ICS 13.080.30
CCS B10

T/SSSC

中 国 土 壤 学 会 团 体 标 准

T/SSSC 0 —2026

蚯蚓肠道病毒颗粒富集技术规范

Technical Specification Enrichment of Viral Particles from the Guts of Earthworms

（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 6
6 蚯蚓采集、保存、运输和交接 7
7 肠道样品获取与病毒颗粒洗脱 8
8 病毒颗粒富集 12
9 质量控制 16
10 数据记录与结果报告 19
附录 A （资料性） 蚯蚓肠道病毒颗粒富集数据记录表 21
附录 B （规范性） 病毒回收率计算方法 32
附录 C （规范性） 病毒样颗粒计数方法 33
附录 D （资料性） 蚯蚓肠道病毒颗粒富集常规操作参数 35
参考文献 37

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、范为宝、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。

蚯蚓肠道病毒颗粒富集技术规范

1 范围

本文件规定了蚯蚓采集、保存、运输、体表清洗、解剖、肠道样品获取、病毒颗粒洗脱、富集、质量控制、数据记录和结果报告要求。

本文件适用于农田、森林、草地、湿地、污染场地及实验室培养蚯蚓的肠道病毒颗粒富集与样品制备。

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 6379.2　测量方法与结果的准确度（正确度与精密度） 第 2 部分：确定标准测量方法重复性与再现性的基本方法

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

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

土壤蚯蚓　soil earthworm

生活于土壤或土壤—凋落物界面的蚯蚓。

3.1.2

蚯蚓肠道样品　earthworm gut sample

按照规定的解剖界限，从蚯蚓体内连续取出的完整消化道样品，包括肠壁、肠腔内容物、肠道黏液及与肠道紧密结合的物质。

3.1.3

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。

3.1.4

病毒颗粒洗脱　viral particle elution

通过缓冲液浸润、剪切、振荡或轻柔匀浆，使肠道样品中的病毒颗粒进入液相的过程。

3.1.5

病毒颗粒洗脱液　viral particle eluate

肠道样品经病毒颗粒洗脱、离心和过滤后获得的含病毒颗粒液体。

3.1.6

病毒颗粒富集　viral particle enrichment

通过超滤离心、切向流过滤、聚乙二醇（PEG）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。

3.1.7

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。

3.1.8

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。

3.1.9

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。

3.1.10

病毒回收率　viral recovery rate

富集后回收的目标病毒、病毒样颗粒或外源模式病毒数量占富集前相应数量的百分比。

3.1.11

病毒样颗粒计数　VLP enumeration

采用荧光显微镜、流式细胞术或其他方法，对样品中病毒样颗粒数量进行测定的过程。

3.1.12

外源模式病毒　external process control virus

在样品处理前或特定处理步骤加入已知数量的完整病毒颗粒，用于评价病毒颗粒洗脱、过滤、富集、核酸酶处理或全过程回收效率的病毒。

3.1.13

病毒样颗粒富集物　virus-like particle-enriched fraction

蚯蚓肠道样品经规定的洗脱、澄清、过滤、富集和游离核酸去除等步骤后获得的、以病毒样颗粒为主要分析对象的富集组分。

3.2 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

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）

NaCl：氯化钠（Sodium chloride）

PBS：磷酸盐缓冲液（Phosphate-buffered saline）

PEG：聚乙二醇（Polyethylene glycol）

PES：聚醚砜（Polyethersulfone）

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）

RT-ddPCR：逆转录微滴数字聚合酶链式反应（Reverse transcription droplet digital polymerase chain reaction）

RT-qPCR：逆转录实时荧光定量聚合酶链式反应（Reverse transcription quantitative polymerase chain reaction）

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；用于样品清洗的无菌水应由符合上述要求的实验用水经灭菌处理后制备。

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，pH 应为 7.0±0.2。实验室配制的 PBS 应经 0.22 μm 滤膜除菌，商品化 PBS 应为无菌级；使用前均应预冷至 4 ℃。

4.2.2 柠檬酸钾洗脱缓冲液：质量浓度应为 1 %（w/v），即 10.0 g/L，pH 应为 7.0±0.2。配制后应经 0.22 μm 滤膜除菌，于 4 ℃保存并在使用前预冷至 4 ℃。

4.2.3 牛血清白蛋白溶液（BSA）：质量浓度应为 1 %（w/v）。配制后应经 0.22 μm 滤膜除菌，于 4 ℃保存，用于超滤膜或 TFF 膜包预处理。

4.2.4 DNase I 和 RNase I：应采用无核酸酶污染的酶制剂。核酸酶处理体系中 DNase I 终活性应为 20 U/mL，RNase I 终活性应为 50 U/mL，并含 $MgCl_2$ 5 mmol/L 和 $CaCl_2$ 1 mmol/L。

4.2.5 EDTA 溶液：浓度应为 0.5 mol/L，pH 应为 8.0。用于终止核酸酶反应时，应将反应体系中 EDTA 终浓度调至 10 mmol/L。

4.2.6 PEG8000 和 NaCl：均应采用分析纯及以上等级固体试剂。聚乙二醇沉淀时，PEG8000 和 NaCl 的终浓度分别按 8.4 规定执行。

4.2.7 消毒试剂：蚯蚓体表、操作台面和不耐高温器具外表面消毒应使用 75 %（v/v）乙醇。75 %（v/v）乙醇应密闭保存，使用后应待器具表面乙醇挥发后再接触样品。

4.3 材料

4.3.1 采样和运输容器：应采用洁净、无毒、耐低温且抗挤压的聚丙烯（PP）硬质样品盒，盒盖应

设置通气孔并能够防止蚯蚓逸出。不同平行样方应使用独立容器。

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（PP）低吸附产品；用于病毒颗粒富集液保存的冻存管宜采用低蛋白吸附和低核酸吸附产品。

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，一次性耗材宜为无 DNA 酶、无 RNA 酶和低吸附型。

4.3.4 滤膜和过滤器：预过滤和终过滤应分别采用 0.45 μm 和 0.22 μm 聚醚砜（PES）滤膜；VLP 显微计数应采用 0.02 μm 氧化铝滤膜。与样品接触的过滤器壳体应采用聚丙烯（PP）或其他低蛋白吸附材料。

4.3.5 超滤膜：常规超滤离心应采用截留分子量 30 kDa 的 PES 超滤膜，膜组件与样品接触部件应为低蛋白吸附材料。

4.3.6 切向流过滤耗材：应采用截留分子量 30 kDa 的 PES 膜包，与样品接触的管路宜采用硅胶或热塑性弹性体材料，并应满足低吸附和无菌使用要求。

5 仪器和设备

5.1 蚯蚓采集器具：包括样方框、铁锹、土铲和镊子。与土壤和蚯蚓直接接触的金属器具宜采用不锈钢材质，并应洁净、耐腐蚀和易清洗。

5.2 解剖器具：应包括不锈钢解剖剪、不锈钢尖头镊子、手术刀柄及一次性无菌刀片、玻璃或聚丙烯培养皿和可清洗消毒的解剖垫。可重复使用的金属器具应能够进行压力蒸汽灭菌。

5.3 体视显微镜：用于蚯蚓观察和肠道样品获取。

5.4 生物安全柜或洁净操作台：用于体表清洗、解剖、过滤和样品转移。

5.5 电子天平：感量不低于 0.01 g。

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

5.7 涡旋振荡器：最高转速不低于 2500 rpm。

5.8 组织剪切或匀浆装置：运行强度应可调，转速应覆盖 3000 rpm。

5.9 高速冷冻离心机：离心温度应可调至 4 ℃，最大离心力不低于 15000 ×g。

5.10 过滤系统：应可配套使用 0.22 μm 和 0.45 μm 滤膜，并能够控制真空或正压过滤压力。

5.11 超滤浓缩装置：应配备 30 kDa PES 超滤离心装置。

5.12 切向流过滤系统：应配备膜包、管路、压力监测和样品收集装置。

5.13 病毒样颗粒计数设备：应配备荧光显微镜；采用流式细胞仪进行 VLP 计数时，应与荧光显微镜计数结果进行平行校核。

5.14 核酸扩增或定量设备：应满足 qPCR、ddPCR、RT-qPCR 或 RT-ddPCR 等质量控制检测要求。

5.15 低温保存设备：应配备 2 ℃～8 ℃冰箱和−80 ℃超低温冰箱。

5.16 pH 计：最小分度值不大于 0.1 pH 单位。

6 蚯蚓采集、保存、运输和交接

6.1 蚯蚓采集

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，能够反映目标区域蚯蚓群落分布特征。

6.1.2 每个样点应设置 3 个独立平行样方，每个样方规格为 1 m×1 m。各平行样方应独立完成采集、编号和保存，不得相互混合。

6.1.3 应采用手拣法采集 0 cm～20 cm 土层中的蚯蚓。采样前应去除样方内地表植物、凋落物和其他非目标覆盖物，将 1 m×1 m×0.2 m 土体挖出后置于洁净防水布上轻柔拍散并逐层分拣。

6.1.4 每个样方应收集其中发现的全部完整活体蚯蚓。样方内未发现蚯蚓时，应记录为“未检出蚯蚓”，该平行样方不进行后续病毒颗粒富集。样方内有蚯蚓时，用于后续处理的完整活体蚯蚓应不少于 5 条，且总鲜重不低于 5.0 g；数量或总鲜重未达到要求时，应记录为“样品量不足”，不得与其他平行样方合并。

6.1.5 应剔除死亡、严重损伤、体表破裂或状态异常的个体。采样时截断或挤压破损的个体不得用于病毒颗粒富集。

6.1.6 采集后的蚯蚓应按平行样方分别置于 4.3.1 规定的运输容器中，并加入原位土壤保持湿度和活性，原位土壤体积宜占容器容积的 1/4～1/3。

6.1.7 用于病毒颗粒富集的蚯蚓应保持活体，不得采用乙醇、甲醛或其他固定剂固定保存。

6.1.8 宜同步采集对应土壤样品作为环境对照，并与蚯蚓样品建立对应编号。

6.1.9 应记录样品编号、采样日期、地点、GPS 坐标、样方面积、采样深度、土地利用方式、土壤类型、蚯蚓数量、总鲜重和采样人员。

6.2 保存、运输和交接

6.2.1 蚯蚓采集后应使用 4.3.1 规定的聚丙烯带通气孔样品盒避光运输，容器内保留 6.1.6 规定量的原位土壤，并防止挤压、积水和蚯蚓逸出。

6.2.2 运输温度应保持在（4 ± 2）℃，冷源不得与蚯蚓样品直接接触，样品不得冻结；从采集结束至到达实验室的时间不应超过 24 h。

6.2.3 蚯蚓到达实验室后应在 12 h 内完成体表清洗和解剖；暂存期间应在（4 ± 2）℃、避光和通气条件下保存。

6.2.4 用于病毒颗粒富集的蚯蚓不进行排空处理。采集后不得将蚯蚓转移至滤纸、无菌土或其他基质中排空。

6.2.5 样品交接时应核对编号、数量、状态、包装完整性和运输条件。出现死亡、泄漏、温度异常或标签缺失时，应记录异常情况并判定是否接收。

7 肠道样品获取与病毒颗粒洗脱

7.1 总则

7.1.1 体表清洗、解剖和样品转移应在II级生物安全柜或洁净操作台内进行，相关操作应符合 GB

19489 的有关要求。操作前应使用 75 %（v/v）乙醇擦拭台面并静置 10 min。

7.1.2 同一批样品应采用一致的清洗、解剖、称量、洗脱、离心和过滤条件。不同平行样品应独立操作，并保持处理顺序和操作时间尽量一致。

7.1.3 除体表乙醇消毒外，缓冲液、肠道样品和病毒颗粒洗脱液应保持在 0 ℃～4 ℃；单批样品连续室温暴露时间不应超过 15 min。

7.1.4 体表清洗、解剖和病毒颗粒洗脱过程中应同步设置相应空白样品。体表清洗空白、解剖空白和过程空白的设置及判定要求按第 9 章执行。

7.1.5 操作人员应穿戴实验服和一次性手套，并根据风险评估采取其他个人防护措施。锐器、样品残余物和污染耗材的处置，以及样品泄漏、锐器损伤等意外事件的处理，应符合 GB 19489 的有关要求。

7.2 技术要求

7.2.1 与蚯蚓、肠道样品和病毒颗粒洗脱液直接接触的器具、容器和耗材应无菌。一次性耗材应符合第 4 章规定。

7.2.2 可重复使用的不锈钢解剖剪、镊子和手术刀柄应采用压力蒸汽灭菌；不耐高温的器具外表面应使用 75 %（v/v）乙醇充分擦拭，并待乙醇挥发后使用。

7.2.3 无菌水、PBS 和柠檬酸钾洗脱缓冲液使用前应预冷至 4 ℃并充分混匀。出现沉淀、浑浊、絮状物或明显 pH 变化的缓冲液不得使用。

7.2.4 样品处理过程中应尽量减少夹持、挤压和转移次数。不得采用可能造成肠道组织严重破碎或病毒颗粒损失的强烈珠磨、长时间高速匀浆和强超声处理。

7.2.5 不同样品之间应更换无菌离心管、移液吸头和接收容器；可重复使用的解剖器具应重新灭菌后再用于下一样品。

7.3 体表清洗

7.3.1 将活体蚯蚓置于冰上 10 min，使个体活动明显降低；随后用预冷无菌水逐只漂洗 5 次，直至体表无可见土壤和植物残体。

7.3.2 将初洗后的蚯蚓完全浸入 75 %（v/v）乙醇 30 s 进行体表消毒，取出后立即用预冷无菌水连续漂洗 5 次，每次均更换新的清洗液。

7.3.3 体表清洗和消毒过程中不得挤压或刺破体壁。出现体壁破裂、肠腔内容物外泄或明显损伤的个体应弃用。

7.3.4 每批样品应收集末次漂洗液不少于 1.0 mL 作为体表清洗空白，并与实际样品同步完成后续质量控制处理。

7.4 无菌解剖与肠道样品获取

7.4.1 每个样品应使用一套独立的灭菌解剖器具或一次性无菌解剖器具；不同样品之间不得直接共用未重新灭菌的器具。

7.4.2 在体视显微镜下沿腹侧或背侧体壁纵向剪开，自咽部后端至肛门端连续分离完整消化道；同批可比样品的解剖界限应保持一致。

7.4.3 连续取出肠道样品后，应使用无菌镊子去除明显附着的体壁、体腔组织和生殖组织；肠壁与肠腔内容物不得分离。

7.4.4 肠道样品取出后宜置于预冷无菌 PBS 中轻柔漂洗 1 次，去除表面明显体腔液和组织残留，不得反复夹持或长时间浸洗。若出现肠道破裂或肠腔内容物明显外泄，应记录并弃用该肠道样品。

7.4.5 应记录肠道完整性、湿重、合并个体数和异常情况。

7.4.6 每批样品应设置解剖空白。解剖空白不加入蚯蚓样品，应使用同批解剖器具、培养皿和缓冲液，并与实际样品同步进行后续处理。

7.5 病毒颗粒洗脱

7.5.1 每份样品称取肠道样品湿重 0.50 g，置于无菌低吸附离心管中，按 10 mL/g 加入预冷 1 %柠檬

酸钾洗脱缓冲液，即 0.50 g 肠道样品加入 5.0 mL 洗脱液。肠道样品湿重不足 0.50 g 时，可合并同一平行样方内的多个完整个体至 0.50 g 左右，并记录合并个体数。

7.5.2 用无菌剪刀将肠道样品剪成 2 mm～5 mm 小段，在冰上使用组织匀浆装置以 3000 rpm 处理 1 min，不得加入玻璃珠、陶瓷珠或金属珠。

7.5.3 匀浆后立即将样品置于 4 ℃恒温振荡器，以 400 rpm 振荡 15 min。洗脱过程中不得进行强烈珠磨、长时间高速匀浆或超声处理。

7.5.4 洗脱结束后立即在 4 ℃、5000 ×g 条件下离心 10 min，将上清液转移至新的无菌低吸附离心管，再按相同条件离心 10 min。

7.5.5 两次离心后应在不扰动沉淀的条件下收集上清液。离心条件应以相对离心力“×g”表示，不得仅以 rpm 记录。

7.5.6 两次离心后上清液仍有明显颗粒或絮状物时，应再于 4 ℃、5000 ×g 离心 10 min 1 次，再进入过滤步骤。

7.5.7 应记录肠道样品湿重、缓冲液类型、加入体积、剪切和匀浆条件、洗脱时间、振荡转速、离心力、离心时间和上清液体积。

7.6 细胞去除与过滤

7.6.1 病毒颗粒洗脱液应先通过 0.45 μm PES 滤膜预过滤，再通过 0.22 μm PES 滤膜终过滤，以去除细菌、真菌、原生生物、残余细胞和颗粒碎片。

7.6.2 过滤宜在 4 ℃或冰上进行。采用真空过滤时，跨膜压差宜控制在 30 kPa～50 kPa；滤膜出现明显堵塞时应立即更换新滤膜，不得提高压力强行过滤。

7.6.3 目标病毒粒径可能大于 0.22 μm 时，可省略 0.22 μm 终过滤，仅采用 0.45 μm PES 滤膜；采用该路线时，第 9.6 规定的 16S rRNA 基因和 COI 基因污染检测均应实施。

7.6.4 单张滤膜过滤过程中出现流速明显下降时，应更换新滤膜继续过滤；不得对堵塞滤膜进行反

冲洗后继续用于同一样品。

7.6.5 不同样品应更换滤膜和接收容器。

7.6.6 过滤后宜留取不少于 1 mL 滤液用于 VLP 计数、空白检测或加标回收评价。

7.6.7 剩余滤液应尽快进行富集。不能立即处理时，宜在 4 ℃避光暂存，时间不宜超过 24 h。

8 病毒颗粒富集

8.1 总则

8.1.1 病毒颗粒富集对象为第 7 章获得的病毒颗粒洗脱液。

8.1.2 富集方法及适用条件应按表 1 选择。扩大处理量时，应保持 7.5.1 规定的液料比及其他关键条件不变，不得合并不同独立平行样品。

8.1.3 同批可比样品应采用相同的富集方法和终体积。

8.1.4 除 PEG 溶解和核酸酶反应外，富集过程宜在 4 ℃条件下进行；样品转移次数应控制在完成操作所需的最少次数。

8.1.5 首次实施本文件规定的方法，或变更过滤孔径、富集路线、关键膜材料时，应采用代表性外源模式病毒进行加标回收确认，并按 9.1.5 确定或重新确认相应控制限。

8.1.6 关键操作参数应符合本文件规定的数值或范围。确需偏离时，应经方法学确认，并记录实际参数和确认结果；相关偏离按 10.2.4 在结果报告中说明。

表 1　病毒颗粒富集方法选择

富集方法	适用情况	富集后体积	标准操作参数
超滤离心法	过滤后体积＜100 mL	0.50 mL	30 kDa PES；1 % BSA 预处理 1 h；4 ℃、1500 ×g、每次 10 min。
切向流过滤法	同一独立平行样品扩大处理量后，过滤后体积≥100 mL	5.0 mL	30 kDa PES；1 % BSA 循环 30 min；跨膜压力 35 kPa～50 kPa，不超过 69 kPa。

富集方法	适用情况	富集后体积	标准操作参数
PEG 沉淀法	经方法学确认适用 PEG 沉淀法的样品	0.50 mL	10 % PEG8000＋0.5 mol/L NaCl；4 ℃、16 h；10000 ×g、30 min、4 ℃。

8.2 超滤离心法

8.2.1 进入超滤装置前，洗脱液应无肉眼可见悬浮物；如仍有悬浮物，应先在 4 ℃、5000 ×g 离心 10 min 后取上清。

8.2.2 应使用 30 kDa PES 超滤膜。使用前加入 1 % BSA 溶液覆盖膜面，于 4 ℃静置 1 h，弃去 BSA 后用无菌 PBS 清洗 2 次。

8.2.3 将洗脱液分批加入超滤管中，在 4 ℃、1500 ×g 条件下每次离心 10 min；每次离心后继续加入样品，直至全部洗脱液完成浓缩。样品通过速度明显降低时，可将离心力提高至 4000 ×g，但不得超过 4000 ×g。

8.2.4 当膜上保留液约为 0.30 mL 时停止离心，以 100 μL 预冷无菌 PBS 轻柔冲洗膜面 2 次并合并保留液，用 PBS 将终体积调至 0.50 mL。超滤过程中不得使滤膜完全干燥。

8.2.5 出现滤膜破裂、严重堵塞或漏液时，应停止处理并记录。

8.3 切向流过滤法

8.3.1 切向流过滤法适用于同一独立平行样品扩大处理量后、过滤后体积不低于 100 mL 的样品，膜包应采用 30 kDa PES 材质。

8.3.2 进入切向流过滤系统前，样品应按 7.6 完成过滤。样品仍含明显颗粒、絮状物或沉淀时，应先在 4 ℃条件下离心澄清；确需再次过滤时，滤膜孔径应与 7.6 选定的过滤孔径一致。

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 使用前以 1 % BSA 溶液循环预处理膜包 30 min，随后以无菌 PBS 冲洗 2 个系统体积并弃去

冲洗液。

8.3.5 TFF 运行期间样品储液瓶应置于冰上，跨膜压力控制在 35 kPa～50 kPa 且不得超过 69 kPa；持续浓缩至保留液体积为 5.0 mL。

8.3.6 浓缩结束后，以 5.0 mL 预冷无菌 PBS 冲洗管路和膜包保留侧，冲洗液并入保留液，再继续浓缩至 5.0 mL。

8.3.7 不同样品应使用独立膜包和与样品接触的管路；同批 TFF 样品应设置 1 份系统空白，并按与样品相同的浓缩和核酸酶处理步骤操作。

8.4 聚乙二醇沉淀法

8.4.1 洗脱液应按 7.6 完成离心和过滤，且无明显悬浮物。

8.4.2 向过滤后的洗脱液加入 NaCl 至终浓度 0.5 mol/L，再加入 PEG8000 至终浓度 10 %（w/v）。

8.4.3 PEG8000 和 NaCl 加入后应轻柔颠倒混匀至完全溶解，于 4 ℃静置孵育 16 h。

8.4.4 孵育结束后在 4 ℃、10000 ×g 条件下离心 30 min 收集沉淀。

8.4.5 离心后立即小心弃去上清液，不得使沉淀干燥；加入 0.50 mL 预冷无菌 PBS，4 ℃静置 10 min 后轻柔吹打重悬。

8.4.6 PEG 富集液应使用 30 kDa PES 超滤装置换液：加入 5.0 mL 预冷无菌 PBS，在 4 ℃、1500 ×g 条件下离心 10 min，重复 2 次，最终将保留液体积调至 0.50 mL。

8.5 游离核酸去除

8.5.1 病毒颗粒富集液应在病毒颗粒裂解前进行 DNase I 和 RNase I 联合处理。

8.5.2 在富集液中加入 DNase I 和 RNase I，使终活性分别达到 20 U/mL 和 50 U/mL，同时加入 $MgCl_2$ 和 $CaCl_2$使终浓度分别为 5 mmol/L 和 1 mmol/L；37 ℃孵育 1 h。

8.5.3 反应结束后立即加入 0.5 mol/L EDTA，使反应体系 EDTA 终浓度达到 10 mmol/L，轻柔混匀后置于冰上。不得采用高温灭活核酸酶。

8.5.4 核酸酶处理前后应各留取 50 μL 样品，用于测定游离核酸信号及外源模式病毒回收变化。

8.6 富集液保存

8.6.1 富集液应置于无菌、低吸附、密封性良好的冻存管中，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 ℃避光保存，并宜在 24 h 内使用，最长不宜超过 48 h；需保存超过 48 h 时，应置于−80 ℃保存。

8.6.3 富集液应按单次使用量分装，避免反复冻融。−80 ℃样品解冻后应一次使用完毕，不得再次冻存。

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、准确并可追溯。

8.7.2 富集前应记录样品编号、过滤后洗脱液体积、过滤孔径、滤膜材质、滤液外观以及是否发生堵膜等情况。

8.7.3 采用超滤离心法时，应记录超滤膜材质、截留分子量、BSA 预处理条件、离心力、离心时间、加入样品总量和富集后体积；采用切向流过滤法时，应记录膜包规格、运行温度、跨膜压力、运行时间、冲洗体积和富集后体积。

8.7.4 采用聚乙二醇沉淀法时，应记录样品初始体积、PEG8000 和 NaCl 终浓度、孵育温度、孵育时间、离心力、离心时间、沉淀状态和重悬后体积。

8.7.5 进行游离核酸去除时，应记录核酸酶类型、终活性、反应温度、反应时间、终止试剂和终止浓度。

8.7.6 富集完成后应记录保存温度、分装数量、每管体积、保存位置、操作者和异常情况。

9 质量控制

9.1 总则

9.1.1 质量控制应符合 GB/T 27403 的有关要求，并覆盖采集、运输、体表清洗、解剖、洗脱、离心、过滤、富集、核酸酶处理、保存和记录等环节。

9.1.2 每批样品应设置空白样品、平行样品和加标回收样品。各类质量控制样品的设置数量、处理方法和判定要求应分别符合 9.2～9.5 的规定。

9.1.3 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、核酸酶处理和保存条件；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空白、平行、加标回收、病毒回收率和污染控制结果综合判定，不应以单一指标代替全过程质量控制。

9.1.5 空白、重复性、全流程加标回收率以及细菌、宿主核酸和游离核酸等质量控制指标的接受限，应在本方法正式应用前通过方法学验证建立。过滤孔径、富集路线、外源模式病毒、关键膜材料或检测平台发生改变时，应重新确认受影响的控制限。

9.2 空白样品与外源污染控制

9.2.1 每批样品应至少设置 1 个体表清洗空白、1 个解剖空白和 1 个过程空白。过程空白不加入肠道样品，应从加入洗脱缓冲液开始，按实际样品的离心、过滤、富集、核酸酶处理和保存流程同步处理。

9.2.2 体表清洗空白和解剖空白应按 7.3.4 和 7.4.6 设置，并与实际样品同步完成过滤、富集和核酸酶处理。

9.2.3 各类空白样品的检测结果应满足经方法学验证建立的空白控制限。VLP 计数的控制限应依据染色空白、缓冲液空白和过程空白确定；采用 qPCR、ddPCR、RT-qPCR 或 RT-ddPCR 定量时，应依据无模板对照、阴性对照、检出限和定量限确定。

9.2.4 空白样品未检出时可判为符合要求；检测结果处于检出限与定量限之间时，应按经验证的低水平结果处理规则记录；同批实际样品均未检出时，仍应依据空白控制限和检出限判定。

9.2.5 样品处理过程中应采取防止外源污染和样品间交叉污染的措施。外源污染应通过各类空白样品监测，不符合控制要求时按 9.7.2 处理。

9.3 平行样品

9.3.1 每组可比样品应设置不少于 3 个独立平行样品，并从体表清洗开始独立完成解剖、洗脱、过滤、富集和质量控制检测。

9.3.2 平行样品应采用相同的肠道样品湿重、洗脱液体积、过滤孔径、富集方法、终体积和核酸酶处理条件。

9.3.3 平行样品病毒回收率的重复性接受限应按 9.1.5 建立，并在同批可比样品中保持一致。应报告各平行样品的回收率、平均值、标准偏差和相对标准偏差。

9.4 加标回收样品

9.4.1 加标对象应采用完整外源模式病毒，不得使用游离病毒核酸替代完整颗粒；宜选用具有独立、可特异定量检测体系的模式病毒，如 MS2、Qβ或λ噬菌体。

9.4.2 采用核酸定量时，RNA 外源模式病毒应采用 RT-qPCR 或 RT-ddPCR 等含逆转录步骤的检测方法；DNA 外源模式病毒可采用 qPCR 或 ddPCR 检测。

9.4.3 外源模式病毒使用前应采用代表性蚯蚓肠道样品进行适用性确认，确认内容包括检测特异性、基体影响和全流程回收性能。未通过适用性确认的外源模式病毒不得用于正式样品处理。

9.4.4 全流程加标应在 7.5.1 加入洗脱缓冲液后、剪切和匀浆前完成；开展分阶段损失评价时，可另设过滤前加标和富集前加标。

9.4.5 基体加标样品数量应不少于实际样品总数的 10 %；实际样品总数不足 10 个时，应至少设置 1 个。

9.4.6 加标样品应记录外源模式病毒种类、加入浓度或数量、加入体积和加入时间，并与未加标样品采用相同的检测方法和检测条件。

9.5 病毒回收率与总 VLP 富集效果

9.5.1 外源模式病毒回收率宜采用具有特异性定量能力的核酸检测或噬菌体效价测定。核酸检测方法应按 9.4.2 选择，富集前后应采用相同的检测体系和条件。

9.5.2 总 VLP 富集效果可采用附录 C 规定的 VLP 计数方法评价；外源模式病毒的特异性加标回收率应按 9.5.1 测定。

9.5.3 病毒回收率应按附录 B 规定的方法计算。全流程加标回收率的接受范围应按 9.1.5 建立。

9.6 细菌、宿主及游离核酸控制

9.6.1 细菌污染应采用 16S rRNA 基因 qPCR 或 ddPCR 评价；以 7.5 离心后、过滤前洗脱液为参照，计算并报告富集液中 16S rRNA 基因拷贝总量的降低比例，接受控制限按 9.1.5 建立。

9.6.2 蚯蚓宿主核酸污染应采用 COI 基因 qPCR 或 ddPCR 评价；以 7.5 离心后、过滤前洗脱液为参照，计算并报告富集液中 COI 基因拷贝总量的降低比例，接受控制限按 9.1.5 建立。

9.6.3 核酸酶处理效果应比较处理前后游离核酸信号并计算降低比例，接受控制限按 9.1.5 建立；外源模式病毒回收率应符合 9.5.3 规定。

9.7 结果判定

9.7.1 符合下列条件时，可判定富集过程有效：

a）各类空白样品符合 9.2.3 和 9.2.4 规定的空白控制要求；

b）独立平行样品的病毒回收率重复性符合 9.3.3 规定的接受限；

c）全流程加标回收率符合 9.5.3 规定的接受范围；

d）16S rRNA 基因、COI 基因和游离核酸控制指标符合 9.6 规定的控制限；

e）关键过程参数和异常情况记录完整。

9.7.2 质量控制结果超出规定的控制限或接受范围，或出现影响结果有效性的过程异常时，应查明原因，对受影响样品进行复核、重新处理或作废，并记录处置结果。

9.8 实验室间验证

9.8.1 开展实验室间验证时，应按照 GB/T 6379.2 的有关规定，采用统一制备的样品或等效质量控制材料，由参与实验室独立完成规定流程。

9.8.2 实验室间验证应评价外源模式病毒回收率、重复性和再现性、空白控制及非病毒核酸控制，并记录验证结果。

10 数据记录与结果报告

10.1 数据记录

10.1.1 数据记录应涵盖样品采集与处理、质量控制、异常处置和结果判定等内容。相应记录表样式见附录 A。

10.1.2 样品编号、平行样方编号、蚯蚓个体、肠道样品、处理批次和保存位置应建立对应关系，并保持可追溯。

10.2 结果报告

10.2.1 结果报告应包括样品基本信息、肠道样品获取方法、病毒颗粒洗脱和富集方法、质量控制结果、异常情况和结果判定。

10.2.2 结果应表述为“蚯蚓肠道病毒样颗粒富集物”或“规定方法条件下获得的蚯蚓肠道相关病毒样颗粒组分”。

10.2.3 结果报告应注明肠壁与肠腔未分离。本方法结果仅表征规定处理条件下获得的蚯蚓肠道病毒样颗粒富集组分，不用于判定病毒在肠道中的空间分布或感染性，也不宜直接推断原始样品中的病毒绝对丰度。

10.2.4 未按本文件执行的步骤及调整的参数应在结果报告中说明。

10.2.5 原始记录、质量控制记录和结果报告应归档保存。

附录 A

（资料性）

蚯蚓肠道病毒颗粒富集数据记录表

A.1 本附录给出了样品基本信息、采样区域与环境信息、蚯蚓采集保存运输和交接、体表清洗与无菌解剖、病毒颗粒洗脱与离心、过滤与暂存、病毒颗粒富集、游离核酸去除与富集液保存、质量控制、异常情况、结果报告核查和记录确认的记录表样式。

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		平行样方编号	
样品来源	□野外采集　□实验室培养　□其他：	采样日期	
采样时间		采样地点	
GPS 坐标	经度：_____　纬度：_____	土地利用方式	□农田 □森林 □草地 □湿地 □污染场地 □其他：
土壤类型		样方面积	1 m×1 m；实际：_____
采样深度	0 cm～20 cm；实际：_____	蚯蚓数量	
完整活体数量		总鲜重	_____ g
对应土壤编号		采样人员	
备注		处理批次	

表 A.2　采样区域与环境信息记录表

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		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：
地表覆盖物	□植物 □凋落物 □秸秆 □其他：	采样前去除情况	□已去除 □未完全去除，说明：
样点代表性说明		现场环境情况	
对应土壤样品	□已同步采集 □未采集；编号：_____	原位土壤用于运输	□是 □否
样点照片记录	□有 □无；照片编号：_____	其他说明	

表 A.3　蚯蚓采集、保存、运输和交接记录表

项目	记录内容	项目	记录内容
采样方法	手拣法；实际：_____	平行样方数量	规定 3 个；实际：_____
样方规格	1 m×1 m	采集土层	0 cm～20 cm
运输容器	PP 硬质带通气孔样品盒	原位土壤体积	容器容积的 1/4～1/3；实际：_____
运输条件	□避光 □通气 □防挤压 □防积水 □防逸出	冷源类型	□冰袋 □其他：_____
运输温度	规定（4 ± 2）℃；实测：_____ ℃	运输时间	规定≤24 h；实际：_____ h
是否冻结	□否 □是	到样时间	
到样状态	□全部存活 □部分死亡 □损伤 □标签异常 □其他：	暂存条件	（4 ± 2）℃、避光、通气
暂存时间	规定≤12 h；实际：_____ h	是否排空	□否（本文件规定不排空） □异常执行：_____

是否使用固定剂	□否 □是，类型：_____	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	

表 A.4 体表清洗与无菌解剖记录表

项目	记录内容	项目	记录内容
操作区域	□II级生物安全柜 □洁净操作台	台面消毒	75 %（v/v）乙醇；静置 10 min
解剖前制动	冰上 10 min；实际：_____	初洗液	预冷无菌水
初洗次数	规定 5 次；实际：_____	体表消毒	75 %（v/v）乙醇 30 s
消毒后漂洗液	预冷无菌水	漂洗次数	规定 5 次；实际：_____
体表状态	□完整 □破裂 □肠腔内容物外泄 □其他：	体表清洗空白编号	
末次漂洗液体积	规定≥1.0 mL；实际：_____ mL	解剖器具	□独立灭菌器具 □一次性无菌器具
器具灭菌方式	□压力蒸汽灭菌 □其他：_____	解剖界限	咽部后端至肛门端
解剖方向	□腹侧 □背侧	肠壁与肠腔	□未分离 □异常分离，说明：_____
附着组织去除	□体壁 □体腔组织 □生殖组织 □无明显附着	肠道外表面漂洗	预冷无菌 PBS 1 次
肠道完整性	□完整 □破裂 □肠腔内容物外泄 □其他：	肠道样品湿重	_____ g
合并个体数		解剖空白编号	
操作者		解剖时间	
异常情况		备注	

表 A.5　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		肠道样品湿重	规定 0.50 g；实际：_____ g
洗脱缓冲液	1 %柠檬酸钾缓冲液	缓冲液 pH	规定 7.0±0.2；实测：_____
洗脱液加入体积	0.50 g 肠道样品加入 5.0 mL；实际：_____ mL	液料比	10 mL/g
剪切大小	2 mm～5 mm	匀浆条件	冰上，3000 rpm，1 min；实际：_____
振荡温度	4 ℃	振荡转速	400 rpm
振荡时间	15 min	室温连续暴露时间	规定≤15 min；实际：_____ min
第 1 次离心	4 ℃、5000 ×g、10 min	第 2 次离心	4 ℃、5000 ×g、10 min
第 3 次离心	□未进行 □进行：4 ℃、5000 ×g、10 min	离心次数	
上清液体积	_____ mL	上清液外观	□澄清 □有颗粒/絮状物 □其他：
过程空白编号		操作者	
异常情况		备注	

表 A.6　过滤与暂存记录表

项目	记录内容	项目	记录内容
预过滤孔径	0.45 μm	终过滤孔径	□0.22 μm □按 7.6.3 省略
滤膜材质	PES	过滤方式	□真空 □正压 □其他：
过滤温度	□4 ℃ □冰上 □其他：	跨膜压差	真空过滤宜 30 kPa～50 kPa；实际：_____ kPa
过滤体积	_____ mL	过滤时间	_____ min

滤膜更换次数		堵膜情况	□无 □有；处理：□更换新膜 □增加澄清
是否反冲洗堵塞滤膜	□否 □是（异常）	接收容器更换	□已更换 □未更换
滤液体积	_____ mL	滤液外观	□澄清 □轻微浑浊 □明显浑浊 □其他：
质控留样	□VLP 计数 □空白检测 □加标回收；体积：_____ mL	大颗粒路线污染检测	□不适用 □16S rRNA □COI
暂存温度	4 ℃	暂存时间	规定≤24 h；实际：_____ h
是否避光	□是 □否	操作者	
异常情况		备注	

表 A.7　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 □PEG 沉淀法 □其他：
富集前体积	_____ mL	富集后体积	_____ mL
富集开始时间		富集结束时间	
运行温度	除 PEG 溶解外宜 4 ℃；实际：_____	操作者	
膜材质/截留分子量	30 kDa PES	BSA 预处理	1 % BSA；超滤 1 h / TFF 循环 30 min
超滤离心条件	4 ℃、1500 ×g、10 min/次；最高不超过 4000 ×g	超滤终体积	0.50 mL
超滤膜冲洗	100 µL 预冷 PBS×2	超滤异常	□无 □堵膜 □破膜 □漏液
TFF 跨膜压力	35 kPa～50 kPa；不得超过 69 kPa	TFF 终体积	5.0 mL
TFF 冲洗	预冷 PBS 5.0 mL；并入保留液后再浓缩至 5.0 mL	TFF 系统空白编号	
PEG8000 终浓度	10 %（w/v）	NaCl 终浓度	0.5 mol/L
PEG 孵育条件	4 ℃、16 h	PEG 离心条件	4 ℃、10000 ×g、30 min
PEG 重悬	0.50 mL 预冷 PBS；4 ℃静置 10 min 后轻柔重悬	PEG 换液	30 kDa PES；PBS 5.0 mL，1500 ×g、10 min×2
沉淀/保留液状态		最终体积	0.50 mL；实际：_____ mL
异常情况		备注	

表 A.8　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
样品编号		富集液体积	_____ mL
DNase I 终活性	20 U/mL	RNase I 终活性	50 U/mL
$MgCl_2$终浓度	5 mmol/L	$CaCl_2$终浓度	1 mmol/L
反应温度	37 ℃	反应时间	1 h
处理前留样	50 μL	处理后留样	50 μL
终止试剂	0.5 mol/L EDTA	EDTA 终浓度	10 mmol/L
终止后处理	轻柔混匀后置冰上	高温灭活核酸酶	□否 □是（异常）
保存容器	无菌、低吸附、密封冻存管	唯一性标识	□完成 □未完成
保存温度	□4 ℃ □−80 ℃	保存时间	4 ℃宜≤24 h，最长≤48 h；实际：_____
分装数量		每管体积	
保存位置		冻融次数	规定避免反复冻融；实际：_____
操作者		异常情况	

表 A.9　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	□体表清洗空白 □解剖空白 □过程空白 □TFF 系统空白	空白检测方法	□VLP □qPCR □ddPCR □RT-qPCR □RT-ddPCR □其他：
空白检测结果		空白判定	按 9.2.3～9.2.4 及已建立的空白控制限判定；□符合 □待复核
独立平行样品数	规定≥3；实际：_____	平行样品回收率 RSD	_____ %；接受限：_____ %；□符合 □超出
加标对象	□MS2（RNA） □Qβ（RNA） □λ噬菌体（DNA） □其他完整病毒颗粒：	加标位置	□全流程（洗脱液加入后、剪切前） □过滤前 □富集前
外源模式病毒适用性确认	□已完成 □未完成；代表性基体：_____	确认结果	□适用 □需优化 □更换外源模式病毒；说明：_____
加标浓度/数量		加入体积/时间	
全流程加标回收率	_____ %	回收率判定	方法验证接受范围：_____；□符合 □超出
16S rRNA 基因	富集液较过滤前洗脱液降低：_____ %	16S 判定	控制限：降低≥_____ %；□符合 □超出
COI 基因	富集液较过滤前洗脱液降低：_____ %	COI 判定	控制限：降低≥_____ %；□符合 □超出
游离核酸信号	处理后较处理前降低：_____ %	核酸酶效果判定	控制限：降低≥_____ %；□符合 □超出
总 VLP 计数/外源模式病毒特异性检测		检测方法	□荧光显微镜 □流式细胞术 □qPCR □ddPCR □RT-qPCR □RT-ddPCR □效价测定

综合判定	□富集过程有效 □污染待复核 □需重新处理 □限定性使用	复核情况	
备注		质控人员	

表 A.10　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 □运输 □交接 □体表清洗 □解剖 □洗脱 □离心 □过滤 □富集 □核酸酶 □保存 □质控 □其他：	样品编号	
异常发生时间		蚯蚓/解剖异常	□死亡 □体壁破裂 □肠道破裂 □肠腔内容物外泄 □肠道样品湿重不足 □其他：
运输/交接异常	□温度异常 □冻结 □泄漏 □包装破损 □标签缺失 □其他：	洗脱/离心异常	□匀浆异常 □上清浑浊 □离心异常 □样品损失 □其他：
过滤异常	□堵膜 □滤膜破裂 □流速过低 □压力异常 □重复过滤 □其他：	富集异常	□超滤堵膜/破膜 □TFF 泄漏/压力异常 □PEG 沉淀失败 □重悬困难 □终体积异常
核酸酶/保存异常	□反应条件异常 □终止异常 □温度异常 □反复冻融 □标签脱落 □其他：	质控异常	□空白污染 □回收率过低 □平行差异大 □16S/COI 异常 □游离核酸去除不足
异常描述		原因分析	
处理措施		是否重新处理	□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
处理人员		复核人员	

表 A.11　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、采样日期、采样地点、GPS 坐标、平行样方编号和处理批次	□是 □否 □不适用
3	土地利用方式、植被类型、土壤类型、污染状况及对应土壤编号	□是 □否 □不适用
4	蚯蚓数量、完整活体数量、总鲜重、运输、暂存和交接情况	□是 □否 □不适用
5	体表清洗和消毒条件、体表清洗空白、解剖界限、肠道完整性、肠道样品湿重和合并个体数	□是 □否 □不适用
6	洗脱缓冲液、液料比、剪切、匀浆、振荡及离心条件	□是 □否 □不适用
7	过滤孔径、滤膜材质、过滤条件、滤液体积和暂存条件	□是 □否 □不适用
8	富集方法、富集前后体积、膜/膜包规格及相应超滤、TFF 或 PEG 关键参数	□是 □否 □不适用
9	DNase I/RNase I 处理、辅助离子、反应条件和 EDTA 终止条件	□是 □否 □不适用
10	空白、平行和加标回收样品设置与结果，以及外源模式病毒适用性确认结果	□是 □否 □不适用
11	总 VLP 计数或外源模式病毒特异性检测结果、病毒回收率及平行样品 RSD	□是 □否 □不适用
12	16S rRNA 基因、COI 基因和游离核酸污染控制结果	□是 □否 □不适用
13	富集液分装、保存温度、保存位置和冻融情况	□是 □否 □不适用
14	异常情况、原因分析、处理措施及其对结果的可能影响	□是 □否 □不适用
15	按照第 9.7 完成的结果有效性判定	□是 □否 □不适用
16	未按本文件执行的步骤、调整参数及偏离说明	□是 □否 □不适用
17	结果解释符合 10.2.2 和 10.2.3 规定	□是 □否 □不适用

表 A.12　记录确认表

记录类别	记录人	日期	复核人	日期
样品基本信息与环境信息				
蚯蚓采集、运输和交接				
体表清洗与无菌解剖				
病毒颗粒洗脱与离心				
过滤与暂存				
病毒颗粒富集				
游离核酸去除与保存				
质量控制				
异常情况				
结果报告				
项目负责人确认				

附录 B

（规范性）

病毒回收率计算方法

B. 1 外源模式病毒回收率应按 9.5.1 规定的方法测定；总 VLP 富集效果可采用附录 C 规定的计数方法评价。

B.2 富集前后应采用相同的检测方法和检测条件。

B.3 病毒回收率按公式（B.1）计算：

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

式中：

R —— 病毒回收率，%；

C_1 —— 富集前样品中目标病毒、VLP 或外源模式病毒的浓度；

C_2 —— 富集后样品中目标病毒、VLP 或外源模式病毒的浓度；

V_1 —— 富集前样品体积，mL；

V_2 —— 富集后样品体积，mL。

B.4 回收率结果应与肠道样品湿重、液料比、过滤孔径、富集方法和保存条件共同记录。

附录 C

（规范性）

病毒样颗粒计数方法

C.1 试剂和材料

C.1.1 无菌 PBS，pH 7.0±0.2。

C.1.2 SYBR Gold 或性能相当的核酸荧光染料。

C.1.3 0.02 μm 氧化铝滤膜，用于 VLP 捕获和显微计数。

C.1.4 无 DNA 酶、无 RNA 酶离心管、移液吸头和载玻片。

C.2 仪器和设备

C.2.1 荧光显微镜或流式细胞仪。

C.2.2 真空过滤装置。

C.2.3 避光孵育装置。

C.3 荧光显微镜测定步骤

C.3.1 取洗脱液、过滤液或富集液 100 μL，以无菌 PBS 进行 10 倍系列稀释，选择显微镜单视野约 20 个～100 个荧光颗粒的稀释度进行计数。

C.3.2 加入 SYBR Gold，使终浓度为 2.5×，室温避光孵育 10 min。

C.3.3 将染色样品通过 0.02 μm 氧化铝滤膜真空过滤，过滤后立即将滤膜置于载玻片上，并在避光条件下完成显微观察。出现明显堵膜或膜面颗粒分布不均时，应适当稀释样品后重新过滤计数。

C.3.4 荧光显微镜计数时，每张滤膜应随机选择不少于 20 个视野，累计计数不少于 200 个 VLP；每个样品设置 3 个技术重复。

C.4 荧光显微镜结果表示

C.4.1 采用显微镜计数时，VLP 浓度按公式（C.1）计算：

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

式中：

N —— VLP 浓度，particles/mL；

n —— 平均每个视野计数的 VLP 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.4.2 每批计数应设置 1 个染色空白和 1 个缓冲液空白；技术重复的精密度接受限应通过 VLP 计数方法学验证建立，并报告相对标准偏差。超出接受限时，应复核染色、过滤、视野选择和颗粒计数过程。

C.4.3 首次采用或改变 0.02 μm 滤膜材质、孔径、规格及关键过滤条件时，应采用已知浓度且粒径具有代表性的病毒颗粒或标准纳米颗粒确认截留和计数性能；目标对象包含较大型病毒或颗粒聚集体时，验证粒径范围应覆盖相应对象。

C.5 流式细胞术计数

C.5.1 采用流式细胞仪进行 VLP 计数时，应使用经验证的方法，并按照 5.13 的要求与荧光显微镜计数结果进行平行校核。

附录 D

（资料性）

蚯蚓肠道病毒颗粒富集常规操作参数

D.1 本附录汇总本文件规定的常规操作参数，供快速查阅。参数要求以正文规定为准。

表 D.1　常规操作参数

步骤	常规操作参数	备注
起始样品量	肠道样品湿重 0.50 g	不足时仅可在同一平行样方内合并完整个体；全部可用个体合并后仍不足 0.50 g 时，不进行后续富集。
洗脱缓冲液	1 %柠檬酸钾缓冲液，pH 7.0±0.2，4 ℃预冷	0.50 g 肠道样品加入 5.0 mL。
液料比	10 mL/g	同一批样品保持一致。
样品剪切与匀浆	剪成 2 mm～5 mm 小段；冰上 3000 rpm 匀浆 1 min	不加研磨珠，不超声。
洗脱	4 ℃，400 rpm，15 min	匀浆后立即进行。
澄清离心	4 ℃，5000 ×g，10 min，连续 2 次	仍有可见颗粒时按同条件再离心 1 次。
过滤	0.45 μm PES 预过滤＋0.22 μm PES 终过滤	目标包含＞0.22 μm 颗粒时仅用 0.45 μm，并实施 16S/COI 污染检测。
超滤	30 kDa PES；1 % BSA 预处理 1 h；4 ℃、1500 ×g、每次 10 min	终体积 0.50 mL；必要时离心力可提高至 4000 ×g 但不得超过。

TFF	30 kDa PES；1 % BSA 循环 30 min；跨膜压力 35 kPa～50 kPa	同一独立平行样品扩大处理量后、过滤后体积≥100 mL 时使用；扩大时保持规定液料比及关键条件不变，不得合并不同独立平行样品；进入 TFF 前按 7.6 已选过滤路线处理。
PEG 沉淀	10 % PEG8000＋0.5 mol/L NaCl；4 ℃、16 h；10000 ×g、30 min、4 ℃	经方法学确认适用时采用；前处理按 7.6 执行，重悬与超滤换液按 8.4 执行。
核酸酶处理	DNase I 20 U/mL＋RNase I 50 U/mL；$MgCl_2$ 5 mmol/L、$CaCl_2$ 1 mmol/L；37 ℃、1 h	EDTA 终浓度 10 mmol/L 终止。
保存	4 ℃避光保存宜≤24 h，最长≤48 h；超过 48 h 时分装后−80 ℃保存	解冻后一次使用完毕，不得再次冻存。

参考文献

[1] Xia R, Sun M, Balcázar J L, et al. Benzo[a]pyrene stress impacts adaptive strategies and ecological functions of earthworm intestinal viromes. The ISME Journal, 2023, 17: 1004-1014.

[2] Thurber R V, Haynes M, Breitbart M, et al. Laboratory procedures to generate viral metagenomes. Nature Protocols, 2009, 4: 470-483.

[3] Castro-Mejía J L, Muhammed M K, Kot W, et al. Optimizing protocols for extraction of bacteriophages prior to metagenomic analyses of phage communities in the human gut. Microbiome, 2015, 3: 64.

[4] Shkoporov A N, Ryan F J, Draper L A, et al. Reproducible protocols for metagenomic analysis of human faecal phageomes. Microbiome, 2018, 6: 68.

[5] Sorensen J W, Zinke L A, ter Horst A M, et al. DNase treatment improves viral enrichment in agricultural soil viromes. mSystems, 2021, 6: e00614-21.

[6] Roux S, Adriaenssens E M, Dutilh B E, et al. Minimum Information about an Uncultivated Virus Genome (MIUViG). Nature Biotechnology, 2019, 37: 29-37.

[7] Larsen F, Offersen S M, Li V R, et al. Choice of Ultrafilter Affects Recovery Rate of Bacteriophages. Viruses, 2023, 15(10): 2051.

[8] Parras-Moltó M, Rodríguez-Galet A, Suárez-Rodríguez P, et al. Evaluation of bias induced by viral enrichment and random amplification protocols in metagenomic surveys of saliva DNA viruses. Microbiome, 2018, 6: 119.

[9] Patel A, Noble R T, Steele J A, et al. Virus and prokaryote enumeration from planktonic aquatic environments by epifluorescence microscopy with SYBR Green I. Nature Protocols, 2007, 2: 269-276.