

微滴式数字 PCR 和实时荧光 PCR 在豆奶饮料转基因成分检测中的应用

王鸣秋, 张涛, 林津, 杨硕, 刘艳, 李诗瑶, 马弋, 张莉

(湖北省食品质量监督检验研究院, 湖北武汉 430075)

摘要: 为探索数字 PCR 在转基因成分筛选检测中的应用, 解决现行转基因食品标准实施中的问题, 完善我国转基因食品的检测监管体系。本文选取转基因启动子 *CaMV35s* 和终止子 *NOS* 基因为靶标, 大豆内源基因 *Lectin* 为内标, 以转基因大豆标准品分别测定数字 PCR 和实时荧光 PCR 的浓度和含量检测低限, 并应用于 30 批次豆奶饮料转基因成分实测。结果表明, 数字 PCR 在转基因筛查的浓度检测低限达到 0.04 ng/反应, 含量检测低限达到 0.05%, 均优于实时荧光 PCR (0.2 ng/反应, 1%), 且能够满足最严欧盟转基因标识阈值 0.9% 的检测要求。在豆奶饮料实际应用中发现, 26 批次样品两个平台检测结果一致为阴性, 1 批次一致为阳性, 3 批次 Ct 值在 34.59~38.28 之间的样品经数字 PCR 检测得到确切结果, 说明数字 PCR 可辅助确认 RT-PCR 可疑结果, 解决现行标准判定难题。

关键词: 微滴式数字 PCR; 实时荧光 PCR; 转基因; 检测; 豆奶饮料

文章编号: 1673-9078(2018)12-239-245

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2018.12.035

Application of Digital PCR and Real-time PCR on Screening Detection of GM Components of Soybean Milk

WANG Ming-qiu, ZHANG Tao, LIN Jin, YANG Shuo, LIU Yan, LI Shi-yao, MA Yi, ZHANG Li

(Hubei Provincial Institute for Food Supervision and Test, Wuhan 430075, China)

Abstract: In order to solve the implementation problems of current GM food standards and improve the inspection and supervision of GM foods in China, the application of digital PCR (dPCR) in the screening detection of genetically modified organisms (GMOs) was developed. In this study, the transgenic promoter *CaMV35s* and the terminator *NOS* genes were selected as targets and soybean endogenous gene *Lectin* as internal standard, and the detection limit were determined using transgenic soybean standard on real-time PCR (RT-PCR) and ddPCR systems. Two methods were both applied to GM screening detection for 30 batched of soybean milk. The results showed that the concentration detection limit of ddPCR reached 0.04 ng/reaction, and the limit of content detection reached 0.05%, which were both superior to RT-PCR (0.2 ng/reaction, 1%). In addition, 0.05% was lower than the most stringent labeling threshold level 0.9% of the European Union (EU). In the practical application of soybean milk, 26 batches of samples were consistently negative and 1 was positive on both of the two platforms, while 3 batches of samples with Ct values between 34.59~38.28 were confirmed by ddPCR, indicating that dPCR could help confirm the uncertain results of RT-PCR and solve the current standard judgment problems.

Key words: droplet digital PCR; real-time PCR; genetically modified organism; detection; soybean milk

转基因作物自商业化种植以来迅速发展, 全球种植面积已由 1996 年的 170 万 hm^3 增长到 2016 年的 1.851 亿 hm^3 , 种植国家增加到 26 个^[1]。但其在解决全球粮食问题的同时也带了诸多安全性争议, 很多国家和地区开始实施转基因产品标识管理制度, 并设置了阈值^[2,3]。如欧盟设定阈值为 0.9%, 日本为 5%, 韩

收稿日期: 2018-09-03

作者简介: 王鸣秋 (1986-), 女, 工程师, 硕士, 研究方向: 食品安全检测
通讯作者: 张莉 (1978-), 女, 高级工程师, 硕士, 研究方向: 食品质量安全检测与管理

国 3%^[4-6]等。我国 2001 年发布的《农业转基因生物安全管理条例》明确规定了在中国境内销售的农业转基因生物应当有明显的标识, 但尚未设定阈值^[7,8]。我国现行标准中对转基因成分的检测方法主要为实时荧光 PCR (real-time PCR, RT-PCR) 定性“有或无”。然而, 实时荧光 PCR 扩增效率容易受到模板纯度、引物探针浓度、反应抑制剂等诸多因素影响, 进而影响反应 Ct 值和结果准确性^[9,10], 特别是对于复杂食品基质容易出现可疑结果无法判定, 存在低含量样品重复性较差等缺点。

数字 PCR (digital PCR, dPCR) 技术是近年来迅速发展起来的一种突破性的核酸定量分析技术。dPCR 是基于单分子目标基因扩增定量的技术, 核酸模板被分配到大量独立的反应单元中, 扩增结束后通过统计学分析单个反应室的阳性信号, 从而实现绝对定量^[11,12]。微滴数字 PCR (droplet digital PCR, ddPCR) 是 dPCR 技术的一种, 它主要是以形成大量油包水微滴的形式对核酸进行成千上万倍稀释, 然后以每个小微滴为独立的反应单元进行 PCR 反应, 最后利用泊松分布原理对核酸分子进行绝对定量分析^[13]。dPCR 技术不依赖于标准品和标准曲线的绘制, 消除了样品基质对 Ct 值的影响, 具有检出限低、重复性好等优点, 非常适用于低拷贝数靶标的转基因检测^[14-16]。

大豆作为人类重要的油料作物, 可生产加工成大豆油、豆粕、大豆营养品等各种食品, 在我国粮食与饲料市场占有不可替代的重要地位。自 1988 年第一株转基因大豆现世至今, 国际市场上转基因大豆种类可达 30 余种^[17], 用于各类食品的加工生产。豆奶饮料以大豆为主要原料, 因其含有丰富的蛋白质、微量元素和维生素, 是一种广受大众欢迎的健康饮品。但国内尚未有针对豆奶饮料的转基因成分检测报道, 加之其品种繁杂, 生产厂家参差不齐, 原料混杂, 可提取的大豆 DNA 质量不高, 必须选择一种灵敏度高, 重复性好的方法进行检测。对于豆奶中转基因成分的检测第一步为筛选 PCR, 即以外源基因中的启动子或终止子为目的检测片段, 筛选为阳性后再进行特异性 PCR 检测^[18]。

本研究以转基因常见启动子 *CaMV35s* 和终止子 *NOS* 基因为靶标, 对比实时荧光 PCR 和微滴式数字 PCR 的检测下限, 并应用于市售豆奶饮料的转基因成分筛查, 从而对豆奶饮料转基因成分进行有效检测和监管, 便于转基因标识制度的实施。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

转基因大豆 GTS40-3-2 标准品 (10%、1%) 购于 European Reference Materials (ERM); 转基因标准品 (100%)、非转基因标准品来源于中检院质控样品; Takara MiniBEST Universal Genomic DNA Extraction Kit、Premix Ex Taq (Probe qPCR) 购于大连宝生物公司; ddPCR Supermix for Probes 购于美国 Bio-rad 公司; PCR 引物和探针由上海生工合成; 豆奶饮料购于湖北市场流通领域。

1.2 仪器和设备

台式高速冷冻离心机 SG3-18K 购于 Sigma 公司; 5424R 高速冷冻离心机购于德国 Eppendorf 公司; CFX96 Deep Well Real-time System、QX200 Droplet dPCR 系统购于美国 Bio-rad 公司; Tissue Lyser II 组织研磨仪、QIAxpert 核酸浓度检测仪购于德国 Qiagen 公司。

1.3 试验方法

1.3.1 DNA 提取

称取 60 mg 标准品于 2 mL 离心管中, 按照试剂盒说明书操作提取基因组 DNA。利用 QIAxpert 测定所提 DNA 溶液浓度, 并以 A260/A280 比值判断 DNA 的质量。DNA 稀释至 50 ng/μL 备用。

1.3.2 引物探针的选择

目的基因序列参考 SN/T 1202-2010 《食品中转基因植物成分定性 PCR 检测方法》^[19], 大豆内源基因 *Lectin* 作为内标。具体引物探针序列见表 1。

表 1 转基因大豆筛选 PCR 引物、探针序列

Table 1 Primers and probes sequences of GM soybean screening PCR

基因	名称	序列
<i>Lectin</i>	正向引物	5'-cctcctcggaaagttacaa-3'
	反向引物	5'-gggcatagaaggtgaagt-3'
	探针	5'-FAM-ccctcgtctcttggctgcgccctct-TAMRA-3'
<i>CaMV35s</i>	正向引物	5'-cgacagtggtcccaaga-3'
	反向引物	5'-aagacgtggttgaacgtcttc-3'
	探针	5'-FAM-tggacccccaccacgagagcatc-TAMRA-3'
<i>NOS</i>	正向引物	5'-atcgttcaaacattggca-3'
	反向引物	5'-attcgggactctaatacata-3'
	探针	5'-FAM-catcgcaagaccggcaacagg-TAMRA-3'

1.3.3 ddPCR 反应体系及条件

ddPCR 反应体系总体积为 20 μL: ddPCR supermix

(2×) 10 μL, 正反向引物 (10 mM) 各 1 μL, 探针 (10 mM) 0.5 μL, DNA 模板 2.5 μL, 补水至 20 μL。将配置好的反应体系转移至微滴发生卡中, 利用微滴发生器进行微滴生成。转移生成的微滴 (约 40 μL) 至 96 孔 PCR 反应板, 封膜, 进行 PCR 反应。反应条件为: 95 °C 5 min; 94 °C 30 s, 60 °C 1 min, 40 个循环; 98 °C 10 min; 4 °C 保存反应产物。扩增结束后将 96 孔板置于微滴分析仪进行荧光测定和数据读取, 采用 Quanta Soft V 软件分析实验数据。

1.3.4 RT-PCR 反应体系及条件

RT-PCR 反应体系总体积为 20 μL: Premix Ex Taq (2×) 10 μL, 正反向引物 (10 mM) 各 1 μL, 探针 (10 mM) 0.5 μL, DNA 模板 2.5 μL, 补水至 20 μL。反应条件为: 95 °C 30 s; 95 °C 5 s, 60 °C 30 s, 50 个循环。

1.3.5 浓度检测低限测定

将提取的 100%转基因标品 DNA 溶液 (50 ng/μL) 用去离子水进行五倍梯度稀释, 得到 50 ng/μL、10 ng/μL、2 ng/μL、0.4 ng/μL、0.08 ng/μL、0.016 ng/μL、0.0032 ng/μL 共 7 个浓度梯度的转基因 DNA 溶液。各取 2.5 μL 为模板, 分别进行 RT-PCR 反应和 ddPCR 反应, 检测 *CaMV35S*、*NOS*、*Lectin* 基因。

1.3.6 含量检测低限测定

将转基因标准品 (100%、10%、1%) 和非转基因标准品以不同质量比充分混合, 制备成 100%、10%、1%、0.1%、0.05%、0.01% 共 6 个梯度百分比含量的转基因样品, 按照 1.3.1 提取 DNA。各取 2.5 μL 为

DNA 模板, 分别进行 RT-PCR 和 ddPCR 反应, 检测 *CaMV35S*、*NOS*、*Lectin* 基因。

1.3.7 豆奶饮料转基因成分的检测

抽取市售豆奶饮料 30 批次, 配料表明示均以大豆为主要原料。取豆奶饮料 40 mL 置于 50 mL 离心管中, 10000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 取沉淀 80 mg 于 2 mL 离心管中, 按照试剂盒说明书操作提取基因组 DNA。若单次离心沉淀较少, 再次取样, 重复离心 1~2 次。以提取的 DNA 为模板, 分别进行 RT-PCR 和 ddPCR 反应, 检测 *CaMV35S*、*NOS*、*Lectin* 基因。

1.3.8 数据统计分析

RT-PCR 每反应设置 2 个平行, 以 Ct 平均值 ≤ 36 作为有效数据判定依据; ddPCR 每反应设置 3 个平行, 计算平均值及相对标准偏差 (RSD), 以 RSD ≤ 25% 作为有效数据判定依据。

2 结果与讨论

2.1 DNA 提取

转基因大豆标准品和豆奶饮料 DNA 提取液经 QIAxpert 测定, DNA 浓度在 10~100 ng/μL 之间, A260/280 值在 1.8~2.0 之间, 可初步判断 DNA 质量满足后续实验要求。而后将标准品浓度均稀释为 50 ng/μL 备用。

2.2 浓度检测低限测定

表 2 转基因大豆筛选 ddPCR 浓度检测低限测定结果

Table 2 Concentration detection limit results of GM soybean screening ddPCR

DNA 模板浓度 (ng/μL)	目标基因	检测结果/(copies/μL)				RSD/%
		平行 1	平行 2	平行 3	平均值	
50	<i>Lectin</i>	1438	1471	1442	1450	1.24
	<i>CaMV35s</i>	1371	1409	1385	1388	1.38
	<i>NOS</i>	1322	1399	1375	1365	2.89
10	<i>Lectin</i>	323	333	328	328	1.52
	<i>CaMV35s</i>	308	319	318	315	1.93
	<i>NOS</i>	298	292	288	293	1.72
2	<i>Lectin</i>	61.5	53.5	55.7	56.9	7.26
	<i>CaMV35s</i>	56.2	61.3	58.6	58.7	4.35
	<i>NOS</i>	52.5	47.6	49.5	49.9	4.95
0.4	<i>Lectin</i>	13.5	16.5	15.3	15.1	10.00
	<i>CaMV35s</i>	13.8	12.6	13.9	13.4	5.39
	<i>NOS</i>	12.5	12.6	13.0	12.7	2.08
0.08	<i>Lectin</i>	3.3	3.0	3.5	3.3	7.70

转下页

接上页

	<i>CaMV35s</i>	2.2	1.9	2.3	2.1	9.76
	<i>NOS</i>	2.6	3.4	3.1	3.0	13.32
	<i>Lectin</i>	0.32	0.27	0.16	0.25	32.74
0.016	<i>CaMV35s</i>	0.25	0.08	0.21	0.18	49.38
	<i>NOS</i>	0.32	0.23	0.11	0.22	47.89

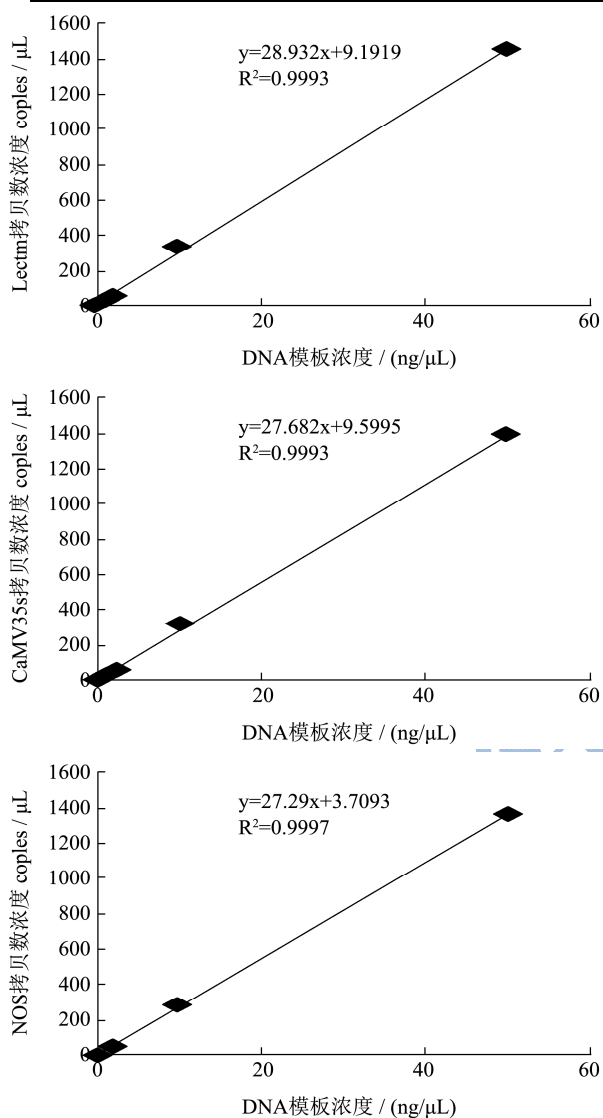


图1 转基因大豆筛选 ddPCR 定量线性范围拟合曲线

Fig.1 Quantitative linear range fitting curves of GM soybean screening ddPCR

对不同浓度的 DNA 模板分别进行 RT-PCR 和 ddPCR 检测。当 DNA 浓度为 50 ng/μL、10 ng/μL、2 ng/μL、0.4 ng/μL、0.08 ng/μL 时, *CaMV35s*、*NOS* 和 *Lectin* 基因均得到良好的扩增曲线, 对应的 Ct 值在 24.0~35.8 之间, 均小于 36。当 DNA 模板浓度小于 0.08 ng/μL 时, 三个基因的 Ct 值均大于 36 (0.016 ng/μL) 或无扩增 (0.0032 ng/μL), 说明 RT-PCR 对 *CaMV35s*、*NOS* 和 *Lectin* 基因的浓度检测低限为 0.2 ng/反应。

由表 2 可知, 当 DNA 模板浓度在 50~0.08 ng/μL

之间时, ddPCR 检测目的基因拷贝数呈线性递减, 但模板浓度降低至 0.016 ng/μL 时, 虽然能检测到少量阳性微滴, 但定量偏差较大 (RSD>25%)。因此, ddPCR 检测 *Lectin*、*CaMV35s*、*NOS* 基因的绝对灵敏度为 0.04 ng/反应。以 DNA 模板添加浓度为横坐标 (50、10、2、0.4、0.08), 以 ddPCR 检测结果拷贝数为纵坐标绘制定量线性范围拟合曲线, 所得的三条曲线中基因拷贝数浓度与 DNA 模板添加浓度呈现高度的线性相关, 相关系数 R^2 大于 0.999, 如图 1 所示, 说明该方法也适用于拷贝数浓度定量检测。考虑到豆奶饮料的原料大豆转基因成分很难达到本实验中标准品 100% 的含量, 因而在实测中模板 DNA 浓度最好选择在 50 ng/μL~2 ng/μL 之间。

2.3 含量检测低限测定

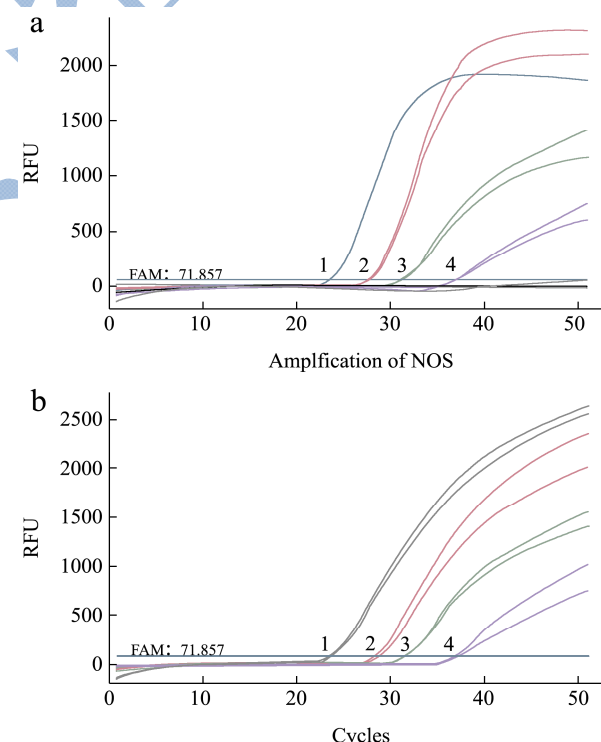


图2 转基因大豆筛选含量检测低限实时荧光 PCR 检测图

Fig.2 Content detection limit of GM soybean screening RT-PCR

注: a、b 分别为 *CaMV35s* 和 *NOS* 基因扩增结果, 1~4 依次为转基因含量 100%、10%、1%、0.1% 的样品。

对不同转基因成分含量 (100%、10%、1%、0.1%、

0.05%、0.01%)样品分别进行 RT-PCR 和 ddPCR 检测。如图 2 所示,使用实时荧光 PCR 方法检测 50 ng/μL DNA 模板中转基因含量为 100%、10%、1%、0.1%的样品时, *CaMV35s* 和 *NOS* 基因皆存在明显的扩增曲线, 所得 Ct 值分别为 23.65±0.06、27.68±0.09、31.42±0.01、37.13±0.12; 23.54±0.19、28.43±0.38、31.43±0.01、37.03±0.22。当样品含量低于 0.1%时, 无扩增曲线。当 Ct 值>36.0 时, 结果不予置信, 因此当

模板浓度为 125 ng/反应时该方法对转基因成分筛选的含量检测低限为 1%。

根据表 3 和图 3 可知, ddPCR 在转基因含量为 100%、10%、1%、0.1%、0.05%的样品检测中, *CaMV35s* 和 *NOS* 基因均得到确切的阳性结果, RSD<25%; 当含量降低到 0.05%以下, 阳性微弱信号时有时无, RSD>25%, 数据不予置信, 即 ddPCR 对转基因大豆筛选的含量检测低限为 0.05%。

表 3 转基因大豆筛选含量检测低限 ddPCR 检测结果

Table 3 Content detection limit of GM soybean screening ddPCR

转基因成分含量/%	目标基因	检测结果/(copies/μL)				RSD/%
		平行 1	平行 2	平行 3	平均值	
100	<i>CaMV35s</i>	1489	1570	1539	1532	2.67
	<i>NOS</i>	1536	1412	1470	1472	4.21
10	<i>CaMV35s</i>	124	142	139	135	7.14
	<i>NOS</i>	129	133	137	133	3.01
1	<i>CaMV35s</i>	16.6	15.7	17.3	16.5	4.85
	<i>NOS</i>	17	16.9	16.5	16.8	1.57
0.1	<i>CaMV35s</i>	1.05	1.20	1.25	1.17	8.92
	<i>NOS</i>	1.8	1.8	1.4	1.67	13.86
0.05	<i>CaMV35s</i>	0.79	0.53	0.56	0.63	22.70
	<i>NOS</i>	1.00	1.17	0.97	1.05	10.30
0.01	<i>CaMV35s</i>	0.08	0	0.04	0.04	100.00
	<i>NOS</i>	0	0.08	0	0.05	89.21

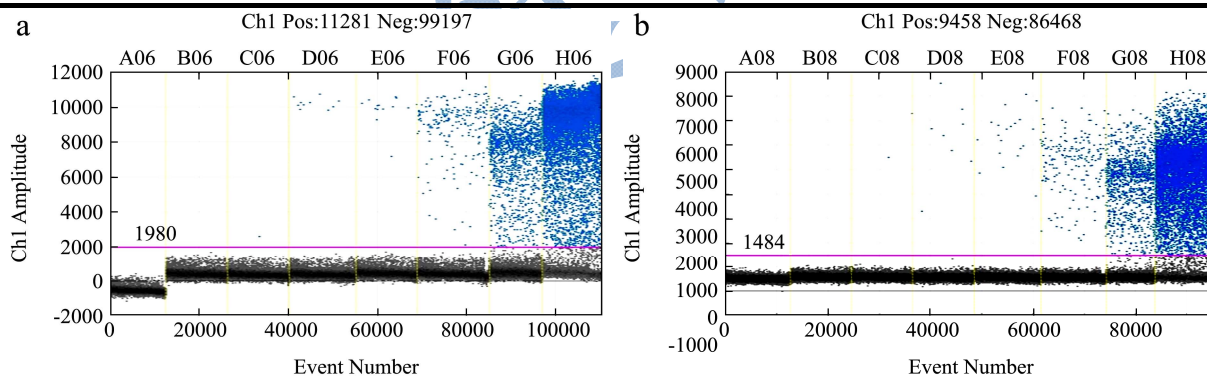


图 3 转基因大豆筛选含量检测低限 ddPCR 检测图

Fig.3 Content detection limit of GM soybean screening ddPCR

注: a、b 分别为 *CaMV35s* 和 *NOS* 基因检测结果, 从左至右通道依次为空白对照、转基因含量 0%、0.01%、0.05%、0.1%、1%、10%、100%的样品。

2.4 豆奶饮料转基因成分检测

30 批次豆奶饮料 DNA 模板经 *Lectin* 基因检测均为阳性, 可用于转基因成分分析。RT-PCR 和 ddPCR 分别筛查其转基因成分 *CaMV35s* 和 *NOS*, 其中 26 批次样品在两个平台均得到阴性结果; 剩余 4 批次样品结果见表 4。15 号样品 RT-PCR 和 ddPCR 结果一致, 均为阳性; 7 号、16 号样品 RT-PCR 的 Ct 值在

34.59~38.28 之间, 为可疑结果, 但经 ddPCR 检测均有阳性微弱, 除了 7 号样品 *NOS* 基因 ddPCR 结果 RSD>25%不予置信以外, 其余均可确定为阳性; 12 号样品 *NOS* 基因 RT-PCR 的 Ct 值为 36.35 为可疑结果, 但 ddPCR 未检测到阳性微弱, 结果确认为阴性。可见, RT-PCR 的 Ct 值可能受豆奶样品基质中 PCR 抑制因子或 DNA 模板纯度影响较大, 以 Ct 值>36 作为判定阴性结果的标准未必适用于所有情况, 而 ddPCR 受这些

因素影响相对较小, 而且检出限更低, 故必要时加以 ddPCR 结果辅助判断非常必要。

表 4 豆奶饮料转基因成分筛选结果

Table 4 GMO screening detection results for soybean milk

样品序号	模板浓度 (ng/μL)	目标基因	筛选结果			结论
			RT-PCR	ddPCR		
			Ct 值	拷贝数/(copies/20μL)	RSD/%	
No.7	34.6	<i>CaMV35s</i>	36.68±0.59	7.4	19.22	阳性
		<i>NOS</i>	38.28±0.05	3.6	33.25	阴性
No.12	44.4	<i>CaMV35s</i>	34.59±0.14	16.7	16.79	阳性
		<i>NOS</i>	36.35±0.11	-	-	阴性
No.15	8.9	<i>CaMV35s</i>	31.8±0.09	80	8.90	阳性
		<i>NOS</i>	33.36±0.13	14.6	10.87	阳性
No.16	34.9	<i>CaMV35s</i>	35.49±0.07	12.6	13.69	阳性
		<i>NOS</i>	34.59±0.08	18.5	11.73	阳性

3 结论

3.1 本研究选取 *CaMV35s* 启动子和 *NOS* 终止子作为筛选元件是考虑到其在转基因作物中的广泛使用, Wu Y 等^[20]曾报道这两种通用元件分别覆盖了 65.7%和 53.49%的转基因产品, 81.4%的转基因产品中至少含有两者之一, 因此我们可以通过筛查这两个基因完成大部分转基因成分的检测。但以导入的外源基因通用元件为靶标进行转基因成分筛选是特异性相对较低的转基因检测技术, 现行标准中一般将其应用为定性筛查; 而本研究发现, 运用 ddPCR 平台进行 *CaMV35s* 和 *NOS* 基因浓度检测低限测定时, 其拷贝数与转基因大豆模板浓度具有较好的线性关系, 说明该方法适用于拷贝数浓度定量检测, 这与刘津等^[21]在转基因大豆 MON89788 双重数字 PCR 检测中报道一致。

3.2 本文将实时荧光 PCR 和数字 PCR 的绝对灵敏度和检测低限对比发现, ddPCR 均优于实时荧光 PCR (1%), 且检测低限达到 0.05%, 比 Wei F 等^[22]报道的转基因玉米筛选数字 PCR 检出限 0.1%更低, 可满足现今所有国家对于转基因标识阈值的检测需求。现行实时荧光 PCR 定性检测标准中, 大部分以 Ct 值>36 作为阴性结果判定依据^[19], 往往出现 Ct 值在 36 附近的疑似结果无法判定。由于 ddPCR 不受样品基质的影响, 对反应体系杂质要求的容忍度较高, 在豆奶饮料实际样品的检测中, 对于实时荧光 PCR 模棱两可的可疑结果, ddPCR 能够通过阳性微滴的有无给出确切的结果, 避免出现假阳性假阴性结果。特别是转基因含量较低的样品, ddPCR 重复性和准确性方面表现更加稳定。然而, 数字 PCR 操作相对复杂费时, 成本较高, 微滴发生器通量小, 很难满足转基因食品的大批量检测。所以, 建议在现行主流检测技术 RT-PCR 实施的

基础上, 辅以 dPCR 确证可疑结果, 是一种既快速又经济的方法。

3.3 我国转基因作物标识暂行“有或无”的规定, 但随着转基因法规的完善, 与国际接轨, 转基因阈值的设置将逐渐纳入到体系中来, 这对转基因精确定量检测提出了更高的要求。而数字 PCR 以其低检出限、高重复性等优势在绝对定量领域将发挥更重要的作用, 除了转基因定性筛查, 利用特异性更高的外源基因和边界序列为靶标, 对转基因成分相对含量进行准确定量是未来应用的主要发展方向。胡佳莹等^[23]应用 cd PCR 建立了转基因玉米 MON863 的品系特异性定量检测方法; Dobnik D 等^[24]应用 dd PCR 技术建立了欧盟批准的 12 种玉米品系的多重量检测方法。不过, 现有转基因定量检测研究对象主要以原料为主, 对转基因产品如豆制品、大米制品、食用油等领域研究较少, 笔者认为这也是未来食品转基因检测的研究方向之一。

参考文献

[1] 国际农业生物技术应用服务组织.2016 年全球生物技术/转基因作物商业化发展态势[J].中国生物工程杂志,2017, 37(4):1-8
ISAAA. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2016 [J]. China Biotechnology, 2017, 37(4): 1-8

[2] Singh O V, Ghai S, Paul D, et al. Genetically modified crops: Success, safety assessment, and public concern [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2006, 71(5): 598-607

[3] 任怡菲,高琴,邓婷婷,等.基于数字 PCR 的转基因水稻 LL62 品系精准定量检测方法建立[J].生物技术通报,2016,32(8): 69-76
REN Yi-Fei, GAO Qin, DENG Ting-ting, et al.

- Establishment of precisely quantitative method of genetically modified rice LL62 based on digital PCR [J]. *Biotechnology Bulletin*, 2016, 32(8): 69-76
- [4] European Commission. Regulation (EC) No. 1829/2003 of the European parliament and of the council of 22 September 2003 on genetically modified food and feed [J]. *Official Journal of the European Union*, 2003, L268: 1-23
- [5] Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries of Japan. Notification 1775. Food and Marketing Bureau [S]
- [6] Ministry of Agriculture and Forestry of Korea (MAF). Notification No. 2000-31, Guidelines for Labeling of Genetically Modified Agricultural Products [S]
- [7] 张大兵,郭金超.转基因生物及其产品检测技术和标准化[J]. *生命科学*,2011,23(2):195-204
ZHANG Da-bing, GUO Jin-chao. The development and standardization of testing methods for genetically modified organisms and their derived products [J]. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 2011, 23(2): 195-204
- [8] 中华人民共和国农业部.农业部第 10 号令<农业转基因生物标识管理办法>[S]
Ministry of Agriculture of the People's Republic of China. Order No. 10 of the Ministry of Agriculture, "Administrative measures on the labeling of agricultural genetically modified organisms" [S]
- [9] Kim J H, Park S B, Roh H J, et al. Event-specific qualitative and quantitative detection of five genetically modified rice events using a single standard reference molecule [J]. *Food Control*, 2015, 55: 127-132
- [10] 刘欣,张国丛,周兴虎,等.转基因大豆 MON89788 实时荧光 PCR 检测方法的建立[J]. *食品科学*,2015,36(4):193-197
LIU Xin, ZHANG Guo-cong, ZHOU Xinghu, et al. Establishment of event-specific real-time PCR method for detection of genetically modified soybean MON89788 [J]. *Food Science*, 2015, 36(4): 193-197
- [11] Burns M J, Burrell A M, Foy C A. The Applicability of Digital PCR for the Assessment of Detection Limits in GMO Analysis [J]. *European Food Research & Technology*, 2010, 231(3):353-362
- [12] 李春勇.数字 PCR 技术原理及应用[J]. *生物技术世界*,2014, 11:10-13
LI Chun-yong. Principle and Application of Digital PCR [J]. *Biotech World*, 2014, 11: 10-13
- [13] 苗丽,张秀平,陈静,等.微滴数字 PCR 法对肉制品中牛源和猪源成分的定量分析[J]. *食品科学*,2016,37(8):187-191
MIAO Li, ZHANG Xiu-ping, CHEN Jing, et al. Quantitative analysis of bovine and porcine ingredients in meat products by droplet digital PCR [J]. *Food Science*, 2016, 37(8): 187-191
- [14] 吴潇,吕贝贝,蒋玮,等.QX200 微滴式数字 PCR 方法检测转基因大豆 GTS-40-3-2[J]. *上海农业学报*,2018,1
WU Xiao, LV Bei-bei, JIANG Wei, et al. Development of droplet digital PCR QX200 method for quantifying transgenic soybean GTS40-3-2 [J]. *Acta Agriculturae Shanghai*, 2018, 1
- [15] 姜志军,江颖,徐摇光,等.利用微滴数字 PCR 方法快速分析转基因玉米中外源基因的拷贝数[J]. *生物技术进展*,2016, 6(4):288-294
JIANG Zhi-jun, JIANG Ying, XU Yao-guang, et al. Rapid analysis of exogenous gene's copy number in transgenic maize with droplet digital PCR [J]. *Current Biotechnology*, 2016, 6(4): 288-294
- [16] 李亮,隋志伟,王晶,等.基于数字PCR的单分子DNA定量技术研究进展[J]. *生物化学与生物物理进展*,2012,10:1017-1023
LI Liang, SUI Zhi-wei, WANG Jing, et al. Progress of digital PCR for single DNA quantification [J]. *Progress in Biochemistry & Biophysics*, 2012, 39(10): 1017-1023
- [17] 于晓帆,高宏伟,孙敏,等.荧光PCR和数字PCR法检测转基因 DAS-44406-6 品系大豆[J]. *食品科学*,2016,37(16):235-241
YU Xiao-fan, GAO Hong-wei, SUN Min, et al. Detection of genetically modified soybean event DAS-44406-6 by real-time PCR method and digital PCR method [J]. *Food Science*, 2016, 37(16): 235-241
- [18] 王晨光,许文涛,黄昆仑,等.转基因食品分析检测技术研究进展[J]. *食品科学*,2014,35(21):297-305
WANG Chen-guang, XU Wen-tao, HUANG Kun-lun, et al. Recent progress in techniques for the detection and analysis of genetically modified foods [J]. *Food Science*, 2014, 35(21): 297-305
- [19] SN/T 1202-2010.食品中转基因植物成分定性PCR检测方法[S]
SN/T 1202-2010. Protocol of the Qualitative Polymerase Chain Reaction for Detecting Genetically Modified Plant Components in Food [S]
- [20] Wu Y, Wang Y, Li J, et al. Development of a general method for detection and quantification of the P35S promoter based on assessment of existing methods [J]. *Scientific Reports*, 2014, 4(2): 7358
- [21] 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 Jin, LI Ting, XIAN Yu-yin, et al. The construction of a universal quantitative detection method on GM soybean event MON89788 using duplex digital PCR [J]. Food Science, 2018, 39(4): 312-319
- [22] Wei F, Zhu P, Wang C, et al. A Highly sensitive and specific method for the screening detection of genetically modified organisms based on digital PCR without pretreatment [J]. Science Rep, 2015, 5: 12715
- [23] 胡佳莹,姜羽,杨立桃.利用 Quant Studio TM 3D 数字 PCR 分析转基因玉米 MON863 含量[J].农业生物技术学报,2016,24(8):1216-1224
- HU Jia-ying, JIANG Yu, YANG Li-tao. Quantification of genetically modified maize (Zea mays) MON863 by Quant Studio™ 3D digital PCR [J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2016, 24(8): 1216-1224
- [24] Dobnik D, Spilsberg B, Košir A B, et al. Multiplex quantification of 12 European Union authorized genetically modified maize lines with droplet digital polymerase chain reaction [J]. Analytical Chemistry, 2015, 87(16): 8218-8226