

DB11

北京市地方标准

DB 11/T XXXX —XXXX

鱼类贝类环境 DNA (eDNA) 识别技术规范

Technical regulations for fish and shellfish identification using
environmental DNA

(征求意见稿)

XXXX - XX - XX 发布

XXXX - XX - XX 实施

北京市市场监督管理局 发布

目 次

前言	II
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
4 鱼类贝类 eDNA 识别程序	2
5 试剂和器具	2
6 水样采集	4
7 水样富集	4
8 DNA 提取和纯化	4
9 PCR 扩增	5
10 测序及结果分析	6
11 质量保证与质量控制	7
参考文献	9

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。

本文件由北京市水务局、北京市生态环境局提出并归口。

本文件由北京市水务局、北京市生态环境局组织实施。

本文件起草单位：北京市水文总站、中国科学院生态环境研究中心、首都师范大学。

本文件主要起草人：

鱼类贝类环境 DNA (eDNA) 识别技术规范

1 范围

本文件规定了鱼类贝类环境DNA (eDNA) 识别的对象、技术方法、采集和实验分析等技术要求。本文件适用于河流、湖泊、水库和渠道等地表水域的鱼类和贝类非损伤性识别。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅所注日期的版本适用于本文件。凡是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 6682 分析实验室用水规格和试验方法

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

贝类 shellfish

具三胚层、真体腔的软体动物，为底栖动物中的重要功能类群，主要包括双壳类（如蚌类、贻贝）和腹足类（如螺类）。

3.2

环境 DNA environmental DNA (eDNA)

从生物生活环境中直接提取到的不同物种DNA的总和，包含动植物脱落的细胞或游离的DNA，可提供一个环境中生活物种的存在记录。

3.3

聚合酶链式反应 polymerase chain reaction (PCR)

一种用于放大扩增特定DNA片段的分子生物学技术，包括变性、退火、延伸等主要步骤。

3.4

分类操作单元 operational taxonomic unit (OTU)

在系统发生学或群体遗传学研究中设定的特定标志，可鉴别生物分类单元（品系、种、属等）。一般把碱基序列相似度不小于97%的OUT定义为一个物种。

3.5

引物条形码 barcode

为高通量测序时区分不同样点来源的物种基因序列，对扩增引物5'端增加的序列特异性短片段标记。

4 鱼类贝类 eDNA 识别程序

鱼类贝类eDNA识别程序见图1。

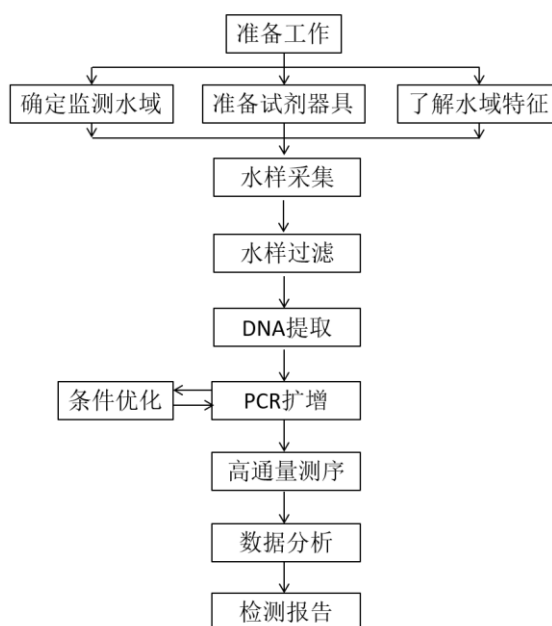


图1 鱼类贝类 eDNA 识别程序

5 试剂和器具

5.1 试剂

除非另有说明，均使用符合国家标准和分析纯试剂，试验用水为新制备的超纯水，满足GB/T 6682中一级水的要求。具体要求如下：

- 消毒液：化学纯次氯酸钠和蒸馏水配制，有效氯浓度 5.5-6.5%；
- 无水乙醇：化学纯，分析纯；
- 75%乙醇：无水乙醇和水 3:1 配制，消毒用 75%乙醇可使用化学纯无水乙醇和蒸馏水，DNA 提取用 75%乙醇应使用分析纯无水乙醇和超纯水；
- 70%乙醇：无水乙醇和水 7:3 配制；
- 琼脂糖：电泳级；
- 十六烷基三甲基溴化铵（CTAB）；
- 氯化钠（NaCl）；
- 乙二胺四乙酸（EDTA）；
- 三羟甲基氨基甲烷盐酸盐（Tris-HCl）；
- 乙二胺四乙酸溶液， ρ （EDTA）=0.02 mol/L：称取 5.8848 g EDTA 溶于适量水中，调节 pH 至

- 8.0, 定容至 1000 mL; 121°C、18 min 灭菌, 冷却后常温保存;
- 三羟甲基氨基甲烷盐酸盐溶液, ρ (Tris-HCl) =0.1 mol/L: 称取 15.76 g Tris-HCl 溶于适量水中, 调节 pH 至 8.0, 定容至 1000 mL; 121°C、18 min 灭菌, 冷却后常温保存;
 - CTAB 提取液: 称取 16.38 g NaCl 和 4 g CTAB, 分别溶于适量水中, 加入 8mL EDTA 溶液和 20 mL Tris-HCl 溶液, 定容至 200 mL; 121°C、18 min 灭菌, 冷却后常温保存;
 - 蛋白酶 K: 酶活力单位为 20;
 - Tris 饱和酚, pH>7.8;
 - 氯仿;
 - 异戊醇;
 - 酚氯仿: Tris 饱和酚、氯仿和异戊醇按 25:24:1 体积比配制;
 - 乙酸铵 ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$);
 - 乙酸钠 ($\text{CH}_3\text{COONa}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$);
 - 乙酸铵溶液, ρ ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$) =7.5 mol/L: 称取 5.78 g 乙酸铵溶于 10 mL 水中;
 - 乙酸钠溶液, ρ (CH_3COONa) =3 mol/L: 称取 102.06 g 乙酸钠溶于适量水中, 冰醋酸调节 pH 至 5.2, 定容至 250 mL, 分装后 121°C、18 min 灭菌;
 - 动物组织细胞 DNA 提取试剂盒: 主要包括样品裂解液、DNA 沉淀试剂、DNA 洗涤试剂、DNA 溶解试剂、纯化柱等, 提取的 DNA 要求 OD260/280 比值介于 1.8-2.0 之间, OD260/230 比值大于 2.0;
 - 柱式 PCR 产物纯化试剂盒: 主要包括 DNA 溶解试剂、纯化柱、DNA 沉淀试剂、DNA 洗涤试剂等, 纯化的 DNA 要求 OD260/280 比值介于 1.8-2.0 之间, OD260/230 比值大于 2.0;
 - PCR 聚合酶: 碱基错配率低于 10^{-6} ;
 - 脱氧核糖核苷三磷酸: 脱氧腺苷三磷酸、脱氧鸟嘌呤三磷酸、脱氧胸苷三磷酸、脱氧胞苷三磷酸的等摩尔数混合物 (各 2.5×10^{-3} mol/L), 纯度>98%;
 - DNA 分子量标准品: 范围 0-100 bp。

5.2 主要器具

具体要求如下:

- 车载冰箱: 温控 4°C 及以下;
- 采样瓶: 1 L, 具螺旋帽或磨口塞, 使用前 121°C、18 min 灭菌;
- 微量移液器: 0.5-10 μL 、20-200 μL 、100-1000 μL ;
- 真空抽滤泵及过滤砂芯: 过滤体积 1 L;
- 冰箱: 温控-20°C;
- 高压蒸汽灭菌器: 可达到标准要求的 121°C、18 min 灭菌条件;
- 混合纤维素酯滤膜: 孔径 0.45 μm ;
- 离心管: 1.5 mL, 无 DNA 酶;
- PCR 管: 200 μL ;
- 超微量紫外分光光度计: 测量体积最小 1 μL , 波长范围包括 230 nm、260 nm 和 280 nm;
- PCR 仪: 温控范围 0-100°C, 升温速度 6°C/s, 配套 PCR 管 200 μL ;
- 低温离心机: 离心转速可达 13000 rpm, 温控范围低至 4°C;
- 凝胶成像分析系统: 302 nm 光源;
- 电泳仪: 水平式;
- 电泳槽: 水平式。

6 水样采集

6.1 采样点设置

eDNA采样点的布设应遵循以下原则：

- a) 根据鱼类和贝类生境选择样点，应覆盖目标水域所有代表性生境类型，兼顾近岸浅水水域和离岸开阔水域，并考虑不同植被覆盖、水文条件和底质特征设置样点；
- b) 湖泊型水体：每 2 km² 设置不少于 1 个采样点；
- c) 水库型水体：入库河口区应设置采样点，库区每 15-20 km² 设置不少于 1 个采样点；
- d) 河流型水体：对鱼类 eDNA 样品，在采样断面上、中、下游间隔 500 m 以上等比采集混合水样；对贝类 eDNA 样品，河流宽度<50 m 时在两岸布设 2 个采样点，河流宽度≥50 m 时在两岸和中间共布设 3 个采样点，等比采集混合水样。

6.2 采集方式

近岸样点：鱼类eDNA样品在距岸5 m内、不受岸边泥沙干扰的区域采集，贝类eDNA样品在距岸0.5 m处采集。采样人佩戴一次性乳胶手套，将1 L的灭菌采样瓶瓶口向上游来水方向采集表层水样。

离岸样点：鱼类eDNA样品在水深<10 m处采集表层水样，水深≥10 m处分表层和距底1 m水层采集混合水样；贝类eDNA样品在距底0.5 m范围内采集。采样人乘船于船行进方向前侧用采水器采样，转移至灭菌采样瓶中。

采样瓶装满后应密封并做好标记，置于车载冰箱4℃冷藏运输。每批样品携带1 L灭菌超纯水作为采样空白对照。

7 水样富集

7.1 器具消毒

抽滤器和废液瓶需用自来水冲洗，置于消毒液中浸泡30 min，自来水冲净后超纯水浸洗，烘干备用。剪刀和镊子用自来水和75%乙醇清洗，超纯水浸洗，烘干备用。

无DNA酶的离心管经121℃、18 min高温灭菌，烘干备用。

7.2 水样抽滤

连接真空泵和抽滤器，用镊子取0.45 μm孔径的混合纤维素酯滤膜置于玻璃滤膜台中央，盖上抽滤漏斗。

取1 L灭菌超纯水进行抽滤，完成后用灭菌镊子从边缘夹起滤膜并折叠放入1.5 mL离心管中，作为抽滤对照组。采用相同方法抽滤采样空白对照作为采样对照组。采用相同方法抽滤各采样点水样作为实验组。全过程保持抽滤器密封，每抽滤完一个水样应清洗抽滤器。

所有水样应于采集当天完成抽滤，4℃冷藏存放不超过24 h。

抽滤后的滤膜均在-20℃冰箱中保存。

8 DNA 提取和纯化

8.1 DNA 提取

具体要求如下：

- a) 用灭菌剪刀将收集的滤膜剪碎至 1-3 mm² 的碎片，置于 1.5 mL 离心管中；
- b) 向离心管中加入 750 μL CTAB 提取液和 20 μL 蛋白酶 K，涡旋震荡混匀，在 56℃ 水浴锅中水浴裂解 3 h，期间每隔 0.5 h 进行间断性震荡；
- c) 将裂解液转移到对应编号的 1.5 mL 新离心管中，加入等体积 Tris 饱和酚，混匀，4℃、13000 rpm 离心 10 min；
- d) 转移上清液到对应编号的 1.5 mL 新离心管中，加入等体积酚氯仿，混匀，4℃、13000 rpm 离心 10 min；
- e) 转移上清液到对应编号的 1.5 mL 新离心管中，加入 2 倍体积冷冻处理的无水乙醇和 50 μL 7.5 mol/L 的乙酸铵溶液，混匀，-20℃ 放置 30 min；
- f) 4℃、13000 rpm 离心 10 min，弃上清液；
- g) 加入 1 mL 75% 乙醇，4℃、13000 rpm 离心 5 min，弃上清液；
- h) 重复步骤 g；
- i) 室温晾干，加入 50 μL 无 DNA 酶的超纯水溶解；
- j) 使用超微量紫外分光光度计检测总 DNA 浓度和质量，利用 2.0% 琼脂糖凝胶电泳分析 DNA 完整性；
- k) DNA 质量要求：OD_{260/280} 比值介于 1.8-2.0 之间，OD_{260/230} 比值大于 2.0；DNA 完整性要求：有单一且清晰明亮的主带，无大量弥散状降解。

也可采用符合 5.1 中要求的动物组织细胞 DNA 提取试剂盒完成，具体操作步骤可参考试剂盒要求。

8.2 DNA 纯化

具体要求如下：

- a) 在装有 8.1 提取成果的离心管中加入 1/10 体积的 3 mol/L 乙酸钠溶液，混匀；
- b) 向混合液中加入 2.5 倍体积的无水乙醇，混匀；
- c) 4℃、4000 rpm 离心 30 min，弃上清液；
- d) 加入 100 μL 70% 乙醇，4℃、3000 rpm 离心 15 min，弃上清液；
- e) 重复步骤 d；
- f) 室温晾干，加入原体积一半的无 DNA 酶超纯水溶解。

也可采用符合 5.1 中要求的柱式 PCR 产物纯化试剂盒完成，具体操作步骤可参考试剂盒要求。

9 PCR 扩增

9.1 引物选择和标记

9.1.1 引物选择

选择鱼类线粒体特定通用扩增引物对 eDNA 进行扩增。引物核苷酸序列如下：

上游引物 F: GTCGGTAAACTCGTGCCAGC

下游引物 R: CATAGTGGGGTATCTAATCCCAGTTTG

选择贝类线粒体特定通用扩增引物对 eDNA 进行扩增。引物核苷酸序列如下：

上游引物 F: GGWACWGGWTGAACWGTWTAYCCYCC

下游引物 R: TANACYTCNGGRTGNCRAARAAYCA

9.1.2 引物标记

在合成引物前,应根据样点数量在扩增引物5'端添加相应数量的引物条形码,以区分不同样点物种的扩增产物。条形码一般为4碱基、6碱基和8碱基。

可参考表1中列出的8碱基条形码参考序列进行添加,也可根据情况自行设计添加。不影响扩增结果且测序后可区分不同样点的引物条形码均可使用。

表1 8碱基条形码参考序列

序号	序列	序号	序列	序号	序列	序号	序列
1	ACACCACA	13	CATGGATC	25	GACAGAGT	37	TATCCGC
2	ACCTAGCA	14	CCATCGTT	26	GACTGTGT	38	TCAGTCAG
3	ACGACTAC	15	CCTACCAT	27	GAGAGTGT	39	TCCTCTAG
4	AGACGTCT	16	CGAACGAA	28	GATCCAAC	40	TCGACAAC
5	AGTCACTG	17	CGTAATCG	29	GCATAAGG	41	TCTGCTGT
6	ATCCGGAT	18	CGTTGCTT	30	GCTACGTA	42	TGCAGTAC
7	ATGCTTCC	19	CTACGATG	31	GGATTACC	43	TGCTGATG
8	ATTAGCCG	20	CTAGCTAG	32	GTACGAAG	44	TGCTACTC
9	CAACCTAG	21	CTCAAGTG	33	GTAGCATC	45	TGTCGTGA
10	CAAGACCT	22	CTGAGACT	34	GTGAGTGA	46	TTATCGCC
11	CACTCTCA	23	CTTCTCCT	35	GTTGGAAG	47	TTCGCTTA
12	CAGTTCAG	24	GAAGCTTC	36	TAGCTACG	48	TTGCTTCG

9.2 PCR 扩增

使用9.1中引物对提取的鱼类和贝类DNA进行PCR扩增。

PCR扩增体系包括PCR聚合酶、聚合酶缓冲液、脱氧核糖核苷三磷酸、上下游引物、经8.1和8.2提取纯化的总DNA模板、超纯水。体积一般为25 μ L或其整数倍,各组分体积根据PCR聚合酶的要求添加。

PCR仪反应程序设置:

——预变性: 94 $^{\circ}$ C 5 min;

——扩增: 94 $^{\circ}$ C变性 30 s, 52 $^{\circ}$ C退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C延伸 90 s, 重复 25 个循环;

——延伸: 72 $^{\circ}$ C 10 min。

4 $^{\circ}$ C保存扩增产物, 2.0%琼脂糖凝胶电泳检测PCR产物。若有特异性目的条带,用8.2所述方法再次纯化。采用2.0%琼脂糖凝胶电泳检测纯化产物的特异性,超微量紫外分光光度计检测纯化后的PCR产物质量和浓度,方法同8.1。

10 测序及结果分析

10.1 数据筛选与处理

对PCR扩增样品进行第二代高通量测序,利用分析软件对测序结果数据进行预处理,去除测序过程产生的低质量测序序列(非特异性扩增序列,含有模糊碱基、单碱基高重复区或长度过短的序列,嵌合体序列等)。具体步骤如下:

- 检测测序数据中每个读长的引物条形码,将所有读长区分到不同的采样点,同时去除检测不到引物条形码的读长,以及错配或测序错误生成的序列;
- 去除读长上的引物序列,去除错配扩增序列,此步骤处理后一般仅留存 35~45%的序列;
- 去除测序质量不达标的序列,即测序读长引起的预期误差大于 0.5 的序列;

- d) 去除测序深度较低的序列，即测序所得碱基总量小于 10×的序列；
- e) 去除由于测序读长限制导致的末端序列不稳定的部分碱基，即序列末端的 5-20 bp；
- f) 将前后两端的读长拼接成一条完整的序列，最低重叠碱基数一般设置为 20 bp 以上；
- g) 将拼接的序列进行去重复处理并排序，即删除相同的序列，每个序列仅保留一条；
- h) 对序列做修剪处理，将长度不同的序列剪齐，去除序列中包含不确定碱基的部分，去除修剪后读长过短的序列，保留长度比 PCR 产物长度短 5-10 bp 的序列，保证低质量序列的充分去除；
- i) 将筛选和处理后的结果输出 fasta 格式的序列文件保存。

10.2 OTUs 聚类及其物种注释

具体要求如下：

- a) 经筛选与处理的测序数据需使用相关生物信息学分析软件基于 97% 序列相似度进行聚类，获得代表生物多样性的 OTUs，并提取其代表性序列；
- b) 利用相关软件的 BLASTn 功能将聚类结果与参考数据库比对 10 次，筛选出匹配的序列信息；
- c) 去除低相似度和覆盖度的结果，保留相似度和覆盖度均大于 85% 的 OTUs；
- d) 提取物种的分类信息，包括界、门、纲、目、科、属、种等，即可展示待识别物种信息。

10.3 结果记录表

应按表2所列内容记录数据处理结果。

表2 鱼类/贝类 eDNA 识别结果记录表

序号	物种编号	学名	分类信息							E 值	序列相似 度(%)	序列覆盖 度(%)
			界	门	纲	目	科	属	种			
1												
2												
3												
...												

11 质量保证与质量控制

11.1 采样和样品保存

具体要求如下：

- a) 取样点布设合理，水样采集操作保持统一规范，包括器具严格消毒、取样水量和位置一致，取样过程避免船体污染和交叉污染；
- b) 每批样品设置 1 个采样空白，每个样点平行采集 3 次水样；
- c) 运输和待测期间严格按照要求保存样品，确保不变质、不污染。

11.2 样品前处理

具体要求如下：

- a) 抽滤所用器具规范灭菌和清洗，避免样点间的交叉污染；
- b) 每批样品设置 1 个抽滤空白；
- c) DNA 提取和纯化所用器具按规范灭菌，耗材一次性使用，避免交叉污染。

11.3 PCR 扩增

具体要求如下：

- a) 扩增过程保证试剂使用量规范，模板 DNA 用量一致；
- b) 设置 PCR 扩增的阴性和阳性对照试验，分别以超纯水和含有目的片段的 DNA 为 DNA 模板进行扩增；
- c) PCR 扩增时，每个样品应设置 3 个室内平行，以琼脂糖凝胶电泳中出现特异性条带作为阳性，如果 2 个及以上平行均为阳性，则认定为阳性；如仅出现 1 个阳性结果，应进行复检；
- d) 确保纯化后的 PCR 产物纯度合格，按规定保存避免降解。

参 考 文 献

- [1] HJ 710.8-2014 生物多样性观测技术导则-淡水底栖大型无脊椎动物
 - [2] DB11/T 1721-2020 水生生物调查技术规范
 - [3] DB43/T 432-2009 淡水生物调查技术规范
 - [4] 黄祥飞, 陈伟民, 蔡启铭.《湖泊生态调查观测与分析》.中国标准出版社.2000年7月.
 - [5] 孟伟, 张远, 渠晓东等.《河流生态调查技术方法》. 科学出版社. 2011年4月.
 - [6] 孔繁翔.《环境生物学》.高等教育出版社.2000年7月.
-