

1.1 实验方法

使用大型浮游生物网(网长 280 cm,网口内径 80 cm,网口面积 0.5 m²,网目 0.505 mm),在站点进行水平拖网,网口挂流量计、完全没于水面一下,拖速保持<1kn,同步采集两网。其一立即转移岛乙醇(>70%)中,低温保存。另一网以福尔马林溶液(5%)保存。

1.2 实验方法

1.2.1 取样

鱼卵表面冲洗干净后,整粒取用。仔稚鱼表面冲洗干净,较小的个体去除肠道后整尾取用,较大的个体取体侧肌肉 25mg 左右。PCR 极其敏感,冲洗表面是为了避免外源性污染,避开肠道是为了避免内源性污染。

1.2.2 提取 DNA

使用商品化的基因组 DNA 提取试剂盒提取,具体步骤参阅试剂盒的说明。

柱式提取方法的回收率在 50%左右到 80%左右,对于单个鱼卵和较小的仔鱼,能获取到的 gDNA 总量有限,最好使用较好的试剂盒,其吸附膜的质量更好, DNA 的最终产量会较高。结合提取效率和经济两方面来选, TaKaRa 公司的 miniBest 系列试剂盒是不错的选择。抑或是选用效率更高的 Thermofisher、mpbio 等公司的试剂盒。在提取过程中加入 Roche 的 polyA 能减少 DNA 贴附,提高 DNA 产量。另一种效果可能较好的方案是使用传统的酚-氯仿抽提,因为整个过程都可以在 eppendorf 管中完成,不经过反复的膜吸附,理论上的回收效率在柱式提取方法之上,此方法对操作的要求稍高。另有所谓的“一管式”DNA 提取试剂盒和“DirectPCR”试剂盒,还有待于试验确定其效率。组织裂解裂解应尽量完全,裂解后可 12000r/min 离心 1min,取上清进行下一步实验,可减少蛋白污染。裂解过程中也可以加入 RNase A,去除 RNA 的影响。还应注意溶解 DNA 产物的终体积,体积过大导致 DNA 产物终浓度过低,将会影响后续的 PCR 效率。

DNA 产物经 1.0%-1.5%琼脂糖凝胶电泳检测条带大小,用微量紫外分光光度计测定 OD 值, 260/280 在 1.8 左右说明 DNA 产物纯度较高,大于 1.9 说明有 RNA 污染,小于 1.6 说明有蛋白或者苯酚污染。通过测定 OD 值也可以得到 DNA 产物的浓度,便于在 PCR 体系中进行准确计算。琼脂糖的质量在实验中影响不大,使用国产品牌即可,如厦门天马生物,当然也可购买更好的大品牌,如 BioRad 等。微量紫外分光光度计可购买 Thermofisher 的产品,国产品牌有 bioteke 等。

DNA 产物经琼脂糖凝胶电泳发现拖带严重, 260/280 低于 1.6,可进一步纯化 DNA 产物。纯化过程不可避免地要损失一部分产物,因此对回收率要求较高,尽量使用较好的试剂

盒，推荐 mpbio 的纯化试剂盒。

实验全程使用的 eppendorf 管和吸头都应是 DNase free 并且经过高温高压灭菌的。

1.2.3 PCR

引物 F (5'-TCR ACY AAY CAY AAA GAY ATY GGC AC)和 R (5'-ACT TCW GGG TGR CCR AAG AAT CA)是针对常见海洋鱼类优化过的通用引物，这一片段是较为常用的位于线粒体基因组上的基因条码，辨识度高，数据库里的数据条目较全并在不断增加。建议退火温度 52°C。

PCR 反应体系可选用商品化试剂盒，如 TaKaRa 的 Ex Taq 系列。参考 50 μ L 反应体系包括：10 \times PCR buffer 5 μ L，dNTP 4 μ L (2.5 mmol/L)，上下游引物各 2 μ L (10 mmol/L)，Taq DNA 聚合酶 0.8 μ L (5 U/ μ L)，模板 DNA 1 μ L，加双蒸水至总体积 50 μ L。实际实验中，应根据模板 DNA 浓度调整模板量。可以选用 Premix 的试剂盒，其包含预先配置好的 DNA 聚合酶、PCR buffer、dNTP 混合液，只需根据说明加入引物、DNA 模板、ddH₂O 即可，各品牌的 PCR 系列试剂盒几乎都有 Premix 版本。

PCR 包括以下步骤：94°C 预变性 5 min；94°C 30 s，52°C 45 s，72°C 45s，30 个循环；72°C 延伸 10 min。PCR 产物使用 2.0%的琼脂糖凝胶电泳检测，应在 600bp 附近观察到清晰单一的条带。PCR 产物可直接送生物公司测序，或者纯化后再送生物公司测序。上海可送 Thermofisher、Sigma-Aldrich 等，国内公司有生工、美吉、杰李等。

1.3 Blast

从生物公司返回的测序结果可以用 DNASTAR 等生物信息软件查看、编辑，也可以简单地作为文本打开，所获序列使用 ncbi 库 nblast 进行比对，选取 max score 最高者作为参考匹配的物种。