

附件

猪用生物制品及相关猪源原辅材料中 非洲猪瘟病毒核酸检测方法

1 适用范围

- 1.1 猪用及采用猪源原辅材料制备的生物制品成品及半成品。
- 1.2 猪源毒种。
- 1.3 猪源细胞及相关制品生产用细胞。
- 1.4 其他猪源原辅材料（如组织、血清、胰酶衍生物等）。

2 取样和处理

2.1 疫苗

2.1.1 活疫苗 取至少 2 瓶样品，按瓶签注明头份用适宜稀释液分别稀释成 10 头份/0.2ml，等量混合，取混合液进行核酸提取。

2.1.2 灭活疫苗 取至少 2 瓶样品，等量混合后进行以下处理。

2.1.2.1 油佐剂灭活疫苗 取 36 ml 混合疫苗，加入正戊醇 4.0 ml，充分振荡混合 1 分钟，2~8℃冰箱静置不少于 60 分钟，直至油相和水相分离。取水相进行核酸提取。

2.1.2.2 水性佐剂灭活疫苗

2.1.2.2.1 铝胶佐剂灭活疫苗 取混合疫苗 5.0 ml，摇匀，加入 0.25 g 解离剂 CPG-odn（人工合成的寡聚核苷酸），放入摇床（200 r/min）37℃解离 1 小时，5000 r/min 离心 10 分钟，取上清液进行核酸提取。

2.1.2.2.2 其他水性佐剂灭活疫苗 直接取混合样品进行核酸提取。

2.2 其他生物制品和半成品冻干类制品，按活疫苗进行取样和处理；液体制品及半成品，取至少 2 份（瓶）样品，等量混合，取混合液进行核酸提取。

2.3 猪源毒种 取至少 2 支毒种。冻干毒种，按冻干前体积复溶后等量混合，取混合液进行核酸提取；非冻干毒种，等量混合后直接取混合液进行核酸提取。

2.4 猪源细胞 除另有规定外，取至少 2 瓶细胞浓度不少于 $10^{7.0}$ 个细胞/ml 的细胞悬液进行核酸提取。

2.5 其他猪源原辅材料

2.5.1 猪组织 每种组织，分别取样和处理。取不少于 2.0 g 组织，研磨后用 5 倍体积灭菌 PBS 悬浮，70℃ 灭活 30 分钟，4℃ 下以 2000~3000 g 离心 10 分钟，取上清液进行核酸提取。

2.5.2 猪血清 每批血清取至少 2 个最小包装的样品，等量混合，取混合液进行核酸提取。

2.5.3 猪胰酶 干粉状胰酶，取至少 2 份样品，根据使用情况分别配制成不低于 2.5% 浓度的溶液，等量混合，取混合液进行核酸提取；液体胰酶，取至少 2 个最小包装的样品，等量混合，取混合液进行核酸提取。

2.5.4 其他猪源衍生物 固体、液体或干粉状猪源衍生物，可分别按组织、血清或干粉状胰酶的方法进行取样和样品处理。

3 核酸提取

3.1 试剂和器材

3.1.1 试剂 根据核酸提取方法确定，如氯仿、异丙醇、无水乙醇、0.1 mol/l 柠檬酸钠（含10%乙醇）、75%乙醇等。

3.1.2 仪器 核酸含量测定仪；常温台式离心机；旋涡振荡器；水浴锅；微量移液器1套（最大量程分别为10 μ l、100 μ l、200 μ l、1000 μ l）。

3.1.3 耗材 1.5 ml带盖离心管、无菌吸头（0~10 μ l、0~200 μ l、100~1000 μ l）、一次性乳胶手套。

3.2 操作程序（TRIZOL法），也可以选择其他等效核酸提取方法提取样品中的DNA。

3.2.1 取样品 250 μ l，加入 750 μ l Trizol，颠倒混匀，室温放置 5 分钟。

3.2.2 加入 200 μ l 氯仿，充分混匀，室温放置 10 分钟，4℃下以 12000 g 离心 15 分钟。

3.2.3 弃去上清液，加入 220 μ l 无水乙醇，颠倒混合，15~30℃放置 2~3 分钟，2~8℃以 2000 g 离心 5 分钟，沉淀物为 DNA。

3.2.4 弃去上清液，加入含 10%乙醇的 0.1 mol/l 柠檬酸钠 750 μ l 洗涤 DNA，15~30℃放置 30 分钟，2~8℃以 2000 g 离心 5 分钟。重复一次。

3.2.5 加入 75%乙醇 1.2 ml，重悬 DNA 沉淀，15~30℃放置 20 分钟，4℃2000 g 离心 5 分钟。可重复一次，充分洗涤 DNA 沉淀。

3.2.6 弃去上清液，敞开离心管管口，在空气中干燥 5~10 分钟，加入 30~50 μ l 的无核酸酶灭菌水溶解 DNA，-20℃以下保存备用。

3.3 注意事项

3.3.1 核酸提取试剂具有腐蚀和强变性能力，应做好个人防护，佩戴手套、口罩和护目镜，防止液体飞溅到皮肤和眼睛。

3.3.2 后续的核酸检测敏感性很高，要防止样品之间相互污染，最好使用带滤芯的枪头，且每次吸取液体时均需更换枪头。

3.3.3 为防止核苷酸降解，应避免核酸酶污染，使用的耗材均需无核酸酶。

3.3.4 做好剩余样品的无害化处理及操作台面的消毒处理。剩余样品可通过高压灭菌或煮沸处理，也可放在 1%卫可或 2%氢氧化钠消毒液中浸泡处理，操作台面使用 1%卫可擦拭。

3.3.5 提取后的 DNA 样品要用锡箔纸封存，取样时应用枪头直接刺破锡箔纸取样，防止污染。

4 检测

下列两种方法可任选其一。

4.1 实时荧光定量 PCR 检测法

4.1.1 试剂和器材

4.1.1.1 试剂

4.1.1.1.1 荧光定量PCR试剂 本操作中以Applied Biosystems TaqMan Gene Expression Assays kit为例，也可选用其他荧光定量PCR试剂。

4.1.1.1.2 扩增引物及探针

扩增引物：

ASF-05-Zsak-1466F (10 μmol/L) : 5'-CCTCGGCGAGCGCTTTATCAC-3'
ASF-05-Zsak-1528R (10 μmol/L) : 5'-GGAAACTCATTACCAAATCCTT-3'
探针ASF-05-Zsak-1486prob (10 μmol/L):

5'-FAM-CGATGCAAGCTTTAT-MGB-3'

4.1.1.1.3 无核酸酶的灭菌水 PCR级别。

4.1.1.2 仪器 荧光定量PCR仪；微量移液器1套（最大量程分别为10 μl、100 μl、200 μl、1000 μl）。

4.1.1.3 耗材 1.5 ml带盖离心管、0.2 ml薄壁PCR管、荧光定量PCR 96孔板、0.1 ml荧光PCR八连管、无菌吸头（0~10 μl、0~200 μl、100~1000 μl）、一次性乳胶手套。

4.1.2 操作程序

4.1.2.1 样品DNA制备 按照前述方法进行核酸提取。

4.1.2.2 反应体系的配制 配制比样品数量至少多4个的反应体系，同时设置强阳性、弱阳性和阴性对照。在强阳性和弱阳性对照反应管中分别加入含有非洲猪瘟P72基因的标准质粒DNA各3 μl，在阴性对照反应管中加入3 μl无核酸酶灭菌水。每个PCR反应管中应包含以下成分：

成分	体积 (μl)
2×ABI TaqMan Gene Expression Mix	10
ASF-05-Zsak-1466F (10 μmol/L)	1
ASF-05-Zsak-1528R (10 μmol/L)	1
探针(10 μmol/L)	0.8
DNA	3
无核酸酶灭菌水	4.2
	总量20

4.1.2.3 反应程序 将所有待检样品和强阳性、弱阳性、阴性对

照反应管放在荧光定量 PCR 仪中，按照以下程序进行扩增：50℃2 分钟，95℃5 分钟，95℃15 秒，58℃退火延伸 1 分钟，45 个循环（荧光信号收集在此阶段每次循环的退火延伸时进行）。

4.1.2.4 结果判定

4.1.2.4.1 阈值设定 试验操作结束后，确定Ct值。Ct值为每个样品反应管内荧光信号到达设定阈值时所经历的循环数。

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扩增曲线的最高点为准。

4.1.2.4.2 质控标准

对照组的检测结果应符合以下情况，此次检测方为有效：

阴性对照无Ct 值，且无扩增曲线。

强阳性对照的Ct 值应在18~22之间，并出现典型的扩增曲线。

弱阳性对照的Ct 值应在33~35之间，并出现典型的扩增曲线。

4.1.2.4.3 判定

阴性：无Ct值，且未出现扩增曲线，判定为样品中无ASFV核酸。

阳性：Ct值 \leq 40，且出现典型的扩增曲线，判定为样品中存在ASFV核酸。

可疑：Ct 值 $>$ 40，且出现典型扩增曲线，判定为可疑，应重检。重检后，Ct 值 \leq 40 且出现典型扩增曲线者判为阳性，其他情况均判定为阴性。

4.2 普通 PCR 检测法

4.2.1 试剂和器材

4.2.1.1 试剂

4.2.1.1.1 PCR试剂 10×PCR缓冲液（含25 mmol/l Mg^{2+} ），DNA扩增酶，dNTP预混液。

4.2.1.1.2 扩增引物

primer PPA-1（10 μ mol/L）：5'-AGTTATGGGAAACCCGACCC-3'（上游引物）；

primer PPA-2（10 μ mol/L）：5'-CCCTGAATCGGAGCATCCT-3'（下游引物）。

4.2.1.1.3 DNA分子量标准品 DL500。

4.2.1.1.4 TAE电泳缓冲液 配制方法见《电泳液标准配制流程》。

4.2.1.1.5 1%琼脂糖凝胶板 在100 ml 1×TAE缓冲液中加入1g琼脂糖，加热融化，加入5.0 μ l（10 mg/ml）溴化乙锭，混匀，倒入水平放置的凝胶盘中，胶板厚度达5.0 mm左右。根据样品数量选用适宜的梳子。待凝胶冷却凝固后拔出梳子（胶中形成加样孔），放入电泳槽中，加1×TAE缓冲液淹没胶面。

4.2.1.2 仪器 DNA扩增仪，稳压稳流电泳仪，水平电泳槽，凝胶成相系统（或紫外透射仪），微量移液器1套。

4.2.1.3 耗材 1.5 ml带盖离心管、0.2 ml薄壁PCR管、无菌吸头（0~10 μ l、0~200 μ l、100~1000 μ l）。

4.2.2 操作程序

4.2.2.1 样品DNA制备 按照前述方法进行核酸提取。

4.2.2.2 反应体系的配制 配制比样品数量至少多3个的反应体系，同时设立阳性和阴性对照。在阳性对照反应管中加入非洲猪瘟P72基因重组质粒2.0 μ l，在阴性对照反应管中加入2.0 μ l无核酸酶灭菌水。每个PCR反应管中应包含以下成分：

成分	体积 (μl)
10×PCR缓冲液	2
DNA 扩增酶	1
dNTP	0.5
PPA-1 (10 μmol/L)	1
PPA-2 (10 μmol/L)	1
DNA	2
无核酸酶灭菌水	12.5
	总量20

4.2.2.3 反应程序 将所有待检样品及阳性和阴性对照反应管放在PCR仪中，按照以下程序进行扩增：94℃2分钟，94℃30秒，60℃30秒，72℃30秒，35个循环；72℃10分钟。4℃保存。

4.2.2.4 PCR扩增产物分析 取PCR扩增产物10 μl，加6×加样缓冲液2.0 μl，混匀，用1.5%琼脂糖凝胶对混合物进行电泳分析，电压120V，电流50 mA，电泳时间30分钟。电泳结束后，用凝胶成像系统拍照，记录检测结果。

4.2.2.5 结果判定

4.2.2.5.1 质控标准

对照组的检测结果应符合以下情况，此次检测方为有效：

阴性对照应不出现257bp的特异性条带。

阳性对照应出现257bp的特异性条带。

4.2.2.5.2 判定

阳性：待检样品出现与阳性对照大小一致的扩增条带，判定为非非洲猪瘟病毒核酸阳性，扩增产物可通过DNA测序进一步确定基因型。

阴性：待检样品未出现与阳性对照大小一致的扩增条带，判定为非非洲猪瘟病毒核酸阴性。

4.3 注意事项

4.3.1 检测过程中应遵循 PCR 实验分区原则，即应区分试剂配制区、样本处理区、核酸扩增区。

4.3.2 应避免在含有靶序列的区域中使用引物，防止污染靶序列。