

ICS

团 体 标 准

T/CVMA ××××—××××

猪瘟病毒与非洲猪瘟病毒双重实时荧光 RT-PCR 检测方法

Duplex real time RT-PCR detection method for CSFV and ASFV

(征求意见稿)

XXXX - XX - XX 发布

XXXX=XX-XX 实施

中国兽医协会 发 布

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。

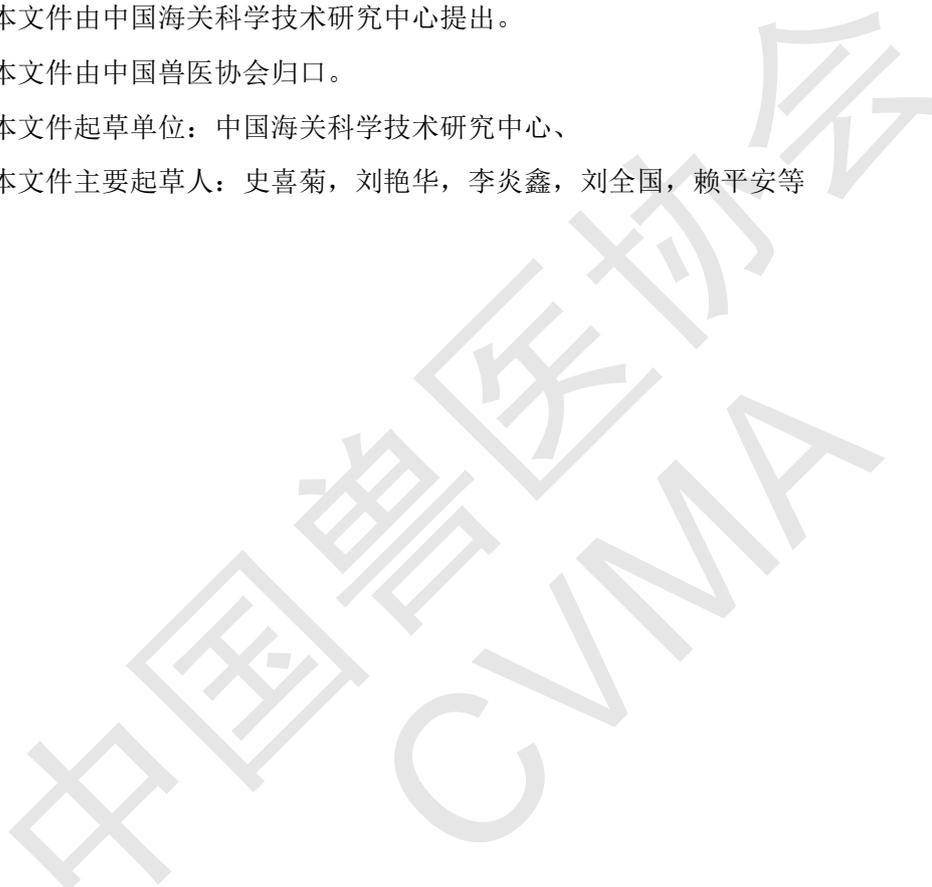
本文件涉及专利。

本文件由中国海关科学技术研究中心提出。

本文件由中国兽医协会归口。

本文件起草单位：中国海关科学技术研究中心、

本文件主要起草人：史喜菊，刘艳华，李炎鑫，刘全国，赖平安等



引言

本文件的发布机构提请注意，声明符合本文件时，条目5.6和条目7的内容可能涉及到相关专利的使用。

本文件的发布机构对于该专利的真实性、有效性和范围无任何立场。

该专利持有人已向本文件的发布机构保证，愿意同任何申请人在合理且无歧视的条款和条件下，就专利授权许可进行谈判。该专利持有人的声明已在本文件的发布机构备案。相关信息可以通过以下联系方式获得：

专利持有人姓名：中国海关科学技术研究中心

地址：北京市朝阳区甜水园街6号

请注意除上述专利外，本文件的某些内容仍可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别这些专利的责任。

猪瘟病毒与非洲猪瘟病毒双重实时荧光 RT-PCR 检测方法

1 范围

本文件规定了猪瘟病毒和非洲猪瘟病毒双重实时荧光 RT-PCR 检测操作规程。

本文件适用于活猪或猪产品中猪瘟病毒和非洲猪瘟病毒快速筛选及鉴别。

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

GB19489 实验室生物安全通用要求

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 双重荧光 RT-PCR Duplex real time RT-PCR

多重荧光反转录-聚合酶链式反应。

3.1.2 Ct 值 Cycle threshold

每个反应孔内的荧光信号达到设定阈值时所经历的循环次数。

3.2 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

3.2.1 CSFV: 猪瘟病毒 (Classical Swine Fever Virus)

3.2.2 ASFV: 非洲猪瘟病毒 (African Swine Fever Virus)

3.2.3 6-FAM: 6-羧基荧光素 (6-Carboxyfluorescein)

3.2.4 Cy5: 荧光发光集团

3.2.5 BHQ: 荧光淬灭基团

4 仪器和设备

4.1 多通道荧光 PCR 仪

- 4.2 生物安全柜
- 4.3 冰箱（2~6 °C和-20°C）
- 4.4 台式冷冻离心机
- 4.5 组织匀浆机
- 4.6 漩涡震荡器
- 4.7 移液器及吸头（10μL、200μL 和 1000μL）

5 试剂和材料

- 5.1 病毒总核酸提取试剂 TIANamp Virus DNA/RNA Kit。
- 5.2 Path-ID™ Multiplex one-step RT-PCR kit。
- 5.3 无水乙醇（分析纯）和 75%乙醇（用新开启的分析纯无水乙醇和 DEPC 水配制），-20 °C 预冷。

5.4 阳性对照

猪瘟病毒体外转录的非感染性RNA片段、含非洲猪瘟病毒DNA片段的重组质粒。

5.5 阴性对照

猪瘟病毒阴性样品、非洲猪瘟病毒阴性样品。

5.6 引物和探针序列

引物和探针序列如表 1。

表 1：引物和探针序列

病原	靶基因	引物名称	序列
猪瘟病毒 (CSFV)	5'UTR 基因	FP1	5' AGCCACCTCGAGATGCTA 3'
		FP2	5' AGCCACCTCGATATGCTATG 3'
		FP3	5' AGCTCACCTCGAGATGCTATG 3'
		RP1	5' CTATCAGGTCGTA TCTCCCATCAC 3'
		RP2	5' TATCAGGTCGTACCCCATCA 3'
		Probe1	5' Cy5-ACGAGGGCAWGCCCAAGAC -BHQ1 3'
		Probe2	5' Cy5-ACGAGGGCACGCCCAAG -BHQ1 3'
		非洲猪瘟病 毒 (ASFV)	VP72 基因
FP2	5' CGATGATGATTACCTTCGCTTTGA 3'		
RP1	5' CGATACCACAAGATCAGCCGT 3'		
RP2	5' CTGATACCACAAGATCAGCCGT 3'		
RP3	5' GATACCACAAGATCGGCCGT 3'		
Probe1	5' FAM-CACGGGAGGAATACCAACCCAG-BHQ1 3'		

6 病毒总核酸的提取

6.1 Carrier RNA 溶液的配制

6.1.1 Carrier RNA 储存液：向装有 310 μg Carrier RNA 冻干粉的管子中加入 310 μL RNase-Free ddH₂O，将 Carrier RNA 彻底溶解，得到终浓度为 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的溶液，并分装、置于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 储存。

6.1.2 Carrier RNA 工作液：根据样品的数量计算所需缓冲液 GB 和 Carrier RNA 溶液的体积（计算公式如下），将缓冲液 GB 与 Carrier RNA 溶液颠倒混匀，即得到 Carrier RNA 工作液；为避免溶液出现起泡现象，请勿使用涡旋振荡。

计算公式：

$$n \times 0.22 \text{ mL} = y \text{ mL}$$

$$y \text{ mL} \times 28 \mu\text{L}/\text{mL} = z \mu\text{L}$$

式中 n =同时提取的样品个数， y =需要加入缓冲液 GB 的体积， z =需要加入 Carrier RNA 溶液的体积。

6.2 操作步骤

6.2.1 用移液器将 20 μL Proteinase K 加入一个干净的 1.5 ml 离心管中。

6.2.2 向离心管中加入 200 μL 血浆/血清/淋巴液或 25mg 磨碎的组织（样品需平衡至室温），如果样本体积小于 200 μL ，可加入 0.9% NaCl 溶液补充。

6.2.3 加入 200 μL Carrier RNA 工作液，盖上管盖，涡旋振荡 15 sec 混匀。

6.2.4 56 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 15 min，简短离心以收集附着在管壁及管盖的液体。

6.2.5 加入 250 μL 无水乙醇，涡旋振荡 15 sec，彻底混匀，在室温（15-25 $^{\circ}\text{C}$ ）放置 5 min。

6.2.6 简短离心，以收集附着在管壁及管盖的液体。

6.2.7 将离心管中的溶液和絮状沉淀全部转移至 RNase-Free 吸附柱 CR2（吸附柱放在收集管中），盖上管盖，8,000 rpm (~6,000 $\times g$) 离心 1 min，弃废液，将吸附柱放回收集管中。

6.2.8 小心打开吸附柱盖子，加入 500 μL 溶液 GD（使用前请先检查是否已加入无水乙醇），盖上管盖，8,000 rpm (~6,000 $\times g$) 离心 1 min，弃废液，将吸附柱放回收集管。

6.2.9 小心打开吸附柱盖子，加入 600 μL 溶液 PW（使用前请先检查是否已加入无水乙醇），盖上管盖，静置 2 min，8,000 rpm (~6,000 $\times g$) 离心 1 min，弃废液，将吸附柱放回收集管。

6.2.10 重复步骤 6.2.9。

6.2.11 小心打开吸附柱盖子，加入 500 μL 无水乙醇，盖上管盖，8,000 rpm (~6,000 $\times g$) 离心 1 min，弃废液。

6.2.12 将吸附柱放回收集管中，12,000 rpm (~13,400 $\times g$) 离心 3 min，使吸附膜完全变干，弃废液。

6.2.13 将吸附柱放入一个新的 RNase-Free 离心管（1.5 ml）中，小心打开吸附柱的盖子，室温

放置 3 min，使吸附膜完全变干。向吸附膜的中间部位悬空滴加 20-150 μL RNase-Free ddH₂O，盖上盖子，室温放置 5 min。

6.2.14 12,000 rpm (~13,400 \times g)离心 1 min，收集到的即为病毒总核酸（DNA 或 RNA）。

6.3 也可以使用其他等效的核酸提取试剂，按照产品说明书进行即可。

7 荧光 RT-PCR 反应

7.1 双重荧光 RT-PCR 反应体系

表 2 双重荧光 RT-PCR 反应体系（20 μL ）

混合液组份	体积（ μL ）	终浓度（nM）
2 \times Multiplex RT-PCR 缓冲液	10	1 \times
Multiplex 酶混合液	1	1 \times
引物混合物	1.6	400
CSFV 探针（Cy5 标记）	0.4	200
ASFV 探针（FAM 标记）	0.4	200
病毒总核酸	1-5	
DEPC 水补齐至总体积	20	

将混合液充分混合后，最后加入模板，简短离心，按照下列反应程序进行荧光 RT-PCR 反应。

7.2 单荧光 RT-PCR 反应体系

表 3 单荧光 RT-PCR 反应体系（20 μL ）

混合液组份	体积（ μL ）	终浓度（nM）
2 \times Multiplex RT-PCR 缓冲液	10	1 \times
Multiplex 酶混合液	1	1 \times
引物混合物	1.6	400
ASFV 探针或者 CSFV 探针	0.4	200
病毒总核酸	1~5	
DEPC 水补齐至总体积	20	

7.3 荧光 RT-PCR 反应程序

表 4 荧光 RT-PCR 反应程序

48℃	10min	
95℃	10min	
95℃	15sec	44 个循环
60℃	45sec	

7.4 结果描述及判定

7.4.1 质控标准

阳性对照（FAM 和 Cy5）均有 S 形扩增曲线，Ct 值大约在 28 左右，阴性对照无扩增信号；阴性对照（FAM 和 Cy5）均无扩增曲线且 Ct>40 或者无值。

满足此条件，视为此次试验有效。

7.4.2 结果判断和鉴别

有扩增曲线，且 $Ct \leq 35$ ，判定为核酸检测阳性；

有扩增曲线，但 $35 < Ct < 40$ ，属于疑似区间，需要重新确认；

没有扩增曲线，或者 $Ct > 40$ ，判定核酸检测阴性。

FAM 阳性荧光信号表示 ASFV 核酸检测阳性，Cy5 阳性荧光信号表示 CSFV 核酸检测阳性，两种阳性荧光信号表示 ASFV 和 CSFV 核酸检测双阳性。

8 生物安全要求

疑似阳性样品的核酸提取要在相应等级的生物安全实验室或者生物安全柜中进行，并做好个人防护。