

LS

中华人民共和国粮食行业标准

LS/T XXXXX—XXXX

## 仓储虫螨 DNA 条形码分子鉴定技术规程

Technical regulations for molecular identifying common stored-product pests and mites with DNA barcode

(征求意见稿)

XXXX - XX - XX 发布

XXXX - XX - XX 实施

国家粮食和物资储备局 发布

## 目 次

前言.....	II
1 范围.....	1
2 规范性引用文件.....	1
3 术语和定义.....	1
4 工作原理.....	1
5 仪器设备及试剂.....	1
6 DNA 条形码分子鉴定.....	2
7 结果判断.....	3
附 录 A（资料性附录）.....	4

## 前 言

本标准按照 GB/T 1.1-2009 给出的规则起草。

本标准由国家粮食和物资储备局提出。

本标准由全国粮油标准化技术委员会（SAC/TC 270）归口。

本标准起草单位：国家粮食和物资储备局科学研究院、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。

本标准主要起草人：

# 仓储虫螨 DNA 条形码分子鉴定技术规程

## 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

### 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 400μl CTAB 提取缓冲液，研碎成匀浆状；加 5μl 蛋白酶 K，56℃温育 1h-3h，其间温和混匀 2-3 次；用等体积 (400μl) 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℃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℃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 500μl 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 30μl TE 缓冲液，完全溶解 DNA。检测基因组 DNA 质量后 4℃保存待用或-20℃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 μL 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 COI 基因的扩增及检测

扩增的单头仓储虫螨条形码 COI 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 50μL：包括 5μL×PCR 反应缓冲液、上下游引物各 2 μL(引物 LCO490/HCO2198 浓度为 10 ng/μL)、4μL 的 dNTP 混合物 (各 10mmol/mL)、0.5μL 的 Taq DNA 聚合酶 (5 U/μL)、20-100ng DNA 模板，用无菌双蒸水补充至总体积为 50μL。

PCR 扩增反应条件：94℃预变性 4 min；35 个循环的 94℃变性 50 sec，50℃退火 50 sec，72℃延伸 50 sec；72℃延伸 5 min，4℃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 COI 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。

附 录 A  
(资料性附录)

## A.1 DNA 条形码分子鉴定所用引物

表 A1 PCR 扩增虫螨 DNA 条形码 COI 片段的引物序列

引物	扩增长度	序列
LCO-1490	658bp	5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3'
HCO-2198		5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3'

## A.2 本技术规程选用的 54 种仓储虫螨

表 A.2 54 种仓储虫螨样品一览表

代 码 标号	种 类	地 理 种 群 缩 写	样 本 量	样 本 量 总 计 (头)
1	麦蛾 <i>Sitotroga cereatella</i> (Olivier)	广西田东 GXTD1、江西九江 JXJJ 3、重庆万州 CQWZ 1	5	5
2	印度谷螟 <i>Plodia interpunctella</i> (Huebner)	新疆昌吉(饲) XJJC 3	3	5
3	杂拟谷盗 <i>Tribolium confusum</i> Jacquelin du Val	广东(饲) GD 3、广东顺德 GDSD 2	2	5
4	赤拟谷盗 <i>Tribolium castaneum</i> Herbst	广西宁夏(饲) GXNX 5、广西田东 GXTD 1、重庆上桥 CQSQ 1、广东顺德 GDSD 1、福建杜乌 FJDW 1、海南海口白水 HKBS 1、海口东方 HKDF 1、云南昆明 YNKM1	1	12
5	亚扁粉盗 <i>Palorus subdepressus</i>	广东肇庆 GDZQ 3、福建厦门 FJXM 3、福建龙岩 FJLY 3 浙江温州 ZJWZ 3、广东江门 GDJM 3、广东梅州 GDMZ3 广东中山 GDZS 3	3	21
6	姬粉盗 <i>Palorus ratzeburgi</i>	福建龙岩 FJLY 3、陕西杨凌 SXYL 3、广西柳州 GXLZ 3 广东江门 GDJM 3、广东汕尾 GDSW 3、广东中山 GDZS 3 广东深圳 GDSZ 3	3	21
7	小粉盗 <i>Palorus cerylonoides</i>	福建厦门 FJXM 3、福建漳州 FJZZ 3	3	6

8	黄粉虫 <i>Tenebrio molitor</i>	山东滨州 SDBZ 2	2
9	二带黑菌虫 <i>Alphitophagus bifasciatus</i>	河南郑州 HNZZ 2	2
10	仓潜 <i>Mesomorpha villiger</i>	河南郑州 HNZZ 2	2
11	欧洲谷蛾 <i>Nemapogon granella</i>	河北 5	5
12	锯谷盗 <i>Oryzaephilus surinamensis</i> (Linnaeus)	广西北海 (1-3 饲) GXBH 6、重庆万州 CQWZ1、重庆上桥 CQSQ 1、重庆铜梁 CQTL1、海南海口白水 HKBS 1、海南海口东方 HKDF 1、新疆昌吉 XJJC 1	12
13	米扁虫 <i>Ahasverus advena</i> (Waltl)	海南海口 HNHK 5	5
14	锈赤扁谷盗 <i>Cryptolestes ferrugineus</i> (Stephens)	广西宁夏 (1-2 饲) GXNX 4、江西九江 JXJJ 1、广西田东 GXTD 1、重庆万州 CQWZ 1、重庆上桥 CQSQ 2、广东顺德 GDSZ 1、海南海口白水 HKBS 1、云南昆明 YNKM 1、辽宁大连 LNDL 1、河南开封 HNKF 1、福建鳌峰州 FJAF 1、重庆铜梁 CQTL 1、广西南宁 GXNN 1、广东湛江 GDZJ 1、广东深圳 GDSZ 1、山东济宁 SDJN 3、广西北海 GXBH 2、捷克 CZ 1、美国 USA 1	26
15	长角扁谷盗 <i>Cryptolestes pusillus</i> (SchÖnherr)	广东湛江 (饲) GDZJ 3、海南海口 HNHK 2、湖北武汉 HBWH 2、捷克 CZ 1、美国 USA 1	9
16	土耳其扁谷盗 <i>Cryptolestes turcicus</i> (Grouville)	广东广州 (饲) GDGZ3、河南商丘 HNSQ 1、捷克 CZ 1	5
17	微扁谷盗 <i>Cryptolestes pusilloides</i>	云南泸西 YNLX 5	5
18	谷蠹 <i>Rhyzopertha dominica</i> (Fabricius)	四川成都所 (饲) SCCD 2、四川金堂 SCJT 3、江西九江 JXJJ 1、广西田东 GXTD 1、重庆铜梁 CQTL 1、海南海口白水 HKBS 1、	11
19	花斑皮蠹 <i>Trogoderma variabile</i> Ballion	北京 (饲) BJ 5	5
20	黑毛皮蠹 <i>Attagenus unicolor japonicus</i> Reitter	北京 1	1
21	烟草甲 <i>Lasioderma serricorne</i> (Fabricius)	北京 (饲) BJ 3、云南昆明 YNKM 2	5
22	药材甲 <i>Stegobium paniceum</i> (Linnaeus)	四川成都 SCCD5	5
23	米象 <i>Sitophilus oryzae</i> (Linnaeus)	澳大利亚 (饲) AU 4、四川成都所 (饲) SCCD 3、江西九江 JXJJ 1、重庆铜梁 CQTL 1、四川金堂 SCJT 2	11

24	玉米象 <i>Sitophilus zeamais</i> (MotschμLsky)	广东广州 GDGZ 3 饲养、广西田东 GXTD 2	5
25	<i>Typhaea decipiens</i>	江西樟树 JXZS 1、辽宁营口 LNYK 2、新疆 XJ、	7
26	脊胸露尾甲 <i>Carpophilus dimidiatus</i> (Fabricius)	海南海口 HNHK 6	6
27	小露尾甲 <i>Carpophilus pilosellus</i> (MotschμLsky)	江西九江 3	3
28	干果露尾甲 <i>Carpophilus mutilates</i> Erichson	海南海口 HNHK 1	1
29	酱曲露尾甲 <i>Carpophilus hemipterus</i>	海南海口 HNHK 1	1
30	绿豆象 <i>Callosobruchus chinensis</i> (Linnaeus)	北京(饲) BJ 5	5
31	四纹豆象 <i>Callosobruchus maculatus</i>	江苏南京 JSNJ 2、广东广州 GDGZ 1、重庆北碚 CQBB 2 江苏苏州 JSSZ 1、福建福州 FJFZ 1、广西南宁 GXNN 1 贵州贵阳 GZGY 1、云南昆明 YNKM 1	
32	菜豆象 <i>Acanthoscelides obtectus</i>	云南昆明 YNKM3	3
33	黄色仓花蝽 <i>Xylocoris flavipes</i>	江西九江 JXJJ 3、广西田东 GXTD 3、	6
34	束翅叉胸花蝽 <i>Amphiareus constrictus</i>	海南海口 5	5
35	米象金小蜂 <i>Lariophagus distinguendus</i> Forster	广西南宁 GXNN 5	5
36	嗜虫书虱 <i>Liposcelis entomophila</i>	北京 BJ 1, 重庆 CQ 1, 广西黄梁梦 HLM 1, 云南丽江 LJ 1, 山东泰安 TA 1, 湖北武汉 WH 1, 河北正定 ZD 1, 克罗地亚 HR 1, 捷克中波西米亚 CB 1, 美国堪萨斯 KS 1, 英国 UK 1	11
37	嗜卷书虱 <i>Liposcelis bostrychophila</i>	重庆 CQ 1, 北京 BJ 1, 广西黄梁梦 HLM 1, 广东新沙港 XSG 1, 河南郑州 ZZ 1, 捷克中波西米亚 CB 1, 捷克东波西米亚 EB 1	7
38	无色书虱 <i>Liposcelis decolor</i>	重庆 CQ 2, 云南丽江 LJ 1, 捷克中波西米亚 CB 1, 美国堪萨斯 KS 1	5
39	小眼书虱 <i>Liposcelis paeta</i>	山东曹县 CX 1, 贵州 GZ 1, 河南南阳 NY 1, 河北石家庄 SJZ 1, 山东泰安 TA 1, 湖北武汉 WH 1, 浙江 ZJ 1, 捷克中波西米亚 CB 1, 克罗地亚 HR 1, 美国堪萨斯 KS 1	10

40	啮书虱 <i>Liposcelis corrodens</i>	捷克中波西米亚 CB 1, 克罗地亚 HR 1, 美国堪萨斯 KS 1, 葡萄牙 PT 1, 英国 HK 1	5
41	暗褐书虱 <i>Liposcelis brunnea</i>	捷克中波西米亚 CB 3, 美国堪萨斯, KS 2	5
42	虚伪书虱 <i>Liposcelis mendax</i>	中国江苏盐城 YC 5	5
43	皮氏书虱 <i>Liposcelis pearmani</i>	美国堪萨斯 KS 5	5
44	三色书虱 <i>Liposcelis tricolor</i>	中国山东菏泽 HZ 5	5
45	红书虱 <i>Liposcelis rufa</i>	美国堪萨斯 KS 5	5
46	<i>Liposcelis silvarum</i>	克罗地亚 HR 5	5
47	线嗜酪螨 <i>Tyroborus lini</i> <i>Oudemans</i>	捷克农作物研究所 CZ 5	5
48	椭圆食粉螨 <i>Aleuroglyphus</i> <i>ovatus</i> (Troupeau)	捷克农作物研究所 CZ 5	5
49	拱殖嗜渣螨 <i>Chortoglyphus</i> <i>arcuatus</i> (Troupeau)	捷克农作物研究所 CZ 5	5
50	家食甜螨 <i>Glycyphagus</i> <i>domesticus</i> (De Geer)	捷克农作物研究所 CZ 5	5
51	马六甲肉食螨 <i>Cheyletus malaccensis</i> Oudemans	中国海南海口 HNHK 10	10
52	普通肉食螨 <i>Cheyletus eruditus</i> , Schränk	捷克农作物研究所 CZ 5	5
53	美洲室尘螨 <i>Dermatophagoides</i> <i>farine</i>	捷克农作物研究所 CZ 5	5
54	粗脚粉螨 <i>Acarus siro</i>	中国海南海口 HNHK 5	5

### A.3 54 种仓储虫螨 DNA 条形码序列列表

附件 A.3 54 种仓储虫螨 DNA 条形码序列列表（单独附件）