ICS 07.080
B 04

NY

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 2174—2012

主要热带作物品种AFLP分子鉴定技术规程

Technical code for identifying main tropical crops varieties with AFLP molecular markers

2012-06-06 发布　　2012-09-01 实施

中华人民共和国农业部 发布

前　言

本标准按照GB/T 1.1—2009给出的规则起草。

本标准由中华人民共和国农业部农垦局提出。

本标准由农业部热带作物及制品标准化技术委员会归口。

本标准起草单位：中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所、中国热带农业科学院热带生物技术研究所、中国热带农业科学院南亚热带作物研究所、中国热带农业科学院橡胶研究所。

本标准主要起草人：邹冬梅、蒋昌顺、吴坤鑫、雷新涛、曾霞。

主要热带作物品种 AFLP 分子鉴定技术规程

1 范围

本标准规定了主要热带作物品种 AFLP 分子鉴定的术语和定义、试剂和材料、仪器和设备、鉴定步骤、结果计算和鉴定规则。

本标准适用于橡胶(*Heava brasiliensis* Muell-Arg)、芒果(*Mangifera indica* Linn.)、荔枝(*Litchi chinensis* Sonn.)、龙眼(*Dimocarpus longana* Lour.)、香蕉(*Musa nana* Lour.)、木薯(*Manihot esculenta* Crants)、柱花草(*Stylosanthes* SW.)的品种 AFLP 分子鉴定;也可作为其他热带作物品种 AFLP 分子鉴定参考。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件。凡是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

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

遗传相似性 genetic similarity

供检品种与真实品种间在 DNA 分子遗传上的一致性程度,用遗传相似系数表示。

4 原理

根据不同热带作物品种基因组 DNA 存在差异,基因组 DNA 经限制性内切酶双酶切后分别连上特定的接头,再进行预扩增和选择性扩增;由于选择性碱基的种类、数目和顺序决定了扩增片段的特殊性,只有那些限制性位点侧翼的核苷酸与引物的选择性碱基相匹配的限制性片段才可以被扩增;扩增产物经聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,然后根据凝胶上 DNA 指纹的有无来鉴定品种间的差异。

5 试剂与材料

除非另有说明外,在分析中仅使用确认为分析纯试剂。水为 GB/T 6682 规定的无菌双蒸水或纯度与之相当的水。

5.1 样品 DNA 提取试剂

5.1.1 三羟甲基氨基甲烷(Tris,$NH_2C(CH_2OH)_3$,CAS:77-86-1)。

5.1.2 氯化氢(HCl,CAS:7647-01-0)。

5.1.3 乙二胺四乙酸二钠(EDTA-$Na_2 \cdot 2H_2O$,$C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8 \cdot 2H_2O$,CAS:6381-92-6)。

5.1.4 氢氧化钠(NaOH,CAS:1310-73-2)。

5.1.5 氯仿(CHCl,CAS:67-66-3)。

5.1.6 异戊醇($C_5H_{12}O$,CAS:123-51-3)。

5.1.7 十六烷基三甲基溴化铵(CTAB,$C_{16}H_{33}(CH_3)_3NBr$,CAS:57-09-0)。

5.1.8 氯化钠(NaCl,CAS:7647-14-5)。

5.1.9 β-巯基乙醇(β - Mercaptoethanol，C_2H_6OS，CAS：60 - 24 - 2)。

5.1.10 苯酚(C_6H_6O，CAS：108 - 95 - 2)。

5.1.11 异丙醇(C_3H_8O，CAS：67 - 63 - 0)。

5.1.12 醋酸钠(CH_3COONa，CAS：127 - 09 - 3)。

5.1.13 乙酸($C_2H_4O_2$，CAS：64 - 19 - 7)。

5.1.14 1 mol/L Tris-HCl(pH8.0)：在 80 mL 无菌双蒸水中溶解 12.11 g Tris(5.1.1)加入 4.2 mL 浓 HCl(5.1.2)调节 pH 至 8.0(溶液冷至室温后，最后调定 pH)，用无菌双蒸水定容至 100 mL。

5.1.15 0.5 mol/L EDTA(pH8.0)：在 80 mL 无菌双蒸水中加入 18.61 g 乙二胺四乙酸二钠(5.1.3)，在磁力搅拌器上剧烈搅拌，用氢氧化钠(5.1.4)调节溶液的 pH 至 8.0(约需 2 g 氢氧化钠)然后用无菌双蒸水定容至 100 mL。

5.1.16 氯仿：异戊醇(24：1)：先加 960 mL 氯仿(5.1.5)，再加 40 mL 异戊醇(5.1.6)，混合均匀，保存在棕色玻璃瓶中，4℃保存。

5.1.17 CTAB 提取缓冲液：称取 4 g CTAB(5.1.7)和 16.364 g NaCl(5.1.8)，量取 1 mol/L Tris-HCl (5.1.14)20 mL 和 0.5 mol/L EDTA(5.1.15)8 mL，先用 70 mL 无菌双蒸水溶解，再定容至 200 mL 灭菌、冷却后，加入 0.2% β-巯基乙醇(5.1.9)400 μL 和氯仿：异戊醇(5.1.16)：100 mL，摇匀即可。

5.1.18 苯酚：氯仿：异戊醇(25：24：1)：将饱和苯酚(5.1.10)与等体积的氯仿：异戊醇(24：1)(5.1.16)混合均匀，保存在棕色玻璃瓶中，4℃保存。

5.1.19 1×TE 缓冲液：量取 1 mol/L Tris-HCl 缓冲液(5.1.14)5 mL 和 0.5 mol/L EDTA(5.1.15) 1 mL溶液于 500 mL 烧杯中，向烧杯中加入 400 mL 无菌双蒸水均匀混合，用无菌双蒸水定容到 500 mL 后，高温高压灭菌。室温保存。

5.1.20 50×TAE 电泳缓冲液：称取 242 g Tris 碱(5.1.1)，量取 57.1 mL 乙酸(5.1.13)，量取 100 mL 0.5 mol/L EDTA(5.1.15)，用无菌双蒸水定容至 1 L。

5.1.21 1×TAE 电泳缓冲液：取 50×TAE 电泳缓冲液(5.1.20)20 mL，用无菌双蒸水定容至 1 L。

5.1.22 琼脂糖，电泳级。

5.1.23 0.8%琼脂糖：称取 0.8 g 琼脂糖到三角瓶中，加入 1×TAE 电泳缓冲液(5.1.21)100 mL，加热至完全溶解。

5.2 生化试剂

5.2.1 RNA 酶。

5.2.2 限制性内切酶 *Eco*RI。

5.2.3 限制性内切酶 *Mse*I。

5.2.4 *Mse*I 接头序列：5′- GACGATGAGTCCTGAG - 3′，3′- TACTCAGGACTCAT - 5′；*Eco*RI 接头序列：5′- CTCGTAGACTGCGTACC - 3′，3′- CATCTGACGCATGGTTAA - 5′。

5.2.5 T4 DNA 连接酶。

5.2.6 引物：预扩增引物，选择性扩增引物(参见附录 A)。

5.2.7 *Taq* DNA 聚合酶。

5.2.8 脱氧核苷三磷酸(dNTPs)。

5.2.9 DL2000：DNA 标准分子量。

5.2.10 小分子量 pUC19 DNA/*Msp*I：DNA 标准分子量。

5.2.11 10×PCR 反应缓冲液：500 mmol/L KCl，100 mmol/L Tris·Cl，在 25℃下，pH9.0，1.0% Triton X - 100。

5.3 点样及制胶试剂

5.3.1 甲酰胺(CH_3NO,CAS:75-12-7)。

5.3.2 二甲苯苯胺($C_{25}H_{27}N_2NAO_6S_2$,CAS:2650-17-1)。

5.3.3 溴酚蓝($C_{19}H_{10}Br_4O_5S$,CAS:115-39-9)。

5.3.4 硼酸(H_3BO_3,CAS:10043-35-3)。

5.3.5 丙烯酰胺($CH_2=CHCONH_2$,CAS:79-06-1)。

5.3.6 双丙烯酰胺(N,N′-亚甲基双丙烯酰胺,$C_7H_{10}N_2O_2$,CAS:110-26-9)。

5.3.7 过硫酸铵[$(NH_4)_2S_2O_8$,CAS:7727-54-0]。

5.3.8 尿素[$CO(NH_2)_2$,CAS:57-13-6],超级纯。

5.3.9 N,N,N',N'-四甲基乙二胺[TEMED,$(CH_3)_2NCH_2CH_2N(CH_3)_2$,CAS:51-67-2]。

5.3.10 2×AFLP上样缓冲液:取980 μL甲酰胺(5.3.1),2 μL 0.5 mol/L EDTA(5.1.15),0.1 μL二甲苯苯胺(5.3.2),0.1 mg溴酚蓝(5.3.3),用无菌双蒸水定容至1 mL。

5.3.11 10×TBE:称取108 g Tris碱(5.1.1)和55 g硼酸(5.3.4),加入0.5 mol/L EDTA(pH8.0) 40 mL,用无菌双蒸水定容至1 L。

5.3.12 40%丙烯酰胺:分别称取丙烯酰胺(5.3.5)76 g和双丙烯酰胺(5.3.6)4.0 g,加150 mL无菌双蒸水,37℃溶解后,定容至200 mL。

5.3.13 10%过硫酸铵:1 g过硫酸铵(5.3.7),加无菌双蒸水定容至10 mL,4℃条件下避光保存。

5.3.14 6%聚丙烯酰胺凝胶:称取42 g尿素(5.3.8),加入30 mL无菌双蒸水,加热溶解并置于冰浴中,加入11 mL的10×TBE(5.3.11),15 mL的40%丙烯酰胺(5.3.12),1.33 mL的10%过硫酸铵(5.3.13)混匀后用无菌双蒸水定容至100 mL。该溶液在4℃条件下,可保存数周。

5.4 处理玻璃板试剂

5.4.1 反硅烷化试剂。

5.4.2 亲和硅烷。

5.4.3 无水乙醇(C_2H_6O,CAS:64-17-5)。

5.5 银染试剂

5.5.1 甲醇(CH_3OH,CAS:67-56-1)。

5.5.2 硝酸银($AgNO_3$,CAS:7761-88-8)。

5.5.3 甲醛(CH_2O,CAS:50-00-0)。

5.5.4 碳酸钠(Na_2CO_3,CAS:497-19-8)。

5.5.5 硫代硫酸钠($Na_2S_2O_3$,CAS:7772-98-7)。

5.5.6 固定溶液:量取200 mL甲醇(5.4.1)和100 mL乙酸(5.1.13),用无菌双蒸水定容至1 L。

5.5.7 染色液:1 g硝酸银(5.5.2),37%甲醛(5.5.3)1.5 mL,用无菌双蒸水定容至1 L。

5.5.8 显影液:称取60 g碳酸钠(5.5.4),溶解于2 L无菌双蒸水,使用前加入37%甲醛3.0 mL,10 g/L硫代硫酸钠(5.5.5)溶液400 μL。

6 仪器和设备

6.1 梯度PCR扩增仪。

6.2 紫外分光光度计。

6.3 多功能电泳仪。

6.4 DNA序列分析电泳槽。

6.5 高速冷冻离心机。

6.6 移液枪。

6.7 高压灭菌锅。

7 鉴定步骤

7.1 样品 DNA 提取

采集 0.4 g～0.5 g 新鲜嫩叶，在液氮中研磨成细粉沫。将研磨后的细粉沫转至 2 mL 的离心管中。加入 600 μL 65℃预热的 CTAB 提取缓冲液(5.1.17)，混匀。在 65℃水浴中温育 1 h～2 h。分别用 600 μL的酚∶氯仿∶异戊醇(5.1.18)和氯仿∶异戊醇(5.1.16)抽提。离心收集上清液到无菌的离心管中。用等体积的异丙醇(5.1.11)和 1/10 体积的 3 mol/L 醋酸钠(pH 5.2)(5.1.12)沉淀 DNA。离心收集 DNA，并在室温下晾干。用 70%的酒精洗盐。加入 100 μL TE 缓冲液(5.1.19)，完全溶解 DNA。加入 10 μL RNA 酶(10 μg/μL)(5.2.1)，并于 37℃水浴中温育 1 h。用紫外分光光度计(6.2)测定 DNA 的浓度。在 0.8%的琼脂糖胶(5.1.23)上电泳，检测 DNA 的质量。DNA 保存在－20℃冰箱。

7.2 AFLP 反应

鉴定所涉及的接头和引物参见附录 A。

7.2.1 模板 DNA 的双酶切

每个 DNA 样品按照 12 μL 的 DNA(25 ng/μL)、0.5 μL 的 *Eco* RI(20 U/μL)(5.2.2)、0.5 μL 的 *Mse* I(10 U/μL)(5.2.3)、2.5 μL 的 10×*Eco* RI 酶切缓冲液、9.5 μL 的无菌双蒸水组分混合，总体积为 25 μL。进行 *Eco* R I 和 *Mse* I 的双酶切，37℃保温酶切 2 h，70℃保温 15 min 以终止反应，冰上放置，短暂离心收集于管底并保存在－20℃冰箱。

7.2.2 DNA 片段和接头的连接

酶切完全后的 DNA 片段与 *Eco*RI 和 *Mse*I 接头(5.2.4)进行连接反应，并按 10 μL 的 DNA 双酶切反应液、5 μL 的 *Eco* RI 接头(10 μmol/L)、5 μL 的 *Mse*I 接头(10 μmol/L)、2.5 μL 的 10×连接缓冲液、1 μL 的 T4 DNA 连接酶(5.2.5)、1.5 μL 的无菌双蒸水组分混合，每个样品反应的总体积为 25 μL。于 16℃条件下过夜(15 h)连接。取连接产物 10 μL，按 1∶5 的比例用 1×TE 缓冲液(5.1.19)稀释后用于预扩增反应。其余连接反应液保存在－20℃冰箱。

7.2.3 AFLP 预扩增反应

按 2.5 μL 的 1∶5 稀释的连接反应液、1 μL 的预扩增引物 E(100 ng/μL)、1 μL 的预扩增引物 M(100 ng/μL)、0.2 μL 的 *Taq* DNA 聚合酶(5.2.7)(5 U/μL)、4 μL 的氯化镁(25 mmol/L)、2.5 μL 的 10×PCR 反应缓冲液(5.2.11)、2 μL 的 dNTPs(5.2.8)(2.5 mmol/L)、11.8 μL 的无菌双蒸水组分混合，反应体积为 25 μL。反应条件：94℃预变性 5 min；94℃变性 30 s，56℃退火 60 s，72℃延伸 60 s，共 25 个循环。预扩增反应后，取 5 μL 预扩增产物进行 0.8%的琼脂糖(5.1.23)电泳，检测预扩增效果。另取 3 μL 反应产物按 1∶50 比例用 1×TE 缓冲液(5.1.19)稀释作为选择性扩增反应模板。其余产物保存在－20℃冰箱。

7.2.4 AFLP 选择性扩增反应

取经 1∶50 比例稀释的预扩增产物 5 μL 作为选择性扩增的 DNA 模板，加入 1 μL 的选择性引物(5.2.6)E(100 ng/μL)、1 μL 的选择性引物 M(100 ng/μL)、2 μL 的 dNTPs(5.2.8)(2.5 mmol/L)、0.3 μL的 *Taq*DNA 聚合酶(5.2.7)(5 U/μL)、1.5 μL 的氯化镁(25 mmol/L)、2.0 μL 的 10×PCR 反应缓冲液、7.2 μL 的无菌双蒸水组分混合，反应体积为 20 μL。采用梯度 PCR 方法，其反应条件为：起始反应温度 94℃变性 60 s，68℃退火 30 s，72℃延伸 60 s；以后每个循环中的退火温度逐次降低 1℃，经 13 个循环后降至 56℃，其余条件不变，再进行 23 个循环。

7.2.5 AFLP 选择性扩增反应产物电泳

7.2.5.1 **玻璃板处理**

用0.1 mol/L的氢氧化钠(5.1.4)处理玻璃板1 h,并清洗,然后自来水冲洗。用洗洁剂清洗,然后分别用自来水和无离子水冲洗干净。玻璃板放置50℃条件下烘干。用无水乙醇去除玻璃板上所有可见的污斑,并凉干。在带耳的玻璃板一面用反硅烷化试剂(5.4.1)处理(用擦镜纸涂),并凉干(必要时在一小角作记号)。在另一板玻璃板的一面用亲和硅烷(5.4.2)处理,方法同上。干后,用去离子水冲洗,再用无水乙醇(5.4.3)处理。将经亲和硅烷处理的玻璃板面向上,在两边放上边条,然后将带耳的经反硅烷化试剂处理的玻璃板面向下叠好,再用医用宽胶带将玻璃板的两边和底端封好,并夹上夹子。

7.2.5.2 **制胶**

取60 mL的6%聚丙烯酰胺凝胶(5.3.14)于200 mL烧杯中,加入800 μL的10%过硫酸铵(5.3.13),40 μL的二甲苯苯胺(5.3.2),迅速混匀。将玻璃板倾斜成15°,并把溶液从玻璃板的一边灌入,直至灌满,并插入梳子(注:对于尖头梳子,先以平端插入0.5 cm左右)。让胶聚合2.5 h,聚合后,用无离子水清洗玻璃板。

7.2.5.3 **样品处理**

取3 μL AFLP选择性产物与等体积的2×AFLP上样缓冲液(5.3.10)混合后,95℃条件变性5 min,并迅速放置冰上冷却。小分子量pUC19 DNA/*Msp*I(5.2.10)也作同样处理。

7.2.5.4 **电泳**

预电泳:使用DNA序列分析电泳槽和多功能电泳仪,以1 500 V、50 W(上槽800 mL 1×TBE,下槽1 000 mL 1×TBE)电泳30 min~40 min。待温度达55℃时断电,开始点样。先用枪头冲洗点样孔,并开始点样。电泳:电压1 500 V,功率50 W条件下电泳2 h,直到前沿染料至玻璃板末端1 cm~1.5 cm为止。电泳结束后15 min,从电泳槽上拆下玻璃板,并用无离子水将玻璃板擦干净。

7.2.5.5 **银染**

固定:将带胶的玻璃板(胶面向上)放在2 L的固定溶液(5.5.6)中固定20 min。洗涤:分别用2 L的无离子水洗涤带胶的玻璃板3次,每次5 min。染色:将带胶的玻璃板(胶面向上)在2 L染色液(5.5.7)中,充分振荡45 min。用超纯水洗胶9 s。显影:在2 L的显影液(5.5.8)中,充分振荡,直至所有带出现。在固定液中终止显影,并在无离子水中漂洗。室温条件下,将玻璃板垂直放置过夜,凉干后,进行图像扫描并记录数据,读带范围为50 bp~330 bp。

8 结果计算

8.1 数据记录

根据AFLP选择性扩增产物范围的主条带有或无分别赋值,有带的记为1,无带的记为0。

8.2 遗传相似系数计算

供检品种与真实品种间遗传相似系数按式(1)计算。

$$Gs = \frac{2N_{xy}}{N_x + N_y} \quad \cdots\cdots (1)$$

式中:

Gs ——为供检品种与真实品种间的遗传相似系数;

N_x ——真实品种 x 的总条带数;

N_y ——供检品种 y 的总条带数;

N_{xy} ——代表两个品种共有的条带数。

9 鉴定规则

遗传相似系数为0.99~1,供检品种是真实品种;遗传相似系数小于0.99,供检品种不是真实品种。

附 录 A
(资料性附录)
热带作物品种 DNA 分子鉴定所用接头和引物

热带作物品种	限制性内切酶	接头	预扩增引物对	选择性扩增引物对
橡胶	*Eco*RI/*Mse* I	*Eco*R I/*Mse* I 接头	*Eco*RI - A/*Mse* I - C	E - AG/M - CAA E - TG/M - CTG
芒果	*Eco*R I/*Mse* I	*Eco*R I/*Mse* I 接头	*Eco*RI - A/*Mse* I - C	E - ACA/M - CAT E - ACT/M - CTT
荔枝	*Eco*R I/*Mse* I	*Eco*R I/*Mse* I 接头	*Eco*RI - A/*Mse* I - C	E - AAC/M - CTG E - ACC/M - CAT
龙眼	*Eco*R I/*Mse* I	*Eco*R I/*Mse*I 接头	*Eco*R I - A/*Mse* I - C	E - ACT/M - CTT
香蕉	*Eco*R I/*Mse* I	*Eco*R I/*Mse* I 接头	*Eco*RI - A/*Mse* I - C	E - ACC/M - CAT E - ACC/M - CAG
木薯	*Eco*R I/*Mse* I	*Eco*R I/*Mse* I 接头	*Eco*R I - A/*Mse* I - C	E - ACT/M - CAT E - ACA/M - CAA E - AGG/M - CTT
柱花草	*Eco*R I/*Mse* I	*Eco*R I/*Mse* I 接头	*Eco*R I - 0/*Mse* I - 0	E - ACC/M - CTC