

# 《土壤病毒颗粒富集技术规范》编制说明

## 一、工作简况

### （一）任务来源

1. 行业计划立项情况：本标准由中国科学院南京土壤研究所牵头申报中国土壤学会团体标准制定项目，编制类型为“制定”。2026 年 7 月完成立项函评，相关领域专家均同意立项。现有材料未载明正式立项文号和项目编号，最终以中国土壤学会正式立项文件为准。
2. 提出与归口单位：本标准由中国土壤学会提出并归口管理。
3. 立项依据：依据《中华人民共和国标准化法》《团体标准管理规定》等有关要求，针对目前土壤病毒颗粒提取与富集方法多样、不同实验室在洗脱缓冲液、液土比、离心过滤条件、富集方式和质量控制指标等方面缺乏统一技术约定的问题，结合土壤病毒组学、土壤微生物生态学和环境微生物监测的实际需求，制定覆盖样品采集、保存运输、病毒颗粒洗脱、过滤、富集、质量控制和结果报告的统一技术规范。

### （二）协作 / 起草单位

1. 牵头起草单位：中国科学院南京土壤研究所。
2. 参编单位：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。

### （三）主要工作过程

1. 前期调研与资料收集阶段：围绕土壤病毒颗粒洗脱、过滤、浓缩富集和质量控制等关键环节，系统梳理实验室常用方法及 GB/T 6682、GB 19489、GB/T 27403、GB/T 40226—2021、HJ/T 166、ISO 11063:2020 等相关标准文件，分析不同土壤基质对病毒颗粒释放、过滤和回收的影响，形成标准总体技术框架。
2. 标准草案编制阶段（2026 年 7 月前后）：根据农田、森林、草地、湿地、酸性土、盐碱土、冻土、泥炭土、高黏粒、高有机质及污染土壤等不同基质特点，对样品采集与保存、AKC' Buffer/PBS 洗脱、离心与过滤、超滤离心、切向流过滤（TFF）、PEG8000 沉淀、游离核酸去除、质量控制和

结果记录等内容进行系统整理，形成《土壤病毒颗粒富集技术规范》草案。

3. 立项函评与修改阶段（2026年7月9日—7月14日）：中国土壤学会组织相关专家开展立项函评。专家总体认可项目必要性、技术基础和可操作性，同时提出进一步明确研究对象和适用范围、补充关键参数验证依据、细化不同富集方法选择原则、增加技术路线图、强化生物安全和记录表客观量化等意见。起草组对意见逐条梳理，并纳入后续标准修订。
4. 征求意见与完善阶段（2026年9月）：在前期草案基础上，结合专家评审意见对标准进行系统修订，重点扩展适用土壤类型和后续用途，增加病毒颗粒富集液、富集倍数等术语，补充生物安全与个人防护、消毒与废弃物处置、样品量与冻融要求，完善三类富集方法的选择逻辑和技术路线，并对附录记录表的过滤状态、堵膜情况、沉淀状态及全过程追溯信息进行细化。

#### **（四）起草组成员及其所做的主要工作**

1. 叶茂：项目总负责人，负责标准总体技术路线、框架设计、关键技术内容统筹及全过程质量控制。
2. 姚柯渝、刘鹏、付玉豪：负责样品采集、保存、运输和交接条款编制，参与标准资料汇总、专家意见整理及野外验证方案设计。
3. 孙明明、王超、陈林：负责病毒颗粒洗脱、离心和过滤技术条款编制，参与不同洗脱和过滤条件的室内比对与方法优化。
4. 朱冬、李弘哲、俞萍锋：负责超滤离心、切向流过滤、PEG 沉淀和游离核酸去除等富集技术条款编制及相关方法验证。
5. 张宴、李冠霖、胡建：负责质量控制、病毒回收率、病毒样颗粒计数、细胞污染和游离核酸污染控制等内容编制。
6. 王晨、刘强、张文：负责不同类型土壤推荐参数、数据记录与结果报告表及附录内容编制。
7. 吴世茂、钱佳：负责术语和定义、规范性引用文件梳理、标准文本规范性及前后对应关系校核。

## **二、标准编制原则及主要内容确定依据**

### **（一）编制原则**

1. 依法合规、规范编制：按照 GB/T 1.1—2020 的结构和起草规则组织标准文本，符合团体标准管理要求，并与实验室生物安全、实验室质量控制和土壤环境监测等现行标准相衔接。
2. 科学性原则：以病毒颗粒从复杂土壤基质中的释放、细胞和颗粒杂质去除、浓缩富集及污染控制为技术主线，采用病毒回收率、VLP 计数、空白、平行样和加标回收等指标评价方法性能。
3. 针对性与适应性原则：充分考虑不同土壤类型在黏粒含量、有机质、pH、盐分和污染性质方面的差异，设置可供选择的洗脱液、液土比、过滤方式和富集路径，并允许在经验证的前提下进行参数调整。
4. 科学性与可操作性并重：优先采用恒温振荡、冷冻离心、0.22 μm 过滤、超滤离心、TFF 和 PEG 沉淀等科研和检测实验室可获得的技术，避免设置不必要的高设备门槛。
5. 全流程闭环质量控制：从采样、保存运输、洗脱、过滤、富集、游离核酸去除到富集液保存和结果报告，设置空白样、平行样、加标回收、病毒回收率、细胞污染、游离核酸污染及异常情况记录要求，形成可追溯质量控制链。
6. 协调互补原则：与 GB/T 6682、GB 19489、GB/T 27403、GB/T 40226—2021、HJ/T 166 和 ISO 11063:2020 等现有文件形成衔接，对其已规定的通用要求不重复替代，重点补充土壤病毒颗粒富集这一专门技术环节。

## （二）标准核心内容及确定依据

本标准为全新制定的中国土壤学会团体标准，无旧版标准，不涉及新旧版本技术条款对比。标准围绕“土壤样品—病毒颗粒洗脱液—病毒颗粒富集液”的前处理链条设置技术要求，各章节主要内容及确定依据如下：

### 1. 范围（第 1 章）

规定土壤病毒样品采集、保存、运输、病毒洗脱、富集、质量控制和数据记录要求。适用对象由常规农田、森林、草地、湿地和污染土壤扩展至根际土壤、酸性土壤、盐碱土壤、冻土、泥炭土和高有机质土壤等环境样品。对于高黏粒、高有机质、极端 pH、高盐分或复杂污染样品，要求结合附录 D 的推荐起始参数进行方法验证。标准获得的病毒颗粒富集液可用于 VLP 计数、病

毒组学分析及其他经验证的后续用途；涉及感染性评价、培养验证或 RNA 病毒研究时，应对核酸酶处理、保存和纯化条件另行验证。上述设置用于明确标准边界，避免与后续测序和生物信息分析环节混淆。

## 2. 规范性引用文件（第 2 章）

引用 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》和 ISO 11063:2020《Soil quality — Direct extraction of DNA from soil samples》等文件，为实验用水、生物安全、实验室质量管理、土壤采样及后续分子分析提供通用依据。

## 3. 术语、定义和缩略语（第 3 章）

设置土壤病毒、病毒样颗粒（VLP）、病毒颗粒洗脱、病毒颗粒洗脱液、病毒颗粒富集、超滤离心法、切向流过滤（TFF）、聚乙二醇沉淀、病毒回收率、VLP 计数、病毒颗粒富集液和富集倍数等术语，统一不同实验室在样品形态、处理过程和结果表达方面的技术口径。其中特别明确“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 VLP 浓度增加倍数。

## 4. 试剂与材料（第 4 章）

规定分析纯及以上试剂、符合 GB/T 6682 一级水要求的实验用水，以及 PBS、AKC' Buffer、1% BSA、DNase I、EDTA/EGTA、PEG8000、NaCl、0.22  $\mu\text{m}$  PES 滤膜和 30 kDa~100 kDa 超滤装置等。AKC' Buffer 的组成、pH 和使用前除菌要求在标准中予以明确；其各组分具体浓度、配制顺序和保存期限应依据编制组方法验证结果在实验室作业文件中固定，不在缺乏充分验证数据的情况下人为给出统一数值。

## 5. 仪器和设备（第 5 章）

规定采样器具、0.01 g 级电子天平、恒温振荡器、涡旋振荡器、高速冷冻离心机、真空过滤系统、超滤浓缩装置、TFF 系统、生物安全柜、VLP 计数设备、qPCR/ddPCR 设备和低温保存设备等。根据专家意见，补充生物安全与个人防护、消毒与废弃物处置要求，对来源不明或可能含潜在病原宿主的样品要求依据 GB 19489 开展风险评估。

## 6. 样品采集、保存、运输和交接（第 6 章）

一般农田、草地和森林表层土壤可采集 0 cm~20 cm 土层，特殊样品根据研究目的确定采样深度。每个混合样一般由 5 个~10 个子样组成，每份用于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，其余样品用于平行样、加标回收、质控、复核或备用；特殊样品采样量可增加至不少于 100 g。样品采集后保持低温、避光和原始含水状态，宜在 24 h 内处理；不能及时处理时采用 -80 °C 保存，-20 °C 仅用于短期保存，并限制反复冻融。

## 7. 病毒颗粒洗脱（第 7 章）

常规单次称取 5 g~10 g 鲜土，以 AKC' Buffer 或 PBS 洗脱。液土比根据基质约为 3:1~8:1；推荐在 4 °C、400 rpm 条件下振荡 15 min~30 min，再涡旋 3 min；固定角转子可采用 15000×g、20 min、4 °C，水平转子可采用 4700×g、10 min、4 °C。原土壤沉淀重复洗脱 2 次，共进行 3 次洗脱。常规样品采用 0.22 μm PES 滤膜过滤，高颗粒、高腐殖质或易堵膜样品先进行 0.45 μm 预过滤。上述条件定位为推荐起始参数，特殊基质偏离时应通过 VLP 计数、加标回收率、病毒回收率或其他验证指标确认。

## 8. 病毒颗粒富集（第 8 章）

规定超滤离心、TFF 和 PEG 沉淀三类技术路线，并按照样品体积、病毒丰度、颗粒物和腐殖质水平、过滤通畅性及实验室设备条件进行选择。超滤离心适用于约 10 mL~200 mL 的中小体积洗脱液，推荐浓缩至约 250 μL~500 μL；TFF 适用于约 100 mL 至数 L 的大体积或低病毒丰度样品，推荐浓缩至约 0.5 mL~10 mL；PEG8000 沉淀适用于设备受限或需要低成本富集的场景，推荐 PEG8000 终浓度 8%~10%、NaCl 0.3 mol/L~0.5 mol/L、4 °C 孵育 4 h~16 h，并在 10000×g~15000×g 条件下离心 30 min~60 min。游离核酸去除主要用于降低未受衣壳保护的核酸干扰，以 RNA 病毒或病毒感染性为主要研究目标时，应单独验证核酸酶处理条件。

## 9. 质量控制（第 9 章）

每批样品至少设置过程空白，并根据采样任务设置现场空白或工具空白；方法验证、标准化研究或方法比较时设置不少于 3 个平行样；基体加标样用

于评价洗脱、过滤、富集和保存损失。质量控制内容包括 VLP 计数、病毒回收率、加标回收率、细胞污染和游离核酸污染。病毒回收率一般宜不低于 5%，并要求实验室结合代表性土壤类型建立内部控制范围。对高黏粒、高有机质、低病毒丰度和污染土壤，可依据方法验证结果合理调整控制范围，并在报告中说明。

#### 10. 数据记录与结果报告（第 10 章）

要求完整记录样品基本信息、保存运输、洗脱和过滤参数、富集方式和关键运行参数、核酸酶处理、质量控制、异常情况、调整参数及验证依据。结果报告应包含方法信息、质量控制结果、异常及可能影响、结果判定和使用限制，并由检测人员、复核人员或项目负责人确认，以保障全过程可追溯和跨实验室结果解释的一致性。

#### 11. 附录 A~D

附录 A 为资料性附录，提供样品信息、采集保存运输、洗脱、过滤、富集、质量控制、异常情况和结果报告记录表；附录 B 为规范性附录，规定病毒回收率计算方法；附录 C 为规范性附录，规定 VLP 计数方法；附录 D 为资料性附录，针对低有机质砂土、常规农田土、森林土、草地土、高黏粒/红壤、泥炭/高有机质土、湿地土、盐碱土、强酸性土、冻土和污染土壤等给出推荐起始参数。附录设置用于统一计算和记录口径，并为不同土壤基质提供可操作的参数选择依据。

### （三）主要技术参数的论据与设置思路

1. 低温原则：样品保存、运输、洗脱、离心、过滤和多数富集步骤尽量在低温条件下进行，核心目的是减少病毒颗粒失活、核酸降解以及微生物继续生长造成的群落组成偏移。
2. 洗脱体系与液土比：AKC' Buffer 适用于多数复杂土壤基质，PBS 可用于低有机质、低黏粒且过滤通畅的样品。液土比采用约 3:1~8:1 的推荐范围，高黏粒、高有机质、强酸性和高吸附性样品提高液土比，以降低基质吸附和黏度对病毒颗粒释放的影响。
3. 振荡、涡旋和重复洗脱：400 rpm 振荡 15 min~30 min 与短时涡旋用于促进土壤团聚体分散并释放吸附态病毒，同时避免强烈超声、玻璃珠研磨和

长时间高速匀浆对病毒衣壳造成破坏；三次洗脱用于提高累计回收率。

4. 离心与过滤：固定角转子和水平转子采用不同推荐离心力和时间，以适应不同设备条件；0.22 μm PES 作为常规终过滤孔径，0.45 μm 作为高颗粒、高腐殖质或易堵膜样品的预过滤孔径，在细胞去除、堵膜风险和病毒损失之间取得平衡。
5. 富集方法分级：超滤离心适合中小体积样品，TFF 适合大体积或低病毒丰度样品，PEG 沉淀适合设备受限或低成本场景。标准不强制单一路线，而是以样品体积、基质性质、设备条件和质量控制结果共同约束方法选择。
6. 病毒回收率与 VLP 计数：附录 B 以  $R=(C_2 \times V_2)/(C_1 \times V_1) \times 100\%$  计算病毒回收率，可结合 PFU、qPCR/ddPCR、VLP 计数或其他经验证方法评价；附录 C 通过荧光显微镜或流式细胞术开展 VLP 计数。二者分别从回收损失和颗粒数量角度评价富集效果和过程稳定性。
7. 不同土壤类型的参数适配：附录 D 对不同基质给出推荐起始条件，并将堵膜、回收率偏低、滤液颜色较深、盐分残留或有机杂质共富集等作为参数调整的重要信号。对于偏离推荐条件的操作，要求记录原因、调整内容和验证依据。

### 三、试验验证分析、技术经济论证、预期综合效益

#### （一）主要试验验证综述报告

标准关键参数需要由代表性土壤样品的方法验证结果予以支撑。现有编制材料已经形成液土比、离心过滤、三类富集方法、回收率和 VLP 计数等技术框架，但未提供完整的验证地点、样本类型、样本量、重复数、原始数据和统计结果。因此，本编制说明对现有材料能够支持的验证内容进行归纳，不虚构具体效应量或统计结论；正式报批前应将完整验证结果作为技术佐证材料补充。

1. 洗脱体系比较：比较 AKC' Buffer 与 PBS 在常规农田土、酸性红壤或高黏粒土、盐碱土、高有机质土等代表性基质中的 VLP 回收、过滤通畅性和背景杂质水平，用于验证洗脱液选择原则及 AKC' Buffer 配方稳定性。
2. 液土比与洗脱次数：比较 3:1、5:1、8:1 等液土比以及 1~3 次洗脱的累计回收情况，用于验证“不同基质采用差异化液土比”和“共 3 次洗脱”的设置合理性。

3. 离心与过滤条件：比较固定角转子与水平转子推荐方案，并比较 0.45  $\mu\text{m}$  预过滤+0.22  $\mu\text{m}$  终过滤和直接 0.22  $\mu\text{m}$  过滤对 VLP 保留、细胞去除和堵膜情况的影响。
4. 超滤离心法验证：围绕 30 kDa~100 kDa 膜截留范围、1% BSA 预处理、1500 $\times$ g~4000 $\times$ g 离心条件以及终体积控制，评价病毒回收率、膜吸附和堵膜情况。
5. 切向流过滤法验证：围绕不同起始体积、膜包参数、跨膜压力、循环流速和系统冲洗条件，评价回收率、系统残留和交叉污染风险，并建立设备运行的实验室控制范围。
6. PEG 沉淀法验证：比较 PEG8000 终浓度 8%~10%、NaCl 0.3 mol/L~0.5 mol/L 以及 4 h~16 h 孵育条件对病毒回收率、沉淀重悬和腐殖质、盐类等杂质共沉淀的影响。
7. 游离核酸去除验证：比较核酸酶处理前后游离 DNA 信号变化和病毒颗粒回收保持情况，确认反应终止条件；以 RNA 病毒或感染性病毒为对象时，应单独验证核酸酶对目标病毒的影响。
8. 质量控制适用性验证：采用模式噬菌体、外源病毒内参、荧光标记病毒颗粒或 VLP 标准物质开展加标回收，评价空白、平行样、加标回收率和病毒回收率控制要求在不同土壤基质中的适用性，并据此建立实验室内部控制范围。

正式报批材料建议至少报告土壤类型及主要理化性质、样品数量、生物学和技术重复、对照设置、检测方法、病毒或 VLP 定量方式、统计方法、均值和变异指标、回收率分布、异常值处理原则以及关键参数最终被采纳的依据。

## **（二）技术经济论证**

1. 技术成本：本标准采用常规冷冻离心、PES 过滤、超滤离心、TFF、PEG 沉淀、荧光计数和 qPCR/ddPCR 等成熟技术，不要求所有实施单位同时配置全部设备。中小体积样品可优先采用超滤离心，大体积样品可采用 TFF，设备受限条件下可采用 PEG 沉淀，从而为不同实验室提供分层技术路线。
2. 耗材与试剂可获得性：PBS、BSA、DNase I、PEG8000、NaCl、PES 滤膜

和常规超滤管均为科研和检测实验室常用材料，市场供应成熟；标准未限定特定品牌和型号，有利于控制实施成本。

3. 工作效率：统一样品采集、低温保存、洗脱、过滤、富集、质量控制和记录要求，可减少因方法不一致导致的重复摸索、样品损失和返工，提高批量样品处理的一致性。
4. 技术成熟度：标准所采用的主要方法均为土壤病毒研究和环境病毒富集中常用技术，实施单位可根据样品体积和设备条件选择路线。正式技术经济论证中仍建议补充典型批次的耗材、工时及设备使用成本，以形成更完整的成本依据。

### **（三）预期效益**

1. 科学与技术效益：推动土壤病毒颗粒富集由不同实验室自定义流程向可记录、可验证、可比较的标准化流程转变，为土壤病毒组学、病毒生态学和病毒—宿主互作研究提供统一前处理基础。
2. 质量管理效益：建立空白、平行、加标回收、病毒回收率、细胞污染和游离核酸污染等质量控制链条，提升结果可追溯性和异常处置能力。
3. 应用效益：通过不同土壤类型推荐参数和多种富集路线，提高标准在农田、森林、草地、湿地、根际、酸性、盐碱、冻土、泥炭、高有机质和污染土壤等场景中的可实施性。
4. 经济效益：统一流程和记录要求有望减少重复试验、重复采样和样品损失，降低跨单位方法比对与协作沟通成本。现有材料不足以支持具体百分比或金额，因此本说明不设置未经验证的量化经济收益指标。

## **四、与国际、国外同类标准技术内容对比情况**

### **（一）国外相关标准现状**

1. 现有编制材料中引用 ISO 11063:2020 《Soil quality — Direct extraction of DNA from soil samples》，其技术对象为土壤 DNA 的直接提取，与本标准规定的“病毒颗粒洗脱—过滤—富集—质量控制”技术链不同，不能直接替代本标准。
2. 现有编制材料未提供与“土壤病毒颗粒富集”完全对应的国际或国外完整标准。正式报批前应继续检索 ISO、ASTM、EN/BS、US EPA 及环境病

毒样品前处理相关文件，形成检索记录，并对命中文件的适用对象、技术步骤和质量控制要求进行核对。

3. 土壤病毒颗粒富集具有明显的固体基质特征。土壤中病毒颗粒受矿物表面、黏粒和有机质吸附影响显著，现有针对水体或直接核酸提取的通用技术不能完全覆盖土壤病毒释放、除细胞、浓缩和回收率评价的全过程，因此需要形成面向该细分技术环节的专门规范。

## **(二) 技术差异对比**

1. 技术对象：本标准直接针对完整或近完整病毒颗粒的释放与富集，而非直接从土壤中提取总 DNA，因此更加关注病毒衣壳完整性、颗粒吸附损失、细胞污染和游离核酸污染。
2. 适用基质：本标准覆盖多类土壤，并针对高黏粒、高有机质、极端 pH、高盐和污染土壤设置参数适配原则，突出复杂土壤基质对病毒回收的影响。
3. 富集路线：本标准同时规范超滤离心、TFF 和 PEG 沉淀三类技术路线，并依据样品体积、病毒丰度、基质特征和设备条件选择，不限定单一富集方式。
4. 质量控制：本标准以过程空白、平行样、加标回收、病毒回收率、VLP 计数、细胞污染和游离核酸污染构成全流程质控体系，强调参数调整需有验证依据和全过程记录。

## **五、采用国际标准情况及未采用原因说明**

1. 本标准未等同采用（IDT）或修改采用（MOD）某一项完整国际标准，而是根据我国土壤病毒颗粒富集的技术对象和实验室应用需求自主制定。
2. 未直接采用国际标准的主要原因是：现有编制材料中未发现可完整覆盖土壤病毒颗粒洗脱、过滤、浓缩富集和质量控制的对应国际标准；ISO 11063:2020 关注土壤 DNA 直接提取，技术对象和过程边界不同；水体病毒浓缩或一般环境病毒检测方法亦不能直接解决土壤固体基质的吸附、堵膜和杂质共富集问题。
3. 本标准在编制过程中参考现行国际标准的通用原则，并与国内土壤监测、实验室质量控制、生物安全和后续分子分析要求保持协调。正式报批前应对国际标准检索结果进行更新，确保相关描述与最新文件状态一致。

## 六、与法律法规、现行相关标准的协调关系

### （一）与法律法规协调

1. 本标准作为推荐性团体标准，编制和实施应符合《中华人民共和国标准化法》及团体标准相关管理规定。
2. 涉及来源不明土壤样品、潜在病原宿主、气溶胶风险及污染废弃物处置时，应遵循实验室生物安全相关法律法规和管理要求，不降低法定安全底线。
3. 本标准规定的技术要求用于土壤病毒颗粒富集前处理，不改变生态环境、自然资源、农业等部门现行土壤采样、污染防治和实验室管理规定的适用范围。

### （二）与国家标准协调

1. GB 19489《实验室生物安全通用要求》：本标准在生物安全柜使用、个人防护、风险评估和污染废弃物处置方面与其衔接。
2. GB/T 6682《分析实验室用水》：本标准规定缓冲液配制用水符合相应实验用水要求。
3. GB/T 27403《实验室质量控制规范》：本标准通过空白样、平行样、加标回收、过程记录和结果复核等要求实现质量控制衔接。
4. GB/T 40226—2021《环境微生物宏基因组检测 高通量测序法》：本标准主要规定测序前的病毒颗粒富集过程，后续涉及环境微生物高通量测序时可执行其适用要求。

### （三）与行业及国际相关文件协调

1. HJ/T 166《土壤环境监测技术规范》：本标准沿用其土壤采样和环境监测的一般原则，在此基础上细化病毒颗粒富集所需的无菌操作、低温保存、样品量和防交叉污染要求。
2. ISO 11063:2020《Soil quality — Direct extraction of DNA from soil samples》：其适用于土壤 DNA 直接提取，本标准侧重病毒颗粒富集，二者技术对象不同，可作为相关土壤分子分析技术的互补文件。

总体而言，本标准与现行法律法规及相关标准在适用范围上不存在替代关系，主要补充土壤病毒颗粒富集这一细分技术环节。当本标准条款与法律法规或强制性标准要求存在差异时，应优先执行法律法规和强制性标准。

## 七、重大分歧意见的处理经过和依据

### （一）立项函评与征求意见阶段意见处理

1. 关于关键参数依据的意见：专家建议进一步补充洗脱缓冲液选择、液土比、振荡、离心和过滤等参数的试验或文献依据。起草组采纳该意见，在标准中将相关条件明确为“推荐起始参数”，要求特殊土壤或偏离推荐条件时通过 VLP 计数、加标回收率、病毒回收率等指标进行验证；对于 AKC' Buffer 各组分具体浓度，现有材料尚不足以支持统一数值，因此采用“依据编制组方法验证结果并在实验室作业文件中固定”的处理方式，属于部分采纳。
2. 关于富集方法选择的意见：专家建议明确超滤离心、TFF 和 PEG 沉淀的适用范围、性能特点和选择原则。起草组采纳意见，按样品体积、病毒丰度、颗粒物和有机质水平、过滤难度及设备条件细化三类方法的适用场景，并在技术路线中体现方法选择。
3. 关于技术路线图的意见：专家建议增加从采样到富集液保存的完整流程。起草组采纳意见，在第 7 章增加“样品采集→低温保存与运输→土壤预处理→病毒颗粒洗脱→离心去除粗颗粒→0.45  $\mu\text{m}$  预过滤（必要时）→0.22  $\mu\text{m}$  过滤去除细胞→超滤离心/TFF/PEG 沉淀富集→游离核酸去除（按研究目的）→质量控制→富集液保存与结果报告”的技术路线。
4. 关于适用范围的意见：专家建议进一步明确研究对象和适用边界。起草组采纳意见，将范围扩展并明确至根际土壤、酸性土壤、盐碱土壤、冻土、泥炭土、高有机质土壤和污染土壤，同时补充病毒颗粒富集液的后续用途和 DNA/RNA 病毒研究中的条件限制。
5. 关于生物安全的意见：专家建议明确样品处理的生物安全等级、II 级生物安全柜使用和个人防护要求。起草组采纳意见，增设生物安全与个人防护、消毒与废弃物处置条款，并要求对来源不明或可能含潜在病原宿主的样品依据 GB 19489 开展风险评估。
6. 关于记录表客观量化的意见：专家建议减少“澄清、浑浊、堵膜、沉淀明显”等纯主观描述。起草组采纳或部分采纳意见，在附录记录表中增加过滤时间、过滤体积、滤膜更换情况、堵膜程度、沉淀颜色/体积/重悬状态、设

备和耗材信息等记录字段；对于尚缺少统一行业阈值的指标，保留定性分级并要求同步记录可量化信息。

7. 关于文本一致性的意见：专家提出附录交叉引用、术语重复、单位和“应/宜/可”使用等规范性问题。起草组采纳意见，对正文和附录进行系统校核，将错误的“附录 E”更正为实际对应的“附录 D”，明确病毒回收率计算参见附录 B，并统一术语、计量单位和前后引用。

## **（二）当前尚需进一步论证的事项**

1. AKC' Buffer 各组分的统一浓度、配制顺序和保存期限仍需以编制组完整方法验证数据为依据后最终确定。
2. 病毒回收率、加标回收率、平行样相对标准偏差等控制值在高黏粒、高有机质、强酸性和污染土壤中的适用范围，正式报批前应补充代表性样品验证数据。
3. TFF 跨膜压力、循环流速以及部分膜截留分子量的优选范围，应结合设备规格和多批次样品验证进一步形成实验室或方法控制范围。

## **（三）总体说明**

目前各类意见主要集中在技术参数证据、方法选择、生物安全、适用范围、记录量化和文本规范性等方面，均可通过补充验证依据、细化条款或明确适用条件予以协调。现阶段未出现涉及标准定位、核心流程或基本质量控制原则的不可协调重大分歧。

## **八、涉及专利的有关说明**

1. 本标准规定的病毒颗粒洗脱、离心过滤、超滤离心、切向流过滤、PEG 沉淀、核酸酶处理、VLP 荧光计数和 qPCR/ddPCR 等均属于公开通用实验技术，标准文本未限定特定品牌、专利设备型号或独占性商业试剂。
2. 标准前言设置“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”的专利风险提示。
3. 正式报批前，起草组仍应按照中国土壤学会团体标准知识产权管理要求开展必要专利检索和声明核查，形成是否涉及必要专利的结论。
4. 如发现标准实施不可避免地使用某项有效专利，应按照中国土壤学会相关程序取得专利权人声明并明确许可条件。

## **九、标准实施要求、组织 / 技术措施及过渡期建议**

### **（一）实施组织措施**

1. 标准发布后建议由中国土壤学会组织面向科研院所、高校、检测机构和相关应用单位的标准宣贯和技术培训，重点讲解不同土壤基质的参数选择、三类富集路线和质量控制要求。
2. 由起草单位核心人员组成技术答疑和实施支持团队，为样品前处理、方法验证、质量控制异常和结果记录等提供技术咨询。
3. 鼓励具有土壤病毒组学和环境微生物检测基础的实验室开展试点应用和实验室间比对，逐步建立代表性土壤基质的回收率和重复性参考范围。
4. 建立标准实施反馈机制，持续收集不同土壤类型、不同设备条件和不同研究用途下的应用情况，为后续复审和修订提供依据。

### **（二）技术保障措施**

1. 配套完善标准操作程序（SOP）、样品采集与交接记录表、洗脱与富集记录表、质量控制记录表和结果报告模板，方便实施单位直接使用。
2. 组织代表性土壤类型的比对验证，进一步完善高黏粒、高有机质、酸性、盐碱和污染土壤的参数选择与质量控制范围。
3. 对超滤离心、TFF 和 PEG 沉淀三类方法建立可追溯的设备运行和质量控制记录，必要时采用统一模式噬菌体或外源病毒内参开展实验室间能力验证。
4. 建立实施案例和常见问题库，对堵膜、腐殖质共富集、回收率偏低、细胞污染和游离核酸残留等常见问题提供标准化处置建议。

### **（三）过渡期与实施日期建议**

1. 建议标准发布之日起设置 6 个月过渡期，供实施单位完成文件转化、人员培训、仪器状态确认和实验室内部分方法验证。
2. 过渡期内可将原有实验室流程与本标准并行开展比对，重点确认病毒回收率、VLP 计数和污染控制结果的一致性。
3. 建议标准实施日期由中国土壤学会结合发布安排确定；正式发布后，相关科研和检测项目可根据合同、课题或质量体系要求逐步采用。

### **（四）配套实施建议**

1. 配套文件：建议同步发布或提供标准记录表电子模板、方法验证记录模板和典型质量控制案例。
2. 能力建设：鼓励相关实验室完善低温保存、冷冻离心、过滤、病毒颗粒计数和分子定量等基础条件，并建立样品分区、耗材批次和设备运行记录。
3. 后续标准化：可根据技术发展和实际需求，进一步研究土壤病毒颗粒纯化、病毒感染性评价、病毒核酸提取及病毒组测序等配套技术文件。

## 十、其他应予说明的事项

1. 标准属性：本文件为推荐性中国土壤学会团体标准，由相关科研、检测和应用单位自愿采用，不具有替代法律法规和强制性标准的效力。
2. 标准适用地域：标准针对土壤病毒颗粒富集的一般技术过程制定，不限定具体行政区域；不同地区和不同土壤基质可依据附录 D 推荐条件开展方法验证后使用。
3. 附录性质：附录 A“土壤病毒颗粒富集数据记录与结果报告表”和附录 D“不同类型土壤病毒颗粒富集推荐参数”为资料性附录；附录 B“土壤病毒回收率计算方法”和附录 C“病毒样颗粒计数方法”为规范性附录。
4. 标准复审：建议在标准实施后根据土壤病毒富集技术发展、实验室间比对结果和实际应用反馈，按照中国土壤学会有关要求适时开展复审；可参考团体标准常规复审周期，在实施约 5 年后重点评估修订需求。
5. 数据与记录保存：标准要求原始记录、质量控制记录和结果报告归档保存，但现有材料未规定统一保存年限。实施单位应依据项目合同、实验室质量管理体系和档案管理要求确定保存期限。
6. 无涉密内容：本标准规定内容为公开的土壤病毒颗粒富集和质量控制技术，不涉及国家秘密或其他需保密的技术信息。
7. 无替代废止文件：现有材料未显示存在与本标准技术对象完全相同、需由本标准替代或废止的中国土壤学会团体标准，本标准按新制定项目组织实施。
8. 关键证据补充：正式报批前仍应补充能够支撑 AKC'Buffer 配方、液土比、三次洗脱、不同富集方法参数范围及质量控制阈值的验证报告，并与征求意见处理表、标准正文和编制说明保持一致。