广西团体标准《水产动物线粒体DNA序列遗传多样性分析操作规程》（征求意见稿）编制说明

广西壮族自治区水产科学研究院

一、工作简况

（一）任务来源

为规范水产动物线粒体DNA序列遗传多样性分析操作，促进对遗传资源的科学研究和开发利用，加强珍稀濒危野生水产动物资源的保护，在完成广西创新驱动发展专项资金项目《广西主导（特色）水产种质资源的收集、评价与鉴定》的基础上，本单位提出《水产动物线粒体DNA序列遗传多样性分析操作规程》的编写要求。

（二）起草单位

本标准由广西壮族自治区水产科学研究院负责起草。

（三）主要起草人

本标准主要起草人：彭敏、杨春玲、陈秀荔、曾地刚、朱威霖、冯鹏霏、张永德、赵永贞、刘青云、李强勇。

本标准制定过程中主要由彭敏、杨春玲、陈秀荔负责文本起草、编制说明撰写、资料收集等工作，由朱威霖、冯鹏霏、张永德、刘青云、李强勇负责资料收集、分析调研、试验论证等工作，由曾地刚、赵永贞负责数据分析和文本修改等工作。

二、制定标准的必要性和意义

遗传多样性作为生物多样性的重要组成部分，是物种多样性、生态系统多样性和景观多样性的基础。随着研究方法和实验技术的发展，遗传多样性研究从形态学水平、细胞学（染色体）水平、生理生化水平逐渐发展到分子水平。DNA是遗传物质的载体，遗传信息就是DNA的碱基排列顺序，因此直接对DNA碱基序列的分析和比较是揭示遗传多样性最理想的方法。目前遗传多样性研究中常用的分子标记技术有微卫星和小卫星DNA标记、线粒体DNA标记、核糖体DNA标记、随机扩增多态性DNA（RAPD）、限制性片段长度多态性（RFLP）、扩增片段长度多态性（AFLP）、单链构象多态性（SSCP）、单核苷酸多态性（SNP）、表达序列标签（EST）等。

线粒体DNA（mitochondrial DNA，简称mtDNA），呈闭合环装双链结构，包含13种蛋白质多肽、22种tRNA的编码基因、2种rRNA（12SrRNA，16SrRNA）、一个轻链复制起始区（OL）和1个主要非编码区（D-loop）。线粒体DNA可独立进行复制、转录和翻译，具有非常活跃的自我复制能力。和核DNA相比，mtDNA具有分子量小、遵循母系遗传、进化速度快、解码体系简单、编码效率高等特征，所以mtDNA标记在分子群体遗传学和分子系统学研究方面得到广泛的应用。

本实验室基于线粒体DNA序列的遗传多样性分析，经在鱼类、甲壳类、双壳类、多毛类等水生动物不同地理群体中进行群体遗传学分析，可以准确反映水产动物群体遗传多样性，为

水生动物资源保护及开发利用提供了理论依据。这些研究为基于线粒体 DNA 序列的水产动物遗传多样性分析标准的问世奠定了基础，因此课题组制定本标准，从而更好规范使用线粒体 DNA 序列进行水产动物遗传多样性检测和分析。

本标准规定通过使用线粒体 DNA 序列进行水产动物遗传多样性分析的技术规程，适用于水产动物遗传多样性和群体结构分析。标准主要包括采样、DNA 抽提、PCR 扩增以及 DNA 序列分析，序列分析主要包括核苷酸多样性、单倍型多样性分析、系统发生树的构建、遗传分化指数分析、分子方差分析以及群体历史动态分析等。

目前尚无利用线粒体 DNA 序列进行水产动物遗传多样性检测的国家标准，广西也无相应团体标准。

三、主要起草过程

（一）成立起草小组

广西壮族自治区水产科学研究院成立了《水产动物线粒体 DNA 序列遗传多样性分析操作规程》的标准起草工作小组；同时及时部署了制标工作方案和小组成员分工负责制及标准起草工作时间安排表，全面启动了该规程的编制工作。

（二）收集资料及调研

收集当前群体遗传多样性检测标准，分子标记技术的研究进展，以及线粒体 DNA 序列开发及应用进展等资料，并对当前研究人员、企业工作人员对分子标记的使用情况进行调研、分析。目前，检索到的同类标准有：《畜禽微卫星 DNA 遗传多样性检测技术规程》（NY/T 1673），《畜禽线粒体 DNA 遗传多样性检测技术规程》（NY/T 1898）。此外，标准起草组广泛收集 2015 年标准改革方案提出，尤其是 2019 年国家标准化管理委员会 民政部印发《团体标准管理规定》以来，国家标准化管理委员会在团体标准制修订管理工作中发布的相关文件和提出的要求，结合本标准的工作需求及特点，明确本标准的编写框架以及需制定的内容。

（三）标准起草

标准起草小组在前期研究工作以及实地调研的基础上，对技术进行系统总结，并查阅了大量的国内外文献资料，确定了广西团体标准《水产动物线粒体 DNA 序列遗传多样性分析操作规程》的基本内容和思路，形成了标准基本构架。

（四）形成征求意见稿

在资料收集、调研的基础上，根据标准制定的依据，按照 GB/T 1.1—2020《标准化工作导则　第 1 部分：标准化文件的结构和起草规则》要求，起草标准文本，形成工作组讨论稿，组织起草组成员针对讨论稿进行认真讨论、征求意见，不断修改完善标准内容，最终完成了《水产动物线粒体 DNA 序列遗传多样性分析操作规程》广西团体标准的征求意见稿。

四、制定标准的原则和依据，与现行法律、法规、标准的关系

（一）制定标准的原则和依据

本标准的制定目的是为了规范使用线粒体 DNA 序列进行水产动物遗传多样性检测和分析，因此，本标准在编制过程中将遵循以下原则：

（1）与国家、行业、地方以及社会团体的标准化管理文件的要求相统一。

（2）与国家、行业、地方管理部门以及社会团体的需求相一致。

（3）标准规定的程序注重效率，编写过程遵循科学、统一、适用、规范、可行的原则，力求标准文本结构清楚、准确、相互协调，易于理解，具有适用性和可操作性。

（二）与现行法律、法规、标准的关系

2015 年，国务院印发的《深化标准化工作改革方案》中提出团体标准作为市场自主制定标准的主要方面，是标准化改革的重要内容。

2018 年 1 月 1 日，《中华人民共和国标准化法》修订后正式实施，赋予了团体标准法律地位。

2019 年 1 月，国家标准化管理委员会和民政部印发《团体标准管理规定》（国标委联[2019]1 号）。

该标准与现行有关国家标准、行业标准协调一致。

五、主要条款的说明

广西团体标准《水产动物线粒体 DNA 序列遗传多样性分析操作规程》主要章节内容包括：样品的采集、基因组 DNA 的制备、PCR 扩增、扩增产物回收纯化和 DNA 序列测定、数据分析等。

1、样品的采集

1.1 珍稀濒危水产动物采样

应在自然保护机构、人工养殖部门等协助下进行，以不伤害个体、不破坏其生境为原则，采集其血液、皮毛、附肢等作为样品，样品数量应不少于 10 个/群体。

1.2 重要水产动物采样

随机采取正常、健康个体样品，每个群体数量不少于 30 个。选择 DNA 含量高、多糖等含量低的肌肉、肠道、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。也可将样品切成 3 mm～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，回实验室后 4℃保存。

2、基因组 DNA 的制备

2.1 基因组 DNA 的提取

2.1.1 血液样本

血液样品基因组DNA的制备参照畜禽微卫星DNA遗传多样性检测技术规程》（NY/T 1673）的规定执行。

2.1.2 组织样本

称取组织样本20 mg～50 mg于1.5 mL离心管中，加入600μL DNA提取缓冲液（10 mmol/L Tris-HCl(pH 8.0)，100 mmol/L EDTA(pH 8.0)，2％ SDS），剪碎后加入20μL 20 mg/mL蛋白酶K，充分混匀后于56℃水浴锅中温浴2 h～3 h；待组织消化完全，冷却至室温，加入200μL 7.5 mol/L醋酸铵溶液，充分颠倒混匀2 min，冰上放置或4℃冷却5 min～10 min，4℃、14000 rpm 离心5 min，取上清至另一1.5 mL离心管；加入等体积预冷异丙醇，轻轻摇匀，-20℃放置15 min；4℃、14000 rpm 离心5 min，沉淀用75%乙醇洗涤2～3次，弃上清，晾干；干燥后加入50μL灭菌超纯水溶解，加入1μL 10 mg/mL RNase酶37℃水浴30 min。DNA提取液应置于冰上备用，若需长期保存应置于≤-20℃保存。

2.1.3 试剂盒提取

不同样本采用相应的DNA提取试剂盒进行基因组DNA提取，根据试剂盒说明书提取基因组DNA。

2.2 基因组 DNA 质量检测

2.2.1 完整性检测

吸取 1 ～3μL 提取的 DNA，用浓度 1.0%琼脂糖凝胶 5 V/cm～8 V/cm 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。

2.2.2 纯度检测

分别在 260 nm 波长和 280 nm 波长下测定 DNA 抽提产物(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，方可继续后续实验。

2.2.3 浓度检测

在 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。

DNA 浓度（μg/mL）=[A260/(0.020×L)]×稀释倍数……. （1）

式中：A260——被测样品在 260nm 波长下的吸光度值

L——比色池厚度，单位 cm

DNA 浓度不低于 10 μg/mL，方可继续后续实验。将部分 DNA 用灭菌超纯水稀释至 50 ng/μL 置于-20℃保存备用。

3、PCR 扩增

3.1 引物的选择

使用线粒体 DNA 目的片段的通用引物，或者参考同一物种 DNA 序列或者相近物种 DNA 序列，选择位于目的序列两侧保守性较高的区域设计特异性 PCR 扩增引物。合成的引物用灭菌超纯水溶解，配成浓度为 10μmol/L 工作液，分装后置-20℃以下冻存保存。

3.2 PCR 反应体系

反应总体积为 50μL：10×PCR buffer（无 Mg^{2+}）5μL，10 mmol/L dNTPs 混合液 1 μL，50 mmol/L $MgSO_4$ 2μL，10μmol/L 上下游引物各 2μL，基因组 DNA 约 50 ng～100 ng，1 U～1.5 U Taq 酶，灭菌超纯水补足至 50 μL。

3.3 PCR 反应程序

反应程序：94℃～95℃预变性 5 min；随后进行 30～35 个循环，每个循环包括 94℃ 变性 30 s～60 s，最适引物退火温度 30 s～60 s，72℃延伸 60 s～90 s；最后 72℃延伸 10 min；4℃保存。

4、扩增产物回收纯化、DNA 序列测定

4.1 试剂盒回收纯化

制备 2%的琼脂糖凝胶，上样，5 V/cm～8 V/cm 电泳 1 h，在紫外灯下切下 DNA 目的片段，根据试剂盒说明书对扩增产物进行纯化。

4.2 低熔点胶法、冻融法、Glassmilk 法纯化回收

采用低熔点胶法、冻融法、Glassmilk 法对扩增产物纯化回收参照《畜禽线粒体 DNA 遗传多样性检测技术规程》（NY/T 1898）的规定执行。

4.3 DNA 序列测定

DNA 纯化回收后，电泳检测应为单一的条带。若电泳结果出现两条以上的带，则需重复纯化回收。将回收纯化后的 DNA 片段送专业测序公司进行正反链双向测序，取回测序图谱和序列进一步分析。

5、数据分析

5.1 序列校对拼接

测序所获得的序列采用序列看图程序（如 Chromas）进行人工编辑、校对峰图与碱基对应关系，剪切非研究区域序列。编辑后序列用序列拼接程序（如 DNAstar 中的 SeqMan）比较双向测序结果，以测得的序列完全匹配为正确序列拼接。用序列比对程序（如 DNAstar 中的 MegAlign）对拼接序列进行完全比对，特别是出现碱基缺失或插入的区域，需要人为校对以达到最大的序列相似性。

5.2 序列变异性分析

利用序列变异分析程序（如 Mega）计算碱基组成、确定多态位点、统计转换/颠换比率(Ts/Tv)。缺失/插入的位点在统计时删除。

5.3 单倍型、单倍型频率分析

在单倍型统计软件（如 DnaSP）中识别单倍型，并计算单倍型频率。

5.4 核苷酸多样性、单倍型多样性分析

用核苷酸多样性、单倍型多样性软件（如 DnaSP）计算核苷酸多样性、单倍型多样性等多态性统计参数。

5.5 群体系统进化关系分析

5.5.1 系统发生数的构建

在系统发生树构建程序（如 MEGA）中基于 Kimura-2 参数核苷酸替代模型，计算单倍型间的遗传距离，构建 Neighbour-joining(NJ)系统发生树及群体间聚类分析。

5.5.2 网络分析

使用基因网络分析程序（如 network）基于 media-joining network 中介连接网络法进一步分析不同单倍型间的进化关系，构建单倍型网络图，探讨单倍型间的谱系结构。

5.6 群体遗传结构分析

5.6.1 遗传分化指数分析

使用遗传分化指数分析程序（如 Arlequin）根据遗传距离、基因流（Nm）、遗传分化指数（FST）评价两两群体间的遗传差异，重复抽样 10 000 次以检验 FST 结果的显著性。

5.6.2 分子方差分析（AMOVA）

使用分子方差分析程序（如 Arlequin）估算遗传变异的分布，10 000 次随机重复抽样后进行显著性分析。

5.6.3 种群分化测试

使用种群分化测试程序（如 Arlequin）进行随机交配群假设，即单倍型在群体间随机分布的检验。

5.7 群体历史动态分析

5.7.1 核苷酸不配对分析和中性检验

采用核苷酸不配对分析(mismatch analysis)和 Tajima's D 检验、Fu's 中性检验等方法分析检验群体在过去是否发生扩张或经受了瓶颈效应。

5.7.2 群体扩张时间

根据公式 $t = T\tau/2u$（T 为世代时间）计算群体自扩张开始到现在的时间 t，其中τ为扩张时间参数（在 Arlequin 软件中根据核苷酸错配分布计算获得），u 为序列的突变速率，$u=2\mu k$，式中 k 为序列长度，μ为每个核苷酸位点的突变速率。

六、重大分歧意见的处理依据和结果

本文件研制过程中无重大分歧意见。

七、贯彻标准的措施建议

首先，及时借助公共媒体、行业内部交流等多种方式进行宣传，引起相关研究人员、专

家、领导的重视。其次，适时对水产动物多样性分析研究人员进行培训、推广等。建议将本标准所涉及的分子标记及其检测规程确定为水产动物遗传多样性分析的优选方案。此外，该标准仍需根据实际情况及时加以修改和更新，以适应技术发展的需要。

八、其他应说明的事项

本标准内容与各项指标不低于国家强制性标准、推荐性国家标准和行业标准。

《水产动物线粒体 DNA 序列遗传多样性分析操作规程》标准起草工作组

2023 年 4 月