

ICS 65.020.20
B 65

LY

中华人民共和国林业行业标准

LY/T 2347—2014

LY/T 2347—2014

刚竹属 DNA 扩增片段长度多态性(AFLP) 分析方法

Method of DNA amplification fragment length polymorphism (AFLP)
for *Phyllostachys bamboo*

中华人民共和国林业
行业标准
刚竹属 DNA 扩增片段长度多态性(AFLP)
分析方法
LY/T 2347—2014

*
中国标准出版社出版发行
北京市朝阳区和平里西街甲 2 号(100029)
北京市西城区三里河北街 16 号(100045)
网址 www.spc.net.cn
总编室:(010)64275323 发行中心:(010)51780235
读者服务部:(010)68523946
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 13 千字
2014 年 12 月第一版 2014 年 12 月第一次印刷

*
书号: 155066·2-27743 定价 16.00 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)68510107



LY/T 2347-2014

2014-08-21 发布

2014-12-01 实施

国家林业局 发布

附录 D
(规范性附录)
银染程序

D.1 各组分配方(现配现用)

固定液:200 mL 酒精+14 mL 冰醋酸+1 800 mL 重蒸水。

银染液:3.0 g 硝酸银+2 000 mL 重蒸水。

显影液:30.0 g 氢氧化钠+8 mL 37%甲醛+2 000 mL 重蒸水。

D.2 银染步骤

D.2.1 固定:取合适的塑料盒,倒入 2 000 mL 新配制的固定液,40 r/min~60 r/min 轻轻摇动 20 min。

D.2.2 冲洗:用 2 000 mL 重蒸水彻底冲洗胶板 3 次。

D.2.3 染色:加入 2 000 mL 染色液,40 r/min~60 r/min 摇动染色 30 min。

D.2.4 冲洗:用重蒸水冲洗胶板不超过 5 s。

D.2.5 显影:把胶板快速转移到 2 000 mL 显影液中,40 r/min~60 r/min 摇动,直至带纹出现。

D.2.6 冲洗:用重蒸水冲洗 2 次。

D.2.7 胶的干燥:室温下自然干燥 24 h 以上。

D.2.8 试验结果记录:拍照,记录条带。

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准的附录为规范性附录。

本标准由全国竹藤标准化技术委员会(SAC/TC 263)提出并归口。

本标准起草单位:国际竹藤中心、北京林业大学、中国林业科学研究院亚热带林业研究所。

本标准主要起草人:李雪平、高志民、牟少华、陈敏、袁金玲。

附录 B
(规范性附录)
扩增引物和接头

刚竹属 DNA 扩增片段长度多态性(AFLP)
分析方法

引物和接头序列见表 B.1。

表 B.1 引物和接头序列

接头	序列(5'-3')
EcoR I 接头 1	CTCGTAGACTGCGTACC
EcoR I 接头 2	AATTGGTACGCAGTCTAC
Mse I 接头 1	GACGATGAGTCCTGAG
Mse I 接头 2	TACTCAGGACTCAT
预扩增引物	序列(5'-3')
E ₀₀	GACTGCGTACCAATTC
M ₀₀	GATGAGTCCTGAGTAA
选择性扩增引物 E _{primer} /M _{primer}	序列(5'-3')
E43A	GACTGCGTACCAATTCATAA
E43C	GACTGCGTACCAATTCATAC
E43G	GACTGCGTACCAATTCATAG
E43T	GACTGCGTACCAATTCATAT
E44A	GACTGCGTACCAATTCATCA
M51CC	GATGAGTCCTGAGTAACCACC
M51CG	GATGAGTCCTGAGTAACCACG
M51CA	GATGAGTCCTGAGTAACCACA
M51GA	GATGAGTCCTGAGTAACCAGA
M51GC	GATGAGTCCTGAGTAACCAGC
M51GG	GATGAGTCCTGAGTAACCAGG

已验证的引物组合: E43A/M51CA、E43A/M51CC、E43A/M51GA、E43A/M51GC、E43A/M51GG、E43C/M51CA、E43C/M51CC、E43C/M51CG、E43G/M51GA、E43G/M51GC、E43T/M51CG、E44A/M51GA、E44A/M51GC、E44A/M51GG。

1 范围

本标准规定了刚竹属(*Phyllostachys*)竹种的 DNA 提取、酶切、连接、扩增实验步骤及采用的仪器设备。

本标准适用于刚竹属竹种 DNA 多态性的分析。

2 试剂

2.1 所用化学试剂如没有特殊说明,均为分析纯。

2.2 DNA 提取液: 1 mol/L Tris-HCl pH8.2、细胞裂解液(1 mol/L Tris-HCl pH7.5, 0.25 mol/L EDTA pH8.0, 5 mol/L 氯化钠, 2% CTAB)与 5% SLS 按 5:5:2 混合,在使用前加入亚硫酸钠至终浓度为 0.02 mol/L。

2.3 三氯甲烷:异戊醇=24:1。

2.4 异丙醇。

2.5 70%乙醇:70 mL 无水乙醇加蒸馏水定容到 100 mL。

2.6 5 mol/L 氯化钠:称取 29.22 g 氯化钠,用蒸馏水溶解后定容到 100 mL。

2.7 0.5 mg/mL 溴化乙锭:称取 5 mg 溴化乙锭,用蒸馏水溶解后定容到 10 mL。

2.8 变性缓冲液:去离子甲酰胺 50 mL, EDTA(0.5 mol/L, pH=8.0)1 mL, 二甲苯青 FF 0.125 g, 溴酚蓝 0.125 g。

2.9 10×TBE: Tris 108.0 g, 硼酸 55.0 g, 0.5 mol/L EDTA(pH8.0)40 mL, 定容到 1 000 mL。

2.10 40%丙烯酰胺溶液:2.0 g 甲叉双丙烯酰胺, 38.0 g 丙烯酰胺混合加水定容到 100 mL。

2.11 10%过硫酸胺溶液:1.0 g 过硫酸胺加水定容到 10 mL。

3 仪器

3.1 PCR 仪(具有 touchdown 功能,温度精度±0.2℃)。

3.2 移液器。

3.3 4℃低温离心机(max 14 000 r/min 以上)。

3.4 水浴锅。

3.5 电泳仪(可满足 DNA 测序)。

3.6 紫外分光光度计。

3.7 分析天平。

3.8 摇床。

4 试验步骤

4.1 DNA 提取

按照附录 A 的方法提取和检测竹子基因组 DNA。电泳检测 DNA 主带完整、平均分子量>20 kb;