

DB2308

黑龙江省佳木斯市地方标准

DB2308/T XXXX—2023

稻瘟病菌无毒基因检测 PCR 法

(征求意见稿)

起草单位：黑龙江省农业科学院水稻研究所

联系人：陆文静

联系电话：18004541526

邮箱：reachwenjing@163.com

2023-XX-XX 发布

2023-XX-XX 实施

佳木斯市市场监督管理局 发布

前 言

本文件按照 GB/T 1.1-2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件某些内容可能涉及专利，本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由黑龙江省佳木斯市农业农村局提出并归口。

本文件由黑龙江省佳木斯市场监督管理局批准发布。

本文件起草单位：黑龙江省农业科学院佳木斯水稻研究所。

本文件主要起草人：陆文静、周通、王桂玲、周雪松、韩笑。

本文件 2023 年首次发布。

稻瘟病菌无毒基因检测 PCR 法

1 范围

本文件规定了稻瘟病菌 (*Magnaporthe grisea*) 无毒基因的分子检测方法。包括分子检测原理、仪器设备、试剂及样品、防污染措施、实验步骤及结果分析。

本文件适用于黑龙江省佳木斯市地区水稻稻瘟病菌无毒基因 *AVR-Pii*、*AVR-Pik*、*AVR-Pita*、*AVR-Piz-t*、*AVR-Pia*、*AVR-Co39* 的 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/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 19495.2 转基因产品检测 实验室技术要求

3 术语和缩略语

下列术语和缩略语适用于本标准。

3.1 正向引物

处于 DNA 双链上游的引物，简称 F 引物。

3.2 反向引物

处于 DNA 双链下游的引物，简称 R 引物。

3.3 DNA:

Deoxyribonucleoside triphosphate, 脱氧核糖核酸。

3.5 PCR:

Polymerase chain reaction, 聚合酶链式反应

3.6 Goldenview :

核酸染料, 替代溴化乙锭。

3.7 DNA Marker :

标准分子量的核酸标记。

4 原理

提取稻瘟病菌菌丝 DNA, 根据无毒基因保守区域序列设计特异性引物, 对样品进行 PCR 扩增, 根据序列比对结果, 依据是否扩增得到预期的 DNA 片段大小及特定的序列来判断样品是否携带该无毒基因。

5 仪器设备

电子天平、瓷质研钵、研杵、Eppendorf 移液枪、水浴锅、高速离心机、NanoDrop 2000: 核酸浓度测定仪、基因扩增仪、琼脂糖电泳槽及电泳仪、凝胶成像系统, 其它相关仪器设备。

6 试剂及样品

10% CTAB、5M NaCl、0.5M EDTA (PH 8.0)、1M Tris, pH 8.0、DNA 提取、1×TE 缓冲液、氯仿: 异戊醇 (24: 1)、75%乙醇、Goldenview (代替溴化乙锭)、干燥的稻瘟病菌丝 0.05g~0.1 g 等。

除非另有说明, 仅使用分析纯试剂和 dd H₂O 或符合 GB/T 6682 规定的一级水。

7 实验过程防污染措施

检测过程中防止污染的措施按照GB/T19495.2中的规定执行。

8 实验步骤

8.1 稻瘟病菌菌丝 DNA 提取

取单孢培养后烘干的菌丝 0.1 g 于研钵中加入液氮用研杵研磨，菌粉转入 2 mL 灭菌离心管，并加入 65 °C 预热的 DNA 提取缓冲液 700 μ L，盖盖混匀，置于水浴锅内 65 °C 温浴 1 h

(期间间隔 15 min 摇动混匀，使 DNA 提取缓冲液与菌丝充分混合，保证菌丝 DNA 的提取效率)。12000 r/min 离心 10 min，取上清液 600 μ L 置于新的 2 mL 离心管，加入等体积氯仿 / 异戊醇(24 : 1)振荡抽提 5min~10 min，12000 r/min 离心 10 min。缓慢吸取上清液 500 μ L 置于新的 1.5 mL 离心管，加入等体积氯仿 / 异戊醇 (24 : 1)振荡抽提 5min~10 min，12000 r/min 离心 10 min。缓慢吸取上清液 300 μ L 于新的 1.5 mL 离心管，加入 900 μ L-20 °C 预冷的无水乙醇，-20 °C 放置 10 min，12000 r/min 离心 10 min。倒掉上清液，用 75%乙醇洗涤沉淀 3 次，干燥后加入 100 μ L 1 $\times$ TE 缓冲液溶解，利用 NanoDrop 2000 测定菌株 DNA 浓度，并用 1 $\times$ TE 缓冲液稀释至 100 ng/ μ L，-20 °C 保存备用。

8.2 PCR 反应

8.2.1 将 DNA、PrimeSTAR Buffer (5 $\times$)、dNTP Mixture、正向引物 (F) 及反向引物 (R) 及重蒸馏水置于冰上融化，引物序列参考附录 A。

8.2.2 在 0.2mL 加盖无菌离心管中，按先后顺序加入以下试剂：

PrimeSTAR Buffer (5 $\times$)	6 μ L
dNTP Mixture (2.5 mM)	2.4 μ L
正向引物及反向引物(100 nM)	0.2 μ L (终浓度：0.2 μ M~0.3 μ M)
样本 DNA	1 μ L (20- 100ng)
dd H ₂ O	20.1 μ L
PrimeSTAR HS DNA Polymerase (2.5U/ μ L)	0.3 μ L

混合后用移液枪抽打混匀，封盖后短暂离心待用。

8.2.3 将离心管置于 PCR 仪中, 反应程序为: 95 ℃ 预变性 5 min, 95 ℃ 变性 30 s, 55 ℃~61 ℃ 退火 30 s, 72 ℃ 延伸 30 s~60 s (每对引物的退火温度及延伸时间参见附录 A), 29 个循环, 72 ℃ 总延伸 5 min, 4 ℃ 保存。

8.3 电泳

用 200 mL 玻璃烧杯称取琼脂糖 0.5 g, 加入 0.5×TBE 缓冲液 50 mL。杯口用锡箔纸盖好封严, 置微波炉中加热至琼脂糖完全溶解。待琼脂糖温度达到 50 ℃ 左右时加入 2.5 μL Goldenview (代替溴化乙锭), 混匀, 迅速将胶倒至 模具中, 放上样梳。约 20 min 待胶完全凝固后, 拔下上样梳, 置于盛有 0.5×TBE 缓冲液的电泳槽中。吸取 5 μL PCR 反应液, 上样 130 V, 电泳 0.5h~1.0 h。电泳结束后, 取下琼脂糖凝胶, 利用凝胶成像系统观察电泳条带大小, 照相。

8.4 PCR 产物测序

试剂盒纯化 25 μL PCR 产物, 提交至生物技术公司测序。

9 结果分析

鉴定稻瘟病菌中是否携带某些抗稻瘟病基因时, 如不能获得特定长度的 PCR 产物, 则可判断试样中不含有相应的无毒基因; 如可扩增出特定长度的 PCR 产物, 则需结合电泳结果和测序结果共同分析。所有无毒基因的扩增子序列应与美国国家生物技术信息中心 (NCBI) 数据库中对应序列相比对。

附 录 A
(规范性附录)
用于扩增无毒基因的引物

引物	无毒基因	引物序列 (5'-3')		延伸时间 (s)	退火温度 (℃)
Primer1	<i>Avr1-Co39</i>	F	CTCTGAACAACCTAAGCAACA	40	55
		R	CAACCTGGACTCTTATTGATC		
Primer2	<i>Avr-Pia</i>	F	TTATTGCTACCACCTTCCTC	30	55
		R	GTAAGTAAGTGGGCTTGGCGTT		
Primer3	<i>Avr-Pii</i>	F	CCTCGGCTTCTTGTATATTACT	30	55
		R	TAAATCGTGCGCTTTCAGAT		
		F	CTGCACACATCAACAGTCTT		

Primer4	<i>Avr-Pik</i>	R	TCACAGTTAAGGCAACGTAG	30	56
Primer5	<i>Avr-Pita1</i> *	F	GTTTCCGCCTTTATTGGTTT	50	56
		R	AATCCCATCCCATTCGTAAC		
Primer6	<i>Avr-Pita2</i> *	F	TTCTCTAACCTGCCACGATA	30	55
		R	CCTCCATTCCAACACTAACG		
Primer7	<i>Avr-Piz-t</i>	F	GATCAAATGAACACCAGGAA	30	55
		R	CGATGAAGAATGGAAGAATG		
