

厚皮甜瓜种子纯度分子标记鉴定方法

Purity identification of Musk melon variety using molecular marker analysis

2015 - 05 - 07 发布

2015 - 06 - 07 实施

前 言

本标准按照GB/T 1.1-2009给出的规则起草。

本标准由浙江省农业厅提出。

本标准由浙江省种植业标准化技术委员会归口。

本标准起草单位：宁波市农业科学研究院、宁波市种植业管理总站。

本标准主要起草人：宋慧、王毓洪、张香琴、臧全宇、陆惠斌、张庆、范雪莲。

厚皮甜瓜种子纯度分子标记鉴定方法

1 范围

本标准规定了厚皮甜瓜种子纯度分子检测方法的术语与定义、原理、试剂、仪器设备、操作步骤和样品纯度判定与计算。

本标准适用于厚皮甜瓜种子纯度鉴定。

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，仅所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（包括所有的修改单）适用于本文件。

农业部1485号公告-4-2010 转基因植物及其产品成分检测 DNA提取和纯化

3 术语与定义

下列术语和定义适用于本标准。

3.1

品种纯度

品种在特征特性方面典型一致的程度，用本品种的种子数占供检本作物样品种子数的百分率表示 [GB/T 3543.5-1995，定义3.2]。

3.2

杂株

某差异位点杂交失败，该位点纯合的单株。

3.3

杂种一代

某差异位点杂交成功，该位点杂合的单株。

3.4

显性标记位点

仅能检测显性等位基因，不能够区分纯合和杂合基因型的遗传标记位点。

3.5

共显性标记位点

同时能检测出显性和隐性等位基因，能够区分纯合和杂合基因型的遗传标记位点。

3.6

随机扩增多态性 DNA 标记 (RAPD)

以基因组DNA为模板，以单个人工合成的随机多态核苷酸序列（通常为10个碱基对）为引物，在热稳定的Taq DNA聚合酶作用下，进行PCR扩增。扩增产物经琼脂糖电泳分离、溴化乙锭染色后，在紫外透视仪上检测多态性。

3.7

简单重复序列标记 (SSR)

根据真核生物中广泛存在的简单重复序列两端的互补保守区域设计引物。由于核心序列串联重复数目不同，PCR扩增后获得的产物长度不同，通过高分辨率琼脂糖凝胶电泳分离、溴化乙锭染色后，在紫外透视仪上检测多态性。

4 原理

从厚皮甜瓜幼苗新叶中提取基因组DNA，利用分子标记进行PCR扩增，扩增产物在琼脂糖凝胶的分子筛效应和电泳分离的电荷效应作用下进行分离。通过溴化乙锭 (EB) 染色，在紫外光下发出荧光显示核酸谱带差异。不同厚皮甜瓜品种由于遗传组成不同，引物结合后扩增产物不同，出现扩增产物有和无、或者扩增片段大小不同的差异。这些差异可利用电泳图谱加以鉴别，从而对种子纯度进行鉴定。

5 试剂

除非另有说明，仅使用分析纯试剂和去离子水。

5.1 引物

5.1.1 RAPD

RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) 引物名称、序列及差异片段大小见表1。

表1 RAPD 引物名称、序列及差异片段大小

名称	序列 (5'-3')	差异片段大小 (bp)
RAPD-1	ACCTGGACAC	1200/1400
RAPD-2	CCACATCGGT	1200/1300
RAPD-3	ACACCGGAAC	1500
RAPD-4	CCGAACACGG	460/550

5.1.2 SSR

SSR (Simple Sequence Repeat) 引物名称、序列及差异片段大小见表2。

表2 SSR 引物名称、序列及差异片段大小

名称	F-序列 (5'-3')	R-序列 (5'-3')	差异片段大小 (bp)
SSR-1	CAAAGGGCTACAATAAC	CATCATAATCACCCCTATCTC	225/350/400/450
SSR-2	CAGCTCTACAACAACATCTC	ATCCAACCTCGACCAAGAAAC	120/130/140/550/600
SSR-3	TGAAGAGACTACCATCCCCA	TTTCCTTATGAGTTAGGGTTTC	140/150/320/350

5.2 琼脂糖

5.2.1 RAPD 使用 2%普通标准凝胶琼脂糖 (DNA 片段分离范围 500 bp~20000 bp)。

5.2.2 SSR 使用 2.5%高分辨率标准凝胶琼脂糖 (DNA 片段分离范围 40 bp~1000 bp)。

5.3 10 g/L 溴化乙锭溶液

称取1.0 g溴化乙锭 (EB)，溶于100 mL水中。配制和使用时应戴一次性手套操作并妥善处理废液。

5.4 10 mol/L 氢氧化钠溶液

称取80.0 g氢氧化钠 (NaOH)，先用160 mL水溶解后，再加水定容到200 mL。

5.5 0.5 mol/L 乙二胺四乙酸二钠溶液 (pH 8.0)

称取18.6 g乙二胺四乙酸二钠 (EDTA-Na₂)，加入70 mL水中，再加入2 g氢氧化钠，加热至完全溶解后，冷却至室温，用按本标准5.4配置氢氧化钠溶液调pH至8.0，加水定容至100 mL。在103.4 kPa (121 °C) 条件下灭菌20 min。

5.6 1 mol/L 三羟甲基氨基甲烷-盐酸溶液 (pH 8.0)

称取121.1 g三羟甲基氨基甲烷 (Tris) 溶解于800 mL水中，加入42 mL盐酸，搅拌均匀。用盐酸调pH至8.0，加水定容至1000 mL。在103.4 kPa (121 °C) 条件下灭菌20 min。

5.7 TE 缓冲液 (pH 8.0)

分别量取10 mL按本标准5.6配置的三羟甲基氨基甲烷-盐酸溶液和2 mL按本标准5.5配置的乙二胺四乙酸二钠溶液，加水定容至1000 mL。在103.4 kPa (121 °C) 条件下灭菌20 min。

5.8 5×TBE 缓冲液

称取54 g三羟甲基氨基甲烷，27.5 g硼酸，先用500 mL水加热搅拌溶解后，加入20 mL按本标准5.5配置的乙二胺四乙酸二钠溶液，加水定容至1000 mL。使用时用水稀释成0.5×TBE。

5.9 加样缓冲液

称取1 g水溶性钠型溴酚蓝于100 mL水中，涡旋直到完全溶解，配制成0.15%溴酚蓝。称取1 g二甲苯腈蓝于足量水中，定容到100 mL，配制成0.15%二甲苯腈蓝。分别取1.5 mL的0.15%溴酚蓝和0.15%二甲苯腈蓝，加入100 μL按本标准5.5配置的乙二胺四乙酸二钠溶液，再加入4 g蔗糖，加水定容至10 mL。在4°C保存。

5.10 DNA 分子量标准

5.10.1 对于 RAPD，选择能够清楚地区分 100 bp~2000 bp 的 DNA 片段的 DNA 分子量标准。

5.10.2 对于 SSR，选择能够清楚地区分 50 bp~1500 bp 的 DNA 片段的 DNA 分子量标准。

5.11 dNTPs 混合溶液

将浓度为 2.5 mmol/L 的 dATP、dTTP、dGTP、dCTP 四种脱氧核糖核苷酸等体积混合。

5.12 Taq DNA 聚合酶及 PCR 反应缓冲液。

将 Taq DNA 聚合酶配制成 5 U/ μ L 使用。

6 仪器设备

6.1 电子天平：感量 0.01 g。

6.2 PCR 扩增仪。

6.3 电泳仪、电泳槽等电泳装置。

6.4 凝胶成像系统。

6.5 其他分子生物学实验室仪器设备。

7 操作步骤

7.1 抽样

厚皮甜瓜种子按照每批次不少于 300 粒抽样。

7.2 取样

抽样结束后，播种，待第一片真叶长至 0.5 cm~1 cm 时，即可单株取真叶样品，液氮冷冻研磨。

7.3 DNA 模板制备

按农业部 1485 号公告-4-2010 规定执行。

7.4 PCR 反应

7.4.1 每个试样 PCR 反应设置三次重复

7.4.2 在 PCR 反应管中按照表 3 和表 4 依次加入反应试剂，用手指轻弹混匀。

表3 RAPD 的 PCR 检测反应体系

试剂	终浓度	体积 (μ L)
无菌水	/	2.57
2.5 mmol/L dNTP	0.25 mmol/L	1.0
10 \times buffer	1 \times	1.0
25 mmol/L MgCl ₂	2.5 mmol/L	1.0
引物 5 mmol/L	0.5 mmol/L	1.0
5 U/ μ L Taq 酶	0.015 U/ μ L	0.03
10 ng/ μ L 模板 DNA	3.4 ng/ μ L	3.4
总体积	/	10

表4 SSR的PCR检测反应体系

试剂	终浓度	体积 (μL)
无菌水	/	2.46
2.5 mmol/L dNTP	0.2 mmol/L	1.2
10× buffer	1×	1.5
25 mmol/L MgCl ₂	3 mmol/L	1.8
上游引物5 mmol/L	0.5 mmol/L	1.5
下游引物5 mmol/L	0.5 mmol/L	1.5
5 U/μL Taq酶	0.0133 U/μL	0.04
10 ng/μL 模板DNA	3.33 ng/μL	5
总体积	/	15

7.4.3 进行PCR反应。RAPD反应程序为：94℃预变性4 min，进行40次循环扩增反应（93℃变性15 s，40℃退火30 s，72℃延伸2 min。根据不同型号的PCR仪，可将PCR反应的退火和延伸时间适当延长）；72℃延伸6 min。SSR反应程序为：94℃预变性1 min，进行40次循环扩增反应（93℃变性1 min，40℃退火1 min，72℃延伸1 min。根据不同型号的PCR仪，可将PCR反应的退火和延伸时间适当延长）；72℃延伸1 min。

7.4.4 反应结束后取出PCR反应管，加入加样缓冲液，对PCR反应产物进行电泳检测。

7.5 PCR产物电泳检测

7.5.1 按20 g/L和25 g/L的浓度，分别称取普通琼脂糖和高分辨率琼脂糖，加入0.5×TBE缓冲液中，加热溶解，配制成琼脂糖溶液。按每100 mL琼脂糖溶液中加入5 μL EB溶液的比例加入EB溶液，混匀，冷却至60℃左右，将凝胶溶液缓缓倒入电泳胶板中，插上梳子，静置冷却30 min以上。在盛有0.5×TBE缓冲液的电泳槽中，垂直向上轻轻拔去梳子。

7.5.2 PCR反应管取7 μL PCR产物与2 μL加样缓冲液混合后加入凝胶点样孔，同时在其中一个点样孔中加入DNA分子量标准，接通电源，在200 A电流、90 V电压条件下电泳2 h~3 h，待加样缓冲液中的溴酚蓝距离点样孔4 cm~5 cm时，停止电泳。

7.6 凝胶成像分析

电泳结束后，取出琼脂糖凝胶，置于凝胶成像仪或紫外投射仪上成像。根据DNA分子量标准估计扩增条带的大小，将电泳结果形成电子文件存档或用照相系统拍照。

8 样品纯度判定与计算

8.1 杂种一代样品纯度判定

8.1.1 标记的差异位点显示共显性，供试材料的带型与杂种一代双亲之一相同，则表明该材料在差异位点杂交不成功，判断为杂株；同时具有杂种一代双亲差异条带的供试材料确定为杂种一代。

8.1.2 标记的差异位点显示显性，供试材料在差异位点缺失，表明该材料在该差异位点杂交不成功，判断为杂株；差异位点有扩增条带的供试材料，不做杂种一代或者杂株的判定。

8.2 常规种样品纯度判定

供试材料在标记差异位点的扩增结果与常规种的不相同，则判断为杂株。

8.3 样品纯度计算

样品纯度按照下列公式计算：

$$\text{品种纯度} = \frac{\text{供检种子粒数 (幼苗数)} - \text{杂株种子粒数 (幼苗数)}}{\text{供检种子粒数 (幼苗数)}} \times 100\%$$
