



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 5133—2019

枣大球蚧及近似种 DNA 条形码鉴定方法

DNA barcoding for *Eulecanium gigantea* and related species

行业标准信息服务平台

2019-09-03 发布

2020-03-01 实施

中华人民共和国海关总署 发布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由中华人民共和国海关总署提出并归口。

本标准起草单位：中华人民共和国太原海关、中华人民共和国运城海关、山西省运城市盐湖区植物保护检疫站。

本标准主要起草人：李惠萍、刘晓琳、刘艳俊、高媛惠、杨营业、王琳、毛本前、高浩、刘海峰。

行业标准信息平台

枣大球蚧及近似种 DNA 条形码鉴定方法

1 范围

本标准规定了枣大球蚧及近似种 DNA 条形码鉴定方法。
本标准适用于枣大球蚧及近似种基因组的提取、DNA 条形码序列的扩增、序列核查比对及基于 DNA 条形码的种类鉴定。

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 6682 分析实验室用水规格和试验方法

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

DNA 条形码是生物体内一段较短的、标准的、有足够变异的且易扩增的基因片段，在昆虫中，一般是指线粒体 COI 基因上 5'端的一段序列。

3.2

COI 基因 COI gene

COI 基因是线粒体基因组的细胞色素 C 氧化酶亚基 I(Cytochrome c oxidase subunit I)的编码基因，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。

3.3

DNA 条形码鉴定 DNA barcoding

通过对 DNA 条形码基因片段的扩增和序列比对，进行生物物种的区分和鉴定。

3.4

序列相似性 Similarity of the sequences

反映序列间相似程度的数值，一般以百分数表示。

4 缩略语

下列缩略语适用于本标准
CTAB:Cetyltrimethylammonium bromide,十六烷基三甲基溴化铵。
PCR:Polymerase chain reaction,聚合酶链式反应。
DNA:Deoxyribonucleic acid,脱氧核糖核酸。
COI: Cytochrome C Oxidase I,线粒体细胞色素 C 氧化酶亚基 I。

5 枣大球蚧及近似种的基本信息

中文名:枣大球蚧
学名:*Eulecanium gigantea*
英文名:Gigantic globular scale
近似种:皱大球蚧 *Eulecanium kuwanai*、朝鲜毛球蚧 *Didesmococcus koreanus*、沙里院褐球蚧 *Rhodococcus sariuoni*、水木坚蚧 *Parthenolecanium corni*。

分类地位:枣大球蚧属半翅目 Hemiptera, 蚧科 Coccidae, 大球蚧属 *Eulecanium* Cockerell。

枣大球蚧与皱大球蚧 *E.kuwanai*、朝鲜毛球蚧 *D. koreanus*、沙里院褐球蚧 *R.sariuoni*、水木坚蚧 *P. corni* 在形态上相似,难以区分,这类蚧虫多分布于温带地区,主要危害经济林木、绿化植物、景观花卉等,通过吸食植物汁液,分泌蜜露,导致植物生长衰弱和枯死,枣大球蚧与近似种均固定在寄主植物上危害,可随寄主作远距离传播。

6 方法原理

利用一对特定引物对球蚧类蚧虫线粒体 DNA 中的 COI 基因片段进行扩增和测序,获得到长度约为 750 bp 的 DNA 序列,对该序列进行核查、校对和处理后得到有效序列,跟 NCBI 数据库中相应的序列进行比对,根据序列的相似度实现物种确定的目的。

7 仪器及试剂耗材

7.1 仪器

常规 PCR 仪、核酸蛋白分析仪、电泳仪、凝胶成像系统、生物安全柜、高压灭菌锅、显微镜、电子天平(感量 1/10 000)、眼科手术剪(10 cm 直尖头)、水浴锅、恒温磁力搅拌器、漩涡混合仪、制冰机、纯水仪、干燥箱、冰箱、离心机(最大离心力大于 14 000 g)、微量移液器(0.5 μ L, 2 μ L, 10 μ L, 20 μ L, 100 μ L, 200 μ L, 1 000 μ L)。

7.2 试剂、耗材

除另有规定外,所有试剂均为分析纯或生化试剂。

CTAB 提取液(参见附录 A)、超纯水(应符合 GB/T 6682)、无水乙醇、Tris 饱和酚、TE 缓冲液、蛋白酶 K、氯仿、异戊醇、异丙醇、75%乙醇、DNA 聚合酶、dNTP、6x DNA 上样缓冲液、DNA 分子量标准、琼脂糖、溴化乙锭(EB)、TAE 电泳液、胶回收试剂盒。

PCR 管(0.2 mL, 1.5 mL)、无粉一次性手套。

7.3 引物

目标基因	引物名称	引物序列(5'-3')	扩增片段
COI	C1-1554_F	CAGGAATAATAGGAACATCAATAAG	750 bp 左右
	C1-2342_R	ATCAATGTCTAATCCGATAGTAAATA	

8 核酸提取与浓度、纯度测定

8.1 样品处理

在显微镜下,取单头未被寄生的虫体(无水乙醇中保存),用无水乙醇洗净,常温晾干。

8.2 DNA 提取

将上述样品置于已灭菌的 1.5 mL 洁净离心管中,加入 CTAB 提取液 180 μ L,充分剪碎,加入 20 μ L 蛋白酶 K,按酚氯法(参见附录 B)或试剂盒进行基因组 DNA 的提取。

8.3 DNA 纯度与浓度的测定

用微量核酸蛋白分析仪测定 DNA 的纯度与浓度,选择浓度为 50 ng/ μ L \sim 200 ng/ μ L,纯度 OD260/OD280 比值为 1.8 \sim 2.0 的 DNA 进行扩增反应。

9 PCR 扩增与序列分析

9.1 PCR 扩增

PCR 扩增反应体系为 25 μ L,体系配制(参见附录 C)。PCR 反应条件为:95 $^{\circ}$ C 3 min 预变性;5 个循环(94 $^{\circ}$ C 40 s,41 $^{\circ}$ C 40 s,72 $^{\circ}$ C 60 s),35 个循环(94 $^{\circ}$ C 30 s,52 $^{\circ}$ C 50 s,72 $^{\circ}$ C 60 s);72 $^{\circ}$ C 10 min 延伸。PCR 产物于 4 $^{\circ}$ C 冰箱保存,如放置时间较长可放-20 $^{\circ}$ C 保存备用。

9.2 琼脂糖凝胶电泳

取 3xDNA 上样缓冲液 4 μ L,与 2 μ LPCR 产物混匀,用 1%琼脂糖凝胶,在电压 140V 条件下,电泳 35 min \sim 40 min,EB 染色,通过凝胶成像系统观察、拍照。

9.3 PCR 产物回收和测序

将电泳检测后以相同模板扩增的两管 PCR 剩余产物合并共计 46 μ L,进行电泳,利用胶回收试剂盒纯化回收,将回收产物或 PCR 扩增原液送测序公司测序。

9.4 序列数据的处理

测序获得长度约 750 bp 的序列,通过序列编辑软件(MEGA 6.0)对该序列进行碱基核对,去除两端峰形杂乱的序列,选择峰形整齐的、方向与 PCR 扩增正向引物方向一致的一段序列,作为确定物种的查询序列(参见附录 D)。

10 结果判定

将查询序列与 NCBI 数据库中序列比对,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(见附录 E),可判定为该物种。

11 标本及原始数据保存

11.1 标本保存

虫样标本置于无水乙醇中,在 4 $^{\circ}$ C 保存;核酸样品在-20 $^{\circ}$ C 条件下保存。样品要标明来源,寄主,

采集时间、地点及采集者。

11.2 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须归档,妥善保管,以备复验、谈判和仲裁。

行业标准信息平台

附 录 A

(资料性附录)

CTAB 提取液配制方法

A.1 称取 6.00 g 固体 CTAB($W/V=3\%$), 16.36g 固体 NaCl($1.4 \text{ mol} \times \text{L}^{-1}$), 2.00 g 固体 PVP(聚乙烯吡咯烷酮)($W/V=1\%$)于 300 mL 烧杯中。

A.2 加 150 mL 水于前述,在恒温磁力搅拌器上,逐渐加热,同时连续搅拌,待固体充分溶解后,再加入 8 mL EDTA-Na($0.5 \text{ mol} \times \text{L}^{-1}$ PH=8.0), 20 mL Tris-HCl($1 \text{ mol} \times \text{L}^{-1}$ PH=8.0),充分混匀。

A.3 将烧杯中液体转入 200 mL 容量瓶中,加入 0.4 mL β -巯基乙醇($V/V=0.2\%$),定容至 200 mL,混匀。

A.4 将容量瓶中的液体转入试剂瓶,高压蒸汽灭菌后,室温保存。

行业标准信息平台

附 录 B

(资料性附录)

酚氯法提取蛭虫基因组 DNA 的操作程序

- B.1** 取单头虫体(无水乙醇中保存)在显微镜下用无水乙醇洗净虫体;常温下晾干虫体。用 70%酒精棉擦拭干净眼科手术剪,晾干手术剪后备用。
- B.2** 将晾干的虫体置于 1.5 mL 离心管中,加入 180 μ L CTAB 提取液,再用眼科手术剪充分剪碎虫体。
- B.3** 加入 20 μ L 蛋白酶 K,于 65 $^{\circ}$ C 左右水浴过夜或 12h,期间可振荡数次,充分裂解。温浴结束,10 000 r/min 离心 15 min。
- B.4** 取上清液至新的 1.5 mL 离心管中,分别加入上清液的一半体积的氯仿异戊醇(氯仿:异戊醇=24:1)和一半体积的 Tris 饱和酚,12 000 r/min 离心 10 min。
- B.5** 取上清液于新的 1.5 mL 离心管中,重复 B.4 一次。
- B.6** 取上清液于新的 1.5 mL 离心管中,加入等体积的异丙醇(异丙醇实验前放入-20 $^{\circ}$ C 冰箱冷冻),轻微混匀放入-20 $^{\circ}$ C,30 min 后,12 000 r/min 离心 20 min;弃液。
- B.7** 加入 500 μ L 75%乙醇洗涤沉淀,12 000 r/min 离心 5 min,如有明未洗干净的杂质,再重复洗 1—2 次,晾干后用 30 μ L~50 μ L TE 缓冲液溶解沉淀,4 $^{\circ}$ C 保存,不立即使用的可-20 $^{\circ}$ C 保存备用。

行业标准信息平台

附 录 C
(资料性附录)

枣大球蚧及近似种 DNA 条形码扩增体系配制

- C.1 枣大球蚧及近似种扩增试剂采用的是 TaKaRa LA Taq 酶,体系体积为 25 μL 。
C.2 25 μL 体系各组分分配比见表 C.1

表 C.1 体系各组成成份及配比

组分名称	体积 μL
10xLA PCR Buffer II (Mg^{2+} free)	2.5
Mgcl_2	2.5
dNTP	4
正向引物(10 pmol/ μL)	1.5
反向引物(10 pmol/ μL)	1.5
Taq DNA 聚合酶(5 U/ μL)	0.25
模板(50~200 ng/ μL)	2
ddH ₂ O	10.75

行业标准信息平台

附 录 D
(资料性附录)
序列有效性

D.1 如图 D.1 所示,有效序列段峰高、基部杂峰少且低的序列,且长度 750 bp 左右。

160 170 180 190 200 210 220 230 240 250
1CAA TCTAAG TTTT GATTAT TTA TTT C C T T C A T T A A T A A T A A T T T C A A G A A T A T T T A T T A A T A A A A T C T A T A C T G G A T G A A C T T T A T A T C C A C C

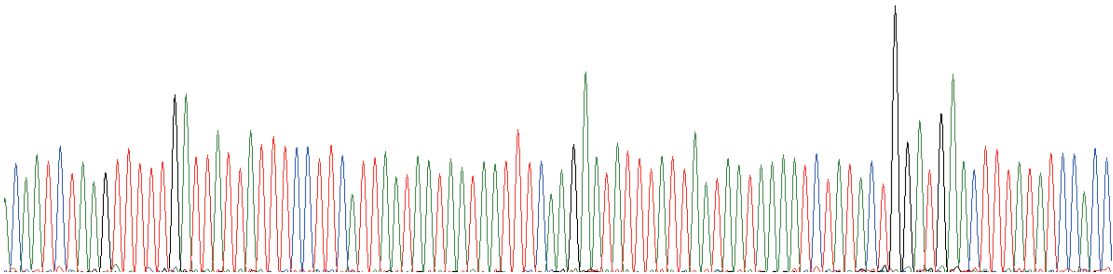


图 D.1 原始峰图

D.2 通过对原始序列进行处理,获取有效序列后,打开 MEGA 软件选择 Align 进入 Edit/Build Alignment 选择 creat a new alignment 点击 OK 进入 DNA。调入有效序列后选择 Translated Protein Sequences 进入 Invertebrate Mitochondrial 点击 OK,完全翻译成氨基酸见图 D.2。

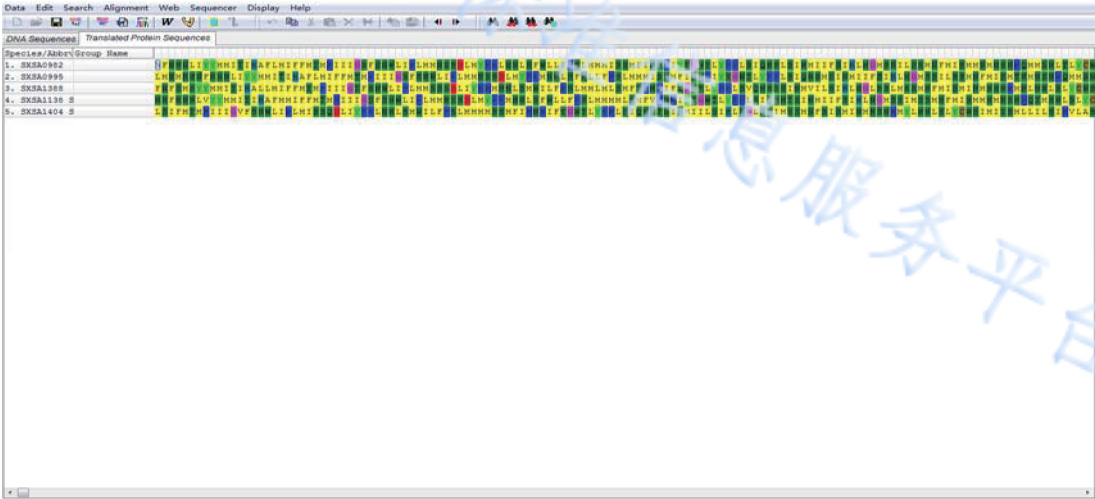


图 D.2 有效序列完全翻译成氨基酸图

附 录 E
(规范性附录)
枣大球蚧及近似种 COI 参考序列

国际通用数据库中枣大球蚧及近似种 DNA 条形码序列

中文名	学名	GenBank 登陆号	变异范围
枣大球蚧	<i>Eulecanium gigantea</i>	KJ98521.1、KJ98531.1、 KJ908511.1、KJ908489.1、 KR001893.1、MG674175、 MG674176、MG674177、 MG674178、MG674179	99.8%~100%
皱大球蚧	<i>Eulecanium kuwanai</i>	KJ908609、KJ908635.1、 KJ908645.1、KJ905603.1、 KJ908597.1、KJ908585.1、 KP189954.1、KP189964.1、 KP189962.1、KP189953.1	98.9%~100%
沙里院褐球蚧	<i>Rhodococcus sariuni</i>	KP189909.1、KP189921.1、 KP189916.1、KP189911.1 MG817435、MG817436 MG817437、MG817438 MG817439、MG817440	99.4%~100%
朝鲜毛球蚧	<i>Didesmococcus koreanus</i>	KP189907.1、KP189895.1 KP189906.1、KP189900.1 MG817428、MG817429 MG817430、MG817431 MG817432、MG817433	99.9%~100%
水木坚蚧	<i>Parthenolecanium corni</i>	KY085291.1、KY085296.1、 KY085133.1、KY085132.1 KY085284.1、KY085283.1 JQ795616.1、KP189848.1 MG817447、MG817446	99.4%~100%

参 考 文 献

- [1] Ratnasingham S, Hebert P. Bold: The Barcode of Life Data System. *Molecular Ecology Notes*. 2007, 7(3): 355-364.
- [2] Ratnasingham S & Hebert PDN. BOLD: The barcode of life data system (<http://www.barcodinglife.org>). *Molecular Ecology Notes*, 2007, 7 (3): 355-364.
- [3] Hebert P, Ratnasingham S, deWard J. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol Sci.* 2003, 270: S96-S99.
- [4] Deng J, Yu F, Zhang T X, et al. DNA barcoding of six Ceroplastes species (Hemiptera: Coccoidea: Coccidae) from China. *Molecular Ecology Resources*, 2012, 12(5): 791-796.
- [5] Park D S, Suh S J, Oh H W, et al. Recovery of the mitochondrial COI barcode region in diverse Hexapoda through tRNA-based primers. *BMC Genomics* , 2010, 11(1): 1-7.
- [6] 汤枋德,1991.中国蚧科.山西:山西高校联合出版社.145-221.
- [7] 谢映平,1998.山西林果蚧虫.北京:中国林业出版社. 22-65.
- [8] 李惠萍,王静慧,张龙霞,刘海峰,刘晓琳.一种球蚧类蚧虫基因组 DNA 提取方法[J].环境昆虫学报,2014,36(2) :182-187.
- [9] 石晶晶,李惠萍,谢映平、林彦伯、刘艳俊、毛本前.基于分子标记 COI、28S 和 18S 对新菠萝灰粉蚧与菠萝灰粉蚧的识别鉴定[J].植物检疫,2016,30(3) :48-52.

行业标准信息平台