

# SN

## 中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 2669—2010

### 三系杂交水稻种子真伪分子鉴定方法

Molecular identification of three-line hybrid rice seeds



2010-11-01 发布

2011-05-01 实施

中华人民共和国  
国家质量监督检验检疫总局 发布



中华人民共和国出入境检验检疫  
行 业 标 准  
三系杂交水稻种子真伪分子鉴定方法  
SN/T 2669 -2010

\*

中国标准出版社出版  
北京复兴门外三里河北街16号  
邮政编码:100045

网址 [www.spc.net.cn](http://www.spc.net.cn)

电话:68523946 68517548

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷

\*

开本 880×1230 1/16 印张 0.5 字数 8 千字

2011年3月第一版 2011年3月第一次印刷

印数 1—1 600

\*

书号: 155066·2-21677 定价 14.00 元

## 前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

本标准起草单位：中国检验检疫科学研究院、中华人民共和国厦门出入境检验检疫局、中华人民共和国湖南出入境检验检疫局、国家杂交水稻工程技术研究中心。

本标准主要起草人：赵文军、陈红运、朱金国、黄新、程毅、杨和华、朱水芳。



# 三系杂交水稻种子真伪分子鉴定方法

## 1 范围

本标准规定了三系杂交水稻种子真伪分子鉴定方法。

本标准适用于通过胞质不育获得的杂交水稻种子的真伪鉴定。

## 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 3543.2 农作物种子检验规程 扦样

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

SN/T 1193 基因检验实验室技术要求

## 3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

### 3.1

**三系杂交水稻 three-line hybrid rice**

包括不育系、保持系和恢复系,用不育系作母本与其同型保持系杂交繁育不育系种子,用不育系作母本与恢复系杂交生产杂交稻种子。

## 4 原理

根据水稻基因组中与雄性不育相关的线粒体 R2-630WA 基因片段的核苷酸序列,设计特异性引物和荧光探针,应用实时荧光 PCR 技术对杂交水稻种子进行快速鉴定,通过检测杂交水稻种子中是否含有胞质不育基因片段来判断真伪。

## 5 实验方法

### 5.1 主要仪器

5.1.1 实时荧光 PCR 仪。

5.1.2 核酸蛋白分析仪。

5.1.3 高速冷冻离心机,台式小型离心机,Mini 个人离心机。

5.1.4 低温冰箱,冷藏冷冻冰箱。

5.1.5 旋涡振荡器。

5.1.6 微量移液器(2.5  $\mu$ L、10  $\mu$ L、20  $\mu$ L、100  $\mu$ L、200  $\mu$ L、1 000  $\mu$ L)。

5.1.7 光化学 PCR 反应管。

## 5.2 主要试剂

除另有规定外,所有试剂均为分析纯或生化试剂。

5.2.1 实验用水:应符合 GB/T 6682 中一级水的规格。

5.2.2 DNA 提取液:100 mmol/L Tris-HCl(pH8.0),20 mmol/L EDTA(pH8.0),500 mmol/L 氯化钠,质量浓度为 1.5% 的 SDS。1.05 kg/cm<sup>2</sup> 高压蒸汽灭菌 15 min,4 ℃ 贮存,用前预热至 60 ℃,使絮状沉淀完全溶解。

5.2.3 三氯甲烷+异戊醇+乙醇混合液:

三氯甲烷+异戊醇+乙醇=80+4+16

5.2.4 10×PCR 缓冲液。

5.2.5 氯化镁。

5.2.6 dNTPs(含 dUTP)。

5.2.7 UNG 酶(Uracil N-glycosylase)。

5.2.8 *Taq* DNA 聚合酶。

5.2.9 引物和探针序列见表 1。

表 1 实时荧光 PCR 所用引物和探针序列

检测基因	引物序列	探针序列
R2-630WA	5'-ggcggagagggattcattagt-3'	5'-ccgggtactggtaccggettaagccc-3'
	5'-ggttagtgtttcatttcgataggga-3'	

## 5.3 实验步骤

### 5.3.1 样品制备

受检样品的打样、分样和保存按 GB/T 3543.2 的规定执行。随机抽取至少 20 粒种子进行检测。

### 5.3.2 样品 DNA 的提取

取单粒种子,剥去颖壳和种皮,碾压破碎后移至 2.0 mL 离心管中;加入液氮,用玻棒充分研磨至粉末状;向离心管中加入 600 μL DNA 提取液,60 ℃ 水浴 1 h,每隔 15 min 颠倒混匀一次;加入等体积的三氯甲烷+异戊醇+乙醇混合液,轻缓混匀,室温静置 1 h;12 000g,4 ℃,离心 15 min,将上清液转移至另一支 1.5 mL 离心管中,加等体积异丙醇混匀,室温静置 30 min;12 000g,4 ℃,离心 15 min,弃上清液;加 200 μL 70% 乙醇洗涤沉淀;12 000g,4 ℃,离心 10 min 后弃去乙醇;重复洗涤一次后自然干燥 DNA,将沉淀溶于 50 μL 去离子灭菌水中。

对于水稻幼苗或植株,单株取叶片约 100 mg,置于 2.0 mL 离心管中,加液氮用玻棒充分研磨至粉末状,DNA 提取过程与单粒种子相同。

除上述方法外,样品 DNA 的提取也可使用商业化的 DNA 提取试剂盒。

### 5.3.3 实时荧光 PCR 反应体系

实时荧光 PCR 反应体系见表 2。每个样品各做 2 个平行管。加样时应使样品 DNA 溶液完全落入反应液中,不要粘附于管壁上,加样后应尽快盖紧管盖。

表 2 实时荧光 PCR 反应体系

试剂名称	终浓度
10×PCR 反应缓冲液	1×
氯化镁(MgCl <sub>2</sub> )	2.5 mmol/L
dNTPs(含 dUTP)	0.2 mmol/L
UNG 酶	0.075 U
引物(上游)	0.2 μmol/L
引物(下游)	0.2 μmol/L
探针	0.1 μmol/L
Taq DNA 聚合酶	2.5 U
DNA 模板	50 ng
补水至	25 μL
注: 也可使用商品化的实时荧光 PCR 反应液(2×PCR Master Mix)。	

#### 5.3.4 实时荧光 PCR 反应参数

实时荧光定量 PCR 的反应参数为:50 °C/2 min;预变性 95 °C/5 min;95 °C/15 s,60 °C/1 min,40 个循环。

注:不同仪器可根据仪器要求将反应参数作适当调整。

#### 5.3.5 仪器检测通道的选择

PCR 反应管荧光信号收集的设置,应与探针所标记的报告基团一致。报告基团为 FAM 时,荧光信号收集应设在 FAM 通道;报告基团为 TET 时,荧光信号收集应设在 TET 通道。具体设置方法因仪器而异,可参照仪器使用说明书。

#### 5.3.6 实时荧光 PCR 反应运行

按预先设定的样品摆放顺序将 PCR 反应管依次摆放(上机前注意检查各反应管是否盖紧,以免荧光物质泄漏污染仪器),开始运行仪器进行实时荧光 PCR 反应。

#### 5.3.7 实验室防污染措施

按照 SN/T 1193 的规定执行。

#### 5.4 质量控制

空白对照:目标基因检测无荧光增幅现象。

阴性对照:目标基因检测无荧光增幅现象。

阳性对照:目标基因检测 Ct 值小于或等于 36。

上述指标有一项不符合者,应重做实时荧光 PCR 扩增。

### 6 结果判定

测试样品目标基因检测 Ct 值等于 40,判断该样品为非三系杂交水稻。

SN/T 2669—2010

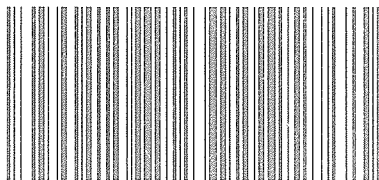
测试样品目标基因检测 Ct 值小于或等于 36,判断该样品为三系杂交水稻。

测试样品目标基因检测 Ct 值在 36~40 之间,应调整模板浓度,重做实时荧光 PCR。再次扩增后检测 Ct 值仍小于 40,且阴性对照、阳性对照和空白对照结果达到质控要求,则可判定该样品为三系杂交水稻。再次扩增后检测 Ct 值等于 40,且阴性对照、阳性对照和空白对照结果达到质控要求,则可判定该样品为非三系杂交水稻。

## 7 样品保存

存查样品应在干燥防虫的条件下保存 6 个月。

---



SN/T 2669—2010

书号:155066·2-21677

定价: 14.00 元