ICS 65.120
CCS B 25

NY

中华人民共和国农业行业标准

NY/T ××××—202×

饲用燕麦品种真实性鉴别 SSR 标记法

**Forage oat (*Avena sativa* L.) variety genuineness determination by SSR
markers**

(公开征求意见稿)

202×-××-××发布

202×-××-××实施

中华人民共和国农业农村部 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。

本文件由农业农村部畜牧兽医局提出。

本文件由全国畜牧业标准化技术委员会（SAC/TC 274）归口。

本文件起草单位：XXXX、XXXX、XXXX。

本文件主要起草人：XXX、XXX、XXX、XXX、XXX、XXX、XXX、XXX、XXX、XXX、XXX、XXX、XXX、XXX、XXX。

饲用燕麦品种真实性鉴别 SSR 标记法

1 范围

本文件描述了利用简单重复序列（Simple Sequence Repeat，SSR）分子标记法进行饲用燕麦（*Avena sativa* L.）品种真实性鉴别的方法及结果判定的规则。

本文件适用于具有标准样品或对照样品的饲用燕麦品种真实性鉴别。

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/T 2930.1 草种子检验规程 扦样

GB/T 2930.2 草种子检验规程 净度分析

GB/T 2930.7 草种子检验规程 种及品种测定

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

3 术语及定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

品种真实性 variety genuineness

品种与文件记录（如标签等）是否相符。

[来源：GB/T-2930.7-2017，3.1，有修改]

3.2

标准样品 standard sample

国家指定机构保存的经认定代表审定品种特征特性的实物种子或植物组织样品。

3.3

对照样品 control sample

送检方提供的用于与待测样品做对比进行鉴别的实物种子或植物组织样品。

4 原理

饲用燕麦不同品种的基因组存在着世代稳定遗传的 SSR 重复次数差异。利用 SSR 标记引物，以代表性检测样品的 DNA 为模板进行聚合酶链式反应（polymerase chain reaction, PCR）扩增和电泳，再与标准样品或对照样品比较，根据扩增产物片段长度差异，即可鉴别品种的真实性。

5 试剂与材料

除另有规定外，分析所用试剂均为分析纯。试剂配制所用水应符合 GB/T 6682 规定的一级水的要求，其中银染溶液的配制可以使用符合三级要求的水。

5.1 液氮（N₂）。

5.2 异丙醇（C₃H₈O）。

5.3 无水乙醇（CH₂CH₃OH）。

5.4 Taq DNA 聚合酶。

5.5 四甲基乙二胺（C₆H₁₆N₂）。

5.6 去离子甲酰胺（C₃H₄NO₂）。

5.7 剥离硅烷。

5.8 荧光染料。

5.9 DNA 分析仪用分子量内标。

5.10 10×PCR 缓冲液（含 Mg²⁺）。

5.11 1 mol/L Tris-HCl 溶液

称取 12.11 g 三羟甲基氨基甲烷[NH₂C(CH₂OH)₃, Tris]溶于适量水中，加盐酸（HCl）调 pH 至 8.0，加水定容至 100 mL，121℃高压灭菌 20 min，室温保存。

5.12 0.5 mol/L EDTA 溶液

称取 18.61 g 二水合乙二胺四乙酸二钠（Na₂EDTA·2H₂O, EDTA）溶于 80 mL 水中，用固体氢氧化钠（NaOH）将 pH 调至 8.0，加水定容至 100 mL，121℃高压灭菌 20 min，室温保存。

5.13 CTAB 提取液

称取 81.70 g 氯化钠 (NaCl)、20.00 g 十六烷基三甲基溴化铵 ($C_{16}H_{33}(CH_3)_3NBr$, CTAB) 和 2 g 聚乙烯吡咯烷酮 K30 (C_6H_9NO , PVP) 溶于水中, 加入 100 mL 1 mol/L 的 Tris-HCl (6.11), 40 mL 0.5 mol/L 的 EDTA 溶液 (5.12), 加水定容至 1,000 mL, 121 °C 高压灭菌 20 min, 4 °C 储存。DNA 提取前, 按照每 100 mL CTAB 溶液加入 2 mL β -巯基乙醇 (C_2H_6OS) 在 65 °C 水浴锅中预热。

5.14 氯仿: 异戊醇混合液

氯仿 ($CHCl_3$): 异戊醇 ($C_5H_{12}O$) 两种有机溶剂按体积比 24:1 混匀。

5.15 70%的乙醇溶液

将 350 mL 无水乙醇 (CH_2CH_3OH) 与 150 mL 水混合为 500 mL 70%的乙醇溶液。

5.16 TE 缓冲液

0.5 mol/L EDTA (5.12) 1 mL, 1 mol/L 的 Tris-HCl (5.11) 5 mL, 加盐酸调 pH 至 8.0, 加水定容至 500 mL, 121 °C 高压灭菌 20 min, 4 °C 储存。

5.17 SSR 引物

用超纯水 (ddH_2O) 分别配制上游引物、下游引物终浓度为 10 μ mol/L 的储存液, -20 °C 储存。

5.18 dNTP

用超纯水分别配制 dATP、dGTP、dCTP、dTTP 终浓度 100 mmol/L 的储存液。各取 20 μ L 混合, 用超纯水 720 μ L 定容至终浓度 2.5 mmol/L 的工作液, 高压灭菌, -20 °C 保存。

5.19 亲和硅烷缓冲液

49.75 mL 无水乙醇和 250 μ L 冰醋酸 ($C_2H_4O_2$), 用去离子水定容至 50 mL, 常温避光干燥处保存。

5.20 亲和硅烷溶液

将 5 μ L 亲和硅烷原液和 1 mL 亲和硅烷缓冲液 (5.19) 混合, 常温避光干燥处保存。

5.21 10×TBE 缓冲液

称取 108.00 g 三羧甲基氨基甲烷 ($NH_2C(CH_2OH)_3$) 和 55.00 g 硼酸 (H_3BO_3) 溶于水中, 加入 37 mL 0.5 mol/L 的 EDTA (5.12) 溶液, 用蒸馏水定容至 1,000 mL, 常温避光干燥处保存。

5.22 1×TBE 缓冲液

量取 500 mL 10×TBE 缓冲液 (5.21), 用去离子水定容至 5,000 mL, 常温避光干燥处保存。

5.23 40% 19:1 聚丙烯酰胺溶液的配制

称取 190.00 g 丙烯酰胺 (C_3H_5NO) 和 10.00 g 甲叉双丙烯酰胺 [$(H_2C=CHCONH)_2CH_2$], 溶于 400 mL 去离子水中, 定容至 500 mL, 4 °C 避光干燥处保存。

5.24 6%变性聚丙烯酰胺溶液的配制

称取 420.00 g 尿素[CO(NH₂)₂]溶于水中，加入 100 mL 10×TBE 缓冲液（5.21）和 150 mL 40% 聚丙烯酰胺溶液（5.23），过滤后加水定容至 1,000 mL，用普通滤纸过滤 2 次，4 °C 避光保存。

5.25 10%过硫酸铵溶液

称取 10.00 g 过硫酸铵[(NH₄)₂S₂O₈]溶于 100 mL 水中。分装后保存于冰箱冷冻室中保存。

5.26 6×上样缓冲液

取 98 ml 去离子甲酰胺（C₃H₄NO₂），加入 2 ml 0.5 mol/L 的 EDTA（5.12）溶液、0.25 g 溴酚蓝（C₂₃H₂₄Br₂O₅S）、0.25 g 二甲苯青（C₂₅H₂₇N₂O₆S₂Na），摇匀，放入 4 °C 保存。

5.27 固定液

量取 100 mL 冰醋酸，加入 1,000 mL 去离子水。

5.28 染色液

称取 2.00 g 硝酸银（AgNO₃），溶于 1,000 mL 去离子水中。

5.29 显影液

称取 15.00 g 氢氧化钠，溶于 1,000 mL 的蒸馏水中。使用之前加入 6 mL 的甲醛（CH₂O）。

6 仪器设备

6.1 电子天平：感量分别为 0.01 g 和 0.001 g。

6.2 高速冷冻离心机：转速为 8,000 r/min~16,000 r/min，温度为—4 °C~30 °C。

6.3 紫外分光光度计或核酸浓度测定仪。

6.4 PCR 扩增仪。

6.5 高压电泳系统。

6.6 DNA 分析仪：可分辨 1 个核苷酸的差异。

7 检验程序

7.1 引物合成

根据品种真实性鉴别的要求，合成附录 A 的引物。选用变性聚丙烯酰胺凝胶垂直板电泳，只需合成普通引物。选用荧光标记毛细管电泳，需要在 SSR 引物的 5' 端标记与毛细管电泳仪发射和吸收波长相匹配的荧光染料。

7.2 样品准备

7.2.1 种子

送检样品应不低于 500g（见 GB/T 2930.7）；试验样品应从净种子中随机分取至少 400 粒（见 GB/T 2930.2）。

7.2.2 植物组织

送检样品不低于 30 个个体，保存于冷藏盒（2 °C~10 °C）、硅胶干燥器或液氮中。

7.3 DNA 提取

7.3.1 试样制备

样品为种子时，抽取不低于 30 粒混合研磨成粉末；样品为植物组织时，取 30 个个体的等量组织组成混合样品研磨成粉末。

当用混样检测杂合位点较多时，应对不少于 20 个个体进行独立检测。

7.3.2 CATB 法

试样加液氮充分研磨后，称取 100 mg~200 mg 粉末，迅速移入 2.0 mL 离心管，每管加入 700 μL，65 °C 预热的 CTAB 提取液，混匀。65 °C 水浴 30 min~60 min，期间颠倒混匀 2-3 次。于通风柜内加入 700 μL 氯仿-异戊醇（24:1），颠倒混匀。12,000 r/min 离心 15 min，取上清液转至新的 2.0 mL 离心管。在上清液中加入预冷的等体积异丙醇或两倍体积无水乙醇，颠倒混匀置于 -20 °C 冰箱 30 min。12,000 r/min（4 °C）离心 10 min，弃上清。70%乙醇溶液洗沉淀两次，将离心管倒立于垫有滤纸的试验台上，室温干燥至无乙醇气味。将干燥的 DNA 溶于 100 μL 0.1×TE 缓冲液中，检测浓度并稀释到 50 ng/μL，置于 4 °C 备用。

注：其他所获 DNA 质量能够满足 PCR 扩增需要的 DNA 提取方法均适用于本文件。

7.4 PCR 扩增

7.4.1 反应体系

PCR 扩增反应体系的总体积和组分的终浓度根据表 1 进行配制。可依据试验条件的不同作适当调整。

表 1 PCR 反应体系

反应组分	原浓度	终浓度	反应体积,μL
ddH ₂ O	—	—	13.9
10×Buffer（含 Mg ²⁺ ）	10×	1×	2
dNTPs	2.5 mmol/L	0.15 mmol/L	1.2

Tag 酶	5.0 U/ μ l	0.1 U	0.4
上游引物	20 μ mol/L	0.25 μ mol/L	0.25
下游引物	20 μ mol/L	0.25 μ mol/L	0.25
模版 DNA	50 ng/ μ l	5 ng/ μ l	2
注：“—”表示不存在。			

7.4.2 反应程序

反应条件：94 °C预变性 5 min，1 个循环；94 °C变性 40 s，60 °C退火 35 s，72 °C延伸 45 s，35 个循环；72 °C延伸 5 min，4 °C保存。

7.5 扩增产物检测

7.5.1 变性聚丙烯酰胺凝胶垂直板电泳与银染检测

7.5.1.1 制胶

将玻璃板清洗干净，用去离子水冲洗后晾干。用 95%乙醇擦洗两遍，吸水纸擦干。在长板上涂 0.5 mL 亲和硅烷工作液，带凹槽的短板上涂 0.5 mL 剥离硅烷工作液。操作过程中防止两块玻璃板互相污染。待玻璃板彻底干燥后，将其组装成电泳胶板，用水平仪调平。在 100 mL 6.0% 变性聚丙烯酰胺溶液中分别加入四甲基乙二胺 50 μ L 和 10% 过硫酸铵溶液 500 μ L，迅速混匀后灌胶，灌胶时应匀速以防止出现气泡。待胶液充满玻璃板夹层，在上部轻轻插入梳子，聚合至少 1 h 以上。胶聚合后，清理胶板表面溢出的胶液，轻轻拔出梳子，用水清洗干净备用。

7.5.1.2 预电泳

将胶板安装于电泳槽上，向上槽中加入约 800 mL 1×TBE 缓冲液，使其超过凝胶顶部约 3cm，向下槽中加入 800 mL 1×TBE 缓冲液。在 60W 的恒定功率下，预电泳 10 min-20 min。

7.5.1.3 样品制备

将 PCR 扩增产物加入 2 μ L 上样缓冲液离心混匀。95 °C 变性 5 min 后，取出迅速放置于碎冰上，冷却 10 min 待用。

7.5.1.4 电泳

用移液枪吹吸加样槽，清除气泡和杂质，插入鲨鱼齿梳子。每个加样孔点入 3 μ L~5 μ L 样品，同一引物扩增的试验样品和实物标样隔空点入相邻加样孔。在 80 W 的恒定功率下电泳 2 h~4 h（电泳时间取决于扩增片段的大小范围）。电泳结束后，小心分开两块玻璃板，取下凝胶附着的长玻璃

板。

7.5.1.5 银染

将凝胶板置于装有固定液的塑料盒内，轻轻摇荡 10 min 后取出，在双蒸水漂洗 1 min；将凝胶板放置新配银染液中，轻轻摇荡 10 min 后取出，在双蒸水快速漂洗，时间不超过 10 s；将凝胶板放置于显影液中，轻轻摇荡，直至出现带纹。待带纹清晰后取出，迅速置于固定液中定影 2 min，然后在双蒸水中漂洗 1 min；取出凝胶板室温下自然晾干，放在胶片观察灯上观察，记录结果，拍照保存。

固定液、染色液、双蒸水和显影液用量，可依据胶板数量和大小调整，以没过胶面为准。

7.5.2 荧光标记毛细管电泳检测

7.5.2.1 上样准备

将 PCR 产物使用超纯水稀释 10 倍，取 1 μL 稀释液、0.1 μL 分子量内标和 8.9 μL 去离子甲酰胺加入到 DNA 分析仪专用板中，离心混匀。将样品 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 min，取出并立即置于碎冰上，冷却 10 min 以上。瞬时离心 10 s 后置于 DNA 分析仪上。

7.5.2.2 荧光检测

按照 DNA 分析仪操作手册，检测并保存数据。

7.6 数据记录

7.6.1 变性聚丙烯酰胺凝胶垂直板电泳

根据标准样品或对照样品的迁移位置，记录送检样品该位点的等位变异，相同条带用相同代码表示。

7.6.2 荧光标记毛细管电泳

使用毛细管电泳检测设备的片段分析软件，读取送检样品的片段大小。每个 SSR 位点的等位变异以扩增片段大小进行记录，缺失记录为“0”。

8 数据分析

记录送检样品和标准样品或对照样品在所有位点的等位变异，统计是否存在差异，统计表见附录 B。

9 结果判定与表述

9.1 结果判定

送检样品与标准样品或对照样品差异位点数目大于 2，判定为“不同品种”；送检样品与标准样品或对照品种差异位点数目小于等于 2，判定为“疑同品种”。

9.2 结果表述

送检样品与标准样品或对照样品采用_____平台检测，检测位点数为_____，差异位点数为_____，判定为_____。

附录 A

(规范性)

引物信息

引物名称、序列见表 A.1

表 A.1 引物信息

编号	引物名称	染色体	引物序列 (5'—3')	PCR 产物长度参考范围 (bp)	重复基元
P01	AM14	Chr1D	F:CTCGCCTTCCAACCCAT R:CCTTGAACCTCCGCTCACC	101~107	(GGA) _n
P02	AM759	Chr1D	F:GAGCAAGGTCTGGATGGAAA R:CACGTTTATGTGGTTGTTAGC	147~163	(GT) _n
P03	AM447	Chr2D	F:TCGCCATTAATAAGAGCGAAGG R:GCTGCTGTTGCGTGGTTAGTG	255~341	(TG) _n
P04	AM1000	Chr2D	F:AGCAGTGTAGGGGAAAGAGT R:TTATAGGTTTAGATGGGAGGA	231~255	(CA) _n
P05	AM31	Chr3D	F:CAAACAGCAACTCGTCAA R:TTACATGCATCGGGTAC	239~295	(GTAT) _n
P06	M70	Chr3A	F:CTGATGCTGCTTCCTTTATTCT R:TACTACGAGACGCGCGAC	160~208	(AC) _n
P07	M236	Chr3D	F:GCTCACCGTCGTCTACAAAT R:GAGCAAGACCTAATCCCAGC	127~143	(AC) _n
P08	AM17	Chr4C	F:CGTGCCCAAGTCGTGAT R:ACTCGTCCTGCTCGTCCCT	236~266	(AAG) _n
P09	AM33	Chr4A	F:GGAAACCCAACACTACTGAT R:AGCATACCAACTCGAAAC	399~463	(TATG) _n
P10	AM38	Chr4C	F:CCACTCCGATCCAGCACA R:GCAATCTCCAAGCGTCCC	193~202	(CACAC) _n
P11	M197	Chr4A	F:CTCCCGAGTCTCTTCTCACG R:GAGTCCTCTCACTCTGTCTCTGTT	117~137	(GT) _n
P12	AF033096	Chr5A	F:TGCATGTTTTTGTGTTGTTGTTG R:CACGATCCAAATACACGCAG	124~130	(TTG) _n
P13	AM262	Chr5D	F:TGGTCAGTAAGCATCACAAT R:TGTGCATGCATCTGTGCATA	201~219	(CT) _n
P14	M8	Chr6C	F:TGTTACACATTTTGGATAGGATTGA R:GTCCGTGTAGGCCATATATTCTG	187~199	(AC) _n
P15	M202	Chr6D	F:GCCTGACCTTTTTCCGCA R:CTATGCAAGGGTTCAGCCG	89~135	(AG) _n
P16	M237	Chr6A	F:TAAATTAGAAGCGGCACAA R:CGATCAAGTTGTACAATTCCACA	95~157	(GA) _n
P17	AM7	Chr7D	F::GTGAGCGCCGAATACATA R:TTGGCTAGCTGCTTGAAACT	150~188	(TC) _n
P18	AM20	Chr7D	F:TTCATCGTTGCTCATGGGTT R:CGAAGTAGGACTCGCCGTAG	228~246	(GTG) _n

附录 B

(资料性)

数据统计记录表

表 B.1 列出了数据统计记录表。

表 B.1 数据统计记录表

送检样品编号

实物标样编号

引物编号	引物名称	指纹数据		是否存在差异	备注
		送检样品	标准样品/ 对照样品		
P01	AM14				
P02	AM759				
P03	AM447				
P04	AM1000				
P05	AM31				
P06	M70				
P07	M236				
P08	AM17				
P09	AM33				
P10	AM38				
P11	M197				
P12	AF033096				
P13	AM262				
P14	M8				
P15	M202				
P16	M237				
P17	AM7				
P18	AM20				

比较位点数：_____，差异位点数：_____。

注：指纹数据栏可用条带的具体长度数据表示也可用代码表示，在备注栏进行说明；是否存在差异栏可填写是、否。