

## 中华人民共和国卫生行业标准

WS/T 594—2018

---

### 蝇类抗药性检测方法 家蝇不敏感乙酰胆碱 酯酶等位基因检测法

Test methods of fly resistance to insecticides-A molecular method for detecting  
insensitive ace allele in the *Musca domestica*

2018 - 03 - 01 发布

2018 - 08 - 01 实施

中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会发布

## 前 言

本标准按照GB/T 1.1—2009给出的规则起草。

本标准主要起草单位：中国科学院动物研究所、北京市疾病预防控制中心、扬州大学、中国疾病预防控制中心传染病预防控制所、中国农业大学、中国人民解放军军事科学院军事医学研究院微生物流行病学研究所、上海市疾病预防控制中心。

本标准主要起草人：邱星辉、李梅、曾晓芃、钱坤、周小洁、李静、刘起勇、高希武、赵彤言、冷培恩。

# 蝇类抗药性检测方法 家蝇不敏感乙酰胆碱酯酶等位基因检测法

## 1 范围

本标准规定了家蝇不敏感乙酰胆碱酯酶等位基因的检测方法。  
本标准适用于家蝇乙酰胆碱酯酶第342氨基酸位点基因型的检测。

## 2 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

### 2.1

**乙酰胆碱酯酶** acetyl cholinesterase

存在于生物体的一种水解酶，由乙酰胆碱酯酶基因*ace*编码。

### 2.2

**等位基因** allele

存在于同一物种的相同基因的不同形式互称为等位基因。

### 2.3

**342G、342V 和 342A**

342G、342V和342A分别表示家蝇乙酰胆碱酯酶第342氨基酸残基位点上的氨基酸为甘氨酸（Gly）、缬氨酸（Val）和丙氨酸（Ala）。

## 3 样本采集

采用诱捕或网捕等方法从现场采集家蝇成虫内，浸泡在100%乙醇溶液中带回实验室。浸泡样品可在4℃条件下短期（6个月内）保存，可在-20℃以下长期保存。

## 4 引物

引物F的序列为CGGTGCATTTGGGTTTCTAC，引物R的序列为CGTAACCGCTAAGATCTGCTG。引物设计参照附录A。配制为10 μmol/L浓度，保存于-20℃冰柜。

## 5 仪器设备

5.1 PCR（聚合酶链式反应）仪。

5.2 琼脂糖凝胶电泳仪。

5.3 凝胶成像仪。

5.4 恒温水浴锅。

## 6 主要试剂

6.1 DNA聚合酶（Taq酶）。

6.2 限制性内切酶Bsp1286I。

6.3 限制性内切酶Eae I。

## 7 操作步骤

7.1 在PCR管中加入10×PCR缓冲液（含100 mmol/L Tris-HCl, 500 mmol/L KCl, 15 mmol/L MgCl<sub>2</sub>）2.5 μL, dNTP（2.5 mmol/L）2.0 μL, 引物F 0.5 μL, 引物R 0.5 μL, 单头家蝇的基因组DNA 1 μL（100 ng~300 ng, 提取方法可参见附录B, 也可用商售的DNA提取试剂盒或其他类似方法提取）和Taq酶（2~5个单位），用灭菌水补齐至25 μL, 混匀。

7.2 将PCR管放入PCR仪中, 设置PCR反应程序为：94℃ 3 min; 94℃ 30 s, 50℃ 30 s, 72℃ 30 s, 35个循环; 72℃ 10 min。运行程序。

7.3 PCR运行结束后, 取5 μL PCR产物在1.5%的琼脂糖凝胶上进行电泳, 电压设定在160 V, 电泳20 min后在紫外光下检测, 有清楚单一的609bp的条带的PCR产物用于进行以下酶切反应。

7.4 取合格样品（即电泳检测产物为609bp）的PCR产物设置两个酶切反应, 反应A用Bsp1286I酶、反应B用Eae I酶进行酶切, 酶切反应体系的设置根据酶产品的使用说明进行（参见附录C）。

7.5 将酶切后的产物上样在1.5%的琼脂糖凝胶上, 电压设定在160 V, 电泳20 min后在紫外光下检测。

## 8 基因型确定

根据酶切产物的电泳结果（参见附录D），确定家蝇个体的乙酰胆碱酯酶的基因型，见表1。

表1 家蝇个体乙酰胆碱酯酶的基因型确定

反应 I（加 Bsp1286I 酶切）	反应 II（加 Eae I 酶切）	乙酰胆碱酯酶 342 氨基酸位点基因型
361bp、248bp	609bp	敏感型纯合子（G/G）
609bp	609bp	不敏感 I 型纯合子（V/V）
609bp	361bp、248bp	不敏感 II 型纯合子（A/A）
609bp、361bp、248bp	609bp	不敏感 I 型/敏感型杂合子（G/V）
609bp、361bp、248bp	609bp、361bp、248bp	不敏感 II 型/敏感型杂合子（G/A）
609bp	609bp、361bp、248bp	不敏感 I 型/不敏感 II 型杂合子（V/A）

注：G 表示氨基酸残基为 Gly（甘氨酸）；V 表示氨基酸残基为 Val（缬氨酸）；A 表示氨基酸残基为 Aal（丙氨酸）。

附 录 A  
(资料性附录)  
引物设计参照序列

342V	<u>CGGTGCATTTGGGTTTCTACATCTTTCACCGTTATGCCAGGTTTTGAAGAAGAAGCTCC</u>
342A	<u>CGGTGCATTTGGGTTTCTACATCTTTCACCGTTATGCCAGGTTTTGAAGAAGAAGCTCC</u>
342G	<u>CGGTGCATTTGGGTTTCTACATCTTTCACCGTTATGCCAGGTTTTGAAGAAGAAGCTCC</u>
342V	CGGCAACGTGGGTCTTTGGGATCAGGCCTTGGCCTTGCCTTGGCTGAAGGAGAATGCCCG
342A	CGGCAACGTGGGCTCTGGGATCAGGCCTTGGCCTTGCCTTGGCTTAAGGAGAATGCCCG
342G	CGGCAACGTGGGCTTTGGGATCAGGCCTTGGCCTTGCCTTGGCTGAAGGAGAATGCCCG
342V	TGCATTTGGCGGCAATCCGGAATGGATGACGCTGTTTGGTGAATCGGCTGGTTCGAGTTC
342A	TGCATTTGGCGGCAATCCGGAATGGATGACGCTGTTTGGTGAATCGGCTGGTTCGAGTTC
342G	TGCATTTGGCGGCGATCCCGAATGGATGACGCTGTTTGGTGAATCGGCTGGTTCGAGTTC
342V	CGTGAATGCTCAACTGATGTCGCCGTAACGCGTGGCCTGGTCAAACGTGGTATGATGCA
342A	CGTGAATGCTCAACTGATGTCGCCGTAACGCGTGGCCTGGTCAAACGTGGCATGATGCA
342G	CGTGAATGCTCAACTGATGTCGCCGTAACGCGTGGCCTTGTCAAACGTGGCATGATGCA
342V	GTCGGTCAACAATGAATGCTCCCTGGAGCCACATGACATCAGAGAAGGCGGTTGAAATTGG
342A	GTCGGCCACAATGAATGCTCCCTGGAGCCACATGACATCAGAGAAGGCGGTTGAAATTGG
342G	GTCGGCACAATGAATGCTCCCTGGAGCCACATGACATCAGAGAAGGCGGTTGAAATTGG
342V	TAAAGCTTTGGTAAATGACTGTAAGTGAATGCCTCATTGTTACCGGTAAGCAGTGGAGT
342A	TAAAGCTTTGGTAAATGACTGTAAGTGAATGCCTCATTGTTACCGGTAAGCAGTGGAGT
342G	TAAAGCTTTGGTAAATGACTGTAAGTGAATGCCTCATTGTTACCGGTAAGCAGTGGAGT
342V	ATTTATGCGACTATACGAATTTTTCTTTGCTGATGAATTTTATTTTCTCTTTTTTGTGT
342A	ATTTATGCGACTATACGAATTTTTCTTTGCTGATGAATTTTATTTTCTCTTTTTTGTGT
342G	ATTTATGCGATTACACGAATTATTCTTTGCTGATGAATTTTATTTTCTCTTTTTTGTGT
342V	TTTCAACTTAGGAAAATCCACAAGCTGTCATGGCTTGCATGCGACAGGTTGATGCGAAAA
342A	TTTCAACTTAGGAAAATCCACAAGCTGTCATGGCTTGCATGCGACAGGTTGATGCGAAAA
342G	TTTCAACTTAGGAAAATCCCAAGCTGTCATGGCTTGCATGCGACAGGTTGATGCGAAAA
342V	CAATTTCTGTCCAACAATGGAAGTCTGATTTCTGGAATTTAAGTTATCCCTCGGCCCAA
342A	CAATTTCTGTCCAACAATGGAAGTCTGATTTCTGGAATTTAAGTTATCCCTCGGCCCAA
342G	CAATTTCTGTCCAACAATGGAAGTCTGATTTCTGGAATTTAAGTTTCCCTCGGCCCAA
342V	CTATAGATGGAGCATTTTTGCCCGCAGATCCAATGACACTGTTGAAAACAGCAGATCTTA

342A	CTATAGATGGAGCATT TTTTGCCCGCAGATCCAATGACACTGTTGAAAAACAGCAGATCTTA
342G	CTATAGATGGTGCATT TTTTGCCCGCAGATCCAATGACACTGTTGAAAAACAGCAGATCTTA
342V	<u>GCGGTACG</u>
342A	<u>GCGGTACG</u>
342G	<u>GCGGTACG</u>

注：下划线分别对应上游引物与下游引物序列(反向互补)；方框内为编码342位氨基酸的密码子。

附 录 B  
(资料性附录)  
家蝇基因组 DNA 提取方法

- B.1 取单头家蝇, 去除腹部后置于 1.5mL 体积的离心管 (eppendorf 管) 中, 加入 0.5 mL 新鲜配制的裂解液 (含 100 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 10 mmol/L EDTA, 50 mmol/L NaCl, 1% SDS, 0.15 mmol/L 精胺, 0.5 mmol/L 亚精胺 和 2 U/mL 的蛋白酶K), 碾磨将虫体捣碎, 置 60 °C 温浴, 20 min 后取出。
- B.2 加入 75  $\mu$ L 的 8 M 醋酸钾, 混匀, 置冰上 10 min。
- B.3 14000 g 离心 5 min, 取 400  $\mu$ L 上清液转至新的离心管。
- B.4 加入 800  $\mu$ L 冰冷的 100% 乙醇, 室温放置 10 min
- B.5 离心 10 min, 弃上清, 离心沉淀用 500  $\mu$ L 的 70% 乙醇清洗。
- B.6 离心 5 min, 沉淀干燥后 (可置超净台中, 开通风), 加入 50  $\mu$ L 灭菌水或 TE 缓冲液 (10 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA, pH=8.0) 中溶解。提取的 DNA 样品可直接用于 PCR。样品保存 4 °C 备用, 也可于 -20 °C 中长期保存。

附 录 C  
(资料性附录)  
酶切体系设置范例

C.1 酶切反应体系的设置见表C.1。

表C.1 酶切反应体系

成分	10×NEBuffer 4	100×BSA	Bsp1286I	Eae I	PCR产物	灭菌水
反应 A	2 μL	0.5 μL	0.5 μL	0	1 μg	补至20 μL
反应B	2 μL	0	0	0.5 μL	1 μg	补至20 μL
注：采用限制性内切酶Bsp1286I, EaeI。10×NEBuffer 4和100×BSA随酶提供，其中 1×NEBuffer 4 含 50 mmol/L KAc, 20 mmol/L Tris-Ac, 10 mmol/L Mg(Ac)2, 1 mmol/L DDT, pH7.9 (25 °C 测定)，100× BSA 成分为10 mg/mL的BSA (牛血清白蛋白)。						

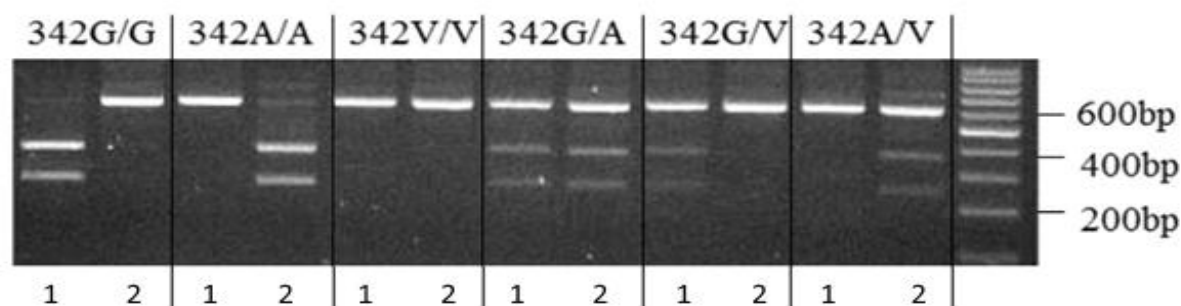
C.2 37℃下进行温浴，时间 2h~4h，反应结束，直接用于电泳检测。



附录 D  
(资料性附录)

家蝇乙酰胆碱酯酶 342 位点不同基因型 PCR 产物的酶切结果

家蝇乙酰胆碱酯酶342位点不同基因型的PCR产物酶切结果见图D. 1。



- G——氨基酸残基为Gly（甘氨酸）；  
 V——氨基酸残基为Val（缬氨酸）；  
 A——氨基酸残基为Aal（丙氨酸）；  
 G/G——敏感型纯合子；  
 V/V——不敏感 I型纯合子；  
 A/A——不敏感II型纯合子；  
 G/V——不敏感I型/敏感型杂合子；  
 G/A——不敏感II型/敏感型杂合子；  
 V/A——不敏感I型/不敏感II型杂合子；  
 1——Bsp1286I酶切产物图；  
 2——EaeI酶切产物图。  
 注：最右侧道为DNA分子量标记。

图D. 1 家蝇乙酰胆碱酯酶342位点不同基因型PCR产物的酶切结果