

《水生生物环境 DNA 实验室建设  
技术要求》  
征求意见稿  
编制说明

《水生生物环境DNA实验室建设技术要求》标准编制组

二零二四年二月

# 目次

1	工作简况.....	1
1.1	任务来源.....	1
1.2	工作过程.....	1
2	标准制定的必要性.....	2
2.1	标准制定的意义和目的.....	2
2.2	国外研究进展.....	4
2.3	国内研究进展.....	5
2.4	现有工作基础.....	5
3	标准编制依据和原则.....	5
3.1	编制目的.....	5
3.2	编制原则.....	5
4	标准主要内容的制定依据.....	6
4.1	范围.....	6
4.2	规范性引用文件.....	6
4.3	术语和定义.....	6
4.4	总体原则.....	7
4.5	分区设置要求.....	8
4.5.1	试剂储存和制备室.....	8
4.5.2	前处理室.....	9
4.5.3	提取纯化室.....	10
4.5.4	检测室.....	11
4.5.5	质量控制室.....	12
4.5.6	数据分析室.....	13
4.5.7	其他分区.....	13
4.6	实验室操作要求.....	13
4.7	房屋配件、实验室辅助设施要求.....	14
4.7.1	门窗.....	14
4.7.2	地面、墙面要求.....	15
4.7.3	顶棚.....	15
4.7.4	走道.....	15
4.7.5	缓冲区.....	16
4.7.6	实验台.....	16
4.7.7	物品架.....	17
4.7.8	紫外灯.....	17
5	附录.....	18
	附录 A.....	18
6	主要试验、验证及试行结果.....	20
7	标准实施建议.....	20
8	标准中设计专利的情况.....	20
9	预期达到的社会效益、对产业发展的作用.....	20
10	与国际、国外标准对比情况.....	20
11	与有关现行法律、法规和强制性标准规范的关系.....	20

12	重大分歧意见的处理经过和依据.....	21
13	标准性质的建议说明.....	21
14	贯彻标准的要求和措施建议.....	21
15	废止现行相关标准的建议.....	21
16	其他应予说明的事项.....	21
17	参考文献.....	21

# 1 工作简况

## 1.1 任务来源

本标准由中国环境监测总站提出，并由中国环境科学学会归口，由中国环境监测总站、南京大学、南京易基诺环保科技有限公司等单位共同起草。

## 1.2 工作过程

按照标准编写要求，中国环境监测总站组织相关科研人员组成了标准编制组。编制组成员由多年从事环境 DNA 水生生物监测的研究技术人员组成，按照 GB/T 1.1—2020 给出的最新规定起草和编制。在前期项目研究、文献资料分析以及实际应用的基础上，编制组讨论并确定了开展标准编制工作的原则、程序、步骤和方法，目前形成标准（征求意见稿）及编制说明。主要工作如下：

### （1）研究基础

编制组通过环境 DNA 实验室建设实践、阅读文献和收集国内外相关资料，确定了环境 DNA 实验室建设要求的工作内容，初步确定了水生生物环境 DNA 实验室建设技术要求方法的基本框架和流程。

### （2）编制启动

编制组接到标准制定任务后，立刻组织落实标准制定工作。确定由中国环境监测总站、南京大学、南京易基诺环保科技有限公司等为主要起草单位，并由来自高校、科研机构、企业的相关专家组成起草组，形成标准初稿。

### （3）理论研究

标准起草组通过各种途径，收集并学习了《检验检测实验室设计与建设技术要求 第 1 部分：通用要求》（GB/T 32146.1-2015），《检验检测实验室设计与建设技术要求 第 3 部分：食品实验室》（GB/T 32146.3-2015），《洁净厂房设计规范》（GB50073），《转基因产品检测 实验室技术要求》（GBT19495.2）和《实验室生物安全通用要求》（GB19489）等实验室建设相关标准规范，收集和研究了国内外环境 DNA 或 PCR 检测实验室建设技术要求。经过资料分析和共性总结，初步对水生生物环境 DNA 实验室建设技术要求进行梳理和提炼。理顺了标准制定的方向和思路，形成标准编制大纲。

### （4）调研/实验研究

为了使标准具有科学性和可操作性，在 2019 年至 2023 年，标准起草组在已有的实验室

建设资料分析的基础上，进一步联合多家编制单位将已构建的环境 DNA 实验室运行状况进行分析，与相关技术和管理人员进行深入地探讨，调整已有方法。

#### (5) 标准草稿

2023 年 4 月~11 月，标准起草组召开起草工作研讨会，就标准起草过程中存在的问题进行集中研讨。标准起草组针对环境 DNA 实验室区域设置、操作人员要求、安全防护和实验室配置要求，进一步完善环境 DNA 实验室建设基本要求及技术要求，经过若干次编制组内部研讨会和专家咨询会，形成了标准草稿。

#### (6) 标准立项

2023 年 12 月，召开标准立项论证会，专家组一致同意标准通过立项论证。

## 2 标准制定的必要性

### 2.1 标准制定的意义和目的

环境 DNA 技术已广泛应用于水生生物多样性研究。基于遗传学的环境 DNA (Environmental DNA, eDNA) 技术为监测和鉴定水体中物种多样性提供了新型替代手段。如 eDNA 宏条形码技术 (Metabarcoding) 采集水样、沉积物、生物膜或生物组织样品，设计通用引物扩增特定基因片段，借助高通量测序获得 DNA 条形码序列，通过数据库比对可以精准地鉴别生物物种和环境中的群落结构信息。相比传统形态学，该方法具有经济高效，流程标准化和精确性高等优势，极有可能会根本性地改变未来生物监测、生态评估和环境管理的模式。自 2011 年以来，全球环境 DNA 条形码研究的相关论文超过 1700 余篇，其中美国发表的论文数最多，其次为欧洲，我国发表论文数占全球总数的 5% (图 1)。尽管 eDNA 宏条形码技术在微生物、藻类、无脊椎动物、鱼类甚至哺乳动物等各个类群中表现出了精确的物种分辨能力，在物种多样性监测中具有广泛的应用前景。但是目前该方法还处在实验室阶段，不同的实验室采取的研究方法不一致，很难实现跨时间和空间尺度的大规模调查和比对，无法保证监测数据的持续性、有效性，难以推广应用到生物监测和管理部门。因此，标准化和规范化是 eDNA 宏条形码监测方法推广和应用的前提。

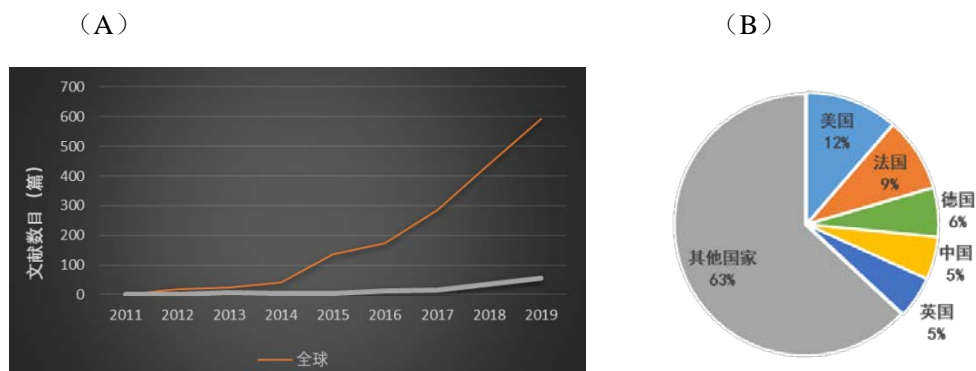


图1 全球及我国环境 DNA 宏条形码研究现状

环境 DNA 技术已成为生物多样性研究最广泛使用的技术之一，该技术的优越性建立在严格的实验室条件基础上。环境 DNA 技术实验室操作核心是 PCR 技术，由于 PCR 技术高度敏感性，其要求高、影响因素多，从样品制备到结果的产生，任何一处细微的失误均会造成结果的偏差，导致样品的假阳性和假阴性结果。实验室研究过程中，很多操作都会产生气溶胶，比如离心、混匀等操作。为保证环境安全，环境 DNA 实验室设计建设需独立区域设计，避免与其它环境的交叉混杂，因此环境 DNA 实验室设计的核心问题是如何避免污染，实验室的平面布局、空调通风系统设计、气流控制等都是围绕这个核心问题进行的<sup>[8-10]</sup>。传统分子生物学 PCR 实验室通常分为试剂准备区、样品制备区、扩增区和产物分析区五大区域，并在各分区设置缓冲间。环境 DNA 实验室所有实验室步骤都必须采用单向工作流程(图 2)，如 DNA 提取必须与所有后续步骤在物理上分开，材料和人员都不能朝相反的方向流动。环境 DNA 实验室在传统 PCR 实验室的基础上，增加并细化了不同类型环境 DNA 样品处理、质量控制、检测及数据分析等分区，更加符合环境 DNA 操作流程与习惯。

环境 DNA 实验室建设技术基本要求与生物安全实验室和医学实验室一致。生物安全实验室、医学实验室按国家卫生部的要求，各实验区域必须是相互独立的，不能直通，每个独立实验区设有专门的闸间供工作人员换工作服和鞋，进入各工作区域必须严格遵循单一方向顺序，避免发生交叉污染。环境 DNA 实验室建设、实验条件、技术操作规范是环境 DNA 技术标准化的基础。

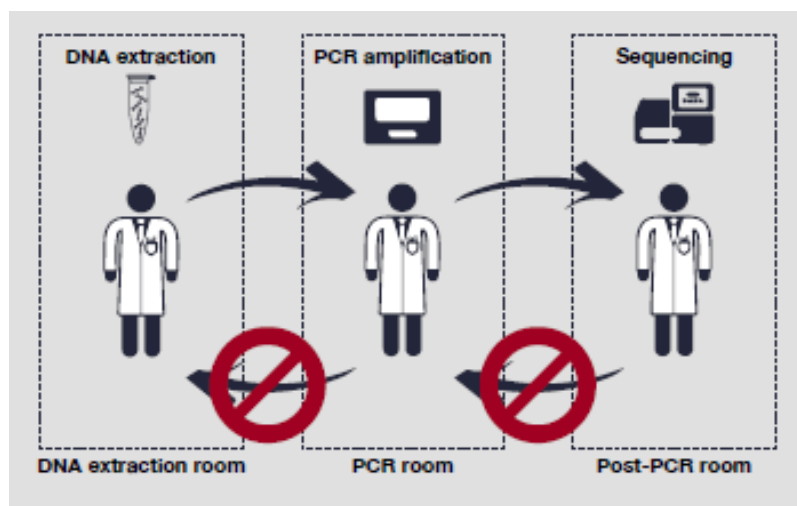


图2 环境 DNA 实验室单向工作流程，引至瑞士环境署发布的《Environmental DNA applications in biomonitoring and bioassessment of aquatic ecosystems》

环境 DNA 实验室对微生物安全级别的要求区别于生物安全实验室和医学实验室。根据对所操作生物因子采取的防护措施，将实验室生物安全防护水平分为一级、二级、三级和四级，一级防护水平最低，四级防护水平最高。依据国家相关规定：一级实验室适用于操作在通常情况下不会引起人类或者动物病的微生物；二级实验室适用于操作能够引起人类或者动物疾病，但一般情况下对人、动物或者环境不构成严重危害，传播风险有限，实验室感染后很少引起严重疾病，并且具备有效治疗和预防措施的微生物；三级实验室适用于操作能够引起人类或者动物严重疾病，比较容易直接或者间接在人与人、动物与人、动物与动物间传播的微生物；四级实验室适用于操作能够引起人类或者动物非常严重疾病的微生物，以及我国尚未发现或者已经宣布消灭的微生物。环境 DNA 实验室几乎不涉及微生物安全问题（废弃物处理除外），生物安全防护水平不做特殊要求，通常按照一级实验室建设即可。

## 2.2 国外研究进展

在国际上，各国都正在或已经制定基于环境 DNA 的生物多样性检测实验室相关标准与规范。早在 2004 年，美国环保署（EPA）就针对环境样品 PCR 实验室制定了相应质量保证/质量控制指南，2015 年由美国内务部（USI）和美国地质调查局（USGS）颁布了联合华盛顿州立大学所形成的环境 DNA 采样技术规范；2020 年瑞士环境署颁发了联合苏黎世大学等单位形成的环境 DNA 水生生态生物监测和评价技术导则，其中明确规定环境 DNA 分子实验室工作要求。2021 年欧盟科技合作联盟（COST）也颁发了环境 DNA 生物评估方法的指南。

## 2.3 国内研究进展

国内目前尚无已发布的相关国家标准、行业标准、地方标准或团体标准。

## 2.4 现有工作基础

目前，编制组已编制并发布 3 项基于环境 DNA 技术的团体标准，分别为《淡水生物 DNA 条形码构建技术规程》T/CSES 80-2023，《淡水生物监测 环境 DNA 宏条形码法》T/CSES 81-2023，《基于环境 DNA 的淡水生物评价技术指南》T/CSES 82-2023。团队基于环境 DNA 技术的基本流程，针对流程中重要参数开展了大量实验探究，并将环境 DNA 技术推广应用于我国多个重点流域的水生生物多样性监测和水生态健康评估<sup>[1-7]</sup>，积累了大量的环境 DNA 技术实验室操作、实验室使用及数据分析等实验经验，对于标准的合理性、可操作性提供了有力的技术保障。同时，整理收集了国内外基于 PCR 实验室建设，或环境 DNA 实验室技术要求，也为标准的编制提供了很好基础支撑。

# 3 标准编制依据和原则

## 3.1 编制目的

水生生物环境 DNA 实验室建设技术的建立和完善对于环境 DNA 生物多样性监测和生物评价的标准化具有重要意义。本标准以水生生物环境 DNA 实验室建设技术要求为目标，规范环境 DNA 实验室建设标准，将促进环境 DNA 技术在我国生物监测和评价体系的标准化与应用推广。

## 3.2 编制原则

本标准按照《中国环境科学学会标准管理办法（试行）》的要求和规定，确定标准的组成要素。

在标准制定过程中遵循了以下几个原则：

- （1）科学性和规范性；
- （2）保证标准的先进性和实用性；
- （3）与国际现行的节水政策、产业政策等相结合；
- （4）尽量与相关的标准、法规接轨；

（5）充分考虑我国现有环境 DNA 宏条形码技术的发展水平，符合我国水生生物监测行业规范化发展需求。



## 4 标准主要内容的制定依据

### 4.1 范围

本文件规定了环境 DNA 实验室建设的总体原则、实验室分区、实验室操作、房屋配件、实验室辅助设施等方面的技术要求。

本文件适用于环境 DNA 实验室的新建、改建和扩建的设计、建设，包括但不限于环境监测中心、高校和第三方检测机构等。

### 4.2 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 6682-1992 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 15481-2000 检测和校准实验室能力的通用要求

GB/T 19495.2 转基因产品检测 实验室技术要求

GB/T 19489 实验室 生物安全通用要求

GB/T 32146.1-2015 检验检测实验室设计与建设技术要求 第 1 部分：通用要求

GB/T 32146.3-2015 检验检测实验室设计与建设技术要求 第 3 部分：食品实验室

SN/T 4835 实验室生物废弃物管理要求

### 4.3 术语和定义

#### 4.3.1 水生生物 hydrobiont

全部或部分生活在各种水域中的动物和植物。包括淡水生物和海洋生物。

#### 4.3.2 环境 DNA environmental DNA; eDNA

环境介质（水、土壤、沉积物、生物膜、空气等）或混合生物组织中存在的生物遗传物质（DNA）。

[来源：T/CSES 81—2023，3.3]

瑞士环境联邦署发布的指南《Environmental DNA applications in biomonitoring and bioassessment of aquatic ecosystems》中定义“Environmental DNA”为“Pool of genomic material originated from living organisms or their traces (such as skin cells, mucus, scales, urine, faeces, saliva, gametes, or deceased remains) present in various environments, such as

water, sediment, soil, or air”, 即“来源于生物活体或其遗迹 (如皮肤细胞、粘液、鳞片、尿液、粪便、唾液、配子或死亡遗骸) 的基因组的混合物, 存在于各种环境中, 如水、沉积物、土壤或空气” 欧洲科技合作机构发布的指南《A practical guide to DNA-based methods for biodiversity assessment》中的定义为“DNA isolated from an environmental sample such as water or sediment. May include both Organismal DNA derived from whole organisms in the sample and extra-organismal DNA which is captured separately from the organism it originated from. Extra-organismal DNA may be in the form of cells, organelles, or free-floating DNA, originating from sources such as shed skin, scales, blood, mucus, faeces, urine, saliva and gametes”, 即“从环境样品 (如水或沉积物) 中分离的 DNA。可包括来自样品中整个生物个体的体内 DNA 和其来源的体外 DNA。体外 DNA 可以是细胞、细胞器或自由漂浮的 DNA, 来源于皮肤鳞片、血液、粘液、粪便、尿液、唾液和配子”。结合以上内容, 本文件将其定义进一步精简为“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)”。

#### 4.3.3 环境 DNA 实验室 environmental DNA Laboratory

利用环境 DNA 技术进行生物多样性样品处理、检测的实验室。

### 4.4 总体原则

环境 DNA 实验室的功能布局、分区隔离、空调通风系统、气流控制等应以避免污染为首要原则。

- a) 实验室宜以室为单元, 进行布局规划和功能分区, 一般应包括以下单元: 试剂储存和制备室、前处理室、提取纯化室、检测室、质量控制室和数据分析室。环境 DNA 实验室的典型布局图见附录 A。
- b) 试剂储存和制备室、提取纯化室、检测室和质量控制室应具备移液、涡旋振荡、瞬时离心功能。移液器需包含 1~10 $\mu$ l、1~20 $\mu$ l、20~200 $\mu$ l 和 100~1000 $\mu$ l 的规格, 根据需求选配 0.1~2.5 $\mu$ l、1~100 $\mu$ l 或其他规格移液器。涡旋振荡速度通常不小于 1000 rpm/分, 瞬时离心速度不小于 1000 rpm/分。
- c) 遵守样品单向流动原则。
- d) 有条件的实验室宜在各工作区域设置缓冲间, 实验室定期通风。
- e) 工作人员应自觉遵守实验室规章制度, 实验操作中戴一次性手套、口罩, 在前处理室和提取纯化室操作时要穿隔离衣、戴防护眼镜。
- f) 正确配制消毒液, 定期对工作环境消毒。

环境 DNA 技术流程主要涉及基因扩增步骤，功能区设置参考 GB/T 19495.2 中实验室功能区域设置要求，结合环境 DNA 技术流程的特殊性，将实验室功能区域划分为六大区域：试剂储存和制备室、前处理室、提取纯化室、检测室、质量控制室和数据分析室。实验室建设功能分区可用于实验室的新建、改建和扩建。

每一区域都须有专用的仪器设备工作区域及各区域所用的仪器设备必须有明确的标记，避免不同工作区域内的设备、物品混用。各区域实验台表面应可耐受次氯酸钠、双氧水等化学物质及紫外线的消毒清洁作用。不同功能的核酸检验工作区应是分隔独立的工作室，并有明显的标志，各区间不能直通。各区之间如果是紧密相连，需安装物品传递舱。

按国家卫生部的要求，各实验区域必须是相互独立的，不能直通，每个独立实验区设有专门的房间供工作人员换工作服和鞋，进入各工作区域必须严格遵循单一方向顺序。

实验室的设施和环境要求应符合 GB/T 15481-2000 中的规定，有条件的宜在所分隔的各工作区域设置缓冲间，缓冲间的压力为负压(或上设抽风装置)，与其相连的工作间为正压，工作间与缓冲间之间宜安装磁性连锁装置受实验场所限制而无条件设置缓冲间的实验室，在对实验室区域进行功能划分后，应根据各实验分区规定设置实验室的压力。非实验人员不应进入各实验工作区。

避免污染是环境 DNA 实验室设计建设首要考虑重点。由于基因扩增技术的高度敏感性，基因扩增技术要求高、影响因素多，从样品制备到结果的产生，任何一处细微的失误均会造成结果的偏差，导致样品的假阳性和假阴性结果。基因扩增实验室研究过程中，很多操作都会产生气溶胶，比如离心、混匀等操作。为保证环境安全，环境 DNA 实验室设计建设需独立区域设计，避免与其余环境的交叉混杂。

## 4.5 分区设置要求

### 4.5.1 试剂储存和制备室

应具备纯水制备、冷冻/冷藏储存、称量、磁力搅拌、制冰和水浴等功能。纯水制备应符合 GB/T 6682 1992 中一级水的规格，去离子水的电阻应达到  $18.2 \Omega$ 。冷冻储存需具备  $-20^{\circ}\text{C}$  和  $-80^{\circ}\text{C}$  条件，冷藏储存需具备  $4^{\circ}\text{C}$  条件。称量精度为万分之一。磁力搅拌转速应不小于 2000 rpm/分。制冰机出冰速度应不低于 30kg/天。水浴温度最大允许误差为  $\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 。

面积应不小于  $5 \text{ m}^2$ 。含核酸的样品禁止带入本室。所有试剂及原材料应直接进入本室，不能经过前处理室、提取纯化室、检测室、质量控制室和数据分析室。

根据美国 EPA 《Quality Assurance/Quality Control Guidance for Laboratories Performing

PCR Analyses on Environmental Samples》中“Reagent Preparation Room”规定，应指定试剂准备室用于制备和储存 PCR 试剂，包括预混液（除样品外 PCR 所需的所有试剂的混合物）。应在此房间内向 PCR 管中加入预混液。为了防止交叉污染并避免重复的冷冻和解冻，试剂储备溶液被等分到“反应体系”中，并储存在此房间中以备用。建议房间处于正压下，防止污染。

实验室基础设备低温冰箱、冷藏冰箱、纯水设备、移液设备为本实验室必备设备，主要用于试剂的储存、配制、转移和分装。必要时可增加天平、水浴锅、磁力搅拌器、制冰机、离心机或自动化设备等试剂准备必要设备。还需设置实验台用于试剂制备等操作，因此，本实验室建筑面积应不小于 5m<sup>2</sup>。

试剂制备所需纯水应符合 GB/T 6682 1992 中一级水的规格，去离子水的电阻应达到 18.2 Ω。试剂配制常用的称量设备为万分之一天平，称量精度为 0.0001g。孵育过程需提供 70℃ 恒温条件，可选水浴或金属浴，要求温度控制误差在 ±0.5℃ 之间。为均匀混合试剂，磁力搅拌转速应不小于 2000rpm/分。PCR 体系配制过程中需一直保持低温环境，应保证每天实验室冰块供应量不小于 30 kg。

根据 GB/T 19489 规定的实验室核心区域的气压与室外大气压的压差值应不小于 30 Pa，与相邻区域的压差(负压)应不小于 10 Pa。在核心工作区域外通常设置缓冲区域，且试剂准备区域通常为正压，因此，按照试剂单向流方向，各个实验室之间设计不同压力梯度来实现单向气流组织方向，环境 DNA 试剂准备室通常设置正压 10~30 Pa。

#### 4.5.2 前处理室

应具备样品储存、样品过滤、冻干、称量、组织处理和烘干等功能。样品储存需满足 4℃ 和 -20℃ 储存条件。针对不同类型样品设置不同操作功能区，如环境水样处理操作区，土壤、粪便、沉积物样品操作区，生物组织样品操作区等。水样过滤负压应达到 -0.9 KPa 以下，需适配环境 DNA 一体化过滤器，宜具备废液直排功能。土壤、粪便、沉积物冷冻干燥的温度应不高于 -40℃，干燥过程中的升华温度应不高于 60℃。称量功能参考 5.1 要求。烘箱温控范围应满足室温~300℃，温度控制精度最大允许误差为 ±0.5℃，烘箱容积不小于 100L。

面积应不小于 5 m<sup>2</sup>。需负压，宜安装排风系统，如万向排风罩。本区域属于高污染区，严禁将核酸样品带入本实验室。

环境 DNA 样品通常以固体、液体如水样、滤膜、土壤、粪便、沉积物和生物组织样品的形式送至实验室，不同类型的样品处理方式不同。水样需要首先使用过滤设备获得环境

DNA，宜使用适配的环境 DNA 一体化过滤器，过滤负压需达到-0.9Kpa 以下，研磨、破碎后进行下一步核酸提取处理；土壤、粪便、沉积物样品需要首先使用冷冻干燥机将样品中水分脱除，所需冻干温度不高于-40℃，且升华温度不高于 60℃。取部分样品称量、分装，研磨、破碎后进行下一步核酸提取。烘干所需温度应在室温~300℃之间。生物组织样品主要包括浮游动物、浮游植物、底栖动物、鱼类、大型水生植物等，生物组织样品可能涉及到两方面的操作，环境 DNA 样品分析、DNA 条形码数据库构建。如样品后续做环境 DNA 样品分析，主要包括浮游动物、浮游植物、底栖动物样品，需脱除酒精，研磨、破碎后进行核酸提取处理；如样品后续做 DNA 条形码数据库构建，浮游动物、浮游植物、底栖动物样品需单个生物个体挑样、鉴定，研磨、破碎后核酸提取，大型底栖动物、鱼类、大型水生植物需剪取部分组织，研磨、破碎后核酸提取。因样品前处理过程极易发生样品交叉污染，不同类型样品，必须分功能区处理。

同时，实验室需制定环境 DNA 样品接收流程。美国 EPA 《Quality Assurance/Quality Control Guidance for Laboratories Performing PCR Analyses on Environmental Samples》中“Environmental Sample Acceptance Protocol”规定，实验室应制定接受环境样本进行 PCR 分析的方案。该方案应记录在实验室 SOP 中，并包括样品验收标准和不符合标准的样品的纠正措施（例如，回收样品或随访样品收集者以获取缺失信息）。在实验室接收样品时，应对样品进行评估，以验证样品体积是否足够，样品是否经过适当处理和保存（例如，冷藏并运输过夜），满足保存时间要求，并且所有必需的样品收集信息均由样品接收者记录。样品体积、样品处理和保存时间的规范将取决于方法，样品验收标准应基于每种方法准备的 SOP 中描述的规范。评估样品后，记录有关样品接收日期和时间以及样品状况的信息。应使用唯一标识符标记、记录和跟踪示例。

为保证实验室有足够空间放置实验操作台、操作空间和实验室基础设备，本实验室建筑面积应不小于 5 m<sup>2</sup>。

根据 GB/T 19489 规定的实验室核心区域的气压与室外大气压的压差值应不小于 30 Pa，与相邻区域的压差(负压)应不小于 10 Pa。在核心工作区域外通常设置缓冲区域，缓冲区域通常为负压，核心工作区域为正压，形成压差。如无缓冲区域的话，可设置负压。

#### 4.5.3 提取纯化室

应具备均质破碎、水浴、离心、涡旋振荡、储存等功能。均质破碎应满足一体化环境 DNA 过滤器和普通滤膜均质模式，均质速度通常不小于 6 m/s，单次均质样本不低于 6 个。可选

水浴、气浴和金属浴等进行孵育，温度控制精度最大允许误差为 $\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ ，孵育容积不小于 3 L。离心速度需 $\geq 3500\text{ rpm}$ 。DNA 储存应满足 $-20^{\circ}\text{C}$ 或 $-80^{\circ}\text{C}$ 储存条件。

面积应不小于  $8\text{ m}^2$ 。需负压，宜安装排风系统，如万向排风罩。DNA 检测体系在此区域配制，必须盖好含主反应混合液的反应管，再进入质量控制区。

为获得高质量 DNA 样品，需进行核酸提取、纯化处理。前处理之后的样品需利用均质破碎仪高速振动以及研磨珠的敲打，达到对样品进行研磨、裂解、均质的目的，大部分样品的均质速度要求不小于  $6\text{ m/s}$ 。DNA 提取时孵育温度一般要求  $55\text{--}70^{\circ}\text{C}$ ，可选水浴、气浴和金属浴。洗脱过程中离心速度应不小于  $3500\text{ rpm}$ ，完成 DNA 提取。

环境 DNA 样品包括但不仅限于 DNA 样品，还包括质粒、RNA、生物组织等样品，这些样品需短期（三个月内）或长期（三年以上）储存，为方便样品后续使用、查找、核对，避免样品损坏、遗失，特设置环境 DNA 样品储存室。符合 GB/T 19495.2-2004 中其他区域要求可设置低温/超低温冰箱室的规定。

为保证实验室有足够空间放置实验操作台、操作空间和实验室基础设备，必要时还需添加自动化核酸提取设备，因此，本实验室建筑面积应不小于  $8\text{ m}^2$ 。

根据 GB/T 19489 规定的实验室核心区域的气压与室外大气压的压差值应不小于  $30\text{ Pa}$ ，与相邻区域的压差(负压)应不小于  $10\text{ Pa}$ 。在核心工作区域外通常设置缓冲区域，缓冲区域通常为负压，核心工作区域为正压，形成压差。如无缓冲区域的话，可设置负压。

#### 4.5.4 检测室

应具备 PCR 扩增、核酸高通量测序、核酸定量检测等功能。宜根据功能设置实验分区。需配备 PCR 扩增仪、高通量测序仪、荧光定量 PCR 仪、数字 PCR 仪等。

面积应不小于  $10\text{ m}^2$ 。需负压，宜安装排风系统，如万向排风罩。本区域主要为精密设备，应避免集中摆放，防止工作过程中的震动产生相互影响。

核酸检测的目的是检测核酸浓度和评估核酸质量，判断是否可用于后续 PCR 扩增反应，核酸提取效率因样品类型、核酸提取程序而异，理想情况下，应满足以下要求：

- a. 展示目标核酸回收的高效率
- b. 保持核酸完整性并最大限度地减少片段化
- c. 提供足够纯的核酸，不含 PCR 抑制剂
- d. 尽量减少危险化学品的使用
- e. 可重复

美国 EPA 《Quality Assurance/Quality Control Guidance for Laboratories Performing PCR Analyses on Environmental Samples》中“Environmental Sample Acceptance Protocol”规定，应指定该室进行与 PCR 扩增和 PCR 后分析相关的活动。PCR 扩增仪应位于这间实验室内。应始终佩戴手套和实验室外套并在离开房间之前移除，以控制其他位置的扩增产物污染。所有用于扩增和产品检测的设备都应该专用于这个房间，包括可调节移液器，带有堵塞，气溶胶屏障或正位移移液器尖端。这个室应该保持在负压下。虽然 PCR 扩增和 PCR 后分析可以在同一个室内进行，但应将这些活动分隔在不同的区域，以减少扩增产物的污染风险。

根据 GB/T 19489 规定的实验室核心区域的气压与室外大气压的压差值应不小于 30 Pa，与相邻区域的压差(负压)应不小于 10 Pa。在核心工作区域外通常设置缓冲区域，且试剂准备区域通常为压，因此，按照试剂单向流方向，各个实验室之间设计不同压力梯度来实现单向气流组织方向，环境 DNA 样品储存室通常设置正压 0~20Pa。

实验室基础设备低温冰箱、冷藏冰箱、纯水设备、移液设备为本实验室必备设备，主要用于 DNA 样品的储存、配制、转移和分装。必要时可增加超净工作台、离心机或自动化设备等试剂准备必要设备。

#### 4.5.5 质量控制室

应具备凝胶电泳、胶图扫描、混库、核酸浓度测定等功能。胶块制备通常使用微波快速加热，电泳电压应满足 100~220V 范围调节，胶图拍照分辨率不低于 1080p。1 $\mu$ L 混库体系移液精度最大允许误差为 $\pm 10.0\%$ ，10 $\mu$ L 混库体系移液精度最大允许误差为 $\pm 1.2\%$ 。浓度测定需配备荧光检测仪或微量分光光度计。

面积应不小于 4 m<sup>2</sup>。需负压，宜安装排风系统，如万向排风罩。本区域属于高污染区，可采用负压或排风扇较少污染扩散，必要时，可配置可移动紫外消毒设备。

质控室主要功能为扩增产物质检和文库质检，用于评估样品是否符合后续操作。样品质检加样过程中，高浓度的扩增产物开盖次数较多，易产生核酸污染，质检方式通常是琼脂糖凝胶电泳、毛细管凝胶电泳，制备琼脂糖胶块时需使用微波加热，使琼脂糖完全溶解。控制电泳电压在 100~220V 之间，使电泳条带平整、清晰。检测过程通常是开放体系，极易产生核酸污染，因此，该区域需与其他区域隔离，避免污染。

为保证实验室有足够空间放置实验操作台、操作空间和凝胶电泳系统、成像仪等分析设备，并保证空气流通和视线清晰，本实验室建筑面积应不小于 4m<sup>2</sup>。

#### 4.5.6 数据分析室

应具备高通量测序数据分析、数据存储、数据备份等功能。数据分析服务器应具备运行内存不小于 32G，硬盘容量不小于 10T。服务器上需安装可视化的数据分析软件系统，并配备本土物种数据库。测序数据应至少备份 1 份。数据分析过程需注意数据安全。

面积应不小于 4 m<sup>2</sup>。

在样品检测室获得高通量测序数据后，通过数据传输导入数据分析服务器，使用生物信息学分析代码、商业化分析软件等方法，获取生物多样性结果。服务器运行内存常用 32GB，硬盘不小于 10T 即可满足储存需求。数据分析过程需注意数据信息安全。

本功能区主要用于高通量测序数据分析，主要包括显示器、服务器，该区域涉及数据安全，为避免数据泄露、服务器需设置密码，进入本区域工作人员需经严格审查、培训。

为保证实验室有足够空间放置操作台和数据分析服务器，并保证人员操作视线清晰，本实验室建筑面积应不小于 4 m<sup>2</sup>。

#### 4.5.7 其他分区

除主要功能区外，环境 DNA 实验室可配备消洗室、更衣室等。消洗室应具备试剂耗材灭菌、除酶，生物样品灭菌处理等功能，应安排在有上下水的角落位置，但不宜与高温室或较强电磁干扰的房间相邻。更衣室用于更换实验服、鞋子以及存放个人物品等。

本工作区域为实验室辅助区域，主要用于试剂耗材灭菌、除酶，生物样品灭菌处理。如不涉及试剂耗材灭菌，实验室直接采购无菌、无酶试剂耗材，且不涉及生物样品灭菌处理，可根据实际情况，不设置消洗室。涉及到生物样品处理，按 GB19489-2008 的规定执行。

根据 GB/T 19489 规定的实验室核心区域的气压与室外大气压的压差值应不小于 30 Pa，与相邻区域的压差(负压)应不小于 10Pa。在核心工作区域外通常设置缓冲区域，且前处理室通常为负压，因此，按照试剂单向流方向，各个实验室之间设计不同压力梯度来实现单向气流组织方向，环境 DNA 扩增建库室通常设置负压与相邻区域的压差不小于 10Pa。

实验室基础设备应包含灭菌设备，必要时可添加其他用于灭菌消毒、除酶的设备，如烘箱等。

### 4.6 实验室操作要求

样品应按照实验室功能分区单一方向，低核酸污染区到高核酸污染区方向流动。

实验操作人员应具备良好的分子生物学专业技术操作规范，自觉遵守实验室规章制度。



非实验室工作人员未经允许不得进入实验室。

实验操作过程中，操作者须穿戴该区的实验服、口罩、手套、鞋套和一次性帽子，鞋套和帽子根据功能区需求穿戴。

应按照实验操作程序开展实验，应特别注意防止样品交叉污染。实验前后应及时台面消毒、废弃物处理等，参照 GB/T 19495.2-2004 的相关规定执行。

样品 DNA 提取过程应选用有效提取环境 DNA 的处理方法，否则将影响后续 PCR 扩增反应。操作过程涉及到微生物安全的内容，按 GB19489-2008 的规定执行。

根据 GB/T 19495.2-2004 转基因产品检测 实验室技术要求的相关要求，用过的加样器吸头必须放入专门的消毒容器（含 1%次氯酸钠溶液）内。实验室桌椅表面每次工作后都要清洁。含有 PCR 产物的任何废液必须收集到 1mol/L 盐酸中，并且不能在实验室内倾倒，而应到远离 PCR 实验室的地方弃掉。污染了 PCR 产物的吸头也必须放到 1mol/L 盐酸中浸泡后再放到垃圾袋中按程序处理（如焚烧）。

样品粉碎、制样、核酸提取等过程中出现实验材料散落或 PCR 产物外溅时，必须立即进行清洁处理并作出记录。

实验室自配试剂（去离子水、缓冲液等）和所有器具在使用前均应高压灭菌或紫外杀菌，移液器吸头、反应管等实验耗材应一次性使用。在操作过程中需正确使用加样器，避免在加样时产生气溶胶气体。

尽量减少在实验区内不必要的走动以减少交叉污染的可能性。

## 4.7 房屋配件、实验室辅助设施要求

### 4.7.1 门窗

按照 GB/T 32146.1-2015 检验检测实验室设计与建设技术要求 第 8 章设置实验室门窗尺寸。

实验室门扇应设观察窗，有特殊要求的房间的门洞尺寸应按具体情况确定。各个实验室的门须保证实验人员和设备进出方便。

有空调、洁净要求的房间设置外窗时，应为双层密闭窗。

由 1/2 标准单元组成的实验室门洞宽度不宜小于 1m，高度不宜小于 2.1m。由一个及以上标准单元组成的实验室门洞宽度不宜小于 1.2m，高度不宜小于 2.1m。

实验室的门扇应设观察窗。有特殊要求的房间的门洞尺寸应按具体情况确定，如经常进出大型试件或设备的房间，可设置无门槛的卷帘门。在共用建筑物中建立的实验室，应设可

自动关闭的带锁的门，必要时，可设立缓冲区域，如缓冲间等。

在设置采暖及空气调节的实验建筑，在满足采光要求的前提下，应减少外窗面积。设置空气调节的实验室外窗应具有良好的密闭性及隔热性，且宜设不少于 1/3 的可开启窗扇。

如果没有机械通风系统，应有窗户进行自然通风，并应有防虫纱窗（一般情况下，应有机械通风系统，否则温湿度指标难以保证）。应有防昆虫、鼠等动物进入和外逃的措施。底层、半地下室及地下室的外窗应采取防虫及防啮齿动物的措施。

实验室窗包括：固定窗、可开关窗、双层窗、密闭窗、屏蔽窗、隔声窗。可根据不同的需求选用。如实验室要求水平遮阳或垂直遮阳，需选用有遮阳功能的窗，如百叶窗。

#### 4.7.2 地面、墙面要求

按照 GB/T 32146.1-2015 检验检测实验室设计与建设技术要求 第 8 章设置实验室地面、墙面。实验室整体要求防尘、防腐蚀，地面耐磨、防滑，并按要求采取防静电措施。

实验室地面应坚实耐磨、不起尘、不积尘并能够防水、防滑、防放射性沾染、防静电。实验室防振应考虑实验本身或精密仪器本身所提出的防振要求，以及实验所产生的振动。使用强酸强碱实验室所布置地面应具有耐腐蚀性。用水量较多的实验室地面应设地漏。

实验室墙面总体要求为方便清洁，不得采用带有强反光性质的饰面材料，对于冷藏墙面要求隔热；有些实验室在实验时有酸碱气体逸出，要求设计耐酸碱的涂层墙面；对于会产生噪声的实验室，墙面应布置吸声材料；有抗电磁波干扰的房间，墙面需做屏蔽处理。

实验室墙裙高度应离地面 1.2~1.5m 左右，便于清洁，如瓷砖墙裙、油漆墙裙等。

#### 4.7.3 顶棚

除了有严格防尘需求的实验室之外，实验室不宜设置吊顶，顶棚应选用易清洁、防尘的难燃材料。对于某些具有吊顶需求且无严格密封要求的空间，可采用活动板块式吊顶。

#### 4.7.4 走道

按照 GB/T 32146.1-2015 检验检测实验室设计与建设技术要求 第 8 章设置实验室走道。走道应直接通向出口，且保证实验人员和货运车辆通过。

走道应直接通向出口的方向，以便危险发生时人员的撤离，因此应避免设计成无规则的形状。

走道地面有高度时，当高差不足二级踏步时，不得设置台阶，应设坡道，其坡度不宜大于 1: 8。实验室宜设置缓坡坡道供货运车辆通行。

应根据使用过程中具体情况来确定走道的宽度和高度设计，同时应特别注意回转余量。双面布房的走道宽度不宜小于 1.8m，单面布房的走道宽度不宜小于 1.5m。

#### 4.7.5 缓冲区

有条件的实验室宜设置缓冲区或在所各工作区域设置缓冲间，缓冲间的压力为负压(或上设抽风装置)，与其相连的工作间为正压，工作间与缓冲间之间宜安装磁性连锁装置受实验场所限制而无条件设置缓冲间的实验室，缓冲区的面积不能大于实验室房间面积的 1/8。缓冲区设置于清洁区与污染区之间，保证有效隔离，每个独立分区都要设置一个缓冲区。非实验人员不应进入各实验工作区。

#### 4.7.6 实验台

按照 GB/T 32146.1-2015 检验检测实验室设计与建设技术要求 第 8 章设置实验台。

根据实验室规模设置实验台的结构和布局。

按结构形式可分为：固定试验台、悬挂实验台、分体实验台和移动实验台。

固定实验台：是一种传统布置，落地柜支撑台面，灵活性较差。

悬挂实验台：防潮性能好、灵活性稍强，柜体可以重新布置而不影响其他工作系统的其他部分。

分体实验台：水电气系统和实验台属于分体的两部分，实验台可以轻易移动，重新布置而不需要新装水电气系统，灵活性强，是未来发展的主流产品之一，这种实验台价格较高。

移动实验台：工作台下方装有轮子，可以轻易移动。许多桌子、推车和工作台物件可以垂直调节高度以更加符合人体工效学。

根据实验室布局不同，可分为：一字型、L 型、半岛型和岛型。

一字型：实验台采用一字型布置方式，适用于小型实验室或大型实验室边台。

L 型：实验台与实验室的两相邻墙壁平行布置且留有维修通道，适合精密仪器室。

半岛型：实验台一端靠墙，适合大型实验室及理化室，空间使用率高。

岛型：实验台布置在实验室中间，方便实验人员工作与逃生，效率及安全性高。

按照 GB/T 32146.1-2015 检验检测实验室设计与建设技术要求 8.1.8.2 的要求，实验台尺寸应根据使用要求设计，实验台的台面高宜为 0.8~0.9m，单面实验台宽度宜为 0.65~0.8m，双面实验台宽度宜为 1.5m，长度应按实验的具体要求确定。

#### 4.7.7 物品架

按照 GB/T 32146.1-2015 检验检测实验室设计与建设技术要求 第 8 章设置物品架。实验室应设置嵌墙式和挂墙式物品架，物品架底距地面不应小于 1.2m。物品架应具有足够的承载能力，并与墙体牢固连接，物品架横隔板的位置应上下可移动。

#### 4.7.8 紫外灯

每个实验室工作区域的顶部应安装紫外灯，紫外灯波长、数量和长度标准参照 GB/T 19495.2-2004 实施。易污染区域可设置移动紫外消毒车。

根据 GB/T 19495.2-2004 6.1.1 设施和环境要求，每个工作区域的顶部应安装紫外灯，紫外灯的波长为 254nm，安装数量为每 20m<sup>2</sup> 安装一支 40W 的紫外灯，灯与地面的距离不宜超过 2.0m±0.1m。

## 5 附录

### 附录 A

(规范性附录)

#### 环境 DNA 实验室典型布局图

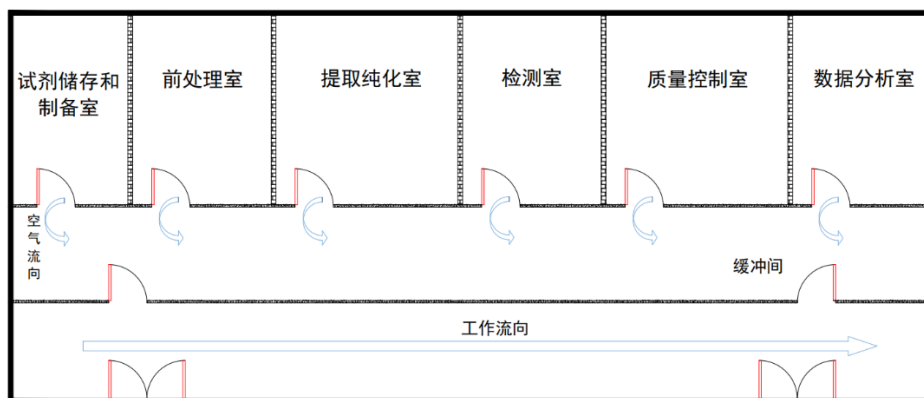


图 A.1 环境 DNA 实验室典型布局图 1

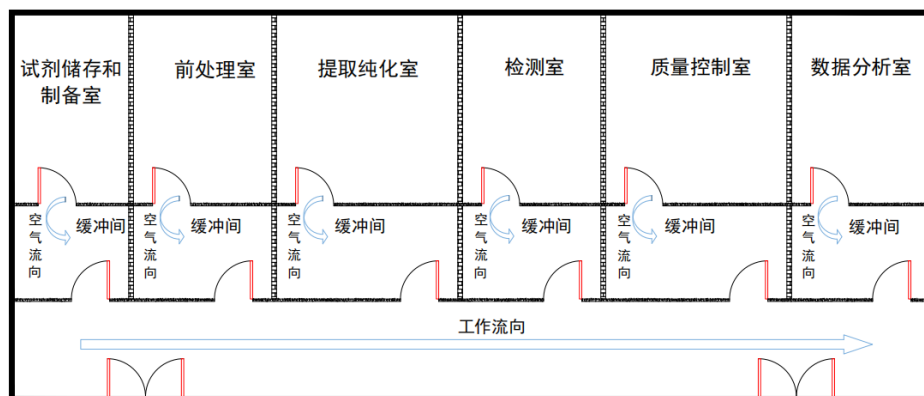


图 A.2 典型环境 DNA 实验室典型布局图 2

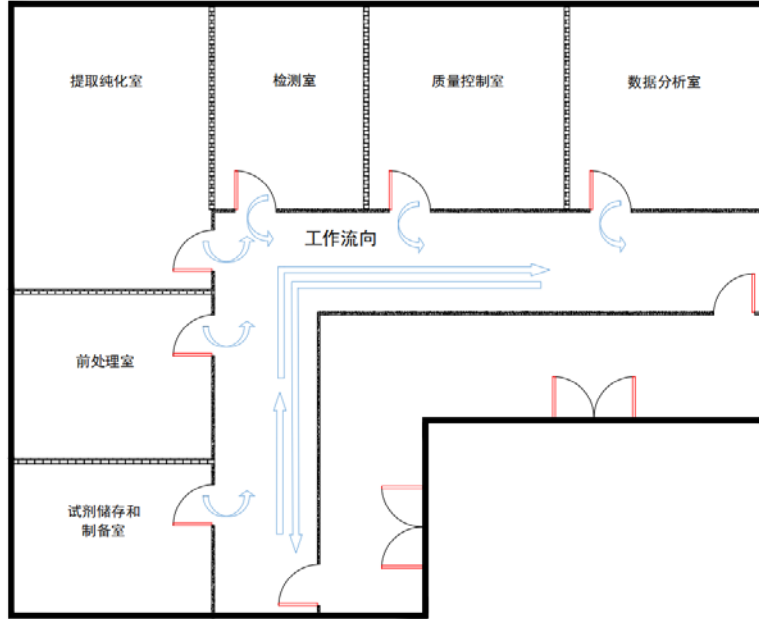


图 A.3 典型环境 DNA 实验室典型布局图 3

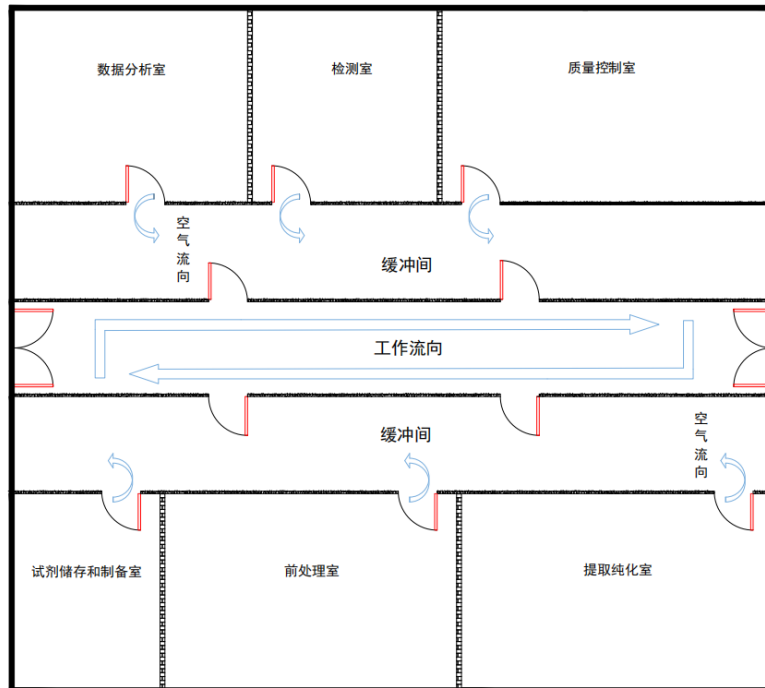


图 A.4 典型环境 DNA 实验室典型布局图 4

## 6 主要试验、验证及试行结果

本标准主要基于已获取的研究数据开展标准的研制，不涉及专题研究、试验、测试等过程。

## 7 标准实施建议

本文件适用于基于环境 DNA 技术的水生生物多类群监测实验室的新建、改建和扩建的设计、建设和质量控制。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。

本标准为首次制定，随着 DNA 条形码技术的快速崛起和发展，本标准中的 DNA 条形码建库方法和涉及到的相关参数也可能会随之发生变化。因此，建议在本标准实施过程中，继续广泛听取和收集各方面的意见与建议，并根据实际应用情况，对本标准进行不断地修订与完善，使其实用性和可操作性与时俱进，为规范开展基于 DNA 技术的水生生物鉴定和生物多样性监测等工作提供基础支撑和指导。

## 8 标准中设计专利的情况

本标准没有设计专利。

## 9 预期达到的社会效益、对产业发展的作用

从社会效益来看，水生生物环境 DNA 实验室的建设将提升公众对于水生态环境保护的认识和意识。实验室的建设也将为科学研究提供更好的平台和条件，推动相关领域的发展和

创新。从产业发展作用来看，实验室的建设将带动相关产业的发展，如生物多样性监测技术研发、实验室工程设计等，进一步推动经济的可持续发展。

## 10 与国际、国外标准对比情况

本标准没有采用国际标准。

## 11 与有关现行法律、法规和强制性标准规范的关系

本标准与有关的现行法律、法规和强制性国家标准无冲突、无交叉。

## 12 重大分歧意见的处理经过和依据

无。

## 13 标准性质的建议说明

本标准建议为推荐标准，不属于强制性标准。

## 14 贯彻标准的要求和措施建议

根据生态环境部每年国家监测培训计划任务安排，由中国环境监测总站负责制定必要的方法培训计划，对本标准的主要内容和实施中的主要环节进行多期专题培训。在本标准实施过程中，继续广泛听取和收集各方面的意见与建议，并根据实际应用情况，对本标准进行不断地修订与完善，使其实用性和可操作性与时俱进，为规范开展基于 DNA 技术的水生生物鉴定和生物多样性监测等工作提供基础支撑和指导。

## 15 废止现行相关标准的建议

无。

## 16 其他应予说明的事项

无

## 17 参考文献

- [1] LI F, PENG Y, FANG W, et al. Application of Environmental DNA Metabarcoding for Predicting Anthropogenic Pollution in Rivers[J]. Environmental Science & Technology, 2018, 52(20): 11708-11719.
- [2] LI F, ZHANG Y, ALTERMATT F, et al. Consideration of Multitrophic Biodiversity and Ecosystem Functions Improves Indices on River Ecological Status[J]. Environmental Science & Technology, 2021, 55(24): 16434-16444.
- [3] LI F, ALTERMATT F, YANG J, et al. Human activities' fingerprint on multitrophic biodiversity and ecosystem functions across a major river catchment in China[J]. Global Change Biology, 2020, 26(12): 6867-6879.
- [4] YANG J, ZHANG X, XIE Y, et al. Ecogenomics of Zooplankton Community Reveals Ecological Threshold of Ammonia Nitrogen[J]. Environmental Science & Technology, 2017, 51(5): 3057-3064.
- [5] ZHANG Y, PAVLOVSKA M, STOICA E, 等. Holistic pelagic biodiversity monitoring of the Black Sea via eDNA metabarcoding approach: From bacteria to marine mammals[J]. Environment International, 2020, 135:



- [6]张宛宛. 基于 DNA 宏条形码技术的浮游植物群落多样性监测研究[D]. 南京大学, 2017.
- [7]高旭. 太湖鱼类环境 DNA 宏条形码快速监测技术应用研究[D]. 南京大学, 2020.
- [8]苏红梅. 检验检测实验室生物安全防护的研究[J]. 医学食疗与健康, 2021, 19(14): 141-142.
- [9]刘彩娟, 王永信, 任亮. 奶牛场荧光定量 PCR 检测实验室建设实践与思考——以原生态牧业奶牛场实验室建设为例[J]. 中国乳业, 2023(04): 47-50+56.
- [10]王海玉, 沈剑. PCR 实验室规划设计与建设要求[C]//中国医学装备协会 (China Association of Medical Equipment). 中国医学装备大会暨 2021 医学装备展览会论文汇编.[出版者不详], 2021: 20-24. DOI: 10.26914/c.cnkihy.2021.013083.
- [11]陈永, 杨莲辞, 常定发. PCR 实验室的污染及其防范措施[J]. 山东畜牧兽医, 2021, 42(03): 35-36.
- [12]刘俊鹏, 屈亮, 高宏昭等. 环境 DNA 监测 PCR 实验室的风险识别与控制[C]//中国水利学会. 2022 中国水利学术大会论文集 (第六分册). 黄河水利出版社, 2022: 56-60. DOI: 10.26914/c.cnkihy.2022.059557.
- [13] CAPO E, SPONG G, KÖNIGSSON H, 等. Effects of filtration methods and water volume on the quantification of brown trout (*Salmo trutta*) and Arctic char (*Salvelinus alpinus*) eDNA concentrations via droplet digital PCR[J]. Environmental DNA, 2020, 2(2): 152-160.
- [14]Quan P L, Sauzade M, Brouzes E. dPCR: a technology review[J]. Sensors, 2018, 18(4): 1271.