种。

9.2 结论

根据 10.1 的判定结果,出具鉴定报告书(参见附录 D)。



附 录 A
(资料性附录)
仪器设备与主要试剂、耗材

A.1 仪器设备

超净工作台、PCR 扩增仪、高压电泳仪(3 000 V 连续可调,0 mA~400 mA 连续可调,额定输出功率 100 W)、电泳槽(垂直、水平)、紫外凝胶成像分析系统、3730XL 测序仪、高速台式离心机(14 000 r/min)、紫外分光光度计、微量移液器 1 套(2.5 μ L~1 000 μ L)、恒温水浴锅(0 $^{\circ}$ C~100 $^{\circ}$ C)、天平(精度 0.01 g、0.000 1 g 各 1 台)、制冰机、磁力搅拌器、漩涡仪、高压灭菌锅、酸度计、冰箱(4 $^{\circ}$ C、-20 $^{\circ}$ C、-80 $^{\circ}$ C)、微波炉。

A.2 主要试剂

三羟甲基氨基甲烷盐酸(Tris-HCl)、乙二胺四乙酸二钠(EDTA $\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)、十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)、氯化钠(NaCl)、RNase 酶、 β -巯基乙醇、无水乙醇、盐酸(HCl)、氢氧化钠(NaOH)、三氯甲烷(chloroform)、异戊醇(isoamyl alcohol)、去离子水、双蒸水、液氮、Premix Taq 酶(Loading dye mix)、引物(primer)、琼脂糖、丙烯酰胺(acrylamide)、甲叉双丙烯酰胺(N, N'-methylene bisacrylamide)、四甲基乙二胺(TEMED)、过硫酸铵(ammonium persulfate)、剥离硅烷(repel-silane)、溴酚蓝(bromophenol blue)、Gelred 染色剂、DNA Marker。

A.3 主要耗材

离心管(1.5 mL、2 mL)、移液器配套枪头、96 孔 PCR 板、一次性手套、玻璃板、长尾夹、烧杯、三角瓶、量筒、玻璃棒、研钵。

附 录 B
(资料性附录)
溶 液 配 置

B.1 DNA 提取溶液的配制

B.1.1 1 mol/L 三羟甲基氨基甲烷盐酸(Tris-HCl)溶液(pH 8.0)

称取 30.28 g Tris 于 250 mL 烧杯中,加 150 mL 去离子水充分搅拌溶解,用 1 mol/L HCl 溶液调 pH 至 8.0,定容至 250 mL,混匀。棕色瓶分装,4 ℃ 冰箱保存。

B.1.2 0.5 mol/L 乙二胺四乙酸二钠盐(EDTANa₂ · 2H₂O)溶液(pH 8.0)

称取 46.53 g EDTANa₂ · 2H₂O 于 250 mL 烧杯中,加 150 mL 去离子水充分搅拌溶解,用 1 mol/L NaOH 溶液调 pH 至 8.0,定容至 250 mL,混匀。4 ℃ 冰箱保存。

B.1.3 DNA 提取液

称取氯化钠(NaCl)14.6 g 至 500 mL 烧杯中,加入 100 mL 去离子水溶解,分别加 1 mol/L Tris-HCl 溶液 50 mL、0.5 mol/L EDTA 溶液 50 mL 和 CTAB 10 g,60 ℃ 水溶解,并用去离子水定容至 500 mL,混匀。4 ℃ 冰箱保存。

B.1.4 氯仿/异戊醇(24 : 1)

分别量取 240 mL 氯仿和 10 mL 异戊醇,混匀。

B.1.5 1×TE 缓冲液

分别量取 1 mol/L 的 Tris-HCl 溶液 2.5 mL 和 0.5 mol/L EDTA 溶液 0.5 mL,混匀,加去离子水定容至 250 mL。

B.2 引物稀释液

合成的引物(见附录 C)先在高速离心机中 10 000 r/min 离心 2 min,然后加入去离子水稀释到浓度 10 μmol/L。

B.3 染色液的配制

B.3.1 0.05%溴酚蓝

称取溴酚蓝 0.1 g,加 0.05 mol/L 氢氧化钠溶液 3.0 mL 使其溶解,去离子水定容至 200 mL。

B.3.2 Gelred 染料液

取 4 μL Gelred 染色剂溶解于 10 mL 溴酚蓝缓冲液中配制成 Gelred 染料液。

B.4 非变性聚丙烯酰胺凝胶配制

B.4.1 10×TBE 缓冲液

分别称取 Tris 108 g, 硼酸 55 g, 倒入 1 000 mL 容量瓶中, 加入 800 mL 去离子水加热溶解, 再加入 0.5 mol/L EDTA 溶液 37 mL, 调 pH 值至 8.0 后, 定容至 1 000 mL, 混匀。

B.4.2 10%过硫酸铵(APS)

称取过硫酸铵 0.1 g, 加入 1 mL 去离子水, 混匀。4 ℃条件下保存(保存期 7 d)。

B.4.3 40%丙烯酰胺

分别称取丙烯酰胺 38 g 和甲叉双丙烯酰胺 2 g, 溶于 60 mL 水中, 加热至 37 ℃溶解, 定容至 100 mL, 混匀, 过滤。4 ℃条件下保存。

B.4.4 8%非变性聚丙烯酰胺凝胶

100 mL 凝胶溶液配方: 26.5 mL 40% 丙烯酰胺, 10 mL 10×TBE, 62.4 mL ddH₂O, 1.0 mL 10% 过硫酸铵和 100 μL TEMED。

附 录 C
(规范性附录)
核 心 引 物

核心引物(27对)见表C.1。

表 C.1 核心引物(27对)

编号	引物名称	引物序列(5'-3')	等位基因数	扩增片段大小/bp
1	Aprigms18	F:TCTGAGTTCAGTGGGTAGCA R:ACAGAATGTGCGTTGCTTTA	17	175~225
2	Aprigms22	F:TAACTAGCTTCCATCAACCC R:TTGCAACAACCTGGAATCCAG	8	229~243
3	Aprigms24	F:ATCTGCTCTTTCCCTCACCT R:GATTATCCCTCAACCCATCC	10	321~365
4	BPPCT002	F:TCGACAGCTTGATCTTGACC R:CAATGCCTACGGAGATAAAAAGAC	23	164~226
5	BPPCT007	F:TCATTGCTCGTCATCAGC R:CAGATTTCTGAAGTTAGCGGTA	18	117~157
6	BPPCT012	F:ACTTCCATTGTCAGGCATCA R:GGAGCAACGATGGAGTGC	12	118~160
7	BPPCT017	F:TTAAGAGTTTGTGATGGGAACC R:AAGCATAATTTAGCATAACCAAGC	18	186~226
8	BPPCT026	F:ATACCTTTGCCACTTGCG R:TGAGTTGGAAGAAAACGTAAC	16	126~164
9	BPPCT029	F:GGACGGACAGAAATGAAGGT R:CCTTAACCCACGCAACTCC	23	137~203
10	BPPCT030	F:AATTGTACTIONGCAATGCTATGA R:CTGCCTTCTGCTCACACC	11	135~159
11	BPPCT034	F:CTACCTGAAATAAGCAGAGCCAT R:CAATGGAGAATGGGGTGC	21	200~260
12	BPPCT037	F:CATGGAAGAGGATCAAGTGC R:CTTGAAGGTAGTGCCAAAGC	18	108~160
13	BPPCT038	F:TATATTGTTGGCTTCTGTCATG R:TGAAAGTGAAACAATGGAAGC	14	123~115
14	BPPCT039	F:ATTACGTACCCTAAAGCTTCTGC R:GATGTCATGAAGATTGGAGAGG	17	130~176

表 C.1 (续)

编号	引物名称	引物序列(5'-3')	等位基因数	扩增片段大小/bp
15	BPPCT040	F:ATGAGGACGTGTCTGAATGG R:AGCCAAACCCCTCTTATACG	12	124~150
16	CPDCT045	F:TGGGATCAAGAAAGAGAACCA R:AGGTGTGCTTGCACATGTTT	11	116~142
17	CPSCT018	F:AGGACATGTGGTCCAACCTC R:GGTTCCCGTTACTTTCAT	9	138~162
18	PceGA25	F:GCAATTCGAGCTGTATTTTCAGATG R:CAGTTGGCGGCTATCATGCTTAC	17	163~205
19	Pchems5	F:CGCCATGACAAACTTA R:GTCAAGAGGTACACCAG	28	241~309
20	Pchgms2	F:GTCAATGAGTTCAGTGTCTACACTC R:AATCATAACATCATTCAGCCACTGC	16	134~182
21	Pchgms3	F:ACGGTATGTCCGTACACTCTCCATG R:CAACCTGTGATTGCTCCTATTAAAC	14	172~208
22	Pchgms4	F:ATCTTCACAACCCTAATGTC R:GTTGAGGCAAAAGACTTCAAT	15	146~208
23	UDP96-010	F:CCCATGTGTGTCCACATCTC R:TTGATGATTCCATGCGTCTC	15	60~110
24	UDP98-406	F:TCGAAACTGGTAGTATGAACAGA R:ATGGGTCGTATGCACAGTCA	18	81~121
25	UDP98-409	F:GCTGATGGGTTTTATGGTTTTTC R:CGGACTCTTATCCTCTATCAACA	23	121~181
26	UDP98-411	F:AAGCCATCCACTCAGCACTC R:CCAAAAACCAAAACCAAAGG	12	155~197
27	UDP98-412	F:AGGGAAAGTTTCTGCTGCAC R:GCTGAAGACGACGATGATGA	14	84~120

附 录 D

(资料性附录)

仁用杏品种 SSR 指纹图谱鉴定报告书

仁用杏品种 SSR 指纹图谱鉴定报告书见表 D.1。

表 D.1 仁用杏品种 SSR 指纹图谱鉴定报告书

送检样品编号		送检样品名称	
对照品种编号		对照品种名称	
送检人(法人)			
检测单位		依据标准	
检测引物数量： 检测引物编号： SSR 指纹图谱检测结果： 检测差异引物和谱带： 结论：			
评语： <div style="text-align: right; margin-top: 100px;"> 检测单位(公章) 年 月 日 </div>			

制表人：

审核人：

批准人：

参 考 文 献

- [1] GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法
 - [2] GB/T 19557.1 植物新品种特异性、一致性和稳定性测试指南 总则
 - [3] GB/T 20452—2006 仁用杏杏仁质量等级
 - [4] DB 13/T 344—1998 大杏扁综合标准
 - [5] NY/T 1306—2007 农作物种质资源鉴定技术规程 杏
-

中华人民共和国林业
行业标准
仁用杏品种鉴定技术规程
SSR 分子标记法
LY/T 2745—2016

*

中国标准出版社出版发行
北京市朝阳区和平里西街甲2号(100029)
北京市西城区三里河北街16号(100045)

网址 www.spc.net.cn

总编室:(010)68533533 发行中心:(010)51780238
读者服务部:(010)68523946

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷
各地新华书店经销

*

开本 880×1230 1/16 印张 1 字数 24 千字
2018年6月第一版 2018年6月第一次印刷

*

书号: 155066·2-33241 定价 18.00 元

如有印装差错 由本社发行中心调换
版权专有 侵权必究
举报电话:(010)68510107



LY/T 2745-2016