

团 体 标 准

T/ CVMA XXXXX—XXXX

非洲猪瘟病毒与猪圆环病毒 2 型双重实时 荧光定量 PCR 检测方法

Duplex real-time fluorescence quantitative PCR method for the detection
of african swine fever virus and porcine circovirus 2

(征求意见稿)

XXXX - XX - XX 发布

XXXX - - XX 实施

中 国 兽 医 协 会 发 布

中国兽医协会
CVMA

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。

本文件由中国兽医协会提出并归口。

本文件起草单位：湖南冠牧生物科技有限公司、上海市动物疫病预防控制中心、中国动物疫病预防控制中心。

本文件主要起草人：杨忠苹、赵和平、杨德全、廖娟红、杨洛扬、张健、周光斌、刘林青、兰德松。

中国兽医协会
CVMA

非洲猪瘟病毒与猪圆环病毒 2 型双重实时荧光定量 PCR 检测方法

1 范围

本文件规定了非洲猪瘟病毒与猪圆环病毒 2 型双重实时荧光定量 PCR 检测方法。

本文件适用于猪组织、猪血液、眼鼻肛拭子及环境中非洲猪瘟病毒和猪圆环病毒 2 型美洲型核酸检测。

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 分析实验室用水规格和试验方法

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 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

荧光 PCR 实时荧光聚合酶链反应 (real-time polymerase chain reaction)

ASFV 非洲猪瘟病毒 (african swine fever virus)

Ct值 每个反应管内的荧光信号量达到设定的阈值所经历的循环数 (cycle threshold)

DEPC 焦碳酸二乙酯 (diethyl pyrocarbonate)

FAM 6-羧基荧光素 (carboxyfluorescein)

PBS 磷酸盐缓冲液 (phosphate-buffered saline buffer)

PCV2 猪圆环病毒2型 (porcine circovirus 2)

ROX 羧基-X-罗丹明 (carboxy-X-rhodamine)

RNA 核糖核酸 (ribonucleic acid)

5 试剂和材料

5.1 试剂

5.1.1 总则：除非另有说明，所用试剂均为分析纯，试验用水符合 GB/T 6682 的要求，所有试剂均用无 RNA 酶的容器分装。

5.1.2 TRIzol：2℃~8℃保存。

5.1.3 氯仿：2℃~8℃保存。

5.1.4 异丙醇：-20℃预冷。

5.1.5 DEPC 水：见附录 A 中 A.1。

5.1.6 75% 乙醇：用新开启的无水乙醇和 DEPC 水配制，-20℃预冷。

5.1.7 0.01 mol/L PBS 溶液（pH 7.2~ pH 7.4）：见附录 A 中 A.2。

5.1.8 组织悬液、阿氏液、拭子悬液：见附录 A 中 A.3、A.4 和 A.5。

5.1.9 双重荧光 PCR 反应液配方：见附录 B 中 B.1。

5.1.10 阳性对照、阴性对照见附录 A 中 A.6 和 A.7。

5.2 引物和探针

双重荧光PCR扩增用上、下游引物和探针序列参见附录C.1。

6 仪器设备

6.1 荧光 PCR 检测仪及配套反应管（板）。

6.2 高速冷冻离心机。

6.3 振荡器。

6.4 微量移液器（10 μL、20 μL、100 μL、200 μL、1 000 μL）及配套吸头（无核酸酶）。

6.5 冰箱（2℃~8℃和-20℃两种）

6.6 1.5 mL 离心管（无核酸酶）和采血管。

7 样品的采集与前处理

7.1 总则

样品的采集、保存与运输按照NY/T 541执行。生物安全要求符合GB 19489的规定。

7.2 样品前处理

7.2.1 组织样品前处理：采集有明显病变的脾脏、淋巴结、扁桃体、肺脏等组织样品，无菌取 0.5 g 样品研磨后，加 0.3 mL~0.5 mL 的组织悬液（符合附录 A 中 A.3 的规定）进行匀浆混匀，转入无菌离心管中，4℃下 5000 r/min 离心 10 min，取上清液备用。

7.2.2 血液、血清样品处理：取耳静脉或前腔静脉血 3 mL~5 mL，待析出血清后，直接吸取至无菌离心管中，编号备用。用无菌注射器先吸入阿氏液（符合附录 A 中 A.4 的规定）2 mL~3 mL，再自耳静脉或前腔静脉采集等量血液，快速混匀后转入无菌离心管中，编号备用。

7.2.3 拭子、环境样品处理：将采集有眼鼻肛拭子或环境的拭子悬液（符合附录 A 中 A.5 的规定）在振荡器上充分混合，捻动、挤压干后弃去拭子。3000 r/min 离心 5 min，吸取上清 200 μ L 于 1.5 mL 灭菌离心管中。

8 操作方法

8.1 样品核酸提取

8.1.1 在样本制备区进行，采取 TRIzol 裂解法提取；也可采用其他等效的 RNA 提取方法。

8.1.2 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。

8.1.3 每管加入 600 μ L TRIzol。

8.1.4 每管对应编号分别加入 200 μ L 待检样品、阳性对照或阴性对照，混匀。

8.1.5 每管加入 200 μ L 氯仿，充分倒混匀。于 4 $^{\circ}$ C、12000 r/min 离心 15 min。

8.1.6 新取 n 个灭菌的 1.5 mL 离心管，逐管编号，每管加入 500 μ L 异丙醇（-20 $^{\circ}$ C 预冷）。

8.1.7 吸取本文件 7.1.5 各管中的上清液 500 μ L，转移至 7.1.6 相应的管中，避免吸出中间层，颠倒混匀。

8.1.8 于 4 $^{\circ}$ C、12000 r/min 离心 15 min，轻轻倒去上清，倒置于吸水纸上，沥干液体，不同样品应在吸水纸不同地方沥干。

8.1.9 每管加入 600 μ L 75% 乙醇（-20 $^{\circ}$ C 预冷），颠倒洗涤。

8.1.10 于 4 $^{\circ}$ C、12000 r/min 离心 10 min，轻轻倒去上清，倒置于吸水纸上，沥干液体，不同样品应在吸水纸不同地方沥干。

8.1.11 4000 r/min 离心 10 s，将管壁上的残余液体甩到管底部，用微量移液器尽量将其吸干。注意一份样本换用一个吸头，吸头不要碰到有沉淀一面。

8.1.12 室温干燥 3 min。不宜过于干燥，以免 RNA 不溶。

8.1.13 每管加入 11 μ L DEPC 水，轻轻混匀，溶解管壁上的 RNA，2000 r/min 离心 5 s，获得 RNA 溶液，可直接用于检测或保存于 -20 $^{\circ}$ C 备用。

8.2 扩增试剂的准备与配制

8.2.1 在试剂配制区进行。

8.2.2 设实时荧光 PCR 反应管数为 n ，为待检样品数+阳性管数+阴性管数，每个反应的体系见附录 B，为了避免移液器取样损失，建议按 $n+1$ 个反应进行配制。配制反应液在冰盒中进行。将配制的荧光 PCR 反应液充分混匀，按照每管 20 μ L 分装于 0.2 mL 透明 PCR 管内，将 PCR 管置于 96 孔板上，按顺序加样并做好标识，转移至核酸提取区。

8.3 加样

8.3.1 在核酸提取区进行。

8.3.2 在上述 7.2.2 的反应管中分别加入 7.1.13 中制备的 RNA 溶液 5 μ L，使每管总体积达到 25 μ L，记录反应管对应的样品编号。盖紧管盖后，瞬时离心。

8.4 荧光 PCR 反应

8.4.1 在核酸扩增区进行。

8.4.2 将 7.3.2 中加样后的反应管放入荧光 PCR 检测仪中，设置探针：报告基团选择 FAM 和 ROX 两个荧光通道，淬灭基团均选择无（None）荧光。在荧光 PCR 仪上进行以下反应：50 $^{\circ}$ C 2 min，95 $^{\circ}$ C 2 min；95 $^{\circ}$ C 15 s，60 $^{\circ}$ C 30 s，在每个循环第二步（60 $^{\circ}$ C 30 s）收集荧光信号，共 40 个循环。

9 结果判定

9.1 结果分析条件设定

阈值设定原则：阈值线设定于刚好超过阴性对照扩增曲线的最高点。不同仪器可根据仪器噪音情况进行调整。

9.2 实验成立的条件

9.2.1 阴性对照：FAM 通道无 Ct 值或无典型的 S 型扩增曲线，ROX 通道无 Ct 值或无典型的 S 型扩增曲线。

9.2.2 阳性对照：FAM 通道 Ct 值 $\leq$ 30，ROX 通道 Ct 值 $\leq$ 30，且两个通道的扩增曲线均为典型的 S 型。

9.2.3 8.2.1 和 8.2.2 要求需在同一次实验中同时满足，否则，本次实验无效，需重新进行。

9.3 结果描述及判定

9.3.1 被检样品若 FAM 通道 Ct 值 $\leq$ 35 且扩增曲线为典型的 S 型曲线，ROX 通道无 Ct 值或无典型的 S 型扩增曲线，报告为 ASFV 核酸阳性；35<Ct $\leq$ 40 时，判定为可疑，可疑样品应重新检测，如重复后 Ct 值仍然 $\leq$ 40，并且有典型的 S 型扩增曲线，报告为 ASFV 核酸阳性。

9.3.2 被检样品若 ROX 通道 Ct 值 $\leq$ 35 且扩增曲线为典型的 S 型曲线，FAM 通道无 Ct 值或无典型的 S 型扩增曲线，报告为 PCV2 核酸阳性。35<Ct $\leq$ 40 时，判定为可疑，可疑样品应重新检测，如重复后 Ct 值仍然 $\leq$ 40，并且有典型的 S 型扩增曲线，报告为 PCV2 核酸阳性。

9.3.3 被检样品若 FAM 通道无 Ct 值或无典型的 S 型扩增曲线，ROX 通道无 Ct 值或无典型的 S 型扩增曲线，报告为 ASFV 核酸阴性和 PCV2 核酸阴性。

附 录 A
(规范性附录)
溶液配制

A.1 DEPC水配方

将 DEPC 加入去离子水（符合 GB/Z6682 要求）中至终浓度为 0.1%（体积比），充分混合均匀后作用 12 h，分装，121 ℃±2 ℃高压灭菌 30 min，冷却后冷藏备用。

A.2 0.01 mol/L PBS溶液（pH 7.2～pH 7.4）

准确称量下面各试剂，加入到 800 mL 蒸馏水中溶解，调节溶液的 pH 至 7.2～7.4，加水定容至 1 L。分装后在 121 ℃灭菌 15 min～20 min，或过滤除菌，保存于室温。

表 A.2.1 0.01 mol/L PBS 溶液配方

名称	用量
氯化钠(NaCl)	8.00 g
氯化钾(KCl)	0.20 g
磷酸二氢钾(KH ₂ PO ₄)	0.24 g
磷酸氢二钠(Na ₂ HPO ₄ •12H ₂ O)	3.65 g
蒸馏水	加至 1000 mL

A.3 组织悬液

在0.01 mol/LPBS液中添加青霉素(2000 IU/mL)，链霉素(2 mg/mL)、庆大霉素(50 pg/mL)和制霉菌素(1000 IU/mL)。

A.4 阿氏液

葡萄糖2.05 g，柠檬酸钠0.8 g，柠檬酸0.055 g，氯化钠0.42 g，加蒸馏水至100 mL，溶解后调pH值至6.1，69 kPa15 min 高压灭菌，4 ℃保存备用。

A.5 拭子悬液

在0.01 mol/L PBS液中添加青霉素(10000 IU/mL)，链霉素(10 mg/mL)、庆大霉素(250 pg/mL)和制霉菌素(5000 IU/mL)，调pH值至7.2～7.4。

T/CVMA XXXXX—XXXX

A.6 阳性对照

为含ASFV和PCV2基因目的片段的质粒DNA。

A.7 阴性对照

为不含ASFV和PCV2基因目的片段的质粒DNA。

附 录 B
(规范性附录)
荧光 PCR 反应液配方

B.1 荧光PCR反应液配方

荧光 PCR 反应液配方见表 B.1。

表 B.1 荧光 PCR 反应液配方

组分	1个检测反应的加入量（μL）
Probe qPCR Mix, with UNG（2×）	12.5
ASFV-1F	0.5
ASFV -1R	0.5
ASFV -1P	0.4
PCV2 -2F	0.5
PCV2 -2R	0.5
PCV2 -2P	0.5
ddH2O	4.6
RNA	5

B.2 注意事项

在检测过程中，应严防不同样品间的交叉污染。
反应液分装时宜避免产生气泡，上机前检查各反应管是否盖紧，以免荧光物质泄漏污染仪器。

附 录 C
(资料性附录)
引物和探针

表 C.1 引物、探针的名称与序列

名称	序列 (5' - 3')
ASFV-1F	GATGATGATTACCTTYGCTTTGAA
ASFV -1R	TCTCTTGCTCTRGATACRTTAATATGA
ASFV -1P	FAM-CCACGGGAGGAATACCAACCCAGTG-BHQ1
PCV2 -2F	CCAGGAGGGCGTTSTGACT
PCV2 -2R	CGYTACCGYTGGAGAAGGAA
PCV2 -2P	ROX-AATGGCATCTTCAACACCCGCCTCT-BHQ2