

T/GXAS

团 体 标 准

T/GXAS 489—2023

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 和多重 qRT-PCR 法

Establishment of multiplex RT-PCR and multiplex qRT-PCR for differential
detection of ASFV, GSFV and APPV

2023 - 05 - 10 发布

2023 - 05 - 16 实施

广西标准化协会 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、广西农垦永新畜牧集团西江有限公司、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、文愈、尹彦文、张胜斌、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 和多重 qRT-PCR 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 和多重 qRT-PCR 法，包括原理、试验条件、试剂、主要仪器设备、样品采集与处理、多重 RT-PCR 检测、多重 qRT-PCR 检测、阴性及阳性对照和结果判定等技术要求。

本文件适用于非洲猪瘟病毒、猪瘟病毒和猪非典型瘟病毒核酸的检测。

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 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

3 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: 反转录 (Reverse Transcription)
PCR: 聚合酶链反应 (Polymerase Chain Reaction)
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 (Quantitative 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)

4 原理

4.1 根据 ASFV、CSFV 和 APPV 基因特定序列的保守区域，合成三对特异性引物所建立的多重 RT-PCR。经反转录酶的作用，从 RNA 合成 cDNA，再以 cDNA 为模板，在 DNA 聚合酶作用下扩增合成目的片段，通过琼脂糖电泳的电泳条带分子量大小进行结果判定。

4.2 根据 ASFV、CSFV 和 APPV 基因特定序列的保守片段，合成三对特异性引物和三条特异性的荧光双标记探针所建立的多重 qRT-PCR。Taqman 探针两端分别标记一个报告荧光基团和一个淬灭荧光基团。在 PCR 扩增时，探针被酶切降解，使报告荧光基团和淬灭荧光基团分离，就形成可被仪器接受的荧光信号，通过标准曲线对未知模板进行定量分析。

5 试验条件

进行 ASFV、CSFV 和 APPV 实验室检测时，如样品处理、核酸提取等，应按 GB19489 执行。

6 试剂

6.1 引物和探针

引物和探针序列见表 A.1 和表 B.1，引物和探针的使用浓度均为 20 pmol/ μ L。

6.2 RNA/DNA 提取试剂盒

宜选取商品化的 RNA/DNA 提取试剂盒。

6.3 PCR 和 qRT-PCR 扩增试剂

应按照普通 PCR 仪和实时荧光 PCR 仪的不同仪器型号选取合适的 PCR 和 qRT-PCR 扩增试剂。

6.4 其他试剂

宜选取商品化的反转录试剂盒、质粒提取试剂盒和电泳缓冲液。

7 主要仪器设备

生物安全柜、普通 PCR 仪、实时荧光 PCR 仪和凝胶成像系统。

8 样品采集与处理

8.1 样品采集

猪口鼻拭子、血清、全血、组织、环境拭子等样品采集按 NY/T 541 执行。

8.2 样品处理

猪口鼻拭子、血清、全血、组织、环境拭子等样品处理按 GB/T 18648 执行。

8.3 待检样品 RNA/DNA 提取

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

9 多重 RT-PCR 检测

9.1 反转录 (RT)

9.1.1 提取样品 RNA 后，以样品 RNA 为模板，按表 1 的反转录体系进行反转录。

表1 反转录体系

试剂	体积
5 \times RT 缓冲液	4 μ L
AMV 反转录酶 (5 U/ μ L)	0.5 μ L
dNTP 混合物 (各 10 mM/L)	1 μ L
RNA 酶抑制剂 (40 U/ μ L)	0.5 μ L
随机引物 6 聚体 (50 pmol/ μ L)	1.5 μ L
待检总 RNA 模板	5 μ L
灭菌双蒸水	补足总体积至 50 μ L

9.1.2 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 $^{\circ}$ C，10 min；48 $^{\circ}$ C，45 min；95 $^{\circ}$ C，5 min。获得的 cDNA 直接用于多重 PCR 扩增，或置 -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

9.2 多重 PCR 扩增

9.2.1 反应体系的配制

反转录后，以获得的 cDNA/DNA 为模板，建立 25 μ L PCR 反应体系。在冰浴条件下，在 PCR 反应管中按表 2 的用量分别加入各成分。

表2 多重 PCR 扩增体系

试剂	体积
2 \times TaqPCR MasterMix	12.5 μ L
APPV 上游、下游引物 (20 pmol/ μ L)	各 0.4 μ L
CSFV 上游、下游引物 (20 pmol/ μ L)	各 0.4 μ L
ASFV 上游、下游引物 (20 pmol/ μ L)	各 0.4 μ L
cDNA/DNA 模板	5 μ L
灭菌双蒸水	补足总体积至 25 μ L

9.2.2 多重 PCR 反应

加完试剂后瞬时离心混匀。将 PCR 反应管置于普通 PCR 仪内，设置如下反应参数：94 $^{\circ}$ C 2 min；然后 94 $^{\circ}$ C 30 s，55 $^{\circ}$ C 30 s，72 $^{\circ}$ C 45 s，循环 40 次；最后 72 $^{\circ}$ C 10 min。PCR 产物直接用于电泳，或置 4 $^{\circ}$ C 保存备用。

10 多重 qRT-PCR 检测

10.1 反应体系的配制

应在配液区配制。采用 25 μ L 反应体系，扩增体系见表 3。

表3 多重 qRT-PCR 扩增体系

试剂	体积
Premix Ex Taq 聚合酶	12.5 μ L
APPV 上游、下游引物 (20 pmol/ μ L)	各 0.4 μ L
CSFV 上游、下游引物 (20 pmol/ μ L)	各 0.4 μ L
ASFV 上游、下游引物 (20 pmol/ μ L)	各 0.4 μ L
ASFV-p72-P 探针 (20 pmol/ μ L)	0.5 μ L
CSFV-5' UTR-P 探针 (20 pmol/ μ L)	0.4 μ L
APPV-5' UTR-P 探针 (20 pmol/ μ L)	0.3 μ L
样品 cDNA/DNA	2 μ L
灭菌双蒸水	补足总体积至 25 μ L

10.2 多重 qRT-PCR 反应

在实时荧光 PCR 仪上选用 Texas Red、JOE 和 FAM 通道，设置如下反应参数：预变性 95 $^{\circ}$ C 20 s；然后 95 $^{\circ}$ C 5 s；59 $^{\circ}$ C 34 s，40 个循环。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。

11 阴性及阳性对照

11.1 阴性对照

用灭菌双蒸水作为阴性对照。

11.2 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，重组质粒的制备方法见附录 C。

12 结果判定

12.1 多重 RT-PCR 结果判定

12.1.1 PCR 扩增产物的电泳检测

称取 1.5 g 琼脂糖加入 100 mL 1 倍电泳缓冲液中，加热充分溶化后，待凝胶温度降至 50 °C ~ 60 °C，加入 10 μL 核酸染料，倒入胶槽制备凝胶板。在电泳槽中加入电泳缓冲液，使液面刚刚没过凝胶。取 5 μL ~ 10 μL PCR 扩增产物分别和 1 μL 的 6 倍上样缓冲液混合后，分别加样到凝胶孔。100 V 恒压下电泳 30 min，用凝胶成像系统观察结果。

12.1.2 电泳结果判定

12.1.2.1 当阴性对照无任何扩增带，而阳性对照在 828 bp、529 bp 和 275 bp 位置出现扩增带，则试验结果成立；否则，此次检测无效。

12.1.2.2 若被检样品在 828 bp 位置出现扩增带，判定为 ASFV 阳性；若被检样品在 828 bp 位置未出现扩增带，判定为 ASFV 阴性。

12.1.2.3 若被检样品在 529 bp 位置出现扩增带，判定为 CSFV 阳性；若被检样品在 529 bp 位置未出现扩增带，判定为 CSFV 阴性。

12.1.2.4 若被检样品在 275 bp 位置出现扩增带，判定为 APPV 阳性；若被检样品在 275 bp 位置未出现扩增带，判定为 APPV 阴性。

注：多重 RT-PCR 检测电泳图见图 A.1。

12.2 多重 qPCR 结果判定

12.2.1 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。

12.2.2 质控标准

12.2.2.1 阴性对照样品 Ct 值 > 35。

12.2.2.2 阳性对照样品的 Ct 值应 < 28，并出现典型的 S 型扩增曲线。否则，此次检测无效。

12.2.3 结果描述及判定

12.2.3.1 被检样品在 Texas Red 通道出现扩增曲线，且 Ct 值 ≤ 35，判定为 ASFV 阳性；否则，判定为 ASFV 阴性。

12.2.3.2 被检样品在 JOE 通道出现扩增曲线，且 Ct 值 ≤ 35，判定为 CSFV 阳性；否则，判定为 CSFV 阴性。

12.2.3.3 被检样品在 FAM 通道出现扩增曲线，且 Ct 值 ≤ 35，判定为 APPV 阳性；否则，判定为 APPV 阴性。

注：多重 qRT-PCR 产物扩增曲线图见图 B.2。

附录 A

(资料性)

ASFV、CSFV 和 APPV 多重 RT-PCR 引物序列及检测电泳图

A.1 ASFV、CSFV 和 APPV 多重 RT-PCR 引物序列

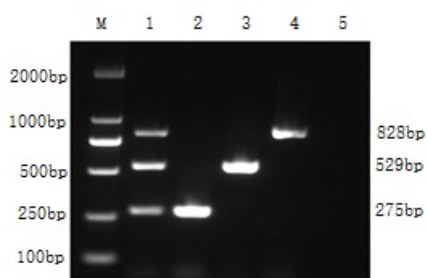
见表 A.1。

表A.1 引物序列

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	CACCCCGAGTGTGGACATA	
APPV-F	TGGGGGAAAGGGGTTAACCAG	275
APPV-R	ATCCGCCGGCACTCTATCAAG	

A.2 ASFV、CSFV 和 APPV 多重 RT-PCR 检测电泳图

见图 A.1。



注：M: DNA 分子量标准；1: 阳性对照；2: APPV (+)；3: CSFV (+)；4: ASFV (+)；5: 阴性对照

图A.1 ASFV、CSFV 和 APPV 多重 RT-PCR 检测电泳图

附录 B (资料性)

ASFV、CSFV 和 APPV 多重 qRT-PCR 引物探针序列及扩增曲线图

B.1 ASFV、CSFV 和 APPV 多重 qRT-PCR 引物探针序列

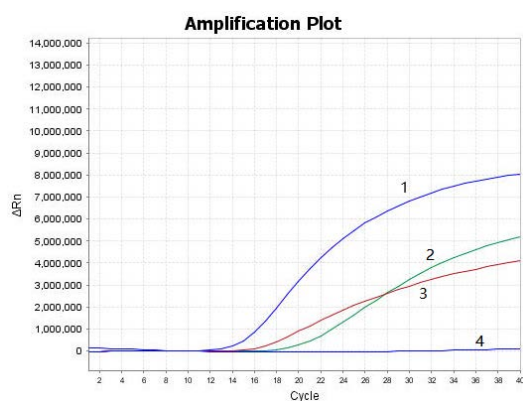
见表 B.1。

表B.1 引物探针序列

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	TTCGCGAGCGCTTTATC	
ASFV-p72-P	Texas Red-TCACCAATCCTTTGCGATGCAAGCT-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-TCGGGTCCACCATGCCCTTT-BHQ1	

B.2 ASFV、CSFV 和 APPV 多重 qRT-PCR 扩增曲线图

见图 B.1。



注：1：qp-APPV 质粒；2：qp-ASFV 质粒；3：qp-CSFV 质粒；4：阴性对照

图B.1 多重 qRT-PCR 扩增曲线图

附录 C
(资料性)
重组质粒标准品制备

C.1 特异性引物

特异性引物序列见表 A.1 和表 B.1。

C.2 多重 RT-PCR 重组质粒标准品的制备

以 ASFV DNA 以及 CSFV、APPV cDNA 为模板，应用特异性引物进行 PCR 扩增，分别获得 828 bp、529 bp 和 275 bp 的目的片段。经回收 PCR 产物，连接 pMD18-T 载体，转化 DH5 α 感受态细胞，阳性克隆增殖培养后提取质粒。经测序鉴定正确后，获得的重组质粒分别命名为 p-ASFV、p-CSFV 和 p-APPV，选取终浓度均为 6.34×10^7 拷贝/ μL 重组质粒混合物作为质粒标准品。

C.3 多重 qRT-PCR 重组质粒标准品的制备

以 ASFV DNA 以及 CSFV、APPV cDNA 为模板，应用特异性引物进行 PCR 扩增，分别获得 79 bp、72 bp 和 90 bp 的目的片段。回收 PCR 产物，连接 pMD18-T 载体，转化 DH5 α 感受态细胞，阳性克隆增殖培养后抽提质粒。经测序鉴定正确后，获得的重组质粒分别命名为 qp-ASFV、qp-CSFV 和 qp-APPV，选取终浓度均为 2.52×10^5 拷贝/ μL 重组质粒混合物作为质粒标准品。

GXAS
广西标准化协会

中华人民共和国团体标准
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和多重qRT-PCR法
T/GXAS 489—2023
广西标准化协会统一印制
版权专有 侵权必究