

微滴式数字聚合酶链式反应在食品安全检测领域的应用

牛会敏, 王静怡, 姚晓洁, 魏华琳, 陈万胜, 邓迎春*

(河南省口岸食品检验检测所, 郑州 450003)

摘要: 微滴式数字聚合酶链式反应(droplet digital polymerase chain reaction, ddPCR)是一种新型核酸扩增技术, 可对 DNA 或 RNA 分子采用绝对定量的方式进行分析。其结果具有更高的精准度、准确性和灵敏度, 大大提升了数字 PCR 技术的可扩展性与实用性, 促进了现代分子生物学在精准定量检测方面的发展和应用。本文重点论述了 ddPCR 法的技术原理、优势以及在食源性致病微生物定量检测、转基因成分分析、食品源性成分检测等食品安全检测领域的应用研究进展情况。

关键词: 微滴式数字聚合酶链式反应; 绝对定量; 食品安全检测

Application of droplet digital polymerase chain reaction in food safety detection

NIU Hui-Min, WANG Jing-Yi, YAO Xiao-Jie, WEI Hua-Lin, CHEN Wan-Sheng, DENG Ying-Chun*

(Food Inspection and Testing Institute of Henan Province, Zhengzhou 450003, China)

ABSTRACT: Droplet digital polymerase chain reaction (ddPCR) is a new kind of nucleic acid amplification technology, which can be used to analyze DNA or RNA molecules in an absolutely quantitative way. The result has higher precision, accuracy and sensitivity, which greatly enhances the scalability and practical of digital PCR technology, and promotes the development and application of modern molecular biology in accurate quantitative detection. This paper reviewed the technical principle and advantages of ddPCR method and its application in food safety field, such as quantitative detection of food borne pathogenic microorganisms, analysis of transgenic components, and detection of food-derived components.

KEY WORDS: droplet digital polymerase chain reaction; absolute quantification; food safety detection

1 引言

微滴式数字聚合酶链式反应 (droplet digital

polymerase chain reaction, ddPCR)技术, 是在实时荧光定量 PCR(real-time quantitative polymerase chain reaction, qPCR)技术基础上发展起来的一种新的核酸定性定量检测

基金项目: 2020 年度河南省市场监督管理局科技计划项目(2020sj39)、河南省科技攻关计划项目(172102310347)、河南省科技攻关计划项目(182102110384)、河南省科技攻关计划项目(202102210193)

Fund: Supported by the Administration for Market Regulation of Henan Province Science and Technology Project in 2020 (2020sj39), Science and Technology Project of Henan Province (172102310347), Science and Technology Project of Henan Province (182102110384), and Science and Technology Project of Henan Province (202102210193)

*通讯作者: 邓迎春, 硕士, 主管技师, 主要研究方向为食品安全检测。E-mail: dengyingchun@126.com

*Corresponding author: DENG Ying-Chun, Master, Technician, 8 Jinger Road, Jinshui District, Zhengzhou 450003, China. E-mail: dengyingchun@126.com

方法,可直接测得样品中的目标基因的绝对拷贝数,被称为“第 3 代 PCR”技术^[1,2]。ddPCR 技术与传统 PCR、定量 PCR 技术相比,不依赖于扩增曲线的循环阈值(cycle threshold, Ct)进行定量,不受扩增效率的影响,不需要内参基因和标准曲线,准确度高、重现性好,可以实现绝对定量分析,因此该方法具有广泛的应用范围,已用于医学、生物学等多个领域,如医学临床诊断方面的肿瘤早期诊疗^[3-5]、无创产前检查^[6,7]、病毒检测^[8,9]、拷贝数变异研究^[10,11]等,生物学方面的基因表达分析^[12,13]、下一代测序^[14-16]等。

目前,各国对食品安全问题均高度重视,加大了对食品的生产、加工、流通和销售等各个环节管理和监控力度。ddPCR 技术可以在 2~3 h 对样品中核酸进行精确定量,在食源性病原体鉴定和预警、食品原材料掺假鉴别、转基因成分分析等问题上展现出强大优势,并已开始广泛应用于食品安全检测领域。本文就该技术的原理和优势进行了阐述,对其在食品安全检测领域的应用和研究进展进行综述,旨在为该技术在食品安全检测领域的进一步发展提供参考。

2 微滴式数字 PCR 技术简介

2.1 微滴式数字 PCR 技术发展简介

数字 PCR 技术提出至今,相关技术和产业化发展非常迅速。该技术主要分为 3 类:微孔板数字 PCR 技术、微流控芯片数字 PCR 技术和微滴式数字 PCR 技术^[17-19]。其中 ddPCR 技术利用微流控技术生成油包水乳化微滴颗粒,以每个油包水小颗粒作为反应体系,进行 PCR 扩增及荧光检测,大大增加了反应器的数量,简化了微流控芯片,操作较为简单,解决了微孔板数字 PCR 技术操作复杂、成本高的问题,因此是目前商业化应用最广泛、最理想的数字 PCR 技术平台。

Bio-Rad 和 Rain Dance Technologies 是商业化开发 ddPCR 技术的公司代表。Quanta Life 公司最早开发 ddPCR 技术平台,2011 年被 Bio-Rad 收购后改名为 QX100 微滴式数字 PCR 系统。2012 年,Rain Dance 公司推出 Raindrop 型号设备,该设备可以将每个标准反应体系分割为包含 100 万至 1000 万个皮升级别的微滴反应乳液,从而获得超高的微滴数目。2013 年,Bio-Rad 公司将 ddPCR 系统升级为 QX200™ Droplet Digital™ PCR 系统,同步上市的还有目前市场上唯一经过实验室严格验证的检测体系。2017 年,Bio-Rad 宣布收购 Rain Dance,这一步巩固了 Bio-Rad 在数字 PCR 技术领域的领先地位。

2.2 微滴式数字 PCR 技术原理

该技术利用微滴发生器将含有核酸分子的荧光 PCR 反应体系“分割”为数万个纳升级的微滴,核酸分子在各微

滴中随机分散,每个微滴或不含待检核酸靶分子,或含有至少 1 个待检核酸靶分子,且每个微滴都是一个独立的 PCR 反应器。经 PCR 扩增后,利用微滴分析仪逐个对每个微滴进行检测,有荧光信号微滴判读为“1”,没有荧光信号微滴判读为“0”,最终根据泊松分布原理以及阳性微滴的比例即可得出待检靶分子的起始拷贝数或浓度,从而实现最初反应体系中核酸靶分子数的绝对定量^[20-22]。

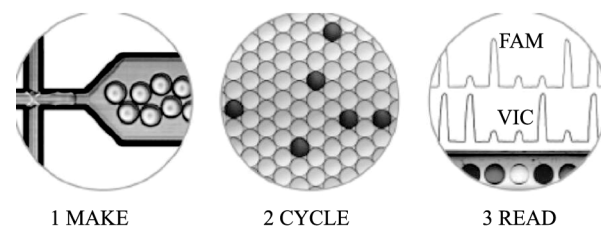


图 1 ddPCR 原理示意图
Fig.1 Schematic diagram of ddPCR

2.3 微滴式数字 PCR 技术优势

ddPCR 技术采用一种全新的方式进行核酸分子的定量,与普通 PCR 和 qPCR 技术相比,具有无可比拟的优势。通过对样品的微滴化处理及分子技术的检测手段,摒弃了通过循环阈值计算间接定量的方式,而直接获取目标基因的绝对拷贝数,实现真正意义上的绝对定量,更加提高了检测精度和分辨率,这是其他方法诸如二代测序、芯片杂交等平台无法企及的。该技术在低丰度及稀有序列精准定量时,通过核心的微滴化处理,使得稀有的核酸序列与大量的背景 DNA 分开,显著降低了有竞争性作用的背景序列浓度,进而提高检测的灵敏度及重复性。通过终点荧光检测方式进行结果判读,因而受扩增效率的影响大为降低,对抑制物的耐受程度大大提高,因此可适用于多种复杂稀有样本的检测。此外,ddPCR 技术除了能检测 TaqMan 水解探针的荧光信号外,还兼容 EvaGreen 染料法的检测功能,使得实验的反应成本更低,利用 EvaGreen 法无差别结合双链 DNA 序列的特点,还可实现多重数字 PCR 技术的检测^[23]。

3 微滴式数字 PCR 技术在食品安全检测领域的应用

3.1 微滴式数字 PCR 技术在食源性致病微生物定量检测方面的应用

食源性致病微生物是影响食品安全的重要因素之一,建立其快速、灵敏、特异的定量检测方法是控制食源性疾病的关键。传统培养法是微生物定量检测的主要技术手段,但需繁琐的增菌、分离、鉴定等步骤,费时费力,辅助的 qPCR 方法,虽在时间上有了很大突破,但其结果的

准确性依赖于标准曲线的构建和引物的扩增效率, 而 ddPCR 技术弥补了这一缺陷。同时由于其抗抑制能力使其可能成为高通量筛选微生物以评估食品质量和安全性的有用策略, 已开发了同时检测乳制品中 8 种致病病原体的 ddPCR 方法。目前, 常见的食源性致病菌如大肠杆菌 O157: H7、单核细胞增生李斯特菌、副溶血性弧菌、大肠菌群、金黄色葡萄球菌、沙门氏菌等均已建立 ddPCR 技术定量检测的方法。

我国 ddPCR 技术起步较晚, 但近几年很多学者利用该技术已开展大量致病性微生物定量检测工作。董莲华等^[24]以大肠杆菌 O157: H7 的 *rfbE* 基因为靶基因建立了可准确定量的 ddPCR 方法, 此方法定量限为 4 copies/20 μ L, 检出限为 3 copies/20 μ L, 具有较好的特异性。方佩佩等^[25]和赵丽青等^[26]分别建立了副溶血性弧菌和单核细胞增生李斯特氏菌的 ddPCR 技术快速定量检测方法, 确定了方法的特异性及定量检测的线性范围, 副溶血性弧菌有效基因组 DNA 浓度范围为 2 ~ 19440 copies/20 μ L, 菌悬液浓度为 (50 ~ 4.86 \times 10⁵) CFU/mL, 与 3M 测试片所得菌悬液浓度无显著性差异 ($P > 0.05$), 与 qPCR 技术相比, 可进行更低浓度检测且能准确定量; 单增李斯特菌的 ddPCR 方法中, 最佳探针浓度为 5 pmol/ μ L, 特异性好, 检出限为 (3.6 \pm 0.1) copies/20 μ L, 重复性良好, 标准偏差为 0.067%, 拷贝数与细菌浓度形成的线性关系较好。周巍等^[27]建立了发酵乳中金黄色葡萄球菌的 ddPCR 定量检测方法, 该方法特异性良好, 灵敏度为 3.3 \times 10¹ CFU/g, 定量的偏差率为 +10.18%, 证明了 ddPCR 技术用于绝对定量检测的可行性。

国外学者如 Rothrock 等^[28]用 ddPCR 技术对商业家禽处理水样进行沙门氏菌和单增李斯特菌检测, 结果表明, 与传统定量方法比较, ddPCR 技术具有灵敏度高、特异性强等优点。Bian 等^[29]采用 ddPCR 技术对大肠杆菌 O157: H7 和单增李斯特菌进行检测, 同时与 qPCR 方法进行比较, ddPCR 技术具有很高的灵敏度, 最低检测下限为 10 CFU/mL。与定量 PCR 方法对比, ddPCR 技术具有灵敏度高、特异性好及检出限低等特征。

目前我国研究人员已成功将 ddPCR 技术与死菌残留 DNA 去除试剂相结合, 开发出了检测食源性致病菌的新方法, 能有效去除死菌细胞残留的核酸, 实现致病菌活菌的准确定量。赵丽青等^[30]将叠氮溴化丙锭 (propidium monoazide, PMA) 与 ddPCR 技术相结合, 用于金黄色葡萄球菌活菌的检测, 结果表明, PMA-ddPCR 法可以定量检测活菌, 避免死菌 DNA 的干扰, 检出限达到 10 copies/20 μ L, 具有较高的灵敏度。此外, 王静等^[31,32]还用脱氧胆酸钠 (sodium deoxycholate, SD)-叠氮溴化丙锭-微滴式数字 PCR 技术 (SD-PMA-ddPCR) 建立了沙门氏菌和单增李斯特菌的定量检测方法, 利用 SD 对受损细胞预处理, 使 PMA 进入

受损细胞与 DNA 发生共价交联, 提取细菌基因组 DNA 进行 ddPCR 方法检测, 灵敏度达到 2.0 copies/20 μ L, 具有特异性强、稳定性好等优点, 在食源性致病微生物的定量检测中有很大发展空间。

3.2 微滴式数字 PCR 在转基因成分检测方面的应用

联合国粮农组织对转基因食品在研发生产和安全性评估上有着严格的文件规范, 各国政府均出台相应的管理和执行法规, 对转基因产品的含量必须进行标识, 包括我国在内的 50 多个国家和地区实施了转基因产品的标识制度, 并制定了各自的标识阈值^[33], 这对转基因成分的精准定量提出了迫切要求。qPCR 法是转基因成分检测中重要的手段, 但该方法还存在难以突破的瓶颈, 对低含量转基因成分检测时, 结果可靠性差, 易漏检; 必须依据标准物质构建的标准曲线进行, 且易受样品中 PCR 反应抑制剂的影响, 造成检测结果不理想。而 ddPCR 技术可以克服以上弊端^[34], 不仅彻底摆脱对标准品的依赖, 检测结果的精确度、重复性更好, 检测成本也比 qPCR 法更低。

Dany 等^[35]首次利用 QX100 系统论述了 ddPCR 技术在转基因检测领域的优点和可行性, 并与 qPCR 技术及芯片式数字 PCR (chip digital PCR, cdPCR) 进行了系统比较, 结果显示 ddPCR 技术灵敏度堪比 cdPCR 和 qPCR 技术, 其超过 4 个数量级的动态范围优于 cdPCR 2~3 个数量级, 可满足日常转基因检测需要。Demeke 等^[36]利用双重 ddPCR 技术对转基因油菜 OXY235 品系和大豆 DP305423 品系进行绝对定量, 结果发现含量为 0.001% 的标准品样品只能被 ddPCR 法检出, 表明 ddPCR 法具有更高的灵敏度。我国学者也利用 ddPCR 技术开展了大量的关于转基因成分检测的相关研究^[37-39], 张佳玲等^[40]创建了我国未批准转基因玉米品系 VOC-01981-5 的二重 ddPCR 定量检测方法, 在相对标准偏差不大于 25% 时, 最低可稳定定量 5 个拷贝的 VOC-01981-5 品系特异性序列分子和 4 个拷贝的内源基因 *hmg* 分子, PCR 反应模板量与测定样品拷贝数之间呈高度正相关, 相关系数达 0.99 以上, 表明该方法特异性强、稳定性好、灵敏度高、定量范围广。柴成梁等^[41]利用 ddPCR 技术对大豆毛油样品进行外源转基因成分检测, 所建立的方法准确可靠, 可进行推广应用。

我国转基因成分 ddPCR 技术定量检测已取得突出成果, 并开始向标准化方向转化。目前已经有 3 项出入境检验检疫行业标准颁布并实施。GB/T 38132-2019《转基因植物物品系定量检测数字 PCR 法》^[42], 该标准可采用微滴数字 PCR 反应体系定量检测物理加工种子样品中转基因玉米 MON810、MON89034、MIR162、转基因大豆 GTS-40-3-2、转基因水稻克螟稻、转基因棉花 GHB119 和转基因油菜 RT73 品系, 定量检测限为 0.1% (质量分数); SN/T 4853-2017《转基因大米定量检测 数字 PCR 法》系列标

准^[43]共包括 7 部分, 分别规定了稻谷和大米中 TT51-1、克螟稻、科丰 6 号、M12、LL62、T2A-1、T1C-19 品系的数字 PCR 定量检测方法; SN/T4993-2017《转基因玉米检测微滴式数字 PCR 定量法》^[44]则覆盖了对 15 种转基因玉米品系的检测, 对 30 ng 玉米基因组 DNA 的检测低限为 0.1%, 150 ng 玉米基因组 DNA 的检测低限为 0.02%。

3.3 微滴式数字 PCR 技术在食品源性成分检测中的应用

由于市场需求的增加和原料价格的上涨, 一些不良商家为了减少生产成本, 在产品中掺入成本低廉的非产品标志的原料, 以次充好, 如用廉价肉代替价格较高的牛羊肉进行销售, 或在植物蛋白饮料中掺入成本低廉的植物原料, 使得掺杂使假等问题日益突出。此外由于在生产加工过程中共用生产线等, 造成产品偶然掺杂未经标识的食品源性成分的现象也很普遍。因此急需建立有效的检测方法能快速、定量检测食品源性成分并准确区分上述 2 种不同性质的掺入。

ddPCR 技术已经应用于鸡、牛、羊、猪、鸭、鹅^[45-49]等动物源性成分及核桃、大豆、椰子、花生、红薯^[50-52]等植物源性成分的定量检测研究中。在动物源性食品的掺假中, 任君安等^[53]通过设计合成羊和猪的特异性引物和探针, 获得单位质量 2 种肉基因拷贝数之比的固定值, 将样品中羊肉和猪肉的拷贝数转换为相对质量分数, 从而建立羊肉中掺杂猪肉的精准定量 ddPCR 检测方法, 定量结果准确、重复性高。杨华等^[54]利用 ddPCR 技术, 创建了牛肉及其制品中掺入鸡肉、鸭肉和猪肉的多重 ddPCR 技术快速定量检测方法, 对 9 个实际样品的检测结果与已知信息完全相符, 结果可靠准确。同样的原理, 杨硕等^[50]建立了市售核桃乳中核桃源及主要掺杂物种大豆 2 种源性成分的准确、快速多重 ddPCR 检测方法, 该方法灵敏度高, 核桃中掺杂大豆的质量检测限为 0.5%, 相对误差为 5.6%, 用实际样品进行验证, 样品大豆与核桃质量之比高于 10%时, 判断存在掺杂使假, 大豆与核桃质量之比低于 0.2 时, 极低的检出量推断为工艺沾染, 该研究建立的准确、快速的多重 ddPCR 定量检测方法可以作为鉴别核桃乳中掺杂使假的有效手段。

目前, 在建立动植物源性成分精准定量检测技术并区分有意掺假和无意掺杂方面, qPCR 技术并不能提供有效的解决方法, 而 ddPCR 技术则可以依据拷贝数含量与质量的相关性, 估算源性成分的质量百分比, 从而准确判断食品源性成分是故意添加还是无意沾染。

4 前景与展望

ddPCR 技术是近 10 年刚发展起来的第 3 代 PCR 技术, 凭借其较好的准确度、重现性、绝对定量等优势, 与采用

相对定量技术的 qPCR 方法等相关分子生物学检测技术在食品安全检测领域互为补充, 弥补了在定量检测方面必须依赖标准曲线与 PCR 扩增效率等问题的不足, 目前已经在致病菌检测、转基因成分检测、食品源性成分及掺杂使假等食品安全领域广泛应用, 为多个食品安全监管专业领域的限量值或阈值设定提供了新的度量标尺。

近几年 ddPCR 定量检测技术发展迅速, 我国在转基因成分检测、病毒检测及致病菌检测领域已经颁布实施了二十几项相关标准, 食品和饲料中动物源性成分数字 PCR 定量测定方法标准正在制定中, 另外在转基因植物及其产品成分检测领域还批准了数字 PCR 方法制定指南的国家标准, ddPCR 技术的逐步标准化将进一步普及该技术的应用。

但 ddPCR 技术还存在一定局限性, 如仪器昂贵及需要开发配套试剂等在一定程度上限制了该技术的全面推广; 另外, 在定量检测中, 仍不能满足市场上种类繁多样品的检测需求, 比如对于成分复杂、添加大量添加剂及未知掺假物质的食品, 该方法的作用依然有限, 还需要更多的理论研究来突破瓶颈。但是, 随着生命科学产业的不断发展, 越来越多的研究者将利用该技术找到更多突破点, 取得更大的成果, 为保障食品安全提供更为先进的技术手段。

参考文献

- [1] 赵新, 兰青阔, 陈锐, 等. 应用微滴数字 PCR 技术快速检测食用菌中沙门氏菌[J]. 食品与生物科学技术学报, 2017, 36(3): 315-321.
Zhao X, Lan QK, Chen R, et al. Rapid detection of *Salmonella* Spp. in edible fungi by droplet digital PCR [J]. J Food Sci Biotechnol, 2017, 36(3): 315-321.
- [2] 刘津, 刘二龙, 谢力, 等. 数字聚合酶链式反应技术在食品安全检测领域的研究应用进展[J]. 食品科学, 2016, 37(17): 275-280.
Liu J, Liu EL, Xie L, et al. Progress in research and application of digital polymerase chain reaction (dPCR) in food safety detection [J]. Food Sci, 2016, 37(17): 275-280.
- [3] Belgrader P, Tanner SC, Regan JF, et al. Droplet digital PCR measurement of HER2 copy number alteration in formalin-fixed paraffin-embedded breast carcinoma tissue [J]. Clin Chem, 2013, 59(6): 991-994.
- [4] Beaver JA, Jelovac D, Balukrishna S, et al. Detection of cancer DNA in plasma of patients with early-stage breast cancer [J]. Clin Cancer Res, 2014, 20(10): 2643-2650.
- [5] Oxnard GR, Paweletz CP, Kuang Y, et al. Noninvasive detection of response and resistance in EGFR-Mutant lung cancer using quantitative next-generation genotyping of cell-free plasma DNA [J]. Clin Cancer Res, 2014, 20(6): 1698-1705.
- [6] Gu W, Koh W, Blumenfeld YJ, et al. Noninvasive prenatal diagnosis in a fetus at risk for methylmalonic acidemia [J]. Genet Med, 2014, 16(7): 564-567.
- [7] Pornprasert S, Prasing W. Detection of alpha (o)-thalassemia south-east asian-type deletion by droplet digital PCR [J]. Eur J Haematol, 2014, 92: 244-248.

- [8] Persaud D, Gay H, Ziemiak C, *et al.* Absence of detectable HIV-1 viremia after treatment cessation in an infant [J]. *New Eng J Med*, 2013, 369: 1828–1835.
- [9] Aubert M, Boyle NM, Stone D, *et al.* *In vitro* inactivation of latent HSV by targeted mutagenesis using an HSV-specific homing endonuclease [J]. *Mol Ther-Nucl Acids*, 2014, 3: e146.
- [10] Boettger LM, Handsaker RE, Zody MC, *et al.* Structural haplotypes and recent evolution of the human 17q21.31 region [J]. *Nat Genetics*, 2012, 44: 881–885.
- [11] Hindson BJ, Ness KD, Masquelier DA, *et al.* High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number [J]. *Anal Chem*, 2011, 8: 8604–8610.
- [12] Gorbachev AY, Fisunov GY, Izraelson M, *et al.* DNA repair in mycoplasma gallisepticum [J]. *BMC Genomics*, 2013, 14: 726.
- [13] Jiang K, Ren C, Nair VD. MicroRNA-137 represses Klf4 and Tbx3 during differentiation of mouse embryonic stem cells [J]. *Stem Cell Res*, 2013, 11: 1299–1313.
- [14] Cangi MG, Biavasco R, Cavalli G, *et al.* BRAFV600E-mutation is invariably present and associated to oncogene-induced senescence in Erdheim-Chester disease [J]. *Ann Rheum Dis*, 2015, 74(8): 1596–1602.
- [15] Fresard L, Leroux S, Servin B, *et al.* Transcriptome-wide investigation of genomic imprinting in chicken [J]. *Nucleic Acids Res*, 2014, 42(6): 3768–3782.
- [16] Morrison T, Hurley J, Garcia J, *et al.* Nanoliter high throughput quantitative PCR [J]. *Nucleic Acids Res*, 2006, 34(18): e123.
- [17] Ottesen EA, Hong JW, Quake SR, *et al.* Microfluidic digital PCR enables multigene analysis of individual environmental bacteria [J]. *Sci*, 2006, 314(5804): 1464–1467.
- [18] Sanders R, Huggett JF, Bushell CA, *et al.* Evaluation of digital PCR for absolute DNA quantification [J]. *Anal Chem*, 2011, 83(17): 6474–6484.
- [19] Kalinina O, Lebedeva I, Brown J, *et al.* Nanoliter scale PCR with TaqMan detection [J]. *Nucleic Acids Res*, 1997, 25(10): 199–2004.
- [20] Sykes PJ, Neoh SH, Brisco MJ, *et al.* Quantitation of targets for PCR by use of limiting dilution [J]. *Biotechniques*, 1992, 13(3): 444–449.
- [21] Vogelstein B, Kinzler KW. Digital PCR [J]. *P Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(16): 9236–9241.
- [22] Medermott GP, Do D, Litterst CM, *et al.* Multiplexed target detection using DNA-binding dye chemistry in droplet digital PCR [J]. *Anal Chem*, 2013, 85(23): 11619–11627.
- [23] Cremonesi P, Cortimiglia C, Picozzi C, *et al.* Development of a droplet digital polymerase chain reaction for rapid and simultaneous identification of common foodborne pathogens in soft cheese [J]. *Front Microbiol*, 2016, (7): 1725.
- [24] 董莲华, 张玲, 姜君, 等. 大肠杆菌 O157: H7 微滴式数字 PCR 定量方法的建立[J]. *分析化学*, 2013, 43(3): 319–324.
Dong LH, Zhang L, Jiang J, *et al.* Establishment of digital PCR method for quantifying *E. coli* O157: H7 microdroplet [J]. *Anal Chem*, 2013, 43(3): 319–324.
- [25] 方佩佩, 赵丽青, 马云, 等. 副溶血性弧菌微滴数字 PCR 定量方法的建立[J]. *食品工业科技*, 2018, 39(19): 252–257.
Fang PP, Zhao LQ, Ma Y, *et al.* Establishment of digital PCR assay for detection of vibrio parahaemolyticus [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2018, 39(19): 252–257.
- [26] 赵丽青, 方佩佩, 唐静, 等. 数字 PCR 定量检测食品中单核细胞增生李斯特氏菌方法的研究[J]. *食品安全质量检测学报*, 2017, 8(11): 4132–4138.
Zhao LQ, Fang PP, Tang J, *et al.* Detection of *Listeria monocytogenes* in foods by droplet digital PCR [J]. *J Food Saf Qual*, 2017, 8(11): 4132–4138.
- [27] 周巍, 李月华, 孙勇, 等. 微滴式数字 PCR 技术定量检测发酵乳中金黄色葡萄球菌[J]. *食品科学*, 2017, 38(16): 287–291.
Zhou W, Li YH, Sun Y, *et al.* Quantitative detection of *Staphylococcus aureus* in yogurt by digital PCR assay [J]. *Food Sci*, 2017, 38(16): 287–291.
- [28] Rothrock MJ, Hiatt KL, Kiepper BH, *et al.* Quantification of zoonotic bacterial pathogens within commercial poultry processing water samples using droplet digital PCR [J]. *Adv Appl Microbiol*, 2013, 3(5): 403–411.
- [29] Bian XJ, Jing FX, Gang L. A microfluidic droplet digital PCR for simultaneous detection of pathogenic *Escherichia Coli* O157 and *Listeria monocytogenes* [J]. *Biosens Bioelectron*, 2015, 74(15): 770–777.
- [30] 赵丽青, 王静, 秦燕. PMA 结合 ddPCR 检测食品中金黄色葡萄球菌的研究[J]. *微生物学杂志*, 2017, 37(1): 105–109.
Zhao LQ, Wang J, Qin Y. Detection of *Staphylococcus aureus* in foods by PMA combined with ddPCR [J]. *J Microbiol*, 2017, 37(1): 105–109.
- [31] 王静, 张慧敏, 魏玮, 等. SD-PMA-ddPCR 检测食品中沙门氏菌的研究[J]. *食品工业科技*, 2016, 37(10): 67–71.
Wang J, Zhang HM, Wei W, *et al.* Detection of *Salmonella* cells based on SD-PMA-ddPCR [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2016, 37(10): 67–71.
- [32] 王静, 刘玉敏, 李春喜, 等. SD-PMA-ddPCR 检测食品中单核细胞增生李斯特氏菌[J]. *微生物学通报*, 2016, 43(10): 2306–2313.
Wang J, Liu YM, Li CX, *et al.* Detection of *Listeria monocytogenes* cells in food based on SD-PMA-ddPCR [J]. *Microbiol China*, 2016, 43(10): 2306–2313.
- [33] Gruere GP, Rao SR. A review of international labeling policies of genetically modified food to evaluate India's proposed rule [J]. *Agbioforum*, 2007, 10(1): 51–64.
- [34] 赵治国, 崔强, 赵林立, 等. 微滴数字 PCR 技术应用进展[J]. *中国生物工程杂志*, 2017, 37(6): 93–96.
Zhao ZG, Cui Q, Zhao LL, *et al.* Advances in the application of droplet digital PCR technology [J]. *China Biotechnol*, 2017, 37(6): 93–96.
- [35] Dany M, Dejan T, Mojca M, *et al.* Quantitative analysis of food and feed samples with droplet digital PCR [J]. *PLoS One*, 2013, 8(5): e62583.
- [36] Demeke T, Grafenhan T, Holigroski M, *et al.* Assessment of droplet digital PCR for absolute quantification of genetically engineered OXY235 canola and DP305423 soybean sample [J]. *Food Control*, 2014, 46: 470–474.
- [37] 刘津, 李婷, 洗钰茵, 等. 转基因大豆 MON89788 双重数字 PCR 通用定量检测方法的建立[J]. *食品科学*, 2018, 39(4): 312–319.
Liu J, Li T, Xian YY, *et al.* The construction of a universal quantitative detection method on GM soybean event MON89788 using duplex digital PCR [J]. *Food Sci*, 2018, 39(4): 312–319.
- [38] 周圆, 单长林, 李孝军, 等. 运用微滴式数字 PCR 技术检测转基因玉米品系的研究[J]. *安徽农业科学*, 2018, 46(14): 175–178.
Zhou Y, Shan CL, Li XJ, *et al.* Study on detection of genetically modified maize lines using microdrop digital PCR technique [J]. *J Anhui Agric Sci*, 2018, 46(14): 175–178.
- [39] 付海滨, 闫超杰, 李妹, 等. 数字 PCR 技术在转基因成分检测中的应

- 用[J]. 辽宁农业科学, 2017, (1): 50-53.
- Fu HB, Yan CJ, Li S, *et al.* Application of digital PCR technology in detection of genetically modified components [J]. Liaoning Agric Sci, 2017, (1): 50-53.
- [40] 张佳玲, 潘广, 章桂明, 等. 微滴式数字 PCR 定量检测转基因玉米品系 VCO-01981-5[J]. 食品科学, 2017, 38(12): 246-252.
- Zhang JL, Pan G, Zhang GM, *et al.* Quantitative detection of transgenic maize event VCO-01981-5 with droplet digital PCR [J]. Food Sci, 2017, 38(12): 246-252.
- [41] 柴成梁, 唐柏飞, 常晓娇, 等. 利用微滴式数字 PCR 技术检测大豆毛油中的转基因成分[J]. 中国粮油学报, 2019, 34(2): 107-111.
- Chai CL, Tang BF, Chang XJ, *et al.* Detection of genetically modified soybean oil by droplet digital PCR [J]. J Cere Oils Ass, 2019, 34(2): 107-111.
- [42] GB/T 38132-2019 转基因植物品系定量检测数字 PCR 法[S].
- GB/T 38132-2019 Quantitative determination of genetically modified plants by digital PCR method [S].
- [43] SN/T 4853-2017 转基因大米定量检测数字 PCR 法[S].
- SN/T 4853-2017 Quantitative detection of genetically modified rice [S].
- [44] SN/T 4993-2017 转基因玉米检测微滴式数字 PCR 定量法[S].
- SN/T 4993-2017 Quantitative detection of genetically modified corn [S].
- [45] Ren JA, Deng TT, Huang WS, *et al.* A digital PCR method for identifying and quantifying adulteration of meat species in raw and processed food [J]. PLoS One, 2017, 12(3): e0173567.
- [46] Cai YC, Li X, Lv R, *et al.* Quantitative analysis of pork and chicken products by droplet digital PCR [J]. Biomed Res Int, 2014, 2014: 810209.
- [47] Floren C, Wiedemann I, Brenig B, *et al.* Species identification and quantification in meat and meat products using droplet digital PCR (ddPCR) [J]. Food Chem, 2015, 173: 1054-1058.
- [48] 苗丽, 张秀平, 陈静, 等. 肉制品中羊源性成分微滴式数字 PCR 法定量检测方法的研究[J]. 食品工业科技, 2016, 37(4): 73-76.
- Miao L, Zhang XP, Chen J, *et al.* Development of quantitative analysis of ovine products by droplet digital PCR [J]. Sci Technol Food Ind, 2016, 37(4): 73-76.
- [49] 王强, 蔡一村, 张扬, 等. 食品和饲料中鹅源性成分微滴式数字 PCR 检测与定量分析[J]. 现代食品科技, 2018, 34(10): 258-263.
- Wang Q, Cai YC, Zhang Y, *et al.* Detection and quantification of goose-derived materials in food and feedstuffs by droplet digital PCR [J]. Mod Food Sci Technol, 2018, 34(10): 258-263.
- [50] 杨硕, 江丰, 刘艳, 等. 多重数字 PCR 定量检测市售核桃乳中核桃大豆源性成分的方法[J]. 食品科学, 2017, 38(16): 280-286.
- Yang S, Jiang F, Liu Y, *et al.* Duplex digital droplet PCR for the determination of walnut-derived and soybean-derived ingredients in walnut protein drink [J]. Food Sci, 2017, 38(16): 280-286.
- [51] 杨硕, 李诗瑶, 王鸣秋, 等. 市售椰子汁(植物蛋白饮料)中椰子、大豆、花生源性成分鉴定的分子生物学方法[J]. 基因组学与应用生物学, 2017, 36(12): 1-7.
- Yang S, Li SY, Wang MQ, *et al.* Digital droplet PCR for the determination of peanut and soybean-derived component in coconut protein drink [J]. Genomics Appl Biol, 2017, 36(12): 1-7.
- [52] 刘二龙, 卢丽, 凌莉, 等. 红薯源性成分微滴式数字 PCR 的检测与定量分析[J]. 现代食品科技, 2019, 35(7): 273-277.
- Liu EL, Lu L, Ling L, *et al.* Detection and quantification of sweet potato components by droplet digital PCR [J]. Mod Food Sci Technol, 2019, 35(7): 273-277.
- [53] 任君安, 邓婷婷, 黄文胜, 等. 微滴式数字聚合酶链式反应精准定量检测羊肉中掺杂猪肉[J]. 食品科学, 2017, 38(2): 311-316.
- Ren JA, Deng TT, Huang WS, *et al.* A precise quantitative assay for measuring pork incorporated into mutton products by droplet digital PCR [J]. Food Sci, 2017, 38(2): 311-316.
- [54] 杨华, 汪小福, 肖英平, 等. 牛肉及其制品中掺入鸡肉、鸭肉和猪肉的多重数字 PCR 快速检测方法研究[J]. 浙江农业学报, 2017, 29(6): 994-1000.
- Yang H, Wang XF, Xiao YP, *et al.* Rapid detection of chicken, duck and pork blending in beef products by multiple digital PCR [J]. Acta Agric Zhejiangensis, 2017, 29(6): 994-1000.

(责任编辑: 张晓寒)

作者简介



牛会敏, 硕士, 工程师, 主要研究方向为食品安全检测。
E-mail: 530796065@qq.com

邓迎春, 硕士, 主管技师, 主要研究方向为食品安全检测。
E-mail: dengyingchun@126.com