

水产动物物种分子鉴定 COI、16S rRNA 分子标记法

Technical specification for species molecular identification using COI and
16S rRNA of aquatic animals

地方标准信息服务平台

2019 - 02 - 28 发布

2019 - 03 - 28 实施

前 言

本标准依据GB/T 1.1—2009给出的规则制定。

本标准由大连市质量技术监督局提出。

本标准由辽宁省农业农村厅归口。

本标准主要起草单位：辽宁省海洋水产科学研究院。

本标准主要起草人：高磊、赫崇波、鲍相渤、高祥刚。

附录A、B、C为资料性附录。

地方标准信息服务平台

水产动物物种分子鉴定 COI、16S rRNA 分子标记法

1 范围

本方法规定了水产动物物种分子鉴定 COI、16S rRNA分子标记法的相关术语和定义，标记方式，试剂、仪器和设备，样品采集、保存和前处理，DNA提取和检测，序列扩增和测序，以及物种鉴定的方法。

本方法适用于水产动物物种分子鉴定 COI、16S rRNA分子标记法。

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 6682 分析实验室用水规格和试验方法

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

水产动物物种分子鉴定 aquatic species molecular identification

指利用分子生物学手段,对水产动物样本（尤其适用于形态学特征相近、模糊或丢失的样本）的分子标记进行分析，鉴定生物种类的过程。

3.2

聚合酶链式反应 polymerase chain reaction (PCR)

用一对寡核苷酸引物、四种脱氧核糖核苷酸(dNTPs)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DNA片段的过程。

3.3

DNA序列测定 DNA sequencing

测定DNA分子的核苷酸序列。

3.4

序列比对 alignment

为确定两个或多个序列之间的相似性和同源性，将他们按照一定的规律进行排列。

3.5

DNA条形码-COI

细胞色素c氧化酶亚基I (cytochrome c oxidase subunit I)。

3.6**16S rRNA**

16S核糖体核糖核酸 (16S ribosomal RNA)。

4 标记方式

水产动物的COI和16S rRNA的DNA序列进化速度较快，同时又相对保守，可作为分子标记条形码用于物种鉴定。通过PCR技术扩增水产动物的COI和16S rRNA基因部分序列，测序后在已知数据库中进行序列比对，确定物种分类信息。本方法同时对COI和16S rRNA两种分子标记条形码进行分析，并在GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) 和BOLD System (<http://www.boldsystems.org>) 两个数据库中比对，确保鉴定成功率和准确率。

5 试剂、仪器和设备**5.1 试剂**

实验仅使用分析纯试剂，水应符合GB/T 6682一级水要求。主要包含以下内容：

- 无水乙醇；
- 95%乙醇；
- TE 缓冲液 (pH7.6) (100mol/L Tris-Cl, pH7.6; 10 mmol/L EDTA, pH 8.0)；
- Taq 酶 (5U/μL)；
- 超纯水；
- 10×PCR 缓冲液 (500 mmol/L KCl; 100mmol/L Tris-Cl, pH 8.3; 15mmol/L MgCl₂)；
- 引物 (10 μmol/L)；
- dNTP 混合液 (每种脱氧核糖核苷三磷酸浓度 2.5 mmol/L)；
- 溴化乙锭 (10mg/mL)；
- 琼脂糖；
- 电泳标记物 (markers)；
- 平衡酚；
- 氯仿/异戊醇 (24:1)；
- 10×Tris 硼酸 (10×TBE) 电泳缓冲液；
- 灭菌蒸馏水；
- 液氮；
- 细胞裂解液 (20 mmol/L)。

5.2 仪器和设备

实验用仪器和设备主要包含以下内容：

- 凝胶成像分析系统；
- PCR 仪；
- 低温高速离心机 (4℃, 12000 转)；

- 稳压稳流电泳仪；
- 单道可调移液器；
- 电子天平（0.001 g）；
- 水浴恒温振荡器；
- 电泳槽；
- 紫外分光光度计；
- 遗传分析仪。

6 样品采集、保存和前处理

6.1 样品采集、保存

样本采集和后续实验应在生物安全实验室进行。选择DNA含量高、多糖等含量低的肌肉、肠道、体腔液、鱼鳍等组织进行采样，样品可通过-20℃冷冻、或4℃冰鲜等方式暂时保存。

6.2 样品前处理

将样品切成5 mm左右直径的小块或薄片，用灭菌蒸馏水洗净，按1:10左右比例将样品放入盛有95 %乙醇的离心管中，4℃保存。

7 DNA 提取和检测

7.1 DNA 提取

7.1.1 取0.1 g左右样品置于陶瓷研钵中，加少许液氮研碎。将粉末转入400 μL~500 μL细胞裂解液离心管中，37℃温浴1 h后转入50℃水浴3 h，期间经常摇动。

7.1.2 反应液冷却后加500 μL平衡酚，缓慢颠倒10 min混匀。12000 rpm离心15 min，转上层水相于新离心管中（重复此过程一次）。

7.1.3 加氯仿/异戊醇450 μL，混匀后12000 rpm离心10 min。转上层水相于新离心管中，加1/10体积3 mol/L NaAc和2.5倍体积无水乙醇，混匀，置于-20℃环境下1 h。

7.1.4 12000 rpm离心15 min，弃上清。以70%冷乙醇洗涤1~2次，真空抽干或自然吹干，加入TE缓冲液溶解，-20℃保存。

7.2 DNA 检测

7.2.1 纯度检测

吸取1 μL~3 μL DNA，琼脂糖凝胶100 V电泳30 min，如条带整齐、亮度高，则纯度满足实验要求。

7.2.2 浓度检测

分别于260 nm和280 nm波长下测定DNA的紫外吸收值。DNA浓度(μg/mL)=[A₂₆₀/(0.020×L)]×稀释倍数，式中L为比色池厚度，单位cm。DNA浓度在10 μg/mL以上时进行后续实验。

8 序列扩增和测序

8.1 引物

水产动物PCR扩增引物参见附录A。

8.2 PCR 扩增

PCR扩增应在以下体系和条件下进行：

- PCR 扩增体系：10×PCR 缓冲液 10 μL、上下游引物各 1 μL、DNA 提取液 5 μL、Taq 酶 0.5 μL，dNTP 混合液 8 μL、超纯水定容至 50 μL；
- PCR 扩增条件：一个循环反应（95℃ 5min），30 个循环反应（94℃ 30s，50℃ 30s，72℃ 60s），72℃ 10min，结束 PCR 反应。

8.3 测序

利用遗传分析仪对PCR产物进行双向测序，得到DNA序列信息。

9 物种鉴定

9.1 序列比对鉴定

将COI基因序列在GenBank和BOLD System中进行核苷酸序列比对，将16S rRNA基因序列在GenBank中进行核苷酸序列比对。比对结果认定如下：

- 序列比对检出标准为序列相似度≥99%；
- 综合 COI 和 16S rRNA 的比对结果形成最终鉴定结果；
- 若出现 2 个及以上比对结果，则选取相似度高且结果一致的鉴定物种作为鉴定结果；
- 对于鉴定成功的样本，记录于《水产动物物种分子鉴定记录表》（见附录 B）；
- 对于无匹配结果，或结果矛盾的样本，作为未检出样本处理。

9.2 未检出样本

未检出样本记录于《未检出水产动物分类记录表》（详见附录C）。

地方标准信息服务平台

附 录 A
(资料性附录)
水产动物物种分子鉴定 PCR 扩增引物

表A.1 水产动物物种分子鉴定PCR扩增引物

| | 物种 | 引物序列 |
|------------------------|-----------------------------|--|
| COI 基因 PCR 扩增引 物 | 硬骨鱼纲 软骨鱼纲 | F: 5' -TGTA AACGACGGCCAGTCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC-3' R: 5' -TGTA AACGACGGCCAGTCGACTAATCATAAAGATATCGGCAC-3' |
| | 甲壳纲 | F: 5' -TATTATTAGACAAGAATCTGGTAAA-3' R: 5' -AGGAAATGTTGAGGGAAGAAAGTAA-3' |
| | 双壳纲 腹足纲 | F: 5' -ACAAATCAYAARGAYATYGG-3' R: 5' -ACCAATCATAAAGATATTGG-3' |
| | 头足纲 | F: 5' -ACAAAYCATAAAGAYATTGG-3' R: 5' -GTAAATATATGRTGGGCTCA-3' |
| | 海参纲 海胆纲 海星纲 | F: 5' -ATAATGATAGGAGRRTTGG-3' R: 5' -GCTCGTGTRTCTACRTCCAT-3' |
| | 钵水母纲 | F: 5' -GGTCAACAAATCATAAAGATATTGGAAC-3' R: 5' -TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3' |
| | 哺乳纲 | F: 5' -TGTA AACGACGGCCAGTCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC-3' R: 5' -CAGGAAACAGCTATGACACTTCAGGGTGACCGAAGAATCAGAA-3' |
| | 爬行纲 | F: 5' -ACTCAGCCATCTTACCTGTGATT-3' R: 5' -TGGTGGGCTCATAACAATAAAGC-3' |
| | 通用 (选用) | F: 5' -GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3' R: 5' -TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3' |
| | 16S rRNA 基因 PCR 扩 增引物 | 通用 (除甲壳 纲和头足 纲) |
| 甲壳纲 | | F: 5' -CCCGCCTGTTACCAAAAACAT-3' R: 5' -TCCATAGGGTCTTATCGTC-3' |
| 头足纲 | | F: 5' -CCCGCCTGTTACCAAAAACAT-3' R: 5' -TCCATAGGGTCTTTTCGTC-3' |

注：COI基因PCR扩增引物可选用特异引物或通用引物。

附 录 B
(资料性附录)
水产动物物种分子鉴定记录表

表B.1 水产动物物种分子鉴定记录表

鉴定人_____；地点_____；
时间_____年___月___日___时___分至_____年___月___日___时___分

| 序号 | 样本编号 | 样品名称 | 样品来源 | 鉴定结果 | 备注 |
|-----|------|------|------|------|----|
| 1 | | | | | |
| 2 | | | | | |
| 3 | | | | | |
| 4 | | | | | |
| 5 | | | | | |
| 6 | | | | | |
| 7 | | | | | |
| 8 | | | | | |
| 9 | | | | | |
| 10 | | | | | |
| 记事： | | | | | |

采样人

记录人

校对入

附 录 C
(资料性附录)
未检出水产动物分类记录表

表C.1 未检出水产动物分类记录表

鉴定人_____；地点_____；
时间_____年___月___日___时___分至_____年___月___日___时___分

| 序号 | 样本编号 | 样品名称 | 样品来源 | 未检出结果 | 备注 |
|-----|------|------|------|-------|----|
| 1 | | | | | |
| 2 | | | | | |
| 3 | | | | | |
| 4 | | | | | |
| 5 | | | | | |
| 6 | | | | | |
| 7 | | | | | |
| 8 | | | | | |
| 9 | | | | | |
| 10 | | | | | |
| 记事： | | | | | |

采样人

记录人

校对人

参 考 文 献

- [1] Mitani T, Akane A, Tokiyasu T, et al. Identification of animal species using the partial sequences in the mitochondrial 16S rRNA gene. *Legal medicine*, 2009, 11: S449–S450.
- [2] Lakra W S, Goswami M, Gopalakrishnan A. Molecular identification and phylogenetic relationships of seven Indian Sciaenids (Pisces: Perciformes, Sciaenidae) based on 16S rRNA and cytochrome c oxidase subunit I mitochondrial genes. *Molecular Biology Reports*, 2009, 36(5): 831–839.
- [3] National Center for Biotechnology Information (US), <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>.
-

地方标准信息服务平台