

ICS 65.020.01
B 61

NY

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 1433—2007

水稻品种鉴定 DNA 指纹方法

Identification of Rice (*Oryza sativa* L.) Varieties Using Microsatellite Markers

2007-09-14 发布

2007-12-01 实施

中华人民共和国农业部 发布

前 言

本标准的附录 A 为规范性附录,附录 B、C 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。

本标准起草单位:中国水稻研究所、农业部科技发展中心、农业部稻米及制品质量监督检验测试中心。

本标准主要起草人:庄杰云、施勇烽、吕波、陈能、杨坤、应杰政、曾瑞珍。

- 4.16 1 mol/L 硫酸氨溶液。
- 4.17 5×PCR 反应缓冲液。
- 4.18 25 mmol/L 氯化镁溶液。
- 4.19 引物溶液,推荐使用的引物及其序列参见附录 C。
- 4.20 70%乙醇溶液(V/V)。
- 4.21 5×TBE 缓冲液。
- 4.22 1×TBE 缓冲液。
- 4.23 100 g/L 过硫酸铵溶液。
- 4.24 400 g/L 丙烯酰胺与甲叉双丙烯酰胺混合液。
- 4.25 10 g/L 琼脂糖溶液。
- 4.26 氢氧化钠显色溶液。
- 4.27 0.5 g/L 硝酸银溶液。
- 4.28 6×溴酚蓝-二甲苯青电泳指示剂。

5 仪器

见附录 A2。

6 分析步骤

6.1 试验样品

试验样品为水稻种子,其质量应符合国家标准 GB 4404.1 中对水稻种子纯度的要求。同时检测待鉴定品种和对照品种,每个品种分别检测 5 个个体,对一致性差的品种可增加检测的个体数,同一批品种的各个体按下述步骤同步进行。

6.2 DNA 提取

从幼苗或植株上取水稻叶片 2 cm~3 cm 放入研钵中,加入 DNA 提取液 400 μ L,研碎,再加入 DNA 提取液 400 μ L;移取 500 μ L 混合液至 1.5 mL 微量离心管,加入 500 μ L 三氯甲烷萃取液,轻缓颠倒混匀。经 12 000 r/min 离心 30 s 至分相,取上清液 400 μ L,转入新的 1.5 mL 管中。加入 800 μ L 冰乙醇,轻缓颠倒混匀,经 12 000 r/min 离心 3 min 至分相,弃上清液。再用 70%乙醇溶液洗涤 2 遍,自然条件下干燥后,加入 50 μ L 1×TE 缓冲液溶解沉淀,置于 -20℃ 保存备用。

6.3 PCR 扩增

6.3.1 引物

推荐使用的 24 对基本核心引物及其序列参见附录 C。优先使用其中的 12 对引物(推荐类型为 I),完成后若未获得确定结果,再增加其他 12 对引物(推荐类型为 II),如果必要可增加指定的辅助引物。

6.3.2 标准 PCR 反应液的配制及扩增准备

在 200 μ L 的 PCR 反应管中依次加入 2 μ L 5×PCR 反应缓冲液、0.8 μ L dNTP 溶液和 0.6 μ L 氯化镁溶液,正、反向引物溶液各 1 μ L、经 6.2 提取备用的模板 DNA 1 μ L、0.25 μ L Taq DNA 聚合酶,加入灭菌蒸馏水 3.25 μ L,使 PCR 反应体积达到 10 μ L。再加约 20 μ L 的石蜡油(有热盖设备的 PCR 仪可以不加石蜡油)。PCR 反应体系除可自行配置外,也可采用试剂盒。

6.3.3 扩增反应

将 PCR 管放入 PCR 扩增仪中,在预设的扩增条件下反应。94℃ 下预变性 2 min;进行 30 次扩增反应循环(94℃ 下变性 45 s,55℃ 下退火 45 s,72℃ 下延伸 1 min);然后 72℃ 下延伸 8 min;最后 10℃ 恒温冷