

T/GXAS

团 体 标 准

T/GXAS 211—2021

玉米品种 DNA 指纹鉴定技术规程 SSR 标记 法

Technical code of practice for the DNA fingerprint identification of
maize varieties-SSR mark method

2021 - 08 - 06 发布

2021 - 08 - 12 实施

广西标准化协会 发 布

目 次

前言 II

1 范围 1

2 规范性引用文件 1

3 术语和定义 1

4 原理 1

5 仪器设备及试剂 1

6 溶液配制 1

7 引物信息 2

8 操作步骤 2

9 数据记录与统计 4

10 判定规则 4

附录 A（规范性） 主要仪器设备及试剂..... 6

附录 B（规范性） 溶液配制..... 8

附录 C（资料性） 数据统计记录表..... 10

参考文献 12

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。

本文件由广西壮族自治区农业科学院玉米研究所提出。

本文件起草单位：广西壮族自治区农业科学院玉米研究所、广西青青农业科技有限公司、广西兆和种业有限公司、广西恒茂种业有限公司、广西绿海种业有限公司、广西博士园种业有限公司、广西桂先种业有限公司、广西万川种业有限公司、南宁市桂福园农业有限公司、广西皓凯生物科技有限公司。

本文件主要起草人：郑加兴、时成俏、覃嘉明、王兵伟、磨康、廖金秀、唐照磊、吕巨智、韦超、滕辉升、刘伟定、邓晶、陈达庆、胡昌、班兆丹、秦绪雄、杨名通。

玉米品种 DNA 指纹鉴定技术规程 SSR 标记法

1 范围

本文件描述了用简单重复序列（Simple sequence repeats, SSR）标记进行玉米（*Zea mays* L.）品种DNA指纹鉴定的原理、仪器设备及试剂、溶液配制、引物信息、参照品种、操作步骤、数据记录与统计、判定规则。

本文件适用于广西壮族自治区行政区域内玉米自交系和单交种的SSR指纹数据采集及品种鉴定，其他杂交种类型及群体和开放授粉品种可参照执行。

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 6682 分析实验室用水规格和试验方法

NY/T 1432 玉米品种鉴定技术规程 SSR标记法

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

核心引物 core primer

品种DNA指纹鉴定中优先选用的一套SSR引物，具有多态性高、稳定性好、重复性好等综合特性。

[来源：DB45/T 1311—2016, 3.1]

4 原理

玉米的不同品种，其基因组存在着能够世代稳定遗传的简单序列重复（SSR）的重复次数差异。这种差异可以通过从抽取有代表性的检测样品中提取DNA，用SSR引物进行扩增和电泳，从而通过其扩增产物片段大小不同而加以区分品种。

5 仪器设备及试剂

应符合附录A的规定。

6 溶液配制

应符合附录B的规定。

7 引物信息

应符合NY/T 1432的要求。

8 操作步骤

8.1 样品制备

随机抽取种子、幼苗、叶片等至少20个个体组成的混合样品进行分析或直接对至少5个个体单独进行分析。

8.2 DNA 提取

8.2.1 CTAB 提取法

取幼苗或叶片200 mg~300 mg充分研磨,或取种子充分磨碎,移入2.0 mL离心管;每管加入600 μ L 65 $^{\circ}$ C预热的CTAB提取液,混合均匀,65 $^{\circ}$ C保温30 min,期间多次轻缓颠倒混匀;每管加入600 μ L的三氯甲烷/异戊醇混合液,充分混合后,静置10 min;12 000 r/min离心5 min后,吸取上清液至新1.5 mL离心管,再加入与吸取上清液等体积预冷的乙醇,颠倒离心管混匀,在室温放置20 min;之后4 $^{\circ}$ C,12 000 r/min离心5 min,弃上清液;加入70%乙醇,旋转离心管混匀,通过自然挥发除去乙醇;将离心管倒立于垫有滤纸的实验台上,室温干燥沉淀4 h以上;加入100 μ L超纯水或TE缓冲液,充分溶解后备用。

8.2.2 SDS 提取法

剥取干种子的胚置于研钵,加入100 μ L三氯甲烷后在通风橱内充分磨碎,移入1.5 mL离心管中,加入300 μ L SDS提取液,混匀后于12 000 g离心2 min,吸上清液加入预先装有300 μ L异丙醇和300 μ L氯化钠溶液的1.5 mL离心管中,待DNA成团后挑出,经70%乙醇洗涤后加入200 μ L TE缓冲液,待充分溶解后备用。

8.2.3 试剂盒提取法

使用经验证适合SSR指纹技术的商业品试剂盒,按使用说明操作。

8.3 PCR 扩增

8.3.1 引物选择

首先选择附录C中前20对引物进行检测,当样品间检测出的差异位点数小于2时,再选用附录C中后20对引物进行检测;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:每种dNTP 0.10 mmol/L,正向、反向引物各0.15 μ mol/L, Taq DNA聚合酶0.04 U/ μ L, 1 $\times$ PCR缓冲液(含 Mg^{2+} 2.5 mmol/L), DNA溶液1.5 ng/ μ L,其余以超纯水补足至10 μ L。

8.3.3 反应程序

95 $^{\circ}$ C预变性5 min, 1个循环; 95 $^{\circ}$ C变性30 s, 55 $^{\circ}$ C~60 $^{\circ}$ C退火30 s, 72 $^{\circ}$ C延伸45 s, 共30个循环; 72 $^{\circ}$ C延伸5 min, 10 $^{\circ}$ C保存。

8.4 PCR产物检测

8.4.1 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳银染检测

8.4.1.1 凝胶制备

将一套电泳玻璃板对齐夹紧，在封口处注入琼脂糖溶液，让其在10 min~15 min凝固密封。然后在烧杯中依次加入5 mL 5×TBE缓冲液，3.75 mL 40%PAGE胶，搅拌并用超纯水定容至25 mL；加入200 μL过硫酸铵和12 μL TEMED，混匀后倒入凝胶板之间，随即插好样品梳，使其在50 min~60 min内聚合凝固，凝胶高度不应小于10 cm。

8.4.1.2 电泳

去掉封口的琼脂糖胶，将玻璃板固定于垂直电泳槽上，向电泳槽中加入1×TBE缓冲液，小心抽出样品梳。在10 μL PCR样品中加入2 μL 6×溴酚蓝-二甲苯青电泳指示剂，混匀，然后向加样孔中点入2 μL样品；同时，在一侧样品孔中加入分子量标记。开始电泳，选用的电压梯度为1 V/cm~5 V/cm，一般电泳300 VH~600 VH，当指示带（二甲苯青）到达胶板的中部时结束电泳。

8.4.1.3 银染显色

电泳完毕后关闭电源，取下玻璃板。小心分开两块玻璃板，取下聚丙烯酰胺凝胶，纯水冲洗30 s~60 s，放入染色液中，轻摇5 min~10 min进行染色；然后从染色液中取出，用水快速漂洗两次，放入显影液中，轻摇至显色出清晰带纹，取出用纯水冲洗2遍，沥干。拍摄或扫描成像。

8.4.2 普通变性聚丙烯酰胺凝胶电泳（PAGE）

8.4.2.1 清洗玻璃板

将玻璃板反复擦洗干净，纯水擦洗2遍，95%乙醇擦洗2遍，干燥。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。

8.4.2.2 组装电泳版

待玻璃板彻底干燥后组装电泳板，并用水平仪调平。

8.4.2.3 灌胶

在100 mL 7% PAGE胶中加入TEMED和25%过硫酸铵各100 μL，迅速混匀后灌胶。待胶流动到凹槽的短板上部，在上部轻轻的插入梳子，使其聚合至少1 h以上，待胶凝结。灌胶时应匀速。

8.4.2.4 预电泳

在正极槽（下槽）加入1×TBE缓冲液600 mL，在负极槽（上槽）加入预热至65 °C的1×TBE缓冲液600 mL，拔出梳子。在90 W恒功率下，预电泳10 min~15 min。

8.4.2.5 变性

在10 μL PCR产物中加入2 μL 6×加样缓冲液，混匀后，在PCR仪上运行变性程序：95 °C变性5 min，4 °C冷却10 min以上。

8.4.2.6 电泳

用注射器吹吸加样槽，清除气泡和杂质。每个加样孔点入 3 μL 样品。100 W 恒功率电泳约 40 min，指示带（二甲苯青）到达胶板的中部，电泳结束后，小心分开两块玻璃板，凝胶会紧贴在长板上。

注：预期扩增产物片段大小在150 bp以下时电泳时间适当缩短，扩增产物片段大小在300 bp以上时电泳时间适当延长。

8.4.2.7 银染显色

具体步骤如下：

- a) 固定：固定液中轻轻晃动 3 min；
- b) 漂洗：纯水快速漂洗 1 次，不超过 10 s；
- c) 染色：染色液中染色 10 min；
- d) 漂洗：纯水快速漂洗 2 次，时间不超过 10 s；
- e) 显影：显影液中轻轻晃动至带纹出现；
- f) 定影：固定液中定影 5 min；
- g) 漂洗：纯水漂洗 10 s。

9 数据记录与统计

9.1 数据记录

同一批次样品每个SSR位点的等位变异采用扩增片段长度的形式表示，纯合位点的基因型数据记录依据扩增片段长度从小到大记录为A, B, C, D, E……，杂合位点的基因型数据记录为A/B, A/C, B/C……，分别表示该位点上两个不同的等位变异，小片段数据在前，大片段数据在后。缺失位点等位变异数据记录为N。

9.2 数据统计

当对送验样品混合DNA进行分析时，可直接进行品种间成对比较，成对比较的数据统计记录表见附录C，如果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20个个体的DNA，并用该引物重新扩增，统计在该引物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。对单交种，应比较两个样品在各引物位点的基因型；对自交系，应比较两个样品在各引物位点的等位变异。

10 判定规则

10.1 结果判定

10.1.1 当样品间差异位点数大于或等于 2，判定为“不同”；当样品间差异位点数等于 1，判定为“近似”；当样品间差异位点数等于 0，判定为“极近似或相同”。

10.1.2 对利用附录 C 中 40 对引物仍未检测到大于或等于 2 个差异位点数的样品，如果相关品种存在特定标记，必要时增加其特定标记进行检测。

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：____；
判定为：_____。



附 录 A
(规范性)
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 高压电泳仪：规格为3 000 V、400 mA、400 W，具有恒电压、恒电流和恒功率功能。
- A.1.3 垂直电泳槽及配套的制胶附件。
- A.1.4 普通电泳仪。
- A.1.5 水平电泳槽及配套的制胶附件。
- A.1.6 高速冷冻离心机：最大离心力不小于15 000 g。
- A.1.7 水平摇床。
- A.1.8 胶片观察灯。
- A.1.9 电子天平：感应为0.01 g，0.001 g。
- A.1.10 微量移液器：规格分别为10 μL、20 μL、100 μL、200 μL、1 000 μL，连续可调。
- A.1.11 磁力搅拌器。
- A.1.12 紫外分光光度计：波长260 nm、280 nm。
- A.1.13 微波炉。
- A.1.14 高压灭菌锅。
- A.1.15 酸度计。
- A.1.16 水浴锅或金属浴：控温精度±1 ℃。
- A.1.17 冰箱：最低温度-20 ℃。
- A.1.18 制冰机。
- A.1.19 研磨仪。
- A.1.20 粉碎机。
- A.1.21 凝胶成像系统或紫外透射仪。

A.2 主要试剂

- A.2.1 除另有说明外，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，其中银染溶液配制可使用符合三级要求的水。
- A.2.2 十六烷基三乙基溴化铵（CTAB）。
- A.2.3 三氯甲烷。
- A.2.4 异丙醇。
- A.2.5 异戊醇。
- A.2.6 乙二胺四乙酸二钠。
- A.2.7 三羟甲基氨基甲烷。
- A.2.8 盐酸：（36%~38%）。
- A.2.9 氢氧化钠。
- A.2.10 氯化钠。
- A.2.11 10×Buffer缓冲液：含Mg²⁺ 25 mmol/L。
- A.2.12 4种脱氧核苷三磷酸：dATP、dTTP、dGTP、dCTP（10 mmol/L each dNTP）。
- A.2.13 Taq DNA聚合酶。
- A.2.14 矿物油。

- A. 2. 15 琼脂糖。
- A. 2. 16 DNA分子量标准 (Marker)。
- A. 2. 17 核酸染色剂。
- A. 2. 18 去离子甲酰胺。
- A. 2. 19 溴酚蓝。
- A. 2. 20 二甲苯青。
- A. 2. 21 甲叉双丙烯酰胺。
- A. 2. 22 丙烯酰胺。
- A. 2. 23 硼酸。
- A. 2. 24 尿素。
- A. 2. 25 亲和硅烷。
- A. 2. 26 剥离硅烷。
- A. 2. 27 无水乙醇。
- A. 2. 28 四甲基乙二胺。
- A. 2. 29 过硫酸铵。
- A. 2. 30 冰醋酸。
- A. 2. 31 乙酸银。
- A. 2. 32 硝酸银。
- A. 2. 33 甲醛。



附录 B

(规范性)

溶液配制

B.1 DNA 提取溶液的配制

B.1.1 0.5 mol/L EDTA 溶液

186.1 g $\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 溶于 800 mL 水中，用固体氢氧化钠调 pH 至 8.0，定容至 1 000 mL，高压灭菌。

B.1.2 1 mol/L Tris-HCl 溶液

60.55 g Tris 碱溶于适量水中，加 HCl 调 pH 至 8.0，定容至 500 mL，高压灭菌。

B.1.3 0.5 mol/L HCl 溶液

25 mL 浓盐酸加水定容至 500 mL。

B.1.4 CTAB 提取液

81.7 g 氧化钠和 20 g CTAB 溶于适量水中，然后加入 1 mol/L Tris-HCl 100 mL，0.5 mol/L EDTA 40 mL，定容至 1 000 mL，4 °C 贮存。

B.1.5 SDS 提取液

1 mol/L Tris-HCl 50 mL，0.5 mol/L EDTA 50 mL，5 mol/L NaCl 50 mL，SDS 7.5 g，定容至 500 mL。

B.1.6 TE 缓冲液

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

B.1.7 氯仿-异戊醇 (24:1)

三氯甲烷与异戊醇按 24:1 (V:V) 的比例配制混合液。

B.1.8 5 mol/L 氯化钠溶液

146 g 固体氯化钠溶于水中，加水定容至 500 mL。

B.2 PCR 扩增溶液的配制

B.2.1 dNTP

用超纯水分别配制 dATP、dGTP、dCTP、dTTP 4 种脱氧核糖核苷酸终浓度 100 mmol/L 的储存液。各取 20 μL 混合，用超纯水 720 μL 定容至终浓度 2.5 mmol/L each 的工作液。

B.2.2 SSR 引物

引物干粉快速离心，用 TE 缓冲液或超纯水分别配制前引物和后引物终浓度均 40 $\mu\text{mol/L}$ 的储存液，等体积混合成 20 $\mu\text{mol/L}$ 的工作液。

B.2.3 6× 加样缓冲液

甲酰胺 49 mL，0.5 mol/L 的 EDTA 溶液 (pH=8.0) 1 mL，溴酚蓝 0.125 g，二甲苯青 0.125 g。

B.3 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳溶液的配制

B.3.1 40%PAGE胶

丙烯酰胺 190 g 和甲叉双丙烯酰胺 10 g，定容至 500 mL。

B.3.2 7% PAGE胶

尿素 450 g，10×TBE 缓冲液 100 mL，40%PAGE 胶 175 mL，定容至 1 000 mL。

B.3.3 Bind缓冲液

49.75 mL 无水乙醇和 250 μ L 冰醋酸，加水定容至 50 mL。

B.3.4 亲和硅烷工作液

在 1 mL Bind 缓冲液中加入 5 μ L Bind 原液，混匀。

B.3.5 剥离硅烷工作液

2%二甲基二氯硅烷。

B.3.6 25%过硫酸铵溶液

0.25 g 过硫酸铵溶于 1 mL 超纯水中。

B.3.7 10×TBE缓冲液

三羟甲基氨基甲烷 (Tris 碱) 108 g，硼酸 55 g，0.5 mol/L EDTA 溶液 37 mL，定容至 1 000 mL。

B.3.8 1×TBE缓冲液

取 10×TBE 缓冲液 500 mL，加水定容至 5 000 mL。

B.4 银染溶液的配制

B.4.1 固定液

100 mL 冰醋酸，加水定容至 1 000 mL。

B.4.2 染色液

称取 2 g 硝酸银，加水定容至 1 000 mL。

B.4.3 显影液

量取 1 000 mL 蒸馏水，加入 30 g 氢氧化钠和 5 mL 甲醛，混匀。

附 录 C
(资料性)
数据统计记录表

数据统计记录表见表C.1。

表C.1 数据统计记录表

样品1编号、名称及来源：

样品2编号、名称及来源：

编号	引物名称	指纹数据		是否存在差异	备注
		样品1	样品2		
P01	bnlg439w1				
P02	umc1335y5				
P03	umc2007y4				
P04	bnlg1940k7				
P05	umc2105k3				
P06	phi053k2				
P07	phi072k4				
P08	bnlg2291k4				
P09	umc1705w1				
P10	bnlg2305k4				
P11	bnlg161k8				
P12	bnlg1702k1				
P13	umc1545y2				
P14	umc1125y3				
P15	bnlg240k1				
P16	phi080k15				
P17	phi065k9				
P18	umc1492y13				
P19	umc1432y6				
P20	umc1506k12				
P21	umc1147y4				
P22	bnlg1671y17				
P23	phi96100y1				
P24	umc1536k9				
P25	bnlg1520k1				
P26	umc1489y3				

表C.1 数据统计记录表（续）

编号	引物名称	指纹数据		是否存在差异	备注
		样品1	样品2		
P27	bnlg490y4				
P28	umc1999y3				
P29	umc2115k3				
P30	umc1429y7				
P31	bnlg249k2				
P32	phi299852y2				
P33	umc2160k3				
P34	umc1936k4				
P35	bnlg2235y5				
P36	phi233376y1				
P37	umc2084w2				
P38	umc1231k4				
P39	phi041y6				
P40	umc2163w3				
比较位点数：_____，差异位点数：_____。					
注1：是否存在差异栏可填写是、否、无法判定、缺失。当样品在某个引物位点出现可见的异质性且影响到差异点判定时，可填写无法判定，或重新提取至少20个个体的DNA，并用该引物重新扩增，统计在该引物位点上不同个体的基因型（或等位变异）及所占比例后予以判定。 注2：如果采用了备案的其他特征标记进行鉴定，可在记录表中依次添加。 注3：当以两个自交系样品的组合作为待测样品时，指纹数据栏应填写两个自交系的指纹组合作为待测样品指纹。					

参 考 文 献

- [1] DB45/T 1311—2016 木薯品种鉴定技术规程 SSR 标记法
 - [2] NY/T 1432-2014 玉米品种鉴定技术规程 SSR 标记法
-

中华人民共和国团体标准

玉米品种DNA指纹鉴定技

术规程 SSR标记法

T/GXAS 211—2021

广西标准化协会统一印制

版权专有 侵权必究

团体标准公告

2023 年第 81 号（总第 206 号）

关于批准发布 T/GXAS 211—2021《玉米品种 DNA 指纹 鉴定技术规程 SSR 标记法》团体标准第 1 号修改单 的公告

广西标准化协会批准 T/GXAS 211—2021《玉米品种 DNA 指纹鉴定技术规程 SSR 标记法》团体标准第 1 号修改单，自 2023 年 7 月 6 日起实施，现予以公布（见附件）。

附件：T/GXAS 211—2021《玉米品种 DNA 指纹鉴定技术规程 SSR 标记法》第 1 号修改单



附件

**T/GXAS 211—2021《玉米品种 DNA 指纹鉴定技术规程
SSR 标记法》第 1 号修改单**

删除参考文献中《NY/T 1432 玉米品种鉴定技术规程
SSR 标记法》。