

权 利 要 求 书

1、一种用于检测罗氏沼虾螺原体扩增用核酸引物组，其特征在于，该引物组包含引物 MrSpi-P1、引物 MrSpi-B1、引物 MrSpi-P2、引物 MrSpi-B2、引物 MrSpi-P3 和引物 MrSpi-B3；

5 所述的引物 MrSpi-P1 的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 1 所示；

 所述的引物 MrSpi-B1 的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 2 所示；

 所述的引物 MrSpi-P2 的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 3 所示；

 所述的引物 MrSpi-B2 的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 4 所示；

 所述的引物 MrSpi-P3 的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 5 所示；

10 所述的引物 MrSpi-B3 的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 6 所示。

2、一种罗氏沼虾螺原体可视化快速检测试剂盒，其特征在于，包括螺原体 DNA 提取试剂和反应试剂，所述的反应试剂中含有权利要求 1 所述的用于检测罗氏沼虾螺原体扩增用核酸引物组。

3、根据权利要求 2 所述的罗氏沼虾螺原体可视化快速检测试剂盒，其
15 特征在于，所述螺原体 DNA 提取试剂的成分为 60mM Tris、800mM NaCl、20mM EDTA、1%体积百分比 NP-40 的 pH 8.0 的裂解液。

4、根据权利要求 2 所述的罗氏沼虾螺原体可视化快速检测试剂盒，其特征在于，所述反应试剂包括以下组分：

3.1) 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、0.5 M 甜菜碱、0.2μM
20 引物 MrSpi-P1、0.2μM 引物 MrSpi-B1、1.6μM 引物 MrSpi-P2、1.6μM 引物 MrSpi-B2、0.8μM 引物 MrSpi-P3 和 0.8μM 引物 MrSpi-B3；

 所述的引物 MrSpi-P1 的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 1 所示；

 所述的引物 MrSpi-B1 的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 2 所示；

25 所述的引物 MrSpi-P2 的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 3 所示；

 所述的引物 MrSpi-B2 的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 4 所示；

 所述的引物 MrSpi-P3 的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 5 所示；

所述的引物 MrSpi-B3 的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 6 所示;

3.2) 反应酶: 每微升含 8 个活性单位的 Bst 2.0 DNA 聚合酶;

3.3) 反应封闭液: 由矿物油或液体石蜡油组成;

3.4) 反应显色液: 含有 10 % SYBR Green I 的荧光染料。

5 ~~5、一种利用权利要求 2-4 中任一权利要求所述的罗氏沼虾螺原体的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) DNA 抽提: 取罗氏沼虾幼体或苗或肠道或肝胰脏组织 30-80mg 于 2mL 离心管中, 采用权利要求 3 所述的螺原体 DNA 提取试剂进行 DNA 提取;~~

10 ~~2) 对罗氏沼虾螺原体基因进行扩增;~~

~~3) 对步骤 2) 中得到的扩增产物进行显色检测。~~

15 ~~6、根据权利要求 5 所述的方法, 其特征在于, 步骤 1) 中的 DNA 抽提具体为: 取罗氏沼虾幼体或苗或肠道或肝胰脏组织 30-80mg 于 1.5 mL 离心管中, 并向离心管加入权利要求 3 所述的螺原体 DNA 提取试剂 200 μ L, 于冰上用研磨棒研磨, 研磨均匀后, 95 $^{\circ}$ C 以上加热 10 分钟左右, 10000 rpm 离心 10 分钟后, 上清即为待检 DNA 模板, -80 $^{\circ}$ C 保存备用。~~

~~7、根据权利要求 5 所述的方法, 其特征在于, 所述步骤 2) 中对罗氏沼虾螺原体基因进行扩增具体为:~~

20 ~~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) 吸取预反应液的体积为 N \times 22 μ L, 加入一洁净的 1.5mL 离心管中, 然后加入 N μ L 反应酶, 混合均匀, 1500~2000 转/分钟离心 10 秒, 取上清之混合液;~~

25 ~~2.3) 向设定的 N 个反应管中分别加入 23uL 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 DNA 模板和阳性对照各 2 μ L;~~

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

~~2.5) 在 65℃ 下恒温反应 50 分钟。~~

~~8、根据权利要求 7 所述的方法，其特征在于，所述的阳性对照为含有罗氏沼虾螺原体基因的质粒，所述的阴性对照为无核酸去离子水。~~

5 ~~9、根据权利要求 7 所述的方法，其特征在于，所述步骤 3) 中显色检测具体为：取出经步骤 2.2) 的反应管，冷却至室温，2000 转/分钟离心 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 uL 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。~~