

非洲猪瘟病毒检测操作规程 (试行)

中国动物卫生与流行病学中心
中国动物疫病预防控制中心
编制

二〇一八年八月

编制说明

本操作规程包括非洲猪瘟核酸检测技术（方法一）、非洲猪瘟核酸检测技术（方法二）、非洲猪瘟病毒核酸检测质量控制程序等三部分内容。非洲猪瘟核酸检测技术（方法二）是可选方法，也可用于辅助判断和验证检测结果。非洲猪瘟病毒核酸检测质量控制程序可用于控制检测质量，评价检测技术，验证检测结果有效性。

目 录

非洲猪瘟核酸检测技术（方法一）	1
1. 核酸提取	1
1.1 试验材料	1
1.2 设备与材料	2
1.3 操作步骤	2
1.4 参考资料	4
2. 实时荧光 PCR 检测	4
2.1 设备与材料	4
2.2 试剂	5
2.3 方法	5
2.4 结果分析	6
2.5 参考资料	7
3. 常规 PCR 检测	7
3.1 设备与材料	7
3.2 试剂	8
3.3 方法	9
3.4 结果分析	10
3.5 参考资料	10
非洲猪瘟核酸检测技术（方法二）	11
一、非洲猪瘟样品处理	11
1. 目的	11
2. 适用范围	11
3. 程序	11
3.1 试验材料	11
3.2 试验器材和试剂	13
3.3 样品处理程序	13
3.4 病毒灭活	14
3.5 使用后器材处理	14
3.6 注意事项	14
二、非洲猪瘟实时荧光 PCR 检测	17
1. 目的	17
2. 适用范围	17
3. 程序	17
3.1 试剂和器材	17
3.2 核酸提取操作程序	18
3.3 荧光 PCR 反应	22
非洲猪瘟病毒核酸检测质量控制程序	24
1. 目的	24
2. 适用范围	24
3. 标准样品	24
4. 程序	25
4.1 标准样品的原液和 1 : 100 倍稀释	25
4.2 检测方法	25
4.3 特性值	25
4.4 溯源性	26
5. 其他信息	26
6. 标准样品来源	26

非洲猪瘟核酸检测技术（方法一）

本规程推荐的检测程序、仪器设备和试剂等可作为 PCR 检测方法的一般性指南，最佳反应条件（如反应时间和温度、设备型号和厂商、引物和 dNTP 等试剂的浓度等）可根据实验室不同而稍有变化。因此，使用前应首先评估这些条件。

1. 核酸提取

1.1 试验材料

- 待检样品（样本制备过程遵照 ASF 诊断样本处理操作规范进行）。
- DNA 提取试剂盒 High Pure PCR template Preparation Kit (Roche 公司产品，图 1)，可使用其他效果相似的病毒核酸提取试剂盒代替，也可使用自动化提取设备（图 2）。
- 每次核酸提取过程中应至少设立阳性提取对照和阴性提取对照各一个。



图 1 High Pure PCR template Preparation Kit

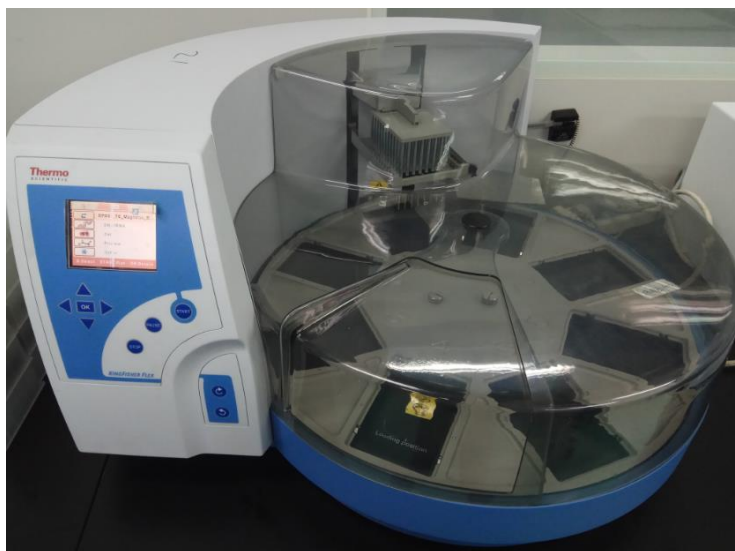


图 2 核酸自动提取仪

1.2 设备与材料

- 台式高速冷冻离心机、冰箱、冰柜、金属浴、移液器等
- 移液器吸头（1-20、20-200 和 200-1000 μL ）、灭菌离心管（0.2、0.5、1.5 和 2 mL）、乳胶或丁腈手套
- 无水乙醇、异丙醇、无 DNase 和 RNase 水（非 DEPC 处理水）

1.3 操作步骤

以 Roche 公司的 High Pure PCR Template Preparation Kit 为例。

1) 试剂准备

- 2) 冻干蛋白酶 K: 将蛋白酶 K 溶解于 4.5 mL 灭菌蒸馏水中，将溶液以每管 500 μL 分装，在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 储存，直到使用。

- 3) 除抑制物缓冲液: 将 20 mL 乙醇加入原瓶(黑色瓶盖)中并进行相应的标记和日期记录。室温下储存。
- 4) 冲洗缓冲液: 将 80 mL 乙醇加入原瓶中(蓝色瓶盖)并进行相应的标记和日期记录。室温下储存。
- 5) 将 200 μ L 结合缓冲液(绿色瓶盖)以及 40 μ L 蛋白酶 K (20 mg/mL) 分别加入到 1.5 mL 离心管中。
- 6) 每管加入 200 μ L 样本。每次提取程序均需设立至少一个 E+和 E-对照。立即混匀并在 72°C 下孵育 10 分钟。
- 7) 将 1.5 mL 离心管瞬时离心, 除去管盖和管壁内的液体。
- 8) 每管加入 100 μ L 异丙醇。
- 9) 将过滤管放入收集管中, 将所有样本移入过滤管。
- 10) 将样品以 8000 转/分离心 1 分钟。如果样品依然留在过滤管中, 重复离心操作。
- 11) 扔掉收集管, 将过滤管插入到干净的收集管中。
- 12) 将 500 μ L 除抑制物缓冲液放入过滤管, 以 8000 转/分离心 1 分钟。
- 13) 扔掉收集管, 将过滤管放入干净的收集管中。
- 14) 将 450 μ L 冲洗缓冲液加入过滤管, 以 8000 转/分进行 1 分钟离心操作。
- 15) 扔掉收集管, 重复冲洗步骤。
- 16) 扔掉收集管, 将过滤管放入干净的收集管中。以 13000 转/分离心 10 秒钟, 以去除残余的冲洗缓冲液。
- 17) 扔掉收集管, 将过滤管放入干净的 1.5 mL 离心管中。
- 18) 对于核酸洗脱, 将 50 μ L 预热 (72°C 左右) 的灭菌蒸馏水加入过滤管 (注意不要使用试剂盒中的洗脱缓冲液), 以 8000 转/分离心 1 分钟。

19) 将 DNA 提取物在-20 °C 温度下储存（有效期：12 个月），以备将来使用，或者如果将在 1-2 小时内用于 PCR 操作，在 4 °C 温度下储存。

1.4 参考资料

《非洲猪瘟诊断技术》（GB/T 18648-2002）

《非洲猪瘟诊断操作手册》（SOP/CISA/ASF, CISA-INIA, 西班牙）

《OIE 陆生动物诊断试验和疫苗手册》第 2.8.1 章（2012 年版）

DNA 提取试剂盒 High Pure PCR template Preparation Kit (Roche) 使用说明书

2. 实时荧光 PCR 检测

2.1 设备与材料

- 冰箱（-20 °C，-70 °C 和 4 °C）
- 乳胶或丁腈手套
- 离心机
- 离心管：0.5 mL、1.5 mL 和 2 mL
- 容量 0.2 mL 或 0.1 mL 的 PCR 管/板（光学级）
- 荧光 PCR 仪（图 3）
- 单道吸液管 1-10 µL, 10-100 µL, 10-200 µL, 200-1000 µL
- 试管架
- 震荡混匀器



图3 ABI 公司 7500 型荧光 PCR 仪（左）和 Roche 公司 LightCycler® 480 II 型
荧光 PCR 仪（右）

2.2 试剂

- 探针法荧光 PCR 试剂盒，可从 Thermo Fisher Scientific 公司、Qiagen 公司或其他公司购买具有效果相似的试剂盒。
- TaqMan 探针，浓度 10 pmol/ μ L，分装后在 -20°C 温度下避光储存，有效期 1 年。
- 引物浓度为 10 pmol/ μ L，在 -20°C 温度下分装储存，有效期 1 年。
- 无 DNase/RNase 的水，PCR 级别。
- 阳性和阴性对照：每次 PCR 检测中需包括提取阳性对照（E+）、提取阴性对照（E-）、反应阳性对照（R+）和反应阴性对照（R-）。

2.3 方法

本方法扩增 ASFV VP72 基因长度为 250 bp 左右的 DNA 片段。PCR 以 20 μ L 体系进行；反应液制备完成后，每管加入 2 μ L DNA 样本。

2.3.1 反应液制备

在灭菌的 1.5 mL 离心管中制备符合试验样本数量(包括 E+、R+、E-和 R-对照)的 PCR 反应混合物,至少额外制备两个样本的量。

吸液步骤	试剂成分	1x 容量 (20 μ L 体系)
1	灭菌纯水	5.9 μ L
2	2 \times PCR 预混液	10 μ L
3	正向引物 VP72F2a (10 μ M)	0.8 μ L
4	反向引物 VP72R2b (10 μ M)	0.8 μ L
5	TaqMan 探针 VP72P2c (10 μ M)	0.5 μ L
混合液容量		18 μ L

- 1) 将 18 μ L PCR 反应混合液加入 PCR 管;
- 2) 将 2 μ L DNA 模板加入每个 PCR 管,另外需设立 E+、R+、E-、R-对照;
- 3) 加入模板后,密封反应试管,瞬时离心。将所有 PCR 管放入荧光 PCR 仪中。按如下要求运行扩增程序。

2.3.2 PCR 循环条件

PCR 步骤	温度	时间	循环次数
UNG 孵育	50 °C	2 分钟	1
激活 Taq 酶	95°C	10 分钟	1
DNA 变性	95°C	15 秒	45
引物退火/延伸	58°C	60 秒	
每循环 58°C 时采集 FAM 通道中的荧光信号			

2.4 结果分析

Ct 值由荧光 PCR 仪软件自动确定。

结果成立的条件: E+ 和 R+ 的 Ct 值在 30 \pm 4 区间内,

且 E- 和 R- 无 Ct 值或 Ct 值 ≥ 40 ，则试验结果有效。

在阳性样本中可以得到 S 形扩增曲线（图 4），Ct 值小于 40.0（强阳性样品的 Ct 值小于 30.0）；在阴性样本中，无 Ct 值或 Ct 值大于 40.0。

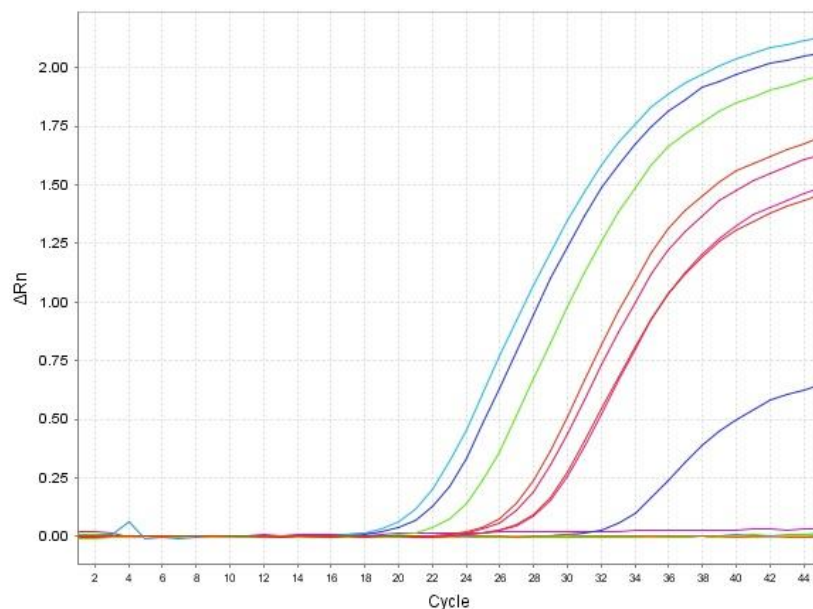


图 4 荧光 PCR 检测结果

2.5 参考资料

《非洲猪瘟诊断技术》（GB/T 18648-2002）

《非洲猪瘟诊断操作手册》（SOP/CISA/ASF, CISA-INIA, 西班牙）

《OIE 陆生动物诊断试验和疫苗手册》第 2.8.1 章（2012 年版）

PCR 检测试剂盒使用说明书

3. 常规 PCR 检测

3.1 设备与材料

- 冰箱（ $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 和 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ）
- 乳胶或丁腈手套

- 用于离心管的微型离心机
- 离心管：容量分别为 0.2 mL、0.5 mL，1.5 mL 和 2 mL
- PCR 仪（图 5）
- 移液器与吸头(1-10 μL 、10-100 μL 、10-200 μL 、200-1000 μL)
- 试管架
- 震荡混匀器



图 5 普通 PCR 扩增仪

3.2 试剂

- PCR 检测试剂盒：可从 ThermoFisher、TaKaRa 或 Qiagen 等公司购买。
- 引物：浓度为 20 pmol/ μL ，分装后在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 温度下储存，有效期 1 年。
- 无 DNase/RNase 水，PCR 级别。
- 阳性和阴性对照：每次 PCR 检测中需包括提取阳性对照（E+）、提取阴性对照（E-）、反应阳性对照（R+）和反应阴性对照（R-）。

3.3 方法

本方法扩增 ASFV VP72 基因长度为 257 bp 的 DNA 片段。PCR 以 25 μL 体系进行；反应液制备完成后，每管加入 3 μL 样本。

3.3.1 反应液制备

在灭菌的 1.5 毫升离心管中制备以下符合试验样本量（包括 E+、R+、E-和 R-对照等）的 PCR 反应混合物，至少额外多制备两个样本的量。

吸液步骤	试剂成分	加入体积
1	灭菌蒸馏水	16.875 μL
2	10 \times PCR Buffer	2.5 μL
3	10 mM dNTPs mix	0.5 μL
4	25 mM MgCl_2	1.5 μL
5	正向引物 PPA-1 (20 μM)	0.25 μL
6	反向引物 PPA-2 (20 μM)	0.25 μL
7	AmpliTaq Gold (5U/ μL)	0.125 μL
混合液总体积		22 μL

- 1) 将 22 μL PCR 反应混合液加入到每个 0.2 mL PCR 管；
- 2) 将 3 μL DNA 模板加入到 PCR 管中，另需设立 E+、R+、E-、R-对照；
- 3) 加入模板后，密封反应管，瞬时离心。将所有 PCR 管放在荧光 PCR 仪中。按如下要求运行扩增程序。

3.3.2 PCR 循环条件

PCR 步骤	温度	时间	循环次数
UNG 孵育	50 $^{\circ}\text{C}$	2 分钟	1
Taq 酶激活	95 $^{\circ}\text{C}$	10 分钟	1
DNA 变性	95 $^{\circ}\text{C}$	15 秒	40
引物退火	62 $^{\circ}\text{C}$	30 秒	
延伸	72 $^{\circ}\text{C}$	30 秒	
延长	72 $^{\circ}\text{C}$	7 分钟	1

将 5 μL 的 6 \times 上样缓冲液加入到 PCR 产物中混匀后取 8 μL 加入到使用 1 \times TAE 缓冲液配制的 2%琼脂糖凝胶中电泳 30~40 分钟。电泳结束后，将琼脂糖凝胶置于凝胶成像系统中观察结果。

3.4 结果分析

结果成立的条件：E+ 和 R+ 均出现大小为 257 bp 的目的条带，且 E- 和 R- 无目的条带，则试验结果有效。

若被检样品出现 257 bp 的扩增条带，则判为 ASFV 阳性，否则应视为阴性（图 6）。

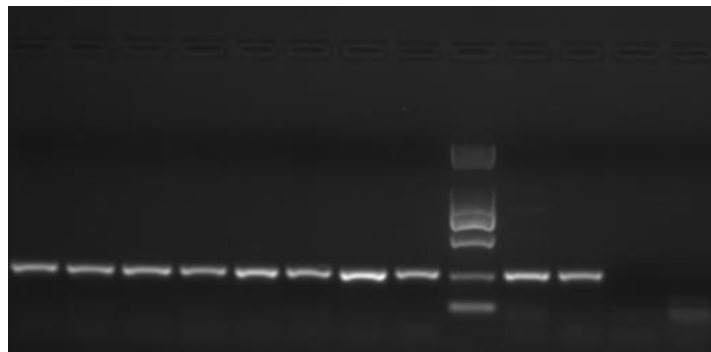


图 6 常规 PCR 检测结果（Marker 为 DL2000）

3.5 参考资料

《非洲猪瘟诊断技术》（GB/T 18648-2002）

《非洲猪瘟诊断操作手册》（SOP/CISA/ASF, CISA-INIA, 西班牙）

《OIE 陆生动物诊断试验和疫苗手册》第 2.8.1 章（2012 年版）

PCR 检测试剂盒使用说明书

非洲猪瘟核酸检测技术（方法二）

一、非洲猪瘟样品处理

1. 目的

规范 ASFV 样品和试验材料的处理程序，保障 ASFV 相关实验的顺利开展和实验室的生物安全。

2. 适用范围

适用于疑似 ASFV 临床样品在试验前的处理。

3. 程序

3.1 试验材料

ASF 的易感动物，主要为家猪、野猪和蜚，通常采集的样品为家猪、野猪的血液样品、组织样品以及蜚三类。田间采集的样品通常需要经过简单的预处理，才能进行后续的检测、诊断工作。

血清：用于病毒核酸检测、病毒抗原和抗体检测。将采好猪血的注射器或采血管在室温下倾斜静置 2~4h（防止暴晒），或置于 37℃ 温箱内 1h，待大部分血清析出后，取出血清，必要时经离心分离血清。（最低建议量 5mL）。

抗凝全血：用于病毒核酸检测和病毒抗原检测。

采血前，在真空采血管或注射器内按比例加入抗凝剂。采集血液，轻轻上下颠倒，使血液与抗凝剂充分混匀，防止

血液凝固的同时避免溶血。也可将血液放入装有玻璃珠的灭菌瓶内，振荡脱纤维蛋白。必要时，可加入双抗以抑制血源性或采血过程中可能出现的细菌污染。

当血样用于病毒核酸检测时，一般不用肝素而选用EDTA作为抗凝剂。（最低建议量 1mL）。

组织样本：活体采集，采取扁桃体，用于临床健康动物ASF监测。

尸体剖检 ASF 发病动物或死亡动物经解剖取材，包括：

- 1) ASFV 靶器官的采集：脾脏、淋巴结、肾脏、扁桃体。
- 2) 其他病变组织脏器的采集：采集具有明显病变的肝脏、肺脏、心脏等组织器官，选取部位在病变和健康组织交界处。

3) 腐败动物尸体的样品采集：剖检取股骨，将附着的肌肉和韧带等全部剔除，采集骨髓。最低建议量 5 克。

蜱的采集：蜱可进行核酸检测、抗原检测和蜱的形态学鉴定，查找猪圈的墙边、墙缝、木质或瓦质的屋顶，或挖掘猪圈地面均可能找到蜱，也可查看猪体表面，采集蜱。

表 1-1 样品保存条件

温度要求或条件 样品名称		采集过程	运输及检测过程 (短时间保存)	长期保存
血液	抗凝血	冷藏	冷藏	-70℃或-196℃
	血清	冷藏	冷藏	-70℃或-196℃
	干血滤纸片	常温	常温	-
	滤纸	冷藏或常温	冷藏或常温	冷藏或常温

组 织	固定组织	常温	常温	常温
	组织触片	常温	常温	-
	新鲜组织	冷藏	冷藏或常温 (灭菌的组织保存液中保存)	-70℃或-196℃
蜚	活体	15℃~22℃	15℃~22℃	15℃~22℃ (血饲) ^[9, 19]
	固定	常温	常温	常温
	速冻	-70℃或-196℃	-70℃或-196℃	-70℃或-196℃

注：用于病毒分离和病理学检测的样品严禁-20℃保存。

3.2 试验器材和试剂

①台式高速冷冻离心机、组织研磨仪、水浴锅、计时器、冰箱和移液器等。

②无菌的剪刀、镊子、钢珠、2mLEP 管、移液器吸头(10μL, 200μL, 1000μL) 等。

③其他试剂和耗材主要包括：0.01mol/L PBS (pH7.2)、0.8%NaOH、75%酒精棉球等。

3.3 样品处理程序

3.3.1 血清及全血样品处理

取血清或全血样品 1mL 于灭菌 EP 管里，保存备用。

3.3.2 组织样品处理

适用于脾脏等组织样品和蜚的处理。尽可能减少污染，每取一个组织块或蜚，用火焰消毒剪镊等取样器械，组织块应分别放入灭菌容器内并立即密封，做好标记，注意防止组织间相互污染。

3.3.2.1 组织样品的处理应在二级生物安全柜中进行，勿使液体溅到生物安全柜中。

3.3.2.2 将 0.1~0.2g 组织块放入 2mL EP 管中，用剪刀剪成碎块，加 1~2 ml 0.01mol/L PBS (pH7.2)，再加入 1~2 粒灭菌钢珠，密封后，表面消毒备用。剩余样品放回容器内，重新密封，表面消毒后保存于-70℃冰箱。

3.3.2.3 组织样品的破碎利用组织研磨仪在生物安全柜外操作，将样品制成组织悬液。

3.4 病毒灭活

病毒的灭活处理应在二级生物安全柜中进行，将处理好的血清、全血或者研磨破碎后的组织样品连同 EP 管放入 60℃ 水浴中，放置 30min 灭活。

3.5 使用后器材处理

剪刀、镊子等均应放入消毒缸进行消毒，放入铁饭盒内，并装入密封袋内进行高压灭菌处理。装有组织样品保存液的容器和盛有组织块的离心管应密封管口，表面消毒后放入密封袋内高压灭菌。钢珠、吸头等废弃物应用 0.8%NaOH 浸泡 30 分钟消毒后，置密封袋内高压灭菌。消毒残液应装入密闭容器内高压灭菌处理。

3.6 注意事项

操作之前要确认生物安全柜和实验室已进行了彻底的卫生消毒处理。

防止样品间交叉污染。

表 1-2 ASF 采样单

ASF 采样单				
畜主姓名			联系电话	
所 属 地	省 市 区/县 乡/镇 村			
饲养模式	<input type="checkbox"/> 散养 <input type="checkbox"/> 商业化半封闭 <input type="checkbox"/> 商业化完全封闭			
动物种类	<input type="checkbox"/> 家猪 <input type="checkbox"/> 野猪 <input type="checkbox"/> 疣猪 <input type="checkbox"/> 蜚 <input type="checkbox"/> 其它		采样日期	年 月 日
猪只来源	<input type="checkbox"/> 饲养场（户） <input type="checkbox"/> 屠宰场 <input type="checkbox"/> 市场 <input type="checkbox"/> 野外 <input type="checkbox"/> 其它			
蜚的来源	<input type="checkbox"/> 洞穴 <input type="checkbox"/> 缝隙 <input type="checkbox"/> 猪体 <input type="checkbox"/> 其它哺乳动物			
与最近猪场 的距离	<input type="checkbox"/> <50 米 <input type="checkbox"/> 50~100 米 <input type="checkbox"/> 100~500 米 <input type="checkbox"/> 500~1000 米 <input type="checkbox"/> 1~5 千米 <input type="checkbox"/> 5~10 千米 <input type="checkbox"/> 10~20 千米 <input type="checkbox"/> >20 千米			
既往病史	<input type="checkbox"/> 无 <input type="checkbox"/> 有（具体时间： 年 月 日）			
临床发病（流行病学）情况：				
治疗措施及免疫情况：				
样品名称				
样品数量				
原始编号				
检测需求：				
备注：				

表 1-3 ASF 样品清单

样品序号:
样品标识 (XXYYZddmmyy.000):
样品名称 <input type="checkbox"/> 蜚 <input type="checkbox"/> 血液 <input type="checkbox"/> Whatman 滤纸 <input type="checkbox"/> FTA 滤纸 <input type="checkbox"/> 淋巴结 <input type="checkbox"/> 脾脏 <input type="checkbox"/> 其他组织 <input type="checkbox"/> 其他:
动物信息
年龄: <input type="checkbox"/> <6 个月 <input type="checkbox"/> 7-12 个月 <input type="checkbox"/> 1-2 岁 <input type="checkbox"/> 2-5 岁 <input type="checkbox"/> >5 岁
体重: <input type="checkbox"/> <20 公斤 <input type="checkbox"/> 20-50 公斤 <input type="checkbox"/> 50-100 公斤 <input type="checkbox"/> >100 公斤
性别: <input type="checkbox"/> 公 <input type="checkbox"/> 母 <input type="checkbox"/> 不详
健康状况: <input type="checkbox"/> 健康 <input type="checkbox"/> 体弱 <input type="checkbox"/> 发病 <input type="checkbox"/> 濒死 <input type="checkbox"/> 死亡
出血症状: <input type="checkbox"/> 无 <input type="checkbox"/> 轻微 <input type="checkbox"/> 严重
备注:

注: 本表部分内容来源于

www.asfnetwork.org/Downloads/documents/RecordFormsamplesCO.pdf

二、非洲猪瘟实时荧光 PCR 检测

1. 目的

规范非洲猪瘟实时荧光 PCR 操作技术, 保证相关实验的顺利进行, 保证实验室生物安全。

2. 适用范围

适用于实验室对临床样品（如全血和脾脏等）中的非洲猪瘟病毒（ASFV）核酸片段的检测。

3. 程序

应用实时荧光 PCR 技术可以从低微含毒量样品中扩增获得病毒特异性核酸片段, 进行病毒鉴定。通过扩增捕获 ASFV 主要免疫原基因 VP72, 进而测定其核酸序列, 可进行以毒株间核苷酸序列同源性比较为主要技术手段的非洲猪瘟分子流行病学研究。

3.1 试剂和器材

3.1.1 试剂

3.1.1.1 AB（Life Techonologies）核酸提取试剂盒或者天根磁珠法病毒 DNA/RNA 提取试剂盒。

3.1.1.2 非洲猪瘟实时荧光 PCR 试剂盒。

3.1.1.3 其他试剂：无水乙醇、异丙醇等。

3.1.2 仪器

Kingfisher 96 核酸提取仪，台式高速离心机，荧光 PCR 检测仪；可高压微量移液器 1 套，量程 0.5~1000 μ L。

3.1.3 耗材

如深孔板、浅孔板、深孔磁头套、1.5mL 带盖 EP 管、0.2mL 8 联管荧光 PCR 管、96 孔荧光 PCR 管、吸头等。

3.2 核酸提取操作程序

3.2.1 天根磁珠法病毒 DNA/RNA 提取试剂盒

该试剂盒组分如下表：

产品组成	DP438-T2K (2 x 96 preps)	保存条件
RNase-Free ddH ₂ O	15 ml	室温
漂洗液 2 (Plate 2 Wash 2)	2 板(250 μ l/孔)	
漂洗液 1 (Plate 3 Wash 1)	2 板(240 μ l/孔)	
漂洗液 1 (Plate 4 Wash 1)	2 板(240 μ l/孔)	
样品板 (Plate 5 Sample)	2 板(125 μ l/孔)	
漂洗液 2 (Plate 6 Wash 2 Tip)	2 板(250 μ l 磁珠悬浮液 FSP1/孔)	
Proteinase K	1 ml	室温
Carrier RNA	310 μ g	
KF 浅孔板 (KF Standard Plate)	2 块	室温
KF96 磁棒套 (KF 96-tip comb)	2 个	室温

Carrier RNA 冻干粉能够在室温（15–25 $^{\circ}$ C）储存至有效期。

采用 Kingfisher 96 核酸提取仪进行 DNA 抽提，具体方法如下：

3.2.1.1 试剂配制：Carrier RNA 先溶解在 310 μ l RNase-Free ddH₂O 中，然后再将 Carrier RNA 溶液加入裂解液中混匀。溶于 RNase-Free ddH₂O 中的 Carrier RNA 溶液，

可置于-20℃冷冻保存；而将 Carrier RNA 溶液加入裂解液后，在 2-8℃能保存最多 48h，请现用现配。

3.2.1.2 预封装深孔板准备：取出预封装 96 孔板，然后轻甩所有孔板使试剂及磁珠均集中到孔板底部（也可使用孔板离心机，500 rpm×1min 进行离心），使用前小心撕去铝箔封口膜，避免孔板振动，防止液体溅出。

3.2.1.3 加试剂：使用前在 KF 浅孔板 Plate 1 中每孔分 50 µl RNase-Free ddH₂O。

3.2.1.4 加样品：加样应在二级生物安全柜中进行，在 Plate5 深孔板中加入 1µl CarrierRNA ， 5µl Proteinase K 和 50 µl 样品（样品需平衡至室温）。

3.2.1.5 提取：将 KF 磁棒套放入 Plate 6 Wash 2 Tip 的深孔板中。

将 96 孔板按照仪器提示正确放置后，执行 Tiangen_Viral 96DW 程序。打开 Kingfisher 96 核酸提取仪，选择 Tiangen_Viral 96DW 程序，按 START 键，提取开始，提取时间约 35min。

顺序	产品组成	体积
Plate 1 ddH ₂ O	RNase-Free ddH ₂ O	50 µl
Plate 2 Wash2	Buffer PWE	250 µl
Plate 3 Wash1	Buffer PD	240 µl
Plate 4 Wash1	Buffer PD	240 µl
Plate 5 Sample	Buffer GHH	125 µl
Plate 6 Wash 2Tip	MagAttract Suspension FSP1 KF 96-tip comb	250 µl

注意：板子 A1（缺一角）应与提取板中的 A1 位置相同。

仪器提示提取结束，按 STOP 键结束，并按<>键取出各块板，将 Plate 板核酸备用，其余板尽快弃掉，并防止污染环境。关闭机器电源。

3.2.1.6 质量监控：每次提取完成后，观察每孔中的溶液，磁珠应全部释放添加磁珠位置，EB 中的溶液不再呈现半球状，表明仪器正常工作。其他板孔中可能会残留微量磁珠，如果发现板孔中出现较多磁珠，应上报仪器负责人进行检查。

3.2.1.7 核酸保存：待检脾混悬液、血液及阴阳性对照提取制备的 DNA 模板，立即使用或-20℃保存备用。

3.2.2 AB（Life Technologies）核酸提取试剂盒

该试剂盒组分如下表：

试剂盒	5×MagMax™-96 Viral RNA Isolation Kit	保存条件
货号	AMB1836	4℃或室温
Lysis//Binding Conc	40 毫升	
Wash Soln Conc.1	120 毫升	
Wash Soln Conc.2	40 毫升	
Elution Buffer	45 毫升	
RNA Binding Beads	5.5 毫升	
Lysis//Binding Enhancer	5.5 毫升	-20℃
Carrier RNA	313 微升×2	

采用 Kingfisher 96 核酸提取仪进行 DNA 抽提，具体方法如下：

3.2.2.1 试剂配制：新拆封的试剂盒先在洗涤液 1 中加入无水异丙醇 60 毫升，洗涤液 2 中加入无水乙醇 160 毫升备用。

按照每份样品 10 μ L RNA Binding Bead; 10 μ L Lysis/Binding Enhancer; 1 μ L Carrier RNA; 65 μ L Lysis/Binding Soln Conc 和 65 μ L100% 异丙醇，配制裂解/结合液。

3.2.2.2 加试剂：

深孔板：裂解/结合液 150ul，1 板

浅孔板：洗涤液 1 150ul，2 板

浅孔板：洗涤液 2 150ul，2 板

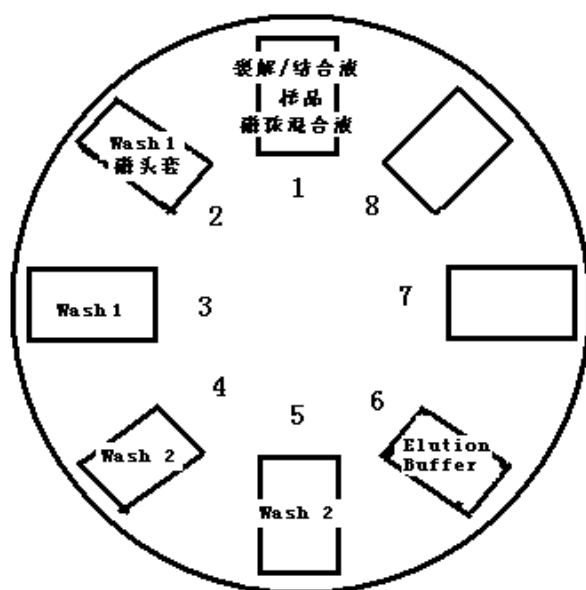
浅孔板：Elution 50ul，1 板

3.2.2.3 加样品：加样应在二级生物安全柜中进行，将制备好的样品各取 50 μ L 加入深孔板中。

3.2.2.4 提取：打开 Kingfisher 96 核酸提取仪，选择 AM1836-5 程序，按 START 键，按照显示面板的提示，依次放入 Elution 板，2 块洗涤液 2，2 块洗涤液 1，其中第二块板要放入磁头套，最后放入裂解/结合液，之后按下 START 键，提取开始，提取时间约 25min。

注意：板子 A1（缺一角）应与提取板中的 A1 位置相同。

仪器提示提取结束，按 STOP 键结束，并按<>键取出各块板，将 EB 板核酸备用，其余板尽快弃掉，并防止污染环境。关闭机器电源。核酸提取应在室温（20～30 $^{\circ}$ C）条件下进行。如下图所示：



3.2.2.5 质量监控：每次提取完成后，观察每孔中的溶液，磁珠应全部释放添加磁珠位置，EB 中的溶液不再呈现半球状，表明仪器正常工作。其他板孔中可能会残留微量磁珠，如果发现板孔中出现较多磁珠，应上报仪器负责人进行检查。

3.2.2.6 核酸保存：待检脾混悬液、血液及阴阳性对照提取制备的 DNA 模板，立即使用或-20℃保存备用。

3.3 荧光 PCR 反应

3.3.1 配液分装

在灭菌的 1.5mL 离心管中制备 PCR 反应混合液，根据被检样品的数量，可准备比实际样品多一份的反应液，将液体按 22μL/管分装。

3.3.2 加样

每管分别加入 3μL 样品 DNA 模板或对照提取物，盖紧管盖后 500rpm 离心 30s，确保 PCR 反应密闭进行。

3.3.3 上机反应

将 PCR 管放入荧光 PCR 检测仪内，记录 PCR 管摆放顺序。设置探针类型，荧光报告基团为 FAM，淬灭基团均为 MGB。反应程序为： 95℃ 3min；扩增条件为 95℃ 15s，52℃ 10s，60℃ 35s，40 个循环。

3.3.4 结果分析条件设定

阈值设定原则：阈值线超过阴性对照扩增曲线的最高点，且相交于阳性对照扩增曲线进入指数增长期的拐点，或根据仪器噪声情况进行调整。每个样品反应管内的荧光信号到达设定的域值时所经历的循环数即为Ct值。

3.3.5 结果描述及判定

当阳性对照Ct 值 ≤ 30.0 且出现典型扩增曲线，阴性对照无Ct 值无扩增曲线时，实验成立。当被检样品出现典型的扩增曲线且Ct 值 ≤ 38.0 时为非洲猪瘟病毒阳性，无Ct 值为非洲猪瘟病毒阴性；对于Ct 值 > 38.0 的样品，应重检，Ct 值仍 > 38.0 的样品判为阴性，Ct 值 ≤ 38.0 的样品判为阳性。

非洲猪瘟病毒核酸检测质量控制程序

1. 目的

为保障非洲猪瘟病毒核酸检测结果的准确、可靠，制订本质量控制程序，适用于各级动物疫病防控机构、科研院所和诊断试剂研发企业等相关实验室对非洲猪瘟病毒核酸检测过程的评价和质量控制。

2. 适用范围

本质量控制程序适用于非洲猪瘟病毒核酸检测方法与检测试剂的评价、检测能力验证和检测过程的质量控制。

3. 标准样品

本标准样品主要以含非洲猪瘟病毒 VP72 基因的质粒 DNA 为原料，采用荧光 PCR 方法检测后，加入适量的稳定剂制备而成。核酸量约为 10^8 copies/mL，其荧光 PCR 检测后 Ct 值为 22-26；将阳性标准样品 1 : 100 倍稀释，再进行荧光 PCR 检测，Ct 值为 28-33。

规格：0.5ml/管，2 管/盒

状态：液体

4. 程序

4.1 标准样品的原液和 1 : 100 倍稀释

将冷冻保存的标准样品放置于室温（20℃～25℃）条件下，自然融解，待其完全融解后，上下颠倒 3 次混匀后，6000rpm 瞬时离心，开盖吸取所需体积的标准样品，依据 DNA 提取试剂盒说明提取 DNA；同时将阳性标准样品利用 PBS（0.01M, pH=7.2）作 1 : 100 倍稀释，提取 DNA；将提取的 DNA 进行荧光 PCR 检测。样品解冻后，2-8℃暂存不超过 3 天，剩余样品可小量分装后保存于-20℃，但应避免再次反复冻融。

4.2 检测方法

本标准物质可用于实时荧光定量 PCR、普通 PCR 及其他核酸检测方法的定量或定性分析。

4.3 特性值

经非洲猪瘟病毒荧光 PCR 检测，其结果应为核酸阳性，荧光 PCR 检测 Ct 位于 22-26；将阳性标准样品 1 : 100 倍稀释后，再进行荧光 PCR 检测，Ct 值约为 28-33，且均出现典型的扩增曲线；普通 PCR 出现预期大小特异性条带，且测序结果与参考序列一致。

4.4 溯源性

本标准样品制备所用的非洲猪瘟病毒核酸为 VP72 编码基因序列，与毒株 ASFV Georgia 2007 基因序列同源性为 100%。

本标准样品内含少量稳定剂，和动物样本相比在检测中表现一致，无明显的基质效应。

5. 其他信息

本标准样品无生物传染性，仅用于实验室检测使用。

6. 标准样品来源

中国动物疫病预防控制中心。北京市大兴区天贵大街 17 号，电话，010-59198913，邮编：101113。