

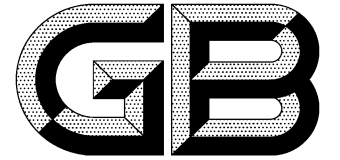
附录 B  
(规范性附录)  
同工酶染色液的配置

表 B.1 给出了各同工酶染色液的成分。

表 B.1 同工酶染色液的配制

同工酶	英文名和缩写	试剂	浓度	用量
超氧化物歧化酶	Superoxide desmutase (SOD)	Tris-HCl	0.2 mol/L, pH8.5	15 mL
		MTT(噻唑蓝)	0.5%	0.5 mL
		PMS(吩嗪甲酯硫酸盐)	0.5%	0.5 mL
		琼脂	1.0%	10 mL
磷酸葡萄糖变位酶	Phosphoglucomu-tase (PGM)	Tris-HCl	0.2 mol/L, pH8.0	15 mL
		NADP(辅酶 II)	0.25%	0.5 mL
		MgCl <sub>2</sub>	1.0 mol/L	0.1 mL
		G6PD (6-磷酸葡萄糖脱氢酶)	—	6U
		Glucose-1-phosphate (1-磷酸葡萄糖)	—	13 mg
		MTT(噻唑蓝)	0.5%	0.5 mL
		PMS(吩嗪甲酯硫酸盐)	0.5%	0.5 mL
		琼脂	1.0%	10 mL
腺苷酸激酶	Adenylate Kinase (AK)	Tris-HCl	0.2 mol/L, pH8.0	15 mL
		NADP(辅酶 II)	0.25%	0.5 mL
		MgCl <sub>2</sub>	1.0 mol/L	0.25 mL
		葡萄糖	—	0.1 g~0.2 g
		ADP(二磷酸腺苷)	—	14 mg~20 mg
		G6PD (6-磷酸葡萄糖脱氢酶)	—	12U
		己糖激酶	—	1.5 mg~3 mg
		MTT(噻唑蓝)	0.5%	0.5 mL
		PMS(吩嗪甲酯硫酸盐)	0.5%	0.5 mL
		琼脂	1.0%	10 mL

GB 20556—2006

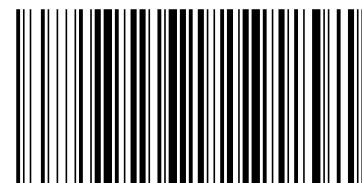


# 中华人民共和国国家标准

GB 20556—2006

## 三疣梭子蟹

Swimming crab



GB 20556—2006

版权专有 侵权必究

\*

书号:155066·1-28674

定价: 10.00 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

附录 A  
(规范性附录)  
缓冲液的配置

A.1 0.1 mol/L 磷酸缓冲液(pH7.0)

0.01 mol/L 磷酸氢二钠溶液 57.7 mL, 0.01 mol/L 磷酸二氢钠溶液 42.3 mL, 加水至 1 000 mL, pH7.0。

A.2 TC 制胶缓冲液

三羟甲基氨基甲烷 3.028 g, 用柠檬酸调 pH 至 7.0, 蒸馏水定容至 1 L。

A.3 TC 电极缓冲液

三羟甲基氨基甲烷 42.65 g, 用柠檬酸调 pH 至 7.0, 蒸馏水定容至 10 L。

A.4 TE 缓冲液(pH8.0)

10 mmol/L Tris-HCl(pH8.0), 1 mmol/L EDTA(pH8.0)。

中华人民共和国  
国家标准  
三疣梭子蟹  
GB 20556—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 0.75 字数 18 千字

2006 年 12 月第一版 2006 年 12 月第一次印刷

\*

书号: 155066·1-28674 定价 10.00 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

$$\text{多态位点比例}(P) = (\text{多态位点数} / \text{所测位点总数}) \times 100\% \quad \dots\dots\dots(5)$$

$$\text{平均杂合度观察值}(H_o) = \text{多态位点杂合度观察值之和} / \text{观察位点总和} \quad \dots\dots\dots(6)$$

$$\text{平均杂合度期望值}(H_e) = \text{多态位点杂合度期望值之和} / \text{观察位点总和} \quad \dots\dots\dots(7)$$

$$\text{平均有效等位基因数}(N_e) = \sum_{i=1}^n (N_{ei}) / n \quad (\text{其中 } N_{ei} = 1 - H_{oi}) \quad \dots\dots\dots(8)$$

### 9.3 分子遗传学特征的测定

#### 9.3.1 DNA 提取

取肌肉组织,尽量剪碎,用 DNA 提取试剂盒或常规酚方法提取基因组 DNA,TE 溶解后-20℃保存备用,TE 溶液的配制见附录 A。

#### 9.3.2 PCR 扩增

16SrRNA 引物 (16sAR/BR) 序列为:

5'-GCCTGTTTATCAAAAACAT-3'(16sAR);

5'-CCGGTCTGAACTCAGATCACGT-3'(16sBR)。

25 μL PCR 扩增反应体积内含:2.0 mmol/L MgCl<sub>2</sub>,0.2 mmol/L 每种 dNTP,0.2 μmol/L 每种引物,1 μL DNA 模板,1UTaq 酶及 1×缓冲液。

PCR 反应程序为:94℃预变性 2 min;94℃ 45 s,50℃ 1 min,72℃ 1 min,循环 35 次;最后 72℃延伸 5 min。

PCR 产物 1.4%琼脂糖凝胶电泳,EB 染色,凝胶成像系统观察、照相。

#### 9.3.3 PCR 产物克隆

PCR 产物经回收纯化后,连接到 T 载体上。连接反应体积 10 μL,其中载体 1 μL,连接酶 I 5 μL,PCR 产物 4 μL,16℃连接 1 h 或 4℃过夜,然后连接液转化感受态大肠杆菌,涂平板,蓝-白斑筛选阳性克隆,液体培养基培养,提纯质粒后用 EcoR I 和 Hind III 酶切检测有无插入片段。

#### 9.3.4 序列测定

对回收质粒进行测序反应,产物纯化后在 DNA 测序仪上测序;为保证测序的可靠性和准确性,采用双向测序,并进行人工核对、校正。

### 10 判定规则

检测结果不符合 5.1 和 5.2 要求的,则判定为不合格项;有不合格项的样品为不合格样品。

## 前 言

本标准的 5.1 和 5.2 为强制性条款,其余为推荐性条款。

本标准的附录 A、附录 B 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、中国海洋大学、山东省渔业技术推广站。

本标准主要起草人:张岩、于东祥、陈四清、孔晓瑜、李鲁晶、王春生。