

团 体 标 准

T/GDSES 43—2026

生态环境损害鉴定评估技术指南 环境 DNA 监测技术

Technical guideline for identification and assessment of
environmental damage—Environmental DNA (eDNA) monitoring technology

2026-06-05 发布

2026-06-05 实施

广东省环境科学学会 发 布

广东省环境科学学会标准

目 次

前言 III

1 范围 1

2 规范性引用文件 1

3 术语与定义 1

4 工作程序 2

5 试剂材料与仪器设备 3

6 准备阶段 4

7 样本采集、保存与运输 5

8 实验室检测 5

9 结果分析 7

10 质量保证和质量控制 8

附录 A（资料性） 常用 DNA 条形码扩增引物 9

附录 B（资料性） 12 碱基条形码参考序列 10

附录 C（资料性） 环境 DNA 物种检测统计表 11

参考文献 12

广东省环境科学学会标准

前 言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由广东省环境科学研究院提出。

本文件由广东省环境科学学会归口。

本文件起草单位：广东省环境科学研究院、壹健生物科技（苏州）有限公司、广东省科学院动物研究所、深圳市环境科学研究院、中科检测技术服务（广州）股份有限公司。

本文件主要起草人：陈佳亮、金桃、宋焱、胡诗佳、张路路、陈江、束文圣、王乃豪、王越、宗同强、郭凤娟、范彬、袁博、李娜、李彬、杨泽涛、王林、曹代男、明瑞梁、禰嘉慧、谭昊言、张端枫。

广东省环境科学学会标准

生态环境损害鉴定评估技术指南 环境 DNA 监测技术

1 范围

本文件提供了支撑开展生态环境损害鉴定评估的环境DNA（eDNA）监测技术指引，包括工作程序、试剂、仪器设备和材料、准备阶段、样品采集与保存、实验检测、结果分析、质量保证和质量控制等内容。

本文件适用于土壤、沉积物、地表水、地下水、海水、空气等环境介质中环境DNA监测，以及基于该监测开展的生物多样性调查评估与环境损害确认等相关工作。

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/T 39791.2 生态环境损害鉴定评估技术指南 总纲和关键环节 第2部分：损害调查
- GB/T 39792.1 生态环境损害鉴定评估技术指南 环境要素 第1部分：土壤和地下水
- GB/T 39792.2 生态环境损害鉴定评估技术指南 环境要素 第2部分：地表水和沉积物
- 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 164 地下水环境监测技术规范
- HJ 166 土壤环境监测技术规范
- HJ/T 374 总悬浮颗粒物采样器技术要求及检测方法
- HJ 442.1 近岸海域环境监测技术规范 第一部分 总则
- HJ 494 水质 采样技术指导
- HJ 664 环境空气质量监测点位布设技术规范（试行）

3 术语与定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

环境DNA environmental DNA; eDNA

环境介质（土壤、沉积物、地表水、地下水、海水、空气等）或生物组织中存在的脱氧核糖核酸（DNA）等生物遗传物质。

[来源：DB32/T 4539—2023, 3.2]

3.2

引物 primer

在DNA复制过程中，结合于模板链上并提供DNA合成起点，具有一定长度和顺序的寡核苷酸链。

[来源：GB/T 35890—2018, 3.11]

3.3

DNA条形码 DNA barcode

生物体细胞核或者细胞器中一段公认的能够代表该物种的、有足够变异的、易扩增的短DNA序列，可用于物种的识别和鉴定。

[来源：SN/T 4278—2015, 3.1, 有修改]

3.4

高通量测序 high-throughput sequencing

区别于传统Sanger（双脱氧链末端终止法）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]

3.5

DNA宏条形码 DNA metabarcoding

利用高通量测序获取环境DNA中的特定DNA片段，根据物种间DNA序列差异识别物种，从而获得物种组成和群落结构信息的技术。

3.6

模板 template

其结构作为另一个分子合成的模型或依据的分子。如转录合成RNA时所依赖的模板DNA，聚合酶链反应扩增时与引物序列互补的模板DNA等。

[来源：WS/T 10011.5—2023，3.5]

3.7

聚合酶链式反应 polymerase chain reaction, PCR

一种在体外扩增DNA片段的方法。当存在模板DNA、底物、上下游引物和耐热的DNA聚合酶时，经过多次“变性-退火-延伸反应”，模板可扩增至数百万倍。

[来源：WS/T 10011.5—2023，3.5]

3.8

操作分类单元 operational taxonomic unit; OTU

将DNA宏条形码测序数据按一定序列相似性阈值聚类后，用于表征物种的分子水平分类单元。

3.9

扩增序列变体 amplicon sequence variants; ASV

DNA宏条形码技术中，通过生物信息学方法剔除PCR扩增和测序错误序列后得到的独特DNA序列，任意两条序列间至少存在一个碱基差异。

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 工作程序

生态环境损害鉴定评估环境DNA监测工作程序见图1。

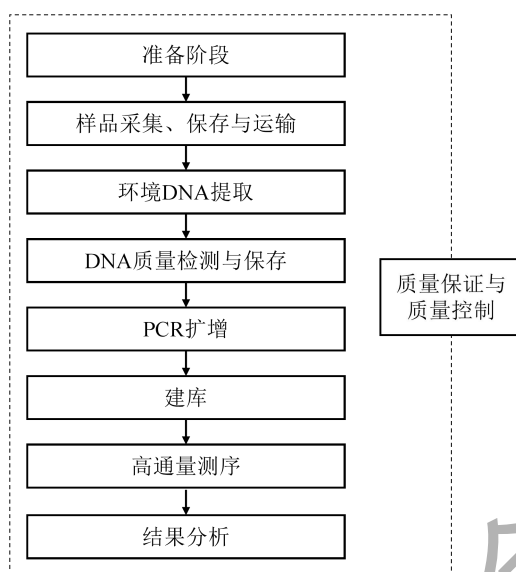


图1 工作程序图

5 试剂材料与仪器设备

5.1 试剂

5.1.1 环境 DNA 提取试剂

使用适合环境样品 DNA 提取的试剂盒。

5.1.2 PCR 扩增试剂

5.1.2.1 PCR 通用引物：根据目标类群选择不同的扩增引物，推荐的引物见表 A.1。

5.1.2.2 PCR 扩增试剂：使用预混型 PCR 试剂预混液。宜选用高效、高特异性的热启动 DNA 聚合酶，以适应复杂环境样品的扩增，并有效降低非特异性扩增。

5.1.3 DNA 凝胶电泳试剂

5.1.3.1 电泳缓冲液：使用 TAE 缓冲液（1×）。取 20 mL TAE 缓冲液（50×），用灭菌超纯水定容至 1 L，pH 值为 7.8~8.8。

5.1.3.2 琼脂糖凝胶：使用 1%~2% 琼脂糖凝胶。取琼脂糖加入电泳缓冲液配制。

5.1.3.3 DNA 分子量标准（含上样缓冲液）：使用 DNA 分子量标准的线性范围覆盖 100 bp~2,000 bp，并包含 100 bp、250 bp、500 bp、750 bp、1,000 bp 及 2,000 bp 等明确参照条带。

5.1.3.4 DNA 染料：推荐使用无毒性或低毒性 DNA 染料。

5.1.4 DNA 胶回收试剂

使用适合环境样品 DNA 的胶回收试剂盒。

5.1.5 DNA 建库试剂

使用与所选高通量测序平台相匹配的市售 DNA 建库试剂盒。用于将纯化后的 PCR 产物构建成测序文库，试剂盒内通常包含末端修复/加尾酶、测序接头、DNA 连接酶、扩增组分及缓冲液等。

5.1.6 高通量测序试剂

使用与测序平台及建库试剂盒相匹配的市售高通量测序试剂盒。该试剂盒用于在测序仪上对完成的文库进行测序反应，其内包含测序引物、测序酶、荧光标记物（或其它检测所需的化学物质）及缓冲液等。

5.2 主要材料

- 5.2.1 无菌手套。
- 5.2.2 口罩。
- 5.2.3 手术剪。
- 5.2.4 尖头镊子。
- 5.2.5 采样瓶：1 L，塑料或玻璃材质，具螺旋帽或磨口塞，使用前经 121℃ 灭菌 18 min。
- 5.2.6 混合纤维素酯滤膜：孔径 0.45 μm。
- 5.2.7 无菌离心管：1.5 mL、2 mL、5 mL、50 mL，无 DNA 和生物残留。
- 5.2.8 无菌冻存管：1.5 mL、2 mL、5 mL、50 mL，无 DNA 和生物残留。
- 5.2.9 枪头：10 μL、200 μL、1,000 μL 等，无 DNA 和生物残留。宜使用带滤芯枪头以防气溶胶污染。
- 5.2.10 PCR 管与板：200 μL PCR 管，八联管或 96 孔 PCR 板，无 DNA 和核酸酶。
- 5.2.11 密封膜：无核酸酶 PCR 封板膜。
- 5.2.12 消毒液：次氯酸钠和蒸馏水配制，有效氯浓度 5.5%~6.5%（质量分数）。
- 5.2.13 核酸清除剂。

5.3 仪器设备

- 5.3.1 高压蒸汽灭菌器：可达到标准要求的 121℃ 及 18 min 灭菌条件。
- 5.3.2 烘箱：室温~250℃ 可调。
- 5.3.3 制冰机。
- 5.3.4 超纯水仪。
- 5.3.5 水浴锅：室温~100℃ 可调。
- 5.3.6 超净工作台。
- 5.3.7 车载冰箱：温控 4℃ 及以下。
- 5.3.8 真空抽滤泵及过滤砂芯。
- 5.3.9 冰箱：温控 -20℃。
- 5.3.10 低温离心机：最高离心转速不低于 13,000 r/min，温控范围低至 4℃。
- 5.3.11 涡旋仪。
- 5.3.12 超微量紫外分光光度计：最小测量体积不高于 1 μL，波长范围包括 230 nm、260 nm 和 280 nm，检出限 1 ng/μL (dsDNA)。
- 5.3.13 荧光光度计。
- 5.3.14 PCR 仪：温控范围 0~100℃，升温速度 6℃/s，配套 PCR 管 200 μL。
- 5.3.15 凝胶成像分析系统：302 nm 光源。
- 5.3.16 电子天平。
- 5.3.17 电泳仪：水平式。
- 5.3.18 电泳槽：水平式。
- 5.3.19 切胶仪。
- 5.3.20 高通量核酸蛋白分析系统。
- 5.3.21 高通量测序仪：测序读长满足 PCR 产物测序长度的要求。

6 准备阶段

6.1 前期准备

按照 GB/T 39791.2 的相关要求开展资料收集、现场踏勘和人员访谈，获取生态环境损害事件相关信息，明确调查重点。

6.2 采样方案制定

6.2.1 明确需要调查的环境要素，针对不同的环境介质制定采样方案，设置评估区域和对照区域。

6.2.2 土壤和地下水采样方案宜按照 GB/T 39792.1 的相关要求制定；地表水和沉积物采样方案宜按照 GB/T 39792.2 的相关要求制定；大气采样方案宜按照 HJ 664 的相关要求制定；海洋采样方案宜按照 HJ 442.1 的相关要求制定。现有标准未规定采样点位数量的，每个采样区域宜设置至少 3 个代表性采样点位。

6.3 器具消毒

6.3.1 宜根据样品数准备足量器具，统一消毒备用。

6.3.2 抽滤器和废液瓶宜用自来水冲洗，再置于消毒液（见 5.2.12）中浸泡 30 min，取出用自来水冲净后超纯水浸洗 10 min，烘干备用。

6.3.3 剪刀和镊子用自来水和 75%乙醇清洗，超纯水浸洗，烘干备用。

6.3.4 1.5 mL 离心管经 121℃灭菌 18 min，烘干备用。

7 样品采集、保存与运输

7.1.1 根据采样方案开展样品采集。每个点位采集至少 3 个平行样品，并参照 GB/T 40226 的相关要求做好环境 DNA 采样记录。

7.1.2 地表水样品采集按照 GB/T 40226 和 HJ 91.2 的相关要求执行；沉积物样品采集按照 HJ 494 的相关要求执行；土壤样品采集按照 GB/T 40226 和 HJ 166 的相关要求执行；地下水样品采集按照 GB/T 40226 和 HJ 164 的相关要求执行；大气样品采集按照 HJ/T 374 的相关要求执行；海水样品采集按照 GB/T 40226 和 HJ 442.1 的相关要求执行。

7.1.3 对于土壤、沉积物样品，每个点取样量保持一致（ ≥ 5 g），去除样品中的植物根系、砾石等杂质，将重复土样混合均匀，做好标记，装入灭菌封口聚乙烯袋或其他无菌容器。采集样品后，立即置于干冰或 -80°C 保存。若不能即刻转移，可暂存于低于 4°C 条件下（如冰盒），并于 30 min 内转移至干冰或 -80°C 保存。在干冰条件下进行运输。保存及运输过程避免反复冻融。

7.1.4 对于地表水、地下水、海水等样品，根据水体不同的浊度，宜使用无菌器材采集 4 L~200 L 不等的水样。连接真空泵和抽滤器，用镊子取不同孔径的混合纤维素酯滤膜置于玻璃滤膜台中央，盖上抽滤漏斗。浊度较大水样，先静置分离悬浮颗粒，再使用 20 μm 孔径滤膜预过滤，再选择 0.45 μm 孔径滤膜进行过滤。浊度较小水样，可选择 0.45 μm 孔径滤膜直接过滤。

7.1.5 在环境样品采集的同时准备阴性对照样品，土壤、沉积物、地表水、地下水、海水等样品可使用无菌水作为阴性对照，空气样品使用未经采样的滤膜作为阴性对照。

8 实验室检测

8.1 样品前处理

土壤、沉积物样品：采用固定剂保存的样品，以不低于 12000 rpm 转速离心 20 min，留取沉淀物。低温保存的样品经均质仪均质后冷冻干燥，充分混匀。

地表水、地下水、海水、空气样品过滤后的滤膜样品：利用研磨珠和 DNA 提取试剂中的裂解液将滤膜振荡破碎，必要时可先将滤膜剪碎。

8.2 DNA 提取

- 8.2.1 采用符合要求的 DNA 提取试剂盒（见 5.1.1）完成，具体操作步骤可参考试剂盒要求。
- 8.2.2 DNA 提取过程，宜以无菌水作为提取阴性对照；每批样品设置不少于 2 个阴性对照，用于验证提取过程是否存在污染。

8.3 DNA 质量检测与保存

样品DNA浓度宜不低于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）宜为1.7~2.0。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。

8.4 PCR 扩增

- 8.4.1 针对不同生物类群选择 PCR 通用引物（见附录 A）扩增目标宏条形码序列，在引物序列两端添加碱基条形码（见附录 B），用于区分不同样品并减少测序错误。
- 8.4.2 每个样品设置 3 个平行样品，以削弱随机性的影响。
- 8.4.3 PCR 扩增反应体系：总体积一般为 25 μL，一般包括 PCR 试剂预混液、引物、模板 DNA（见 5.1.2），剩余体积用灭菌超纯水补齐。各组分浓度宜根据酶和实验优化条件确定。
- 8.4.4 PCR 反应程序设置：95℃预变性 5 min；95℃变性 30 s，每对扩增引物的扩增条件不同，推荐引物的退火温度可参考附录 A，退火时间为 30 s，72℃延伸 45 s；变性、退火、延伸过程共 35 个循环，最后 72℃下延伸 10 min。4℃保存扩增产物。
- 8.4.5 设置 PCR 扩增的阴性对照（以 DNA 提取阴性对照为模板）和阳性对照（含有目的片段的 DNA 为模板）。

8.5 PCR 反应产物的凝胶电泳检测

反应结束后，PCR反应产物采用1%~2%的琼脂糖凝胶、1×电泳缓冲液TAE（见5.1.3），在稳压150 V下电泳约30 min。依据胶图检测扩增的有效性。阴性对照无目的条带；阳性对照和受试样品在目标长度位置出现条带，判定PCR扩增结果是否合格的判定标准见表1。

表1 PCR 扩增结果是否合格的判定标准

PCR 产物类别	是否合格
A 类	合格，PCR 样品浓度≥15 ng/3 μL
B 类	风险样品 3 ng/3 μL≤PCR 样品浓度<15 ng/3 μL
C 类	不合格样品，无目的条带，PCR 样品浓度<3 ng/3 μL

8.6 混样

同一点位的平行样品PCR产物可按等总量原则混合；A类和B类样品可直接混样，C类样品应重新实验，不宜混样。

8.7 PCR 产物纯化和保存

将混样样品使用凝胶回收试剂盒（见5.1.4）回收PCR混合产物，TE缓冲液洗脱回收目标DNA片段。用荧光光度计检测PCR回收产物的总量。PCR产物在-20℃温度条件下保存，保存时间一般不超过1年。

8.8 建库

使用合适的文库构建试剂（见5.1.5）进行文库构建。对回收产物依次进行末端修复、接头连接及PCR扩增等建库操作。利用高通量核酸蛋白分析系统对构建完成的文库进行质控检测，文库的浓度和片段大小符合预期，质控合格后使用高通量测序仪进行测序。

8.9 高通量测序

使用合适的文库和高通量测序试剂（见5.1.6）进行高通量测序。将多个质检合格的文库按比例混合，参考GB/T 30989和GB/T 35537的相关要求，对PCR扩增产物进行测序。同一试验样品宜安排在同一批次上机测序。每个样品的预期有效序列数宜不少于100,000条。

9 结果分析

9.1 生物信息学分析

9.1.1 数据质控

对上机原始数据进行质量过滤，标准包括：

- 过滤长度小于100 bp的测序片段；
- 过滤碱基平均质量低于20的测序片段；
- 过滤不合格碱基比例超过5%的测序片段；
- 过滤N碱基数目超过3的测序片段。

9.1.2 序列拼接

将质控后的双端序列进行拼接，要求重叠区不少于16 bp且不允许有碱基错配。对拼接序列进行以下处理：

- 去除两端的引物序列；
- 保留长度在预期目标区间内的序列，具体范围为预期扩增长度 ± 20 bp；
- 剔除碱基错误率高于1%的序列；
- 去除可能的人为干扰序列污染，与相应片段的宏条形码序列进行比对，相似度高于98%且覆盖度高于90%的序列予以剔除。

9.1.3 聚类

将所有样品的拼接序列合并去冗余，获得唯一序列及其丰度。剔除丰度 ≤ 4 的序列以减少噪音，并去除嵌合体。随后通过以下任一方法生成可操作分类单元：

- OTU 聚类法：使用UPARSE算法对序列进行聚类，生成OTU。
- ASV 降噪法：使用UNOISE3算法识别真实扩增序列变体，去除低丰度污染序列，得到ASV。

9.1.4 物种注释和特征表

得到特征序列（即OTU或ASV序列）后，将样品质控后的拼接序列按相似度99%映射到特征序列上，计算每个样品在不同特征上的序列丰度，得到样品的特征丰度表。特征序列的物种分类学注释需要结合以下数据库的参考物种的序列比对信息，要求特征序列覆盖度大于90%，比对相似度不低于80%。

可参考以下数据库：

- NCBI 的 NT 库：<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>；
- BOLD 数据库：<https://id.boldsystems.org/>；
- Silva 数据库：<https://www.arb-silva.de/>；
- PLaniTS 数据库：<https://github.com/apallavicini/PLaniTS>；
- MitoFish 鱼类线粒体数据库：<https://mitofish.aori.u-tokyo.ac.jp/>；
- figshare 数据库：<https://info.figshare.com/>；
- ITS2 数据库：https://its2.bioapps.biozentrum.uni-wuerzburg.de/?group_pub。

根据上述数据库的比对结果,挑选比对分值(bitscore)最高的参考序列的物种信息作为注释模板,并按照相似度 80%、85%、90%、95%、99% 阈值临界点分别对纲、目、科、属、种五个分类层级进行截取。对于相似度阈值达到 99% 的所有参考序列(同为种水平注释),均作为候选物种。获取特征序列的物种注释信息后,生成注释特征表,见附录 C。

9.2 生物多样性指数分析

9.2.1 生物多样性指数可通过群落丰富度和群落多样性来反映。

9.2.2 群落丰富度指样品中物种的数量,可通过 Chao1 指数估计样品中的 OTU 数目。Chao1 值越大表示物种总数越多。

9.2.3 群落多样性是物种丰富度和物种均匀度的综合指标,可通过 Shannon-Wiener 指数进行评价。Shannon-Wiener 值越大表示生物多样性越高。

9.3 损害确认

对比评估区生态环境及其服务功能现状与基线,必要时开展专项研究,确定评估区生态环境损害的事实和损害类型。满足以下任一条件时,可确认存在生态环境损害:

- a) 评估区生物种群特征(如指示物种、濒危保护物种的相对丰度)与基线相比发生不利改变;
- b) 评估区有害生物(如病原微生物的相对丰度)与基线相比发生不利改变;
- c) 评估区生态系统特征(如生物多样性指数)与基线相比发生不利改变。

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 的相关要求。

10.2 平行样品

每个位点设置宜不少于 3 个生物平行样品,可根据试验需求和试验条件适当设置 DNA 提取、PCR 建库测序平行样品。平行样品的相对丰度取平均值作为位点的相对丰度。

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 DNA 提取实验中设置不少于 2 个 DNA 提取的阴性样品。

10.3.3 每批次 PCR 扩增实验时设置不少于 2 个 PCR 扩增阴性对照样品。

10.3.4 在 PCR 的结果中,阴性对照样品无目的条带,否则本批次样品重新检测。

10.3.5 混样时,阴性样本按照体积进行混样,而不是总量。

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 扩增实验设置不少于 2 个阳性对照样品。

10.4.3 阳性对照样品在目标长度位置出现条带。否则本批次样品重新检测。

附 录 A
(资料性)
常用 DNA 条形码扩增引物

环境DNA常用扩增引物见表A. 1。

表 A. 1 常用 DNA 条形码扩增引物

目标基因	引物名称	序列 (5' -3')	预期片段长度 (bp)	退火温度 (°C)
COI	Sauron-S878	GGDRCWGGWTGAACWGTWTAYCCNCC	~313	56°C
	jgHC02198	TAIACYTCIGGRTGICRAARAAYCA		
	mICOIintF	GGWACWGGWTGAACWGTWTAYCCYCC	~313	56°C
	jgHC02198	TAIACYTCIGGRTGICRAARAAYCA		
12S	MiFish-U/E-F	GTYGTTAAWCTCGTGCCAGC	~171	58°C
	MiFish-U/E-R	CATAGTGGGTATCTAATCCYAGTTTG		
	MetafishF1	TCGTGCCAGCCACCGCGTTA	~165	58°C
	MetafishR1	ATAGTGGGTATCTAATCCAG		
18S	V8F	ATAACAGGTCTGTGATGCCCT	~382	57°C
	1510R	CCTTCYGCAGGTTACCTAC		
	TAReuk454FWD1	CCAGCASCYCGGTAATTCC	~382	56°C
	TAReukREV3r	ACTTTCGTCTTGATYRA		
rbcL	rbcLChloF24F	CGTATGACTCCWCAACCWGG	~400	55°C
	rbcLChlo411R	GGTTAATWGTACAWCCTAA		
	rbcL2_F	YGATGGACTTACNAGTCTTGATCGTTACAAAGG	~280	55°C
	rbcL2_R	GNCCATAYTTRTTCAATTATCTCTTCAACTTGGATNCC		
ITS	ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	~280	56°C
	5.8S	CGCTGCGTTCTTCATCG		
	ITS5	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	~306	56°C
	ITS2	GCTGCGTTCTTCATCGATGC		
16S	338F	ACTCCTACGGGAGGCAGCA	~470	53°C
	806R	GGACTACHVGGGTWTCTAAT		
	515F	GTGCCAGCMGCCGCGGTAA	~310	53°C
	806R	GGACTACHVGGGTWTCTAAT		

附 录 B
(资料性)

12 碱基条形码参考序列

作为PCR引物标记的12碱基条形码参考序列见表B. 1。

表 B. 1 12 碱基条形码参考序列

序号	序列	序号	序列	序号	序列
1	AGCTGTCGGTAA	21	GTATAGTCTGTG	41	GTACGCTGTAAG
2	GCAAAGGTCAC	22	AAGTGCACGTAA	42	TACCGCAATGGA
3	CTTAGAATCCGA	23	AACCAACCTTGG	43	CTCGATCTCGCT
4	GTCCGTACCTTG	24	TGTTATTGCGTG	44	GCTGGGCTATTG
5	AACGCATGAGGA	25	CCTAACCTGGAA	45	CGAGGGTGTCTT
6	CTGTTGACTGAC	26	GTCGAGCTCCTA	46	GAAGTCAACTGG
7	GTTACGTATTCG	27	GGACGTACTCTC	47	GTGGCTTCACCA
8	CACCCTCCTAGA	28	TAAGGTAACGAC	48	TGCTACGGTCTT
9	TGGTTAGTTGCG	29	TGGAATTCCTCC	49	AGTTTCTCGCAA
10	CAGTGAGATACG	30	GTTGGTGTTCCT	50	TAGCGGAATTGC
11	G TTCAGGTGTAC	31	AGGCAAGCACTG	51	GGCGACGGATTC
12	TGGCTAATGCCG	32	TTACCTAGCAAG	52	GGTGTTAAGCGG
13	CTGGTCAGACGA	33	AGCTTGCTTCCA	53	AACTTGCAGGTA
14	TCTCGATAGGCT	34	GAAGGCTTAGCT	54	GCAACAATCGAC
15	TCTATGGTACAG	35	AACCAACCGTTC	55	TGTATGTTGAG
16	GGTCCAAGGTCT	36	TATCGACATTCC	56	CATGTGGAGTTG
17	CTCTGCTATCCT	37	AGTAAGACCGTA	57	CGTCACGATGAC
18	TGTGATGGAAGG	38	ACGCTGCGTAGA	58	GTCTTGATGTCC
19	CCTATCAAGGAC	39	AGATTCGGTTAC		
20	TTCTGTTACGCA	40	GGTTATGACGTC		

附 录 C
(资料性)
环境 DNA 物种检测统计表

环境DNA检测结果见表C. 1。

表 C. 1 环境 DNA 物种检测统计表

检测单位				项目名称	
采集日期				检测日期	
目标片段				测序引物	
纲	目	科	属	种	物种名称

参 考 文 献

- [1] GB 17378—2007（所有部分） 海洋监测规范
- [2] GB 19489—2008 实验室 生物安全通用要求
- [3] GB/T 29859—2013 生物信息学术语
- [4] GB/T 30989—2014 高通量基因测序技术规程
- [5] GB/T 35537—2017 高通量基因测序结果评价要求
- [6] GB/T 35890—2018 高通量测序数据序列格式规范
- [7] GB/T 39791.1—2020 生态环境损害鉴定评估技术指南 总纲和关键环节 第1部分：总纲
- [8] GB/T 40171—2021 磁珠法DNA提取纯化试剂盒检测通则
- [9] GB/T 40664—2021 用于高通量测序的核酸类样本质量控制通用要求
- [10] HJ 194—2017 环境空气质量手工监测技术规范
- [11] SN/T 4278—2015 国境口岸医学媒介昆虫DNA条形码鉴定操作规程
- [12] SN/T 4835—2017 实验室 生物废弃物管理要求
- [13] WS/T 10011.5—2023 公共卫生检测与评价实验室常用名词术语标准 第5部分：分子生物学检测
- [14] DB11/T 2023—2022 鱼类贝类环境DNA识别技术规范
- [15] DB11/T 2358—2024 淡水大型底栖无脊椎动物环境DNA监测技术规范
- [16] DB32/T 4539—2023 淡水生物 环境DNA监测技术方法
- [17] T/CSES 80—2023 淡水生物DNA条形码构建技术规程
- [18] T/CSES 81—2023 淡水生物监测 环境DNA宏条形码法
- [19] T/CSES 82—2023 基于环境DNA的淡水生物评价技术指南