

权 利 要 求 书

~~1、一种基于恒温隔绝式荧光 PCR 平台的基因 C 型鸭甲肝病毒检测的引物和探针，其特征在于，所述引物和探针包括：基因 C 型鸭甲肝病毒上游引物、基因 C 型鸭甲肝病毒下游引物和基因 C 型鸭甲肝病毒探针，其中，所述基因 C 型鸭甲肝病毒上游引物的核苷酸序列如 SEQ ID NO.1 所示；所述基因 C 型鸭甲肝病毒下游引物的核苷酸序列如 SEQ ID NO.2 所示；所述基因 C 型鸭甲肝病毒探针的核苷酸序列如 SEQ ID NO.3 所示；基因 C 型鸭甲肝病毒探针的核苷酸序列的 5'端连接有 FAM 标记，3'端连接有非荧光淬灭基团和 BHQ1。~~

~~2、权利要求 1 所述的引物和探针在制备基因 C 型鸭甲肝病毒检测试剂盒方面的应用。~~

31、一种基于恒温隔绝式荧光 PCR 平台的基因 C 型鸭甲肝病毒检测试剂盒，其特征在于，包括反应缓冲液、荧光定量 PCR 反应液冻干管、阳性对照品冻干管和阴性对照品冻干管；所述荧光定量 PCR 反应液冻干管包括 Taq 酶 1.5 μ L、反转录酶 1.5 μ L、权利要求 1 所述的基因 C 型鸭甲肝病毒上游引物、基因 C 型鸭甲肝病毒下游引物各 2.5 μ L、基因 C 型鸭甲肝病毒探针 0.5 μ L、dNTPs 2.5 μ L；所述基因 C 型鸭甲肝病毒上游引物的核苷酸序列如 SEQ ID NO.1 所示；所述基因 C 型鸭甲肝病毒下游引物的核苷酸序列如 SEQ ID NO.2 所示；所述基因 C 型鸭甲肝病毒探针的核苷酸序列如 SEQ ID NO.3 所示；基因 C 型鸭甲肝病毒探针的核苷酸序列的 5'端连接有 FAM 标记，3'端连接有非荧光淬灭基团和 BHQ1。

42、根据权利要求 31 所述的基于恒温隔绝式荧光 PCR 平台的基因 C 型鸭甲肝病毒检测试剂盒，其特征在于，所述 Taq 酶的终浓度为 5U $\cdot\mu$ L⁻¹，反转录酶的终浓度为 20U $\cdot\mu$ L⁻¹，基因 C 型鸭甲肝病毒上游引物和基因 C 型鸭甲肝病毒下游引物的终浓度均为 10 μ mol $\cdot\mu$ L⁻¹，基因 C 型鸭甲肝病毒探针的终浓度为 10

$\mu\text{mol} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, dNTPs 的终浓度为 2.5 mM。

53、根据权利要求 31 或 42 所述的基于恒温隔绝式荧光 PCR 平台的基因 C 型鸭甲肝病毒检测试剂盒，其特征在于，所述荧光定量 PCR 反应液冻干管通过以下方法制备得到：将权利要求 3 或 4 所述的 Taq 酶、反转录酶、基因 C 型鸭甲肝病毒上游引物、基因 C 型鸭甲肝病毒下游引物和基因 C 型鸭甲肝病毒探针、dNTPs 混合加入 0.5ml 的 PCR 管中降至 -50°C ，然后在 10pa 气压下冻干 24h，形成干粉状后闭管，制得荧光定量 PCR 反应液冻干管。

64、根据权利要求 53 所述的基于恒温隔绝式荧光 PCR 平台的基因 C 型鸭甲肝病毒检测试剂盒，其特征在于，所述荧光定量 PCR 反应液冻干管设置有 50 管。

75、根据权利要求 31 所述的基于恒温隔绝式荧光 PCR 平台的基因 C 型鸭甲肝病毒检测试剂盒，其特征在于，所述反应缓冲液由以下组分构成：500 mM KCl、pH 8.3、100 mM Tris-HCl、15 mM MgCl_2 ，余量为 ddH₂O，以上体积总量为 3ml。

86、根据权利要求 31 所述的基于恒温隔绝式荧光 PCR 平台的基因 C 型鸭甲肝病毒检测试剂盒，其特征在于，阳性对照品冻干管通过以下方法制备得到：将含有基因 C 型鸭甲肝病毒 RNA 片段的 RNA 样品 100 μL 装入 PCR 管内，降至 -50°C ，然后在 10pa 气压下冻干 24h，形成干粉状后闭管制备而成；

阴性对照品冻干管通过以下方法制备得到：将无基因 C 型鸭甲肝病毒 RNA 片段的样品 100 μL 装入 PCR 管内，降至 -50°C ，然后在 10pa 气压下冻干 24h，形成干粉状后闭管制备而成。

97、根据权利要求 31 所述的基于恒温隔绝式荧光 PCR 平台的基因 C 型鸭甲肝病毒检测试剂盒，其特征在于，该试剂盒保存于 4°C 下。

权 利 要 求 书

408、一种非诊断目的地基于恒温隔绝式荧光 PCR 平台的基因 C 型鸭甲肝病毒检测试剂盒的使用方法，其特征在于，采用权利要求 1~7 任意一项所述的试剂盒，该使用方法包括以下步骤：

1) 制备 RNA 模板：取粪便样本上清液 200 μ L，参考金瑞泓捷（厦门）生物科技有限公司的 PetNAD 试剂盒提取说明书提取被检样本上清总 RNA，制备得到 RNA 模板；

2) 荧光 PCR 反应体系的制备：荧光 PCR 反应体系的制备于冰上操作；取 100 μ L 反应缓冲液加入到阳性对照品冻干管中混合，制备得到阳性对照品，然后取 50 μ L 反应缓冲液和 5 μ L 阳性对照品加入荧光定量 PCR 反应液冻干管中，制备得到阳性对照反应体系；取 100 μ L 反应缓冲液加入阴性对照品冻干管中，制备得到阴性对照品，然后取 50 μ L 反应缓冲液和 5 μ L 阴性对照品加入荧光定量 PCR 反应液冻干管中，制备得到阴性对照反应体系；取 50 μ L 反应缓冲液和 5 μ L 检测样本 RNA 加入荧光定量 PCR 反应液冻干管中，制备得到检测样本 RNA 反应体系；然后分别从各个反应体系中取 50 μ L 混合物移入恒温隔绝式荧光 PCR 反应管中；加样时注意避光操作；将制备好的荧光定量 PCR 反应管瞬时高速离心 5 s，避免出现气泡；

3) 扩增检测：把 PCR 反应管放置于恒温隔绝式荧光 PCR 仪器内，按运行键，即开始反应；

4) 检测结果判定：“+”表示阳性，“-”表示阴性。