

用于核酸提取的鱼类样本野外采集、处理及 保存技术规范

Technical specification for collection, processing and storage of fish samples for
nucleic acid extraction in nature environment

2020 - 08 - 20 发布

2020 - 09 - 20 实施

目 次

前言	II
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
4 缩略语	1
5 样本采集前准备	2
5.1 采集方案设计	2
5.2 稀有或珍惜物种的采集	2
5.3 采集工具和材料	2
6 鱼类获取	2
6.1 获取方法	2
6.2 鱼类信息记录	2
6.3 拍照规范	2
7 样本采集及处理	3
7.1 消毒	3
7.2 鱼的预处理	3
7.3 取样	3
7.4 样本处理	4
7.5 取样量	4
8 编码规则	5
8.1 鱼类凭证编号	5
8.2 组织样本编号	5
9 样本运输	5
9.1 运输要求	5
9.2 样本包装	5
9.3 干冰需求量	6
10 样本储存	6
11 质量控制	6
附录 A（规范性附录） 野外鱼类采集信息表	7
附录 B（规范性附录） 拍照例图	8
附录 C（规范性附录） 鱼体各器官对应的英文缩写	9
参考文献	10

前 言

本标准按GB/T 1.1—2009给出的规则起草。

本标准由山东省海洋局提出并组织实施。

本标准由山东省海洋标准化技术委员会归口。

本标准负责起草单位：青岛华太基因研究院。

本标准主要起草人：张梦淇、刘姗姗、王萌萌、苏小珊、孟亮。

用于核酸提取的鱼类样本野外采集、处理及保存技术规范

1 范围

本标准规定了用于核酸提取的鱼类样本野外采集、处理及保存的技术规范及其相关要求。
本标准适用于在野外获取分子生物学、基因组学相关研究的鱼类样本。

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。

HJ 628 生物遗传资源采集技术规范

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

野外 nature environment

泛指市场、码头、养殖场、海水以及淡水水域等非实验室环境。

3.2

用于核酸提取的鱼类样本 fish sample for nucleic acid

在鱼体上采集到的、可进行高质量核酸提取并应用于分子生物学、基因组学相关研究的组织和器官。

3.3

伤害性取样 destructive sampling

将鱼体进行有效麻醉或低温休克，通过解剖来获得新鲜鱼类组织、器官等样本的取样方法。

3.4

轻微伤害性取样 non-destructive sampling

将鱼体进行有效麻醉或低温休克，通过采集血液、鳍条等组织，保证鱼体存活并对其生理机能和生命不产生重大影响的取样方法。

3.5

尾静脉 tail vein

尾静脉是指紧贴于鱼体尾椎骨下方的静脉血管。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

DNA: 脱氧核糖核酸 (Deoxyribonucleic Acid)

RNA: 核糖核酸 (Ribonucleic Acid)

MS-222: 间氨基苯甲酸乙酯甲磺酸盐 (3-Aminobenzoic acid ethyl ester methanesulfonate)

5 样本采集前准备

5.1 采集方案设计

采集鱼类之前应制定完整的采集方案,了解野外采集区域鱼类的分布,根据当地自然情况制定采集路线,避免无目的的采集活动破坏鱼类的自然栖息地。

5.2 稀有或珍惜物种的采集

若需采集的鱼类属于稀有或珍惜物种,应当按照相关法律法规的要求,向相关主管部门提出申请,获得批准后方可实施采集。

5.3 采集工具和材料

5.3.1 样本处理器材

医用剪刀、解剖刀、镊子、解剖盘、乳胶手套、医用口罩、毛巾、酒精棉球、冻存管、冻存管盒、封口袋、封口膜、注射器、巴氏吸管、液氮罐。器材应进行洗净并消毒,确保无核酸酶污染。

5.3.2 处理和保存试剂

0.65%生理盐水(淡水鱼用)、1.2%生理盐水(海水鱼用)、75%乙醇、无水乙醇、抗凝剂、MS-222、无RNA酶水、RNA保存液。

5.3.3 记录工具

抗冻标签纸、拍照背景板、比色卡、标尺(量程20 cm、分度值0.1 cm)、蓄电电子秤、高清相机、记号笔、铅笔等。

5.3.4 运输耗材

泡沫箱、棉花、冰袋、干冰。

6 鱼类获取

6.1 获取方法

在市场、码头、养殖场、自然水域等地,通过购买、垂钓、捕捞等方法获取。

6.2 鱼类信息记录

现场获取到新鲜活体鱼类后,填写《野外鱼类采集信息表》,详见附录A。

6.3 拍照规范

选取干净的白色平板作为背景板，同批鱼类尽量保证用同一背景板。同时，准备比色卡（消除因光照、拍摄原因造成的误差）、标尺、鱼类对应的采集编号等。具体要求如下：

- a) 建议选用 500 万以上像素的相机进行拍照；
- b) 鱼体摆放方向为头朝左尾朝右；
- c) 标尺和比色卡需要与鱼体同框；
- d) 照片必须要有鱼类采集编号的体现，具体图例见附录 B。

7 样本采集及处理

7.1 消毒

选择通风、整洁的环境，解剖盘置于平整的台面上，解剖工具用75%乙醇消毒。

7.2 鱼的预处理

7.2.1 总则

取样前需对鱼体进行预处理使其失去知觉，在最大程度减少鱼体痛苦的情况下进行操作。对于进行伤害性取样的鱼类及轻微伤害性取样的冷水性鱼类，推荐使用麻醉的处理方式；对于轻微伤害性取样的其它鱼类，尤其是稀有或珍惜物种，推荐使用低温休克的处理方式。

7.2.2 麻醉

用MS-222麻醉剂对采集到的鲜活鱼进行麻醉，麻醉剂的推荐使用量为20 mg/L，并根据鱼体大小及水温来进行适当调整。如需添加，每次添加量小于当前用量的10%。在添加麻醉剂后注意观察鱼的活性，若鱼体失去平衡、鳃盖活动减弱以至消失且对外界刺激无反应则表明麻醉剂浓度适中，可以进行下一步操作。

7.2.3 低温休克

将鱼放入冰水混合物中进行低温处理，使其产生低温休克。若鱼体失去平衡、鳃盖活动减弱以至消失且对外界刺激无反应则表明鱼已经休克，可以进行下一步操作，操作完后将鱼放入常温水体中进行复苏。

7.3 取样

7.3.1 伤害性取样

按照HJ 628伤害性取样的要求，选用医用剪刀及解剖刀对麻醉或低温休克后的鱼进行解剖。将取材后的组织和器官用镊子夹取在生理盐水中进行漂洗，以去除血渍和污物，并剔除结缔组织和脂肪组织等非研究所需的组织类型。

漂洗过后的组织和器官剪碎成0.5 cm×0.5 cm小块，放入2.0 mL带螺纹旋盖的冻存管中，对样本进行编号，并贴好样本信息标签。

7.3.2 鱼类凭证保存

解剖取样后的鱼类尸体不得丢弃，用封口袋装好后，放置于-20℃条件中保存，作为鱼类凭证，鱼类凭证编号详见8.1。

7.3.3 轻微伤害性取样

7.3.3.1 总则

特殊情况下，需进行轻微伤害性取样，轻微伤害性取样要求采集鱼体的血液和鳍条。采样时，在解剖盘上放置消毒海绵或棉布，以免采样过程中刮伤鱼鳞造成损伤。取样完成后，及时将复苏后的鱼放回其原生的水域环境。

7.3.3.2 鳍条取样流程

用医用剪刀沿尾鳍边缘剪下一部分鳍条，用镊子夹取放入2.0 mL带螺纹旋盖的冻存管中，贴好样本标签，并用酒精棉球对尾部进行消毒处理。

7.3.3.3 血液取样流程

使用经抗凝剂润洗过的注射器在鱼体尾静脉处进行抽血，抽出的血液尽快打入装好抗凝剂的冻存管中，来回颠倒冻存管使血液与抗凝剂混匀，并贴好样本标签。

7.4 样本处理

7.4.1 总则

根据样本处理以及研究内容的差异，分为液氮、RNA保存液和无水乙醇三种处理方式，推荐的处理方式排序为：液氮>RNA保存液>无水乙醇。

7.4.2 液氮处理

将冻存管直接放入盛有液氮的液氮罐中进行速冻，在采样过程中注意对液氮进行定期的补充。

本方法处理过后的样本可以满足高质量的RNA、DNA的提取及后续分子生物学、基因组学方面的研究。

7.4.3 RNA保存液处理

向冻存管中加入RNA保存液（血液样本除外），使用RNA保存液比例为1:5，例如：0.5 g组织，2.5 mL RNA保存液，置于4℃浸泡12 h~24 h，后将冻存管放入冻存管盒中，再将冻存管盒统一放置于-20℃条件下保存。

本方法处理过后的样本可以满足高质量的RNA、DNA的提取及后续分子生物学、基因组学方面的研究。

7.4.4 无水乙醇处理

向装有新鲜鱼类组织的冻存管中加满无水乙醇（血液样本除外），且在12 h、24 h、48 h后分别对无水乙醇进行更换，目的是让组织尽快脱水以延长保存时间。用封口膜对冻存管进行封口，冻存管放入冻存管盒中，再将冻存管盒统一放置于-20℃条件下保存。

本方法处理过后的样本可以满足DNA的提取及后续分子生物学、基因组学方面的研究。

7.5 取样量

每种组织取样3份（样本备份），每份样本的取样量尽量满足以下要求：

- a) 新鲜鱼类组织 ≥ 1 g；
- b) 血液 ≥ 2 mL；
- c) 轻微伤害性取样的鳍条取样量，建议取0.5 cm \times 0.5 cm大小。

8 编码规则

8.1 鱼类凭证编号

采用[时间][地点][流水号]规则来对鱼类凭证进行命名。时间为采样当天日期，八位数字；地点以采样地的拼音首字母表示；流水号为当天采集到的鱼类顺序号。

示例：20140504QD004。

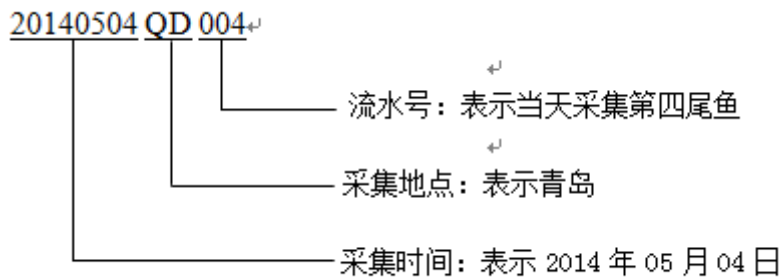


图1 鱼类凭证编号说明

8.2 组织样本编号

采用[时间][地点][流水号][组织名称][分管号]规则来对样本进行命名。[时间][地点][流水号]与鱼类凭证编号相对应；组织名称用鱼类器官、组织对应的英文缩写表示，详见附录C；分管号为一位数字。

示例：20140504QD004Mu1。



图2 组织样本编号说明

9 样本运输

9.1 运输要求

待采样结束或条件允许后，尽快进行样本的运输。统一用干冰进行运输，且干冰运输时间建议不超过72 h。

9.2 样本包装

组织样本用2.0 mL的带螺纹旋盖的冻存管装载并统一置于冻存管盒中，为防止冻存管在在运输过程中受到碰撞而破裂，将棉花填充在冻存管的间隔中，冻存管盒用橡皮筋绑紧以防在运输过程中开盖。

9.3 干冰需求量

样本运输过程中需要添加干冰的重量与季节、运输时间长短、泡沫盒的薄厚有关。宜选用厚泡沫箱和大块干冰，安全的干冰维持量为5 kg/d，确保样本送达接收地点时有足够的干冰剩余以保证低温。

10 样本储存

待样本运输至实验室时，尽快将其存放于实验室 - 80 °C 冰箱中并尽早进行后续实验，样本在 - 80 °C 冰箱储存时间不要超过1年。

11 质量控制

用于核酸提取的鱼类样本野外采集、处理、运输及储存过程中，需要进行质量控制，保证组织样本质量及操作人员安全，要求如下：

- a) 采集人员应掌握目标采集物种的分类学、形态学知识及生活习性、栖息环境和捕捉技巧等；
- b) 采集到的样本应采用唯一的编号进行样本识别，避免不同样本的混淆；
- c) 采集人员应接受生物安全、操作规范等专业培训方可上岗；
- d) 严格控制样本采集、处理、运输及储存的时间及温度，避免采集到的样本降解或污染；
- e) 定期对样本保存设施、设备进行维护和检修。

附 录 A
(规范性附录)
野外鱼类采集信息表

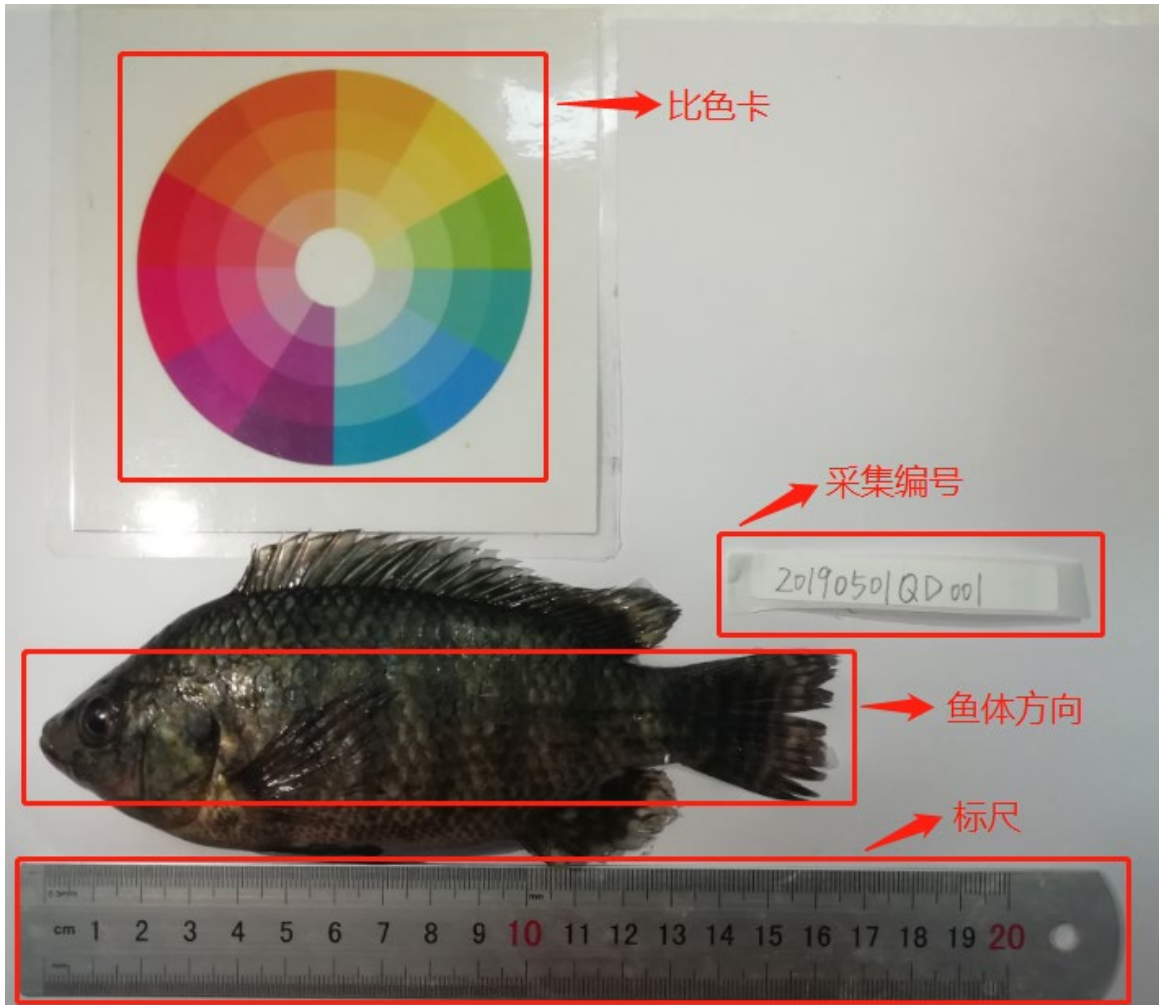
表A.1给出了野外鱼类采集信息表。

表A.1 野外鱼类采集信息表

采集时间*				
采集地点*				
鱼类凭证编号*				
采集方式*	<input type="checkbox"/> 购买 <input type="checkbox"/> 垂钓 <input type="checkbox"/> 捕捞			
采集人*				
采集人联系方式*		采集人机构*		
鉴定人*				
鉴定人联系方式*		鉴定人机构*		
形态学鉴定分类信息*	_____纲_____目_____科_____属_____种			
备注				
全长 (cm)	体长 (cm)	体高 (cm)	体重 (g)	性别 (♂/♀)
注：带*的为必填项，其余为选填项。				

附录 B
(规范性附录)
拍照例图

图B.1给出了拍照的图例。



图B.1 拍照例图

附 录 C
(规范性附录)
鱼体各器官对应的英文缩写

表C.1给出了鱼体各器官对应的英文缩写。

表C.1 鱼体各器官对应的英文缩写

组织名称	英文名	缩写
血	blood	Bl
脑	brain	Br
眼	eye	Ey
鳍	fin	Fi
鳃	gill	Gi
心脏	heart	He
肠	intestine	In
头肾	head kidney	Hk
中肾	middle kidney	Mk
后肾	after kidney	Ak
肝脏	liver	Li
鳔	swim bladder	Sb
肌肉	muscle	Mu
卵巢	ovary	Ov
精巢	testis	Te
垂体	pituitarium	Pi
皮肤	skin	Sk
脾脏	spleen	Sp

参 考 文 献

- [1] 中华人民共和国国务院. 医疗废物管理条例[J]. 中华人民共和国国务院公报, 2003, 3(21):5-10.
- [2] 马琳. 鱼类学实验[M]. 中国海洋大学出版社, 2010.
- [3] 成庆泰, 郑葆珊. 中国鱼类系统检索[M]. 科学出版社, 1987.
- [4] 水柏年, 赵盛龙, 韩志强, 等. 鱼类学[M]. 同济大学出版社, 2015.
- [5] 赵战勤, 李健, 刘志军. 鱼形态学彩色图谱[M]. 化学工业出版社, 2017.
- [6] 孟庆闻. 鱼类比较解剖[M]. 科学出版社, 1987.
- [7] 吴娜. 南海鱼类凭证标本采集及DNA条形码库构建与应用[D]. 上海海洋大学, 2017.
- [8] 董蓓亚. 鱼类生理盐水[J]. 科学养鱼, 1986:24.
- [9] Satish KP. A Review on Freshwater fish diversity[J]. Food Sci Res, 2017, 2(1):104.
- [10] Vega G C, Wiens J J. Why are there so few fish in the sea[J]. Proc Biol Sci, 2012, 279(1737):2323-2329.
- [11] Souraditya Chakraborty. Review on freshwater fish diversity of Northern West Bengal, India: status, threats and conservation measures[J]. Int. Res. J. Biological Sci, 2018, 7(7):39-51.
- [12] William N. Eschmeyer, Ronald Fricke, Jon D. Fong, et al. Marine fish diversity: history of knowledge and discovery (Pisces)[J]. Zootaxa, 2010, 2525: 19-50.
- [13] Nelson J S. Fishes of the world. 4th ed. [M]. 2005.
-