



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 4876.1—2017

DNA 条形码方法 第 1 部分：检疫性乳白蚁

DNA barcode—Part 1: Quarantine *Coptotermes* spp.

2017-07-21 发布

2018-03-01 实施

中 华 人 民 共 和 国 发 布
国家质量监督检验检疫总局

前 言

本部分为 SN/T 4876《DNA 条形码方法》系列标准的第 1 部分。

本部分按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别这些专利的责任。

本部分由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

本部分起草单位：中华人民共和国珠海出入境检验检疫局、中华人民共和国江苏出入境检验检疫局、中华人民共和国深圳出入境检验检疫局、中华人民共和国湖北出入境检验检疫局。

本部分主要起草人：张卫东、权永兵、许彩芸、钱路、黄永辉、迟远丽、徐浪、廖力、徐森锋、余道坚、安榆林、王振华。

DNA 条形码方法

第 1 部分：检疫性乳白蚁

1 范围

SN/T 4876 的本部分规定了我国检疫性乳白蚁的 DNA 条形码检测方法。
本部分适用于我国进境植物检疫性乳白蚁 DNA 条形码的测定、结果的比对分析与判定。

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。
SN/T 1105 大家白蚁检疫鉴定方法

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

DNA 条形码 DNA barcodes

一段短的、标准化的基因片段，用于区分不同的物种。该片段在种间存在明显的遗传变异和分化并容易进行 PCR 扩增。DNA 条形码技术主要用于物种识别和新种发现。

3.2

凭证标本 voucher specimens

DNA 条形码的实物参考凭证，凭证标本信息包括馆藏信息、采集信息、鉴定信息，用于复核。模式标本是用于分类学研究的凭证标本。

3.3

CO II 基因

线粒体基因组的蛋白质编码基因，全称为细胞色素 c 氧化酶亚基 II (cytochrome c oxidase subunit II)，由于该基因进化速率较快，常用于分析亲缘关系密切的种、亚种及地理种群之间的系统关系。

4 乳白蚁基本信息

中文名称：乳白蚁

学名：*Coptotermes* spp.

分类地位：等翅目 Isoptera，鼻白蚁科 Rhinotermitidae，乳白蚁属 *Coptotermes* Wasman。

乳白蚁属是世界性的重要害虫种之一，目前全世界有效定名的乳白蚁近 70 种。主要危害房屋建筑中的木结构，也危害埋地塑料和绿化树木。乳白蚁近距离传播靠成虫飞行扩散，远距离传播主要借助于原木、板材、木方及木质包装等铺垫材料等扩散。

5 方法原理

根据乳白蚁的 CO II 序列特征,应用 DNA 条形码技术对乳白蚁进行鉴定。

6 仪器设备、用具及试剂

6.1 仪器设备与用具

常规 PCR 仪、微量分光光度仪、电泳仪、凝胶成像系统、酸度计、测序仪、高速冷冻离心机、生物安全柜、烘箱、高压灭菌锅、解剖镜、天平(感量 1/10 000)、摇床、水浴锅、制冰机、纯水仪、旋涡振荡器、-70 ℃ 冰箱、冰箱、微量移液器(0.5 μL, 2 μL, 10 μL, 20 μL, 100 μL, 200 μL, 1 000 μL)、PCR 反应管(0.2 mL, 0.5 mL)。

6.2 试剂

除另有规定外,所有试剂均为分析纯或生化试剂。

提取液(含 1% SDS、50 mmol/L Tris-HCl、25 mmol/L NaCl、25 mmol/L EDTA)、3 mmol/L KAc (pH7.2)、Tris 饱和酚、蛋白酶 K、氯仿、异戊醇、异丙醇、75%乙醇、无水乙醇、RNaseA、10× PCR 缓冲液、脱氧核糖核苷三磷酸(dNTPs)、r Taq DNA 聚合酶、引物(见表 1)、DL2000 Marker、琼脂糖、溴化乙锭(EB)。

表 1 扩增引物

目标基因		引物序列	扩增片段大小/bp
CO II	TY-F	5'-GTGCATTGGATTTAAGCTCC-3'	763
	TY-R	5'-CTTGCTTTCAGTCATCTGATG-3'	

7 DNA 条形码鉴定

7.1 样品的处理

样品的处理见 SN/T 1105。尽可能选择新鲜标本,标本保存于无水乙醇中,每份标本单管保存,并做好唯一性标识。

7.2 核酸的制备

取白蚁于双蒸水中漂洗,吸水纸吸干,解剖镜下剔除腹部,取胸部肌肉和足置于 1.5 mL Eppendorf 管中,加入 40 μL 提取液(含 1% SDS、50 mmol/L Tris · Cl、25 mmol/L NaCl、25 mmol/L EDTA),放置于-70 ℃ 冰箱中,4 min 后取出,用牙签捣碎,匀浆,加入等体积的 3 mmol/L KAc(pH 7.2),冰上放置 1 h,酚/氯仿提取基因组 DNA,溶解在 H₂O 中,用微量分光光度仪测定 DNA 浓度和纯度后,将样品于-20 ℃ 保存备用。

核酸制备也可采用昆虫 DNA 提取试剂盒法。

7.3 DNA 纯度与浓度的测定

用微量分光光度仪测定 DNA 的纯度与浓度,分别取得 260 nm 和 280 nm 处的吸收值,计算核酸的

纯度和浓度,计算公式如下:

DNA 纯度=OD260/OD280

DNA 浓度=50×OD260 μg/mL

PCR 级 DNA 溶液的 OD260/OD280 比值应为 1.7~1.9。

7.4 PCR 检测

7.4.1 PCR 扩增

每个样品设置两个平行反应,同时设置空白核酸提取对照和空白扩增对照。PCR 反应体系总体积为 50 μL,包含 5 μL 10× PCR 缓冲液(含 Mg²⁺)、4 μL 的 dNTP 混合物(各 10 mmol/mL)、上下游引物各 2 μL(10 μmol/mL)、rTaq DNA 聚合酶 1 μL(5 U/μL),20 ng~100 ng DNA 模板,最后加 ddH₂O 补充至总体积为 50 μL,体系配好后进行 PCR 扩增。PCR 反应条件为:94 ℃ 预变性 5 min;35 个循环为 94 ℃ 变性 1 min、58 ℃ 退火 45 s、72 ℃ 延伸 1 min;最后 72 ℃ 延伸 5 min,结束后产物于 4 ℃ 冰箱保存。

7.4.2 琼脂凝胶电泳

取 5 μL PCR 产物,在 1.5% 琼脂糖凝胶(5 V/cm)电压进行电泳,EB 染色,凝胶成像系统观察、拍照。

7.4.3 PCR 产物回收和克隆测序

取剩余 PCR 扩增产物 45 μL,使用 DNA 产物纯化试剂盒纯化回收产物,进行克隆测序。

7.4.4 DNA 序列数据的处理

使用 DNA 测序仪对目的条带进行双向测序,PCR 扩增引物作为测序引物,测序原理同 Sanger 测序法。为确保测序结果的可靠性,需对测序质量进行评估,去除测序结果两端的低质量序列,质量评估以碱基的 Q 值为依据。应用软件进行序列拼接,去除引物区,获得包含 685 bp 大小的完整 CO II 基因序列,序列方向应与 PCR 扩增正向引物方向一致。

8 结果判断

8.1 中国检疫性有害生物 DNA 条形码鉴定系统判定

登录中国检疫性有害生物 DNA 条形码鉴定系统(<http://www.qbol.org.cn>),点击“物种识别”导航条,进入物种识别页面。在鉴定框内输入 FASTA 格式(或纯文本格式)序列后,点击“提交鉴定”,系统进行 BLAST 后,自动生成鉴定结果。当相似度最高的 10 条序列为相同物种,最大相似度在 98% 以上,且 CO II 结果相符,可明确判定为该物种(参见附录 A);否则请辅以其他鉴定方法。

8.2 国际通用数据库判定

登录 GenBank 数据库 BLAST 鉴定系统(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>),在 BLAST 结果中查看序列相似性最高的物种,CO II 基因序列结果与已知乳白蚁种类基因序列相似性最高,相似度最高的 10 条序列为相同物种,且最大相似度在 98% 以上,可明确判定检出相应的乳白蚁种类。常见的乳白蚁种类 CO II 基因序列表信息参见附录 B。

9 标本与原始数据保存

9.1 标本保存

采集到的标本应乙醇浸渍低温保存,并注明货物来源,寄主,采集时间、地点及采集者,保存期为1年,以备复验,如涉及贸易纠纷则应保存到纠纷解决完毕。保存期满后,按后期用途长久保存或处理。

9.2 原始数据保存

样品检测结束后,其原始记录单和检验报告或证书应归档,妥善保管,以备复验、谈判和仲裁。

附录 A
(资料性附录)

中国检疫性有害生物 DNA 条形码鉴定系统操作方法

中国检疫性有害生物 DNA 条形码鉴定系统操作方法见图 A.1、图 A.2。

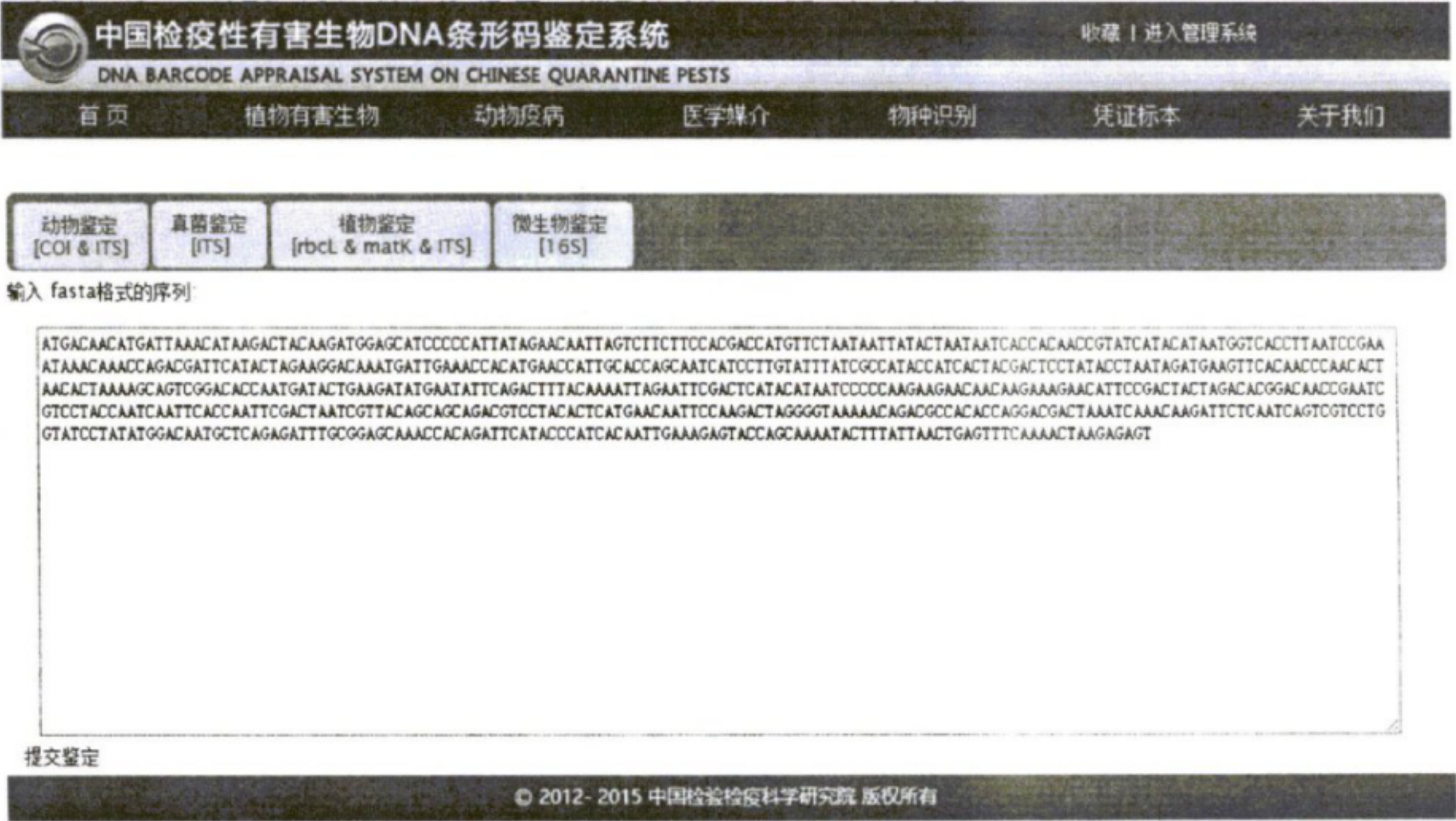


图 A.1 物种识别页面

中国检疫性有害生物DNA条形码鉴定系统									
DNA BARCODE APPRAISAL SYSTEM ON CHINESE QUARANTINE PESTS									
收藏 进入管理系统									
首页 植物有害生物 动物疫病 医学媒介 物种识别 凭证标本 关于我们									
相似样本鉴定结果									
序列编码	门	纲	目	科	属	种	相似度	遗传标记	E-Value
CYTC5223-12	Chordata	Mammalia	Artiodactyla	Bovidae	Bos	Bos taurus	93.18%	COII	3.07868e-08
CYTC5229-12	Chordata	Mammalia	Artiodactyla	Bovidae	Bos	Bos taurus	93.18%	COII	3.07868e-08
CYTC5240-12	Chordata	Mammalia	Artiodactyla	Bovidae	Bos	Bos taurus	93.18%	COII	3.07868e-08
CYTC4896-12	Chordata	Mammalia	Artiodactyla	Bovidae	Bos	Bos taurus	93.18%	COII	3.07868e-08
CYTC417-12	Chordata	Mammalia	Artiodactyla	Bovidae	Bos	Bos taurus	93.18%	COII	3.07868e-08
CYTC4888-12	Chordata	Mammalia	Artiodactyla	Bovidae	Bos	Bos taurus	93.18%	COII	3.07868e-08
CYTC423-12	Chordata	Mammalia	Artiodactyla	Bovidae	Bos	Bos taurus	93.18%	COII	3.07868e-08

图 A.2 鉴定结果页面

附 录 B
(资料性附录)

常见乳白蚁种类线粒体细胞色素氧化酶基因(COⅡ)序列

常见乳白蚁种类线粒体细胞色素氧化酶基因(COⅡ)序列见表 B.1。

表 B.1 常见乳白蚁种类线粒体细胞色素氧化酶基因(COⅡ)序列信息

学 名	中文名	GenBank 登录号
<i>C.acinaci formis</i>	短刀乳白蚁	KJ918272, KJ918281, KJ918276, KJ918273, KJ918270, KJ918269, KJ918267, KJ918282, KJ918275, AB005583, DQ367827, KJ918306, KJ918274, KJ918278, AF262610, KJ918277, KJ918340, KJ918250, KJ918338, KJ918337, KJ918279, KJ907839, KJ907838, KJ918339, KJ918336, KJ918335, KJ918280, DQ367826
<i>C.amanii</i>	阿曼乳白蚁	JF923247, JF923246, JF923245
<i>C.brunneus</i>		KJ918305
<i>C.curvignathus</i>	曲颚乳白蚁	AJ854177, AJ854179, FJ384634, AJ854180, AJ854178
<i>C.dreghorni</i>		KJ918313
<i>C.frenchi</i>	大唇乳白蚁	KJ918342, KJ918320, KJ918302, KJ918322, KJ918343
<i>C.formosanus</i>	台湾乳白蚁	KJ918308, KC515425, KU925203, KJ918309, KJ918307, KC515433, KC515415, AB626147, AB626146, AB626145, AY683218, FJ870577, FJ870566, AB109529, AY683212, AY168204, AF107488, KC515424, AY027489, AY536403, AY536404, EF056707
<i>C.gestroii</i>	格斯特乳白蚁	KC515409, KC515411, KC515408, KC515403, AJ854175, AJ854173, AJ854176, AJ854174, KU925205, GQ994994, AY536402, KC515414, HQ231233, EF379956, AJ854171, EU805750, EF379953, EF379955, EF379954, EF379945, EF379951, EF379947, EU805757, EF379944, JX128695, JX128693, FJ384649, AJ854172, AY295078
<i>C.kalshoveni</i>	卡肖乳白蚁	KU925210, KU925209, AJ854168, AJ854167, AJ854166
<i>C.lacteus</i>	澳洲乳白蚁	KU925211, KJ918299, KJ918292, AY536410, DQ367840, EU253886, AF220600, FJ806883, KJ918258, KJ918257, JX144934, DQ367841, KJ918296
<i>C.michaelseni</i>		KU925212, KJ918326, KJ918349, KJ918348, KJ918346, KJ918316, DQ367839, DQ367838
<i>C.sepangensis</i>	塞庞乳白蚁	AJ854163, KU925214, KU925215
<i>C.sjostedti</i>	非洲乳白蚁	KU925216
<i>C.testaceus</i>	南美乳白蚁	KU925218, KU925220, KU925219, DQ442102
<i>C.travians</i>	南亚乳白蚁	KU925221, KU925222, AJ854170, AJ854169
<i>C.truncatus</i>		KJ918303, FJ818986

参 考 文 献

- [1] Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, et al. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc R Soc Lond B*, 2003, 270 (1512): 313-321.
- [2] Margaret C G, Rubinoff D, Grace J K. Phylogenetic analysis of subterranean termites (*Coprotormes* spp., Isoptera: Rhinotermitidae) indicates the origins of Hawaiian and North American invasions; potential implications for invasion biology[J]. *Proceedings of Hawaiian Entomological Society*, 2008, 40: 1-9.
- [3] Scheffrahn R H, Krecek J, Boudanath J K, et al. Establishment of the African termite, *Coprotormes sjostedti* (Isoptera: Rhinotermitidae), on the island of Guadeloupe, French West Indies[J]. *Systematics*, 2004, 97(5): 872-876.
- [4] Lahaye R, van der Bank M, Bogarin D, et al. DNA barcoding the floras of biodiversity hotspots. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(8): 2923-2928.
- [5] Schindel DE, Miller SE. DNA barcoding, a useful tool for taxonomists. *Nature*, 2005, 435: 17.
- [6] 陈士林. 中药 DNA 条形码分子鉴定. 北京: 人民卫生出版社, 2012: 1-510.
-