

ICS 65.020
B 05
备案号: 35077-2012

DB 22

吉 林 省 地 方 标 准

DB 22/T 1589—2012

高粱品种鉴定 DNA 指纹法 (SSR)

Identification of sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) varieties using DNA fingerprinting method (SSR)

2012 - 09 - 15 发布

2012 - 10 - 31 实施

吉林省质量技术监督局 发布

前 言

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别这些专利的责任。

本标准按照GB/T 1.1-2009和GB/T 20001.4-2001给出的规则起草。

本标准由吉林省农业委员会提出并归口。

本标准起草单位：吉林省农业科学院农业部植物新品种测试(公主岭)分中心、农业生物技术研究所。

本标准主要起草人：李晓辉，王凤华，张春宵，周海涛，郝彩环，王威，侯佳明，王晶。

高粱品种鉴定 DNA 指纹法（SSR）

1 范围

本标准规定了利用简单重复序列（SSR,simple sequence repeat）分子标记进行高粱（*Sorghum bicolor* (L.) Moench)品种DNA指纹鉴定的试验方法、数据采集、结果记录及判定标准。

本标准适用于高粱各类材料的DNA分子数据采集和品种鉴定。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 3543.2 农作物种子检验规程 扦样

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

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 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

核心引物 core primer

多态性、稳定性、重复性等综合特性好，可作为DNA指纹鉴定优先选用的一套SSR引物，包括基本核心引物和扩展核心引物。基本核心引物是用于品种建库和鉴定，并且保证不同实验室数据具有可比性，可进行数据整合的一套统一固定引物。扩展核心引物是可根据引物的最新研究结果和特殊鉴定性状进行调整的一套相对固定的引物。

3.2

参照品种 reference cultivar

用于确定等位变异，校正仪器设备的系统误差,对应于特定SSR位点上大小已知的不同等位变异的一组品种。

4 原理

从高粱种子、幼苗、叶片等组织中提取DNA，利用普通或荧光染料标记的SSR引物进行PCR扩增。不同长度的PCR扩增片段通过变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离，经硝酸银染色或者荧光染料标记检测区分开来。不同高粱品种由于遗传组成不同，在基因组DNA的多个SSR位点中，一些位点的简单重复序列的重复次数有差异，这种差异可通过变性聚丙烯酰胺凝胶电泳区分，从而对不同品种进行区分鉴定。

5 试剂与材料

除另有说明外，在分析中仅使用确认为分析纯的试剂和GB/T 6682规定的一级水。

5.1 试剂

- 5.1.1 十六烷基三乙基溴化铵（CTAB: $C_{16}H_{33}(CH_3)_3NBr$ ）。
- 5.1.2 乙二胺四乙酸二钠（EDTA- $Na_2 \cdot 2H_2O$: $C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8 \cdot 2H_2O$ ）。
- 5.1.3 三羟甲基氨基甲烷（tris-base: $C_4H_{11}NO_3$ ）。
- 5.1.4 氢氧化钠（NaOH）。
- 5.1.5 氯化钠（NaCl）。
- 5.1.6 琼脂糖（agarose）。
- 5.1.7 溴酚蓝（brph blue: $C_{19}H_{10}Br_4O_5S$ ）。
- 5.1.8 二甲苯青 FF（ $C_{25}H_{27}N_2O_6S_2Na$ ）。
- 5.1.9 甲叉双丙烯酰胺（bisacrylamide: $(H_2C=CHCONH)_2CH_2$ ）。
- 5.1.10 丙烯酰胺（ C_3H_5NO ）。
- 5.1.11 硼酸（boric Acid: H_3BO_3 ）。
- 5.1.12 尿素（ CH_4N_2O ）。
- 5.1.13 过硫酸铵（APS: $(NH_4)_2S_2O_8$ ）。
- 5.1.14 乙酸铵（ CH_3COONH_4 ）。
- 5.1.15 硝酸银（ $AgNO_3$ ）。
- 5.1.16 三氯甲烷（ $CHCl_3$ ）。
- 5.1.17 异丙醇（ C_3H_8O ）。
- 5.1.18 异戊醇（ $C_5H_{12}O$ ）。
- 5.1.19 盐酸（HCl）：37%。
- 5.1.20 10×Buffer 缓冲液：含 Mg^{2+} 25 mmol/L。
- 5.1.21 四种脱氧核苷三磷酸：dATP、dTTP、dGTP、dCTP（10 mmol/L each）。
- 5.1.22 Taq DNA 聚合酶：2 U/ μ L。
- 5.1.23 矿物油。
- 5.1.24 去离子甲酰胺（formamide: HCONH）。
- 5.1.25 亲和硅烷（binding silane）：97%。
- 5.1.26 剥离硅烷（repel silane）：2%二甲基二氯硅烷（ $C_2H_6Cl_2Si$ ）。
- 5.1.27 无水乙醇（ C_2H_6O ）。
- 5.1.28 四甲基乙二胺（TEMED: $C_6H_{16}N_2$ ）。
- 5.1.29 冰醋酸（ $C_2H_4O_2$ ）。
- 5.1.30 甲醛溶液（ CH_2O ）：37%。
- 5.1.31 DNA 分子量标准：DL2000。
- 5.1.32 核酸染色剂。
- 5.1.33 DNA 分析仪专用丙烯酰胺胶液。
- 5.1.34 DNA 分析仪专用电泳缓冲液。
- 5.1.35 DNA 分析仪专用分子量内标 Liz 标记。
- 5.1.36 DNA 分析仪专用光谱校准基质，6-FAM 荧光标记的 DNA 片段。

5.2 试剂配制

5.2.1 DNA 提取试剂的配制

5.2.1.1 EDTA 溶液 (0.5 mol/L)

186.1 g EDTA -Na₂·2H₂O溶于800 mL水中, 用NaOH调pH值至8.0, 定容至1000 mL, 103.4 kPa灭菌。

5.2.1.2 Tris-HCl 溶液 (1 mol/L)

60.55 g Tris-base溶于适量水中, 加HCl调pH至8.0, 定容至500 mL, 103.4 kPa灭菌。

5.2.1.3 HCl 溶液 (0.5 mol/L)

25 mL浓盐酸(36%-38%), 加水定容至500 mL。

5.2.1.4 NaCl 溶液 (5 mol/L)

292.5 g NaCl + ddH₂O至终体积1000 mL, 103.4 kPa灭菌。

5.2.1.5 DNA 提取 CTAB 缓冲液

1 mol/L Tris-HCl 83.5 mL, 5 mol/L NaCl 235 mL, 0.5 mol/L EDTA 33.4 mL, CTAB固体20 g, 定容至1000 mL。

5.2.1.6 氯仿-异戊醇(24:1)

按24:1的比例(体积比)配制混合液。

5.2.1.7 76%乙醇

无水乙醇380 mL, 定容至500 mL。

5.2.1.8 TE 缓冲液

1 mol/L Tris-HCl 5 mL, 0.5 mol/L EDTA 1 mL, 加HCl调pH至8.0, 定容至500 mL。

5.2.2 dNTP 的配制

用超纯水分别配制A、G、C、T终浓度100 mmol/L的储存液。各取20 μL混合, 用超纯水120 μL定容至每种核苷三磷酸终浓度为10 mmol/L的工作液。103.4 kPa灭菌, -20 °C保存。

5.2.3 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳试剂的配制

5.2.3.1 40% PAGE 胶

190 g丙烯酰胺和10 g甲叉双丙烯酰胺, 定容至500 mL, 混匀。4 °C贮存备用。

5.2.3.2 6% PAGE 胶

尿素450 g, 10×BTE缓冲液100 mL, 40%PAGE胶150 mL, 定容至1000 mL。

5.2.3.3 亲和硅烷工作液

250 μL冰醋酸, 250 μL亲和硅烷, 加无水乙醇至50 mL, 混匀。分装于1.5 mL Eppendorf管中。4 °C贮存备用。

5.2.3.4 剥离硅烷工作液

2%二甲基二氯硅烷。

5.2.3.5 25%过硫酸铵溶液

0.25 g过硫酸铵溶于1 mL超纯水中，混匀。

5.2.3.6 10×TBE 缓冲液

Tris-base 108 g，硼酸 55 g，EDTA- $\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 7.44 g，定容至1 L。

5.2.3.7 1×TBE 缓冲液

10×TBE缓冲液500 mL，加水定容至5 L。

5.2.3.8 6×加样缓冲液

去离子甲酰胺（用于DNA变性）49 mL，0.5 mmol/L EDTA 1 mL，溴酚兰0.125 g，二甲苯青0.125 g。

5.2.4 银染试剂的配制

5.2.4.1 固定液

200 mL冰醋酸，加水定容至2000 mL。

5.2.4.2 染色液

3 g硝酸银，加水定容至2000 mL。

5.2.4.3 显影液

2000 mL蒸馏水中加入25 g氢氧化钠和7 mL甲醛。

注1：银染溶液的配制可使用符合 GB/T 6682 规定的三级水。

注2：同样标准的试剂盒可代替上述试剂。

6 仪器设备

6.1 DNA 分析仪：基于毛细管电泳，有片段分析功能和数据分析软件，能够分辨 1 个核苷酸大小的差异。

6.2 紫外分光光度计：波长 260 nm 及 280 nm。

6.3 酸度计。

6.4 电子天平：感应为 0.01 g、0.001 g。

6.5 凝胶成像系统或紫外透射仪。

6.6 PCR 扩增仪。

6.7 高压电泳仪：规格为 3000 V、400 mA、400 W，具有恒电压、恒电流和恒功率功能。

6.8 垂直电泳槽及配套的制胶附件。

6.9 普通电泳仪。

6.10 水平电泳槽及配套的制胶附件。

6.11 高速冷冻离心机：最大离心力不小于 15,000 rpm。

6.12 水平摇床。

6.13 胶片观察灯。

- 6.14 微量移液器：规格分别为 10 μ L、20 μ L、100 μ L、200 μ L、1000 μ L，连续可调。
- 6.15 磁力搅拌器。
- 6.16 微波炉。
- 6.17 高压灭菌锅。
- 6.18 水浴锅或金属浴：控温精度 ± 1 $^{\circ}$ C。
- 6.19 冰箱：最低温度-20 $^{\circ}$ C。
- 6.20 制冰机。

7 SSR 引物

用超纯水分别配制正向引物和反向引物终浓度均为20 μ mol/L，等体积混合成10 μ mol/L的工作液。引物在DNA分析仪上使用，须在正向引物5'端加入6-FAM荧光修饰基团。引物清单见附录A。

8 参照品种及其使用

在进行等位变异检测时，应同时包括相应参照品种的PCR扩增产物。若多个品种在某一SSR位点上都具有相同的等位变异。在确认这些品种该位点等位变异大小与参照品种相同后，这些品种也可以代替资料附录B中的参照品种使用。若同一名称不同来源的参照品种的某一位点上的等位变异不相同，在使用其他来源的参照品种时，应与原参照品种核对，确认无误后使用。对于附录B中未包括的等位变异，应按本标准方法，确定其大小和对应参照品种。参照品种的名称参见附录B。

9 操作步骤

9.1 试样制备

- 9.1.1 样品材料可为种子、幼苗、植株幼嫩叶片等组织或器官。对于种子样品分样和保存，按 GB/T 3543.2 的规定进行。
- 9.1.2 每份样品随机取 10 个个体（种子、叶片或其他等效物）进行分析。

9.2 DNA 提取

DNA提取步骤如下：

- a) 称取 500 mg 幼苗，液氮下迅速磨成粉末；
- b) 将粉末转入 2.0 mL Eppendorf 管中，加入 700 μ L 65 $^{\circ}$ C 预热的 CTAB 缓冲液，并使其混匀；
- c) 65 $^{\circ}$ C 水浴加热 45 min，不断地轻轻倒转摇动。水浴后，取出离心管，冷却至室温；
- d) 通风橱下加入 700 μ L 的氯仿:异戊醇（24:1），轻轻倒转摇动 5 min~10 min；
- e) 12000 rpm(室温)离心 10 min，用去头枪尖将上清转至一新 2.0 mL Eppendorf 管中；
- f) 加入 10 μ L RNA 酶溶液（10 mg/mL），37 $^{\circ}$ C 下温浴 30 min；
- g) 重复 4~5 步骤；
- h) 加入-20 $^{\circ}$ C 预冷的异丙醇（1 倍体积）或无水乙醇（2 倍体积）于 2.0 mL Eppendorf 管中，轻轻混匀。-20 $^{\circ}$ C 冰箱静置一段时间后，至 DNA 凝集，室温下钩出 DNA；
- i) 76%乙醇洗涤两次（其中一次可过夜）。洗涤完毕后，将 DNA 晾干；
- j) 加入适量的 1 $\times$ TE (pH 8.0)溶解于试管中，4 $^{\circ}$ C 下保存备用；
- k) 将 DNA 原液于 0.8%琼脂糖凝胶电泳检测质量（DL2000 为 Marker）。-20 $^{\circ}$ C 下保存备用。

注1: 利用种子、幼苗、植株幼嫩叶片等组织或器官提取 DNA 均可, 但鉴于高粱的种子籽粒较小, 本标准推荐使用幼苗。

注2: 上述 DNA 提取方法为标准推荐使用的, 在保证 DNA 提取质量的前提下其它 DNA 提取方法均可采用。

注3: 杂交种种种子应为当代种子, 常规系及其他类型种子应为纯合种子。

9.3 PCR 反应体系及程序

9.3.1 反应体系

10 μL 的反应体积, 含每种 dNTP 0.10 mmol/L, 正向、反向引物各 0.24 $\mu\text{mol/L}$ (利用 DNA 分析仪检测时使用荧光标记引物), *Taq* DNA 聚合酶 0.4 U, 1 $\times$ PCR 缓冲液 (含 Mg^{2+} 2.5 mmol/L), 样品 DNA 20 ng~40 ng, 其余以超纯水补足至所需体积。如果 PCR 过程中不采用热盖程序, 则反应液上加盖 15 μL 矿物油 (Sigma), 以防止反应过程中水分蒸发。

9.3.2 反应程序

94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min, 1 个循环; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 45 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 60 s, 共 36 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

9.4 电泳检测

9.4.1 普通变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测

9.4.1.1 灌胶板制作

灌胶板制作步骤如下:

- 严格地将玻璃板洗净;
- 蒸馏水冲洗并擦干;
- 用 95% 酒精擦拭;
- 在母板上均匀涂 2 mL~3 mL 亲和硅烷工作液, 凹槽板上涂 2 mL~3 mL 剥离硅烷。放置 10 min 以上, 让其充分晾干。操作过程中防止两块玻璃板相互污染。

9.4.1.2 组装玻璃板

待玻璃板彻底干燥后组装电泳板, 并用水平仪调平。

9.4.1.3 灌胶

在 50 mL 6% PAGE 胶中加入 TEMED 65 μL 和 25% 的过硫酸铵 250 μL , 迅速混匀后灌胶。待胶液流动到下部, 在上部轻轻插入梳子, 使其凝聚至少 1 h 以上。灌胶过程中防止出现气泡。

9.4.1.4 预电泳

在正极槽 (下槽) 中加入 1 $\times$ TBE 缓冲液 600 mL, 在负极槽 (上槽) 中加入 0.5 $\times$ TBE 缓冲液 600 mL, 拔出梳子。80 W 恒功率预电泳 30 min~40 min。

9.4.1.5 试样制备

10 μL PCR 扩增样品加入 3 μL 6 $\times$ 加样缓冲液, 混匀后, 在 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 min, 迅速用冰水浴冷却, 并于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中冷却 10 min 以上。

9.4.1.6 电泳

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：<https://d.book118.com/076243211142011004>