ICS 11.220
B 41

团　　体　　标　　准

T/CVMA 28-2020

猪瘟病毒微滴式数字 RT-PCR 检测方法

Method of droplet digital RT-PCR for detection of classical swine fever virus

中国兽医协会
CVMA

202-12-22 发布　　2020-12-22 实施

中 国 兽 医 协 会　发 布

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：中国动物疫病预防控制中心、辽宁省动物疫病预防控制中心、辽宁省葫芦岛市建昌县现代农业发展服务中心。

本文件主要起草人：董浩、王传彬、杨林、宋晓晖、原霖、李硕、韩焘、毕一鸣、陈亚娜、陈瑶、赵妍、郑文峰、于广秋。

中国兽医协会
CVMA

猪瘟病毒微滴式数字 RT-PCR 检测方法

1 范围

本文件规定了猪瘟病毒（classical swine fever virus，CSFV）微滴式数字RT-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。

本文件适用于猪的脏器、血液、排泄物和细胞培养物中猪瘟病毒野毒株和疫苗株核酸的精准定量检测。

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 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 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 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。然后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。

5 试剂与耗材

5.1 提取试剂

宜选取商品化的病毒 RNA 提取试剂盒，或选用其他等效提取核酸方法。

5.2 微滴式数字 RT-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。

5.3 引物和探针

CSFV 上游引物（CSFVF）：5′- ATGCCCAYAGTAGGAHTAGCA -3′
CSFV 下游引物（CSFVR）：5′- CTVCTGACGACTGTYCTGTAC -3′
CSFV探针（CSFV P）：5′-FAM- TGKCGAGCTCCCTGBGTGGTCTAAGT -BHQ1-3′

5.4 阳性、阴性及空白对照

以含有CSFV的RNA作为阳性对照；以未感染CSFV猪的组织混样总RNA作为阴性对照；以无核酸酶水作为空白对照。

6 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。

7 操作步骤

7.1 样品采集及运输

按照NY/T 541执行。

7.2 样品处理

检测前样品应在二级生物安全柜中处理。

抗凝血样品：直接转入离心管中编号备用。

扁桃体样品和内脏样品：取待检样品，按1:5倍体积加入DEPC水，于研钵或组织匀浆器中充分研磨，3000 g离心15 min，取上清液转入离心管中编号备用。

排泄物：挑取少许粪便样品于离心管中，加入适量生理盐水，震荡混匀，室温3000 g离心15 min，取上清液转入离心管中编号备用。其它液体排泄物直接转入离心管编号备用。

细胞培养物：细胞培养物冻融3次，转入离心管中编号备用。

7.3 RNA 提取

使用病毒RNA提取试剂盒或选用其他等效提取核酸方法对样品进行RNA提取。

7.4 微滴式数字 RT-PCR 扩增方法

微滴式数字 RT-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。

中国兽医协会 CVMA

表 1 微滴式数字 RT-PCR 扩增体系

试剂	终浓度 μmol/L	体积 μL
2×酶混合液 [a]	-	10
ASFV F（10 μmol/L）	0.5	1
ASFV R（10 μmol/L）	0.5	1
ASFV P（10 μmol/L）	0.1	0.2
DNA 模板	-	2
无核酸酶水	-	5.8
总体系	-	20
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，使用数字 PCR 微滴发生器对扩增体系进行微滴生成。微滴生成后，使用 PCR 扩增仪或荧光定量 PCR 仪进行微滴式数字 RT-PCR 扩增。使用数字 PCR 微滴检测器读取 PCR 扩增结果，荧光分析步骤采用 FAM 单荧光通道，微滴式数字 RT-PCR 扩增程序如表 2 所示。

表 2 微滴式数字 RT-PCR 扩增程序

步骤	温度	持续时间	循环数
1	42 ℃	60 min	1
2	95 ℃	10 min	1
3	95 ℃	30 s	40
4	55 ℃	1 min	
5	98 ℃	10 min	1
6	4 ℃	60 min	1
注：升降温速率设置为 2℃/s。			

7.5 微滴式数字 RT-PCR 反应的对照

在进行微滴式数字RT-PCR实验时，应设置阳性对照、阴性对照与空白对照。各对照PCR扩增体系中，除模板外，其余组分和RT-PCR扩增程序同7.4。

8 结果分析

8.1 实验成立条件

微滴式数字RT-PCR扩增结果，有效微滴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。

8.2 阈值设定

微滴式数字RT-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。

8.3 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，且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。

9 实验室生物安全要求

9.1 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。

9.2 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按医疗废弃物进行处理。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按医疗废弃物进行处理。

中国兽医协会 CVMA