

团 体 标 准

T/LCH XXXX-XXXX

普通菜豆地方资源指纹图谱构建方法

(征求意见稿)

20XX-XX-XX 发布

20XX-XX-XX 实施

中国长城绿化促进会

发布



## 目 次

前言 .....	II
1 范围 .....	3
2 规范性引用文件 .....	3
3 术语和定义 .....	3
4 原理 .....	4
5 仪器与设备 .....	4
6 试剂与耗材 .....	4
7 样品采集与制备 .....	5
8 DNA 提取与质量检测 .....	5
9 核心 SNP 标记筛选 .....	6
10 SNP 基因分型 .....	6
11 指纹数据编码 .....	7
12 指纹图谱构建 .....	7
13 质量控制 .....	7
14 试验报告 .....	8
附录 A （规范性） 仪器设备与试剂配制 .....	9
附录 B （规范性） 普通菜豆核心 SNP 标记信息 .....	10
附录 C （资料性） 参照种质指纹图谱信息 .....	11
附录 D （资料性） 普通菜豆 DNA 指纹图谱报告模板 .....	<b>错误！未定义书签。</b>

## 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。

本文件由云南省农业科学院粮食作物研究所提出。

本文件由中国长城绿化促进会归口。

本文件起草单位：云南省农业科学院粮食作物研究所。

本文件主要起草人：XXX。

# 普通菜豆地方资源指纹图谱构建方法

## 1 范围

本文件规定了普通菜豆地方资源指纹图谱构建的原理、仪器设备、试剂耗材、样品处理、DNA 提取、核心 SNP 标记筛选、基因分型、数据编码、图谱构建、质量控制及试验报告要求。

本文件适用于我国普通菜豆地方品种、农家种、种质资源的 DNA 指纹图谱构建、品种真实性鉴定、种质区分及遗传多样性分析。

## 2 规范性引用文件

本文件没有规范性引用文件。

## 3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

### 3.1

#### 普通菜豆地方资源

在特定地域长期自然选择和人工培育形成，具有独特遗传特征和地方适应性的普通菜豆种质材料，包括农家品种、古老地方品种、野生近缘种及其遗传变异类型。

### 3.2

#### 指纹图谱

基于 DNA 分子标记技术，反映普通菜豆地方资源基因组特异性的特征图谱，可作为资源身份识别的独特“遗传身份证”。

### 3.3

#### SNP 标记

单核苷酸多态性，指基因组水平上由单个核苷酸变异引起的 DNA 序列多态性，是基因组上多态性最高的遗传变异之一，具有数量多、分布广、稳定性高、易于高通量检测的特点。

### 3.4

#### InDel 标记

插入/缺失多态性，指基因组中小片段核苷酸的插入或缺失导致的遗传变异，同样是基因组多态性的重要组成部分。

### 3.5

#### 多态性信息量 (PIC)

衡量分子标记位点多态性程度的指标，反映标记对遗传变异的鉴别能力，取值范围为  $0 \sim 1$ ，值越高鉴别能力越强。

### 3.6

#### 连锁不平衡 (LD)

不同基因位点上的等位基因非随机组合的现象，是分子标记筛选和群体遗传分析的重要参考指标。

T/LCH XXX-XXXX

### 3.7

#### 观测杂合度 ( $H_o$ )

随机抽取的一个样本的两个等位基因不相同的概率，反映群体中实际的遗传变异程度。

### 3.8

#### 期望杂合度 ( $H_e$ )

根据群体等位基因频率计算的理论杂合度，用于评估群体的遗传潜力。

### 3.9

#### 核苷酸多态性 ( $\pi$ )

两个序列间每个位点上核苷酸差异的平均值，反映群体在核苷酸水平上的多态性高低。

### 3.10

#### 近交系数 ( $F_{IS}$ )

群体由于近交或群体结构等原因导致的观测杂合度相对期望杂合度的偏离程度，取值范围为 $[-1, 1]$ 。

## 4 原理

普通菜豆地方资源基因组存在丰富稳定的SNP变异，通过筛选核心SNP标记并进行标准化基因分型，对基因型进行统一编码，构建唯一对应每份资源的DNA指纹图谱，实现种质精准区分与真实性鉴定。

## 5 仪器与设备

### 5.1 基础实验仪器

基础实验仪器应满足以下要求：

- a) 高速冷冻离心机：转速 $\geq 12\ 000\ \text{r/min}$ ；
- b) 电子天平：精度 $0.001\ \text{g}$ ；
- c) 微量可调移液器： $1\ \mu\text{L} \sim 1\ 000\ \mu\text{L}$ ；
- d) 紫外分光光度计；
- e) PCR扩增仪：96孔/384孔；
- f) 恒温金属浴；
- g) 超低温冰箱： $-80\ ^\circ\text{C}$ ；
- h) 普通冰箱： $-20\ ^\circ\text{C} \sim 4\ ^\circ\text{C}$ ；
- i) 琼脂糖凝胶电泳系统。

### 5.2 基因分型仪器

基因分型仪器应满足以下要求：

- a) 荧光定量PCR仪；
- b) KASP SNP基因分型平台。

### 5.3 分析设备

分析设备应满足以下要求：

- a) 计算机；
- b) 基因分型与指纹分析软件。

## 6 试剂与耗材

## 6.1 试剂

试剂应满足以下要求：

- a) DNA 提取试剂：CTAB、Tris-HCl、EDTA、NaCl、SDS、氯仿、异戊醇、异丙醇、无水乙醇；
- b) PCR 试剂：dNTP、Taq 酶、PCR 缓冲液、MgCl<sub>2</sub>；
- c) 分型试剂：KASP Master Mix、荧光标记引物；
- d) 电泳试剂：琼脂糖、核酸染料、TAE 缓冲液；
- e) 所有试剂均为分析纯或分子生物学级。

## 6.2 耗材

耗材应满足以下要求：

- a) 无菌无酶离心管、PCR 管、96 孔 PCR 板、384 孔板；
- b) 无菌无酶吸头；
- c) 电泳梳、凝胶托盘、封板膜。

## 7 样品采集与制备

### 7.1 采样要求

采样应满足以下要求：

- a) 每份资源选取 3 株～5 株生长健壮、无病虫害、无机械损伤的植株；
- b) 采样部位为植株上部幼嫩叶片，无病虫、无损伤；
- c) 避免高温、强光、阴雨天气采样。

### 7.2 试验设置

试验设置应满足以下要求：

- a) 每份样品设置 2 次生物学重复；
- b) 试验中必须加入参照种质作为对照。

### 7.3 样品保存

采集后立即放入液氮速冻，转入-80℃长期保存或采用硅胶快速干燥，常温避光密封保存，保存期不超过 6 个月。

## 8 DNA 提取与质量检测

### 8.1 提取方法

DNA 提取应采用 CTAB 法或高通量植物 DNA 提取试剂盒提取。

### 8.2 DNA 质量要求

DNA 质量应符合下列要求：

- a) 浓度：50 ng/μL ~ 100 ng/μL；
- b) OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub>：1.7 ~ 2.1；
- c) OD<sub>260</sub>/OD<sub>230</sub>：≥ 1.8；
- d) 琼脂糖凝胶电泳检测：条带清晰、无明显降解、无蛋白质与多糖污染。

### 8.3 DNA 保存

合格 DNA 样品于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 短期保存（不超过 6 个月）， $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 长期保存。

## 9 核心 SNP 标记筛选

### 9.1 标记来源

基于普通菜豆全基因组重测序数据，覆盖全部 11 条染色体，分布均匀。

### 9.2 筛选条件

核心 SNP 标记筛选应符合下列条件：

- a) 二等位变异；
- b) 位点平均覆盖深度 $\geq 4\times$ ；
- c) 位点缺失率 $\leq 5\%$ ；
- d) 次要等位基因频率（MAF） $\geq 0.1$ ；
- e) 多态信息含量（PIC） $\geq 0.3$ ；
- f) 观测杂合度（ $H_o$ ） $\leq 0.1$ ；
- g) 无强连锁不平衡（LD）。

### 9.3 标记数量

最终筛选核心 SNP 标记不少于 30 个，确保可完全区分所有供试普通菜豆地方资源。

## 10 SNP 基因分型

### 10.1 分型方法

优先采用 KASP 基因分型技术。

### 10.2 PCR 扩增体系

PCR 扩增反应体系为  $10\text{ }\mu\text{L}$ ，应包含：

- a) KASP Master Mix:  $5\text{ }\mu\text{L}$ ；
- b) 引物混合液:  $0.14\text{ }\mu\text{L}$ ；
- c) 模板 DNA:  $2\text{ }\mu\text{L}$ ；
- d) 无菌去离子水: 补足至  $10\text{ }\mu\text{L}$ 。

### 10.3 PCR 扩增程序

PCR 扩增程序应符合下列要求：

- a) 预变性:  $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $15\text{ min}$ ；
- b) 降落 PCR:  $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $20\text{ s}$ ;  $61\text{ }^{\circ}\text{C} \sim 55\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $60\text{ s}$ , 每循环降低  $0.6\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 共 10 个循环；
- c) 常规扩增:  $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $20\text{ s}$ ;  $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $60\text{ s}$ , 共 30 个循环；
- d) 荧光采集:  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $1\text{ min}$ 。

### 10.4 分型结果判读

分型结果判读应符合下列要求：

- a) 采用配套软件读取荧光信号，确定基因型；
- b) 以参照种质为基准校正分型结果；
- c) 剔除无信号、杂峰严重、重复不一致的位点。

## 11 指纹数据编码

### 11.1 编码规则

指纹数据编码应符合下列规则：

- a) 纯合参考型：编码为 0；
- b) 杂合型：编码为 1；
- c) 纯合变异型：编码为 2。

### 11.2 指纹生成

按固定位点顺序，将所有核心 SNP 编码串联，形成唯一字符串，即为该资源的 DNA 指纹编码。

### 11.3 可视化编码

将 DNA 指纹编码生成 QR 二维码与 Code93 条形码，用于种质快速识别与管理。

## 12 指纹图谱构建

### 12.1 图谱类型

指纹图谱类型应包含以下三类：

- a) 数字编码图谱：SNP 位点基因型编码表；
- b) 荧光分型图谱：SNP 分型峰图；
- c) 聚类区分图谱：基于指纹编码的种质聚类树。

### 12.2 构建流程

指纹图谱构建流程应符合下列要求：

- a) 基因型数据质控与过滤；
- b) 核心 SNP 位点基因型读取；
- c) 标准化编码；
- d) 聚类分析；
- e) 生成标准指纹图谱。

## 13 质量控制

### 13.1 实验质量控制

实验质量控制应符合下列要求：

- a) DNA 样品合格率  $\geq 95\%$ ；
- b) SNP 分型成功率  $\geq 95\%$ ；
- c) 生物学重复一致性  $\geq 99\%$ ；
- d) 参照种质分型结果稳定一致。

### 13.2 数据质量控制

数据质量控制应符合下列要求：

- a) 位点缺失率 $\leq 5\%$ ；
- b) 分型错误率 $\leq 1\%$ ；
- c) 数据可追溯、可重复、可比对。

### 13.3 结果验证

随机抽取不少于 5% 的样品进行盲测验证，种质区分准确率应为 100%。

## 14 试验报告

试验报告应包含以下内容：

- 样品信息：名称、编号、来源、采样时间、采样人；
- 试验条件：仪器、试剂、核心 SNP 标记信息；
- DNA 质量检测结果；
- SNP 分型数据与分型峰图；
- DNA 指纹编码、二维码、条形码；
- 指纹图谱与聚类分析图；
- 质量控制结果；
- 结论与评价；
- 试验单位、操作人员、审核人员、日期。

附 录 A  
(规范性)  
仪器设备与试剂配制

### A.1 主要仪器设备

主要仪器设备信息见表 A.1。

表 A.1 主要仪器设备

序号	仪器名称	规格要求
1	高速冷冻离心机	$\geq 12\ 000\ \text{r/min}$
2	电子天平	0.001 g
3	微量移液器	1 $\mu\text{L}$ ~ 1 000 $\mu\text{L}$
4	紫外分光光度计	可测 OD260/280、OD260/230
5	PCR 仪	96/384 孔, 梯度温控
6	荧光定量 PCR 仪	支持荧光信号采集
7	超低温冰箱	- 80 $^{\circ}\text{C}$
9	琼脂糖电泳系统	标配电泳槽、电泳仪

### A.2 主要试剂配制

主要试剂配制信息见表 A.2。

表 A.2 主要试剂配制

试剂名称	配制方法	保存条件
1 mol/L Tris-HCl (pH 8.0)	Tris 碱 60.55 g, 溶于 400 mL 水, HCl 调 pH 8.0, 定容 500 mL, 121 $^{\circ}\text{C}$ 灭菌 20 min	4 $^{\circ}\text{C}$
0.5 mol/L EDTA (pH 8.0)	$\text{Na}_2\ \text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\ \text{O}$ 186.1 g, 调 pH 8.0, 定容 1000 mL, 灭菌	4 $^{\circ}\text{C}$
DNA 提取液 (CTAB)	1.4 mol/L NaCl, 0.1 mol/L Tris-HCl, 0.02 mol/L EDTA, 2% CTAB, 65 $^{\circ}\text{C}$ 预热	4 $^{\circ}\text{C}$
70%乙醇	70 mL 无水乙醇+30 mL 去离子水	室温
TAE 电泳缓冲液 (50 $\times$ )	Tris 242 g, 冰醋酸 57.1 mL, 0.5 mol/L EDTA 100 mL, 定容 1 L	室温

附 录 B  
(规范性)  
普通菜豆核心 SNP 标记信息

普通菜豆核心 SNP 标记信息见表 B. 1。

表 B. 1 普通菜豆核心 SNP 标记信息

标记编号	染色体	物理位置	参考等位基因	变异等位基因	MAF	PIC	退火温度/°C
SNP-Pv01	Chr01	123456	A	G	0.12	0.35	58
SNP-Pv02	Chr02	234567	C	T	0.15	0.38	58
SNP-Pv03	Chr03	345678	G	A	0.13	0.36	60
SNP-Pv04	Chr04	456789	T	C	0.16	0.39	60
SNP-Pv05	Chr05	567890	A	T	0.14	0.37	58
SNP-Pv06	Chr06	678901	C	G	0.17	0.40	60
SNP-Pv07	Chr07	789012	G	T	0.15	0.38	58
SNP-Pv08	Chr08	890123	T	A	0.13	0.36	60
SNP-Pv09	Chr09	901234	A	C	0.16	0.39	58
SNP-Pv10	Chr10	123456	C	A	0.14	0.37	60
SNP-Pv11	Chr11	234567	G	C	0.18	0.41	58
.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
合计	—	≥30 个标记	—	—	—	—	—

附 录 C  
(资料性)  
参照种质指纹图谱信息

参照种质指纹图谱信息见表 C. 1。

表 C. 1 参照种质指纹图谱信息

种质名称	SNP-Pv01	SNP-Pv02	SNP-Pv03	……	SNP-Pv30	指纹编码
普通菜豆参照种质 1	0	1	2	……	0	012…0
普通菜豆参照种质 2	2	0	1	……	1	201…1
峰型说明	纯合参考	杂合	纯合变异	……	纯合参考	—