

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 1743—2009

食用菌菌种真实性鉴定 RAPD法

Verification of genuineness for edible
mushroom spawn—RAPD

2009-04-23 发布

2009-05-20 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 C 为规范性附录,附录 B 为资料性附录。

本标准由中华人民共和国农业部种植业管理司提出并归口。

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。

食用菌菌种真实性鉴定 RAPD 法

1 范围

本标准规定了利用 RAPD 技术鉴定食用菌菌种真实性的方法。

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 floridanus*)、杏鲍菇(*Pleurotus eryngii*)、白灵菇(*Pleurotus nebrodensis*)、香菇(*Lentinula edodes*)、双孢蘑菇(*Agaricus bisporus*)、黑木耳(*Auricularia auricula*)、茶树菇(*Agrocybe cylindrica*)、鸡腿菇(*Coprinus comatus*)、金针菇(*Flammulina velutipes*)、灰树花(*Grifola frondosa*)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。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

NY/T 1097—2006 食用菌菌种真实性鉴定 酯酶同工酶电泳法

3 原理

RAPD 方法是以一系列不同的随机排列的寡聚核苷酸单链(通常为十聚体)为引物,对所研究的基因组 DNA 进行 PCR 扩增,RAPD 所用的一系列引物的 DNA 序列各不相同,但对于任一特定引物,它同基因组 DNA 序列有其特定的结合位点。这些特定的结合位点在基因组某些区域内的分布如符合 PCR 扩增的反应条件,即在一定范围内模板 DNA 上有与引物互补的反相重复序列时,就可扩增出此范围内的 DNA 片段。不同物种基因组 DNA 中的这种反相重复序列的数目和间隔的长短不同,就可导致这些特定结合位点分布发生相应的变化,而使 PCR 产物增加、减少或发生分子量的改变。通过对 PCR 产物的检测和比较,即可识别这些物种基因组 DNA 的多态片段。

4 试剂与材料

除非另有说明,在分析中仅使用分析纯试剂,水为 GB/T 6682 规定的二级水。

- 4.1 70%乙醇溶液:见附录 A.1。
- 4.2 1 mol/L Tris-HCl(pH 8.0):见附录 A.2。
- 4.3 0.5 mol/L 乙二胺四乙酸二钠盐(EDTA)溶液:见附录 A.3。
- 4.4 CTAB 提取缓冲液:见附录 A.4。
- 4.5 TE 缓冲液:见附录 A.5。
- 4.6 50×TAE 缓冲液:见附录 A.6。
- 4.7 加样缓冲液:见附录 A.7。
- 4.8 核酸染料:按使用说明操作。
- 4.9 苯酚—三氯甲烷—异戊醇溶液=25+24+1。
- 4.10 三氯甲烷—异戊醇溶液=24+1。

- 4.11 无水乙醇
- 4.12 四种脱氧核糖核苷酸(dATP、dCTP、dGTP、dTTP)混合溶液。
- 4.13 *Taq* DNA 聚合酶。
- 4.14 10×PCR 反应缓冲液(含 $MgCl_2$)。
- 4.15 引物:参见附录 B。
- 4.16 DNA 分子量标记。

5 仪器

- 5.1 紫外分光光度计。
- 5.2 高速冷冻离心机(转速不小于 10 000 r/min)。
- 5.3 高压灭菌锅。
- 5.4 PCR 扩增仪。
- 5.5 电泳仪。
- 5.6 电泳槽。
- 5.7 紫外透射仪。
- 5.8 凝胶成像系统或照相系统。

6 操作步骤

6.1 DNA 模板的制备

6.1.1 菌丝体培养

将供检菌种与对照菌种在相同条件下培养,培养量可供做 3 个平行试验。

采用 PDA 培养基配方: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。

培养条件:直径 75 mm 或 90 mm 培养皿,24℃±1℃避光、隔膜培养。

糙皮侧耳、白黄侧耳、肺形侧耳、佛州侧耳和茶树菇培养 7 d~9 d;金针菇、鸡腿菇、白灵菇、杏鲍菇培养 9 d~12 d;灰树花、黑木耳、香菇和双孢蘑菇培养 12 d~15 d。

6.1.2 DNA 模板的制备

按照附录 C 制备供检菌种、对照菌种和阴性提取对照的 DNA 模板。

6.2 RAPD 扩增

6.2.1 反应成分

PCR 反应的总体积为 25 μ L,含有 1×PCR 反应缓冲液,0.1 mmol/L dNTP,0.2 μ mol/L 引物,1U *Taq* DNA 聚合酶,20 ng~50 ng 模板 DNA,加灭菌双蒸水至 25 μ L。按上述比例将反应液各组分加入 0.2 mLPCR 管中,混匀,放入 PCR 仪中,进行 PCR 扩增。

设置 PCR 空白对照。

6.2.2 反应条件

PCR 扩增仪上进行以下循环:94℃预变性 5 min;94℃变性 1 min,35℃复性 1 min,72℃延伸 2 min,共 35 个循环;72℃延伸 7 min,4℃保存。

6.2.3 PCR 产物的电泳检测

将适量的琼脂糖加入 1×TAE 缓冲液中,加热将其溶解,配制成琼脂糖浓度为 1.5%的溶液,待冷却至 50℃~60℃,加入核酸染料,混匀,将其倒入制胶模具,室温下凝固成凝胶后,放入 TAE 缓冲液中。取 PCR 扩增产物和加样缓冲液按照 5+1 比例混匀,点样,其中一个泳道中加入 DNA 分子量标记,接通电源进行电泳。以 5 V/cm 电压恒压电泳,待溴酚蓝距凝胶前缘 1 cm 左右停止电泳。

6.2.4 结果记录

电泳结束后,将琼脂糖凝胶置于凝胶成像仪上或紫外透射仪上成像。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。

如果在阴性提取对照或 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。如果空白对照为阴性,并且 3 个平行试验结果一致,则本次试验结果可以使用。

6.3 鉴定

将供检菌种的 RAPD 结果与对照菌种的 RAPD 结果相比较,若供检菌种与对照菌种有显著差别,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,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)
试 剂 的 配 制

A.1 70%乙醇溶液

取 70 mL 无水乙醇,加水定容至 100 mL。

A.2 1 mol/L Tris-HCl(pH 8.0)

在 80 mL 去离子水中溶解 12.11 g 三羟甲基氨基甲烷(Tris),冷却至室温后用浓盐酸调节溶液的 pH 至 8.0(约需 4.2 mL 浓盐酸),加水定容至 100 mL,高压灭菌。

A.3 0.5 mol/L 乙二胺四乙酸二钠盐(EDTA)溶液(pH 8.0)

在 160 mL 水中加入 37.22 g 二水乙二胺四乙酸二钠($\text{EDTA} \cdot \text{Na} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$),在磁力搅拌器上剧烈搅拌,用氢氧化钠调节溶液的 pH 至 8(约需 4 g 氢氧化钠颗粒),然后定容至 200 mL,高压灭菌。

A.4 CTAB 提取缓冲液

在 70 mL 去离子水中加入 8.18 g 氯化钠、2 g 溴代十六烷基三甲胺(CTAB)、2 g 聚乙烯吡咯烷酮(PVP),摇动容器使溶质完全溶解,然后加入 10 mL 1 mol/L Tris-HCl(pH 8.0)、4 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 0.1%的 β -巯基乙醇。

A.5 TE 缓冲液

在 80 mL 水中依次加入 1 mol/L Tris-HCl(pH 8.0)1 mL、0.5 mol/L EDTA(pH 8.0)0.2 mL,加水定容至 100 mL,高压灭菌。

A.6 50×TAE 缓冲液

称取 Tris 242.2 g,先用 300 mL 水加热搅拌溶解后,加 100 mL 0.5 mol/L EDTA 的水溶液(pH 8.0),用冰乙酸调 pH 至 8.0,然后用水定容到 1 L。

A.7 加样缓冲液

称取溴酚蓝 250 mg,加水 10 mL,在室温下过夜溶解;再称取二甲苯青 FF 250 mg,用 10 mL 水溶解;称取蔗糖 40 g,用 30 mL 水溶解,合并 3 种溶液,用水定容至 100 mL,在 4℃中保存。

附 录 B
(资料性附录)
试 验 用 引 物

1. 5'- AATCGGGCTG - 3'
2. 5'- ACTTCGCCAC - 3'
3. 5'- AGGGGTCTTG - 3'
4. 5'- AGTCAGCCAC - 3'
5. 5'- CAATCGCCGT - 3'
6. 5'- CAGGCCCTTC - 3'
7. 5'- CCCATGGCCC - 3'
8. 5'- CCGATATCCC - 3'
9. 5'- CCGCATCTAC - 3'
10. 5'- GAAACGGGTG - 3'
11. 5'- GACCGCTTGT - 3'
12. 5'- GACGGATCAG - 3'
13. 5'- GGGAATTCGG - 3'
14. 5'- GGGTAACGCC - 3'
15. 5'- GGTGATCAGG - 3'
16. 5'- GTGACGTAGG - 3'
17. 5'- GTGAGGCGTC - 3'
18. 5'- GTGATCGCAG - 3'
19. 5'- GTTGCCAGCC - 3'
20. 5'- TCGGCGATAG - 3'
21. 5'- TGAGTGGGTG - 3'
22. 5'- TGCCGAGCTG - 3'

如果必要可以筛选新的引物。

附 录 C
(规范性附录)
DNA 的提取和质量检测

C.1 DNA 的提取

- C.1.1 称取 0.2 g 菌丝,置研钵中,在液氮中充分研磨成粉末。
- C.1.2 迅速转入 1.5 mL 离心管中,加入 600 μ L 65℃预热的 CTAB 提取缓冲液。
- C.1.3 置于 65℃水浴 40 min~60 min,不时轻轻地摇动混匀。
- C.1.4 10 000 r/min,离心 10 min,将上清液转移至已灭菌的 1.5 mL 离心管中,弃沉淀。
- C.1.5 加等体积苯酚—三氯甲烷—异戊醇溶液,轻轻摇匀,室温静置 5 min。
- C.1.6 10 000 r/min 离心 10 min,将上清液转移至已灭菌的 1.5 mL 离心管中,弃下层有机相。
- C.1.7 加等体积的三氯甲烷—异戊醇溶液,轻轻摇匀,室温静置 5 min。
- C.1.8 10 000 r/min 离心 10 min,观察分界面有无沉淀,将上清液转移至已灭菌的 1.5 mL 离心管中,弃下层有机相。
- C.1.9 根据需要,上清液可用三氯甲烷—异戊醇溶液提取多次直至中间层无明显沉淀。
- C.1.10 加 2 倍体积冰冷的无水乙醇,轻轻混匀,−20℃沉淀 20 min。
- C.1.11 8 000 r/min 离心 5 min,弃上清液。
- C.1.12 加 70%乙醇洗涤沉淀 2~3 次。
- C.1.13 待沉淀干燥后,加 100 μ L TE 缓冲液,使 DNA 充分溶解,−20℃保存。

C.2 DNA 质量的检测

C.2.1 凝胶电泳检测

取 5 μ L 上述溶液与 1 μ L 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,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,若 DNA 质量好、分子量大且无降解,在点样孔附近呈现一条致密亮带;若 DNA 部分降解,则呈现连续分布状态;若严重降解,则观察不到大片段 DNA。

C.2.2 紫外吸收检测

将 DNA 适当稀释,测定并记录其在 260 nm 和 280 nm 处的紫外光吸收率,以一个 OD_{260} 值相当于 50 μ g/mL DNA 浓度来计算纯化的 DNA 浓度。要求 DNA 溶液 OD_{260}/OD_{280} 的比值在 1.7~2.0 之间。

依据测得的质量浓度将 DNA 溶液稀释到 25 ng/ μ L~50 ng/ μ L,−20℃保存。

注:由于基因组 DNA 不宜反复冻融,因此建议对于需要经常使用的 DNA 需要分装,多管存放,需要使用时取出,融化后应该立即使用,使用结束后,剩余的 DNA 应在 4℃冰箱短期保存,存放时间不宜超过 14 d。