

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 1963—2010

马铃薯品种鉴定

Cultivar identification of potato

2010-12-23 发布

2011-02-01 实施

中华人民共和国农业部 发布

前 言

本标准遵照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由中华人民共和国农业部种植业管理司提出并归口。

本标准起草单位：农业部脱毒马铃薯种薯质量监督检验测试中心(哈尔滨)。

本标准主要起草人：吕典秋、王绍鹏、刘尚武、邱彩玲、宿飞飞、李勇、高云飞、王文重、张抒、王亚洲、李学湛。

马铃薯品种鉴定

1 范围

本标准规定了马铃薯品种鉴定 SSR 分子标记方法。

本标准适用于马铃薯品种及种质资源鉴定。

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 7331 马铃薯种薯产地检疫规程

GB 18133 马铃薯脱毒种薯

3 试剂

DNA 的提取及 PCR 扩增所使用的实验室独立,微量移液器为分子检测专用。试验中,溴化乙锭染色剂可诱发基因突变,丙烯酰胺水溶液具有神经毒性,操作人员在操作过程中需佩戴手套和口罩。电泳后的凝胶以及被溴化乙锭污染的物品要有专用收集处,集中进行无害化处理。

以下所用试剂,除特别注明者外均为分析纯试剂,水为符合 GB/T 6682 中规定的一级水。

3.1 1 mol/L 三羟甲基氨基甲烷—盐酸(Tris-HCl)溶液(pH 8.0)

称取 Tris 碱 121.1 g,溶解于 800 mL 水中,用浓盐酸调 pH 至 8.0,加水定容至 1 000 mL,121℃ 高压灭菌 20 min。

3.2 0.5 mol/L 乙二铵四乙酸二钠溶液(pH 8.0)

称取乙二铵四乙酸二钠 186.1 g,溶于 700 mL 水中,用氢氧化钠调 pH 至 8.0,加水定容至 1 000 mL。

3.3 TE 缓冲液(pH 8.0)

量取 1 mol/L 三羟甲基氨基甲烷—盐酸(Tris-HCl)溶液(3.1)2 mL、0.5 mol/L 乙二铵四乙酸二钠溶液(3.2)0.4 mL,加水溶解,定容至 200 mL,121℃ 高压灭菌 20 min 后,室温保存。

3.4 5×Tris-硼酸(TBE)电泳缓冲液

称取 Tris 碱 27 g、硼酸 13.75 g,量取 0.5 mol/L 乙二铵四乙酸二钠溶液(3.2)10 mL,加灭菌双蒸水 400 mL 溶解,定容至 500 mL。

3.5 1×Tris-硼酸(TBE)电泳缓冲液

量取 5×Tris-硼酸(TBE)电泳缓冲液(3.4)200 mL,加水定容至 1 000 mL。

3.6 样品提取缓冲液

称取氯化钠 15.2 g、十二烷基磺酸钠(SDS)0.4 g、聚乙烯基吡咯烷酮(PVP)2 g、二硫苏糖醇(DTT)0.309 g,溶于 100 mL 双蒸水中,再加入 0.5 mol/L 乙二铵四乙酸二钠溶液(3.2)20 mL、1 mol/L 三羟甲基氨基甲烷—盐酸(Tris-HCl)溶液(3.1)20 mL、Triton X100 1 mL、β-巯基乙醇 0.8 mL,混合均匀,加水定容至 200 mL,4℃ 贮存待用。

3.7 Tris 饱和酚+三氯甲烷+异戊醇混合液(现用现配)

量取 Tris 饱和酚 25 mL、三氯甲烷 24 mL、异戊醇 1 mL,混合均匀待用。

3.8 30%丙烯酰胺溶液

称取丙烯酰胺 29 g、N,N'-亚甲基双丙烯酰胺 1 g,加水溶解,定容至 100 mL,过滤,4℃储存。

3.9 10%过硫酸铵溶液(现用现配)

称取 0.1 g 过硫酸铵,加水溶解,定容至 1 mL。

3.10 12%聚丙烯酰胺凝胶(双板)

量取 30%丙烯酰胺溶液(3.8)20 mL、5×Tris-硼酸(TBE)电泳缓冲液(3.5)10 mL、灭菌双蒸水 25 mL、四甲基乙二胺(TEMED)50 μL,混匀,制板前加过硫酸铵溶液(3.9)500 μL,混匀,灌胶。

3.11 溴化乙锭贮液(10 mg/mL)

称取溴化乙锭 200 mg,加水溶解,定容至 20 mL。

3.12 溴化乙锭染色液(0.5 μg/mL)

量取溴化乙锭贮液(3.11)10 μL,加水定容至 200 mL。

3.13 3 mol/L 乙酸钠溶液(pH 5.2)

称取乙酸钠·3H₂O 24.6 g,加水 80 mL 溶解,用冰乙酸调 pH 至 5.2,定容至 100 mL。

3.14 100 bp DNA 分子量标准物

3.15 SSR 标记引物序列情况

见附录 A。

4 仪器

4.1 分析天平(感量 0.000 1 g)。

4.2 台式低温高速离心机($\geq 12\ 000$ r/min)。

4.3 微量移液器(0.5 μL~10 μL、10 μL~100 μL、20 μL~200 μL、100 μL~1 000 μL)。

4.4 冰箱(4℃、-20℃)。

4.5 稳压稳流电泳仪、水平板电泳槽、垂直板电泳槽。

4.6 液氮罐。

4.7 紫外凝胶成像仪。

4.8 PCR 扩增仪。

4.9 紫外分光光度计。

4.10 超净工作台。

5 分析步骤

5.1 样品的采集和制备

检测材料可以取马铃薯植株的叶片(嫩叶效果好)、休眠的块茎或试管苗。叶片样品采集按照 GB 18133 和 GB 7331 中要求,随机在田间采集。叶片样品用牛皮纸包装,利用冰盒携带,4℃条件下保存。块茎和芽样品采集后,利用冰盒携带,4℃条件下保存。试管苗提取 DNA 前不开封,防止污染。样品在 4℃条件下可保存 2 周,在 -20℃条件下可保存 6 个月,在 -70℃条件下可长期保存。设标样,与样品采用同样方法处理。

5.2 DNA 提取

5.2.1 称取 1 g 马铃薯待检测样品置于研钵中,液氮冷冻下迅速研磨至粉末状,加入 3 mL 样品提取缓冲液(3.6)使其混合均匀,吸取混合液置于 1.5 mL 离心管中。

5.2.2 加入等体积的 Tris 饱和酚+三氯甲烷+异戊醇混合液(3.7),充分混匀,离心 3 min(12 000 r/min),吸取上清液。此过程重复一次。

- 5.2.3 吸取上清液(5.2.2)加入等体积的三氯甲烷,12 000 r/min 离心 3 min。
- 5.2.4 吸取上清液(5.2.3)加入 1/10 体积的 3 mol/L 乙酸钠(3.13),再加入 2.5 倍体积预冷的无水乙醇,低温放置 4 h。
- 5.2.5 10 000 r/min 离心 15 min,弃上清,用 75%的乙醇清洗沉淀后,10 000 r/min 离心 3 min,清洗过程重复 1 次~2 次。
- 5.2.6 弃上清,将沉淀置于通风处干燥至变成白色或透明状态。
- 5.2.7 用 TE 缓冲液(3.5)溶解 DNA,并将溶解液置于-20℃冰箱保存。

5.3 PCR(聚合酶链式反应)扩增反应

5.3.1 PCR 反应体系(20 μL)

10×PCR 缓冲液	2 μL
MgCl ₂ (25 mmol/L)	2.4 μL
10 mmol/L dNTPs	0.8 μL
贮存浓度的引物(3.15)	各 1 μL
Taq DNA 聚合酶(5 u/μL)	0.15 μL
模板 DNA	1 μL
灭菌双蒸水	5.65 μL

先加入灭菌双蒸水,然后按顺序加入上述成分,缓慢颠倒 PCR 管混匀,瞬时离心;对于多个样品,可先将上述成分(模板 DNA 除外)混匀,分装到 PCR 管中,再加入模板 DNA。

5.3.2 PCR 扩增程序

95℃预变性 5 min;94℃变性 30 s,57℃复性 45 s,72℃延伸 90 s,共 35 个循环;72℃延伸 10 min,4℃保存。

5.4 电泳

5.4.1 制备 12%聚丙烯酰胺凝胶

取 30%丙烯酰胺溶液(3.8)10 mL,加入 5×Tris-硼酸(TBE)电泳缓冲液 5 mL、无菌水 10 mL,再加入 10%过硫酸铵溶液(3.9)250 μL、四甲基乙二胺(TEMED)30 μL,混合均匀,立刻倒入玻璃板中,并插入梳子。玻璃板、梳子的规格均为 1.5 mm。

5.4.2 加样

电泳槽中加入 1×Tris-硼酸(TBE)电泳缓冲液(3.5),取 5 μL PCR 产物与 1 μL 载样缓冲液混合均匀,加入到点样孔中,另取 100 bp DNA 分子量标准物(Marker)(3.14)5 μL 作为对照,加入到相邻的点样孔中。

5.4.3 电泳

在 100 V 电压下预电泳 30 min,然后在 160 V 电压下电泳约 4.5 h。当指示剂二甲苯腈距玻璃板底部 1 cm 时停止电泳。

5.5 电泳结果观察

5.5.1 聚丙烯酰胺凝胶染色

将电泳后的 12%聚丙烯酰胺凝胶(5.4.3)浸入到溴化乙锭染色液(3.12)中染色 30 min,用清水洗去染色液,5 min/次,重复一次。

5.5.2 紫外灯观察

利用紫外观察灯或紫外凝胶成像仪观察 PCR 反应扩增出的 DNA 条带,并拍照以记录实验结果。

6 结果判定

6.1 结果稳定性判定

将一已知马铃薯品种多次扩增,带型稳定后将其作为稳定性参照物,并记录带型及条带数量。将待检测马铃薯品种、稳定性参照物、100 bp DNA 分子量标准物(Marker)(3.14)一同操作。当此品种扩增带型与记录带型一致,且 100 bp DNA 分子量标准物(Marker)(3.14)泳道从上到下依次出现清晰的条带时,实验成立,可以进行结果判定,否则应重新进行实验。

6.2 品种真伪鉴定

将待检测的疑似品种与真实品种、稳定性测试品种、100 bp DNA 分子量标准物(Marker)(3.14)一同操作,在一块凝胶板上电泳。实验成立时,将疑似品种与真实品种进行直接对比,如果疑似品种与真实品种的条带数量、带型一致,则判定二者为同一品种;反之,为不同品种。

附 录 A
(资料性附录)

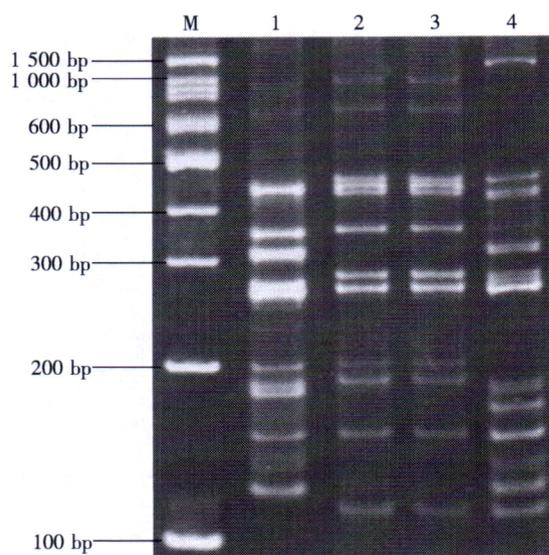
用于马铃薯品种鉴定的 SSR 标记引物

用于马铃薯品种鉴定的 SSR 标记正向引物序列、反向引物序列、贮存浓度及终浓度见表 A. 1。

表 A. 1 马铃薯品种鉴定 SSR 标记引物序列

引 物	序列(5'→3')	贮存浓度 μmol/L	终浓度 μmol/L
SSI - F	TCT CTT GAC ACG TGT CAC TGA AAC	3	0.15
SSI - R	TCA CCG ATT ACA GTA GGC AAG AGA	3	0.15
Patatin - F	CAA CCA ACA AGG TAA ATG GTA CC	6	0.3
Patatin - R	TGG TCT GGT GCA TTA GAA AAA A	6	0.3
STM0014 - F	CAG TCT TCA GCC CAT AGG	3.6	0.18
STM0014 - R	TAA ACA ATG GTA GAC AAG ACA AA	3.6	0.18
UGP - F	GAA ACT GCT GCC GGT GC	8	0.4
UGP - R	TGG GGT TCC ATC AAA C	6	0.3

附录 B
(资料性附录)
马铃薯品种真伪检测结果判定图



M. DL 1 500marker
1. 稳定性测试品种
2. 真实品种
3. 疑似品种 I
4. 疑似品种 II

注：稳定性测试品种是克新 1 号；真实品种为大西洋；疑似品种 I 与真实品种条带数量、带型一致，判定为大西洋品种；疑似品种 II 与真实品种条带数量、带型相异，判定不是大西洋品种。