附件 1 狭翅缨翅缨小蜂 DNA 条形码信息

附件包括狭翅缨翅缨小蜂 *Anagrus frequens* 的 DNA 提取、COI 基因扩增与测序方法，以及登录号 PP419007 对应的序列信息。

1 DNA 提取

采用 DNeasy 提取试剂盒（Qiagen, Germantown, MD）进行无损 DNA 提取。超净工作台紫外灭菌 30 min，用 75%乙醇清洗台面。标本用双蒸水清洗 3 遍后放入 1.5 mL 离心管，加入 180 μL Buffer ATL 和 20 μL 蛋白酶 K 工作液，于 55 ℃、500 rpm 孵育 24 h，再于−80 ℃放置 12 h。加入 200 μL Buffer AL，涡旋混匀，70 ℃加热 10 min；加入 200 μL 预冷的 95%乙醇并混匀，取出完整虫体，保存于 75%乙醇中作为凭证标本。

将混合液转入离心柱，室温 8000 r/min 离心 1 min，弃滤液。依次加入 500 μL Buffer AW1 和 500 μL Buffer AW2，分别于室温 8000 r/min 离心 1 min、14000 r/min 离心 3 min。将离心柱移入新的 1.5 mL 离心管，加入 50 μL 经 50 ℃预热的 Buffer AE，室温静置 1 min 后，8000 r/min 离心 1 min。重复洗脱一次，所得 DNA 溶液于−20 ℃保存备用。

2 PCR 扩增

扩增线粒体细胞色素 c 氧化酶亚基Ⅰ（COI）基因片段。采用 C1-J-1718 和 C1-N-2191 引物对（表 1），引物由生工生物工程（上海）有限公司合成。PCR 反应总体积为 50 μL，包括 2×Taq PCR Mix 25 μL、上下游引物（10 μmol/L）各 2 μL、DNA 模板 5 μL 及 ddH_2O 16 μL。反应程序为 98 ℃预变性 1 min；98 ℃变性 15 s，50 ℃退火 50 s，72 ℃延伸 50 s，共 35 个循环；最后 72 ℃延伸 5 min。

表 1 扩增 DNA 条形码 COI 片段所用引物

引物	序列（5′—3′）
C1-J-1718	GGAGGATTTGGAAATTGATTARTTCC
C1-N-2191	CCCGGTAAAATTAAAATATAAACTTC

3 电泳检测与测序

取 5 μL PCR 产物进行 1.5%琼脂糖凝胶电泳检测，电泳缓冲液为 1×TAE，电压 150 V，并用凝胶成像仪观察。检测到目标片段后，采用 Cycle-Pure Kit（100）（Omega Bio-Tek）回收纯化 PCR 产物，委托生工生物工程（上海）有限公司进行 Sanger 测序。使用 Geneious 9.0 拼接双端序列、去除低质量部分，并按无脊椎动物线粒体遗传密码表（translation table 5）检查密码子。

4 序列信息

狭翅缨翅缨小蜂 COI 基因部分序列已上传至 GenBank，登录号为 PP419007，序列长度为 458 bp，凭证标本编号为 A_2，序列按 FASTA 格式列出。

>PP419007.1 Anagrus frequens voucher A_2 COX1 partial cds
CATTAATAATAGGTGTACCTGATATAGCTTTTCCACGAATAAATAATATAAGATTTTGAT
TATTATTACCTAGAATTTTATTATTAATTTCAAGAATATTTATTGGTTTAGGAACTGGWA
CAGGTTGAACTGTTTATCCTCCTTTATCTTATAATGTTTCTCATAGTGGACCATCTGTTG
ATTTATCTATTTTTTCTTTACATGTAGCTGGAATATCTTCAATTATGGCTTCAATTAATT
TTATTTCTACAATTTTAAATATAAAATTATTTAAAATAGAAAAAGTTACATTATTTTGTT
GATCTATAATGTTAACTGCTATTTTATTATTATTATCTTTACCTGTATTGGCTGGAGCTA
TTACTATATTATTATTTGATCGAAATTTAAATACTTCATTTTTTGATCCATCAGGTGGAG
GTGATCCTATTTTATATCAACATTTATTTTGATTTTTT

序列记录：https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/PP419007.1