



(21) 申请号 202210252169.0

(22) 申请日 2022.03.15

(71) 申请人 上海市农业科学院

地址 201106 上海市闵行区北翟路2901号

(72) 发明人 朱红芳 李晓锋 朱玉英 奚丹丹
高璐

(74) 专利代理机构 北京中创博腾知识产权代理
事务所(普通合伙) 11636

专利代理师 戴鹏

(51) Int. Cl.

C12Q 1/6858 (2018.01)

C12Q 1/6895 (2018.01)

C12N 15/11 (2006.01)

权利要求书4页 说明书5页 附图1页

(54) 发明名称

不结球白菜红明青菜指纹图谱的建立方法

(57) 摘要

本发明公开了不结球白菜红明青菜指纹图谱的建立方法,属于分子生物学和植物品种鉴别技术领域。本发明提供了30对SSR引物组成的标记组合,利用PCR扩增技术和毛细管电泳检测技术对‘红明青菜’品种进行检测,能够很好的区分不同的品种,本发明的品种鉴定检测方法可高效且精准地对‘红明青菜’品种进行鉴定,利用各种先进仪器进行检测,操作十分简单,检测的成本较低,本发明提供的检测方法还能有效辨别‘红明青菜’种子的真伪,可以有效鉴定出假冒伪劣的‘红明青菜’种子,保护了‘红明青菜’种子。



1. 不结球白菜红明青菜指纹图谱的建立方法,其特征在于,包括引物编号-引物名称,引物编号-引物名称分别为SA000189-cnu_m139a、SA000190-nia_m086a、SA000191-nia_m098a、SA000192-nia_m138a、SA000193-cnu_m046a、SA000194-nia_m121a、SA000195-cnu_m073a、SA000196-cnu_m288a、SA000197-cnu_m316a、SA000198-cnu_m327a、SA000199-nia_m101a、SA000200-cnu_m252a、SA000201-Na10-D09、SA000202-cnu_m289a、SA000203-cnu_m442a、SA000204-cnu_m050a、SA000205-cnu_m149a、SA000206-nia_m037a、SA000207-nia_m049a、SA000208-cnu_m182a、SA000209-cnu_m295a、SA000210-cnu_m090a、SA000211-cnu_m537a、SA000212-cnu_m016a、SA000213-cnu_m530a、SA000214-cnu_m534a、SA000215-nia_m022a、SA000216-nia_m038a、SA000217-ENA2、SA000218-nia_m035a;

所述分子标记分别通过以下引物对扩增得到:SEQ ID NO.1-2、SEQ ID NO.3-4、SEQ ID NO.5-6、SEQ ID NO.7-8、SEQ ID NO.9-10、SEQ ID NO.11-12、SEQ ID NO.13-14、SEQ ID NO.15-16、SEQ ID NO.17-18、SEQ ID NO.19-20、SEQ ID NO.21-22、SEQ ID NO.23-24、SEQ ID NO.25-26、SEQ ID NO.27-28、SEQ ID NO.29-30、SEQ ID NO.31-32、SEQ ID NO.33-34、SEQ ID NO.35-36、SEQ ID NO.37-38、SEQ ID NO.39-40、SEQ ID NO.41-42、SEQ NO.43-44、SEQ ID NO.45-46、SEQ ID NO.47-48、SEQ ID NO.49-50、SEQ ID NO.51-52、SEQ ID NO.53-54、SEQ ID NO.55-56、SEQ ID NO.57-58、SEQ ID NO.59-60所示的引物对。

2. 根据权利要求1所述的不结球白菜红明青菜指纹图谱的建立方法,其特征在于,由以下30对特异性引物对组成,其为SEQ ID NO.1-2、SEQ ID NO.1-2、SEQ ID NO.3-4、SEQ ID NO.5-6、SEQ ID NO.7-8、SEQ ID NO.9-10、SEQ ID NO.11-12、SEQ ID NO.13-14、SEQ ID NO.15-16、SEQ ID NO.17-18、SEQ ID NO.19-20、SEQ ID NO.21-22、SEQ ID NO.23-24、SEQ ID NO.25-26、SEQ ID NO.27-28、SEQ ID NO.29-30、SEQ ID NO.31-32、SEQ ID NO.33-34、SEQ ID NO.35-36、SEQ ID NO.37-38、SEQ ID NO.39-40、SEQ ID NO.41-42、SEQ ID NO.43-44、SEQ ID NO.45-46、SEQ ID NO.47-48、SEQ ID NO.49-50、SEQ ID NO.51-52、SEQ ID NO.53-54、SEQ ID NO.55-56、SEQ ID NO.57-58、SEQ ID NO.59-60。

3. 根据权利要求2所述的不结球白菜红明青菜指纹图谱的建立方法,其特征在于,还包括试剂盒。

4. 根据权利要求2所述的不结球白菜红明青菜指纹图谱的建立方法,其特征在于,所述分子标记或引物组合应用于鉴定‘红明青菜’的品种。

5. 根据权利要求2所述的不结球白菜红明青菜指纹图谱的建立方法,其特征在于,所述分子标记或引物组合应用于鉴定‘红明青菜’及‘苏州青’种质资源品种。

6. 根据权利要求1所述的不结球白菜红明青菜指纹图谱的建立方法,其特征在于,所述的引物组合对‘红明青菜’和‘苏州青’品种的DNA进行PCR扩增和一代测序和利用毛细管电泳检测PCR产物;

扩增产物读带为无时,显性标记时记录为0;扩增条件为有时,显性标记记录为1;条带较弱或无法判断基因型时记录为?,无效条带记录为--;共显性标记中纯合位点的等位变异大小数据记录为X/X,扩增产物读带为纯合亲本1,其中X为该位点等位变异的大小;纯合位点的等位变异大小数据记录为Y/Y,扩增产物读带为纯合亲本2,Y为该位点等位变异的大小;杂合位点的等位变异数据记录为X/Y,扩增产物为双亲带型,其中X、Y为该位点上两个不同的等位变异;条带较弱或无法判断基因型时记录为?,无效等位变异的大小记录为--;上

述“/”前为小片段，“/”后为大片段；通过对不同位点的数据整合，形成‘红明青菜’及其亲本和‘苏州青’品种的SSR指纹图谱。

7. 根据权利要求6所述的不结球白菜红明青菜指纹图谱的建立方法，其特征在于，其特征不在于，PCR扩增方法为：

反应程序为：将PCR试剂加入到1.5ml离心管中，混合后用110 μ L的石蜡油覆盖在混合液上，打开PCR反应仪，设定好如下数据：94 $^{\circ}$ C预变性5min；94 $^{\circ}$ C变性50s，45 $^{\circ}$ C退火50s，78 $^{\circ}$ C延伸70s，将1.5ml离心管放入仪器中进行扩增，将共循环30次，78 $^{\circ}$ C延伸10min；

反应体系：25 μ L反应体系体积，含每种dNTP2.5mmol/L，正向引物和反向引物各2.5 μ mol/L，Taq DNA聚合酶2.0U，5倍PCR缓冲液，MgCl₂ 2.5mmol/L，样品DNA30-50ng。

8. 根据权利要求7所述的不结球白菜红明青菜指纹图谱的建立方法，其特征在于，鉴别‘红明青菜’品系和‘苏州青’中的应用，或在‘苏州青’种质资源改良中的应用。

9. 根据权利要求1所述的不结球白菜红明青菜指纹图谱的建立方法，其特征在于，所述‘红明青菜’指纹图谱为‘红明青菜’和‘苏州青’指纹图谱，分别如下：

样 品 名 称	SA000189	SA000190	SA000191	SA000192	SA000193	SA000194
	cnu_m139a	nia_m086a	nia_m098a	nia_m138a	cnu_m046a	nia_m121a
A	161/161	257/257	285/285	249/251	161/173	284/284
B	167/167	259/259	242/268	253/253	173/173	284/284

和

样	SA000195	SA000196	SA000197	SA000198	SA000199	SA000200
品 名 称	cnu_m073a	cnu_m288a	cnu_m316a	cnu_m327a	nia_m101a	cnu_m252a
A	302/334	153/153	211/211	262/262	270/279	251/284
B	298/298	153/167	211/211	229/272	272/272	241/241

和

样 品 名 称	SA000201	SA000202	SA000203	SA000204	SA000205	SA000206
	Na10-D09	cnu_m289a	cnu_m442a	cnu_m050a	cnu_m149a	nia_m037a
A	284/284	180/192	280/280	175/175	/	297/297
B	370/370	172/172	270/270	161/161	171/171	297/297

和

样 品 名 称	SA000207	SA000208	SA000209	SA000210	SA000211	SA000212
	nia_m049a	cnu_m182a	cnu_m295a	cnu_m090a	cnu_m537a	cnu_m016a
A	309/311	373/373	200/200	199/199	187/187	157/172
B	310/310	366/366	192/192	193/193	193/193	172/172

和

样 品 名 称	SA000213	SA000214	SA000215	SA000216	SA000217	SA000218
	cnu_m530a	cnu_m534a	nia_m022a	nia_m038a	ENA2	nia_m035a
A	283/283	204/204	316/325	321/333	283/283	366/366
B	291/369	207/207	316/316	333/333	280/280	363/363

上述A指代‘红明青菜’品种,B为‘苏州青’,作为对照。

10. 根据权利要求1所述的不结球白菜红明青菜指纹图谱的建立方法,其特征在于,包括如下步骤:

S1、提取待检青菜品种的DNA,以权利要求2所述的引物组合中的30对SSR引物对分别对检青菜品种的DNA进行PCR扩增;

S2、对扩增产物进行一代测序;

S3、测序的同时进行检测,根据扩增产物的相对位置,扩增产物读带为无时,显性标记时记录为0;扩增条件为有时,显性标记记录为1;条带较弱或无法判断基因型时记录为?,无效条带记录为--;共显性标记中纯合位点的等位变异大小数据记录为X/X,扩增产物读带为纯合亲本1,其中X为该位点等位变异的大小;纯合位点的等位变异大小数据记录为Y/Y,扩

增产物读带为纯合亲本2, Y为该位点等位变异的大小; 杂合位点的等位变异数据记录为X/Y, 扩增产物为双亲带型, 其中X、Y为该位点上两个不同的等位变异; 条带较弱或无法判断基因型时记录为?, 无效等位变异的大小记录为--; 上述“/”前为小片段, “/”后为大片段; 通过对不同位点的数据整合, 形成‘红明青菜’和‘苏州青’品种的SSR指纹图谱。

不结球白菜红明青菜指纹图谱的建立方法

技术领域

[0001] 本发明涉及分子生物学和植物品种鉴别技术领域,具体为不结球白菜‘红明青菜’指纹图谱的建立方法。

背景技术

[0002] ‘红明青菜’产自上海县七一乡红明村而得名,叶片为绿色,宽椭圆,叶柄短,浅绿厚实,呈匙形,束腰莲花状,具有矮箕、质优、抗性强、高产等特点。

[0003] 目前我国对‘红明青菜’品种进行鉴定主要方法是按照《大白菜品种鉴定技术规程SSR分子标记法》NY/T 2476-2013来鉴定的,该种鉴定方法容易受到鉴定周期和环境的影响,因此会影响鉴定的准确性和速度,且人为判定会因为主观认知的不同而使得判定结果产生偏差,因此很难鉴定‘红明青菜’的品种,难以辨别‘红明青菜’的真伪。

发明内容

[0004] (一)解决的技术问题

[0005] 为了解决上述难题,本发明提供了一种通过一代测序技术测序并进行基因分型,分析‘红明青菜’基因组序列,并根据序列合成核心基因组SSR引物,构建了‘红明青菜’种子鉴定的SSR指纹图谱,可高效、准确、低成本对‘红明青菜’种子进行鉴定。

[0006] (二)技术方案

[0007] 为实现上述目的,本发明以‘红明青菜’和‘苏州青’的基因组DNA为模板,通过一代测序技术测序并进行基因分型,分析‘红明青菜’基因组序列,并根据序列合成核心基因组SSR引物,经过筛选有30对基因组SSR标记可以完全鉴别‘红明青菜’和‘苏州青’的差异。所述的‘红明青菜’品种和‘苏州青’的特性和来源见表1

[0008] 表1青菜品种

编号	名称	来源
A	‘红明青菜’	上海市农业科学院
B	‘苏州青’	上海市农业科学院

[0010] 本发明提供的用于鉴别不结球白菜‘红明青菜’品种的SSR分子标记,其特征在于,包括引物编号-引物名称,引物编号-引物名称分别为 SA000189-cnu_m139a、SA000190-nia_m086a、SA000191-nia_m098a、SA000192-nia_m138a、SA000193-cnu_m046a、SA000194-nia_m121a、SA000195-cnu_m073a、SA000196-cnu_m288a、SA000197-cnu_m316a、SA000198-cnu_m327a、SA000199-nia_m101a、SA000200-cnu_m252a、SA000201-Na10-D09、SA000202-cnu_m289a、SA000203-cnu_m442a、SA000204-cnu_m050a、SA000205-cnu_m149a、SA000206-nia_m037a、SA000207-nia_m049a、SA000208-cnu_m182a、SA000209-cnu_m295a、SA000210-cnu_m090a、SA000211-cnu_m537a、SA000212-cnu_m016a、SA000213-cnu_m530a、SA000214-cnu_m534a、SA000215-nia_m022a、SA000216-nia_m038a、SA000217-ENA2、SA000218-nia_m035a;

[0011] 所述分子标记分别通过以下引物对扩增得到:SEQ ID NO.1-2、SEQ ID NO.3-4、SEQ ID NO.5-6、SEQ ID NO.7-8、SEQ ID NO.9-10、SEQ ID NO.11-12、SEQ ID NO.13-14、SEQ ID NO.15-16、SEQ ID NO.17-18、SEQ ID NO.19-20、SEQ ID NO.21-22、SEQ ID NO.23-24、SEQ ID NO.25-26、SEQ ID NO.27-28、SEQ ID NO.29-30、SEQ ID NO.31-32、SEQ ID NO.33-34、SEQ ID NO.35-36、SEQ ID NO.37-38、SEQ ID NO.39-40、SEQ ID NO.41-42、SEQ ID NO.43-44、SEQ ID NO.45-46、SEQ ID NO.47-48、SEQ ID NO.49-50、SEQ ID NO.51-52、SEQ ID NO.53-54、SEQ ID NO.55-56、SEQ ID NO.57-58、SEQ ID NO.59-60所示的引物对。

[0012] 一种引物组合,由以下30对特异性引物对组成,其为SEQ ID NO.1-2、SEQ ID NO.1-2、SEQ ID NO.3-4、SEQ ID NO.5-6、SEQ ID NO.7-8、SEQ ID NO.9-10、SEQ ID NO.11-12、SEQ ID NO.13-14、SEQ ID NO.15-16、SEQ ID NO.17-18、SEQ ID NO.19-20、SEQ ID NO.21-22、SEQ ID NO.23-24、SEQ ID NO.25-26、SEQ ID NO.27-28、SEQ ID NO.29-30、SEQ ID NO.31-32、SEQ ID NO.33-34、SEQ ID NO.35-36、SEQ ID NO.37-38、SEQ ID NO.39-40、SEQ ID NO.41-42、SEQ ID NO.43-44、SEQ ID NO.45-46、SEQ ID NO.47-48、SEQ ID NO.49-50、SEQ ID NO.51-52、SEQ ID NO.53-54、SEQ ID NO.55-56、SEQ ID NO.57-58、SEQ ID NO.59-60。

[0013] 本发明提供含有上述引物组合的试剂盒。

[0014] 本发明提供了一种‘红明青菜’品种SSR指纹图谱的构建方法,其特征在于,以权利要求2所述的引物组合对‘红明青菜’和‘苏州青’品种的DNA进行PCR扩增和一代测序和利用毛细管电泳检测PCR产物;

[0015] 扩增产物读带为无时,显性标记时记录为0;扩增条件为有时,显性标记记录为1;条带较弱或无法判断基因型时记录为?,无效条带记录为--;共显性标记中纯合位点的等位变异大小数据记录为X/X,扩增产物读带为纯合亲本1,其中X为该位点等位变异的大小;纯合位点的等位变异大小数据记录为Y/Y,扩增产物读带为纯合亲本2,Y为该位点等位变异的大小;杂合位点的等位变异数据记录为X/Y,扩增产物为双亲带型,其中X、Y为该位点上两个不同的等位变异;条带较弱或无法判断基因型时记录为?,无效等位变异的大小记录为--;上述“/”前为小片段,“/”后为大片段;通过对不同位点的数据整合,形成‘红明青菜’及其亲本和‘苏州青’品种的SSR指纹图谱。

[0016] 其中,PCR扩增方法为:

[0017] 反应程序为:将PCR试剂加入到1.5ml离心管中,混合后用110 μ L的石蜡油覆盖在混合液上,打开PCR反应仪,设定好如下数据:94 $^{\circ}$ C预变性5min;94 $^{\circ}$ C变性50s,45 $^{\circ}$ C退火50s,78 $^{\circ}$ C延伸70s,将1.5ml离心管放入仪器中进行扩增,将共循环30次,78 $^{\circ}$ C延伸10min;

[0018] 反应体系:25 μ L反应体系体积,含每种dNTP2.5 mmol/L,正向引物和反向引物各2.5 μ mol/L,Taq DNA聚合酶2.0U,5倍PCR缓冲液,MgCl₂2.5 mmol/L,样品DNA30-50ng。

[0019] 采用上述方法构建的‘红明青菜’和‘苏州青’指纹图谱,如表2-6所示:

[0020] 表2

[0021]	样品名称	SA000189	SA000190	SA000191	SA000192	SA000193	SA000194
		cnu_m139a	nia_m086a	nia_m098a	nia_m138a	cnu_m046a	nia_m121a
	A	161/161	257/257	285/285	249/251	161/173	284/284
	B	167/167	259/259	242/268	253/253	173/173	284/284

[0022] 表3

[0023]	样品名称	SA000195	SA000196	SA000197	SA000198	SA000199	SA000200
		cnu_m073a	cnu_m288a	cnu_m316a	cnu_m327a	nia_m101a	cnu_m252a
	A	302/334	153/153	211/211	262/262	270/279	251/284
	B	298/298	153/167	211/211	229/272	272/272	241/241

[0024] 表4

[0025]	样	SA000201	SA000202	SA000203	SA000204	SA000205	SA000206
--------	---	----------	----------	----------	----------	----------	----------

[0026]	品名	Na10-D09	cnu_m289a	cnu_m442a	cnu_m050a	cnu_m149a	nia_m037a
	A	284/284	180/192	280/280	175/175	/	297/297
	B	370/370	172/172	270/270	161/161	171/171	297/297

[0027] 表5

[0028]	样品名称	SA000207	SA000208	SA000209	SA000210	SA000211	SA000212
		nia_m049a	cnu_m182a	cnu_m295a	cnu_m090a	cnu_m537a	cnu_m016a
	A	309/311	373/373	200/200	199/199	187/187	157/172
	B	310/310	366/366	192/192	193/193	193/193	172/172

[0029] 表6

[0030]	样品名称	SA000213	SA000214	SA000215	SA000216	SA000217	SA000218
		cnu_m530a	cnu_m534a	nia_m022a	nia_m038a	ENA2	nia_m035a
	A	283/283	204/204	316/325	321/333	283/283	366/366
	B	291/369	207/207	316/316	333/333	280/280	363/363

[0031] 上述A指代‘红明青菜’品种,B为‘苏州青’,作为对照。

[0032] 10.一种‘红明青菜’品种的鉴定方法,其特征在于,包括如下步骤:

[0033] S1、提取待检青菜品种的DNA,以权利要求2所述的引物组合中的30对SSR引物对分别对检青菜品种的DNA进行PCR扩增;

[0034] S2、对扩增产物进行一代测序;

[0035] S3、测序的同时进行检测,根据扩增产物的相对位置,扩增产物读带为无时,显性标记时记录为0;扩增条件为有时,显性标记记录为1;条带较弱或无法判断基因型时记录为?,无效条带记录为--;共显性标记中纯合位点的等位变异大小数据记录为X/X,扩增产物读带为纯合亲本1,其中X为该位点等位变异的大小;纯合位点的等位变异大小数据记录为Y/Y,扩增产物读带为纯合亲本2,Y为该位点等位变异的大小;杂合位点的等位变异数据记录为X/Y,扩增产物为双亲带型,其中X、Y为该位点上两个不同的等位变异;条带较弱或无法判断基因型时记录为?,无效等位变异的大小记录为--;上述“/”前为小片段,“/”后为大片段;通过对不同位点的数据整合,形成‘红明青菜’和‘苏州青’品种的SSR指纹图谱。

[0036] 与现有技术相比,本发明的有益效果是:

[0037] 1、本发明提供的不结球白菜‘红明青菜’指纹图谱的建立方法,能够很好的区分不同的品种,本发明的品种鉴定检测方法可高效且精准地对‘红明青菜’品种进行鉴定,利用各种先进仪器进行检测,操作十分简单,检测的成本较低;

[0038] 2、本发明提供的检测方法还能有效辨别‘红明青菜’种子的真伪,可以有效鉴定出假冒伪劣的‘红明青菜’种子,保护了‘红明青菜’种子。

附图说明

[0039] 图1为本发明‘红明青菜’指纹图谱二维码；

[0040] 图2为本发明‘苏州青’指纹图谱二维码。

具体实施方式

[0041] 下面结合具体实施对本发明的技术方案进行进一步详细地说明,本发明所述的技术特征或连接关系没有进行详细描述的部分均为采用的现有技术。

[0042] 本发明品种判定原则遵照以下国家标准进行,依据中华人民共和国农业行业标准《大白菜品种鉴定技术规程SSR分子标记法》NY/T 2476-2013。

[0043] 实施例1

[0044] DNA的提取步骤:

[0045] S1、取幼嫩组织新鲜叶片0.2g,放入1.5mL离心管中;

[0046] S2、加入700u1裂解缓冲液,用研磨机进行研磨2min;

[0047] S3、加入浓度为8%的去污剂60-90μL,再加入蛋白酶K3μL,混合均匀,50℃的水中水浴2h,期间将1.5mL离心管反复颠倒若干次;

[0048] S4、加入120μL氯化钠,5000rpm离心20min,去沉淀;

[0049] S5、取上清液500μL,加入预先加好500μL异丙醇的1.5ml离心管中,轻轻上下颠倒混匀;

[0050] S6、加入700μL 24:1氯仿/异戊醇,上下混匀10min,保证样品和氯仿充分混合;

[0051] S7、14000rpm离心8min,去上清液;

[0052] S8、加入120-150μL 170%ALC,离心后去ALC;

[0053] S9、烘干箱50℃烘干20min,180μL双蒸水冲洗管壁四周;

[0054] S10、溶解16h,保存备用。

[0055] 实施例2

[0056] PCR扩增产物样品准备及电泳分析步骤:

[0057] S1、将不同颜色的荧光标记的PCR产物用超纯水稀释30倍,分别取等体积的上述2种稀释后溶液混合形成混合液,吸取1uL混合液、0.1uL LIZ500 分子量内标和8.9uL去离子甲酰胺分别加入到DNA分析仪专用深孔板孔中;

[0058] S2、然后将其在PCR反应仪上94℃变性40s,取出后立即置于冰块上,冷却20min;离心15s,进行毛细管电泳检测;

[0059] 除待测样品外,每个SSR位点还应同时包括若干个参照品种的扩增产物。检测结果判定:结果为Pass,说明有检测信号且验证具有多态性;结果为Mono,说明有检测信号,无多态性;结果为Fail,说明检测无信号;结果为undetermined(?),说明扩增信号不稳定或分型不集中。

[0060] 最后应当说明的是,以上内容仅用以说明本发明的技术方案,而非对本发明保护范围的限制,本领域的普通技术人员对本发明的技术方案进行的简单修改或者等同替换,均不脱离本发明技术方案的实质和范围。



图1



图2