

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 1097—2006

食用菌菌种真实性鉴定 酯酶同工酶电泳法

Verification of genuineness for edible mushroom
spawn—Esterase isozyme electrophoresis

2006-07-10 发布

2006-10-01 实施

中华人民共和国农业部 发布

前 言

本标准的附录 A、附录 B、附录 C 为规范性附录。

本标准由中华人民共和国农业部提出并归口。

本标准起草单位：中国农业科学院农业资源与农业区划研究所、农业部微生物肥料和食用菌菌种质量监督检验测试中心。

本标准主要起草人：黄晨阳、张金霞、陈强、张瑞颖、郑素月、管桂萍、胡清秀、李俊。

食用菌菌种真实性鉴定 酯酶同工酶电泳法

1 范围

本标准规定了食用菌菌种真实性鉴定方法 酯酶同工酶电泳法的原理、仪器、试剂、电泳操作、试验结果的观察和统计分析。

本标准适用于糙皮侧耳(*Pleurotus ostreatus*)、白黄侧耳(*Pleurotus cornucopiae*)、肺形侧耳(*Pleurotus pulmonarius*)、佛州侧耳(*Pleurotus ostreatus* var. *florida*)、香菇(*Lentinula edodes*)、杏鲍菇(*Pleurotus eryngii*)、双孢蘑菇(*Agaricus bisporus*)、黑木耳(*Auricularia auricula*)、茶树菇(*Agrocybe cylindrica*)等食用菌菌种真实性的鉴定,包括母种(一级种)、原种(二级种)和栽培种(三级种)。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件,其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本标准,然而,鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件,其最新版本适用于本标准。

NY/T 528 食用菌菌种生产技术规程

3 术语和定义

NY/T 528 中确立的以及下列术语和定义适用于本标准。

3.1

菌种真实性 genuineness of spawn

供检菌种与对照菌种的符合性。

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食用菌菌种的真实性进行鉴定。

5 仪器

5.1 电泳仪

5.2 垂直板电泳槽

5.3 高速冷冻离心机(10 000 r/min 以上)

5.4 冰箱

5.5 离心管

5.6 研钵(备有研杵)

5.7 分析天平(感量 0.01 g、0.000 1 g 各一台)

5.8 微量进样器

6 试剂

除非另有说明,在分析中仅使用确认为分析纯的试剂和蒸馏水或去离子水或相当纯度的水。

6.1 样品提取缓冲液(pH 7.5)

称取 6.02 g 磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$), 0.5 g 磷酸二氢钠($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 溶于水中, 并稀释至 100 mL。

6.2 过硫酸铵溶液

1.4 g/L。称取 0.14 g 过硫酸铵, 溶于水中, 并稀释至 100 mL。用时现配。

6.3 核黄素溶液

0.04 g/L。称取 0.004 g 核黄素, 溶于水中, 并稀释至 100 mL。用时现配。

6.4 蔗糖溶液

400 g/L。称取 40 g 蔗糖, 溶于水中, 并稀释至 100 mL。

6.5 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 1mol/L 盐酸溶解, 然后加 N,N,N',N'-甲基乙二胺($\text{C}_6\text{H}_{16}\text{N}_2$, TEMED) 0.23 mL, 用水定容至 100 mL, 4℃ 贮存。

6.6 浓缩胶缓冲液(pH 6.7)

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 盐酸溶解, 然后加 N,N,N',N'-甲基乙二胺($\text{C}_6\text{H}_{16}\text{N}_2$, TEMED) 0.46 mL, 用水定容至 100 mL, 4℃ 贮存。

6.7 分离胶母液

称取 28.0 g 丙烯酰胺($\text{C}_3\text{H}_5\text{NO}$, Acr), 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, 并稀释至 100 mL, 用棕色瓶 4℃ 贮存。

6.8 浓缩胶母液

称取 10.0 g 丙烯酰胺($\text{C}_3\text{H}_5\text{NO}$, Acr), 2.5 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, 并稀释至 100 mL, 用棕色瓶 4℃ 贮存。

6.9 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), 甘氨酸($\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$) 28.8 g, 溶于水中, 并稀释至 1 L, 使用时稀释 10 倍。

6.10 磷酸缓冲液(pH 6.5)

称取 2.26 g 磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$), 2.14 g 磷酸二氢钠($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 溶于水中, 并稀释至 100 mL。

6.11 染色液

称取 50 mg 乙酸-1-萘酯($\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{O}_2$), 50 mg 乙酸-2-萘酯($\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{O}_2$), 100 mg 固兰 RR 盐($\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{ClN}_3\text{O}_3 \cdot 1/2\text{ZnCl}_2$), 用 5 mL 丙酮溶解, 再加入磷酸缓冲液(6.10) 150 mL, 过滤。

6.12 乙酸溶液

70 mL/L。量取 14 mL 乙酸, 加到适量水中, 并稀释至 200 mL。

6.13 溴酚蓝指示液

称取溴酚蓝 0.1 g, 加 0.05 mol/L 氢氧化钠溶液 3.0 mL 使之溶解, 用水稀释至 100 mL。

6.14 石英砂

7 分析步骤

7.1 试样制备

7.1.1 菌丝体培养

将被检菌种与对照菌种在相同条件下培养,培养量以各自可以做3个平行试验为准。培养基和培养条件见附录A。

7.1.2 试样制备

收集被检菌种与对照菌种的菌丝体各3份,样品研磨见附录B。将研磨后的样品在4℃下10 000 r/min离心10 min,取其上清液,将上清液、蔗糖溶液(6.4)和溴酚蓝指示液(6.13)按5+1+1的比例混合,混合液即为电泳样品。

7.2 凝胶制备

7.2.1 分离胶

根据食用菌种类配制分离胶,分离胶配制见附录C,然后将分离胶灌入胶室至距短玻璃板上沿2.5 cm~3.0 cm,加入适量的水封住胶面,待凝胶聚合后将水吸出。

7.2.2 浓缩胶

将浓缩胶缓冲液(6.6)、浓缩胶母液(6.8)、核黄素溶液(6.3)和蔗糖溶液(6.4)按1+2+1+4比例混合,搅拌均匀,灌入胶室,立即插好样品梳,日光或灯光下聚合。

7.2.3 点样

浓缩胶聚合后,小心抽出样品梳,吸去点样孔中多余的水分,注入电极缓冲液(6.9),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;用微量进样器吸取适量样品加入样品孔中。点样时被检样品与标准样品间隔一个点样孔。

7.2.4 电泳

将电泳槽和电泳仪连接后,打开电源,采用稳流电泳,电流为1 mA/cm~2 mA/cm,待指示剂进入分离胶后,将电泳槽放入冰箱内进行低温电泳,并将电流升至2 mA/cm~3 mA/cm。待溴酚蓝指示剂下移至距胶底部约1 cm时,停止电泳。

7.2.5 取胶染色

倒出电极缓冲液,卸下胶条,在水中启开玻璃板,取出凝胶片,浸入染色液中,室温下染色15 min~30 min,用蒸馏水冲洗后置乙酸溶液(6.12)中固定。

8 试验结果的观察和统计分析

观察样品酶带的位置,计算每条酶带的迁移率(Rf), Rf 按下列公式计算:

$$Rf_n = \frac{d_n}{d}$$

式中:

Rf_n ——条带 n 的迁移率;

d_n ——条带 n 的迁移距离,单位为厘米(cm);

d ——溴酚蓝的迁移距离,单位为厘米(cm)。

计算结果表示到小数点后两位。

同时将凝胶片照相或用扫描仪扫描存图。根据对照菌种每条酶带在被检菌种中出现与否,计算被检菌种和对照菌种二者之间的相似系数。

附 录 A
(规范性附录)
菌丝培养条件

A.1 培养基配方

A.1.1 马铃薯 200 g(用浸出汁),葡萄糖 20 g,琼脂 20 g,水 1 000 mL,pH 自然。

A.1.2 Difco PDA 培养基。

A.2 培养条件

直径 75 mm 或 90 mm 培养皿,24℃ ± 1℃ 避光培养;糙皮侧耳、白黄侧耳、肺形侧耳、佛州侧耳和茶树菇培养 9 d;杏鲍菇培养 12 d;黑木耳、香菇和双孢蘑菇培养 15 d。

附 录 B
(规范性附录)
样品研磨方法

B.1 液氮研磨法

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 1.0 mL 样品提取液(6.1)。

B.2 冰浴研磨法

称取菌丝体 0.5 g,加入 1.0 mL 样品提取液(6.1)和少量石英砂,冰浴研磨,将样品收集于 1.5 mL 离心管中。

附 录 C
(规范性附录)
分 离 胶 配 制

糙皮侧耳、白黄侧耳、肺形侧耳、佛州侧耳、茶树菇、杏鲍菇、黑木耳、香菇分离胶浓度 7 %，将分离胶缓冲液(6.5)、分离胶母液(6.7)、水和过硫酸铵溶液(6.2)按 1+2+1+4 比例混合，搅拌均匀，即可使用。

双孢蘑菇分离胶浓度 9%，将分离胶缓冲液(6.5)、分离胶母液(6.7)、水和过硫酸铵溶液(6.2)按 2+5+1+8 比例混合，搅拌均匀，即可使用。
