

权 利 要 求 书

1、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，其特征在于，包括以下步骤：

5 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，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；

10 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 μ L，Quick Taq HS DyeMix 10 μ L，上游引物和下游引物各 0.6 μ L，余下的由 ddH₂O 补足，总量为 20 μ L；

15 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。

~~2、根据权利要求 1 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~~
20 模板 4 μ L 与 1 号 5×Prime Script Buffer 4 μ L、2 号 Prime ScriptRT Enzyme Mix 1 μ L、4 号 Random 6 mers 2 μ L 和 5 号 RNase Free dH₂O 9 μ L 混匀，放入 PCR 仪上进行反转录。

~~32、根据权利要求 1 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~~
25 为：37℃ 15 min，85℃ 15 s，16℃ 10 min。