

## 权 利 要 求 书

1、检测黄颡鱼杯状病毒-1 的引物探针混合物，其特征在于，其由引物组 A 和 Taqman 荧光探针 B 组成，Taqman 荧光探针 B 的 5' 端标记有荧光报告基团，3' 端标记有荧光淬灭基团。

- 5        2、根据权利要求 1 所述的引物探针混合物，其特征在于，所述引物组 A 包含引物 YCCV-1-q183F 和引物 YCCV-1-q183R；

所述的引物 YCCV-1-q183F 的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 1 所示；

所述的引物 YCCV-1-q183R 的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 2 所示；

所述 Taqman 荧光探针 B 的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 3 所示。

- 10        3、根据权利要求 1 所述的黄颡鱼杯状病毒-1 荧光定量检测探针 B，其特征在于，所述荧光报告基团选自 6-羧基荧光素、六氯-6-甲基荧光素、VIC 荧光染料、四氯-6-羧基荧光素、羧基-X-罗丹明、6-羧基四甲基罗丹明、磺酰罗丹明、6-羧基-4'，5'-二氯-2'，7'-二甲氧基荧光素琥珀酰亚胺酯、花菁 3、花菁 3.5、花菁 5 和花菁 5.5 中的一种或几种；所述荧光淬灭基团选自 6-羧基四甲基罗丹明、4-(4-二甲基氨基苯偶氮基)苯甲酸、黑洞淬灭剂 1、  
15        黑洞淬灭剂 2 或黑洞淬灭剂 3 中的一种或几种。

4、一种黄颡鱼杯状病毒-1 荧光定量检测试剂盒，其特征在于，包括特异性引物组 A 和 Taqman 荧光探针 B。

- 20        5、根据权利要求 4 所述的检测黄颡鱼杯状病毒-1 荧光定量检测试剂盒，其特征在于，Taqman 荧光探针 B 核苷酸序列 5' 端标记 HEX，3' 端标记 BHQ1。

- 25        6、根据权利要求 4 所述的检测检测黄颡鱼杯状病毒-1 荧光定量检测试剂盒，其特征在于，该试剂盒还包括独立包装的病毒核酸提取液、一步法 RT-qPCR 反应液、阳性质控品、阴性质控品，其中病毒核酸提取液为含有 4 mol/L 异硫氰酸胍、0.5%十二烷基肌氨酸钠、0.1 mmol/L  $\beta$  巯基乙醇、25 mmol/L 柠檬酸钠、20  $\mu$ g 糖原、pH8.0 的缓冲液，PCR 反应液为探针法荧光定量 PCR 反应液，阴性质控品为灭菌生理盐水，阳性质控品为含有黄颡鱼杯状病毒-1 衣壳蛋白基因的载体。

7、一种由权利要求 5 所述的检测黄颡鱼杯状病毒-1 荧光定量检测试剂盒在检测黄颡鱼杯状病毒-1 中的应用，其特征在于，包括以下步骤：

待检样品使用病毒核酸提取液提取总 RNA，采用一步法 RT-qPCR 试剂盒  
5 进行荧光定量 RT-PCR，反应条件为 42℃ 20 分钟，95℃条件下反应 10 分钟；  
然后 95℃反应 15 秒，60℃反应 45 秒，共 40 个循环；荧光信号收集时设定  
为 HEX，荧光信号收集设在 60℃ ；

结果判断：如果检测通道没有出现 S 型扩增曲线，判为黄颡鱼杯状病毒  
-1 阴性；如果检测通道出现 S 型扩增曲线，Ct 值 $\leq$ 35，则黄颡鱼杯状病毒  
10 -1 别判定为阳性。

15

20

25