

实时荧光单引物等温扩增 (SPIA) 技术检测 大肠杆菌 O157 的方法研究

李瑞¹, 王建昌², 李静², 胡连霞², 张伟¹

(1. 河北农业大学食品科技学院, 河北保定 071000)

(2. 河北出入境检验检疫局检验检疫技术中心, 河北石家庄 050000)

摘要: 建立一种快速、灵敏的食品中肠出血性大肠杆菌 O157 的检测方法。以大肠杆菌 O157 的特异性基因(*rfbE*)为靶序列, 设计相应的 RNA/DNA 组合引物和链终止序列, 优化引物浓度、Mg²⁺浓度、温度等反应条件, 建立实时荧光单引物等温扩增 (Real Time Fluorescence Single Primer Isothermal Amplification, 实时荧光 SPIA) 检测大肠杆菌 O157 的方法, 并对该方法的特异性、灵敏度以及人工污染检出限进行检测。确定了实时荧光 SPIA 法的最适反应条件, 该方法可以在 55 min 内完成检测工作, 除大肠杆菌 O157 外, 其他细菌均未产生特异性荧光扩增曲线, 而且实时荧光 SPIA 检测大肠杆菌 O157 的灵敏度为 2.0 CFU/mL, 对猪肉人工污染样品中大肠杆菌 O157 的检出限是 4.0 CFU/g。实时荧光 SPIA 方法检测大肠杆菌 O157 具有耗时短, 灵敏度高, 特异性强, 方法简便的优越性, 为检测食源性致病菌构建了一个技术平台。

关键词: 大肠杆菌 O157; *rfbE* 基因; 检测

文章编号: 1673-9078(2016)2-317-322

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.2.046

A Method for the Detection of *Escherichia coli* O157 Based on Real-time Fluorescence Single Primer Isothermal Amplification (SPIA)

LI Rui¹, WANG Jian-chang², LI Jing², HU Lian-xia², ZHANG Wei¹

(1. Agricultural University of Hebei College of Food Science and Technology, Baoding 071000, China)

(2. Hebei Entry-Exit Inspection and Quarantine Technical Center, Shijiazhuang 050000, China)

Abstract: The aim of this study was to establish a rapid, sensitive method for detecting enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 in foods. To establish a real-time fluorescence single primer isothermal amplification (real-time fluorescence SPIA) method for the detection of *Escherichia coli* O157, an RNA/DNA primer and chain terminator were designed based on the sequence of the *rfbE* gene of *Escherichia coli* O157, and the reaction conditions, such as primer concentration, Mg²⁺ concentration, and temperature, were optimized. The specificity, sensitivity, and detection limit for artificial contamination were determined. Under optimal conditions, a sample measurement could be completed within 55 min. No other bacteria besides *E. coli* O157 showed a specific fluorescent amplification curve. The sensitivity of the real-time fluorescence SPIA method for the detection of *E. coli* O157 was 2.0 CFU/mL, and the detection limit for an artificially contaminated pork sample was 4.0 CFU/g. The advantages of this real-time fluorescence SPIA assay include short detection time, high sensitivity, high specificity, and convenience. This study establishes a technology platform for the detection of food-borne pathogens.

Key words: *Escherichia coli* O157; *rfbE*; detection

食品中大肠杆菌 O157 (包括 H7 和 H-血清型) 可引起肾衰竭等严重食物中毒并发症, 严重危害消费者的身体健康。目前, 检测大肠杆菌 O157 方法有常规培养法、免疫磁珠捕获法、生化和免疫^[1]、毒素的

收稿日期: 2015-05-15

基金项目: 质检公益性科研专项项目 (201210128; 201310126)

作者简介: 李瑞 (1990), 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 有害微生物的检测

通讯作者: 张伟 (1963), 男, 教授, 研究方向: 有害微生物的检测

细胞学试验^[2]等, 常规培养法耗时且工作量大; 免疫磁珠捕获法由于方法自身的局限性, 检测的灵敏度低且造成一定程度的漏检。PCR 技术在过去几十年里被大量用于病原菌的检测, 灵敏度高和特异性较传统方法有较大提高, 但是 PCR 方法必须有精密的温度循环装置, 且仅限于实验室操作, 另外反应过程容易受污染物影响, 假阳性较高, 从而使其无法满足实地检测的需要^[3]。环介导等温扩增(LAMP)是 Notomi 等^[4]于 2000 年首先提出的一种新的核酸扩增技术, 该方法

有较高的敏感性、特异性和抗干扰能力,反应体系稳定可靠。不足之处是 LAMP 扩增需要设计多对引物而且在引物设计方面要求高并且比较复杂,因为引物之间极有可能互补而扩增出非特异性条带,造成假阳性。

单引物等温扩增技术 (single primer isothermal amplification, SPIA) 是近年来报道的一种新型核酸等温扩增技术^[5]。其扩增反应需要一条 3' 端是 DNA 片段、5' 端是 RNA 片段的混合引物、链终止多聚核苷酸 (blocker)、RNase H 和具有强链置换活性的 DNA 聚合酶来完成,在扩增反应中,首先,混合引物和 blocker 分别与单链模板 DNA 结合,在 DNA 聚合酶作用下,引物延伸合成 DNA,当延伸到 blocker 结合处时,因 blocker 序列无法被置换出来,延伸反应被终止。混合引物部分的 RNA 与 DNA 单链形成 DNA 和 RNA 的杂合双链, RNase H 可不断降解 DNA/RNA 杂合链中的 RNA 部分,使未结合的混合引物中的 RNA 能够不断得到结合位点,并与模板结合,在具有链置换活性的 DNA 聚合酶的作用下,进行链置换反应,置换出上一个反应循环中合成的 DNA 单链,并使引物延伸合成新的 DNA 单链,在 blocker 结合处终止,如此往复循环,最终扩增出大量的 cDNA 单链^[6]。

本研究在普通 SPIA 的基础上,针对大肠杆菌 O157 的 rfbE 基因设计特异性的 DNA/RNA 组合引物,加入特异性结合单链 DNA 的荧光染料 SYBR Green II,利用荧光仪进行实时监测扩增,建立了大肠杆菌 O157 的实时荧光 SPIA 检测方法,为检测大肠杆菌 O157 提供了一种更加新型、敏感的方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种

本试验所用菌株见表 1。

1.1.2 实验仪器

实时荧光分析仪 (GNM-C7-8, 北京金诺美生物技术有限公司)、PCR 扩增仪 (Whatman T Gradient 基因扩增仪, 德国 Biometra 公司)、核酸蛋白分析仪 (Eppendorf Biophotometer plus, 德国 Eppendorf 公司)

表 2 实时荧光 SPIA 设计的引物

Table 2 Primers used for real-time fluorescence SPIA detection of *E. coli* O157:H7

引物名称	序列(5'to3')	修饰
RfbE	UAUCGGAAGGAGATGAAGTTAT	5'端 10nt 碱基为 RNA 序列, 3'端 12nt 碱基为 DNA 序列
Blocker	TAATAAAACTAAAGC	3'端用生物素修饰, 中间随机加上五个 XNA 修饰

1.2 方法

等。

1.1.3 实验试剂

BstDNA 聚合酶、RNase H、RNA 酶抑制剂、MgCl₂、dNTPs、SYBR Green II 等购自于上海生工生物工程股份有限公司; 基因组 DNA 提取试剂盒购自北京天根生化科技有限公司; 所有培养基均购自北京陆桥有限责任公司。试验中所用到的猪肉样品来自实验室保存样品并经检测为大肠杆菌 O157 阴性。

表 1 实验用菌株

Table 1 Strains used in this study

菌株编号	菌种名称	菌种来源
1	大肠杆菌 O157:H7	CICC21530
2	大肠杆菌 O157:H7	IQCC10102
3	大肠杆菌 O157:H7	ATCC43889
4	大肠埃希氏菌	CMCC44102
5	大肠埃希氏菌	CICC23657
6	产肠毒素大肠埃希氏菌	CICC10413
7	致泻大肠埃希氏菌	CICC10412
8	空肠弯曲杆菌	ATCC33291
9	单核细胞增生李斯特氏菌	ATCC19114
10	弗氏柠檬酸杆菌	ATCC 10787
11	宋内志贺氏菌	CICC21679
12	福氏志贺氏菌	CICC21678
13	蜡样芽胞杆菌	CICC10468
14	小肠结肠炎耶耳森氏菌	CICC21609
15	阪崎肠杆菌	ATCC29544
16	乙型溶血性链球菌	CMCC10373
17	金黄色葡萄球菌	ATCC 6538
18	恶臭假单胞菌	ATCC17485
19	嗜麦芽寡养单胞菌	ATCC 13637

1.1.4 RNA/DNA 组合引物和 Blocker 的设计和合成

根据 Genebank 中大肠杆菌 O157 (rfbE) 基因组已知序列 (基因号: S83460.1), 对其进行同源性分析, 确定其保守序列, 用 Primer premier5.0 设计组合引物和相应链终止序列, 如表 2 所示。组合引物和 Blocker 均由大连 TAKARA 公司合成。

1.2.1 菌种大肠杆菌 O157 的培养

取保藏的大肠杆菌 O157 在营养琼脂培养基中进

行划线, 培养箱 36 °C 培养 12 h, 传代培养 2 次。挑取传代培养菌落接种至新鲜无菌的营养肉汤培养基中, 36 °C 过夜培养。

1.2.2 基因组 DNA 的提取

本研究采用普通热裂解法和商业化试剂盒方法提取细菌基因组 DNA。

普通热裂解法: 取 1 mL 菌液 5000~8000 r/min, 离心 5 min, 弃上清。加入 200 μ L 无菌 DEPC 水, 振荡混匀, 5000~8000 r/min, 离心 5 min, 弃上清, 重复操作一次。加入 100 μ L 无菌 DEPC 水, 振荡混匀, 100 °C 水浴 10 min, 12000 r/min 离心 10 min, 取上清, -20 °C 保存备用。

商业化试剂盒法: 按试剂盒说明书进行基因组 DNA 的提取, 并测定浓度。

1.2.3 大肠杆菌 O157 实时荧光 SPIA 反应条件的优化

1.2.3.1 引物浓度的优化

设计反应体系中 RNA/DNA 组合引物的浓度依次为 2.8、3.2、3.6、4.0、4.4、4.8 μ mol/L, 从而筛选出适宜的组合引物浓度。

1.2.3.2 Mg^{2+} 浓度的优化

设计反应体系中 Mg^{2+} 浓度依次为 3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0 mmol/L, 从而筛选出适宜的 Mg^{2+} 浓度。

1.2.3.3 反应温度的优化

设计反应体系的温度依次为 58、59、60、61、62、63 °C, 从而筛选出适宜温度。

1.2.3.4 Bst DNA 聚合酶添加量的优化

设计反应体系中 Bst DNA 聚合酶的添加量依次为 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 μ L, 从而筛选出适宜的 Bst DNA 聚合酶浓度。

1.2.3.5 dNTPs 添加量的优化

设计反应体系中 dNTPs 的浓度依次为 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2 mmol/L, 从而筛选出适宜的 dNTPs 浓度。

1.2.4 大肠杆菌 O157 实时荧光 SPIA 检测方法的特异性试验

取表 1 中 16 株过夜培养菌悬液 1 mL, 用普通热裂解法提取基因组 DNA 作为模板, 根据 1.2.3 中所建立的反应体系和条件进行检测, 对所建立的实时荧光 SPIA 方法进行特异性分析。

1.2.5 大肠杆菌 O157 实时荧光 SPIA 检测方法的灵敏度试验

挑取营养琼脂 37 °C 培养 12 h 的大肠杆菌 O157 单菌落, 制备成一定浓度菌悬液。用生理盐水进行 10 倍系列稀释, 采用稀释平板法, 测定每个稀释倍数菌

悬液活菌数; 同时各取每个稀释倍数菌悬液 1 mL 使用普通热裂解法和试剂盒法提取大肠杆菌 O157 基因组 DNA, 分别进行 SPIA 灵敏性试验。同时通过分析起峰时间 (或 Ct 值) 的差异, 分析两种基因组 DNA 提取方法对检测灵敏度的影响。本实验重复 3 次。

1.2.6 大肠杆菌 O157 实时荧光 SPIA 检测方法在人工污染试验中检出限分析

选取猪肉样品, 已按 SN/T 0973-2010 常规检验法证实大肠杆菌 O157 阴性。挑取营养琼脂上 37 °C 培养 12 h 的大肠杆菌 O157 单菌落, 制备成一定浓度菌悬液, 用生理盐水进行 10 倍系列稀释后, 选取适当浓度菌悬液 1 mL 添加到猪肉样品均质液中 (25g 猪肉样品已均质于 225 mL 无菌 EC 增菌肉汤中)。将猪肉样品均质液采用稀释平板法, 计数得人工污染猪肉样品混合液中大肠杆菌 O157 活菌数为 4.0×10^6 CFU/g $\sim 4.0 \times 10^1$ CFU/g, 同时各取 1 mL 污染样品均质液, 采用普通热裂解法提取大肠杆菌 O157 基因组 DNA, 进行 SPIA 检测, 确定检出限。本实验重复检测 3 次。

2 结果与讨论

2.1 实时荧光 SPIA 反应条件的优化结果

2.1.1 引物浓度的优化结果

由图 1 所示, 当引物浓度为 4.4 μ mol/L 时, 从实时荧光 SPIA 监测仪上可以清楚地看到, 出峰时间较早, 且峰值最高。综合检测效果及检测成本, 本研究选择的最适引物浓度为 4.4 μ mol/L。

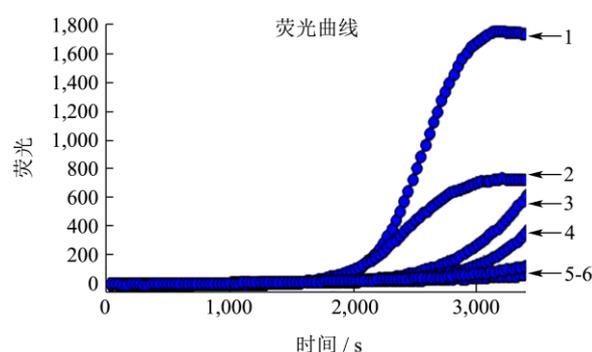


图 1 最适引物浓度选择

Fig.1 Optimization of primer concentration for real-time fluorescence SPIA detection of *E. coli* O157:H7

注: 1、4.4 μ mol/L; 2、4.8 μ mol/L; 3、4.0 μ mol/L; 4、3.6 μ mol/L; 5、3.2 μ mol/L; 6、2.8 μ mol/L。

2.1.2 Mg^{2+} 浓度的优化结果

由图 2 可知, 当 Mg^{2+} 浓度为 7.0 mmol/L 时, 出峰时间最早, 而 Mg^{2+} 浓度过高或过低时, 扩增反应的时间均延迟。因此, 本研究选择的最佳及最优 Mg^{2+}

浓度为 7.0 mmol/L。

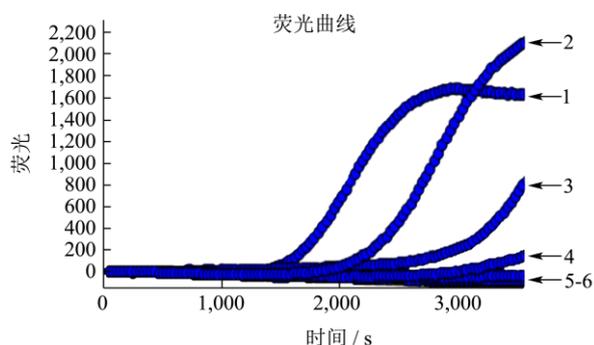


图2 最适 Mg²⁺ 浓度选择

Fig.2 Optimization of Mg²⁺ concentration for real-time fluorescence SPIA detection of *E. coli* O157:H7

注：1、7.0 mmol/L；2、8.0 mmol/L；3、6.0 mmol/L；4、5.0 mmol/L；5、4.0 mmol/L；6、3.0 mmol/L。

2.1.3 反应温度的优化结果

从图 3 可以发现，不同的温度对扩增反应的出峰时间和峰值高度的影响。比较几个温度的试验结果后发现，温度为 61 °C 时反应出峰时间较早且峰值最高。因此选取 61 °C 为最佳反应温度。

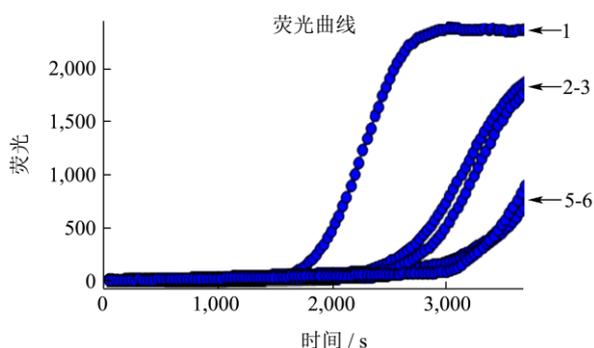


图3 反应温度对实时荧光 SPIA 的影响

Fig.3 Effect of temperature on the detection of *E. coli* O157:H7 by real-time fluorescence SPIA

注：1、61 °C；2、62 °C；3、60 °C；4、63 °C；5、59 °C；6、58 °C。

2.1.4 Bst DNA 聚合酶添加量的优化结果

为了验证 Bst DNA 聚合酶(8000U/mL)对反应的影响，在 25 μL 反应体系中依次加入 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 μL 反应均可进行，而在添加量为 2.5 μL 时出峰时间最早，且峰值较高。说明体系中 BstDNA 聚合酶最适添加量为 2.5 μL 即 20 U。

2.1.5 dNTPs 添加量的优化结果

由图 5 可以看出，当反应体系中 dNTPs 浓度为 1.0 mmol/L 时，出峰时间最早，且峰值最高，由此确定反应体系中适宜的 dNTPs 浓度为 1.0 mmol/L。

2.1.6 实时荧光 SPIA 反应体系的建立

经过反应体系的优化，适宜反应体系为：RNA/DNA 组合引物 4.4 μmol/L、Blocker 0.2 μmol/L、Mg²⁺ 7.0 mmol/L、dNTPs 1.0 mmol/L、10×Bst Buffer 2.2 μL、10×RNaseH Buffer 2.2 μL、BST DNA 聚合酶 20 U、RNase H 酶 2.5 U、RNase Inhibitor 的 32U、DNA 模板 1 μL、SYBR Green II 0.3 μL (300×稀释)，其余用灭菌 DEPC 水补足体系；最佳反应温度为 61.0 °C，反应 55 min。

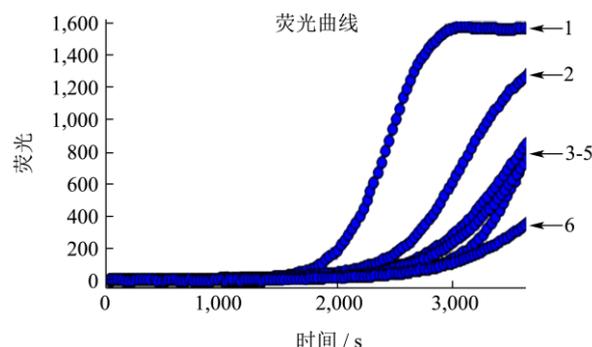


图4 不同 BstDNA 酶添加量对 SPIA 反应的影响

Fig.4 Effect of the amount of Bst DNA polymerase on the detection of *E. coli* O157:H7 by real-time fluorescence SPIA

注：1、2.5 μL；2、2.0 μL；3、3.0 μL；4、1.5 μL；5、1.0 μL；6、0.5 μL

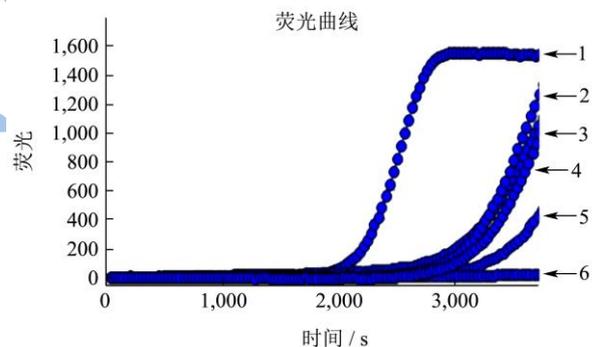


图5 不同 dNTPs 酶添加量对 SPIA 反应的影响

Fig.5 Effect of the amount of dNTPs on the detection of *E. coli* O157:H7 by real-time fluorescence SPIA

注：1、1.0 mmol/L；2、1.2 mmol/L；3、0.8mmol/L；4、0.6 mmol/L；5、0.4 mmol/L；6、0.2 mmol/L。

2.2 实时荧光 SPIA 检测方法的特异性分析

在 C7 实时荧光分析仪上采用 2.1 中建立的反应体系对 3 株大肠杆菌 O157 及 16 株食源性致病菌进行检测，结果表明仅大肠杆菌 O157 出现特异性的典型荧光扩增曲线，而其他细菌均未产生荧光扩增曲线。结果表明建立的大肠杆菌 O157 实时荧光 SPIA 检测方法对该菌具有良好的特异性。具体结果如图 6 所示。

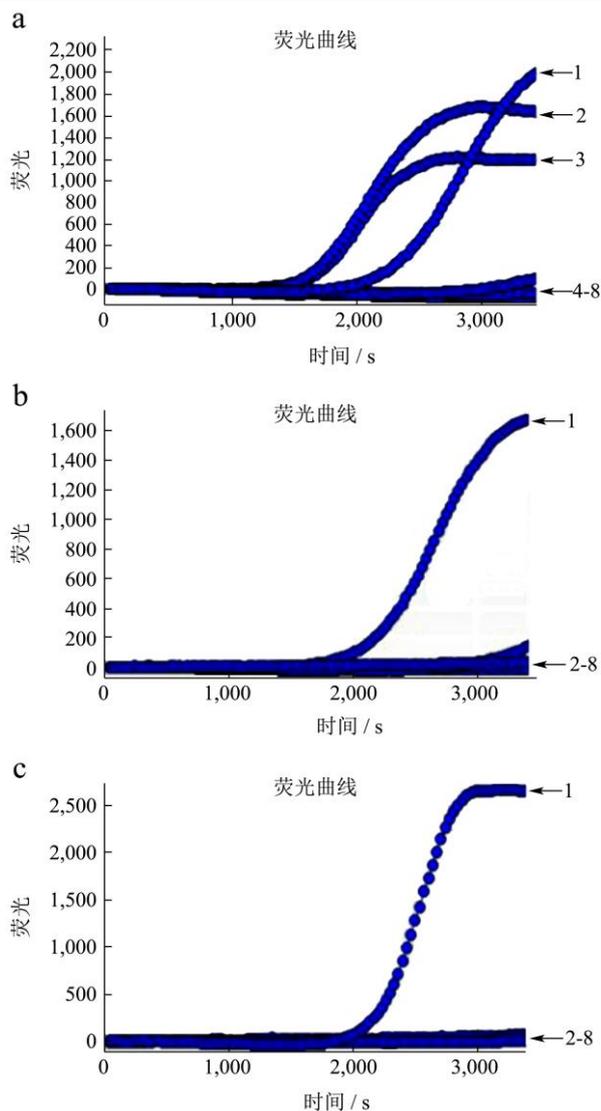


图6 大肠杆菌 O157 实时荧光 SPIA 引物特异性检测结果

Fig.6 Specificity test of the real-time fluorescence SPIA assay for the detection of *E. coli* O157

注: 6a, 1~3, 大肠杆菌 O157:H7(*Escherichia coli* O157:H7); 4~7, 大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*); 产肠毒素大肠埃希氏菌(*Escherichia coli* ETEC O78: K80); 致泻大肠埃希氏菌(*Escherichia coli* EPEC O86: K61); 8, DEPC H₂O; 6b, 1, 大肠杆菌 O157:H7(*Escherichia coli* O157: H7); 2~7, 单核细胞增生李斯特氏菌(*Listeria monocytogenes*); 空肠弯曲杆菌(*Campylobacter jejuni*); 弗氏柠檬酸杆菌(*Citrobacter freundii*); 阪崎肠杆菌(*Enterobacter sakazakii*); 宋内志贺氏菌(*Shigella sonnei*); 福氏志贺氏菌(*Shigella flexneri*); 8, DEPC H₂O; 6c, 1, 大肠杆菌 O157:H7(*Escherichia coli* O157: H7); 2~7, 蜡样芽胞杆菌(*Bacillus cereus*); 小肠结肠炎耶尔森氏菌(*Yersinia enterocolitica*); 嗜麦芽寡养单胞菌(*Stenotrophomonas maltophilia*); 乙型溶血性链球菌(*Streptococcus hemolytic-β*); 金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*); 恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*); 8, 空白对照 DEPC H₂O。

2.3 大肠杆菌 O157 实时荧光 SPIA 检测方法

灵敏性试验

无论采用试剂盒法还是普通热裂解法提取模板 DNA, 在大肠杆菌 O157 CICC21530 浓度为 2.0×10^0 CFU/mL 时, 反应呈现典型的扩增曲线; 当大肠杆菌 O157 CICC21530 浓度为 2.0×10^{-1} CFU/mL 时, 反应无扩增曲线, 结果见图 7 所示。结果表明采用普通热裂解法或试剂盒法提取纯培养的大肠杆菌 O157 CICC21530 基因组 DNA, 进行该方法的灵敏性试验时, 检出限没有明显差异, 灵敏度均为 2.0×10^0 CFU/mL。实验表明, 实时荧光 SPIA 方法检测大肠杆菌 O157 对模板质量要求不苛刻, 能适应基层和现场检测。

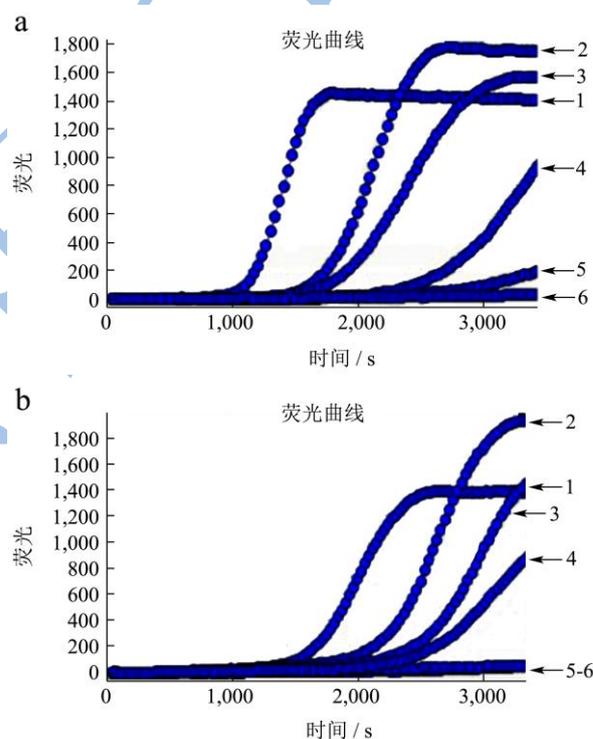


图7 大肠杆菌 O157 实时荧光 SPIA 检测方法的灵敏性试验

Fig.7 Sensitivity of the real-time fluorescence SPIA assay for the detection of *E. coli* O157

注: a, 以试剂盒法提取大肠杆菌 O157 基因组 DNA 为模板的反应灵敏性试验; b, 以普通热裂解法提取大肠杆菌 O157 基因组 DNA 为模板的反应灵敏性试验; 1, 大肠杆菌 O157 基因组 DNA 阳性对照; 2, 2.0×10^2 CFU/mL; 3, 2.0×10^1 CFU/mL; 4, 2.0×10^0 CFU/mL; 5, 2.0×10^{-1} CFU/mL; 6, DEPC H₂O。

2.4 大肠杆菌 O157 实时荧光 SPIA 检测方法

在人工污染猪肉样品中的检出限

当人工污染猪肉样品中大肠杆菌 O157 CICC21530 浓度为 4.0×10^0 CFU/g 时, 检测反应出现典型的扩增曲线; 当大肠杆菌 O157 CICC21530 浓度为 4.0×10^{-1} CFU/g 时, 则无扩增曲线。如图 8 所示。结果表明本研究建立的实时荧光 SPIA 方法对人工污染猪肉中大肠杆菌 O157 CICC21530 的检出限为 4.0×10^0 CFU/g。三次试验结果一致。

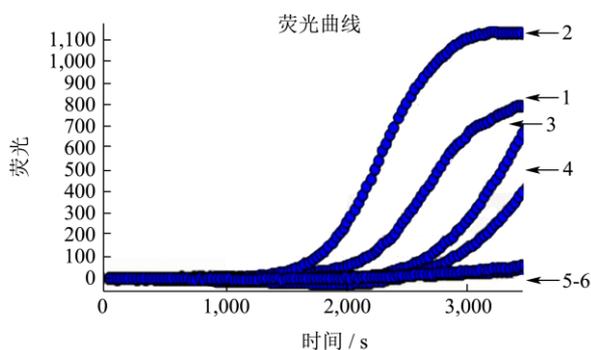


图 8 实时荧光 SPIA 方法检测模拟样品中大肠杆菌 O157 的检出限分析

Fig.8 Detection limit of the real-time fluorescence SPIA assay for the detection of *E. coli* O157 in a simulated contaminated sample

注: 1、大肠杆菌 O157; 2、 4.0×10^2 CFU/g; 3、 4.0×10^1 CFU/g; 4、 4.0×10^0 CFU/g; 5、 4.0×10^{-1} CFU/g; 6、DEPC H₂O。

3 结论

3.1 由大肠杆菌 O157:H7 引起的感染性腹泻, 目前还没有一种特效药或有效的治疗手段, 而且大肠杆菌 O157:H7 的感染剂量极低^[7], 毒性较强。根据《食品中大肠杆菌 O157:H7 的预测模型及风险评估》, 大肠杆菌 O157:H7 是严重危害人类健康的肠道致病菌, 感染剂量极低, 低至 10 个菌体。因此筛检大肠杆菌 O157:H7 的方法是否灵敏、特异及快速至关重要^[8]。樊杰等^[9]建立的荧光定量 PCR 方法的灵敏度达 7.06×10^3 CFU/mL。徐德顺等^[10]采用实时荧光 PCR 在纯菌条件下, 定量检测低限为 17 CFU/mL。张雪寒等^[11]建立的 LAMP 方法对大肠杆菌 O157 菌液和模拟阳性样品的最低检测限分别为 1 CFU/ml、1 CFU/g。

3.2 SPIA 技术相对于其它检测方法有明显优势。首先是等温扩增, 其反应无需温度循环, 等温条件下即可实现扩增反应使反应更方便省时; 由于在一个模板分子上, RNase H 不需要等延伸反应结束即可切割引物 RNA, 暴露出新混合引物 RNA 部分的结合位点, 新混合引物可不断地与模板结合, 从而引发多个合成反应同时进行, 因此 SPIA 扩增效率高; 另外, 扩增产物污染造成假阳性是普通核酸扩增技术经常出现的问题, 但是 SPIA 的 DNA 扩增产物缺少 5'端引物区大

部分序列, 因此这些产物不能与引物结合发生扩增反应, 从而该方法可避免扩增产物的污染。当前基因表达分析的重要工具是基因芯片, 其分析对象为单链核酸。Ribo-SPIA 技术因具有快速扩增 RNA 模板获得大量 cDNA 单链的特点, 完全符合基因表达分析的 mRNA 扩增要求, 已成功应用于基因表达分析^[12-13]。有报道显示, SPIA 已经在 SNP 检测、基因分型及药物抗性突变检测中得到很好的应用。

3.3 该方法对大肠杆菌 O157 能扩增出典型的 S 曲线, 而非阳性菌则无特异性扩增, 其反应时间仅 55 min, 对大肠杆菌 O157 纯培养的灵敏度能达 2.0 CFU/mL, 在检测污染猪肉模拟样品时其检出限是 4.0 CFU/g。因此, 本研究在实时荧光分析仪上实现了实时荧光单引物等温扩增 (SPIA) 技术检测大肠杆菌 O157, 而且实时荧光 SPIA 检测方法在致病细菌的检测方面具有操作简便、用时少、灵敏度高、特异性强的特点。

参考文献

- [1] PARK C H, VANDEL N M, HIXON D L, et al. Rapid immunoassay for detection of *Escherichia coli* O157:H7 directly from stool specimens [J]. *Clin. Microbiol.*, 1996, 34: 988-990
- [2] CLARK C G, JOHNSON S, JOHNSON R P, et al. Further characterization of a monoclonal antibody reactive with *Escherichia coli* O157:H7 [J]. *Clin. Microbiol.*, 1995, 43 (4): 262-269
- [3] Mullah B, Livak K, Andrus A, et al. Efficient synthesis of double dye-labeled oligodeoxyribonucleotide probes and their application in a real time PCR assay [J]. *Nucleic Acids Research*, 1998, 26: 1026-1031
- [4] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA [J] *Nucleic Acid Research*, 2000, 28: 63
- [5] Kurn N, Chen P, Heath J D, et al. Novel isothermal, linear nucleic acid amplification system for highly multiplexed applications [J]. *Clin. Chem.*, 2005, 51(10): 1973-1981
- [6] Gill P, Ghaemi A. Nucleic acid isothermal amplification technologies: a review [J]. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, 2008, 27 (3): 224- 243
- [7] MARUYAMA F, KENZAKA T, YAMAGUCHI N, et al. Detection of bacteria carrying the *stx2* gene by in situ loop mediated isothermal amplification [J]. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2003, 69(8): 5023-5028
- [8] NAGAMINE K, WATANABE K, OHTSUKA K, et al.

- Loop mediated isothermal amplification reaction using a nondenatured template [J]. *Clin. Chem.*, 2001, 47 (9) : 1742-1743
- [9] 樊杰,伏小平.O157:H7型大肠杆菌荧光定量PCR检测方法的建立[J].*中国兽医学报*,2008, 38(1):15-19
FAN Jie, FU Xiao-ping. Establishment of fluorescent quantitative PCR assay for detection of *Escherichia coli* O157:H7 [J]. *Chinese Veterinary Science*, 2008, 38(1): 15-19
- [10] 徐德顺,沈月华,程平庆.大肠杆菌 O157:H7 实时荧光 PCR 快速检测方法的建立[J].*上海预防医学杂志*,2009, 21(4): 174-177
XU De-shun, SHN Yue-hua, CHENG Ping-qing. Construction and primary application of a TAQMAN PCR detection method for detection of *Escherichia coli* O157:H7 [J]. *Shanghai Journal of Preventive Medicine*, 2009, 21(4): 174- 177
- [11] 张雪寒,何孔旺,叶青,等.快速检测大肠杆菌 O157 的 LAMP 方法的建立与评价[J].*中国兽医学报*,2013,33(7):1027-1031
ZHANG Xue-han, HE Kong-wang, YE Qing, et al. Establishment of loop-mediated isothermal amplification technique for rapid detection of *Escherichia coli* O157:H7 [J]. *Chinese Veterinary Science*, 2013, 33(7): 1027-1031
- [12] Barker C S, Griffin C, Dolganov G M, et al. Increased DNA microarray hybridization specificity using sscDNA targets [J]. *BMC Genomics*, 2005, 6 (1): 57
- [13] Singh R, Maganti R J, Jabba S V, et al. Microarray-based comparison of three amplification methods for nanogram amounts of total RNA [J]. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 2005, 288(5): C1179-C1189