ICS 65.020.01
B 60

DB21

辽　宁　省　地　方　标　准

DB 21/T ××××—2021

软枣猕猴桃品种鉴别技术规程
SSR 分子标记法

Technical regulation for the identification of *Actinidia arguta*
SSR marker method

（报批稿）

2021-XX-XX 发布　　2021-XX-XX 实施

辽宁省市场监督管理局　发 布

目　　次

1 范围 1
2 规范性引用文件 1
3 术语和定义 1
4 测试准备 2
5 DNA 提取 2
6 PCR 扩增 3
7 PCR 扩增产物检测 3
8 指纹比对 3
9 数据记录 3
10 结果判定 3
附录 A（资料性） 仪器设备与主要试剂、耗材 4
附录 B（资料性） 溶液配制 5
附录 C（规范性） 核心引物 6
附录 D（规范性） 软枣猕猴桃 SSR 等位基因数据记录格式 7
附录 E（规范性） 软枣猕猴桃 SSR 指纹图谱鉴别报告 8

前　　言

本文件按照GB/T 1.1-2020《标准化工作导则　第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件由辽宁省林业和草原局提出并归口管理。

本文件起草单位：辽宁省经济林研究所。

本文件主要起草人：刘振盼、尤文忠、孙阳、周狄、李仁浩、李冬生、陈喜忠、张雪梅、卢立媛、徐开源、宋建宇、郝家臣、于雷。

本文件发布实施后，任何单位和个人如有问题和意见建议，均可以通过来电和来函等方式进行反馈，我们将及时答复并认真处理，根据实际情况依法进行评估及复审。

归口管理部门通讯地址：辽宁省林业和草原局（沈阳市和平区太原北街2号），联系电话：024-23448927。

文件起草单位通讯地址：辽宁省经济林研究所（大连市甘井子区中华西路31号），联系电话：0411-86515158。

软枣猕猴桃品种鉴别技术规程 SSR 分子标记法

1 范围

本文件规定了利用简单重复序列（Simple sequence repeats，SSR）分子标记法对软枣猕猴桃（*Actinidia arguta*(Sieb.&Zucc)Planch.ex Miq.）材料进行鉴别过程中样品准备、DNA提取、PCR扩增、PCR扩增产物检测、指纹比对、数据记录、结果判定等方面的技术要求。

本文件适用于SSR分子标记技术构建软枣猕猴桃资源DNA指纹图谱过程中DNA分子数据采集和鉴别。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T19557.1 植物新品种特异性、一致性和稳定性测试指南 总则

LY/T 2745仁用杏品种鉴定技术规程 SSR分子标记法

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

PCR

指聚合酶链反应（polymerase chain reaction，PCR)，是利用一段DNA为模板，在DNA聚合酶和核苷酸底物共同参与下，将该段DNA扩增至足够数量，以便进行检测分析。

3.2

SSR 分子标记 SSR molecular marker

又称微卫星标记，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，因而可根据两端的序列设计特异性引物，利用PCR技术对两条引物间的DNA重复序列进行扩增，通过电泳可以区分不同大小的扩增产物片段，经荧光染料标记加以区分。

3.3

待检样品 test sample

待鉴别的软枣猕猴桃样品，由送检人提供。

3.4

对照样品 control sample

用于与待检样品进行指纹比对的样品，由送检人提供。

3.5

核心引物 core primer

扩增产物具有高度的稳定性和一致性（无干扰谱带），并具有较强的鉴别能力，可以用于建立软枣猕猴桃比对的人工合成引物。

3.6

SSR 指纹图谱 SSR fingerprint

采用SSR核心引物（或相当于核心引物）扩增出的待检样品和对照样品的DNA片段，通过毛细管电泳，得到不同大小的DNA片段图谱。

3.7

指纹对比 fingerprint comparison

将待检样品与对照样品的SSR指纹图谱进行比对，分析待检样品与对照样品的SSR指纹是否具有差异，并确定其大小。

4 测试准备

4.1 仪器设备与主要试剂、耗材

仪器设备与主要试剂、耗材参见附录A。

4.2 溶液配制

溶液配制方法参见附录B。

4.3 核心引物

核心引物信息参见附录C。

4.4 样品准备

依据NY/T 2324中样本采集的技术规定进行样本采集，3次以上重复。取无病虫害的健康的芽，做好标记后，蒸馏水清洗后-80℃保存。

5 DNA 提取

a） 将样品倒入研钵中，加入液氮研磨2次，约取0.1 mL放入1.5 mL离心管；

b） 加入900 μL 2.5 %CTAB提取液，65℃水浴60 min，每10 min颠倒，混匀；

c） 10000 r•min^{-1}离心1 min，取上清650 μL，加650 μL氯仿∶异戊醇（24:1）混合液，混匀；

d） 10000 r•min^{-1}离心5 min，取上清400 μL，加入800 μL无水乙醇，-20℃放置30 min；

e） 5000 r•min^{-1}离心1 min后倒掉上清液，用70 %乙醇洗3次，自然风干，再用50 μLTE溶解，置于4℃备用或保存；

f） 用琼脂糖凝胶电泳法检测DNA提取质量，要求电泳条带清晰明亮；

g） 用紫外分光光度法测定纯度和浓度，OD260/OD280比值范围在1.7~1.9之间即为可用DNA样品，将其最终质量浓度调至20 ng•μL^{-1}。

6 PCR 扩增

6.1 PCR 反应体系

总体积为20 μL，其中6.0 μL ddH_2O，10 μL 2×Taq master mix，2.0 μL DNA模板（20 ng•μL^{-1}），1.0 μL F-primer（20 μmol•L^{-1}，5’端饰有FAM荧光标记），1.0 μL R-primer（20 μmol•L^{-1}）。

6.2 PCR 扩增程序

PCR扩增程序为：94℃预变性5 min，94℃30 s，55℃30 s，72℃30 s，共35个循环，最后72℃10 min，4℃保存。

7 PCR 扩增产物检测

7.1 标样准备

取PCR产物0.3 μL、LIZ500分子量内标0.5 μL和去离子甲酰胺9.5 μL混合加入PCR板，95℃变性5 min，4℃冷却后离心，加1.0 μL1×Buffer缓冲液。

7.2 上机检测

参照LY/T 2745中毛细管电泳比对方法。

8 指纹比对

根据待检样品与对照样品的谱带位置进行指纹比对，确定是否具有差异；根据各泳道内分子量内标的位置与各样品峰值的位置比较分析，确定待测样品和对照样品的片段大小。

9 数据记录

数据记录采用统一格式，参见附录D。

10 结果判定

10.1 判定方法

将待检样品与对照样品的SSR指纹比对结果进行分析，若待检样品与对照样品有等位基因不同的位点，则依据该位点及其等位基因的不同，判定两者不同；若待检样品与对照样品全部位点等位基因均相同，则判定两者为疑似相同。

10.2 判定结果

根据10.1的判定结果，出具鉴别报告书，参见附录E。

附　录　A
（资料性）
仪器设备与主要试剂、耗材

A.1　仪器设备

冰箱（4 ℃、-20 ℃）精密天平（精度0.001 g以上）、酸度计、2.5 μL移液器、10 μL移液器、100 μL移液器、1000 μL移液器、水浴锅、高压灭菌锅、台式离心机（10000 r•min^{-1}或以上），紫外分光光度计、磁力搅拌器、PCR扩增仪、3730XL测序仪、琼脂粮凝胶电泳仪，凝胶成像系统。

A.2　主要试剂

液氮、三羟甲基氨基甲烷盐酸盐（Tris-HCl）、乙二胺四乙酸二钠（EDTA-Na_2）、十六烷基三甲基溴化铵（CTAB）、氯化钠（NaCl）、聚乙烯吡咯烷酮（PVP）、氯仿：异戊醇（24:1）、2×Taq master mix、引物、琼脂糖、去离子水、无水乙醇、双蒸水、硼酸、B.3　TBE电泳缓冲液。

A.3　主要器材

量筒、玻璃棒、研钵、1.5 mL离心管、移液器配套枪头（2.5 μL、10 μL、100 μL、1000 μL）、PCR管、96孔板。

附　录　B
（资料性）
溶液配制

B.1　DNA提取溶液的配制

B.1.1　1 mol•L^{-1}三羟甲基氨基甲烷盐酸盐（Tris-HCl）溶液（pH8.0）

称取30.28 gTris于250mL烧杯中，加150 mL去离子水充分搅拌溶解，用1 mol•L^{-1} HCl溶液调pH至8.0，定容至250 mL，混匀。棕色瓶分装，4℃冰箱保存。

B.1.2　0.5 mol•L^{-1}乙二胺四乙酸二钠盐（EDTANa$_2$• 2H$_2$O）溶液（pH8.0）

称取46.53 g EDTANa$_2$•2H$_2$O于250 mL烧杯中，加150 mL去离子水充分搅拌溶解，用1 mol•L^{-1} NaOH溶液调pH至8.0，定容至250 mL，混匀。4℃冰箱保存。

B.1.3　DNA提取液

依次称取十六烷基三甲基溴化铵（CTAB）6.25 g、聚乙烯吡咯烷酮（PVP）5.00 g、氯化钠（NaCl）20.454 g至250 mL烧杯中，分别加1 mol•L^{-1} Tris-HCl溶液25 mL、0.5 mol•L^{-1}EDTANa$_2$•2H$_2$O溶液10 mL，60℃水溶解，并用去离子水定容至250 mL，混匀。4℃冰箱保存。

B.1.4　1×TE缓存液

分别量取1 mol•L^{-1} Tris-HCl溶液2.5 mL、0.5 mol•L^{-1}EDTANa$_2$•2H$_2$O溶液0.5 mL，用去离子水定容至250 mL，混匀。4℃冰箱保存。

B.2　引物的稀释

合成的引物在高速离心机中10000 r•min^{-1}离心2 min，加入去离子水稀释到浓度为20 μmol•L^{-1}。

B.3　TBE电泳缓冲液

将Tris108g、硼酸55g、40 ml 0.5 M EDTA溶解在600 ml的去离子水中，调节pH至8.3，加去离子水定容至1L后，室温保存。使用时稀释10倍即可。

附　录　C
（规范性）
核心引物

C.1　核心引物

本文件中PCR反应体系中规定使用的引物，用于软枣猕猴桃样品鉴别。

表 C.1　核心引物

编号	引物名称	引物序列		目的片段大小
		F	R	
1	UDK-096	CCCAAAGTTCCTCACTCTTCC	TAAACAAAAACCAAATCTGGCA	111–173
2	UDK-098	GTAAGGTTGGTACTGGCAGTCA	TGCATGATTATGGTTGGCAT	75–200
3	UDK-099	TCCTATTATTGCTGACACGACA	TGTTATAGGCCACCTCACTGG	65–85
4	UDK-103	TCTTCTTCCCTTTCTTGGCA	GCTGTCTAGTCATTTCCCTCAA	100–167
5	UDK-104	ACATCTCGGCTGAAGATGCT	AGGTTGCATATGAGTGGTTGC	135–192
6	UDK-106	CACCTGTCAAGCATTTGTAGAA	GTGTTGCCAGTGAAGTTATGC	100–150
7	UDK-125	ACGAGCCCAAAATAGAGTTCA	TGAGTGCAGCATAGCTACTTCC	200–269
8	UDK-128	GCTCTCGGGACTGTTTGGTA	GCAACGTAAACTCCGTTAACG	119–210
9	UDK-131	CGGTGTGGAGAGGATACGAT	AAGTAAAGCCATTGTCATTGCA	121–192
10	UDK-143	TGGTGTAAAGTCAAAAACAGCC	AGAAGATTTCATTGTCCTCCCT	94–125
11	UDK-153	CCCCAGTGGAGATCACTTTC	TGGATATCTTGCCCATCTCC	123–192
12	UDK-158	GCCCATCTAATCCGTACTCTG	TCAATTGAAGCAACTCTTCTTGA	120–167

附　录　D
（规范性）
软枣猕猴桃 SSR 等位基因数据记录格式

D.1　软枣猕猴桃SSR等位基因数据记录格式

本文件中用于软枣猕猴桃软枣猕猴桃SSR等位基因数据记录的格式标准。

D.1　软枣猕猴桃SSR等位基因数据记录格式

引物名称	等位基因 1 大小	等位基因 2 大小	等位基因 3 大小	等位基因 4 大小	……
引物 1					
引物 2					
引物 3					
引物 4					
……					

附　录　E
（规范性）
软枣猕猴桃 SSR 指纹图谱鉴别报告

E.1　软枣猕猴桃SSR指纹图谱鉴别报告

本文件规定的样品鉴别报告格式。

表E.1　软枣猕猴桃SSR指纹图谱鉴别报告

送检样品编号		送检样品名称	
对照样品编号		对照样品名称	
送检人			
检测单位		依据标准	
检测引物数量： 检测引物编号： SSR 指纹图谱检测结果： 检测差异引物和谱带： 结论：			
评语： 检测单位（公章） 年　月　　日			