



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 108254569 B

(45)授权公告日 2020.06.05

(21)申请号 201711448368.4

(51)Int.Cl.

(22)申请日 2017.12.27

G01N 33/68(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

G01N 33/543(2006.01)

申请公布号 CN 108254569 A

G01N 33/535(2006.01)

(43)申请公布日 2018.07.06

审查员 贾静

(73)专利权人 浙江省农业科学院

地址 310021 浙江省杭州市江干区石桥路
198号

专利权人 天台县特产技术推广站

(72)发明人 陈琳 张彩萍 于少芳 胡文君

裘晓云 卢红伶 沈国新

(74)专利代理机构 杭州杭诚专利事务所有限公
司 33109

代理人 尉伟敏

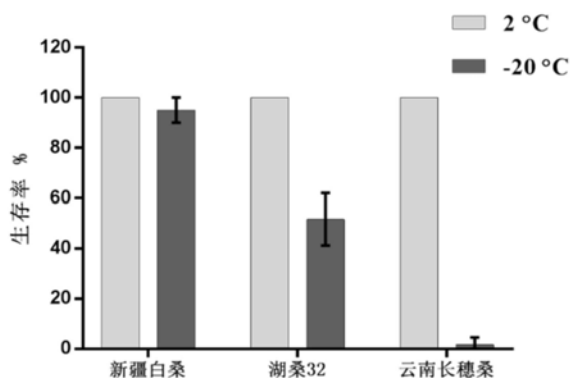
权利要求书1页 说明书6页 附图2页

(54)发明名称

一种检测桑树品种抗寒能力的方法

(57)摘要

本发明涉及生物技术领域,尤其涉及一种检测桑树品种抗寒能力的方法,通过特定AKR2A蛋白序列制作抗体,将拟南芥AKR2A抗体包被在96孔聚苯乙烯反应板。利用特定的桑叶组织处理后,获得AKR2A蛋白抗原,按编号加入抗体包被的反应板上,与AKR2A抗体起免疫反应,再与辣根过氧化物酶标记的二抗起反应,经过底物显色以检测桑树中特异性AKR2A蛋白。通过检测桑树中AKR2A蛋白,对比分析发现桑树抗低温胁迫能力的高低与AKR2A基因或蛋白含量呈正相关关系,通过桑树顶端1~2片叶片中AKR2A蛋白含量的检测指示桑树抗寒能力。本发明建立直接、快速、可靠的比较桑树抗寒能力检测方法,将其用于抗寒桑树品种的筛选、分子育种,以及桑种质(品种)的远程和超远程引种,具有巨大的学术和经济价值。



1. 一种检测桑树品种抗寒能力的方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 抗体制作:在拟南芥Tair Database中检索AKR2A的cDNA序列,去除N端1-198碱基,配上起始碱基ATG连接AKR2A第199碱基到终止密码的序列;以PET21为质粒,BL21为菌种生产拟南芥AKR2A目标片段蛋白质;制作拟南芥AKR2A目标片段抗体;

(2) 抗体包被:采用pH 9.6的碳酸盐缓冲液按1:1000稀释拟南芥AKR2A目标片段抗体,以100 μ L/孔的浓度包被96孔聚苯乙烯ELISA反应板,获得ELISA反应的抗体基质,置于4 $^{\circ}$ C备用;

(3) 用5%脱脂奶粉封闭抗体包被板,每孔200 μ L,室温下孵育1 h;

(4) 桑树AKR2A抗原的制备:取0.2 g桑树样品在液氮冷冻状态下于研钵中研磨后,用0.2 mL第一提取液振荡30 s,混合均匀,冰上静置0.5 h;取出后4 $^{\circ}$ C下离心,将上清液移至另一试管中,沉淀物用0.2 mL第二提取液悬浮得到悬浮液;将上述悬浮液煮沸10 min,置于冰上冷却,4 $^{\circ}$ C下离心,取上清液;将上述2次上清液合并,获得桑树AKR2A抗原;

(5) 将桑树AKR2A抗原与阴阳性对照,以PBST溶液1:1稀释后,按编号加入拟南芥AKR2A目标片段抗体包被的96孔聚苯乙烯反应板的反应孔中,每个反应孔加100 μ L,阴阳性重复两孔,22~28 $^{\circ}$ C饱和湿度反应2h,洗涤备用;

(6) 将辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG-HRP抗体,以PBST溶液1:1000稀释后,按顺序加入到96孔聚苯乙烯反应板的反应孔中,每个反应孔加100 μ L,22~28 $^{\circ}$ C饱和湿度避光反应2h,以PBST洗涤备用;

(7) 将过氧化物酶HRP底物TMB,按顺序加入到96孔聚苯乙烯反应板的反应孔中,每个反应孔加100 μ L,避光反应20min,随后每个反应孔加入50 μ L 2M浓硫酸,终止反应;

(8) 将终止反应的96孔聚苯乙烯反应板放入酶标仪中,读取OD650数据,判定结果。

2. 根据权利要求1所述的一种检测桑树品种抗寒能力的方法,其特征在于,步骤(4)中,所述第一提取液中各组分浓度为50 mmol/L磷酸钠和1 mmol/L EDTA;所述第二提取液中各组分浓度为50 mmol/L磷酸盐缓冲液,2% (v/v) Triton X-100和2% (m/v) SDS。

3. 根据权利要求1所述的一种检测桑树品种抗寒能力的方法,其特征在于,步骤(4)中,所述第一提取液和第二提取液的pH为6.8~7.2。

4. 根据权利要求1所述的一种检测桑树品种抗寒能力的方法,其特征在于,步骤(4)中,离心转速为12000~15000 r/min,离心时间为8~10 min。

5. 根据权利要求1-4任一所述的一种检测桑树品种抗寒能力的方法,其特征在于,步骤(4)中,所述桑树样品为30 d待检测扦插桑树苗顶端1~2片叶片组织样品。

一种检测桑树品种抗寒能力的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,尤其涉及一种检测桑树品种抗寒能力的方法。

背景技术

[0002] 桑树的自然分布区域十分广阔,亚洲、北美、欧洲以及非洲都有发现桑树,桑树资源遍及热带、亚热带、温带至冷温带。由于长期生长在不同的自然环境中,形成了极其丰富的遗传多样性。有的桑树可以在降水量不足150mm的干旱半干旱荒漠区生长,有些能抗摄氏零下30℃的低温,也能忍受摄氏40℃的高温,而有些桑树对土壤酸碱度的适应性较强,在pH值4.5~8.5的条件下都能生长,土壤含盐量在0.2%时桑树也能正常生长。全球主要桑树种质资源保存地保存的桑树种质超过7000份。迄今为止,中国已收集整理了各种类型桑树种质资源3000余份,这些桑树资源保证了今后我国蚕桑产业的多元化发展需求。目前,蚕桑产业面临转型发展,桑树不仅仅可以用于养蚕,在生态环境保护方面可以发挥更大的作用。所以需要加快培育综合桑树优质性状的桑树品种,扩大优质种质资源种质范围,这对自然条件恶劣(例如寒冷)地区顺利引种也非常关键。

[0003] 寒冷过程中,细胞内许多酶活性被钝化,有毒害作用的活性氧(ROS)积累,引发膜脂流动性降低、膜通透性增强,膜脂过氧化作用是造成细胞伤害的直接原因(Gombos et al., 1994)。正常情况下,植物能够有效地将ROS作为信号分子,启动相应的基因表达,以清除ROS的毒害,包括超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、过氧化物酶(POD)、抗坏血酸过氧化物酶(APX)和谷胱甘肽还原酶(GR)等。分子伴侣是细胞中一类能识别特定肽链的非天然构象、帮助新生蛋白质实现正确折叠并维持这种折叠状态的保守蛋白质。没有分子伴侣,许多蛋白就无法定向到靶区域执行其功能。

[0004] 植物遭受低温伤害时,生物膜首先发生膜脂物相变化,从液晶层状变为坚硬的凝胶相。细胞的膜组织主要是脂肪酸组成的双层膜,脂肪酸分子的形状像蝌蚪,在膜上有规律地排列,其头面向膜外,尾巴藏于双层膜内。细胞受低温影响时,尾巴会非常紧密地靠近以降低膜的流动性,减少对细胞危害(Vijayan and Browse, 2002)。那些“直的”脂肪酸尾巴通常由饱和脂肪酸组成,而扭曲的脂肪酸尾巴为不饱和脂肪酸组成(Beck et al., 2004)。不饱和脂肪酸根据双键个数的不同,分为单不饱和脂肪酸和多不饱和脂肪酸。单不饱和脂肪酸有油酸(C18:1),多不饱和脂肪酸有亚油酸(C18:2)、亚麻酸(C18:3)、花生四烯酸(C20:4)、二十碳五烯酸(C20:5)、二十二碳六烯酸(C22:6)等。碳原子数超过18C的脂肪酸称为(超)长链脂肪酸。其合成是由脂肪酰-CoA延长酶催化16C/18C的脂肪酸延长产生不同链长的脂肪酸。所以18C脂肪酸是一个重要的延伸点。脂肪酰-CoA延长酶为一个多酶复合体,其中酮脂酰-CoA合酶(3-ketoacyl-CoA synthase, KCS)是多酶复合体的关键性亚体。KCS1催化VLCFAs合成的第一步缩合反应,是脂肪酸延长反应的限速酶(Lassner et al., 1996)。KCS1、KCS2等在酵母中异源表达后,各种C20-C30脂肪酸的含量均有不同程度地提高,抗性增加(Trenkamp et al., 2004)。而kcs1拟南芥突变体中长链脂类含量明显降低(Todd et al., 1999)。基因工程转化脂肪酸合成的酶基因,同样可以增加植物不饱和脂肪酸的合成,

烟草中导入拟南芥脂肪酸去饱和酶基因Fad7,可增加转化植株中十八碳三烯脂肪酸的含量高,明显提高了其抗寒能力(Kodama et al.,1994)。利用酵母双杂交验证拟南芥文库与AKR2A互作蛋白,发现AKR2A与KCS1有明显互作关系。AKR2A是一个保守性强的调控蛋白,与KCS1的互作关系暗示AKR2A处在长链脂肪酸合成酶KCS1的上游调控脂肪酸的合成,继而通过介导脂肪酸合成调控植物的抗寒能力。

发明内容

[0005] 本发明为了克服现有技术的不足,提供了一种通过检测桑树中AKR2A蛋白含量来检测桑树品种抗寒能力的方法。

[0006] 为了实现上述目的,本发明采用以下技术方案:

[0007] 一种检测桑树品种抗寒能力的方法,包括以下步骤:

[0008] (1) 抗体制作:在拟南芥Tair Database中检索AKR2A的cDNA序列,去除N端1-198碱基,配上起始碱基ATG连接AKR2A第199碱基到终止密码的序列;以PET21为质粒,BL21为菌种生产拟南芥AKR2A目标片段蛋白质;制作拟南芥AKR2A目标片抗体;

[0009] (1) 抗体制作:在拟南芥Tair Database中检索AKR2A的cDNA序列,去除N端1-198碱基,配上起始碱基ATG连接AKR2A第199碱基到终止密码的序列;以PET21为质粒,BL21为菌种生产拟南芥AKR2A目标片段蛋白质;制作拟南芥AKR2A目标片抗体;

[0010] (2) 抗体包被:将上述拟南芥AKR2A目标片抗体稀释,以100 μ L/孔的浓度包被96孔聚苯乙烯ELISA反应板,获得ELISA反应的抗体基质,置于4 $^{\circ}$ C备用;

[0011] (3) 用5%脱脂奶粉封闭抗体包被板,每孔200 μ L液,室温下孵育1h;

[0012] (4) 桑树AKR2A抗原的制备:取0.2g桑树样品在液氮冷冻状态下于研钵中研磨后,用0.2mL第一提取液振荡30s,混合均匀,冰上静置0.5h;取出后4 $^{\circ}$ C下离心,将上清液移至另一试管中,沉淀物用0.2mL第二提取液悬浮得到悬浮液;将上述悬浮液煮沸10min,置于冰上冷却,4 $^{\circ}$ C下离心,取上清液;将上述2次上清液合并,获得桑树AKR2A抗原;

[0013] (5) 将桑树AKR2A抗原与阴阳性对照,以PBST溶液1:1稀释后,按编号加入抗原包被的96孔聚苯乙烯反应板的反应孔中,每个反应孔加100 μ L,阴阳性重复两孔,22~28 $^{\circ}$ C饱和湿度反应2h,洗涤备用;

[0014] (6) 将辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG-HRP抗体,以PBST溶液1:1000稀释后,按顺序加入到96孔聚苯乙烯反应板的反应孔中,每个反应孔加100 μ L,22~28 $^{\circ}$ C饱和湿度避光反应2h,以PBST洗涤备用;

[0015] (7) 将碱性磷酸酶底物TMB,按顺序加入到96孔聚苯乙烯反应板的反应孔中,每个反应孔加100 μ L,避光反应20min,随后每个反应孔加入50 μ L 2M浓硫酸,终止反应;

[0016] (8) 将终止反应的96孔聚苯乙烯反应板放入酶标仪中,读取OD650数据,判定结果。

[0017] 本发明通过特定AKR2A蛋白序列制作抗体,将拟南芥AKR2A抗体包被在96孔聚苯乙烯反应板。利用特定的桑叶组织处理后,获得AKR2A蛋白抗原,按编号加入抗体包被的反应板上,与AKR2A抗体起免疫反应,再与辣根过氧化物酶标记的二抗起反应,经过底物显色以检测桑树中特异性AKR2A蛋白。通过检测桑树中AKR2A蛋白,对比分析发现桑树抗低温胁迫能力的高低与AKR2A基因或蛋白含量呈正相关关系,通过桑树顶端1~2片叶片中AKR2A蛋白含量的检测指示桑树抗寒能力。寒冷条件下,桑树叶片中AKR2A蛋白表达水平与桑树抗寒能力

呈高度正相关关系。所以,只需运用ELISA的方法在苗期待检测桑树顶端1~2片叶片组织中AKR2A的表达量(即桑树中AKR2A抗原含量),就可判断出桑树品种的抗寒能力,为通量筛选抗旱桑树种质资源、超远程桑树引种,及大面积种植时抗寒桑树品种的筛选提供了重要操作方法和理论依据。

[0018] 作为优选,步骤(2)中,采用pH 9.6的碳酸盐缓冲液按1:1000稀释拟南芥AKR2A目标片抗体。

[0019] 作为优选,步骤(4)中,所述第一提取液中各组分浓度为50mmol/L磷酸钠和1mmol/L EDTA;2% (v/v) Triton X-100和2% (m/v) SDS。

[0020] 作为优选,步骤(4)中,所述第一提取液和第二提取液的pH为6.8~7.2。

[0021] 作为优选,步骤(4)中,离心转速为12000~15000r/min,离心时间为8~10min。

[0022] 作为优选,步骤(4)中,所述桑树样品为30d待检测扦插桑树苗顶端1~2片叶片组织样品。

[0023] 桑树顶端1~2片叶片样品中AKR2A的蛋白表达量与桑树品种抗寒能力之间呈显著的正相关关系,这种模式为桑树特有。寒冷条件下,桑树叶片中AKR2A蛋白表达水平与桑树抗寒能力呈高度正相关关系。

[0024] 作为优选,步骤(8)中,读取OD650数据,根据以下公式判定结果:定义待检桑树样品与已知阳性样品OD值的比值为S/P,已知阴性样品的OD值 ≤ 0.20 ,阳性样品的OD值 ≥ 0.8 ,在上述条件成立的情况下:

[0025] 当 $S/P < 0.5$,则判为阴性,即对应桑树抗寒能力较差;

[0026] 当 $S/P \geq 0.5$,则判为阳性;

[0027] 当 $0.5 \leq S/P \leq 0.75$,即对应桑树抗寒能力中等;

[0028] 当 $S/P > 0.75$,即对应桑树抗寒能力较强。

[0029] 因此,本发明具有如下有益效果:提供了一种早期(苗期)判定和预测某一品种(品系或种质)的抗寒能力的检测方法,减少了在实际生产中桑树育苗人和育种人在品种选育和桑树种质资源的超远程引种中抗寒品种选择的盲目性,同时也为科研工作者研究抗寒机理提供重要的理论方法。本发明建立直接、快速、可靠的比较桑树抗寒能力检测方法,将其用于抗寒桑树品种的筛选、分子育种,以及桑种质(品种)的远程和超远程引种,具有巨大的学术和经济价值。

附图说明

[0030] 图1是本发明寒冷处理后不同桑树样品发芽率对比图。

[0031] 图2是本发明荧光定量PCR分析AKR2A与SOD表达水平。

[0032] 图3是本发明Westernblot分析AKR2A与SOD表达水平:对照N;寒冷处理C。

具体实施方式

[0033] 下面通过具体实施例并结合附图,对本发明的技术方案作进一步具体的说明。

[0034] 在本发明中,若非特指,所有设备和原料均可从市场购得或是本行业常用的,下述实施例中的方法,如无特别说明,均为本领域常规方法。

[0035] 本发明以相同的AKR2A蛋白检测方法,对新疆白桑、湖桑32以及云南长穗桑进行了

抗寒能力检测。新疆白桑 (*Morus alba* L. 简称白桑), 湖桑32 (*Morus alba* Linn. var. *multicaulis* (Perrott.) Loud. 简称湖桑) 以及云南长穗桑 (*Morus wittiorum* Hand.-Mazz. 简称长穗桑)。其中新疆白桑原产我国北方地区, 是公认的抗寒能力较强桑树品种。而湖桑32主要种植区在我国长江流域蚕区, 是通用的对照桑品种, 云南长穗桑是一种抗寒能力较弱品种, 即使在长江中下游地区种植, 第二年桑树发芽率依然超不多20%。

[0036] 桑树寒冷实验:

[0037] 12月初将直径1cm左右的一年生盆栽新疆白桑、农桑12以及云南长穗桑桑树分别-20℃和2℃, 黑暗培养30天。随后将桑树移种到人工气候箱, 培养条件: 湿度70%; 温度25℃; 光周期16h光/8h暗; 光照强度20,000lx培养15天, 记录统计桑树发芽情况。

[0038] 12月初取直径1cm左右的桑条, 并保证每根桑条具有活性芽6只左右, 在人工气候箱进行扦插。培养条件: 湿度70%; 温度25℃; 光周期16h光/8h暗; 光照强度20,000lx培养至第二片新叶完全伸展, 随后进行寒冷处理。寒冷处理, 将正常生长的桑条移入4℃培养箱, 处理8小时。随后取下叶片于-80℃冻存。

[0039] 寒冷处理对桑树发芽率、以及AKR2A和SOD表达水平的影响, 将植株放置在2℃, 三个桑树品种发芽率没有明显差异, 而经过-20℃处理, 三种桑树发芽率发生明显差异, 寒冷处理后不同桑树样品发芽率对比结果如图1所示。从图2荧光定量PCR结果和图3 Westernblot结果可以看出, 寒冷处理后, 三种桑品种mAKR2A和SOD基因水平降低, 但是白桑mAKR2A和SOD的基因和蛋白表达水平仍然高于长穗桑和湖桑。

[0040] 实施例1

[0041] 桑树AKR2A抗原ELISA检测:

[0042] (1) 抗体制作: 在拟南芥Tair Database中检索AKR2A的cDNA序列, 去除N端1-198碱基, 配上起始碱基ATG连接AKR2A第199碱基到终止密码的序列; 以PET21为质粒, BL21为菌种生产拟南芥AKR2A目标片段蛋白质; 制作拟南芥AKR2A目标片抗体;

[0043] (2) 抗体包被: 将上述拟南芥AKR2A目标片抗体稀释, 以100μL/孔的浓度包被96孔聚苯乙烯ELISA反应板, 获得ELISA反应的抗体基质, 置于4℃备用;

[0044] (3) 用5%脱脂奶粉封闭抗体包被板, 每孔200μL液, 室温下孵育1h;

[0045] (4) 桑树AKR2A抗原的制备: 取0.2g新疆白桑及后续17个不同桑树品种的30d待检测扦插桑树苗顶端1~2片叶片组织样品, 在液氮冷冻状态下于研钵中研磨后, 用0.2mL含有50mmol/L磷酸钠和1mmol/L EDTA, pH为7.0的第一提取液振荡30s, 混合均匀, 冰上静置0.5h; 取出后4℃下13000r/min离心10min, 将上清液移至另一试管中, 沉淀物用0.2mL含有50mmol/L磷酸盐缓冲液, 2% (v/v) Triton X-100和2% (m/v) SDS, pH为7.0的第二提取液悬浮得到悬浮液; 将上述悬浮液煮沸10min, 置于冰上冷却, 4℃下13000r/min离心10min, 取上清液; 将上述2次上清液合并, 获得桑树AKR2A抗原;

[0046] (5) 将桑树AKR2A抗原与阴阳性对照, 以PBST溶液1:1稀释后, 按编号加入抗原包被的96孔聚苯乙烯反应板的反应孔中, 每个反应孔加100μL, 阴阳性重复两孔, 22~28℃饱和湿度反应2h, 洗涤备用;

[0047] (6) 将辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG-HRP抗体, 以PBST溶液1:1000稀释后, 按顺序加入到96孔聚苯乙烯反应板的反应孔中, 每个反应孔加100μL, 22~28℃饱和湿度避光反应2h, 以PBST洗涤备用;

[0048] (7) 将碱性磷酸酶底物TMB,按顺序加入到96孔聚苯乙烯反应板的反应孔中,每个反应孔加100 μ L,避光反应20min,随后每个反应孔加入50 μ L 2M浓硫酸,终止反应;

[0049] (8) 将终止反应的96孔聚苯乙烯反应板放入酶标仪中,读取OD650数据,根据以下公式判定结果:定义待检桑树样品与已知阳性样品OD值的比值为S/P,已知阴性样品的OD值 ≤ 0.20 ,阳性样品的OD值 ≥ 0.8 ,在上述条件成立的情况下:

[0050] 当 $S/P < 0.5$,则判为阴性,即对应桑树抗寒能力较差;

[0051] 当 $S/P \geq 0.5$,则判为阳性;

[0052] 当 $0.5 \leq S/P \leq 0.75$,即对应桑树抗寒能力中等;

[0053] 当 $S/P > 0.75$,即对应桑树抗寒能力较强。

[0054] 实施例2

[0055] 实施例2与实施例1的区别在于步骤(4):

[0056] 取0.2g胡桑32的30d待检测扦插桑树苗顶端1~2片叶片组织样品,在液氮冷冻状态下于研钵中研磨后,用0.2mL含有50mmol/L磷酸钠和1mmol/L EDTA,pH为6.8的第一提取液振荡30s,混合均匀,冰上静置0.5h;取出后4 $^{\circ}$ C下12000r/min离心8min,将上清液移至另一试管中,沉淀物用0.2mL含有50mmol/L磷酸盐缓冲液,2% (v/v) Triton X-100和2% (m/v) SDS,pH为6.8的第二提取液悬浮得到悬浮液;将上述悬浮液煮沸10min,置于冰上冷却,4 $^{\circ}$ C下12000r/min离心8min,取上清液;将上述2次上清液合并,获得桑树AKR2A抗原;

[0057] 其余步骤与实施例1完全相同。

[0058] 实施例3

[0059] 实施例3与实施例1的区别在于步骤(4):

[0060] 取0.2g云南长穗桑的30d待检测扦插桑树苗顶端1~2片叶片组织样品,在液氮冷冻状态下于研钵中研磨后,用0.2mL含有50mmol/L磷酸钠和1mmol/L EDTA,pH为7.2的第一提取液振荡30s,混合均匀,冰上静置0.5h;取出后4 $^{\circ}$ C下15000r/min离心9min,将上清液移至另一试管中,沉淀物用0.2mL含有50mmol/L磷酸盐缓冲液,2% (v/v) Triton X-100和2% (m/v) SDS,pH为7.2的第二提取液悬浮得到悬浮液;将上述悬浮液煮沸10min,置于冰上冷却,4 $^{\circ}$ C下15000r/min离心9min,取上清液;将上述2次上清液合并,获得桑树AKR2A抗原;

[0061] 其余步骤与实施例1完全相同。

[0062] 实施例4-实施例20

[0063] 实施例4-实施例20与实施例1的不同之处在于:步骤(4)中选用其它17个不同桑树品种的30d待检测扦插桑树苗顶端1~2片叶片组织样品获得桑树AKR2A抗原,其余步骤与实施例1完全相同。

[0064] 对实施例1-实施例20中检测不同品种的桑树抗寒能力结果汇总,如表1所示:

[0065] 表1. 桑树AKR2A蛋白ELISA检测结果AKR2A包被

[0066]

样品	OD650	Mean	S/P值	阴阳性判断	抗寒能力判断
阳性	1.163	1.0605			
阳性	0.958				
阴性	0.198	0.188			
阴性	0.178				
新疆白桑	1.55		1.461575	+	强

胡桑32	0.55		0.518623	+	中等
云南长穗桑	0.16		0.150872	-	弱
桑树品种1	1.038		0.978784	+	强
桑树品种2	0.208		0.196134	-	弱
桑树品种3	0.382		0.360207	-	弱
桑树品种4	1.084		1.022159	+	强
桑树品种5	0.331		0.312117	-	弱
桑树品种6	0.87		0.820368	+	强
桑树品种7	0.56		0.528053	+	中等
桑树品种8	0.79		0.744932	+	中等
桑树品种9	1.355		1.277699	+	强
桑树品种10	1.458		1.374823	+	强
桑树品种11	0.872		0.822254	+	强
桑树品种12	1.071		1.009901	+	强
桑树品种13	0.449		0.423385	-	弱
桑树品种14	0.732		0.69024	+	中等
桑树品种15	1.241		1.170203	+	强
桑树品种16	0.694		0.654408	+	中等
桑树品种17	1.357		1.279585	+	强

[0067] 由表1可知,新疆白桑的S/P值为1.46,抗寒能力强。胡桑32的S/P值为0.51,抗寒能力中等。云南长穗桑的S/P值为0.15,抗寒能力较弱。相比之下,新疆白桑的抗寒能力最强,胡桑32次之,云南长穗桑最差。

[0068] 以上数据表明,本发明能够通过桑树幼苗中特定基因AKR2A的蛋白表达量来鉴定和预测桑树品种的抗寒能力,为选种人员准确地选择优良品种育苗推广提供鉴定方法。

[0069] 以上所述仅为本发明的较佳实施例,并非对本发明作任何形式上的限制,在不超出权利要求所记载的技术方案的前提下还有其它的变体及改型。

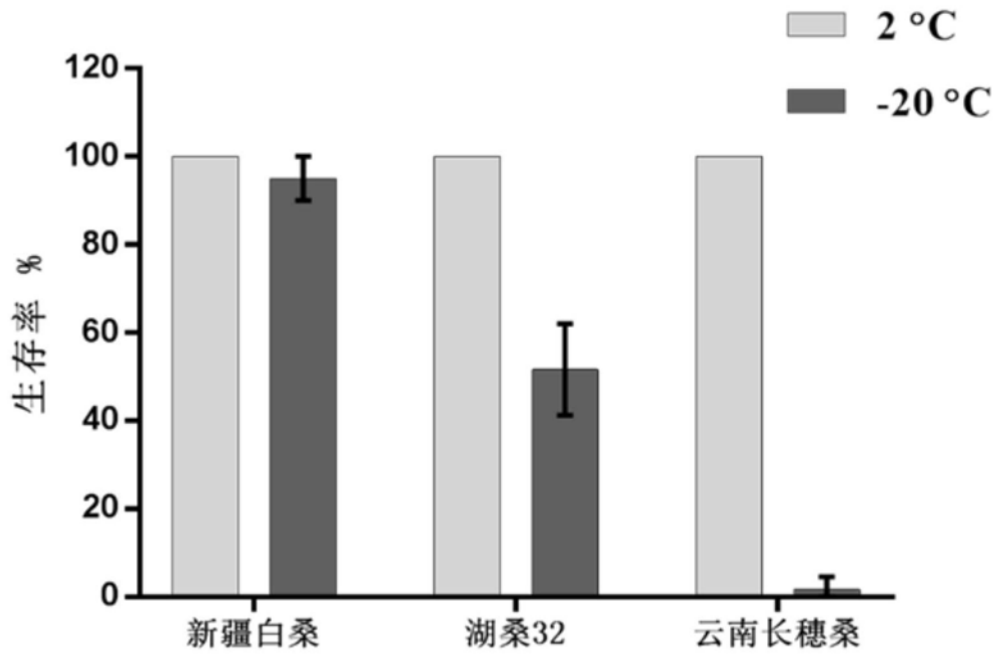


图1

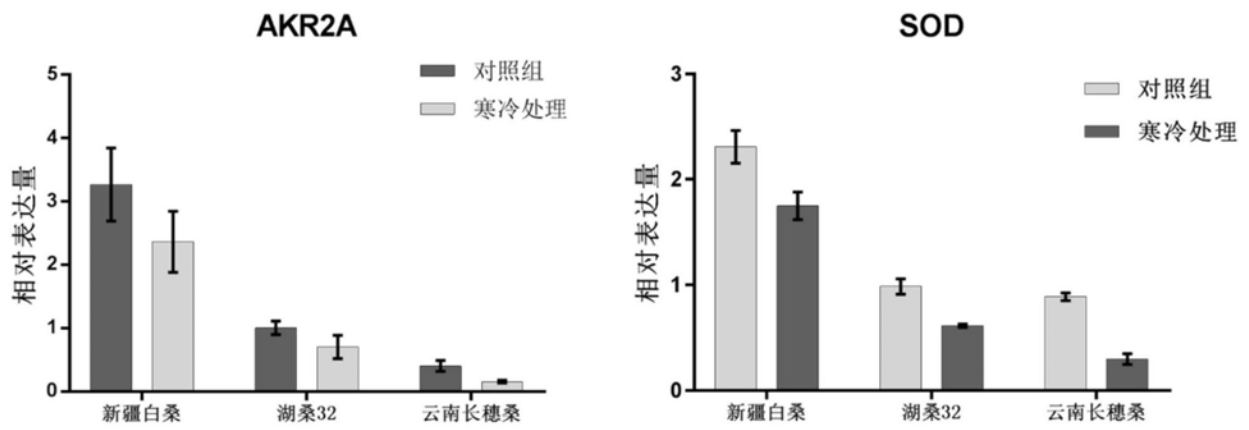


图2

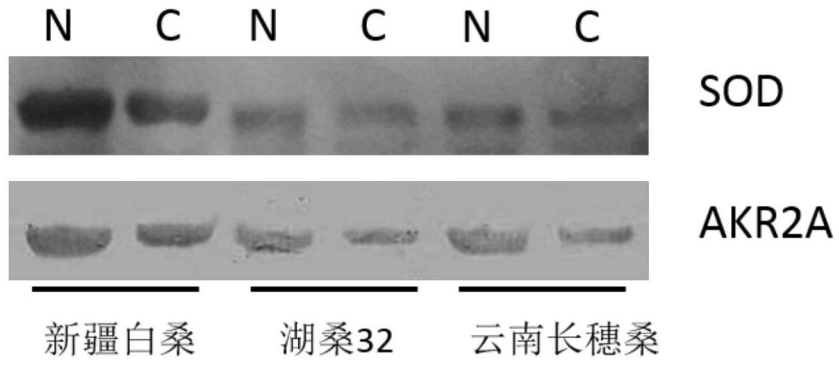


图3

专利名称(译)	一种检测桑树品种抗寒能力的方法		
公开(公告)号	CN108254569B	公开(公告)日	2020-06-05
申请号	CN201711448368.4	申请日	2017-12-27
[标]申请(专利权)人(译)	浙江省农业科学院		
申请(专利权)人(译)	浙江省农业科学院		
当前申请(专利权)人(译)	浙江省农业科学院		
[标]发明人	陈琳 张彩萍 于少芳 胡文君 裘晓云 卢红伶 沈国新		
发明人	陈琳 张彩萍 于少芳 胡文君 裘晓云 卢红伶 沈国新		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/543 G01N33/535		
CPC分类号	G01N33/535 G01N33/543 G01N33/6857 G01N33/686 G01N2333/415		
审查员(译)	贾静		
其他公开文献	CN108254569A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及生物技术领域，尤其涉及一种检测桑树品种抗寒能力的方法，通过特定AKR2A蛋白序列制作抗体，将拟南芥AKR2A抗体包被在96孔聚苯乙烯反应板。利用特定的桑叶组织处理后，获得AKR2A蛋白抗原，按编号加入抗体包被的反应板上，与AKR2A抗体起免疫反应，再与辣根过氧化物酶标记的二抗起反应，经过底物显色以检测桑树中特异性AKR2A蛋白。通过检测桑树中AKR2A蛋白，对比分析发现桑树抗低温胁迫能力的高低与AKR2A基因或蛋白含量呈正相关关系，通过桑树顶端1~2片叶片中AKR2A蛋白含量的检测指示桑树抗寒能力。本发明建立直接、快速、可靠的比较桑树抗寒能力检测方法，将其用于抗寒桑树品种的筛选、分子育种，以及桑种质(品种)的远程和超远程引种，具有巨大的学术和经济价值。

