|  |  |
| --- | --- |
| ICS | 点击此处添加ICS号 |
| CCS | 点击此处添加CCS号 |

|  |
| --- |
| 11 |

北京市地方标准

DB 11/T XXXXX—XXXX

大型底栖无脊椎动物环境DNA监测技术规范

Technical specification for environmental DNA monitoring of benthic macroinvertebrates

(点击此处添加与国际标准一致性程度的标识)

XXXX - XX - XX发布

XXXX - XX - XX实施

北京市市场监督管理局  发布

目次

[前言 II](#_Toc148619840)

[1 范围 1](#_Toc148619841)

[2 规范性引用文件 1](#_Toc148619842)

[3 术语和定义 1](#_Toc148619843)

[4 环境DNA监测原则及流程 2](#_Toc148619844)

[5 试剂和材料 3](#_Toc148619845)

[6 仪器和设备 5](#_Toc148619846)

[7 样品 5](#_Toc148619847)

[8 分析步骤 7](#_Toc148619848)

[9 结果分析 8](#_Toc148619849)

[10 质量保证和质量控制 9](#_Toc148619850)

[11 注意事项 10](#_Toc148619851)

[12 废物处置 10](#_Toc148619852)

[附录A（资料性） 大型底栖无脊椎动物常用扩增引物 11](#_Toc148619853)

[附录B（资料性） 环境DNA采样记录表 12](#_Toc148619854)

[附录C（资料性） 沉积物样品采集和前处理 13](#_Toc148619855)

[附录D（资料性） 大型底栖无脊椎动物监测结果记录表 14](#_Toc148619856)

1. 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。

本文件由北京市生态环境局提出并归口。

本文件由北京市生态环境局组织实施。

本文件起草单位：北京市生态环境监测中心、中国科学院生态环境研究中心。

本文件主要起草人：常淼、杜泽瑞、沈秀娥、孙成华、陈圆圆、刘康、任帅、晁晶迪、马秋月、贺鑫、战爱斌、熊薇、陈义永。

大型底栖无脊椎动物环境DNA监测技术规范

* 1. 范围

本文件规定了大型底栖无脊椎动物环境DNA监测的样品采集、保存、运输、分析、质量保证与质量控制等技术要求。

本文件适用于北京市范围内河流、湖泊、水库等淡水水域类型中大型底栖无脊椎动物的监测。

* 1. 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 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

HJ 91.2 地表水环境质量监测技术规范

HJ 494 水质 采样技术指导

HJ 1295 水生态监测技术指南 河流水生生物 监测与评价（试行）

HJ 1296 水生态监测技术指南 湖泊和水库水生生物 监测与评价（试行）

DB11/T 1368 实验室危险废物污染防治技术规范

* 1. 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

大型底栖无脊椎动物 benthic macroinvertebrates

指生活史的全部或至少一个时期栖息于内陆淡水（包括流水和静水水体）的水底表面或底部基质中的大型无脊椎动物类群。主要由腔肠动物、扁形动物、线形动物、线虫动物、环节动物、软体动物和节肢动物及其幼虫等组成。

环境DNA environmental DNA (eDNA)

从生物生活环境中直接提取到的不同物种DNA的总和，包含生物脱落、释放的细胞或游离的DNA。

高通量测序 high-throughput sequencing

区别于传统双脱氧链末端终止法（Sanger）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。

DNA 条形码 DNA barcoding

DNA条形码是一段标准的、短小的、易于PCR扩增的、物种间有足够变异且物种内相对保守的、能够代表该物种的基因序列。本标准选用大型底栖无脊椎动物常用的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（COI基因）作为目标序列。

DNA 宏条形码技术 DNA metabarcoding

利用高通量测序技术获取环境样本（如水、沉积物等）中的COI基因序列，根据物种间特定DNA序列差异识别物种，获取物种组成和群落结构的技术。

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

一种用于放大扩增特定DNA片段的分子生物学技术，包括变性、退火、延伸等主要步骤。

索引 Index

通过PCR或文库准备过程中为每个样品添加一个短核苷酸碱基链，多个样品在一个高通量测序运行中同时检测。每个样本添加了样品特异性的短核苷酸链，在处理测序数据时可以用于区分不同样本，实现大量样本的高通量混合检测。

引物 Primer

PCR反应中用于与目的DNA片段5’端结合的寡核苷酸链。由于DNA聚合酶不能直接在模板链上合成DNA链，只能从引物的3’端开始延伸DNA链，因此DNA复制需要以引物作为起始。

操作分类单元 operational taxonomic unit；OTU

DNA宏条形码技术中，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。

相对丰度 relative abundance

样品中分配到某一分类单元的序列数占该样品序列总数的比例。

阳性对照样品 Positive control sample

已知物种组成的基因组DNA或人工合成含有目标序列的基因片段的混合物，与待测样本同步实验，用于判断结果是否可靠。

* 1. 环境DNA监测原则及流程
     1. 监测原则
        1. 科学性原则

大型底栖无脊椎动物环境DNA监测应客观、科学地反映监测对象的实际状况，符合生态学和环境科学的基本原理和要求。

* + - 1. 代表性原则

监测结果应能在物种及相对丰度等方面全面客观反映监测水域大型底栖无脊椎动物群落的整体状况。

* + - 1. 可操作性原则

在水生态环境监测业务部门现有技术水平和资源配置的条件下，以支撑环境管理为目标，优先采用 效率高、成本低、方法简、操作易的监测方法。

* + - 1. 可比性原则

大型底栖无脊椎动物群落及生境的时空变化具有长期性、复杂性，监测点位、方法、指标、时间和频次等一经确定，应尽量保持延续性，使监测结果可比。

* + - 1. 保护性原则

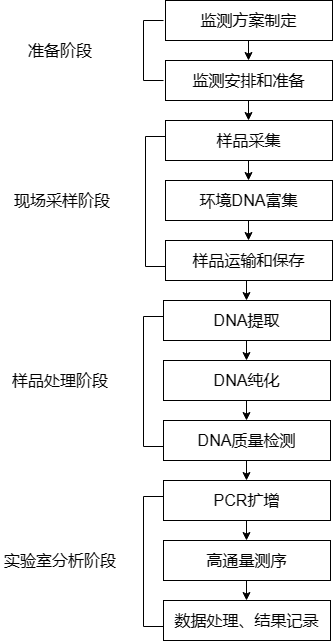
监测工作以保护和恢复为最终目标，因此在监测过程中应避免伤害野生生物、破坏生态环境 和超出客观需要的频繁采样。

* + - 1. 安全性原则

监测工作具有一定的风险，监测人员应接受相关专业培训，并做好安全防护措施。

* + 1. 监测流程

大型底栖无脊椎动物环境DNA监测流程见图1。



1. 监测流程图
   1. 试剂和材料
      1. 试剂基本要求

除非另有说明，分析时均使用符合国家标准的分析纯试剂。实验用水应满足GB/T 6682中一级水要求。

* + 1. 采样及前处理试剂和材料

含氯消毒剂：市售的含氯消毒剂有效氯浓度5 g/100 mL左右。使用时稀释至使用浓500 mg/L左右。

75%乙醇：可由无水乙醇和超纯水3:1配制。

采样瓶或采样袋：1 L螺口旋盖的高密度聚乙烯塑料瓶或市售的无菌采样袋。

无菌微孔滤膜：混合纤维素酯滤膜，直径47 mm，孔径0.45 µm。

离心管：1.5 mL、2 mL、5 mL和 50 mL，无DNA和生物残留。

* + 1. 环境DNA提取试剂

推荐采用市售商品化的DNA提取纯化试剂盒。如使用CTAB法提取DNA所需试剂如下：

* + - 1. 乙二胺四乙酸二钠（Na2EDTA，C10H14N2O8Na2·2H2O）。
      2. 氢氧化钠（NaOH）。
      3. EDTA溶液：ρ（EDTA）=0.02 mol/L：称取5.8448 g EDTA溶于适量超纯水中，NaOH固体调节pH至8.0，定容至1000 mL，121℃灭菌18 min，冷却后常温保存。
      4. 三羟甲基氨基甲烷（Tris，C4H11NO3）。
      5. 浓盐酸：ρ（HCl）=1.19 g/mL。
      6. Tris-HCl溶液：ρ（Tris-HCl）=0.1 mol/L：称取15.76 g Tris-HCl溶于适量超纯水中，浓盐酸调 pH至8.0，定容至1000 mL，121℃灭菌18 min，冷却后常温保存。
      7. 十六烷基三甲基溴化铵（CTAB）。
      8. 氯化钠（NaCl）。
      9. CTAB 提取液：称取4 g CTAB 和 16.38 g NaCl，分别溶于适量超纯水中，加入0.02 mol/L EDTA 溶液（5.3 c）8 mL和0.1 mol/L Tris-HCl溶液（5.3 f） 20 mL，定容至200 mL，121℃灭菌 18 min，冷却后常温保存。
      10. Tris饱和酚（pH=8.0）。
      11. 三氯甲烷（CHCl3）。
      12. 异戊醇（C5H12O）。
      13. 酚氯仿：Tris 饱和酚、氯仿和异戊醇按25:24:1 体积比配制。
      14. 乙酸铵（CH3COONH4）。
      15. 乙酸铵溶液，ρ（CH3COONH4）=7.5 mol/L：称取5.78 g乙酸铵溶于10 mL超纯水中。
      16. 乙酸钠（CH3COONa·3H2O）。
      17. 乙酸钠溶液，ρ（CH3COONa）=3 mol/L：称取102.06 g乙酸钠溶于适量超纯水中，冰醋酸调节pH 至5.2，定容至250 mL，121 ℃灭菌18 min；
      18. 无水乙醇（C2H6O）。
      19. 冰乙酸（C2H4O2）。
      20. 蛋白酶K：400 U/mL。
      21. 超纯水：经121 ℃，0.1 MPa灭菌30 min，无细菌无DNA酶。
    1. PCR 扩增试剂和材料

大型底栖无脊椎动物PCR通用引物：大型底栖无脊椎动物环境DNA引物可选择一对或多对，推荐的引物参照表A.1。

PCR扩增试剂：推荐市售商品化的PCR扩增试剂套装，包含Taq DNA聚合酶、dNTPs、Mg2+和PCR缓冲液等。

PCR管、96 孔板等PCR 反应容器：无DNA和生物残留。

* + 1. DNA 凝胶电泳试剂和材料
       1. 电泳级琼脂糖

用于配制1%琼脂糖：加热至恰好全部熔化，冷却至合适温度倒入制胶槽中，插入制胶梳，冷却凝固拔出制胶梳后检查上样孔是否完整无损。

* + - 1. 电泳缓冲液

推荐使用TAE缓冲液（50×），取乙二胺四乙酸二钠 （5.3 a）37.2 g，三羟甲基氨基甲烷（5.3 d）242 g，用约 800 mL 超纯水（5.3 u）溶解，加入冰乙酸（5.3 s）57.1 mL，搅拌均匀后，用氢氧化钠（5.3 b）调pH至8.3，定容至1 L，灭菌后常温备用。

* + - 1. DNA分子量标准（含上样缓冲液）

标记范围100 bp～2000 bp，标记精度通常为50 bp 、100 bp、1 kb等。

* + - 1. DNA染料

推荐采用市售的商品SYBR型或SYBR safe型等无毒性或者低毒性DNA染料，按照说明书操作，在凝胶染色和成像观察时做好防护措施。

* + - 1. PCR产物纯化试剂

推荐使用市售的商品化PCR产物纯化试剂盒。

* 1. 仪器和设备

采水器：1 L、2 L、3 L等规格，不锈钢或有机玻璃材质。

过滤装置：配有砂芯滤器和真空泵，抽滤压力不应超过-50 kPa。

恒温烘箱：室温～250℃可调。

水浴锅：室温～100℃可调。

高压蒸汽灭菌器：可达到121 ℃，0.1 MPa灭菌条件。

超净工作台：具有初效、高效过滤器和紫外灯。

PCR仪：PCR反应程序可编辑。

水平电泳仪：工作电压100 V～120 V可调。

离心机：离心力可达12000 r/min，温度可控制在4 ℃。

DNA浓度分光光度计：最小测量体积达到1 μL，波长范围包括 230 nm、260 nm 和 280 nm。

凝胶成像仪：302 nm 光源，具备成像拍照功能。

高通量测序仪：测序读长不低于250 bp，一次测序反应能产出不低于100 Mb的测序数据。

一般实验室常用仪器和设备。

* 1. 样品
     1. 监测方案制定及准备
        1. 监测点位布设

点位布设原则按照HJ 91.2的规定，遵循连续性、一致性、代表性和可行性原则。综合考虑大型底栖无脊椎动物生活史和监测区域水体类型、生境、水文特征等因素的影响。根据研究目标和污染分布的空间异质性等因素可适当增加采样点位。

河流点位布设方法按照HJ 1295的相关规定。根据河流的宽度和深度设置采样点位，河流宽度<50 m时，在两岸近岸水域布设2个采样点，河流宽度>50 m时在两岸近岸水域和中间共布设3个采样点。

湖泊、水库点位布设方法按照HJ 1296。根据区域内湖库形态、水文状况、水环境质量、水生生物分布等因素的差异，将湖库分为不同的小区域，如湖库滨岸带、沿岸带、湖库心区、主要河流出入口等，在每个小区域内布设监测点位。根据监测目标，确定每个区域的监测点位数量。主要河流入口应设置采样点。库区每15 km2～20 km2应设置不少于1个采样点。将湖库群作为整体开展监测时，可适当调整监测点位数量。

* + - 1. 监测频次及时间

监测频次及时间可根据监测目标而定。根据大型底栖无脊椎动物的生命周期、生活史特征（如羽化期或繁殖期）、季节变化特征等因素确定监测时间。

* + - 1. 监测安排和准备

根据监测点位及所在水体的实际情况制定具有较强可操作性的监测工作计划，明确人员分工、监测任务、时间进度及后勤保障等，开展监测前的技术及安全培训。

所有采样用具、实验室分析仪器和设备、材料等应规范灭菌和清洗，避免样点间的交叉污染。需要重复使用的装置（如采样器具、过滤装置）使用前后应使用含氯消毒剂（5.1.1）对过滤器接触表面消毒不少于1分种，然后用超纯水（5.3 u）反复冲洗3次。其他材料（如移液枪头、离心管、PCR管等）试验前要按无菌操作要求包扎，121 ℃，灭菌20 min备用。超净工作台使用前后应紫外线消毒30 min。移液器等用75%乙醇（5.1.2）擦拭消毒或在超净工作台（6.6）内紫外线消毒30 min。

* + 1. 样品采集
       1. 采样位置

样品采集时应拍摄并详细记录现场情况，采样点位周边是否有污水排口、天气、采样时间、样品运输和保存条件等信息，采样记录表参见表B.1。不能抵达指定采样位置时，应记录现场情况和调整后的实际采样位置。

* + - 1. 采样方式和技术要求

按照HJ 91.2，河流、湖库岸边采样：河流和湖库岸边点位用采水器（6.1）在水面下0.5 m范围内采集水样。水深不到 0.5 m时，在1/2水深处采样。河流、湖库离岸分层采样：按照HJ 91.2设置监测垂线上采样点位和数量。深度≤5 m时，在水面下0.5 m至距底0.5 m范围内设置1个采样点位。深度5 m～10 m时，在水面下0.5 m和距底0.5 m设置2个采样点位。深度＞10 m时，在水面下0.5 m、1/2水深处和距底0.5 m设置3个采样点位。可根据监测目标，充分考虑大型底栖无脊椎动物特定类群的生活史调整分层点位和分层数量。

* + - 1. 采样方法

大型底栖无脊椎动物环境DNA样品与生境、水质或形态学鉴定样品同步采样时，一般应先采集环境DNA样品。在同一监测断面分层采样时，应自上而下进行，避免不同层次水体混扰。每个采样点平行采集3次水样，每次采集1 L。也可根据现场情况调整采样体积（0.5 L～2 L）。同时携带1 L超纯水（5.3 u）作为采样阴性对照，用于检验采样过程中引入的污染情况。

条件具备时，在同一点位也可补充采集沉积物样品，沉积物样品采样和前处理方式见附录C，沉积物监测结果可与水样合并使用。

* + 1. 环境DNA富集

采水器采集的样品，装入采样瓶或采样袋（5.1.3）中。推荐现场过滤至滤膜（5.1.4）上，过滤体积推荐1 L，也可根据情况调整过滤体积（0.5 L～2 L）。高泥沙水样，应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滤膜，作为子样本。

* + 1. 样品保存

如果采取现场过滤，过滤后的滤膜放入无菌离心管（5.1.5）中，保存在样品低温保存箱中4 ℃及以下冷藏运输，返回实验室后-20 ℃保存。

如未能现场过滤，需要采样瓶装满水后盖上瓶盖密封，4 ℃冷藏运输，并在6 h内返回实验室，24h内完成过滤，滤膜-20 ℃保存。水样滤膜应妥善保存，在条件允许的情况下应保留备份样品并记录保存信息。

* 1. 分析步骤
     1. DNA提取

使用市售的DNA提取试剂盒或CTAB法提取环境样品中的DNA。DNA提取试剂盒提取的具体操作步骤参照试剂盒说明书。CTAB法提取步骤如下：

将水样滤膜剪碎为1 mm2～3 mm2并放入离心管（5.1.5）中，加入 750 μL CTAB提取液（5.3 i）和 20 μL 蛋白酶 K（5.3 t），涡旋震荡混匀，在56 ℃水浴锅（6.4）中水浴裂解3 h。裂解完毕后移出上清液至离心管（5.1.5），加入等体积 Tris 饱和酚（5.3 j），混匀，利用离心机（6.9），13000 rpm ，温度4 ℃，离心10 min。离心后转移上清液至新的离心管（5.1.5），加入等体积酚氯仿（5.3 m），混匀，利用离心机（6.9），13000 rpm ，温度4 ℃，离心10 min。离心后转移上清液至新的离心管（5.1.5），加入50 μL 7.5 mol/L 的乙酸铵溶液（5.3 o），然后加入上一步离心后上清液2倍体积的-20 ℃预冷处理的无水乙醇（5.3 r），混匀，-20 ℃放置30 min后，利用离心机（6.9），13000 rpm ，温度4℃，离心10 min。，弃上清液，保留离心管底部沉淀物。向离心管内加入1 mL 75%乙醇（5.1.2），利用离心机（6.9），13000 rpm ，温度4℃，离心 5 min，弃上清液。重复以上操作一次。75%乙醇洗脱两次后的沉淀物，室温晾干，加入50 μL～100 μL 超纯水（5.3 u）溶解。-20 ℃条件下保存，待测。

* + 1. DNA纯化

使用市售的DNA纯化试剂盒或乙酸钠乙醇沉淀法纯化环境样品中的DNA。市售的DNA纯化试剂盒的纯化方法主要有离心柱法和磁珠法，离心柱法是通过离心柱上的吸附膜，特异性吸附DNA。磁珠法是基于表面修饰后磁性颗粒与DNA的亲和性结合DNA分子。DNA纯化试剂盒纯化的具体操作步骤参照试剂盒说明书。乙酸钠乙醇沉淀法纯化DNA步骤如下：

根据提取得到的DNA体积，加入1/10体积的3 mol/L 乙酸钠溶液（5.3 q），混匀,然后加入2.5倍体积的无水乙醇（5.3 r），混匀，利用离心机（6.9），4000 rpm ，温度4 ℃，离心 30 min，弃上清液，保留离心管底部沉淀物。向离心管内中加入100 μL 70%乙醇，利用离心机（6.9），3000 rpm ，温度4 ℃，离心15 min，弃上清液。重复以上操作一次。室温晾干，加入50 μL～100 μL 超纯水（5.3 u）溶解。

* + 1. DNA质量检测和保存

样本DNA浓度建议不低于1 ng/μL，DNA在260 nm和280 nm波长处的吸光度值比值（OD260 nm/OD280 nm）应在1.7～2.0范围内。如DNA质量不合格，可再次对DNA进行纯化后复检。DNA在-20 ℃及以下保存，避免反复冻融。

* + 1. PCR扩增
       1. PCR反应体系和反应条件

选择PCR通用引物扩增目标DNA条形码序列，可在引物序列前添加Index，用于扩增大批量样品。

PCR扩增反应体系：总体积一般为25 μL的整数倍，一般包括扩增缓冲液、dNTPs、引物、Taq DNA聚合酶酶、模板DNA，各组分浓度根据Taq DNA聚合酶和实验情况调整。剩余体积用灭菌双蒸水补齐。

PCR反应程序设置：95 ℃预变性5 min；95 ℃变性30 s，53 ℃退火30 s，72 ℃延伸45 s，此过程35个循环；最后72 ℃下延伸10 min。4 ℃保存扩增产物。每个样品设置3个重复，以削弱偏好性扩增的影响。

应设置PCR扩增的阴性和阳性对照试验，分别以超纯水和含有目的片段的DNA为DNA模板进行扩增。

* + - 1. PCR反应产物的凝胶电泳检测

PCR扩增结束后，用1%～2%的琼脂糖凝胶电泳检测扩增是否成功。无非特异性扩增条带则判定为合格。如3个PCR重复样品中有1个重复样品扩增结果不合格，该样品应重新进行PCR扩增。扩增成功的PCR产物使用PCR产物纯化试剂盒纯化目的片段，用DNA浓度分光光度计检测纯化后的PCR产物质量和浓度。PCR产物在-20 ℃或以下温度条件下保存。将3个PCR重复产物混合测序，以减少PCR扩增过程产生的扩增偏好性。

* + 1. 高通量测序

按照GB/T 30989和GB/T 35537的规定对扩增产物进行测序。每个样本的预期序列数应不低于10000条。

* 1. 结果分析
     1. 生物信息学分析
        1. 序列处理

首先根据测序引物前添加的Index将序列分配到不同的样品中。通过检查Index序列和特异性引物序列的匹配度筛除非特异性扩增序列；去除测序序列中含有模糊碱基、单碱基高重复区或长度过短的序列、嵌合体序列等。对碱基序列进行质量过滤（质量值一般>Q20），再进行序列长度过滤，去除序列长度过短的序列，再按照测序预期长度的70%进行序列修剪。

* + - 1. OTUs聚类

将相似性高于或等于阈值（相似性阈值一般为0.97）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。过滤低丰度（如总序列数为1～10）的分子分类单元（可能为假阳性、污染序列或未去除的嵌合体）。

* + - 1. 物种注释

将每个OTU的代表性序列与DNA条形码数据库比对分析，获得物种注释信息。根据覆盖度（coverage）、E值（E value）和序列比对一致度（Per. Ident）排序综合考虑确定注释结果，可根据历史监测数据设置阈值范围。物种注释方法和物种鉴定阈值的设定应综合考虑选用的DNA条形码片段、参考数据库的完整性及数据用途。

注释得到的物种信息应与历史监测结果和形态学鉴定结果进行人工校验，筛选保留大型底栖无脊椎动物信息，剔除非大型底栖无脊椎动物的物种信息。如检出历史上本地无分布的物种等假阳性物种信息，应保留假阳性结果并记录。根据监测目标，可邀请专家对注释结果进行确认。

* + 1. 结果记录

同一批实验生物信息学分析流程及关键参数应详细记录并保持一致。某个监测点位的大型底栖无脊椎动物监测结果记录表由OTU编号、序列、序列数物种注释信息等组成，见附录D表D.1。

* 1. 质量保证和质量控制
     1. 基本要求

采样和样品运输保存期间、实验室分析阶段应严格按要求操作，避免外源污染和样品间的交叉污染，保证样品不变质。

DNA提取和纯化，PCR扩增等实验所用试剂应严格低温保存，确保试剂质量稳定。

* + 1. 平行样品

每个采样点平行采集3次样品，平行样品的相对丰度取平均值作为该采样点的相对丰度结果报出。

每个样品应设置3个PCR重复样品，3个PCR重复样品中有1个重复样品扩增结果不合格，该样品应重新进行PCR扩增。

* + 1. 阴性对照和阳性对照

每批次样品应设置1个采样阴性对照，每批次样品应设置1个实验室阴性对照，每批次PCR扩增实验应设置阴性对照，阴性对照样品为超纯水（5.3 u）。

每批次PCR扩增实验应设置阳性对照。PCR扩增阳性对照样品应为不少于5个特定物种的基因组DNA的等量混合物，浓度一般为1 ng/μL。

阴性对照应无条带，阳性对照应出现条带。否则本批次样品应重新检测。

* + - 1. 假阴性率

使用阳性对照样品控制假阴性率。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。

()

式中：

*FN*——假阴性率，%；

*Q1*——标准样品中未被测出的物种数目；

*Q*——标准样品的实际物种数目。

* + - 1. 假阳性率

使用阳性对照样品控制假阳性率。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。

()

式中：

*FP*——假阳性率，%；

*Q2*——未在标准品物种清单的物种数目；

*Q*——标准样品的实际物种数目。

* 1. 注意事项

DNA提取和纯化，PCR反应产物的凝胶电泳检测等过程中涉及到的试剂具有毒性，实验时应带好手套、口罩做好防护措施。DNA提取和纯化所有步骤均应在通风橱内操作。电泳实验室内应划分清洁区与污染区。若沾染有毒分子生物学试剂后应使用大量清水清洗。

* 1. 废物处置

实验中产生的有害废物应集中收集，按照DB11/T 1368 中的相关规定进行处理。

2. （资料性）  
   大型底栖无脊椎动物常用扩增引物

大型底栖无脊椎动物常用扩增引物见表A.1。

* 1. 大型底栖无脊椎动物常用扩增引物

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 基因名称 | 引物名称 | 序列（5'-3'） |
| COI-1 | mCOIintF | GGWACWGGWTGAACWGTWTAYCCYCC |
| jgHCO2198 | TANACYTCNGGRTGNCCRAARAAYCA |
| COI-2 | mLCOIintF | GGWACWGGWTGAACWGTWTAYCCYCC |
| jgHCO2198 | TAIACYTCIGGRTGICCRAARAAYCA |
| COI-3 | BF2 | GCHCCHGAYATRGCHTTYCC |
| BR2 | TCDGGRTGNCCRAARAAYCA |
| 16S rRNA | Ins\_F | ACGCTGTTATCCCTAARGTA |
| Ins\_R: | RGACGAGAAGACCCTATARA |

1. （资料性）  
   环境DNA采样记录表

环境DNA采样记录表见表B.1。

* 1. 环境DNA采样记录表

1. 监测单位：                             记录表编号：               共   页  第   页

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 位点名称： | | | | | 位点编号： |
| 采样位点及周边生境描述（照片应作为附件保存至少包含上下游和采样点位）: | | | | | |
| 经度:     度    分    秒 | 纬度:     度    分    秒 | | 海拔（m）： | | |
| **水体类型：**□河流  □湖泊 □水库 | | **点位类型：**□岸边  □离岸 | | | |
| 水深（m） | 气温 | | 水温 | | |
| pH | 透明度 | | 溶氧量 | | |
| 流速（m/s） | 电导率 | |  | | |
| **环境DNA采集和保存** | | | | | |
| 采样介质 | □ 水样  □沉积物 | | | | |
| 水样 | 采样体积/样品（mL）： | | 过滤体积/样品（mL）： | | |
| 点位数量/样品数量 | | 样品编号： | | |
| 过滤方法：□ 现场过滤 □实验室真空泵过滤 | | | | |
| 滤膜保存方法：        ℃冷藏 □避光 □其他： | | | | |
| 沉积物 | 采样工具：□抓斗 □抓泥器 □其他： | | | | |
| 样品数/位点： | | 样品编号： | | |
| 沉积物保存方法：□       ℃冷藏 □避光 □其他： | | | | |
| 采样人： | 校核人： | | | 采集日期：   年   月   日 | |
| 备注： | | | | | |

1. （资料性）  
   沉积物样品采集和前处理
   1. 样品采集

按照HJ 494的规定采集表层沉积物（0～5 cm），应剔除砾石、木屑、杂草、贝壳及其它大体积生物 残体，收集至无菌管中（一般为50 mL），野外干冰或-20℃保存，实验室-20℃保存。 同一采样点沉积物采集要尽量涵盖各类小生境。

* 1. 样品前处理

经均质器均质后冷冻干燥，用网筛过滤杂质并混匀后取约0.5g样品提取DNA，后续分析步骤与水样相同，见正文8分析步骤。

1. （资料性）  
   大型底栖无脊椎动物监测结果记录表

大型底栖无脊椎动物监测结果记录表见表D.1。

表D.1 大型底栖无脊椎动物监测结果记录表

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| OTU编号 | 序列 | 序列条数 | 分类信息 | | | | | | | 相似度(%) | 覆盖度(%) |
| 界 | 门 | 纲 | 目 | 科 | 属 | 种 |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |

参考文献

[1] GB/T 35890-2018 高通量测序数据序列格式规范

[2] GB/T 40226-2021 环境微生物宏基因组检测 高通量测序法

[3] HJ 710.8-2014 生物多样性观测技术导则 淡水底栖大型无脊椎动物

