

SF

中华人民共和国司法行政行业标准

SF/T 0136—2023

法医学非人源生物检材种属鉴定技术规范

Technical specification for species identification of forensic non-human biological
sample

2023 - 10 - 07 发布

2023 - 12 - 01 实施

中华人民共和国司法部 发布

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	1
5 原理	1
6 总体要求	2
7 检验程序	2
8 鉴定意见	4
9 鉴定文书	4
参考文献	5

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。

本文件由司法鉴定科学研究院提出。

本文件由司法部信息中心归口。

本文件起草单位：司法鉴定科学研究院、复旦大学、中国科学院昆明动物研究所、中山大学、深圳海关动植物检验检疫技术中心。

本文件主要起草人：张素华、李成涛、孔庆鹏、孙宏钰、李玉春、郑晓聪、于力、史秀杰、夏若成。

法医学非人源生物检材种属鉴定技术规范

1 范围

本文件规定了基于DNA条形码技术对非人源生物检材（以下简称“检材”）进行种属鉴定的总体要求以及检验程序、鉴定意见和鉴定文书的要求。

本文件适用于实验室采用DNA条形码技术对检材进行种属鉴定。

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，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。

SF/T 0069 法医物证鉴定实验室管理规范

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

种属鉴定 species identification

基于形态学、血清学或DNA分析等方法甄别种属特征、种属特异性成分或种属特异性DNA序列等，实现对植物、动物和微生物进行分类地位（科、属、种）的认定。

注：本文件中专指基于DNA分析方法对动物和植物进行分类地位（科、属、种）的认定。

3.2

参考序列 reference sequence

测序序列对应的物种基因组序列。

3.3

DNA条形码 DNA barcode

生物体一段公认的能够代表该物种的、标准的、有足够变异的、易扩增且相对较短的DNA片段。

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)

bp: 碱基对 (Base Pair)

COI: 细胞色素氧化酶 I (Cytochrome Oxidase I)

DNA: 脱氧核糖核酸 (Deoxyribonucleic Acid)

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

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

QV: 质量评分 (Quality Value)

rRNA: 核糖体 RNA (Ribosomal RNA)

T_m: 熔解温度 (Melting Temperature)

5 原理

运用DNA条形码技术,根据检材类型选择合适的DNA条形码引物,扩增目标区域并进行双向测序,再将测序结果与现有数据库中序列进行比对和分析,确定检材的分类地位(科、属、种)。

注:DNA条形码技术指采用测序技术对物种的DNA条形码进行识别,利用其种间多样性和种内特异性来实现对物种的快速鉴定的一种方法。

6 总体要求

6.1 鉴定机构应具有从事法医物证的执业范围,且应满足以下要求:

- a) 对所有影响鉴定结果的人员岗位规定相应的能力要求,包括教育、资质、培训、专业知识和技能等,并保留相关记录,制定适宜的培训计划并组织实施;
- b) 依据第7章~第9章的规定,对鉴定人以及参与鉴定工作的人员进行监督,以评价其鉴定工作的符合性和满意程度,监督的结果作为培训需求评价的依据之一;
- c) 具有能识别样本的标识系统,并确保样本在鉴定过程期间能得到持续的识别;
- d) 建立样本的运输、接收、处置、保护、存储、保留和/或清理的规定,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。

6.2 鉴定人应具有法医物证鉴定执业资格,熟悉并掌握测序技术的原理和操作,并能正确使用相关分析软件对检测结果进行分析与评价。

6.3 鉴定活动应包括检验(采样、DNA制备、目标区域扩增、PCR产物纯化、PCR产物测序、结果分析)、鉴定意见出具和鉴定文书撰写等环节。鉴定活动结束后,应将各个环节的记录进行归档。

6.4 实验室的基本要求以及样本管理、设备管理、质量管理等应符合SF/T 0069的规定。

7 检验程序

7.1 实验设置

检材提取宜设置2个重复(样本量允许的情况下)。

DNA样本的PCR扩增宜设置2个重复(DNA样本量允许的情况下),PCR过程中应同步设置阴性模板对照(不加DNA)和空白检材对照(无菌双蒸水)。

7.2 采样

检材的采集、包装和保存要求如下:

- a) 动物检材应包括血液(斑)、唾液(斑)、表皮拭子、毛发、软组织、骨骼、牙齿、趾甲、甲醛固定动物组织和石蜡包埋动物组织等;植物检材应包括叶片、花和果实等组织或干品。有条件的情况下,宜选择新鲜的检材;
- b) 检材应分别包装,外包装袋上注明检材编号、检材外观及状态、采样地点、采样时间和采样人等;
- c) 动物血液、唾液和软组织等应冷藏或冷冻保存,其余类型检材采集后应干燥保存;
- d) 植物检材采集后应干燥保存。

7.3 DNA制备

检材宜采用商业化动物/植物DNA提取试剂盒进行DNA提取。其中,甲醛固定动物组织应先脱醛,石蜡包埋动物组织应先脱蜡,然后再通过物理和/或化学的方法,将待检检材处理成粉末或匀浆,悬浮在生理盐水或磷酸缓冲液中,振荡混匀后采用相应的试剂盒进行DNA的提取。含有自溶酶的动物组织样本(如海参),应经过超高压处理灭活自溶酶以后再按照动物组织样本进行后续处理。

检材DNA宜采用荧光定量试剂盒进行定量。具体操作步骤应按照相应的试剂盒说明书及仪器使用指南执行。

7.4 目标区域扩增

7.4.1 引物

宜采用DNA条形码通用引物进行目标区域的扩增。推荐用于法医学检材种属鉴定的通用引物信息见表1。经通用引物扩增检测后无法获取准确的物种信息时，宜采用已发表文献或实验室自行设计并验证过的其它通用引物或物种特异性引物。

表1 推荐用于法医学检材种属鉴定的通用引物信息

检材类型	目标区域所在基因	引物序列 (5'~3')	目标片段大小 bp ^a
动物检材	COI	F-CACAAAGACATTGGCACCCCT	641
		R-CCTCCTGCAGGGTCAAAGAA	
	16S rRNA	F-CGCCTGTTTATCAAAAACAT	589~632
		R-CCGGTCTGAACTCAGATCACGT	
	12S rRNA	F-GCTTCAAACCTGGGATTAGATACCCCACTAT	413~461
		R-TGACTGCAGAGGGTGACGGGCGGTGTGT	
植物检材	rbcL	F-CCATTYATGCGTTGGAGAGATCG	733~734
		R-TCAGGACTCCACTTACTAGCTTCACG	
	psbA-trnH	F-GTTATGCATGAACGTAATGCTC	291~559
		R-CGCGCATGGTGGATTACAATCC	
	trnL	F-AGCTGTTCTAACAATGGAGTTG	268~337
		R-GGACTCTATCTTGTTCCTCGTCC	

^a给出的数据为NCBI数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 现有物种在目标区域的产物片段大小，该数据在不同物种之间存在差异。

7.4.2 PCR 扩增

应选用合适的PCR扩增试剂盒和PCR扩增仪进行PCR扩增反应。具体操作应按照试剂盒说明书和仪器使用指南进行。

以QIAGEN Multiplex PCR试剂盒和9700型PCR扩增仪为例，采用表1中引物进行扩增的推荐PCR扩增体系见表2，推荐PCR扩增程序见表3。若采用已发表文献或实验室自行设计并验证过的其它通用引物或物种特异性引物，应相应调整PCR扩增体系及PCR扩增程序。

注：QIAGEN Multiplex PCR试剂盒是QIAGEN公司提供的产品，9700型PCR扩增仪是Thermo Fisher Scientific公司提供的仪器。给出这一信息是为了方便本文件的使用者，并不代表对该产品/仪器的认可。如果其他等效产品/仪器具有相同的效果，则能使用其他等效产品/仪器。

表2 检材采用表1中通用引物进行PCR扩增的扩增体系

成分	体积 μL
2×Multiplex PCR Master Mix	25
5×Q-Solution	5
10×引物混合液 (2 μmol/L)	5
无核酸酶水	14
DNA (1 ng/μL)	1

表3 检材采用表1中通用引物进行PCR扩增的扩增程序

步骤	温度 ℃	时间	循环数
1	95	15 min	-
2	94	30 s	30~45 ^b
	T _m ^a	90 s	
	72	90 s	
3	72	10 min ^c	-

^a应根据目标区域片段选择合适的T_m。对应表1中的目标区域，T_m宜为：COI (53℃)、16S rRNA (53℃)、12S rRNA (60℃)、rbcL (53℃)、psbA-trnH (53℃)、trnL (57℃)。
^b根据目标区域片段的实际大小、测序引物的T_m值，扩增循环数可进行相应的调整。
^c根据目标区域片段的实际大小、测序引物的T_m值，延伸时间可进行相应的调整。

7.5 PCR产物纯化

根据目标区域片段大小采用合适浓度的琼脂糖凝胶对7.4.2中PCR产物进行电泳检测，在条带单一无其他杂带的情况下，宜选用合适的产物纯化试剂盒对PCR扩增产物直接进行纯化；若存在非特异性条带，应通过切胶将目的条带分离出来，随后选用合适的胶回收试剂盒对凝胶回收纯化。

纯化PCR产物的 OD_{260nm}/OD_{280nm} 值宜在1.6~2.0之间。具体操作应按照相应的试剂盒说明书进行。

7.6 PCR产物测序

将回收产物在基因测序仪上进行双向Sanger测序，具体操作应按照仪器使用指南进行。若PCR产物片段小于150 bp时，宜对其进行克隆后再测序。克隆操作应按照相应的试剂盒说明书进行。采用克隆测序时每个PCR产物应测定5个以上。

经基因测序仪配套的数据分析系统对图谱进行分析后，获得所测序列信息，并形成碱基序列输出。应对序列进行质量核验，平均QV应 ≥ 30 ， $QV < 20$ 的碱基数应不大于序列总长度的1%。

7.7 结果分析

7.7.1 将7.6中测序序列在NCBI数据库或者BOLD网站中进行序列比对，应根据相似度初步判定物种。测序序列与数据库参考序列相似度不小于90%的情况下，检测结果应为相似度最高的物种；测序序列与数据库参考序列相似度小于90%的情况下，应采用其它引物进行扩增检测，若序列相似度仍小于90%，则本文件中规定的方法无法明确该检材种属来源。

注1：NCBI序列比对工具：BLAST→Nucleotide BLAST。

注2：BOLD网址：<http://www.boldsystems.org/>。BOLD序列比对工具：IDENTIFICATION。

7.7.2 宜从GenBank数据库中下载相似度最高的物种同一属内的参考序列；宜采用MEGA X等软件进行聚类分析，并基于邻接法构建系统聚类树。

7.7.3 应根据相似度和聚类情况综合判断检材的种属来源。

8 鉴定意见

8.1 检材测序序列与数据库参考序列相似度不小于90%的情况下，且与相似度最高的物种同一属内某物种的参考序列聚在同一支，遗传距离最近，可出具“倾向于支持XX检材来源于该物种”。如鉴定意见可表述为“倾向于支持XX检材来源于软骨鱼纲(Chondrichthyes)板鳃亚纲(ELASMOBRANCHII)鼠鲨目(LAMNIFORMES)长尾鲨科(Alopiidae)长尾鲨属(Alopias)大眼长尾鲨(*Alopias superciliosus*)”。

8.2 不满足8.1条件时，出具“无法判断XX检材的种属来源”。

9 鉴定文书

鉴定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) 描述检测的目标区域及采用的引物信息、检测方法、分析方法、测序结果和分析结果；
- b) 按照第8章的规定出具鉴定意见。

参 考 文 献

- [1] Inoue JG, Miya M, Tsukamoto K, Nishida M. A mitogenomic perspective on the basal teleostean phylogeny: resolving higher-level relationships with longer DNA sequences. *Mol Phylogenet Evol.* 2001, 20(2):275-85
- [2] Kocher TD, Thomas WK, Meyer A, Edwards SV, Pääbo S, Villablanca FX, Wilson AC. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1989, 86(16):6196-200
- [3] Ng AE, Sandoval E, Murphy TM. Identification and Individualization of Lophophora using DNA Analysis of the trnL/trnF Region and rbcL Gene. *J Forensic Sci.* 2016, 61 Suppl 1:S226-9
- [4] Mitani T, Akane A, Tokiyasu T, Yoshimura S, Okii Y, Yoshida M. Identification of animal species using the partial sequences in the mitochondrial 16S rRNA gene. *Leg Med (Tokyo).* 2009, 11:S449-50
-