

三个数字 PCR 平台在动植物 DNA 定量检测中的应用比较

董立明¹, 闫伟¹, 邢珍娟¹, 夏蔚¹, 刘奕君², 龙丽坤¹, 李飞武^{1*}

(1. 吉林省农业科学院农业质量标准与检测技术研究所, 长春 130033; 2. 吉林农业大学生命科学学院, 长春 130118)

摘要: 数字 PCR 是一种不依赖外部标准样品和标准曲线的绝对定量技术, 在定量检测中应用广泛。本研究针对 QX200 微滴式数字 PCR、Naica 微滴芯片数字 PCR、DropDx-2044 微流控芯片数字 PCR 等三个数字 PCR 平台, 分别测定动植物样品特异性 DNA 序列拷贝数。比较不同数字 PCR 平台的测定结果、检测通量以及检测成本, 评价三个数字 PCR 平台在 DNA 精准定量检测方面的特性。结果表明: 三个数字 PCR 平台在动植物定量检测的适用性、线性相关性、正确度和精密度等方面均无显著差异; 在检测通量、检测成本以及操作简便性方面, Naica 数字 PCR 平台优势明显。本研究对实验室有效控制检测成本以及开展不同类型样品的定量检测提供了技术参考。

关键词: 精准定量检测; 应用比较; QX200 微滴式数字 PCR; Naica 微滴芯片数字 PCR; DropDx-2044 微流控芯片数字 PCR

中图分类号: TS207.3

文献标识码: A

文章编号: 2096-5877(2024)05-0074-07

Comparison of Three Digital PCR Platforms in DNA Quantitative Detection of Animals and Plants

DONG Liming¹, YAN Wei¹, XING Zhenjuan¹, XIA Wei¹, LIU Yijun², LONG Likun¹, LI Feiwu^{1*}

(1. Institute of Agricultural Quality Standard and Testing Technology, Jilin Academy of Agricultural Sciences, Changchun 130033; 2. College of Life Science, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China)

Abstract: Digital PCR is an absolute quantitative technique that does not depend on reference material and standard curves, and is widely used in quantitative detection. In this study, three digital PCR platforms, including QX200 droplet digital PCR, Naica droplet chip digital PCR and DropDx-2044 microfluidic digital PCR, were used to determine the specific DNA sequence copy number of animal and plant samples. The throughput and cost of different digital PCR platforms were compared, and the characteristics of the three digital PCR platforms in DNA accurate quantitative detection were evaluated. The results showed that there were no significant differences in the applicability, linear correlation, accuracy and precision of the three digital PCR platforms for the quantitative detection of animals and plants. The Naica digital PCR platform has obvious advantages in terms of detection throughput, detection cost and ease of operation. This study provides a technical reference for laboratories to select an appropriate digital PCR platform for different types of sample detection.

Key words: Quantitative detection; Application Comparison; QX200 droplet digital PCR; Naica droplet chip digital PCR; DropDx-2044 microfluidic chip digital PCR

近年来, 转基因生物安全和食品安全等问题受到越来越多的关注^[1]。食品中转基因成分、动物源性成分快速准确检测的需求与日俱增^[2]。目

前实时荧光 PCR (qPCR) 是最常用的动植物核酸成分定性及定量检测技术^[3-4], 但此类方法有一些不足, 如依赖标准曲线且容易被抑制剂影响, 而数字 PCR 方法具有对抑制剂不敏感、无需标准品、不依赖标准曲线、精准度和灵敏度高等优势, 已成为定量检测方法新的研究方向^[5-6]。

数字 PCR 是一种高效精准的绝对定量分析方法。自 1992 年数字 PCR 概念被提出以来发展迅速, 现已在转基因成分分析、动物源性产品检测、微生物检测等相关领域广泛应用^[7-9]。其原理是

收稿日期: 2024-04-10

基金项目: 吉林省科技发展计划项目(2220505025ZP); 农业生物育种重大专项(2022ZD0402010-02)

作者简介: 董立明(1980-), 男, 副研究员, 硕士, 主要从事转基因生物安全评价与检测工作。

通信作者: 李飞武, 男, 博士, 研究员, E-mail: lifeiwu3394@sina.com

将含有DNA模版的PCR反应体系分成数万个独立的PCR反应单元,单分子间通过大量稀释分离,使每个反应单元中含有的靶标DNA分子小于或等于一个拷贝。这些反应单元在相同条件下独自进行PCR扩增,反应结束后含有靶标分子的反应单元能够发生PCR反应,即产生阳性信号,系统计数为“1”;不含靶标分子的反应单元则产生阴性信号,系统计数为“0”。扩增结束后,对产生阳性信号的反应单元逐一计数,再根据泊松分布的模型计算出样品中初始的DNA模板量。He等^[10]利用微滴式数字PCR对肉制品中牛、羊、猪、鸡、鸭和火鸡源性成分进行定量分析,结果测定值与真实值基本一致,说明数字PCR在肉制品真伪鉴别方面具有较大的应用潜力。Bogožalec等^[11]利用微滴式数字PCR平台对转基因大豆MON40-3-2样品进行单重ddPCR和双重ddPCR的定量分析,并将结果与qPCR结果进行比较,证明在复杂基质中ddPCR比qPCR具有更好的精准度和准确度。

目前,两种类型的数字PCR平台在研究中使用较多,一种是基于微流控芯片的数字PCR(cd-PCR),如Stilla公司的Naica微滴芯片数字PCR系统、锐讯DropDx-2044微流控芯片式数字PCR系统等;另一种是利用油包水液滴作为载体的数字PCR(ddPCR)^[12],如Bio-Rad公司的QX200、QX100等。Naica微滴芯片数字PCR系统是利用芯片上的微管和微腔体,将反应样本分成大小一致的油包水微滴,形成单层微滴阵列于芯片内,通过自动化图像分析处理软件,对微滴进行可视化读取及质控,智能化数据分析。DropDx-2044微流控芯片数字PCR系统是结合高精度压力控制微流控系统,实现油包水乳液微滴的制备,利用先进的集成流体管道,将大小一致的微滴置于芯片的微反应孔中,形成高通量微孔阵列,通过自动化图像分析处理软件对微滴阴阳信号进行数据分析。QX200微滴式数字PCR是利用微滴生成仪将反应体系制备成约20 000个微小的油包水小液滴,每个液滴作为一个单独的反应单元。PCR扩增后,采用微滴分析仪逐一对每个微滴进行检测,最后利用分析软件对数据进行分析。两类平台都是基于数字PCR的基本原理,将大量稀释后的核酸溶液分散至芯片的微反应器或者微滴当中,但是分液方式和读取结果的系统不同。

本研究选择常见的三个数字PCR平台,对转

基因玉米MON810、转基因大豆ZH10-6、转基因水稻TT51、羊肉、牛肉和猪肉等动植物样品进行核酸定量检测,通过比较相同样品、相同方法在不同数字PCR平台上的适用性、线性和准确性等检测结果,评价三个数字PCR平台的性能,以期为不同类型样品的定量检测提供技术参考。

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器

转基因玉米MON810、转基因水稻TT51、转基因大豆ZH10-6标准样品购自农业农村部科技发展中心;羊肉、牛肉、猪肉样品购自长春市农贸市场,实验室冷冻保存;非转基因大豆为实验室低温保存;植物基因组提取试剂盒、动物血液和组织基因组提取试剂盒购自德国QIAGEN公司;ddPCR Supermix for Probes试剂盒购自美国Bio-Rad公司;PrefecTa Multiplex qPCR Tough mix试剂盒购自美国Apexbio公司;锐讯数字PCR预混液购自苏州锐讯生物公司;数字PCR引物和荧光标记探针购自上海生工公司。

QX200 Digital PCR系统:美国Bio-Rad公司;Naica™ Crystal Digital PCR:法国Stilla公司;DropDx-2044数字PCR系统:苏州锐讯生物公司;紫外/可见光分光光度计:美国Thermo Fisher公司。

1.2 试验方法

1.2.1 DNA提取

按照植物基因组提取试剂盒、动物血液和组织基因组提取试剂盒说明书,分别提取植物和动物试验样品的基因组DNA,用ND1000分光光度计测量DNA的质量和浓度,用1×TAE将样品DNA稀释至25 ng/μL,4℃冷藏保存备用。

1.2.2 引物和探针

通过查阅国内外已发表的论文、检测方法数据库、技术标准等方式,获得检测靶标DNA的引物和探针序列,信息见表1。用灭菌超纯水将引物和探针干粉溶解至10 μmol/L备用。

1.2.3 数字PCR反应体系和扩增条件

QX200数字PCR反应体系为20 μL,包含2×ddPCR Supermix for Probes 10 μL,10 μmol/L正向引物和反向引物各1.0 μL,10 μmol/L探针0.5 μL,DNA模板1.0 μL,用ddH₂O补齐至20 μL。扩增条件为95℃预变性10 min,95℃变性15 s,60℃退火60 s共40个循环。在扩增完成后95℃热变性10 min,升降温设计为2.5℃/s。Naica数字

表1 引物/探针序列信息

靶标	引物/探针	序列(5'-3')	产物大小/bp	参考文献
MON810玉米	CaMV35S-QF	CGACACTGGTCCCAAAGA	74	[13]
	CaMV35S-QR	AAGACGTGGTTGGAACGTCTTC		
	CaMV35S-QP	FAM-TGGACCCCCACCCACGAGGAGCATC-BHQ1		
TT51水稻	TT51-QF	AGAGACTGGTGATTTTCAGCGGG	120	[14]
	TT51-QR	GCGTCCAGAAGGAAAAGGAATA		
	TT51-QP	FAM-ATCTGCCCCAGCACTCGTCCG-BHQ1		
ZH10-6大豆	ZH10-6-QF	CAAATCCTATGGGCATTTCTCC	111	[15]
	ZH10-6-QR	CTAGAGCAGCTTGAGCTTGATC		
	ZH10-6-QP	FAM-CACCTTCTGGCTCCTTCAAACACTG-BHQ1		
大豆内标准基因	Lectin-QF	GCCCTTACTCCACCCCA	120	[16]
	Lectin-QR	GCCCATCTGCAAGCCTTTTT		
	Lectin-QP	FAM-AGCTTCGCCGCTTCTTCAACTTCAC-BHQ1		
羊内标准基因	Lamb-QF	CCAACATGCCTTTAAACCCTCAA	85	[17]
	Lamb-QR	GGAACGTAGCCTTCTGACTCG		
	Lamb-QP	FAM-TGCCTTTCGCCAGTCTC-BHQ1		
牛肉标准基因	Beef-QF	GTAGGTGCACAGTACGTTCTGAAG	96	[18]
	Beef-QR	GGCCAGACTGGGCACATG		
	Beef-QP	FAM-CGGCACACTCGGCTGTGTCTCTGC-BHQ1		
猪肉标准基因	Pork-QF	GGAGTGTGTATCCCGTAGGTG	103	[19]
	Pork-QR	CTGGGGACATGCAGAGAGTG		
	Pork-QP	FAM-TCTGACGTGACTCCCCGACCTGG-BHQ1		

PCR反应体系为7 μL , 包含 PrefecTa Multiplex qPCR Tough mix 1.4 μL , Fluorescein sodium 0.7 μL , 10 $\mu\text{mol/L}$ 正向引物和反向引物各 0.35 μL , 10 $\mu\text{mol/L}$ 探针 0.175 μL , DNA模板 1.0 μL , 用 ddH₂O 补齐至 7 μL 。扩增条件为 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s, 58 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s 共 45 个循环。DropDx-2044 数字 PCR 反应体系为 20 μL , 包含锐讯数字 PCR 预混液 10 μL , 10 $\mu\text{mol/L}$ 正向引物和反向引物各 0.9 μL , 10 $\mu\text{mol/L}$ 探针 0.5 μL , DNA 模板 1.0 μL , 用 ddH₂O 补齐至 20 μL 。扩增条件为 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 10 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 58 $^{\circ}\text{C}$ 退火 60 s 共 40 个循环。在扩增完成后 95 $^{\circ}\text{C}$ 热变性 10 min, 升降温设计为 2.0 $^{\circ}\text{C/s}$ 。

1.2.4 适用性测试

以转基因玉米 MON810、转基因大豆 ZH10-6、转基因水稻 TT51、羊肉、牛肉、猪肉等样品的基因组 DNA 为测试样品, 以 CaMV35S 启动子、ZH10-6 转化体特异性序列、TT51 转化体特异性序列及羊、牛、猪的内标准基因为扩增靶标, 分别在三个数字 PCR 平台上扩增, 每个样品重复 3 次试验, 每次设 4 个 PCR 平行。对 12 个平行测试的试验结果进行分析, 评价三个数字 PCR 平台在动植物核酸定量检测中的适用性。

1.2.5 线性测试

以转基因大豆 ZH10-6 为代表, 用 0.1 \times TAE 将 ZH10-6 基因组 DNA 进行梯度稀释, 制备成一系列拷贝数浓度的线性测试样品, 分别在三个数字 PCR 平台上扩增, 每个样品重复 3 次试验, 每次设 4 个 PCR 平行。分析测定结果, 评价三个数字 PCR 平台对转基因大豆 ZH10-6 含量进行定量测定的线性动态范围。

1.2.6 检出限和定量限测试

用 0.1 \times TAE 稀释 ZH10-6 基因组 DNA, 制备拷贝数浓度分别为 20、10、5、2、1 copy/ μL 测试样品, 分别在三个数字 PCR 平台上扩增, 每个样品设 15 个 PCR 平行, 分析三个数字 PCR 平台对转基因大豆 ZH10-6 含量定量测定的检出限及定量限。

1.2.7 准确度和精密度测试

将转基因大豆 ZH10-6 粉末与非转基因大豆粉末进行均匀混合, 制备成 ZH10-6 转化体成分的质量分数分别为 5%、1%、0.5%、0.1% 的测试样品, 分别在三个数字 PCR 平台上扩增, 每个样品重复 3 次试验, 每次设 4 个 PCR 平行。对 12 次测试的结果进行分析, 比较测量值与预期值之间的差异, 评价三个数字 PCR 平台进行转基因成分精确定量时的准确度和精密度。

1.3 数据分析

转基因成分含量采用拷贝数比值表示;利用测量值的相对标准偏差(RSD)评价重复试验之间、不同数字PCR平台之间的精密度;利用测量值的偏差(Bias)评价与预期值之间的正确度^[20]。数字PCR测量拷贝数值采用Excel 2010进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 适用性测试

为了测试QX200、Naica和DropDx-2044等三个数字PCR平台在动植物样品核酸定量检测方面的适用性,以转基因玉米MON810、转基因大豆ZH10-6、转基因水稻TT51及羊肉、牛肉、猪肉为

测试样品,分别进行数字PCR扩增,结果如表2所示。在三个数字PCR平台上,6种不同测试样品中均能稳定扩增出靶标DNA成分,且测量值比较接近。此外,对6个样品的测定结果进行RSD分析,QX200、Naica、DropDx-2044数字PCR平台的三次重复试验测量值的RSD值范围分别为0.42%~1.08%、0.14%~0.77%和0.04%~1.01%;相同样品在不同平台上的测量值的RSD值介于1.65%~8.66%,均小于25%。因此,三个平台测定重复性良好,符合数字PCR的MIQE(Minimum Information for Publication of Quantitative Digital PCR Experiments)指南要求^[21],表明这三个数字PCR平台均适用于6种不同类型动植物样品的定量检测。

表2 动植物样品在三个数字PCR平台上的检测结果

测试样品	数字PCR平台	浓度/copies· μL^{-1}			三次试验测量值的均值/ copies· μL^{-1}	三次试验测量值的相对标准偏差 RSD/%	三个平台测量值的均值/ copies· μL^{-1}	三个平台测量值的相对标准偏差 RSD/%
		第一次试验 测量值的 均值	第二次试验 测量值的 均值	第三次试验 测量值的 均值				
Mon810 玉米	QX200	2 059	2 175	2 009	2 051	0.64	2 071	1.74
	Naica	2 040	1 970	1 835	2 041	0.42		
	DropDx-2044	2 205	2 267	1 960	2 212	0.91		
ZH10-6 大豆	QX200	906	980	1 094	903	0.69	945	8.66
	Naica	871	847	945	872	0.25		
	DropDx-2044	1 059	1 091	1 120	1 059	0.43		
TT51-1 水稻	QX200	1 104	936	855	1 108	1.08	1 140	3.83
	Naica	1 200	933	907	1 202	0.33		
	DropDx-2044	1 105	1 023	1 066	1 111	1.01		
羊肉	QX200	2 830	2 811	2 663	2 838	0.54	2 853	2.50
	Naica	2 949	2 955	2 928	2 947	0.14		
	DropDx-2044	2 775	2 735	2 788	2 774	0.04		
牛肉	QX200	2 260	2 475	2 149	2 249	0.84	2 220	1.65
	Naica	2 246	2 266	2 206	2 242	0.66		
	DropDx-2044	2 160	2 214	2 208	2 168	0.68		
猪肉	QX200	6 660	6 485	5 870	6 649	0.42	6 423	3.87
	Naica	6 101	6 276	5 986	6 077	0.77		
	DropDx-2044	6 530	6 390	6 470	6 543	0.45		

2.2 线性测试

在反应体系中加入拷贝数分别为10 000、1 000、100、20、10、5、2、1的ZH10-6大豆基因组DNA,进行数字PCR扩增,对预期拷贝数和测定值进行线性分析,结果如图1所示。当测试样品的基因组DNA在10~10 000拷贝范围内,QX200、Naica、DropDx-2044数字PCR平台的线性相关性方程分别为 $y=1.025x+14.684$ 、 $y=0.923x+11.920$ 和 $y=1.056x-6.495$, R^2 分别为0.999 7、0.999 9和1.000 0,

均呈现出良好的线性相关性,且三个平台的测量值与预期值之比均介于0.94~1.0,接近1:1。以上测试结果符合相关标准的动态范围要求,因此三个数字PCR平台在10~10 000拷贝数范围,适用于基因组DNA拷贝数的准确测定。

2.3 检出限和定量限测试

检出限(LOD)和定量限(LOQ)测试结果如表3所示。当测试样品中的靶标DNA拷贝数浓度低至5个拷贝,在三个数字PCR平台上分别进

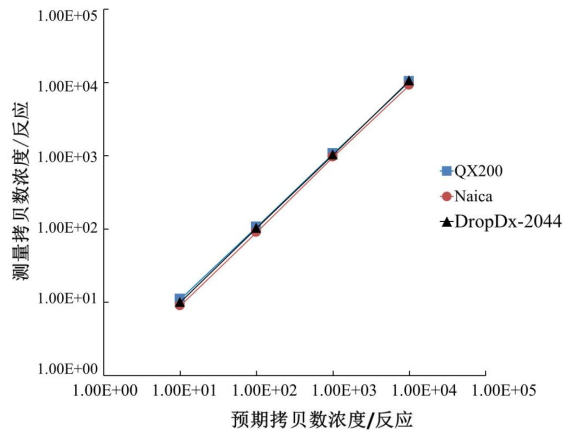


图1 三个数字PCR平台对ZH10-6大豆基因组DNA拷贝数鉴定的线性范围测试

行的15次平行扩增中,分别仅有13、11和12次扩增检测到阳性信号,而在 ≥ 10 个拷贝的样品中15次平行扩增均能全部检出,说明利用同一方法在三个数字PCR平台上均能获得低至10个拷贝的检出限。当样品中的靶标DNA拷贝数为20个拷贝时,在三个数字PCR平台上测得的15个重复数据的RSD分别为19.77%、16.38%和22.15%,说明利用三个数字PCR平台检测ZH10-6转化体成分的LOQ均可达20个拷贝。LOD和LOQ结果表明,三个数字PCR平台在检测灵敏度、准确度方面表现一致,均不低于ENGL中对测定方法的要求^[22]。

表3 三个数字PCR平台的LOQ和LOD测试结果

数字PCR平台	靶标DNA拷贝数	检出率	测量值均值/ $\text{copies} \cdot \mu\text{L}^{-1}$	偏差/%	相对标准偏差/%
QX200	20	15/15	21	6.60	19.77
	10	15/15	10	4.17	27.28
	5	13/15	-	-	-
	2	8/15	-	-	-
	1	4/15	-	-	-
Naica	20	15/15	20	2.30	16.38
	10	15/15	11	6.67	31.64
	5	11/15	-	-	-
	2	4/15	-	-	-
	1	2/15	-	-	-
DropDx-2044	20	15/15	21	4.15	22.15
	10	15/15	11	5.83	33.29
	5	12/15	-	-	-
	2	5/15	-	-	-
	1	2/15	-	-	-

2.4 准确度和精密度测试

对转基因成分含量分别为5%、1%、0.5%、0.1%的ZH10-6大豆样品,应用三个数字PCR平台进行拷贝数比值测定。结果如表4所示。QX200数字PCR的测定结果为5.27%、1.01%、0.49%、0.10%, Naica为4.99%、0.96%、0.48%、0.10%, DropDx-2044为5.22%、1.02%、0.51%、0.09%,三个数字PCR平台的测量值均与预期值

无显著差异。QX200、Naica、DropDx-2044数字PCR测量值与预期值的Bias范围分别为1.14%~5.33%、0.22%~3.57%和1.64%~7.92%;三次重复试验测量值的RSD范围分别为2.05%~11.53%、1.24%~8.97%和1.90%~11.99%;Bias和RSD均小于25%。以上结果表明,检测结果的准确度、精密度均符合MIQE指南中定量分析的参数要求。因此,三个数字PCR平台均具有良好的准确度和精密度。

表4 三个数字PCR平台准确性测试结果

数字PCR平台	预期值/%	扩增参数	重复1均值/ $\text{copies} \cdot \mu\text{L}^{-1}$	重复2均值/ $\text{copies} \cdot \mu\text{L}^{-1}$	重复3均值/ $\text{copies} \cdot \mu\text{L}^{-1}$	总体平均值/ $\text{copies} \cdot \mu\text{L}^{-1}$	转基因含量/%	偏差/%	相对标准偏差/%
QX200	5	Lectin	9 555	9 890	9 815	9 753	5.27	5.33	2.05
		ZH10-6	512	506	523	514			
	1	Lectin	8 910	9 540	9 530	9 327	1.01	1.14	4.52
		ZH10-6	96	94	93	94			

续表 4

数字PCR平台	预期值/%	扩增参数	重复1均值 /copies· μL^{-1}	重复2均值 /copies· μL^{-1}	重复3均值 /copies· μL^{-1}	总体平均值 /copies· μL^{-1}	转基因含量/%	偏差/%	相对标准偏差/%
Naica	0.5	Lectin	9 995	9 990	10 115	10 033	0.49	1.66	4.51
		ZH10-6	51	46	51	49			
	0.1	Lectin	9 850	9 985	10 070	9 968	0.10	3.66	11.53
		ZH10-6	10	9	12	10			
	5	Lectin	10 465	9 889	10 132	10 162	4.99	0.22	1.24
		ZH10-6	526	485	511	507			
1	Lectin	10 280	10 584	11 284	10 716	0.96	3.57	6.90	
	ZH10-6	109	98	103	103				
DropDx-2044	0.5	Lectin	9 191	11 333	10 059	10 194	0.48	3.21	6.06
		ZH10-6	48	51	49	49			
	0.1	Lectin	9 860	9 707	9 706	9 758	0.10	0.93	8.97
		ZH10-6	11	9	9	10			
	5	Lectin	10 045	10 100	9 890	10 011	5.22	4.34	1.90
		ZH10-6	522	540	505	522			
	1	Lectin	9 535	9 420	9 750	9 568	1.02	1.72	1.57
		ZH10-6	98	97	97	97			
	0.5	Lectin	9 330	9 490	9 515	9 445	0.51	1.64	6.98
		ZH10-6	52	45	47	48			
	0.1	Lectin	9 275	9 535	9 425	9 412	0.09	7.92	11.99
		ZH10-6	10	8	8	9			

3 讨论与结论

随着数字PCR技术的快速发展和广泛应用,各种数字PCR平台相继被研发^[23]。由于cdPCR与ddPCR平台的分区方式不同,可能会导致不同类型数字PCR平台的性能差别。为了实现动植物样品的核酸精准定量检测,有必要对不同数字PCR平台进行适用性、灵敏性和精准性评价,以确定不同数字PCR平台的检测性能是否存在差异。

在前人研究中,针对数字PCR检测方法开发的居多,尚未见不同平台间的比较研究。例如,在动物源性产品检测方面,刘立兵等^[24]利用ddPCR对香肠制品中鸡、猪、牛源性成分进行定量检测;Cai等^[25]建立了能同时定量检测牛肉和猪肉成分的双重ddPCR。在转基因成分检测方面,Cottenet等^[26]评价了数字PCR技术对9种转基因大豆和15种转基因玉米定量检测的准确性,各项技术参数均符合实际检测需求;Zhu等^[27]通过建立的双重数字PCR方法实现对7种转基因玉米的准确定量。在多平台联合定值方面,郑兰等^[28]采用QX100、cdPCR、3D-dPCR三种数字PCR平台对多靶标质粒DNA标准物质进行定值分析,均获得了准确的定值结果;本实验室在建立转基因大豆数

字PCR定量检测方法时,发现同一方法在ddPCR和cdPCR平台上均能适用,定值准确性与荧光定量PCR无明显差异^[29]。

本研究详细地比较了不同原理、不同型号的数字PCR平台在动植物产品核酸定量检测方面的性能,采用多个样本对仪器设备的适用性、线性动态、LOD、LOQ、正确度等进行分析,结果显示,在三个平台均获得了理想的测定结果。此外,本研究也对不同数字PCR平台的检测通量、检测成本以及操作简便性进行了比较分析。检测通量方面,QX200、Naica和DropDx-2044数字PCR平台的样本通量分别为96个样本、48个样本和32个样本,因此在大批量样本定量检测时,QX200数字PCR更具应用优势;检测成本和耗时方面,三个数字PCR平台的检测成本为55~70元/样本,检测耗时为2.5~3 h/次,相对而言,Naica数字PCR更具优势;操作性和试剂耗材的兼容性方面,QX200、Naica数字PCR对检测人员的操作技术要求相对较高,且需使用与数字PCR平台配套的试剂,而DropDx-2044数字PCR具有操作简单、可使用国产数字PCR扩增试剂,兼容性好、有利于检测人员快速掌握仪器设备等优点。因此,在数字PCR检测中,要根据实际情况选择合适的数字

PCR平台,以满足精准定量检测的需求。

参考文献:

- [1] 刘可,李梦霞,张亮,等.数字PCR技术在食品检测中的应用研究进展[J].食品工业科技,2021,42(4):319-324.
- [2] 董文凤,梁晋刚,李夏莹,等.转基因抗虫耐除草剂玉米C0030.1.1定性PCR检测方法的建立[J].东北农业科学,2023,48(2):49-54,63.
- [3] Li T T, Wang J S, Wang Z Y, et al. Quantitative determination of mutton adulteration with single-copy nuclear genes by real-time PCR[J]. Food Chemistry, 2021, 344: 128622.
- [4] 董立明,杨帆,邢珍娟,等.一种5重real-time PCR筛查转基因水稻方法的建立[J].食品科学,2021,42(24):329-334.
- [5] Yang L T, Chen Y, Li R, et al. Universal LNA probe-mediated multiplex droplet digital polymerase chain reaction for ultrasensitive and accurate quantitative analysis of genetically modified organisms[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2021, 69: 1705-1713.
- [6] 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.
- [7] Li J, Gao H F, Li Y J, et al. Event-specific PCR methods to quantify the genetically modified DBN9936 maize[J]. Journal Food Composition and Analysis, 2022, 105: 104236.
- [8] Chen X Y, Ji Y, Li K, et al. Development of a duck genomic reference material by digital PCR platforms for the detection of meat adulteration[J]. Foods, 2021, 10: 1890.
- [9] Long S, Berkemeier B. Ultrasensitive detection and quantification of viral nucleic acids with raindance droplet digital PCR (ddPCR)[J]. Methods, 2022, 201: 49-64.
- [10] He Y X, Yan W, Dong L M, et al. An effective droplet digital PCR method for identifying and quantifying meat adulteration in raw and processed food of beef(*Bos taurus*) and lamb(*Ovis aries*) [J]. Frontiers in Sustainable Food Systems, 2023, 7: 1180301.
- [11] Bogožalec Košir A, Demšar T, Štebih D, et al. Digital PCR as an effective tool for GMO quantification in complex matrices[J]. Food Chemistry, 2019, 294: 73-78.
- [12] Hou Y, Chen S L, Zheng Y J, et al. Droplet-based digital PCR (ddPCR) and its applications[J]. Trac-Trends in Analytical Chemistry, 2023, 158: 116897.
- [13] 中华人民共和国农业部.转基因植物及其产品成分检测—调控元件*CaMV* 35S启动子、*FMV* 35S启动子、*NOS*启动子、*NOS*终止子和*CaMV* 35S启动子终止子定性PCR方法[S].北京:中国农业出版社,2012.
- [14] 中华人民共和国农业部.转基因植物及其产品成分检测—抗虫水稻TT51-1及其衍生品种定量PCR方法[S].北京:中国农业出版社,2014.
- [15] 刘双,陈笑芸,曹际娟,等.转基因耐除草剂大豆ZH10-6实时荧光定量PCR检测方法的建立[J].分子植物育种,2021,19(15):5030-5037.
- [16] 中华人民共和国农业部.转基因植物及其产品成分检测—大豆内标准基因定性PCR方法[S].北京:中国农业出版社,2013.
- [17] Ren J N, Deng T T, Huang W S, et al. A digital PCR method for identifying and quantifying adulteration of meat species in raw and processed food[J]. Plos One, 2017, 12: e0173567.
- [18] 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.
- [19] Köppel R, Ruf J, Rentsch J. Multiplex real-time PCR for the detection and quantification of DNA from beef, pork, horse and sheep[J]. European Food Research Technology, 2011, 232: 151-155.
- [20] 中华人民共和国农业部.转基因植物及其产品成分检测实时荧光定量PCR方法制定指南[S].北京:中国农业出版社,2015.
- [21] Huggett J F, Foy C A, Benes V, et al. The digital MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative digital PCR experiments[J]. Clinical Chemistry, 2013, 59(6): 892-902.
- [22] Long L K, Zhao N, Li C C, et al. Development and collaborative validation of an event-specific quantitative real-time PCR method for detection of genetically modified CC-2 maize[J]. Frontiers in Plant Science, 2024, 15: 1460038.
- [23] 李慧调,潘建章,方群.数字PCR技术的发展及应用[J].化学进展,2020,32(5):581-593.
- [24] 刘立兵,陈敏娜,孙晓霞,等.微滴式数字聚合酶链式反应对香肠制品中鸡,猪,牛源性成分的定量分析[J].肉类研究,2020,34(8):51-56.
- [25] Cai Y C, He Y P, Lv R, et al. Detection and quantification of beef and pork materials in meat products by duplex droplet digital PCR[J]. Plos One, 2017, 12: e0181949.
- [26] Cottenet G, Blancpain C, Chuah P F. Performance assessment of digital PCR for the quantification of GM-maize and GM-soya events[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2019, 411: 2461-2469.
- [27] Zhu P Y, Fu W, Wang C G, et al. Development and application of absolute quantitative detection by duplex chamberbased digital PCR of genetically maize events without pretreatment steps [J]. Analytical Chimica Acta, 2016, 916: 60-66.
- [28] 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.
- [29] Long L K, Yan W, He Y X, et al. Development of a duplex digital PCR method to quantify five genetically modified soybean events[J]. Food Analytical Methods, 2022, 15(2): 294-306.

(责任编辑:王 昱)