ICS 65.120

B 40

团 体 标 准

T/HXCYXXX-2025

杂交苜蓿种子真实性鉴定SSR分子标记法

**Authenticity Identification of Hybrid Alfalfa Seeds by SSR**

（征求意见稿）

202X-XX-XX发布 202X-XX-XX实施

北京华夏草业产业技术创新战略联盟发布

**目 次**

[前 言 II](#_Toc197958262)

[1范围 1](#_Toc197958263)

[2规范性引用文件 1](#_Toc197958264)

[3术语和定义 1](#_Toc197958265)

[4缩略词 2](#_Toc197958266)

[5 原理 2](#_Toc197958267)

[6仪器设备 3](#_Toc197958268)

[7所需试剂 3](#_Toc197958269)

[8 引物 3](#_Toc197958270)

[9 试验步骤 4](#_Toc197958271)

[10数据统计记录 7](#_Toc197958272)

[11结果分析 7](#_Toc197958273)

# 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。

本文件由北京华夏草业产业技术创新战略联盟团体标准委员会提出并归口。

本文件起草单位：内蒙古大学、中国农业科学院草原研究所、内蒙古农业大学。

本文件主要起草人：崔乐乐、于林清、王照兰、李俊、徐春波、闫春霞、王运涛。

本文件为首次发布。

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。

**杂交苜蓿种子真实性鉴定SSR分子标记法**

# 1范围

本文件规定了SSR分子标记法鉴定杂交苜蓿种子真实性的术语和定义、仪器设备、实验步骤、结果分析等内容。

本文件适用于杂交苜蓿种子真实性鉴定、品种的审定、新品种知识产权保护及种子市场监管。

# 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 2930.4《草种子检验规程 发芽试验》

DB 62/T 4094 《草品种真实性检验规程 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简单重复序列 simple sequence repeat (SSR)

是由1-6个核苷酸为基本单位，通过连续串联重复形成的DNA片段，长达通常在几十个至几百个bp之间，又称微卫星序列或短串联重复序列，重复单元的数量在不同个体或物种中高度可变，形成多态性标记，是遗传分析的重要工具。

3.2琼脂糖凝胶电泳agarose gel electrophoresis

是一种基于分子大小分离DNA片段的常用分子生物学技术。琼脂糖凝胶电泳利用琼脂糖凝胶作为介质，在电场作用下，使带负电的核酸分子（DNA）从负极向正极迁移，通过凝胶孔径的分子筛效应，实现不同大小核酸片段的分离。分离后的核酸可通过染色进行可视化分析。

3.3聚合酶链式反应 polymerase chain reaction (PCR)

是一种在体外快速扩增特定DNA片段的分子生物学技术，通过模拟DNA天然复制过程，实现目标序列的指数级扩增。DNA双链变性：高温（约95℃）使双链DNA解链为单链模板；引物退火：降温（通常是55℃～65℃）使特异性引物与单链DNA的互补区域结合；链延伸：中温（约72℃）下，DNA聚合酶以单链为模板，按照碱基互补配对原则，以5'→3'方向合成新链；重复循环上述步骤，实现DNA指数增长。

3.4引物 primer

是人工合成的短核苷酸序列（通常在18 bp～30bp），能够通过碱基互补配对与模板DNA特异性结合，引导DNA聚合酶从3'端开始合成新链。

3.5聚丙烯酰胺凝胶电泳polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)

是一种基于分子大小、电荷或构象分离DNA的高分辨率电泳技术。以聚丙烯酰胺凝胶为介质，通过交联聚合反应，利用电场驱动带电分子迁移。

# 4缩略词

下列缩略语适用于本文件。

bp: base pair，碱基对

DNA：deoxyribonucleic acid，脱氧核糖核苷酸

DNA marker: 用于比较DNA片段大小的标准工具

TBE：电泳缓冲液

Taq酶：Taq-DNA polymerase，耐热DNA聚合酶

dNTPs: 脱氧核糖核苷三磷酸

ddH2O：双蒸水（超纯水）

Loading Buffer：上样缓冲液

# 5 原理

因基因组存在着能够世代遗传的简单重复序列，杂交种子具有双亲等位标记互补带型。根据父母本的特征分子标记对应在杂交种中的谱带，可判断该杂交种的真伪性。SSR分子标记技术因其多态性高、重复性好、操作简便等特点，是遗传分析的重要工具。设计特异引物，利用PCR技术进行扩增，扩增产物利用电泳进行分离，分析其长度多态性，达到杂交苜蓿种子真实性鉴定。

# 6仪器设备

高压灭菌锅、台式冷冻高速离心机、恒温水浴锅（30-100℃）、超纯水仪、电子天平、凝胶成像系统、PCR扩增仪、电泳仪、垂直电泳槽及配套制胶工具、摇床、磁力搅拌器等。

# 7所需试剂

所用试剂均为分析纯。

## 7.1 DNA提取

使用植物基因组DNA提取试剂盒进行DNA的提取。（液氮、研钵等）

## 7.2 琼脂糖凝胶电泳

琼脂糖、核酸染料、乙二胺四乙酸二钠、三羟甲基氨基甲烷、冰醋酸、氢氧化钠、6×Loading Buffer等。

## 7.3 PCR扩增

引物、DNA、dNTPs、Taq酶、10×Buffer缓冲液、ddH2O、Mg2+ 、Mix反应混合液。

## 7.4 聚丙烯酰胺凝胶电泳

溴酚蓝、丙烯酰胺、亚甲基双丙烯酰胺、硼酸、亲和硅烷、玻璃硅烷、乙酸、DNA marker、无水乙醇、碳酸钠、四甲基乙二胺、过硫酸铵、去离子甲酰胺、冰醋酸、硝酸银、甲醛、氢氧化钠等。

# 8 引物

引物信息见表1。

表1 引物信息表

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 引物名称 | 正向序列（5‘-3’） | 反向序列（3‘-5’） |
| MTB60 | AAGAATGACGAAGAGGCGAA | TCAGAAATTCCCTCCCATTG |
| AFcact60 | CCTCCCTAACTTTCCAACA | TGGATCAACGTGTCTTTC |
| AFct32 | TTTTTGTCCCACCTCATTAG | TTGGTTAGATTCAAAGGGTTAC |
| MTLEC2A | CGGAAAGATTCTTGAATAGATC | TGGTTCGCTGTTCTCATG |
| MTB330 | ATCAACGTGTTGTCACCTCCT | TCCATAAGCATTGTCGCTTG |
| B14B03 | GCTTGTTCTTCTTCAAGCTC | ACCTGACTTGTGTTTTATGC |
| MTB45 | TCCTTGAGAGGTTTACAAAGCA | TCAATGGTACCTCATTTCAACAA |
| MTB340 | GACTTTGATTGGAAGGCCAAA | TCCACCACAAATCACAGGAA |
| MTB200 | ATTAGTGTGCGGGTCACCTC | AGTTTCGTACTCCCTCCGGT |
| MMT42 | CGTCGTTTACTCAAACGACACC | GCGTGTTTCTGCTGATTCAT |
| MMTB76 | AAAAAGGGATCGGCACACTTG | AGGACACAGTCTCCGTGAGC |
| MTRmiR045 | ATGACTTCAACCATAACTCCA | AAAAGAAAAAGAGGCTGACAT |
| MTRmiR054 | TAGCTAGCAATGAAAACCACT | CAAGCACAGAAGAAAAGTTGA |
| MTRmiR072 | ACTCCAATTGTGGCTATAAAA | GGTCCATGAGCTAACAAACTA |

# 9 试验步骤

## 9.1 取样

供检的样品按GB/T 2930.4《草种子检验规程 发芽试验》标准中规定的方法进行发芽，从发芽的幼苗中取样进行检测。同时对父、母本幼嫩叶片进行取样。

## 9.2 **DNA**提取

本文件采用植物基因组DNA提取试剂盒进行苜蓿DNA的提取，提取流程按照DNA提取试剂盒流程说明书进行。

## 9.3 **DNA**质量检测

将2 μL的DNA样品与1μL的6×Loading Buffer 充分混合均匀后点于0.8%的琼脂糖凝胶点样孔内。进行琼脂糖凝胶电泳，电泳结束后，在凝胶成像仪下进行拍照观察。

凝胶配制：（1）配制TBE溶液：称取108g的Tris碱、55g硼酸、EDTA-Na2 9.3g于烧杯中，加800ml 去离子水搅拌溶解，用NaOH调节PH值为8.0，混合均匀，定容至1L;（2）称取0.4g琼脂粉置于100ml锥形瓶中，加入20ml1×TBE后，放到加热器加热至琼脂糖完全融化;（3）待琼脂糖完全融化后，加入2μl核酸染料，混合均匀后，冷却;（4）将冷却至65℃左右的琼脂糖凝胶沿制胶槽边沿小心缓慢地倒入内槽玻璃板上，待琼脂糖凝胶溶液缓慢展开，直至整个制胶槽内槽表面形成均匀无气泡的胶层，室温静置;（5）待凝胶完全凝固后，垂直轻拔出梳子，取出胶带，放入电泳槽中，用于上样。

## 9.4引物筛选

利用亲本DNA，在核心引物中筛选出具有较好多态性、亲本间DNA片段差异较大，条带清晰的引物，作为特定引物对供检样品进行检测。

## 9.5 PCR 扩增

9.5.1 反应体系

10μL的反应体系包含2μL的DNA，正反引物各0.4μL、5μL Mix反应混合液和2.2μL超纯水。

9.5.2反应程序

94℃预变性4min，94℃变性30s，52℃退火30s，72℃下延伸1min，循环35次，在72℃下延伸10min。

注：此程序中退火温度根据引物进行调节。

9.5.3 扩增产物PAGE电泳检测

扩增产物基因型用PAGE电泳检测，本标准使用100孔垂直电泳槽进行PAGE电泳检测的方法。

## 9.6 PAGE电泳

9.6.1 凝胶制备

（1）先取六对十二板玻璃板，加洗洁精，用自来水洗净每板玻璃板表面灰尘和污渍直至光滑无污渍（避免凝胶过程中产生气泡），再用蒸馏水冲洗，直立晾干，用95%的酒精擦拭玻璃板后，晾干备用;（2）取适量的剥离硅烷均匀地涂抹在短玻璃板上，取同量的亲和硅烷，均匀地涂抹在长玻璃板上，干燥待用；（3）将两块玻璃板对向放置，四边对齐后用夹子夹牢两个竖边，备用；（4）量取40ml的8%聚丙烯酰胺（提前配好）于100ml烧杯中；（5）向烧杯中分别加入40μl的四甲基乙二胺和200μl的过硫酸铵，迅速混匀；（6）将混合均匀的溶液沿孔边缘缓缓倒入，使溶液充满两板之间而不外漏。灌胶过程中应缓慢避免出现气泡。同时，也不宜过慢，以免在还未灌完胶时出现已凝固的情况；（7）灌胶完成后，插上梳子（不能左右摇晃），放置2h以上，使其完全凝固；（8）胶完全凝固之后，缓慢拔出梳子，拔梳子过程中要垂直拔出，不能左右摇晃；（9）将配好的5×TBE倒入电泳槽下槽，用夹子将制好的胶固定在电泳槽两侧，在电泳槽的 上侧倒入5×TBE没过胶面。预电泳10 min ~20min。

9.6.2 电泳

在胶板两侧点入2μl的2000bp DNA 分子量标准，依次将2μl的PCR产物迅速注入点样孔内（避免出现气泡），同时记录好点样顺序。加样完成后，在200V恒压下电泳2h。

9.6.3 银染显色

（1）关闭电泳槽，切断电源，去掉夹子，回收电泳槽上槽的5×TBE于烧杯中。取下玻璃板并冲洗，缓慢取下涂有剥离硅烷的玻璃板，将涂有亲和硅烷的玻璃板置于盛有固定液（提前配制）的盘中。放在80rmp的摇床上，摇晃15min；（2）取出胶板（带有凝胶的玻璃板），将胶板放入盛有1L蒸馏水的盘内5min；（3）硝酸银溶液配制：称取2g的硝酸银，加入1000ml的蒸馏水，用玻璃棒搅拌均匀;（4）将漂洗好的胶板取出放入盛有硝酸银溶液的盘中，在80rmp的摇床上，摇晃15min；（5）取出胶板，放入盛有1L蒸馏水的盘内清洗；（6）显示溶液配制：称取20g氢氧化钠，加入1000ml的蒸馏水，用玻璃棒搅拌均匀后，加入5ml甲醛溶液，摇匀，使其充分混合备用;（7）取出清洗过的胶板，放入显示溶液中，放置在80rmp的摇床上，直至条带清晰；（8）出现清晰条带后，加入配制好的终止液。待终止后，取出胶板，用清水冲洗干净；（9）将条带清晰的胶板放到扫描仪上扫描并保存图片。

注：银染过程中戴专用塑胶手套。

# 10数据统计记录

根据聚丙烯酰胺凝胶电泳扩增出来的条带来判断杂交种的真伪。依据保存好的图片，位点由上到下记录。该位点有条带的标记为“1”，无条带的标记为“0”。如果该位点出现无法分辨，缺失等情况，则记为“0”。

# 11结果分析

首先依据父母本中的条带，对杂交种的条带进行分析，将含有父母本条带的检测样品判定为真杂种。