

实验技术与方法

出血性大肠埃希菌 O157:H7 可视化和实时荧光 RPA 检测方法的比较

徐颖¹, 庄国栋², 王丽丽¹, 滕新栋¹

(1. 青岛国际旅行卫生保健中心, 山东青岛 266000; 2. 中华人民共和国黄岛海关口岸监管处, 山东青岛 266000)

摘要:目的 以检测出血性大肠埃希菌(EHEC)O157:H7为目的,基于重组酶聚合酶扩增(RPA)技术,分别建立可视化 RPA 检测方法和实时荧光 RPA 检测方法。方法 根据出血性大肠埃希菌 O157:H7 的 *rfbE* 基因设计引物和探针,进行特异性、灵敏度检测,建立实时荧光 RPA 检测方法。结合 SYBR Green I 在核酸反应中的颜色变化特征,设计可视化 RPA 检测方法。结果 建立的实时荧光 RPA 检测方法和可视化 RPA 检测方法,分别在 35 °C 时反应不超过 25 min 即可检测 EHEC O157:H7。设计的引物和探针仅对 EHEC O157:H7 出现特异性结果。两种检测方法的检测限低于 10⁻⁵ ng/μL。结论 EHEC O157:H7 的可视化 RPA 检测方法和实时荧光 RPA 检测方法操作简便,且特异性强、敏感性高,可为 EHEC O157:H7 的现场快速检测和实验室检测提供新方法。

关键词:重组酶聚合酶扩增技术;出血性大肠埃希菌 O157:H7;可视化 RPA;显色反应;实时荧光 RPA;检测方法;食源性致病菌

中图分类号:R155 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2024)01-0026-06

DOI:10.13590/j.cjfh.2024.01.005

Visualization and real-time fluorescence RPA detection methods for enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7

XU Ying¹, ZHUANG Guodong², WANG Lili¹, TENG Xindong¹

(1. Qingdao International Travel Health Care Center, Shandong Qingdao 266000, China; 2. Huangdao Customs Port Administration of the People's Republic of China, Shandong Qingdao 266000, China)

Abstract: Objective To detect enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) O157:H7, visualization recombinant enzyme polymerase amplification (RPA) detection and real-time fluorescence RPA detection methods were established based on RPA technology. **Methods** Primers and probes were designed based on the *rfbE* gene of EHEC O157:H7, and specificity and sensitivity were determined. A real-time fluorescent RPA method was established. Combined with the color change characteristics of SYBR Green I in nucleic acid reactions, a visualization RPA method for the detection of EHEC O157:H7 was established. **Results** The established real-time fluorescence RPA detection and visual RPA detection methods both detected EHEC O157:H7 in 25 min at a reaction temperature of 35 °C. The designed primers and probes showed specific results only for EHEC O157:H7. The detection limits of the two methods were lower than 10⁻⁵ ng/μL. **Conclusion** The visual RPA detection and real-time fluorescence RPA detection methods of EHEC O157:H7 were easy to operate with strong specificity and high sensitivity. This study provides novel methods for the rapid detection of EHEC O157:H7 in the field and laboratory.

Key words: Recombinant enzyme polymerase amplification technology; enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7; visualization RPA; chromogenic reaction; real-time fluorescence RPA; detection method; foodborne pathogenic

出血性大肠埃希菌(Enterohemorrhagic *Escherichia coli*, EHEC)O157:H7 是肠出血性大肠杆菌常见的

血清型,世界各地都有不同规模的 EHEC O157:H7 爆发和流行^[1-2],全球每年约有 280 万人感染^[2],因此 EHEC O157:H7 受到各国的重点关注。EHEC O157:H7 主要经食物和水传播^[3],感染后可以引起患者腹泻、出血性结肠炎、溶血性尿毒综合征,甚至死亡,死亡率可以达 5%~10%。EHEC O157:H7 的致病性强且致病量很低,食入不足 10 个细菌就能致病^[4-5]。此外 EHEC O157:H7 的生存能力强、自然分

收稿日期:2022-11-14

基金项目:山东省重点研发计划(2021CXCG011306)

作者简介:徐颖 女 硕士研究生 研究方向为病原检测和微生物学检测 E-mail:261660636@qq.com

通信作者:滕新栋 男 副主任医师 研究方向为媒介鉴定和病原检测 E-mail:17853278290@139.com

布广泛,集体食堂的肉和肉制品、冷菜、凉菜、奶和奶制品、蛋和蛋制品、蔬菜、水果和饮料等均有分布,且可以在环境和食物中长期存在^[6]。EHEC O157:H7 的感染机制尚未研究清楚,临床缺乏有效的治疗方法^[7]。因此建立快速、灵敏的检测 EHEC O157:H7 方法,对维护食品安全、预防食源性疾病传播具有重要意义。

重组酶聚合酶技术(Recombinase enzyme polymerase amplification, RPA)是由 PIEPENBURG 等^[8]在 2006 年首次提出的一种新型等温核酸扩增技术。RPA 技术的优势在于能够在 37 °C 左右的恒温条件下,扩增 15~30 min 获得足够的目的片段^[9],且灵敏度和 PCR 技术一致。RPA 近年来发展迅速,已被应用于多种病原菌检测^[10],例如在海产品中检测副溶血性弧菌^[11],在尿液中检测大肠杆菌、奇异变形杆菌、铜绿假单胞菌和金黄色葡萄球菌^[12],食品中检测沙门菌^[13]等。EHEC O157:H7 作为高致病性病原菌之一,是食品安全监管部门风险监测重点关注的食源性致病菌。RPA 技术可以克服传统方法耗时长、操作繁琐和昂贵仪器等缺点,在基层实验室和现场环境条件下有望实现对 EHEC O157:H7 高效、灵敏的快速检测。本研究根据 EHEC O157:H7 的 *rfbE* 基因保守序列,设计 RPA 检测引物和探针,建立实时荧光 RPA 检测方法;同时运用 SYBR Green I 作为核酸显色剂,建立可视化 RPA 检测方法,不需要复杂的仪器设备且操作简单、灵敏度高,可为食品卫生监督和食源性疾病暴发现场快速检测提供新的技术手段。

1 材料与方法

1.1 菌株

志贺菌标准菌株(*Shigella flexneri* ATCC 12022)、肠炎沙门菌标准菌株(*Salmonella enteritidis* ATCC 15611)、EHEC O157:H7 标准菌株(*Enterohemorrhagic Escherichia coli* O157:H7 ATCC 43889)、副溶血性弧菌标准菌株(*Vibrio parahaemolyticus* ATCC 17802)、粪肠球菌标准菌株(*Enterococcus faecalis* ATCC 29212)均来自青岛海关技术中心实验室保存菌株。

1.2 主要仪器与试剂

紫外凝胶成像仪、电泳仪、PCR 热循环仪(美国 BioRad 公司),核酸蛋白检测仪(北京 Merinton 公司),QuantStudio 3 荧光定量 PCR 仪(美国 Thermo Fisher 公司)。

细菌核酸提取试剂盒、PCR 扩增试剂盒、DNA Marker、DNA Buffer、电泳级琼脂糖(上海生工生物工程股份有限公司),RPA 基础扩增试剂盒、RPA

exo 扩增试剂盒(英国 TwistDX 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 细菌基因组 DNA 提取

按细菌核酸提取试剂盒的使用说明对志贺菌、沙门菌、副溶血性弧菌、粪肠球菌、EHEC O157:H7 的标准菌株菌液进行 DNA 提取,使用核酸蛋白检测仪对 DNA 纯度及浓度进行测定,用纯水稀释核酸浓度至 100 ng/ μ L, -20 °C 保存备用。

1.3.2 引物设计

从 NCBI 数据库中检索到 EHEC O157:H7 的 *rfbE* 基因序列,比对后选择相对保守区域,利用 Primer Premier 5.0 软件,参照 TwistDx 公司说明书设计引物,引物由上海生工生物工程股份有限公司合成。

以 EHEC O157:H7 标准菌株的基因组 DNA 为模板,根据 RPA 基础扩增试剂盒说明书推荐方法,配制 RPA 基础扩增体系 50 μ L: 10 μ mol/L 引物各 2.4 μ L, Primer Free Rehydration buffer 29.5 μ L, DNA 模板 13.2 μ L,最后加入 280 mmol/L 醋酸镁 2.5 μ L, 300 r/min 离心 15 s。37 °C 下反应扩增 40 min。扩增完成后,制备 1.5%~2% 浓度的琼脂糖凝胶, 3~5 V/cm 恒压电泳 20~40 min,电泳检测结果用凝胶成像分析系统记录并保存。

1.3.3 RPA 反应的建立及优化

将 RPA 基础扩增体系分别在 4、15、25、35、45 °C 下扩增 20 min,以检测扩增效率最好的温度为最佳反应温度。

1.3.4 RPA 反应的特异性检测

将志贺菌、EHEC O157:H7、沙门菌、副溶血性弧菌、粪肠球菌 5 种标准菌株菌液按照 1:1:1:1:1 混合,按细菌核酸提取试剂盒要求分别提取 DNA,配制 RPA 基础扩增体系,反应管加入 35 °C 的加热块中反应扩增 20 min,检测 RPA 反应的特异性。

1.3.5 RPA 反应的灵敏性检测

检测并调整 EHEC O157:H7 基因组 DNA 浓度,按照 10 倍的倍比稀释,直至核酸浓度为 100、10、1、 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} ng/ μ L。使用上述核酸作为模板,配制 RPA 基础扩增体系,反应管加入 35 °C 的加热块中反应扩增 20 min。同时参照标准 WS 271—2007《感染性腹泻诊断标准》^[14],配制 PCR 反应体系检测上述核酸,检测引物为: O157-F: 5'-TTCAAACAGAGGACCATC-3', O157-R: 5'-CCCAGC CACTAAGTATTG-3',目标扩增产物长度为 636 bp。

1.3.6 可视化 RPA 检测方法的建立及优化

为确定 RPA 检测的最短有效反应时间,将 EHEC O157:H7 基因组 DNA 13.2 μ L 作为模板,配制 RPA 基础扩增体系,反应管在 35 °C 下分别扩增

4、6、8、10、12 min。

选择 SYBR Green I 作为 PRA 产物检测的显色剂,反应管加入 35 °C 的加热块中反应扩增 10 min,结束后在管中分别加入 1.25 μL SYBR Green I (100×)、0.5 μL SYBR Green I (1 000×)、1 μL SYBR Green I (1 000×)、2 μL SYBR Green I (1 000×)、4 μL SYBR Green I (1 000×),充分混匀,室温放置 10 min 充分反应观察颜色变化。

1.3.7 RPA 反应可视化检测方法的灵敏度检测

采用核酸浓度为 100、10、1、10⁻¹、10⁻²、10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵ ng/μL 的 EHEC O157:H7 基因组 DNA 作为模板,配制 RPA 基础扩增体系,RPA 反应管加入 35 °C 的加热块中反应扩增 10 min。反应结束后,反应管中加入 2 μL 的 SYBR Green I (1 000×),充分混匀后室温放置 10 min 充分反应观察颜色变化。

1.3.8 实时荧光 RPA 检测方法的建立及特异性、灵敏性检测

根据筛选得到的最佳引物及扩增片段,设计 exo 探针, O157-probe: CATAGGCAATATTGGCATGAC GTTATAGGC (FAM-dT) A (THF) AA (BHQ-dT) TAT AGGATGACAAATA。根据 RPA exo 扩增试剂盒说明书推荐方法,配制 RPA 实时荧光扩增反应体系 50 μL:10 μmol/L 引物各 2.1 μL,10 μmol/L exo 探针 0.6 μL,Primer Free Rehydration buffer 29.5 μL,DNA 模板 13.2 μL,混匀后加入 Twist Amp 反应管,吹打混匀至所有颗粒溶解,加入 2.5 μL 的 280 mmol/L 醋酸镁,充分混匀后 300 r/min 离心 15 s,放入到荧光定量 PCR 仪中进行检测,检测程序设置为 35 °C 预热 1 min,35 °C 30 s,循环 30 次,每个循环自动采集荧光。

以志贺菌、EHEC O157:H7、沙门菌、副溶血性弧菌、粪肠球菌基因组 DNA 作为模板,配制 RPA 实时荧光扩增反应体系,检测实时荧光 RPA 方法的特异性。采用核酸浓度为 100、10、1、10⁻¹、10⁻²、10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵ ng/μL 的 EHEC O157:H7 基因组 DNA 作为模板,配制 RPA 实时荧光扩增反应体系,检测实时荧光 RPA 方法的灵敏性。

2 结果

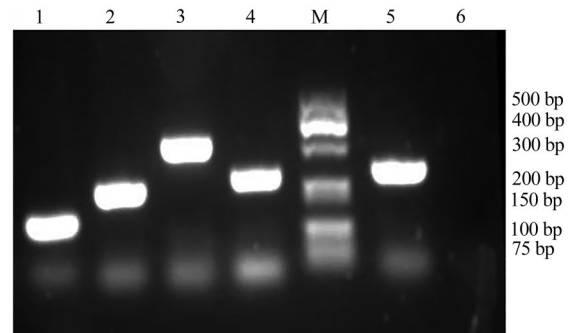
2.1 引物设计验证

选出 5 对可扩增出 *rfbE* 基因序列的引物及扩增产物长度见表 1,RPA 扩增的结果见图 1,结果显示所设计引物的扩增条带与目的条带大小一致,且扩增条带单一、清晰、无弥散、无拖尾,可以用于 RPA 检测体系。根据 TwistDX 公司的 RPA 说明书建议,实时荧光 RPA 的引物扩增产物长度最好不超过 200 bp,且需要从目的片段中设计符合要求的

RPA 探针。第 2 对引物的扩增产物长度为 191 bp 的,目的片段中能够筛选得到 RPA 探针,因此更适合同时作为 RPA 反应可视化检测和实时荧光 RPA 的特异性引物。

表 1 EHEC O157:H7 的 RPA 扩增引物
Table 1 RPA amplification primers of EHEC O157:H7

引物	引物序列(5'-3')	扩增产物长度/bp
1	F1: ATTCTAACTAGGACCGCAGAGGAAAGAGAGGAA R1: AGTACATTGGCATCGTGTGGACAGGGTAAA	109
2	F2: AACTATTACTACAGGTGAAGGTGGAATGGT R2: AATCATCAGCTTGTCTAACTGGGCTAATC	191
3	F3: AACTATTACTACAGGTGAAGGTGGAATGGT R3: TTCCTCTGCGGTCTAGTTAGAAATTGAGAC	325
4	F4: TGGCATGACGTTATAGGCTACAATTATAGG R4: TTCCTCTGCGGTCTAGTTAGAAATTGAGAC	219
5	F5: TGGCATGACGTTATAGGCTACAATTATAGG R5: GGTGATTCTTAATTCCTCTCTTTCCTCTG	241



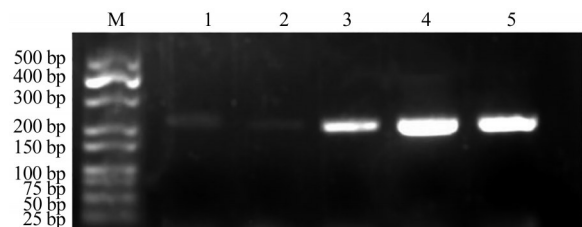
注:M:Marker;1~5:表1中的引物编号;6:空白对照

图 1 5 对引物的 RPA 扩增电泳结果

Figure 1 RPA amplification and electrophoresis results of 5 pairs of primers

2.2 RPA 反应的建立及优化

RPA 反应管分别在 4、15、25、35、45 °C 下扩增的结果见图 2,在扩增温度为 4 °C 时出现微弱的目的扩增条带,随着温度升高目的条带逐渐明亮,在 35 °C 时目的条带最清晰明亮,在 45 °C 下条带变暗,说明温度在 25 °C~45 °C 范围内,RPA 基础扩增体系检测 *rfbE* 基因均可以达到比较理想的扩增效果,且在 35 °C 时扩增效率最高。



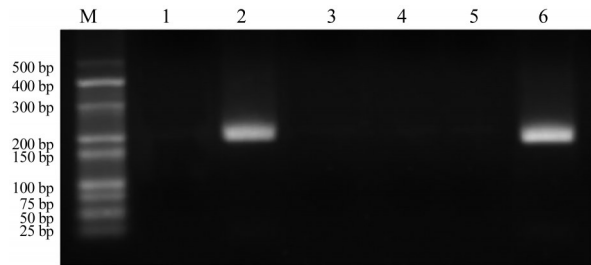
注:M:Marker;1~5:表1中的引物编号

图 2 不同扩增温度下 RPA 扩增电泳结果

Figure 2 RPA amplification electrophoresis results at different amplification temperatures

2.2.1 RPA 反应的特异性检测

以志贺菌、EHEC O157:H7、沙门菌、副溶血性弧菌、粪肠球菌标准菌株混合液的提取 DNA,作为待测模板的 RPA 扩增,结果见图 3。除了 EHEC O157:H7 和混合菌液扩增出目的片段,其他菌株未见扩增,说明 RPA 检测方法的特异性良好。



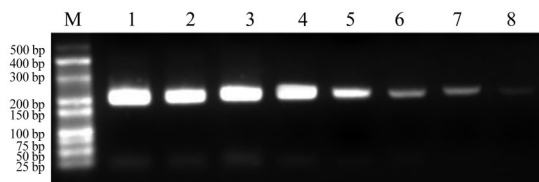
注: M: Marker; 1~6: 志贺菌、EHEC O157:H7、沙门菌、副溶血性弧菌、粪肠球菌、菌株混合液

图 3 RPA 检测 EHEC O157:H7 的特异性电泳结果

Figure 3 Specific electrophoresis results for RPA detection of EHEC O157:H7

2.2.2 RPA 反应的灵敏性检测

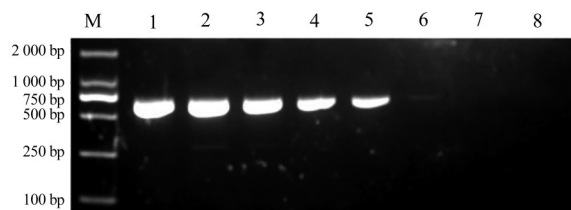
对 8 个梯度浓度 ($100 \sim 10^{-5} \text{ ng}/\mu\text{L}$) 的 EHEC O157:H7 的 DNA 进行 RPA 检测,结果见图 4,结果表明在 DNA 浓度为 $10^{-5} \text{ ng}/\mu\text{L}$ 时,扩增条带依然可见。根据标准方法进行 PCR 检测,结果见图 5,结果表明 PCR 检测的核酸最低检测限为 $10^{-3} \text{ ng}/\mu\text{L}$ 。



注: M: Marker; 1~8: EHEC O157:H7 的 DNA 浓度分别为 100、10、1、 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 $10^{-5} \text{ ng}/\mu\text{L}$

图 4 RPA 检测 EHEC O157:H7 的敏感性电泳结果

Figure 4 Sensitive electrophoresis results for RPA detection of EHEC O157:H7



注: M: Marker; 1~8: EHEC O157:H7 的 DNA 浓度分别为 100、10、1、 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 $10^{-5} \text{ ng}/\mu\text{L}$

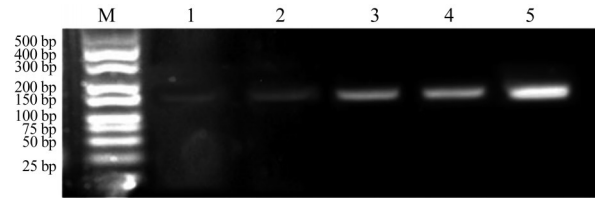
图 5 PCR 检测 EHEC O157:H7 的敏感性电泳结果

Figure 5 Sensitive electrophoresis results for PCR detection of EHEC O157:H7

2.3 RPA 反应可视化检测方法的建立及优化

在 $35 \text{ }^\circ\text{C}$ 下分别扩增 4、6、8、10、12 min 检测结果见图 6,RPA 扩增 10 min 以上可以看到明显的扩

增条带,达到理想的检测结果,随着扩增时间的延长,RPA 扩增的效果越好。

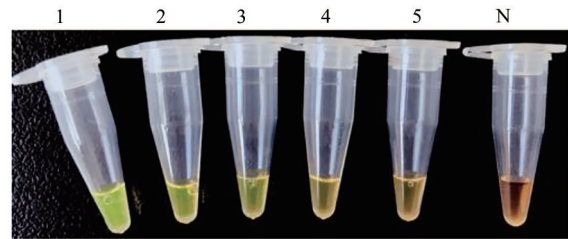


注: M: Marker; 1~5: 扩增时间分别为 4、6、8、10、12 min

图 6 不同扩增时间下 RPA 扩增电泳结果

Figure 6 RPA amplification and electrophoresis results under different amplification times

在扩增 10 min 后的 RPA 体系中加入不同浓度的 SYBR Green I 进行可视化检测,结果见图 7,结果表明 $50 \mu\text{L}$ 的 RPA 基础扩增体系中加入超过 $1 \mu\text{L}$ 的 SYBR Green I ($1000\times$),反应管的颜色即从橙色变向绿色, $2 \mu\text{L}$ 的 SYBR Green I ($1000\times$) 变色非常明显。



注: N: 阴性对照; 1~5: $4 \mu\text{L}$ SYBR Green I ($1000\times$)、 $2 \mu\text{L}$ SYBR Green I ($1000\times$)、 $1 \mu\text{L}$ SYBR Green I ($1000\times$)、 $0.5 \mu\text{L}$ SYBR Green I ($1000\times$)、 $1.25 \mu\text{L}$ SYBR Green I ($100\times$)

图 7 不同浓度 SYBR Green I 的检测结果

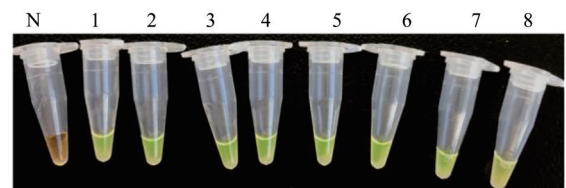
Figure 7 Staining results of SYBR Green I with different concentrations

2.4 RPA 反应可视化检测方法的灵敏度检测

对 8 个梯度浓度 ($100 \sim 10^{-5} \text{ ng}/\mu\text{L}$) 的 EHEC O157:H7 的 DNA 进行 RPA 反应可视化检测结果见图 8,DNA 浓度为 $10^{-5} \text{ ng}/\mu\text{L}$ 时,反应管与阴性对照相比依然有比较明显的变色反应,灵敏度检测结果与电泳检测结果一致。

2.5 实时荧光 RPA 检测方法的建立及特异性、灵敏性检测

实时荧光 RPA 检测方法的特异性检测结果除



注: N: 阴性对照; 1~8: EHEC O157:H7 的 DNA 浓度分别为 100、10、1、0.1、0.01、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 $10^{-5} \text{ ng}/\mu\text{L}$

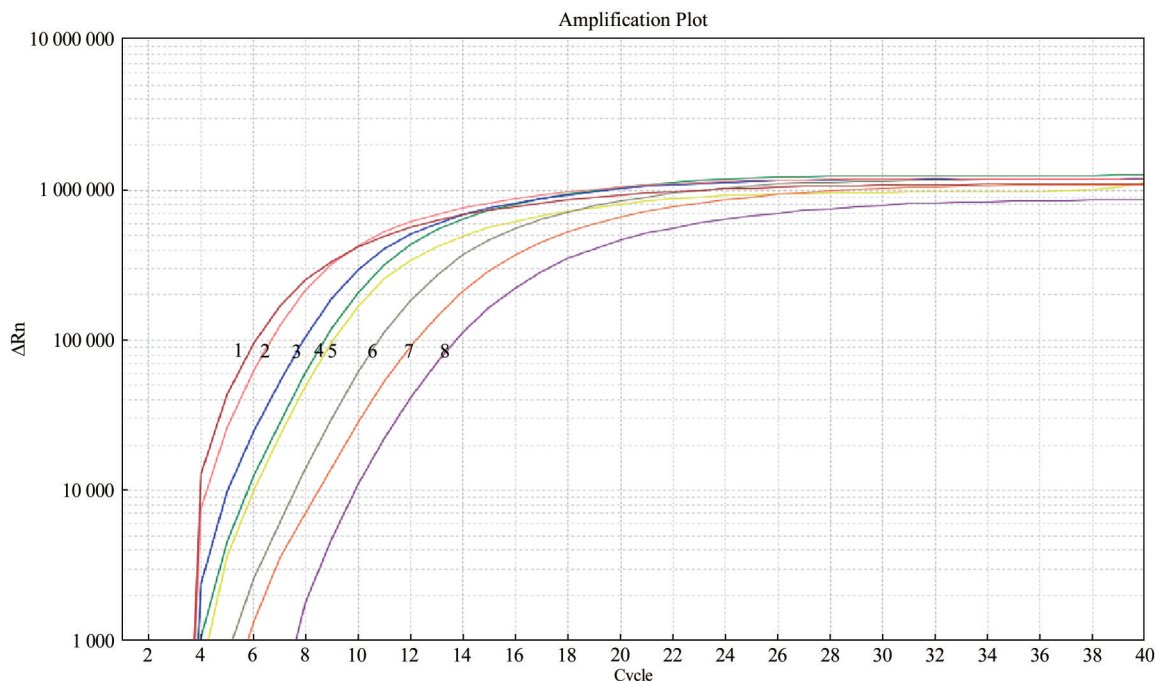
图 8 可视化 RPA 检测 EHEC O157:H7 的敏感性结果

Figure 8 Sensitivity results of visual RPA detection for EHEC O157:H7

了 EHEC O157:H7 出现扩增曲线,其他菌株未见扩增,说明实时荧光 RPA 检测方法的特异性良好。

参照 RPA *exo* 扩增试剂盒说明书建议,Ct 值<15 时方可判断为扩增阳性。对 8 个梯度浓度(100 ng/μL~10⁻⁵ ng/μL)的 EHEC O157:H7 的 DNA 进行实时荧

光 RPA 检测结果见图 9,在核酸浓度为 10⁻⁵ ng/μL 时,Ct 值<15,说明实时荧光 RPA 方法的检测限可以低于 10⁻⁵ ng/μL。综上,本研究建立的实时荧光 RPA 检测方法可以用于 EHEC O157:H7 的核酸检测。



注:1~8:EHEC O157:H7 的 DNA 浓度分别为 100、10、1、0.1、0.01、10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵ ng/μL

图9 实时荧光 RPA 检测 EHEC O157:H7 的敏感性结果

Figure 9 Sensitivity results of real-time RPA detection for EHEC O157:H7

3 讨论

目前,检测 EHEC O157:H7 的常用方法包括传统细菌检测法、免疫学分析法^[15-16]、分子生物学检测^[17]、微流控传感器检测法^[18]等。现行的国家标准 GB 4789.6—2016^[19],操作繁琐且周期很长,通常需要 2~3 d,耗时耗力;免疫学分析法的样品预处理时间长,容易出现假阳性结果;核酸检测方法有诸多优势,比如 PCR 检测的特异性、敏感性都很好,但是检测时长依然在 120 min 左右,不能满足快速检测的需求。RPA 作为一种新兴的核酸扩增技术,具有特异性强、灵敏度高、操作快速便捷等明显优势,是现今呼声最高的“一种可替代 PCR 的技术”。

rfbE 基因是 EHEC O157:H7 的特异性菌体抗原基因,WANG 和 REEVES^[20]克隆分析了 O157 抗原基因,并对 166 个大肠杆菌 O 血清群和一系列革兰氏阴性杆菌进行 PCR 扩增检测,证明 O157 抗原基因具有高度特异性,且 *rfbE* 基因对 EHEC O157:H7 的抗血清有交叉反应的菌株特异性也较好。因此本研究选择了 EHEC O157:H7 的 *rfbE* 基因作为靶基因,设计 RPA 特异性引物后,分别建立了特异性较

强、灵敏度较高的实时荧光 RPA 检测方法和满足现场检测需求的可视化 RPA 检测方法。

本研究建立的 RPA 反应可视化检测方法,只需要 25 °C~45 °C 范围内的温度即可进行核酸扩增,对提取到的样本核酸,可在 15 min 内检测出结果,且反应灵敏、稳定、快捷、直观,因此非常适用于现场快速检测^[21]。之后研究建立的实时荧光 RPA 检测方法检测 EHEC O157:H7,20 min 就能得到检测结果,灵敏度达到 10⁻⁵ ng/μL,且能实现定量检测,完全满足实验室快速检测的需要。综上,基于 *rfbE* 基因建立的 EHEC O157:H7 的可视化 RPA 检测方法和实时荧光 RPA 检测方法操作简便,且特异性强、敏感性高,为 EHEC O157:H7 的现场快速检测和实验室检测提供新方法。

参考文献

- [1] COULOMBE G, CATFORD A, MARTINEZ-PEREZ A, et al. Outbreaks of *Escherichia coli* O157:H7 infections linked to Romaine lettuce in Canada from 2008 to 2018: An analysis of food safety context[J]. *Journal of Food Protection*, 2020, 83(8): 1444-1462.
- [2] LIM J Y, YOON J, HOVDE C J. A brief overview of *Escherichia coli* O157:H7 and its plasmid O157[J]. *Journal of Microbiology*

- and Biotechnology, 2010, 20(1): 5-14.
- [3] FERENS W A, HOVDE C J. *Escherichia coli* O157: H7: Animal Reservoir and sources of human infection [J]. Foodborne Pathogens and Disease, 2011, 8(4): 465-487.
- [4] ANDERSEN H. Children on the frontline against *E. coli*: Typical hemolytic-uremic syndrome [J]. Clinical Laboratory Science: Journal of the American Society for Medical Technology, 2005, 18(2): 90-99.
- [5] 董莲华, 张玲, 姜君, 等. 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 L H, ZHANG L, JIANG J, et al. Development of droplet digital polymerase chain reaction for quantifying *Escherichia coli* O157: H7 [J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2015, 43(3): 319-324.
- [6] MONEY P, KELLY A F, GOULD S J, et al. Cattle, weather and water: Mapping *Escherichia coli* O157: H7 infections in humans in England and Scotland [J]. Environmental Microbiology, 2010, 12(10): 2633-2644.
- [7] 夏灿, 蒋蔚, 刘迎春, 等. 肠出血性大肠杆菌 O157:H7 抗原基因及毒力基因多重荧光定量 PCR 检测方法的建立 [J]. 畜牧与兽医, 2016, 48(10): 13-21.
XIA C, JIANG W, LIU Y C, et al. Establishment of multiplex real-time FQ PCR for detection of antigen and virulence genes of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7 [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2016, 48(10): 13-21.
- [8] PIEPENBURG O, WILLIAMS C H, STEMPLE D L, et al. DNA detection using recombination proteins [J]. PLoS Biology, 2006, 4(7): e204.
- [9] 周广彪, 段建发, 胡晓珊, 等. 重组酶聚合酶扩增技术 (RPA) 检测拟态弧菌 [J]. 检验检疫学刊, 2018, 28(5): 1-4.
ZHOU G B, DUAN J F, HU X S, et al. Detection of *Vibrio mimicus* heat-labile hemolysin by recombinase polymerase amplification [J]. Journal of Inspection and Quarantine, 2018, 28(5): 1-4.
- [10] 岳苑, 张建中, 张茂俊. NASBA 和 RPA 两种等温扩增技术在病原菌检测中的应用研究 [J]. 中华流行病学杂志, 2019, 40(8): 1018-1022.
YUE Y, ZHANG J Z, ZHANG M J. Study on the application of NASBA and RPA isothermal amplification techniques in pathogen detection [J]. Chinese Journal of Epidemiology, 2019, 40(8): 1018-1022.
- [11] GENG Y Y, TAN K, LIU L B, et al. Development and evaluation of a rapid and sensitive RPA assay for specific detection of *Vibrio parahaemolyticus* in seafood [J]. BMC Microbiology, 2019, 19(1): 186.
- [12] CHEN J G, XU Y C, YAN H, et al. Sensitive and rapid detection of pathogenic bacteria from urine samples using multiplex recombinase polymerase amplification [J]. Lab on a Chip, 2018, 18(16): 2441-2452.
- [13] LIU H B, ZANG Y X, DU X J, et al. Development of an isothermal amplification-based assay for the rapid visual detection of *Salmonella* bacteria [J]. Journal of Dairy Science, 2017, 100(9): 7016-7025.
- [14] 中华人民共和国卫生部. 感染性腹泻诊断标准: WS 271—2007 [S]. 北京: 人民卫生出版社, 2007.
Ministry of Health of the People's Republic of China. Diagnostic Criteria for Infections Diarrhea: WS 271—2007 [S]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2007.
- [15] YE Y, SU W, ZHANG J, et al. Development of a combined immunochromatographic lateral flow assay for accurate and rapid *Escherichia coli* O157: H7 detection [J]. Letters in Applied Microbiology, 2020, 71(3): 311-319.
- [16] PARK J Y, PARK K, OK G, et al. Detection of *Escherichia coli* O157: H7 using automated immunomagnetic separation and enzyme-based colorimetric assay [J]. Sensors (Basel, Switzerland), 2020, 20(5): 1395.
- [17] KIM J H, OH S W. Rapid detection of *E. coli* O157: H7 by a novel access with combination of improved sample preparation and real-time PCR [J]. Food Science and Biotechnology, 2020, 29(8): 1149-1157.
- [18] LI T, OU G Z, CHEN X L, et al. Naked-eye based point-of-care detection of *E. coli* O157: H7 by a signal-amplified microfluidic aptasensor [J]. Analytica Chimica Acta, 2020, 1130: 20-28.
- [19] 国家卫生和计划生育委员会, 国家食品药品监督管理总局. 食品安全国家标准 食品微生物学检验 致泻大肠埃希氏菌检验: GB 4789.6—2016 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2017.
National Health and Family Planning Commission, National Food and Drug Administration. National food safety standard-Microbiological examination of food hygiene-Examination of diarrheogenic *Escherichia coli*: GB 4789.6—2016 [S]. Beijing: Standards Press of China, 2017.
- [20] WANG L, REEVES P R. Organization of *Escherichia coli* O157 O antigen gene cluster and identification of its specific genes [J]. Infection and Immunity, 1998, 66(8): 3545-3551.
- [21] 高威芳, 朱鹏, 黄海龙. 重组酶聚合酶扩增技术: 一种新的核酸扩增策略 [J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2016, 32(6): 627-634.
GAO W F, ZHU P, HUANG H L. Recombinase polymerase amplification: A new DNA/RNA amplification strategy [J]. Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 2016, 32(6): 627-634.