

权 利 要 求 书

1、一种基于 POCKIT Micro 荧光 PCR 平台的犬细粒、多房棘球绦虫的引物和探针，其特征在于，所述引物和探针包括：细粒、多房棘球绦虫上游通用引物、细粒、多房棘球绦虫下游通用引物和细粒、多房棘球绦虫通用探针，其中，

所述细粒、多房棘球绦虫上游通用引物的核苷酸序列如 SEQ ID NO.1 所示；所述细粒、多房棘球绦虫下游通用引物的核苷酸序列如 SEQ ID NO.2 所示；所述细粒、多房棘球绦虫通用探针如 SEQ ID NO.3 所示。

2、权利要求 1 所述的引物和探针在制备犬细粒、多房棘球绦虫的试剂盒方面的应用。

31、一种基于 POCKIT Micro 荧光 PCR 的犬细粒、多房棘球绦虫的试剂盒，其特征在于，该试剂盒包括 DNA 模板、荧光定量 PCR 反应液、阳性对照品和阴性对照品；

所述荧光定量 PCR 反应液包括细粒、多房棘球绦虫上游通用引物 3.5 μ L，细粒、多房棘球绦虫下游通用引物 3.5 μ L，细粒、多房棘球绦虫通用探针 1.5 μ L，Taq 酶 1.5 μ L，预混 buffer 25 μ L，去离子水 14 μ L，总量为 49 μ L，DNA 模板与荧光定量 PCR 反应液的总量为 50 μ L；

所述细粒、多房棘球绦虫上游通用引物的核苷酸序列如 SEQ ID NO.1 所示；所述细粒、多房棘球绦虫下游通用引物的核苷酸序列如 SEQ ID NO.2 所示；所述细粒、多房棘球绦虫通用探针如 SEQ ID NO.3 所示。

Taq 酶的终浓度为 6U $\cdot\mu$ L⁻¹，细粒、多房棘球绦虫上游通用引物和细粒、多房棘球绦虫下游通用引物的终浓度均为 600nM，细粒、多房棘球绦虫通用探针的终浓度为 400nM。

4、根据权利要求 3 所述的试剂盒，其特征在于，Taq 酶的终浓度为 6U $\cdot\mu$ L⁻¹，细粒、多房棘球绦虫上游通用引物和细粒、多房棘球绦虫下游通用引物的终浓度均为 600nM，细粒、多房棘球绦虫通用探针的终浓度为 400nM。

52、根据权利要求 31 所述的试剂盒，其特征在于，所述阳性对照品为：

含有细粒棘球绦虫 ND1 基因片段的 pEASY-T1 载体质粒，所述 ND1 基因的核苷酸序列如 SEQ ID NO.4 所示；所述阴性对照品为：无 ND1 基因片段的 pEASY-T1 空载体。

5 | **63**、根据权利要求 **52** 所述的试剂盒，其特征在于，含有细粒棘球绦虫 ND1 基因片段的 pEASY-T1 载体质粒，由以下方法制备得到：

1) 利用细粒、多房棘球绦虫上游通用引物和细粒、多房棘球绦虫下游通用引物，以细粒棘球绦虫的基因组 DNA 为模板，进行 PCR 扩增获得目的基因的 PCR 扩增产物；

10 | 2) 将 PCR 扩增产物克隆到 pEASY-T1 载体上，构建含有细粒棘球绦虫 ND1 基因片段的 pEASY-T1 载体质粒；

3) 抽提质粒，定量并稀释至 10^3 拷贝/ μ l，制备得到含有细粒棘球绦虫 ND1 基因片段的 pEASY-T1 载体质粒，即为阳性对照品。

| **74**、权利要求 **31** 所述的试剂盒定性检测犬细粒、多房棘球绦虫的方法，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：

15 | a) 采用 OMEGA Stool DNA Kit 基因组提取试剂盒从待检测的标本中提取 DNA，用无菌去离子水调整 DNA 浓度为 $1.5\text{ng}/\mu\text{l}$ ，制备得到 DNA 提取液；

20 | b) 以提取得到的 DNA 作为模板，加入到装有荧光定量 PCR 反应液的 PCR 管中，对照 PCR 管中分别加入等体积的阳性对照模板和阴性对照模板，将 PCR 管放置到 POCKIT Micro 荧光 PCR 仪中进行检测，42 分钟以后判读结果。