ICS 11.220

B 41

团　　体　　标　　准

T/CVMA X27—2019

非洲猪瘟病毒环介导等温扩增检测方法

Loop-mediated isothermal amplification for detection of African swine fever virus

中国兽医协会
CVMA

2019 - XX - XX 发布　　2019 - XX - XX 实施

中　国　兽　医　协　会　发布

前　　言

本标准按 GB/T 1.1-2009给出的规则起草。

本标准不涉及专利。

本标准由中国兽医协会提出并归口。

本标准起草单位：中国动物疫病预防控制中心、中国农业科学院兰州兽医研究所、北京市动物疫病预防控制中心、北京森康维特生物技术研究所

本标准主要起草人：刘洋、倪建强、王传彬、丁凯、宋晓晖、杨吉飞、林密、杨林、周德刚、臧京帅、周智、蒋韬、刘玉良、傅彩霞、刘颖昳、刘永生、顾小雪、张硕、毕一鸣、汪葆玥、原霖、董浩、杨鹏。

中国兽医协会
CVMA

非洲猪瘟病毒环介导等温扩增检测方法

1 范围

本标准规定了非洲猪瘟病毒环介导等温扩增检测方法的试剂、仪器和耗材、操作步骤、结果判定、实验室生物安全等技术要求。

本标准适用于猪全血、猪肉、淋巴结、脾脏等样本中的非洲猪瘟病毒检测。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，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

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 10×等温扩增缓冲液（见附录 A）

3.2 引物

3.2.1 采用针对非洲猪瘟病毒 VP72 基因（核苷酸序列见附录 B）的引物组：

上游外引物 ASFF3：5'-GTAGACGCAATATACGCTTTA--3'

下游外引物 ASFB3：5'--GCCATTTAAGAGCAGACATT--3'

上游内引物 ASFFIP：5'-ATTTCAGGGGTTACAAACAGGTTTTGGAGTCATTAATGAAATCT-3'

下游内引物 ASFBIP：5'-AACGCGTTCGCTTTTCGCTTTTGTGGTGGTTATTGTTGG-3'

上游环引物 ASFFLP：5'--GTAAAGTTCATTATTCGTG--3'

下游环引物 ASFBLP：5'--TGATACGTGTCCATA--3'

将引物 ASFF3、ASFB3、ASFFIP、ASFBIP 用无菌无核酸酶水稀释至 20μmol/L，将引物 ASFFLP、

ASFBLP 用无菌无核酸酶水稀释至 40 μmol/L，按 ASFF3:ASFB3:ASFFIP:ASFBIP:ASFFLP:ASFBLP= 0.25:0.25:2:2:0.5:0.5 的比例将稀释后的引物混合。

3.2.2 使用国家农业行政主管部门批准的其他荧光等温扩增引物，应对检测程序和判定标准作相应调整。

3.3 阳性及阴性对照

阳性及阴性对照的制备方法见附录C。

3.4 其他试剂

消毒液配制见附录A。

4 仪器和耗材

分析天平（感量 0.1 mg）、冰盒、等温荧光 PCR 仪及配套反应管、组织研磨器、生物安全柜、-20℃冰箱、可调移液器（2 μL、20 μL、200 μL、1 000 μL）、1.5 mL 离心管（无核酸酶）。

5 操作步骤

5.1 样品采集与处理

5.1.1 样品采集与运输

样品采集及运输按照 NY/T 541 的规定执行，采集猪的脾脏、淋巴结、血液等组织材料或血粉用于检测，样品应在冷藏条件下尽快运输至实验室，避免反复冻融。采样时应穿戴个人生物安全防护装备，实施现场消毒和废弃物处理。

5.1.2 样品处理

检测前样品应在二级生物安全柜中处理。

血液样品：用无核酸酶水作 1:5 稀释后编号备用。

淋巴结、脾脏、扁桃体、肌肉等组织样品，用无菌的剪刀和镊子剪取待检样品 2.0 g 于研钵中充分研磨，再加 10.0 mL 的 0.01mol/L PBS（见附录 A）混匀（样品不足 2.0 g 按 1:5 比例加 PBS），3 000 r/min，4 ℃离心 5 min，取上清液，编号备用。

血球粉处理省略研磨步骤，其余处理同组织样品。

将上述处理的样品置于 60℃条件下灭活 30min。

5.1.3 样品保存

采集或处理好的样品在 2℃～8℃条件下保存应不超过 24 h；如需长期保存，应放置-70℃冰箱，但应避免反复冻融（冻融不超过 3 次）。

5.2 扩增试剂配制

在反应混合物配制区对反应液进行配制。每个检测反应体系需使用 23μL 荧光等温扩增反应液。待检样品、阳性对照和阴性对照的份数总和用 n 表示，按附录 D 配制反应液，充分混匀后分装，每个 PCR 反应管 23 μL。然后加入 20 μL 矿物油，转移 PCR 反应管至样品制备区。

5.3 扩增加样

在样品制备区进行扩增加样。在上述 5.2 的反应管中分别加入 5.1.2 中快提的 DNA 溶液 2 μL，使每管总体积达到 25 μL，盖紧管盖后，瞬时离心。记录反应管对应的样品编号。

5.4 上机扩增

在检测区进行上机扩增。将 5.3 加样后的反应管放入检测仪内（专用配套仪器或普通的荧光 PCR 仪均可），设定好被检样品（S）、阳性对照（PC）、阴性对照（NC）的位置。反应参数设置如下：64℃ 60min，每 1min 采集一次 FAM 通道荧光信号，共采集 60 次。试验结束后，根据收集的 Tt 值（Time Threshold）和荧光曲线判定结果。

6 结果判定

6.1 结果分析条件设定

荧光等温扩增检测阈值设定原则：根据仪器噪声情况进行调整，以阈值线刚好超过阴性对照品扩增曲线的最高点为准。

6.2 结果分析条件设定

阳性对照的 Tt 值应小于或等于 45，并出现典型的扩增曲线；阴性对照无 Tt 值并且无扩增曲线即 S 型扩增曲线时，实验成立，实例参考附录 E。当被检样品出现典型的扩增曲线且 Tt 值≤45.0 时，判为非洲猪瘟病毒核酸阳性；被检样品无 Tt 值，或出现 Tt 值但无特征性扩增曲线的判为非洲猪瘟病毒核酸

阴性；对于 Tt 值＞45.0 的样品且出现典型的扩增曲线，应重检，重检仍出现上述结果的判为阳性， 否则判为阴性。

7 实验室生物安全要求

7.1 本方法涉及实验室生物安全管理要求见 GB 19489。国家农业行政主管部门另有规定的，按其规定执行。

7.2 使用过的实验器材和液体废弃物应先经过消毒液浸泡处理，再经高温高压处理后废弃。剩余样品等固体废弃物应在生物安全柜中密封包装，经表面消毒后移出，再经高温高压处理后废弃。

中国兽医协会
CVMA

附 录 A

(规范性附录)

非洲猪瘟病毒荧光 PCR 快速检测方法试剂的配制

A.1 10×等温扩增缓冲液

DEPC 处理水	400 mL
三羟甲基氨基甲烷（Tris base）	24.23 g
氯化钾	3.73 g
硫酸铵	6.607 g
七水和硫酸镁	2.465 g
Triton X-100	5 mL
Brij-58	5 mL
盐酸	调 pH 至 8.8
无菌无核酸酶水	定容至 500 mL

A.2 磷酸盐缓冲液（PBS）的配方

A.2.1 A 液

0.2 mol/L 磷酸二氢钠水溶液：$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ 27.6 g，溶于蒸馏水中，最后定容至 1 000 mL。

A.2.2 B 液

0.2 mol/L 磷酸氢二钠水溶液：$Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ 53.6 g（或 $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 71.6 g 或 $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ 35.6 g），加蒸馏水溶解，最后定容至 1 000 mL。

A.2.3 0.01 mol/L、pH 7.2 磷酸盐缓冲液（PBS）的配制

取 A 液 14 mL、B 液 36 mL，加 NaCl 8.5 g，用蒸馏水定容至 1 000 mL。经过滤除菌后，无菌条件下分装。

A.3 消毒液

8‰氢氧化钠或 3‰福尔马林或 3%邻苯基苯酚或碘化合物等其他消毒试剂均可。

中国兽医协会 CVMA

附 录 B

（资料性附录）

非洲猪瘟病毒 VP72 基因参考序列

1 ATGGCATCAG GAGGAGCTTT TTGTCTTATT GCTAACGATG GGAAGGCCGA CAAGATTATA

61 TTGGCCCAAG ACTTGCTGAA TAGCAGGATC TCTAACATTA AAAATGTGAA CAAAAGTTAT

121 GGGAAACCCG ATCCCGAACC CACTTTGAGT CAAATCGAAG AAACACATTT GGTGCATTTT

181 AATGCGCATT TTAAGCCTTA TGTTCCAGTA GGGTTTGAAT ACAATAAAGT ACGCCCGCAT

241 ACGGGTACCC CCACCTTGGG AAACAAGCTT ACCTTTGGTA TTCCCCAGTA CGGAGACTTT

301 TTCCATGATA TGGTGGGCCA TCATATATTG GGTGCATGTC ATTCATCCTG GCAGGATGCT

361 CCGATTCAGG GCACGTCCCA GATGGGGGCC CATGGGCAGC TTCAAACGTT TCCTCGCAAC

421 GGATATGACT GGGACAACCA AACACCCTTA GAGGGCGCCG TTTACACGCT TGTAGATCCT

481 TTTGGAAGAC CCATTGTACC CGGCACAAAG AATGCGTACC GAAACTTGGT TTACTACTGC

541 GAATACCCCG GAGAACGACT TTATGAAAAC GTAAGATTCG ATGTAAATGG AAATTCCCTA

601 GACGAATATA GTTCGGATGT CACAACGCTT GTGCGCAAAT TTTGCATCCC AGGGGATAAA

661 ATGACTGGAT ATAAGCACTT GGTTGGCCAG GAGGTATCGG TGGAGGGAAC CAGTGGCCCT

721 CTCCTATGCA ACATTCATGA TTTGCACAAG CCGCACCAAA GCAAACCTAT TCTTACCGAT

781 GAAAATGATA CGCAGCGAAC GTGTAGCCAT ACCAACCCGA AATTTCTTTC ACAGCATTTT

841 CCCGAGAACT CTCACAATAT CCAAACAGCA GGTAAACAAG ATATTACTCC TATCACGGAC

901 GCAACGTATC TGGACATAAG ACGTAATGTT CATTACAGCT GTAATGGACC TCAAACCCCT

961 AAATACTATC AGCCCCCTCT TGCGCTCTGG ATTAAGTTGC GCTTTTGGTT TAATGAGAAC

1021 GTGAACCTTG CTATTCCCTC AGTATCCATT CCCTTCGGCG AGCGCTTTAT CACCATAAAG

1081 CTTGCATCGC AAAAGGATTT GGTGAATGAA TTTCCTGGAC TTTTTGTACG CCAGTCACGT

1141 TTTATAGCTG GACGCCCCAG TAGACGCAAT ATACGCTTTA AACCATGGTT TATCCCAGGA

1201 GTCATTAATG AAATCTCGCT CACGAATAAT GAACTTTACA TCAATAACCT GTTTGTAACC

1261 CCTGAAATAC ACAACCTTTT TGTAAAACGC GTTCGCTTTT CGCTGATACG TGTCCATAAA

1321 ACGCAGGTGA CCCACACCAA CAATAACCAC CACGATGAAA AACTAATGTC TGCTCTTAAA

1381 TGGCCCATTG AATATATGTT TATAGGATTA AAACCTACCT GGAACATCTC CGATCAAAAT

1441 CCTCATCAAC ACCGAGATTG GCACAAGTTC GGACATGTTG TTAACGCCAT TATGCAGCCC

中国兽医协会 CVMA

1501 ACTCACCACG CAGAGATAAG CTTTCAGGAT AGAGATACAG CTCTTCCAGA CGCATGTTCA

1561 TCTATATCTG ATATTAGCCC CGTTACGTAT CCGATCACAT TACCTATTAT TAAAAACATT

1621 TCCGTAACTG CTCATGGTAT CAATCTTATC GATAAATTTC CATCAAAGTT CTGCAGCTCT

1681 TACATACCCT TCCACTACGG AGGCAATGCG ATTAAAACCC CCGATGATCC GGGTGCGATG

1741 ATGATTACCT TTGCTTTGAA GCCACGGGAG GAATACCAAC CCAGTGGTCA TATTAACGTA

1801 TCCAGAGCAA GAGAATTTTA TATTAGTTGG GACACGGATT ACGTGGGGTC TATCACTACG

1861 GCTGATCTTG TGGTATCGGC ATCTGCT

中国兽医协会
CVMA

附 录 C

（规范性附录）

非洲猪瘟病毒核酸阳性及阴性对照

C.1 阳性对照

阳性对照制备方法：人工合成非洲猪瘟病毒VP72基因片段，序列参见附录B，将VP72基因连接于pMD20-T载体制成阳性质粒pMD20-T-VP72，使用非洲猪瘟病毒阴性猪的组织研磨液将质粒稀释至浓度为10 000copies/μL，保存于-20℃备用。

C.2 阴性对照

阴性对照为非洲猪瘟病毒阴性猪的组织研磨液。

中国兽医协会
CVMA

附 录 D

（规范性附录）

非洲猪瘟病毒荧光等温扩增（免提取）检测方法反应液配方

非洲猪瘟病毒荧光等温扩增（免提取）检测方法反应液配方见表D.1。

表D.1 非洲猪瘟病毒荧光等温扩增（免提取）检测方法反应液配方

组 分	1个检测体系的加入量
10×等温扩增缓冲液 [a]	2.5 μL
引物液	5.5 μL
5 mol/L 甜菜碱溶液	4 μL
10mmol/L dNTP Mixture	3.5 μL
100 mmol/L MgSO4 溶液	1.5μL
SYBR Green I 液	0.5μL
无菌无核酸酶水	4.5 μL
Bst DNA 聚合酶	1 μL
总体积	23 μL
10×等温扩增缓冲液 [a]：参见附录 A 配方。	

中国兽医协会 CVMA

附 录 E

（资料性附录）

非洲猪瘟病毒荧光等温扩增（免提取）检测扩增实例参考

非洲猪瘟病毒荧光等温扩增（免提取）检测扩增实例（见图E.1）。

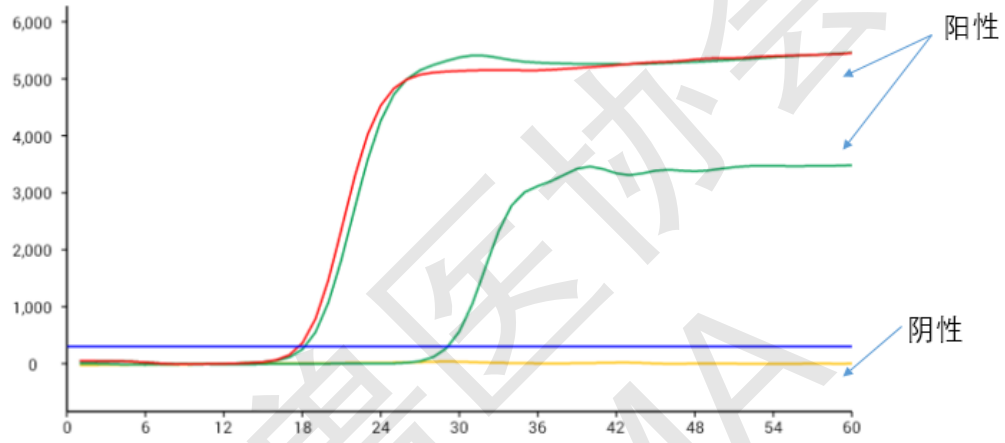

图 E.1 非洲猪瘟病毒荧光等温扩增（免提取）检测扩增曲线示意图

中国兽医协会 CVMA