团体标准

T/CSES XXXX—XXXX

|  |  |
| --- | --- |
| ICSZ01 | 13.020.01  |

水生生物监测 环境DNA宏条形码法

Aquatic biomonitoring—Environmental DNA metabarcoding method

XXXX - XX - XX发布

XXXX - XX - XX实施

中国环境科学学会  发布

目次

[前言 II](#_Toc102126440)

[引言 III](#_Toc102126441)

[1 范围 1](#_Toc102126442)

[2 规范性引用文件 1](#_Toc102126443)

[3 术语和定义 1](#_Toc102126444)

[4 环境DNA宏条形码监测内容和方法 3](#_Toc102126445)

[4.1 环境DNA宏条形码监测流程 3](#_Toc102126446)

[4.2 环境DNA样品采集 3](#_Toc102126447)

[4.3 环境DNA提取 4](#_Toc102126448)

[4.4 宏条形码扩增与测序 5](#_Toc102126449)

[4.5 生物信息学分析 5](#_Toc102126450)

[4.6 生物统计表 6](#_Toc102126451)

[4.7 质量控制与质量保证 6](#_Toc102126452)

[附录A （规范性） 环境DNA采样记录表 8](#_Toc102126453)

[附录B （资料性） 环境DNA固定剂 9](#_Toc102126454)

[附录C （资料性） 常用DNA条形码扩增引物信息 10](#_Toc102126457)

[附录D （规范性） 分子实验记录表 11](#_Toc102126458)

[附录E （规范性） 生物信息学分析记录表 12](#_Toc102126459)

[附录F （规范性） 生物统计表 13](#_Toc102126460)

[附录G （规范性） 野外质量控制与保证 14](#_Toc102126461)

[附录H （规范性） 实验室质量控制与保证 16](#_Toc102126466)

1. 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。

本文件由南京大学提出。

本文件由中国环境科学学会归口。

本文件起草单位：

本文件主要起草人：

1. 引言

利用环境DNA开展生物监测和生物多样性调查是一个快速发展的领域。环境DNA宏条形码法是一种有效的水生生物多样性调查方法，对于评估物种的存在与否，它比传统的调查方法更有效，并且可以检测出更多的物种。在静水中环境DNA也可以用于推断水生物种的相对丰度。

为规范水生生物环境DNA宏条形码监测技术，促进该技术在我国生物多样性监测体系中的应用推广，制定本文件。

水生生物监测 环境DNA宏条形码法

* 1. 范围

本文件规定了利用环境DNA宏条形码技术监测淡水水生生物的步骤、生物信息学分析、质量控制及数据分析方法。

本文件适用于基于DNA条形码序列相似性的水生生物多类群监测，包括浮游植物、浮游动物、着生藻类、水生维管植物、大型底栖无脊椎动物和鱼类等。

* 1. 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 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

HJ 494 水质 采样技术指导

HJ 710.8 生物多样性观测技术导则 淡水底栖大型无脊椎动物

SC/T 9402 淡水浮游生物调查技术规范

SN/T 4278 国境口岸医学媒介昆虫DNA条形码鉴定操作规程术语和定义

DB32/T 4178 河流水生态监测规范

* 1. 术语和定义

GB/T 30989和SN/T 4278界定的以及下列术语和定义适用于本文件。

水生生物 hydrobios

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植物、浮游动物、水生维管植物、大型底栖无脊椎动物和鱼类等。

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。

* + 1.

环境DNA environmental DNA；eDNA

通过从环境介质（水、土壤、沉积物、空气等）或混合生物组织中提取的DNA。

* + 1.

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标准的、有足够变异的、易扩增的短DNA序列，可用于实现生物的识别和鉴定。

* + 1.

16S核糖体DNA 16S ribosomal DNA；16S rDNA

原核生物编码核糖体小亚基16S rRNA的DNA序列。

* + 1.

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。

* + 1.

线粒体12S 核糖体DNA mitochondrial 12S ribosomal DNA；Mt 12S rDNA

后生动物线粒体基因组上12S rRNA对应的DNA序列。

* + 1.

线粒体细胞色素c氧化酶I mitochondrial cytochrome c oxidase I；COI

后生动物线粒体基因组上的线粒体细胞色素c氧化酶I对应的DNA序列。

* + 1.

DNA 宏条形码技术 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。

* + 1.

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。

* + 1.

序列相似性 sequence similarity

序列间相同 DNA 序列或氨基酸残基序列所占的比例。环境 DNA 宏条形码分析中通常根据序列相似性对测序数据进行物种注释。

序列相似性阈值 cutoff value of sequence similarity

判定两条核酸序列的相似程度，特定阈值以上碱基相同的序列，可以认定为同一物种。

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。

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，即每条序列至少有一个碱基不相同，可以根据ASV的序列差异进行物种鉴定。

* + 1.

分子分类单元 molecular taxonomic unit

DNA宏条形码监测分类工作中的客观操作单位，有特定的名称和序列分类特征，如ASV和OTU。

* + 1.

嵌合体 chimera

在PCR扩增的延伸步骤中由两种或更多种序列组合生成的错误序列。

* + 1.

检出率 detection rate

特定物种检出的样品数/总样品数。

* + 1.

相对丰度 relative abundance

样品中分配到某一分类单元的序列数占该样品序列总数的比例。

* + 1.

阴性质控样本 negative control sample

确定不含特定物种或者所有物种的样本（例如无菌水），与待测样本同步实验，用于判断待测样本是否被污染。

* + 1.

阳性质控样本 positive control sample

确定已知物种组成的样本，与待测样本同步实验，用于判断测序结果是否可靠。

* 1. 环境DNA宏条形码监测内容和方法
		1. 环境DNA宏条形码监测流程

环境DNA宏条形码监测包括环境DNA样品采集、环境DNA提取、宏条形码扩增与测序、生物信息学分析、生物统计表和质量控制与质量保证等过程。环境DNA宏条形码监测技术路线见图1。



1. 环境DNA宏条形码监测技术路线图
	* 1. 环境DNA样品采集
			1. 概述

根据监测的生物类群选取合适的环境DNA采集方法，见表1。每个位点采集3个生物重复。填写环境DNA采样记录表，见附录A。

1. 不同生物类群的环境DNA采样介质

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 生物类群 | 水 | 沉积物 | 生物膜 | 混合生物组织 |
| 浮游植物 | +++ | + |  |  |
| 着生藻类 |  |  | +++ |  |
| 水生维管植物 | + | ++ |  |  |
| 浮游动物 | ++ | + |  | +++a |
| 大型底栖无脊椎动物 | + | ++ |  | +++b |
| 鱼类 | +++ | + |  |  |
| 1. + 表示可用，++表示较多采用，+++表示最为常用
 |
| 1. 浮游动物主要通过浮游生物网收集组织DNA
2. 大型底栖无脊椎动物主要通过采集沉积物中底栖动物组织，进一步通过酒精浸提法获取组织DNA
 |

* + - 1. 水样
				1. 水样采集按照HJ 494的规定执行，现场过滤至一定孔径（一般为0.45 µm）的滤膜上，野外干冰或-20 ℃保存，实验室-20 ℃保存；或者加入附录B推荐的固定剂，常温保存。采样体积一般不小于1L。浮游植物和水生维管植物监测的水样体积一般为1L，底栖动物和鱼类监测的水样体积一般为3L。
				2. 高泥沙水样，应低温（4 ℃或冰袋保存）静置分离悬浮颗粒物，再过滤。生物密度较高的水体（如处于藻华爆发期），可将水样等体积分开过滤至多张（1~5）滤膜，作为子样本。
			2. 沉积物样品
				1. 按照HJ 494的规定采集表层沉积物（0~5cm），应剔除砾石、木屑、杂草、贝壳及其它大体积生物残体，收集至无菌离心管中（一般为50 mL），野外干冰或-20 ℃保存，实验室-20 ℃保存。
				2. 同一采样点沉积物采集宜尽量涵盖各类小生境。
			3. 生物膜样品

参考DB32/T 4178的规定从不同自然基质（如粗砾石、鹅卵石以及树木残干等）表面刮取一定面积（一般为25 cm2）的样品，无菌水清洗至采样瓶中。野外干冰或-20 °C保存，实验室-20 °C保存。

* + - 1. 混合生物组织样品
				1. 按照SC/T 9402的规定定量采集浮游动物样品，采样体积一般为20 L，过滤至一定孔径（一般为5 µm）的孔径滤膜，野外干冰或-20 ℃保存，实验室-20 ℃保存；或者加入附录B推荐的固定剂，常温保存。
				2. 按照HJ 710.8的规定进行定量采集与筛选大型底栖无脊椎动物，野外干冰或-20 ℃保存，实验室-20 ℃保存。
		1. 环境DNA提取
			1. 样品前处理

应包括以下内容：

1. 滤膜样品（水样或混合浮游动物组织样品）：利用研磨珠和裂解液将滤膜振荡破碎；
2. 沉积物样品：经均质器均质后冷冻干燥，用网筛过滤杂质并混匀；
3. 生物膜样品：4 ℃解冻，高速离心，留取沉淀物；
4. 混合底栖动物组织样品：4 ℃解冻，沥干水分，加入3~5倍体积的无水乙醇（纯度≥99%），1g换算为1mL，振荡混匀，室温静置3天~14天，吸取浸出液，真空离心浓缩。
	* + 1. DNA提取

借助物理和化学方法充分释放环境介质中蕴含的DNA，并去除样品中的蛋白质、脂类、多糖、RNA等杂质，可采用离心柱法或磁珠法等常规分子生物学操作纯化DNA。

* + - 1. DNA浓度与保存

样本DNA浓度应不低于1 ng/μL，最佳浓度范围为10 ng/μL~100 ng/μL，260nm和280nm波长处的吸光度值比值（OD260 nm/OD280 nm）应在1.7~2.0范围内。DNA在-20℃及以下保存，避免反复冻融。

* + 1. 宏条形码扩增与测序
			1. 宏条形码扩增
				1. 针对不同生物类群选择特异性引物扩增目标条形码序列，可在引物序列前添加Index，用于扩增大批量样品。推荐引物参照附录C。
				2. 宏条形码产物用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。若样品出现多个条带，按照SN/T 4278的规定纯化PCR产物。
				3. 宏条形码扩增产物在-20℃或以下温度条件下保存。
			2. 高通量测序

利用高通量测序平台，按照GB/T 30989和GB/T 35537的规定对宏条形码扩增产物进行测序。每个样本的预期序列数应不低于10000条。填写分子实验记录表，见附录D。

* + 1. 生物信息学分析
			1. 概述

同一批实验数据，生物信息学分析流程及关键参数应保持一致。填写生物信息学分析记录表，见附录E。

* + - 1. 序列质控

通过搜索特定序列（去除测序接头adaptor、样品索引index和引物），并基于碱基识别质量（一般>Q20）和序列长度（一般大于预期长度的70%）进行序列修剪。

* + - 1. 文库拆分

根据每个样品的Index将序列分配到不同的样品中。

* + - 1. 分子分类单元构建及质量控制

可选用OTU或ASV方法进行序列聚类和质量控制，获得分子分类单元，并过滤掉PCR扩增过程中产生的嵌合体序列。

1. OTU方法：将相似性高于或等于阈值（相似性阈值一般为0.97）的序列合并成OTUs，将序列比对到每个OTU的代表性序列，获得每个OTU在每个样品中出现的序列数；
2. ASV方法：每个独特的序列即为一个ASV，根据生物信息学方法过滤潜在的PCR和测序错误的ASV序列，将序列比对到每个ASV，获得每个ASV在每个样品中出现的序列数。
	* + 1. 过滤低丰度的分子分类单元

过滤低丰度（如总序列数为1~5）的分子分类单元（可能为假阳性、污染序列或未去除的嵌合体），也可根据实际监测需求调整过滤的丰度阈值。

* + - 1. 物种注释

将分子分类单元的序列与条形码数据库比对分析，获得物种注释信息。物种注释方法和物种鉴定阈值（主要是序列相似性阈值）的选择，应综合考虑选用的条形码片段、参考数据库的完整性及数据用途。

* + 1. 生物统计表
			1. 检出判定

分子分类单元在某一位点的生物重复样品中检出率不低于2/3。每个样品宜保留相对丰度>0.1%的分子分类单元。

* + - 1. 相对丰度

每个位点检出的分子分类单元的相对丰度为所有生物重复样品中相对丰度的平均值。每个样品的生物多样性统计表由分子分类单元（如ASVs或OTUs）名称、序列、物种注释信息、序列数和相对丰度组成，应符合附录F的规定。

* + 1. 质量控制与质量保证
			1. 质量保证与控制操作
				1. 野外质量控制与保证

野外样品采集与运输应做好记录和交接，并防止样品的交叉污染，应符合附录G的规定。

* + - * 1. 实验室质量控制与保证

实验过程应做好记录，实验样品应做好交接和保存，并防止样品的交叉污染，应符合附录H的规定。

* + - 1. 质量控制与质量保证参数
				1. 质量控制参数类别

环境DNA宏条形码技术质量控制包括阴性对照、阳性对照、平行样品。环境DNA宏条形码技术全流程下质量控制参数及原因见图2。

|  |
| --- |
| 1. 环境DNA宏条形码技术全流程下质量控制参数及原因
 |

* + - * 1. 阴性对照

在每天的样品采集、同一批次DNA提取和PCR扩增阶段应分别设置不少于3个阴性对照，也可适当设置测序的阴性对照，见表2。

* + - * 1. 阳性对照

建议设置不少于6个PCR扩增的阳性对照，作为阳性质控样本。PCR扩增的阳性对照应为不少于10个特定物种的基因组DNA（已知可以有效扩增）的等量混合物，浓度一般为1ng/uL。也可根据实验需要和实验条件在DNA提取和测序过程中适当设置阳性对照，见表2。

1. 环境DNA宏条形码技术每个流程设置的阴性和阳性对照

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 操作过程 | 阴性质控样本 | 阳性质控样本 |
| 过滤 | 无菌水 | 无 |
| DNA提取 | 无菌水 | 已知组成的混合群落 |
| PCR扩增 | 无菌水 | 已知组成的DNA标准样品 |
| 测序 | 无菌水 | 测序试剂盒中的对照试剂 |

* + - * 1. 平行样品

每个位点应至少设置3个生物重复样品，可根据实验需求和实验条件适当设置DNA提取、PCR和建库测序平行样品。

* + - 1. 质量控制评价指标
				1. 质量控制评价指标类别

质量控制评价指标包括假阴性率和假阳性率。

* + - * 1. 假阴性率

使用阳性质控样品评估监测的假阴性率。重复测定6次，计算标准样品中含有但测量结果中未检出的物种所占比例，即假阴性率（*FN*）。假阴性率不应超过10%。按照公式（1）计算。

 $FN= \frac{Q\_{1}}{Q}$ ()

式中：

*FN*——假阴性率；

*Q1*——标准样品中未被测出的物种数目；

*Q* ——标准样品的实际物种数目。

* + - * 1. 假阳性率

使用阳性质控样品评估监测的假阳性率。重复测定6次，计算测量结果中检出但标准样品中不存在的物种所占比例，即假阳性率（*FP*）。假阳性率不应超过10%。按照公式（2）计算。

 $FP= \frac{Q\_{2}}{Q}$ ()

式中：

*FP*——假阳性率；

*Q2*——未在标准品物种清单的物种数目；

*Q* ——标准样品的实际物种数目。

1.
2. （规范性）
环境DNA采样记录表

表A.1 环境DNA采样记录表

监测单位： 采样人： 采集日期： 年 月 日 记录表编号：

|  |  |
| --- | --- |
| 位点名称： | 位点编号： |
| 采样位点及周边生境照片: |
| 经度: 度 分 秒 | 纬度: 度 分 秒 | 海拔（m）：  |
| 生境条件 |
| 水深（m） | 气温 | 水温 |
| pH | 透明度 | 溶氧量 |
| 流速（m/s） | 叶绿素a（mg/L） | 电导率 |
| 环境DNA采集 |
| 采样介质 | □ 水样 □沉积物 □生物膜 □ 混合浮游动物组织 □混合底栖动物组织 |
| 水样 | 体积/样品（mL）： | 过滤体积/样品（mL）： |
| 样品数/位点：  | 样品编号： |
| 过滤方法：□ 手动过滤 □蠕动泵 □真空泵 |
| 滤膜材质：□硝酸纤维素 □玻璃纤维 □聚碳酸酯 □尼龙 □其他： |
| 滤膜孔径： | 过滤时间/样本： |
| 滤膜保存方法：□ 乙醇 □ Longmire’s固定剂 □ 干冰 □ -20 ℃ |
| 沉积物 | 采样工具：□抓斗 □抓泥器 □钻探装置 □其他： | 体积/样品（mL）: |
| 样品数/位点： | 样品编号： |
| 生物膜 | 基质类型：□粗砾石 □粗鹅卵石□树木残干 □其他： | 基质面积（cm2）: |
| 样品数目/位点： | 样品编号： |
| 浮游动物混合组织 | 体积/样品（mL）： | 过滤体积/样品（mL）： |
| 样品数/位点：  | 样品编号： |
| 过滤方法：□ 手动过滤 □蠕动泵 □真空泵 |
| 滤膜材质：□硝酸纤维素 □玻璃纤维 □聚碳酸酯 □尼龙 □其他： |
| 滤膜孔径： | 过滤时间/样本： |
| 滤膜保存方法：□ 乙醇 □ Longmire’s固定剂 □ 干冰 □ -20 ℃ |
| 底栖动物混合组织 | 采样工具：□抓斗式采泥器 □彼得森采样器 □D形抄网 □其他： | 采样面积/样品（m2）： |
| 样品数/位点：  | 样品编号： |

1. （资料性）
环境DNA固定剂
	1. 乙醇固定剂

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

* 1. Longmire’s固定剂

Longmire’s固定剂需浸没整个样本，常温下，样本在Longmire’s中可以稳定储存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。Longmire’s固定剂配方见表A.1。

表B.1 Longmire’s固定剂配方

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 序号 | 成分 | 浓度 | 体积 |
| 1 | Tris-HCl | 1M | 100mL |
| 2 | EDTA | 0.5M | 200mL |
| 3 | NaCl | 4M | 2.5mL |
| 4 | SDS | —— | 5g |
| 定容 | 双蒸水 | —— | 1L |

1. （资料性）
常用DNA条形码扩增引物信息

表C.1给出了常用DNA宏条形码扩增引物信息。

表C.1 常用DNA宏条形码扩增引物信息

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 目标群落 | 基因名称 | 引物名称 | 引物序列（5’ - 3’） | 退火温度 |
| 蓝藻门 | 16S\_V3 | 16S\_341F | CCTACGGGRSGCWGCAG | 55 °C~62 °C |
| 16S\_518R | ATTACCGCGGCTGCTGG |
| 16S\_V4 | 16S\_515F | GTGCCAGCMGCCGCGGTAA | 55 °C~62 °C |
| 16S\_806R | GGACTACHVGGGTWTCTAAT |
| 16S\_V3\_V4 | 16S-338F | ACTCCTACGGGAGGCAGCAG | 55 °C~62 °C |
| 16S-806R | GGACTACHVGGGTWTCTAAT |
| 真核藻类 | 18S\_V9 | 18S\_1389F | TCCCTGCCHTTTGTACACAC | 55 °C~62 °C |
| 18S\_1510R | CCTTCYGCAGGTTCACCTAC |
| 18S\_V4 | TAReuk454FWD1 | CCAGCA(G/C)C(C/T)GCGGTAATTCC | 55 °C~62 °C |
| TAReukREV3 | ACTTTCGTTCTTGAT(C/T)(A/G)A |
| 着生硅藻 | 18S\_V4 | DIV4\_F | GCGGTAATTCCAGCTCCAATAG | 48 °C~55 °C |
| DIV4\_R | CTCTGACAATGGAATACGAATA |
| 水生维管植物 | 18S\_ V7 | Euka02\_V7F | TTTGTCTGSTTAATTSCG | 45 °C~55 °C |
| Euka02\_V7R | ACAGACCTGTTATTGC |
| RbcL | orbcL2\_F | YGATGGACTTACNAGTCTTGATCGTTACAAAGG | 60 °C~62 °C |
| orbcL2\_R | GNCCATAYTTRTTCAATTTATCTCTTTCAACTTGGATNCC |
| 浮游动物大型底栖无脊椎动物 | COI-1 | mlCOIintF | GGWACWGGWTGAACWGTWTAYCCYCC | 45 °C~55 °C |
| dgHCO2198 | TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA |
| 大型底栖无脊椎动物 | COI-2 | mlCOIintF | GGWACWGGWTGAACWGTWTAYCCYCC | 45 °C~55 °C |
| jgHCO2198 | TAIACYTCIGGRTGICCRAARAAYCA |
| 鱼类 | Mt 12S rDNA-1 | MetafishF1 | TCGTGCCAGCCACCGCGGTTA | 60 °C~63 °C |
| MetafishR1 | ATAGTGGGGTATCTAATCCCAG |
| Mt 12S rDNA-2 | Tele02\_F | AAACTCGTGCCAGCCACC | 55 °C~60 °C |
| Tele02\_R | GGGTATCTAATCCCAGTTTG |

1. （规范性）
分子实验记录表

表D.1 分子实验记录表

实验单位： 负责人： 实验日期： 样品来源水域：

样品类型（水样/沉积物/生物膜/混合浮游动物组织/混合底栖动物组织）：

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 环境DNA提取 | DNA提取实验室： | DNA提取人： | DNA提取日期： |
| DNA提取方法： | DNA检测工具： | DNA保存位置： |
|  | 阴性对照 | 样品1 | 样品2 | …… |
| DNA浓度（ng/µL）： |  |  |  |  |
| DNA质量（OD 260/280）： |  |  |  |  |
| 宏条形码扩增 | PCR实验室： | 操作人：  | PCR日期： |
| PCR重复数目： | 反应体积： µL | PCR引物名称： |
| PCR上游引物序列（5’~3’） |  |
| PCR下游引物序列（5’~3’） |  |
| 预期扩增长度： | PCR聚合酶： | 退火温度： |
| 循环数： | 阴性对照结果： | 阳性对照结果 |
| 琼脂糖凝胶电泳图： |
| 高通量测序 | 测序实验室： | 操作人：  | 测序日期： |
| 测序平台： | 预期序列数/样本： | 高通量测序数据存储位置： |

1. （规范性）
生物信息学分析记录表

表E.1 生物信息学分析记录表

生信分析单位： 负责人： 操作人： 分析日期：

样品数目： 宏条形码扩增引物及预期扩增长度：

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 质量控制 | 原始序列数： | 碱基识别质量阈值：□ Q20 □ Q30 □ 其他： |
| 序列长度筛选阈值： | 质控后序列数： | 质控后序列数/样本： |
| 序列聚类和质控 | 序列聚类方法：□ ASV □ OTU □ 其他： | OTU聚类阈值： |
| 聚类软件和关键参数：□ Usearch □ Vsearch □ Swarm □ 其他： |
| 嵌合体剔除方法：□ Vsearch □ Swarm □ DADA2 □ LULU □ 其他： |
| 分子分类单元过滤 | 低丰度分类单元的过滤阈值： |
| 物种注释 | 物种注释方法：□ Blastn □ 其他： | 物种鉴定阈值： |
| 条形码数据库：□ NCBI □ BOLD □ 其他： |

1. （规范性）
生物统计表

表F.1 生物统计表

检测单位： 检测人： 样品采集日期： 年 月 日

样品处理日期： 点位名称： 样品序列数：

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 分子分类单元编号 | 序列 | 门 | 纲 | 目 | 科 | 属 | 种 | 序列数 | 相对丰度 |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |

1. （规范性）
野外质量控制与保证
	1. 样品的采集
		1. 制定合理的采样操作程序，在确定的采样时间、采样点、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，以保证采集的样品具有代表性和可比性。
		2. 保证所有野外设备处于良好的运行状态，应制定一项常规检查、维护及/或校准的计划，以确保野外数据的异质性和质量。
		3. 合理安排各类生物样品采集顺序，尽量避免生物类群在采集前受到较大扰动。
		4. 正确填写样品标签，包括样品编号、日期、水体名称、采样位置以及采集人姓名。
		5. 及时在现场处理样品。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。
		6. 水样采集后可应选用冰袋或4°C短暂保存，并在6小时内完成过滤。
		7. 整个采样和前处理过程尽量保持无外源污染，符合以下要求：
2. 应全程佩戴无菌实验手套，采集下一个样品应及时更换手套。
3. 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，应选用漂白剂（次氯酸钠的浓度不低于1.5%）消毒不少于1分钟。
4. 重复使用的采样瓶，应浸泡在漂白剂中不少于5分钟，用蒸馏水重复冲洗3次，并晾干。在采样点，再次用水样冲洗三次，在采集样品前应除去任何残留的漂白剂。确保清洗后丢弃的水样未与待取的水样混合。
5. 应只从外部接触采样瓶，不得接触采样瓶及瓶盖内部。
6. 如果有必要进入水中采样，应使用胶靴，并在采样点之间进行消毒。清除鞋底和靴子两侧的所有污垢、鹅卵石和其他环境碎屑。
7. 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。
8. 过滤水样前，每个样品的过滤器接触面应使用漂白剂消毒不少于1分钟，并用蒸馏水冲洗3遍。
	* 1. 所有使用漂白剂产生的废物须收集运送至实验室，按照危险废物处理。
	1. 采样记录
		1. 认真填写环境采样记录表，见附录A。除了样品相关信息，采样时间、地点、经纬度、水温、气温、水文、采样介质等也应有详细记录，确保采样现场数据的完整性。
	2. 样品的运输
		1. 应根据采样记录或登记表核对清点样品，以免有误或丢失。
		2. 样品运输应按照要求的贮存温度执行，必要时需准备冷藏设备。
		3. 运输中应仔细保管样品，以确保样品无破损、无污染。应避免强光照射及强烈震动。
		4. 样品的运输尽量迅速。
	3. 样品的保存
		1. 按照要求分别保存各类样品，保存时，每隔一周检查固定液，必要时进行添加。
		2. 不同介质来源的环境DNA样品应单独运输保存，宜置于不同冰箱中保存，若条件有限，应置于冰箱的不同储存室。
		3. 环境样品不得与DNA样品共同运输保存，宜置于不同冰箱中保存，若条件有限，应置于冰箱的不同储存室。
9. （规范性）
实验室质量控制与保证
	1. 概述

本文件涉及大量分子生物学实验操作，应防止样品的污染，尤其防止交叉污染极为重要。

* 1. 实验室要求
		1. DNA提取实验室和PCR实验室须在物理空间上相互独立，不应有空气的直接相通。
		2. PCR实验室应配备紫外线超净工作台。
		3. 每个实验室应配备专用的实验工作服，并定期清洗。
	2. 基本操作要求
		1. 实验人员不得在同一天进行DNA提取和PCR扩增实验。
		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。
		3. 确保所有的实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。
		4. 实验耗材（如枪头、离心管和PCR管等）须高温灭菌。
		5. 实验操作前，应用1.5%的漂白剂擦拭桌面，用75%乙醇消毒双手，用1.5%的漂白剂消毒实验仪器。
		6. 实验操作前，移液枪应选用75%的酒精消毒或紫外线消毒30 min。
		7. 实验过程中，实验人员应全程穿着实验服，并佩戴一次性无菌实验手套。
		8. 实验过程中，移液枪不得接触任何盛放样品或试剂的容器内壁。
		9. 同一耗材（例如1.5 mL离心管、移液枪头等）不得重复接触来自不同样品的实验材料。
		10. 实验过程中，应小心开关容器盖，样品不宜长时间敞口放置。
		11. 怀疑或确定产生交叉污染的样品、试剂或耗材，不得继续使用。
	3. 环境DNA提取
		1. 实验操作前，应用1.5%的漂白剂擦拭桌面。
		2. DNA提取应全程佩戴口罩，防止刺激性气味和交叉污染。
		3. 沉积物称量和转移宜选用一次性无菌称量匙。
		4. 同一批次实验应最后处理阳性对照样品。
		5. 准确记录阴性对照、阳性对照和实验样品的DNA浓度和质量。
		6. 应按照要求对DNA样品进行分装和保存。环境DNA应长期保存，准确记录、标记完整。
		7. 阴性对照、阳性对照和样品的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。
	4. 宏条形码扩增与保存
		1. PCR混合试剂配制宜在紫外线超净工作台中进行。
		2. 紫外线超净工作台使用前，应紫外线消毒30 min。
		3. 原始测序数据应按照GB/T 35890的规定保存为FASTQ文件，并准确记录测序数据的样品来源、编号、扩增引物和对应的Index信息等。
	5. 生物信息学分析
		1. 阴性对照中的序列数应小于样品平均序列数的10%，并剔除样品中包含的阴性对照序列。
		2. 生信分析产生的数据集应妥善存储，并按照要求记录保存位置。
	6. 数据记录

详细准确记录样品信息、操作人、实验依据及关键技术参数。实验室主管应检查所有数据记录的正确性和完整性。数据记录表须有记录人、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。

* 1. 样品保存

按照要求保存样品，并记录保存信息，定期核查。

