

团 体 标 准

T/LTIA 31—2025

动物种属鉴定高通量测序技术规范

Technical specifications for animal species identification based on high-throughput sequencing technology

2025 - 11 - 18 发布

2025 - 11 - 18 实施

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 缩略语.....	2
5 基本要求.....	2
5.1 实验室要求.....	2
5.2 设施设备要求.....	2
5.3 人员要求.....	3
6 鉴定流程.....	3
6.1 流程要求.....	3
6.2 样本采集.....	3
6.3 DNA 提取.....	3
6.4 高通量测序.....	3
6.5 数据分析.....	4
6.6 鉴定意见.....	5
6.7 鉴定意见文书.....	6
参考文献.....	7

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。

本文件由深圳华大法医科技有限公司提出。

本文件由深圳市生命科技产学研资联盟归口。

本文件起草单位：深圳华大法医科技有限公司、东北林业大学、公安部物证鉴定中心、南方医科大学、中国政法大学、辽宁省公安厅、浙江省公安厅、陕西省公安厅、青海省公安厅、天津市公安局、上海市公安局、北京市公安局、黑龙江省公安厅、内蒙古自治区公安厅、山西省公安厅、河南省公安厅、湖北省公安厅、广东华大法医物证司法鉴定所、北京华大方瑞鉴定技术有限公司司法鉴定中心、台州市公安局、深圳海关缉私局、中国海关科学技术研究中心、兰州市公安局、柳州市公安局、广西壮族自治区公安厅、丽水市公安局、深圳华大基因细胞科技有限责任公司、杭州华大赛迪斯逆熵科技有限责任公司、深圳市生命科技产学研资联盟、深圳华大基因科技有限公司。

本文件主要起草人：程莹莹、徐艳春、郭小森、张颖、陈玲、袁丽、邵武、郝宏蕾、赵杰、鲁斌、沈悦生、高昀露、赵东、黄飞、聂同钢、杨帆、刘金杰、马云龙、徐颖、吴轩、郭利红、王锬、刘佳、康恒亮、彭微、李达、牛宝东、高勇、骆继怀、张秀、陈祖聪、陈国林、邓超慧、刘雪媛、赵雪宇、郑海兵、李陶莎、尹焯。

动物种属鉴定高通量测序技术规范

1 范围

本文件规定了基于高通量测序技术的动物种属鉴定的技术要求，描述了鉴定的基本要求、样本DNA文库构建、测序及测序数据分析的方法、相应的质量评估方法及鉴定意见文书书写规范。

本文件适用于各领域中单一种属样品和混合种属样品的动物源性成分鉴别的高通量测序定性检测。

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，注日期的引用文件，仅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。

GB/T 30989 高通量基因测序技术规程

GB/Z 31233 分立个体类产品随机抽样实施指南

GB/T 43650 野生动物及其制品DNA物种鉴定技术规程

SF/T 0069 法医物证鉴定实验室管理规范

SF/T 0136 法医学非人源生物检材种属鉴定技术规范

CNAS-CL08 司法鉴定/法庭科学机构能力认可准则

3 术语和定义

GB/T 30989、GB/Z 31233和SF/T 0136界定的以及下列术语和定义适用于本文件。

3.1

动物种属 animal species

动物的基本分类单元，即具有统一且稳定的形态和遗传特征以及占有自然分布区的动物类群，被划分为同一类群的动物个体的总称，是由具有生殖隔离能力的种群进行自然繁殖产生的个体组成的群体。

3.2

DNA 种属鉴定 DNA species identification

基于DNA分析方法甄别种属特异性DNA序列，实现对动物进行分类地位（科、属、种）的认定。

[来源：SF/T 0136—2023，3.1，有修改]

3.3

DNA 宏条形码 DNA metabarcoding

一种通过高通量测序解析单个或混合样本的一个或多个DNA条形码的分子生物学技术，常用于物种鉴别和生物多样性评估。

3.4

DNA 文库 DNA library

带有特定接头序列的双链待测DNA片段分子集合。

3.5

DNA 条形码参考序列 DNA barcode reference sequence

公共数据库中收录的与物种对应的DNA条形码序列。

3.6

操作分类单元 operational taxonomic units, OTU

在系统发生学研究或群体遗传学研究中，为了便于进行分析，人为给某一个分类单元（如品系、种、属、分组等）设置的同一标志。

3.7

聚类分析 clustering analysis

将具有较高相似性的测序序列进行分组，以OTU（3.6）的形式呈现不同的组。

3.8

一致度 identity

OTU（3.6）与DNA条形码参考序列（3.5）比对部分DNA序列的一致程度，用于评估比对序列的相似性程度。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

BOLD: 生命条形码数据系统（The Barcode of Life Data System）

COI: 细胞色素C氧化酶亚基I基因（Cytochrome C Oxidase Subunit I）

cyt b: 细胞色素b基因（Cytochrome b）

DNA: 脱氧核糖核苷酸（Deoxyribonucleic Acid）

NCBI: 美国国立生物技术信息中心（National Center for Biotechnology Information）

OTU: 操作分类单元（Operational Taxonomic Units）

PCR: 聚合酶链式反应（Polymerase Chain Reaction）

12S: 12S核糖体RNA基因（12S ribosomal RNA, 12S rRNA）

16S: 16S核糖体RNA基因（16S ribosomal RNA, 16S rRNA）

5 基本要求

5.1 实验室要求

从事动物种属鉴定的实验室应符合以下要求：

- a) 实验室环境条件满足 GB/T 30989 要求；
- b) 实验室以及样本管理、设备管理、质量管理等应符合 SF/T 0069 的规定；
- c) 建立样本的运输、接收、处置、保护、存储、保留和清理的制度，能对接收、内部传递、处置、保留、返还和清理等过程进行记录，确保记录的完整性和可追溯性。

5.2 设施设备要求

5.2.1 主要仪器

从事动物种属鉴定所需的主要仪器（包括但不限于）：

- a) 高速离心机：大于 10,000 r/min；
- b) 移液器套装：常见量程范围为 0.1~1000 μ L；
- c) 低温冰箱：4 $^{\circ}$ C, -20 $^{\circ}$ C, -80 $^{\circ}$ C；
- d) 涡旋振荡混合仪；
- e) 超净工作台；
- f) 生物安全柜；
- g) 恒温孵育仪；
- h) 核酸精准定量仪器；
- i) DNA 扩增 PCR 仪；
- j) 磁力架；
- k) 高通量测序仪；
- l) 数据分析服务器。

5.2.2 主要试剂

从事动物种属鉴定所需的主要试剂包括但不限于：

- a) 无水乙醇；
- b) 双链 DNA 定量试剂盒；
- c) 高通量测序文库构建试剂；

d) 高通量测序试剂。

5.3 人员要求

从事动物种属鉴定的实验人员应符合以下要求：

- a) 遵守鉴定人员资质要求、行业管理规范等实验室的管理要求；
- b) 熟悉并掌握 DNA 提取、PCR 和 DNA 高通量测序技术的原理和操作；
- c) 能正确使用分析方法对检测结果进行分析评价。

6 鉴定流程

6.1 流程要求

鉴定流程应包括样本采集、DNA提取、DNA文库构建、高通量测序、数据分析、鉴定意见文书撰写等环节。其中DNA文库构建、高通量测序、数据分析、鉴定意见文书撰写为必须环节，样本采集和DNA提取为可选环节。鉴定流程完毕后，应将各个环节的记录进行归档。

6.2 样本采集

6.2.1 基本要求

鉴定样本按照鉴定需求确定由委托方送样或鉴定机构进行样本采集。如需由鉴定机构进行采集，可按照CNAS-CL08中7.3 抽样/取样的要求进行样本采集。

6.2.2 取样

不涉及统计学方法进行样本采集时，应满足以下要求：

- a) 样本分成两份，作为待测样本和储存样本；
- b) 清楚、规范的样本编号以及采集时间、地点、类型等信息的准确记录，保证样本可追溯；
- c) 样本的采集、包装和运输、储存中应防止降解、丢失、损坏以及交叉或外源污染。

6.2.3 抽样

基于有效的统计学方法进行样本采集时，应满足以下要求：

- a) 参考 6.2.2 的 a)、b)和 c)；
- b) 参考 GB/Z 31233 选择有效的统计学抽样方法，使每个抽取样本被抽到的概率完全相等；
- c) 形态特征完整、可分类识别的同类多个样本，可按照样本编号或样本排列距离规定抽样规则，例如参考 GB/Z 31233 中的简单随机抽样或等距抽样规定执行；
- d) 具有部分形态特征、可简单分类的多个样本，先按照特征进行分类，再从每种类别中进行抽样，可参考 GB/Z 31233 中的简单随机抽样、等距抽样或分层抽样规定执行；
- e) 不具有可识别的形态特征的大批量样本，先按照空间排列进行分组，再从每个组中进行抽样，可参考 GB/Z 31233 中的分层抽样或二阶抽样规定执行。

6.3 DNA 提取

如需进行DNA提取，应满足以下要求：

- a) 待测样本 DNA 的提取可参考 LSEA 0007-2024 的提取方法或使用公开发表的方法，并按照 GB/T 43650 的 6.4 DNA 质量评估方法评估后进行后续的检测步骤；
- b) 特殊检材的 DNA 提取无法使用通用方法时，应进行方法有效性确认，并在报告中详细说明提取过程和 DNA 的质量评估结果。

6.4 高通量测序

6.4.1 基本要求

根据鉴定需求，可选择靶向测序法或基因组测序法。

6.4.2 靶向测序法

6.4.2.1 文库构建

以基因组DNA为模板富集DNA条形码片段，进行靶向测序的DNA文库构建应满足以下要求：

- a) DNA 条形码：*COI*、*cyt b*、*12S*、*16S* 等 DNA 条形码区域；
- b) 根据 DNA 条形码序列选择合适的通用引物或特异性引物，宜按照商业化扩增试剂盒说明进行靶向扩增。必要时可以使用多对引物进行复合扩增。若使用非标方法进行靶向扩增，应先进行方法有效性确认；
- c) 获得目标 DNA 条形码片段后，宜使用商业化文库构建试剂盒进行 DNA 文库构建；
- d) 实验应同步设置阳性对照、阴性对照和空白对照，以防污染影响检测准确性；
- e) 用于纯化的 DNA 文库扩增的总循环数不宜超过 35；
- f) 同一样本宜进行 2 次以上独立实验，以确保结果的重复性与稳定性。

6.4.2.2 高通量测序

靶向测序法制备的DNA文库测序时，应满足以下要求：

- a) 宜利用单端测序策略进行高通量测序，尽量避免序列拼接引入错误；
- b) 宜使用商业化的测序平台进行高通量测序；
- c) 若测序数据量不足说明书推荐值的一半，或测序数据的前 100 个碱基的数据质量值 $Q30 < 90\%$ ，应重新测序。

6.4.3 基因组测序法

6.4.3.1 文库构建

以基因组DNA为模板，宜使用商业化的全基因组测序文库构建试剂盒进行文库构建：

- a) 宜根据测序策略收集长度合适的 DNA 片段进行文库构建；
- b) 文库富集 PCR 循环数不宜超过 20；
- c) 文库纯化后的产量满足高通量测序平台测序基本要求。

6.4.3.2 高通量测序

基因组测序法制备的DNA文库测序时，参考6.4.2.2的b)和c)进行测序。

6.5 数据分析

6.5.1 靶向测序法

6.5.1.1 数据质控

靶向测序的数据质控应满足以下要求：

- a) 应使用公开发表或经过有效性确认的软件对原始测序数据进行接头序列去除、低质量序列去除、质量评估等处理；
- b) 处理后的数据质量值（Q30）不低于 80%。

6.5.1.2 聚类分析

对得到的序列进行聚类分析以获得代表性的OTU：

- a) 应使用公开发表或经过有效性确认的软件对质控合格的数据进行引物序列去除、聚类分析、质量评估等处理；
- b) 聚类分析的相似性阈值宜不低于 98%；
- c) 聚类后得到的 OTU 序列长度应符合目标扩增子大小，OTU 序列长度宜不小于 100 bp，且单个 OTU 的聚类读序不少于 100 条。

6.5.1.3 序列比对

靶向测序的序列比对应满足以下要求：

- a) 宜使用 BLAST 或其他工具进行序列比对；
- b) 宜使用 BOLD、NCBI 等公认数据库作为参考；

- c) OTU 的比对覆盖度不低于 90%、序列一致度不低于 99%；
- d) 若一个 OTU 序列比对到多个种属，仅保留一致度最高的种属作为种属比对结果；若最高一致度存在多个种属，说明此 OTU 在这些物种间的分辨率不足。

6.5.1.4 种系分析

若序列有比对结果，但未满足6.5.1.3步骤中条件c)，可选取比对结果中一致性最高的序列及其他近缘种属的同源序列，构建系统进化树。

6.5.2 基因组测序法

6.5.2.1 数据质控

基因组测序的数据质控应满足以下要求：

- a) 参考 6.5.1.1 进行数据质控；
- b) 每个样本有效测序数据量应不少于参考基因组的 30 倍。

6.5.2.2 种系分析

基因组测序的种系分析应满足以下要求：

- a) 参考 GB/T 43650 中 6.5.3.4 全基因组种属鉴定分析执行；
- b) 混合物种样本不适用于此分析方法。

6.6 鉴定意见

6.6.1 判定流程

根据靶向测序和基因组测序的比对结果出具鉴定意见，判定流程如图1所示。

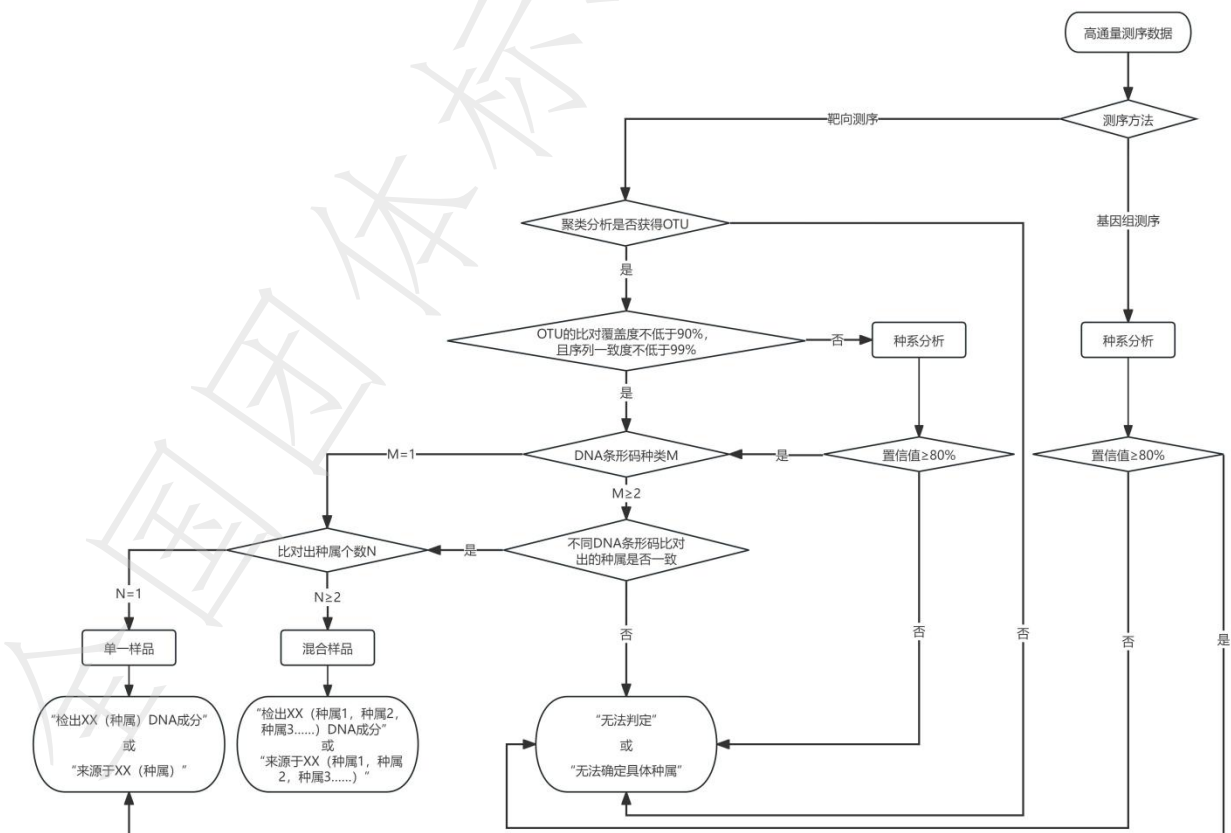


图1 判定流程图

6.6.2 靶向测序比对结果

根据靶向测序DNA文库构建时使用条形码基因种类个数，测序结果分为一种DNA条形码和多种DNA条形码两种情况进行判定；OTU比对种属个数可用于判定单一样品或混合样品，具体情况如下：

- a) 只有一种 DNA 条形码聚类出一个 OTU，与数据库参考序列覆盖度不小于 90%，一致度不小于 99%的情况下，确定为单一样品，鉴定意见可表述为“检出 XX（种属）DNA 成分”或“来源于 XX（种属）”；
- b) 只有一种 DNA 条形码聚类出多个 OTU，每个 OTU 与数据库参考序列覆盖度不小于 90%，一致度不小于 99%的情况下：
 - 1) 每个 OTU 比对到同一种属，确定为单一样品，鉴定意见可表述为“检出 XX（种属）DNA 成分”或“来源于 XX（种属）”，
 - 2) 不同 OTU 比对到不同种属，确定为混合样品，鉴定意见可表述为“检出 XX（种属 1，种属 2，种属 3……）DNA 成分”或“来源于 XX（种属 1，种属 2，种属 3……）”；
- c) 多种 DNA 条形码仅有一个 OTU 有比对结果，与数据库参考序列覆盖度不小于 90%，一致度不小于 99%的情况下，确定为单一样品，鉴定意见可表述为“检出 XX（种属）DNA 成分”或“来源于 XX（种属）”；
- d) 多种 DNA 条形码聚类出多个 OTU，每个 OTU 与数据库参考序列覆盖度不小于 90%，一致度不小于 99%的情况下：
 - 1) 每种 DNA 条形码均比对上同一种属时，确定为单一样品，鉴定意见可表述为“检出 XX（种属）DNA 成分”或“来源于 XX（种属）”，
 - 2) 所有 DNA 条形码比对上 2 种以上种属，且不同条形码的比对结果一致时，确定为混合样品，鉴定意见可表述为“检出 XX（种属 1，种属 2，种属 3……）DNA 成分”或“来源于 XX（种属 1，种属 2，种属 3……）”，
 - 3) 不同 DNA 条形码比对种属不完全一致时，鉴定意见可表述为“无法判定”或“无法确定具体种属”；
- e) 对于 OTU 不满足与参考序列覆盖度不小于 90%，或一致度大于 99%的样本，选取 6.4.1.4 构建的进化树中位于同一分支且置信值达 80%以上的物种作为种属比对结果，鉴定意见可表述为“检出 XX（种属）DNA 成分”或“来源于 XX（种属）”；否则鉴定意见可表述为“无法判定”或“无法确定具体种属”；
- f) 对于未获得 OTU 序列的情况，鉴定意见可表述为“无法判定”或“无法确定具体种属”。

6.6.3 基因组测序比对结果

参考GB/T 43650中6.5.3.5进行种属鉴定。

6.7 鉴定意见文书

鉴定意见文书的格式宜按照主管部门的规定或相关标准执行，且内容应符合以下要求：

- a) 描述检测的样本采集情况、采用的 DNA 提取方法、检测的目标区域及模板 DNA 用量、引物信息、文库构建方法、测序结果、比对结果和鉴定结果；
- b) 按照 SF/T 0136 第 8 章的规定出具鉴定意见；
- c) 意见书应盖公章，并附检测样品照片。

参 考 文 献

- [1] ISO 20813 Molecular biomarker analysis — Methods of analysis for the detection and identification of animal species in foods and food products (nucleic acid-based methods) — General requirements and definitions.
- [2] ISO 22949-1:2021 Molecular biomarker analysis — Methods of analysis for the detection and identification of animal species in food and feed products (nucleotide sequencing-based methods).
- [3] LSEA 0007-2024 Technical Specification of DNA Extraction for Wild Vertebrate Identification.
- [4] Alfred J. Arulandhu, Martijn Staats, Rico Hagelaar, et al. 2017. Development and validation of a multi-locus DNA metabarcoding method to identify endangered species in complex samples. *GigaScience*, 6(10):1-18.
- [5] Lucy M.I. Webster, Tracey-Leigh Prigge, Greta J. Frankham. 2024. A guide for the validation of DNA based species identification in forensic casework. *Forensic Science International: Animals and Environments*, 5:100080.
- [6] M. Katherine Moore a , Barry W. Baker b , Tasha L. Bauman, et al. 2021. The Society for Wildlife Forensic Science standards and guidelines. *Forensic Science International: Animals and Environments*, 1:100015.
-