GⅡ型诺如病毒微滴式数字 RT-PCR 检测方法的建立及初步应用

管锦绣[1]，翁文川[2]，许喜林[1]，凌莉[2]，冼钰茵[2]，易蓉[2]，李志勇[2]
（1.华南理工大学食品科学与工程学院，广东广州 510640）
（2.广东出入境检验检疫局检验检疫技术中心，广东广州 510623）

摘要：为了建立快速准确的GⅡ型诺如病毒定量检测方法，本研究将微滴式数字 RT-PCR 技术应用于GⅡ型诺如病毒检测中，并与实时荧光RT-PCR法进行了比对。微滴式数字RT-PCR反应退火温度的优化实验确定了其最佳退火温度为56 ℃，实时荧光RT-PCR和微滴式数字 RT-PCR 两种方法的灵敏度实验对比表明微滴式数字 RT-PCR 法检测GⅡ型诺如病毒的灵敏度为5.40 copies/μL，其灵敏度高于实时荧光RT-PCR法，重复性实验对比表明两种方法在检测中间浓度的GⅡ型诺如病毒时重复性均较好；人工污染西生菜实验中表明微滴式数字 RT-PCR 法最低检测限为 54.00 copies/μL。本研究建立的GⅡ型诺如病毒的微滴式RT-PCR检测方法，灵敏度高，重复性良好，在人工污染西生菜GⅡ型诺如病毒的检测中表现理想，具有良好的应用前景。

关键词：实时荧光RT-PCR；微滴式数字 RT-PCR；GⅡ型诺如病毒；灵敏度；重复性；西生菜
文章篇号：1673-9078(2018)05-222-228 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2018.05.032

Establishment and Preliminary Application of Droplet Digital RT-PCR Assay for Detection of GⅡ Norovirus

GUAN Jin-xiu[1], WENG Wen-chuan[2], XU Xi-lin[1], LING Li[2], XIAN Yu-yin[2], YI Rong[2], LI Zhi-yong[2]
(1.School of Food Science and Engineering South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)
(2.Guangdong Inspection and Quarantine Technology Center Food Testing Lab, Guangzhou 510623, China)

Abstract: The droplet digital RT-PCR assay was applied in the detection of GⅡ norovirus to establish a rapid and accurate method in this study, which was compared with real-time fluorescent RT-PCR. The annealing temperature of droplet digital RT-PCR was optimized and determined to be 56℃. Compared with real-time fluorescent RT-PCR, the sensitivity of droplet digital RT-PCR was determined to be 5.40 copies/μL which was higher than that of real-time fluorescent RT-PCR, and the repeatability of real-time fluorescent RT-PCR and droplet digital RT-PCR were good determined by the comparison test. The droplet digital RT-PCR was applied to detect the artificially contaminated Romaine Lettuce with the sensitivity wof 54.00 copies/μL. Droplet digital RT-PCR assay established for detection of GⅡ norovirus had a high sensitivity and repeatability, and had an outstanding performance in the detection of the artificially contaminated Romaine Lettuce, which would own a good application prospects.

Key words: real-time fluorescent RT-PCR; droplet digital RT-PCR; GⅡ norovirus; sensitivity; repeatability; Romaine Lettuce

诺如病毒(Norovirus，NoV)是引发世界范围内非细菌性急性胃肠炎的主要致病原之一。诺如病毒属于人类杯状病毒科，呈球形，无包膜[1]，直径27~35 nm，基因组是一条长达7.5~7.7 kb的单股正链RNA，包含3个开放阅读框，分别编码高度保守的非结构蛋白，主要结构衣壳蛋白VP1和次级衣壳蛋白VP2[2]。根据诺如病毒聚合酶和衣壳蛋白编码区核苷酸和氨基酸序列特征，诺如病毒分为5个基因型[3]。人群致病诺如病毒大致分为GⅠ、GⅡ、GⅣ3个基因型，其中统计表明当属GⅡ型诺如病毒最为高发[1]。诺如病毒有很强的感染力和致病力，在人口聚集的场所极易引起暴发，被喻为“肠道流感”[5]。该病毒的传播途径类似于甲肝病毒，主要是通过人-人接触和污染的食品及水源传播[6]，诺如病毒可以存活在被污染的食品表面数日或数周内都具有感染性[7]。在全球都有其流行扩散的报道，诺如病毒引起每年美国2300万胃肠炎病例，

收稿日期：2017-11-18
基金项目：广州市科信委项目（2014J4500027）
作者简介：管锦绣（1993-），女，硕士研究生在读，主要研究方向为食品微生物
通讯作者：翁文川（1973-），男，高级工程师，主要研究方向为食品与化妆品质量安全及微生物检测

95%的急性病毒性胃肠炎暴发由诺如病毒引起[8]，国内由诺如病毒引起的急性胃肠炎疫情的报道逐渐增多，日益成为重要的公共卫生问题[9]。

由于GⅡ诺如病毒尚不能进行体外培养，也缺乏相应的动物模型，变异多，鉴别和检测非常困难。传统的免疫学及血清学检测方法存在很大的局限性。随着大量诺如病毒全基因及部分序列的测定与分析，分子生物学技术被广泛应用于其诊断和研究[9]。目前诺如病毒的检测大多使用实时荧光RT-PCR（RT-qPCR）方法。但RT-qPCR法需要制备标准曲线，且在灵敏度方面有一定的局限性。微滴数字 RT-PCR(Reverse Transcription Droplet Digital PCR，RT-ddPCR)是近年来兴起的一种新的绝对定量的技术，又称为第三代PCR技术。微滴数字RT-PCR法与实时荧光RT-PCR法相比，具有更高的灵敏度，并且它不需要依赖标准曲线，能够实现绝对定量，无疑是理想的选择。

本研究对 RT-ddPCR 反应的退火温度进行了优化，对RT-qPCR法和RT-ddPCR法检测GⅡ型诺如病毒的灵敏度及重现性进行了比较，并将优化后的RT-ddPCR法初步应用于人工污染样品西生菜的检测，建立了快速准确的GⅡ型诺如病毒定量检测方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 材料

GⅡ型诺如病毒阳性样品悬液由丹东出入境检验检疫局技术中心提供；西生菜采集于广州市各区农贸市场。

1.1.2 主要试剂

配制溶液：牛肉膏-甘氨酸洗脱液（含3%牛肉膏，0.05 mol/L 甘氨酸，pH 9.5）、PEG6000+PEG8000溶液（含20%（*m/V*）PEG6000，20%（*m/V*）PEG8000，1.5 mol/L 氯化钠）。

购置试剂：PBS缓冲液，美国GE Healthcare Life Sciences公司；PEG8000和PEG6000分析纯，上海生工公司；甘氨酸分析纯，广州化学试剂厂；牛肉浸膏，广东环凯生物科技有限公司；QIAamp Viral RNA mini Kit，德国 QIAGEN 公司；One Step PrimeScript™ RT-PCR Kit(Perfect Real Time)（货号：RR064A），宝生物工程(大连)有限公司；One-Step RT-ddPCR Advanced Kit for ProbesNo dUTP(货号：1864021)，美国伯乐公司；微滴式数字PCR其他有关试剂，美国伯乐公司。

1.1.3 仪器

pH 计，北京普析通用仪器有限责任公司；GFL1013 恒温水浴锅，德国GFL公司；E163302生物安全柜，赛默飞公司；Sigma1-15PK 高速冷冻离心机，美国 Sigma 公司；Sigma1-14 小型高速离心机，美国Sigma 公司；MDF-382E(N)-70 ℃冰箱，日本 Sanyo公司；ABI 7900HT Fast 型实时荧光PCR仪，美国ABI公司；BSA3202S 电子天平，北京赛多利斯仪器系统有限公司；VORTEX GENE-2G560E 涡旋震荡器，美国 Scientific Industries 公司；HVE-50 高压灭菌锅，华粤行仪器有限公司；QX200 Droplet Reader、DG8 cartridge 微滴生成卡、QX200 Droplet Generator、PX1TM PCR Plate Sealer 和 PCR 基因扩增循环仪，美国伯乐公司。

1.1.4 引物和探针

选取检验检疫行业标准（SN/T 1635-2005 贝类中诺沃克病毒检测方法 普通 RT-PCR 方法和实时荧光RT-PCR 方法）中引物和探针研究 GⅡ型诺如病毒，用于实时荧光 RT-PCR（RT-qPCR）法和微滴式数字RT-PCR（RT-ddPCR）法检测。引物和探针均由生工生物工程（上海）股份有限公司合成(表1)。

表1 检测GⅡ型诺如病毒所用引物探针序列

Table 1 The primers and probe for the detection of GⅡ Norovirus

病毒基因型	引物和探针	序列(5’-3’)	产物长度/bp
GⅡ	COG2F	CAR GAR BCN ATG TTY AGR TGG ATG AG	98
	COG2R	TCG ACG CCA TCT TCA TTC ACA	
	Probe Ring2-TP	FAM-TGG GA G GGC GAT CGC AAT CT-TAMRA	

1.2 方法

1.2.1 RNA 提取

取140 μL GⅡ型诺如病毒阳性样品悬液于1.5 mL离心管中，按照QIAamp Viral RNA mini Kit说明书操作进行病毒RNA的提取。将提取的RNA进行10倍梯度稀释，然后-80 ℃冻存或者直接进行RT-qPCR和RT-ddPCR反应。

1.2.2 实时荧光RT-PCR反应

以1.2.1制备的RNA为模板，使用的引物和探针序列见表1，进行RT-qPCR反应。RT-qPCR反应体系（20 μL）：Buffer 10 μL，Taq HS 0.4 μL，RT Enzyme

Mix 0.4 μL，上引物 COG2F 0.8 μL（10 μmol/L），下引物 COG2R 0.8 μL（10 μmol/L），探针 Probe Ring2-TP 0.8 μL（10 μmol/L），ROX 0.4 μL，RNA 模板 2 μL，RNase-free Water 4.4 μL。反应条件设置为：42 ℃ 5 min；95 ℃ 10 s；95 ℃ 5 s，56 ℃ 1 min，共 45 个循环。

1.2.3 微滴式数字 RT-PCR 反应

采用 One-step RT-ddRT-PCR Kit for Probes 试剂盒推荐的 20 μL 体系，以 1.2.1 制备的 RNA 为模板，使用的引物和探针序列见表 1，进行 RT-ddPCR 反应。RT-ddPCR 反应尽量在封好膜之后 30 min 内进行或者放于 4 ℃冰箱 4 h 之内进行。RT-ddPCR 反应体系（20 μL）：Supermix 5 μL，Reverse transcriptase 2 μL，300 Mm DTT 1 μL，上引物 COG2F 1.8 μL（10 μmol/L），下引物 COG2R 1.8 μL（10 μmol/L），探针 Probe Ring2-TP 0.5 μL（10 μmol/L），RNA 模板 2 μL，RNase-free Water 5.9 μL。反应条件设置为：42 ℃ 60 min；95 ℃ 10 min；95 ℃ 30 s，56 ℃ 1 min，共 40 个循环；98 ℃ 10 min；4 ℃ ∞。RT-ddPCR 反应结束后将 96 孔板放入 QX200 Droplet Reader，依次录入样品信息后运行，仪器自动采集荧光信号，完毕后采用软件 Quanta Soft 计算出最终结果。

1.2.4 人工污染样品检测

将西生菜叶片剪成 1 cm×cm 片状，称取 5.0 g 放入 50 mL 离心管中。将 GⅡ型诺如病毒阳性样品悬液 10 倍稀释，稀释度为 10^{-1}~10^{-5}，然后分别取不同稀释度的 GⅡ型诺如病毒稀释液 200 μL 加入到装有西生菜叶片的 50 mL 离心管中，生物安全柜室温静置 20 min 制得人工污染样品。然后加入 40 mL 牛肉膏-甘氨酸洗脱液，37 ℃ 100 r/ min 孵育 30 min，4 ℃，10000 r/min 离心 30 min；转移上清至另一个 50 mL 离心管中，用 1 mol/L 盐酸溶液调节 pH 至 7.0±0.5；加入等体积同浓度（40%）的 PEG6000+PEG8000，使沉淀剂终浓度为 8%，涡旋振荡 60 s 混匀；在 4 ℃下孵育 4 h。5 ℃ 10000 r/min 离心 30 min，弃去上清液，然后 5 ℃10000 r/min 离心 5 min，以压实沉淀物；弃上清，保留沉淀；加入 500 μL PBS 重悬沉淀，60 ℃加热 5 min 充分溶解沉淀。4 ℃，10000 r/ min 离心 3 min，取上清液，得到病毒粗提产物，-20 ℃保留用于提取 RNA。以提取的 RNA 为模板进行 RT-ddPCR 反应。

2 结果与讨论

2.1 退火温度的优化结果

RT-ddPCR 的退火温度是最重要的参数，对于反应的特异性有重要影响，退火温度太低可能引起非特异性扩增，退火温度过高会降低反应的灵敏度[10]。设置 GⅡ型诺如病毒的 RT-ddPCR 反应程序的退火温度为 55.0 ℃，梯度差异为 9.3 ℃。反应结束后，将 96 孔板转移到 QX200 Droplet Reader 进行读数，各退火温度下（55.0~64.3 ℃）实测拷贝数浓度分别为 910、925、890、914、855、629、323 copies/μL，见图 1。由图 1 可知，55.0~56.9 ℃时扩增结果良好，阳性微滴和阴性微滴明显分成两簇而且中间弥散的微滴数目很少.

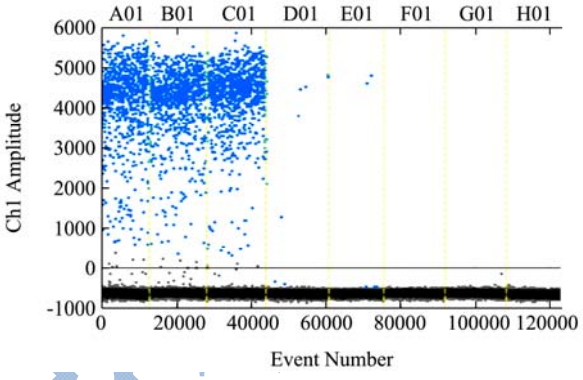


图1 不同退火温度的RT-ddPCR法检测GⅡ型诺如病毒的一维散点图

Fig.1 One-dimensional scatter plots of detection of GⅡ norovirus by RT-ddPCR with different annealing temperature

注：A01：55.0 ℃；B01：55.7 ℃；C01：56.9 ℃；D01：58.8 ℃；E01：61.1 ℃；F01：63.0 ℃；G01：64.3 ℃；H01：NTC。

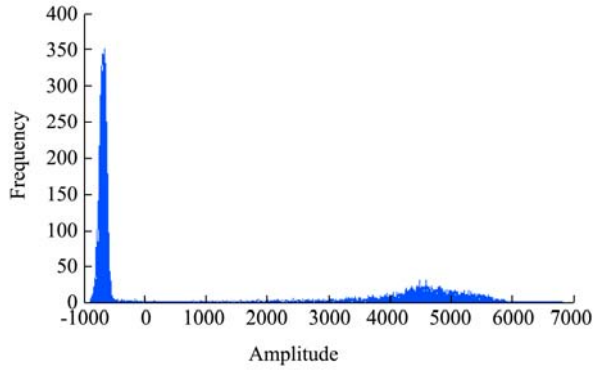


图2 退火温度为55.7 ℃的RT-ddPCR法检测GⅡ型诺如病毒的直方图

Fig.2 Histograms of detection of GⅡ norovirus by RT-ddPCR with 55.7 ℃ of annealing temperature

由图 2 可知，退火温度为 55.7 ℃时，阳性峰和阴性峰显著分开，中间没有任何干扰，微滴数量和质量都较好，表明此退火温度能够保证 RT-ddPCR 法定量检测 GⅡ型诺如病毒的结果的可靠性。所以为了保持与 RT-qPCR 反应的一致性，确定 GⅡ型诺如病毒的

RT-ddPCR 反应的较适退火温度为 56 ℃。

2.2 RT-ddPCR 和 RT-qPCR 的灵敏度

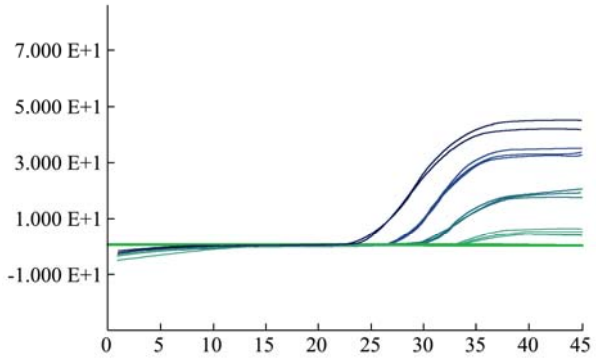


图 3 RT-qPCR 法检测不同稀释度 GⅡ型诺如病毒 RNA 的扩增曲线

Fig.3 Amplication plot of detection of GⅡ type norovirus RNA by RT-qPCR with different dilution

注：扩增曲线从左到右代表稀释度为 10^{-1}、10^{-2}、10^{-3}、10^{-4}（三平行）。

以稀释度为 10^{-1}~10^{-5} 的 RNA 为模板，分别进行 RT-qPCR 反应和 RT-ddPCR 反应。由图 3 可知，稀释度为 10^{-1}~10^{-4} 的 RNA 都有“S”型扩增曲线，而对于稀释度为 10^{-5} 的 RNA，RT-qPCR 结果和阴性对照几乎均无扩增，由此可知 RT-qPCR 法检测 GⅡ型诺如病毒的灵敏度为稀释度为 10^{-4} 的 RNA 浓度，其 Ct 值（循环阈值）为 32.63。

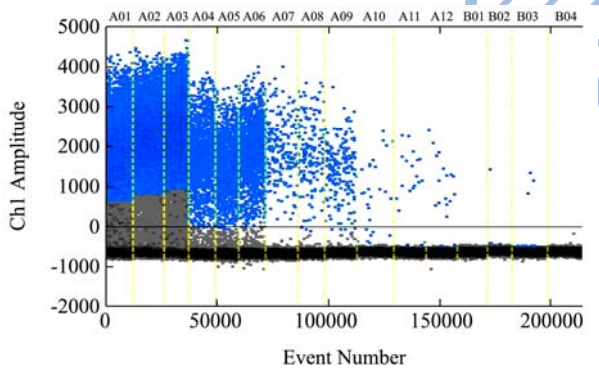


图 4 RT-ddPCR 法检测不同稀释度 GⅡ型诺如病毒 RNA 的一维散点图

Fig.4 One-dimensional scatter plots of detection of GⅡ norovirus RNA by RT-ddPCR with different dilution

注：A01~A03：10^{-1}；A04~A06：10^{-2}；A07~A09：10^{-3}；A10~A12：10^{-4}；B01~B03：10^{-5}；B04：NTC。

由图 4 可知，所有稀释度均有阳性和阴性微滴，满足泊松分布，不存在所有微滴均被 RNA 饱和，无阴性微滴存在的情况，所以数据有效；单个样品内总微滴数是检验实验好坏的指标，可接受的平均微滴数目为 10000[10]，由图 5 可知，所有反应生成的可接受的平均微滴数目为 13283.07，均大于 10000，表明所有反应微滴生成正常，保证了后续实验结果分析的准确性，且可看出，随着 RNA 稀释度的增高，阳性微滴逐步减少，阴性微滴逐步增加；NTC 没有检测到阳性微滴，可见该体系没有污染或非特异性扩增，方法的特异性良好；当原始模板稀释度为 10^{-5} 时，实测拷贝数浓度为 0.54 copies/μL，对应原始模板的拷贝数浓度为 5.40 copies/μL。对比 RT-qPCR 对应浓度的结果，RT-ddPCR 法检测 GⅡ型诺如病毒的灵敏度比 RT-qPCR 法高一个稀释度，检测低限为 5.40 copies/μL。

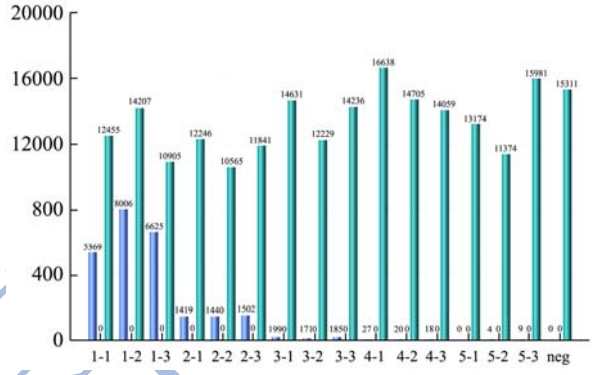


图 5 RT-ddPCR 法检测不同稀释度 GⅡ型诺如病毒 RNA 的微滴数目柱状图

Fig.5 Number of droplet events of detection of GⅡ norovirus RNA by RT-ddPCR with different dilution

注：1-1~1-3：10^{-1}；2-1~2-3：10^{-2}；3-1~3-3：10^{-3}；4-1~4-3：10^{-4}；5-1~5-3：10^{-5}；neg：NTC。

2.3 RT-ddPCR 和 RT-qPCR 的重复性

通过对五个梯度浓度的 3 次重复性实验结果分析，初步得到 RT-qPCR 法和 RT-ddPCR 法检测 GⅡ型诺如病毒的重复性，如表 2 所示。

由表 2 可知，RT-qPCR 法的 RSD 为 0.58~2.08%；RT-ddPCR 法的 RSD 为 3.74~25.00%。两种方法的 RSD 均先随 RNA 稀释度的升高而减小，即精密度（精密度越高，重复性越好）升高，后随稀释度的升高而增大，即精密度减小，说明两种方法在中间浓度时重复性较好。

在稀释度为 10^{-3} 时，RT-ddPCR 法的 RSD 为 3.74%，精密度最好，在稀释度为 10^{-5} 即 RNA 浓度最低时，RT-ddPCR 法的 RSD 为 25.00%精密度最差。说明在 RNA 浓度很低时，RT-ddPCR 法的稳定性反而不如 RT-qPCR，这种情况也在其它的研究文献中有所提及[11]，初步分析原因可能是与泊松分布统计算法和极低浓度核酸较分散造成吸液时各平行样中核酸量不同有关。

表 2 RT-qPCR 法与 RT-ddPCR 法检测的重现性

Table 2 Repeatability of RT-qPCR and RT-ddPCR

稀释度	RT-qPCR（Ct）			SD	RSD/%	RT-ddPCR/(copies/μL)			SD	RSD/%
	1	2	3			1	2	3		
10^{-1}	24.01	23.83	24.43	24.09	1.29	975	1100	1040	1038.30	6.02
10^{-2}	25.95	25.74	25.65	25.78	0.58	153	172	160	161.67	5.94
10^{-3}	28.43	27.73	28.90	28.35	2.07	16.1	16.6	15.4	16.03	3.74
10^{-4}	31.75	31.48	32.75	31.99	2.08	1.9	1.6	1.5	1.67	12.60
10^{-5}	-	-	-	-	-	0.49	0.41	0.66	0.52	25.00

注：“-”代表检测结果为阴性。

表 3 RT-ddPCR 法检测人工污染样品的结果

Table 3 Results of detection of artificially contaminated sample by RT-ddPCR

病毒稀释度	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}
实测拷贝数/(copies/μL)	654	108	7.9	0.69	No Call
原始模板拷贝数/(copies/μL)	6540	1080	79	6.9	No Call

2.4 人工污染样品检测结果

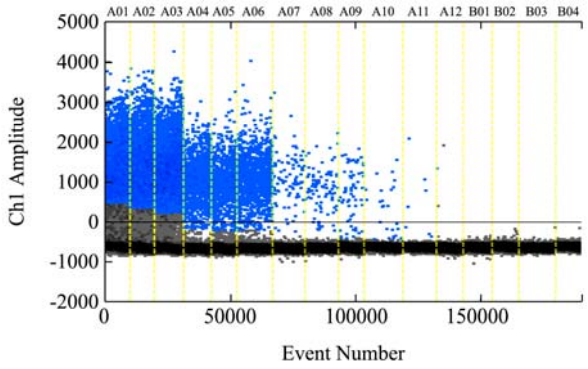


图 6 RT-ddPCR 法检测人工污染样品的一维散点图

Fig.6 One-dimensional scatter plots of detection of artificially contaminated sample byRT-ddPCR

注：A01~A03：10^{-1}；A04~A06：10^{-2}；A07~A09：10^{-3}；A10~A12：10^{-4}；B01~B03：10^{-5}；B04：NTC。

各稀释度的 GⅡ型诺如病毒制得的人工污染样品经 RT-ddPCR 法检测的结果如表 3 所示。由表 3 可知，RT-ddPCR 法最低可以将人工污染西生菜中稀释度为 10^{-4} 的 GⅡ型诺如病毒（RT-ddPCR 检测结果为 54.00 copies/μL）检测出来，说明 RT-ddPCR 法在人工污染样品检测中表现理想；且可看出，人工污染样品的检测低限比直接检测的检测低限高，这是由于人工污染样品中病毒经富集回收有一定损失造成的[12]。

3 结论

3.1 微滴数字 RT-PCR(RT-ddPCR)是通过将微量样品作大倍数稀释和分液(partitioning)，通过极度稀释实现理论上的单分子扩增，然后用终点法 PCR 和统计学中的泊松分布原理计算出样品的原始浓度[13]。RT-ddPCR 方法与 RT-qPCR 方法相比，不依赖扩增曲线的 Ct 值进行定量，不受扩增效率影响，也不必采用内参基因和标准曲线，具有较好的准确度和重现性[14]，同时其相对 RT-qPCR 具有更高的灵敏度，下限可调至单拷贝，阳性微滴计算准确且直接[15]，得以实现绝对定量分析[15~18]。

3.2 目前数字 PCR 主要应用于 3 方面：（1）复杂的异质样品中的稀有序列检测、从外周血中获得分子生物标记物、血液中拷贝数很低的 HBV(hepatitis B virus，HBV)检测[19]；（2）低频特异突变筛查、肿瘤分子标志物稀有突变检测、疾病相关的基因拷贝数变异检测；（3）病毒核酸定量检测（如：猪圆环病毒 2 型[20]、甲型流感病毒[10]）、病毒的分析、其他病原微生物的 RNA 检测和基因表达分析。目前国内已出现数字 PCR 用于金黄色葡萄球菌[21]、沙门氏菌[22]和大肠杆菌[23]等菌的检测的报道，国外 David Polo，Julien Schaeffer[24]、Audrey Fraisse[25]和 Coralie Coudray-Meunier[26]等使用微流体数字 RT-PCR（RT-dPCR）检测诺如病毒。

3.3 本研究使用 RT-ddPCR 检测诺如病毒，优化了 RT-ddPCR 反应的退火温度，退火温度为 55.7 ℃时，阳性峰和阴性峰显著分开，中间没有任何干扰，微滴数量和质量都较好；考察了 RT-qPCR 和 RT-ddPCR 两种方法的灵敏度及重复性，RT-ddPCR 方法检测 GⅡ型诺如病毒的灵敏度为 5.40 copies/μL，其灵敏度高于 RT-qPCR，重复性实验对比表明两种方法在在检测中间浓度的 GⅡ型诺如病毒中间浓度时重复性均较好；人工污染西生菜实验中表明微滴式数字 RT-PCR 法最低检测限为 54.00 copies/μL。本研究建立了一种高灵敏度的快速准确的检测方法，方法操作简单、使用方

便、读数直接，进一步提高了GⅡ型诺如病毒的检测水平。

参考文献

[1] 纪衍瑾,孙雯雯,祝喆,等.应用实时荧光RT-PCR法检测水产品中诺如病毒[J].中国现代医生,2015,53(19):130-132
JI Yan-jin, SUN Wen-wen, ZHU Zhe, et al. The application of real-time fluorescent RT-PCR in testing norovirus in aquatic products [J]. China Mod. Doctor, 2015, 53(19): 130-132

[2] 夏体娇,金敏,陈照立,等.荧光定量RT-PCR检测诺如病毒基因Ⅱ型方法的建立和评估[J].解放军预防医学杂志,2013,31(3):200-203
XIA Ti-jiao, JIN Min, CHEN Zhao-li, et al. Detection of norovirus genogroup Ⅱby real-time fluorescent quantitative reverse transcription-PCR assay [J]. J Prev. Med. Chin. PLA, 2013, 31(3): 200-203

[3] 谭翰清,郭赐贶,谭海芳,等.诺如病毒遗传组Ⅰ型TaqMan-MGB探针实时荧光RT-PCR的研究[J].热带医学杂志,2008,8(10):1030-1033,1040
TAN Han-qing, GUO Ci-kuang, TAN Hai-fang, et al. The study for genogroup Ⅰ of norovirus detection using TaqMan-MGB probe-based real-time fluorescent reverse translation polymerase chain reaction [J]. Journal of Tropical Medicine, 2008, 8(10): 1030-1033, 1040

[4] 姚秀林.应用实时荧光定量RT-PCR技术快速检测基因Ⅱ型诺如病毒的价值探讨[J].中国医药指南,2016,14(3):179
YAO Xiu-lin. The value discussion of the application of the rapid detection of genogroup Ⅱnorovirus by real-time fluorescent quantitative reverse transcription-PCR [J]. Guide of China Medicine, 2016, 14(3): 179

[5] 周阳,栾军,蒋鲁岩,等.实时荧光RT-PCR检测冷冻草莓中诺如病毒[J].食品安全质量检测学报,2013,4(2):515-520
ZHOU Yang, LUAN Jun, JIANG Lu-yan, et al. Detection of norovirus in frozen strawberry by real-time fluorescent RT-PCR [J]. Journal of Food Safety and Quality, 2013, 4(2): 515-520

[6] 邓丽丽,刘巍,莫建光,等.应用荧光定量RT-PCR法检测牡蛎中诺如病毒[J].中国热带医学,2011,11(2):133-135
DENG Li-li, LIU Wei, MO Jian-guang, et al. Detection of norovirus in oyster by real time RT-PCR [J]. China Tropical Medcine, 2011, 11(2): 133-135

[7] 谢雅晶,刘贤金.食源性诺如病毒在果蔬农产品中的污染及检测研究[J].病毒学,2015,31(6):685-697
XIE Ya-Jing, LIU Xian-Jin. The advances in the contamination and detection of foodborne pathogen noroviruses in fresh produce [J]. Chin. J Virol., 2015, 31(6): 685-697

[8] 周冬梅,靳淼,李慧莹,等.双重荧光定量一步RT-PCR法同时检测 GⅠ、GⅡ型诺如病毒[J].病毒学报,2013, 29(3):310-315
ZHOU Dong-mei, JIN Miao, LI Hui-ying, et al. Eatablish a duplex fluorescent quantitative one-step RT-PCR system for the detection of norovirus genogroup Ⅰand Ⅱ [J]. Chinese of Journal of Virology, 2013, 29(3): 310-315

[9] 钱明明,许海燕,宗晴,等.常规RT-PCR与荧光定量RT-PCR检测GⅠ、GⅡ型诺如病毒方法的建立及其应用[J].中国人兽共患病学报,2015,31(7):602-606,611
QIAN Ming-ming, XU Hai-yan, ZONG Qing, et al. Establishment of conventional RT-PCR and real-time RT-PCR to detect norovirus and its application [J]. Chinese Journal of Zoonoses, 2015, 31(7): 602-606, 611

[10] 冯兆民,赵翔,邹晓辉,等.基于微滴式数字PCR技术的甲型流感病毒绝对定量方法的建立及应用[J].病毒学报,2017,33(1):1-5
FENG Zhao-min, ZHAO Xiang, ZOU Xiao-hui, et al. Droplet digital polymerase chain reaction method for absolute quantification of influenza A virus [J]. Chinese of Journal of Virology, 2017, 33(1): 1-5

[11] 杨纯佳,张娟,周臣清,等.数字PCR在食源性致病微生物检测中的应用研究进展[J].食品安全质量检测学报,2016,7(12):4726-4730
YANG Chun-jia, ZHANG Juan, ZHOU Chen-qing, et al. Research progress on the application of digital PCR in detection of foodborne pathogenic microorganisms [J]. Journal of Food Safety and Quality, 2016, 7(12): 4726-4730

[12] 管锦绣,许喜林,翁文川,等.西生菜中低污染量GⅡ型诺如病毒的富集与定量检测研究[J].食品安全质量检测学报,2017,8(9):3536-3542
GUAN Jin-xiu, XU Xi-lin, WENG Wen-chuan, et al. Enrichment and quantitative detection of low artificially contaminated GⅡ type norovirus in fresh romaine lettuce [J]. Journal of Food Safety and Quality, 2017, 8(9): 3536-3542

[13] Hindson B J, Ness K D, Masquelier D A, et al. High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number [J]. Anal. Chem., 2011, 83 (22): 8604-8610

[14] 杨纯佳,张娟,周臣清,等.数字PCR在食源性致病微生物检测中的应用研究进展[J].食品安全质量检测学报,2016,7(12):4726-4730

YANG Chun-jia, ZHANG Juan, ZHOU Chen-qing, et al. Research progress on the application of digital PCR in detection of foodborne pathogenic microorganisms [J]. Journal of Food Safety and Quality, 2016, 7(12): 4726-4730

[15] 王珊,李志娟,苗丽.微滴式数字 PCR 与实时荧光 PCR 检测羊肉制品中羊源和猪源性成分方法的比较[J].肉类工业,2015,411(7):38-41
WANG Shan, LI Zhi-juan, MIAO Li. Comparison of microsphere digital PCR and real-time fluorescence PCR for detection mutton- derived and porcine-derived ingredients in mutton products [J]. Meat Industry, 2015, 411(7): 38-41

[16] Hindson C M, Chevillet J R, Briggs H A, et al. Absolute quantification by droplet digital PCR versus analog real-time PCR [J]. Nat Methods, 2013, 10(10): 1003-1005

[17] Sanders R, Huggett J F, Bushell C A, et al. Evaluation of digital PCR for absolute DNA quantification [J]. Anal. Chem., 2011, 83(17): 6474-6484

[18] Pinheiro L B, Coleman V A, Hindson C M, et al. Evaluation of a droplet digital polymerase chain reaction format for DNA copy number quantification [J]. Anal. Chem., 2012, 84 (2): 1003-1011

[19] 蔡青春.基于微滴式数字 PCR 技术的新型超敏外周血 HBV-DNA 检测方法的建立及其应用[D].重庆:重庆医科大学,2016
CAI Qing-chun. Establishment and application of the new and hypersensitive detection of hepatitis B virus in peripheral blood based on droplet digital PCR [D]. Chongqing: Chongqing Medical University, 2016

[20] 赵珊.猪圆环病毒 2 型微滴式数字 PCR 检测方法的建立与初步应用[D].雅安:四川农业大学,2016
ZHAO Shan. Establishment and application of the dection of Porcine circovirus type2 by droplet digital PCR [D]. Ya'an: Sichuan Agricultural University, 2016

[21] 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 Wei, LI Yue-hua, SUN Yong, et al. Quantitative detection of *Staphylococcus aureus* by droplet digital PCR assay in yogurt [J]. Food Science, 2017, 38(16): 287-291

[22] 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 Jing, ZHANG Hui-min, WEI Wei, et al. Detection of *Salmonella* cells based on SD-PMA-ddPCR [J]. Science and Technology of Food Industry, 2016, 37(10): 67-71

[23] 董莲华,张玲,姜君,等.大肠杆菌 O157:H7 微滴数字 PCR 定量方法的建立[J].分析化学,2015,43(3):319-324
DONG Lian-hua, ZHANG Ling, JIANG Jun, et al. Development of droplet digital polymerase chain reaction for quantifying *Escherichia Coli* O_{157}:H_7 [J]. Chin. J Anal. Chem., 2015, 43(3): 319-324

[24] David Polo, Julien Schaeffer, Nelly Fournet, et al. Digital PCR for Quantifying Norovirus in Oysters Implicated in Outbreaks [J]. France Emerging Infectious Diseases, 2016, 22(12)

[25] Audrey Fraisse, Coralie Coudray-Meunier, Sandra Martin-Latil, et al. Digital RT-PCR method for hepatitis A virus and norovirus quantification in soft berries [J]. International Journal of Food Microbiology, 2017, 243: 36-44

[26] Coralie Coudray-Meunier, Audrey Fraisse, Sandra Martin-Latil, et al. A comparative study of digital RT-PCR and RT-qPCR for quantification of Hepatitis A virus and Norovirus in lettuce and water samples [J]. International Journal of Food Microbiology, 2015, 201: 17-26