ICS 65.020.01
B 04

NY

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 2473—2013

结球甘蓝品种鉴定技术规程 SSR分子标记法

Protocol for identification of cabbage varieties—SSR marker method

2013-12-13 发布　　2014-04-01 实施

中华人民共和国农业部 发布

目　　次

前言 …… Ⅱ
1　范围 …… 1
2　规范性引用文件 …… 1
3　原理 …… 1
4　仪器设备及试剂 …… 1
5　溶液配制 …… 1
6　引物 …… 1
7　参照品种及其使用 …… 1
8　操作程序 …… 1
9　等位基因数据采集 …… 3
10　判定标准 …… 4
附录 A(规范性附录)　主要仪器设备及试剂 …… 5
附录 B(规范性附录)　溶液配制 …… 7
附录 C(规范性附录)　核心引物 …… 8

前　言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

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。

本标准由农业部种子管理局提出。

本标准由全国植物新品种测试标准化技术委员会(SAC/TC 277)归口。

本标准起草单位:农业部科技发展中心、中国农业科学院蔬菜花卉研究所。

本标准主要起草人:庄木、堵苑苑、张扬勇、王庆彪、方智远、杨丽梅、刘玉梅。

结球甘蓝品种鉴定技术规程　SSR 分子标记法

1　范围

本标准规定了利用简单重复序列(SSR)分子标记进行结球甘蓝(*Brassica oleracea* L. var. *capitata*)品种鉴定的试验方法、数据记录格式及判定标准。

本标准适用于结球甘蓝品种的 DNA 指纹数据的采集和 DNA 指纹鉴定。

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 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　原理

简单重复序列(SSR)分布于结球甘蓝整个基因组的不同位置上，不同品种每个位点上重复单位的数目及序列可能不同。由于每个简单重复序列两侧的序列是高度保守和单拷贝的，因而可根据其两侧的序列设计一对特异引物，利用 PCR 技术对重复序列进行扩增，得到的 PCR 产物在电泳过程中的电荷效应作用下得到良好的分离，经硝酸银染色或者荧光染料标记检测区分开。由于不同结球甘蓝品种遗传组成不同，所以，根据引物 DNA 序列存在差异或引物结合部位之间的 DNA 片段大小存在差异，即可鉴定结球甘蓝品种。

4　仪器设备及试剂

仪器设备及试剂见附录 A。

5　溶液配制

本标准所用试剂为分析纯，所用水应符合 GB/T 6682 中规定的要求。溶液配制方法见附录 B。

6　引物

基本核心引物见附录 C。

7　参照品种及其使用

参照品种的名称见附录 C。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。

注 1：多个品种在某一 SSR 位点上可能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附录 C 中的参照品种使用。

注 2：同一名称不同来源的参照品种的某一位点上的等位变异可能不相同，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 C 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。

8　操作程序

8.1　样品准备

8.1.1 送检样品可为种子、幼叶或其他组织。

8.1.2 每份样品中至少随机抽取 10 个个体，混合分析。对一致性差的样品，应分别随机抽取 20 个以上的个体，每个个体单独分析。

8.2 DNA 提取

提取 DNA 可采用以下方法：

a) 选取适量(0.2 g 左右)植物组织置于 2.0 mL 离心管中，用液氮研磨至粉末；

b) 离心管中加入 700 μL 预热 2% CTAB 缓冲液，轻摇混匀；

c) 65℃水浴 15 min，每隔 5 min 轻摇 1 次；

d) 冷却后加入 700 μL 氯仿—异戊醇(24∶1)混合液，混匀 5 min；

e) 12 000 *g* 离心 15 min；

f) 吸取上清液到 2 mL 的离心管中，加入 700 μL 预冷异丙醇，混匀后放 4℃沉淀 1 h；

g) 12 000 *g* 离心 15 min；

h) 弃上清，75%乙醇洗涤后晾干；

i) 加入 300 μL ddH_2O，6 μL RNAase，37℃水浴 1 h；

j) 待充分溶解后，用 1%琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的浓度和纯度；

k) 稀释成工作液或−20℃保存备用。

注：以上为推荐的一种 DNA 提取方法。所获 DNA 质量能够符合 PCR 扩增需要的 DNA 提取方法都适用于本标准。

8.3 PCR 扩增

8.3.1 反应体系

反应液体积为 20 μL，反应组分配制见表 1。DNA 分析仪检测时使用荧光标记的正向引物，每种引物的荧光染料种类见附录 C。

表 1 PCR 扩增反应体系

反应组分	终浓度	反应体积(μL)
10×Buffer(含氯化镁 15 mmol/L)	1×	1
dNTP(2.5 mmol/L each)	200 μmol/L	1.6
正向引物(10 μmol/L)	0.25 μmol/L	0.5
正向引物(10 μmol/L)	0.25 μmol/L	0.5
Taq 酶(5 U/μL)	1 U	0.2
DNA(20 ng/μL)	60 ng	3
ddH_2O		13.2
注：反应体积可以根据需要调整。		

8.3.2 反应程序

94℃预变性 4 min；94℃变性 30 s，合适的退火温度 30 s；72℃延伸 45 s；共 35 个循环；72℃延伸 7 min；4℃保存。退火温度可根据表 C.1 推荐的引物退火温度设定。

8.4 等位基因检测

8.4.1 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳与银染检测

8.4.1.1 清洗玻璃板

将长、短玻璃板清洗干净，用去离子水冲洗后晾干。用无水乙醇擦洗 2 遍，吸水纸擦干。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。

8.4.1.2 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。

8.4.1.3 灌胶

取 60 mL 6%的变性聚丙烯酰胺胶（根据不同型号的电泳槽确定胶的用量和合适的灌胶方式），300 μL APS 和 60 μL TEMED 轻轻混匀，把板的一边抬起，将胶缓缓地灌入。当胶到底部后将板放置水平，将梳子平端插入适当的位置，聚合 1h 后用于电泳。灌胶过程中应防止出现气泡。

8.4.1.4 预电泳

将梳子小心拔出，并把碎胶清理干净，然后擦干净玻璃板，将电泳槽装配好后，在电泳槽中加入 1× TBE。在恒功率 80 W 条件下预电泳 20 min～30 min。

8.4.1.5 变性

在 PCR 产物中加入 10 μL 6×加样缓冲液，混匀后，在 PCR 仪上 95℃变性 5 min，取出，迅速置于碎冰上，冷却 10 min 以上。

8.4.1.6 电泳

预电泳结束后，将胶面的气泡及杂质吹打干净，将梳子轻轻插入，梳子齿的深度为刚进入胶面约 1 mm。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）到达胶板的中下部（约 1.5 h）。电泳结束后，小心分开两块玻璃板，凝胶会紧贴在长板上。

8.4.1.7 银染（快速银染法）

a) 固定：带凝胶长板在固定液中轻轻晃动 6 min，固定液回收待用；
b) 染色：染色液中轻轻摇晃 6 min；
c) 漂洗：蒸馏水快速漂洗，30 s；
d) 显影：显影液中轻轻晃动至带纹出现，6 min～8 min；
e) 定影：用回收的固定液定影 2 min；
f) 漂洗：蒸馏水漂洗 1 min。

8.4.2 DNA 分析仪检测

8.4.2.1 样品准备

将带有荧光标记的 PCR 产物稀释到合适的检测浓度。不同荧光标记的扩增产物的最适稀释倍数可以通过预试验确定，一般 6 - FAM 和 HEX 荧光标记的 PCR 产物用超纯水稀释 30 倍，TAMRA 和 ROX 荧光标记的 PCR 产物稀释 10 倍。

分别取等体积的上述 4 种稀释后溶液混合，从混合液中吸取 1 μL 加入到 DNA 分析仪专用深孔板孔中。板中各孔分别加入 0.1 μL LIZ500 分子量内标和 8.9 μL 去离子甲酰胺。除待测样品外，还应同时包括参照品种的扩增产物。将样品在 PCR 仪上 95℃变性 5 min，立即取出置于冰浴中，冷却 10 min 以上。瞬时离心后，准备上机器进行毛细管电泳。

8.4.2.2 开机准备

打开 DNA 分析仪，检查仪器工作状态，更换缓冲液，灌胶。将装有样品的深孔板置放于样品架基座上。打开数据收集软件。

8.4.2.3 编板

按照仪器操作程序，创建电泳板，输入电泳板名称，选择适合的程序和电泳板类型，输入样品编号或名称。

8.4.2.4 运行程序

运行程序。DNA 分析仪自动将毛细管电泳数据、运行参数等存放在仪器中。

9 等位基因数据采集

9.1 数据格式

样品每个 SSR 位点的等位基因采用扩增片段大小的形式表示。如同一品种不同个体间等位基因扩增片段大小存在差异，以多数个体共同的等位基因扩增片段大小表示。

9.2 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳与银染检测

将待测样品扩增片段的带型和泳动位置与对应的参照品种进行比较，与待测样品相同的参照品种的片段大小即为待测样品该引物位点的等位基因扩增片段大小。

9.3 毛细管电泳荧光检测

使用 DNA 分析仪的片段分析软件，读出每个位点每个样品的等位基因扩增片段大小数据。通过使用参照品种，消除同型号不同批次间或不同型号 DNA 分析仪间可能存在的系统误差。比较参照品种的等位基因扩增片段大小数据与表 C.1 中的数据。如两者不一致，其差数即是系统误差的大小。从待测样品的等位基因扩增片段数据中去除该系统误差，获得的数据即为待测样品的等位基因扩增片段大小。

9.4 结果记录

纯合位点的等位基因扩增片段数据记录为 XXX/XXX，其中 XXX 为该位点等位基因扩增片段大小；杂合位点的等位基因扩增片段数据记录为 XXX/YYY，其中 XXX、YYY 分别为该位点上两个不同的等位基因，小片段数据在前，大片段数据在后；无效位点的等位基因数据记录为 0/0。

示例 1：

一个品种的一个 SSR 位点为纯合位点，等位基因扩增片段大小为 120 bp，则该品种在该位点上的等位基因扩增片段数据记录为 120/120。

示例 2：

一个品种的一个 SSR 位点为杂合位点，两个等位基因扩增片段大小分别为 120 bp、126 bp，则该品种在该位点上的等位基因扩增片段数据记录为 120/126。

10 判定标准

品种鉴定包括对两个或两个以上的品种同时进行检测（“直接比较”）和对待测品种进行检测后利用其检测数据和数据库中品种的数据进行比对（“数据库比较”）两种情况。后者也适用于新品种测试中利用 SSR 标记选择近似品种的情况。

10.1 直接比较

用附录 C 中 20 对基本核心引物检测，获得待测品种在这些引物位点的等位基因数据，利用这些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。

对于 b)和 c)的两种情况，应按照 GB/T 19557.1 给出的原则进行田间试验，确定品种间在形态性状上是否存在明显差异。

10.2 数据库比较

先用附录 C 中 20 对基本核心引物检测，获得待测品种在上述引物位点的等位基因数据，利用这些数据和数据库中品种进行比较：

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。

对于 b)和 c)的两种情况，将这些相近品种或疑同品种与待测品种按照 11.1 的方法进行鉴定。

附 录 A
（规范性附录）
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 测序电泳槽及配套的制胶附件。

A.1.3 高压电泳仪。

A.1.4 水平摇床。

A.1.5 胶片观察灯箱。

A.1.6 电子天平（量程为 1 000 mg、100 g、600 g）。

A.1.7 微量移液器。

A.1.8 磁力搅拌器。

A.1.9 高压灭菌锅。

A.1.10 酸度计。

A.1.11 台式高速离心机。

A.1.12 制冰机。

A.1.13 凝胶成像系统或紫外透射仪。

A.1.14 DNA 分析仪：基于毛细管电泳，有 DNA 片段分析功能和数据分析软件，能够分辨 1 个核苷酸的差异。

A.1.15 水浴锅或金属浴：控温精度±1℃。

A.1.16 冰箱：最低温度−20℃。

A.1.17 紫外分光光度计：波长 260 nm 及 280 nm。

A.2 试剂

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 Taq DNA 聚合酶 10×Buffer。

A.2.6 四种脱氧核苷酸：（dATP、dTTP、dCTP、dGTP）。

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 蔗糖。
A.2.14 甲叉双丙烯酰胺。
A.2.15 丙烯酰胺。
A.2.16 硼酸。
A.2.17 尿素。
A.2.18 亲和硅烷。
A.2.19 剥离硅烷。
A.2.20 无水乙醇。
A.2.21 四甲基乙二胺(TEMED)。
A.2.22 过硫酸铵。
A.2.23 冰醋酸。
A.2.24 硝酸银。
A.2.25 甲醛溶液。
A.2.26 CTAB。
A.2.27 PVP。
A.2.28 氯仿。
A.2.29 异戊醇。
A.2.30 异丙醇。
A.2.31 RNA 酶。
A.2.32 琼脂糖。
A.2.33 液氮。
A.2.34 LIZ-500 分子量内标。
A.2.35 POP-4 胶。
A.2.36 DNA 分析仪专用电泳缓冲液。

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 EDTA - $Na_2 \cdot 2H_2O$ 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 2% CTAB：CTAB 20 g、NaCl 81.816 g、PVP 20 g、1 mol/L Tris - HCl 溶液（pH8.0）100 mL、0.5 mol/L EDTA 溶液（pH8.0）40 mL，定容至 1 000 mL。

B.1.5 5 mol/L NaCl 溶液：146 g 固体 NaCl 溶于水中，加水定容至 500 mL。

B.1.6 氯仿—异戊醇（24∶1）：取 240 mL 氯仿和 10 mL 异戊醇，混匀。

B.2 PCR 扩增溶液的配制

B.2.1 SSR 引物：用超纯水分别配制前引物和后引物终浓度均为 10 μmol/L 的储存液，各取 10 μL 混合。

注：干粉配制前应首先快速离心。

B.2.2 6×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，溴酚蓝 0.125 g，二甲苯青 0.125 g，蔗糖 40 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 6.0% PAGE 胶：尿素 420 g、10×TBE 缓冲液 100 mL、40% PAGE 胶 150 mL，定容至 1 000 mL。

B.3.3 Binding 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 Binding 缓冲液中加入 5 μL Binding 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 10%过硫酸铵溶液：10 g 过硫酸铵加水定容至 100 mL，分装到 2 mL 离心管中，在 4℃最多保存 2 周～3 周，若需长期保存应置于－20℃环境下。

B.3.7 10×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×TBE 缓冲液：10×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：200 mL 无水乙醇、10 mL 冰醋酸，加水定容至 1 000 mL。

B.4.2 染色液：3 g 硝酸银、3 mL 甲醛，加水定容至 2 000 mL。

B.4.3 显影液：2 000 mL 蒸馏水中加入 30 g 氢氧化钠和 4 mL 甲醛。

附 录 C
（规范性附录）
核 心 引 物

核心引物见表 C.1。

表 C.1 核心引物目录

位点	染色体	引物序列(5′→3′)	荧光标记	退火温度 ℃	等位基因 bp	参照品种
BoE188	1	F:CGACGATGGCGAGGAAACA R:CACATAACCCAAATACCCAAATCA	5′HEX	58	238 247	秋甘 4 号 中甘 21
BoE607	1	F:TCTATTCACAACGATTCAACTAAC R:CGGTACGGCTGGCTCTT	5′TAMRA	55	179 185 194 197 203	秋甘 1 号 中甘 18 号 怡春 争春 中甘 21
BoE162	2	F:AGCAGCTTCGTTCAATCTCC R:CGGCAGCGTATACCTTCACA	5′6-FAM	58	270 283 292 296	惠丰 7 号 苏甘 8 号 中甘 21 中甘 8 号
BoE966	2	F:TCGAATAAAGAAGAAAAAGAAGA R:TAATCCCTGGTAAGAGTAGT	5′ROX	55	236 244 252	春甘 2 号 秋甘 4 号 中甘 192
BoE222	3	F:ACTACCCTCTCCGTTTACTCCACA R:GCCCCATAGCTTTCTCAA	5′HEX	55	160 178	豫生早熟牛心 中甘 16 号
BoE718	3	F:CAAGAAACGGACGTGGTGAAAG R:TCTCGCGTATGGGGCTGTCT	5′TAMRA	55	184 190 196	中甘 18 号 中甘 10 号 夏光
BoE002	4	F:CGTCACGGTGGCGCTTTATTTT R:ACGACGTCGCCGCACTGAAC	5′6-FAM	58	180 190	京丰一号 争春
BoE450	4	F:TCTCGCCATGGCTGATAAG R:TCGGGGCGTTGATTCTCGTCTCT	5′TAMRA	55	165 171 174	瑞甘 55 8398 中甘 96
BoE882	5	F:CCGCTTCTTCCTTGCCTTCCT R:TTCGCCAGTAGATCCCCGTAATG	5′ROX	52	172 175 181	苏晨一号 中甘 21 春丰
BoE699	5	F:TCCCCACCCCCAAAAAGAGA R:AACGAGCCATCCGAAGAAGAGG	5′TAMRA	58	229 233 243	瑞甘 55 中甘 18 号 惠丰 5 号
BoE379	6	F:GCGGGGACTCTACCTCTA R:AGCAGCTCAGCATACAAG	5′TAMRA	52	143 151 160 162 164	豫生早熟牛心 秋甘 1 号 春甘 2 号 京丰一号 8398
BoE761	6	F:CATTCAGCGACTTCCTTCAAACTT R:GGCGCACTTCTTCCCCTGTA	5′ROX	55	174 180	西园四号 中甘 21

表 C.1（续）

位点	染色体	引物序列(5′→3′)	荧光标记	退火温度 ℃	等位基因 bp	参照品种
BoE723	7	F:CGTTGAGGCCGAGAGTGAGAG R:ATGGACGCCGGAAATGAGAA	5′ROX	55	158 161 167 180 182	西园四号 春甘 2 号 争春 中甘 21 秋甘 4 号
BoE209	7	F:ATCTATCCCATCCGCTCGTCA R:AACCCCTATTCGCTTACTCC	5′HEX	55	224 226 229	京丰一号 惠丰 4 号 夏光
BoE875	7	F:CCGACAATGGCTGGAGTAGG R:GATAAGCCGGTAGAGCATAAGGAG	5′ROX	55	184 189	苏甘 8 号 中甘 18 号
BoE237	7	F:AATCCCGAAAAGAGCGAAACC R:CTGGGGAGCCGAGAAGGAG	5′HEX	55	141 147	中甘 21 京丰一号
BoE134	8	F:CTCTTATTTCTTGTAGGGCTTTTA R:CCGTTGGAGATGACTGACTG	5′HEX	55	210 222	中甘 18 号 春丰
BoE734	8	F:TCATCCAAAGAAATCAGAGG R:ACAGGGAGAAAGAAAAAGAGA	5′TAMRA	52	217 223 229	争牛 苏甘 20 号 西园四号
BoE051	9	F:GAGTCTTCGTCTTCTTCTTCC R:AGTCGCCATTATTAACACCTCTA	5′6-FAM	55	169 178 187	苏甘 8 号 豫甘 5 号 中甘 18 号
BoE917	未知	F:AACAACCCTTTCCTGACAC R:AAAAACCAAAGAACTACAAAATA	5′ROX	55	248 252	中甘 8 号 中甘 192
注:等位基因片段大小为在 ABI3130XL 测序仪使用推荐荧光标记扩增后获得。						