

ICS 65.020.01
CCS B 21

NY

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 2595—2025

大豆品种真实性鉴定 SSR分子标记法

Soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] variety genuineness
identification—SSR-based methods

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 原理	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(资料性) 溶液配制	10
附录 B(资料性) 38 对标记荧光的 SSR 引物分组方案	12
附录 C(资料性) 38 对 SSR 引物等位变异信息(毛细管电泳)	13
附录 D(资料性) 参照品种名单	17

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》的规则起草。

请注意本文件的某些内容有可能涉及专利。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：全国农业技术推广服务中心、中国农业科学院作物科学研究所、黑龙江省种业技术服务中心、山西省农业种子总站、内蒙古自治区农牧业技术推广中心、河北省种子管理总站、安徽省种子管理总站。

本文件主要起草人：邱丽娟、刘丰泽、关荣霞、任雪贞、郭潇阳、刘谢香、王羨国、孟全业、邓澍、郑静宜、张文晓、孙全、金石桥、晋芳。



大豆品种真实性鉴定 SSR 分子标记法

1 范围

本文件规定了大豆[*Glycine max* (L.) Merr.]品种真实性鉴定(simple sequence repeat, SSR)分子标记法术语和定义、原理、检测方案、检测程序和结果报告。

本文件适用于大豆品种真实性验证和品种真实性身份鉴定,不适用于实质性派生品种(Essential derived variety, EDV)的鉴定。

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 **variety genuineness**

供检样品与标准品种是否相符。

3.2

品种真实性验证 **variety verification**

与其对应品种名称的标准样品比较,检测证实供检样品的品种名称与标注是否相符。

3.3

品种真实性身份鉴定 **variety identification**

经分子技术检测并通过相应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。

3.4

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。

3.5

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

采用 SSR 标记的标准化方法对品种标准样品的等位变异进行检测,并运用计算机数据库技术和网络信息技术所构建的品种分子数据信息的检索比对载体。

3.6

参照样品种 **reference sample**

具有 SSR 位点上主要等位变异的品种,用于辅助确定试验样品的等位变异,校正仪器设备的系统误差。

3.7

引物组合 **primer panel**

最大限度区分大豆品种的一套引物。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

bp: 碱基对(base pair)

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)

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

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

SSR: 简单重复序列(simple sequence repeat)

Taq 酶: 耐热 DNA 聚合酶(Taq-DNA polymerase)

5 原理

大豆不同品种的基因组存在着能够世代稳定遗传的简单重复序列(SSR)的重复次数差异。这种差异可以通过从有代表性的试验样品中提取 DNA, 用 SSR 引物进行扩增和电泳检测出来, 因此, 可以利用扩增片段大小区分不同品种。

依据 SSR 标记检测原理, 采用 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 位点差异数目而判定, 品种真实性身份鉴定依据被检 SSR 位点无差异原则进行筛查和鉴定。

6 检测方案

6.1 总则

对于真实性鉴定, 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, 选定适宜的检测平台、样品状况, 制订相应的检测方案。

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试验样品按 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, 检测报告应注明检测方案所选择的影响检测结果的关键信息。

DNA 提取、PCR 扩增和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做适当调整。

6.2 检测平台

6.2.1 品种真实性验证可采用变性 PAGE 垂直板电泳或者毛细管电泳, PAGE 电泳宜在同一电泳板上比较试验样品和标准样品; 真实性身份鉴定, 宜采用毛细管电泳, 利用 SSR 指纹数据比对平台进行鉴定。

6.2.2 对于试验样品数量较多的, 可将组织研磨仪、DNA 自动提取、自动移液工作站、高通量 PCR 扩增仪、DNA 分析仪进行组合, 以提高检测的综合效率。

6.3 引物

6.3.1 开发 38 对 SSR 引物作为品种真实性验证和身份鉴定的引物(见表 1)。

表 1 引物信息

编号	引物名称	染色体	退火温度, °C	引物序列(5'-3')
PG01	Gm016	9	60	正向: AGTTAGGGTGATCAGAAAAGTGTAA 反向: GATTGCTCCAACGTATTAAGCACTT
PG02	Gm008	5	60	正向: TGAAACCTGGAAAAGATACGTGTG 反向: GTTGAAGGAAATGCTTCAAACCAAC

表 1 (续)

编号	引物名称	染色体	退火温度,℃	引物序列(5'-3')
PG03	Gm034	18	60	正向:AGTTGGTGTTTTCTTGTGGTTTTCT 反向:CGTACTCTGTACTGGGAGCTAATTA
PG04	Gm023	13	60	正向:TTTATGACTCTTTGCAGCAAGAAGG 反向:AATGATCTAATGTGTGACCATGCAC
PG05	Gm039	20	60	正向:TGCTTCCCTATGCAAAAAGATTGAG 反向:TCAAGTATGGTGGAAAACCTGAAGC
PG06	Gm037	19	60	正向:TCACCTATTTTCAAATTATGCGCTCA 反向:ATGGAAATACTGAATGAAAGCATATTG
PG07	Gm030	16	60	正向:TCACGAAAGTTTTTCTGTAACATCT 反向:GCCTGTATATAAAGGTGCACAAAGT
PG08	Gm006	4	60	正向:GAGCTATTCCTTTGATTGAAACCCA 反向:TTGGGAGCTTATACTGAGGTTTCTT
PG09	Gm031	17	60	正向:GCTTACATGCAACCTATAAGGCATT 反向:AGGTTGTCAAATGATGAGAAGTCTT
PG10	Gm025	14	60	正向:GGTGATGCCAATTTGTAAGTGTGAA 反向:TCCATTAGTCTCTCATCCTCCTCAT
PG11	Gm015	8	60	正向:TTCTTGAGAATTACTGTGTCCCTGT 反向:CCTGATGGGATGCACTTTGTATATT
PG12	Gm010	7	60	正向:GCTAACCCGCTCTATGTTAAAGTTC 反向:ATAGAGACAGAGCCAACCTCAAACCTT
PG13	Gm001	1	60	正向:AACACCAAACCTATCACTAGGTTTGC 反向:CCAGGTCACCTACACCTTAACACTA
PG14	Gm029	16	60	正向:TCACTTGACTAATCGTGTGCATGACA 反向:AGAATGGACTAACGTTGAGAGGATT
PG15	Gm012	7	60	正向:TCACCATTTAGATTCTTCTCAGGCA 反向:TTCGTGAGCTATTGTTTTTCATCGT
PG16	Gm007	5	60	正向:AGTCATGTCAGCAATTCAGCTTATG 反向:GTCTCCCTCTCTTTCATTTCTACGA
PG17	Gm033	18	60	正向:TCAAATTTTAACTCAGAGGACAGG 反向:TGACAATGAAGATAATGATAACAAAATTAGT
PG18	Gm032	18	60	正向:ATCCCAAAGTTATGGAAGAGTCAA 反向:TCAAGAAACAAAAGGTATGCATGCT
PG19	Gm027	15	60	正向:ATCATAGTCAGGGGTGGACCTATAT 反向:AACAACATCATTCTGATCAGTGGTG
PG20	Gm022	12	60	正向:GACACCAATCAAAAATTGAACTGCA 反向:ACTCAACCAATAAAAAGAGCATGCAA
PG21	Gm070	20	60	正向:GATGTCTGCCTCTATGGTAGCTTAA 反向:AGTAGTTGTAAGCATACCACCATGA
PG22	Gm065	4	60	正向:AAAACATCTCTTCATGCTGTTGTCC 反向:AAACCTAACTAAGCTTCGGTCTCAA
PG23	Gm043	10	60	正向:TCAAGCACTTTGATTTCCATTCTGT 反向:CGTGTAGTATAGTTTTGAAAATGGCG
PG24	Gm045	2	60	正向:AGTTGGTTAAGTCGATTAGGCTTGA 反向:GCCAAAATGAGCAAAAATGCAACA
PG25	Gm054	3	60	正向:TTAAGCAGTTCCTCTCATCACGTAA 反向:TGGATAGTTGACTTTGTTTGGTTGG
PG26	Gm004	3	60	正向:AAAAACCATCCTTACAAAACCTGCCA 反向:TCAGTGGGATCTGATTGTATTTTACC
PG27	Gm051	6	60	正向:TGTATACACGAAAGATGGAATATTCTTTT 反向:TGCCGAAAATTTTATGGCATAGAT

表 1 (续)

编号	引物名称	染色体	退火温度,℃	引物序列(5'-3')
PG28	Gm053	13	60	正向:TGTTTAGTCAATTCAGGTCGATAAGT 反向:GTTACATGCTTGTACCGATTGATA
PG29	Gm046	1	60	正向:CCAGAGTTAACATCTCGGTTTGATG 反向:AATTTGGCCAAATTCAAACTGGTCA
PG30	Gm052	6	60	正向:TAATTCTAGCTGGCCTTTAGAACGT 反向:ATATTTAAGTGGCGTTGGATTGAC
PG31	Gm059	4	60	正向:TATCCATCGTGTGCTGTCATACTT 反向:ACCATTGTCCTTATCATATTCGTTAAAAA
PG32	Gm049	12	60	正向:CGCCCACCAATAGAAATAATTGTGA 反向:TGTGATCGGATGTTAATTAGCTTTTCA
PG33	Gm013	7	60	正向:TGGTGACACTGTATACCAAACCTCTT 反向:GGACTCTGCCTCGTAATATTACCAT
PG34	Gm005	4	60	正向:GCACACATCATTCTTTGTTTGACC 反向:TGTGTTCCGATTTTGATTGCGATAA
PG35	Gm056	8	60	正向:GCAATCAATTTGTGTCTTTATGCC 反向:TTTTGAATCCTAGACATGCATGCAA
PG36	Gm019	10	60	正向:TCTTTGTAAGATCACGCCATTATTT 反向:GTTGCATTGCACATTAGGTTTTCTG
PG37	Gm014	7	60	正向:ACAAAAATCAACAACGTTAACAATATAAATT 反向:GGCAGGGTGAAGTGAATTTTT
PG38	Gm048	20	60	正向:TACGTATTTTCATTGCACAAGTTGT 反向:TGTCTATGTTCTACCATTAAATGATGACA
注:本表中 38 对引物均为中国农业科学院作物科学研究所自主开发				

6.3.2 品种真实性验证允许采用序贯方式。若 PG01~PG10 检测到可以判定不符结果的差异位点数的,可终止检测。若采用前 10 对引物未达到可以判定不符结果的差异位点数时,则继续完成引物 PG11~PG20 的检测,以此类推。也可直接采用表 1 的 38 对 SSR 引物进行检测。

6.3.3 品种真实性鉴定采用表 1 的 38 对 SSR 引物构建试验样品指纹,与 SSR 指纹数据比对平台比较筛查与试验样品指纹一致的品种。

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应符合 GB/T 3543.2 的要求。

6.4.2 试验样品不少于 30 个个体,可以采用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实施的控制条件下进行,包括但不限于下列条件:

- 检测员熟悉所使用检测技术的知识和技能;
- 所有仪器与使用的技术相匹配,并已经过定期维护、验证和校准;
- 使用适当等级的试剂盒、灭菌处理的耗材;
- 使用校准检测结果评定的适宜参照品种。

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、紫外分光光度计、酸度计、移液器、组织研磨仪等。

7.1.2 PCR 扩增

PCR 扩增仪、移液器等。

7.1.3 电泳

7.1.3.1 变性 PAGE 垂直板电泳

高压电泳仪、垂直板电泳槽及制胶附件、胶片观察灯、水平摇床、数码相机或凝胶成像系统、移液器等。

7.1.3.2 毛细管电泳

DNA 分析仪等。

7.1.4 其他器具

微量移液器、电子天平、高压灭菌锅、电热恒温鼓风干燥箱、加热磁力搅拌器、冰箱等。

7.2 试剂

7.2.1 DNA 提取

液氮、CTAB、氯化钠、乙二胺四乙酸二钠(EDTA- $\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)、三羟甲基氨基甲烷(Tris-base)、氯仿、异戊醇、乙醇、盐酸。

7.2.2 引物合成

选用变性 PAGE 垂直板电泳,只需合成普通引物。选用荧光毛细管电泳,需要在上游或下游引物的 5'端或 3'端标记与毛细管电泳仪发射和吸收波长相匹配的荧光染料。

7.2.3 PCR 扩增

DNA、引物、dNTPs、 $10\times$ PCR Buffer(含 MgCl_2)、Taq 酶、ddH₂O 或者 $2\times$ Taq Mix 反应混合液。

7.2.4 电泳

7.2.4.1 变性 PAGE 垂直板电泳

丙烯酰胺(Acrylamide)、N,N-亚甲基双丙烯酰胺(Methylene-bis-acrylamide)、尿素、去离子甲酰胺(Formamide)、溴酚蓝(Bromophenol blue)、二甲苯青、三羟甲基氨基甲烷(Tris)、硼酸、乙醇(95%)、亲和硅烷(Binding silane)、剥离硅烷(Repel silane)、过硫酸铵、冰醋酸、四甲基乙二胺(Tetramethylethylenediamine, TEMED)、蒸馏水、无水乙醇、去离子水、硝酸银、氢氧化钠、乙二胺四乙酸二钠(EDTA- $\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)、甲醛、DNA 分子量标准。

7.2.4.2 毛细管电泳

与使用的 DNA 分析仪型号相匹配的分离胶、分子量内标、去离子甲酰胺、电泳缓冲液等。

7.3 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,其中银染溶液的配制可以使用符合三级要求的水。

8 检测程序

8.1 DNA 提取

8.1.1 CTAB 法

选取试样的叶片 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 700 μL 经 65 $^{\circ}\text{C}$ 预热的 CTAB 提取液,充分混匀,65 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 60 min,其间轻摇颠倒混匀 3 次。每个离心管加入 700 μL 氯仿:异戊醇(24:1)混合液,上下轻摇颠倒多次混匀直至液体呈乳白色,12 000 r/min 离心 15 min。取上清液移至新的离心管中,加入等体积的氯仿,上下轻摇颠倒多次混匀 5 min,12 000 r/min 离心 10 min。取上清液移至新的离心管中,加入等体积预冷的无水乙醇,颠倒摇匀后放于-20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱静置 30 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 12 000 r/min 离心 10 min。弃上清液,70%乙醇漂洗 1 次,12 000 r/min 离心 10 min,弃上清液,自然干燥 DNA 沉淀 10 min。将干燥的 DNA 溶于 100 μL 0.1 \times TE 缓冲液中,检测浓度,置于-20 $^{\circ}\text{C}$ 备用。该方法也适用于种子 DNA 的提取。

8.1.2 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。具体引物荧光信息见附录 B。

注:DNA 提取可选 8.1.1、8.1.2 或其他达到 PCR 扩增质量要求的方法。

8.2 PCR 扩增

8.2.1 反应体系

PCR 扩增反应体系的总体积和组分的终浓度根据表 2 进行配制,可依据试验条件不同作相应调整。

表 2 PCR 扩增反应体系

反应组分	原浓度	终浓度	反应体积, μL
10 \times PCR Buffer(含 MgCl_2)	10 \times	1 \times	2.0
dNTP	2.5 mmol/L	0.25 $\mu\text{mol}/\mu\text{L}$	2.0
<i>Taq</i> 酶	5 U/ μL	0.05 U/ μL	0.2
SSR 正向引物	2 $\mu\text{mol}/\text{L}$	0.2 $\mu\text{mol}/\text{L}$	2.0
SSR 反向引物	2 $\mu\text{mol}/\text{L}$	0.2 $\mu\text{mol}/\text{L}$	2.0
DNA	20 ng/ μL	5 ng/ μL	5
dd H ₂ O	—	—	6.8

注:使用 2 \times *Taq* Mix 混合液进行 PCR 扩增,可直接在反应体系中加入相应的引物和模板 DNA,加入量参照表 2,用 ddH₂O 补齐至反应总体积 20 μL 。

8.2.2 反应程序

反应程序中各反应参数可根据 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:

- 预变性:95 $^{\circ}\text{C}$, 5 min;
- 扩增:95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 共 35 个循环;
- 终延伸:72 $^{\circ}\text{C}$, 5 min。

扩增产物置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

8.3 扩增产物分离

8.3.1 变性 PAGE 垂直板电泳

8.3.1.1 制胶

蘸洗涤剂用清水仔细反复将玻璃板刷洗,再用蒸馏水冲洗干净,竖置晾干。将玻璃板水平放置(玻璃板的规格宜为 45 cm \times 35 cm),用 95%乙醇纵向横向各擦拭板面 3 次。5 min 后,用亲和硅烷溶液擦拭板面 3 次(擦拭方式同上),晾置 5 min 后备用。同样刷洗背板,平放晾干,用 95%乙醇纵向横向各擦拭背板表面 3 次,晾置 5 min。再用剥离硅烷溶液擦拭背板表面 3 次(擦拭方式同上),晾置 5 min 后备用。

将间隔条、附着板和背板组装成凝胶夹层装置,水平放置,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%变性聚丙烯酰胺凝胶溶液,加入 180 μL 10% 过硫酸铵和 60 μL TEMED,轻轻混匀后利用灌胶瓶将其灌入夹层中,将鲨鱼齿梳的平齐端插入两板之间的胶液 5 mm~6 mm。胶聚合 1.5 h 后,轻轻拔出梳子,用清水洗干净备用。

8.3.1.2 变性

将 PCR 扩增产物加入 5 μL 上样缓冲液离心混匀。95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 min 后,取出迅速放置于冰上,冷却 10 min 待用。

8.3.1.3 电泳

- 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 0.5 \times TBE 缓冲液,负极槽(上槽)加入 600 mL 的 0.5 \times TBE 缓冲液,拔出样品梳,在 1 800 V 恒压预电泳(10 min~20 min),用塑料滴管清除加样槽孔内的气泡和杂质,将样品梳插入胶中 1 mm~2 mm。每一个加样孔加入 5 μL 变性样品,在 1 800 V 恒压下电泳。
- 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(见表 B.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移动的位置与 230 bp 扩增产物泳

动的位置大致相当。扩增产物片段大小在(100±30) bp、(150±30) bp、(200±30) bp、(250±30) bp 范围的,电泳参考时间分别为 0.7 h、1.0 h、1.5 h、2.0 h。电泳结束后关闭电源,取下玻璃板并轻轻撬开,凝胶附着在长玻璃板上。

8.3.1.4 银染

将凝胶板置于装有固定液的塑料盒内,轻轻摇荡 10 min 后取出,在双蒸水漂洗 3 min;将凝胶板放置新配染色液中,轻轻摇荡 20 min 后取出,在双蒸水快速漂洗,时间不超过 10 s;将凝胶板放置于显影液中,轻轻摇荡,直至出现带纹。待带纹清晰后取出,迅速置于固定液中定影 2 min,然后在双蒸水中漂洗 2 min;取出凝胶板室温下自然晾干,放在胶片观察灯上观察,记录结果,拍照保存。

注:固定液、染色液和显影液的用量,以没过胶面为准。

8.3.2 毛细管电泳

8.3.2.1 将按照预先确定的组合引物,等体积取同一组合中不同荧光标记引物的扩增产物,充分混匀。从混合液中吸取 1 μL,加入 DNA 分析仪专用 96 孔上样板上。每孔再分别加入 0.2 μL 分子量内标和 8.8 μL 去离子甲酰胺,95 ℃ 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。

8.3.2.2 打开 DNA 分析仪,检查仪器工作状态和试剂状态。

8.3.2.3 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 DNA 分析仪的使用手册进行操作。DNA 分析仪将自动运行参数,并保存电泳原始数据。

8.4 数据分析

电泳结果需要通过规定程序进行数据读取以降低误读率。在引物等位变异片段大小范围内,对于毛细管电泳,特异峰呈现为稳定的单峰型;对于变性 PAGE 垂直板电泳,特异谱带呈现稳定的单谱带。

采取混合样检测的,无论是毛细管电泳还是变性 PAGE 垂直板电泳,结果表明在引物位点出现因样品异质质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。

8.4.1 变性 PAGE 垂直板电泳

对甄别后的特异谱带进行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 分别为该位点两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。

8.4.2 毛细管电泳

8.4.2.1 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,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 2 个相距 1 bp 左右的峰,应视为单峰;
- c) 对于高低峰,应通过设定一定阈值不予采集低于阈值的峰;
- d) 对于有 2 个及以上特异峰,应考虑是由非纯合 SSR 位点或混入杂株所致。

8.4.2.2 导出电泳原始数据文件,采用数据分析软件对数据进行甄别。

- 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:按 8.4.2.1 的规定执行。

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 8.4.3.1、8.4.3.2 方式的,应分别通过同时进行试验的标准样品、参照样品(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。

8.4.3 数据比对

8.4.3.1 采用与标准样品比较的,对甄别后的特异谱带(见 8.4.1)或特异峰(见 8.4.2.1),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。

8.4.3.2 采用毛细管电泳与 SSR 指纹数据比对平台比对的,按照数据导入模板的要求,将数据及其指纹截图上传到 SSR 指纹数据比对平台,进行逐个位点在线比对,核实确定相互间的指纹数据的异同。

8.4.3.3 采用 PAGE 垂直板电泳与 SSR 指纹数据比对平台比对的,按照数据导入模板的要求,将数据上传到 SSR 指纹数据比对平台,进行逐个位点的两两比对,核实确定相互间的指纹数据的异同。

注:采用 PAGE 垂直板电泳与 SSR 指纹数据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,等位变异可参照附录 C(见表 C.1),试验参照品种可参照附录 D(见表 D.1),同时同一电泳板上电泳;
- b) 电泳时间足够,符合 8.3.1.3 的要求;
- c) 试验样品存在扩增片段为一个基序差异的,按片段大小顺序重新电泳进行复核确定后读取。

9 鉴定意见

9.1 检测结果用试验样品和标准样品的位点差异数表示,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。品种真实性身份验证时,检测结果与标准样品的容许差距不能大于 2 个等位位点。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 3,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、2 或 3,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 对于真实性验证,选择下列方式之一进行填报:

- a) 通过_____对引物,采用_____电泳方法进行检测,与标准样品比较未能检测出位点差异。
- b) 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_____个,差异位点的引物编号为_____,鉴定意见为_____。

10.3 对于品种身份鉴定,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 指纹数据库筛查,试验样品与_____品种未发现位点差异。
- b) 通过_____对引物,采用_____电泳方法进行检测,经与 SSR 指纹数据比对平台筛查,检测到供检样品与_____品种位点差异为 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 指纹数据比对平台筛查,未检测到与供检样品位点一致品种,无法鉴定品种身份。

10.4 属于下列情形之一的,需在检验报告中注明:

- a) 试验样品低于 6.4.1 规定数量;
- b) 与试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) 试验样品遗传不稳定严重的位点(引物编号)清单。

附 录 A
(资料性)
溶液配制

A.1 DNA 提取

A.1.1 CTAB 提取液

称取 20 g 的 CTAB(20 g/L)、81.816 g 的 NaCl(1.4 mol/L)、2.922 5 g 的 EDTA-Na₂ · 2H₂O (10 mmol/L)、12.114 g 的 Tris(100 mmol/L),溶于适量水中,调 pH 至 8.0,加水定容至 1 000 mL,121 °C 高压灭菌 20 min,4 °C 储存。DNA 提取前,按照每 100 mL CTAB 溶液加入 2 mL β-巯基乙醇在 65 °C 水浴锅中预热。

A.1.2 10×TE 缓冲液

称取 0.292 3 g 的 EDTA-Na₂ · 2H₂O(10 mmol/L)、1.211 4 g 的 Tris(100 mmol/L),溶于适量水中,调 pH 至 8.0,加水定容至 100 mL,121 °C 高压灭菌 20 min,4 °C 储存。

A.1.3 0.1×TE 缓冲液

量取 10 mL 的 10×TE 缓冲液,加水定容至 1 000 mL,4 °C 储存。

A.2 SSR 引物

用 ddH₂O 分别配制上游引物、下游引物终浓度为 10 μmol/L 的储存液,-20 °C 储存。

A.3 电泳

A.3.1 亲和硅烷溶液

量取 2 mL 亲和硅烷原液与 500 mL 的无水乙醇混匀,于常温避光干燥处保存备用。

A.3.2 剥离硅烷溶液

量取 10 mL 剥离硅烷原液与 490 mL 的无水乙醇混匀,于常温避光干燥处保存备用。

A.3.3 10×TBE 缓冲液

称取 108 g 的 Tris、55 g 的硼酸、7.44 g 的 EDTA-Na₂ · 2H₂O 溶于适量水中,搅拌至完全溶解,加水定容至 1 000 mL 后,于常温避光干燥处保存备用。

A.3.4 0.5×TBE 缓冲液

量取 250 mL 的 10×TBE 缓冲液,加水定容至 5 000 mL,于常温避光干燥处保存备用。

A.3.5 45%聚丙烯酰胺凝胶的配制

称取 434 g 的丙烯酰胺、16 g 的 N,N-亚甲双丙烯酰胺溶于适量水中,搅拌至完全溶解。加水定容至 1 000 mL 后,用普通滤纸过滤 2 次,于常温避光干燥处保存备用。

A.3.6 6%变性聚丙烯酰胺凝胶的配制

称取 210 g 的尿素、133 mL 的 45%聚丙烯酰胺凝胶、100 mL 的 10×TBE,加去离子水搅拌至完全溶解。定容至 1 000 mL 后,用普通滤纸过滤 2 次,于常温避光干燥处保存备用。

A.3.7 20%过硫酸铵溶液

称取 20 g 过硫酸铵溶于 100 mL 水中,4 °C 储存备用。

A.3.8 0.5 mol/L EDTA 溶液

称取 18.61 g 的 EDTA-Na₂ · 2H₂O 溶于水中,调 pH 至 8.0,加水定容至 100 mL,121 °C 高压灭菌 20 min,4 °C 储存。

A.3.9 上样缓冲液

取 98 mL 去离子甲酰胺、2 mL 的 0.5 mol/L EDTA、0.25 g 的溴酚蓝和 0.25 g 的二甲苯青混合摇匀,4 ℃ 备用。

A.4 银染

A.4.1 固定液 (10% 冰醋酸)

200 mL 冰醋酸,加水定容至 2 000 mL。

A.4.2 染色液 (0.15% 硝酸银溶液)

3 g 硝酸银,加水定容至 2 000 mL。

A.4.3 显影液 (1.25% 氢氧化钠、0.1295% 甲醛溶液)

2 000 mL 蒸馏水中加入 25 g 氢氧化钠和 7 mL 甲醛。

附 录 B

(资料性)

38 对标记荧光的 SSR 引物分组方案

大豆 38 对 SSR 引物的荧光标记及分组见表 B.1。

表 B.1 38 对标记荧光的 SSR 引物分组

分组	编号	引物名称	5'荧光基团
1	PG01	Gm016	FAM
	PG02	Gm008	FAM
	PG03	Gm034	FAM
	PG04	Gm023	HEX
	PG05	Gm039	HEX
	PG06	Gm037	HEX
2	PG07	Gm030	TAMRA
	PG08	Gm006	TAMRA
	PG09	Gm031	ROX
	PG10	Gm025	HEX
	PG11	Gm015	ROX
3	PG12	Gm010	FAM
	PG13	Gm001	HEX
	PG14	Gm029	TAMRA
	PG15	Gm012	TAMRA
	PG16	Gm007	TAMRA
	PG17	Gm033	TAMRA
	PG18	Gm032	ROX
	PG19	Gm027	ROX
4	PG20	Gm022	ROX
	PG21	Gm070	FAM
	PG22	Gm065	FAM
	PG23	Gm043	FAM
	PG24	Gm045	HEX
	PG25	Gm054	HEX
	PG26	Gm004	HEX
	PG27	Gm051	HEX
5	PG28	Gm053	TAMRA
	PG29	Gm046	ROX
	PG30	Gm052	FAM
	PG31	Gm059	FAM
	PG32	Gm049	FAM
	PG33	Gm013	ROX
	PG34	Gm005	HEX
	PG35	Gm056	HEX
	PG36	Gm019	HEX
	PG37	Gm014	HEX
	PG38	Gm048	ROX

注 1:毛细管电泳时,每一组别的引物可以组合在一起电泳。
注 2:荧光标记仅为示例,如采用其他荧光基团,需用参照样进行数据校正。

附 录 C

(资料性)

38 对 SSR 引物等位变异信息(毛细管电泳)

表 C.1 列出了 38 对引物在已知大豆品种中扩增片段长度范围、主要等位变异扩增片段大小以及参
照样品对应的等位变异信息。

表 C.1 已知品种主要等位变异扩增片段信息

编号	名称	组别	染色体 编号	等位变异扩增片段, bp		参照样品种名称
				范围	片段大小	
PG01	Gm016	1	9	327~372	342	浙鲜 5 号
					345	南农 99-6
					348	冀豆 12
					351	汾豆 78
					357	黑河 45
PG02	Gm008	1	5	241~271	247	南农 48
					250	湘春豆 26
					253	汾豆 78
					256	黑河 45
					259	南农 99-6
PG03	Gm034	1	18	108~152	111	汾豆 78
					126	天隆一号
					129	吉育 72
					139	冀豆 12
					142	浙鲜 5 号
					149	黑河 45
PG04	Gm023	1	13	327~385	335	黑河 45
					338	黑河 49
					356	汾豆 78
					359	南农 48
					361	冀豆 12
					364	天隆一号
					379	湘春豆 26
PG05	Gm039	1	20	258~313	267	吉育 86
					270	华春 2 号
					279	冀豆 12
					282	吉育 72
					285	浙鲜 5 号
					291	黑河 45
					296	南农 99-6
PG06	Gm037	1	19	91~182	99	南农 99-6
					108	华夏 9 号
					123	黑河 49
					132	吉育 86
					135	黑河 45
					139	华疆 2 号
					150	冀豆 12
					164	浙鲜 5 号

表 C.1 (续)

编号	名称	组别	染色体 编号	等位变异扩增片段, bp		参照样品名称
				范围	片段大小	
PG07	Gm030	2	16	151~216	158	南农 48
					167	中黄 13
					170	南农 99-6
					190	黑河 45
					193	湘春豆 26
					196	华夏 9 号
PG08	Gm006	2	4	83~150	86	浙鲜 5 号
					131	黑河 45
					137	湘春豆 26
					140	华夏 9 号
					150	中黄 13
PG09	Gm031	2	17	341~384	350	南农 99-6
					353	黑河 45
					361	吉育 86
PG10	Gm025	2	14	182~224	192	南农 99-6
					210	吉育 86
PG11	Gm015	2	8	247~307	277	天隆一号
					285	黑河 45
					292	冀豆 12
					295	南农 99-6
					298	华夏 9 号
PG12	Gm010	3	7	160~187	173	冀豆 12
					176	汾豆 78
					179	南农 99-6
					182	黑河 45
PG13	Gm001	3	1	250~288	265	天隆一号
					274	湘春豆 26
					282	南农 99-6
PG14	Gm029	3	16	329~368	335	天隆一号
					338	黑河 49
					341	南农 99-6
					353	齐黄 34
					356	黑河 45
PG15	Gm012	3	7	292~319	301	冀豆 12
					304	黑河 45
					307	吉育 86
					313	吉育 72
PG16	Gm007	3	5	223~265	243	南农 99-6
					246	黑河 45
					249	湘春豆 26
PG17	Gm033	3	18	131~163	134	南农 99-6
					154	黑河 45
					157	齐黄 34
PG18	Gm032	3	18	265~333	300	湘春豆 26
					306	黑河 45
					309	冀豆 12
					322	汾豆 78

表 C.1 (续)

编号	名称	组别	染色体 编号	等位变异扩增片段, bp		参照样品名称
				范围	片段大小	
PG19	Gm027	3	15	230~282	230	南农 99-6
					243	齐黄 34
					263	吉育 86
					275	黑河 45
					278	汾豆 78
PG20	Gm022	3	12	131~175	140	黑河 45
					143	湘春豆 26
					150	南农 99-6
PG21	Gm070	4	20	313~368	326	南农 99-6
					338	湘春豆 26
					341	华夏 9 号
PG22	Gm065	4	4	280~308	294	冀豆 12
					297	南农 99-6
					300	吉育 72
PG23	Gm043	4	10	85~105	85	中黄 13
					97	南农 99-6
PG24	Gm045	4	2	316~383	328	冀豆 12
					331	浙鲜 5 号
					334	汾豆 78
					352	天隆一号
					355	中黄 13
					357	南农 99-6
PG25	Gm054	4	3	225~281	363	吉育 72
					246	冀豆 12
					249	南农 99-6
					258	浙鲜 5 号
					261	南农 48
					269	天隆一号
PG26	Gm004	4	3	182~214	272	齐黄 34
					189	吉育 72
					192	浙鲜 5 号
					198	汾豆 78
					201	南农 99-6
					208	中黄 13
PG27	Gm051	4	17	107~172	211	吉育 86
					131	邯豆 5 号
					141	吉育 72
					144	齐黄 34
					147	吉育 86
					163	湘春豆 26
PG28	Gm053	4	13	316~360	166	南农 99-6
					328	齐黄 34
					333	中黄 13
					336	黑河 49
					348	南农 99-6
PG29	Gm046	4	1	167~225	350	华疆 2 号
					182	冀豆 12
					203	汾豆 78
					216	南农 48
					219	苏豆 13

表 C.1 (续)

编号	名称	组别	染色体 编号	等位变异扩增片段, bp		参照样品种名称
				范围	片段大小	
PG30	Gm052	5	6	349~382	349	湘春豆 26
					364	吉育 86
					373	南农 99-6
					376	天隆一号
					379	沪宁 95-1
PG31	Gm059	5	4	267~309	273	天隆一号
					276	黑河 45
					278	南农 99-6
					295	华夏 9 号
					298	中黄 13
					301	齐黄 34
PG32	Gm049	5	12	210~225	213	中豆 41
					216	黑河 45
					232	南农 99-6
					238	齐黄 34
PG33	Gm013	5	7	304~343	313	南农 99-6
					316	湘春豆 26
					319	冀豆 12
					331	黑河 45
					334	南农 48
PG34	Gm005	5	4	296~337	302	汾豆 78
					314	齐黄 34
					324	南农 99-6
					330	黑河 45
					333	冀豆 12
PG35	Gm056	5	8	257~287	269	南农 99-6
					272	吉育 72
					275	黑河 45
					278	中黄 13
PG36	Gm019	5	10	191~242	201	中黄 13
					204	南农 99-6
					213	齐黄 34
					216	黑河 45
					236	浙鲜 5 号
					239	华夏 9 号
PG37	Gm014	5	7	101~158	107	中黄 13
					110	南农 99-6
					123	湘春豆 26
					126	冀豆 12
					145	邯豆 5 号
					149	吉育 72
PG38	Gm048	5	20	143~182	159	黑河 45
					162	齐黄 34
					171	南农 99-6
					174	汾豆 78
					180	吉育 72

附 录 D
(资料性)
参照品种名单

参照品种名单见表 D.1。

表 D.1 参照大豆品种名单

编号	品种名称	编号	品种名称
1	吉育 86	10	南农 48
2	吉育 72	11	浙鲜 5 号
3	汾豆 78	12	华夏 9 号
4	冀豆 12	13	邯豆 5 号
5	齐黄 34	14	苏豆 13
6	中黄 13	15	中豆 41
7	天隆一号	16	铁丰 31
8	湘春豆 26	17	黑河 49
9	南农 99-6	18	沪宁 95-1

