

权 利 要 求 书

~~1、一种检测猪蓝耳病毒经典毒株、高致病性变异毒株和 NADC-30 毒株的引物，用于 RT-PCR 反应，其特征在于，该引物包括上游引物和下游引物，所述上游引物和下游引物的核苷酸序列分别如 SEQ ID NO:1 和 SEQ ID NO:2 所示。~~

~~21、一种非诊断目的的检测猪蓝耳病毒经典毒株、高致病性变异毒株和 NADC-30 毒株的 RT-PCR 方法一种检测猪蓝耳病毒经典毒株、高致病性变异毒株和 NADC-30 毒株的 RT-PCR 方法，其特征在于，包括以下步骤：~~

以待检测样品的 RNA 为模板，反转录得到 cDNA，用检测猪蓝耳病毒经典毒株、高致病性变异毒株和 NADC-30 毒株的引物权利要求 1 中所述的引物，对待测样本进行 RT-PCR 扩增，用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物；扩增产物大小为 887 bp，则样本中含有或候选含有猪蓝耳病毒经典毒株；扩增产物大小为 797 bp，则样本中含有或候选含有高致病性变异毒株；扩增产物大小为 493 bp，则样本中含有或候选含有 NADC-30 毒株。

所述引物包括上游引物和下游引物，所述上游引物和下游引物的核苷酸序列分别如 SEQ ID NO:1 和 SEQ ID NO:2 所示；

所述 RT-PCR 扩增的反应体系如下：模板 cDNA 3 μL，Quick Taq HS DyeMix 10 μL，上游引物和下游引物各 0.6 μL，余下的由 ddH₂O 补足，总量为 20 μL；

所述 RT-PCR 扩增的反应体系条件如下：94℃预变性 2 min；94℃变性 30 s，55℃退火 30 s，68℃延伸 1 min，共 35 个循环；72℃延伸 8 min。

32、根据权利要求 21 所述的检测猪蓝耳病毒经典毒株、高致病性变异毒株和 NADC-30 毒株的 RT-PCR 方法，其特征在于，用购自宝生物工程（大连）有限公司的反转录试剂盒进行反转录，所述反转录的步骤为：将 RNA 模板 4 μL 与 1 号 5×Prime Script Buffer 4 μL、2 号 Prime Script RT Enzyme Mix 1 μL、4 号 Random 6 mers 2 μL 和 5 号 RNase Free dH₂O 9 μL 混匀，放入 PCR 仪上进行反转录。

43、根据权利要求 21 所述的检测猪蓝耳病毒经典毒株、高致病性变异

毒株和 NADC-30 毒株的 RT-PCR 方法，其特征在于，所述反转录的反应条件为：37℃ 15 min，85℃ 15 s，16℃ 10 min。

5 ~~5、根据权利要求 2 所述的检测猪蓝耳病毒经典毒株、高致病性变异毒株和 NADC 30 毒株的 RT-PCR 方法，其特征在于，所述 RT-PCR 扩增的反应体系如下：模板 cDNA 3 μL，Quick Taq HS DyeMix 10 μL，上游引物和下游引物各 0.6 μL，余下的由 ddH₂O 补足，总量为 20 μL。~~

10 ~~6、根据权利要求 2 所述的检测猪蓝耳病毒经典毒株、高致病性变异毒株和 NADC 30 毒株的 RT-PCR 方法，其特征在于，所述 RT-PCR 扩增的反应体系条件如下：94℃预变性 2 min；94℃变性 30 s，55℃退火 30 s，68℃延伸 1 min，共 35 个循环；72℃延伸 8 min。~~