ICS 11.220

B 41

团　　体　　标　　准

T/CVMA X29—2019

非洲猪瘟病毒微滴式数字 PCR 检测方法

Method Of Droplet Digital PCR 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。

本标准主要起草人：原霖、杨林、王传彬、宋晓晖、董浩、倪建强、刘洋、毕一鸣、陈亚娜。

中国兽医协会
CVMA

非洲猪瘟病毒微滴式数字 PCR 检测方法

1 范围

本标准规定了非洲猪瘟病毒(African Swine Fever Virus，ASFV)微滴式数字PCR检测方法的原理、试剂与耗材、仪器与设备、操作步骤、结果分析。

本标准适用于非洲猪瘟病毒检测。

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。

NY/T 541兽医诊断样品采集、保存与运输技术规范

3 原理

微滴式数字PCR（Droplet Digital PCR，ddPCR）的技术原理是利用微滴化技术将一份反应体系分成数万个纳升级的微滴进行定量PCR检测，本质上是将传统定量PCR的一次检测变成数万次检测，提高了核酸序列检测的灵敏度和精准度。微滴发生器可以将每一份扩增体系分成数万个均匀的纳升级微滴，每个微滴不含或者含有一个至数个待检核酸靶分子。每个微滴都将作为一个独立的PCR扩增体系，在PCR扩增仪上进行终点PCR扩增。利用微滴分析仪逐个对每个微滴进行检测，有荧光信号的微滴判读为1，没有荧光信号的微滴判读为0。根据泊松分布原理以及阳性微滴的比例，计算出待检靶分子的浓度或拷贝数。

4 试剂与耗材

4.1 提取

宜选取商品化的病毒DNA提取试剂盒。

4.2 微滴式数字 PCR 扩增试剂

宜按照不同的微滴式数字 PCR 平台的说明书选取推荐的微滴式数字 PCR 扩增试剂。

4.3 引物和探针

ASFV 上游引物(ASFV F)：5′- CGATGATGATKACCTTYGCTBTGA -3′

ASFV 下游引物(ASFV R)：5′- ATTCTCTTSCTCTGGATACGTTARTATG -3′

ASFV探针(ASFV P)：5′-FAM- CCACGSGAGGAATACCAACCBAGTG -BHQ1-3′

5 仪器与设备

生物安全柜、PCR扩增仪、数字PCR微滴发生器、数字PCR微滴检测器、纯水仪、核酸定量仪、涡旋震荡仪。

6 操作步骤

6.1 样品采集及运输

按照NY/T 541执行。

6.2 DNA 提取

按照所选取的病毒DNA提取试剂盒说明书进行提取。

6.3 微滴式数字 PCR 扩增方法

每个样品微滴式数字 PCR 扩增体系设置 3 个平行。微滴式数字 PCR 扩增体系配制如表 1。该步骤按照不同微滴式数字 PCR 平台的说明书进行操作。

表 1 微滴式数字 PCR 扩增体系

试剂	终浓度	体积
2×酶混合液 [a]	/	10 μL
ASFV F（10 μmol/L）	0.5 μmol/L	1 μL
ASFV R（10 μmol/L）	0.5 μmol/L	1 μL
ASFV P（10 μmol/L）	0.1 μmol/L	0.2 μL
DNA 模板	/	2 μL
无核酸酶水	/	5.8 μL

总体系	/	20 μL
注：使用微滴式数字 PCR 平台进行实验时，应依据不同微滴式数字 PCR 平台说明调整扩增体系的组分和最终体积，并保证表中所列组分的终浓度不变。 [a] 微滴式数字 PCR 扩增试剂。		

反应液配制后，使用微滴发生器对扩增体系进行微滴生成。微滴生成后，进行微滴式数字 PCR 扩增，荧光分析步骤采用 FAM 单荧光通道，微滴式数字 PCR 扩增程序如表 2 所示。

表 2 微滴式数字 PCR 扩增程序

步骤	温度	持续时间	循环数
1	95 ℃	10 min	1
2	95 ℃	30 s	40
3	55 ℃	1 min	
4	98 ℃	10 min	1
5	4 ℃	60 min	1
注：升降温速度设置为 2 ℃/s。			

6.4 微滴式数字 PCR 反应的对照

在进行微滴式数字PCR实验，应设置阳性对照、阴性对照与空白对照。以含有ASFV目的基因片段的质粒作为阳性对照；以未感染ASFV的动物组织混样基因组作为阴性对照；以无核酸酶水作为空白对照。各对照PCR扩增体系中，除模板外，其余组分和PCR扩增程序同6.3。

7 结果分析

7.1 实验成立条件

微滴式数字PCR扩增结果，有效微滴数不得低于理论微滴数的60 %。阴性对照组和空白对照组均未检出阳性微滴，阳性对照有明显阳性微滴，且核酸拷贝数浓度大于10 copies/μL，则实验成立。

7.2 阈值设定

微滴式数字PCR结果中，阴性微滴和阳性微滴明显分开，阈值设在阴性微滴和阳性微滴分开的区域。

7.3 结果判定

样品中检测出阳性微滴，且阳性核酸拷贝数浓度≥10 copies/μL，则判定为阳性。

样品中检测出阳性微滴，阳性核酸拷贝数浓度＜10 copies/μL，则需复检。若复检结果仍检测出阳性微滴，则判定为阳性，否则判定为阴性。

样品中未检出阳性微滴，则判定为阴性。

中国兽医协会
CVMA