



团 体 标 准

T/GDAAV 0511—2025

非洲猪瘟病毒超快速荧光 PCR 检测 技术规范

Technical Specification for Ultra-fast Real-time PCR Detection of
African Swine Fever Virus

2025-09-26 发布

2025-10-01 实施

广东省畜牧兽医学会 发布

目 次

前言 II

1 范围 1

2 规范性引用文件 1

3 术语和定义 1

 3.1 超快速荧光 PCR 1

4 缩略语 1

5 试剂和耗材 2

 5.1 试剂 2

 5.2 引物和探针 2

6 仪器设备 2

7 样品采集与处理 2

 7.1 生物安全措施..... 2

 7.2 采样工具 2

 7.3 样品采集 2

 7.4 样品运输 3

 7.5 样品前处理 3

8 操作方法 3

 8.1 样品核酸提取..... 3

 8.2 反应体系的配制..... 3

 8.3 超快荧光 PCR 反应 4

9 质量控制与结果判定 4

 9.1 阈值设定 5

 9.2 质控标准 5

 9.3 结果描述及判定 5

附录 A（规范性） 溶液配制..... 6

附录 B（资料性） 非洲猪瘟病毒 pUC57-*B646L* 重组质粒和内参的制备..... 7

附录 C（规范性） 非洲猪瘟病毒和内参引物、探针的名称、序列..... 9

附录 D（资料性） DNA 提取方法（磁珠法） 10

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。

本文件由东莞市动物疫病预防控制中心、广东省畜牧兽医学会提出。

本文件由广东省畜牧兽医学会归口。

主要起草单位：东莞市动物疫病预防控制中心、超快生物技术（广州）有限公司、广州国家实验室、广东省动物疫病预防控制中心、深圳市动植物疫病预防控制中心、深圳海关动植物检验检疫技术中心、珠海市动物疫病预防控制中心、海南省动物疫病预防控制中心、广西壮族自治区动物疫病预防控制中心、广州市疾病预防控制中心、肇庆市动物疫病预防控制中心、东莞市横沥镇农业技术服务中心、东莞市东坑镇农业技术服务中心、华润五丰肉类食品（河南）有限公司深圳分公司、东莞市洪梅镇农业技术服务中心、东莞鹏佑生物科技有限公司。

主要起草人：张险朋、管知深、卢受昇、徐 强、徐振娜、李秋剑、阮周曦、黄 铮、迟庆安、韦正吉、刘雪怡、李漪舟、邝筱珊、曹 蓝、周美芳、赖笑娴、周柱辉、卢伟昌、谢柱彬、洪伟彬、王婉君、林仰孝、李小军、张远龙、李 敏、叶毅飞、曾瀚熙、钟群芳、谭铭光、林梦哲、黄超杰。

非洲猪瘟病毒超快速荧光 PCR 检测技术规范

1 范围

本文件描述了非洲猪瘟病毒超快速荧光PCR检测方法。

本文件适用于猪组织样品、猪全血、动物产品和环境样品中非洲猪瘟病毒的检测。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过本文件的规范性引用而成为本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅注日期的版本适用于本文件。凡是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

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

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

下列术语和定义适用于本文件。

3.1 超快速荧光 PCR ultra-fast Real-time PCR

一种基于快速温控模块技术（升降温速率40℃/s以上），结合快速启动酶及高特异性预混反应体系所构建的高效核酸扩增检测方法，可在8min~15min内完成45个循环反应。

4 缩略语

下列缩略语适合本文件。

PCR: 聚合酶链式反应 (Polymerase Chain Reaction)

Ct值: 阈值循环数 (Cycle threshold)

DNA: 脱氧核糖核酸 (Deoxyribonucleic Acid)

F: 上游引物 (Forward primer)

R: 下游引物 (Reverse primer)

P: 探针 (Probe)

BHQ2: 黑洞淬灭剂2 (Black Hole Quencher 2)

FAM: 6-羧基荧光素 (6-Carboxyfluorescein)

MGB: Minor Groove Binder Quencher淬灭基团

ROX: 羧基-X-罗丹明 (Carboxy-X-Rhodamine)

PBS: 磷酸盐缓冲液 (Phosphate buffer solution)

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

EDTA: 乙二胺四乙酸 (Ethylenediaminetetraacetic acid)

5 试剂和耗材

5.1 试剂

- 5.1.1 试验用水符合 GB/T 6682 二级水的要求。
- 5.1.2 PBS (pH 7.2) 液配制方法见附录 A 中 A.1, 试剂药品采用分析纯。
- 5.1.3 阴性对照为灭菌生理盐水, 配制方法按照附录 A 中 A.2。
- 5.1.4 50%甘油-PBS 保存液, 配制方法按照附录 A 中 A.3。
- 5.1.5 阳性对照为非洲猪瘟 pUC57-B646L 重组质粒, 制备方法见附录 B 中 B.1。
- 5.1.6 内参为健康猪肝脏(不含非洲猪瘟病毒), 制备方法按照附录 B 中 B.3。
- 5.1.7 5×PCR buffer (含 Mg^{2+})。
- 5.1.8 dNTP。
- 5.1.9 快速启动聚合酶。
- 5.1.10 DNA 提取试剂盒。
- 5.1.11 超快速荧光 PCR 反应板。
- 5.1.12 青霉素, 工作浓度为 1000IU/mL。
- 5.1.13 链霉素, 工作浓度为 1000μg/mL。

5.2 引物和探针

超快速荧光 PCR 扩增(非洲猪瘟病毒和内参)上、下游引物和探针序列参见附录 C.1。

6 仪器设备

- 6.1 超快速荧光 PCR 仪。
- 6.2 移液器(量程: 0.5μL~10μL、10μL~100μL、100μL~1000μL)。
- 6.3 生物样品均质器。
- 6.4 冷冻高速离心机。
- 6.5 II 级生物安全柜。
- 6.6 高压灭菌器。
- 6.7 pH 计。

7 样品采集与处理

7.1 生物安全措施

采样及样品前处理过程须戴一次性手套, 样品不得交叉污染。实验室生物安全符合 GB 19489 规定。

7.2 采样工具

解剖刀、剪刀、镊子、棉拭子、离心管(2mL、10mL)、研磨管等无菌处理, 真空采血管(含 EDTA 抗凝剂)。

7.3 样品采集

7.3.1 口、鼻拭子采集

用棉拭子在口腔或鼻腔转动来回刮 2 次~3 次,采集口腔或鼻腔的分泌物,随后立即将棉拭子放入装有 1.0mL50%甘油-PBS 液的保存管中,剪去露出部分,盖紧离心管盖,密封后冷藏保存。

7.3.2 环境拭子采集

将棉拭子在物体表面来回涂抹 2 次~3 次,每支棉拭子分别放入装有 1mL50%甘油-PBS 液的保存管中,剪去露出部分,盖紧离心管盖,密封后冷藏保存。

7.3.3 全血样品采集

使用真空采血管(含 EDTA 抗凝剂),采集猪血 5mL,密封后冷藏保存。

7.3.4 组织样品采集

采集猪组织样品,首选脾脏,其次为扁桃体、淋巴结、肾脏、骨髓等。脾脏、肾脏采集约 3cm×3cm 大小,扁桃体整体采集,采集出血严重的淋巴结,骨髓采集长度约 3cm,将采集的样品放入 50%甘油-PBS 液的保存管中。

7.4 样品运输

样品运输应符合 NY/T 541 的规定。

7.5 样品前处理

7.5.1 口、鼻拭子样品处理

震荡混匀后取 200 μ L 液体,立即进行核酸提取或冷冻保存。

7.5.2 环境拭子样品处理

震荡混匀后取 200 μ L 液体,立即进行核酸提取或冷冻保存。

7.5.3 全血样品处理

摇匀后取 200 μ L 液体,立即进行核酸提取或冷冻保存。

7.5.4 组织样品处理

无菌操作取适量组织样品放入 2mL 研磨管中,加入 1mL PBS 液(含工作浓度 1000IU/mL 青霉素和 1000 μ g/mL 的链霉素),用均质器 7000r/min 进行 3 次匀浆,每次 20s、间隔 20s,制备成组织匀浆液。2000r/min 离心处理 10min,取上清 200 μ L,立即进行核酸提取或冷冻保存。

8 操作方法

8.1 样品核酸提取

样品前处理后,除了猪组织和全血样品以外,其他类型样品均加入内参参与提取。在提取口、鼻拭子和环境拭子样品核酸时,取处理后的样品 160 μ L,加入内参 40 μ L。DNA 提取方法见附录 D,也可以采用经过验证的等效核酸提取方法。

8.2 反应体系的配制

每个样品检测反应体系配制见表1，总体积为50μL，配制完毕分装时应尽量避免产生气泡，加入超快速荧光PCR反应板中。反应体系试剂可采用经过验证的等效果商品化试剂盒。

表1 ASFV 超快速荧光 PCR 反应体系配制表

反应体系组分		用量 (μL)
5×PCR Buffer (含Mg ²⁺)		10.00
快速启动聚合酶 (5U/μL)		4.00
dNTP (25mmol/L)		0.80
ASFV	F1 (10μmol/L)	5.00
	R1 (10μmol/L)	5.00
	P1 (10μmol/L)	2.50
内参	F2 (10μmol/L)	2.00
	R2 (10μmol/L)	2.00
	P2 (10μmol/L)	1.00
模板		5.00
ddH ₂ O		12.70
合计		50.00

8.3 超快速荧光 PCR 反应

8.3.1 上机

将 8.2 中加样后的反应板放入超快速荧光 PCR 仪中，记录样品放置顺序。

8.3.2 反应条件

95℃预变性 1min；95℃变性 1s，60℃退火延伸（收集荧光信号）6s（升降温速率 40℃/s），45 个循环。

8.3.3 荧光通道设定

非洲猪瘟病毒选择 FAM 通道；内参选择 ROX 通道。

9 质控标准与结果判定

9.1 阈值设定

阈值由超快速荧光 PCR 仪自动分析并设定。

9.2 质控标准

阳性对照 FAM 通道（非洲猪瘟病毒）和 ROX 通道（内参）的 Ct 值 ≤ 30.0 ，并出现典型的“S”型扩增曲线；阴性对照 FAM 通道无 Ct 值或无典型扩增曲线，ROX 通道 Ct 值 ≤ 30.0 。阳性对照和阴性对照同时成立可判定试验有效，否则试验无效。

9.3 结果描述及判定

9.3.1 FAM 通道无 Ct 值或无典型“S”型扩增曲线，ROX 通道 Ct 值 ≤ 30.0 判为非洲猪瘟病毒核酸阴性。

9.3.2 FAM 通道出现典型“S”型扩增曲线，且 Ct 值 ≤ 37 ，Cy5 通道 Ct 值 ≤ 30.0 判定非洲猪瘟病毒核酸阳性。

9.3.3 FAM 通道 $37 < \text{Ct 值} < 45$ 且有典型“S”型扩增曲线，ROX 通道 Ct 值 ≤ 30.0 ，判为可疑。结果为可疑时应用提取的核酸重新进行检测，若 FAM 通道无特异性扩增曲线或无 Ct 值或等于 45 则为非洲猪瘟病毒核酸阴性，若 FAM 通道 Ct 值小于 45 且有典型“S”型扩增曲线则判为非洲猪瘟病毒核酸阳性。

9.3.4 如 ROX 通道 Ct 值 > 30.0 或无 Ct 值，则样品应重新检测，重测如 ROX 通道 Ct 值 ≤ 30.0 则结果可采用。

附 录 A
(规范性)
溶液配制

A.1 0.01mol/L PBS(pH7.2)溶液的配制

称取磷酸氢二钠 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) 3.0g, 磷酸氢二钾 (K_2HPO_4) 0.2g, 氯化钠 (NaCl) 8g, 加二级水定容至1000 mL, 完全溶解后用3 mol/L NaOH调pH为7.2经121℃ ($\pm 2^\circ\text{C}$), 高压灭菌15min, 室温保存。

A.2 生理盐水的配制及灭菌

称取0.9g氯化钠, 加入蒸馏水溶解, 定容至100ml, 121℃ ($\pm 2^\circ\text{C}$), 高压灭菌15min, 常温保存备用。

A.3 50%甘油-PBS 保存液的配制

0.01mol/L PBS 溶液与甘油 1:1 混合, 调 pH 至 7.2, 分装成小瓶。经 121℃ ($\pm 2^\circ\text{C}$) 高压灭菌 15min, 室温或 4℃ 保存。

附 录 B

(资料性)

非洲猪瘟病毒 pUC57-*B646L* 重组质粒和内参的制备B.1 非洲猪瘟病毒 pUC57-*B646L* 重组质粒的制备

扩增非洲猪瘟病毒 *B646L* 基因序列片段, 将扩增产物进行胶回收和双酶切后, 连接至 pUC57 载体上, 再转化至 DH5 α 大肠杆菌感受态细胞中, 得到重组质粒, 提取重组质粒进行 PCR 检测和测序, 鉴定为 pUC57-*B646L* 重组质粒, 质粒浓度约为 7.85×10^9 copies/ μ L, 将其稀释为工作浓度约 7.85×10^7 copies/ μ L。

B.2 非洲猪瘟病毒 *B646L* 基因序列 (NCBI 序列号: NC_001659.2)

ATGGCATCAGGAGGAGCTTTTGTCTTATTGCTAACGATGGGAAGGCCGACAAGATTATATTGGCCCAAGACTTGCTTAATAGCAGGATTCTAACATTAATAATGTGAACAAAAAGTTATGGGAAACCCGACCCCGAACCACCTTTGAGTCAAATCGAAGAAACACATTTGGTTCATTTAATGCGCATTTTAAGCCTTATGTTCCAGTAGGGTTTGAATACAATAAAGTACGCCCGCATACGGGTACCCACCTTGGGAAA
CAAGCTTACCTTTGGTATTTCCCACTACGAGACTTTTCCATGATATGGTGGGCCACCATATATTGGGTGCATGTCATTTCGTCCTGGCAGGATGCTCCGATTCAGGGCAGGCCAGATGGGGGCCATGGTCAGCTTCAAACGTTTCCTCGCAACGGATATGACTGGGACAACCA
ACACCTTTAGAGGGCGCCGTTTACACGCTTGTAGATCCCTTTGGAAGACCTATTGTACCCGGCACAAGAATGCGTACCGAACTTGGT
TTACTACTGCGAATACCCCGAGAACGACTTTATGAAAACGTAAGATTCGATGTAAATGGAATTCCTGGACGAATATAGTTTCGGATG
TCACAACGCTTGTGCGCAAATTTTGCATCCAGGGGATAAAATGACTGGATATAAGCACTTGGTCGGCCAGGAGGTATCGGTGGAGGGA
ACTAGTGGCCCTCTCCTATGCAACATTCATGATTTGCACAAGCCGACCAAAGCAAACCTATTCTTACCGATGAAAATGATACGACGCG
AACGTGCAGCCATACCAACCCGAAATTCCTTTCACAACATTTTCCGAGAATCTCACAATATCCAAACAGCAGGTAAACAAGATATTA
CTCCTATTACGACGCAACGTATCTGGACATAAGACGTAATGTTTATTACAGCTGTAATGGACCTCAAACCCCTAAATACTATCAGCCC
CCTCTTGCCTCTGGATTAAGCTGCGCTTTTGGTTTAAACGAGAACGTGAACCTTGTCTATTCCCTCGGTATCCATTCCCTTCGGCAGCG
CTTTATCACCATAAAGCTTGCATCGCAAAAGGATTGGTGAATGAATTTCTGGACTTTTATACGCCAGTCGCGTTTATACCTGGAC
GCCCCAGTAGACGCAATATACGCTTTAAACCATGGTTTATCCCAGGAGTCATTAATGAAATCTCGCTCAGCAATAATGAACTTTACATC
AATAACCTGTTTGTAAACCCCTGAAATACACAACCTTTTGTAAACCGGTTTCGATTTTCCCTGATACGTGTCCATAAAACGCAGGTGAC
CCACACCAACAATAACCACACGATGAAAACTAATGCTGCTCTTAAATGGCCATTGAATATATGTTTATAGGATTAACCTACCT
GGAACATCTCCGATCAAAATCCTCATCAACACCGAGATTGGCACAAGTTTCGGACATGTTGTTAACGCCATTATGCAGCCTACTCACCAC
GCAGAGATAAGCTTTCAGGATAGAGATACAGCTCTTCCAGACGCATGTTTCATCTATATCGGATATTAGCCCGTTACGTATCCGATCAC
ATTACCTATTATTAACCAATTTCCGTAACGTGCTCATGGTATCAATCTTATCGATAAGTTTCCATCAAAGTTCTGCAGCTCTTACATAC
CCTTCCACTACGGAGGCAATGCAATTAACCCCGATGATCCGGGTGCGATGATGATTACCTTTGCTTTGAAGCCACGGGAGGAATAC
CAACCCAGTGGTCATATTAACGTATCCAGAGCAAGAGAATTTTATATTAGTTGGGACACGGATTACGTGGGTCTATCACTACGGCTGA
TCTTGTGGTATCGGCATCTGCTATTAACCTTCTTCTTCTTTCAGAACGGTTCAGCTGTGCTGCGTTACAGTACCTAA

B.3 内参的制备

取绿豆大小的健康猪肝脏 (不含非洲猪瘟病毒) (约 0.2g) 置于研磨管内, 加入 1 mL PBS 溶液匀浆 (速度 7 200 r/min; 匀浆 4 次, 每次 15 s, 每次间隔 30 s), 离心后备用。

B.4 猪 *GAPDH* 基因序列 (NCBI 序列号: NM_001206359.1)

AGGGTCATCATCTCTGCCCCTTCTGCCGATGCCCCATGTTTGTGATGGGCGTGAACCATGAGAAGTATGACAACCTCCCTCAAGA
TCGTCAGGTGAGCTTGGTGGAGGGGGCGGGGGGGTTCATGCTGCGCGGACCCGTGGACCTGCCCGTTGACTTGCCTCCCTCGTTTCA

GCAATGCCTCCTGCACCACCAACTGCTTGGCACCCCTGGCCAAGGTCATCCATGACCACTTCGGCATCGTGGAGGGACTCATGGTAGGT
GATGGGGACTGAGCCAGAGCACGTTCTGTCTCACCCAGGACTGGATCCTTCCCCTCCCAGAGCTCAGCCCGGAGCTGTAGGGGCTCAG
GACATCAGAGGAGGGGTAGGGTGGGGTGGTTCCAAGCACTGTGTCCCTTAGTTCTTCCCACCTTCAACACGCCGGCCATGTACGTGGCC
ATCCAGGCCGTGCTGTCCCTGTACGCCTCTGGCCGCACCACTGGCATTGTATGGACTCTGGGGATGGGGTCACCCACACGGTGCCCAT
CTACGAGGGGTACGCCCTGCCCCACGCCATCCTGCGTCTGGACCTGGCTGGCCGGGACCTGACCGACTACCTCATGAAGATCCTCACGG
AGCGGGGCTACAGCTTCACCACCACGGCCGAGCGGGAGATCGTGCGGGACATCAAGGAGAAGCTCTGCTACGTCCCTGGACTTCGAG
CAGGAGATGGCCACCGCCGCGTCCTCCTCCTCCCTGGAGAAGAGCTACGAGCTGCCCGACGGCCAGGTCATCACCATCGGCAACGAGCG
CTTCCGGTGTCCAGAGGCGCTCTTCCAGCCCTCCTTCTTGGGTAGGTGTCGGGCAGCGCGGCCTGCCTGGGGGGGGCCGGGGGCTCAT
CCCCTTGACGGGGGACCGCTAAGGGGGCGCTCTGTGGCCTCTCAGGCATGGAGTCCTGCGGCATCCACGAGACCACCTTCAACTCGA
TCATGAAGTGCGACGTGGACATCAGGAAGGACCTCTACGCCAACACGGTGCTGTCTGGCGGGACCACCATGTACCCCGGCATCGCCGAC
AGGATGCAGAAGGAGATCACGGCCCTGGCGCCCAGCACCATGAAGATCAAGGTGAGTCGGGTGGCCGTG

附 录 C
(规范性)

非洲猪瘟病毒和内参引物、探针的名称、序列

C.1 非洲猪瘟病毒和内参引物、探针的名称、序列

表 C.1 列出了 ASFV 超快速荧光 PCR 引物、探针信息。

表 C.1 非洲猪瘟病毒和内参引物、探针的名称、序列

名称	序列（5’—3’）
ASFV-F	GGCAATGCRATTAACCC
ASFV-R	CGTGGCTTCAAAGCAAAGT
ASFV-P	FAM-TCCGGGTGCGATGATGATTACCTT-MGB
GAPDH-F	GTTTGTGATGGGCGTGAACC
GAPDH-R	CACCAAGCTCACCTGACGAT
GAPDH-P	ROX-AAGTATGACAACTCCCTCAAG-BHQ2

附 录 D

(资料性)

DNA 提取方法 (磁珠法)

- D.1 取阳性对照、阴性对照和经过处理的样品200 μ L, 直接加入装有715 μ L裂解液管中, 漩涡混匀5s, 室温静置10min使样品充分裂解, 转移离心管至磁力架上, 静置30s, 磁珠完全吸附后吸弃上清液, 将离心管从磁力架上取下。
- D.2 加洗涤液700 μ L至裂解液管中, 振荡混匀30s, 转移离心管至磁力架上, 静置30s, 磁珠完全吸附后, 吸取上清液并弃除, 将离心管从磁力架上取下。
- D.3 短暂离心收集管壁上的液滴, 转移离心管至磁力架上, 磁珠完全吸附后, 吸取上清液并弃除。
- D.4 打开离心管盖, 室温干燥3min晾干磁珠, 将离心管从磁力架上取下。
- D.5 加洗脱液100 μ L至裂解液管中, 振荡混匀, 转移裂解液管至磁力架上, 静置1min, 磁珠完全吸附后小心将DNA溶液转移至一个新离心管中, 应尽快用于下游试验, 如不能立即使用, 应置于-20℃储存。
-