ICS 11.220
CCS B 41

团　　体　　标　　准

T/CVMA 87—2021

非洲猪瘟病毒与猪圆环病毒 2 型双重荧光 PCR 检测方法

Duplex Fluorescence PCR method for the detection of African Swine Fever Virus and Porcine Circovirus 2

中国兽医协会 CVMA

2021 - 12 - 23 发布　　2021 - 12- 23 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、辽宁省动物疫病预防控制中心、丰城市农业农村局、榆林市农业宣传信息中心、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、兰德松、杨沼扬、张健、周光斌、白艳艳、刘林青、廖娟红。

中国兽医协会 CVMA

中国兽医协会
CVMA

非洲猪瘟病毒与猪圆环病毒 2 型双重荧光 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 型双重荧光 PCR 检测方法的试剂材料、仪器设备、样品的采集与处理、操作方法和结果判定等。

本文件适用于猪口鼻拭子、血清、全血、组织和环境等样品中非洲猪瘟病毒和猪圆环病毒 2 型的核酸检测。

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/T 18648—2020 非洲猪瘟诊断技术

GB 19489 实验室 生物安全通用要求

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。

PCR：聚合酶链式反应（polymerase chain reaction）

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

BHQ：无荧光淬灭基团（black hole quencher）

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）

DNA：脱氧核糖核酸（deoxyribonucleic acid）

FAM：6-羧基荧光素（6-carboxyfluorescein）

PCV2：猪圆环病毒2型（porcine circovirus 2）

ROX：羧基-X-罗丹明（carboxy-X-rhodamine）

5 试剂和材料

5.1 试剂

5.1.1 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。

5.1.2 TE Buffer (pH 8.0)配制方法按附录 A 中 A.1。

5.1.3 阳性对照、阴性对照见附录 A 中 A.2 和 A.3，其中阳性对照质粒序列见附录 B。

5.1.4 PCR Assay Kit （包含 2×PCR Buffer 和 PCR Enzyme Mix ）。

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。
6.2 高速冷冻离心机。
6.3 振荡器。
6.4 微量移液器（量程：0.5 μL～10 μL、2 μL～20 μL、20 μL～200 μL 和 200 μL～1 000 μL）。
6.5 冰箱（2 ℃～8 ℃和−20 ℃以下）。

7 样品的采集与处理

7.1 总则

实验室生物安全要求符合GB 19489的规定。

7.2 样品采集

猪口鼻拭子、血清、全血、组织和环境等样品采集分别按照GB/T 18648—2020中6.3.1、6.3.2和6.3.4中的规定执行。

7.3 样品处理

猪口鼻拭子、血清、全血、组织和环境等样品处理分别按照GB/T 18648—2020中6.4.1、6.4.2和6.4.4中的规定执行。

8 操作方法

8.1 DNA 提取

8.1.1 在样本制备区进行。使用商用 DNA/RNA 共提取试剂盒提取病毒基因组 DNA；也可采用其他等效的 DNA 提取方法。

8.1.2 待检样品、阳性对照和阴性对照逐管编号，按照试剂盒操作说明进行提取操作。

8.1.3 洗脱获得 DNA 溶液，可直接用于检测或保存于−20 ℃备用。

8.2 扩增试剂的准备与配制

8.2.1 在试剂储存和准备区进行。

8.2.2 每个反应的体系见附录 C，根据 8.1.2 中提到的 n 值，按 n＋1 配制反应液，充分混匀后分装，每个反应管 20 μL。转移反应管至样本制备区。

8.3 加样

8.3.1 在样本制备区进行。

8.3.2 在上述 8.2.2 的反应管中分别加入 8.1.3 制备的 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，3000 r/min 离心 30 s。转移至扩增区。

8.4 荧光 PCR 反应

8.4.1　在扩增区进行。

8.4.2　将 8.3.2 中加样后的反应管放入荧光 PCR 检测仪中，通道设置如下：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。反应程序设置如下：50 ℃ 2 min，95 ℃ 2 min；95 ℃ 15 s，60 ℃ 30 s，共 45 个循环，在每个循环第二步（60 ℃ 30 s）收集荧光信号。

9　结果判定

9.1　结果分析条件设定

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　试验成立的条件

9.2.1　阴性对照：FAM 通道 Ct 值>40 或无 Ct 值，无典型的 S 型扩增曲线；且 ROX 通道 Ct 值>40 或无 Ct 值，无典型的 S 型扩增曲线。

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

9.2.3　9.2.1 和 9.2.2 要求需在同一次试验中同时满足，否则，本次试验无效，应重新进行。

9.3　结果描述及判定

9.3.1　阴性

两个检测通道均Ct值>40或无Ct 值，无典型的S 型扩增曲线，表示样品中无ASFV 和PCV2 核酸。

9.3.2　双检测通道阳性

两个检测通道出现两条对应的典型的S 型扩增曲线，且Ct值≤ 35，表示样品中同时存在ASFV 和PCV2 核酸。

9.3.3　单检测通道阳性

如仅FAM检测通道出现典型的S 型扩增曲线，且Ct值≤ 35；而ROX检测通道Ct值>40或无Ct值，无典型的S 型扩增曲线，表示样品中存在ASFV核酸，但不含有PCV2核酸。

如仅ROX检测通道出现典型的S型扩增曲线，且Ct值≤ 35；而FAM检测通道Ct值>40或无Ct值，无典型的S型扩增曲线，表示样品中存在PCV2 核酸，但不含有ASFV 核酸。

上述结果描述及判定可参见表1。

表 1　结果描述与判定

FAM 检测通道	ROX 检测通道	结果描述判定
阳性	阳性	同时存在ASFV 和PCV2 核酸
阳性	阴性	存在ASFV 核酸，但不含有PCV2 核酸
阴性	阳性	存在PCV2 核酸，但不含有ASFV 核酸
阴性	阴性	无ASFV 和PCV2 核酸

9.3.4　可疑判定

Ct 值＞35，且出现典型的S型扩增曲线的样品建议复检。复检仍出现上述结果的，判相应检测通道的病毒核酸为阳性，否则判为阴性。

附 录 A
（规范性）
溶液配制

A.1 TE Buffer (pH 8.0)

量取下列溶液于 500 ml烧杯中，1M Tris-HCl Buffer PH=8.0 5 ml，0.5M EDTA PH=8.0 1 ml，向烧杯中加入约 400 ml ddH_2O均匀混合；将溶液定容到 500 ml后；室温保存.

A.2 阳性对照

用 500 μl TE Buffer (pH 8.0)将含ASFV 和PCV2 基因检测片段的质粒进行溶解和 10 倍梯度稀释，用按本标准制造的试剂盒测定FAM通道和ROX通道Ct值。选择FAM通道和ROX通道Ct值在 23~28 之间的稀释倍数作为阳性对照。

A.3 阴性对照

为灭菌生理盐水：称取 0.9 g氯化钠，溶解在少量蒸馏水后，定容到 100 mL，高压灭菌后作为阴性对照。

中国兽医协会 CVMA

附 录 B
（资料性）
阳性对照质粒序列

阳性对照质粒序列如下：

TCGCGCGTTTCGGTGATGACGGTGAAAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTCACAGCT
TGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTTGGCGGGT
GTCGGGGCTGGCTTAACTATGCGGCATCAGAGCAGATTGTACTGAGAGTGCACCATATGCGGTGTG
AAATACCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAATACCGCATCAGGCGCCATTCGCCATTCAGGCTGCGC
AACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGGATG
TGCTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGACGTTGTAAAACGACGG
CCAGTGAATTC<u>GATCCGGGTGC**GATGATGATTACCTTTGCTTTGAAGCCACGGGAGGAATACC**
AACCCAGTGG</u>**TCATATTAACGTATCCAGAGCAAGAGA**ATTTTATACGCCAC<u>**CGTTACCGCTGG**
AGAAGGAAA**AATGGCATCTTCAACACCCGCCTCT**CCCGCACCATCGGTTATACTGTCAAGAAAA
CCAC**AGTCAGAACGCCCTCCTGG**AATGTGGAC</u>AAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCC
TGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAAGC
CTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCCAGTC
GGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCGTA
TTGGGCGCTCTTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTCGGCTGCGGCGAGCGG
TATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAAC
ATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCC
ATAGGCTCCGCCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCG
ACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACC
CTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCAC
GCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCG
TTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACT
TATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACA
GAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTG
CTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGG
TAGCGGTGGTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAAGGATCTCAAGAAGATC
CTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCA
TGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAAAAATGAAGTTTTAAATCAATCTA
AAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCG
ATCTGTCTATTTCGTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGG
GCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTAT
CAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGCCTCC
ATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGCGCAACG
TTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTCACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGG
TTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGG
TCCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGCAGTGTTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCAT

AATTCTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCAT
TCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGC
CACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACTCTCAAGG
ATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTGATCTTCAGCATCTT
TTACTTTCACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAAT
AAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAG
GGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGC
GCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTCTAAGAAACCATTATTATCATGACATTAACCTATAA
AAATAGGCGTATCACGAGGCCCTTTCGTC

注：下划线部分为连入 PUC19 载体中的包含 ASFV 和 PCV2 目标检测片段部分，粗体为引物和探针序列。

中国兽医协会 CVMA

附 录 C
（规范性）
引物探针序列与荧光 PCR 反应液配方

C.1 引物、探针的名称和序列

引物、探针的名称和序列见表C.1。

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-BHQ1
注：R=A/G，Y=C/T，S=C/G。	

C.2 荧光PCR反应液配方

荧光PCR反应液配方见表C.2。

表 C.2 荧光 PCR 反应液配方

组分	1个检测反应的加入量（μL）
2×PCR Buffer（Mg2+, dNTP plus）* a	12.5 μL
PCR Enzyme Mix *b	1.0 μL
ASFV-1F（10 μmol/L）	0.5
ASFV -1R（10 μmol/L）	0.5
ASFV -1P（10 μmol/L）	0.375
PCV2 -2F（10 μmol/L）	0.5
PCV2 -2R（10 μmol/L）	0.5
PCV2 -2P（10 μmol/L）	0.5
ddH2O	3.625
模板DNA	5
* a为Multiplex PCR Assay Kit 组分，内含 Buffer、dNTP Mixture 等，Mg^{2+}的终浓度是 2 mM。 * b为Multiplex PCR Assay Kit 组分，内含Taq DNA聚合酶等。	

C.3 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。

中国兽医协会
CVMA