

权 利 要 求 书

~~1、一种基于恒温隔绝式荧光 PCR 平台的牦牛轮状病毒检测的引物和探针，其特征在于，所述引物和探针包括：牦牛轮状病毒上游引物和牦牛轮状病毒下游引物和牦牛轮状病毒探针，其中，~~

~~所述牦牛轮状病毒上游引物的核苷酸序列如 SEQ ID NO.1 所示；所述牦牛轮状病毒下游引物的核苷酸序列如 SEQ ID NO.2 所示；所述牦牛轮状病毒探针的核苷酸序列如 SEQ ID NO.3 所示；牦牛轮状病毒探针的核苷酸序列的 5'端连接有 FAM 标记，3'端连接有非荧光淬灭基团和 BHQ。~~

~~2、权利要求 1 所述的引物和探针在制备牦牛轮状病毒检测试剂盒方面的应用。~~

13、一种基于恒温隔绝式荧光 PCR 平台的牦牛轮状病毒检测试剂盒，其特征在于，包括反应缓冲液、荧光定量 PCR 反应液冻干管、阳性对照品冻干管和阴性对照品冻干管；

所述荧光定量 PCR 反应液冻干管包括 Taq 酶 1 μ L、反转录酶 1.25 μ L、牦牛轮状病毒上游引物、牦牛轮状病毒下游引物各 3.5 μ L 和牦牛轮状病毒探针 0.25 μ L、dNTPs 4 μ L；所述 Taq 酶的终浓度为 5U $\cdot\mu$ L⁻¹，反转录酶的终浓度为 20U $\cdot\mu$ L⁻¹，牦牛轮状病毒上游引物和牦牛轮状病毒下游引物的终浓度均为 10 μ mol $\cdot\mu$ L⁻¹，牦牛轮状病毒探针的终浓度为 10 μ mol $\cdot\mu$ L⁻¹，dNTPs 的终浓度为 2.5 mM；

牦牛轮状病毒上游引物的核苷酸序列如 SEQ ID NO.1 所示；所述牦牛轮状病毒下游引物的核苷酸序列如 SEQ ID NO.2 所示；所述牦牛轮状病毒探针的核苷酸序列如 SEQ ID NO.3 所示；牦牛轮状病毒探针的核苷酸序列的 5'端连接有 FAM 标记，3'端连接有非荧光淬灭基团和 BHQ。

~~4、根据权利要求 3 所述的基于恒温隔绝式荧光 PCR 平台的牦牛轮状病毒检测试剂盒，其特征在于，所述 Taq 酶的终浓度为 5U $\cdot\mu$ L⁻¹，反转录酶的终浓度为 20U $\cdot\mu$ L⁻¹，牦牛轮状病毒上游引物和牦牛轮状病毒下游引物的终浓度均为 10 μ mol $\cdot\mu$ L⁻¹，牦牛轮状病毒探针的终浓度为 10 μ mol $\cdot\mu$ L⁻¹，dNTPs 的终浓度为 2.5 mM。~~

25、根据权利要求 ~~3~~或41所述的基于恒温隔绝式荧光 PCR 平台的牦牛轮状病毒检测试剂盒，其特征在于，所述荧光定量 PCR 反应液冻干管通过以下方法制备得到：将权利要求 3 或 4 所述的 Taq 酶、反转录酶、牦牛轮状病毒上游引物、牦牛轮状病毒下游引物和牦牛轮状病毒探针、dNTPs 混合加入 0.5ml 的 PCR 管中降至-50℃，然后在 10pa 气压下冻干 24h，形成干粉状后闭管，制得荧光定量 PCR 反应液冻干管。

36、根据权利要求 52 所述的基于恒温隔绝式荧光 PCR 平台的牦牛轮状病毒检测试剂盒，其特征在于，所述荧光定量 PCR 反应液冻干管设置有 50 管。

74、根据权利要求 31 所述的基于恒温隔绝式荧光 PCR 平台的牦牛轮状病毒检测试剂盒，其特征在于，所述反应缓冲液由以下组分构成：500 mM KCl、pH 8.3、100 mM Tris-HCl、15 mM MgCl₂，余量为 ddH₂O，以上体积总量为 3ml。

58、根据权利要求 31 所述的基于恒温隔绝式荧光 PCR 平台的牦牛轮状病毒检测试剂盒，其特征在于，阳性对照品冻干管通过以下方法制备得到：将含有牦牛轮状病毒 RNA 片段的 RNA 样品 100μL 装入 PCR 管内，降至-50℃，然后在 10pa 气压下冻干 24h，形成干粉状后闭管制备而成；

阴性对照品冻干管通过以下方法制备得到：将无牦牛轮状病毒 RNA 片段的样品 100μL 装入 PCR 管内，降至-50℃，然后在 10pa 气压下冻干 24h，形成干粉状后闭管制备而成。

69、根据权利要求 31 所述的基于恒温隔绝式荧光 PCR 平台的牦牛轮状病毒检测试剂盒，其特征在于，该试剂盒保存于 4℃ 下。

740、一种基于恒温隔绝式荧光 PCR 平台的牦牛轮状病毒检测试剂盒的使用方法，其特征在于，所述方法为非疾病的诊断和治疗目的；包括以下步骤：

1) 制备 RNA 模板：取粪便样本上清液 200μL，参考金瑞泓捷（厦门）生物科技有限公司的 PetNAD 试剂盒提取说明书提取被检样本上清总 RNA，制备得到 RNA 模板；

2) 荧光 PCR 反应体系的制备: 荧光 PCR 反应体系的制备于冰上操作; 取 100 μ L 反应缓冲液加入到阳性对照品冻干管中混合, 制备得到阳性对照品, 然后取 50 μ L 反应缓冲液和 5 μ L 阳性对照品加入荧光定量 PCR 反应液冻干管中, 制备得到阳性对照反应体系; 取 100 μ L 反应缓冲液加入阴性对照品冻干管中, 制备得到阴性对照品, 然后取 50 μ L 反应缓冲液和 5 μ L 阴性对照品加入荧光定量 PCR 反应液冻干管中, 制备得到阴性对照反应体系; 取 50 μ L 反应缓冲液和 5 μ L 检测样本 RNA 加入荧光定量 PCR 反应液冻干管中, 制备得到检测样本 RNA 反应体系; 然后分别从各个反应体系中取 50 μ L 混合物移入恒温隔绝式荧光 PCR 反应管中; 加样时注意避光操作; 将准备好的荧光定量 PCR 反应管瞬时高速离心 5 s, 避免出现气泡;

3) 扩增检测: 把 PCR 反应管放置于恒温隔绝式荧光 PCR 仪器内, 按运行键, 即开始反应;

4) 检测结果判定: “+”表示阳性, “-”表示阴性。