



# 中华人民共和国国家标准

GB/T 43650—2024

## 野生动物及其制品 DNA 物种鉴定 技术规程

Technical procedures for DNA species identification of wild animals and  
their products

2024-03-15发布

2024-07-01 实施

国家市场监督管理总局 发布  
国家标准化管理委员会

## 目 次

前言 .....	Ⅲ
1 范围 .....	1
2 规范性引用文件 .....	1
3 术语、定义和缩略语 .....	1
<b>3.1 术语和定义</b> .....	<b>1</b>
<b>3.2 缩略语</b> .....	<b>2</b>
4 样品采集与储存 .....	2
<b>4.1 样品采集</b> .....	<b>2</b>
<b>4.2 抽样</b> .....	<b>2</b>
4.3 取样与储存 .....	2
4.4 运输 .....	3
<b>5 DNA 鉴定程序的构成</b> .....	<b>4</b>
6 DNA 鉴定程序 .....	4
6.1 样品前处理 .....	4
6.2 DNA 提取 .....	5
6.3 DNA 纯化 .....	5
6.4 DNA 质量评估 .....	5
<b>6.5 检测方法</b> .....	<b>6</b>
7 结果表述 .....	10
8 追溯方法 .....	10
9 污染预防与处理 .....	10
10 实验室区域设置 .....	10
11 仪器和试剂要求 .....	10
<b>12 实验室清洁</b> .....	<b>10</b>
<b>13 安全防护</b> .....	<b>10</b>
14 废弃物处理 .....	10
附录 A (资料性) 电泳检测程序 .....	11
A.1 常规电泳检测法 .....	11

A.2	芯片电泳检测法 .....	12
A.3	其他电泳检测法 .....	12
<b>附录B (资料性)</b>	<b>通用引物序列信息 .....</b>	<b>13</b>
B.1	Cytb 基因通用引物 .....	13
<b>B.2</b>	<b>COI 基因通用引物 .....</b>	<b>13</b>

B.3	12S rRNA 基因通用引物 .....	13
B.4	16S rRNA 基内通用引物 .....	13
附录C	(资料性) 通用引物 PCR 反应体系与反应程序 .....	15
C.1	反应体系 .....	15
C.2	反应程序 .....	15
附录D	(资料性) 特异性 PCR 的引物、反应程序与反应体系 .....	16
C.1	高鼻羚羊( <i>Saiga tatarica</i> )特异引物 .....	16
C.2	雪豹( <i>Panthera uncia</i> )特异引物 .....	16
C.3	豹( <i>Panthera pardus</i> )特异引物 .....	17
C.4	虎( <i>Panthera tigris</i> )特异引物 .....	17
C.5	黑熊( <i>Ursus thibetanus</i> )特异引物 .....	17
附录E	(资料性) qPCR 反应体系与反应程序 .....	18
E.1	反应体系 .....	18
E.2	反应程序 .....	18
附录F	(资料性) dPCR 反应体系与反应程序 .....	19
F.1	反应体系 .....	19
F.2	反应程序 .....	19
参考文献	.....	20

## 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。

本文件由国家林业和草原局提出。

本文件由全国野生动物保护管理与蜂否利用标准化技术委员会(SAC/TC 369)归口。

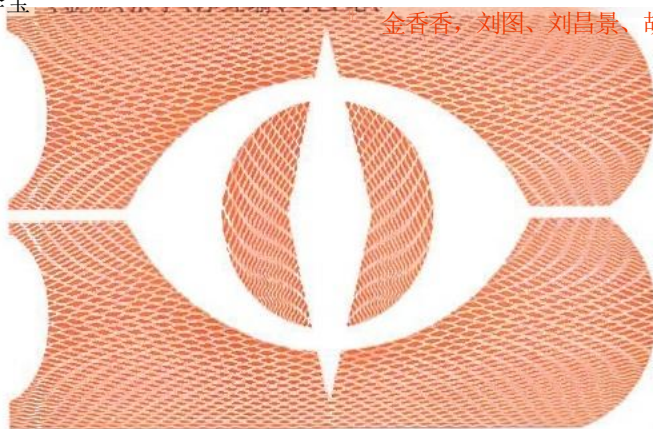
本文件起草单位：东北林业大学、东北林业太学司法临定所、深圳作大生命科学研究院、中国海关科学技术研究中心、黑龙江省公安厅，峰尔滨检验检测认证集团有限公司、深圳华大法医科技有限公司、广东华大法医物证司法鉴定所，黑龙江省野生动物研究所、华南动物物种环境损害司法鉴定中心、南宁海关技术中心、南京警察学院、合肥海关技术中心、广西壮族自治区公安厅、东潭市公安易。

本文件主要遵草人出素英、马跃、王震、李波、张伟、孙磊、徐艳春、张利峰、王剑刘微物天天、兰天明、

李晓平、危金、郭小森、李宝

唐阔凯。

金香香，刘图、刘昌景、胡调佳、养云飞、张新成、



# 野生动物及其制品 DNA 物种鉴定 技术规程

## 1 范围

本文件规定了对野生动物及其制品的水源进行中下物种鉴定时样品采集与储存、DNA 鉴定程序的构成、DNA 鉴定程序、结果表述、追溯方法、污染预防与处理、实验室区域设置等主要技术要求。

本文件适用于野生动物及其制品来源物种的 DNA 检验鉴定

## 2 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，河日期的引用文件，仅该日期题应的最本适用于本文件，不让出期的写明文件，其报新版本(包括所有的修吸单)适用于本文件。

GB1969 实验室 生物安在西用要求

GB/T194962 转基因品应实验的位不要

GB/ZE123 日 分立个样类产流随机抽植经施 指南

GB/ TB4796 水溶液币核酸的在度和细度格则 紫外分光光度人

GA/TE83 法庭科学 D 空 检验规池

LY/ T01 野生动物及 其产品的预埋鉴 定规范，

NY/T5—216 曾区诊和称品采集、保 输度

## 3 术语、定义和缩略语

### 3.1 术语和定义

下列术语和定义适用于 本文件。

#### 3.1.1

DNA 条形码 DNA barcode

选定的标准区域的、用于物种鉴定的一段相对较短的保守DNA 片段。

#### 3.1.2

DNA 物种鉴定 DNA species identification

利用DNA 检验技术对野生动物及其制品进行分类地位(科、属、种)的判定。

### 3.1.3

#### 序列比对 alignment

利用计算机算法和程序，确定两个或多个核苷酸序列的相似性以至于同源性。

### 3.1.4

#### 引物 primers

人工合成的两段互补寡核苷酸片段，一段与靶区域5'端DNA模板链互补；另一段与靶区域3'端DNA模板链互补。

### 3.1.5

荧光探针 fluorescent probe

5'端和3'端分别标记荧光基团和淬灭基团，并与目的DNA序列碱基互补的一段DNA片段。

### 3.2 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

BOLD: 生命条形码数据系统(barcode of life data system)

Ct值: 循环阈值(cycle threshold,或Cq值)

Cytb: 细胞色素 b(cytochrome b)

dPCR: 数字PCR(digital PCR)

PCR: 聚合酶链式反应(polymerase chain reaction)

qPCR: 实时荧光定量PCR(real-time fluorescence quantitative PCR)

RFLP: 限制性片段长度多态性(restriction fragment length polymorphism)

## 4 样品采集与储存

### 4.1 样品采集

4.1.1 样品分成两等份，作为检样和储存样。

4.1.2 规范标记编号，记录采集时间、地点、类型等内容，保证样品可追溯。

4.1.3 样品分别采集、分别包装，注意工具清洁或消毒，防止交叉污染。

### 4.2 抽样

4.2.1 形态特征完整、可分类识别的同类多个检材，按照GB/Z31233中的简单随机抽样或等距抽样规定执行。

4.2.2 具有部分形态特征、可简单分类的多个检材，先分类，再按照GB/Z31233中的简单随机抽样或等距抽样规定执行；或按照GB/Z31233中的分层抽样规定执行。

4.2.3 不具有可识别的形态特征的大批量检材，先按照GB/Z31233中的简单随机抽样或等距抽样规定执行，结果出现多个物种时，再按照GB/Z31233中的分层抽样规定执行。物种的个体数量可按鉴定结果所占比例核算。

### 4.3 取样与储存

#### 4.3.1 整体

昆虫等小型无脊椎动物可整体取样，取适量或整体粉碎，收集到离心管或密封袋等储存介质中，干燥常温、冷藏或-20℃保存。

#### 4.3.2 组织和内脏

应先去除易污染的表层，宜采取新鲜洁净的组织或内脏5 mm<sup>3</sup> 以上，收集到离心管或密封袋等储存介质中，冷藏暂存，宜尽快在-20 ℃以下保存。

#### **4.3.3 皮张与蛇蜕等**

取 1 cm<sup>2</sup> 以上收集到离心管或密封袋等储存介质中，干燥常温、冷藏或-20 ℃保存。

#### 4.3.4 骨骼与牙齿

整体送检或清洗后取不少于0.2 g 骨粉或牙粉(组织残留时宜取组织),收集到离心管或密封袋等储存介质中,干燥常温、冷藏或-20 ℃保存。

#### 4.3.5 皮肤衍生物

##### 4.3.5.1 角、喙、爪、鳞、龟甲等

整体送检或清洗后取不少于0.2 g 粉末等收集到离心管或密封袋等储存介质中,干燥常温、冷藏或-20 ℃保存。

##### 4.3.5.2 毛、羽等

收集1根以上置于离心管或密封袋等储存介质中,干燥常温、冷藏或-20 ℃保存。

注:皮肤衍生物是指由皮肤衍生而成的特殊器官,如毛、羽、喙、爪、蹄、角、鳞、鳍、盾片、骨板、龟甲等。

#### 4.3.6 血液(血痕)

宜选新鲜全血采集于 EDTA 抗凝管或采血卡。血痕宜用采样拭子等采集。抗凝管和采样拭子等冷藏或-20 ℃保存;采血卡晾干,常温、冷藏或-20 ℃保存。

#### 4.3.7 尿液

用清洁容器或密封袋等收集1 mL~5 mL,密封,冷藏或-20 ℃保存。

#### 4.3.8 粪便

用消毒的镊子或勺等取整颗或在表层和内层各取不低于0.2 g,收集到离心管或密封袋等储存介质中,可加干燥剂或保存液,常温、冷藏或-20 ℃保存。

#### 4.3.9 分泌物

唾液等用消毒的纱布、棉花或拭子等采集,晾干密封常温保存;或者直接密封,冷藏或-20 ℃保存;收集足量其他分泌物到离心管或密封袋等储存介质中,冷藏保存,宜尽快于-20 ℃保存。

注:分泌物是指由腺体和组织器官分泌的物质。

### 4.4 运输

4.4.1 样品宜尽快送检。干燥样品常温运输,鲜软组织等易腐败的样品应冷藏(特殊时干冰冷冻)运输。

4.4.2 每个样品应分别包装,在样本袋或容器外标记清楚,再将各样品放到统一包装袋或盒中。

4.4.3 抗凝管等玻璃容器,放入盒内,加垫缓冲材料周定,防止晃动、破裂。

4.4.4 包装应防水、防漏、密封性良好。

4.4.5 疑似疫病(如禽流感等)动物样品,应先消毒处理后,包装按照 NY/T541—2016 中7.2的规定

执行。

## 5 DNA 鉴定程序的构成

DNA 鉴定程序包括5个操作步骤，检材无形态鉴别特征时，有4大类方法可选；检材具有部分形态鉴别特征或理化鉴别指标等时，可与之结合进行综合判断，程序流程图如图1所示。

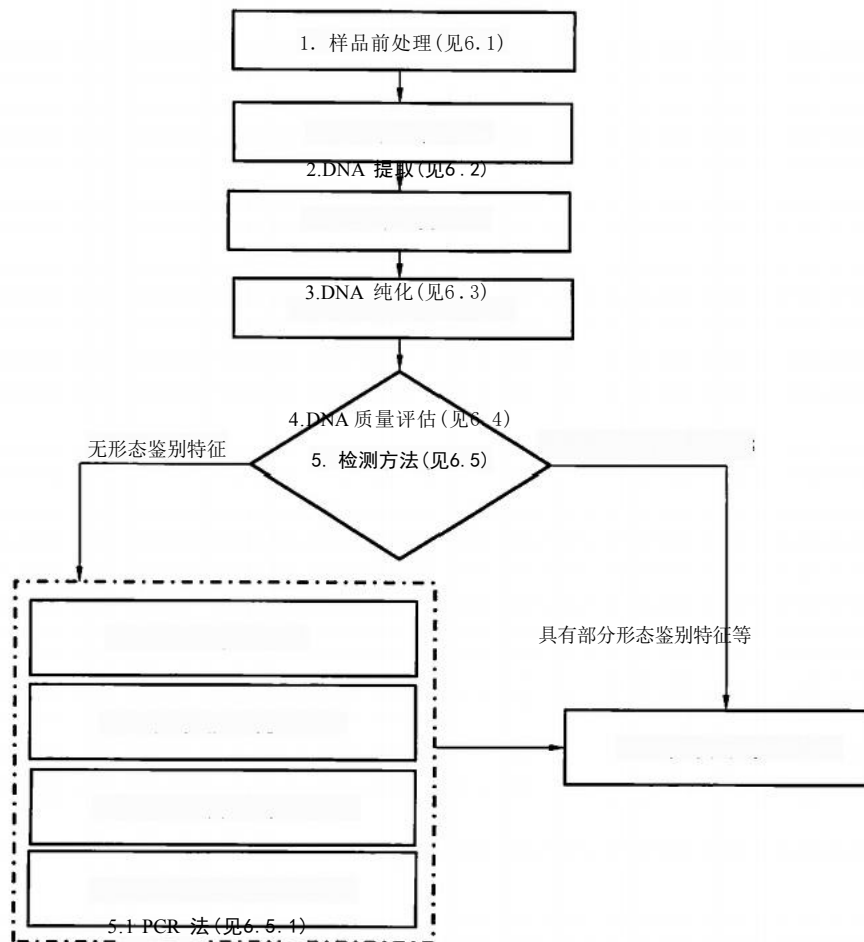


图 1 DNA 鉴定程序流程图

## 6 DNA 鉴定程序

### 6.1 样品前处理

#### 6.1.1 骨、角等

用75%乙醇或去离子水等清洗表面2次~3次，粉碎(必要时脱钙)处理。

#### 6.1.2 皮张、蛇蜕等

新鲜皮张等去除表层，剪碎或研磨。干燥皮张等应先用75%乙醇或去离子水等清洗2次~3次，缓冲液浸泡去除表层，再剪碎或研磨。

### **6.1.3 肌肉等组织**

新鲜干净组织直接剪碎或研磨。干燥组织应先用缓冲液浸泡、去除表层，再剪碎或研磨。

#### 6.1.4 毛、羽等

用75%乙醇、去离子水等充分清洗、剪碎。

### 6.2 DNA 提取

#### 6.2.1 提取要求

依据检材类型和DNA 物种鉴定目标，确定 DNA 提取方法，应设置空白对照并严防交叉污染。

#### 6.2.2 苯酚氯仿提取法

适用于组织、血液等样品量充足的检材，按照GA/T383 的相关规定执行。

#### 6.2.3 盐析提取法

适用于组织、血液等样品量充足，且需要大片段DNA 进行全基因组测序的检材。

#### 6.2.4 吸附柱试剂盒

适用于组织、血液等样品量充足的检材，毛、羽等微量检材以及粪便等检材，应严格按照说明书操作。

#### 6.2.5 磁珠法试剂盒

适用于毛、羽等微量检材以及粪便等检材，应严格按照说明书操作。

#### 6.2.6 全自动工作站法

适用于大批量样品，应严格按照仪器说明书操作。

#### 6.2.7 其他提取方法

使用等效 DNA 提取试剂盒，或验证的新方法。

### 6.3 DNA 纯化

可选择高质量纯化试剂盒或同行验证的纯化方法。

### 6.4 DNA 质量评估

#### 6.4.1 分光光度法

按照GB/T34796 方法，测定 DNA 浓度，并判定 DNA 纯度。

#### 6.4.2 电泳法

评估 DNA 片段大小，判断 DNA 完整性(见附录 A)。

#### 6.4.3 qPCR 法

检测样品目标基因的Ct 值，分析 DNA 含量。

#### 6.4.4 荧光计法

检测与 DNA 结合荧光染料的荧光强度，定量目标 DNA 的浓度。

## 6.5 检测方法

### 6.5.1 PCR 法

#### 6.5.1.1 通用引物测序法

##### 6.5.1.1.1 设置对照

应严格设置阴性对照(不加 DNA 的空白对照)与阳性对照(已知物种的 DNA 样品,必要时)

##### 6.5.1.1.2 扩增与测序

确定目标区域(如 DNA 条形码、Cytb 基因等),选择通用引物(见附录 B),按照反应体系和反应程序(见附录 C)进行 PCR 扩增,电泳检测见附录A,有扩增产物且与预期大小一致,则纯化(按纯化试剂盒操作)或直接测序(混合样品克隆测序)。如无扩增产物,分析原因重新试验。

##### 6.5.1.1.3 序列分析

使用BLAST 或 CLUSTAL, 等软件,将测序所得有效 DNA 序列与候选物种的标准序列进行序列比对,得到序列一致性结果;或在数据库中进行序列比对,选取一致性最高的序列及其他近缘物种的同源序列,构建系统进化树。

注:多个数据库综合比对,包括但不限于自建标准数据库、国家动物核酸数据库以及各专项数据库、国际的 BOLD 和(incBank 数据库等.注意甄别其数据的正确性。

##### 6.5.1.1.4 结果判定

具体结果判定如下:

- a) 与单一物种一致性最高,且 $\geq 99\%$ ,判定与已知物种一致,判定该检材“来源于 $\times\times\times$ (物种)”或“检出 $\times\times\times$ (物种)DNA 成分”;
- b) 与两个及以上物种一致性最高,且 $\geq 99\%$ ,应加测基因,或判定该检材“来源于 $\times\times\times$ (物种)或 $\times\times\times$ (物种)……”或“检出 $\times\times\times$ (物种)或 $\times\times\times$ (物种)DNA 成分”;
- c) 与单一物种一致性最高,且在 $90\%\sim 99\%$ 之间,应加测基因,如仍未达到 $99\%$ ,应谨慎判定;
- d) 或进化树中,位于同一单系分支且置信值达 $80\%$ 以上的物种即为检材所属物种,判定该检材“来源于 $\times\times\times$ (物种)”或“检出 $\times\times\times$ (物种)DNA 成分”;
- c) 因为检材质量原因,未获得有效 DNA,或缺乏比对的标准序列,判定“无法判定”或“无法确定具体物种”。

### 6.5.1.2 特异引物扩增法

#### 6.5.1.2.1 设置对照

应严格设置阳性对照(已知物种的DNA 样品,即检材疑似物种的 DNA 样品)和阴性对照(近缘物种的 DNA 和以无菌去离子水代替 DNA 模板的空白对照)。

#### 6.5.1.2.2 特异扩增

选择目标区域(如 DNA 条形码、Cytb 基因等),并选择根据物种特异位点设计的物种特异性引物,确定反应体系和反应程序(见附录 D),进行 PCR 扩增,扩增产物进行电泳检测(见附录 A)。

### 6.5.1.2.3 结果判定

具体结果判定如下：

- a) 检材与阳性对照有扩增产物，产物的大小与 DNA 分子量标准比对时与预期大小一致，且阴性对照无扩增产物，则表示结果阳性，判定该检材“来源于×××(物种)”或“检出×××(物种) DNA 成分”。若存在疑问可测序验证。
- b) 阳性对照有扩增产物，且产物的大小与 DNA 分子量标准比对时与预期大小一致，检材和阴性对照均无扩增产物；或者检材扩增产物与预期大小不一致，则表示结果阴性，判定为“未检出×××(物种) DNA 成分”。阴性结果谨慎判别，可更换方法验证。
- c) 检材、阳性对照和阴性对照均有扩增产物且产物的大小与 DNA 分子量标准比对时，与预期大小一致，则表示试验污染，应分析原因，重新试验。检材、阳性对照和阴性对照均无扩增产物，表示扩增失败，应分析原因，重新试
- d) 因为检材质量原因无法获得有效 DNA, 判定“无法判定”或无法确定具体物种”。

### 6.5.1.3 qPCR 探针法

#### 6.5.1.3.1 设置对照

应严格设置阴性对照(已知物种的 DNA 样品，即检材疑似物种的 DNA 样品、阴用对照(非疑似物种的 DNA)和空白对照(提取时设置的提报空白对照和这无菌去离子水代替 DNA 家板间 PCR 空白对照)。

#### 6.5.1.3.2 qPCR 扩增

根据事的用标区域(X 元码、因 物种每筑性面和实光计的定反应体系 and 反应程序《见附录F空 排 行 CR 扩墩

#### 6.5.1.3.3 结果分析

qPCR 反应结束后，应设密无效基我范围三基线范期地控在变 车循环，如果意强阳性样本，应根据实障情况围整基线范间。简值设密原测误是线刚好超过正常空白对照扩地曲线无规则的噪声线)的最高点且 C 值不出现任何数值为准。

以下条件有一条不脑足时，试验视为无效，应重做 qPCR 扩增：

- a) 提取空白鸡照无得导性扩增曲线；
- b) PCR 空白对照无特异性扩增曲线；
- c) 阴性对照无特异作扩增曲线
- d) 阳性对照 Ct 值<35。

#### 6.5.1.3.4 结果判断

具体结果判定如下。

- a) 待测样品 DNA 物种特异性扩增的 Ct 值<35并有明显扩增曲线，阳性对照、阴性对照和空白对照扩增正常(含内参基因时，检测结果也为阳性)，判定该样品“检出×××(物种) DNA 成

分”或“来源于×××(物种)”。若存在疑问可测序验证。

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要  
下载或阅读全文，请访问：

<https://d.book118.com/747153132151006063>