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 20224-4:2020

、

动物源性制品中源性成分检测 实时荧光定量 PCR 法 第 4 部分： 鸡 DNA 检测方法

Detection of common animal-derived components in livestock and poultry
Real-time PCR — Part 4: Chicken DNA detection method

(点击此处添加与国际标准一致性程度的标识)

（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

引　言

食品和饲料中肉类的欺诈性掺假威胁公共安全和商业秩序。掺假行为可能影响遵守民族饮食规则的人群、经济发展和社会稳定。本文件提供了一种实时聚合酶链反应（实时PCR）分析方法，用于根据食品和饲料配料中存在的核酸鉴定肉类动物物种。

食品和饲料中动物源性生物材料的检测和鉴定，在实验室中通过以下连续（或同步）步骤进行：监测样品/试样的制备、核酸提取与纯化、PCR扩增及结果解读。本文件为针对鸡源性DNA检测的PCR扩增和结果解读提供了指导。

ISO 20224系列由描述具体应用的技术规范组成。未来建立的新物种DNA检测方法将作为独立部分添加到该系列中。

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。

本文件由全国生化检测标准化技术委员会(SAC/TC387)提出并归口。

本文件起草单位：中国测试技术研究院、成都市食品检验研究院

本文件主要起草人：

动物源性制品中源性成分检测 实时荧光定量 PCR 法 第 4 部分： 鸡 DNA 检测方法

1 范围

本文件规定了一种用于检测源自动物源性食品中的鸡特异性DNA的实时聚合酶链反应（实时PCR）定性检测方法。该方法要求从相关基质中提取足量可进行PCR扩增的DNA，并可用于检测源自家鸡（*Gallus gallus domesticus*）和原鸡（*Gallus gallus*）的鸡源性成分。

靶标序列是家鸡转化生长因子β-3第四内含子（TGF-β3基因）的部分片段（即GenBank登录号AY685072.1），该序列在每个单倍体基因组中以单拷贝形式存在。针对该靶标序列所提供的PCR检测方法，其绝对检测极限为每个反应5个拷贝，并且在此浓度下具有≥95%的可重复性（检出限$LOD_{95\%}$）。

2 指导性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅所注日期的版本适用于本文件。凡是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。

ISO 16577 《分子生物标记物分析——术语与定义》

ISO 20813 《分子生物标记物分析——食品和食品中动物物种检测与鉴定的分析方法（基于核酸的方法）——通用要求和定义》

ISO 21571 《食品——转基因生物及衍生产物检测的分析方法——核酸提取》

ISO 24276 《食品——转基因生物及衍生产物检测的分析方法——通用要求和定义》

3 术语和定义

本文件采用ISO 16577界定的术语和定义。

ISO和IEC维护用于标准化的术语数据库，可通过以下地址访问：

—ISO在线浏览平台：访问网址 https://www.iso.org/obp

—IEC电工术语数据库：访问地址https:// www .electropedia .org/

4 原理

通过采用适当的方法（参见 ISO 21571:2005，A.1）从试样中提取 DNA。DNA 分析由两部分组成：

——使用针对真核生物（例如 18S rRNA 基因）或哺乳动物和家禽（如肌肉生长抑制素基因）特异性 PCR 测定法，验证所提取 DNA 的质量和可扩增性；

——通过实时PCR检测鸡的特异性DNA序列，即单拷贝TGF-β3基因（GenBank登录号AY685072.1）的。

注：细胞中真核核糖体18S RNA（18S rRNA）基因的拷贝数为数百至几千不等，而鸡基因组中的TGF-β3基因以及哺乳动物和禽类基因组中的肌肉生长抑制素基因为单拷贝。鸡基因组中TGF-β3基因的拷贝数已通过全基因组范围的生物信息学分析（参见附录A）和用于决定定量的数字PCR技术进行了确认。

5 试剂和材料

5.1 通用要求

对于本文本，仅应使用公认的分析纯级别且适用于分子生物学的化学品和水。除非另有说明，溶液应通过将相应试剂溶于水中并随后进行高压灭菌来制备。在所有使用手套的操作中，手套须为无粉型。建议使用带气溶胶防护的移液器吸头（以防交叉污染）。

5.2 PCR 试剂

5.2.1 PCR 预混液

PCR 预混液包含热稳定 DNA 聚合酶、pH 缓冲液、KCl、$MgCl_2$、尿嘧啶-DNA 糖基化酶（UDG）以及四种脱氧核苷三磷酸（dATP、dGTP、dUTP、dCTP），以可稀释的浓缩液形式提供，可直接使用。

注：可使用商品化实时PCR预混液。

5.2.2 寡核苷酸

寡核苷酸的质量应满足其作为引物和探针使用的要求。见表 1。

表 1 寡核苷酸序列

名称	寡核苷酸的 DNA 序列	PCR 反应中的终浓度
鸡 TGF-β3 基因目标序列（GenBank 登录号 AY685072.1）[a]		
鸡-77bp-F	5′-CAGCTGGCCTGCCGGC-3′	400 nmol/L
鸡-77bp-R	5′-GCCCAGTGGAATGTGGTATTCA-3′	400 nmol/L
鸡-77bp-P	5′-[FAM]-TGCCACTCCTCTGCACCCAGTGC-[TAMRA]-3′	200 nmol/L
[a] PCR 产物 = 313 - CAGCTGGCCT GCCGGCTTCT GCCAAGCTCT GCCACTCCTC TGCACCCAGT GCAGGTGAAT ACCACATTCC ACTGGGC - 389 - AY685072.1。 [b] FAM：6-羧基荧光素, TAMRA：6-羧基四甲基罗丹明		

鸡-77bp-F 对应于 AY685072.1（鸡 TGF-β3 基因）的第 313-328 位碱基，鸡-77bp-R 对应于第 368-389 位碱基，鸡-77bp-P 对应于第 342-364 位碱基。如果能达到相同或更好的结果，可使用等效的报告基团和/或淬灭基团。

6 仪器设备

仪器设备和材料的要求应符合 ISO 20813 的规定。除常规实验室设备外，还需以下设备：

6.1 实时热循环仪

PCR 过程需要一种能够在体外扩增 DNA 并执行温度-时间循环的设备。此外，该设备应能激发特定波长的荧光分子，并充分检测所使用荧光基团发射的荧光，以执行 TaqMan 格式的检测。

7 实验步骤

7.1 试样/样品的制备

用于 DNA 提取的检测样品应具有实验室样品的代表性，并且是均质的，例如通过将实验室样品研磨或均质化成细小的混合物。试样/样品的制备应遵循 ISO 21571 和 ISO 20813 中描述的通用要求和具体方法。

7.2 DNA 提取物的制备

从试样中提取/纯化和定量 DNA 应遵循 ISO 21571 中提供的通用要求和方法。推荐使用 ISO 21571:2005 附录 A 中描述的 DNA 提取方法。

7.3 PCR 反应体系设置

7.3.1 反应混合液

本方法采用每个 PCR 反应总体积 25 μL。反应体系的配制见表 2。试剂应在室温下完全解冻。每种试剂在移取前应充分混匀并瞬时离心。制备含有除样品 DNA 之外所有组分的 PCR 试剂混合液。所需制备的 PCR 试剂混合液总量取决于需进行的反应数量，并应至少额外准备一个反应作为移液损耗的预留。样品和对照的重复次数应遵循 ISO 20813 的规定。按以下步骤设置 PCR 检测：

按以下步骤设置进行PCR检测:

a) 混匀 PCR 试剂混合液，瞬时离心后向每个反应管中移取 20 μL；
b) 分别向相应的反应管中加入 5 μL 样本 DNA（20 ng/μL 至 200 ng/μL）或阳性 DNA 目标对照或提取空白对照或水；
c) 混匀后瞬时离心。

表 2 PCR 扩增反应体系

总反应体积	25 μL
样本 DNA（20ng/μL-200 ng/μL）或对照	5 μL
2×PCR 预混液 [a]	12.5 μL
引物鸡-77bp-F，c = 10 μmol/L 和鸡-77bp-R，c = 10 μmol/L	各 1.0 μL
探针鸡-77bp-P，c = 10 μmol/L	0.5 μL
补水至	25 μL
[a] 在合作试验中，使用了一种即用型优化的 2× PCR 预混液，该预混液包含除模板和引物外的所有组分。该 2× PCR 预混液含有热稳定 DNA 聚合酶、包含 dUTP 和尿嘧啶-DNA 糖基化酶（UDG）的 dNTP 混合物（以减少 PCR 遗留污染），以及基于 ROX 染料的被动内参。如果能获得相同或更好的结果，可以使用等效产品。如有必要，可对试剂量和温度-时间程序进行调整。	

7.3.2 PCR 对照

7.3.2.1 通用要求

PCR 对照的设置应符合 ISO 24276 和 ISO 20813 的规定。

7.3.2.2 内参对照（参考基因检测）

应使用样本 DNA 进行参考对照基因（例如，针对真核生物的 18S rRNA 基因、针对哺乳动物和禽类的肌肉生长抑制素基因）的 PCR 检测，以验证核酸的可扩增性，并作为排除假阴性结果的对照。

7.3.3 实时 PCR 仪样板设置

将已设置好的反应管转移至实时 PCR 仪中。反应管的摆放应能避免因特定实时 PCR 仪可能导致的边缘温度变化。启动温度-时间程序。

7.4 PCR 反应程序

验证研究中使用的 PCR 反应程序见表 3。如果使用不同的反应条件和实时 PCR 循环程序，则必须进行验证。初始变性时间取决于所使用的预混液。

表 3 PCR 反应程序

步骤	参数		温度	时间	荧光测量	循环数
1	初始变性		95℃	10 min	否	1
2	扩增	变性	95℃	15 s	否	45
		退火/延伸	60℃	60 s	是	

8 结果判定标准

8.1 通用要求

应使用相应的实时 PCR 仪器专用的数据分析程序来识别 PCR 产物。扩增结果的表达方式可能因所使用的仪器而异。在没有检测到 PCR 产物的情况下（例如阴性对照），结果应表示为“未检出”、“无扩增”或所执行的最大反应循环数。如果样品中的 DNA 靶标序列发生扩增（例如阳性对照），则应观察到典型的 S 型扩增曲线。应计算扩增曲线与荧光阈值交叉点处的循环数[循环阈值（Ct）或定量循环数（Cq）]。

如果由于非典型的荧光测量数据导致自动判读无法提供有意义的结果，则可能需要在解读数据前手动设置基线和阈值。在这种情况下，应遵循判读软件随附的仪器专用说明。

8.2 结果判定

在以下情况下，目标序列被视为检出：

鸡特异性引物鸡-77bp-F 和鸡-77bp-R 以及探针鸡-77bp-P 产生 S 型扩增曲线，并且可以计算出 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）未产生扩增；

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

痕量检出定义为 Ct 值晚于目标检测限 $LOD_{95\%}$所定义 Ct 值的 PCR 结果。如果出现痕量检出，或同一样品不同提取物出现矛盾的阳性/阴性结果，则应重新检测该样品。应从已均质化的实验室样品中至少制备两份新的提取物。对新提取物应进行至少 20 次 PCR 重复检测（例如，两份提取 DNA 各进行 10 次 PCR 重复，三份提取 DNA 各进行 7 次 PCR 重复）。如果新提取物的 PCR 结果中≥95%显示阳性检出，则目标序列应视为“检出”。如果新提取物的 PCR 结果中< 95%显示阳性检出，则目标序列应视为“未检出”。

9 方法验证与性能指标

9.1 通用要求

验证遵循两部分流程：

a) 实验室内部验证；

b) 协同试验验证。

9.2 稳健性

通过改变以下因素的反应条件，在协同试验中确认了该方法的稳健性：

a) 实时 PCR 仪器（如 ABI 7500, BioRad CFX96, ABI 7900 HT Fast, Eppendorf Realplex 4[1)]；

b) 反应体积：19μL 或 21μLPCR 混合液加 5μL 样本 DNA（20 ng/μL -200 ng/μL）；

c) 退火温度：59℃和 61℃；

d) 引物或探针浓度：两者均降低 30%。

对于每个测试因素，PCR 分析均进行三次重复，每个重复均包含 20 个拷贝的目标序列，并使用 100 个拷贝的非目标序列作为阴性对照。在改变每个测试因素的条件下，样品和阴性对照的方法性能均保持令人满意。

1）这些是市售合适产品的示例。提供此信息是为了方便本文件的使用者，并不构成 ISO 对这些产品的认可。

9.3 重现性验证

该方法的重现性通过一项由上海海关动植物与食品检验检疫技术中心组织、遵循 IUPAC 协议和 BVL 指南的协同试验进行了验证，共有 13 家实验室参与。参与者收到 12 份 DNA 样品，用于评估假阳性和假阴性率。所有样品均使用随机编码标记，由六个重复样品组成。这 12 份 DNA 样品为：

——6 份鸡源 DNA 溶液，10 拷贝/μL；

——6 份马源 DNA 溶液，20 拷贝/μL。

拷贝数通过使用本方法的实时 PCR 和含有靶标序列的质粒 DNA 的系列稀释液确定。质粒 DNA 的浓度（拷贝/μL）通过数字 PCR 测量。

参与者从协同试验组织者处收到 PCR 预混液和寡核苷酸（引物和探针）以进行 PCR 实验。

鸡和马基因组 DNA 分别从鸡肉和马肉中提取，然后用 0.2×TE 缓冲液调整至标称浓度：鸡 DNA 为 10 拷贝/μL，马 DNA 为 20 拷贝/μL。

协同试验旨在确定假阳性率和假阴性率。每份 DNA 样本由参与者使用 5 μL 相应的 DNA 溶液，按照表 2 和表 3 中给出的程序和条件进行单次 PCR 测试。协同试验结果见表 4。

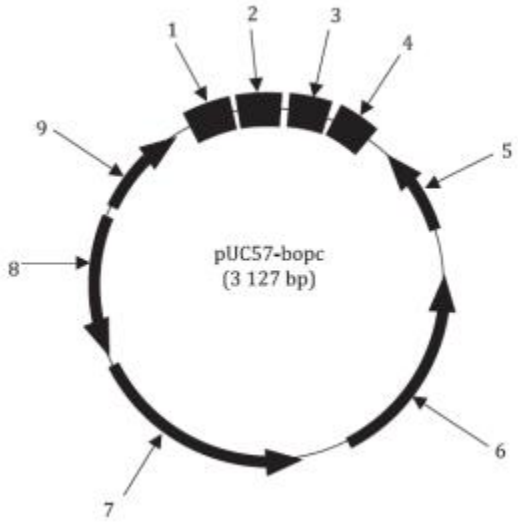
表 4 协同实验结果

参与实验室数量	13
提交结果的实验室数量	13

每个实验室的样本数量	12
可接受结果数量	156
可接受的含鸡肉成分样品数量	78
可接受的不含鸡肉成分样品数量	78
假阳性结果数量	0
假阳性率（%）	0
假阴性结果数量	0
假阴性率（%）	0

9.4 灵敏度

该方法的绝对检测限（$LOD_{95\%}$）为 5 个 DNA 拷贝。鸡检测方法的协同试验与牛、猪和羊检测方法的协同实验同时进行。合成了牛、羊、猪和鸡目标 DNA 序列，并将其克隆至 pUC57 载体（长度为 2,710 bp，GenBank/EMBL 登录号 Y14837）。对该构建的质粒 pUC57-bopc（长度为 3,127bp）进行了测序，以确保每种牛、羊、猪和鸡的目标 DNA 序列仅插入一个拷贝（见图 1）。在插入序列中未发现缺失或插入突变（见图 2）。相应 PCR 方法的目标序列已标明。



图例
1 第 1~ 62 位碱基 =牛扩增子（62 bp）
2 第 63~150 位碱基 =羊扩增子（88 bp）
3 第 244~340 位碱基=猪扩增子（97 bp）
4 第 341~417 位碱基 =鸡扩增子（77 bp）
5 M13 反向启动子
6 ColE1 复制起始点
7 β-内酰胺酶基因（氨苄青霉素抗性基因）
8 氨苄青霉素抗性基因启动子
9 M13 正向启动子

图 1 多靶标 DNA 质粒图谱

1 GGCCTCGGAG TGTGTATTCA GTAGGTGCAC AGTACGTTCT GAAGTGAACC

51 TCATTCTGGG GCCCAACATG CCTTTAAACC CTCAAAAACC ATTGAGACTG

101 GCGGGGAAGG AAAGGCAGCC AAACAGAGCG AGTCAGAAGG CTACAGTTCC

151 acacaatgtt acgcgtatgc aagtacatta caccgctcgc ctacacacaa

201 atacatttac taacatccat ataacgcgga catacagcct tcaCGTAGGT

251 GCACAGTAGG TCTGACGTGA CTCCCCGACC TGGGGTCCCC AGCACACTTA

301 GCCGTGTTCC TTGCACTCTC TGCATGTCCC CAGTCTGGCC CAGCTGGCCT

351 GCCGGCTTCT GCCAAGCTCT GCCACTCCTC TGCACCCAGT GCAGGTGAAT

401 ACCACATTCC ACTGGGC

图例
单实线 nt 1~62 = 牛扩增子（62 bp）
双实线 nt 63~150 = 羊扩增子（88 bp）
虚线 nt 244~340 = 猪扩增子（97 bp）
点线 nt 341~417 = 鸡扩增子（77 bp）

图 2 质粒 pUC57 中插入片段的完整核苷酸序列及注释

协同试验中的每个参与者都收到一份含有质粒 pUC57 DNA 的溶液，该溶液在 20 ng/μL 的超声破碎鲑鱼精子 DNA 中调整为靶标序列 1000 拷贝/μL。在分发前，通过数字 PCR（QX100 微滴式数字 PCR 系统[2)]）测量了浓度。13 家实验室使用含有 20 ng/μL 超声破碎鲑鱼精子 DNA 的 0.2× TE 缓冲液，制备了范围为 0.02 拷贝/μL 至 4 拷贝/μL 的系列稀释液。每位参与者对每个浓度水平进行六次重复测量。在 78 次测试中，有 78 次在每 PCR 反应 5 个拷贝时获得了阳性结果（见表 5）。

检测概率（POD）描述了在给定靶标序列拷贝数下发生 PCR 扩增的概率。使用收集自所有实验室和所有稀释水平（见表 5）的定性数据来确定该检测方法的 POD = 0.95（见表 6）。经测定，标准差为 0.30，LOD_{95}% 为 3.3 拷贝；这两个参数均远低于所要求的最大值（分别为 1 和 20 拷贝）。

[2)] 这是由 Bio-Rad GmbH 公司供应的产品。提供此信息是为了方便本文件的使用者，并不构成 ISO 对该指定产品的认可。如果能证明等效产品能得出相同的结果，则可以使用这些等效产品。

表 5 检测限的协同试验结果

每 PCR 反应中鸡 TGF-β3 基因拷贝数（标称值）	78 次检测结果中的阳性结果数（Ct < 45）
20	78
10	78
5	78
2	69
1	42
0.5	25
0.1	6

表 6 检出概率（POD）的协同试验结果

参数		鸡 TGF-β3 基因
参与实验室数量		13
每个稀释水平的 PCR 重复次数		6
POD 曲线	各实验室间的平均检出概率（LPOD）	0.74
	相对于理想 POD 曲线的斜率（b = 1）	1.18

参数		鸡 TGF-β3 基因
	实验室间标准差，σ_L	0.30
检出限 LOD_{95}% （拷贝数）	理论中位实验室	3.3

9.5 特异性

从鸡 TGF-β3 基因（GenBank 登录号 AY685072.1）中选取了一个代表性序列作为 PCR 靶标。使用引物-探针选择和优化软件设计并优化了引物和探针。

使用 BLASTN 程序分析了鸡 TGF-β3 基因引物和探针与其他物种同源性的理论排他性特异性。用作查询序列的 77 bp 序列是 NCBI 登录号 AY685072.1 的一部分（核苷酸位置：313-389）。相似性搜索结果见附录 A。未发现与其他基因和物种的同源性。

使用来自不同物种的 DNA（约 200 ng/PCR）建立了表 7 中规定的检测方法。理论预期数据通过在公共 NCBI 数据库中的查询确定。

使用来自 10 个品种的样品测试了包容性特异性，这些品种包括：罗马母鸡（德国，蛋用）、白来航鸡（意大利，蛋用）、白普利茅斯岩鸡（美国，肉用）、罗斯鸡（英格兰，蛋用）、狼山鸡（中国，肉蛋兼用）、芦花鸡（中国，肉蛋兼用）、萧山鸡（中国，肉蛋兼用）、阳山鸡（中国，肉用）、白隐性岩鸡（法国，肉用）以及原鸡亚种（中国，肉用）。在约 100 个靶标 DNA 拷贝的情况下，所有品种的样品均被检出，并获得了预期的阳性信号和扩增曲线。还使用 BLASTN 程序针对 GenBank 全动物基因组数据库评估了该 77 bp 靶标序列的包容性。附录 A 中提供了表明该 77 bp 靶标序列为鸡所特有的结果。

表 7　鸡 TGF-β3 基因检测方法的特异性

测试物种		理论预期值	实验确认
动物	美洲野牛(*Bison bison*)	N	N
	骆驼(*Camelus bactrianus*)	N	N
	鲤鱼(*Cyprinus carpio*)	N	N
	猫(*Felis catus*)	N	N
	牛(*Bos taurus*)	N	N
	家鸡(*Gallus gallus domesticus*)	Pos	Pos
	狗(*Canis familiaris*)	N	N
	驴(*Equus asinus*)	N	N
	鸭(*Anas platyrhynchos*)	N	N
	马鹿(*Cervus canadensis*)	N	N
	山羊(*Capra hircus*)	N	N
	金鱼(*Carassius auratus*)	N	N
	鹅(*Anser anser*)	N	N
	马(*Equus caballus*)	N	N
	印度瘤牛(*Bos indicus*)	N	N
	原鸡(*Gallus gallus*)	Pos	Pos
	小鼠(*Mus musculus*)	N	N
	猕猴(*Macaca mulatta*)	N	N
	鸵鸟(*Struthio camelus*)	N	N
	雉鸡(*Phasianus colchicus*)	N	N
	猪(*Sus scrofa domesticus*)	N	N
	鸽(*Columba livia*)	N	N
	鹌鹑(*Coturnix coturnix*)	N	N
	兔(*Oryctolagus cuniculus*)	N	N
	大鼠(*Rattus norvegicus*)	N	N
	绵羊(*Ovis aries*)	N	N

	虹鳟鱼(*Onchorhynchus mykiss*)	N	N
	火鸡(*Meleagris gallopavo*)	N	N
	水牛(*Bubalus bubalis*)	N	N
	牦牛(*Bos mutus*)	N	N
人	人(*Homo sapiens*)	N	N
植物	紫花苜蓿(*Medicago sativa*)	N	N
	玉米(*Zea mays*)	N	N
	油菜(*Brassica rapa*)	N	N
	水稻(*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			

10 检测报告

检测报告应按照 ISO 20813 和其他适用标准（如 ISO 24276）的规定进行编制。

附 录 A
（资料性）
针对 GenBank refseq_genomes（441 个数据库）进行查询的 BlastN 2.9.0 结果

A.1 查询序列

A.1.1 查询序列ID：AY685072.1（第313-389位碱基）

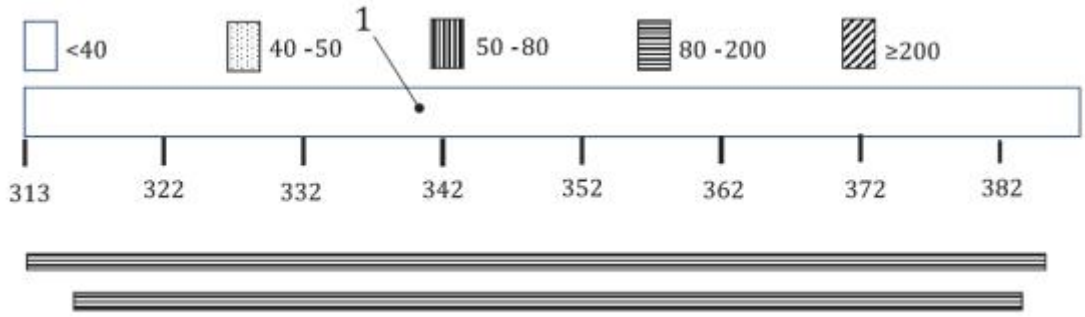
A.1.2 描述：家鸡 (*Gallus gallus*)转化生长因子β3基因第四内含子（TGF-β3）基因

A.1.3 分子类型：核酸。

A.1.4 查询序列长度：77bp。

A.2 2 条目标序列上排名前 2 的 BLAST 命中结果分布

见图A.1。



图例
1 查询序列

图 A.1 比对得分图例

A.3 序列描述

表 A.1 序列描述

说明	最高得分	总分	查询覆盖度%	期望值	一致性%	登录号
家鸡(*Gallus gallus*)，红原鸡品种，分离株RJF #256，5 号染色体，GRCg6a 参考基因组	143	143	100	2e-30	100	NC_006092.5
火鸡(*Meleagris gallopavo*)，分离株NT-WF06-2002-E0010，安伟捷火鸡品种，Nicholas 种禽品牌，5 号染色体，Turkey_5.0 参考基因组	106	106	97	2e-19	93.75	NC_015015.2

A.4 比对结果

家鸡 (*Gallus gallus*)，红原鸡品种，分离株RJF #256，5号染色体，GRCg6a参考基因组序列编号：NC_006092.5

特征: 转化生长因子β-3前蛋白

长度：59,809,098 bp 匹配数量：1 范围1: 38,672,925至38,673,001

分值	期望值	一致性	空缺	链方向
143bits(77)	2e-30	77/77(100%)	0/77(0%)	正链/负链

```
Query 313      CAGCTGGCCTGCCGGCTTCTGCCAAGCTCTGCCACTCCTCTGCACCCAGTGCAGGTGAAT 372
               ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 38673001 CAGCTGGCCTGCCGGCTTCTGCCAAGCTCTGCCACTCCTCTGCACCCAGTGCAGGTGAAT 38672942
Query 373      ACCACATTCCACTGGGC 389
               |||||||||||||||||
Sbjct 38672941 ACCACATTCCACTGGGC 38672925
```

火鸡(*Meleagris gallopavo*)，分离株 NT-WF06-2002-E0010，安伟捷火鸡品种，Nicholas 种禽品牌，5 号染色体，Turkey_5.0 参考基因组

序列编号：NC_015015.2

长度：59,006,440　　匹配数量：1　　范围1: 37,540,933至37,541,007

分值	期望值	一致性	空缺	链方向
106 比特(57)	2e-19	69/75(92%)	0/75(0%)	正链/正链

```
Query 315      GCTGGCCTGCCGGCTTCTGCCAAGCTCTGCCACTCCTCTGCACCCAGTGCAGGTGAATAC 374
               ||||||||| | ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||
Sbjct 37541007 GCTGGCCTGACAGCTTCTGCCAAGCTCTGCCACTCCTCTGCACCCAGTGCAGGTGAACAC 37540948
Query 375      CACATTCCACTGGGC 389
                | || |||||||||
Sbjct 37540947 TATATCCCACTGGGC 37540933
```

参 考 文 献

[1]AXELSSON E.,WEBSTER M.T.,SMITH N.G.,BURT D.W.,ELLEGREN H.Comparison of the chicken and turkey genomes reveals a higher rate of nucleotide divergence on microchromosomes than macrochromosomes. Genome Res.,2005,15(1),pp.120-125

[2]WANG Q.,CAI Y.C.,HE Y.P.,YANG L.T.,PAN L.W.Collaborative ring trial of two real-time PCR assays for the detection of porcine- and chicken-derived material in meat products.Plos ONE.2018,13(10), pp.e0206609

[3]HORWITZ W.Protocol for the design,conduct and interpretation of method performance studies.Pure and Appl.Chem.1995,67, pp.331-343

[4]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)

[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).Available at (accessed 2019-07-28): https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome