

SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 4280.1—2015

国境口岸红头丽蝇 DNA 条形码鉴定方法

DNA barcoding identification of *Calliphora vicina* Robineau-Desvoidy,
1830 at the frontier port

2015-05-26 发布

2016-01-01 实施



中 华 人 民 共 和 国
国家质量监督检验检疫总局 发 布

前 言

本部分按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

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：中华人民共和国广东出入境检验检疫局、中华人民共和国河北出入境检验检疫局。

本部分主要起草人：邱德义、岳巧云、张宪臣、刘德星、聂维忠、陈健、魏晓雅、吴可量、胡佳。

国境口岸红头丽蝇 DNA 条形码鉴定方法

1 范围

SN/T 4280 的本部分规定了红头丽蝇的 DNA 条形码鉴定程序和结果判定。

本部分适用于对红头丽蝇的成虫(包括肢体不全的成虫),以及蛹、幼虫、卵等 DNA 条形码鉴定的工作。

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 19489 实验室 生物安全通用要求

SN/T 1876 医学媒介生物标本采集、制作及保存规程

SN/T 2752.4 卫生检疫人员的自我防护规范 第4部分:实验室人员

WS/T 230 临床诊断中聚合酶链反应(PCR)技术的应用

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

红头丽蝇 *Calliphora vicina* Robineau-Desvoidy, 1830

丽蝇科,丽蝇属。因为腹部呈青色,俗名为“blue blowfly”或者“blue bottle”,因其颊部橙红色,所以中文名为红头丽蝇,为重要的媒介生物和法医昆虫。

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。DNA 条形码已经成为物种鉴定的重要工具,在节肢动物尤其是昆虫中,一般是指线粒体 COI(线粒体细胞色素 C 氧化酶亚基 I)上的 658 bp 的标准片段。

3.3

DNA 条形码鉴定技术 DNA barcoding identification technology

一种利用 DNA 条形码基因片段进行生物物种鉴定和系统进化关系研究的技术,建立在基因扩增和序列比对的基础之上,它具有不受物种发育状态、性别及形态特征完整与否的限制、减少对形态分类专家的依赖、不受主观因素影响、准确率高、借助互联网可以实现数据共享等特点。

3.4

空白对照 blank control

从基因组 DNA 提取步骤开始至 PCR 扩增和 PCR 产物检测整个过程,没有加入任何医学媒介昆虫组织的空白,与其他受试的昆虫平行进行操作以观察实验是否处于正常状态。空白对照应没有 PCR 产物条带产生。

3.5

阳性对照 positive control

在 PCR 扩增过程中,与受试样品平行进行的,在正常反应情况下,一定能产生 PCR 产物的 DNA 为反应模板,用于观察整个反应体系和反应过程是否正常,阳性对照应有 PCR 产物带产生。

3.6

阴性对照 negative control

在 PCR 扩增过程中,与受试样品平行进行的,用 ddH₂O 代替模板 DNA 而进行的对照反应,用于观察整个反应体系是否正常,确认没有受到污染,阴性对照应没有 PCR 产物条带产生。

3.7

凭证标本 voucher specimen

获取 DNA 条形码等分子数据的来源(母体)标本。凭证标本可以是不完整的标本,但与本标本的 DNA 条形码数据等分子凭证必须是一一对应的关系。凭证标本的保存非常重要,必须有唯一性标识如:标本编号、存放、鉴定以及采集等详细信息。

3.8

分子凭证 molecular voucher

与凭证标本相对应的基因组 DNA、PCR 产物、DNA 条形码序列及峰图,做克隆还应包括含 DNA 条形码片段的阳性转化子。分子凭证的保存非常重要,必须有唯一性的编号、存放等详细信息,以便于日后查证。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

BOLD:生物条形码数据系统(barcoding of life data system)

注:网址:<http://www.boldsystems.org>。

5 原理

利用线粒体 DNA 中的 COI 基因的通用引物对受试样品基因组 DNA 进行扩增,PCR 产物测序后,得到长度约为 658 bp(不包含引物的序列)的 DNA 片段,跟 BOLD 数据库进行比对,根据序列的相似度实现物种鉴定的目的。

6 引物

LCO1490 5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3'

HCO2198 5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3'

7 鉴定程序

7.1 准备

实验室需具备的设备和试剂参见附录 A,实验室生物安全应符合 GB 19489 要求,人员防护应符合 SN/T 2752.4 的规定;PCR 防污染措施遵照 WS/T 230 执行。

7.2 标本的处理

7.2.1 取样

对所检测的标本进行唯一性标识。新鲜标本(包括卵、幼虫、蛹及成虫)及时冷冻或者置于毒瓶处死后,投入大于75%的乙醇固定;截获的干燥标本和死标本直接投入大于75%的乙醇固定。取样时,尽量减小组织块的大小,尽可能保持凭证标本的形态完整性,尤其是避免破坏具有重要分类意义的形态特征。

7.2.2 凭证标本的制作

将取样后的标本制作成凭证标本,标本的制作按照 SN/T 1876 执行。

7.3 基因组 DNA 的抽提

7.3.1 取样

取成虫左侧前足或中足,若左侧前、中足缺失,可取右侧;或一个蛹、一头幼虫的一部分、一只卵,置于灭菌的洁净 1.5 mL 离心管中,加入 50 μL 裂解液研磨至糜状,根据实验室实际情况,选择试剂盒法或者酚-三氯甲烷法抽提 DNA。提取时应设置空白对照。

7.3.2 试剂盒法

按动物组织基因组 DNA 提取试剂盒的操作指导书进行基因组 DNA 的抽提。

7.3.3 酚-三氯甲烷法

细胞裂解后离心分离含核酸的水相,然后再加入等体积三氯甲烷:异戊醇(24:1),14 000 g 离心 5 min~10 min,取上清液至一新的离心管中;加入等体积的饱和酚,14 000 g 离心 5 min,转移上清液至一新的离心管;加入等体积的饱和酚/三氯甲烷/异戊醇(25:24:1),14 000 g 离心 5 min,转移上清液至一新的离心管;加入等体积的饱和酚,14 000 g 离心 5 min,转移上清液至一新的离心管;加入 2 倍体积的无水乙醇,14 000 g 离心 5 min,弃上清液;加入 500 μL 的 70%乙醇,14 000 g 离心 1 min,弃上清液,重复该步骤一次;室温或者 37 $^{\circ}\text{C}$ 彻底干燥离心管,加入 50 μL 经高压灭菌的 ddH_2O 溶解 DNA;提取的 DNA 保存在 4 $^{\circ}\text{C}$ 备用,长期保存应置于-20 $^{\circ}\text{C}$ 或以下冷冻保存。

7.4 PCR 扩增

7.4.1 PCR 扩增体系

根据实际情况,可以选择 50 μL 体系,或者 25 μL 体系。为了验证 PCR 体系有无污染,需同时设置阴性对照。为了验证 PCR 反应正常,需要设置阳性对照。

50 μL 体系:缓冲液(10 \times)5 μL , dNTP(各 2.5 mmol/L)2 μL , 正反引物(20 $\mu\text{mol/L}$)各 1 μL , *Taq* DNA 聚合酶(5 U/ μL)0.5 μL , 模板 50 ng/ μL ~100 ng/ μL 3 μL , ddH_2O 37.5 μL 。

25 μL 体系各组分减半。

7.4.2 PCR 扩增条件

94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,50 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s,30 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min;10 $^{\circ}\text{C}$ 保温 30 min。

SN/T 4280.1—2015

7.5 PCR 产物的检测

用 $1\times$ TAE 缓冲液与琼脂糖配成 1% 的琼脂糖凝胶,检测是否有 PCR 产物及产物的质量。TAE 缓冲液的配制参见附录 B,PCR 产物检测过程参见附录 C。

7.6 PCR 产物的纯化

如需要纯化,选用胶孔大的梳子(如:厚度 1.5 mm,13 齿),重新制胶、跑胶,将目的片段连胶一起割下,按 PCR 产物纯化试剂盒的操作指导书进行 PCR 产物的纯化。也可根据实际情况,委托测序公司进行纯化。

7.7 PCR 纯化产物的测序

委托专业的测序公司进行 PCR 产物的直接测序,按照所选公司的特定要求进行送样。要求两端测序或测通。实验室也可以选择克隆后测序,克隆测序流程参见附录 D。

7.8 序列的分析和比对

7.8.1 序列的有效性

序列长度应为 658 bp 左右。通过查看序列的原始峰图,有效序列段峰高、基部杂峰少且低的序列为有效序列(参见附录 E 中的 E.1)。将符合要求的序列进行拼接,去除引物片段,拼接后的序列可翻译成通顺的蛋白质序列,反之序列仅可供为参考(参见附录 E 中的 E.2)。

7.8.2 序列比对

与 BOLD 系统的序列进行比对。具体操作见附录 F。

比对序列时,引物序列不包含在内。红头丽蝇的 DNA 条形码序列参见附录 G。

8 结果判定

BOLD 系统给出最大相似种为红头丽蝇并且相似度大于 99.0% 者,DNA 条形码方法鉴定为红头丽蝇。若大于 98%,小于 99.0%,需参考形态学特征进行综合判断,小于 98% 者,不予与种类判定。

附 录 A
(资料性附录)
主要设备和试剂

A.1 仪器和用具

普通台式离心机(相对离心力大于 14 000 g)、各量程($2\ \mu\text{L}$ 、 $10\ \mu\text{L}$ 、 $20\ \mu\text{L}$ 、 $100\ \mu\text{L}$ 、 $200\ \mu\text{L}$ 、 $1\ 000\ \mu\text{L}$)可调移液器、可调式恒温浴、PCR 工作站或者超净工作台、PCR 扩增仪、电泳仪、凝胶成像系统、冰箱。

A.2 耗材

$1.5\ \text{mL}$ 离心管、 $0.2\ \text{mL}$ PCR 管、各量程的移液器 TIPS、无粉一次性手套。

A.3 试剂

除另有规定外,所有试剂均采用分析纯。

乙醇、动物组织基因组 DNA 提取试剂盒、*Taq* 酶、dNTP、PCR 产物纯化试剂盒、琼脂糖、DNA 分子量标准、核酸染料、TAE 电泳液、上样缓冲液等。

使用酚-三氯甲烷法提取 DNA 需要饱和酚、三氯甲烷、异戊醇等试剂。

SN/T 4280.1—2015

附 录 B
(资料性附录)
TAE 缓冲液的配制

B.1 50×储存液(1 L)的配制

B.1.1 称量试剂

Tris(三羟甲基氨基甲烷)	242 g
Na ₂ EDTA·2H ₂ O(乙二胺四乙酸二钠·2H ₂ O)	37.2 g

B.1.2 配制

加入 800 mL 的去离子水,充分搅拌溶解,加入 57.1 mL 的醋酸,充分混匀。用去离子水定容至 1 L,室温保存备用。

B.2 1×工作液的配制

用去离子水稀释 50×储存液成 1×工作液。

示例:配制 1 L 1×的工作液,取 50×储存液 20 mL,加入 980 mL 去离子水,混匀即可。

附 录 C
(资料性附录)
PCR 产物检测过程

C.1 制胶

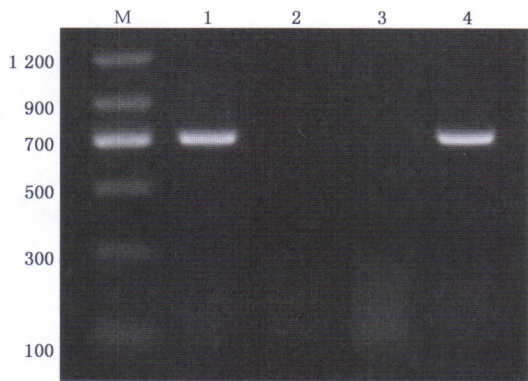
用 1×TAE 缓冲液与琼脂糖配成 1% 的琼脂糖凝胶,加热煮沸充分溶解后,降温至 50 ℃ 左右,或者用手背碰触烧瓶可以忍受的温度,按照核酸染料的说明加入适量的核酸染料,混匀。在制胶板上加入梳子,倒入适量的琼脂糖凝胶,室温凝固备用。

C.2 点样

将制胶板和胶一起放入电泳槽内,带胶孔的一端位于负电极端,加入 1 倍的 TAE 电泳缓冲液至完全浸没制胶板和胶。一个胶孔中加入 6 μL 的 DNA 分子量标准,另一胶孔中加入 6 μL 混入上样缓冲液的 PCR 产物(5 μL 的 PCR 产物中加入 1 μL 的 6 倍上样缓冲液)。

C.3 跑胶

电压 5 V/cm,依据胶块的大小,时间在 20 min~40 min 之间。将胶块整个移入凝胶成像仪,检查有无目的片段,片段的大小约为 710 bp 左右,PCR 产物胶图参见图 C.1。



说明:
M——DNA 分子量标准;
1——阳性对照;
2——阴性对照;
3——空白对照;
4——目的片段。

图 C.1 PCR 产物胶图

附录 D

(资料性附录)

PCR 纯化产物的克隆测序流程

D.1 纯化产物的连接

将 DNA 纯化产物 50 ng 用连接酶连接到 50 ng 载体中。具体操作方法参考连接酶说明书。

D.2 转化

D.2.1 转化平板的制备

向铺好的含有 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 相应抗生素的 LB 固体培养基表面加入 5 μL 的 IPTG(异丙基硫代半乳糖苷, 50 mg/mL)和 20 μL 的 X-Gal(5-溴-4-氯-3-吡啶- β -D-半乳糖苷, 20 mg/mL), 使用无菌的弯头玻璃棒将其均匀涂布, 避光置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 放置 1 h~3 h, 使溶解 X-Gal 的二甲基甲酰胺尽量挥发干净。

D.2.2 转化

将感受态细胞从 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱取出放于冰浴上, 取 10 μL 连接产物加入到 100 μL 刚刚解冻的感受态细胞中。轻弹混匀, 冰浴 30 min, 置于 42 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 90 s, 取出后立即置于冰浴中放置 2 min~3 min, 期间不要摇动离心管。向离心管中加入 500 μL 37 $^{\circ}\text{C}$ 预热的培养基(不含抗生素), 150 r/min、37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养 45 min。将离心管中的菌液混匀, 加到已制备好的转化平板中, 用无菌的弯头玻璃棒轻轻的将细胞均匀涂布。待平板表面干燥后, 倒置平板, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 12 h~16 h。

D.3 挑取阳性克隆

将过夜培养生长出的白色菌落可根据载体特性选择 PCR 或酶切方法鉴定插入片段是否正确。挑取判断为阳性的克隆用 5 mL LB 液体培养基(含有 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 相应抗生素), 37 $^{\circ}\text{C}$ 过夜培养后提取质粒, 送测序公司进行测序。

D.4 阳性转化子的保存

将经序列比对分析确定无污染的阳性克隆重组菌落(转化子)保存于终浓度为 15%~20% 的甘油中, 置于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冷冻保存。

附录 E
(资料性附录)
序列的有效性判断

E.1 通过原始峰图判断

见图 E.1。

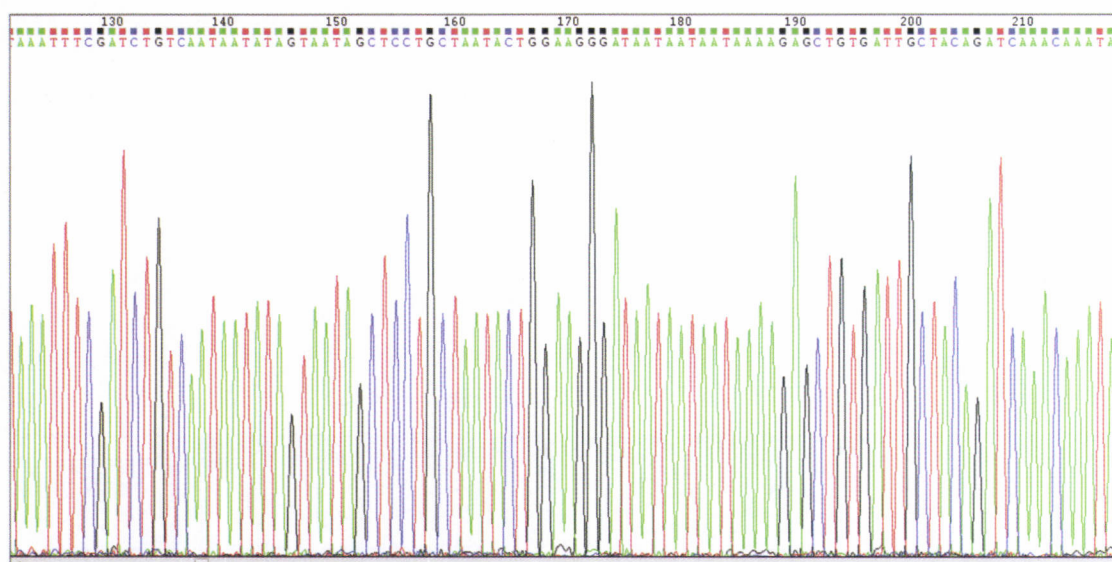


图 E.1 原始峰图

E.2 通过翻译成氨基酸判断

E.2.1 登陆网址：www.ebi.ac.uk/Tools/st/emboss_transeq。

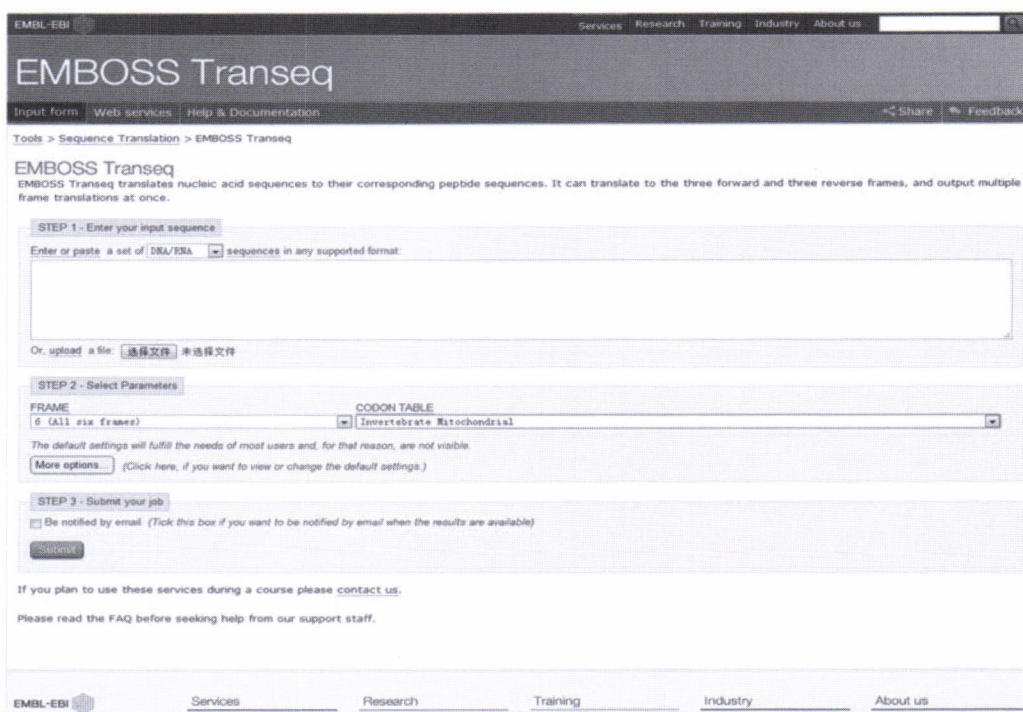


图 E.2 序列输入窗口截图

E.2.2 将序列复制至图 E.2 Step 1 中的空格处, Step 2 中的 Frame 栏中选择 6(All Frame), Co don Table 中选择“invertebrate mitochondrial”, 点击 Submit, 得到以下画面(见图 E.3)。

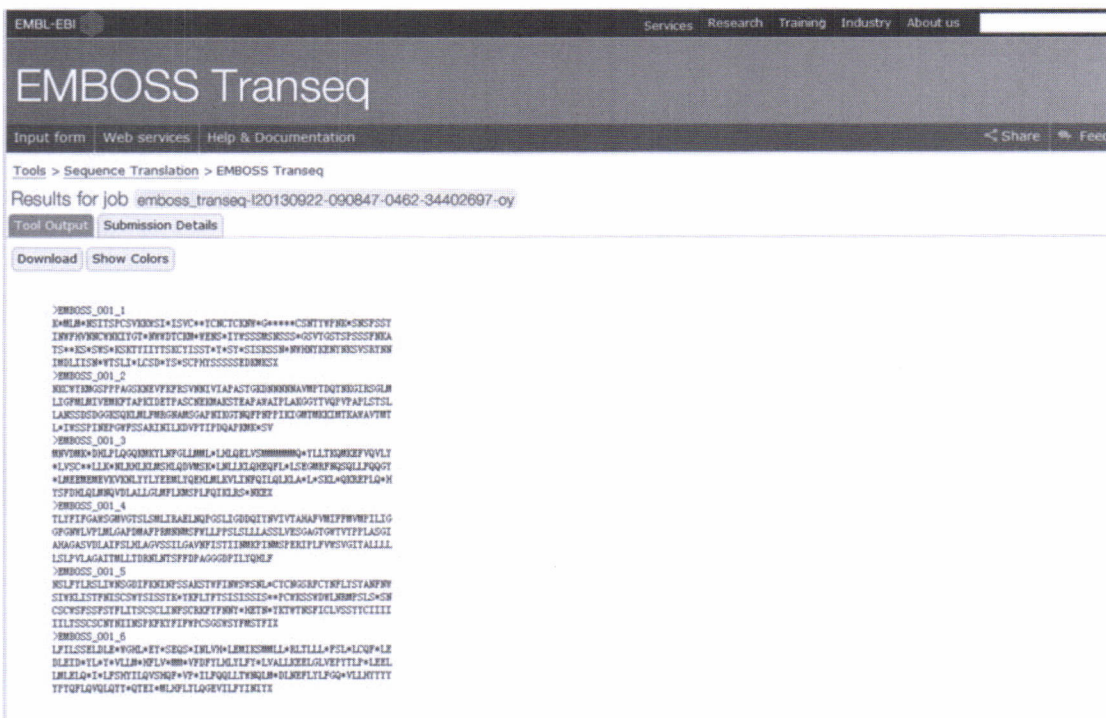


图 E.3 输出的翻译蛋白质序列窗口截图

E.2.3 给出的六条氨基酸序列中,只要有一条没有星号,能翻译通顺,即为好的序列,否则序列仅供参考。

附录 F
(规范性附录)

DNA 条形码在 BOLD 系统中物种鉴定流程

F.1 鉴定流程

F.1.1 登陆网站 <http://www.boldsystems.org>, 进入画面, 见图 F.1。



图 F.1 BOLD 登陆窗口截图

F.1.2 点击 Identification 进入以下画面, 见图 F.2。

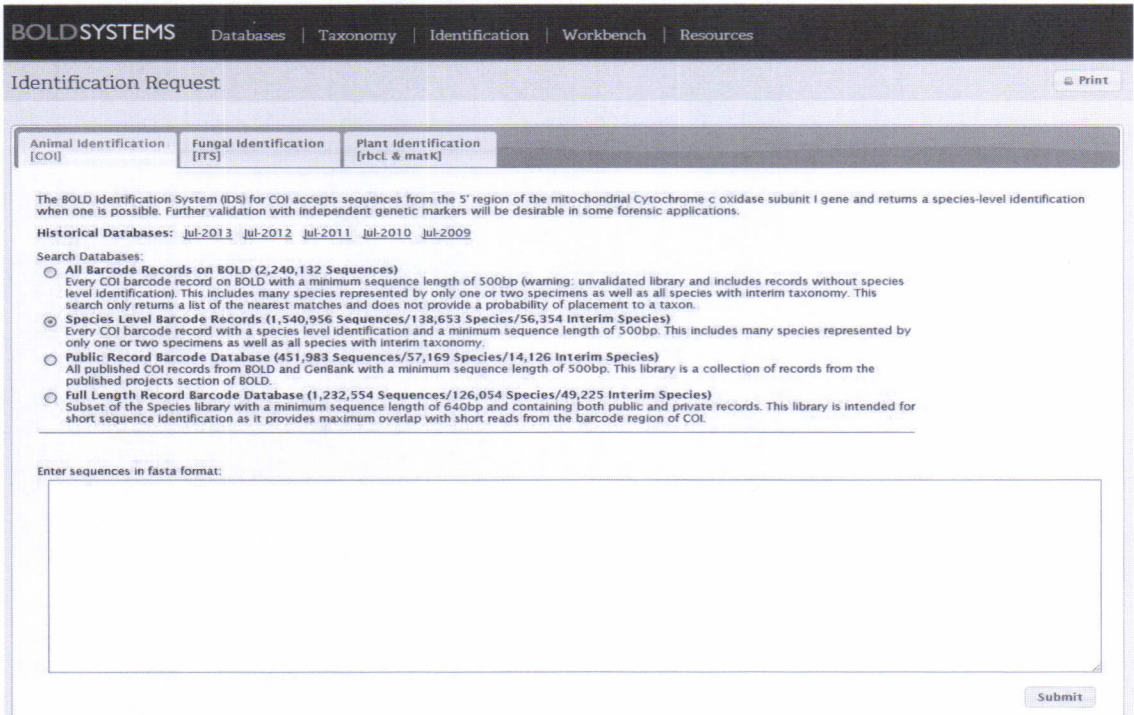


图 F.2 序列输入窗口截图

将序列以 Fasta 格式黏在上面的空格内,点击 Submit。

F.1.3 得到以下报告,见图 F.3。

Identification Summary :

Taxonomic Level	Taxon Assignment	Probability of Placement (%)
phylum	Arthropoda	100
class	Insecta	100
order	Diptera	100
family	Calliphoridae	100
genus	Calliphora	100
species	Calliphora vicina	100

图 F.3 鉴定结果窗口截图

F.2 结果判定

相似度最高且大于 99%者,直接鉴定为查询结果所示种类。小于 99%大于 98%者,需参考形态学特征进行综合判断,结论可做参考。小于 98%者,不进行种类判断。

附 录 G
(资料性附录)

红头丽蝇的 DNA 条形码鉴定参考序列

GGTCAACAAATCATAAAGATATTGGTACTTTATACTTTATTTTTTGGAGCTTGATCGGGAA
TAATTGGAACTTCATTAAGAATTCTAATTTCGAGCCGAAGTAGGACATCCTGGAGCATTAA
TTGGAGATGACCAAATTTATAATGTAATTGTTACAGCTCATGCTTTTATTATAATTTTTT
TTATAGTAATACCAATTATAATTGGAGGATTTGGTAATTGATTAGTCCCTTTAATATTAG
GAGCTCCAGATATAGCCTTCCCTCGGATAAACAATATAAGTCTCTGACTTTTACCTCCTGC
ATTAACCTTTACTATTAGTAAGTAGTATAGTAGAAAACGGAGCTGGAACAGGATGAACTG
TTTACCCACCTTTATCTTCTAATATCGCTCATGGAGGAGCTTCTGTTGATTAGCTATTT
TTTCTTTACACTTAGCAGGAATTTCTTCAATTTTAGGAGCTGTAAATTTTATTACTACAG
TTATTAATATACGATCAACAGGAATTACATTCGACCGAATACCATTATTTGTTTGATCTG
TAGTAATTACAGCTTTATTACTTTTATTATCTTTACCAGTATTAGCAGGTGCTATTACTA
TATTATTAACAGATCGAAATCTTAATACATCATTCTTTGACCCAGCAGGAGGAGGAGACC
CAATCTTGTACCAA CATTATTT **TGA TTT TTTGGTCACCCTGAAGTTA**

注：粗体斜体为引物序列，序列比对时不包括在内。BOLD 序列号为“GBDP 4486-08”。