ICS 65.150
CCS B50

福建省水产学会团体标准

T/FSF 002-2023

大黄鱼增殖放流效果评估技术规范
—微卫星分子标记法

Technical specification for stock enhancement assessment on large yellow croaker - a method based on SSR marker

20XX - XX- XX 发布　　20XX - XX - XX 实施

福建省水产学会　　发布

目 次

前言 II
1 范围 1
2 规范性引用文件 1
3 术语与定义 1
4 信息采集 2
4.1 亲体准备 2
4.2 组织采集 2
4.3 DNA 提取 2
4.4 微卫星 DNA 扩增 2
4.5 基因分型 3
4.6 数据库构建 3
5 标记大黄鱼放流 3
6 大黄鱼样本采集 3
7 样本分析 3
7.1 DNA 提取 3
7.2 微卫星 DNA 扩增 3
7.3 基因分型 3
7.4 标记放流个体溯源 3
8 增殖效果评估 3
8.1 经济效益评估 4
8.2 生态效益评估 4
8.3 社会效益评估 4
附录 A 试剂材料和器材设备 5
附录 B 大黄鱼增殖放流亲体生长指标信息记录表 7
附录 C 组织 DNA 提取方法 8
附录 D 微卫星 DNA 扩增特异性引物序列 9
附录 E 亲体基因型信息表 10
附录 F 大黄鱼样本采集信息记录表 11

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。

本文件由福建省水产学会提出并归口。

本文件起草单位：福建省水产技术推广总站、宁德富发水产有限公司、厦门大学

本文件主要起草人：林国清、李苗苗、丁少雄、吴斌、林楠、郑炜强、吴利娜、翁华松、陈佳、翁祖桐、王凡、陈曦飞、王巧煌、陈云月、陈玉红、元丽花、林位琅。

大黄鱼增殖放流效果评估技术规范-微卫星分子标记法

1 范围

本文件给出了大黄鱼（*Larimichthys crocea*）增殖放流效果评估技术规范-微卫星分子标记法的术语与定义，规定了亲体分子标记、增殖效果评估的方法，描述了信息采集、标记大黄鱼放流、大黄鱼样本采集、样本分析等方面的内容和要求。

本文件适用于大黄鱼增殖放流效果评估。

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，仅注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

GB/T 12763.6 海洋调查规范 第6部分：海洋生物调查

GB/T 34748-2017 水产种质资源基因组DNA的微卫星分析

SC/T 9401-2010 水生生物增殖放流技术规范

SC/T 9413-2014 水生生物增殖放流技术规范 大黄鱼

SC/T 9437-2020 水生生物增殖放流技术规范名词术语

3 术语与定义

SC/T 9401-2010、SC/T 9437-2020界定的以及下列术语和定义适用于本文件，为了便于使用，本文件重复列出了SC/T 9437-2020中的某些术语和定义。

3.1

微卫星分子标记 microsatellite molecular mark

利用能反映生物个体或种群间基因组中差异的特异性微卫星DNA为标识的方法。

3.2

基因座位 gene locus

各个基因在染色体上所占的位置，实际上指的就是个体染色体上控制特定性状的特定DNA片段。

3.3

等位基因　allele

指分别遗传自父本和母本，位于一对同源染色体相同位置上，控制同一性状不同形态的一对基因。

3.4

基因分型　genotyping

通过分析微卫星分子标记的长度变异来确定不同个体之间遗传差异的过程。

3.5

回捕率　recapture rate

标记放流的水生生物经过一段时间后，被捕捞到的标记个体数量占标记放流个体总数的百分比。

4　信息采集

4.1　亲体准备

来源及质量要求按 SC/T 9401-2010、SC/T 9413-2014 执行，每批次亲体数量应在 500 尾（雌：雄=2:1）以上。

4.2　组织采集

每尾亲体采集约 0.1 g 的鳍条组织于 95%乙醇中保存，记录相应编号和性别信息（附录 B）。

4.3　DNA 提取

按附录 C 进行组织 DNA 的提取，也可采用同等抽提效果的其他方法或商品化试剂盒进行提取。

使用超微量分光光度计检测基因组DNA的纯度与浓度。具体要求参照GB/T 34748-2017执行。

4.4　微卫星 DNA 扩增

4.4.1　引物

引物序列见附录 D。将合成的引物配制成 100 μmol/L 的保存液，-20 ℃避光保存。使用时取部分保存液配制成 5 μmol/L 的工作液后使用。

4.4.2　PCR 扩增

配制反应体系：在 0.2 mL PCR 管或八联管中，按每个样品 PCR 扩增预混液(含 Taq DNA 聚合酶、PCR Buffer、Mg^{2+}、dNTPs) 12.5 μL、微卫星 DNA 正向和反向特异性引物(5 μmol/L)各 1.0 μL、DNA 模板（50 ng/μL）1.0 μL、无菌双蒸水补足至 25.0 μL。

按下列反应条件进行 PCR 扩增：95 ℃预变性 5 min；95 ℃变性 30 s，55 ℃~59 ℃（不同位点引物退火温度见附录 D）退火 30 s，72 ℃延伸 45 s，30 个循环；72 ℃延伸 5 min；4 ℃保温。

可采用同等扩增效果品化试剂盒进行 PCR 扩增。

4.5 基因分型

收集 PCR 扩增产物，产物经毛细管电泳仪电泳，应用产物片段长度分析软件（如：GeneMapper，GentMarker 等）对 PCR 扩增产物进行基因分型，具体操作参照软件说明书进行。

4.6 数据库构建

将所确定的亲体基因型数据填入《亲体基因型信息表》（附录 E）。

5 标记大黄鱼放流

将4.1亲体繁育的苗种作为标记个体进行放流，具体放流过程按SC/T 9413-2014执行。

6 大黄鱼样本采集

放流后在放流区域及临近海域采用拖网、张网等捕捞工具采集大黄鱼样本，具体方法按 GB/T 12763.6 执行。

采集频率：放流后 3~6 个月 1 次，9~12 个月 1 次，第 2 年和第 3 年秋季各 1 次。

7 样本分析

7.1 DNA 提取

对采集到的大黄鱼样本取鳍条或肌肉组织进行 DNA 提取，方法按 4.3 执行。

7.2 微卫星 DNA 扩增

以 7.1 提取的大黄鱼样本组织 DNA 为模板，进行微卫星 DNA PCR 扩增，方法按 4.4 执行。

7.3 基因分型

将大黄鱼样本组织的微卫星 PCR 扩增产物进行基因分型，方法按 4.5 执行。

7.4 标记放流个体溯源

利用谱系鉴定软件（如 CERVUS，COLONY, PAPA 等）对采集到的大黄鱼样本基因型与亲体基因型数据进行比较分析，相关参数设置和判别标准参照软件说明书进行。

8 增殖效果评估

在每个放流周期结束后，进行增殖效果评估。评估周期原则上不少于一周年。

8.1 经济效益评估

通过标志鱼回捕法计算回捕率，用百分比表示。回捕率按式（1）计算：

$$R=\frac{m}{M}\times 100\% \quad \cdots\cdots (1)$$

式中：

R—回捕率（%）；

m—大黄鱼采集样本中标志个体的尾数，单位为尾；

M—标志放流大黄鱼的尾数，单位为尾。

放流产值按式（2）计算：

$$IN=Q\times R\times W\times P \quad \cdots\cdots (2)$$

式中：

IN—放流产值，即通过放流产出的经济总额，单位为元；

Q—放流大黄鱼的总尾数，单位为尾；

W—回捕大黄鱼的平均体质量，单位为千克/尾；

P—当年的鱼价，单位为元/千克。

投入产出比按式（3）计算：

$$V=K：IN=1：N \quad \cdots\cdots (3)$$

式中：

V—投入产出比；

K—放流投入经济总额（苗种费、管理费、捕捞成本等），单位为元；

N 值越大，说明经济效益越好。

8.2 生态效益评估

生态效益主要通过放流大黄鱼对资源量的贡献率来表示。按式（4）估算大黄鱼资源量，按式（5）估算放流大黄鱼对资源量的贡献率。

$$Y=\frac{y}{R} \quad \cdots\cdots (4)$$

$$C=\frac{Q}{Y}\times 100\% \quad \cdots\cdots (5)$$

式中：

Y—放流后大黄鱼总尾数（资源量）；

y—回捕大黄鱼尾数；

C—放流大黄鱼对资源量的贡献率。

8.3 社会效益评估

大黄鱼增殖放流的社会效益评估主要通过对比分析法。通过分析大黄鱼增殖放流后的渔民增收情况、大黄鱼产业发展情况、解决渔民就业情况，结合满意度调查，分析大黄鱼增殖放流带来的社会效益。

附　录　A

（资料性附录）

试剂材料和器材设备

A.1 试剂和材料

本文件中所有化学试剂，除特别注明外，全部为分析纯试剂。

A.1.1 水：符合 GB/T 6682 中一级水规定。

A.1.2 三羟甲基氨基甲烷（Tris）。

A.1.3 盐酸（HCl）。

A.1.4 氢氧化钠（NaOH）。

A.1.5 乙二胺四乙酸二钠（EDTA）。

A.1.6 十二烷基磺酸钠（SDS）。

A.1.7 蛋白酶 K（20 mg/mL），商品化试剂，-20 ℃保存。

A.1.8 异硫氰酸胍。

A.1.9 异丙醇。

A.1.10 95%乙醇，商品化试剂。

A.1.11 75%乙醇，商品化试剂。

A.1.12 PCR 扩增预混液：含 *Taq* DNA 聚合酶、PCR Buffer、Mg^{2+}、dNTPs，商品化试剂。

A.1.13 微卫星 DNA 扩增特异性引物序列，见附录 D，由生物公司合成，按说明书配制，-20 ℃保存。

A.1.14 琼脂糖：电泳级。

A.1.15 核酸染料：商品化试剂，4 ℃保存。

A.1.16 DNA 分子量标准：商品化试剂，-20 ℃保存。

A.1.17 1 M Tris-HCl：配制方法见附录 C。

A.1.18 0.5 M EDTA：配制方法见附录 C。

A.1.19 10% SDS：配制方法见附录 C。

A.1.20 50×电泳缓冲液，商品化试剂。

A.1.21 DNA 抽提液：配制方法见附录 C。

A.2 器材和设备

A.2.1 电子天平。

A.2.2 普通冰箱。

A.2.3 -80 ℃冰箱。

A.2.4 冷冻高速离心机。

A.2.5 生物安全柜。

A.2.6 超微量分光光度计。

A.2.7 普通 PCR 仪。

A.2.8 荧光 PCR 仪。

A.2.9 水平电泳仪。

A.2.10 凝胶成像仪。

A.2.11 高压灭菌锅。
A.2.12 水浴锅。
A.2.13 制冰机。
A.2.14 微量移液器。
A.2.15 微波炉。

附　录　B

（规范性附录）

大黄鱼增殖放流亲体生长指标信息记录表

编号	性别	体长/cm	全长/cm	体重/g

附　录　C

（资料性附录）

组织DNA提取方法

C.1 试剂配制

C.1.1 M Tris-HCl

称量6.057 g 固体Tris于烧杯中，加入40 mL双蒸水溶解，用盐酸调节pH至8.0，用50 mL容量瓶定容。

C.1.2 0.5 M EDTA

称量4 g NaOH颗粒于烧杯中，加入160 mL双蒸水溶解，再加入36 g EDTA·Na2·2H2O，调节pH至8.0，用200 mL容量瓶定容。（刚开始时可先少加点NaOH颗粒）

C.1.3 10% SDS

称量10 g SDS溶解于80 mL双蒸水，于68 ℃加热助溶，用盐酸调节pH至7.2，100 mL容量瓶定容。

C.1.4 DNA抽提液

按10 mL 1 M Tris-HCl，200 mL 0.5 M EDTA，50 mL 10% SDS，加双蒸水至1000 mL，定容后高压灭菌，4 ℃保存。

C.1.5 异硫氰酸胍

称取235 g 异硫氰酸胍于烧杯中，加入500 mL水中溶解，配置成终浓度为4 M 异硫氰酸胍溶液，用0.1 M Tris-HCl调节pH至7.5。

C.2 DNA提取

C.2.1 取出亲体组织样品，晾干后将样品剪碎置于1.5 mL离心管内，加入400 μL无菌水，7500 rpm离心2 min，弃上清。

C.2.2 加入600 μL DNA抽提液，8 μL蛋白酶K，56 ℃水浴2~3 h，隔15~20 min摇晃一次，直到组织消化至透明。

C.2.3 在上述离心管中加入200 μL异硫氰酸胍，轻轻摇晃10 min，12000 rpm离心10 min。

C.2.4 吸取750 μL上清液于一新的1.5 mL离心管，12000 rpm离心10 min。

C.2.5 吸取600 μL上清液，加入600 μL异丙醇，轻轻上下颠倒混匀，-20 ℃静置30 min，12000 rpm离心10 min，弃上清。

C.2.6 向上述离心管中加入1 mL 75%乙醇，7500 rpm离心5 min，弃上清，吸干残余液体，晾干沉淀。

C.2.7 加入50 μL无菌水溶解DNA，-20 ℃保存待用。

附　录　D

（规范性附录）

微卫星 DNA 扩增特异性引物序列

位点	荧光标记	重复单元	引物序列（5’-3’）	退火温度/℃	片段大小/bp
LYC01	FAM	(CTTTT)9	F:ATGCTGACCCATGTTGGACT	58	197～250
			R:TGCATGCAGTCAAAATACCA		
LYC07	ROX	(CTTTT)9	F:CCTGTTTTGCTCTCCTCTGG	59	185～227
			R:GCAGCACACAATGGAAACAC		
LYC08	TAM	(CTTTT)8	F:TCCTGGGTAACTTTGAGTTGG	56	185～290
			R:AATGTCAGCAAAATCCCAAGA		
LYC013	FAM	(CTTTT)8	F:GAATGGCATAGAGCCCGTAA	57	161～274
			R: GCAGTTTCCTTTTATGGCATGT		
LYC017	HEX	(CTTTT)8	F:TTCAAGGAGCCCAGTATGGT	59	219～290
			R:CTTGAGAATGAGCGCAACAG		
LYC033	ROX	(CTTTT)8	F:TGCATGTCTCAGTCCCTGAA	59	245～285
			R:AAGTCTTCCCAGCATGCACT		
LYC042	FAM	(CTTTT)9	F:ATTCAGCGCGAAGCTCTTT	55	210～280
			R:ATTTACTTTTCGGGGCTGCT		
LYC047	HEX	(CTGT)9	F:AATGTGGACGGAGTTGCTTC	59	147～220
			R:CCCCAATCTCCCACTAATCC		
LYC052	ROX	(ACAT)9	F:AAGGCTTTTAACACATTTGATCG	58	150～215
			R:AGTGGACACCACCCAGTGTT		
LYC059	TAM	(ACAT)9	F:CACAGCCTTTCTTTGGAATCA	59	120～180
			R:CACTGTCACTTTTGCTGTATGGA		

附　录　E

（规范性附录）

亲体基因型信息表

亲体编号	性别	基因座 1	基因座 1	基因座 2	基因座 2	基因座 n	基因座 n

附　录　F

（规范性附录）

大黄鱼样本采集信息记录表

采样编号	体长/cm	全长/cm	体重/g	时间	地点	捕获方式