

• 综 述 •

数字 PCR 技术及应用研究进展

林佳琪¹, 苏国成^{1,2}, 苏文金^{1,2}, 周常义^{1,2}

1 集美大学 食品与生物工程学院, 福建 厦门 361021

2 厦门市食品科技研发检测中心, 福建 厦门 361021

林佳琪, 苏国成, 苏文金, 等. 数字 PCR 技术及应用研究进展. 生物工程学报, 2017, 33(2): 170–177.

Lin JQ, Su GC, Su WJ, et al. Progress in digital PCR technology and application. Chin J Biotech, 2017, 33(2): 170–177.

摘 要: 数字 PCR 是继实时定量 PCR 之后新兴发展起来的一种绝对定量分析技术。通过将单个 DNA 分子转移入独立的反应室, PCR 扩增反应后, 对荧光信号进行检测分析, 实现单分子的绝对定量。数字 PCR 技术摆脱了对标准曲线的依赖, 具有更高灵敏度和准确度, 在基因突变检测、拷贝数变异检测、微生物检测、转基因食品检测以及下一代测序等方面均得到广泛应用。本文介绍数字 PCR 技术的定量方法, 并评述该技术在主要应用领域的研究进展。

关键词: 数字 PCR, 绝对定量, 泊松分布, 突变检测, 拷贝数变异检测, 微生物检测, 转基因食品检测

Progress in digital PCR technology and application

Jiaqi Lin¹, Guocheng Su^{1,2}, Wenjin Su^{1,2}, and Changyi Zhou^{1,2}

1 College of Food and Bioengineering, Jimei University, Xiamen 361021, Fujian, China

2 Xiamen Food Research and Inspection Centre, Xiamen 361021, Fujian, China

Abstract: Digital PCR is an emerging analysis technology for absolute quantification after realtime-PCR. Through digital PCR, single DNA molecules are distributed into isolated reactions, and the product with fluorescence signal can be detected and analyzed after amplification. With the advantages of higher sensitivity and accuracy, digital PCR, independent of a standard curve, is developing rapidly and applied widely to the next generation sequencing and detection fields, such as gene mutation, copy number variation, microorganism, and genetically modified food. In this article, we reviewed the quantitative method and research progress of digital PCR technology in the main application fields.

Keywords: digital PCR, absolute quantification, poisson distribution, mutation detection, copy number variation

Received: July 15, 2016; **Accepted:** November 7, 2016

Supported by: Natural Science Foundation of Fujian Province (No. 2015J01614), Science and Technology Project of Xiamen (No. 3502Z20133012).

Corresponding author: Changyi Zhou. Tel: +86-592-6181487; E-mail: chyizhou@163.com

福建省自然科学基金 (No. 2015J01614), 厦门市科技计划项目 (No. 3502Z20133012) 资助。

网络出版时间: 2017-02-13

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20170213.1638.006.html>

detection, microbial detection, genetically modified food detection

1999 年, 美国学者 Kenneth Kinzler 与 Bert Vogelstein 首次提出了“数字 PCR (Digital PCR, dPCR)”的概念^[1], 该技术实现了核酸拷贝数绝对定量的突破。其主要特点之一在于将目标分子分散入单个反应室中, 使每个反应室中包含或不包含一个或多个拷贝的目标分子, 是实现数字 PCR 高灵敏度和高准确度的关键。

1 技术原理

数字 PCR 主要原理是将单个 DNA 分子置于独立的反应室中, 并对其进行 PCR 扩增, 利用 TaqMan[®] 化学试剂及染料标记探针检测特定的靶序列, 通过呈现两种信号类型的反应单元比例和数目进行统计学分析, 实现样品的绝对定量。因此, 数字 PCR 也称单分子 PCR, 其检测过程主要包括两部分内容, 即 PCR 扩增和荧光信号分析。在 PCR 反应前, 将样品分散至几万个单元 (反应室) 中, 使每个单元中只存在单个 DNA 分子。PCR 扩增阶段的扩增程序、扩增体系与普通 PCR 并没有什么不同。在荧光信号分析阶段, 采用终端检测, 是对每个反应单元的荧光信号进行采集, 然后直接计数或者借用泊松统计得到样品的原始浓度或含量 (图 1)。与

实时荧光定量 PCR 不同的是, 整个数字 PCR 过程不需要扩增标准曲线和看家基因, 具有良好的准确度和重现性, 可以实现真正意义上的绝对定量。

基于分液方式的不同, 数字 PCR 主要分为 3 种: 微流体数字 PCR (Microfluidic digital PCR, mdPCR)、微滴数字 PCR (Droplet digital PCR, ddPCR) 和芯片数字 PCR (Chip digital PCR, cdPCR)。分别通过微流体通道、微液滴或微流体芯片实现分液, 分隔开的每个微小区域都可进行单独的 PCR 反应, 其中 mdPCR 基于微流控技术, 对 DNA 模板进行分液, 微流控技术能实现样品纳升级或更小液滴的生成, 但液滴需要特殊吸附方式再与 PCR 反应体系结合, mdPCR 已逐渐被其他方式取代; ddPCR 技术, 是相对成熟的数字 PCR 平台, 利用油包水微滴生成技术, 目前的仪器主要有 Bio-rad 公司的 QX100/QX200 微滴式 dPCR 系统和 RainDance 公司的 RainDropTM dPCR 系统, 其中 Bio-rad 公司的 dPCR 系统利用油包水生成技术将含有核酸分子的反应体系生成 20 000 个纳升级微滴, 经 PCR 扩增后, 微滴分析仪逐个对每个微滴进行检测; cdPCR 利用微流控芯片技术

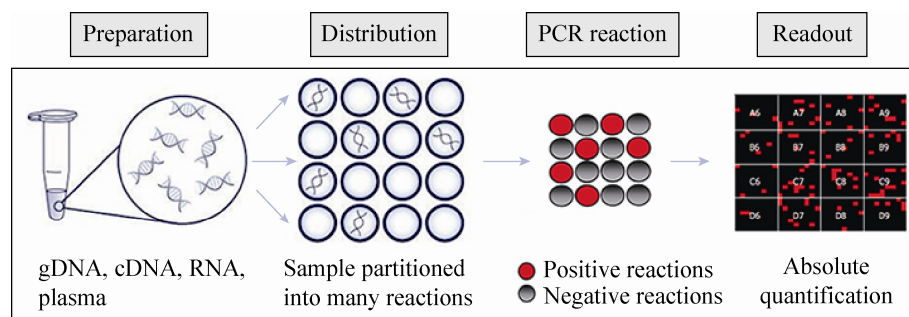


图 1 数字 PCR 原理^[2]

Fig. 1 The schematic diagram of digital PCR^[2].

将样品的制备、反应、分离和检测等集成到一块芯片上,目前的仪器主要有 Fluidigm 公司的 Bio-Mark™ 基因分析系统和 Life Technologies 公司的 QuantStudio 系统。利用集成流体通路技术在硅片或石英玻璃上刻上许多微管和微腔体,通过不同的控制阀门控制溶液在其中的流动来实现生物样品的分液、混合、PCR 扩增,实现绝对定量。

2 数字 PCR 的优势

传统 PCR 技术是将目的基因经过 PCR 扩增循环,一个 DNA 分子模板复制成成千上万的子代双螺旋,然后用凝胶电泳进行检测。但是,凝胶电泳检测只能对扩增产物的分子大小进行判断,而无法推断出起始样品中 DNA 的含量,因此无法进行定量分析;实时荧光定量 PCR 可以进行绝对定量和相对定量,其中绝对定量是用一系列已知浓度的标准品制作标准曲线,在相同的条件下目的基因测得的荧光信号量同标准曲线进行比较,从而得到目的基因的量,标准品可选择纯化的质粒 DNA 或体外合成的 ssDNA 等,相对定量通过内参等进行换算起始样品中 DNA 的相对含量。数字 PCR 是基于传统 PCR、实时荧光定量 PCR 基础上发展起来的第 3 代 PCR 技术,它不需要标准品,也不要制作标准曲线,即能实现更灵敏、更准确的绝对定量。

数字 PCR 高精度的另一个重要因素是将泊松统计引入数字 PCR 的检测应用中。由于数字 PCR 是一种终端检测的分析方法,如果目标分子没有得到很好的离散,在一个反应室中不止存在一个靶 DNA,那么得到的浓度便不可信。泊松统计是对随机分布的一种描述方法,当反应室/液滴量和其中阴性比例已知,即可通

过泊松模型获得初始浓度。所以,如果反应室没有达到饱和,研究者也可以计算样品的起始分子数。Beer 等的研究表明,基于液滴方法的优势在于其可扩大性,增加反应容器的数量,数据的质量也就随之增大^[3]。即当扩大或增加了反应容器的数量时,泊松精度也随之提升。

同时,数字 PCR 能够有效避免反应抑制剂的影响。随着反应室的增加,反应受到抑制剂的影响就越小。

3 数字 PCR 的应用

在 Web of Knowledge 平台 Science Citation Index Expanded 数据库中搜索 1999 年至 2016 年 6 月间“digital PCR, dPCR”关键词(截止至 2016 年 6 月 25 日),搜索结果显示,共有 1 787 篇相关文献,针对其中 1 405 篇 article 类文章进行文献统计分析。如图 2 表明,与数字 PCR 相关的研究文章数量逐年增加,而且自 2010 年起每年论文数的增加量迅猛;在众多国家中,美国和中国是数字 PCR 研究大军中的主要国家(图 3)。据 Kalorama Information 发布的研究报告显示,2019 年全球数字 PCR 和 qPCR 市场预计将达到 39.7 亿美元,中国是最主要的新兴市场^[4]。

3.1 在突变检测方面的应用

常规组织和血液等样品中,由于单个突变的体细胞含量低,使得检出其的存在变得困难。而 dPCR 可对复杂的大背景进行有限的稀释或分区,通过有限稀释,降低野生基因型的背景信号,使得低丰度的目的序列能够被灵敏的检出,特别适用于稀有突变的检测应用。研究表明,低至 1/100 000 的变异频率能被检测出来^[5-6]。并且随着反应室数量的增加,对稀有变异的分析更灵敏。

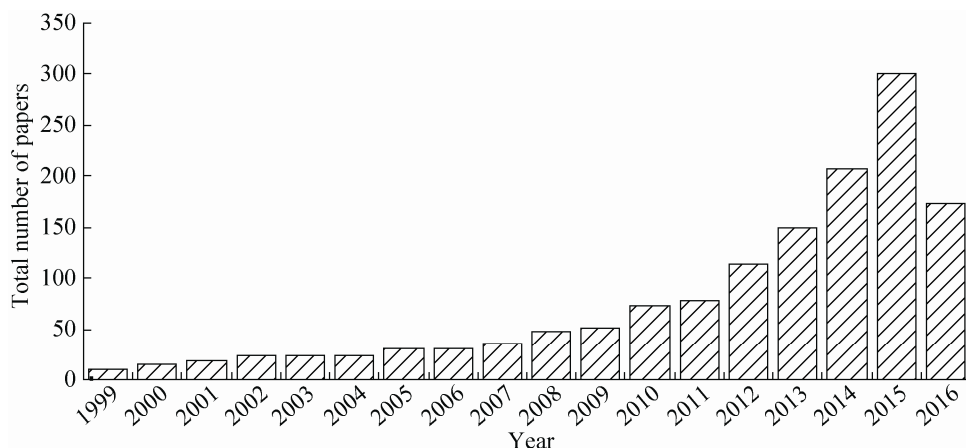


图 2 SCIE 数据库统计 1999–2016 年间全球数字 PCR 论文发表量

Fig. 2 Number of published papers on digital PCR from 1999 to June 2016 according to SCIE.

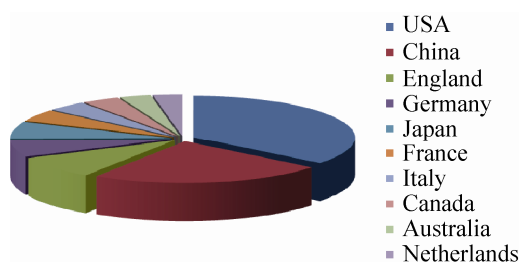


图 3 数字 PCR 论文发文量排在前十位的国家

Fig. 3 Top 10 countries which ranked in the number of published papers on digital PCR.

dPCR 在稀有突变检测方面有广泛的应用和研究, 尤其是与癌症相关的检测和定量研究, 如 EGFR^[7]、BRAF^[8]、KRAS^[9]、PIK3CA^[10–11]、JAK2^[12] 和 miRNAs^[13] 等。PIK3CA 可由 IGF-1、HGF、EGF 等生长因子激活, 与生长因子一同作用于受体酪氨酸激酶, 促进增殖、血管生成和细胞的新陈代谢。Kim 等用 ddPCR 对血清中游离的 DNA 进行 PIK3CA 突变的检测分析^[10], 血清中低丰度的 PIK3CA 突变成功被检测出来。对 38 份转移性胆道癌样品进行试验, 匹配的一份血清样品 PIK3CA

p.E542K 对 28 突变拷贝呈阳性, 相当于 48 copies/mL 血清和 0.3% 的等位基因的患病率; 另一血清样品 PIK3CA p.H1047R 对 10 突变拷贝呈阳性, 相当于 18 copies/mL 血清和 0.2% 的等位基因的患病率。Miotto 等研究表明 EvaGreen 染料法和 TaqMan 探针法均可用于人体血浆和血清中循环 miRNA 的 ddPCR 检测定量^[14]。

3.2 在拷贝数变异检测方面的应用

通常基因表达分析依赖于琼脂糖凝胶电泳、realtime PCR 等方法, 拷贝数的确定总是受到限制。而使用 dPCR 进行直接计数目标基因和参照基因的双重反应, 通过计算比值, 便直接得到目标基因的拷贝数^[15–17]。

影响 HIV 感染和疾病进展的 CCL3 编码基因拷贝数变异 (Copy number variations, CNV) 的发现引起广泛的争议, 已经在一定程度上归因于拷贝数评估方法获得的不同结果。CCL3 基因编码 CC 趋化因子 CCL4, 也是 CCR5 受体的自然配体, 对 HIV-1 起到了保护作用。Bharuthram 等用标准方法 qPCR 和 ddPCR 对 CCL4L 基因拷贝数进行评估测定^[18]。研究表

明, 与 $qPCR$ ($r=0.87$, $P<0.000\ 1$)相比, 由 $ddPCR$ 测得 CCL4L 拷贝与 CCL4L1 和 CCL4L2 拷贝之和具有良好的相关性 ($r=0.99$, $P<0.000\ 1$)。而 $qPCR$ 在高拷贝数时出现准确性明显下降。Whale 等模拟不同 CNVs 的 *HER2* 基因扩增, 相同试验条件下, $dPCR$ 能够检测比 $qPCR$ 更低的 CNVs^[19]。由于 $dPCR$ 准确度与扩增大小和模板浓度是直接相关性的, 他们也建立了用于测量 CNV 的 $dPCR$ 方法。利用泊松和二项分布, 得出 $dPCR$ 的方差表达式。

3.3 在微生物检测方面的应用

核酸扩增技术是病原微生物检测的一个重要方法, 但可能存在的问题是, 有时候低水平目标分子和小分子抑制剂的存在使得检测量化的结果发生偏移。 $dPCR$ 则是一种不需要标准曲线并且对部分抑制剂不灵敏的检出方法。因此, 研究人员纷纷将其应用于一些病毒或致病菌的检测研究中, 如 HBV^[20-21]、肠病毒^[22]、腺相关病毒^[23]、巨细胞病毒^[24]、耐甲氧西林金黄色葡萄球菌^[25]、结核分支杆菌^[26]、产志贺毒素大肠杆菌^[27]等。Strain 等采用 $ddPCR$ 和 $qPCR$ 对 HIV 经过联合抗逆转录病毒治疗的病人体内残留的 DNA 进行检测, 研究发现, $ddPCR$ 具有更高的精确度和更低的拷贝变异系数^[28]。Dong 等对 *E. coli* O157:H7 的 *rfbE* 基因建立 $ddPCR$, 优化探针浓度, 在 20 μL 体系中, 对 *E. coli* O157:H7 基因组 DNA 的检测范围为 $4-1.25\times 10^5$ copies, 线性相关系数为 0.999^[29]。同时用 $ddPCR$ 和 $qPCR$ 对 16 份实际样品进行检测得到相同结果。

在环境检测方面, $dPCR$ 也得到相应的应用^[30-31]。Josefa 等在对土壤、植物根茎样品中

烟草疫霉菌的低拷贝 DNA 定性定量的研究发现, 与 $qPCR$ 相比, $dPCR$ 对反应抑制剂更不敏感^[32]。由于基于标准曲线的 *realtime PCR* 方法在检测方面带来的偏差, Cao 等利用双重 $ddPCR$ 同时检测粪源和水质中的肠球菌和人源粪便相关标记 HF183^[33]。 $qPCR$ 中双重的肠球菌和 HF183 相互竞争使得其无检出或超出其单重最低检测浓度范围, 而 $ddPCR$ 的单重和双重检测结果一致。其对抑制剂的较高耐受性、重复性、检测灵敏度以及准确度均比 $qPCR$ 高, 但是其定量上限较 *realtime PCR* 低。Anja 等将 $ddPCR$ 与 $qPCR$ 联合起来使用, 用 $ddPCR$ 制备标准曲线, 用 *realtime PCR* 进行定量, 成功实现对不同生物膜形成时期的单增李斯特菌定量检测^[34]。

3.4 在转基因食品检测方面的应用

欧盟国家对转基因食品有着严格的限定, 而目前, 一般采用实时定量 PCR 用于商品中转基因的分子定量分析。但是在一些复杂的食物原料和饲料原材料中, 目标 DNA 非常少, 使得对其的检测和定量受到限制。 $dPCR$ 为国内外研究人员提供了新的方法。Morisset 等用 $ddPCR$ 对 *MON810* 转基因和 *hmg* 玉米参考基因进行绝对定量^[35]。研究表明, $ddPCR$ 对低浓度的检测具有更高的重复性, 并且对抑制剂具有更高耐受性。Dobnik 等用多重 $ddPCR$ 检测定量 12 个欧盟授权转基因玉米, 对于含转基因组织样品中, 该方法比实时定量 PCR 更高通量、更高效^[36]。Damira 等建立双重 $ddPCR$ 用于检测定量转基因玉米中 *T-nos/hmg* 基因的拷贝数比例, 通过中心复合设计优化, 并在体系中加入 DNA 消化酶减小检测偏差, 所建立的方法 *T-nos* 检测限为 11 拷贝, *T-nos/hmg* 比例的动态范围为 0.08%–100%^[37]。

3.5 在下一代测序方面的应用

下一代测序 (NGS) 又叫高通量测序,是测序技术革命性的进步,能一次上百万条 DNA 分子进行序列测定,使得对一个物种的转录组和全基因组进行细致全貌的分析成为现实。dPCR 平台可以与 NGS 对接,实现对测序文库的质量控制、提供对测序文库的定量分析和质量评估信息。一方面,dPCR 对 NGS 的测序结果进行验证,对诸如单核苷酸多态性,突变及拷贝数变异在内的基因组变异进行验证,确保测序结果的可信度;另一方面,所得到的结果还包含反映测序文库质量的信息,如接头与接头二聚体、错误连接片段、过长连接片段等,这是当前其他方法所不具备的优势。Alikian 等研究表明,在慢性粒细胞白血病患者检测中,dPCR 比 qPCR 更准确,定量分析结果可靠性高、重复性好^[38]。

4 展望

dPCR 与普通 PCR、qPCR 相比具有独特的技术优势,实现了单分子 DNA 绝对定量,使其成为了分子生物学研究中的重要工具,研究者对其应用分析也日益关注。近期,相应的分析软件有所突破,美国已推出一款 ddpcr 软件可用于使用者分析 dPCR 数据,免费在线网址为 <https://daattali.com/shiny/ddpcr/>^[39]。软件及网站的建立为 dPCR 技术的推广和应用提供重要支持。

未来如果能有效解决 dPCR 耗材成本高、实验通量少等问题和实现操作智能化,dPCR 将在临床诊断与治疗、微生物检测和食品安全检测等方面拥有更广阔的应用前景。

REFERENCES

- [1] Vogelstein B, Kinzler KW. Digital PCR. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(16): 9236–9241.
- [2] 数字 PCR 可以实现更高准确性、灵敏度和绝对定量[EB/OL]. [2016-06-12]. <http://www.thermofisher.com/cn/zh/home/life-science/pcr/digital-pcr.html>.
- [3] Beer NR, Hindson BJ, Wheeler EK, et al. On-chip, real-time, single-copy polymerase chain reaction in picoliter droplets. *Anal Chem*, 2007, 79(22): 8471–8475.
- [4] qPCR and dPCR markets (instruments, reagents, software/services)[EB/OL]. [2016-06-12]. <http://www.marketresearch.com/Kalorama-Information-v767/qPCR-dPCR-Instruments-Reagents-Software-10061387/>.
- [5] Heyries KA, Tropini C, VanInsberghe M, et al. Megapixel digital PCR. *Nat Methods*, 2011, 8(8): 649–651.
- [6] Pekin D, Skhiri Y, Baret JC, et al. Quantitative and sensitive detection of rare mutations using droplet-based microfluidics. *Lab Chip*, 2011, 11(13): 2156–2166.
- [7] Koh Y, Kawaguchi T, Watanabe M, et al. Ultrasensitive detection of the pretreatment EGFR T790M mutation in non-small cell lung cancer patients with an EGFR-activating mutation using picodroplet digital PCR. *Cancer Res*, 2015, 75(15S): 617.
- [8] Bidshahri R, Attali D, Fakhfakh K, et al. Quantitative detection and resolution of *BRAF* V600 status in colorectal cancer using droplet digital PCR and a novel wild-type negative assay. *J Mol Diagn*, 2016, 18(2): 190–204.
- [9] Taly V, Pekin D, Benhaim L, et al. Multiplex picodroplet digital PCR to detect *KRAS* mutations in circulating DNA from the plasma of colorectal cancer patients. *Clin Chem*, 2013, 59(12): 1722–1731.
- [10] Kim ST, Lira M, Deng S, et al. PIK3CA mutation detection in metastatic biliary cancer using cell-free DNA. *Oncotarget*, 2015, 6(37): 40026–40035.

- [11] Takeshita T, Yamamoto Y, Yamamoto-Ibusuki M, et al. Prognostic role of *PIK3CA* mutations of cell-free DNA in early-stage triple negative breast cancer. *Cancer Sci*, 2015, 106(11): 1582–1589.
- [12] Kinz E, Leiherer A, Lang AH, et al. Accurate quantitation of JAK2 V617F allele burden by array-based digital PCR. *Int J Lab Hematol*, 2015, 37(2): 217–224.
- [13] Li N, Ma J, Guarnera MA, et al. Digital PCR quantification of miRNAs in sputum for diagnosis of lung cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2014, 140(1): 145–150.
- [14] Miotto E, Saccenti E, Lupini L, et al. Quantification of circulating miRNAs by droplet digital PCR: comparison of EvaGreen- and TaqMan-based chemistries. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2014, 23(12): 2638–2642.
- [15] Ling L, Swain M, Conyers R, et al. A powerful new approach to measuring engraftment using copy number variations and droplet digital PCR, exemplified in a complex allogeneic bone marrow transplantation case. *Pathology*, 2015, 47(S1): S87.
- [16] Zhang YN, Tang ET, Du ZQ. Detection of MET gene copy number in cancer samples using the droplet digital PCR method. *PLoS ONE*, 2016, 11(1): e0146784.
- [17] GLMMs for nucleic acid concentration estimation in digital droplet PCR [EB/OL]. [2016-06-12]. <https://biblio.ugent.be/publication/5992468>.
- [18] Bharuthram A, Paximadis M, Picton ACP, et al. Comparison of a quantitative real-time PCR assay and droplet digital PCR for copy number analysis of the *CCL4L* genes. *Infect Genet Evol*, 2014, 25: 28–35.
- [19] Whale AS, Huggett JF, Cowen S, et al. Comparison of microfluidic digital PCR and conventional quantitative PCR for measuring copy number variation. *Nucleic Acids Res*, 2012, 40(11): e82.
- [20] Huang JT, Liu YJ, Wang J, et al. Next generation digital PCR measurement of hepatitis B virus copy number in formalin-fixed paraffin-embedded hepatocellular carcinoma tissue. *Clin Chem*, 2015, 61(1): 290–296.
- [21] Wongjitrat C, Horthongkham N, Sutthent R, et al. Comparison of droplet digital PCR and real time PCR method for HBV DNA quantification. *J Med Assoc Thai*, 2015, 98(S9): S140–S145.
- [22] Lui YLE, Tan EL. Droplet digital PCR as a useful tool for the quantitative detection of *Enterovirus* 71. *J Virol Methods*, 2014, 207: 200–203.
- [23] Lock M, Alvira MR, Chen SJ, et al. Absolute determination of single-stranded and self-complementary adeno-associated viral vector genome titers by droplet digital PCR. *Hum Gene Ther Methods*, 2013, 25(2): 115–125.
- [24] Hayden RT, Gu Z, Ingersoll J, et al. Comparison of droplet digital PCR to real-time PCR for quantitative detection of cytomegalovirus. *J Clin Microbiol*, 2013, 51(2): 540–546.
- [25] Kelley K, Cosman A, Belgrader P, et al. Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by a duplex droplet digital PCR assay. *J Clin Microbiol*, 2013, 51(7): 2033–2039.
- [26] Devonshire AS, Honeyborne I, Gutteridge A, et al. Highly reproducible absolute quantification of *Mycobacterium tuberculosis* complex by digital PCR. *Anal Chem*, 2015, 87(7): 3706–3713.
- [27] Droplet digital PCR method for multiple gene marker determination in single cells enabling accurate detection of priority STEC in food enrichment cultures [EB/OL]. [2016-06-12]. <https://iafp.confex.com/iafp/2016/webprogram/Paper11730.html>.
- [28] Strain MC, Lada SM, Luong T, et al. Highly precise measurement of HIV DNA by droplet digital PCR. *PLoS ONE*, 2013, 8(4): e55943.
- [29] Dong LH, Zhang L, Jing J, et al. Development of droplet digital polymerase chain reaction for quantifying *Escherichia coli* O157:H7. *Chin J Anal Chem*, 2015, 43(3): 319–324 (in Chinese).
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. *分析化学*, 2015, 43(3): 319–324.
- [30] Te SH, Chen EY, Gin KYH. Comparison of

- quantitative PCR and droplet digital PCR multiplex assays for two genera of bloom-forming cyanobacteria, *Cylindrospermopsis* and *Microcystis*. *Appl Environ Microbiol*, 2015, 81(15): 5203–5211.
- [31] Rački N, Dreó T, Gutierrez-Aguirre I, et al. Reverse transcriptase droplet digital PCR shows high resilience to PCR inhibitors from plant, soil and water samples. *Plant Methods*, 2014, 10: 42.
- [32] Blaya J, Lloret E, Santísima-Trinidad AB, et al. Molecular methods (digital PCR and real-time PCR) for the quantification of low copy DNA of *Phytophthora nicotianae* in environmental samples. *Pest Manag Sci*, 2016, 72(4): 747–753.
- [33] Cao YP, Raith MR, Griffith JF. Droplet digital PCR for simultaneous quantification of general and human-associated fecal indicators for water quality assessment. *Water Res*, 2015, 70: 337–349.
- [34] Klančnik A, Toplak N, Kovač M, et al. Quantification of *Listeria monocytogenes* cells with digital PCR and their biofilm cells with real-time PCR. *J Microbiol Methods*, 2015, 118: 37–41.
- [35] Morisset D, Štebih D, Milavec M, et al. Quantitative analysis of food and feed samples with droplet digital PCR. *PLoS ONE*, 2013, 8(5): e62583.
- [36] Dobnik D, Spilberg B, Košir AB, et al. Multiplex quantification of 12 European union authorized genetically modified maize lines with droplet digital polymerase chain reaction. *Anal Chem*, 2015, 87(16): 8218–8226.
- [37] Dalmira FU, Melina PU, José-Benigno VT, et al. Development, optimization, and evaluation of a duplex droplet digital PCR assay to quantify the *T-nos/hmg* copy number ratio in genetically modified maize. *Anal Chem*, 2016, 88(1): 812–819.
- [38] Alikian M, Ellery P, Forbes M, et al. Next-generation sequencing-assisted DNA-based digital PCR for a personalized approach to the detection and quantification of residual disease in chronic myeloid leukemia patients. *J Mol Diagn*, 2016, 18(2): 176–189.
- [39] Attali D, Bidshahri R, Haynes C, et al. ddPCR: an R package and web application for analysis of droplet digital PCR data. *F1000 Res*, 2016, 5: 1411.

(本文责编 陈宏宇)