

基于 $^{60}\text{Co}\gamma$ 辐射技术创制秸秆降解真菌种 质资源筛选鉴定技术规程

（征求意见稿）

起草单位：东北农业大学

联系人：胡小梅

联系电话：15246782509

邮 箱：50026280@qq.com

XXXX-XX-XX 发布

XXXX-XX-XX 实施

黑龙江省市场监督管理局 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。

请注意本文件的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。

本文件由黑龙江省农业农村厅提出。

本文件起草单位：东北农业大学、哈尔滨学院、黑龙江省农业科学院。

本文件主要起草人：胡小梅、李凤兰、董士嘉、王浩、谷春涛、高爱丽、孙以新、冯旭、高云飞、虞琦。

基于 ^{60}Co γ 辐射技术创制秸秆降解真菌种质资源筛选鉴定技术规程

1 范围

本标准规定了基于 ^{60}Co γ 辐射技术创制秸秆降解真菌种质资源筛选鉴定技术规程的术语和定义、辐射处理要求、鉴定方法等。

本标准适用于基于 ^{60}Co γ 辐射诱变创制秸秆降解真菌种质资源。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；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 10252 钴-60辐照装置的辐射防护与安全标准

GB 17568 γ 辐射装置设计建造和使用规范

SN/T 2632 微生物菌种常规保藏技术规程

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1 菌种

面向农业废弃物秸秆降解和转化利用过程中发挥生理代谢作用的产孢丝状真菌。

3.2 ^{60}Co γ 辐射

选择金属元素钴源（ ^{60}Co ）的 γ 射线进行辐射处理，辐射装置应符合GB 17568的规定，辐射过程应符合GB 10252的规定。

3.3 辐射诱变

利用 ^{60}Co γ 辐射使真菌遗传物质发生突变，并从突变群体中筛选出所需要的突变菌株。

4 诱变材料

根据辐射目的选用秸秆降解真菌及资源作为诱变材料。

4.1 培养基

PDA培养基：见附录A.1。

高粱粒培养基：见附录A.2。

Mandels-Andreotti（MA）培养基：见附录A.3。

产纤维素酶培养基：见附录A.4。

产木质素酶培养基：见附录A.5。

4.2 菌种活化

将冻存的菌种在 PDA 培养基上采用四区划线方法进行活化，待长出单菌落后，取单菌落进行后续制备孢子悬浮液，以保证菌种纯度。

4.3 孢子悬浮液

将菌种的单菌落接种至高粱粒培养基中，30℃培养至产生大量新鲜孢子，用无菌 0.9% (w/v) 生理盐水洗脱并四层无菌纱布过滤除去菌丝体，在 3000×g 条件下离心 20 min 收集沉淀。将沉淀再用适量生理盐水重悬后，利用血球计数板计算孢子浓度，并用生理盐水将孢子浓度稀释至 1×10^6 CFU/mL~ 1×10^8 CFU/mL。

5 辐射处理

5.1 辐射剂量选择

根据辐射材料特性和辐射需求，选择⁶⁰Co γ 辐射的适合剂量，真菌孢子悬浮液的辐射剂量为1000Gy（低剂量）、1500Gy（中剂量）、2000Gy（高剂量）。

6 辐射材料鉴定

6.1 突变菌株鉴定

将辐照后的孢子悬浮液稀释 100 倍，取 100 μL 稀释孢子液涂布在 PDA 平板上。在 28℃ 下培养至菌落长出，进行形态学观察，并与野生型菌株进行比较，获得形态上具有差异的突变菌株。

诱变结果以致死率表示，致死率按式（1）计算：

$$LR = \frac{C_c - C_T}{C_T} \times 100\% \dots\dots\dots (1)$$

式中：LR—致死率；

C_c —阴性对照 PDA 平板菌落数；

C_T —试验组 PDA 平板菌落数。

6.2 突变菌株酶活力测定

将菌株接种至产纤维素酶培养基中，在菌株最适产酶条件下培养 3-10 天。在 4℃，10000×g 条件下离心 5 min。上清液为粗酶液，用于测定纤维素酶活力。

6.2.1 纤维素酶和半纤维素酶活力测定

(1) 内切葡聚糖酶活力：见附录 B 中 B.1。

(2) 外切葡聚糖酶活力：见附录 B 中 B.2。

(3) β-葡萄糖苷酶活力：见附录 B 中 B.3。

(4) 木聚糖酶活力：见附录 B 中 B.4。

$$\text{酶活力计算公式} = \frac{m}{M \times t} \times 1000 \times n$$

式中：m 为根据标准曲线方程计算出相应葡萄糖或对硝基苯酚质量 (mg)；
M 为葡萄糖或对硝基苯酚摩尔质量 (g/mol)；
t 为酶解反应时间 (min)；
1000 为转化因子，1mmol=1000 μmol；
n 为样品总稀释倍数。

6.2.2 木质素酶活力测定

将菌株接种于产木质素酶培养基中，在菌株最适产酶条件下培养 3~10 天。在 4℃，10000×g 条件下离心 5 min。上清液为粗酶液，用于测定木质素酶活力。

- (1) 漆酶活力：见附录 B 中 B. 5。
- (2) 锰过氧化物酶活力：见附录 B 中 B. 6。
- (3) 木质素过氧化物酶活力：见附录 B 中 B. 7。

$$\text{酶活力计算公式} = \frac{\Delta A}{\varepsilon \times l \times t} \times \frac{V_{\text{总}}}{V_{\text{酶}}} \times 10^6$$

式中：A 为 t 时间内吸光度变化值；

l 为比色皿厚度 (cm)；

t 为反应时间 (min)；

V_总 为反应体系体积 (mL)；

V_酶 为反应中酶液的体积 (mL)；

ε 为摩尔消光数 (L·mol⁻¹·cm⁻¹)，ABTS：ε₄₂₀=36000 L·mol⁻¹·cm⁻¹，

Mn³⁺：ε₂₄₀=6500 L·mol⁻¹·cm⁻¹，VA：ε₃₁₀=9300 L·mol⁻¹·cm⁻¹。

6.3 秸秆降解菌株保藏

选取优势突变菌株，按照 SN/T 2632-2010 规定进行保藏。

附录 A

(规范性附录)

培养基和试剂

A.1 PDA 培养基:

200 g 去皮土豆, 加 ddH₂O 煮沸 20 min, 纱布过滤得滤液, 加 20 g 葡萄糖和 15 g 琼脂溶解后, ddH₂O 定容至 1 L, 121 °C 灭菌 20 min 后备用。

A.2 高粱粒培养基:

称取 5 g 高粱粒, 加 ddH₂O 5 mL, 121°C 灭菌 20 min 后备用。

A.3 Mandels-Andreotti (MA) 培养基:

17.907 g Na₂HPO₄ · 12H₂O, 1.4 g (NH₄)₂SO₄, 2.0 g KH₂PO₄, 0.60 g MgSO₄ · 7H₂O, 0.60 g CaCl₂, 0.3 g Urea, 0.5 mL Tween-80, 2.0 g Peptone, 1 mL MA Trace elements, 加 ddH₂O 溶解后, 用柠檬酸调节 pH 至 5.5, 定容至 1L。

MA Trace elements (1000×): 0.5 g FeSO₄ · 7H₂O, 0.16 g MnSO₄ · H₂O, 0.14 g ZnSO₄ · 7H₂O, 0.2 g CoCl₂ · 2H₂O, ddH₂O 定容至 100 mL, 0.22 μm 无菌滤膜过滤除菌。

A.4 产纤维素酶培养基:

在 100 mL MA 培养基中添加 1% (w/v) 纤维素 (秸秆), 121°C 灭菌 20 min, 使用时加入 0.1% (v/v) 的 MA Trace elements。

A.5 产木质素酶培养基:

2 g 碱性木素 (秸秆), 1.33 g NH₄NO₃, 0.5 g MgSO₄, 1 g KH₂PO₄, 0.2 g Na₂HPO₄, ddH₂O 定容至 1000 mL, 121°C 灭菌 20 min 后备用。

附录 B

(规范性附录)

菌株酶活力测定

B.1 内切葡聚糖酶活力测定

取 1% (w/v) 羧甲基纤维素钠 (CMC-Na) 溶液 1.5 mL, 加入 0.5 mL 稀释后的粗酶液, 50℃ 水浴条件下孵育 30 min。采用 3,5-二硝基水杨酸 (DNS) 测定法, 加入 1.5 mL DNS 显色剂。沸水浴 5 min 终止反应, 在 540 nm 波长处测定吸光度。根据葡萄糖标准曲线计算酶活力, 每分钟水解 CMC-Na 产生 1 μmol 还原糖所需的酶量定义为 1 U。

B.2 外切葡聚糖酶活力测定

取 0.1% (w/v) 对硝基苯酚纤维二糖苷 (pNPC) 溶液 50 μL , 加入 100 μL 稀释后的粗酶液, 50℃ 水浴条件下孵育 30 min。加入 150 μL 10% Na_2CO_3 溶液终止反应, 在 420 nm 波长下测定吸光度。根据对硝基苯酚标准曲线计算酶活力, 每分钟水解 pNPC 产生 1 μmol 对硝基苯酚所需的酶量定义为 1 U。

B.3 β -葡萄糖苷酶活力测定

取 0.5% (w/v) 水杨苷溶液, 加入 0.5 mL 稀释后的粗酶液, 在 50℃ 水浴条件下孵育 30 min。采用 DNS 测定法, 加入 1.5 mL DNS 显色剂, 沸水浴 5 min 终止反应, 在 540 nm 波长处测定吸光度。根据葡萄糖标准曲线计算酶活力, 每分钟水解水杨苷产生 1 μmol 还原糖所需的酶量定义为 1 U。

B.4 木聚糖酶活力测定

取 1% (w/v) 木聚糖溶液 1.5 mL, 加入 0.5 mL 稀释后的粗酶液, 50℃ 条件下孵育 30 min。采用 DNS 测定法, 加入 1.5 mL DNS 显色剂, 沸水浴 5 min 终止反应, 在 540 nm 波长处测定吸光度。根据葡萄糖标准曲线计算酶活力, 每分钟水解木聚糖产生 1 μmol 还原糖所需的酶量定义为 1 U。

B.5 漆酶活力测定

取 3.3 mL 100 mmol/L 醋酸-醋酸钠缓冲液 (pH 4.5), 加入 0.5 mL 0.5 mmol/L ABTS (2,2'-联氮-双-3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸) 溶液, 加入 200 μL 粗酶液, 混匀。在 30℃ 水浴条件下孵育 3 min, 在 420 nm 处测定吸光度变化。每分钟氧化 1 μmol ABTS 所需的酶量为一个酶活单位 (U)。

B.6 锰过氧化物酶活力测定

取 2.5 mL 50 mmol/L 琥珀酸-琥珀酸钠缓冲液 (pH 4.5), 加入 0.4 mL 1.6 mmol/L MnSO_4 溶液, 加入 1 mL 粗酶液, 加入 100 μL 10 mmol/L H_2O_2 溶液, 混匀。在 37℃ 水浴条件下孵育 3 min, 在 240 nm 处测定吸光度变化。每分钟氧化 1 μmol Mn^{2+} 转化为 Mn^{3+} 所需的酶量为一个酶活单位 (U)。

B.7 木质素过氧化物酶活力测定

取 2.5 mL 250 mmol/L 酒石酸-酒石酸钠缓冲液 (pH 3.0), 加入 0.4 mL 10 mmol/L 藜芦醇 (VA), 加入 1 mL 粗酶液, 加入 100 μL 10 mmol/L H_2O_2 溶液, 混匀。在 30℃ 水浴条件下孵育 3 min, 在 310 nm 处测定吸光度变化。每分钟氧化 1 μmol 的藜芦醇所需的酶量为一个酶活单位 (U)。

以上均为三次重复实验, 对照组中加入沸水浴 30 min 灭活的粗酶液, 其它条件均相同。