

中华人民共和国国家标准

农业部 953 号公告—6—2007

转基因植物及其产品成分检测 抗虫转 *Bt* 基因水稻定性 PCR 方法

Detection of genetically modified plants and their derived products
—Qualitative PCR methods for pest-resistant rice transgenic for *Bt* gene

2007-12-18 发布

2008-03-01 实施



中华人民共和国农业部 发布

前 言

本标准附录 A、附录 B 为规范性附录。

本标准由中华人民共和国农业部提出。

本标准由全国农业转基因生物安全管理标准化技术委员会归口。

本标准起草单位：农业部科技发展中心、中国农业科学院生物技术研究所、上海交通大学、中国农业科学院植物保护研究所、中国农业大学、中国检验检疫科学研究院。

本标准主要起草人：金芩军、刘信、杨立桃、张永军、黄昆仑、宋贵文、李宁、沈平、彭于发、黄文胜、宛煜嵩。

转基因植物及其产品成分检测 抗虫转 *Bt* 基因水稻定性 PCR 方法

1 范围

本标准规定了转 *Bt* 基因抗虫水稻的定性 PCR 检测方法。

本标准适用于转基因水稻及其产品中的 *CaMV 35S* 启动子、*NOS* 终止子、*Bt* 基因的定性 PCR 检测。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本规范的条款。凡是注明日期的引用文件，其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本标准，然而，鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注明日期的引用文件，其最新版本适合于本标准。

NY/T 672 转基因植物及其产品检测 通用要求

NY/T 673 转基因植物及其产品检测 抽样

NY/T 674 转基因植物及其产品检测 DNA 提取和纯化

SN/T 1193—2003 基因检验实验室技术要求

SN/T 1194—2003 植物及其产品中转基因成分检测 抽样和制样方法

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

3.1

SPS 基因 SPS gene

蔗糖磷酸合酶(sucrose phosphate synthase)基因，在本标准中用作水稻内标准基因。

3.2

GOS 基因 GOS gene

一个根部表达的水稻基因，在本标准中用作水稻内标准基因。

3.3

***CaMV 35S* 启动子 *CaMV 35S* promoter**

花椰菜花叶病毒(*Cauliflower mosaic virus*) 35S 的启动子。

3.4

***NOS* 终止子 *NOS* terminator**

根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*) Ti 质粒胭脂碱合酶(nopaline synthase)基因的终止子。

3.5

***CryIaC* 基因 *CryIaC* gene**

编码苏云金芽胞杆菌(*Bacillus thuringiensis*) *CryIaC* 杀虫晶体蛋白的基因。

3.6

***CryIaB* 基因 *CryIaB* gene**

编码苏云金芽胞杆菌(*Bacillus thuringiensis*) *CryIaB* 杀虫晶体蛋白的基因。

3.7

***CryIAb/CryIAc* 融合基因 *CryIAb/CryIAc* fusion gene**

CryIAb 基因与 *CryIAc* 基因经人工拼接形成的基因。

3.8

转 *Bt* 基因抗虫水稻 transgenic insect-resistant rice with *Bt*(*Bacillus thuringiensis*) gene

通过基因工程技术将外源 *CryIAc* 基因或 *CryIAb* 基因或 *CryIAb/CryIAc* 融合基因导入水稻而培育出的抗虫水稻。

3.9

Ct 值 cycle threshold

每个反应管内的荧光信号到达设定的阈值时所经历的循环数。

4 原理

根据转 *Bt* 基因抗虫水稻中 *CaMV* 35S 启动子、*NOS* 终止子、*CryIAc* 基因或 *CryIAb* 基因或 *CryIAb/CryIAc* 融合基因,以及水稻的内标准基因 *SPS* 基因、*GOS* 基因,设计特异性引物/探针进行 PCR 扩增检测,以确定水稻及其产品中是否含有转 *Bt* 基因抗虫水稻成分。

5 试剂

除非另有说明,本方法试剂均为分析纯试剂和重蒸馏水。

5.1 琼脂糖。

5.2 溴化乙锭(EB)溶液:10mg/mL。

注:EB有致癌作用,配制和使用时应戴一次性手套操作并妥善处理废液。

5.3 10 mol/L 氢氧化钠(NaOH)溶液:在 160 mL 水中加入 80 g NaOH,溶解后加水定容至 200 mL,塑料瓶中保存。

5.4 500 mmol/L EDTA 溶液(pH 8.0):称取二水乙二胺四乙酸二钠($\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)18.6 g,加入 70 mL 水中,加入少量 10 mol/L NaOH 溶液,加热至完全溶解后,冷却至室温,用 10 mol/L NaOH 溶液调 pH 至 8.0,加水定容至 100 mL。在 103.4 kPa(121℃)条件下灭菌 20 min。

5.5 1 mol/L Tris-HCl 溶液(pH 8.0):称取 121.1 g 三羟甲基氨基甲烷(Tris)溶解于 800 mL 水中,用浓盐酸调 pH 至 8.0,加水定容至 1 000 mL。在 103.4 kPa(121℃)条件下灭菌 20 min。

5.6 TE 缓冲液(pH 8.0):分别加入 1 mol/L Tris-HCl(pH 8.0)10 mL 和 500 mmol/L EDTA(pH 8.0)溶液 2 mL,加水定容至 1 000 mL。在 103.4 kPa(121℃)条件下灭菌 20 min。

5.7 50×TAE 缓冲液:称取 242.2 g Tris,用 500 mL 水加热搅拌溶解,加入 500 mmol/L EDTA 溶液(pH 8.0)100 mL,用冰乙酸调 pH 至 8.0,然后加水定容至 1 000 mL。使用时用水稀释成 1×TAE。

5.8 加样缓冲液:称取溴酚蓝 0.25 g,加入 10 mL 水,在室温下过夜溶解;再称取二甲苯腈蓝 0.25 g,用 10 mL 水溶解;称取蔗糖 50 g,用 30 mL 水溶解,混合三种溶液,加水定容至 100 mL,在 4℃下保存备用。

5.9 1 mol/L Tris-HCl(pH 7.5):称取 121.1 g Tris 溶解于 800 mL 水中,用浓盐酸调 pH 至 7.5,用水定容至 1 000 mL。在 103.4 kPa(121℃)条件下灭菌 20 min。

5.10 苯酚:氯仿:异戊醇溶液:将苯酚、氯仿和异戊醇按照 25:24:1 的体积比混合。

5.11 氯仿:异戊醇溶液:将氯仿和异戊醇按照 24:1 的体积比混合。

5.12 10 mg/mL RNase A:将胰 RNA 酶(RNase A)溶于 10 mmol/L Tris-HCl(pH 7.5)、15 mmol/L NaCl 中,配成 10 mg/mL 的浓度,于 100℃加热 15 min,缓慢冷却至室温,分装成小份保存于一 20℃。

- 5.13 异丙醇。
- 5.14 3 mol/L 乙酸钠(pH 5.6):称取 408.3 g 三水乙酸钠溶解于 800 mL 水中,用冰乙酸调 pH 至 5.6,用水定容至 1 000 mL。在 103.4 kPa(121℃)条件下灭菌 20 min。
- 5.15 70%乙醇(V/V)。
- 5.16 抽提液(1 000 mL):在 600 mL 水中加入 69.3 g 葡萄糖、20 g 聚乙烯吡咯烷酮(K 30)(PVP)、1 g DIECA(diethyldithiocarbamic acid),充分溶解,然后加入 1 mol/L Tris-HCl(pH 7.5)100 mL、0.5 mol/L EDTA(pH 8.0)10 mL,加水定容至 1 000 mL,4℃保存,使用时加入 0.2%(V/V)的β-巯基乙醇。
- 5.17 裂解液(1 000 mL):在 600 mL 水中加入 81.7 g 氯化钠、20 g 十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)、20 g 聚乙烯吡咯烷酮(K 30)(PVP)、1 g DIECA(diethyldithiocarbamic acid),充分溶解,然后加入 1 mol/L Tris-HCl(pH 7.5)100 mL、0.5 mol/L EDTA(pH 8.0)4 mL,加水定容至 1 000 mL,室温保存,使用时加入 0.2%(V/V)的β-巯基乙醇。
- 5.18 DNA 分子量标准。
- 5.19 dNTPs:浓度为 10 mmol/L 的 dATP、dTTP、dGTP、dCTP 四种脱氧核糖核苷酸的等体积混合溶液。
- 5.20 适用于普通 PCR 反应 *Taq* DNA 聚合酶(5U/μL)及其反应缓冲液。
- 5.21 适用于实时荧光 PCR 反应 *Taq* DNA 聚合酶(5U/μL)及其反应缓冲液。
- 5.22 植物 DNA 提取试剂盒。
- 5.23 石蜡油。
- 5.24 PCR 产物回收试剂盒。

6 仪器

- 6.1 通常分子生物学实验室仪器设备。
- 6.2 PCR 扩增仪。
- 6.3 实时荧光 PCR 扩增仪。
- 6.4 电泳槽、电泳仪等电泳装置。
- 6.5 紫外透射仪。
- 6.6 凝胶成像系统或照相系统。

7 抽样与制样

按 NY/T 673 或 SN/T 1194 执行。

8 操作步骤

8.1 DNA 提取和纯化

8.1.1 试样预处理

按 NY/T 674 执行。

8.1.2 DNA 模板制备

采用 NY/T 674 所描述的方法,或经认证适用于水稻及其产品 DNA 提取的试剂盒方法,或按下述方法执行。DNA 模板制备时设置不加任何试样的空白对照。

称取 200 mg 经预处理的试样,在液氮中充分研磨后装入液氮预冷的 1.5 mL 或 2 mL 离心管中(不需研磨的试样直接加入)。加入 1 mL 预冷至 4℃的抽提液,剧烈摇动混匀后,在冰上静置 5 min,4℃条

件下 10 000 g 离心 15 min, 弃上清液。加入 600 μ L 预热到 65 $^{\circ}$ C 的裂解液, 充分重悬沉淀, 在 65 $^{\circ}$ C 恒温保持 40 min, 期间颠倒混匀 5 次。室温条件下, 10 000 g 离心 10 min, 取上清液转至另一新离心管中。加入 5 μ L RNase A, 37 $^{\circ}$ C 恒温保持 30 min。分别用等体积苯酚: 氯仿: 异戊醇溶液和氯仿: 异戊醇溶液各抽提一次。室温条件下, 10 000 g 离心 10 min, 取上清液转至另一新离心管中。加入 2/3 体积异丙醇, 1/10 体积 3 mol/L 乙酸钠溶液 (pH 5.6), -20 $^{\circ}$ C 放置 2 h~3 h。在 4 $^{\circ}$ C 条件下, 10 000 g 离心 15 min, 弃上清液, 用 70% 乙醇洗涤沉淀一次, 倒出乙醇, 晾干沉淀。加入 50 μ L TE (pH 8.0) 溶解沉淀, 所得溶液即为样品 DNA 溶液。

8.1.3 DNA 溶液纯度测定和保存

将 DNA 溶液适当稀释, 测定并记录其在 260 nm 和 280 nm 的紫外光吸收率, OD_{260} 值应该在 0.05~1 的区间内, $OD_{260\text{ nm}}/OD_{280\text{ nm}}$ 比值应介于 1.4~2.0 之间, 根据 OD_{260} 值计算 DNA 浓度。

依据测得的浓度将 DNA 溶液稀释到 25 ng/ μ L, -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

8.2 PCR 反应 (8.2.1 和 8.2.2 选一)

8.2.1 方法一

见附录 A。

8.2.2 方法二

见附录 B。

9 结果表述

9.1 在试样的 PCR 反应中, 未检出 *SPS* 基因和/或 *GOS* 基因, 结果表述为“样品中未检出水稻成分”。

9.2 在试样 PCR 反应中, 检出 *Bt* 基因, 对于水稻及以水稻为唯一原料的产品, 结果表述为“样品中检出转 *Bt* 基因水稻成分”; 对于混合原料产品, 结果表述为“样品中检出 *Bt* 基因”, 需要进一步对加工原料进行检测确认。

9.3 在试样 PCR 反应中, 未检出 *Bt* 基因, 但检出 *CaMV 35S* 启动子和/或 *NOS* 终止子, 表明该样品含有转基因成分, 结果表述为“样品中检出 *CaMV 35S* 启动子和/或 *NOS* 终止子, 未检出转 *Bt* 基因水稻成分”。

9.4 在试样的 PCR 反应中, 检出水稻内标准基因, 但未检出 *Bt* 基因、*CaMV 35S* 启动子和 *NOS* 终止子, 结果表述为“样品中未检出转 *Bt* 基因水稻成分”。

10 防污染措施

防污染措施应符合 SN/T 1193 或 NY/T 672 的规定。

附 录 A
(规范性附录)
普通 PCR 方法

A.1 引物

引物序列见表 A.1,用 TE 缓冲液(pH 8.0)或双蒸水分别将表 A.1 引物稀释到 10 $\mu\text{mol/L}$ 。

表 A.1 PCR 引物序列

检测基因	引物	引物序列(5'—3')	PCR 产物大小(bp)
SPS	Primer1	SPS - F1: TTGCGCCTGAACGGATAT	277
	Primer2	SPS - R1: GGAGAAGCACTGGACGAGG	
CaMV 35S	Primer1	35S - F1: GCTCCTACAAATGCCATCATTGC	195
	Primer2	35S - R1: GATAGTGGGATTGTGCGTCATCCC	
NOS	Primer1	NOS - F1: GAATCCTGTTGCCGGTCTTG	180
	Primer2	NOS - R1: TTATCCTAGTTTGCGCGCTA	
Bt	Primer1	Bt - F1: GAAGGTTTGAGCAATCTCTAC	301
	Primer2	Bt - R1: CGATCAGCCTAGTAAGGTCGT	

A.2 PCR 检测

A.2.1 PCR 反应

A.2.1.1 试样 PCR 反应

在 PCR 反应管中按表 A.2 依次加入反应试剂,轻轻混匀,再加约 50 μL 石蜡油(有热盖设备的 PCR 仪可不加)。每个试样 3 次重复。

离心 10 s 后,将 PCR 管插入 PCR 仪中。反应程序为:95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 min;进行 35 次循环扩增反应(94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min,56 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s。根据不同型号的 PCR 仪,可将 PCR 反应的退火和延伸时间适当延长):72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min。反应结束后取出 PCR 反应管,对 PCR 反应产物进行电泳检测或在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下保存待用。

表 A.2 PCR 反应体系

试 剂	终浓度	单样品体积
ddH ₂ O		28.75 μL
10 \times PCR 缓冲液	1 \times	5 μL
25 mmol/L MgCl ₂	2.5 mmol/L	5 μL
dNTPs	0.2 mmol/L	4 μL
10 $\mu\text{mol/L}$ Primer 1	0.5 $\mu\text{mol/L}$	2.5 μL
10 $\mu\text{mol/L}$ Primer2	0.5 $\mu\text{mol/L}$	2.5 μL
5 U/ μL Taq 酶	0.025 U/ μL	0.25 μL
25 ng/ μL DNA 模板	1 ng/ μL	2.0 μL
总体积		50 μL

注:PCR 缓冲液中有 Mg²⁺ 的,不应再加 MgCl₂。

A.2.1.2 对照 PCR 反应

在试样 PCR 反应的同时,应设置阴性对照、阳性对照和空白对照。

阴性对照是指用非转基因水稻材料中提取的 DNA 作为 PCR 反应体系的模板;设置两个阳性对照,分别用转 *Bt* 基因抗虫水稻材料中提取的 DNA、以及转 *Bt* 基因水稻含量为 0.1% 的水稻 DNA 作为 PCR 反应体系的模板;设置两个空白对照,分别用无菌重蒸水和 DNA 制备空白对照作为 PCR 反应体系的模板。上述各对照 PCR 反应体系中,除模板外其余组分及 PCR 反应条件与 A. 2. 1. 1 相同。

A. 2. 2 PCR 产物电泳检测

将适量的琼脂糖加入 $1\times$ TAE 缓冲液中,加热溶解,配制成浓度为 2.0%(W/V)的琼脂糖溶液,然后按每 100 mL 琼脂糖溶液中加入 $5\ \mu\text{L}$ EB 溶液的比例加入 EB 溶液,混匀,稍适冷却后,将其倒入电泳板上,插上梳板,室温下凝固成凝胶后,放入 $1\times$ TAE 缓冲液中,轻轻垂直向上拨去梳板。吸取 $7\ \mu\text{L}$ 的 PCR 产物与适量的加样缓冲液混合后加入点样孔中,在其中一个点样孔中加入 DNA 分子量标准,接通电源在 $2\ \text{V}/\text{cm}$ 条件下电泳。

A. 2. 3 凝胶成像分析

电泳结束后,取出琼脂糖凝胶,轻轻地置于凝胶成像仪上或紫外透射仪上成像。根据 DNA 分子量标准估计扩增条带的大小,将电泳结果形成电子文件存档或用照相系统拍照。根据琼脂糖凝胶电泳结果,按照 A. 3 的规定对 PCR 扩增结果进行分析。如需进一步确认 PCR 扩增片段是否为目的 DNA 片段,需对 PCR 扩增的 DNA 片段参照 A. 2. 4 和 A. 2. 5 的规定执行。

A. 2. 4 PCR 产物回收

按 PCR 产物回收试剂盒说明书回收 PCR 扩增的 DNA 片段。

A. 2. 5 PCR 产物测序验证

回收的 PCR 产物进行序列测定,并对测序结果进行比对和分析,确定 PCR 扩增的 DNA 片段是否为目的 DNA 片段。

A. 3 结果分析

如果阳性对照的 PCR 反应中,水稻内标准 *SPS* 基因、*CaMV 35S* 启动子和/或 *NOS* 终止子和 *Bt* 基因得到了扩增,且扩增片段大小与预期片段大小一致,而在阴性对照中仅扩增出 *SPS* 基因片段,空白对照中没有任何扩增片段,表明 PCR 反应体系正常工作。否则,表明 PCR 反应体系不正常,需要查找原因重新检测。

在 PCR 反应体系正常工作的前提下,检测结果通常有以下几种情况:

- a) 在试样的 PCR 反应中,内标准 *SPS* 基因片段没有得到扩增,或扩增出的 DNA 片段与预期大小不一致,表明样品未检出 *SPS* 基因。
- b) 在试样 PCR 反应中,内标准 *SPS* 基因和 *Bt* 基因均得到了扩增,且扩增出的 DNA 片段大小与预期片段大小一致,无论 *CaMV 35S* 启动子和/或 *NOS* 终止子是否得到扩增,表明样品检出 *Bt* 基因。
- c) 在试样 PCR 反应中,内标准 *SPS* 基因、*CaMV 35S* 启动子和/或 *NOS* 终止子得到了扩增,且扩增片段大小与预期片段大小一致,但 *Bt* 基因没有得到扩增,或扩增出的 DNA 片段与预期大小不一致,表明样品检出 *CaMV 35S* 启动子和/或 *NOS* 终止子,未检出 *Bt* 基因。
- d) 在试样的 PCR 反应中,内标准 *SPS* 基因片段得到扩增,且扩增片段大小与预期片段大小一致,*Bt* 基因、*CaMV 35S* 启动子和 *NOS* 终止子没有得到扩增,表明样品未检出 *Bt* 基因。

附录 B
(规范性附录)
实时荧光 PCR 方法

B.1 引物/探针

引物/探针序列见表 B.1, 用 TE 缓冲液 (pH 8.0) 或双蒸水分别将表 B.1 引物/探针稀释到 10 μmol/L。

表 B.1 荧光 PCR 引物/探针序列

检测基因	引物/探针	引物/探针序列(5'—3')	PCR 产物大小(bp)
SPS	Primer1	SPS-F2; TTGCGCCTGAACGGATAT	81
	Primer2	SPS-R2; CGGTTGATCTTTTCGGGATG	
	Probe	SPS-P; FAM-TCCGAGCCGTCCGTGCGTC-TAMRA	
GOS	Primer1	GOS-F; TTAGCCTCCCGCTGCAGA	68
	Primer2	GOS-R; AGAGTCCACAAGTGCTCCCG	
	Probe	GOS-P; FAM-CGGCAGTGTGGTTGGTTTCTTCGG-TAMRA	
CaMV 35S	Primer1	35S-F; -CGACAGTGGTCCCAAAGA-	74
	Primer2	35S-R; -AAGACGTGGTTGGAACGTCTTC-	
	Probe	35S-P; FAM-TGGACCCCAACCCACGAGGAGCATC-TAMRA	
NOS	Primer1	NOS-F2; ATCGTTCAAACATTTGGCA	165
	Primer2	NOS-R2; ATTGCGGGACTCTAATCATA	
	Probe	NOS-P; FAM-CATCGCAAGACCGGCAACAGG-TAMRA	
Bt	Primer1	Bt-F2; GGGAAATGCGTATTCAATTCAAC	73
	Primer2	Bt-R2; TTCTGGACTGCGAACAATGG	
	Probe	Bt-P2; FAM-ACATGAACAGCGCCTGACCACAGC-TAMRA	
	Primer1	Bt-F3; GACCCTCACAGTTTTGGACATTG	93
	Primer2	Bt-R3; ATTTCTCTGGTAAGTTGGGACACT	
	Probe	Bt-P3; FAM-TCCCGAACTATGACTCCAGAACCTACCCTAT-CC-TAMRA	

注: SPS 基因和 GOS 基因任选其一; 2 组 Bt 基因扩增检测的引物/探针任选其一。

B.2 PCR 检测

B.2.1 对照设置

阴性对照以非转基因水稻 DNA 为模板; 设置两个阳性对照, 分别用转 Bt 基因抗虫水稻材料中提取的 DNA, 以及转 Bt 基因水稻含量为 0.1% 的水稻 DNA 作为 PCR 反应体系的模板; 空白对照以重蒸蒸馏水代替 DNA 模板。

B.2.2 PCR 反应体系

按表 B.2 配制 PCR 扩增反应体系, 也可采用等效的实时荧光 PCR 反应试剂盒配制反应体系, 每个试样和对照设 3 次重复。

表 B.2 实时荧光 PCR 反应体系

试剂	终浓度	单样品体积
ddH ₂ O		26.6 μ L
10 \times PCR 缓冲液	1 \times	5 μ L
25 mmol/L MgCl ₂	2.5 mmol/L	5 μ L
dNTPs	0.2 mmol/L	4 μ L
10 μ mol/L Probe	0.2 μ mol/L	1 μ L
10 μ mol/L Primer1	0.4 μ mol/L	2.0 μ L
10 μ mol/L Primer2	0.4 μ mol/L	2.0 μ L
5 U/ μ L Taq 酶	0.04 U/ μ L	0.4 μ L
25 ng/ μ L DNA 模板	2 ng/ μ L	4.0 μ L
总体积		50 μ L

注:PCR 缓冲液中有 Mg²⁺ 的,不应再加 MgCl₂。

B.2.3 PCR 反应

PCR 反应按以下程序运行。

第一阶段 95 $^{\circ}$ C/10 min;第二阶段 95 $^{\circ}$ C/15 s、60 $^{\circ}$ C/60 s,循环数 40;在第二阶段的退火延伸时段收集荧光值,PCR 反应结束后,根据收集的荧光曲线和 Ct 值判定结果。

B.3 结果分析

B.3.1 阈值设定

实时荧光 PCR 反应结束后,设置荧光信号阈值,阈值设定原则根据仪器噪声情况进行调整,以阈值线刚好超过正常阴性样品扩增曲线的最高点为准。

B.3.2 质量控制

在内源参照基因 *SPS* 和 *GOS* 基因扩增时,空白荧光曲线平直,阴性对照和阳性对照出现典型的扩增曲线,或空白对照荧光值低于阴性对照和阳性对照荧光值的 15%;在外源基因(序列) *CaMV 35S*、*NOS* 和 *Bt* 扩增时,空白对照和阴性对照的荧光曲线平直,阳性对照出现典型的扩增曲线,或空白对照和阴性对照的荧光值低于阳性对照荧光值的 15%,表明反应体系工作正常。否则,表明 PCR 反应体系不正常,需要查找原因重新检测。

B.3.3 结果判定

在 PCR 反应体系正常工作的前提下:

待测样品基因(序列)检测 Ct 值大于或等于 40,则判定样品未检出该基因(序列);

待测样品基因(序列)出现典型的扩增曲线,且检测 Ct 值小于或等于阳性对照的 Ct 值,则判定样品检出该基因(序列);

待测样品基因(序列)出现典型的扩增曲线,检测 Ct 值大于阳性对照的 Ct 值但小于 40,应进行重复实验,如重复实验的外源基因(序列)出现典型的扩增曲线,且检测 Ct 值小于 40,则判定样品检出该基因(序列)。