

# 团 体 标 准

T/GDSES XXXXX

## 生态环境损害鉴定评估指南 环境 DNA 检测技术

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

20XX-XX-XX 发布

20XX-XX-XX 实施

广东省环境科学学会 发 布



# 目 次

前 言 .....	III
引 言 .....	IV
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 .....	3
5 试剂 .....	3
6 仪器设备和材料 .....	4
7 准备阶段 .....	5
8 样品采集与保存 .....	5
9 分析测试 .....	6
10 结果分析 .....	7
11 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 .....	10
附录 B（资料性） 12 碱基条形码参考序列 .....	11
附录 C（资料性） 环境 DNA 物种检测统计表 .....	12
参考文献 .....	13

T/GDSES XXXXX

## 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。

请注意本标准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学会提出并归口。

本文件起草单位：。

本标准主要起草人：

本文件首次制定。

## 引 言

为贯彻《中华人民共和国民法典》《中华人民共和国环境保护法》等法律法规和《生态环境损害赔偿制度改革方案》《生态环境损害赔偿管理规定》等文件，保护生态环境，保障公众健康，规范生态环境损害鉴定评估工作，完善生态环境损害鉴定评估技术体系，制定本标准。

# 生态环境损害鉴定评估指南 环境 DNA 检测技术

## 1 范围

本文件规定了支撑开展生态环境损害鉴定评估的环境DNA (eDNA) 检测技术要求, 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。

本文件适用于地表水、沉积物、土壤、地下水、海水、大气等环境介质中环境DNA检测, 以及基于该检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 17378 海洋监测规范
- GB 19489 实验室 生物安全通用要求
- GB/T 29859 生物信息学术语
- 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
- 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 39791.4 生态环境损害鉴定评估技术指南 总纲和关键环节 第4部分: 土壤生态环境基线调查与确定
- 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 40171 磁珠法DNA提取纯化试剂盒检测通则
- GB/T 40226 环境微生物宏基因组检测 高通量测序法
- GB/T 40664 用于高通量测序的核酸类样本质量控制通用要求
- 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 194 环境空气质量手工监测技术规范
- HJ 442 近岸海域环境监测技术规范
- 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)
- HJ/T 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
- SN/T 4835 实验室 生物废弃物管理要求

## 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（水、土壤、沉积物、生物膜、空气等）或混合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—2014，3.11]

### 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，根据物种间特定DNA序列差异识别物种，进而获取物种组成和群落结构。

### 3.6

#### 索引 index

通过PCR或文库准备过程中为每个样品添加1个短序列的核苷酸碱基对，允许多个样品在一个高通量测序运行中被汇集。这个序列对于运行中的每个样本都是不同的，并使序列能够在测序后分配回他们来自的样本。

### 3.7

#### 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。

### 3.8

#### 扩增序列变体 amplicon sequence variants; ASV

DNA宏条形码技术中，通过生物信息学剔除PCR扩增和测序产生的错误序列后形成的独特DNA序列，即任意两条序列间至少有一个碱基存在差异。



## 3.9

**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]

## 3.10

**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]

## 3.11

**生物多样性调查评估 biodiversity survey and assessment**

基于环境DNA检测数据，分析特定区域内物种的组成、数量、分布及群落结构特征，评估生态系统多样性状况的过程。

## 3.12

**生态环境损害确认 ecological and environmental damage confirmation**

依据环境DNA检测结果反映的物种变化、群落结构异常等信息，结合环境基线，确认生态环境是否发生损害的过程。

## 4 工作程序

工作程序见图1所示。

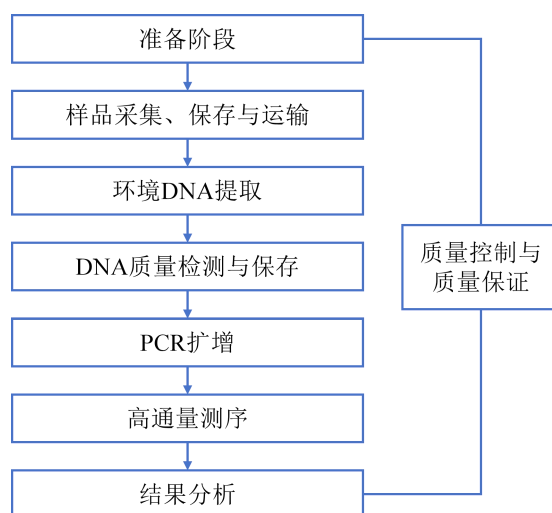


图1 检测流程图

## 5 试剂

## 5.1 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 环境 DNA 提取试剂

推荐使用市售的适合于环境样本的DNA提取试剂盒。

## 5.3 PCR 扩增试剂

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

5.3.2 PCR 扩增试剂：推荐使用市售的预混型 PCR 试剂预混液。宜选用高效、高特异性的热启动 DNA 聚合酶，以适应复杂环境样本的扩增，并有效降低非特异性扩增。

## 5.4 DNA 凝胶电泳试剂

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

5.4.2 琼脂糖凝胶：使用 1%~2%琼脂糖凝胶。取市售的琼脂糖，加入电泳缓冲液配制。

5.4.3 DNA 分子量标准（含上样缓冲液）：使用市售的 DNA 分子量标准，其线性范围应覆盖 100 bp 至 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。

5.4.4 DNA 染料：推荐使用市售无毒性或低毒性 DNA 染料。

## 5.5 DNA 胶回收试剂

推荐使用市售的胶回收试剂盒。

## 5.6 DNA 建库试剂

推荐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。

## 5.7 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。

# 6 仪器设备和材料

## 6.1 仪器设备

6.1.1 高压蒸汽灭菌器：可达到 121 °C，0.1 MPa 灭菌条件。

6.1.2 烘箱：室温~250 °C可调。

6.1.3 微量移液器：0.2 μL~2 μL、1 μL~10 μL、20 μL~200 μL、100 μL~1,000 μL。

6.1.4 制冰机。

6.1.5 超纯水仪。

6.1.6 水浴锅：室温~100 °C可调。

6.1.7 超净工作台。

6.1.8 低温离心机：最高离心转速不低于 13,000 rpm，温控范围低至 4 °C。

6.1.9 涡旋仪。

- 6.1.10 超微量紫外分光光度计：最小测量体积不高于 1  $\mu\text{L}$ ，波长范围包括 230 nm、260 nm 和 280 nm，检出限 1 ng/ $\mu\text{L}$ (dsDNA)。
- 6.1.11 荧光光度计。
- 6.1.12 PCR 仪：PCR 反应程序可编辑。
- 6.1.13 凝胶成像分析系统：302 nm 光源。
- 6.1.14 电子天平。
- 6.1.15 电泳仪：水平式。
- 6.1.16 电泳槽：水平式。
- 6.1.17 切胶仪。
- 6.1.18 高通量核酸蛋白分析系统。
- 6.1.19 高通量测序仪：测序读长满足 PCR 产物测序长度的要求。

## 6.2 材料

- 6.2.1 无菌手套。
- 6.2.2 口罩。
- 6.2.3 无菌离心管：1.5 mL、2 mL、5 mL、50 mL，无 DNA 和生物残留。
- 6.2.4 无菌冻存管：1.5 mL、2 mL、5 mL、50 mL，无 DNA 和生物残留。
- 6.2.5 枪头：10  $\mu\text{L}$ 、200  $\mu\text{L}$ 、1,000  $\mu\text{L}$  等，无 DNA 和生物残留。宜使用带滤芯枪头以防气溶胶污染。
- 6.2.6 PCR 管与板：200  $\mu\text{L}$  PCR 管，八联管或 96 孔 PCR 板，无 DNA 和核酸酶。
- 6.2.7 密封膜：无核酸酶 PCR 封板膜。
- 6.2.8 消毒用品：75%酒精、核酸清除剂。

## 7 准备阶段

### 7.1 资料收集和现场踏勘

参照 GB/T39791.2 开展资料收集、现场踏勘和人员访谈，获取污染事件调查需要的信息，确定调查重点。

### 7.2 采样方案制定

应先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，设置污染区域和对照区域。

土壤和地下水采样方案制定执行 GB/T 39792.1；地表水和沉积物采样方案制定执行 GB/T 39792.2；大气采样方案执行 HJ 664；海洋采样方案执行 HJ 442。现有标准中未规定采样点位数量的，每个采样区域应设置至少 3 个重复采样点位，保证所取样本对所在采样区域的代表性。

## 8 样品采集、保存与运输

### 8.1 样品采集

根据采样方案开展样品采集。可选取一种或多种适宜的采样介质作为环境 DNA 来源。每个点位应采集至少 3 个重复样品，并做好环境 DNA 采样记录。无论选用何种采样介质，均应优先在现场完成环境 DNA 富集；不满足现场富集条件时，则应按终浓度 0.01%添加阳离子表面活性剂类杀菌剂或将采样介质存放在单独的无菌洁净容器内置于干冰、液氮等超低温环境中储存，并在 24 h 内完成环境 DNA 富集；若不满足上述条件，则应将采样介质存放在单独的无菌洁净容器内置于干冰、液氮等超低温环境中长期储存，以便带回实验室完成环境 DNA 富集。

地表水样品执行 HJ 91.2；沉积物样品执行 HJ 494；土壤样品采集执行 HJ/T 166；地下水样品执行 HJ 164；大气样品执行 HJ/T 374；海水样品执行 HJ 442。

在环境样本采集的同时准备阴性对照样本，沉积物、土壤和水样可使用无菌水作为阴性对照，空气样本使用未经采样的滤膜作为阴性对照。

## 8.2 样品保存与运输

采集的土壤、沉积物样品，应立即置于干冰或-80℃保存。若不能即刻转移，可暂存于≤4℃条件下（如冰盒），30 min 内转移至干冰或-80℃保存。

采集的地表水、地下水、海水、空气样品过滤后的滤膜样品，应放置于无菌容器，应立即置于干冰或-80℃保存。若不能即刻转移，可暂存于≤4℃条件下（如冰盒），30 min 内转移至干冰或-80℃保存。

应在干冰条件下进行运输。保存及运输过程应避免反复冻融。如需常温保存或运输，宜将样品浸润于稳定剂中。

## 9 实验检测

### 9.1 样品前处理

采集的土壤、沉积物样品：固定剂保存的样品应高速（不低于 12000 rpm）离心 20 min，留取沉淀物。低温保存的样品可进均质仪均质后冷冻干燥，充分混匀。

采集的地表水、地下水、海水、空气样品过滤后的滤膜样品：利用研磨珠和裂解液将滤膜振荡破碎，必要时可先将滤膜剪碎。

### 9.2 DNA 提取

9.2.1 根据不同的样本类型选择市售的 DNA 提取试剂盒提取样品中的 DNA。DNA 提取的具体操作步骤参照试剂盒说明书。

9.2.2 提取过程中，每次都应设置无菌水作为提取的阴性对照。其中每批样本应设置 2 个阴性对照样本，用于验证 DNA 提取流程无污染。

### 9.3 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（OD 260 nm/OD 280 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。

### 9.4 PCR 扩增

9.4.1 针对不同生物类群选择 PCR 通用引物扩增目标宏条形码序列，在引物序列双端添加碱基条形码，用于扩增大批量样品时区分样品以及减少测序过程中引入的错误。推荐的碱基条形码见附录表 B.1。

9.4.2 每个样品设置 3 个重复样品，以削弱随机性的影响。

9.4.3 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，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。

9.4.4 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.1，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。

9.4.5 应设置 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）。

## 9.5 PCR 反应产物的凝胶电泳检测

反应结束后,PCR产物采用1%~2%的琼脂糖凝胶,1X电泳缓冲液TAE,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,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 $\geq 15$ ng/3 $\mu$ L
B 类	风险样本 $3$ ng/3 $\mu$ L $\leq$ PCR 样品浓度 $< 15$ ng/3 $\mu$ L
C 类	不合格样本, 无目的条带, PCR 样品浓度 $< 3$ ng/3 $\mu$ L

## 9.6 混样

将3个PCR重复产物混合,其中A类样本和B类样本可以直接进行混样,按等总量原则进行混样,C类样本应重新进行实验,不建议混样。

## 9.7 PCR 产物纯化和保存

将混样样本使用凝胶回收试剂盒回收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。

## 9.8 建库

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应符合预期,质控合格后使用高通量测序仪进行测序。

## 9.9 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对宏条形码扩增产物进行测序。同一试验样本宜安排在同一批次上机测序。每个样本的预期的有效序列数不低于100,000条。

# 10 结果分析

## 10.1 生物信息学分析

### 10.1.1 数据质控

对下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。

### 10.1.2 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 $\pm 20$  bp;
- 剔除碱基错误率高于1%的序列;

d) 去除可能的人类序列污染，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。

### 10.1.3 聚类

将所有样本的拼接序列合并去冗余，获得唯一序列及其丰度。剔除丰度 $\leq 4$ 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：

- a) OTU 聚类法：使用 UPARSE 算法对序列进行聚类，生成 OTU。
- b) 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。

### 10.1.4 物种注释和特征表

得到特征序列（即 OTU 或 ASV 序列）后，将样本质控后的拼接序列按相似度 99%映射到特征序列上，计算每个样本在不同特征上的序列丰度，得到样本的特征丰度表。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%。

可以参考以下数据库：

- a) NCBI 的 NT 库：<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>;
- b) BOLD 数据库：<https://id.boldsystems.org/>;
- c) Silva 数据库：<https://www.arb-silva.de/>;
- d) PLanITS 数据库：<https://github.com/apallavicini/PLanITS>;
- e) MitoFish 鱼类线粒体数据库：<https://mitofish.aori.u-tokyo.ac.jp/>;
- f) figshare 数据库：<https://info.figshare.com/>;
- g) ITS2 数据库：[https://its2.bioapps.biozentrum.uni-wuerzburg.de/?group\\_pub](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.1。

## 10.2 生物多样性指数分析

生物多样性指数可以通过群落丰富度和群落多样性来反映。

群落丰富度指的是一个样本中物种数目的多少，可以通过 Chao1 指数估计样本中所含 OTU 数目。Chao1 值越大表示物种总数越多。

群落多样性指的是物种丰富度和物种均匀度的综合指标，可以通过 Shannon-Winner 指数衡量。Shannon-Winner 值越大表示生物多样性越高。

## 10.3 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。生态环境损害确认应满足以下任一条件：

- 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。

## 11 质量保证和质量控制

### 11.1 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。

## 11.2 平行样品

每个位点应设置至少 3 个生物重复样品，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。

## 11.3 阴性对照试验

11.3.1 阴性对照样品为灭菌超纯水。

11.3.2 每批次 DNA 提取实验中应设置不少于 2 个 DNA 提取的阴性样品。

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

11.3.4 在 PCR 的结果中，阴性对照样品应无目的条带，否则本批次样品应重新检测。

11.3.5 混样时，阴性样本应按照体积进行混样，而不是总量。

## 11.4 阳性对照试验

11.4.1 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。

11.4.2 每次 PCR 扩增实验应设置不少于 2 个阳性对照样品。

11.4.3 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。

## 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
	jjHCO2198	TAIACYTCIGGRTGICCRAARAAYCA		
	mIColintF	GGWACWGGWTGAACWGTWTAYCCYCC	~313	56°C
	jjHCO2198	TAIACYTCIGGRTGICCRAARAAYCA		
12S	MiFish-U/E-F	GTGGTAAAWCTCGTGCCAGC	~171	58°C
	MiFish-U/E-R	CATAGTGGGGTATCTAATCCYAGTTTG		
	MetafishF1	TCGTGCCAGCCACCGCGGTTA	~165	58°C
	MetafishR1	ATAGTGGGGTATCTAATCCCAG		
18S	V8F	ATAACAGGTCTGTGATGCCCT	~382	57°C
	1510R	CCTTCYGCAGGTTACCTAC		
	TAREuk454FWD1	CCAGCASCYGCGGTAATTCC	~382	56°C
	TAREukREV3r	ACTTTCGTCTTGATYRA		
rbcL	rbcLChloF24F	CGTATGACTCCWCAACWGG	~400	55°C
	rbcLChlo411R	GGTTTAATWGTACAWCCTAA		
	rbcL2_F	YGATGGACTTACNAGTCTTGATCGTTACAAAGG	~280	55°C
	rbcL2_R	GNCCATAYTTRTTCAATTTATCTCTTTCAACTTGGATNCC		
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	GTTACGTATTCTG	27	GGACGTACTCTC	47	GTGGCTTCACCA
8	CACCCTCCTAGA	28	TAAGGTAACGAC	48	TGCTACGGTCTT
9	TGGTTAGTTGCG	29	TGGAATTCCTCC	49	AGTTTCTCGCAA
10	CAGTGAGATACG	30	GTTGGTGTTCCT	50	TAGCGGAATTGC
11	GTTCAAGGTGTAC	31	AGGCAAGCACTG	51	GGCGACGGATTCT
12	TGGCTAATGCCG	32	TTACCTAGCAAG	52	GGTGTTAAGCGG
13	CTGGTCAGACGA	33	AGCTTGCTTCCA	53	AACTTGCAGGTA
14	TCTCGATAGGCT	34	GAAGGCTTAGCT	54	GCAACAATCGAC
15	TCTATGGTACAG	35	AACCAACCGTTC	55	TGTATGTTTCGAG
16	GGTCCAAGGTCT	36	TATCGACATTCC	56	CATGTGGAGTTG
17	CTCTGCTATCCT	37	AGTAAGACCGTA	57	CGTCACGATGAC
18	TGTGATGGAAGG	38	ACGCTGCGTAGA	58	GTCTTGATGTCC
19	CCTATCAAGGAC	39	AGATTTCGGTTAC		
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/T 35537—2017 高通量基因测序结果评价要求
  - [2] DB32/T 4539—2023 淡水生物 环境DNA监测技术方法
-