

《流域典型水生生物环境DNA监测技术规范》 (征求意见稿)

编制说明

《流域典型水生生物环境DNA监测技术规范》编制组

二零二五年八月

目 录

1、编制背景.....	1
1.1、任务来源.....	1
1.2、工作过程.....	1
1.3、目的和意义.....	3
2、标准编制必要性.....	4
3、国内外相关标准情况.....	4
4、编制依据和原则.....	6
4.1、编制依据.....	6
4.2、编制原则.....	7
5、主要内容.....	7
5.1、适用范围.....	7
5.2、术语和定义.....	7
5.3、技术流程.....	9
5.4、技术规范.....	10
6、重要意见分歧.....	19
7、涉及专利情况.....	19
8、先行标准废止.....	19
9、其他说明.....	19
10、标准实施建议.....	19
11、案例.....	19
11.1、黄河流域黄河口典型水生生物环境 DNA 监测	19
11.2、长江流域赤水河典型水生生物环境 DNA 监测	20
12、附表.....	22

1、编制背景

1.1、任务来源

本标准由中国科学院生态环境研究中心提出，并由中华环保联合会归口，2025 年申请立项，被列入中华环保联合会 2025 年标准编制计划正式批准立项，由中国科学院生态环境研究中心、中国环境监测总站、北京师范大学、江西省生态环境监测中心、珠江水资源保护科学研究所等单位参与起草。

1.2、工作过程

按照标准编写要求，牵头承担单位中国科学院生态环境研究中心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。在前期实验研究、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，目前形成了技术规范的征求意见稿及编制说明。主要工作如下：

（1）基础研究

2022 年至 2025 年，编制组通过阅读文献和收集国内外相关资料，确定了构建流域典型水生生物环境 DNA 监测技术规范的工作内容，并针对相关内容和关键参数开展了大量的科学研究工作，积累了大量的实验数据和实践经验，初步确定了流域典型水生生物环境 DNA 监测技术规范的基本框架和流程。

（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。确定由中国科学院生态环境研究中心为主要起草单位，并由来自高校和科研机构的相关专家组成编制起草组，形成标准初稿。

（3）理论研究

2024 年-2025 年：为了按照文件要求准确完成标准制定工作，标准编制组通过各种途径，收集并学习了 HJ 710.7—2004 生物多样性观测技术导则 内陆水域鱼类、SL 733—2016 内陆水域浮游植物监测技术规程、SC/T 9402—2010 淡水浮游生物调查技术规范、HJ 1295—2023 水生态监测技术指南 河流水生生物监测与评价（试行）、HJ 1296—2023 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）、DB32/T 4178 河流水生态监测规范、DB43/T 432 淡水生物资源调查技术规范、T/CTESGS 01-2022 长江流域河流水生态监测技术规程等基于传

统形态学方法的水生生物多样性监测标准，并进一步整理学习了 GB/T 30989 高通量基因测序技术规程、GB/T 35537 高通量基因测序结果评价要求、GB/T 35890 高通量测序数据序列格式规范等与高通量测序相关的标准，以及 HJ 494 水质采样技术指导等与样品采集和样点布设相关的技术标准，研究了众多国内外基于环境 DNA 技术监测水生生物多样性的方法和实际案例。经过资料分析和共性总结，初步对流域典型水生生物环境 DNA 监测方案进行了梳理和提炼，理顺了标准制定的方向和思路，形成标准编制大纲。

（4）调研/实验性研究

2023 年 6 月-2025 年 4 月，编制组完成资料收集、文献调研，以及掌握了基于环境 DNA 技术的水生生物监测在国内外的最新研究成果及发展趋势，并将已构建的环境 DNA 监测方法应用在我国长江和黄河流域的典型水生生物类群监测实践中。为了使标准具有科学性和可操作性，标准编制起草组在已有的实验研究和资料分析的基础上，进一步与相关技术和管理人员进行了深入地探讨和沟通，并及时调整了已有方法。

（5）标准草稿

2025 年 1 月-2025 年 7 月：标准编制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。标准编制组针对流域典型生物类群的采样方法、过滤方式、扩增引物和物种遗传特征，进一步完善了基于环境 DNA 技术监测流域典型水生生物类群的流程、关键参数和技术要点，经过若干次编制组内研讨会和专家咨询会，组织优势力量和团队学术骨干编写了标准草稿。

（6）标准立项

2025 年 3 月：标准起草组向中华环保联合会提交制修订立项申请书。

2025 年 4 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。

2025 年 4 月：经中华环保联合会审议进行立项公示。

2025 年 5 月：经中华环保联合会审议进行正式立项。

2025 年 7 月：由中华环保联合会牵头组织关于标准的修改会议。

2025 年 7 月：编制组根据修改建议，进一步对标准内容和格式进行完善。

（7）专家咨询和征求意见稿

2025 年 8 月：中华环保联合会组织召开了团体标准征求意见稿技术审查会。

专家组提前审阅了相关材料,听取了编制组汇报,经质询和讨论,形成意见如下:标准的文本、结构及内容符合团体标准的编制要求;标准制定过程符合《中华环保联合会团体标准管理办法(试行)》的有关规定;标准编制技术路线合理,内容全面,对长江、黄河流域典型水生生物监测具有技术指导性和操作性;建议进一步完善和细化标准文本及编制说明。专家一致同意完善后公开征求意见。

2025 年 8 月:标准起草组根据专家评审意见和建议进一步修改完善标准文本,修改完善的主要内容包括:(1)文本的格式和规范性;(2)对于术语和定义的规范和统一;(3)相关步骤等参数;(4)样点的布设、监测时间、水样浑浊程度的量化等。

1.3、目的和意义

标准制定的目的:随着我国生态文明建设的深入推进,长江、黄河流域水生态保护已上升为国家战略。《中华人民共和国长江保护法》和《中华人民共和国黄河保护法》明确要求建立科学完善的流域生态环境监测体系,将水生态健康作为考核评价的重要内容。当前,我国流域水生态监测仍主要依赖传统形态学方法,存在效率低、成本高、破坏性强等局限,难以满足大范围、高频次、环境友好等监测需求。环境 DNA 技术作为国际前沿的生物监测手段,通过检测水体中的遗传物质,能够快速、灵敏地反映水生生物多样性信息,为流域水生态健康评估提供科学依据。目前,环境 DNA 领域普遍使用物种通用性扩增引物,这些引物在各种水体类型中具有普适性,适用于检测分布范围较为广泛的水生生物类群,存在监测灵敏度不高、特异性不强等问题。长江和黄河流域的地理纬度、气候特征等自然条件与其他流域有着显著差异,水生生物种类的差异也十分显著。利用已有的普适性引物对长江黄河流域水生生物类群进行环境 DNA 监测,结果很难全面准确的反映出该流域水生生物物种数量和分布特征。本标准的制定旨在针对长江、黄河流域浮游动物、浮游藻类和鱼类等三类典型水生生物类群,建立规范化且有流域特色的环境 DNA 监测技术体系,统一从样品采集、水样过滤、DNA 提取、PCR 扩增到数据分析的全流程操作标准。

标准制定的意义:以水生生物为核心评价指标是流域生态系统管理的必然趋势。以长江流域为例,2022 年长江干流水质优良断面比例已达 98.1%,但水生态系统的完整性和稳定性仍面临挑战,部分珍稀特有物种濒危状况尚未根本扭转。

传统监测方法难以全面、及时地反映水生态系统的真实状况。环境 DNA 技术具有灵敏度高、覆盖范围广、对生物扰动小等优势,能够有效弥补传统方法的不足。本标准的制定将填补我国长江、黄河流域特异性环境 DNA 监测技术规范空白。通过明确适用于长江、黄河流域的典型水生生物监测引物、质量控制要求和数据分析方法,实现监测数据的可比性和可追溯性,为流域水生态监测提供标准化技术工具。同时,本标准还将促进跨区域、跨部门的协同监测,推动建立统一的水生态数据库,为流域综合治理和生态修复决策提供科学依据,助力长江、黄河流域生态保护和高质量发展国家战略的实施。

2、标准编制必要性

当前,我国环境 DNA 监测技术应用面临标准缺乏、方法不统一等突出问题。一方面,长江、黄河流域具有独特的水文特征和生物区系,现有的通用引物 and 标准流程难以满足流域特异性监测需求;另一方面,不同机构采用的技术方法差异较大,导致监测数据难以共享和比较分析。随着长江黄河等重点流域水资源与水环境综合治理等国家重点项目的实施,我国已积累了大量流域环境 DNA 监测的研究成果和实践经验,为本标准的制定奠定了坚实基础。同时,生态环境部"十四五"生态环境监测规划明确提出要推动环境 DNA 等新技术的标准化应用,建立完善的水生态监测技术体系。因此,亟需制定流域典型水生生物环境 DNA 监测技术规范等团体标准,将科研成果转化为可推广的技术规范,指导流域管理机构、科研单位和第三方监测机构规范开展环境 DNA 监测工作,提升我国水生态监测的现代化水平,为全球大尺度的流域治理贡献中国智慧和中国方案。

3、国内外相关标准情况

自 20 世纪 70 年代以来,全球水环境管理逐步从单一化学污染控制转向水生态系统健康保护,水生生物多样性评价成为流域管理的核心内容。美国环境保护署(EPA)于 1990 年启动环境监测评价计划,系统监测河流与湖泊生态状态,并于 1994 年联合美国地质调查局推进国家水质评价计划,构建覆盖全美 50 余条河流的长期监测网络,为政策制定提供数据支撑。澳大利亚 1992 年推出河流健康计划,通过对比受干扰区域与天然参考点的生物群落,评估河流生态完整性,成为国际公认的河流健康评价范式。南非 1994 年实施的“河流健康评价计划”则整合无脊椎动物、鱼类、水文等多指标,首次在发展中国家建立生物监测框架。2000

年欧盟水框架指令要求成员国以浮游植物、底栖动物、鱼类等“生物质量要素”为核心，对全欧水体开展系统监测，目标到 2015 年实现“良好生态状态”，推动了标准化生物监测技术的广泛应用。韩国 2003-2006 年完成“国家水生态监测工程”，建立涵盖生物与生境指标的国家评价体系；2019 年美国国家生态观测网络正式运行，耗资 4.6 亿美元布设 81 个标准化观测点，实现从微生物到气候参数的全要素数据采集。这些国际实践表明，基于生物指标的流域管理已成为全球共识，但其技术体系多依赖传统形态学方法，环境 DNA 技术的标准化应用尚处探索阶段。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，并于 2024 年出台《国家水环境 DNA 战略》，系统规范从采样到数据分析的全流程标准。日本作为 eDNA 技术应用的先行者，其环境 DNA 学会于 2018 年成立后，联合科研机构编制了《环境 DNA 调查实验手册》，详细规定了淡水及海洋生态系统的 eDNA 采样、引物设计及污染防控方法，成为亚太地区的重要参考。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。本技术规范在编制过程中充分借鉴了上述国际经验。同时，针对环境 DNA 技术的前沿性，重点整合了美国等国家在环境 DNA 监测中应用的技术参数。在此基础上，针对长江、黄河流域的特殊性进行创新，依托国家重点研发计划成果，构建覆盖流域浮游动物、藻类及鱼类的本土条形码数据，开发优化了扩增引物，以提升对流域特有物种的特异性和检测灵敏度。

随着国家和地方对流域水生态监测的重视，一些地方生态环境监测部门也相继发布了基于环境 DNA 技术的水生态监测评价地方标准，用以推动各自流域的水生态监测和评价工作。北京市在 2022 年和 2024 年发布的《鱼类贝类环境 DNA 识别技术规范（DB11/T 2023—2022）》和《底栖无脊椎动物环境 DNA 监测指南（DB11/T 2358—2024）》，以及江苏省制定的《淡水生物环境 DNA 标准（DB32/T 4539-2023）》，分别聚焦特定生物类群（如鱼类、贝类、底栖动物）或区域水体，规定了利用环境 DNA 技术监测淡水生物的采样、试剂和材料、仪器和设备、监测内容和步骤，以及质量控制与保证，为区域水生态监测提供了技术依据。中国环境科学学会已发布的团体标准《水生生物监测 环境 DNA 宏条形码法》（T/CSES

36-2022)、《水生生物 DNA 条形码构建规程》(T/CSES 37-2022) 及《基于环境 DNA 的水生生物评价技术》(T/CSES 38-2022), 共同构建了我国环境 DNA 技术应用的基础框架。其中,《水生生物监测 环境 DNA 宏条形码法》以规范环境 DNA 宏条形码技术的全流程为核心, 明确了水样采集、过滤、DNA 提取及高通量测序等通用方法, 为生物多样性监测提供了标准化模板;《水生生物 DNA 条形码构建规程》聚焦物种参考数据库的建立, 规定了 DNA 条形码获取、验证及存储的技术要求;《基于环境 DNA 的水生生物评价技术》则从数据分析角度提出了生物多样性指数计算与评价方法。本技术规范在吸收地方和行业标准实践经验的基础上, 针对长江、黄河流域的生态特征进行系统性优化, 整合浮游动物、浮游藻类及鱼类三大类群, 建立覆盖全流域的多类群同步检测技术, 针对流域动态条件细化采样和过滤操作规范, 提升 DNA 捕获效率与数据可靠性, 同时基于国家重点研发计划项目成果, 构建流域本土物种条形码数据, 优化引物设计以增强对流域特有物种的检测灵敏度, 可以为未来大规模高质量开展基于环境 DNA 技术的流域水生态监测工作提供依据。

4、编制依据和原则

4.1、编制依据

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

GB/T 35890 高通量测序数据序列格式规范

T/CSES 81-2023 淡水生物监测 环境 DNA 宏条形码法

T/CTESGS 01-2022 长江流域河流水生态监测技术规程

HJ 710.7—2004 生物多样性观测技术导则 内陆水域鱼类

HJ 1295—2023 水生态监测技术指南 河流水生生物监测与评价(试行)

HJ 1296—2023 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)

HJ 494 水质 采样技术指导

SL 733—2016 内陆水域浮游植物监测技术规程

SC/T 9402—2010 淡水浮游生物调查技术规范

DB32/T 4178 河流水生态监测规范

DB43/T 432 淡水生物资源调查技术规范

DB11/T 2023 鱼类贝类环境 DNA 识别技术规范

DB11/T 2358-2024 淡水大型底栖无脊椎动物环境 DNA 监测技术规范

DB32/T 4539-2023 淡水生物环境 DNA 监测技术方法

4.2、编制原则

本标准按照中华环保联合会有关标准编制的要求和规定，确定标准的组成要素。在标准制定过程中遵循了以下几个方面的原则：

- (1) 科学性和规范性；
- (2) 保证标准的先进性和实用性；
- (3) 与国际国内现行的政策、产业政策等相结合；
- (4) 与相关的标准、法规接轨；

(5) 充分考虑我国长江和黄河流域水生生物群落特征和分布，结合现有环境 DNA 技术的发展动态，符合我国流域水生生物监测行业的规范化和标准化发展需求。

5、主要内容

5.1、适用范围

本规范规定了基于环境 DNA 技术开展长江和黄河流域典型水生生物类群监测的试剂耗材、样点布设、水样采集、水样过滤、DNA 提取、PCR 扩增、测序与数据分析和质量控制等内容。

本规范适用于长江和黄河流域的河流、湖泊、水库等水体中浮游动物、浮游藻类和鱼类的环境 DNA 监测。

5.2、术语和定义

(1) 环境 DNA environmental DNA (eDNA)

是指从环境样本（如水、土壤、沉积物、空气等）中提取的、来源于生物体释放的游离 DNA 或细胞残留 DNA。DNA 片段可能来自生物体的代谢排泄、脱落细胞、生殖细胞、黏液、死亡分解等过程。就长江黄河流域而言，环境

DNA 除了上述来源外还包括自于单细胞生物如浮游藻类。

(2) 水生生物 aquatic organisms

全部或部分生活在各种水域中的生物。主要的淡水生物类群包括浮游藻类、浮游动物、水生维管植物、大型底栖无脊椎动物和鱼类等。

(3) 23S 核糖体 DNA 23S ribosomal DNA (23S rDNA)

原核生物编码核糖体大亚基 23S rRNA 的 DNA 序列。

(4) 18S 核糖体 DNA 18S ribosomal DNA (18S rDNA)

真核生物编码核糖体小亚基 18S rRNA 的 DNA 序列。

(5) 12S 核糖体 DNA 12S ribosomal DNA (12S rDNA)

后生动物线粒体基因组上 12S rRNA 对应的 DNA 序列。

(6) DNA 宏条形码 DNA metabarcoding

利用高通量测序获取环境样本（如水、沉积物、土壤、空气等）或混合生物组织中的特定 DNA 片段，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。

(7) 操作分类单元 operational taxonomic unit (OTU)

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

(8) 引物

在 DNA 复制过程中，结合于模板链上并作为复制延伸的起始位点和/或终止位点的，具有一定长度和顺序的寡核苷酸链。

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

一种体外酶促合成特异 DNA 片段的分子技术，由高温变性、低温退火及适温延伸等几步反应组成一个周期，循环进行，使目的 DNA 得以迅速扩增，具有特异性强、灵敏度高、操作简便省时等特点。

(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。

(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。

(12) 二代测序 Next-generation sequencing

第二代测序又称为高通量测序，是基于 PCR 和基因芯片发展而来的 DNA 测序技术，具有通量高、速度快、读长短的特点。

(13) 序列覆盖度 sequence coverage

反映序列间相似程度的数值，即测序序列与文库序列间比对成功的片段在测序序列中所占碱基数目的比例，一般以百分数表示。

(14) 序列相似度 sequence similarity

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

(15) 浮游藻类 Phytoplankton

悬浮于水体、缺乏主动移动能力或移动能力较弱的光合自养型微型生物群落，常见的种类主要包括硅藻、绿藻、蓝藻等类群，个体大小通常为 2-200 μm 。

(16) 浮游动物 Zooplankton

悬浮或弱游泳能力的水生异养型动物群落，常见的种类包括原生动物、轮虫、枝角类、桡足类等，个体大小通常为 50 μm -2 mm。

(17) 鱼类 Fish

脊索动物中数量最多的一类生物，终生在水中生活，以鳃呼吸，用鳍运动并维持身体平衡，多数体被鳞片，身体温度随环境变化，可以分为软骨鱼类和硬骨鱼类。

5.3、技术流程

流域典型水生生物环境 DNA 监测技术流程如下图 1。

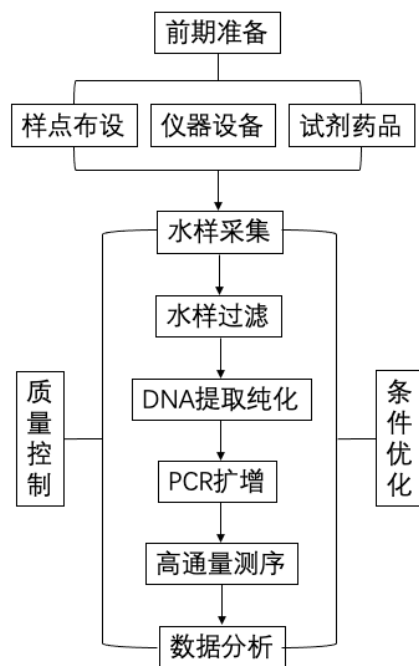


图 1 流域典型水生生物环境 DNA 监测技术流程图

5.4、技术规范

(1) 试剂耗材

1) 实验试剂

推荐使用市售的试剂盒进行 DNA 提取和纯化。如使用 CTAB（十六烷基三甲基溴化铵）和醋酸钠法提取和纯化 DNA，所需试剂如下：

- a) 乙二胺四乙酸（EDTA）溶液：分析纯，配置浓度为 0.02 mol/L、pH=8.0；
- b) 氢氧化钠（NaOH）溶液：分析纯，配置浓度为 1 mol/L；
- c) 三羟甲基氨基甲烷盐酸盐（Tris-HCl）溶液：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，配置浓度为 0.1 mol/L；
- d) 盐酸（HCl）：浓度 1.19 g/mL；
- e) 十六烷基三甲基溴化铵（CTAB）：分析纯；
- f) 氯化钠（NaCl）：分析纯；
- g) CTAB 提取液：称取 4 g CTAB 和 16.38 g NaCl，溶解于适量灭菌超纯水中，加入 8 mL EDTA 溶液和 20 mL Tris-HCl 溶液，调整 pH 至 8.0，定容至 200 mL，灭菌后备用；

- h) 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，pH = 8.0；
- i) 乙酸铵 ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$)：分析纯；
- j) 乙酸铵溶液：称取 57.81 g 乙酸铵溶于适量灭菌超纯水中，定容至 100 mL，配置浓度为 7.5 mol/L；
- k) 无水乙醇 ($\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$)：分析纯；
- l) 75%乙醇：无水乙醇和灭菌超纯水体积比 3:1 混合配制；
- m) 蛋白酶 K：市售，酶活力 $\geq 45 \text{ U/mg}$ ，浓度为 20 mg/mL。
- 进行 DNA 和 PCR 产物质量检测时，需要如下试剂：
- n) PCR 扩增使用市售扩增试剂，如 Ex Taq, LA Taq, Premix 等。
- o) 电泳缓冲液：市售 TAE 缓冲液 (1×)，pH=7.8-8.8；
- p) 琼脂糖凝胶：取市售的琼脂糖，加入 TAE 缓冲液 (1×)，配制浓度为 1-2%；
- q) 分子量标准：市售 100-2000 bp DNA 分子量标准试剂。
- r) DNA 染料：推荐使用市售无毒性或低毒性 DNA 染料；

2) 实验耗材

- a) 采样瓶：1 L，塑料材质具螺旋帽，无 DNA 和生物残留；
- b) 混合纤维素酯滤膜：孔径 0.45 μm ；
- c) 手术剪；
- d) 尖头镊子；
- e) 离心管：1.5 mL，无 DNA 和生物残留；
- f) PCR 管：0.2 mL，无 DNA 和生物残留；
- g) 一次性无菌手套。

3) 仪器设备

- a) 车载冰箱：温控 4 °C至-20 °C；
- b) 采水器：2 L 和 5 L；
- c) 冰箱：温控-20 °C和 4 °C；
- d) 过滤装置：配有砂芯滤器和真空泵；
- e) 烘箱：室温-250 °C；

- f) 水浴锅：室温=100 °C；
- g) 高压蒸汽灭菌器：可达 121 °C、0.1 MPa 灭菌条件；
- h) 超净工作台；
- i) 低温离心机：转速可达 13000 rpm，温控范围可至 4 °C；
- j) PCR 仪：温控范围 0 °C=100 °C，升温速度 6 °C/s，配套 PCR 管 200 μL；
- k) 微量移液枪：量程为 0.5-10 μL、20-200 μL 和 100-1000 μL 等；
- l) 超微量紫外分光光度计：测量体积最小 1 μL，波长范围包括 230 nm、260 nm 和 280 nm；
- m) 水平电泳仪：电场强度为 5 -10 V/cm，输出电压 6-400 V；
- n) 水平电泳槽；
- o) 凝胶成像系统：具备 DNA 凝胶成像和拍照功能。

4) 分析软件

高通量测序数据质量控制和分析软件：QIIME2（扩增子分析）、R 语言（数据处理）和 Seed（物种注释）等。

(2) 样点布设

采样点布设和监测频次参考标准 T/CSES 81-2023 和 T/CTESGS 01-2022 的规定。

对于河流型水体，每个监测位置的横断面设置 3 个代表性样点，分别设置在河流的两岸和中心。河流中心样点采用纵断面混合水样的采集方式，即水深 0-5 m、5-15 m、> 15 m 分别采集 1/3 水样，取样后混合为 1 个样品。其中，缓慢流动水体（< 2.0 m/s）的样点间隔为 5 km，快速流动水体（> 2.0 m/s）样点间隔为 10 km。对于湖泊和水库型水体，可按照湖库面积进行样点数量设定，具体可如下表 1。

表 1 湖库样点数设置参考值

	湖库面积 (km ²)				
	< 50	50-500	500-1000	1000-2000	> 2000
样点数量 (个)	5-10	10-20	20-40	40-50	> 50

样点监测设置在春、夏、秋、冬四个季节，每个季节监测一次。

(3) 水样采集

水样采集根据标准 HJ 494 的规定执行。

样品采集时，使用相机拍摄并详细记录采样点周边环境条件，填写附表 A。采样体积一般为 1 L，每个样点设置 3 个重复样品。如果水体泥沙等悬浮颗粒物含量较高（浊度 > 50 NTU），可扩大采样体积至 2-4 L，但需保持所有采样点体积一致。

采样瓶装满后应密封并做好标记，置于车载冰箱于 4℃条件下冷藏运输，并在 2 h 内返回实验室，保存于 4℃冰箱或立即进行过滤操作。若在实验室 4℃冰箱内保存超过 1d，则水样不建议继续使用。

(4) 水样过滤

1) 预处理

过滤前需对使用的器具和耗材执行全面消毒。真空抽滤器经次氯酸钠消毒液浸泡 30 min，后用超纯水冲洗并烘干。剪刀、镊子依次经 75%乙醇清洗及超纯水浸洗处理。离心管等一次性塑料耗材经 121℃高压灭菌 18 min 后，烘干备用。

2) 过滤流程

使用灭菌镊子夹取 0.45 μm 孔径的混合纤维素酯滤膜，放入抽滤器中抽滤水样。也可以选择其他孔径（如 0.22 μm）或材质（醋酸纤维素膜）的滤膜，但效果需要评估。

对于泥沙含量较高的水样，首先于 4℃条件下静置 30 min 沉淀悬浮颗粒物，再用直径 100 μm 筛网去除大颗粒，最后使用多张滤膜进行过滤（一般不超过 5 张）。

每完成单一样品后，需拆卸抽滤器进行重新清洗消毒，方可继续使用。

3) 滤膜保存

滤膜经灭菌镊子折叠后，密封于无菌的离心管中，按采样点编号归类，保存于-20℃冰箱，在 7 日内完成 DNA 提取操作。若保存时间在 7 d 以上，滤膜保存于-80℃冰箱。若保存时间多余 30 d，则滤膜不建议继续使用。

(5) DNA 提取和纯化

1) DNA 提取

利用试剂盒提取 DNA 时，按照试剂盒说明书流程进行操作。如以 CTAB 法进行滤膜 DNA 提取，具体步骤如下：

- a) 使用灭菌剪刀将滤膜剪为 1~3 mm² 的碎片，置于 1.5 mL 灭菌离心管中；如果过滤了多张滤膜，则应从每张滤膜上都剪取一部分，剪碎后混合在一起继续使用；
- b) 向离心管中加入 750 μ L CTAB 提取液及 20 μ L 蛋白酶 K，涡旋震荡混合 30 s，置于 56℃水浴锅中孵育 3 h，每隔 30 min 涡旋震荡一次；
- c) 将裂解液转移至新离心管中，加入等体积酚-氯仿-异戊醇混合液（体积比 25:24:1；pH 8.0），剧烈震荡混匀后，于 4℃、13000 rpm 离心 10 min；
- d) 小心吸取上层水相至新 1.5 mL 灭菌离心管，重复加入等体积 酚-氯仿-异戊醇混合液（体积比 25:24:1），震荡混匀后 4℃、13000 rpm 离心 10 min；
- e) 转移上清液至新离心管中，加入 2 倍体积预冷无水乙醇（-20℃保存）及 50 μ L 7.5 mol/L 乙酸铵溶液，轻柔颠倒混匀，-20℃静置 30 min，倒掉上清液；
- f) 加入 1 mL 75%乙醇，上下颠倒混匀，4℃、13000 rpm 离心 10 min，倒掉上清；
- g) 加入 1 mL 75%乙醇，上下颠倒混匀，4℃、13000 rpm 离心 10 min，倒掉上清；
- h) 开盖，置于 25℃超净工作台中晾干 30 min；
- i) 加入 50 μ L 无 DNA 酶的超纯水溶解沉淀，轻弹管壁混匀；
- j) 使用超微量紫外分光光度计测定样品浓度，OD_{260/280} 比值应为 1.8~2.0（无蛋白质及苯酚等），OD_{260/230} 比值需 ≥ 2.0 （无碳水化合物，多肽，苯酚等）；
- k) 取 5 μ L DNA 溶液在电压 100 V 条件下进行 2.0%琼脂糖凝胶电泳 20 min，在凝胶成像系统中观察，标准为主带清晰明亮（> 10 kb），无弥散状降解条带出现；

1) 将提取的 DNA 置于 4℃低温条件下保存备用，如一周内不使用则应保存于-20℃冰箱。若需长期保存，转移至-80℃超低温冰箱，避免反复冻融。DNA

样品在-80℃冰箱保存超过 30 d，则样品不建议继续使用。

2) DNA 纯化

利用试剂盒纯化 DNA 时，按照试剂盒说明书流程进行操作。如利用醋酸钠法进行纯化，具体步骤如下：

- a) 向 DNA 加入 1/10 体积 3 mol/L 乙酸钠溶液，轻柔混匀；
- b) 加入 2.5 倍体积预冷无水乙醇，颠倒混匀后 4℃静置 15 min；
- c) 4℃、4000 rpm 离心 30 min，弃上清液，保留沉淀；
- d) 加入 100 μL 预冷 75%乙醇，4℃、3000 rpm 离心 15 min，弃上清液，重复洗涤一次；
- e) 开盖室温晾干 10min，至无乙醇残留；
- f) 加入 1/2 原体积无 DNA 酶超纯水，轻弹混匀，-20℃保存备用；
- g) 重复 5.5.1 中的步骤进行紫外分光光度计和琼脂糖凝胶电泳检测，确保 OD 值和完整性符合要求；
- h) 若需长期保存，转移至-80℃超低温冰箱，避免反复冻融。DNA 样品在-80℃冰箱保存超过 30 d，则样品不建议继续使用。

(6) PCR 扩增

1) 引物选择和标记

浮游藻类、浮游动物和鱼类等流域典型水生生物扩增引物信息如附表 B 所示。

根据样点数量，在相应扩增引物的 5'端需添加 6-10 个碱基的标记序列，对样点构建的文库进行区分。可参考附表 C 中列出的 8 碱基条形码标记序列，也可根据情况自行设计标记序列。

2) PCR 扩增

使用 5.6.1 中的引物对目标水生生物类群进行 PCR 扩增。

对 5.5.2 中纯化出的 DNA 模版进行稀释，可以选择稀释 1-100 倍，确保模版 DNA 浓度在 10-30 ng/μL。

扩增采用 25 μL 体系：包括 PCR 聚合酶 0.2 μL、聚合酶缓冲液 2.5 μL、脱氧核糖核苷三磷酸 2 μL、上下游引物各 1 μL、DNA 模板 1 μL、超纯水 18.3 μL。体积可为 25 μL 的整数倍，各组分体积可根据 PCR 聚合酶的要求添加。

PCR 仪反应程序设置：预变性：95 °C 5 min；扩增：每个循环包括 95 °C 变性 30-40 s、退火 30 s（退火温度参考附表 B）、72 °C 延伸 20-30 s，重复 30-35 个循环；延伸：72 °C 5-10 min。每个样品设置 3 个 PCR 技术重复。

3) PCR 产物检验

PCR 产物经 1.0-2.0% 琼脂糖凝胶电泳检测，并利用 5.5.2 的方法进行 PCR 产物纯化和回收。纯化后的产物采用 1.0-2.0% 琼脂糖凝胶电泳检测完整性，超微量紫外分光光度计方法检测扩增产物的质量和浓度。纯化后的产物置于 4 °C 低温条件下保存备用，如一周内不使用则应保存于 -20 °C 冰箱。若需长期保存，转移至 -80 °C 超低温冰箱，避免反复冻融。PCR 产物在 -80 °C 冰箱保存超过 30 d，则样品不建议继续使用。

(7) 测序与数据分析

1) 高通量测序

参考标准 GB/T 30989 和 GB/T 35537 对 PCR 扩增产物进行建库和二代高通量测序，确保每个样本的预期的有效序列数不低于 10000 条。

2) 数据筛选与处理

利用生物信息学软件对测序原始数据进行质控和预处理，去除低质量序列，具体步骤如下：

- a) 文库拆分：根据引物条形码将序列分配到对应采样点，剔除无效条形码序列及测序错误导致的错配序列；
- b) 引物去除：切除测序读长中的引物序列并过滤非特异性扩增产物；
- c) 质量过滤：剔除低质量序列（Phred 评分 $Q < 20$ ，含 N 的序列或单碱基重复 ≥ 8 bp）；
- d) 长度筛选：去除短于 10 bp 的无效读长；
- e) 末端修剪：切除测序读长末端不稳定的低质量碱基（连续 3 bp $Q < 30$ ）；
- f) 序列拼接：对双端测序数据进行重叠拼接（最小重叠 20 bp），生成完整序列；
- g) 长度筛选：按目标片段长度进一步筛选有效序列；
- h) 数据输出：保存清洗后的高质量序列为 FASTA 格式文件。

3) OTUs 聚类及其物种注释

对预处理后的数据进行生物多样性分析和分类学注释，步骤如下：

- a) 序列去噪与聚类：使用 DADA2（精确 ASV）或 UPARSE（97%相似度 OTU）算法生成代表性序列；
- b) 嵌合体剔除：基于参考数据库（如 SILVA 或 UNITE）去除嵌合体序列；
- c) 数据库比对：使用 BLASTn 比对 NCBI 或本地数据库；
- d) 结果筛选：保留相似度 $\geq 97\%$ 、覆盖度 $\geq 85\%$ 的高置信匹配结果；
- e) 分类解析：提取物种分类信息（界→种），并剔除未分类至门级的序列；
- f) 数据输出：生成 OTU 丰度表及物种注释结果，提取物种的分类信息，包括界、门、纲、目、科、属、种等，填写监测统计表（附表 D）。

（8）质量控制

1) 样品采集和保存

- a) 每批次样品设置 1 个采样空白（使用灭菌超纯水）；
- b) 每个采样点平行采集 ≥ 3 次独立水样（间隔 $\geq 10\text{min}$ ）；
- c) 样品采集后立即置于 4°C 车载冰箱中冷藏保存；
- d) 实验室接收后，滤膜或水样需保存于 -20°C 或 -80°C 冰箱保存；
- e) 样品冻融次数不超过 2 次；
- f) 详细记录采样时间、天气、水温、pH 值等环境参数。

2) 样品过滤

- a) 抽滤器使用前经 10%次氯酸钠浸泡 30 min 消毒，后使用无 DNA 酶超纯水冲洗 3 次；
- b) 每完成一个样点过滤后，需拆卸抽滤装置并重新消毒；
- c) 每批次样品设置 1 个抽滤空白（灭菌超纯水过滤）；
- d) 高浊度水样滤膜更换不超过 5 张/样品。

3) DNA 提取

- a) 使用 121°C 高压灭菌 18 min 的耗材；
- b) 每批次 DNA 提取设置 1 个空白对照（无滤膜）；
- c) DNA 纯度要求： $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280} = 1.8\text{--}2.0$ ， $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{230} \geq 2.0$ ；
- d) 通过 2%琼脂糖凝胶电泳验证 DNA 完整性，主带应清晰（ $> 10\text{ kb}$ ），无降解弥散条带。

4) PCR 扩增

- a) 同一批样品 DNA 模板用量保持一致;
- b) 每个样品设置 3 个 PCR 技术重复;
- c) 阳性判定标准: ≥ 2 个重复出现目标条带, 仅 1 个重复阳性时需重新检测;
- d) 每 PCR 板设置 1 个阴性对照 (灭菌超纯水);
- e) 每 PCR 板设置 1 个阳性对照 (已知物种 DNA)。

5) 测序与数据分析

- a) 剔除低质量读长 ($Q < 20$);
- b) 剔除短序列 ($< 10 \text{ bp}$);
- c) 去除嵌合体序列;
- d) OTU 聚类采用 97% 相似度阈值 (UPARSE);
- e) 或采用 ASV 去噪 (DADA2);
- f) 保留相似度 $\geq 97\%$ 且覆盖度 $\geq 85\%$ 的注释结果。

6) 对照设置

- a) 采样空白: 每批次不少于 1 个, 使用灭菌超纯水;
- b) 抽滤空白: 每批次不少于 1 个, 使用采样后的灭菌超纯水;
- c) 提取空白: 每批次不少于 1 个, 使用灭菌超纯水过滤的滤膜;
- d) PCR 阴性对照: 每批次扩增不少于 1 个, 使用灭菌超纯水为模版, 要求无扩增条带;
- e) PCR 阳性对照: 每批次扩增不少于 1 个, 使用已知物种的 DNA 为模版, 要求目标条带扩增清晰。

7) 其他质控要求

- a) 对于进行分子生物学操作的人员, 应具有半年以上的实验室操作经验和分子生物学实验经验, 需通过实验室安全培训;
- b) 实验人员需穿戴一次性手套、口罩和实验服;
- c) 不同样点间操作需更换手套;
- d) 定期对实验台面、移液器等设备进行消毒;
- e) 保存所有原始数据和中间分析结果;

f) 定期进行实验室内交叉比对测试与分析。

6、重要意见分歧

本标准在起草过程中没有出现重大分歧意见。

7、涉及专利情况

本标准不涉及任何已有的专利内容，与国家及行业其他标准无知识产权冲突。

8、先行标准废止

无。

9、其他说明

无。

10、标准实施建议

本标准为首次制定，有关条款直接引用了现有国家标准或行业标准的内容，尽量避免重复，力求简化。内容上力求突出基于环境 DNA 的流域典型水生生物类群监测技术要求，层次上尽量体现与各标准之间的衔接。随着环境 DNA 监测技术的快速发展，本标准中的环境 DNA 采样、过滤收集、扩增和数据分析等方法以及涉及到的相关参数也可能会随之发生变化。因此，建议在本标准实施过程中，继续广泛听取和收集各方面的意见与建议，并根据流域实际应用情况，对本标准进行不断地修订与完善，使其实用性和可操作性更强，为规范开展基于环境 DNA 技术的流域典型水生生物多样性监测工作提供依据和指导。

11、案例

11.1、黄河流域黄河口典型水生生物环境 DNA 监测

编制组严格按照本标准规定的流程在黄河流域黄河口监测示范区采集了浮桥（HH1）、丁字路口（HH2）、湿地（HH3）、桩埕路桥（HH4）、飞燕滩（HH5）、刁口河滨孤路桥（HH6）、垦利（HH7）、利津水文站（HH8）等 8 个站点的水体样品。样点布设情况如图 11-1 所示。



图 11-1 黄河口示范区环境 DNA 采样点设置

按照本标准流程进行水样过滤、环境 DNA 提取和纯化、PCR 扩增、高通量测序和数据分析后，共监测获得：浮游藻类 278 种、浮游动物 182 种、鱼类 106 种。以上监测获得的水生生物物种数量均能够占到黄河口监测示范区物种名录的 80%以上，说明本标准在开展黄河口示范区以及黄河流域浮游藻类、浮游动物和鱼类等典型水生生物类群环境 DNA 监测方面具有较好适用性和应用优势。

11.2、长江流域赤水河典型水生生物环境 DNA 监测

编制组严格按照本标准规定的流程在长江流域监测示范区赤水河分别采集了洗白(CJ1)、洛旬河水文站(CJ2)、岔河渡口(CJ3)、清水铺(CJ4)、清池(CJ5)、黄歧坳(CJ6)、茅台(CJ7)、九龙囤(CJ8)、鲢鱼溪(CJ9)、醒觉溪(CJ10)、长沙(CJ11)等 11 个站点的水体样品。样点布设情况如图 11-2 所示。

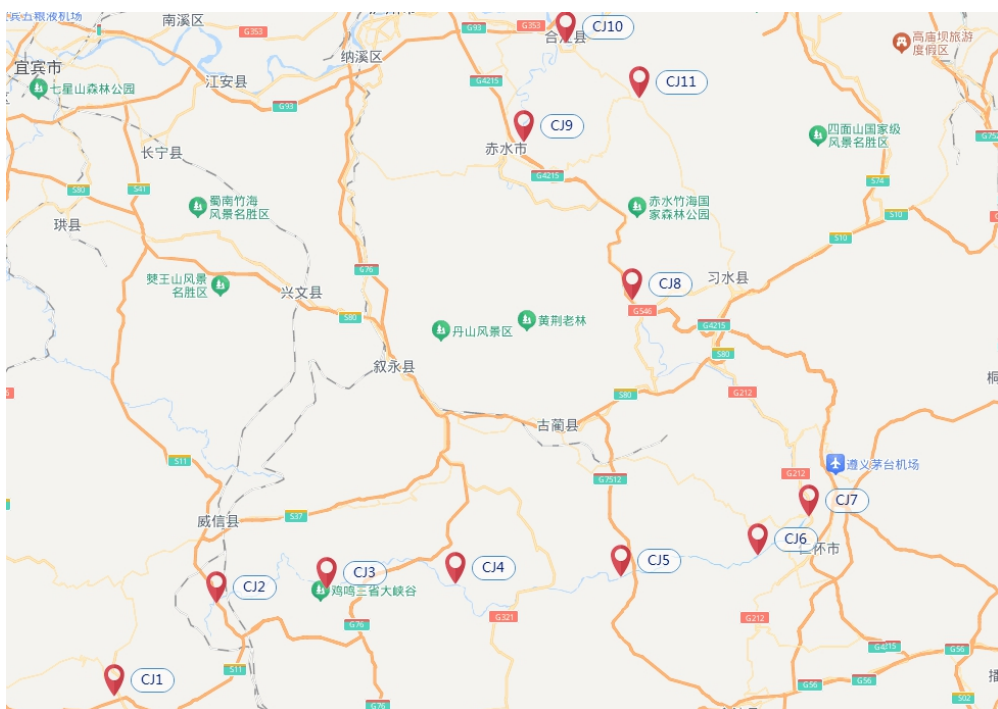


图 11-2 长江赤水河示范区环境 DNA 采样样点设置

按照本标准流程进行水样过滤、环境 DNA 提取和纯化、PCR 扩增、高通量测序和数据分析后，共监测获得：浮游藻类 301 种、浮游动物 226 种、鱼类 126 种。以上监测获得的水生生物物种数量均能够占到赤水河监测示范区物种名录的 80%以上，说明本标准在开展赤水河示范区以及长江流域浮游藻类、浮游动物和鱼类等典型水生生物类群环境 DNA 监测方面具有较好适用性和应用优势。

12、附表

附表 A: 环境 DNA 采样信息表

站点名称:	站点编号:	坐标定位:	站点类型:
样品编号:	采样时间:	记录人:	
采样体积:		运输条件:	
天气描述: (气温、降雨、湿度、风向、风力等)			
生境描述: (植被、底质、岸带、人为扰动等)			
水质描述: (水深、透明度、水温、pH、溶氧、盐度、叶绿素 a 等)			
站点照片: (上游、下游、样点等)			

附表 B 长江黄河流域典型水生生物环境 DNA 监测引物信息表

序号	物种类别	引物长度	GC 含量	退火温度	引物序列
1	浮游动物	19 bp 和 20 bp	42.11% 和 38.10%	55-58℃	F: AAGRCGATYAGATACCGYC R: TCYGTCAATTYCTWYAAGTT
2	浮游藻类	18 bp 和 20 bp	50%和 50%	53-56℃	F: GGACAGAAAGACCCTATG R: TCAGCCTGTTATCCCTAGAG
3	鱼类	17 bp 和 18bp	64.71%和 55.56%	57-60 °C	F:ACACCGCCCGTCACTCT R:CTTCCGGTACACTTACCA

附表 C 常用引物参考标记序列表

序号	标记序列	序号	标记序列	序号	标记序列
1	ACCTAGCA	17	CGTTGCTT	33	CAGTTCAG
2	ACGACTAC	18	CTACGATG	34	CGTAATCG
3	CAAGACCT	19	CTCAAGTG	35	CAACCTAG
4	CTGAGACT	20	CTTCTCCT	36	GACAGAGT
5	GAGAGTGT	21	GAAGCTTC	37	CATGGATC
6	GTTGGAAG	22	GCATAAGG	38	GATCCAAC
7	TCTGCTGT	23	GGATTACC	39	CTAGCTAG
8	TGCTGATG	24	GTAGCATC	40	GCTACGTA
9	AGACGTCT	25	TAGCTACG	41	GACTGTGT
10	AGTCACTG	26	TCAGTCAG	42	GTGAGTGA
11	ATCCGGAT	27	TCCTCTAG	43	GTACGAAG
12	ATTAGCCG	28	TGTCACTC	44	TTATCGCC
13	CACTCTCA	29	TGTCGTGA	45	TATTCCGC
14	CCATCGTT	30	TTCGCCTA	46	TCGACAAC
15	CCTACCAT	31	ACACCACA	47	TGCAGTAC
16	CGAACGAA	32	ATGCTTCC	48	TTGCTTCG

附表 D 水生生物环境 DNA 监测结果统计表

样品采集时间：		采样坐标定位：			记录人：			记录时间：
序号	物种分类信息							测序丰度
	界	门	纲	目	科	属	种	