ICS
CCS 点击此处添加 CCS 号

T/GXAS

团 体 标 准

T/GXAS XXXX—XXXX

水产动物线粒体 DNA 序列遗传多样性分析操作规程

Practice of analysis for mitochondrial DNA sequence genetic diversity of aquatic animals

（征求意见稿）

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

XXXX－XX－XX 发布 XXXX－XX－XX 实施

广西农产品质量安全服务协会 发 布

前　　言

本文件按照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》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利，本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由广西壮族自治区水产科学研究院提出。

本文件由广西农产品质量安全服务协会归口。

本文件起草单位：广西壮族自治区水产科学研究院。

本文件主要起草人：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。

水产动物线粒体DNA序列遗传多样性分析操作规程

1 范围

本文件规定了水产动物线粒体DNA序列遗传多样性分析的原理、仪器试剂、DNA提取、PCR扩增、扩增产物序列测序和数据分析。

本文件适用于水产动物线粒体DNA序列遗传多样性分析。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；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

NY/T 1673 畜禽微卫星DNA遗传多样性检测技术规程

NY/T 1898 畜禽线粒体DNA遗传多样性检测技术规程

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

线粒体DNA mitochondrial DNA（mtDNA）

动物细胞核外唯一具有半自主能力的双链环状DNA。

3.2

聚合酶链式反应 polymerase chain reaction（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

核苷酸多样性 nucleotide diversity（π）

遗传变异的一个量化值。通常用于衡量种群内或种群间的多样性，或某一物种与相关物种间的遗传变异。值越大说明核苷酸多样性越高。

3.4

分子方差分析 Analysis of Molecular Variance（AMOVA）

通过估计单倍型(含等位基因)或基因型之间的进化距离，进行遗传变异的等级剖分，并提出了与Fstatistics类似的Φstatistics等方法来有效地度量亚群体的分化。

3.5

聚类分析 cluster analysis

将研究对象分为相对同质的群组（clusters）的统计分析技术。

3.6

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。

4 原理

利用水产动物线粒体DNA目的片段的通用引物或自行设计的引物，对模板DNA进行PCR扩增得到目的片段，并对扩增产物进行纯化、测序，然后将所有序列进行两两比较并采用相应软件统计分析其遗传多样性及遗传结构。

5 仪器与试剂

5.1 仪器

低温冰箱、纯水仪、水浴锅、微量移液器、台式高速冷冻离心机、PCR 扩增仪、水平电泳仪、凝胶成像仪、核酸蛋白测定仪等。

5.2 试剂

5.2.1 试剂级别

除另有规定，实验化学试剂均为分析纯，试验用水应符合GB/T 6682规定的一级水要求。

5.2.2 其他试剂

Tris-HCl、EDTA、SDS、蛋白酶K、醋酸铵、异丙醇、无水乙醇、RNase、高保真 DNA 聚合酶、10×PCR buffer、$MgSO_4$、dNTPs、6×loading buffer、 DNA Marker、琼脂糖、GelRed核酸染料等。

5.2.3 引物

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10 μmol/L 工作液，分装后置-20℃以下冻存保存。

6 样品的采集

6.1 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。

6.2 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。

7 基因组 DNA 制备

7.1 基因组 DNA 提取

7.1.1 血液样本

血液样品基因组DNA的制备参照NY/T 1673的规定执行。

7.1.2 组织样本

称取组织样本20 mg～50 mg于1.5 mL离心管中，加入600 μL 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20 μL 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200 μL 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50 μL灭菌超纯水溶解，加入1 μL 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。

7.1.3 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。

7.2 基因组 DNA 测定

7.2.1 完整性测定

吸取1 μL～3 μL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。

7.2.2 纯度测定

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A_{260} / A_{280}比值在1.8～2.0范围内，方可继续后续实验。

7.2.3 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。

$$\text{DNA 浓度}(\mu g/mL) = [A260 / (0.020 \times L)] \times \text{稀释倍数} \cdots\cdots (1)$$

式中：A_{260}——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。

8 PCR 扩增

8.1 PCR 反应体系

反应总体积为50 μL：10×PCR buffer（无Mg^{2+}） 5uL，10 mmol/L dNTPs混合液1 μL，50 mmol/L $MgSO_4$ 2 μL，10 μmol/L上下游引物各2 μL，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。

8.2 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。

9 扩增产物回收纯化、DNA 序列测定

9.1 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。

9.2 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NY/T1898 的规定执行。

9.3 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。

10 数据分析

10.1 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。

10.2 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(T_s/T_v)。缺失/插入的位点在统计时删除。

10.3 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。

10.4 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。

10.5 群体系统进化关系分析

10.5.1 系统发生树的构建

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。

10.5.2 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。

10.6 群体遗传结构分析

10.6.1 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（F_{ST}）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。

10.6.2 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。

10.6.3 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。

10.7 群体历史动态分析

10.7.1 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。

10.7.2 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。

11 质控措施

检测过程中分别设空白对照、阴性对照和阳性对照。用等体积的水代替模板DNA作空白对照、已知不含同一品种成分的模板做阴性对照、已知同一品种做阳性对照。