

附录 A
(资料性附录)
DNA 序列的测序

A.1 测序样品预处理

PCR 扩增完毕,将样品置于-20℃条件下。利用 PCR 产物纯化试剂盒进行纯化。具体操作如下:

- 往 PCR 产物中加入 4 倍体积 75%异丙醇,室温沉淀 30 min。在 3 200 r/min 下离心 30 min;
- 去掉上清,加 8 倍体积 75%异丙醇。室温静置 10 min;
- 在 3 200 r/min 下离心 10 min,去上清;
- 在 50℃烘干 3 min 以除去残留的异丙醇,或置于温箱中盖上保鲜膜至无异丙醇;
- 加入适量的无菌去离子水稀释,1 000 r/min 振荡混匀。

A.2 测序

A.2.1 纯化后的 PCR 产物在 ABI PRISM 3730 测序仪上采用 Sanger 双脱氧链终止法原理从两端进行测序。

注:本标准以 ABI PRISM 3730 测序仪为例,不排除采用具有同等工效的其他型号的测序仪。

A.2.2 设立双脱氧测序反应。要求:

- 引物:测序引物即为扩增引物;
- 微量滴定板:为 96 孔 U 形微量滴定板;
- 链延伸-链终止反应混合液的配制。

A.2.3 测序凝胶的制备。

A.2.4 准备样品和列表,上样到微量滴定板中进行测序。

A.2.5 电压 160 V/cm,温度 42℃。

A.2.6 根据凝胶的荧光放射自显影,运用计算机读取 DNA 序列。

A.3 数据处理

利用相关的生物信息学软件读取所测裙带菜 ITS 序列,并同 GenBank 中公开的近缘种序列进行比对,确定裙带菜 ITS(包括 ITS-1,5.8S 和 ITS-2)序列的起点和终点。利用软件 MEGA 计算裙带菜不同品系 ITS 序列的变异数目。



中华人民共和国国家标准

GB/T 25166—2010

裙 带 菜

Wakame



GB/T 25166—2010

版权专有 侵权必究

*

书号:155066·1-40628

定价: 14.00 元

2010-09-26 发布

2011-05-01 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局
中国国家标准化管理委员会 发布

1 ccctccctc cccctctctt tgtggggggg gggggggtt cggggcggac tatgagtgtt ccggagcgtc
 71 cgcgctccga gtgcaccaa tctcgtgaac gaagcctctc gcgcctgcc gcacagagtt gttgacggcg
 141 ctgcttcgg cggcgactct cgactacca aacgtgcgcg gggattcgcc tgettattc cggtcatgc
 211 cttttcccc ccccccccc cagcaagtg agggaggag ggaaggagag gccatatcca cac

6.2.3 裙带菜不同品系核糖体 ITS 全序列(ITS-1+ITS-2)变化幅度为 0~10 个碱基。

7 检测方法

7.1 形态构造特征检验

采用肉眼和显微镜观察相结合的方法。

7.2 染色体检验

7.2.1 标本的制备

压片法。

7.2.2 染色液

2%地衣红溶于 70%的乙酸中。

7.2.3 染色方法

固定材料在自来水中浸泡 15 min~30 min 后压片。揭开盖片,滴入乙酸地衣红后盖片 0.5 h,用滤纸吸出多余的染色液,石蜡封片。

7.3 裙带菜 ITS 序列的检测

7.3.1 裙带菜配子体基因组 DNA 的提取

取约 1 g(湿重)的裙带菜配子体,加少量石英沙和 PVP-40,在液氮中研成粉末。将粉末转至 50 mL 的离心管中,加入 15 mL 裂解缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl,10 mmol/L EDTA,1.0 mol/L NaCl,1.0% CTAB,1% SDS,pH=8.0),在 65 °C 保温 1 h,期间摇匀几次。用等体积的酚:三氯甲烷:异戊醇(25:24:1,体积比)抽提两次,再将水相转移至一新的 50 mL 离心管中,加入 1/10 体积 RNA 酶,37 °C 保温 1 h,再用三氯甲烷:异戊醇(24:1,体积比)抽提一次,用 2/3 体积的异丙醇沉淀回收 DNA。DNA 最后溶于 100 μL 的 TE(10 mmol/L Tris-HCl,pH=8.0;1 mmol/L EDTA,pH=8.0)中。

7.3.2 ITS 特异性扩增

总反应体积为 20 μL,含 10 mmol/L Tris-HCl,pH=8.3,50 mmol/L KCl,1.5 mmol/L MgCl₂,Taq polymerase 1U,4 种 dNTP 各 2 mmol/L,两个引物各 4 mmol/L~6 mmol/L(正向引物 P1:5'-CGCGAGTCATCAGCTCGCATT-3';反向引物 P2:5'-AGCTTCACTCGCCGTACTGG-3'),模板 DNA 10 ng,其余用双蒸馏水补满。

PCR 反应参数:96 °C 预变性 5 min;96 °C,30 s;72 °C,60 s;55 °C,30 s,37 个循环;72 °C,保温 5 min。

7.3.3 测序

参照 DNA 测序仪进行测序(参见附录 A)。

8 判定规则

被检样品完整并符合本标准第 4 章要求的为合格样品。如被检样品不完整需增加第 5 章、第 6 章内容进行检验,均符合上述质量要求的为合格样品。

中 华 人 民 共 和 国
 国 家 标 准
 裙 带 菜
 GB/T 25166—2010

*

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 0.5 字数 9 千字
 2010 年 11 月第一版 2010 年 11 月第一次印刷

*

书号:155066·1-40628 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

4.1.2 固着器

由多次双分枝的圆柱形假根组成,其末端有吸盘。

4.1.3 柄

扁平,其腹背隆起而稍圆,柄的边缘有狭窄的龙骨。藻体接近成熟时,在柄的两侧形成耳状孢子叶,孢子叶定义见 NY/T 5283—2004 中的 3.3。

4.1.4 叶片

褐色具光泽。幼时长盾形,边缘光滑无缺刻,为单叶。成藻为羽状裂片,叶片的中部是由柄部延伸而来的中肋,中肋扁平隆起直达叶片的顶端。成藻一般长 1.0 m~2.5 m,宽 50 cm~100 cm。

4.2 孢子体内部构造特征

4.2.1 表皮

由一层个体小、排列紧密和整齐的细胞组成,呈栅栏状。细胞含粒状色素体。

4.2.2 皮层

外皮层细胞呈柱状,大小不等,排列不整齐。内皮层细胞大小相近,排列较整齐。

4.2.3 髓部

细胞呈丝状或树枝状,排列疏松。

5 生活周期与繁殖

5.1 生活史

明显的孢子体($2n$,大型)与配子体(n ,微型)不等世代交替型。

5.2 生命周期

裙带菜的生命周期为一年。

5.3 繁殖

5.3.1 性成熟年龄

8个月~12个月。

5.3.2 无性繁殖

孢子体柄部产生孢子叶,孢子叶上产生孢子囊群,孢子囊内形成游孢子。游孢子单细胞,梨形,长 $9\ \mu\text{m}\sim 11\ \mu\text{m}$,宽 $5\ \mu\text{m}\sim 6\ \mu\text{m}$,有两条侧生不等长鞭毛,长的 $14.0\ \mu\text{m}\sim 16.5\ \mu\text{m}$,伸向前端,短的 $5.3\ \mu\text{m}\sim 7.0\ \mu\text{m}$,伸向后端。

5.3.3 有性繁殖

卵配方式。雄配子体产生精子囊,每个精子囊产生一个梨形精子,精子(n)长 $4\ \mu\text{m}\sim 5\ \mu\text{m}$ 。雌配子体产生卵囊,每个卵囊产生一个卵(n),卵成熟后排出体外粘着在卵囊口处与精子结合生成合子($2n$)。

6 遗传学特征

6.1 染色体数

孢子体细胞染色体数 $2n=60$ 。

6.2 DNA 序列特征

6.2.1 ITS-1 序列:总长度 242 bp。

```
1   ccgatcagga aggggacacc ctctgacac tacgctcgtg cgcgctcggtt ttgtaaacc cgagaaagaa
71  aatcgttacg cgatgttggg cgaggggagc ctcgccgagg gtaattccc tcgaatcaaa gcgacccca
141 cttttcaacc ccattaaact ctgaatctga actcaaaagg ggggcatgcg cgcgcccgcg cgcgcggtc
211 cccaacctt taacgttgta aaacttcag cg
```

6.2.2 ITS-2 序列:总长度 273 bp。

前 言

本标准的附录 A 为资料性附录。

本标准由中华人民共和国农业部提出。

本标准由全国水产标准化技术委员会海水养殖分技术委员会归口。

本标准起草单位:中国水产科学研究院黄海水产研究所。

本标准主要起草人:王飞久、孙修涛、胡自民、汪文俊、王翔宇、李修良。