ICS

备案号：

团　体　标　准

T/CVMA XXXX—XXXX

非洲猪瘟病毒（P72/CD2V/MGF）三重实时荧光定量PCR检测方法

Detection of African classical swine fever virus (P72/CD2V/MGF) by triples real-time PCR

（征求意见稿）

XXXX - XX - XX 发布　　XXXX - XX - 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 第一部分：标准化文件的的结构和起草规则》 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这些专利的责任。

本文件由中国兽医协会提出并归口。

本文件起草单位：中国动物疫病预防控制中心、禾旭（郑州）生物技术有限公司。

本文件主要起草人：

中国兽医协会 CVMA

非洲猪瘟病毒（P72/CD2V/MGF）三重实时荧光 定量PCR 检测方法

1 范围

本文件规定了非洲猪瘟病毒（P72/CD2V/MGF）三重实时荧光PCR检测方法的规范性引用文件、试剂、仪器设备、实验操作步骤和结果判定等内容。

本文件适用于猪全血、血清、唾液等样本中的非洲猪瘟病毒P72基因、CD2V基因和MGF基因的检测。

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文件的必不可少的条款。其中注日期的引用文件，仅注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

NY/T 541 兽医诊断样品采集、保存与运输技术规范

3 试剂

3.1 DNA 提取试剂

DNA提取试剂详见附录A，或选取商品化的病毒DNA提取试剂盒。

3.2 5 × RT-PCR 缓冲液的配制

Tris base	15.14 g
KCL	13.98 g
$MgCL_2 \cdot 6H_2O$	1.53 g
DTT	3.86 g

中国兽医协会 CVMA

加无核酸酶灭菌蒸馏水至 400 mL，调 pH 值至 8.3（25 ℃），定容至 500 mL。过滤（0.22μm）除菌后置于 2 ℃~8 ℃保存备用。

3.3 引物和探针

表1 所用引物和探针

名称	序列（5′-3′）	病毒名称
P72上游引物	5’-CTGCTCATGGTATCAATCTTATCGA-3’	ASFV
P72下游引物	5’-GATACCACAAGATC（AG）GCCGT-3’	
探针	5’-FAM-CCACGGGAGGAATACCAACCCAGTG-BHQ1-3’	
CD2V上游引物	5’-AGGTAAGGGAAATGGGTTGAG-3’	
CD2V 下游引物	5’-GCCTTACAGTCGTTATCAGT-3’	
探针	5’-CY5-TGGTTGTGTTGAGGGACGCATGTAGT-BHQ3-3’	
MGF上游引物	5’-CTACGGGCTGGTATCTGTCA-3’	
MGF下游引物	5’-AAGCCCTCTTTAATACCTGCTGA-3’	
探针	5’-ROX-ACGGCGTTAGTGAAGGCTGTAAGGG-BHQ2-3’	
注：将表中引物和探针均用无核酸酶的灭菌蒸馏水稀释至 10 μmoL/μL 后使用。		

3.4 荧光 PCR 反应液的制备

按表2中所示各组分体积按一定比例扩大后配制荧光PCR反应液。体系配制过程应无菌操作，反应液配制完成后，过滤（0.22μm）除菌，无菌定量分装，加贴标签。

表2 荧光PCR反应液配方

成分	体积比例（1 个反应）
P72 上游引物（10 μmoL/L）	0. 3 μL
P72 下游引物（10 μmoL/L）	0.3 μL
P72 探针（10 μmoL/L）	0.3 μL
CD2V 上游引物（10 μmoL/L）	0.3 μL
CD2V 下游引物（10 μmoL/L）	0.3 μL

中国兽医协会 CVMA

成分	体积比例（1 个反应）
CD2V 探针（10 μmoL/L）	0.3 μL
MGF 上游引物（10 μmoL/L）	0.3 μL
MGF 下游引物（10 μmoL/L）	0.3 μL
MGF 探针（10 μmoL/L）	0.3 μL
2×qPCR 预混液	9.5 μL
DEPC 水	6.8 μL

3.5 酶混合物、阴性对照、阳性对照，制备方法见附录 B。

3.6 其他试剂

无水乙醇、无核酸酶灭菌蒸馏水、生理盐水。

4 仪器设备

分析天平、高速离心机、荧光PCR仪、组织研磨器、-20℃冰箱、可调移液器。

5 操作步骤

5.1 样品采集

样品采集按照 NY/T 541 进行。采集猪全血、血清、唾液等样本样品，进行编号，之后立即进行处理或置于 - 80℃保存备用。

5.2 样品处理

5.2.1 血液样品

5.2.1 进行静脉无菌采血，不少于 2 mL。采集静脉血时，每头动物使用一个采血器。

5.2.2 将血液室温静置于斜面 2 h，待血液自然凝固后，置 2 ℃～8 ℃冰箱中放置不少于 2 h，然后置高速冷冻离心机 4000 r/min 离心 10 min。

5.2.3 用单道微量移液器小心吸出上层血清。血清应清亮，无溶血、无污染。

中国兽医协会 CVMA

5.2.2 病毒 DNA 的提取

5.2.3 若使用病毒 DNA 试剂盒提取病毒 DNA，则按试剂盒说明书进行操作。

5.2.3.1 取已处理的样品、阴性对照和阳性对照，分别加入裂解液 600 μL，充分颠倒混匀，室温静置 3 min～5 min；

5.2.3.2 将液体吸入吸附柱中，10,000 × g 离心 30 s；

5.2.3.3 弃去收集管中液体，加入 600 μL 洗涤液，10,000 × g 离心 30 s；

5.2.3.4 重复上述步骤 5.3.1.3 进行洗涤；

5.2.3.5 弃去收集管中液体，10,000× g 离心 2 min，以除去残留的洗涤液；

5.2.3.6 将吸附柱移入新的 1.5 mL 无菌离心管中，向柱中央加入洗脱液 50 μL，室温静置 1 min，10,000 × g 离心 30 s，离心管中液体为模板 DNA。

5.3 试剂准备

取出试验所需各组分，室温放置，待其完全融化后，混匀后备用。

5.4 配制 PCR 混合液

按照下表的反应体系，量取用于（N+1）个反应的荧光PCR反应液和酶混合物配制PCR混合液，混匀后，分装至N个PCR反应管中。

表4 反应体系配制方法

试剂	1 个反应加样量	N 个反应加样量 （N=样品量+阴性对照+阳性对照）
荧光PCR反应液	19μL	19μL×（N+1）
酶混合物	1μL	1μL×（N+1）
模板	5μL	5μL×（N+1）

5.5 加样

中国兽医协会 CVMA

向 PCR 反应管中分别加入 5μL 模板，同时设置阳性对照和阴性对照，加样量各为 5μL，记录加样顺序。

5.6 盖好 PCR 管盖，将 PCR 反应液与模板振荡混匀后 2000r/min 离心 10 秒。

5.7 将 PCR 反应管转移到 PCR 区进行上机。

5.8 PCR 扩增

5.8.1 开机预热并检验仪器性能。

5.8.2 将PCR反应管放入扩增仪，按对应顺序设置阴性对照、阳性对照以及待测样本名称。

5.8.3 循环参数设定如下表所示：

表5 仪器核酸扩增相关参数

反应体系	25μL		
信号采集	选择 FAM 通道检测 P72 基因，选择 CY5 通道检测 CD2V 基因，选择 ROX 通道检测 MGF 基因		
扩增程序	阶段	条件	循环数
	UNG 酶反应	50℃，2 分钟	1
	预变性	95℃，2 分钟	1
	变性	95℃，15 秒	40
	退火，延伸，荧光采集	60℃，30 秒	
	仪器冷却	25℃，10 秒	1

5.9 结果判定

5.9.1 条件设定 合理调整阈值线，不同仪器可根据仪器噪音情况进行调整。

5.9.2 试验成立条件

——阳性对照 FAM通道、CY5通道及ROX通道Ct值均＜30，呈典型的S型扩增曲线。

——阴性对照 FAM通道、CY5通道及ROX通道均无Ct值，或无典型的S型扩增曲线。

5.9.3 样本结果判定

中国兽医协会 CVMA

5.9.3.1 P72基因检测结果判定（FAM通道）

被检样品Ct值≤35且呈典型的S型扩增曲线，判定为ASFV P72基因检测阳性；无Ct值或Ct值≥37，判定为ASFV P72基因检测阴性；35＜Ct值＜37且出现特异性扩增曲线，判为可疑。对可疑样品，再进行1次复检，做3个重复；至少2个重复Ct值＜37且呈典型的S型扩增曲线即判定ASFV P72基因检测阳性，否则判定为ASFV P72基因检测阴性。

5.9.3.2 CD2V基因检测结果判定（CY5通道）

被检样品Ct值≤35且呈典型的S型扩增曲线，判定为ASFV CD2V基因检测阳性；无Ct值或Ct值≥37，判定为ASFV CD2V基因检测阴性；35＜Ct值＜37且出现特异性扩增曲线，判为可疑。对可疑样品，再进行1次复检，做3个重复；至少2个重复Ct值＜37且呈典型的S型扩增曲线即判定ASFV CD2V基因检测阳性，否则判定为ASFV CD2V基因检测阴性。

5.9.3.3 MGF基因检测结果判定（ROX通道）

被检样品Ct值≤35且呈典型的S型扩增曲线，判定为ASFV MGF基因检测阳性；无Ct值或Ct值≥37，判定为ASFV MGF基因检测阴性；35＜Ct值＜37且出现特异性扩增曲线，判为可疑。对可疑样品，再进行1次复检，做3个重复；至少2个重复Ct值＜37且呈典型的S型扩增曲线即判定ASFV MGF基因检测阳性，否则判定为ASFV MGF基因检测阴性。

5.9.4 综合判定

结合P72、CD2V、MGF基因的检测结果进行综合判定，如下表所示：

表6 结果判定表

检测结果（Ct值）			判定
FAM-P72	CY5-CD2V	ROX-MGF	
≤35	≤35	≤35	ASFV野毒
≤35	≤35	≥37	ASFV MGF基因缺失
≤35	≥37	≤35	ASFV CD2V基因缺失
≤35	≥37	≥37	ASFV MGF/CD2V双基因缺失
≥37	≥37	≥37	ASFV阴性

中国兽医协会 CVMA

附 录 A

(规范性)

试剂的配制

A.1 保护液（50% 生理盐水）

将生理盐水缓慢倒入盛有甘油的容器中，按 1:1 体积比充分混合。

A.2 裂解液

异硫氰酸胍	236.4 g
氯化钠	23.2 g
0.5 moL/L 乙二铵四乙酸二钠溶液（EDTA）（ pH=8.0 ）	40 mL
灭菌双蒸水	加至 2000 mL

EDTA（0.5 moL/L , pH=8.0）溶液配制

EDTA	18.61 g
灭菌双蒸水	80 mL
氢氧化钠	调 pH 至 8.0
灭菌双蒸水	加至 100 mL

A.3 洗涤液

磷酸氢二钠	143.2 g
磷酸二氢钾	62.4 g
氯化钠	18 g
灭菌双蒸水	加至 2000 mL

再加入 6000mL 无水乙醇，充分混匀。

A.4 洗脱液

磷酸氢二钠	143.2 g
磷酸二氢钾	62.4 g
灭菌双蒸水	加至 2000 mL

中国兽医协会 CVMA

附 录 B

(规范性)

酶混合物、阴性对照、阳性对照

B.1 酶混合物

购自商品化的酶混合物（DNA 聚合酶和尿嘧啶 DNA 糖基化酶）。

B.2 阴性对照

将 DEPC 水作为阴性对照，无菌定量分装，-20 ℃以下保存。

B.3 阳性对照

B.3.1 菌种的繁殖

将-70 ℃以下冻存的重组大肠杆菌 DH5α ASFV P72 -CD2V-MGF 株，用挑菌环挑取少量的菌液，接种于 LB（Amp^+）固体培养基，37℃温箱倒置培养 12～16 小时。挑取单菌落转接于 3 mL～5 mL LB（Amp^+）液体培养基，在 37 ℃、200 r/min 摇床培养至菌液 OD_{600nm} 值为 1.0～1.2，收取菌液。

B.3.2 阳性对照的制备

按商品化质粒提取试剂盒操作说明对菌液进行质粒的提取，用核酸测定仪测定质粒浓度（以 ng/μL 计），按下列计算公式将浓度换算为拷贝数：拷贝数/μL=（6.02×1023）×（质粒浓度×10-9）/（质粒分子量（3657）×660），质粒拷贝数应达到 1.0×1010 拷贝/μL 以上。将提取的质粒用 DEPC 水稀释到 1.0×104 拷贝/μL，无菌定量分装，-20 ℃以下保存。

中国兽医协会 CVMA