

权 利 要 求 书

1、一种检测 Nebovirus 的 SYBR Green 荧光定量 RT-PCR 引物,其特征在于,包括上游引物 NeV F、下游引物 NeV R, 其中, 上游引物 NeV F 的核苷酸序列如 SEQ ID NO:1 所示, 下游引物 NeV R 的核苷酸序列如 SEQ ID NO:2 所示。

2、一种非诊断目的地检测 Nebovirus 的 SYBR Green 荧光定量 RT-PCR 的方法, 其特征在于, 包括以下步骤:

提取待检测样品的 RNA,以待检测样品的 RNA 为模板,反转录得到 cDNA,用权利要求 1 中所述的引物和 SYBR Green 对 cDNA 进行荧光定量 RT-PCR 扩增;通过实时荧光定量 PCR 仪进行结果的读取,判断 S 型扩增曲线和荧光强度值,在扩增曲线正常的情况下,若荧光强度值超过阈值时,则记为阳性,则该待检测样品含有 Nebovirus 病毒,若荧光强度值低于阈值时,则记为阴性,则该待检测样品不含有 Nebovirus 病毒。

3、根据权利要求 2 所述的方法, 其特征在于, 所述反转录的步骤为: 将 RNA 模板 4 μ L、1 号 5 \times 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。

4、根据权利要求 3 所述的方法, 其特征在于, 所述反转录反应所需试剂为宝生物工程(大连)有限公司的 PrimeScriptTMRT 试剂。

5、根据权利要求 2 所述的方法, 其特征在于, 荧光定量 PCR 反应检测体系为: TB Green Premix Ex Taq II 10 μ L, 上游引物 NeV F、下游引物 NeV R 各 1.0 μ L, cDNA 模板 100 ng, 用 ddH₂O 补齐到 20 μ L。

6、根据权利要求 2 所述的方法, 其特征在于, 所述的荧光定量 RT-PCR 反应条件为:95 $^{\circ}$ C 预变性 2 min; PCR: 95 $^{\circ}$ C 反应 15 sec, 51 $^{\circ}$ C 反应 20 sec 进行 40 个循环。

权 利 要 求 书

7、权利要求 1 所述的检测 Nebovirus 的 SYBR Green 荧光定量 RT-PCR 引物在制备 Nebovirus 的快速诊断试剂盒中的应用。