**《螺旋藻种质资源鉴定评价技术规范》国家标准**

**编 制 说 明**

（征求意见稿）

一、任务来源

本国家标准的制定任务列入国家标准化管理委员会《国标委综合[2018]41号》，项目编号“20180928-T-424”。本项任务由中国标准化研究院提出并归口，定于2019年完成。本标准起草工作组由中国科学院烟台海岸带研究所等单位共同组成。

二、目的和意义

螺旋藻（Spirulina），亦称“节旋藻”。分类学上属于属于蓝藻门(Cyanophyta)、蓝藻纲 (cyanophyceae)、段殖体目(Hormogonales)、颤藻科(oscillatoraceae)，螺旋藻属。是一种光合放氧、呈规则螺旋形的原核丝状微藻。其营养成分和生理活性物质含量极为丰富，具有抗衰老、抗辐射、降血糖、抗凝血、抗癌和提高免疫力等作用。因其营养均衡、全面、富含优质蛋白和多种生物活性物质而受到国内外的极大关注。已成为当前螺旋藻开发研究领域的热点。因此，螺旋藻被认为是可开发利用的最有前途的的一种新型的微藻，并被世界卫生组织和联合国粮农组织誉为“世纪人类最佳保健品和最理想的食品”。

螺旋藻是[多细胞](https://www.baidu.com/s?wd=%E5%A4%9A%E7%BB%86%E8%83%9E&tn=44039180_cpr&fenlei=mv6quAkxTZn0IZRqIHckPjm4nH00T1Y4nHwBnhD1ujIBPyn3mvnv0ZwV5Hcvrjm3rH6sPfKWUMw85HfYnjn4nH6sgvPsT6KdThsqpZwYTjCEQLGCpyw9Uz4Bmy-bIi4WUvYETgN-TLwGUv3EnHT3rHRznWDkrHTdPHfzn1mY)藻体，圆柱形螺旋状的丝状体，单生或集群聚生，藻丝直径5-10μm，先端钝形，螺旋数2-7个。藻体可以颤动和旋转运动，细胞内含物均匀，无真正的[细胞核](https://www.baidu.com/s?wd=%E7%BB%86%E8%83%9E%E6%A0%B8&tn=44039180_cpr&fenlei=mv6quAkxTZn0IZRqIHckPjm4nH00T1Y4nHwBnhD1ujIBPyn3mvnv0ZwV5Hcvrjm3rH6sPfKWUMw85HfYnjn4nH6sgvPsT6KdThsqpZwYTjCEQLGCpyw9Uz4Bmy-bIi4WUvYETgN-TLwGUv3EnHT3rHRznWDkrHTdPHfzn1mY" \t "_blank)。藻体为单列细胞组成的不分枝丝状体，胶质鞘无或只有极薄的鞘，并有规则螺旋状，以形成藻殖段繁殖。无[异形胞](https://www.baidu.com/s?wd=%E5%BC%82%E5%BD%A2%E8%83%9E&tn=44039180_cpr&fenlei=mv6quAkxTZn0IZRqIHckPjm4nH00T1Y4nHwBnhD1ujIBPyn3mvnv0ZwV5Hcvrjm3rH6sPfKWUMw85HfYnjn4nH6sgvPsT6KdThsqpZwYTjCEQLGCpyw9Uz4Bmy-bIi4WUvYETgN-TLwGUv3EnHT3rHRznWDkrHTdPHfzn1mY)和后壁孢子。

常用于培养的螺旋藻有钝顶螺旋藻、极大螺旋藻和盐泽螺旋藻。从形态学角度讲，主要分为钝顶螺旋藻（*Arthrospira platensis*）、极大螺旋藻（*Arthrospira maxima*）和盐泽螺旋藻(*Spirulina subsalsa*)。其中，钝顶螺旋藻原产于[非洲](http://baike.baidu.com/item/%E9%9D%9E%E6%B4%B2%22%20%5Ct%20%22_blank)乍得湖（Tchad Lake），国内主要分布在[海南](http://baike.baidu.com/item/%E6%B5%B7%E5%8D%97%22%20%5Ct%20%22_blank)、[广东](http://baike.baidu.com/item/%E5%B9%BF%E4%B8%9C)、[云南](http://baike.baidu.com/item/%E4%BA%91%E5%8D%97)等地。藻丝螺旋状,无横隔壁,蓝绿色。藻丝宽4～5μm,长400～600μm。藻丝的[顶端细胞](http://baike.baidu.com/item/%E9%A1%B6%E7%AB%AF%E7%BB%86%E8%83%9E%22%20%5Ct%20%22_blank)钝圆,无[异形胞](http://baike.baidu.com/item/%E5%BC%82%E5%BD%A2%E8%83%9E%22%20%5Ct%20%22_blank)。极大螺旋藻原产于墨西哥特斯科科湖（Texcoco Lake），细胞宽7～9μm，长小于宽，螺间距70～80μm，顶端微尖，横壁不收缢，横壁两边有颗粒。一般而言，极大螺旋藻藻丝的直径大于钝顶螺旋藻；极大螺旋藻藻丝两端的6-7个细胞细长，因此，藻体两端变细。钝顶螺旋藻藻丝在横隔处有明显的收缢，而极大螺旋藻收缢不明显。

钝顶螺旋藻和极大螺旋藻两个品种是螺旋藻品种中最优良的。其中钝顶螺旋藻应用比较广泛，原因在于钝顶螺旋藻的蛋白质最高，藻蓝蛋白含量最多，SOD活性高，可溶性蛋白量高。具有关资料显示，钝顶螺旋藻蛋白质含量最低都已达到56%以上，全国的钝顶螺旋藻蛋白质平均含量在63%左右、大康螺旋藻蛋白质含更是高达65%以上。

对于钝顶螺旋藻和极大螺旋藻的鉴定和识别，是培养优良螺旋藻的基础，也是养殖和应用领域的核心步骤。目前对钝顶螺旋藻和极大螺旋藻的鉴定主要依靠经验丰富的分类学专家识别形态学特征来实现，一旦遇到和形态特征掌握不全的标本鉴定就很棘手；而且，对钝顶螺旋藻和极大螺旋藻的形态鉴定存在视觉误差等因素，因此，亟需寻求一种新的方法，以弥补传统分类方法的缺陷。

三、标准制定原则

标准编写遵循GB1.1-2009《标准化工作导则 第1部分：标准的结构和编写规则》的有关要求。标准编写内容符合我国相应的法规、标准。

四、标准主要技术内容

1. 主要形态特征
	1. 钝顶螺旋藻与极大螺旋藻的区别

钝顶螺旋藻藻丝在横隔处有明显的收缢，而极大螺旋藻收缢不明显；一般而言，极大螺旋藻藻丝的直径大于钝顶螺旋藻；极大螺旋藻藻丝两端的6-7个细胞细长，因此，藻体两端变细。

1. 分子遗传学特征
	* 1. 钝顶螺旋藻与极大螺旋藻的区别：

钝顶螺旋藻VNTR序列大小为1057bp, 极大螺旋藻VNTR序列序列大小为1291bp。

钝顶螺旋藻VNTR序列：

GAACATTTACGGTTTTACCCAATCCCAATCTCAACTCCCATCCCAGAGTCAAGCGATCGCATCTCAATCCCAATTGCTATCACGCCTAGAATCTCAGGTCAAAGCGATCGCATCTCAGCTTCCATCCCAGAGTCAAGCGATCGCATCTCAACTCCAATCCCAGAGTCAAGCGATCGCATCTCAACTCCAATCCCAGAGTCAAGCGATCGCATCTCAACTCCAATCCCAGAGTCAAGCGATCGCATCTCAACTCCAATCCCAGAGTCAAGCGATCACATCTCAACTCCAATCCCAGAGTCAAGCGATCGCATCTCAATCCCAATTGCTATCACGCCTAGAATCCCAGGTAGAAGCGATCGCATCTCAACTCCAATCCCAGAGTCAAGCGATCGCATCTCAACTCCAATCCCAGAGTCAAGCGATCGCATTTCAACTCCCATCCCAGAGTCAAGCGATCGCATCTCAACTCCCATCCCAGAGTCAAGCGATCGCATCTCAACTCCCATCCCAGAGTCAAGCGATCGCATCTCAACTCCCATCCCAGAGTCAAGCGATCGCATCTCAACTCGACGAGTCGATAACTGAAGCCGTGGCAGACATTACTCCCATCGTGTCTTCATCCTCTGGTTTTGATTATAGTCAACTCGACAGATTATTGAAATCAGGCCAGTGGGAAGCAGCCGACGAAGAAACGACTAAGATGATGTGTAGGGTGGCGGGAAAAACCTCTAGGAGATATTTAGACGACGATGATATCAAAAACTTTCCCGGCGAGGATTTGCGAATCATCGATGGTCTTTGGGTCAAACACAGCAGGGGACGCTTCGGGTTTAGTGTCCAGAAGCAAATTTACATCAATTGTGGAGGATTGCCTGATGGACGCTATCCAGGTGATACAATATGGGAGCGCTATTGCGGGGAGGTGGGATGGCGAATGAATGGGTCGTATATATCATGGTCTGATTGCACGTTTTCGGCGGCTGCTCCCCTGGGCCATCTTCCCGCCCGTTTTGTTGGGGTTGGTTGGTGGTTGGGTTTTGGTGTGGGACTGGTAAGG

极大螺旋藻VNTR序列：

GAACATTTACGGTTTTACCCAATCCCAATCTCAACTTCCATCCCAGAGTCAAGCGATCGCATCTCAATCCCAATTGCTATCACGCCTAGAATCCCAGAGTCAAGCGATCGCATCTCAATCCCAATTGCTATCACGCCTAGAATCTCAGGTCAAAGCGATCGCATCTCAACTTCCATCCCAGAGTCAAGCGATCGCATCTCAACTTCCGTCCCAGAGTCAAGCGATCGCATCTCAACTTCCATCCCAGAGTCAAGCGATCGCATCTCAACTTCCATCCCAGAGTCAAGCGATCGCATCTCAACTCCAATCCCAGAGTCAAGCGATCGCATCTCAACTCCAATCCCAGAGTCAAGTGATCGCATCTCAACTCCAATCCCAGAGTCAAGCGATCGCATCTCAACTCCAATCCCAGAGTCAAGTGATCGCATCTCAACTCCAATCCCAGAGTCAAGTGATCGCATCTCAACTCCAATCCCAGAGTCAAGCGATCGCATCTCAATCCCAATTGCTATCACGCCTAGAATCCCAGGTAGAAGCGATCGCATTTCAACTCCCATCCCAGAGTCAAGCGATCGCATCTCAATCCCAATTGCTATCACGCCTAGAATCCCAGAGTCAAGCGATCGCATCTCAACTCCCATCCCAGAGTCAAGCGATCGCATCTCAACTCCCGTCCCAGAGTCAAGCGATCGCATCTCAACTCCCATCCCAGAGTCAAGCGATCGCATCTCAACTCCCATCCCAGAGTCAAGCGATCGCATCTCAACTCCCATCCCAGAGTCAAGCGATCGCATCTCAACTCGACGAGTCGATAACTGAAGCCGTGGCAGACATTACTTCCATCGTGTCTTCATCCTCTGGTTTTGATTATAGCCAACTCGACAGATTATTGAAATCAGGCCAGTGGGAAGCAGCCGACGAAGAAACGACTAAGATGATGTGTAGGGTGGCGGGAAAAACCTCTAGGAGATATTTAGACGACGATGATATCAAAAACTTTCCCGGCGAGGATTTGCGAATCATCGATGGTCTTTGGGTCAAACACAGCAGGGGACGCTTCGGGTTTAGTGTCCAGAAGCAAATTTACATCAATTGTGGAGGATTGCCTGATGGACGCTATCCAGGTGATACAATATGGGAGCGCTATTGCGGGGAGGTGGGATGGCGAGTGAATGGGTCGTATATATCATGGTCTGATTGCACGTTTTCGGCGGCAGCTCCCCTGGGCCATCTTCCCGCCCGTTTTGTTGGGGTTGGTTGGTGGTTGGGTTTTGGTGTGGGACTGGTAAGG

1. 检测方法
	1. 形态学特征

采用目视法和显微镜检测。

* 1. VNTR克隆DNA片段序列的检测
		1. 螺旋藻DNA提取

采用改良的CTAB法。具体步骤如下：

1. 取0.5 g鲜重的丝状体或叶状体，用蒸馏水洗涤3遍，液氮研磨后分别转入5倍于藻体积的CTAB缓冲液（含：2%（v/w）CTAB，1.4 M NaCL，20 mM EDTA，100 mM Tris-HCL（pH8.0），2%巯基乙醇）；
2. 65 ℃温浴2 h，期间每10 min颠倒混匀2-3次；
3. 离心管放在台式高速离心机中离心，1,2000 rpm，10 min，把上清液加入到另一离心管中；
4. 冷却至室温后，轻柔加入等体积的氯仿:异戊醇（24:1），轻轻颠倒混匀，并重复3次；
5. 离心机中12000 rpm离心10 min，取上清液至另一离心管中；
6. 加入等体积的-20 ℃预冷异丙醇，轻轻颠倒混匀，于-20 ℃冰箱放置1 h。
7. 离心机中12000 rpm离心10 min；
8. 弃上清液，在离心管中加入1 mL的70％乙醇，洗两次，再用无水乙醇洗一次；
9. 倒去乙醇，干将DNA沉淀在超净工作台上吹干；
10. 加100 μL的TE缓冲液，完全溶解后，加5 μL RNase A（10 mg/mL）至50 μg/mL，37 ℃温浴1h；
11. 加等体积的酚:氯仿:异戊醇（25:24:1），颠倒混匀；
12. 离心机中12000 rpm离心10 min，取上清液至另一离心管中；
13. 重复步骤（11）和（12）；
14. 加蛋白酶K至200 μg/mL，37 ℃温浴1 h；
15. 重复步骤11、12；
16. 加2倍体积的无水乙醇、1/2体积的NaCl，混匀后在-20 ℃放置1h；
17. 重复步骤（7）～（9）；
18. 加100 μL的TE缓冲液，室温下放置1 h～2 h，直至DNA完全溶解；
19. 取2 μL DNA溶液，稀释50倍，用BECKMAN-DU600核酸蛋白分析仪检测其浓度与纯度；
20. 用0.8％的琼脂糖凝胶检测所提取的基因组DNA片段的完整性；
21. 将DNA溶液用TE缓冲液稀释至100 ng/μL的浓度，置于-20 ℃的冰箱中保存备用。
	* 1. PCR扩增与检测

PCR扩增反应体系为25 μL，含2.5 μL 10×PCR Buffer，10ng模板DNA，2.5 mmol/L Mg2+，1.5 U Taq酶，200 nmol/L 引物，200 μmol/L dNTP，最后添加无菌ddH2O至总体积为25 μL。

PCR扩增具体程序为：94 ℃预变性5 min，94 ℃变性30 s，60 ℃复性30 s，72 ℃延伸1 min，35个循环后，72 ℃延伸10 min，PCR扩增结束后对PCR产物进行电泳检测。

* + 1. 序列扩增引物

正向引物：5’-GAACATTTACGGTTTTAC-3’。

反向引物：5’-CCTTACCAGTCCCACACC-3’。

* + 1. 测序

参照DNA测序仪进行测序，钝顶螺旋藻VNTR序列大小为1057bp, 极大螺旋藻VNTR序列序列大小为1291bp。见附录B。



**五、主要工作过程**

1、组成标准起草小组

标准制定任务下达后，2016年6月，组成了标准起草工作组，明确了任务要求，安排了工作进度，成立了标准起草工作小组

2、开展相关调研情况

从接到标准的编制任务开始，参与编写的人员就开始收集国内有关螺旋藻的资料，随后在2016年 11月中旬在海口，2017年1月上旬在青岛，2018年12月中旬在烟台组织相关专家和螺旋藻生产企业的代表召开了三次工作组讨论会议，获取了关于螺旋藻养殖的相关资料，并在认真听取生产企业对螺旋藻种质资源鉴定标准的建议后，完成了标准初稿。

3、标准起草完善过程

依据GB/T 1.1—2000《标准化工作导则 第1部分：标准的结构和编写规则》、GB/T 1.2—2002《标准化工作导则 第2部分：标准中规范性技术要素内容的确定方法》等标准编制要求，对《螺旋藻种质资源鉴定评价技术规范》标准开展了研制工作，2017年2月葛保胜、秦松等起草工作小组完成了《螺旋藻种质资源鉴定评价技术规范》国家标准（草案）。2017年2月-2018年12月起草人对全国螺旋藻企业进行调研并收集各个企业螺旋藻，建立螺旋藻藻种库；在此基础上起草人检测和调整《螺旋藻种质资源鉴定评价技术规范》的方法，并月2018年12月召集螺旋藻研究的专家和螺旋藻生产企业的技术人员对《螺旋藻种质资源鉴定评价技术规范》的方法征求意见。起草组按照专家意见对标准内容进行了修改完善，形成了标准征求意见稿。

**六、方法验证及结果**

本方法在中国科学院烟台海岸带研究所，中国石油大学，山东省农业科学院生物技术研究中心等单位进行了验证。验证报告附后。

**七、与有关的现行法律、法规和强制性国家标准的关系**

本标准符合国家现行法律、法规、规章和强制性国家标准的要求，本标准有助于相关法律、法规、规章和强制性国家标准的实施。本标准的实施不涉及对现行标准的废止情况。

**八、标准属性的建议**

本标准属于基础管理标准，建议作为推荐性标准批准发布。