



中华人民共和国国家标准

GB/T 35880—2018

银耳菌种质量检验规程

Regulations for quality inspection of tremella culture

2018-02-06 发布

2018-09-01 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局 发布
中国国家标准化管理委员会



前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由中华全国供销合作总社提出。

本标准由全国银耳标准化工作组(SAC/SWG 9)归口。

本标准起草单位:全国银耳标准化工作组、福建农林大学生命科学学院、古田县食用菌研发中心、古田县食用菌产业管理局。

本标准主要起草人:张琪辉、温志强、雷银清、余新敏、龚宽俊、金珊珊、彭冬祥、林铃。

银耳菌种质量检验规程

1 范围

本标准规定了银耳菌种质量检验的术语和定义、抽样、检验内容与方法、质量要求、判定规则。
本标准适用于银耳菌种质量的检验。

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。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 29368 银耳菌种生产技术规范

GB/T 30989 高通量基因测序技术规程

NY/T 1284 食用菌菌种中杂菌及害虫的检验

3 术语和定义

GB/T 29368 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 GB/T 29368 中的一些术语和定义。

3.1

银耳菌种 tremella culture

生长在适宜基质上具有结实性的银耳菌丝和香灰菌丝的混合培养物。

注:包括银耳母种、银耳原种和银耳栽培种。

3.2

银耳母种 stock culture of tremella

经混合培养或基内分离得到的具有结实性的银耳菌丝和香灰菌丝的混合培养物。

注1:改写 GB/T 29368—2012,定义 3.10。

注2:也称银耳一级种。

3.3

银耳原种 mother spawn of tremella

由银耳母种移植、繁殖的培养物。

注:也称银耳二级种。

3.4

银耳栽培种 spawn of tremella

由银耳原种移植、繁殖的培养物。

注:也称银耳三级种。

3.5

银耳菌种真实性 genuineness of tremella culture

同时含有银耳菌丝和香灰菌丝的菌种。

3.6

银耳菌种活力 tremella culture activity

银耳菌种生长、繁殖、形成子实体的能力。

3.7

白毛团 mycelium pellet

银耳菌丝与香灰菌丝混生在培养基表面形成的白色菌丝团。

[GB/T 29368—2012, 定义 3.4]

3.8

银耳菌丝体 mycelium of tremella

由许多银耳菌丝联结在一起组成的营养体。

注：银耳菌丝颜色白至黄色，纤细，具分枝及分隔，锁状联合明显。

3.9

香灰菌丝体 mycelium of cohabitant fungus

由许多香灰菌丝联结在一起组成的营养体。

注：香灰菌丝细长，呈羽毛状分枝，爬壁能力和分解纤维素能力强，能分泌黑色素，与银耳菌丝伴生。

3.10

漆酶 laccase

含四个铜离子的多酚氧化酶，属于铜蓝氧化酶，以单体糖蛋白的形式存在。

注：漆酶存在于菌类、植物中，亦可存活于空气中，以其独特的催化特性，被广泛应用于生物检测。

4 抽样

4.1 抽样方法

采用随机抽样法。银耳母种、银耳原种、银耳栽培种的抽样数量(瓶、袋)分别以每批生产的菌种数量(以每天的生产数量为一批)为单位，按式(1)计算抽样数量。

$$n = \sqrt{\frac{N}{2}} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

n —— 抽样数量；

N —— 每批数量。

计算结果保留整数。

4.2 样品的运输与保藏条件

样品在运输过程中容器内的温度应控制在 18℃～23℃，湿度自然；待检样品应放置在 18℃～23℃，湿度自然的环境中，24 h 内检测；保留样品应放置在 18℃～23℃，湿度自然的环境中保藏备查，保藏时间 20 天。

5 检验内容与方法

5.1 仪器设备和试剂

5.1.1 仪器设备

5.1.1.1 放大镜：10 倍。

- 5.1.1.2 体视显微镜:50 倍。
- 5.1.1.3 灭菌锅:最大温度可达 126 ℃,最大压力可达 0.155 MPa。
- 5.1.1.4 恒温水浴锅:±1 ℃。
- 5.1.1.5 高速冷冻离心机:转速可达 10 000 r/min。
- 5.1.1.6 超净工作台:洁净等级 100 级@≥0.5 μm。
- 5.1.1.7 PCR 仪。
- 5.1.1.8 电泳仪:可电压 6 V~600 V,电流 4 mA~400 mA。
- 5.1.1.9 凝胶成像系统。
- 5.1.1.10 紫外可见分光光度计。

5.1.2 试剂

除非另有说明,所用试剂均为分析纯,水为符合 GB/T 6682 规定的三级水。

- 5.1.2.1 三羟甲基氨基甲烷。
- 5.1.2.2 二水合乙二胺四乙酸钠。
- 5.1.2.3 盐酸。
- 5.1.2.4 氢氧化钠。
- 5.1.2.5 氯化钠。
- 5.1.2.6 三甲基溴化铵。
- 5.1.2.7 聚乙烯吡咯烷酮。
- 5.1.2.8 氯仿。
- 5.1.2.9 异戊醇。
- 5.1.2.10 饱和酚。
- 5.1.2.11 乙醇。
- 5.1.2.12 核糖核酸酶(RNase 酶)。
- 5.1.2.13 硼酸。
- 5.1.2.14 引物 ITS4。
- 5.1.2.15 引物 ITS5。
- 5.1.2.16 PCR 扩增缓冲液(10×,pH8.3)。
- 5.1.2.17 脱氧核糖核苷三磷酸(dNTP)。
- 5.1.2.18 Taq DNA 聚合酶(1.5 U)。
- 5.1.2.19 核酸染料。
- 5.1.2.20 分子标记(DNA marker):2 000 bp。
- 5.1.2.21 琼脂糖。
- 5.1.2.22 重蒸水:应符合 GB/T 6682 规定的二级水及以上标准。

5.2 感官检验

母种、原种、栽培种感官检验内容和方法如表 1 所示。

表 1 母种、原种、栽培种感官检验内容和方法

菌种级别	检验内容		检验方法
	菌种容器外观	菌丝体外观	
母种	菌种瓶和标签的完整性;菌种瓶塞(盖)的松紧度、干燥度、清洁度、气味、杂菌、害虫和其他污染物	白毛团、香灰菌、子实体生长状态	用眼睛观察、鼻闻、手触摸,必要时用放大镜或体视显微镜观察
原种			
栽培种		白毛团、香灰菌生长状态	

5.3 杂菌及害虫检验

母种、原种、栽培种的杂菌及害虫检验按照 NY/T 1284 的规定进行。

5.4 真实性检验

5.4.1 DNA 的提取

母种、原种、栽培种 DNA 的提取,按照附录 A 的方法进行。也可以采用 DNA 提取试剂盒进行,要求得到的 DNA 浓度不低于 50 ng/ μ L, $1.7 < A_{260}/A_{280} < 2.0$,琼脂糖凝胶电泳结果条带清晰不拖尾。用 TE 缓冲液将 DNA 浓度稀释到 50 ng/ μ L~100 ng/ μ L。

5.4.2 ITS 序列分析

银耳菌种 ITS 序列分析按照附录 B 的方法进行。

5.5 活力检验

银耳菌种活力检验按照附录 C 的方法进行。

6 质量要求

6.1 感官

母种、原种、栽培种感官要求应符合表 2 的规定。

表 2 母种、原种、栽培种感官要求

菌种级别	菌种容器外观	菌丝体外观
母种	标签应注明品种名称、菌种级别、接种日期、保藏条件、保质期、菌种生产单位名称等;菌种瓶应无破损;菌种瓶塞(盖)应干燥、洁净、无脱落、无异味、无杂菌、无害虫和其他污染物	白毛团应结实圆润;香灰菌丝爬壁呈羽毛状,分泌的黑色素均匀无杂色;无拮抗线;原基表面分泌液清澈透明;子实体耳片整齐、无异状
原种		白毛团应结实圆润;香灰菌丝爬壁呈羽毛状,分泌的黑色素均匀无杂色;无拮抗线;原基表面分泌液清澈透明;子实体耳片整齐、无异状
栽培种		培养基表面出现许多小而紧实圆润的白毛团;香灰菌丝生长健壮、分布均匀、呈羽毛状;无拮抗线

6.2 杂菌及害虫

银耳菌种杂菌及害虫检验应同时符合以下规定:

- a) 用放大镜观察,培养物表面没有光滑、润湿的黏稠物;菌种瓶塞(盖)处或培养基面没有与正常颜色不同的霉菌斑点,没有害虫的卵、幼虫、蛹或成虫;
- b) 用显微镜观察,培养物没有不同粗细菌丝或异样孢子存在,没有害虫的卵、幼虫、蛹或成虫;
- c) NA 培养液清澈无浑浊,PDA 培养的菌种菌丝生长速度、菌落特征、孢子特征与正常菌种一致。

6.3 真实性

母种、原种、栽培种真实性应符合以下规定:

- a) ITS 序列分析过程中,电泳结果同时出现 535 bp 和 910 bp 两条片段,且测序结果满足其中 535 bp 的片段序列和银耳的 ITS 序列相似性达 98% 以上;其中 910 bp 的片段序列和香灰菌的 ITS 序列相似性达 99% 以上。银耳和香灰菌的 ITS 序列参见附录 D;
- b) 银耳菌种同时含有银耳 ITS 标记和香灰菌 ITS 标记。

6.4 漆酶活力

母种、原种、栽培种的漆酶活力应符合表 3 的规定。

表 3 母种、原种、栽培种漆酶的酶活力指标

菌种级别	母种	原种	栽培种
酶活力/(U/L)	≥ 2.78	≥ 5.56	≥ 1.39

7 判定规则

7.1 合格菌种

感官、真实性、杂菌及害虫、活力均符合要求的为合格菌种。

7.2 不合格菌种

感官、真实性、杂菌及害虫、活力若有一项不符合要求即为不合格菌种。

附 录 A
(规范性附录)
DNA 提取方法

A.1 溶液配制

A.1.1 1.0 mol/L pH8.0 的 Tris-HCl

称取三羟甲基氨基甲烷(Tris)121.14 g,用 800 mL 蒸馏水溶解,然后用 1.0 mol/L 的 HCl 溶液调节 pH 到 8.0,再用蒸馏水定容至 1 000 mL。

A.1.2 0.5 mol/L pH8.0 的 EDTA 溶液

称取二水合乙二胺四乙酸钠(EDTA-Na·2H₂O)186.1 g,用 800 mL 蒸馏水溶解,然后用 1.0 mol/L 的 NaOH 溶液调节 pH 到 8.0,再用蒸馏水定容至 1 000 mL。

A.1.3 提取缓冲液(SDEB)

称取氯化钠 0.585 g,量取 1 mol/L pH8.0 的 Tris-HCl 溶液 25 mL、0.5 mol/L pH8.0 的 EDTA 溶液 10 mL,用蒸馏水溶解定容至 100 mL,灭菌冷却后待用。

A.1.4 2×CTAB 缓冲液

称取十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)2.0 g、氯化钠 8.2 g、聚乙烯吡咯烷酮 1.0 g,量取 1 mol/L pH8.0 的 Tris-HCl 溶液 10 mL、0.5 mol/L pH8.0 的 EDTA 溶液 4 mL,用蒸馏水溶解定容至 100 mL,灭菌冷却后待用。

A.1.5 TE 缓冲液

量取的 pH 8.0 的 1.0 mol/L Tris-HCl 溶液 1.0 mL 与 pH 8.0 的 0.5 mol/L EDTA 溶液 0.2 mL 混合后,用重蒸水定容至 100 mL。

A.1.6 5×TBE 缓冲液

称取 Tris 54.0 g,硼酸 27.5 g,用 20 mL 0.5 mol/L pH 8.0 的 EDTA 溶液溶解后用蒸馏水定容至 1 000 mL。

A.2 DNA 提取

DNA 提取按照以下步骤进行:

- a) 称取白毛团 0.1 g~0.2 g 放入研钵中,加液氮研磨至粉状后转移到 2 mL 离心管中,往离心管中加入 400 μ L 提取缓冲液(SDEB),涡旋震荡,必要时用手弹离心管使粉末充分溶于 SDEB;
- b) 往离心管中加入 2×CTAB 缓冲液 400 μ L;
- c) 在通风厨中,往离心管中加入饱和酚 250 μ L 和氯仿:异戊醇=24:1 的溶液 250 μ L,室温涡旋 5 min;
- d) 13 000 r/min,4 $^{\circ}$ C 条件下离心 5 min;

- e) 吸取 650 μL 上清液, 转移到 1.5 mL 离心管中;
- f) 往上清液中加入 455 μL (0.7 倍体积) 的异丙醇, 上下颠倒混匀;
- g) 13 000 r/min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下离心 10 min;
- h) 倒掉上清液, 13 000 r/min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下离心 10 s, 用 200 μL 移液枪将离心管中残余的上清液弃除;
- i) 往离心管沉淀中加入 70% 乙醇 900 μL , 用手指弹离心管使白色沉淀悬浮;
- j) 13 000 r/min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下离心 10 min;
- k) 用 1 mL 移液枪吸取上清液弃除;
- l) 13 000 r/min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下离心 10 s, 用 200 μL 的移液枪将离心管中残余的上清液弃除;
- m) 在通风厨中, 打开离心管盖子, 放在 96 孔板上, 让 96 孔板板面与通风厨台面成直角, 放置 10 min;
- n) 往离心管中加入 50 μL ~100 μL 含有 RNase 酶的 TE 缓冲液, 55 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 30 min;
- o) 将溶解后的 DNA 暂存于冰上, 分别采用超微量分光光度计和 1%~1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 浓度和质量。



附 录 B
(规范性附录)
ITS 序列分析

B.1 ITS 引物

引物选用 ITS-基因间隔序列 4(ITS4)和 ITS-基因间隔序列 5(ITS5),引物序列为: ITS4:5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3';ITS5:5'-GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G-3'。

B.2 ITS 反应体系和条件

B.2.1 PCR 反应体系(25 μ L)

PCR 反应的总体积为 25 μ L,含有 2.5 μ L 10 $\times$ PCR 反应缓冲液,0.2 mmol/L dNTP,引物 4 μ mol/L, 20 ng~50 ng 模板 DNA,1.5 U *Taq* 酶,双蒸无菌水补充体积到 25 μ L。按上述比例将反应液各组分加入 0.2 mL PCR 管中,混匀,放入 PCR 仪中,进行 PCR 扩增。

B.2.2 PCR 反应条件

PCR 扩增仪上进行以下循环:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,然后 94 $^{\circ}$ C 变性 45 s,55 $^{\circ}$ C 退火 45 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,扩增 35 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min,4 $^{\circ}$ C 保存。

B.3 测序分析

PCR 产物经 1%~1.5%琼脂糖检测后进行单一片段回收,对回收产物按照 GB/T 30989 方法进行测序,测序结果在 DNAMAN 软件中同附录 D 中银耳和香灰菌的标准序列进行双链比对。

附 录 C
(规范性附录)
漆酶活力测定方法

C.1 溶液准备

C.1.1 0.1 mol/L 邻苯二酚溶液

称取邻苯二酚($C_6H_6O_2$, $M_r=110.11$) 11 g 用蒸馏水溶解并定容至 1 000 mL。

C.1.2 0.1 mol/L pH 4.5 的醋酸-醋酸钠(HAc-NaAc)缓冲液

称取醋酸钠 4.1 g, 用蒸馏水溶解, 再用冰醋酸调节 pH 至 4.5, 定容至 500 mL。

C.1.3 1 mmol/L 的 2'-联氨-双-3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸(ABTS)溶液

称取 0.027 4 g ABTS 用 pH4.5 醋酸钠缓冲液定容至 50 mL。

C.1.4 粗酶液

把银耳菌种里的子实体去除, 然后将上层 2 cm 的菌种用拌种器打碎搅拌均匀; 取搅拌后的菌种 5.0 g, 加入 25 mL 蒸馏水并搅匀, 浸提 2 h, 在 4 ℃ 下 10 000 r/min 离心 10 min 后所得上清液即为粗酶液。设置 3~5 个重复。

C.2 测定步骤

在 5 mL 试管中分别加入 0.1 mol/L pH 4.5 的 HAc-NaAc 缓冲液 2.7 mL、1 mmol/L 的 2'-联氨-双-3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸(ABTS)溶液 0.2 mL、粗酶液 100 μ L, 28 ℃ 水浴保温 30 min, 室温下用紫外分光光度计, 在 420 nm 波长测量反应液的 OD 值, 设置 3 个~5 个重复, 最终结果取平均值。以沸水煮 10 min 灭活的粗酶液为对照。

C.3 结果计算

将 C.2 中测得的 OD 值代入式(C.1)计算得到漆酶活力:

$$\text{漆酶活力(U/L)} = \frac{10^6}{\epsilon} \times \frac{V_{\text{总}}}{V_{\text{酶}}} \times \frac{\Delta OD}{\Delta t} \dots\dots\dots (C.1)$$

式中:

$V_{\text{总}}$ ——反应体系的总体积, 单位为毫升(mL);

$V_{\text{酶}}$ ——粗酶液的体积, 单位为毫升(mL);

ΔOD ——反应前后 OD 值变化;

Δt ——反应时间, 单位为秒(s);

ϵ ——420 nm 处 ABTS 摩尔吸光系数为 36 000 $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$ 。

结果保留 2 位小数。

附录 D

(资料性附录)

银耳和香灰菌的 ITS 序列

D.1 银耳的 ITS 序列

TCCTCCGCTTATTGATATGCTTAAGTTCAGCGGGTAGCCCTACCTGATTTGAGGCCAG
AGTGCAAAAGTAAAGGGGGTTGTGAGCGGCCACAGTCGACGCGTAACTTACGACGTCTGC
GTGAAACCACTAACGCATTTAAGGCCAGCCAGAGAGGCAGGGCCCAAATCCAACACCGCCG
GGTCAGAAACCCAGGGGGTTGAGTCTACATGACACTCAAACAGGCATGCCTTTCGGAATA
CCAAAAGGCGCAAGGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATT
ACTTTTCGCAATTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCGAGAGCCAAGAGATCCGTTGTTGAAAG
TTGTTTCATGTTATGATGCATTACGTTCTTGACATATGTTTGTGTGAAGGCGGCCCGGCC
GGGGGCGCGGTCCGATGTGCACAGGTGTTTGGAAAGGGCCTCGTGGCCCGGTGTAATCTCAA
ATGATCCTTCCGCAGGTTACCTACGGAAACCTTGTTACGACTTTTACTTCC。

D.2 香灰菌的 ITS 序列

TCCTCCGCTTATTGATATGCTTAAGTTCAGCGGGTATTCCTACCTAATCCGAGGTCAA
CCACTATAAGTTATAGGGGGTTTTACGGCAAGCAGCTACAGCCTCCCTGAAAGCGAGTTAA
ACTACTACGCTTAGAGTGTGCTATAACCCCGCCACTAAATTTAAGGAACCTACCCCTCAGTG
AGGGGTAGATTCCCAACGCTAAGCTACAAGGCTTAAGGGTTGTAATGACGCTCGAATAGG
CATGCCCACTAGAATACTAATGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAA
TTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGTCAGAACCAAGA
GATCCGTTGTTGAAAGTTTTAACGTATTTGGTTTTTAAAACCTTGGTTTGATCACCCCTA
AGAACCGTAGTTTATAGGTGGCTTTTGCCAATTTTATGAATTCATTCAGACCCCTCAGAGC
TTTGAACAATTTTCGAGCAGATATTGTAGCTTGAAAACAAACGACTGCAGGGTAAAGAAA
TTATTATTTTCGAGCAATAATTCCAACCAGGAAAGACGTTTTAGCGTAAAGAAAAAAGCA
AAAGCAGATTTTCGATAGTTGTTCAACGCGGGGTTGGATGCACTAGGTGCTTAAGTTTGG
AGCGGTCCTACTCGGCGCCGCCGAGGCCTTGGTCAGCACCTTCACTGCACTAACCGTACCCC
GAAGGATGGGTAGCACTCAGGCACCTCCCCAGCAGAACCCCCCTTAGGGGAGCCCTGTGG
GTAGGCTAAAGCGGTACGCCGAGGAAACATAGGTAGGTTCACAAAGGGTTGGAGTTTTT
GATAACTCAGTAATGATCCCTCCGCTGGTTCACCAACGGAGACCTTGTTACGACTTTTACT
TCC。

参 考 文 献

- [1] NY/T 1846—2010 食用菌菌种检验规程
 - [2] DB35/T 1203—2011 银耳栽培种质量检验规程
-

中 华 人 民 共 和 国
国 家 标 准

银耳菌种质量检验规程

GB/T 35880—2018

*

中国标准出版社出版发行
北京市朝阳区和平里西街甲2号(100029)
北京市西城区三里河北街16号(100045)

网址 www.spc.net.cn

总编室:(010)68533533 发行中心:(010)51780238

读者服务部:(010)68523946

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷
各地新华书店经销

*

开本 880×1230 1/16 印张 1 字数 24 千字
2018年2月第一版 2018年2月第一次印刷

*

书号: 155066 • 1-59495 定价 18.00 元

如有印装差错 由本社发行中心调换
版权专有 侵权必究

举报电话:(010)68510107



GB/T 35880—2018