

ICS 65.020

CCS B 61

中国作物学会团体标准

T/CROPSSC 002-2023

玉米品种纯度鉴定：InDel 分子标记法

Varietal genetic purity testing of maize (*Zea mays* L.): InDel marker method

2023-06-01 发布

2023-06-01 实施

中国作物学会 发布

前 言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第一部分：标准化文件的结构和起草规则》规定的相关原则起草。

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这些专利的责任。

本文件由中国作物学会提出并归口。

本文件起草单位：北京市农林科学院玉米研究所、江苏省农业科学院种质资源与生物技术研究所、北京市种子管理站、中国农业大学。

本文件主要起草人：王风格、赵久然、许理文、田红丽、王蕊、易红梅、赵涵、葛建镭、杨扬、吴明生、李莉、吕远大、周玲。

玉米品种纯度鉴定: InDel 分子标记法

1 范围

本文件规定了玉米品种纯度 InDel 分子标记鉴定的原理、检测方案、仪器设备、试剂和溶液配制、纯度检测程序、数据记录与结果计算和结果报告的要求。

本文件适用于玉米单交种、自交系的品种纯度鉴定。双交种、三交种品种纯度鉴定也可参照本文件。

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

GB/T 3543.2 农作物种子检验规程 扦样

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 39914 主要农作物品种真实性和纯度SSR分子标记检测 玉米

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

品种纯度 varietal genetic purity

品种在特征特性方面的典型一致的程度。

注:用该品种的应有特征种子数占供检样品种子数的百分率表示。

3.2

InDel 标记 Insertion-Deletion marker

基因组上等位基因位点处的 DNA 序列在不同个体间发生了核苷酸片段的插入/缺失而产生的多态性变异,可根据 InDel 位点两侧的保守序列,设计特异扩增引物揭示其多态性的方法。

3.3

引物 primer

一条互补结合在模板DNA链上的短单链,能提供3'-OH末端作为DNA合成的起始点,延伸合成模板DNA的互补链。

[来源: GB/T 39914—2021, 3.1.6]

3.4

组合引物 panel

能够组合在一起电泳、具有不同颜色或相同颜色而扩增产物片段大小不同的荧光标记的一组引物。

[来源: GB/T 39914—2021, 3.1.7]

3.5

等位基因 allele

在同源染色体的同一基因座上的一对基因。

注：对于InDel标记，等位基因差异以扩增产物片段大小或荧光信号类型不同来表示。

3.6

自交系位点纯合度 loci homogeneity of inbred line

反映自交系品种纯合稳定程度的参数。用纯合位点占总检测位点的百分率表示。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

bp：碱基对(base pair)。

CTAB：十六烷基三甲基溴化铵(cetyltrimethyl ammonium bromide)。

DNA：脱氧核糖核酸(deoxyribonucleic acid)。

dNTPs：脱氧核苷三磷酸(deoxyribonucleoside triphosphates)。

PAGE：聚丙烯酰胺凝胶电泳(polyacrylamide gel electrophoresis)。

PCR：聚合酶链式反应(polymerase chain reaction)。

SDS：十二烷基苯磺酸钠(sodium dodecyl sulfate)。

InDel：插入缺失变异(Insertion-Deletion)。

Taq酶：耐热DNA聚合酶(Taq-DNA polymerase)。

CE：毛细管电泳(capillary electrophoresis)。

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

5 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插入缺失变异(InDel)带来的长度差异。通过对检测样品进行DNA提取、PCR扩增和扩增产物电泳或荧光扫描发现差异，进而检测其扩增产物片段大小或荧光类型不同而加以区分。

采用能够识别品种中杂株指纹或荧光信号的适宜引物，通过对待测样品的杂株数目或百分率统计进行纯度值测定，从而对其整体的典型一致程度做出评价。

6 检测方案

6.1 总则

6.1.1 引物、检测平台、样品状况不同，其检测结果准确度、精确度可能有所不同。应依据“适于检测目的”的原则，统筹考虑检测规模和检测能力，择定适宜的引物、检测平台和样品状况，制定相应的检测方案。

6.1.2 在严格控制条件下，合成选择的引物，确定检测平台，对检测样品按DNA提取、PCR扩增、电泳或荧光扫描、数据分析的程序进行检测。

6.1.3 按规定要求填报检测结果，检验报告应注明所选择检测方案影响检测结果的关键信息。

6.1.4 品种纯度鉴定时，除待测样品外，一般应提供代表该品种的对照样品作为其正常个体的参考基因型；如果待测样品为单交种，一般还应把其父母本样品基因型作为自交苗等异常个体的参考。未提供对

照样品的, 如果为匿名品种, 可将待测样品的主要基因型作为参考基因型; 如果为已知品种, 必要时应先将待测样品与已知品种标准样品或标准指纹比较, 确定其真实性后再进行纯度鉴定。

6.2 引物

6.2.1 应明确所检测的杂株类型。杂株的类型不同, 所选引物和数目也有所不同, 必要时需相应父母本的 DNA 指纹数据辅助判断杂株类型。杂交种的杂株类型主要为自交株、异交株、混杂株; 自交系的杂株类型主要为异交株、变异株、混杂株。

6.2.2 应通过对待测样品进行预试验, 筛选出能够准确识别该样品杂株的纯度鉴定引物。引物筛选时还需综合考虑引物的杂合度、DNA 快速提取和多重组合电泳的潜力。待测样品在个别引物位点存在遗传不稳定状况时, 可将该引物剔除; 待测样品在多个引物位点存在严重遗传不稳定状况时, 可终止纯度鉴定。

6.3 检测平台

6.3.1 基因型采集是纯度鉴定的关键环节, 可 adopt 电泳检测和荧光扫描两类平台对 InDel 位点进行基因型采集。电泳检测可采用荧光毛细管电泳(CE)或变性聚丙烯酰胺凝胶(PAGE)电泳平台; 荧光扫描检测可采用 KASP 荧光扫描平台。

6.3.2 样品量较大时, 可将样品粉碎仪、DNA 自动提取和移液工作站、水浴 PCR 扩增仪、多色荧光毛细管电泳仪、KASP 荧光扫描平台进行组合, 以提高检测的综合效率。

6.3.3 DNA 提取、PCR 扩增、电泳的技术条件要求, 可在适于检测目的和不影响检测质量的前提下作适宜的修改。

6.4 样品

6.4.1 送验样品为种子, 对于杂交种样品重量应不低于 200 g 或不少于 500 粒; 对于自交系样品重量应不低于 400 g 或不少于 1000 粒。

6.4.2 从送验样品中随机分取规定数量的试样, 试样的分取应符合 GB/T 3543.2 的要求。对于杂交种, 试样进行单粒独立检测, 试样的数量应至少含有 96 (适用时可含对照)粒种子; 对于自交系, 试样可采用混合样或单粒独立检测, 应至少含有 96 (适用时可含对照)×2 粒种子。

6.5 检测条件

应在有利于检测正确实施的控制条件下进行, 包括但不限于下列条件:

- 种子检验员具备熟悉所使用检测技术的知识和技能;
- 所有仪器与使用的技术相适应, 并已经过定期维护、验证和校准;
- 使用适当等级的试剂和灭菌处理的耗材。

7 仪器设备、试剂和溶液配制

7.1 仪器设备

7.1.1 DNA 提取设备: 高速冷冻离心机、水浴锅或金属浴、紫外分光光度计或核酸浓度测定仪、组织研磨仪。

7.1.2 PCR 体系配制及扩增设备: 移液器或移液工作站、PCR 扩增仪。

7.1.3 电泳设备

7.1.3.1 CE电泳设备：DNA分析仪。

7.1.3.2 PAGE电泳设备：高压电泳仪、垂直电泳槽及制胶附件、水平摇床、胶片观察灯、凝胶成像系统或数码相机。

7.1.4 KASP 荧光扫描设备：荧光扫描仪。

7.1.5 其他器具：微量移液器、电子天平、高压灭菌锅、磁力搅拌器、微波炉、冰箱、染色盒。

7.2 试剂

7.2.1 DNA 提取试剂：CTAB、三氯甲烷、异戊醇、异丙醇、乙二胺四乙酸二钠(EDTA- $\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)、三羟甲基氨基甲烷碱(Tris-base)、盐酸、氢氧化钠、氯化钠。

7.2.2 PCR 扩增试剂：dNTPs、*Taq* 酶、10×缓冲液、矿物油、ddH₂O、引物和 Mg^{2+} 。

7.2.3 电泳试剂

7.2.3.1 CE 电泳试剂：DNA 分析仪专用的丙烯酰胺胶、分子量内标、去离子甲酰胺、电泳缓冲液。

7.2.3.2 PAGE电泳试剂：去离子甲酰胺(Formamide)、溴酚蓝(Brph Blue)、二甲苯青FF、甲叉双丙烯酰胺(Bisacrylamide)、丙烯酰胺(Acrylamide)、硼酸(Boric Acid)、尿素、亲和硅烷(Binding Silane)、疏水硅烷(Repel Silane)、DNA分子量标准、无水乙醇、四甲基乙二胺(TEMED)、过硫酸铵(APS)、冰醋酸、乙酸铵、硝酸银、甲醛、氢氧化钠。

7.2.4 KASP荧光扫描试剂：2×PCR MIX，引物工作液。

7.3 溶液配制

DNA提取、PCR扩增、电泳、银染的溶液应按照附录A的规定进行配制，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以使用符合三级要求的水。

8 鉴定程序

8.1 DNA 提取

8.1.1 总则

DNA提取方法应保证提取的DNA质量符合PCR扩增的要求，DNA无降解，溶液的紫外光吸光度OD₂₆₀与OD₂₈₀的比值宜介于1.6~2.0之间。

DNA 提取可任选 8.1.2 至 8.1.5 所列的一种方法。其他 DNA 提取方法经实验室确认后也可使用。

8.1.2 CTAB 法

取试样的幼苗或叶片(200~300) mg 置于 2.0 mL 离心管，加液氮充分研磨，或切取干种子的胚充分磨碎，移入 1.5 mL 或 2.0 mL 离心管。每管加入 700 μL 经 65℃预热的 CTAB 提取液，充分混合，65℃水浴 60 min。期间不时多次轻缓颠倒混匀。每管加入等体积的三氯甲烷/异戊醇(24:1)混合液，充分混合后静置 10 min，在 12,000 转/min 离心 15 min 至分相。吸取上清液转移至新的离心管中，加入等体积预冷的异丙醇，轻轻颠倒混匀，约 20℃放置 30 min 后在 4℃、12,000 转/min 离心 10 min。弃上清液，加入 70%乙醇，旋转数次后弃去乙醇溶液，并倒立于垫有滤纸的实验台上，室温放置 10 min 以上。加入 100 μL 超纯水或 TE 缓冲液 1，充分溶解后供备用。

8.1.3 SDS 法

取试样的幼苗或叶片，或切取干种子的胚，置于 1.5 mL 或 2.0 mL 离心管，加入 100 μ L 氯仿后研磨，再加入 300 μ L SDS 提取液，混匀后在 10,000 转/min 离心 2 min。吸取上清液，转移至预先装有 300 μ L 异丙醇和 300 μ L 5 mol/L 氯化钠溶液的 1.5 mL 离心管中。待成团后，挑出 DNA，经 70%乙醇洗涤后，加入 200 μ L TE 缓冲液 1，充分溶解后供备用。

8.1.4 碱煮法

切取试样干种子的胚，或将种子发芽至幼苗长度达到 3 cm 左右时剪取 1.5 cm 长的幼苗，放入 96 孔深孔板中。每孔加入 150 μ L 氢氧化钠提取液，沸水加热 5 min，然后加入 150 μ L TE 缓冲液 2，充分溶解后供备用。

8.1.5 试剂盒法

选择适宜的商业化植物基因组 DNA 提取试剂盒，并经验证合格后使用。DNA 提取方法，按照提供的使用说明进行操作。

8.2 引物合成及筛选

8.2.1 引物合成

推荐 20 个兼容电泳平台和 KASP 平台的二态型 InDel 位点作为优先选用的玉米纯度鉴定核心位点(见表 1)。根据所用检测平台的不同，电泳检测平台选择附录 B 中表 B.1 的引物序列进行合成；KASP 荧光扫描平台选择附录 B 中表 B.2 的引物序列进行合成。引物混合液的配方满足附录 A 的要求。

表 1 玉米品种纯度鉴定推荐的 20 个 InDel 位点

位点编号	位点名称	染色体	位置	序列(5'-3')
MID01	YJ03601	1	3,276,317	F: ACCCCAGCATTTCAAACGCTCAGTCACGACAGGAC[-/CAT] R: CATCCTCACAGTATTCCGCAAATATGACTGGTTTT
MID02	YJ03417	1	299,827,493	F: CAGTCATGTAACACACAAAGTGATTTAGCCACA[-/CAAG] TGTTCTAGGTAAAGGGTACATACAAGTGCTCTGAA
MID03	YJ07550	2	20,612,540	F: GCTTGGCAGCATGCAACGTGATGGCCACTGCCCAC[-/AGCT] R: AGCACACTCCTTGAGTTCCAGTTCCCCAAATCACA
MID04	YJ07075	2	226,983,963	F: GAAGGTAATGAACATACAAGTGTCAGCAGATACTA[-/TTT] R: CTTACCCGGATCCTGTACTTGTACACAGCATATCC
MID05	YJ09778	3	6,945,444	F: TGGGTAGTAGCAACAGGGACCTGGTAAATAGTGGC[-/GAT] R: GATGTGAATGCTGAAGGAACACTAACCGCAACCAC
MID06	YJ09984	3	187,234,741	F: TGCCAGTTTGCCAAGAGCAATGCTGAAGGTCTGAA[-/CTT] R: CTTGTGGCCAGGATCTAGTAATGGCAGAGAGGCT
MID07	YJ15669	4	62,592,185	F: CCCTAGTCATGAGCAAACTTGTACAAAAAACACTC[-/CTT] R: CTCTTTATTCATTGATTCATCCACCGATCCACGC
MID08	YJ14889	4	241,305,985	F: TGTCAAAGAGAAGGAAGTCTAGGATTAAATTAAG[-/GTGC] R: GTGGTAGAAAAAACGAACAACCAGACAATTACCGT
MID09	YJ20088	5	3,948,109	F: TTTTAAAAGGCATCAGGCAGGTGCTAAGCCACCG[-/ATT] R: AGTGCCTCGGACGTCTAAACATAGATTAAACACGA
MID10	YJ19605	5	81,193,690	F: CAGAAGTCAAACATATTACGAACCAGGCAGAACCA[-/AGC] R: AGCAGTGGATAATACTTACGGGAGTTTGCCATGGA
MID11	YJ21753	6	79,625,669	F: GACGAGTGTCCAACAACAGTGCCCTTTCATTATTG[-/ATTGT] R: ATTGTACCCTCTCGCAAAAGTGGGCACGTGGGCCT

位点编号	位点名称	染色体	位置	序列(5'-3')
MID12	YJ22580	6	124,329,446	F: TAAATTTGTTATCGTCGTTGCTTTAAACACCCATC[-/TATA] R: TATAGCTCACTCACTGCTGCTGTTACTGGCATTTC
MID13	YJ23874	7	1,227,237	F: TAGGTAGCGTTGCGACAAAGGAGCATCAACATCTC[-/CTGA] R: CTGACTGACTGACTGGATCAATAGAGCTCCCTTGA
MID14	YJ23787	7	174,461,806	F: GCCTCCGTGCCGTGCAGGTGCGGGCAGCAATCGGT[-/CCTC] R: CCTCTCACTCCTCAGTCAGACGTGTACGGTCGGA
MID15	YJ29057	8	8,859,946	F: GTCGAAATATTTGCTTGTCTCTGAAGTTGTAACC[-/CTT] R: CTTCAATTCGTCACCAGGTCTGCACTGGATGGGGAA
MID16	YJ28416	8	130,526,079	F: ATGAGTCTGACGATTGAAAAATTAGACCAGAGAG[-/CTCC] R: AATATGTGTCAAACCTAGTTCGATGGGGTCGACAGG
MID17	YJ29935	9	39,739,271	F: CGTTTCGTCGACAAGCATGCCAAACCCGTCGCGCA[-/CGTC] R: CATTACACGCCGTATCCGATGGCTTCTGTCTTC
MID18	YJ31351	9	128,731,094	F: AGGATTGACTTTAAATACTTGATGAAACATATAGG[-/AAT] R: AAGCAAGGAGGTGGAACACCGATGCACCTCTTTAA
MID19	YJ32555	10	58,404,418	F: TTGTCTTTTCACTAGAGCGTTCGGATCAGTCAGCC[-/AAATT] R: AAACCACATTCAAATGAGATGATCCACTCCGTCAG
MID20	YJ33109	10	90,829,383	F: AGACCACACATCAGGCAATGCAGGCGAACTAGTAT[-/GAG] R: GAGGAGGATTCCTTCTATGTATAGACTCATCATGC
注：位点的物理位置基于玉米品种 B73 参考基因组 B73 RefGen V3 的物理位置。				

8.2.2 引物筛选

8.2.2.1 可用至少含 20 个个体的小样品进行引物筛选试验，确定适宜的鉴定引物或引物组合。推荐引物未达到筛选效果的，可继续筛选其他引物。

8.2.2.2 对于玉米杂交种纯度鉴定，杂株主要为自交个体、异交个体、混杂个体，针对不同类型杂株的引物筛选，可参照下列规则：

- 对于自交个体，识别特征为该基因型具有母本等位基因而缺失父本等位基因，筛选至少 1 对能检测杂合位点(通常表现为双亲互补)的引物进行鉴定；
- 对于异交个体，识别特征为该基因型具有母本等位基因而父本错误，在具备父母本对照或其 InDel 指纹数据的条件下，筛选 2 对以上的引物进行鉴定；
- 对于混杂个体，识别特征为该基因型具有父本等位基因而母本错误或父母本等位基因均不具有，在具备父母本对照或其 InDel 指纹数据的条件下，筛选 3 对以上的引物进行鉴定；
- 对于同时鉴定自交、异交、混杂个体或者其中两者的需求，应综合考虑筛选 3 对以上的引物进行鉴定。

8.2.2.3 对于玉米自交系纯度检测，杂株主要为异交个体、变异个体、混杂个体，可采用混合样品筛选出 3 对以上表现杂合的位点，用于分析被检单株个体的基因型。

8.2.2.4 为简化鉴定流程，可将引物筛选和鉴定环节合并，即直接采用 20 个 InDel 核心位点组成的多重复合体系对待测样品的单株进行基因型采集，综合 20 个位点的数据进行综合判定。

8.3 基于电泳检测的基因分型

8.3.1 PCR 反应体系制备

PCR扩增反应体系的总体积和组分的终浓度参照表2进行配量，可依据试验条件不同作相应调整。表2中的缓冲液若含有MgCl₂，不再加MgCl₂溶液，加等体积无菌水替代。采用附录B中附表B.1所列的20个InDel核心引物配置单引物扩增反应体系，也可配置包含多个引物的多重复合扩增反应体系。

表2 PCR 扩增反应体系

反应组分	原浓度	终浓度	体积(μL)
ddH ₂ O	—	—	12.35
10×缓冲液	10×	1×	2
MgCl ₂	25 mmol/L	2.5 mmol/L	2
dNTP	2.5 mmol/L each	0.15 mmol/L each	1.2
Taq 酶	5 U/μL	1 U	0.2
引物	20 μmol/L	0.25 μmol/L each	0.25
DNA	25 ng/μL	2.5 ng/μL	2

8.3.2 PCR 反应程序运行

反应程序的反应参数可根据PCR扩增仪型号、Taq酶、引物等不同而作适当的调整。通常采用下列反应程序：

- 预变性：94℃ 5 min；
- 扩增：94℃变性 40 s，60℃退火 35 s，72℃延伸 45 s，进行 35 次循环；
- 终延伸：72℃ 10 min；
- 形成的扩增产物于4℃保存。

8.3.3 荧光毛细管电泳(CE)

8.3.3.1 产物混合及变性

根据 InDel 分子标记扩增片段大小的不同及所标记的荧光，可采用 20 重的组合引物进行电泳。如果引物扩增采用单重 PCR 扩增，按照预先确定的组合引物，分别取等体积的同一组合引物的不同荧光标记的扩增产物，充分混匀，从混合液中吸取 1 μL，加入到 DNA 分析仪专用 96 孔板孔中；如果引物扩增采用 20 重复合 PCR 扩增，直接从扩增产物中吸取 1 μL，加入到 DNA 分析仪专用 96 孔板孔中。各孔再分别加入 0.1 μL 分子量内标和 8.9 μL 去离子甲酰胺，在 PCR 仪上 95℃变性 5 min，取出立即置于冰上，冷却 10 min 以上。瞬时离心 10 s 后供备用。

8.3.3.2 电泳及原始数据采集

打开 DNA 分析仪，检查仪器工作状态和试剂状态。将装有样品的微孔板放置于样品架基座上，打开数据收集软件，按照 DNA 分析仪使用手册进行操作。DNA 分析仪将自动运行参数，并保存电泳原始数据文件。

8.3.4 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)

8.3.4.1 制胶

将玻璃板沾洗涤灵后，用清水反复擦洗干净，再用双蒸水、95%乙醇分别擦洗两遍。玻璃板干燥后，将0.5 mL亲和硅烷工作液，均匀涂在无凹槽的玻璃板上；将0.5 mL疏水硅烷工作液，均匀涂在带凹槽的玻璃板上。操作过程中两块玻璃板分别处理，防止相互污染；玻璃板彻底干燥后，将塑料隔条整齐放在无凹槽玻璃板两侧，盖上凹槽玻璃板，夹子固定后，用水平仪检测玻璃胶室是否水平；取100 mL 4.5% PAGE胶，加入各 100 μL的TEMED、25%过硫酸铵，迅速混匀，将胶灌入玻璃胶室，灌胶过程应防止气泡的出现。待胶室灌满后，在凹槽处将鲨鱼齿朝外轻轻插入样品梳，在室温下聚合1 h以上。

8.3.4.2 变性

取20 μL 扩增产物(见8.3.2)，加入4 μL 6 $\times$ 加样缓冲液，混匀。在PCR扩增仪上运行95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 min，4 $^{\circ}\text{C}$ 冷却10 min后供备用。

8.3.4.3 电泳

在电泳正极槽(下槽)加入1 $\times$ TBE缓冲液 600 mL，负极槽(上槽)加入经65 $^{\circ}\text{C}$ 预热的1 $\times$ TBE缓冲液 600 mL，拔出样品梳，在90 W恒功率下预电泳(10~20) min，用移液器吹打或吸清除加样槽孔气泡和杂质，插入样品梳(鲨鱼齿朝下)。每一个加样孔点入5 μL 样品(见8.4.2.2)，在80W恒功率下进行电泳。

电泳的适宜时间，参考二甲苯青指示带移动的位置和扩增产物预期片段大小范围(参见表B.1)加以确定。二甲苯青指示带在4.5%的变性聚丙烯酰胺凝胶电泳中所移动的位置与150 bp扩增产物泳动的位置大致相当。扩增产物片段大小在(150 $\pm$ 50) bp、(250 $\pm$ 50) bp、(350 $\pm$ 50) bp范围的，指示带从上到下应分别到达胶板1/2、2/3、3/4处后，才可结束电泳。电泳结束后关闭电源，取下玻璃板并轻轻撬开，通常凝胶附着在无凹槽的玻璃板上。

8.3.4.4 染色及原始数据采集

将附着凝胶的玻璃板浸入固定液中，轻轻晃动3 min后取出，在双蒸水中快速漂洗，时间不超过10 s；将胶板放入染色液中，轻轻晃动5 min后取出，在双蒸水中快速漂洗，时间不超过10 s；将胶板放入显影液中，轻轻晃动待条带清晰后取出，再迅速放入固定液中定影5 min取出，在双蒸水中漂洗1 min；取出胶板，晾干，放在胶片观察灯上观察，记录结果，拍照保存。

注：固定液、染色液、双蒸水和显影液的用量，可依据胶板数量和大小调整，以淹没过胶面为准。

8.4 基于荧光原位扫描检测的基因分型

8.4.1 PCR 反应体系制备

PCR反应可以在不同规格的PCR板或膜上进行，反应体系的总体积和各组分体积应按照表3进行配制，每板设空白对照，试验过程中设2个参照样品种。

表3 基于微孔板或微量反应孔膜平台的PCR反应体系

微孔板类型	96微孔板(μL)	384微孔板(μL)	1536微孔板(μL)	微量反应孔膜(μL)
DNA模板(20 ng/ μL)	1.5	1.5 (烘干)	1.5 (烘干)	1.6 (烘干)
2 $\times$ PCR MIX	5	1.5	0.5	0.8
KASP引物工作液	0.140	0.042	0.014	0.024
双蒸水	3.36	1.5	0.5	0.776
总反应体积	10	3	1	1.6

8.4.2 PCR 反应程序运行

PCR反应程序如下：

- 94 $^{\circ}\text{C}$ 15 min；
- 94 $^{\circ}\text{C}$ 20 s，61 $^{\circ}\text{C}$ 60 s，以0.6 $^{\circ}\text{C}$ /循环的速度降落，10次循环；
- 94 $^{\circ}\text{C}$ 20 s，55 $^{\circ}\text{C}$ 60 s，26次循环；
- 若初始反应结束未获得明确的基因分型，可继续94 $^{\circ}\text{C}$ 20 s，57 $^{\circ}\text{C}$ 60 s，3次循环。

8.4.3 荧光扫描及原始数据采集

利用荧光原位扫描系统对PCR扩增产物进行基因分型，空白对照没有扩增信号或者扩增信号较弱，且参照样品种等位变异与附录C的等位变异一致时，采集基因分型数据。

9 数据记录与结果计算

9.1 数据记录

无论采用电泳检测平台还是KASP荧光扫描平台,数据记录时均用I代表InDel位点的插入等位变异,D代表InDel位点的缺失等位变异,基因型记录为II、ID、DD,数据发生缺失记录为NA。对电泳检测平台,扩增产物的小片段代表等位基因为D,大片段代表等位基因为I;对KASP荧光扫描平台,扩增产物的蓝色荧光信号代表等位基因为D,绿色荧光信号代表等位基因为I。数据质量须符合对应平台的质控要求。

9.2 结果计算及容许误差

品种纯度使用正常个体数目(检测试样总数减去杂株数目)占检测试样总数的百分率表示。对自交系品种,必要时可检测其位点纯合度,自交系位点纯合度用纯合位点占总检测位点的百分率表示。

判定品种纯度是否达到国家规定质量标准、合同和标签标注指标的要求,使用GB/T 3543.5表2容许差距,如果在表中查不到,可用下式进行计算:

$$T = 1.65 \sqrt{\frac{p \times q}{N}} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

p —— 品种纯度的标准规定值;

q —— $100 - p$;

N —— 检测试样总数。

10 结果报告

10.1 结果填报格式

10.1.1 杂交种纯度结果填报

可以选择下列方式之一进行品种纯度检测结果的填报:

- 采用 InDel 分子标记检测法,对____(种子/幼苗/叶片)提取的 DNA,利用____(CE 电泳/PAGE 电泳/KASP 荧光扫描)平台,通过编号为____的引物,检测了____个体,检测出自交个体____个,其他类型杂株____个。
- 采用 InDel 分子标记检测法,对____(种子/幼苗/叶片)提取的 DNA,利用____(CE 电泳/PAGE 电泳/KASP 荧光扫描)平台,通过编号为____的引物,检测了____个体,检测出自交个体____个,其他类型杂株____个,品种纯度为____%。
- 采用 InDel 分子标记检测法,对____(种子/幼苗/叶片)提取的 DNA,利用____(CE 电泳/PAGE 电泳/KASP 荧光扫描)平台,通过编号为____的引物,检测了____个体,检测出自交个体____个,其他类型杂株____个,品种纯度为____%。判定品种纯度____(达到/未达到)____(国家规定质量标准/合同/标签标注)指标的要求。

10.1.2 自交系纯度结果填报

可以选择下列方式之一进行品种纯度检测结果的填报:

- 采用 InDel 分子标记检测法,对____(种子/幼苗/叶片)提取的 DNA,利用____(CE 电泳/PAGE 电泳/KASP 荧光扫描)平台,通过编号为____的引物,检测了____个体,检测出杂株____个,品种纯度为____%。

- b) 采用 InDel 分子标记检测法, 对____(种子/幼苗/叶片)提取的 DNA, 利用____(CE 电泳/PAGE 电泳/KASP 荧光扫描)平台, 通过编号为____的引物, 检测了____个体, 测杂株____个, 品种纯度为____%。判定品种纯度____(达到/未达到)____(国家规定质量标准/合同/标签标注)指标的要求。

10.1.3 自交系纯合度结果填报

采用 InDel 分子标记检测法, 对____(种子/幼苗/叶片)提取的 DNA, 利用____(CE 电泳/PAGE 电泳/KASP 荧光扫描)平台, 检测了____个位点, 检测出未纯合稳定位点____个, 自交系纯合度为____%。

10.2 需注明的特殊情况

属于下列情形之一的, 需在检验报告中注明:

- 送验样品低于 5.4.1 规定数量的;
- 杂株仅检测自交个体的;
- 检测样品中存在遗传严重不稳定的位点(引物编号)清单;
- 检测采用了其他 InDel 引物的名称及序列;
- 自交系位点纯合度低于 80%。

附录 A
(规范性)
溶液配制

A.1 DNA提取

A.1.1 0.5 mol/L EDTA溶液

Na₂EDTA·2H₂O 186.1 g溶于800 mL水中，加固体NaOH调pH至8.0，加水定容至1000 mL，高压灭菌。

A.1.2 1 mol/L Tris-HCl溶液

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

A.1.3 0.5 mol/L HCl溶液

浓盐酸(36%~38%) 25 mL，加水定容至500 mL。

A.1.4 CTAB提取液

NaOH 81.7 g、CTAB 20 g、1 mol/L Tris-HCl 100 mL和0.5 mol/L EDTA 40 mL，加水定容至1000 mL，4 °C贮存。

A.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和SDS 7.5 g混合，加水定容至500 mL。

A.1.6 NaOH提取液

固体NaOH 2 g，加水定容至500 mL。

A.1.7 TE缓冲液1

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

A.1.8 TE缓冲液2

1 mol/L Tris-HCl 5 mL、0.5 mol/L EDTA 1 mL和0.5 mol/L HCl 100 mL，加水定容至500 mL。

A.1.9 5 mol/L NaCl溶液

固体NaCl 146 g，加水定容至500 mL。

A.2 PCR扩增

A.2.1 dNTP

用TE缓冲液1分别配制dATP、dGTP、dCTP、dTTP终浓度100 mmol/L的储存液。各取20 μL混合，用720 μL TE缓冲液1定容至终浓度2.5 mmol/L each的工作液。

A.2.2 基于电泳平台的InDel引物工作液

用TE缓冲液1分别配制正向引物、反向引物终浓度均为40 μmol/L的储存液，等体积混合成20 μmol/L的工作液。

A.2.3 基于 KASP 平台的 InDel 引物工作液

将附录B所示每个位点的3管引物干粉分别用水溶解至100 $\mu\text{mol/L}$ ，2条上游引物和1条下游通用引物分别取12 μL 、12 μL 、30 μL 混合，再补46 μL 水；最终2条上游引物、1条下游通用引物终浓度分别为 12 $\mu\text{mol/L}$ 、12 $\mu\text{mol/L}$ 、30 $\mu\text{mol/L}$ 。

A.3 电泳

A.3.1 6 $\times$ 加样缓冲液

去离子甲酰胺49 mL、0.5 mol/L EDTA 1 mL、溴酚蓝0.125 g和二甲苯青0.125 g混合。

A.3.2 40% PAGE胶

丙烯酰胺190 g和甲叉双丙烯酰胺10 g，加水定容至500 mL。

A.3.3 4.5% PAGE胶

尿素450 g、10 $\times$ TBE缓冲液100 mL和40% PAGE胶112.5 mL，加水定容至1000 mL。

A.3.4 Bind缓冲液

无水乙醇49.75 mL和冰醋酸250 μL ，加水定容至50 mL。

A.3.5 亲和硅烷工作液

Bind缓冲液1 mL和Bind原液5 μL 混合。

A.3.6 疏水硅烷工作液

2%二甲基二氯硅烷。

A.3.7 25%过硫酸铵溶液

0.25 g过硫酸铵溶于1 mL超纯水中。

A.3.8 10 $\times$ TBE缓冲液

Tris碱108 g、硼酸55 g和0.5 mol/L EDTA 37 mL，加水定容至1000 mL。

A.3.9 1 $\times$ TBE缓冲液

10 $\times$ TBE缓冲液500 mL，加水定容至5000 mL。

A.3.10 50 $\times$ TAE缓冲液

Tris碱242 g、冰醋酸57.1 mL和0.05 mol/L EDTA 100 mL，加水定容至1000 mL。

A.3.11 1 $\times$ TAE缓冲液

50 $\times$ TAE缓冲液100 mL，加水定容至5000 mL。

A.4 银染

A.4.1 固定液

100 mL冰醋酸，加水定容至1000 mL。

A.4.2 染色液

硝酸银2 g，加水定容至1000 mL。

A.4.3 显影液

固体 NaOH 30 g 和甲醛 5 mL，加水定容至 1000 mL。

中国团体标准信息平台

附录 B

(规范性)

20 个 InDel 位点基于电泳检测平台设计的引物

B.1 表 B.1 列出了 20 个纯度鉴定 InDel 位点的基于电泳检测平台设计引物信息。

表 B.1 20 个 InDel 位点基于电泳检测平台设计的引物信息

引物编号	位点编号	引物序列(5'-3')	产物大小	推荐荧光
EMID01	MID01	F: CCCCTTCGTCAAGTCTGCATCC R: ggACCTTCTGATAACTCGGGTGGCA	186/191	FAM
EMID02	MID02	F: CCGTCGTCAGAAATGCAGGCA R: gTGAAGTGCATTGCCGTAAGTGC	238/242	ROX
EMID03	MID03	F: GGTCTGCACTGGATGGGGAATG R: TGAGTGCAATTCCCTGGGTCT	160/163	ROX
EMID04	MID04	F: GAGAGGGAGGGAGGACGAGTG R: GGTAGCTTGCCTTGAAGGTGATG	109/114	FAM
EMID05	MID05	F: TGGAAAGCCCTACCTGGTCAAAG R: ccGTACACGTCTGACTGAGGAG	84/88	FAM
EMID06	MID06	F: GCTGCTGGAACACCCAACTTG R: gGCTGATGTCATCCTCGTCTTGTG	198/201	FAM
EMID07	MID07	F: TGCCACCTCTGTTGACG R: ggAGGACAGAAGCCATCGGATACG	94/98	FAM
EMID08	MID08	F: AGCCAGCCAAATCCTAAACGAAG R: GCAGTACCCGAAGCAGGAAATC	121/124	FAM
EMID09	MID09	F: TTTCCAGTGCTTGCCAGTTTGC R: ATCAACGTCCTCCGATGCTTCTC	144/147	FAM
EMID10	MID10	F: AAGGCATCAGGCAGGTGCTAAG R: CGCAGGTGACCGTGGTGATC	207/210	FAM
EMID11	MID11	F: ACATCAAGCACCCACAGAAACAG R: GCGTGGATCGGTGGATGAATC	238/241	FAM
EMID12	MID12	F: AGAAAGAGCATGACCGTTGAACC R: GTGCCAGCGTTAGAGTGTACTG	224/228	FAM
EMID13	MID13	F: TACGAACCAGGCAGAACCAAGC R: gTGTGGGAAAGGCAAGGTGTGG	103/106	ROX
EMID14	MID14	F: TAGAGCGTTCGGATCAGTCAGC R: gCGTGTGTGCGGGATTAGTTGAG	115/120	ROX
EMID15	MID15	F: TAGGTAGCGTTGCGACAAAGGAG R: gtttttAAGGCTCAGACTCGTCTTCTC	133/137	ROX
EMID16	MID16	F: CAGGATGCTTCATTGCTCACC R: GTGGTTGCGGTTAGTGTTCTTC	147/150	ROX
EMID17	MID17	F: GCCGACCACATTTAAGATGCTCTG R: gtttttTGCTCGGTATTGGCGTCGTAAC	175/179	ROX
EMID18	MID18	F: CCAGAGCAGAGCAGTCATGTAAC R: gCTCACTTGGGCCACACTTCTTC	222/226	ROX
EMID19	MID19	F: GGAACCTGAGTGAAGAAGCCATC R: gtttACAGGGAACCACAGTGCTACG	255/258	ROX
EMID20	MID20	F: ACCTCAGGTCTCAGCCACA R: CCGATCGTACGTGTGATTGGGG	201/205	ROX

注 1: 标记荧光栏所列的仅作为示例, 只适用于荧光毛细管电泳检测平台的使用, 20 个引物可以进行 20 重组电泳。

注 2: 如使用 PAGE 电泳检测, 引物不需要标记荧光。

注 3: 小片段等位基因记录为 D, 大片段等位基因记录为 I。

注 4: 为降低 N+1 峰的影响或调节扩增产物长度, 部分引物的 5'端额外加 1~7 bp 的尾巴序列, 用小写的碱基表示。

B.2 表 B.2 列出了 20 个纯度鉴定 InDel 位点的基于 KASP 荧光扫描平台设计的引物信息。

表 B.2 20 个 InDel 位点基于 KASP 荧光扫描平台设计的引物信息

引物编号	位点编号	引物序列(5'-3')
KMID01	MID01	FAM: TATTTGCGGAATACTGTGAGGATGA HEX: TTGCGGAATACTGTGAGGATGG Common: CCCAGCATTTCAAACGCTCAGTCAC
KMID02	MID02	FAM: CTACACAAAGTGATTTTAGCCACAC HEX: AACTACACAAAGTGATTTTAGCCACAT Common: CTTCAGAGCACTTGTATGTACCCTTTAC
KMID03	MID03	FAM: TGGATCATCTCATTGAATGTGGTTTA HEX: GGATCATCTCATTGAATGTGGTTTG Common: GTCTTTTCACTAGAGCGTTCGGATC
KMID04	MID04	FAM: CTATACATAGAAGGAATCCTCCTCC HEX: CTATACATAGAAGGAATCCTCCTCA Common: CACACATCAGGCAATGCAGGCG
KMID05	MID05	FAM: GAACATACAAGTGTCAGCAGATACTAT HEX: ACATACAAGTGTCAGCAGATACTAC Common: GGATATGCTGTGTACAAGTACAGGATC
KMID06	MID06	FAM: CTGGAAGTCAAGGAGTGTGCTA HEX: CTGGAAGTCAAGGAGTGTGCTG Common: CAGCATGCAACGTGATGCCAC
KMID07	MID07	FAM: CGGTGTTCCACCTCCTTGCTTA HEX: GGTGTTCCACCTCCTTGCTTC Common: CCATCATTAGGATTGACTTTAAATACTTGATG
KMID08	MID08	FAM: TAGTGTTTCCTTCAGCATTACATCA HEX: GTGTTTCCTTCAGCATTACATCG Common: GTAGCAACAGGGACCTGTTAAATAG
KMID09	MID09	FAM: CATTACTAGATCCTGGCCACAAAGA HEX: CATTACTAGATCCTGGCCACAAAGT Common: CAGTTTGCCAAGAGCAATGCTGAAG
KMID10	MID10	FAM: GAACTGCTAGGATTAAATTAAGGTGC HEX: GAACTGCTAGGATTAAATTAAGGTGG Common: GAAGTTACGGTAATTGTCTGGTTGTTTCG
KMID11	MID11	FAM: GGTGGATGAATCAAGTGAATAAAGAGA HEX: GTGGATGAATCAAGTGAATAAAGAGG Common: CTCCCTAGTCATGAGCAAACCTTGATC
KMID12	MID12	FAM: CCCGTAAGTATTATCCACTGCTG HEX: CTCCCGTAAGTATTATCCACTGCTT Common: AGCAGAAGTCAAACATATTACGAACCAG
KMID13	MID13	FAM: TGTTTAGACGTCCGAGGCACTA HEX: GTTTAGACGTCCGAGGCACTC Common: TAAAAGGCATCAGGCAGGTGCTAAG
KMID14	MID14	FAM: CAGCAGCAGTGAGTGAGCTATAT HEX: AGCAGCAGTGAGTGAGCTATAG Common: GTAAATTTGTTATCGTCGTTGCTTTAAACAC
KMID15	MID15	FAM: CCACTTTTGCAGAGGGTACAATA HEX: CACTTTTGCAGAGGGTACAATC Common: GAGTGTCCAACAACAGTGCCCTTTC
KMID16	MID16	FAM: CTATTGATCCAGTCAGTCAGTCAGT HEX: TTGATCCAGTCAGTCAGTCAGG Common: GTAGCGTTGCGACAAAGGAGCATC

引物编号	位点编号	引物序列(5'-3')
KMID17	MID17	FAM: TGACTGAGGAGTGAGGAGGG HEX: CTGACTGAGGAGTGAGGAGGA Common: TACCTGGTCAAAGGCCTCCGTG
KMID18	MID18	FAM: CAGACCTGGTGACGAATGAAGA HEX: CAGACCTGGTGACGAATGAAGG Common: TGTCGAAATATTTGCTTGTCCTCTGAAG
KMID19	MID19	FAM: CGATTTGAAAAATTAGACCAGAGAGC HEX: ACGATTTGAAAAATTAGACCAGAGAGA Common: GTCGACCCCATCGAACTAGTTTGAC
KMID20	MID20	FAM: CGGATACGGCGTGTGAATGG HEX: ATCGGATACGGCGTGTGAATGT Common: GTTCGTCGACAAGCATGCCAAACC
注：标记 FAM 荧光(蓝色)的引物序列代表插入等位变异，记录为 I；标记 HEX 荧光(绿色)的引物序列代表缺失等位变异，记录为 D。纯合基因型 II 显示为蓝色荧光信号，纯合基因型 DD 显示为绿色荧光信号，杂合基因型 ID 显示为既有蓝色荧光信号又有绿色荧光信号。		