

团 体 标 准

T/CVMA 5—2018

非洲猪瘟病毒实时荧光 PCR 检测方法

Real-time PCR assay for detection of African swine fever virus

2018 - 10 - 24 发布

2018 - 10 - 24 实施

中 国 兽 医 协 会 发 布

前 言

本标准按 GB/T 1.1-2009给出的规则起草。

本标准由中国兽医协会提出并归口。

本标准起草单位：中国动物疫病预防控制中心、中国兽医药品监察所、中国农业科学院哈尔滨兽医研究所、中国农业科学院兰州兽医研究所、北京海关。

本标准主要起草人：倪建强、王传彬、王琴、仇华吉、殷宏、杨林、辛盛鹏、刘艳华、刘洋、宋晓晖、赵启祖、罗玉子、刘志杰、张乾义、乔彩霞、夏应菊、杨吉飞、徐璐、顾小雪、亢文华、李硕、毕一鸣。

非洲猪瘟病毒实时荧光 PCR 检测方法

1 范围

本标准规定了非洲猪瘟病毒实时荧光PCR检测方法的试剂、仪器和耗材、操作步骤、结果判定、实验室生物安全等技术要求。

本标准适用于猪脾脏、淋巴结、血液等组织和血粉中非洲猪瘟病毒核酸的检测。

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

NY/T 541 兽医诊断样品采集、保存与运输技术规范

3 试剂

3.1 DNA 提取试剂

DNA提取试剂的配制见附录A,或选取商品化的病毒DNA提取试剂盒并参照说明书进行DNA提取。

3.2 2 × PCR 缓冲液

2 × PCR缓冲液的配制见附录A。

3.3 引物探针

3.3.1 采用针对非洲猪瘟病毒 VP72 基因(核苷酸序列见附录 B)的引物及探针:

上游引物ASF-CADC-rPCR_F: 5'-1528-ATAGAGATACAGCTCTTCCAG-1548-3'

下游引物ASF-CADC-rPCR_R: 5'-1660-GTATGTAAGAGCTGCAGAAC-1679-3'

荧光探针ASF-CADC-Probe: 5'-1638-FAM-TATCGATAAGATTGAT-MGB-1653-3'

3.3.2 可以使用世界动物卫生组织(OIE)在陆生动物诊断技术和疫苗手册(Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals)第2.8.1章 African Swine Fever 中提供的引物和探针,并按照手册中规定的检测程序和判定标准操作:

上游引物ASF-OIE-rPCR_F: 5'-1627-CTGCTCATGGTATCAATCTTATCGA-1651-3'

下游引物ASF-OIE-rPCRR: 5'-1857-ACGGCNGATCTTGTGGTATC-1876-3'

荧光探针ASF-OIE-Probe: 5'-1761-FAM-CCACGGGAGGAATACCAACCCAGTG-TAMRA-1785-3'

3.3.3 使用国家农业行政主管部门批准的其他引物、探针，应对检测程序和判定标准作相应调整。

3.4 阴性及阳性对照

阴性及阳性对照的制备方法见附录C。

3.5 其他试剂

消毒液、5U/ μ L *Taq* DNA聚合酶、无菌无核酸酶水、0.01mol/L PBS (pH7.2)。

消毒液配制见附录A，0.01mol/L PBS配制见附录A。

4 仪器和耗材

分析天平(感量0.1 mg)、高速台式冷冻离心机(最高离心速度不低于12 000 r/min)、冰盒、实时荧光PCR仪及配套反应管(板)、组织研磨器、-20℃冰箱、可调移液器(2 μ L, 20 μ L, 200 μ L, 1 000 μ L)、1.5 mL离心管(无核酸酶)。

5 操作步骤

5.1 样品采集及运输

样品采集及运输按照NY/T 541的规定执行，采集猪的脾脏、淋巴结、血液等组织材料或血粉用于检测，样品应在冷藏条件下尽快运输至实验室，避免反复冻融。采样时应穿戴个人生物安全防护装备，实施现场消毒和废弃物处理。

5.2 样品处理

检测前样品应在二级生物安全柜中处理。取0.1g~0.2g组织或血粉，经研磨破碎后加1mL的0.01mol/L PBS (pH7.2)制成匀浆，经10 000 r/min离心取上清；全血、血清样品直接取1mL，置于1.5 mL离心管内盖紧管帽。将上述处理的样品置于60℃条件下灭活30min。

5.3 样品保存

采集或处理好的样品在2℃~8℃条件下保存应不超过24 h；如需长期保存，应放置-70℃冰箱，但应避免反复冻融(冻融不超过3次)。

5.4 病毒 DNA 提取

5.4.1 DNA提取应在样本制备区内采用以下方法进行，若使用其他等效的病毒DNA提取试剂，则按照试剂说明书操作。

5.4.2 待检样品、阳性对照和阴性对照的份数总和用n表示，取n个灭菌1.5 mL离心管，逐管编号。

5.4.3 每管加入 200 μL DNA 提取液 1, 然后分别加入待测样品、阴性对照和阳性对照各 200 μL , 1 份样品换用 1 个吸头, 混匀器上震荡混匀 5 s。于 4 $^{\circ}\text{C}$ ~25 $^{\circ}\text{C}$ 条件下, 13 000 r/min 离心 10 min。DNA 提取液 1 见附录 A。

5.4.4 尽可能吸取上清、弃去, 吸头不要碰到沉淀, 再加入 10 μL DNA 提取液 2, 混匀器上震荡混匀 5 s。于 4 $^{\circ}\text{C}$ ~25 $^{\circ}\text{C}$ 条件下, 2 000 r/min 离心 10 s。DNA 提取液 2 见附录 A。

5.4.5 100 $^{\circ}\text{C}$ 干浴或沸水浴 10 min。

5.4.6 加入 90 μL 无 DNA 酶的灭菌去离子水, 13 000 r/min 离心 10 min, 上清即为提取的 DNA, -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。无 DNA 酶的灭菌去离子水见附录 A。

5.5 实时荧光 PCR 操作

5.5.1 在反应混合物配制区、样品制备区和检测区分别进行 5.5.2~5.5.4。

5.5.2 每个检测反应体系需使用 20 μL 实时荧光 PCR 反应液。根据 5.4.2 中设定的 n 值, 按附录 D 配制反应液, 充分混匀后分装, 每个 PCR 反应管 20 μL 。转移 PCR 反应管至样品制备区。

5.5.3 在上述 5.5.2 的反应管中分别加入 5.4 中提取的 DNA 溶液 5 μL , 使每管总体积达到 25 μL , 记录反应管对应的样品编号。盖紧管盖后, 瞬时离心。

5.5.4 将 5.5.3 加样后的反应管放入实时荧光 PCR 检测仪内, 记录反应管摆放顺序。选定 5-羧基荧光素 (FAM) 作为报告基团, 小沟结合物 (MGB) 为淬灭基团, 反应参数设置如下: 预变性 95 $^{\circ}\text{C}$ /3 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ /15 s, 52 $^{\circ}\text{C}$ /10 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ /35 s, 45 个循环; 在每次循环的 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火延伸时收集荧光。试验结束后, 根据收集的 Ct 值和荧光曲线判定结果。

6 结果判定

6.1 结果分析条件设定

实时荧光 PCR 检测阈值设定原则: 阈值线超过阴性对照扩增曲线的最高点, 且相交于阳性对照扩增曲线进入指数增长期的拐点, 或根据仪器噪声情况进行调整。每个样品反应管内的荧光信号到达设定的域值时所经历的循环数即为 Ct 值。

6.2 结果描述及判定

当阳性对照 Ct 值 ≤ 28.0 且出现典型扩增曲线, 阴性对照无 Ct 值无扩增曲线时, 实验成立, 实例参考附录 E。当被检样品出现典型的扩增曲线且 Ct 值 ≤ 38.0 时, 判为非洲猪瘟病毒核酸阳性; 被检样品无 Ct 值, 判为非洲猪瘟病毒核酸阴性; 对于 Ct 值 > 38.0 的样品且出现典型的扩增曲线, 应重检, 重检仍出现上述结果的判为阳性, 否则判为阴性。

7 实验室生物安全要求

7.1 本方法涉及非洲猪瘟感染性样品的实验操作应在 (动物) 生物安全三级试验室中进行, 实验室生物安全管理要求见 GB 19489。国家农业行政主管部门另有规定的, 按其规定执行。

7.2 使用过的实验器材和液体废弃物应先经过消毒液浸泡处理, 再经高温高压处理后废弃。剩余样品等固体废弃物应在生物安全柜中密封包装, 经表面消毒后移出, 再经高温高压处理后废弃。

附 录 A
(规范性附录)
试剂的配制

A.1 DNA 提取液 1

PEG8000 晶体 20.74g, NaCl 17.53g, 加去离子水定容到 100 mL。

A.2 DNA 提取液 2

1 mol/L Tris.HCl 2 mL, 2 mol/L KCl 5 mL, 0.5 mol/L EDTA 0.5 mL, NP-40 1 mL, 加去离子水定容到 100 mL。

即 KCl 14.912g, Tris 碱 12.114g, 1.2068 mL 浓 HCl, EDTA 14.612g, NaOH 6g, 加去离子水定容到 100 mL。

A.3 2×PCR 缓冲液

灭菌去离子水	70 mL
三羟甲基氨基甲烷 (Tris)	0.79 g
氯化钾	1.865 g
曲拉通 X-100	0.5 mL
dATP (100mmol/L)	2.5 mL
dTTP (100mmol/L)	2.5 mL
dGTP (100mmol/L)	2.5 mL
dCTP (100mmol/L)	2.5 mL
六水氯化镁	0.61 g
盐酸	调 pH 至 9.0
灭菌去离子水	加至 100 mL

A.4 消毒液

8‰氢氧化钠或 3‰福尔马林或 3‰邻苯基苯酚或碘化合物等其他消毒试剂均可。

A.5 磷酸盐缓冲液 (PBS) 的配方

A.5.1 A 液

0.2 mol/L 磷酸二氢钠水溶液: $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 27.6 g, 溶于蒸馏水中, 最后定容至 1 000 mL。

A.5.2 B 液

0.2 mol/L 磷酸氢二钠水溶液: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 53.6 g (或 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 71.6 g 或 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 35.6 g), 加蒸馏水溶解, 最后定容至 1 000 mL。

A.5.3 0.01 mol/L、pH 7.2 磷酸盐缓冲液 (PBS) 的配制

取 A 液 14 mL、B 液 36 mL, 加 NaCl 8.5 g, 用蒸馏水定容至 1 000 mL。经过滤除菌后, 无菌条件

下分装。

A.6 无DNA酶的灭菌去离子水

无DNA酶的灭菌去离子水是用1%DEPC处理后的去离子水，电阻应该大于18.2mΩ。

附 录 B
(资料性附录)
非洲猪瘟病毒 VP72 基因参考序列

```

1      ATGGCATCAG GAGGAGCTTT TTGTCTTATT GCTAACGATG GGAAGGCCGA CAAGATTATA
61     TTGGCCCAAG ACTTGCTGAA TAGCAGGATC TCTAACATTA AAAATGTGAA CAAAAGTTAT
121    GGGAAACCCG ATCCCGAACC CACTTTGAGT CAAATCGAAG AAACACATTT GGTGCATTTT
181    AATGCGCATT TTAAGCCTTA TGTTCCAGTA GGGTTTGAAT ACAATAAAGT ACGCCCGCAT
241    ACGGGTACCC CCACCTTGGG AAACAAGCTT ACCTTTGGTA TTCCCAGTA CGGAGACTTT
301    TTCCATGATA TGGTGGGCCA TCATATATTG GGTGCATGTC ATTCATCCTG GCAGGATGCT
361    CCGATTGAGG GCACGTCCCA GATGGGGGCC CATGGGCAGC TTCAAACGTT TCCTCGCAAC
421    GGATATGACT GGGACAACCA AACACCCTTA GAGGGCGCCG TTTACACGCT TGTAGATCCT
481    TTTGGAAGAC CCATTGTACC CGGCACAAAG AATGCGTACC GAAACTTGGT TTACTACTGC
541    GAATACCCCG GAGAACGACT TTATGAAAAC GTAAGATTCG ATGTAAATGG AAATTCCTTA
601    GACGAATATA GTTCGGATGT CACAACGCTT GTGCGCAAAT TTTGCATCCC AGGGGATAAA
661    ATGACTGGAT ATAAGCACTT GGTGAGCCAG GAGGTATCGG TGGAGGGAAC CAGTGGCCCT
721    CTCTATGCA ACATTCATGA TTTGCACAAG CCGCACAAA GCAAACCTAT TCTTACCGAT
781    GAAAATGATA CGCAGCGAAC GTGTAGCCAT ACCAACCCGA AATTTCTTTC ACAGCATTTT
841    CCCGAGAACT CTCACAATAT CCAAACAGCA GGTAACAAG ATATTACTCC TATCACGGAC
901    GCAACGTATC TGGACATAAG ACGTAATGTT CATTACAGCT GTAATGGACC TCAAACCCCT
961    AAATACTATC AGCCCCCTCT TGCGCTCTGG ATTAAGTTGC GCTTTTGGTT TAATGAGAAC
1021   GTGAACCTTG CTATTCCCTC AGTATCCATT CCCTTCGGCG AGCGCTTTAT CACCATAAAG
1081   CTTGCATCGC AAAAGGATTT GGTGAATGAA TTTCTGGAC TTTTGTACG CCAGTCACGT
1141   TTTATAGCTG GACGCCCCAG TAGACGCAAT ATACGCTTTA AACCATGGTT TATCCCAGGA
1201   GTCATTAATG AAATCTCGCT CACGAATAAT GAACTTTACA TCAATAACCT GTTTGTAAAC
1261   CCTGAAATAC ACAACCTTTT TGTA AACGC GTTCGCTTTT CGCTGATACG TGTCCATAAA
1321   ACGCAGGTGA CCCACACCAA CAATAACCAC CACGATGAAA AACTAATGTC TGCTCTTAAA
1381   TGGCCCATTG AATATATGTT TATAGGATTA AAACCTACCT GGAACATCTC CGATCAAAAT
1441   CCTCATCAAC ACCGAGATTG GCACAAGTTC GGACATGTTG TTAACGCCAT TATGCAGCCC
1501   ACTCACCACG CAGAGATAAG CTTTCAGGAT AGAGATACAG CTCTTCCAGA CGCATGTTCA
1561   TCTATATCTG ATATTAGCCC CGTTACGTAT CCGATCACAT TACCTATTAT TAAAAACATT
1621   TCCGTAAC TGCTCATGGTAT CAATCTTATC GATAAATTTT CATCAAAGTT CTGCAGCTCT
1681   TACATAACCT TCCACTACGG AGGCAATGCG ATTAAAACCC CCGATGATCC GGGTGCATG
1741   ATGATTACCT TTGCTTTGAA GCCACGGGAG GAATACCAAC CCAGTGGTCA TATTAACGTA
1801   TCCAGAGCAA GAGAATTTTA TATTAGTTGG GACACGGATT ACGTGGGGTC TACTACTACG
1861   GCTGATCTTG TGGTATCGGC ATCTGCT

```

附 录 C
(规范性附录)
非洲猪瘟病毒核酸阳性及阴性对照

C.1 阳性对照

阳性对照制备方法：人工合成非洲猪瘟病毒VP72基因片段，序列参见附录B，将VP72基因连接于pMD20-T载体制成阳性质粒pMD20-T-VP72，使用非洲猪瘟病毒阴性猪的组织研磨液将质粒稀释至浓度为10 000copies/ μ L，保存于-20℃备用。

C.2 阴性对照

阴性对照为非洲猪瘟病毒阴性猪的组织研磨液。

附 录 D
(规范性附录)
实时荧光 PCR 反应液配方

实时荧光PCR反应液配方见表D.1。

表D.1 实时荧光PCR反应液配方

组 分	1个检测体系的加入量
2×PCR 缓冲液 ^a	12.5μL
dNTP (2.5 mmol/L)	1.0 μL
上游引物 (10 μmol/L)	1.0 μL
下游引物 (10 μmol/L)	1.0μL
探针 (10 μmol/L)	1.0 μL
<i>Taq</i> 酶 ^b (5U/μL)	0.5μL
去离子水	3μL
总体积	20μL
<p>2×PCR 缓冲液^a: 参见附录 A.1 配方。 <i>Taq</i> 酶^b: 具有 5'→3'外切活性。</p>	

附录 E
(资料性附录)
非洲猪瘟病毒实时荧光 PCR 扩增实例参考

图D.1给出了非洲猪瘟病毒实时荧光PCR扩增实例。

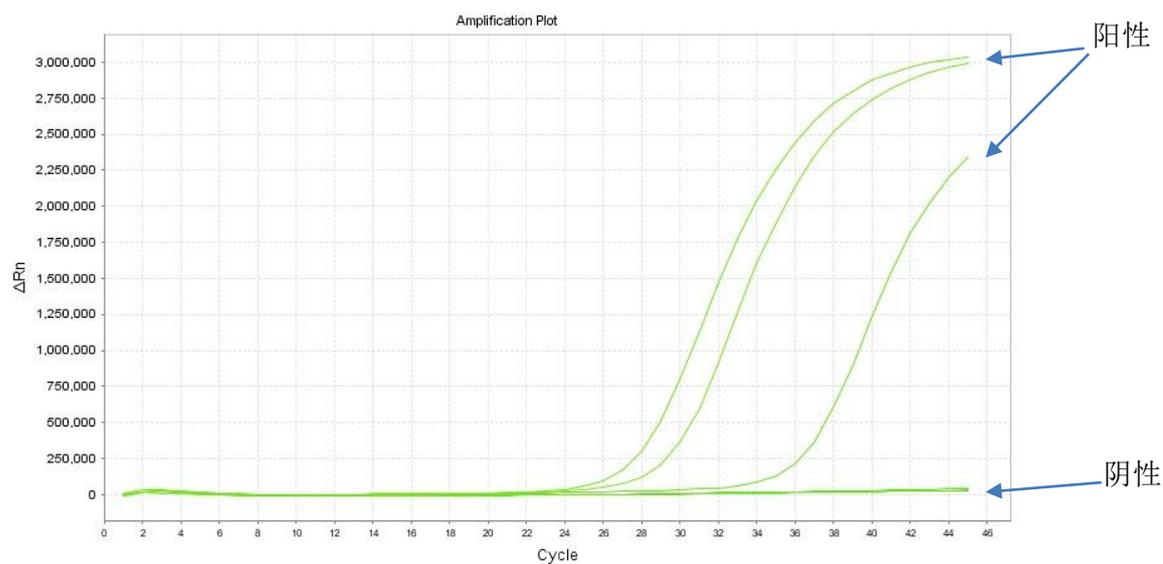


图 E.1 非洲猪瘟病毒核酸实时荧光 PCR 典型扩增曲线示意图