

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

*C12Q 1/68 (2006.01)*

*G01N 33/53 (2006.01)*

*G01N 21/78 (2006.01)*



# [12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200810200421.3

[43] 公开日 2009年3月25日

[11] 公开号 CN 101392293A

[22] 申请日 2008.9.25

[21] 申请号 200810200421.3

[71] 申请人 上海交通大学

地址 200240 上海市闵行区东川路 800 号

[72] 发明人 陈火英 王新华 刘 杨 庄天明

[74] 专利代理机构 上海交大专利事务所

代理人 王锡麟 王桂忠

权利要求书 4 页 说明书 11 页 附图 1 页

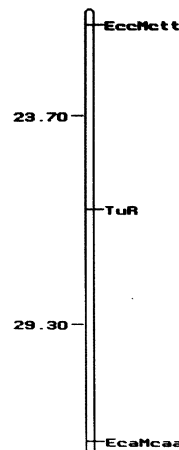
## [54] 发明名称

不结球白菜抗芜菁花叶病毒基因的分子标记方法

## [57] 摘要

一种不结球白菜抗芜菁花叶病毒基因的分子标记方法，包括抗感芜菁花叶病毒的不结球白菜亲本材料的筛选和栽培、亲本杂交和 F1 自交、芜菁花叶病毒的接种和检测、不结球白菜材料的 DNA 提取和抗感池建立、抗病基因的分子标记筛选、抗病基因连锁标记交换率和距离的计算以及抗病基因连锁标记图谱的建立等。其中：分子标记技术应用于对不结球白菜抗感芜菁花叶病毒的亲本筛选和抗病基因连锁基因的标记，不同的分子标记有不同的反应体系和扩增程序。本发明构建了以不结球白菜为材料的抗芜菁花叶病毒基因的分子标记程序和体系，为不结球白菜抗病基因在染色体上的定位、抗病基因克隆和抗病分子辅助育种研究提供了依据。

Dist. (cM) Marker



1、一种不结球白菜抗芜菁花叶病毒基因的分子标记方法，其特征在于，包括步骤如下：

①抗感芜菁花叶病毒的不结白菜亲本材料的筛选；

②不结球白菜材料的栽培；

③抗感亲本材料的杂交和子一代F1自交获得子二代F2群体，其中对抗性亲本为母本P1，感病亲本为父本P2；

④芜菁花叶病毒在不结球白菜上的接种和检测；

⑤不结球白菜材料的DNA提取；

⑥不结球白菜抗芜菁花叶病毒的抗感池建立，即建立抗病DNA池RP和感病DNA池SP；

⑦抗病基因的分子标记筛选；

⑧抗病基因连锁标记交换率计算；

⑨抗病基因连锁标记距离计算和图谱建立；

其中：

所述抗病基因的分子标记筛选，具体为：利用分子标记技术，对 P1、P2、F1、RP 和 SP 进行标记，针对抗病显性基因，筛选出 P1、F1、RP 有条带且 P2、SP 无条带的标记引物，再把这些引物用于标记 P1、P2、F1、RP、SP 和抗感病池中的 F2 个体，筛选出 P1、F1、RP 和抗病池 F2 个体有条带且 P2、SP 和感病池 F2 个体无条带的标记，即为抗病显性基因分子标记；针对抗病隐性基因，筛选出 P2、SP 有条带且 P1、F1、RP 无带的标记引物，再把这些引物用于标记 P1、P2、F1、RP、SP 和抗感病池中的 F2 个体，筛选出 P2、SP 和感病池 F2 个体有条带且 P1、F1、RP 和抗病池 F2 个体无条带的标记，即为抗病隐性基因分子标记；

所述抗病基因连锁标记交换率计算，具体为：利用抗病基因分子标记的对 P1、P2 和 F2 群体进行标记，统计每个 F2 个体的抗病基因分子标记的情况，再与酶联免疫吸附测定法对 F2 群体的检测结果相比较，所有不一致的个体之和与 F2 个体数的百分比即为交换率；

所述抗病基因连锁标记距离计算和图谱建立，具体为：把 F2 群体中抗病基

因分子标记和酶联免疫吸附测定法对 F2 群体的检测结果进行处理, 得出抗病基因与连锁标记间的距离, 形成和输出图谱。

2、根据权利要求 1 所述的不结球白菜抗芜菁花叶病毒基因的分子标记方法, 其特征是, 所述抗感芜菁花叶病毒的不结球白菜亲本材料的筛选, 具体为: 把从不结球白菜育种单位得到的高度抗和高度感芜菁花叶病毒的多份材料, 通过比较, 筛选出亲缘关系较远的抗病和感病材料用于研究。

3、根据权利要求 1 所述的不结球白菜抗芜菁花叶病毒基因的分子标记方法, 其特征是, 所述芜菁花叶病毒在不结球白菜上的接种和检测, 具体为: 索取到芜菁花叶病毒毒源后, 先进行增殖, 然后用缓冲液稀释病菌液, 把金刚砂放入病菌液中, 用纱布蘸取摩擦叶片表面, 再用高压水冲压叶片表面, 完成接种; 检测采用酶联免疫吸附测定法, 剪取少量叶片研碎, 放入检测试剂中, 凡是呈现阴性为无病毒, 呈现阳性的为有病毒。

4、根据权利要求 1 所述的不结球白菜抗芜菁花叶病毒基因的分子标记方法, 其特征是, 所述不结球白菜材料的 DNA 提取, 是指: 选取不结球白菜 2-3 叶期的一片真叶, 利用 CTAB 法提取 DNA, 4°C 保存备用。

5、根据权利要求 1 或 4 所述的不结球白菜抗芜菁花叶病毒基因的分子标记方法, 其特征是, 所述不结球白菜材料的 DNA 提取, 具体步骤为:

①叶片清洗: 用纯净水把剪取的叶片洗干净;

②叶片研磨: 冷冻, 加入液氮, 研磨, 转入 1.5 或 2ml 离心管;

③CTAB 液提取: 加入 60°C 预热的 CTAB 提取液 500 $\mu$ L, 60°C 水浴 30-60 分钟, 每 10 分钟混匀一次; 其中 CTAB 提取液, 其配备为: 称取 CTAB 20g 和氯化钠 81.9g 溶解于 100 ml 蒸馏水中, 加入 0.5mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> 的 EDTA 40ml 和 1mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> 的 Tris-HCl 100ml, 最后用蒸馏水定容至 1000ml, 使用前按体积 100: 1 加入巯基乙醇;

④去蛋白: 加-20°C 冰浴的酚、氯仿和异戊醇混合液 500 $\mu$ L 混匀, 4°C 条件下 12000 转离心 10 分钟, 取上清液; 其中酚、氯仿和异戊醇混合液, 其配备为: 先吸取体积比为 24 份的氯仿和 1 份的异戊醇, 制成氯仿异戊醇混合液, 再与 25 份的酚混合待用;

⑤沉淀: 加-20°C 冰浴的异丙醇 500  $\mu$  l, 混匀沉淀 30 分钟以上, 4°C 条件下 8000 转离心 10 分钟, 去上清液, 晾干;

⑥去 RNA: 加 RNA 酶 300 $\mu$ L, 37°C 消化 30 分钟; 其中 RNA 酶的制备为: 先配

制 TE 缓冲液, 吸取  $0.5\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 EDTA 0.2ml 和  $1\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 Tris-HCl 1ml, 用蒸馏水定容至 100ml, 再按体积比为 993: 7 加入  $10\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  的 RNA 酶;

⑦二次去蛋白: 加 $-20^{\circ}\text{C}$ 冰浴的氯仿异戊醇混合液 300 $\mu\text{L}$  混匀,  $4^{\circ}\text{C}$ 条件下 12000 转离心 10 分钟, 取上清液;

⑧去离子: 加 $-20^{\circ}\text{C}$ 冰浴的  $7.5\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  醋酸铵 100 $\mu\text{L}$  混匀,  $0^{\circ}\text{C}$ 冰浴 20 分钟,  $4^{\circ}\text{C}$ 条件下 10000 转离心 20 分钟, 取上清液;

⑨DNA 沉淀: 加 $-20^{\circ}\text{C}$ 冰浴的无水乙醇 900 $\mu\text{L}$ ,  $0^{\circ}\text{C}$ 冰浴 20 分钟,  $4^{\circ}\text{C}$ 条件下 8000 转离心 20 分钟, 去上清液, 获得 DNA 沉淀;

⑩DNA 洗涤: 对 DNA 沉淀用 $-20^{\circ}\text{C}$ 冰浴的 70%乙醇洗两遍, 晾干;

⑪溶解: 加 TE 溶解和稀释, DNA 浓度稀释至  $50\text{--}250\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ , 放  $4^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。

6、根据权利要求 1 所述的不结球白菜抗芜菁花叶病毒基因的分子标记方法, 其特征是, 所述抗病基因的分子标记筛选, 其中的分子标记技术包括 AFLP、SSR、SAMPL、SRAP、ISSR、RAPD、RFLP、TRAP、SNP、SCAR、CAPS 中一种。

7、根据权利要求 6 所述的不结球白菜抗芜菁花叶病毒基因的分子标记方法, 其特征是, 所述 AFLP 分子标记, 具体为:

①DNA 的酶切-连接: 采用 26 $\mu\text{L}$  反应体系, 分成两步, 13.5 $\mu\text{L}$  酶切反应体系包括 0.24U 的 EcoRI 酶、1.35 $\mu\text{L}$  缓冲液和 100ng 的 DNA, 在  $37^{\circ}\text{C}$ 水浴 6 小时; 连接反应体系包括 13.5 $\mu\text{L}$  酶切液、2.5pmol 的 EcoRI 接头、25pmol 的 MseI 接头、0.5U 的 T4-DNA 连接酶、2 $\mu\text{mol}$  的 ATP 和 2.6 $\mu\text{L}$  的缓冲液, 在室温下过夜, 产物稀释 1 倍,  $-20^{\circ}\text{C}$ 保存;

②预扩增: 采用 10 $\mu\text{L}$  反应体系进行 AFLP 预扩增:  $2.5\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{MgCl}_2$ ,  $0.2\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  dNTPs, 60ng 的预扩引物, 0.3 U Taq 聚合酶, 1 $\mu\text{L}$   $10\times\text{PCRBuffer}$ , 2.0 $\mu\text{L}$  酶切连接产物, 预扩增产物稀释 20 倍,  $-20^{\circ}\text{C}$ 保存。

预扩引物为两个, 序列是 E00 5'-GACTGCGTACCAATTC-3'

M00 5'-GATGAGTCCTGAGTAA-3'

PCR 扩增程序采用  $94^{\circ}\text{C}$ 预变性 2 分钟;  $94^{\circ}\text{C}$ 变性 30 秒,  $56^{\circ}\text{C}$ 复性 30 秒,  $72^{\circ}\text{C}$ 延伸 60 秒, 共 24 个循环; 最后  $72^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 分钟;

③选择性扩增: 采用 20 $\mu\text{L}$  反应体系,  $2.5\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{MgCl}_2$ ,  $0.2\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  dNTPs, 100ng 引物, 1.5U Taq 聚合酶, 2 $\mu\text{L}$   $10\times\text{PCRBuffer}$  (缓冲液), 6 $\mu\text{L}$  预扩增产物,

扩增产物与上样缓冲液 1:0.5 体积混合变性, -4℃保存待电泳, 其中上样缓冲液组成为: 甲酰胺 98ml、0.5M 的乙二胺四乙酸 2ml、溴酚蓝 0.25g、二甲苯腈 0.25g;

选扩引物为 EcoRI 和 MseI 引物组合, 序列是 E+2 个选择性碱基

M+3 个选择性碱基

PCR 扩增程序采用 94℃预变性 2 分钟; 94℃变性 30 秒, 65-56℃复性 30 秒, 每个循环降低 0.7℃, 72℃延伸 60 秒, 共 12 个循环; 94℃变性 30 秒, 56℃复性 30 秒, 72℃延伸 60 秒, 共 24 个循环; 最后 72℃延伸 30 分钟;

④电泳: 通过 6%的变性聚丙烯酰胺凝胶垂直电泳进行分离, 扩增产物吸取 5μL 点样后, 在 50W 的恒功率下电泳;

⑤银染显色。

8、根据权利要求 7 所述的不结球白菜抗芜菁花叶病毒基因的分子标记方法, 其特征是, 所述银染显色, 具体为:

①固定: 将带胶的玻璃板放入盛有 2 L 新配制的 0.5%的冰醋酸和 10%无水乙醇混合液的固定盒中, 在摇床上轻摇 20 分钟, 直至胶面上变性剂颜色褪掉;

②水洗: 放到盛有蒸馏水的水洗盒中, 轻摇 3 分钟;

③银染: 放入盛有 2L 0.2%的硝酸银染色液的染色盒中, 轻摇 30 分钟;

④再水洗: 从染色盒中取出胶板, 放到水洗盒中清洗 5-10 秒;

⑤显影: 迅速将胶板放入 2 L 1.5%氢氧化钠和 0.5% 甲醛的显影液中显影, 直至出现清晰的条带;

⑥定影: 2 L 0.75%无水碳酸钠定影液定影;

⑦取出胶板, 清水冲洗, 银染结束。

## 不结球白菜抗芜菁花叶病毒基因的分子标记方法

### 技术领域

本发明涉及的是一种农业技术领域的筛选病毒抗性基因分子标记的方法，具体是一种不结球白菜抗芜菁花叶病毒基因的分子标记方法。

### 背景技术

不结球白菜(又名青菜)是我国非常重要的大众化绿叶蔬菜，常年供应市场，但是，病毒病尤其是芜菁花叶病毒病对不结球白菜危害严重，芜菁花叶病毒通过蚜虫传播，蔓延迅速，系统性侵染植物，有潜伏期。发病后产生花叶和病斑，造成蔬菜品质下降和作物减产，无农药可根治，一经发生将损失惨重。现在常用的防治方法是防治蚜虫的发生和蔓延，防治成本较高，且已造成农药残留，不能通过检验供应市场。所以，选育抗芜菁花叶病毒的不结球白菜品种工作在许多年前就已开展，传统的杂交选育方法耗费大量的人力物力，但因芜菁花叶病毒有许多生理小种和变种，所以成效并不显著。现在，分子辅助育种技术已被广泛应用，借助分子标记可以对育种材料从DNA(脱氧核糖核酸)水平上进行选择，增强选择的针对性和准确性，省时省力，再结合传统遗传育种方法将加快选择进度，从而显著提高育种效率。

经对现有技术的检索发现，芜菁花叶病毒(TuMV)是1921年美国人Gardner等和Schultz同时在白菜上发现的，论文都发表在当年第22期《Journal of Agricultural Research》上，分别是第123页至124页的Turnip Mosaic和第173页至177页的A transmissible mosaic disease of Chinese cabbage。在芜菁花叶病毒抗性基因研究方面，国际上，Walsh等人最先标记和命名了芜菁花叶病毒抗性基因TuRB01和TuRB02，发表在《Theoretical and Applied Genetics》1999年第99期第1149页至1154页，题目为Characterisation of resistance to turnip mosaic virus in oilseed rapa (*Brassica napus*) and genetic mapping of TuRB01;此后，在*Brassica napus*(甘蓝类蔬菜)上陆续标记出TuRB03、TuRB04和TuRB05抗性基因和在白菜上标记出TuRB01b、ConTR01和retr01基因。

在国内，结球甘蓝抗芜菁花叶病毒相关基因 TuR2 基因被克隆，大白菜上的一对抗芜菁花叶病毒隐性基因被标记；最新的研究是 Zhang 等人标记了大白菜抗芜菁花叶病毒的 4 个数量性状 (Tu1-4)，发表在《Plant Breeding》2008 年第 127 期第 82 页至 86 页上，题目为 Quantitative trait loci analysis for resistance against Turnip mosaic virus based on a doubled-haploid population in Chinese cabbage。国内外关于抗芜菁花叶病毒基因的研究虽已经开展了十年，但不结球白菜抗芜菁花叶病毒基因的研究却没有报道过。

#### 发明内容

本发明的目的在于针对现有技术的不足，提供一种不结球白菜抗芜菁花叶病毒基因的分子标记方法，在不结球白菜上开展了抗芜菁花叶病毒基因的研究工作，为不结球白菜抗病育种提供依据。

本发明是通过以下技术方案实现的，本发明包括步骤如下：

- ①抗感芜菁花叶病毒的不结白菜亲本材料的筛选；
- ②不结球白菜材料的栽培；
- ③抗感亲本材料的杂交和F1（子一代）自交获得F2群体；
- ④芜菁花叶病毒在不结球白菜上的接种和检测；
- ⑤不结球白菜材料的DNA提取；
- ⑥不结球白菜抗芜菁花叶病毒的抗感池建立；
- ⑦抗病基因的分子标记筛选；
- ⑧抗病基因连锁标记交换率计算；
- ⑨抗病基因连锁标记距离计算和图谱建立。

所述抗感芜菁花叶病毒的不结白菜亲本材料的筛选，具体为：把从不结球白菜育种单位得到的高抗和高感芜菁花叶病毒的多份材料，利用分子标记（如 AFLP、SRAP）的方法进行亲缘关系远近比较，筛选出亲缘关系较远的抗病和感病材料用于研究。

所述不结球白菜材料的栽培，具体为：不结球白菜种子，要先在 25℃ 培养箱中催芽，然后播种到塑料穴盘中，长出幼苗后，要进行低温春化，再放置到具有防虫网的玻璃温室中培养，白天温度为 25-30℃，夜间温度为 15-20℃，光照、水分和氧气要充足。

所述抗感亲本材料的杂交和 F1 自交，具体为：开花后的抗感病材料，以抗

性亲本为母本 (P1), 感病亲本为父本 (P2), 母本都去掉雄蕊, 用父本的花粉人工授到母本的雌蕊柱头上, 所结种子为 F1。F1 开花后, 人工用雄蕊花粉授到同一朵花的雌蕊柱头上, 所结种子为 F2 (子二代)。

所述芜菁花叶病毒在不结球白菜上的接种和检测, 具体为: 索取到芜菁花叶病毒毒源后, 先进行增殖, 然后用缓冲液稀释病菌液, 把金刚砂放入病菌液中, 用纱布蘸取摩擦叶片表面, 再用高压水冲压叶片表面, 完成接种。检测采用酶联免疫吸附测定法, 剪取少量叶片研碎, 放入检测试剂中, 凡是呈现阴性为无病毒, 呈现阳性的为有病毒。

所述不结球白菜材料的 DNA 提取, 具体为: 选取不结球白菜 2-3 叶期的一片真叶, 利用 CTAB (溴代十六烷基三甲胺法) 法提取 DNA, 4℃ 保存备用。

所述不结球白菜抗芜菁花叶病毒的抗感池建立, 具体为: 根据酶联免疫吸附测定法检测结果和肉眼观察到的病情分级情况, 各选取 10-15 株高度抗病和高度感病 F2 单株, 将其预先提取的叶片 DNA 混合, 建立抗病 DNA 池 (RP) 和感病 DNA 池 (SP)。

所述抗病基因的分子标记筛选, 具体为: 利用分子标记技术, 对 P1、P2、F1、RP 和 SP 进行标记, 针对抗病显性基因, 筛选出 P1、F1、RP 有条带且 P2、SP 无条带的标记引物, 再把这些引物用于标记 P1、P2、F1、RP、SP 和抗感病池中的 F2 个体, 筛选出 P1、F1、RP 和抗病池 F2 个体有条带且 P2、SP 和感病池 F2 个体无条带的标记, 即为抗病显性基因分子标记; 针对抗病隐性基因, 筛选出 P2、SP 有条带且 P1、F1、RP 无带的标记引物, 再把这些引物用于标记 P1、P2、F1、RP、SP 和抗感病池中的 F2 个体, 筛选出 P2、SP 和感病池 F2 个体有条带且 P1、F1、RP 和抗病池 F2 个体无条带的标记, 即为抗病隐性基因分子标记。

所述抗病基因连锁标记交换率计算, 具体为: 利用抗病基因分子标记对 P1、P2 和 F2 群体进行标记, 统计每个 F2 个体的抗病基因分子标记的情况。针对抗病显性基因的标记引物, 有带的标为与 P1 一致, 没有带的标为与 P2 一致; 针对抗病隐性基因的标记引物, 有带的标为与 P2 一致, 没有带的标为与 P1 一致。再与酶联免疫吸附测定法对 F2 群体的检测结果相比较, 所有不一致的个体之和与 F2 个体数的百分比即为交换率。

所述抗病基因连锁标记距离计算和图谱建立, 具体为: 利用 MapMarker 软件, 把 F2 群体中抗病基因分子标记和酶联免疫吸附测定法对 F2 群体的检测结果都换

算成 A=1 (与 P1 一致)、B=2 (与 P2 一致)、0=- (未电泳出任何条带), 用软件处理数据, 可以得出抗病基因与连锁标记间的距离和相关数值, 然后再用软件根据数据形成和输出图谱。

本发明中, 以不结球白菜为材料, 通过建立抗病池和感病池, 将分子标记技术 (如 AFLP、SSR、SAMPL、SRAP、ISSR、RAPD、RFLP、TRAP、SNP、SCAR、CAPS 等) 应用于对不结球白菜抗感芜菁花叶病毒的亲本筛选和抗病基因连锁基因的标记, 不同的分子标记有不同的反应体系和扩增程序, 通过试验筛选合适的引物或引物组合, 用于抗病基因的标记; 亲本杂交、F1 自交和病毒接种都要在特定的时间内人工完成; 不结球白菜 F2 个体感病与否要通过酶联免疫吸附测定法检测, 根据检测结果和目测的病情级别, 挑选高度抗病和感病单株建立抗感池, 利用 CTAB 法提取叶片 DNA, 混合 DNA 建立抗病 DNA 池和感病 DNA 池; 抗病基因与连锁标记间的交换率和距离的计算以及连锁图谱的建立都要通过 MapMarker 软件完成。本发明筛选不结球白菜抗芜菁花叶病毒的抗性基因, 为后续开展抗病基因在染色体上的定位、抗病基因克隆和抗病基因导入感病材料育种研究奠定基础, 从而为不结球白菜抗病的分子辅助育种提供依据。

#### 附图说明

图 1 为本发明实施例不结球白菜抗芜菁花叶病毒分子标记图

图 2 为本发明实施例不结球白菜抗芜菁花叶病毒基因与连锁标记图谱图

#### 具体实施方式

下面结合附图对本发明的实施例作详细说明: 本实施例在以本发明技术方案为前提下进行实施, 给出了详细的实施方式和具体过程, 但本发明的保护范围不限于下述的实施例。

#### 实施例 1

材料的筛选: 以来自上海市农业科学院园艺研究所的不结球白菜为试验材料, 抗病材料 5 份, 感病材料 3 份, 利用 AFLP (Amplified fragment length polymorphism, 扩增片段长度多态性) 进行标记, 利用 DPS 数据处理系统, 根据 UPGMA 构建聚类树状图, 选择遗传相似性最低即亲缘关系最远抗病材料 Q048 和感病材料 A168-5D 作为本实施例的材料。采用的材料和样品可以通过购买等公开途径从上海市农业科学院园艺研究所获得。

材料的培养: 挑选饱满的种子催芽后, 播到由草炭、蛭石及有机肥 (体积比

4:4:1) 混合的基质中, 浇透水后打 0.5 厘米深的孔, 将种子放入, 然后覆 0.5 厘米厚的草炭。将穴盘放入带有防虫网的温室里进行培养, 白天温度为 25-30℃, 夜间温度为 15-20℃。开花后, 以 Q048 为母本 (P1), A168-5D 为父本 (P2), 母本都去掉雄蕊, 用父本的花粉人工授到母本的雌蕊柱头上, 所结种子为 F1。F1 开花后, 人工用雄蕊花粉授到同一朵花的雌蕊柱头上, 所结种子为 F2。挑选 200 粒饱满的 F2 种子和 P1、P2、F1 各 10 粒种子播种到穴盘里, 长到 2-3 片真叶后, 剪取 1 片用于提取 DNA, 待新叶长出后准备接种芜菁花叶病毒。

病毒的接种和检测: 从保存芜菁花叶病毒沪 1 株系毒源的寄主植物上剪取幼嫩的重病叶, 每 1g (克) 病叶加入 pH=7 的  $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  (摩尔每升) 的磷酸缓冲液 4 ml (毫升), 在消毒的研钵内充分研碎, 放入适量 600 目的金刚砂, 用纱布蘸取摩擦叶片表面, 再用高压水冲压叶片表面, 完成接种。接种 1 周后, 采用酶联免疫吸附测定法 (ELISA) 进行病毒检测, 剪取半个叶片研碎, 放入检测试剂中, 凡是呈现阴性为无病毒, 呈现阳性的为有病毒。本实施例的检测结果显示呈阳性的个体数与呈阴性的个体数之比接近 3: 1, 根据孟德尔定律可判断为不结球白菜抗芜菁花叶病毒基因为显性基因。2 周后, 用肉眼观察进行病情分级, 0 级为抗病单株, 且 ELISA 检测为阴性; 1-3 级为感病单株, ELISA 检测都为阳性, 1 级为幼嫩叶片花叶, 2 级为系统性花叶, 3 级为花叶中有坏死斑或植株枯死。

DNA 的提取: 采用 CTAB 方法提取 DNA, 具体操作步骤如下:

1、叶片清洗: 用纯净水把剪取的叶片洗干净;

2、叶片研磨: 冷冻, 加入液氮, 研磨, 转入 1.5 或 2ml 离心管;

3、预先配备 CTAB 提取液: 称取 CTAB 20g 和氯化钠 81.9g 溶解于 100ml 蒸馏水中, 加入  $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 EDTA 40ml 和  $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 Tris-HCl 100ml, 最后用蒸馏水定容至 1000ml, 4℃ 保存备用。使用前按体积 100: 1 加入巯基乙醇;

4、CTAB 液提取: 加入 60℃ 预热的 CTAB 提取液 500 $\mu\text{L}$  (微升), 60℃ 水浴 30-60 分钟, 每 10 分钟混匀一次;

5、去蛋白: 加 -20℃ 冰浴的酚: 氯仿: 异戊醇 (体积比 25:24:1) 500 $\mu\text{L}$  混匀, 4℃ 条件下 12000 转离心 10 分钟, 取上清液;

6、沉淀: 加 -20℃ 冰浴的异丙醇 500 $\mu\text{L}$ , 混匀沉淀 30 分钟以上, 4℃ 条件下 8000 转离心 10 分钟, 去上清液, 晾干;

7、预先配制 RNA 酶液:吸取  $0.5\text{mol L}^{-1}$  的 EDTA 0.2ml 和  $1\text{mol L}^{-1}$  的 Tris-HCl 1ml, 用蒸馏水定容至 100ml, 制备 TE 缓冲液, 再按体积比为 993: 7 加入  $10\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  的 RNA 酶;

8、去 RNA (核糖核酸): 加 RNA 酶液 300 $\mu\text{L}$ , 37 $^{\circ}\text{C}$  消化 30 分钟;

9、二次去蛋白: 加-20 $^{\circ}\text{C}$  冰浴的氯仿:异戊醇 (体积比 24:1) 300 $\mu\text{L}$  混匀, 4 $^{\circ}\text{C}$  条件下 12000 转离心 10 分钟, 取上清液;

10、去离子: 加-20 $^{\circ}\text{C}$  冰浴的  $7.5\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  醋酸铵 100 $\mu\text{L}$  混匀, 0 $^{\circ}\text{C}$  冰浴 20 分钟, 4 $^{\circ}\text{C}$  条件下 10000 转离心 20 分钟, 取上清液;

11、DNA 沉淀: 加-20 $^{\circ}\text{C}$  冰浴的无水乙醇 900 $\mu\text{L}$ , 0 $^{\circ}\text{C}$  冰浴 20 分钟, 4 $^{\circ}\text{C}$  条件下 8000 转离心 20 分钟, 去上清液, 获得 DNA 沉淀;

12、DNA 洗涤: 对 DNA 沉淀用-20 $^{\circ}\text{C}$  冰浴的 70%乙醇洗两遍, 晾干;

13、溶解: 加 TE 溶解和稀释, DNA 浓度稀释至  $50\text{-}250\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ , 放 4 $^{\circ}\text{C}$  冰箱保存。

抗感池建立:根据 ELISA 检测结果和肉眼观察到的病情分级情况, 各选取 10 株 0 级和 2 级的 F2 单株 (本实施例中无 3 级单株), 将其预先提取的叶片 DNA 混合, 建立抗病 DNA 池 (RP) 和感病 DNA 池 (SP)。

AFLP 分子标记筛选: 用 AFLP 分子标记技术, 对 P1、P2、F1、RP 和 SP 进行标记, 筛选出 P1、F1、RP 有条带且 P2、SP 无条带的标记引物组合, 再把这些引物用于标记 F1、RP、SP 和抗感病池中的 F2 个体, 筛选出 P1、F1、RP 和抗病池 F2 个体有条带且 P2、SP 和感病池 F2 个体无条带的标记, 即为抗病基因的分子标记。AFLP 技术的具体步骤如下:

1、DNA 的酶切-连接: 采用 26 $\mu\text{L}$  反应体系, 分成两步, 13.5 $\mu\text{L}$  酶切反应体系包括 0.24U 的 EcoRI 酶、1.35 $\mu\text{L}$  缓冲液和 100ng 的 DNA, 在 37 $^{\circ}\text{C}$  水浴 6 小时; 连接反应体系包括 13.5 $\mu\text{L}$  酶切液、2.5 $\mu\text{mol}$  的 EcoRI 接头、25 $\mu\text{mol}$  的 MseI 接头、0.5U 的 T4-DNA 连接酶、2 $\mu\text{mol}$  的 ATP 和 2.6 $\mu\text{L}$  的缓冲液, 在室温下 (20 $^{\circ}\text{C}$  左右) 过夜。产物稀释 1 倍, -20 $^{\circ}\text{C}$  保存。

2、预扩增: 采用 10 $\mu\text{L}$  反应体系进行 AFLP 预扩增:  $2.5\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{MgCl}_2$ ,  $0.2\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  dNTPs, 60ng 的预扩引物, 0.3 U Taq 聚合酶, 1 $\mu\text{L}$  10 $\times$ PCRBuffer (缓冲液), 2.0 $\mu\text{L}$  酶切连接产物。预扩增产物稀释 20 倍, -20 $^{\circ}\text{C}$  保存。

预扩引物为两个, 序列是 E00 5'-GACTGCGTACCAATTC-3'

M00 5'-GATGAGTCCTGAGTAA-3'

PCR 扩增程序采用 94℃ 预变性 2 分钟；94℃ 变性 30 秒，56℃ 复性 30 秒，72℃ 延伸 60 秒，共 24 个循环；最后 72℃ 延伸 30 分钟。

3、选择性扩增：采用 20μL 反应体系，2.5mmol·L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>，0.2mmol·L<sup>-1</sup> dNTPs，100ng 引物，1.5U Taq 聚合酶，2μL 10×PCRBuffer（缓冲液），6μL 预扩增产物。扩增产物与上样缓冲液（甲酰胺 98ml、0.5M 的乙二胺四乙酸 2ml、溴酚蓝 0.25g、二甲苯腈 0.25g）1:0.5 体积混合变性，-4℃ 保存待电泳。

引物为 600 个组合，25 个含 2 个选择性碱基的 EcoRI 引物和 24 个含 3 个选择性碱基的 MseI 引物。

PCR 扩增程序采用 94℃ 预变性 2 分钟；94℃ 变性 30 秒，65-56℃ 复性 30 秒（每个循环降低 0.7℃），72℃ 延伸 60 秒，共 12 个循环；94℃ 变性 30 秒，56℃ 复性 30 秒，72℃ 延伸 60 秒，共 24 个循环；最后 72℃ 延伸 30 分钟。

4、电泳：通过 6% 的变性聚丙烯酰胺凝胶垂直电泳进行分离，扩增产物吸取 5μL 点样后，在 50W 的恒功率下电泳。

5、银染显色：

①固定：将带胶的玻璃板放入盛有 2 L 新配制的 0.5% 的冰醋酸和 10% 无水乙醇混合液的固定盒中，在摇床上轻摇 20 分钟，直至胶面上二甲苯腈颜色全部褪掉。

②水洗：放到盛有蒸馏水的水洗盒中，轻摇 3 分钟。

③银染：放入盛有 2L 0.2% 的硝酸银染色液的染色盒中，轻摇 30 分钟。

④再水洗：从染色盒中取出胶板，放到水洗盒中清洗 5-10 秒。

⑤显影：迅速将胶板放入 2 L 1.5% 氢氧化钠和 0.5% 甲醛的显影液中显影，直至出现清晰的条带。

⑥定影：2 L 0.75% 无水碳酸钠定影液定影。

⑦取出胶板，清水冲洗，银染结束。

结果：

利用 AFLP 分子标记技术，从 600 个引物组合中筛选出 P1、F1 有条带且 P2 无条带的标记引物 232 个组合，从中又筛选出了 P1、F1、RP 有条带且 P2、SP 无条带的标记引物 56 个组合，最终筛选出了 2 个引物组合在 P1、F1、RP 和抗病

池 F2 个体有条带且 P2、SP 和感病池 F2 个体无条带的标记，即为抗病基因的分子标记。引物 E1M1 序列为 E1: 5'-GACTGCGTACCAATTCACC-3' (E+CC),

M1: 5'- GATGAGTCCTGAGTAACTT-3' (M+CTT);

E2M2 序列为 E2: 5'- GACTGCGTACCAATTCACA-3' (E+CA),

M2: 5'- GATGAGTCCTGAGTAACAA-3' (M+CAA)。

引物 E1M1 的结果如图 1，图 1 中 M 代表标准 DNA 标记，不同条带代表不同 DNA 片段的分子量，R1-10 为 F2 抗病个体，S1-10 为 F2 感病个体，200bp (碱基对) 代表此处 DNA 片段的分子量为 200bp。由图 1 可直观看出在约 190bp 处，红色箭头所指的抗病亲本 P1 和子一代 F1 以及抗病池 RP 和 F2 抗病个体 R1-10 都有明显的条带，而感病亲本 P2 和感病池 SP 及 F2 感病个体 S1-10 都无条带，这条差异带非常清晰，直观地说明此标记与不结球白菜抗芜菁花叶病毒基因紧密连锁，为后续的研究提供了依据。

## 实施例 2

材料的筛选：以来自上海农业科学院园艺研究所的不结球白菜为试验材料，抗病材料 5 份，感病材料 3 份，利用 AFLP (Amplified fragment length polymorphism, 扩增片段长度多态性) 进行标记，利用 DPS 数据处理系统，根据 UPGMA 构建聚类树状图，选择遗传相似性最低即亲缘关系最远抗病材料 Q048 和感病材料 A168-5D 作为本实施例的材料。

材料的培养：挑选饱满的种子催芽后，播到由草炭、蛭石及有机肥 (体积比 4:4:1) 混合的基质中，浇透水后打 0.5 厘米深的孔，将种子放入，然后覆 0.5 厘米厚的草炭。将穴盘放入带有防虫网的温室里进行培养，白天温度为 25-30℃，夜间温度为 15-20℃。开花后，以 Q048 为母本 (P1)，A168-5D 为父本 (P2)，母本都去掉雄蕊，用父本的花粉人工授到母本的雌蕊柱头上，所结种子为 F1。F1 开花后，人工用花粉授到同一朵花的雌蕊柱头上，所结种子为 F2。挑选 200 粒饱满的 F2 种子和 P1、P2、F1 各 10 粒种子播种到穴盘里，长到 2-3 片真叶后，剪取 1 片用于提取 DNA，待新叶长出后准备接种芜菁花叶病毒。

病毒的接种：从保存芜菁花叶病毒沪 1 株系毒源的寄主植物上剪取幼嫩的重病叶，每 1g 病叶加入 pH=7 的 0.05 mol · L<sup>-1</sup> 的磷酸缓冲液 4 ml，在消毒的研钵内充分研碎，放入适量 600 目的金刚砂，用纱布蘸取摩擦叶片表面，再用高压水

冲压叶片表面，完成接种。接种 1 周后，采用酶联免疫吸附测定法（ELISA）进行病毒检测，剪取半个叶片研碎，放入检测试剂中，凡是呈现阴性为无病毒，呈现阳性的为有病毒。2 周后，用肉眼观察进行病情分级，0 级为抗病单株，且 ELISA 检测为阴性；1-3 级为感病单株，ELISA 检测都为阳性，1 级为幼嫩叶片花叶，2 级为系统性花叶，3 级为花叶中有坏死斑或植株枯死。

DNA 的提取：采用 CTAB 方法提取 DNA，具体操作步骤如下：

- 1、叶片清洗：用纯净水把剪取的叶片洗干净；
- 2、叶片研磨：冷冻，加入液氮，研磨，转入 1.5 或 2ml 离心管；
- 3、预先配备 CTAB 提取液：称取 CTAB 20g 和氯化钠 81.9g 溶解于 100 ml 蒸馏水中，加入  $0.5\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 EDTA 40ml 和  $1\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 Tris-HCl 100ml，最后用蒸馏水定容至 1000ml， $4^{\circ}\text{C}$  保存备用。使用前按体积 100: 1 加入巯基乙醇；
- 4、CTAB 液提取：加入  $60^{\circ}\text{C}$  预热的 CTAB 提取液 500 $\mu\text{L}$ ， $60^{\circ}\text{C}$  水浴 30-60 分钟，每 10 分钟混匀一次；
- 5、去蛋白：加  $-20^{\circ}\text{C}$  冰浴的酚:氯仿:异戊醇（体积比 25:24:1）500 $\mu\text{L}$  混匀， $4^{\circ}\text{C}$  条件下 12000 转离心 10 分钟，取上清液；
- 6、沉淀：加  $-20^{\circ}\text{C}$  冰浴的异丙醇 500 $\mu\text{L}$ ，混匀沉淀 30 分钟以上， $4^{\circ}\text{C}$  条件下 8000 转离心 10 分钟，去上清液，晾干；
- 7、预先配制 RNA 酶液：吸取  $0.5\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 EDTA 0.2ml 和  $1\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 Tris-HCl 1ml，用蒸馏水定容至 100ml，制备 TE 缓冲液，再按体积比为 993: 7 加入  $10\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  的 RNA 酶；
- 8、去 RNA（核糖核酸）：加 RNA 酶液 300 $\mu\text{L}$ ， $37^{\circ}\text{C}$  消化 30 分钟；
- 9、二次去蛋白：加  $-20^{\circ}\text{C}$  冰浴的氯仿:异戊醇（体积比 24:1）300 $\mu\text{L}$  混匀， $4^{\circ}\text{C}$  条件下 12000 转离心 10 分钟，取上清液；
- 10、去离子：加  $-20^{\circ}\text{C}$  冰浴的  $7.5\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  醋酸铵 100 $\mu\text{L}$  混匀， $0^{\circ}\text{C}$  冰浴 20 分钟， $4^{\circ}\text{C}$  条件下 10000 转离心 20 分钟，取上清液；
- 11、DNA 沉淀：加  $-20^{\circ}\text{C}$  冰浴的无水乙醇 900 $\mu\text{L}$ ， $0^{\circ}\text{C}$  冰浴 20 分钟， $4^{\circ}\text{C}$  条件下 8000 转离心 20 分钟，去上清液，获得 DNA 沉淀；
- 12、DNA 洗涤：对 DNA 沉淀用  $-20^{\circ}\text{C}$  冰浴的 70%乙醇洗两遍，晾干；
- 13、溶解：加 TE 溶解和稀释，DNA 浓度稀释至  $50\text{-}250\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ，放  $4^{\circ}\text{C}$  冰箱保存。

抗感池建立:根据 ELISA 检测结果和肉眼观察到的病情分级情况,各选取 10 株 0 级和 2 级的 F2 单株(本实施例中无 3 级别单株),将其预先提取的叶片 DNA 混合,建立抗病 DNA 池(RP)和感病 DNA 池(SP)。

AFLP 分子标记筛选:用 AFLP 分子标记技术,对 P1、P2、F1、RP 和 SP 进行标记,筛选出 P1、F1、RP 有条带且 P2、SP 无条带的标记引物组合,再把这些引物用于标记 F1、RP、SP 和抗感病池中的 F2 个体,筛选出 P1、F1、RP 和抗病池 F2 个体有条带且 P2、SP 和感病池 F2 个体无条带的标记,即为抗病基因的分子标记。AFLP 技术的具体步骤如下:

1、DNA 的酶切-连接:采用 26 $\mu$ L 反应体系,分成两步,13.5 $\mu$ L 酶切反应体系包括 0.24U 的 EcoRI 酶、1.35 $\mu$ L 缓冲液和 100ng 的 DNA,在 37 $^{\circ}$ C 水浴 6 小时;连接反应体系包括 13.5 $\mu$ L 酶切液、2.5pmol 的 EcoRI 接头、25pmol 的 MseI 接头、0.5U 的 T4-DNA 连接酶、2 $\mu$ mol 的 ATP 和 2.6 $\mu$ L 的缓冲液,在室温下(20 $^{\circ}$ C 左右)过夜。产物稀释 1 倍,-20 $^{\circ}$ C 保存。

2、预扩增:采用 10 $\mu$ L 反应体系进行 AFLP 预扩增:2.5 mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>, 0.2mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup> dNTPs, 60ng 的预扩引物,0.3 U Taq 聚合酶,1 $\mu$ L 10 $\times$ PCRBuffer (缓冲液),2.0 $\mu$ L 酶切连接产物。预扩增产物稀释 20 倍,-20 $^{\circ}$ C 保存。

预扩引物为两个,序列是 E00 5'-GACTGCGTACCAATTC-3'

M00 5'-GATGAGTCCTGAGTAA-3'

PCR 扩增程序采用 94 $^{\circ}$ C 预变性 2 分钟;94 $^{\circ}$ C 变性 30 秒,56 $^{\circ}$ C 复性 30 秒,72 $^{\circ}$ C 延伸 60 秒,共 24 个循环;最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 分钟。

3、选择性扩增:采用 20 $\mu$ L 反应体系,2.5mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>, 0.2mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup> dNTPs, 100ng 引物,1.5U Taq 聚合酶,2 $\mu$ L 10 $\times$ PCRBuffer (缓冲液),6 $\mu$ L 预扩增产物。扩增产物与上样缓冲液(甲酰胺 98ml、0.5M 的乙二胺四乙酸 2ml、溴酚蓝 0.25g、二甲苯腈 0.25g) 1:0.5 体积混合变性,-4 $^{\circ}$ C 保存待电泳。

PCR 扩增程序采用 94 $^{\circ}$ C 预变性 2 分钟;94 $^{\circ}$ C 变性 30 秒,65-56 $^{\circ}$ C 复性 30 秒(每个循环降低 0.7 $^{\circ}$ C),72 $^{\circ}$ C 延伸 60 秒,共 12 个循环;94 $^{\circ}$ C 变性 30 秒,56 $^{\circ}$ C 复性 30 秒,72 $^{\circ}$ C 延伸 60 秒,共 24 个循环;最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 分钟。

4、电泳:通过 6%的变性聚丙烯酰胺凝胶垂直电泳进行分离,扩增产物吸取 5 $\mu$ L 点样后,在 50W 的恒功率下电泳。

5、银染显色:

①固定：将带胶的玻璃板放入盛有 2 L 新配制的 0.5%的冰醋酸和 10%无水乙醇混合液的固定盒中，在摇床上轻摇 20 分钟，直至胶面上二甲苯腈颜色全部褪掉。

②水洗：放到盛有蒸馏水的水洗盒中，轻摇 3 分钟。

③银染：放入盛有 2L 0.2%的硝酸银染色液的染色盒中，轻摇 30 分钟。

④再水洗：从染色盒中取出胶板，放到水洗盒中清洗 5-10 秒。

⑤显影：迅速将胶板放入 2 L 1.5%氢氧化钠和 0.5% 甲醛的显影液中显影，直至出现清晰的条带。

⑥定影：2 L 0.75%无水碳酸钠定影液定影。

⑦取出胶板，清水冲洗，银染结束。

抗病基因连锁标记交换率计算：利用抗病基因分子标记的引物 E1 (E+CC) M1 (M+CTT) 和 E2 (E+CA) M2 (M+CAA) 对 P1、P2 和 F2 群体进行标记，统计每个 F2 个体的抗病基因分子标记的情况，有带的标为与 P1 一致，没有带的标为与 P2 一致。再与酶联免疫吸附测定法对 F2 群体的检测结果相比较，所有不一致的个体之和与 F2 个体数的百分比即为交换率。

抗病基因连锁标记距离计算和图谱建立：利用 MapMarker 软件，把 F2 群体中抗病基因分子标记和酶联免疫吸附测定法对 F2 群体的检测结果都换算成 A=1（与 P1 一致）、B=2（与 P2 一致）、0=-（模糊不清的条带），用软件处理数据，得出抗病基因与连锁标记间的距离，根据数据形成的图谱如图 2。

结果：

利用 AFLP 分子标记技术，筛选出的抗病基因的分子标记引物 E1M1 (E+CC) M1 (M+CTT) 和 E2 (E+CA) M2 (M+CAA) 对 P1、P2 和 F2 群体进行标记，引物 E1M1 的抗病基因连锁标记交换率为 18.33%，引物 E2M2 的抗病基因连锁标记交换率为 22.78%。利用 MapMarker 软件进行数据处理，由图 2 可直观地看出，抗芜菁花叶病毒沪 1 株系的基因 TuR 与引物 E1M1 连锁标记间的距离为 23.7 cM(厘摩尔)，抗病基因 TuR 与引物 E2M2 连锁标记间的距离为 29.3cM。

M P1 P2 F1 RP SP R1 R2 R3 R4 R5 R6 R7 R8 R9 R10 S1 S2 S3 S4 S5 S6 S7 S8 S9 S10 M

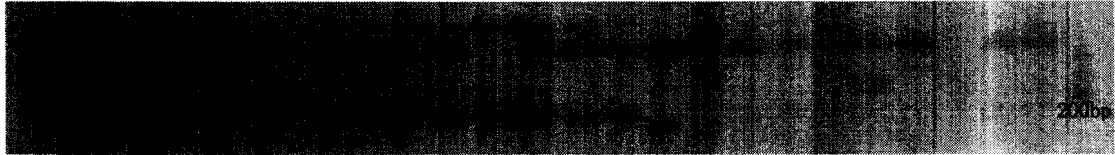


图 1

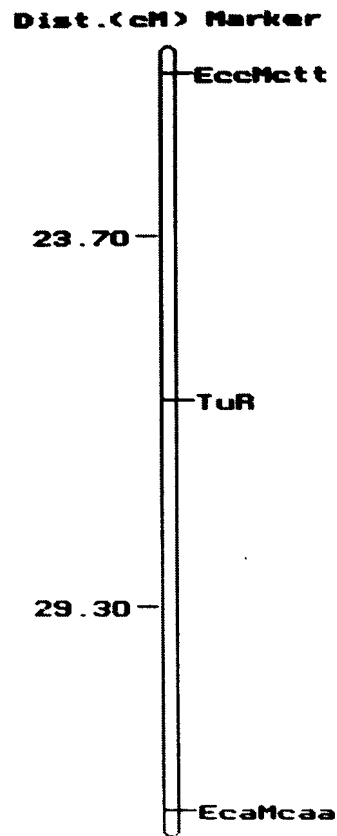


图 2

专利名称(译)	不结球白菜抗芜菁花叶病毒基因的分子标记方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN101392293A</a>	公开(公告)日	2009-03-25
申请号	CN200810200421.3	申请日	2008-09-25
[标]申请(专利权)人(译)	上海交通大学		
申请(专利权)人(译)	上海交通大学		
当前申请(专利权)人(译)	上海交通大学		
[标]发明人	陈火英 王新华 刘杨 庄天明		
发明人	陈火英 王新华 刘杨 庄天明		
IPC分类号	C12Q1/68 G01N33/53 G01N21/78		
代理人(译)	王锡麟 王桂忠		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

一种不结球白菜抗芜菁花叶病毒基因的分子标记方法，包括抗感芜菁花叶病毒的不结球白菜亲本材料的筛选和栽培、亲本杂交和F1自交、芜菁花叶病毒的接种和检测、不结球白菜材料的DNA提取和抗感池建立、抗病基因的分子标记筛选、抗病基因连锁标记交换率和距离的计算以及抗病基因连锁标记图谱的建立等。其中：分子标记技术应用于对不结球白菜抗感芜菁花叶病毒的亲本筛选和抗病基因连锁基因的标记，不同的分子标记有不同的反应体系和扩增程序。本发明构建了以不结球白菜为材料的抗芜菁花叶病毒基因的分子标记程序和体系，为不结球白菜抗病基因在染色体上的定位、抗病基因克隆和抗病分子辅助育种研究提供了依据。

M P1 P2 F1 RP SP R1 R2 R3 R4 R5 R6 R7 R8 R9 R10 S1 S2 S3 S4 S5 S6 S7 S8 S9 S10 M

