ICS 07.080
CCS A 40

中华人民共和国国家标准化指导性技术文件

GB/Z XXXXX—XXXX/ISO/TS 20224-10:2024

、

动物源性制品中源性成分检测 实时荧光定量 PCR 法 第 10 部分：鸭 DNA 检测方法

Detection of common animal-derived components in livestock and poultry
Real-time PCR Part 10: Duck DNA detection method

(ISO/TS 20224-10:2024,IDT)

（征求意见稿）

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

XXXX－XX－XX 发布 XXXX－XX－XX 实施

国家市场监督管理总局
国家标准化管理委员会 发布

目　　次

前言 III
引言 IV
1　范围 1
2　规范性引用文件 1
3　术语和定义 1
4　原理 1
5　试剂耗材 2
5.1　通则 2
5.2　PCR 试剂 2
5.2.1　PCR 预混液 2
5.2.2　引物和探针 2
6　仪器和设备 2
6.1　实时荧光 PCR 仪 2
7　方法 2
7.1　样品制备 2
7.2　DNA 提取 2
7.3　PCR 设置 3
7.3.1　反应物混合 3
7.3.2　PCR 对照 3
7.3.3　实时 PCR 设置 3
7.4　反应程序 3
8　质控要求与结果表达 4
8.1　质控要求 4
8.2　结果表达 4
9　验证过程和性能指标 4
9.1　概述 4
9.2　稳定性 ..... 错误！未定义书签。
9.3　再现性 4
9.4　灵敏度 5
9.5　特异性 7
10　检验报告 8
附录 A （资料性 ） 附录 A 基于 BlastN+2.12.0 软件对 GenBank 参考序列基因组和全基因组鸟枪法叠连群测序结果的比对 9
A.1　查询 9
A.2　描述 9
A.3　序列比对 10

附录 B （资料性 ） 利用现有公共基因组序列构建的鸭科及其系统发育树 13
B.1 鸭科成员 13
参考文献 18

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。

本文件等同采用ISO/TS 20224-10:2024 《Molecular biomarker analysis—Detection of animal-derived materials in foodstuffs and feedstuffs by real-time PCR—Part 10:Duck DNA detection method》，文件类型由ISO的技术规范调整为我国的国家标准。

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。

本文件由全国生化检测标准化技术委员会（SAC/TC 387）提出并归口。

本文件起草单位：

本文件主要起草人：

引　言

食品和饲料中肉类的掺杂掺假行为对公共安全和商业活动均构成威胁。掺假可能会影响遵循民族饮食习惯的人群，还会对经济发展和社会稳定造成影响。本文件提供了一种实时荧光定量PCR分析方法，利用食品成分中存在的核酸来鉴别肉类动物物种。

食品中的动物源性样品在实验室中通过以下连续（或同步）步骤进行检测和鉴定：试样/样品的制备、核酸提取与纯化、PCR扩增及结果判读。本文件针对绿头鸭（*Anas platyrhynchos*）和斑嘴鸭（*Anas zonorhyncha*）DNA检测，为其PCR扩增和结果判定提供指导。同时也发现了对白翅栖鸭（*Asarcornis scutulata*）、凤头潜鸭（*Aythya fuligula*）、番鸭（*Cairina moschata*）和鸳鸯（*Aix galericulata*）的交叉检测情况。

ISO 20224 系列由描述特定应用的技术规范组成。今后建立的新物种 DNA 检测方法，将以独立部分的形式增补纳入。

动物源性制品中源性成分检测　实时荧光定量 PCR 法 第 10 部分：鸭 DNA 检测方法

1　范围

本文件规定了动物源性产品中鸭特异性 DNA 的实时荧光定量PCR检测方法。

本文件适用于绿头鸭(*Anas platyrhynchos*)和斑嘴鸭(*Anas zonorhyncha*)来源的鸭源性成分检测。

本文件存在与白翅栖鸭(*Asarcomis scutulata*)、凤头潜鸭(*Aythya fuligula*)、番鸭(*Cairina moschata*)及鸳鸯(*Aix galericulata*)的交叉反应。其中绿头鸭与番鸭为食用家禽，斑嘴鸭、白翅栖鸭、凤头潜鸭和鸳鸯为野生禽类。

本文件目标序列为绿头鸭(*Anas platyrhynchos*)分离株CAU pekin 2.0 chr1片段(GenBank登录号JACEUO10000001.1)，其以单拷贝的形式存在于单个基因组中。方法检测限为 5 拷贝/反应，在此浓度($LOD_{95\%}$)下的置信度 ≥ 95%。

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。

ISO16577:2022 分子生物标志物分析 农业与食品生产中分子生物标记分析方法的术语（Molecular biomarker analysis — Vocabulary for molecular biomarker analytical methods in agriculture and food production）

ISO 20813:2019 分子生物标志物分析 食品和农产品中动物源性成分检测与鉴定的分析方法（基于核酸的方法）通用要求和定义（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）

ISO 21571:2005 食品-转基因生物及其产品检测的分析方法 核酸提取（Foodstuffs — Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products — Nucleic acid extraction）

ISO 24276:2006 食品-转基因生物及其产品检测的分析方法 通用要求和定义（Foodstuffs — Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products — General requirements and definitions）

3　术语和定义

ISO 16577界定的术语和定义适用于本文件。

ISO和IEC在以下网址获取标准化术语数据库。

——ISO在线浏览平台：https://www.iso.org/obp

——IEC电子百科全书：可在https://www.electropedia.org/

4　原理

按照ISO 21571:2005，附录A.1规定的方法提取试样DNA。DNA检测包括两部分：

——通过测定真核生物（如 18S rRNA 基因），哺乳动物、家禽（如肌肉生长抑制素基因）的 PCR 方法，验证提取得到的 DNA 质量；

——基于实时荧光定量 PCR 技术，对绿头鸭（*Anas platyrhynchos*）分离株 CAU_Pekin_2.0 chr1 全基因组鸟枪法序列（即 GenBank 登录号：JACEUM010000001.1）的单拷贝鸭种特异性 DNA 序列进行检测。

注：真核核糖体18S RNA（18S rRNA）基因在细胞中的拷贝数从几百到几千不等，而鸭基因组中的特定靶序列和哺

乳动物、家禽基因组中的肌肉生长抑制素基因是单拷贝。基因组中特定靶序列的拷贝数通过全基因组的生物信息学分析（见附录A）和数字PCR来进行绝对定量。

5 试剂耗材

5.1 通则

本文件所用试剂及实验用水均应符合分子生物学级别要求。特殊说明的试剂应经高压灭菌制备。实验应使用无粉手套。建议采用带滤芯移液器吸头，防止交叉污染。

5.2 PCR 试剂

5.2.1 PCR 预混液

实时荧光PCR预混液通常包含耐热DNA聚合酶、dNTPs、$MgCl_2$、KCl及缓冲液，以即用型浓缩混合液形式提供。

注：可使用符合要求的商品化实时荧光 PCR 预混液。

5.2.2 引物和探针

检测所用的引物和探针序列见表1。

表 1 引物和探针序列

检测基因	引物和探针序列	PCR中的终浓度
绿头鸭（*Anas platyrhynchos*）分离株CAU pekin 2.0 Chr1片段（GenBank登录号JACEU010000001.1）[a]		
鸭-105bp-F	5′-TCTTCACAAGCAGGGTCTAATGG-3′	400 nmol/L
鸭-105bp-R	5′-CTTGGCAGAAGGTCCAGAGG-3′	400 nmol/L
鸭-105bp-P	5′-[FAM]-AGGCACAGCACGCATCTCACCACA-[TAMRA][b]-3′	200 nmol/L
[a] PCR 产物=200 064 152-TCTTCACAAG CAGGGTCTAA TGGAAGACTT GCTGGCCTGC TCTCTACTGG TGATGATGTG GTGAGATGCG TGCTGTGCCT CTCTTCCTCT GGACCTTCTG CCAAG - 200 064 048 - JACEUM010000001.1 [b] FAM:6-羧基荧光素，TAMRA:6-羧基四甲基罗丹明。		

鸭源105bp-F对应绿头鸭（*Anas platyrhynchos*）分离株CAU pekin 2.0 Chr1片段（GenBank登录号JACEU010000001.1）的200 064 152 – 200 064 130 bp；鸭源105bp-R对应200 064 048 – 200 064 067 bp；鸭源105bp-P对应200 064 073 – 200 064 096 bp。若能达到相同或更优检测效果，可采用等效报告荧光染料和/或淬灭荧光染料组合。

6 仪器和设备

仪器和设备应符合ISO 20813。除常规的实验室设备外，还需要以下设备：

6.1 实时荧光定量 PCR 仪

需配备能进行DNA扩增并执行温度-时间循环的PCR设备。该设备应具备：

——在特定波长激发荧光分子的能力。

——检测所用荧光标记物（TaqMan 检测体系）荧光信号的能力。

7 方法

7.1 样品制备

选取具有代表性且均一的样品进行DNA提取，样品制备应满足ISO 21571和ISO 20813中所述的一般要求和具体方法。

7.2 DNA 提取

样品的DNA提取应满足ISO 21571中规定的一般要求和方法。推荐ISO 21571:2005附录A中描述的DNA提取方法。

7.3 PCR 设置

7.3.1 反应物混合

总体系为25 μL。反应体系配置如表2所示。试剂在室温下完全解冻，颠倒混匀后瞬时离心。所制备的PCR试剂混合物应包含除样品DNA之外的所有成分，且所制备的PCR试剂混合物的所需总量取决于要进行的反应次数，并至少要额外准备一份反应量，用作移液过程的损失。样品和对照的数量应符合ISO 20813。按照以下步骤进行PCR检测：

a) 将反应液混合后瞬时离心，按照每管 20 μL 分装于 PCR 仪适用的 PCR 管中；
b) 分别取 5 μL 的 DNA 样品加入到分装好的 PCR 管中，阴性对照反应管中加入 5 μL 阴性对照，阳性对照反应管中加入 5 μL 相应模板，空白对照反应管中加入 5 μL 水；
c) 混匀并瞬时离心。

表 2 实时荧光 PCR 反应体系

总反应体积	25 μL
样品DNA[a]或对照	5 μL
2×PCR预混液[b]	12.5 μL
引物Duck-105bp-F，浓度=10 μmol/L	1.0 μL
引物Duck-105bp-R，浓度=10 μmol/L	1.0 μL
探针Duck-105bp-P，浓度=10 μmol/L	0.5 μL
补水至	25 μL

[a] 一次反应中的 DNA 量可以高达 200ng，但建议每次反应的 DNA 量应少于 200ng。
[b] 实验中使用了一种即用型优化的 2×PCR Master Mix，其中包含除模板和引物外的所有成分。2×PCR Master Mix 包含耐热 DNA 聚合酶、dNTP 与 dUTP 和尿嘧啶 UDG 的混合物，以尽量减少携带的 PCR 污染，以及基于 ROX 染料校正荧光信号。可以使用等效产品，不同仪器可根据仪器要求将反应参数作适当调整。

7.3.2 PCR 对照

7.3.2.1 概述

PCR对照应符合ISO 24276和ISO 20813的规定。

7.3.2.2 PCR 对照

应使用内参照基因（即真核生物的 18SrRNA 基因、哺乳动物和家禽的肌肉生长抑制素基因）的 DNA 进行 PCR 检测，以测试核酸的可扩增性并提供对照以排除假阴性结果。

7.3.3 实时 PCR 设置

将配制好的反应管转移到实时荧光定量PCR仪上，摆放反应管时应避免边际效应。

7.4 反应程序

PCR循环条件设置如表3所示。在验证研究中使用时，应验证不同反应条件和实时PCR循环的使用情况，初始变性的时间取决于所使用的预混液。

表 3 实时荧光 PCR 反应参数

步骤	参数		温度	时间	荧光测量	循环数
1	UNG酶活化[a]		50 ℃	2 min	否	1
2	预变性		95 ℃	1 min	否	1
3	扩增	变性	95 ℃	15 s	否	45
		退炎和延伸	60 ℃	60 s	是	

[a] 如果预混液中包含 UDG 酶，则 UNG（尿嘧啶-N-糖苷酶）必须激活，如果预混液不包含 UDG-糖基酶，则 UNG 可选是否激活操作。

8 质控要求与结果表达

8.1 质控要求

鉴定PCR产物应使用与实时荧光PCR仪配套的数据分析程序。扩增结果因所使用仪器型号的不同而存在差异。在没有可检测的PCR产物（如阴性对照）的情况下，结果应表示为“未检出”、“无扩增”或进行的最大反应循环次数。如果样品（如阳性对照）中的DNA靶序列发生扩增，则应观察到S形扩增曲线，应计算扩增曲线和荧光阈值交叉点处的循环数[循环阈值（Ct）或定量循环（Cq）]。

如果由于非典型荧光测量数据导致自动判读不能提供有效结果，则需要在软件分析数据之前手动设置基线和阈值。在这种情况下，应遵循分析软件提供的设备特定说明。

8.2 结果表达

如果满足以下条件，则认为目标序列已检测到：

——结果呈现 S 形扩增曲线并且可以计算 Ct 值或 Cq 值；

——未添加 DNA 的 PCR 对照反应（PCR 试剂对照、提取空白对照）无扩增；

——扩增对照（阳性 DNA 靶标对照、PCR 抑制对照）产生预期的扩增和 Ct 值（或 Cq 值）。

痕量检测被定义为PCR的Ct值大于目标组分$LOD_{95\%}$所对应的Ct值。若出现痕量检出，或同一样品不同提取液的检测结果呈阳性/阴性互相矛盾时，应对该样品进行复检。复检应从实验室均质样品中重新制备至少两份新提取液，并对新提到液开展不少于20次PCR平行重复试验（例如，2份DNA提取液各进行10次PCR重复试验，3份DNA提取液分别进行7次PCR重复试验）。若新提取液的PCR结果中，≥95%为阳性，则判定目标序列检出；若新提取液的PCR结果中，<95%为阳性，则判定目标序列未检出。

9 验证过程和性能指标

9.1 概述

验证过程分为两部分：内部验证和实验室间验证。

9.2 稳健性

通过改变以下因素的反应条件，证实该方法在实验室间验证试验中的稳定性：

d） 实时 PCR 仪器（例如 ABI 7500、BioRad CFX96、ABI 7900 HT Fast、Eppendorf Realplex 4[1)]）；

e） 反应体系：19 µL 或 21 µL PCR 试剂混合物加 5 µL 样品 DNA；

f） 退火温度：59 ℃和 61 ℃；

g） 引物或探针浓度：均降低 30%。

针对每个反应条件，PCR 反应均设置三重复 ：每重复包含 20 拷贝阳性靶序列及 100 拷贝阴性非靶序列（作为阴性对照）。在所有变更条件下，阳性对照与阴性对照的方法性能均符合要求。

9.3 再现性

该方法的再现性试验由上海海关动植物与食品检验检疫技术中心组织的实验室进行验证。试验依据国际纯粹与应用化学联合会（IUPAC）协议及德国联邦消费者保护与食品安全局（BVL）指南开展，共12家实验室参与。实验室间验证中，参与者共接收了12份DNA样本用于假阳性率与假阴性率评估。所有样本采用随机盲样编码，且包含6份重复样本。具体样本组成如下：

鸭源性DNA样本组 （6份），浓度 10 拷贝/µL；

牛源性DNA样本组 （6份），浓度 20 拷贝/µL。

目标序列的拷贝数通过本研究的实时荧光PCR及含目标序列的质粒DNA梯度稀释法测定。质粒DNA浓度（拷贝/µL）通过数字PCR进行绝对定量。

参与者从验证组织方获取PCR预混液和DNA序列（引物和探针）， 以进行PCR实验。

鸭和牛基因组DNA分别从鸭肉和牛肉中提取，然后用0.2×TE缓冲液分别调整其标称浓度，鸭DNA为10 拷贝/µL，牛DNA为20 拷贝/µL。

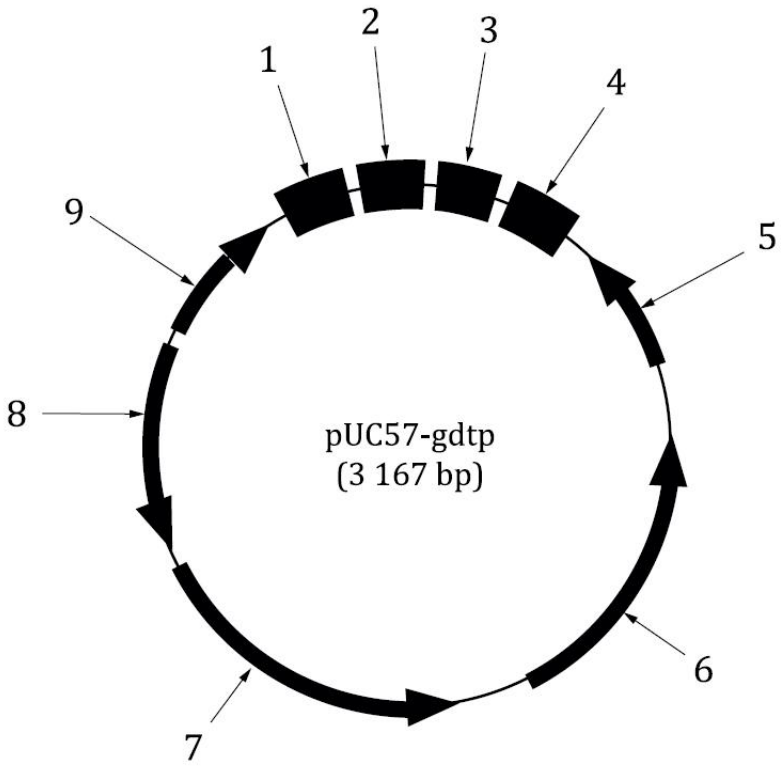
本验证旨在评估检测方法的假阳性和假阴性率。各参与实验室依据表2与表3提供的实验步骤与反应条件，采用单次PCR检测（加样量5 μL）对每个DNA样本进行分析。验证结果汇总于表4。

表 4　协同实验结果

实验室数量	12
提交结果的实验室数量	12
每个实验室的样本数量	12
可接受的结果数量	144
含有鸭源性的样品数量	72
不含鸭源性的样品数量	72
假阳性结果	0
假阳性结果（%）	0
假阴性结果	0
假阴性结果（%）	0

9.4　灵敏度

该方法的检测限（$LOD_{95\%}$）为 5 个 DNA 拷贝。鸭源性成分检测方法的协同验证试验，与鹅（*Anser anser domesticus* ）、火鸡（*Meleagris gallopavo*）和鸽（*Columba livia*）检测方法的协同实验同步开展。通过人工合成鹅、鸭、火鸡和鸽的目标 DNA 序列，并将其克隆到 pUC57 载体中（长 2710bp，GenBank/EMBL 登录号 Y14837），构建重组质粒 pUC57-gdtp（长 3167bp）经测序验证，确认质粒中仅插入了单拷贝的鹅、鸭、火鸡和鸽目标 DNA 序列。图 1 插入序列中无缺失或插入突变，图 2 注明了相应 PCR 方法的目标序列。



注：1　nt 1~121=鹅扩增子（121bp）
2　nt 122~226=鸭扩增子（105bp）
3　nt 227~344=火鸡扩增子（118bp）
4　nt 345~457=鸽子扩增子（113bp）
5　M13反向启动子
6　ColE1复制起点

7 β-内酰胺酶基因（氨苄西林耐药基因）
8 氨苄青霉素抗性基因启动子
9 M13正向启动子

图 1 多鞍点 DNA 质料结构示意图

1	ACGAGGATAG	GTTGTGACAG	CTGACTCTGT	TCAGCCTTGC	GAAGACCTTA
51	TGCTGTCTAC	AATTACCTAA	TTGGAGGATA	TAGAATTATA	GAATCATATA
101	GAGAAGACGA	CACAGAGATT	CTCTTCACAA	GCAGGGTCTA	ATGGAAGACT
151	TGCTGGCCTG	CTCTCTACTG	GTGATGATGT	GGTGAGATGC	GTGCTGTGCC
201	TCTCTTCCTC	TGGACCTTCT	GCCAAGTGAA	CAAATCCACT	TCCCTTTAAC
251	CTCAGGAACA	TCCAGCATAT	TGGTAAACAG	CGGGATGTGG	GGGTGTGGCT
301	GCGGCTCGTC	ATCACCTGCA	GCTCACTTGT	GCAGCAGCTA	ATGAGCAGTT
351	GTTTAGTCCT	CCTGTAACAC	GGACTCCTAA	GAGCACTTCT	CAGCCTGGCT
401	TTGTTTTCGT	CACACTGTGT	ATCTGAACCG	CCGTTCTTTG	CGTCTTGATG
451	TTAGCCC				

注：单粗实线下划线 nt 1~121=鹅扩增片段（121bp）
双下划线 nt 122~226=鸭扩增片段（105bp）
虚线下划线 nt 227~344=火鸡扩增片段（118 bp）
点线下划线 nt 345~457=鸽子扩增片段（113 bp）

图 2 质粒 pUC57 中核苷酸（nt）的完整序列和插入注释

在本次验证中，每个参与方均获得了一种含有pUC57质粒DNA的溶液体系。该溶液中目标序列的拷贝数经校准至1000 拷贝/μL（见图1和图2），并以20 ng/ μL超声处理的鲑鱼精DNA作为载体溶液进行配制。在分装前，该浓度通过数字PCR（QX100液滴数字 PCR系统）完成定量检测。参与验证的12家实验室使用含20 ng/μL超声破碎鲑鱼精DNA的0.2×TE缓冲液，制备了浓度梯度为0.02 拷贝/μL至4 拷贝/μL的系列稀释液。

每个参与方对每个浓度梯度进行了六次重复测定。在72次测试中，每个PCR反应均达到5个拷贝，结果呈阳性（见表5)。

检测概率（POD）指在给定靶序列拷贝数条件下发生PCR扩增的概率（见ISO/TS 16393）。通过整合所有实验室及稀释梯度产生的定性检测数据（见表5），按照文献[3]所述方法确定该检测方法的POD值为0.95（见表6）。测得标准偏差为0.30，95%检测限为3.1拷贝；这两个参数分别显著低于规定的最大值1 拷贝和20 拷贝。

表 5 检测限（$LOD_{95\%}$）的协同实验结果

每次PCR鸭基因组序列中特定DNA序列的拷贝数（标称）	在72个结果中阳性结量（Ct<45）
20	72
10	72
5	72
2	68
1	49
0. 5	34
0.1	8

表 6 检测概率（POD）的协同实验结果

参数		鸭基因组序列中的特定DNA序列
实验室数量		12
每个稀释水平的PCR重复次数		6
POD曲线	实验室平均检测概率（LPOD）	0.80
	LPOD的95%置信区间	0.76~0.83

	相对于理想POD曲线的斜率b（b=1）	1.16
	实验室标准偏差，σL	0.30
$LOD_{95\%}$（拷贝数）	理论中值实验室	3.1

9.5 特异性

根据2019 年初多种鸟类参考基因组的比对结果，研究团队选定绿头鸭（*Anas platyrhynchos*）品种分离株CAU_Pekin_2.0 Chr1 全基因组鸟枪法测序的代表性序列（即GenBank登录号JACEUM010000001.1）作为PCR靶标。通过专用引物-探针设计与优化软件完成了引物及探针的系统设计与参数优化。

基于BLASTN程序对绿头鸭（*Anas platyrhynchos*）基因组特异性引物及探针的理论排他性进行同源性分析。用于比对的 105 bp 查询序列源自 NCBI 登录号 JACEUM010000001.1（核苷酸位置 200 064 152 – 200 064 048）。相似性搜索结果见附件A，未发现与其他基因或物种存在同源性。

表7所列检测体系基于不同物种的DNA样本（约200 ng/PCR）建立，其理论预期值是通过NCBI公共数据库检索确定.

正如预期那样，该PCR扩增体系对绿头鸭（*Anas platyrhynchos*）和斑嘴鸭（*Anas-zonorhyncha*）的DNA检测具有特异性，但实验中发现与鸳鸯（*Aix galericulata*）、白翅栖鸭（*Asarcornis scutulata*），凤头潜鸭（*Aythya fuligula*）及番鸭（*Cairina moschata*）存在交叉反应。

本研究对绿头鸭（*Anas platyrhynchos*）及斑嘴鸭（*Anas zonorhyncha*）的9个品种进行了包容性特异性验证，包括：普通绿头鸭（产地未知，蛋肉样本）、卡其•坎贝尔鸭（英国，蛋用）、樱桃谷鸭（英国，肉用）、北京鸭（中国，肉用）、泰格尔鸭（澳大利亚，肉用）、绍兴鸭（中国，蛋用）、金定鸭（中国，蛋用）、高邮鸭（中国，蛋肉兼用）及斑嘴鸭（中国，野生）。当靶DNA约为100个拷贝时，所有品种样本均检测出预期的阳性信号及扩增曲线。通过BLASTN程序比对GenBank全动物基因组数据库，验证了105bp靶序列的物种包容性。该序列为鸭属特异性序列的验证数据详见附件A.

图B.1展示了鸭科（*Anatidae*）成员及其基于现有公共基因组序列构建的系统发育树。

表 7　目标鸭基因组序列检测方法的特异性

物种测试		理论预期	实验验证
动物	美洲野牛（*Bison bison*）	N	N
	黑天鹅（*Cygnus atratus*）	N	N
	骆驼（*Camelus bactrianus*）	N	N
	鲤鱼（*Cyprinus carpio*）	N	N
	猫（*Felis catus*）	N	N
	牛（*Bos taurus*）	N	N
	鸡（*Gallus Gallus*）	N	N
	家鹅（*Anser Anser domesticus*）	N	N
	家火鸡（*Meleagris gallopavo*）	N	N
	狗（*Canis familiaris*）	N	N
	驴（*Equus asinus*）	N	N
	加拿大马鹿（*Cervus canadensis*）	N	N
	山羊（*Capra hircus*）	N	N
	金鱼（*Carassius auratus*）	N	N
	马（*Equus caballus*）	N	N
	印度瘤牛（*Bos indicus*）	N	N
	绿头鸭（*Anas platyrhynchos*）	Pos	Pos
	鸳鸯（*Aix galericulata*）	Pos	Pos
	小鼠（*Mus musculus*）	N	N
	番鸭（*Cairina moschata*）	Pos	Pos
	鸵鸟（*Struthio camelus*）	N	N
	环颈雉（*Phasianus colchicus*）	N	N
	猪（*Sus scrofa domesticus*）	N	N
	鹌鹑（*Coturnix Coturnix*）	N	N

物种测试		理论预期	实验验证
	欧洲兔（*Oryctolagus cuniculus*）	N	N
	虹鳟（*Oncorhynchus mykiss*）	N	N
	大鼠（*Rattus norvegicus*）	N	N
	猕猴（*Macaca mulatta*）	N	N
	原鸽（*Columba livia*）	N	N
	绵羊（*Ovis aries*）	N	N
	斑嘴鸭（*Anas zonorhyncha*）	Pos	Pos
	鸿雁（*Anser cygnoides domesticus*）	N	N
	凤头潜鸭（*Aythya fuligula*）	Pos	Pos
	珠颈斑鸠（*Streptopelia chinensis*）	N	N
	水牛（*Bubalus bubalis*）	N	N
	野火鸡（*Meleagris Ocellata*）	N	N
	白翅栖鸭（*Asarcornis scutulata*）	Pos	Pos
	野牦牛(*Bos mutus*)	N	N
人类	人类(*Homo sapiens*)	N	N
植物	紫花苜蓿(*Medicago sativa*)	N	N
	玉米(*Zea mays*)	N	N
	油菜(*Brassica napus*)	N	N
	稻(*Oryza sativa*)	N	N
	高粱(*Sorghum bicolor*)	N	N
	大豆(*Glycine max*)	N	N
	小麦(*Triticum aestivum*)	N	N
注：Pos：阳性，N：阴性			
a） 在实验测试中采用合成的105个碱基高同源靶序列（登录号WNMM01000001.1，位置199 307 524 bp – 199 307 628 bp）替代凤头潜鸭（*Aythya fuligula*）生物样本，该序列经BLASTN比对鉴定后已克隆至pUC57质粒载体。 b） 在实验测试中采用合成的105个碱基高同源靶序列（登录号VZSO01008967.1，位置648 bp – 752 bp）替代白翅栖鸭（*Asarcornis scutulata*）生物样本，该序列经BLASTN比对鉴定后已克隆至pUC57质粒载体。			

10 检验报告

测试报告应按照ISO 20813及其他适用标准（如ISO 24276等）的规定编制。

附 录 A
（资料性）
附录 A 基于 BlastN+2.12.0 软件对 GenBank 参考序列基因组和全基因组鸟枪法叠连群测序结果的比对

A.1 查询

A.1.1 查询ID：JACEUM010000001.1（200 064 152 - 200 064 048 bp）。

A.1.2 描述：绿头鸭(*Anas platyrhynchos*)分离株CAU pekin 2.0 chr1片段，全基因组鸟枪法序列。

A.1.3 分子类型：核酸。

A.1.4 查询序列长度：105bp。

A.2 描述

见表A.1

表 A.1 描述

序列描述	最高得分	总分	查询覆盖率%	e值	一致性%	登录号	登录号长度	标准数据库	物种分类
绿头鸭（*Anas platyrhynchos*）分离株CAU_pekin_2.0 Chr1，全基因组鸟枪法序列	195	195	100	2e-47	100	JACE-UM010000001	207246783	全基因组鸟枪法叠连群（wgs）	鸟类（分类ID：8782）
斑嘴鸭（*Anas zonorhyncha*），Scaffold 627，全基因组鸟枪法序列	195	195	100	2e-47	100	01000625.1	360378	全基因组鸟枪法叠连群（wgs）	鸟类（分类ID：8782）
白翅栖鸭（*Asarcornis scutulata*）分离株OUT-0051 Scaffold 113644，全基因组鸟枪法序列	191	191	98	3e-46	100	VZSO01008967.1	1936	全基因组鸟枪法叠连群（wgs）	鸟类（分类ID：8782）
凤头潜鸭（*Aythya fuligula*）分离株bAytFul2 Chr 1，bAytFul2.pri	185	185	98	9e-44	99	NC_045559.1	207018403	GenBank 参考序列基因组（refseq_genomes）	鸟类（分类ID：8782）
鸳鸯（*Aix galericulata*）分离株NCHU-2012 Aplatyrhynchos.1_RagTag，全基因组鸟枪法序列	180	180	98	6e-43	98.06	JAL-LAJ010000001.1	201074787	全基因组鸟枪法叠连群（wgs）	鸟类（分类ID：8782）
番鸭（*Cairina mos- chata*）分离株CanardBarbarie3_02_2015_G,Scaffold 136，全基因组鸟枪法序列	169	169	98	1e-39	96.12	QZEJ01000136.1	2119812	全基因组鸟枪法叠连群（wgs）	鸟类（分类ID：8782）

A.3 序列比对

绿头鸭（*Anas platyrhynchos*）分离株 CAU_Pekin_2.0 Chr1，全基因组鸟枪法测序
序列ID：JACEUM010000001

长度：207246783	比对次数：1		范围 1:200064048 到 200064152	
得分	期望	一致性	差异性	链方向
195 bits（105）	2e-47	105/105(100 %)	0/105(0 %)	正/负

```
Query  1          TCTTCACAAGCAGGGTCTAATGGAAGACTTGCTGGCCTGCTCTCTACTGGTGATGATGTG  60
                  ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  200064152  TCTTCACAAGCAGGGTCTAATGGAAGACTTGCTGGCCTGCTCTCTACTGGTGATGATGTG  200064093

Query  61         GTGAGATGCGTGCTGTGCCTCTCTTCCTCTGGACCTTCTGCCAAG  105
                  |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  200064092  GTGAGATGCGTGCTGTGCCTCTCTTCCTCTGGACCTTCTGCCAAG  200064048
```

斑嘴鸭（*Anas zonorhyncha*），Scaffold 627，全基因组鸟枪法测序
序列ID：NOIK01000625.1

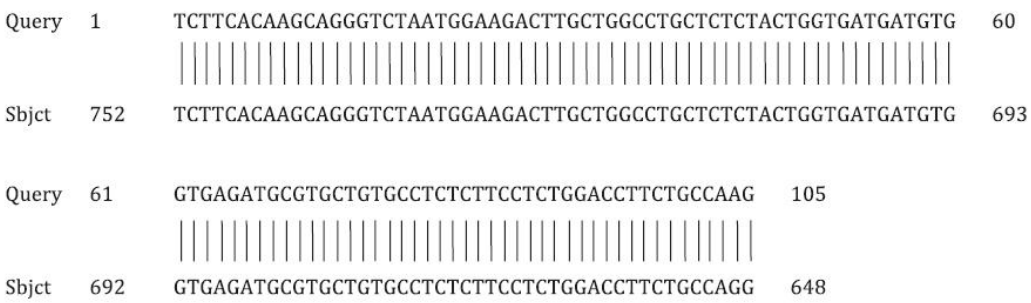
长度：360378	比对次数：1		范围 1:51915 到 52019	
得分	期望	一致性	差异性	链方向
195 bits（105）	2e-47	105/105(100 %)	0/105(0 %)	正/负

```
Query  1      TCTTCACAAGCAGGGTCTAATGGAAGACTTGCTGGCCTGCTCTCTACTGGTGATGATGTG  60
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  52019  TCTTCACAAGCAGGGTCTAATGGAAGACTTGCTGGCCTGCTCTCTACTGGTGATGATGTG  51960

Query  61     GTGAGATGCGTGCTGTGCCTCTCTTCCTCTGGACCTTCTGCCAAG  105
              |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  51959  GTGAGATGCGTGCTGTGCCTCTCTTCCTCTGGACCTTCTGCCAAG  51915
```

白翅栖鸭（*Asarcornis scutulata*）分离株 OUT-0051 Scaffold 113644，全基因组鸟枪法测序
序列编号：VZSO01008967.1

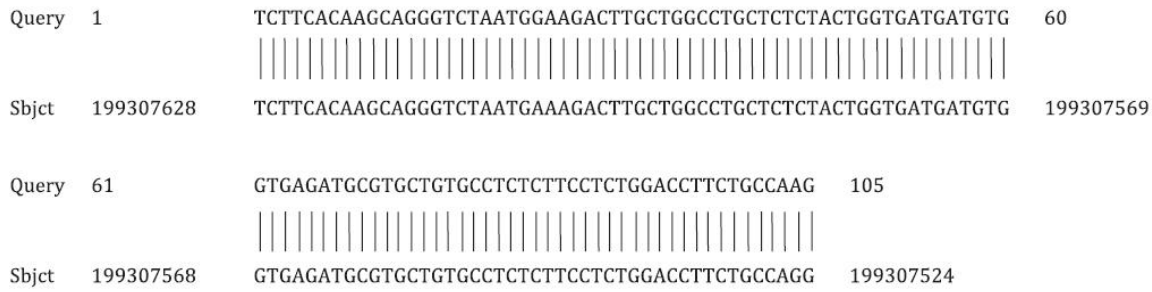
长度：1936	比对次数：1		范围 1:648 到 752	
得分	预期	一致性	差异性	链方向
191 bits（103）	3e-46	103/103(100 %)	0/103(0 %)	正/负



凤头潜鸭（*Aythya fuligula*）分离株bAytFul2 Chr 1，全基因组鸟枪法测序
序列ID：WNMM01000001.1

长度：207018403	比对次数：1	范围 1:199307524 到 199307628
长度：207018403	比对次数：1	范围 1:199307524 到 199307628

得分	预期	一致性	差异性	链方向
185 bits（100）	1e-44	102/103(99 %)	0/103(0 %)	正/负



鸳鸯（*Aix galericulata*）分离株NCHU-2012 Aplatyrhynchos.1_RagTag，全基因组鸟枪法测序
序列ID：JALLAJ010000001.1

长度：207018403	比对次数：1	范围 1:193845780 到 193845884
长度：207018403	比对次数：1	范围 1:193845780 到 193845884

得分	预期	一致性	差异性	链方向
180 bits（97）	6e-43	101/103(98 %)	0/103(0 %)	正/负

```
Query   1       TCTTCACAAGCAGGGTCTAATGGAAGACTTGCTGGCCTGCTCTCTACTGGTGATGATGTG    60
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct   52019   TCTTCACAAGCAGGGTCTAATGGAAGACTTGCTGGCCTGCTCTCTACTGGTGATGATGTG    51960

Query   61      GTGAGATGCGTGCTGTGCCTCTCTTCCTCTGGACCTTCTGCCAAG    105
                |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct   51959   GTGAGATGCGTGCTGTGCCTCTCTTCCTCTGGACCTTCTGCCAAG    51915
```

番鸭（*Cairina moschata*）分离株Canard Barbarie3_02_2015_G,Scaffold 136，全基因组鸟枪法测序
序列ID：QZEJ01000136.1

长度：2119812	比对次数：1			范围 1:1872455 到 1872559
得分	预期	一致性	差异性	链的方向
169 bits（91）	1e-39	99/103(96 %)	0/103(0 %)	正/负

```
Query   1       TCTTCACAAGCAGGGTCTAATGGAAGACTTGCTGGCCTGCTCTCTACTGGTGATGATGTG    60
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct   1872559 TCTTCACAAGCAGGGTCTAATGGAAGACTTGCTGGCCTGCTCTCTGCTGCTGATGACGTG    1872500

Query   61      GTGAGATGCGTGCTGTGCCTCTCTTCCTCTGGACCTTCTGCCAAG    105
                |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct   1872499 GTGAGATGCGTGCCGTGCCTCTCTTCCTCTGGACCTTCTGCCAGG    1872455
```

附 录 B
（资料性）
利用现有公共基因组序列构建的鸭科及其系统发育树

B.1 鸭科成员

表 B.1 鸭科成员

属编号	属	种	可用公共基因组序列的登录号
1	鸳鸯属 (*Aix*)	鸳鸯 (*galericulata*)	JALLAJ000000000.1 (wgs)[a]
		林鸳鸯 (*sponsa*)	
2	埃及雁属(*Alopochen*)	埃及雁 (*aegyptiaca*)	
		马达加斯加埃及雁 (*kervazoi*)	
		毛里求斯埃及雁 (*mauritiana*)	
3	巴西鸭属(*Amazonetta*)	巴西鸭 (*brasiliensis*)	
4	鸭属（ *Anas*）	针尾鸭（*acuta*）	
		白脸针尾鸭（*albogularis*）	
		安第斯鸭（*andium*）	
		奥克兰鸭（*aucklandica*）	
		巴哈马鸭（*bahamensis*）	
		伯尼尔鸭（*bernieri*）	
		海角鸭（*capensis*）	
		北美黑鸭（*carolinensis*）	
		栗胸鸭（*castanea*）	
		黄嘴鸭（*chlorotis*）	
		绿翅鸭（*crecca*）	
		加那利群岛鸭（*diazi*）	
		艾氏鸭（*eatoni*）	
		红嘴鸭（*erythrorhyncha*）	
		黄嘴黑鸭（*flavirostris*）	
		美洲黑鸭（*fulvigula*）	
		乔治亚鸭（*georgica*）	
		灰鸭（*gibberifrons*）	
		赤颈鸭（*gracilis*）	
		雷仙岛鸭（*laysanensis*）	
		吕宋鸭（*luzonica*）	
		马岛鸭（*melleri*）	
		留尼汪鸭（*nesiotis*）	
		绿头鸭（*platyrhynchos*）	JACEUM00000000.1（wgs）
		印缅斑嘴鸭（*poecilorhyncha*）	
		红腿鸭（*rubripes*）	
		非洲黑鸭（*sparsa*）	
		坎贝尔鸭（*superciliosa*）	
		毛里求斯鸭（*theodori*）	
		罗纹鸭（*undulata*）	
		夏威夷黑鸭（*wyvilliana*）	
		斑嘴鸭（*zonorhyncha*）	NOIK01000625.1 (wgs)
5	雁属（*Anser*）	白额雁（*albifrons*）	
		灰雁（*anser*）	
		粉脚雁（*brachyrhynchus*）	NXHY01000202.1（wgs）
		雪雁（*caerulescens*）	
		帝雁（*canagicus*）	
		鸿雁（*cygnoides*）	NW_025927981.1（基因组）

属编号	属	种	可用公共基因组序列的登录号
		小白额雁（*erythropus*）	
		豆雁（*fabalis*）	
		斑头雁（*indicus*）	VDDG01000056.1（wgs）
		细嘴雁（*rossii*）	
		短嘴豆雁（*serrirostris*）	
6	白翅栖鸭属（*Asarcornis*）	白翅栖鸭（*scutulata*）	VZSO01008967.1（wgs）
7	潜鸭属（*Aythya*）	小潜鸭（*affinis*）	
		澳洲潜鸭（*australis*）	
		青头潜鸭（*baeri*）	JAKRSJ000000000.1 ((wgs)
		环颈潜鸭（*collaris*）	
		红头潜鸭（*ferina*）	
		凤头潜鸭（*fuligula*）	NC_045559.1（基因组）
		马岛潜鸭（*innotata*）	
		斑背潜鸭（*marila*）	JAOQIG000000000.1 (wgs)
		新西兰鸭（*novaeseelandiae*）	
		白眼潜鸭（*nyroca*）	
		美洲潜鸭（*valisineria*）	
8	麝鸭属（*Biziura*）	麝鸭（*lobata*）	
9	黑雁属（*Branta*）	黑雁（*bernicla*）	
		加拿大雁（*canadensis*）	SNRU01005576.1（wgs）
		小美洲黑雁（*hutchinsii*）	
		白颊黑雁（*leucopsis*）	
		红胸黑雁（*ruficollis*）	
		夏威夷黑雁（*sandvicensis*）	
10	鹊鸭属（*Bucephala*）	白枕鹊鸭（*albeola*）	
		鹊鸭（*clangula*）	
		巴岛鹊鸭（*islandica*）	
11	栖鸭属（*Cairina*）	番鸭（*moschata*）	QZEJ01000136.1（wgs）
12	环颈鸭（*Callonetta*）	环颈鸭（*leucophrys*）	
13	拉布拉多鸭属（*Camptorhynchus*）	拉布拉多鸭（*labradorius*）	
14	蜡嘴雁属（*Cereopsis*）	蜡嘴雁（*novaehollandiae*）	
15	草雁属（*Chloephaga*）	斑胁草鸭（*hybrida*）	
		黑翅草雁（*melanoptera*）	
		斑草雁（*picta*）	
		灰头草雁（*poliocephala*）	
		棕头草雁（*rubidiceps*）	
16	长尾鸭属（*Clangula*）	长尾鸭（*hyemalis*）	
17	扁嘴天鹅属（*Coscoroba*）	扁嘴天鹅（*coscoroba*）	
18	蓝翅雁属（*Cyanochen*）	蓝翅雁（*cyanoptera*）	
19	天鹅属（*Cygnus*）	黑天鹅（*atratus*）	NW_02336758.1（基因组）
		黑嘴天鹅（*buccinator*）	JAHMHU010001625.1（wgs）
		小天鹅（*columbianus*）	
		大天鹅（*cygnus*）	BMBB01013197.1（wgs）
		黑颈天鹅（*melancoryphus*）	
		疣鼻天鹅（*olor*）	NC_049169.1（基因组）
20	树鸭属（*Dendrocygna*）	西印度树鸭（*arborea*）	
		斑胸树鸭（*arcuata*）	
		黑腹树鸭（*autumnalis*）	

属编号	属	种	可用公共基因组序列的登录号
		茶色树鸭（*bicolor*）	
		尖羽树鸭（*eytoni*）	
		细斑树鸭（*guttata*）	
		栗树鸭（*javanica*）	
		白脸树鸭（*viduata*）	
21	黑头鸭属（*Heteronetta*）	黑头鸭（*atricapilla*）	JAACYQ000000000.1（wgs）
22	丑鸭属（*Histrionicus*）	丑鸭（*histrionicus*）	
23	褐顶秋沙鸭属（*Hymenolaimus*）	褐顶秋沙鸭（*malacorhynchos*）	
24	棕胁秋沙鸭属（*Lophodytes*）	棕胁秋沙鸭（*curullatus*）	
25	南美鸭属（Lophonetta）	南美鸭（*specularioides*）	
26	粉耳鸭属（*Malacorhynchus*）	粉耳鸭（*membranaceus*）	
27	赤颈鸭属（*Mareca*）	美洲赤颈鸭（*americana*）	
		罗纹鸭（*falcata*）	
		阿岛鸭（*marecula*）	
		赤颈鸭（*penelope*）	
		黑白斑胸鸭（*sibilatrix*）	
		赤膀鸭（*strepera*）	
28	斑嘴潜鸭属（*Marmaronetta*）	斑嘴潜鸭（*angustirostris*）	
29	海番鸭属（*Melanitta*）	白翅黑海番鸭（*deglandi*）	
		丝绒海番鸭（*fusca*）	
		黑海番鸭（*nigra*）	
		斑头海番鸭（*perspicillata*）	
		斑脸海番鸭（*stejnegeri*）	
30	湍鸭属（*Merganetta*）	湍鸭（*armata*）	
31	斑头秋沙鸭属（*Mergellus*）	斑头秋沙鸭（*albellus*）	
32	秋沙鸭属（*Mergus*）	奥洲秋沙鸭（*australis*）	
		普通秋沙鸭（*merganser*）	
		巴西秋沙鸭（*octosetaceus*）	
		红胸秋沙鸭（*serrator*）	
		中华秋沙鸭（*squamatus*）	
33	绿翅雁属（*Neochen*）	绿翅雁（*jubata*）	
34	狭嘴潜鸭属（*Netta*）	灰嘴潜鸭（*erythrophthalma*）	
		粉嘴潜鸭（*peposaca*）	
		赤嘴潜鸭（*rufina*）	
35	棉凫属（*Nettapus*）	厚嘴棉凫（*auritus*）	JAACYP010002576.1（wgs）
		棉凫（*coromandelianus*）	
		绿棉凫（*pulchellus*）	
36	花脸硬尾鸭属（*Nomonyx*）	花脸硬尾鸭（*dominicus*）	
37	硬尾鸭属（*Oxyura*）	棕硬尾鸭（*jamaicensis*）	NW_023310710.1（基因组）
		白头硬尾鸭（*leucocephala*）	
		澳洲硬尾鸭（*maccoa*）	
		非洲硬尾鸭（*vittata*）	
38	距翅雁属（*Plectropterus*）	距翅雁（*gambensis*）	
39	小绒鸭属（*Polysticta*）	小绒鸭（stelleri）	
40	黑头凫属（*Pteronetta*）	黑头凫（*hartlaubii*）	
41	白腹麻鸭属（*Radjah*）	白腹麻鸭（*radjah*）	
42	粉头鸭属（*Rhodonessa*）	粉头鸭（*caryophyllacea*）	
43	花纹鸭属（*Salvadorina*）	花纹鸭（*waigiuensis*）	
44	瘤鸭属（*Sarkidiornis*）	瘤鸭（*melanotos*）	

属编号	属	种	可用公共基因组序列的登录号
		美洲瘤鸭（*sylvicola*）	
45	花脸鸭属（*Sibirionetta*）	花脸鸭（*formosa*）	
46	绒鸭属（*Somateria*）	眼圈绒鸭（*fischeri*）	
		欧绒鸭（*mollissima*）	
		王绒鸭（*spectabilis*）	
47	匙嘴鸭属（Spatula）	琵嘴鸭（*clypeata*）	
		蓝翅鸭（*discors*）	
		南非鸭（*hottentota*）	
		赤琵嘴鸭（*platalea*）	
		安第斯银鸭（*puna*）	
		白眉针尾鸭（querquedula）	
		澳洲琵嘴鸭（*rhynchotis*）	
		非洲琵嘴鸭（*smithii*）	
		银鸭（*versicolor*）	
48	铜翅鸭属（*Speculanas*）	铜翅鸭（*specularis*）	
49	点斑鸭属（*Stictonetta*）	澳洲斑鸭（*naevosa*）	JAACYO010005739.1（wgs）
50	船鸭属（*Tachyeres*）	短翅船鸭（*bachypterus*）	
		白头船鸭（*leucocephalus*）	
		花斑船鸭（*patachonicus*）	
		灰头船鸭（*pteneres*）	
51	麻鸭属（*Tadorna*）	灰头麻鸭（*cana*）	
		冠麻鸭（*cristata*）	
		赤麻鸭（*ferruginea*）	
		翘鼻麻鸭（*tadorna*）	
		棕胸麻鸭（*tadornoides*）	
		黑胸麻鸭（*variegata*）	
52	白背鸭属（*Thalassornis*）	白背鸭（*leuconotus*）	
[a] wgs：全基因组鸟枪法序列			

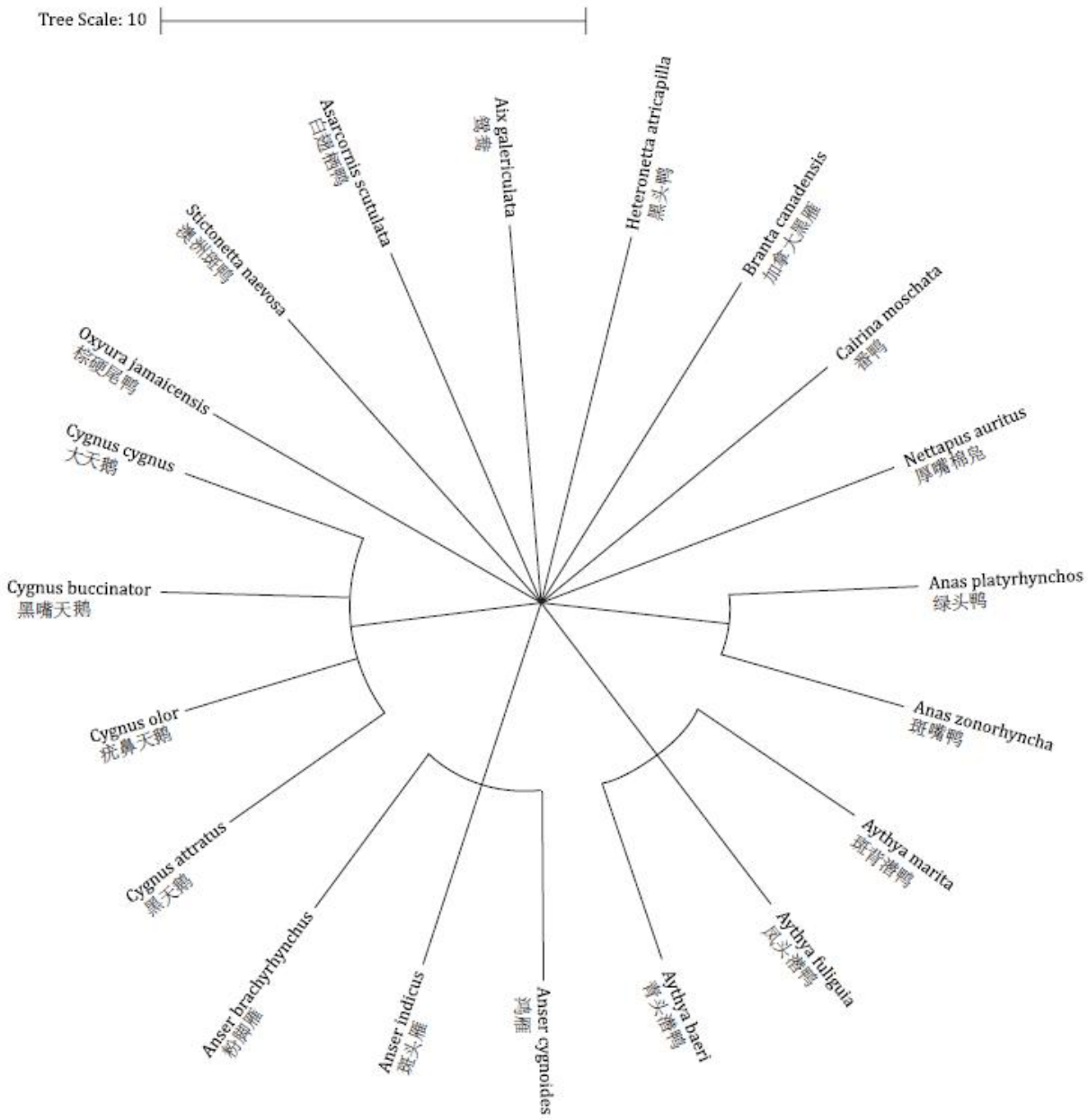


图 B.1　基于现有公共基因组序列建立的鸭科（*Anatidae*）系统发育树

基于公共基因组数据，通过NCBI分类数据库（NCBI Taxonomy）与交互式生命之树工具（iTol）进行分析。各物种的登录号详见表 B.1。

参 考 文 献

[1] Three chromosome-level duck genome assemblies provide insights into genomic variation during domestication. Nat Commun. 2021, 12(1), pp. 5932-5942
[2] HoRwITz W., Protocol for the design, conduct and interpretation of method performance studies. Pure and Appl. Chem. 1995, 67, pp. 331–343
[3] Guidelines for the validation of qualitative real-time PCR methods by means of a collaborative study. Federal Office of Consumer Protection and Food Safety. Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL)
[4] ISO/TS 16393, Molecular biomarker analysis — Determination of the performance characteristics of qualitative measurement methods and validation of methods
[5] UhLIg S., FRost K., CoLSon B., SIMon K., Mäde D., ReITINg R., GowIK P., GRohMANN L., Validation of qualitative PCR methods on the basis of mathematical-statistical modelling of the probability of detection. Accred Qual Assur. 2015, 20, pp. 75–83
[6] NatIonaL CenteR FoR BIoteChnoLogy InFoRMATIon (NCBI BLAST), Available at (accessed 2022-09-20):https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINKLOC=blasthome
[7] WoRLD BIRD LIST I.O.C., (v13.1). Available at (accessed 2023-05-06): https://www.worldbirdnames.org/ioc-lists/crossref/
[8] NatIonaL CenteR FoR BIoteChnoLogy InFoRMATIon (NCBI TaxonoMy), Available at (accessed 2023-05-06): https://www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy/?term=
[9] Interactive Tree Of Life (iTOL v6). Available at (accessed 2023-05-06): https://itol.embl.de/