**三叶青种质资源鉴定技术规程**

**SSR标记法**

 **（征求意见稿）**

前言

本标准按GB/T　1.1-2009给出的规则起草。

本标准由杭州市农业农村局提出并归口。

本标准起草单位：杭州市农业科学研究院

本标准主要起草人：严建立 黄雨晴 阮松林 钱丽华 应武 陆秋君 蔡和平

**三叶青种质资源鉴定技术规程 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）标记进行三叶青(*Tetrastigmahemsleyanum Diels et Gilg*)种质资源鉴定的操作程序、数据记录与统计、判定方法。

本标准适用于三叶青种质资源SSR指纹数据采集及种质资源鉴定。

**2 术语和定义**

下列术语和定义适用于本文件。

**2.1 推荐引物 Recommended primer**

种质资源鉴定中优先选用的一套SSR引物，其检测位点多态性高，检测结果重复性好。

**2.2 参照种质资源 Reference germplasm resource**

具有所用SSR位点上不同等位变异的品种。参照种质资源用于辅助确定送检样品的等位变异，校正仪器设备的系统误差。

**3 原理**

由于不同三叶青种质资源遗传组成不同，基因组DNA中简单重复序列的重复次数有差异。这种差异可以通过PCR扩增及电泳方法进行检测，从而能够区分不同种质资源。

**4 仪器设备及试剂**

见附录A。

**5 溶液配制**

见附录B。所用试剂均为分析纯。

**6 引物信息**

见附录C。其他在本文件中未推荐的非连锁引物也可使用。

**7 操作程序**

**7.1 样品准备**

选取幼嫩叶片，每份样品检测20张叶片的混合样。

**7.2 DNA提取**

取三叶青叶片0.5 g将叶片剪碎放入2.0 ml离心管中，加800 ul 经65°C预热的CTAB 缓冲液,研碎。65°C水浴 1 h，期间上下颠倒混匀几次，12000 r/min 离心 15 min，小心吸取上清液 500 ul 左右，加入等体积的氯仿:异戊醇(24:1)，混匀，4°C，12000 r/min 离心 10 min。小心吸取上清液约 450 ul，加入 2/3 体积的异丙醇约 300 ul，上下颠倒混匀，-20°C放置 20 min，12000 r/min 离心15 min。弃上清，加 500 ul 75%和 100%乙醇各洗一次，干燥后，溶于100ul TE水中，-20°C保存。

**7.3PCR扩增**

**7.3.1 引物选择**

选择附录C中引物引进进行扩增。

**7.3.2 反应体系**

SSR- PCR扩增体系为15μL，包括2μL Pre-Mix（含Mg+和Taq酶）、1μL模板(75~100 ng)、0.6μL正、反向引物(0.4μM)和超纯水10.8μL。

**7.3.3反应程序**

94℃预变性5 min；94℃变性1min，60℃退火45s，72℃延伸2min，共35个循环；72℃延伸5 min。

**7.4 PCR产物检测-非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳银染检测**

**7.4.1 凝胶制备**

取1mm的边条，至于长玻璃板的两侧，将短玻璃板压于长玻璃板上，使边条刚好处于边缘位置，用夹子固定，以1%琼脂糖凝胶病封住玻璃板底部。

在烧杯中依次加入5 mL 5×TBE缓冲液，3.75 mL丙烯酰胺与甲叉双丙烯酰胺混合液，搅拌并用双蒸水定容至25 mL；加入200 µL过硫酸铵和12 µLTEMED，混匀后倒入凝胶板之间，随即插好样品梳，于室温下静置2h，使胶完全聚合后使用。

**7.4.2电泳**

去掉封口的琼脂糖胶，将玻璃板固定于垂直电泳槽上，在电泳槽中加入1×TBE缓冲液，小心抽出样品梳。在10 µL PCR样品中加入2 µL溴酚蓝-二甲苯青电泳指示剂，混匀，然后向加样孔中点入1.5 µL；同时，在一侧样品孔中加入分子量标记。TBE中110V恒压电泳约2.5h。

**7.4.3 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，双蒸水冲洗30s-60s，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，放入显影液中，轻摇至显色出清晰带纹，取出用双蒸水冲洗2遍，沥干。扫描或拍摄成像。

**8 数据记录与统计**

根据扩增图谱，有带记为“1”，无带记为“0”，生成距阵，采用Nei和Li（1979）公式计算各材料间的遗传相似系数(GSij)和遗传距离(GDij)，GSij=2a/2a+b+c，GDij=1-GSij，其中a为第i个材料和第j个材料共有的条带数，b和c分别为第i个材料和第j个材料各自的特有条带数。根据Botstein等（1980）报道的方法计算多态信息含量（PIC，polymorphism information content）值，PIC=1- ，表示第i种等位基因型出现的频率。利用NTSYS-pc 2.10软件对数据进行分析，以非加权成对算术平均法（UPGMA）对材料进行聚类作图。

**附录A**

**（规范性附录）**

**仪器设备及试剂**

**A.1 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 高速冷冻离心机：最大离心力不小于20000 g。

A.1.6 水平摇床。

A.1.7 电子天平。

A.1.8 微量移液器：规格分别为10 µL、20 µL、100 µL、200µL、1000µL，连续可调。

A.1.9 pH计。

A.1.10 冰箱。

A.1.11 磁力搅拌器。

A.1.12 核酸浓度测定仪。

A.1.13 微波炉。

A.1.14 高压灭菌锅。

A.1.15 制冰机。

A.1.16 组织破碎仪。

A.1.17 凝胶成像系统。

**A.2试剂**

A.2.1十六烷基三甲基溴化铵。

A.2.2 氯仿。

A.2.3 异戊醇。

A.2.4 异丙醇。

A.2.5 乙醇。

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 SSR引物。

A.2.9 10×PCR缓冲液。

A.2.10 氯化镁。

A.2.11 四种脱氧核糖核苷酸。

A.2.12 Taq DNA聚合酶。

A.2.13 琼脂糖。

A.2.14 冰醋酸。

A.2.15 氢氧化钠。

A.2.16 丙烯酰胺。

A.2.17 甲叉双丙烯酰胺。

A.2.18 过硫酸铵。

A.2.19 四甲基乙二胺。

A.2.20 溴酚蓝-二甲苯青。

A.2.21 硝酸银。

A.2.22 甲醛。

A.2.23 DNA marker。

A.2.24硼酸。

**附录B**

**（规范性附录）**

**溶液配制**

**B.1 DNA提取溶液的配制**

**B.1.1十六烷基三甲基溴化铵（CTAB）溶液**

称取十六烷基三甲基溴化铵（CTAB）20g、氯化钠（NaCl）81.816g、乙二胺四乙酸（EDTA）2.9225g、三羟甲基氨基甲烷（Tris）12.114g，加水调整pH为8.0后定容至1000mL，在103.4kPa（121°C）条件下灭菌20min。

**B.1.2 TE水溶液**

乙二胺四乙酸（EDTA）0.29225g、三羟甲基氨基甲烷（Tris）1.2114g，加水调整pH为8.0后定容至1000mL，在103.4kPa（121°C）条件下灭菌20min。

**B.1.3 氯仿-异戊醇（24:1）**

按体积比24:1的比例配制混合液。

**B.1.4 75%乙醇溶液**

取750mL无水乙醇，用水定容至1000mL。

**B.2 PCR扩增溶液的配制**

**B.2.1 SSR引物**

用超纯水配制浓度为0.4µmol/L的工作液。

**B.3聚丙烯酰胺凝胶电泳溶液的配制**

**B.3.1 0.5mol/L 乙二胺四乙酸二钠（EDTA）溶液**

称取186.1g乙二胺四乙酸二钠盐，加入20g氢氧化钠搅拌，溶解后，调整pH为8.0。

**B.3.210×TBE缓冲液**

称取三羟甲基氨基甲烷（Tris）108g和硼酸55g，加入40毫升0.5mol/L 乙二胺四乙酸二钠（EDTA）溶液，调整pH为8.0，定容至1000mL。

**B.3.3 40%丙烯酰胺溶液**

分别称取丙烯酰胺190g和甲叉双丙烯酰胺10g。定容至500mL。

**B.3.4 10%过硫酸铵溶液**

称取1.0g过硫酸铵，溶于10mL水中。

**B.4银染溶液的配制**

**B.4.1 固定液**

量取100mL冰醋酸，加水定容至1000mL。

**B.4.2 染色液**

称取1g硝酸银，加水溶解，定容至1000mL。

**B.4.3 显影液**

称取10g氧化钠溶液，量取5mL甲醛，定容至1000mL。

**附录C**

**（规范性附录）**

**推荐引物**

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 基因\_ID | SSR编号 | 扩增基元 | 引物序列F/R (5'-3') | 预期产物（bp） | Tm=60℃测试 |
| c68753 | THSSR1 | (AG)6 | ACCAACATTCCGGAGTCTCATCCTGGTCACCAATCATCAA | 101 | **√** |
| c68920 | THSSR2 | (AG)6 | CGCCTTTCTCTCTCAACAGCAATCGCTCCCAGAGACAAGA | 260 | **√** |
| c56402 | THSSR3 | (AG)8 | AAAAACGAAAAGCTCGCTCCGCGGTGTTATGGAAGGAGAA | 183 | **√** |
| c66457 | THSSR5 | (AG)10 | GGAGGTGGAGGTACTGGTGATCCAATTCCATCCCTTTGAG | 217 | **√** |
| c66945 | THSSR6 | (AG)10 | CCAAGATAATCTGGCCTCCATTTGATTCCTTTTGGGTTGG | 279 | **√** |
| c55441 | THSSR7 | (AT)6 | TTCTTGCAGAGGCTACTTTGGGACGATGCTCAGGTCTGTGA | 277 | **√** |
| c57644 | THSSR8 | (AT)6 | GCCACACACAAACACACACAGCTGGAAGCAAATTCAAAGC | 248 | **√** |
| c69725 | THSSR9 | (AT)8 | ACATGAGGTGGGTGGAGAAGGGCAGTTCTGGATTTCTGGA | 191 | **√** |
| c69821 | THSSR10 | (AT)8 | ATGTGGCCCAATTTTGTCATCCCAAATAAACCTCCCTGGT | 163 | **√** |
| c46090 | THSSR13 | (CT)6 | GATGCCATAGGGTAGGACCAAACTGGGCAAGGATGAACAC | 238 | **√** |
| c48231 | THSSR14 | (CT)6 | GCGCTCTCCCTAATGTGTGTTGACCAAGCTCTCACACTGG | 213 | **√** |
| c54461 | THSSR15 | (CT)8 | AGAATGGAGAGGAGGGGAAAACACCAAGGGCTTTGAAATG | 232 | **√** |
| c54541 | THSSR16 | (CT)8 | TTGGCATTCTGATTCTGCTGATAAACCCTGCCCTCGAGTT | 237 | **√** |
| c58259 | THSSR19 | (GA)6 | TGTCTTTTCATCTGGGAGGGGCAGAGGGACTATCAATGGC | 259 | **√** |
| c59258 | THSSR20 | (GA)6 | TCCGAGTGCCCTATACCATCATCTCAGGACGTTCCCCTTT | 238 | **√** |
| c55880 | THSSR21 | (GA)8 | CGTGTTCTTATTGGGGTCGTAAATCCTCTTCCTCTCCCCA | 241 | **√** |
| c56112 | THSSR22 | (GA)8 | GAAAAGGAAGCCAAACAACGATCAACGGAATGAACCATCC | 249 | **√** |
| c58594 | THSSR23 | (GA)10 | CAGAGAAAAATGCGAACCAATAGATGCTCTCGCAGCAGAA | 210 | **√** |
| c48789 | THSSR25 | (TA)10 | CTTGCCCCAAAAATATTCCAAGTGGAACAGCCAAAACCAG | 204 | **√** |
| c61911 | THSSR28 | (TA)6 | GAGGAGCTTGCAATTCGTTTAATTTGAAGACGATGACGGC | 221 | **√** |
| c66966 | THSSR29 | (TA)8 | ATTGATAAATTCCGTTGCCGTCAGTGGCTTTGCCATGATA | 257 | **√** |
| c68857 | THSSR30 | (TA)8 | TAGGCAAATTGGTCTTTGGGTCTGAAATGGATTTTGATGCC | 252 | **√** |
| c60999 | THSSR31 | (TC)6 | TGGGTCTCTATCGTTTTCTGCTCAAACCCTTCCATGCTTCT | 278 | **√** |
| c61404 | THSSR32 | (TC)6 | ATCTTACGCACGCGTTTTCTTCAATACCCAACCAGCACAA | 280 | **√** |
| c6785 | THSSR33 | (TC)8 | ATCTGTGCTGTGTCTGTGGCAGCGATCTGTCCGAGGAGTA | 227 | **√** |
| c68202 | THSSR34 | (TC)8 | TTCTCTCTCCTCGTTCTCGCAGAGAACTCCTCCCTCTCCG | 236 | **√** |
| c70169 | THSSR35 | (TC)10 | TGAAGTGATCTGGGAGGAGGAGTCAAGTTGCACCCCAAAG | 256 | **√** |
| c57662 | THSSR37 | (TTC)5 | ACCTCAACGTTTATCCACGCTCGAAATTGGTGGTGTTCAA | 231 | **√** |
| c58241 | THSSR38 | (TTC)5 | GCTTGCCTCCATTTGAGAACAAACCCAGAGGCAAAATCCT | 260 | **√** |
| c64355 | THSSR39 | (TTC)7 | CCGAACCCCAACTGTAGAAACACAGTTTCTGTGAAGCGGA | 187 | **√** |
| c54644 | THSSR41 | (GAA)7 | CAAGTAGAACGAAGCGAGGGTCTCCATTCCCATTTCAACC | 274 | **√** |
| c54682 | THSSR42 | (GAA)5 | AAGGGGAGAGGGAGATAGGGAGGTTCCAGTGAATGCTTGC | 280 | **√** |
| c72999 | THSSR44 | (GAA)7 | GCTTTCACGCTTTCTGATCCGAGACACCCAGAAATCCCAA | 218 | **√** |
| c62119 | THSSR45 | (TCT)5 | CAGCACTAAGCTCACCACGACAAACTGATCCCCTTTTGGA | 233 | **√** |
| c62675 | THSSR46 | (TCT)5 | TTCCTATAATGAGAATGCAGAGGACAAAGAACCAAAAACCGGAA | 280 | **√** |
| c68169 | THSSR47 | (TCT)7 | GCCCATCAAAGCTCTCTCACAGGCATCAACTCCTTAGCGA | 167 | **√** |
| c67435 | THSSR49 | (A)16 | GGAGGGGTCTAGGTTCGAGTCCCAGAGGTGACTCCAAAAA | 204 | **√** |
| c66070 | THSSR51 | (A)18 | TCCCACCTACTGTGGAAAGGCCTCAACTCACTAAGAAGCCAAA | 201 | **√** |
| c70549 | THSSR53 | (T)16 | CAAGGCTGAAAATTTCTTCTGGTGCAAGACTCCAATCATGTACC | 255 | **√** |
| c70308 | THSSR54 | (T)16 | ACCAACGCCAGGAGTATGAGATAATCCTACGTTTGGGGGC | 271 | **√** |
| c63639 | THSSR55 | (T)18 | TTCCAGGTGACCATCATCAATTGGAGAGAGGAAAGCGAAG | 251 | **√** |
| c72839 | THSSR56 | (T)18 | TCATATTCACAGGCAGGCAGGTACGTGAAGCTCAGGAGGC | 263 | **√** |
| c63197 | THSSR57 | (T)20 | CAAATGGACTTGCTTGATCGGGCAGCTCCTGTTCTTCTTG | 260 | **√** |
| c69155 | THSSR58 | (ATCAT)6 | CAGTCAAACAAGGAGGAATGAATTCCCAAATCAAAAGCTTCG | 250 | **√** |
| c70882 | THSSR59 | (GTCAG)7 | AAGAGGGAGCCTGGAATCATAGCTGAATGTGAGGACGGAC | 278 | **√** |
| c61954 | THSSR60 | (TGAAG)8 | CCCGGTTTGATTTTGGTATGCGCTGAATTGAGAACGATGA | 173 | **√** |