

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 4485—2025

胡麻(油用亚麻)品种真实性鉴定  
SSR分子标记法

Oil flax (*Linum usitatissimum* L.) variety genuineness identification—  
SSR marker method

2025-01-09 发布

中华人民共和国农业农村部 发布





## 目 次

前言 .....	II
1 范围 .....	1
2 规范性引用文件 .....	1
3 术语和定义 .....	1
4 缩略语 .....	2
5 总则 .....	2
6 检测方案 .....	2
7 仪器设备、试剂和溶液配制 .....	4
8 检测程序 .....	5
9 鉴定意见 .....	8
10 结果报告 .....	8
附录 A(规范性) 溶液配制 .....	10
附录 B(资料性) 等位基因扩增片段信息 .....	12
附录 C(资料性) 引物分组信息 .....	13
附录 D(资料性) 参照样品及其等位变异信息 .....	16

## 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。

本文件由农业农村部种业管理司提出。

本文件由全国农作物种子标准化技术委员会(SAC/TC 37)归口。

本文件起草单位：甘肃省农业科学院作物研究所、北京市农林科学院杂交小麦研究所、全国农业技术推广服务中心、甘肃农业大学。

本文件主要起草人：赵利、王斌、刘丽华、刘丰泽、高玉红、任雪贞、李宏博、王利民、党照、刘阳娜、袁明璐、侯静静、孙全、张明明。



# 胡麻(油用亚麻)品种真实性鉴定 SSR 分子标记法

## 1 范围

本文件规定了利用简单重复序列(Simple Sequence Repeat, SSR)分子标记法进行油用亚麻(*Linum usitatissimum* L.)品种真实性检测的总则,仪器设备、试剂和溶液配制,检测程序,鉴定意见和结果报告。

本文件适用于胡麻(油用亚麻)品种真实性验证和真实性身份鉴定。

## 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 3543.1 农作物种子检验规程 总则
- 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 6682 分析实验室用水规格和试验方法

## 3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

### 3.1

**品种真实性验证** **variety genuineness verification**

与其对应品种名称的标准样品比较,检测证实供检样品品种名称标注是否名副其实。

### 3.2

**品种真实性身份鉴定** **variety genuineness identification**

经 SSR 分子标记检测并通过已知品种指纹数据比对平台筛查比较,确定供检样品的真实品种名称。

### 3.3

**标准样品** **standard sample**

国家指定机构保存的代表品种特征特性的实物样品或 DNA 样品。

### 3.4

**SSR 指纹数据比对平台** **SSR fingerprint blast platform**

采用 SSR 分子标记的标准化方法对品种标准样品等位基因进行检测,并运用计算机数据库技术和网络信息技术所构建的审定品种分子数据信息的检索比对载体。

### 3.5

**参照样品** **reference control sample**

用于校准检测样品 SSR 等位基因已定义扩增产物片段大小的样品。

### 3.6

**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。

### 3.7

**组合引物** **panel**

能够组合在一起电泳的,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。

### 3.8

#### 等位基因 allele

在一对同源染色体上同一基因座上的一对基因。

注 1:对于 SSR 检测,等位基因差异以扩增产物片段大小来表示。

注 2:对于荧光标记引物,扩增产物片段大小是指一个已定义片段大小的区间范围,本文件将之称为 Bin。

## 4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

bp: 碱基对(base pair)

CI: 氯仿:异戊醇(chloroform:3-Methyl-1-butanol)( $V_1:V_2=24:1$ )

CTAB:十六烷基三甲基溴化铵(cetyltrimethylammonium bromide)

DNA:脱氧核糖核酸(deoxyribonucleic acid)

dNTPs:脱氧核糖核苷三磷酸(deoxy-ribonucleoside triphosphate)

EDTA:乙二胺四乙酸(ethylenediaminetetraacetic acid)

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

PCI:苯酚:氯仿:异戊醇(phenol:chloroform:3-Methyl-1-butanol)( $V_1:V_2:V_3=25:24:1$ )

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

SDS:十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate)

SSR:简单重复序列(simple sequence repeat)

TBE:三羟甲基氨基甲烷-硼酸盐-乙二胺四乙酸二钠(tris-borate-EDTA)

Tris:三羟甲基氨基甲烷[tris(hydroxymethyl)aminomethane]

Taq 酶:耐热 DNA 聚合酶(Taq-DNA polymerase)

## 5 总则

胡麻的不同品种,其基因组存在着能够世代稳定遗传的简单序列重复(SSR)的重复次数差异。这种差异可以通过从抽取有代表性的检测样品中提取 DNA,用 SSR 引物进行扩增和电泳检测,从而通过其扩增产物片段大小不同而加以区分品种。

依据 SSR 检测原理,采用固定数目的 SSR 引物,通过与标准样品比较或与 SSR 指纹数据比对平台比对的方式,对品种真实性进行验证或身份鉴定。真实性验证依据规定数目引物的 SSR 分子标记差异数目而判定,品种真实性身份鉴定依据 SSR 分子标记数目没有差异的原则进行筛查、鉴定而确定。

## 6 检测方案

### 6.1 总则

对于品种真实性鉴定,引物、检测平台、样品状况不同,其检测结果的准确度、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,选定适宜的引物、检测平台、样品状况,制定相应的检测方案。

在严格控制条件下,合成选择的引物,按照确定的检测平台对检测样品按 DNA 提取、PCR 扩增、电泳、数据分析的程序进行检测。

按规定要求填报检测结果,检验报告应注明检测方案所选择的影响检测结果的关键信息。

### 6.2 引物

6.2.1 遴选了 23 对 SSR 引物作为品种真实性验证和身份鉴定的引物,具体见表 1。引物编号为 FM01~FM23,并据此构建了登记胡麻品种的 SSR 指纹数据库。

表 1 引物信息

编号	引物名称	引物序列(5'-3')	引物来源
FM01	LGM-53	F:GACCTTGATCGGTGGTCAAC R:AAAGAAGAACCAGCCACAGC	Soto-Cerda et al. ,2011
FM02	LGM-61	F:GCCTGCAGTTTAGTCGTTGG R:CGGAAAGAACAATTCCAGCTC	Soto-Cerda et al. ,2011
FM03	LU28	F:TCCCAGCGAGTTTGGTGAG R:TGGAGGAACATAATTGTGGCAAG	Roose-Amsaleg et al. ,2006
FM04	Lu2235	F:TTGTCCAAACCAACCAAGTG R:GACCACCGATTCTAACTCGAAC	Cloutier et al. , 2012
FM05	Lu682	F:CCTCCTAAAACCGGTCAACA R:AAACCCTTCTGACGCTCATC	Cloutier et al. ,2009
FM06	LU8	F:TCCCGTAATATTCTATGTTCTTCC R:TGAGTTGGACCTTACAAGACTCA	Deng Xing,2011
FM07	sfd25-3	F:TGGAGCTTCTTCATCTGCTTTG R:GGATTCAACCGACTTGGGATAA	Sahaet et al. ,2019
FM08	sfd993	F:CAGATCGATGAACTCCTCTCA R:GCTGCTTTTGTGTTGTTGGAG	Sahaet et al. ,2019
FM09	Lu532	F:AAACTCAGTGAATCACCGCTAA R:TCCCATGAAGAGTGATGGA	Cloutier et al. ,2009
FM10	Lu2633	F:CATGAATTAGCTCGGGTTCG R:ACCCATGATGATTGGTGAG	Cloutier et al. , 2012
FM11	Lu672	F:CCATTGCTGTTCTGGCTACC R:GGATTTGACGCTGGGTGTAG	Cloutier et al. ,2009
FM12	Lu2923	F:TTGCACCCGATACATATTCC R:CTAGCCTTCTTGGTTGAAGG	Cloutier et al. ,2012
FM13	LU18	F:AGAGGCGGAGGGCATTAC R:TTGGAGAGTTGGAATCGAGA	Deng Xing,2011
FM14	Lu2183	F:CTTCATGCAGTCCGTTTTTACA R:CAGTTCGTAGTTTACTTGGTGCAG	Cloutier et al. ,2012
FM15	sfd231	F:TTGAGGTGCAGCTTAACAGAGC R:AATGGGTTTCAGCAGCTTCTTC	Sahaet et al. ,2019
FM16	LU15	F:TGGACGACGATGAAGATGAA R:CCGCCGGGTACACTACTACT	Deng Xing,2011
FM17	Lu3082	F:ACACATTGGAGTGTAGCTCAAG R:TCACATCACACTGTTAGTAGATGG	Cloutier et al. ,2012
FM18	Lu2565	F:TTTGGGCTTCTACTTTCTCCTG R:AACCAAGAGGCTTCATACGG	Cloutier et al. , 2012
FM19	Lu2486	F:TTCACCATCACACCTTCACC R:TTTGTGTTGATGTTCTGGACCTG	Cloutier et al. 2012
FM20	35	F:ACGTCGAGGAGAAGGGAGAT R:AATGTCCGTCTCCACAAAC	Bickel et al. ,2011
FM21	SR3572	F:TCTCGTAGCTAGGGAGATGG R:AAAGCCGTCGTACTIONACCAC	Bickel et al. ,2011
FM22	Lu2996	F:AGCCTCTGCGTTTCTTTCAG R:GGCAGACTCTCGCTGGTTAG	Cloutier et al. , 2012
FM23	M10	F:GGGATGCTGATGAGGAAG R:GGAGGAGACAGAGGTGGA	甘肃省农业科学院作物研究所开发

6.2.2 品种真实性验证允许采用序贯方式,若检测到可以排除两者为同一品种的差异位点数的,可终止检测。也可直接采用表 1 的 23 对 SSR 引物进行检测。

6.2.3 品种真实性身份鉴定是在已具备已知品种 SSR 指纹数据的前提下,通过构建供检样品的指纹,利

用 SSR 指纹数据库比对平台能够筛查确定至具体品种。检测时采用表 1 的 23 对 SSR 引物进行检测,与 SSR 指纹数据库比对平台比较筛查与试验样品指纹一致的品种。

### 6.3 检测平台

6.3.1 对于胡麻品种真实性验证或身份鉴定,可选择采用变性 PAGE 电泳或毛细管电泳,如需利用 SSR 指纹数据库比对平台,则需要利用参照样品种确定供检样品的指纹后,再进行真实性身份鉴定。

6.3.2 对于样品量较大的,可将组织研磨仪、DNA 自动提取和移液工作站、高通量 PCR 扩增仪、多引物组合的毛细管电泳进行组合,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,在适于检测目的和不影响检测质量的前提下,按照检测平台的要求允许对本文件的规定作适宜的局部改进。

### 6.4 样品

6.4.1 送验样品为种子、幼苗、叶片等组织或器官。需要扦样的样品数量符合 GB/T 3543.2 的要求。

6.4.2 送验样品如为种子,重量应不低于 4 g 或不少于 500 粒;如为幼苗、叶片、蒴果等组织或器官,样品应至少含有 30 个个体,可以混合检测或单个个体检测。

### 6.5 检测条件

真实性鉴定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:

- a) 种子检验人员具备熟悉所使用检测技术的知识和技能;
- b) 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;
- c) 使用适当等级的试剂和灭菌处理的耗材;
- d) 使用校准检测结果评定的适宜参照样品种。

## 7 仪器设备、试剂和溶液配制

### 7.1 仪器设备

#### 7.1.1 DNA 提取

高速冷冻离心机、水浴锅或干式恒温金属浴、微量核酸定量仪或紫外分光光度计、组织研磨仪。

#### 7.1.2 PCR 扩增

PCR 扩增仪。

#### 7.1.3 电泳

##### 7.1.3.1 毛细管电泳

基因分析仪。

##### 7.1.3.2 PAGE 电泳

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 其他器具

超纯水仪、微量移液器、电子天平、高压灭菌锅、磁力搅拌器、涡旋混合器、冰箱、染色盒。

### 7.2 试剂

#### 7.2.1 DNA 提取

CTAB、 $\beta$ -巯基乙醇、氯仿、三氯甲烷、异戊醇、无水乙醇、异丙醇、乙二胺四乙酸二钠 (EDTA-2Na $\cdot$ 2H<sub>2</sub>O)、三羟甲基氨基甲烷碱 (Tris-base)、盐酸、异丙醇、氢氧化钠、醋酸钠、醋酸钾、氯化钠。

#### 7.2.2 PCR 扩增

dNTPs、*Taq* 酶、10 $\times$ 缓冲液、ddH<sub>2</sub>O、引物或 2 $\times$ *Taq* Mix 混合液。

### 7.3 电泳

#### 7.3.1 毛细管电泳

基因分析仪专用的丙烯酰胺胶、分子量内标、去离子甲酰胺、电泳缓冲液等。

#### 7.3.2 PAGE 电泳

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。

#### 7.4 溶液配制

DNA 提取、PCR 扩增、电泳、银染的溶液按照附录 A 规定的要求进行配制,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 检测程序

#### 8.1 引物合成

根据真实性验证或身份鉴定的要求,选定表 1 中的引物。选用变性 PAGE 电泳,只需合成普通引物,采用单引物电泳。选用荧光毛细管电泳,需在正向引物的 5' 端标记荧光染料合成引物,采用单引物或组合引物电泳。附录 B 引物分组信息仅作为示例,只适用于某一检测平台使用。

#### 8.2 DNA 提取

##### 8.2.1 总则

DNA 提取方法应保证提取的 DNA 数量与质量符合 PCR 扩增的要求,DNA 无降解,溶液的紫外光吸光度  $OD_{260}/OD_{280}$  宜介于 1.7~2.0。

DNA 提取可选 8.2.2 和 8.2.3 所列的任何一种方法,其他达到 PCR 扩增质量要求的 DNA 提取方法均适用。

##### 8.2.2 改良的 CTAB 法

选取试验样品的幼苗或叶片 200 mg~300 mg,加液氮迅速研磨成粉末,转入 2.0 mL 的离心管中,每管加入 900  $\mu$ L CTAB 提取液,65  $^{\circ}$ C 水浴 1 h,其间倒置混匀多次。然后加入 305  $\mu$ L 醋酸钾(5 mol/L)和 225  $\mu$ L 氯仿,倒置混匀 3 min~5 min,-20  $^{\circ}$ C 冷冻 30 min 后,12 000 r/min 离心 15 min;取 900  $\mu$ L 上清液移至新的 2.0 mL 离心管中,之后加入 900  $\mu$ L PCI(25:24:1),剧烈混匀 3 min~5 min,12 000 r/min 离心 10 min。取 900  $\mu$ L 上清液至新的 2.0 mL 离心管中,加入 800  $\mu$ L 氯仿:异戊醇(24:1,V/V)混合液,剧烈混匀 3 min~5 min,12 000 r/min 离心 10 min。取 800  $\mu$ L 上清液移至新的 2.0 mL 离心管中,加入 640  $\mu$ L 无水乙醇和 80  $\mu$ L 醋酸钠(3 mol/L),颠倒摇匀 3 次~5 次后室温静置 10 min,12 000 r/min 离心 10 min。弃上清液,加入 1.0 mL 70%~75%乙醇,颠倒摇匀之后,12 000 r/min 离心 5 min。倒掉上清液,再快速离心(7 000 r/min~8 000 r/min)之后,用 200  $\mu$ L 枪头吸走剩余液体。于室温风干几分钟之后,加入适量 TE(100  $\mu$ L)溶解 DNA,检测浓度并稀释到 50 ng/ $\mu$ L~100 ng/ $\mu$ L,置于 4  $^{\circ}$ C 备用或 -20  $^{\circ}$ C 保存。

注:利用幼苗、植株幼嫩叶片等组织或器官提取 DNA 均可。

##### 8.2.3 试剂盒法

选用适宜 SSR 标记法的商业试剂盒,并经验证合格后使用。DNA 提取方法,按照试剂盒提供的使用说明进行操作。

#### 8.3 PCR 扩增

##### 8.3.1 反应体系

PCR 扩增反应体系的总体积和组分的终浓度参照表 2 进行配制,可以依据试验条件不同作相应调整。表 2 中缓冲液若含有  $MgCl_2$ ,不再加  $MgCl_2$  溶液,加等体积无菌水替代。

表 2 PCR 扩增反应体系

反应组分	原浓度	终浓度	推荐反应体积/ $\mu$ L
10 $\times$ PCR Buffer(含 $Mg^{2+}$ )	10 $\times$	1 $\times$	2.0

表 2 (续)

反应组分	原浓度	终浓度	推荐反应体积/ $\mu\text{L}$
dNTPs	2.5 mmol/L	0.1 mmol/mL	0.8
Taq 酶	5 U/ $\mu\text{L}$	0.05 U/ $\mu\text{L}$	0.2
上游引物	2.5 $\mu\text{mol/L}$	0.25 $\mu\text{mol/L}$	2.0
下游引物	2.5 $\mu\text{mol/L}$	0.25 $\mu\text{mol/L}$	2.0
模板 DNA	50 ng/ $\mu\text{L}$	5 ng/ $\mu\text{L}$	2.0
ddH <sub>2</sub> O	—	—	11.0
总体积			20.0
注:反应组分的原浓度、体积为参考值。			

### 8.3.2 反应程序

反应程序的反应参数可根据 PCR 扩增仪型号、酶、引物等的不同做适当调整。通常采用下列反应程序:

- a) 预变性:94 °C, 5 min;
- b) 扩增:94 °C 变性 30 s, 65 °C ~ 55 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 30 s, 12 个循环, 每个循环降 0.8 °C; 94 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 30 s, 共 24 个循环;
- c) 终延伸:72 °C, 10 min。

扩增产物置于 4 °C 保存。

## 8.4 扩增产物分离

### 8.4.1 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳

#### 8.4.1.1 制胶

用少量洗涤剂和清水将玻璃板反复擦洗干净,再用蒸馏水冲洗干净后,竖置晾干。分别蘸取蒸馏水和 75%乙醇水平擦拭玻璃板 2 次,干燥后将亲和硅烷工作液均匀涂满无凹槽的玻璃板表面,疏水硅烷工作液均匀涂在有凹槽的玻璃板表面。玻璃板干燥后,将 0.4 mm 厚的塑料隔条放在无凹槽的玻璃板两侧,盖上凹槽短玻璃板,用夹子在两侧夹好固定,用水平仪检测是否水平。量取 80 mL 6% 聚丙烯酰胺凝胶溶液,加入 180  $\mu\text{L}$  10% 过硫酸铵和 60  $\mu\text{L}$  TEMED,迅速混匀后,沿着灌胶口轻轻灌入,防止气泡出现。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。

注:为保证检测结果的准确性,建议玻璃板的规格为 45 cm $\times$ 35 cm。

#### 8.4.1.2 变性

取 10  $\mu\text{L}$  扩增产物,加入 2  $\mu\text{L}$  6 $\times$  加样缓冲液,混匀。在 PCR 扩增仪上运行 95 °C 变性 5 min, 4 °C 冷却 10 min 后供备用。

#### 8.4.1.3 电泳

8.4.1.3.1 将聚合好的胶板安装于电泳槽上,在电泳正极槽(下槽)加入 600 mL 的 1 $\times$ TBE 缓冲液,负极槽(上槽)加入 600 mL 的 1 $\times$ TBE 缓冲液,拔出样品梳,在 1 800 V 恒压预电泳(20 min~30 min)。断开电源,拔出样品梳,用注射器或吸管清除加样槽内的气泡和碎胶,将样品梳尖齿插入胶中 1 mm~2 mm。每一个加样孔加入 5  $\mu\text{L}$  变性样品,在 1 800 V 恒压下电泳。

8.4.1.3.2 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(见附录 C 中的表 C.1)加以确定。二甲苯青指示带在 6% 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。

#### 8.4.1.4 银染

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,以没过胶面为准。

#### 8.4.2 荧光毛细管电泳

8.4.2.1 按照预先确定的组合引物,将同一组合中不同引物的扩增产物等比例混匀,稀释 2 倍。吸取稀释后的混合液 2  $\mu\text{L}$ ,加入到基因分析仪专用 96 孔上样板上。每孔再分别加入 0.1  $\mu\text{L}$  分子量内标和 8.9  $\mu\text{L}$  去离子甲酰胺,95  $^{\circ}\text{C}$  变性 5 min,取出立即置于冰上,冷却 10 min 以上,离心 10 s 后备用。

8.4.2.2 打开基因分析仪,检查仪器工作状态和试剂状态。

8.4.2.3 将装有扩增产物的 96 孔上样板放置于样品架基座上,将装有电极缓冲液的 buffer 板放置于 buffer 板架基座上,打开数据收集软件,按照基因分析仪的使用手册进行操作。基因分析仪将自动运行参数,并保存电泳原始数据。

### 8.5 数据分析

#### 8.5.1 总则

8.5.1.1 为了获得一致的比对结果,电泳结果特别是毛细管电泳,需要通过规定程序进行数据分析。在引物等位基因片段大小范围内(见表 C.1),对于毛细管电泳,特异峰呈现为稳定的尖锐峰型,纯合位点显示为单峰,杂合位点显示为双峰;对于 PAGE 电泳,特异谱带呈现明显,纯合位点显示为单条,杂合位点显示为双条。

8.5.1.2 对于 PAGE 电泳,位于其相应的等位基因扩增片段大小范围之外的谱带需要甄别是非特异性扩增带还是新增的稀有等位基因谱带。采用单个个体提取的,出现双带以上的多带则可能为非特异性扩增带;采用混合样提取的,某些位点出现三带、强弱带等状况,则需要通过单个个体提取进行甄别。

8.5.1.3 对于毛细管电泳,由于不同引物扩增产物表现不同、引物不对称扩增、试验条件干扰等因素影响,可能出现不同状况的峰型,按照以峰高为主、兼顾峰型的原则,依据下列规则进行甄别、过滤处置:

- a) 对于连带(pull-up)峰,即因某一位置某一颜色荧光的峰值较高而引起同一位置其他颜色荧光峰值升高的,应预先将其干扰消除后再进行分析;
- b) 对于 $(n+1)$ 峰,即同一位置出现两个相距 1 bp 左右的峰,应视为单峰;
- c) 对于连续多峰,即峰高递增或峰高接近的相差一个重复序列的连续多个峰,应视为单峰,取其最右边的峰,峰高值为连续多个峰的叠加值;
- d) 对于多个特异峰,峰高值应只采集位于前两位的两个峰,不采集其他峰;
- e) 对于高低峰,应通过设定一定阈值不予采集低于阈值的峰。

注:当存在非纯合 SSR 位点时,将会有两个特异峰,此时需要采集两个峰值。

8.5.1.4 采取混合样检测的,无论是毛细管电泳还是 PAGE 电泳,结果表明在引物位点出现异质性而无法识别特异谱带或特异峰的,应采用单个个体独立检测,试样至少含有 30 个个体的数量。异质性严重时,可终止真实性鉴定。

#### 8.5.2 数据分析和读取

##### 8.5.2.1 变性 PAGE 电泳

对甄别后的特异谱带(见 8.5.1)进行读取。扩增片段大小的读取,统一采用两段式数据记录方式。纯合位点数据记录为 X/X,非纯合位点数据记录为 X/Y(其中 X、Y 分别为该位点 2 个等位基因扩增片段大小),小片段数据在前,大片段数据在后。缺失位点数据记录为 0/0。

##### 8.5.2.2 毛细管电泳

导出电泳原始数据文件,采用数据分析软件按照下列步骤对数据进行甄别:

- a) 设置参数:在数据分析软件中预先设置好 panel、分子量内标、panel 的相应引物的 Bin(等位变异片段大小范围区间);
- b) 导入原始数据文件:将电泳原始数据文件导入分析软件,选择 panel、分子量内标、Bin、质量控制参数等进行分析;
- c) 甄别过滤处置数据:执行 8.5.1 的规定。

分析软件会对检测质量赋以颜色标志进行评分,绿色表示质量可靠无需干预,红色表示质量不过关或未落入 Bin 范围内,黄色表示有疑问需要查验原始图像进行确认。

数据比对采用 8.5.3.1、8.5.3.2 方式的,应分别通过同时进行试验的标准样品、参照样品种(依据引物选择少量的对照),校准不同电泳板间的数据偏差后再读取扩增片段大小。甄别后的特异峰落入 Bin 范围内,直接读取扩增片段大小;若其峰大多不在 Bin 范围内,可将其整体平移尽量使峰落入 Bin 设置范围内后读取数据。

### 8.5.3 数据比对

8.5.3.1 采用与标准样品比较的,对甄别后的特异谱带或特异峰(见 8.5.2.1 和 8.5.2.2),按照在同一电泳板上的试验样品与标准样品逐个位点进行两两比较,确定其位点差异。

8.5.3.2 采用毛细管电泳与 SSR 指纹数据库比对的,按照数据导入模板的要求,将数据及其指纹图谱截图上传到 SSR 指纹数据库,进行逐个位点比对,核实确定指纹数据的异同。

8.5.3.3 采用 PAGE 垂直板电泳与 SSR 指纹数据库比对的,按照数据导入模板的要求,将数据上传到 SSR 指纹数据库,进行逐个位点的两两比对,核实确定指纹数据的异同。

注:采用 PAGE 垂直板电泳与 SSR 指纹数据库比对平台比对较为困难,建议作为参考使用,比对前采取以下措施:

- a) 读取扩增产物片段大小数据的,试验样品与参照样品种(附录 C、附录 D)同时同一电泳板上电泳;
- b) 电泳时间足够,符合 8.4.1.3.2 的要求;
- c) 检测样品存在扩增片段差异较小的,按片段大小顺序重新电泳进行复核确定后读取。

### 8.5.4 数据记录

数据比对后,按照位点存在差异或相同、数据缺失、无法判定等情形,记录每个引物的位点状况。

## 9 鉴定意见

9.1 检验结果用供检样品和标准样品比较的位点差异数表示。根据检验结果进行鉴定意见判断,一般分为 3 类:排除属于同一品种、不确定是否为同一品种和不排除属于同一品种。对于有异议的样品,可以按照 GB/T 3543.5 的规定进行田间小区种植鉴定。

9.2 鉴定意见可参考以下原则:

- a) 供检样品与标准样品或 SSR 指纹数据平台某品种比较检测出差异位点数大于 2,排除两者为同一品种;
- b) 供检样品与标准样品或 SSR 指纹数据平台某品种比较检测出差异位点数为 1 或 2,不确定两者为同一品种;
- c) 供检样品与标准样品或 SSR 指纹数据平台某品种比较检测出差异位点数为 0,不排除两者属于同一品种。

## 10 结果报告

10.1 按照 GB/T 3543.1 的检验报告要求,对品种真实性验证或身份鉴定的检测结果进行填报。

10.2 对于品种真实性验证,采用下列方式进行填报:

通过\_\_\_\_\_对引物,采用\_\_\_\_\_电泳方法进行检测,与标准样品比较检测出差异位点数为\_\_\_\_\_个,差异位点的引物编号为\_\_\_\_\_,鉴定意见为:\_\_\_\_\_。

10.3 对于品种真实性身份鉴定,采用下列方式进行填报:

- a) 通过\_\_\_\_\_对引物,采用\_\_\_\_\_电泳方法进行检测,经与 SSR 指纹数据筛查,送验样品与品种未检测出位点差异,鉴定意见为:\_\_\_\_\_。
- b) 通过\_\_\_\_\_对引物,采用\_\_\_\_\_电泳方法进行检测,经与 SSR 指纹数据筛查,送验样品与品种位点差异数为 1 或 2,鉴定意见为:\_\_\_\_\_。
- c) 通过\_\_\_\_\_对引物,采用\_\_\_\_\_电泳方法进行检测,经与 SSR 指纹数据筛查,未检测到与送验样品位点一致品种,无法鉴定品种身份。

10.4 属于下列情形之一的,应在检验报告中注明:

- a) 送验样品低于 6.4 规定的数量;
- b) 与送验样品比较的标准样品的来源;
- c) 与 SSR 指纹数据比对平台进行数据比对;
- d) 送验品种异质性严重的位点(引物编号)清单;
- e) 检测采用其他 SSR 引物的名称及序列。

附录 A  
(规范性)  
溶液配制

A.1 DNA 提取

A.1.1 1 mol/L Tris-HCl

称取 121.1 g Tris 碱溶于 800 mL 水中,加入 HCl 调节 pH 至 8.0,加水定容至 1 000 mL,高压灭菌,室温保存。

A.1.2 0.5 mol/L EDTA 溶液

称取 186.1 g 二水合乙二胺四乙酸二钠(EDTA-2Na·2H<sub>2</sub>O)溶于 800 mL 水中,加入固体 NaOH 调节 pH 至 8.0,加水定容至 1 000 mL,高温高压灭菌后,室温保存。

A.1.3 5 mol/L NaCl 溶液

称取 146 g 固体 NaCl,加水定容至 500 mL。

A.1.4 CTAB 提取液

称取 20 g CTAB、81.816 g 氯化钠溶于适量水中,加入 1 mol/L Tris-HCl 100 mL、0.5 mol/L EDTA 溶液 40 mL,定容至 1 000 mL,4 ℃ 储存。

A.1.5 5 mol/L 醋酸钾溶液

称取 490 g 醋酸钾,加水定容至 1 000 mL。

A.1.6 3 mol/L 乙酸钠溶液

称取 246 g 乙酸钠,加水定容至 1 000 mL。

A.1.7 TE 缓冲液

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.2 PCR 扩增

A.2.1 SSR 引物

用 TE 缓冲液分别配制正向引物、反向引物终浓度均为 100 μmol/L 的储存液,等体积混合成 10 μmol/L 的工作液。

A.2.2 6×上样缓冲液

去离子甲酰胺 49 mL、0.5 mol/L EDTA 溶液 1 mL、溴酚蓝 0.125 g 和二甲苯青 0.125 g 混合,4 ℃ 保存。

A.3 电泳

A.3.1 10×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 1 000 mL。

A.3.2 1×TBE 缓冲液

10×TBE 缓冲液 500 mL,加水定容至 5 000 mL。

A.3.3 50×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 1 000 mL。

A.3.4 1×TAE 缓冲液

50×TAE 缓冲液 100 mL,加水定容至 5 000 mL。

**A.3.5 40% PAGE 胶**

丙烯酰胺( $C_3H_5NO$ )190 g 和甲叉双丙烯酰胺( $(H_2C=CHCONH)_2CH_2$ )10 g,加水定容至 500 mL。

**A.3.6 6%变性 PAGE 胶**

尿素 450 g、10×TBE 缓冲液 100 mL 和 40% PAGE 胶 150 mL,过滤后加水定容至 1 000 mL。

**A.3.7 亲和硅烷工作液**

量取 93 mL 的 75%乙醇、5 mL 的冰醋酸和 2 mL 的亲和硅烷原液,混匀,于常温避光干燥处保存备用。

**A.3.8 剥离硅烷工作液**

量取 25 mL 的二甲基二氯硅烷( $H_2Cl_2Si$ )、75 mL 的三氯甲烷( $CHCl_3$ )混匀,于常温避光干燥处保存备用。

**A.3.9 10%过硫酸铵溶液**

称取 0.1 g 过硫酸铵 $[(NH_4)_2S_2O_8]$ 溶于 1 mL 水中,4 °C 储存备用。

**A.4 银染****A.4.1 固定液**

100 mL 冰醋酸( $CH_3COOH$ ),加蒸馏水定容至 1 000 mL。

**A.4.2 染色液**

称取 2 g 硝酸银( $AgNO_3$ ),加水定容至 1 000 mL。

**A.4.3 显色液**

称取 20 g 氢氧化钠( $NaOH$ )溶于 1 000 mL 水中,使用前加入 5 mL 甲醛( $CH_2O$ )溶液。

**附 录 B**  
(资料性)  
引物分组信息

23 对 SSR 引物标记四色荧光的引物分组方案见表 B.1。

**表 B.1 23 对 SSR 引物标记四色荧光的引物分组方案**

组别	引物编号	引物名称	推荐荧光基团
1	FM01	LGM-53	FAM
	FM02	LGM-61	HEX
	FM03	LU28	TAMRA
	FM04	Lu2235	FAM
	FM05	Lu682	HEX
	FM22	Lu2996	ROX
2	FM06	LU8	FAM
	FM07	sfd25-3	TAMRA
	FM08	sfd993	ROX
	FM09	Lu532	FAM
	FM10	Lu2633	TAMRA
	FM21	SR3572	HEX
3	FM11	Lu672	FAM
	FM12	Lu2923	ROX
	FM13	LU18	FAM
	FM14	Lu2183	HEX
	FM15	sfd231	TAMRA
	FM16	LU15	ROX
4	FM17	Lu3082	FAM
	FM18	Lu2565	HEX
	FM19	Lu2486	TAMRA
	FM20	35	FAM
	FM23	M10	ROX
<p>注 1: 每个组别的 SSR 引物的扩增产物可以组合在一起电泳。</p> <p>注 2: 荧光染料 FAM、HEX、TAMRA、ROX 在此仅为示例。</p>			

**附 录 C**  
**(资料性)**  
**等位基因扩增片段信息**

表 C.1 列出了 23 对引物在已知胡麻品种中主要等位变异扩增片段范围、大小以及参照样品对应的等位变异信息。等位变异扩增的片段大小受标记荧光染料的影响,标记染料不同片段大小会发生变化。其中,参照样品只是列举,考虑到在某一 SSR 位点多个品种存在相同的扩增片段大小,确认某一品种在该位点扩增片段大小与参照样品是相同的,该品种也可替代相应的参考样品。

**表 C.1 已知胡麻品种主要等位变异扩增片段信息**

引物编号	引物名称	主要等位变异扩增片段, bp		参照样品
		范围	片段大小	
FM01	LGM-53	171~182	171	定亚 19 号
			173	天亚 5 号
			178	天亚 9 号
			182	定亚 4 号
FM02	LGM-61	159~162	159	晋亚 2 号
			162	定亚 20 号
FM3	LU28	180~189	180	定亚 21 号
			189	坝亚 12 号
FM04	Lu2235	219~229	219	定亚 14 号
			221	定亚 9 号
			223	定亚 23 号
			225	坝亚 5 号
FM05	Lu682	180~189	229	晋亚 8 号
			180	陇亚 9 号
			183	内亚 6 号
			186	天亚 1 号
FM06	LU8	162~199	189	宁亚 2 号
			162	定亚 23 号
			165	张亚 1 号
			168	陇亚 1 号
			171	陇亚 5 号
			173	晋亚 5 号
			175	天亚 5 号
			178	陇亚 2 号
			181	天亚 9 号
			187	甘亚 3 号
FM07	sfd25-3	156~177	190	雁农 1 号
			199	定亚 12 号
			156	甘亚 2 号
			168	坝亚 11 号
FM8	sfd993	157~163	174	晋亚 8 号
			177	宁亚 13 号
			157	晋亚 1 号
			161	定亚 18 号
			163	陇亚 9 号

表 C.1 (续)

引物编号	引物名称	主要等位变异扩增片段, bp		参照样品
		范围	片段大小	
FM09	Lu532	235~259	235	宁亚 10 号
			241	宁亚 7 号
			244	天亚 1 号
			259	陇亚 4 号
FM10	Lu2633	212~236	212	定亚 12 号
			216	宁亚 16 号
			220	雁杂 10 号
			222	晋亚 6 号
			224	轮选 2 号
			226	伊亚 3 号
			227	晋亚 1 号
			228	宁亚 7 号
			230	晋亚 2 号
			240	天亚 9 号
FM11	Lu672	138~145	138	坝亚 12 号
			141	天亚 2 号
			145	晋亚 9 号
FM12	Lu2923	202~228	202	定亚 2 号
			206	宁亚 21 号
			208	天亚 9 号
			216	定亚 3 号
			218	轮选 3 号
			220	陇亚 3 号
			222	天亚 2 号
			224	雁杂 10 号
			226	坝亚 12 号
228	陇亚 5 号			
FM13	LU18	171~184	171	雁杂 10 号
			172	陇亚 2 号
			173	坝亚 6 号
			178	宁亚 7 号
			181	定亚 13 号
			184	内亚 6 号
FM14	Lu2183	360~374	360	陇亚 7 号
			362	天亚 2 号
			364	定亚 5 号
			366	陇亚 5 号
			368	陇亚 4 号
			370	晋亚 10 号
			372	定亚 23 号
			374	宁亚 21 号
FM15	sfd231	154~157	154	伊亚 3 号
			157	晋亚 3 号
FM16	LU15	106~126	106	定亚 15 号
			109	定亚 20 号
			112	定亚 8 号
			115	定亚 22 号
			126	陇亚 9 号

表 C.1 (续)

引物编号	引物名称	主要等位变异扩增片段, bp		参照样品
		范围	片段大小	
FM17	Lu3082	172~181	172	坝亚 1 号
			174	天亚 1 号
			180	定亚 20 号
			181	宁亚 13 号
FM18	Lu2565	191~207	191	定亚 13 号
			205	定亚 17 号
			207	天亚 5 号
FM19	Lu2486	217~228	217	定亚 4 号
			221	内亚油 1 号
			226	定亚 19 号
			228	定亚 20 号
FM20	35	65~68	65	雁农 1 号
			68	轮选 2 号
FM21	SR3572	78~91	78	定亚 9 号
			91	定亚 16 号
FM22	Lu2996	221~233	221	定亚 20 号
			227	晋亚 8 号
			230	宁亚 11 号
			233	甘亚 3 号
FM23	M10	123~146	123	定亚 23 号
			137	定亚 3 号
			140	宁亚 14 号
			143	天亚 1 号
			146	天亚 9 号

**附 录 D**  
(资料性)  
参照样品及其等位变异信息

参照样品及其等位变异信息见表 D. 1。

**表 D. 1 参照样品及其等位变异信息**

引物编号	引物名称	陇亚 8 号	伊亚 4 号
FM01	LGM-53	182/182	178/178
FM02	LGM-61	160/160	163/163
FM03	LU28	189/189	189/189
FM04	Lu2235	223/223	223/223
FM05	Lu682	180/189	180/189
FM06	LU8	168/171	171/171
FM07	sfd25-3	156/156	156/156
FM08	sfd993	161/161	142/157
FM09	Lu532	244/244	241/241
FM10	Lu2633	226/230	220/220
FM11	Lu672	141/141	141/141
FM12	Lu2923	216/216	218/218
FM13	LU18	172/172	178/178
FM14	Lu2183	362/362	370/370
FM15	sfd231	154/154	154/154
FM16	LU15	112/112	112/126
FM17	Lu3082	172/172	172/180
FM18	Lu2565	207/209	205/205
FM19	Lu2486	217/217	217/217
FM20	35	65/65	65/65
FM21	SR3572	78/91	78/78
FM22	Lu2996	233/233	221/221
FM23	M10	143/143	143/143