

《基于环境 DNA 的长江水生生物监测
与完整性评价技术导则》

编制说明

（征求意见稿）

《基于环境 DNA 的长江水生生物监测与完整性评价技术导则》

编制组

二〇二五年三月

目 次

1 项目背景	1
1.1 任务来源	1
1.2 起草单位和主要起草人	1
1.3 工作过程	1
2 标准制订的必要性	2
2.1 管理支撑	2
2.2 技术进步	2
3 国内外研究进展	3
3.1 国外研究进展	3
3.2 国内研究进展	5
3.3 前期研究成果	5
4 编制原则和技术路线	6
4.1 编制原则	6
4.2 技术路线	6
5 标准主要技术内容	7
5.1 总体框架	7
5.2 适用范围	8
5.3 规范性引用文件	8
5.4 术语和定义	9
5.5 工作程序	10
5.6 基于环境 DNA 的长江水生生物监测	11
5.7 水生生物完整性评价	35

6 标准实施建议	37
6.1 确保资源和技术准备充分	37
6.2 加强质量控制和质量保证体系建设	37
6.3 加强培训与能力建设	38
参考文献	39

1 项目背景

1.1 任务来源

依托国家重点研发计划课题——“水生态系统完整性技术体系集成与管理应用”，经中国环境科学研究院等单位申请与开题论证，2024年5月10日，重庆市环境科学学会对《基于环境DNA的长江水生生物监测与完整性评价技术导则》团体标准立项（渝环学[2024]12号），标准性质为推荐性。

1.2 起草单位和主要起草人

《基于环境DNA的长江水生生物完整性评价技术导则》的主要起草单位为中国环境科学研究院、广东工业大学、上海海洋大学、白洋淀流域生态环境保障中心。

主要起草人：闫振广、乔桥、凌佳楠、王书平、周静博、张远、李晨虹、孙福红、范俊韬、郑欣、门姝慧、王鹏远。

1.3 工作过程

2024年1月，依托国家重点研发计划课题——“水生态系统完整性技术体系集成与管理应用”，在长期研究的基础上，中国环境科学研究院牵头，与广东工业大学、上海海洋大学共同组成标准编制组。

2024年4月，标准编制组向重庆市环境科学学会申请团体标准立项。同月16日，重庆市环境科学学会组织召开了标准开题论证会，经编制组汇报与专家质询，论证会专家一致同意开题。

2024年4月—2025年2月，标准编制组在调研国内外相关研究进展、多轮内部研讨、多次咨询国内优势科研单位专家意见的基础上，编制完成标准的初审稿及编制说明。

2025年2月28日，重庆市环境科学学会组织召开了初审稿审议会，编制组

根据专家意见对初审稿标准文本及编制说明进一步修改完善，形成标准的技术审查稿及编制说明。

2 标准制订的必要性

2.1 管理支撑

我国正处在由传统的水质监测向水质和水生态监测转变的重要时期，长江幅员辽阔，生物多样性高，迫切需要开展生物完整性的监测与保护^[1]。生态环境部发布的《生态环境监测规划纲要（2020—2035年）》中提出“地表水监测要逐步实现水质监测向水生态监测的系统转变，建立以流域为单元的水生态监测指标体系和评价体系”。“十四五”重点流域水生态环境保护规划要求在长江、辽河、海河、松花江等流域开展水生生物环境 DNA 监测试点。2020年农业农村部发布《长江十年禁渔计划》，在长江流域严格禁渔，而传统的形态学鉴定损伤性的取样方式对目标生物群落造成破坏，违背了保护生物多样性和生态系统完整性的初衷，因此，环境 DNA 监测技术展示出强大应用前景。

2.2 技术进步

现行标准和技术规范不足以支撑长江水生态环境管理和生物完整性保护工作的需要。传统生物监测需要借助专业设备，不利于开展大规模的现场调查。此外，通过形态学鉴定的方法进行水生物种监测具有多种局限性：（1）采样要求高，监测效率低。一次采样难以全面准确的采集到合格的样品，造成样品代表性差；（2）分类鉴定过于依赖专家的经验，对研究人员的经验要求较高，质控困难；（3）在生活史早期阶段的部分生物类群以及特定发育阶段的生物往往难以辨别，影响鉴定结果的准确性等。因此，亟需建立低成本、高灵敏度、高效率的新型水生生物监测技术和方法。

环境 DNA（environmental DNA，环境 DNA）是从环境介质中提取到的多种不同物种 DNA 的总和，包含动植物脱落的细胞或游离的 DNA，现已被广泛应用

于水生生物多样性监测中^[2]。相对于传统的形态学监测方法，环境 DNA 技术的优势包括：（1）采样简单，省时省力；（2）无损伤采样，对生态系统干扰较少；（3）灵敏度高，即使物种密度很低也能准确检测到其存在；（4）能快速和高效检测群落多样性；（4）流程的标准化程度高，易重复，便于质量控制。因此，环境 DNA 技术已逐渐成熟，成为新一代生物监测方法，为长江水生态完整性保护提供有力支撑。

《基于环境 DNA 的长江水生生物监测与完整性评价技术导则》将为长江水生生物监测与生态完整性保护提供新型的分子生物学方法，满足长江大保护中生物完整性监测与评估的技术需求。

3 国内外研究进展

3.1 国外研究进展

关于环境 DNA 的报道最早可以追溯到 1987 年^[3]，而正式应用则是在 21 世纪初应用于环境微生物的检测^[4]。2005 年 Tringe 等^[5]通过对从环境中获得的微生物基因片段成功预测蛋白组并获得了足够的微生物群落信息，这是环境 DNA 在生态系统研究中初始的应用方式。

环境 DNA 技术也广泛用于珍稀物种调查。如，淡水珍珠贻贝，其大多数居于底泥中，甚至埋在泥下，且不同物种之间的形态学差异较小，这就使得在传统的淡水珍珠贻贝调查中，对目标物种难以发现和识别。2017 年 Charise 等^[6]人在对珍稀淡水贻贝的调查评估研究中，验证了 4 种珍稀贻贝的环境 DNA 监测技术，说明了环境 DNA 技术可以有效的对目标贻贝进行监测。同时越来越多的研究报道了利用环境 DNA 技术监测到了环境中的珍稀物种，如在哥伦比亚流域的大鳞大麻哈鱼（*Oncorhynchus tshawytscha*）^[7]，在日本桂川河流域检测到日本大鲵（*Andrias japonicus*）^[8]，在比利时检测到欧洲特有的泥鳅（*Misgurnus fossilis*）^[9]。

伴随着全球范围内国际交往的日益频繁，各地的入侵种显现也变得越来严重。入侵种可能会对原对生态系统的结构、功能造成严重的影响。避免引进和减少外来物种的传播是保护当地生态环境的重中之重。随着 eDNA 分析在低密度物

种中的成功应用，eDNA 方法已扩展到入侵物种入侵早期。2008 年法国的研究者利用环境 DNA 技术成功的发现了环境中美国牛蛙的 DNA 片段^[10]，该方法立即引起了对入侵生物学感兴趣的研究人员的注意。在利用环境 DNA 监测入侵种的研究中很多方法针对某个物种而研发相应的特异性 PCR 引物，对环境中目标物种的 DNA 进行针对性扩增以检测到该物种的存在。Antoinette 等在佛罗里达水域展开对入侵种缅甸蟒 (*Burmese python*)^[11]监测方法的研究，研究者们开发出缅甸蟒的特异性 PCR 引物，并成功的实现了对环境 DNA 中缅甸蟒的线粒体细胞色素 b 基因特异性扩增，并且发现被检测物种的 DNA 可以在环境中保存长达 96 小时，由此可见环境 DNA 可以有效的提高物种的监测效率。在特异性物种监测方面环境 DNA 已经成为一种日益成熟，且更加经济便捷的方法。

另外，环境 DNA metabarcoding 技术可以实现对整个生物群落的监测。2014 年 Matthieu Leray 和 Nancy Knowlton 在对 Virginia 和 Florida 两地的底栖无脊椎生物群落结构的研究中使用 COI 基因为特异性识别片段^[12]，利用 DNA 条形码技术和宏条形码技术展开研究，较好的实现了对研究区域的底栖物种在属的水平上的分类，但是研究所得到的属水平的条形码数据只有一小部分能与公共数据库匹配，这更加说明环境 DNA 技术在物种监测上的巨大潜力，并提出了大规模环境 DNA 应用中对标准化采样的需要。Katherine 等以加拿大安大略省南部的两个大湖支流为研究区域，对环境水样进行分析得到了检测了 3 种濒危物种、1 种稀有物种，另外 78 种本地物种。

在环境 DNA 技术标准化方面，国际上已经制定了基于环境 DNA 的生物监测的标准、指南或手册。2015 年，美国内务部 (USI) 和美国地质调查局 (USGS) 发布了《环境 DNA 采样技术规范》。2019 年，日本环境 DNA 学会《环境 DNA 采样、实验手册》。2020 年，瑞士环境署颁布了联合苏黎世大学等单位发布了《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) 出台了《环境 DNA 生物评估方法指南》。2022 年，澳大利亚政府农业、渔业和林业部门倡议制定了《环境 DNA 生物监测手册》《环境 DNA 检测验证指南》。

综上，环境 DNA 技术在国内外发展已经较为成熟，被广泛应用于生态环境

监测工作中，发挥了重要作用。

3.2 国内研究进展

国内对环境 DNA 技术的研究虽然相对晚一些，但也已经开展了很多研究。从细菌^[13]、真菌^[14]、浮游生物^[15]、大型底栖无脊椎动物^[16]、鱼类^[2]到水生哺乳动物^[17]等各类群的监测上，都有环境 DNA 技术成功应用的案例。

在环境 DNA 相关的技术标准制定方面，国内已发布的标准有《高通量基因测序技术规程》（GB/T 30989—2014）、《高通量基因测序结果评价要求》（GB/T 35537—2017）、《高通量测序数据序列格式规范》（GB/T 35890—2018）、《环境微生物宏基因组检测高通量测序法》（GB/T 40226—2021）、中国环境科学学会团体标准《淡水生物监测环境 DNA 宏条形码法》（T/CSES 81—2023）、中国环境科学学会团体标准《水生生物环境 DNA 实验室建设技术要求》（T/CSES 148—2024）、北京市地方标准《鱼类贝类环境 DNA 识别技术规范（DB11/T 2023—2022）》、辽宁省地方标准《水质 DNA 条形码鉴定底栖动物（DB21/T 3794—2023）》、江苏省地方标准《淡水生物环境 DNA 监测技术方法（DB32/T 4539—2023）》等。通过上述这些标准方法的制定和发布，我国环境 DNA 技术的应用逐渐规范化。

3.3 前期研究成果

长期以来，编制组对环境 DNA 技术进行了深入研究，特别是依托国家重点研发计划长江专项，利用环境 DNA 技术对长江水生生物多样性和完整性进行了监测与评估，在长江流域从源头到入海口布设点位近百个，取样的水体类型覆盖干流、支流、湖泊等，对细菌、浮游生物、大型底栖无脊椎动物、鱼类，以及长江旗舰物种中华鲟和长江江豚等各种生物类群，开展了环境 DNA 监测与评估，申请环境 DNA 专利 5 项，发表环境 DNA 相关学术论文十余篇，较为全面的揭示了长江水生生物完整性状况，为长江水生态保护修复提供了技术支持。

4 编制原则和技术路线

4.1 编制原则

本标准按照重庆市环境科学学会规定的标准格式进行编写，以现行生态环境相关法律、法规、政策和规划中水生生物监测的相关要求为依据，符合各项法规要求，与现行相关标准协调衔接，满足水生态环境管理要求。标准编制的基本原则如下：

（1）科学性：充分考虑环境 DNA 及生物完整性评估的最新科学研究进展，吸纳最新科研成果。

（2）规范性：依据标准编制的各项规定进行编写，与已颁布的有关法规、标准内容不矛盾。

（2）合理性：总结现有文献资料及环境 DNA 监测技术的基础上，可操作性强，易于使用。

4.2 技术路线

基于长江水生生物完整性监测的工作需求，分析标准制订的必要性和开展前期准备工作，在资料调研和前期研究工作的基础上，梳理标准制定的相关问题并制定标准编制方案。参考目前发布的环境 DNA 及水生生物监测的相关技术方法和文件，在广泛征求专家意见的基础上开展标准的编制工作。基于长江水生生物完整性监测的实际情况，吸收专家和相关单位意见，对标准文本进行修改完善，逐步形成标准文本和编制说明。

技术路线和工作流程参见图 1。

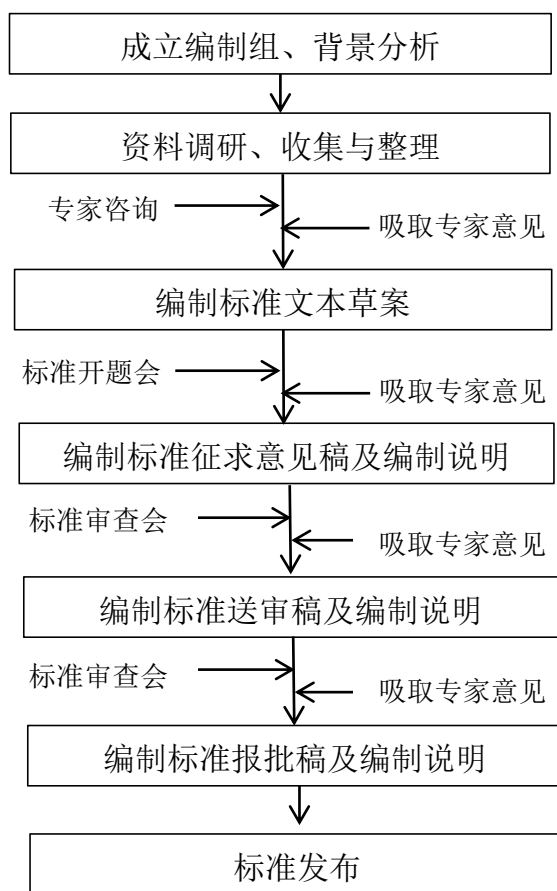


图 1 本标准编制的技术路线

5 标准主要技术内容

5.1 总体框架

本标准的主要条款包括：

第 1 章：范围。说明了本文件的主要内容及适用情景。

第 2 章：规范性引用文件。规定了在本标准制定过程中引用的相关规范性文件。

第 3 章：术语和定义。规定了本标准中使用的 5 个关键的术语和定义。

第 4 章：技术流程。规定了基于环境 DNA 的长江水生生物监测与完整性评

价步骤主要分为：环境 DNA 采样、DNA 提取、条形码基因扩增与高通量测序、生物信息学分析，以及生物完整性评价的具体指标和方法等。

第 5 章：基于环境 DNA 的长江水生生物监测。规定了如何基于环境 DNA 开展长江水生生物监测，具体包括：环境 DNA 采样、DNA 提取、条形码基因扩增、高通量测序、生物信息学分析和质量控制与保证等。

第 6 章：长江水生生物完整性评价。规定了开展长江水生生物完整性评价的方法步骤，具体包括：评价指标、指标赋分方法和评价步骤等。

附录：共包括 3 个附录，分别对长江水生态考核试点水体名单及重点保护水生生物期望值、长江水生生物监测点位清单、部分旗舰物种条形码基因扩增推荐引物等进行了规定。

5.2 适用范围

在本部分明确了本标准的适用范围，规定了基于环境 DNA 技术对长江水生生物进行监测与完整性评价的技术要求，以及说明了本文件适用于在长江流域范围内，对水生生物进行监测与生物完整性的评价，其他流域可参照使用。环境 DNA 技术的应用具有普遍性，虽然本标准是为长江水生生物监测与评价而建立，但对于其他水域具有参考价值。

5.3 规范性引用文件

本标准共引用了 9 项规范性引用文件，按照先国标、再行标、再团标的顺序，以及编号顺序列出，具体如下：

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 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）

SL/T 793 河湖健康评估技术导则

SN/T 4278 国境口岸医学媒介昆虫 DNA 条形码鉴定操作规程

T/CSES 81 淡水生物监测 环境 DNA 宏条形码法

5.4 术语和定义

本部分针对本标准中关键的 5 个术语和定义进行了规定，具体如下：

生物完整性 (biological integrity)：生态系统支持和维护区域内平衡的、完整的、自适应的生物群落的能力，以及生物群落所具有的与自然生境状态相适应的物种组成、多样性和功能的状况。

本术语定义修改自 HJ 1295—2023 的 3.6。原定义仅限定于水生态系统，与“生物完整性”的术语没有完全对应。

环境 DNA (environmental DNA)：环境样品中发现的源自于许多不同生物体的 DNA 复杂混合物，环境样品包括土壤、沉积物、水或空气等，样品中含有完整细胞、游离 DNA、甚至完整的生物体。

本定义综合参考了《淡水生物监测 环境 DNA 宏条形码法》(T/CSES 81—2023) 团体标准与期刊论文^[18]的表述。T/CSES 81—2023 中将环境 DNA 定义为：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生物遗传物质（DNA）。期刊论文^[18]中将环境 DNA 定义为：环境 DNA 指从水、沉积物、土壤、粪便、空气等环境介质中提取的各种生物的全部 DNA，可获得多种生物多样性信息。本标准针对二者进行优化整合，保留二者对“环境介质”的开放性描述，如水、土壤、沉积物、生物膜、空气等，吸纳期刊论文定义中“多种生物多样性信息”的核心理念，进一步补充环境 DNA 的物质载体（完整细胞、游离 DNA、甚至完整的生物体），明确其“DNA 复杂混合物”的复合属性。通过融合生物来源、介质范围及存在形式三要素，进一步完善了环境 DNA 的概念。

DNA 条形码 (DNA barcode)：一种利用生物体细胞核或细胞器中特定的、标准的短 DNA 序列来快速鉴别和分类物种的分子工具，该序列具备种间变异性

和种内保守性。

本定义参考了《淡水生物监测 环境 DNA 宏条形码法》(T/CSES 81—2023)与期刊论文^[19]当中对 DNA 条形码的概念描述。T/CSES 80—2023 将 DNA 条形码定义为：生物体细胞核或者细胞器中能够代表该物种的标准的、有足够变异的、易扩增的短 DNA 序列，可用于生物体的识别和鉴定。期刊论文^[19]中阐述 DNA 条形码技术是对 DNA 条形码序列分析实现物种快速准确鉴定的一种手段，具有快速、准确性高、操作便捷等优点。本标准以“种间变异性与种内保守性”替代原定义中“足够变异”的模糊表述，避免因变异阈值不清导致的物种误判；保留“细胞核或细胞器”来源描述，同时通过“特定的、标准的短 DNA 序列”修饰定义边界。

索引 (index)：通过 PCR 或文库准备过程中为每个样品添加一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它们来自的样本。

操作分类单元 (operational taxonomic unit)：DNA 条形码技术中，高通量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。

本定义参考《淡水大型底栖无脊椎动物环境 DNA 监测技术规范》(DB11_T 2358-2024)当中对操作分类单元的术语定义：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。本标准增加“DNA 条形码技术中”限定词，明确操作分类单元的生成依托靶向扩增与测序流程；以“高通量测序数据”替代“测序数据”，强调现代环境 DNA 监测依赖的高通量、大规模测序技术。

5.5 工作程序

参照国际最新研究成果以及发布的相关技术规范，本标准规定基于环境 DNA 的长江水生生物监测与完整性评价步骤分为环境 DNA 监测和完整性评价两个部分，其中环境 DNA 监测部分包括：环境 DNA 采样、DNA 提取、条形码基因扩增、高通量测序、生物信息学分析和质量控制与保证等步骤；生物完整性

评价包括评价指标、指标赋分方法和评价步骤等，技术流程如下：

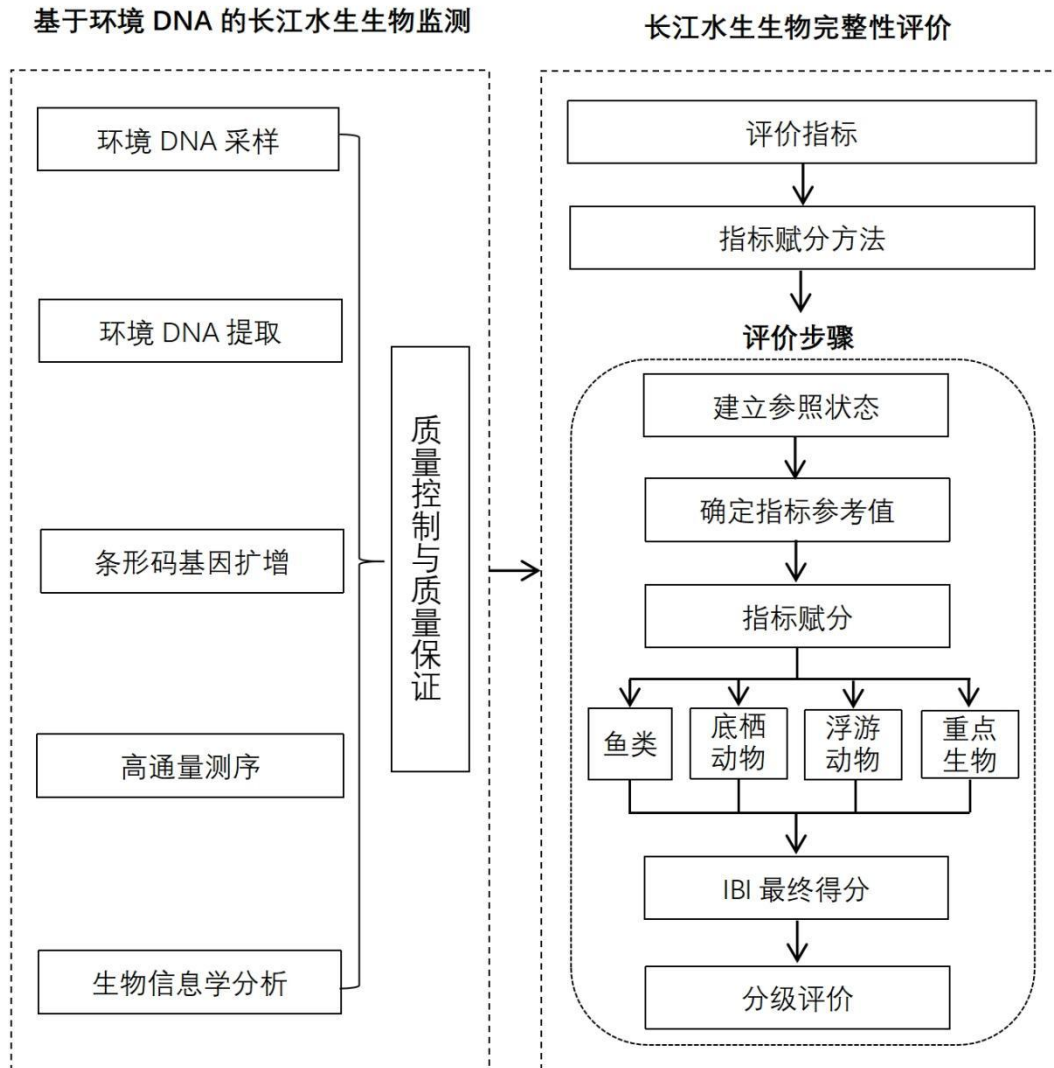


图2 基于环境 DNA 的长江水生生物监测和完整性评价技术流程

5.6 基于环境 DNA 的长江水生生物监测

5.6.1 环境 DNA 采样

5.6.1.1 目标生物类群及采样介质

根据国内外相关研究结果，鱼类和浮游动物以及重点保护水生生物释放的环境 DNA 在环境水体中有丰富的分布，因此这几个类群环境 DNA 的采样介质可以规定为方便采样的水样，而对于大型底栖无脊椎动物来说，由于表层底泥中含

有的环境 DNA 的浓度一般情况下高于水体，因此，对于大型底栖无脊椎动物比较理想的采样介质为表层沉积物，在实践中从表层底泥中提取得到底栖动物环境 DNA 的浓度也高于水体。因此，结合《长江流域水生态监测方案（试行）》中关于监测的水生生物类群的规定，本标准规定长江水生生物监测和完整性评价的生物类群主要包括浮游动物、大型底栖无脊椎动物、鱼类和重点保护水生生物（含旗舰物种）等，其环境 DNA 的常见采样介质及适用水体类型见表 1。

表1 水生生物类群及其环境DNA采样介质

水生生物类群	常用采样介质	适用水体类型
鱼类	水体	河流、湖库
大型底栖无脊椎动物	表层沉积物	河流、浅水湖泊
浮游动物	水体	湖泊
重点保护水生生物	根据栖息环境确定	有重点保护水生生物分布的水体

5.6.1.2 采样点位、频次和时间

参照《水生态监测技术指南 河流水生生物监测与评价（试行）》和《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）》中的规定，结合《长江流域水生态监测方案（试行）》，按照科学性、代表性、延续性、差异性和可达性的原则，确定采样点位的布设、采样频次及采样时间。根据现场的河湖水文、污染等状况，避开死水区、回水区和排污口处（生活污水中可能含有外源水生生物体的 DNA，导致环境 DNA 出现假阳性，因此，采样时应尽量避开采样点位周边有废水、生活污水排放等的情况），选取代表性点位取样，并记录采样点位的环境状况。在河口感潮河段，规定宜在退潮期采样，并记录采样时的潮汐状况。

采样点位的布设主要参照《地表水环境质量监测技术规范》（HJ 91.2）执行，主要涉及采样垂线和采样垂线上采样点的布设两部分。另外，因为本标准是针对长江流域制订，因此，点位的布设可结合长江水生态考核办法规定的 50 个考核水体（包括 37 个河流、9 个湖泊和 4 个水库，见表 2），以及《长江流域水生态监测方案（试行）》中规定的 331 个水生生物监测点位（包括 239 个河流点位和 92 个重点湖泊点位）确定（见表 3），也可根据需要自行确定采样范围和

布设采样点位。

环境 DNA 的采样频次与传统形态学采样一样，没有固定要求，可依据研究或工作需要而定，可以一年一次或多次，因此没做特殊规定。环境 DNA 的采样时间同样也并不固定，一般可按水期、季节或实际研究需要等进行。具体在实施中，也可参考目标水生生物的生命周期、生活史特征、季节变化特征等因素确定。

表 2 长江水生态考核试点水体名单及重点保护水生生物物种数期望值

序号	省份	水体类型	水体	重点保护水生生物物种数
1	青海	河流	长江干流（青海）	3
2	四川		长江干流（四川）	24
3	四川		赤水河（四川）	12
4	四川		岷江	21
5	四川		嘉陵江（四川）	18
6	四川		沱江	16
7	四川		雅砻江	12
8	西藏		长江干流（西藏）	5
9	云南		长江干流（云南）	24
10	云南		赤水河（云南）	7
11	重庆		长江干流（重庆）	13
12	重庆		嘉陵江（重庆）	21
13	重庆		乌江（重庆）	16
14	贵州		赤水河（贵州）	9
15	贵州		乌江（贵州）	10
16	贵州		清水江	12
17	甘肃		白龙江	7
18	甘肃		嘉陵江（甘肃）	21
19	湖北		长江干流（湖北）	24

20	湖北		汉江（湖北）	15	
21	湖南		长江干流（湖南）	24	
22	湖南		湘江	22	
23	湖南		资江	3	
24	湖南		沅江	22	
25	湖南		澧水	5	
26	江西		长江干流（江西）	24	
27	江西		赣江	9	
28	陕西		汉江（陕西）	16	
29	陕西		嘉陵江（陕西）	21	
30	河南		丹江（河南）	/	
31	广西		湘江西源	/	
32	安徽		长江干流（安徽）	11	
33	江苏		长江干流（江苏）	12	
34	浙江		东苕溪	1	
35	浙江		西苕溪	1	
36	上海		长江干流（上海）	11	
37	上海		黄浦江	3	
38	云南		湖泊	滇池	6
39	贵州			草海	/
40	湖北			洪湖	/
41	湖南			洞庭湖	16
42	江西			鄱阳湖	6
43	安徽			巢湖	/
44	江苏			太湖	/
45	江苏			淀山湖—元荡（江苏）	/
46	上海			淀山湖—元荡（上海）	/

47	重庆	水库	三峡水库（重庆）	9
48	湖北		三峡水库（湖北）	9
49	湖北		丹江口水库（湖北）	5
50	河南		丹江口水库（河南）	5

表3 长江流域水生生物监测位点清单

序号	点位名称	经度	纬度	水体类型
1	直门达	97.2481	33.0219	河流
2	通天河大桥	95.8266	34.0358	河流
3	庚卓如瓦	96.9622	33.3438	河流
4	洛须镇温托村	98.9975	29.7111	河流
5	江达县邓科乡	97.9811	32.4644	河流
6	江达县波罗乡	98.6020	31.1879	河流
7	金江桥	100.5938	26.1838	河流
8	五孙庙	100.4039	26.5654	河流
9	金沙江树底桥	100.4373	27.0058	河流
10	龙洞	101.4627	26.5384	河流
11	新华	99.9583	26.9331	河流
12	三块石	104.4516	28.6317	河流
13	倒流子	103.8229	28.4728	河流
14	黄沙坡	104.2553	28.6469	河流
15	洗白	104.8118	27.4996	河流
16	岔河渡口	105.2893	27.7147	河流
17	洛甸河水文站	105.0408	27.6859	河流
18	金沙江岗托桥	98.5967	31.6178	河流
19	倮果	101.7888	26.6010	河流
20	石门子	104.5955	28.7406	河流

21	水磨沟村	99.0550	29.9381	河流
22	挂弓山	104.7162	28.7815	河流
23	江南镇沙嘴上	105.0390	28.7849	河流
24	纳溪大渡口(左岸)	105.2302	28.7488	河流
25	手爬岩	105.5430	28.8950	河流
26	沙溪口	105.9031	28.8813	河流
27	蒙姑	103.0314	26.5719	河流
28	贺龙桥	99.3892	28.1706	河流
29	拉鲊	101.9251	26.3652	河流
30	渭门桥	103.8247	31.7589	河流
31	镇平乡	103.7367	32.1636	河流
32	悦来渡口	103.7401	29.7273	河流
33	岷江青衣坝	103.7850	29.4974	河流
34	凉姜沟	104.6233	28.7799	河流
35	彭山岷江大桥	103.8916	30.2114	河流
36	岷江东青交界	103.8391	29.9044	河流
37	映秀	103.4779	31.0456	河流
38	岳店子下	103.8668	30.3575	河流
39	河口渡口	103.9887	29.1419	河流
40	月波	104.1599	29.0423	河流
41	雅砻江口	101.7996	26.6120	河流
42	雅江县城上游	101.0481	29.2033	河流
43	呷拉乡雅砻江	99.9788	31.6115	河流
44	柏枝沙滩	101.8198	27.1095	河流
45	长须干马乡	99.0061	32.7519	河流
46	沙溪(底)	105.9539	31.6200	河流

47	金溪电站	106.2619	31.1572	河流
48	上石盘	105.7408	32.3890	河流
49	金子	106.2278	30.2134	河流
50	烈面	106.1105	30.5035	河流
51	元西村	105.8373	32.5368	河流
52	伍嘉码头	106.2629	30.9585	河流
53	新政电站	106.2364	31.3108	河流
54	小渡口	106.0883	30.7336	河流
55	麻柳包	106.0343	31.4010	河流
56	醒觉溪	105.8272	28.8045	河流
57	宏缘	104.5339	30.6033	河流
58	拱城铺渡口	104.6806	30.0608	河流
59	大磨子	105.2593	28.9678	河流
60	李家湾	104.9747	29.1044	河流
61	老翁桥	105.0075	29.2658	河流
62	银山镇	104.9697	29.6872	河流
63	幸福村(河东元坝)	104.6532	29.9614	河流
64	脚仙村	105.0225	29.4413	河流
65	沱江大桥(底)	105.4288	28.8849	河流
66	和尚山	106.5287	29.5076	河流
67	江津大桥	106.2530	29.2670	河流
68	寸滩	106.5914	29.6180	河流
69	丰收坝	106.4643	29.3949	河流
70	沙溪镇	106.9358	29.7129	河流
71	北温泉	106.4351	29.8368	河流
72	井口(嘉陵江右岸)	106.4603	29.6633	河流

73	大溪沟	106.5533	29.5705	河流
74	梁沱(左岸)	106.4565	29.6012	河流
75	长江涪陵菜场沱	107.4045	29.7115	河流
76	麻柳嘴	107.4232	29.5955	河流
77	锣鹰	107.9491	29.3867	河流
78	江口镇烂泥坨	107.8386	29.2818	河流
79	鹿角	108.2845	29.1333	河流
80	大关桥	106.1795	26.8673	河流
81	六广	106.4354	27.0067	河流
82	乌江下五龙	106.8634	27.3012	河流
83	大乌江镇	107.6904	27.4009	河流
84	乌杨树	108.2381	27.9969	河流
85	沿河	108.5105	28.6225	河流
86	清池	105.9517	27.7390	河流
87	黄歧坳	106.2584	27.7817	河流
88	茅台	106.3742	27.8603	河流
89	九龙囤	105.9767	28.2917	河流
90	鲢鱼溪	105.7339	28.6078	河流
91	茶园岔河	107.4557	26.3604	河流
92	兴仁桥	107.7766	26.3247	河流
93	下司	107.7822	26.4944	河流
94	旁海	108.0799	26.7482	河流
95	茅坪	109.2569	26.7476	河流
96	崔家	110.6706	25.5236	河流
97	大冲口	110.7683	25.7272	河流
98	大源屋	111.1669	26.0130	河流

99	白果村	111.2676	26.2509	河流
100	白龙江两河口桥	104.4819	33.6975	河流
101	姚渡	105.4158	32.7865	河流
102	洛大	104.0030	33.9797	河流
103	固水子村	105.0792	33.3280	河流
104	白水江	106.1176	33.6034	河流
105	站儿巷	106.2945	33.7820	河流
106	烈金坝	106.2589	33.0438	河流
107	老君关	109.0742	32.7156	河流
108	黄金峡	107.8330	33.1934	河流
109	南柳渡	107.2239	33.1118	河流
110	兰滩	109.7911	32.8794	河流
111	八庙沟	105.9206	32.8315	河流
112	鲁光坪	106.1427	33.3117	河流
113	黄牛铺	106.8396	34.1950	河流
114	灶火庵	106.4677	33.9021	河流
115	凤州	106.6267	33.9567	河流
116	浙川史家湾	111.2159	33.0805	河流
117	荆紫关丹江河桥	111.0113	33.2533	河流
118	寺湾镇丹江河桥	111.1224	33.1605	河流
119	沈湾	111.6007	32.4650	河流
120	白家湾	112.0409	32.0584	河流
121	仙人渡	111.6943	32.2259	河流
122	陈家坡	110.9033	32.8046	河流
123	罗汉闸	112.5932	30.6898	河流
124	皇庄	112.5611	31.1851	河流

125	黑流渡	112.9414	30.5411	河流
126	转斗	112.4374	31.4598	河流
127	余家湖	112.1765	31.9142	河流
128	汉南村	113.4028	30.4045	河流
129	石到	113.5217	30.4183	河流
130	小河	113.9462	30.6805	河流
131	石牌港	112.5255	30.9930	河流
132	岳口	113.0696	30.5010	河流
133	宗关	114.2160	30.5772	河流
134	云池(白洋)	111.4379	30.4310	河流
135	调关	112.6330	29.6982	河流
136	柳口	112.4321	29.9714	河流
137	砖瓦厂	112.0619	30.2848	河流
138	观音寺	112.2854	30.2322	河流
139	荆江口	113.1264	29.4664	河流
140	南津关	111.2537	30.7687	河流
141	白浒山	114.6287	30.5484	河流
142	纱帽	114.0906	30.3083	河流
143	黄盖湖镇右	113.6003	29.8661	河流
144	中官铺	115.5045	29.8443	河流
145	风波港(右岸)	115.1860	30.2143	河流
146	刘佐(左岸)	116.1150	29.8233	河流
147	燕矶	115.0122	30.4067	河流
148	桑植打鼓泉渡口	110.1042	29.4551	河流
149	永定澄潭(区水厂)	110.4353	29.1253	河流
150	张公庙	111.6497	29.6008	河流

151	澧水三江口	111.2985	29.5884	河流
152	窑坡渡	111.8752	29.5937	河流
153	永定潭口	110.6358	29.1897	河流
154	沙河口	112.0933	29.2600	河流
155	大夫庙	111.5470	26.2790	河流
156	港子口	111.6426	26.5032	河流
157	归阳镇	112.1806	26.5371	河流
158	新塘铺	112.5813	26.7780	河流
159	城北水厂	112.6101	26.9122	河流
160	鱼石村	112.7319	26.9792	河流
161	樟树港	112.8021	28.5686	河流
162	熬洲	112.9325	27.3281	河流
163	桔子洲	112.9522	28.1678	河流
164	昭山	112.9978	27.9720	河流
165	马家河	113.0337	27.8489	河流
166	诸葛庙	111.6169	26.2068	河流
167	五强溪	110.9115	28.7746	河流
168	浦市上游	110.1115	28.0852	河流
169	陈家河(四水厂)	111.6428	28.9848	河流
170	武水汇合口	110.1655	28.2866	河流
171	侯家淇	110.3786	28.4107	河流
172	萝卜湾	110.0222	27.1486	河流
173	坡头	112.1176	28.9130	河流
174	城陵矶(右岸)	113.1722	29.4833	河流
175	天字一号	112.9158	29.6978	河流
176	陆城	113.2847	29.6083	河流

177	江南镇	113.4357	29.7631	河流
178	君山长江取水口	112.9747	29.4825	河流
179	桂花渡水厂	111.4266	27.2074	河流
180	桃谷山	112.1366	28.5419	河流
181	球溪	111.4460	27.6024	河流
182	万家嘴	112.3867	28.6168	河流
183	新化水厂	111.3031	27.7194	河流
184	晒谷滩电站	111.4106	27.3300	河流
185	坪口	111.0989	28.0478	河流
186	临资口	112.7300	28.7000	河流
187	瓦石矶	112.5285	28.7139	河流
188	株溪口	111.3272	28.3986	河流
189	新庙前	114.9242	25.9953	河流
190	青原七姑岭	115.0392	26.9731	河流
191	新干车头	115.3333	27.6854	河流
192	生米	115.8056	28.5417	河流
193	丰城小港口	115.8650	28.2619	河流
194	吴城赣江	116.0162	29.1884	河流
195	周坊	116.0439	28.7864	河流
196	吉里	116.1283	28.7783	河流
197	马当渡口	116.6519	29.9917	河流
198	湖口(右岸)	116.2008	28.7783	河流
199	彭泽红光村	116.4028	29.8592	河流
200	九江县大屋何	115.6928	29.8381	河流
201	陈家墩(右岸)	117.9648	31.0784	河流
202	皖河口(左岸)	116.9954	30.4892	河流

203	前江口(左岸)	117.2387	30.5734	河流
204	五步沟(右岸)	117.7376	30.8063	河流
205	民生水厂(右岸)	117.4523	30.6789	河流
206	三兴村(底)	118.4967	31.7788	河流
207	元宝圩(左岸)	117.7216	30.9985	河流
208	东西梁山	118.3568	31.5014	河流
209	乌江(左岸)	118.4947	31.8425	河流
210	塘浦	119.6054	30.6459	河流
211	荆湾	119.7782	30.8288	河流
212	铁路桥	120.0165	30.8817	河流
213	新港口	120.1269	30.9401	河流
214	递铺	119.6884	30.6529	河流
215	汪家埠	119.8675	30.2572	河流
216	城南翻水站	120.0723	30.5314	河流
217	东升	120.0678	30.6547	河流
218	城西大桥	120.0736	30.8652	河流
219	毗山	120.1368	30.8784	河流
220	团结闸	121.0486	31.7915	河流
221	高港码头(左岸)	119.8632	32.2851	河流
222	小河口上游(左岸)	119.0800	32.2429	河流
223	焦山尾(右岸)	119.5614	32.2264	河流
224	浏河(右岸)	121.3241	31.5468	河流
225	魏村(右岸)	119.9619	32.0070	河流
226	九乡河口	118.9495	32.1780	河流
227	下青龙港	120.4908	32.0512	河流
228	小湾(右岸)	120.2723	31.9401	河流

229	启东港	121.6081	31.7483	河流
230	朝阳农场	121.8908	31.1722	河流
231	崇明东滩(左岸)	121.9457	31.3911	河流
232	东风西沙	121.2768	31.7048	河流
233	白龙港(右岸)	121.7369	31.3092	河流
234	青草沙进水口	121.5459	31.4908	河流
235	淀峰	120.9792	31.0897	河流
236	夏字圩	121.1537	30.9723	河流
237	闵行西界	121.3439	30.9794	河流
238	吴淞口	121.5035	31.3836	河流
239	临江	121.4603	31.1127	河流
240	草海中心	102.6428	24.9917	湖泊
241	灰湾中	102.6903	24.9136	湖泊
242	罗家营	102.7492	24.8900	湖泊
243	观音山东	102.7611	24.8372	湖泊
244	观音山中	102.7094	24.8372	湖泊
245	观音山西	102.6756	24.8372	湖泊
246	海口西	102.6300	24.7733	湖泊
247	滇池南	102.6364	24.7064	湖泊
248	白鱼口	102.6700	24.8100	湖泊
249	断桥	102.6596	25.0150	湖泊
250	草海杨关山	104.2144	26.8742	湖泊
251	草海中部	104.2451	26.8515	湖泊
252	朱家湾子	104.2283	26.8335	湖泊
253	万下河口	104.2110	26.8548	湖泊
254	刘家巷	104.2647	26.8491	湖泊

255	洪湖湖心 A	113.3537	29.8396	湖泊
256	杨柴湖	113.3429	29.7936	湖泊
257	排水闸	113.3789	29.8281	湖泊
258	洪湖湖心 B	113.3812	29.8817	湖泊
259	小港	113.4570	29.9284	湖泊
260	王垸村	113.2386	29.8821	湖泊
261	下新河	113.4010	29.9477	湖泊
262	洪湖 5#	113.4159	29.8760	湖泊
263	桐梓湖	113.2893	29.8118	湖泊
264	鹿角(洞)	112.9886	29.1541	湖泊
265	扁山	113.0556	29.3380	湖泊
266	东洞庭湖	112.9986	29.3300	湖泊
267	洞庭湖出口	113.1377	29.4429	湖泊
268	横岭湖	112.8661	28.8375	湖泊
269	虞公庙	112.8902	28.8297	湖泊
270	岳阳楼	113.0890	29.4027	湖泊
271	蒋家嘴	112.1646	28.8631	湖泊
272	万子湖	112.4109	28.8184	湖泊
273	南嘴	112.2989	29.0630	湖泊
274	小河嘴	112.3108	28.8516	湖泊
275	东洞庭湖湖心	112.8961	29.2454	湖泊
276	主湖体 1	112.8992	29.4279	湖泊
277	主湖体 4	112.8452	29.2062	湖泊
278	磊石山	112.9164	28.9722	湖泊
279	莲湖	116.4958	29.0215	湖泊
280	康山	116.4269	28.9406	湖泊

281	南矶山	116.3387	28.9924	湖泊
282	伍湖分场	116.2205	29.0559	湖泊
283	青岚湖	116.1468	28.4913	湖泊
284	三山	116.3182	29.1498	湖泊
285	星子	116.0511	29.4447	湖泊
286	老爷庙	116.0580	29.3730	湖泊
287	蚌湖	115.9990	29.2842	湖泊
288	鄱阳湖出口	116.1930	29.7272	湖泊
289	蛤蟆石	116.1298	29.6090	湖泊
290	都昌	116.1894	29.2455	湖泊
291	梅溪咀	116.3664	28.8000	湖泊
292	白沙洲	116.5497	29.1233	湖泊
293	湖滨	117.4203	31.6461	湖泊
294	黄麓	117.6331	31.5778	湖泊
295	新河入湖区	117.3832	31.5674	湖泊
296	西半湖湖心	117.3725	31.6527	湖泊
297	龟山	117.7559	31.6019	湖泊
298	东半湖湖心	117.6200	31.5220	湖泊
299	忠庙	117.4696	31.5658	湖泊
300	兆河入湖区	117.5605	31.4726	湖泊
301	天灯村	117.7900	31.5900	湖泊
302	炯炆	117.6674	31.6343	湖泊
303	花塘	117.5402	31.5606	湖泊
304	余家墩	117.4800	31.4800	湖泊
305	南淝河入湖区	117.3948	31.6862	湖泊
306	孤山	117.3520	31.6021	湖泊

307	派河入湖区	117.3212	31.6607	湖泊
308	梅梁湖心	120.1728	31.4686	湖泊
309	锡东水厂	120.3700	31.4478	湖泊
310	沙渚南	120.2461	31.3789	湖泊
311	竺山湖心	120.0373	31.3909	湖泊
312	兰山嘴	119.9583	31.2167	湖泊
313	胥湖心	120.4000	31.1717	湖泊
314	乌龟山南	120.2294	31.3103	湖泊
315	西山西	120.1897	31.1347	湖泊
316	拖山	120.1622	31.3919	湖泊
317	椒山	120.0969	31.3333	湖泊
318	漫山	120.2697	31.2328	湖泊
319	平台山	120.1033	31.2258	湖泊
320	十四号灯标	120.1506	31.0628	湖泊
321	泽山	120.2675	31.0136	湖泊
322	大雷山	120.0119	31.1364	湖泊
323	五里湖心	120.2617	31.5131	湖泊
324	大浦口	119.9736	31.2967	湖泊
325	东太湖	120.5358	31.0933	湖泊
326	元荡	120.8715	31.0700	湖泊
327	千灯浦口	120.9813	31.1876	湖泊
328	新华港	121.0073	31.1383	湖泊
329	汪洋荡	120.9351	31.1406	湖泊
330	淀山湖中	120.9600	31.1200	湖泊
331	急水港口	120.9229	31.1039	湖泊

5.6.1.3 采样方法

对于环境 DNA 的水样，采用滤膜过滤的方式采集环境 DNA 仍然是最常见的方式，滤膜的孔径大小目前文献中没有统一，一般情况下 0.45 微米的滤膜适用于大多数的情况，如果要采集细菌样品，则需要采用 0.22 微米的滤膜。

样品采集时，根据研究或监测目标的需要，可使用采水器在不同水体深度采集样品，同时对采样现场环境进行拍照记录。水样品现场过滤最佳，可以保持环境 DNA 最原始的状态，如果现场过滤的条件不成熟，则可以冷藏保存水样并于采样当天过滤收集环境 DNA。

水样采集后进行过滤，每个采样点的样品过滤前应对抽滤装置清洁消毒（如用大于 1.5%次氯酸钠消毒液，浸泡抽滤装置 10 min 以上并洗净），再用 70%乙醇去除抽滤装置的消毒液残留。对于比较干净的水体，宜将一份水样过滤于同一张滤膜（一般孔径为 0.45 μm ）；对于浑浊水样可换多张滤膜过滤。每个样品抽滤前，为防止不同样品间的交叉污染，应采用相同体积的蒸馏水代替样品进行过滤获得滤膜，作为空白对照。

过滤完成后，将滤膜样品转移至无菌离心管或冻存管中，置于液氮或干冰中冷冻运输，或者置于保存溶液（无水乙醇或其他合适的保存剂）中运输。需要长期保存的滤膜样品置于 -80°C 保存。

国内有学者对于长江环境 DNA 水样采集的适宜体积进行了研究，结果表明，过滤的水样体积越大，能检测到的鱼类生物覆盖度越高。根据前期研究经验，一般情况下，长江水体中环境 DNA 的水样过滤体积宜为 5 L 以上，对于目标类群的生物量较低的区域，应加大采集的水样体积，最高可达 100 L。也可通过构建分子分类单元累积曲线，准确确定适合于本区域的采样体积。

长江源头区及上游等部分区域水体的泥沙含量很高，过滤比较困难，因此，对于这些泥沙含量高的水样，应放置于 4°C 静置后取上层澄清水样过滤。

另外，前期研究结果表明，对于一个断面，进行环境 DNA 的立体采样能最大程度的捕获环境 DNA，因此，在具备条件的河流断面，可采用立体采样的方法。比如，在一个断面上设置 6 个或 9 个采集水样的点位，分为左、中、右及上、中、下层等。

针对沉积物样品，提取环境 DNA 时只需要很少的重量或者体积的底泥，在采集表层沉积物（0~5 cm）时可以适当多采集一些，如获取 50 g（湿重）以上，剔除杂物及大体积生物残体后，收集至无菌离心管中，现场干冰保存。需要长期保存的样品置于-80℃保存。

5.6.2 环境 DNA 数据获取

环境 DNA 数据获取过程包括：DNA 提取、条形码基因扩增和高通量测序等。

5.6.2.1 环境 DNA 提取

环境 DNA 提取之前需要对样品进行预处理。对于保存在保存剂中的滤膜样品，需要进行溶剂替换，然后将滤膜剪碎和破碎；对于沉积物样品，需要将样品均质后冷冻干燥并混匀。

环境 DNA 的提取一般直接使用试剂盒，根据环境介质的不同可以选择不同的试剂盒，如水样试剂盒、动物组织和血液试剂盒、沉积物 DNA 提取试剂盒等。也可以采用分子生物学方法购买相关化学试剂直接提取 DNA，见的 DNA 提取方法包括苯酚氯仿抽提法、离心柱法或磁珠法等，可参见常规分子生物学实验方法或参照 GB/T 40226。

提取滤膜上的 DNA 时首先需要将滤膜剪碎。对于在保存剂中保存的滤膜样品，在 DNA 提取之前需进行预处理。根据选择的 DNA 提取方法，必要时以抽滤等方式先将保存剂（如乙醇）清洗干净。然后将滤膜剪碎，再利用研磨珠和裂解液将滤膜振荡破碎；对于沉积物样品宜将样品均质后冷冻干燥并混匀。

DNA 提取后，应对其浓度和质量进行检测。一般用于后续扩增实验的样本 DNA 浓度应不低于 1 ng/μL，最佳浓度范围为 10 ng/μL 以上。DNA 样品在 230 nm、260 nm 和 280 nm 处的吸光度比值应符合以下要求：OD₂₆₀/280 应在 1.7~2.0 之间，OD₂₆₀/230 应大于 2.0，否则表明 DNA 纯度不足，可能有蛋白质、RNA 或者化学物质污染。另外，也建议使用电泳的方式对提取的环境 DNA 的完整性进行检测。对于有污染的环境 DNA 样品，如果体积相对较多，可以通过分子生物学中规定的 DNA 的纯化方法进行纯化，具体参见相关的分子生物学教科书或者工具书。提取后的环境 DNA 样品分装保存于-80℃，避免反复冻融。

5.6.2.2 条形码基因扩增与纯化

条形码扩增的主要目的是通过选择特定的基因标记(如 COI 基因、18S rRNA 基因等)进行高效的 DNA 片段扩增,确保从复杂的样本中准确提取目标物种的遗传信息。传统的物种鉴定方法通常依赖形态学特征,存在种类识别困难、样本损坏或采样环境对物种发现的限制,而条形码扩增能够超越这些限制,通过标记基因快速、准确地识别物种,尤其是在水体、土壤等环境 DNA 样本中,能够检测到隐性或难以采集的物种。纯化则是为了去除 PCR 扩增过程中可能出现的非特异性产物、引物二聚体和杂质,从而确保后续分析的准确性。纯化操作能够提高 DNA 片段的纯度,减少测序错误和假阳性结果的产生,确保最终获得的基因数据具有较高的质量和可信度。这一过程不仅有助于提高物种鉴定的准确性,还能为后续的基因测序、遗传多样性分析和生态监测提供可靠的数据支持。条形码扩增与纯化操作的意义在于它能够为研究者提供高效、准确的物种识别工具,降低分析误差,提升数据质量,为生态环境监测、物种保护和生物多样性研究提供坚实的分子基础。

条形码基因的扩增分为两种情况,如果是针对某一生物类群进行群体的扩增,如浮游生物、鱼类等,称为宏条形码扩增,则需要设计通用引物进行扩增,合适的通用引物可以一次性将目标生物类群扩增出来。当然,不同的引物具有不同的扩增效率,可以根据文献里的报道,以及在具体实验中不断进行优化,建立覆盖率高的引物对和反应体系。而对于单一的物种,如重点保护水生生物或者旗舰物种,如中华鲟和长江江豚等,可设计一对特异性引物进行扩增。

另外,为区分一次上机测序中的不同点位的样品,可在引物序列前添加索引(一般 6~8 bp)。推荐引物可参照 T/CSES 81—2023 或相关文献报道。对于旗舰物种中华鲟和长江江豚,可参照表 4 给出的经过实验验证的特异性引物及扩增方式进行扩增。长江水系有多种旗舰物种,对于其他旗舰物种条形码基因的扩增方法,可参照相关文献。

条形码基因的扩增产物用 1%~2%的琼脂糖凝胶电泳检测,应呈现单一清晰明亮、无拖尾的条带,且电泳条带对应的分子量应符合预期。对于针对特定重点保护水生生物条形码基因的扩增产物,必要时可以通过测序鉴定扩增产物是否

正确。若电泳检测显示样品出现多个条带，可参照 SN/T 4278 的规定对扩增产物进行纯化。

宏条形码或条形码基因扩增产物保存于-20°C或以下条件。

表 4 中华鲟和长江江豚条形码基因扩增引物

目标生物	基因名称	扩增方式	引物名称	引物序列 (5'-3')	产物长度 (bp)
中华鲟	ND4	巢式 PCR	GAS4-F (第一轮)	CTACTAAAACCTTGCGGATACG	313
			GAS4-R (第一轮)	TGTGGAGGCGTTCATAGTTAGGA	
			GAS4N-F (第二轮)	GACCGGGTCAATTTGTCTACG	113
			GAS4N-R (第二轮)	AGCCTCATGGGGTTTGGATG	
长江江豚	D-loop	PCR	YFPDloop-F	TATGTCCACTAGCCCTTCATAACCATTA	102
			YFPDLoop-R	AGATCATTATTTAGCTACCCCCACAAGC	

5.6.2.3 文库构建

文库构建是基因组学和分子生态学研究中的基础步骤，旨在将目标 DNA 片段克隆到载体中，形成一个可以长期保存并且能够代表原始样本基因信息的 DNA 文库。文库构建的主要目的是为后续的高通量测序、功能分析以及基因组学研究提供系统化的 DNA 资源。通过构建文库，可以获得一个包含多种不同 DNA 片段的集合，这些片段能够全面、准确地代表整个样本的遗传信息，为后续的数据分析提供丰富的遗传背景。传统的基因组分析方法往往难以处理大规模、高复杂度的基因组信息，而文库构建技术则提供了一种标准化和高效的方式，能够为大规模基因组测序和功能分析提供稳定的样本来源。此外，文库的构建还能够帮助克服某些 DNA 样本中存在的低丰度或高重复序列问题，确保后续分析的全面性和代表性。

文库构建为研究提供了重要的工具，它不仅是基因组研究、基因功能分析和群体遗传学等领域的基础，也为环境 DNA 分析、物种多样性评估等应用提供了强有力的支持。通过建立高质量的文库，能够更好地揭示样本中存在的基因多样性、生态功能及其与环境因素的关系，为生态保护、物种监测和生物多样性保护提供可靠的科学依据。

文库构建包括混库、末端处理、接头连接、文库扩增和文库质检等过程。

混库是将使用同一个引物进行 PCR 扩增的所有产物等比例混库，混库可以提高上机测序的效率，一般可将数十个用同一对引物扩增的不同点位的样品混在一起。混库可以在精确检测 DNA 浓度基础上不同样品进行等量混合，也可以参考不同样品 DNA 电泳条带的亮度进行等比例混合，混库体积应大于 200 μL 。为确保后续建库质量，应当对混库产物行琼脂糖凝胶电泳，确定其条带位置符合预期长度，此外如果混库产物的浓度较低，需对其进行磁珠纯化。

末端处理是选择相关的成品试剂盒将混库产物中的 DNA 末端补平，并在 5' 段进行磷酸化和 3 端添加 dA 尾，以产生黏性末端。

另外，为得到与高通量测序仪适配的待测 DNA 溶液，需使用相关试剂盒搭配 PCR 仪给末端处理产物连接接头。接头的质量和用量直接影响建库效率和建库质量，推荐接头：末端处理产物摩尔比在 10: 1-200: 1 之间。对接头连接产物进行磁珠纯化，去除多余接头。可以根据实际需求对文库进行扩增，以提高文库质量，增加文库浓度。

通常情况下，构建好的文库可通过长度分布检测和浓度检测来进行质量评价，文库长度可通过基于电泳分离原理的设备进行检测，确保文库的长度符合预期。文库浓度的检测可通过 Qubit、PicoGreen 等基于双链 DNA 荧光染料的方法；还可以是基于 qPCR 绝对定量的方法，有效定量样品中两端接头完整的文库（即可测序文库），且不受到过度扩增的影响。

这里描述的建库过程是一般性的通用过程，不同的基因测序仪可能对建库有独特的要求，实践中可以根据测序要求调整建库流程和方法。

5.6.2.4 高通量测序

对于质检合格的文库，按照 GB/T 30989 和 GB/T 35537 的规定进行高通量测序，要求每个样本的预期序列数宜不低于 30000 条。目前环境 DNA 测序多使用第二代测序技术，即高通量测序技术（High-throughput sequencing），以 Illumina 和 ABI 的 SOLiD 平台为代表。这种测序技术采用了边合成边测序的原理，通过捕获新合成的末端标记来确定 DNA 序列。第二代测序技术具有高通量、低成本和较短的测序周期等优势，因此在环境 DNA 测序中得到了广泛应用。

5.6.3 生物信息学分析

环境 DNA 数据的生物信息学分析主要包括：高通量测序下机数据预处理与数据清洗、构建 OTU、物种注释与统计等。

5.6.3.1 下机数据预处理与数据清洗

在进行环境 DNA 数据分析之前，首先需要对高通量测序的下机数据进行预处理和数据清洗，具体包括：根据样本索引将序列分配于不同样本中；合并双端测序的序列，并去除测序接头、样本索引和引物序列；基于滑动窗口法修剪去除低质量碱基，窗口内碱基平均质量一般要求 $>Q20$ ；去除序列长度过短（一般 <50 bp）的 Reads；识别并去除嵌合体序列；剔除阴性对照中的污染序列。在数据清洗时可以根据研究或工作需要调整参数，比如如果对碱基质量要求更高，可以提高到 $>Q30$ 等，将进一步提高测序正确率，但同时也会剔除掉更多的序列。

5.6.3.2 构建 OTU

构建分子分类单元有两种形式，OTU 和 ASV，两种方式各有优缺点，相比之下，在现阶段 OTU 更常用一些，因此，本标准也选用 OTU 的方式构建分子分类单元。在经过基于相似性的聚类获得 OTU 后，以常用的平均距离最小法识别出每个 OTU 的代表性序列，再经过每个 OTU 和代表性序列的比对获得每个 OTU 的序列数。对于低丰度 OTU（一般总序列数为 1~5）的处理根据研究和工作目的不同而不同，对于一般性检测，需要去除低丰度 OTU，但如果检测的目标是稀有物种，则需要谨慎处理，仔细核实低丰度 OTU 的真实性。

5.6.3.3 物种注释与统计

在进行物种注释与统计时，需要根据目标水生生物类群的不同，选择合适的条形码基因参考数据库进行比对分析。目前公认的环境 DNA 条形码基因数据库比较统一，如 BOLD、NCBI 基因数据库等。如果算力不足，需要将数据库信息下载到本地运行，也可以利用构建的区域特色数据库进行比对，获得物种注释信息。确定物种注释结果时，应综合考虑多种因素，尽可能减少不确定性。一般每个样本的 OTU 统计表由 OTU 名称、序列、物种注释的分类信息（门、纲、目、科、属、种等）、序列数和序列相对丰度组成。对于 OTU 的统计结果也有质量

控制的要求，如对于某一点位，一般 OTU 在生物重复样品中的检出率不应低于 2/3 等。

5.6.4 质量控制与质量保证

5.6.4.1 质量控制

环境 DNA 监测的质量控制涉及到多个环节，包括：样品采集、DNA 提取、扩增与测序、生信分析等。（1）在样品采集、DNA 提取、条形码基因扩增和测序阶段，应分别设置阴性对照（无菌水）和阳性对照（已知物种组成的样本、特定物种样本或测序对照试剂），且每个采样点位应采集不少于 3 个重复样本，高质量的文献研究中也有设 9 个重复样本的，另外，也可以在实验过程中设置 3 个技术重复以增加结果的确定性；（2）在生物信息学分析过程中，对于同一批实验数据，生物信息学分析流程及过滤等参数设置应保持一致；最好从原始数据开始，每一步质控所过滤或剔除的数据应备份并予以说明，以便对数据分析过程有疑义时回溯；（3）假阳性与假阴性是经常可能出现的问题，在物种注释时，两者均不应超过 10%，否则应优化实验流程，或者对于特定物种可以通过测序对特定物种序列进行鉴定区分。

5.6.4.2 质量保证

质量保证体系的建立，有助于确保评价过程中的每一步都符合国际或国家标准或规范，使得不同实验室、不同人员在相同条件下能够得到一致的结果，能提升结果的可信度，为后续监测、长期数据对比和区域间数据共享提供有力保障，具体措施包括：（1）所有采样工作遵循标准化采样流程，使用无菌技术采集样品，避免样品间交叉污染。样品保存与运输也应当符合标准或规范的要求；（2）实验场所应满足分子生物学实验室的各项条件，如，PCR 产物因操作不当极易引起气溶胶污染，会影响实验结果准确性，因此应将 PCR 反应体系配置区和 PCR 产物纯化检测区进行强制性物理隔离。另外，实验前应对实验室环境（实验台、仪器设备、实验耗材等）消毒灭菌，避免污染和交叉污染。（3）详实记

录实验过程中产生的数据，保证数据的可追溯性，如给每个样品一个特定编号，原始数据记录表格保存归档等。

5.7 水生生物完整性评价

5.7.1 评价指标与赋分方法

生物完整性指数（Index of Biological Integrity, IBI）是一种用于评估水体或生态系统生物群落健康状况的综合性工具，具有较高的敏感性和实用性。此外，IBI 在实践中操作简便，能够为管理者提供定量化、标准化的评估依据，广泛应用于水体质量监测、生态保护与修复等领域。生物完整性指数的构建是基于参照点位与受损点位筛选基础上进行的。在评价水生态状况时，往往根据生物群落结构特征、数据可获得情况，选择指示物种构建生物完整性指数，实际应用中对于鱼类、大型底栖无脊椎动物等可以单独建立完整性指数。

本标准推荐以 IBI 的方式评价生物完整性，根据长江水生态监测和考核的需求，针对四个水生生物类群，鱼类、大型底栖无脊椎动物、浮游动物和重点保护水生生物分别建立 IBI。在我国发布的技术文件中，基于 IBI 评价的方法主要可以分为两种，一是生态环境部在其发布的《水生态监测技术指南 河流水生生物监测与评价（试行）》（HJ 1295—2023）和《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 1296—2023）两项技术规范中，规定的基于 IBI 指数数值百分位划分的方法，这种方法可以对 IBI 进行分级评价，但无法获得具体的分值；还有一种是农业农村部在其发布的《长江流域水生生物完整性指数评价方法（试行）》（农长鱼发〔2021〕3号）中规定的定量分级方法，能够得出具体的分值。考虑到分值计算的便利性和易理解性，本标准主要参照农业农村部发布的方法构建 IBI 评价方法。评价中所用的具体指标根据生物类群的不同，分别包括物种种类数、优势物种或者物种多样性等，指标赋分方法也根据指标的不同，分为比值法和偏离度法两种。评价步骤则包括：参照状态建立、确定指标参考值、指标赋分、水生生物完整性指数最终得分、评价等级划分等。

5.7.2 建立参照状态

建立参照状态是 IBI 评价的重要前提，在长江流域不同区域建立生物完整性评价的参照状态时，需要根据各区域的具体特点进行合理的参照点位选择和筛选。对于长江源头和上游区域，通常能够较为容易地获得未受或少受人类活动干扰的理想参照点位。这些区域的生态环境相对原始且未受到过多的开发和污染，因而可以作为较为理想的参照状态。参照点位的筛选没有固定的流程，应从多个方面进行评估，包括人类活动的干扰强度、河湖/库的物理形态结构以及水环境质量等，确保所选参照点位能够真实反映未受或少受干扰的生态系统状态。相关的标准和方法可参照 SL/T 793 的执行要求。

对于长江中下游区域，由于这些地区受人类活动影响较大，难以直接获得理想的未受干扰的参照点位，故可采用最优状态法或历史数据法等方法来确定参照点位。最优状态法通过选择当前在水质、生态健康等方面表现最佳的区域作为参照点位，而历史数据法则依赖于历史环境数据和生态状况的变化趋势来推算理想的参照状态。在这种情况下，参照点位的选择需要严格遵循 HJ 1295—2023 标准的相关规定，确保所选参照状态具有科学性和代表性。

这一方法的实施旨在确保在不同区域能够根据实际情况选择合适的参照状态，从而更准确地进行生物完整性评估。

5.7.3 确定指标参考值

指标参考值是水生态评价指标的基准值，一般代表水体状态良好时的指标数值，按照相关技术规范的建议，可选择参照点位或参照状态的指标数值作为参考值，对于长江的重点保护水生生物来说，国家在水生态考核方案文件里公布了部分点位的物种种类数的期望值，对于这个指标，则可以直接引用考核期望值作为指标参考值。

5.7.4 指标的赋分

指标的赋分方法主要参考农业农村部发布的《长江流域水生生物完整性指数评价方法（试行）》中的方法，本着简化易操作的原则略作调整：对于鱼类，选择了文件中的推荐的关键指标鱼类种类数，另外从备选指标中选择了优势科这一指标，对于资源量指标由于环境 DNA 技术不支持，没有纳入。对于大型底栖无脊椎动物，选择了文件推荐的优势种指标，对于无脊椎动物中的软体动物种类数

之一指标，从生态环境指示种的角度，调整为大型底栖无脊椎动物的种类数，这样更能全面展示底栖无脊椎动物这一重要类群和生态环境的关系。对于浮游动物，则选择了文件推荐的生物多样性指标，以香农多样性指数作为表征指标，也符合惯例。对于重点保护水生生物，指的是国家 I 级和 II 级重点保护水生生物，则参照长江水生生态监测方案和农业农村部技术文件，以物种种类数比例对生物完整性进行评价。各项指标的赋分标准采用百分制，也主要参考农业农村部技术文件确定。

5.7.5 分级评价

在对生物完整性进行分级评价之前，首先需要对各项指标的赋分进行综合对比决定取舍原则。依据农业农村部文件，单一生物类群的不同指标，以得最低分的指标分值为准；不同生物类群的分值综合起来进行最终评价时，则取分值的算术平均值作为最终分值。这一方面考虑了保守的生态环境保护理念，另一方面，也考虑了不同生物类群完整性评价的均衡性，结论更为科学。

评价分级的标准则按照百分制，每 20 分一个等级，分为优、良、中、差、劣五个等级，这种分级方法也较为常见，主要参考了农业农村部技术文件、生态环境部技术文件以及广东省生态环境厅于 2021 年发布的《广东省江河湖库水生态环境调查与评价技术指引（试行）》中的分级方法。

6 标准实施建议

6.1 确保资源和技术准备充分

实施该标准时，首先需要保证各参与单位具备必要的技术设施和设备，特别是环境 DNA 采样、数据分析及测序的相关工具和技术支持。标准中所涉及的高通量基因测序技术、环境 DNA 数据处理和分析步骤都需要相应的实验室和技术人员的支持。

6.2 加强质量控制和质量保证体系建设

在标准的实施过程中，应建立严格的质量控制与保证体系，确保每一阶段（包

括采样、DNA 提取、扩增、测序等) 的质量达到规范要求。尤其是在数据分析阶段, 应采取统一标准和技术, 以保证结果的可靠性和可追溯性。

6.3 加强培训与能力建设

为确保标准的正确实施, 需要对相关人员进行培训, 包括采样技术、数据处理技术以及生物统计方法的应用。培训应包括标准操作流程的熟悉, 确保各地实验室和技术人员能够准确执行标准施过程中应进行定期的监督检查和评估, 确保所有环节符合标准要求, 并根据实际实施情况进行必要的调整和优化。尤其是在不同区域的环境 DNA 监测数据收集上, 要确保样本的代表性和准确性。

参考文献

- [1] 生态环境部, 农业农村部, 水利部. 关于印发《重点流域水生生物多样性保护方案》的通知[J]. 中华人民共和国国务院公报, 2018, (28): 71-9.
- [2] Qian M M, Wang Z Y, Zhou Q, et al. Environmental DNA unveiling the fish community structure and diversity features in the Yangtze River basin[J]. *Environmental Research*. 2023;239.
- [3] Ogram AV, Sayler GS, Barkay T. The extraction and purification of microbial DNA from sediments[J]. *Journal of Microbiological Methods*. 1987;7:57-66.
- [4] Steinberger RE, Holden PA. Extracellular DNA in single- and multiple-species unsaturated biofilms[J]. *Applied and Environmental Microbiology*. 2005;71(9):5404-10.
- [5] Tringe SG, von Mering C, Kobayashi A, et al. Comparative Metagenomics of Microbial Communities[J]. *Science*. 2005;308(5721):554-7.
- [6] Currier CA, Morris TJ, Wilson CC, et al. Validation of environmental DNA (eDNA) as a detection tool for at-risk freshwater pearly mussel species (*Bivalvia: Unionidae*)[J]. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*. 2018;28(3):545-58.
- [7] Ostberg CO, Chase DM. Ontogeny of eDNA shedding during early development in Chinook Salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*)[J]. *Environmental DNA*. 2022;4(2):339-48.
- [8] Hidaka S, Jo TS, Yamamoto S, et al. Sensitive and efficient surveillance of Japanese giant salamander (*Andrias japonicus*) distribution in western Japan using multi-copy nuclear DNA marker[J]. *Limnology*. 2024;25(2):189-98.
- [9] Brys R, Halfmaerten D, Neyrinck S, et al. Reliable eDNA detection and quantification of the European weather loach (*Misgurnus fossilis*)[J]. *Journal of Fish Biology*. 2021;98(2):399-414.
- [10] Ficetola GF, Miaud C, Pompanon F, Taberlet P. Species detection using environmental DNA from water samples[J]. *Biology Letters*. 2008;4(4):423-5.
- [11] Piaggio AJ, Engeman RM, Hopken MW, et al. Detecting an elusive invasive species: A diagnostic PCR to detect Burmese python in Florida waters and an assessment of persistence of environmental DNA[J]. *Molecular ecology resources*. 2014;14(2):374-80.
- [12] Leray M, Knowlton N. DNA barcoding and metabarcoding of standardized samples reveal patterns of marine benthic diversity[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2015;112(7):2076-81.
- [13] 尹婷婷, 赵峰, 刘巍岳, 等. 基于环境RNA研究西太平洋浅水海山区真核微生物多样性及其与细菌的关系[J]. *海洋与湖沼*. 2024;55(05):1213-22.
- [14] Gao X, Yang J, Zhang X. Study on the Selection of Marker Genes in

- Zooplankton DNA Metabarcoding Monitoring[J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*. 2020;15(2):61-70.
- [15] Huang X Y, Zhong W J, Liu X J, et al. Biological Evaluation and Key Stress Factor Diagnosis of Compound Contaminated Soil Based on Environmental DNA. *Huanjing Kexue*. 2023;44(7):4130-41.
- [16] 王萌, 金小伟, 林晓龙, 等. 基于环境 DNA-宏条形码技术的底栖动物监测及水质评价研究进展[J]. *生态学报*. 2021;41(18):7440-53.
- [17] Qiao Q, Zhou Q, Wang J, et al. Environmental DNA reveals the spatiotemporal distribution and migration characteristics of the Yangtze Finless Porpoise, the sole aquatic mammal in the Yangtze River[J]. *Environmental research*. 2024:120050.
- [18] 程云山, 任艺晨, 席贻龙, 等. 基于环境DNA技术和形态学鉴定的浮游植物多样性比较. *湖泊科学*. 2024;36(05):1336-55.
- [19] 李蓉, 温瑞丹, 李晓环, 等. DNA 条形码技术在鱼类生物学和保护生物学中的研究进展. *生命科学*. 2024;36(11):1439-49.