



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111663003 A

(43)申请公布日 2020.09.15

(21)申请号 202010683079.8

(22)申请日 2020.07.15

(71)申请人 江西农业大学

地址 330000 江西省南昌市青山湖区志敏大道1101号

(72)发明人 廖江林 黄英金

(74)专利代理机构 义乌市宏创专利代理事务所
(普通合伙) 33320

代理人 牟姣

(51) Int. Cl.

C12Q 1/6895(2018.01)

C12Q 1/686(2018.01)

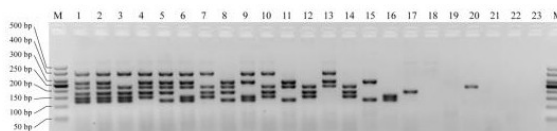
权利要求书1页 说明书5页 附图1页

(54)发明名称

一组关联水稻耐热性的分子标记检测试剂盒及其检测方法

(57)摘要

本发明提供了一组关联水稻耐热性的分子标记检测试剂盒及其检测方法,以灌浆期耐热水稻种质的基因组DNA为模板,进行PCR扩增,产物大小依次为387 bp、269 bp、224 bp、173 bp、141 bp和123 bp;而以灌浆期热敏感水稻种质基因组DNA为模板,则不能扩增出相应大小的条带,水稻种质的灌浆期耐热性强弱与携带上述InDel分子标记的数量成正相关,利用上述6个InDel分子标记的引物对发明了的检测试剂盒,试剂盒内包含了6个分子标记对应的正向混合引物、反向混合引物和扩增产物大小一致的DNA Maker, DNA Maker具有387 bp、269 bp、224 bp、173 bp、141 bp和123 bp的条带,试剂盒用一个PCR反应完成6个InDel分子标记的扩增和检测,本发明对灌浆期耐热水稻种质的筛选,具有高效、准确和限制少的优点。



1. 一组关联水稻耐热性的分子标记检测试剂盒,其特征在于:所述试剂盒内设有387 bp、269 bp、224 bp、173 bp、141 bp和123 bp的DNA Maker,所述试剂盒中包括了6个InDel分子标记的正向混合引物和反向混合引物,所述试剂盒内还包括了PCR反应缓冲液以及Taq DNA聚合酶。

2. 一组关联水稻耐热性的分子标记检测试剂盒的使用方法,其特征在于:包括以下具体步骤:

S1:提取待检测水稻种质的基因组总DNA;

S2:以提取的所述基因组总DNA为模板,以所述试剂盒中的387 bp、269 bp、224 bp、173 bp、141 bp标记的正向混合引物和反向混合引物进行PCR扩增;

S3:所述PCR扩增产物在浓度为3%的琼脂糖凝胶中电泳25分钟;

S4:电泳结束后,在琼脂糖凝胶成像系统中进行拍照,凝胶照片中呈现0-6条DNA条带,DNA条带数量越多则被检测水稻种质的灌浆期耐热性越强,DNA条带越少则被检测水稻种质对灌浆期高温越敏感。

3. 一组关联水稻耐热性的分子标记检测试剂盒的使用方法,其特征在于:所述S2中,PCR扩增方法为取PCR Mastermix缓冲液12.5 ul, 2ul DNA模板5.0 ng, 3ul正向混合引物150 ng, 3ul反向混合引物150 ng,双蒸水4.5 ul,配制成25ul体系;反应程序:95°C预变性3分钟, 95°C变性15秒, 58°C退火20秒, 72°C延伸30秒,进行38个循环,72°C保温5分钟。

一组关联水稻耐热性的分子标记检测试剂盒及其检测方法

[0001]

技术领域

[0002] 本发明涉及分子标记技术领域技术领域,具体公开了一组关联水稻耐热性的分子标记检测试剂盒及其检测方法。

背景技术

[0003] 全球气候变暖导致夏季频繁高温,危害我国水稻的正常生产,尤其是7月中下旬的高温气候对我国长江流域以南的双季早稻灌浆期危害严重。灌浆期是稻谷产量和米质形成的关键时期,此时遇高温热害可导致籽粒灌浆不饱满,造成籽粒充实度下降、秕粒率增加、垩白面积增大、垩白粒率增加,最终造成产量降低、米质变劣。近年来我国早稻灌浆期的高温热害呈明显上升趋势,严重威胁了我国稻谷生产安全。因此,选育高温钝感的优良水稻新品种势在必行,也是确保我国口粮安全的有效减灾对策。

[0004] 高温钝感水稻新品种的选育首先必须筛选出灌浆期耐热的水稻种质资源,然而水稻种质的灌浆期耐热性筛选过程中,由于不同基因型水稻的生育期差异而难以保障不同基因型水稻同期进入灌浆期,从而导致不同基因型水稻在灌浆过程中所遭遇的高温胁迫程度不同,最终造成水稻种质耐热性的鉴定结果失真。同时,由于不同年度间的同期气温变化,导致不同年度鉴定的耐热性结果之间缺乏可比性。再次,由于不同研究单位所处地理位置的差异而水稻种植的气候条件不同,也会导致在水稻灌浆期耐热性鉴定过程中,由于水稻灌浆期遭遇高温胁迫程度和研究人员的评价标准不同,而造成不同研究单位鉴定结果之间也缺乏可比性。因此,提高水稻耐热性鉴定结果的可靠性和耐热性鉴定结果之间的可比性,对提高水稻耐热性育种成效、减少由于不同研发单位重复鉴定而造成的资源浪费具有重要意义。

发明内容

[0005] 本发明针对上述现有技术的不足设计而提供一组关联水稻耐热性的分子标记检测试剂盒,所述试剂盒内设有387 bp、269 bp、224 bp、173 bp、141 bp和123 bp的DNA Maker,所述试剂盒中包括了6个InDel分子标记的正向混合引物和反向混合引物,所述试剂盒内还包括了PCR反应缓冲液以及Taq DNA聚合酶。

[0006] 本发还提供一组关联水稻耐热性的分子标记检测试剂盒的使用方法,包括以下具体步骤:

- S1:提取待检测水稻种质的基因组总DNA;
- S2:以提取的所述基因组总DNA为模板,以所述试剂盒中的387 bp、269 bp、224 bp、173 bp、141 bp标记的正向混合引物和反向混合引物进行PCR扩增;
- S3:所述PCR扩增产物在浓度为3%的琼脂糖凝胶中电泳25分钟;
- S4:电泳结束后,在琼脂糖凝胶成像系统中进行拍照,凝胶照片中呈现0-6条DNA条带,

DNA条带数量越多则被检测水稻种质的灌浆期耐热性越强,DNA条带越少则被检测水稻种质对灌浆期高温越敏感。

[0007] 进一步的,所述S2中,PCR扩增方法为取PCR Mastermix缓冲液12.5 ul, 2ul DNA模板5.0 ng, 3ul正向混合引物150 ng, 3ul反向混合引物150 ng,双蒸水4.5 ul,配制成25ul体系;反应程序:95℃预变性3分钟,95℃变性15秒,58℃退火20秒,72℃延伸30秒,进行38个循环,72℃保温5分钟。

[0008] 本发明的有益效果:一组关联水稻耐热性的分子标记检测试剂盒及其检测方法,以耐热水稻种质基因组DNA为模板,进行PCR扩增,产物大小依次为387 bp、269 bp、224 bp、173 bp、141 bp和123 bp;而以热敏感水稻种质基因组DNA为模板,则不能扩增出相应大小的条带,水稻种质的灌浆期耐热性强弱与携带上述InDel分子标记的数量成正相关,利用上述6个InDel分子标记的引物对发明的检测试剂盒,试剂盒内包含了6个分子标记对应的正向方向引物和扩增产物大小一致的DNA Maker,DNA maker具有387 bp、269 bp、224 bp、173 bp、141 bp和123 bp的条带,试剂盒用一个PCR反应完成6个InDel分子标记的扩增和检测,本发明对灌浆期耐热水稻种质的筛选,具有高效、准确和限制少的优点。

附图说明

[0009] 图1为采用本发明中的试剂盒检测已鉴定水稻种质灌浆期耐热性的电泳图;
图2为试剂盒包含特异DNA Maker的琼脂糖电泳图。

具体实施方式

[0010] 下面将结合本发明实施例中的附图,对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述,但并不构成对本发明保护范围的限制。

[0011] 本发明提供了一组关联水稻耐热性的分子标记检测试剂盒及其检测方法,

本发明提供了用于筛选水稻灌浆期耐热性种质的分子标记检测试剂盒,包括了6个InDel分子标记对应的正向混合引物和反向混合引物,还包括了6个InDel分子标记的PCR扩增产物大小一致的DNA Maker,参见图2,DNA Maker经琼脂糖电泳后呈现大小为387 bp、269 bp、224 bp、173 bp、141 bp和123 bp的条带,试剂盒的反应体系为取PCR Mastermix缓冲液12.5 ul, 2ul DNA模板5.0 ng, 3ul正向混合引物150 ng, 3ul反向混合引物150 ng,双蒸水4.5 ul,配制成25ul反应体系;反应程序为95℃预变性3分钟,95℃变性15秒,58℃退火20秒,72℃延伸30秒,进行38个循环,72℃保温5分钟。

[0012] 附表1 InDel 分子标记的引物序列和InDel序列

标记编号	引物名称	引物序列	InDel 标记序列	PCR 产物大小 (bp)
InDel 1	SEQ ID No.1F (5'→3')	CGATTATCTTCATTTTGC ACATCT	TCGTATAACTTCGTATAATGTATGC TATACGAAGTTATTACGATTATCTT CATT	387
	SEQ ID No.1R (3'→5')	TGTCCTTGGTATACCAITTT TGTGGAG		
InDel 2	SEQ ID No.2F (5'→3')	TTGGTTAGAGAAGAGAG TTGG	TCGTATAACTTCGTATAATGTATGC TATACGAAGTTATTACGAAAACAC AGCTTTGACATATTTCTCACCCCTC GCCAAACCAC	269
	SEQ ID No.2R (3'→5')	GCCAAACCACCTCGTATA ACTT		
InDel 3	SEQ ID No.3F (5'→3')	GCCAGAACCAGATCCAG AGC	CGCCATTTTGTCCACCACCCGCCA CCTCCACCTTGTCCATATAACTTC GTATAATGTATGCTATACGAACCG CCACCAC	224
	SEQ ID No.3R (3'→5')	GCTATACGAACCGCCAC CAC		
InDel 4	SEQ ID No.4F (5'→3')	CAGATCTCACTGTAGGG AAG	GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG GTGGGGGGGGGGGGGAGGCCGT TGAGTACAGATCTCACTGTGA	173
	SEQ ID No.4R (3'→5')	GGCGGCGGATCTCGTTA GAG		
InDel 5	SEQ ID No.5F (5'→3')	GTATGAATTGTCIATTAG AATGGC	CTATAGATGAATTGGAGCTAGTAG TTGGCTATACTATTAACCTGTCTCT AAGCAATTATTGTATGAATTGTCT ATTAGAT	141
	SEQ ID No.5R (3'→5')	TACTGTCCGATAGCGGA GGAA		
InDel 6	SEQ ID No.6F (5'→3')	TGGTTACAAGTAAGCC AATTAA	CTTCGAGAGAGAACTTCGGGGAG ACTGGGGCATGTCTCCTGTGGC ATGTCTGGGTGGCGGCCCAAAA GTGCAT	123
	SEQ ID No.6R (3'→5')	GAGAACTTCGGGGAGA CTGG		

本发明提供了一组关联水稻灌浆期耐热性的6个InDel分子标记,所述InDel分子标记的正向引物与反向引物的核苷酸序列分别如附表1所示。所述的一组分子标记与水稻灌浆期耐热性紧密关联。以灌浆期耐热水稻种质基因组DNA为模板,利用所述InDel分子标记的正向引物与反向引物进行PCR扩增,产物大小依次为387 bp、269 bp、224 bp、173 bp、141 bp和123 bp;以灌浆期热敏感水稻种质的基因组DNA为模板,利用所述InDel分子标记的引物对进行PCR扩增,则不能扩增出相应大小的条带。水稻种质的灌浆期耐热性强弱与携带上述InDel分子标记的数量成正相关,即若某个水稻种质基因组序列中携带上述6个InDel分子标记、则其灌浆期耐热性极强;若携带上述6个中的5个InDel分子标记、则其灌浆期耐热性次之,依次类推。

[0013] 本发明提供了用于筛选灌浆期具有耐热性的水稻种质的试剂盒,包括所述的6个InDel分子标记的正向混合引物和反向混合引物;所述试剂盒还包括条带大小依次为387 bp、269 bp、224 bp、173 bp、141 bp和123 bp的DNA Make,所述试剂盒还包括了优选的PCR反应所需试剂,例如PCR反应缓冲液、Taq DNA聚合酶等试剂。

[0014] 基于所述的一组关联水稻灌浆期耐热性的InDel分子标记,本发明提供了所述

InDel分子标记或所述试剂盒筛选灌浆期耐热水稻种质的方法,包括如下步骤:

- 1、提取待检测水稻种质的基因组总DNA;
- 2、以提取的基因组总DNA为模板,以所述试剂盒中的6个InDel分子标记的正向混合引物和反向混合引物进行PCR扩增;
- 3、所述PCR扩增产物在浓度为3%的琼脂糖凝胶中电泳25分钟;
- 4、电泳结束后,在琼脂糖凝胶成像系统中进行拍照,凝胶照片中呈现0-6条DNA条带,DNA条带数量越多则被检测水稻种质的耐热性越强,DNA条带越少则被检测水稻种质对灌浆期高温越敏感。

[0015] 本发明提取待检测样品基因组DNA的方法没有特殊限制,采用本领域所熟知的植物基因组总DNA提取方法即可,如CTAB法、SDS法等。

[0016] 本发明中,所述PCR扩增的反应体系优选25ul体系:PCR Mastermix缓冲液12.5 ul, 2ul DNA模板约5.0 ng, 3ul正向混合引物150 ng, 3ul反向混合引物150 ng,双蒸水4.5 ul。所述PCR反应程序:95℃预变性3分钟, 95℃变性15秒, 58℃退火20秒, 72℃延伸30秒,38个循环,72℃保温5分钟。本发明对所述PCR扩增仪器没有特殊限制,采用本领域所熟知的PCR扩增仪器即可。

[0017] 1、水稻种质材料

从公开技术期刊名为Rice Science,2011年第18期,第279-286页得知,采用此实验室研制的协青早B/N22//协青早B的水稻回交重组自交系稳定株系中,随机选取了在高温胁迫条件下灌浆时籽粒充实度大于90%的2个株系、籽粒充实度大于80%的4份水稻种质、籽粒充实度大于70%的4份水稻种质、籽粒充实度大于60%的4份水稻种质、籽粒充实度大于50%的2份水稻种质以及籽粒充实度小于50%的7份水稻种质。

[0018] 2、水稻幼苗的总DNA提取

水稻种质通过浸种催芽生长至1叶1心后,分别剪切每份水稻种质的幼叶约0.5克、采用CTAB法提取总DNA,总DNA通过琼脂糖电泳检测其提取完整性、采用分光光度计测定所提总DNA的浓度。

[0019] 1、利用本发明提供的一组关联水稻耐热性的分子标记检测试剂盒。即取PCR Mastermix缓冲液12.5 ul,上述所提总DNA 2 ul约5.0 ng, 3ul正向混合引物约150 ng, 3ul反向混合引物约150 ng,双蒸水4.5 ul,混合均匀后转移至PCR仪进行PCR反应,反应程序为95℃预变性3分钟, 95℃变性15秒, 58℃退火20秒, 72℃延伸30秒,38个循环,72℃保温5分钟。

[0020] 2、琼脂糖凝胶电泳检测

取上述PCR产物4ul点样于浓度为3%的琼脂糖凝胶的上样孔内,打开电泳仪电源,以5V/cm的电压电泳25分钟后停止电泳。电泳结束后在琼脂糖凝胶成像系统中进行拍照,凝胶照片中呈现0-6条DNA条带,DNA条带数量越多则被检测水稻种质的耐热性越强,DNA条带越少则被检测水稻种质对灌浆期高温越敏感。

[0021] 参见图1,泳道1和泳道2为每个泳道呈现6条带,表明这2个水稻株系的基因组携带了6个InDel分子标记,这2个水稻株系在高温胁迫条件下灌浆时,其籽粒充实度大于90%。泳道3-6为每个泳道呈现5条带,表明这4个水稻株系的基因组携带了5个InDel分子标记,这4个水稻株系在高温胁迫条件下灌浆时,其籽粒充实度大于80%且小于90%。泳道7-10为每个

泳道呈现4条带,表明这4个水稻株系的基因组携带了4个InDel分子标记,这4个水稻株系在高温胁迫条件下灌浆时,其籽粒充实度大于70%且小于80%。泳道11-14为每个泳道呈现3条带,表明这4个水稻株系的基因组携带了3个InDel分子标记,这4个水稻株系在高温胁迫条件下灌浆时,其籽粒充实度大于60%且小于70%。泳道15和16为每个泳道呈现2条带,表明这3个水稻株系的基因组携带了2个InDel分子标记,这3个水稻株系在高温胁迫条件下灌浆时,其籽粒充实度大于50%且小于60%。泳道17-23为每个泳道呈现1条带或无条带,表明这7个水稻株系的基因组携带了1个或0个InDel分子标记,这7个水稻株系在高温胁迫条件下灌浆时,其籽粒充实度小于50%。表明水稻株系的灌浆期耐热性强弱与携带上述InDel分子标记的数量正相关。

[0022] 一组关联水稻耐热性的分子标记检测试剂盒及其检测方法,以灌浆期耐热水稻种质的基因组DNA为模板,进行PCR扩增,产物大小依次为387 bp、269 bp、224 bp、173 bp、141 bp和123 bp;而以灌浆期热敏感水稻种质基因组DNA为模板,则不能扩增出相应大小的条带,水稻种质的灌浆期耐热性强弱与携带上述InDel分子标记的数量成正相关,利用上述6个InDel分子标记的引物对发明了检测试剂盒,试剂盒内包含了6个分子标记对应的正向混合引物、反向混合引物和扩增产物大小一致的DNA Maker,DNA Maker具有387 bp、269 bp、224 bp、173 bp、141 bp和123 bp的条带,试剂盒用一个PCR反应完成6个InDel分子标记的扩增和检测,本发明对灌浆期耐热水稻种质的筛选,具有高效、准确和限制少的优点。

[0023] 上述实施例为本发明较佳的实施方式,但本发明的实施方式并不受上述实施例的限制,其他的任何未违背本发明的精神实质与原理下所作的改变、修饰、替代、组合、简化,均应为等效的置换方式,都包括在本发明的保护范围之内

上述实施例为本发明较佳的实施方式,但本发明的实施方式并不受上述实施例的限制,其他的任何未违背本发明的精神实质与原理下所作的改变、修饰、替代、组合、简化,均应为等效的置换方式,都包括在本发明的保护范围之内。

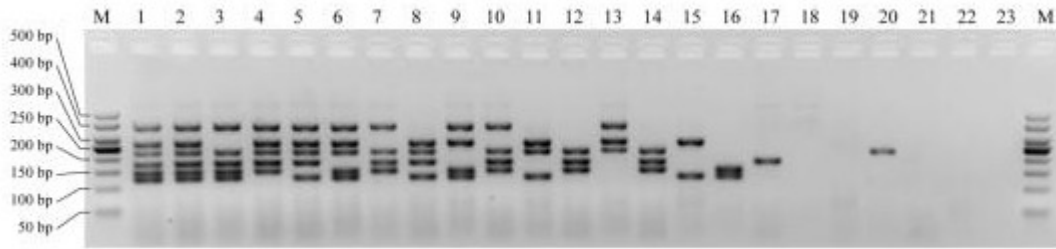


图1

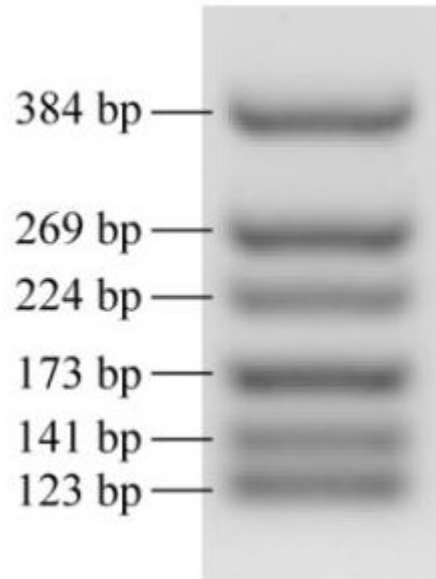


图2