

数字 PCR 技术在核酸标准物质研制中的应用

郑子繁, 柳方方, 刘卫晓, 金芑军, 李亮*

中国农业科学院生物技术研究所, 北京 100081

摘要: 在标准物质研制领域, 生物标准物质的研制逐渐成为了研究热点, 同时基于核酸的检测技术的开发与应用又推动了核酸标准物质的进程。核酸标准物质需要高级别、精准的定值方法, 数字 PCR 作为单分子定量技术得到了广泛的应用。数字 PCR 是一种测定核酸分子的绝对定量方法, 如微滴式数字 PCR 是采用油包水形成的微滴作为反应室, 将含有 DNA 模板的反应溶液分配到大量独立的反应室中进行扩增反应, 再通过统计反应室中的阳性信号来定量 DNA 的拷贝数, 从而达到精确定量核酸拷贝数的目的。综述了近年来关于数字 PCR 及其在核酸标准物质研究领域的最新应用进展, 重点综述了其在转基因检测、医疗诊断等领域的应用进展, 以期核酸标准物质的研制提供参考。

关键词: 数字 PCR; 标准物质; 生物标准物质; 测量不确定度

DOI: 10.19586/j.2095-2341.2020.0128

Application of Digital PCR Technology in the Development of Nucleic Acid Reference Materials

ZHENG Zifan, LIU Fangfang, LIU Weixiao, JIN Wujun, LI Liang*

Institute of Biotechnology, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China

Abstract: In the field of reference material development, the development of biological reference material has gradually become a hot topic. At the same time, the development and application of nucleic acid-based detection technology has promoted the process of nucleic acid reference material. Nucleic acid reference materials require high-level and accurate valuation methods, and digital PCR has been widely used as a single-molecule quantitative technology. Digital PCR is an absolute quantitative method for the determination of nucleic acid molecules. For example, droplet digital PCR uses droplets formed by water-in-oil as the reaction chamber, and distributes the reaction solution containing the DNA template to a large number of independent reaction chambers for expansion. Increase the reaction, and then quantify the copy number of DNA by counting the positive signals in the reaction chamber, so as to achieve the purpose of accurately quantifying the copy number of nucleic acid. This article reviewed the literature on the research of digital PCR and the latest application progress of digital PCR technology in the development of DNA and nucleic acid reference materials, especially in the fields of medical diagnosis and genetic modification detection, which was expected to provide reference for the research of reference material development.

Key words: digital PCR; reference material; biological reference material; measurement uncertainty

核酸的序列、多样性和丰度分析是现代生物学的基础。由于分子生物学技术的不断发展, 核酸定量技术已广泛应用于生命科学领域, 核酸定量技术也相应地更新换代: 在传统的定量 PCR (quantitative PCR, qPCR) 基础上, 数字 PCR (digital PCR, dPCR) 技术应运而生^[1]。1992 年,

Sykes 等^[2]报道了巢式 PCR 定量技术, 巢式 PCR 技术是基于样品稀释和泊松分布数据处理成立的, 同时他还提出了数字 PCR 的构想。1997 年, Kalinina 等进行了微升 (μL) 级的 PCR 反应, 使用毛细玻璃管作为反应器, 通过荧光探针收集到基因组 DNA 的单分子信号, 进而发展出了单分子定

收稿日期: 2020-10-13; 接受日期: 2020-11-11

基金项目: 国家转基因新品种培育重大专项 (2016ZX08012-003); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项 (16103920200010)。

联系方式: 郑子繁 E-mail: 598134077@qq.com; * 通信作者 李亮 E-mail: liliang@caas.cn

量技术^[3]。1999年, Vogelstein 和 Kinzler^[4] 基于以上报道采用 96 孔板系统将 PCR 扩增方法发展到了微升级, 并对结肠癌的致癌突变基因 *ras* 进行了定量分析。

早期数字 PCR 技术的反应单元使用的是 96/384 孔板^[2]。由于数字 PCR 技术的反应单元数与灵敏度和准确度成正相关, 因此需要找到比普通 96/384 孔板更高精度的反应器才能满足越发精密的检测需要。为了提高精度, 需要将反应单元数目成倍提高, 因此反应体积从微升级精确到了纳升级^[3], 数字 PCR 技术也因此愈发成熟。

在许多诊断应用和常规实验室测试中, 能够进行准确、可靠和可重复的核酸定量 (DNA/RNA) 是十分重要的^[2]。为了准确地定量核酸, 需要用已知测量不确定性的量的靶核酸序列 (拷贝数或拷贝数浓度) 作为标准物质^[5]。标准物质 (reference material, RM) 是一种足够均匀的, 具有一种或多种相对容易确定的特性值的材料或物质, 可用于给材料赋值、评价测量方法及校准测量仪器等^[6]。标准物质具有通用属性。标准物质可以用于定性检测, 也可以用于定量检测。由于标准物质特性量值具有稳定性、均匀性和准确性, 现已被越来越多地应用在分析测量、国内外贸易、环境保护、医疗卫生、工农业生产、国防建设以及人民生活等各个领域^[7]。标准物质的分类方式多样, 按标准物质的应用领域, ISO/REMCO 将标准物质分为 17 大类: 地质学、核材料及放射性材料、有色金属、塑料/橡胶/塑料制品、生物/植物/食品、临床化学、石油、有机化工产品、物理学和计量学、物理化学、环境、黑色金属、玻璃/陶瓷、生物医学/药物、纸、无机化工产品、技术和工程。核酸标准物质即为用于核酸扩增技术的标准物质, 是生物标准物质的一种。生物标准物质拥有已知的生物含量、活性和特性测定的计量标准和溯源体系, 使得各生产单位在进行产品的生产、研发和检测时结果具有可比性。本文着重介绍了数字 PCR 的基本原理、类型, 以及数字 PCR 目前在核酸标准物质研制中的应用进展, 以期为核酸标准物质的研制提供参考。

1 数字 PCR 概述

目前, 核酸定量的金标准是实时荧光定量

PCR 技术 (qPCR)^[5]。然而, 这种定量方法需要将未知物与参考标准进行比较^[8], 这意味着如果使用了不同的标准或校准物, 不同实验室之间得到的结果将很难进行对比。数字 PCR 是近些年的新兴技术, 无需外参曲线, 能够独立精准地对未知物进行测量, 目前已有很多文献对其进行了报道。

1.1 数字 PCR 的原理

数字 PCR 的基本原理是将含有靶核酸、引物、探针和主混合物的反应混合物随机分布到数百至数百万个均匀大小的纳升或皮升分区中, 使得一些分区含有靶分子的复合物, 单分子间通过稀释被分离, 在单个分区中独自进行 PCR 扩增, 最后分析每个扩增产物^[9]。每个分区的 DNA 模板数少于或者等于 1 个, 这样经过 PCR 循环之后, 有一个 (或一个以上) DNA 模板的分区是亮的, 没有 DNA 模板的分区就是暗的^[10], 然后计算靶核酸拷贝数浓度。

数字 PCR 作为一种参考方法已在一些计量机构使用, 这种方法能够将拷贝数浓度联系到标准物质^[9,11-12], 将常规定量分子检测中使用的校准物质追溯到国际单位制 (SI)^[13]。一项国际对比研究^[14]表明, dPCR 和 qPCR 结果之间具有极好的可比性, 且 dPCR 具有更好的精确度。dPCR 可以直接计数目标分子数量且不需依靠任何校准物或外标, 只通过对单个分子计数就能实现绝对定量, 因此有着相当的优势。相较于 qPCR 而言, dPCR 的关键特性列于表 1。目前, dPCR 逐渐应用在量化 DNA 靶标、稀有^[10,15-16] 病原体检测^[13,17]、病毒载量测试^[18]、检测食品中的转基因成分^[19] 和大规模平行序列文库的量化等方面。

1.2 数字 PCR 的分类

根据反应单元形成方式的不同, 数字 PCR 可分为微滴、微流控芯片和微滴芯片式数字 PCR 等。

1.2.1 微滴数字 PCR 微滴数字 PCR 基于乳液 PCR (emulsion PCR) 技术^[12-13], 是使用微滴发生器来一次生成数万乃至数百万个纳升甚至皮升级别的单个油包水微滴, 用这些很小的油包水微滴来作为数字 PCR 的样品分散载体。通过油水不相溶的原理, 油形成油膜将水包裹在其中, 形成一个个微滴作为反应室。PCR 反应结束后对每个

微滴进行检测,含有阳性样品的微滴会有荧光信号(图1)。微滴数字 PCR 以微滴为单位,PCR 反应体系体积更小,因此更容易进行高通量实验,而且系统简单、成本低,是理想的数字 PCR 技术平台。

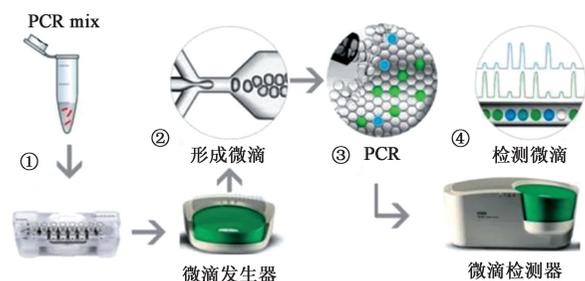


图1 微滴数字 PCR 原理

Fig.1 Principle of droplet digital PCR

1.2.2 微流控芯片数字 PCR 微流控芯片数字 PCR 基于微流控芯片技术,能够快速并准确地将样品流体分成若干个独立的单元,从而进行多步平行反应。这种数字 PCR 得益于微流体技术、纳米制造技术和微电子技术等技术的发展,具有成本低、体积小和高通量的优势,是理想的数字 PCR 平台^[9,11]。目前使用微流控芯片技术的数字 PCR 系统有 Fluidigm 公司的 Bio-Mark™ 基因分析系统、Life Technologies 公司的 QuantStudio™ 3D 数字 PCR 系统。

1.2.3 微滴芯片式数字 PCR 法国 Stilla Technologies 公司专注于开发新一代核酸绝对定量技术,其旗下品牌有 Naica™ Crystal 全自动微滴芯片数字 PCR。数字 PCR 过程的唯一耗材是 cutting-edge 微流体创新型芯片——Sapphire 芯片。样品通过毛细通道网格以 25 000~30 000 个微滴阵列形式进入 2D 芯片中,可称作 Crystal 微滴,PCR 扩增实验在芯片上实现,采用微滴成像技术检测含有扩增片段的微滴。最终对阳性微滴进行计数得到精准的核酸绝对数量^[19]。

1.3 dPCR 测量的影响因素

作为高精度参考方法,众多影响因素都会对测量精度产生影响或造成测量结果的偏差,实验过程中应控制或尽可能缩小这些影响因素对测量结果的影响。目标分子 DNA 浓度计算方法如式(1)所示。

$$\text{靶 DNA 拷贝数浓度} = -\ln\left(1 - \frac{P}{R}\right) \frac{D}{V_R} \text{拷贝数} \cdot \mu\text{L}^{-1} \quad (1)$$

式(1)中, P —阳性反应数, R —反应总数, V_R —反应体积, D —稀释因子。如等式(1)所示,反应总数和阳性反应数计数的多少会直接影响靶 DNA 拷贝数浓度,而制备 PCR 反应体系过程中样品的稀释产生的反应体积(V_R)和稀释因子(D),其误差也会反映到最终浓度上。除此之外,某些外部因素,如样品制备、原液及任何中间稀释溶液的均匀性和稳定性、DNA 构象和热温度变化均会影响 dPCR 数据的质量。

一些研究^[8,16]已阐述了反应数、阳性率和反应体积对 dPCR 浓度的影响。Corbisier 等^[20]研究阐述了微滴体积对拷贝数数据的影响,并表明拷贝数浓度依据液滴体积的变化而变化。因此,在使用 dPCR 进行计量时,最终结果需加上不确定度以确保目标分子拷贝数浓度结果的准确性。

1.4 测量的不确定度

为了得到更准确的实验结果,实验中需考虑测量值的偏差与不确定度^[7]。任何测量都存在缺陷,由于所有的测量结果都会或多或少地偏离被测量的真值,所以在给出测量结果的同时指出所给测量结果的可靠程度是十分必要的。因此要用测量不确定度评定来指出测量结果的可靠程度^[20]。

根据 JJF1005-2016 测量不确定度是根据所用到的信息,表征赋予被测量量值的分散性非负参数。根据测量不确定度的定义,标准不确定度以标准偏差表征。实际工作中则以实验标准差 S 作为其估计值。

在标准物质研制的过程中,将定值不确定度与均匀性评估、稳定性考察引入的不确定度按照平方和开方的方法叠加就给出合成标准不确定度 u_{CRM} ,该合成标准不确定度乘以包含因子 k 得出的不确定度称为扩展不确定度 U ^[21]。

2 数字 PCR 在核酸标准物质研制中的应用

近年来,我国生物制品产业逐步发展壮大,目前主要的生物制品有病毒性疫苗、细菌性疫苗、基因工程产品、血液制品、诊断试剂、基因芯片和基因治疗产品等类型。同时,以核酸扩增为基础的分诊断技术正快速发展,并广泛应用于医学、出

入境检验检疫等领域。为了准确地定量核酸,需要用已知测量不确定性的量的靶核酸序列(拷贝数或拷贝数浓度)作为标准物质^[5]。数字 PCR 作为一种绝对定量的方法,在多种领域的核酸标准物质研制中均有应用。

2.1 数字 PCR 在转基因生物标准物质研制中的应用

截至 2018 年,全球共有 70 个国家种植或进口了转基因作物,这已是全球连续应用转基因作物的第 23 年。2018 年,26 个国家(21 个发展中国家和 5 个发达国家)共种植了 1.917 亿 hm^2 转基因作物,比 2017 年的种植面积增加了 190 万 hm^2 。现如今,由于越来越多的转基因作物得以在全球范围内大规模种植和消费,多个国家和地区实施了转基因产品标识管理制度。由于转基因作物在种植收割、生产加工和运输消费等过程中不可避免地出现混杂的情况,目前有 60 多个国家和地区对转基因产品标识设置了阈值,如欧盟规定合法转基因成分标识阈值为 0.9%、非法转基因成分标识阈值为 0.5%,日本和俄罗斯规定的标识阈值为 5%^[22]。在这些国家和地区的规定中,产品中转基因成分含量低于阈值可以不用标识。转基因标识阈值是大势所趋,我国相关部门也正将其引入转基因安全管理体系当中。目前,AOCS 已有 GMO 标物 45 种,欧盟 IRMM 及 ERM 125 种,中国研制 GMO 标准物质 46 种。转基因生物标准物质根据其形态特征,可分为基体标准物质、基因组 DNA 标准物质和质粒 DNA 标准物质。基因组 DNA 和质粒 DNA 标准物质的形态是液体,基体标准物质的形态主要是粉末。

在基体标准物质中,通过使用双重数字 PCR 法和荧光定量 PCR 方法结果互相对验证,研制了 MON89788 纯品粉末标准物质。转基因大豆 MON89788 是孟山都公司研发的耐除草剂品种,我国于 2008 年批准进口 MON89788 用作加工原料,是我国转基因生物安全监管的重要对象。MON89788 基体标准物质的研制弥补了前期研制的低浓度质量分数标准物质不能满足定量检测需求的缺陷。且数字 PCR 定值较荧光定量 PCR 技术更为准确,解决了国外纯品标准物质无准确量值的问题^[21]。

与此类似的还有使用二重数字 PCR 方法研制转基因玉米 MIR604 的标准物质。实验中使用

了 MIR604/*Adh1* 进行二重数字 PCR 定量实验,消除了单重数字 PCR 实验中因取样误差造成的影响。转基因玉米 MIR604 是先正达公司(Syngenta)研发的抗虫转基因玉米,我国 2008 年批准其进口用作加工原料,是我国进行转基因生物安全监管的重要对象。研制转基因玉米 MIR604 基体标准物质对转基因玉米 MIR604 及其加工产品的定性和定量检测,将为我国转基因生物安全管理及标识制度的实施提供有效的技术支撑^[23]。再如对于拜耳作物科学公司研发的转基因玉米 T25,有实验室通过数字 PCR 的方法对样品的特异性、动力学范围等进行了检测。最后通过多家实验室的二重数字 PCR 法的联合定值,研制了转基因玉米 T25 的基体标准物质。T25 已经在中国、美国、澳大利亚、加拿大、阿根廷、日本等国家被批准进口用作加工原料。T25 标准物质的研制可用于对转基因玉米 T25 及其加工产品的定性和定量检测,有效加强了我国转基因生物安全管理和标识制度^[24]。除此之外,数字 PCR 技术还应用在水稻 KeFeng6 号质粒标准物质^[25]、转基因水稻品系“Bt 汕优 63”^[21]、转基因水稻 KMD 的标准物质研制中^[26]。

2.2 数字 PCR 在临床方面标准物质研制中的应用

随着分子生物学技术的发展和普及,核酸的分析检测技术已取得了重大进展。现今临床上通常采用 PCR 方法识别和定量 DNA、RNA 的变化,这是基因检测的基本方法,但其具有一定的局限性。近年来,dPCR 的发展使得高灵敏度和高精度定量检测稀有变异序列成为可能。dPCR 在分析复杂的生物样本上有很多的优势,除了相较于 qPCR 具有高灵敏度的定量检测能力外,还可以避免生物样本中存在的多种抑制剂的干扰,由于数据的高度重复性,还可以提高各实验室之间的检测可比性。dPCR 在医疗诊断标准物质中也有了相当广泛的应用。

有研究通过数字 PCR 的方法研制了一种低浓度水平的短链 DNA 标准物质,用于低浓度水平循环肿瘤 DNA(ctDNA)检测过程的量值溯源,能够对低浓度水平的短链基因标准物质的定值方法进行研究。基因异常表达常诱发一些疾病的产生,ctDNA 是一类具备广泛应用前景的肿瘤标志物,可用于肿瘤早期的无创诊断、发展过程监测、

预后判断,以及个性化用药指导,然而其含量非常低,约占整个循环 DNA 的 1%,甚至只有 0.1%,只有准确找到 ctDNA 并精准定量才能对疾病做出精准治疗。ctDNA 标准物质的研制给低浓度水平基因测试方法的发展提供了可靠的计量依据^[27]。

2.3 其他应用

除用于转基因检测的生物标准物质和临床上诊断所需的生物标准物质之外,还有许多其他应用领域。在已有和空缺的生物标准物质研发中,数字 PCR 技术作为比荧光定量 PCR 更精确先进的技术必然有着良好的应用前景。

在食品安全方面,世界各国都非常关注食品中微生物引起食源性疾病的预防与控制,其中关键技术环节便是食品中微生物的检测技术。目前我国食品中微生物的检测仍以传统的病原菌培养、血清抗体检测和生化特征比较等方法为主,不能满足日益发展的检验检疫工作需要。但与此同时,也有多家实验室在使用数字 PCR 等新兴方法研制新的生物标准物质。已有实验室使用 ddPCR 制备了食品中肠侵袭性大肠埃希氏菌核酸标准样品。从致病菌核酸标准样品的关键制备技术和保存技术入手,开展均匀性和稳定性试验,并对食品中致病菌核酸标准样品的不确定度进行深入细致的分析计算,最终研制出具有较好均匀性和稳定性的肠侵袭性大肠埃希氏菌核酸标准样品^[28]。如 Wen 等^[29]通过 3 种不同的方法对质粒浓度进行定量,其中包括数字 PCR 方法。最终开发了 3 个质粒候选 RM。

在动物病毒方面,已有研究通过数字 PCR 法制备出了猪繁殖与呼吸综合征病毒 (PRRSV) 国家二级标准物质。采用高精确度的数字 PCR 技术替代荧光定量 PCR 技术进行定值,从而充分保障了定值结果的可靠性和技术权威性^[30]。

3 展望

核酸标准物质在医疗诊断、转基因检测、生物安全等方面有着极大的发展空间。PCR 测量准确性对于疾病诊断和治疗至关重要,并可应用于动植物疫病、转基因植物等领域的检测上。目前通用的金标准是 qPCR, dPCR 是 qPCR 的一种进化方法,具备精确性高、可靠性好,且不需依赖外参,已经用于多种化验及测量领域。因其定量方

法的精确性,已被用作核酸 CRM 定值的参考方法,在 CRM 的研制和检测上都有很好地适用性和更加深远的应用前景。当前新型冠状病毒在全球肆虐新冠检测方法在国家标准、地方标准等层面已提上标准化日程^[31]。后疫情时代,为更加完善生物安全防护工作,需要扩大及加深生物安全领域标准物质的研发与应用,做到早识别、早防范。

参 考 文 献

- [1] 杨德平,刘维薇. 数字 PCR 技术在临床诊断中的应用进展[J]. 临床检验杂志, 2016, 34(10):785-787.
- [2] HINDSON C M, CHEVILLET J R, BRIGGS H A, *et al.*. Absolute quantification by droplet digital PCR versus analog real-time PCR[J]. *Nature Methods*, 2013, 10(10):1003-1005.
- [3] STRAIN M C, LADA S M, LUONG T, *et al.*. Highly precise measurement of HIV DNA by droplet digital PCR [J/OL]. *PLoS ONE*, 2013, 8 [2020-11-20]. <http://org.doi/10.1371/journal.pone.0055943>.
- [4] LO Y M D, LUN F M F, CHAN K C A, *et al.*. Digital PCR for the molecular detection of fetal chromosomal aneuploidy[J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2007, 104(32):13116-13121.
- [5] BHAT S, EMSLIE K R. Digital polymerase chain reaction for characterisation of DNA reference materials[J]. *Biomol. Detection Quant.*, 2016, 10:47-49.
- [6] VAN HEUVERS WYN F, KARCZMARCZYK M, SCHIMMEL H, *et al.*. Influence of primer & probe chemistry and amplification target on reverse transcription digital PCR quantification of viral RNA[J]. *Biomol. Detect. Quant.*, 2016, 9:20-28.
- [7] MEYER V R. Measurement uncertainty [J]. *J. Chrom. A*, 2007, 1158(1-2):15.
- [8] 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]. *Analyt. Chem.*, 2012, 84(2):1003-1011.
- [9] SOMANATH B, NATALIE C, THOMAS M, *et al.*. Comparison of methods for accurate quantification of DNA mass concentration with traceability to the international system of units[J]. *Analyt. Chem.*, 2010, 82(17):7185-7192.
- [10] 柳方方,张玲,王晶,等. 数字 PCR 测定 DNA 含量及测量结果不确定度评定[J]. *化学分析计量*, 2013, 22(001):18-22.
- [11] ROSS J H, MARGARET C K, BLAZA T, *et al.*. Standard reference material 2366 for measurement of human cytomegalovirus DNA[J]. *J. Mol. Diagn.*, 2013, 15(2):177-185.
- [12] WHITE H, DEPREZ L, CORBISIER P, *et al.*. A certified plasmid reference material for the standardisation of BCR-ABL1 mRNA quantification by real-time quantitative PCR[J]. *Leukemia*, 2015, 29(2):369-376.
- [13] DANIEL G B, DONG L, SOMANATH B, *et al.*. Digital polymerase chain reaction measured pUC19 marker as calibrant for HPLC measurement of DNA quantity [J]. *Analyt. Chem.*, 2013, 85(3):1657-1664.

- [14] 国家质量监督检验检疫总局. 测量不确定度评定与表示: JJF-1059.1-2012[S]. 北京, 中国标准出版社: 1-5.
- [15] Vogelstein B, Kinzler K W. Digital PCR [J]. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1999, 96(16): 9236-9241.
- [16] BHAT S, HERRMANN J, ARMISHAW P, *et al.*. Single molecule detection in nanofluidic digital array enables accurate measurement of DNA copy number [J]. *Analyt. Bioanalyt. Chem.*, 2009, 394(2): 457-467.
- [17] CAO Y, RAITH M R, GRIFFITH J F. Droplet digital PCR for simultaneous quantification of general and human-associated fecal indicators for water quality assessment [J]. *Water Res.*, 2015, 70: 337-349.
- [18] HAYDEN R T, GU Z, INGERSOLL J, *et al.*. Comparison of droplet digital PCR to real-time PCR for quantitative detection of cytomegalovirus [J]. *J. Clin. Microbiol.*, 2013, 51(2): 540-546.
- [19] MORISSET D, TTEBIH D, MILAVEC M, *et al.*. Quantitative analysis of food and feed samples with droplet digital PCR [J/OL]. *PLoS ONE*, 2013, 8(5): e62583 [2020-11-05]. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062583>.
- [20] 孟巧玲. 了解测量不确定度的概念及来源分析 [J]. 卷宗, 2011(8): 111-111.
- [21] 李俊, 李夏莹, 李亮, 等. 转基因大豆 MON89788 纯品粉末标准物质的研制及定值 [J]. *农业农学通报*, 2018(6): 131-136.
- [22] 陈雪娇, 宗凯, 孙娟娟, 等. 转基因水稻品系 'Bt 汕优 63' 微滴式数字 PCR 定量检测方法的建立 [J]. *农业生物技术学报*, 2020, 28(6): 137-148.
- [23] 李俊, 张秀杰, 武玉花, 等. 转基因玉米 MIR604 基体标准物质研制 [J]. *作物学报*, 2020, 46(4): 473-483.
- [24] 李夏莹, 武玉花, 李俊, 等. 转基因玉米 T25 数字 PCR 方法的建立与验证 [J]. *中国农业科技导报*, 2020, 22(2): 178-183.
- [25] LI L, ZHANG X, WAN Y, *et al.*. Development of a novel reference plasmid for accurate quantification of genetically modified Kefeng6 rice DNA in food and feed samples [J/OL]. *BioMed Res. Intern.*, 2013, 2013: 134675 [2020-11-20]. <https://doi.org/10.1155/2013/134675>.
- [26] LI J, LI L, ZHANG L, *et al.*. Development of a certified genomic DNA reference material for detection and quantification of genetically modified rice KMD [J]. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2020, 412: 7007-7016.
- [27] 闻艳丽, 梁文, 刘刚. 数字 PCR 法定量低浓度水平短链 DNA 标准物质的研究 [J]. *中国测试*, 2020, 46(01): 44-49.
- [28] 那晗, 倪长鹏, 刘宇, 等. 肠侵袭性大肠埃希氏菌国家核酸标准样品的研制 [J]. *食品安全质量检测学报*, 2015(1): 140-144.
- [29] LIANG W, XU L, SUI Z, *et al.*. Quantification of plasmid DNA reference materials for Shiga toxin-producing *Escherichia coli* based on UV, HR-ICP-MS and digital PCR [J/OL]. *Chem. Cent. J.*, 2016; 10(1): 55 [2020-11-18]. <http://org.doi/10.1186/s13065-016-0201-0>.
- [30] 原霖, 王传彬, 高旭年, 等. 猪繁殖与呼吸综合征病毒美洲经典株国家核酸标准物质的研制 [J]. *畜牧与兽医*, 2018, 50(11): 78-82.
- [31] 李亮. 生物分析测试: 探索生命科学奥秘的工具 [J]. *生物技术通报*, 2020, 36(5): 1.