

权 利 要 求 书

1、一种用于检测鲤鱼浮肿病毒扩增用核酸引物组，其特征在于，该引物组包含引物 CEV-F3、引物 CEV-B3、引物 CEV-FIP、引物 CEV-BIP、引物 CEV-LpF 和引物 CEV-LpB；

5 所述的引物 CEV-F3 的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 1 所示；

所述的引物 CEV-B3 的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 2 所示；

所述的引物 CEV-FIP 的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 3 所示；

所述的引物 CEV-BIP 的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 4 所示；

所述的引物 CEV-LpF 的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 5 所示；

10 所述的引物 CEV-LpB 的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 6 所示。

2、一种鲤鱼浮肿病毒可视化快速检测试剂盒，其特征在于，包括病毒 RNA 提取试剂和反应试剂，所述的反应试剂中含有权利要求 1 所述的用于检测鲤鱼浮肿病毒扩增用核酸引物组。

15 3、根据权利要求 2 所述的鲤鱼浮肿病毒可视化快速检测试剂盒，其特征在于，所述反应试剂具体包括以下组分：

a) 预反应液：20mM pH 为 8.8 的 Tris-HCl、8mM 硫酸镁、15mM 氯化钾、10mM 硫酸铵、0.12% Tween-20、1.4 mM dNTP、0.6 M 甜菜碱、0.2 μ M 引物 CEV-F3、0.2 μ M 引物 CEV-B3、1.6 μ M 引物 CEV-FIP、1.6 μ M 引物 CEV-BIP、0.8 μ M 引物 CEV-LpF 和 0.8 μ M 引物 CEV-LpB；

20 b) 反应酶：每微升含 8 个活性单位的 Bst 3.0 DNA 聚合酶；

c) 反应封闭液：由矿物油或液体石蜡油组成；

d) 反应显色液：含有 10 % SYBR Green I 的荧光染料。

4、根据权利要求 2 所述的鲤鱼浮肿病毒可视化快速检测试剂盒，其特征在于，所述病毒 RNA 提取试剂包含以下组分：成分为 80mM Tris、50 mM EDTA、500mM NaCl、1.5% SDS、0.01% β -巯基乙醇的 pH 8.0 的裂解液 A；
25 Tris 饱和酚，pH8.0；乙酸钠水溶液，浓度 3mol/L；无水乙醇；DEPC 水配置的含 75%无水乙醇的洗液 A；DEPC 水。

~~5、一种利用权利要求 2 所述的鲤鱼浮肿病毒的可视化快速检测试剂盒进行检测的方法，其特征在于，包括以下步骤：~~

~~1) RNA 抽提：取鱼鳃丝或肾脏组织 30-80mg 于 2mL 离心管中，采用权利要求 4 所述的病毒 RNA 提取试剂进行 RNA 提取；~~

~~2) 对鲤鱼浮肿病毒基因进行扩增；~~

~~3) 对步骤 2) 中得到的扩增产物进行显色检测。~~

~~6、根据权利要求 5 所述的方法，其特征在于，所述步骤 1) 中取鱼鳃丝或肾脏组织 30-80mg 于 2mL 离心管中，采用权利要求 4 所述的病毒 RNA 提取试剂进行 RNA 提取具体为：取鲤鱼脾脏或心脏组织 30-80mg 于 2mL 离心管中，于冰上用研磨棒研磨，加 600 μ L 裂解液 A 后，继续研磨充分后加 600 μ L pH 值 8.0 的 Tris 饱和酚，强烈振荡，11000g 离心 10 min，取上清液，重复酚抽提；取上清液，加入 0.1 倍体积的浓度为 3mol/L 的乙酸钠，混匀，再加两倍体积的冰冷无水乙醇，混匀后低温静置 10 min，15000g 离心 5 min，弃上清，沉淀用 75% 乙醇洗涤 2 次，室温干燥 5~10 min 后以 30 μ L DEPC 水重悬，-80℃ 保存备用。~~

~~7、根据权利要求 5 所述的方法，其特征在于，步骤 2) 中对鲤鱼浮肿病毒基因进行扩增具体为：~~

~~2.1) 根据待检测样品的数目，设置所需反应管数 N，N=样品数+2，其中 1 管为阳性对照，1 管为阴性对照；~~

~~2.2) 吸取所述的预反应液的体积为 $N \times 22 \mu\text{L}$ ，加入一洁净的 1.5mL 离心管中，然后加入 N μL 反应酶，混合均匀，1500~2000 rpm 离心 10 秒，取上清之混合液；~~

~~2.3) 向设定的 N 个反应管中分别加入 23 μL 步骤 2.2) 得到的混合液，得到 N 个 PCR 反应管，向上述 N 个 PCR 反应管内按顺序依次分别加入阴性对照、待检 RNA 模板和阳性对照各 2 μL ；~~

~~2.4) 在上述步骤 2.3) 得到的反应管中再分别加入 30 μL 反应封闭液，盖紧管盖并做好标记，2000 rpm 离心 5 秒；~~

~~2.5) 在 65℃ 下恒温反应 50 min。~~

~~8、根据权利要求 7 所述的方法，其特征在于，所述阳性对照为含有鲤鱼浮肿病毒基因的质粒；所述阴性对照为无核酸去离子水。~~

5 ~~9、根据权利要求 5 所述的方法，其特征在于，步骤 3) 中对步骤 2) 中得到的扩增产物进行显色检测具体为：取出经步骤 2) 的反应管，冷却至室温，2000 rpm 离心 5 秒，按照阴性对照、待检样品和阳性对照的顺序依次分别加入 1 μ L 反应显色液，轻轻混匀，直接用肉眼观察颜色变化，绿色判断为阳性，浅黄色为阴性，观察结束后将反应管装入密封袋，丢弃至特定区域。~~