

# 改良环介导等温扩增技术快速检测肉类中的 大肠杆菌 O157: H7

刘道亮 胡连霞\* 赵占民 孙晓霞 张峻峰

(河北出入境检验检疫局 河北 石家庄 050051)

**摘要:** 针对大肠杆菌 O157: H7 (*Escherichia coli* O157: H7, *E. coli* O157: H7) 传统检测方法检测周期长的问题, 建立了肉类中的 *E. coli* O157: H7 的改良环介导等温扩增(LAMP)快速检测方法。以 *E. coli* O157: H7 的 O157 特异性抗原 *rfbE* 基因、鞭毛 H7 特异性抗原 *fliC* 基因序列作为靶序列, 分别设计 2 套增加了环引物的改良 LAMP 引物序列, 单管同时检测, 通过肉眼观察白色沉淀, 判断检测结果。采用 36 株细菌验证了该改良 LAMP 引物的特异性。热裂解法提取的 DNA 经改良 LAMP 体系扩增 20 min, 检测 *E. coli* O157: H7 的灵敏度为 1.4 CFU/mL, 人工污染肉中的 *E. coli* O157: H7 检出限为 1.8 CFU/g。137 份实样中, 检测出 1 份 *E. coli* O157: H7 假阳性, 与行业标准 SNT0973-2000 符合率达到 99.3%。

**关键词:** 环介导等温扩增, LAMP, 检测, 大肠杆菌 O157: H7, 肉类

## Rapid detection of *Escherichia Coli* O157: H7 in meat using an improved loop-mediated isothermal amplification technology

LIU Dao-Liang HU Lian-Xia\* ZHAO Zhan-Min SUN Xiao-Xia ZHANG Jun-Feng

(Hebei Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Shijiazhuang, Hebei 050051, China)

**Abstract:** The detection period of *Escherichia coli* O157: H7 (*E. coli* O157: H7) using traditional testing methods is relatively long. Therefore a kind of rapid detection method, namely a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) technology with two loop primers detection *E. coli* O157: H7 in meat, was developed to address this problem. Two sets LAMP primers with loop primers were respectively designed based on the target sequences of *rfbE* and *fliC* genes of *E. coli* O157: H7. The detection results were judged by observing the white precipitate at simultaneous detection of single-tube. The specificity of the improved LAMP was verified using 36 strains of bacteria. DNA extracted by pyrolysis was amplified 20 min by the LAMP system. The detecting sensitivity of *E. coli* O157: H7 was 1.4 CFU/mL.

\* 通讯作者: Tel: 86-311-85981034; Fax: 86-311-85980550; ✉ hulianna168@tom.com  
收稿日期: 2010-11-12; 接受日期: 2010-12-27

The detection limit of *E. coli* O157: H7 from artificial contamination meat was 1.8 CFU/g. One false positive of 137 meat samples was detected, which can obtain compliance rate of 99.3% with the industry standard SNT0973-2000.

**Keywords:** Loop-mediated isothermal amplification, LAMP, Detection, *Escherichia coli* O157: H7, Meat

大肠杆菌 O157: H7 (*Escherichia coli* O157: H7) 是一类能引起严重食物中毒的致泻性大肠杆菌, 是出血性大肠杆菌的主要血清型<sup>[1]</sup>, 感染剂量极低, 在食入不足 5 个细菌就可引起疾病<sup>[2]</sup>。它除了引起腹泻、出血性肠炎外, 还可发生溶血性尿毒综合征 (Hemo-lyticuremic syndrome, HUS)、血栓性血小板减少性紫癜 (Thrombocytopenic purpura, TTP) 等严重的并发症<sup>[3]</sup>, 且后者病情发展快, 死亡率高, 给人民健康和社会造成严重危害, 自 1982 年美国首次被报告后, 在世界范围内得到普遍关注<sup>[4]</sup>。

国内外检测 *E. coli* O157: H7 的方法很多, 我国进出口食品对 *E. coli* O157: H7 目前采用的方法是以行业标准 SNT0973-2000 作为依据<sup>[5]</sup>。通过对样品增菌处理后, 进行平板划线, 然后挑取可疑菌落进行形态、染色及血清学试验、生化鉴定等进行判定。检测过程耗时长达 4-7 d, 难以适应快速检验的要求。本研究针对 *E. coli* O157: H7 的 O157 特异性抗原基因 (*rfbE* 基因)、鞭毛 H7 特异性抗原基因 (*fliC* 基因) 设计引物, 单管同时检测, 建立了肉类中的 *E. coli* O157: H7 改良 LAMP 快速检测方法, 其灵敏度高, 特异性好, 简便, 快速, 解决了传统检测方法耗时长、灵敏度低, 血清凝集有交叉反应等问题<sup>[6]</sup>, 对于及时有效应对食源性突发公共卫生事件具有重大意义。现将研究结果报道如下:

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 主要仪器设备:** 电热恒温水浴锅 DK-98-1 (天津市泰斯特仪器有限公司)、小型台式离心机 SIGMA1-14 (德国西格马公司)、恒温培养箱 LRH-150B (广东省韶关市鑫腾科普仪器有限公司)、凝胶成像系统 MINIBIS Pro (以色列 DNI 公司)、电泳仪 DYCP-31DN 型 (北京市六一厂生产)、微量移液器 0.5-1 000  $\mu$ L Finnpiptette (美国) 等。

**1.1.2 主要试剂:** BstDNA 聚合酶、dNTPs、10 $\times$ loading buffer、DNA Marker DL100、溴化乙锭、琼脂糖等购自于大连宝生物工程有限公司, LAMP 引物合成于上海英潍捷基 (上海) 贸易有限公司, mEC 肉汤、SMAC 琼脂、新生霉素、*E. coli* O157: H7 生化试剂鉴定套装购自北京陆桥技术有限责任公司, *E. coli* O157: H7 血清购自兰州生物制品研究所, 营养肉汤培养基, 营养琼脂培养基等购自北京路桥公司。

**1.1.3 菌株:** *E. coli* O157: H7 标准菌株 (ATCC43889)、*E. coli* O157: H7 (IQCL10102)、*E. coli* O157: H7 (EDL933)、*E. coli* O157: H7 (CMCC44828)、大肠艾希氏菌 (*E. coli* CGMCC 11229)、沙门氏菌 (*Salmonella* CMCC47005、CMCC50047、CMCC50083、CMCC50104)、阪崎肠杆菌 (*Enterobacter sakazakii* ATCC29544、ATCC51007、ATCC51024)、鲍氏志贺氏菌 (*Shigella boydii* CMCC51149)、痢疾志贺氏菌 (*Shigella dysenteriae* CMCC51054)、福氏志贺氏菌 (*Shigella flexneri* CMCC51061)、产气荚膜梭菌 (*Clostridium perfringens* CICC22949)、蜡样芽孢杆菌 (*Bacillus cereus* ATCC 7064)、绿脓杆菌 (*Pseudomonas aeruginosa* CMCC10104)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus* CGMCC26003)、单核细胞增生李斯特菌 (*L. monocytogenes* ATCC7644)。ATCC 购自美国菌种保藏中心; IQCL 购自中国检验检疫科学研究院; EDL 购自中国医学细菌保藏管理中心; CMCC 购自中国药检所; CGMCC 和 CICC 购自中国工业微生物菌种保藏中心。

*E. coli* O157: H7、6 株其它大肠杆菌血清型 (*E. coli* O6: K15、*E. coli* O20: K17、*E. coli* O<sub>144</sub>: K<sub>90</sub>、*E. coli* O<sub>128</sub>: K<sub>67</sub>、*E. coli* O<sub>125</sub>: K<sub>70</sub>、*E. coli* O<sub>124</sub>: K<sub>72</sub>)、蜡样芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、单核细胞增生李斯特菌 (*L. monocytogenes*)、弗氏柠檬酸杆菌 (*Citrobacter*

*freundii*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、副溶血性弧菌(*V. parahaemolyticus*)为本实验室分离保藏。

**1.1.4 样品来源:** 鸡肉、猪肉、羊肉、牛肉购自集贸市场和送检样品。

## 1.2 方法

**1.2.1 LAMP 引物的特异性分析:** 各取 1.1.3 中 36 株过夜培养菌悬液 1 mL, 直接用热裂解法提取其基因组 DNA 作为模板进行 LAMP 引物的特异性分析。

**1.2.2 LAMP 检测 *E. coli* O157: H7 (ATCC43889) 纯培养的灵敏性试验:** *E. coli* O157: H7 接种于新鲜无菌的营养肉汤培养基中, 37 °C 培养 12 h。用生理盐水进行 10 倍系列稀释, 采用稀释平板法, 测定其纯培养物活菌数为  $1.4 \times 10^8$  CFU/mL; 同时从每稀释度菌悬液中取 1 mL 直接用热裂解法提取 *E. coli* O157: H7 基因组 DNA, 进行 LAMP 灵敏度试验。

**1.2.3 人工污染 *E. coli* O157: H7 (ATCC43889) 检出限的确定:** 用 *E. coli* O157: H7 对牛肉样品进行人工污染前, 牛肉样品已按 SNT0973-2000 的常规检验法证实 *E. coli* O157: H7 阴性。取 10 g 牛肉样品于 90 mL 灭菌生理盐水中, 混匀, 人工加入 1 mL *E. coli* O157: H7 过夜培养菌悬液, 混匀, 用灭菌生理盐水进行 10 倍系列稀释, 采用稀释平板法计数得人工污染的牛肉样品混合液中 *E. coli* O157: H7 活菌数为  $1.8 \times 10^6$  CFU/g。同时从每稀释度混合液中取 1 mL, 直接用热裂解法提取 *E. coli* O157: H7 基因组 DNA, 进行 LAMP 检测, 确定检出限。

**1.2.4 DNA 模板的制备<sup>[7]</sup>:** 取样液 1 mL, 11 000 r/min 离心 1 min, 弃上清, 加入 100  $\mu$ L 灭菌去离子水悬浮沉淀, 重复操作一次, 100 °C, 10–15 min, 冷却至室温, 11 000 r/min 离心 1 min, 取上清, 4 °C 冷藏保存, 备用。

**1.2.5 引物设计:** 针对 *E. coli* O157: H7, GenBank: S83460.1 编码 O157 抗原的 *rfbE* 基因序列和 GenBank: AF228487.1 编码鞭毛 H7 特异性抗原的 *fliC* 基因序列, 运用引物设计软件(<https://primerexplorer.jp/lamp3.0.0/index.html>) 在线进行 LAMP 引物设计。引物设计的原则如 notomietal<sup>[8]</sup>所述。设计的 6 对引物是: 2 个外引物被描述为上游外引物(F3)和下游外

引物(B3)。2 个内引物被描述为上游内引物(FIP)和下游内引物(BIP)。此外, 2 个环引物被描述为上游环引物(LF)和下游环引物(LB)。两套 LAMP 引物的名称和具体序列见表 1 和表 2。

表 1 *E. coli* O157: H7 *rfbE* 基因 LAMP 引物序列  
Table 1 The LAMP primers of *E. coli* O157: H7 *rfbE*

Primer name	Sequence (5'→3')
Forward outer (F3)	GATGGTCTCAATTCTAACTAGG
Backward outer (B3)	GCTCATTCGATAGGCTGG
Forward inner primer (FIP)	TAAAAAACTGGCCTTGTTCACCGCAG AGGAAAGAGAG
Backward inner primer (BIP)	ACACGATGCCAATGTACTCTAAATTAAT TCCACGCCA
Forward loop primer (LF)	GAGTTTATCTGCAAGGTGATTCTCT
Backward loop primer (LB)	GCACCCTATAGCTGAGGATCTTGGT

表 2 *E. coli* O157: H7 *fliC* 基因 LAMP 引物序列  
Table 2 The LAMP primers of *E. coli* O157: H7 *fliC*

Primer name	Sequence (5'→3')
Forward outer (F3)	CTGTCTTCTGGCTTGCGTAT
Backward outer (B3)	GTCCAGGTCAGAATCGGAGT
Forward inner primer (FIP)	CCGCCTGAGTCAGGCCTTTAATTAACA GCGCGAAGGATGAC
Backward inner primer (BIP)	GTTGCGCAGACCACCGAAGGAACCGT CAGTTCACGAA
Forward loop primer (LF)	AGAAGTAAAACGGTTAGCAATCGCC
Backward loop primer (LB)	CCGAAATCAACAACAACCTTACAGCG

**1.2.6 改良 LAMP 反应:** 分别优化引物浓度、 $Mg^{2+}$ 、Bst DNA 聚合酶、dNTPs、甜菜碱、反应温度、反应时间等条件, 建立 *E. coli* O157:H7 LAMP 检测 25  $\mu$ L 反应体系为: 内引物(FIP 和 BIP)各 1.6  $\mu$ mol/L, 外引物(F3 和 B3)各 0.2  $\mu$ mol/L, 环引物(LF 和 LB)各 0.8  $\mu$ mol/L, 2.5 mmol/L dNTPs, 1.6 mol/L 甜菜碱 (Sigma, St. Louis, Mo.), 4 mmol/L  $MgSO_4$ , 10 $\times$ Bst DNA 聚合酶反应缓冲液(New England Biolabs, MA) [20 mmol/L Tris-HCl (pH 8.8), 10 mmol/L KCl, 10 mmol/L  $(NH_4)_2SO_4$ , 2 mmol/L  $MgSO_4$ , 0.1% Triton X-100], 8 U 的 Bst DNA 聚合酶(New England Biolabs, Beverly, MA), 3  $\mu$ L DNA 模板和用灭菌双蒸水补足体系。LAMP 反应过程是首先在 63 °C 水浴

锅中反应 20 min, 然后将其放入 80 °C 水浴锅中, 水浴 10 min 终止反应, 通过肉眼观察有无白色焦磷酸镁沉淀。此外, 取扩增产物 5 μL, 与 1 μL 的 Loading buffer 混合均匀, 进行 1.5%琼脂糖凝胶电泳, 观察梯形条带, 以证实是否发生了 LAMP 反应。

2 结果与分析

2.1 *E. coli* O157: H7 改良 LAMP 反应

*rfbE* 基因是合成 O157 菌体抗原的特异酶基因, *fliC* 基因是 H7 鞭毛特异性抗原基因, 即 LAMP 检测 *rfbE* 基因和 *fliC* 基因, 同时为阳性, 才判定结果为阳性。目的基因被扩增的同时伴随白色焦磷酸镁沉淀产生, 扩增 20 min 的可视结果如图 1 所示。目的基因被扩增生成大小不一的 DNA 片段混合物, 其电泳呈现典型的梯形条带, 如图 2 所示。

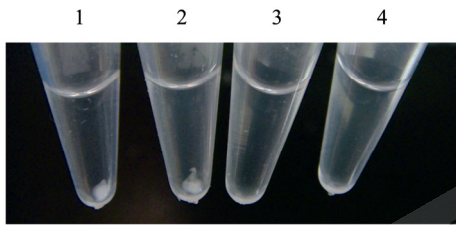


图 1 改良 LAMP 反应的可视结果

**Fig. 1 The visual results of the improved LAMP reaction**  
Note: 1: Positive result of *rfbE*; 2: Positive result of *fliC*; 3: Negative control of *rfbE*; 4: Negative control of *fliC*.

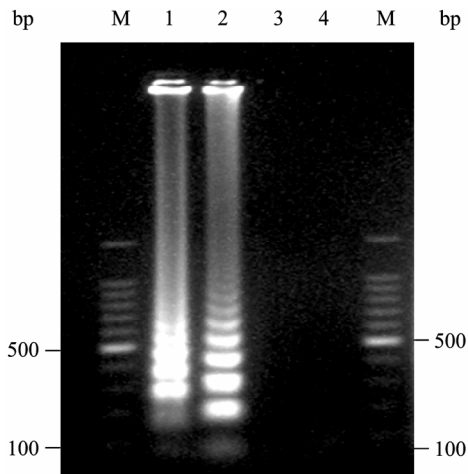


图 2 改良 LAMP 反应的电泳分析

**Fig. 2 The electrophoretic analysis of the improved LAMP reaction**  
Note: M: 100 bp DNA ladder marker; 1: Positive result of *rfbE*; 2: Positive result of *fliC*; 3: Negative control of *rfbE*; 4: Negative control of *fliC*.

2.2 改良 LAMP 引物的特异性

采用改良 LAMP 方法对 6 株不同来源 *E. coli* O157: H7 及 12 种 30 株食源性肠道细菌进行检测, 除 *E. coli* O157: H7 菌株扩增 20 min 两管都产生肉眼可见的白色沉淀为阳性外, 其他细菌检测均未产生肉眼可见的白色沉淀, 均为阴性。统计结果如表 3 所示, 表明本实验建立的改良 LAMP 检测方法对 *E. coli* O157: H7 有很好的特异性。

表 3 改良 LAMP 引物的特异性				
Table 3 The specificity of the improved LAMP primers				
菌株 Strain	数量 Quantity	LAMP 检测结果 <i>rfbE</i>	LAMP test results <i>fliC</i>	结果判定 Results determined
<i>E. coli</i> O157: H7 (IQCL10102、CMCC44828、EDL933)	3	+	+	+
<i>E. coli</i> (CGMCC11229、O6: K15、O20: K17、O144: K90、O128: K67、O125: K70、O124: K72)	7	—	—	—
<i>Salmonella</i> (CMCC47005、CMCC50047、CMCC50083、CMCC50104)	4	—	—	—
<i>Enterobacter sakazakii</i> (ATCC29544、ATCC51007、ATCC51024)	3	—	—	—
<i>Shigella</i> (CMCC51061、CMCC51054、CMCC51149)	3	—	—	—
<i>Clostridium perfringens</i> (CICC22949)	1	—	—	—
<i>Bacillus cereus</i> (ATCC7064)	1	—	—	—
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (CMCC10104)	1	—	—	—
<i>Staphylococcus aureus</i> (CGMCC26003)	1	—	—	—
<i>L. monocytogenes</i> (ATCC7644)	1	—	—	—
<i>Citrobacter freundii</i>	1	—	—	—
<i>Bacillus subtilis</i>	1	—	—	—
<i>V. parahaemolyticus</i>	1	—	—	—

注: +: 阳性结果; —: 阴性结果。  
Note: +: Positive result; —: Negative result.

## 2.3 LAMP 检测的敏感性

**2.3.1 改良 LAMP 检测 *E. coli* O157: H7 纯培养物的灵敏度:** *E. coli* O157: H7 菌悬液, 采用稀释平板法, 计数测得原菌液活菌数为  $1.4 \times 10^8$  CFU/mL, 在稀释到  $10^9$  倍( $1.4 \times 10^{-1}$ )时 LAMP 扩增 20 min, *rfbE* 基因仍出现沉淀, 电泳仍有梯形条带。而 *fliC* 基因已无沉淀出现, 电泳也无梯形条带; 而稀释到  $10^{10}$  倍( $1.01 \times 10^{-2}$ )时 *rfbE* 基因、*fliC* 基因均未出现沉淀, 电泳也均无梯形条带。即检测 *E. coli* O157: H7 的灵敏度达到 1.4 CFU/mL, 琼脂糖凝胶电泳如图 3 所示。

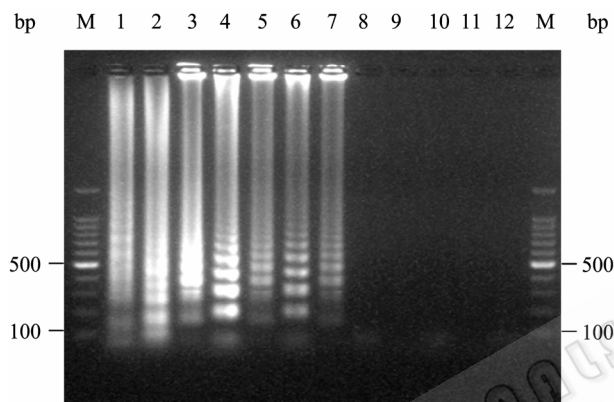


图 3 改良 LAMP 检测 *E. coli* O157: H7 的灵敏度

**Fig. 3 The sensitivity of the improved LAMP for detection of *E. coli* O157: H7**

Note: M: 100 bp DNA ladder marker; 3, 5, 7, 9:  $1.4 \times 10^1$ ,  $1.4 \times 10^{-1}$ ,  $1.4 \times 10^{-2}$  CFU/mL of *E. coli* O157: H7 for detection *rfbE*, respectively; 4, 6, 8, 10:  $1.4 \times 10^1$ ,  $1.4 \times 10^{-1}$ ,  $1.4 \times 10^{-2}$  CFU/mL of *E. coli* O157: H7 for detection *fliC*, respectively; 1: Positive result of *rfbE*; 11: Negative control of *rfbE*; 2: Positive result of *fliC*; 12: Negative control of *fliC*.

**2.3.2 人工污染样品的检出限:** *E. coli* O157: H7 (ATCC43889) 人工污染样品后, 采用稀释平板法, 计数测得人工污染样品的 *E. coli* O157: H7 活菌数为  $1.8 \times 10^6$  CFU/g。在稀释到  $10^7$  倍( $1.8 \times 10^{-1}$ )时 LAMP 扩增 20 min, *rfbE* 基因仍出现沉淀, 电泳仍有梯形条带。而 *fliC* 基因已无沉淀出现, 电泳也无梯形条带; 而稀释到  $10^8$  倍( $1.8 \times 10^{-2}$ )时, *rfbE* 基因和 *fliC* 基因均未出现沉淀, 电泳也均无梯形条带。即改良 LAMP 检测人工污染肉中 *E. coli* O157: H7 的检出限是 1.8 CFU/g, 琼脂糖凝胶电泳如图 4 所示。

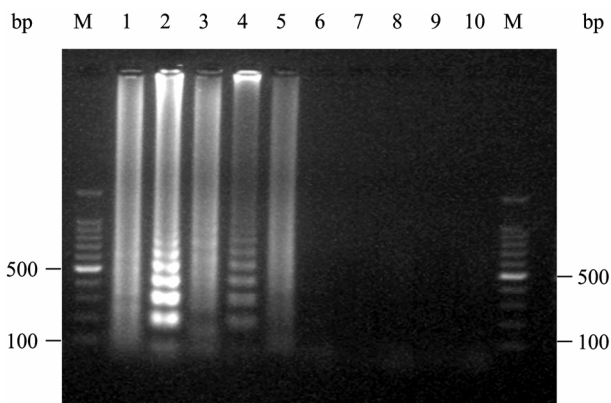


图 4 改良 LAMP 检测肉类中 *E. coli* O157: H7 的检出限  
**Fig. 4 The detection limit of improved LAMP for detection of *E. coli* O157: H7 in meat**

Note: M: 100 bp DNA ladder marker; 3, 5, 7:  $1.8 \times 10^{-1}$ ,  $1.8 \times 10^{-2}$  CFU/g of *E. coli* O157: H7 in meat for detection *rfbE*, respectively; 4, 6, 8:  $1.8 \times 10^{-1}$ ,  $1.8 \times 10^{-2}$  CFU/g per reaction, respectively; 1: Positive result of *rfbE*; 9: Negative control of *rfbE*; 2: Positive result of *fliC*; 10: Negative control of *fliC*.

## 2.4 肉类样品检测

肉类样品共 137 份, 分别为鸡肉 25 份, 猪肉 31 份, 羊肉 36 份, 牛肉 45 份。对实际样品同时进行改良 LAMP 检测和依据 SNT0973-2000 进行常规检测, 检出一份样品 *E. coli* O157: H7 假阳性, 结果证明, 两种方法符合率达到 99.3%。

## 3 讨论

环介导的等温扩增技术(Loop-mediated Isothermal Amplification, LAMP)是一种新的核酸等温扩增技术<sup>[9]</sup>。其原理是针对目的片段上的 6 个位点设计 4 条引物, 在 BstDNA 聚合酶的作用下, 将目的片段在等温条件下( $60^\circ\text{C}$ – $65^\circ\text{C}$ )进行扩增, 通过浊度仪或者肉眼直接观察扩增过程中有无白色焦磷酸镁沉淀产生<sup>[10]</sup>, 来判定有无扩增发生。增加环引物的环介导等温扩增方法, 使反应速度可提高  $1/2$ – $1/3$ <sup>[11]</sup>, 缩短检测时间。

*E. coli* O157: H7 主要靶基因有 *stx1*、*stx2*、*eaeA*、*rfbE*、*hly*、*uidA*、*fliC* 等<sup>[12–14]</sup>。对于血清型较复杂的 *E. coli* O157: H7, 检测单一靶基因容易出现假阳性, 特异性差, 具有一定的局限性。由于外环境中存在大量菌体抗原 O157 和鞭毛抗原非 H7 的大肠埃希菌<sup>[15]</sup>, 而且这些菌株的致病性与 H7 血清型菌株有

很大差别, 因此, 本研究选用 *E. coli* O157: H7 的 O157 所独有的抗原特异性基因 *rfbE* 与 H7 鞭毛抗原基因 *fliC*, 分别设计选择出合理的 LAMP 引物序列, 两基因单管检测同时进行, 直接报告 *E. coli* O157: H7 血清型, 比文献报道<sup>[16]</sup>的实时 PCR 的灵敏性高 1 个数量级, 与日本 Yukiko 等<sup>[17]</sup>对 *E. coli* O157: H7 的 Vero 毒素进行 LAMP 检测的报道相一致, 而且加入环引物后扩增时间从 60 min 缩至 20 min。因此, 本研究建立的 *E. coli* O157: H7 改良 LAMP 快速检测技术, 将为重大食源性疾病的诊断治疗和流行病学调查提供强有力的技术手段, 具有较强的实际应用价值和良好的应用前景。

## 参 考 文 献

- [1] Griffin PM, Tauxe RV. The epidemiology of infections caused by *Escherichia Coli* O157: H7, other enterohemorrhagic *E. coli*, and the associated hemolytic uremic syndrome[J]. Epidemiologic Rev, 1991, 13(1): 60-98.
- [2] Paton AW, Paton JC. Detection and characterization of shiga toxinogenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for *stx1*, *stx2*, *eaeA*, enterohemorrhagic *E. coli* *hlyA*, *rfbO111* and *rfbO157*[J]. J Clin Microbiol, 1998, 36(2): 598-602.
- [3] Caprioli J, Peng L, Remuzzi G. The hemolytic uremic syndromes[J]. Curr Opin Crit Care, 2005, 11(5): 487-492.
- [4] Reilly A. Prevention and control of enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) infections: memorandum from a WHO meeting. WHO Consultation on Prevention and Control of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) Infections[J]. Bull World Health Organ, 1998, 76(3): 245-255.
- [5] 中华人民共和国上海出入境检验检疫局. SN/T 0973-2000, 进出口肉及肉制品中肠出血性大肠杆菌 O157: H7 检验方法[S]. 北京: 中华人民共和国出入境检验检疫局, 2000.
- [6] Kehl SC. *Escherichia coli* O157: H7 Diarrhea in the United States: Clinical and Epidemiologic Features[J]. J Clin Microbiol, 2002, 40(8): 2711-2715.
- [7] 杨洋, 张伟, 袁耀武, 等. 用于 PCR 检测的乳品中金黄色葡萄球菌 DNA 提取方法比较研究[J]. 食品与发酵工业, 2005, 31(9): 91-95.
- [8] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. Nucleic Acids Rev, 2000, 28(12): e63.
- [9] Eiken Chemical Co., Ltd. The principles of LAMP method[EB/OL]. <http://loopamp.eiken.co.jp/e/lamp/index.html>. 2003.
- [10] Mori Y, Nagamine K, Tomita N, et al. Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. Biochem Biophys Res Commun, 2001, 289(1): 150-154.
- [11] Nagamine K, Hase T, Notomi T. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. Molecular Cell Probes, 2002, 16(3): 223-229.
- [12] 朱文冠, 薛素强, 洪洁心, 等. 多重 PCR 方法检测大肠杆菌 O157:H7 的初步研究[J]. 中国人兽共患病学报, 2006, 22(5): 428-432.
- [13] 吴家林, 肖勇, 凌霞, 等. 肠出血性大肠杆菌 O157:H7 多重 PCR 快速检测研究[J]. 现代预防医学, 2009, 36(1): 117-119.
- [14] Fortin NY, Mulchandani A, Chen W. Use of real-time polymerase chain reaction and molecular beacons for the detection of *Escherichia coli* O157:H7[J]. Anal Biochem, 2001, 289(2): 281-288.
- [15] 朱文冠, 杨德胜, 郭霄峰. 大肠杆菌 O157:H7 *rfbE* 基因和 *fliC* 基因的克隆与序列分析[J]. 中国动物检疫, 2005, 22(9): 22-24.
- [16] 张建华, 陆群英, 程苏云, 等. 实时 PCR 在大肠杆菌 O157: H7 快速检测中的应用[J]. 中国人兽共患病学报, 2007, 23(8): 839-841.
- [17] Hara-Kudo Y, Nemoto J, Ohtsuka K, et al. Sensitive and rapid detection of Vero toxin-producing *Escherichia coli* using loop-mediated isothermal amplification[J]. Journal of Medical Microbiology, 2007, 56(3): 398-406.