

DOI:10.3969/j.issn.1671-9638.2018.12.019

· 综述 ·

基于聚合酶链式反应的肠道病原菌检测技术

Detection technique of intestinal pathogens based on polymerase chain reaction

陈莹(CHEN Ying)¹, 胡蕊(HU Rui)¹, 刘颖勋(LIU Ying-xun)², 王真真(WANG Zhen-zhen)¹, 张林艳(ZHANG Lin-yan)¹, 顾兵(GU Bing)¹, 李颖(LI Ying)¹, 王鑫(WANG Xin)³

(1 徐州医科大学医学技术学院, 江苏 徐州 221004; 2 西安交通大学医学部基础医学院, 陕西 西安 710061; 3 南京巨鲨显示科技有限公司市场管理部, 江苏 南京 210036)

(1 School of Medical Technology, Xuzhou Medical University, Xuzhou 221004, China; 2 School of Basic Medical Sciences, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China; 3 Market Management Department, Nanjing Jusha Display Technology Co., Ltd., Nanjing 210036, China)

【关键词】 聚合酶链式反应; 肠道病原菌; 检测技术

【中图分类号】 R446.5 【文献标识码】 A 【文章编号】 1671-9638(2018)12-1122-07

肠道感染性疾病重要病原菌, 如志贺菌和沙门菌等感染发病率高、传播速度快、耐药发生率也高^[1-2]。据文献报道, 肝硬化^[3]、HIV 感染^[4]、炎症性肠道病^[5]以及血糖调节^[6]等均与肠道菌群失调有关。此外, 引起胃肠道感染的食源性致病菌是食品安全的严重隐患^[7], 可引起胃肠炎、败血症等疾病。因此, 快速检测威胁人类健康的病原菌刻不容缓。目前, 临床常规的病原菌检测技术多采用传统细菌培养并进行生化反应及血清学鉴定等, 耗时繁琐, 检测灵敏度低, 且检测技术人员的操作水平和经验也对检测结果的准确性有重要影响^[8]。研发灵敏度高、特异性强的检测技术进行病原菌的快速检测, 在疾病预防以及临床诊断、指导用药等方面具有重要意义。1985 年美国 Kary mullis 首次提出聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)技术, 该技术因其高效、灵活以及快速等特点被广泛应用。由于传统 PCR 技术存在一定缺陷, 为弥补该检测方法的不足, 一系列基于 PCR 原理的新型检测技术不断研发, 为肠道病原菌的鉴定提供了有效的指导与技术支持。本文就基于 PCR 技术原理的肠道病原

菌检测技术进行归纳综述, 并分析比较各类方法的优缺点。

1 PCR 技术的基本原理

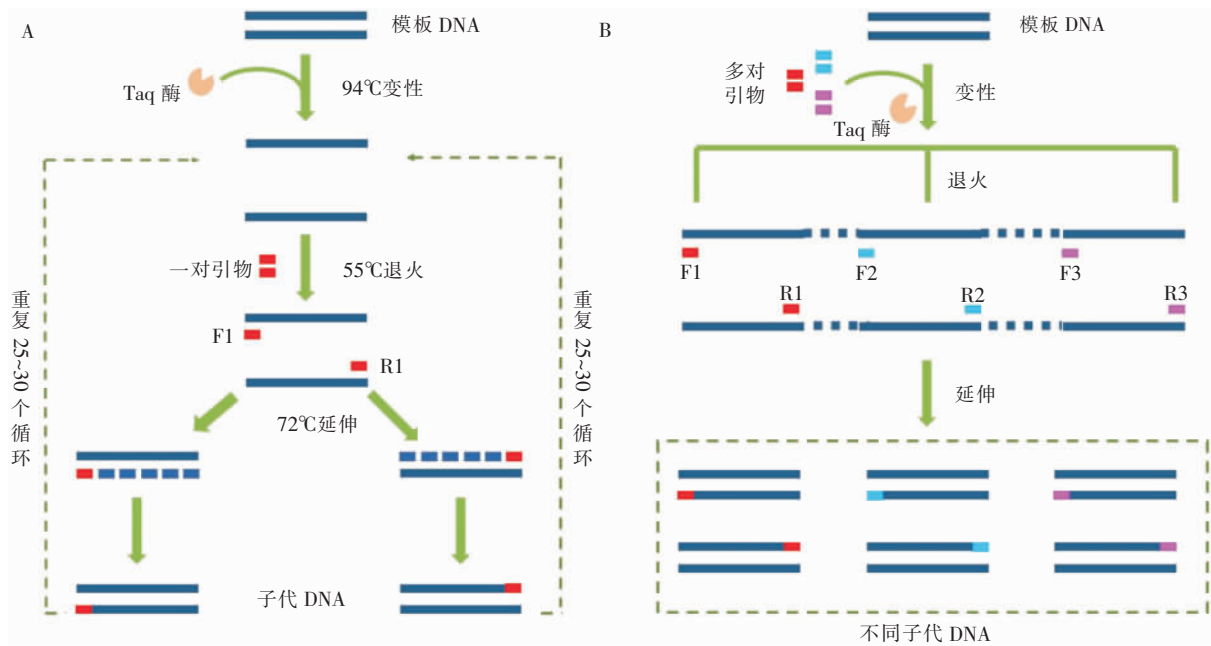
传统 PCR 技术的基本思路与 DNA 的天然复制过程相似, 包括变性、退火和延伸。扩增过程中, 以单链 DNA 为模板, 寡核苷酸为引物, 在 DNA 聚合酶的作用下沿 5'→3' 方向扩增 DNA 片段, 使目的基因得以大量复制^[9](见图 1A)。以肠道病原菌特异性靶基因为研究对象, 通过 PCR 引物的设计与合成, 以临床微生物样本的基因组 DNA 为模板, 可实现肠道病原菌特异性靶基因的 PCR 快速检测。通过该技术, 可以进行 12 种志贺菌毒力因子的快速检测^[10]以及该肠道病原菌的耐药性检测^[11]。尽管传统 PCR 技术具有高效、灵活以及快速等优点(见表 1), 但是该技术仍受采样过程中无菌操作、样品预处理以及定量不准确等因素的影响, 而作为对传统 PCR 技术的补充, 基于 PCR 原理的衍生检测技术为肠道病原菌的鉴定提供了有效指导与技术支持。

【收稿日期】 2018-03-22

【基金项目】 国家自然科学基金项目(81702103); 江苏省自然科学基金(BK20170252); 徐州市科技计划项目(KC16SY157)

【作者简介】 陈莹(1983-), 女(汉族), 河南省洛阳市人, 讲师, 主要从事医学检验技术研发及医学检验教学研究。

【通信作者】 王鑫 E-mail: wangxintxy@163.com



A: 传统 PCR; B: 多重 PCR

图 1 PCR 原理图

表 1 不同 PCR 方法的优缺点比较

检测类型	技术缩写	常见检测对象	优点	缺点	文献来源
传统 PCR	PCR	靶基因组 DNA	特异、敏感、产率高、快速、简便、重复性好、易自动化、对标本的纯度要求低	检测限受限,有假阳性、假阴性的可能,仅定性检测	[9-11]
PCR 衍生技术	mPCR	志贺菌、大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、沙门菌、艰难梭菌、单核细胞增生李斯特菌	提高扩增效率	容易发生错配及非特异性扩增	[12-18]
	RTFQ-PCR	志贺菌、沙门菌、大肠埃希菌、弯曲杆菌	实时检测,绝对或相对定量分析,解决 PCR 污染问题	可能出现假阳性,依赖校准物	[19-23]
	dPCR	沙门菌、大肠埃希菌、单核细胞增生李斯特菌、弯曲杆菌	通过计数单个分子实现绝对定量	成本较高	[24-29]
	RAPD-PCR	大肠埃希菌	无需设计引物,允许适当错配,覆盖率高,使用灵活,成本较低	重复性、稳定性差	[30-32]
	rep-PCR	大肠埃希菌	快速分型,重复性好,分辨率高	对反应体系要求高	[33-35]
	aPCR	金黄色葡萄球菌、志贺菌、沙门菌、大肠埃希菌、副溶血弧菌	解决非目标扩增物与目标产物竞争的问题	对限制性引物的绝对量要求较高	[36-39]
	IC-PCR	沙门菌、大肠埃希菌	特异性和灵敏度提高,耗时短	检测灵敏度依赖抗体	[40-41]
	nested-PCR	大肠埃希菌、霍乱弧菌、副溶血弧菌	提高反应特异性,提高扩增倍数	交叉污染概率大	[42-44]
	DPO-PCR	大肠埃希菌、沙门菌、空肠弯曲杆菌、金黄色葡萄球菌、单核细胞增生李斯特菌、志贺菌及小肠结肠炎耶尔森氏菌	对退火温度不敏感,提高扩增效率,简化了引物设计步骤	有假阳性、假阴性的可能	[45-47]

2 基于 PCR 技术的肠道病原菌检测

2.1 多重 PCR(multiplex PCR, mPCR) Chamberlain 于 1988 年首次设计并命名了多重 PCR, 该方法是普通 PCR 技术的延伸, 旨在一个扩增体系中添加多对引物, 完成多个目的片段的扩增, 达到同时

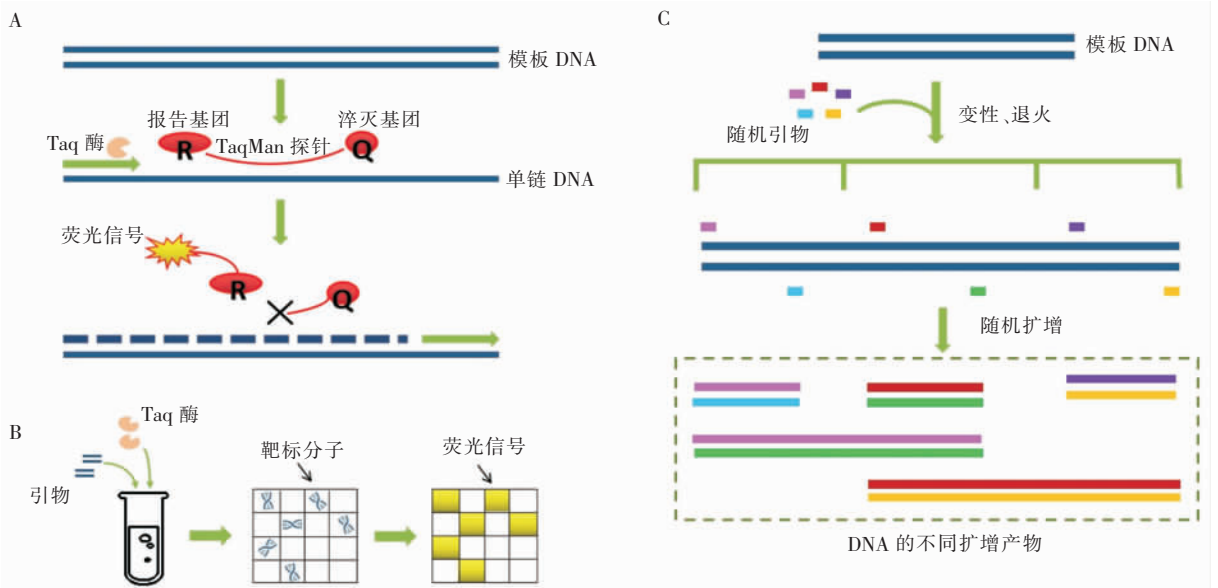
进行多种靶基因检测的目的(见图 1B)。通过多重 PCR 技术, 研究者对志贺菌、侵袭性大肠埃希菌及艰难梭菌进行了快速检测^[12-13]。孟相秋等^[14]应用该方法, 对肠毒性大肠埃希菌(ETEC)的肠毒素基因 STa、STb、LT-I 和 LT-II 同时进行检测, 检测结果证明了该方法的高效性与特异性。Van 等^[15]成功建立了食源性大肠埃希菌 O157 : H7 *stx1*、*stx2*

靶基因的快速检测技术,与传统培养方法相比,该方法可将检测时间缩短至 2 d。此外,与传统血清学方法相比,肠道病原菌如沙门菌、大肠埃希菌等分型繁多,多重 PCR 既可以较大幅度地提高致病菌的检出率,同时还可以鉴定其型别及突变。张晓云等^[16]对比多重 PCR 与血清凝集法鉴定志贺菌,结果显示,前者的检出率(55.00%)高于后者(33.33%),表明多重 PCR 技术有助于提高肠道病原菌检测的准确性及有效性。此外,有研究团队^[17]结合多重 PCR 技术与基因芯片技术,进一步尝试致病菌的高通量检测。理论上,相较于传统 PCR 而言,多重 PCR 更高效,但李新福团队在对比传统和多重 PCR 检出限时,发现多重 PCR 的灵敏度明显下降^[18]。因此,我们通常需要对多重 PCR 的反应体系,如引物浓度、退火温度、退火时间以及 DNA 聚合酶含量等参数进行优化。

2.2 实时荧光定量 PCR (real-time fluorescent quantitative PCR, RTFQ-PCR) RTFQ-PCR 是一种能将核酸放大并同时检测核酸产物的方法,以 TaqMan 探针技术为例,探针完整时,报告基团发射的荧光信号被淬灭基团吸收;PCR 扩增时, Taq 酶的 5'→3'外切酶活性将探针酶切降解,使报告荧光基团和淬灭荧光基团分离,荧光信号产生,即每扩增一条 DNA 链,就有一个荧光分子形成,荧光信号的累积与 PCR 产物的形成完全同步(见图 2A)。该技术实现了 PCR 从定性到定量的突破,具有更高的灵敏度、特异度及精确性。与传统 PCR 方

法相比,该方法最大的优势是全封闭操作以及不需要后续的分析过程,显著缩短了检测时间,并减少了标本污染的可能性。Barletta 研究团队曾利用该方法对志贺菌、沙门菌和弯曲杆菌进行了识别^[19]。胡慧等^[20]使用该技术对大肠埃希菌 O157:H7 特异性基因进行检测,结果显示纯菌检测的灵敏度可达 2×10 CFU/mL,同时假阳性率降低,其检出率是普通 PCR 的两倍多。高春燕团队针对志贺菌属侵袭性质粒抗原 H 基因(*ipaH*)建立了志贺菌快速敏感的荧光定量 PCR 检测方法,检测下限可达 200 拷贝/mL^[21]。刘生峰等^[22]使用基于 TaqMan 探针的荧光 PCR 技术检测肠出血性大肠埃希菌 O157:H7,实验显示该方法的线性范围为 $10^2 \sim 10^8$ CFU/mL,检测限达 20 CFU/mL。麻丽丹团队将 Taqman MGB(Minor Groove Binder)探针技术与实时 PCR 相结合,于 2 h 内完成水产品中沙门菌的检测,纯菌检测限达 13 CFU/mL^[23]。

2.3 数字 PCR(digital PCR, dPCR) dPCR 是一种定量分析技术(见图 2B),扩增前首先对样品进行预处理,使含有核酸分子的反应体系被划分为成千上万个独立反应室,每个反应室中含有零、一个至数个待检测核酸分子。经 PCR 扩增后,通过检测每个反应室,含有单个模板分子的反应室产生阳性信号,其数量可通过绝对定量的方式读出,根据泊松分布原理及阳性微滴的个数与比例,即可得出靶分子的起始拷贝数或浓度。该方法确保了痕量核酸也可获得高拷贝的定量结果^[24-25]。



A: RTFQ-PCR 技术; B: 数字 PCR 技术; C: 随机扩增多态性 PCR 技术

图 2 衍生 PCR 技术原理图

董莲华等^[26]通过该方法建立了大肠埃希菌 O157:H7 的检测体系,检出限可达 10 CFU/mL。此方法除灵敏度高,特异性强外,更有无需核酸标准品的优点。王静团队将叠氮溴化丙锭与微滴数字 PCR 技术(ddPCR)相结合,对沙门菌进行检测,检出限为 8.0 拷贝/20 μ L,在检测人工污染鸡肉样品时,最低可检出 10^3 CFU/mL 的沙门菌^[27]。Bian 等^[28]另选择了油饱和的聚二甲基硅氧烷与 ddPCR 技术相结合,对致病性大肠埃希菌 O157 和单核细胞增生李斯特菌进行检测,同时对比 RTFQ-PCR 技术,结果显示,前者具有高灵敏度的特点,最低检测限达 10 CFU/mL,但该方法的缺点是稳定性和精密度略低于后者;Suo 等^[29]成功验证此法,针对大肠埃希菌 O157:H7、肠炎沙门菌、单核细胞增生李斯特菌和空肠弯曲杆菌的不同 70 聚体寡核苷酸,开发了病原体微阵列检测技术,结合多重 PCR 扩增,成功区分了 4 种病原体,其检测灵敏度为 1×10^{-4} ng(约 20 拷贝)/每个基因组 DNA。

2.4 随机扩增多态性 PCR(random amplified polymorphic DNA PCR, RAPD-PCR) 1990 年,由 Williams 建立起来的一项 DNA 多态检测技术—RAPD-PCR,进入广大研究人员视野,该技术具有多态性检测的特点,打破了传统 PCR 技术使用特定核苷酸序列作为引物的惯例,采用一系列人工合成的随机寡核苷酸链,对所研究的基因组 DNA 进行 PCR 扩增(见图 2C),通过该技术可有效研究肠杆菌亚群之间的遗传性差异,以及尿路感染(UTI)大肠埃希菌多重耐药分离株的遗传分型^[30-31]。此外,Alni 等^[32]利用该技术对人、牛和食品样品中分离的金黄色葡萄球菌进行基因分型,确定分离株之间的遗传关系,从而进行感染流行病学的监测与控制。

2.5 基因组重复序列 PCR(repetitive element PCR, rep-PCR) rep-PCR 是利用设计好的引物扩增目标 DNA 间高度保守的重复序列,得到不同区域的扩增图谱,分析目标基因组的多态性。该方法具有高分辨力,常用于病原菌的分子分型、基因图谱制作、溯源性的系统分析等,其中肠杆菌基因间重复共有序列-PCR(ERIC-PCR)是重要的检测方法之一。Ranjbar 等^[33]应用 ERIC-PCR 对地表水大肠埃希菌菌株的基因组指纹图谱进行分析;Abakpa 研究小组应用该方法对从蔬菜、灌溉水等 440 份样本中分离的耐药性大肠埃希菌 O157:H7 进行指纹图谱分析,揭示了发展中国家耐药性菌株的传播威胁^[34]。张辉团队利用此方法对分离自食品及住院

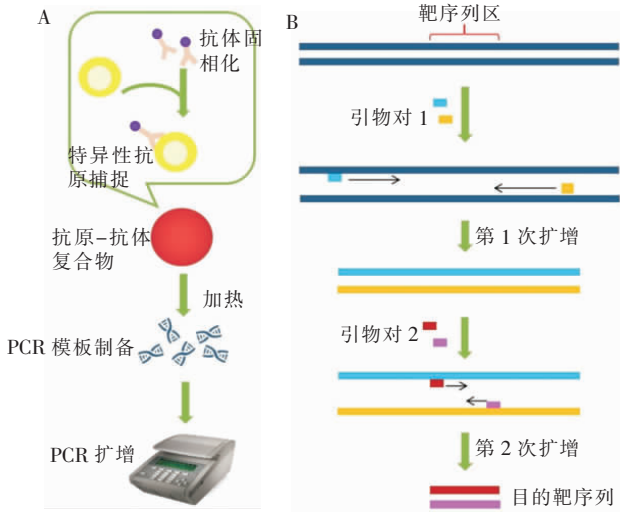
患者的大肠埃希菌菌株进行检测,为防控食源性大肠埃希菌引起的疾病提供了有力的实验依据,但该方法也有不足之处,如对反应体系要求较高^[35]。

2.6 不对称 PCR(asymmetric PCR, aPCR) aPCR 技术其反应原理和操作步骤与传统 PCR 相似,主要区别是体系中添加了不等量的一对引物。在 DNA 聚合酶的催化下,通过对不等量引物结合的 DNA 片段进行扩增,在扩增前期其产物主要是双链 DNA,而扩增后期则为大量单链 DNA^[36]。因不存在互补双链的竞争性结合,使得该方法的杂交效率及检测灵敏度提高^[37-38]。王小强团队利用多重不对称 PCR 技术结合基因芯片技术,建立了一种可同时检测 7 种常见食源性致病菌的方法,并使基因组 DNA 的检测灵敏度达 0.1~1 pg,该方法提供了一种特异性检测单一和混合感染目标菌的手段^[39]。

2.7 免疫捕捉 PCR(immuno-capture PCR, IC-PCR) IC-PCR 是免疫捕捉与传统 PCR 相结合的一门技术,在传染病诊断、流行病学调查等诸多领域有着广阔的应用前景。该方法首先将特定抗原微生物通过固相或均相抗体特异性捕捉,之后通过加热等步骤完成 PCR 模板的制备,再利用基因组序列特异性引物进行 PCR 扩增,从而对样本中的病原微生物进行定性或定量分析(见图 3A)。张体银等^[40]采用免疫捕捉-通用引物 PCR(IC-UPPCR)对食品中的沙门菌进行检测,检测灵敏度可达 2×10^2 CFU/mL,该技术表现出特异性好、灵敏度高和高通量等特点,适用于食品卫生监管以及临床诊断等领域。高涛团队将免疫磁珠捕获-通用引物 PCR(IMC-UPPCR)与传统培养法进行比较,结果显示免疫捕捉 PCR 与传统培养法符合率达 93.22%^[41],说明该方法还有进一步的发展空间和广阔的应用前景。

2.8 巢式 PCR(nested-PCR) nested-PCR 又称套式 PCR,即通过两对 PCR 引物进行两轮 PCR 扩增,得到完整的目的片段。利用第一对 PCR 引物进行常规 PCR 扩增,之后利用第二对引物(即巢式引物,设计于第一次 PCR 扩增产物的内部)进行二次扩增,第二对引物可结合在第一次 PCR 产物的内部,使得第二次 PCR 扩增片段短于第一次扩增片段(见图 3B)。该方法特异性强、灵敏度高,可避免由于环境污染造成的假阳性结果,成本也相对较低。樊琛研究小组通过套式 PCR 技术检测了 10 株大肠埃希菌的 *iss* 基因,并探讨该技术的检测缺陷和改进方法^[42]。陈爱平等^[43]通过该方法对外环境水中的致病霍乱弧菌进行监测,在保证霍乱监测数据灵敏度

的同时,有助于追踪霍乱的传播趋势。樊晓琳等^[44]通过 nested-PCR 对水产品中的副溶血弧菌进行快速检测,结果表明该方法对副溶血弧菌纯培养物的检测限为 6.62 CFU/mL,对 DNA 的检测限为 200 fg,且该方法与国家标准检测方法结果一致,但检测时间更具优势。



A: 免疫捕捉 PCR 技术; B: 巢式 PCR 技术

图 3 衍生 PCR 技术原理图

2.9 双启动寡核苷酸 PCR(dual priming oligonucleotide PCR, DPO-PCR) DPO-PCR 是一种融合新型引物设计方法,进行靶基因快速检测的新技术。在该技术中,DPO 引物由三个区域组成:较长的 5'-区段、较短的 3'-区段,以及桥接 5'-和 3'-区段的聚肌苷酸[poly(I)]连接物^[45]。该检测技术可以有效消除错配引发,从而提高 PCR 扩增的特异性,其检测结果要比传统 PCR 方法更精确。该方法可有效检测肠出血性大肠埃希菌 O157:H7,其检测灵敏度低至 94 CFU/mL^[46]。针对致病性大肠埃希菌,李丹丹研究小组建立的 DPO-PCR 检测体系,其灵敏度为 97 CFU/mL^[47],上述实验为精准、快速检测大肠埃希菌提供了新的检测思路。此外,基于 DPO-多重 PCR 技术可以同时进行沙门菌、空肠弯曲杆菌、金黄色葡萄球菌、单核细胞增生李斯特菌、志贺菌及小肠结肠炎耶尔森菌的快速检测,为食源性病原菌的快速检测提供了有效检测手段^[45]。

3 其他 PCR 技术

其他基于 PCR 原理的肠道病原菌检测技术包括

与新兴检测技术结合的检测方法,如随机 PCR 结合基因芯片技术^[48]、多重 PCR 结合基因芯片技术^[17, 49]、传统 PCR 与变性高效液相色谱法结合的多重 PCR-DHPLC 技术^[50-51]、PCR 技术结合免疫层析技术(PCR-ICT)^[52]和多重荧光 PCR 结合 Allglo 探针技术^[53],上述技术在肠道致病菌,如致泻性大肠埃希菌、艰难梭菌等的快速检测中发挥着重要作用。

4 讨论

PCR 技术自问世以来,在医学检验等领域,如临床疾病诊断,细菌、病毒以及寄生虫定性和定量检测等方面取得了巨大成就^[54-57],并成为常用临床快速检测方法之一。由于传统 PCR 技术存在易交叉污染、产生假阳性及定量不准确等缺点,已经不能满足人们的检测需求。研究人员研发的各种基于 PCR 原理的衍生技术,可针对 PCR 各方面的性能进行不断地突破:如将变性高效液相色谱及量子点免疫层析技术与 PCR 技术相结合^[50, 58],提高了检测速度与灵敏度;将传统琼脂糖电泳替换成基于测序仪的荧光毛细管电泳,提高了分辨性^[59-60],解决反应产物处理后的污染问题;将荧光基团引入引物扩增便于进行实时监测,改进了时效性^[61]并避免相关物质的干扰。尽管现有 PCR 衍生技术自身仍存在不足,还需要在检测成本、稳定性等方面进行优化,然而在医学检验诊断中,这些方法因其具有的显著优势,仍将发挥重要的作用。总之,随着创造性地将 PCR 及其衍生技术与现代分子生物学检测新技术相结合,以及生物芯片、质谱、拉曼光谱等新技术的不断推广及检测水平的不断提升,PCR 技术的限制正在逐渐被打破,在肠道病原菌检测方面的应用价值也得到了更大程度的体现,并在感染控制、卫生预防、食品安全监测等领域发挥着巨大作用。

[参考文献]

[1] Fan W, Qian H, Shang W, et al. Low distribution of genes encoding virulence factors in *Shigella flexneri* serotypes 1b clinical isolates from eastern Chinese populations [J]. Gut Pathogens, 2017, 9: 76.
 [2] Crump JA, Sjolund-Karlsson M, Gordon MA, et al. Epidemiology, clinical presentation, laboratory diagnosis, antimicrobial resistance, and antimicrobial management of invasive *Salmonella* infections [J]. Clin Microbiol Rev, 2015, 28(4): 901-937.
 [3] Qin N, Yang F, Li A, et al. Alterations of the human gut microbi-

- ome in liver cirrhosis[J]. Nature, 2014, 513(7516): 59-64.
- [4] Trama AM, Moody MA, Alam SM, et al. HIV-1 envelope gp41 antibodies can originate from terminal ileum B cells that share cross-reactivity with commensal bacteria[J]. Cell Host Microbe, 2014, 16(2): 215-226.
- [5] Scaldaferrì F, Gerardi V, Lopetuso LR, et al. Gut microbial flora, prebiotics, and probiotics in IBD: their current usage and utility[J]. Biomed Res Int, 2013, 2013: 435268.
- [6] Bauer PV, Duca FA, Waise TMZ, et al. Metformin alters upper small intestinal microbiota that impact a glucose-SGLT1-sensing gluco regulatory pathway[J]. Cell Metab, 2018, 27(1): 101-117.
- [7] Scallan E, Hoekstra RM, Angulo FJ, et al. Foodborne illness acquired in the United States-major pathogens[J]. Emerg Infect Dis, 2011, 17(1): 7-15.
- [8] 史大川. 恒温型纳米-滚环扩增-SPR 传感器快速检测病原微生物的研究[D]. 重庆:第三军医大学, 2015.
- [9] Grothen DC, Zach SJ, Davis PH. Detection of intestinal pathogens in river, shore, and drinking water in Lima, Peru[J]. J Genomics, 2017, 5: 4-11.
- [10] Lluque A, Mosquito S, Gomes C, et al. Virulence factors and mechanisms of antimicrobial resistance in *Shigella* strains from periurban areas of Lima (Peru)[J]. Int J Med Microbiol, 2015, 305(4-5): 480-490.
- [11] Azmi IJ, Khajanchi BK, Akter F, et al. Fluoroquinolone resistance mechanisms of *Shigella flexneri* isolated in Bangladesh[J]. PloS One, 2014, 9(7): e102533.
- [12] Binet R, Deer DM, Uhlfelder SJ. Rapid detection of *Shigella* and enteroinvasive *Escherichia coli* in produce enrichments by a conventional multiplex PCR assay[J]. Food Microbiol, 2014, 40(2): 48-54.
- [13] 金慧, 高晓东, 陈琳, 等. 中国部分城市艰难梭菌携带毒素基因特征分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2016, 26(11): 2418-2420.
- [14] 孟相秋, 袁超文, 刘文鑫, 等. 大肠杆菌肠毒素基因多重 PCR 检测方法的建立[J]. 中国人兽共患病学报, 2015, 31(1): 6-10.
- [15] Van Giau V, Nguyen TT, Nguyen TKO, et al. A novel multiplex PCR method for the detection of virulence-associated genes of *Escherichia coli* O157:H7 in food[J]. Biotech, 2016, 6(1): 5.
- [16] 张晓云, 邓文松, 姜利群. 多重 PCR 法在志贺菌基因分型鉴定中的应用价值[J]. 实用临床医药杂志, 2013, 17(16): 53-55.
- [17] 王乃福, 吴冬雪, 张霞, 等. 致泻性大肠杆菌基因芯片检测方法的建立[J]. 食品研究与开发, 2014, 35(7): 5-9.
- [18] 李新福, 王周平, 李聪, 等. 低温肉制品中 3 种食源性致病菌多重聚合酶链式反应快速检测方法的建立[J]. 肉类研究, 2017, 31(2): 45-50.
- [19] Barletta F, Mercado EH, Lluque A, et al. Multiplex real-time PCR for detection of *Campylobacter*, *Salmonella*, and *Shigella*[J]. J Clin Microbiol, 2013, 51(9): 2822-2829.
- [20] 胡慧, 陈雅君, 段志刚, 等. 大肠杆菌 O157:H7 特异基因的实时荧光定量 PCR 检测[J]. 食品科学, 2011, 32(12): 278-282.
- [21] 高春燕, 高庆双, 刘树平, 等. 荧光定量 PCR 检测志贺菌方法的建立[J]. 转化医学电子杂志, 2014, 1(4): 38-40.
- [22] 刘生峰, 肖进文, 刘利成, 等. TaqMan 探针荧光 PCR 检测肠出血性大肠埃希菌 O157:H7 方法的建立[J]. 微生物学杂志, 2012, 32(5): 6-10.
- [23] 麻丽丹, 王殿夫, 巴中华, 等. Taqman MGB PCR 定量检测水产品中沙门氏菌的方法建立[J]. 食品科学, 2009, 30(20): 303-307.
- [24] Perkins G, Lu H, Garlan F, et al. Droplet-based digital PCR: Application in cancer research[J]. Adv Clin Chem, 2017, 79: 43-91.
- [25] Streets AM, Huang Y. Microfluidics for biological measurements with single-molecule resolution[J]. Curr Opin Biotechnol, 2014, 25: 69-77.
- [26] 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.
- [27] 王静, 张慧敏, 魏玮, 等. SD-PMA-ddPCR 检测食品中沙门氏菌的研究[J]. 食品工业科技, 2016, 37(10): 67-71.
- [28] Bian X, Jing F, Li G, et al. A microfluidic droplet digital PCR for simultaneous detection of pathogenic *Escherichia coli* O157 and *Listeria monocytogenes* [J]. Biosens Bioelectron, 2015, 74: 770-777.
- [29] Suo B, He Y, Paoli G, et al. Development of an oligonucleotide-based microarray to detect multiple foodborne pathogens [J]. Mol Cell Probes, 2010, 24(2): 77-86.
- [30] Vázquez-Marrufo G, Rosales-Castillo JA, Robinson-Fuentes VA, et al. Multi-typing of Enterobacteria harboring LT and ST enterotoxin genes isolated from Mexican children[J]. Jpn J Infect Dis, 2016, 70(1): 50-60.
- [31] Marialouis XA, Santhanam A. Antibiotic resistance, RAPD-PCR typing of multiple drug resistant strains of *Escherichia coli* from urinary tract infection (UTI)[J]. J Clin Diagn Res, 2016, 10(3): DC05-DC09.
- [32] Alni RH, Mohammadzadeh A, Mahmoodi P, et al. RAPD-PCR analysis of *Staphylococcus aureus* strains isolated from different sources[J]. Comparat Clin Pathol, 2017, 26(4): 1-8.
- [33] Ranjbar R, Pezeshknejad P, Khamesipour F, et al. Genomic fingerprints of *Escherichia coli* strains isolated from surface water in Alborz province, Iran[J]. BMC Res Notes, 2017, 10(1): 295.
- [34] Abakpa GO, Umoh VJ, Kamaruzaman S, et al. Fingerprints of resistant *Escherichia coli* O157:H7 from vegetables and environmental samples[J]. J Sci Food Agric, 2018, 98(1): 80-86.
- [35] 张辉, 杨振泉, 赵隼, 等. 大肠杆菌 ERIC-PCR 分子分型方法的建立及其初步应用[J]. 江苏农业学报, 2010, 26(5): 1098-1103.
- [36] 李凡, 许恒毅. 不对称 PCR 技术及其在食源性致病菌检测中应用的研究进展[J]. 食品工业科技, 2017, 38(4): 379-383.
- [37] Wen Y, Wang L, Xu L, et al. Electrochemical detection of PCR amplicons of *Escherichia coli* genome based on DNA nanostructural probes and polyHRP enzyme [J]. Analyst, 2016, 141(18): 5304-5310.

- [38] Liu F, Liu H, Liao Y, et al. Multiplex detection and genotyping of pathogenic bacteria on paper-based biosensor with a novel universal primer mediated asymmetric PCR[J]. Biosens Bioelectron, 2015, 74: 778 - 785.
- [39] 王小强, 袁军, 韩锐郡, 等. 通用多重不对称 PCR 结合寡核苷酸芯片检测 7 种食源性致病菌[J]. 食品科学, 2017, 38(8): 290 - 295.
- [40] 张体银, 黄晓蓉, 郑晶, 等. 免疫捕捉 - 通用引物 PCR 检测食品中沙门氏菌[J]. 食品科学, 2009, 30(12): 233 - 236.
- [41] 高涛, 张丽萍, 魏雯, 等. 免疫磁珠富集 - 实时荧光 PCR 技术在食源性致病菌监测中的应用研究[J]. 医学动物防制, 2017, 33(1): 18 - 20.
- [42] 樊琛, 徐旺焯, 李丹丹, 等. PCR 方法检测大肠杆菌 iss 基因的缺陷及改进[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(11): 69 - 70.
- [43] 陈爱平, 杨劲松, 徐海滨, 等. 双重巢式 PCR 监测外环境中霍乱弧菌结果分析[J]. 中华流行病学杂志, 2010, 31(11): 1318 - 1319.
- [44] 樊晓琳. 水产品中副溶血弧菌巢式 PCR 快速检测方法的建立与应用[D]. 锦州:渤海大学, 2015.
- [45] Xu YG, Sun B, Zhao HY, et al. Development and evaluation of a dual priming oligonucleotide system-based multiplex PCR assay for simultaneous detection of six foodborne pathogens[J]. Eur Food Res Technol, 2017, 243(4): 555 - 563.
- [46] Xu YG, Li DD, Cui LC, et al. Detection of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 by DPO-PCR method[J]. Food Sci, 2014, 35(8): 160 - 164.
- [47] 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, 37(7): 541 - 544.
- [48] 高兴, 曲险峰, 孙伟, 等. 多种食源性致病菌的基因芯片检测技术[J]. 解放军医学杂志, 2012, 37(8): 765 - 769.
- [49] 王小强, 营思思, 韩锐郡, 等. 多重寡核苷酸连接 - 聚合酶链式反应 - 通用基因芯片检测食源性致病菌方法的建立[J]. 卫生研究, 2017, 46(2): 225 - 231.
- [50] Zhan X, Zheng Q, Fu J, et al. A rapid multiplex PCR-DHPLC method of detection and identification of pathogenic bacteria in aquatic products[J]. J Food Safety, 2015, 35(1): 50 - 58.
- [51] 晚观生, 刘晓玉, 郑秋月, 等. 多重 PCR-DHPLC 快速检测食品中产志贺毒素大肠杆菌[J]. 工业微生物, 2016, 46(3): 42 - 46.
- [52] 王静, 杨昀赞, 杨瑞馥. 用 PCR-ICT 方法检测肠出血性大肠杆菌 O157[J]. 卫生研究, 2007, 36(3): 376 - 378.
- [53] 金大智, 罗芸, 罗丽, 等. 多重荧光 PCR 结合 Allglo 探针技术检测艰难梭菌相关毒素基因[J]. 中华检验医学杂志, 2014, 37(1): 32 - 35.
- [54] Buchheidt D, Reinwald M, Hofmann WK, et al. Evaluating the use of PCR for diagnosing invasive aspergillosis[J]. Expert Rev Mol Diagn, 2017, 17(6): 603 - 610.
- [55] Gu B, Qin TT, Fan WT, et al. Novel mutations in gyrA and parC among *Shigella sonnei* strains from Jiangsu Province of China, 2002 - 2011[J]. Int J Infect Dis, 2017, 59: 44 - 49.
- [56] Vynck M, Trypsteen W, Thas O, et al. The future of digital polymerase chain reaction in virology[J]. Mol Diagn Ther, 2016, 20(5): 437 - 447.
- [57] Robert-Gangneux F, Brenier-Pinchart MP, Yera H, et al. Evaluation of toxoplasma ELITe MGB real-time PCR assay for diagnosis of toxoplasmosis[J]. J Clin Microbiol, 2017, 55(5): 1369 - 1376.
- [58] Chen X, Gan M, Xu H, et al. Development of a rapid and sensitive quantum dot-based immunochromatographic strip by double labeling PCR products for detection of *Staphylococcus aureus* in food[J]. Food Control, 2014, 46(46): 225 - 232.
- [59] Xiao M, Kong F, Jin P, et al. Comparison of two capillary gel electrophoresis systems for *Clostridium difficile* ribotyping, using a panel of ribotype 027 isolates and whole-genome sequences as a reference standard[J]. J Clin Microbiol, 2012, 50(8): 2755 - 2760.
- [60] 肖克林, 王中兴, 周天祥, 等. 艰难梭菌数字化聚合酶链反应 - 核糖体分型方法及参考图谱的建立[J]. 中华传染病杂志, 2016, 34(2): 111 - 114.
- [61] Zhang C, Niu P, Hong Y, et al. A probe-free four-tube real-time PCR assay for simultaneous detection of twelve enteric viruses and bacteria[J]. J Microbiol Methods, 2015, 118: 93 - 98.

(本文编辑:左双燕)