

ICS 65.020.01
B 61

NY

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 1432—2007

玉米品种鉴定 DNA 指纹方法

Maize Variety Identification Molecular Techniques

2007-09-14 发布

2007-12-01 实施



中华人民共和国农业部 发布 中国谷物网<http://www.ex-grain.cn>

玉米品种鉴定 DNA 指纹方法

1 范围

本标准规定了玉米(*Zea mays* L.)品种 DNA 指纹鉴定的实验方法及判定标准。

本标准适用于玉米自交系和单交种的品种鉴定,其他杂交种类型及群体和开放授粉品种可参考本标准。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件,其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本标准。然而,鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件,其最新版本适用于本标准。

GB/T 3543.2 农作物种子检验规程 扦样

GB 4404.1 粮食作物种子 禾谷类

GB/T 19557.1—2004 植物新品种特异性、一致性和稳定性测试指南 总则

3 原理

从玉米种子、幼苗、叶片等组织中提取 DNA,利用 SSR 引物进行 PCR 扩增,不同碱基长度的 PCR 扩增产物通过聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,并通过染色显示 DNA 指纹谱带类型。不同玉米品种由于遗传组成不同,基因组 DNA 中简单重复序列的重复次数有差异,这种差异可通过 PCR 扩增、电泳、染色程序获得的 DNA 指纹图谱加以区分,从而对不同品种进行鉴定。

4 仪器设备及试剂

仪器设备及试剂名单见附录 A。

5 溶液配制

相关溶液配制方法见附录 B。

6 操作程序

6.1 样品准备

6.1.1 取样量

每份送检样品至少检测 5 个个体,对一致性差的样品应增加检测个体至 10 个以上。如果检测品种为自交系,应剔除杂交种个体;如果检测品种为杂交种,应剔除自交系个体。

6.1.2 品种比较方式

成对品种的比较:送检样品提供两份,一份为待检品种,一份为对照品种。将待检品种与对照品种直接进行成对比较。

品种与 DNA 指纹库入库品种的比较:送检样品提供一份。将待检样品与 DNA 指纹库所有入库品种的指纹进行比较,筛选出指纹最相似或相同的品种作为待检品种的近似品种,然后将待检品种与近似品种直接进行成对比较。

6.2 DNA 提取

提供两种 DNA 提取方法,分别适用于不同的实际需要。

- a) 方法一:剥取单粒干种子的胚,放入 1.5 mL 离心管中,加入 100 μ L 氯仿后研磨,加入 300 μ L DNA 提取液 1,混匀后于 10 000 rpm 离心 2 min,吸上清液加入预先装有 300 μ L 异丙醇和 300 μ L NaCl 溶液的 1.5 mL 离心管中,待 DNA 成团后挑出,经 70% 乙醇洗涤后加入 200 μ L TE 缓冲液 1,待充分溶解后备用。适用于需要 DNA 提取量大和长期存放的情况。
- b) 方法二:剥取单粒干种子的胚,或将玉米种子发芽,当玉米幼苗长度达到 3 cm 左右,每株幼苗取 1.5 cm,剪碎,将样品分别放入 96 孔深孔板中,每孔加入 150 μ L DNA 提取液 2,沸水加热 5 min,然后每孔再分别加入 150 μ L TE 缓冲液 2,直接取 2 μ L 进行 SSR 扩增,或 4 $^{\circ}$ C 保存。适用于需要高通量快速提取的情况,同时适用于种子和幼芽 DNA 提取。

6.3 PCR 扩增

6.3.1 SSR 引物

基本核心引物名单见附录 C。

6.3.2 反应体系

反应液体积为 20 μ L,组分配制应符合表 1 的规定。

表 1 PCR 扩增反应体系

反应组分	原浓度	终浓度	反应体积 μ L
ddH ₂ O		—	12.35
10 \times Buffer	10 \times	1 \times	2
MgCl ₂	25 mmol/L	2.5 mmol/L	2
dNTP	2.5 mmol/L each	0.15 mmol/L each	1.2
Tag 酶	5 U/ μ L	1 U	0.2
引物	20 μ mol/L	0.25 μ mol/L each	0.25
DNA			2

6.3.3 反应程序

94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,1 个循环;94 $^{\circ}$ C 变性 40 s,60 $^{\circ}$ C 退火 35 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s,共 30 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min,4 $^{\circ}$ C 保存。

6.4 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳

6.4.1 清洗玻璃板

用自来水沾洗涤剂将玻璃板反复擦洗干净,双蒸水擦洗两遍,95% 乙醇擦洗两遍,干燥。在长板上涂上 0.5 mL 亲和硅烷工作液,带凹槽的短板上涂 0.5 mL 剥离硅烷工作液。操作过程中防止两块玻璃板互相污染。

6.4.2 组装电泳板

待玻璃板彻底干燥后组装电泳板,并用水平仪调平。

6.4.3 灌胶

在 100 mL 4.5% PAGE 胶中加入 TEMED 和 25% 过硫酸铵各 100 μ L,迅速混匀后灌胶。待胶流动到下部,在上部轻轻插入梳子,使其聚合至少 1 h 以上。灌胶过程中防止出现气泡。

6.4.4 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)加入预热至 65 $^{\circ}$ C 的 1 \times TBE 缓冲液 600 mL,拔出梳子。90 W 恒功率预电泳 10 min~20 min。

6.4.5 变性

在 20 μL PCR 样品中加入 4 μL 6 \times 加样缓冲液, 混匀后, 在 PCR 仪上运行变性程序: 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 冷却 10 min 以上。

6.4.6 电泳

用移液器吹吸加样槽, 清除气泡和杂质, 插入样品梳子。每一个加样孔点入 5 μL 样品。80 W 恒功率电泳至上部的指示带(二甲苯青)到达胶板的中部(约 40 min)。电泳结束后, 小心分开两块玻璃板, 凝胶会紧贴在长板上。

6.5 银染

- 6.5.1 固定: 固定液中轻轻晃动 3 min;
- 6.5.2 漂洗: 双蒸水快速漂洗 1 次, 不超过 10 s;
- 6.5.3 染色: 染色液中染色 5 min;
- 6.5.4 漂洗: 双蒸水快速漂洗, 时间不超过 10 s;
- 6.5.5 显影: 显影液中轻轻晃动至带纹出现;
- 6.5.6 定影: 固定液中定影 5 min;
- 6.5.7 漂洗: 双蒸水漂洗 1 min。

7 结果及判定

7.1 数据表示

以多数个体具有的谱带即主带作为品种的特征谱带(如果检测品种为自交系, 应剔除杂交种个体; 如果检测品种为杂交种, 应剔除自交系个体), 当无法判断主带时, 给出各种谱带所占的比率。

谱带记录方式: 每个核心引物的所有谱带按扩增片段从大到小的顺序编号, 用二位代码描述(依次为 01、02、.....), 并确定代表每条谱带的一套标准品种。每个待测品种在每个引物位点上的谱带号用四位代码描述, 对照标准品种确定待测品种的谱带号。

示例 1: 在一个核心引物上仅有一条谱带 02, 品种在该引物位点的谱带代码为 0202;

示例 2: 在一个核心引物上有两条谱带 02 和 03, 品种在该引物位点的谱带代码为 0203。

7.2 检测及判定标准

7.2.1 先用 20 对基本核心引物检测, 获得待测品种在 20 个引物位点的 DNA 指纹谱带数据, 利用 20 个位点的 DNA 指纹谱带数据进行品种间比较:

- a) 品种间差异位点数 ≥ 2 , 判定为不同品种;
- b) 品种间差异位点数 = 1, 判定为相近品种;
- c) 品种间差异位点数 = 0, 判定为疑同品种。

7.2.2 对 b) 和 c) 的情况, 必要时继续用 20 对扩展核心引物进行检测, 利用 40 个位点的 DNA 指纹谱带数据进行品种间比较:

- a) 品种间差异位点数 ≥ 2 , 判定为不同品种;
- b) 品种间差异位点数 = 1, 判定为近似品种;
- c) 品种间差异位点数 = 0, 判定为相同品种或极近似品种。

7.3 鉴定报告

鉴定报告书格式参见附录 D。

附 录 A
(规范性附录)
仪器设备及试剂

A.1 仪器设备

- A.1.1 PCR 核酸扩增仪:规格为 96 孔;
- A.1.2 序列分析电泳槽;
- A.1.3 高压电泳仪:规格为 3 000 V,400 mA,400 W;
- A.1.4 水平摇床;
- A.1.5 胶片观察灯;
- A.1.6 电子天平;
- A.1.7 微量加样器;
- A.1.8 磁力搅拌器;
- A.1.9 电磁炉;
- A.1.10 微波炉;
- A.1.11 高压灭菌锅;
- A.1.12 pH 酸度计。

A.2 试剂

所用试剂均为分析纯,所用水均为去离子水。

- A.2.1 乙二胺四乙酸二钠;
- A.2.2 Tris 碱;
- A.2.3 盐酸;
- A.2.4 氢氧化钠;
- A.2.5 10×Buffer 缓冲液:不含 Mg^{2+} ;
- A.2.6 四种脱氧核苷酸:4×dNTP;
- A.2.7 Taq DNA 聚合酶;
- A.2.8 SSR 引物;
- A.2.9 矿物油;
- A.2.10 去离子甲酰胺;
- A.2.11 溴酚蓝;
- A.2.12 二甲苯青 FF;
- A.2.13 甲叉双丙烯酰胺;
- A.2.14 丙烯酰胺;
- A.2.15 硼酸;
- A.2.16 尿素;

- A.2.17 亲和硅烷:97%;
- A.2.18 剥离硅烷:2%二甲基二氯硅烷;
- A.2.19 无水乙醇;
- A.2.20 四甲基乙二胺(TEMED);
- A.2.21 过硫酸铵;
- A.2.22 冰醋酸;
- A.2.23 硝酸银;
- A.2.24 甲醛溶液:37%。

附录 B
(规范性附录)
溶液配制

B.1 DNA 提取溶液的配制

B.1.1 0.5 mol/L EDTA 溶液: 186.1 g $\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 溶于 800 mL 水中, 用固体 NaOH 调 pH 至 8.0, 定容至 1 000 mL, 高压灭菌。

B.1.2 1 mol/L Tris-HCl 溶液: 60.55 g Tris 碱溶于适量水中, 加 HCl 调 pH 至 8.0, 定容至 500 mL, 高压灭菌。

B.1.3 0.5 mol/L HCl 溶液: 25 mL 浓盐酸(36%~38%), 加水定容至 500 mL。

B.1.4 DNA 提取液 1:1 mol/L Tris-HCl 50 mL, 0.5 mol/L EDTA 50 mL, 5 mol/L NaCl 50 mL, SDS 7.5 g, 定容至 500 mL。

B.1.5 DNA 提取液 2:2 g 固体 NaOH 溶于水中, 加水定容至 500 mL。

B.1.6 TE 缓冲液 1:1 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。

B.1.7 TE 缓冲液 2:1 mol/L Tris-HCl 5 mL, 0.5 mol/L EDTA 1 mL, 0.5 mol/L HCl 100 mL, 定容至 500 mL。

B.1.8 5 mol/L NaCl 溶液: 146 g 固体 NaCl 溶于水中, 加水定容至 500 mL。

B.2 PCR 扩增溶液的配制

B.2.1 dNTP: 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 720 μL 定容至终浓度 2.5 mmol/L each 的工作液。

B.2.2 SSR 引物: 用超纯水分别配制前引物和后引物终浓度均 40 $\mu\text{mol/L}$ 的储存液, 等体积混合成 20 $\mu\text{mol/L}$ 的工作液。注: 干粉配制前应首先快速离心。

B.2.3 6 \times 加样缓冲液: 去离子甲酰胺 49 mL, 0.5 mol/L 的 EDTA 溶液(pH8.0) 1 mL, 溴酚兰 0.125 g, 二甲苯青 0.125 g。

B.3 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳溶液的配制

B.3.1 40% PAGE 胶: 丙烯酰胺 190 g 和甲叉双丙烯酰胺 10 g, 定容至 500 mL。

B.3.2 4.5% PAGE 胶: 尿素 450 g, 10 \times TBE 缓冲液 100 mL, 40% PAGE 胶 112.5 mL, 定容至 1 000 mL。

B.3.3 Bind 缓冲液: 49.75 mL 无水乙醇和 250 μL 冰醋酸, 加水定容至 50 mL。

B.3.4 亲和硅烷工作液: 在 1 mL Bind 缓冲液中加入 5 μL Bind 原液, 混匀。

B.3.5 剥离硅烷工作液: 2% 二甲基二氯硅烷。

B.3.6 25% 过硫酸铵溶液: 0.25 g 过硫酸铵溶于 1 mL 超纯水中。

B.3.7 10 \times TBE 缓冲液: Tris 碱 108 g, 硼酸 55 g, 0.5 mol/L EDTA 溶液 37 mL, 定容至 1 000 mL。

B.3.8 1 \times TBE 缓冲液: 10 \times TBE 缓冲液 500 mL, 加水定容至 5 000 mL。

B.4 银染溶液的配制

B.4.1 固定液:100 mL 冰醋酸,加水定容至 1 000 mL。

B.4.2 染色液:2 g 硝酸银,加水定容至 1 000 mL。

B.4.3 显影液:1 000 mL 蒸馏水中加入 30 g 氢氧化钠和 5 mL 甲醛。

附录 C
(规范性附录)
基本核心引物名单

编号	引物名称	染色体位置	引物序列
P 01	bnlg 439	1.03	Left End: TTGACATCGCCATCTTGGTGACCA Right End: TCTTAATGCGATCGTACGAAGTTGTGGAA
P 02	bnlg 2331	1.11	Left End: TCTGATATCATAAAGGAGGACCG Right End: GGAGCTTGCGCTTTTAAACA
P 03	bnlg 125	2.02	Left End: GGGACAAAAGAAGAAGCAGAG Right End: GAAATGGGACAGAGACAGACAAT
P 04	mmc 0191	2.07	Left End: GGTGTTTCAGTGTGAAAGGTTA Right End: AAGATTTCCGCAAGGTTAAAC
P 05	umc 2105	3.00	Left End: ACATACATAGGCTCCCTTTTTCCG Right End: TCCCGTGACACTCTCTTTCTCTCT
P 06	bnlg 1496	3.09	Left End: CTGGGCAGACAGCAACAGTA Right End: AGCCAAAGACATGATGGTCC
P 07	phi 072	4.00	Left End: ACCGTGCATGATTAATTTCTCCAGCCTT Right End: GACAGCGCGCAAATGGATTGAACT
P 08	bnlg 2291	4.06	Left End: CCTCTCGATGTTCTGAAGCC Right End: GTCATAACCTTGCTCCCAA
P 09	umc 1705	5.03	Left End: ATCTCACGTACGGTAATGCAGACA Right End: CATGACCTGATAAACCTCCTCTCT
P 10	umc 1225	5.08	Left End: CTAGCTCCGTGTGAGTGAGTGAGT Right End: TTCCTTCTTTCTTTCTGTGCAAC
P 11	bnlg 161	6.00	Left End: GCTTTTCGTCATACACACACATTCA Right End: ATGGAGCATGAGCTTGCATATTT
P 12	phi 299852	6.07	Left End: GATGTGGGTGCTACGAGCC Right End: AGATCTCGGAGCTCGGCTA
P 13	bnlg 1792	7.02	Left End: CGGGAATGAATAAGCCAAGA Right End: GCGCTCCTTCACCTTCTTTA
P 14	phi 116	7.06	Left End: GCATACGGCCATGGATGGGA Right End: TCCCTGCCGGGACTCCTG
P 15	umc 1741	8.03	Left End: AGACGAACCCACCATCATCTTTC Right End: CGCTTGGCATCTCCATGTATATCT
P 16	phi 080	8.08	Left End: CACCCGATGCAACTTGGGTAGA Right End: TCGTCACGTTCCACGACATCAC

附录 C (续)

编号	引物名称	染色体位置	引物序列
P 17	phi 065	9.03	Left End:AGGGACAAATACGTGGAGACACAG Right End:CGATCTGCACAAAGTGGAGTAGTC
P 18	bnlg 1191	9.07	Left End:AATCATGCGTAGGCGTAGCT Right End:GCCAGAGGAAAAAGAAGGCT
P 19	umc 2163	10.04	Left End:AAGCGGGAATCTGAATCTTTGTTC Right End:GAAATTGCTGGGGTTCTCATTCT
P 20	bnlg 1450	10.07	Left End:ACAGCTCTTCTTGGCATCGT Right End:GACTTTGCTGGTCAGCTGGT

附录 D
(资料性附录)
玉米品种 DNA 指纹鉴定报告书

鉴定品种编号		对照品种编号	
鉴定品种名称		对照品种名称	
委托单位			
依据标准			
审批机关			
测试单位		测试日期	
报告完成地点和日期			
DNA 指纹鉴定结果和结论: 检测引物数量: 差异位点数量: 结论:			
评语:			
制表人:		鉴定单位名称(公章)	

审核人:

批准人:
