

DB11

北京市地方标准

DB11/T 2358—2024

淡水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
freshwater benthic macroinvertebrates

2024 - 12 - 25 发布

2025 - 04 - 01 实施

北京市市场监督管理局 发布

目 次

前 言	11
1 范围.....	1
2 规范性引用文件.....	1
3 术语和定义.....	1
4 环境 DNA 监测原则及流程.....	2
5 试剂.....	3
6 仪器设备和材料.....	5
7 样品.....	5
8 分析步骤.....	6
9 结果分析.....	7
10 质量保证和质量控制.....	8
11 废物处置.....	9
附 录 A （资料性） 淡水大型底栖无脊椎动物常用扩增引物	10
附 录 B （资料性） 环境 DNA 采样记录表	11
附 录 C （资料性） 沉积物样品采集和前处理	12
附 录 D （资料性） 淡水大型底栖无脊椎动物环境 DNA 监测结果记录表	13
参考文献.....	14

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、沈秀娥、孙成华、杜泽瑞、陈圆圆、战爱斌、熊薇、陈义永、马秋月、贺鑫、荆红卫、陶蕾、刘康、任帅、晁晶迪。

淡水大型底栖无脊椎动物环境 DNA 监测技术规范

1 范围

本文件规定了淡水大型底栖无脊椎动物环境DNA监测的监测原则及流程、试剂、仪器设备和材料、监测点位布设、监测频次和时间、样品采集、实验分析、结果分析、质量保证和质量控制等技术要求。

本文件适用于河流、湖泊、水库等淡水水体中大型底栖无脊椎动物环境DNA的监测。

2 规范性引用文件

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

GB 19489 实验室 生物安全通用要求

GB/T 30989 高通量基因测序技术规程

GB/T 40226 环境微生物宏基因组检测 高通量测序法

HJ 91.2 地表水环境质量监测技术规范

HJ 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 2023 鱼类贝类环境DNA识别技术规范

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

淡水大型底栖无脊椎动物 freshwater benthic macroinvertebrates

生活史的全部或至少一个时期栖息于内陆淡水水体的水底中且个体不能通过500 μm孔径网筛的无脊椎动物。主要包括刺胞动物门（Cnidaria）或称腔肠动物门（Coelenterata）、扁形动物门（Platyhelminthes）、线形动物门（Nematomorpha）、线虫动物门（Nematoda）、环节动物门（Annelida）、软体动物门（Mollusca）、节肢动物门（Arthropoda）的动物。

[来源：HJ 710.8—2014，3.1、3.2，有修改]

3.2

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。

[来源：DB11/T 2023—2022，3.3，有修改]

3.3

高通量测序 high-throughput sequencing (HTS)

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。

[来源：GB/T 30989—2014，3.19，有修改]

3.4

DNA 条形码 DNA barcode

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。本文件选用淡水大型底栖无脊椎动物常用的后生动物线粒体基因组上的DNA序列作为目标序列。

3.5

eDNA 宏条形码技术 eDNA metabarcoding technology

利用高通量测序技术获取环境样品（如水、沉积物等）中的目标基因序列，根据物种间特定DNA序列差异识别物种，获取物种组成的技术。

3.6

序列相似值 sequence similarity

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

[来源：SN/T 4278—2015，3.8，有修改]

3.7

序列相似度阈值 cutoff value of sequence similarity

判定两条DNA序列是否为同一操作分类单元的最小序列相似值。

3.8

操作分类单元 operational taxonomic unit (OTU)

测序数据按照一定的序列相似度阈值进行聚类，获得的用于表征物种的分子水平的分类单元。

3.9

相对序列丰度 relative sequence abundance

样品中分配到某一分类阶元的序列数占该样品序列总数的比例。

[来源：GB/T 40226—2021，3.2，有修改]

3.10

阴性对照 negative control

不含待测物种或者所有物种DNA的样品（如灭菌超纯水），与待测样品同步实验，用于判断待测样品是否被污染。

[来源：SN/T 4278—2015，3.7，有修改]

3.11

阳性对照 positive control

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

[来源：SN/T 4278—2015，3.6，有修改]

4 环境 DNA 监测原则及流程

4.1 监测原则

4.1.1 科学性原则

淡水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，符合生物学、生态学和环境科学的基本原理和要求。

4.1.2 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淡水大型底栖无脊椎动物群落的整体状况。

4.1.3 可操作性原则

在水生态环境监测行业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。

4.1.4 可比性原则

淡水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。

4.1.5 保护性原则

监测工作以保护和恢复为最终目标，在监测过程中应尽量避免伤害野生动植物、破坏生态环境和超出客观需要的频繁采样。

4.1.6 安全性原则

监测工作具有一定的安全风险，监测人员应接受相关专业培训，并做好安全防护措施。

4.2 监测流程

淡水大型底栖无脊椎动物环境DNA监测流程见图1。

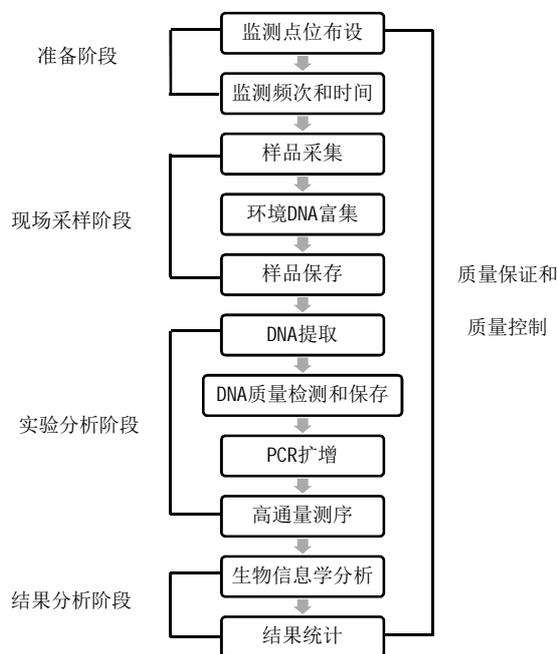


图1 监测流程图

5 试剂

5.1 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。实验用水为灭菌超纯水。

5.2 采样及前处理试剂

市售含氯消毒剂，使用时按说明书稀释，使用浓度约为500 mg/L。

5.3 环境 DNA 提取试剂

推荐使用市售的DNA提取试剂或试剂盒。如使用十六烷基三甲基溴化铵（CTAB）法提取DNA所需试剂如下：

- a) 灭菌超纯水：超纯水经 121 °C，0.1 MPa 灭菌 30 min，无细菌无核酸酶；
- b) 乙二胺四乙酸（EDTA， $C_{10}H_{16}N_2O_8$ ）；
- c) 氢氧化钠（NaOH）；
- d) 氢氧化钠溶液： $c(\text{NaOH}) = 1 \text{ mol/L}$ ；
- e) 乙二胺四乙酸溶液： $c(\text{EDTA}) = 0.02 \text{ mol/L}$ ， $\text{pH} = 8.0$ ；
- f) 三羟甲基氨基甲烷盐酸盐（Tris-HCl， $C_4H_{12}ClNO_3$ ）；
- g) 盐酸： $\rho(\text{HCl}) = 1.19 \text{ g/mL}$ ；
- h) Tris-HCl 溶液： $c(\text{Tris-HCl}) = 0.1 \text{ mol/L}$ ，称取 15.76 g 三羟甲基氨基甲烷盐酸盐溶于适量灭菌超纯水中，盐酸调节 pH 至 8.0，定容至 1000 mL，灭菌后备用；
- i) 十六烷基三甲基溴化铵（CTAB， $C_{19}H_{42}BrN$ ）；
- j) 氯化钠（NaCl）；
- k) CTAB 提取液：称取 4 g 十六烷基三甲基溴化铵和 16.38 g 氯化钠，分别溶于适量灭菌超纯水中，加入乙二胺四乙酸溶液 8 mL 和 Tris-HCl 溶液 20 mL，pH 约 8.0，定容至 200 mL，灭菌后备用；
- l) 酚氯仿异戊醇：市售，Tris 饱和酚、三氯甲烷和异戊醇体积比 25:24:1， $\text{pH} = 8.0$ ；
- m) 乙酸铵（ $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ ）；
- n) 乙酸铵溶液： $c(\text{CH}_3\text{COONH}_4) = 7.5 \text{ mol/L}$ ，称取 57.81 g 乙酸铵溶于适量灭菌超纯水中，定容至 100 mL；
- o) 无水乙醇（ $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$ ）；
- p) 75%乙醇：无水乙醇和灭菌超纯水体积比 3:1 配制；
- q) 蛋白酶 K：市售，酶活力 $\geq 45 \text{ U/mg}$ ，浓度为 20 mg/ml；
- r) 阳性对照样品：已知物种组成的基因组 DNA 或人工合成含有目标序列的 DNA 片段的混合物，市售。

5.4 PCR 扩增试剂

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

5.4.2 PCR 扩增试剂：推荐市售的 PCR 扩增试剂套装，包含 Taq DNA 聚合酶、dNTPs、 Mg^{2+} 和 PCR 缓冲液等。

5.5 DNA 凝胶电泳试剂

5.5.1 电泳缓冲液：使用 TAE 缓冲液（1×）。取 20 mL 市售 TAE 缓冲液（50×），灭菌超纯水[见 5.3 a)]定容至 1 L， $\text{pH} = 7.8 \sim 8.8$ 。

5.5.2 琼脂糖凝胶：使用 1%~2%琼脂糖凝胶。取市售的琼脂糖，加入电泳缓冲液（5.5.1）配制。

5.5.3 DNA 分子量标准（含上样缓冲液）：市售的 DNA 分子量标准范围 100 bp~2000 bp，包含若干条单一的 DNA 条带，如 100 bp，250 bp，500 bp，750 bp，1000 bp，2000 bp。

5.5.4 DNA 染料：推荐使用市售无毒性或低毒性 DNA 染料。

5.5.5 PCR 产物纯化试剂：推荐使用市售 PCR 产物纯化试剂盒。

6 仪器设备和材料

6.1 采水器：有机玻璃材质，1 L、2 L、3 L 等规格。

6.2 过滤装置：配有砂芯滤器和真空泵。

6.3 烘箱：室温~250 °C 可调。

6.4 水浴锅：室温~100 °C 可调。

6.5 高压蒸汽灭菌器：可达到 121 °C，0.1 MPa 灭菌条件。

6.6 超净工作台。

6.7 PCR 仪：PCR 反应程序可编辑。

6.8 水平电泳仪：电场强度为 5 V/cm~10 V/cm。

6.9 离心机：转速可达 13000 r/min，温度可控制在 4 °C。

6.10 DNA 浓度分光光度计：最小测量体积 1 μL，波长范围应覆盖 230 nm~280 nm。

6.11 凝胶成像仪：具备 DNA 凝胶成像拍照功能。

6.12 高通量测序仪：测序读长满足 PCR 产物测序长度的要求。

6.13 采样瓶或采样袋：市售的 1 L 螺口旋盖的无菌高密度聚乙烯塑料瓶或无菌采样袋。

6.14 无菌微孔滤膜：孔径 0.45 μm，根据水体浊度也可选用孔径 0.22 μm~1.2 μm 的滤膜。

6.15 一次性离心管：1.5 mL、2 mL、5 mL 和 50 mL，无 DNA 和生物残留。

6.16 一次性冻存管：1.5 mL、2 mL、5 mL 和 10 mL，无 DNA 和生物残留。

6.17 一般实验室常用仪器设备和材料。如 PCR 管、96 孔板等 PCR 反应容器：无 DNA 和生物残留。

7 样品

7.1 监测点位布设

按照 HJ 1295、HJ 1296 的规定。

7.2 监测频次和时间

按照 HJ 1295、HJ 1296 的规定。

7.3 样品采集

7.3.1 采样位置

样品采集时应拍摄并详细记录现场情况，记录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，采样记录表见表 B.1。若在规定的监测时间段内河流、湖库水文气象条件（如降雨集中期、冰冻期）不适宜采样，可根据实际情况调整采样时间。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。

7.3.2 采样方式和技术要求

河流、湖库岸边采样：按照HJ 91.2，河流和湖库岸边点位用采水器在水面下0.5 m范围内采集水样。水深（ h ）， $h < 0.5$ m时，在1/2水深处采样。

河流、湖库离岸采样：在水底上0.5 m设置采样点位。

7.3.3 采样方法

淡水大型底栖无脊椎动物环境DNA样品与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。采样体积为1 L，也可根据现场情况调整采样体积（1 L~2 L）。

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。

7.4 环境 DNA 富集

水样宜现场过滤，过滤体积推荐1 L，也可根据水体浊度调整过滤体积（1 L~2 L）。如水样混浊且含有易堵塞滤膜的悬浮物，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，作为子样品。

7.5 样品保存

7.5.1 如现场过滤，过滤后的滤膜放入无菌离心管或冻存管中，保存在样品低温保存箱中4 °C及以下冷藏运输，当天返回实验室后-20 °C~-80 °C保存，应尽快完成DNA的提取。

7.5.2 如未能现场过滤，需要采样瓶装满水后盖上瓶盖密封，4 °C冷藏运输，并在6 h内返回实验室，24 h内完成过滤，滤膜-20 °C~-80 °C保存，应尽快完成DNA的提取。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。

8 分析步骤

8.1 DNA 提取

使用市售的DNA提取试剂盒或CTAB法提取水样中的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：

- a) 将水样滤膜尽量剪碎后放入离心管中，加入 500 μ L CTAB 提取液[见 5.3 k)]和 5 μ L 蛋白酶 K[见 5.3 q)]，涡旋震荡混匀后在水浴锅中 56 °C 水浴裂解 3 h；
- b) 移取全部溶液至离心管，加入 550 μ L 酚氯仿异戊醇[见 5.3 l)]混匀后，13000 r/min，4 °C 离心 10 min；
- c) 取上清液移至离心管，加入 550 μ L 酚氯仿异戊醇[见 5.3 l)]混匀后，13000 r/min，4 °C 离心 10 min；
- d) 取上清液移至离心管，加入 1 ml 的-20 °C 预冷处理的无水乙醇[见 5.3 o)]、50 μ L 乙酸铵溶液[见 5.3 n)]混匀后，-20 °C 静置 30 min，13000 r/min，4 °C 离心 10 min。弃上清液，保留离心管底部沉淀物；
- e) 向离心管内加入 1 mL 75%乙醇[见 5.3 p)]，13000 r/min，4 °C 离心 10 min，弃上清液，保留离心管底部沉淀物。重复操作一次；
- f) 沉淀物用 75%乙醇洗脱两次，25 °C 烘干 1 h~2 h，加入 50 μ L~100 μ L 灭菌超纯水[见 5.3 a)]溶解。待测。

8.2 DNA 质量检测 and 保存

用DNA浓度分光光度计检测提取后的DNA质量和浓度，DNA浓度宜高于1 ng/μL，DNA在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。合格的DNA样品分装为两份，一份保存在-20℃用于后续实验，另一份在-80℃长期保存，避免反复冻融。

8.3 PCR 扩增

8.3.1 PCR 反应体系和反应条件

8.3.1.1 选择已添加索引的PCR引物扩增目标DNA条形码序列。

8.3.1.2 每个样品应设置3个PCR重复样品。

8.3.1.3 PCR扩增反应体系：总体积一般为25 μL，一般包括扩增缓冲液、dNTPs、引物、*Taq* DNA聚合酶、模板DNA。各组分浓度宜根据目标基因、引物和实验情况调整。剩余体积用灭菌超纯水补齐。

8.3.1.4 PCR反应程序设置：95℃预变性5 min；95℃变性30 s；退火温度范围见表A.1，退火时间范围为30 s~45 s，宜根据预实验结果确定最佳退火温度；72℃延伸45 s；变性、退火、延伸过程共35个循环，最后72℃延伸10 min。

8.3.2 PCR 反应产物的凝胶电泳检测

使用1%~2%的琼脂糖凝胶电泳检测扩增的有效性。阴性对照应无目的条带；阳性对照和受试样品应在目标长度位置出现条带；若3个PCR重复样品中出现2个PCR重复样品扩增失败，该样品应重新进行PCR扩增。

8.3.3 PCR 产物纯化和保存

将3个PCR重复产物混合，使用市售的PCR产物纯化试剂盒纯化目的片段，具体操作步骤参照试剂盒说明书。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℃~-80℃温度条件下保存，保存时间一般不超过1年。

8.4 高通量测序

宜将含有不同索引的扩增产物等摩尔量混合构建测序文库。文库的片段长度分布应符合预期。文库浓度应满足高通量测序要求。参照GB/T 30989和GB/T 35537的规定对扩增产物进行测序。每个样品的预期序列数不宜低于30000条，可根据监测目标和测序结果调整测序预期序列数。

9 结果分析

9.1 生物信息学分析

9.1.1 序列处理

首先根据扩增引物前添加的索引将序列分配到不同的样品中。通过检查索引序列和引物序列的匹配度筛除非特异性扩增序列。删除测序序列中含有的模糊碱基、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），按照GB/T 40226的规定，>Q20的碱基比

例应 $\geq 90\%$ 。再进行序列长度过滤，删除序列长度过短的序列，按照序列长度（ $>$ 测序预期长度的70%）修剪序列。

9.1.2 OTU 聚类

将序列相似值高于或等于阈值（序列相似度阈值一般为0.97）的序列合并成OTU，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。根据监测目标和测序结果调整应删除的低丰度OTU。

9.1.3 物种注释

将每个OTU的代表性序列与本地DNA条形码数据库或公开数据库进行比对分析，获得物种注释信息。按照DB11/T 2023设定物种鉴定阈值范围，保留覆盖度、序列相似值均大于85%的注释信息。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，筛选保留淡水大型底栖无脊椎动物信息，剔除非淡水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信息，应记录。

9.2 结果统计

建议保留3个现场平行样品中出现在2个现场平行样品以上的物种注释信息，取平行样品间共有的物种注释信息作为该点位的结果。

根据监测目标调整应保留的物种相对序列丰度，物种相对序列丰度宜取平行样品间物种相对序列丰度的几何平均值。

9.3 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。某个监测点位的淡水大型底栖无脊椎动物监测结果记录表由OTU编号、代表性序列、序列条数、相对序列丰度、物种分类信息、覆盖度和序列相似值等组成，见表D.1。

10 质量保证和质量控制

10.1 质量保证

实验室工作区域的设置宜符合GB/T 30989中有关实验室工作区域的要求。

10.2 平行样品

每个采样点位平行采集3个样品。建议保留3个平行样品中出现在2个平行样品以上的物种注释信息。相对序列丰度宜取几何平均值。

10.3 阴性对照试验

10.3.1 阴性对照样品为灭菌超纯水。

10.3.2 每批次采样时应设置1个全程序阴性对照样品。用采样瓶（见6.13）携带灭菌超纯水至采样现场，经采水器（见6.1）盛装的阴性对照移入采样瓶，按7.4相同的步骤富集后，与样品一起进行

8.1~8.3的分析步骤。

10.3.3 每批次 PCR 扩增实验时应设置不少于 1 个 PCR 扩增阴性对照样品。按 8.3 的分析步骤与样品一起进行 PCR 扩增。

10.3.4 阴性对照样品应无目的条带。否则本批次样品应重新检测。

10.4 阳性对照试验

10.4.1 阳性对照为不少于 10 个特定物种的基因组 DNA 或人工合成含有目标序列的 DNA 片段的等摩尔量混合物，样品浓度一般不低于 1 ng/μL。

10.4.2 每次 PCR 扩增实验应设置 1 个阳性对照样品。按 8.3 的分析步骤与样品一起进行 PCR 扩增。

10.4.3 阳性对照样品应在目标长度位置出现条带。否则本批次样品应重新检测。

10.5 质量控制指标

10.5.1 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。

$$FN = \frac{Q_1}{Q} \times 100\% \dots\dots\dots (1)$$

式中：

FN——假阴性率，%；

Q₁——标准样品中未被测出的物种数目，单位为个；

Q——标准样品的实际物种数目，单位为个。

10.5.2 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。

$$FP = \frac{Q_2}{Q} \times 100\% \dots\dots\dots (2)$$

式中：

FP——假阳性率，%；

Q₂——未在标准品物种清单的物种数目，单位为个；

Q——标准样品的实际物种数目，单位为个。

11 废物处置

实验中产生的有害废物的分类、收集和处置应按照GB 19489的规定执行，生物废弃物在处置之前应采用高压蒸汽灭菌、消毒或灼烧等方式灭活。

附录 A

(资料性)

淡水大型底栖无脊椎动物常用扩增引物

淡水大型底栖无脊椎动物常用扩增引物见表A.1。

表A.1 淡水大型底栖无脊椎动物常用扩增引物

适用类群	目标基因	引物名称	序列 (5' -3')	预期片段长度 (bp)	退火温度范围 (°C)
淡水大型底栖无脊椎动物	COI	mlCOIintF	GGWACWGGWTGAACWGTWTAYCCYCC	~313	45~55
		dgHC02198	TANACYTCNGGRTGNCCRAARAAYCA		
	COI	mlCOIintF	GGWACWGGWTGAACWGTWTAYCCYCC	~313	
		dgHC02198	TAIACYTCI GGRTGICRAARAAYCA		
	COI	BF2	GCHCCHGAYATRGCHTTYCC	~421	
		BR2	TCDGGRTGNCCRAARAAYCA		
水生昆虫	16S	InsF	ACGCTGTTATCCCTAARGTA	~155	
	rRNA	InsR	RGACGAGAAGACCCTATARA		

附录 B
(资料性)
环境 DNA 采样记录表

环境DNA采样记录表见表B.1。

表B.1 环境 DNA 采样记录表

点位名称:	点位编号:	天气:
采样点位及周边生境描述(照片应作为附件保存至少包含上下游和采样点位):		
底质类型: <input type="checkbox"/> 淤泥 <input type="checkbox"/> 泥沙 <input type="checkbox"/> 粘土 <input type="checkbox"/> 粗砂 <input type="checkbox"/> 砾石 <input type="checkbox"/> 岩石 <input type="checkbox"/> 其他:		
经度: 度 分 秒	纬度: 度 分 秒	海拔(m):
水体类型: <input type="checkbox"/> 河流 <input type="checkbox"/> 湖泊 <input type="checkbox"/> 水库		点位类型: <input type="checkbox"/> 岸边 <input type="checkbox"/> 离岸
水深(m):	水温(°C):	pH值(无量纲):
透明度(m):	溶解氧(mg/L):	
环境 DNA 采集和保存		
采样介质	<input type="checkbox"/> 水样 <input type="checkbox"/> 沉积物	
水样	样品编号:	
	采样体积/样品(L):	过滤体积/样品(L):
	过滤地点: <input type="checkbox"/> 现场过滤 <input type="checkbox"/> 实验室过滤	
	滤膜保存方法: <input type="checkbox"/> __°C冷藏 <input type="checkbox"/> 避光 <input type="checkbox"/> 其他:	
沉积物	样品编号:	
	采样工具: <input type="checkbox"/> 采泥器 <input type="checkbox"/> 其他:	
	沉积物保存方法: <input type="checkbox"/> __°C冷藏 <input type="checkbox"/> 避光 <input type="checkbox"/> 其他:	
采样人:	校核人:	采集日期: 年 月 日
备注:		

附 录 C
(资料性)
沉积物样品采集和前处理

C.1 样品采集

按照HJ 494的规定采集表层沉积物(0 cm~5 cm),应剔除砾石、木屑、杂草、贝壳及其它大体积生物残体,收集至无菌离心管中(一般为50 mL),野外干冰或-20 °C保存,实验室-20 °C~-80 °C保存。同一采样点沉积物采集应尽量涵盖各类小生境。

C.2 样品分析

沉积物样品经均质器均质后冷冻干燥,用网筛过滤杂质并混匀后取约0.5 g样品,使用市售的DNA提取试剂盒提取沉积物中的DNA。DNA提取试剂盒提取的具体操作步骤参照试剂盒说明书。后续分析按照8.2进行。

附录 D

(资料性)

淡水大型底栖无脊椎动物环境 DNA 监测结果记录表

淡水大型底栖无脊椎动物环境DNA监测结果记录表见表D.1。

表 D.1 淡水大型底栖无脊椎动物环境 DNA 监测结果记录表

OTU 编号	代表 性 序列	序列 条数	相对序 列丰度 (%)	分类信息								覆盖度 (%)	序列相似 值(%)
				门	纲	目	科	属	属拉 丁名	种	种拉 丁名		
检测人：				校核人：				检测日期： 年 月 日					

参考文献

- [1] GB/T 35537—2017 高通量基因测序结果评价要求
 - [2] GB/T 33681.1—2017 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
 - [3] GB/T 35890—2018 高通量测序数据序列格式规范
 - [4] GB/T 37874—2019 核酸提取纯化方法评价通则
 - [5] HJ 494—2009 水质 采样技术指导
 - [6] 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
 - [7] SN/T 4278—2015 国境口岸医学媒介昆虫DNA条形码鉴定操作规程
 - [8] DB32/T 4539—2023 淡水生物 环境DNA监测技术方法
 - [9] T/CSES 81—2023 淡水生物监测 环境DNA宏条形码法
-