

权 利 要 求 书

~~1、一种基于 POCKIT Micro 荧光 PCR 平台的牛羊细粒棘球蚴病检测的引物和探针，其特征在于，所述引物和探针包括：牛羊细粒棘球蚴病上游引物、牛羊细粒棘球蚴病下游引物和牛羊细粒棘球蚴病探针，其中，~~

~~所述牛羊细粒棘球蚴病上游引物的核苷酸序列如 SEQ ID NO.1 所示；所述牛羊细粒棘球蚴病下游引物的核苷酸序列如 SEQ ID NO.2 所示；所述牛羊细粒棘球蚴病探针如 SEQ ID NO.3 所示。~~

~~2、权利要求 1 所述的引物和探针在制备牛羊细粒棘球蚴病检测试剂盒方面的应用。~~

13、一种基于 POCKIT Micro 荧光 PCR 的牛羊细粒棘球蚴病的试剂盒，其特征在于，该试剂盒包括 DNA 模板、荧光定量 PCR 反应液、阳性对照品和阴性对照品；

所述荧光定量 PCR 反应液包括牛羊细粒棘球蚴病上游引物 3.5 μ L，牛羊细粒棘球蚴病下游引物 3.5 μ L，牛羊细粒棘球蚴病探针 1.5 μ L，Taq 酶 1.5 μ L，预混 buffer 25 μ L，去离子水 14 μ L，总量为 49 μ L，DNA 模板与荧光定量 PCR 反应液的总量为 50 μ L；Taq 酶的终浓度为 5U $\cdot\mu$ L⁻¹，牛羊细粒棘球蚴病上游引物和牛羊细粒棘球蚴病下游引物的终浓度均为 400nM，牛羊细粒棘球蚴病探针的终浓度为 250nM；

所述牛羊细粒棘球蚴病上游引物的核苷酸序列如 SEQ ID NO.1 所示；所述牛羊细粒棘球蚴病下游引物的核苷酸序列如 SEQ ID NO.2 所示；所述牛羊细粒棘球蚴病探针如 SEQ ID NO.3 所示。

~~4、根据权利要求 3 所述的基于 POCKIT Micro 荧光 PCR 的牛羊细粒棘球蚴病的试剂盒，其特征在于，Taq 酶的终浓度为 5U $\cdot\mu$ L⁻¹，牛羊细粒棘球蚴病上游引物和牛羊细粒棘球蚴病下游引物的终浓度均为 400nM，牛羊细粒棘球蚴病探针的终浓度为 250nM。~~

25、根据权利要求 13 所述的基于 POCKIT Micro 荧光 PCR 的牛羊细粒棘球蚴病的试剂盒，其特征在于，所述阳性对照品为：含有细粒棘球绦虫 ND1 基因片段的 pEASY-T1 载体质粒，所述 ND1 基因的核苷酸序列如 SEQ

ID NO.4 所示；所述阴性对照品为：无 ND1 基因片段的 pEASY-T1 空载体。

36、根据权利要求 25 所述的基于 POCKIT Micro 荧光 PCR 的牛羊细粒棘球蚴病的试剂盒，其特征在于，含有细粒棘球绦虫 ND1 基因片段的 pEASY-T1 载体质粒，由以下方法制备得到：

5 1) 利用牛羊细粒棘球蚴病上游引物和牛羊细粒棘球蚴病下游引物，以细粒棘球绦虫的基因组 DNA 为模板，进行 PCR 扩增获得目的基因的 PCR 扩增产物；

 2) 将 PCR 扩增产物克隆到 pEASY-T1 载体上，构建含有细粒棘球绦虫 ND1 基因片段的 pEASY-T1 载体质粒；

10 3) 抽提质粒，定量并稀释至 10^3 拷贝/ μ l，制备得到含有细粒棘球绦虫 ND1 基因片段的 pEASY-T1 载体质粒，即为阳性对照品。

~~7、权利要求 3 所述的试剂盒定性检测牛羊细粒棘球蚴病的方法，其特征在于，包括以下步骤：~~

15 ~~a) 采用 PetNAD 核酸快速提取试剂盒从待检测的标本中提取 DNA，用无菌去离子水调整 DNA 浓度为 $1.5\text{ng}/\mu\text{l}$ ，制备得到 DNA 提取液；~~

~~b) 以提取得到的 DNA 作为模板，加入到装有荧光定量 PCR 反应液的 PCR 管中，对照 PCR 管中分别加入等体积的阳性对照模板和阴性对照模板，将 PCR 管放置到 POCKIT Micro 荧光 PCR 仪中进行检测，42 分钟以后判读结果。~~

20