

黑木耳菌种区别性及真实性鉴定 第 2 部分：酯酶同工酶法

Verification of distinctness and genuineness for Black wood ear spawn

Part 2: Esterase isozyme

2017 - 06 - 12 发布

2017 - 08 - 12 实施

本标准仅供内部使用 不得翻印

本标准仅供内部使用 不得翻印

前 言

《黑木耳菌种区别性及真实性鉴定》分为以下3个部分：

- DB22/T 2623.1 黑木耳菌种区别性及真实性鉴定 第1部分 对峙培养法
- DB22/T 2623.2 黑木耳菌种区别性及真实性鉴定 第2部分 酯酶同工酶法
- DB22/T 2623.3 黑木耳菌种区别性及真实性鉴定 第3部分 SRAP法

本部分为第2部分：酯酶同工酶法。

本标准按照GB/T 1.1—2009和GB/T 20001.4—2015给出的规则起草。

本标准由吉林省农业委员会提出并归口。

本标准起草单位：吉林农业大学、吉林省海外农业投资开发集团有限公司。

本标准主要起草人：姚方杰、张友民、方明、陈影、鲁丽鑫、王鹏、姚允武、于娅、刘宏宇、李丹、王晓娥、陈艳秋、刘迪、张伟彤、孔祥会、马晓旭、张媛媛、李玉。

本标准仅供内部使用 不得翻印

本标准仅供内部使用 不得翻印

黑木耳菌种区别性及真实性鉴定 第2部分 酯酶同工酶法

1 范围

本标准规定了黑木耳菌种真实性鉴定酯酶同工酶法的原理、试剂和材料、仪器设备、样品、试验步骤、试验数据处理。

本标准适用于黑木耳菌种真实性的鉴定。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅所注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

NY/T 1097 食用菌菌种真实性鉴定 酯酶同工酶电泳法

3 术语和定义

NY/T 1097界定的以及下列术语和定义适用于本文件。为了便于使用，以下重复列出了NY/T 1097中的术语和定义。

3.1

菌种真实性 genuineness of spawn

供检菌种和对照菌种的符合性。

[NY/T 1097, 定义3.1]

4 原理

在生物中，酶的表达受遗传基因的调控。酯酶是多等位基因调控的酶类，在凝胶电泳中经聚丙烯酰胺凝胶的浓缩，在分子筛效应和电场的电荷效应作用下而发生分离。从食用菌菌丝体中提取的粗酶液经电泳后，进行酯酶的生物化学染色，不同的酯酶组分显示在凝胶的不同位置而形成酯酶同工酶酶谱。相同的菌种遗传背景相同，其酯酶同工酶酶谱也相同。因此可以用酯酶同工酶酶谱对黑木耳菌种的真实性进行鉴定。

5 试剂和材料

5.1 培养基：见附录 A。

5.2 酯酶同工酶上样缓冲液：4×Protein Native PAGE Loading Buffer。

5.3 样品提取液（pH 7.5）：见附录 B.1。

5.4 过硫酸铵：见附录 B.2。

5.5 分离胶缓冲液（pH 8.9）：见附录 B.3。

5.6 浓缩胶缓冲液（pH 6.7）：见附录 B.4。

- 5.7 分离胶母液：见附录 B.5。
- 5.8 浓缩胶母液：见附录 B.6。
- 5.9 酯酶同工酶电极缓冲液：见附录 B.7。
- 5.10 磷酸缓冲液：见附录 B.8。
- 5.11 酯酶同工酶电泳染色液：见附录 B.9。
- 5.12 液氮。

6 仪器设备

- 6.1 高速冷冻离心机（10000 rpm 以上）。
- 6.2 全温摇瓶柜：精度 ± 0.1 °C。
- 6.3 垂直板电泳槽：凝胶面积（W×L）160×180 mm。
- 6.4 稳压稳流电泳仪。
- 6.5 分析天平：感量 0.01 g、0.0001 g 各一台。

7 样品

7.1 液体培养

直接将接种块接入三角瓶液体培养基中，25 °C，120 rpm振荡避光培养20 d。培养基的制备参见附录 A。

7.2 酯酶同工酶样品制备

将振荡培养的黑木耳菌丝球过滤除去水分，获得供检黑木耳供试菌株与标准菌株的菌丝体各3份。称取菌丝体0.5 g，加液氮研磨，将样品收集于1.5 mL离心管中，加入0.5 mL样品提取液（附录 B.1）。将研磨后的样品在4 °C下12000 rpm，离心10 min，取其上清液，将上清液和上样缓冲液按10:1比例混匀，混合液即为电泳样品。

8 试验步骤

8.1 凝胶制备

8.1.1 分离胶

分离胶浓度9%，按照分离胶缓冲液（附录 B.3）：分离胶母液（附录 B.5）：双蒸水：过硫酸铵（附录 B.2）=2:5:1:8的比例配制，再加入胶溶液体积0.1%的TEMED，充分混匀。将分离胶灌入胶室至距短玻璃板上沿2.2 cm~2.5 cm，加入适量的水封住胶面，待凝胶聚合后将水吸出。

8.1.2 浓缩胶

浓缩胶浓度3%，按照浓缩胶缓冲液（附录 B.4）：浓缩胶母液（附录 B.6）：双蒸水：过硫酸铵（附录 B.2）=1:2:1:4比例混合，再加入胶溶液体积0.1%的TEMED，充分混匀，灌入胶室，立即插入样品梳，待凝胶。

8.2 点样

浓缩胶聚合后，小心抽出样品梳，用微量进样器吸去点样孔中多余的水分后，注入电极缓冲液（附录 B.7），上槽电极缓冲液面要高于短玻璃板，下槽电极缓冲液面要高于铂金丝；用微量进样器吸取15 μL ~20 μL 样品加入点样孔。

8.3 电泳

将电泳槽放入冰箱内进行低温电泳，采用稳压电泳，电压为130 V，待指示剂进入分离胶后，电压升至260 V。待前沿指示剂距胶底部约1 cm~1.5 cm，停止电泳。

8.4 取胶染色

倒出电极缓冲液，在水中启开玻璃板，取出凝胶片，浸入染色液（附录 B.9）中，37 $^{\circ}\text{C}$ 染色15 min~20 min，用水冲洗干净。

9 试验数据处理

9.1 迁移率 R_f 值计算

应按照NY/T 1097的规定执行。

9.2 判断

将凝胶片用凝胶成像系统拍照存图。对比供检菌株和对照菌株酶带数量与迁移率的大小，若酶带数量或迁移率不同，用相关软件分析遗传相似系数，相似系数小于1，则供检菌株与对照菌株为不同菌株，当相似系数等于1则须结合其他鉴定方法判断。

附录 A
(规范性附录)
培养基制备

200 g新鲜马铃薯，20 g葡萄糖，加去离子水或相当纯度的水补齐至1000 mL，pH自然。100 mL三角瓶装50 mL左右。

附录 B
(规范性附录)
试剂的制备

除非另有说明，在分析中仅使用分析纯试剂和去离子水或相当纯度的水。

B.1 样品提取液 (pH 7.5)

称取6.02 g磷酸氢二钠 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)、0.50 g磷酸二氢钠 ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 溶于水中，定容至100 mL。

B.2 过硫酸铵 (1.4 g/L)

称取0.14 g过硫酸铵溶于水中，定容至100 mL，现用现配。

B.3 分离胶缓冲液 (pH 8.9)

称取36.3 g三羟甲基氨基甲烷 ($\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$, Tris)，用48 mL 1 mol/L HCL溶解，TEMED 0.23 mL，定容至100 mL，4 °C贮存。

B.4 浓缩胶缓冲液 (pH 6.7)

称取5.98 g三羟甲基氨基甲烷 ($\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$, Tris)，用48 mL 1mol/L HCL溶解，TEMED 0.46 mL，定容至100 mL，4 °C贮存。

B.5 分离胶母液

称取28.0 g丙烯酰胺 ($\text{C}_3\text{H}_5\text{NO}$, Arc)、0.735 g甲叉双丙烯酰胺 ($\text{C}_7\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_2$, Bis)，溶于水中，定容至100 mL，用棕色瓶4 °C贮存。

B.6 浓缩胶母液

称取10.0 g丙烯酰胺 ($\text{C}_3\text{H}_5\text{NO}$, Arc)、2.0 g甲叉双丙烯酰胺 ($\text{C}_7\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_2$, Bis) 溶于水中，定容至100 mL，用棕色瓶4 °C贮存。

B.7 酯酶同工酶电极缓冲液

称取6.0 g三羟甲基氨基甲烷 ($\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$, Tris)、28.8 g甘氨酸 ($\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$) 溶于水中，定容至1 L，使用时稀释10倍，使用液pH 8.3。

B.8 磷酸缓冲液

称取22.6 g磷酸氢二钠 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)、21.4 g磷酸二氢钠 ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 溶于水中，定容至1 L。

B.9 酯酶同工酶染色液

称取0.1 g乙酸-1-萘酯、0.1 g乙酸-2-萘酯、0.2 g固兰RR盐，用10 mL丙酮溶解，再加入磷酸缓冲液300 mL，过滤，现用现配。
