

# 《仓储虫螨 DNA 条形码分子鉴定技术规程》 行业标准编制说明

## 一、工作简况

### （一）任务来源

仓储虫螨的快速、准确鉴定是有效防控的前提和基础。截止 2000 年，全世界已记载的仓储昆虫和螨类约 500 种，我国有 383 种，其中仓储昆虫 242 种，螨类 141 种。传统的仓储虫螨种类鉴定技术普遍以成虫形态特征为依据，很难对未成熟虫态、残损样品以及形态相似种类进行准确鉴定。DNA 条形码分子鉴定技术是通过一段标准化基因 DNA 序列的分析来实现对生物物种准确、快速鉴定的技术。为解决仓储虫螨监测预警及防控中的种类鉴定问题，因此编制该技术规程。本标准规定了仓储虫螨的 DNA 条形码鉴定方法，适用于仓储虫螨 DNA 条形码的测定、结果的比对分析和判定，服务于虫螨监测和防控。

根据《国家粮食和物资储备局办公室关于下达 2018 年第三批粮油行业标准制修订计划的通知》（〔2018〕329 号），本行业标准立项，国家粮食和物资储备局科学研究院组织逐步开展《仓储虫螨 DNA 条形码分子鉴定技术规程》行业标准的编制工作。

### （二）起草单位

本标准负责起草单位：国家粮食和物资储备局科学研究院。

本标准参加起草单位：中国农业大学、中储粮成都储藏研究院有限公司、河南工业大学、南京财经大学。

### **（三）主要工作过程**

标准编制计划下达后，积极组织行业内技术骨干成立标准起草工作组，研究和制定了标准编制工作方案，并按照标准化工作要求展开标准制定工作。

标准起草工作组收集整理国内外仓储虫螨鉴定技术的相关资料，分析比较仓储害虫及农业害虫分子鉴定的相关技术，结合仓储虫螨个体微小、种类较多的特点以及残损样品鉴定难度大的问题，参考已发布的相关规范性国家标准和行业标准，起草《仓储虫螨 DNA 条形码分子鉴定技术规程》。

具体征求意见情况如下：发送“征求意见稿”的单位数 18 个，收到“征求意见稿”后回函的单位数 17 个，收到“征求意见稿”后回函并有建议或意见的单位数 14 个，没有回函的单位数 1 个。

表 1 标准起草人员信息表

姓名	单位	分工
伍伟	国家粮食和物资储备局科学研究院	标准整体框架搭建、标准编制及相关实验的设计和组织管理工作；本标准主编。
曹阳	国家粮食和物资储备局科学研究院	标准整体框架搭建；参与标准编制。
李志红	中国农业大学	参与本标准 DNA 条形码部分的编制。
严晓平	中储粮成都储藏研究院有限公司	参与本标准 DNA 条形码部分的编制。
唐培安	南京财经大学	参与本标准 DNA 条形码部分的编制
鲁玉杰	河南工业大学	参与本标准 DNA 条形码部分的编制
邵小龙	南京财经大学	参与本标准 DNA 条形码部分的编制
吴芳	中储粮成都储藏研究院有限公司	参与本标准 DNA 条形码部分的编制编制。
汪中明	国家粮食和物资储备局科学研究院	参与本标准起草及论证工作。
张涛	国家粮食和物资储备局科学研究院	参与标准起草及论证工作。

## 二、标准的编制原则和主要内容

### （一）标准的编写原则

与相关法律法规一致，与现行有效标准相协调，同时符合我国国情。

标准编制重点围绕仓储虫螨 DNA 条形码的测定、结果的比对分析和判定的规范化操作设定相应技术规程内容。在确保仓储虫螨 DNA 条形码分子鉴定术语方法操作规范的基础上，实现仓储虫螨准确、高效、快速的鉴定。

《仓储虫螨 DNA 条形码分子鉴定技术规程》的编写格式符合 GB/T 1.1-2009《标准化工作导则 第 1 部分：标准的结构和编写》的要求。

### （二）提出本标准的依据

仓储虫螨的监测检测和防控是粮食仓储行业重要的工

作，而仓储虫螨的准确鉴定是成功控制虫害的第一步。传统的仓储虫螨种类鉴定技术普遍以成虫形态特征为依据，需要严格的专业知识学习和培训，而且很难对未成熟虫态（卵、幼虫及蛹）、残损样品以及形态相似种类进行准确鉴定。现代分子技术的发展，尤其是 DNA 条形码技术的出现和完善，为物种准确快速鉴定开辟了新方法，同时从基因水平反映物种的进化关系，在提高物种鉴定效率、发现新种和隐存种等方面具有重要应用价值。通过前期需求调研及仓储虫螨 DNA 条形码分子鉴定技术研究，制定本标准。

### **（三）制定本标准的基础**

起草组共 10 人：伍祎、曹阳、李志红、严晓平、唐培安、鲁玉杰、邵小龙、吴芳、汪中明、张涛。其中高级职称 4 人，副高级职称 6 人。

本标准起草工作组在储粮害虫 DNA 条形码分子鉴定领域一直处于国内领先地位。本起草组近几年来一直从事储粮害虫 DNA 条形码分子鉴定技术相关研究，建立优化了方法、比较筛选了通用的几个基因、分别从不同仓储虫螨进行了 DNA 条形码研究，重点开展基于 DNA 条形码分子鉴定技术的储粮害虫鉴定研究，形成了该技术的标准化操作，获得了 54 种仓储虫螨的 DAN 条形码序列数据，为仓储虫螨的准确鉴定提供技术支持。

### **（四）标准主要内容**

#### **1. 范围**

本标准规定了仓储虫螨 DNA 条形码的测定、结果的比

对分析和判定技术，适用于仓储虫螨的种类鉴定。

## 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 6682-2008 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技术规程：

### 3.1 DNA 条形码 DNA barcodes

生物体内一段短的、标准化的 DNA 片段，用于区分不同的物种。该片段在物种间有足够的变异、容易进行 PCR 扩增。

### 3.2 CO I 基因 CO I gene

线粒体基因组的蛋白编码基因，全称为细胞色素 c 氧化酶亚基 I (cytochrome c oxidase subunit I, CO I)，该片段在物种间有足够的变异、易进行 PCR 扩增且重复性好，被证实能对很多动物物种进行高效区分，是进行 DNA 条形码分子鉴定的首选目的基因。

## 4. 工作原理

根据仓储虫螨的 DNA CO I 序列特征，应用 DNA 条形码分子鉴定技术对仓储虫螨进行鉴定。通过对一段标准化基因—线粒体 CO I 序列的扩增和分析来实现对生物物种准确、快速鉴定的技术。CO I 基因在动物物种之间序列位点信息具

有足够的差异性，且能被通用引物广泛扩增，能够成功地在 DNA 水平上区分动物物种。

## 5. 仪器设备及试剂

### 5.1 仪器设备

高速冷冻离心机、微量核酸浓度检测仪、常规 PCR 扩增仪、电泳设备、凝胶成像系统、生物安全柜、高压灭菌锅、解剖镜、天平、摇床、水浴锅、制冰机、旋涡振荡器、冰箱、-80℃ 冰箱、不同量程微量移液器。

### 5.2 试剂

仓储虫螨基因组 DNA 的提取可采用市售基因组 DNA 提取试剂盒，也可采用如下自制 CTAB 基因组 DNA 提取液。CTAB 提取液：称取 4g CTAB 和 16.364 g NaCl，量取 1 mol/L Tris-HCl 20 mL 和 0.5 mol/L EDTA 8 mL，先用 70 mL 无菌双蒸水溶解，再定容至 200 mL 灭菌、冷却后，加入氯仿：异戊醇 100 mL，摇匀即可。

仓储虫螨生化试剂采用市售分子生物学生化试剂，包括酚：氯仿：异戊醇抽提液、3M pH 5.2 的 NaAc 溶液、无水乙醇、TE 缓冲液、蛋白酶 K 溶液(Proteinase K, 20mg/mL)、Taq DNA 聚合酶、脱氧核苷三磷酸(dNTPs)、引物：扩增引物（参见附录 A 表 A.1，委托生物公司合成）、DL2000：DNA 标准分子量、10×PCR 反应缓冲液、琼脂糖、1×TAE 电泳缓冲液、染色剂（EB 或市售其他染色剂）。

## 6. DNA 条形码分子鉴定

### 6.1 样品基因组 DNA 的提取

基因组 DNA 提取: 仓储虫螨单头样品 DNA 的提取可采用市售基因组 DNA 提取试剂盒, 根据其说明要求进行提取, 也可采用自制 CTAB 提取液。

自制 CTAB 提取液提取法: 取仓储虫螨单头标本 (新鲜样品为佳, 主要种类参见附录 A 表 A.2), 用双蒸水清洗干净并用滤纸吸去多余水分, 晾干样品; 将样品放入 1.5ml 离心管中, 液氮进行预冷后 (螨类不需进行此操作), 加入 400 $\mu$ l CTAB 提取缓冲液, 研碎成匀浆状; 加 5 $\mu$ l 蛋白酶 K, 56 $^{\circ}$ C 温育 1h-3h, 其间温和混匀 2-3 次; 用等体积 (400 $\mu$ l) 酚: 氯仿: 异戊醇抽提液进行抽提, 缓慢上下轻轻倒置混匀至两相混合形成乳浊液, 静置 3-5min 待其分层后 4 $^{\circ}$ C 下 12000g 离心 5min, 将上清液移至另一干净的 1.5ml 离心管; 加等体积氯仿: 异戊醇抽提液, 取上清液于 1.5ml 离心管中, 加 0.1 倍体积的 3M pH 5.2 的 NaAc 溶液, 充分混匀后加 2 倍体积 -20 $^{\circ}$ C 的无水乙醇, 缓慢上下颠倒后沉淀 10min-20min; 12000g 离心 10min, 弃上清液, 留沉淀; 加 70% 预冷的乙醇 500 $\mu$ l 混匀清洗沉淀 1-3min; 12000g 离心 2min, 弃上清, 留沉淀; 于室温倒置干燥 30min 或抽干机中干燥 3-5min, 以不见管壁上的水珠为准; 加 30 $\mu$ l TE 缓冲液, 完全溶解 DNA。检测基因组 DNA 质量后 4 $^{\circ}$ C 保存待用或 -20 $^{\circ}$ C 长期保存。

## 6.2 DNA 提取质量的检测

微量光吸收检测仪检测法: 取 1  $\mu$ L DNA 模板溶液在微量核酸浓度检测仪进行检测, PCR 级 DNA 溶液的 OD260/OD280 比值应为 1.7-1.9。

### 6.3 DNA 条形码 CO I 基因的扩增及检测

扩增的单头仓储虫螨条形码 CO I 基因，均使用通用引物对 LCO490/HCO2198(参见附录 A 表 A.1)。可自行配制 PCR 体系，也可采用市售 PCR mix 体系进行扩增。

PCR 扩增体系 50 $\mu$ L：包括 5 $\mu$ L $\times$ PCR 反应缓冲液、上下游引物各 2  $\mu$ L(引物 LCO490/HCO2198 浓度为 10 ng/ $\mu$ L)、4 $\mu$ L 的 dNTP 混合物（各 10mmol/mL）、0.5 $\mu$ L 的 Taq DNA 聚合酶 (5 U/ $\mu$ L)、20-100ng DNA 模板，用无菌双蒸水补充至总体积为 50 $\mu$ L。

PCR 扩增反应条件：94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min; 35 个循环的 94 $^{\circ}$ C 变性 50 sec，50 $^{\circ}$ C 退火 50 sec，72 $^{\circ}$ C 延伸 50 sec；72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min，4 $^{\circ}$ C 保存。

扩增结果检测：扩增完成后，取 5 $\mu$ L 扩增产物进行 1% 的琼脂糖电泳，EB 染色（或其他方法染色），凝胶成像系统观察、拍照。

### 6.4 CO I 基因序列的测定及序列处理

将获取的 PCR 反应产物进行纯化并委托 DNA 测序公司双向测序，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，质量评估以碱基的 Q 值为依据去除测序结果两端的低质量序列，应用具有序列拼接功能的常规软件（例如 DNAMAN）进行序列拼接去除两端引物序列。

## 7. 结果判断

剪切后的 CO I 基因序列长度为 620bp-680bp，登录



GenBank 数据库 BLAST 鉴定系统,在 BLAST 结果中查看序列相似性最高的物种,或运用附录 A.3 中常见的仓储虫螨数据进行相似度比较分析,当 CO I 基因序列结果与已知仓储虫螨种类基因序列相似度最高,且最大相似度大于或等于 98%时,可明确判定待鉴定的物种为该物种。若待鉴定物种相似度低于 98%,则应进行专业形态鉴定确认物种,之后获取该物种的 CO I 基因序列,作为该物种的标准 DNA 条形码序列。常见的仓储虫螨 CO I 基因序列表信息参见附录 A.3。

### 三、主要试验（或验证）情况

#### （一）主要试验或验证的分析

在粮情数据检测的基础上,选取房内外温湿度数据、粮堆温度、湿度、水分等主要技术参数指标,综合粮堆各项异性特征描述性参数、横向通风粮堆湿热传递模型、粮堆内通风速率方程、水汽迁移方程、对流传热方程、干燥速率方程、多参数粮情耦合等理论,研发出横向智能通风系统预判模型。横向智能通风系统可根据通风预断模型自动捕捉通风时机,通过粮情智能化云图分析和通风作业全程自动测控实现通风作业的自动开启、运行和关闭。

于北京市、河北省、黑龙江省、安徽省、浙江省、福建省、广西壮族自治区等地域的粮库开展不同生态储粮区、不同跨度、不同仓容、不同粮种的横向智能通风实验,对横向智能通风系统预判模型进行验证与校准、对技术进行优化、对预期经济效果进行评价。

#### （二）预期的经济效果

横向智能通风可有效减损降耗，节约成本，使用横向智能通风技术的储粮粮堆，储藏期间其粮食水分损耗小于0.3%，与现存应用较为广泛的通风系统相比，一个储粮周期可减少粮食通风水分造成的重量损失约0.5%，经济效益显著。

#### **四、与国际、国外对比情况**

本标准未涉及采用国际标准。

#### **五、与有关的现行法律、法规和强制性标准的关系**

本标准符合国家现行法律、法规、规章和强制性国家标准的要求，本标准有助于粮油储藏行业内储粮害虫领域相关法规、规章和强制性国家标准的实施。

本标准涉及、引用的相关国家及行业标准如下：

GB/T 2887 电子计算机场地通用规范

GB/T 4793 测量、控制和实验室用电气设备的安全要求

GB/T 26881 粮油储藏 通风自动控制系统基本要求

GB/T 26882 粮油储藏 粮情测控系统

GB/T 29890 粮油储藏技术规范

LS/T 1201 磷化氢环流熏蒸技术规程

LS/T 1707 粮食信息分类与编码

#### **六、重大分歧意见的处理经过和依据**

本标准在制定过程中未出现重大分歧意见。

#### **七、标准性质的建议说明**

本标准为粮食储藏行业标准技术委员会采用，建议作为推荐性标准发布实施。

## **八、贯彻标准的要求和措施建议**

本标准针对粮油储藏行业储粮虫螨鉴定制定的行业标准，为推荐性标准，在组织上建议在我国粮食储藏行业中应用实施本标准。并将实施过程中出现的问题和好的改进建议反馈起草小组，以便进一步对本标准修订完善。

在技术上，本标准在实施过程中，按照本标准给出的仪器设备及试剂、DNA 条形码分子鉴定和结果判定等对储粮虫螨鉴定进行规范。通过本标准的实施，尽可能实现在整个粮油储藏行业内储粮虫螨鉴定领域的规范性、共享性、综合性和一致性。

## **九、废止现行有关标准的建议**

本标准不涉及对现行标准的废止。

## **十、其他应予说明的事项**

无。