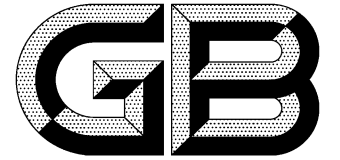


附录 A  
(规范性附录)  
DNA 序列的测定

- A.1 测序样品预处理:PCR 扩增完毕,将样品置于-20℃条件下。随后除去矿物油,残留的部分用等体积的三氯甲烷抽提一两次。经纯化后,获取纯化的 DNA。
- A.2 洗脱:用洗脱液[10 mmol/L Tris 和 0.1 mmol/L EDTA(pH 8.0)]将纯化的 DNA 进行洗脱,然后克隆到 pT7Blue T-vector 中,PCR 产物和载体的摩尔比为 5:1,所用的酶为高活性的 T4 连接酶,接着进行细菌转化。
- A.3 从含有合适插入片段的克隆中分离出质粒 DNA。
- A.4 用质粒纯化试剂盒从细菌克隆中提取和纯化 DNA。
- A.5 纯化后的 DNA 在 DNA 测序仪上采用 Sanger 双脱氧链终止法原理在两端同时进行测序。具体如下:
- A.5.1 设立双脱氧测序反应:
- a) 引物,测序引物即为扩增引物。
  - b) 微量滴定板,为 96 孔 U 形微量滴定板。
  - c) 链延伸—链终止反应混合液的配置。
- A.5.2 准备样品和列表,上样到微量滴定板中进行测序。
- A.6 测序条件:电压 160 V/cm,温度 42℃。
- A.7 根据凝胶的荧光放射自显影,运用计算机读取 DNA 编码。
- A.8 打印测试结果,然后进行数据处理。

GB 20554—2006

ICS 65.150  
B 51

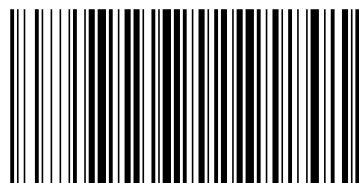


# 中华人民共和国国家标准

GB 20554—2006

## 海 带

Kelp



GB 20554—2006

版权专有 侵权必究

\*

书号:155066·1-28577

定价: 8.00 元

2006-09-29 发布

2006-12-01 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

中 华 人 民 共 和 国  
国 家 标 准  
海 带

GB 20554—2006

\*

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 8 千字

2006年12月第一版 2006年12月第一次印刷

\*

书号: 155066·1-28577 定价 8.00 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

## 6 检测方法

## 6.1 形态构造检验

采用肉眼和显微镜观察相结合的方法。

## 6.2 染色体检验

## 6.2.1 标本的制备

压片法。

## 6.2.2 染色液

2%(质量分数)地衣红溶于70%(体积分数)的乙酸中。

## 6.2.3 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,滴入醋酸地衣红后盖片0.5 h,用滤纸吸出多余的染色液,石蜡封片。

## 6.3 海带 ITS 序列的检测

## 6.3.1 海带配子体 DNA 的提取

取约1 g(湿重)的海带配子体,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,pH8.0),在65℃保温1 h,期间摇匀几次。用同体积的三氯甲烷+异戊醇(24+1)抽提一次,再将水相转移至一新的50 mL离心管中,加入1/3体积的4 mol/L Tris-HCl,1 mmol/L EDTA, pH8.0中,加2 μL RNase A,37℃保温1 h,再用三氯甲烷+异戊醇(24+1)抽提一次,异丙醇沉淀回收DNA。DNA最后溶于一定体积的TE中,检测DNA的浓度。

## 6.3.2 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 MgCl<sub>2</sub>,Taq polymerase 1 U,4种dNTP各2 mmol/L,两个引物各4 mmol/L~6 mmol/L,模板DNA 10 ng,其余用双蒸馏水补满。

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

## 6.3.3 ITS 序列扩增引物

正向引物:5'-AGAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGG-3'。

反向引物:5'-AATCCTGGTTAGTTTCTTTTCCTC-3'。

## 6.3.4 测序

参照DNA测序仪进行测序,见附录A。

## 6.4 判定规则

以第3章为主,结合第4章、第6章判断检验样品结果。经检验,符合上述质量要求的样品为合格样品。

### 3.2 孢子体内部构造特征

柄和叶片均分三层组织,外层为表皮,其内为皮层,中央为髓部。

#### 3.2.1 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。

#### 3.2.2 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。

#### 3.2.3 髓部

由喇叭丝和髓丝组成。

## 4 生活周期与繁殖

### 4.1 生活史

明显的孢子体( $2n$ )与配子体( $n$ )不等世代交替型。

### 4.2 生命周期

海底自然繁生的海带,其寿命为两年。

### 4.3 繁殖

#### 4.3.1 性成熟年龄

10个月~12个月。

#### 4.3.2 无性繁殖

孢子体产生单室孢子囊群,每个孢子囊内形成32个游孢子。游孢子单细胞,梨形,长 $6.9\mu\text{m}$ ~ $8.2\mu\text{m}$ ,宽 $4.1\mu\text{m}$ ~ $5.5\mu\text{m}$ ,有两条侧生不等长鞭毛,前面一条长 $17.8\mu\text{m}$ ~ $19.6\mu\text{m}$ ,后面一条长 $6.9\mu\text{m}$ ~ $8.2\mu\text{m}$ 。

#### 4.3.3 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。精子长 $4.4\mu\text{m}$ ~ $6.2\mu\text{m}$ ,宽 $2.7\mu\text{m}$ ~ $3.4\mu\text{m}$ ,具两条侧生不等长鞭毛,前面一条长 $13.7\mu\text{m}$ ~ $16\mu\text{m}$ ,后面一条长 $16\mu\text{m}$ ~ $19\mu\text{m}$ 。精子( $n$ )与附着在卵囊口处的卵( $n$ )结合生成合子( $2n$ )。

## 5 遗传学特征

### 5.1 染色体数

孢子体细胞染色体数 $2n=44$ 。

### 5.2 DNA序列特征

#### 5.2.1 ITS-1序列:总长度238 bp。

```

1 CCGAAAGCGG GTTCGTTCAA TCCCCCCGC TCTATAAATT GTCTGTGAGG CCGCTTCGTG
61 CGGCCTCTTT ACCCCGAGAA AGAATTCGTT ATGCGAAGTT GGGCGAGGGG CGCCTCGCCG
121 AGAGCCTGTG AAAAGGCCCT CGAATCAAAG CGCACCCAC ATTTCAACCC ATTAAACTCT
181 GAATCTGAAC TCAAAGGGGC GCTGCGCTAG CCGCGGCTCC CCCAACCTTT AACGTTGT

```

#### 5.2.2 ITS-2序列:总长度258 bp。

```

1 GACACCACTC GCCCCTCTC TCTCCTGTCT CACGACGGGG GAGTCGCGGC GCGGACTTTT
61 GAGTGTTCCG GAGTTCATG GCTCCGAGTG CACCTAATCT CGTGAACGAA GCCTCTCGCG
121 CCCTGCCGCA CAGAGTTGTT GACGGCGCTC GCTTCGGCGG CGACTCTCGA CTCACCAAAC
181 GTGCGCAGGA TGCTGCCTC ATTCCGGGCG TCCGACGCCG ACCCTTCTGG GTCAGCGTCC
241 GAAACCGTAC CACTTTCG

```

## 前 言

本标准的第3章为强制性条款,其余为推荐性条款。

本标准的附录A为规范性附录。

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、中国科学院海洋研究所、中国海洋大学。

本标准主要起草人:王飞久、段德麟、刘涛、陈四清、张岩、高淳仁、于东祥、崔竞进。