

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 μL 细胞裂解缓冲液的聚丙烯离心管中混匀，加入 3 μL 蛋白酶 K，在 55 $^{\circ}\text{C}$ 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 μL 醋酸钾溶液，振荡、混匀。

8.1.4 将步骤 8.1.3 的离心管在 4 $^{\circ}\text{C}$ 、10,000 g 离心力条件下离心 3min，然后将上清液转移至装有 600 μL 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 μL 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 μL TE 缓冲液(pH 7.6)，作为海绵基因组 DNA 提取液，-80 $^{\circ}\text{C}$ 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 μL 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 μL 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 $^{\circ}\text{C}$ 变性 3 分钟；接着，35 个循环扩增，扩增的温度条件为 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 20 秒；55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 秒；72 $^{\circ}\text{C}$ 停留 1 分钟；最后，72 $^{\circ}\text{C}$ 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 mmol/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 ₂	1.05kg/cm ² 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：