



中华人民共和国林业行业标准

LY/T 1772—2008

杨树品种分子鉴定实验方法 DNA 扩增片段长度多态性法(AFLP)

Molecular identification method for varieties of poplar—
Amplified fragment length polymorphism (AFLP)

2008-09-03 发布

2008-12-01 实施

国家林业局 发布

前 言

本标准的附录 A 为资料性附录。

本标准由国家林业局提出。

本标准由全国林木种子标准化技术委员会归口。

本标准起草单位：中国林业科学研究院林业研究所、中国科学院遗传与发育生物学研究所和国家林业局北方林木种子检验中心。

本标准主要起草人：李金花、张绮纹、王斌、宋红竹、周春江、卢孟柱、李庆梅、牛正田。

杨树品种分子鉴定实验方法

DNA 扩增片段长度多态性法(AFLP)

1 范围

本标准规定了以杨树新鲜组织(叶片、芽等)为材料,利用扩增片段长度多态性 DNA 法(Amplified Fragment Length Polymorphism,简称 AFLP)对杨树品种进行分子鉴定的实验方法。

本标准适用于杨树品种分子鉴定。

2 原理

杨树基因组 DNA 经限制性内切酶双酶切后,形成分子量大小不等的随机片段,将针对 *EcoR* I 和 *Mse* I 的特定接头连接在这些 DNA 片段的两端,形成带特异接头的 DNA 片段,随后利用一对与接头和邻接酶切位点相匹配的引物进行扩增,最终通过变性聚丙烯酰胺凝胶电泳将这些特异性片段分离开来,通过比较待测品种和对照品种间 DNA 指纹谱带数据的差异,来判定待测品种与对照品种是否为相同品种。

3 仪器和设备

- 3.1 通用实验室仪器设备。
- 3.2 梯度 PCR 扩增仪。
- 3.3 琼脂糖胶电泳系统。
- 3.4 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳系统。
- 3.5 紫外透射仪。
- 3.6 凝胶成像系统或照相系统。
- 3.7 重蒸馏水仪。

4 试剂与溶液

除非另有说明,在分析中使用分析纯试剂。配制好的溶液经高压灭菌后使用。实验中所使用的水均为无菌超纯水。

- 4.1 DNA 限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Mse* I(10 U/ μ L)及其 10 \times 反应缓冲液
-20 $^{\circ}$ C 保存。

- 4.2 *Taq* DNA 聚合酶(1 U/ μ L)及其 10 \times PCR 反应缓冲液

10 \times PCR 反应缓冲液含 200 mmol/L Tris-HCl(pH8.4)、15 mmol/L 氯化镁($MgCl_2$)和 500 mmol/L 氯化钾(KCl),-20 $^{\circ}$ C 保存。

- 4.3 T_4 DNA 连接酶(1 U/ μ L)及其 10 \times 连接反应缓冲液

10 \times 反应缓冲液含 350 mmol/L Tris-HCl(pH7.6)、50 mmol/L $MgCl_2$ 和 500 mmol/L KCl 和 5 mmol/L β -巯基乙醇;-20 $^{\circ}$ C 保存。

- 4.4 四种脱氧核糖核苷酸(dATP,dCTP,dGTP,dTTP)混合溶液(各 10 mmol/L)
-20 $^{\circ}$ C 保存。

- 4.5 DNA 分子量标记(DNA Molecular Weight Marker)

λ DNA 和 DNA Marker DL 2000,-20 $^{\circ}$ C 保存。