产志贺毒素大肠杆菌 O26 多重双启动寡核苷酸引物-PCR 检测方法的建立

杨广珠，张淑红，黄远斌，吴清平，张菊梅

（华南应用微生物国家重点实验室，广东省菌种保藏与应用重点实验室，广东省微生物应用新技术公共实验室，广东省微生物研究所，广东省科学院，广东广州 510070）

摘要：为建立一种三重 DPO-PCR 方法用于食品样品中的产志贺毒素大肠杆菌 O26 的检测。以志贺毒素 *stx1* 和 *stx2*、O 抗原基因 *wzx* O26 特异性和实际检测效果，设计引物，构建三重 DPO-PCR 反应体系，进行特异性、灵敏度、模拟样品验证和实际样品验证。结果表明，三对 DPO 引物对退火温度不敏感，在 49~69 ℃之间均能发生扩增，且引物之间干扰较小，具有较高的特异性，除目的基因外非目标细菌均无扩增条带出现，纯菌灵敏度检测表明，三重 DPO-PCR 方法对 O26 的最低检测限为 3.8×10^3 cfu/g。在模拟样品和实际样品中具有良好的检测效果。本研究基于 DPO 引物构建的三重 DPO-PCR 方法具有效率高，特异性强，不受退火温度限制等优点，可用于食品样品中产志贺毒素大肠杆菌 O26 的快速准确检测提供一种高效的辅助检测方法。

关键词：产志贺毒素大肠杆菌 O26；DPO 引物；三重 PCR

文章篇号：1673-9078(2020)04-290-295 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2020.4.038

Establishment of Multiplex DPO-PCR Method for Detection of Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* O26

YANG Guang-zhu, ZHANG Shu-hong, HUANG Yuan-bin, WU Qing-ping, ZHANG Ju-mei

(State Key Laboratory of Applied Microbiology Southern China, Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application, Guangdong Open Laboratory of Applied Microbiology, Guangdong Institute of Microbiology, Guangdong Academy of Sciences, Guangzhou 510070, China)

Abstract: In order to develop a triple DPO-PCR assay for the detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26 in foods based DPO primers, three sets of DPO primers were designed according to shiga toxin *stx1*, *stx2* and O antigen *wzx* O26 genes. Their specificity, sensitivity and detection effect were evaluated. The results showed that an optimized system was established, which showed a high specificity and sensitivity. The amplification could product at 49~69 ℃. The detection limit of this assay for *Escherichia coli* O26 was 3.8×10^3 cfu/g. Further, this method demonstrated good detection results in artifical contaminated samples and natural food samples. The triple DPO-PCR assay in this work based on DPO primers possessed highly advantages of high efficiency, specificity and wide annealing temperature range, which can provide a reliable and efficient molecule assay for the rapid and accurate detection of Shiga toxin-producing E. coli O26 in food samples method.

Key words: Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26; DPO primer; triple PCR

引文格式：

杨广珠,张淑红,黄远斌,等.产志贺毒素大肠杆菌 O26 多重 DPO-PCR 检测方法的建立[J].现代食品科技,2020,36(4):290-295

YANG Guang-zhu, ZHANG Shu-hong, HUANG Yuan-bin, et al. Establishment of multiplex DPO-PCR method for detection of shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26 [J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(4): 290-295

收稿日期：2019-11-08

基金项目：国家重点研发计划专项（2018YFD0400901）；广东省科技计划项目（2017B090904004）；广州市科技计划项目（201704020089）；广东省科学院实施创新驱动发展能力建设专项（2019GDASYL-0201001）

作者简介：杨广珠（1991-），女，研究实习员，研究方向：食源性致病菌检测技术

通讯作者：吴清平（1962-），男，中国工程院院士，研究员，研究方向：食品微生物安全检测及控制技术

产志贺毒素大肠杆菌(Shiga toxin-producing *Escherichia coli*，STEC)是一类能产生志贺毒素(Shiga toxin)的致泻大肠杆菌，可引起人感染性腹泻，严重者甚至可出血性结肠炎(Hemorrhagic colitis，HC)和溶血性尿毒症综合征(Hemolytic uremic syndrome，HUS)[1]。志贺毒素包括志贺毒素 STX1 和志贺毒素 STX2，分别由 *stx1* 和 *stx2* 基因编码，STEC 菌株可携带其中一种毒素或者两种毒素同时携带[2]。动物性食品是这类致病菌的重要污染源，人类感染主要通过是食用受污染的食物。STEC 有多种血清型，其中 O157:H7 是国内外普遍关注的重要血清型，在全球多个国家引起食源性疾病暴发[3]。然而近年来，国内外学者对 non-O157STEC 的“六大类血清型”(O26、O111、O103、O45、O121、O145)的关注越来越高，对其污染调查和检测方法的报道也日益增多[4]。2011 年在美国爆发的 38 次 non-O157 STEC 污染事件中，有 11 例是由 O26 血清型引起的，O26 其可通过乳制品、农产品和肉类污染导致人类感染[5]；2011 年对爱尔兰 20 个牛场采集的粪便样品和土壤样品检测中发现，13%是携带 *stx* 毒力基因的 STEC O26，且同时检测出多种其他毒力基因[6]；2019 年在法国爆发的 19 例小儿溶血性尿毒症综合征中有 16 例是由 STEC O26 导致的[7]；而在国内，2003 年广东东莞出入境检验检疫局首次在入境的菲律宾冻墨鱼中分离出 STEC O26[8]；2005 年，河南省更是首次在人体内分离出一株 STEC O26:H11，且携带其他毒力基因[9]。

双启动寡核苷酸引物(Dual-priming Oligonucleotide，DPO)是一种错配率低、特异性好的新型引物[10]，引物分为两部分，5’端长 18~25 bp，3’端长 6~15 bp，中间用多聚次黄嘌呤肌苷连接[11]。这种特殊的结构使得引物自身以及引物间难以形成二级结构，对退火温度不敏感，实验中无需对引物进行筛选以及对退火温度进行优化。而且，DPO 引物与模版发生错配的几率小，有 3 个以上的碱基发生错配，反应就会停止，特别适于多套引物的同时扩增。相比之下，传统的 PCR 引物设计对扩增体系和退火温度比较敏感、容易出现非特异性扩增条带[12,13]。近几年，已经有研究者将此方法应用于食源性致病菌的快速检测中，如小肠炎耶尔森氏菌[12]、副溶血弧菌[13]等，但是 DPO-PCR 方法在 STEC 的检测中未见报道[14]。因此，本研究针对 STEC O26 三个特异性基因(*stx1*，*stx2* 和 *wzx* O26)设计了三套 DPO 引物，建立 STEC O26 三重 DPO-PCR 检测方法，为食品中 STEC O26 高效检测提供重要辅助手段。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 参考菌株

产志贺毒素大肠杆菌 STEC O26(*stx1*,*stx2* 和 *wzx* O26)、产志贺毒素大肠杆菌 STEC O111(*stx1*,*stx2* 和 *wzx* O111)、鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium* ATCC 10428)、小肠结肠炎耶尔森氏(*Yersinia enterocolitica* CMCC 52204)、阪崎肠杆菌(*Enterobacter sakazakii* ATCC 29544)、单核细胞增生李斯特氏菌(*Listeria monocytogenes* ATCC 19115)、副溶血性弧菌(*Vibrio Parahemolyticus* ATCC 17802)、蜡样芽胞杆菌(*Bacillus cereus* ATCC 14579)、肺炎克雷伯氏菌(*Klebsiella Pneumoniae* ATCC 46117)、空肠弯曲菌(*Campylobacter jejuni* ATCC 33291)。

1.1.2 主要仪器试剂

离心机，美国贝克曼仪器公司；移液器、PCR 仪，德国 Biometra 公司；电泳仪(EPS301、EPS501、EPS3501)，瑞典安玛西亚公司；和凝胶分析成像系统，英国 GE Healthcare 公司。

2×Taq PCR Master Mix、50×TAE、DNA Marker 2000、琼脂糖，均购自广州东盛生物科技有限公司；LB 肉汤，购自广东环凯微生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细菌 DNA 模板制备

取 10 μL 菌液接入 5 mL 的 LB 肉汤中，37 ℃过夜培养。取 1 mL 菌液于 1.5 mL 离心管中，13000 r/min 离心 5 min，弃上清，加入 100 μL 无菌水，充分混匀，沸水浴煮 10 min 后，冰浴 3 min，13000 r/min 离心 5 min，取上清；-20 ℃保存备用。

1.2.2 引物设计

表 1 DPO 引物序列

Table 1 Sequence of DPO primer used in this study

引物名称	引物序列	片段大小	靶基因	参考文献
GB-stx1	F:CGATGTTACGGTTTGTTACTGTGACAGC R: AATGCCACGCTT CCCAGAATTG	244 bp	*stx1*	GB 4789.6-2016

转下页

接上页

GB-stx2	F: GTTTTGACCATCTTCGTCTGATTATTG AG R: AGCGTAAGGCTTCTGCTGTGAC	324 bp	*stx2*	GB 4789.6-2016
Og26	F: GGGGGTGGGTACTATATTGG R: AGCGCCTATTTCAGCAAAGA	241 bp	*wzx* O26	Paddock et al.，2012[15]
DPO-stx1	F:CAGCGTGTTGCAGGGATCAIIIIIACGGGGATGC R: CGAACAGAGTCTTGTCCATGIIIIICAGGCAGG	308 bp	*stx1*	本研究
DPO-stx2	F: CCACACCCCACCGGGCAGTIIIIITGCTGTGG R:GCTGCGACACGTTGCAGAGTGGIIIIICTGCTGTCCG	240 bp	*stx2*	本研究
DPO-O26	F: GCTTCGCCTGTTGCAACGIIIIIGTACGCGAC R; CATAAGCAATTGCAGCGCCIIIIICAGCAAAG	472 bp	*wzx* O26	本研究

1.2.3 三重 DPO-PCR 反应体系的建立与优化

DPO-PCR 25 μL 体系包括：2×PCR mix 12.5 μL，基因 *stx1* 和 *stx2* 正反向 DPO 引物各 0.5 μL，O26 正反向 DPO 引物各 1 μL，模板 3 μL。传统 PCR 25 μL 体系包括：2×PCR mix 12.5 μL，基因 *stx1* 和 *stx2* 正反向 DPO 引物各 0.5 μL，O26 正反向 DPO 引物各 1 μL，模板 3 μL。反应程序均为：94 ℃ 5 min；94 ℃ 30 s、58 ℃ 45 s、72 ℃ 1 min，30 个循环；72 ℃ 10 min。PCR 反应完成后进行琼脂糖凝胶电泳检测扩增效果。

1.2.4 DPO-PCR 退火温度敏感性

将退火温度范围设为 49~69 ℃，利用所建立的方法，分别进行 DPO-PCR 扩增和传统 PCR 扩增，经琼脂糖凝胶电泳检测两种方法的扩增效果。

1.2.5 DPO-PCR 特异性检测

利用建立的 DPO-PCR 检测方法(1.2.3 节)对目标菌和非目标菌株进行扩增，然后进行琼脂糖凝胶电泳结果的分析，验证所建立方法的特异性。

1.2.6 DPO-PCR 灵敏度检测

提取 STEC O26 菌株基因组 DNA 并测定浓度，将菌液用无菌水进行 10 倍梯度稀释至 10^{-1}~10^{-7}，各浓度菌液 1 mL 提取 DNA，并各取 3 μL 作为模板进行 DPO-PCR 扩增。同时，稀释后的菌液选取 10^{-5}~10^{-8} 菌液涂布 NA 平板进行菌落计数。

1.2.7 DPO-PCR 模拟样品检测

取各参考菌株菌液 10 μL 加入 25 g 猪肉糜中混匀，并加入至 225 mL 营养肉汤的均质袋中，均质 1 min~2 min，37 ℃过夜培养。取 1 mL 菌液于 1.5 mL 离心管中，13000 r/min 离心 5 min，弃上清，加入 100 μL 无菌水，充分混匀，沸水浴煮 10 min 后，冰浴 3 min，13000 r/min 离心 5 min，取上清。用 DPO-PCR 方法和传统 PCR 方法进行模拟样品检测。

1.2.8 实际样品检测

实际样品检测中，采集 100 份食品样品(肉类样品 50 份、水产品 25 份、蔬菜 25 份)，参考国标法 GB 4789.6-2016 进行检测，稍改动。称取食品样品 25 g，加入 225 mL 营养肉汤的均质袋中，均质 1 min~2 min，将样品均质液在 36 ℃±1 ℃培养 6 h。取 10 μL 接种于 30 mL 肠道菌增菌肉汤管内，42 ℃±1 ℃培养 18 h。取 1 mL 菌液于 1.5 mL 离心管中，13000 r/min 离心 5 min，弃上清，加入 100 μL 无菌水，充分混匀，沸水浴煮 10 min 后，冰浴 3 min，13000 r/min 离心 5 min，取上清；采用本研究建立的三重 DPO-PCR 和传统 PCR 进行检测。阳性样品取 1 mL 菌液涂布大肠杆菌显色板，挑取疑似菌落进行 PCR 再次进行三重 DPO-PCR 和传统 PCR 验证。

2 结果与讨论

2.1 DPO 引物及扩增体系

优化的 DPO-PCR 25 μL 体系包括：2×PCR mix 12.5 μL，基因 *stx1* 和 *stx2* 正反向 DPO 引物各 0.5 μL，O26 正反向 DPO 引物各 1 μL，模板 3 μL。目标菌扩增情况如图 1 所示。STEC O26 三个基因全部扩增出目的条带，用传统 PCR 扩增，*wzx* O26 基因未能扩增出条带，仅 *stx1* 和 *stx2* 出现目的条带。

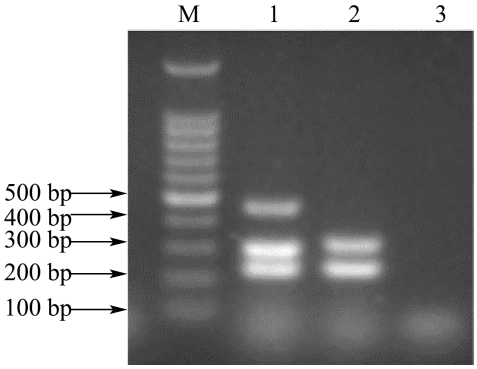

图 1 DPO PCR 扩增结果

Fig.1 The result of DPO-PCR for STEC O26

注：M：100 bp Marker；1：DPO-PCR；2：Conventional PCR；3：Negative control。

2.2 DPO-PCR 特异性检测结果

建立的三重 DPO-PCR 方法能特异扩增 STEC O26，三条阳性条带与预期长度一致，属于特异性扩增条带。而对照的产志贺毒素大肠杆菌 STEC O111、鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium* ATCC 10428)、小肠结肠炎耶尔森氏(*Yersinia enterocolitica* CMCC 52204)、阪崎肠杆菌(*Enterobacter sakazakii* ATCC 29544)、单核细胞增生李斯特氏菌(*Listeria monocytogenes* ATCC 19115)、副溶血性弧菌(*Vibrio parahemolyticus* ATCC 17802)、蜡样芽胞杆菌(*Bacillus cereus* ATCC 14579)、肺炎克雷伯氏菌(*Klebsiella pneumoniae* ATCC 46117)、空肠弯曲菌(*Campylobacter jejuni* ATCC 33291)的扩增结果均呈阴性。显示基于 DPO 引物构建的三重 DPO-PCR 用于检测 STEC O26 具有较好的特异性。

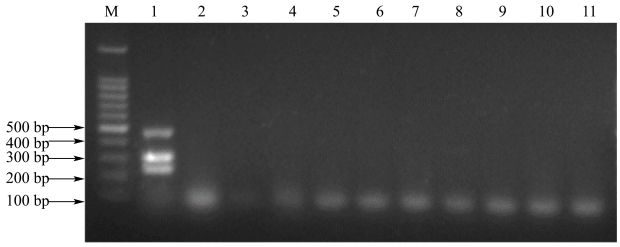

图 2 DPO-PCR 特异性检测

Fig.2 Specificity of DPO-PCR

注：M:100 bp Marker；1:STEC O26；2:*Escherichia coli* O111；3：*Salmonella typhimurium*；4：*Yersinia enterocolitica*；5：*Enterobacter sakazakii*；6：*Listeria monocytogenes*；7：*Vibrio Parahemolyticus*；8：*Klebsiella Pneumoniae*；9：*Bacillus cereus*；10：*Campylobacter jejuni*；11：Negative control。

2.3 DPO-PCR 退火温度敏感性

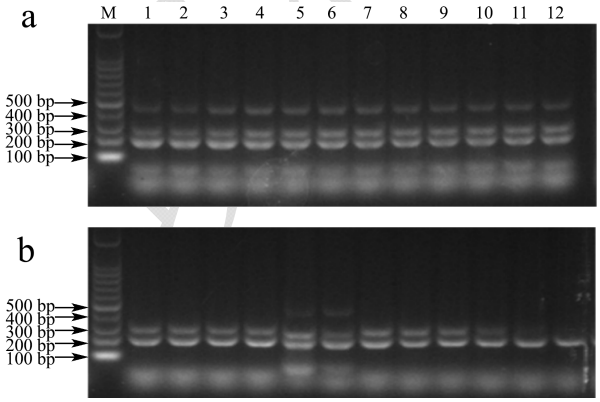

图 3 退火温度敏感性；a：DPO-PCR；b：传统 PCR

Fig.3 PCR amplification at different annealing temperatures;A:DPO-PCR; B:Conventional PCR

注：M：100bp Marker；1-12：Annealing temperature at 49.0 ℃，49.4 ℃，50.4 ℃，52.0 ℃，54.2 ℃，57.2 ℃，60.8 ℃，63.8 ℃，66.0 ℃，67.6 ℃，68.6 ℃ and 69.0 ℃。

由图 3 可知，DPO 引物在 49.0 ℃、49.4 ℃、50.4 ℃、52.0 ℃、54.2 ℃、57.2 ℃、60.8 ℃、63.8 ℃、66.0 ℃、67.6 ℃、68.6 ℃和 69.0 ℃均可以扩增出三条目的条带 *stx1* 308 bp、*stx2* 240 bp、*wzx* O26 472 bp，表明 DPO 引物的退火温度范围较宽，不易受温度变化影响(图 3a)；而传统 PCR 引物最佳的退火温度为 57.2 ℃，易受退火温度变化的影响，在扩增反应前需要进行退火温度的优化(图 3b)。

2.4 三重 DPO-PCR 灵敏度检测结果

根据平板计数法结果和电泳结果可得，本研究建立的三重 DPO-PCR 的灵敏度为 3.8×10^3 cfu/g。在前期的研究中，徐义刚等分别建立了小肠结肠炎耶尔森氏菌、志贺氏菌、单核细胞增生李斯特氏菌、空肠弯曲菌、霍乱弧菌等致病菌的 DPO-PCR 检测方法[16-20]；李丹丹等建立了基于 DPO-PCR 方法可特异性检测肠致病性大肠杆菌、肠侵袭性大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、副溶血性弧菌[10,13,21]。上述文献中所建立的 DPO-PCR 方法主要针对单个目的基因，检测灵敏度在 10^2 cfu/mL。而本研究以 *wzx* O26、*stx1* 和 *stx2* 为靶标基因设计引物，建立了三重 DPO-PCR 方法，检测灵敏度达 3.8×10^3 cfu/g，与传统多重 PCR 方法相当。这种检测限的差异是可预测的，与检测基因的数量有关。

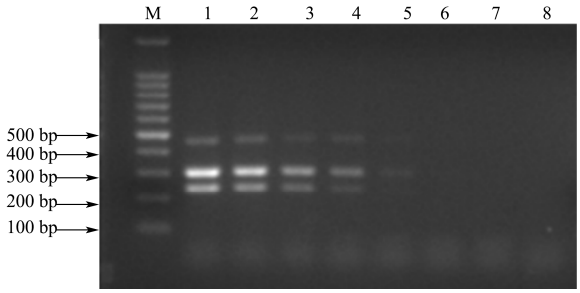

图 4 三重 DPO-PCR 灵敏度

Fig.4 Sensitivity of DPO-PCR

注：M：100 bp Marker；1~8：3.8×10^7 cfu/g，3.8×10^6 cfu/g，3.8×10^5 cfu/g，3.8×10^4 cfu/g，3.8×10^3 cfu/g，3.8×10^2 cfu/g，3.8×10^1 cfu/g，3.8 cfu/g。

2.5 DPO-PCR 的模拟样品检测结果

模拟样品中，DPO-PCR 方法检测混菌中的 STEC O26，三个基因均能扩增出特异性条带；且 STEC O111 菌株能够扩增出 *stx1* 和 *stx2* 基因条带，而 *wzx* O111 未能扩增出条带。而传统 PCR 方法则仅扩增出 *stx1* 和 *stx2* 基因，O26 基因未能扩增出条带。

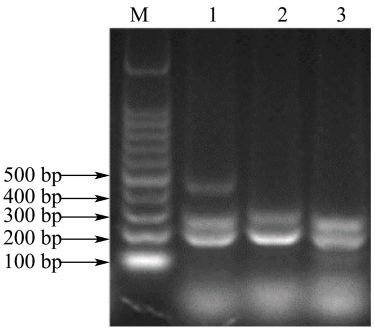

图 5 模拟样品验证

Fig.5 The results of artificial contaminated samples

注：M：100 bp Marker；1：DPO-PCR STEC O26；2：Conventional PCR STEC O26；3：DPO-PCR STEC O111。

2.6 实际样品检测结果

利用建立的 DPO-PCR 检测方法对肉类、水产品、蔬菜样品进行了检测，共检出 STEC O26 阳性为 2 份，均为肉类样品，且平板分离获得 2 株阳性菌株。传统多重 PCR 检出 STEC O26 阳性 1 份，为肉类样品，获得 1 株阳性分离株。表 2 为两种方法的比较结果，DPO-PCR 可补充传统三重 PCR 方法漏检的阳性样品，显示该方法具有良好的检测效率。

表 2 三重 DPO-PCR 方法对实际样品中的 STEC O26 检测

Table 2 Triple DPO-PCR method for detecting STEC O26 in actual samples

样品	三重 DPO-PCR		传统三重 PCR	
	阳性	阴性	阳性	阴性
肉类	2	48	1	49
水产品	0	25	0	25
蔬菜	0	25	0	25
总计	2	98	1	99

3 结论

目前国内外对非 O157 没有统一检测的标准，由于肉制品、乳制品、蔬菜等样品中的非 O157 污染率相对较低，非 O157 血清型的检测和分离鉴定方面还有一定困难。目前多数实验室仍主要沿用传统的分离培养方法，这种方法操作繁琐、检测时间长、特异性差、容易漏检[22]。近年来国内外学者一直在探索建立高效准确的检测方法。以 PCR 为基础的技术具有操作简便、耗时短和特异性强等优点，逐步成为致病菌快速检测的常规分子鉴定方法[13]。部分实验室建立了多重 PCR 技术、荧光定量 PCR 和 LAMP 技术等，然而这些检测方法还存在着一些局限性，如对引物设计要求高、需要优化扩增体系、LAMP 技术易污染等[23]。相比而言，DPO 具有引物设计简单、无需优化退火温度、特异性强、灵敏度高等特点，特别适于多个基因的特异性扩增，这在一定程度上弥补其他分子手段检测方法的不足[14]。通常情况下，致病菌污染样品经过 18~24 h 增菌培养，菌落数量可达到 10^3~10^5 cfu/mL，因此 DPO-PCR 方法可以满足实际样品的检测需求。与传统多重 PCR 相比，本研究建立的多重 DPO-PCR 可在 49~69 ℃内范围内完成扩增，不受温度变化的影响，而传统多重 PCR 方法仅在限定温度下扩增，且容易出现部分基因无法扩增的结果，降低了样品增菌液中致病菌检测结果的误判几率。此外，由于 DPO 引物具有低错配率的特点（三个碱基不匹配扩增即会停止），在实际样品检测中减少了假阳性结果的发生。对于阳性样品中的目标菌，可实现 O 抗原和毒力基因的同步鉴定，缩短鉴定时间。总之，本研究建立的多重 DPO-PCR 方法可应用于实际样品的检测，相比于传统分离培养方法可缩短检测周期，具有较高的检测效率，为 STEC O26 的快速检测和准确鉴定提供了新的辅助方法。进一步研究中，将采集更多数量的样品进行实际应用。

参考文献

[1] Bosilevac J M, Koohmaraie M. Predicting the presence of non-O157 Shiga toxin-producing escherichia coli in ground beef by using molecular tests for Shiga toxins, intimin, and O serogroups [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2012, 78(19): 7152-7155

[2] 巴鹏斌,孟琼,白向宁,等.非O157产志贺毒素大肠埃希菌研究进展[J].中国人兽共患病学报,2017,33(2):56-162
BA Peng-bin, MENG Qiong, BAI Xiang-ning, et al. Research progress on non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* [J]. Chinese Journal of Zoonoses, 2017, 33(2): 56-162

[3] Sharapov U M, Wendel A M, Davis J P, et al. Multistate outbreak of *Escherichia coli* O157: H7 infections associated with consumption of fresh spinach: United States, 2006 [J]. Journal of Food Protection, 2016, 79(12): 2024-2030

[4] 夏诗琪,赖卫华,刘道峰,等.O26等产志贺毒素的6种血清型大肠杆菌的暴发流行情况及检测研究现状[J].食品科学,2014,35(17):301-305
XIA Shi-qi, LAI Wei-hua, LIU Dao-feng, et al. Outbreaks and detection methods of six Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serogroups including O26: Current situation [J]. Food Science, 2014, 35(17): 301-305

[5] Luna-Gierke R E, Griffin P M, Gould L H, et al. Outbreaks of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection:

USA [J]. Epidemiology and Infection, 2014, 142(11): 2270-2280

[6] Monaghan A, Byrne B, Sn P M, et al. Outbreaks ofulence profiles of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates from bovine farms [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2011, 77(24): 8662-8668

[7] Jones G, Lefèvre S, Donguy M, et al. Outbreak of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) O26 paediatric haemolytic uraemic syndrome (HUS) cases associated with the consumption of soft raw cow's milk cheeses [J]. Euro Surveill, 2019, 24(22)

[8] 李光伟,林涛,郭慧,等.全国口岸首次检出致病性大肠埃希菌 O26[J].中国卫生检验杂志,2003,13(4):439-440
LI Guang-wei, LIN Tao, GUO Hui, et al. Detection of pathogenic *E. coil* O26 at the port for the first time in China [J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2003, 13(4): 439-440

[9] 张濛,廖兴广,张锦,等.河南省首次从人体内分离出 *E.coli* O26:H11[J].中国人兽共患病学报,2005,21(2):108-109
ZHANG Meng, LIAO Xing-guang, ZHANG Jin, et al. Isolation of *E .coli* O26: H11 from human body for the first time in Henan province [J]. Chinese Journal of Zoonoses, 2005, 21(2): 108-109

[10] 李丹丹,徐义刚,陈文慧,等.肠致病性大肠杆菌 DPO-PCR 快速检测方法的建立[J].中国预防兽医学报,2015,7:541-544
LI Dan-dan, XU Yi-gang, CHEN Wen-hui, et al. Development of a dual-priming oligonucleotide-based PCR assay for the rapid detection of enteropathogenic *Escherichia coli* [J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2015, 7: 541-544

[11] 徐义刚,李丹丹,崔丽春,等.应用 DPO-PCR 技术检测肠出血性大肠杆菌 O157:H7[J].食品科学,2014,35(8):160-164
XU Yi-gang, LI Dan-dan, CUI Li-chun, et al. Detection of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 by DPO-PCR method [J]. Food Science, 2014, 35(8): 160-164

[12] 徐义刚,李丹丹,刘忠梅,等.基于 DPO 引物特异性检测小肠结肠炎耶尔森氏菌的 PCR 方法[J].中国人兽共患病学报,2014,30(5):507-510
XU Yi-gang, LI Dan-dan, LIU Zhong-mei, et al. DPO-based PCR method for specific detection of *Yersinia enterocolitica* [J] Chinese Journal of Zoonoses, 2014, 30(5): 507-510

[13] 李丹丹,徐义刚,王昱,等.副溶血弧菌 DPO-PCR 检测方法的建立[J].食品与发酵工业,2015,41(11):133-136
LI Dan-dan, XU Yi-gang, WANG Yu, et al. Development of DPO-PCR method for the detection of *Vibrio parahaemolyticus* [J]. Food and Fermentation Industries, 2015, 41(11): 133-136

[14] 苏琰,李融,黎华,基于双启动寡聚核苷酸引物的 PCR 技术及其研究应用[J].基因组学与应用生物学,2018,37(7): 2906-2912
SU Yan, LI Rong, LI Hua, Research and application of PCR technique based on dual priming oligonucleotide primers [J]. Genomics and Applied Biology, 2018, 37(7): 2906-2912

[15] Paddock Z, Shi X, Bai J, et al. Applicability of a multiplex PCR to detect O26, O45, O103, O111, O121, O145, and O157 serogroups of *Escherichia coli* in cattle feces1 [J]. Veterinary Microbiology, 2012, 156(3-4): 381-388

[16] 徐义刚,李丹丹,刘忠梅,等.产肠毒性大肠杆菌 DPO-PCR 检测方法的建立与应用[J].中国生物工程杂志,2013,33(11): 75-80
XU Yi-gang, LI Dan-dan, LIU Zhong-mei, et al. Establishment and application of DPO-PCR detection method for enterotoxic *Escherichia coli* [J]. China Biotechnology, 2013, 33(11): 75-80

[17] 徐义刚,李丹丹,吴言,等.霍乱弧菌 DPO-PCR 特异性检测方法的建立与应用[J].中国兽医学报,2014,34(8):1284-1288
XU Yi-gang, LI Dan-dan, LIU Yan, et al. Development and application of DPO-PCR method for specific detection of *Vibrio cholera* [J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2014, 34(8): 1284-1288

[18] 徐义刚,李丹丹,刘忠梅,等.基于 DPO 引物的空肠弯曲菌 PCR 检测方法的建立与初步应用[J].中国预防兽医学报, 2014,36(4):293-296
XU Yi-gang, LI Dan-dan, LIU Zhong-mei, et al. Development and preliminary application of DPO-based PCR method for detection of *Campylobacter jejuni* [J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2014, 36(4): 293-296

[19] 徐义刚,李丹丹,张柏棋,等.基于双启动引物特异性检测单核细胞增生李斯特氏菌的 PCR 方法[J].食品工业科技, 2014,35(10):86-89
XU Yi-gang, LI Dan-dan, ZHANG bai-qi, et al. Dual-priming primers-based PCR method for specific detection of *Listeria monocytogenes* [J]. Science and Technology of Food Industry, 2014, 35(10): 86-89

（下转第 24 页）