

ICS 67.060
B 21

NY

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 1788—2009

大豆品种纯度鉴定技术规程 SSR分子标记法

Protocol of purity identification for soybean variety using—SSR
molecular markers

2009-12-22 发布

2010-02-01 实施

中华人民共和国农业部 发布

前 言

本标准的附录 A、附录 B 为资料性附录。

本标准由中华人民共和国农业部提出并归口。

本标准负责起草单位：全国农业技术推广服务中心、中国农业科学院作物科学研究所。

本标准主要起草人：廖琴、陈应志、邱丽娟、常汝镇、关荣霞、李春广、王爱珺。

大豆品种纯度鉴定技术规程 SSR 分子标记法

1 范围

本标准规定了大豆品种纯度的 SSR 分子标记检测技术规程。

本标准适用于大豆品种纯度鉴定。

2 原理

简单重复序列(SSR)分布于大豆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,因而形成片段长度多态性。由于每个简单重复序列两端的序列是高度保守的单拷贝序列,因而可根据其两端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,扩增产物通过电泳进行分离,经硝酸银染色,可辨别 SSR 电泳谱带。通过选用品种间具有广泛多态性的 SSR 引物,根据 PCR 扩增产物电泳谱带差异(等位变异数目),鉴定大豆品种纯度。

3 仪器设备、试剂与耗材

参见附录 A。

4 试剂配制

4.1 DNA 提取试剂

4.1.1 0.5 mol/L 乙二胺四乙酸二钠盐(EDTA)(pH8.0)溶液

称取 EDTA 186.1 g,倒入 1 000 mL 烧杯中,加 800 mL 去离子水溶解,用固体氢氧化钠调 pH 至 8.0,再加去离子水定容至 1 000 mL,混匀,过滤。在 4℃ 条件下保存。

4.1.2 1 mol/L 三羟甲基氨基甲烷盐酸(Tris-HCl)溶液(pH8.0)

称取 Tris 60.55 g,倒入 500 mL 烧杯中,加 400 mL 去离子水溶解,用 HCl 调 pH 至 8.0,再加去离子水定容至 500 mL,混匀,4℃ 条件下保存。

4.1.3 DNA 提取液

称取氯化钠(NaCl)14.6 g,倒入 500 mL 烧杯中,加 100 mL 去离子水溶解,加 1 mol/L Tris-HCl 溶液 50 mL,加 0.5 mol/L EDTA 溶液 50 mL 和 SDS 10 g,用去离子水定容至 500 mL,60℃ 水溶解,混匀。4℃ 条件下保存。

4.1.4 三氯甲烷/异戊醇(24+1)

取 240 mL 三氯甲烷和 10 mL 异戊醇,混匀。

4.2 PCR 扩增试剂

4.2.1 四种脱氧核糖核苷酸(dNTPs:dATP、dCTP、dGTP、dTTP)混合溶液配制

取浓度为 100 mmol/L 的 dATP、dCTP、dGTP、dTTP 储存液各 20 μL 混合,加入 920 μL 超纯水,配成终浓度为 2 mmol/L 工作液。-20℃ 条件下保存。

4.2.2 引物稀释

用超纯水分别配制正向(F)引物和反向(R)引物至浓度均为 100 μmol/L 的储存液,取 10 μL 储存液加入 490 μL 超纯水配成 2 μmol/L 工作液。

4.3 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳试剂

4.3.1 10×TBE 缓冲液