

ICS

CCS 点击此处添加 CCS 号

DB

海南省地方标准

DB 46/T XXXX—XXXX

白木香品种鉴定技术规程 SSR 标记法

Protocol for identification of varieties of *Aquilaria sinensis*
(Lour.) Gilg —SSR marker method

(征求意见稿)

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

XXXX - XX - XX 发布

XXXX - XX - XX 实施

海南省市场监督管理局 发布

前 言

本标准由海南省质量技术监督局提出。

本标准由海南省林业局归口。

本标准由中国医学科学院药用植物研究所海南分所、海南省林木种子(苗)总站起草。

本标准主要起草人：刘培卫、魏建和、杨云、张玉秀、薛荟、甄云楠、陈波、吴海莹

白木香品种鉴定技术规程 SSR 标记法

1 范围

本标准规定了利用简单重复序列(Simple Sequence Repeats, SSR)标记进行白木香(*Aquilaria sinensis* (Lour.) Gilg)品种鉴定的操作程序、数据记录与统计、判定方法。

本标准适用于白木香品种的SSR指纹数据采集及品种鉴定。

本标准中的白木香品种包括白木香选育品种和农家种。

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 19557.1 植物新品种特异性、一致性和稳定性测试指南

NY/T 2594 植物品种鉴定 DNA分子标记法 总则

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)

基因组中有2个及以上核苷酸组成的基本单位重复多次构成的一段DNA序列。

3.2

核心引物 core primers

品种鉴定中优先选用的一套人工合成的SSR引物,具有多态性高、重复性好和分布均匀性的特点,统一用于品种DNA分子比较数据采集和品种鉴定。

3.3

扩展引物, extended primers

品种鉴定时备选的一组位点,具有重复性好、分布均匀的特点。

3.4

参照品种 reference variety

参照品种是指多样性好,核心引物位点扩增片段大小已知的一组品种。用于辅助确定待测样品在某个位点上扩增片段的大小,校正仪器设备的系统误差。

3.5

对照品种 control cultivar

与待检样品近似的品种，用于与待检样品进行比对；或指已知品种中与待检样品相似度最高的品种。

3.6

待测样品 test sample

送检单位提供的待鉴定的白木香种质、品系、品种。

4 原理

SSR广泛分布于白木香基因组中，不同白木香品种每个SSR位点的重复单元重复次数有差异。依据SSR两端的保守序列设计特异性引物对重复序列进行聚合酶链反应(PCR)扩增，扩增产物的片段长度可以通过变性聚丙烯酰胺凝胶电泳和硝酸银染色，或通过毛细管电泳技术加以区分。通过检测不同白木香品种间SSR长度的差异，实现品种的鉴定。

5 仪器设备及试剂

除非另有说明，本标准所用试剂均为分析纯。仪器设备及试剂参见附录A。

6 溶液配制

所有用水按照GB/T 6682 的要求，相关溶液配制方法参见附录B。

7 引物信息

推荐引物相关信息见附录C。当运用核心引物对某一特定品种无法鉴别时，再运用扩展引物进行鉴别。其他在本文件中未推荐的引物也可使用，但新增引物应符合NY/T 2594 的要求。

8 操作程序

8.1 样品准备

试验样品为待鉴定白木香样品和对照品种的叶片、枝条等器官或组织，最好为幼嫩叶片，采集后放入变色硅胶中，4℃保存。每份品种至少检测3个个体，同时选用3个参照品种同时进行分析。

8.2 DNA 提取

- a) 称取样品材料 200 mg，用 70%酒精脱脂棉擦洗样品和用具，在称量纸上切碎，置入 2 mL 的离心管中，加入 2 颗 70%酒精消毒过的钢珠，组织研磨机粉碎 3 分钟。
- b) 向研磨好的粉末中加 800 uL DNA 提取缓冲液和 50 uL β -巯基乙醇，用涡旋器充分混匀，然后 65 °C 孵育 40 min，期间颠倒离心管混匀 2-3 次，水浴后放至室温。

- c) 加 800 μL 现配氯仿/异戊醇 (24:1)，用手上下颠倒离心管 30 s，室温 9000 rpm 离心 10 min。小心吸出上清液到另一新的 1.5 mL 离心管中，确保不要吸入残渣。
- d) 加入等体积 -20 $^{\circ}\text{C}$ 预冷的异丙醇沉淀 DNA，颠倒混匀，在 -20 $^{\circ}\text{C}$ 下静置 30 min；12000 rpm，4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 10 min，弃上清液。
- e) 沉淀的 DNA 用 70%乙醇洗涤两次，离心后风干，溶于 100 μL 超纯水中。
- f) 检测提取 DNA 的质量：浓度值要求在 50 ng/ μL 以上，OD260 和 OD280 的比值在 1.8-2.0 范围内，A260 和 A230 比值大于 1.0。质量合格的 DNA -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用，不合格的样品需重新提取 DNA。

注：以上为推荐的 DNA 提取方法，其他能够达到质量要求的 DNA 提取方法都适用于本标准。

8.3 PCR 扩增

8.3.1 SSR 引物的选择

引物信息见附录C。首先选择附录C中核心位点引物进行扩增，当样品间检测出的差异位点数小于2时，再选用扩展位点组的引物进行检测；若样品间检测出累计的差异位点小于2时，可以按照本标准的流程新增新的引物进行检测。

8.3.2 PCR 反应体系

10 μL 的反应体系：DNA模板1 μL ，2 \times EcoTaq PCR SuperMix 5 μL （主要包括Taq DNA 聚合酶， MgCl_2 和 dNTP），10 $\mu\text{mol/L}$ 正向和反向引物各0.5 μL ，ddH₂O 3 μL 。

8.3.3 反应程序

PCR扩增程序为 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性5 min；94 $^{\circ}\text{C}$ 变性30 s，55 $^{\circ}\text{C}$ 复性30 s，72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸30 s，35个循环；72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min；反应结束后4 $^{\circ}\text{C}$ 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 凝胶的制备

用洗洁精将玻璃板洗刷干净，用胶架将两块玻璃板对齐夹紧，固定好。用移液枪将蒸馏水从左至右加入胶板，溢出，静置 5-10min，观察液面是否明显下降，若不下降则倒掉蒸馏水，用滤纸伸进胶板吸干残留水分。在烧杯中配置 6%PAGE 胶溶液：先加入 2.25ml 的 40%制胶液（丙烯酰胺与甲叉双丙烯酰胺混合液）、再加入 11.085ml 超纯水和 1.5ml 10 \times TBE 缓冲液，搅拌混匀；最后加 10%PAGE 凝固剂 150 μL 和 PAGE 促凝剂（四甲基乙二胺）15 μL ，混匀。用 1ml 移液枪从左至右快速地将制好的胶液加入胶板，溢出，待气泡全部浮至胶液上层后用移液枪刮掉，立刻插入样品梳，室温下放置 30min 以上。

8.4.1.2 电泳

将配置好的PAGE胶板装入垂直电泳槽上，在电泳槽中加入1 \times TBE电泳缓冲液，电泳液要没过胶板，轻轻拔出样品梳。在胶板两侧的样孔中加入5 μL 的DNA maker，在中间的样孔

中加入3 μ L的PCR扩增产物，开始电泳，选用的电压梯度为1 V/cm–5V/cm，具体电泳时间根据预测片段的大小，及DNA marker的迁移程度来判断。一般DNA marker中的颜色指示剂到达胶板的四分之三处即可停止电泳。

8.4.1.3 银染显色

电泳结束后关闭电源，取出胶板。将胶板放置水龙头下冲洗一遍，顺着水流方向，借用梳子轻轻把上层玻璃板翘起，取出胶块放入玻璃皿中，用超纯水漂洗2次，每次1 min。再加入0.2%硝酸银染色液，用量以完全覆盖胶块为准，然后将玻璃皿放于摇床上，转速50rpm银染15min，然后用超纯水漂洗2次，每次1–2 min。再加入适量的显影液（1%氢氧化钠和0.3%甲醛），轻摇至显色出清晰的带纹，然后用超纯水冲洗2遍，扫描或拍摄成像。

8.4.2 毛细管电泳荧光检测

8.4.2.1 PCR产物样品准备

PCR扩增完成后，取2 μ L PCR产物进行琼脂糖凝胶电泳检测（1%浓度），通过PCR产物条带的亮度对各荧光PCR产物进行稀释，得到浓度均一的荧光PCR产物。

8.4.2.2 电泳检测

将稀释至统一浓度的荧光PCR产物加至DNA分子分析仪专用的96孔板中，然后加入0.5 μ L GeneScan™500 LIZ, 8.5 μ L Hi-Di™ Formamide，混匀离心后放到PCR仪上运行变性程序（95℃，3min），变性完成后立即冷却；参照DNA分子分析仪如ABI 3730x1上机操作流程，进行SSR样本的分析检测。利用GeneMarker软件中的Fragment (Plant)片段分析功能分析上述毛细管原始数据，通过将各泳道内分子量内标的位置与各样品峰值的位置进行比较分析，获得每个扩增产物的荧光毛细管电泳特征峰图。

9 结果及判定

9.1 结果记录

采用扩增片段长度的形式表示每个SSR位点的等位变异。对于非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳银染检测方法，将每个扩增位点的等位变异与DNA marker相比较，同时参考参照品种的等位变异片段的大小，确定送检样品在该位点的等位变异。对于毛细管电泳荧光检测方法，通过使用参照品种，消除同型号不同批次间或不同型号DNA分析仪间可能存在的系统误差，使用片段分析软件读取送检样品在该位点的等位变异。

以所分析的SSR引物名称为前缀，该SSR引物在某样品上扩增的长度为后缀（小片段在前，大片段在后，缺失位点为0），得到这个样品在某个SSR标记的带型编号。

示例1:

品种“棋香21号”在ASSR-28位点上仅扩增出一条192bp的片段，则该品种在该位点上的带型编号记录为192/192。

示例2:

品种“中科1号”在ASSR-28位点上扩增出两条片段，分别为189bp，192bp，则该品种在该位点上的带型编号记录为189/192。

9.2 判定方法

对待检样品和参照品种以附录C中的引物一起进行标记检测,获得待检样品和对照品种在这些位点的等位变异数据,利用这些数据进行比较,判定方法如下:

- a) 当样品间的差异谱带数 ≥ 2 , 判定为不同的品种;
- b) 当样品间的差异谱带数=1, 判定为相近的品种;
- c) 当样品间的差异谱带数=0, 判定为极近似品种或相同品种。

对于 9.2b) 或 9.2c) 的情况, 可按照 GB/T 19557.1 的规定进行田间鉴定。

9.3 结论

根据9.2的判定结果, 填写白木香样品SSR分子鉴定报告书。

附 录 A
(规范性)
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：最高电压不低于2000 V，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 DNA分析仪：基于毛细管电泳，有片段分析功能和数据分析软件。
- A.1.6 高速冷冻离心机：最大离心力不小于20000 g。
- A.1.7 水平摇床。
- A.1.8 电子天平。
- A.1.9 微量移液器：规格分别为10 uL、20 uL、100 uL、200 uL、1000 uL，连续可调。
- A.1.10 磁力搅拌器。
- A.1.11 核酸浓度测定仪或紫外分光光度计。
- A.1.12 微波炉。
- A.1.13 高压灭菌锅。
- A.1.14 酸度计。
- A.1.15 普通冰箱。
- A.1.16 低温冰箱。
- A.1.17 制冰机。
- A.1.18 组织研磨仪。
- A.1.19 凝胶成像系统或紫外透射仪和照相机。

A.2 试剂

- A.2.1 十二烷基苯磺酸钠。
- A.2.2 聚乙烯吡咯烷酮 (PVP)。
- A.2.3 氯仿。
- A.2.4 异戊醇。
- A.2.5 乙二胺四乙酸二钠。
- A.2.6 三羟甲基氨基甲烷。
- A.2.7 浓盐酸。
- A.2.8 氢氧化钠。
- A.2.9 10×PCR反应缓冲液。

- A. 2. 10 氯化镁。
- A. 2. 11 氯化钠。
- A. 2. 12 4种脱氧核糖核苷酸 (dNTP)。
- A. 2. 13 Taq DNA聚合酶。
- A. 2. 14 SSR引物。引物序列见附录C。
- A. 2. 15 石蜡油。
- A. 2. 16 琼脂糖。
- A. 2. 17 DNA分子量标准 (DNA maker): DNA片段分布范围至少在50 bp~500 bp。
- 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 无水乙醇。
- A. 2. 24 四甲基乙二胺 (TEMED)。
- A. 2. 25 过硫酸铵。
- A. 2. 26 冰醋酸。
- A. 2. 27 硝酸银。
- A. 2. 28 甲醛。
- A. 2. 29 DNA分析仪用丙烯酰胺胶液。
- A. 2. 30 DNA分析仪用分子量内标LIZ500。
- A. 2. 31 DNA分析仪用光谱校准基质, 包括FAM、NED、VIC和PET 4种荧光标记的DNA片段。
- A. 2. 32 DNA分析仪用电泳缓冲液。

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 乙二胺四乙酸二钠盐(EDTA) (pH 8.0) 溶液

称取186.1g乙二胺四乙酸二钠盐(Na₂EDTA·2H₂O)，加入800mL水，再加入20g固体氢氧化钠(NaOH)，搅拌。待Na₂EDTA·2H₂O完全溶解后，冷却至室温。再用NaOH准确调pH至8.0，定容至1000mL。在103.4 kPa(121℃)条件下灭菌20 min。

B.1.2 0.5 mol/L 盐酸(HCl) 溶液

量取25 mL浓盐酸(36%~38%)，加水定容至500 mL。

B.1.3 1mol/L 三羟甲基氨基甲烷盐酸(Tris-HCl) (pH8.0) 溶液

量取25 mL浓盐酸(36%~38%)，加水定容至500 mL。称取60.55 g三羟甲基氨基甲烷(Tris碱)，溶于400mL水中，用0.5 mol/L 盐酸溶液(B.1.2)调pH至8.0。定容至500 mL，在103.4kPa(121℃)条件下灭菌20 min。

B.1.4 5 mol/L 氯化钠溶液

称取146g氯化钠(NaCl)溶于水，搅拌，加水定容至500 mL，在103.4 kPa(121℃)条件下灭菌20 min。

B.1.5 DNA 提取液

分别称取15g十二烷基苯磺酸钠(SDS)，放入烧杯中，分别加入40 mL 乙二胺四乙酸二钠盐溶液(pH8.0)(B.1.1)、100 mL三羟甲基氨基甲烷盐酸溶液(pH8.0)(B.1.3)和100 mL氯化钠溶液(B.1.4)，再加入800mL水，搅拌溶解，定容至1000 mL。在103.4 kPa(121℃)条件下灭菌20 min。于4℃保存。

B.1.6 氯仿-异戊醇(24:1)

按24:1的比例(V:V)配制混合液。

B.1.7 70%乙醇溶液

取700ml无水乙醇，用水定容至1000 mL。

B.1.8 TE缓冲液

分别量取5 mL三羟甲基氨基甲烷盐酸溶液(pH 8.0)(B.1.3)和1 mL 乙二胺四乙酸二钠盐溶液(pH8.0)(B.1.1)，定容至500 mL，在103.4 kPa(121℃)条件下灭菌20 min。于4℃保存。

B.2 PCR 扩增溶液的配制

B.2.1 dNTP

用超纯水分别配制dATP、dTTP、dGTP、dCTP4种脱氧核糖核苷酸终浓度为100 mmol/L的储存液。分别量取4种储存液20 μ l混合。用120 μ l超纯水定容，配制成每种核苷酸终浓度为10 mmol/L的工作液。在103.4 kPa(121 $^{\circ}$ C)条件下灭菌20 min，于-20 $^{\circ}$ C保存。

注：可用购买的满足试验要求的商品试剂。

B. 2.2 SSR引物

用超纯水分别配制正向引物和反向引物至浓度为10 μ mol/L的工作液。

B. 2.3 10XPCR缓冲液

含500 mmol/L KCl、100 mmol/L Tris-HCl(pH8.3)、0.01 %明胶。在103.4 kPa (121 $^{\circ}$ C)条件下灭菌20 min，于-20 $^{\circ}$ C保存。

B. 2.4 氯化镁(MgCl₂)溶液

称取氯化镁1.19 g.用超纯水溶解，定容至500 mL，配制成25 mmol/L的工作液。在103.4 kPa(121 $^{\circ}$ C)条件下灭菌20 min，于-20 $^{\circ}$ C保存。

B. 3 聚丙烯酰胺凝胶电泳溶液的配制

B. 3.1 40%制胶溶液

分别称取丙烯酰胺190g和甲叉双丙烯酰胺10 g，定容至500 mL。

B. 3.2 10%过硫酸铵溶液(10% PAGE胶凝固剂)

称取1.0g过硫酸铵，溶于10mL水中，混匀。于4 $^{\circ}$ C保存。

B. 3.3 10 \times TBE 缓冲液

分别称取三甲基氨基甲烷(Tris碱)108g和硼酸55g，溶于800 mL水中，加入37 mL乙二胺四乙酸二钠盐溶液(pH8.0) (B. 1. 3)，定容至1000mL。

B. 3.4 6 \times 加样缓冲液

分别称取0.25 g溴酚蓝和0.25 g二甲苯青，分别加入98 mL去离子甲酰胺和1mL乙二胺四乙酸二钠盐溶液(pH8.0)，搅拌溶解。

B. 4 银染溶液的配制

B. 4.1 染色液

称取试剂2g硝酸银，加10%无水乙醇溶解，并定容至1000ml。

B. 4.2 显影液

量取1000 mL水，加入10g氢氧化钠和3mL甲醛，混匀。

附 录 C
(规范性)
推荐引物

编号	引物	引物组别	引物序列 (5' -3')	退火温度 ℃	常见等位变异bp	参照品种
A01	ASSR-184	核心位点	正向引物: TCTCACATTTGAGCAGGTCG 反向引物: TAGATCCTGAACCTGTCGCC	55	242, 244, 248, 252, 256, 258, 266, 333, 334, 336, 340	凹身 (AoShen-11), 虎斑紫 棋 (HuBanZQ), 金丝油 (JinSiY), 葡萄藤 (PuTaoT), 油 叶子 (YouYeZ), 演丰老树 (YanFengW), 指天椒 (ZhiTianj), 云南沉香 (YunNan-19), 马来沉 香(F- MalaiXY-15- A. malaccensi s)和越南沉香 (F-Laowo-1- A. crassna)
A02	ASSR-197	核心位点	正向引物: TGTAGCTTCCTTGCCATTCC 反向引物: CTGCTGGTGTTCGACTCAG	55	244, 248, 250, 252, 254, 258	
A03	ASSR-145	核心位点	正向引物: CACTGGCGTGTGTATT 反向引物: CGTAGGAGCATCCTCCAAT	55	273, 281, 285	
A04	ASSR-169	核心位点	正向引物: CAGCAGCAGATGCCATTA 反向引物: ACAAGCCATGCAATCATCAC	55	247, 250, 253, 255	
A05	ASSR-3	核心位点	正向引物: TTTGCATTCTCACATTCCA 反向引物: AGCCAAGGCTTGGTTAAT	55	172, 176, 178, 180, 182, 184, 186, 188, 195	
A06	ASSR-105	核心位点	正向引物: GCTCAAAGATGGAGCGAAAG 反向引物: GCAGGATCAAAGTCAGCTC	55	243, 247, 250, 255, 257, 266	
A07	ASSR-127	核心位点	正向引物: GCTTGGCTTGTGGAACAAT 反向引物: TATTAATCCAGGTGTGGCG	55	272, 274, 275, 277, 279	
A08	ASSR-176	核心位点	正向引物: TACAGCAGCATGTTTGAGC 反向引物: CCTTGGACTCAGTTCCGA	55	235, 237, 284, 286, 288, 290, 291	
A09	ASSR-171	核心位点	正向引物: AGTGAGATATGGCGTGGCTC 反向引物: TAACCCTGTCCCGTCACTC	55	283, 286, 289, 292, 304, 307, 313	
A10	ASSR-28	扩展位点	正向引物: TCCTTACGCGGAACCAATAC 反向引物: GAGCGGTTAACAATTCCAA	55	189, 192	
B01	ASSR-158	扩展位点	正向引物: CCCATGAGACAAGGAAAGGA 反向引物: CACCAGAAATGGGATGCTCT	55	221, 226, 229, 232	
B02	ASSR-6	扩展位点	正向引物: ACAAAATACGCACAGCAACCA 反向引物: CTTGGATCTGACCCAGGAA	55	217, 219, 221, 228	
B03	ASSR-20	扩展位点	正向引物: GCTCATCTCGGATGGTTGT 反向引物: TTTGCTTCATTGACTGCTGG	55	222, 224, 228, 230, 232	
B04	ASSR-155	扩展位点	正向引物: GGTATGGTAGCAGGAGCCAA 反向引物: GTTAGCCCTTCCTAATCCCG	55	183, 186, 189, 190	
B05	ASSR-178	扩展位点	正向引物: CTTCAAAGGATGCAGCACA 反向引物: CGTCAGATGCTTTCCTTGG	55	197, 199, 217, 219	
B06	ASSR-27	扩展位点	正向引物: GTTCAAGCAGCCTTACCAT 反向引物: TCTGAATTGGCAGCACAAG	55	237, 241	

