

DB22

吉 林 省 地 方 标 准

DB 22/T 2083—2014

食用菌菌种真实性鉴定 RAMP 法

Verification of genuineness for edible mushroom spawn — RAMP

2014 - 05 - 04 发布

2014 - 06 - 01 实施

吉林省质量技术监督局

发 布

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

本标准按照GB/T 1.1-2009和GB/T 20001.4-2001 给出的规则起草。

本文件的某些内容可能涉及专利，本文件的发布机构不承担识别这些专利的责任。

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。

本标准主要起草人：宋慧、刘晓龙、金周雨、汤海峰、宗立立、李雨婷、王健、谭旭华、李艳丽。

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

食用菌菌种真实性鉴定 RAMP 法

1 范围

本标准规定了利用RAMP技术鉴定食用菌菌种真实性的分析步骤、结果记录、分析鉴定的方法。

本标准适用于猴头菌 (*Hericium erinaceus*)、小刺猴头菌 (*Hericium caput-medusae*)、珊瑚状猴头菌 (*Hericium coralloides* Pers)、黑木耳 (*Auricularia auricular*) 和光帽鳞伞 (*Pholiota nameko*) 食用菌菌种真实性的鉴定。

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。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 12728 食用菌术语

3 术语和定义

GB/T 12728 界定的以及下列术语和定义适用于本文件。

3.1

随机扩增微卫星 DNA 多态性标记 Random Amplified Microsatellite Polymorphism (RAMP)

是以 1 条与微卫星序列互补的 SSR 引物和 1 条 RAPD 随机引物相组合，对基因组中的微卫星序列与随机引物互补序列之间的 DNA 片段进行随机扩增的技术。

3.2

菌种真实性 Verification of Spawn

供检菌种与对照菌种的符合性

4 RAMP 标记原理

采用RAMP标记扩增基因组中微卫星序列与随机引物互补序列之间的DNA片段，通过比较试样与对照指纹图谱，从而对菌种进行鉴定。

5 仪器设备及试剂

见附录A。

6 溶液配制

见附录B。

7 分析步骤

7.1 菌丝培养

7.1.1 培养基的制备

称取去皮马铃薯200.0 g，制备成均匀碎块（约1cm³），加蒸馏水1000 mL，煮沸30 min，滤除固体残渣，在马铃薯汁液中加入葡萄糖20.0 g，硫酸镁 0.5 g，磷酸二氢钾0.46 g，磷酸氢二钾1.0 g，琼脂18.0 g，加热使其充分溶解，定容至1000 mL，pH自然，装入试管，塞好试管塞。121℃-126℃，高压灭菌30 min，摆成斜面冷却后使用。

7.1.2 接种

将供检菌株与对照菌株在相同条件下培养，培养量可供做3个平行鉴定试验。将待供检菌株与对照菌株在无菌条件下，切取（3~5）mm×（3~5）mm大小一块母种，迅速转移至试管斜面培养基中央位置，每个菌株接种20支~30支试管。

7.1.3 恒温培养

将接种后的试管置恒温培养箱中，分别在25℃条件下避光培养黑木耳9 d~12 d，猴头菌、小刺猴头菌、珊瑚状猴头菌培养12 d~15 d；在20℃条件下避光培养光帽鳞伞15 d~20 d。

7.2 DNA 提取

7.2.1 称取0.1 g的菌丝置于无菌研钵中，在液氮中充分研磨成粉末；

7.2.2 将菌丝粉末迅速转移至1.5 mL离心管中，加入600 μL的65℃预热的CTAB DNA提取缓冲液，置于65℃水浴45~60 min，每5 min~15 min颠倒混匀；

7.2.3 加入等体积苯酚-氯仿-异戊醇（25:24:1）抽提10 min，颠倒混匀，4℃，12000 rpm离心5 min；

7.2.4 取上清加等体积氯仿-异戊醇（24:1）抽提10 min，颠倒混匀，4℃，12000 rpm离心5 min，重复7.2.4抽提1次；

7.2.5 加等体积异丙醇-20℃充分沉淀；

7.2.6 4℃，5000 rpm离心10 min，弃上清；

7.2.7 加500 μL的70%乙醇洗涤沉淀2次，室温干燥，加40 μL的TE缓冲液（pH 8.0）溶解；

7.2.8 加入10 mg/mL的RNase溶液至终浓度达50 μg/mL，去除RNA，37℃水浴1 h；

7.2.9 重复操作7.2.3~7.2.5，加入100 μL TE缓冲液（pH 8.0），使DNA充分溶解，并置于4℃冰箱中保存备用

注：长期保存应采用-20℃；多次测定需分装保存，每次使用后不再重新冻存。

7.3 DNA 纯度检测

7.3.1 电泳检测

取1%琼脂糖溶液40 mL加入4 μL的溴化乙锭，缓慢倒入凝胶托盘中冷却，避免出现气泡，插入梳子，待胶体凝固后，缓慢拔出梳子，将凝胶托盘置于装有1×TAE缓冲液的水平电泳槽中；在凝胶点样孔中加入5 μL菌株DNA提取液与2 μL的6×Loading buffer的混合液体，用5 μL的λHindIII Marker作为参照；采用100 V恒压电泳，待溴酚蓝前沿指示剂移动到距凝胶前沿0.5 cm~1 cm处，停止电泳

(约 1 h)；在凝胶成像系统中观察并照相；电泳条带应呈现单一清晰状态，否则重新提取 DNA。

7.3.2 紫外检测

取 3 μL DNA 提取液，用无菌水稀释至一定倍数，混匀后，加入石英比色皿中，加入量为比色皿体积的 3/4，并以无菌水或 TE 缓冲液为空白对照，用紫外-可见分光光度计分别在 260 nm 和 280 nm 下测量其 OD 值，计算 $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ 比值，如果该比值在 1.6~1.8 之间，可以进行 PCR 反应，否则重新提取 DNA。

$$\text{待测样品含量}(\mu\text{g}/\text{mL}) = \text{OD}_{260} \text{ 值} \times \text{稀释倍数} \times 50$$

7.4 PCR 扩增

7.4.1 RAMP 引物及其使用

由 4 条 SSR 引物和 10 条 RAPD 引物组成 40 对核心引物。使用时首先选用 5 对参见附录 C（按菌种分类引物）。如果没有得到好的结果，则选用其他组合。

7.4.2 PCR 反应体系

25 μL 的反应体积，含 dd H₂O 为 3.25 μL ，10 $\times$ PCR 缓冲液为 2.50 μL ，2.5 mmol/L dNTPs 为 2.00 μL ，10 $\mu\text{mol/L}$ Primer1 为 1.00 μL ，10 $\mu\text{mol/L}$ Primer2 为 1.00 μL ，5 U/ μL Taq DNA 聚合酶为 0.25 μL ，5 ng/ μL DNA 模板为 15.00 μL 。

7.4.3 PCR 反应程序

设置空白对照。

94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 2 min，1 个循环；94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min，45 $^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min，72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 2 min，共 45 个循环；72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min，4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

7.5 PCR 产物电泳检测

参见 7.3.1 方法。配制 2% 琼脂糖凝胶，在点样孔中加入 5 μL 的菌株 PCR 产物与 2 μL 的 6 $\times$ Loading buffer 的混合液体，取 DL2000 Marker 和 150 bp Marker 各 3 μL 混合后作为参照。

8 结果判定

电泳结束，将凝胶置于凝胶成像仪或紫外透射仪观察，照相保留实验结果。

如果三个平行结果一致，实验结果可以使用。

供检菌株与对照菌株差异明显，判定供检菌株与对照菌株不属于同一菌种或同一品种，如只出现一对引物差异，则判定为近似菌种或近似品种。

供检菌株与对照菌株之间的谱带未检测出差异，再选定 5 个引物做进一步验证试验。必要时可增加其他方法佐证。

附录 A
(规范性附录)
主要仪器设备及试剂

A.1 主要仪器设备

- A.1.1 PCR扩增仪;
- A.1.2 紫外-可见分光光度计;
- A.1.3 凝胶成像系统或紫外透射仪;
- A.1.4 冷冻离心机 (能离心0.2~1.5 mL离心管, 转速在 1×10^4 rpm以上);
- A.1.5 高压灭菌装置 (可以达到温度121.3 °C, 压力0.15 MPa);
- A.1.6 超净工作台;
- A.1.7 分析天平 (感量0.0001 g);
- A.1.8 微量移液器: 规格分别为10 μ L、20 μ L、100 μ L、200 μ L、1000 μ L, 连续可调;
- A.1.9 酸度计;
- A.1.10 恒温培养箱;
- A.1.11 冰箱: 最低温度-20°C;
- A.1.12 水浴锅或金属浴: 控温精度 $\pm 1^\circ\text{C}$;
- A.1.13 电泳仪 (具有稳流4~400 mA连续可调 and 稳压5~500 V连续可调);
- A.1.14 水平电泳槽及配套的制胶附件;
- A.1.15 照相系统。

A.2 主要试剂

- A.2.1 十六烷基三乙基溴化铵 (CTAB);
- A.2.2 聚乙烯吡咯烷酮 (PVP-40)
- A.2.3 溴酚蓝
- A.2.4 乙二胺四乙酸二钠 ($\text{EDTA-Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$);
- A.2.5 三羟甲基氨基甲烷 (Tris-base);
- A.2.6 β -巯基乙醇
- A.2.7 苯酚
- A.2.8 三氯甲烷;
- A.2.9 异丙醇: (2-丙醇; 二甲基甲醇; $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}$; CAS RN:67-63-0)
- A.2.10 异戊醇;
- A.2.11 盐酸;
- A.2.12 氢氧化钠 (NaOH);
- A.2.13 氯化钠;
- A.2.14 10×Buffer缓冲液: 含 Mg^{2+} 25 mmol/L;
- A.2.15 四种脱氧核苷三磷酸: dATP、dTTP、dGTP、dCTP (10 mmol/L each);
- A.2.16 Taq DNA聚合酶: 2 U/ μ L;
- A.2.17 琼脂糖;

- A. 2. 18 DNA分子量标准：DL2000；
- A. 2. 19 核酸染色剂；按说明使用。（警告——使用本试剂的人员应有正规实验室的工作经验。本标准并未指出所有可能的安全问题。使用者有责任采取适当的的安全和健康措施，并保证符合国家有关法规规定的条件。）
- A. 2. 20 甲叉双丙烯酰胺（bisacrylamide）；
- A. 2. 21 丙烯酰胺（acrylamide）；
- A. 2. 22 无水乙醇；
- A. 2. 23 四甲基乙二胺（TEMED）；
- A. 2. 24 过硫酸铵（APS）；
- A. 2. 25 冰醋酸；
- A. 2. 26 DNA分子量标准

附录 B
(规范性附录)
试剂的配制

除另有说明外，在分析中仅使用确认为分析纯的试剂和 GB/T 6682 规定的一级水。

B.1 溴酚蓝前沿指示剂

加1g水溶性钠型溴酚蓝于100ml水中，搅拌或涡旋混合直到完全溶解(溴酚蓝其钠盐易溶解在水里)。

B.2 1 mol/L Tris-HCl (pH 8.0) 溶液

称取Tris 121.1 g，加去离子水溶解，冷却至室温后用浓HCl溶液调节溶液的pH至8.0 (约42 mL)，定容至1000 mL，高压灭菌。

B.3 10 mol/L 氢氧化钠溶液

称取氢氧化钠80 g，用去离子水溶解后，定容至200 mL。

B.4 0.5 mol/L 乙二胺四乙酸 (pH 8.0) 溶液

称取二水乙二胺四乙酸二钠186.1 g，加去离子水700 mL完全溶解(加热)后，冷却至室温，用10 mol/L 氢氧化钠溶液调pH值至8.0，加去离子水定容至1000 mL，高压灭菌。

B.5 CTAB DNA提取缓冲液

1 mol/L Tris-HCl (pH 8.0) 10 mL，0.5 mol/L EDTA (pH 8.0) 4 mL，5 mol/L NaCl 56 mL，1-2g CTAB，1 g PVP-40，65 °C水浴溶解，定容至100 mL，高压灭菌。使用前加入0.1% 的β-巯基乙醇。

B.6 TE缓冲液 (pH 8.0)

量取1 mol/L Tris-HCl (pH 8.0) 溶液10 mL和0.5 mol/L 乙二胺四乙酸 (pH 8.0) 溶液2 mL，加水定容至1000 mL，分装高压灭菌。

B.7 50×TAE缓冲液

称取Tris 242.2 g，量取冰醋酸57.2 mL，加水溶解后，再加入0.5 mol/L乙二胺四乙酸 (pH 8.0) 溶液100 mL，加水定容至1000 mL。使用时稀释50倍。

B.8 1% 琼脂糖溶液

称取0.4 g琼脂糖于三角瓶中，加入40 mL的1×TAE缓冲液，微波炉加热溶解。

B.9 70% 乙醇溶液

取70 mL无水乙醇，加水定容至100 mL。

本标准仅供内部使用 不得翻印

附 录 C
(资料性附录)
分析用 DNA 引物参照

引物对表中相对应的核心引物对(一)为优选引物。

表C.1 黑木耳核心引物对(一)

编号	类型	核苷酸序列	编号	类型	核苷酸序列
I2	SSR	5'-GTTGTGTGTG-3'	S8	RAPD	5'-GTCCACACGG-3'
I3	SSR	5'-GTCACACACA-3'	S8	RAPD	5'-GTCCACACGG-3'
I4	SSR	5'-GCCACACACA-3'	S1	RAPD	5'-GTGACATGCC-3'
I4	SSR	5'-GCCACACACA-3'	S5	RAPD	5'-ACGCACAACC-3'
I4	SSR	5'-GCCACACACA-3'	S8	RAPD	5'-GTCCACACGG-3'

表C.2 黑木耳核心引物对(二)

编号	类型	核苷酸序列	编号	类型	核苷酸序列
I1	SSR	5'-GCTGTGTGTG-3'	S2	RAPD	5'-TTGGCAGGG-3'
I1	SSR	5'-GCTGTGTGTG-3'	S5	RAPD	5'-ACGCACAACC-3'
I3	SSR	5'-GTCACACACA-3'	S1	RAPD	5'-GTGACATGCC-3'
I3	SSR	5'-GTCACACACA-3'	S5	RAPD	5'-ACGCACAACC-3'
I4	SSR	5'-GCCACACACA-3'	S2	RAPD	5'-TTGGCAGGG-3'
I4	SSR	5'-GCCACACACA-3'	S6	RAPD	5'-CAGCACCCAC-3'

表C.3 光帽鳞伞核心引物对(一)

编号	类型	核苷酸序列	编号	类型	核苷酸序列
I3	SSR	5'-GTCACACACA-3'	S6	RAPD	5'-CAGCACCCAC-3'
I4	SSR	5'-GCCACACACA-3'	S1	RAPD	5'-GTGACATGCC-3'
I4	SSR	5'-GCCACACACA-3'	S3	RAPD	5'-GGTGACGAG-3'
I4	SSR	5'-GCCACACACA-3'	S5	RAPD	5'-ACGCACAACC-3'
I4	SSR	5'-GCCACACACA-3'	S8	RAPD	5'-GTCCACACGG-3'

表C.4 光帽鳞伞核心引物对（二）

编号	类型	核苷酸序列	编号	类型	核苷酸序列
I1	SSR	5'-GCTGTGTGTG-3'	S9	RAPD	5'-CTGCTGGGAC-3'
I2	SSR	5'-GTTGTGTGTG-3'	S10	RAPD	5'-AGATGCAGCC-3'
I3	SSR	5'-GTCACACACA-3'	S3	RAPD	5'-GGTGACGCAG-3'
I3	SSR	5'-GTCACACACA-3'	S7	RAPD	5'-CCAGATGCAC-3'
I3	SSR	5'-GTCACACACA-3'	S8	RAPD	5'-GTCCACACGG-3'
I4	SSR	5'-GCCACACACA-3'	S2	RAPD	5'-TTGGCACGGG-3'
I4	SSR	5'-GCCACACACA-3'	S4	RAPD	5'-GTCGCCGTCA-3'
I4	SSR	5'-GCCACACACA-3'	S6	RAPD	5'-CAGCACCCAC-3'
I4	SSR	5'-GCCACACACA-3'	S9	RAPD	5'-CTGCTGGGAC-3'
I4	SSR	5'-GCCACACACA-3'	S10	RAPD	5'-AGATGCAGCC-3'

表C.5 猴头菌属核心引物对（一）

编号	类型	核苷酸序列	编号	类型	核苷酸序列
I1	SSR	5'-GCTGTGTGTG-3'	S6	RAPD	5'-CAGCACCCAC-3'
I1	SSR	5'-GCTGTGTGTG-3'	S8	RAPD	5'-GTCCACACGG-3'
I2	SSR	5'-GTTGTGTGTG-3'	S6	RAPD	5'-CAGCACCCAC-3'
I3	SSR	5'-GTCACACACA-3'	S6	RAPD	5'-CAGCACCCAC-3'
I4	SSR	5'-GCCACACACA-3'	S8	RAPD	5'-GTCCACACGG-3'

表C.6 猴头菌属核心引物对（二）

编号	类型	核苷酸序列	编号	类型	核苷酸序列
I2	SSR	5'-GTTGTGTGTG-3'	S1	RAPD	5'-GTGACATGCC-3'
I2	SSR	5'-GTTGTGTGTG-3'	S2	RAPD	5'-TTGGCACGGG-3'
I2	SSR	5'-GTTGTGTGTG-3'	S3	RAPD	5'-GGTGACGCAG-3'
I2	SSR	5'-GTTGTGTGTG-3'	S5	RAPD	5'-ACGCACAACC-3'
I3	SSR	5'-GTCACACACA-3'	S4	RAPD	5'-GTCGCCGTCA-3'

表C.7 分析用 SSR 和 RAPD 引物

编 号	类 型	核 苷 酸 序 列
I1	SSR	5'-GCTGTGTGTG-3'
I2	SSR	5'-GTTGTGTGTG-3'
I3	SSR	5'-GTCACACACA-3'
I4	SSR	5'-GCCACACACA-3'
S1	RAPD	5'-GTGACATGCC-3'
S2	RAPD	5'-TTGGCACGGG-3'
S3	RAPD	5'-GGTGACGCAG-3'
S4	RAPD	5'-GTCGCCGTCA-3'
S5	RAPD	5'-ACGCACAACC-3'
S6	RAPD	5'-CAGCACCCAC-3'
S7	RAPD	5'-CCAGATGCAC-3'
S8	RAPD	5'-GTCCACACGG-3'
S9	RAPD	5'-CTGCTGGGAC-3'
S10	RAPD	5'-AGATGCAGCC-3'