

黑木耳菌种区别性及真实性鉴定 第 3 部分: SRAP 法

Verification of distinctness and genuineness for Black wood ear spawn

Part 3: SRAP

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3部分：SRAP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3部分：SRAP 法

1 范围

本标准规定了黑木耳菌种真实性SRAP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鉴定。

2 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

2.1

引物 primer

适用于黑木耳菌株真实性鉴定的一定长度和顺序的寡核苷酸链。

2.2

PCR空白对照 PCR control check

以无菌水作为模板进行PCR反应，以验证PCR反应过程中是否发生污染。

2.3

阴性提取对照 negative control

水作为材料提取DNA，以证明黑木耳DNA在制备过程中是否发生污染。

3 原理

对黑木耳菌种的ORFs区域中内含子、启动子进行特异扩增，检测和比较该序列长度多态性。通过对PCR产物的检测和比较，识别黑木耳菌种基因组DNA的多态片段，鉴定菌种的真实性。

4 试剂和材料

4.1 培养基：见附录 A。

4.2 四种脱氧核糖核苷酸(dATP, dCTP, dGTP, dTTP)混合溶液。

4.3 TaqDNA 聚合酶。

4.4 核酸染料。

4.5 DNA 分子量标记。

4.6 引物：参见附录 C。

4.7 剥离硅烷。

4.8 亲和硅烷。

4.9 1 mol/L Tris-HCl(pH 8.0)：见附录 B.1。

4.10 0.5 mol/L 乙二胺四乙酸二钠盐(EDTA-2Na)溶液：见附录 B.2。

4.11 CTAB 提取缓冲液：见附录 B.3。

- 4.12 CTAB 纯化缓冲液：见附录 B.4。
- 4.13 氯仿异戊醇（24:1）：见附录 B.5。
- 4.14 酚-氯仿异戊醇（25:24:1）：见附录 B.6。
- 4.15 70%乙醇溶液：见附录 B.7。
- 4.16 30%丙烯酰胺溶液：见附录 B.8。
- 4.17 10%过硫酸铵：见附录 B.9。
- 4.18 8%聚丙烯酰胺凝胶溶液：见附录 B.10。
- 4.19 5×TBE 缓冲液：见附录 B.11。
- 4.20 1×TBE 缓冲液：见附录 B.12。
- 4.21 0.1%硝酸银（AgNO₃）溶液：见附录 B.13。
- 4.22 显影液：见附录 B.14。
- 4.23 液氮。

5 仪器设备

- 5.1 PCR 扩增仪。
- 5.2 高速冷冻离心机（10000 rpm 以上）。
- 5.3 紫外分光光度计。
- 5.4 全温摇瓶柜：精度±0.1℃。
- 5.5 凝胶成像系统。
- 5.6 电热恒温水浴槽：精度±0.1℃。
- 5.7 垂直板电泳槽。
- 5.8 稳压稳流电泳仪。
- 5.9 分析天平：感量 0.01 g、0.0001 g 各一台。

6 样品

6.1 菌丝体培养

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

6.2 DNA 样品提取

6.2.1 菌丝培养量以可做 3 次平行试验为准，固体方法培养的菌丝，称取 0.2 g 菌丝，液体培养的菌丝，无菌水冲洗 3 次，用滤纸吸干水分备用，称取菌丝 0.5 g，置研钵中，在液氮中充分研磨成粉末，迅速转入 1.5 mL 离心管中，加入 650 μL 65℃预热的 CTAB（附录 B.3）提取缓冲液。混匀后置于 65℃水浴 40 min，轻轻地摇动混匀。

6.2.2 离心管降至室温，加入等体积的酚-氯仿异戊醇（附录 B.6），振荡混匀，4℃，12000 rpm 离心 15 min；将上清液转移至已灭菌的 1.5 mL 离心管中，弃沉淀。

6.2.3 加入等体积的氯仿异戊醇（附录 B.5），4℃，12000 rpm 离心 15 min，将上清液转移至已灭菌的 1.5 mL 离心管中，弃沉淀。

6.2.4 加入 2 倍体积预冷的无水乙醇，静置沉淀 60 min，用无菌枪头挑取白色絮状物至干净离心管中，无水乙醇充分挥发。

- 6.2.5 70%乙醇（附录 B.7）漂洗沉淀，晾干乙醇充分挥发，剩余无色透明状物质黑木耳基因组 DNA。
- 6.2.6 用 100 μL 的无菌水充分溶解 DNA，加入 2 μL RNAase，37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温静置 8 h~12 h。
- 6.2.7 取出上述静置的 DNA 溶液，用无菌水补足至 300 μL ，加入 5 M NaCl 50 μL ，CTAB 纯化缓冲液（附录 B.4）40 μL ，65 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 10 min。重复 6.2.3、6.2.4、6.2.5 步骤，获得黑木耳基因组 DNA，-20 $^{\circ}\text{C}$ 分装保存备用。不宜反复冻融使用。

6.3 DNA 样品合格性确认

6.3.1 凝胶电泳检测

6.3.1.1 凝胶成像

取 5 μL 上述溶液与 1 μL 加样缓冲液混匀，在 0.8% 琼脂糖凝胶电泳，凝胶成像仪上或紫外透射仪上成像。

6.3.1.2 筛选判定

与 DNA 分子量标记比较，观察所提取的基因组 DNA 质量及片段大小，按下列标准判定：

- 在点样孔附近呈现一条致密亮带，表明是质量好、分子量大且无降解的 DNA 样品，可用于鉴定；
- 呈现连续分布状态，表明是部分降解的 DNA 样品，不建议用于鉴定；
- 观察不到大片段，表明是严重降解的 DNA 样品，不可用于鉴定。

6.3.2 基因组 A260/A280 的 OD 值检测

无菌水清洗微量核酸检测仪的点样孔三次，并校正对照数值为零。将 DNA 适当稀释，取 1 μL DNA 样品在微量核酸检测仪的点样孔，重复三次读取 A260/A280 的 OD 值，依据测得的质量浓度将 DNA 溶液稀释到 25 ng/ μL ~50 ng/ μL 。

7 试验步骤

7.1 PCR 反应

7.1.1 引物

引物见附录 C.1。如果必要可以筛选新的引物。

7.1.2 反应

7.1.2.1 反应体系

PCR 反应的总体积为 10 μL ，含有 10 $\times$ PCR 反应缓冲液，150 $\mu\text{mol/L}$ dNTP，1 U Taq 聚合酶，引物浓度 300 pmol/L，50 ng/ μL 模板 DNA， Mg^{2+} 浓度 2.0 mmol/L，其余用灭菌的双蒸馏水补充至 10 μL 。按上述比例将反应液依次加入 0.2 mL 离心管中，混匀，放入 PCR 仪中，进行 PCR 扩增。设置 PCR 空白对照。

7.1.2.2 反应条件

PCR 扩增仪上进行以下循环：95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min；95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s，35 $^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min，72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min，5 个循环；95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s，50 $^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min，72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min，35 个循环；72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min，4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

7.2 聚丙烯酰胺凝胶电泳检测

7.2.1 玻璃板处理

将玻璃板清洗干净，用双蒸水反复冲洗自然晾干，再用无水乙醇擦拭2遍，吸水纸吸干；在凹板玻璃上涂上剥离硅烷，长板玻璃上涂上亲和硅烷，涂抹均匀，待玻璃板彻底干燥后进行电泳装置组装，胶板厚度0.4 mm。

7.2.2 制胶

取100 mL配制好的8%聚丙烯酰胺胶溶液（附录 B.10），加入10%新配制的过硫酸铵（附录 B.9）700 μ L和TEMED 65 μ L，混匀后，进行灌胶，待胶液充满玻璃板夹层，插入样品梳，注意梳齿下不要产生气泡，凝胶聚合时间2 h以上。

7.2.3 预电泳

胶聚合后拔出梳齿，用双蒸水冲洗点样孔，冲掉碎胶，将凝胶板安装到电泳槽，夹紧，加入1×TBE电极缓冲液（附录 B.12），检查设备连接正常后，160 V电压预电泳2 h。

7.2.4 电泳

预电泳结束后，用移液器轻轻吹打胶面，除去气泡和杂质，每个点样孔加样8 μ L PCR扩增产物，加样结束后，以200 V恒压电泳，电泳过程中确保胶板温度不高于50 $^{\circ}$ C以免玻璃破裂。待前沿指示剂距胶底2 cm~3 cm处停止电泳。

7.2.5 银染

电泳结束后，小心取出玻璃板并分开，将凝胶附着的长玻璃板用双蒸水冲洗15 s，重复两次，再转入0.1% AgNO₃溶液（附录 B.13）中，轻轻摇动染色8 min，然后用双蒸水快速漂洗15 s，放入显影液（附录 B.14）中轻摇至条带清晰可辨为止，最后用双蒸水冲洗2次。

8 试验数据处理

8.1 结果记录

电泳结束后，将聚丙烯酰胺凝胶置于凝胶成像仪上成像。根据DNA分子量标记判断扩增出的目的条带的大小，将电泳结果形成电子文件存档或用照相系统拍照。

8.2 PCR产物质量判断

观察空白对照的凝胶成像照片，按下列结果判断：

- 空白对照为阴性，并且3个平行试验结果一致，则本次试验结果可以使用；
- 在阴性提取对照或PCR空白对照中扩增出了片段，则说明检测过程中发生了污染，需查找原因重新检测。

8.3 判定分析

将供检黑木耳菌株PCR扩增的条带与对照菌株比较，若有显著差别，遗传相似系数小于1，可判定供检菌种与对照菌种为不同菌种；若供检菌种与对照菌种的PCR产物一致，再增加引物个数，进行检测验证。必要时可以增加其他方法佐证。

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 1 mol/L Tris-HCl (pH 8.0)

12.11 g 三羟甲基氨基甲烷 ($C_4H_{11}NO_3$, Tris) 溶解于 80 mL 去离子水中，冷却至室温后用浓盐酸调节溶液的 pH 至 8.0，加水定容至 100 mL，高压灭菌。

B.2 0.5 mol/L 乙二胺四乙酸二钠盐 (EDTA-2Na) 溶液 (pH 8.0)

称取 37.22 g 二水乙二胺四乙酸二钠 ($EDTA-Na \cdot 2H_2O$) 溶解于 160 mL 水，磁力搅拌，用 NaOH 调节溶液的 pH 至 8.0，然后定容至 200 mL，高压灭菌。

B.3 2% CTAB 提取缓冲液

称取 16.364 g 氯化钠溶解于 70 mL 去离子水中，加入 4 g 溴代十六烷基三甲胺 (CTAB)，完全溶解，再加入 20 mL 1 mol/L Tris-HCl (pH 8.0)、8 mL 0.5 mol/L EDTA (pH 8.0)，用水定容至 100 mL，高压灭菌。使用前加入体积分数为 0.1% 的 β -巯基乙醇。

B.4 CTAB 纯化缓冲液

称取 4.1 g NaCl 溶于 80 mL 水中，慢慢加入 10 g CTAB，55 °C 加热溶解，定容至 100 mL。

B.5 氯仿异戊醇 (24:1)

氯仿和异戊醇以 24:1 的体积比进行配制，置于 4 °C 冰箱中保存。

B.6 酚-氯仿异戊醇 (25:24:1)

三者按 25:24:1 的体积比进行配制，4 °C 保存。

B.7 70% 乙醇溶液

量取 70 mL 无水乙醇，加水定容至 100 mL。

B.8 30% 丙烯酰胺溶液

称取 290 g 丙烯酰胺 (C_3H_5NO , Arc)、10 g 甲叉双丙烯酰胺 ($C_7H_{10}N_2O_2$, Bis) 加水定容至 1000 mL。

B.9 10%过硫酸铵

称取1 g过硫酸铵，定容至10 mL，4 ℃保存（保存时间为一周）。

B.10 8%聚丙烯酰胺凝胶溶液

量取5×TBE缓冲液200 mL，30%丙烯酰胺溶液265 mL，加水定容至1000 mL。

B.11 5×TBE缓冲液

分别称取三羟甲基氨基甲烷（Tris）53.9 g和硼酸27.5 g，溶于800 mL水中，加入20 mL 0.5 mol/L 乙二胺四乙酸二钠盐（EDTA-2Na）的水溶液（pH 8.0），用水定容至1000 mL。

B.12 1×TBE缓冲液

量取5×TBE缓冲液100 mL，加水定容至500 mL。

B.13 0.1%硝酸银（AgNO₃）溶液

称取1 g硝酸银（AgNO₃）加水定容至1000 mL。

B.14 显色液

称取8 g氢氧化钠（NaOH）和8 mL 37%甲醛加入1000 mL水中，混匀。

附 录 C
(资料性附录)
试验用引物参照

表C.1 SRAP 引物组合序列

序号	引物组合	引物序列	
		上游引物序列 5' -3'	下游引物序列 5' -3'
1	me1+em2	TGAGTCCAAACCGGATA	GACTGCGTACGAATTGTC
2	me1+em5	TGAGTCCAAACCGGATA	GACTGCGTACGAATTAAC
3	me1+em6	TGAGTCCAAACCGGATA	GACTGCGTACGAATTGCA
4	me1+em8	TGAGTCCAAACCGGATA	GACTGCGTACGAATTAGC
5	me2+em4	TGAGTCCAAACCGGAGC	GACTGCGTACGAATTTGA
6	me2+em5	TGAGTCCAAACCGGAGC	GACTGCGTACGAATTAAC
7	me3+em2	TGAGTCCAAACCGGAAT	GACTGCGTACGAATTGTC
8	me3+em3	TGAGTCCAAACCGGAAT	GACTGCGTACGAATTGAC
9	me4+em8	TGAGTCCAAACCGGACC	GACTGCGTACGAATTAGC
10	me5+em1	TGAGTCCAAACCGGAAG	GACTGCGTACGAATTAAT
11	me5+em3	TGAGTCCAAACCGGAAG	GACTGCGTACGAATTGAC
12	me6+em2	TGAGTCCAAACCGGTAG	GACTGCGTACGAATTTGC
13	me6+em6	TGAGTCCAAACCGGTAG	GACTGCGTACGAATTGCA
14	me6+em7	TGAGTCCAAACCGGTAG	GACTGCGTACGAATTATG