

湖南省农业技术规程

HNZ266-2020

甘蓝型油菜 Ogu CMS 杂交种纯度鉴定 KASP 标记法

Technical regulation for Ogu CMS Hybrids purity
identification of *Brassica napus L.* by KASP method

湖南省农业农村厅制定

发布日期：2021年1月4日

甘蓝型油菜 Ogu CMS 杂交种纯度鉴定 KASP 标记法

为规范甘蓝型油菜 Ogu CMS 杂交种纯度 KASP 标记鉴定技术，特制定本规程。

1 样品准备

1.1 标准样品准备

随机选取待检杂交种的父、母本（原种种子）各 5 个单株的幼嫩叶片，混合后分别置于 2 毫升离心管中，利用 CTAB 小样法提取基因组 DNA：将样品于研钵中研碎后，加入 0.8 毫升 2% 的 CTAB 提取缓冲液后倒入 2 毫升离心管，60℃ 水浴 40 分钟，然后加入 0.8 毫升氯仿：异戊醇（24:1）溶液，混匀后置于室温下静置 5~10 分钟后，10000 rpm 离心 5 分钟。

吸取上清至另 1 个 2 毫升离心管，加入 1/10 体积的 3 mol/L NaAc 和 2 倍体积的无水乙醇，于 -20℃ 放置 20 分钟，5000 rpm 离心 5 分钟，去上清，用 70% 乙醇洗涤 2 次，室温风干后，加入 200 μl 的 ddH₂O 溶解，用紫外分光光度计检测 DNA 浓度，用 ddH₂O 稀释到 20 ng/μl，于 -20℃ 保存备用。

1.2 鉴定样品准备

随机从送验样品中数取 300 粒种子，置于 12 厘米×12 厘米 大小铺有吸水纸的发芽盒中，25℃ 条件下发芽培养 5~7 天，并注意保湿。随机取 188 个单粒发芽种子的幼胚胚轴和子叶部分约 0.5 厘米至 1.0 厘米，置于 96 深孔板，用于基因组 DNA 提取。

2 KASP 纯度鉴定程序

2.1 单株基因组 DNA 提取

将装有样品的 96 深孔板（数量）置于冻干机中，抽真空 16 h 以上后于研磨仪中研碎；在 96 孔板中每孔加入 500 μl “基因组 DNA 提取液”，振荡混匀后置于 75℃ 烘箱中 30 分钟；将 96 孔板于 4000 rpm 离心 10 分钟后，取 190 μl 上清液至新的 96 孔板；每孔加入 190 μl 异丙醇后，置于 -20℃ 冰箱中静置 1 小时，然后 4000 rpm 离心 10 分钟；弃上清液后，置于 50℃ 烘箱中烘干，加入 500 μl ddH₂O 溶解 DNA，4℃ 保存留用。本方法提取的 DNA 在 4℃ 条件可保存 10 天。

2.2 KASP 标记引物筛选

首先选择附录 B 中的 1-2 个引物，对进行 Ogu CMS 恢复基因 Rfo 基因位点及其侧翼序列进行基因型鉴定，然后选择附录 C 中的引物对进行基因分型鉴定，可增加附录 C 以外的

KASP 标记引物进行基因分型鉴定。

2.3 PCR 检测

将步骤 2.1 提取的样品基因组 DNA 溶液,每孔吸取 2 μ l 混合液置于 96 孔 PCR 板或 Array tape 自动化工作站的 PCR 反应膜中,并预留 2 孔,加入步骤 1.1 中的杂交种亲本基因组 DNA 作对照;基因组 DNA 溶液干燥后,加入 PCR 反应液,然后进行 KASP 标记 PCR 扩增。PCR 扩增反应为 0.8 μ l 体系, KASP 反应配方按照附录 D 中提供的配方配制反应体系。

Touchdown PCR 反应程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 15 分钟; 95 $^{\circ}$ C 变性 20 秒, 65 $^{\circ}$ C~56 $^{\circ}$ C 退火延伸 60 秒, 每循环退火延伸温度降低 0.8 $^{\circ}$ C, 共计 10 个循环; 94 $^{\circ}$ C 变性 20 秒, 57 $^{\circ}$ C 退火延伸 60 秒, 共 30 个循环。

2.4 基因分型统计与计算公式

KASP 标记检测标记位点表现为双亲杂合等位基因型的单株, 统计为杂交种; KASP 标记位点表现为单个亲本纯合等位基因型和其他非双亲等位基因型的单株, 则统计为异型株。根据 KASP 标记纯度鉴定公式: $\text{KASP 标记纯度值} = (\text{试验样品单株检测总数} - \text{异型株总数}) / \text{试验样品单株检测总数} \times 100\%$, 计算杂交种纯度。

3 结果记录和鉴定报告出具

3.1 结果记录与鉴定样品封缄

将 KASP 标记纯度鉴定结果需填报附录 E 的信息, 包括种子批名称、送验样品编号、试验样品编号、检测总株数、异型株总数、纯度值、检测时间、检测人等信息; 对完成纯度鉴定的送验样品, 填写附录 E 的标贴的内容后, 进行样品封缄、保存。

3.2 纯度鉴定报告出具

根据附录 F 中 KASP 标记纯度鉴定结果, 填写附录 G 的具体信息, 经检测人、编制人、审核人和批准人进行核实, 确保准确无误后签字或盖章, 一式两份, 一份检验单位存档, 另一份与送验样品一同交付受检单位。

判断利用 KASP 标记鉴定获得的杂交种纯度值是否达到国家品种纯度质量及合同的种子纯度质量要求, 需根据《GB/T3543.5-1995 农作物种子检验规程 真实性和品种纯度鉴定》中确定的供鉴植株数量是否高于 4N 原则规定的数量和品种纯度的容许差距标准进行判别。

4 技术术语

4.1 异型株 (unusual plant)

指性状(特征、特性)与原品种的性状明显不同的植株。

4.2 萝卜细胞质雄性不育 (ogura cytoplasmic male sterility)

HNZ266-2020

日本萝卜中发现的细胞质雄性不育现象，该不育类型已被转育至甘蓝型油菜，并广泛应用于杂种优势利用。

4.3 KASP 标记（kompetitive allele specific PCR marker）

可用于基因组 SNPs 和特定位点上的 InDels 进行精准的竞争性等位基因特异性 PCR 标记。

5 引用和参考资料

- | | |
|-----------------|----------------------|
| GB/T3543.1-1995 | 农作物种子检验规程 总则 |
| GB/T3543.5-1995 | 农作物种子检验规程 真实性和品种纯度鉴定 |
| GB 20464 | 农作物种子标签通则 |

编写单位：湖南省作物研究所 华智生物技术有限公司

编写人员：王同华 李莓 李宝 彭佩 郭一鸣 刘新红 曲亮 陈哲红

附录 A 仪器设备、试剂、耗材及常用试剂配方

1 主要仪器设备

光照培养箱、电子天平、恒温水浴锅、高速台式离心机、高压灭菌锅、PCR 扩增仪、酸度计、微量移液器、通风柜、冰箱（4 °C 冰箱和 -20 °C 冰箱各一台）、LGC SNP line 或 Douglas Array Tape 等 KASP 分型的平台、真空冷冻干燥机、样品粉碎仪或研磨仪、涡旋振荡器。

2 主要试剂

浓盐酸(HCl)、氢氧化钠(NaOH)、三羟甲基氨基甲烷【Tris(hydroxymethyl) methyl a 分钟 omethane, Tris】、乙醇(Ethanol)、三氯甲烷(Chloroform)、异戊醇(Isoamyl alcohol)、醋酸钠(Sodium acetate)、LGC 2×Master MIX、等。

3 主要耗材

发芽盒、吸水纸、96 深孔板、枪头（20 μl、200 μl、1000 μl、5 毫升）、96 孔 PCR 板、一次性手套、一次性口罩、烧杯、镊子，封板膜。

4 常用试剂配置方法

4.1 0.25 mol/L 的 NaOH

称取 NaOH 1.0g，加入双蒸水定容至 100 毫升。

4.2 0.1 mol/L 的 Tris · HCl 缓冲液

取 1 mol/L Tris-HCl (pH 8.0) 10 毫升，加双蒸水定容至 100 毫升。

4.3 PCR 扩增反应体系

PCR 扩增所用的试剂均从试剂公司（艾吉析科技（北京）有限公司）购买，-20 °C 保存备用。引物委托赛默飞世尔科技（中国）有限公司合成，并将合成后的后缀为 X\Y\C 引物用灭菌的双蒸水配置成 100 μM 的储存液，X\Y\C 引物\水体积比 12:12:30:46 混合成工作液，-20 °C 保存备用。

4.4 基因组 DNA 提取液

取 74.55g 氯化钾，放入烧杯中，分别加入 20 毫升乙二胺四乙酸二钠盐（0.5M，pH 8.0）和 100 毫升三羟甲基氨基甲烷盐酸溶液（1M，pH 8.0），再加入 880 毫升超纯水，搅拌溶解，定容至 1000 毫升后，于室温保存。

附录 B 甘蓝型油菜 Ogu CMS 恢复基因位点的 KASP 标记引物信息表

本规程采用 Ogu CMS 恢复基因位点的特异 KASP 标记引物 BN900003_K01 和 BN900004_K01, 对波里马细胞质雄性不育杂交品种“泮油 C496”和 10 余个杂交组合的制种样品进行了纯度鉴定, 鉴定结果与 SSR 标记和田间鉴定结果一致。对于其它 Ogu CMS 杂交品种纯度鉴定, 需要进行引物筛选与验证。

合成引物名称	引物序列 5'→3'
BN9000018_K01_C	TCCATCAGGATTGACTTGAACAAACA
BN9000018_K01_X	TGTTTTGTCTTGTAGGAGGACAGGCT
BN9000018_K01_Y	TAACTATTTTGTAGGAGGACAGGCG
BN9000019_K01_C	AGAGTCTTAGCCTGTCCTCCTACA
BN9000019_K01_X	CCCTTTGTCTTGACTTTTTTGTTTTGTC
BN9000019_K01_Y	TGTTCCCTTAACTCTTGTCTTAACTATT
BN9000020_K01_C	GAGTCTTCGCCTGTCCTCCTACA
BN9000020_K01_X	CCCTTTGTCTTGACTTTTTTGTTTTGTC
BN9000020_K01_Y	TGTTCCCTTAACTCTTGTCTTAACTATT
BN9000020_K02_C	TCTTCGCCTGTCCTCCTACAA
BN9000020_K02_X	CCCTTTGTCTTGACTTTTTTGTTTTGTC
BN9000020_K02_Y	TGGTACACTTAACTCTCTGTCTTAACTATT

附录 C 甘蓝型油菜基因组上部分 KASP 标记引物信息

本表提供的 19 组 KASP 标记引物是由甘蓝型油菜 19 个连锁群开发获得的多态性相对较高的标记, 但纯度鉴定 KASP 引物使用范围不限于本规程公布的标记。

引物合成名称	引物序列 5'→3'
BNGPS1001.K1C	GACATCCCATACCTATCACTCACCAA
BNGPS1001.K1X	GGTATGGTCCACCAGGAGACG
BNGPS1001.K1Y	GGTATGGTCCACCAGGAGACC
BNGPS1002.K1C	TCGCCTTACCACAAAAGGCTTGTT
BNGPS1002.K1X	TGGGGAAAGGTCATTTGCCTGA
BNGPS1002.K1Y	GGGGAAAGGTCATTTGCCTGC
BNGPS1003.K1C	GTAGCTCCTACCAAGCGTTTCTTGAA
BNGPS1003.K1X	GATGGATCTGATGGATGTGAGTTCT
BNGPS1003.K1Y	ATGGATCTGATGGATGTGAGTTCC
BNGPS1004.K1C	GATCCAGACGGAGGTTTCAGGTTT
BNGPS1004.K1X	ATACAAAAGAGTGTTGTCAGTTCAAGAAT
BNGPS1004.K1Y	CAAAAAGAGTGTTGTCAGTTCAAGAAC
BNGPS1005.K1C	CTAGCCATCTTATCAGGATGGTGCTT
BNGPS1005.K1X	GAAAAGCTATCGTGAAGCTGCGT
BNGPS1005.K1Y	GAAAAGCTATCGTGAAGCTGCGC
BNGPS1006.K1C	TTGCACCAGTCACCAAATGAAAAGCTTA

BNGPS1006.K1X	TTGGAAATCAAAGAACCAACCCACAA
BNGPS1006.K1Y	GGAAATCAAAGAACCAACCCACAG
BNGPS1007.K1C	GATTTTGGTACCAGAGGCTTTGGGAT
BNGPS1007.K1X	CATTCCTGAGCCTTAACCCAGTTT
BNGPS1007.K1Y	CCTGAGCCTTAACCCAGTTC
BNGPS1008.K1C	GACTTGACAGAGAGGTTTCAGGAGTT
BNGPS1008.K1X	ATGTTTGAGCTCATCCAGAGAGGT
BNGPS1008.K1Y	GTTTGAGCTCATCCAGAGAGGC
BNGPS1009.K1C	CCTCACGAAGACCTTCTTCTTCAA
BNGPS1009.K1X	TGAAAGTGATATCGTGTTTCGATAAATTATAAT
BNGPS1009.K1Y	GAAAGTGATATCGTGTTTCGATAAATTATAAC
BNGPS1010.K1C	CGGAGGAGCCAAAGGAGGGATT
BNGPS1010.K1X	GAGCTTGCTCGGATCGCAA
BNGPS1010.K1Y	CTGAGCTTGCTCGGATCGCAG
BNGPS1011.K1C	GATTGATCTGGCAAGGGAGACCATA
BNGPS1011.K1X	GTCGATCAGACAACAGGTGGAGT
BNGPS1011.K1Y	CGATCAGACAACAGGTGGAGC
BNGPS1012.K1C	AGGAGGCAGGGGAAGTCAGGAA
BNGPS1012.K1X	GCCAGAAAATCACTAGCATGTACGA
BNGPS1012.K1Y	GCCAGAAAATCACTAGCATGTACGT
BNGPS1013.K1C	CACAGCGCCCTCGCCTATCAA
BNGPS1013.K1X	CACAGATCTGACCATCTGAGACT
BNGPS1013.K1Y	CACAGATCTGACCATCTGAGACG
BNGPS1014.K1C	TTGTGGAAGCAATAAATAAACCAGCTGAAT
BNGPS1014.K1X	AGGTGATTAGTTAGCTCTAGCGAGA
BNGPS1014.K1Y	GTGATTAGTTAGCTCTAGCGAGG
BNGPS1015.K1C	TATACAAACTACCCAACCTACCAGAGAT
BNGPS1015.K1X	GTGGTACATGGTTGTAGCTTTCTCT
BNGPS1015.K1Y	GGTACATGGTTGTAGCTTTCTCC
BNGPS1016.K1C	GGGAAAGAAACATCGGAGTGGAGAA
BNGPS1016.K1X	GGCTCTGAATGAATGTTTGAAAGAGATA
BNGPS1016.K1Y	GCTCTGAATGAATGTTTGAAAGAGATC
BNGPS1017.K1C	CAATCCAGCCACCTGCATCTTTGAT
BNGPS1017.K1X	CAGTAAAGCAGCTGTTCAAGAAATGAAA
BNGPS1017.K1Y	AGTAAAGCAGCTGTTCAAGAAATGAAG
BNGPS1018.K1C	CGAGGAAGAGAGGGTTGGAGGAA
BNGPS1018.K1X	ACTTTTCCATCGTCCGTCATCTCA
BNGPS1018.K1Y	CTTTTCCATCGTCCGTCATCTCC
BNGPS1019.K1C	TGATTTCTTCGCCAAGTGTAAGGAAGAT
BNGPS1019.K1X	TTGAGATCTGGTCCCAGTGAGAT
BNGPS1019.K1Y	GAGATCTGGTCCCAGTGAGAG

附录 D. KASP 标记 PCR 反应体系配方

KASP 标记 PCR 反应体系配方表		
	配制浓度	实际用量与工作液浓度
Primer C	0.42 μ M	0.0033 μ l (100UM)
Primer X	0.17 μ M	0.0013 μ l (100UM)
Primer Y	0.17 μ M	0.0013 μ l (100UM)
KASP Master Mix	1 \times	0.3945 μ l
ddH ₂ O		0.3995 μ l
基因组 DNA		20ng-50ng
总体积		0.8 μ l

附录 E 甘蓝型油菜 Ogu CMS 杂交种 KASP 标记纯度鉴定结果记录表

甘蓝型油菜 Ogu CMS 杂交种 KASP 标记纯度鉴定结果记录表										
序号	种子批名称	种子批重量 (Kg)	送验样品编号	送验样品重量 (g)	试验样品编号	检测总数 (株)	异型株总数 (株)	纯度值 (%)	检测时间	检测人

附录 F 甘蓝型油菜 Ogu 厘米 S 杂交种纯度鉴定样品封缄标签

甘蓝型油菜杂交种纯度鉴定样品封缄标签					
送验样品编号	试验样品编号	种子纯度 (%)	检验人签名	封缄人签名	封缄时间

附录 G 甘蓝型油菜 Ogu CMS 杂交种纯度鉴定结果报告单

甘蓝型油菜 Ogu CMS 杂交种纯度鉴定结果报告单			
受检单位:			
品种名称:		种子批名称:	
送验样品编号:		种量 (g):	
纯度值 (%):		检测总数 (株):	
检验结论:	检验人 (单位): 签章		
批准人:	审核人:	编制人:	