**ICS**

**CCS B**

**DB61**

陕西省地方标准

**DB61/T ××××—2023**

外来入侵昆虫种类的分子鉴定技术规范

Technical specification for species identification of small invasive insect based on DNA-biocoding

（征求意见稿）

202**×**–**××**–**××**发布 202**×**–**××**–**××**实施

陕西省市场监督管理局 发布

目  次

[目  次 I](#_Toc21543)

[前  言 II](#_Toc26231)

[1 范围 1](#_Toc8575)

[2 规范性引用文件 1](#_Toc2605)

[3 术语和定义 1](#_Toc29629)

[4 方法原理 1](#_Toc14706)

[5 仪器设备、试剂与实验准备 1](#_Toc22935)

[6 鉴定方法 2](#_Toc31752)

[附录A 3](#_Toc18441)

[附录B 4](#_Toc22070)

[附录C 5](#_Toc28816)

[附录D 6](#_Toc16530)

[附录E 7](#_Toc27208)

前  言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

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专利的责任。

本文件由陕西省农业农村厅提出并归口。

本文件起草单位：西北农林科技大学、榆林市榆阳区孟家湾区域农业技术推广站。

本文件主要起草人：张皓、胡想顺、刘彦飞、刘焕星、杨杰、刘小凤、李苗苗、陈艳芬。

本文件首次发布。

本文件由西北农林科技大学负责解释。

联系信息如下：

单位：西北农林科技大学

电话：029-87082809

地址：陕西省杨凌农业高新技术产业示范区邰城路3号

邮编：712100

外来入侵昆虫种类的分子鉴定技术规范

1. 范围

本文件规定了外来入侵昆虫的田间调查、取样和分子鉴定等要求。

本文件适用于外来入侵昆虫种类的分子鉴定。

1. 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅对该日期对应的版本适用于本文件。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。

GB19489 实验室生物安全通用要求

SN/T 1876 医用媒介生物标本采集、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

SN/T 4278 国境口岸医学媒介昆虫DNA条形码鉴定操作规程

WS/T 230 临床诊断中聚合酶链反应（PCR）技术的应用

1. 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1 *COⅠ* 基因 *COⅠ* gene

COⅠ 基因即线粒体细胞色素C氧化酶亚基Ⅰ基因(Cytochrome c oxidase I,COI)，它的突变速度较核DNA快，使物种分离更为准确，且其DNA序列本身很少存在插入和缺失,使序列比对容易操作，可应用于相近物种鉴定。

3.2 *ITS2*基因 *ITS2* gene

ITS2基因核糖体内转录间隔区2，变异速度适中，能够提供较丰富的变异位点和信息位点，位于5.8S与28S之间，可应用于种团、复合体之间进行鉴定。

1. 方法原理

基于线粒体*COⅠ* 基因序列对外来入侵害虫进行鉴定，确定种内差异、种间差异，结合核糖体*ITS2*基因对种团、复合组进行鉴定。

1. 仪器设备、试剂与实验准备

5.1 仪器设备

生物安全柜、高压灭菌锅、离心机、微量分光光度仪、PCR仪、电泳设备、凝胶成像系统等。

5.2 主要试剂

动物组织基因组DNA提取试剂盒、PCR Premix、超纯水、DNA标准分子量标（DL2000）。

5.3 实验准备

实验室生物安全符合GB 19489和SN/T 2752.4的规定；PCR防污染措施遵照WS/T 230的要求执行。

1. 鉴定方法

6.1 取样

标本样品经过冷冻或乙醚麻醉，死后取成批同种样品的单份标本、珍稀单份标本取对称一侧组织（如单侧昆虫足）置于灭菌的洁净1.5 mL离心管留用，如长期不用需放置体积分数为90%以上乙醇-20℃保存。标本的其他同种个体或部分针插为凭证标本。

6.2 凭证标本制作

将取样后的标本制作成凭证标本，标本的制作按照SN/T 1876的要求执行。

6.3 DNA制备

将单份样品（成虫、幼虫、蛹）置于灭菌的洁净1.5 mL离心管后用研磨棒研磨，利用商品化昆虫DNA提取试剂盒进行昆虫基因组提取（样品为单只昆虫的，可去掉头部后再研磨）；样品为少量对称一侧组织（单侧虫足）置于灭菌的洁净1.5 mL离心管后用研磨棒研磨，利用微量组织DNA提取方法（见附录A）进行昆虫基因组的制备，制备好的DNA进行浓度及纯度测定后，保存至-20℃冰箱备用。

6.4 *COⅠ* 序列扩增

利用通用引物进行*COⅠ* 序列扩增（见附录B）、测序，测序结果在NCBI官网进行比对（见附录C）。

6.5 *ITS2* 序列扩增

根据序列*COⅠ* 结果鉴定困难的，同时属于同一种团、复合组目录（见附录D）中的昆虫种类可以通过*ITS2* 通用引物进行扩增（见附录E）、测序，测序结果在NCBI官网进行比对（见附录C）。

6.6 结果判定

*COⅠ* 序列长度电泳条带在750 bp左右，*ITS2* 序列长度电泳条带在500 bp左右，在NCBI官网进行比对，若与数据库中昆虫种序列同源性大于等于98%，则判定该昆虫种和数据库中的昆虫种为同一种。也可以在BOLD比对，具体按SN/T 4278规定执行。

6.7 样本保藏

对同一批中相同形态特征的昆虫种数量较多的情况下，除了作为核酸提取的标本外，其他根据SN/T 1876进行标本制作和保存，提取后核酸和扩增产物除一部分测序外，剩下的分别做好标记并保存与-80℃超低温冰箱作为凭证样本，以便复核。

附录A

（资料性）

微量组织DNA提取方法

A.1 配置裂解液

配置100 mL裂解液（10 mmol/L Tris-HCl PH 8.0，1 mmol/L EDTA，1% Nonidet P-40，100 u g/mL 蛋白酶K）。

A.2 热裂解

吸取35 μL 儿裂解液，加样匀浆，加35 μL ddH2O，煮沸5 min。

A.3 离心

10000 r/min 离心10min，取上清备用。

附录B

（规范性）

*COⅠ*序列扩增流程

B.1 引物序列

LCO-1490：5′-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3′、

HCO-2198：5′-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3′

B.2 PCR体系

推荐用50 μL体系，引物浓度为10 μM，模板可用提取的昆虫 DNA 10-100 ng，可用商品化的PCR mix。

B.3 扩增程序

第一步：94℃ 5min；

第二步：95℃ 30s，46℃ 30s，72℃ 40s，35个循环；

第三步：72℃ 7min。

B.4 电泳及测序

5 μL PCR产物，质量浓度为1.5%琼脂糖，PCR产物大小：约750 bp。测序引物为LCO-1490或HCO-2198，双向测序。

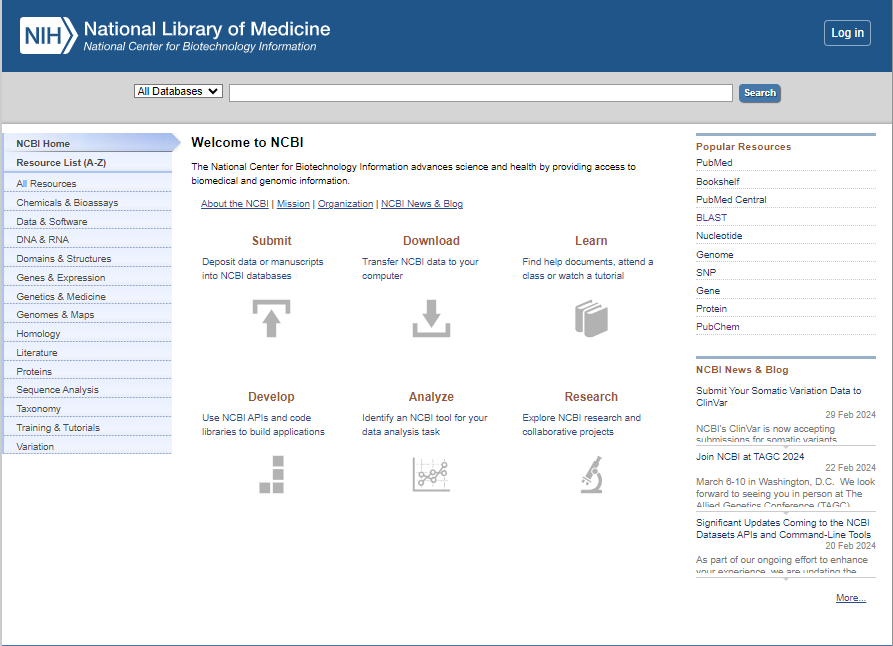
附录C

（资料性）

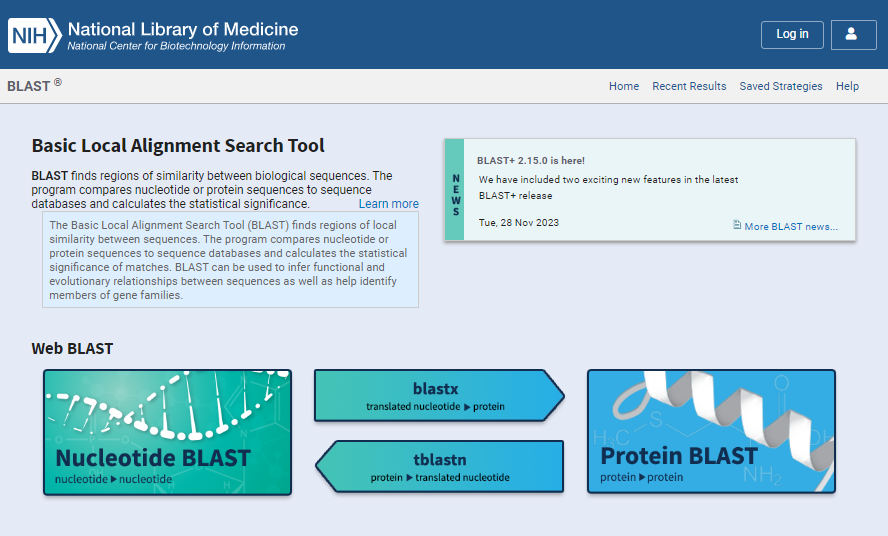
序列比对

C.1 进入网站

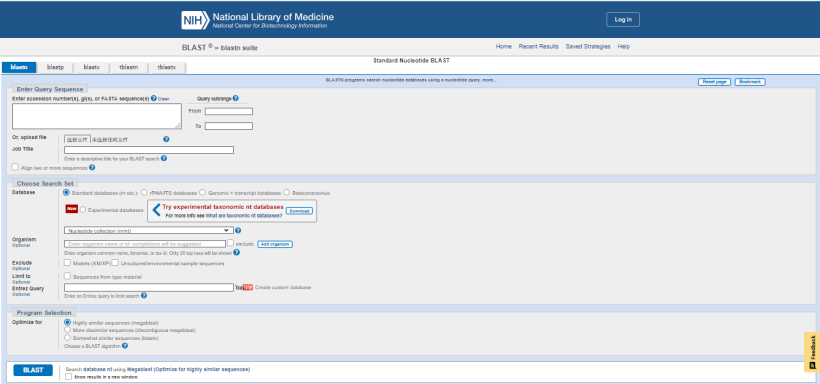
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>，进入网站主页；



C.2 点击BLAST，选择Nucleotide BLAST



C.3 提交序列



输入序列，点击BLAST，提交鉴定。

附录D

（资料性）

陕西省常见的外来入侵物种

|  |  |
| --- | --- |
| 中文名 | 拉丁学名 |
| 西花蓟马 | *Frankliniella occidentalis* |
| 南美斑潜蝇 | *Liriomyza huidobrensis* |
| 美洲斑潜蝇 | *Liriomyza sativae* |
| 苜蓿籽蜂 | *Bruchophagus gibbus* |
| 烟粉虱 | *Tobacco whitefly* |
| 二斑叶螨 | *Tetranychus urticae* |
| 番茄潜叶蛾 | *Tuta absoluta* |

附录E

（资料性）

ITS2基因扩增程序

E1. 引物序列

ITS2F 5′-TGTGAACTGCAGGACACATG-3′-

ITS2R 5′-AATGCTTAAATTTAGGGGGTA-3′

E2. PCR体系及扩增程序

推荐用50 μL体系，引物浓度为10 μM，模板可用提取的昆虫 DNA 10-100 ng，可用商品化的PCR mix。

E.3 扩增程序

第一步：94℃ 5min；

第二步：95℃ 30s，46℃ 30s，72℃ 40s，35个循环；

第三步：72℃ 7min。

E.4 电泳测序

5 μL PCR产物，质量浓度为1.5%琼脂糖，PCR产物大小：约500 bp。测序引物为ITS2F或ITS2R，双向测序。