

湖南省农业技术规程

HNZ190-2018

南瓜杂交种纯度鉴定 SSR 法技术规程

Rules for variety purity identification of *C.moschata*. Duchesne by
SSR molecular markers

湖南省农业农村厅发布

发布日期：2018 年 12 月 31 日

南瓜杂交种纯度鉴定 SSR 法技术规程

为规范南瓜杂交种纯度鉴定 SSR 分子标记技术的 DNA 提取、PCR 反应、电泳、结果统计与计算等实验流程，制定本规程。

1 DNA 提取

1.1 取样

供试南瓜杂交种每份取种子 200 粒，父母本各 5-10 粒，将种子浸种 1 h 后，置于垫有滤纸的发芽盒，37 °C 恒温，并注意保湿。发芽 5-6 d 左右，取单粒发芽种子的胚轴或者根尖部分约 0.5 cm 至 1 cm，置于 2 ml 离心管或者 96 孔 PCR 板，用于 DNA 提取。

1.2 提取

可采用常规 CTAB 法或者快速碱煮法提取。

1.2.1 常规 CTAB 法

在 2 ml 离心管中加入 0.8 ml DNA 提取缓冲液，60 °C 水浴预热，取样品在研钵中研碎，倒入预热的离心管中，摇动混匀，60 °C 水浴保温 60 min，不时摇动，然后加入 0.8 ml 氯仿:异戊醇 (24:1) 溶液，颠倒混匀 (需带手套，防止损伤皮肤)，室温下静置 5-10 min 后 10,000 rpm 离心 5 min；将上清仔细移至另一 2 ml 离心管，加入 1 倍体积异丙醇，混匀，室温静置 3 min，5,000 rpm 离心 5 min，去除上清，用 70% 的乙醇洗涤沉淀 2 次，待乙醇全部风干后，加入 500 μ l 60 °C 预热的双蒸水，再加入 5 μ l RNaseA(10 μ g/ μ l)，37 °C 温浴 10 min，最后加入 1/10 体积的 3 mol/L NaAc 及 2 \times 体积的冰乙醇，混匀，-20 °C 放置 20 min，5,000 rpm 离心 5 min，去上清，用 70% 的乙醇洗涤沉淀 2 次，风干乙醇后加入 200 μ l 60 °C 预热的双蒸水，用紫外分光光度计检测 DNA 浓度并将 DNA 溶液用双蒸水稀释到 20 ng/ μ l，-20 °C 冰箱中保存备用。

1.2.2 碱煮法

将样品放入 96 孔 PCR 板中，并加入 0.25 mol/L 的 NaOH 溶液 50 μ l，沸水中煮 3 min，加入 0.1 mol/L 的 Tris · HCl (pH=8.0) 150 μ l 中和反应。本方法提取的 DNA 容易降解，在 4 °C 冰箱最长可保存 4 天。

2 PCR 反应

2.1 PCR 反应体系

PCR 扩增反应为 10 μ l 体系，10 ng/ μ l DNA 模板约 0.5 μ l，10 \times Buffer 1 μ l，10 mmol/l dNTP 0.1 μ l，10 pmol/l SSR 引物 0.2 μ l，2.5 U/ μ l rTaq 0.1 μ l，加灭菌 ddH₂O 至总体积 10 μ l。

2.2 PCR 反应程序

PCR 反应程序为：94 °C 预变性 4 min，94 °C 变性 30 s，58 °C 退火 30 s，72 °C 延伸 30 s，共 28 个循环，最后 72 °C 延伸 3 min。

2.3 加入上样缓冲液

PCR 结束后, 于 10 μ l 反应体系中加入 2 μ l 6 \times 加样缓冲液, 混匀, 置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱待跑电泳。

3 电泳

对于扩增条带差别不大的引物采用变性聚丙烯酰胺凝胶电泳, 扩增条带大小差别较大的引物建议采用普通琼脂糖凝胶电泳。

3.1 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳

3.1.1 玻璃板处理

用自来水和海绵球加少许清洗液将玻璃板清洗干净, 再用蒸馏水冲洗 1-2 遍, 带透光条件下玻璃板上无细小杂质时, 自然条件下晾干。

3.1.2 玻璃板组装

玻璃板彻底晾干后, 盖上凹槽玻璃板, 将玻璃板放在塑料隔条中, 仔细对齐玻璃板, 使玻璃板与塑料隔条紧密吻合。

3.1.3 封胶

称 0.3 g 琼脂粉, 加 30 ml 1 \times TBE 缓冲液, 微波炉上加热完全溶解后, 用 5 ml 移液器取适量加到玻璃板下面的空隙里, 琼胶液以渗入玻璃板凹槽中 3 mm 左右, 室温放置 30 min。

3.1.4 玻璃板与电泳槽组装

将封胶好的玻璃板放在电泳槽中, 使玻璃板周边的塑料条与电泳槽的卡位紧密吻合, 将螺丝拧紧, 将电泳槽的正极和负极与电泳仪连接。

3.1.5 灌胶

将现配的 8% PAGE (丙烯酰胺) 凝胶, 轻轻摇匀, 缓缓灌入玻璃胶室, 胶灌满整个胶室后, 插入样品梳, 室温下聚合 90 min。胶完全聚合后, 加入 0.5 \times TBE 电泳缓冲液, 拔出样品梳。

3.1.6 点样与电泳

每个 PCR 产物中加 5 μ l 6 \times 加样缓冲液, 混匀, 每个加样孔加入 3-4 μ l 样品, 并设置标准分子量 DNA 作片段大小标准。180 V 恒温电泳 90 min 左右待指示剂 (6 \times 加样缓冲液中的二甲苯青) 接近胶板底部时, 停止电泳。

3.1.7 染色和显色

电泳结束后, 分开两块玻璃板, 将凝胶放在专用盆中, 加入 500 ml 蒸馏水清洗 2 遍后, 放入染色液中, 染色 5 min, 取出胶板, 用蒸馏水漂洗 2 次。将胶板放入 400 ml 显影液中, 轻轻摇动, 待条带清晰后, 迅速用蒸馏水漂洗 2-5 遍后将胶板置于胶片观察灯上, 拍照记录。

3.2 普通琼脂糖凝胶电泳

将 PCR 产物与 2 μ l 6 \times 加样缓冲液混合, 点样至 1.0-3.0% 的琼脂糖凝胶点样孔内 (含有 0.5 μ g/ml 的溴化乙锭或者其它指示剂, 制胶浓度根据扩增片段差异大小定), 同时设置标准分子量 DNA 作片段大小标准, 在 1 \times TAE 缓冲液中进行凝胶电泳, 电泳电压 120 V, 电泳时间约 30 min, 具体根据扩增片段大小确定, 并在凝胶成像系统控制软件上观察记录 PCR 扩增条带。

4 统计与计算

如果 SSR 位点表现双亲带型，说明是杂交种；如果出现单个亲本带型或其它带型，则认为该种子为假杂种，根据公式： $SSR \text{ 纯度} = (\text{检测总数} - \text{非杂交种谱带类型的个体数量}) / \text{检测总数} \times 100\%$ ，计算杂交种纯度。

5 引用和参考资料

GB/T3543. 5 农作物种子检验规程 真实性和品种纯度鉴定

编写单位：湖南省蔬菜研究所

编写人员：韩小霞 胡新军 李勇奇 闵子扬 粟建文 袁祖华

附件 A 仪器设备、试剂、耗材及常用试剂配方

1 主要仪器设备

研钵、电子天平、恒温水浴锅、高速台式离心机、紫外分光光度计、高压灭菌锅、PCR 扩增仪、电泳仪、垂直电泳槽、凝胶成像系统、酸度计、微量移液器、摇床、通风柜、数码相机、胶片观察灯、冰箱（4 °C 冰箱和 -20 °C 冰箱各一台）。

2 主要试剂

乙二胺四乙酸二钠（Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt, EDTANa₂）、盐酸（HCl）、氢氧化钠（NaOH）、液氮、三羟甲基氨基甲烷【Tris(hydroxymethyl) methyl aminomethane, Tris】、十二烷基磺酸钠（Sodium dodecyl sulfonate, SDS）、三氯甲烷（Chloroform）、乙醇（Ethanol）、异丙醇（Isopropanol）、异戊醇（Isoamyl alcohol）、dNTP（dATP、dCTP、dGTP、dTTP）、引物、Taq DNA 聚合酶、丙烯酰胺（Acrylamide）、甲叉双丙烯酰胺（N, N, -methylene bisacrylamide）、硼酸（Boric acid）、四甲基乙二胺（TEMED）、过硫酸铵（Ammonium persulfate）、冰醋酸（Glacial acetic acid）、硝酸银（Silver nitrate）、甲醛（Formaldehyde）、醋酸钠（Sodium acetate）。

3 主要耗材

离心管（0.6 ml、1.5 ml、2.0 ml）、枪头（白枪头、黄枪头、蓝枪头）、96 孔 PCR 扩增板、玻璃板、一次性手套、一次性口罩。

4 常用试剂配置

4.1 DNA 提取试剂

4.1.1 0.5 mol/L EDTA（乙二胺四乙酸二钠盐）（pH 8.0）溶液

称 EDTA 186.1 g，加入已有 800 ml 双蒸水的烧杯中，用氢氧化钠调节 pH 值至 8.0，补双蒸水至 1000 ml，用玻璃棒搅拌、摇匀，分装至 100 ml 的玻璃瓶中，高压蒸汽灭菌（121 °C，20 min）后，置于 4 °C 冰箱中保存备用。

4.1.2 mol/L Tris-HCl（三羟基氨基甲烷盐酸，pH 8.0）溶液

称 121.1 g Tris 加入含有 800 ml 双蒸水的烧杯中，用盐酸调节 pH 值至 8.0，补双蒸水定容至 1 L，摇匀，4 °C 冰箱中保存备用。

4.1.3 DNA 提取液

取 1 mol/L Tris-HCl 溶液 50 ml、0.5 mol/L EDTA 溶液 20 ml，称 SDS 7.5 g 和氯化钠 14.6 g 加入到 500 ml 烧杯中，用双蒸水定容至 500 ml，充分混匀，使得溶液中的最终浓度为 Tris•HCl 100 mmol/L，EDTA 20 mMol/L，NaCl 500 mmol/L，SDS 1.5 %（v/v）。

4.1.4 氯仿:异戊醇:乙醇（80:4:16）

取 160 ml 三氯甲烷，8 ml 异戊醇和 32 ml 乙醇加在一起混匀，4 °C 冰箱保存备用。

4.1.5 0.25 mol/L 的 NaOH

称取 NaOH 1g，加入双蒸水定容至 100 ml。

4.1.6 0.1 mol/L 的 Tris · HCl

取 1 mol/L Tris-HCl（pH 8.0）10 ml，加双蒸水定容至 100 ml。

4.2 PCR 扩增试剂

PCR 扩增所用的 dNTP, Taq DNA 聚合酶均从试剂公司（北京全式金生物技术有限公司）购买，-20 °C 保存备用。引物委托上海生工生物工程公司合成，并将合成后的正向和反向引物用灭菌的双蒸水配置成 100 μM 的储存液，从中取 10 μl 加 90 μl 双蒸水配置成 10 μM 的工作液，-20 °C 保存备用。

4.3 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳试剂

4.3.1 10×TBE 缓冲液

称取 108 g Tris，55 g 硼酸，40 ml 0.5 M EDTA（pH 8.0），加入烧杯中，用双蒸水定容到

HNZ190-2018

1 L, 摇匀。

4.3.2 40% PAGE (丙烯酰胺) 溶液

称 380 g 丙烯酰胺和 20 g N',N'-亚甲双丙烯酰胺加 ddH₂O 定容至 1 L, 4 °C 保存备用。

4.3.3 10% (W/V) 过硫酸铵溶液 (APS)

称 0.1 g 过硫酸铵, 加入 1 ml 双蒸水, 混匀, 现配现用 (保质期 48 h)。

4.3.4 1×TBE 缓冲液

取 10×TBE 缓冲液 200 ml, 加双蒸水 1800 ml, 摇匀。

4.3.5 6×加样缓冲液

称取溴酚蓝 0.25 g, 二甲苯青 0.25 g, 加 98 ml 甲酰胺溶液和 2 ml EDTA (pH 8.0) 溶液溶解, 混匀, -20 °C 保存备用。

4.3.6 8% PAGE (丙烯酰胺) 凝胶

40% PAGE 8 ml、10×TBE 4 ml、ddH₂O 28 ml、10% AP 400 μl、TEMED 20 μl, 总体积 40 ml, 实践中可根据垂直板的大小按比例配置凝胶。

4.4 银染、显影试剂

4.4.1 染色液

称 1.5 g 硝酸银, 加双蒸水 1000 ml 溶解, 再加 1.5 ml 甲醛混匀。

4.4.2 显影液

称 15 g 氢氧化钠, 加入 1000 ml 双蒸水溶解, 再加 7.5 ml 甲醛, 混匀。

附件 B 引物信息

本规程对“大果蜜本”南瓜采用引物 NG010，“蜜宝”南瓜采用引物 NG004 和 NG010，“嫩早 2 号”和“嫩早黑妞”南瓜采用引物 NG005，“嫩早佳美”采用引物 NG026 进行了纯度鉴定，鉴定结果与田间鉴定结果无显著差异。对于其它南瓜杂交种，需要进行引物筛选，附录中提供了部分 SSR 引物信息，更多引物请参考 Gong 等开发的中國南瓜 SSR 标记。

部分 SSR 引物信息

编号	上游引物	下游引物	扩增片段 (bp)
NG001	AAGAAGAAGAGAAAGGGAAATGG	GTATCTCTATCTGCCAATCTGCTG	150
NG002	AAACGTTCTGCAATCAAGGA	CAAGCTTGTGTACAATAGGATAAGG	94
NG003	AAGCATTTCATAAGTCACAGAG	TGAAGTGCTTTTTGTATTGG	186
NG004	ACAAATGCCATGAAACACAACA	TGGTTGCTAGAGACCGTTGG	127
NG005	TGTATGGGGGAGTATTTTGG	TCAAGTCAACGAGTATCGTCAT	103
NG006	TCTGCTGTCTTCATCTTTGCT	CCAGCAGACAAGCTAATGTGT	137
NG007	ACCCTAAGCCAGATATTCATGC	GGGCTTCATGCATCTAGTTTG	153
NG008	GGTCATAATATTTTCAACCCCATC	TTCTCTTACACCAATTTTGTTTGG	154
NG009	CCCTCCACCACCTCCTTAG	CAGGGGATCATAAAAGTGG	110
NG010	TCAGACCCACTCCCATGAAC	AGCGAACACGTGAAAACGTC	113
NG011	TATCACCAAACGTGCAT	AGGTTTTGAAGAACAATTC	122
NG012	AAAGGCCTTGGATTTTCTCC	CCTTTCATGGTGGTGAAGA	198
NG013	AACCAAACCTCCGGAAGA	GTTCTCTCCGTTCCAGGATGG	152
NG014	TTGAAGCACTGGAAGCCATT	GGAAGGAAGGGGAGAGTGAA	173
NG015	CATTTTCTCTTCCATTCTCATCC	CAACCCGATAACAGAGAGC	108
NG016	GGTGGCCTCTGAACAATTTTC	ACCTAACCAATGGGCATGAG	228
NG017	ATAGGAATGTGCAGAGCTGAG	CAATATAGATACCGTTTTTCGAATC	102
NG018	TTTCATGTTATGATATTGTCAG	TCCAAAGCTTACGTTTACT	159
NG019	GTCATCTCATCATGCATCT	AATGTTATATGATGTTACACGATGG	113
NG020	GGCCTAATGGGTTGTGAAGA	AGTGGAATCCATTTGTTCTGTG	129
NG021	GAAGCTGCCGGAAGTTAGC	GGGACCACCCTCTTCTCTTC	149
NG022	CAAATTCAGACGCTTCTTTTGG	AGAATTGAGCAAAAAGGAGATGG	107
NG023	GAACATTTCTGGTTCAATC	CTTTCAAAGAAGCGTAAAG	132
NG024	AATCTGCAAACGGACTTCAAT	TCACAGTGATCCCCAACTC	104
NG025	CAATCCCCCTTTCCTCGT	TCAGAGGTTTACGCCGTTTC	138
NG026	CAACGTGAACCTCTTAACGTGTC	CTGGGATGAAAAGGAACCCTA	133
NG027	CTGCATTCTACCGGCTCAAG	ATTTTGATCGCACCCATTGT	131
NG028	CATCAGGGGTACTTCCCATT	ACTTCCGGAGGTCAGAAGAC	131
NG029	GAAAATTTTGAACAGACTCAA	CAGTAGAAAAATAAAAAGAAAAACA	117
NG030	TGCTTTGATCAGTGAGCAGT	GGATGTACTCTCCGACTTTC	139
NG031	TCGAAGTACGTGATGGGACTT	CCATTATGATAAAGCTCCGTTGT	155
NG032	GGCATTCTGAGAACAGCTT	ACGTTAGTTATGCTATTTTGTAGGC	111
NG033	TATGTAGCGCTCTGCACAAT	CCTCAATGTAATGTTTTGAATCC	113