



团 体 标 准

T/GDAAV 0511—2025

非洲猪瘟病毒超快速荧光 PCR 检测 技术规范

Technical Specification for Ultra-fast real-time PCR Detection of
African swine fever virus

(征求意见稿)

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

XXXX-XX-XX 发布

XXXX-XX-XX 实施

广东省畜牧兽医学会 发布

目 次

前言	II
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
3 术语和定义	1
3.1 超快速荧光 PCR ultra-fast Real-time PCR	1
4 缩略语	1
5 试剂和耗材	2
5.1 试剂	2
5.2 引物和探针	2
6 仪器设备	2
7 样品采集与处理	2
7.1 采样工具	2
7.2 样品采集	2
7.3 样品运输	3
7.4 样品前处理	3
8 操作方法	3
8.1 样品核酸提取	3
8.2 反应体系的配制	3
8.3 加样	4
8.4 超快速荧光 PCR 扩增	4
9 结果判定	4
9.1 阈值设定	5
9.2 质控标准	5
9.3 结果描述及判定	5
附录 A（规范性） 溶液配置	6
附录 B（资料性） 非洲猪瘟病毒 <i>B646L</i> 重组阳性质粒和内参质粒的制备	7
附录 C（规范性） 引物、探针的名称、序列和工作浓度	9
附录 D（资料性） DNA 提取试剂盒方法（磁珠法）	10

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。

本文件由东莞市动物疫病预防控制中心、广东省畜牧兽医学会提出。

本文件由广东省畜牧兽医学会归口。

主要起草单位：东莞市动物疫病预防控制中心、超快生物技术（广州）有限公司、广州国家实验室、广东省动物疫病预防控制中心、深圳市动植物疫病预防控制中心、深圳海关动植物检验检疫技术中心、海南省动物疫病预防控制中心、广西壮族自治区动物疫病预防控制中心、广州市疾病预防控制中心、肇庆市动物疫病预防控制中心、东莞市横沥镇农业技术服务中心、东莞市东坑镇农业技术服务中心、华润五丰肉类食品（河南）有限公司深圳分公司、东莞市洪梅镇农业技术服务中心。

主要起草人：张险朋、管知深、卢受昇、徐 强、徐振娜、李秋剑、阮周曦、迟庆安、韦正吉、刘雪怡、李漪舟、曹 兰、周美芳、赖笑娴、周柱辉、卢伟昌、谢柱彬、洪伟彬、王婉君、林仰孝、李小军、张远龙、李 敏、叶毅飞、钟群芳、谭铭光、林梦哲。

非洲猪瘟超快速荧光 PCR 检测技术规范

1 范围

本文件描述了非洲猪瘟超快速荧光PCR检测方法。

本文件适用于猪组织、猪全血、动物产品和环境样品中非洲猪瘟病毒的检测。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过本文件的规范性引用而成为本文件必不可少的条款。其中，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

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

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

下列术语和定义适用于本文件。

3.1 超快速荧光 PCR ultra-fast Real-time PCR

一种基于快速温控模块技术（升降温速率40℃/s以上），结合快速启动酶及高特异性预混反应体系所构建的高效核酸扩增检测方法，可在8~15min内完成45个循环检测。

4 缩略语

下列缩略语适合本文件。

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

Ct值: 阈值循环数 (Cycle threshold)

DNA: 脱氧核糖核酸 (Deoxyribonucleic Acid)

F: 上游引物 (Forward primer)

R: 下游引物 (Reverse primer)

P: 探针 (Probe)

BHQ2: 黑洞淬灭剂2 (Black Hole Quencher1)

FAM: 6-羧基荧光素 (6-Carboxyfluorescein)

MGB: Minor Groove Binder Quencher淬灭基团

ROX: 羧基-X-罗丹明 (Carboxy-X-Rhodamine)

PBS: 磷酸盐缓冲液 (Phosphate buffer solution)

ASFV: 非洲猪瘟病毒 (African swine fever virus)

EDTA：乙二胺四乙酸（Ethylenediaminetetraacetic acid）

5 试剂和耗材

5.1 试剂

- 5.1.1 除另有说明，所用试剂均为分析纯。
- 5.1.2 PBS（pH=7.2）液配制方法见附录 A 中 A.1。
- 5.1.3 阴性对照为灭菌生理盐水，配制方法按照附录 A 中 A.2。
- 5.1.4 50%甘油-PBS 保存液，配制方法按照附录 A 中 A.3。
- 5.1.5 阳性对照为非洲猪瘟 *B646L* 基因序列重组质粒，制备方法见附录 B 中 B.2。
- 5.1.6 内参为猪 GAPDH 基因重组质粒，制备方法按照附录 B 中 B.4。
- 5.1.7 超快速荧光 PCR 预混液（包含 5×PCR buffer、Mg²⁺、dNTP）。
- 5.1.8 快速启动聚合酶（5 U/μL）。
- 5.1.9 DNA 提取试剂盒。
- 5.1.10 超快速荧光 PCR 板。
- 5.1.11 青霉素，浓度为 10000IU/mL。
- 5.1.12 链霉素，浓度为 10000μg/mL。

5.2 引物和探针

超快速荧光 PCR 扩增（非洲猪瘟病毒和内参基因序列）上、下游引物和探针序列参见附录 C.1。

6 仪器设备

- 6.1 超快速荧光 PCR 仪。
- 6.2 移液器（量程：0.5μL~10μL、10μL~100μL、100μL~1000μL）。
- 6.3 生物样品均质器。
- 6.4 冷冻高速离心机。
- 6.5 II 级生物安全柜。
- 6.6 高压灭菌器。
- 6.7 pH 计。

7 样品采集与处理

采样及样品前处理过程须戴一次性手套，样品不得交叉污染。实验室生物安全符合 GB 19489 规定。

7.1 采样工具

解剖刀、剪刀、镊子、棉拭子、离心管（2mL、10mL）、研磨管等采样工具需经 121℃（±2℃）高压灭菌 15min。真空采血管（含 EDTA 抗凝剂）。

7.2 样品采集

7.2.1 口、鼻拭子采集

用棉拭子在口腔或鼻腔转动来回刮2次~3次,采集口腔或鼻腔的分泌物,随后立即将棉拭子放入装有1.0mL50%甘油-PBS液的保存管中,剪去露出部分,盖紧离心管盖,密封后冷藏或冷冻保存。

7.2.2 环境拭子采集

将棉拭子在物体表面来回刮2次~3次,每支棉拭子分别放入装有1mL50%甘油-PBS液的保存管中,剪去露出部分,盖紧离心管盖,密封后冷藏或冷冻保存。

7.2.3 全血样品采集

使用真空采血管(含EDTA抗凝剂),采集猪猪血5mL,密封后冷藏或冷冻保存。

7.2.4 组织样品采集

采集猪组织样品,首选脾脏,其次为扁桃体、淋巴结、肾脏、骨髓等。脾脏、肾脏采集约3cm*3cm大小,扁桃体整体采集,采集出血严重的淋巴结,骨髓采集长度约3cm,将采集的样品放入50%甘油-PBS液的保存管中。

7.3 样品运输

样品运输应符合NY/T 541的规定。

7.4 样品前处理

7.4.1 口、鼻拭子样品处理

震荡混匀后取200 μ L液体,立即进行核酸提取或冷冻保存。

7.4.2 口、鼻拭子样品处理

震荡混匀后取200 μ L液体,立即进行核酸提取或冷冻保存。

7.4.3 全血样品处理

摇匀后取200 μ L液体,立即进行核酸提取或冷冻保存。

7.4.4 组织样品处理

无菌操作取组织样品放入2mL研磨管中,用均质器7000r/min匀浆3次,每次20s,每次间隔20s进行匀浆,瞬时离心后获组织匀浆液,加入终浓度10000IU/mL的青霉素、10000 μ g/mL的链霉素,灭菌的0.01mol/L PBS (pH=7.2)液制备10%组织匀浆液。2000r/min离心处理10min。取上清200 μ L,立即进行核酸提取或冷冻保存。

8 操作方法

8.1 样品核酸提取

样品前处理后,加入5 μ L内参参与核酸提取,DNA提取过程详见附录D,也可采用其他等效的DNA提取方法。

8.2 反应体系的配制

每个样品检测反应体系配制见表1，总体积为45 μ L。配制完毕分装时应尽量避免产生气泡。反应体系试剂可采用等效果的商品化试剂盒。

表1 ASFV 超快速荧光 PCR 反应体系配制表

反应体系组分		用量 (μ L)
5 \times PCR Buffer		10.00
快速启动聚合酶 (5U/ μ L)		4.00
dNTP (0.4mmol/ μ L)		0.80
ASFV	F1 (10 μ mol/L)	5.00
	R1 (10 μ mol/L)	5.00
	P1 (10 μ mol/L)	2.50
内参	F2 (10 μ mol/L)	2.00
	R2 (10 μ mol/L)	2.00
	P2 (10 μ mol/L)	1.00
<i>GAPDH</i> 基因重组质粒		5.00
ddH ₂ O		7.70
合计		45.00

8.3 加样

在各设定的荧光 PCR 管中分别加入 8.1 提取的 DNA 溶液 5 μ L，经涡旋后瞬时离心，取 50 μ L 反应液加入超快速荧光 PCR 反应板中。

8.4 超快速荧光 PCR 扩增

8.4.1 上机

将 8.3 中加样后的反应板放入超快速荧光 PCR 仪中，记录样品放置顺序。

8.4.2 循环条件设置

95 $^{\circ}$ C 预变性，1min；95 $^{\circ}$ C、1s，60 $^{\circ}$ C，6s（收集荧光信号）（升降温速率 40 $^{\circ}$ C/s），45 个循环。

8.4.3 荧光通道设定

非洲猪瘟病毒选择 FAM 通道；内参选择 ROX 通道。

9 结果判定

9.1 阈值设定

超快速荧光 PCR 仪自动分析。

9.2 质控标准

阳性对照 FAM 通道（非洲猪瘟病毒）和 ROX 通道（内参）的 Ct 值 \leq 30.0，并出现典型的“S”型扩增曲线；阴性对照 FAM 通道无 Ct 值或无典型扩增曲线，ROX 通道 Ct 值 \leq 30.0。阳性对照和阴性对照同时成立可判定试验有效，否则试验无效。

9.3 结果描述及判定

9.3.1 FAM 通道无 Ct 值或无典型“S”型扩增曲线，ROX 通道 Ct 值 \leq 30.0 判为非洲猪瘟病毒核酸阴性。

9.3.2 FAM 通道出现典型“S”型扩增曲线，且 Ct 值 \leq 37，Cy5 通道 Ct 值 \leq 30.0 表示样品中非洲猪瘟病毒核酸阳性。

9.3.3 FAM 通道 $37 < \text{Ct 值} < 45$ 且有典型“S”型扩增曲线，ROX 通道 Ct 值 \leq 30.0，判为可疑。可疑样品应重新检测，若重新检测结果无特异性扩增曲线或无 Ct 值或等于 45 则为非洲猪瘟病毒核酸阴性，若 Ct 值小于 45 且有典型“S”型扩增曲线则判为非洲猪瘟病毒核酸阳性。

9.3.4 如 ROX 通道 Ct 值 > 30.0 或无 Ct 值，则样品应重新检测，重测如 ROX 通道 Ct 值 \leq 30.0 则结果可采用。

附 录 A
(规范性)
溶液配置

A.1 0.01mol/L PBS (pH=7.2) 溶液的配置

称取磷酸氢二钠 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) 3.0g, 磷酸氢二钾 (K_2HPO_4) 0.2g, 氯化钠 (NaCl) 8g, 加二级水并定容至 1L, 完全溶解后用 3mol/L NaOH 调 pH 至 7.2, 经 121°C ($\pm 2^\circ\text{C}$) 高压灭菌 15min, 室温保存。

A.2 阴性对照

为灭菌生理盐水: 称取 0.9g 氯化钠, 溶解在少量蒸馏水后, 定容至 100ml, 121°C ($\pm 2^\circ\text{C}$), 高压灭菌 15min 后作为阴性对照使用。

A.3 50%甘油-PBS 保存液的配置

0.01mol/L PBS 溶液与甘油 1:1 混合, 调 pH 至 7.2, 分装成小瓶。经 121°C ($\pm 2^\circ\text{C}$) 高压灭菌 15min, 室温或 4°C 保存。

附录 B

(资料性)

非洲猪瘟病毒 *B646L* 重组阳性质粒和内参质粒的制备B.1 非洲猪瘟病毒 *B646L* 基因序列

ATGGCATCAGGAGGAGCTTTTTGTCTTATTGCTAACGATGGGAAGGCCGACAAGATTATATTGGCCCAAGACTTGCTTAATAGCA
 GGATTTCTAACATTAATAATGTGAACAAAAGTTATGGGAAACCCGACCCCGAACCCTTTGAGTCAAATCGAAGAAACACATTTGGTT
 CATTTAATGCGCATTTTAAGCCTTATGTTCCAGTAGGGTTTGAATACAATAAAGTACGCCGCATACGGGTACCCACCTTGGGAAA
 CAAGCTTACCTTTGGTATTCCCAGTACGGAGACTTTTTCCATGATATGGTGGGCCACCATATATTGGGTGCATGTCATTGCTCCTGGC
 AGGATGCTCCGATTCAGGGCAGGCCAGATGGGGGCCATGGTCAGCTTCAAACGTTTCCTCGCAACGGATATGACTGGGACAACCAA
 ACACCTTTAGAGGGCGCCGTTTACACGCTTGTAGATCCCTTTGGAAGACCTATTGTACCCGGCACAAGAATGCGTACCGAAACTTGGT
 TTAATACTGCGAATACCCCGAGAACGACTTTATGAAAACGTAAGATTCGATGTAAATGGAAATTCCTGGACGAATATAGTTCCGATG
 TCACAACGCTTGTGCGCAAATTTTGCATCCAGGGGATAAAAATGACTGGATATAAGCACTTGGTCGGCCAGGAGGTATCGGTGGAGGGA
 ACTAGTGGCCCTCTCTATGCAACATTCATGATTTGCACAAGCCGACCAAAGCAAACCTATTCTTACCGATGAAAATGATACGCAGCG
 AACGTCAGCCATACCAACCCGAAATTCCTTTCACAACATTTCCCGAGAACTCTACAATATCCAAACAGCAGGTAACAAGATATTA
 CTCCTATTACGGACGCAACGTATCTGGACATAAGACGTAATGTTTACAGCTGTAATGGACCTCAAACCCCTAAATACTATCAGCCC
 CCTCTTGCCTCTGGATTAAGCTGCGCTTTTGGTTTAAACGAGAACGTAACCTTGTATTCCCTCGGTATCCATTCCCTTCGGCGAGCG
 CTTTATCACCATAAAGCTTGCATCGCAAAAGGATTTGGTGAATGAATTTCTGGACTTTTTATACGCCAGTCGCGTTTTATACCTGGAC
 GCCCCAGTAGACGCAATATACGCTTTAAACCATGGTTTATCCCAGGAGTCATTAATGAAATCTCGCTCAGCAATAATGAACTTTACATC
 AATAACCTGTTTGAACCCCTGAAATACACAACCTTTTTGTAACGCGTTCGATTTTCCCTGATACGTGTCCATAAAACGCAGGTGAC
 CCACACCAACAATAACCACCAGATGAAAACTAATGTCTGCTCTTAAATGGCCATTGAATATATGTTTATAGGATTAACCTACCT
 GGAACATCTCCGATCAAAATCCTCATCAACACCGAGATTGGCACAAGTTTCGGACATGTTGTTAACGCCATTATGCAGCCTACTCACCAC
 GCAGAGATAAGCTTTCAGGATAGAGATACAGCTCTCCAGACGCATGTTTATCTATATCGGATATTAGCCCGTTACGTATCCGATCAC
 ATTACCTATTATTAACCAATTTCCGTAACGCTCATGGTATCAATCTTATCGATAAGTTTCCATCAAAGTTCTGCAGCTCTTACATAC
 CCTTCCACTACGGAGGCAATGCAATTAACCCCGATGATCCGGTGGGATGATGATTACCTTTGCTTTGAAGCCACGGGAGGAATAC
 CAACCCAGTGGTCATATTAACGTATCCAGAGCAAGAGAAATTTATATTAGTTGGGACACGGATTACGTGGGTCTATCACTACGGCTGA
 TCTTGTGGTATCGGCATCTGTATTAACCTTCTTCTTCTTTCAGAACGGTTCAGCTGTGCTGCGTTACAGTACCTAA

B.2 非洲猪瘟病毒 *B646L* 重组阳性质粒的制备

使用表 C.1 的非洲猪瘟病毒引物，扩增非洲猪瘟病毒 *B646L* 基因序列片段，将扩增产物进行胶回收和双酶切后，连接至 pUC57 载体上，再转化至 DH5 α 大肠杆菌感受态细胞中，得到重组质粒，提取重组质粒进行 PCR 检测和测序，鉴定为重组阳性质粒 (pUC57-*B646L*)，质粒浓度约为 7.85×10^9 copies/ μ L，将其稀释为工作浓度约 7.85×10^7 copies/ μ L。

B.3 猪 *GAPDH* 基因序列

AGGGTCATCATCTCTGCCCCTTCTGCCGATGCCCCATGTTTGTGATGGGCGTGAACCATGAGAAGTATGACAACCTCCCTCAAGA
 TCGTCAGGTGAGCTTGGTGGAGGGGGCGGGGGGTCATGCTGCGCGGACCCCGTGGACCTGCCCGTTGACTTGCTCCCTCGTTTCA
 GCAATGCCTCCTGCACCACCAACTGCTTGGCACCCTGGCCAAGGTCATCCATGACCACTTCGGCATCGTGGAGGGACTCATGGTAGGT
 GATGGGACTGAGCCAGAGCACGTTCTGTCTCACCCAGGACTGGATCCTTCCCTCCAGAGCTCAGCCCGAGCTGTAGGGGCTCAG
 GACATCAGAGGAGGGGTAGGTGGGGTGGTTCCAAGCACTGTGTCCCTTAGTTCTTCCACCTTCAACACGCCGCCATGTACGTGGCC

ATCCAGGCCGTGCTGTCCCTGTACGCCTCTGGCCGCACCACTGGCATTGTCATGGACTCTGGGGATGGGGTCACCCACACGGTGCCCAT
CTACGAGGGGTACGCCCTGCCACGCCATCTGCGTCTGGACCTGGCTGGCCGGGACCTGACCGACTACCTCATGAAGATCCTCACGG
AGCGGGGTACAGCTTACCACCACGGCCGAGCGGGAGATCGTGGGGACATCAAGGAGAAGCTCTGCTACGTCGCCCTGGACTTCGAG
CAGGAGATGGCCACCGCCGCTCCTCCTCCCTGGAGAAGAGCTACGAGCTGCCCACGGCCAGGTCATCACCATCGGCAACGAGCG
CTTCCGGTGTCCAGAGGCGCTCTCCAGCCCTCCTTCTTGGGTAGGTGTCGGGCAGCGCGCCTGCCTGGGGGGGGCCCGGGGGCTCAT
CCCCTTGACGGGGACCGCTAAGGGGGCGCTCTGTGGCCCTCTCAGGCATGGAGTCCGCGGCATCCACGAGACCACCTTCAACTCGA
TCATGAAGTGCACGTGGACATCAGGAAGACCTCTACGCCAACACGGTGTGTCTGGCGGGACCACCATGTACCCCGGCATCGCCGAC
AGGATGCAGAAGGAGATCACGGCCCTGGCGCCAGCACCATGAAGATCAAGGTGAGTCGGGTGGCCGTG

B.4 猪 *GAPDH* 基因重组质粒的制备

使用表 C.1 的内参引物，扩增猪 *GAPDH* 基因序列片段，将扩增产物进行胶回收和双酶切后，连接至 pUC57 载体上，再转化至 DH5 α 大肠杆菌感受态细胞中，得到重组质粒，提取重组质粒进行 PCR 检测和测序，鉴定为重组阳性质粒（pUC57- β -*GAPDH*），质粒浓度约为 9.5×10^9 copies/ μ L，将其稀释为工作浓度约 9.5×10^7 copies/ μ L。

附录 C

(规范性)

引物、探针的名称、序列和工作浓度

C.1 引物、探针的名称、序列和工作浓度

表 C.1 列出了 ASFV 超快速荧光 PCR 引物、探针信息和工作浓度。

表 C.1 引物、探针的名称、序列和浓度

名称	序列 (5'—3')	工作浓度 ($\mu\text{mol/L}$)
ASFV-F	GGCAATGCRATTAACCC	10
ASFV-R	CGTGGCTCAAAGCAAAGGT	10
ASFV-P	FAM-TCCGGGTGCGATGATTACCTT-MGB	10
GAPDH-F	GTTTGTGATGGCGTGAACC	10
GAPDH-R	CACCAAGCTCACCTGACGAT	10
GAPDH-P	ROX-AAGTATGACAACCTCCCTCAAG-BHQ2	10

附录 D

(资料性)

DNA 提取试剂盒方法 (磁珠法)

- D.1 取195 μL 经过处理的样品、阳性对照和阴性对照分别加入5 μL 内参，然后分别加入装有715 μL 裂解液管中，漩涡混匀5s，室温静置10min使样品充分裂解，转移离心管至磁力架上，静置30s，磁珠完全吸附后，吸取上清液并弃除，将离心管从磁力架上取下。
- D.2 加洗涤液700 μL 至裂解液管中，振荡混匀30s，转移离心管至磁力架上，静置30s，磁珠完全吸附后，吸取上清液并弃除，将离心管从磁力架上取下。
- D.3 短暂离心收集管壁上的液滴，转移离心管至磁力架上，磁珠完全吸附后，吸取上清液并弃除。
- D.4 打开离心管盖，室温干燥3min晾干磁珠，将离心管从磁力架上取下。
- D.5 加洗脱液100 μL 至裂解液管中，振荡混匀，转移裂解液管至磁力架上，静置1min，磁珠完全吸附后小心将DNA溶液转移至一个新离心管中，应尽快用于下游试验，如不能立即使用，应置于-20 $^{\circ}\text{C}$ 储存。
-