

可视化-环介导等温扩增技术检测肠出血性 大肠杆菌 O157:H7

夏学峰^{1,2}, 张碧成³, 王 警¹, 张红印², 张雪寒^{1,2*}

(1. 江苏省农业科学院兽医研究所/农业部兽用生物制品工程技术重点实验室, 南京 210014;
2. 江苏大学食品与生物工程学院, 镇江 212013; 3. 江苏省动物疫病预防控制中心, 南京 210024)

摘要: 目的 建立可视化的环介导等温扩增技术(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)联合横向流动试纸条(lateral flow dipstick, LFD)方法检测肠出血性大肠杆菌(enterohemorrhagic *Escherichia coli*, EHEC)O157:H7的分析方法。**方法** 以 EHEC O157:H7 的遗传标志性基因 z3276 基因序列为检测靶标设计 6 条 LAMP 特异性引物, 其中 2 条环引物分别标记异硫氰酸荧光素和地高辛, 用 LFD 检测扩增产物, 建立 EHEC O157:H7 LAMP-LFD 检测方法。**结果** 所建立的检测方法能够特异性的检测 EHEC O157:H7, 与试验对照菌株 EHEC O26、O145、O45、O121, 及其他主要大肠杆菌血清型 O25、O78、O103、O111、O127、O138、O139、O141, 及禽致病性大肠杆菌(avian pathogenic *Escherichia coli*, APEC)E058、肠致病性大肠杆菌(enteropathogenic *Escherichia coli*, EPEC)SEC627、EPEC SEC689、K12-MG1655、BL21, 和其他种属的受试菌, 不存在交叉反应; 对 EHEC O157:H7 纯培养物的最低检测限为 1.3 CFU/mL。**结论** 本研究所建立的 LAMP-LFD 检测方法特异性和敏感性良好, 操作简单, 结果可视。

关键词: 肠出血性大肠杆菌; z3276 基因序列; 环介导等温扩增技术; 横向流动试纸条

Determination of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7 by visualization-loop mediated isothermal amplification

XIA Xue-Feng^{1,2}, ZHANG Bi-Cheng³, WANG Jing¹, ZHANG Hong-Yin², ZHANG Xue-Han^{1,2*}

(1. Institute of Veterinary Medicine/Key Laboratory of Engineering Research of Veterinary Bio-products of Agricultural Ministry, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China; 2. School of Food and Biological Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China; 3. Jiangsu Provincial Animal Disease Prevention and Control Center, Nanjing 210024, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for determination of enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) O157: H7 by visualization-loop mediated isothermal amplification (LAMP)-lateral flow dipstick(LFD). **Methods** Totally 6 LAMP-specific primers were designed targeting the genetic marker gene of z3276 from EHEC O157:H7, and 2 loop primers were respectively labeled with fluorescein isothiocyanate and digoxin. The amplification products were detected by LFD, then the LAMP-LFD detection method was established. **Results** This assay could

基金项目: 国家重点研发计划项目(2018YFD0500500)、江苏省重点研发项目(BE2017341)

Fund: Supported by the National Key Research and Development Program of China (2018YFD0500500), and the Jiangsu Key Research and Development Plan (BE2017341)

*通讯作者: 张雪寒, 博士, 研究员, 主要研究方向为食源性病原菌的防控技术和致病机制研究。E-mail: liuxuehan1996@hotmail.com

*Corresponding author: ZHANG Xue-Han, Ph.D, Professor, the Institute of Veterinary Medicine, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, St.50, Zhongling, Xuanwu District, Nanjing 210014, China. E-mail: liuxuehan1996@hotmail.com

specifically detect EHEC O157:H7, and no cross-reaction was observed with any of the other test bacteria, including the control strains EHEC O26, O145, O45, O121, other major *Escherichia coli* serotypes O25, O78, O103, O111, O127, O138, O139, O141, and avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) E058, enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) SEC627, EPEC SEC689, K12-MG1655, BL21, and other species. The minimum detection limit of this assay was 1.3 CFU/mL for EHEC O157:H7 culture. **Conclusion** The established LAMP-LED detection method has good specificity and sensitivity, and the results of operation detection are visible.

KEY WORDS: enterohemorrhagic *Escherichia coli*; z3276 gene sequence; loop mediated isothermal amplification; lateral flow dipstick

1 引言

自 1982 年美国首次爆发出血性肠炎以来, 肠出血性大肠杆菌 (enterohemorrhagic *Escherichia coli*, EHEC) O157:H7 已经被认定为人类胃肠疾病的主要原因, 在全世界范围内爆发感染。人感染 EHEC O157:H7 后的临床表现从自限性腹泻到出血性肠炎, 有时导致更严重的并发症, 包括溶血性尿毒综合症, 死亡率 2%~10%^[1,2]。中国已将 EHEC 列为 21 世纪可能对国人健康有重大影响的 12 种病原微生物之一, O157:H7 是 EHEC 主要的致病血清型^[3]。动物源性是 EHEC O157:H7 的重要特征之一是病原菌可以感染几乎所有温血动物体, 并长期处于无症状带菌状态, 不仅关乎食品安全, 而且与医疗和公共卫生问题密切相关。

到目前为止, 鲜少有有效措施降低和消除动物的带菌状态, 因此需要加强检测, 防止病原菌伴随动物源食品进入生产、流通和消费环节。我国现行的肠出血性大肠杆菌 O157:H7 国家标准^[4]主要采用培养、菌株分离和生化试验的方法, 虽然结果可靠, 但耗费时间长。现有的分子生物学检测大多是基于核苷酸建立的检测技术, 聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR)、定量 PCR 和环介导等温扩增 (loop-mediated isothermal amplification, LAMP) 等。LAMP 是针对靶基因设计 2~3 对特异引物 (内引物、外引物和环引物), 在 Bst DNA 聚合酶等温条件下完成核酸扩增反应^[5]。LAMP 扩增结果一般通过电泳、染料 (SYBR Green I) 和浊度测定进行分析。染料主要与扩增中的双链 DNA 结合, 由淡棕色变成绿色, 易受模板 DNA 的影响, 出现假阳性。上述这些检测技术在不同领域、不同时期发挥着重要的作用。

为了更好地实现敏感、便捷、特异性的检测, 需要引入新的技术。横向流动试纸条 (lateral flow dipstick, LFD) 是很有用的一种便捷而即时检测的技术, 它是基于特异性抗体结合的原理而实现的^[6,7]。将 LAMP 技术的高敏感性与 LFD 的高特异性相结合使用, 实现样品检测即时性的同时具备高敏感性和高特异性, 肉眼可以通过条带数量的增减清晰判定检测结果的阴阳性。但目前将这两种技术联用并检测肠出血性大肠杆菌 O157:H7 的研究相对较少。

本研究将横向流动试纸条 (lateral flow dipstick, LFD) 与环介导等温扩增技术 (loop-mediated isothermal amplification, LAMP) 联用检测肠出血性大肠杆菌 (enterohemorrhagic *Escherichia coli*, EHEC) O157:H7, 实现检测结果的可视化, 为相关研究提供参考。

2 材料与方法

2.1 菌株

EHEC O157:H7 EDL933 菌株, 江苏省农业科学院兽医研究所保存; 32 个菌株模板用于 PCR 特异性研究, 包括 EHEC O26、O145、O45、O121, 及其他主要大肠杆菌血清型 O25、O78、O103、O111、O127、O138、O139、O141, 及禽致病性大肠杆菌 (avian pathogenic *Escherichia coli*, APEC) E058、肠致病性大肠杆菌 (enteropathogenic *Escherichia coli*, EPEC) SEC627、EPEC SEC689、K12-MG1655、BL21, 和其他种属细菌, 包括沙门氏杆菌、巴氏杆菌、粪链球菌、葡萄球菌、巨大芽孢杆菌、乳酸杆菌、绿脓杆菌、肺炎克雷伯杆菌、普通变形杆菌、奇异变形杆菌、阴沟肠杆菌、弗氏柠檬酸杆菌、痢疾志贺氏菌、福氏志贺氏菌 2a、普罗威登斯菌。菌种模板均为江苏省农业科学院兽医研究所保存。

2.2 主要试剂

通用性 LAMP 试剂盒、Bst DNA 聚合酶、横向流动试纸条 (南京钟鼎生物技术有限公司); 质粒提取试剂盒、DNA Marker、MgCl₂、核酸染料 Gelred (南京助研生物技术有限公司)。

2.3 LAMP 引物组的设计及合成

根据大肠杆菌 O157:H7 的 z3276 基因序列设计了 LAMP 引物组, 包括引物 ZF3、ZB3、ZFIP、ZBIP、ZFLP 和 ZBLP。其中, ZFLP 和 ZBLP 均是带有标记的引物, ZFLP 的 5'端标记有 FITC (异硫氰酸荧光素), ZBLP 的 5'端标记有 DIG (地高辛)。引物 ZF3、ZB3、ZFIP、ZBIP、ZFLP 和 ZBLP 的核苷酸序列, 如表 1 所示。引物 ZF3、ZB3、ZFIP、ZBIP、ZFLP 和 ZBLP 委托南京金斯瑞生物科技有限公司合成。

表 1 引物信息
Table 1 primers sequences

引物名称	引物序列 (5'-3')	扩增长度 (bp)	5'修饰
ZF3	gtgtcgactactgcatca	226	
ZB3	gctggtttactaaagactct		
ZFIP	tccagtaaacacgacacttttacta gatggattaatgttggggag		
ZBIP	atcttgtagacgagcagcgataatc gccattacaaaaggc		
ZFLP	aaaggaagtcttcattgct		FITC
ZBLP	atccaaagtgattgggtgaagttg		DIG

2.4 LAMP 反应

2.4.1 LAMP 体系

LAMP 扩增体系包括 2×LAMP Mix 10 μL、ZFIP 引物 0.8 μL、ZBIP 引物 0.8 μL、ZF3 引物 0.2 μL、ZB3 引物 0.2 μL、ZFLP 引物 0.4 μL、ZBLP 引物 0.4 μL、MgCl₂ 3 μL、Bst DNA 聚合酶 1.5 μL、模板 DNA 1 μL, 加 ddH₂O 至终体积为 20 μL。

2.4.2 扩增条件

用 PCR 管架固定 PCR 管后, 分别放置于 60、63、65 °C 的水浴槽中, 孵育 60 min, 然后再放置于 80 °C 水浴槽中孵育 10 min, 以失活 Bst DNA 聚合酶。以无菌双蒸水作为空白对照。LAMP 扩增结束后, 将产物进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分析。

2.4.3 产物的鉴定

取 1~5 μL 的 LAMP 反应产物加于含染料 Gelred 的 1% 琼脂糖凝胶上, 120 V, 电泳 20~30 min 左右, 紫外成像仪下观察并拍照。

2.5 LAMP-LFD 的建立

按照 2.4 的试验条件进行 LAMP 扩增。反应结束后, 分别取扩增产物 1 μL, 加入到 100 μL 的磷酸盐吐温缓冲液中, 混匀后取 60 μL 滴到胶体金试纸的样品层析垫上, 反应 10 min, 观察检测结果。以磷酸盐吐温缓冲液为阴性对照。

将 LAMP 扩增得到产物滴加到胶体金试纸上, 观察结果; 若只有质控线出现条带, 则样品中无 EHEC O157:H7; 若质控线和检测线均出现条带, 则样品中含有 EHEC O157:H7。

2.6 特异性试验

以 EHEC O157:H7 的 DNA 作为阳性对照模板, 选用 2.1 中菌株 DNA 为检测用模板, 应用 LAMP-LFD 进行检测, 以分析方法的特异性。同时, 应用琼脂糖电泳方法检测 LAMP 扩增产物进行比较。

2.7 敏感性试验

将 EHEC O157:H7 过夜培养物进行 10 倍比稀释, 浓

度为 1.3、1.3×10、1.3×10²、1.3×10³、1.3×10⁴、1.3×10⁵ CFU/mL, 按照细菌提取试剂盒说明书方法制备模板 DNA, 对应的 DNA 浓度为 0.5 pg/μL、5 pg/μL、50 pg/μL、500 pg/μL、5 ng/μL、50 ng/μL, 然后采用 2.4 中方法进行 LAMP-LFD 扩增和检测。

2.8 样品检测

2.8.1 样品采集

分装 35 mL 肉汤培养基到无菌自封袋, 手掌大小无菌海绵浸泡在培养基中, 采样备用。手持半湿润海绵于牛体两侧肩甲附近擦拭, 采样面积 30 cm×30 cm, 经过上下和左右方向来回 5 次的擦拭, 海绵重新放回含有培养基的自封袋中, 密封后暂存低温采样箱; 粪便采集, 主要是直结肠端残存粪便, 采样勺从离体的脏器中取出不少于 30 g 左右的粪便, 放于含有缓冲液的 50 mL 采样管中, 密封后暂存于低温采样箱中。

2.8.2 增菌

将 2.8.1 中的样品袋取出, 揉捏海绵 3~5 次, 确保海绵与肉汤培养基充分接触以挤压出最大量的样品, 然后吸取 1 mL, 常规方法提取 DNA, 进行 LAMP-LFD 检测。剩余液体吸取 25 mL 加入 225 mL 的 EC 肉汤中, 含有 20 μg/mL 的新生霉素, 41.5 °C 培养 6 h, 再吸取 1 mL 样品, 常规方法提取 DNA, 进行 LAMP-LFD 的检测。粪便样品处理同上, 吸取前确保粪便充分打散, 模板提取前, 首先去除大的颗粒。

2.8.3 样品的检测

运用成熟的 LAMP-LFD 扩增体系和扩增条件, 进行检测。同时运用前期建立的 EHEC O157:H7 二重 PCR 方法^[8]。

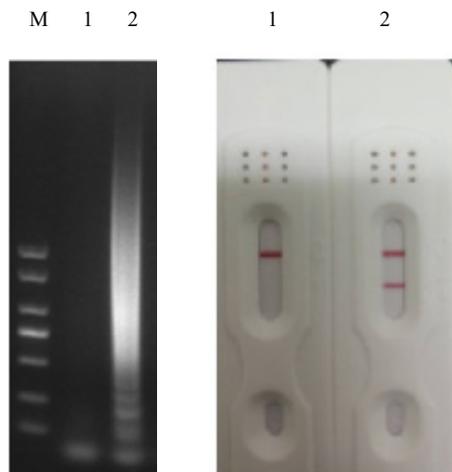
3 结果与分析

3.1 LAMP-LFD 检测方法的建立

对同一 LAMP 体系设置不同的温度和时间进行孵育, 发现 60 °C、60 min 条件下扩增效率最高, 经琼脂糖电泳分析扩增产物呈现阶梯状分布(图 1)。因此, 60 °C、60 min 条件为 LAMP 的最佳反应条件。取以 EHEC O157:H7 基因组 DNA 为模板获得的 LAMP 扩增产物 1 μL, 加入到 100 μL 的磷酸盐吐温缓冲液中, 混匀后取 60 μL 滴到胶体金试纸的样品层析垫上, 反应 10 min, 观察检测结果。检测阳性扩增产物的试纸条检测线和质控线均出现红褐色条带, 而阴性对照扩增产物只有质控线出现红褐色条带(图 1)。

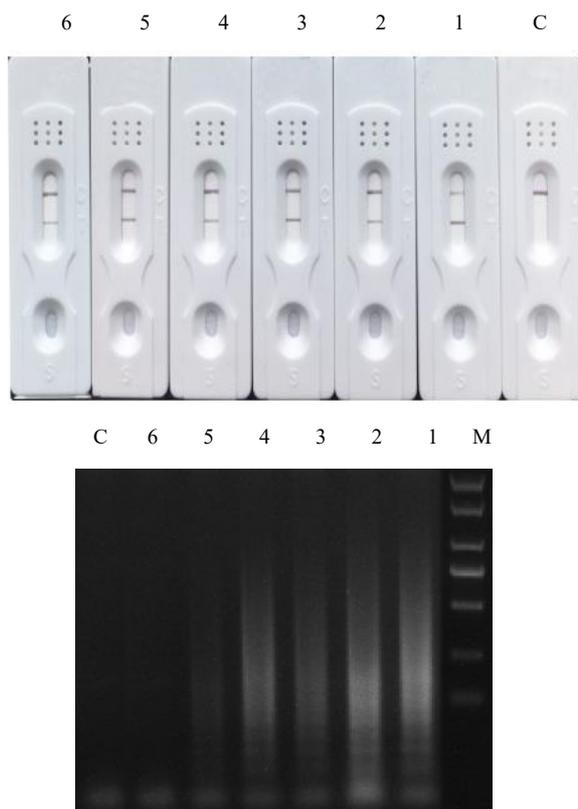
3.2 敏感性分析

LAMP 方法检测不同稀释浓度的 EHEC O157:H7 模板时, 1.3 CFU/mL 时仍然有清晰的条带, 同样用 LFD 检测时, 结果与琼脂糖凝胶电泳一样(图 2)。



注: M: DL2000 DNA 分子量标准; 1: 空白对照; 2: EHEC O157:H7 基因组 DNA 为模板获得的 LAMP 扩增产物。

图 1 横向流动试纸条(右图)和凝胶电泳(左图)检测 LAMP 扩增产物
Fig.1 Lateral flow test strip (right) and gel electrophoresis (left) for detection of LAMP amplification products



注: M: DL2000 DNA 分子量标准; C: 空白对照(模板为 ddH₂O); 1-6: EHEC O157:H7 基因组 DNA 为模板浓度分别为 1.3×10^5 CFU/mL、 1.3×10^4 CFU/mL、 1.3×10^3 CFU/mL、 1.3×10^2 CFU/mL、 1.3×10 CFU/mL、 1.3 CFU/mL 的 LAMP 扩增产物。

图 2 不同浓度模板 LAMP 扩增产物的横向流动试纸条(左图)和凝胶电泳检测(右图)

Fig.2 Lateral flow test strip (left) and gel electrophoresis (right) for detection LAMP amplification products from different concentrations EHEC O157: H7 genomic DNA

3.3 特异性分析

只有 EHEC O157:H7 能够扩增出梯状条带, 其他大肠杆菌血清型, 包括 O26、O145、O45、O121、O25、O78、O103、O111、O127、O138、O139、O141, 及 APEC (禽致病性大肠杆菌)E058、EPEC(肠致病性大肠杆菌)SEC627、EPEC SEC689、K12-MG1655、BL21, 和其他种属的细菌, 包括沙门氏杆菌、巴氏杆菌、粪链球菌、葡萄球菌、巨大芽孢杆菌、乳酸杆菌、绿脓杆菌、肺炎克雷伯杆菌、普通变形杆菌、奇异变形杆菌、阴沟肠杆菌、弗氏柠檬酸杆菌、痢疾志贺氏菌、福氏志贺氏菌 2a、普罗威登斯菌, 均不能扩增出相应的条带。

3.4 样品检测

从 2018 年 12 月至 2019 年 11 月, 江苏境内牛屠宰场采集胴体拭子 225 份、粪便样品 411 份。所有样品运用 LAMP-LFD 检测时, 增菌前样品的 EHEC O157:H7 阳性率为 0.63%(4/636), 并且全部为牛粪便样品; 增菌后检测阳性率为 10.06%(64/636); 其中胴体拭子阳性率为 3.1%(7/225); 粪便样品阳性率为 13.87%(57/411)。

将上述增菌后模板, 再运用 *rfbE*/*fliC* 二重 PCR 进行检测, 阳性率是 9.28%(59/636); 其中胴体拭子阳性率为 3.1%(7/225), 并且与 LAMP-LFD 样品编号一致; 粪便样品阳性率为 12.65%(52/411), 其中 5 个样品的检测为阴性。

4 结论与讨论

肠出血性大肠杆菌(EHEC)是一种可引起严重食源性疾病的细菌。O157:H7 是 EHEC 主要的致病血清型, 主要流行特点是: 病原菌生命力旺盛, 可以在 pH 值 2~3 的环境中生存^[9,10]; 对人的致病力强, 感染剂量低, 尤其是老人和幼儿^[11]; 病原菌的宿主范围广泛, 可以长期处于无症状带菌状态定植于所有温血动物体内; 人感染 EHEC O157:H7, 目前无有效防控措施, 一般多采用对症治疗^[12]。

反刍动物被认为是 EHEC O157:H7 最主要的储存宿主^[13,14]。感染动物主要通过排泄物污染环境、食物和水源, 并且长时间(长达数月, 有的甚至一年)在环境中存活。因此, 建立特异、敏感而便捷的检测技术很有必要, 以保证食品安全和人类健康。本研究以前期筛选的遗传标志性基因 *z3276* 为检测靶标^[14-17], 设计 3 对引物, 其中 2 条促环引物分别标记 FITC 和地高辛, 结合横向流动试纸条技术, 建立了 EHEC O157:H7 LAMP-LFD 快速检测方法, 1 h 内即可完成检测, 以期满足临床样品检测的需求。

目前国内文献报道中, *stx*^[18]、*eae*^[19]、*hly*^[20]等毒力基因多被作为检测 EHEC O157:H7 的靶基因, 但以上基因并非 EHEC O157:H7 菌株特有。*rfbE* 基因的序列高度保守, 编码 O157 的菌体抗原, 具有菌株的特异性, 但不能确定鞭毛型, 仍然需要再进一步的检测。正如我们前期建立的以

rfbE 和 *fliC* 为检测靶标的二重 PCR 方法^[9], 2 个基因全部正确才能确认为 O157:H7。本研究建立的 EHEC O157:H7 LAMP-LFD 检测方法, 选择病原菌的遗传标志性基因 *z3276* 为检测靶标, 只需要检测一个基因就能够确定 O157:H7 这个致病血清型。BLAST 分析显示, 基因 *z3276* 唯一存在于 EHEC O157:H7 染色体基因组中^[16,17], 与其他细菌基因组无显著交叉, 并且基因在病原菌中的拷贝数与志贺毒素基因基本相同^[17], 非常适合作为检测技术的候选基因。

本研究选用 32 个菌株验证 LAMP-LFD 的特异性, 只有血清型 O157:H7 扩增出梯状条带, 而其他血清型大肠杆菌和其他种属的细菌, 均无明显的扩增条带。同样以 *z3276* 基因建立的 MGB 荧光定量 PCR, 也只有 O157:H7 出现扩增曲线。所有结果表明, 以 *z3276* 建立的检测技术具有良好的特异性和实用性, 可用于样品中 O157:H7 的检测和初步鉴定。在临床样品检测使用过程中, LAMP-LFD 方法在检测敏感性方面明显优于二重 PCR, 粪便样品检测时, LAMP-LFD 的检出率为 13.87%(57/411), 相比二重 PCR 的 12.65%(52/411)高。这与国内外报道也一致, LAMP 的敏感性高于常规 PCR 方法, 并且单重 PCR 的敏感性也会相对多重 PCR 敏感性略高一些。

综上所述, 本文选择 EHEC O157:H7 的遗传标志性基因 *z3276* 基因序列为检测靶标建立了 LAMP-LFD 检测方法, 特异性和敏感性良好, 操作简便, 结果可视。

参考文献

- [1] Garimano N, Amaral MM, Ibarra C. Endocytosis, cytotoxicity, and translocation of Shiga toxin-2 are stimulated by infection of human intestinal (HCT-8) monolayers with an hypervirulent *E. coli* O157:H7 lacking *stx2* gene [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2019, 9: 396.
- [2] Bottichio L, Keaton A, Thomas D, et al. Shiga toxin-producing *E. coli* infections associated with romaine lettuce-United States, 2018 [J]. *Clin Infect Dis*, 2019, 12: 9.
- [3] Rhades LC, Larzábal M, Bentancor A, et al. A one-year longitudinal study of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 fecal shedding in a beef cattle herd [J]. *Res Vet Sci*, 2019, 127: 27–32.
- [4] GB 4789.36-2016 食品安全国家标准 大肠埃希氏菌 O157:H7/NM 检验[S].
GB 4789.36-2016 National food safety standard- *Escherichia coli* O157:H7/NM detection [S].
- [5] Notomi, T, Okayama H, Masubuchi H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA [J]. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28: E63.
- [6] Shan S, Lai W, Xiong Y, et al. Novel strategies to enhance lateral flow immunoassay sensitivity for detecting foodborne pathogens [J]. *J Agric Food Chem*, 2015, 63: 745–753.
- [7] Singh J, Sharma S, Nara S. Evaluation of gold nanoparticle based lateral flow assays for diagnosis of enterobacteriaceae members in food and water [J]. *Food Chem*, 2015, 170: 470–483.
- [8] 李丽, 张雪寒, 何孔旺, 等. EHEC O157:H7 二重 PCR 的建立及应用[J]. *华北农学报*, 2011, 26(6): 1–8.
Li L, Zhang XH, He KW, et al. Duplex PCR procedure for the detection of EHEC O157:H7 [J]. *Acta Agric Sin*, 2011, 26(6): 1–8.
- [9] Chung D, Cho TJ, Rhee MS. Citrus fruit extracts with carvacrol and

- thymol eliminated 7-log acid-adapted *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium*, and *Listeria monocytogenes*: A potential of effective natural antibacterial agents [J]. *Food Res Int*, 2018, 107: 578–588.
- [10] Lee SY, Kang DH. Survival mechanism of *Escherichia coli* O157:H7 against combined treatment with acetic acid and sodium chloride [J]. *Food Microbiol*, 2016, 55: 95e104.
- [11] Naghavi M, Wang H, Lozano R, et al. Global, regional, and national age-sex specific all cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990-2013: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013 [J]. *Lancet*, 2015, 385: 117–171.
- [12] Croxen MA, Law RJ, Scholz R, et al. Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli* [J]. *Clin Microbiol Rev*, 2013, 26: 822–880.
- [13] Chen Z, Biswas S, Aminabadi P, et al. Prevalence of *Escherichia coli* O157 and *Salmonella* spp. in solid bovine manure in California using real-time quantitative PCR [J]. *Lett Appl Microbiol*, 2019, 69(1): 23–29.
- [14] Zhang B, Sun X, Fan H, et al. The fimbrial gene *z3276* in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 contributes to bacterial pathogenicity [J]. *Front Microbiol*, 2018, 9: 1628.
- [15] 张碧成, 张雪寒, 孙小涵, 等. EHEC O157:H7 *z3276* 基因缺失株构建及其生物学特性[J]. *微生物学通报*, 2017, 44(12): 2958–2966.
Zhang BC, Zhang XH, Sun XH, et al. Construction of *z3276* gene knocked-out mutant for EHEC O157:H7 and preliminary study on its biological property [J]. *Bull Microbiol*, 2017, 44(12): 2958–2966.
- [16] 张碧成, 张雪寒, 何孔旺, 等. 大肠杆菌 O157:H7 独有基因 *z3276* 的表达及初步鉴定[J]. *中国兽医学报*, 2016, 36(8): 1312–1317.
Zhang BC, Zhang XH, He KW. Preliminary identification and expression expression of unique gene *z3276* of *Escherichia coli* O157:H7 [J]. *Chin J Veter Med*, 2016, 36(8): 1312–1317.
- [17] Li B, Chen JQ. Real-time PCR methodology for selective detection of viable *Escherichia coli* O157:H7 cells by targeting *z3276* as a genetic marker [J]. *Appl Environ Microbiol.*, 2012, 78(15): 5297–5304.
- [18] Aslan S, Altindis M, Kara R, et al. Detection and evaluation of *Escherichia coli* O157:H7 and shiga-toxin genes *stx1*, *stx2* in cattle meat samples [J]. *Clin Lab*, 2018, 64(11): 1–6.
- [19] Karimi F, Balazadeh N, Eftekhari-Sis B. 3' end of *eae* gene-based fluorescence DNA nanosensor for detection of *E. coli* O157:H7 [J]. *J Appl Genet*, 2019, 60(3–4): 417–426.
- [20] Kargar M, Homayoon M. Prevalence of shiga toxins (*stx1*, *stx2*), *eaeA* and *hly* genes of *Escherichia coli* O157:H7 strains among children with acute gastroenteritis in southern of Iran [J]. *Asian Pac J Trop Med*, 2015, (1): 24–28.

(责任编辑: 韩晓红)

作者简介



夏学峰, 硕士研究生, 主要研究方向为食源性病原菌分离、鉴定和遗传进化分析。
E-mail: 1371051390@qq.com



张雪寒, 博士, 研究员, 主要研究方向为食源性病原菌的防控技术和致病机制研究。
E-mail: liuxuehan1996@hotmail.com