

ICS 67.120.30
B 50
备案号: 30031-2011

DB21

辽宁省地方标准

DB21/T 1861.4—2010

水产生物种质检验技术规程 简单 重复序列扩增法

Simple sequence repeat procedure to detect germplasm for aquaculture species

DB21

2010 - 12 - 31 发布

2011 - 02 - 01 实施

辽宁省质量技术监督局 发布

辽宁省地方标准全文公开

DB21

前 言

本标准按照GB/T1.1-2009给出的规则起草。

本标准由辽宁省海洋水产科学研究院提出。

本标准归口单位：辽宁省海洋与渔业厅。

本标准主要起草人：赫崇波、李宏俊、高祥刚、刘卫东、李云峰、鲍相渤。

附录A为资料性附录。



辽宁省地方标准全文公开

DB21

水产生物种质检验技术规程 简单重复序列扩增法

1 范围

本标准规定了水产生物简单重复序列扩增法的术语定义、原理、试剂、仪器、取样、DNA提取、微卫星引物筛选、PCR扩增、聚丙烯酰胺凝胶检测产物、数据统计和水产生物种质检验分析评价。

本标准适用于水产生物种质检测与鉴定等方面的种质检验工作。

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，仅所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 18654.15-2008 养殖鱼类种质检验 第15部分 RAPD分析

3 术语定义

下列术语定义适用于本标准。

3.1

简单重复序列(simple sequence repeat, SSR)

又称为微卫星，一般指基因组中由短的重复单元(一般为 1~6 个碱基)组成的 DNA 串联重复序列。

3.2

聚合酶链式反应(PCR)

一种分子生物学技术，指用一对寡核苷酸引物、四种脱氧核糖核苷酸为原料，在合适的温度、离子条件和耐热 DNA 聚合酶催化下，在体外人工合成特异的 DNA 片段的过程，用于放大特定的 DNA 片段。

3.3

脱氧核苷酸 (DNA)

脱氧核苷的磷酸酯。如 5'-脱氧腺苷酸(5'-dAMP)、5'-脱氧鸟苷酸(5'-dGMP)、5'-脱氧胞苷酸(5'-dCMT)

和 5'-脱氧胸腺苷酸(5'-dTMP)，体内常为 5'-磷酸酯。

3.4

等位基因 (allele)

基因的一种变异体，在二倍体细胞内每个基因有两个等位基因，每个等位基因分别来自于各自的亲本。在一个群体中一个基因可能有许多等位基因。

3.5

基因型 (genotype)

指特定座位的等位基因组成。

3.6

座位 (locus)

染色体上的位点。

3.7

等位基因频率 (allele frequency)

给定座位上某等位基因所占的比例。

3.8

遗传杂合度 (heterozygosity)

表示群体在某个座位为杂合子的比例，用于衡量标记方式的信息含量程度。

3.9

平均遗传杂合度 (average heterozygosity)

表示群体平均在各座位为杂合子的比例，用于衡量标记方式的信息含量程度。

3.10 多态信息含量 (PIC)

在连锁分析中一个遗传标记多态性可提供的信息量的度量。它是一个亲本为杂合子，另一亲本为不同基因型的概率。现常用来衡量座位多态性高低的程度。

3.11

遗传距离 (genetic distance)

用基因频率的函数表示的群体间遗传差异，它的最适宜的测度是单位长度 DNA 的核苷酸数或密码子的差数，是用来表示群体或个体之间遗传关系远近的一个量化指标，其值可以从 0 至无限大。群体或个体间的遗传距离越小，它们之间的亲缘关系越近，反之群体或个体间的遗传距离越大，那么它们之间

的亲缘关系将越远。遗传距离的计算方法有多种。

3.12

Nei 氏遗传距离 (Nei's genetic distance)

Nei 提出的从大量基因频率数据估计每个座位的平均密码子差数的统计方法。

3.13

邻近结合法聚类分析 (Neighbor joining method, NJ)

邻近结合法聚类分析 (neighbor joining, 简称 NJ) 是在系统进化分析时基于某个基因的序列进行分析, 通过碱基的变化和差异计算相互之间的进化关系的一种计算方法。

4 原理

微卫星中重复单位的数目存在高度差异, 但是微卫星的侧翼通常都是保守的单一序列, 因而可以将微卫星侧翼的 DNA 片段克隆、测序, 然后根据微卫星的侧翼序列设计引物将微卫星位点扩增出来。由于微卫星位点重复单元数量的变异, 不同个体的扩增产物在长度上的变化就产生长度的多态性, 这就是微卫星标记的原理。

5 试剂

5.1 裂解液 按附录 A 配制

5.2 三羟甲基氨基甲烷饱和酚 (Tris 饱和酚)

5.3 三氯甲烷

5.4 异戊醇

5.5 无水乙醇

5.6 溴化乙锭

5.7 10×Tris 硼酸(10×TBE)电泳缓冲液 按附录 A 配制

5.8 6×上样缓冲液

5.9 100 bp DNA 分子量标记

5.10 冰乙酸

5.11 琼脂糖

5.12 核苷酸(RNA)酶

- 5.13 蛋白酶 K
- 5.14 丙烯酰胺
- 5.15 甲叉双丙烯酰胺
- 5.16 过硫酸铵
- 5.17 硝酸银 (AgNO₃)
- 5.18 N, N, N', N'—四甲基乙二胺 (TEMED)
- 5.19 无水碳酸钠
- 5.20 Taq DNA 聚合酶
- 5.21 分子量标准(markers)
- 5.22 超纯水
- 5.23 硝酸
- 5.24 甲醛
- 5.25 乙二胺四乙酸(EDTA)
- 5.26 盐酸(HCl)

仪器

- 6.1 凝胶成像分析系统
- 6.2 PCR 仪
- 6.3 低温高速离心机
- 6.5 稳压稳流电泳仪
- 6.7 单道可调移液器
- 6.8 电子天平
- 6.9 水浴恒温振荡器
- 6.10 电泳槽
- 6.11 普通离心机
- 6.12 紫外分光光度计
- 6.13 超声波清洗器
- 6.14 超纯水器

6 取样

7.1 样品固定

7.1.1 I 型样品



将样品先用70%乙醇洗1次，再用超纯水冲洗2次，-20℃保存备用。

7.1.2 II型样品

从活体中直接采集肌肉或脏器组织，-20℃冰箱直接冻存。

7.1.3 III型样品

选取幼嫩藻尖，用毛笔在无菌海水中充分刷洗，解剖镜下观察，确定没有附生杂藻后，在无菌蒸馏水中清洗，晾干备用。

8 DNA提取

8.1 I型样品

在200 μ L离心管中放入1~4根毛发，毛囊置于离心管底部，剪去高于离心管部分的毛发，设置一个空白对照管；在每个离心管中加入15 μ L配制好的毛囊裂解液。毛囊裂解液用1 \times PCR缓冲液(50mmol/L KCl, 10mmol/L Tris-HCl, 0.01%明胶)，加MgCl₂至2mmol/L，蛋白酶K 20mg/L；在PCR仪上设置一个单循环程序：65℃ 30min, 95℃ 15min, 4℃ 10min；将上一步骤中的离心管放入预热好的PCR仪中，运行该程序。程序结束后，将离心管进行瞬时离心，-20℃保存备用。

8.2 II型样品

取-20℃下冻存的脏器0.2g，置于液氮中研成粉末；加DNA提取液(10mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 75mmol/L NaCl, 0.5% SDS, 5mmol/L EDTA)。振荡均匀后，65℃水浴1h；按GB/T 18654.15-2008的规定，用苯酚和氯仿方法抽提DNA；用适当50 μ L TE缓冲液(10mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 1mmol/L EDTA)溶解DNA，-20℃保存。

8.3 III型样品

取鲜样品50~150mg，剪成小块放入研钵中，加入液氮，待样品完全冷冻后，快速、用力研磨至粉末状；将研钵放入65℃水浴至样品粉末刚开始融化，向研钵中加入DNA提取液(10mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 75mmol/L NaCl, 0.5% SDS, 5mmol/L EDTA)及RNA酶、蛋白酶K共400 μ L，用力碾磨30s。收集研磨好的组织匀浆移至1.5mL离心管中，65℃保温15~60min，按GB/T 18654.15-2008的方法，用苯酚和氯仿方法抽提DNA；水相加入0.1倍体积醋酸钠(3mol/L, pH5.2)和两倍体积无水乙醇沉淀；溶于50 μ L TE缓冲液(10mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 1mmol/L EDTA)，置-20℃保存备用。

8.4 DNA产物测定

8.4.1 DNA纯度检测

吸取1~3 μ L提取的DNA，用浓度1~2%琼脂糖凝胶100V电泳 30 min，检测所提取DNA的质量。以DNA条带的分子量及有无拖尾为标准判断DNA的质量。

8.4.2 DNA浓度检测

(1) 紫外吸收定性测试

分别于260 nm波长和280 nm波长下测定产物(或产物稀释液)的紫外吸收值。确定A₂₆₀ / A₂₈₀比值在1.8~2.0范围内，方可正常进行后续实验。

(2) 紫外吸收定量测试

260nm 波长下测定产物（或产物稀释液）的紫外吸收值，根据公式(1)计算 DNA 浓度。

$$\text{DNA 浓度}(\mu\text{g/mL})=[A_{260} / (0.020 \times L)] \times \text{稀释倍数} \dots\dots\dots(1)$$

式中：A₂₆₀—被测样品在 260nm 下的吸光度值

L—比色池厚度，单位 cm。

(3) 基因组DNA完成定量测试后，稀释到50 ng/μL备用。

9 微卫星引物筛选

9.1 微卫星引物的设计

9.1.1 根据已有序列设计引物

利用 GenBank 上的已注册的物种的微卫星序列，参照引物设计的原则，用 Primer premier5.0 进行引物设计。

9.1.2 利用文献中已公开的引物

10 PCR 扩增

10.1 PCR 反应体系

PCR 反应体积均为 25 μL，按表 1 配制 PCR 反应体系。

表 1 微卫星标记—PCR 反应体系

试剂	反应体系
PCR Buffer (10×)	2.5 μL
MgCl ₂ (25mmol/L)	2 μL
正向引物 (2pmol/μL)	0.5 μL
反向引物 (2pmol/μL)	0.5 μL
dNTPs (25mmol/L)	0.5 μL
rTaq (5U/μL)	0.2 μL
DNA (50ng-100ng)	3 μL
超纯水	16.8 μL

10.2 PCR 反应程序

按表 2 设置程序进行 PCR 反应。

表 2 微卫星标记—PCR 反应程序

阶段	温度	时间
1	94℃	5 min

2	94℃	30–60 s
	50–62℃	30–60 s
	72℃	30–60 s
	35 个循环	
3	72℃	10 min
4	4℃ 保存	

11 聚丙烯酰胺凝胶检测 PCR 产物

11.1 聚丙烯酰胺凝胶的制备

11.1.1 制胶装置的准备

弹簧夹、干胶架、胶板和隔板、手套、鲨鱼齿梳子、隔板、烧杯和搅棒。

11.1.2 胶板的按置

- (1) 用 KOH 或乙醇清洗玻璃板上的污渍。
- (2) 用温的去污剂溶液洗涤玻璃板和间隔片，用自来水彻底冲洗，再用去离子水洗净。用乙醇冲洗玻璃板去掉水印，并放于一旁晾干（必须洗净玻璃板，以确保灌胶时不会产生气泡）。
- (3) 把大块玻璃板放在空的试管架上，把隔片放在玻璃板的两边。
- (4) 再将较小（或带凹口）的玻璃板在间隔片上放置妥当，对齐隔片。
- (5) 用弹簧夹将三边夹住，用琼脂糖胶液封好边。
- (6) 将梳子放在胶模的敞开端并检查是否贴切适合，取出梳子将空胶模放在实验桌上。

11.1.3 制胶

- (1) 在桌上放好空胶模。
- (2) 将按附录 A 配制的 30ml8%凝胶储存液中加入 80 μL 过硫酸铵，20 μL TEMED，用搅棒混匀溶液（不得有气泡），将胶模放在架片成 45 度角，然后用玻棒引流缓缓灌入溶液。缓缓灌入胶模中。
- (3) 立即将鲨鱼梳子的平整侧插入凝胶溶液中，梳子两端插入面应等同。
- (4) 平放在实验桌上，等其聚合完毕后，可立即使用或保存于室温达 24 h。

11.1.4 装备装胶

- (1) 慢慢地从凝胶上移走梳子和弹簧夹以及底部的隔片，将胶板装到电泳槽上，用弹簧夹夹紧胶模。
- (2) 用合适缓冲液把电泳槽的上下槽加满，用注射器冲洗胶的顶部。
- (3) 将电极与电泳装置相连，在 150–170V 的恒定电压下预电泳 20min。

11.2 点样

11.2.1 吸取 5 μ L 扩增产物与 5 μ L 变性缓冲液混合；

11.2.2 放入 PCR 仪变性：98 °C，8 min，拿出后冰浴；

11.2.3 切断电泳槽电源，将已变性的样品扩增产物和变性缓冲液按 1:2 混合，用专门的点样移液器点入凝胶样品槽中。当所有的样品加完后，在预留的样品槽加入 100 bp markers，将电源连接，300V 恒压电泳。

11.3 凝胶的分离、标识与固定标识操作规程

11.3.1 关闭电源开关

当指示剂跑到胶板 2/3 位置时，结束电泳。将电源电压调至为“O”，接着再关闭电源开关，切忌直接关闭电源开关，烧坏电泳仪。然后收集电泳缓冲液以备下次重用。

11.3.2 凝胶的标记

将粘着聚丙烯酰胺凝胶的玻璃板小心用边条沿着玻璃板的耳朵将玻璃板与聚丙烯酰胺凝胶分开，根据点样人员记录的先后顺序，将分离的聚丙烯酰胺凝胶先从左上角切除一小块，接着从左下角切除一小块。将切除位置的差异作为聚丙烯酰胺凝胶的标识。同时，将准备好的托盘编号分别与电泳槽对应。

11.3.3 凝胶的固定

当聚丙烯酰胺凝胶被标识好后，立即放入存有固定液（10%酒精，体积比）的塑料托盘中，将胶放在摇床上摇动 20 min 或至电泳示踪染料消失。

11.4 硝酸银染色

11.4.1 洗胶 待固定结束后，用双蒸水漂洗凝胶 2-3 次，目的是洗去凝胶中的尿素，每次 1-2 分钟，漂洗时轻轻摇动。

11.4.2 氧化 向漂洗过的凝胶中加入 2%的硝酸，氧化 5 min。

11.4.3 漂洗 氧化结束后，同样用双蒸水漂洗一次，时间 2 min。

11.4.4 染色 加入染色液缓缓摇动 30 min。

11.4.5 漂洗显影。用双蒸水漂洗 5-10 s 后，迅速放入准备好的显影液中，缓缓摇动，直到凝胶上出现条带。

11.4.6 终止显影。待目的片段出现的时候，立即从染色液中取出并用双蒸水冲洗，然后把凝胶放入 10%的酒精中，缓缓摇动，终止反应。再以双蒸水漂洗 2 次，每次 2 min。

11.5 拍照

显影结束后，利用凝胶成像系统将聚丙烯酰胺凝胶拍照保存。

12 数据分析

12.1 数据统计 选择电泳后清晰的扩增位点进行数据统计。根据片段迁移位置的不同，分别统计出每个样品的基因型（如AA，AB，AC或BB等），建立各个群体的等位基因型数据阵列。

12.1 结果分析 利用群体遗传学分析软件专业（PopGene 1.32 版本），按照共显性二倍体数据模型，进行等位基因频率、哈代-温伯格平衡检验、遗传杂合度、遗传距离、香农指数等遗传参数的分析和计算，并用 UPGMA 做基于 Nei's 遗传距离的树形图，以及用邻近法（Neighbor joining method, NJ）构建聚类分析图（系统树检验置信度值为 1000 次）。



1 裂解液

0.25 mg/mL 蛋白酶 K 为 0.02 g，10%的 SDS 为 5 mL，0.5 mol/L DETA(pH=8.0)为 20 mL，用超纯水定容至 100 mL。

2 蛋白酶 K 贮存液（20 mg/mL）

200 mg 蛋白酶 K 溶于 10mL 灭菌超纯水中，分装，每管 1 mL，-20 °C 保存。

3 TE 缓冲液（pH8.0）：10 mmol/L Tris-HCl（pH8.0），1 mmol/L EDTA（pH8.0）。

4 电泳缓冲液

1×Tris-乙酸（TAE）：0.04 mol/L Tris-乙酸，0.01 mol/L EDTA

5 溴化乙锭（EB，10 mg/mL）

用少量超纯水融解 1 g 溴化乙锭，磁力搅拌器搅拌数小时确保其完全溶解，定容至 100mL，

然后转移到棕色瓶或铝箔包裹容器中，室温保存。

小心：溴化乙锭是强诱变剂并有中度毒性，使用含有这种染料的溶液时务必戴上手套，称量染料时要带口罩。

6 6×上样缓冲液

0.12%溴酚蓝，0.12%二甲苯青 FF，40%(W/V)蔗糖水溶液

或 0.12%溴酚蓝，0.12%二甲苯青 FF，30%(W/V)甘油水溶液

7 1mol/L Tris (pH8.0): 将 121.1 g Tris 溶于 800mL 水中，加浓 HCl 调 pH 值至 8.0，定容至 1000 mL 后高压灭菌。

8 0.5 mol/L EDTA(pH8.0): 将 186.1 g Na₂EDTA·2H₂O 加入 800mL 水中，再加入 NaOH(约 20 g)调 pH 值到 8.0，定容至 1000 mL，高压灭菌。

9 10%SDS(500 mL): 将 50 g SDS 加入 400 mL 水中，60 °C 加热融解，定容至 500 mL 后过滤灭菌。

10 30%丙烯酰胺(丙烯酰胺: 甲叉双丙烯酰胺=29: 1): 200 mL 水中融解 285 g 丙烯酰胺，15 g 甲叉双丙烯酰胺，定容至 1000 mL，4 °C 保存。

11 10%过硫酸铵(AP): 8 mL 水中溶解 1g 过硫酸铵，加水至 10 mL，4 °C 保存，现用现配。

12 将氯仿和异戊醇按 24:1 体积比混合，棕色瓶装，室温保存。酚/氯仿/异戊醇(25:24:1)

将酚、氯仿、异戊醇按 25:24:1 体积比混合，棕色瓶装，室温保存。

13 10×TBE 配制

Tris	108 g
硼酸	55 g
0.5M EDTA (pH8.0)	40 mL

加超纯水至 1000 mL。

14 8%变性聚丙烯酰胺凝胶储存液

丙烯酰胺	37.7 g
N,N-亚甲叉双丙烯酰胺	2 g
尿素	100 g
10×TBE	50 mL

加水定容至 500mL，滤纸过滤，棕色瓶 4 °C 保存。

注：选择 8%聚丙烯酰胺凝胶而不是 6%或 12%。原因在于所选的微卫星引物的扩增产物的长度范围基本处于 50–300bp 内，8%聚丙烯酰胺凝胶的分辨范围为 50–400bp，而 6%聚丙烯酰胺凝胶分辨范围为 150–800bp,12%聚丙烯酰胺凝胶分辨范围为低于 100 bp 以下，所以，综合考虑，采用 8%聚丙烯酰胺凝胶的凝胶最适合所选微卫星座位引物的扩增结果分析。

15 染色液(0.2%AgNO₃)

AgNO ₃	2 g
超纯水	950 mL
甲醛	1.24 mL
加 ddH ₂ O 定容至 1000 mL。	

16 显影液(3%Na₂CO₃)

超纯水	950 mL
无水 Na ₂ CO ₃	30 g
甲醛	1.24 mL
加超纯水定容至 1000mL。	

17 固定液(20%乙醇或 10%冰乙酸)

取 200 mL 无水乙醇，加水定容至 1000 mL。

18 聚丙烯酰胺凝胶加样缓冲液

溴酚兰	15 mg
二甲苯菁 FF	15 mg
甘油	3 mL
超纯水	10 mL