



中华人民共和国国家标准

GB/T 18654.15—2008

养殖鱼类种质检验 第 15 部分:RAPD 分析

Inspection of germplasm for cultured fishes—
Part 15:RAPD analysis

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 15 部分。

本部分的附录 A、附录 B 和附录 C 为规范性附录。

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、中国水产科学研究院长江水产研究所。

本部分主要起草人：李思发、邹曙明、徐忠法、赵金良、蔡完其。

养殖鱼类种质检验

第 15 部分:RAPD 分析

1 范围

GB/T 18654 的本部分规定了鱼类 RAPD 分析的试剂与材料、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 原理

利用 10 碱基的随机寡核苷酸引物,对样品基因组的 DNA 进行 PCR 扩增,扩增产物进行电泳分离和溴化乙锭染色,根据谱带多态性比较分析,判定鱼类物种的遗传特性。

4 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。

- 4.1 三羟甲基氨基甲烷(Tris)。
- 4.2 氢氧化钠(NaOH)。
- 4.3 氯化钠(NaCl)。
- 4.4 十二烷基磺酸钠(SDS)。
- 4.5 氯化钾(KCl)。
- 4.6 氯化镁($MgCl_2$)。
- 4.7 乙二胺四乙酸二钠(EDTA)。
- 4.8 硼酸。
- 4.9 琼脂糖。
- 4.10 蔗糖。
- 4.11 明胶。
- 4.12 溴化乙锭(EB)。
- 4.13 蛋白酶 K。
- 4.14 RNA 酶 A(无 DNA 酶活性)。
- 4.15 *Taq* 酶。
- 4.16 DNA Marker。
- 4.17 石蜡油。

- 4.18 无水乙醇。
- 4.19 95%乙醇。
- 4.20 70%乙醇。
- 4.21 平衡酚。
- 4.22 三氯甲烷。
- 4.23 异戊醇。
- 4.24 浓盐酸。
- 4.25 Tris-HCl 缓冲液:配制方法见附录 A。
- 4.26 0.5 mol/L EDTA 溶液:配制方法见附录 A。
- 4.27 5 mol/L NaCl:配制方法见附录 A。
- 4.28 STE 缓冲液:配制方法见附录 A。
- 4.29 10% SDS 溶液:配制方法见附录 A。
- 4.30 20 mg/mL 蛋白酶 K 溶液:配制方法见附录 A。
- 4.31 25 mg/mL RNA 酶 A 溶液:配制方法见附录 A。
- 4.32 PCR 扩增缓冲液(10×):配制方法见附录 B。
- 4.33 TBE 电泳缓冲液(10×):配制方法见附录 C。
- 4.34 0.5 mg/mL 溴化乙锭溶液(1 000×):配制方法见附录 C。
- 4.35 加样缓冲液(6×):配制方法见附录 C。
- 4.36 溴酚蓝。

5 仪器和设备

- 5.1 PCR 扩增仪。
- 5.2 高速低温离心机。
- 5.3 电子天平,感量为 0.000 1 g。
- 5.4 紫外透射分析仪。
- 5.5 照相器材。
- 5.6 凝胶成像系统。
- 5.7 恒温水浴锅。
- 5.8 烘箱。
- 5.9 低温冰箱及普通冰箱。
- 5.10 0.5 μL ~1 000 μL 取样器(1 套)。
- 5.11 样品混合器。
- 5.12 微波炉。
- 5.13 高压湿热灭菌锅。
- 5.14 紫外分光光度计。
- 5.15 0.2 mL 薄壁离心管(PCR 扩增用)。
- 5.16 1.5 mL 离心管。
- 5.17 解剖用具(镊子、剪刀、手术刀、搪瓷盘)。
- 5.18 陶瓷研钵。
- 5.19 玻璃组织匀浆器。
- 5.20 一次性手套。
- 5.21 水平电泳仪(1 套)。
- 5.22 凝胶灌制平台。

- 5.23 凝胶样品梳。
5.24 胶带。
5.25 直流电源。

6 抽样

- 6.1 试验鱼抽样按 GB/T 18654.2 的规定执行。
6.2 样品数量为 30 尾~50 尾。
6.3 取 0.1 g 肌肉、肝脏、鳍条等新鲜样品,于液氮、干冰及 $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以下低温保存,或于 95% 乙醇中保存。

7 分析步骤

7.1 基因组 DNA 的提取

取 0.1 g 样品,视保存方式而采用剪碎、液氮碾碎或匀浆器磨碎样品,放入 1.5 mL 离心管内,加入 400 μL STE 缓冲液。

再加入终浓度分别为 1% 的 SDS 和 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ~300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的蛋白酶 K,混匀后,56 $^{\circ}\text{C}$ 作用 5 h~15 h。

混合液中加入等体积饱和酚,于样品混合器上缓慢转动 0.5 h~1 h,待充分混匀后,10 000g 离心 8 min,吸取上清液;加入等体积的混合液(酚、三氯甲烷、异戊醇三者之比为 25 : 24 : 1),缓慢转动 0.5 h,离心后吸取上清液;加入等体积的三氯甲烷,缓慢转动 5 min,离心后吸取上清液;加入等体积的异丙醇或 2 倍体积的无水乙醇,缓慢转动几分钟,产生絮状 DNA 沉淀,静置 5 min 后,低速(1 000g~1 500g)离心 5 min,获得 DNA 沉淀。DNA 沉淀用 70% 的乙醇洗涤,干燥,加入 500 μL 无菌重蒸水或 TE 溶解,再加入 25 mg/mL 的 RNA 酶 A 溶液(无 DNA 酶活性)2 μL ,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 1 h 后,置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。

使用紫外分光光度计或琼脂糖凝胶电泳检测样品的纯度与浓度。紫外分光光度计检测的 $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ 值应在 1.6~1.8 范围内,电泳检测显示 DNA 长度应大于 50 kb。DNA 样品的浓度约为 100 ng/ μL 。

7.2 基因组 DNA 的 PCR 扩增

在 0.2 mL 薄壁管中加下列 PCR 反应混合液(反应总体积为 25 μL):1.5 μL ~3.0 μL PCR 扩增缓冲液,1 μL 2.5 mmol/L dNTP 混合液,1 μL ~2 μL 5 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 引物,约 25 ng~150 ng 基因组 DNA,0.6 U~1 U *Taq* 酶。离心后,再加入约 30 μL 石蜡油防止挥发。

离心后于 PCR 扩增仪上反应,循环程序为:第一个程序为 93 $^{\circ}\text{C}$ ~94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 min,第二个程序为 93 $^{\circ}\text{C}$ ~94 $^{\circ}\text{C}$ 45 s,36 $^{\circ}\text{C}$ 45 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 90 s,40 个~45 个循环后,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。

扩增产物直接电泳或 4 $^{\circ}\text{C}$ 暂时保存(一般不超过 6 h)至电泳分析。

7.3 PCR 扩增样品的电泳分析

1.5% 琼脂糖凝胶的制备:称取适量琼脂糖(电泳级)置于三角瓶中,加入 TBE 电泳缓冲液混匀,在微波炉中加热熔化,需要时可加入溴化乙锭,制成 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ EB 染色液的凝胶,冷却至 55 $^{\circ}\text{C}$,倒入已用胶带封好的凝胶灌制平台,插上样品梳。

待胶凝固后,从制胶平台上除去封带,拔出梳子,放入电泳槽中,TBE 缓冲液高出凝胶表面约 1 mm~5 mm。

取 10 μL PCR 扩增产物加适量的加样缓冲液,混匀,然后用移液器将样品加入样品孔中。DNA Marker 同时点在旁边的孔中。

接通电源,使 DNA 向阳极移动,在 1 V/cm~10 V/cm 的电压下进行电泳。

当加样缓冲液中的溴酚蓝迁移至足够分离 DNA 片段的距离时,关闭电源。

用 0.5 μg/mL 的 EB 染色 10 min~30 min 后在凝胶成像系统上记录(已加入 EB 染色液的凝胶可以直接在紫外透射仪上观察、照相)。

7.4 结果分析

7.4.1 种、亚种或地理群体 RAPD 遗传图谱的建立及寻找特征标记引物

选择条带清晰、重复性佳的引物(一般以 20 个以上引物为准),对每群体 30 个~50 个样本进行 PCR 扩增。建立该种、亚种或地理群体 RAPD 标准遗传图谱。并寻找出尽可能多的可以用来区分种间、亚种间、地理群体间的特征标记条带。

7.4.2 种、亚种或地理居群内的遗传相似度的计算

经电泳获得基因组遗传图谱,在同一电泳迁移位置上,有 DNA 扩增条带的计为 1,没有的计为 0。个体间遗传相似度(F)按式(1)计算:

$$F = \frac{2N_{xy}}{N_x + N_y} \dots\dots\dots(1)$$

式中:

F ——个体 x 和 y 间的遗传相似度;

N_{xy} ——个体 x 和 y 共同拥有的带数;

N_x ——个体 x 所具有的总带数;

N_y ——个体 y 所具有的总带数。

种、亚种或地理居群内的平均遗传相似度通过对群体内各个体间的遗传相似度平均而求得。

8 结果判定

8.1 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该种、亚种或地理群体 RAPD 标准遗传图谱和特征标记条带进行对照,凡符合标准规定的判定为合格;凡不符合标准或与标准规定有显著差异的判定为不合格。

8.2 样品群体的判定

根据 8.1 的判定结果,计算出被检样品中合格品的百分率。

附 录 A
(规范性附录)
DNA 提取液的配制

A.1 1 mol/L Tris-HCl 缓冲液(需灭菌)

取 800 mL 重蒸水中溶解 121 g Tris 碱,用浓盐酸调至 pH8.0,混匀后加重蒸水至 1 L。

A.2 0.5 mol/L EDTA 溶液(需灭菌)

取 700 mL 重蒸水中溶解 186.1 g $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$,用 10 mol/L NaOH 调至 pH8.0(约 50 mL),补加重蒸水至 1 L。

A.3 5 mol/L NaCl(需灭菌)

取 1 000 mL 重蒸水中溶解 292 g NaCl。

A.4 STE 缓冲液

30 mmol/L Tris-HCl(pH8.0),200 mmol/L EDTA,50 mmol/L NaCl。

A.5 10% SDS 溶液

取 900 mL 重蒸水溶解 100 g 电泳级 SDS,加热至 68 °C 助溶,调节 pH 至 7.2,定容至 1 L,分装备用。

A.6 20 mg/mL 蛋白酶 K 溶液

蛋白酶 K 20 mg 溶解于 1 mL 无菌重蒸水中,分装后 -20 °C 保存。

A.7 25 mg/mL RNA 酶 A 溶液

25 mg 无 DNA 酶活性的 RNA 酶 A 溶解于 1 mL 无菌重蒸水中,-20 °C 保存。

附 录 B
(规范性附录)
PCR 扩增缓冲液

PCR 扩增缓冲液:

100 mmol/L Tris-HCl(pH9.0), 500 mmol/L KCl, 30.0 mmol/L MgCl₂, 0.001%明胶。

附 录 C
(规范性附录)
电泳缓冲液

C.1 TBE 电泳缓冲液

108 g Tris, 55 g 硼酸, 40 mL 0.5 mol/L EDTA(pH8.0)。

C.2 0.5 mg/mL 溴化乙锭溶液

50 mg 溴化乙锭, 100 mL 重蒸水。

C.3 加样缓冲液

0.25% 溴酚蓝, 40% (质量浓度) 蔗糖水溶液。

中 华 人 民 共 和 国
国 家 标 准
养 殖 鱼 类 种 质 检 验
第 15 部 分 : RAPD 分 析

GB/T 18654.15—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 0.75 字数 14 千字

2008年9月第一版 2008年9月第一次印刷

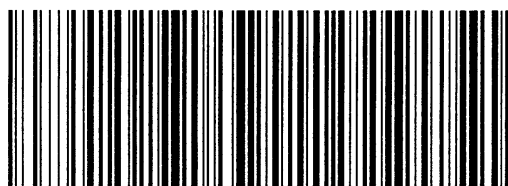
*

书号:155066·1-33314 定价 14.00 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 18654.15—2008