ICS：13.080.30
CCS：B10

T/SSSC

中 国 土 壤 学 会 团 体 标 准

T/SSSC 0 —2026

农田土壤 eDNA 分析技术规范

Technical specification for analysis of agricultural soil environmental DNA (eDNA)

（征求意见稿）

2026-XX-XX 发布　　2026-XX-XX 实施

中国土壤学会　发 布

目　　次

前　言 II
1 范围 1
2 规范性引用文件 1
3 术语、定义和缩略语 1
4 试剂与材料 5
5 仪器和设备 9
6 土壤采集、保存、运输和交接 10
7 土壤 eDNA 样品提取与纯化 12
8 PCR 扩增 14
9 结果分析 16
10 质量控制 19
11 结果报告 22
附录 A （资料性） 环境 DNA 采样记录表 23
附录 B （资料性） 土壤典型生物环境 DNA 监测引物信息 25
参考文献 26

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。

本文件由中国土壤学会提出并归口。

本文件起草单位：南京农业大学、中国科学院南京土壤研究所、中国科学院城市环境研究所、中国科学院生态环境研究中心、华东师范大学、南京大学、江苏省生态地质调查大队、江苏省海洋地质调查院。

本文件主要起草人：孙明明、王广昊、王丹蕊、张文、吴世茂、刘鹏、付玉豪、王超、陈林、朱冬、李弘哲、何尔凯、张宴、胡建、姜夏烨、徐明钻。

农田土壤 eDNA 分析技术规范

1 范围

本文件规定了基于环境 DNA（eDNA）技术开展典型土壤生物类群监测的试剂耗材、样点布设、土壤样品采集与预处理、DNA 提取、PCR 扩增、测序与数据分析和质量控制等内容。

本文件适用于农田类型土壤中细菌、真菌、脊椎和无脊椎动物等典型土壤生物类群的环境 DNA 监测。

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 30989—2014 高通量基因测序技术规程

GB/T 35537—2017 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

GB/T 40226—2021 环境微生物宏基因组检测 高通量测序法

HJ/T 166 土壤环境监测技术规范

GB 19489 实验室生物安全通用要求

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

3 术语、定义和缩略语

3.1 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1.1

环境 DNA environmental DNA (eDNA)

环境 DNA（environmental DNA，eDNA）是生物体通过生理活动掉落在环境中的遗传物质。DNA 片段可能来自生物体的代谢排泄、脱落细胞、生殖细胞、分泌物、死亡分解等过程。就土壤环境而言，环境 DNA（eDNA）除上述来源外，还包括吸附于土壤矿物颗粒表面的胞外 DNA，以及土壤中细菌、真菌等微生物和土壤动物直接释放的 DNA。

3.1.2

土壤生物 soil organisms

全部或部分生活在土壤中的生物。主要的土壤生物类群包括细菌、真菌、古菌等微生物，以及线虫、蚯蚓、节肢动物等土壤动物。

3.1.3

12S 核糖体 DNA 基因 12S ribosomal DNA (12S rDNA)

后生动物线粒体基因组上编码 12S rRNA 的 DNA 序列，多用于土壤脊椎动物多样性检测。

3.1.4

16S 核糖体 DNA 基因 16S ribosomal DNA (16S rDNA)

原核生物基因组上编码 16S rRNA 的 DNA 序列，广泛用于细菌、古菌群落解析。

3.1.5

内转录间隔区 Internal Transcribed Spacer (ITS)

真核生物核糖体基因簇中的非编码间隔 DNA 序列，主要用于真菌物种鉴定与群落分析。

3.1.6

COI 基因 cytochrome c oxidase subunit I gene (COI)

线粒体细胞色素 C 氧化酶亚基 I 基因（cytochrome c oxidase subunit I gene，COI），为动物 DNA 条形码（DNA barcoding）的标准分子标记。该基因进化速率适中，种间变异通常大于种内变异，物种分辨率高，广泛用于脊椎及无脊椎动物等后生动物类群的物种鉴定与隐存种发现。在土壤 eDNA 研究中，COI 基因常与通用简并引物配合使用，用于批量解析土壤动物群落组成。

3.1.7

宏条形码 metabarcoding

基于环境 DNA，利用通用分子标记与高通量测序技术，批量解析环境样本中生物群落组成与结构的分子检测技术。

3.1.8

分类单元 taxon

依据序列特征、遗传相似度及系统发育关系，对环境 DNA 序列划分的各类生物分类层级单元，包括界、门、纲、目、科、属、种等。

3.1.9

操作分类单元 Operational Taxonomic Unit (OTU)

依据序列相似度阈值聚类得到的序列单元，用于微生物群落组成的分类统计。

3.1.10

阴性对照 negative control

不含待测物种或者所有物种 DNA 的样品（如灭菌超纯水），与待测样品同步实验，用于判断待测样品是否被污染。

3.1.11

阳性对照 positive control

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，与待测样品同步实验，用于判断结果是否可靠。

3.2 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

DNA：脱氧核糖核酸（Deoxyribonucleic acid）

EDTA：乙二胺四乙酸（Ethylenediaminetetraacetic acid）

NaCl：氯化钠（Sodium chloride）

PBS：磷酸盐缓冲液（Phosphate-buffered saline）

qPCR：实时荧光定量聚合酶链式反应（Quantitative polymerase chain reaction）

RNase：核糖核酸酶（Ribonuclease）

Tris-HCl：三羟甲基氨基甲烷盐酸盐（Tris (hydroxymethyl) aminomethane hydrochloride）

SDS：十二烷基硫酸钠（Sodium dodecyl sulfate）

$MgCl_2$：氯化镁（Magnesium chloride）

PVPP：交联聚乙烯吡咯烷酮（Polyvinylpolypyrrolidone）

PES：聚醚砜（Polyethersulfone）

DEPC：焦碳酸二乙酯（Diethyl pyrocarbonate）

4 试剂与材料

4.1 总则

所用试剂应采用分析纯及以上等级试剂，特殊情况除外。实验用水应符合 GB/T 6682 中一级水要求。

与样品直接接触的器具和耗材应无菌。一次性耗材宜采用无 DNA 酶、无 RNA 酶和低吸附产品。

4.2 试剂

4.2.1 磷酸盐缓冲液（PBS）

应采用 1×PBS 缓冲体系，pH 控制为 7.0±0.2。实验室自行配制的 PBS 需经 0.22 μm 无菌滤膜过滤除菌；商品化 PBS 需为分子生物学无菌级别。所有 PBS 试剂使用前均需预冷至 4 ℃，用于土壤样品预处理、体系平衡及膜清洗操作。

4.2.2 核糖核酸酶（RNase）

选用无 DNase、无蛋白酶污染的高纯 RNase I 酶制剂。在土壤 eDNA 提取过程中，RNase I 用于选择性降解共提取的 RNA 杂质，终活性为 50 U/mL；反应体系中需配套添加 5 mmol/L $MgCl_2$ ，保障 RNase I 高效发挥活性。RNase I 处理完成后，应通过后续柱纯化步骤予以去除，避免对 DNA 产物造成影响。

4.2.3 EDTA 溶液

储备液浓度为 0.5 mol/L，pH 调节至 8.0。用于终止核酸酶消化反应时，需将整体反应体系中 EDTA 终浓度调控至 10 mmol/L，通过螯合金属离子彻底终止核酸酶活性，保护土壤 eDNA 完整性。

4.2.4 消毒试剂

试验操作台面、低温不耐高温器具外表面、采样辅助器具消毒均采用 75 %（v/v）乙醇溶液。75 %乙醇需密封避光保存，单次消毒后需待器具、台面乙醇完全挥发干燥后，方可接触土壤样品与核酸体系，杜绝乙醇残留造成核酸降解与扩增抑制。

4.2.5 提取与纯化辅助试剂

a) 无核酸酶纯水：应符合 GB/T 6682 中一级水要求，经 DEPC 处理或等效工艺制备，无 DNase、RNase 及核酸残留，用于配制反应体系及 DNA 溶解。

b) 无水乙醇：分子生物学级，纯度≥99.5 %（v/v），无 DNase、RNase 及核酸残留，用于核酸沉淀及纯化过程中的漂洗步骤。

c) 核酸结合缓冲液：含离液盐及醇类的缓冲体系，无 DNase、RNase 及核酸背景，介导 DNA 与固相载体选择性结合。

d) 核酸洗涤缓冲液：含乙醇及低盐缓冲体系，无 DNase、RNase，用于去除固相载体上残留的盐分、腐殖酸、多酚等 PCR 抑制物。

e) DNA 洗脱缓冲液：低离子强度缓冲液（如 10 mmol/L Tris-HCl，pH 8.0~8.5），无 DNase、RNase，用于将纯化 DNA 从固相载体上释放。

4.2.6 PCR 扩增试剂

a) 高保真热启动 DNA 聚合酶：具有 3'→5'外切酶校正活性，经化学或抗体修饰实现热启动，错配率≤5×10^{-6}，无 DNase/RNase 及外源核酸污染，能适配含腐殖酸、多酚等抑制物的土壤 eDNA 模板。

b) PCR 缓冲液：与高保真热启动 DNA 聚合酶配套的专用缓冲液，含 Tris-HCl、KCl 或 $(NH_4)_2SO_4$ 及稳定剂，无 DNase/RNase 及核酸污染。

c) 高纯 dNTP 混合液：含 dATP、dCTP、dGTP、dTTP 四种脱氧核糖核苷三磷酸的等摩尔混合液，纯度≥99%（HPLC 级），无 DNase/RNase 污染。

d) Mg^{2+}缓冲体系：含 $MgCl_2$ 或 $MgSO_4$ 的缓冲溶液，使用终浓度应满足聚合酶要求（通常为 1.5 mmol/L~4.0 mmol/L），无 DNase/RNase 及核酸污染。若商品化 PCR 预混液中已含最适浓度 Mg^{2+}，则无须单独添加。

e) 特异性扩增引物：针对 16S rDNA、ITS、12S rDNA、COI 基因设计的寡核苷酸引物对，纯度不低于 HPLC 级，无 DNase/RNase 污染，工作浓度为 10 μmol/L，引物序列及扩增参数见附录 B。

4.2.7 质控辅助试剂

a) 核酸荧光定量试剂：高特异性双链 DNA 荧光染料（如 SYBR Green I 类、PicoGreen 类等），线性检测范围应覆盖 0.1~1000 ng/mL，对 RNA 及蛋白质干扰物响应低，用于 DNA 浓度精准定量。

b) 琼脂糖：分子生物学级，凝胶强度≥1000 g/cm^2，无 DNase/RNase 污染，用于配制电泳凝胶。

c) 无毒核酸染料：安全环保型荧光核酸染料（如 GelRed、GelGreen、SYBR Safe 等），灵敏度不低于 1 ng DNA/条带，用于凝胶中 DNA 条带的可视化。

d) 梯度 DNA Marker：已知长度和浓度的 DNA 片段混合物，片段范围覆盖 100 bp~3000 bp，无 DNase/RNase 污染，用作电泳片段大小参照及浓度参照。

e) PCR 阳性对照模板：含目标基因片段的已知 DNA 样品（基因组 DNA、质粒或合成基因片段），浓度经标定，用于验证扩增体系有效性。

f) 无模板阴性对照试剂：以无核酸酶纯水替代模板 DNA 的 PCR 反应体系，与待测样品同批次配制，用于扩增全流程污染排查（即 10.4 中规定的 PCR 阴性对照）。

4.2.8 土壤 eDNA 提取专用试剂

a) TENP 缓冲液：由 50 mmol/L Tris-HCl、20 mmol/L EDTA、100 mmol/L NaCl、0.01 g/mL PVPP（聚乙烯聚吡咯烷酮）组成，pH 值调至 10.0。用于土壤样品的均质预处理，有效去除土壤中腐殖酸、多酚等 PCR 抑制物。

b) SDS 溶液：十二烷基硫酸钠（Sodium Dodecyl Sulfate，SDS），纯度≥98%，用于配制细胞裂解缓冲液，终浓度不低于 4%。

c) 异硫氰酸胍溶液：浓度 5 mol/L，用于高温化学裂解步骤，辅助蛋白质变性、核酸释放及 RNase 灭活。

d) 异丙醇：分子生物学级，纯度≥99.5%，用于核酸沉淀。

e) 溶菌酶：用于细菌细胞壁的特异性酶解破壁，活性≥20000 U/mg。

f) NovoZym 234：真菌细胞壁裂解酶，用于真菌样本的特异性酶解破壁。

4.3 材料

4.3.1 采样与运输容器

应采用洁净、无毒、耐低温、抗挤压的聚丙烯（PP）材质采样袋、冻存盒；容器应密闭，避免样品泄漏与外源核酸污染。不同采样位点、不同生物学平行样品应使用独立容器，不得混用。

4.3.2 离心管和冻存管

应采用无菌、耐低温、密封性良好的聚丙烯（PP）低吸附产品；用于土壤 eDNA 粗提物、纯化后 DNA 保存的冻存管宜采用低核酸吸附型产品，避免核酸吸附损失。

4.3.3 移液吸头和样品接收容器

应采用无菌聚丙烯（PP）材质产品；一次性耗材应为无 DNA 酶、无 RNA 酶的低吸附

型，降低土壤 eDNA 的非特异性吸附损耗。

4.3.4 滤膜和过滤器

土壤游离 eDNA 分离富集时，预过滤宜采用 0.45 μm 聚醚砜（PES）滤膜，核酸截留过滤采用 0.22 μm PES 滤膜；与样品接触的过滤器壳体应采用聚丙烯（PP）或其他低核酸吸附材料。

4.3.5 土壤采样器具

土钻、采样铲、样品勺宜选用不锈钢材质，可耐乙醇擦拭消毒；器具表面光滑，便于去除土壤残留与外源核酸，不同样点之间应充分消毒处理。

4.3.6 PCR 扩增消耗品

a) PCR 反应管或 96 孔 PCR 板：适配所用 PCR 仪型号，无 DNA 酶、无 RNA 酶，密封性良好；

b) 封板膜或管盖：可用于 qPCR 的透明密封膜或八联管盖、96 孔板封板膜，防止 PCR 过程中样品蒸发及交叉污染。

4.3.7 核酸沉淀与保存材料

a) 无菌研杵（适配 1.5 mL 离心管）：用于土壤样本的手动研磨均质，处理含植物残体、块状杂质的土壤样品；

b) 核酸保存管：无菌、低核酸吸附，适配−80 ℃超低温保存条件。

5 仪器和设备

5.1 高压蒸汽灭菌器：可达 121 ℃、0.1 MPa 灭菌条件；

5.2 生物安全柜或洁净操作台：满足核酸前处理无菌操作要求，可降低外源核酸气溶胶污

染；

5.3 电子天平：感量不低于 0.01 g；

5.4 恒温振荡器：转速范围应覆盖 50 rpm~500 rpm，温度应可调至 4 ℃；

5.5 涡旋振荡器：最高转速不低于 2500 rpm；

5.6 低温离心机：转速可达 13000 rpm，温控范围可至 4 ℃；

5.7 低温保存设备：应配备 2 ℃~8 ℃冰箱和−80 ℃超低温冰箱；

5.8 pH 计：最小分度值不大于 0.1 pH 单位；

5.9 PCR 仪：温控区间 0 ℃~100 ℃，升降温速率不低于 6 ℃/s，适配 200 μL PCR 反应管；

5.10 移液枪：量程为 0.5~10 μL、20~200 μL 和 100~1000 μL 等；

5.11 水平电泳系统：含水平电泳仪主机与电泳槽，工作电场强度 5 ~10 V/cm，输出电压范围 6 ~400 V；

5.12 凝胶成像系统：具备 DNA 凝胶成像和拍照功能；

5.13 核酸荧光定量仪（Qubit 类）：可实现土壤 eDNA 精准定量，满足高通量测序上机前核酸质控。

5.14 超声水浴处理器：功率可调，可维持室温超声条件，用于土壤 eDNA 提取前的超声辅助破壁处理，作用时间不低于 3 min。

5.15 恒温孵育器/水浴锅：温控精度±1 ℃，可稳定维持 37 ℃及 68 ℃，用于酶解破壁与高温化学裂解。

6 土壤采集、保存、运输和交接

6.1 土壤采集

6.1.1 采样点位应根据研究目的、土地利用方式、植被类型、土壤类型和污染状况等因素设置，样点应具有代表性。

6.1.2 采样应避开枯枝落叶、石块、动物残体等杂质，去除表层 0～2 cm 浮土后，采集 0～20 cm 耕层土壤；若监测特定土层（如 20～40 cm 底层），应在方案中明确目标深度，保证样品均一性与代表性，降低外源生物背景干扰。

6.1.3 同一试验处理单元应设置不少于 3 个生物学重复样品；每个采样点位应采集不少于 3 份独立现场平行样，各平行样应独立采集、独立分装、独立编号。每份 DNA 样品应设置不少于 3 个 PCR 技术重复。

6.1.4 单份土壤 eDNA 提取样品采样量不少于 500 mg（鲜重）；如需开展游离 eDNA 富集分析，单份样品采样量不少于 2 g（鲜重）；如需开展提取效率验证、重复提取或备份保存，每份样品采集量宜不少于 5 g（鲜重），确保满足 DNA 提取、纯化和复检需求。

6.1.5 所有土壤 eDNA 样品采集完成后立即置于低温冰盒避光暂存，野外暴露时间不得超过 30 min，最大程度抑制微生物群落结构改变与 eDNA 降解。

6.1.6 每批次采样需设置野外空白对照，空白器具全程跟随采样、运输、保存流程，用于甄别野外环境与运输过程中的外源核酸污染。

6.1.7 采样过程应完整记录样点坐标、土壤类型、采样深度、温湿度、采样时间、样品编号等信息，建立完整样品溯源档案，保障试验数据可追溯性。

6.1.8 采样深度应根据农田类型、作物根系分布和研究目的确定。无特殊要求时，旱地、水浇地、设施农田和水稻田宜采集 0-20 cm 耕作层土壤；果园、茶园等可采集 0-20 cm 或 0-40 cm 土层；如需分层研究，可按 0-10 cm、10-20 cm、20-40 cm 等分层采集。采样深度应完整记录。

6.1.9 采样点应覆盖不同农田利用方式、土壤类型、作物类型和污染状况，样点布设参照 HJ/T166 执行。采样记录应包括土地利用方式、作物类型、灌溉与施肥情况、采样深度、样本量及重复设置等信息。

6.2 保存、运输和交接

a) 样品野外临时保存需采用避光密封冰盒低温环境，全程保持低温恒温状态，避免温度波动引发土壤微生物代谢扰动及 eDNA 降解。

b) 样品运输全程采用低温冷链模式，运输过程中避免剧烈震荡、挤压及阳光直射，防止样品撒漏、混杂。

c) 样品运回实验室后需快速完成样品转接整理，全程在低温超净工作台内操作，缩短常温暴露时长，杜绝外源核酸交叉污染。

d) 完成转接后的土壤 eDNA 样品即刻分类编号、密封标识，统一存放于−80 ℃超低温冰箱，样品冻融次数严格控制在 3 次以内，严禁反复冻融。

e) 样品保存与转接全程同步登记台账，明确样品入库时间、存放位置、转接操作人员，实现样品全流程溯源管理。

f) 样品保存与运输记录应包括采样深度、样本量、重复设置、保存温度、运输温度、运输时间、冻融次数等信息，记录表见附录 A.2。

7 土壤 eDNA 样品提取与纯化

7.1 土壤 eDNA 提取方法

a) 样本称量与均质预处理：准确称取 100 mg（湿重）预处理土壤环境样本，置于无菌 1.5 mL 离心管中，加入 350 μL TENP buffer（50 mmol/L Tris-Hcl，20 mmol/L EDTA，100 mmol/L NaCl，0.01 g/mL PVPP，pH 值为 10.0），涡旋振荡 30 s 充分混匀；含植物残体、块状杂质的土壤样本，采用适配离心管的无菌研杵手动研磨 30 s。

b) 超声辅助破壁处理：将均质完成后的样本置于室温超声水浴处理 3 min，通过超声作用破坏微生物表层结构，提升后续细胞裂解效率。

c) 复合酶解破壁：向处理后的样本体系中加入 10 μL 10 mg/mL 复合酶液，细菌样本添

加溶菌酶、真菌样本添加 NovoZym 234，分别特异性降解细菌与真菌细胞壁；涡旋振荡 10 s 充分混匀后，置于 37 ℃恒温条件孵育 60 min。

d) 高温化学裂解：酶解结束后，向体系内加入 350 μL TENP buffer（0.25 mol/L NaCl，0.1 mol/L EDTA，4%SDS）与 50 μL 5 mol/L 异硫氰酸胍溶液，涡旋振荡 10 s 混匀，置于 68 ℃水浴恒温裂解 60 min，充分释放样本总核酸。

e) 裂解完成后于 4 ℃、12000 g 离心 15 min，全部转移上清液至新无菌离心管，加入 750 μL 异丙醇充分混匀，−20 ℃静置沉淀 30 min，12000 g 离心 15 min 收集核酸沉淀。沉淀室温自然风干，加入 100 μL 无菌去离子水充分溶解，获得土壤总 eDNA 粗提液。

7.2 DNA 纯化

用 2 种试剂盒对上述提取的 DNA 进行纯化：采用商品化土壤 DNA 纯化柱（具腐殖酸去除功能），实验方法参照试剂盒说明书。测定纯化后的 DNA 浓度，并用琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量，同时以未用纯化试剂盒纯化的样品作对照。

试剂盒选型原则： 应选择适用于土壤等复杂基质、具有腐殖酸和多酚去除能力、DNA 回收率高、重复性好、低核酸吸附、无 DNase/RNase 污染的商品化土壤 DNA 纯化试剂盒。两种试剂盒宜采用不同纯化原理或不同品牌，并经过本实验室验证。

纯化效果判定指标： 纯化后 DNA 浓度应满足后续 PCR 和建库要求；OD260/280 宜为 1.8～2.0，OD260/230 宜≥1.8；琼脂糖凝胶电泳主带清晰，无明显弥散降解；qPCR 或 PCR 扩增效率宜为 80%～120%，或 Ct 值偏移≤1 个循环；加标回收率宜≥50%；同一样品平行纯化浓度和纯度变异系数宜≤20%；纯化空白对照应无目标扩增。两种试剂盒均符合要求时，优先选择回收率高、纯度好、抑制物去除效果佳、重复性好的试剂盒。

7.3 eDNA 提取效率验证

a) 每批次 DNA 提取应设置加标回收对照。向空白基质或低目标土壤样品中加入已知拷贝数的外源 DNA（如质粒 DNA、人工合成 DNA 片段或鲑鱼精 DNA），与待测样品同步提取。

b) 采用 qPCR 或数字 PCR 定量加标样品和未加标样品中外源 DNA 拷贝数，计算提取回收率：

回收率（%）=（加标样品实测拷贝数－未加标样品本底拷贝数）/ 添加拷贝数 × 100%。

c) 提取回收率宜不低于 50%，批内相对标准偏差宜≤25%。若回收率低于 50%或 RSD 过大，应排查提取过程、抑制物去除和试剂效率，必要时重新提取。

d) 每批次样品至少设置 1 个加标回收对照和 1 个提取空白对照；样品数量超过 20 个时，每 20 个样品至少设置 1 个加标回收对照。

e) 提取效率验证结果应记录并纳入结果报告。

8 PCR 扩增

使用不同的细菌、真菌和底栖无脊椎动物的通用引物对提取的土壤环境 DNA 进行 PCR 扩增，筛选到以下扩增效果较好的引物，引物序列及对应的 PCR 程序参见附录 B。

8.1 引物选择原则

应根据目标生物类群选择特异性好、覆盖度高、扩增效率稳定、经文献或本实验室验证的通用引物。推荐引物见附录 B。若使用附录 B 以外的引物，应提供引物序列、目标基因、退火温度、扩增片段长度、特异性验证及适用性说明。

8.2 不同类群引物选择

a) 细菌：宜选用 16S rDNA V3～V4 区通用引物，如 515F/806R，退火温度 55℃～58℃。

b) 真菌：宜选用 ITS 区通用引物，如 fITS7/ITS2R，退火温度 52℃～55℃。

c) 脊椎动物：宜选用 12S rDNA 通用引物，如 12S-V5-F/12S-V5-R，退火温度 54℃～58℃。

d) 无脊椎动物：宜选用 COI 基因通用简并引物，如 Fol-degen-for/Fol-degen-rev，退火温度 54℃～56℃

8.3 扩增与判定

同批次样品应采用相同的引物、聚合酶、模板量和 PCR 程序。PCR 反应体系总体积宜为 20 μL～50 μL，典型体系如下：高保真热启动 DNA 聚合酶按说明书推荐量，PCR 缓冲液 1×，dNTP 混合液 0.2 mmol/L，Mg^{2+} 1.5～4.0 mmol/L，上、下游引物各 0.2～0.5 μmol/L，DNA 模板 1～10 ng，无核酸酶水补足至总体积。

PCR 循环程序宜为：95℃预变性 3～5 min；95℃变性 15～30 s，按附录 B 退火温度退火 30 s，72℃延伸 30～60 s，共 25～35 个循环；72℃终延伸 5～10 min；4℃保存。退火温度按附录 B 执行，实际退火温度应根据引物、聚合酶、PCR 仪和模板条件优化确定。

每份 DNA 样品应设置不少于 3 个 PCR 技术重复。≥2 个平行出现特异性目标条带判定为扩增阳性；仅 1 个平行阳性时应重新扩增。阴性对照应无特异性扩增条带；阳性对照应出现清晰目标条带。

8.4 PCR 产物检测与纯化

PCR 产物应采用琼脂糖凝胶电泳检测目标条带大小和特异性。目标条带清晰、无明显非特异性扩增时，方可进行纯化。纯化可采用商品化 PCR 产物纯化试剂盒或磁珠法，按说明书操作。纯化后应测定 DNA 浓度，并进行琼脂糖凝胶电泳检测。阴性对照应无目标条带；阳性对照应出现清晰目标条带。

8.5 文库构建

纯化后的 PCR 产物应进行文库构建。文库构建应包括末端修复、接头连接、索引添加、文库纯化和文库定量等步骤。不同样品应使用不同索引标签，避免样品间交叉污染。文库浓度和片段大小应满足测序平台要求，文库合格后方可上机测序。

8.6 测序平台与读长

宜采用高通量测序平台，如 Illumina、MGI 等平台。测序策略宜采用双端测序，读长宜为 2×250 bp 或 2×300 bp；若目标片段较短，也可采用 2×150 bp。

8.7 最低测序数据量

细菌 16S 宜≥20,000 条有效序列/样品；真菌 ITS 宜≥10,000 条有效序列/样品；脊椎动物 12S 和无脊椎动物 COI 宜≥5,000 条有效序列/样品。若需高分辨率群落分析，应适当增加测序数据量。阴性对照有效序列数应低于样品中位数的 1%或≤100 条；阳性对照应检出目标物种。

8.8 引物与参数执行

引物序列、退火温度和扩增片段长度见附录 B；PCR 反应体系、循环程序、产物纯化、文库构建、测序平台、读长及最低测序数据量按本章执行。

9 结果分析

9.1 生物信息学分析

9.1.1 序列处理

下机原始测序数据经平台配套软件完成样本拆分，去除 Barcode 及引物序列，获得原始 reads。对原始序列开展质控过滤，截断尾部质量值 20 以下碱基，设置 10 bp 滑动窗口并剔除窗口平均质量低于 20 的区域，过滤质控后长度不足 50 bp、含 N 碱基及低质量碱基占比

较高的序列；基于双端序列重叠关系完成序列拼接，最小重叠长度 10 bp，重叠区最大错配率设为 0.2。剔除拼接过短、存在错配的无效序列，完成序列质控与预处理，用于后续 OTU 聚类分析。原始数据 Q20 宜≥90%，Q30 宜≥80%；拼接后应去除嵌合体；每样品有效序列数宜满足：细菌≥20,000 条，真菌≥10,000 条，12S/COI≥5,000 条；阴性对照有效序列数应低于样品中位数的 1%或≤100 条；阳性对照应检出目标物种。

9.1.2 OTU 聚类

对所有优化测序序列提取非重复序列，有效减少数据分析过程中的冗余计算量；随后剔除序列丰度为 1 的单序列（Singletons），该类单序列多由测序随机误差、PCR 点突变及嵌合体等干扰因素产生，有效剔除后可大幅降低数据分析的假阳性率与误差干扰，仅保留丰度≥2 的有效序列用于后续分析；进一步基于 97%的序列相似性阈值对筛选后的非重复序列开展 OTU 聚类分析，并在聚类过程中去除嵌合体序列，最终获得各 OTU 的代表性序列；最后将全部优化序列比对映射至 OTU 代表序列，构建得到最终的 OTU 丰度表格。97%相似性用于 OTU 聚类以生成分子分类单元；各标记的物种级注释阈值按 9.1.3 分别执行，不得统一采用 97%作为物种级注释阈值。

9.1.3 物种注释

将每个 OTU 的代表性序列与本地 DNA 条形码数据库或公开数据库进行比对分析，获得物种注释信息。不同目标标记的数据库、相似性阈值、分类等级和报告原则应分别执行，不得统一采用同一套规则。数据库版本应记录并在报告中说明。

① 16S rDNA（细菌）

a) 数据库：宜使用 SILVA、RDP 或 Greengenes 数据库。

b) 相似性阈值：属水平宜采用≥97%，种水平宜采用≥98.5%～99%；低于属水平阈值

但≥90%的序列可注释至科或目水平。

c) 去嵌合体：聚类过程中应去除嵌合体。

d) 非目标序列处理：剔除注释为古菌、真核生物或未分类的 OTU。

e) 报告原则：结果报告至属水平为主，种水平注释需标注“疑似种”或“种水平参考”，不得直接等同于活体细菌物种计数。

② ITS（真菌）

a) 数据库：宜使用 UNITE 数据库。

b) 相似性阈值：因真菌种间变异较大，属水平阈值应因类群调整，宜为≥95%～97%；种水平宜采用≥98%～99%。对酵母等变异较大的类群，应放宽属水平阈值或仅报告至科/目。

c) 去嵌合体：应去除嵌合体。

d) 非目标序列处理：剔除注释为非真菌真核生物、植物或未分类的 OTU。

e) 报告原则：优先报告至属或科水平；种水平注释需经人工校验，对无法确定到种的 OTU 保留“Unidentified sp.”并记录最高可信分类等级。

③ COI（无脊椎动物）

a) 数据库：宜使用 BOLD 数据库，可辅以 NCBI GenBank。

b) 相似性阈值：宜采用分级阈值——种水平≥97%，属水平≥95%，科水平≥90%，目水平≥85%，低于 80%的序列不纳入报告。

c) 去嵌合体：应去除嵌合体。

d) 非目标序列处理：剔除注释为脊椎动物、植物和真菌的 OTU；保留后生动物无脊椎类群。

e) 报告原则：结果报告至科或属水平；种水平注释需经 BOLD 或 GenBank 人工校验，并记录比对覆盖度和 identity 值。

④ 12S rDNA（脊椎动物）

a) 数据库：宜使用 NCBI GenBank、Mitofish 或本地校正的 12S 参考数据库。

b) 相似性阈值：种水平阈值因类群而异，鱼类宜采用≥98.3%，其他脊椎动物宜采用≥97%～99%；低于种水平阈值但≥95%的序列可注释至属。

c) 去嵌合体：应去除嵌合体。

d) 非目标序列处理：剔除注释为无脊椎动物、植物和真菌的 OTU；保留脊椎动物类群。

e) 报告原则：种水平结果需经人工校验；对数据库覆盖不足的类群，应报告至属或科水平，并在报告中说明数据库局限性。

9.2 结果统计

同批次样品的生物信息学分析流程与关键参数应保持一致，并完整留存记录。同一点位 3 个现场平行样品，仅保留在≥2 个平行中检出的物种，以平行共有物种作为该点位物种结果；结合监测目标设置物种丰度筛选阈值，物种相对序列丰度采用平行样品的几何平均值。

细菌、真菌、脊椎动物和无脊椎动物 eDNA 监测结果记录表应包含：序列编号、代表性序列、序列条数、相对序列丰度、物种分类信息、覆盖度、序列相似值。

10 质量控制

10.1 样品采集与保存

a) 平行样设置：每一个采样点位应采集不少于 3 份独立土壤平行样品，样品间采样间隔满足土壤环境监测技术规范 HJ/T 166，用于评估采样重复性。

b) 空白对照设置：每一批次样品设置至少 1 个采样空白对照，使用灭菌无 DNA 残留的石英砂代替土壤样品，与野外样品同步开展全部实验流程，用于识别野外采样、转运过程引入的外源 DNA 污染。

c) 采样器具防污染：采样铲、土钻、样品盒等器具使用前做去污消毒；不同点位采样之间必须对工具进行消毒处理，避免点位之间交叉污染；优先使用一次性无 DNA 酶耗材。

d) 样品保存运输：土壤样品采集后尽快低温冷藏转运；若不能立即开展前处理，样品应-20 ℃保存；长期保存置于-80 ℃，严格控制冻融次数，冻融不宜超过 3 次，防止 eDNA 降解。

e) 现场记录：完整记录采样点位坐标、采样时间、土壤类型、土层深度、温度、湿度、周边环境扰动等信息，留存原始记录。

10.2 样品前处理质量控制

a) 器具消毒：研磨、筛分、离心等所用器具进行严格灭菌消毒；重复使用器具采用有效氯 0.5%～1%的次氯酸钠消毒液浸泡，超纯水充分冲洗烘干；剪刀、镊子使用 75%乙醇擦拭、超纯水浸洗烘干。离心管等塑料耗材采用高压蒸汽灭菌处理，优先选用一次性无 DNA 酶耗材。

b) 批次空白对照：每一批次样品设置 1 个前处理空白对照，无土壤基质，其余操作与待测样品完全一致，用于监控前处理过程试剂、器具带来的污染。

c) 样品处理操作：处理不同样品之间更换手套，必要时更换工具，防止样品交叉污染；操作在洁净环境开展，避免环境 DNA 气溶胶污染。

10.3 DNA 提取与纯化质量控制

a) 耗材与试剂：提取所用离心管、枪头等耗材需无 DNA 酶；试剂应当避免核酸污染；每批次提取设置提取空白对照。

b) DNA 质量指标

纯度：超微量紫外分光光度计检测，$OD_{260/280}$应在 1.8-2.0 之间，$OD_{260/230}$宜 ≥ 1.8；

完整性：琼脂糖凝胶电泳检测，主带清晰，无明显弥散降解条带。

c) DNA 保存：短期 4 ℃保存；一周以上-20 ℃保存；长期-80 ℃保存，避免反复冻融；-80 ℃条件下粗提 DNA 不宜超过 30 d，超期不建议继续使用。

10.4 PCR 扩增质量控制

10.4.1 模板与试剂：同批次样品 DNA 模板添加量保持一致；PCR 试剂避免核酸污染。

10.4.2 对照设置

a) 采样空白：以灭菌无 DNA 残留石英砂代替土壤样品，与野外样品同步完成采样、运输、保存，用于识别野外采样和转运过程引入的外源 DNA 污染。

b) 前处理空白：无土壤基质，其余前处理操作与待测样品一致，用于监控前处理过程试剂、器具带来的污染。

c) 提取空白：以无菌无核酸酶水代替土壤样品，与待测样品同步提取，用于监控提取过程污染。

d) 纯化空白：以无核酸酶水代替 DNA 粗提液，与待测样品同步纯化，用于监控纯化过程污染。

e) PCR 阴性对照：以灭菌超纯水为模板，同板同步扩增，应无特异性扩增条带；qPCR 阴性对照应无 Ct 值或 Ct 值大于规定阈值。

f) PCR 阳性对照：加入已知目标类群 DNA 模板，应出现清晰目标条带，验证扩增体系有效性。

10.4.3 不同目标类群阳性对照

a) 细菌：已知菌株 DNA 或含 16S rDNA 目标片段的质粒；

b) 真菌：已知真菌 DNA 或含 ITS 目标片段的质粒；

c) 脊椎动物：已知脊椎动物 DNA 或含 12S rDNA 目标片段的质粒；

d) 无脊椎动物：已知无脊椎动物 DNA 或含 COI 目标片段的质粒。

10.4.4 技术平行：每个待测 DNA 样品设置 ≥3 个 PCR 技术重复。

10.4.5 结果判定

a) ≥2 个平行出现特异性目标条带判定为扩增阳性；仅 1 个平行出现阳性条带，应重新开展 PCR 检测。

b) 阴性对照应无特异性扩增条带；若阴性对照出现扩增，应排查污染源并重新实验。

c) 阳性对照应出现清晰目标条带或 Ct 值符合预期；若阳性对照未扩增，应检查体系并重新实验。

10.4.6 PCR 产物保存：纯化后产物 4℃ 短期保存；长期 -20℃ 或 -80℃ 保存，规避反复冻融。

11 结果报告

报告至少包含以下内容：

a) 基本信息：项目名称、报告编号、采样点位、土壤类型、土层深度、土地利用方式、采样日期、样品编号、平行样组编号。

b) 方法信息：目标类群、标记基因、引物序列、退火温度、PCR 条件、测序平台、试剂盒、生物信息分析软件版本、数据库版本。

c) 质控结果：DNA 浓度与纯度、阴阳性对照结果、测序数据量、Q20/Q30、有效序列数、OTU 数。

d) 结果数据：物种注释表、相对序列丰度表、多样性指数、组间比较结果。

e) 数据可及性：原始数据提交号、附件清单。

f) 局限性说明：本方法输出为物种相对丰度，不等同于物种绝对数量；土壤 eDNA 同时包含死亡生物核酸，检测结果不能直接等同于活体微生物群落。

附录 A

（资料性）

环境 DNA 采样记录表

表 A.1 样品基本信息记录表

项目名称		记录人	
样品编号		平行样方编号	
样品编号与平行样对应关系			
土壤类型		采样日期	
采样时间		采样地点	
采样深度		重量	
GPS 坐标	经度(°)：_____ 纬度(°)：_____	土地利用方式	农田
天气描述		备注	

采样人: 记录人： 时间：

表 A.2 样品保存、运输和交接记录表

项目	记录内容	项目	记录内容
采集深度		平行样方数量	规定不少于 3 个；实际：_____
运输容器		采集重量（g）	
运输条件	□避光 □防挤压 □防积水 □防污染	冷源类型	□冰袋 □其他：_____
运输温度	规定 4 ℃±2 ℃；实测：_____ ℃	运输时间	宜≤48 h；实际：_____ h
是否冻结	□否 □是	到样时间	
到样状态		暂存条件	（4±2） ℃或-20 ℃、避光、通气
暂存时间	宜≤24 h；实际：_____ h	包装完整性	□完整 □破损 □泄漏
交接人员	移交：_____ 接收：_____	是否符合接收要求	□是 □否，原因：_____
异常情况		备注	

采样人： 记录人： 时间：

附录 B

（资料性）

土壤典型生物环境 DNA 监测引物信息

土壤典型生物环境 DNA 监测引物信息如表 B.1 所示，PCR 扩增程序参见正文第 8 章。

表 B.1 土壤典型生物环境 DNA 监测引物信息

目标类群	目标基因	引物名称	引物序列	退火温度/℃	扩增片段长度
细菌	16S	515F 806R	GTGYCAGCMGCCGCGGTAA GGACTACNVGGGTWTCTAAT	55~58	约 290 bp
真菌	ITS	fITS7 ITS2R	CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA GCTGCGTTCTTCATGATGC	52~55	约 200~400 bp
无脊椎动物	COI	Fol-degen-for Fol-degen-rev	TCNACNAAYCAYAARRAYATYGG TANACYTCNGGRTGNCNCCRAARAAYCA	54~56	约 300 bp
脊椎动物	12S	12S-V5-F 12S-V5-R	ACTGGGATTAGATACCCC TAGAACAGGCTCCTCTAG	54~58	约 100~200 bp

注：表中退火温度范围为推荐范围，实际退火温度应根据引物、DNA 聚合酶、PCR 仪型号及模板条件优化确定。同一引物对的两条引物退火温度应一致或接近，必要时可采用梯度 PCR 确定最适退火温度。扩增片段长度按参考序列估算，实际长度可能因物种差异而略有不同。

参考文献

[1] Kong, Y., Tian, J., Chai, Z., Li, S., and Yao, M. (2026) Soil eDNA biomonitoring: Assessing efficacy for detecting terrestrial vertebrate and plant biodiversity. *Environ Sci Technol* **60**: 18707–18722.

[2] Leray, M., Yang, J.Y., Meyer, C.P., Mills, S.C., Agudelo, N., Ranwez, V., et al. (2013) A new versatile primer set targeting a short fragment of the mitochondrial COI region for metabarcoding metazoan diversity: application for characterizing coral reef fish gut contents. *Front Zool* **10**: 34.

[3] Parada, A.E., Needham, D.M., and Fuhrman, J.A. (2016) Every base matters: assessing small subunit rRNA primers for marine microbiomes with mock communities, time series and global field samples. *Environ Microbiol* **18**: 1403–1414.

[4] Riaz, T., Shehzad, W., Viari, A., Pompanon, F., Taberlet, P., and Coissac, E. (2011) ecoPrimers: Inference of new DNA barcode markers from whole genome sequence analysis. *Nucleic Acids Res* **39**: e145.

[5] Zhu, D., Li, B., Ao, L., Liu, X., Zhang, M., Sun, G., et al. (2026) Cropping alfalfa for 18 years increases importance of fungi in multi-kingdom networks in saline-alkali soils. *Pedosphere* **36**: 802–817.

[6] Horton, D.J., Kershner, M.W., and Blackwood, C.B. (2017) Suitability of PCR primers for characterizing invertebrate communities from soil and leaf litter targeting metazoan 18S ribosomal or cytochrome oxidase I (COI) genes. European Journal of Soil Biology 80: 43–48.

[7] DB32/T 4539-2023 淡水生物 环境 DNA 监测技术方法

[8] T/CSES 81-2023 淡水生物监测 环境 DNA 宏条形码法

[9] GB/T 41689-2022 土壤质量 土壤样品直接提取 DNA 的方法

[10] GB/T 40226-2021 环境微生物宏基因组检测 高通量测序法