ICS 11.220
CCS B 41

SN

# 中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 5336—2020

# 猪瘟病毒及非洲猪瘟病毒检测 微流控芯片法

**Detection of classical swine fever virus and african swine fever virus ——Microfluidic chip method**

以正式出版文本为准

2020-12-30 发布　　2021-07-01 实施

中华人民共和国海关总署　发布

以正式出版文本为准

# 前　言

本文件按照 GB/T 1.1—2020 规则起草。

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。

本文件由中华人民共和国海关总署提出并归口。

本文件主要起草单位：中华人民共和国上海海关、上海速芯生物科技有限公司、中华人民共和国天津海关、中华人民共和国南京海关、中华人民共和国青岛海关、宁波爱基因科技有限公司。

本文件主要起草人：薛俊欣、方雪恩、李健、董志珍、姜焱、蔡一村、孔继烈、岳志芹、卢先东、刘艳红。

以正式出版文本为准

以正式出版文本为准

# 猪瘟病毒及非洲猪瘟病毒检测 微流控芯片法

## 1 范围

本文件规定了猪瘟病毒及非洲猪瘟病毒的微流控芯片检测方法。

本文件适用于猪瘟病毒及非洲猪瘟病毒的检测。对于不能通过临床症状区分的疑似猪瘟病毒或非洲猪瘟病毒感染病例的样品，可通过本标准规定的方法进行鉴别检测。

## 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 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 16551 猪瘟诊断技术

GB/T 18648 非洲猪瘟诊断技术

GB 19489 实验室生物安全通用要求

GB/T 27401 实验室质量控制规范 动物检疫

## 3 术语、定义和缩略语

### 3.1 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1.1

**微流控 microfluidics**

微流控是使用微管道 (尺寸为数十到数百微米) 处理或操纵微小流体的系统所涉及的科学和技术，是涉及化学、流体物理、微电子、新材料、生物学和生物医学工程的新兴交叉学科。

3.1.2

**微流控芯片技术 microfluidic chip technology**

把生物、化学、医学分析过程中的样品制备、反应、分离、检测等基本操作单元集成到一块微米尺寸的芯片上，自动完成分析全过程的技术。

### 3.2 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）

Bst：嗜热脂肪芽孢杆菌（bacillus stearothermophilus）

CSFV：猪瘟病毒（classical swine fever virus）

DNA：脱氧核糖核酸（deoxyribonucleic acid）

EDTA：乙二胺四乙酸（ethylenediaminetetraacetic acid）

FEN：结构特异性核酸内切酶（flap structure-specific endonuclease）

以正式出版文本为准

RNA：核糖核酸（ribonucleic acid）
SDS：十二烷基硫酸钠（sodium dodecyl sulfate）
Tris-HCl：三羟甲基氨基甲烷-盐酸（tris（hydroxymethyl）aminomethane-hydrochloric acid）
Tt：时间阈值（time threshold）

## 4 原理

针对猪瘟病毒（CSFV）的5`端非编码区和非洲猪瘟病毒（ASFV）的VP72基因的核酸序列设计引物，并将其分别固定在微流控芯片的相应位置后，对微流控芯片进行封装，将提取的核酸模板与反应液（包含SYBR Green荧光染料）混合后，加到封装好的微流控芯片中，之后放入到带有离心功能、恒温功能及实时荧光检测一体化的微流控芯片检测仪中，利用离心力驱动样品进入微流控芯片反应孔，进行反转录与恒温扩增。若样本中含有目的片段而得到恒温扩增，扩增产物将与荧光物质进行结合，通过荧光检测仪实时捕获荧光信号，直观反应扩增产物的产生，根据实时荧光信号的出现时间、强度和位置，判断样本中是否含有CSFV、ASFV。

## 5 试剂和材料

5.1 试剂组分和存放条件见附录A。除非另有说明，在检测中所用的试剂均为分析纯，实验室用水应符合GB/T 6682的要求。所有试剂均用无核酸酶污染的容器分装。

5.2 阴性对照、阳性对照和内参对照的成分如下：

a）阴性对照：无RNase水；

b）阳性对照：从含阳性样本中提取的核酸，或人工合成的含有目标核酸序列的DNA片段；

c）内参对照：包括扩增内参基因片段的引物（非扩增CSFV和ASFV核酸片段）和人工合成的内参质粒（非ASFV和CSFV的基因片段），其中引物固定于微流控芯片反应孔中，内参质粒存在于反应液中。

5.3 反应液：20 mmol/L Tris-HCl（pH 8.8），10 mmol/L KCl，10 mmol/L $(NH_4)_2SO_4$，8 mmol/L $MgSO_4$，0.1%吐温-20，1.4 mmol/L dNTPs，8000 U/mL Bst DNA聚合酶，0.5 mg/mL FEN，50 μmol/L SYBR Green荧光染料，内参质粒（400 copies/μL）。

5.4 核酸提取试剂：可同时提取DNA和RNA，包含蛋白酶（20 mg/mL）、磁珠（50 mg/mL）、裂解液、异丙醇、洗液一、洗液二、洗液三和洗脱液，试剂配制方法见附录B。也可以使用其他等效核酸提取试剂或者将DNA或RNA分别提取的试剂。

5.5 高温反转录酶：5000 U/ mL。

5.6 RNase抑制剂：40 U/μL。

5.7 引物：猪瘟病毒引物与非洲猪瘟病毒引物见附录A。

5.8 微流控芯片：5 μL / 反应池，8×4离心微流控芯片。微流控芯片制作参见附录C，也可以根据实际需求选择其他类型的等效商品化的微流控芯片。

5.9 耗材：封口膜、无RNase吸头（10 μL、100 μL、1000 μL）、无RNase离心管（1.5 mL、2 mL）。

## 6 器材和设备

6.1 微流控芯片检测仪。

6.2 纯水仪。

6.3 恒温干燥箱。

6.4 漩涡振荡仪。

以正式出版文本为准

6.5 微量点样仪。
6.6 低温冷冻离心机。
6.7 低温冰箱。
6.8 移液器（0.5 μL、10 μL、100 μL、1000 μL）。

## 7 生物安全措施

7.1 实验室设备、设施及废弃物处理等要求应符合 GB 19489 的规定。
7.2 微流控芯片的检测过程应符合国家有关生物安全规定。
7.3 检验过程中防止交叉污染的措施应符合 GB/T 27401 的规定。

## 8 试验方法

### 8.1 样品

所有测试样品的采集和样品制备应按照 GB/T 16551、GB/T 18648 的规定执行。

### 8.2 核酸提取

#### 8.2.1 核酸提取试剂

CSFV 属于 RNA 病毒，ASFV 属于 DNA 病毒，本文件以常规核酸提取试剂（可同时提取 DNA 和 RNA）为例说明核酸提取步骤，也可采用 GB/T 16551、GB/T 18648 所规定的提取方法。为了确保核酸提取的准确可靠，每个测试样品提取时应做两个重复，在后续检测中两份核酸以同样的操作步骤实施检测。

#### 8.2.2 核酸提取纯化准备

裂解液如有沉淀，应于 56 ℃温浴至沉淀完全溶解后使用。
将蛋白酶充分混匀后，按照每管 20 μL 分装至各离心管中。

#### 8.2.3 核酸提取纯化

核酸的提取纯化步骤如下：
a）向上述已加蛋白酶的离心管中加入 200 μL 制备好的样本，混匀；再加入 400 μL 裂解液，漩涡振荡 10 s，56 ℃孵育 10 min；2 ℃～8 ℃ 8 000 g 离心 1 min，取上清待用；
b）加入 300 μL 异丙醇和 2 μL 磁珠，上下颠倒离心管 10 次，使管内磁珠分布均匀；
c）静置离心管 10 min，期间每隔 2 min 上下颠倒离心管 5 次，使管内磁珠分布均匀；
d）将离心管置于离心机上，2 ℃～8 ℃ 8 000 g 离心 1 min，用移液器吸去管内液体；
e）加入 500 μL 洗液一，用移液器枪头轻柔打散管壁磁珠，漩涡振荡 10 s，直至其分布均匀；
f）将离心管置于离心机上，2 ℃～8 ℃ 8 000 g 离心 1 min，用移液器吸去管内液体；
g）加入 500 μL 洗液二，用移液器枪头轻柔打散管壁磁珠，漩涡振荡 10 s，直至其分布均匀；
h）将离心管置于离心机上，2 ℃～8 ℃ 8 000 g 离心 1 min，用移液器吸去管内液体；
i）加入 500 μL 洗液三，用移液器枪头轻柔打散管壁磁珠，漩涡振荡 10 s，直至其分布均匀；
j）将离心管置于离心机上，2 ℃～8 ℃ 8 000 g 离心 1 min，用移液器吸去管内液体；
k）将离心管置于离心机上，2 ℃～8 ℃ 8 000 g 离心 30 s，用移液器吸去管内残余液体；
l）打开管盖，室温干燥 2 min。
m）加入 60 μL 洗脱液，用移液器枪头打散管壁磁珠，直至其分布均匀。56 ℃孵育 3 min；
n）将离心管置于离心机上，2 ℃～8 ℃ 10 000 g 离心 1 min，将收集到的 60 μL 上清液吸取至一

以正式出版文本为准

个无核酸酶的离心管中，即为纯化后的核酸溶液，作为待测的模板。

### 8.3 微流控芯片检测

#### 8.3.1 微流控芯片的制作

将各引物配制成浓度为 100 μmol/L 的储存液，分别吸取引物 OP1、OP2、FP、BP 储存液各 10 μL、10 μL、80 μL、80μL 于离心管中混合，再加入 1.66 mL 超纯水，涡动混匀 10 s，瞬离 5 s 后，即作为引物工作液，用于微流控芯片的引物包埋。微流控芯片的制作方法参见附录 C。

#### 8.3.2 反应体系

按表 1 配制 25 μL 反应体系。

**表 1 猪瘟病毒 / 非洲猪瘟病毒联检反应体系**

| 序号 | 组分名称 | 体积/μL |
|---|---|---|
| 1 | 反应液 | 10 |
| 2 | 高温反转录酶 | 0.1 |
| 3 | RNase 抑制剂 | 0.1 |
| 4 | 模板 | 14.8 |
| | 总反应体系 | 25 |

以正式出版文本为准

#### 8.3.3 加样与封片

将上述反应体系旋涡振荡混匀，瞬时离心，全部加入到微流控芯片加样孔中，用与芯片匹配的封口膜封住加样孔（参见附录 C）及透气孔，使用刮片赶走气泡，确保封口膜完全贴合。

#### 8.3.4 扩增与检测

上机：将上述封装好的芯片的凹处对准微流控芯片检测仪卡扣的凸处，水平彻底按下去即可。

程序设置：1 600 r/min 低速离心 10 s，4 600 r/min 高速离心 30 s。温度为 63.5 ℃，反应时间为 60 min。

运行：仪器运行后，待温度上升到设定温度，微流控芯片仪开始离心，离心结束后，仪器便开始连续采集荧光信号。

#### 8.3.5 对照组的设置

阴性对照、阳性对照、空白对照和内参对照的设置如下：

a）阴性对照：不含目标核酸序列，单独作为一个样本，加入到加样孔中；

b）阳性对照：含目的核酸序列，单独作为一个样本，加入到加样孔中；

c）空白对照：存在于微流控芯片反应孔中，不含有任何引物；

d）内参对照：扩增内参基因片段的引物存在于微流控芯片反应孔中，内参质粒存在于反应液中，用来质控是否可以正常进行恒温扩增反应。

### 8.4 微流控芯片结果判断

#### 8.4.1 微流控芯片检测仪阈值线设置

阈值线一般情况设置为 800，可根据实际情况进行调整，设定原则以阈值线刚好超过非典型 S 型扩增曲线的最高点，且时间阈值（Tt）值显示为 0。判定为阳性的 Tt 值设置为 45，仪器配套软件自

动分析结果。

#### 8.4.2 质量控制

内参对照孔和阳性对照孔在 Tt 值≤ 45 时，出现 S 型扩增曲线，且空白对照无扩增曲线，试验结果有效；否则试验无效。

#### 8.4.3 结果判定

判定标准如下：

a）阳性：检测孔出现 Tt ≤ 45，有明显扩增曲线，判定对应检测指标为阳性；

b）阴性：检测孔出现 Tt ＞ 45，无扩增曲线，判定对应检测指标为阴性。

以正式出版文本为准

# 附　录　A
（规范性）
微流控芯片检测试剂组分和存放条件以及引物序列

表 A.1　微流控芯片检测试剂组分和存放条件

| 序号 | 名称 | 存放条件 |
|---|---|---|
| 1 | 微流控芯片 | 室温 |
| 2 | 反应液 | −20℃ |
| 3 | 高温反转录酶 | −20℃ |
| 4 | RNase 抑制剂 | −20℃ |

表 A.2　猪瘟病毒引物序列

| 引物名称 | 序列 |
|---|---|
| CSFV-OP1 | AGGGACTAGCCGTAGTGG |
| CSFV-OP2 | AGGTCGTACCCCCATCAC |
| CSFV-FP | GGTGAGCTTCTGCTCATGTCGAAGCTCCCTGGGTGGTCTA |
| CSFVBP | CGAGATGCTATGTGGACGAGGGTGTGAGTTCACCCTAGCGA |

表 A.3　非洲猪瘟病毒引物序列

| 引物名称 | 序列 |
|---|---|
| ASFV-OP1 | GCTGTAATGGACCTCAAACC |
| ASFV-OP2 | AAAGTCCAGGAAATTCATTCA |
| ASFV-FP | TCTCGTTAAACCAAAAGCGCACCTAAATACTATCAGCCCCCT |
| ASFV-BP | CGTGAACCTTGCTATTCCCTCGCAAATCCTTTTGCGATGCA |

以正式出版文本为准

# 附 录 B
（规范性）
试剂配制

## B.1 裂解液

| | |
|---|---|
| 1 mol/L Tris-HCl（pH 8.0） | 10 mL |
| 0.5 mol/L EDTA（pH 8.0） | 10 mL |
| SDS | 0.50 g |
| 盐酸胍 | 47.77 g |
| 尿素 | 30.03 g |
| 吐温 -20 | 1 mL |
| 超纯水 | 加至 100 mL |

充分溶解，室温保存。

## B.2 洗液一

| | |
|---|---|
| 盐酸胍 | 40.12 g |
| 异丙醇 | 40 mL |
| 超纯水 | 加至 100 mL |

充分溶解，室温保存。

## B.3 洗液二

| | |
|---|---|
| NaCl | 0.58 g |
| 异丙醇 | 25 mL |
| 无水乙醇 | 25 mL |
| 超纯水 | 加至 100 mL |

充分溶解，室温保存。

## B.4 洗液三

| | |
|---|---|
| 无水乙醇 | 80 mL |
| 超纯水 | 加至 100 mL |

充分混匀，室温保存。

## B.5 洗脱液

| | |
|---|---|
| 1 mol/L Tris-HCl（pH 8.0） | 1 mL |
| 0.5 mol/L EDTA（pH 8.0） | 0.2 mL |
| 超纯水 | 加至 100 mL |

充分混匀，1.034 x $10^5$ Pa 高压蒸汽灭菌 10 min，室温保存。

以正式出版文本为准

# 附　录　C
（资料性）
微流控芯片的制作

采用微量点样仪，将各个核酸引物均匀的点布在微流控芯片上的特定位置区域，芯片反应孔和加样孔的布局示意图如图 C.1。微流控芯片每反应孔添加引物工作液 2 μL，将加好引物工作液的芯片置于 37 ℃恒温干燥箱干燥 30 min，确保彻底干燥后贴上封口膜密封芯片。

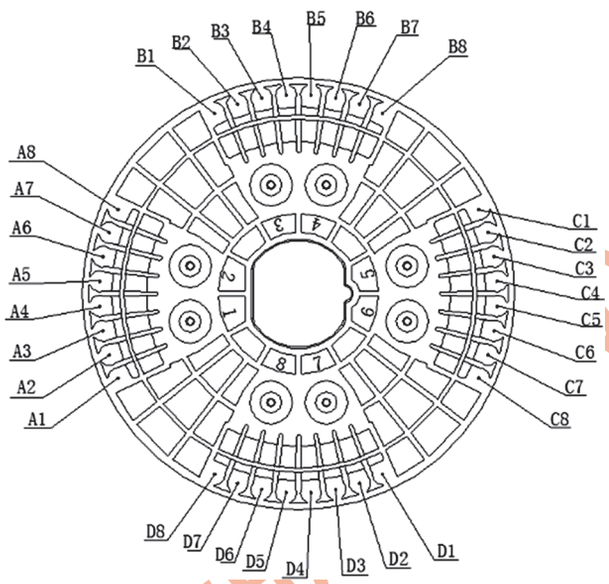


图 C.1　猪瘟病毒及非洲猪瘟病毒联检微流控芯片布局示意图

说明：

A1、A5、B1、B5、C1、C5、D1、D5——猪瘟病毒检测孔；

A2、A6、B2、B6、C2、C6、D2、D6——非洲猪瘟病毒检测孔；

A3、A7、B3、B7、C3、C7、D3、D7——内参对照孔；

A4、A8、B4、B8、C4、C8、D4、D8——空白对照孔。

以正式出版标准

以正式出版文本为准

以正式出版文本为准

中华人民共和国出入境检验检疫
行　业　标　准
**猪瘟病毒及非洲猪瘟病毒检测
微流控芯片法**
SN/T 5336—2020
*
中国海关出版社有限公司出版发行
北京市朝阳区东四环南路甲 1 号（100023）
编辑部：（010）65194242-7509
网址 www.customskb.com/book
中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷
*
开本 880×1230 1/16　印张 0.00　字数 00 千字
2021 年 6 月第一版　2021 年 6 月第一次印刷
印数 1—000
*
书号：000·000　定价 00.00 元

SN/T 5336-2020