

ICS 13.020.30

CCS Z 06

HJ

中华人民共和国国家生态环境标准

HJ 1468—2026

基于环境DNA的内陆水体外来入侵 水生动物调查与分布评估技术指南

Technical guidelines for investigation and distribution assessment of invasive alien aquatic animals in inland waters based on environmental DNA

本电子版为正式标准文件，由生态环境部环境标准研究所审校排版。

2026-05-08 发布

2026-09-01 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 试剂、仪器设备和材料.....	2
5 目标物种	2
6 评估程序	3
7 资料收集	4
8 外来入侵水生动物采样.....	4
9 外来入侵水生动物分布评估.....	6
10 质量控制与质量保证.....	8
11 废弃物处理.....	8
12 评估报告编制.....	8
附录A（资料性附录） 环境DNA试剂、仪器设备和材料	9
附录B（资料性附录） 主要外来入侵水生动物名单	11
附录C（资料性附录） 基于环境DNA的内陆水体外来入侵水生动物调查与分布评估资料收集清单.....	12
附录D（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.....	13
附录E（资料性附录） 环境DNA固定剂.....	14
附录F（规范性附录） 目标物种引物特异性验证.....	15
附录G（资料性附录） qPCR检测信息记录表	16
附录H（资料性附录） 最低检测限确定方法.....	17
附录I（规范性附录） 野外质量控制与保证	18
附录J（规范性附录） 实验室质量控制与保证	19
附录K（资料性附录） 基于环境DNA的内陆水体外来入侵水生动物调查与分布评估报告编写格式.....	21

前 言

为贯彻《中华人民共和国生态环境法典》《中华人民共和国生物安全法》等法律法规和《外来入侵物种管理办法》，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调查、分布评估及监督管理工作，制定本标准。

本标准规定了基于探针法实时荧光定量聚合酶链式反应（qPCR）的环境 DNA 技术，评估外来入侵水生动物区域分布的程序、内容、方法和技术要求。

本标准首次发布。

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

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 2026年5月8日批准。

本标准自 2026 年 9 月 1 日起实施。

本标准由生态环境部解释。

基于环境 DNA 的内陆水体外来入侵水生动物调查与 分布评估技术指南

1 适用范围

本标准规定了基于探针法实时荧光定量聚合酶链式反应（qPCR）的环境 DNA 技术，评估外来入侵水生动物区域分布的程序、内容、方法和技术要求。

本标准适用于河流（不含入海口）、湖泊、水库、水田等内陆水体外来入侵水生动物调查与分布评估。

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/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 42077 生物技术 核酸靶序列定量方法的性能评价要求 qPCR 法和 dPCR 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），包括爬行动物、两栖动物、鱼类、甲壳动物、软体动物等。

3.2

外来水生动物 alien aquatic animals

在我国无天然分布，经直接或间接人为途径传入的水生动物，包括该动物所有可能存活和繁殖的部分、配子或繁殖体。

3.3

外来入侵水生物 *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物。

3.4

环境 DNA *environmental DNA(eDNA)*

环境介质（水、土壤、沉积物、生物膜、空气等）或混合生物组织中直接提取到的所有生物 DNA 的集合。本标准特指从水环境中（如水、沉积物等）直接提取到的外来入侵水生物脱落、释放的细胞或游离 DNA。

3.5

阳性对照 *positive control*

确定含目标物种 DNA 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 DNA 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

实时荧光定量聚合酶链式反应 *quantitative real-time polymerase chain reaction(qPCR)*

在体外扩增环境 DNA 片段的方法，在扩增过程中由于荧光物质的释放或荧光物质与扩增产物结合而释放荧光信号，依据荧光信号的强度对扩增产物进行实时监测，从而实现初始环境 DNA 模板量进行定量分析的技术。

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。

3.10

技术重复 *technical repetition*

对同一个来源的样本 DNA 模板进行多次独立的 qPCR 检测，用于判断实验操作本身引入的随机误差，提高检测结果的精确度和可靠性。

3.11

引物 *primer*

在 DNA 复制过程中，结合于模板链上并作为复制延伸的起始位点和/或终止位点的，具有一定长度和顺序的人工合成寡核苷酸链。

4 试剂、仪器设备和材料

包括野外采样和室内实验所需试剂、仪器设备和材料。资料清单参见附录 A。

5 目标物种

目标物种依据农业农村部、生态环境部等公开发布的外来入侵物种管理名单确定，并根据最新公开

发布或修编的外来入侵物种名录同步更新，参见附录 B。

6 评估程序

基于环境DNA的内陆水体外来入侵水生动物调查与分布评估工作内容包括资料收集、外来入侵水生动物采样、外来入侵水生动物分布评估、报告编制等。评估程序见图1。

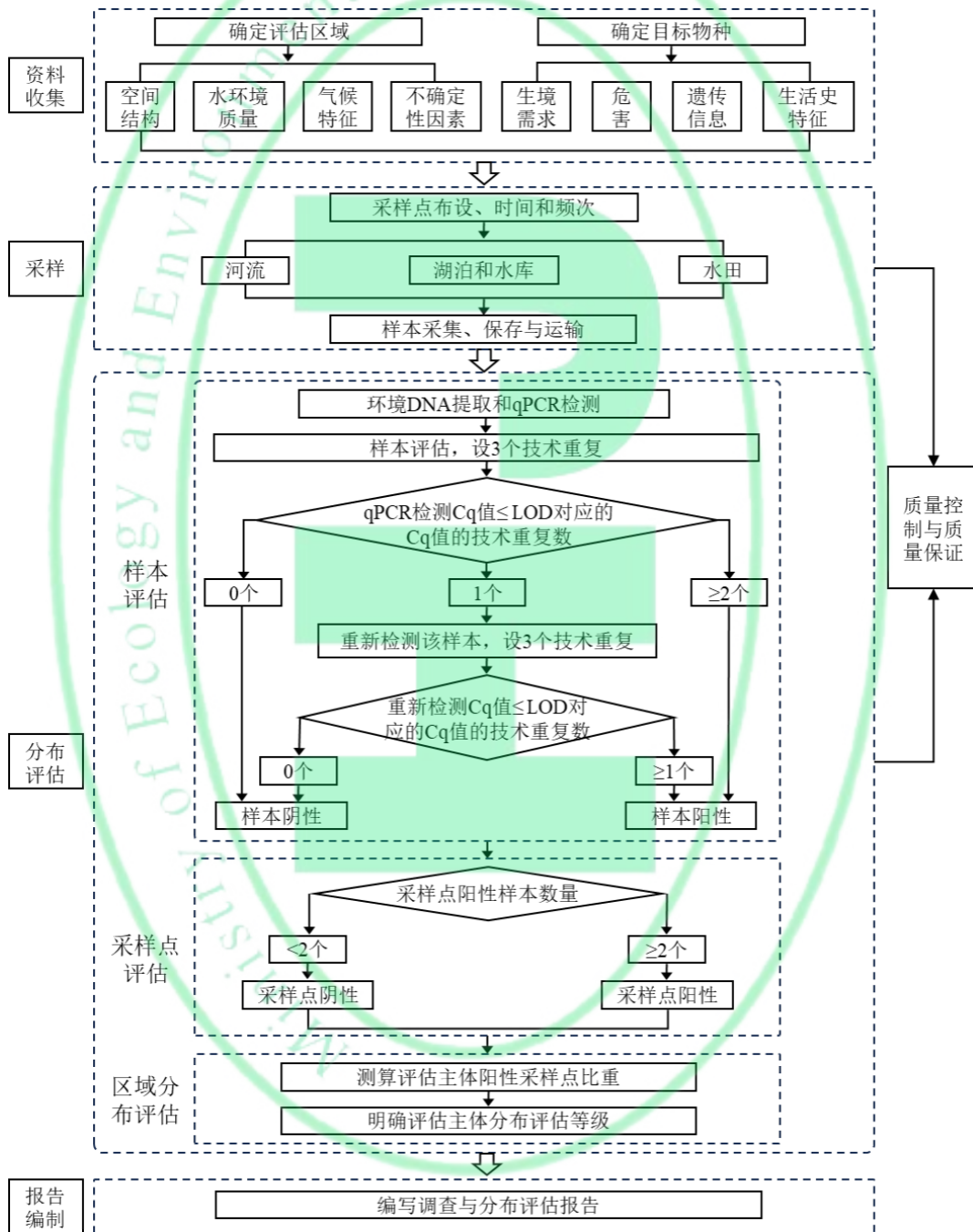


图1 基于环境DNA的内陆水体外来入侵水生动物调查与分布评估程序

7 资料收集

对评估区域周边居民、渔民、垂钓者、渔业管理人员等进行走访，结合文献查阅、信息收集和遥感识别，以及现场踏勘、传统生物监测等形式，收集评估区域和目标物种相关信息，包括评估区域空间结构、水环境质量、气候特征、不确定性因素等，目标物种生境需求、危害、遗传信息、生活史特征等。资料清单参见附录 C。

8 外来入侵水生动物采样

8.1 一般性要求

8.1.1 按照本标准规定的采样点布设要求和样本采集方法，对评估区域外来入侵水生动物开展采样，并保证采样时间的一致性。

8.1.2 采样点宜布设在外来入侵水生动物可能分布的区域，避开排污口、养殖区、垂钓区等局部特殊区域，并通过北斗卫星导航系统记录经纬度信息。

8.1.3 应充分考虑采样安全性和可行性。

8.2 采样

8.2.1 采样点布设

8.2.1.1 河流采样点布设

8.2.1.1.1 依据河流空间结构、地形等因素的差异，将河流划分为不同评估河段。评估河段长度参照 HJ 1295 确定，可涉水河流宜小于 10 km，不可涉水河流宜小于 50 km，江河干流可根据实际情况适当调整。

8.2.1.1.2 每个评估河段内等距设置 10 个采样河段。采样河段长度参照 HJ 1295 确定，可涉水河流为 100 m，不可涉水河流为 1 km 或 40 倍河流宽度。

8.2.1.1.3 在采样河段中部、左右岸边水域等区域设置采样点。采样点参照 HJ 1295 确定，每个采样河段宜布设 3~5 个采样点，数目可依据水体形态特点、水文特征、目标物种生境需求调整。

8.2.1.1.4 河流采样点点位布设示意图见附录 D 中图 D.1。

8.2.1.2 湖泊和水库采样点布设

8.2.1.2.1 将湖泊和水库划分为近岸带、湖库心区、主要进水区、主要出水区等不同湖库区。近岸带沿湖库岸线等分设置 10 个湖库区，近岸带湖库区宽度宜小于 10 m。

8.2.1.2.2 每个湖库区内均匀布设采样点。采样点数量参照 HJ 1296 确定，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。

8.2.1.2.3 湖泊和水库采样点点位布设示意图见附录 D 中图 D.2。

8.2.1.2.4 河道型或狭长型湖库，参照 8.2.1.1 进行采样点布设。

表 1 湖库区采样点参考数量

湖库区面积 A (km^2)	$A < 50$	$50 \leq A < 500$	$500 \leq A < 1\,000$	$1\,000 \leq A < 2\,000$	$A \geq 2\,000$
点位数量 N (个)	$3 \leq N < 10$	$10 \leq N < 15$	$15 \leq N < 20$	$20 \leq N < 30$	$30 \leq N < 50$

8.2.1.3 水田采样点布设

以田埂为边界将大片水田划分为单块水田。每块水田按五点采样法或随机法布设 2~5 个采样点，采样点数量可依据水田面积进行调整。

8.2.2 采样介质

根据目标物种类群，选取环境 DNA 采样介质，获取采样点具有代表性的水体样本或沉积物样本。目标物种为爬行动物、两栖动物、鱼类时，可采集水体样本；目标物种为甲壳动物、软体动物时，可采集沉积物样本。

8.2.3 采样时间和频次

采样频次 1 年不少于 2 次，针对重点关注区域或突发入侵事件，可适当提高采样频次。采样时间需满足以下要求：

- a) 爬行动物：一般于活动盛期和繁殖期采样；
- b) 两栖动物：一般于 4~10 月活跃期采样；
- c) 鱼类：一般于繁殖季开展采样；
- d) 甲壳动物和软体动物：一般于春末至秋末采样；
- e) 优先在目标物种日活动高峰时段采样；
- f) 避免在高温或强降水等不利环境条件下采样。

8.2.4 样本采集

8.2.4.1 参照 HJ 710.7 垂直采集水体样本，一般要求如下：

- a) 水深 ≤ 1 m：采集表层水体样本，采集深度不超过该点水深的 0.5 倍；
- b) $1 \text{ m} < \text{水深} \leq 3 \text{ m}$ ：在表层和底层等比例采集混合水体样本，表层、底层采集深度分别为该点水深的 0.2 倍、0.8 倍；
- c) 水深 $> 3 \text{ m}$ ：在表层（水面下 0.5 m 处）、中层和底层等比例采集混合水体样本，中层和底层采集深度分别为该点水深的 0.5 倍、0.8 倍。

8.2.4.2 每个采样点平行采集 3 个样本。同一采样点各样本采集深度应保持一致。

8.2.4.3 使用无菌器材采集水体样本，快速过滤至 $0.45 \mu\text{m}$ 的混合纤维素酯滤膜上。水体样本体积推荐为 1 L，可根据水体流速、浊度等现场情况增加采样体积。浊度较大的水体样本可 4°C 静置分离出悬浮颗粒物后再过滤。

8.2.4.4 沉积物样本采集按照 HJ 494 的规定执行，采集表层沉积物（0~5 cm），剔除砾石及大体积生物残体，收集至无菌容器中。

8.3 保存与运输

8.3.1 水体样本采集后应立即过滤，如不能即刻过滤，可暂置于 4°C 密封冷藏保存。样本采集和过滤间隔不宜超过 24 h。

8.3.2 按照 GB/T 40226 技术要求，水体样本过滤后的滤膜或沉积物样本应置于无菌容器 -80°C 低温保存。保存及运输过程避免反复冻融。

8.3.3 当需要常温保存或运输时，可将滤膜或沉积物样本迅速浸没到附录 E 推荐的固定剂中，固定剂类型参见附录 E。保存和运输过程避免阳光直射。

9 外来入侵水生动物分布评估

9.1 环境 DNA 提取

9.1.1 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、过筛去除杂质混匀。

9.1.2 DNA 提取

9.1.2.1 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。选用提取试剂或相应试剂盒提取样本DNA。

9.1.2.2 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1 ng/μL，最佳质量浓度范围为10 ng/μL~100 ng/μL，在260 nm和280 nm波长处的吸光度值比值（OD_{260 nm}/OD_{280 nm}）应在1.7~1.9范围内，在260 nm和230 nm波长处的吸光度值比值（OD_{260 nm}/OD_{230 nm}）应大于2.0。符合浓度和纯度要求的DNA样本均匀分装为2份，1份在-80℃保存用于备份，1份在-20℃保存用于后续的qPCR检测，避免反复冻融。

9.2 qPCR 检测

9.2.1 目标物种特异性引物与探针

9.2.1.1 按照 GB/T 34797 技术要求，根据目标物种特异位点设计引物和探针。引物退火温度宜在 50℃~68℃范围内，鸟嘌呤（G）与胞嘧啶（C）碱基含量宜在 40%~60%范围，且无任何明显二级结构。引物对中的两条引物退火温度差宜在 1℃~2℃。探针长度宜小于 30 个碱基。探针的退火温度要求宜比引物的退火温度至少高 5℃，在探针 5'端避免使用太多 G。

9.2.1.2 按照附录 F 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。

9.2.2 qPCR 扩增

每个样本设置 3 个技术重复。参照 GB/T 43650 技术要求对各技术重复进行 qPCR 扩增，明确其对应的 C_q 值。及时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 G。

9.2.3 明确 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 qPCR 的循环数（C_q 值）关系绘制标准曲线。以 95%置信水平下的最低检出浓度确定目标物种 DNA 的 LOD。具体方法参见附录 H。明确 LOD 所对应的 C_q 值。

9.3 采样点评估

9.3.1 样本评估结果

按照以下要求明确样本评估结果：

- a) 2份及以上技术重复检测的 C_q 值均 \leq LOD 对应的 C_q 值，认定该样本为阳性样本，检出目标物种成分；
- b) 仅1份技术重复检测的 C_q 值 \leq LOD 对应的 C_q 值，应重新检测该样本。重新检测样本设置3个技术重复，当1份及以上技术重复检测的 C_q 值 \leq LOD 对应的 C_q 值，认定该样本为阳性样本，检出目标物种成分；否则，认定该样本为阴性样本，未检出目标物种成分；
- c) 不符合上述情况，认定该样本为阴性样本，未检出目标物种成分。

9.3.2 采样点评估结果

按照以下要求明确环境 DNA 采样点评估结果：

- a) 同一采样点存在2个及以上阳性样本，该采样点为阳性采样点；
- b) 不符合上述情况，该采样点为阴性采样点。

9.4 区域分布评估

9.4.1 确定评估主体

按照以下要求确定评估主体，明确区域内阳性采样点数量：

- a) 河流宜以评估河段为主体进行分布评估；
- b) 湖泊和水库宜开展整体评估，河道型或狭长型湖库宜参照河流进行分布评估；
- c) 水田宜开展整体评估。

9.4.2 评估主体阳性采样点所占比重测算

评估主体阳性采样点所占比重按照公式(1)计算：

$$P=(M/N)\times 100\% \quad (1)$$

式中： P ——阳性采样点所占比重，%；

M ——阳性采样点数量；

N ——采样点总数。

9.4.3 评估主体分布评估等级划分

评估主体外来入侵水生动物分布评估等级依据 P 值划分，具体如下：

- a) P 值为 0，无分布；
- b) P 值在 0~10%，零星分布；
- c) P 值在 10%（含）~30%，局部分布；
- d) P 值为 30%（含）以上，广泛分布。

10 质量控制与质量保证

10.1 质量控制

10.1.1 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。

10.1.2 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。阳性对照样本qPCR检测Cq值 \leq LOD对应的Cq值则可判断整个反应体系和反应过程可靠。

10.1.3 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。阴性对照样本qPCR检测Cq值 $>$ LOD对应的Cq值则可判断该过程中受试样本未被污染。

10.1.4 每个采样点平行采集3个样本，每个样本qPCR扩增过程设置3个技术重复，必要时可增加样本数和技术重复数。

10.2 质量保证

10.2.1 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。

10.2.2 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、Cq值确定、数据记录、样本保存和数据保存。

11 废弃物处理

参照SN/T 4835规定执行废弃物的分类、隔离、收集、贮存、处理和处置。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。实验过程中产生的废物应集中收集，分类保存，及时处理，并做好处理记录。

12 评估报告编制

基于环境DNA的内陆水体外来入侵水生动物调查与分布评估报告内容包括前言、评估区域概况、目标物种概述、采样方法和流程、分布评估结果、对策与建议等，评估报告编写格式参见附录K。

附录 A (资料性附录)

环境 DNA 试剂、仪器设备和材料

A.1 试剂

A.1.1 试剂基本要求

除非另有说明，分析时均使用符合国家标准和分析纯试剂。实验用水为无菌水。

A.1.2 环境 DNA 样本采集及前处理试剂

A.1.2.1 消毒液：1.5%的次氯酸钠。

A.1.2.2 环境 DNA 固定剂：参见附录 E。

A.1.3 环境 DNA 提取试剂

推荐使用市售的 DNA 提取试剂或试剂盒。如使用十六烷基三甲基溴化铵（CTAB）法提取 DNA 所需试剂如下：

A.1.3.1 无菌水：超纯水经 121℃，0.1 MPa 灭菌 30 min，无细菌无核酸酶。

A.1.3.2 氢氧化钠溶液： $c(\text{NaOH})=1 \text{ mol/L}$ 。

A.1.3.3 盐酸： $\rho(\text{HCl})=1.19 \text{ g/mL}$ 。

A.1.3.4 三羟甲基氨基甲烷盐酸盐（Tris-HCl， $\text{C}_4\text{H}_{12}\text{ClNO}_3$ ）。

A.1.3.5 Tris-HCl 溶液： $c(\text{Tris-HCl})=0.1 \text{ mol/L}$ ，称取 15.76 g 三羟甲基氨基甲烷盐酸盐（A.1.3.4）溶于适量无菌水（A.1.3.1）中，盐酸调节 pH 至 8.0，定容至 1 000 mL，灭菌后备用。

A.1.3.6 十六烷基三甲基溴化铵（CTAB， $\text{C}_{19}\text{H}_{42}\text{BrN}$ ）。

A.1.3.7 氯化钠（NaCl）。

A.1.3.8 乙二胺四乙酸（EDTA， $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_8$ ）。

A.1.3.9 乙二胺四乙酸溶液： $c(\text{EDTA})=0.02 \text{ mol/L}$ ，pH=8.0。

A.1.3.10 CTAB 提取液：称取 4 g 十六烷基三甲基溴化铵（A.1.3.6）和 16.38 g 氯化钠（A.1.3.7），分别溶于适量无菌水（A.1.3.1）中，加入乙二胺四乙酸溶液（A.1.3.9）8 mL 和 Tris-HCl 溶液（A.1.3.5）20 mL，pH 约 8.0，定容至 200 mL，灭菌后备用。

A.1.3.11 酚氯仿异戊醇：市售，Tris 饱和酚、三氯甲烷和异戊醇体积比 25:24:1，pH=8.0。

A.1.3.12 乙酸铵（ $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ ）。

A.1.3.13 乙酸铵溶液： $c(\text{CH}_3\text{COONH}_4)=7.5 \text{ mol/L}$ ，称取 57.81 g 乙酸铵（A.1.3.12）溶于适量无菌水（A.1.3.1）中，定容至 100 mL。

A.1.3.14 无水乙醇（ $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$ ）。

A.1.3.15 75%乙醇：无水乙醇（A.1.3.14）和无菌水（A.1.3.1）体积比 3:1 配制。

A.1.3.16 蛋白酶 K：市售，酶活力 $\geq 45 \text{ U/mg}$ ，浓度为 20 mg/mL。

A.1.3.17 阳性对照样品：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，市售。

A.1.4 PCR 检测试剂

A.1.4.1 PCR 特异性引物：外来入侵水生动物环境 DNA 扩增引物，可选择一对或多对。

A.1.4.2 PCR 扩增试剂：推荐市售的 PCR 扩增试剂套装，包含 Taq DNA 聚合酶、dNTPs、 Mg^{2+} 和 PCR 缓冲液等。

A.1.4.3 电泳缓冲液：使用 TAE 缓冲液（1×）。取 20 mL 市售 TAE 缓冲液（50×），无菌水定容至 1 L，pH=7.8~8.8。

A.1.4.4 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。

A.1.4.5 DNA 分子量标准（含上样缓冲液）：市售的 DNA 分子量标准范围 100 bp~2 000 bp，包含若干条单一的 DNA 条带，如 100 bp，250 bp，500 bp，750 bp，1 000 bp，2 000 bp。

A.1.4.6 DNA 染料：推荐使用市售无毒性或低毒性 DNA 染料。

A.1.4.7 PCR 产物纯化试剂：推荐使用市售 PCR 产物纯化试剂盒。

A.2 仪器设备和材料

A.2.1 环境 DNA 样本采集仪器设备和材料

A.2.1.1 常规材料：通用无菌一次性手套，尖头镊子，不含乙醇的记号笔等。

A.2.1.2 采水器：有机玻璃材质，1 L、2 L 等规格。

A.2.1.3 过滤装置：配有砂芯滤器和真空泵。

A.2.1.4 采样瓶或采样袋：市售 1 L 螺口旋盖的无菌高密度聚乙烯塑料瓶或无菌采样袋。

A.2.1.5 混合纤维素酯滤膜：孔径 0.45 μm 。

A.2.1.6 一次性离心管：1.5 mL、2 mL、5 mL 和 50 mL，无 DNA 和生物残留。

A.2.1.7 一次性冻存管：1.5 mL、2 mL、5 mL 和 10 mL，无 DNA 和生物残留。

A.2.1.8 车载冰箱：温控 4℃ 及以下。

A.2.2 实验室仪器设备和材料

A.2.2.1 一般实验室常用材料：PCR 管、96 孔板等 PCR 反应容器，无 DNA 和生物残留。

A.2.2.2 移液器：0.5 μL ~10 μL 、20 μL ~200 μL 、100 μL ~1 000 μL 等，无 DNA 和生物残留。

A.2.2.3 低温冰箱：温控 -20℃、-80℃。

A.2.2.4 烘箱：室温~250℃可调。

A.2.2.5 水浴锅：室温~100℃可调。

A.2.2.6 高压蒸汽灭菌器：可达到标准要求的 121℃，0.1 MPa 灭菌条件。

A.2.2.7 超净工作台。

A.2.2.8 均质仪。

A.2.2.9 PCR 仪：PCR 反应程序可编辑。

A.2.2.10 水平电泳仪：电场强度为 5 V/cm~10 V/cm。

A.2.2.11 离心机：转速可达 13 000 r/min，温度可控制在 4℃。

A.2.2.12 DNA 浓度分光光度计：最小测量体积 1 μL ，波长范围应覆盖 230 nm~280 nm。

A.2.2.13 凝胶成像仪：具备 DNA 凝胶成像拍照功能。

附 录 B
(资料性附录)
主要外来入侵水生动物名单

主要外来入侵水生动物名单见表 B.1。

表 B.1 主要外来入侵水生动物名单

分类	目标物种	别名	拉丁名
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>Macrolemys temminckii</i>
两栖动物	美国牛蛙	牛蛙	<i>Rana catesbeiana</i>
鱼类	豹纹翼甲鲇	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	柳条鱼、大肚鱼	<i>Gambusia affinis</i>
	鳄雀鳝	福鳄、雀鳝	<i>Atractosteus spatula</i>
甲壳动物	克氏原螯虾	小龙虾、淡水小龙虾、喇蛄、红色螯虾	<i>Procambarus clarkii</i>
软体动物	福寿螺	大瓶螺、苹果螺、雪螺	<i>Pomacea canaliculata</i>

附 录 C
(资料性附录)

基于环境 DNA 的内陆水体外来入侵水生动物调查与分布评估资料收集清单

基于环境 DNA 的内陆水体外来入侵水生动物调查与分布评估资料收集，主要包括评估区域空间结构，评估区域水环境质量，评估区域气候特征，评估区域不确定性因素，目标物种生境需求，目标物种危害，目标物种遗传信息，目标物种生活史特征。

表 C.1 基于环境 DNA 的内陆水体外来入侵水生动物调查与分布评估资料收集清单

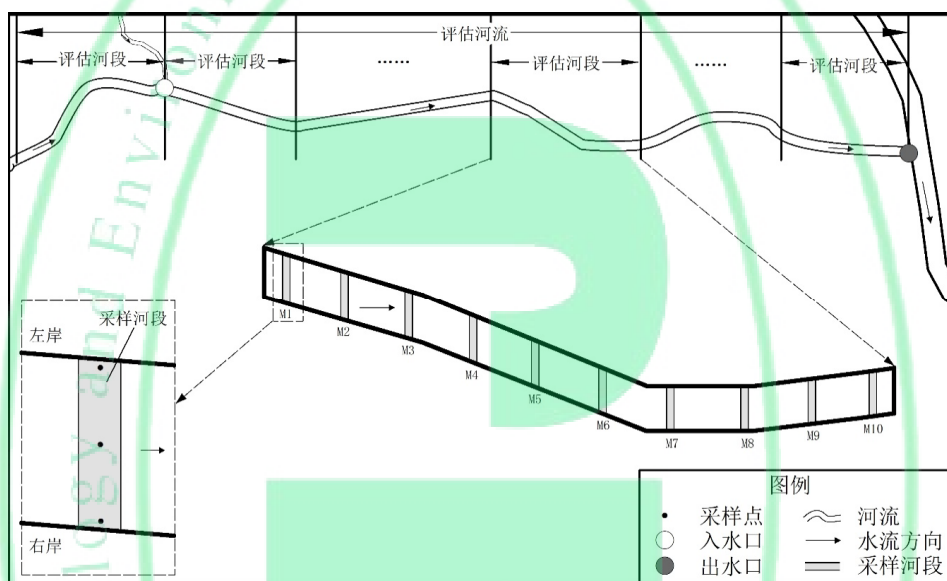
评估内容	资料类别	资料清单
评估区域	空间结构	1.水体类型，如湖泊、水库、河流、水田等； 2.水体地理位置； 3.水体形态，如是否为独立水体。
	水环境质量	1.水体水位、水深、流速、流向、水体透明度等； 2.水体面积、长度、宽度、温度等； 3.水体地形等。
	气候特征	年均温、降水量等。
	不确定性因素	排污口、规模化养殖区、垂钓区等。
目标物种	生境需求	1.目标物种类群； 2.目标物种空间分布状况； 3.目标物种潜在适生区； 4.目标物种适生生境类型。
	危害	已造成的经济损失、社会和生态危害等。
	遗传信息	1.目标物种 DNA 条形码； 2.目标物种特异性引物和探针。
	生活史特征	1.目标物种生长发育阶段； 2.目标物种繁殖周期； 3.目标物种种群结构变化、迁徙特征等。

附录 D (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

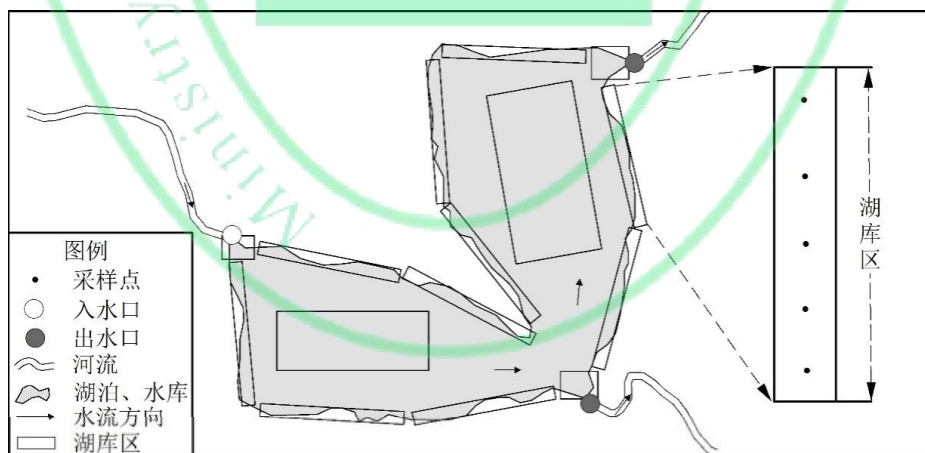
D.1 河流外来入侵水生动物环境 DNA 采样点布设示意图

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



D.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 D.2 所示湖库中布设外来入侵水生动物环境 DNA 采样点。



附录 E
(资料性附录)
环境 DNA 固定剂

E.1 乙醇固定剂

乙醇浓度不小于 96%。固定剂不含甲醇等其他醇类。固定剂需浸没整个样本。样本在固定剂中可常温下稳定储存 3~6 个月。

E.2 Longmire's 固定剂

E.2.1 试剂配制

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

E.2.2 样本保存

固定剂需浸没整个样本。常温下, 样本在 Longmire's 固定剂中可以稳定储存 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, 加热温度不得超过 60℃。

附录 F (规范性附录)

目标物种引物特异性验证

F.1 序列比对

参照 GB/T 42077 技术要求，通过生物信息学检测特异性。根据转录组数据库或者基因组数据库，将引物和探针序列与目标物种的参考基因组、同源基因序列及不少于 3 个近缘物种基因组进行比对，筛选出特异性靶模板，并识别出所有潜在的非特异性模板。若在此初步筛选中鉴定出可能产生非预期 PCR 产物的序列，则应评估探针序列引物对的非特异性结合所产生的可能扩增序列的同源性，以显示基于探针检测的特异性。

F.2 实验验证

以近缘物种及含有同源基因的样本 DNA 为阴性对照，目标物种为阳性对照，以无菌水为空白对照，进行 qPCR 扩增。琼脂糖凝胶电泳显示为单一目标条带，且其大小与预期产物一致，并经测序验证序列与目标序列完全一致，表明引物具有特异性。

附 录 G
(资料性附录)
qPCR 检测信息记录表

qPCR 检测信息记录表见表 G.1、G.2。

表 G.1 目标物种特异性引物和探针信息列表

目标物种:	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):
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 G.2 qPCR 反应体系与反应条件

实验单位: 操作人: 校对人对: 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

DNA 模板量 (ng):	反应体积 (μL):	
聚合酶浓度:	镁离子浓度:	脱氧核苷三磷酸浓度:
缓冲液品牌:	缓冲液体积:	
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 H
(资料性附录)
最低检测限确定方法

H.1 绘制标准曲线

基于标准溶液浓度的对数值与qPCR的循环数(Cq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个技术重复。

H.2 确定最低检测限(LOD)

H.2.1 离散阈值法

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)。

H.2.2 曲线拟合法

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。

H.3 示例

图 H.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(Cq 值)。STD1 至 STD9 分别代表一系列由高到低的标准溶液浓度梯度。

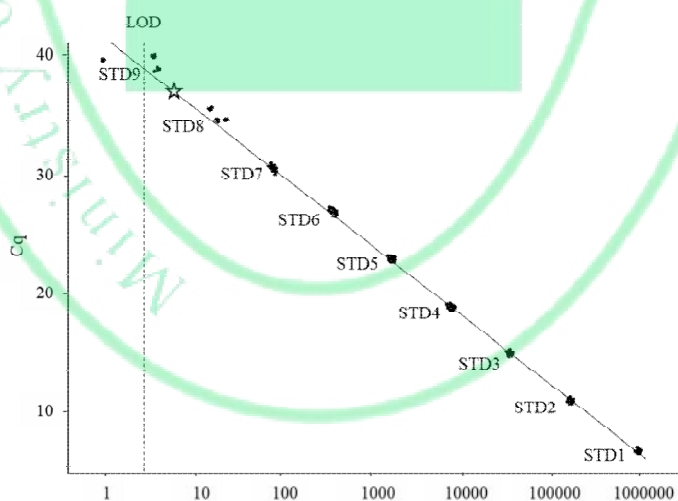


图 H.1 LOD 在标准曲线中位置示例

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 I
(规范性附录)
野外质量控制与保证

1.1 样本采集

1.1.1 统一样本采集操作要求，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。

1.1.2 保证所有野外设备处于良好的运行状态。

1.1.3 正确填写样本标签，包括样本编号、日期、水体名称、北斗卫星导航系统定位的经纬度、采样深度、采集水量以及采集人姓名等。

1.1.4 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。

1.1.5 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 1 min。
- c) 重复使用的采样瓶，应浸泡在 1.5% 的次氯酸钠中不少于 10 min，用无菌水重复冲洗 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 1.5% 次氯酸钠溶液消毒不少于 1 min，并用无菌水反复冲洗 3 次。

1.2 采样记录

除样本标签信息外，还应记录采样时水温、气温、天气、水文、植被等信息。

1.3 样本运输

1.3.1 应根据采样记录或登记表核对清点样本，以免有误或丢失。

1.3.2 样本运输过程中需按照规定温度准备冷藏设备。

1.3.3 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。

1.3.4 不同介质来源的环境 DNA 样本应单独保存运输。

1.3.5 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 qPCR 实验室应在物理空间上相互独立，不应有空气直接相通。

J.1.2 DNA 提取实验室和 qPCR 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 紫外线超净工作台使用前，应紫外线消毒 30 min。

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 qPCR 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% 的次氯酸钠溶液消毒桌面和实验仪器，用 75% 的乙醇消毒双手。

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 30 min。

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 1.5 mL 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% 的次氯酸钠溶液擦拭桌面。

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 应按照要求对 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 C_q 值确定

J.4.1 标准曲线应具有 R² 值接近 1（通常 >0.99）。

J.4.2 在分析 C_q 值时，应排除极端值与异常波动值。

J.4.3 C_q 值确定过程中的数据应妥善存储，并按照要求记录保存位置。

J.5 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.6 样本保存

J.6.1 按照要求保存样本，并记录保存信息，定期核查。每隔 1 周检查固定剂，必要时进行添加。

J.6.2 不同介质来源的环境 DNA 样本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.6.3 滤膜、沉积物样本加入固定剂后常温保存不宜超过 2 周。

J.7 数据保存

数据应保存 2~3 个月以备查验。

附录 K (资料性附录)

基于环境 DNA 的内陆水体外来入侵水生动物调查与分布评估报告编写格式

K.1 摘要

概述评估单位、评估区域、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、水环境质量、气候特征、不确定性因素等。

K.3.3 目标物种概述

包括目标物种生境需求、危害、遗传信息、生活史特征等。

K.3.4 采样方法和流程

包括环境 DNA 采样点布设、环境 DNA 样本采集、技术路线等。

K.3.5 分布评估结果

包括环境 DNA 提取、qPCR 检测、采样点评估、区域分布评估等。

K.3.6 对策与建议

针对采样与分布评估结果开展的下一步监测、扩散潜力分析、早期预警及防控计划等。

K.4 参考文献

列出报告所采用资料的出处和来源。