ICS 65.020.20
B 05

DB23

黑龙江省佳木斯市地方标准

DB2308/T 182—2023

稻瘟病菌无毒基因检测 PCR 法技术规范

地方标准信息服务平台

2023-12-11 发布　　2024-01-11 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。

地方标准信息服务平台

稻瘟病菌无毒基因检测 PCR 法技术规范

1 范围

本文件规定了稻瘟病菌（*Magnaporthe grisea*）无毒基因检测 PCR 法技术规范。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：

Deoxyribonucleic acid，脱氧核糖核酸。

3.4 PCR：

Polymerase Chain Reaction，聚合酶链式反应

地方标准信息服务平台

3.5 Goldenview：

核酸染料，替代溴化乙锭。

3.6 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、移液枪、水浴锅、高速离心机、核酸浓度测定仪（NanoDrop 2000）、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

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

除非另有说明，仅使用分析纯试剂和 dd H_2O 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/T 19495.2 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 ℃ 预热的 DNA 提取缓冲液 700 μL，盖盖混匀，置于水浴锅内 65 ℃ 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 μL 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 5 min～10 min，12000 r/min 离心 10 min。缓慢吸取上清液 500 μL 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 5 min～10 min，12000 r/min 离心 10 min。缓慢吸取上清液 300 μL 于新的 1.5 mL 离心管，加入 900 μL、-20℃ 预冷的无水乙醇，-20℃ 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 μL 1 × TE 缓冲液溶解，利用 NanoDrop 2000 测定提取 DNA 浓度，并用 1 × TE 缓冲液稀释至 100 ng/μL，-20 ℃ 保存备用。

8.2 PCR 反应

8.2.1 将 DNA、PrimeSTAR Buffer（5 ×）、 dNTP Mixture、正向引物（F）及反向引物（R）及 ddH_2O 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×）	6 μL
dNTP Mixture （2.5 mM）	2.4 μL
正向引物及反向引物（100 nM）	0.2 μL （终浓度：0.2 μM～0.3 μM）
样本 DNA	1 μL （20- 100 ng）
dd H_2O	20.1 μL
PrimeSTAR HS DNA Polymerase（2.5U/μL）	0.3 μL

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，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 0.5 h～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

使用试剂盒纯化 25 μL PCR 产物，提交至生物技术公司测序。

地方标准信息服务平台

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	***Avr1-Co39***	F	CTCTGAACAACTAAGCAACA	40	55
		R	CAACCTGGACTCTTATTGATC		
Primer2	***Avr-Pia***	F	TTATTGCTACCACCTTCCTC	30	55
		R	GTAGTAACTGAGTTGGCGTT		
Primer3	***Avr-Pii***	F	CCTCGGCTTCTTGTATATTACT	30	55
		R	TAAATCGTGCGCTTTCAGAT		
Primer4	***Avr-Pik***	F	CTGCACACATCAACAGTCTT	30	56
		R	TCACAGTTAAGGCAACGTAG		
Primer5	***Avr-Pita1****	F	GTTTCCGCCTTTATTGGTTT	50	56
		R	AATCCCATCCCATTCGTAAC		
Primer6	***Avr-Pita2****	F	TTCTCTAACCTGCCACGATA	30	55
		R	CCTCCATTCCAACACTAACG		
Primer7	***Avr-Piz-t***	F	GATCAAATGAACACCAGGAA	30	55
		R	CGATGAAGAATGGAAGAATG		

地方标准信息服务平台