

团体标准

T/SEEPLA XXXXX—XXXX

淡水生物监测 环境 DNA 定量 PCR 法

Freshwater biomonitoring—environmental DNA quantitative PCR method

（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

四川省生态环境政策法规研究会 发布

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 2

5 设备和材料 2

6 环境 DNA 定量 PCR 检测方法 2

7 质量控制与质量保证 6

8 废弃物处理 7

附录 A（资料性） 环境 DNA 采样记录表..... 8

附录 B（规范性） 野外质量控制与保证..... 9

附录 C（规范性） 实验室质量控制与保证..... 10

参考文献 12

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。

本文件起草单位：

本文件主要起草人：

本文件为首次发布。

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定量PCR法是一种有效的淡水生物多样性调查方法，可以定量监测与评估生物类群或物种的时空变化。

为规范淡水生物环境DNA定量PCR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。

淡水生物监测 环境 DNA 定量 PCR 法

1 范围

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

本文件适用于淡水生生物类群或物种监测，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 19495.5-2018 转基因产品检测 实时荧光定量聚合酶链式反应（PCR）检测方法

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—2015 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

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

荧光定量 PCR *quantitative real-time polymerase chain reaction*

实时荧光定量PCR即定量PCR，在聚合酶链式反应体系中加入荧光基团，利用荧光信号积累实时监测整个 PCR 进程，并通过标准曲线对未知模板进行定量分析的方法。

[来源：GB/T 19495.5-2018，3.1.3，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

Ct 值 *cycle threshold*

每个反应管内的荧光信号达到设定的阈值时所经历的循环数。

[来源：GB/T 19495.5-2018，3.1.5]

3.4

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]

3.5

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 保存液。
- 4.4 DNA 提取试剂。
- 4.5 定量 PCR 预混液。
- 4.6 扩增引物和探针。

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，具备废液直排功能。
- 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 μm 。
- 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 均质仪，速度不小于 6m/s。
- 5.2.2 冷冻干燥仪。
- 5.2.3 真空离心浓缩仪。
- 5.2.4 微量紫外分光光度计：测量体积最小 1 μL ，波长范围包括 230 nm、260 nm 和 280 nm。
- 5.2.5 荧光定量 PCR 仪。

5.3 其他辅助设备和材料

- 5.3.1 低温冰箱：4 $^{\circ}\text{C}$ 、-20 $^{\circ}\text{C}$ 和 -80 $^{\circ}\text{C}$ 。
- 5.3.2 采样瓶：100 mL 和 1000 mL 等。
- 5.3.3 照相器具：照相机或摄像机等。
- 5.3.4 微量移液器：0.5 μL ~10 μL 、20 μL ~200 μL 和 100 μL ~1000 μL 等。
- 5.3.5 通用无菌手套。
- 5.3.6 离心管：1.5 mL、2 mL、5 mL 和 50 mL，无 DNA 和生物残留。
- 5.3.7 无菌微孔滤膜：0.22 μm 、0.45 μm 、1.2 μm 和 5 μm 等。
- 5.3.8 PCR 管、96 孔板等类似的 PCR 反应容器：无 DNA 和生物残留。
- 5.3.9 记录工具：记录纸、防水笔等。

6 环境 DNA 定量 PCR 检测方法

6.1 环境 DNA 定量 PCR 技术流程

包括环境DNA样品采集、环境DNA提取、标准曲线制备、定量PCR扩增、结果分析与计算、质量控制与质量保证等过程（见图1）。

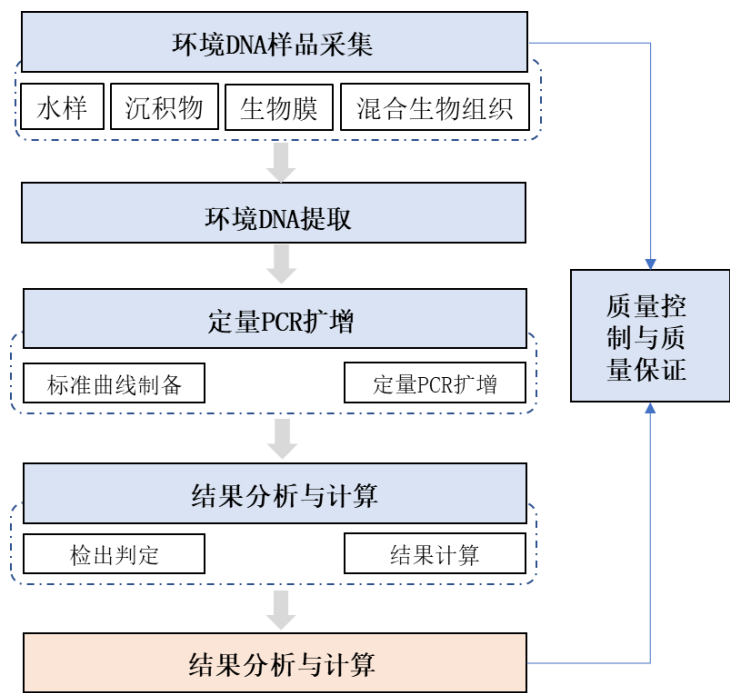


图1 环境 DNA 定量 PCR 监测流程图

6.2 环境 DNA 样品采集

6.2.1 总则

根据监测的生物类群或物种选取合适的环境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A。

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的滤膜上（采样体积一般不小于 5 L），野外干冰或-20 ℃保存，实验室-20 ℃保存；或者加入固定剂，常温保存。

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 cm~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 ℃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%，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）表面刮取一定面积（一般为25 cm²）的样品，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%，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 μm）的滤膜上，野外干冰或-20℃保存，实验室-20℃保存；或者加入固定剂，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，称重后将 1 g 换算为 1 mL，加入 3 倍体积的无水乙醇，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℃解冻，振荡混匀，取 2 mL 样品，高速（不低于 12000rpm）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 ng/μL，最佳浓度范围为10 ng/μL~100 ng/μL，260 nm和280 nm波长处的吸光度值比值（OD_{260 nm}/OD_{280 nm}）应在1.7~2.0范围内，OD_{260 nm}/OD_{230 nm}应大于2.0。DNA在-20℃或以下温度条件保存，避免反复冻融。

6.4 标准曲线制备

6.4.1 一般要求

制备标准曲线时需设置至少5个浓度点，且设置的最低浓度点应该尽量接近该扩增目标的定量下限。标准曲线上的每个浓度应至少做3个平行重复。

6.4.2 标准曲线制备

将含有目标物种或生物类群的质粒标准分子DNA溶液进行梯度稀释。为便于后续计算，可先稀释至1×10⁵拷贝，后采用10倍梯度稀释，如稀释至10⁵拷贝，10⁴拷贝，10³拷贝，10²拷贝、10拷贝，其中10拷

贝为定量下限模板浓度，必须设置。采用稀释后的 DNA 溶液进行实时荧光 PCR 扩增制备标准曲线。每个浓度模板DNA设置至少3个平行重复扩增。扩增后，根据扩增Ct值与样品浓度（拷数）对数值间的线性关系制备标准曲线。标准曲线即以DNA拷贝数的对数作为横坐标，Ct值作为纵坐标作图，并获得标准曲线方程。

6.5 定量 PCR 扩增

6.5.1 定量 PCR 反应体系

定量PCR反应体系配制见表2，其中，基因探针为推荐使用，使用或不使用基因探针时，需使用相应定量PCR预混液。每个DNA样品3个重复。体系配制应按照单次实验所需总量统一配制。

表2 反应体系

PCR反应试剂名称	终浓度	体积
定量PCR预混液	1×	10 μL
PCR反应试剂名称	终浓度	体积
正向引物（10 μmol/L）	0.5 μmol/L	1 μL
反向引物（10 μmol/L）	0.5 μmol/L	1 μL
基因探针（5 μmol/L）	0.25 μmol/L	0.5 μL
DNA模板	—	1–5 μL
ddH ₂ O（双蒸水）	—	补足至20 μL

6.5.2 定量 PCR 反应程序

定量PCR反应程序见表3。不同定量PCR平台对除退火延伸外步骤中的温度和时间要求不同，可做相应调整。不同引物退火温度不同，推荐退火温度不小于60℃，不高于65℃。退火延伸步骤检测荧光信号。

表3 反应程序

反应步骤	温度	时间	循环
预热	50℃	2 min	
预变性	95℃	10 min	
变性	95℃	15 s	40
退火延伸	60℃	1 min	

6.5.3 仪器检测通道选择

设置PCR反应荧光信号收集条件，应与探针标记的报告基团一致。具体设置方法可参照仪器使用说明书。

6.5.4 实验对照的设立

实验设立以下对照：

- a) 阳性对照，为目标物种或生物类群基因组 DNA，或含有上述片段的质粒标准分子 DNA；
- b) 阴性对照，相应的不含目标物种的基因组 DNA 或质粒 DNA 的样品，或混合样品；
- c) 空白对照，设两个，一是提取 DNA 时设置的提取空白对照（以双蒸水代样品），二是 PCR 反应的空白对照（以双蒸水代替 DNA 模板）。

6.6 结果分析与计算

6.6.1 检出判定

下述指标有一项不符合者，需重新进行实时荧光PCR扩增：

- a) 空白对照：基因扩增 Ct 值 ≥ 40 ；
- b) 阴性对照：基因扩增 Ct 值 ≥ 35 ；
- c) 阳性对照：基因扩增 Ct 值 ≤ 35 （根据检出下限 Ct 值确认）；
- d) 被检测的样品核酸浓度应在标准曲线测定范围内，如不在标准曲线测定范围内，则需对样品核酸浓度进行适当调整后重新进行检测。

6.6.2 结果计算

样品DNA浓度换算为DNA拷贝数，可参考公式（1）计算：

$$\text{Copy} = \frac{6.022 \times 10^{23} \times \text{Cont}}{\text{length} \times 10^9 \times 660} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

Copy——DNA拷贝数；

Cont.——DNA量，单位为ng；

length——基因组DNA长度，单位为bp。

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；定量PCR扩增时，相应的不含目标物种的基因组DNA，或混合样品；至少设置3个阴性对照，见表4。

7.1.1.2 阳性对照

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4。

表4 环境 DNA 定量 PCR 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
定量PCR扩增	无菌水	已知拷贝数的目标物种DNA或质粒DNA

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、定量PCR扩增平行样品。

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（2）计算。

$$FN = \frac{n_1}{n} \dots\dots\dots (2)$$

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（3）计算。

$$FP = \frac{n_2}{n} \dots\dots\dots (3)$$

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B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C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 采样记录表

监测单位： 采样人： 校对入：
采集日期： 年 月 日 天气： 记录表编号：

点位名称：		点位编号：
经度： 度 分 秒	纬度： 度 分 秒	海拔 (m)：
生境条件		
水深 (m)：	气温 (°C)：	水温 (°C)：
pH 值：	浊度：	溶氧量 (mg/L)：
流速 (m/s)：	电导率 (μS/cm)：	
环境 DNA 采集		
采样介质	☐ 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	
水样	体积/样品 (mL)：	过滤体积/样品 (mL)：
	样品数/点位：	样品编号：
	过滤方法： ☐ 手动过滤 ☐ 蠕动泵 ☐ 真空泵	
	滤膜材质： ☐ 硝酸纤维素 ☐ 玻璃纤维 ☐ 聚碳酸酯 ☐ 尼龙 ☐ 其他：	
	滤膜孔径：	过滤时间/样本：
	滤膜保存方法： ☐ 乙醇 ☐ Longmire's 固定剂 ☐ 干冰 ☐ -20 °C	
沉积物	采样工具： ☐ 抓斗 ☐ 抓泥器 ☐ 钻探装置 ☐ 其他：	体积/样品 (mL)：
	样品数/点位：	样品编号：
生物膜	基质类型： ☐ 粗砾石 ☐ 粗鹅卵石 ☐ 树木残干 ☐ 其他：	基质面积 (cm²)：
	样品数/点位：	样品编号：
混合浮游动物组织	体积/样品 (mL)：	过滤体积/样品 (mL)：
	样品数/点位：	样品编号：
	过滤方法： ☐ 手动过滤 ☐ 蠕动泵 ☐ 真空泵	
	滤膜材质： ☐ 硝酸纤维素 ☐ 玻璃纤维 ☐ 聚碳酸酯 ☐ 尼龙 ☐ 其他：	
	滤膜孔径：	过滤时间/样本：
	滤膜保存方法： ☐ 乙醇 ☐ Longmire's 固定剂 ☐ 干冰 ☐ -20 °C	
混合大型底栖无脊椎动物组织	采样工具： ☐ 抓斗式采泥器 ☐ 彼得森采样器 ☐ D 形抄网 ☐ 其他：	采样面积/样品 (m²)：
	样品数/点位：	样品编号：
	采样点位及周边生境照片应作为附件保存。	

附 录 B
(规范性)
野外质量控制与保证

B.1 样品的采集

B.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。

B.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、维护及/或校准的计划，以确保野外数据的异质性和质量。

B.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。

B.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。

B.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。

B.1.6 水样采集后可应选用冰袋或4℃短暂保存，并在6小时内完成过滤。

B.1.7 整个采样和前处理过程尽量保持无外源污染，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漂白剂。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) 过滤水样前，每个样品的过滤器接触面应使用漂白剂消毒不少于1分钟，并用蒸馏水冲洗3遍。

B.1.8 所有使用漂白剂产生的废物须收集运送至实验室，按照危险废物处理。

B.2 采样记录

认真填写环境采样记录表，见附录A。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。

B.3 样品的运输

B.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。

B.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。

B.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。

B.3.4 样品的运输尽量迅速。

B.4 样品的保存

按照要求分别保存各类样品，保存时，每隔一周检查固定液，必要时进行添加。

附录 C
(规范性)
实验室质量控制与保证

C.1 实验室要求

C.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。

C.1.2 PCR实验室应配备紫外线超净工作台。

C.1.3 每个实验室应配备专用的实验工作服，并定期清洗。

C.2 基本操作要求

C.2.1 实验人员不应在同一天进行DNA提取和PCR扩增实验。

C.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。

C.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。

C.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。

C.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。

C.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。

C.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。

C.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。

C.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。

C.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。

C.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。

C.3 环境 DNA 提取

C.3.1 实验操作前，应用1.5%的漂白剂擦拭桌面。

C.3.2 DNA提取应全程佩戴口罩，防止刺激性气味和交叉污染。

C.3.3 沉积物称量和转移宜选用一次性无菌称量匙。

C.3.4 同一批次实验应最后处理阳性对照样品。

C.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。

C.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。

C.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。

C.4 定量 PCR 扩增

C.4.1 定量PCR反应体系配制宜在紫外线超净工作台中进行。

C.4.2 紫外线超净工作台使用前，应紫外线消毒30 min。

C.5 结果分析与计算

按照荧光定量PCR标准曲线公式计算目标物种，或目标类群拷贝数。

C.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。

C.7 样品保存

C.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。

C.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。

C.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。

C.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]GB/T 38132-2019 转基因植物品系定量检测数字PCR法
 - [2]NY/T 3677-2020 家蚕微孢子虫荧光定量PCR检测方法
 - [3]SN/T 2358-2009 国境口岸炭疽芽孢杆菌荧光定量PCR检测方法
-