

## 权 利 要 求 书

1.一种使用寡序列检测林木染色体端部的方法，其特征在于，该方法通过 (AGGGTTT)<sub>3</sub> 寡序列探针及包含该探针的试剂盒实现，所述 (AGGGTTT)<sub>3</sub> 寡序列探针的碱基序列为：5'- AGGGTTTAGGGTTTAGGGTTT-3'，用于识别并标记林木染色体端部；所述试剂盒包括：(1)所述探针；(2)酶解液；(3)20×SSC 缓冲液；(4)2×SSC 缓冲液；(5)70%FA 液；(6)50%DS 液；(7)鲑鱼精 DNA；所述林木为 *Croton tiglium*、*Erythrina crista-galli*、*Litsea baviensis*、*Litsea elongata*、*Podocarpus macrophyllus*、*Quercus aquifolioides*、*Robiniapseudoacacia* 中的一种；所述方法包括以下步骤：

1)获取林木染色体载玻片标本：剪取林木种子新生 1.0~1.5cm 根尖组织，依次用冰水混合物处理 18~24h、冰醋酸处理 5min，用双蒸水清洗后，切取根尖分生组织 1~2mm，置于酶解液中于 37℃ 酶解 45~60min；

去除酶解液，依次用双蒸水、70%、90%、100%酒精依次清洗根尖分生组织，再加入冰醋酸制成根尖组织悬浮液，滴于载玻片上，晾干，镜检，将能清晰观察到染色体的载玻片进行标记，并置于-20℃保存箱中保存；

2)变性：准备好灭菌的 1.5mL 离心管，每管加入 2μL 鲑鱼精 DNA，0.5μL 探针，然后加入 10μL 100%FA、2μL 20×SSC 和 4μL 50%DS，混匀后瞬时离心，于沸水浴中变性 10min，立即置于冰上放置 20min，防止其复性；

3)荧光原位杂交：将步骤 1)中的载玻片用 2×SSC 缓冲液处理两次，每次 5min，再依次用 70%酒精、90%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℃处理 2min；

之后依次用 70%酒精、90%酒精、100%酒精梯度处理，每次 5min，晾干后滴加 10μL 步骤 2)的变性混合液，遮光下将载玻片于 37℃恒温箱中放置 1.5~2h，依次用 2×SSC 缓冲液清洗 3min、双蒸水清洗 3min，最后在常温下晾干；

## 权 利 要 求 书

4)信号检测：晾干后的载玻片上加入 DAPI，用荧光显微镜进行检测，并采集检测图像；

5)回收载玻片：将载玻片置于 2×SSC 缓冲液中，60℃水浴 10min，用 70%、90%、100%酒精分别处理 10min，之后于日光灯下放置 24h，集中收集并置于 -20℃保存箱中，以备下次使用。

2.根据权利要求 1 所述的一种使用寡序列检测林木染色体端部的方法，其特征在于，所述探针采用 FAM 标记其序列的 5'端。

3.根据权利要求 1 所述的一种使用寡序列检测林木染色体端部的方法，其特征在于，所述酶解液的配制方法为：每 10mLddH<sub>2</sub>O 中加入 2g 纤维素酶和 1g 果胶酶。

4.根据权利要求 1 所述的一种使用寡序列检测林木染色体端部的方法，其特征在于，所述 20×SSC 缓冲液的配制方法为：每 1000mL 的 ddH<sub>2</sub>O 加入 88.23g 柠檬酸钠和 175.32g 氯化钠。

5.根据权利要求 4 所述的一种使用寡序列检测林木染色体端部的方法，其特征在于，所述 2×SSC 缓冲液的配制方法为：将 20×SSC 缓冲液稀释 10 倍。

6.根据权利要求 1 或者 4 所述的一种使用寡序列检测林木染色体端部的方法，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。

7.根据权利要求 1 所述的一种使用寡序列检测林木染色体端部的方法，其特征在于，所述 50%DS 液的配制方法为：每 500μL ddH<sub>2</sub>O-20 中加入 0.5g 硫酸葡聚糖，于 37℃震荡过夜，待完全融化后瞬时离心混匀。

8.根据权利要求 1 所述的一种使用寡序列检测林木染色体端部的方法，其特征在于，所述鲑鱼精 DNA 的处理方法为：将室温下溶解的 10mg/mL 鲑鱼精

带格式的：下标

## 权 利 要 求 书

DNA(~~10mg/mL~~)高压灭菌处理 10min，沸水煮沸使其 DNA 变性 10min，-20℃ 保存。