

ICS 65.020.01  
CCS B 36

# DB52

贵 州 省 地 方 标 准

DB52/T 1528—2020

---

## 紫苏品种鉴定技术规程 SSR 标记法

Protocol for the identification of perilla varieties—SSR marker method

2020 - 11 - 13 发布

2021 - 03 - 01 实施

---

贵州省市场监督管理局

发布



# 目 次

前言 .....	II
1 范围 .....	1
2 规范性引用文件 .....	1
3 术语与定义 .....	1
4 原理 .....	1
5 仪器设备及试剂 .....	2
6 溶液配制 .....	2
7 引物信息 .....	2
8 参照品种准备 .....	2
9 操作步骤 .....	2
10 数据记录与统计 .....	3
11 结果判定 .....	4
附录 A（资料性） 主要仪器设备及试剂 .....	5
附录 B（资料性） 溶液配制 .....	7
附录 C（资料性） 推荐引物名单及序列 .....	9
附录 D（资料性） 参照品种等位变异位点 .....	11
附录 E（资料性） 参照品种名单 .....	15



## 前 言

本文件按照GB/T 1.1-2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件由贵州省农业农村厅提出并归口。

本文件起草单位：贵州省油菜研究所。

本文件主要起草人：沈奇、温贺、王仙萍、徐静、商志伟、杨森、杜才富、陈俊琨、田飞、汤勇。



# 紫苏品种鉴定技术规程 SSR 标记法

## 1 范围

本文件规定了利用简单重复序列（Simple sequence repeat, SSR）标记法进行紫苏资源材料及品系品种鉴定的原理、仪器设备及试剂、溶液配制、引物信息、参照品种准备、操作步骤、数据记录与统计、结果判定等。

本文件适用于紫苏种质资源、品系品种的SSR标记鉴定。

## 2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；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。

NY/T 2494 植物新品种特异性、一致性和稳定性测试指南 紫苏

## 3 术语与定义

下列术语和定义适用于本文件。

### 3.1

**推荐引物** Recommended Primer

品种鉴定中优先选用的一套SSR引物，具有多态性高，重复性好等综合特性。

### 3.2

**参照品种** Reference Variety

具有所用SSR位点上不同等位变异的品种。参照品种用于辅助确定待测样品的等位变异，校正仪器设备的系统误差。

### 3.3

**SSR 指纹图谱** SSR Finger Print

品种或材料特征性的SSR变异位点集合，代表着以品种特有的基因组DNA中简单重复序列特征。

## 4 原理

由于不同紫苏品种遗传组成不同，基因组DNA中简单重复序列的重复次数存在差异，这种差异可通过DNA提取、PCR扩增以及聚丙烯酰胺凝胶电泳（PAGE）或毛细管电泳荧光检测进行检测，从而能够区分紫苏资源材料及品系品种。

## 5 仪器设备及试剂

详见附录A。

## 6 溶液配制

参照附录B的要求执行。

## 7 引物信息

推荐引物名单及序列参见附录C，推荐引物等位变异等相关信息参见附录D。

## 8 参照品种准备

参见附录E。

## 9 操作步骤

### 9.1 材料准备

随机取5个单株的组织或器官（种子，幼苗，叶片，苞叶，花，果穗等）。

### 9.2 DNA 提取

CTAB提取法：幼苗或叶片500 mg，置于研钵，加液氮充分研磨，或取种子充分磨碎，称取100 mg移入2 mL离心管；每管加入600  $\mu\text{L}$ ，65  $^{\circ}\text{C}$  预热的 CTAB提取液，充分混合，65  $^{\circ}\text{C}$  保温60 min，期间多次颠倒混匀；每管加入等体积的三氯甲烷 / 异戊醇混合液，充分混匀，静置10 min；12000 r离心15 min后，吸取上清液至一新离心管，再加入等体积的三氯甲烷 / 异戊醇混合液，充分混匀，静置10 min，12000 r离心15 min。吸取上清液至一新离心管，加入2倍体积的预冷乙醇，置于-20  $^{\circ}\text{C}$  冰箱过夜放置后12000 r离心15 min，弃上清液；加入70%乙醇，旋转离心管数次，弃去乙醇，室内干燥沉淀6 h以上；加入100  $\mu\text{L}$  超纯水或TE缓冲液，充分溶解后备用。

注：以上为推荐的DNA提取方法，其他达到PCR扩增质量要求的DNA提取方法均适用。

### 9.3 PCR 扩增

#### 9.3.1 引物选择

选择附录C中引物进行检测。

#### 9.3.2 反应体系

各试验材料的DNA浓度稀释至50 ng/ $\mu\text{L}$ 使用。10  $\mu\text{L}$ 反应体系各组分推荐含量如下：10 $\times$ Buffer 1.0  $\mu\text{L}$ ， $\text{Mg}^{2+}$  0.8  $\mu\text{L}$  (1.5 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$ )，dNTPs 0.2  $\mu\text{L}$  (0.225 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$ )，Taq DNA聚合酶0.1  $\mu\text{L}$ ，模板DNA1.0  $\mu\text{L}$ ，引物各0.5  $\mu\text{L}$  (0.5  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )，ddH<sub>2</sub>O 5.9  $\mu\text{L}$ 。

### 9.3.3 反应程序

94 °C 预变性 3 min，每个循环 94 °C 变性 30 s，57 °C 退火 30 s，72 °C 延伸 40 s，共 36 个循环，72 °C，10 min，10 °C 保持。

## 9.4 聚丙烯酰胺凝胶电泳检测 (PAGE)

### 9.4.1 PAGE 胶制备

电泳胶板洗净，用蒸馏水和无水乙醇分别淋洗并晾干。在长胶板上均匀涂抹 1.5 mL 硅化液，短胶板上均匀涂抹 1 mL 反硅化液，5 min 后用 95% 乙醇擦除多余的硅化液和反硅化液。将玻璃胶板装配好并以 0.4 mm 边条隔开。配制 80 mL 变性凝胶液，从制胶夹底部小孔缓慢注入，插入梳子并加夹子保护，凝聚 2 h 后即可电泳。

### 9.4.2 电泳分离

将电泳槽底部的制胶夹板取下，擦净电泳槽玻璃外侧并将其垂直固定于底座上，上槽加 1×TBE 缓冲液 1000 mL，下槽加同样浓度的电泳缓冲液 500 mL，将梳子拔出后立即冲洗点样孔。接通电源后，120 W 电泳预热 30 min。在选择性扩增产物中加入等体积的上样缓冲液，95 °C 变性 3 min~5 min 后立即冰浴冷却，上样 2 μL，70 W~90 W 电泳 2 h 左右，当二甲苯青跑过 2/3 胶板时中止电泳。

### 9.4.3 染色与显影

电泳完毕，剥离下胶板，将其浸入 2 L 固定液，摇床在速度 20 r/min 下摇动 20 min 或至指示剂消失为止，然后用去离子水漂洗胶板 2 次，每次不少于 10 min。然后转至 2 L 染色液中染色，置于摇床速度 20 r/min 下摇动 30 min。取出胶板，在双蒸水中迅速漂洗 10 s，马上转入到 2 L 的显影液中，置于摇床速度 20 r/min 下摇动至带型清晰可见后取出放回固定液中停止显影，然后用自来水漂洗 5 min，室温下自然晾干，拍照保存。

## 9.5 毛细管电泳荧光检测

分别取等体积稀释后的不同荧光标记扩增产物混合液 1 μL 加入 DNA 分析仪 96 孔板中，各孔中分别加入 0.1 μL 内标及 8.9 μL 去离子甲酰胺。样品变性 5 min 取出置于冰上冷却 10 min，转速 11000 r/min 离心 10 s 放置分析仪上。电泳检测按照仪器操作手册，编辑样品表，执行运行程序。

## 10 数据记录与统计

### 10.1 结果记录

纯合位点的基因型数据记录为 X/X，杂合位点的基因型数据记录为 X/Y，其中 X、Y 分别为该位点上两个等位变异，小片段数据在前，大片段数据在后；缺失位点基因型数据记录为 0/0。

示例 1: 扩增样品在某个位点上仅出现一个等位变异，大小为 250 bp，在该位点的基因型记录为 250/250。

示例 2: 扩增样品在某个位点上有两个等位变异，大小分别为 245 bp、250 bp，在该位点的基因型记录为 245/250。

## 10.2 统计比较

样品每个SSR位点的等位变异采用扩增片段长度的形式表示。对于普通聚丙烯酰胺凝胶电泳银染检测法，每个扩增位点的等位变异与参照品种的等位变异片段大小进行比较，确定样品在该位点的等位变异。对于毛细管电泳荧光检测方法，通过使用参照品种，消除同型号不同批次或不同型号DNA分析仪间可能存在的系统误差，使用片段分析软件读取送检样品在该位点的等位变异。

## 11 结果判定

当样品间差异位点数大于2，判定为“不同”；当样品间差异位点数等于1，判定为“近似”；当样品间差异位点数等于0，判定为“极近似或相同”。

对利用附录C中30对引物仍未检测到2个差异位点数的样品，可进行田间种植鉴定。田间种植鉴定参照NY/T 2494进行判定。

附 录 A  
(资料性)  
主要仪器设备及试剂

### A.1 主要仪器设备

- A.1.1 PCR扩增仪。
- A.1.2 高压电泳仪：最高电压不低于2000V，具有恒电压，恒电流和恒功率功能。
- A.1.3 垂直电泳槽及配套的制胶附件。
- A.1.4 普通电泳仪。
- A.1.5 DNA分析仪。
- A.1.6 高速冷冻离心机：最大离心力不小于20000g。
- A.1.7 水平摇床。
- A.1.8 胶片观察灯。
- A.1.9 电子天平。
- A.1.10 微量移液器：规格分别为 10 $\mu$ L、20 $\mu$ L、100 $\mu$ L、200 $\mu$ L、1000 $\mu$ L，连续可调。
- A.1.11 磁力搅拌器。
- A.1.12 核酸浓度测定仪及紫外分光光度计。
- A.1.13 微波炉。
- A.1.14 高压灭菌锅。
- A.1.15 酸度计。
- A.1.16 水浴锅或金属浴：控温精度  $\pm 1^{\circ}\text{C}$ 。
- A.1.17 冰箱。
- A.1.18 制冰机。
- A.1.19 凝胶成像系统或紫外透射仪。

### A.2 主要试剂

- A.2.1 十二烷基苯磺酸钠。
- A.2.2 聚乙烯吡咯烷酮。
- A.2.3 氯仿。
- A.2.4 异戊醇。
- A.2.5 乙二胺四乙酸二钠。
- A.2.6 三羟甲基氨基甲烷。
- A.2.7 盐酸。
- A.2.8 氢氧化钠。
- A.2.9 氯化钠。
- A.2.10 10 $\times$ Buffer 缓冲液。
- A.2.11 dNTP。
- A.2.12 Taq DNA 聚合酶。
- A.2.13 矿物油。

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/56711152054010003>