

上海市环境科学学会

关于《基于环境 DNA 技术的水生入侵物种 RPA 快速检测方法》团体标准公开征求意见的函

各有关单位及专家：

由上海市环境科学学会组织编制的团体标准《基于环境 DNA 技术的水生入侵物种 RPA 快速检测方法》已形成征求意见稿。按照《上海市环境科学学会团体标准管理办法》的有关要求，现公开征求意见。请于 2024 年 12 月 11 日前将《征求意见回复表》反馈至上海市环境科学学会。

联系人：宋老师

电 话：021-64756391

邮 箱：shanghaissese@126.com

附件：1.征求意见稿文件

2.编制说明

3.征求意见回复表



T/XXXX XXXX-2024

团 体 标 准

T/XXXX XXXX-2024

基于环境 DNA 技术的水生入侵物种 RPA 快速
检测方法

Rapid Detection Method for Aquatic Invasive Species Based on
Environmental DNA Technology and Recombinase Polymerase
Amplification (RPA)

(征求意见稿)

2024-XX-XX 发布

2024-XX-XX 实施

上海市环境科学学会

发布

目 次

前 言	III
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义、缩略语	1
3.1 术语和定义.....	1
3.2 缩略语.....	3
4 技术原理	3
5 检测用引物和探针	3
6 试剂	4
7 仪器设备	4
8 检测步骤	5
8.1 样品采集.....	5
8.2 DNA 提取.....	5
8.3 LFD-RPA 检测.....	5
8.4 试验对照的设置.....	6
9 质量控制	6
10 结果判定及表述	6
10.1 结果判定.....	6
10.2 结果表述.....	6
附录 A.....	7
(资料性附录)	7
水生入侵物种基因扩增靶标序列	7

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》有关规定起草。

请注意本文件的某些内容涉及以下专利的使用：

专利1：

- 专利编号：CN202311710128.2
- 专利名称：基于RPA技术现场检测巴西龟的引物探针组合、试剂盒及方法
- 专利权人：上海海洋大学

专利2：

- 专利编号：CN202311710130.X
- 专利名称：基于RPA技术现场检测齐氏罗非鱼的引物探针组合、试剂盒及方法
- 专利权人：上海海洋大学

专利3：

- 专利编号：CN202311710137.1
- 专利名称：基于RPA技术现场检测食蚊鱼的引物探针组合、试剂盒及方法
- 专利权人：上海海洋大学

专利4：

- 专利编号：CN202410696497.9
- 专利名称：塔玛亚历山大藻RPA检测试剂盒和RPA-LFD检测系统及检测方法
- 专利权人：中国水产科学研究院东海水产研究所

本文件的发布机构对于该专利的真实性、有效性和范围无任何立场。专利持有人已向本文件的发布机构承诺，他愿意同任何申请人在合理且无歧视的条款和条件下，就专利授权许可进行谈判。该专利持有人的声明已在本文件的发布机构备案。相关信息可以通过以下联系方式获得：

专利持有人姓名：李晨虹等

地址：上海市浦东新区沪城环路999号

请注意，除上述专利外，本文件的某些内容仍可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由上海市环境科学学会提出并归口。

本文件主要起草单位：上海海洋大学、上海市环境科学研究院、中国水产科学研究院东海水产研究所、中国海洋大学。

本文件参与起草单位：江西省水产科学研究所（鄱阳湖渔业研究中心、江西省渔业资源生态环境监测中心）、上海之江生物科技股份有限公司。

本文件主要起草人：李晨虹、谭娟、张秋灏、王敏、康伟、王辉、李强、王玮。

基于环境DNA的水生入侵物种RPA快速检测方法

1 范围

本文件规定了利用RPA技术检测水生入侵物种齐氏罗非鱼（*Coptodon zillii*）、食蚊鱼（*Gambusia affinis*）、红耳彩龟（*Trachemys scripta elegans*）和塔玛亚历山大藻（*Alexandrium tamarense*）的技术方法

本文件适用于生态环境监测领域湖泊、水库、溪流、河流、河口、海洋等水域上述水生入侵物种的RPA检测。

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 19489 实验室 生物安全通用要求

GB/T 20001.4 标准编写规则 第4部分：试验方法标准

GB/T 29859 生物信息学术语

GB/T 37874 核酸提取纯化方法评价通则

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

HJ 494 水质采样技术指导

HJ 1295-2023 水生态监测技术指南河流水生生物监测与评价（试行）

HJ 1296-2023 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）

DB11/T 2023-2022 鱼类贝类环境DNA识别技术规范

T/CSES 80-2023 淡水生物DNA条形码构建技术规程

T/CSES 81-2023 淡水生物监测 环境DNA宏条形码法

T/CSES 82—2023 基于环境DNA的淡水生物评价技术指南

DB32/T 4539-2023 淡水生物环境DNA监测技术方法

3 术语和定义、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)

指环境介质（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）。

3.1.2

水生入侵物种 (Aquatic Invasive Species)

已经引入或进入境内水体，并因繁殖、逃逸、外泄、扩散等原因在野外形成了稳定的种群，对水体自然生态、人体健康、农业生产建设或水生生物多样性造成侵害的外来物种。

3.1.3

重组酶聚合酶等温扩增技术 (Recombinase Polymerase Amplification, RPA)

利用重组酶与寡核苷酸引物形成重组酶-引物复合物，该复合物在双链 DNA 中寻找同源序列，定位至同源靶序列后，重组酶解开双链结构，并促使引物与模板进行链交换，同时，单链结合蛋白结合到被置换出的单链 DNA 上，防止 DNA 单链再次复性为双链，随后，重组酶解离暴露出引物的 3'端，DNA 聚合酶结合至引物上，启动 DAN 扩增，整个过程反复进行，实现目的 DNA 序列在常温下的指数级扩增。

3.1.4

重组聚合酶等温扩增-侧流层析试纸条检测技术 (recombinase polymerase amplification-lateral flow dipstick , RPA-LFD)

RPA-LFD 检测技术是基于 RPA 基础反应体系加入一个核酸外切酶 IV (Endonuclease IV, NFO)和探针。探针长 46-52 bp，5'端标记羧基荧光素 (Carboxyfluorescein, FAM)，中间一个碱基被四氢呋喃残基 (Tetrahydrofuran abasic-site mimic, THF) 所替换，3'端磷酸化处理，使其附有 DNA 聚合酶延伸阻断基团。探针与正向引物的方向相同，可以重叠这条引物的 3'端序列。另一条与探针方向相反的引物在 5'端用生物素标记为抗原标签。在 RPA 反应过程中，扩增产物与被荧光基团标记的特异性探针杂交，核酸外切酶 nfo 切开探针上的 THF 位点，产生一个新的 3'羟基末端，以此作为 DNA 聚合酶的延伸位点，此时，探针相当于“引物”，与另一条 5'端添加生物素标签的引物组成一对扩增引物，形成带有探针荧光基团 FAM 与生物素的双标记扩增子。

RPA 扩增产物利用侧流层析试纸条技术进行检测。具体反应过程为：含有荧光基团 FAM 和生物素双标签的 DNA 分子与胶体金标记的 FAM 的抗体特异性结合，形成二元复合物，随着反应混合液在毛细管作用力下向前移动。当该复合物到检测线 (T 线) 时，它们的生物素基团可与被喷印在 T 线上的生物素抗体结合，由于胶体金大量聚集而显红色；剩下的金标抗体继续随溶液向前扩散到达质控线 (C 线) 时，被质控线 (C 线) 上的二级抗 FAM 抗体捕获，显示红色，表明 LFD 的有效性。

3.1.5

线粒体 DNA (mitochondrial DNA, mtDNA)

线粒体中的遗传物质，呈双链闭环结构，存在于线粒体的基质内或依附于线粒体内膜。

3.1.6

引物 (Primer)

在 DNA 复制过程中，结合于模板链上并提供 DNA 合成起点，具有一定长度和顺序的寡核苷酸链。

3.1.7

探针 (Probe)

一小段单链 DNA 或者 RNA 片段，用于检测与其互补的核酸序列。

3.2 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

FAM: 羧基荧光素 (Carboxyfluorescein)

THF: 四氢呋喃残基 (Tetrahydrofuran)

Taq DNA 聚合酶: 耐热 DNA 聚合酶 (Taq DNA polymerase)

RPA: 重组酶聚合酶等温扩增技术 (Recombinase Polymerase Amplification)

LFD: 测流层析试纸条检测技术 (Lateral Flow Dipstick)

mtDNA: 线粒体 DNA (mitochondrial DNA)

eDNA: 环境 DNA (environmental DNA)

NADH: 还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (Nicotinamide Adenine Dinucleotide)

ITS: 内部转录间隔区 (Internal transcriptional spacer)

4 技术原理

本方法联合重组聚合酶等温扩增技RPA与侧向流动试纸条LFD 技术。RPA技术利用重组酶和聚合酶在恒温条件下对特定DNA序列进行快速扩增。LFD技术则是一种侧向流动的试纸条，是以纳米胶体金颗粒作为信号标签的纸基即时检测装置，可以直观地显示检测结果。将LFD与RPA技术联合使用，可在较短时间内对扩增产物进行目视检测。

5 检测用引物和探针

本技术规范选定的水生入侵物种为红耳彩龟 (*Trachemys scripta elegans*)、食蚊鱼 (*Gambusia affinis*)、齐氏罗非鱼 (*Coptodon zillii*)和塔玛亚历山大藻 (*Alexandrium tamarense*)，各物种特异性引物和探针序列见表 1。

表 1 引物探针序列

组别	名称	序列	基因来源
红耳彩龟	上游引物 下游引物 探针	GCCCCTATCAATCAATTTAACCACGTAGCAT TGTATGTTATTCGTTTGGATTTTAGTGGAGTTTCA 5'-6-FAM-TATTGTCCTAGTTCAATGATGGCTACTGTT/dSpacer/TAAAATTAACCCACAA-C3 Spacer-3'	线粒体 NADH dehydrogenase subunit 5~NADH dehydrogenase subunit 6
	上游引物 下游引物 探针	CGACAAATTCTTTAAATACCTACTAATCTTCC TTTAATGAGTTTGTGTTTTGAAATGAGTCAGACC 5'-6-FAM-GATGGTGACGCGGCCGAGAAGATACACTCG/dSpacer/CATCAGCCTTAATAGC-C3 Spacer-3'	线粒体 NADH dehydrogenase subunit 5
食蚊鱼	上游引物 下游引物 探针	TGAAGCTACGAATACACAGACTATGAAGACTTAAA GTCCTGGCACTGCGTCTATTTGATTCCGAGGGAG 5'-6-FAM-TTCGACTCATATATAGTCCCCACCCAAGAA/dSpacer/CTCACCCCTGGCCAAT-C3 Spacer-3'	线粒体 cytochrome oxidase subunit II
	上游引物 下游引物 探针	AACTATTCTTTGACCGGACTCTGCCCCCTAAAGG AATGAGAGTTATGATAGGACAATTCAATTTTCGTCATTCG ACTCA5'-6-FAM-TAAAATAGTGTATCCCTACATTAATGA AAT/dSpacer/TTCAAATTTGTAGGA-C3 Spacer-3'	线粒体 tRNA-Thr ~ control region
齐氏罗非鱼	上游引物 下游引物 探针	5'-CCTACTTGTACAAAGAAACATGAAACATTGGGGTG-3' 5'-TGCGTTATCTACAGAGAAGCCCCCTCAGATTCACT-3' 5'-6-FAM-CATCTCCACAGCCTTCTCCTCCGTGGCCCAT/dSpacer/ATCTGCCGAGATGTA-C3 Spacer-3'	线粒体 cytochrome b
塔玛亚历山大藻	上游引物 下游引物 探针	5'-TTGGGATATTCTTGAAGGTTTGCTTGGTTT-3' 5'-GCGGGTTTATGTGCTTCACCTCAGCCTTAG-3' 5'-ATGGTTTCGTGGGGCAGACCTGTTTCGTCA[FAM-dT][THF][BHQ1-dT]GATGGTTGATATTT-C3 Spacer-3'	核糖体 ITS 区

6 试剂

- 6.1 Chelex-100溶液，生化试剂（BC），浓度（10%）。
- 6.2 蛋白酶K溶液，生物试剂（BR），浓度（20mg/mL）。
- 6.3 DNA恒速扩增试剂盒（胶体金试纸条型）。
- 6.4 无菌无酶水，生化试剂（BC）。
- 6.5 氯化镁溶液，生化试剂（BC），浓度（25mM）。
- 6.6 引物，生物试剂（BR），浓度（100 μM）。
- 6.7 探针，生物试剂（BR），浓度（100 μM）。

7 仪器设备

- 7.1 金属浴锅（4~100℃）

- 7.2 便携式离心机（0-2500rpm）
- 7.3 便携式涡旋仪（1000-3500rpm）
- 7.4 移液器（量程 0.1 μL~ 2.5 μL, 2 μL~ 20 μL, 10 μL~ 100 μL 和 100 μL~1 000 μL）
- 7.5 采水器（2L）
- 7.6 水样抽滤设备（80W）

8 检测步骤

8.1 样品采集

水样抽提：利用0.45μm孔径的混合纤维素脂膜进行水样过滤，水样过滤体积至少为500ml，过滤后将滤膜放至灭菌离心管。水样过滤时设阴性对照（见8.4 试验对照的设置）。

8.2 DNA提取

将滤膜剪碎，然后在离心管中加入500uL 浓度为10%的chelex-100溶液，20uL 蛋白酶K溶液，用便携式金属浴锅56°C孵育10分钟，再将金属浴锅温度调整至99°C（从升温到99°C的过程保持15分钟），再用便携式小离心机离心10分钟，离心后取上清液进行下一步实验。

8.3 LFD-RPA检测

8.3.1 扩增反应体系：

使用恒温扩增试剂盒配置扩增反应体系。

红耳彩龟、食蚊鱼和齐氏罗非鱼的 RPA 反应体系总体积 50μL，包括，荧光基础缓冲液 29.4μL、无菌无酶水 11.5μL、10μM 的上下游引物各 2μL、10μM 的探针 0.6μL、10μM 的氯化镁溶液 2.5μL，以及待测样品 DNA2μL。

塔玛亚历山大藻的 RPA 反应体系总体积 50μL，包括，荧光基础缓冲液 29.5μL、无菌无酶水 10.7μL、乙酸镁 2.5μL、10μM 的上下游引物各 2.1μL、10μM 的探针 0.6μL、10μM 的氯化镁溶液 2.5μL，以及待测样品 DNA2.5 μL。

8.3.2 反应条件：

红耳彩龟、食蚊鱼和齐氏罗非鱼的 RPA 反应条件为：将混合后的体系涡旋离心，38°C金属浴孵育 4min 后，取出反应体系涡旋离心 30s 后再放入 38°C金属浴继续反应 8min。

塔玛亚历山大藻的 RPA 反应条件为：将混合后的体系涡旋离心，40°C金属浴孵育 4min 后，取出反应体系涡旋离心 30s 后再放入 40°C金属浴继续反应 11min。

8.3.3 LFD检测：

反应结束后，吸取反应液 10 μ L 并加入 190 μ L 无菌去离子水后涡旋离心，混匀后吸取 50 μ L 稀释液滴加在带有抗 FAM 和 Biotin 标记的 LFD 试纸条进行检测。

8.4 试验对照的设置

检测过程中分别设阳性对照、阴性对照和空白对照。

- a) 阳性对照：含入侵物种成分的样品或含有扩增目的片段的阳性质粒；
- b) 阴性对照：不含入侵物种成分的样品；
- c) 空白对照：无菌无酶水。

9 质量控制

以下条件有任一不满足时，实验视为无效：

- 9.1 空白对照：检测线未显示条带，质控线显示条带
- 9.2 阴性对照：检测线未显示条带，质控线显示条带
- 9.3 阳性对照：检测线和质控线都显示条带

10 结果判定及表述

10.1 结果判定

在符合第 9 章的情况下，检测结果按以下进行判定：

当检测线和质控线都显示条带，则结果为阳性；若检测线未显示条带，质控线显示条带，则结果为阴性；若质控线未显示条带，则检测无效。

10.2 结果表述

10.2.1 结果为阳性者，表述为“检出×××（目标物种）”。

10.2.2 结果为阴性者，表述为“未检出×××（目标物种）”。

附录 A
(资料性附录)
水生入侵物种基因扩增靶标序列

红耳彩龟扩增靶标参考序列 (GenBank: NC_011573.1) :

GCCCCTATCAATCAATTTAACCACGTAGCATAAATAATCATAATTAAGAGAGGACGTTTATT
GTCCTAGTTCAATGATGGCTACTGTTTAAAATTAACCCACAACATCTAACCCCTAATAGAAT
GCAACGTCCACAAGACAAGCCTCGAACCATCTCCAGCACAACAAATAATGTTAACACA
ACCCTCAACCAGAAATCAAAAACATCACACTACCATAATAATAAAACCATGAAACTCCACT
AAAATCCAAACGAATAACATACA

红耳彩龟扩增靶标参考序列 (GenBank: NC_011573.1) :

CGACAAATTCCTTAAATACCTACTAATCTTCCTAATAGCCATAATAATTTAATCACATCTAA
CAATCTATTCCAATTTTTTCATTGGCTGGGAAGGAGTAGGAATCATATCCTTCTTACTCATTGG
ATGGTGACGCGGCCGAGAAGATACACTCGCATCAGCCTTAATAGC

食蚊鱼扩增靶标参考序列 (GenBank: NC 004388.1) :

TGAAGCTACGAATACACAGACTATGAAGACTTAACTTCGACTCATATATAGTCCCCACCC
AAGAACTCACCCCTGGCCAATTTGACTACTAGAAACAGATCACCGCATGGTAGTCCCCCT
AGAATCCCCTATTCGTGTCTTAATCTCTGCTGATGACGTCCTCCACTCCTGAGCAGTTCCT
CCCTCGGAATC

食蚊鱼扩增靶标参考序列 (GenBank: NC 004388.1) :

AACTATTCTTTGACCGGACTCTGCCCCCTAAAGGACATGTATGTATTATCCCCATTAATC
TATTTTAACCATTTAAAATAGTGTATCCCTACATTAATGAAATTTCAAATTGTAGGAATT
TAATAACATTAACATATCAAATAATCAATAAGGTAGACAAAACCACTATATTAATTAAT
CCAACACTCCTGTAAATAACATGACGAAATTGAATTGTCCTATC

齐氏罗非鱼扩增靶标参考序列 (GenBank: NC 026110.1) :

CCTACTTGACAAAGAAACATGAAACATTGGGGTGATCCTCCTCCTGACCATAATAAC
AGCCTTCGTGGGCTACGTCTTCCCTGAGGACAAATATCATTCTGAGGTGCAACCGTCATC
ACAAATCTTCTCTCTGCAGTTCCTACATCGGCAACTCTCTAGTCCAGTGAATCTGAGGGG
GCTTCTCTGTAGATAACGCA

塔玛亚历山大藻扩增靶标参考序列 (GenBank: [KX599346.1](#)) :

TGTTGTGAACAATAAAGGTCAATGTTTTGCATTGAACCTGGATGTCATACAGTTGTTTACAA
CCTAAACATGGTTTTCGTGGGGCAGACCTGTTTCGTCAATTTGATGGTTGATATTTGTAAATGT
GCACAACCTGGGACAAGCTGAAGACTTGCATATGCTAAGCGTGAAGTGAAGCACATAAAC
CGCTGAACCTTA

《基于环境 DNA 技术的水生入侵物种
RPA 快速检测方法》
团体标准编制说明

目 录

一、 工作背景.....	1
1.1 任务背景.....	1
1.2 任务来源.....	3
二、 标准编制的必要性.....	3
2.1 适应新形势下全球生物多样性保护的要求.....	3
2.2 落实国家相关法律法规和文件的要求.....	4
2.3 健全外来入侵物种监测预警体系的现实需求.....	5
三、 编制过程.....	6
3.1 成立编制组（2023年6月）.....	6
3.2 理论研究（2023年6月-7月）.....	7
3.3 调研/实验研究，草案编制（2023年7月-2024年3月）.....	8
3.4 立项论证，征求意见稿编制（2024年4月-2024年10月）.....	8
四、 标准主要条文依据.....	9
五、 主要试行结果.....	10
六、 与相关标准的关系分析.....	10
七、 重大分歧或重难点的处理经过和依据.....	11
八、 标准推广应用措施及预期效果.....	11

一、工作背景

1.1 任务背景

生物多样性是人类赖以生存和发展的基础，是地球生命共同体的血脉和根基。中国是世界上生物多样性最丰富的国家之一，同时也是生物多样性受威胁最严重的国家之一。近些年，随着生物资源开发利用活动和前沿生物技术的发展，涉及生物安全的动植物和微生物遗传资源流失、外来物种入侵等问题日益凸显，由生物因素引发的各类安全威胁呈现出复杂性、多样化特点，对我国生物多样性保护、生态安全及生物安全构成重大威胁。外来入侵物种防控形势不容乐观。我国是全球遭受生物入侵威胁最大和损失最严重的国家之一，目前已发现 600 多种外来入侵物种，其中在我国已产生严重危害的外来入侵物种至少已达 283 种，世界自然保护联盟 (IUCN) 公布的全球 100 种最具威胁的外来入侵物种中，我国就有 50 种，对我国生物多样性、农林牧渔业生产造成严重影响。

党的二十大报告明确指出“加强生物安全管理，防治外来物种侵害”。2022 年 8 月 1 日，农业农村部、自然资源部、生态环境部和海关总署四部门联合公布的《外来入侵物种管理办法》正式实施。为有效防范和应对外来物种入侵，切实推进生物多样性保护工作，全面维护生态安全，国家及各部委相关规划文件均提出加强外来入侵物种普查和监测预警，持续提升综合治理能力与防控管理水平。明确要求建立外来物种入侵风险评估制度和监测预警体系，合理布局外来入侵物种监测站点，依托现有监测网络，优化监测站（点）布局形成系统性网络，加强重点物种发生区域和入侵高风险区域监测，努力做到早发现、早应对，探索利

用卫星遥感、物联网、环境 DNA 等技术进行调查监测，提升外来入侵物种动态监测预警能力。

研究表明，系统地构建并应用早期监测预警技术是防控水生生态系统生物入侵最有效的途径。和陆生生物相比，水生生物群落的物种繁多、群落结构复杂、生物形体微小且在入侵初期群体规模极小、隐匿于水下、可用于物种鉴定的外部形态缺乏，使得在水生生态系统中构建并应用早期监测和预警体系在技术层面更具挑战。水生生物鉴定的传统手段依赖于显微镜或流式细胞技术，该方法工作量大，无法满足快速大量监测的需求，且灵敏度低，难以监测和识别数量庞大的稀有生物区系。此外，采样方式和物种自身形态特征也对水生生物物种鉴定工作产生了较大影响。这些因素直接影响了基于形态的水生入侵物种鉴定的准确度和效率，因此亟需建立集快速精确、高灵敏度、高分辨率于一体的检测方法。环境 DNA 技术具有检测灵敏度高、耗时短、成本低、通量高等优势，成为鉴定外来水生入侵物种的强有力工具，在复杂群落稀有种的监测方面优势明显，具有极大的应用前景，为水生生态系统入侵生物的早期监测预警系统的建立提供了条件。

综上所述，开发基于环境 DNA 的水生入侵物种特异性分子检测技术，建立水生入侵物种快速检测技术团体标准，有助于实现入侵物种早期精准高精度监测，促进生物入侵由被动性防控向自动监测和主动发现转变，有助于健全我国外来生物入侵防控体系，保障国家生物安全战略的健康快速发展。

1.2 任务来源

本标准由上海环境科学学会提出并归口。

二、标准编制的必要性

2.1 适应新形势下全球生物多样性保护的要求

生物多样性保护是当今国际社会最为瞩目的重大环境问题之一，开启全球生物多样性治理新征程，是国际社会的热切期盼。目前，全球面临着生物多样性丧失加速和生态系统退化的严峻挑战，在2011—2020年全球生物多样性目标（“爱知目标”）中，20个目标只有6个目标部分实现。生物安全是维护生物多样性的基础，外来物种经自然或人为的途径从境外传入，经过定殖、潜伏、扩散和爆发等过程破坏生态系统及栖息生境从而给本地物种带来严重威胁或危害，是造成生物多样性丧失的重要原因。我国把生物安全纳入国家安全体系，颁布实施《生物安全法》，持续加强外来物种入侵防范。

外来水生生物的科学利用极大地促进了全球渔业和经济发展，但盲目引种和不规范养殖、丢弃、放生等原因所导致的部分外来水生生物的入侵，又对全球粮食安全和生态安全构成了严重威胁。国家高度重视外来入侵物种防控工作，党的二十大报告明确提出了“加强生物安全管理，防治外来物种侵害”。外来水生生物作为一个独特的类群，由于其特殊的生境类型和生活史特征，一直都是研究的盲区。通过早期监测预警从源头上阻止外来物种进入自然水域是降低防控成本的有效手段。随着全球各区域外来物种入侵数量的急剧上升和其负面影响的不断扩大，人们已经意识到加强入侵物种的早期识别对保护生物多样性和生态系统安全至关重要。鉴于eDNA技术在入侵

物种早期识别方面的优势，将eDNA技术与传统监测方法结合，建立健全的应急防控机制与反应体系是未来外来物种监管与防控工作的一个发展趋势。

2.2 落实国家相关法律法规和文件的要求

2018年3月，生态环境部会同农业农村部、水利部制订了《重点流域水生生物多样性保护方案》。方案明确了开展重点流域水生生物调查观测的重点任务，在流域干流、重要支流和附属水体，调查鱼类、水生哺乳动物、底栖动物、水生植物、浮游生物等物种的组成、分布和种群数量。建立水生生物多样性观测网络，掌握重要水生生物动态变化情况。强化外来物种入侵防治，定期评估入侵状况，建立外来物种入侵防控预警体系。

2020年10月，第十三届全国人民代表大会常务委员会第二十二次会议通过《中华人民共和国生物安全法》。法律明确了国家建立生物安全风险监测预警制度，国家生物安全工作协调机制组织建立国家生物安全风险监测预警体系，提高生物安全风险识别和分析能力。国家建立生物安全风险调查评估制度。国家生物安全工作协调机制应当根据风险监测的数据、资料等信息定期组织开展生物安全风险调查评估。

2020年12月，第十三届全国人民代表大会常务委员会第二十四次会议通过《中华人民共和国长江保护法》。法律明确了国务院野生动物保护主管部门应当每十年组织一次野生动物及其栖息地状况普查，或者根据需要组织开展专项调查，建立野生动物资源档案，并向社会公布长江流域野生动物资源状况。禁止在长江流域开放水域养殖、投放外来物种或者其他非本地物种种质资源。

2021年1月，经国务院同意，农业农村部 自然资源部 生态环境部 海

关总署国家林草局联合印发《进一步加强外来物种入侵防控工作方案》。该工作方案明确提出开展外来入侵物种普查和监测预警。依托国土空间基础信息平台等构建监测预警网络，在边境地区及主要入境口岸、粮食主产区、自然保护区等重点区域，以农作物重大病虫、林草外来有害生物为重点，布设监测站（点），组织开展常态化监测。

2021年10月，中共中央办公厅 国务院办公厅印发《关于进一步加强生物多样性保护的意見》。意見指出持续提升外来入侵物种防控管理水平。开展外来入侵物种普查，加强农田、渔业水域、森林、草原、湿地、近岸海域、海岛等重点区域外来入侵物种的调查、监测、预警、控制、评估、清除、生态修复等工作。构建外来物种风险评价和监管技术支撑体系，进一步加强早期预警狙击、应急控制、阻断扑灭、可持续综合防御控制等技术研究和示范应用。

2021年11月，农业农村部印发《长江生物多样性保护实施方案（2021—2025年）》。方案提出健全水生生物资源及栖息地监测体系。构建统一的长江生物资源和栖息地调查监测体系，实现水生生物及其水域环境的动态化、信息化和网络化监测，为长江生物完整性指数评价和长江生态健康状况监测预警提供基础数据，同时提高外来物种预警和防控能力。

2022年4月，农业农村部联合自然资源部、生态环境部、海关总署印发《外来入侵物种管理办法》，该办法指出农业农村部会同有关部门建立外来入侵物种普查制度，每十年组织开展一次全国普查，建立外来入侵物种监测制度，构建全国外来入侵物种监测网络，按照职责分工布设监测站点，组织开展常态化监测。

2.3 健全外来入侵物种监测预警体系的现实需求

对外来入侵物种进行预防和控制的最佳阶段是物种入侵的初期

阶段，此时的种群密度通常较低且往往并不引人注目。在这个阶段对入侵物种进行早期监测，有助于做出快速高效的反应并制定早期防治决策，进而阻止入侵物种的扩散传播。然而，传统的调查方法耗时、成本高，且由于外来物种的种群密度在入侵的早期阶段（即建群阶段前）通常很低，运用传统方法进行监测往往成效甚微。因此，需要开发更为高效、低成本、无伤害性且能在外来物种建群前就能检测到外来物种的技术，用于更高效、更精准地对外来物种在建群成为入侵物种之前进行早期监测。

近年来，环境DNA（environmental DNA, eDNA）技术在物种鉴定中的作用受到了广泛关注，其检测灵敏度高、耗时短、成本低、通量高，成为鉴定外来水生入侵物种的强有力工具，在复杂群落稀有种的监测方面优势明显，具有极大的应用前景。该技术在对外来物种的检测、诊断与监测方面具有重要的潜在价值，是传统检测、诊断与监测方法的有力补充。在2013年对全球生态保护的地球扫描分析中，该技术在水生生物监测的应用被确定为15个最重要的全球生态保护议题之一。当前，eDNA技术已在鱼类和两栖类入侵物种的研究中被广泛使用。运用环境DNA 技术对外来物种开展调查已被许多研究者证明其准确性不低于传统方法。此外，物种分布模型也已被广泛应用于入侵物种的治理和防控，科研工作者能够根据物种分布模型的预测结果，确定外来物种的高度适宜生境区，从而在此及时开展高效的预防和控制措施

三、编制过程

3.1 成立编制组（2023年6月）

按照标准编写要求，上海海洋大学于2023年6月组织标准参与编制

单位相关科研人员组成了编制组，编制组成员由多年从事水生生物监测、环境 DNA 水生生物监测、水环境质量监测的研究技术人员组成。

3.2 理论研究（2023 年 6 月-7 月）

标准编制组通过各种途径收集并学习了《水生态监测技术指南 河流水生生物监测与评价》（试行）（HJ01295）、《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）（HJ 1296）、《海洋调查规范 第 6 部分：海洋生物调查》（GB/T 12763.6），《水质采样方案设计技术规定》（HJ 495），《生物遗传资源采集技术规范》（HJ 628），《生物多样性观测技术导则 内陆水域鱼类》（HJ 710.7）、《生物多样性观测技术导则 淡水底栖大型无脊椎动物》（HJ 710.8）和《生物多样性观测技术导则 水生维管束植物》（HJ 710.12）等基于传统形态学监测的标准导则，并进一步整理学习了《生物信息学术语》（GB/T 29859）、《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）、《淡水生物环境 DNA 监测技术方法》（DB32/T 4539-2023）和《淡水水生生物环境 DNA 测技术指南》（2023 年 9 月发布）等与环境 DNA 技术相关的标准，收集和研究了众多国内外基于环境 DNA 监测生物多样性的方法和实际案例，同时整理学习了 RPA-LFD（重组酶聚合酶扩增结合侧流层析技术）检测相关的专利技术及应用情况。经过资料分析和共性总结，初步对基于 RPA-LFD 技术的水生入侵物种快速检测方案进行了梳理和提炼。理顺了

标准制定的方向和思路，形成标准编制大纲。

3.3 调研/实验研究，草案编制（2023 年 7 月-2024 年 3 月）

为了使标准具有科学性和可操作性，在明确所研究的典型入侵物种后，通过在 NCBI 上搜索该物种所有近源种的线粒体基因组序列，利用 MEGA 软件进行初步比对，确定序列的位点同源性，再根据 RPA 引物设计原则，设计针对目标物种的高特异性引物及探针。基于已有的实验研究和相关案例分析，建立 RPA-LFD 方法体系，以目标物种的 DNA 为阳性标准品以及无菌无酶水为阴性对照，按照上述建立的方法体系开展引物和探针验证试验。筛选可用性和特异性好的引物和探针，进一步开展灵敏度测试，将目标物种的组织样 DNA 原液进行梯度稀释后开展 RPA-LFD 检测，明确筛选出的特异性引物和探针的灵敏度。在特异性和灵敏度测试完成后，进一步在实验室、养殖水体和野外有模板物种生存的天然水体中开展实际应用，应用结果与相关技术进行深入地探讨，进一步对已建立的方法体系进行调整优化，并编制形成标准草案。关于引物探针设计、特异性和灵敏度测试及天然水体检测应用等情况详见标准所引用的发明专利内容。

3.4 立项论证，征求意见稿编制（2024 年 4 月-2024 年 10 月）

上海市环境科学学会团体标准领导小组和团体标准审查委员会于 2024 年 5 月 14 日组织专家论证，对《基于环境 DNA 技术的水生入侵物种 RPA 快速检测方法》团体标准立项申请进行了审查，审查专家组在

综合考量了标准立项背景和意义、标准技术内容的创新性和实用性、标准的可操作性等多个维度后，一致认为该标准符合立项条件，并正式批准立项。专家组聚焦标准适用范围、格式的规范性及推广应用等方面出了具体建设性意见 10 余条，标准编制组充分吸收借鉴这些意见建议，开展了一系列的试验验证工作，确保标准的科学性、实用性和可操作性。通过多轮的讨论和修改，标准草案得到了进一步的完善和优化，最终形成了目前的版本——标准征求意见稿和编制说明。

四、标准主要条文依据

本标准编制过程中主要参考依据包括：

《外来入侵物种管理办法》

《外来入侵物种环境风险评估技术规范》

《农业外来入侵物种普查面上调查技术规程（试行）》

《长江水生生物保护管理规定》

《重点流域水生生物多样性保护方案》

《国家重点管理外来入侵物种名录》

《水生态监测技术指南河流水生生物监测与评价（试行）（HJ 1295-2023）

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）（HJ1296—2023）

《鱼类贝类环境 DNA 识别技术规范》（DB11/T 2023-2022）

《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）

《淡水生物环境 DNA 监测技术方法》（DB32/T 4539-2023）

《淡水水生生物环境 DNA 测技术指南》（2023 年 9 月发布）

五、主要试行结果

标准起草人员根据已有水生生物环境 DNA 监测技术研究基础，结合水生入侵物种入侵早期群体规模小、难以发现等特点，围绕不同生物类群筛选典型入侵物种开展基于环境 DNA 的 RPA-LFD 快速检测技术研究，通过实验室可行性验证后，依托重点研发计划初步构建的全国入侵水生生物监测网络，开展实地监测，结果表明采用 RPA-LFD 快速检测技术进行水生入侵生物监测能较好覆盖传统形态学鉴定的结果，进一步验证了该技术规范的可操作性、适用性和科学性。

六、与相关标准的关系分析

本标准与现行法律法规规章、强制性国家标准、其他国际标准、国家标准、行业标准、相应地方标准协调一致，没有冲突。标准本身各部分之间也相互协调。与《淡水生物监测 环境 DNA 宏条形码法》（T/CSES 81-2023）、《淡水生物环境 DNA 监测技术方法》（DB32/T 4539-2023）和《淡水水生生物环境 DNA 测技术指南》（2023 年 9 月发布）对比，本技术规范规定的适用场景更广泛，包括河口、海洋

以及压舱水等特定场景；同时，现场试验操作降低了对精密仪器及试验条件的依赖，操作相对简单可行，降低了对技术人员专业能力水平要求的限制，提高了使用灵活性；此外，相比之前的标准，该技术规范主要为早期定性判断入侵物种是否存在，检测结果现场可获得，对于相关政策决策制定具有积极意义。

七、重大分歧或重难点的处理经过和依据

该技术规范主要基于 eDNA 技术，结合 RPA 恒温扩增及 LFD 快速检测，形成一种适用于多场景、灵敏度高、特异性强、操作简单的入侵物种监测方法；该技术方法具有灵活性高、安全性好和易于实施等优点。首先，eDNA 技术是一种快速、非侵入性的生物监测方案，通过采集水样过滤的方法富集生物释放在水中的 DNA，对采样环境干扰小，不会对水生生物造成损伤，与传统形态学调查相比，既保证了采样环境及栖息生物不被干扰，也保障了从业人员的人身安全。同时，eDNA、RPA-LPD 技术经过数十年的发展，技术本身日趋成熟，本技术规范重点是筛选典型入侵物种，设计特异性分子标记，再对各项技术的组合应用条件进行优化，保证检测结果的特异性和灵敏性。经实验室和野外反复验证后，该技术规范的实施将不存在技术上的风险，可作为水生入侵物种早期监测手段进行推广应用。因此，该技术规范制定过程中，未出现重大分歧。

八、标准推广应用措施及预期效果

将依托上海市环境科学学会、上海海洋大学、上海市环境科学研究院等单位的资源积累，开展宣传、贯标、培训等工作；同时，依托各编制单位承担的科研及工作项目开展实际应用，确保本技术规范在外来入侵物种普查及船舶压载水监督管理中得到应用。

本技术规范的制定为水生入侵物种早期监测提供了技术参考，作为生物入侵管理的关键环节，早期监测有助于及时发现和控制潜在的入侵物种，防止它们对本地生态系统造成破坏，从而保护生物多样性和维持生态平衡，对于保护全球生物多样性和生态系统安全具有重要作用。早期监测为政策制定者提供了科学依据，有助于制定和实施更有效的入侵物种管理政策和措施。同时，可为研究入侵物种生态学、传播途径、影响机制等方面提供宝贵数据，同时也为公众教育和提高环保意识提供了实例。

九、标准性质的建议

本技术规范建议为推荐性技术规范，不属于强制性标准。

本技术规范为首次制订，随着环境 DNA 快速检测技术的崛起和发展，本技术规范中的环境 DNA 提取方法、RPA-LFD 方法体系的建立和涉及到的相关参数也可能会随之发生变化。因此，建议在本技术规范实施过程中，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，对本技术规范进行不断地修订与完善，使其实用性和可操作性与时俱进，为规范开展水生入侵物种早期监测工作提供依据和指导。

