

ICS 65.020.20  
B 21  
备案号: 33041-2012

# DB42

## 湖北省地方标准

DB42/T 800—2012

### 两系杂交水稻 品种纯度 SSR 检测方法

Procedure for testing seed purity of two-line system hybrid rice by SSR

地方标准信息服务平台

2012 - 01 - 12 发布

2012 - 05 - 04 实施

湖北省质量技术监督局 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 原理.....	2
5 核心引物确定原则.....	2
6 检测程序.....	2
7 结果计算.....	3
附录 A（资料性附录） NY/T1433-2007 推荐的 24 对 SSR 引物序列.....	4
附录 B（资料性附录） 47 对湖北省现有两系杂交水稻品种纯度 SSR 检测常用引物序列.....	5
附录 C（规范性附录） 相关试剂配制.....	7

地方标准信息服务平台

## 前 言

本标准按照 GB/T 1.1-2009《标准化工作导则 第1部分：标准的结构和编写》给出的规则起草。

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这些专利的责任。

本标准由湖北省农业厅提出并归口。

本标准起草单位：湖北省种子管理局。

本标准主要起草人：周正明、谢建平、李彧、高明鑫、马磊。

地方标准信息服务平台

# 两系杂交水稻 品种纯度 SSR 检测方法

## 1 范围

本标准规定了两系杂交水稻 品种纯度SSR检测技术方法的术语和定义、原理、核心引物确定原则、检测程序和结果计算。

本标准适用于品种真实性已经确认的两系杂交水稻 品种纯度的鉴定。

## 2 规范性引用文件

下列文件对于本文件是必不可少的。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 3543.4-1995 农作物种子检验规程 发芽试验

NY/T 1433-2007 水稻品种鉴定DNA指纹方法

## 3 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

### 3.1

**简单重复序列 SSR simple sequence repeats**

又称微卫星序列或串联重复序列，是由1-5个核苷酸为重复单位聚集而成的长达几十个至几百个bp的串联重复序列。

### 3.2

**聚合酶链式反应 PCR polymerase chain reaction**

一种用于在体外扩增DNA序列的技术程序。模板DNA经高温变性分解为两条单链，在适宜温度下，经DNA聚合酶的催化作用，两条引物分别与DNA模板两条单链上的一段互补序列发生退火结合，然后在DNA聚合酶的催化下以四种脱氧核苷三磷酸（dNTP deoxyribonucleoside triphosphate）为底物，引物延伸合成DNA。如此变性分解、退火结合和延伸合成DNA反复循环，使位于引物序列之间的DNA片段呈几何倍数扩增。

### 3.3

**引物 primer**

具有游离的3'-OH末端及特定序列的寡核苷酸短片段，与DNA模板结合后启动PCR反应。

### 3.4

**亲本种子 parental**

用于配制大田生产杂交种子的不育系和恢复系种子。

## 4 原理

简单重复序列分布于水稻整个基因组,每个位点上重复单位的数目及重复单位的序列都可能不完全相同,因而造成了对应座位上的多态性。由于每个简单重复序列两端的序列是高度保守的单拷贝序列,因而可根据其两端的序列设计一对特异引物,利用PCR技术进行扩增,扩增产物利用电泳进行分离,分析其长度多态性,达到区别不同于杂交种的目的。

## 5 核心引物确定原则

在水稻基因组上选取多态性、稳定性、重复性等综合特性好的引物作为核心引物(推荐引物序列见附录A、附录B)。其中附录A引自 NY/T 1433-2007 水稻品种鉴定DNA指纹方法,附录B为湖北省现有两系杂交水稻品种纯度SSR检测常用引物。

## 6 检测程序

### 6.1 样品数

从供检样品中随机取400粒种子按GB/T 3543.4-1995《农作物种子检验规程 发芽试验》标准中规定的方法进行发芽,从发芽的幼苗中随机取192株幼苗进行检测。同时将标准的杂种及其父、母本设为对照。

注:为增加室内SSR检测结果与田间鉴定结果的一致性,可随机选取192株正常幼苗进行检测。

### 6.2 DNA 提取

截取0.5cm-1cm长的水稻幼苗,加入40 $\mu$ l 1%NaOH溶液,在沸水中煮30s,然后加入60 $\mu$ l 2:1 HCl-Tris溶液,在沸水中煮2min,取1 $\mu$ l进行PCR扩增。

### 6.3 特定引物筛选

利用亲本DNA,在核心引物中筛选出具有较好多态性、亲本间DNA片段差异较大,条带清晰的引物,作为特定引物对供检样品进行检测。引物的选用还应考虑杂交种的生产情况,注意以下原则:

- 对亲本纯度较高、去杂彻底,且制种田隔离效果较好的,一般选用一对引物即可。
- 对制种田隔离条件较差,有外源花粉污染的,应根据外源花粉类型增加引物对原模板DNA进行再检测。
- 对亲本中杂株较多,或去杂不严的,应根据亲本杂株类型增加引物对原模板DNA进行再检测。

### 6.4 PCR 扩增

#### 6.4.1 反应体系

10 $\mu$ l的反应体系包含10 $\mu$ M正反引物各0.2 $\mu$ l,10mM的dNTP 0.2 $\mu$ l,2U/ $\mu$ l的 0.6 $\mu$ l AmpliTaq Gold DNA聚合酶,10倍PCR反应液(100mmol/L Tris-HCl, pH8.3, 15mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 500mmol/L KCl, 0.01%的明胶)1 $\mu$ l,1 $\mu$ l模板DNA(约10ng)和6.8 $\mu$ l超纯水。

#### 6.4.2 反应程序

94℃变性4min，然后是94℃15s、55℃15s、72℃30s进行35个循环，最后72℃延伸5min。

注：此程序中55℃15s，其温度为参考温度，实际操作时可根据厂家提供的引物说明书设置。

## 6.5 谱带分离

### 6.5.1 凝胶配制

称取4g Nusieve3:1琼脂糖，加入96ml 1倍TAE缓冲液，室温下放置30min，在微波炉中煮沸8min，用蒸馏水加至原来体积，待冷却至60℃左右时，加入5μl溴化乙锭溶液并混匀，倒入12×12cm的制胶盒中，插好制胶梳，冷却后，缓慢抽去制胶梳，置于电泳槽中，用于上样。

注：上样孔在电泳槽负极方向

### 6.5.2 上样

用移液器依次取约10μl扩增产物，按顺序点于上样孔。每排上样孔分别点100bp~600bp marker、父、母亲本种子的DNA扩增产物作为对照。

### 6.5.3 电泳、成像

将上样的琼脂糖凝胶置于电泳槽内，接通电泳仪电源，设置合适的电压值，（一般为6V/cm-10V/cm），电泳约30min。电泳完毕后，取出凝胶置于保鲜膜上，放入凝胶成像仪中观察并拍照。

## 7 结果计算

以亲本作对照，鉴定各样品电泳谱带的特征和一致性，判定杂株类型。其带型与母本一致的定为不育系杂株，其他与杂种带型不一致的定为其他杂株。然后按下列公式计算纯度值X。

$$X(\%) = \frac{\text{实际检测样品幼苗株数} - \text{不育系杂株数} - \text{其他杂株数}}{\text{实际检测样品幼苗株数}} \times 100$$

注：如使用多对引物进行检测，需对所用的每对引物分别给出计算结果，并说明引物筛选方法。

附 录 A  
(资料性附录)

NY/T1433-2007 推荐的 24 对 SSR 引物序列

表A.1 NY/T1433-2007推荐的24对SSR引物序列

引物名称	正向序列(5' -3' )	反向序列(3' -5' )
RM297	TCTTTGGAGGCGAGCTGAG	CGAAGGGTACATCTGCTTAG
RM71	CTAGAGGCGAAAACGAGATG	GGGTGGCGAGGTAATAATG
RM85	CCAAGATGAAACCTGGATTG	GCACAAGGTGAGCAGTCC
RM5414	ACCATGGTTCAAGAGTGA	ACAGCTCAACCTGTTGAGTG
RM274	CCTCGCTTATGAGAGCTTCG	CTTCTCCATCACTCCCATGG
RM190	CTTGTCTATCTCAAGACAC	TTGCAGATGTTCTTCCTGATG
RM336	CTTACAGAGAAAACGGCATCG	GCTGGTTTGTTCAGGTTTCG
RM72	CCGGCGATAAAACAATGAG	GCATCGGTCCTAACTAAGGG
RM219	CGTCGGATGATGTAAAGCCT	CATATCGGCATTTCGCCTG
RM311	TGGTAGTATAGGTACTAAACAT	TCCTATACACATACAAACATAC
RM209	ATATGAGTTGCTGTCGTGCG	CAACTTGCATCCTCCCCTCC
RM19	CAAAAACAGAGCAGATGAC	CTCAAGATGGACGCCAAGA
RM1195	ATGGACCACAAACGACCTTC	CGACTCCCTTGTCTCTG
RM208	TCTGCAAGCCTTGTCTGATG	TAAGTCGATCATTGTGTGGACC
RM232	CCGGTATCCTTCGATATTGC	CCGACTTTTCCTCCTGACG
RM273	GAAGCCGTCGTGAAGTTACC	GTTTCCTACCTGATCGCGAC
RM267	TGCAGACATAGAGAAGGAAGTG	AGCAACAGCACAACTTGATG
RM253	TCCTTCAAGAGTGCAAAACC	GCATTGTCATGTCGAAGCC
RM18	TTCCCTCTCATGAGCTCCAT	GAGTGCCTGGCGCTGTAC
RM337	GTAGGAAAGGAAGGCAGAG	CGATAGATAGCTAGATGTGGCC
RM258	TGCTGTATGTAGCTCGACC	TGGCCTTTAAAGCTGTGCGC
RM278	GTAGTGAGCCTAACAATAATC	TCAACTCAGCATCTCTGTCC
RM224	ATCGATCGATCTTCACGAGG	TGCTATAAAAGGCATTCGGG
RM17	TGCCCTGTTATTTTCTTCTCTC	GGTGATCCTTCCCATTCA



附 录 B  
(资料性附录)

47 对湖北省现有两系杂交水稻品种纯度 SSR 检测常用引物序列

表B.1 47对湖北省现有两系杂交水稻品种纯度SSR检测常用引物序列

引物名称	正向序列(5' -3' )	反向序列(3' -5' )
RM212	CCACTTTCAGTACTACCAG	CACCCATTTGTCTCTCATTATG
RM276	CTCAACGTTGACACCTCGTG	TCCTCCATCGAGCAGTATCA
RM242	GGCCAACGTGTGTATGTCTC	TATATGCCAAGACGGATGGG
RM110	TCGAAGCCATCCACCAACGAAG	TCCGTACGCCGACGAGGTCGAG
RM286	GGCTTCATCTTTGGCGAC	CCGGATTCACGAGATAAACTC
RM263	CCCAGGCTAGCTCATGAACC	GCTACGTTTGAGCTACCACG
OSR28	AGCAGCTATAGCTTAGCTGG	ACTGCACATGAGCAGAGACA
RM1	GCGAAAACACAATGCAAAAA	GCGTTGGTTGGACCTGAC
RM234	ACAGTATCCAAGGCCCTGG	ACAGTATCCAAGGCCCTGG
RM424	TTTGTGGCTCACCAGTTGAG	TGGCGCATTCATGTTCATC
RM243	GATCTGCAGACTGCAGTTGC	AGCTGCAACGATGTTGTCC
RM264	GTTGCGTCCTACTGCTACTTC	GATCCGTGTCGATGATTAGC
RM21	ACAGTATTCCGTAGGCACGG	GCTCCATGAGGGTGGTAGAG
RM201	CTCGTTTATTACCTACAGTACC	CTACCTCCTTCTAGACCGATA
RM202	CAGATTGGAGATGAAGTCCTCC	CCAGCAAGCATGTCAATGTA
RM204	GTGACTGACTTGGTCATAGGG	GCTAGCCATGCTCTCGTACC
RM302	TCATGTCATCTACCATCACAC	ATGGAGAAGATGGAATACTGTC
RM11	TCTCCTCTTCCCCGATC	ATAGCGGGCGAGGCTTAG
RM247	TAGTGCCGATCGATGTAACG	CATATGGTTTGACAAAGCG
RM251	GAATGGCAATGGCGCTAG	ATGCGGTTCAAGATTTCGATC
RM164	TCTTGCCCGTCACTGCAGATATCC	GCAGCCCTAATGCTACAATTCTTC
RM154	ACCTCTCCGCTCGCTCCTC	CTCCTCCTCTCGACCGCTCC
RM341	CAAGAAACCTCAATCCGAGC	CTCCTCCCGATCCCAATC
RM246	GAGCTCCATCAGCCATTAG	CTGAGTGTGCTGCGACT
RM310	CCAAAACATTTAAAATATCATG	GCTTGTGGTCATTACCATTTC
RM26	GAGTCGACGAGCGGCAGA	CTGCGAGCGACGGTAACA
RM16	CGTAGGGCAGCATCTAAA	AACACAGCAGGTACGCGC
RM135	CTCTGTCTCCTCCCCGCGTCG	TCAGCTTCTGGCCGCTCCTC
RM136	GAGAGCTCAGCTGCTGCTTAGC	GAGGAGCGCCACGGTGTACGCC
RM152	GAAACCACCACCTCACC	CCGTAGACCTTCTGAAGTAG
RM160	AGCTAGCAGCTATAGCTTAGCTGGAGATCG	TCTCATCGCCATGCGAGGCCTC
RM186	TCCTCCATCTCCTCCGCTCCCG	GGGCGTGGTGGCCTTCTTCGTC
RM226	AGCTAAGGTCTGGGAGAAACC	AAGTAGGATGGGGACAAGCTC
RM235	AGAAGCTAGGGCTAACGAAC	TCACCTGGTCAGCCTCTTTC

表 B.1 47 对湖北省现有两系杂交水稻品种纯度 SSR 检测常用引物序列(续)

RM287	TTCCTGTAAAGAGAGAAATC	GTGTATTTGGTGAAAGCAAC
RM340	GGTAAATGGACAATCCTATGGC	GACAAATATAAGGGCAGTGTGC
RM7	TTCGCCATGAAGTCTCTCG	CCTCCATCATTTTCGTTGTT
RM317	CATACTTACCAGTTCACCGCC	CTGGAGAGTGCAGCTAGTTGA
RM307	GTACTACCGACCTACCGTTCAC	CTGCTATGCATGAACTGCTC
RM480	GCTCAAGCATTCTGCAGTTG	GCGCTTCTGCTTATTGGAAG
RM30	GGTTAGGCATCGTCACGG	TCACCTCACCACACGACACG
RM3	ACACTGTAGCGGCCACTG	CCTCCACTGCTCCACATCTT
RM214	CTGATGATAGAAACCTCTTCTC	AAGAACAGCTGACTTCACAA
RM248	TCCTTGTGAAATCTGGTCCC	GTAGCCTAGCATGGTGCATG
RM304	TCAAACCGGCACATATAAGAC	GATAGGGAGCTGAAGGAGATG
RM271	TCAGATCTACAATTCCATCC	TCGGTGAGACCTAGAGAGCC
RM216	GCATGGCCGATGGTAAAG	TGTATAAAACCACACGGCCA

地方标准信息服务平台

附录 C  
(规范性附录)  
相关试剂配制

- C.1 0.5mol/L Tris-HCl 溶液 (PH8.0): 称取 60.5 克三羟甲基氨基甲烷 (Tris), 加入 400ml 双蒸水中溶解, 加入浓盐酸 29.7ml, 加水定溶至 1000ml。
- C.2 2:1 HCl-Tris 溶液: 0.25 mol/L HCl 与 0.5 mol/L Tris-HCl (PH8.0) 按 2:1 配制。
- C.3 0.5 mol/L EDTA 溶液 (PH8.0): 称取 186.6 克乙二胺四乙酸二钠 ( $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), 加入 700ml 双蒸水中溶解, 加入 20 克 NaOH, 加水定溶至 1000ml。
- C.4 0.1 倍 TE 缓冲液: 取 1 ml 1mol/L Tris 溶液 (PH8.0) 和 0.2 ml 0.5 mol/L EDTA 溶液 (PH8.0), 加水定溶至 1000ml。
- C.5 50 倍的 TAE 电极缓冲液: 称取 242.2 克三羟甲基氨基甲烷 (Tris), 加入 100 ml 0.5M EDTA 溶液 (PH8.0) 和 57.1ml 冰乙酸, 加水定溶至 1000ml。用时稀释 50 倍。
- C.6 6 倍上样缓冲液: 0.25% 的溴酚兰, 40% (W/V) 蔗糖。称取 0.25 克溴酚兰和 40 克蔗糖, 用双蒸水定容至 100ml。用时稀释 6 倍。
- C.7 1000 倍 溴化乙锭溶液: 称取 50mg 溴化乙锭定溶于 100ml 双蒸水中, 配成 0.5mg/ml 的 1000 倍贮存液, 用时按 1: 1000 稀释配制染色液, 溶液要 4℃ 避光避光 (溴化乙锭是一种诱变剂)。

地方标准信息平台