



# 中华人民共和国国家标准

GB/T 18654.13—2008

---

## 养殖鱼类种质检验 第 13 部分：同工酶电泳分析

Inspection of germplasm for cultured fishes—  
Part 13: Analysis of isozyme electrophoresis

2008-06-27 发布

2008-10-01 实施

---

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局 发布  
中国国家标准化管理委员会

## 前 言

GB/T 18654《养殖鱼类种质检验》分为下列部分：

- 第 1 部分：检验规则；
- 第 2 部分：抽样方法；
- 第 3 部分：性状测定；
- 第 4 部分：年龄与生长的测定；
- 第 5 部分：食性分析；
- 第 6 部分：繁殖性能的测定；
- 第 7 部分：生态特性分析；
- 第 8 部分：耗氧率与临界窒息点的测定；
- 第 9 部分：含肉率测定；
- 第 10 部分：肌肉营养成分的测定；
- 第 11 部分：肌肉中主要氨基酸含量的测定；
- 第 12 部分：染色体组型分析；
- 第 13 部分：同工酶电泳分析；
- 第 14 部分：DNA 含量的测定；
- 第 15 部分：RAPD 分析；

.....

本部分为 GB/T 18654 的第 13 部分。

本部分的附录 A 为规范性附录。

本部分由中华人民共和国农业部提出。

本部分由全国水产标准化技术委员会淡水养殖分技术委员会归口。

本部分起草单位：上海水产大学、中国水产科学研究院长江水产研究所。

本部分主要起草人：李思发、赵金良、徐忠法、蔡完其、邹曙明。

## 养殖鱼类种质检验

### 第 13 部分:同工酶电泳分析

#### 1 范围

GB/T 18654 的本部分规定了鱼类同工酶聚丙烯酰胺凝胶水平电泳分析的试剂与材料、仪器和设备、抽样、分析步骤和结果判定。

本部分适用于鱼类同工酶电泳分析。

#### 2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过 GB/T 18654 的本部分的引用而成为本部分的条款。凡是注日期的引用文件,其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本部分,然而,鼓励根据本部分达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件,其最新版本适用于本部分。

GB/T 18654.1—2002 养殖鱼类种质检验 第 1 部分:检验规则

GB/T 18654.2 养殖鱼类种质检验 第 2 部分:抽样方法

#### 3 原理

同工酶为该酶基因产物的表现型,根据其所带电荷的不同和分子大小、形状的不同,在电场和凝胶中出现各同工酶组分不同的迁移率,经催化、染色、扫描,根据酶带迁移距离、数目及吸收强度进行分析比较,判定鱼类物种、种群的遗传特性。

#### 4 试剂和材料

除非另有说明,在分析中仅使用确认为分析纯的试剂和蒸馏水或去离子水或相当纯度的水。

- 4.1 丙烯酰胺(Arc)。
- 4.2  $N',N'$ -亚甲基双丙烯酰胺或甲叉双丙烯酰胺(Bis)。
- 4.3 四甲基乙二胺(TEMED)。
- 4.4 过硫酸胺。
- 4.5 三羟甲基氨基甲烷(Tris)。
- 4.6 柠檬酸。
- 4.7 乙二胺四乙酸(EDTA)。
- 4.8 硼酸。
- 4.9 L-组氨酸。
- 4.10 乳酸。
- 4.11 DL-苹果酸。
- 4.12  $\alpha$ -磷酸甘油钠。
- 4.13 磷酸氢二钠( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )。
- 4.14 二个结晶水的磷酸二氢钠( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )。
- 4.15 辅酶 I (NAD)。
- 4.16 辅酶 II (NADP)。

- 4.17 吩嗪甲酯硫酸盐(PMS)。
- 4.18 氯化硝基四氮唑蓝(NBT)。
- 4.19 山梨醇。
- 4.20 DL-异柠檬酸三钠。
- 4.21 6-磷酸葡萄糖酸钠。
- 4.22  $\alpha$ -乙酸萘酯。
- 4.23  $\beta$ -乙酸萘酯。
- 4.24 丙酮。
- 4.25 坚牢蓝 RR 盐。
- 4.26 氨基黑 10B。
- 4.27 95%乙醇。
- 4.28 盐酸(HCl)。
- 4.29 氢氧化钠(NaOH)。
- 4.30 固定液:3份乙醇,加1份冰乙酸,加1份甘油,加5份蒸馏水,混合均匀。
- 4.31 TC制胶缓冲液:三羟甲基氨基甲烷 3.028 5 g,用柠檬酸调至 pH8.0,蒸馏水定容至 1 L。
- 4.32 EBT制胶缓冲液:三羟甲基氨基甲烷 5.451 3 g、EDTA 0.292 2 g,用硼酸调节至 pH8.6,蒸馏水定容至 1 L。
- 4.33 HC制胶缓冲液:组氨酸 1.939 5 g、柠檬酸 21.014 g,用 5% NaOH 调至 pH8.2,蒸馏水定容至 1 L。
- 4.34 TC电极缓冲液:三羟甲基氨基甲烷 48.65 g,用柠檬酸调 pH 至 8.0,蒸馏水稀释至 10 L。
- 4.35 EBT电极制胶缓冲液:三羟甲基氨基甲烷 65.4 g、EDTA 3.51 g,用硼酸调至 pH8.6,蒸馏水稀释至 15 L。
- 4.36 HC电极制胶缓冲液:组氨酸 1.939 5 g、柠檬酸 21.014 g,用 5% NaOH 调 pH 至 8.5,蒸馏水稀释至 10 L。
- 4.37 Arc. Bis 液:丙烯酰胺 98 g、 $N'$ , $N'$ -亚甲基双丙烯酰胺 2 g,用蒸馏水溶解并定容到 500 mL。
- 4.38 25% TEMED:TEMED 25 mL,加入 75 mL 蒸馏水。
- 4.39 100 mg/mL 过硫酸胺:过硫酸胺 0.1 g,溶解于 1 mL 蒸馏水中。
- 4.40 4%聚丙烯酰胺凝胶:Arc. Bis 液 13.2 mL、制胶缓冲液 14.7 mL、蒸馏水 37.5 mL、25% TEMED 0.3 mL、10%过硫酸胺 0.6 mL,混匀后,立即灌注到凝胶模具中,聚合反应结束后,取出凝胶,放在保湿盒内备用。
- 4.41 1.5 mol/L Tris-HCl(pH8.0):三羟甲基氨基甲烷 181.71 g,用 HCl 调至 pH8.0,蒸馏水稀释至 1 L。
- 4.42 1.5 mol/L Tris-HCl(pH9.5):三羟甲基氨基甲烷 181.71 g,用 HCl 调至 pH9.5,蒸馏水稀释至 1 L。
- 4.43 0.1 mol/L 磷酸缓冲液: $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  51.6 g、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  14.2 g,蒸馏水溶解并定容至 1 L。
- 4.44 染色液:几种常见同工酶染色液的配制方法见附录 A。

## 5 仪器与设备

- 5.1 微量匀浆机:转速 4 000 r/min。
- 5.2 高速冷冻离心机:转速 15 000 r/min 以上,冷冻温度为 4℃。
- 5.3 多用电泳仪。
- 5.4 激光扫描仪。
- 5.5 pH 计:读数值 0.01。

- 5.6 微量加样注射器。
- 5.7 制胶模具。
- 5.8 染色缸。
- 5.9 低温冰箱:冰室温度在 $-30^{\circ}\text{C}$ 以下。
- 5.10 恒温培养箱。
- 5.11 分析天平:感量为 $0.000\ 1\ \text{g}$ 。
- 5.12 电子天平:感量为 $0.1\ \text{g}$ 。
- 5.13 照相机。

## 6 抽样

### 6.1 活体样品鱼的抽样

按 GB/T 18654.2 的规定执行,样品鱼数量为 30 尾以上。

### 6.2 取样

活体解剖样品鱼,按被检鱼类种质标准所规定的组织取 $1\ \text{g}\sim 2\ \text{g}$ 试样,放入编号的小塑料袋中;对于血液试样用注射器从鱼的尾动脉抽血,分离出血清。样品均需置于低温冰箱中保存备用。

## 7 分析步骤

### 7.1 分析样品的制备

取 $0.3\ \text{g}$ 样品,以 1 份试样加入 3 份体积的 $0.3\%$  NAD 液,于匀浆机中以 $4\ 000\ \text{r/min}$ 匀浆 $2\ \text{min}$ ,粉碎组织。用吸管将匀浆后的样品移入指管中,在冷冻离心机中以 $15\ 000\ \text{r/min}$ 离心直至上清液澄清,以上操作均在 $4^{\circ}\text{C}$ 低温下进行。

制备后样品于冰箱中暂存或直接电泳。

### 7.2 凝胶制备

凝胶制备按试剂和材料中 4.40 的规定执行。

### 7.3 电泳步骤

7.3.1 每次实验前,先打开多用恒温循环仪,冷却至 $4^{\circ}\text{C}$ 左右。

7.3.2 预电泳:依酶的种类不同,采用相应的凝胶缓冲系统。并将预先制备的聚丙烯酰胺凝胶放在冷却板上,在 $50\ \text{mA}$ 电流下,电泳 $30\ \text{min}$ 。

7.3.3 前电泳:预电泳结束后,用微量加样器在凝胶的点样槽中加入 $8\ \mu\text{L}$ 的分析样品,在 $25\ \text{mA}$ 电流下,电泳 $10\ \text{min}$ 。

7.3.4 正式电泳:在适当的电压下恒压电泳,电泳时间依酶的种类而定。

### 7.4 染色、脱色和固定

7.4.1 染色:将电泳胶放入预先配制并在 $37^{\circ}\text{C}$ 恒温箱中保温所需检测酶的染色液中染色。当酶带全部显示清晰时,停止染色。

7.4.2 脱色:在 $2.5\%$ 冰乙酸中脱色至凝胶背景清晰、透明。

7.4.3 固定:脱色后的电泳胶放入乙醇-冰乙酸-甘油-水的混合液中,其混合比例为 $3:1:1:5$ ,固定数小时。

### 7.5 制干胶片

取与凝胶板大小适中的玻璃纸,浸泡湿润后,平铺在凝胶板上,排空气泡,四周向下包紧。在室温下自然风干,制成透明胶片,编号保存。

### 7.6 摄影、扫描

用近镜头对凝胶及其谱带照相,用激光扫描仪对电泳谱带进行扫描,计算同工酶各组分的相对含量。

## 7.7 结果分析

7.7.1 酶位点与等位基因分析：根据酶的结构组成和同工酶在组织中所表现的酶谱特征，确定每种同工酶的编码基因位点、多态位点的等位基因频率。

7.7.2 群体遗传异质性用多态座位比例( $P$ )和平均杂合度( $H$ )来度量，分别按式(1)和式(2)计算：

$$P = \frac{n_1}{n} \times 100 \quad \dots\dots\dots(1)$$

$$H = \sum(1 - \sum X_i^2)/n \quad \dots\dots\dots(2)$$

式中：

$P$ ——多态座位比例，%；

$n_1$ ——多态座位数；

$n$ ——所测基因总座位数；

$H$ ——平均杂合度；

$X_i$ ——等位基因  $i$  的频率。

## 8 结果判定

### 8.1 个体测定结果的判定

按 GB/T 18654.1—2002 中 6.1 的规定执行。

将所有测定结果逐一与标准对照，凡符合标准规定的判定为合格；凡不符合标准或与标准规定有显著差异的判定为不合格。

### 8.2 样品群体的判定

根据 8.1 的判定结果，计算出被检样品中合格品的百分率，用%表示。

附 录 A  
(规范性附录)

几种常见同工酶的染色配制方法

表 A.1 几种常见同工酶的染色配制方法

| 同工酶                          | 染色缓冲液                               | 辅酶 I<br>NAD/<br>mg | 辅酶 II<br>NADP/<br>mg | 1 mg/mL<br>NBT/<br>mL | PMS/<br>mg | 其他试剂                                                                    |
|------------------------------|-------------------------------------|--------------------|----------------------|-----------------------|------------|-------------------------------------------------------------------------|
| 醇脱氢酶<br>ADH                  | 0.25 mol/L Tris-HCl<br>pH8.0,140 mL | 22                 | —                    | 10.5                  | 10.5       | 95%乙醇 4.5 mL                                                            |
| 酯酶<br>EST                    | 0.1 mol/L 磷酸缓冲<br>液,150 mL          | —                  | —                    | —                     | —          | $\alpha$ -乙酸萘酯 20 mg<br>$\beta$ -乙酸萘酯 20 mg<br>丙酮 1 mL<br>坚牢蓝 RR 100 mg |
| 甘油-3-磷酸脱氢酶<br>$\alpha$ -GPDH | 0.25 mol/L Tris-HCl<br>pH9.5,114 mL | 45                 | —                    | 21                    | 10.5       | 1 mol/L 甘油 磷酸钠<br>15 mL                                                 |
| 山梨醇脱氢酶<br>SDH                | 0.25 mol/L Tris-HCl<br>pH8.0,140 mL | 22                 | —                    | 10.5                  | 10.5       | 山梨醇 3 g                                                                 |
| 异柠檬酸脱氢酶<br>IDH               | 1.5 mol/L Tris-HCl<br>pH9.5,15 mL   | —                  | 10                   | 30                    | 10.5       | 异柠檬酸钠 400 mg<br>MgCl <sub>2</sub> 150 mg<br>蒸馏水 105 mL                  |
| 乳酸脱氢酶<br>LDH                 | 1.5 mol/L Tris-HCl<br>pH9.5,15 mL   | 30                 | —                    | 30                    | 10.5       | 1 mol/L 乳酸钠 10 mL<br>蒸馏水 95 mL                                          |
| 苹果酸脱氢酶<br>MDH                | 1.5 mol/L Tris-HCl<br>pH9.5,15 mL   | 30                 | —                    | 30                    | 10.5       | 1 mol/L 苹果酸钠 15 mL<br>蒸馏水 90 mL                                         |
| 苹果酸酶<br>ME                   | 1.5 mol/L Tris -HCl<br>pH8.0,15 mL  | —                  | 40                   | 30                    | 10.5       | 1 mol/L 苹果酸钠 15 mL<br>蒸馏水 90 mL                                         |
| 6-磷酸葡萄糖脱氢酶<br>6-PGDH         | 0.25 mol/L Tris-HCl<br>pH8.0,140 mL | —                  | 15                   | 10.5                  | 10.5       | 6-磷酸葡萄糖酸钠 75 mg                                                         |
| 超氧化物歧化酶<br>SOD               | 0.5 mol/L Tris-HCl<br>pH9.5,118 mL  | 40                 | —                    | 31.5                  | 31.5       | —                                                                       |

中 华 人 民 共 和 国  
国 家 标 准  
养殖鱼类种质检验  
第 13 部分:同工酶电泳分析  
GB/T 18654.13—2008

\*

中国标准出版社出版发行  
北京复兴门外三里河北街 16 号  
邮政编码:100045

网址 [www.spc.net.cn](http://www.spc.net.cn)

电话:68523946 68517548

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷  
各地新华书店经销

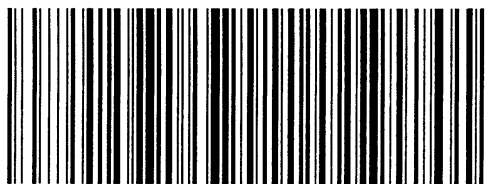
\*

开本 880×1230 1/16 印张 0.75 字数 12 千字  
2008 年 9 月第一版 2008 年 9 月第一次印刷

\*

书号: 155066 · 1-33312 定价 14.00 元

如有印装差错 由本社发行中心调换  
版权专有 侵权必究  
举报电话:(010)68533533



GB/T 18654.13—2008