

doi: 10.11857/j.issn.1674-5124.2019010006



# 转基因玉米 MON89034、MON810、MIR162 双重 数字 PCR 定量方法的建立

梁文, 杨镇州, 李妍, 罗超, 闻艳丽, 刘刚

(上海市计量测试技术研究院, 上海 201203)

**摘要:** 针对进出口贸易中涉及较多的转基因玉米 MON89034、MON810、MIR162 品系, 研究一套双重数字 PCR(dPCR)定量检测方法, 包括引物探针的序列设计和浓度, DNA 模板浓度, PCR 反应过程的时间、温度等。该方法的定量限为 0.1%, 转基因定量检测范围覆盖 0.1%~100%, 线性系数为 0.999, 精密度优于 10%。该检测方法中, 每个微反应体系都含有两套引物探针, 分别用 FAM 和 VIC 荧光通道进行检测, 能实现内外源基因的同时检测, 避免同一样品因取样不一致造成的定量差异。该方法可以同时应用到市面上最常用微滴 dPCR 平台和 3D 芯片 dPCR 平台, 且两种方法定量结果一致性好。

**关键词:** 生物技术; 数字 PCR; 双重数字 PCR; 转基因玉米

中图分类号: Q503

文献标志码: A

文章编号: 1674-5124(2019)06-0070-07

## A quantitative method for genetically modified maize event MON89034, MON810, MIR162 using duplex digital PCR

LIANG Wen, YANG Zhenzhou, LI Yan, LUO Chao, WEN Yanli, LIU Gang

(Shanghai Institute of Measurement and Testing Technology, Shanghai 201203, China)

**Abstract:** This paper reports a quantification method for genetically modified maize, MON89034, MON810, MIR162 based on duplex digital PCR (dPCR). Several important analysis conditions of dPCR were formed including sequence designing of primers and probes, the template concentration range, the duration time and temperature of PCR reaction. The limit of quantification of the method was 0.1%, and the quantitative detection range covered 0.1%-100% with a linear coefficient 0.999, and the precision was better than 10%. In this method, each micro-reaction system contains two sets of primer probes, which are respectively detected by FAM and VIC fluorescence channels, and the internal and external sequences can be detected simultaneously, thereby avoiding the quantitative error caused by the sampling inconsistency. The method was demonstrated on two main dPCR platform: microdrop dPCR and chip-based dPCR, and both of the quantitative results were consistent.

收稿日期: 2019-01-02; 收到修改稿日期: 2019-03-18

基金项目: 国家科技重大专项项目(2018ZX0801112B); 国家自然科学基金面上基金项目(21775104); 上海市质量技术监督局科研项目(2017-03)

作者简介: 梁文(1986-), 女, 四川德阳市人, 工程师, 硕士, 主要从事转基因检测方法研究、核酸定量方法研究。

通信作者: 刘刚(1982-), 男, 山东青岛市人, 教授级高工, 博士, 主要从事核酸检测方法研究。

**Keywords:** biotechnology; digital PCR; duplex digital PCR; genetically modified maize

## 0 引言

随着生物技术产业的迅速发展,全球转基因作物的研发速度和面积持续增加,转基因的食品安全问题也成为世界关注的热点<sup>[1]</sup>。控制转基因的含量,实施转基因食品标识制度是各国加强转基因管理的重要举措。转基因检测方法分核酸检测和蛋白检测两类。核酸在生物细胞中含量相对稳定,在产品加工中也相对不容易被破坏,而且核酸检测方法灵敏度高、操作简便,因此成为转基因检测的主流方法<sup>[2]</sup>。常用的核酸检测手段包括等温扩增、普通 PCR、多重 PCR、实时荧光定量 PCR(real-time fluorescence quantitative, qPCR)、数字 PCR(dPCR)等方法<sup>[3]</sup>。目前常用的 qPCR 法可以筛选转基因特异 DNA 片段,但大多数的 qPCR 在转基因检测方法的应用还停留在定性阶段<sup>[4]</sup>。

dPCR 作为一种新的 PCR 技术在各检测领域发展迅猛,尤其在转基因定量检测方面有独特优势。dPCR 的技术特点是,不需要建立工作曲线,避免了标准品配制过程及标准品与待测样品的天然差异导致的偏差<sup>[5]</sup>。dPCR 采用终点荧光检测,微小反应单元的独立扩增不易受到转基因样品 DNA 提取过程中抑制物的影响<sup>[6]</sup>。dPCR 定量准确度高,对于痕量转基因 DNA 样品检测重复性好<sup>[7]</sup>。在 dPCR 检测体系中设计双重荧光检测,分别用于标记外源基因和内源基因,可以实现内外源基因的双重检测,进一步避免加样误差的同时降低了检测成本,提高了检测效率。

本文在转基因玉米品系 MON89034, MON810, MIR162 定量检测体系中实现了内源基因和外源基因的同时检测,通过一个反应直接得出外源基因和内源基因的拷贝数,进而给出外源基因和内源基因的拷贝数浓度的比,即转基因的含量<sup>[8]</sup>。目前,市面上的 dPCR 分为微滴 PCR 和芯片 PCR 两大类。两者在独立的 PCR 反应微小单元形成方式,加热介质方面各有不同。本文首先在芯片 dPCR 平台上建立了实验方法,考察其特异性、定量限和线性范围、精密密度。最后将该方法应用到微滴 dPCR 中,考察了两种平台的结果一致性。

## 1 实验部分

### 1.1 试剂和仪器

植物基因组 DNA 提取试剂盒(天根 DP305,北京);引物及探针(佰力格,上海);3D 数字 PCR 系统(QuantStudio™ 3D, ABI 公司);微滴数字 PCR(QX200, 伯乐公司);核酸定量仪(Nanodrop2000, thermo 公司)。

转基因标准物质:转基因玉米种子粉末 MON810(ERM-BF413gk),转基因玉米种子粉末 MON89034(AOCS 0906-E),转基因玉米种子粉末 MIR162(AOCS 1208-A),种子粉末均为 F1 代杂合子。

### 1.2 转基因 DNA 的抽提

用 TIANGEN 公司的植物基因组 DNA 提取试剂盒进行玉米基因组 DNA 的抽提。在抽提过程中需要用到酚氯仿,以有效去除玉米材料中的多糖和多酚成分。抽提结束后用核酸定量仪定量 DNA 的浓度,要求其 A260/A280 在 1.8~2.0 之间。

### 1.3 DNA 模板浓度的控制

dPCR 法的模板 DNA 浓度受到泊松分布原理的限制,即大量微反应单元(10 000 以上)中, DNA 模板的分布应具备随机性。由于目前市售 dPCR 的微反应单元数量都至少高于 10 000 个,在保证定量结果的重复性优于 25% 的条件下,要满足定量限达到 0.1%,则模板 DNA 浓度应保证上样体系中总 DNA 模板数(内源基因拷贝数)在 4 700~73 551 拷贝范围内<sup>[9]</sup>。从而避免低转基因含量样本出现转基因片段漏取样的情况,也避免 DNA 拷贝数过高,阳性过载使数据精确度下降的情况。

### 1.4 反应体系和反应条件

3 种玉米品系的内源基因均采用 Adh-1 基因为检测靶基因,外源基因选择每个玉米品系的特异性序列<sup>[10-11]</sup>,引物探针的序列见表 1。以转基因样品 MON89034 为例,用实时荧光 PCR 反应检验设计引物探针的特异性。在含转基因 MON89034 外源基因的引物探针或内源基因 Adh-1 引物探针的 PCR 反应体系中,分别加入转基因玉米 MIR162 品系、MON810 品系、玉米 GA21 品系、玉米 TC1507 品系、玉米 T25 品系、玉米 NK603 品系、转基因玉米 MON89034 品系和非转基因玉米的基因组 DNA,

表1 转基因玉米品系特异基因及内源基因的引物和探针序列

基因	名称	序列
玉米 MON810 品系特异	正向引物	GATGCCTTCTCCCTAGTGTGA
	反向引物	GGATGCACTCGTTGATGTTTG
	探针	FAM-AGATACCAAGCGCCATGGACAACAA-BHQ1
玉米 MON89034 品系特异	正向引物	TTCTCCATATTGACCATCATACTCATT
	反向引物	CGGTATCTATAATACCGTGGTTTTTAAA
	探针	FAM-ATCCCCGGAAATTATGTT-MGB
玉米 MIR162 品系特异	正向引物	CACCTTCAGCAACCCGAACCTA
	反向引物	GCTTAGCCTCCACGATCATCTT
	探针	FAM-GTCCTCGTCGCTGCCCTTACCT-BHQ1
玉米 Adh-1	正向引物	CGTCGTTTCCCATCTCTTCTCTCC
	反向引物	CCACTCCGAGACCCTCAGTC
	探针	VIC-AATCAGGGCTCATTTTCTCGTCTCTCA-BHQ1

验证该引物探针体系是否只针对 MON89034 基因组有品系特异性外源基因扩增曲线,其他样品仅有内源基因扩增。每个转基因玉米品系的芯片 dPCR 反应体系(总体积为 20  $\mu\text{L}$ )中,内外源基因的正反向引物终浓度均为 500 nmol/L,探针终浓度为 100 nmol/L。Master mix 体积为 10  $\mu\text{L}$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  体积为 3.2  $\mu\text{L}$ 。3D 芯片 dPCR 的反应条件为酶激活和预变性阶段: 96  $^{\circ}\text{C}$ , 10 min; 循环扩增阶段: 60  $^{\circ}\text{C}/2$  min, 98  $^{\circ}\text{C}/30$  s, 共 40 个循环。升温速率为 0.8  $^{\circ}\text{C}/\text{s}$ , 降温速率为 1.2  $^{\circ}\text{C}/\text{s}$ 。

### 1.5 定量限和线性范围验证

定量检测低限是指被检测的样品在合适的精度水平下(一般转基因定量检测要求 RSD 小于 25%),能被检测出的最低含量或浓度<sup>[12]</sup>。本文将转基因含量为 100% 的转基因玉米品系 MON89034 与阴性的玉米种子粉末进行混合,制成 10%、5%、1%、0.5%、0.1% 的样品,验证其转基因含量检测的定量限和线性范围。

### 1.6 精密度实验

dPCR 的实验结果是通过统计上万个微小反应单元的结果得出,重复性好。精密度实验方案为在相同的 PCR 反应体系中分别加入相同的基因组 DNA 样品(选择了 1%、10%、100% 转基因含量的 3 种样品),实验重复 8 次,统计 8 次检测结果的 RSD。

### 1.7 玉米品系混合样品检测

采用双盲样验证法,由实验室不同人员利用

1.1 中转基因玉米种子粉标准物质按照质量配比配制成玉米品系混合样品,然后按照 1.2 中的方法提取基因组 DNA。盲样 1 为含 25% 玉米 MIR162 和 50% 玉米 MON89034 混合样品,盲样 2 为含 50% 玉米 MIR162 和 4% 玉米 MON810 混合样品,分别由转基因玉米 MIR162, MON89034 和 MON810 的扩增体系对混合 DNA 样品进行扩增,验证 3 个不同玉米品系数 PCR 方法定量检测混合样本的准确性。

### 1.8 微滴 dPCR 和芯片 dPCR 结果的一致性验证

将 1.1 中转基因玉米种子粉标准物质寄送给两家不同公司,进行 DNA 提取实验和 dPCR 实验。在微滴 dPCR 与芯片 dPCR 实验中采用相同的 PCR 反应体系(相同的引物探针浓度,但 PCR 预混液 Master mix 不同,与仪器配套使用),选择与平台相适应的 PCR 反应程序进行实验,每种平台实验重复 8 次,用 T-test 比较两种方法的实验结果,判断是否具有显著性差异。

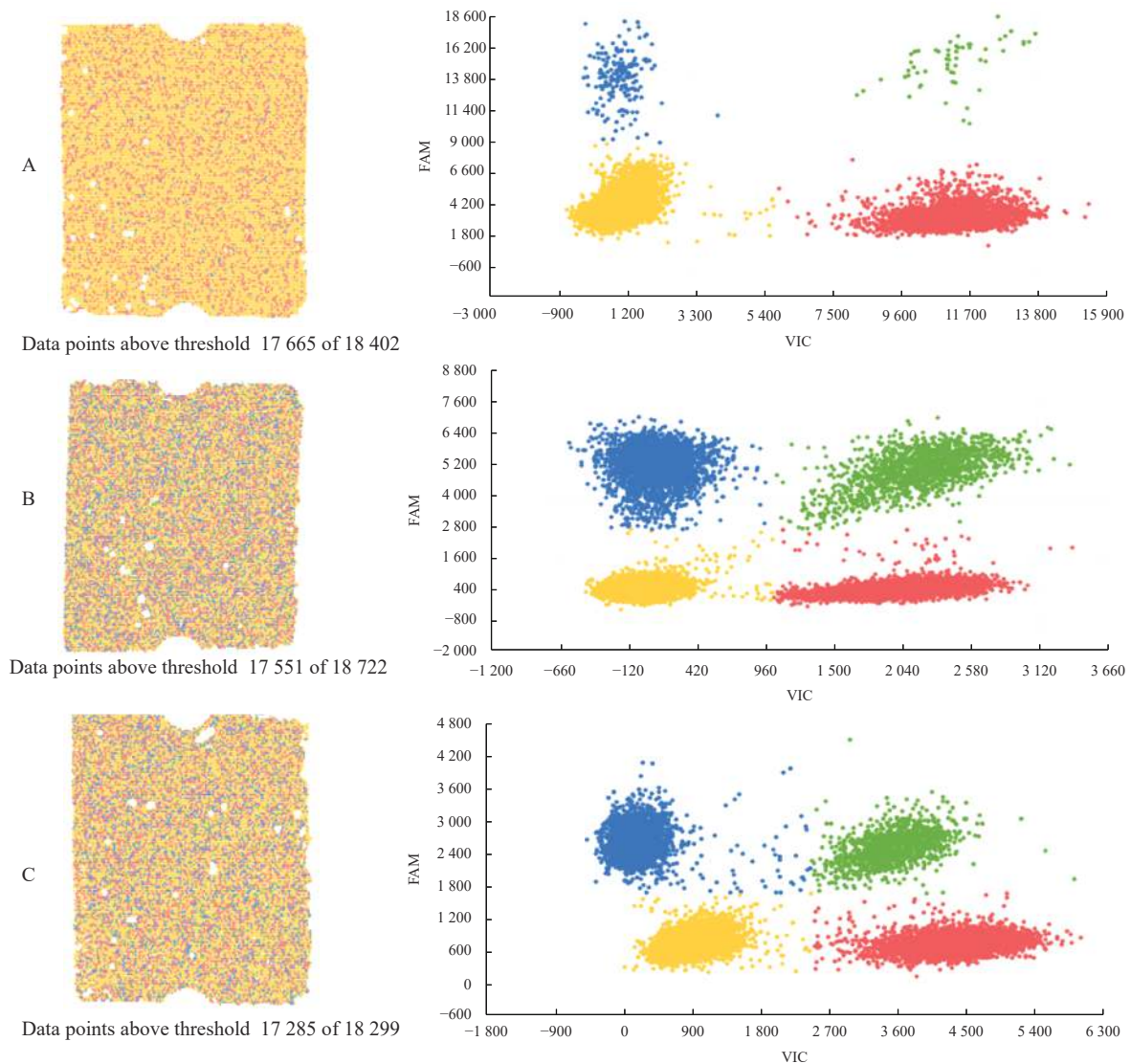
## 2 实验结果

### 2.1 反应条件的建立

本文中所设计的引物探针仅对特定玉米品系有明显的扩增曲线,对非目标玉米品系无扩增。在芯片 dPCR 中,所有玉米品系都同时进行外源基因和玉米内源基因的扩增。为了避免可能出现的两个靶基因的扩增体系相互干扰,本文设计了多个内源基因和外源基因的引物探针进行配对,选出内外源基因都能正常扩增且两种荧光信号彼此不干扰的扩增

体系。每种转基因玉米的扩增图见图 1。研究结果表明,3 个转基因玉米品系的内外源基因可以在同

一反应体系中进行,且阴性反应孔和阳性反应孔的荧光信号能明显区分。



图中 A 为玉米品系 MON810, B 为玉米品系 MON89034, C 为玉米品系 MIR162, 每张图中左侧为芯片孔, 右侧为所有反应孔的荧光信号分布图, 其中黄色点 FAM(外源基因)和 VIC(内源基因)均为阴性; 红色点 FAM 为阴性, VIC 为阳性; 蓝色点 FAM 为阳性, VIC 为阴性; 绿色点 FAM 为阳性, VIC 也为阳性。

图 1 转基因玉米的芯片 dPCR 扩增图

## 2.2 线性范围和定量限检测结果

将转基因含量为 100% 的转基因玉米品系 MON89034 与阴性的玉米进行混合, 制成 10%、5%、1%、0.5%、0.1% 的种子粉末样品。提取样品的基因组 DNA 并进行 dPCR 的扩增。每个样品进行 3 次重复检测, 取 3 次检测的平均值作为定值结果。扩增结果显示, 本方法检测 0.1% 转基因含量的种子样品时 RSD 为 12.5%。本方法检测转基因含量 0.1% 及以上的样品 RSD 小于 25%, 即本方法定量

限可达到 0.1%。检测转基因含量标准值为 0.1%~100% 的种子样品, 检测结果方程为  $Y=1.042X-0.002$ , 其中  $X$  为转基因含量标准值,  $Y$  为转基因含量实际检测值, 线性  $r^2$  为 0.999。具体检测结果见表 2。

## 2.3 方法精密度检测

用转基因含量为 100%、10%、1% 的转基因玉米 MON89034 基因组 DNA 测试方法的精密度, 重复测量 8 次, 检测结果精密度见表 3。不同转基因比例的精密度均优于 10%, 符合国际上转基因定量

表2 线性范围和定量限检测结果

%

转基因含量/%	重复1	重复2	重复3	实际检测转基因含量平均值
100	103.60	103.68	105.10	104.13
10	7.71	8.66	11.82	9.40
5	3.98	4.72	5.57	4.75
1	1.16	0.69	1.33	1.06
0.5	1.21	0.30	0.55	0.69
0.1	0.07	0.09	0.08	0.08

表3 芯片 dPCR 精密度实验结果

%

转基因比例/%	1	2	3	4	5	6	7	8	平均值	RSD
1	0.94	1.00	0.92	0.94	0.92	1.08	1.10	0.98	0.99	7.18
10	10.42	10.14	10.42	10.13	10.58	10.02	10.11	10.86	10.34	2.80
100	105.9	103.9	104.4	108.5	109.0	104.1	104.0	107.1	105.9	2.0

结果 RSD 优于 25% 的要求。

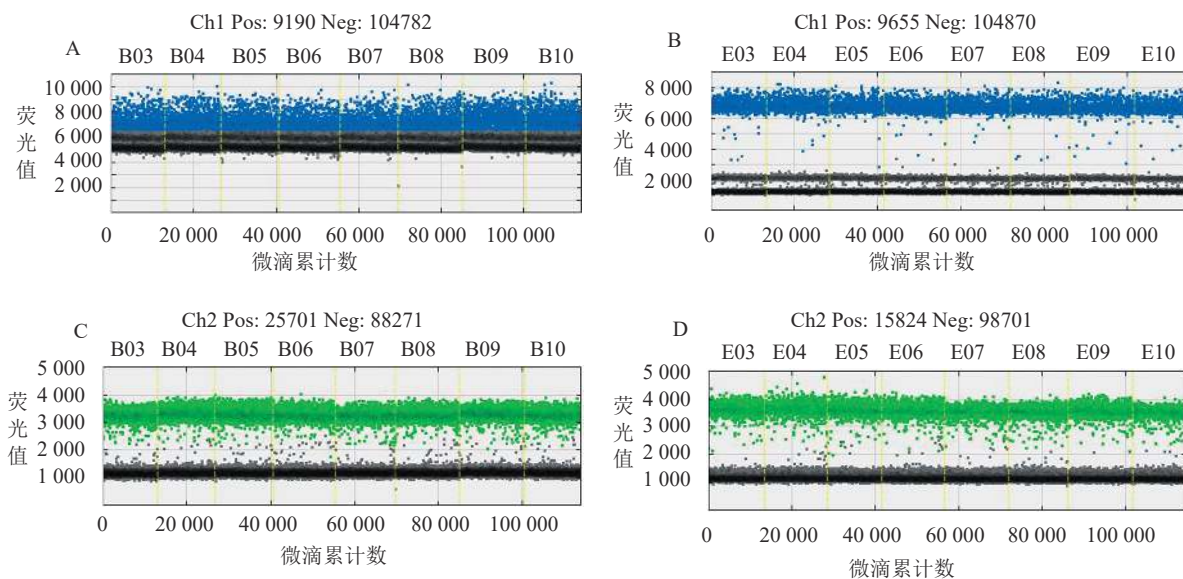
#### 2.4 混合种子粉末样品检测结果

在盲样检测中, 25% 玉米 MIR162 混合样品的定量结果为 19.6%, 50% 玉米 MON89034 混合样品的定量结果为 66.7%, 50% 玉米 MIR162 混合样品的定量结果为 64.7%, 4% 玉米 MON810 混合样品的定量结果为 3.3%, 定量结果的误差均小于 25%, 符合国家转基因定量检测的需要。

#### 2.5 两种平台实验结果的一致性验证

dPCR 主要有微滴式和芯片式两种平台, 微小

反应单元的形成方式有差异。微滴 dPCR 中微滴在 PCR 反应前由微滴振荡器现场生成, 芯片 dPCR 的微孔大小在制造芯片时已经确定。微滴 dPCR 是在油包水的液体中进行反应, 加热速度快, PCR 反应中的退火温度、时间和芯片式 dPCR 有所区别。芯片 dPCR 由于芯片的影响, 热传导时间较慢, 因此芯片 dPCR 中 60 °C 退火延伸的时间较长, 需要 2 min。而微滴 PCR 在油包水的液体条件下扩增, 退火温度在 56 °C 反而能到达更好的扩增效果, 扩增时间为 1 min。图 2 为微滴 PCR 退火温度的优化情况,



图中, A 和 B 分别为转基因玉米 MON89034 品系的外源基因在 60 °C 和 56 °C 的扩增图; C 和 D 分别为转基因玉米内源基因在 60 °C 和 56 °C 的扩增图。

图2 微滴 dPCR 退火温度优化

MON89034 品系特异基因扩增优化情况见图 A、图 B。图 A 阴性(黑色)信号值在 5 000~6 500 之间,阳性(蓝色)信号在 6 000~10 000 之间,阴性和阳性信号不能明显区分。图 B 优化退火温度后,阴性信号在 1 000~2 000 之间,而阳性信号在 6 000~8 000 之间,阴性和阳性信号分离情况好。内源基因 Adh-1 的扩增情况见图 C、D。图 C 和图 D 中阴性孔的荧光值(黑色)没有变化,阳性孔的荧光信号值(蓝色)在优化后由 3 000 提高到 3 500~4 000,最终阴性和阳性反应孔的荧光值分离情况更好。微滴 dPCR 的反应条件为:酶激活和预变性阶段:95 °C, 10 min;循环扩增阶段:56 °C/1 min, 94 °C/30 s, 共 40 个循环。

将 3 种转基因玉米粉末交给两家不同公司进行玉米基因组 DNA 的提取和 dPCR 检测实验。3 种转基因玉米品系在两种平台的检测结果见表 4。尽

管由于提取 DNA 浓度不同,两种平台的拷贝数浓度有差异,但其转基因含量定量结果的一致性很好。转基因含量 100% 的转基因玉米 MON89034,芯片 dPCR 和微滴 dPCR 的定量结果分别为 105.6% 和 106.5%,将两种检测方法的结果进行 T-检验,其显著性差异  $P=0.58>0.05$ ,证明两种方法的检测结果没有显著性差异。转基因含量为 10% 的转基因玉米 MON810,芯片 dPCR 和微滴 dPCR 的定量结果分别为 9.7% 和 9.5%,显著性差异  $P=0.38>0.05$ 。转基因含量 100% 的转基因玉米 MIR162,芯片 dPCR 和微滴 dPCR 的定量结果分别为 114.2% 和 115.8%,显著性差异  $P=0.39>0.05$ 。3 种转基因玉米用两种不同平台检测结果的 T-检验表明,两种平台的检测结果没有显著性差异。

表 4 两种平台检测结果的一致性对比

样品	平台	靶标	1	2	3	4	5	6	7	8	平均值
玉米 MON89034	芯片 dPCR	外源/(拷贝· $\mu\text{L}^{-1}$ )	255.9	292.7	309.1	302.4	297.1	292.6	295.8	316.8	295.28
		内源/(拷贝· $\mu\text{L}^{-1}$ )	488.3	591.3	583.2	567.3	576.8	551.0	542.7	573.9	559.31
		转基因含量/%	104.8	99.0	106.0	106.6	103.0	106.2	109.0	110.4	105.6
	微滴 dPCR	外源/(拷贝· $\mu\text{L}^{-1}$ )	99.6	96.4	97.1	99.9	100.1	97.0	99.6	97.2	98.35
		内源/(拷贝· $\mu\text{L}^{-1}$ )	183.0	188.0	187.0	191.0	190.0	180.0	181.0	178.0	184.75
		转基因含量/%	108.8	102.6	103.8	104.6	105.4	107.8	110.0	109.2	106.5
玉米 MON810	芯片 dPCR	外源/(拷贝· $\mu\text{L}^{-1}$ )	6.6	6.8	6.5	7.0	6.2	5.6	6.8	6.5	6.50
		内源/(拷贝· $\mu\text{L}^{-1}$ )	140.1	137.8	141.7	137.3	129.9	124.9	133.8	131.8	134.66
		转基因含量/%	9.4	9.8	9.2	10.2	9.6	9.0	10.2	9.8	9.7
	微滴 dPCR	外源/(拷贝· $\mu\text{L}^{-1}$ )	35.3	36.3	34.9	34.8	34.4	34.1	32.9	34.3	34.63
		内源/(拷贝· $\mu\text{L}^{-1}$ )	716.0	763.0	730.0	727.0	731.0	727.0	731.0	720.0	730.63
		转基因含量/%	9.9	9.5	9.6	9.6	9.4	9.4	9.0	9.5	9.5
玉米 MIR162	芯片 dPCR	外源/(拷贝· $\mu\text{L}^{-1}$ )	172.0	183.9	182.7	187.3	162.6	176.6	168.3	169.4	175.36
		内源/(拷贝· $\mu\text{L}^{-1}$ )	312.1	326.7	324.6	320.8	282.3	303.9	288.7	298.8	307.24
		转基因含量/%	110.2	112.6	112.6	116.8	115.2	116.2	116.6	113.4	114.2
	微滴 dPCR	外源/(拷贝· $\mu\text{L}^{-1}$ )	141.1	140.4	138.7	140.5	148.8	137.3	139.6	150.8	142.14
		内源/(拷贝· $\mu\text{L}^{-1}$ )	248.0	240.0	245.0	243.0	246.0	250.0	248.0	244.0	245.50
		转基因含量/%	113.8	117.0	113.2	115.6	121.0	109.8	112.6	123.6	115.8

### 3 结束语

dPCR 定量检测转基因产品的灵敏度高,特异性好,可以应用于更多不同转基因植物品系的定量检测。本文针对进出口贸易中涉及最多的 3 个转基

因玉米品系 MON89034, MON810, MIR162 设计引物探针进行 dPCR 定量检测。通过对不同玉米品系的 qPCR 实验,验证了用于 3 个玉米品系检测的引物与探针的特异性。在 qPCR 实验中具有特异性的

内外源基因的引物探针有多种,但能应用在 dPCR 同一个反应微小单元中,并且内外源基因的扩增体系不相互干扰却并不容易,很常见的现象是内源或外源基因的扩增受到抑制,从而阴性反应孔和阳性反应孔的荧光信号无法区分,因此不能将 qPCR 中的反应条件直接应用到 dPCR 中。本文通过多对引物探针组合,并筛选最佳引物探针浓度、退火温度、PCR 反应过程的时间、温度等,从而建立一套完整的转基因玉米 dPCR 定量检测方法。该检测方法中,每个微反应体系都含有两套引物探针,分别用 FAM 和 VIC 荧光通道进行检测,能实现内外源基因的同时检测,避免了同一样品因取样不一致造成的定量差异,从而节约了检测成本。该方法可以同时应用到市面上最常用微滴 dPCR 平台和 3D 芯片 dPCR 平台。两种平台的加热介质有很大的差异,芯片 dPCR 是金属腔室,其微小反应单位的体积变动较小,但热传导性略慢,因此退火延伸需要的时间较长,和 qPCR 实验有很大的差异。而微滴 dPCR 是油包水的液滴,其反应的程序和 qPCR 实验基本一致,这样也利于用 qPCR 实验进行 PCR 反应程序优化。但优化实验条件后两种平台的结果一致性很好, T-test 中 3 种转基因玉米品系的转基因含量平均值和重复性 RSD 没有显著性差异。该方法的定量限为 0.1%, 转基因定量检测范围覆盖 0.1%~100%, 线性系数为 0.999, 精密度优于 10%。该方法快速高效, 在检测结果的准确度、稳定性优于传统的 qPCR。在实验操作上, 和 qPCR 相比不需要制作标准曲线, 避免购买昂贵的标准物质, 也避免了标准物质和检测样品之间的 PCR 扩增效率差异对实验结果的影响。将该方法用于转基因玉米的定量检测, 能为规范我国转基因监管工作提供技术支撑。

## 参考文献

- [1] TYCZEWSKA A, WOŹNIAK E, GRACZJ, et al. Towards food security: current state and future prospects of agrobiotechnology[J]. *Trends Biotechnol*, 2018, 36(12): 1219-1229.
- [2] 刘信. 适于转基因产品检测的核酸扩增技术 [J]. *中国农业科技导报*, 2011, 13(6): 78-81.
- [3] JACCHIA S, KAGKLI DM, LIEVENS A, et al. Identification of single target taxon-specific reference assays for the most commonly genetically transformed crops using digital droplet PCR[J]. *Food Control*, 2018, 93: 191-200.
- [4] 贺鹏, 马静. 应用于转基因食品检测的 PCR 技术及其进展研究 [J]. *食品安全导则*, 2018, 32: 74-75.
- [5] DANY M, DEJAN S, MOJCA M. Quantitative analysis of food and feed samples with droplet digital PCR[J]. *PLOS ONE*, 2013, 8(5): e62583.
- [6] DEMEKE T, DOBNIK D. Critical assessment of digital PCR for the detection and quantification of genetically modified organisms[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2018, 410(17): 4039-4050.
- [7] KÖPPEL R, BUCHER T. Rapid establishment of droplet digital PCR for quantitative GMO analysis[J]. *European Food Research & Technology*, 2015, 241(3): 1-13.
- [8] 胡佳莹, 姜羽, 杨立桃. 利用 QuantStudio(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.
- [9] FAZEKASDE S, GROTH S T. The evaluation of limiting dilution assays[J]. *Journal of Immunological Methods*, 1982, 49(2): R11-R23.
- [10] DOBNIK D, SPILSBERG B, BOGOŹALEC KOŠIR A, et al. Multiplex droplet digital pcr protocols for quantification of gm maize events[J]. *Methods Mol Biol*, 2018, 1768: 69-98.
- [11] 转基因成分检测玉米检测方法: SN/T 1196-2012[S]. 北京: 中国质检出版社, 2013.
- [12] GRYSON N. Effect of food processing on plant DNA degradation and PCR-based GMO analysis: a review[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2010, 396(6): 2003-2022.

(编辑:莫婕)