|  |  |
| --- | --- |
| ICS | 11.220 |
| CCS | |  | | --- | | D:\000000部门项目\09标准化插件开发\程序源代码\StandardEditor_ShanDongKeXieYuan\团标首页面字母T.pngD:\000000部门项目\09标准化插件开发\程序源代码\StandardEditor_ShanDongKeXieYuan\团标首页面字母T后面的反斜杠.png GX |   B 41 |

团体标准

T/GX XXXX—XXXX

非洲猪瘟病毒、猪瘟病毒和猪非典型瘟病毒鉴别检测 多重RT-PCR和qRT-PCR方法

Establishment of Multiplex RT-PCR and qRT-PCR for differential detection of ASFV, CSFV and APPV

（本草案完成时间：2022年7月25日）

XXXX - XX - XX发布

XXXX - XX - XX实施

广西标准化协会  发布

1. 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这些专利的责任。

本文件由广西兽医协会提出并归口。

本文件起草单位：广西壮族自治区动物疫病预防控制中心、广西桂垦西江牧业有限公司、广西中科基因科技有限公司、广西民生中检联检测有限公司。

本文件起草人：施开创、冯淑萍、屈素洁、林昌华、龙凤、文金华、文俞、尹彦文、苏丽娟、宋靖萱、黄海愉、蒋家霞、陆文俊、谢守玉、黄美芝、李 军。

非洲猪瘟病毒、猪瘟病毒和猪非典型瘟病毒鉴别检测 多重RT-PCR和qRT-PCR方法

* 1. 范围

本文件规定了用于鉴别检测非洲猪瘟病毒、猪瘟病毒和猪非典型瘟病毒的多重RT-PCR和qRT-PCR方法，包括缩略词、试剂、主要仪器设备、操作步骤及结果判定等技术要求。

本文件适用于广西壮族自治区行政区域内非洲猪瘟病毒、猪瘟病毒和猪非典型瘟病毒的鉴别检测诊断。

* 1. 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 18648-2020 非洲猪瘟诊断技术

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

SN/T 1193 基因检验实验室技术要求

SN/T 5335-2020 非洲猪瘟检测实验室生物安全操作技术规范

* 1. 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

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

CSFV：猪瘟病毒（Classical swine fever virus）

APPV：猪非典型瘟病毒 （Atypical porcine pestivirus）

RT-PCR：反转录聚合酶链反应（Reverse transcription polymerase chain reaction）

qRT-PCR: 实时荧光定量反转录聚合酶链反应（Real-time RT-PCR）

Ct值：每个反应管内的荧光信号量达到设定的阈值时所经历的循环数（Cycle threshold）

* 1. 试剂
     1. 引物探针

引物序列见附录A，上游、下游引物的使用浓度均为20 pmol/µL。

* + 1. RNA/DNA提取试剂盒

宜选取商品化的病毒RNA/DNA提取试剂试剂盒。

* + 1. PCR和qRT-PCR扩增试剂

应按照不同的PCR和实时荧光PCR平台的说明书选取推荐的PCR和qRT-PCR扩增试剂。

* + 1. 其他试剂

宜选取商品化的反转录试剂盒、胶回收试剂盒、T4连接酶试剂盒、质粒提取试剂盒和电泳缓冲液。

* 1. 主要仪器设备

生物安全柜、普通PCR仪、荧光PCR仪、高速台式冷冻离心机、电热恒温水槽、混匀器、组织匀

浆机、凝胶成像系统、微量移液器。

* 1. 操作步骤
     1. 操作环境

以下操作应在生物安全II级及以上防护实验室内、无RNA酶的环境下进行。

* + 1. 待检样品处理

无菌采取病猪肺脏、脾脏和淋巴结等共约5g，置于2.0mL离心管中，加入灭菌的1 mol/L PBS（pH 7.2）1mL，用组织匀浆机充分研磨后，反复冻融3次；以10 000×g离心5min，收集上清，用于RNA/DNA 抽提，或置-20℃保存备用。

血清样品直接用于RNA/DNA抽提，或置-20℃保存备用。

* + 1. 待检样品RNA/DNA提取

取200µL待检样品于无RNA/DNA酶的1.5mL离心管中，按照RNA/DNA提取试剂盒操作说明书抽提总RNA/DNA 。

* + 1. 反转录(RT)

提取样品总RNA后，以样品总RNA为模板，按下列反应体系进行反转录：

5×RT缓冲液 4µL

AMV反转录酶（5 U/µL） 0.5µL

dNTP混合物（各10mM/L） 1µL

RNA酶抑制剂（40U/µL） 0.5µL

随机引物6聚体（50pmol/µL） 1.5µL

待检总RNA模板 5µL

灭菌双蒸水 补足总体积至50µL

加完试剂后瞬时离心混匀。将PCR反应管置于普通PCR仪内进行反转录。反应程序为：30℃，10 min；48℃，45min；95℃，5min。获得的cDNA直接用于多重PCR扩增，或置-20℃保存备用。

* + 1. 多重PCR扩增
       1. 反应体系的配置

反转录后，以获得的cDNA/DNA为模板,建立25µLPCR反应体系。在冰浴条件下，在PCR反应管中按下列用量分别加入各成分：

2×TaqPCR MasterMix 12.5µL

APPV上、下游引物（20 pmol/µL） 各0.4µL

CSFV上、下游引物（20 pmol/µL） 各0.4µL

ASFV上、下游引物（20 pmol/µL） 各0.4µL

cDNA/DNA模板 5µL

灭菌双蒸水 补足总体积至25µL

* + - 1. PCR反应

加完试剂后瞬时离心混匀。将PCR反应管置于PCR仪内，设置如下反应参数：

94℃2min；然后94℃30s，55℃30s,72℃45s,循环40次；最后72℃10min。PCR产物直接用于电泳，或置4℃保存备用。

* + 1. 多重qRT-PCR
       1. 反应体系的配置

反应配置应在专门的区域进行。采用25µL反应体系，扩增体系配制如下：

Premix Ex Taq聚合酶 12.5µL

APPV上、下游引物（20 pmol/µL） 各0.4µL

CSFV上、下游引物（20 pmol/µL） 各0.4µL

ASFV上、下游引物（20 pmol/µL） 各0.4µL

ASFV-p72-P探针(20 pmol/µL) 0.5µL

CSFV-5'UTR-P探针(20 pmol/µL) 0.4µL

APPV-5'UTR-P探针(20 pmol/µL) 0.3µL

样品cDNA/DNA 2µL

灭菌双蒸水 补足总体积至25µL。

* + - 1. qPCR反应

在荧光PCR仪上选用Texas Red、JOE和FAM通道，设置如下反应参数：

预变性95℃20s；然后40个循环（95℃5s；59℃34s），在每次循环的退火延伸时分别收集Texas Red、JOE和FAM通道的荧光信号。

* + 1. 阴性及阳性对照
       1. 阴性对照

用灭菌双蒸水作为阴性对照。

* + - 1. 阳性对照

用重组质粒p-ASFV、p-CSFV和p-APPV混合物作为阳性对照，重组质粒p-ASFV、p-CSFV和p-APPV 的制备方法见附录C。

* 1. 结果判定
     1. 多重RT-PCR结果判定
        1. 琼脂糖凝胶制备

称取1.5g琼脂糖加入到100mL 1倍电泳缓冲液，煮沸溶解琼脂糖，冷却至约50℃时，加入10 mg/mL的琼脂糖凝胶10µL，充分混合后倒入水平的已插入合适梳子的凝胶盘中，凝胶厚度控制在3 mm~5 mm之间。待凝胶充分凝固后，拔出梳子，将凝胶连同托架一起放入电泳槽中，加入1倍电泳缓冲液，使之没过凝胶表面2mm，以备加样电泳。

* + - 1. 加样

将5µLPCR产物与1µL加样缓冲液混合均匀，加入一个琼脂糖凝胶样品孔中。每次电泳应加阳性和阴性对照的扩增产物，并且设立DNA分子质量标准作为分子质量大小的对照。

* + - 1. 电泳条件

以100V稳压进行电泳，直至溴酚蓝指示剂到达离琼脂糖凝胶末端2cm ~3cm时停止。

* + - 1. 电泳结果判定
         1. 将电泳后的琼脂糖凝胶用凝胶成像系统观察并拍照。当阴性对照无任何扩增带，而阳性对照在828bp、529bp和275bp位置出现扩增带，则试验结果成立；否则，此次检测无效。
         2. 若被检样品在828bp位置出现DNA扩增带，判定为ASFV阳性，记为ASFV（+）；若被检样品在828bp位置未出现 扩增带，判定为ASFV阴性，记为ASFV（-）。
         3. 若被检样品在529bp位置出现扩增带，判定为CSFV阳性，记为CSFV（+）；若被检样品在529bp位置未出现扩增带，判定为CSFV阴性，记为CSFV（-）。

若被检样品在275 bp位置出现扩增带，判定为APPV阳性，记为APPV（+）；若被检样品在275 bp 位置未出现扩增带，判定为APPV阴性，记为APPV（-）。

* + 1. 多重qPCR结果判定
       1. 结果分析条件设定

阈值设定根据仪器噪声情况进行调整，以阈值线刚好超过正常阴性对照样品扩增曲线的最高点为准。

* + - 1. 质控标准
         1. 阴性对照样品Ct值≥37。
         2. 阳性对照样品的Ct值均应 <28，并出现典型的S型扩增曲线。反之，此次检测无效。
      2. 结果描述及判定
         1. 若被检样品出现ASFV的特异性扩增曲线，且Ct值 ≤30，判定为ASFV阳性；反之，判定为ASFV阴性。
         2. 若被检样品出现CSFV的特异性扩增曲线，且Ct值 ≤30，判定为CSFV阳性；反之，判定为CSFV阴性。
         3. 若被检样品出现APPV的特异性扩增曲线，且Ct值 ≤ 30，判定为APPV阳性；反之，判定为APPV阴性。

2. （规范性）  
   引物序列、扩增片段及结果判定
   1. ASFV、CSFV和APPV特异性引物序列及扩增片段长度

见表 A.1。

* 1. 引物序列及扩增片段长度

| 引物名称 | 引物序列（5′→3′） | 扩增片段长度（bp） |
| --- | --- | --- |
| ASFV-F | AGGGGTTTGAGGTCCATTA | 828 |
| ASFV-R | CCGAACCCACTTTGAGTC |
| CSFV-F | TGCGGGGATGATGGTTTC | 529 |
| CSFV-R | C ACCCCGAGTGTGGACATA |
| APPV-F | TGGGGGAAAGGGGTTAACCAG | 275 |
| APPV-R | ATCCGCCGGCACTCTATCAAG |

* 1. ASFV、CSFV和APPV多重 RT-PCR 产物凝胶电泳图

见图 A.1。



1. M. DNA分子质量标准；1. 阳性对照；2.APPV（+）； 3.CSFV（+）； 4.ASFV（+）；5. 阴性对照
   1. ASFV、CSFV和APPV多重RT-PCR产物琼脂凝胶电泳图

1. （规范性）  
   引物探针及结果判定
   1. ASFV、CSFV和APPV引物探针序列及扩增片段长度

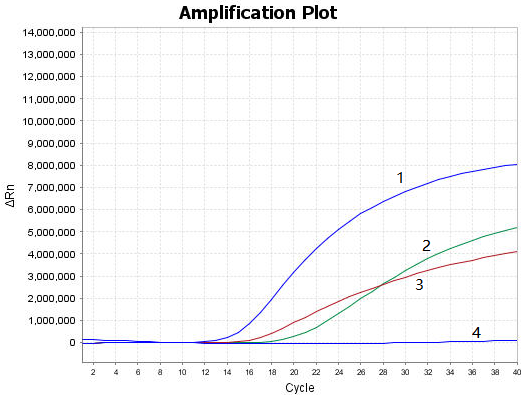
见表 B.1。

* 1. 引物探针序列及扩增片段长度

| 引物名称 | 引物序列（5′→3′） | 扩增片段长度（bp） |
| --- | --- | --- |
| ASFV-p72-F | GGCGTATAAAAAGTCCAGGAAATTC | 79 |
| ASFV-p72-R | TTCGGCGAGCGCTTTATC |
| ASFV-p72-P | Texas Red-TCACCAAATCCTTTTGCGATGCAAGCT-BHQ2 |
| CSFV-5'UTR-F | CCTGAGTACAGGACAGTCGTCAGT | 72 |
| CSFV-5'UTR-R | CCCTCGTCCACATAGCATCTC |
| CSFV-5'UTR-P | JOE-TTCGACGTGAGCAGAAGCCCACC-BHQ1 |
| APPV-5'UTR-F | GGCGTGCCCAAAGAGAAAT | 90 |
| APPV-5'UTR-R | GGCACTCTATCAAGCAGTAAGGTCTA |
| APPV-5'UTR-P | FAM-TCGGGTCCACCATGCCCCTTT-BHQ1 |

* 1. ASFV、CSFV和APPV多重qRT-PCR反应曲线图

见图 B.1。



1. 1. p-APPV质粒；2. p-ASFV质粒；3. p- CSFV质粒；4. 阴性对照
   1. 多重qRT-PCR扩增曲线图

1. （规范性）  
   重组质粒标准品制备
   1. 特异性引物

特异性引物序列及扩增片段长度见附录A中的表 A.1。

* 1. 病毒核酸提取及RT-PCR扩增

取ASFV临床阳性样品，按 4.3提取总DNA；分别取APPV临床阳性样品和CSFV疫苗C株病毒液，按6.3提取总RNA后，按6.4进行反转录（RT），获得cDNA。以DNA为模板，应用ASFV-F/R引物对，建立50µL反应体系；或以cDNA为模板，分别利用CSFV-F/R、APPV-F/R引物对，建立50µL反应体系。按6.5中的反应程序进行单重PCR扩增，获得PCR产物。

* 1. 重组质粒标准品构建

将PCR产物进行凝胶电泳、用凝胶成像系统观察后，按胶回收试剂盒说明书回收PCR产物。按T4连接酶试剂盒说明书将PCR产物连接到pMD-18T载体，并转化到DH5α感受态细胞，涂布于LB/Amp+/X-gal/IPTG平板上，37℃培养16h~18h。挑选阳性菌落，増菌培养后，按质粒提取试剂盒说明书提取质粒。

* 1. 重组质粒标准品的制备
     1. PCR鉴定

以提取的质粒为模板，利用附录A中表A.1相应的引物进行PCR扩增、凝胶电泳后，用凝胶成像系统观察，可看到与表A.1中预期大小一致的扩增片段。

* + 1. 测序鉴定

对获得的质粒送商业测序公司进行测序，并将获得的序列在NCBI上进行比对，确认所获得的序列与标准毒株相应区域的序列一致。以上经PCR、测序鉴定正确的重组质粒，分别命名为p-ASFV、p-CSFV和p-APPV可作为PCR反应的阳性标准品。

