

# 团 体 标 准

T/CSES 81—2023

## 淡水生物监测 环境 DNA 宏条形码法

Freshwater biomonitoring—Environmental DNA metabarcoding method

发布稿

2023 - 01 - 04 发布

2023 - 01 - 04 实施

## 目 次

前言.....	II
引言.....	III
1 范围.....	1
2 规范性引用文件.....	1
3 术语和定义.....	1
4 试剂.....	3
5 设备和材料.....	3
5.1 样品采集及前处理设备.....	3
5.2 实验室分析设备.....	3
5.3 分析软件.....	3
5.4 其他辅助设备和材料.....	3
6 环境 DNA 宏条形码监测方法.....	4
6.1 环境 DNA 宏条形码监测流程.....	4
6.2 环境 DNA 样品采集.....	4
6.3 环境 DNA 提取.....	5
6.4 宏条形码扩增与测序.....	5
6.5 生物信息学分析.....	6
6.6 生物统计表.....	6
7 质量控制与质量保证.....	7
7.1 质量控制.....	7
7.2 质量保证.....	8
8 废弃物处理.....	8
附录 A（资料性） 环境 DNA 固定剂.....	9
附录 B（资料性） 环境 DNA 采样记录表.....	10
附录 C（资料性） 分子分类单元累积曲线构建方法.....	11
附录 D（资料性） 常用 DNA 条形码扩增引物信息.....	12
附录 E（资料性） 分子实验记录表.....	13
附录 F（资料性） 生物信息学分析记录表.....	15
附录 G（资料性） 生物统计表.....	16
附录 H（规范性） 野外质量保证.....	17
附录 I（规范性） 实验室质量保证.....	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。

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。

本文件由南京大学提出。

本文件由中国环境科学学会归口。

本文件起草单位：南京大学、江苏省环境监测中心、中国环境监测总站、中国环境科学研究院、昆明学院、南京易基诺环保科技有限公司。

本文件主要起草人：张效伟、张咏、张丽娟、杨江华、金小伟、杨雅楠、王书平、吕学研、田颖、徐杉、赵峥、贾世琪、王志浩、孙晶莹。

## 引 言

利用环境DNA开展生物监测和生物多样性调查是一个快速发展的领域。环境DNA宏条形码法是一种有效的淡水生物多样性调查方法，可以高效评估物种的存在与否和相对丰度。

为规范淡水生物环境DNA宏条形码监测技术，促进该技术在我国生物多样性监测体系中的应用推广，制定本文件。

全国团体标准信息平台

# 淡水生物监测 环境 DNA 宏条形码法

## 1 范围

本文件规定了利用环境DNA宏条形码技术监测淡水生物的方法和质量控制与质量保证。

本文件适用于基于DNA序列相似性的淡水生物多类群监测，包括浮游植物、着生藻类、水生维管束植物、浮游动物、大型底栖无脊椎动物和鱼类等。

## 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 19489 实验室 生物安全通用要求
- GB/T 30989 高通量基因测序技术规程
- 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 40266 环境微生物宏基因组检测 高通量测序法
- HJ 494 水质 采样技术指导
- 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
- 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 4178 河流水生态监测规范

## 3 术语和定义

GB/T 30989和SN/T 4278界定的以及下列术语和定义适用于本文件。

### 3.1

**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]

### 3.2

**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标准的、有足够变异的、易扩增的短DNA序列，可用于生物体的识别和鉴定。

[来源：SN/T 4278—2015，3.1，有修改]

### 3.4

**16S 核糖体 DNA** 16S ribosomal DNA; 16S rDNA

原核生物核基因组上编码核糖体小亚基16S rRNA的DNA序列。

### 3.5

**18S 核糖体 DNA** 18S ribosomal DNA; 18S rDNA

真核生物核基因组上编码核糖体小亚基18S rRNA的DNA序列。

- 3.6  
**线粒体 12S 核糖体 DNA** mitochondrial 12S ribosomal DNA; Mt 12S rDNA  
 后生动物线粒体基因组上12S rRNA对应的DNA序列。
- 3.7  
**线粒体细胞色素 *c* 氧化酶 I** mitochondrial cytochrome *c* oxidase I; COI  
 后生动物线粒体基因组上的线粒体细胞色素*c*氧化酶I对应的DNA序列。
- 3.8  
**扩增子** Amplicon  
 通过PCR扩增获得的一段特定DNA序列。
- 3.9  
**DNA 宏条形码技术** DNA metabarcoding technology  
 利用高通量扩增子测序获取环境DNA的特定片段序列，根据物种间DNA序列差异识别物种，获取物种组成的技术。
- 3.10  
**索引** Index  
 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。
- 3.11  
**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]
- 3.12  
**序列相似性阈值** cutoff value of sequence similarity  
 判定两条DNA序列的相似程度，特定阈值以上的序列为同一分类单元。
- 3.13  
**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的分类单元。
- 3.14  
**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，即每条序列至少有一个碱基不相同，可以根据ASV的序列差异进行物种鉴定。
- 3.15  
**分子分类单元** molecular taxonomic unit  
 DNA宏条形码监测分类工作中的操作单位，有特定的名称和序列分类特征，如ASV和OTU。
- 3.16  
**嵌合体** chimera  
 在PCR扩增的延伸步骤中由两种或更多种序列组合生成的错误序列。
- 3.17  
**序列相对丰度** relative abundance of sequences  
 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]
- 3.18  
**阴性对照** negative control  
 在实验过程中，与受试样品平行进行的，用确定不含DNA的样品代替受试样品进行的对照反应，用于观察整个反应体系是否正确，确认没有受到污染。  
 [来源：SN/T 4278—2015，3.7，有修改]
- 3.19

**阳性对照 positive control**

在实验过程中，与受试样品平行进行的，且预期产生已知阳性结果的样本，用于观察整个反应体系和反应过程是否正常，确认没有受到污染。

[来源：SN/T 4278—2015，3.6，有修改]

**4 试剂**

- 4.1 无菌水。
- 4.2 无水乙醇：分析纯。
- 4.3 环境 DNA 固定剂，见附录 A。
- 4.4 DNA 提取试剂。
- 4.5 通用 PCR 扩增试剂。
- 4.6 PCR 扩增引物。
- 4.7 PCR 产物纯化试剂。
- 4.8 通用 DNA 浓度测定试剂盒：主要成分包括缓冲液和染色剂。
- 4.9 凝胶电泳相关试剂。
- 4.10 文库构建试剂。
- 4.11 高通量测序试剂。

**5 设备和材料****5.1 样品采集及前处理设备**

- 5.1.1 竖式采水器：2 L 或 5 L。
- 5.1.2 水样抽滤设备。
- 5.1.3 沉积物采样装置：抓斗、采泥器等。
- 5.1.4 着生藻类采集器具：毛刷、刀片、托盘、洗瓶等。
- 5.1.5 浮游生物网：孔径 64  $\mu\text{m}$ 。
- 5.1.6 大型底栖无脊椎动物采集装置：彼得生采泥器、D 型抄网、踢网、索伯网、40 目的筛网等。

**5.2 实验室分析设备**

- 5.2.1 低温离心机：离心转速可达 13000 rpm，温控范围低至 4  $^{\circ}\text{C}$ 。
- 5.2.2 均质仪。
- 5.2.3 冷冻干燥仪。
- 5.2.4 真空离心浓缩仪。
- 5.2.5 超微量紫外分光光度计：测量体积最小 1  $\mu\text{L}$ ，波长范围包括 230 nm、260 nm 和 280 nm。
- 5.2.6 PCR 仪。
- 5.2.7 核酸电泳仪：水平式。
- 5.2.8 凝胶成像分析仪。
- 5.2.9 高通量测序仪。
- 5.2.10 高压蒸汽灭菌仪：可达到 121  $^{\circ}\text{C}$ 、18 min 灭菌条件。
- 5.2.11 紫外线超净工作台。

**5.3 分析软件**

高通量测序数据质量控制和分析软件：QIIME、R 语言等。

**5.4 其他辅助设备和材料**

- 5.4.1 低温冰箱：4  $^{\circ}\text{C}$ 、-20  $^{\circ}\text{C}$ 和-80  $^{\circ}\text{C}$ 。
- 5.4.2 采样瓶：100 mL 和 1000 mL 等。
- 5.4.3 照相器具：照相机或摄像机等。
- 5.4.4 微量移液器：0.5~10  $\mu\text{L}$ 、20~200  $\mu\text{L}$  和 100~1000  $\mu\text{L}$  等。

- 5.4.5 通用无菌手套。
- 5.4.6 离心管：1.5 mL、2 mL、5 mL 和 50 mL，无 DNA 和生物残留。
- 5.4.7 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。
- 5.4.8 PCR 管、96 孔板等类似的 PCR 反应容器：无 DNA 和生物残留。
- 5.4.9 记录工具：记录纸、防水笔等。

## 6 环境 DNA 宏条形码监测方法

### 6.1 环境 DNA 宏条形码监测流程

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，监测流程见图1。

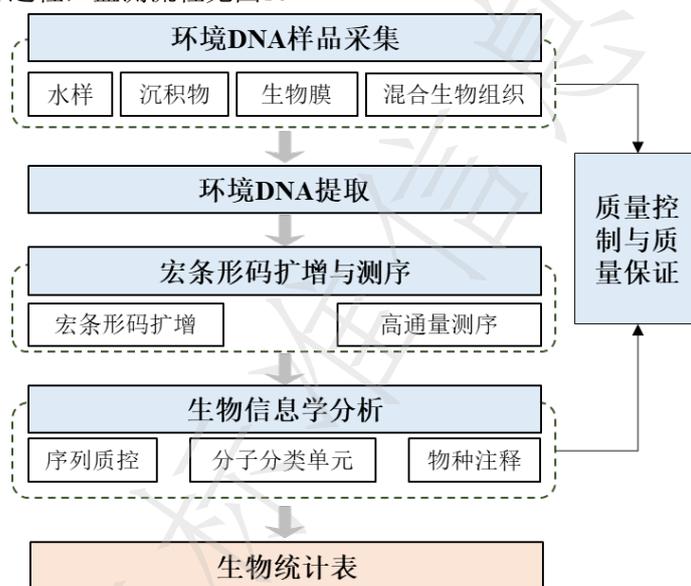


图1 环境 DNA 宏条形码监测流程图

### 6.2 环境 DNA 样品采集

#### 6.2.1 总则

根据监测的生物类群选取合适的环境DNA采样介质，见表1。每个点位采集3个生物重复样品。填写环境DNA采样记录表，见附录B。

表1 不同生物类群的环境 DNA 采样介质

生物类群	水	沉积物	生物膜	混合生物组织
浮游植物	+++	+		
着生藻类			+++	
水生维管束植物	+	++		
浮游动物	++	+		+++
大型底栖无脊椎动物	+	++		+++
鱼类	+++	+		

注：+表示可用，++表示较多采用，+++表示最为常用。

## 6.2.2 水样

6.2.2.1 水样采集按照 HJ 494 的规定执行，现场过滤至一定孔径（一般为 0.45  $\mu\text{m}$ ，大型底栖无脊椎动物和鱼类可选择 0.45~1.2  $\mu\text{m}$ ）的滤膜上，野外干冰或-20  $^{\circ}\text{C}$  保存，实验室-20  $^{\circ}\text{C}$  保存；或者加入附录 A 推荐的固定剂，常温保存。采样体积一般不小于 1 L，浮游植物和水生维管束植物一般为 1 L，大型底栖无脊椎动物一般为 1~3 L，鱼类一般不少于 3 L。可通过构建分类单元累积曲线，确定实际水体的采样体积，相关示例见附录 C。

6.2.2.2 高泥沙水样，应低温（4  $^{\circ}\text{C}$  或冰袋）静置分离悬浮颗粒物，再过滤。生物密度较高的水体（如处于水华暴发期），可将水样等体积分开过滤至多张（1~5）滤膜，作为子样本。

## 6.2.3 沉积物

6.2.3.1 按照 HJ 494 的规定采集 50 mL 的表层沉积物（0~5 cm），应剔除砾石、木屑、杂草、贝壳及其他大体积生物残体，收集至无菌离心管中，野外干冰或-20  $^{\circ}\text{C}$  保存，实验室-20  $^{\circ}\text{C}$  保存；或者加入无水乙醇，确保样品中最终的乙醇浓度 $\geq 80\%$ ，常温保存。

6.2.3.2 同一采样点沉积物采集宜尽量涵盖各类小生境。

## 6.2.4 生物膜

按照 DB 32/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）表面刮取一定面积（一般为 25  $\text{cm}^2$ ）的样品，无菌水清洗至采样瓶中。野外干冰或-20  $^{\circ}\text{C}$  保存，实验室-20  $^{\circ}\text{C}$  保存；或者加入无水乙醇，确保最终的乙醇浓度 $\geq 80\%$ ，常温保存。

## 6.2.5 混合生物组织

6.2.5.1 按照 SC/T 9402 的规定用浮游生物网采集浮游动物样品，采样体积一般为 20 L，过滤至一定孔径（一般为 5  $\mu\text{m}$ ）的滤膜上，野外干冰或-20  $^{\circ}\text{C}$  保存，实验室-20  $^{\circ}\text{C}$  保存；或者加入附录 A 推荐的固定剂，常温保存。

6.2.5.2 按照 HJ 710.8 的规定定量采集与筛选大型底栖无脊椎动物，加入 3 倍体积的无水乙醇，1 g 换算为 1 mL，常温保存。

## 6.3 环境 DNA 提取

### 6.3.1 样品前处理

6.3.1.1 滤膜样品（水样或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，必要时可先将滤膜剪碎。

6.3.1.2 沉积物：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。

6.3.1.3 生物膜：4  $^{\circ}\text{C}$  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。

6.3.1.4 混合大型底栖无脊椎动物组织：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。

### 6.3.2 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，可采用离心柱法或磁珠法等常规分子生物学操作纯化 DNA，操作步骤见 GB/T 40226。

### 6.3.3 DNA 浓度与保存

样本 DNA 浓度应不低于 1  $\text{ng}/\mu\text{L}$ ，最佳浓度范围为 10~100  $\text{ng}/\mu\text{L}$ ，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 在 -20  $^{\circ}\text{C}$  或以下温度条件保存，避免反复冻融。

## 6.4 宏条形码扩增与测序

### 6.4.1 宏条形码扩增

6.4.1.1 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索引以区分样品。推荐引物见附录 D。

6.4.1.2 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，按照 SN/T 4278 的规定纯化 PCR 产物。

6.4.1.3 宏条形码扩增产物在-20 °C 或以下温度条件保存。

#### 6.4.2 文库构建与高通量测序

6.4.2.1 宜将含有不同的引物索引的宏条形码扩增产物等摩尔量混合，使用文库构建试剂进行文库构建。进行文库构建的混合宏条形码扩增产物的总量应不低于 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。

6.4.2.2 将多个质检合格的文库按比例混合，按照 GB/T 30989 和 GB/T 35537 的规定进行高通量测序。每个样品的预期序列数应不低于 30000 条。填写分子实验记录表，见附录 E。

### 6.5 生物信息学分析

#### 6.5.1 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。填写生物信息学分析记录表，见附录 F。

#### 6.5.2 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、样品索引和引物），并基于碱基识别质量（一般 $>Q20$ ）和序列长度（一般大于预期长度的70%）进行序列修剪。

#### 6.5.3 文库拆分

根据每个样品的索引将序列分配到不同的样品中。

#### 6.5.4 分子分类单元构建及质量控制

可选用 OTU 或 ASV 方法进行序列聚类和质量控制，获得分子分类单元，并过滤掉错误序列和非目标序列。

- a) 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；
- b) 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。

#### 6.5.5 过滤分子分类单元

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）和阴性对照包含的分子分类单元，也可根据实际监测需求调整过滤的丰度阈值。

#### 6.5.6 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（主要是序列相似性阈值）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。

### 6.6 生物统计表

#### 6.6.1 检出判定

分子分类单元在某一点位的生物重复样品中检出率不低于 2/3。每个样品宜保留序列相对丰度 $>0.01\%$ 的分子分类单元。

#### 6.6.2 序列相对丰度

每个点位检出的分子分类单元的序列相对丰度为所有生物重复样品中序列相对丰度的平均值。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、序列数和序列相对丰度组成，应符合附录G的规定。

## 7 质量控制与质量保证

### 7.1 质量控制

#### 7.1.1 质量控制参数

##### 7.1.1.1 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，也可适当设置1~3个测序阴性对照，见表2。

##### 7.1.1.2 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10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1 ng/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，见表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	阴性对照	阳性对照
过滤	无菌水	无
DNA提取	无菌水	已知物种组成的混合群落
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

##### 7.1.1.3 平行样品

每个点位应至少设置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扩增和建库测序平行样品。

#### 7.1.2 质量控制评价指标

##### 7.1.2.1 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。

$$FN = \frac{n_1}{n} \dots \dots \dots (1)$$

式中：

FN——假阴性率；

$n_1$ ——标准样品中未被测出的物种数目；

$n$ ——标准样品的实际物种数目。

##### 7.1.2.2 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，计算测量结果中检出但标准样品中不存在的物种所占比例，即假阳性率（FP）。假阳性率不应超过10%。按照公式（2）计算。

$$FP = \frac{n_2}{n} \dots \dots \dots (2)$$

式中：

FP——假阳性率；

$n_2$ ——未在标准样品物种清单中的物种数目；

$n$ ——标准样品的实际物种数目。

## 7.2 质量保证

### 7.2.1 野外质量保证

按附录H的规定，做好样品采集、记录、运输和保存，防止样品的交叉污染。

### 7.2.2 实验室质量保证

按附录I的规定，实验过程应防止样品的污染，并做好数据记录和样品保存。

## 8 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、消毒或焚烧等方式灭活，对含核酸染料的废液和废胶单独收集和处理。

附录 A  
(资料性)  
环境 DNA 固定剂

### A.1 乙醇固定剂

乙醇的浓度应不小于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

#### A.2.1 试剂配制

将100 mL三羟甲基氨基甲烷盐酸溶液 (Tris-HCl, 1 mol/L)、200 mL乙二胺四乙酸溶液 (EDTA, 0.5 mol/L)、2.5 mL氯化钠溶液 (NaCl, 4 mol/L) 和5 g十二烷基硫酸钠 (SDS) 混匀，加无菌水定容至1 L。

#### A.2.2 样本保存

Longmire's固定剂需浸没整个样本，常温下，样本在Longmire's固定剂中可以稳定储存2~6周。Longmire's固定剂在低温下可能会出现沉淀，当该情况出现时可适当加热待沉淀溶解再使用。



附录 C  
(资料性)  
分子分类单元累积曲线构建方法

### C.1 样品采集

在代表性点位采集20个水样样本，每个样本采样体积为500 mL，累积采样体积为10 L。

### C.2 样品-分子分类单元表

通过环境DNA宏条形码分析，获得样品-分子分类单元表格，保存为sample.csv文件，见表C.1。

表C.1 样品-分子分类单元表格示例

	分子分类单元 1	分子分类单元 2	分子分类单元 3	.....
样品 1				
样品 2				
样品 3				
.....				

### C.3 R 语言构建分子分类单元累积曲线

#### C.3.1 读取样品-分子分类单元表格

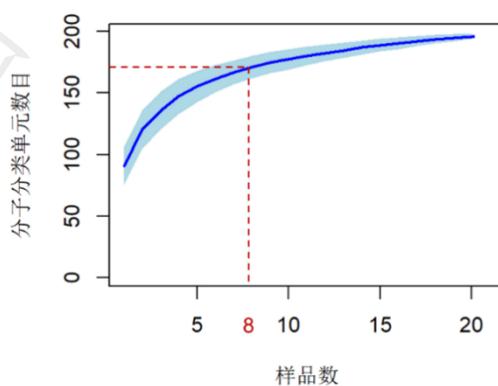
```
samp<-read.csv("sample.csv",row.names = 1)
```

#### C.3.2 构建分子分类单元累积曲线

```
accu<- specaccum(samp, method="random")
plot(accu, ci.type="poly", col="blue", lwd=2, ci.lty=0, ci.col="lightblue",xlab="样品数",ylab="分子分类单元数目")
```

#### C.3.3 确定最适采样体积

根据分子分类单元累积曲线确定识别出90%的分子分类单元数目所需的采样体积（即样品数和采样体积/样品的乘积，以mL计），见图C.1。



图C.1 分子分类单元累积曲线图

附录 D  
(资料性)  
常用 DNA 条形码扩增引物信息

表D.1给出了常用DNA宏条形码扩增引物信息。

表D.1 常用 DNA 宏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 (°C)
原核浮游植物、原核着生藻类	16S_V3	16S_341F	ACCTACGGGRSGCWGCAG	100~200	55~62
		16S_518R	ATTACCGCGGCTGCTGG		
	16S_V4	16S_515F	GTCACAGCMGCCGCGGTAA	~300	55~62
		16S_806R	GGACTACHVGGGTWTCTAAT		
	16S_V3_V4	16S_338F	ACTCCTACGGGAGGCAGCAG	400~500	55~62
		16S_806R	GGACTACHVGGGTWTCTAAT		
	CPC_IGS	PCβF	GGCTGCTTGTTTACGCGACA	350~400	50~55
PCβR		GCTTCGGTRAKKGGRTTTTCAT			
真核浮游植物	18S_V9	18S_1389F	TCCCTGCCHTTTGTACACAC	100~200	55~62
		18S_1510R	CCTTCYGCAGGTTACCTAC		
	18S_V4-1	TAREuk454FW D1	CCAGCA(G/C)C(C/T)GCGGTAATCC	300~400	55~62
TAREukREV3		ACTTTCGTTCTTGAT(C/T)(A/G)A			
真核着生藻类	18S_V4-2	DIV4_F	GCGGTAATCCAGCTCCAATAG	400~500	48~55
		DIV4_R	CTCTGACAATGGAATACGAATA		
水生维管束植物	18S_V7	Euka02_V7F	TTTGTCTGSTTAATTSCG	100~150	45~55
		Euka02_V7R	ACAGACCTGTTATTGC		
	RbcL	orbcL2_F	YGATGGACTTACNAGTCTTGATCGTTACA AAGG	200~300	60~62
		orbcL2_R	GNCCATAYTRTTCAATTTATCTCTTTCAA CTTGGATNCC		
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	TAIACYTCIGGRTGICCRARAAYCA		
鱼类	Mt 12S rDNA-1	MetafishF1	TCGTGCCAGCCACCGCGGTTA	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	GTCGGTAAAACCTCGTGCCAGC	150~200	55~60
		Mifish_U_R	CATAGTGGGGTATCTAATCCCAGTTTG		
	Mt 16S rDNA	Fish16S_F	GGTCGCCCAACCRAAG	~100	55~60
		Fish16S_R	CGAGAAGACCCTWTGGAGCTTIAG		

附 录 E  
(资料性)  
分子实验记录表

表E.1 DNA 提取记录表

实验单位：                      操作人：                      校对入：                      实验日期：  
 样品来源水域：  
 样品类型：水样   沉积物   生物膜   混合浮游动物组织   混合大型底栖无脊椎动物组织  
 DNA浓度检测仪器：

处理编号	样品名称	DNA浓度 (ng/ $\mu$ L)	OD260 nm/OD280 nm	OD260 nm/OD230 nm
1				
2				
3				
4				
5				
6				
7				
8				
9				
10				
11				
12				
13				
14				
15				
16				
17				
18				
19				
20				

表E.2 宏条形码扩增记录表

实验单位：                    操作人：                    校对人对：                    实验日期：  
 DNA样品数：  
 DNA样品来源水域：  
 DNA样品类型：水样 沉积物 生物膜 混合浮游动物组织 混合大型底栖无脊椎动物组织

PCR 重复数目：	反应体积：_____μL	PCR 引物名称：
PCR 上游引物序列（5'-3'）		
PCR 下游引物序列（5'-3'）		
预期扩增长度：	PCR 聚合酶：	退火温度（℃）：
循环数：	阴性对照结果：	阳性对照结果：
琼脂糖凝胶电泳图：		
注：琼脂糖凝胶电泳图应作为附件保存，并标记清楚样品编号。		

表E.3 高通量测序记录表

实验单位：                    操作人：                    校对人对：                    实验日期：  
 建库试剂盒名称：  
 预期序列数/样本：                    高通量测序平台：  
                                             高通量测序数据存储位置：

编号	文库名称	文库浓度 (ng/μL)	PCR引物 名称	预期长度 (bp)	索引 编号	索引序列	样品数
1							
2							
3							
4							
5							
6							
7							
8							
9							
10							

附 录 F  
(资料性)  
生物信息学分析记录表

表F.1 生物信息学分析记录表

生物信息分析单位:

负责人:

操作人:

分析日期:

样品数:

宏条形码扩增引物及预期扩增长度:

质量控制	原始序列数:	碱基识别质量阈值: <input type="checkbox"/> Q20 <input type="checkbox"/> Q30 <input type="checkbox"/> 其他:	
	序列长度筛选阈值:	质量控制后序列数:	质量控制后序列数/样本:
序列聚类和质量控制	序列聚类方法: <input type="checkbox"/> ASV <input type="checkbox"/> OTU <input type="checkbox"/> 其他:		OTU 聚类阈值:
	聚类软件和关键参数: <input type="checkbox"/> Usearch <input type="checkbox"/> Vsearch <input type="checkbox"/> Swarm <input type="checkbox"/> 其他:		
	嵌合体剔除方法: <input type="checkbox"/> Vsearch <input type="checkbox"/> Swarm <input type="checkbox"/> DADA2 <input type="checkbox"/> LULU <input type="checkbox"/> 其他:		
分子分类单元过滤	低丰度分类单元的过滤阈值:		
物种注释	物种注释方法: <input type="checkbox"/> Blastn <input type="checkbox"/> 其他:		物种鉴定阈值:
	条形码数据库: <input type="checkbox"/> NCBI <input type="checkbox"/> BOLD <input type="checkbox"/> 其他:		



## 附录 H (规范性) 野外质量保证

### H.1 样品的采集

H.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。

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

H.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。

H.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。

H.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。

H.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。

H.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。
- b) 采样和前处理过程宜采用一次性无菌装置或耗材。对于重复使用的装置和耗材，应选用漂白剂（次氯酸钠的浓度不低于1.5%）消毒不少于1分钟。
- c) 重复使用的采样瓶，应浸泡在漂白剂中 $\geq 5$ 分钟，用蒸馏水冲洗3次，并晾干。在采样点，再次用水样冲洗3次，采样前应除去残留的漂白剂。确保清洗后丢弃的水样未与待取水样混合。
- 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，如未消毒的设备等。若接触，应及时更换手套。
- g) 水样过滤前，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。

### H.2 采样记录

认真填写环境DNA采样记录表，见附录B。除了样品相关信息，采样时间、地点、经纬度、水温、气温、水文、采样介质等也应有详细记录，确保采样现场数据的完整性。

### H.3 样品的运输和保存

H.3.1 应根据采样记录或登记表核对清点样品，以免有误或丢失。

H.3.2 样品运输应按照要求的贮存温度执行，必要时需准备冷藏设备。

H.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振荡。

H.3.4 不同介质来源的环境DNA样品应单独保存运输。

H.3.5 样品的运输尽量迅速。

**附录 I**  
**(规范性)**  
**实验室质量保证**

### 1.1 实验室要求

- 1.1.1 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。
- 1.1.2 PCR实验室应配备紫外线超净工作台。
- 1.1.3 每个实验室应配备专用的实验工作服，并定期清洗。

### 1.2 基本操作要求

- 1.2.1 实验人员不应在同一天进行DNA提取和PCR扩增实验。
- 1.2.2 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。
- 1.2.3 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。
- 1.2.4 实验耗材（如枪头、离心管和PCR管等）须进行高压蒸汽灭菌。
- 1.2.5 实验操作前，应用1.5%的漂白剂擦拭桌面，用75%乙醇消毒双手，用1.5%的漂白剂消毒实验仪器。
- 1.2.6 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。
- 1.2.7 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。
- 1.2.8 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。
- 1.2.9 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。
- 1.2.10 实验过程中，应小心开关容器盖，样品不宜长时间敞口放置。
- 1.2.11 怀疑或确定产生交叉污染的样品、试剂或耗材，不得继续使用。

### 1.3 环境 DNA 提取

- 1.3.1 实验操作前，应用1.5%的漂白剂擦拭桌面。
- 1.3.2 DNA提取应全程佩戴口罩，防止刺激性气味和交叉污染。
- 1.3.3 沉积物称量和转移宜选用一次性无菌称量匙。
- 1.3.4 同一批次实验应最后处理阳性对照样品。
- 1.3.5 准确记录阴性对照、阳性对照和实验样品的DNA浓度和质量。
- 1.3.6 应按照要求对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。
- 1.3.7 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。

### 1.4 宏条形码扩增与保存

- 1.4.1 PCR反应宜在紫外线超净工作台中进行。
- 1.4.2 紫外线超净工作台使用前，应紫外线消毒30 min。
- 1.4.3 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、扩增引物和对应的索引信息等。

### 1.5 生物信息学分析

- 1.5.1 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。

1.5.2 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。

## 1.6 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、校对人签字。如果数据是以电子方式保存的，则数据应定期备份。

## 1.7 样品保存

1.7.1 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。

### 1.7.2

1.7.3 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。

1.7.4 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。

1.7.5 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。

---