ICS 65.020.01
CCS B 20

DB63

青海省地方标准

DB 63/ T XXXX—2023

青稞品种鉴定技术规程 SNP 分子标记法

点击此处添加与国际标准一致性程度的标识

（征求意见稿）

XXXX－XX－XX 发布　　XXXX－XX－XX 实施

青海省市场监督管理局　　发 布

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。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由青海省农业农村厅提出并归口。

本文件起草单位：中国科学院西北高原生物研究所、青海省农作物种子站、海南州农牧业综合服务中心、青海省乡村产业发展指导中心。

本文件主要起草人：王寒冬、沈裕虎、王蕾、徐金青、边海燕、韩文婷、李春桥、薛明珍、王焕强、李俊仁、包天忠、赵璨、王健斌、陈同睿、尤恩、邓超。

本文件由青海省农业农村厅监督实施。

青稞品种鉴定技术规程 SNP 分子标记法

1 范围

本文件规定了青稞（*Hordeum valgare* L.var.*nudum* Hook.f.）品种鉴定SNP分子标记方法的相关术语和定义、缩略语、仪器设备及试剂、溶液配制、KASP引物信息、引物选择、操作程序、数据记录与统计、结果应用等技术要求。

本文件适用于青稞品种和种质资源的鉴定。

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 4404.1 粮食作物种子 第1部分：禾谷类

GB/T 3543.2 农作物种子检验规程 扦样

GB/T 3543.4 农作物种子检验规程 发芽试验

GB/T 3543.5 农作物种子检验规程 真实性和品种纯度鉴定

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 19495.3 转基因产品检测 核酸提取纯化方法

GB/T 30988 多酚类植物基因组DNA提取纯化及测试方法

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

推荐引物

用本文件进行品种鉴定时选用的一套SNP引物。

3.2

参照品种

具有所用SNP位点上不同等位变异的品种。

3.3

送检样品

送到种子检验机构检验的样品。

3.4

试验样品

在实验室中从送检样品中分离出来的部分样品，供测定某一检验项目使用。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

DNA：脱氧核糖核酸（DeoxyriboNucleic Acid）

KASP：竞争性等位基因特异性PCR（Kompetitive Allele Specific PCR）

SNP：单核苷酸多态性（Single Nucleotide Polymorphism）

5 仪器设备及试剂

仪器设备见附录A.1。试剂见附录A.2，所用试剂均为分析纯。本文件所使用的水应符合GB/T 6682的要求。

6 溶液配制

见附录B。

7 KASP 引物信息

分为Ⅰ、Ⅱ两组。见附录C

8 KASP 引物选择

首先选择附录C中Ⅰ组引物进行扩增。当样品间检测出的差异位点数小于2时，选用附录C中Ⅰ、Ⅱ组所有引物进行扩增。

9 操作程序

9.1 样品准备

送检样品质量应符合GB 4404.1 粮食作物种子 第1部分：禾谷类中对大麦种子纯度的要求。试验样品的分样应符合GB/T 3543.2的规定。按照GB/T 3543.4的规定进行发芽，发芽的籽粒数须大于等于50个。植株长至三叶一心时，按单株采取叶片进行样品制备。

9.2 DNA 样品制备

按照GB/T 19495.3的方法或采用商用的植物基因组DNA提取试剂盒进行DNA的提取。按照GB/T 3543.5的规定，每各送检品种制备的DNA样品数量须大于等于50个单株；单提、单检。试验样品DNA纯度、浓度测试应符合GB/T 30988的规定。

9.3 实时荧光定量 PCR 仪 SNP 分型

SNP分型操作流程如下：

1） 将2 μL DNA样品编号后分别加到96孔PCR板上对应编号的反应孔中，每块PCR板均须加2个阴性对照（即用2 μL超纯水替代DNA样品，其余所加试剂完全一致）。DNA样品尽往PCR板中部摆放，避免放在PCR板的四个角上，每块PCR板只检测一个待检品种。

2） 依试验样品量，按照表1配制KASP基因分型混合液。配制前所有试剂均应短暂地涡旋振荡，补足损失的体积。

表1　KASP 基因分型混合液

试剂	体积（μL）
2×KASP Master mix	5
Primer_Allele [FAM] (10 μmol/L)	0.5
Primer_Allele [HEX] (10 μmol/L)	0.5
Primer_Common (10 μmol/L)	1
超纯水	1
总体积	8

3） 使用微量移液器将9.3 SNP分型操作流程2）中的KASP基因分型混合液分别加入到9.3 SNP分型操作流程1）已加入DNA样品的PCR板上的反应孔中，每孔加8 μL。

4） 用荧光透视的膜将PCR板密封，然后离心（转速3000 rpm，时间30 sec）。

5） KASP反应在实时荧光定量PCR仪上进行，程序设置见表2。

表2　实时荧光定量 PCR 反应程序

步骤	说明	温度	时间	循环数
1	预变性	94℃	15 min	1
2	变性	94℃	20 sec	10
	复性/延伸	61~55℃	60 sec（每循环降低 0.6℃）	
3	变性	94℃	20 sec	26
	复性/延伸	55℃	60 sec	

6） PCR反应结束后，在该仪器上进行荧光数据的读取，读取时程序设置为：温度30℃，时间60 sec，循环数1。

7） 当数据对应的荧光信号较低，分群较散时，可以增加循环后进行荧光读取，同时保证阴性对照没有被扩增。程序设置如下：94℃变性20 sec，57℃复性/延伸60 sec，此步骤进行3个循环。再按照9.3 SNP分型操作流程6）进行荧光数据的读取。

10　数据记录与统计

样品每个SNP位点的等位变异采用荧光定量PCR仪检出的荧光信号表示。通过读取荧光信号确定试验样品在该位点的等位变异并进行记录和统计。

11　结果应用

当样品间差异位点数大于等于2，则判定为“不同品种”；当样品间差异位点数等于1，判定为“近似品种”；当样品间差异位点数等于0，判定为“极近似品种或相同品种”。

另外，可将试验样品数据结果直接与附录D参照品种SNP碱基类型进行比对，当与参照品种一致时，可以鉴定为某一品种。

附　录　A
（规范性）
主要仪器设备及试剂

A.1　主要仪器设备

实时荧光定量PCR仪、电子恒温不锈钢水浴锅、电子天平、磁力搅拌机、高速台式离心机、高通量组织研磨仪、微量分光光度计、高压灭菌锅、酸度计、微量移液器、冰箱。

A.2　主要试剂

乙二胺四乙酸二纳、三羟甲基氨基甲烷、盐酸、氢氧化钠、氯化钠、十六烷基三甲基溴化铵、β-巯基乙醇、Tris-饱和酚、三氯甲烷、异丙醇、无水乙醇、2×KASP Master mix、KBD Assay mix、超纯水。

附 录 B
（规范性）
溶液配制

B.1 DNA提取试剂

B.1.1 0.5 mol/L乙二胺四乙酸二纳盐（EDTA）（pH 8.0）溶液

称取9.305 g的EDTA-$Na_2 \cdot 2H_2O$，加40 mL超纯水，充分溶解，用0.8 g~1.1 g NaOH固体调节pH至8.0，定容至50 ml。在103.4 kPa（121℃）条件下灭菌20 min，室温保存。

B.1.2 1 mol/L三羟甲基氨基甲烷盐酸（Tris - HCl）（pH 8.0）溶液

称取6.06 g的Tris，加40 ml的超纯水，充分溶解。用1.8 mL~2.2 mL 的浓HCl（36%~38%）调节pH至8.0，定容至50 ml。灭菌温度和时间同B.1.1，室温保存。

B.1.3 DNA提取液

依次加入十六烷基三甲基溴化铵（CTAB）8 g、氯化钠32.7 g、10 mL Tris - HCl溶液（pH 8.0）（见B.1.2）和4 mL EDTA溶液（pH 8.0）（见B.1.1），再加入超纯水，充分溶解后，用超纯水定容至400 mL。灭菌温度和时间同B.1.1，4 ℃保存。

B.1.4 10倍DNA溶解液

取10 mL 1 mol/L Tris - HCl溶液（pH 8.0）（见B.1.2）和2 mL 0.5 mol/L EDTA溶液（pH 8.0）（见B.1.1），加入超纯水，混合均匀，定容至100 ml。分装后灭菌，灭菌温度和时间同B.1.1，室温保存。

附 录 C
（规范性）
推荐 KASP 引物

推荐KASP引物见表C.1

表C.1 推荐 KASP 引物

标记	引物组别	染色体	等位变异	KASP 引物序列（5′–3′）
1H_1	Ⅰ	1H	A/T	Primer_Allele [FAM]: CTGAGTTTGTGGAAGGAGCTATTTTT Primer_Allele [HEX]: CTGAGTTTGTGGAAGGAGCTATTTTA Primer_Common: TCAGTAAGAGTGAAATGACCTGCAACAAA
2H_1	Ⅰ	2H	C/A	Primer_Allele [FAM]: TGTTGCTCCTTCTGCTGCCC Primer_Allele [HEX]: GTTGTTGCTCCTTCTGCTGCCA Primer_Common: CCACACAAACCTCACTGCTAGTAGTA
3H_1	Ⅰ	3H	G/A	Primer_Allele [FAM]: CGCAACACCTGGATTCGGTCG Primer_Allele [HEX]: CGCAACACCTGGATTCGGTCA Primer_Common: CGCTGGCAGCTCCAGGGCAA
4H_1	Ⅰ	4H	G/T	Primer_Allele [FAM]: GCGTCAGGTTGAGGAGATTCTG Primer_Allele [HEX]: GGCGTCAGGTTGAGGAGATTCTT Primer_Common: AAGGTTGCCAAGCTCAAAAAGGAGAAATT
5H_1	Ⅰ	5H	G/A	Primer_Allele [FAM]: CGTCAGCACTGACTGTCCC Primer_Allele [HEX]: CTCGTCAGCACTGACTGTCCT Primer_Common: CTTGCCTGCATCCATTCATTCAAATACAA
6H_1	Ⅰ	6H	G/A	Primer_Allele [FAM]: CCAATTCGCCTGATTAAACCAACC Primer_Allele [HEX]: CTCCAATTCGCCTGATTAAACCAACT Primer_Common: ACAGATCTGGCGGACAGTTATGGAA
7H_1	Ⅰ	7H	G/A	Primer_Allele [FAM]: AGAAATATTCCAGCCGGCCGAG Primer_Allele [HEX]: AGAAATATTCCAGCCGGCCGAA Primer_Common: CGGTACTACCGCCAGAGTTCAAAAT
1H_2	Ⅱ	1H	A/G	Primer_Allele [FAM]: GCGACGCAGCACGACCGA Primer_Allele [HEX]: GCGACGCAGCACGACCGG Primer_Common: CTGATTCGACGCAGCGCTGGAA
2H_2	Ⅱ	2H	A/G	Primer_Allele [FAM]: GACAAGGCCAGCGGTGCAGT Primer_Allele [HEX]: ACAAGGCCAGCGGTGCAGC Primer_Common: TCGTGCACGCCAAGACCTCCAA
3H_2	Ⅱ	3H	G/A	Primer_Allele [FAM]: CCTCCGGTGGCCGGCG Primer_Allele [HEX]: GCCTCCGGTGGCCGGCA Primer_Common: GGCCGGATCCAGGCTCCCTT

表 C.1（续）

标记	引物组别	染色体	等位变异	KASP 引物序列（5′–3′）
4H_2	Ⅱ	4H	T/C	Primer_Allele [FAM]: CCACCTCCTTCTCCAGCCGT Primer_Allele [HEX]: CACCTCCTTCTCCAGCCGC Primer_Common: GGCGGGCCCAAGATGGGCTT
6H_2	Ⅱ	6H	C/A	Primer_Allele [FAM]: ATTGGACTAATGGAGGAGTCACTTC Primer_Allele [HEX]: AATTGGACTAATGGAGGAGTCACTTA Primer_Common: TCCAAACTGTTTTGGGGAAATTACTCCTT
7H_2	Ⅱ	7H	G/A	Primer_Allele [FAM]: GGCGGCACCGACGCCG Primer_Allele [HEX]: CTGGCGGCACCGACGCCA Primer_Common: GCTAAGCCCCGCCGGCCAT
1H_3	Ⅱ	1H	C/T	Primer_Allele [FAM]: GCCACCCAACCGTAGCAGC Primer_Allele [HEX]: CGCCACCCAACCGTAGCAGT Primer_Common: GGTGCCCTAGGGTTTCCCCTTA
2H_3	Ⅱ	2H	G/T	Primer_Allele [FAM]: GGTGGTCTGATCCTCAAAGGC Primer_Allele [HEX]: GGGTGGTCTGATCCTCAAAGGA Primer_Common: CCTTCCGTCACAGCCATGAAGTTTA
3H_3	Ⅱ	3H	C/T	Primer_Allele [FAM]: CATGCCTTGCATAATTTACAAGTTATGC Primer_Allele [HEX]: ACATGCCTTGCATAATTTACAAGTTATGT Primer_Common: CTCCGAACCAAACACTCTAATCATAACTT
4H_3	Ⅱ	4H	C/A	Primer_Allele [FAM]: GTAGCGCCACTTGCGTGCTC Primer_Allele [HEX]: AGTAGCGCCACTTGCGTGCTA Primer_Common: CTTCCTCCTCCCACACCCGTAT
6H_3	Ⅱ	6H	G/A	Primer_Allele [FAM]: GCACTAAACATCGCACTCGGG Primer_Allele [HEX]: GTGCACTAAACATCGCACTCGGA Primer_Common: TTAGGCGATTCGTGATCGCAGCTAA
7H_3	Ⅱ	7H	T/G	Primer_Allele [FAM]: GCCTCAGCCTCCGCCTCA Primer_Allele [HEX]: GCCTCAGCCTCCGCCTCC Primer_Common: CGGAGGCTGAGGCGGAGCAT
1H_4	Ⅱ	1H	T/C	Primer_Allele [FAM]: CAAATCTATGTTTGCCGTGTACATTGT Primer_Allele [HEX]: AAATCTATGTTTGCCGTGTACATTGC Primer_Common: GCTCCTATCACCACAACTGCAAGTA
2H_4	Ⅱ	2H	C/G	Primer_Allele [FAM]: GCGTTTCGCCAGCGCACAG Primer_Allele [HEX]: GCGTTTCGCCAGCGCACAC Primer_Common: ATCGACCAATAGATTTGGGGAAACGTTTA
2H_5	Ⅱ	2H	T/C	Primer_Allele [FAM]: GCGCACCGGTGCGTGCTT Primer_Allele [HEX]: GCGCACCGGTGCGTGCTC Primer_Common: CCGAAGAGCTCGGCGTCGAA
3H_4	Ⅱ	3H	C/T	Primer_Allele [FAM]: CAATACCTACCAATGGTATATAGCAAG Primer_Allele [HEX]: AACAATACCTACCAATGGTATATAGCAAA Primer_Common: GACCTGAAAGCAGTACTAACGATATCTTA

表 C.1（续）

标记	引物组别	染色体	等位变异	KASP 引物序列（5′–3′）
4H_4	Ⅱ	4H	G/A	Primer_Allele [FAM]: CGCTCCGCCATCATCGGC Primer_Allele [HEX]: GCGCTCCGCCATCATCGGT Primer_Common: CAGGAAGGCGCACCGACACTTA
6H_4	Ⅱ	6H	T/C	Primer_Allele [FAM]: GGCATTGGCAGCTTCAACACGA Primer_Allele [HEX]: GCATTGGCAGCTTCAACACGG Primer_Common: TGCTGTCCAGTTTTCAGCTCCTGTT
6H_5	Ⅱ	6H	C/T	Primer_Allele [FAM]: AGGTAACAACAATGAAGCGAACGAC Primer_Allele [HEX]: AAGGTAACAACAATGAAGCGAACGAT Primer_Common: CGTCCTCCGCCTCATCGTCAT
6H_6	Ⅱ	6H	A/G	Primer_Allele [FAM]: TCTTGATGGCGTCGTCCA Primer_Allele [HEX]: GCTTCTTGATGGCGTCGTCCG Primer_Common: GAAGAAGCGGCCCAAGCAGCTA
7H_4	Ⅱ	7H	T/A	Primer_Allele [FAM]: GTACCGTCATCCTTGCGGTTGT Primer_Allele [HEX]: GTACCGTCATCCTTGCGGTTGA Primer_Common: GAAAGTCTTCGCAAAAAGTCCGACGAA

注：［ ］中为标记荧光

附　录　D
（资料性）
参照品种 SNP 碱基类型

参照品种推荐引物变异位点SNP碱基类型见表D.1

表D.1　参照品种推荐引物变异位点 SNP 碱基类型

品种名称	1H_1	1H_2	1H_3	1H_4	2H_1	2H_2	2H_3	2H_4	2H_5	3H_1	3H_2	3H_3	3H_4	4H_1
福 8-4	T	R	C	T	M	A	K	C	T	G	G	T	T	G
莫多吉 1 号	A	R	C	Y	C	A	K	G	T	G	G	T	T	K
门农 1 号	A	R	C	Y	C	A	K	G	T	G	G	T	T	K
东青 1 号	T	R	C	Y	C	A	K	G	T	G	R	T	C	G
同德系选 8 号	A	R	C	Y	C	A	K	C	T	G	G	T	T	K
互青 2 号	A	R	C	T	C	A	K	G	T	G	R	T	T	G
北青 1 号	T	R	C	Y	C	A	K	S	Y	G	G	T	T	G
北青 4 号	T	R	C	Y	M	A	K	C	C	G	R	T	T	G
北青 5 号	T	R	C	Y	M	A	K	S	T	G	G	T	T	K
北青 6 号	T	R	Y	Y	C	A	K	C	C	G	G	T	T	G
北青 7 号	T	R	C	Y	C	A	K	G	T	G	G	T	C	G
北青 8 号	A	R	C	Y	M	A	K	G	T	G	G	T	T	K
昆仑 1 号	T	R	C	Y	C	A	K	C	C	G	G	Y	C	G
昆仑 2 号	T	R	C	T	M	A	G	C	C	G	G	C	C	G
昆仑 3 号	T	R	C	Y	C	A	K	C	C	G	R	C	C	G
昆仑 8 号	T	R	C	T	C	A	K	C	C	G	G	T	C	K
昆仑 10 号	T	R	C	T	C	A	K	C	C	G	G	T	C	G
昆仑 12 号	T	A	C	T	M	A	K	C	T	G	G	T	T	G
昆仑 164	T	R	C	Y	M	A	K	C	C	G	R	T	T	G
昆仑 13 号	T	R	C	T	C	A	K	C	T	G	G	T	T	G
巴青 1 号	A	R	C	Y	M	A	K	C	T	G	R	Y	T	G
昆仑 14	T	A	C	T	C	A	G	C	T	G	R	C	T	G
昆仑 15	T	A	C	T	C	A	K	C	T	G	G	T	T	G

表 D.1（续）

品种名称	4H_2	4H_3	4H_4	5H_1	6H_1	6H_2	6H_3	6H_4	6H_5	6H_6	7H_1	7H_2	7H_3	7H_4
福 8-4	C	A	R	G	G	A	G	C	Y	G	G	G	K	T
莫多吉 1 号	C	A	G	G	R	A	R	C	Y	G	R	R	G	T
门农 1 号	C	A	G	G	R	A	G	C	Y	G	R	G	T	T
东青 1 号	C	A	G	G	G	A	G	C	C	G	G	G	G	T
同德系选 8 号	C	A	G	G	G	A	R	C	Y	G	R	G	T	T
互青 2 号	C	A	R	G	G	A	R	C	Y	G	R	G	K	T
北青 1 号	C	A	G	G	G	A	G	Y	Y	R	G	G	T	T
北青 4 号	C	A	G	G	G	A	G	C	C	G	G	R	T	T
北青 5 号	C	A	G	G	G	A	G	C	Y	G	G	G	K	T
北青 6 号	C	A	G	G	G	A	G	C	Y	G	R	G	K	T
北青 7 号	C	A	G	G	G	A	G	C	Y	G	R	G	T	T
北青 8 号	C	A	G	G	R	A	G	Y	Y	G	G	R	G	T
昆仑 1 号	C	A	R	G	R	A	G	C	Y	G	G	G	K	T
昆仑 2 号	C	A	R	G	G	A	G	C	Y	G	R	G	G	T
昆仑 3 号	C	A	R	G	R	A	R	C	Y	G	G	G	K	T
昆仑 8 号	C	M	G	G	G	A	G	C	Y	G	G	G	G	T
昆仑 10 号	C	A	G	G	G	A	G	C	Y	G	R	G	K	T
昆仑 12 号	C	A	G	G	G	A	R	T	Y	G	G	G	K	T
昆仑 164	C	A	G	G	G	A	G	C	Y	G	R	G	K	T
昆仑 13 号	C	A	G	G	G	A	R	T	Y	G	G	G	K	T
巴青 1 号	C	A	G	G	R	M	G	Y	Y	G	R	R	K	T
昆仑 14	C	A	G	G	G	A	G	C	Y	G	G	G	G	T
昆仑 15	C	A	A	G	G	A	G	Y	Y	G	R	G	K	T

注：M:A/C; K:T/G; Y:T/C; R:A/G; W:A/T; S:G/C