

数字 PCR 技术在转基因检测与溯源中的应用

张宜文¹, 吴红¹, 赵海波¹, 马康^{2*}

(1. 北京市计量检测科学研究院, 北京 100021; 2. 中国计量科学研究院, 北京 100029)

摘要: 转基因食品的安全性一直备受关注, 准确测定转基因成分及其含量十分重要。近年来, 数字聚合酶链式反应(digital polymer chain reaction, dPCR)技术因具有高灵敏度、受基质干扰少等优势而被广泛用于转基因食品检测。本研究综述了数字 PCR 技术的原理、系统各部件的优劣势, 梳理了数字 PCR 技术在转基因检测与溯源技术(标准物质)方面的进展和发展趋势, 以期期为转基因食品检测领域提供参考依据。

关键词: 数字聚合酶链反应; 转基因; 食品安全

Application of digital PCR technology in transgenic detection and traceability

ZHANG Yi-Wen¹, WU Hong¹, ZHAO Hai-Bo¹, MA Kang^{2*}

(1. Beijing Institute of Metrology, Beijing 100021, China; 2. National Institute of Metrology, Beijing 100029, China)

ABSTRACT: The safety of genetically modified food has always been controversial. It is of great significance to accurately determine the content of genetically modified ingredients. Digital polymerase chain reaction (dPCR) analysis is widely used in the detection of genetically modified food in recent years because of its advantages of high sensitivity and less matrix interference. This paper reviewed the principle of digital PCR technology, the advantages and disadvantages of each part of the system, and summarized the development trend of digital PCR technology in transgenic detection and traceability technology (reference materials), in order to provide reference for the detection of genetically modified food.

KEY WORDS: digital polymerase chain reaction; genetically modified; food safety

1 引言

转基因是人为引进基因编码, 使该基因转录, 产生额外特定功能的蛋白的技术。目前全球转基因农作物约有 30 种, 涉及上百种转化体^[1,2]。世界上大多数国家都对转基因农作物的使用有明确规定, 德国、法国、奥地利规定食品中不得含有大于 0.1% 的转基因含量, 饲料中转基因含量介于 0.1%~0.9% 之间; 瑞士、荷兰、芬兰等国家采用更加严格的限制, 在饲料和食品中禁止添加转基因成分, 并禁止在动物喂养的过程中使用转基因成分^[3]。近年来, 农作物、

饲料、食品和配料中使用的转基因成分的多样性增加了检测的复杂性, 检测方法对于定量检测结果的准确性具有重要影响^[4,5]。

目前转基因检测常用的 2 类检测方法分别是基于 DNA 和基于蛋白质的方法。基于蛋白的转基因检测是从作物或加工产品(食品等)中提取的原材料, 通过检测 DNA 编码产生的新蛋白进行测定, 但受到基质干扰影响较大^[6,7]。而基于 DNA 的转基因检测的结果更稳定, 被更多实验室认可, 目前基于 DNA 的转基因检测最为常用的方法^[8,9]有 4 种: (1) DNA 印迹法; (2) 荧光定量 PCR (quantitative PCR,

基金项目: 国家重点研发计划项目(2018YFF0212800, 2018YFF0212801)

Fund: Supported National Key R&D Planned Project (2018YFF0212800, 2018YFF0212801)

*通讯作者: 马康, 博士, 研究员, 主要研究方向为食品安全。E-mail: makang@nim.ac.cn

*Corresponding author: MA Kang, Ph.D., Researcher, National Institute of Metrology, Beijing 100029, China. E-mail: makang@nim.ac.cn

qPCR)技术; (3)下一代测序技术; (4) 数字 PCR(digital polymer chain reaction, dPCR)技术。DNA 印迹法常用于定性的测定以及基因的编辑和分型, 而不能用于定量检测; 荧光定量 PCR 技术是目前转基因测定的金标方法, 但此方法受基质影响较大并且不适合多重检测; 下一代测序技术多用于大米和大豆转基因检测中, 对于多倍体作物, 如玉米、马铃薯和小麦等的检测仍有难度, 且噪音较大, 影响方法的灵敏度, 导致检出限较高^[10,11]; dPCR 技术可以在不需要校准的情况下对核酸目标序列进行可靠、准确的定量, 得到绝对拷贝数和核酸含量, 被认为是可溯源至国际单位制(SI)的绝对定量方法。dPCR 技术适合应用于单一及多重转基因的测定, 是近年来食品和饲料的转基因检测中的研究热点, 在转基因检测中具有巨大的潜力^[12]。目前尚未有 dPCR 技术应用于转基因检测以及相关溯源技术(标准物质)的综述, 本文概述了数字 PCR 技术的原理、系统各部件的优劣势, 梳理了 dPCR 技术在转基因检测与进展和发展趋势, 以期对转基因食品检测领域提供参考依据。

2 dPCR 技术的原理、仪器系统和影响因素

2.1 dPCR 原理

目前 PCR 技术经历了 3 代的改进: 首先是传统 PCR, 方法通过控制反应温度, 使待测核酸分子在不同温度下变

性、复性、延伸循环复制, 再对经多次复制后的核酸分子进行凝胶分析, 观察是否出现目标核酸的条带(定性测定); 之后是荧光定量 PCR, 方法在传统基础之上, 加入特定的荧光染料, 荧光强度与扩增后和染料相结合的扩增后核酸分子的数量相关, 对比扩增后荧光值与初始设定荧光强度, 得到待测核酸的阈值(C_t), 将 C_t 值代入到由已知含量 DNA 建立的标准曲线, 计算待测核酸的 DNA 含量; 再之后是第三代的定量 PCR 技术, 即 dPCR。dPCR 是将通过样品大量稀释等量均分到相互隔离的大数量微小的反应单元(芯片微孔或微滴液珠)中, 每个微单元中最多包含一个待测核酸分子。在扩增反应后, 在荧光下显示荧光(含待测核酸分子, 表示为“1”), 或没有荧光(不含待测核酸分子, 表示为“0”), 计算没有荧光的微反应单元数量(“0”)与总单元数量(“1”+“0”)的比例, 根据泊松统计得到待测核酸的绝对含量^[13,14]。

2.2 数字 PCR 仪器系统

dPCR 的扩增过程大致上可以分为 3 步: 样品的分散、样品的热循环扩增和样品的检测。对于数字 PCR 仪器系统, 各个部件之间仍然有较大的改进空间, 要发挥部件之间的协同作用是很重要的, 而且有持续研究的价值。表 1 中总结了部分常见的数字 PCR 系统的类型, 以及相对在硬件、便携性、性价比和自动化程度上的比较^[15,16]。

表 1 常见数字 PCR 系统各部分组成方式及特点
Table 1 Components and characteristics of common dPCR system

类型	优势	劣势	硬件复杂性	便携性	性价比	自动化	
分散方式	液滴(共聚焦、流路聚焦、T型)	液滴体积小, ($10^{-9} \sim 10^{-18}$ L) 高通量, 可以使用多种驱动方式便于操作	换体系容易造成污染	较复杂	差	低	低
	通道	平行性好	反应体系较大(10^{-9})	复杂	NA	低	中
	微反应池	平行性好, 容易和加热检测系统连接	相对于液滴体积较大($10^{-9} \sim 10^{-15}$ L)	复杂	NA	低	中
	印刷	清洗后可重复使用	NA	简单	NA	高	高
	焦耳热	加热快	降温慢, 热惯性大	较复杂	好	高	高
加热方式	通电加热	降温快	NA	简单	好	高	高
	表面声波加热	温度变化速率高	NA	复杂	中等	低	NA
	光子加热	光能转化成热	温度变化速率低	复杂	差	低-高	NA
	感应加热	耗能低, 体积小	芯片制作复杂, 有污染的风险	复杂	中等	一般	NA
	微波加热	能量高, 热惯性小, 温度变化速率高	介电常数随温度变化影响效率, 限于狭窄的体积范围和典型的微波频率	复杂	差	低	高
检测方式	太阳能热	不需电源	太阳光对荧光的干扰	简单	差	一般	高
	光电转化	适用于液滴, 误差小	低通量	复杂	差	低	高
	扫描拍照	高通量	数据分析时间长	复杂	差	低	高

注: NA, 未提及。

精确简便的操作方法、便携的设备和良好的实际应用性价比是 dPCR 技术发展的方向, 数字 PCR 系统各部分具有不同的构成和各自的优劣势, 其多样性和可扩展性使得 dPCR 不断发展, 达到各部分的协同优化^[17-20]。表 2 列出目前部分数字 PCR 系统商业化产品型号以及常见的数字 PCR 系统性能参数。

2.3 dPCR 技术定量结果的影响因素

影响 dPCR 定量结果的因素包括: 仪器采用的分散方式与数量、溶液稀释方法、分散体积的准确性以及结果表达方式。分散方式与数量由数字 PCR 系统决定, 分散体积和结果表达方式需要实验人员在实验过程中优化得到。

2.3.1 分散方式与数量

数字 PCR 系统的分散方式决定了分散数量, 其结果基于统计的方法进行定量, 增加反应单元数量(统计样本量), 可以增加其检测的容量和动态检测线性范围达到和 qPCR 相近的动态范围, 同时减小一个反应单元中包含多个分子所造成的误差, 达到提高灵敏度和准确度^[16]。

2.3.2 溶液稀释方法

qPCR 常使用目标序列的拷贝数或某一给定样品中转基因的百分比来体现方法灵敏度。由于 qPCR 和 dPCR 实验过程所用试剂的兼容性较好, 在使用 dPCR 进行转基因检测时, 通常直接参照 qPCR 的方法。使用不同技术对同样样品检测时, 两种方法的灵敏度是否具有可比性成为关注的问题。Burns 等^[21]使用 Fluidigm 公司的 12.765(12 板, 每板 765 个微单元)芯片数字 PCR 分析仪测定标准物质 ERM-AD413 检测转基因玉米 MON810。该小组应用 dPCR 技术评估在 qPCR 定义下的灵敏度数值, 在拷贝数 200~700 之间, dPCR 与 qPCR 的测量结果具有一致性。但与 qPCR 的灵敏度相比, dPCR 在低于拷贝数 200 时有被

低估的风险, 在高于拷贝数 1000 时有被高估的风险。dPCR 在同一阵列上同时测量转基因和内源性靶点时, 需要稀释内源性靶点和转基因靶点在合理拷贝数范围内以保证 dPCR 测量结果的准确性。

2.3.3 分散体积的准确性

dPCR 在使用过程中需要特别注意体积误差造成的结果偏差。体积误差对于测量绝对拷贝数浓度会产生显著的偏差。目前 dPCR 中体积优化方法以光学显微镜观测为主。分散体积的差异会增加拷贝数结果的不确定性, Emslie 等^[22]使用光学显微镜纵向拍照比较图片边缘的微小差异, 考察了数字 PCR 系统中每个微孔内和孔与孔间的体积差异对实验结果的影响程度。Corbisier 等^[23]使用微滴数字 PCR 对 6 种不同质量分数棉籽粉质粒 DNA 标准物质 [ERM-AD623a-f, 浓度范围(10~10⁶) copies/μL] 进行分析, 优化了液滴体积得到相应校正因子, 并使用该校正因子发现并校准了运行软件中液滴体积不变的假设而引起的数据偏离, 数据结果的一致性有明显提高。

2.3.4 结果统计方式

dPCR 的结果统计方式有 2 种, 一种是采用标记多种颜色, 通过不同检测通道分辨不同颜色和强度, 再根据分散液滴的数量计算待测基因的含量; 另一种采用概率统计的数据处理方法, 即通过泊松分布的方法对结果进行分析。

应用概率统计分析数据和对数据处理方法的模型直接关系着结果的准确性和分析时间的长短。常用的统计方法是假设每个微反应单元的体积相同, 根据泊松统计计算拷贝数, 公式为:

$$N_i = -N \times \ln(1-x/N) \quad (1)$$

式中 N_i 是目标总拷贝数; N 是微反应单元数量; x 是发光的微反应单元数量。

表 2 部分数字 PCR 系统性能参数
Table 2 Some dPCR system performance parameters

厂家名称	仪器型号	类型	反应单元数量	反应单元体积*	通道数量
Fluidigm 公司	Bio-mark	芯片式	770	6 nL	4
Life Technologies(Thermo)	Open Array	芯片式	3,072	33 nL	4
Thermo	QuantStudio 3D	微孔板(微反应池)	20,000	0.86 nL	4
Bio-Rad	QX200	微液滴	20,000	0.85 nL	2
RainDance	RainDrop	微液滴	1,000 万	5 pL	2
JN MEDSYS	Clarity	芯片在管	10,000	1.5 nL	2
Stilla Technologies	Naica crystal	微液滴	30,000	0.8 nL	3

注: *反应单元体积=加样体积/反应单元数量

或根据式(2)得到浓度:

$$C = \frac{N_i}{V_t} = -\frac{N}{V_t} \left(1 - \ln \frac{x}{N}\right) \text{ copies/unit volume} \quad (2)$$

式中 V_t 是所有反应单元的总容积。

如果待测样品浓度较高, 或者每个微反应单元的体积不相同, 会造成结果中含有拷贝数的低估, Majumdar 等^[24]在泊松分布的基础上提出泊松 Plus 模型, 即用荧光强度来估计微反应单元的体积, 优化了芯片 dPCR 技术在高浓度下的结果, 改进了由浓度和微反应单元体积非均一性引起的误差, 并使用蒙特卡洛法验证了模型的可靠性。

dPCR 的测量结果通常表示为绝对含量, 即拷贝数绝对值或转基因质量百分比, 而 qPCR 结果通常表示为拷贝数的质量分数。目前市场上可购买到大多数转基因标准物质, 以 qPCR 定值的标准物质是以拷贝数(单倍体基因组当量)的质量分数来表示特性量; 以 dPCR 定值的标准物质直接采用拷贝数比例来表示特性量。不同方法使用不同的表示方式, 会造成测量结果不可比。因此质量分数、拷贝数和拷贝数比例之间的关系需要转化, 才能得到单位一致, 数值可比的数据。EU 联合研究中心建议使用转换因子从拷贝数换算到质量分数^[25,26]。

3 数字 PCR 技术在转基因检测中的应用

相比于 qPCR, dPCR 在转基因检测中具有以下优势: (1)检测灵敏度高: 理论上 dPCR 的灵敏度可达 1 个拷贝, 而实际应用中 dPCR 的最小检出限和最低定量限数值非常接近, 所以 dPCR 可以在非常低的目标拷贝数下得到精确的结果; 通常转基因比参考基因(内源基因)浓度低很多; (2)前处理简单且受基质成分干扰较小: dPCR 反应效率和精密密度受到食品基质成分干扰影响较小, 可应用于混合基质样品中低丰度 DNA 的检测; (3)dPCR 对抑制剂的敏感性较低: 由于 dPCR 结果表示为“有荧光”或“无荧光”, 即使存在抑制剂降低了荧光强度仍可以表示为“有荧光”; (4)适合多重转基因检测: 食品或饲料提取的 DNA 中可能包含多种转基因片段, 可以进行多重 dPCR 检测, 提高分析效率。同时, dPCR 可以直接溯源至 SI 国际单位制摩尔, 适合单一、双重及多重转基因标准物质研究, 一次可识别不同的转基因区域。下面详细进行说明。

3.1 用于低含量的转基因定量测定

欧盟对于转基因产品要求在包装上标明转基因含量, 使得准确测定转基因含量成为关键。Glowacka 等^[27]对转基因烟草 T-DNA 拷贝数和纯合性进行了实验, 结果表明微滴数字 PCR 的结果可靠, 速度更快。Demeke 等^[28]使用 dPCR 可检测到 0.001%(1000 ng)的加标油菜和大豆的转基因 OXY235 和 DP305423 的 DNA 样本, 证明检测低含量的转基因样品时, dPCR 比 qPCR 具有更高的灵敏度; Cottenet^[29]等使用 dPCR 对 9 种转基因大豆和 15 种转基因

玉米的高($\geq 4\%$)、中(1%)、低($\leq 0.5\%$)3 个水平的转基因成分进行检测, 分析结果的准确性和精密密度。最低定量限(limit of quantification, LOQ)(m/m)在 0.025%~0.090%之间, 方法灵敏度高。Deng 等^[30]采用微滴数字 PCR 方法对水稻 6 个基因(gos9、PLD、SPS、RBE4、ppi-PPF 和 oriazain)进行了特异性定量方法的比较和评价。结果表明, dPCR 在水稻同源基因的分析中, 方法可对 0.1%含量的转基因进行定量, 定量限 LOQ 为 10~20 copies/reaction, 优于 qPCR 方法。

3.2 用于无前处理的转基因含量的测定

大部分 dPCR 的方法需要对样品进行限制性内切酶消化与热变性等前处理^[21,28], 从而使参考组和目标组具有更好的分离效果。目前有研究表明, dPCR 无需前处理, 可直接应用于转基因分析。Fu 等^[31]基于筛选元件的无前处理 dPCR 检测方法, 以 CaMV35s 启动子和 NOS 终止子作为筛选元件, 用微滴数字 PCR 和微孔数字 PCR 对 MON810、MON863、TC1507、MIR604、MIR162、GA21、T25、NK603 和 Bt176 等 9 种转基因作物进行测试, 建立了拷贝数含量和质量含量的线性关系, 并对结果的重复性进行了实验室内和实验室间的评估, 结果表明, 在无前处理的情况下, 2 种数字 PCR 检出限(limit of detection, LOD)均达到 0.1%, CaMV35s 和 NOS 元件在转基因作物的出现概率分别为 65.7%和 53.49%, 组合后可覆盖 81.4%的转基因农作物, 即该方法可覆盖大多数转基因作物。Zhu 等^[32]使用相同的方法, 对双重数字 PCR 进行 7 种转基因玉米的检测。结果表明, 未经前处理的样品在双重数字 PCR 中的检测结果良好, LOQ 为 0.5%。

3.3 用于复杂基质的转基因含量测定

Košir 等^[33]对大豆 lectin gene (Le1)和 MON40-3-2 (MON-04032-6)建立 dPCR 技术进行单重和混合后双重方法, LOD 在 20-24 copies/reaction 之间, 使用单重和双重方法对 4 个复杂基质的真实样品进行检测, 发现复杂基质会导致 qPCR 抑制难以量化, 而对 dPCR 影响不大, 即在使用 dPCR 进行转基因定量检测时, 可直接使用高浓度的基质样品而无需由于基质抑制效应多倍稀释样品。

Lwobi 等^[34]对比了抑制剂对 dPCR 和 qPCR 扩增结果影响情况。实验使用 3 种常用的乙二胺四乙酸(EDTA, 0.1~1.0 mmol/L)、十二烷基硫酸钠(SDS, 0.001%~0.010%, V/V)和 乙醇(MtOH, 0.0625%~1%, V/V)扩增抑制剂在不同浓度下比较了 dPCR 和 qPCR 的转基因和参考基因的扩增情况。实验表明, qPCR 在检测内源参考基因时抑制剂对结果的影响并不明显, 而检测转基因时抑制剂浓度不同扩增结果波动较大, 对相同转基因样品的检测转基因含量结果(EDTA)在 109%~161%之间变动; 而 dPCR 对转基因和参考基因检测结果变化不大, 不同浓度的 EDTA 结果在 80%~91%之间。另外 2 种抑制剂与 EDTA 结果类似。证明抑制剂对 dPCR 的干扰较小。

3.4 用于多重检测

近年来, 欧盟为某些未经授权的转基因生物设定了 0.1% 的技术零容忍限度^[35-38], 大量的检测带来了同时对检测和量化多种转基因序列多重分析需求的日益增加。dPCR 多重检测可在不使用标准曲线的情况下, 在同一分析过程中同时测定单一或多个转基因与参考基因的比率, 提高检测的效率节省重复操作。

Lwobi 等^[34]从 100% 转基因参考大豆植株(CV127)中提取 DNA 稀释至低拷贝数, 在 2 拷贝(标称值)处测定 LOD, 优于 qPCR 分析结果。实验中分别对 2 种大豆样品的 DP356 和 DAS684162 个转基因进行分析, qPCR 使用 2 次单独实验分析 2 种转基因, dPCR 采用一次双重实验得到 2 种转基因, 2 种方法测定结果的分散程度相似, 但 dPCR 可减少实验的时间。

Košir 等^[39]使用多重数字 PCR 对 11 种大豆品系进行性能评估, 方法性能参数设置为偏差 $\pm 25\%$; 刘晓等^[40]对 3 种大豆外源基因进行双重 dPCR 检测, 结果表明双重 dPCR 方法特异性良好, 方法定量限 LOQ 为 0.05%。双重 dPCR 可满足低纯度的转基因检测。

4 dPCR 技术用于溯源性研究

dPCR 技术用于溯源性研究主要是用于转基因标准物质的研制过程。

转基因标准物质可分为 3 种类型: 真实的转基因材料(如模拟真实生长的植物, 大豆、玉米等农作物)、基因组和质粒 DNA。第一种方法使用接近真实的样品, 从而减少了实际样品和参考标准物质之间的差异, 但制备困难; 而后 2 种方法更适合批量制备^[6]。遵循良好的规范和使用特定

的参考物质对结果质量进行控制, 可以避免由于操作和定量方法等多种原因所导致的结果误差^[41-43]。

dPCR 技术应用于溯源性研究主要体现为可溯源至国际计量单位制的方法, 其在转基因标准物质的应用范围在逐渐扩展。其在标准物质定值方面的优势包括: 依据计数的方法, 可以向国际单位摩尔(mol)直接溯源。dPCR 技术的系统设备可保证测量结果一致性, 可应用于标准物质质量的确定和稳定性、均匀性考察, 且可以有多个参考实验室联合定值^[43,44]。

我国已应用 dPCR 制备多种转基因标准物质(表 3), 包括转基因玉米、水稻、油菜等多种质粒标准物质和基体标准物质, 为我国转基因农作物的量值溯源提供可靠标准。

5 讨论与展望

转基因是关系粮食安全和食品安全的重要问题。准确快速地了解转基因农产品情况并针对性地控制, 对确保粮食和食品安全具有重要意义。因此, 目前世界各国政府都十分重视转基因农产品的分析和检测, 并制定了相应的限量标准。相比于第一代 cPCR 技术和第二代 qPCR 技术, dPCR 技术具有绝对定量, 可溯源至 SI 国际单位制摩尔; 基质成分干扰较小^[51]; 灵敏度高; 对抑制剂的敏感性较低; 适合多重转基因检测^[52,53], 可提高分析效率; 实验条件优化简单^[54]对实验条件优化的要求较低, 适合多重基因检测等优势, 可为转基因农作物提供准确的量值保证, 目前 dPCR 仪器的价格仍然十分昂贵, 但随着系统加工工艺的改进以及使用较便宜的材料, 集合成更小的体积^[55,56], 其价格将会不断的降低, 使其应用到更多的检测中。

表 3 采用 dPCR 技术溯源的标准物质

Table 3 Reference materials traced by digital PCR

名称	标准物质类型	参考值	定值方法	参考文献
转基因玉米 MIR604	基体	0.50(拷贝数比值)	MIR604/Adh1 二重 dPCR	[45]
转基因水稻 G6H1	基体	4.986~49.825 g/kg	使用 dPCR(ddPCR)测定外源基因和内源基因的拷贝数比值	[46]
转基因油菜 Ms8	质粒分子	1.12(拷贝数比值)	3D-dPCR 测得 pMs8 的外源基因和内源基因的比值	[47]
转基因油菜	质粒分子	200~600 copies/ μ L	cdPCR, dd PCR, 3D-PCR 测定 pCAN 上内外源基因的拷贝数	[48]
转基因 BT63 水稻种子粉	基体	0.50%~5.03%(质量分数)	采用 dPCR 法分别对插入水稻基因组中的外源基因拷贝数与水稻基因组中的内标准基因的拷贝数进行测量, 得到拷贝数分数作为参考值	[49]
转基因水稻 BT63	质粒分子	$2.2 \times 10^2 \sim 8.9 \times 10^5$ copy/ μ L	dPCR 对 BT63 转化体特异性基因片段和内源基因片段的拷贝数比值定值。	[50]

本研究对数字 PCR 技术在转基因检测与溯源的研究进展进行了综述。dPCR 在转基因检测方面的应用仍处于研究和探索的阶段。相比于目前的“金标”荧光定量 PCR 检测方法, 数字 PCR 具有诸多优点, 但也存在一定的不足, 如成本高、仪器操作复杂、经济效益低等。虽然实际检测应用中 dPCR 技术尚未完全普及, 但我国目前已有多家国产数字 PCR 仪器面世或即将面世, 这些 dPCR 仪器在操作中集成了前处理以减少手工移液和样品转移的操作, 增加了通量, 并在价格上具有优势。面对日益严格的限量标准和可预期降低的仪器购置成本, 数字 PCR 将在食品检测领域起到越来越重要的作用。同时, 数字 PCR 技术带来的绝对量值的溯源方式, 也将成为转基因标准物质的主要研究方向。发展 dPCR 协同分析和自动化程度, 使其具有更好兼容性、更低廉的成本, 可使数据结果不间断地纳入到全食品安全全产业链中, 从而在未来的食品检测中得到更广泛的应用。

参考文献

- [1] Singh M, Pal D, Soo P, *et al.* Loop-mediated isothermal amplification assays: Rapid and efficient diagnostics for genetically modified crops [J]. *Food Control*, 2019, (106): 1–10.
- [2] 李亮, 王晶, 隋志伟, 等. 转基因定量检测用质粒分子标准物质研究进展[J]. *生物技术通报*, 2012, (2): 48–52.
Li L, Wang J, Sui ZW. Advances in Reference plasmids for the quantitative detection of genetically modified crops [J]. *Biotechnol Bull*, 2012, (2): 48–52.
- [3] Elena C, Claudio S, Thomas V, *et al.* Food processor and retailer non-GMO standards in the US and EU and the driving role of regulations [J]. *Food Policy*, 2018, (78): 26–37.
- [4] Van DBM, Bellocchi G, Berben, G, *et al.* The modular approach in GMO quality control and enforcement support systems [M]. *Genetically modified and non-genetically modified food supply chains: Co-existence and traceability*, 2012.
- [5] Burns M. Chapter 9: A perspective on quantitative DNA approaches [M]. *Food Chemistry, Function and Analysis*, 2020.
- [6] Ahmed FE. Detection of genetically modified organisms in foods [J]. *Trends Biotechnol*, 2002, 20(5): 215–223.
- [7] Fraiture, MA, *et al.* Current and new approaches in GMO detection: challenges and solutions [J]. *BioMed Res Int*, 2015, (10): 392872.
- [8] Böhme K, Calo-Mata P, Barros-Velázquez J, *et al.* Review of recent DNA-based methods for main food-authentication topics [J]. *J Agric Food Chem*, 2019, (67): 3854–3864.
- [9] Meyer R. Detection methods for genetically modified crops [M]. *Genetically Engineered Food: Methods and Detection*, 2006.
- [10] Fritsch L, Fischer R, Wambach C, *et al.* Next generation sequencing is a robust strategy for the high-throughput detection of zygosity in transgenic maize [J]. *Transgenic Res*, 2015, (24): 615–623.
- [11] Siddique K, Wei JJ, Li R. Identification of T-DNA insertion site and flanking sequence of a genetically modified maize event IE09S034 using next-generation sequencing technology [J]. *Mol Biotechnol* 2019, (61): 694–702.
- [12] 闻艳丽, 梁文, 刘刚. 数字 PCR 法定量低浓度水平短链 DNA 标准物质的研究[J]. *中国测试*, 2020, 46(1): 44–49.
Wen YL, Liang W, Liu G. Quantification of short length and low concentration level DNA reference material based on digital PCR [J]. *China Meas Test*, 2020, 46(1): 44–49.
- [13] Dong L H, Meng Y, Wang J, *et al.* Evaluation of droplet digital PCR for characterizing plasmid reference material used for quantifying ammonia oxidizers and denitrifiers [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2014, 406(6): 1701–1712.
- [14] Ottesen EA, Hong JW, Quake SR, *et al.* Microfluidic digital PCR enables multigene analysis of individual environmental bacteria [J]. *Science*, 2006, 314(5804): 1464–1467.
- [15] Sreejith KR, Ooi CH, Jin J, *et al.* Digital polymerase chain reaction technology -recent advances and future perspectives [J]. *Lab Chip*, 2018, (18): 3717–3735.
- [16] Quan PL, Sauzade M, Eric B. dPCR: A technology review. [J]. *Sensors*, 2018, 18(4): 1271–1298.
- [17] Perkel JM. The digital PCR revolution [J]. *Science*, 2014, 344(6180): 212–214.
- [18] Francis YO, Zheng JH, Zhu TY, *et al.* Design of a reduced objective lens fluorescence dPCR gene chip detection system with high-throughput and large field of view [J]. *Optik*, 2019, (179): 1071–1083.
- [19] Maier J, Lange T, Cross M, *et al.* Optimized digital droplet PCR for BCR-ABL [J]. *J Mol Diagn*, 2019, 21(1): 27–37.
- [20] Gerdes L, Iwobi A, Busch U, *et al.* Optimization of digital droplet polymerase chain reaction for quantification of genetically modified organisms [J]. *Biomol Detect Quan*, 2016, (7): 9–20.
- [21] Burns MJ, Burrell AM, Foy CA. The applicability of digital PCR for the assessment of detection limits in GMO analysis [J]. *Eur Food Res Technol*, 2010, 231(3): 353–362.
- [22] Emslie KR, McLaughlin JLH, Griffiths K, *et al.* Droplet volume variability and impact on digital PCR copy number concentration measurements [J]. *Anal Chem*, 2019, 91(6): 4124–4131.
- [23] Corbisier P, Pinheiro L, Mazoua S, *et al.* DNA copy number concentration measured by digital and droplet digital quantitative PCR using certified reference materials [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2015, 407(7): 1831–1840.
- [24] Majumdar N, Banerjee S, Pallas M, *et al.* Poisson plus quantification for digital PCR systems [J]. *Sci Rep*, 2017, (7): 9617.
- [25] Corbisier P, Barbante A, Berben G, *et al.* Recommendation for the unit of measurement and the measuring system to report traceable and comparable results expressing GM content in accordance with EU legislation [R]. *Luxembourg*, 2017.
- [26] Deprez L, Corbisier P, Kortekaas AM, *et al.* Validation of a digital PCR method for quantification of DNA copy number concentrations by using a certified reference material [J]. *Biomol Detect Quan*, 2016, (9): 29–39.
- [27] Glowacka K, Kromdijk J, Leonelli L, *et al.* An evaluation of new and established methods to determine T-DNA copy number and homozygosity in transgenic plants [J]. *Plant Cell Environ*, 2016 (39): 908–917.
- [28] Demeke T, Grafenhan T, Holigroski M, *et al.* Assessment of droplet digital PCR for absolute quantification of genetically engineered OXY235 canola and DP305423 soybean samples [J]. *Food Control*, 2014, (46): 470–474.
- [29] Cottenet G, Blancpain C, Chuah PF. Performance assessment of digital PCR for the quantification of GM-maize and GM-soya events [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2019, 411(11): 2461–2469.

- [30] Deng TT, Huang WS, Ren JN, *et al.* Verification and applicability of endogenous reference genes for quantifying GM rice by digital PCR [J]. *Anal Biochem*, 2019, (587): 1–10.
- [31] Fu W, Zhu PY, Wang CG, *et al.* A highly sensitive and specific method for the screening detection of genetically modified organisms based on digital PCR without pretreatment [J]. *Sci Rep*, 2015, (5): 12715.
- [32] Zhu PY, Fu W, Wang CG, *et al.* Development and application of absolute quantitative detection by duplex chamber-based digital PCR of genetically modified maize events without pretreatment steps [J]. *Anal Chim Acta*, 2016, (916): 60–66.
- [33] Košir AB, Demšar T, Štebih D, *et al.* Digital PCR as an effective tool for GMO quantification in complex matrices [J]. *Food Chem*, 2019, (294): 73–78.
- [34] Iwobi A, Gerdes L, Busch U, *et al.* Droplet digital PCR for routine analysis of genetically modified foods (GMO)-A comparison with real-time quantitative PCR [J]. *Food Control*, 2016, (69): 205–213.
- [35] Dobnik D, Štebih D, Blejec A, *et al.* Multiplex quantification of four DNA targets in one reaction with Bio-Rad droplet digital PCR system for GMO detection [J]. *Sci Rep*, 2016, (6): 1–9.
- [36] Dobnik D, Spilberg B, Košir A, *et al.* Multiplex quantification of 12 European Union authorized genetically modified maize lines with droplet digital polymerase chain reaction [J]. *Anal Chem*, 2015, 87(16): 8218–8226.
- [37] Shang Y, Xu YC, Huang KL, *et al.* Multiplex pyrosequencing quantitative detection combined with universal primer-multiplex-PCR for genetically modified organisms [J]. *Food Chem*, 2020, (3201): 126634.
- [38] Qian C, Wang R, Wu H, *et al.* Recent advances in emerging DNA-based methods for genetically modified organisms (GMOs) rapid detection [J]. *Trends Anal Chem*, 2018, (109): 19–31.
- [39] Košir AB, Bjørn S, Arne HJ, *et al.* Development and inter-laboratory assessment of droplet digital PCR assays for multiplex quantification of 15 genetically modified soybean lines [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 8601–8613.
- [40] 刘晓, 朱鹏宇, 景小艳, 等. 双重数字 PCR 在转基因大豆检测中的应用[J]. *生物技术进展*, 2020, 10(1): 60–66.
Liu X, Zhu PY, Jing XY, *et al.* Application of double digital PCR in detection of transgenic soybean [J]. *Curr Biotechnol*, 2020, 10(1): 60–66.
- [41] Allnutt T, Chisholm J, Hird H, *et al.* Final report plasmid standards for real time PCR and GM [R]. *Enforcement Testing*, 2017.
- [42] Baoutina A, Bhat S, Partis L, *et al.* Storage stability of solutions of DNA standards [J]. *Anal Chem*, 2019, 91(19): 12268–12274.
- [43] Bhat S, Curach N, Mostyn T, *et al.* Comparison of methods for accurate quantification of DNA mass concentration with traceability to the international system of units [J]. *Anal Chem*, 2010, (82): 7185–7192.
- [44] Yu J, Hui Y, Sheng Q, *et al.* Development of certified matrix-based reference material of genetically modified rice event TT51-1 for real-time PCR quantification [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2015, 407(22): 6731–6739.
- [45] 李俊, 李亮, 李夏莹, 等. 转基因玉米 MIR604 基体标准物质研制[J]. *作物学报*, 2020, 46(4): 473–483.
Li J, Li L, Li XY, *et al.* Development of genetically modified maize MIR604 matrix reference materials [J]. *Acta Agro Sin*, 2020, 46(4): 473–483.
- [46] 杨宇. 转基因水稻 G6H1 和转基因玉米 C00303.5 基体标准物质研制[D]. 上海: 上海交通大学, 2018.
- Yang Y. The development of the matrix reference materials for detection of transgenic rice G6H1 and transgenic maize C00303.5 [D]. Shanghai: Shanghai Jiaotong University, 2018.
- [47] 余笑波, 沙跃兵, 张晓东, 等. 转基因油菜 Ms8 质粒分子外/内源基因比值的不确定度评定[J]. *中国测试*, 2017, 43(S1): 15–20.
Yu XB, Sha YB, Zhang XD, *et al.* The uncertainty assessment for the ratio of exogenous gene and endogenous gene of PMs8 [J]. *China Meas Test*, 2017, 43(S1): 15–20.
- [48] 郑兰, 杨立桃, 王灿华. 三种数字 PCR 平台对多靶标质粒标准物质的定值[J]. *农业生物技术学报*, 2017, 25(9): 1500–1507.
Zheng L, Yang LT, Wang CH. Validation certified value of multi-targets plasmid reference materials by three digital PCR platforms [J]. *J Agric Biotechnol*, 2017, 25(9): 1500–1507.
- [49] 隋志伟, 余笑波, 李亮, 等. 转基因水稻 TT51-1 基体标准物质研制[J]. *计量学报*, 2012, 33(5): 467–471.
Sui ZW, Yu XB, Li L, *et al.* Development of TT51-1 matrix reference material for transgenic rice [J]. *Acta Metrol Sin*, 2012, 33(5): 467–471.
- [50] 李亮, 臧超, 王晶, 等. 转基因水稻克螟稻 2 号定量检测用质粒标准分子研制及不确定度评价[J]. *中国生物工程杂志*, 2012, 32(10): 19–24.
Li L, Zang C, Wang J, *et al.* Development and uncertainty evaluation of plasmid standard molecule for quantitative detection of transgenic rice Kezhaidao 2 [J]. *China Biotechnol*, 2012, 32(10): 19–24.
- [51] Morley AA. Digital PCR: A brief history [J]. *Biomol Detect Quan*, 2014, (1): 1–2.
- [52] Alexandra SW, Jim FH, Svilen T. Fundamentals of multiplexing with digital PCR [J]. *Biomol Detect Quan*, 2016, (10): 15–23.
- [53] Dobnik T, Demeke D. Critical assessment of digital PCR for the detection and quantification of genetically modified organisms [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2018, 410(17): 4039–4050.
- [54] Xu XL, Peng C, Wang XF, *et al.* Comparison of droplet digital PCR with quantitative real-time PCR for determination of zygosity in transgenic maize [J]. *Transgenic Res*, 2016, 25(6): 855–864.
- [55] Zhou HF, Gou T, Hu JM, *et al.* A highly integrated real-time digital PCR device for accurate DNA quantitative analysis [J]. *Biosens Bioelectron*, 2019, (128): 151–158.
- [56] Gou T, Hu JM, Wu WS, *et al.* Smartphone-based mobile digital PCR device for DNA quantitative analysis with high accuracy [J]. *Biosens Bioelectron*, 2018, (120): 144–152.

(责任编辑: 李磅礴)

作者简介



张宜文, 硕士, 高级工程师, 主要研究方向为计量检测。

E-mail: zhangyw@bjjl.cn



马康, 博士, 研究员, 主要研究方向为食品质量与安全。

E-mail: makang@nim.ac.cn