

ICS 13.080.30
CCS B10

T/SSSC

中国土壤学会团体标准

T/SSSC 0 —2026

土壤病毒颗粒富集技术规范

Technical Specification for Soil Viral Particle Enrichment

（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	III
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语、定义和缩略语	2
4 试剂与材料	5
5 仪器和设备	7
6 样品采集、保存、运输和交接	8
7 病毒颗粒洗脱	11
8 病毒颗粒富集	16
9 质量控制	22
10 数据记录与结果报告	26
附录 A（资料性） 土壤病毒颗粒富集数据记录与结果报告表	28
附录 B（规范性） 土壤病毒回收率计算方法	35
附录 C（规范性） 病毒样颗粒计数方法	36
附录 D（资料性） 不同类型土壤病毒颗粒富集推荐参数	38
参考文献	43

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：中国科学院南京土壤研究所、南京农业大学、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、浙江大学、南京大学、江苏大学、江苏省生态地质调查大队、江苏省海洋地质调查院、江苏中宜金大分析检测有限公司。

本文件主要起草人：叶茂、姚柯渝、刘鹏、付玉豪、孙明明、王超、陈林、朱冬、李弘哲、俞萍锋、张宴、李冠霖、胡建、王晨、刘强、张文、吴世茂、钱佳。

土壤病毒颗粒富集技术规范

1 范围

本文件规定了土壤病毒样品采集、保存、运输、病毒洗脱、富集、质量控制和数据记录要求。

本文件适用于农田土壤、森林土壤、草地土壤、湿地土壤、根际土壤、酸性土壤、盐碱土壤、冻土、泥炭土、高有机质土壤以及污染土壤等环境样品的病毒颗粒富集与样品制备。对于具有高黏粒、高有机质、极端 pH、高盐分或复杂污染特征的样品，应结合附录 D 的推荐起始参数开展方法验证，并记录参数调整及验证依据。

本文件获得的病毒颗粒富集液可用于病毒样颗粒计数、病毒组学分析及其他经验证的后续分析。用于感染性评价、培养验证或对病毒颗粒完整性有特殊要求的研究时，应根据研究目的对核酸酶处理、保存条件和纯化步骤另行验证。本文件可用于 DNA 病毒颗粒富集；以 RNA 病毒为主要目标时，核酸酶处理及保存条件应按照 8.5.5 的规定经验证后确定。

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 分析实验室用水

GB 19489 实验室生物安全通用要求

GB/T 27403 实验室质量控制规范

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

3 术语、定义和缩略语

下列术语和定义适用于本文件。

3.1 术语和定义

3.1.1

土壤病毒 soil virus

存在于土壤环境中，能够感染细菌、古菌、真菌、植物、动物或其他宿主的病毒颗粒。

3.1.2

病毒样颗粒 virus-like particle; VLP

具有病毒颗粒形态特征，可通过显微镜、流式细胞术或其他方法观察或计数的颗粒。

注：病毒样颗粒不一定具有感染性，可作为评价土壤病毒颗粒丰度和富集效果的指标。

3.1.3

病毒颗粒洗脱 viral particle elution

通过缓冲液浸润、振荡、涡旋或其他方式，将土壤中游离态或吸附态病毒颗粒释放至液相中的过程。

3.1.4

病毒颗粒洗脱液 viral particle eluate

土壤样品经病毒颗粒洗脱、离心和过滤后获得的含病毒样颗粒液体。

3.1.5

病毒颗粒富集 viral particle enrichment

通过超滤离心、切向流过滤、聚乙二醇沉淀或其他方法，降低样品体积并提高单位体积中病毒颗粒浓度的过程。

3.1.6

超滤离心法 centrifugal ultrafiltration

利用具有特定截留分子量的超滤膜截留病毒颗粒，并通过离心去除部分液体，从而实现病毒颗粒浓缩的方法。

3.1.7

切向流过滤 tangential flow filtration; TFF

样品液体沿滤膜表面切向流动，通过膜截留和液体透过实现病毒颗粒浓缩的过滤方法。

3.1.8

聚乙二醇沉淀 polyethylene glycol precipitation; PEG precipitation

利用聚乙二醇和盐类促进病毒颗粒沉淀，并通过离心收集病毒颗粒的富集方法。

3.1.9

病毒回收率 viral recovery rate

富集后回收的目标病毒、病毒样颗粒或外源内参数量占富集前相应数量的百分比。

3.1.10

病毒样颗粒计数 VLP enumeration

采用荧光染色显微镜、流式细胞术或其他经验证方法，对样品中病毒样颗粒数量进行测定的过程。

3.1.11

病毒颗粒富集液 viral particle concentrate

经洗脱、过滤并通过超滤离心、切向流过滤、聚乙二醇沉淀或其他经验证方法浓缩后获得的、病毒颗粒浓度高于富集前样品的液体。

3.1.12

富集倍数 concentration factor

富集前样品体积与富集后终体积之比。注：富集倍数反映体积浓缩程度，不等同于病毒回收率，也不等同于病毒样颗粒浓度增加倍数。

3.2 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

AKC' Buffer: 改良柠檬酸钾洗脱缓冲液 (Amended potassium citrate prime buffer)

BSA: 牛血清白蛋白 (Bovine serum albumin)

ddPCR: 微滴数字聚合酶链式反应 (Droplet digital polymerase chain reaction)

DNA: 脱氧核糖核酸 (Deoxyribonucleic acid)

DNase: 脱氧核糖核酸酶 (Deoxyribonuclease)

EDTA: 乙二胺四乙酸 (Ethylenediaminetetraacetic acid)

EGTA: 乙二醇双 (2-氨基乙基醚) 四乙酸 (Ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid)

NaCl: 氯化钠 (Sodium chloride)

PBS: 磷酸盐缓冲液 (Phosphate-buffered saline)

PEG: 聚乙二醇 (Polyethylene glycol)

PEG8000: 平均分子量约 8000 的聚乙二醇 (Polyethylene glycol 8000)

PES: 聚醚砜 (Polyethersulfone)

PFU: 噬菌斑形成单位 (Plaque forming unit)

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

RNA: 核糖核酸 (Ribonucleic acid)

RNase: 核糖核酸酶 (Ribonuclease)

TFF: 切向流过滤 (Tangential flow filtration)

VLP: 病毒样颗粒 (Virus-like particle)

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。缓冲液应采用无菌纯水配制, 并经 0.22 μm 滤膜过滤除菌或高压灭菌后使用。

与样品直接接触的耗材应无菌、密封性良好, 并尽量采用低吸附材料。一次性耗材宜采用无 DNA 酶、无 RNA 酶产品。

4.2 试剂

4.2.1 磷酸盐缓冲液 (PBS): pH 宜为 7.0 ± 0.2 。可采用实验室常规配方配制, 也可采用商品化无菌 PBS。

4.2.2 病毒洗脱缓冲液 (AKC' Buffer): AKC' Buffer 宜由柠檬酸钾、PBS 和 MgSO_4 组成, pH 宜为 7.0 ± 0.2 。各组分具体浓度、配制顺序及保存期限应依据编制组方法验证结果确定并在实验室作业文件中明确; 不同批次应采用一致配方。使用前应充分混匀, 并经 0.22 μm 滤膜过滤除菌。配制日期、批号或配制人员信息宜纳入过程记录。

4.2.3 牛血清白蛋白溶液 (BSA)：BSA 溶液质量浓度宜为 1 % (w/v)，可用于超滤膜或切向流过滤膜预处理，以降低病毒颗粒的非特异性吸附。是否采用 BSA 预处理应结合膜材质、样品基质及病毒回收率验证结果确定；若省略该步骤，应记录依据。使用前应经 0.22 μm 滤膜过滤除菌。

4.2.4 DNase I 溶液：DNase I 溶液用于去除未受病毒衣壳保护的游离 DNA。DNase I 储备液活性宜不低于 40000 U/mL，工作液活性宜为 1 U/ μL 。工作液应现配现用，储备液应按生产商说明书低温保存，并避免反复冻融。以 RNA 病毒为主要目标或需保持病毒感染性时，应评估核酸酶种类、反应条件及终止方式对目标病毒的影响。

4.2.5 EDTA 溶液和 EGTA 溶液：EDTA 和 EGTA 用于终止 DNase I 反应。常用浓度为 0.5 mol/L，pH 宜为 8.0。

4.2.6 PEG8000 和 NaCl：PEG8000 和 NaCl 用于聚乙二醇沉淀法富集病毒颗粒。

PEG8000 宜采用平均分子量约 8000 的生物技术级或分析纯及以上级别固体试剂；NaCl 应采用分析纯及以上级别固体试剂。

4.2.7 消毒试剂：可采用 75 %乙醇、有效氯消毒剂或其他适用于实验室器具和操作台面的消毒试剂。

4.3 材料

4.3.1 采样容器和样品保存容器：可采用无菌聚丙烯离心管、无菌聚乙烯采样袋、无菌冻存管或其他适用于低温保存的无菌容器。

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材质产品。

4.3.3 滤膜和过滤器：常规过滤宜采用 0.22 μm PES 滤膜；颗粒物较多的样品可采用 0.45 μm 滤膜预过滤。

4.3.4 超滤装置：超滤离心管或超滤浓缩装置的截留分子量宜为 30 kDa~100 kDa。

5 仪器和设备

5.1 土壤采样器具：包括不锈钢土钻、土铲、环刀或其他洁净、耐腐蚀、易灭菌的采样器具。

5.2 电子天平：感量不低于 0.01 g。

5.3 恒温振荡器：转速范围应覆盖 50 rpm~500 rpm。

5.4 涡旋振荡器：最高转速不低于 2500 rpm。

5.5 高速冷冻离心机：离心温度应可调至 4 °C，最大离心力不低于 15000 × g，并配备与样品容器相匹配的转子。

5.6 真空过滤系统：应可配套使用 0.22 μm 和 0.45 μm 滤膜。

5.7 超滤浓缩装置：可采用超滤离心管或性能相当的超滤系统。

5.8 切向流过滤系统：应配备适用于病毒颗粒富集的膜包、管路、压力监测和样品收集装置。

5.9 生物安全柜：宜采用 II 级生物安全柜，用于样品分装、过滤、富集液转移和质量控制样品处理等操作。

5.10 病毒样颗粒计数设备：可采用荧光显微镜、流式细胞仪或其他经验证可用于病毒样颗粒计数的设备。

5.11 核酸扩增或定量设备：用于 qPCR、ddPCR 或其他质量控制检测时，应配备相应的核酸扩增或定量设备。

5.12 低温保存设备：应配备 2 °C ~ 8 °C 冰箱和 -80 °C 超低温冰箱。

5.13 pH 计：测量范围应覆盖 pH 0~14，最小分度值不大于 0.1 pH 单位。

5.14 生物安全与个人防护：样品分装、过滤、病毒颗粒富集液转移以及可能产生气溶胶的操作宜在Ⅱ级生物安全柜内完成。对于来源不明、可能含有潜在病原宿主或其他生物危害因子的样品，应依据 GB 19489 进行风险评估，并按照相应实验室生物安全等级要求操作。操作人员应穿着实验服并佩戴一次性手套；存在飞溅或气溶胶风险时，应根据风险评估增加口罩、护目镜或其他必要的个人防护用品。

5.15 消毒与废弃物处置：与样品或病毒颗粒富集液接触的滤膜、离心管、吸头、残余土壤和其他污染耗材应按照实验室生物安全管理要求分类收集、消毒或灭活后处置。操作台面和可重复使用器具应在操作前后进行适宜的消毒处理，并避免不同批次样品间交叉污染。

6 样品采集、保存、运输和交接

6.1 样品采集

6.1.1 土壤样品采集应根据研究目的、监测对象、土壤类型、土地利用方式、植被类型、管理措施、污染状况和地形条件等因素合理设置采样点位。采样点位应具有代表性，并能反映目标区域土壤病毒颗粒分布特征。

6.1.2 采样前应了解采样区域基本情况，包括地理位置、土壤类型、土地利用方式、植被类型、管理措施、污染来源、土壤含水状况、土壤 pH、有机质含量及既往采样记录等信息。

6.1.3 用于不同处理、不同区域或不同时间样品比较时，应保持采样深度、采样面积、采样时间、采样工具和样品处理方式一致。用于长期定位监测的样品，应固定采样区域和采样坐标，并记录 GPS 信息。

6.1.4 采样深度应根据研究目的确定。一般农田、草地和森林表层土壤样品可采集 0 cm~20 cm 土层；根际土、冻土、泥炭土、盐碱土、污染土壤等特殊样品应根据研究目的确定采样深度和采样方式，并在记录表中注明。

- 6.1.5 采样前应去除地表凋落物、石块、植物残体及其他非目标杂物。采样工具宜采用不锈钢土钻、土铲、环刀或其他洁净、耐腐蚀、易灭菌的器具。不同样点之间应更换或重新清洁采样工具，避免交叉污染。
- 6.1.6 采样容器宜采用无菌聚丙烯离心管、无菌聚乙烯采样袋、无菌冻存管或其他适用于低温保存的无菌容器。容器应密封良好，并具有唯一性标识。
- 6.1.7 每个样点宜采用多点混合法采集。一般情况下，每个混合样品可由 5 个~10 个子样组成。用于统计分析的生物学重复样品应独立采集，不宜将不同重复样品混合。
- 6.1.8 每份用于土壤病毒颗粒富集的土壤样品量不宜少于 50 g，其中单次病毒颗粒洗脱一般使用 5 g~10 g 鲜土，其余样品可用于平行样、加标回收样、质量控制、复核或备用。对于病毒丰度较低、有机质含量高、黏粒含量高或需设置较多质控样的样品，采样量不宜少于 100 g。
- 6.1.9 样品采集后应尽量保持原始含水状态，不应进行风干、烘干或暴晒处理。确需过筛时，宜在低温条件下使用无菌 2 mm 筛轻柔去除石块、根系和大颗粒杂物，并记录过筛温度、筛孔规格及操作方式。用于组间比较的样品应采用一致的过筛条件，以降低过筛造成的颗粒损失或基质差异。
- 6.1.10 冻土、泥炭土或其他低温环境土壤样品应在采样后保持低温状态。若样品在实验前需解冻，应在 4℃条件下缓慢解冻，并避免反复冻融。
- 6.1.11 采样过程中宜设置现场空白或工具空白。空白样品应与实际样品同步保存、运输和检测。
- 6.1.12 采样时应填写土壤病毒样品采集和富集记录表。记录内容应包括样品编号、采样日期、采样地点、GPS 坐标、采样深度、土壤类型、土地利用方式、样品类型、采样量、保存方式和采样人员等信息。

6.2 样品保存、运输和交接

6.2.1 土壤样品采集后应立即置于低温、避光条件下保存。短时间运输时，样品宜置于冰盒或冷藏箱中，保存温度宜为 2℃~8℃。

6.2.2 用于土壤病毒颗粒富集的样品宜在采样后 24h 内完成病毒颗粒洗脱和初步富集。若无法及时处理，应置于 -80℃保存；短期保存可置于 -20℃，但不宜超过 2 周。4℃仅适用于短时运输或待处理暂存。不同保存条件的选择应结合后续用途和实验室验证结果确定，并应避免反复冻融。

6.2.3 低温或冻土环境采集的样品应全程冷链运输。已冻结样品应使用干冰或液氮运输，并保持冻结状态；冷藏样品应使用冰袋或其他冷源维持 2℃~8℃。

6.2.4 样品运输过程中应采用密封、防漏、防压和防污染包装。运输过程中应防止样品融化、霜冻反复、容器破裂、标签脱落和外部污染。

6.2.5 样品运输期间应记录运输开始时间、运输结束时间、运输方式、保存温度、冷源类型和异常情况。必要时可使用温度记录仪监测运输过程温度变化。

6.2.6 样品到达实验室后，应核对样品编号、数量、标签、保存状态、包装完整性和记录表信息。样品接收后应立即置于 4℃、-20℃或 -80℃条件下保存，并根据后续实验安排及时处理。

6.2.7 样品交接应填写交接记录。交接记录应包括样品编号、样品数量、交接时间、保存条件、运输条件、样品状态和交接人员等信息，并由交接双方确认。

6.2.8 样品在保存、运输和交接过程中应分区存放、明确标识，避免不同来源、不同处理或不同时间点样品之间发生混淆或交叉污染。

6.2.9 若样品在运输或保存过程中发生容器破损、样品泄漏、标签缺失、温度异常、一次以上冻融或其他可能影响病毒颗粒富集结果的情况，应如实记录，并根据质量控制要求判定是

否继续用于后续分析。发生再次冻融的样品不宜直接作为方法比较或定量评价的常规样品，确需使用时应在结果报告中说明限制。

7 病毒颗粒洗脱

7.1 总则

7.1.1 病毒颗粒洗脱的对象为土壤中游离态或吸附于土壤颗粒、有机质、矿物表面的病毒颗粒。处理过程包括土壤预处理、病毒颗粒洗脱、粗颗粒去除、细胞去除与过滤、洗脱液暂存等步骤。

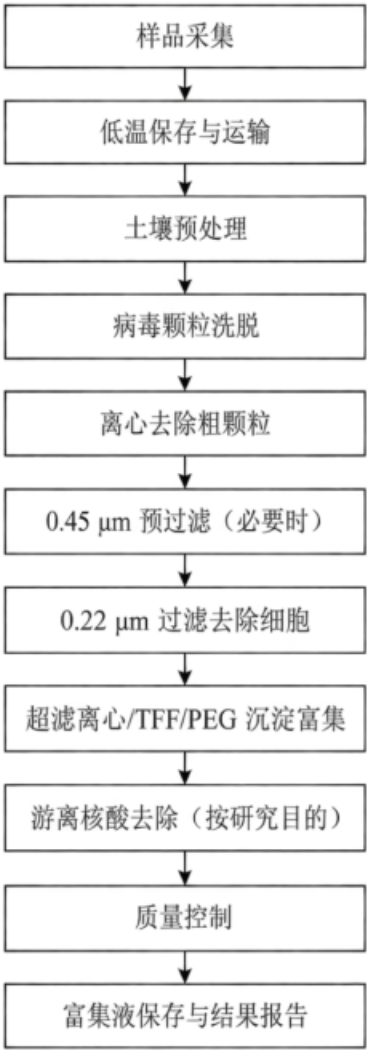


图 1 土壤病毒颗粒富集技术路线

7.1.2 病毒颗粒洗脱宜在低温条件下进行。除另有规定外，土壤预处理、洗脱、离心、过滤和暂存过程宜在 4℃条件下完成。

7.1.3 样品处理过程中应避免反复冻融、剧烈升温、强酸强碱处理和长时间暴露于室温环境。已冻结样品应在 4℃条件下缓慢解冻，并在解冻后尽快处理。

7.1.4 不同土壤类型、土壤质地、有机质含量、pH、盐分和污染性质可能影响病毒颗粒释放和过滤效率。应根据土壤性质选择适宜的洗脱缓冲液、液土比、洗脱次数、离心条件和过滤方式。表 1 和附录 D 所列参数作为推荐起始条件；对特殊土壤或偏离推荐条件的操作，应通过病毒样颗粒计数、加标回收率、病毒回收率或其他经验证指标进行确认，并记录调整内容及依据。

7.1.5 同一批样品应采用一致的样品质量、洗脱缓冲液、洗脱液体积、洗脱次数、振荡条件、离心条件、过滤孔径和富集前处理方式。确需调整时，应注明调整原因。

7.1.6 病毒颗粒洗脱过程中宜设置空白样品、平行样品和加标回收样品。空白样品应与实际样品经过相同处理流程。

7.2 技术要求

7.2.1 用于称量、分样、洗脱、离心、过滤和转移的器具应灭菌处理。一次性耗材应符合第 4 章规定。

7.2.2 过滤装置中耐高温器材宜采用压力蒸汽灭菌；不耐高温器材宜采用 75%乙醇或有效氯消毒剂进行表面消毒，并使用无菌水充分冲洗或晾干后使用。

7.2.3 洗脱缓冲液使用前应充分混匀，并按第 4 章规定进行除菌处理。若缓冲液出现沉淀、浑浊、絮状物或明显 pH 变化，不宜直接使用。

7.2.4 洗脱过程中应使土壤与洗脱缓冲液充分接触和悬浮，但不宜采用玻璃珠研磨、强烈超声、长时间高速匀浆等可能破坏病毒衣壳完整性的处理方式。

7.2.5 洗脱、离心和过滤过程中应尽量减少样品转移次数。转移上清液时应避免扰动沉淀；过滤时应避免滤膜干裂、过度负压和长时间堵塞。

7.2.6 用于不同处理组、不同土壤类型或不同时间点比较的样品，应采用相同处理批次或设置批次间质量控制样品。

7.3 土壤预处理

7.3.1 取保存状态良好的土壤样品，在低温条件下充分混匀。若样品中含有明显石块、植物根系、凋落物、动物残体或其他非目标杂物，应轻柔去除。

7.3.2 样品应尽量保持原始含水状态，不应进行风干、烘干或暴晒处理。确需过筛时，宜在 4℃或冰上条件下使用无菌 2 mm 筛轻柔过筛，并记录过筛条件。

7.3.3 用于单次病毒颗粒洗脱的土壤样品质量宜为 5 g~10 g 鲜土。常规方法可称取 5 g 鲜土进行处理。对于低病毒丰度、高黏粒、高有机质或污染土壤，可按相同比例扩大土壤质量和洗脱液体积。

7.3.4 冻土、泥炭土或其他低温环境土壤应在 4℃条件下缓慢解冻。解冻后的样品不宜再次冻存后重复用于病毒颗粒洗脱。

7.3.5 根际土壤宜去除粗大根系后进行洗脱。若研究对象为根际紧密附着土，应在记录表中注明根际土收集方式和根系处理方式。

7.3.6 污染土壤、盐碱土壤、酸性土壤、高黏粒土壤和高有机质土壤应根据样品性质调整洗脱液体积、洗脱次数和过滤方式，推荐参数参见附录 D。

7.3.7 若样品含水率过高，形成泥浆状或积水状态，可经自然沉降或低速离心后取均质土体进行称量；若样品过干，可直接加入洗脱缓冲液，不宜预先加水湿润。特殊处理应在记录表中注明。

7.4 病毒颗粒洗脱

7.4.1 病毒颗粒洗脱缓冲液应根据土壤类型、土壤质地、有机质含量、pH、盐分和污染性质进行选择。常用洗脱缓冲液选择见表 1。AKC' Buffer 一般适用于基质复杂、黏粒或有机质含量较高的样品；低有机质、低黏粒且过滤通畅的矿质土可选用 PBS。比较研究中应保持缓冲体系一致；确需调整时，应以回收率或其他质量控制结果作为验证依据。

表 1 病毒颗粒洗脱缓冲液选择

土壤类型或样品特征	推荐洗脱缓冲液	推荐液土比	说明
常规农田、森林、草地土壤	AKC' Buffer	3:1~5:1	一般优先采用 AKC' Buffer。
低有机质砂土、低黏粒矿质土	PBS 或 AKC' Buffer	3:1~4:1	过滤通畅时可采用 PBS；比较研究应保持方法一致。
高黏粒、高有机质、泥炭或湿地土壤	AKC' Buffer	5:1~8:1	宜充分洗脱，必要时增加离心步骤。
盐碱土壤、强酸性土壤或污染土壤	AKC' Buffer 或 PBS	3:1~8:1	应记录 pH、电导率或污染类型，必要时开展预实验。
常规农田、森林、草地土壤	AKC' Buffer	3:1~5:1	一般优先采用 AKC' Buffer。
低有机质砂土、低黏粒矿质土	PBS 或 AKC' Buffer	3:1~4:1	过滤通畅时可采用 PBS；比较研究应保持方法一致。
高黏粒、高有机质、泥炭或湿地土壤	AKC' Buffer	5:1~8:1	宜充分洗脱，必要时增加离心步骤。
盐碱土壤、强酸性土壤或污染土壤	AKC' Buffer 或 PBS	3:1~8:1	应记录 pH、电导率或污染类型，必要时开展预实验。

7.4.2 常规方法可称取 5.00 g 鲜土置于无菌离心管中，按表 1 加入相应体积的洗脱缓冲液。

高有机质或强吸附性土壤第一次洗脱宜加入 25 mL 洗脱缓冲液；低有机质或矿质土壤第一次洗脱宜加入 15 mL~20 mL 洗脱缓冲液。

7.4.3 加入洗脱缓冲液后，应立即盖紧管盖，轻轻颠倒混匀，使土壤充分湿润和悬浮。

7.4.4 将离心管水平放置于恒温振荡器上，在 4℃条件下以 400rpm 振荡 15 min~30 min。

该条件作为推荐起始参数：常规样品宜振荡 15 min；高黏粒、高有机质、泥炭土、污染土壤或团聚体较多的样品宜振荡 30 min。实验室可根据代表性样品的病毒回收率和颗粒完整性

验证结果对转速或时间进行调整，并在同批可比样品中保持一致。

7.4.5 振荡后，将离心管置于涡旋振荡器上涡旋 3 min，作为促进团聚体分散的推荐起始条件。每涡旋 1 min 后，可在 4℃条件下手动振荡 30 s。对于衣壳稳定性较差或对感染性有要求的目标病毒，应通过预实验确认涡旋强度和时间；洗脱过程中应避免玻璃珠研磨、强烈超声或长时间高速匀浆等可能破坏病毒颗粒完整性的处理方式。

7.4.6 完成洗脱后，应立即离心以去除土壤颗粒、矿物颗粒和较大有机碎屑。采用固定角转子时，离心条件宜为 $15000 \times g$ 、20 min、4℃；采用水平转子时，离心条件宜为 $4700 \times g$ 、10 min、4℃。上述条件为针对不同转子沉降效率设置的推荐起始条件；采用其他转子或容器时，应根据设备规格和方法验证结果调整。离心结束后，应在不扰动沉淀的条件下小心吸取上清液，并转移至新的无菌容器中。

7.4.7 对原土壤沉淀宜重复洗脱 2 次，共进行 3 次洗脱，以提高吸附态病毒颗粒的释放和总回收量。第二次和第三次洗脱可适当减少洗脱液体积，但应保证土壤处于充分浸润和悬浮状态。方法验证时宜记录各次洗脱的回收体积或病毒颗粒信号，以评价后续洗脱的贡献；三次洗脱所得上清液应合并，作为土壤病毒颗粒洗脱液。

7.4.8 若离心后上清液仍有明显土壤颗粒、絮状物或悬浮浑浊，可重复离心 1 次，或适当延长离心时间。调整后的离心条件应记录，并在同批样品中保持一致。

7.4.9 应记录每次洗脱加入的洗脱液体积、离心后回收的上清液体积和最终合并体积。

7.5 细胞去除与过滤

7.5.1 合并后的土壤病毒颗粒洗脱液应通过滤膜过滤，以去除细菌、真菌孢子、原生生物、残余细胞和较小颗粒碎片。

7.5.2 常规样品宜采用 $0.22 \mu m$ PES 滤膜过滤。颗粒物、腐殖质或黏粒含量较高，或出现过滤速度明显下降、滤膜快速堵塞等情况时，宜先采用 $0.45 \mu m$ 滤膜预过滤，再采用 0.22

μm PES 滤膜终过滤。是否增加预过滤步骤应结合过滤通量、滤膜更换次数和病毒回收率综合判定，并在记录表中记录。

7.5.3 过滤过程宜在 4°C 条件下或冰上进行。采用真空过滤时，应避免过高负压造成滤膜破裂或病毒颗粒损失。若滤膜堵塞导致过滤缓慢，应更换滤膜或增加预过滤步骤，不宜强行加压过滤。

7.5.4 过滤过程中应避免不同样品共用同一滤膜、过滤器或接收容器。不同样品之间应更换滤膜和接收容器，防止交叉污染。

7.5.5 若过滤后滤液仍明显浑浊或含有可见颗粒，可再次进行 $0.22\ \mu\text{m}$ PES 滤膜过滤，或经低温离心澄清后再过滤。重复过滤可能造成病毒颗粒损失，应在记录中说明。

7.5.6 过滤后的滤液为病毒颗粒富集前洗脱液，应取不少于 $1\ \text{mL}$ 滤液用于病毒样颗粒计数、空白检测或加标回收率评价。剩余滤液应尽快进入病毒颗粒富集步骤；不能立即富集时，应置于 4°C 避光暂存，暂存时间不宜超过 $24\ \text{h}$ 。

8 病毒颗粒富集

8.1 总则

8.1.1 病毒颗粒富集的对象为经第 7 章洗脱、离心和过滤后获得的土壤病毒颗粒洗脱液。处理过程包括病毒颗粒富集、游离核酸去除、富集液保存和过程记录等步骤。

8.1.2 病毒颗粒富集可采用超滤离心法、切向流过滤法、聚乙二醇沉淀法或其他经验证的方法。原则上， $10\ \text{mL}\sim 200\ \text{mL}$ 的常规小批量样品优先考虑超滤离心法； $100\ \text{mL}$ 以上、大体积或低病毒丰度样品宜考虑切向流过滤法；设备受限或需低成本处理的中大体积样品可采用 PEG 沉淀法。实际选择还应综合土壤类型、颗粒物残留、有机质含量、病毒丰度、基质干扰和实验室设备条件，并参照表 2。

8.1.3 同一研究任务、同一监测任务或同一批次可比样品宜采用一致的富集方法。确需采用

不同方法时，应设置方法比对样品或加标回收样品，并记录方法差异。

8.1.4 病毒颗粒富集过程宜在 4℃条件下进行。无法全程低温操作时，应缩短室温暴露时间，并记录操作温度和持续时间。

8.1.5 富集过程中应避免滤膜堵塞、过度离心、强烈剪切、高温处理和反复冻融。涉及样品接触的器具和耗材应符合第 4 章规定。

8.1.6 病毒颗粒富集方法的适用范围见表 2。表中样品体积、推荐终体积和适用情况为方法选择的起始依据。实际应用时，可根据病毒样颗粒计数、加标回收率、病毒回收率、处理时间、膜堵塞或杂质共富集情况进行调整；采用不同方法处理可比样品时，应按照 8.1.3 进行方法一致性验证。

表 2 病毒颗粒富集方法选择

富集方法	适用样品体积	推荐富集后体积	适用情况	注意事项
超滤离心法	10 mL~200 mL	250 μL~500 μL	常规洗脱液、小批量样品	操作简便、适于小批量；高有机质或高黏粒样品易堵膜，膜吸附可能造成损失。
切向流过滤法	100 mL~数 L	0.5 mL~10 mL	大体积、低病毒丰度样品	适合连续处理大体积和低病毒丰度样品；需控制跨膜压力、系统清洗和交叉污染。
聚乙二醇沉淀法	50 mL~数 L	0.5 mL~10 mL	设备受限或需低成本富集样品	设备要求较低；易共沉淀腐殖质、盐类和有机杂质，后续可能需要进一步纯化。

8.2 超滤离心法

8.2.1 超滤离心法适用于经 0.22 μm 滤膜过滤后的中小体积土壤病毒颗粒洗脱液，尤其适

用于常规农田土壤、森林土壤、草地土壤和过滤通畅的样品。

8.2.2 高有机质土壤、泥炭土、湿地土壤、黏粒含量高土壤或污染土壤洗脱液采用超滤离心法前，应确认滤液无明显悬浮物。必要时可再次低温离心或过滤。

8.2.3 超滤膜使用前可采用 1% BSA 溶液预处理 1 h，以降低病毒颗粒在滤膜上的非特异性吸附。对于低吸附膜、对蛋白残留敏感的后续分析或经方法验证证明无需预处理的情况，可省略 BSA 处理，但应记录膜材质、处理方式及验证依据。预处理后应使用无菌 PBS 或洗脱缓冲液清洗滤膜，并弃去滤过液。

8.2.4 将过滤后的病毒颗粒洗脱液分批加入超滤管中进行离心富集。每次加入样品体积不应超过超滤管标称容量，多个超滤管同时操作时应保持质量平衡。

8.2.5 超滤离心宜在 4℃条件下进行，离心力宜为 $1500 \times g \sim 4000 \times g$ 。推荐起始条件为 $1500 \times g$ 、5 min~10 min。若样品通过速度较慢，可适当延长离心时间，不宜直接采用过高离心力。

8.2.6 每次离心后应弃去下层滤过液，再继续加入样品，直至全部样品完成富集。超滤过程中应避免滤膜完全干燥。

8.2.7 当超滤膜上方保留液体积达到 250 μL ~500 μL 时，应停止离心。若体积低于 250 μL ，应加入适量 AKC' Buffer 或无菌 PBS 重悬。

8.2.8 病毒颗粒重悬宜采用 AKC' Buffer 或无菌 PBS。可轻柔吹打膜面，或将滤膜取出后以 1500 rpm 涡旋 30 s，使病毒颗粒从滤膜表面释放。

8.2.9 重悬步骤宜重复 3 次。每次重悬后收集重悬液，合并至同一无菌低吸附离心管中，作为病毒颗粒富集液。

8.2.10 若超滤过程中出现滤膜破裂、严重堵膜、离心管漏液、富集液异常浑浊或样品明显损失，应停止处理并记录异常情况。

8.3 切向流过滤法

8.3.1 切向流过滤法适用于大体积土壤病毒颗粒洗脱液、低病毒丰度样品、多个平行样品合并处理或需降低死端过滤堵塞风险的样品。

8.3.2 进入切向流过滤系统前的样品应已经过 0.22 μm PES 滤膜过滤。若样品仍含明显颗粒、絮状物或沉淀，应先进行低温离心或再次过滤。

8.3.3 切向流过滤系统使用前应进行清洗、消毒和完整性检查。与样品接触的管路、膜包、储液瓶和收集容器应符合无菌要求。

8.3.4 系统使用前宜采用无菌 PBS 或 AKC' Buffer 进行预润洗。必要时可采用 1% BSA 溶液循环预处理膜包 30 min~60 min，预处理后应充分冲洗系统。

8.3.5 切向流过滤宜在 4℃或低温条件下进行。若设备无法置于低温环境，应将样品储液瓶置于冰上，并尽量缩短操作时间。

8.3.6 切向流过滤的跨膜压力、循环流速和浓缩倍数应根据膜包规格、设备说明书和样品性质确定，并在方法验证中确认其对病毒回收率和膜堵塞的影响。运行过程中应记录循环流速、跨膜压力和运行时间，保持压力稳定，避免压力突升、泡沫产生和膜包堵塞。不同批次可比样品宜采用一致的运行参数。

8.3.7 当样品浓缩至目标体积时，应停止浓缩。对于 100 mL~数 L 洗脱液，富集后体积宜控制在 0.5 mL~10 mL。

8.3.8 浓缩结束后，宜使用适量 AKC' Buffer 或无菌 PBS 冲洗系统管路和膜包保留侧，以回收残留病毒颗粒。冲洗液应与富集液合并。

8.3.9 不同样品之间应对切向流过滤系统进行充分清洗和消毒。用于低生物量样品时，宜设置系统空白样品。

8.4 聚乙二醇沉淀法

8.4.1 聚乙二醇沉淀法适用于中等至大体积土壤病毒颗粒洗脱液的低成本富集,或在缺少超滤设备和切向流过滤设备时使用。

8.4.2 采用聚乙二醇沉淀法前,洗脱液应经 0.22 μm PES 滤膜过滤。若样品浑浊或含有可见颗粒,应再次离心或过滤后再进行沉淀。

8.4.3 聚乙二醇沉淀可采用 PEG8000 和 NaCl 组合体系。PEG8000 终浓度宜为 8%~10% (w/v), NaCl 终浓度宜为 0.3 mol/L~0.5 mol/L,作为推荐起始条件。具体条件应结合土壤基质、病毒回收率和后续分析用途进行验证;对高有机质、高盐或污染样品,应特别评估杂质共沉淀影响。

8.4.4 加入 PEG8000 和 NaCl 后,应在 4℃条件下轻柔搅拌或颠倒混匀至完全溶解,并于 4℃孵育 4 h~16 h。低病毒丰度样品或大体积样品宜孵育 12 h~16 h。

8.4.5 孵育结束后,应在 4℃条件下离心收集沉淀。离心条件宜为 $10000 \times g \sim 15000 \times g$ 、30 min~60 min。具体条件可根据样品体积、转子类型和沉淀情况调整。

8.4.6 离心结束后,应小心弃去上清液,避免扰动沉淀。沉淀宜使用 AKC' Buffer 或无菌 PBS 重悬。

8.4.7 50 mL~200 mL 洗脱液所得沉淀可使用 0.5 mL~2 mL 重悬液;大体积样品可根据需要使用 2 mL~10 mL 重悬液。重悬时应轻柔吹打或低速振荡,不宜强烈涡旋或超声处理。

8.4.8 采用聚乙二醇沉淀法获得的富集液可能残留 PEG、盐类和腐殖质等杂质,应在结果记录中说明。若富集液颜色深、黏度高、盐分高,或后续核酸提取、PCR 扩增、测序等受到明显抑制,宜采用超滤换液、透析、密度梯度离心或其他经验证方法进一步纯化,并记录纯化前后样品体积及质量控制结果。

8.5 游离核酸去除

8.5.1 病毒颗粒富集液宜进行游离核酸去除处理,以降低未受病毒衣壳保护的游离 DNA

或 RNA 对后续分析的影响。

8.5.2 以 DNA 病毒颗粒为主要目标时，宜采用 DNase I 处理。DNase I 工作液活性宜为 1 U/ μ L，按每 9 μ L 病毒颗粒富集液加入 1 μ L DNase I 工作液的比例进行处理。

8.5.3 DNase I 处理宜在室温下孵育 2 h，或在 4 °C 条件下孵育过夜。对于低温来源样品、冻土样品或对病毒衣壳稳定性要求较高的样品，宜采用 4 °C 孵育。

8.5.4 DNase I 反应结束后，应加入 EDTA 和 EGTA 终止反应，EDTA 和 EGTA 的终浓度宜均为 10 mmol/L。不宜采用高温方式灭活 DNase I，除非经过验证。

8.5.5 以 RNA 病毒颗粒为主要目标时，可根据实验目的选择 DNase I、RNase 或 DNase/RNase 组合处理方案，具体条件应经验证后确定。若目标包括 RNA 病毒核酸，不应在未验证的情况下使用可能降解目标核酸的 RNase 处理；若研究需保持病毒感染性，应同时评估核酸酶、终止试剂和反应条件对病毒颗粒完整性及感染性的影响。

8.6 富集液保存

8.6.1 完成富集或游离核酸去除后的病毒颗粒富集液应置于无菌、低吸附、密封性良好的离心管或冻存管中保存，并进行唯一性标识。

8.6.2 短期保存时，病毒颗粒富集液宜置于 4 °C 避光保存，保存时间不宜超过 24 h~48 h。若需较长时间保存，应置于 -80 °C 保存。

8.6.3 病毒颗粒富集液应避免反复冻融。需多次使用时，应按单次使用量分装，并记录分装数量、每管体积和保存位置。

8.6.4 若富集液在保存过程中出现沉淀、絮状物、明显变色、泄漏、标签脱落、温度异常或反复冻融，应作为异常情况记录，并根据质量控制结果判定是否继续使用。

8.7 富集过程记录

- 8.7.1 病毒颗粒富集过程应建立全过程记录，记录内容应完整、准确、可追溯。
- 8.7.2 富集前应记录样品编号、洗脱液类型、过滤后洗脱液体积、滤液外观、过滤孔径、滤膜材质、是否发生过滤堵塞以及是否设置空白样品、平行样品和加标回收样品。
- 8.7.3 采用超滤离心法时，应记录超滤管规格、截留分子量、BSA 预处理条件、清洗条件、离心力、离心时间、加入样品总量、滤过液体积、重悬液类型、重悬次数和富集后体积。
- 8.7.4 采用切向流过滤法时，应记录设备型号、膜包类型、截留分子量、样品初始体积、运行温度、循环流速、跨膜压力、运行时间、冲洗体积、富集后体积和系统清洗情况。
- 8.7.5 采用聚乙二醇沉淀法时，应记录样品初始体积、PEG8000 终浓度、NaCl 终浓度、孵育温度、孵育时间、离心力、离心时间、沉淀状态、重悬液类型和富集后体积。
- 8.7.6 进行游离核酸去除时，应记录核酸酶类型、酶活性、加入体积、样品体积、孵育温度、孵育时间、终止试剂和终止试剂终浓度。
- 8.7.7 富集过程中出现滤膜堵塞、超滤膜破裂、管路漏液、沉淀难以重悬、样品损失、离心异常、温度异常或疑似污染时，应记录异常情况和处理措施。
- 8.7.8 富集完成后，应记录富集液保存条件、分装数量、每管体积、保存位置、操作者、记录者和复核者。

9 质量控制

9.1 总则

- 9.1.1 土壤病毒颗粒富集过程应建立质量控制体系，覆盖样品采集、保存、运输、交接、洗脱、离心、过滤、富集、游离核酸去除、保存和记录等环节。
- 9.1.2 每批样品应根据实验目的设置空白样品、平行样品和加标回收样品。质量控制样品应与实际样品同步处理，并采用相同的洗脱、过滤、富集和保存流程。
- 9.1.3 同一批样品应尽量保持样品质量、液土比、洗脱次数、过滤孔径、富集方法、终体积、

核酸酶处理条件和保存条件一致；确需调整时，应记录原因和实际参数。

9.1.4 质量控制结果应结合土壤类型、样品基质、病毒丰度、富集方法和后续用途综合判定。

本文件给出的空白样、平行样、加标回收率和病毒回收率控制值为推荐起始控制值，不宜作为所有土壤类型的统一强制阈值；实验室应基于代表性土壤和方法验证结果建立内部控制范围，并保留验证记录。

9.2 空白样品

9.2.1 每批样品应至少设置 1 个过程空白样品。采样过程中宜设置现场空白或工具空白。

空白样品应与实际样品同步保存、运输和处理。

9.2.2 空白样品不应出现明显病毒样颗粒信号、细胞污染信号或游离核酸污染信号。采用定量方法检测时，空白样品信号宜低于实际样品平均信号的 1%；低生物量样品可根据实验室方法检出限确定判定标准。

9.2.3 若空白样品信号高于实验室控制限，或出现明显污染，应查明污染来源，并对同批样品进行复核；必要时应重新处理样品。

9.3 平行样品

9.3.1 每批样品宜设置平行样品。用于方法验证、标准化研究或不同富集方法比较时，平行样品数量不宜少于 3 个。

9.3.2 平行样品应独立完成病毒颗粒洗脱、过滤、富集和质量控制检测。平行样品之间的病毒样颗粒数量、病毒回收率或目标内参检测结果应具有合理一致性。

9.3.3 平行样品病毒回收率的相对标准偏差宜不超过 30%；对于高黏粒、高有机质、低病毒丰度或污染土壤样品，可放宽至 50%，但应在记录或报告中说明。

9.3.4 若平行样品差异明显，应检查样品异质性、称样误差、洗脱效率、过滤堵塞、富集损

失和操作批次差异等因素，并记录复核结果。

9.4 加标回收样品

9.4.1 每批样品宜设置加标回收样品，用于评价病毒颗粒洗脱、过滤、富集和保存过程中的损失。

9.4.2 加标对象宜采用完整模式噬菌体、衣壳完整的病毒颗粒、荧光标记病毒颗粒、病毒样颗粒标准物质或经验证适用于土壤基质的外源病毒内参，不宜仅采用游离病毒核酸。加标对象宜在颗粒大小、衣壳结构、核酸类型及对土壤吸附特性等方面尽可能接近目标病毒；若无法满足，应在结果解释中说明其代表性限制。

9.4.3 基体加标样品数量宜不低于样品总数的 10%；样品总数不足 10 个时，宜至少设置 1 个基体加标样品。

9.4.4 加标回收率宜不低于 5%。对于常规农田土壤、森林土壤、草地土壤等基质干扰较低的样品，加标回收率宜不低于 10%；上述数值作为推荐起始控制限。对于高黏粒、高有机质、泥炭、盐碱、强酸性或污染土壤样品，可根据代表性样品的方法验证结果确定实验室可接受范围，并在记录或报告中说明依据。

9.4.5 加标回收率低于实验室控制范围时，应检查病毒颗粒吸附、过滤堵塞、膜吸附、沉淀损失、保存条件和样品基质干扰等因素，并记录处理措施。

9.5 病毒回收率

9.5.1 病毒回收率可采用病毒样颗粒计数、PFU 计数、qPCR、ddPCR、荧光标记病毒颗粒检测或其他经验证方法测定。富集前后检测方法和检测条件应保持一致。

9.5.2 病毒回收率计算方法参见附录 B。一般情况下，病毒回收率宜不低于 5%，该数值作为推荐起始控制值；用于方法验证、不同方法比较或特殊土壤样品时，宜根据代表性土壤类

型建立实验室内部控制范围，并说明所采用控制值的验证依据。

9.5.3 病毒回收率不宜作为不同土壤类型之间病毒丰度高低的唯一比较依据。富集倍数仅反映体积浓缩程度，病毒样颗粒浓度增加倍数反映检测信号变化，二者均不等同于病毒回收率；VLP 计数亦不直接代表感染性病毒数量。结果解释时应结合土壤性质、样品基质、过滤情况、富集方法和质量控制结果综合判断。

9.6 污染控制与结果判定

9.6.1 应控制细胞来源颗粒或核酸污染。细胞污染可采用显微观察、流式细胞术、细菌或真菌标志基因检测、宿主细胞培养检查或其他经验证方法评价。

9.6.2 病毒颗粒富集液宜进行游离核酸污染控制。核酸酶处理效果可通过处理前后游离核酸信号、目标病毒颗粒回收率、空白样品结果或其他经验证方法评价。

9.6.3 符合下列条件时，可判定富集过程有效：

- a) 空白样品无明显污染，或污染信号低于实验室控制限；
- b) 平行样品结果具有合理一致性；
- c) 加标回收率不低于实验室可接受范围；
- d) 病毒回收率不低于实验室参考控制值；
- e) 细胞污染和游离核酸污染得到有效控制；
- f) 关键过程参数和异常情况记录完整。

9.6.4 出现空白污染、加标回收率过低、平行样品差异明显、病毒回收率过低、样品损失严重、膜破裂、系统泄漏、沉淀失败、污染异常或关键参数缺失时，应复核、重新处理或在结果报告中说明限制。

10 数据记录与结果报告

10.1 数据记录

10.1.1 数据记录应覆盖样品信息，样品采集、保存、运输和交接，病毒颗粒洗脱，病毒颗粒富集，质量控制和异常情况。

10.1.2 样品采集、保存、运输和交接信息应按照第 6 章要求记录，并保证样品编号、处理批次和后续富集记录能够对应追溯。

10.1.3 洗脱记录应包括土壤质量、洗脱缓冲液、洗脱体积、液土比、洗脱次数、振荡条件、离心条件、过滤孔径、滤膜材质、过滤体积、滤液外观和暂存条件。

10.1.4 富集记录应包括富集方法、富集前后体积、富集倍数、关键运行参数、游离核酸去除条件、富集液保存条件和操作者；宜同步记录主要试剂批号或配制批次、滤膜或膜包规格与批号、超滤装置规格、主要设备编号及操作批次，以保证全过程可追溯。

10.1.5 质量控制记录应包括空白样品、平行样品、加标回收样品、病毒回收率、细胞污染和游离核酸污染控制结果。所有偏离本文件推荐程序的情况均应记录“偏差内容—调整原因—处理措施—验证依据—对结果的可能影响”，并注明是否重新处理样品。

10.2 结果报告

10.2.1 结果报告应包括样品基本信息、病毒颗粒洗脱方法、病毒颗粒富集方法、质量控制结果、异常情况和结果判定。

10.2.2 结果报告宜列明标准名称或所依据的方法，样品背景信息，样品保存、运输和交接情况，洗脱、离心、过滤、富集、游离核酸去除和保存条件，病毒回收率及质量控制结果，异常情况及其可能影响，结果判定和使用限制。

10.2.3 报告中使用的计量单位、符号、缩略语和术语应符合本文件规定。未按本文件规定执行的步骤，以及因特殊土壤类型、样品量不足、过滤困难或设备限制而调整的参数，应在

报告中说明调整原因、验证依据及其对结果解释的可能影响。

10.2.4 结果报告应由检测人员、复核人员或项目负责人确认。原始记录、仪器原始文件、质量控制记录和结果报告应按照实验室质量管理体系归档保存；保存期限应符合项目、机构或相关法规要求。

附录 A

(资料性)

土壤病毒颗粒富集数据记录与结果报告表

A.1 本附录给出了土壤病毒颗粒富集过程中样品信息、采集保存运输交接、洗脱与离心、富集、质量控制、异常情况和结果报告的记录表样式。

A.2 表格可根据实验目的、土壤类型、富集方法和质量控制要求适当增减。未测定或不适用项目应分别注明“未测定”或“不适用”。

表 A.1 样品基本信息记录表

项目	记录内容	项目	记录内容
样品编号		样品名称	
采样日期		采样时间	
采样地点		GPS 坐标	经度： 纬度：
采样深度	cm～ cm	样品类型	☐ 表层土 ☐ 根际土 ☐ 冻土 ☐ 泥炭土 ☐ 盐碱土 ☐ 污染土 ☐ 其他：
采样人员		保存方式	☐ 2℃～8℃ ☐ -20℃ ☐ -80℃ ☐ 其他：
运输方式	☐ 冰袋 ☐ 干冰 ☐ 液氮 ☐ 常温短时 ☐ 其他：	特殊样品特征	☐ 冻土 ☐ 泥炭土 ☐ 盐碱土 ☐ 酸性土壤 ☐ 污染土壤 ☐ 根际土 ☐ 其他：
特殊处理方式			

表 A.2 采样区域与土壤性质记录表

项目	记录内容	项目	记录内容
土地利用方式	☐ 农田 ☐ 森林 ☐ 草地 ☐ 湿地 ☐ 污染场地 ☐ 其他:	植被类型	
土壤类型		土壤质地	☐ 砂土 ☐ 壤土 ☐ 黏土 ☐ 其他:
管理措施	☐ 施肥 ☐ 灌溉 ☐ 耕作 ☐ 污泥/有机肥施用 ☐ 其他:	污染状况	☐ 无明显污染 ☐ 重金属 ☐ 农药 ☐ 有机污染物 ☐ 复合污染 ☐ 其他:
现场环境情况		土壤 pH	☐ 未测定
有机质含量	☐ 未测定	含水率	☐ 未测定
盐分/电导率	☐ 未测定	黏粒含量	☐ 未测定
主要污染物类型	☐ 未测定		

表 A.3 样品采集、保存、运输和交接记录表

项目	记录内容	项目	记录内容
采样点位		采样量	g
采样工具		采样容器	
保存温度	☐ 2 °C~8 °C ☐ -20 °C ☐ -80 °C ☐ 其他:	是否避光	☐ 是 ☐ 否
是否发生冻融	☐ 否 ☐ 是, 次数:	冷源类型	☐ 冰袋 ☐ 干冰 ☐ 液氮 ☐ 其他:
运输开始时间		运输结束时间	
运输异常情况	☐ 无 ☐ 有:	交接时间	
样品状态	☐ 完好 ☐ 破损 ☐ 泄漏 ☐ 温度异常 ☐ 其他:	交接人员	移交: 接收:
包装和标签	包装: ☐ 完整 ☐ 不完整; 标签: ☐ 完整 ☐ 不完整	是否符合接收要求	☐ 是 ☐ 否, 原因:

表 A. 4 病毒颗粒洗脱与离心 记录表

项目	记录内容	项目	记录内容
样品编号		土壤质量	g
样品状态	☐ 鲜土 ☐ 冻土解冻后 ☐ 其他特殊状态（注明）：	洗脱缓冲液类型	☐ AKC' Buffer ☐ PBS ☐ 其他：
洗脱液加入体积	第 1 次： mL；第 2 次： mL；第 3 次： mL	液土比	
洗脱次数	☐ 1 次 ☐ 2 次 ☐ 3 次 ☐ 其他：	洗脱液回收体积	第 1 次： mL；第 2 次： mL；第 3 次： mL
振荡温度	°C	振荡转速	rpm
振荡时间	min	涡旋时间	min
样品分散状态	☐ 充分分散 ☐ 部分团聚 ☐ 难以分散；必要时记录团聚比例或其他客观描述：	离心力	× g
离心时间	min	离心温度	°C
离心次数		沉淀状态	颜色： ；估计体积： mL；重悬难度： ☐ 易 ☐ 一般 ☐ 难
上清液回收体积	mL		

表 A. 5 过滤与暂存记录表

项目	记录内容	项目	记录内容
过滤孔径	☐ 0.45 μm 预过滤 ☐ 0.22 μm 终过滤 ☐ 其他：	滤膜材质	☐ PES ☐ 其他：
过滤方式	☐ 真空过滤 ☐ 针式过滤 ☐ 其他：	过滤体积	mL
过滤时间	min；必要时记录平均过滤速率： mL/min	滤膜更换情况	☐ 未更换 ☐ 更换，次数：
堵膜情况	☐ 无 ☐ 有；发生时间： min；更换滤膜次数：	滤液体积	mL
滤液外观	☐ 澄清 ☐ 轻微浑浊 ☐ 明显浑浊 ☐ 颜色深 ☐ 其他： ； 如具备条件，浊度/吸光度：	暂存条件	温度： °C；时间： h； ☐ 避光

质控取样	☐ 未取样 ☐ VLP 计数 ☐ 空白检测 ☐ 加标回收率评价；体积： mL		
------	---	--	--

表 A. 6 病毒颗粒富集记录表

项目	记录内容	项目	记录内容
样品编号		富集方法	☐ 超滤离心法 ☐ 切向流过滤法 ☐ 聚乙二醇沉淀法 ☐ 其他：
富集前体积	mL	富集后体积	mL（或 μL ，注明单位）
富集倍数	倍	富集温度	$^{\circ}\text{C}$
富集开始时间		富集结束时间	
操作者		截留分子量	☐ 30 kDa ☐ 50 kDa ☐ 100 kDa ☐ 其他：
预处理方式	☐ BSA ☐ PBS/缓冲液清洗 ☐ 无 ☐ 其他：	超滤离心条件	离心力： $\times \text{g}$ ；时间： min ；次数：
TFF 运行参数	循环流速：（注明单位）；跨膜压力：（注明单位）；运行时间： min	TFF 冲洗体积	mL
PEG8000 终浓度	%； ☐ 不适用	NaCl 终浓度	mol/L ； ☐ 不适用
PEG 孵育条件	温度： $^{\circ}\text{C}$ ；时间： h	PEG 离心条件	离心力： $\times \text{g}$ ；时间： min ；温度： $^{\circ}\text{C}$
沉淀状态	颜色：；体积： mL ； ☐ 易重悬 ☐ 一般 ☐ 难重悬 ☐ 不适用	重悬液类型	☐ AKC' Buffer ☐ PBS ☐ 其他：
重悬次数		终体积	mL（或 μL ，注明单位）

表 A. 7 游离核酸去除与富集液保存记录表

项目	记录内容	项目	记录内容
核酸酶类型	☐ DNase I ☐ RNase ☐ DNase/RNase ☐ 未处理 ☐ 其他:	酶活性	
样品体积/酶加入量	样品: μL ; 酶: μL	孵育条件	温度: $^{\circ}\text{C}$; 时间: h
终止方式	☐ EDTA+EGTA ☐ 其他:	终止试剂终浓度	EDTA: mmol/L; EGTA: mmol/L
保存容器		保存温度	☐ 4 $^{\circ}\text{C}$ ☐ -20 $^{\circ}\text{C}$ ☐ -80 $^{\circ}\text{C}$ ☐ 其他:
是否分装	☐ 否 ☐ 是, 数量:	每管体积	
保存位置		是否发生冻融	☐ 否 ☐ 是, 次数:

表 A. 8 质量控制记录表

项目	记录内容	项目	记录内容
空白样品设置	☐ 过程空白 ☐ 现场空白 ☐ 工具空白 ☐ 未设置	空白检测结果	
污染判定	☐ 合格 ☐ 异常:	平行样品类型	☐ 生物学重复 ☐ 技术重复 ☐ 未设置
重复数量		平行样品结果	VLP 计数/回收率/差异情况:
加标对象	☐ 模式噬菌体 ☐ 灭活病毒颗粒 ☐ 荧光标记病毒颗粒 ☐ VLP 标准物质 ☐ 外源病毒内参 ☐ 未设置	加标量	
加标位置	☐ 洗脱前 ☐ 过滤前 ☐ 富集前 ☐ 其他:	检测方法	
富集前检测值		富集后检测值	
回收率	%	细胞污染结果	
游离核酸污染结果		异常处理情况	
追溯信息	主要试剂批号/配制批次: ; 滤膜/膜包批号:	设备/操作批次	设备编号: ; 操作批次:

表 A. 9 异常情况记录表

项目	记录内容	项目	记录内容
异常发生环节	☐ 采集 ☐ 保存 ☐ 运输 ☐ 交接 ☐ 洗脱 ☐ 离心 ☐ 过滤 ☐ 富集 ☐ 质控 ☐ 保存 ☐ 其他:	样品编号	
异常发生时间		异常类型	☐ 容器破损 ☐ 泄漏 ☐ 标签脱落 ☐ 温度异常 ☐ 冻融 ☐ 样品量不足 ☐ 交叉污染风险 ☐ 其他:
洗脱/离心异常	☐ 无法充分悬浮 ☐ 上清液严重浑浊 ☐ 离心异常 ☐ 样品损失 ☐ 不适用	过滤异常	☐ 堵膜 ☐ 滤膜破裂 ☐ 过滤时间过长 ☐ 不适用
富集异常	☐ 超滤膜破裂 ☐ TFF 漏液/压力异常 ☐ PEG 沉淀失败 ☐ 沉淀难重悬 ☐ 终体积异常 ☐ 不适用	质控异常	☐ 空白污染 ☐ 加标回收率异常 ☐ 平行样品差异大 ☐ 细胞污染异常 ☐ 游离核酸污染异常 ☐ 不适用
异常描述		原因分析	
处理措施		是否重新处理样品	☐ 是 ☐ 否
是否影响结果解释	☐ 否 ☐ 是 ☐ 不确定	结果处理意见	☐ 结果可用 ☐ 限定性使用 ☐ 样品作废 ☐ 重新处理
标准程序偏离	☐ 无 ☐ 有; 偏离内容:	验证依据/影响	验证依据: ; 对结果影响: ☐ 无明显影响 ☐ 有限制 ☐ 需重新处理

表 A. 10 结果报告内容核查表

序号	报告内容	是否包含
1	标准名称或所依据的方法	☐ 是 ☐ 否 ☐ 不适用
2	样品编号、采样地点、采样时间、采样深度和样品类型	☐ 是 ☐ 否 ☐ 不适用
3	土壤类型、土地利用方式、主要土壤性质和污染类型	☐ 是 ☐ 否 ☐ 不适用
4	样品保存、运输和交接情况	☐ 是 ☐ 否 ☐ 不适用
5	洗脱缓冲液类型、土壤质量、洗脱液体积、洗脱次数和洗脱条件	☐ 是 ☐ 否 ☐ 不适用
6	离心、过滤和暂存条件	☐ 是 ☐ 否 ☐ 不适用
7	富集方法、富集前体积、富集后体积、富集倍数和终体积	☐ 是 ☐ 否 ☐ 不适用
8	游离核酸去除方法	☐ 是 ☐ 否 ☐ 不适用
9	病毒回收率、空白样品、平行样品和加标回收样品结果	☐ 是 ☐ 否 ☐ 不适用
10	细胞污染和游离核酸污染控制结果	☐ 是 ☐ 否 ☐ 不适用
11	富集液保存条件	☐ 是 ☐ 否 ☐ 不适用
12	异常情况及其可能影响	☐ 是 ☐ 否 ☐ 不适用
13	结果判定和使用限制	☐ 是 ☐ 否 ☐ 不适用
14	调整参数、调整原因、验证依据及对结果的可能影响	☐ 是 ☐ 否 ☐ 不适用
15	检测人员、复核人员或项目负责人确认信息	☐ 是 ☐ 否 ☐ 不适用

表 A. 11 记录确认表

项目	记录内容	项目	记录内容
检测/处理人员		记录人员	
复核人员		项目负责人	
记录日期		备注	

附录B

（规范性）

土壤病毒回收率计算方法

B.1 土壤病毒回收率可采用病毒样颗粒计数、qPCR、ddPCR、荧光标记病毒颗粒、模式噬菌体或其他经验证方法进行测定。

B.2 采用加标回收法时，宜选用与目标病毒颗粒大小、结构和核酸类型相近的模式病毒、模式噬菌体、病毒样颗粒标准物质或外源病毒内参。

B.3 回收率按公式（B.1）计算：

$$R = (C_2 \times V_2) / (C_1 \times V_1) \times 100\% \quad \text{..... (B.1)}$$

式中：

R —— 病毒回收率，%；

C₁ —— 富集前样品中目标病毒、病毒样颗粒或内参的浓度；

C₂ —— 富集后样品中目标病毒、病毒样颗粒或内参的浓度；

V₁ —— 富集前样品体积；

V₂ —— 富集后样品体积。

B.4 当采用噬菌体效价评价回收率时，C₁ 和 C₂ 可分别以样品制备前后噬菌体效价表示，

单位宜为 PFU/mL。

B.5 当采用 qPCR 或 ddPCR 评价回收率时，C₁ 和 C₂ 可分别以目标基因拷贝数浓度表示，

单位宜为 copies/mL。

B.6 当采用 VLP 计数评价回收率时，C₁ 和 C₂ 可分别以病毒样颗粒数量浓度表示，单位

宜为 particles/mL。

B.7 回收率结果应与土壤质地、有机质含量、含水率、pH、洗脱条件、过滤条件和富集方式共同记录 and 解释。

附录 C

（规范性）

病毒样颗粒计数方法

C.1 病毒样颗粒计数可采用 SYBR Gold 或其他核酸荧光染料染色后，利用表面荧光显微镜、落射荧光显微镜、流式细胞仪或其他经验证方法进行。

C.2 试剂和材料

C.2.1 无菌 PBS 或其他适宜缓冲液。

C.2.2 SYBR Gold 或性能相当的核酸荧光染料。

C.2.3 0.02 μm 或经验证适用于病毒样颗粒截留的无机氧化铝膜、聚碳酸酯膜或其他滤膜。

C.2.4 无 DNA 酶、无 RNA 酶离心管、移液吸头和载玻片。

C.3 仪器和设备

C.3.1 荧光显微镜或流式细胞仪。

C.3.2 真空过滤装置。

C.3.3 避光孵育装置或避光容器。

C.4 测定步骤

C.4.1 取病毒洗脱液、过滤后样品或病毒富集液适量，根据病毒样颗粒丰度进行适当稀释。

C.4.2 加入荧光染料并避光孵育，使病毒样颗粒充分染色。染料稀释比例、染色时间和避光条件应按照染料说明书并结合实验室方法验证结果确定，同一批可比样品应保持一致。

C.4.3 采用滤膜截留法时，将染色样品过滤至适宜滤膜上，置于载玻片上观察。

C.4.4 采用显微镜计数时，应随机选择多个视野进行计数，并保证计数视野具有代表性。每个样品宜至少计数 3 个技术重复或不少于实验室验证确定的有效视野数；当视野间变异较

大时，应增加视野数量或重新制样。

C.4.5 采用流式细胞仪计数时，应设置空白对照、荧光阈值和门控参数，并记录仪器设置。

检测前宜按仪器质量控制要求进行校准；使用标准颗粒或其他校准材料时，应记录名称、批号和设置参数，以保证批次间可比性。

C.5 结果表示

C.5.1 病毒样颗粒浓度可按公式（C.1）计算：

$$N = (n \times A \times D) / (a \times V) \dots\dots\dots (C.1)$$

式中：

N——病毒样颗粒浓度，particles/mL；

n——平均每个视野计数的病毒样颗粒数；

A——滤膜有效过滤面积；

a——单个视野面积；

D——稀释倍数；

V——过滤样品体积，mL。

C.5.2 若采用流式细胞仪计数，结果应根据进样体积、稀释倍数和仪器计数结果换算为particles/mL。VLP 计数表示具有病毒样颗粒特征的颗粒数量，不应直接解释为具有感染性的病毒数量。

C.6 质量控制

C.6.1 每批计数应设置染色空白和缓冲液空白。

C.6.2 每个样品宜至少设置 3 个技术重复或多个显微视野。

C.6.3 若背景荧光较高、颗粒聚集明显或视野分布不均，应重新稀释、过滤或染色。

附录 D

(资料性)

不同类型土壤病毒颗粒富集推荐参数

D.1 本附录给出了不同类型土壤病毒颗粒洗脱、离心、过滤、富集和纯化的推荐起始参数。土壤类型及“高黏粒”“高有机质”“强酸性”“高盐”等基质特征应优先依据实测土壤质地、有机质、pH、电导率或相关土壤分类资料判定，并记录实际测定值；在缺乏统一阈值时，不宜仅凭主观观察分类。实际操作时，可根据土壤质地、有机质含量、pH、盐分、污染性质、病毒回收率、病毒样颗粒计数结果和实验室方法验证结果进行调整。

D.2 不同类型土壤病毒颗粒富集推荐参数见表 D.1。

表 D.1 不同类型土壤病毒颗粒富集推荐参数

土壤类型	主要基质特征	推荐洗脱缓冲液	推荐液土比	5.00 g 土壤第一次洗脱体积	洗脱次数	离心处理	过滤方式	推荐富集方法	是否建议进一步纯化	注意事项
低有机质砂土、矿质土	有机质和黏粒含量较低，过滤较通畅	PBS 或 AKC' Buffer	3:1~4:1	15 mL~20 mL	3 次	4700 × g, 10 min, 4 °C 或 15000 × g, 20 min, 4 °C	可直接 0.22 μm PES 过滤	超滤离心法	一般不需要	若病毒丰度低，可适当扩大起始土壤量或采用 TFF

土壤类型	主要基质特征	推荐洗脱缓冲液	推荐液土比	5.00 g 土壤第一次洗脱体积	洗脱次数	离心处理	过滤方式	推荐富集方法	是否建议进一步纯化	注意事项
常规农田土壤	基质复杂度中等, 适用性较广	AKC' Buffer	3:1~5:1	15 mL~25 mL	3 次	15000 × g, 20 min, 4 °C	0.45 μm 预过滤 +0.22 μm PES 过滤, 或直接 0.22 μm PES 过滤	超滤离心法	根据富集液颜色和浊度确定	同一批样品应保持液土比和富集方法一致
森林土壤	根系、凋落物和腐殖质较多	AKC' Buffer	5:1 左右	25 mL 左右	3 次	15000 × g, 20 min, 4 °C; 必要时重复离心	0.45 μm 预过滤 +0.22 μm PES 过滤	超滤离心法或 TFF	建议进行超滤换液; 腐殖质高时进一步纯化	应去除粗根和凋落物, 避免过滤堵塞
草地土壤	根系较多, 团聚体较明显	AKC' Buffer	3:1~5:1	15 mL~25 mL	3 次	15000 × g, 20 min, 4 °C	0.45 μm 预过滤 +0.22 μm PES 过滤	超滤离心法	根据样品浊度确定	根际土应注明根系处理方式
高黏粒土壤、红壤、酸性黏土	黏粒和铁铝氧化物含量高, 病毒吸附强	AKC' Buffer	5:1~8:1	25 mL~40 mL	3 次	15000 × g, 20 min, 4 °C; 必要时重复离心	0.45 μm 预过滤 +0.22 μm PES 过滤	超滤离心法或 TFF	建议进行超滤换液或密度梯度纯化	洗脱液 pH 宜控制在 6.5~7.5; 不宜强行高压过滤。高黏粒判定宜结合实测黏粒含量和过滤表现。
高有机质土壤、泥炭土	腐殖质含量高, 黏度较高, 易堵膜	AKC' Buffer	5:1~8:1	25 mL~40 mL	3 次	15000 × g, 20 min, 4 °C; 可重复离心	0.45 μm 预过滤 +0.22 μm PES 过滤	TFF 或超滤离心法; 体积大时优先 TFF	建议进一步纯化	过滤可能耗时较长; 富集液颜色深时宜进行纯化。高有机质判定宜结合实测有机质含量和基质表现。

土壤类型	主要基质特征	推荐洗脱缓冲液	推荐液土比	5.00 g 土壤第一次洗脱体积	洗脱次数	离心处理	过滤方式	推荐富集方法	是否建议进一步纯化	注意事项
湿地土壤	含水率高, 还原性强, 有机胶体多	AKC' Buffer	5:1 左右	25 mL 左右	3 次	15000 × g, 20 min, 4 °C; 必要时自然沉降后离心	0.45 μm 预过滤 +0.22 μm PES 过滤	TFF 或超滤离心法	建议进一步纯化	样品应低温避光处理, 避免长时间室温放置
盐碱土壤	pH 和盐分较高, 离子强度可能影响颗粒稳定性	AKC' Buffer 或 PBS	3:1~5:1	15 mL~25 mL	3 次	15000 × g, 20 min, 4 °C	0.45 μm 预过滤 +0.22 μm PES 过滤	超滤离心法	根据盐分残留情况建议超滤换液	应记录 pH 和电导率; 是否调整 MgSO ₄ 浓度或缓冲体系需经方法验证。
强酸性土壤	pH 低, 病毒吸附可能增强	AKC' Buffer	5:1 左右	25 mL 左右	3 次	15000 × g, 20 min, 4 °C	0.45 μm 预过滤 +0.22 μm PES 过滤	超滤离心法	根据富集液状态确定	应记录实测 pH; 洗脱缓冲液 pH 宜控制在 6.5~7.5; 是否调节样品体系需经方法验证。
冻土、永久冻土或低温土壤	低温保存, 解冻可能影响颗粒释放	AKC' Buffer	5:1 左右	25 mL 左右	3 次	15000 × g, 20 min, 4 °C	0.45 μm 预过滤 +0.22 μm PES 过滤	超滤离心法或 TFF	根据腐殖质含量确定	应在 4 °C 缓慢解冻, 并尽量全程 4 °C 操作
重金属污染土壤	金属离子可能影响病毒吸附和酶处理	AKC' Buffer 或 PBS	3:1~5:1	15 mL~25 mL	3 次	15000 × g, 20 min, 4 °C	0.45 μm 预过滤 +0.22 μm PES 过滤	超滤离心法	建议根据富集液颜色和污染水平确定	不宜加入 EDTA 等螯合剂, 除非经过方法验证

土壤类型	主要基质特征	推荐洗脱缓冲液	推荐液土比	5.00 g 土壤第一次洗脱体积	洗脱次数	离心处理	过滤方式	推荐富集方法	是否建议进一步纯化	注意事项
农药污染土壤	有机污染物可能增加疏水吸附和杂质共富集	AKC' Buffer	5:1 左右	25 mL 左右	3 次	15000 × g, 20 min, 4 °C; 必要时重复离心	0.45 μm 预过滤 +0.22 μm PES 过滤	超滤离心法或 TFF	建议进一步纯化	是否添加表面活性剂暂不作统一规定, 应经验证
石油或有机污染土壤	疏水性强、黏附性强, 易共富集有机杂质	AKC' Buffer	5:1~8:1	25 mL~40 mL	3 次	15000 × g, 20 min, 4 °C; 必要时重复离心	0.45 μm 预过滤 +0.22 μm PES 过滤	TFF 或超滤离心法	建议进一步纯化	富集液若黏稠或颜色深, 应进行超滤换液或密度梯度纯化
污泥施用土壤、有机肥长期施用土壤	有机质、胶体和细胞碎片较多	AKC' Buffer	5:1~8:1	25 mL~40 mL	3 次	15000 × g, 20 min, 4 °C; 可重复离心	0.45 μm 预过滤 +0.22 μm PES 过滤	TFF 或超滤离心法	建议进一步纯化	应重点控制细胞污染和游离核酸污染
生物炭改良土壤	吸附能力强, 可能造成病毒颗粒损失	AKC' Buffer	5:1~8:1	25 mL~40 mL	3 次	15000 × g, 20 min, 4 °C	0.45 μm 预过滤 +0.22 μm PES 过滤	超滤离心法或 TFF	根据回收率确定	应设置加标回收样品评价吸附损失
根际土壤	根系分泌物和细胞碎片较多	AKC' Buffer	5:1 左右	25 mL 左右	3 次	15000 × g, 20 min, 4 °C	0.45 μm 预过滤 +0.22 μm PES 过滤	超滤离心法	根据细胞污染情况确定	应记录根系去除方式和根际土收集方式

D.3 当样品用于不同土壤类型或不同处理之间比较时, 应优先保持同一类土壤样品的洗脱缓冲液、液土比、洗脱次数、过滤方式和富集方法一致。若不同土壤类型因基质差异必须采用不同参数, 应在结果报告中说明调整原因。

D.4 对于低病毒丰度土壤, 可通过增加起始土壤质量、增加洗脱液总体积、采用 TFF 处理较大体积洗脱液或合并多个平行洗脱液等方式提高最终病毒颗粒富集量。合并样品时应记录每份样品的起始质量和洗脱液体积。

D.5 对于易堵膜样品，应优先通过增加离心、降低单张滤膜负荷、更换滤膜、采用 0.45 μm 预过滤和缩短过滤时间等方式处理，不宜通过提高真空度或强行加压完成过滤。

D.6 对于富集液颜色深、黏度高、盐分高或疑似腐殖质、PEG、盐类残留较多的样品，宜进行超滤换液、透析或密度梯度离心等进一步纯化。

D.7 表 D.1 中涉及盐碱土壤缓冲体系调整、强酸性土壤 pH 调整、有机污染土壤助洗脱组分、CsCl 或蔗糖密度梯度具体参数等内容，应结合后续方法验证或文献资料进一步确定。

D.8 推荐参数调整触发条件包括：过滤速度持续下降或频繁堵膜；加标回收率或病毒回收率低于实验室控制范围；滤液或富集液颜色明显加深、黏度升高或出现大量絮状物；盐分、腐殖质、PEG 或其他杂质对后续检测产生明显抑制；平行样差异超过实验室控制范围。出现上述情况时，应按照本附录和第 9 章要求调整参数并验证。

D.9 参数调整的一般决策顺序宜为：先优化离心和预过滤以降低颗粒负荷；再根据样品体积和过滤难度选择超滤离心或 TFF；当设备条件受限时可采用 PEG 沉淀，并关注杂质共沉淀；如富集液仍存在高盐、高腐殖质或高黏度问题，应增加换液、透析或密度梯度等纯化步骤。不同处理组间进行比较时，应尽可能保持相同技术路线。

参考文献

- [1] Trubl, G., Solonenko, N., Chittick, L., Solonenko, S. A., Rich, V. I., and Sullivan, M. B. Optimization of viral resuspension methods for carbon-rich soils along a permafrost thaw gradient. *PeerJ*, 2016, 4: e1999.
- [2] Trubl, G., Solonenko, N., Li, Y. F., Roux, S., Bolduc, B., Rodríguez-Ramos, J., Carlson, M., Elie-Fadrosh, E. D., Rich, V. I., and Sullivan, M. B. Soil viral extraction protocol for ssDNA and dsDNA viruses.
- [3] Trubl, G., Jang, H. B., Roux, S., et al. Coming-of-age characterization of soil viruses. *mSystems*, 2020.
- [4] Santos-Medellín, C. B., et al. Viromes outperform total metagenomes in revealing the spatiotemporal patterns of agricultural soil viral communities. *The ISME Journal*, 2021.
- [5] Roux, S., et al. Minimum Information about an Uncultivated Virus Genome (MIUViG). *Nature Biotechnology*, 2019.