

中华人民共和国国家生态环境标准

HJ □□□□—20□□

基于环境 DNA 的外来入侵水生动物分布 评估技术指南

**Technical guidelines for distribution assessment of invasive alien aquatic
animals based on environmental DNA**

(征求意见稿)

20□□-□□-□□发布

20□□-□□-□□实施

生态环境部 发布

目 次

前 言	II
1 适用范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
4 目标物种	2
5 评估程序	2
6 环境 DNA 样本采集	3
7 采样点阳性判定	5
8 分布评估	6
9 质量控制与质量保证	6
10 废弃物处理	6
11 评估报告编制	6
附录 A（资料性附录）主要外来入侵水生动物名单	7
附录 B（资料性附录）环境 DNA 样本采集前期收集资料清单	8
附录 C（资料性附录）河流、湖库外来入侵水生动物环境 DNA 采样点布设示意图	9
附录 D（资料性附录）环境 DNA 固定剂	10
附录 E（规范性附录）目标物种引物特异性验证	11
附录 F（资料性附录）qPCR 检测信息记录表	12
附录 G（资料性附录）最低检测限确定方法	13
附录 H（资料性附录）外来入侵水生动物分布图示例	14
附录 I（规范性附录）野外质量控制与保证	15
附录 J（规范性附录）实验室质量控制与保证	16
附录 K（资料性附录）基于环境 DNA 的外来入侵水生动物分布评估报告编写格式	18

前 言

为贯彻《中华人民共和国环境保护法》《中华人民共和国生物安全法》《外来入侵物种管理办法》等法律法规，落实《中国生物多样性保护战略与行动计划（2023—2030年）》，规范我国外来入侵水生动物分布评估及监督管理工作，制定本标准。

本标准规定了基于环境DNA技术的外来入侵水生动物区域分布的评估程序、内容、方法和技术要求。

本标准附录A~附录D、附录F~附录H、附录K为资料性附录，附录E、附录I、附录J为规范性附录。

本标准为首次发布。

本标准由生态环境部自然生态保护司、法规与标准司组织制订。

本标准主要起草单位：中国环境科学研究院、云南大学、中国环境监测总站。

本标准生态环境部202□年□□月□□日批准。

本标准自202□年□□月□□日起实施。

本标准由生态环境部解释。

基于环境 DNA 的外来入侵水生动物分布评估技术指南

1 适用范围

本标准规定了基于环境 DNA 技术的外来入侵水生动物区域分布的评估程序、内容、方法和技术要求。

本标准适用于内陆水体外来入侵水生动物的区域分布评估。

2 规范性引用文件

本标准引用了下列文件或其中的条款。凡是注明日期的引用标准，仅注日期的版本适用于本标准。凡是未注日期的引用标准，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本标准。其他文件被新文件废止、修改、修订的，新文件适用于本标准。

GB 19489	实验室 生物安全通用要求
GB/T 34797	核酸引物探针质量技术要求
GB/T 37874	核酸提取纯化方法评价通则
GB/T 40226	环境微生物宏基因组检测 高通量测序法
GB/T 43650	野生动物及其制品 DNA 物种 鉴定技术规程
HJ 494	水质 采样技术指导
HJ 710.7	生物多样性观测技术导则 内陆水域鱼类
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）
SN/T 4835	实验室生物废弃物管理要求

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

3.1

水生动物 aquatic animals

生活史全部或主要阶段生活在水中的各类动物（包括卵和配子），包括大型底栖动物、两栖动物、鱼类、爬行动物等。

3.2

外来水生动物 alien aquatic animals

出现在其过去或现在的自然分布范围及潜在扩散范围以外的水生动物、亚种或以下分类单元，包括该物种所有可能存活繁殖的部分。

3.3

外来入侵水生动物 invasive alien aquatic animals

传入定殖并对生态系统、生境、物种带来威胁或者危害，影响我国生态环境，损害农林牧渔业可持续发展和生物多样性的外来水生动物。

3.4

环境 DNA environmental DNA (eDNA)

生物生活环境（水、沉积物等）中存在的脱氧核糖核酸（DNA）等生物遗传物质。

3.5

阳性对照 positive control

确定能检出目标物种的样本，与受试样本平行进行，用于判断整个反应体系和反应过程是否可靠。

3.6

阴性对照 negative control

确定不含目标物种的样本（例如无菌水），与受试样本平行进行，用于判断受试样本是否被污染。

3.7

最低检测限 limit of detection (LOD)

一定置信水平下可以检测到的目标物种 DNA 的最低浓度。

3.8

定量聚合酶链式反应 quantitative polymerase chain reaction (qPCR)

在聚合酶链式反应（PCR）的反应体系中加入可与目标物种 DNA 结合的带有荧光基团的特异性探针或荧光染料，依据荧光信号的强度对扩增产物进行实时监测，从而对初始目标物种 DNA 模板量进行定量分析。

3.9

定量循环 quantification cycle (Cq)

qPCR 反应时每个管内产生的荧光信号达到设定阈值时所经历的循环数。

4 目标物种

目标物种（参见附录 A）依据农业农村部、生态环境部等公开发布的外来入侵物种管理名单确定：

a) 农业农村部、自然资源部、生态环境部、住房和城乡建设部、海关总署、国家林草局发布的《重点管理外来入侵物种名录》；

b) 原环境保护部联合中国科学院发布的四批“中国自然生态系统外来入侵物种名单”；

c) 目标物种根据农业农村部、生态环境部等公开发布和修编的外来入侵物种名录同步更新。

5 评估程序

基于环境DNA的外来入侵水生动物区域分布评估工作内容包括环境DNA样本采集、采样点阳性判定、分布评估、报告编制等。评估程序见图1。

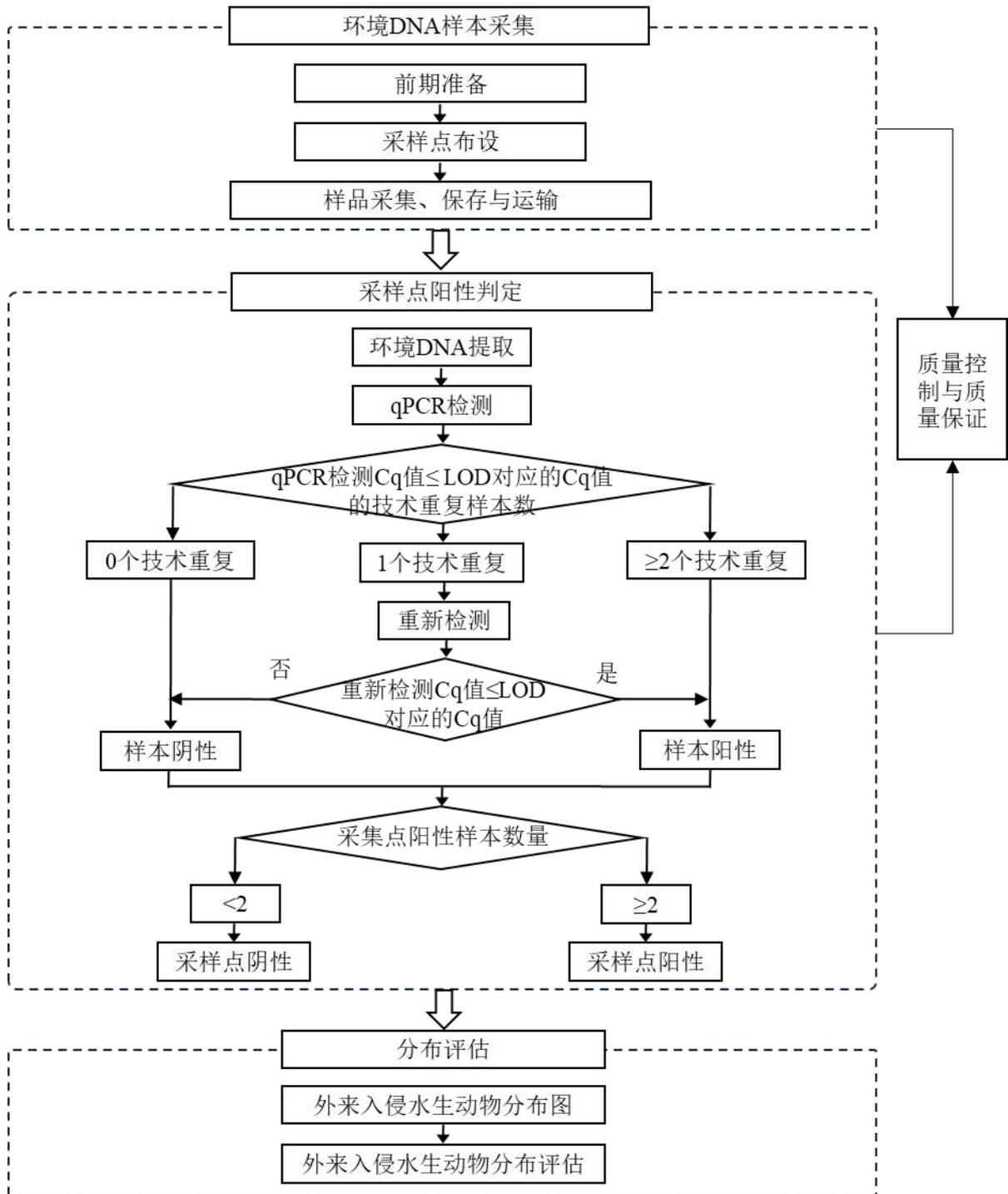


图1 基于环境DNA的外来入侵水生动物的区域分布评估程序

6 环境DNA样本采集

6.1 前期准备

通过文献查阅、问卷调查、访问调查、现场踏勘等形式，收集评估区域和目标物种相关资料，包括评估区域空间结构、水文特征、气候特征等，目标物种分布特征、遗传信息、生活史特征等。资料清单

参见附录 B。

6.2 采样点布设

6.2.1 采样点分布

6.2.1.1 将河流划分成河口区、上游、中游、下游等区域，各区域按照 HJ 1295 要求设置有代表性的采样河段，每个采样河段内均匀布设 3~5 个采样点，采样点数目依据水体形态特点、水文特征、目标物种分布特征调整。河流采样点点位布设示意图参见附录 C。每个采样点平行采集 3 个样本。

6.2.1.2 将湖库分为湖库滨岸带、沿岸带、湖库心区、主要河流出入口等湖库区。每个湖库区采样点设置参照 HJ 1296 执行，应全面覆盖湖库区范围。采样点数量参见表 1，并根据水体形态特点、水文特征、目标物种分布特征等差异进行调整。采样点点位布设示意图参见附录 C。每个采样点平行采集 3 个样本。

表 1 湖库区采样点点位布设参考数量

湖库区面积 A (km^2)	$A < 50$	$50 \leq A < 500$	$500 \leq A < 1000$	$1000 \leq A < 2000$	$A \geq 2000$
点位数量 N (个)	$3 \leq N < 10$	$10 \leq N < 15$	$15 \leq N < 20$	$20 \leq N < 30$	$30 \leq N < 50$

6.2.1.3 河道型或狭长型湖库，参照 6.2.1.1 进行采样点布设。

6.2.1.4 水田参照 6.2.1.2 进行采样点布设。

6.2.1.5 采样点宜布设在适于外来入侵水生动物生存的生境。

6.2.1.6 采样点应避开排污口、养殖区、垂钓区等局部特殊区域。

6.2.2 采样时间

采样时间根据生物物种类型设置，一般要求如下：

- a) 鱼类：一般于繁殖季开展采样；
- b) 底栖动物：一般在春末至秋末开展采样；
- c) 爬行动物：根据爬行动物生活习性及其气候条件，一般根据其活动盛期于繁殖季节开展采样；
- d) 两栖动物：根据两栖动物生活史特点以及活动规律于最活跃的 4 月~10 月开展采样；
- e) 针对重点关注区域或突发入侵事件，可开展更高频次的采样。

6.2.3 采样深度

根据目标物种栖息地偏好、目标物种迁移特征、区域水动力情况等因素确定采样深度。分层采样要求参照 HJ 710.7 执行。

6.3 样本采集、保存与运输

6.3.1 根据目标种类群，选取环境 DNA 样本采集介质，获取采样点具有代表性的水体样本或沉积物样本。

6.3.2 水体样本采集按照 GB/T 40226 的规定执行，使用无菌器材采集 1~3L 不等的水体样本，现场过滤至一定孔径 ($0.45\mu\text{m}$ ~ $5\mu\text{m}$) 的滤膜上。浊度较大的水体样本应先 4°C 静置再过滤。水体样本最后一次过滤的滤膜置于无菌容器 -20°C 低温保存；或者加入附录 D 推荐的固定剂常温保存。

6.3.3 沉积物样本采集按照 HJ 494 的规定执行，采集表层沉积物 ($0\sim 5\text{cm}$)，剔除砾石及大体积生物残体，置于无菌容器中 -20°C 低温保存。

6.3.4 保存与运输方法按照 GB/T 40226 执行。

6.3.5 样本采集和处理间隔不宜超过 24h。

7 采样点阳性判定

7.1 环境DNA提取

7.1.1 环境DNA样本前处理

水体样本和沉积物样本按照以下要求进行前处理：

- a) 水体样本：利用研磨珠和裂解液将水体样本过滤后的滤膜振荡破碎，必要时将滤膜剪碎；
- b) 沉积物：高速离心、留取沉积物沉淀物，均质、混匀后冷冻干燥保存。

7.1.2 DNA提取

7.1.2.1 按照GB/T 40226的要求，借助物理和化学方法充分释放滤膜和沉积物中蕴含的DNA，去除样本中蛋白质、脂类、多糖、RNA等杂质。选用手工提取或相应DNA提取试剂盒提取样本DNA。

7.1.2.2 按照GB/T 37874规定评价提取的DNA浓度和纯度，要求样本DNA质量浓度不低于1ng/μL，最佳质量浓度范围为10ng/μL~100ng/μL，在260nm和280nm波长处的吸光度值比值（OD_{260nm}/OD_{280nm}）应在1.7~1.9范围内，OD_{260nm}/OD_{230nm}应大于2.0。有效的DNA样本均匀分装为2份，一份在-80℃保存用于存档，另一份保存在-20℃用于后续的qPCR检测，避免反复冻融。

7.2 qPCR检测

7.2.1 目标物种特异性引物、探针及反应体系

按照GB/T 34797技术要求设计目标物种引物和探针。按照附录E的规定评估引物和探针对目标物种的特异性及其与近缘物种的潜在交叉反应。记录目标物种特异性引物和探针、反应体系及反应条件，记录格式参见附录F。

7.2.2 qPCR扩增

利用目标物种特异性引物和探针对DNA进行PCR扩增，每个样本设置3个技术重复。

7.3 样本阳性结果判定

7.3.1 确定LOD

按照以下步骤确定LOD：

- a) 依据GB/T 43650要求提取、纯化目标物种组织DNA，定量检测DNA浓度，制备标准溶液。标准溶液的浓度梯度不少于5个。
- b) 基于标准溶液浓度的对数值与定量PCR的循环数（C_q值）关系绘制标准曲线。以95%的检出率为标准置信水平确定目标物种DNA的LOD。具体方法参见附录G。明确LOD所对应的C_q值。

7.3.2 环境DNA阳性样本确定

环境DNA样本的阳性判定依据如下：

- a) 二份及以上qPCR技术重复样本检测C_q值均≤LOD对应的C_q值，判定该样本阳性，检出目标物种成分；
- b) 仅一份qPCR技术重复样本检测C_q值≤LOD对应的C_q值，应重新检测。重新检测后的C_q值

≤LOD 对应的 Cq 值，判定该样本阳性，检出目标物种成分；否则，判定该样本阴性，未检出目标物种成分；

c) 不符合上述情况，判定该样本阴性，未检出目标物种成分。

7.4. 采样点阳性结果判定

环境 DNA 采样点的阳性判定依据如下：

a) 采样点内存在 2 个及以上阳性样本，采样点阳性；

b) 不符合上述情况，采样点阴性。

8 分布评估

基于评估区域阳性采样点数量、位置等信息，绘制外来入侵水生动物分布图（分布图绘制示例参见附录H），结合目标物种历史分布信息评估外来入侵水生动物空间分布状况。

9 质量控制与质量保证

9.1 质量控制

9.1.1 环境DNA样本采集过程中以无菌水为阴性对照，用于检测采集过程中的污染。

9.1.2 qPCR检测过程中以等体积已知浓度目标物种DNA为阳性对照，同步进行qPCR扩增。

9.1.3 qPCR检测过程中以无菌水为阴性对照，用于排除检测过程中污染造成的假阳性。

9.1.4 每个采样点平行采集3个样本，qPCR扩增过程设置3个技术重复。

9.2 质量保证

9.2.1 环境 DNA 样本采集工作人员应掌握水生动物野外观测标准及相关知识，严格按照要求完成规定的采样点数与样本数。

9.2.2 环境 DNA 样本采集前应彻底灭活设备和装置，按照附录 I 的规定做好样本采集、采样记录、样本运输，防止样本交叉污染。

9.2.3 实验过程应防止样本污染，按照附录 J 的规定做好环境 DNA 提取、qPCR 扩增、Cq 值确定、数据记录和样本保存。

10 废弃物处理

废弃物的分类、收集、存放和集中处理应按照 GB 19489 和 SN/T 4835 的规定执行。生物废弃物在处理之前应采用高压灭菌、消毒或灼烧等方式灭活。含核酸染料的废液和废胶应单独收集，及时报有资质实验室统一处理，并做好处理记录。

11 评估报告编制

基于环境 DNA 的外来入侵水生动物分布评估报告应包括前言、评估区域概况、目标物种概述、评估方法和流程、评估结果、对策与建议等内容。评估报告编写格式参见附录 K。

附录 A
(资料性附录)
主要外来入侵水生动物名单

表 A.1 主要外来入侵水生动物名单

分类	目标物种	别名	拉丁名
两栖动物	美国牛蛙	牛蛙	<i>Rana catesbeiana</i>
爬行动物	红耳彩龟	巴西龟	<i>Trachemys scripta elegans</i>
	大鳄龟	鳄鱼咬龟、鳄甲龟	<i>Macroclmys temminckii</i>
底栖动物	福寿螺	大瓶螺、苹果螺、雪螺	<i>Pomacea canaliculata</i>
	稻水象甲	稻水象	<i>Lissorhoptrus oryzophilus</i>
	克氏原螯虾	小龙虾、淡水小龙虾、喇蛄、红色螯虾	<i>Procambarus clarkii</i>
鱼类	豹纹翼甲鲶	清道夫、琵琶鼠、垃圾鱼	<i>Pterygoplichthys pardalis</i>
	红腹锯鲑脂鲤	食人鲳、食人鱼	<i>Pygocentrus nattereri</i>
	尼罗罗非鱼	罗非鱼、吴郭鱼、非鲫	<i>Oreochromis niloticus</i>
	齐氏罗非鱼	红腹罗非鱼	<i>Coptodon zillii</i>
	食蚊鱼	无	<i>Gambusia affinis</i>
	鳄雀鳝	无	<i>Atractosteus spatula</i>

附录 B
(资料性附录)

环境 DNA 样本采集前期收集资料清单

环境 DNA 样本采集前期收集资料主要包括评估区域空间结构，评估区域水文特征，评估区域气候特征，目标物种分布特征，目标物种遗传信息，目标物种生活史特征。

表 B.1 环境 DNA 样本采集前期收集资料清单

评估内容	资料类别	资料清单
评估区域	空间结构	1. 水域类型，如湖泊、水库、湿地、河流、水田等； 2. 水域地理位置； 3. 水域结构，如是否为独立水体。
	水文特征	1. 水域水位、水量、水深、流速、流向、水体洁净度等； 2. 水域面积、长度、宽度、温度、pH 值等； 3. 水域地形、水底基质、河床结构等。
	气候特征	年均温、降水量、蒸发量等。
目标物种	分布特征	1. 目标物种类群； 2. 目标物种空间分布状况； 3. 目标物种潜在适生区； 4. 目标物种适生生境类型。
	遗传信息	1. 目标物种 DNA 条形码； 2. 目标物种特异性引物和探针。
	生活史特征	1. 目标物种生长发育阶段； 2. 目标物种繁殖周期； 3. 目标物种季节变化特征。

附录 C
(资料性附录)

河流、湖库外来入侵水生动物环境 DNA 采样点布设示意图

C.1 河流外来入侵水生动物环境 DNA 采样点布设示意图

以内陆河流为例，在图 C.1 所示河流中布设外来入侵水生动物环境 DNA 采样点。

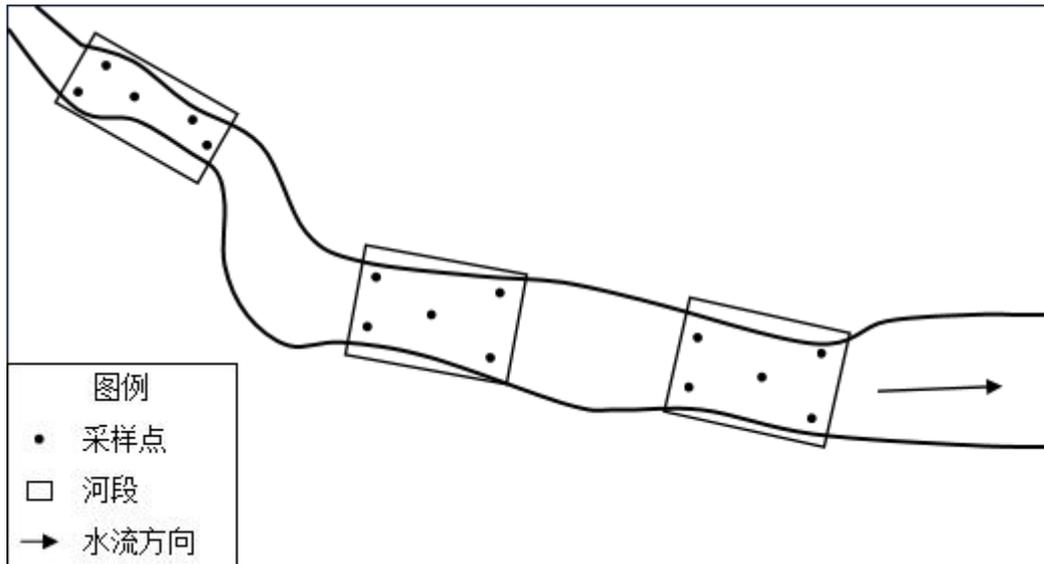


图 C.1 河流外来入侵水生动物环境 DNA 采样点布设示意图

C.2 湖库外来入侵水生动物环境 DNA 采样点布设示意图

以内陆湖库为例，在图 C.2 所示湖库中布设外来入侵水生动物环境 DNA 采样点。

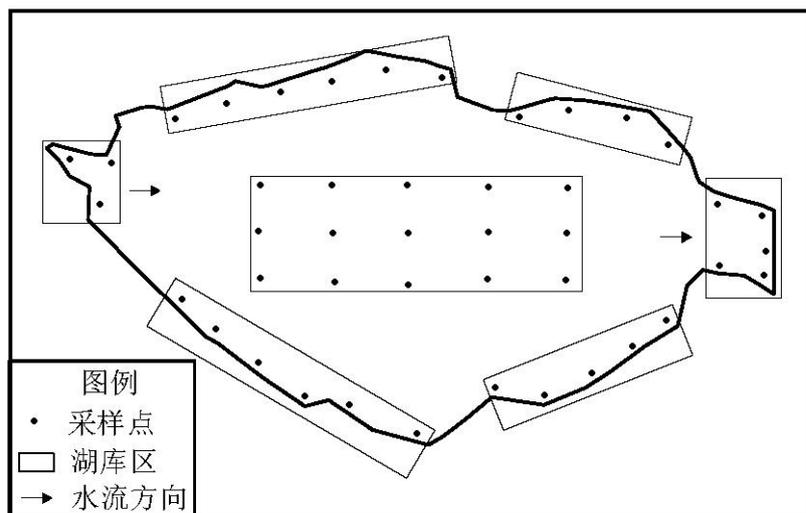


图 C.2 湖库外来入侵水生动物环境 DNA 采样点布设示意图

附录 D
(资料性附录)
环境 DNA 固定剂

D.1 乙醇固定剂

乙醇浓度不小于 96%，且其中不含甲醇等其他醇类。固定剂需浸没整个样本。样本在乙醇中可在常温下稳定储存 3~6 个月。乙醇保存样本不可在 -10℃ 以下储存。

D.2 Longmire's 固定剂

D.2.1 试剂配制

将 100mL 三羟甲基氨基甲烷盐酸溶液 (Tris-HCl, 1mol/L)、200mL 乙二胺四乙酸溶液 (EDTA, 0.5mol/L)、2.5mL 氯化钠溶液 (NaCl, 4mol/L) 和 5g 十二烷基硫酸钠 (SDS) 混匀，加无菌水定容至 1L。

D.2.2 样本保存

固定剂需浸没整个样本。样本在 Longmire's 固定剂中可稳定储存 2~6 周。Longmire's 固定剂在低温下可能会出现沉淀，当该情况出现时可适当加热待沉淀溶解再使用。

附录 E
(规范性附录)
目标物种引物特异性验证

E.1 序列比对

E.1.1 基于美国国立生物技术信息中心局部相似性基本查询工具比对引物序列与目标基因组和其他非目标物种（如近缘物种）的基因组，确保引物与非目标基因不会有较高的同源性。

E.1.2 确保引物不会与基因组中的其他区域（例如同源基因或转录本）发生交叉扩增。

E.2 凝胶电泳法验证

以非目标物种 DNA 作为阴性对照，以灭菌去离子水为空白对照，并设置提取空白对照，进行 PCR 扩增，通过琼脂糖凝胶电泳并出现一条特异性条带，表明引物具有特异性。

附录 F
(资料性附录)
qPCR 检测信息记录表

表 F.1 目标物种特异性引物和探针信息列表

靶标物种:		拉丁名:	
基因名称:		GenBank 号:	
引物来源: <input type="checkbox"/> 引物序列设计		<input type="checkbox"/> 参考已有引物序列	
引物序列 (5'-3'):	探针序列:	扩增片段大小 (bp):	
检测方法: <input type="checkbox"/> DNA 探针法		<input type="checkbox"/> 荧光染料	<input type="checkbox"/> 其他:
引物序列比对结果:			
引物特异性检验证明:			
已有特异性引物参考来源:			

表 F.2 qPCR 反应体系与反应条件

实验单位: 操作人: 校对入: 实验日期:
DNA 样本数:
DNA 样本来源水域:
DNA 样本类型: 水样 沉积物

预混液品牌:		反应体积 (μL):	
退火温度 (°C):	延伸温度 (°C):	循环数 (Cq):	
qPCR 仪器品牌:		qPCR 仪器型号:	
阴性对照结果:		阳性对照结果:	
Cq 值计算方法:		Cq 值分析软件:	
琼脂糖凝胶电泳图:			

注: 琼脂糖凝胶电泳图应作为附件保存, 并标记清楚样本编号及相似物种名称。

附录 G
(资料性附录)
最低检测限确定方法

给定置信水平（通常为95%）下最低检测限（LOD）的确定方法如下：

a) 绘制标准曲线

基于标准溶液浓度的对数值与定量PCR的循环数（C_q值）关系绘制标准曲线。标准曲线校准点一般不少于5个，至少重复20次实验，每次实验至少设置3个平行样。

b) 确定最低检测限LOD

可采用离散阈值法或曲线拟合法确定。

1) 离散阈值方法

在至少 95% 的重复检测中成功检出目标 DNA 的最低标准浓度即为该实验体系的最低检测限（LOD）。

2) 曲线拟合方法

基于 R 对标准品 qPCR 检测结果数据进行曲线拟合，根据对数似然值、赤池信息准则等选择最佳拟合模型，确定至少 95% 的重复检测中成功检出目标 DNA 的最低标准浓度。

c) 示例

图 G.1 显示已知（黑点）和未知（星形）DNA 浓度在标准曲线上的位置。横轴为标准溶液浓度以 10 为底的对数值，纵轴为 qPCR 仪器检测到荧光信号的反应循环数（C_q 值）。STD1 至 STD9 分别代表一系列由高到低的标准溶液浓度梯度。

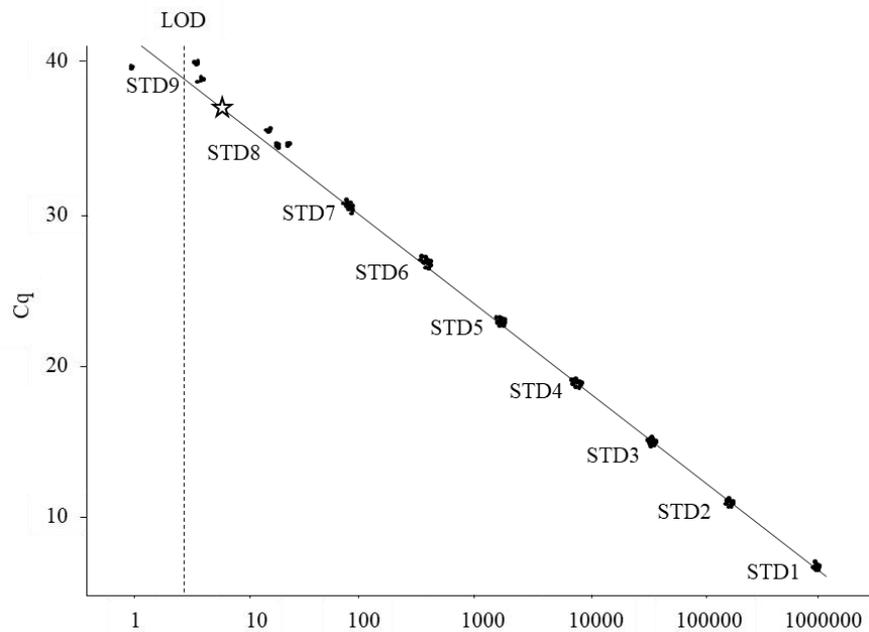
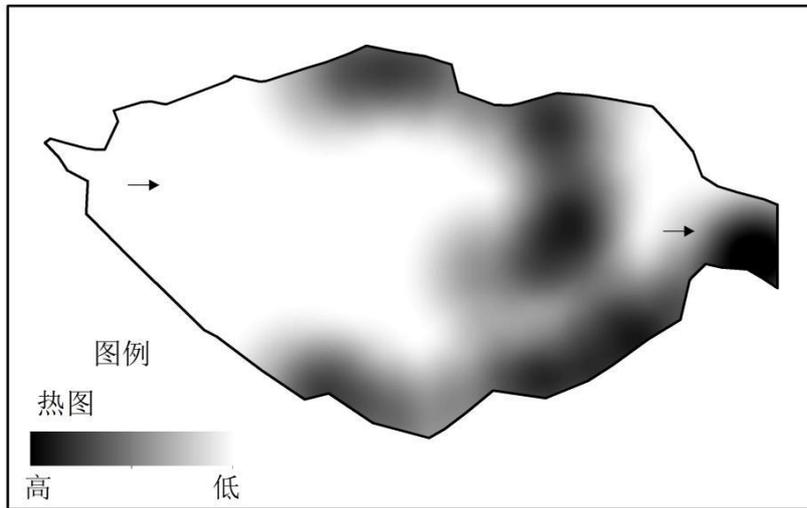


图 G.1 LOD 在标准曲线中位置示例

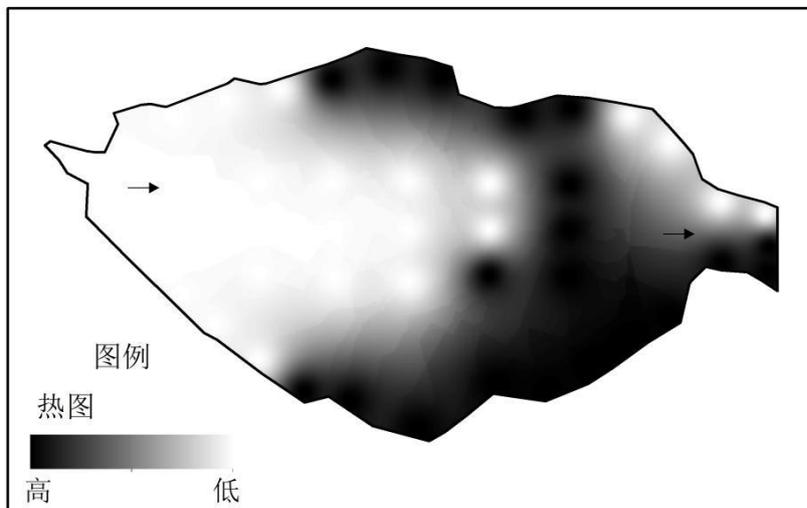
注：LOD 的确定应在 qPCR 实验条件优化后进行，包括退火温度、引物/探针浓度等，这些因素都会影响 qPCR 效率；每个标准浓度有足够的重复数才能确保 LOD 数值准确；当将实验转移到新的实验体系时，应重新确定 LOD。

附录 H
(资料性附录)
外来入侵水生动物分布图示例

以内陆湖库为例，基于核密度、反距离加权插值等方法绘制评估区域外来入侵水生动物分布图。



图H.1 基于核密度法绘制的内陆湖库外来入侵水生动物分布图



图H.2 基于反距离加权插值法绘制的内陆湖库外来入侵水生动物分布图

附录 I
(规范性附录)
野外质量控制与保证

I.1 样本采集

I.1.1 制定合理的采样操作程序，在确定的采样点、采样时间、采样层次，用符合质量要求的统一设备采样，采水量或采泥量尽量保持一致，以保证采集的样本具有代表性和可比性。

I.1.2 保证所有野外设备处于良好的运行状态。

I.1.3 正确填写样本标签，包括样本编号、日期、水体名称、采样位置以及采集人姓名。

I.1.4 及时在现场处理样本。受生物活动影响，随时间变化明显的项目应在规定时间内测定。

I.1.5 整个采样和前处理过程应保持无外源污染，并符合以下要求。

- a) 应全程佩戴无菌实验手套，采集下一个样本应及时更换手套。建议佩戴口罩。
- b) 采样和前处理过程宜采用一次性无菌装置或耗材。对于重复使用装置和耗材，应选用 1.5% 的次氯酸钠消毒不少于 1min。
- c) 重复使用的采样瓶，应浸泡在 1.5% 的次氯酸钠中不少于 5min，用蒸馏水重复冲洗 3 次，并晾干。在样本采集前应再次用水样冲洗三次，除去任何残留的次氯酸钠。确保清洗后丢弃的水样未与待取的水样混合。
- d) 应只从外部接触采样瓶，不应接触采样瓶及瓶盖内部。
- e) 如果有必要进入水中采样，应使用胶靴，并在平行样本之间进行消毒。清除鞋底和靴子两侧的所有污垢、鹅卵石和其他环境碎屑。
- f) 水样过滤前，不应让手套接触被污染的表面，如任何未消毒的设备。若接触，应及时更换手套。
- g) 过滤每个样本的水样前，过滤器接触面应使用漂白剂消毒不少于 1min，并用蒸馏水反复冲洗 3 次。

I.2 采样记录

除了样本相关信息，采集时间、地点、水温、气温、水文、植被等也应有详细记录，确保采集现场数据的完整性。

I.3 样本运输

I.3.1 应根据采样记录或登记表核对清点样本，以免有误或丢失。

I.3.2 样本运输过程中需按照规定温度准备冷藏设备。

I.3.3 运输中应仔细保管样本，以确保样本无破损、无污染。应避免强光照射及强烈震动。

I.3.4 不同介质来源的环境 DNA 样本应单独保存运输。

I.3.5 样本的运输尽量迅速。

附录 J
(规范性附录)
实验室质量控制与保证

J.1 实验室要求

J.1.1 DNA 提取实验室和 PCR 实验室应在物理空间上相互独立，不应有空气的直接相通。

J.1.2 PCR 实验室应配备紫外线超净工作台。

J.1.3 每个实验室应配备专用的实验工作服，并定期清洗。

J.2 基本操作要求

J.2.1 实验人员不应在同一天进行 DNA 提取和 PCR 扩增试验。

J.2.2 确保所有仪器和设备处于良好的工作状态，重要仪器（如 PCR 仪、离心机、冰箱和移液枪）应进行定期校准和维护。

J.2.3 确保所有的试验耗材和试剂在保质期内，在正确的 pH 值下，可适当地进行高压蒸汽灭菌。

J.2.4 试验耗材（如枪头、离心管和 PCR 管等）应进行高压蒸汽灭菌。

J.2.5 试验操作前，应用 1.5% 的消毒剂擦拭桌面，用 75% 的乙醇消毒双手，用 1.5% 的消毒剂消毒实验仪器。

J.2.6 试验操作前，移液枪应选用 75% 的乙醇消毒或紫外线消毒 30min。

J.2.7 试验过程中，实验人员应全程穿着实验服，并佩戴一次性无菌实验手套。

J.2.8 试验过程中，移液枪不应接触任何盛放样本或试剂的容器内壁。

J.2.9 同一耗材（例如 1.5mL 离心管、移液枪头等）不应重复接触来自不同样本的试验材料。

J.2.10 试验过程中，应小心开关容器盖，样本不宜长时间敞口放置。

J.2.11 怀疑或确定产生交叉污染的样本、试剂或耗材，不应继续使用。

J.3 环境 DNA 提取

J.3.1 试验操作前，应用 1.5% 的漂白剂擦拭桌面。

J.3.2 DNA 提取应全程佩戴口罩，防止刺激性气味和交叉污染。

J.3.3 沉积物称量和转移宜选用一次性无菌称量匙。

J.3.4 同一批次试验应最后处理阳性对照样本。

J.3.5 准确记录阴性对照、阳性对照和试验样本的 DNA 浓度和质量。

J.3.6 应按要求对 DNA 样本进行分装和保存。环境 DNA 应长期保存，记录准确，标记完整。

J.3.7 阴性对照、阳性对照和样本的 DNA 应分开保存，在物理空间上相互独立。可保存在不同冰箱，若条件有限，可保存在冰箱的不同分层。

J.4 qPCR 扩增

J.4.1 PCR 反应宜在紫外线超净工作台中进行。

J.4.2 紫外线超净工作台使用前，应紫外线消毒 30min。

J.5 C_q 值确定

J.5.1 标准曲线应具有 R² 值接近 1（通常 >0.99）。

J.5.2 在分析 C_q 值时，应排除极端值与异常波动值。

J.5.3 C_q 值确定过程中的数据应妥善存储，并按照规定记录保存位置。

J.6 数据记录

详细准确记录样本信息、操作人、试验数据及 qPCR 过程关键技术参数。实验室主管应检查所有数据记录的正确性和完整性。数据记录表应有记录人、校对人签字。如果数据是以电子方式保存的，则数据应定期备份。

J.7 样本保存

J.7.1 按照要求保存样本，并记录保存信息，定期核查。每 1 周检查固定液，必要时进行添加。

J.7.2 不同介质来源的环境 DNA 样宜置于不同冰箱中保存。若条件有限，宜置于冰箱的不同储存室。

J.7.3 滤膜、沉积物样本在-20℃低温保存时间不宜超过 1 个月，常温保存不宜超过 2 周。

附录 K
(资料性附录)

基于环境 DNA 的外来入侵水生动物分布评估报告编写格式

K.1 摘要

概述评估单位、评估区域概述、评估目的、评估内容、评估结果和结论。

K.2 目录

一般列出二到三级目录。

K.3 正文

K.3.1 前言

包括评估背景、评估目的、评估任务等。

K.3.2 评估区域概况

包括评估区域空间结构、水文特征、气候特征等。

K.3.3 目标物种概述

包括目标物种分布特征、遗传信息、生活史特征等。

K.3.4 评估方法和流程

包括环境 DNA 采样点布设、环境 DNA 样本采集、环境 DNA 样本检测方法、技术路线等。

K.3.5 评估结果

包括环境 DNA 样本检测结果、采样点判定结果和目标物种分布评估等。

K.3.6 对策与建议

针对评估结果开展的下一步监测、防控计划等。

K.4 参考文献

按照 GB/T 7714 的规定执行。
