

湖南省农业技术规程

HNZ092-2015

杂交棉种子纯度检测（SSR 分子标记法） 技术规程

Technical regulations for purity verification of hybrid cotton
seed with SSR molecular marker

湖南省农业农村厅发布

发布日期：2015年12月31日

杂交棉种子纯度检测（SSR 分子标记法）

技术规程

为规范杂交棉种子纯度 SSR 分子标记的检测技术，制订本规程。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。

1 仪器和试剂

1.1 仪器和用具

- 1.1.1 PCR 仪，
- 1.1.2 低温高速离心机，
- 1.1.3 PCR 板离心机，
- 1.1.4 电泳仪及配套电泳槽，
- 1.1.5 观片灯，
- 1.1.6 冰箱（ $-20^{\circ}\text{C}\sim 4^{\circ}\text{C}$ ），
- 1.1.7 恒温水浴锅（ 65°C ），
- 1.1.8 涡旋仪，
- 1.1.9 高压灭菌锅，
- 1.1.10 液氮罐，
- 1.1.11 脱色摇床，
- 1.1.12 混合型震荡研磨仪，
- 1.1.13 真空浓缩冻干系统，
- 1.1.14 微量移液器（ $0.1\ \mu\text{L}\sim 2.5\ \mu\text{L}$ 、 $2\ \mu\text{L}\sim 20\ \mu\text{L}$ 、 $10\ \mu\text{L}\sim 100\ \mu\text{L}$ 、 $100\ \mu\text{L}\sim 1000\ \mu\text{L}$ ），
- 1.1.15 12 道移液器（ $0.5\ \mu\text{L}\sim 10\ \mu\text{L}$ ）
- 1.1.15 其他用具：PCR 板，天平，量筒等

1.2 试剂

- 1.2.1 常用贮备液：见附件 1
- 1.2.2 DNA 提取试剂：见附件 2
- 1.2.3 聚丙烯酰胺凝胶电泳试剂：见附件 3
- 1.2.4 银染试剂：见附件 4
- 1.2.5 SSR（简单重复序列）标记引物：见附件 5
- 1.2.6 Taq DNA 聚合酶（Taq DNA Polymerase）和配套的 PCR 缓冲液
- 1.2.7 DNA Marker（ $50\ \text{bp}\sim 500\ \text{bp}$ ）
- 1.2.8 β -巯基乙醇
- 1.2.9 四甲基二乙胺（TEMED）

1.2.10 异丙醇

1.2.11 乙醇（70%、95%、100%）

1.2.12 灭菌双蒸水（ddH₂O）

2 材料

2.1 取样

取待测样品种子，按照 NY/T 1385-2007 要求的方法，于光照培养箱中培养（根据种子发芽率，保证最后能取到 30 株幼苗）。

2.2 样品保存

取 30 株幼苗子叶，分别保存于-80℃冰箱内。

3 程序

3.1 总 DNA 提取（CTAB 法）

3.1.1 加 2% β-巯基乙醇于 DNA 提取液（见附件 2）中，并置于 65℃ 水浴预热半小时以上；称取样品子叶 0.1 g 置于 2.0 mL 离心管中，加入 800 μL DNA 提取液，由混合型震荡研磨仪迅速磨成浆。

3.1.2 置 65℃ 水浴 2 h，期间混匀几次。

3.1.3 加入 900 μL 三氯甲烷-异戊醇（24:1）混合液（见附件 2），盖上盖后摇匀 30-50 次（轻缓上下颠倒混匀，直到管中颜色泛白），12000 r/min 离心 15 min。

3.1.4 取上清（用剪过的吸头吸取）于 1.5 mL 离心管中，加入等体积的三氯甲烷-异戊醇（24:1）混合液，重新抽提一次，方法与 3.1.3 相同。

3.1.5 取上清（用剪过的吸头吸取）于 1.5 mL 离心管中，加入 60% 预冷异丙醇，立即轻缓地上下颠倒，直至有絮状沉淀析出，然后于-20℃冰箱放置 20~40 min。

3.1.6 用枪头挑出白色絮状沉淀于 1.5 mL 离心管中，加入 1 mL 乙醇（浓度为 70%），轻轻上下颠倒清洗沉淀，然后静置 1 min，倒掉乙醇。

3.1.7 用 1 mL 乙醇（浓度为 70%）重新清洗一遍。

3.1.8 用无水乙醇清洗一遍。

3.1.9 倒掉无水乙醇后，12000 r/min 离心 5 min，用枪头吸去乙醇。

3.1.10 置于浓缩冻干系统冻干 DNA。

3.1.11 加入 30 μL ddH₂O 溶解 DNA。（4℃短期保存，-20℃长期保存。）

3.2 PCR 反应

3.2.1 PCR 反应体系

按表 1 所列成分和用量，依次加入，准备 PCR 反应体系。

表1 PCR 反应体系（供 1 个样品、1 对 SSR 引物检测）

成分	用量 (μL)
ddH ₂ O	5.9
10×PCR buffer(含 20 mmol/L Mg ²⁺)	1.0
dNTP(2.5 mmol/L each)	0.5
正向引物 F (5 μmol/L)	0.25
反向引物 R (5 μmol/L)	0.25
Taq DNA 聚合酶	0.1
DNA 模板	2
总体积	10

3.2.2 反应程序

在 PCR 仪上按表 2 设置反应程序。

表2 PCR 反应程序

程序	时间
94℃ 预变性	3 min
94℃ 变性	45 s
57℃ 退火	45 s
72℃ 延伸	1 min
循环次数	30 次
72℃ 延伸	5 min
4℃ 终止反应	-

3.2.3 加入上样缓冲液

PCR 结束后, 于 10 μL 反应体系中加入 2 μL 6 倍聚蔗糖上样缓冲液 (见附件 3), 以 3000 r/min 离心 10 s, 然后将 PCR 底部轻触运转的振荡器混匀, 置于 4℃ 冰箱待跑电泳。

3.3 聚丙烯酰胺凝胶电泳

3.3.1 电泳玻璃板清洗

新玻璃用浓度为 30% 的 NaOH 溶液浸泡过夜, 然后用蒸馏水冲洗。以后用过的玻璃用洗涤剂清洗即可, 置于玻璃架上晾干。

3.3.2 胶槽装配

将长板、短板装配好 (长板在外, 短板在里), 然后用琼脂糖胶 (1.5%) 将周边封好 (Bio-Rad 垂直板电泳设备可不用封胶)。

3.3.3 灌胶

将配制好的 8% 的聚丙烯酰胺凝胶（见附件 3）注入胶槽，至短板高度，然后迅速插入梳子，避免胶内形成气泡，室温下放置聚合 2 h 以上，以便凝胶完全凝固。

3.3.4 电泳

待凝胶完全凝固后，将胶板装入电泳槽中，注入 1×TBE（5×TBE 稀释 5 倍，见附件 1），没过短板，然后小心平行向上拔出梳子。将已经加入 6 倍聚蔗糖凝胶上样液（见附件 3）的 PCR 产物 0.8 μL~1.2 μL 小心注入每个点样孔中，并在胶板的一侧或适当位置加入 0.5 μL 的 DNA Marker。以 200 V 的电压电泳 45 min 左右，或电泳至上样缓冲液中示踪染料的第一条带迁移至胶板底部为止。

3.4 银染

3.4.1 固定

从电泳槽中取出胶槽，拧松螺丝，取出胶板，先取下短板，然后在胶上做好标记，去掉琼脂糖凝胶，将胶放入装有适量固定液（见附件 4）的塑料方盆中，然后将塑料方盆放在脱色摇床上轻轻水平摇动 5~6 min。倒掉固定液，用蒸馏水漂洗 2~3 次。

3.4.2 染色

加入适量硝酸银染色液（见附件 4），摇床上缓慢水平摇动 12 min。倒掉染色液，用蒸馏水漂洗 2~3 次（时间不宜太长，每次 4~5 s）。

3.4.3 显色

加入适量显色液（见附件 4），摇床上缓慢水平摇动，直至清楚显影。倒掉显色液，用蒸馏水漂洗两次。

3.4.4 记录

将胶拿出展平放在观片灯上观察和记录电泳结果，拍照。

4 结果记录和分析

4.1 SSR 标记结果记录

参照 DNA Marker 电泳结果，采用 0、1 系统记录谱带位置，观察某一扩增条带的有无，有带记为 1，无带记为 0。建立 SSR 引物、检测样品以及有无对应扩增条带的数据库。

4.2 SSR 标记结果分析

利用统计分析软件 NTSYSp2.1，根据 Nei（1973）的遗传相似系数（Genetic Similarity, GS），按式 1 计算检测样品间的遗传相似性水平。采用非加权组平均法（unweighted pair-group method with arithmetic means, UPGMA）进行聚类分析；绘制聚类分析结果图，显示 SSR 标记分析的直观结果。

$$\text{式 1 : } GS = \frac{2N_{ij}}{N_i + N_j} \times 100\%$$

式中：

GS —遗传相似系数，%

N_i —第 i 个样品的扩增条带数

N_j —第 j 个样品的扩增条带数

N_{ij} —第 i 个样品和第 j 个样品共有的扩增条带数

5 鉴定结果判定

根据聚类分析结果，如在本标准要求的 16 个 SSR 标记位点上，所有检测样品间的遗传相似性为 100%，即棉花种子纯度 (P) 为 100%。如没有 100% 的遗传相似性，则根据有差异的检测样品数 (S) 占总抽样检测样品数量 ($T=30$) 的百分比来判定种子纯度 (式 2)。

$$\text{式 2: } P = \left(1 - \frac{S}{T}\right) \times 100\%$$

式中：

P —种子纯度，%

S —有差异的检测样品数量

T —总抽样检测样品数量

6 结果记录与保存

实验结果需保存原始的电泳图、读带记录表，标明待测样品送检日期、送检单位、实验操作人员和检测日期、检测方法、检测结果。

7 引用和参考资料

NY/T 1385-2007 棉花种子快速发芽试验方法。

编写单位：湖南省棉花科学研究所

编写人员：蒋杰 张志刚 贺云新 陈浩东 梅正鼎 李彩红 李玉芳

附件 1

常用贮备液

1.1 1.0 mol/L Tris 母液 (pH8.0, 1000 mL)

成分	用量	备注
Tris 碱	121.1 g	
灭菌双蒸水 (dd H ₂ O)	800 mL	
37%浓盐酸	42 mL	用约 42 mL 浓盐酸调节 pH 至 8.0
总体积	1000 mL	高温高压灭菌, 4℃保存

1.2 0.5 mol/L 乙二胺四乙酸贮备液 (EDTA 贮备液) (pH8.0, 1000 mL)

成分	用量	备注
乙二胺四乙酸 (Na ₂ EDTA·2H ₂ O)	186.1 g	
NaOH	20 g	
灭菌双蒸水 (dd H ₂ O)	800 mL	用 NaOH 溶液调节 pH 至 8.0
总体积	1000 mL	高温高压灭菌, 4℃保存

1.3 5 倍三羟甲基氨基甲烷-硼酸-乙二胺四乙酸缓冲液 (5×TBE 缓冲液) (pH8.0, 1000mL)

成分	用量	备注
Tris 碱	54 g	
硼酸	27.5 g	
0.5 mol/L EDTA (pH8.0)	20 mL	
灭菌双蒸水 (dd H ₂ O)	800 mL	用 dd H ₂ O 定容至 1000 mL
总体积	1000 mL	室温保存

附件 2:

DNA 提取试剂

2.1 DNA 提取液

成分	用量	备注
1.0 mol/L Tris	100 mL	
0.5 mol/L Na ₂ -EDTA	40 mL	
NaCl	87.75 g	
CTAB	20 g	
PVP40	20 g	
β-巯基乙醇（使用前加入）	20 mL	
总体积	1000 mL	加β-巯基乙醇前高温高压灭菌, 4℃保存

2.2 三氯甲烷-异戊醇混合液（24:1，100 mL）

成分	用量	备注
三氯甲烷	96 mL	
异戊醇	4 mL	
总体积	100 mL	4℃保存

附件 3

聚丙烯酰胺凝胶电泳试剂

3.1 30%丙烯酰胺母液(100 mL)

成分	用量	备注
丙烯酰胺	29 g	
亚甲基双丙烯酰胺	1 g	
灭菌双蒸水 (dd H ₂ O)	60 mL	
总体积	定容至 100 mL	高温高压灭菌, 4℃保存

3.2 6 倍聚蔗糖凝胶上样液 (10 mL)

成分及终浓度	10 mL 溶液	备注
0.15%溴酚蓝	1.5 mL 1 % 溴酚蓝	
0.15 % 二甲苯青 FF	1.5 mL 1 % 二甲苯青 FF	
5mol/L EDTA	100 mL 0.5mol/L EDTA	
15 % 聚蔗糖 (400 型)	1.5 g	
灭菌双蒸水 (dd H ₂ O)	补足至 10 ml	室温保存

3.3 10%过硫酸铵 (AP) (50mL)

成分	用量	备注
过硫酸铵	5 g	
灭菌双蒸水 (dd H ₂ O)	50 mL	4℃保存

3.4 8%聚丙烯酰胺凝胶配置

成分	1 板用量	备注
30%丙烯酰胺母液	5.4 mL	
5×TBE	4 mL	
超纯水	10.6 mL	
10% AP	360 μL	
TEMED	14.1 μL	灌胶前加入, 迅速混均
总体积	20 mL	混匀后迅速倒入胶槽, 避免胶凝固

附件 4:

银染试剂

4.1 固定液（12 块胶用量）

成分	用量	备注
d H ₂ O	900 mL	
95%乙醇	100 mL	
10%乙酸	8 mL	现配

4.2 硝酸银染色液（12 块胶用量）

成分	用量	备注
d H ₂ O	900 mL	
硝酸银固体	1.5 g	现配

4.3 显色液（12 块胶用量）

成分	用量	备注
d H ₂ O	1000 mL	
甲醛	12.5 mL	
0.25% Na ₂ S ₂ O ₃	7 mL	现配

4.4 0.2% Na₂S₂O₂ 溶液（100 mL）

成分	用量	备注
Na ₂ S ₂ O ₂	0.2 g	
灭菌双蒸水（dd H ₂ O）	100 mL	室温保存

附件 5

SSR（简单重复序列）标记引物

引物名称	→ 引物序列 (5' 3')	退火温度
BNL243	F:GGGTTTTCTGGGTATTTATACAACA R:TCATCCACTTCAGCAGCATC	57℃
BNL1317	F:AAAAATCAGCCAAATTGGGA R:CGTCAACAATTGTCCCAAGA	57℃
CM45	F:GATGCCAGTAAGTTCAGGAATG R:GCCAACTTATATTCGGTTCCT	57℃
DPL0071	F:GCAAACACCATCCTACCACAA R:GGTTCTATGATCAAGGCTTGGTTT	57℃
DPL0183	F:TTATTTCTTCCCTTGCGTTCTG R:AGAGGTGGCAATGGAGTTCTT	57℃
DPL0752	F:CACATCACCTAATTACCATTGAAGC R:TATCGTGAATATGTATGTGCGTGG	57℃
GH185	F:CAACTTGTTGACGTTTTGATAAGG R:AGTCCAATTCTAGCTTGATCTTACC	57℃
GH450	F:CCATTTAAGCAAATGGTGAATGTCC R:GGTGCCTGTTCAATTACAATTATCAG	57℃
JESPR65	F:CCACCCAATTTAAGAAGAAATTG R:GGTTAGTTGTATTAGGGTCGTTG	57℃
JESPR300	F:CGCATCACAAACCAAACAC R:CGGAAAATGATGATGATGAAGAAG	57℃
MON-DPL0384	F:CCCTTCACTGTACAATACCTGGA R:TTGGACATAATGACCTAGCGTATG	57℃
MON-DPL0707	F:GATATTGGTTGCCTATCATCCTTG R:GAAGTTCGGTGAGGAAATGAAAC	57℃
NAU2121	F:CCACTTCTCCCTCATTGTCT R:CGCAACAGTCACAACCAC	57℃
NAU3820	F:CTTCTCAAAGCCATGAAGGT R:AGGATCCAGATTCTGGTGA	57℃
TMB1152	F:CCTATGATGTGAACATCCCTGA R:CCCAATCACCTCCTTCAAAA	57℃
TMB1667	F:TCCGTCACAGACGTCACAGT R:GAGGAGAGGGTTCGGATTAGG	57℃