

# 肺炎克雷伯菌的芯片式数字 PCR 检测方法的建立

台萃\*, 旷代, 张萍, 许杰, 张薇, 罗倩

上海交通大学生命科学技术学院 微生物代谢国家重点实验室, 上海 200240

台萃, 旷代, 张萍, 许杰, 张薇, 罗倩. 肺炎克雷伯菌的芯片式数字 PCR 检测方法的建立[J]. 微生物学通报, 2022, 49(3): 1200-1213

Tai Cui, Kuang Dai, Zhang Ping, Xu Jie, Zhang Wei, Luo Qian. Development of a chip digital PCR assay for detection of *Klebsiella pneumoniae*[J]. Microbiology China, 2022, 49(3): 1200-1213

**摘要:** 【背景】条件致病菌肺炎克雷伯菌是医源性感染最重要的革兰氏阴性菌之一, 目前对该病原菌的核酸检测方法存在费时费力、灵敏度低、准确性差等问题。【目的】建立基于芯片式数字 PCR 的肺炎克雷伯菌检测方法。【方法】依据肺炎克雷伯菌的 16S rRNA 基因保守序列设计特异性引物和 TaqMan 探针, 通过与实时荧光定量 PCR 的比较分析, 确定了芯片式数字 PCR 方法的检测范围和最佳反应条件, 并进行了方法特异性、灵敏性分析及临床菌株的检测。【结果】芯片式数字 PCR 检测灵敏度比实时荧光定量 PCR 提高了约 1.5 个数量级, 最低检出限可达到 3.77 copies/ $\mu$ L; 优化后的芯片式数字 PCR 特异性与实时荧光定量 PCR 结果一致, 方法的相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)均小于 25%; 本研究利用优化后的芯片式数字 PCR 方法共检测了 28 株临床菌株, 检测到 14 株为肺炎克雷伯菌, 14 株为其他种属, 这也与实时荧光定量 PCR 检测结果一致。【结论】采用芯片式数字 PCR 技术建立了肺炎克雷伯菌核酸检测的绝对定量方法。该方法特异性好、灵敏度高、准确度高, 适合肺炎克雷伯菌的核酸检测和定量分析, 也为其他临床病原菌的分子检测提供了新的技术参考。

**关键词:** 肺炎克雷伯菌; 芯片式数字 PCR; 绝对定量; 病原菌检测

基金项目: 国家重点研发计划(2018YFE0102400); 上海交通大学决策咨询课题(JCZXSJB2020-020)

**Supported by:** National Key Research and Development Program of China (2018YFE0102400); Decision-Making Consultation Project of Shanghai Jiao Tong University (JCZXSJB2020-020)

\*Corresponding author: E-mail: ctai@sjtu.edu.cn

Received: 2021-09-07; Accepted: 2021-10-29; Published online: 2021-12-28

## Development of a chip digital PCR assay for detection of *Klebsiella pneumoniae*

TAI Cui\*, KUANG Dai, ZHANG Ping, XU Jie, ZHANG Wei, LUO Qian

State Key Laboratory of Microbial Metabolism, School of Life Sciences and Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China

**Abstract:** [Background] *Klebsiella pneumoniae* is one of the major Gram-negative bacteria causing iatrogenic infection. The available methods for the nucleic acid detection of this pathogen are time-consuming and laborious and have low sensitivity and poor accuracy. [Objective] A chip digital PCR-based method for *K. pneumoniae* detection was established. [Methods] Specific primers and TaqMan probe were designed according to the conserved sequence of the 16S rRNA gene of *K. pneumoniae*. By comparison with the real-time fluorescence quantitative PCR, we determined the detection range and optimal reaction conditions of the chip digital PCR, analyzed the specificity and sensitivity of this method, and then applied this method to the detection of clinical isolates. [Results] The chip digital PCR had the limit of detection up to 3.77 copies/ $\mu$ L and about 1.5 orders of magnitude increase in sensitivity compared with real-time fluorescent quantitative PCR. The optimized chip digital PCR showed the specificity consistent with that of real-time fluorescence quantitative PCR, with the relative standard deviation (RSD) below 25%. Of the 28 clinical strains detected by the optimized chip digital PCR method, 14 strains were identified as *K. pneumoniae* and 14 strains as other species, which was also consistent with the results of real-time fluorescence quantitative PCR. [Conclusion] An absolute quantitative method for nucleic acid detection of *K. pneumoniae* was established with the chip digital PCR. This method, characterized by good specificity, high sensitivity, and high accuracy, is suitable for nucleic acid detection and quantitative analysis of *K. pneumoniae*. Moreover, it provides a new technical reference for molecular detection of other clinical pathogens.

**Keywords:** *Klebsiella pneumoniae*; chip digital PCR; absolute quantification; pathogen detection

肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*)属于肠杆菌科克雷伯菌属, 是一类重要的医源性感染革兰氏阴性条件致病菌, 该菌可引起包括肺炎、呼吸道感染、肝脓肿、腹膜炎、脑膜炎等多种感染类疾病<sup>[1]</sup>。肺炎克雷伯菌对外界抵抗力强, 对多数抗菌药物易产生耐药性<sup>[2]</sup>, 这使之在临床治疗上极为棘手, 日渐成为全球公共卫生的严重威胁。过去 20 年, 肺炎克雷伯菌逐渐在全球蔓延, 已经成为超过大肠埃希菌、从化脓性肝脓肿患者中分离的重要病原菌<sup>[3]</sup>。在我国, 肺炎克雷伯菌已成为公共卫生事业的沉

重负担。据 2021 年中国细菌耐药监测网(China Antimicrobial Surveillance Network, CHINET, <http://www.chinets.com>)报道, 肺炎克雷伯菌约占临床分离菌的 13%, 成为仅次于大肠埃希菌(19%)的院内感染第二大致病菌。对肺炎克雷伯菌的快速检测将有助于提供抗感染的精确治疗方案。目前检测肺炎克雷伯菌的方法主要有微生物培养法、生理生化检测、组织病理学观察、显微镜镜检、微生物鉴定系统以及普通 PCR (polymerase chain reaction, PCR)、实时荧光定量 PCR (real-time fluorescence quantitative PCR,

qPCR)等分子诊断方法<sup>[4]</sup>。这些检测方法都或多或少存在一些问题,例如,qPCR方法在核酸定量方面已成为检测的“金标准”,但其结果准确性在很大程度上要依赖标准曲线,而且需要已知浓度的标准品,受反应体系背景影响较大,不能直接快速地得到样品的实际拷贝数。此外,由于qPCR检出限的限制,对低拷贝样品显得力不从心。

数字PCR(digital PCR, dPCR)作为第3代PCR技术,具有简便快速、灵敏度高、精确度高的特点,只要有微量被检细菌核酸分子即可检出。其原理是将含有核酸模板的标准PCR反应体系平均分配到上万个或数百万个PCR反应中,即分配到芯片或油包水的微滴中,使每个反应中含有或不含1个核酸模板分子,然后进行单分子模板PCR扩增,通过读取荧光信号的有无进行计数,利用泊松分布原理,根据阳性微滴与阴性微滴数的比例计算目标分子的拷贝数,从而实现绝对定量<sup>[5-6]</sup>。依据分液方式的不同,dPCR分为微滴式数字PCR(droplet digital PCR, ddPCR)和芯片式数字PCR(chip digital PCR, cdPCR)<sup>[7]</sup>。与传统的qPCR相比,dPCR不受扩增效率的影响,无需依赖扩增曲线的循环阈值进行定量,也不必利用标准曲线和内参基因,并且对低浓度的核酸定量更加准确可靠<sup>[8]</sup>。该方法降低了标准曲线对测量结果的影响,实现了PCR扩增的样品分离,消除了本底信号的影响,显著提高了低丰度靶标的扩增灵敏度<sup>[9-11]</sup>。因此,dPCR特别适用于依赖qPCR的 $C_t$ 值不能很好分辨的低拷贝含量的核酸检测,现已逐渐被应用于临床病原菌诊疗上<sup>[8-9,11-13]</sup>。

目前已有研究者利用数字PCR技术对病原微生物展开了广泛的研究,主要集中在人类

免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)<sup>[14-15]</sup>、乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)<sup>[12,16]</sup>、流感病毒<sup>[17]</sup>、人乳头瘤病毒<sup>[9]</sup>、非洲猪瘟病毒<sup>[18]</sup>、硫酸盐还原菌<sup>[19]</sup>、伤寒沙门氏菌<sup>[20]</sup>、结核分枝杆菌<sup>[21]</sup>、大肠埃希菌<sup>[22-23]</sup>和猪链球菌<sup>[24]</sup>等方面,但其对肺炎克雷伯菌的检测尚未见报道。为此,本研究利用cdPCR技术,根据肺炎克雷伯菌16S rRNA基因高度保守序列设计筛选了一套特异性较好的引物、探针,经过优化反应体系及反应条件,在与qPCR比较的基础上建立一种特异、准确、灵敏的肺炎克雷伯菌快速定量检测方法,并通过临床菌株的检测验证该方法的实际应用性。该方法将有助于提高肺炎克雷伯菌的早期感染的检测效率,为其快速、准确地定性和定量检测提供量化标准和参考,为危害公共卫生安全的致病菌防控提供新的技术手段和借鉴。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 主要试剂和仪器

PerfectStart™ II Probe qPCR SuperMix,北京全式金生物技术有限公司;PerfeCTa® qPCR ToughMix UNG、荧光素钠盐,北京深蓝云生物科技有限公司;细菌基因组DNA提取试剂盒,天根生化科技(北京)有限公司;引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成;探针由苏州鸿旭生物科技股份有限公司合成。荧光定量PCR仪,Analytik-jena公司;芯片式数字PCR系统,Stilla Technologies公司;超微量核酸蛋白分析仪(NanoDrop),基因有限公司。

#### 1.1.2 菌株

参考菌株7株,临床分离株28株,由上海交通大学分离保存(表1)。

表 1 实验用菌株

Table 1 Bacteria stains in the experiment

Species	Strain	Accession No.	Note	Amounts
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	HS11286	CP003200.1	Reference	2
	RJF999	CP014010.1		
<i>Escherichia coli</i>	DH5 $\alpha$	CP026085.1	Reference	1
<i>Salmonella enterica</i>	ATCC 14028	CP034230.1	Reference	1
<i>Acinetobacter baumannii</i>	ATCC 19606	CP045110.1	Reference	1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PAO1	AE004091.2	Reference	1
<i>Staphylococcus aureus</i>	N315	BA000018.3	Reference	1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KP21101, KP21102, KP21103, KP21104, KP21105, KP21106, KP21107, KP21108, KP21109, KP21110, KP21111, KP21112, RJA166, RJF293		Clinical isolate	14
<i>Escherichia coli</i>	EC21301, EC21302		Clinical isolate	2
<i>Salmonella enterica</i>	SE21401, SE21402, SE21403		Clinical isolate	3
<i>Acinetobacter baumannii</i>	AB21501, AB21502, AB21503		Clinical isolate	3
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PA21601, PA21602, PA21603		Clinical isolate	3
<i>Staphylococcus aureus</i>	SA21701, SA21702, SA21703		Clinical isolate	3

## 1.2 方法

### 1.2.1 细菌基因组 DNA 的提取

取参考菌株和经过质谱鉴定的临床分离菌株, 在 LB 琼脂平板上挑取单菌落接种至 LB 液体培养基, 于 37 °C、220 r/min 振荡培养过夜。取 1 mL 菌液, 在生物安全柜中提取基因组 DNA。通过超微量核酸蛋白分析仪对基因组 DNA 检测浓度及纯度, -20 °C 保存备用。

### 1.2.2 引物、探针设计及筛选

应用美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>)在线引物设计程序 Primer-Blast 对肺炎克雷伯菌参考基因组 HS11286 (GenBank 登录号为 CP003200.1)的 16S rRNA 基因保守区设计引物; 包括 V1-V2 区 5 对、V4-V5 区 4 对、V5-V6 区 3 对, 选取表 1 中 7 株参考菌株即 2 株肺炎克雷伯菌 (HS11286, RJF999)和 5 株其他菌株(大肠埃希氏菌 DH5 $\alpha$ , 鼠伤寒沙门氏菌 ATCC 14028, 鲍

曼不动杆菌 ATCC 19606, 铜绿假单胞菌 PAO1, 金黄色葡萄球菌 N315), 筛选设计引物、探针。

### 1.2.3 PCR 标准品的制备和梯度稀释

以肺炎克雷伯菌 HS11286 基因组的 16S rRNA 基因为模板, 用引物 V1-V2-5-Pf 和 V1-V2-5-Pr (表 2)扩增获得目的片段, PCR 反应体系: (20  $\mu$ L): 2 $\times$ Taq Plus Master Mix 10  $\mu$ L, V1-V2-5-Pf (10  $\mu$ mol/L) 0.6  $\mu$ L, V1-V2-5-Pr (10  $\mu$ mol/L) 0.6  $\mu$ L, RNase-Free ddH<sub>2</sub>O 8.2  $\mu$ L, 模板 DNA 0.6  $\mu$ L。PCR 反应条件: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 62 °C 15 s, 72 °C 15 s, 共 30 个循环; 72 °C 5 min; 4 °C 保存。然后将目的片段与载体 pUC57 连接构建重组质粒, 命名为 pUC57-16S。重组质粒经测序, 序列与肺炎克雷伯菌 HS11286 的 16S rRNA 基因相应序列的一致性为 100%, 作为实验标准品原液使用。

将 pUC57-16S 标准品原液用超纯水进行 10 倍比梯度稀释: 取水 18  $\mu$ L 加入上述模板

表 2 引物和探针序列

Table 2 Primer and probe sequences

Primer and probe	Sequence (5'→3')	Size (bp)
Forward primer: V1-V2-5-Pf	CTCGGGTGACGAGCGG	16
Reverse primer: V1-V2-5-Pr	TGAGCCGTTACCCACCTAC	20
Probe: primer5-FAM-BHQ1	FAM-CATGCCATCAGATGTGCCAGATG-BHQ1	24

2  $\mu\text{L}$ , 混匀后取 2  $\mu\text{L}$  至 2 号管 18  $\mu\text{L}$  的水中, 依次类推稀释。样品编号从高浓度稀释至低浓度, 依次标记为 S1 (pUC57-16S 标准品原液)、S2、S3、S4、S5、S6、S7、S8、S9、S10。在 cdPCR 和 qPCR 反应体系中加入经逐级梯度稀释过的模板, 评估 cdPCR 和 qPCR 检测方法的检出限, 3 次重复。

#### 1.2.4 标准曲线的绘制、检测范围及检出限的确定

分别用 cdPCR 和 qPCR 两种方法检测不同梯度稀释的标准品并做标准曲线, 每个浓度样品重复 3 次。cdPCR 反应体系 (25  $\mu\text{L}$ ): 2 $\times$ PerfeCTa<sup>®</sup> qPCR ToughMix UNG 12.5  $\mu\text{L}$ , V1-V2-5-Pf (10  $\mu\text{mol/L}$ ) 2.5  $\mu\text{L}$ , V1-V2-5-Pr (10  $\mu\text{mol/L}$ ) 2.5  $\mu\text{L}$ , 荧光素钠盐 (1  $\mu\text{mol/L}$ ) 2.5  $\mu\text{L}$ , primer5-FAM-BHQ1 (10  $\mu\text{mol/L}$ ) 0.625  $\mu\text{L}$ , RNase-Free ddH<sub>2</sub>O 2.375  $\mu\text{L}$ , 模板 DNA 2  $\mu\text{L}$ 。cdPCR 反应条件: Partition 40  $^{\circ}\text{C}$ ; 95  $^{\circ}\text{C}$  3 min; 95  $^{\circ}\text{C}$  15 s, 60  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 共 45 个循环。cdPCR 反应结束后利用 Crystal Miner for the Naica<sup>TM</sup> System 软件分析结果, 绘制标准曲线。qPCR 反应体系 (20  $\mu\text{L}$ ): 2 $\times$ PerfectStart<sup>TM</sup> II Probe qPCR SuperMix 10  $\mu\text{L}$ , V1-V2-5-Pf (10  $\mu\text{mol/L}$ ) 0.4  $\mu\text{L}$ , V1-V2-5-Pr (10  $\mu\text{mol/L}$ ) 0.4  $\mu\text{L}$ , primer5-FAM-BHQ1 (10  $\mu\text{mol/L}$ ) 0.4  $\mu\text{L}$ , RNase-Free ddH<sub>2</sub>O 7.8  $\mu\text{L}$ , 模板 DNA 1  $\mu\text{L}$ 。qPCR 反应条件: 94  $^{\circ}\text{C}$  30 s; 94  $^{\circ}\text{C}$  5 s, 60  $^{\circ}\text{C}$  30 s; 共 45 个循环。qPCR 利用 qTOWER<sup>3</sup>G Touch qPCR Soft 4.0 分析软件

生成标准曲线。通过标准曲线结果选出最佳浓度样品作为后续反应条件优化的标准品, 并比较两种方法的检测范围及检出限。

#### 1.2.5 芯片式数字 PCR 反应条件的优化

cdPCR 扩增反应后所得到的荧光强度是决定检测方法准确性的一个因素<sup>[25]</sup>, 而荧光信号的累积与 PCR 扩增效率密切相关。PCR 反应在无抑制因子的情况下, 其扩增效率与扩增体系中的引物、探针浓度关系密切<sup>[22]</sup>。实验以 pUC57-16S 最佳浓度标准品 (S7 号样品) 为模板进行反应体系的优化, 通过改变引物浓度 (0.7–1.3  $\mu\text{mol/L}$ )、探针浓度 (0.05–0.90  $\mu\text{mol/L}$ ) 分析比较微滴分布状态、荧光信号强度以确定 cdPCR 对标准品 pUC57-16S 检测的最佳反应体系和反应条件。

#### 1.2.6 特异性实验

提取肺炎克雷伯菌 HS11286、RJF999, KP21112 及大肠埃希菌 DH5 $\alpha$ 、鲍曼不动杆菌 ATCC 19606、铜绿假单胞菌 PAO1、金黄色葡萄球菌 N315 共 7 株菌的基因组 DNA 分别作为 cdPCR 和 qPCR 模板, 以优化后的反应条件分析 cdPCR 检测肺炎克雷伯菌的特异性。

#### 1.2.7 重复性、精密度实验

用已优化好的 cdPCR 方法对不同稀释浓度标准品进行 3 次重复性检测, 在 25  $\mu\text{L}$  反应体系中加入 2  $\mu\text{L}$  标准品 DNA 作为模板, 通过计算结果的相对标准偏差 (relative standard deviation, RSD) 检测方法的重复性、精密度。

### 1.2.8 临床菌株的检测

分别提取 28 株临床菌株的基因组 DNA 作为临床检测的模板,用优化好反应条件的 cdPCR 和 qPCR 两种方法分别进行检测,以标准品为阳性对照,以 no template control (NTC)为阴性对照,综合评价 cdPCR 方法检测临床菌株的可行性。

### 1.3 数据统计

采用 R 软件包(<https://www.r-project.org/>)进行数据统计学分析,计算标准差和相对标准偏差等;使用 Excel 2016 进行标准曲线线性回归分析;使用 qPCR Soft 4.0 软件进行 qPCR 数据分析;使用 Crystal Miner for the Naica™ System 软件进行 cdPCR 数据分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 PCR 引物筛选

根据肺炎克雷伯菌参考菌株 HS11286 的 16S rRNA 基因的多段保守区及可变区设计引物共 12 对,选取表 1 中 7 个菌株(2 株肺炎克雷伯菌和 5 株其他菌株)作为参考菌株筛选设计引

物。结果表明,引物 V1-V2-5-Pf 和 V1-V2-5-Pr 对肺炎克雷伯菌 HS11286、RJF999 特异性单一扩增,而对 5 株其他菌株无扩增,可见此引物对肺炎克雷伯菌有特异性扩增,所以选取此引物对作为后续实验引物(表 2),该对引物预期扩增片段大小为 181 bp。

### 2.2 芯片式数字 PCR 的检测范围和灵敏性实验

分别以各浓度梯度稀释的标准品为模板,将稀释好的样本重复 3 次,确定检测范围。结果显示(图 1),S4 样品浓度平均值为 207 104.6 copies/ $\mu$ L 时,阳性微滴(26 153 个)占全部微滴(26 157 个)的 99.9%,阳性微滴数与微滴总数接近,说明该浓度下所有微滴被 DNA 模板饱和,几乎无阴性微滴。微滴分布不满足泊松分布原理,定量结果会偏离真实值,模板 DNA 浓度超出了 cdPCR 的检测范围,可见此浓度不能用于 cdPCR 定量,所以 S1-S4 的样品放弃检测;虽然 S10 样品 3 次检测结果均值浓度为 0.98 copies/ $\mu$ L,但由于样品浓度极低,所

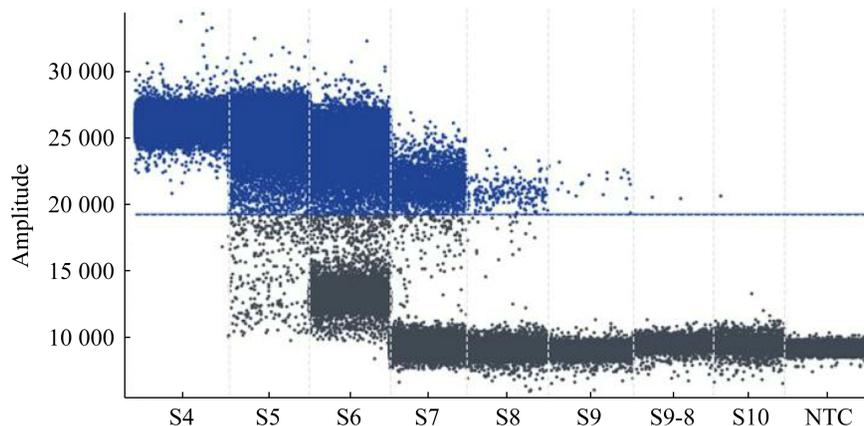


图 1 芯片式数字 PCR 对不同稀释度标准品灵敏度测试结果 蓝色: 阳性微滴; 灰色: 阴性微滴; NTC: 阴性对照

Figure 1 Sensitivity of the cdPCR for the pUC57-16S rRNA gene DNA with different dilution ratios. Blue: Positive droplets; Gray: Negative droplets; NTC: No template control.

以存在无法取到核酸样品的可能,认为此浓度用于 cdPCR 定量也存在结果不准确的可能,因此, cdPCR 样品后续检测范围在 S5-S9 样本范围内进行。

单个样品产生的微滴数是检验实验准确与否的又一关键因素,只有形成的完整微滴个数超过 12 000 时,核酸分子的分布才被认为符合泊松分布原理,系统才能有效区分阴性和阳性的微滴数量,测定的结果才会准确、可靠<sup>[26]</sup>。本研究所有 cdPCR 反应用于分析的有效微滴数均大于 12 000,表明本研究所有 cdPCR 反应微滴生成正常,生成微滴质量较高,保证了后续实验定性、定量分析的准确性。

从 cdPCR 的标准曲线(图 2A)可以看出, S4 样品的检出结果已经超出了标准曲线的检出范围,这与前面描述的结果一致。为了能测量出 cdPCR 对 S9-S10 样品范围内的检出限,将 S9 作为模板 DNA 逐级稀释,最终确定 cdPCR 对本实验标准品 pUC57-16S 梯度稀释样品的检测范围在 S5-S9-8 (S9 号标准品 8 倍稀释)之间,对应浓度范围为 3.37-88 887.30 copies/ $\mu$ L,标

准曲线的  $R^2$  为 0.994 8,具有良好的线性关系,最低检出限为 3.37 copies/ $\mu$ L。另外,对于 cdPCR,当模板 DNA 浓度处于 2 000-3 000 copies/ $\mu$ L 时,定量结果最准确,这一点在后续实验中会具体阐述,确定后续优化实验体系模板选用 S7 号样品(2 172.3 copies/ $\mu$ L)。

### 2.3 荧光定量 PCR 的检出范围和灵敏性实验

为了评估 cdPCR 检测方法的灵敏度和准确度,选择 qPCR 方法进行比较。对于 qPCR 检出结果,通常认为  $C_t$  值在 15-34 之间检测结果比较准确。从 qPCR 标准曲线和对应  $C_t$  值可以看出(图 2B), S8 号样品的  $C_t$  值为 32.56,将 S8 号样品作为模板逐级稀释,发现相应  $C_t$  值与 S9 号样品(35.42)无显著差异,因此确定 qPCR 对本实验标准品 pUC57-16S 的检测范围在 S3-S8 样品之间, $R^2$  为 0.994 2,具有良好的线性关系,最低检出限为 194.9 copies/ $\mu$ L (S8 号样品)。S9 样品检测  $C_t$  值大于 35,检出结果已经超出了标准曲线的检出范围,因此对 S9-S10 样品放弃检测。另外,对于 qPCR,从荧光信号强弱及

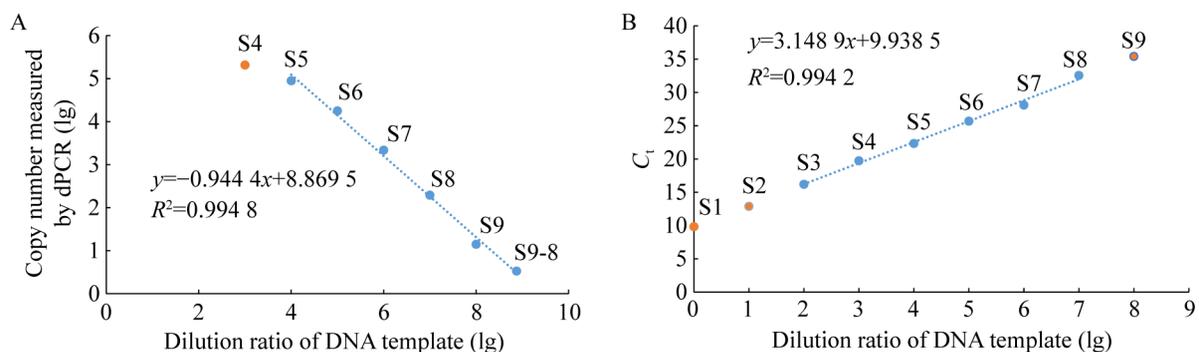


图 2 pUC57-16S 的芯片式数字 PCR (A)和荧光定量 PCR (B)的标准曲线 图 2B 不同稀释倍数标准品检测的  $C_t$  值: S1: 9.84; S2: 12.89; S3: 16.21; S4: 19.74; S5: 22.34; S6: 25.69; S7: 28.11; S8: 32.56; S9: 35.42

Figure 2 Standard curves of the cdPCR (A) and the qPCR (B) for the pUC57-16S rRNA gene DNA.  $C_t$  value of standards with different dilution ratios (2B): S1: 9.84; S2: 12.89; S3: 16.21; S4: 19.74; S5: 22.34; S6: 25.69; S7: 28.11; S8: 32.56; S9: 35.42.

$C_t$  值来看, 确定后续优化实验体系模板选用 S4 号样品。

从图 2A 和图 2B 可以看出, 两种方法标准曲线的线性关系较好, 但对于不同稀释倍数的标准品, 检测范围有所不同。cdPCR 的检测范围在 S5-S9-8 之间, qPCR 的检测范围在 S3-S8 之间, 说明 cdPCR 对低浓度样品的检测更准确。此外, cdPCR 的最低检出限(3.37 copies/ $\mu$ L)也要比 qPCR (194.9 copies/ $\mu$ L)高约 1.5 个数量级, 这说明 cdPCR 与 qPCR 相比有更高的检测灵敏度, 这一结果与石磊等对猪链球菌的核酸检测结果<sup>[24]</sup>基本一致。

#### 2.4 芯片式数字 PCR 反应体系的优化

为测定 cdPCR 最佳反应体系, 分别选用了 0.7-1.3  $\mu$ mol/L 引物浓度、0.05-0.90  $\mu$ mol/L 探针浓度进行优化。结果显示, 从荧光信号及阴性和阳性微滴分布来看, 当引物浓度为 1.0  $\mu$ mol/L (图 3A)、探针浓度为 0.9  $\mu$ mol/L (图 3B)时, 反应的荧光强度最强且阳性微滴(蓝色)和阴性微滴(灰色)之间荧光幅度差异最大。

如图 4 所示, 经过优化的 cdPCR 体系对实

验标准品 pUC57-16S 目标片段的扩增结果良好, 阳性微滴(蓝色)和阴性微滴(灰色)明显分成两簇, 两种微滴分离幅度较大, 差异显著, 而且中间弥散的微滴数目较少, 说明此反应体系针对 cdPCR 对肺炎克雷伯菌 DNA 定量分析是适合的。综合微滴分布状态及荧光信号强度, 确定了 cdPCR 最佳反应体系(25  $\mu$ L): 2 $\times$ PerfeCTa<sup>®</sup> qPCR ToughMix UNG 12.5  $\mu$ L, V1-V2-5-Pf (10  $\mu$ mol/L) 2.5  $\mu$ L, V1-V2-5-Pr (10  $\mu$ mol/L) 2.5  $\mu$ L, 荧光素钠盐(1  $\mu$ mol/L) 2.5  $\mu$ L, primer5-FAM-BHQ1 (10  $\mu$ mol/L) 2.25  $\mu$ L, RNase-Free ddH<sub>2</sub>O 0.75  $\mu$ L, 模板 DNA 2  $\mu$ L。最佳反应条件: Partition 40  $^{\circ}$ C; 95  $^{\circ}$ C 3 min; 95  $^{\circ}$ C 15 s, 60  $^{\circ}$ C 30 s, 共 45 个循环。

#### 2.5 芯片式数字 PCR 对肺炎克雷伯菌的特异性实验

采用优化反应体系, 运用 cdPCR 分别对 3 株肺炎克雷伯菌(HS11286、RJF999、KP21112)和 4 株其他菌株(大肠埃希菌 DH5 $\alpha$ 、鲍曼不动杆菌 ATCC19606、铜绿假单胞菌 PAO1、金黄色葡萄球菌 N315)的基因组 DNA 进行检测, 设

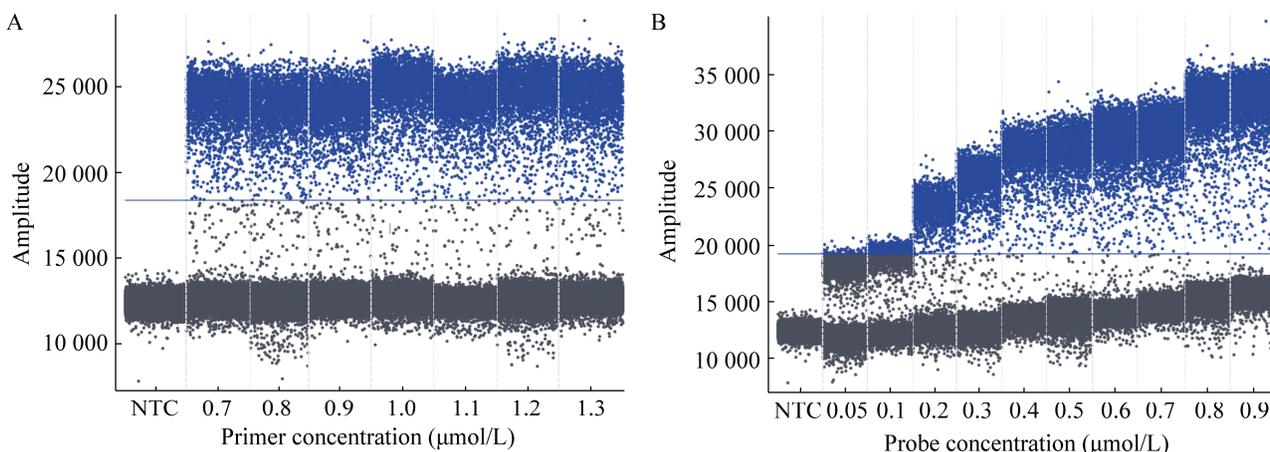


图 3 芯片式数字 PCR 优化结果 A: 引物浓度优化; B: 探针浓度优化; 蓝色: 阳性微滴; 灰色: 阴性微滴; NTC: 阴性对照

Figure 3 Optimization of the cdPCR. A: Optimization of the primer concentration; B: Optimization of the probe concentration; Blue: Positive droplets; Gray: Negative droplets; NTC: No template control.

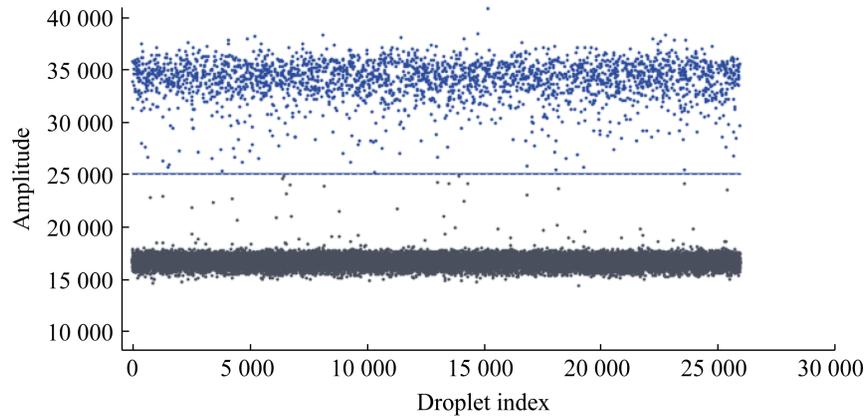


图 4 pUC57-16S 芯片式数字 PCR 优化扩增结果 蓝色：阳性微滴；灰色：阴性微滴

Figure 4 Optimization of the cdPCR results for the pUC57-16S rRNA gene DNA. Blue: Positive droplets; Gray: Negative droplets.

立阳性对照 S7 (pUC57-16S 标准品 7 号样品)和阴性对照(NTC), 以验证 cdPCR 方法对肺炎克雷伯菌检测的特异性。图 5 结果显示, cdPCR 对肺炎克雷伯菌(1-4 道)均有良好扩增, 阴性和阳性微滴明显分离, 5-8 道(其他菌株)只有少量阳性微滴, 经反复排除各实验因素, 认为此少量阳性微滴为假阳性, 属非特异性扩增。这一

结果与文献[14-15]的检测结果一致。数字 PCR 也是基于普通常规 PCR 的原理, 因此, 常规 PCR 中假阳性的问题在数字 PCR 中也同样存在。当阳性样品的阳性微滴数是 NTC 样品阳性微滴数 3 倍以上时, 则样品可认定为真阳性。由表 3 可知, 前 4 株肺炎克雷伯菌的阳性微滴数已经比 NTC 阳性微滴数高出 50 倍以

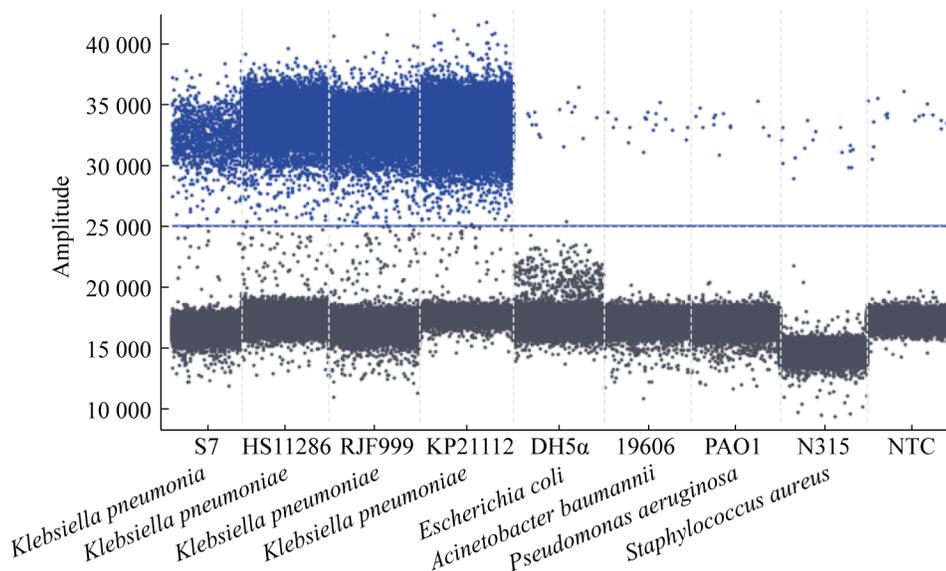


图 5 芯片式数字 PCR 对不同参考菌株特异性检测结果 蓝色：阳性微滴；灰色：阴性微滴；NTC：阴性对照

Figure 5 Specificity assay of the cdPCR for the different reference strains. Blue: Positive droplets; Gray: Negative droplets; NTC: No template control.

表 3 芯片式数字 PCR 和荧光定量 PCR 对不同参考菌株的特异性检测

Table 3 Specificity assay of the cdPCR and qPCR for the different reference strains

cdPCR				qPCR	
Strains	Number of droplets	Number of positive droplets	Results	C <sub>t</sub> value	Results
S7	20 295	1 103	+	17.12 (S4)	+
HS11286	25 814	8 049	+	26.47	+
RJF999	27 067	6 735	+	26.73	+
KP21112	27 736	24 621	+	25.67	+
DH5 $\alpha$	27 153	17	-	34.70	-
ATCC 19606	25 738	17	-	35.02	-
PAO1	26 430	13	-	35.07	-
N315	26 046	16	-	34.02	-
NTC	25 914	19	-	No C <sub>t</sub>	-

注: +: 检测结果为肺炎克雷伯菌; -: 检测结果为非肺炎克雷伯菌; NTC: 阴性对照

Note: +: *Klebsiella pneumoniae*; -: Non-*Klebsiella pneumoniae*; NTC: No template control.

上, 而其他 5–8 株的阳性微滴数与 NTC 相比并未达到 3 倍以上。此外, 为了对 cdPCR 特异性结果进行评估, 通过 qPCR 方法验证, 两者检测结果一致(表 3), 说明 cdPCR 方法对肺炎克雷伯菌的特异性检测是有效的。

## 2.6 芯片式数字 PCR 对肺炎克雷伯菌的重复性和精密度分析

以 6 组不同稀释倍数的 DNA (S5–S9-8) 为模板, 评估 cdPCR 检测方法的重复性。6 组模板的相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)为 2.00%–23.17%, 均不超过 25% (图 6), 符合数字 PCR 实验数据发表所必需实验信息的最低限度标准(minimum information for publication of quantitative digital PCR experiments, MIQE)指南要求<sup>[27-28]</sup>, 以上结果说明该方法在检测范围内反应体系稳定、重复性较好。

从图 6 还可以看出, 随着 DNA 模板浓度的增加(S9-8–S7), 测定结果的 RSD 逐渐降低, 精密度逐渐增高; 但模板浓度增加到一定值(S7)后, 随着 DNA 模板浓度的增加(S7–S5), RSD 逐渐升高、方法精密度降低。当 DNA 模板浓度为 2 201 copies/ $\mu$ L (S7)时, 测量结果的 RSD 为

2.00%, 此时该方法精密度最高。从这个结果看, 这与前面将 S7 号样品作为最佳模板浓度进行优化实验的结果也一致。因此, 采用 cdPCR 对肺炎克雷伯菌基因组 DNA 进行绝对定量时, 将模板浓度控制在 2 000–3 000 copies/ $\mu$ L 之间可保证 cdPCR 测量结果的精密度更好、准确度更高。

## 2.7 芯片式数字 PCR 对临床菌株的检测

利用 cdPCR 优化条件对 28 株临床菌株进行检测, 设立阳性对照(pUC57-16S 标准品 7 号样品)和阴性对照(NTC), 检测结果显示, 有 14 株

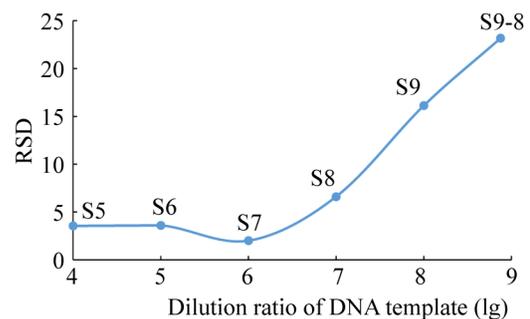


图 6 不同稀释倍数标准品的芯片式数字 PCR 结果的精密度分析

Figure 6 Precision of the cdPCR for the pUC57-16S rRNA gene DNA with different dilution ratios.

菌为肺炎克雷伯菌, 14 株为其他菌株, 这一检测结果与 qPCR 检测结果一致(表 4), 说明经过优化的 cdPCR 方法对肺炎克雷伯菌株的检出是准确可靠的。

### 3 讨论与结论

肺炎克雷伯菌等常见病原菌的核酸检测目

前主要依赖荧光定量 PCR 技术对血液、痰液等临床样本进行检测, 但 qPCR 技术存在较多缺点, 如灵敏度不够高, 特别是对低浓度样品检测比较困难, 导致感染早期诊断比较困难; 而且需要建立标准曲线来进行相对定量, 导致定量准确度受到较大限制。随着数字 PCR 技术的快速发展, 这些问题在一定程度上可以得到解

表 4 芯片式数字 PCR 和荧光定量 PCR 对不同临床分离菌株的检测结果

Table 4 The results of the cdPCR and qPCR for the different clinical isolate strains

cdPCR					qPCR	
No.	Strains	Number of droplets	Number of positive droplets	Results	$C_t$ value	Results
1	S7	27 483	2 777	+	19.85 (S4)	+
2	KP21101	24 803	23 658	+	24.16	+
3	KP21102	26 662	25 813	+	24.18	+
4	KP21103	27 410	1 357	+	24.50	+
5	KP21104	27 048	2 275	+	22.46	+
6	KP21105	25 993	912	+	21.77	+
7	KP21106	27 440	11 184	+	23.35	+
8	KP21107	26 865	18 833	+	26.10	+
9	KP21108	26 892	293	+	22.25	+
10	KP21109	28 143	188	+	21.74	+
11	KP21110	26 762	6 905	+	22.51	+
12	KP21111	27 221	1 538	+	20.47	+
13	KP21112	27 736	24 632	+	25.67	+
14	RJA166	27 823	16 953	+	23.96	+
15	RJF293	26 808	8 254	+	25.42	+
16	EC21301	27 805	16	-	34.01	-
17	EC21302	26 620	15	-	34.70	-
18	SE21401	27 294	22	-	35.39	-
19	SE21402	27 016	27	-	35.47	-
20	SE21403	27 543	33	-	34.43	-
21	AB21501	24 607	13	-	35.83	-
22	AB21502	28 956	8	-	35.61	-
23	AB21503	28 018	7	-	35.02	-
24	PA21601	27 407	15	-	35.70	-
25	PA21602	26 491	17	-	35.01	-
26	PA21603	28 209	13	-	34.71	-
27	SA21701	26 330	9	-	36.65	-
28	SA21702	27 458	11	-	35.84	-
29	SA21703	27 525	9	-	35.32	-
30	NTC	27 607	12	-	No $C_t$	-

注: +: 检测结果为肺炎克雷伯菌; -: 检测结果为非肺炎克雷伯菌; NTC: 阴性对照

Note: +: *Klebsiella pneumoniae*; -: Non-*Klebsiella pneumoniae*; NTC: No template control.

决,目前数字 PCR 技术已经广泛应用于病毒载体定量、病原菌检测、产前诊断、癌症诊断检测、转基因检测、下一代测序技术应用等诸多方面。如 2012 年,Pinheiro 等确定了 ddPCR 对  $\lambda$ DNA 的检测范围在 37–131 000 拷贝/反应,对  $\lambda$ DNA 进行了准确定量<sup>[29]</sup>。White III 等第一次利用 dPCR 对 GBV-C RNA 病毒进行了绝对定量,逆转录 dPCR 的检出限在每反应中 3–10 个模板分子,表明 dPCR 在低浓度的样本中有很好的扩增<sup>[30]</sup>。2016 年,Yan 等对 H7N9 感染的病人连续采取 10 个不同治疗期的样本进行定量检测,针对 qPCR 检测为阴性的样本,dPCR 仍检测出病毒的存在,表明 dPCR 在定量 H7N9 病毒载量方面的灵敏性比 qPCR 更高<sup>[31]</sup>。本研究利用芯片式数字 PCR 方法,根据肺炎克雷伯菌 16S rRNA 基因保守序列设计特异性引物及探针,通过优化反应条件并对临床菌株进行检测,建立了针对肺炎克雷伯菌的芯片式数字 PCR 检测方法。

就核酸检测灵敏度而言,本研究测定 cdPCR 对于肺炎克雷伯菌的最低检出限为 3.77 copies/ $\mu$ L,此检测结果与其他研究的检测结果比较接近,如冯兆民等对甲型流感病毒的数字 PCR 检测方法检出限为 3.77 copies/ $\mu$ L<sup>[17]</sup>;袁润余等对肠道病毒的数字 PCR 方法检测限为 3.02 copies/ $\mu$ L<sup>[25]</sup>;石磊等对猪链球菌的数字 PCR 检出限为 2.692 copies/ $\mu$ L<sup>[24]</sup>。qPCR 的最低检出限为 194.9 copies/ $\mu$ L,可见 cdPCR 检测灵敏度比 qPCR 高出大约 1.5 个数量级。因此,对于低浓度样品的检测或者病菌早期感染检测,cdPCR 更加准确可靠,具有较高的检测优势。

就核酸检测范围来看,虽然 cdPCR 的检出限更低,但从整体检测的线性范围来看,cdPCR 与 qPCR 相比仍有不足。从本研究可以看出,cdPCR 的线性范围上限只能检测到 S5 号样品,

由于 S4 号样品内浓度太高,导致微滴分布不满足泊松分布原理,定量结果会偏离真实值,因此 S1–S4 号样品都无法检测;而 qPCR 具有更大的检测上限(可检测 S3 号样品),所以在实际样品测试中应该两种方法结合使用,相互验证效果会更好。

就核酸检测特异性而言,cdPCR 和 qPCR 对临床菌株的检测结果并无明显差异,说明 cdPCR 具有临床菌株检测的应用潜力。

综上所述,本研究建立了检测肺炎克雷伯菌的芯片式数字 PCR 方法,并优化了检测条件,检测中阳性和阴性微滴显著分开,反应体系微滴数量、生成质量较好、检测结果可靠,同时得到了 cdPCR 对该菌的线性范围、检出限、重复性、精密性、特异性分析、临床菌株等检测结果。从研究结果可以看出,与 qPCR 技术相比,cdPCR 可以精准地对核酸进行绝对定量分析,检测下限低至单拷贝,不依赖于标准曲线,具有较好的数据重现性,在稀有样品或痕量样品的检测方面具有独特的优势。因此,该方法为提高肺炎克雷伯菌的早期核酸检测提供了新的方法,也为核酸绝对定量提供了新的数据支持。**致谢:**感谢上海交通大学生命科学技术学院仪器共享与技术服务平台提供实验相关仪器及技术支持。

## REFERENCES

- [1] 李富祥,廖德芳,姚俊,熊和丽,李华春.肺炎克雷伯菌 TaqMan 荧光定量 PCR 检测方法的建立[J].中国兽医科学,2014,44(12):1231-1235  
Li FX, Liao DF, Yao J, Xiong HL, Li HC. Development of TaqMan real-time PCR for detection of *Klebsiella pneumoniae*[J]. Chinese Veterinary Science, 2014, 44(12): 1231-1235 (in Chinese)
- [2] 杨燕文,吴梦莹,韩鹏鹏,陶佳,周晓燕,李刚.耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌耐药性及耐药基因的研究[J].中国医学装备,2020,17(1):118-121  
Yang YW, Wu MY, Han PP, Tao J, Zhou XY, Li G. The investigation and study of drug resistance and drug

- resistance genes of CRKP[J]. China Medical Equipment, 2020, 17(1): 118-121 (in Chinese)
- [3] 冉艳. 肺炎克雷伯菌荧光定量 PCR 检测方法的建立和临床应用[D]. 杭州: 浙江大学硕士学位论文, 2015  
Ran Y. Development and clinical application of real-time PCR in detection of *Klebsiella pneumoniae*[D]. Hangzhou: Master's Thesis of Zhejiang University, 2015 (in Chinese)
- [4] Dong DR, Liu W, Li H, Wang YF, Li XR, Zou DY, Yang Z, Huang SM, Zhou DS, Huang LY, et al. Survey and rapid detection of *Klebsiella pneumoniae* in clinical samples targeting the *rcsA* gene in Beijing, China[J]. Frontiers in Microbiology, 2015, 6: 519
- [5] Morisset D, Štebih D, Milavec M, Gruden K, Žel J. Quantitative analysis of food and feed samples with droplet digital PCR[J]. PLoS One, 2013, 8(5): e62583
- [6] 李智杰, 刘占愷, 李健友, 刘泽余, 郭利. 数字 PCR 技术研究进展[J]. 特产研究, 2019, 41(1): 120-123  
Li ZJ, Liu ZK, Li JY, Liu ZY, Guo L. Research progress of digital PCR technology[J]. Special Wild Economic Animal and Plant Research, 2019, 41(1): 120-123 (in Chinese)
- [7] 詹成, 燕丽, 王琳, 金玉麟, 陈力, 时雨, 王群. 数字 PCR 技术的发展和應用[J]. 复旦学报(医学版), 2015, 42(6): 786-789  
Zhan C, Yan L, Wang L, Jin YL, Chen L, Shi Y, Wang Q. The development and application of digital PCR[J]. Fudan University Journal of Medical Sciences, 2015, 42(6): 786-789 (in Chinese)
- [8] 林彩琴, 姚波. 数字 PCR 技术进展[J]. 化学进展, 2012, 24(12): 2415-2423  
Lin CQ, Yao B. Recent advance in digital PCR[J]. Progress in Chemistry, 2012, 24(12): 2415-2423 (in Chinese)
- [9] Jeannot E, Becette V, Campitelli M, Calmèjane MA, Lappartient E, Ruff E, Saada S, Holmes A, Bellet D, Sastre-Garau X. Circulating human papillomavirus DNA detected using droplet digital PCR in the serum of patients diagnosed with early stage human papillomavirus-associated invasive carcinoma[J]. The Journal of Pathology Clinical Research, 2016, 2(4): 201-209
- [10] Sanders R, Huggett JF, Bushell CA, Cowen S, Scott DJ, Foy CA. Evaluation of digital PCR for absolute DNA quantification[J]. Analytical Chemistry, 2011, 83(17): 6474-6484
- [11] 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  
Yang DP, Liu WW. Application progress of digital PCR in clinical diagnosis[J]. Chinese Journal of Clinical Laboratory Science, 2016, 34(10): 785-787 (in Chinese)
- [12] 梅建华, 雷永良, 陈秀英, 王晓光, 叶灵, 刘敏. 基于芯片式数字 PCR 技术的乙型肝炎病毒绝对定量检测方法的建立及应用[J]. 中国卫生检验杂志, 2018, 28(8): 925-928, 933  
Mei JH, Lei YL, Chen XY, Wang XG, Ye L, Liu M. Establishment and application of chip-based digital PCR system for absolute quantitative detection of hepatitis B virus[J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2018, 28(8): 925-928, 933 (in Chinese)
- [13] Svobodová I, Pazourková E, Hořínek A, Novotná M, Calda P, Korabečná M. Performance of droplet digital PCR in non-invasive fetal RHD genotyping: comparison with a routine real-time PCR based approach[J]. PLoS One, 2015, 10(11): e0142572
- [14] Strain MC, Lada SM, Luong T, Rought SE, Gianella S, Terry VH, Spina CA, Woelk CH, Richman DD. Highly precise measurement of HIV DNA by droplet digital PCR[J]. PLoS One, 2013, 8(4): e55943
- [15] Kiselina M, Pasternak AO, Spiegelaere WD, Vogelaers D, Berkhout B, Vandekerckhove L. Comparison of droplet digital PCR and seminested real-time PCR for quantification of cell-associated HIV-1 RNA[J]. PLoS One, 2014, 9(1): e85999
- [16] Huang JT, Liu YJ, Wang J, Xu ZG, Yang Y, Shen F, Liu XH, Zhou X, Liu SM. Next generation digital PCR measurement of hepatitis B virus copy number in formalin-fixed paraffin-embedded hepatocellular carcinoma tissue[J]. Clinical Chemistry, 2015, 61(1): 290-296
- [17] 冯兆民, 赵翔, 邹晓辉, 朱闻斐, 陈永坤, 王大燕, 舒跃龙. 基于微滴式数字 PCR 技术的甲型流感病毒绝对定量方法的建立及应用[J]. 病毒学报, 2017, 33(1): 1-5  
Feng ZM, Zhao X, Zou XH, Zhu WF, Chen YK, Wang DY, Shu YL. Droplet digital polymerase chain reaction method for absolute quantification of influenza A viruses[J]. Chinese Journal of Virology, 2017, 33(1): 1-5 (in Chinese)
- [18] 邹旭龙, 肖璐, 宋勇, 林华, 陈世界, 杨苗, 安徽, 姚学萍, 杨泽晓, 王印. 非洲猪瘟病毒微滴数字 PCR (ddPCR) 方法的建立及应用[J]. 微生物学通报, 2017, 44(12): 2839-2846  
Wu XL, Xiao L, Song Y, Lin H, Chen SJ, Yang M, An

- W, Yao XP, Yang ZX, Wang Y. A novel high-sensitivity droplet digital PCR (ddPCR) for detection of African swine fever virus[J]. *Microbiology China*, 2017, 44(12): 2839-2846 (in Chinese)
- [19] 赵佳怡, 甄世军, 张翠云, 殷密英, 张胜, 何泽, 宁卓. 深部热水硫酸盐还原菌微滴数字 PCR 检测技术的建立与应用[J]. *微生物学通报*, 2020, 47(11): 3756-3767
- Zhao JY, Zhen SJ, Zhang CY, Yin MY, Zhang S, He Z, Ning Z. Development and application of a droplet digital PCR technique for detection of sulfate-reducing bacteria in deep geothermal water[J]. *Microbiology China*, 2020, 47(11): 3756-3767 (in Chinese)
- [20] 王静, 张慧敏, 魏玮, 贾俊涛, 李春喜, 秦燕. SD-PMA-ddPCR 检测食品中沙门氏菌的研究[J]. *食品工业科技*, 2016, 37(10): 67-71
- Wang J, Zhang HM, Wei W, Jia JT, Li CX, Qin Y. Detection of *Salmonella* cells based on SD-PMA-ddPCR[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2016, 37(10): 67-71 (in Chinese)
- [21] 宋能, 谭杨, 罗凤玲, 关清, 闫明哲, 潘勤, 章晓联. 微滴数字 PCR 定量检测全血样品中结核分枝杆菌特异 *CFP10* 基因[J]. *中国生化药物杂志*, 2016, 36(2): 10-15
- Song N, Tan Y, Luo FL, Guan Q, Yan MZ, Pan Q, Zhang XL. Sensitive and quantitative detection of specific *CFP10* gene of *Mycobacterium tuberculosis* in whole blood samples by droplet digital PCR[J]. *Chinese Journal of Biochemical and Pharmaceutics*, 2016, 36(2): 10-15 (in Chinese)
- [22] 董莲华, 张玲, 姜君, 王江南, 王晶, 陈唯军. 大肠杆菌 O157:H7 微滴数字 PCR 定量方法的建立[J]. *分析化学*, 2015, 43(3): 319-324
- Dong LH, Zhang L, Jiang J, Wang JN, Wang J, Chen WJ. Development of droplet digital polymerase chain reaction for quantifying *Escherichia coli* O157:H7[J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2015, 43(3): 319-324 (in Chinese)
- [23] 魏咏新, 马丹, 李丹, 徐蕾蕊, 魏海燕, 张西萌, 刘莉, 曾静. 食品中 *Escherichia coli* O157:H7 微滴数字 PCR 绝对定量检测方法的建立[J]. *食品科学*, 2020, 41(16): 259-265
- Wei YX, Ma D, Li D, Xu LR, Wei HY, Zhang XM, Liu L, Zeng J. Establishment of droplet digital PCR system for absolute quantitative detection of *Escherichia coli* O157:H7 in foods[J]. *Food Science*, 2020, 41(16): 259-265 (in Chinese)
- [24] 石磊, 温雯, 陈洵, 叶蕾, 常彦磊, 李丽丽. 猪链球菌微滴数字 PCR 定量检测方法的建立[J]. *现代食品科技*, 2019, 35(1): 233-238
- Shi L, Wen W, Chen X, Ye L, Chang YL, Li LL. Development of droplet digital PCR for the detection of *Streptococcus suis*[J]. *Modern Food Science and Technology*, 2019, 35(1): 233-238 (in Chinese)
- [25] 袁润余, 曾汉日, 苏娟, 黎薇, 莫艳玲, 陆靖, 柯昌文. 一种通用型肠道病毒微滴式数字 PCR 检测方法的建立及应用[J]. *华南预防医学*, 2019, 45(1): 15-20
- Yuan RY, Zeng HR, Su J, Li W, Mo YL, Lu J, Ke CW. Establishment and application of universal droplet digital polymerase chain reaction method for quantification of *Enterovirus*[J]. *South China Journal of Preventive Medicine*, 2019, 45(1): 15-20 (in Chinese)
- [26] 姜志军, 江颖, 徐摇光, 张立全, 张晓东. 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 ZJ, Jiang Y, Xu YG, Zhang LQ, Zhang XD. Rapid analysis of exogenous gene's copy number in transgenic maize with droplet digital PCR[J]. *Current Biotechnology*, 2016, 6(4): 288-294 (in Chinese)
- [27] Huggett JF, Foy CA, Benes V, Emslie K, Garson JA, Haynes R, Hellemans J, Kubista M, Mueller RD, Nolan T, et al. The digital MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative digital PCR experiments[J]. *Clinical Chemistry*, 2013, 59(6): 892-902
- [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
- Zheng L, Yang LT, Wang CH. Validation certified value of multi-targets plasmid reference materials by three digital PCR platforms[J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2017, 25(9): 1500-1507 (in Chinese)
- [29] Pinheiro LB, Coleman VA, Hindson CM, Herrmann J, Hindson BJ, Bhat S, Emslie KR. Evaluation of a droplet digital polymerase chain reaction format for DNA copy number quantification[J]. *Analytical Chemistry*, 2012, 84(2): 1003-1011
- [30] White III RA, Quake SR, Curr K. Digital PCR provides absolute quantitation of viral load for an occult RNA virus[J]. *Journal of Virological Methods*, 2012, 179(1): 45-50
- [31] Yan Y, Jia XJ, Wang HH, Fu XF, Ji JM, He PY, Chen LX, Luo JY, Chen ZW. Dynamic quantification of avian influenza H7N9(A) virus in a human infection during clinical treatment using droplet digital PCR[J]. *Journal of Virological Methods*, 2016, 234: 22-27