

## 权 利 要 求 书

1、一种用于检测燕麦属植物染色体的探针组，其特征在于，包括 Aml、(A CT)<sub>6</sub>、(GAA)<sub>6</sub>、(TTG)<sub>6</sub> 四种探针，其中所述 Aml 探针由 51 个碱基对组成，其碱基序列为：5'- GATCCATGTGTGGTTTGTGGAAAGAACACACATGCAATGA CTCTAGTGGTT -3'，用于特异性识别燕麦属 C 基因组所有染色体；所述(ACT)<sub>6</sub> 探针的碱基序列为：5'- ACTACTACTACTACTACT -3'，用于识别偏好 C 基因组部分染色体的部分结构，也微弱识别 A 染色体组部分染色体的部分结构；所述(GAA)<sub>6</sub> 探针的碱基序列为：5'- GAAGAAGAAGAAGAAGAA -3'，用于识别偏好 A 和 C 基因组部分染色体的部分结构；所述(TTG)<sub>6</sub> 探针的碱基序列为：5' - TTGTTGTTGTTGTTGTTG -3'，用于识别偏好 A 基因组部分染色体部分结构，微弱识别 C 基因组部分染色体的部分结构。

2、根据权利要求 1 所述的一种用于检测燕麦属植物染色体的探针组，其特征在于，所述 Aml 探针采用 FAM 或者 TAMRA 标记其序列的 5'端。。

3、根据权利要求 1 所述的一种用于检测燕麦属植物染色体的探针组，其特征在于，所述(ACT)<sub>6</sub> 探针采用 FAM 或者 TAMRA 标记其序列的 5'端。

4、根据权利要求 1 所述的一种用于检测燕麦属植物染色体的探针组，其特征在于，所述(GAA)<sub>6</sub> 探针采用 FAM 或者 TAMRA 标记其序列的 5'端。

5、根据权利要求 1 所述的一种用于检测燕麦属植物染色体的探针组，其特征在于，所述(TTG)<sub>6</sub> 探针采用 FAM 或者 TAMRA 标记其序列的 5'端。

6、一种用于检测燕麦属植物染色体的试剂盒，其特征在于，包括：

- (1) 权利要求 1~5 任意一项所述的上述探针组；
- (2) 酶解液；
- (3) 4%多聚甲醛液；
- (4) 2×SSC 缓冲液；

(5) 70%FA 液;

(6) 杂交液;

所述杂交液由等体积的 1×TE 和 2×SSC 缓冲液组成;其中 1×TE 的配制方法为: 每 800mL 的 ddH<sub>2</sub>O 中加入 1.211g Tris 和 0.372g EDTANa<sub>2</sub>•2H<sub>2</sub>O, 用 HCl 调 pH 到 8.0, 定容到 1000mL, 灭菌后即得。

7、根据权利要求 6 所述的一种用于检测燕麦属植物染色体的试剂盒, 其特征在于, 所述酶解液的配制方法为: 每 1mL 的柠檬酸缓冲液中加入 0.04g 纤维素酶和 0.02g 果胶酶; 其中柠檬酸缓冲液的配制方法为: 每 50mL 的 ddH<sub>2</sub>O 加 0.5707g 柠檬酸三钠和 0.4324g 柠檬酸。

8、根据权利要求 6 所述的一种用于检测燕麦属植物染色体的试剂盒, 其特征在于, 所述 2×SSC 缓冲液的配制方法为: 每 1000mL 的 ddH<sub>2</sub>O 加入 8.823g 柠檬酸三钠和 17.532g 氯化钠。

9、根据权利要求 6 所述的一种用于检测燕麦属植物染色体的试剂盒, 其特征在于, 所述 70%FA 液由去离子甲酰胺(FA)和 2×SSC 缓冲液按照体积比 7:3 组成。

10、一种用于检测燕麦属植物染色体的方法, 是采用权利要求 6~9 任意一项权利要求所述的试剂盒, 其特征在于, 包括以下步骤:

1) 燕麦属植物染色体载玻片标本的制备: 将燕麦属植物种子用双蒸水浸泡, 置于 4℃环境中放置 24h, 吸去多余水分, 并于 22℃恒温培养, 待根尖长至 1.5~2.0cm 时, 剪取 1~1.5cm 根尖组织, 依次用 N<sub>2</sub>O 处理 5h、冰醋酸处理 5min, 然后置于 75%酒精中于-20℃保存;

将低温保存的根尖组织以双蒸水清洗后切取根尖分生组织 1~2mm, 置于酶解液中于 37℃酶解 45min, 去除酶解液, 依次用双蒸水、75%酒精、95%酒精、

## 权 利 要 求 书

---

100%酒精清洗根尖分生组织后室温晾干；在根尖组织中加入冰醋酸制成悬浮液；将悬浮液滴于载玻片上室温晾干后镜检，镜检良好的玻片于-20℃保存；

2) 荧光原位杂交：将载玻片置于 4%多聚甲醛中处理 10min，然后用 2×SSC 缓冲液处理两次，每次 5min，再依次用 75%酒精、95%酒精、100%酒精梯度处理，每次 5min，室温晾干后滴加 70%FA 液，盖上盖玻片，于 80℃变性 2min；

载玻片变性完成后于 5s 内依次放入-20℃的 75%酒精、95%酒精、100%酒精梯度处理，每次 5min，室温晾干；在晾干的载玻片上滴加放有探针的杂交液，每张载玻片滴加 10μL 放有探针的杂交液，其中每种探针含有 0.5μL，剩余为杂交液；盖上盖玻片，于黑暗条件下在杂交盒中于 37℃恒温孵化 1.5~2h；

将孵化完成的载玻片在避光条件下依次用 2×SSC 缓冲液清洗 3min、双蒸水清洗 2min，室温晾干；

3) 信号检测：晾干后的载玻片上加入 DAPI，盖上盖玻片，采用荧光显微镜对载玻片进行检测，采集检测图像；

4) 载玻片回收：信号采集之后回收制片并放入 2×SSC 缓冲液中于 60℃水浴 5min，依次在 75%酒精、95%酒精、100%酒精中梯度处理，每次 5min，处理完成后将回收制片于日光灯下放置 12h；-20℃保存以备下次使用。