天净沙系列

CAT#:15-182gfap-SN
低温运输，-20℃保存

天净沙

牛海绵状脑病特殊风险物质检测实时荧光 RT-PCR 试剂盒

（商检标准 SN/T3987-2014）

使用手册 V1.01

北京天净沙基因科技有限公司

网址：www.tjs.bio；电话：400-1078566；电邮：order@tjs.bio

产品及特点

根据 SN/T3987-2014 标准，牛海绵状脑病特殊风险物质实时荧光 RT-PCR 检测方法的原理是：牛海绵状脑病的感染性主要集中在中枢神经组织（脑和脊髓）。检测通过鉴定中枢神经组织的特异性标记物——胶原纤维酸性蛋白来实现。该方法以 GFAP 的 mRNA 为靶标，利用实时荧光 RT-PCR 技术进行检测。它具有下列特点：

1. 即开即用，用户只需要提供样品 RNA 模板。
2. 引物和探针经过优化，分析灵敏度高，可以达到 1000 拷贝/反应。
3. 提供阳性对照，便于区分假阴性结果。
4. 特异性高，引物是根据牛海绵状脑病 RNA 高度保守区设计，不会跟其他生物的 RNA 发生交叉反应。
5. 用于定量检测。定量检测时线性范围至少 5 个数量级。
6. 本产品足够 50 次 20 μL 体系的探针法 RT-PCR 反应。
7. 不提供核酸提取试剂。
8. 本产品只能用于科研。

规格及成分

本产品采用五孔盒包装

成份	编号	规格	包装
探针法 RT-PCR 缓冲液	990504a	500 μL	0.5 mL 蓝盖管
探针法 RT-PCR 酶混合液 v2	990504bv2	50 μL	0.5 mL 红盖管
荧光 PCR 专用模板稀释液	180701	1 mL	1.5 mL 绿盖管
牛海绵状脑病特殊风险物质检测实时荧光 RT-PCR 引物-探针干粉	yp15-182 gfap-SN	50 次	0.5 mL 棕盖管
牛海绵状脑病特殊风险物质检测实时荧光 RT-PCR 阳性对照（1E4 拷贝/μL）	pc182-NM_174065-GFAP	50 μL	0.5 mL 黄盖管
使用手册	15-182gfap-SNsc	1 份	无

运输及保存

低温运输，-20℃保存，保存期限为 12 个月。

自备试剂

实时荧光 PCR 仪、高速冷冻离心机（≥12000g）、漩涡振荡器、系列冰箱（4℃,-20℃,-80℃）、微量移液器及滤芯吸头、一次性棉签和研磨用具。

使用方法

一、样品采集与制备

1. 样品类型包括鲜牛肉、冷冻牛肉及其制品。若为组织匀浆，取 100 μL 匀浆液；若为固体样品，选择表面不同区域，用一次性消毒棉签刮取组织表面，每个样品

约 25 mg。

2. 每个样品加入 600 μL 裂解液（若为棉签刮取样品，加入裂解液后需用力挤压，充分挤出棉签内液体）。

3. 处理后的样品可以立即使用；4℃条件下保存不超过 48 h；长期保存需置于-80℃冰箱，且避免反复冻融。

二、核酸提取

4. 按商检要求进行提取得到样品 RNA。

三、设置 RT-PCR 反应（20 μL 体系）

成分	样品管	阴性对照	阳性对照
探针法 RT-PCR 缓冲液	各 10 μL	10 μL	各 10 μL
探针法 RT-PCR 酶混合液 v2	各 1 μL	1 μL	各 1 μL
牛海绵状脑病特殊风险物质检测实时荧光 RT-PCR 引物-探针干粉混合液	各 3 μL	3 μL	各 3 μL
N+2 个待测 RNA 样本	各 6 μL	不加	不加
超纯水	不加	6 μL	不加
牛海绵状脑病特殊风险物质检测实时荧光 RT-PCR 阳性对照（1E4 拷贝/μL）	不加	不加	各 6 μL

上机进行 RT-PCR，RT-PCR 反应参数为：

过程	温度	时间
逆转录	42℃	30 分钟
预变性	94℃	3 分钟
PCR 反应扩增（5 循环）	94℃	10 秒
	45℃	30 秒
	72℃	1 分钟
荧光收集（40 循环）	94℃	10 秒
	60℃	30 秒
降温	40℃	1 分钟

四、结果判定

5. 质控标准：阴、阳性对照均需符合以下要求，否则此次试验无效；阴性对照：无

	扩增曲线，或 Ct 值大于 35。阳性对照：出现典型的扩增曲线，且 Ct 值小于或等于 30.0。 6. 阴性判定：在对照成立的情况下，检测样品无扩增曲线，且 Ct 值大于 35，判定为未检测出牛海绵状脑病特殊风险物质。 7. 阳性判定：在对照成立的情况下，检测样品出现典型的扩增曲线，且 Ct 值小于或等于 30，判定为检测出牛海绵状脑病特殊风险物质。 8. 不确定结果：在对照成立的情况下，检测样品扩增曲线不典型，且 Ct 值大于 30 小于或等于 35，结果不确定，建议重复检测。重复检测后 Ct 值小于或等于 35，判定为检测出牛海绵状脑病特殊风险物质；重复检测后 Ct 值大于 35，判定为未检测出牛海绵状脑病特殊风险物质。 **五、注意事项** 9. 实验操作需在无菌环境下进行，避免交叉污染，所有接触 RNA 的器具均需经 DEPC 处理。 10. 试剂使用前需检查是否在有效期内，按要求储存和处理，避免试剂失效。 11. 核酸提取过程中需严格控制温度和时间，离心步骤需确保转速和温度符合要求，以保证 RNA 提取质量。 12. 实时荧光 RT-PCR 反应体系配制需准确无误，避免因试剂用量偏差影响检测结果。 13. 实验过程中需做好个人防护，穿戴实验服、手套、口罩等防护用品，避免接触有害物质。 14. 实验废弃物需按相关规定分类处理，避免环境污染。
关联产品	牛海绵状脑病特殊风险物质检测实时病毒可视化染料-荧光染料 RT-LAMP 试剂盒