

# 淡水生物环境 DNA 监测技术方法

Technical method for environmental DNA monitoring of  
freshwater organisms

(报批稿)

XXXX – XX – XX 发布

XXXX – XX – XX 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..... 2

4 监测点位布设..... 4

5 监测频次与时间..... 4

6 试剂和材料..... 4

7 仪器和设备..... 5

8 环境 DNA 宏条形码监测内容和方法 ..... 6

9 质量控制与质量保证..... 9

10 废弃物处理.....11

附录 A（资料性） 环境 DNA 固定剂 ..... 12

附录 B（资料性） 常用 DNA 条形码扩增引物信息..... 13

附录 C（规范性） 淡水生物 DNA 条形码构建方法..... 15

附录 D（资料性） 生物统计表 ..... 19

附录 E（规范性） 野外质量控制与保证..... 20

附录 F （规范性） 实验室质量控制与保证 ..... 21

参 考 文 献..... 23

# 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。

本文件由江苏省生态环境厅提出并归口。

本文件起草单位：江苏省环境监测中心、南京大学。

本文件主要起草人：张咏、张效伟、杨雅楠、杨江华、蔡琨、王晨波、吕学研、李婧慧、张丽娟、钟文军、侍昊、朱晨、毛成贵、卜亚谦、范帆。

# 淡水生物环境 DNA 监测技术方法

## 1 范围

本文件规定了利用环境DNA技术监测淡水生物的采样、试剂和材料、仪器和设备、监测内容和步骤、以及质量控制与保证。

本文件适用于生态环境监测领域湖泊、水库、溪流、河流、河口区等水域浮游植物、浮游动物、着生藻类、大型底栖无脊椎动物和鱼类等淡水生物物种组成及相对丰度的监测。

## 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 12763.6 海洋调查规范 第6部分：海洋生物调查
- GB 19489 实验室 生物安全通用要求
- GB/T 20001.4 标准编写规则 第4部分：试验方法标准
- GB/T 29859 生物信息学术语
- GB/T 30989 高通量基因测序技术规程
- GB/T 34265 Sanger法测序技术指南
- GB/T 35537 高通量基因测序结果评价要求
- GB/T 35890 高通量测序数据序列格式规范
- GB/T 37870 个体鉴定的高通量测序方法
- GB/T 37874 核酸提取纯化方法评价通则
- GB/T 40266 环境微生物宏基因组检测 高通量测序法
- HJ 91.2 地表水环境质量监测技术规范
- HJ 494 水质采样技术指导
- HJ 710.7 生物多样性观测技术导则 内陆水域鱼类
- HJ 710.8 生物多样性观测技术导则 淡水底栖大型无脊椎动物
- HJ 1216 水质 浮游植物的测定 0.1 ml计数框-显微镜计数法
- HJ 1295 水生态监测技术指南 河流水生生物监测与评价（试行）
- HJ 1296 水生态监测技术指南 湖泊和水库水生生物监测与评价（试行）
- SC/T 9402 淡水浮游生物调查技术规范
- SN/T 4278 国境口岸医学媒介昆虫DNA条形码鉴定操作规程
- SN/T 4835 实验室生物废弃物管理要求
- DB 32/T 3202 湖泊水生态监测规范
- DB 32/T 3871 太湖流域水生态环境功能区质量评估技术规范
- DB 32/T 4178 河流水生态监测规范

### 3 术语和定义

GB/T 20001.4、GB/T 29859和GB/T 30989界定的以及下列术语和定义适用于本文件。

#### 3.1

**淡水生物 freshwater organisms**

生活在各类淡水生境中的生物，种类繁多。主要的淡水生物类群包括浮游植物、浮游动物、大型底栖无脊椎动物和鱼类等。

#### 3.2

**环境 DNA environmental DNA (eDNA)**

环境介质（水、土壤、沉积物、生物膜、空气等）或混合生物组织中存在的生物遗传物质（DNA）。

#### 3.3

**DNA 条形码 DNA barcode**

生物体细胞核或者细胞器中能够代表该物种的、有足够变异的、易扩增的短DNA序列，可用于物种的识别和鉴定。

[来源：SN/T 4278—2015，3.1，有修改]

#### 3.4

**引物 primer**

在DNA复制过程中，结合于模板链上并提供DNA合成起点，具有一定长度和顺序的寡核苷酸链。

#### 3.5

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

一种体外酶促合成特异DNA片段的分子技术，由高温变性、低温退火及适温延伸等组成一个周期，循环进行，使目的DNA得以迅速扩增，具有特异性强、灵敏度高、操作简便省时等特点。

#### 3.6

**Sanger 测序 Sanger sequencing**

用于基因测序的双脱氧末端终止法，在链延伸过程中利用荧光标记双脱氧碱基随机阻断，产生以A/T/G/C结束的四组不同长度的核苷酸链，通过读取荧光信号实现对核酸碱基序列信息的读取。

#### 3.7

**遗传距离 genetic distance**

群或分类单元间的遗传差异程度，可以通过遗传标记如DNA条形码的序列差异来表示。

#### 3.8

**高通量测序 high-throughput sequencing**

区别于传统Sanger（双脱氧链末端终止法）测序，能够一次并行对大量核酸分子进行平行序列测定的技术。

[来源：GB/T 30989—2014，3.19，有修改]

#### 3.9

**16S 核糖体 DNA 16S ribosomal DNA (16S rDNA)**

原核生物编码核糖体小亚基rRNA的DNA序列。

#### 3.10

**18S 核糖体 DNA 18S ribosomal DNA (18S rDNA)**

真核生物编码核糖体小亚基rRNA的DNA序列。

#### 3.11

**线粒体 12S 核糖体 DNA mitochondrial 12S ribosomal DNA (Mt 12S rDNA)**

后生动物线粒体编码12S rRNA的DNA序列。

### 3. 12

**线粒体细胞色素 c 氧化酶 I mitochondrial cytochrome c oxidase I (COI)**

后生动物线粒体编码细胞色素c氧化酶I的DNA序列。

### 3. 13

**DNA 宏条形码 DNA metabarcoding**

利用高通量测序获取环境DNA中特定的DNA片段，根据DNA序列差异识别物种，获取物种组成和群落结构。

### 3. 14

**标签 tag**

通过PCR或文库准备过程中为每个样品添加一个短序列的核苷酸碱基对，允许多个样品在一个高通量测序运行中被汇集。这个序列对于同一个运行中的每个样本都是不同的，并使序列能够在测序后分配回它们来自的样本。

### 3. 15

**序列相似性 sequence similarity**

反映序列间相似程度的数值，即序列间相同DNA碱基数目所占的比例，一般以百分数表示。

[来源：SN/T 4278—2015，3.8，有修改]

### 3. 16

**序列相似性阈值 cutoff value of sequence similarity**

判定两条DNA序列是否为同一分类单元的最小序列相似值。

### 3. 17

**扩增序列变体 amplicon sequence variants (ASV)**

DNA宏条形码技术中，通过生物信息学剔除PCR扩增和测序产生的错误序列后形成的独特DNA序列，即任意两条序列间至少有一个碱基存在差异。

### 3. 18

**操作分类单元 operational taxonomic unit (OTU)**

DNA宏条形码测序数据按照一定的序列相似性阈值进行聚类，获得的用于表征物种的分子水平分类单元。

### 3. 19

**相对丰度 relative abundance**

样品中分配到某一分类单元的序列数占该样品序列总数的比例。

[来源：GB/T 40266—2021，3.2，有修改]

### 3. 20

**阴性质控样本 negative control sample**

确定不含特定物种或者所有物种的样本（例如无菌水），与待测样本同步实验，用于判断待测样本是否被污染。

### 3. 21

**阳性质控样本 positive control sample**

已确定物种组成的样本，与待测样本同步实验，用于判断测序结果是否可靠。

## 4 监测点位布设

### 4.1 总体要求

按照HJ 91.2设置环境DNA采样点位，应遵循连续性、一致性、代表性和可行性原则。结合环境DNA的时空分布特征，综合考虑监测类群的生态和生活史特征、水体类型、大小、深度、分层、连通性、基质、温度、水文和水化学等因素的影响。

注：生活污水中可能含有残留的生物DNA，采样位点布设要尽量避免污水排放渠和污水处理厂，并详实记录。

### 4.2 溪流、河流点位布设

按照HJ 1295的规定设置监测断面，每个断面设置不少于3个代表性点位。在缓慢流动的低地溪流和河流中，宜间隔1 km设置采样点。在快速流动的高山溪流和河流中，采样位点宜间隔10 km以上。应详实记录河流的地形特征（如地形、河岸结构、河床沉积物、人工改造等）、流速、水温、pH值等影响环境DNA扩散的因素。

### 4.3 湖泊、水库监测点位布设

按照HJ 1296的规定设置监测点位，大型湖泊应适当增加监测点位。湖库构成湖库群，当对区域湖库作整体监测时，可适当减少单个湖库的监测点位。宜设置湖库监测点位周边100 m的范围内为采样区域。深水型湖泊宜间隔5 m深度分层采样。

## 5 监测频次与时间

### 5.1 监测频次

综合考虑水域环境条件、生物类群的时空分布特点、监测目的及人力、费用投入，确定监测频次。可选择季度或月度开展监测，应避开雨水集中的时间。针对重点关注区域、突发环境问题或其他条件下，可开展更高频次的监测。

### 5.2 监测时间

采样时间应综合考虑靶向监测类群的生态特征和生活史及水体类型。如湖泊、水库应考虑生物类群的季节性分层，溪流、河流应考虑迁移物种的分布模式（如鱼类洄游）。

## 6 试剂和材料

### 6.1 超纯水。

### 6.2 分析纯无水乙醇。

### 6.3 环境DNA固定剂，可参考附录A。

### 6.4 DNA提取试剂盒或CTAB法提取DNA所用到的试剂。

### 6.5 PCR扩增试剂：用于特异性片段PCR扩增，通常包含缓冲液、扩增酶等。

### 6.6 PCR扩增引物：可参考附录B。



- 6.7 PCR 产物纯化试剂盒：用于 PCR 产物纯化。
- 6.8 DNA 浓度测定试剂：用于 DNA 浓度测定，主要成分包括缓冲液和染色剂。
- 6.9 凝胶电泳相关试剂：用于 PCR 产物凝胶电泳检测，通常包含：琼脂糖、TAE、片段大小标记。
- 6.10 文库构建试剂：用于样品的基因文库构建，试剂盒内至少应包含：末端修复酶、测序接头、DNA 连接酶、缓冲液。
- 6.11 高通量测序试剂：用于对测序文库进行高通量基因测序，试剂盒内至少应包含测序引物、测序反应酶、缓冲液。
- 6.12 无菌采样瓶或采样袋：1 L 及以上规格。
- 6.13 无菌微孔滤膜：0.22  $\mu\text{m}$ ，0.45  $\mu\text{m}$ ，1.2  $\mu\text{m}$  和 5  $\mu\text{m}$  等。
- 6.14 无菌镊子。
- 6.15 无菌离心管：1.5 mL、2 mL、10 mL，无 DNA 和生物残留。
- 6.16 冻存管：5 mL，无 DNA 和生物残留。
- 6.17 枪头：10  $\mu\text{L}$ ，200  $\mu\text{L}$ ，1000  $\mu\text{L}$  和 5 mL 等，无 DNA 和生物残留。
- 6.18 PCR 管、96 孔板等类似的 PCR 反应容器：无 DNA 和生物残留。
- 6.19 无菌手套。

## 7 仪器和设备

- 7.1 恒温水浴锅。
- 7.2 涡旋振荡器或均质仪。
- 7.3 冷冻干燥仪。
- 7.4 真空离心浓缩仪。
- 7.5 高速冷冻离心机：离心转速可达 13000 rpm，温控范围低至 4℃。
- 7.6 微量移液器：0.5~10  $\mu\text{L}$ 、20~200  $\mu\text{L}$  和 100~1000  $\mu\text{L}$  等。
- 7.7 超微量分光光度计：测量体积最小 1  $\mu\text{L}$ ，波长范围包括 230 nm、260 nm 和 280 nm。
- 7.8 PCR 仪。
- 7.9 电子天平。
- 7.10 水平式核酸电泳仪。
- 7.11 凝胶成像分析仪。
- 7.12 高通量测序仪。

- 7.13 高温高压灭菌器：可达到标准要求的 121℃、21 min 灭菌条件。
- 7.14 采水器：2 L 或 5 L。
- 7.15 浮游生物网：25 号浮游动物网，孔径 64 μm。
- 7.16 着生藻类采集器具：毛刷、刀片、托盘、洗瓶等。
- 7.17 大型底栖无脊椎动物采集装置：如彼得森采泥器、D 型抄网、踢网、索伯网等。
- 7.18 水样抽滤设备：具备负 0.9 个大气压以上的真空抽滤设备。
- 7.19 大型底栖无脊椎动物清洗装置：如 40 目筛网等。
- 7.20 超净工作台。
- 7.21 低温存储设备：普通冰箱、低温冰箱和超低温冰箱。
- 7.22 液氮罐。
- 7.23 工作站：运行内存不低于 16 Gb，硬盘存储不低于 2 T，处理器不低于 8 核。
- 7.24 高通量测序数据质量控制和分析软件。

8 环境 DNA 宏条形码监测内容和方法

8.1 环境 DNA 宏条形码监测内容

环境DNA宏条形码监测包括环境DNA样品采集、环境DNA提取、宏条形码扩增与测序、生物信息学分析、生物统计表和质量控制与质量保证等过程（图1）。

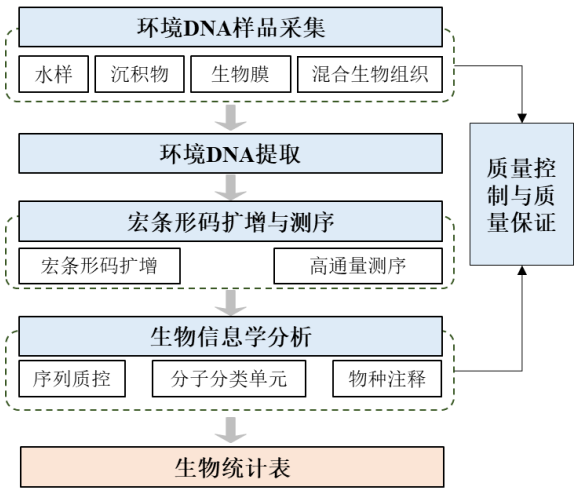


图 1 环境 DNA 宏条形码监测技术流程

8.2 环境 DNA 样品采集

8.2.1 通则

根据监测的生物类群，按照表1选择合适的环境DNA采集方法，每个位点的采集3个生物重复样品。

表1 不同生物类群的环境 DNA 采样介质

生物类群	水样	沉积物	生物膜	混合生物组织
浮游植物	+++	+		
着生藻类	+	+	+++	
浮游动物	++	+		+++ <sup>1</sup>
大型底栖无脊椎动物	++	+	+	+++ <sup>2</sup>
鱼类	+++	+		

注：表中+ 表示可用，++表示较多采用，+++表示最为常用；1、浮游动物主要通过浮游生物网收集组织 DNA；2、大型底栖无脊椎动物主要通过采集沉积物中底栖动物组织，进一步通过酒精浸提法获取组织 DNA

8.2.2 水样

水样采集按照HJ 494的规定执行，采样体积不宜小于1 L。浮游植物监测的水样体积宜为1 L，底栖动物和鱼类监测的水样体积宜为3 L。现场过滤至一定孔径（一般为0.45 μm）的滤膜上，高泥沙水样，应低温（4℃或冰袋保存）静置分离悬浮颗粒物，再过滤。生物密度较高的水体（如处于藻华爆发期），可将水样等体积分开过滤至多张（1~5）滤膜作为子样本。野外干冰、液氮或-20℃保存，实验室-20℃以下保存；或者加入附录A推荐的固定剂，常温保存。

8.2.3 沉积物样品

按照HJ 494的规定采集50 mL的表层沉积物（0~5 cm），剔除砾石、木屑、杂草、贝壳及其它大体积生物残体，收集至无菌管中，同一采样点沉积物采集宜涵盖各类小生境（如周从区、沉水植被覆盖区等）。野外干冰或-20℃保存，实验室-20℃保存；或者加入无水乙醇，确保样品中最终的乙醇浓度≥80%，低温保存。

8.2.4 生物膜样品

按照DB32/T 4178的规定从不同自然基质（如粗砾石、鹅卵石以及树木残干等）表面刮取25 cm<sup>2</sup>样品，无菌水清洗至采样瓶中，野外干冰或-20℃保存，实验室-20℃保存；或者加入无水乙醇，确保最终的乙醇浓度≥80%，低温保存。

8.2.5 混合生物组织样品

8.2.5.1 按照 SC/T 9402 的规定用浮游生物网定量采集浮游动物样品，采样体积不小于 20 L，过滤至 5 μm 孔径滤膜，野外干冰保存，实验室-20℃保存；或者加入附录 A 推荐的固定剂，常温保存。

8.2.5.2 大型底栖无脊椎动物采集与筛选应按照 HJ 710.8，加入 3 倍体积的无水乙醇，1 g 换算为 1 mL，常温保存。

8.3 环境 DNA 样品前处理

8.3.1 滤膜样品（水样/混合浮游动物组织样品）：利用研磨珠和裂解液将滤膜振荡破碎。

8.3.2 沉积物样品：酒精保存的样品应高速（不低于 12000 rpm）离心 20 min，留取沉淀物。低温

保存的样品可经均质仪均质后冷冻干燥，充分混匀。

**8.3.3 生物膜样品：**4℃解冻，振荡混匀，取 2 mL 样品，高速（不低于 12000 rpm）离心 20 min，留取沉淀物。

**8.3.4 混合底栖动物组织样品：**室温放置 5 天，多次振荡混匀，吸取浸出液，真空离心浓缩至酒精完全去除。

## 8.4 环境 DNA 提取

### 8.4.1 DNA 提取

借助物理和化学方法充分释放环境介质中蕴含的 DNA，并去除样品中的蛋白质、脂类、多糖、RNA 等杂质，采用离心柱法和磁珠法等常规分子生物学操作纯化 DNA，操作步骤见 GB/T 40226。

### 8.4.2 DNA 浓度测定与保存

样本 DNA 浓度应不低于 1 ng/μL，最佳浓度范围为 10~100 ng/μL，260 nm 和 280 nm 波长处的吸光度值比值（OD<sub>260 nm</sub>/OD<sub>280 nm</sub>）应在 1.7~2.0 范围内，OD<sub>260 nm</sub>/OD<sub>230 nm</sub> 应大于 2.0。DNA 平行分装后，应在-20℃及以下温度条件保存，避免反复冻融。

## 8.5 宏条形码扩增与测序

### 8.5.1 宏条形码扩增

**8.5.1.1** 针对不同生物类群选择特异性一对或多对引物扩增目标条形码序列，可在引物序列前添加标签以区分样品。推荐引物参照附录 B。

**8.5.1.2** 宏条形码产物用 1~2% 的琼脂糖凝胶电泳检测，应呈现单一清晰明亮、无拖尾的条带。若样品出现多个条带，需纯化 PCR 产物，纯化过程参考 SN/T 4278。

**8.5.1.3** 条形码扩增产物在-20℃及以下保存，保存时间一般不超过一年。

### 8.5.2 高通量测序

**8.5.2.1** 宜将含有不同的引物标签的宏条形码扩增产物等摩尔量混合构建测序文库。文库构建起始量应不低于 100 ng。当文库的片段长度分布符合预期，且文库浓度满足高通量测序要求时，文库质检合格。

**8.5.2.2** 将多个质检合格的文库按比例混合，参考 GB/T 30989 和 GB/T 35537 对宏条形码扩增产物进行测序。同一实验样本宜安排在同一批次上机测序。每个样本的预期的有效序列数不宜低于 30000 条。

## 8.6 生物信息学分析

### 8.6.1 一般要求

同一批实验数据，生物信息学分析流程及关键参数应保持一致。

### 8.6.2 序列质量控制

双端测序应进行序列合并。通过搜索特定序列（去除测序接头 adaptor、样品标签 tag 和引物），

并基于碱基识别质量 ( $>Q20$ , 参考) 和序列长度 ( $>$ 预期长度的 70%, 参考) 进行序列修剪, 确保前端序列长度+后端序列长度-两段序列的重叠长度 (overlap)  $\geq$  目标序列长度。

### 8.6.3 文库拆分

根据每个样品的**标签**将序列分配到不同的样品中。

### 8.6.4 序列聚类及质量控制

8.6.4.1 可选用 OTU 或 ASV 方法进行序列聚类和或降噪, 获得分子分类单元, 并过滤掉非目标序列。

8.6.4.2 OTU 方法: 将相似性高于或等于阈值 (相似性阈值一般为 97%) 的序列合并成 OTUs, 将序列比对到每个 OTU 的代表性序列, 获得每个 OTU 在每个样品中出现的序列数。

8.6.4.3 ASV 方法: 每个独特的序列即为一个 ASV, 根据生物信息学方法过滤潜在的 PCR 和测序错误的 ASV 序列, 将序列比对到每个 ASV, 获得每个 ASV 在每个样品中出现的序列数。

### 8.6.5 过滤低丰度的分子分类单元

过滤低丰度 (如总序列数为 1~5, 可能为假阳性、污染序列或未去除的嵌合体) 和阴性对照中相对序列丰度超过千分之一的分子分类单元, 也可根据实际监测需求调整过滤的丰度阈值。

注: 嵌合体为 PCR 扩增中产生的由两种或两种以上序列母体组合的错误序列。

### 8.6.6 物种注释

将分子分类单元的序列与条形码数据库比对分析, 获得物种注释信息。物种注释方法和物种鉴定阈值 (主要是序列相似性) 的选择, 应综合考虑选用的条形码片段、参考数据库的完整性及数据用途。当参考数据库中不存在目标物种的 DNA 序列时, 按照附录 C 构建 DNA 条形码。

## 8.7 结果统计

### 8.7.1 检出判定

分子分类单元在某一位点的生物重复样品中检出率 (物种检出的样品数除以总样品数) 不应低于 2/3。建议每个样品宜保留相对丰度  $>0.01\%$ , 出现在两个样点以上的分子分类单元。

### 8.7.2 序列相对丰度

每个位点检出的分子分类单元的序列相对丰度应为所有生物重复样品中序列相对丰度的平均值。针对相对丰度差异较大的生物重复, 宜取几何平均数。

### 8.7.3 生物统计表

每个样品的生物多样性统计表由分子分类单元 (如 ASVs 或 OTUs) 名称、序列、物种注释信息、序列数和相对丰度组成, 可参考附录 D。

## 9 质量控制与质量保证

### 9.1 质量控制

9.1.1 质量控制参数

9.1.1.1 阴性对照

在每天的样品采集、同一批次 DNA 提取和 PCR 扩增阶段应分别设置不少于 3 个阴性对照，高通量测序时可适当设置 1~3 个测序的阴性对照（表 2）。

9.1.1.2 阳性对照

宜设置不少于 6 个 PCR 扩增的阳性对照。PCR 扩增的阳性对照应为不少于 5 个物种的基因组 DNA（已知可以有效扩增）的等量混合物，浓度一般为 1ng/μL。也可根据实验需要和实验条件在 DNA 提取和测序过程中适当设置阳性对照（表 2）。

表2 环境 DNA 宏条形码技术每个流程设置的阴性和阳性对照

操作过程	阴性质控样本	阳性质控样本
过滤	无菌水	无
DNA提取	无菌水	已知组成的混合群落
PCR扩增	无菌水	已知物种组成的DNA标准样品
测序	无菌水	测序试剂盒中的对照试剂

9.1.1.3 平行样品

每个位点应设置至少 3 个生物重复样品，可根据实验需求和实验条件适当设置 DNA 提取、PCR 和建库测序平行样品。平行样品的相对丰度取平均值作为位点的相对丰度。

9.1.2 质量控制评价指标

9.1.2.1 假阴性率

使用 PCR 扩增的阳性对照评估监测的假阴性率。重复测定 6 次，计算标准样品中含有但测量结果中未检出的物种所占比例，，即假阴性率（FN）。假阴性率不应超过 10%。按照公式（1）计算。

$$FN=n_1/n \dots\dots\dots (1)$$

式中：  
FN——假阴性率；  
n<sub>1</sub>——标准样品中未被测出的物种数目，单位：个；  
n——标准样品的实际物种数目，单位：个。

9.1.2.2 假阳性率

使用 PCR 扩增的阳性对照评估监测的假阳性率。重复测定 6 次，计算测量结果的中标准样品中未包含物种的出现概率，即假阳性率（FP）。假阳性率不应超过 10%。按照公式（2）计算。

$$FP = n_2/n \dots\dots\dots (2)$$

式中：

$FP$ ——假阳性率；

$n_2$ ——未在标准样品物种清单的物种数目，单位：个；

$n$ ——标准样品的实际物种数目，单位：个。

## 9.2 质量保证

### 9.2.1 野外质量保证

按照附录 E 的规定做好野外样品采集、运输与保存，防止样品的交叉污染。

### 9.2.2 实验室质量保证

实验过程应防止样品的污染，并按照附录 F 的规定做好数据记录和样品保存。

## 10 废弃物处理

废弃物的分类、收集、存放和集中处理应按照 GB 19489 和 SN/T 4835 的规定执行，其中生物废弃物在处理之前应采用高压灭菌、消毒或灼烧等方式灭活，对含核酸染料的废液和废胶单独收集和

附 录 A  
(资料性)  
环境 DNA 固定剂

A.1 乙醇固定剂

乙醇的浓度不小于 96%，且其中不含甲醇等其他醇类。固定剂需浸没整个样本，样本在乙醇中可以在常温下稳定储存 3~6 个月。乙醇保存样本不可在-10℃以下储存。

A.2 Longmire’s 固定剂

Longmire’s 固定剂应浸没整个样本，常温下，样本在 Longmire’s 中可以稳定储存 2~6 周。Longmire’s 固定剂在低温下可能会出现沉淀，可适当加热待沉淀溶解再使用。Longmire’s 固定剂配方如表 A.1。

表 A.1 Longmire’s 固定剂配方

序号	成分	浓度	体积
1	Tris-HCl	1 M	100 mL
2	EDTA	0.5 M	200 mL
3	NaCl	4 M	2.5 mL
4	SDS	——	5 g
定容	双蒸水	——	1 L



附 录 B  
(资料性)  
常用 DNA 条形码扩增引物信息

淡水生物常用 DNA 条形码扩增引物信息表如表 B.1 所列。

表 B.1 常用淡水生物 DNA 条形码扩增引物信息

目标群落	基因名称	引物名称	引物序列 (5'~3')	预期长度 (bp)	退火温度 (℃)
蓝藻门	16S_V3	16S_341F	ACCTACGGGRSGCWGCAG	100 ~ 200	55 ~ 62
		16S_518R	ATTACCGCGGCTGCTGG		
	16S_V4	16S_515F	GTGCCAGCMGCCGCGGTAA	~ 300	55 ~ 62
		16S_806R	GGACTACHVGGGTWTCTAAT		
	16S_V3_V4	16S-338F	ACTCCTACGGGAGGCAGCAG	400 ~ 500	55 ~ 62
		16S-806R	GGACTACHVGGGTWTCTAAT		
	23S	p23SrV_f1	GGACAGAAAGACCCTATGAA	400 ~ 450	49 ~ 52
		p23SrV_r1	TCAGCCTGTTATCCCTAGAG		
真核藻类	18S_V9	18S_1389F	TCCCTGCCHTTTGTACACAC	100 ~ 200	55 ~ 62
		18S_1510R	CCTTCYGCAGGTTCACCTAC		
	18S_V4	TAREuk454FWD1	CCAGCASCYGCGGTAATTCC	300 ~ 400	55 ~ 62
		TAREukREV3	ACTTTCGTTCTTGATYRA		
着生硅藻	18S_V4	DIV4_F	GCGGTAATTCCAGCTCCAATAG	400 ~ 500	48 ~ 55
		DIV4_R	CTCTGACAATGGAATACGAATA		
浮游动物 大型底栖无脊 椎动物	COI-1	mlCOIintF	GGWACWGGWTGAACWGTWTAYCCYCC	~ 313	45 ~ 55
		dgHCO2198	TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA		
大型底栖无脊 椎动物	COI-2	mlCOIintF	GGWACWGGWTGAACWGTWTAYCCYCC	~ 313	45 ~ 55
		jgHCO2198	TAIACYTCIGGRTGICCRAARAAYCA		

表 B.1（续）

目标群落	基因名称	引物名称	引物序列（5'~3'）	预期长度 （bp）	退火温度 （℃）
鱼类	Mt 12S rDNA-1	MetafishF1	TCGTGCCAGCCACCGCGTTA	150 ~ 200	60 ~ 63
		MetafishR1	ATAGTGGGGTATCTAATCCCAG		
	Mt 12S rDNA-2	Teleo_F	ACACCGCCCGTCACTCT	~ 100	55 ~ 60
		Teleo_R	CTTCCGGTACACTTACCATG		
	Mt 12S rDNA-3	Tele02_F	AAACTCGTGCCAGCCACC	150 ~ 200	55 ~ 60
		Tele02_R	GGGTATCTAATCCCAGTTTG		
	Mt 12S rDNA-4	Mifish_U_F	GTCGGTAAAACTCGTGCCAGC	150 ~ 200	55 ~ 60
		Mifish_U_R	CATAGTGGGGTATCTAATCCCAGTTTG		
	Mt 16S rDNA	Fish16S_F	GGTCGCCCCAACCRAAG	~ 100	55 ~ 60
		Fish16S_R	CGAGAAGACCCTWTGGAGCTTIAG		

简并碱基代码：M：（A/C）、V：（A/C/G）、R：（A/G）、H：（A/C/T）、W：（A/T）、D：（A/G/T）、S：（C/G）、B：（C/G/T）、Y：（C/T）、N：（A/G/C/T）、K：（G/T）。

附 录 C  
(规范性)  
淡水生物 DNA 条形码构建方法

### C.1 DNA 条形码构建流程

当参考数据库中不存在目标物种的 DNA 序列时,按照附录 C 构建 DNA 条形码。水生生物 DNA 条形码构建流程主要包括:物种鉴定、条形码扩增与测序、条形码评估和条形码入库等过程。

### C.2 样品采集和物种鉴定

C.2.1 浮游植物的定性样品采集、保存与鉴定应按照 HJ 1216 的规定执行,浮游植物的分离培养按照 DB 21/T 2777 的规定执行。

C.2.2 浮游动物的定性样品采集与鉴定应按照 SC/T 9402 的规定执行,加乙醇溶液固定(乙醇浓度 $\geq 90\%$ ),常温保存。

C.2.3 大型底栖无脊椎动物的定性样品采集与鉴定应按照 HJ 710.8 的规定执行,加乙醇溶液固定(乙醇浓度 $\geq 90\%$ ),常温保存。

C.2.4 鱼类样品采集与鉴定应按照 HJ 710.7 的规定执行,野外干冰或 $-20^{\circ}\text{C}$ 保存,实验室 $-20^{\circ}\text{C}$ 保存;或加乙醇溶液固定(乙醇浓度 $\geq 90\%$ ),常温保存。

C.2.5 浮游动物、大型底栖无脊椎动物和鱼类的每个物种个体数不宜少于 5 个(株);浮游植物和着生藻类的纯培养藻种样品数不宜少于 5 个。

C.2.6 形态学鉴定应由三名具有丰富鉴定经验的专业人员独立完成后汇总,结果不一致的重新鉴定,并保留凭证标本。

### C.3 条形码扩增与测序

#### C.3.1 DNA 提取和浓度及纯度测定

C.3.1.1 常用 DNA 提取方法包括离心柱法和磁珠法。选取完整个体或合适部位的组织提取 DNA,避免外源污染。植物和动物组织 DNA 的提取分别参考 LY/T 3191 和 SY/T 4278。

C.3.1.2 按 GB/T 37874 的规定评价提取的 DNA 浓度和纯度,一般要求浓度不低于  $1\text{ ng}/\mu\text{L}$ ,在  $260\text{ nm}$  和  $280\text{ nm}$  波长处的吸光度值比值( $\text{OD}_{260\text{ nm}}/\text{OD}_{280\text{ nm}}$ )应在  $1.7\sim 1.9$  范围内, $\text{OD}_{260\text{ nm}}/\text{OD}_{230\text{ nm}}$  应 $>2.0$ 。有效的 DNA 样品分装为两份,一份在 $-80^{\circ}\text{C}$ 长期保存,另一份保存在 $-20^{\circ}\text{C}$ 用于后续实验,避免反复冻融。

#### C.3.2 条形码扩增与检测

C.3.2.1 针对不同生物类群选择引物扩增目标 DNA 条形码序列,常用 PCR 扩增引物和扩增反应条件参照附录 C。

C.3.2.2 PCR 扩增产物通过  $1\%\sim 2\%$  琼脂糖凝胶电泳检测扩增的有效性,应在目标长度位置出现一条单一的条带。若样品出现多个条带,需纯化 PCR 产物。具体过程参考 SN/T 4278。

#### C.3.3 测序

使用 Sanger 法测序仪或第二代高通量测序仪对目标条带进行测序。为减少 Sanger 法测序出现双峰或者测序失败,可以先将 PCR 产物克隆到质粒中再进行测序。第二代高通量测序可为每个样本提供不少于 1000 条高质量序列。Sanger 法测序要求参考 GB/T 34265,高通量测序要求参考 GB/T 30989 和 GB/T

35537。

## C.4 条形码评估

### C.4.1 序列质量控制

将一代测序双端测序文件进行拼接，按照 GB/T 34265 去除测序结果两端的低质量序列，序列方向须与 PCR 扩增正向引物方向一致。第二代高通量测序通常保留数量最多的序列，去除扩增引物，保证序列方向须与 PCR 扩增正向引物方向一致。Sanger 测序和高通量测序分别达到 QV20 和 Q20。

### C.4.2 遗传距离分析

C.4.2.1 将有效的样本序列合并整理成 FASTA 格式的文件，采用 ClustalW、Muscle 等方法进行多序列核苷酸或氨基酸密码子比对，检查蛋白编码基因是否存在终止密码子，并修剪对齐双端序列。遗传距离计算基于有差异的核苷酸位点在序列中所占的比例，同时需要考虑四种核苷酸的发生频率和核苷酸替换类型。遗传距离计算模型包括 p-距离模型、Jukes-Cantor 模型和 Kimura 两参数（K2P）模型，一般采用 K2P 模型。

C.4.2.2 p-距离模型：利用两个同源基因 DNA 序列间的核苷酸差异数所占的比例来表示基因间的分歧度。

C.4.2.3 Jukes—Cantor 模型：本模型假定 4 种核苷酸之间相互随机替代，即某一核苷酸替代变成其他 3 种核苷酸的概率是等同的。

C.4.2.4 Kimura 两参数模型：本模型将核苷酸替代分成转换替代和颠换替代，其中转换指 A、G 间替代或 T、C 间替代。颠换指 A 和 T/C 间的替代或 G 和 T/C 间的替代。根据实际监测数据，核苷酸的转换替代率约为颠换替代率的 2 倍，该方法可以更加真实的反映核苷酸序列间的差异。

### C.4.3 条形码有效性

成功的物种条形码应同时满足以下条件：

- （1）阴性对照 PCR 无条带；
- （2）阳性对照的 PCR 产物在预期的 DNA 条形码序列长度位置出现目的条带；
- （3）同一个样本 Sanger 测序获得的序列相似性 $\geq 99\%$ ；
- （4）同一个样本高通量测序获得的第一优势序列占比 $\geq 90\%$ ；
- （5）种内遗传距离明显小于种间距离（一般 5~10 倍）。

## C.5 物种条形码入库

成功的物种条形码相关信息导入 DNA 条形码数据库。DNA 条形码由样本信息、DNA 条形码信息、分类信息构成。样本信息库包括完整的样本采集和鉴定信息，即样本编号、凭证标本存放地、采样信息、分类信息、鉴定者、数张样本照片等。DNA 条形码信息包括每个样本扩增采用的引物，DNA 序列及基本信息统计。

DNA 条形码信息表格可参考表 C.1。

表 C.1 DNA 条形码信息表

样本编号				样本照片	
采样位点		采样人/单位		采样时间	
经纬度		海拔		温度	
鉴定人/单位		鉴定时间		分类特征	
中文名		拉丁名		分类信息  (门纲目科属种)	
DNA 条形码	引物信息	<input type="checkbox"/> 16S <input type="checkbox"/> 18S <input type="checkbox"/> COI <input type="checkbox"/> 线粒体 12S <input type="checkbox"/> 其他:			
	GC 含量				
	序列长度				
	测序平台				
	序列				
	序列原始峰图				

C.6 质量控制和安全管理

- C.6.1 严格按照标准要求进行信息采集，填写各项数据记录。记录表格编页装订成册，内容齐全，填写翔实，字迹工整、清晰。原始数据记录表、图片、样品和分类凭证标本应及时保存归档，并及时填写和归档电子数据（包括数据记录表和数码图片等）。
- C.6.2 采样完成后，将所有样品运回实验室，与实验室人员交接，填写实验室样品记录表。将样品瓶上的所有信息抄写在实验室样品登记表上，按照采样区域或样点对样品登记表进行统一编号。
- C.6.3 实验场所应具备分子生物学实验室的基本条件。
- C.6.4 为防止外源污染，实验前应将实验用具进行高压灭菌，并用 75%乙醇擦洗表面。
- C.6.5 DNA 提取阴性对照（negative isolation control, NIC），用于监控 DNA 提取过程中的污染：在 DNA 提取过程中设置一个空管，和样品同步操作。

C.6.6 PCR 扩增阴性对照（negative amplification control, NAC），用于排除 PCR 反应混合物制备过程中由于污染造成的假阳性：用无菌水替代 DNA 样品进行同步 PCR 扩增。

C.6.7 PCR 扩增效率的阳性对照（positive amplification control, PAC）：添加等体积已知浓度的靶向生物的基因组 DNA，同步进行 PCR 扩增。

附 录 D  
(资料性)  
生物统计表

淡水生物环境 DNA 监测生物统计表要求参考表 D.1。

表 D.1 淡水生物环境 DNA 监测生物统计表

检测单位：					点位名称：				
样品采集日期：					样品处理日期：				
测序日期：					测序引物：				
分子分类单元编号	序列	门	纲	目	科	属	种	序列数	相对丰度

附 录 E  
(规范性)  
野外质量控制与保证

### E.1 样品的采集

E.1.1 制定合理的采样操作程序，在确定的采样时间、采样点、采样层次，用符合质量要求的统一设备采样，采水量或采泥量尽量保持一致，以保证采集的样品具有代表性和可比性。

E.1.2 保证所有野外设备处于良好的运行状态，须制定一项常规检查、维护及/或校准的计划，以确保野外数据的异质性和质量。

E.1.3 合理安排各类生物样品采集顺序，尽量避免生物类群在采集前受到较大扰动。

E.1.4 正确填写样品标签，包括样品编号、日期、水体名称、采样位置以及采集人姓名。

E.1.5 及时在现场处理样品。受生物活动影响，随时间变化明显的项目应在规定时间内测定。

E.1.6 水样采集后应选用冰袋或 4℃ 短暂保存，并在 12 小时内完成过滤。

E.1.7 整个采样和前处理过程应保持无外源污染，并符合以下要求：

- a) 应全程佩戴无菌实验手套，采集下一个样品应及时更换手套。建议佩戴口罩；
- b) 采样和前处理过程宜采用一次性无菌装置或耗材。对于重复使用装置和耗材，应选用 1.5% 的次氯酸钠消毒不少于 1 分钟。
- c) 重复使用的采样瓶，应浸泡在 1.5% 的次氯酸钠中不少于 5 分钟，用蒸馏水重复冲洗 3 次，并晾干。在采样点，再次用水样冲洗三次，在采集样品前应除去任何残留的次氯酸钠。确保清洗后丢弃的水样未与待取的水样混合。
- d) 应只从外部接触采样瓶，不得接触采样瓶及瓶盖内部。
- e) 如果有必要进入水中采样，应使用胶靴，并在采样点之间进行消毒。清除鞋底和靴子两侧的所有污垢、鹅卵石和其他环境碎屑。
- f) 水样过滤前，不应让手套接触被污染的表面，如任何未消毒的设备。若接触，应及时更换手套。
- g) 过滤每个位点的水样前，过滤器接触面应使用漂白剂消毒不少于 1 分钟，并用蒸馏水反复冲洗 3 次。

### E.2 采样记录

除了样品相关信息，采样时间、地点、水温、气温、水文、植被等也应有详细记录，确保采样现场数据的完整性。

### E.3 样品的运输

E.3.1 必须根据采样记录或登记表核对清点样品，以免有误或丢失。

E.3.2 样品运输中贮存温度不超过采样时的温度，必要时需准备冷藏设备。

E.3.3 运输中应仔细保管样品，以确保样品无破损、无污染。应避免强光照射及强烈震动。

E.3.4 不同介质来源的环境 DNA 样品应单独保存运输。

E.3.5 样品的运输尽量迅速。



附 录 F  
(规范性)  
实验室质量控制与保证

### F.1 实验室要求

F.1.1 DNA 提取实验室和 PCR 实验室须在物理空间上相互独立，不应有空气的直接相通。

F.1.2 PCR 实验室应配备紫外线超净工作台。

F.1.3 每个实验室应配备专用的实验工作服，并定期清洗。

### F.2 基本操作要求

F.2.1 实验人员不应在同一天进行 DNA 提取和 PCR 扩增实验。

F.2.2 确保所有仪器和设备处于良好的工作状态，重要仪器（如 PCR 仪、离心机、冰箱和移液枪）应进行定期校准和维护。

F.2.3 确保所有的实验耗材和试剂在保质期内，在正确的 pH 值下，可适当地进行高压蒸汽灭菌。

F.2.4 实验耗材（如枪头、离心管和 PCR 管等）须进行高压蒸汽灭菌。

F.2.5 实验操作前，应用 1.5% 的消毒剂擦拭桌面，用 75% 乙醇消毒双手，用 1.5% 的消毒剂消毒实验仪器。

F.2.6 实验操作前，移液枪应选用 75% 的酒精消毒或紫外线消毒 30 min。

F.2.7 实验过程中，实验人员应全程穿着实验服，并佩戴一次性无菌实验手套。

F.2.8 实验过程中，移液枪不得接触任何盛放样品或试剂的容器内壁。

F.2.9 同一耗材（例如 1.5 mL 离心管、移液枪头等）不得重复接触来自不同样品的实验材料。

F.2.10 实验过程中，应小心开关容器盖，样品不宜长时间敞口放置。

F.2.11 怀疑或确定产生交叉污染的样品、试剂或耗材，不得使用。

### F.3 环境 DNA 提取

F.3.1 实验操作前，应用 1.5% 的漂白剂擦拭桌面。

F.3.2 DNA 提取应全程佩戴口罩，防止刺激性气味和交叉污染。

F.3.3 沉积物称量和转移宜选用一次性无菌称量匙。

F.3.4 同一批次实验应最后处理阳性对照样品。

F.3.5 准确记录阴性对照、阳性对照和实验样品的 DNA 浓度和质量。

F.3.6 应按要求对 DNA 样品进行分装和保存。环境 DNA 应长期保存，记录准确，标记完整。

F.3.7 阴性对照、阳性对照和样品的 DNA 应分开保存，在物理空间上相互独立。可保存在不同冰箱，若条件有限，可保存在冰箱的不同分层。

### F.4 宏条形码扩增与保存

F.4.1 PCR 反应宜在紫外线超净工作台中进行。

F.4.2 紫外线超净工作台使用前，应紫外线消毒 30 min。

F.4.3 原始测序数据应按照 GB/T 35890 的规定保存为 FASTQ 文件，并准确记录测序数据的样品来源、编号、扩增引物和对应的标签信息等。

### F.5 生物信息学分析

F.5.1 阴性对照中的序列数应小于样品平均序列数的 10%，并剔除样品中包含的阴性对照序列。

F.5.2 生物信息分析产生的数据应妥善存储，并按照要求记录保存位置。

### F.6 数据记录

详细准确记录样品信息、操作人、实验数据及关键技术参数。实验室主管应检查所有数据记录的正

确性和完整性。数据记录表须有记录人、校对人对人签字。如果数据是以电子方式保存的，则数据应定期备份。

#### F.7 样品保存

F.7.1 按照要求保存样品，并记录保存信息，定期核查。每隔一周检查固定液，必要时进行添加。

F.7.2 不同介质来源的环境 DNA 样品宜置于不同冰箱中保存。若条件有限，宜置于冰箱的不同储存室。

F.7.3 环境样品不得与 DNA 样品共同保存，宜置于不同冰箱中保存。若条件有限，宜置于冰箱的不同储存室。

F.7.4 滤膜、沉积物、生物膜或混合生物组织样品在-20℃低温保存时间不宜超过一个月，常温保存不宜超过两周。

## 参 考 文 献

- [1]Yang Jianghua, Zhang Xiaowei, Xie Yuwei, Song Chao, Zhang Yong, John P. Giesy and Yu Hongxia. Ecogenomics of Zooplankton Community Reveals Ecological Threshold of Ammonia Nitrogen. *Environmental science & technology*, 2017, 51(5):3057-3064.
- [2]Zhang Shan, Lu Qi, Wang Yiyan, Wang Xiaomei, Zhao Jingdong and Yao Meng. Assessment of fish communities using environmental DNA: Effect of spatial sampling design in lentic systems of different sizes. *Molecular Ecology Resources*, 2020, 20, 242-255.
- [3]Yang Jianghua, Zhang Xiaowei, Xie Yuwei, Song Chao, Zhang Yong, Yu Hongxia and G Allen Burton. Zooplankton Community Profiling in a Eutrophic Freshwater Ecosystem-Lake Tai Basin by DNA Metabarcoding. *Scientific Reports*, 2017, 7(1):1773.
- [4]Zhang Lijuan, Yang Jianghua, Zhang Yong, Shi Jun-zhe, Yu Hongxia and Zhang Xiaowei. eDNA biomonitoring revealed the ecological effects of water diversion projects between Yangtze River and Tai Lake. *Water research*, 2022, 210:117994.
- [5]李飞龙,杨江华,杨雅楠,张效伟.环境DNA宏条形码监测水生态系统变化与健康状态[J].中国环境监测,2018,34(06):37-46.
- [6]金珂,张丽娟,张伟,张翔,陈桥,杨江华,张咏,张效伟.基于环境DNA宏条形码的太湖流域底栖动物监测与生态健康评价[J].中国环境监测,2022,38(01):175-188.
- [7]杨江华.太湖流域浮游动物物种多样性与环境污染群落生态效应研究[D].南京大学,2017
- [8]谢玉为.基于沉积物DNA宏系统分类学的底栖生物群落对化学污染物的生态响应研究[D].南京大学,2016.
-