

中华人民共和国国家标准

GB/T 18654.14—2008

养殖鱼类种质检验 第 14 部分：DNA 含量的测定

Inspection of germplasm for cultured fishes—
Part 14: Determination of DNA content

2008-06-27 发布

2008-10-01 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局 发布
中国国家标准化管理委员会

前 言

GB/T 18654《养殖鱼类种质检验》分为下列部分：

- 第 1 部分：检验规则；
- 第 2 部分：抽样方法；
- 第 3 部分：性状测定；
- 第 4 部分：年龄与生长的测定；
- 第 5 部分：食性分析；
- 第 6 部分：繁殖性能的测定；
- 第 7 部分：生态特性分析；
- 第 8 部分：耗氧率与临界窒息点的测定；
- 第 9 部分：含肉率测定；
- 第 10 部分：肌肉营养成分的测定；
- 第 11 部分：肌肉中主要氨基酸含量的测定；
- 第 12 部分：染色体组型分析；
- 第 13 部分：同工酶电泳分析；
- 第 14 部分：DNA 含量的测定；
- 第 15 部分：RAPD 分析；

.....

本部分为 GB/T 18654 的第 14 部分。

本部分由中华人民共和国农业部提出。

本部分由全国水产标准化技术委员会淡水养殖分技术委员会归口。

本部分起草单位：上海水产大学、中国水产科学院长江水产研究所。

本部分主要起草人：李思发、赵金良、徐忠法、蔡完其、邹曙明。

养殖鱼类种质检验

第 14 部分:DNA 含量的测定

1 范围

GB/T 18654 的本部分规定了鱼类脱氧核糖核酸(DNA)含量测定的试剂与材料、仪器和设备、抽样、分析步骤和结果判定。

本部分适用于常见淡水、海水养殖鱼类。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过 GB/T 18654 的本部分的引用而成为本部分的条款。凡是注日期的引用文件,其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本部分,然而,鼓励根据本部分达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件,其最新版本适用于本部分。

GB/T 18654.1—2002 养殖鱼类种质检验 第 1 部分:检验规则

GB/T 18654.2 养殖鱼类种质检验 第 2 部分:抽样方法

3 试剂与材料

除非另有说明,在分析中仅使用确认为分析纯的试剂和蒸馏水或去离子水或相当纯度的水。

- 3.1 磷酸氢二钠(Na_2HPO_4)。
- 3.2 二个结晶水的磷酸二氢钠($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)。
- 3.3 生理盐水:0.75%氯化钠(NaCl)溶液。
- 3.4 固定液:3 份甲醇加入 1 份冰乙酸,现配现用。
- 3.5 肝素溶液:浓度为 500 IU/mL。
- 3.6 胰酶:浓度为 5 mg/mL。
- 3.7 核糖核酸酶(RNase):1 mg/mL。
- 3.8 碘化丙啶(PI):浓度为 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。
- 3.9 0.1 mol/L 磷酸缓冲液(PBS): Na_2HPO_4 12.35 g、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 20.3 g,蒸馏水定容至 1 L。

4 仪器和设备

- 4.1 离心机:转速为 5 000 r/min,常温。
- 4.2 流式细胞仪。
- 4.3 10 mL 离心管及试管架。
- 4.4 5 mL 试管及试管架。
- 4.5 吸管。
- 4.6 2 mL 注射器。
- 4.7 5 号针头。
- 4.8 锦纶筛网(或涤纶筛网):规格为 80 孔/cm。
- 4.9 封口膜。

5 抽样

- 5.1 试验鱼抽样按 GB/T 18654.2 的规定执行。
- 5.2 样品数量达 10 尾以上。
- 5.3 用酒精棉球将鱼体尾部待采血部位擦试消毒,用装有少量肝素溶液的注射器在尾动(静)脉处取 0.2 mL~1.0 mL 血液为试样。另用注射器在小公鸡(*Gallus sp.*)翅静脉处取 2 mL 血液作对照用。

6 分析步骤

6.1 样品处理

- 6.1.1 采好的血样立即注入装有 5 mL 生理盐水或磷酸缓冲液的离心管中,用吸管反复吹吸洗涤。
- 6.1.2 500 r/min 离心 5 min,待血球沉淀后,用吸管将上清液及上层的白血球吸出。
- 6.1.3 加入生理盐水或 PBS 吹吸洗涤,离心 5 min,吸除上清液。
- 6.1.4 混匀剩余的上清液及血球,慢慢滴入 5 mL 固定液中固定,用封口膜封好待用。
- 6.2 染色
 - 6.2.1 固定后的血样,包括鱼血样和对照鸡血样,800 r/min 离心 2 min,吸除上清液,用生理盐水或 PBS 制成细胞悬浮液,静止 1 h 以上。
 - 6.2.2 800 r/min 离心 2min,吸除上清液。
 - 6.2.3 每一血样加入 1.8 mL 胰酶液作用 10 min,再加入 1.5 mL RNase 溶液作用 10 min,最后加入 1.5 mL 碘化丙啶溶液染色 15 min 以上。
 - 6.2.4 用规格为 80 孔/cm 的锦纶筛网(或涤纶筛网)过滤,并将细胞浓度调到 1×10^8 个/mL 左右备测。

6.3 对照血样及计算方法

- 6.3.1 用鸡红血球($2c=2.3\text{pg}$)做标准 DNA 对照,依各种鱼 DNA 含量的不同,可选择内定标或外定标。
- 6.3.2 用流式细胞仪进行测定,每血样测量 3 000 个细胞以上,用流式细胞仪的相关软件处理测得鱼红血球与对照鸡红血球的消光值。
- 6.3.3 血样的 DNA 含量按式(1)计算:

$$P = \frac{E_2}{E_1} \times 2.3 \quad \dots\dots\dots(1)$$

式中:

- P ——鱼血样中的 DNA 含量,单位为皮克(pg);
- E_2 ——鱼红血球消光值;
- E_1 ——鸡红血球消光值。

7 结果判定

7.1 个体测定结果的判定

按 GB/T 18654.1—2002 中 6.1 的规定执行。

将所有测定结果逐一与标准对照,凡符合标准规定的判定为合格;凡与标准规定有显著差异或不符合标准的判定为不合格。

7.2 样品群体的判定

根据 7.1 的判定结果,计算出被检样品中合格品的百分率,用%表示。

中 华 人 民 共 和 国
国 家 标 准
养 殖 鱼 类 种 质 检 验
第 14 部 分：DNA 含 量 的 测 定
GB/T 18654.14—2008

*

中国标准出版社出版发行
北京复兴门外三里河北街16号
邮政编码：100045

网址 www.spc.net.cn

电话：68523946 68517548

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷
各地新华书店经销

*

开本 880×1230 1/16 印张 0.5 字数 6 千字
2008年9月第一版 2008年9月第一次印刷

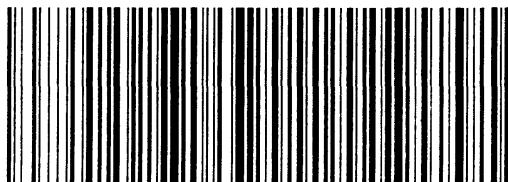
*

书号：155066·1-33313 定价 10.00 元

如有印装差错 由本社发行中心调换

版权专有 侵权必究

举报电话：(010)68533533



GB/T 18654.14—2008