

DB32

江 苏 省 地 方 标 准

DB32/T 3681—2019

小麦产毒镰刀菌种群分子分型技术 □ 规范

Technical specification for molecular typing of toxin-producing fusarium species in
wheat



2019 – 12 – 04 发布

2019 – 12 – 25 实施

江苏省市场监督管理局

发 布

前 言

本标准按照GB/T 1.1—2009给出的规则起草。

本标准由江苏省农业科学院提出并归口。

本标准起草单位：江苏省农业科学院。

本标准主要起草人：邢宇俊、仇剑波、董飞、徐剑宏、史建荣、吴季荣、陆丹丹。

小麦产毒镰刀菌种群分子分型技术规范

1 范围

本标准规定了小麦产毒镰刀菌种群以及产毒素化学型区分中镰刀菌DNA的提取、PCR扩增、电泳检测及结果判定方法和操作规范。

本标准适用于产毒镰刀菌种群及产毒化学类型的定性PCR检测。

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 4789.15 食品安全国家标准 食品微生物检验 霉菌和酵母计数

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

3 原理

产毒镰刀菌经过提取 DNA 后，利用特异性区分引物，通过普通 PCR 判断该样品是否为禾谷镰刀菌或亚洲镰刀菌。根据关键特异基因 Tri11 来区分该样品是否产生 3ADON、15ADON 或者雪腐镰刀烯醇 NIV 化学型。

4 试剂和材料

4.1 水：应符合 GB/T 6682 中一级水的规格。

4.2 PDA 培养基：按 GB4789.15 规定。

4.3 CTAB 缓冲液：55 mmol/L CTAB、1400 mmol/L 氯化钠（NaCl）、20 mmol/L EDTA、100 mmol/L Tris-HCl（pH 8.0），121℃高压灭菌 20 min，储存于 2℃~8℃。

4.4 TE 缓冲液。

4.5 RNA 酶溶液（5μg/μL）。

4.6 蛋白酶 K（20mg/mL）。

4.7 Tri 饱和酚。

4.8 酚：三氯甲烷：异丙醇（25：24：1）；三氯甲烷：异戊醇（24：1）。

4.9 异丙醇。

4.10 区分禾谷镰刀菌和亚洲镰刀菌引物

Fg16F: 5'-CTCCGGATATGTTGCGTCAA-3'

Fg16R: 5'-GGTAGGTATCCGACATGGCAA-3'

预期亚洲镰刀菌扩增片段大小为 497 bp；预期禾谷镰刀菌扩增片段大小为 410 bp。

4.11 区分 3A-DON、5A-DON 和 NIV 化学型引物

Tri11-CON: 5'-GACTGCTCATGGAGACGCTG-3'

Tri11-3ADON: 5'-TCCTCATGCTCG GTGGACTCG-3'

Tri11-15ADON: 5'-TGGTCCAGT TGTCCGTATT-3'

Tri11-NIV: 5'-GTAGGTTCCATTGC TTGTTC-3'

预期产 3ADON 毒素类型扩增片段大小为 334 bp; 产 15ADON 毒素类型扩增片段大小为 279bp ; 产 NIV 毒素类型扩增片段大小为 497 bp。

4.12 无水乙醇。

4.13 DNA Ladder: 可以清楚区分 100 bp~1000 bp 的 DNA 片段。

4.14 dNTPs 混合溶液: 将浓度为 10 mmol/L 的 dATP、dTTP、dGTP、dCTP 四种脱氧核糖核苷酸溶液等体积混合。

4.15 Taq DNA 聚合酶、PCR 扩增缓冲液及 25 mmol/L 氯化镁溶液。

4.16 50×TAE 缓冲液: 称取 484g Tris, 量取 114 mL 冰乙酸, 200mL 0.5 mol/L EDTA, 溶于水中, 定容至 2 L。分装后高压灭菌备用。使用时用水稀释成 1×TAE 电泳缓冲液 (工作液)。

4.17 加样缓冲液。

4.18 琼脂糖。

4.19 溴化乙锭。

5 主要仪器和设备

5.1 天平: 感量 0.1 g 和 0.1 mg。

5.2 PCR 扩增仪: 升降温速度>1.5 °C/s, 孔间温度差异<1.0 °C。

5.2 电泳槽、电泳仪等电泳装置。

5.3 紫外透射仪。

5.4 凝胶成像系统或照相系统。

5.5 高速冷冻离心机: 转速不低于 12000 r/min。

5.6 培养箱。

6 检测

6.1 样品制备与培养

参照 GB 4789.15 对样品进行稀释与培养。

6.2 DNA 提取

从培养皿上刮取菌丝 0.2 g~0.5 g 于 1.5 mL 灭菌离心管中, 加入少许石英砂用细玻璃棒充分碾碎菌丝, 加入 500 μL CTAB、40 μL 蛋白酶 K, 震荡均匀, 65 °C 水浴 30min; 加入 500 μL 酚: 三氯甲烷: 异戊醇 (25: 24: 1), 强烈震荡, 12000r/min 离心 15 min; 吸取上层水相至 1.5 mL 离心管中, 加入等体积的异丙醇, 震荡混匀, 12000r/min 离心 15 min; 弃上清液, 用预热至 65 °C TE 缓冲液溶解 DNA (TE 量视 DNA 沉淀的多少而定); 加入 5 μL RNA 酶溶液, 37 °C 水浴 30 min; 加入 200 μL 三氯甲烷: 异戊醇 (24: 1), 强烈震荡, 12000r/min 离心 15 min; 吸取上层水相至新的 1.5 mL 离心管中, 加入等体积的异丙醇, 震荡均匀, 12000r/min 离心 10 min; 弃上清液, 加入 1 mL 70% 冰乙醇洗涤沉淀 DNA, 12000r/min 离心 10 min; 弃上清液, 无菌条件下自然干燥, 加预热至 65 °C TE 缓冲液溶解 DNA (如不能及时检验, 可将提取液于 -20 °C 保存)

也可使用等效的真菌基因组 DNA 提取试剂盒。

6.3 PCR 检测

6.3.1 区分禾谷镰刀菌和亚洲镰刀菌检测

6.3.1.1 PCR 反应体系

在 PCR 管中按表 1 依次加入反应试剂，混匀。也可采用经验证的、等效的定性 PCR 试剂盒配制反应体系。

表 1 PCR 检测反应体系

试剂	终浓度	体积
水		—
10×PCR 缓冲液	1×	2.5 μL
25 mmol/L 氯化镁溶液	1.5 mmol/L	1.5 μL
dNTPs 混合溶液（各 2.5 mmol/L）	各 0.2 mmol/L	2.0 μL
10 μmol/L Fg16F	0.3 μmol/L	0.75 μL
10 μmol/L Fg16R	0.3 μmol/L	0.75 μL
Taq DNA 聚合酶	0.025 U/μL	—
25 mg/L DNA 模板	2 mg/L	2.0 μL
总体积		25.0 μL
“—”表示体积不确定，如果 PCR 缓冲液中含有氯化镁，则不加氯化镁溶液，根据 Taq DNA 聚合酶的浓度确定其体积，并相应调整水的体积，使反应体系总体积达到 25.0 μL。		

6.3.1.2 PCR 反应程序

反应程序为：94 ℃变性 5 min；94 ℃变性 30 s，58 ℃退火 30 s，72 ℃延伸 30 s，共进行 35 次循环；72 ℃延伸 10 min。

不同仪器、不同 Taq DNA 聚合酶可根据要求将反应条件做适当调整。

6.3.1.3 PCR 结果检测

用电泳缓冲液（1×TAE）制备 2% 琼脂糖凝胶（55℃~60℃时加入溴化乙锭至终浓度为 0.5 μg/ml，也可在电泳后进行染色）。取 8 μL~15 μL PCR 扩增产物，加入 2 μL 上样缓冲液混合，进行点样，用 DNA Ladder 作参照，9 v/cm 恒压电泳，电泳 40 min~60 min，电泳结束后，置于凝胶成像仪上或紫外透射仪上成像。根据 DNA 分子量标准估计扩增条带的大小，将电泳结果形成电子文件存档或用照相系统拍照。

在样品 PCR 扩增的同时，应设置 PCR 阴性对照、PCR 阳性对照和 PCR 空白对照，实验重复三次。

6.3.2 3ADON、15ADON 和 NIV 化学型检测

6.3.2.1 PCR 反应体系

在 PCR 管中按表 2 依次加入反应试剂，混匀。也可采用经验证的、等效的定性 PCR 试剂盒配制反应体系。

表 2 PCR 检测反应体系

试剂	终浓度	体积
水		—
10×PCR 缓冲液	1×	2.5 μL
25 mmol/L 氯化镁溶液	1.5 mmol/L	1.5 μL
dNTPs 混合溶液（各 2.5 mmol/L）	各 0.2 mmol/L	2.0 μL
10 μmol/L Tri11-CON	0.3 μmol/L	0.75 μL
10 μmol/L Tri11-3ADON	0.3 μmol/L	0.75 μL
10 μmol/L Tri11-15ADON	0.3 μmol/L	0.75 μL
10 μmol/L Tri11-NIV	0.3 μmol/L	0.75 μL
Taq DNA 聚合酶	0.025 U/μL	—
25 mg/L DNA 模板	2 mg/L	2.0 μL
总体积 10 μmol/L		25.0 μL
“—”表示体积不确定，如果 PCR 缓冲液中含有氯化镁，则不加氯化镁溶液，根据 Taq DNA 聚合酶的浓度确定其体积，并相应调整水的体积，使反应体系总体积达到 25.0 μL。		

6.3.2.2 PCR 反应程序

反应程序为：94 ℃变性 5 min；94 ℃变性 30 s，58 ℃退火 30 s，72 ℃延伸 30 s，共进行 35 次循环；72 ℃延伸 10 min。

不同仪器、不同 Taq DNA 聚合酶可根据要求将反应条件做适当调整。

6.3.2.3 PCR 结果检测

用电泳缓冲液（1×TAE）制备 2% 琼脂糖凝胶（55℃~60℃时加入溴化乙锭至终浓度为 0.5 μg/mL，也可在电泳后进行染色）。取 8 μL~15 μL PCR 扩增产物，加入 2 μL 上样缓冲液混合，进行点样，用 DNA Ladder 作参照，9 v/cm 恒压电泳，电泳 40 min~60 min，电泳结束后，置于凝胶成像仪上或紫外透射仪上成像。根据 DNA 分子量标准估计扩增条带的大小，将电泳结果形成电子文件存档或用照相系统拍照。

在样品 PCR 扩增的同时，应设置 PCR 阴性对照、PCR 阳性对照和 PCR 空白对照，实验重复三次。

7 判定

7.1 区分禾谷镰刀菌和亚洲镰刀菌判定

7.1.1 样品中扩增出预期 497 bp 条带，则表示样品是亚洲镰刀菌；样品未扩增出预期 497 bp 条带，则表示样品不是亚洲镰刀菌；

7.1.2 样品中扩增出预期 410 bp 条带，则表示样品是禾谷镰刀菌；样品未扩增出预期 410 bp 条带，则表示样品不是禾谷镰刀菌。

7.2 3ADON、5ADON 和 NIV 化学型判定

7.2.1 样品中扩增出预期 334 bp 条带，表示样品产 3ADON；样品未扩增出预期 334 bp 的条带，则表示样品不产 3ADON；

7.2.2 样品中扩增出预期 279 bp 条带，表示样品产 15ADON；样品未扩增出预期 279 bp 的条带，则表示样品不产 15ADON；

7.2.3 样品中扩增出预期 497 bp 条带，表示样品产 NIV；样品未扩增出预期 497 bp 的条带，则表示样品不产 NIV。

8 质量控制

阳性对照 PCR 中扩增片段大小与预期片段大小一致，而阴性对照、空白对照 PCR 中没有预期扩增片段，表明 PCR 检测反应体系正常工作。否则，重新检测。
