

团 体 标 准

T/CVMA 287—2025

非洲猪瘟病毒微流控荧光 PCR 检测方法

Microfluidic Real-time PCR detection method for African swine fever virus

2025 - 9 - 30 发布

2025 - 9 - 30 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。

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。

本文件由泰州蕾灵百奥生物科技有限公司提出。

本文件由中国兽医协会归口。

本文件起草单位：泰州蕾灵百奥生物科技有限公司、牧原食品股份有限公司、中国农业科学院兰州兽医研究所、江苏省农业科学院、扬州大学。

本文件主要起草人：陈蕾、刘婉思、骆焕东、成晶、刘振东、牛旻、张娇蕊、李亚楠、刘帅杰、张强、杨吉飞、何继军、马维民、毛立、刘爵、陈政海。

中国兽医协会
CVMA

非洲猪瘟病毒微流控荧光 PCR 检测方法

1 范围

本文件规定了非洲猪瘟病毒微流控荧光PCR检测方法的技术原理、试剂与耗材、仪器设备、操作方法和结果判定。

本文件适用于非洲猪瘟病毒核酸的检测。

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

NY/T 1948 兽医实验室生物安全要求通则

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。

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

BHQ1: 无荧光淬灭基团1 (Black hole quencher 1)

Ct值: 每个检测体系内的荧光信号量达到设定的阈值所经历的循环数 (Cycle threshold)

DNA: 脱氧核糖核酸 (Deoxyribonucleic acid)

FAM: 6-羧基荧光素 (6-carboxyfluorescein)

HEPES: 4-(2-羟乙基)-1-哌嗪乙磺酸 (4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid)

MAOPA: 磁珠介导的一体化聚合酶扩增 (Magnetic beads mediated All-in-One Polymerase Amplification)

PBS: 磷酸盐缓冲液 (Phosphate buffered saline)

PCR: 聚合酶链式反应 (Polymerase Chain Reaction)

ROX: 羧基-X-罗丹明 (Carboxy-X-rhodamine)

5 原理

本方法核心在于通过微流控卡槽式芯片技术将核酸提取与荧光 PCR 检测整合为一体，由磁珠全流程参与核酸的吸附、洗涤、洗脱和扩增，实现基于 MAOPA 技术的一体化分子检测。其中，微流控检测卡盒作为加样和检测过程中的重要载体，在其不同功能区域（包括裂解、洗涤、扩增反应等）依次预装填了相应试剂并密封后制备而成。微流控检测卡盒工作流程：检测时，样品随磁珠一同加入到卡盒的裂解区域；之后卡盒放入到带有电磁功能、变温功能及实时荧光检测一体化的微流控荧光 PCR 检测仪器中，利用仪器的电磁控制模块，控制磁珠依次完成样品核酸的吸附、洗涤、洗脱和扩增反应，最后仪器对卡盒扩增反应区域的基因扩增产物引起的实时荧光信号变化进行光学检测。根据实时荧光信号的出现时间、强度和位置，仪器自动判断样品中是否含有 ASFV 核酸。

6 试剂与耗材

6.1 试剂

- 6.1.1 除特别说明以外，本文件所用试剂均为分析纯，试验用水符合 GB/T 6682 中二级水的要求。
- 6.1.2 洗涤液I，按照附录 A 中 A.1 配制。
- 6.1.3 洗涤液II，按照附录 A.2 配制。
- 6.1.4 裂解液，按照附录 A.3 配制。
- 6.1.5 磁珠，按照附录 A.4 配制。
- 6.1.6 针对 ASFV B646L 基因序列设计的特异性引物和探针，并根据外源性 DNA 序列设计的内标引物和探针。B646L 基因参考序列见附录 B.1，内标基因参考序列见附录 C.1，引物和探针序列见附录 D 中表 D.1。
- 6.1.7 阳性对照样品：阳性重组大肠杆菌菌液，参考附录 B.2 进行制备。
- 6.1.8 阴性对照样品：ASFV 核酸阴性的样品（如猪血清、血浆、10 %组织匀浆或无核酸酶水等）。
- 6.1.9 内标样品：内标重组大肠杆菌菌液，参考附录 C.2 进行制备。
- 6.1.10 其它商品化试剂：石蜡、硅油、荧光 PCR 预混液（2×）等。
- 6.1.11 无菌去离子水，符合 GB/T 6682 要求。

6.2 耗材

- 6.2.1 微流控检测卡盒。
- 6.2.2 离心管（1.5 mL，无核酸酶）。
- 6.2.3 微量移液器吸头（10 μ L、200 μ L、1000 μ L，无核酸酶）。

7 仪器设备

- 7.1 二级生物安全柜。
- 7.2 微流控荧光 PCR 检测仪器。

7.3 微量可调移液器（2.5 μL 、10 μL 、100 μL 、200 μL 、1000 μL 等不同规格）。

7.4 组织研磨仪。

7.5 台式高速离心机。

8 样品采集、处理和储存

8.1 生物安全措施

样品采集及运输的生物安全措施按 NY/T 541 的规定执行；样品处理、检测应在符合 GB 19489、NY/T 1948 的生物安全二级及以上且经省级畜牧兽医行政主管部门批准非洲猪瘟检测的实验室进行。

8.2 样品采集及运输

样品采集及运输按照 NY/T 541 的规定执行。采集猪血清、血浆、口鼻拭子等液体样品，脾脏、扁桃体、淋巴结、肾脏、骨髓、肌肉等组织样品，圈舍、饲槽、运输工具和周边环境拭子等样品用于检测，样品应在冷藏条件下尽快运输至实验室，避免反复冻融。

8.3 样本处理

8.3.1 应在二级生物安全柜中处理检测前样品。

8.3.2 血清、血浆样品：无需处理，可直接吸取上清待检。

8.3.3 唾液样品：充分涡旋震荡 30 s 后，5000 r/min 离心 2 min，吸取上清待检。

8.3.4 拭子（包括口鼻拭子、血拭子、肛拭子、环境拭子）样品：充分涡旋震荡含有拭子的管子 30 s，尽力挤压拭子后，5000 r/min 离心 2 min，吸取上清待检。

8.3.5 组织样品：取约 0.1 g 组织至 2 mL 研磨管，加入 1 mL 0.01 mol/LPBS（pH 7.2），置组织研磨仪充分研磨制成约 10 %组织匀浆液，5000 r/min 离心 5 min，吸取上清待检。

8.3.6 精液样品：反复冻融 3 次，5000 r/min 离心 2 min，吸取上清待检。

8.4 样品存放

采集或处理好的样品在 2 $^{\circ}\text{C}$ ~ 8 $^{\circ}\text{C}$ 保存应不超过 24 小时；若需长期保存，须放置 -20 $^{\circ}\text{C}$ 以下保存，并应避免反复冻融。

9 操作方法

9.1 扩增反应液的配制

将 40 $\mu\text{mol/L}$ ASFV 检测上游引物和下游引物各 0.5 μL ，20 $\mu\text{mol/L}$ 探针 0.4 μL ，与 40 $\mu\text{mol/L}$ 内标上游、下游引物各 0.4 μL 、20 $\mu\text{mol/L}$ 探针 0.3 μL ，荧光 PCR 预混液（2 $\times$ ）20 μL ，无菌去离子水 17.5 μL 混合均匀。

9.2 微流控检测卡盒的制备

9.2.1 样品裂解区

使用自动化灌装设备或手动将1.2 mL裂解液灌装至空卡盒的样品裂解区，加入适量非活性液体（包括但不限于硅油等）封闭该区，通过塑性材料活塞实现对该区的物理隔离并控制样品流向洗涤液I区。

9.2.2 洗涤液 I 区

使用自动化灌装设备或手动将140 μL 洗涤液I灌装至空卡盒的洗涤液I区，加入适量非活性液体（包括但不限于硅油等）封闭该区，通过塑性材料活塞实现对该区的物理隔离并控制样品流向洗涤液II区。

9.2.3 洗涤液 II 区

使用自动化灌装设备或手动将140 μL 洗涤液II灌装至空卡盒的洗涤液II区，加入适量非活性液体（包括但不限于硅油等）封闭该区，通过塑性材料活塞实现对该区的物理隔离并控制样品流向扩增反应区。

9.2.4 扩增反应区

使用自动化灌装设备或手动将40 μL 扩增反应液灌装至空卡盒的扩增反应区（反应管），加入适量非活性液体（包括但不限于溶解后的石蜡等）封闭该区，完成微流控检测卡盒的制备。

9.3 微流控荧光 PCR 检测

9.3.1 加样

应在二级生物安全柜中加入待检样品。打开微流控检测卡盒顶盖，分别向各卡盒中加入10 μL 磁珠（需提前混匀）、20 μL 内标样品。按样品顺序向卡盒加样区分别加入200 μL 待测样品，盖紧各卡盒顶盖，水平摇晃，使卡盒内液体充分混匀，转移至检测区，每轮样品检测设阴、阳性对照。

9.3.2 测定

打开微流控荧光PCR检测仪器，按提示将微流控检测卡盒插入仪器相应的检测通道，按紧。提取部分运行参数为：裂解35 $^{\circ}\text{C}$ 8 min；扩增部分运行参数为：预变性95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min；变性95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s、退火延伸58 $^{\circ}\text{C}$ 30 s，共45个扩增循环，于每一循环退火结束时收集FAM和ROX荧光信号（具体设置方式参考仪器说明书）。

9.4 废弃物及剩余样品无害化处理

检测实验结束后，使用过的微流控检测卡盒和一次性废弃物（例如用过的吸头）应用1%次氯酸钠或等效消毒剂浸泡处理；剩余样品密封包装后用高压蒸汽消毒（121 $^{\circ}\text{C}$ ，30 min）后，统一交给指定的生物安全垃圾处理公司进行无害化处理，并做好记录。

样品检测结果出现阳性时，应及时报告送样部门和业务主管部门，并将剩余样品用生物安全袋密封包装并进行明显标识，待上级业务主管部门明确进一步处理方案后，对剩余样品进行相应处理。同时应用有效消毒剂对实验室内可能接触到的设备设施和环境进行全面消毒处理。

10 结果判定

10.1 试验成立条件

阳性对照显示检测结果为阳性，同时FAM通道Ct值 ≤ 30 并出现典型的扩增曲线，且内标ROX通道Ct值 ≤ 30 并呈现典型的扩增曲线；阴性对照显示检测结果为阴性，同时FAM通道无Ct值且无典型的扩增曲线，且内标ROX通道Ct值 ≤ 30 并呈现典型的扩增曲线，则判为试验成立。否则试验不成立，应分析原因后重新进行试验。

当阳性对照的FAM通道和内标ROX通道均出现典型的S型扩增曲线且Ct值 ≤ 30 ，同时阴性对照的FAM通道和内标ROX通道均无扩增曲线且Ct >35 或者无值时，试验成立；否则试验不成立。如试验不成立，应分析原因后重新进行试验。

10.2 结果判定

10.2.1 阳性

待检样品FAM通道Ct值 <36 并呈现典型的扩增曲线，ROX通道Ct值 ≤ 30 并呈现典型的扩增曲线。

10.2.2 阴性

待检样品FAM通道无Ct值且无典型的扩增曲线，ROX通道Ct值 ≤ 30 并呈现典型的扩增曲线。

10.2.3 疑似与复检

待检样品FAM通道 $36 \leq \text{Ct值} \leq 45$ 并呈现典型的扩增曲线，ROX通道Ct值 ≤ 30 并呈现典型的扩增曲线，判为疑似；对疑似样品按原条件进行复检，结果FAM通道Ct值 ≤ 45 并呈现典型的扩增曲线，ROX通道Ct值 ≤ 30 并呈现典型的扩增曲线，则判为阳性；否则判为阴性。

附录 A
(规范性)
试剂溶液的配制

A.1 洗涤液 I

称取15.138 g三羟甲基氨基甲烷、100 g聚乙二醇，加灭菌纯化水定容至1 L，混合均匀，0.22 μm滤膜过滤除菌。2~8 °C保存，有效期为15个月。

A.2 洗涤液 II

称取6.055 g三羟甲基氨基甲烷、15 g氯化钾、300 mL无水乙醇，加灭菌纯化水定容至1 L，混合均匀，0.22 μm滤膜过滤除菌。2~8 °C保存，有效期为15个月。

A.3 裂解液

称取486.59 g异硫氰酸胍、26.8 g无水乙酸钠、60 mL Triton X-100、2 mL乙酸，加灭菌纯化水定容至1 L，混合均匀，0.22 μm滤膜过滤除菌。2~8 °C保存，有效期为15个月。

A.4 磁珠

用商品化HEPES缓冲液（1 mol/L）将商品化磁珠（1 μm核酸提取硅羟基磁珠）进行10倍稀释，混合均匀。2~8 °C保存，有效期为15个月。

附 录 B (资料性) 阳性对照的制备

B.1 非洲猪瘟病毒B646L基因片段参考序列 (GenBank Accession No. MK333180.1)

5'-ATGGCATCAGGAGGAGCTTTTTGTCTTATTGCTAACGATGGGAAGGCCGACAAGATTATAT
TGGCCCAAGACTTGCTGAATAGCAGGATCTCTAACATTA AAAATGTGAACAAAAGTTATGGGAA
ACCCGATCCCGAACCCACTTTGAGTCAAATCGAAGAAACACATTTGGTGCATTTTAATGCGCATT
TTAA**GCCTTATGTTCCAGTAGGGTTTGAATACAATAAAGTACGCCCGCATACGGGTACCCCCA**
CCTTGGGAAACAAGCTTACCTTTGGTATTCCCCAGTACGGGAGACTTTTCCATGATATGGTGGG
CCATCATATATTGGGTGCATGTCATTCATCCTGGCAGGATGCTCCGATTTCAGGGCACGTCCCAGA
TGGGGGCCCATGGGCAGCTTCAAACGTTTCCTCGCAACGGATATGACTGGGACAACCAAACACC
CTTAGAGGGCGCCGTTTACACGCTTGTAGATCCTTTTGGAAGACCCATTGTACCCGGCACAAAGA
ATGCGTACCGAAACTTGGTTTACTACTGCGAATACCCCGGAGAACGACTTTATGAAAACGTAAGA
TTCGATGTAAATGGAAATTCCCTAGACGAATATAGTTCGGATGTCACAACGCTTGTGCGCAAATT
TTGCATCCCAGGGGATAAAATGACTGGATATAAGCACTTGGTTGGCCAGGAGGTATCGGTGGAG
GGAACCACTGGCCCTCTCCTATGCAACATTCATGATTTGCACAAGCCGCACCAAAGCAAACCTAT
TCTTACCGATGAAAATGATACGCAGCGAACGTGTAGCCATACCAACCCGAAATTTCTTTCACAGC
ATTTTCCCGAGAACTCTCACAATATCCAAACAGCAGGTAAACAAGATATTACTCCTATCACGGAC
GCAACGTATCTGGACATAAGACGTAATGTTTATTACAGCTGTAATGGACCTCAAACCCCTAAATA
CTATCAGCCCCCTCTTGCCTCTGGATTAAAGTTGCGCTTTTGGTTTAATGAGAACGTGAACCTTGC
TATTCCCTCAGTATCCATTCCCTTCGGCGAGCGCTTTATCACCATAAAGCTTGCATCGCAAAAGG
ATTTGGTGAATGAATTTCCCTGGACTTTTGTACGCCAGTCACGTTTTATAGCTGGACGCCCCAGTA
GACGCAATATACGCTTTAAACCATGGTTTATCCCAGGAGTCATTAATGAAATCTCGCTCACGAAT
AATGAACTTTACATCAATAACCTGTTTGTAAACCCCTGAAATACACAACCTTTTTGTAAAACGCGTT
CGCTTTTCGCTGATACGTGTCCATAAAACGCAGGTGACCCACACCAACAATAACCACCACGATGA
AAAATAATGTCTGCTCTTAAATGGCCATTGAATATATGTTTATAGGATTAAAACCTACCTGGA
ACATCTCCGATCAAAATCCTCATCAACACCGAGATTGGCACAAGTTTCGGACATGTTGTTAACGCC
ATTATGCAGCCCACTCACCACGCAGAGATAAGCTTTCAGGATAGAGATACAGCTCTTCCAGACGC
ATGTTTCATCTATATCTGATATTAGCCCCGTTACGTATCCGATCACATACCTATTATTA AAAACATT
TCCGTAACCTGCTCATGGTATCAATCTTATCGATAAATTTCCATCAAAGTTCTGCAGCTCTTACATA
CCCTTCCACTACGGAGGCAATGCGATTAAAACCCCGATGATCCGGGTGCGATGATGATTACCTT
TGCTTTGAAGCCACGGGAGGAATACCAACCCAGTGGTCATATTAACGTATCCAGAGCAAGAGAA
TTTTATATTAGTTGGGACACGGATTACGTGGGGTCTATCACTACGGCTGATCTTGTGGTATCGGCA
TCTGCTATTAACCTTTCTTCTTCTCAGAACGGTTCAGCTGTGCTGCGTTACAGTACCTAA-3'

注：下划线部分为连入pUC57载体中的包含的目标检测片段部分，粗体为引物和探针序列。

B.2 阳性对照的制备

按 B.1 中下划线部分序列合成基因片段，并克隆至 pUC57 载体，再转化至 DH5 α 感受态细胞，构建重组大肠杆菌，重组大肠杆菌进行 PCR 鉴定和测序分析，结果正确的为阳性重组大肠杆菌。阳性重

组大肠杆菌按 0.5 % (ml/ml) 的比例接种于含有氨苄青霉素 (100 $\mu\text{g/ml}$) 的 LB 培养基中, 置 37 $^{\circ}\text{C}$ 摇床、以 220 r/min 振荡培养 10 ~ 12 h, 收获菌液。菌液 5000 r/min 离心 20 min, 弃去培养基, 并用同等体积的磷酸盐缓冲液 (pH 7.2, 0.01 mol/L PBS) 进行重悬、冲洗, 反复三次。100 $^{\circ}\text{C}$ 灭活 10 min, 对灭活后的菌液进行核酸拷贝数的测定, 稀释至 10^4 拷贝/mL 浓度作为阳性对照, 置 -20 $^{\circ}\text{C}$ 以下分装保存, 避免反复冻融, 12 个月内有效。

附 录 C
(资料性)
内标样品的制备

C.1 内标基因片段参考序列

5'-TATTTTCGAGAGCGATAAGCCTTTATTAATTCCTCTAGCAACGTGAACAATAGGGCATTTCCTGG
CTTCAGAGGGGAAAAAGCGTAACGATAGCACTAGCTTACGTACGGCTTCCCAATAGGGATATACTA
CCTAAGGTTAGCAACCGGTTGGTAGGCTCAGGCCGCAAAGTGAATGGCCCATGGCGTAAGCCATG
TCGATACGTTGAATAGGCTACAATTCTAGTAAATCGACCAGAGTTGATTAAAAGCTTTCATGTCTG
GTAACCTCCGACCCGACGATATGCGAGCCGGGAGCGCAATAAGCCGAGATACACTTAGCTTACGATA
CATTAAATGATTTTGCCCATGTAGCCGTTGTGCTGGGGACATTAAAAACCACGGAGTTCAGTCCTC
GCACCATGGGGGGCCCATCCACTTGAGTCACGGCTTAGCCCTAACTCGAAGAATTATCAACTATCGA
AGTACGTACTAAAATTGGTTAGCTAT-3'

注：下划线部分为连入pUC57载体中的内标检测片段，粗体为引物和探针序列。

C.2 内标样品的制备

按C.1下划线部分序列合成内标基因片段，并克隆至pUC57载体，再转化至DH5 α 感受态细胞，构建重组大肠杆菌，重组大肠杆菌进行PCR鉴定和测序分析，结果正确的为内标重组大肠杆菌。内标重组大肠杆菌按0.5 % (ml/ml) 的比例接种于含有氨苄青霉素 (100 μ g/ml) 的LB培养基中，置37 $^{\circ}$ C摇床、以220 r/min振荡培养10 ~ 12 h，收获菌液。菌液5000 r/min离心20 min，弃去培养基，并用同等体积的磷酸盐缓冲液 (pH 7.2, 0.01 mol/L PBS) 进行重悬、冲洗，反复三次。100 $^{\circ}$ C灭活10 min，对灭活后的菌液进行核酸拷贝数的测定，稀释至 10^4 拷贝/mL浓度作为内标样品，置-20 $^{\circ}$ C以下分装保存，避免反复冻融，12个月内有效。

附 录 D
(规范性)

ASFV B646L 基因和内标基因引物和探针序列

ASFV B646L基因和内标基因的引物、探针的名称与序列见表D.1。

表D.1 ASFV B646L基因和内标基因引物和探针序列

名称	序列
ASFV检测上游引物	5'-GCCTTATGTTCCAGTAGGGT-3'
ASFV检测下游引物	5'-AGTCTCCGTACTGGGGAATAC-3'
ASFV检测探针	5'- (FAM) AGGTGGGGGTACCCGTATGC (BHQ1) -3'
内标上游引物	5'-GGGATATACTACCTAAGGTTA-3'
内标下游引物	5'-TGGTCGATTACTAGAAATTG-3'
内标探针	5'- (ROX) CCTATTCAACGTATCGACATGGCTTAC (BHQ1) -3'