

ICS 65.020.20
B 61



中华人民共和国国家标准

GB/T 19564—2004

GB/T 19564—2004

落叶松种子鉴定实验方法 随机扩增多态性 DNA 法

Experimental identification method for species of larch seed—RAPD

中华人民共和国
国家标准
落叶松种子鉴定实验方法
随机扩增多态性 DNA 法
GB/T 19564—2004

*

中国标准出版社出版发行
北京复兴门外三里河北街 16 号
邮政编码:100045

网址 www.bzcs.com

电话:68523946 68517548

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷
各地新华书店经销

*

开本 880×1230 1/16 印张 0.75 字数 16 千字

2004 年 10 月第一版 2004 年 10 月第一次印刷

*

书号:155066·1-21678 定价 10.00 元

如有印装差错 由本社发行中心调换

版权专有 侵权必究

举报电话:(010)68533533



GB/T 19564—2004

2004-06-22 发布

2004-12-01 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局
中国国家标准化管理委员会 发布

A.6.2 5×TBE:称取 54 g Tris,溶于 800 mL 水中,加入 20 mL 0.5 mol/L EDTA(pH8.0)和 27.5 g 硼酸,定容至 1 000 mL,高压灭菌,贮存于室温。

A.6.3 0.5×TBE:称取 5×TBE 100 mL,加水定容至 1 000 mL,备用。

A.7 凝胶加样缓冲液

0.25%溴酚蓝、0.25%二甲苯青 FF、40%(质量浓度)蔗糖水溶液。

A.8 反应体系中各反应成分的配制

A.8.1 1 U TaqDNA 聚合酶

25 μL 反应体系中需加入 TaqDNA 聚合酶体积按公式(A.1)计算:

$$V = \frac{1}{D} \quad \dots\dots\dots(A.1)$$

式中:

V ——TaqDNA 聚合酶的体积,单位为微升(μL);

D ——TaqDNA 聚合酶的浓度,单位为单位每微升(U/μL)。

A.8.2 1.5 mmol/L Mg²⁺

25 μL 反应体系中需加入 Mg²⁺ 体积按公式(A.2)计算:

$$V = \frac{1.5 \times 25}{D} \quad \dots\dots\dots(A.2)$$

式中:

V ——Mg²⁺ 的体积,单位为微升(μL);

D ——Mg²⁺ 的浓度,单位为毫摩尔每升(mmol/L)。

A.8.3 10 μmol/L 引物

首先将引物离心,然后加水稀释。加水体积按公式(A.3)计算,放在-20℃冰箱中保存,每次使用前用水稀释三倍,终浓度即为 10 μmol/L。

$$V = \frac{OD_{260} \times 33}{M \times 10} \quad \dots\dots\dots(A.3)$$

其中公式(A.3)中 M 的计算按公式(A.4)进行:

$$M = nA \times 313.22 + nG \times 329.22 + nC \times 289.19 + nT \times 304.19 - 61.97 \quad \dots\dots\dots(A.4)$$

式中:

V ——加水体积,单位为微升(μL);

M ——引物分子量,单位为克每毫升(g/mL);

n ——碱基数;

A——腺嘌呤(adenine);

G——鸟嘌呤(guanine);

C——胞嘧啶(cytosine);

T——胸腺嘧啶(thymine)。

前 言

本标准的附录 A 为规范性附录。

本标准由国家质量监督检验检疫总局提出。

本标准起草单位:国家农业标准化监测与研究中心(黑龙江)、黑龙江省质量技术监督局。

本标准主要起草人:王庆贵、徐晶、姜雯、李光宇、石绍业、王卫国。

引 言

目前,我国林木种子的鉴定多采用感官鉴定、理化水平鉴定等方法。这些方法所需的检验周期较长,不具备分子水平鉴定的诸多优点。

随着分子生物学的发展,特别是20世纪90年代以来,分子生物学的相关技术已被广泛应用,其检测对象为DNA大分子——生物的遗传基础。以DNA为检测对象,具有许多其他检测水平所不具备的优点:首先,可供探测DNA标记的数量可能是无限的,这是同工酶技术所无法比拟的;其二,DNA分析技术不像其他技术那样随组织或发育阶段而异,植物体任何部位、任何时期提供的DNA均可用于分析,其检测结果都是一样的;第三,DNA分析不受环境影响,其变异只源于等位基因DNA序列的变异,这种稳定性便于揭示品种间的遗传变异,从而排除了环境变异所造成的表型变异。

基于上述优点,DNA分析技术是农、林、牧、渔等品种鉴定的先进方法。

附 录 A

(规范性附录)

灭菌方法及缓冲液和主要试剂的配制

A.1 高压灭菌的操作方法

将欲灭菌的离心管放入烧杯中,用锡箔纸封口;移液器吸头装在吸头盒内;配好的试剂装入试剂瓶中,盖好盖,放入灭菌锅中。首先将压力升至1 Pa,放气,再将压力重新升至1 Pa,开始计时,20 min后,将电源关闭。待压力为零时,取出离心管、吸头及试剂瓶,待用。

A.2 匀浆缓冲液的配制

取1 mol/L Tris·Cl(pH8.0)200 mL、0.5 mol/L EDTA(pH8.0)50 mL和0.5 g SDS,加水至100 mL。使用前应保证SDS充分溶解,若出现结晶,应放在50℃水浴中溶解10 min。

A.2.1 1 mol/L Tris·Cl(pH8.0):称取12.11 g Tris,溶于80 mL水中,用浓HCl调节溶液的pH值至8.0,加水定容至100 mL,高压灭菌。

A.2.2 0.5 mol/L EDTA(pH8.0):称取18.61 g EDTANa₂·2H₂O,溶于80 mL水中,在磁力加热搅拌器上剧烈搅拌,用NaOH(约需2 g左右)调节溶液的pH值至8.0,加水定容至100 mL,高压灭菌。

A.3 饱和酚的制备

饱和酚的制备宜在通风橱或通风良好的条件下进行。

A.3.1 将室温下的酚置于60℃水浴中融化,然后倒入蒸馏器中加热,在180℃左右搜集液体。经重蒸的酚分装贮存于-20℃冰箱中备用。

A.3.2 将重蒸酚60℃水浴中融化后,加入8-羟基喹啉达到终浓度0.1%,加入等体积0.5 mol/L Tris·Cl(pH8.0)溶液,用磁力加热搅拌器混匀后静止一段时间,移出上层水相,重复此过程,直到酚相的pH值大于7.8时,即为饱和酚溶液,装入棕色瓶中,4℃冰箱中贮存。

A.4 TE缓冲液的配制

取1 mol/L Tris·Cl(pH7.6)1 mL,0.5 mol/L EDTA(pH8.0)0.2 mL,加水至100 mL。

A.4.1 1 mol/L Tris·Cl(pH7.6):称取12.11 g Tris,溶于80 mL水中,用浓HCl调节溶液的pH值至7.6,加水定容至100 mL,高压灭菌。

A.4.2 0.5 mol/L EDTA(pH8.0):同A.2.2。

A.5 RNA酶(10 mg/mL)的配制

称取RNA酶1 mg,溶于100 μL TE缓冲液中,水浴(70℃)10 min,缓慢冷却至室温。

A.6 琼脂糖凝胶的配制

配制浓度为0.7%(或2%)的琼脂糖凝胶需称取琼脂糖0.7 g(或2 g)置于200 mL三角瓶中,溶于100 mL 0.5×TBE中,在微波炉中溶化至溶液透明,冷却至50℃~60℃,加入溴化乙锭(10 mg/mL),调至终浓度为0.5 μg/mL,混匀后将凝胶倒入已封口并放好梳子(距底板1.0 mm左右)的载胶板上,凝胶厚度在3 mm~5 mm为宜,待凝胶完全凝固后放入电泳槽中备用。

A.6.1 溴化乙锭(EB)贮液(10 mg/mL):称取1 g 溴化乙锭,溶于100 mL水中,用磁力加热搅拌器搅拌数小时以确保其完全溶解,移至棕色瓶中,4℃冰箱中保存。