

四川省生态环境政策法规研究会团体标准
《淡水生物监测 环境 DNA 定量 PCR 法》
(征求意见稿)

编
制
说
明

《淡水生物监测 环境DNA环境DNA定量PCR法》标准编制组

二〇二四年五月

目录

1	项目背景	1
1.1	任务来源	1
1.2	工作过程	1
2	标准制定的必要性	3
2.1	标准制定的意义和目的	3
2.2	国外研究进展	4
2.3	国内研究进展	5
2.4	环境 DNA 监测技术研究进展	6
2.5	相关国际标准或国外先进标准情况	7
2.6	与国内相关法律法规和标准的协调关系	7
2.7	现有工作基础	8
3	标准编制依据和原则	8
3.1	编制目的	8
3.2	编制依据	8
3.3	编制原则	8
4	规范主要内容和适用范围	9
4.1	适用范围	9
4.2	术语和定义	9
4.3	试剂	11
4.4	仪器和设备	11
4.5	环境 DNA 定量 PCR 监测方法	11
5	质量控制与质量保证	24
5.1	质量控制	24
5.2	质量保证	25
6	废弃物处理	25
7	附录	26
7.1	附录 A（资料性）环境 DNA 采样记录表	26
7.2	附录 B（规范性）野外质量控制与保证	26
7.3	附录 C（规范性）实验室质量控制与保证	26
8	标准实施建议	26
9	案例	26
9.1	河川沙塘鳢定量 PCR 检测	26
10	参考文献	52

1 项目背景

1.1 任务来源

本文件由四川大学提出，并由四川省生态环境政策法规研究会归口，2023 年申请立项，2023 年 10 月 16 日被四川省生态环境政策法规研究会正式批准立项，由四川大学、南京大学、成都南易生态环境科技有限公司等单位起草。

1.2 工作过程

按照标准编写要求，项目承担单位组织相关科研人员组成了标准编制组。编制组成员及时查阅国内外相关文献资料，按照 GB/T 1.1—2020 给出的最新规定起草和编制。在前期项目研究、文献资料分析以及实际应用的基础上，编制组讨论并确定了开展标准编制工作的原则、程序、步骤和方法，目前形成标准（征求意见稿）及编制说明。主要工作如下：

（1）研究基础

2013 年至 2018 年，编制组通过阅读文献和收集国内外相关资料，确定了构建基于环境 DNA 定量 PCR 技术监测水生生物的工作内容，并针对相关内容和关键参数开展了大量的科学研究工作，积累了大量的数据和实践经验，初步确定了环境 DNA 定量 PCR 监测水生生物多样性方法的基本框架和流程。

（2）编制启动

编制组接到标准制定任务后，立刻组织落实标准制定工作。确定由四川大学、南京大学、成都南易生态环境科技有限公司等为主要起草单位，并由来自高校、科研机构、企业的相关专家组成起草组，形成标准初稿。

（3）理论研究

2021 年 10 月-2023 年 10 月：为了按照文件要求，准确完成制定工作，标准起草组通过各种途径，收集并学习了《实验室 生物安全通用要求》（GB 19489）、《水质 采样技术指导》（HJ 494）、《生物多样性观测技术导则 淡水底栖大型无脊椎动物》（HJ 710.8）、《淡水浮游生物调查技术规范》（SC/T 9402）、《实验室生物废弃物管理要求》（SN/T 4835）、《河流生态监测规范》（DB 32/T 4178）等基于传统形态学监测的标准导则，并进一步整理学习了《国境口岸医学媒介昆虫 DNA 条形码鉴定操作规程》（SN/T 4278）、《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》（GB/T 19495.5-2018）、《转基因植物品系定量检测数字 PCR 法》（GB/T38132-2019）、《家蚕微孢子虫荧光定量 PCR 检测方法》

(NY/T3677-2020)、《国境口岸炭疽芽孢杆菌荧光定量 PCR 检测方法》(SN/T2358-2009)等与环境 DNA 定量 PCR 相关的标准,收集和研究了众多国内外基于环境 DNA 定量 PCR 监测生物多样性和群落结构的方法和实际案例。经过资料分析和共性总结,初步对基于环境 DNA 定量 PCR 法监测淡水生物的方案进行梳理和提炼。理顺了标准制定的方向和思路,形成标准编制大纲。

(4) 调研/实验研究

为了使标准具有科学性和可操作性,在 2021 年至 2023 年,标准起草组在已有的实验研究和资料分析的基础上,进一步联合多家编制单位将已构建的方法应用在我国重点流域的水生生物监测构建实践中,与相关技术和管理人员进行深入地探讨,调整已有方法。

(5) 标准草稿

2023 年 4 月-2023 年 6 月:标准起草组召开起草工作研讨会,就标准起草过程中存在的问题进行集中研讨。标准起草组针对不同生物类群的采样方法和遗传特征,进一步完善基于环境 DNA 定量 PCR 技术监测淡水生物的流程和关键参数,经过若干次课题组内部研讨会和专家咨询会,形成了标准草稿。

(6) 标准立项

2023 年 6 月:标准起草组向四川省生态环境政策法规研究会提交制修订立项申请书。

2023 年 10 月:召开标准立项论证会,专家组一致同意标准通过立项论证。

2023 年 11 月:经四川省生态环境政策法规研究会审议进行立项公示。

(7) 标准征求意见稿

2023 年 11 月-2024 年 5 月:标准起草组对标准草稿进行完善,并经过若干次课题组内部研讨会和专家咨询会,形成了标准征求意见稿。调整完善的主要内容包括:(1)调整标准内容结构,确保更加系统和完整;(2)术语和定义的规范化和统一化;(3)细化标准的各个步骤和参数;(4)文本的格式和规范性等。

(8) 公开征求意见

2023 年 5 月:四川省生态环境政策法规研究会提交的标准征求意见稿进行审核,并组织公开征集公众意见和定向单位意见。

2 标准制定的必要性

2.1 标准制定的意义和目的

生物多样性保护和水生态健康是全球关注的热点问题。尽管淡水生态系统覆盖不到地球表面积的 1%，但却栖息着超过 10% 的人类所认知的生物，地球上约 40% 的鱼类和超过 30% 的脊椎动物生活在淡水生态系统中。然而，相比于山林、陆地、海洋等其他生态系统，淡水生态系统中生物多样性的下降最为严重（图 1），淡水生态系统已成为地球上退化最严重的生态系统。因此，对淡水生态系统的管理与保护将直接与维持高水平的生物多样性和避免物种的大灭绝息息相关，关乎生态环境的可持续发展，符合生态文明建设的发展理念。

水生生物监测是以水生生物作为指标，根据生物个体、种群和群落结构对环境污染或变化所产生的反应阐明环境污染状况，从生物学角度为环境质量的监测和评价提供依据。目前国内外常用的水生生物监测类群主要包括长期在水体中生活的底栖动物、浮游植物、浮游动物、鱼类、着生生物、水生维管植物等。监测方法包括传统形态学鉴定监测和环境 DNA 监测。

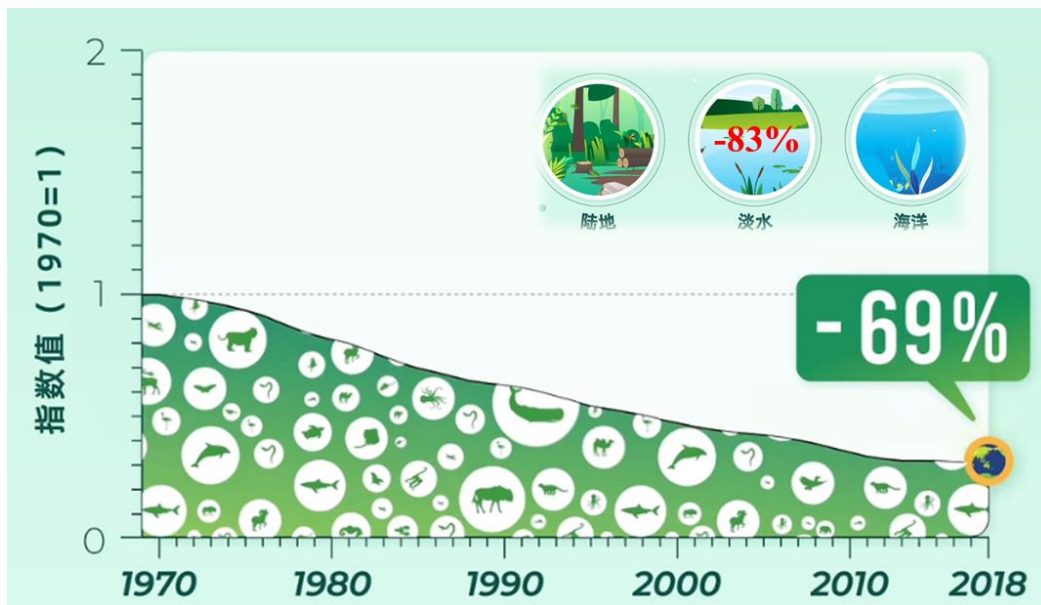


图1 地球生命指数 1970 年至 2022 年间下降 69%（图片改编于 WWF 地球生命力报告 2022）

传统形态学鉴定监测方法通过工具采集到水生生物类群的个体样品，通过观察区分样品中各个体的形态学特征信息，鉴定个体具体为何物种，得知种群的物种组成及密度。但是该

方法费时费力，价格昂贵，且需要熟练的操作人员，特别是浮游植物，浮游动物和底栖无脊椎动物的识别和计数，对于鱼类目前仍然采用电鱼和网捕法等损害生物且高危的采样方法。为保护鱼类种质资源，我国分别推出长江和太湖 10 年禁渔制度。因此，迫切需要简化已有的监测方法，降低成本，加快监测速度，同时需要保障监测的质量、稳定性和重复性。

基于遗传学的环境 DNA (Environmental DNA, eDNA) 技术为监测和鉴定水体中物种多样性提供了新型替代手段。环境 DNA (Environment DNA, eDNA) 技术是指从环境样品 (土壤、沉积物和水体等) 中直接提取目的基因片段后利用各种分子技术进行定性或定量分析的方法；eDNA 检测方法主要依赖分子技术，如聚合酶链反应(Polymerase chain reaction, PCR)、实时定量聚合酶链反应(Real-time quantitative polymerase chain reaction, qPCR)、数字 PCR (Digital PCR, dPCR)、环境 DNA 宏条形码 (eDNA metabarcoding) 等，这些检测方法的主要原理是通过扩增水样中含有的基因序列片段，从而对目标物种进行监测。

聚合酶链式反应 (PCR) 是分子生物学领域功能最强大的技术之一。采用 PCR 技术，利用序列特异性寡核苷酸、热稳定性 DNA 聚合酶和热循环，可将 DNA 或 cDNA 模板内的特异性序列拷贝或“扩增”数千至数百万倍。在传统 PCR 中，扩增序列的检测和定量是在反应结束，即最后一次 PCR 循环完成后进行的，且需要 PCR 后分析，如凝胶电泳和图像分析。在定量 PCR 中，通过 Ct 值和标准曲线对环境样本的起始模板进行定量，用荧光信号的变化反映 PCR 扩增中每个循环扩增产物量的变化。与传统 PCR 相比，qPCR 敏感性更高，已被用于快速检测环境样本中水生生物 DNA。相比传统形态学，该方法具有经济高效，流程标准化和精确性高等优势，极有可能会根本性地改变未来生物监测、生态评估和环境管理的模式。

2.2 国外研究进展

自 20 世纪七八十年代以来，人们对水环境的关注逐步由单纯的流域水体化学污染控制转变为对水生态环境质量的保护，评价内容也开始由单一的水化指标转向对生态环境质量的评价。世界各国针对生态环境质量和流域水生生物多样性的保护，发展出多种评价方法，并将评价水生态环境质量状况的工作视为环境管理的重要目标。而且在美国、欧盟、澳大利亚、英国和南非等国家和地区都已经建立了各自的评价体系和技术方法体系，已将水生态环境质量评价工作及流域管理的理念深入到其法令法规以及国家范围的监测计划中。

美国环境保护署 (U.S Environmental Protection Agency, EPA) 在 1990 年启动了环境监测评价计划 (EMAP)，用于监测和评价国家河流和湖泊的生态资源状态和趋势；美国地质

调查局（United States Geological Survey, USGS）在 1994 年开展了国家水质评价计划（NAWQA），收集和分析了全美 50 多条河流和含水层系统的数据和信息，目的是在河流、地下水和水生态系统方面建立长期持久的且能对比的信息，以支持优良的管理和政策决策。1992 年澳大利亚开启河流健康计划（AusRivAs），通过研究区与未受人为干扰参考点的比较来判断河流的健康状态，主要监测和评价澳大利亚河流的生态状况，评价现行水管理政策及实践的有效性，并为管理决策提供更全面的信息。南非的水事务及森林部于 1994 年发起了“河流健康评价计划”（RHP），选用河流无脊椎动物、鱼类、河岸植被、生境完整性、水质、水文、形态等河流生境状况作为河流健康的评价指标，提供了可广泛应用于河流生物监测的框架。2000 年欧盟成员国开始实施“水框架法令”，该法令的主要目标是到 2015 年，使各种水（河流、湖泊、地下水和海岸水）处于良好状态，其中包括对欧洲十万余个河流，湖泊和沿海水域的“生物质量要素”（浮游植物，底栖植物和大型水生植物，底栖无脊椎动物和鱼类等）进行监测调查。韩国于 2003-2006 年启动完成了“国家水生态监测工程”（NAEMP），目的是采用生物和生境指标来管理河流和流域生态质量。2007 年 NAEMP 建立了韩国国家层面的生物和栖境评价体系、标准，以及监测网络。2010 年以后巴西、印度、泰国等一些发展中国家逐渐启动相关的水质保护计划，重视水质生物监测，逐渐形成水生生物监测网络。2019 年 9 月，美国国家生态观测网络（NEON）正式投入运营，历经 20 年建设、耗资 4.6 亿美元、涵盖 81 个观测点，该监测网可收集的数据包括植物、动物、天气及其他环境参数，采用标准化方法以便相互比较。

2.3 国内研究进展

中国历来高度重视生物多样性保护和水生态健康评估工作。随着国家和省“水十条”的颁布实施，流域水环境管理将逐步从单一水质目标管理向水质、水生态双重管理转变。相对而言，国内水质监测开展较早，技术方法较成熟，标准规范体系相对健全，而水生生物监测虽有不同程度的开展，但技术的标准化、规范化程度依然不高，体系尚不健全。

我国的生物监测工作始于上世纪 70 年代，1984 年原国家环境保护局召开了第一次环境生物监测工作会议，之后于 1986 年出版了《生物监测技术规范（水环境部分）》；1989 年组织编写了《水和废水监测分析方法》中的“水生生物检测分析方法”，1993 年编写出版《水生生物监测手册》，并在这个时期初次建立起国家水生生物监测网，开始在全国范围开展生物监测例行工作。我国制定实施《中国生物多样性保护战略与行动计划（2011—2030 年）》，划定生态保护红线，开展生物多样性保护重大工程，有效保护野生动植物种群及其栖息地安

全。2018 年，生态环境部、农业农村部、水利部三部门联合制订并印发《重点流域水生生物多样性保护方案》，把流域水生生物多样性保护放在突出位置。《海洋监测规范 第 7 部分：近海污染生态调查和生物监测》(GB 17378.7—2007)也明确要求对浮游生物、大型底栖动物、潮间带生物等开展生态调查，作为近岸污染生态评估的主要内容。2020 年水利部发布的“河湖健康评价指南（试行）”中提出需要基于大型底栖无脊椎动物，鱼类，水鸟，浮游植物和大型水生植物等类群的生物指数评价河湖健康。2021 年生态环境部颁布的“河流水生态环境质量监测与评价技术指南”明确指出对底栖动物，藻类，着生藻等生物要素展开生态评价，在“湖泊水生态环境质量监测与评价技术指南”中则要求基于浮游植物，浮游动物，底栖动物和大型水生植物等关键类群展开生物评价和水生态健康评估。日前生态环境部也首次提出将生物多样性指标纳入我国生态质量综合评价指标体系。

2.4 环境 DNA 监测技术研究进展

美国最早从 2009 年“亚洲鲤鱼事件”开始探索研究环境 DNA 技术，用于监测调查河流中的鱼类物种。自 2009 年以来，全球环境 DNA 热点逐渐上升，截至 2021 年相关论文约有 12944 余篇，其中美国发表的论文数最多，其次为巴西、英国，我国发表论文数占全球总数的 4.91%(图 2)。eDNA 宏条形码技术是当前使用最多的定性方法之一，在微生物、藻类、无脊椎动物、鱼类甚至哺乳动物等各个类群中表现出了精确的物种分辨能力，在物种多样性监测中具有广泛的应用前景,但该方法只能定性研究。除了单纯判断物种是否存在，研究者还基于定量 PCR 方法，利用 eDNA 浓度和生物量之间的关系，具体量化物种存在的实时情况，定量 PCR 的结果以扩增量是否超过荧光阈值为依据，当扩增量超过荧光阈值时，表明样品中含有一定量的 eDNA；当扩增量低于荧光阈值时，表明样品中没有 eDNA 或 eDNA 浓度太低导致检测失败。目前，已有学者进行了大量研究，如：Takahara 等（2012）率先利用 qPCR 技术在实验室条件和野外池塘对鲤进行生物量评估，得出 eDNA 浓度与其生物量呈正相关关系，该研究为渔业资源调查评估提供了新的研究思路。Mauvisseau 等（2017）使用 qPCR 检测和量化评估了难捕获的章鱼 (*Cotyledon octopus*)，在实验室条件下检测的总生物量与捕获到的章鱼数量呈显著正相关。但是目前该方法还处在实验室阶段，不同的实验室采取的研究方法不一致，很难实现跨时间和空间尺度的大规模调查和比对，无法保证监测数据的持续性、有效性，难以推广应用到生物监测和管理部门。因此，标准化和规范化是环境 DNA 定量 PCR 监测方法推广和应用的前提。

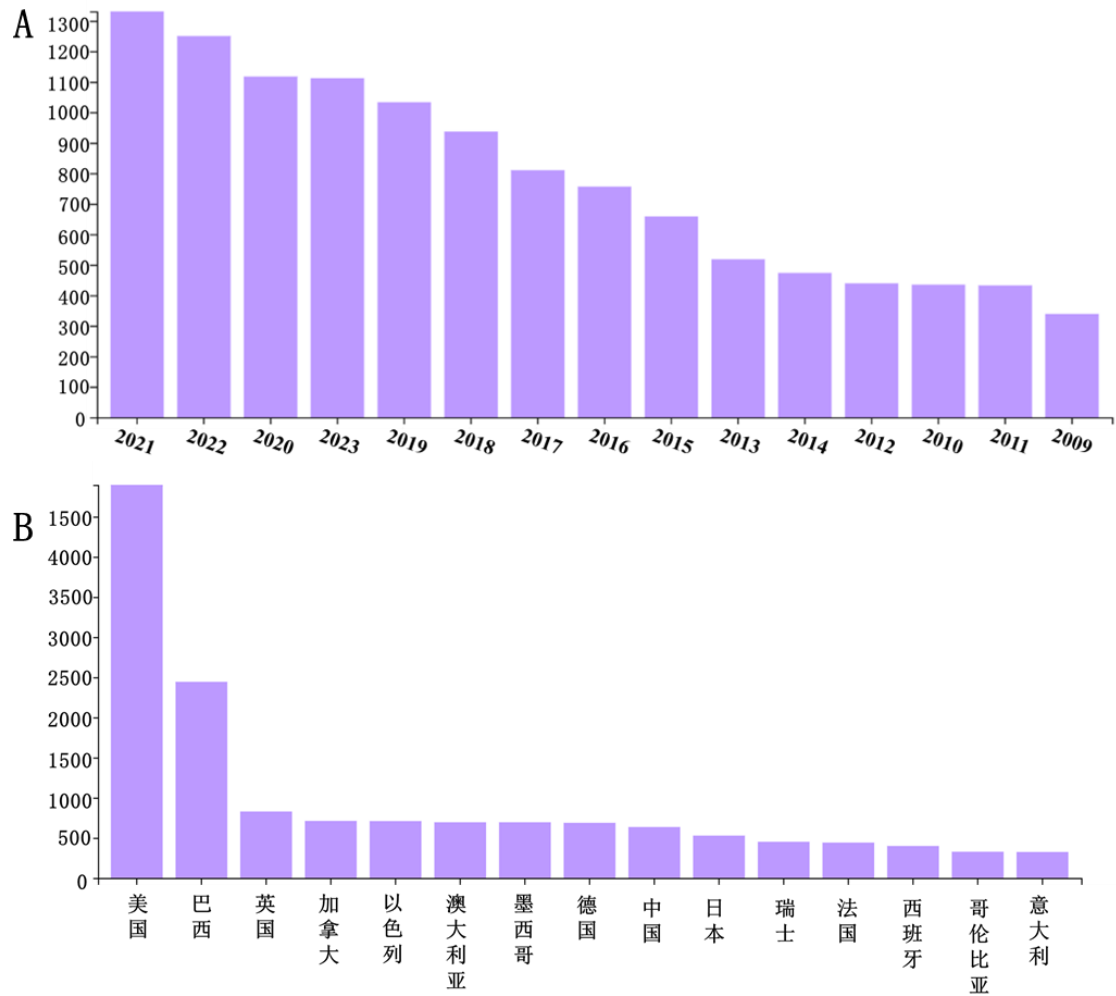


图2 基于 Web of Science 的全球环境 DNA 研究现状（A：各年度论文发表数量，B：各国家论文发表数量）

2.5 相关国际标准或国外先进标准情况

在国际上，各国都正在或已经制定基于环境 DNA 的生物监测和生态评价标准与规范。2015 年由美国内务部（USI）和美国地质调查局（USGS）颁布了联合华盛顿州立大学所形成的环境 DNA 采样技术规范；2020 年瑞士环境署颁发了联合苏黎世大学等单位形成的环境 DNA 水生生态生物监测和评价技术导则。2021 年欧盟科技合作联盟（COST）也颁发了环境 DNA 生物评估方法的指南，但未查到特异性物种监测相关标准。

2.6 与国内相关法律法规和标准的协调关系

国内目前尚无已发布的相关国家标准、行业标准、地方标准或团体标准。

2.7 现有工作基础

目前，编制组已形成基于环境 DNA 定量 PCR 法监测水生生物的基本流程，针对流程中重要参数开展了大量实验探究，并将环境 DNA 定量 PCR 技术推广应用于我国多个重点流域的水生生物多样性监测^[1-7]，积累了大量的野外调查和实验经验，对于标准的合理可操作性提供了很好的保障。同时，整理收集了国内外基于环境 DNA 宏条形码法及定量 PCR 法监测水生生物成功的经验案例，也为标准的编制提供了很好基础支撑。

3 标准编制依据和原则

3.1 编制目的

环境 DNA 定量 PCR 法对监测水生生物方法的建立和完善对于我国生物多样性监测和生物评价方法的变革具有重要意义。本文件以环境 DNA 定量 PCR 法监测水环境生物多样性（物种存在与否和相对丰度）为目标，规范水环境 DNA 的采样方法和定量 PCR 监测方法，将促进该技术在生物监测和评价体系的应用推广。

3.2 编制依据

本文件共引用了 11 项国家标准、行业标准和地方标准，具体内容见标准文本“2 规范性引用文件”。

3.3 编制原则

本文件按照《四川省生态环境政策法规研究会标准管理办法（试行）》的要求和规定，确定标准的组成要素。

在标准制定过程中遵循了以下几个原则：

- （1）科学性和规范性；
- （2）保证标准的先进性和实用性；
- （3）与国际现行的淡水生物监测与评价方法等相结合；
- （4）尽量与相关的标准、法规接轨；
- （5）充分考虑我国水生生物群落特征和分布，结合现有环境 DNA 技术的发展水平，符合我国水生生物监测行业规范化发展需求。

4 规范主要内容和适用范围

4.1 适用范围

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物特异性物种监测，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。

4.2 术语和定义

4.2.1 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]

4.2.2 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）。

[来源：T/CSES 80-2023]

4.2.3 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。Ct 值与模板的起始拷贝数的对数存在线性关系，起始模板浓度越高，Ct 值越小；起始模板量浓度越低，Ct 值越大。

[来源：GB/T 19495.5-2018]

4.2.4 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]

根据 SN/T 4278—2015《国境口岸医学媒介昆虫 DNA 条形码鉴定操作规程》中“阴性对照”的定义为“在 PCR 扩增过程中，与受试样品平行进行的，用 ddH₂O 代替模板 DNA 而进行的对照反应，用于观察整个反应体系是否正常，确认没有受到污染，阴性对照没有 PCR 产物条带产生”。瑞士环境联邦署发布的指南《Environmental DNA applications in

biomonitoring and bioassessment of aquatic ecosystems》中定义阴性对照（Negative Control）为“Measures that allow tracking potential contaminations during field sampling, DNA extraction, and PCR”，即允许在野外采样、DNA 提取和 PCR 过程中追踪潜在污染的措施。欧洲科技合作机构发布的指南《A practical guide to DNA-based methods for biodiversity assessment》中对 Negative control（阴性对照）的定义为“A negative control is used to check for potential contamination. A negative site control refers to a sample collected from a field site where the target taxon is known to be absent. A negative filtration control is a sample where DNA-free water is filtered alongside the eDNA samples to check that DNA is not transferred between samples. Negative laboratory controls consist of DNA-free samples processed alongside the test samples at each stage of the process to check for (cross-) contamination. In the context of DNA extraction, a negative control should not contain a DNA template and in the context of PCR, a negative control should not give amplicons.即阴性对照用于检查潜在的污染。点位阴性对照是指从野外点位采集的已知不存在目标类群的样本。过滤阴性对照是将不含 DNA 的水（如无酶水）和环境样品一起过滤，以检查样品之间不存在 DNA 交叉污染。阴性实验室对照包括在过程的每个阶段与测试样品一起处理的无 DNA 样品，以检查（交叉）污染。在 DNA 提取过程中，阴性对照不应包含 DNA 模板，在 PCR 过程中不应产生扩增子。因此阴性对照应该针对整个实验过程，因此本文件在 SN/T 4278—2015 的基础上修改“阴性对照”的定义为“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”。

4.2.5 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。

[来源：SN/T 4278—2015，3.6，有修改]

根据 SN/T 4278—2015《国境口岸医学媒介昆虫 DNA 条形码鉴定操作规程》中“阳性对照”的定义为“在 PCR 扩增过程中，与受试样品平行进行的，在正常反应情况下，一定能产生 PCR 产物的 DNA 为反应模板，用于观察整个反应体系和反应过程是否正常，阳性对照应有 PCR 产物带产生”。欧洲科技合作机构发布的指南《A practical guide to DNA-based methods for biodiversity assessment》中的定义为“A positive control is a sample that is expected to produce a known positive result, and is analysed alongside test samples to check that the

analytical process is working as it should (e.g. a mock community can be used as a positive control during metabarcoding). Positive laboratory controls consist of a known concentration of pre-prepared DNA of one or more species that are expected to be amplified efficiently using the selected PCR protocol. See also section 6.3 on analytical controls used for DNA and eDNA analyses”, 即阳性对照是指与测试样本一起进行分析，且预期产生已知阳性结果的样本，以检查分析过程是否正常工作（例如，在宏条形码监测中可选用模拟群落用作阳性对照）。实验室的阳性对照包括包含一个或多个物种的预先制备的已知浓度的 DNA，并且预期可以实现有效扩增。结合上述两个定义，本文件将“阳性对照”定义为“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”。

4.3 试剂

本文件规定了淡水生物环境 DNA 定量 PCR 法所需要的试剂，具体内容见文本“4 试剂”。

4.4 仪器和设备

本文件规定了样品采集及前处理设备、实验室分析设备和其他辅助设备和材料，具体见标准文本“5 设备和材料”。

4.5 环境 DNA 定量 PCR 监测方法

4.5.1.环境 DNA 定量 PCR 监测流程

包括环境 DNA 样品采集、环境 DNA 提取、定量 PCR 扩增、结果分析与计算、质量控制与质量保证等过程。

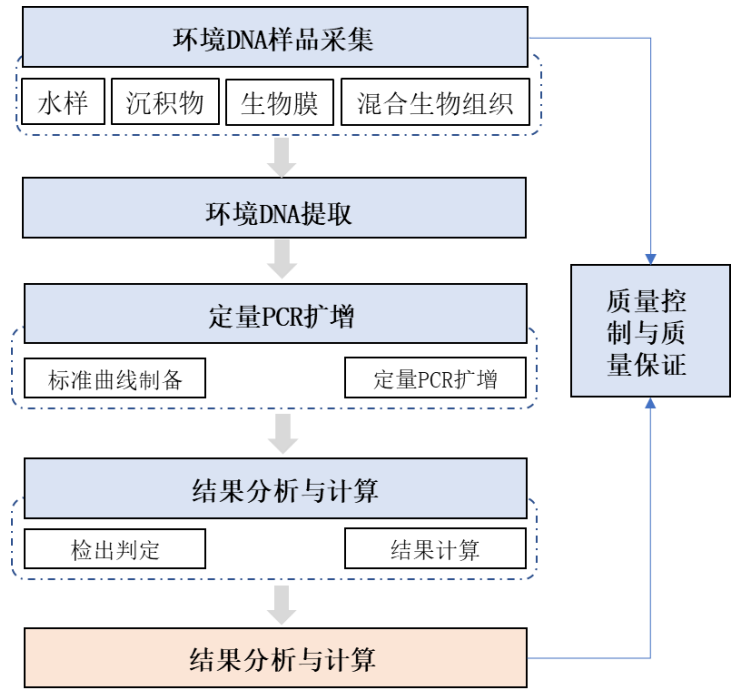


图3 环境 DNA 定量 PCR 监测流程图

4.5.2. 环境 DNA 样品采集

根据监测的生物类群选取合适的环境 DNA 采样介质（表 1），每个位点采集 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。

环境 DNA 的采样方法取决于生态系统类型和靶向监测类群。不同的栖息地和生物群需要采集不同来源的环境 DNA，目前主要从 4 种环境样本中分离 DNA 用于水生生物监测，分别为水样、沉积物样品、生物膜样品和混合生物组织样品。

4.5.2.1 水样

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 μm，大型底栖无脊椎动物和鱼类可选择 0.45~1.2 μm）的滤膜上，野外干冰或-20 ℃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。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 L~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。

高泥沙水样，应低温（4 ℃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。

采样体积：一般来说，采样体积越大，监测的物种种类更全。但是采样和前处理的难度更大，同时也会存在更多的杂质和抑制剂，增加 DNA 提取和 PCR 扩增实验的难度。因此采样体积的选择需要根据实验条件、实验目的（是否监测稀有物种）、水体类型和监测的生物类群综合考虑。对于浮游植物，环境 DNA 研究采集的水样体积在 50 mL~3L 不等，但大多数研究的过滤水样在 500 mL~1 L^[8]。采用水样 DNA 监测水生维管植物的研究较少，但是采样体积在 500 mL~5L，一般在 1L 左右^[9]。已有的关于水样 eDNA 监测底栖动物的采样体积也大多在 1L 左右^[10]，但是基于水样 eDNA 方法目前仍然很难捕获绝大多数底栖动物。根据已有的研究综述，鱼类监测的采水体积在 1.5mL~45L 不等，但是大多数的水样体积都超过 1L（图 4）^[11]。研究者已在水样 eDNA 的采样体积方面开展了大量工作。如 Sakata 等^[12]在日本的一个小型河流采集不同体积（0.01~4L）的水样 eDNA，发现在每个监测位点，采集 1L 水样即可以满足鱼类监测。Capo 等^[13]比较了用 0.45 μm 的滤膜过滤 1L 和 2L 水样 eDNA

对监测靶向物种褐鳟鱼(*Salmo trutta*)和北极鲑(*Salvelinus alpinus*)的差异,结果显示:2L 水样获得的鱼类 DNA 的拷贝数更高,但是过滤过程更艰难,可能是由于过滤器堵塞导致的。Bessey 等^[14]研究了热带岛屿上水样 eDNA 的采集体积对鱼类监测的影响,发现用 0.45 μm 的滤膜过滤 4.4 L 水样可以满足单个位点的鱼类物种监测。Macher 等^[15]在德国穆尔德河(Mulde)全长 2 km 的河段,每个位点采集并过滤(0.45 μm) 18 个 1L 水样,分析了检测到的物种丰富度与生物重复数量的关系。结果发现:8 个生物重复(即 8 L 水),检出的物种数基本达到饱和。Cantera 等^[16]在物种丰富的法国热带溪流和河流中采用孔径为 1 μm 的滤膜过滤 17~340 L 水样 eDNA,发现采集 34 L 水样可以监测到绝大多数预期的鱼类物种,同时可以高分辨率地区分不同位点和不同区域的鱼类组成。

欧洲科技合作机构发布的指南《A practical guide to DNA-based methods for biodiversity assessment》中未对采样体积提出明确要求,但是建议采样体积的选取需要考虑:1) 采样策略,包括采样重复次数和每个样本的空间代表性。2) 实际采样的限制,如水的浑浊度,这导致过滤器堵塞。3) 水流的大小,影响水体中 eDNA 的浓度,从而影响检测概率。4) 未能检测到低丰度物种的监测和管理成本的目的。小体积的水样 eDNA 可以监测群落组成,但是针对稀有物种的检出,则需要更大体积。5) DNA 提取和分析等过程的影响。瑞士环境联邦署发布的指南《Environmental DNA applications in biomonitoring and bioassessment of aquatic ecosystems》中提到,对于温带的河流和湖泊,建议每个位点总过滤的水样体积为 2 L,可以由多个子样本组成。美国地调局发布的《Environmental DNA Sampling Protocol—Filtering Water to Capture DNA from Aquatic Organisms》中提到采用 0.45 μm 的滤膜过滤水样体积 250~1000 mL。对于杂质和有机质较高的溪流或池塘,过滤水样体积为 500 mL 甚至更少。当需要时,可以选择孔径更大的滤膜(0.45~3 μm)过滤,防止堵塞,进而增加过滤体积。日本环境 DNA 学会发布的《Environmental DNA Sampling and Experiment Manual》中要求每个位点至少采集 1L 水样,可过滤至 2 张 0.7 μm 的滤膜上,即每张滤膜过滤 500 mL 水样。国内 GB/T 40226《环境微生物宏基因组检测 高通量测序法》中规定水样采集:根据水体不同的浊度,应使用无菌器材采集 4L~200L 不等的水样。采集好的水样需要通过滤膜进行过滤,可选择不同孔径大小的滤膜(如 20 μm , 3 μm , 0.8 μm , 0.4 μm , 0.2 μm 和 0.1 μm 等)。对于浊度较大水样应先静置,分离悬浮颗粒;再使用 20 μm 孔径滤膜预过滤,再选择小孔径滤膜进行过滤。对于浊度较小水样,可选择小孔径滤膜直接过滤。但是已有的研究显示预过滤可能会导致鱼类 eDNA 存在损失,且重复间差异较大。

生物重复:为了保证 eDNA 数据的可靠性,通常采用多个平行样本。例如,当一个物种

在多个重复中被检测到时，它更有可能是真实存在于环境中的，而不是假阳性。因此，为了在统计上有效，每个位点的 eDNA 采样应包括多个生物重复。然而，重复样本是耗时且代价高昂的。瑞士环境联邦署发布的指南《Environmental DNA applications in biomonitoring and bioassessment of aquatic ecosystems》建议，每个位点至少有 3 个生物重复。对于池塘或非常大的水体，需要更多的子样本和重复。

为尽可能覆盖所有的物种，同时考虑国内绝大多数地区处于亚热带和温带气候，本研究建议采样体积一般不小于 1L。浮游植物和水生维管植物监测的水样体积一般为 1L，底栖动物和鱼类监测的水样体积一般为 3L。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。另外每个点位至少设置 3 个生物重复。

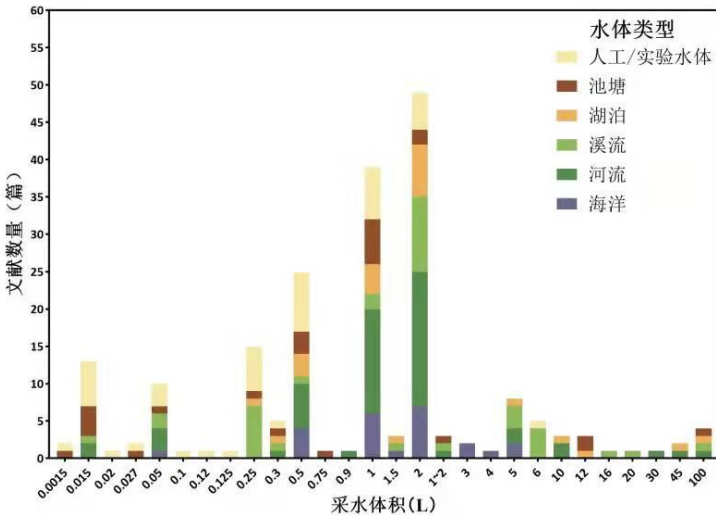


图4 鱼类监测 eDNA 水样体积分布（改编自 Lu Shu 等）^[11]

滤膜的材质和孔径：水样的前处理包括过滤法和沉淀法，其中过滤法可以处理大体积水样，效率更高，是目前最为常用的方法。滤膜孔径的选择对监测结果至关重要。使用更小的孔径(如 0.22 μm)可以捕获大多数细胞和细胞器，但是在过滤器堵塞前可以过滤的水样体积有限。通常采用 0.22 μm 滤膜监测微生物，浮游植物选择的滤膜孔径范围包括 0.22μm~68 μm，建议在较为清澈的河流和湖体，选用 0.22 μm 的滤膜，浑浊的水样过滤则选用 0.45 μm 的滤膜。鱼类监测选择的滤膜孔径范围在 0.22μm~3 μm，其中较为常用的是 0.45 μm、0.7μm 和 1.2μm。Li 等^[17]比较了不同孔径的滤膜监测鱼类群落的效率，发现 0.45 μm 的滤膜在总 DNA 产量、物种检出概率和重复性等方面效果最好。

过滤方法包括手动过滤、蠕动泵或真空泵过滤。手动过滤一般选用小型注射器和过滤器，

适合在偏远的采样点使用，但操作过程需要一定的体力，取决于过滤器的孔隙大小和水体中的悬浮颗粒。蠕动泵或真空泵经常用于过滤较大容量(即几升)。过滤所需的体力较少，但泵通常由汽车电池驱动，很难运到偏远地区。在两个位置之间，蠕动泵的所有管子都需要更换，以减少交叉污染。

4.5.2.2 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)，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 °C 保存，实验室-20 °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。

同一采样点沉积物采集宜尽量涵盖各类小生境。

用于采集沉积物环境 DNA 的采样材料取决于采样点的深度和可达性。深湖沉积物采样通常使用重型设备，如彼得森采泥器。河流沉积物样品可以用勺子收集(一次性使用)，或者用切断末端的注射器取芯。后一种方法可以得到沉积物表层的精确体积样品。

取样沉积物的体积取决于提取方法。商业试剂盒一般可以提取 5g~10g 的沉淀物。大多数用于监测微生物的沉积物/土壤试剂盒只需 0.2g ~0.5 g 的样品。存储沉积物样本最简单的方法是存储在-20°C 下。也可选用保存液保存，如乙醇或商业保存试剂(如 Qiagen 公司的 Life Guard Soil preservation Solution)。乙醇是一种价格低廉的保存液，但是沉积物样品中水分含量高，导致最终的乙醇浓度改变，仅有最终浓度达到 80%以上的乙醇才能有效保护 DNA，因此保存过程存在较大的不确定性。另外，如果在 DNA 提取前，没有将样品中的乙醇完全清理，也会干扰 DNA 提取过程。商业保存试剂可以更加高效地保护环境 DNA，但是经济成本高，只适用于少量沉积物和少数样品。

4.5.2.3 生物膜样品

参考 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 cm²)的样品，无菌水清洗至采样瓶中。野外干冰或-20 °C 保存，实验室-20 °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。

目前，生物膜样品仅用于针对流动水体中的着生藻类监测。欧盟已有环境 DNA 宏条形码监测着生硅藻的采样规范(CEN/TR 17245)，本文件参考相关标准的采样方法。同时国内江苏省地方标准 DB32/T 4178《河流水生态监测规范》中规定了着生藻的采样方法，包括人工基质和自然基质两种方法。本文件主要参考其自然基质方法。在附近浅滩选择易于刮取的基质，基质的选择为岩石、砖块、树木和秸秆等。通过毛刷或刀片在基质表面刮取一定量的样品(25 cm²)，基质的选择可单一或混合，保证基质的随机性。用蒸馏水冲洗所刮取样品

和毛刷获取样品，收集样品到样品瓶。

4.5.2.4 混合生物组织样品

(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，采样体积一般为 20 L，过滤至一定孔径（一般为 5 μm ）滤膜，野外干冰或 -20℃ 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。

目前浮游动物 DNA 富集研究过程中所使用的采样方法大多沿用传统形态学监测的方法，即采用浮游生物网捕获富集浮游动物组织，但是不同研究者采用的浮游生物网也不相同。如已有研究采用 690 μm 的 ORI 浮游生物网收集浮游动物样品，有研究使用孔径为 200 μm 的 WP2 浮游生物网，也有研究则采用 80 μm 和 250 μm 的斜向浮游生物拖曳网，我国则一般采用 13 号浮游生物网（112 μm ）或者 25 号浮游生物网收集环境中的浮游动物 DNA。也有部分研究采用直接过滤水样的方法进行浮游动物 DNA 富集（表 2）。

表2 浮游动物环境 DNA 富集方法

序号		采样方法	采样体积	滤膜大小 (μm)
1		ORI 浮游生物网	-	690
2		WP2 浮游生物网	-	200
3	浮游生物网富集法	斜向浮游生物拖曳网	-	80/250
4		MANTA 浮游生物网	-	150
5		Bongo 浮游生物网	-	150
6		13 号浮游生物网	-	112
7		25 号浮游生物网	20L	64
8	水样过滤法	环境水样→滤膜过滤	30L	20
9			1L	0.22
10		环境水样→预过滤→过滤	1L	3/0.22

为了探索最适的浮游动物环境 DNA 采样方法，有研究者比较了 MANTA, Bongo 和 WP2 三种浮游生物网获得的浮游动物多样性，发现 WP2 获得的浮游动物丰富度最高，Bongo 次之。也有研究者比较了传统的浮游生物网富集法和环境 DNA 采样方法对浮游动物多样性研究的影响，包括：1) 经 3 μm 滤膜预过滤（去除组织残留）再进一步经 0.22 μm 滤膜过滤的 1L 水样（预过滤）；2) 直接经 0.22 μm 滤膜过滤的 1L 水样（直接过滤）；3) 孔径分别为 64 μm , 200 μm 及 500 μm 的浮游生物网在水中拖曳 5 分钟富集的浮游动物组织（组织富集）。DNA 宏条形码分析结果显示三种采样方法得到的浮游动物组成差异显著，预过滤方法检测到的浮游动物种类数最少，直接过滤法检测到的物种最多，但是组织富集法获得的大型浮游动物如桡足类的物种数目更多，因此浮游生物网富集法更适合用于大型浮游动物的环境

DNA 富集。

编制组比较了两种采样方法及不同采样体积对浮游动物群落监测的影响^[18]，处理组包括：1) “直接过水法”：利用孔径为 5 μ m 的滤膜直接过滤不同体积（0.1L，0.2L，0.5L 和 1L）的水样；2) “网富集法”：首先利用 25#浮游动物网过滤一定体积的水样（5L，10L，20L 和 1000L）富集浮游动物，富集后的浮游动物再用 5 μ m 的滤膜过滤。结果显示：“直接过水法”中随着过滤体积的增加，大型浮游动物（枝角类和桡足类）的多样性在增加，在过滤体积为 1L 时达到最大值，过滤体积对桡足类的多样性没有显著的影响，而枝角类的多样性随着过滤体积的增加有所增加；轮虫的多样性随着过滤体积的增加而下降。“网富集法”中，大型浮游动物多样性在 5L 富集体积时最大，与过滤体积为 1000L 时得到的多样性结果相似，小型浮游动物轮虫的多样性在富集体积为 1000L 时达到最大值。因此，对于轮虫等小型浮游动物，可直接过滤一定体积的水样，在该研究中发现 1L 的过滤体积比较合适。对于大型浮游动物，由于其在自然水体中密度较低，通常需要先利用浮游生物网进行生物富集，该研究建议的富集体积为 5L~10L^[18]。但是由于不同的水生态系统含有的浮游动物密度和种类存在差异，因此过滤的水样体积需要根据水体类型适当调整。结合以上研究成果，本文件建议浮游动物的采样体积不少于 20 L。

（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，1g 换算为 1mL，常温保存。

底栖动物的环境 DNA 具有一定特殊性，由于单体生物量较小，且生活在水体底部，通过水样品很难捕获到底栖动物的 DNA，而现有的沉积物 DNA 提取方法能够覆盖的沉积物量较小（<0.5g），这对于底栖动物的采样范围而言又是过少的。目前常用的底栖动物环境 DNA 捕获方法，仍然需要对大量环境样品进行预处理，其中包括样品的清洗、底栖动物个体的挑拣和粗分类，这增加了处理时间、人力成本和污染的可能性。前处理过后，通过对组织混合物的提取，获得环境 DNA，这需要对底栖动物个体进行破坏，如果样品需要保存并用于其他用途，就可能产生矛盾。较早的研究已经表明，从用于保存经过挑拣的干净样品的乙醇固定剂中可以提取到底栖动物的 DNA，但目前为止只有少数研究对于环境样品直接进行过提取，该方法用于实际环境中底栖动物监测的可靠性仍有待检验，一些具体的操作方法和参数也需要确定。

编制组利用少数环境样品，在不同实验条件下，基于酒精浸提前处理方法，使用环境 DNA 宏条形码技术识别底栖动物，与同步进行的形态学鉴定结果比对，检验了环境 DNA 方法的有效性。本研究通过不同浸提时间和浸提体积的比较，确定了酒精浸提前处理方法用于

环境 DNA 提取的具体参数和流程。在浸提的 1 天~15 天均能从浸提液中检出足量的环境 DNA，前 3 天内 DNA 浓度的变化较为剧烈，5 天后逐渐稳定并略有上升趋势，不同浸提体积对于 DNA 浓度没有明显影响。酒精浸提前处理方法对于环境 DNA 的提取是有效的，推荐使用 3 倍体积无水乙醇浸提 7 天~15 天以获取完整和均匀的环境 DNA^[19]。

4.5.3.环境 DNA 提取

4.5.3.1 样品前处理

应包括以下内容：

- a) 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；
- b) 酒精保存的样品应高速（不低于 12000 rpm）离心 20 min，留取沉淀物。经均质器均质后冷冻干燥，充分混匀；
- c) 生物膜：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；
- d) 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。



图5 大型底栖无脊椎动物酒精浸泡

4.5.3.2 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，见 GB/T 40226。根据《高通量基因测序样本预处理方法 第 1 部分：动物组织样本预处理》（GB/T 33681.1）中对于核酸提取的定义，核酸提取是用物理、化学或生物酶的方法，释放生物组织样本中的核酸并对它进行纯化，充分去除生物组织样本中的蛋白质、脂类等 PCR 抑制剂以及提取核酸时加入的试剂，保证核酸的质量和浓度的稳定，以能满足下游实验要求。物理方

法主要包括机械破碎、超声破碎、冻融破碎等方法；化学方法主要包括浓盐法、异硫氰酸胍法、碱裂解法等；生物方法主要包括酶法。核酸分离纯化可选用磁珠法、硅质材料或阴离子交换树脂法等。可选用商业化试剂盒完成 DNA 提取。现在试剂盒的 DNA 提取方法主要为离心柱法和磁珠法。

Piggott 等采用 eDNA 监测濒危鱼类澳洲麦氏鲈(*Macquaria australasica*) 研究发现：基于商业试剂盒 QIAGEN DNasy 试剂盒的提取方法比传统酚氯仿法的效果更好。编制组使用不同的 DNA 提取方法提取河流和湖泊水样的 DNA，选用 5 种商业化试剂盒，其中包括 3 种离心柱法 DNA 提取试剂盒：DNeasy Power Water Kit (Qiagen, 14900-100-NF)、E.Z.N.A. water Kit (Omega, D5525-01) 和离心柱法环境 DNA 提取试剂盒（易基诺，MT057）及两种磁珠法 DNA 提取试剂盒：磁珠法环境 DNA 提取试剂盒（易基诺，MT058）和土壤基因组 DNA 提取试剂盒（天根，DP612-T1D）。每种方法 4 个河流水样重复，4 个湖泊水样重复，提取方法详见操作说明。结果显示：5 种提取方法河流水样 DNA 提取浓度范围 28 ng/μL~106 ng/μL，湖泊水样 DNA 提取浓度范围 7.3 ng/μL~118 ng/μL。磁珠法环境 DNA 提取试剂盒（易基诺，MT058）提取的 DNA 浓度最高，其次为 DNeasy Power Water Kit（Qiagen, 14900-100-NF）（表 3）。

表3 不同 DNA 提取方法 DNA 提取效率

提取方法	河流水样(ng/μL)	湖泊水样(ng/μL)	DNA 提取率
EGN.mag	106.1	118	100%
Qiagen	66.4	112	62%~95%
EGN.column	41.8	60.3	39%~51%
Tiagen	28.7	52.35	27%~44%
Omega	28.65	7.3	6%~27%

注：EGN.mag：环境 DNA 提取试剂盒（易基诺，MT058）；Qiagen：DNeasy Power Water Kit（Qiagen，14900-100-NF）；

EGN.column：环境 DNA 提取试剂盒（易基诺，MT057）；Tiagen：土壤基因组 DNA 提取试剂盒（天根，DP612-T1D）。

4.5.3.3 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，260nm 和 280nm 波长处的吸光度值比值(OD260nm/OD280nm)应在 1.7~2.0 范围内，OD260 nm/OD230 nm 应>2.0。DNA 在-20℃及以下保存，避免反复冻融。建议将提取的 DNA 等分为 2 份，一份保存在-20℃用于后续实验，一份保存在-80℃用于长期保存。

按 GB/T 37874《核酸提取纯化方法评价通则》的规定，几种常见的生物样本（如全血、细胞和新鲜植物叶片等）合格的 DNA 不低于 1μg，在 260nm 和 280nm 波长处的吸光度值比

值（OD260nm/OD280nm）应在 1.7~1.9 范围内。若 OD260nm/OD280nm 值低于 1.7，说明提取的 DNA 中有蛋白质、多酚等杂质污染；若 OD260nm/OD280nm 值高于 1.9，说明提取的 DNA 可能有 RNA 污染。但是由于环境 DNA 不同于纯物种组织的 DNA，存在更多来源的污染（如腐殖质等），吸光度比值可适当放宽。eDNA 提取一般最终的洗脱体积为 100 μ L，按照 GB/T 37874 要求，DNA 浓度应不低于 10 ng/ μ L。但是由于环境 DNA 的来源样本中 DNA 含量偏低且含有大量的腐殖质等抑制物，因此浓度建议不低于 1 ng/ μ L，纯度 OD260nm/OD280nm 在 1.7~2.0 范围即可。

4.5.4.定量 PCR 扩增

荧光定量 PCR 技术（Real-time Quantitative PCR，qPCR）是指在 PCR 反应体系中加入荧光化学物质，利用荧光信号积累实时监测整个 PCR 进程，最终通过相对定量或绝对定量的方法来实现对初始模板的定量分析。根据所加入的荧光化学物质不同可分为：荧光染料法和荧光探针法。荧光染料法原理是在 PCR 反应体系中，加入可与双链 DNA 小沟区域结合的荧光染料，荧光染料在游离状态下几乎不发出荧光信号，与双链 DNA 结合后发出强烈的荧光信号，检测到的荧光信号强度与 PCR 产物的数量呈正相关。荧光探针法原理是在 PCR 反应体系中，加入一对引物和一个特异性的荧光探针，探针的 5' 端标记一个报告基团，3' 端标记一个淬灭基团。探针完整时，报告基团的荧光信号被淬灭基团所淬灭，检测不到荧光信号，探针水解后，报告基团逃离淬灭基团的淬灭范围，发出荧光信号。PCR 扩增时，引物和探针同时与模板特异性结合，当延伸到探针结合的位置时，Taq 酶利用 5'端外切酶活性将探针水解切割，报告基团和淬灭基团分离，荧光信号开始积累。每形成一条 DNA 双链，就会切断一个探针，释放一份荧光信号，检测到的荧光信号强度与 PCR 产物的数量呈正相关。探针法具有极高的特异性、准确性、重复性。常用的荧光探针为 TaqMan 探针。

本文件推荐使用探针法，但使用或不使用基因探针时均需使用相应定量 PCR 预混液。

4.5.4.1 定量 PCR 反应体系及反应条件

定量 PCR 反应体系配制见表 4，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 4 定量 PCR 反应体系

PCR 反应试剂名称	终浓度	体积
定量 PCR 预混液	1×	10 μ L
正向引物（10 μ mol/L）	0.5 μ mol/L	1 μ L

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

实验设置阴性、阳性、空白 3 个对照组；阳性对照组 DNA 模板为目标物种或类群基因组 DNA，或含有上述片段的质粒标准分子 DNA；阴性对照 DNA 模板为相应的不含目标物种的基因组 DNA，或混合样品；空白对照组分为两类，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)。

定量 PCR 反应程序见表 5。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 5 反应程序

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

4.5.4.2 仪器检测通道选择

选择定量 PCR 仪器的检测通道应考虑引物和探针的荧光标记，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。

4.5.5.标准曲线制备

制备标准曲线时需设置至少 5 个浓度点（如 1×10^1 Copies/μl, 1×10^2 Copies/μl, 1×10^3 Copies/μl, 1×10^4 Copies/μl, 1×10^5 Copies/μl），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。

将含有目标基因的质粒标准分子 DNA 溶液进行梯度稀释。如可采用 10 倍梯度稀释至 10^6 拷贝, 10^5 拷贝, 10^4 拷贝, 10^3 拷贝, 10^2 拷贝和 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。

4.5.6. 结果分析与计算

在定量 PCR 进程中，随着产物的积累，荧光信号的强度等比加强。每经过一次循环，收集一次荧光信号，即可得到一个荧光扩增曲线，根据荧光强度的变化即可监测产物量的变化。荧光扩增曲线可分为三个阶段，即荧光背景信号阶段、荧光信号指数扩增阶段和平台期。在荧光信号指数扩增阶段，定量 PCR 产物量的对数值与起始模板量之间存在线性关系，因此可以在该阶段进行定量分析。为了便于对所检测样本进行比较，在指数期需要设定一个荧光信号的阈值。检测到的荧光信号超过阈值则被认为是真正的信号。荧光信号由本底进入指数增长阶段的阈值所对应的循环次数称为 Ct 值。模板的 Ct 值与其起始拷贝数的对数存在线性关系，起始拷贝数越多，则 Ct 值越小。利用已知起始拷贝数的标准品及其相应的 Ct 值可绘制出标准曲线，测得未知样品的 Ct 值后，根据标准曲线便可准确计算出该样品的起始拷贝数。

4.5.6.1 检出判定

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。

本文件以空白对照、阴性对照的基因 Ct 值 ≥ 40 ，阳性对照基因 Ct 值 ≤ 35 为判定标准，若有一项不符合者，需重新进行实时荧光 PCR 扩增。

具体判别标准如下：

阳性样本：3 个重复 CT 值 ≤ 35 ，判为阳性，给出拷贝数结果；

可疑样本：3 个重复中 2 个 CT 值 ≤ 35 ，1 个 undetermined，重复测试，确认结果；

可疑样本：3 个重复中 3 个 CT 值 ≤ 35 ，重复测试，确认结果；

可疑样本：3 个重复中 1 个 CT 值 ≤ 35 ，2 个 undetermined，重复测试，确认结果；

阴性样本：3 个重复中 1 个 CT 值 ≤ 35 ，2 个 undetermined，判为阴性；

阴性样本：3 个重复中 2 个 CT 值 ≤ 35 ，1 个 undetermined，判为阴性；

阴性样本：3 个重复中 3 个 undetermined，判为阴性。

4.5.6.2 结果计算

拷贝数是指质粒分子在溶液中的数量。在质粒分子的计算中，需要考虑质粒的长度、质量和摩尔质量。计算标准质粒拷贝数，计算公式如下：

$$\text{Copy} = \frac{6.022 \times 10^{23} \times \text{Cont.}}{\text{length} \times 10^9 \times 660}$$

注：Copy 为 DNA 拷贝数；Cont. 为标准质粒 DNA 量，单位为 ng；Length 为标准质

粒 DNA 长度，单位 bp。

5 质量控制与质量保证

5.1.质量控制

5.1.1.质量控制参数

(1) **质量控制参数类别：**环境 DNA 定量 PCR 技术质量控制包括：阴性对照、阳性对照、平行样品。环境 DNA 定量 PCR 技术全流程下质量控制参数及原因见图 6。

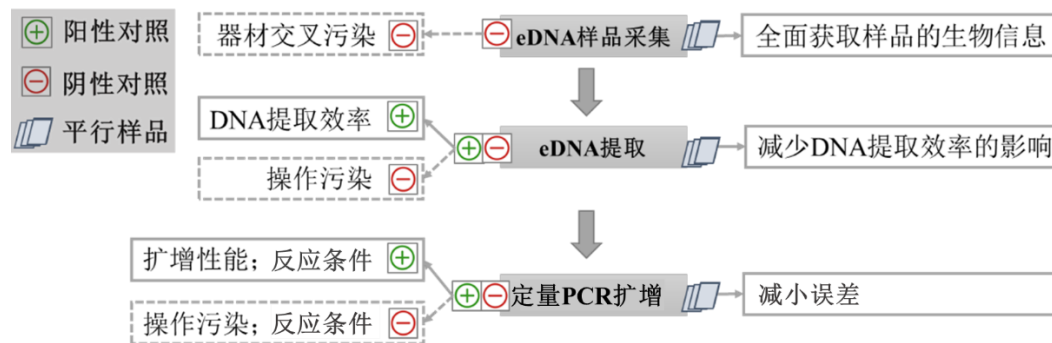


图6 环境 DNA 定量 PCR 技术全流程下质量控制参数及原因

(2) **阴性对照。**在每天的样品采集、同一批次 DNA 提取和定量 PCR 扩增阶段应分别设置不少于 3 个阴性对照（表 6），本文件规定阴性对照为无菌水。

(3) **阳性对照。**宜设置不少于 6 个定量 PCR 扩增的阳性对照，作为阳性质控样本。本文件规定 DNA 提取阳性对照为已知物种组成的混合群落，定量 PCR 扩增阳性对照为已知拷贝数的目标物种 DNA 或质粒 DNA（表 6）。

表 6 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	已知拷贝数的目标物种 DNA 或质粒 DNA

(4) **平行样品。**每个位点应至少设置 3 个生物重复样品，可根据实验需求和实验条件适当设置 eDNA 样品采集、eDNA 提取、定量 PCR 扩增平行样品。

平行样本设置的数目越多，越接近真实环境中的物种数目，但也会增加成本。目前国际上的相关标准指南，如瑞士环境联邦署发布的环境 DNA 相关指南《Environmental DNA applications in biomonitoring and bioassessment of aquatic ecosystems》建议每个位点至少有 3

个重复。因此本文件中建议至少设置 3 个平行样品。

5.1.2.质量控制评价指标

(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。

(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 ——未在标准品物种清单的物种数目；

n ——标准样品的实际物种数目。

5.2.质量保证

5.2.1.野外质量保证

按标准文本附录 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。

5.2.2.实验室质量保证

实验过程应防止样品的污染，并按标准文本附录 I 的规定做好数据记录、交接和样品保存。

6 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。此外，对含核酸染料的废液和废胶单独收集和处理。

7 附录

7.1. 附录 A（资料性）环境 DNA 采样记录表

环境 DNA 采集应详实做好记录，记录表见标准文本中附录 A，

7.2. 附录 B（规范性）野外质量控制与保证

野外质量保证操作见附录 B。

7.3. 附录 C（规范性）实验室质量控制与保证

实验室质量保证操作见附录 C。

8 标准实施建议

本文件适用于淡水生物特异性物种监测，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。

本文件为首次制定，随着利用环境 DNA 开展生物监测和生物多样性调查的快速发展，本文件中的环境 DNA 定量 PCR 方法和涉及的相关参数也可能会随之发生变化。因此，建议在本文件实施过程中，继续广泛听取和收集各方面的意见与建议，并根据实际应用情况，对本文件进行不断地修订与完善，使其实用性和可操作性与时俱进，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提供依据和指导。

9 案例

9.1.河川沙塘鳢定量 PCR 检测

河川沙塘鳢（*Odontobutis potamophilus*）是鲈形目、沙塘鳢科、沙塘鳢属的一种鱼类。为中国特有种，分布于长江中、下游（湖北荆州至上海江段）及沿江各支流、钱塘江水系、闽江水系，偶见于黄河水系。

9.1.1.靶向物种确认

使用河川沙塘鳢组织经过 DNA 提取→DNA 质检→建库→测序后，进行全线粒体基因组拼装注释后拼接成环（图 7），并对其进行基因预测（表 7），并在数据库中进行比对验证

测序结果与现有序列是否有所差异(图8),在该序列上查找到特定的 *Cytb* 区域以及 *Dloop* 区域(图9),用于与近缘物种进行多重序列比对。

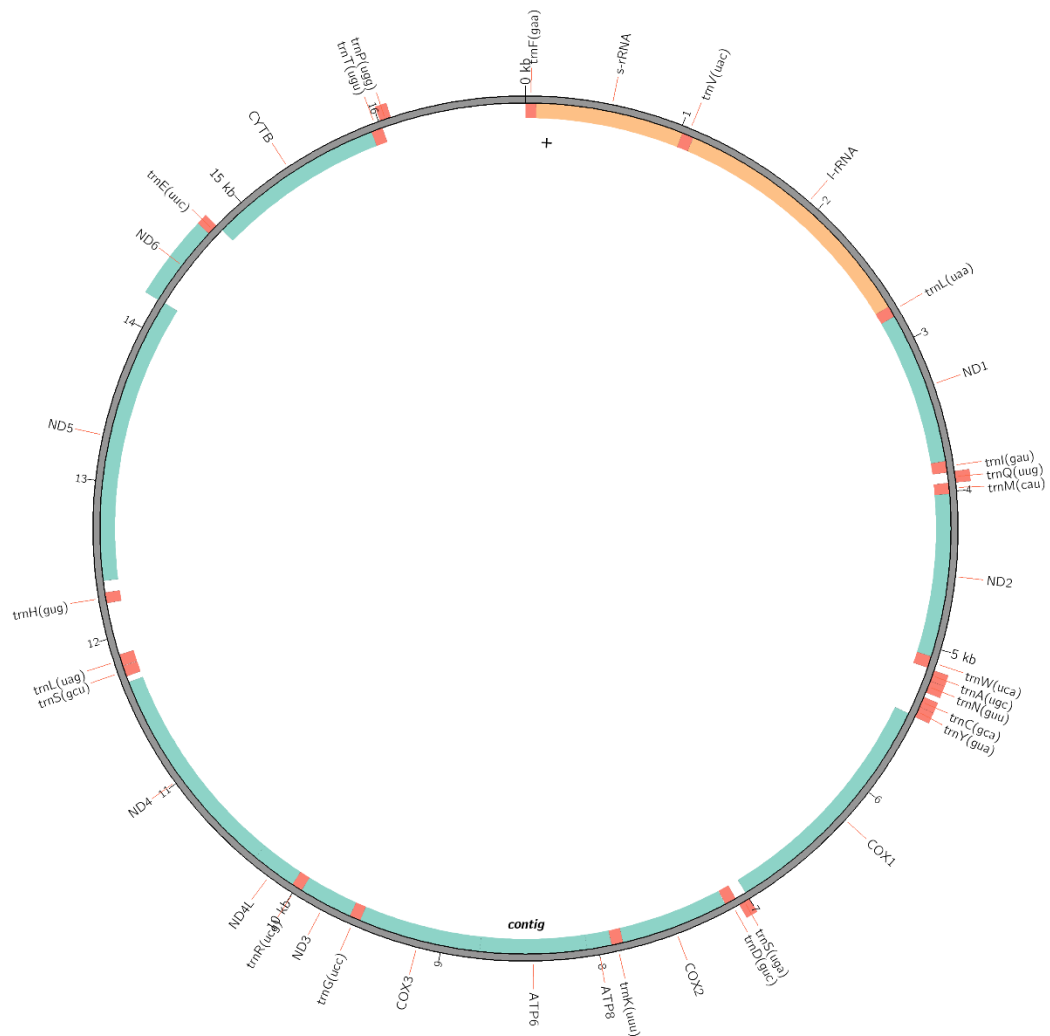


图 7 河川沙塘鳢全线粒体基因组序列结构图

表 7 基因预测

区域	颜色	基因名称	个数
编码区	绿色	protein-coding genes	13
	红色	tRNA genes	22
	黄色	rRNA genes	2
非编码区	灰色	control region or "d-loop"	1
	合计		37+1

Descriptions	Graphic Summary	Alignments	Taxonomy					
Sequences producing significant alignments								
Download Select columns Show 100								
select all 100 sequences selected								
GenBank Graphics Distance tree of results MSA Viewer								
Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
☒ Odontobutis potamophila mitochondrion complete genome	Odontobutis potamophila	30989	30989	100%	0.0	99.70%	16932	NC_022706.1
☒ Odontobutis potamophila mitochondrion complete genome	Odontobutis potamophila	30858	30858	100%	0.0	99.56%	16939	MK408452.1
☒ Odontobutis valuensis mitochondrion complete genome	Odontobutis valuensis	23163	23163	100%	0.0	91.39%	16909	KM277942.1
☒ Odontobutis valuensis mitochondrion complete genome	Odontobutis valuensis	16430	22874	99%	0.0	91.63%	16988	NC_027160.1
☒ Odontobutis interrupta mitochondrion complete genome	Odontobutis interrupta	14713	26584	99%	0.0	95.20%	16802	NC_027583.1
☒ Odontobutis potamophila mitochondrion complete genome	Odontobutis potamophila	12774	28670	99%	0.0	98.84%	16846	KF874495.1

图 8 重测序序列在公共数据库中比对

AACACCAAATGGCCAGCCTACGAAAAACACCCACTTCTAAAAATGCAAATGAAGCCCTAGTGACCTCC
CCACTCCCTCAACATCTCCGTCTGATGAACTTCGGCTCTCTCTGGGCCTTTCCTTATCACCCTTATC
ACAGGCCTCTTTAGCCATGCACTACACCCCGACATTATATCAGCTTTTCATCCATCACGCACATCTGCG
GGATGTTAACTTTGGATGATTAGTCCGAAATGTACACGCCAACGGTGCCTCCTCTCTCTCATCTGCATTACC
TCCACATCGGACGAGGCTTACTACGGTCTTACCTATATAAGAAACATGGAATATTGGAGTTATACTGCTA
CTATTAGTTATAATACTGCCTTCGTAGGTACGCTCTGCCTGAGGACAAATATCATTCTGAGGCGCAACAGT
AATTACCAACCTTCTCTCCGCCATCCCTTATGTAGGAAATTCCTTAGTCCAATGAATCTGAGGAGGCTTCTCCG
TAGACAACGCAACCCCTTACCGATTCTTCGCATTCCACTTCCTCTACCATTCAATATTGCAGCTGCAACAGTC
CTCCACCTACTATTCTCCACGAAACAGGATCCAACCAACGGGCTTAAGCTCAACACCGACAAAATC
CCATTCCACCCATCTTCTATACAAAGATCTCTAGGATTGCCATTCTCTTCTAACCTTATTTCCCTGGCG
TTATTCTCACCAACTACCTGGGTGACCCAGATAATTTACCCCGCCAATCCCTTGTAACACCCCGACAT
TAAGCCCGAATGATACTTCTTATTTGGCTACGCCATCTACGATCAATCCCAATAAACTGGGAGGACTAG
CCTTACTAGCATCAATCCTTGACTTATAATTATTCCTCTACTTCATACATCCAACCAACGAAGCCTCACCTTTC
GCCCCCTTTCCAGCTGACCTTTTGACTTCTAATTGCAACGTGGCCATCCTTACATGAATTGGAGGCATACC
CGTTGAACACCCCTACATTATTATTGGACAAGTAGCATCTTCTCTACTTCTTATTTTCTAATACTATTCCCA
ACAACAGGATGACTAGAAATAAACTTCTAAAATTATACTGCACTAGTAGCTCAGCGCCAGAGCACCGGCT
CCCTTTCCAGCTGACCTTTTGACTTCTAATTGCAACGTGGCCATCCTTACATGAATTGGAGGCATACCCGT
TGAACACCCCTACATTATTATTGGACAAGTAGCATCTTCTCTACTTCTTATTTTCTAATACTATTCCCAACA
ACAGGATGACTAGAAATAAACTTCTAAAATTATACTGCACTAGTAGCTCAGCGCCAGAGCACCGGCTTGT
AAGCCGGCCGCCGGGGTTTAAATCCCCCTACTGCTATTCAAGAAAGAGATTTTAACTCCACCCCTTAG
CTCCCAAGCTAAAATCTGAATTAACCTATTCTTTGTACGAATAGTACATATATGATTATCCCATATATAGATA
TATACCATAATATATAATGCTTTAGGAGACATACTATGTATTATCACCATTCTCTGAATTTAACCATTATACATCA
ACAGCAAGACAAGATTCAACACAAGACATATAATGAATATCTAACCTAATGAAAACCTCACAGATATTCCCG
AAGTAACTCTCCCATATATAAATAAGATCTAATATAAATTTAATTTAACCATATATACAGGATTCAACACACTA
TCAAGATAACAGCCGATGACAGATAAGGAAGACATTGAGTCAAGCGTTGGAACATATGTTTCTTGAAGGTG
AGGGACAATAATTGTGGGGGTTTCACTAGTGAACATTTCTGGCATTGGTTCTTATTTAGGGCCATTGAT
TGATATTATTTCCCATCTTTCTTCTAAAACGGGCATAAGTTGTTGGTGGGGTTCTACTCTAGTCACTCCACA
TGCCGAGCGTTCTTCTAATGGACTAGGTATTTTCTTATTTCTTCTTCACTTGGCATTTCAGAGTGACAGCGC
TAAGGCTTGTGACAAGGGAGATCATTTTCTTGCTTACAATAATAGATGTTAATGTTAGAAAGACTTTTTA
AGATAATTTGCATAACTGATCAAGAGCATATAGTAATTTCTTCTCTAACATAACTGATATATCCCCCTTG
GCTTTTGCGCGTAACCCCTTACCCCTTACTCGTAAGCTATTATTTATTTCTGAAAACCCCTCCGGAA
CAGGAGAACCTCGAGTTGGGTATTGATCGCCCTAAAATGCATTATTATAATATTATAATAATGATTTT

图 9 重测序序列在公共数据库中比对

9.1.2. 靶向物种确认

与河川沙塘鳢同科的物种有海丰沙塘鳢（*Odontobutis haifengensis*）、暗色沙塘鳢（*Odontobutis obscura*）、中华沙塘鳢（*Odontobutis sinensis*）、鸭绿江沙塘鳢（*Odontobutis yaluensis*）、云斑尖塘鳢（*Oxyleotris marmorata*）等 17 种，其中海丰沙塘鳢和河川沙塘鳢生态位相近，形态和体色相似，在常规鱼类调查中很难区分和鉴别，体型很小的仔稚鱼就更

难辨认。有文献表明,河川沙塘鳢和鸭绿沙塘鳢的亲缘关系最近,同时云斑尖塘鳢最易获取;故本次研究拟选择海丰沙塘鳢、鸭绿江沙塘鳢和云斑尖塘鳢作为近缘物种设计引物。云斑尖塘鳢提取 DNA 后使用由 COI 引物进行普通 PCR 验证(图 10),PCR 产物进行一代测序,经测序后比对确认鱼苗物种为云斑尖塘鳢,且云斑尖塘鳢与河川沙塘鳢的序列比对相似性达到了 75%以上(图 11),故使用云斑尖塘鳢 DNA 作为实验中近缘物种的阴性对照。

在 Cytb 区域河川沙塘鳢与云斑尖塘鳢、鸭绿江沙塘鳢和海丰沙塘鳢的相似性达到 79.06%、81.45%和 91.32%(图 12);在 Dloop 区域河川沙塘鳢与云斑尖塘鳢、鸭绿江沙塘鳢和海丰沙塘鳢的相似性达到 78.78%、86.59%和 95.07%(图 13)。

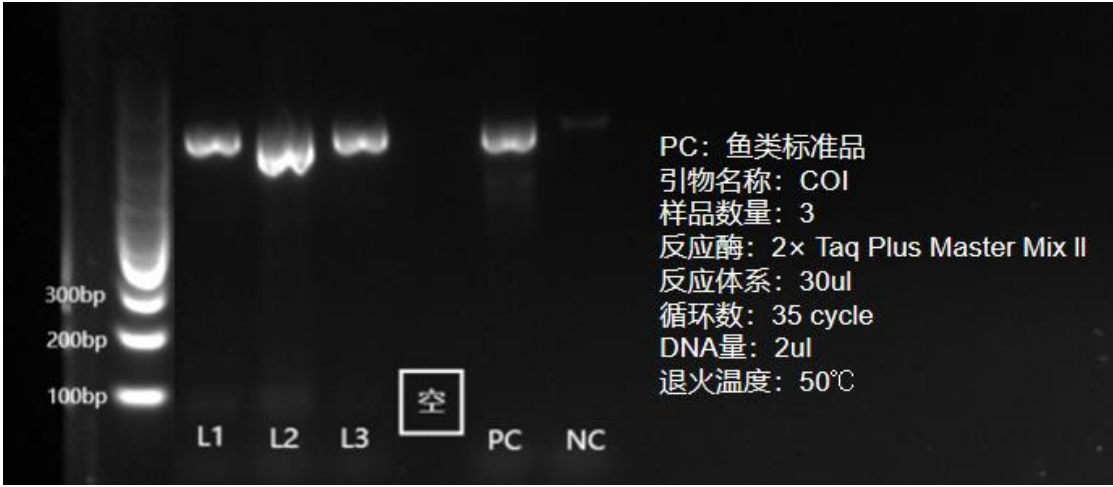


图 10 云斑尖塘鳢 COI 引物扩增凝胶电泳图

Sequences producing significant alignments					Download	Select columns	Show	100	
☒ select all 1 sequences selected					Graphics				
Description					Scientific Name				
					Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident
					Acc. Len	Accession			
☒ KJ595342.1 Oxyeleotris marmorata mitochondrion complete genome					8000	10722	95%	0.0	79.22%
					16555	Query_903			

图 11 云斑尖塘鳢与河川沙塘鳢序列比对结果

Sequences producing significant alignments										Download	Select columns	Show	100	?
☒ select all 1 sequences selected												Graphics	MSA Viewer	
Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession						
☒ KJ595342.1 <i>Oxyeleotris marmorata</i> mitochondrion, complete genome		769	769	98%	0.0	79.06%	16555	Query_349329						

Sequences producing significant alignments										Download	Select columns	Show	100	?
☒ select all 1 sequences selected												Graphics	MSA Viewer	
Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession						
☒ None_provided		926	926	99%	0.0	81.45%	1141	Query_39087						

Sequences producing significant alignments										Download	Select columns	Show	100	?
☒ select all 1 sequences selected												Graphics	MSA Viewer	
Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession						
☒ None_provided		1559	1559	100%	0.0	91.32%	1141	Query_51445						

图 12 河川沙塘鳢与 3 个近缘物种 Cytb 区域序列比对结果

Sequences producing significant alignments										Download	Manage Columns	Show	100	?
☐ select all 0 sequences selected												Graphics	MSA Viewer	
Description	Scientific Name	Common Name	Taxid	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession				
☐ KJ595342.1 <i>Oxyeleotris marmorata</i> mitochondrion, complete genome			0	551	551	99%	1e-159	78.78%	16555	Query_78615				

Sequences producing significant alignments										Download	Select columns	Show	100	?
☒ select all 1 sequences selected												Graphics	MSA Viewer	
Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession						
☒ None_provided		850	850	90%	0.0	86.59%	830	Query_337047						

Sequences producing significant alignments										Download	Select columns	Show	100	?
☒ select all 1 sequences selected												Graphics	MSA Viewer	
Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession						
☒ None_provided		1339	1339	100%	0.0	95.07%	850	Query_45103						

图 13 河川沙塘鳢与 3 个近缘物种 Dloop 区域序列比对结果

9.1.3.引物设计

9.1.3.1.多重序列比较

将河川沙塘鳢与三个近缘物种进行多重序列比对(图 14), 在差异大的片段上设计引物。

	1	100
KJ595342.1	(1) GCTAACGTAGCTTAACTTAAAGCATAACCTGAAAT-----GTTAAGATGAGCCTAGAGAACTCCGCAAGGCACAAAAGCTTGTCTGACTTTAC	
KM277942.1	(1) GCTAGTGTAGCTCAACTTAAAGCATAACCTGAAAT-----GTTAAGATGAGCCTAGAGAACTCCGCAAGGCACAAAAGCTTGTCTGACTTTAC	
NC_022706.1	(1) GCTAGTGTAGCTTAACTTAAAGCATAACCTGAAAT-----GTTAAGATGAGCCTAGAGAACTCCGCAAGGCACAAAAGCTTGTCTGACTTTAC	
NC_036056.1	(1) GCTAGTGTAGCTTAACTTAAAGCATAACCTGAAATCTGGAAATGTTAAAGTGGCCTAGAGAACTCCGCAAGGCACAAAAGCTTGTCTGACTTTAC	
Consensus	(1) GCTAGTGTAGCTTAACTTAAAGCATAACCTG AAGAC GTTAACATGGGGCTAGAGAACTCCGCAAGGCACAAAAGCTTGTCTGACTTTAC	
	101	200
KJ595342.1	(92) TATCAATTTTGAATAATTTATACATGCAAGTATCCGCTTCCCTGTGAGAATGCCCTAACACCCATTITGSAACGCGAGCTGGTATCAGGCACAA	
KM277942.1	(93) TATCAATTTTGAATAATTTATACATGCAAGTATCCGCTTCCCTGTGAGAATGCCCTAACACCCATTITGSAACGCGAGCTGGTATCAGGCACAA	
NC_022706.1	(93) TATCAATTTTGAATAATTTATACATGCAAGTATCCGCTTCCCTGTGAGAATGCCCTAACACCCATTITGSAACGCGAGCTGGTATCAGGCACAA	
NC_036056.1	(101) TATCAATTTTGAATAATTTATACATGCAAGTATCCGCTTCCCTGTGAGAATGCCCTAACACCCATTITGSAACGCGAGCTGGTATCAGGCACAA	
Consensus	(101) TATCAATTTTGGCCAAACTTACACATGCAAGTATCCGCAACCCCTGTGAGAATGCCCTAAACTTCCACCATAGGAGTTAAGGACAGGTATCAGGCACAA	
	201	300
KJ595342.1	(192) CTCCTGCTTATGCCACACACACCTTGCTTAGCCACACCTTCAAGGACTTCAGCAGTAAATAACTTAAGCCATAAGTGAAGCTTGACTTATTTAGAG	
KM277942.1	(193) TATAA-TATTATGCCACACACACCTTGCTTAGCCACACCTTCAAGGACTTCAGCAGTAAATAACTTAAGCCATAAGTGAAGCTTGACTTATTTAGAG	
NC_022706.1	(193) TATAA-TATTATGCCACACACACCTTGCTTAGCCACACCTTCAAGGACTTCAGCAGTAAATAACTTAAGCCATAAGTGAAGCTTGACTTATTTAGAG	
NC_036056.1	(201) TATAA-TATTATGCCACACACACCTTGCTTAGCCACACCTTCAAGGACTTCAGCAGTAAATAACTTAAGCCATAAGTGAAGCTTGACTTATTTAGAG	
Consensus	(201) TATAA TATTATGCCACACACCTTGCTTAGCCACACCTTCAAGGAGTTTC AGCAGTGAATAATTAAGCCATAAGTGAAGCTTGACTTATGTCAGG	

图 14 多重序列比对结果

9.1.3.2.引物设计

分别在 Cytb 区域和 Dloop 区域差异大的片段上各设计 3 对引物。

	101	200
Od.h.CYTB	(101) GCTCTCTCTTGGCTTATGCTAGCTACCCCAATCATCACAGGCTTTCTTAGCCATACATATACCAAGATATTTTCATCAGCTTTTTCATCCATCAT	
Od.p.CYTB	(101) GCTCTCTCTTGGCTTATGCTAGCTACCCCAATCATCACAGGCTTTCTTAGCCATACATATACCAAGATATTTTCATCAGCTTTTTCATCCATCAT	
Od.y.CYTB	(101) GCTCTCTCTTGGCTTATGCTAGCTACCCCAATCATCACAGGCTTTCTTAGCCATACATATACCAAGATATTTTCATCAGCTTTTTCATCCATCAT	
Consensus	(101) GCTCTCTCTGGGCTT GCTCTATCAACCAATCATCACAGGCT TTTCTAGCCATACATACACCCCGACATTATATCAGCTTTTTCATCCATCAT	
	201	300
Od.h.CYTB	(201) CATATCTGCTGATGTTAACTTGGATGATTAATCCGCAACATACACGCTAAGGCGCCTCTCTCTTCAATTGTTATCTACCTGACATGGAGGA	
Od.p.CYTB	(201) GCACATCTGCTGATGTTAACTTGGATGATTAATCCGCAACATACACGCTAAGGCGCCTCTCTCTTCAATTGTTATCTACCTGACATGGAGGA	
Od.y.CYTB	(201) CATATCTGCTGATGTTAACTTGGATGATTAATCCGCAACATACACGCTAAGGCGCCTCTCTCTTCAATTGTTATCTACCTGACATGGAGGA	
Consensus	(201) CATATCTGCTGATGTTAACTTGGATGATTAATCCGCAACATACACGCTAAGGCGCCTCTCTCTTCAATTGTTATCTACCTGACATGGAGGA	

图 15 Cytb 区域设计第一对引物

	301	400
Od.h.CYTB	(301) GGCTATATCTACGGCTGCTACCTCTATAAAGAAACATGAAGGTTGGAGTCACTCATGCTACTTCTAGTTATATACACCCTCTTCGTGGCTACGCTCTAC	
Od.p.CYTB	(301) GGCTATATCTACGGCTGCTACCTCTATAAAGAAACATGAAGGTTGGAGTCACTCATGCTACTTCTAGTTATATACACCCTCTTCGTGGCTACGCTCTCTAC	
Od.y.CYTB	(301) GGCTATATCTACGGCTGCTACCTCTATAAAGAAACATGAAGGTTGGAGTCACTCATGCTACTTCTAGTTATATACACCCTCTTCGTGGCTACGCTCTCTAC	
Consensus	(301) GGCTATATCTACGGCTCTACCTATATAAAGAAACATGAAGGTTGGAGTCACTCATGCTACTTCTAGTTATATAAAGCTCTGCTGGCTACGCTCTCTAC	
	401	500
Od.h.CYTB	(401) CCTGAGGACAAATATCATTCTGAGGCGCAACAGTAATTACCAACCTCTCTCTGCCATCCCTTCAAGGCGCTCCCTAGTCCCAATGAATCTGAGGAGG	
Od.p.CYTB	(401) CCTGAGGACAAATATCATTCTGAGGCGCAACAGTAATTACCAACCTCTCTCTGCCATCCCTTCAAGGCGCTCCCTAGTCCCAATGAATCTGAGGAGG	
Od.y.CYTB	(401) CCTGAGGACAAATATCATTCTGAGGCGCAACAGTAATTACCAACCTCTCTCTGCCATCCCTTCAAGGCGCTCCCTAGTCCCAATGAATCTGAGGAGG	
Consensus	(401) CCTGAGGACAAATATCATTCTGAGGCGCAACAGTAATTACCAACCTCTCTCTGCCATCCCTTATGTAGGAACTCCCTAGTCCCAATGAATCTGAGGAGG	

图 16 Cytb 区域设计第二对引物

		601		700
Od.h.CYTB	(601)	CAGGAAACAGGCTCAACAACCCGCGGGCTTAAGCTCAAAACATGACAAATATCCCATTCACCCCTACTTCTCATATAAAGACTTTAGGATTTCATG		
Od.p.CYTB	(601)	CAGGAAACAGGATCCACAACCCGCGGGCTTAAGCTCAAAACATGACAAATATCCCATTCACCCCTACTTCTCATATAAAGATCTCTAGGATTTCGCA		
Od.y.CYTB	(601)	CAGGAAACAGGCTCAACAACCCGCGGGCTTAAGCTCAAAACATGACAAATATCCCATTCACCCCTACTTCTCATATAAAGATCTCTAGGATTTCGCA		
Consensus	(601)	CAGGAAACAGGCTCAAAACACCCGCGGGCTTAAGCTCAAAACATGACAAATATCCCATTCACCCCTACTTCTCATATAAAGATCTCTAGGATTTCGCA		
		701		800
Od.h.CYTB	(701)	TCTACTTCTTAATCTGCTAATCTACTAGCACTATTCTTGCCCAACCACTCGGAGACCCAGATAATCTCGCCAGCCAACTCTTAACACACCCCTCA		
Od.p.CYTB	(701)	TCTCTCTTCTAACCCTTATTTCCTTGGGTATTCTCAACCACTCACTGGTGAACCCAGATAATTTACCCCGCCAACTCTCTGTACACCCCTCA		
Od.y.CYTB	(701)	TCTACTTCTTAATCTGCTAATCTACTAGCACTATTCTTGCCCAACCACTCGGAGACCCAGATAATTTACCCCGCCAACTCTCTGTACACCCCTCA		
Consensus	(701)	TCTACTTCTTAACCTCTCTCTCTAGCACTATTCTCAACCACTCACTGGTGAACCCAGATAATTTACCCCGCCAACTCTCTGTACACCCCTCA		
		801		900
Od.h.CYTB	(801)	CATCAACCCGATGATACCTTCTATTGCTTACGCCATCTCTCGATCAACCCAGATAAGCTAGGAGGTATATACTTCTCATCAATCTTCTG		
Od.p.CYTB	(801)	CATTAAGCCCGATGATACCTTCTATTGCTTACGCCATCTCTCGATCAACCCAGATAAGCTAGGAGGTATATACTTCTCATCAATCTTCTG		
Od.y.CYTB	(801)	CATTAAGCCCGATGATACCTTCTATTGCTTACGCCATCTCTCGATCAACCCAGATAAGCTAGGAGGTATATACTTCTCATCAATCTTCTG		
Consensus	(801)	CATTAAGCCCGATGATACCTTCTATTGCTTACGCCATCTCTCGATCAATCCCATAAATCTAGGAGGGTA TAGCCTTACTAGCATCAATCTTAGTA		

图 17 Cytb 区域设计第三对引物

		101		200
Od.p.dloop	(101)	TAACCATTCATACATCAACAGCAAGATTAACACCA-AGACATA-TAATGAATATCTAAGCCTAATGAAACTCTACAGATATTTCCCAAGTAAAT		
Od.y.dloop	(101)	TAACCATTCATACATCAACAGTAAAGATTAAGATTAACACCA-AGACATA-TAATGAATATCTAAGCCTAATGAAACTCTACAGATATTTCCCAAGTAAAT		
Od.h.dloop	(101)	TAACCATTCATACATCAACAGTAAAGATTAAGATTAACATTCATACATA-TAATGAATATCTAAGCCTAATGAAACTCTACAGATATTTCCCAAGTAAAT		
Consensus	(101)	TAACCATTCATACATCAACAGTAAAGATTAAGATTAACACCA-AGACATA-TAATGAATATTTAACACCTAATGAAACTCTACAGATATTTCCCAAGTAAAT		
		201		300
Od.p.dloop	(199)	C-TCCCATATATTAATTAAGATCTAATATAAATTAAATTAACCATATATACCAGGATTCACACACTATCAAGATAACAGCCGATGCAGATAAGGAAG		
Od.y.dloop	(199)	A-ACCTCATATCAAGTTAAGATCTAATATAAATTAAATTAACCATATATACCAGGATTCACACACTATCAAGATAACAGCCGATGCAGATAAGGAAG		
Od.h.dloop	(201)	TA-TCCACACGACAGATTAAGATCTAATATAAATTAAATTAACCATATATACCAGGATTCACACACTATCAAGATAACAGCCGATGCAGATAAGGAAG		
Consensus	(201)	TCC CATATCAAGTTAAGACCTAACATAAACTTAATT AACCATATATACCAGGATTCACCAATCTATCAAGATAACAGCCGATGCAGATAAGGAAG		

图 18 Dloop 区域设计第一对引物

		201		300
Od.h.dloop	(201)	TATCCACACGACAGATTAAGATCTAATATAAATTAAATTAACCATATATACCAGGATTCACACACTATCAAGATAACAGCCGATGCAGATAAGGAAG		
Od.p.dloop	(199)	C-TCCCATATATTAATTAAGATCTAATATAAATTAAATTAACCATATATACCAGGATTCACACACTATCAAGATAACAGCCGATGCAGATAAGGAAG		
Od.y.dloop	(199)	A-ACCTCATATCAAGTTAAGATCTAATATAAATTAAATTAACCATATATACCAGGATTCACACACTATCAAGATAACAGCCGATGCAGATAAGGAAG		
Consensus	(201)	TCC CATATCAAGTTAAGACCTAACATAAACTTAATT AACCATATATACCAGGATTCACCAATCTATCAAGATAACAGCCGATGCAGATAAGGAAG		
		301		400
Od.h.dloop	(301)	TCAATTCAGTCAAGCAAA-STATTTA-GTTTATTGAAGGTGAGGGACAATGATTGTGGGGGTTTCACTAGTGAACATTTCTGGCATTTGGTTCTCTATT		
Od.p.dloop	(298)	ACATTCGAGTCAAGCGTTGGAACTACGTTCTTGAAGGTGAGGGACAATAATTGTGGGGGTTTCACTAGTGAACATTTCTGGCATTTGGTTCTCTATT		
Od.y.dloop	(298)	ACATTCGAGTCAAGCGTTGGAACTACGTTCTTGAAGGTGAGGGACAATGATTGTGGGGGTTTCACTAGTGAACATTTCTGGCATTTGGTTCTCTATT		
Consensus	(301)	ACATTCGAGTCAAGCGTTGGAACTACGTTCTTGAAGGTGAGGGACAATAATTGTGGGGGTTTCACTAGTGAACATTTCTGGCATTTGGTTCTCTATT		
		401		500
Od.h.dloop	(400)	CAGGGGCATTATTGATATTATTTCCCATCTTTCTTTAAACCGGGCATAAGTTGTTGGTGGAGTTTCATACCTCTACTCTCCCATGCGGAGCGTTCT		
Od.p.dloop	(398)	CAGGGGCATTATTGATATTATTTCCCATCTTTCTTTAAACCGGGCATAAGTTGTTGGTGGAGTTTCATACCTCTACTCTCTCCCATGCGGAGCGTTCT		
Od.y.dloop	(398)	CAGGGGCATTATTGATATTATTTCCCATCTTTCTTTAAACCGGGCATAAGTTGTTGGTGGAGTTTCATACCTCTACTCTCTCCCATGCGGAGCGTTCT		
Consensus	(401)	CAGGGGCATTATTGATATTATTTCCCATCTTTCTTTAAACCGGGCATAAGTTGTTGGTGGAGTTTCATACCTCTACTCTCCCATGCGGAGCGTTCT		

图 19 Dloop 区域设计第二对引物

		101		200
Od.h.dloop	(101)	TAACCATTCATACATCAACAGTAAAGATTAAGATTAACATTCATACATA-TAATGAATATCTAAGCCTAATGAAACTCTACAGATATTTCCCAAGTAAAT		
Od.p.dloop	(101)	TAACCATTCATACATCAACAGTAAAGATTAAGATTAACATTCATACATA-TAATGAATATCTAAGCCTAATGAAACTCTACAGATATTTCCCAAGTAAAT		
Od.y.dloop	(101)	TAACCATTCATACATCAACAGTAAAGATTAAGATTAACATTCATACATA-TAATGAATATCTAAGCCTAATGAAACTCTACAGATATTTCCCAAGTAAAT		
Consensus	(101)	TAACCATTCATACATCAACAGTAAAGATTAAGATTAACATTCATACATA-TAATGAATATTTAACACCTAATGAAACTCTACAGATATTTCCCAAGTAAAT		
		201		300
Od.h.dloop	(201)	TA-TCCACACGACAGATTAAGATCTAATATAAATTAAATTAACCATATATACCAGGATTCACACACTATCAAGATAACAGCCGATGCAGATAAGGAAG		
Od.p.dloop	(199)	C-TCCCATATATTAATTAAGATCTAATATAAATTAAATTAACCATATATACCAGGATTCACACACTATCAAGATAACAGCCGATGCAGATAAGGAAG		
Od.y.dloop	(199)	A-ACCTCATATCAAGTTAAGATCTAATATAAATTAAATTAACCATATATACCAGGATTCACACACTATCAAGATAACAGCCGATGCAGATAAGGAAG		
Consensus	(201)	TCC CATATCAAGTTAAGACCTAACATAAACTTAATT AACCATATATACCAGGATTCACCAATCTATCAAGATAACAGCCGATGCAGATAAGGAAG		
		301		400
Od.h.dloop	(301)	TCAATTCAGTCAAGCAAA-STATTTA-GTTTATTGAAGGTGAGGGACAATGATTGTGGGGGTTTCACTAGTGAACATTTCTGGCATTTGGTTCTCTATT		
Od.p.dloop	(298)	ACATTCGAGTCAAGCGTTGGAACTACGTTCTTGAAGGTGAGGGACAATAATTGTGGGGGTTTCACTAGTGAACATTTCTGGCATTTGGTTCTCTATT		
Od.y.dloop	(298)	ACATTCGAGTCAAGCGTTGGAACTACGTTCTTGAAGGTGAGGGACAATGATTGTGGGGGTTTCACTAGTGAACATTTCTGGCATTTGGTTCTCTATT		
Consensus	(301)	ACATTCGAGTCAAGCGTTGGAACTACGTTCTTGAAGGTGAGGGACAATAATTGTGGGGGTTTCACTAGTGAACATTTCTGGCATTTGGTTCTCTATT		

图 20 Dloop 区域设计第三对引物

9.1.3.3.引物调整

依照引物设计原则：上游引物 F3'端需要有 3 个以上差异碱基、下游引物 5'端（反向互补后是 3'）需要有 3 个以上差异碱基、引物长度设计最好在 25~28bp，退火温度 60 度左右、探针在 32~35bp 左右，退火温度 65 度左右，目的片段长度在 100~200bp 之间。在设计结果的基础上调整个别引物的前后碱基，使引物达到最佳状态。

F1: 前端增加4个碱基, 后端去掉7个碱基		P1	200
Od.h.CYTB	(101)	GGTCCCTGCTTGGCTTAGGCTAGCAGCAACATCACAGGCTTTCTTGGCATCTATACCAAGATATTCATCAGCTTTTCATCCATCAT	
Od.p.CYTB	(101)	GTCTCTGCTTGGGCTTTGGCTTATCAACCAATATCACAGGCTCTTCTGGCATCTATACCAAGATATTCATCAGCTTTTCATCCATCAG	
Od.y.CYTB	(101)	GTCTCTGCTTGGGCTTTGGCTTATCAACCAATATCACAGGCTCTTCTGGCATCTATACCAAGATATTCATCAGCTTTTCATCCATCAG	
Consensus	(101)	GCTCTCTCTGGGCTTGGCTTATCACCCAAATCATCACAGGCTTTCTAGCCATACACTACACCCCGACATTATATCAGCTTTTCATCCATCAC	
R1: 前端增加1个碱基, 后端去掉1个碱基			300
Od.h.CYTB	(201)	CGATACCTGCGGTGGTAACTTGGATGATTAGTCCGAAJATACACGGCAAGGCGCTCTCTCTCATTTGATTAATCTCACATGGACGA	
Od.p.CYTB	(201)	GCACATCTGGGATGTTAACTTTGGATGATTAGTCCGAAJATACACGGCAAGGCGCTCTCTCTCATTTGATTAATCTCACATGGACGA	
Od.y.CYTB	(201)	ACATATCTGCGGATGTTAACTTGGATGATTAGTCCGAAJATACACGGCAAGGCGCTCTCTCTCATTTGATTAATCTCACATGGACGA	
Consensus	(201)	CATATCTGTCG GATGTTAACTTTGGATGATTAAATCCGAAATGTACAGCCACGGTGCTCTCTCTCTCATCTGTATCTACCTCCACATTGGACGA	

图 21 Cyth.1 引物调整结果

F1		301	P1	400
Od.h.CYTB	(301)	GGCTTATCTACGGCTGACCTCTATAAAGAAACATGAAAGTTGGAGTCACTCACTACTCTAGTTATATCAGCTTCGTGGTACGCTCTAG		
Od.p.CYTB	(301)	GGCTTATCTACGGCTGACCTCTATAAAGAAACATGAAAGTTGGAGTCACTCACTACTCTAGTTATATCAGCTTCGTGGTACGCTCTAG		
Od.y.CYTB	(301)	GGCTTATCTACGGCTGACCTCTATAAAGAAACATGAAAGTTGGAGTCACTCACTACTCTAGTTATATCAGCTTCGTGGTACGCTCTAG		
Consensus	(301)	GGCTTATCTACGGCTGACCTCTATAAAGAAACATGAAAGTTGGAGTCTAGTTATATCAGCTTCGTGGTACGCTCTAGCTCTAG		
R1		401		500
Od.h.CYTB	(401)	CCTGAGGACAAATATCATTCTGAGGCGCAACAGTAATACCAACCTCTCTGCGCATCCCTTATGTAGGAACTCCCTAGTCCCAATGAATCTGAGG		
Od.p.CYTB	(401)	CCTGAGGACAAATATCATTCTGAGGCGCAACAGTAATACCAACCTCTCTGCGCATCCCTTATGTAGGAACTCCCTAGTCCCAATGAATCTGAGG		
Od.y.CYTB	(401)	CCTGAGGACAAATATCATTCTGAGGCGCAACAGTAATACCAACCTCTCTGCGCATCCCTTATGTAGGAACTCCCTAGTCCCAATGAATCTGAGG		
Consensus	(401)	CCTGAGGACAAATATCATTCTGAGGCGCAACAGTAATACCAACCTCTCTGCGCATCCCTTATGTAGGAACTCCCTAGTCCCAATGAATCTGAGG		

图 22 Cyth.2 引物检查结果

F1		601		700
Od.h.CYTB	(601)	CACGAACAGGCTCAACAAOCCCTGGCTTAAAGTCAACAGTACCAAAATCCGATTCACCTTCTCATATAGAGCTTGAAGTTCATCG		
Od.p.CYTB	(601)	CACGAACAGGCTCAACAAOCCCTGGCTTAAAGTCAACAGTACCAAAATCCGATTCACCTTCTCATATAGAGCTTGAAGTTCATCG		
Od.y.CYTB	(601)	CACGAACAGGCTCAACAAOCCCTGGCTTAAAGTCAACAGTACCAAAATCCGATTCACCTTCTCATATAGAGCTTGAAGTTCATCG		
Consensus	(601)	CACGAACAGGCTCAACAAOCCCAACAGGCTTAAAGTCAACAGTACCAAAATCCGATTCACCTTCTCATATAGAGCTTGAAGTTCATCG		
P1		701		800
Od.h.CYTB	(701)	TCAATCTCTTGTAAATCTACCTGCTATTTTGGCGAACTCTGCGAGGCGGAGATTAATCAAGGCTTAACACAGGCTCTAG		
Od.p.CYTB	(701)	TCTCTCTTGAAGCTTATTTCTGCTTATTTCTGCGAACTCTGCGAGGCGGAGATTAATCAAGGCTTAACACAGGCTCTAG		
Od.y.CYTB	(701)	TCTCTCTTGAAGCTTATTTCTGCTTATTTCTGCGAACTCTGCGAGGCGGAGATTAATCAAGGCTTAACACAGGCTCTAG		
Consensus	(701)	TCTCTCTTGAAGCTTATTTCTGCTTATTTCTGCGAACTCTGCGAGGCGGAGATTAATCAAGGCTTAACACAGGCTCTAG		
R1		801		900
Od.h.CYTB	(801)	CATCAAGCCGATGATACCTCTTATTGCTAGGCTCTGATCAACCGAGATTAAGGAGGCTTAATCAAGGCTTAACACAGGCTCTAG		
Od.p.CYTB	(801)	CATCAAGCCGATGATACCTCTTATTGCTAGGCTCTGATCAACCGAGATTAAGGAGGCTTAATCAAGGCTTAACACAGGCTCTAG		
Od.y.CYTB	(801)	CATCAAGCCGATGATACCTCTTATTGCTAGGCTCTGATCAACCGAGATTAAGGAGGCTTAATCAAGGCTTAACACAGGCTCTAG		
Consensus	(801)	CATCAAGCCGATGATACCTCTTATTGCTAGGCTCTGATCAACCGAGATTAAGGAGGCTTAATCAAGGCTTAACACAGGCTCTAG		

图 23 Cyth.3 引物检查结果

F1: 前端去掉8个碱基, 后端增加6个碱基		P1: 前端去掉5个碱基, 后端增加5个碱基	
Od.p.dloop	(101)	TAACCATTCATACATCAACAGCAAGACAAGATTCAACACA-AGACATA-TAATGAATACTTAACCTATGAAA-CTCAGATATTTCCCAAGTAAAT	
Od.y.dloop	(101)	TAACCATTCATACATCAACAGTAAAGATAGATCAACACA-AGACATA-TAATGAATACTTAAGGCTTATGAAA-CTCAGATATTAACCAAGTAAAT	
Od.h.dloop	(101)	TAACCATTCATACATCAACAGTAAAGATAGATCAACACA-AGACATA-TAATGAATACTTAAGGCTTATGAAA-CTCAGATATTAACCAAGTAAAT	
Consensus	(101)	TAACCATTCATACATCAACAGTAAAGACAAGATACACACA AGACATA TAATGAATATTTAACACCTAATGAAAACCTCATAGATATAACCAAGTAAAT	
R1		201	300
Od.p.dloop	(199)	C-TCCCATATATATAAAGATCTAATATAAATTAAATTAAACATATATACCAGGATTCAACACACTATCAAGATAACAGGCCATCAGATAAGGAAG	
Od.y.dloop	(199)	A-ACCTCATCAAGCTTAAGACTAACTATAAATTAAATTAAACATATATACCAGGATTCAAAATCTATTAAGATAACAGGCCATCAGATAAGGAAG	
Od.h.dloop	(201)	TAACCAACGAGCTAAGACTAACTATAAATTAAATTAAACATATATACCAGGATTCAAAATCTATTAAGATAACAGGCCATCAGATAAGGAAG	
Consensus	(201)	TCC CATATCAAGTTAAGACTTAACATAAACTTAATT AACATATATACCAGGATTCAAAATCTATTAAGATAACAGGCCATCAGATAAGGAAG	

图 24 Dloop.1 引物调整结果

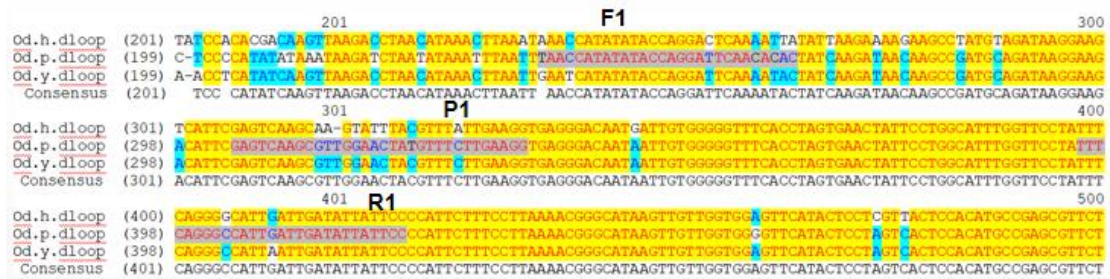


图 25 Dloop.2 引物检查结果

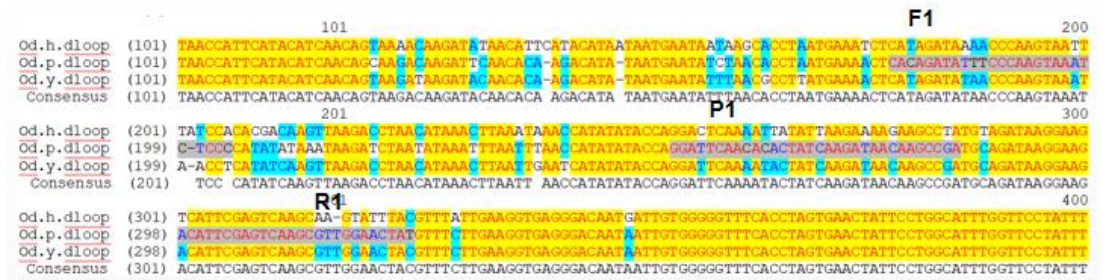


图 26 Dloop.3 引物检查结果

9.1.3.4.引物 *in silico* PCR 验证

使用 2 种在线方法做引物 *in silico* PCR 验证：UCSC *in silico* PCR 方法和 NCBI Primer-Blast 方法。验证结果表明，6 对引物均仅能扩增出目标物种河川沙塘鳢。

UCSC *in silico* PCR 验证结果：



图 27 Cytb.1 引物



图 28 Cytb.2 引物

T/SEEPLA XXX—202X

Genomes Genome Browser Tools Mirrors Downloads My Data Projects Help About Us

UCSC In-Silico PCR

Genome: Assembly: Forward Primer: Reverse Primer:

Max Product Size: Min Perfect Match: Min Good Match: Flip Reverse Primer: ☐ Append to existing PCR result: ☒

No matches to cccatcttctcatacaagatccc gaagtatcatcgggttaagtgt in hub_3671779_Human Jan. 2022 (T2T CHM13v2.0hs1)

Primer Melting Temperatures

Forward: 60.6 °C cccatcttctcatacaagatccc
Reverse: 61.7 °C gaagtatcatcgggttaagtgt
The temperature calculations are done assuming 50 mM salt and 50 nM annealing oligo concentration. The code to calculate the melting temp comes from [Primer3](#), the formula by Rychlik W, Spencer WJ and Rhoads RE NAR 1990, which can be activated in Primer3 with PRIMER_TM_FORMULA=0

图 29 Cytb.3 引物

Genomes Genome Browser Tools Mirrors Downloads My Data Projects Help About Us

UCSC In-Silico PCR

Genome: Assembly: Forward Primer: Reverse Primer:

Max Product Size: Min Perfect Match: Min Good Match: Flip Reverse Primer: ☐ Append to existing PCR result: ☒

No matches to aacagcaagacaagattcaacacag cggcttgattctgagtggtgaa in hub_3671779_Human Jan. 2022 (T2T CHM13v2.0hs1)

Primer Melting Temperatures

Forward: 63.0 °C aacagcaagacaagattcaacacag
Reverse: 63.3 °C cggcttgattctgagtggtgaa
The temperature calculations are done assuming 50 mM salt and 50 nM annealing oligo concentration. The code to calculate the melting temp comes from [Primer3](#), the formula by Rychlik W, Spencer WJ and Rhoads RE NAR 1990, which can be activated in Primer3 with PRIMER_TM_FORMULA=0

图 30 Dloop.1 引物

Genomes Genome Browser Tools Mirrors Downloads My Data Projects Help About Us

UCSC In-Silico PCR

Genome: Assembly: Forward Primer: Reverse Primer:

Max Product Size: Min Perfect Match: Min Good Match: Flip Reverse Primer: ☐ Append to existing PCR result: ☒

No matches to taacatatataacagattcaacacac ggaataatataatcaatggccctgaaa in hub_3671779_Human Jan. 2022 (T2T CHM13v2.0hs1)

Primer Melting Temperatures

Forward: 60.5 °C taacatatataacagattcaacacac
Reverse: 60.5 °C ggaataatataatcaatggccctgaaa
The temperature calculations are done assuming 50 mM salt and 50 nM annealing oligo concentration. The code to calculate the melting temp comes from [Primer3](#), the formula by Rychlik W, Spencer WJ and Rhoads RE NAR 1990, which can be activated in Primer3 with PRIMER_TM_FORMULA=0

图 31 Dloop.2 引物

Genomes Genome Browser Tools Mirrors Downloads My Data Projects Help About Us

UCSC In-Silico PCR

Genome: Assembly: Forward Primer: Reverse Primer:

Max Product Size: Min Perfect Match: Min Good Match: Flip Reverse Primer: ☐ Append to existing PCR result: ☒

No matches to cacagatatttccaagtaaatctccc ctgactcgaatgtcttcttctg in hub_3671779_Human Jan. 2022 (T2T CHM13v2.0hs1)

Primer Melting Temperatures

Forward: 63.2 °C cacagatatttccaagtaaatctccc
Reverse: 61.7 °C ctgactcgaatgtcttcttctg
The temperature calculations are done assuming 50 mM salt and 50 nM annealing oligo concentration. The code to calculate the melting temp comes from [Primer3](#), the formula by Rychlik W, Spencer WJ and Rhoads RE NAR 1990, which can be activated in Primer3 with PRIMER_TM_FORMULA=0

图 32 Dloop.3 引物

NCBI Primer-Blast 验证结果：

Primer Parameters

Use my own forward primer (5'->3' on plus strand)

GGGCCTTTGCCTTATCACCCAAATT

Clear

Use my own reverse primer (5'->3' on minus strand)

TTCGGACTAATCATCCAAAGTTAACATC

Clear

PCR product size

Min70Max1000

of primers to return

10

Primer melting temperatures (T_m)

Min57.0Opt60.0Max63.0Max T_m difference3

Exon/intron selection

A refseq mRNA sequence as PCR template input is required for options in the section

Exon junction spanNo preference

Exon junction matchMin 5' match7Min 3' match4Max 3' match8

Minimal and maximal number of bases that must anneal to exons at the 5' or 3' side of the junction

Intron inclusionPrimer pair must be separated by at least one intron on the corresponding genomic DNA

Intron length rangeMin1000Max1000

Primer Pair Specificity Checking Parameters

Note: Parameter values that differ from the default are highlighted in yellow

Specificity checkEnable search for primer pairs specific to the intended PCR template

Search modeAutomatic

Database

ExclusionExclude predicted Refseq transcripts (accession with XM, XR prefix)Exclude uncultured/environmental sample sequences

Organism

Odontobutis hatengensis (taxid:357169)

Odontobutis yaluensis (taxid:357170)

Oxyeleotris marmorata (taxid:86250)

Add organism

Primer pair 1						
	Sequence (5'->3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	GGGCCTTTGCCTTATCACCCAAATT	25	64.09	48.00	6.00	4.00
Reverse primer	TTCGGACTAATCATCCAAAGTTAACATC	28	61.31	39.29	6.00	2.00

Cytb.1 引物

Primer pair 1						
	Sequence (5'->3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	GTCCCTACCTATATAAGAAACATGGAAT	28	57.11	32.14	6.00	2.00
Reverse primer	ATTTCCTACATAAGGGATGCGGAG	25	62.27	48.00	4.00	1.00

Cytb.2 引物

Primer pair 1						
	Sequence (5'->3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	GCCTACTACGGGTCTACCTATATA	27	59.98	44.44	6.00	6.00
Reverse primer	ATTTCCTACATAAGGGATGCGGAG	25	62.27	48.00	4.00	1.00

Cytb.3 引物

Primer pair 1						
	Sequence (5'->3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	AACAGCAAGACAAGATTCAACACAAG	26	60.90	38.46	3.00	0.00
Reverse primer	TTCAACACACTATCAAGATAACAAGCCG	28	62.11	39.29	6.00	2.00

Dloop.1 引物

Primer pair 1						
	Sequence (5'->3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	TAACCATATATACAGGATTCAACACAC	28	59.12	35.71	6.00	0.00
Reverse primer	GGAATAATATCAATCAATGCCCTGAAA	28	60.27	35.71	6.00	0.00

Dloop.2 引物

Primer pair 1						
	Sequence (5'->3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	CACAGATATTTCCCAAGTAATCTCCC	27	59.77	40.74	7.00	3.00
Reverse primer	ACATTCGAGTCAAGCGTTGGAACAT	26	62.94	42.31	4.00	2.00

Dloop.3 引物

图 33 NCBI Primer-Blast 验证结果:

9.1.3.5.引物结果

表 8 引物序列

引物	引物序列（5'-3'）	引物长度(bp)	目的片段长度(bp)	Tm(°C)	GC含量(%)	Self complementarity	Self complementarity 3'
Cytb.F.1	GGGCCTTTGCCTTATCAC CCAAATT	25		64.1	48.0	6	4
Cytb.R.1	TTCGGACTAATCATCCAA AGTTAACATC	28	127	61.3	39.3	6	2
Probe1	ACATTATATCAGCTTTTTC ATCCATCACGCACATC	35		59.9	37.1		
Cytb.F.2	GCCTATACTACGGGTCCT ACCTATATA	28		57.1	32.1	6	2
Cytb.R.2	ATTTCCTACATAAGGGAT GGCGGAG	25	152	62.3	48.0	4	1
Probe2	TATAATAACTGCCTTCGTA GGCTACGTCCTGC	32		65.4	47.0		
Cytb.F.3	CCCATACTTCTCATACAA AGATCTCC	26		58.8	42.3	6	2
Cytb.R.3	GAAGTATCATTCGGGCTT AATGTGT	25	164	59.5	40.0	5	1
Probe3	GATTTGCCATTCTCCTTCT AACCCTTATTTCCCTG	35		65.3	42.9		
Dloop.F.1	AACAGCAAGACAAGATT CAACACAAG	26		60.9	38.5	3	0
Dloop.R.1	CGGCTTGTTATCTTGATA GTGTGTTGAA	28	173	62.1	39.3	6	2
Probe1	CAGATATTTCCCAAGTAA ATCTCCCCATATAT	32		60.2	34.0		
Dloop.F.2	TAACCATATATACCAGGAT TCAACACAC	28		59.1	35.7	6	0
Dloop.R.2	GGAATAATATCAATCAAT GGCCCTGAAA	28	184	60.3	35.7	6	0
Probe2	GAGTCAAGCGTTGGAAC TATGTTTCTTGAAGG	32		60.0	43.8		
Dloop.F.3	CACAGATATTTCCCAAGT AAATCTCCC	27		59.8	40.7	7	3
Dloop.R.3	CTTGACTCGAATGTCTTC CTTATCTG	26	169	62.9	42.3	4	2
Probe3	GGATTCAACACACTATCA AGATAACAAGCCGA	32		59.1	40.6		

9.1.4.引物验证

9.1.4.1.PCR 验证引物特异性

使用 6 对引物，以河川沙塘鳢组织 DNA 做阳性样品，以云斑尖塘鳢 DNA、无酶水做阴性对照进行 PCR 检测来确定引物的特异性，筛选出较适宜的引物并且用于合成标准质粒，产物用 1.5%的琼脂糖凝胶电泳检测，PCR 反应体系与反应条件如表 9、10。

表 9 反应体系

试剂名称	体积/ μ l
Taq mix	15
F	1
R	1
DNA 模板	2
dd H ₂ O	11
合计	30

表 10 反应条件

温度	时间
95℃	3min
95℃	15s
各引物退火温度	20s
72℃	20s
72℃	5min
4℃	∞

经凝胶电泳验证确定 6 对引物都能够检出河川沙塘鳢物种，对近缘物种云斑尖塘鳢无检测效果，但 Cytb.1 与 D-loop.3 这两对引物检出条带较淡，最终选取 Cytb.2 与 D-loop.2 两对引物进行后续实验，凝胶电泳图如图 34、35。

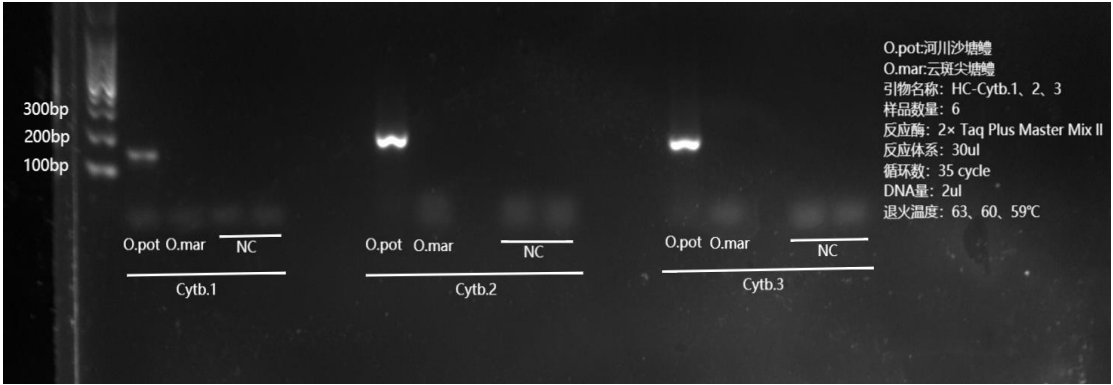


图 34 Cytb 区域三对引物扩增电泳图

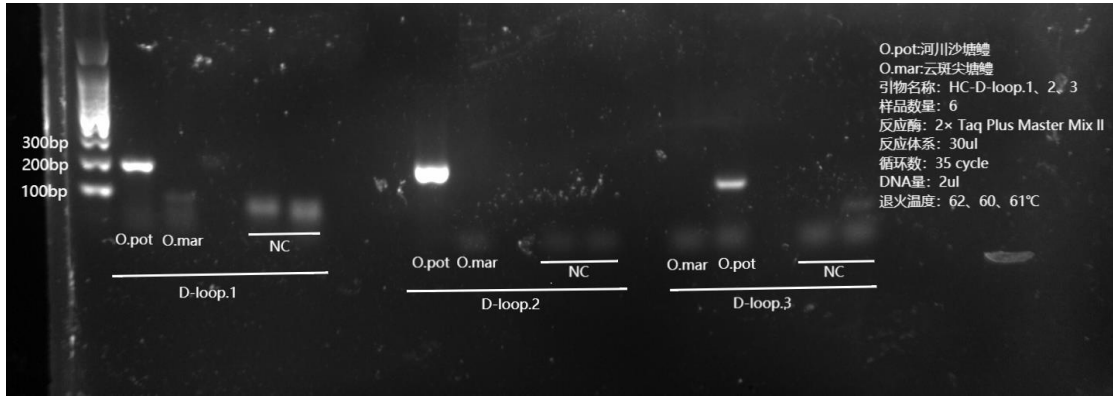


图 35 D-loop 区域三对引物扩增电泳图

9.1.4.2.PCR 验证引物特异性——环境样品

使用 Cytb.2 与 D-loop.2 两对引物，以河川沙塘鳢组织 DNA 做阳性样品，以云斑尖塘鳢 DNA、环境样品 DNA、无酶水做阴性对照进行 PCR 检测来确定引物的特异性，PCR 反应体系与反应条件如表 9、10，筛选出较适宜的引物并且用于合成标准质粒，产物用 1.5%的琼脂糖凝胶电泳检测，结果如图 36、37。

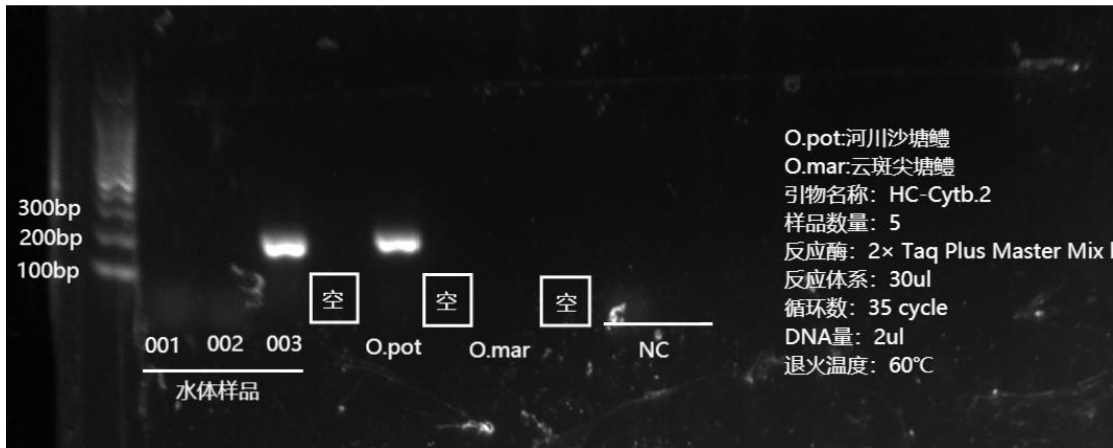


图 36 Cytb.2 区域三对引物扩增电泳图

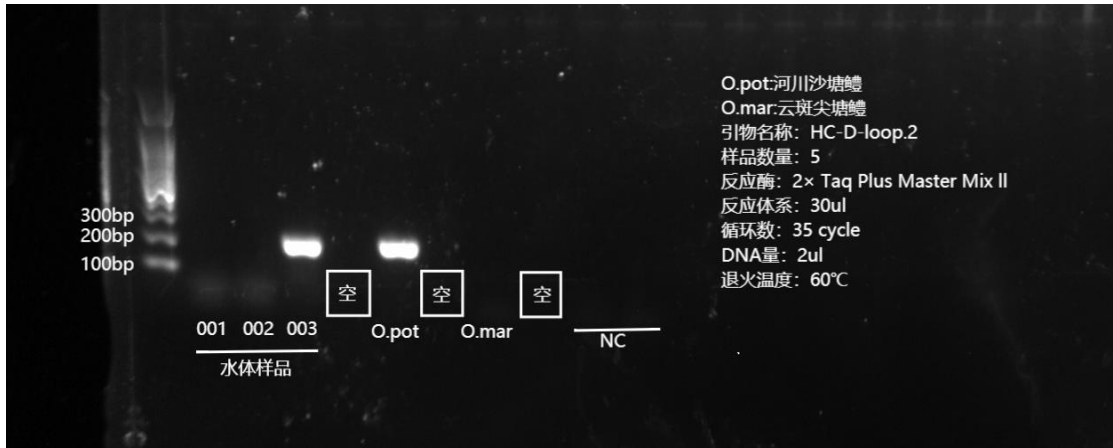


图 37 D-loop.2 区域三对引物扩增电泳图

经凝胶电泳验证 2 对引物均能检测出 3 号样品河川沙塘鳢信号，且条带没有明显差异，所以继续进行 qPCR 实验验证并筛选引物。

9.1.4.3.qPCR 验证引物特异性——环境样品

使用 Cytb.2 与 D-loop.2 两对引物，以河川沙塘鳢组织 DNA 做阳性样品，以云斑尖塘鳢 DNA、环境样品 DNA、无酶水做阴性对照进行 qPCR 检测来确定引物的特异性，筛选出较适宜的引物并且用于合成标准质粒，反应体系见表 11，反应条件见表 12。产物用 1.5%的琼脂糖凝胶电泳检测。

表 11 反应体系

试剂	体积(ul)
PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix	10
HC-Cytb.2-F	1.5
HC-Cytb.2-R	1.5
H2O	5
DNA 模板	2
总体积	20

表 12 反应条件

温度	时间	
50℃	2min	
95℃	5min	
95℃	15s	40cycle
各引物退火温度	1min	检测荧光信号

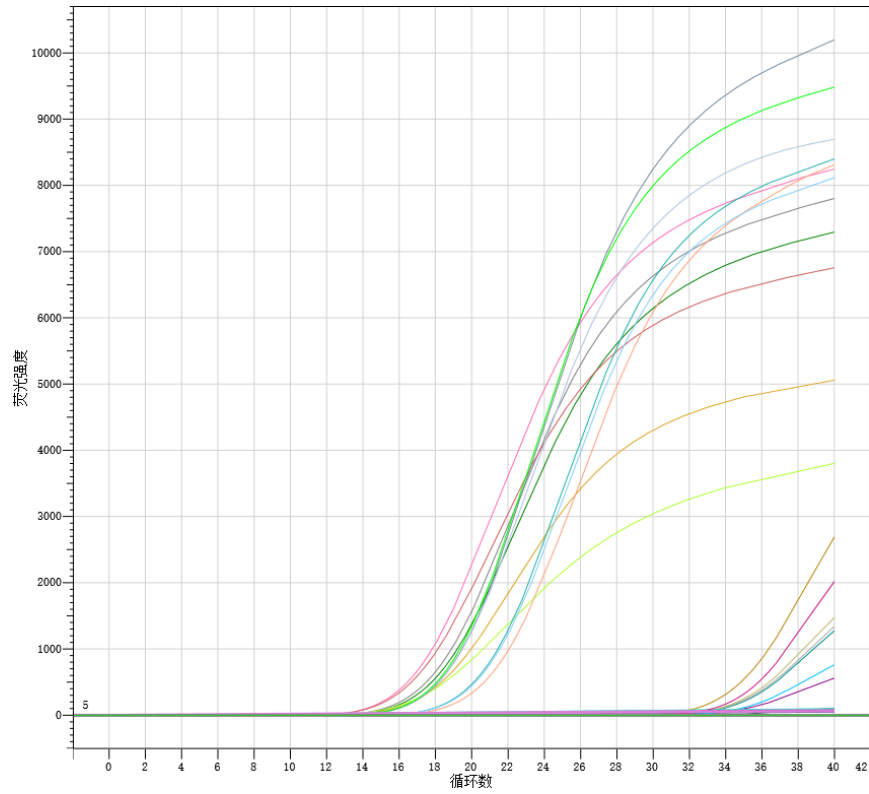


图 38 扩增曲线

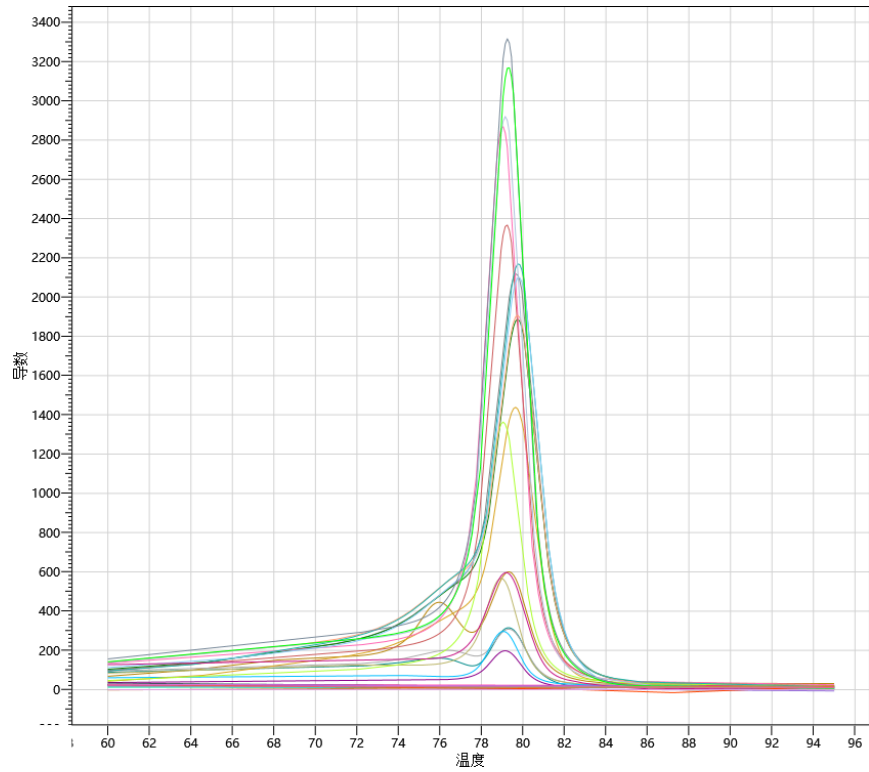


图 39 溶解曲线

表 13 CT 值表

加入引物	样品名称	CT 值平均值	CT 值标准方差
Cytb.2	001	30.43	0.43
Cytb.2	002	25.95	9.83
Cytb.2	003	13.05	0.18
Cytb.2	河川沙塘鳢	15.74	0.18
Cytb.2	云斑尖塘鳢	17.49	1.54
Cytb.2	NC	15.72	1.56
Dloop.2	001	30.91	0.49
Dloop.2	002	31.45	0
Dloop.2	003	12.19	0.26
Dloop.2	河川沙塘鳢	13.76	0.04
Dloop.2	云斑尖塘鳢	21.38	7.92
Dloop.2	NC	0	0

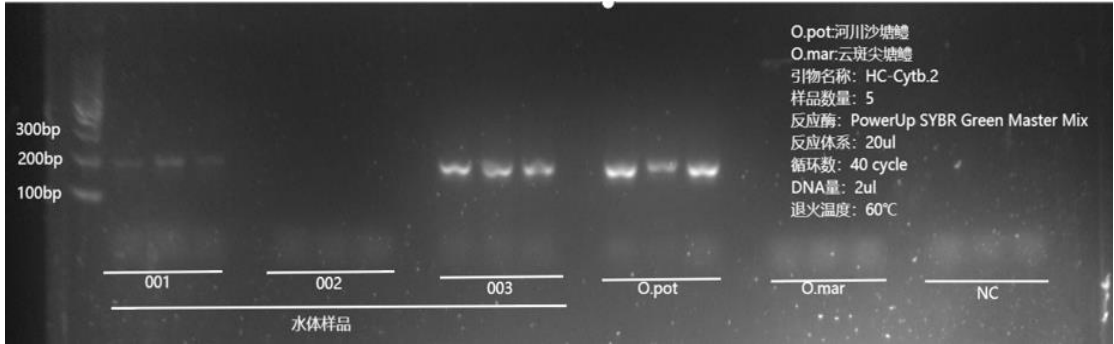


图 40 Cytb.2 引物扩增电泳图

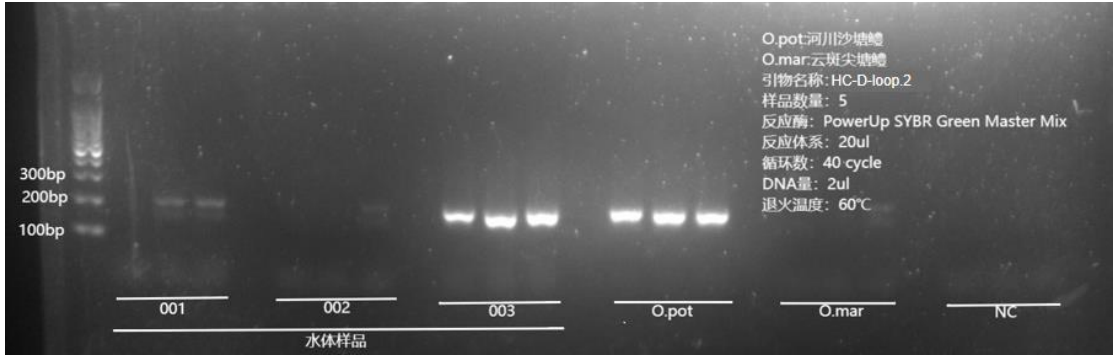


图 41 D-loop.2 引物扩增电泳图

两对引物下 CT 值对比结果为：D-loop.2 引物平均 CT 值略小于 Cytb.2 引物；凝胶电泳验证对比结果为：D-loop.2 引物条带更明亮；最终选定 D-loop.2 引物 PCR 后未纯化产物合成质粒。

9.1.5.河川沙塘鳢标准质粒

9.1.5.1.构建标准质粒

根据标准质粒浓度及其长度，计算标准质粒拷贝数，计算公式如下：

$$\text{Copies} = [(6.02 \times 10^{23}) \times (C \times 10^{-9}) / (L \times 660)] \times V$$

注：Copies 为拷贝数；C 为标准质粒 DNA 浓度，单位 $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ；L 为标准质粒 DNA 长度，单位 bp；V 为实时荧光 qPCR 体系中标标准质粒 DNA 体积。

标准质粒浓度为 $25.6 \text{ ng}/\mu\text{l}$ ，PMD 18T 载体全长 2692 bp ，D-loop.2 引物片段大小为 184 bp ，根据上述公式可得以下结果：

$$\text{河川沙塘鳢标准质粒拷贝数}/\mu\text{l} = [(6.02 \times 10^{23}) \times (25.6 \times 10^{-9}) / (2876 \text{ bp} \times 660)] = 8.11 \times 10^9 \text{ Copies}/\mu\text{l}$$

原始标准质粒浓度为 $8.11 \times 10^9 \text{ Copies}/\mu\text{l}$ ，先稀释至 $1 \times 10^9 \text{ Copies}/\mu\text{l}$ ，随后每个梯度 10 倍稀释，最终选择 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^0$ 这 6 个浓度梯度构建标准曲线。

9.1.6.qPCR 方法验证

9.1.6.1.检出限预测

使用 D-loop.2 引物，以河川沙塘鳢标准质粒做阳性样品，以无酶水做阴性对照进行 qPCR 检测来构建标准曲线，并通过多次实验检验并结合凝胶电泳验证目的条带，产物用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测。

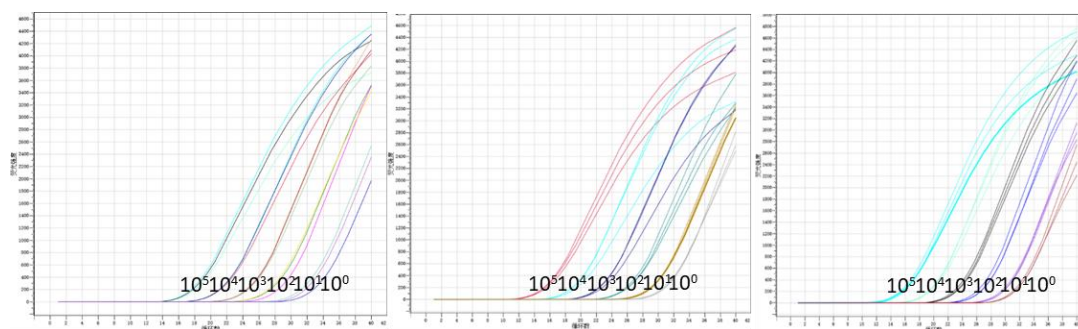


图 42 多次验证实验结果扩增曲线

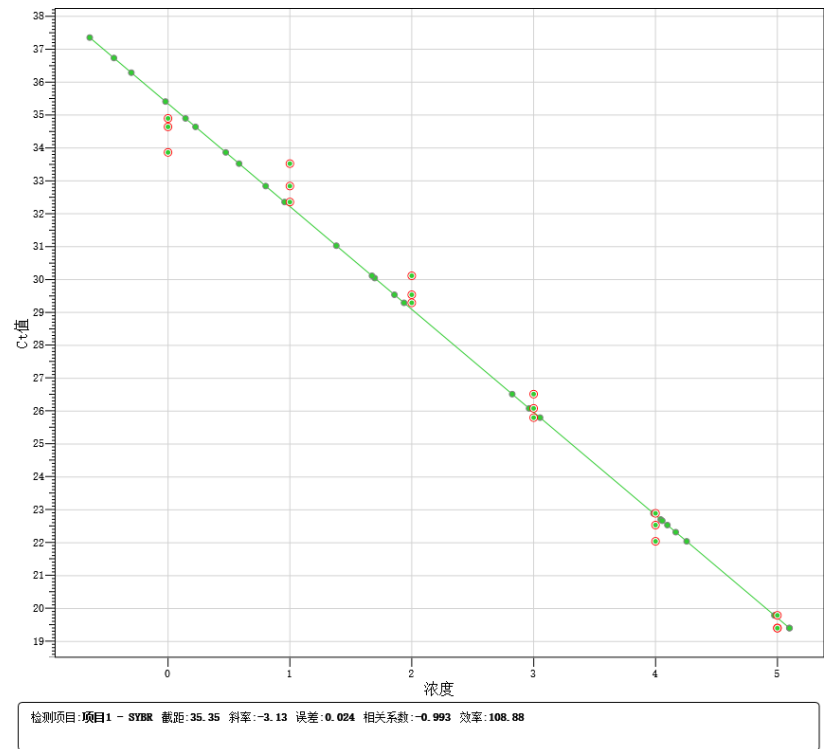


图 43 标准曲线

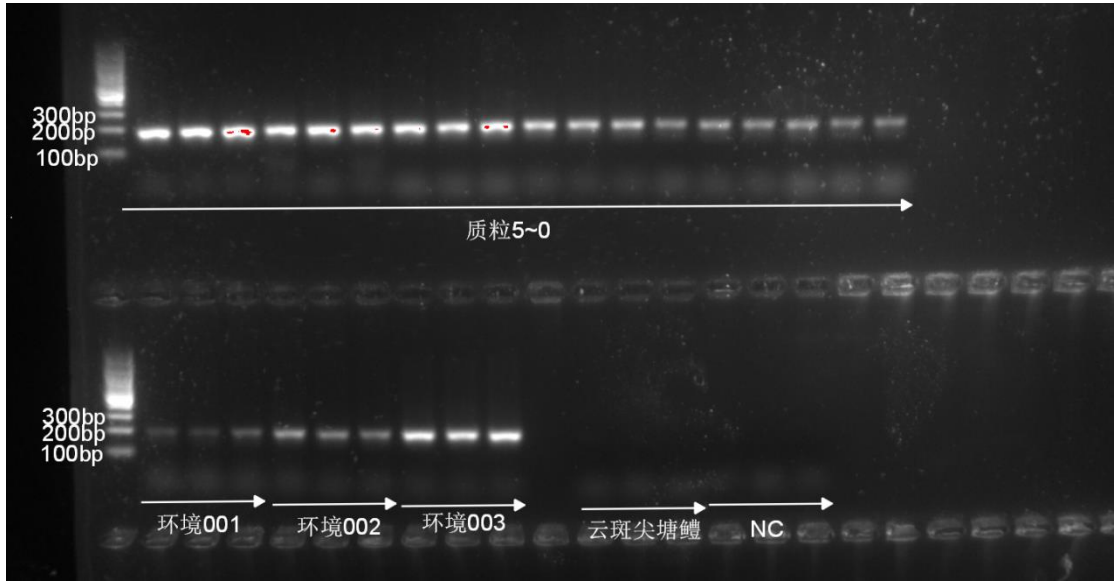


图 44 标准质粒凝胶电泳验证

本次最终预估检出限在 10^1 Copies/ μ l。

9.1.6.2.检出限验证

将标准质粒 10^2 Copies/ μ l 作为预计检出限，用标准质粒 10^2 、标准质粒 10^1 、标准质粒 10^0 做检出限验证，重复 10 次，发现这 10 次中，标准质粒 10^2 、标准质粒 10^1 都有检出，标准质粒 10^0 都无检出，而且这 10 次两两间的 P 值都大于 0.05，无显著性差异，说明基于此 qPCR 方法的标准质粒检出限为 1×10^1 Copies/ μ l。基于 10 次的标准质粒 10^1 的平均值为

32，此实验将 CT 值 32 作为阳性样品检出判别线。

表 14 标准质粒 10¹ 的 CT 值

重复	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	平均 CT 值
10 ¹ CT 值	31.72	32.48	31.58	32.86	31.62	31.95	31.83	31.64	32.04	32.74	32.1
	31.84	32.1	32.49	31.4	31.72	31.5	33.7	31.23	33.41	33.64	
	31.48	31.86	33.07	31.35	30.75	33.45	32.03	31.89	31.34	32.24	
P 值	0.59	0.3	0.3	0.41	0.47	0.53	0.94	0.78	0.8	0.79	

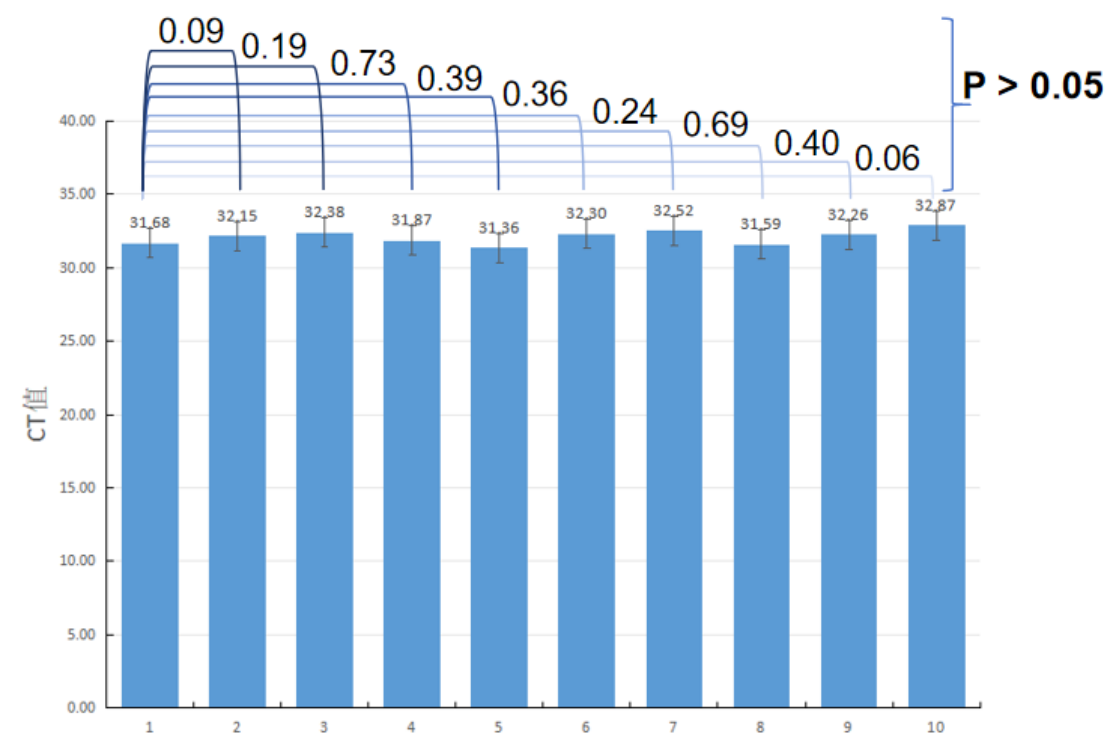


图 45 10 次检出限 CT 值结果

9.1.6.3.稳定性验证

9.1.6.3.1.人员稳定性验证

人员稳定性验证结果显示，不同实验人员同一样本 CT 值及拷贝数差异性 P 值>0.05，差异均不显著。

表 15 3 位实验人员结果的 CT 值

实验人员	样本 ID	CT 值平均值	CT 标准方差	拷贝数 (copies)
人员 1	质粒 10 ⁵	20.33	0.16	2.06E+06
	质粒 10 ⁴	23.97	0.22	5.79E+04
	质粒 10 ³	27.31	0.33	2.19E+03
	质粒 10 ²	30.56	0.15	8.66E+01
	质粒 10 ¹	32.17	0.18	1.78E+01
	样品 003	20.54	0.36	1.73E+06
	NC	undetermined	undetermined	/
人员 2	质粒 10 ⁵	20.08	0.37	1.89E+06
	质粒 10 ⁴	23.49	0.31	7.04E+04
	质粒 10 ³	26.98	0.17	2.41E+03
	质粒 10 ²	30.03	0.07	1.26E+02
	质粒 10 ¹	31.75	0.1	2.43E+01
	样品 003	20.29	0.21	1.50E+06
	NC	undetermined	undetermined	/
人员 3	质粒 10 ⁵	18.26	0.32	1.24E+06
	质粒 10 ⁴	22.32	0.36	8.60E+04
	质粒 10 ³	25.61	0.58	1.01E+04
	质粒 10 ²	29.56	0.18	7.17E+02
	质粒 10 ¹	32.2	0.87	1.41E+02
	样品 003	20.31	0.36	3.23E+05
	NC	undetermined	undetermined	/

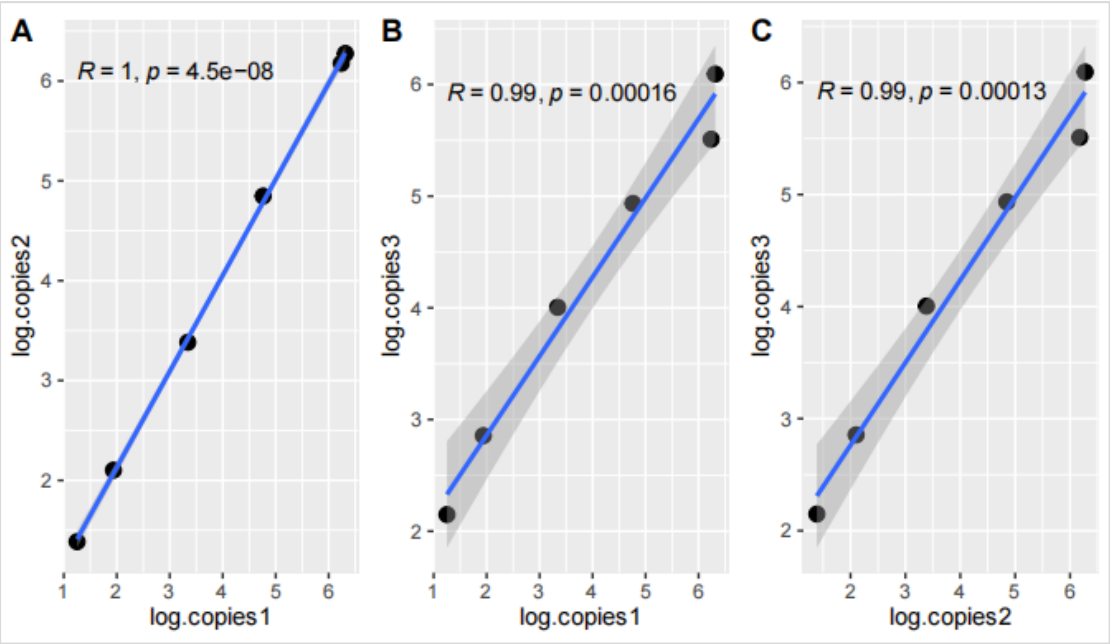


图 46 3 位实验人员实验结果 P 值

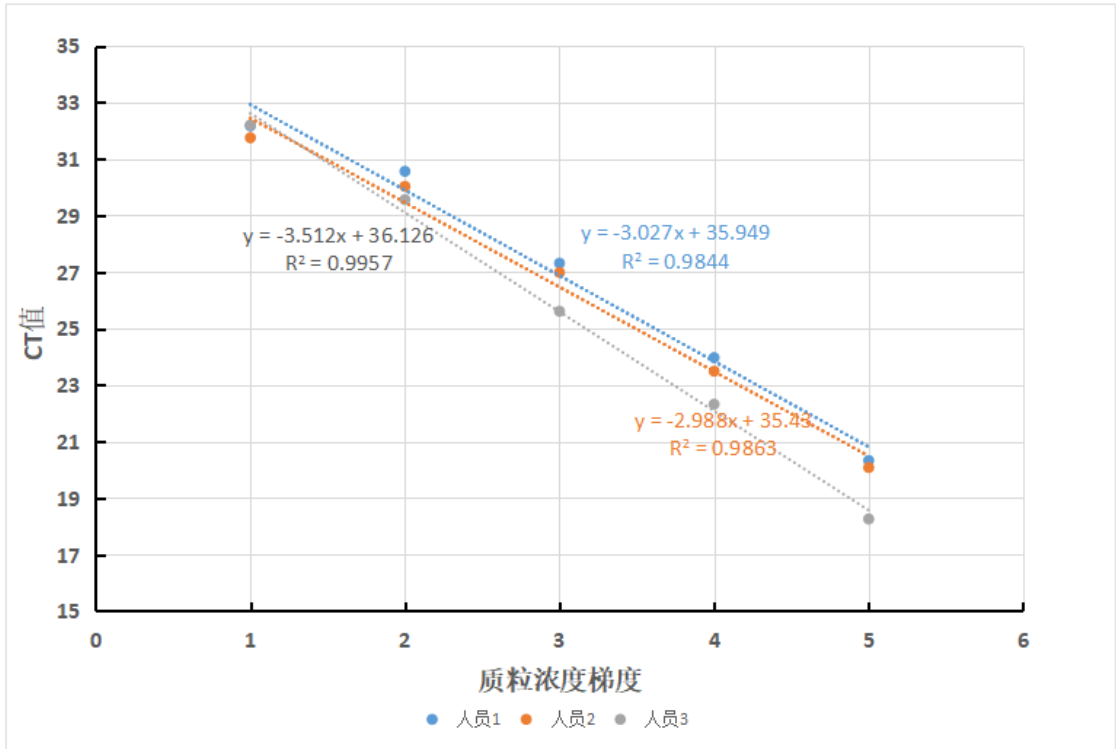


图 47 3 位实验人员实验结果标准曲线

9.1.6.4.试剂稳定性验证

控制变量进行 qPCR 检测验证实际稳定性，结果显示不同时间的同一样本的 CT 值差异 ≤ 1 ，不同时间同一样本 CT 值及拷贝数差异性 P 值 > 0.05 ，差异均不显著。而且 2 次的标准曲线的 R^2 均大于 0.99，结果可信度高（图 48），说明试剂具有稳定性，最低浓度质粒在 -20°C 可以保存至少 7 天。

表 16 3 次实验结果的 CT 值

不同时间	样本 ID	CT 值平均值	拷贝数 (copies)
第 1 天	质粒 10 ⁵	18.54	1.30E+05
	质粒 10 ⁴	22.31	9.85E+04
	质粒 10 ³	26.65	7.41E+03
	质粒 10 ²	29.38	6.24E+02
	质粒 10 ¹	32.99	5.90E+01
第 2 天	质粒 10 ⁵	19.54	1.15E+05
	质粒 10 ⁴	22.49	1.34E+04
	质粒 10 ³	26.13	9.05E+03
	质粒 10 ²	29.65	6.90E+02
	质粒 10 ¹	32.91	6.90E+01
第 3 天	质粒 10 ⁵	18.71	9.24E+05
	质粒 10 ⁴	22.07	9.97E+04
	质粒 10 ³	25.47	8.65E+03
	质粒 10 ²	28.61	8.70E+02
	质粒 10 ¹	32.85	7.70E+01

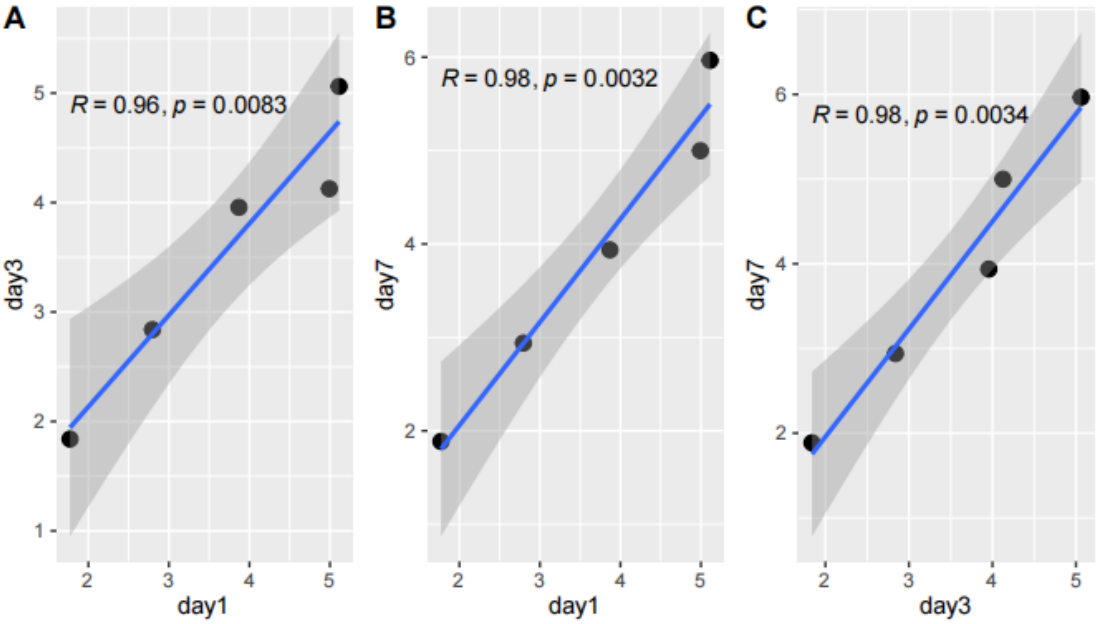


图 48 不同时间实验结果 P 值

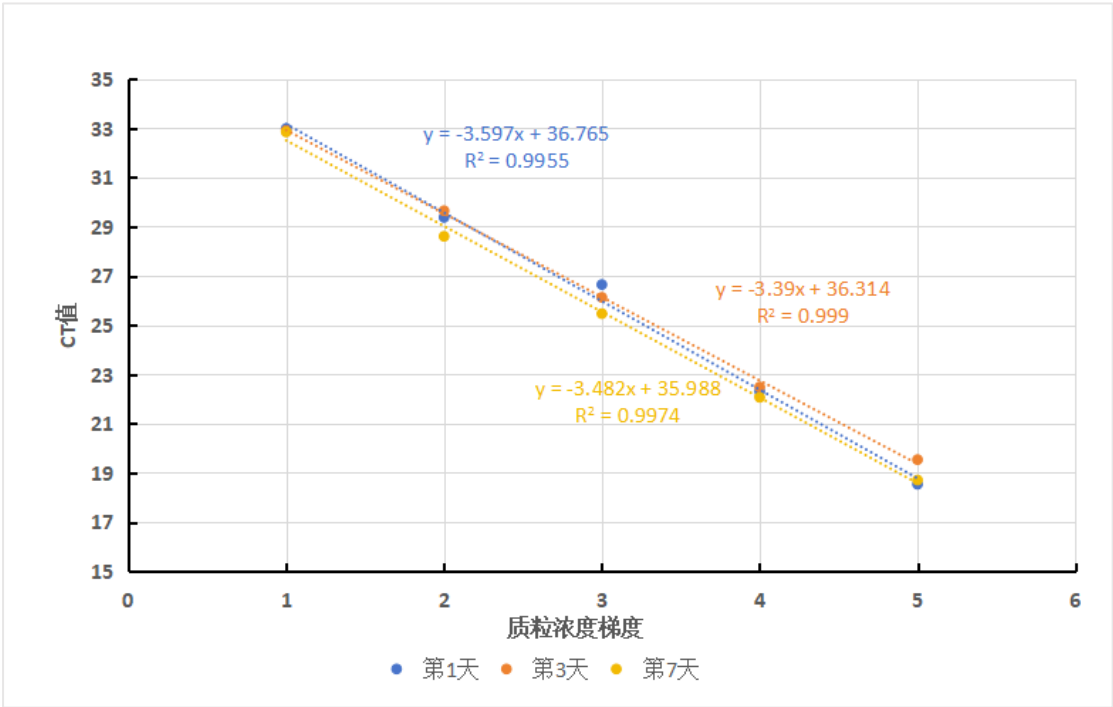


图 49 3 次实验结果标准曲线

9.1.6.5.准确性验证

选取太湖样品中 4 个经形态学与宏条形码检测均表明含有河川沙塘鳢的样品，与四川雅安经形态学与宏条形码鉴定后确认不含有河川沙塘鳢的环境样品 10 个，以河川沙塘鳢标准质粒做阳性样品，以无酶水做阴性对照进行 qPCR 检测，其中 3 个阳性对照样品有检出，说明阳性准确率在 75%左右，阴性对照均没有检出，说明阴性准确率为 100%，确认引物可以准确检出环境中河川沙塘鳢物种，且对环境中其他物种没有检出效果。

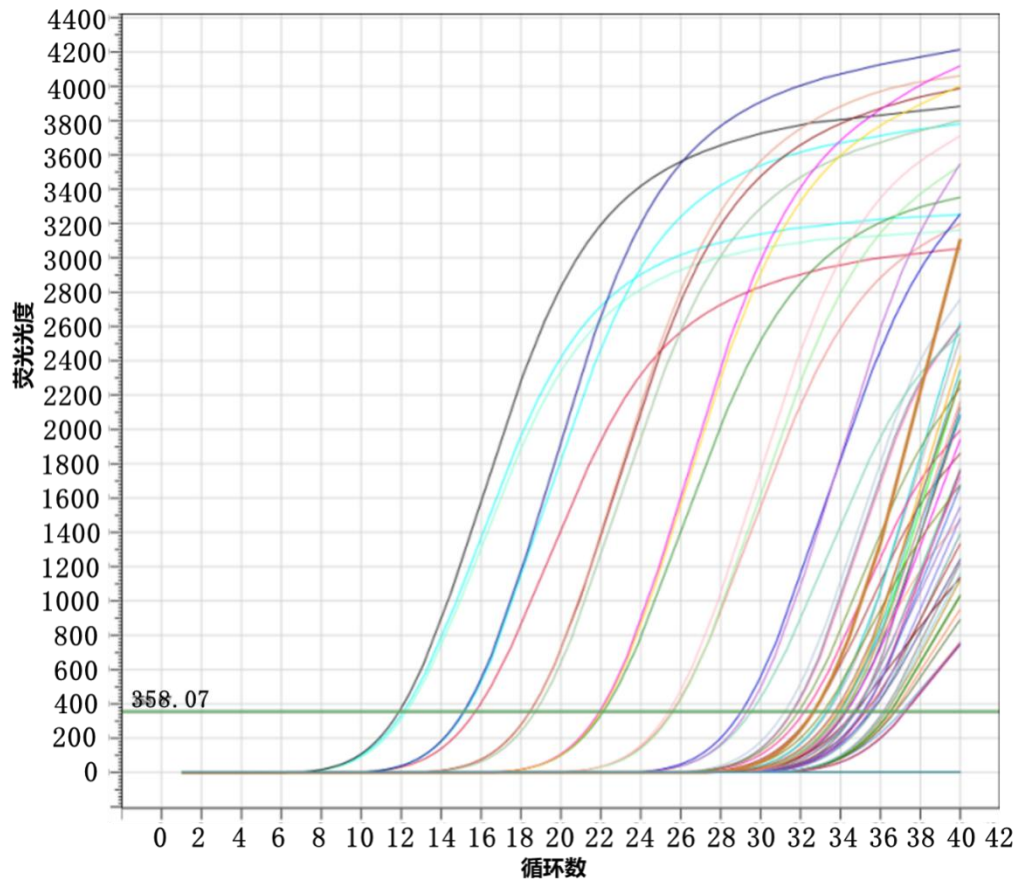


图 50 扩增曲线

表 17 样品实验结果 CT 值

样品名称	CT 值平均值	拷贝数 (copies)
质粒 10^5	18.65	1.17E+05
质粒 10^4	22.11	1.10E+04
质粒 10^3	25.63	1.00E+03
质粒 10^2	29.4	7.78E+02
质粒 10^1	33.06	7.40E+01
阳性样品 1	32.73	7.97E+00
阳性样品 2	33.49	2.69E+00
阳性样品 3	33.4	2.89E+00
阳性样品 4	undetermined	/
阴性样品 1~10	undetermined	/
云斑尖塘鳢	undetermined	/
NC	undetermined	/

9.1.7.判读标准

判读标准应遵循每一板实验中检出限 CT 值，根据 4.5.1.2 中 10 次的标准质粒 10^1 的平

均值为 32，所以将此 CT 值作为阳性样品检出判别线，具体判别标准如下：

阳性样本：3 个重复 CT 值<32，判为阳性，给出拷贝数结果；

可疑样本：3 个重复中 2 个 CT 值<32，1 个 undetermined，重复测试，确认结果；

可疑样本：3 个重复中 3 个 CT 值>32，重复测试，确认结果；

可疑样本：3 个重复中 1 个 CT 值<32，2 个 undetermined，重复测试，确认结果；

阴性样本：3 个重复中 1 个 CT 值>32，2 个 undetermined，判为阴性；

阴性样本：3 个重复中 2 个 CT 值>32，1 个 undetermined，判为阴性；

阴性样本：3 个重复中 3 个 undetermined，判为阴性。

10 参考文献

- [1] LI F, PENG Y, FANG W, 等. Application of Environmental DNA Metabarcoding for Predicting Anthropogenic Pollution in Rivers[J]. *Environmental Science & Technology*, 2018, 52(20): 11708-11719.
- [2] LI F, ZHANG Y, ALTERMATT F, 等. Consideration of Multitrophic Biodiversity and Ecosystem Functions Improves Indices on River Ecological Status[J]. *Environmental Science & Technology*, 2021, 55(24): 16434-16444.
- [3] LI F, ALTERMATT F, YANG J, 等. Human activities' fingerprint on multitrophic biodiversity and ecosystem functions across a major river catchment in China[J]. *Global Change Biology*, 2020, 26(12): 6867-6879.
- [4] YANG J, ZHANG X, XIE Y, 等. Ecogenomics of Zooplankton Community Reveals Ecological Threshold of Ammonia Nitrogen[J]. *Environmental Science & Technology*, 2017, 51(5): 3057-3064.
- [5] ZHANG Y, PAVLOVSKA M, STOICA E, 等. Holistic pelagic biodiversity monitoring of the Black Sea via eDNA metabarcoding approach: From bacteria to marine mammals[J]. *Environment International*, 2020, 135:
- [6] 张宛宛. 基于 DNA 宏条形码技术的浮游植物群落多样性监测研究[D]. 南京大学, 2017.
- [7] 高旭. 太湖鱼类环境 DNA 宏条形码快速监测技术应用研究[D]. 南京大学, 2020.
- [8] 张丽娟, 徐杉, 赵峥, 等. 环境 DNA 宏条形码监测湖泊真核浮游植物的精准性[J]. *环境科学*, 2021, 42(02): 796-807.
- [9] COGHLAN S A, SHAFER A B A, FREELAND J R. Development of an environmental DNA metabarcoding assay for aquatic vascular plant communities[J]. *Environmental DNA*, 2021, 3(2): 372-387.
- [10] MÄCHLER E, LITTLE C J, WÜTHRICH R, 等. Assessing different components of diversity across a river network using eDNA[J]. *Environmental DNA*, 2019, 1(3): 290-301.
- [11] SHU L, LUDWIG A, PENG Z. Standards for Methods Utilizing Environmental DNA for Detection of Fish Species[J]. *Genes*, 2020, 11(3): 296.
- [12] SAKATA M K, WATANABE T, MAKI N, 等. Determining an effective sampling method for eDNA metabarcoding: a case study for fish biodiversity monitoring in a small, natural river[J]. *Limnology*, 2021, 22(2): 221-235.
- [13] CAPO E, SPONG G, KÖNIGSSON H, 等. Effects of filtration methods and water volume on the quantification of brown trout (*Salmo trutta*) and Arctic char (*Salvelinus alpinus*) eDNA concentrations via droplet digital PCR[J]. *Environmental DNA*, 2020, 2(2): 152-160.
- [14] BESSEY C, JARMAN S N, BERRY O, 等. Maximizing fish detection with eDNA metabarcoding[J]. *Environmental DNA*, 2020, 2(4): 493-504.
- [15] MACHER T-H, SCHÜTZ R, ARLE J, 等. Beyond fish eDNA metabarcoding: Field replicates disproportionately improve the detection of stream associated vertebrate species[J]. *bioRxiv*, 2021: 2021.03.26.437227.
- [16] CANTERA I, CILLEROS K, VALENTINI A, 等. Optimizing environmental DNA sampling effort for fish inventories in tropical streams and rivers[J]. *Scientific Reports*, 2019, 9(1): 3085.
- [17] LI J, LAWSON HANDLEY L-J, READ D S, 等. The effect of filtration method on the efficiency of environmental DNA capture and quantification via metabarcoding[J]. *Molecular Ecology Resources*, 2018, 18(5): 1102-1114.
- [18] 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.
- [19] 金珂, 张丽娟, 张伟, 等. 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.
- [20] 张宛宛, 谢玉为, 杨江华, 等. DNA 宏条形码(metabarcoding)技术在浮游植物群落监测研究中的应用[J]. 生态毒理学报, 2017, 12(01): 15-24.
- [21] JIANG Y, XIAO P, LIU Y, 等. Targeted deep sequencing reveals high diversity and variable dominance of bloom-forming cyanobacteria in eutrophic lakes[J]. Harmful Algae, 2017, 64: 42-50.
- [22] ZHAN A, BAILEY S A, HEATH D D, 等. Performance comparison of genetic markers for high-throughput sequencing-based biodiversity assessment in complex communities[J]. Molecular Ecology Resources, 2014, 14(5): 1049-1059.
- [23] LERAY M, YANG J Y, MEYER C P, 等. A new versatile primer set targeting a short fragment of the mitochondrial COI region for metabarcoding metazoan diversity: application for characterizing coral reef fish gut contents[J]. Frontiers in Zoology, 2013, 10(1): 34.
- [24] 高旭, 杨江华, 张效伟. 浮游动物 DNA 宏条形码标志基因比较研究[J]. 生态毒理学报, 2020, 15(02): 61-70.
- [25] ZHANG S, ZHAO J, YAO M. A comprehensive and comparative evaluation of primers for metabarcoding eDNA from fish[J]. Methods in Ecology and Evolution, 2020, 11(12): 1609-1625.
- [26] ZENG C, LIU Y, LIU Y, 等. An Integrated Approach for Assessing Aquatic Ecological Carrying Capacity: A Case Study of Wujin District in the Tai Lake Basin, China[J]. International Journal of Environmental Research and Public Health, 2011, 8(1): 264-280.