

中华人民共和国海洋行业标准

HY/T ××××—××××

海绵种属分子鉴定技术规程

Specification of identifying sponge based on molecular data

(报批稿)

20××-××-××发布

20××-××-××实施

自然资源部 发布



## 前 言

本标准按照 GB/T 1.1-2009 给出的规则起草。

本标准由自然资源部提出。

本标准由全国海洋标准化技术委员会（SAC/TC 283）归口。

本标准起草单位：大连海洋大学、中国科学院大连化学物理研究所、大连金普新区农业农村发展服务中心。

本标准主要起草人：付晚涛、曹旭鹏、杜萌萌、苏延明、王刚、吴孟嘉、张世杰、李东子、沈思思、丁小涵、王玄、肖一帆、王少杰、鲁艳莉、李晶莹。



# 海绵种属分子鉴定技术规程

## 1 范围

本标准规定了海绵种属分子生物学鉴定的原理与方法、海绵样品采集与保存。  
本标准适用于海绵的样品采集、保存和分子生物学方法种属鉴定。

## 2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅所注日期的版本适用于本文件。凡是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 12763.6—2007 海洋调查规范 第6部分：海洋生物资源调查

GB/T 30744—2014 深海微生物样品前处理技术规范

HY/T 058—2010 海洋调查观测监测档案业务规范

## 3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

### 3.1

**海绵** sponge

目前已知仍然生存的最古老、最低等的多细胞动物，在动物界中单独构成多孔动物门。

### 3.2

**DNA 条形码** DNA barcode

生物体内能够代表该物种的、标准的、有足够变异的、易扩增且相对较短的 DNA 片段，用于快速准确识别、鉴定物种。

### 3.3

**海绵条形码** sponge barcode

海绵的保守基因序列信息的一种表述形式。

### 3.4

**18S rRNA 基因** 18S rRNA gene

编码 18S rRNA 基因的 DNA 序列。

### 3.5

### 细胞色素氧化酶亚基 I cytochrome oxidase subunit I

编码线粒体细胞色素氧化酶亚基 I (Cytochrome oxidase subunit I) 基因的 DNA 序列，简称 COI。

#### 3.6

#### 聚合酶链式反应 polymerase chain reaction

DNA 模板先经高温变性为单链，在适宜温度下和缓冲液中，两条引物分别与模板 DNA 两条链上的一段互补序列发生退火，接着在 DNA 聚合酶催化下以四种 dNTP 为底物，使退火引物得以延伸，如此反复变性、退火和延伸，使位于两段引物序列之间的 DNA 片段呈几何倍数扩增。

## 4 原理

通过聚合酶链式反应(简称 PCR)分别扩增海绵的 18S rDNA 和 COI DNA 的部分序列，测序获得各自序列信息后分别与已经鉴定的海绵 18S rDNA 和 COI DNA 序列比对，以此鉴定海绵种属。

## 5 仪器与设备

- 5.1 野外生物样品保存箱或保温箱；
- 5.2 低温冰箱；
- 5.3 研钵；
- 5.5 水浴锅；
- 5.6 高速低温冷冻离心机；
- 5.7 紫外分光光度计；
- 5.8 聚合酶链式反应 DNA 扩增仪（简称 PCR 仪）；
- 5.9 电泳仪；
- 5.10 高压灭菌锅；
- 5.11 酒精灯；
- 5.12 液氮罐。

## 6 试剂与材料

- 6.1 无水乙醇；
- 6.2 70%乙醇

- 6.2 液氮；
- 6.3 异丙醇；
- 6.4 浓硝酸或浓盐酸；
- 6.5 浓硫酸；
- 6.6 蒸馏水或去离子水；
- 6.7 蛋白酶 K；
- 6.8 Taq 酶；
- 6.9 琼脂糖；
- 6.10 醋酸钾溶液（配方参见附录 A）；
- 6.11 细胞裂解缓冲液（配方参见附录 A）；
- 6.12 TE 缓冲液（pH 7.6）（配方参见附录 A）；
- 6.13 10×PCR 缓冲液（配方参见附录 A）；
- 6.14 吸管；
- 6.15 载玻片；
- 6.16 采样袋或采样瓶；
- 6.17 聚丙烯离心管。

注：除非另有规定，使用试剂均为分析纯。

## 7 海绵样品采集与保存

### 7.1 海绵样品采集

首先，对于海绵及其周围环境，先拍照或摄像；此外，按照 GB/T 12763.6-2007 中 10.2 规定执行。

### 7.2 海绵样品保存

#### 7.2.1 暂时保存

加入无水乙醇与海绵样品的体积比约（4~5）:1，然后放入装有冰袋的泡沫保温箱或野外生物样品保存箱。有条件时，直接放入冰箱冷藏保存。保存时间 1 天。

#### 7.2.2 短期保存

暂时保存在无水乙醇中 1 天海绵样品，需要更换全部无水乙醇。然后冷冻保存 1 周。

#### 7.2.3 长期保存

暂时保存在无水乙醇中 1 天海绵样品或采集海绵样品需要转移至-20℃ 保存。在-20℃ 保存约 2 周时间，需要更换全部无水乙醇，乙醇加入量与海绵样品的体积比同样约（4~5）:1，然后可继续放在-20℃ 保存。在-20℃ 继续保存约 3 个月，需要更换全部无水乙醇，然后继续放在-20℃ 保存。由此，在-20℃ 条件，可以按此方法连续保存 1 年。

### 7.3 海绵样品记录

海绵样品采集与保存记录于《海绵资源调查采样表》（详见附录 B）。

## 8 海绵种属分子生物学鉴定方法

### 8.1 海绵 DNA 提取与纯化

8.1.1 取出保存在乙醇中的海绵样品，在样品几何中心部位取样品约 0.5 g，放入事先用液氮预冷的研钵中，加入液氮研磨海绵样品成粉末状。

8.1.2 将上述研磨成粉末的海绵样品量约 1/5 移入装有 600  $\mu$ L 细胞裂解缓冲液的聚丙烯离心管中混匀，加入 3  $\mu$ L 蛋白酶 K，在 55 $^{\circ}$ C 水浴锅上放置 3h。

8.1.3 从水浴锅取下装有海绵的离心管，在室温加入 200  $\mu$ L 醋酸钾溶液，振荡、混匀。

8.1.4 将步骤 8.1.3 的离心管在 4 $^{\circ}$ C、10,000 g 离心力条件下离心 3min，然后将上清液转移至装有 600  $\mu$ L 异丙醇的 1 个新的聚丙烯离心管中，振荡、混匀。

8.1.5 将步骤 8.1.4 的离心管在室温、10,000 g 离心力条件下离心 3min，然后吸去上清液，加入 600  $\mu$ L 乙醇（70%），振荡、混匀。

8.1.6 将步骤 8.1.5 的离心管在室温、10,000 g 离心力条件下离心 3min，弃上清液。

8.1.7 重复清洗 DNA 沉淀一次。

8.1.8 将步骤 8.1.7 离心管中的上清液吸去，将离心管中 DNA 风干 15 min。

8.1.9 将步骤 8.1.8 中 DNA 沉淀溶解于 300  $\mu$ L TE 缓冲液(pH 7.6)，作为海绵基因组 DNA 提取液，-80 $^{\circ}$ C 保存。

8.1.10 按照 GB/T 30744—2014 中 9.2.1 规定，将步骤 8.1.9 收获的 DNA 进行纯度测定，满足要求的 DNA 用于 PCR 扩增。

### 8.2 海绵 18S DNA 序列片段 PCR 扩增与测序

8.2.1 使用扩增海绵 18S rDNA 基因序列片段的特异引物对（18S rRNA-F: TTG ACG GAA GGG CAC CA; 18S rRNA-R: CAA AGG GCA GGG ACG TAA TC），在 100  $\mu$ L PCR 反应管中，以海绵基因组 DNA 提取液为模板，以 18S rRNA-F/ 18S rRNA-R 为引物，按照 Taq 酶产品说明书推荐的优化体系配制 50  $\mu$ L PCR 反应液。

8.2.2 把此 PCR 反应管放在 PCR 仪中，按照如下条件在进行 PCR 扩增海绵 18S rDNA 基因序列片段：首先，94 $^{\circ}$ C 变性 3 分钟；接着，35 个循环扩增，扩增的温度条件为 94  $^{\circ}$ C 变性 20 秒；55  $^{\circ}$ C 退火 30 秒；72  $^{\circ}$ C 停留 1 分钟；最后，72  $^{\circ}$ C 停留 5 分钟，结束 PCR 反应。

8.2.3 从 PCR 仪中取出扩增的海绵基因片段产品，按照 GB/T 30744—2014 中 9.2.2 规定使用琼脂糖凝胶电泳检测合格，然后测序获得待鉴定海绵 18S rDNA 片段序列信息。

### 8.3 海绵 COI DNA 序列片段 PCR 扩增与测序

8.3.1 使用扩增海绵 COI 基因的序列片段的特异引物对（LCO1490: GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G; HCO2189: TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA），在 100

μL PCR 反应管中，以海绵基因组 DNA 提取纯化液为模板，以 LCO1490 (20 pmol/L) / HCO2189 为引物，按照 Taq 酶产品说明书推荐的优化体系配制 50 μL PCR 反应液。

8.3.3 把此 PCR 反应管放在 PCR 仪中，按照如下条件在进行 PCR 扩增海绵 COI 基因序列片段：首先，94℃、变性 5 分钟；接着，1 个预循环反应（94℃、30s，45℃、90 s，72℃、1 min）重复 5 次；然后，1 个循环反应（94℃、30s，51℃、40 s，72℃、1 min）重复 35 次；最后，72℃ 停留 5 分钟，结束 PCR 反应。

8.3.4 从 PCR 仪中取出扩增的海绵基因片段扩增产品，经电泳检测合格，然后测序获得待鉴定海绵 COI DNA 片段序列信息。

#### 8.4 海绵分子生物学种属鉴定

8.4.1 参照 GB/T 30744—2014 附录 C 中 C.3 规定，通过互联网搜索、比对、鉴定微生物菌属方法，将测序获得的海绵 18S rDNA 片段序列信息和 COI DNA 片段序列信息在在线网站（<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>）分别进行 18S rDNA 和 COI DNA 的核苷酸序列比对，结果记录于海绵分子生物学鉴定记录与结果判定表（见附录 C）。

8.4.2 根据国际公认的基于海绵 COI DNA 片段序列信息鉴定海绵种属在线网站（<http://www.palaeontologie.geo.uni-muenchen.de/SBP/>）进行海绵 COI 基因的核苷酸序列比对，结果记录于海绵分子生物学鉴定记录与结果判定表（见附录 C）。

8.4.3 以海绵 18S rDNA 和 COI DNA 的片段序列信息鉴定海绵的判断依据和结果，记录于《海绵分子生物学鉴定记录表》（见附录 C）。

8.4.4 数据资料处理记录应按 HY/T 058-2010 要求归档。

#### 附录 A (规范性附录) 溶液、缓冲液

溶液和缓冲液	配方	备注
醋酸钾溶液	60 mL 5 mol/L 醋酸钾, 11.5 mL 冰醋酸, 28.5 mL 纯水	
细胞裂解缓冲液	10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 1 mmol/L EDTA (pH 8.0), 0.1%(W/V) SDS	
TE 缓冲液 (pH 7.6)	100 m mol/L Tris-HCl (pH 7.6), 10 mmol/L EDTA (pH 8.0)	
10×PCR 缓冲液	500 mmol/L KCl, 100 mmol/L Tris-HCl (pH 8.3), 15 mmol/L MgCl <sub>2</sub>	1.05kg/cm <sup>2</sup> 高压灭菌 10 min

AA

附 录 B  
(规范性附录)  
海绵资源调查采样表

海区\_\_\_\_\_ 船名\_\_\_\_\_ 航次\_\_\_\_\_；  
 采样点：经度\_\_\_\_\_ 纬度\_\_\_\_\_；  
 采样时间\_\_\_\_\_年 月 日 \_\_\_\_\_时 分 至\_\_\_\_\_年 月 日 \_\_\_\_\_时 分  
 采样工具\_\_\_\_\_；水深\_\_\_\_\_；

序号	样本编号	采集海绵的外形及尺寸、 颜色、质量等基本数据	分子生物学样品标号	保存方式	备注
1					
2					
3					
4					
5					
6					
7					
		记事：			

采样：

记录：

校对：

BB

附 录 C  
(规范性附录)  
海绵分子生物学鉴定记录与结果判定表

鉴定人\_\_\_\_\_；单位\_\_\_\_\_；  
时间\_\_\_\_\_年\_\_\_\_\_月\_\_\_\_\_日至\_\_\_\_\_年\_\_\_\_\_月\_\_\_\_\_日；

序号	分子生物学样品标号	海绵样品记录名称	海绵 18S rDNA 基因片段序列信息鉴定结果 (序列比对一致性)	海绵 COI 基因片段序列信息鉴定结果 (序列比对一致性)	海绵分子生物学综合鉴定结果	备注
1			≥98%	≥98%	同种	
2				98% > ~ ≥90%	同属	
3				90% >	暂不能鉴定	
4			>98% ~ ≥90%	≥98%	同属	
5				98% > ~ ≥90%	暂不能鉴定	
6				90% >	暂不能鉴定	
7			90% >	≥98%	暂不能鉴定	
8				98% > ~ ≥90%	暂不能鉴定	
9				90% >	暂不能鉴定	

鉴定：

记录：

校对：