ICS 65.020.01
CCS B 61

DB23

黑 龙 江 省 地 方 标 准

DB23/T XXXX—XXXX

红松无性系 SSR 鉴别技术规程

（征求意见稿）

主要起草单位：东北林业大学

联系人：张含国

联系电话：13030004632

邮箱：hanguozhang1@sina.com

XXXX-XX-XX 发布　　XXXX-XX-XX 实施

黑龙江省市场监督管理局 发布

前　言

本标准依据 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。

本标准由黑龙江省林业和草原局提出并归口。

本标准起草单位：东北林业大学

本标准主要起草人：张含国、闫平玉、张磊、孙国飞、潘凤刚、李金泉、石宝英、胡振宇、曹振宇、李志新

红松无性系 SSR 鉴别技术规程

1 范围

本标准规定了利用简单重复序列（Simple sequence repeat, SSR）对红松（*Pinus koraiensis*）无性系鉴别技术规程的范围、规范性引用文件、术语和定义、仪器设备及试剂、溶液配制、引物信息、操作程序、数据记录与统计、判定规则。

本标准适用于红松无性系的 SSR 指纹数据采集及品种鉴定，家系等可参考本标准。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改章节）适用于本文件。

GB/T 6682 中国实验室用水国家标准

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

红松无性系

从红松天然群体或人工杂交、诱变群体中，选择优良单株，通过无性繁殖得到的红松品系。

3.2

参照无性系

具有 SSR 位点上不同等位变异的红松无性系，用于辅助确定送检样品的等位变异，校正仪器设备的系统误差。

3.3

核心引物

红松无性系鉴定中优先选用的一套 SSR 引物，具有多态性高、重复性好等综合特性。

4 技术原理

由于不同红松无性系遗传组成不同，基因组 DNA 中简单重复序列的重复次数存在广泛差异，这种差异可以通过 PCR 扩展及电泳方法进行检测，从而能够区分不同红松无性系。

5 仪器设备及试剂

见附录 A。

6 溶液配制

见附录 B。

7 引物信息

核心引物名单及序列见附录 C。

8 操作程序

8.1 样品制备

送检样品宜为一年生针叶，-80℃超低温冷冻保存。同一红松无性系样品数应大于 5 个。

8.2 DNA 提取

CTAB 提取法：新鲜针叶 200 mg~300 mg，置于研钵中，加液氮充分研磨，移入 2.0 mL 离心管；每管加入 700 μL 65℃预热的 CTAB 提取液后，充分混合，65℃保温 60 min 期间多次颠倒混匀；每管加入等体积的三氯甲烷/异戊醇混合液，充分混合后，静置 10 min；12 000 g 离心 15 min 后，吸取上清液至一新离心管,再加入等体积预冷的异丙醇，颠倒离心管数次，在-20℃放置 30 min；4℃，12 000 g 离心 10 min，弃上清液；加入 70%乙醇，旋转离心管数次，弃去乙醇；将离心管倒立于热有滤纸的实验台上，室温干燥沉淀；加入 100 μL 超纯水或 TE 缓冲液，1%琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量，并进行浓度测定，稀释至 20 ng/μL 充分溶解后备用。

试剂盒提取法：使用经验证适合 SSR 指纹技术的商业试剂盒，按照试剂盒的使用说明操作。

8.3 PCR 扩增

8.3.1 引物选择

应选择附录 C 中核心引物进行检测，当检测出不同无性系差异位点数小于 2 时，再选用其他引物进行检测；必要时进一步选择特定标记进行检测。

8.3.2 反应体系

各组分的终浓度如下：DNA 聚合酶 0.1 U/μL，dNTP 0.2 mmol/L，1×PCR 缓冲液（含 Mg^{2+} 2.5 mmol/L），样本 DNA 溶液 1 ng/μL，正向反向引物各 0.25 μmol/L，其余以超纯水补充至所需体积。

8.3.3 反应程序

94℃预变性 3 min，1 个循环；94℃变性 30 s，51-60℃退火 30 s，72℃延伸 15 s，共 35 个循环；72℃延伸 7 min，4℃保存。

8.4 PCR 产物检测

8.4.1 聚丙烯酰胺凝胶电泳（PAGE）

8.4.1.1 清洗玻璃板

将玻璃板反复擦洗干净，双蒸水擦洗 2 遍，95%乙醇擦洗 2 遍，干燥。

8.4.1.2 组装制胶板

待玻璃板彻底干燥后组装电泳版，调平。

8.4.1.3 灌胶

在 40 mL 7% PAGE 胶中加入 TEMED 和 25%过硫酸铵各 60 μL，迅速混匀后匀速灌胶，以防出现气泡，在上部轻轻地插入梳子，使其聚合 1 h。

8.4.1.4 电泳

小心拔去梳子后移液器吹吸点样孔，清除气泡和杂质，每一个加样孔点入 1 μL 混合有 DNA Loading Buffer（终浓度为 1×）的样品，180 V 恒电压电泳 1 h。电泳结束后小心分开两块玻璃板，取下凝胶。

注：预期扩增片段大小在 150 bp 以下时适当缩短电泳时间，扩增产物片段在 300 bp 以上时适当延长电泳时间，以保证片段分离效果。

8.4.1.7 银染

a)染色：凝胶置于染色液中水平摇动染色 8 min；

b)漂洗：双蒸水快速漂洗 15 s;

c)显影：凝胶置于染色液中水平摇动至带纹出现；

d)漂洗：双蒸水漂洗 1 min。

9 数据记录与统计

9.1 数据记录

将每个扩增位点的等位变异片段大小进行比较，确定样品在该位点的等位变异；纯合位点的基因型数据记录为 X/X，杂合位点的基因型数据记录为 X/Y，其中 X、Y 分别为该位点上两个等位变异，小片段数据在前，大片段数据在后；缺失位点基因型数据记录为 0/0。

示例 1：

样品在某个位点上仅出现一个等位变异，大小为 150 bp，在该位点的基因型记录为 150/150。

示例 2：

样品在某个位点上有两个等位变异，大小分别为 150 bp、160 bp，在该位点的基因型记录为 150/160。

9.2 数据统计

对送验样品进行分析时，可直接进行无性系之间的对比，如果送验样品某个引物位点出现可见的异质性且影响到差异位点判定时，可重新提取至少 10 个个体的 DNA，并用该引物重新扩增，统计在该引物扩增位点上不同个体的基因型(或等位变异)及所占比例。当对送检样品多个个体 DNA 进行分析时，应比较样品在各引物位点的基因型以及样品在各引物位点的等位变异，并统计其在各引物位点的各种基因型(或等位变异)及所占比例。

10 判定规则

10.1 结果判定

当无性系间差异位点数≥2 时，判定为“不同”；当无性系间差异位点数=1 时，判定为“近似”；当样品间差异位点数=0 时，判定为“相同或极近似”。

对于利用附录 C 中核心引物未能检测到≥2 个差异位点的无性系，如果相关无性系存在特定标记，可增加特定标记对其检测，或筛选表中其他引物进行鉴别。

10.2 结果表述

比较位点数：____，比较位点为：____；

差异位点数：____，差异位点为：____；

判定结果为：____。

附录 A
（规范性附录）

主要仪器设备及试剂

A.1 主要仪器设备

A.1.1 PCR 扩增仪。
A.1.2 电泳仪：具有恒电压、恒电流功能。
A.1.3 垂直电泳槽及配套的制胶附件。
A.1.4 水平电泳槽及配套的制胶附件。
A.1.5 高速离心机：最大离心力大于 15 000 g。
A.1.6 水平摇床。
A.1.7 电子天平：感应为 0.1 mg。
A.1.8 微量移液器：规格分别为 2.5 μL、20 μL、200 μL、1 000 μL，连续可调。
A.1.9 磁力搅拌器。
A.1.10 超微量分光光度计。
A.1.11 微波炉。
A.1.12 高压灭菌锅。
A.1.13 水浴锅。
A.1.14 超低温冰箱：最低温度-80℃。
A.1.15 制冰机。
A.1.16 凝胶成像系统。

A.2 主要试剂

A.2.1 十六烷基三乙基溴化铵（CTAB）。
A.2.2 三氯甲烷。
A.2.3 异丙醇。
A.2.4 异戊醇。
A.2.5 乙二胺四乙酸二钠。
A.2.6 三羟甲基氨基甲烷。
A.2.7 氢氧化钠。
A.2.8 10×Buffer 缓冲液：含 Mg2+ 25 mmol/L。
A.2.9 dNTP。
A.2.10 Taq DNA 聚合酶。
A.2.11 琼脂糖。
A.2.12 DNA 分子量标准。
A.2.13 核酸染色剂。
A.2.14 去离子甲酰胺。
A.2.15 溴酚蓝。
A.2.16 二苯甲青。
A.2.17 甲叉双丙烯酰胺。
A.2.18 丙烯酰胺。
A.2.19 硼酸。

A.2.20 无水乙醇。

A.2.21 过硫酸铵。

A.2.22 硝酸银。

A.2.23 甲醛。

附　录　B
（规范性附录）

溶液配制

B.1　DNA 提取溶液的配制

B.1.1　0.5mol/L EDTA 溶液

186.1 g $Na_2EDTA·2H_2O$ 溶于 800 mL 水中，用固体 NaOH 调 pH 至 8.0，定容至 1 L，高压灭菌。

B.1.2　1mol/L Tris-HCI 溶液

60.55 g Tris 碱溶于适量水中，加 HCl 调 pH 至 80 定容至 500 mL，高压灭菌。

B.1.3　0.5mol/L HCI 溶液

25 mL 浓盐酸（36%~38%），加水定容至 500mL。

B.1.4　CTAB 提取液

81.7 g 氯化钠和 20 g CTAB 溶于适量水中，然后加入 1 mol/L Tris HCl 100mL，0.5 mol/L EDTA 40 mL，定容至 1 L，4℃贮存。

B.1.5　TE 缓冲液

1 mol/L Tris-HCl 5 mL，0.5 mol/L EDTA 1 mL，加 HCI 调 pH 至 8.0，定容至 500 mL。

B.2　PCR 扩增溶液的配制

B.2.1　SSR 引物

用超纯水分别配制前引物和后引物终浓度均 10 μmol/L 的工作液。

注：干粉配制前应首先快速离心。

B.2.2　6×加样缓冲液

去离子甲酰胺 49 mL，0.5 mol/L 的 EDTA 溶液（pH8.0）1 mL，溴酚蓝 0.125 g，二甲苯青 0.125 g。

B.3　聚丙烯酰胺凝胶电泳溶液的配制

B.3.1　30%PAGE 胶

丙烯酰胺 290 g 和甲叉双丙烯酰胺 10 g 定容至 1 L。

B.3.2　7%PAGE 胶

10×TBE 缓冲液 50 mL，30% PAGE 胶 233.3 mL，定容至 1 L。

B.3.3　25%过硫酸铵溶液

0.25 g 过硫酸铵溶于 1 mL 超纯水中。

B.3.4　10×TBE 缓冲液

三羟甲基氨基甲烷 108 g，硼酸 55 g，0.5 mol/L EDTA 溶液 37 mL，定容至 1 L。

B.3.5　0.5×TBE 缓冲液

取 10×TBE 缓冲液 50 mL，加水定容至 1 L。

B.4　银染溶液的配制

B.4.1　染色液

称取 1 g 硝酸银，加水定容至 1 L。

B.4.2　显影液

量取 1 L 蒸馏水中，加入 15 g 氢氧化钠和 5 mL 甲醛，混匀。（甲醛现用现加）

注:除银染溶液的配制可使用符合 GB/T 6682 规定的三级水外试验中仅使用确认为分析纯的试剂和 GB/T 6682 规定的一级水。

附　录　C
（资料性附录）

核心引物列表

核心引物序列及参考无性系见表 C.1。

表 C.1 引物名单及序列信息

位点名称	引物序列	预期片段大小	参考无性系	基因型
ALBI_16	F: TGTTATTGCTAACGGAGATGG R: TTTTCTATTGTAGACAGTGTCGTCTT	215	渤海省67	215/215
EPD11	F: GTGGATGCAATGAAGAAAAACAT R: ACGAATTGCAAAACTGCATAACT	138-145	渤海省10	138/145
			鹤岗5	138/138
			苇青1号028	140/143
EPD12	F: CTAAAGGAAACTCGAAACCCTTG R: ATGTCGATGATGATGAGGATGAT	140-144	小北湖007	142/142
			苇青2号042	140/144
EPD32	F: CCTGCTAAAATTCATCTACATCCC R: AAAGCGAGGAAAATTTGCAGTAT	150-156	渤海省51	150/150
			渤海省69	150/156
			苇青2号042	154/156
EPD70	F: AGGCTTTAGTTTTTCAAATCCCA R: AAGTTGTTTGCTCGACTGTTAGC	140-145	小北湖024	140/140
			小北湖007	140/145
P49	F: GAGATGAGCGAATCTGGG R: TACAAGTTCCACCTACGG	290-294	小北湖007	290/294
			小北湖024	294/294
			鹤岗29	290/290
P70	F: CAACATCGCCAATGACTC R: CCTACCTACGCTCTGCTC	296-302	渤海省71	298/300
			渤海省73	302/302
			渤海省92	296/296
			渤海省93	296/298
P72	F: TGGGTTACCACCTTTAGC R: CAATCAGAGTCTGGAGCA	200-208	渤海省008	200/202
			小北湖024	202/208
			渤海省51	208/208
			苇青5号074	200/208
P79	F: CCACCGCCAAGTCCATTA R: GCTTTGTTAGCCGTCCAG	200-203	渤海省69	203/203
			渤海省71	200/200
			苇青1号028	200/203
P82	F: GGAAGATGAATCGCAAACC R: ACACCCGCCTGAAGAGCA	284-290	小北湖007	284/290
			小北湖024	290/290
			苇青5号074	287/290
P90	F: CCGCAAATCCGAGCAATG R: GCAGCAGACGATAATGAACCC	141-147	渤海省70	145/145
			渤海省71	145/147
			孟家岗090	141/145