

大肠杆菌 O157:H7 微滴数字 PCR 定量方法的建立

董莲华^{* 1} 张玲¹ 姜君² 王江南³ 王晶¹ 陈唯军²

¹(中国计量科学研究院 北京 100029)

²(中国科学院北京基因组研究所基因组科学与信息重点实验室 北京 100029)

³(北京市计量检测科学研究院 北京 100029)

摘 要 以大肠杆菌 O157:H7 (*E. coli* O157:H7) *rfbE* 基因为靶基因 ,建立了可对其准确定量的微滴数字 PCR(ddPCR) 方法。对 ddPCR 反应中的探针浓度进行了优化 ,考察了方法的线性范围、精密度、定量限和检出限。最终确定 ddPCR 反应中的最佳探针浓度为 300 nmol/L。 *E. coli* O157:H7 基因组 DNA 浓度范围为 4 ~ 1.25×10⁵ 拷贝/20 μL ddPCR 反应液时 ,ddPCR 方法线性相关系数(R^2) 为 0.999。当 DNA 浓度为 760 ~ 88400 拷贝/20 μL 时 ,方法的精密度最好(RSD < 5%)。本方法的定量限为 4 拷贝/20 μL ,检出限为 3 拷贝/20 μL。特异性验证结果表明 ,建立的 ddPCR 方法特异性良好 ,对 13 份猪肉、牛肉和鸡肉样品的检测结果与定量 PCR 方法检出结果一致。

关键词 微滴数字聚合酶链式反应; 大肠杆菌 O157:H7; 拷贝数

1 引 言

大肠杆菌 O157:H7(*E. coli* O157:H7) 是肠出血性大肠杆菌常见的血清型 ,是以食物为主要的传播途径的致病菌 ,牛、羊、猪和鸡等家畜家禽是其主要宿主^[1-2]。可引起严重并发症 ,甚至导致死亡 ,死亡率可达 5% ~ 10%。近年 ,肠出血性大肠杆菌 O157:H7 感染在世界各地都有不同规模的爆发和流行 ,在世界范围内都受到普遍关注。此外 ,*E. coli* O157:H7 的感染剂量极低 ,在食入不足 10 个细菌就可能引起疾病^[2-3]。目前还没有一种特效药或有效的治疗手段 ,因此建立快速、有效的检测方法对 *E. coli* O157:H7 的预防工作显得尤为重要。

目前 ,检测肠出血性 *E. coli* O157:H7 的方法可分为传统方法、免疫方法和分子检测方法。传统的分离培养法和生化鉴定时间长 ,灵敏度低;免疫学方法虽然检测时间相对较短^[4] ,但是容易发生于大肠杆菌的多种血清型的交叉反应。刘霞等^[5]采用纳米金标记抗体增强表面等离子体共振(SPR) 传感器对 *E. coli* O157:H7 进行检测。随着分子生物学技术的发展 ,聚合酶链式反应(PCR) 方法被广泛用于 *E. coli* O157:H7 疾病的快速诊断中。实时荧光定量 PCR(Real time quantitative PCR , qPCR)^[6-7] 技术以其特异性强、灵敏度高、速度快等优点在基因表达、病原体基因检测等方面得到广泛应用 ,已经成为当前细菌快速检测的重要方法 ,并已成功用于不同来源的 *E. coli* O157:H7 的检测中^[8-12]。如 Fratamico 等^[10]建立了不同食品中针对 *stx1*、*stx2*、*wzy*O157、*eae* 和 *fliC* 目标基因检测 *E. coli* O157:H7 的多重定量 PCR 方法。Bonetta 等^[12]建立了一步富集法结合 PCR 方法检测地表水中的 *E. coli* O157:H7 ,解决了由于方法灵敏度的限制而难以检测地表水中的 *E. coli* O157:H7 ,检测限低至 3 CFU/L。

微滴数字 PCR 方法(Droplet digital PCR , ddPCR) 是近年来发展起来的快速、准确、可实现 DNA 绝对定量的 PCR 方法。其原理是通过把稀释到一定浓度的 DNA 分子分布在一定数目的微滴中 ,使大部分微滴中的 DNA 分子数目为 1 或 0 ,然后通过 PCR 扩增和荧光信号的累计读取阳性微滴数目 ,再根据泊松分布计算出样本中的 DNA 分子数^[13-15]。本方法无需依赖外部核酸标准 ,可实现核酸绝对定量分析。ddPCR 与 qPCR 方法相比 ,本方法无需核酸标准品 ,又兼具 qPCR 方法的优点 ,用于环境微生物^[16]和病原体基因的检测具有更广阔的应用前景。因此 ,研究和建立 *E. coli* O157:H7 的 ddPCR 方法 ,

2014-07-03 收稿; 2014-12-01 接受

本文系中国计量科学研究院基本科研业务费资助项目(Nos. AKY1323-14 , AKY1408-14)

* E-mail: donglh@nim.ac.cn

对 *E. coli* O157:H7 的快速、准确的定性和定量检测具有重大意义。本研究在之前建立的 qPCR 方法^[17]基础上,进行 ddPCR 检测 *E. coli* O157:H7 方法的建立和优化。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

Nanodrop 2000 超微量紫外分光光度计(美国赛默飞世尔公司); Roche Light Cycle 480 实时荧光定量 PCR 仪(瑞士罗氏诊断公司); QX100 微滴式数字 PCR 仪(美国伯乐公司)。

E. coli O157:H7(ATCC 35150)、志贺氏菌、霍乱弧菌、金黄色葡萄球菌、副溶血性弧菌等非大肠杆菌菌株和 5 株非 O157:H7 血清型大肠杆菌基因组 DNA 由北京基因组研究所提供。实时荧光定量 PCR 试剂盒(美国 Life Technology 公司)。微滴数字 PCR 定量试剂盒(美国伯乐公司)。肉类样品购自本地超市和集贸市场。

2.2 实验方法

2.2.1 引物探针设计

根据 *E. coli* O157:H7 编码脂多糖的 *rfbE* 特异性基因序列,设计的引物和探针序列见表1,采用设计好的引物

表1 大肠杆菌 O157:H7 特异性 PCR 扩增引物和探针序列

Table 1 Primer and probe sequence for quantifying *E. coli* O157 by polymerase chain reaction (PCR)

引物/探针 Primer/probe	序列(5'-3') Sequence (5'-3')	产物长度 Product Length (bp)
正向引物 <i>rfbE</i> -Forward	TGTAGCCTATAACGTCATGCCAAT	109
反向引物 <i>rfbE</i> -Reverse	GGTGAATGGTTGTCACGAAT	
探针 <i>rfbE</i> -Probe	ATCCTTGGCCTTTAAATGTAAACAACGGTCA	

和探针建立实时荧光定量 PCR 方法,包括扩增循环条件的优化及引物和探针浓度的优化。

2.2.2 探针浓度优化 PCR 体系中上下游引物浓度分别为 400 nmol/L,设置探针浓度分别为 100, 200, 300 和 400 nmol/L,然后加入 12.5 μ L PCR mastermix, DNA 模板 5 μ L,用 $1\times TE_{0.1}$ 补足 25 μ L。然后进行 qPCR 扩增。扩增条件确定为:95 $^{\circ}$ C 4 min 40 个循环; 95 $^{\circ}$ C 15 s; 60 $^{\circ}$ C 1 min。

2.2.3 微滴数字 PCR 线性范围 将 *E. coli* O157:H7 基因组 DNA 进行梯度稀释,分别标记为 S0~S8,根据紫外分光光度计测定结果计算,在总体积为 20 μ L 的 ddPCR 反应体系中加入稀释好的 S0~S8 的 DNA 模板 4 μ L,使稀释后的浓度分别为 1.08×10^6 , 2.63×10^5 , 1.07×10^5 , 1.05×10^4 , 1.04×10^3 , 1.06×10^2 , 21.2, 10.6 和 1.01 拷贝/20 μ L ddPCR 反应液,进行 ddPCR 方法的线性范围研究^[16]。ddPCR 扩增的循环条件为:95 $^{\circ}$ C 4 min 40 个循环; 95 $^{\circ}$ C 15 s; 60 $^{\circ}$ C 1 min; 98 $^{\circ}$ C 10 min。

在考察本方法的线性范围时,每个浓度梯度设置 4 次重复。以 4 次重复测量结果的 RSD 值表示 ddPCR 测定 O157:H7 时相应浓度下的精密度,以 *E. coli* O157:H7 基因组 DNA 浓度的对数为横坐标,以相应浓度下测定的 ddPCR 方法的精密度为纵坐标作图,研究 ddPCR 方法精密度与目标基因组浓度之间的相关性。

2.2.4 方法特异性验证 分别提取购自 ATCC 的菌株 *E. coli* O157:H7 参考株、沙门氏菌、军团菌、霍乱弧菌、金黄色葡萄球菌、单增李斯特菌和 5 株非 O157 血清型大肠杆菌的纯培养物菌液的基因组 DNA,浓度分别为: 4.1×10^3 拷贝、 3.8×10^3 拷贝、 4.2×10^3 拷贝、 5.1×10^3 拷贝、 4.1×10^3 拷贝、 5.2×10^3 拷贝、 5.7×10^3 拷贝、 4.8×10^3 拷贝、 4.7×10^3 拷贝、 5.2×10^3 拷贝和 5.4×10^3 拷贝,按照优化的条件进行 ddPCR 检测,验证其特异性。

2.2.5 实际样品分析 无菌条件下取 10 g 样品于 90 mL 含 20 mg/L 新生霉素的改良 EC 肉汤中, 42 $^{\circ}$ C 培养,取适量培养液参考文献[18]的方法进行基因组 DNA 的提取。然后进行 ddPCR 和实时荧光定量 PCR^[19]两种方法检测。

3 结果与讨论

3.1 探针浓度的确定

由于 ddPCR 方法对结果的判读是基于反应终点阅读到的微滴的荧光信号强度,荧光信号高于阈值的反应判定为阳性反应,低于阈值的反应则判定为阴性反应,然后根据得到的阳性微滴和阴性微滴的数目,利用泊松分布公式^[16]计算出目标 DNA 分子的浓度。因此 ddPCR 方法中所有反应扩增后累积的荧

光信号的强弱直接决定了该方法的准确性,而荧光信号的累积与 PCR 扩增效率密切相关。在没有 PCR 抑制因子的情况下,PCR 扩增效率与 PCR 扩增体系中的引物、探针浓度密切相关。通常 qPCR 方法的扩增体系可以直接用到 ddPCR 方法上,但如果微滴数字 PCR 扩增结果不够理想,需要对探针浓度进行调整。

采用 qPCR 对探针的浓度进行了优化和确定。探针浓度分别为 100, 200, 300 和 400 nmol/L 时, qPCR 扩增的 Ct 值分别为 27.85, 28.49, 28.80 和 29.05, 即探针浓度在 100 nmol/L 时, Ct 值最小。从荧光信号强度来看,探针浓度为 300 nmol/L 时, qPCR 荧光信号强度达到最高,探针浓度在 400 nmol/L 时,荧光信号强度与 300 nmol/L 时的荧光信号强度无显著差异。综合考虑荧光信号强度和 Ct 值两个指标,确定探针浓度为 300 nmol/L。

3.2 微滴数字 PCR 扩增

ddPCR 对 *E. coli* O157:H7 DNA 扩增的一维散点图和直方图见图 1。经过优化的 PCR 体系对 O157:H7 基因组 DNA 扩增结果良好,其中阳性微滴和阴性微滴明显分成两簇(图 1a),而且中间弥散的微滴数目很少;直方图(图 1b)中阳性峰和阴性峰显著分开,中间没有任何干扰,表明经过优化确定的 ddPCR 探针浓度和扩增体系适合对 *E. coli* O157:H7 进行定量分析。

3.3 微滴数字 PCR 线性范围

所有反应(32 个)生成的平均微滴数目为 14101 ± 1759 , 每个浓度下产生的可接受的平均微滴数目均大于 10000(图 2a), 表明所有反应微滴生成正常,保证了后续定量分析的准确性。从 S1 至 S8 生成的可接受总微滴数和阳性微滴数分布图(图 2a)还可看出, DNA 样品从高浓度至低浓度经过扩增后,阳性微滴数目随着浓度的降低而逐渐减少,但阴性微滴数目却逐渐增加。在 S0 中,阳性微滴数与微滴总数接近,表明所有的微滴有 DNA 分子分布,该浓度下所有微滴均被 DNA 饱和,无阴性微滴存在,这可在一维散点图(图 2b)上得到证实。如果 DNA 浓度过高,微滴不满足泊松分布,定量结果将显著偏离真实值,无法实现 ddPCR 的准确定量。因此在图 3 中, S0 不在线性直线上。此外, NTC 中没有检测到阳性微滴,可见该体系中没有污染或非特异性扩增,方法的特异性较好。

由图 3 可知,从 S7 至 S1, *E. coli* O157:H7 基因组 DNA 浓度范围在 4.16 拷贝/ $20 \mu\text{L}$ ~ 1.25×10^5 拷贝/ $20 \mu\text{L}$, 线性关系良好,线性相关系数为 0.999, 因此可以确定 ddPCR 方法对 *E. coli* O157:H7 定量检测的线性范围为 5 个数量级。这与之前的研究结果^[20]一致。

3.4 微滴数字 PCR 方法测定大肠杆菌 O157:H7 基因组 DNA 的定量限(LOQ)和检出限(LOD)

由图 3 可见, S7 为可准确定量的最低浓度, ddPCR 测定的 S7 在 PCR 反应液中的浓度为 0.2 拷贝/ μL , 因此该方法检测 *E. coli* O157:H7 基因组 DNA 的定量限为 4 拷贝/ $20 \mu\text{L}$ 。对于检测限的确定,当 $20 \mu\text{L}$ ddPCR 反应液中含 1 拷贝、2 拷贝、3 拷贝和 4 拷贝 DNA 时,经 ddPCR 检测后,3 拷贝和 4 拷贝的样品检测结果均为阳性,因此 ddPCR 方法测定 *E. coli* O157:H7 的检测限确定为 3 拷贝/ $20 \mu\text{L}$ 。

3.5 微滴数字 PCR 方法的精密度与目标基因组 DNA 浓度之间的关系

由图 4 可见, ddPCR 方法的精密度和所测定的 DNA 浓度有很好的相关性, $R^2 = 0.91$ 。当每个反应中 DNA 量由低到高逐渐增加时,测定结果的精密度逐渐增高,即 RSD 降低;但 DNA 量增加到一定值时,方法精密度不再增加,之后随着每个反应中的 DNA 量的增加,精密度降低,即 RSD 增加。由图 4 可知,当 DNA

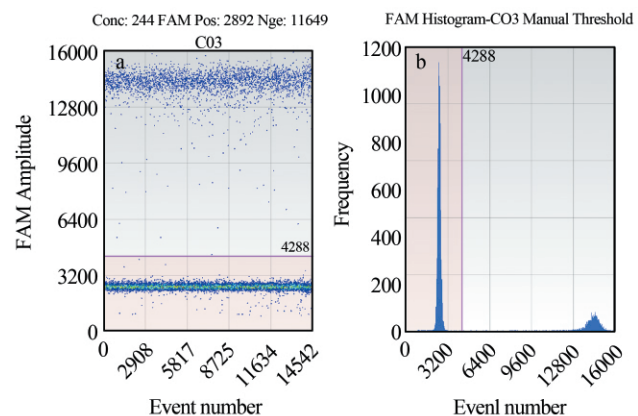


图1 微滴数字 PCR 方法扩增大肠杆菌 O157:H7 的一维散点图(a)和直方图(b)

Fig. 1 One-dimensional scatter plots of selected wells/samples (a) and histograms of selected wells/samples fluorescent droplet amplitudes (b) for quantifying *E. coli* O157:H7 genomic DNA by droplet digital PCR

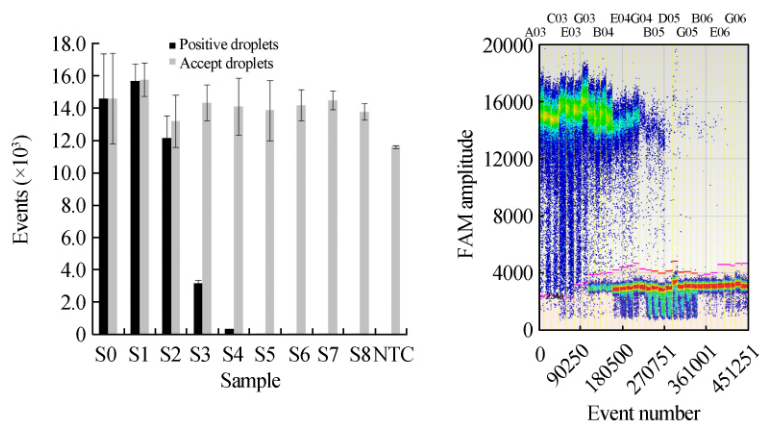


图 2 不同浓度的大肠杆菌 O157: H7 基因组 DNA 样品扩增的微滴数目柱状图 (a) 和一维散点图 (b)。a 中黑色柱状图表示每个相应浓度下产生的平均阳性微滴数目, 灰色柱状图表示每个相应浓度下产生的平均可接受的总微滴数目

Fig. 2 Number of droplet events counted for selected wells/samples for quantifying different concentrations of *E. coli* O157: H7 genomic DNA (a) and one-dimensional scatter plots for selected wells/samples fluorescent droplet amplitudes. Black histogram stands for the average number of positive droplets, and grey histogram stands for the average accepted total number of droplets in Fig 2a

浓度为 4 拷贝/20 μL 时, 测量结果的 RSD=51%, 而当浓度增加到 759 拷贝/20 μL 时, 测定结果的重复性达到 5%, DNA 浓度为 8419 拷贝/20 μL 时, 测定结果的精密度达到最好 (RSD 为 0.39%)。当 DNA 浓度在 760 拷贝/20 μL ~ 88400 拷贝/20 μL 时, 测量结果的 RSD 小于 5%。因此, 采用 ddPCR 对 *E. coli* O157: H7 基因组 DNA 进行绝对定量时, 将 DNA 浓度控制在 759 ~ 88417 拷贝/20 μL 范围内, 可保证 ddPCR 测量结果的精密度好、准确度高。

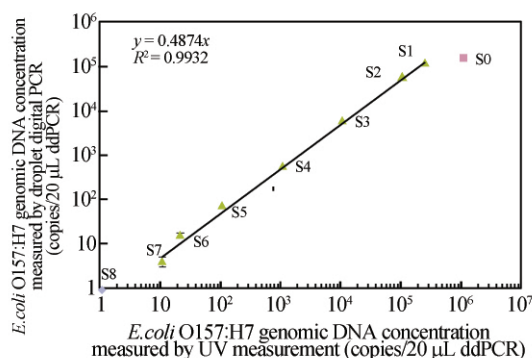


图 3 微滴数字 PCR 方法测定大肠杆菌 O157: H7 基因组 DNA 的线性范围

Fig. 3 Linearity range of droplet digital PCR for quantifying *E. coli* O157: H7 genomic DNA

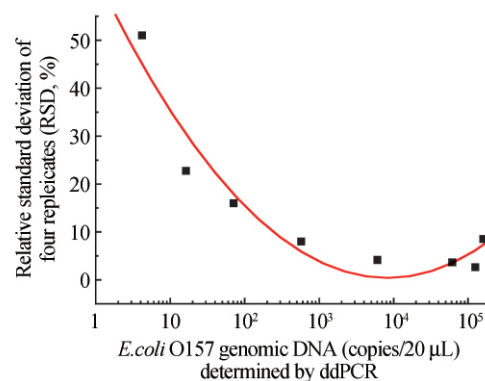


图 4 微滴数字 PCR 方法精密度与 DNA 浓度 (拷贝/20 μL ddPCR 反应液) 的关系

Fig. 4 Relationship between the precision of ddPCR method and the DNA concentration (copies/20 μL ddPCR system)

3.6 特异性检测

采用 5 株非大肠杆菌和 5 株大肠杆菌非 O157: H7 血清型的菌株基因组 DNA 进行 ddPCR 方法特异性验证, 结果表明, 除了 *E. coli* O157: H7 得到了特异性扩增, 其它菌株的检测均为阴性, 表明建立的 ddPCR 方法特异性良好。

3.7 肉类样品检测

从市场和超市共采集肉类样品 13 份, 其中猪肉 7 份、牛肉 3 份、鸡肉 3 份。分别采用我国出入境检验检疫行业标准中规定的 qPCR 方法和本研究建立的 ddPCR 方法对肉类样品进行 *E. coli* O157: H7 检测。检测结果表明, 13 份样品中, 猪肉和鸡肉各 1 份样品为 *E. coli* O157: H7 阳性, 两种方法检测结果一致。

猪肉、牛肉和鸡肉各 1 份阴性样品,各添加高、中、低 3 个浓度(5.25×10^3 , 5.25×10^2 和 1.20 CFU)的标准 *E. coli* O157:H7 菌液后,经 ddPCR 测定后的回收率均大于 96%,表明肉类基质对 ddPCR 测定 *E. coli* O157:H7 无显著影响。

3.8 肠出血性 *E. coli* O157:H7 ddPCR 方法的优点

采用传统的分离培养方法进行肠出血性 *E. coli* O157:H7 的鉴定和检测至少需要 4~7 天,检出限约为 10^4 CFU/mL。郭小英等^[21]利用化学发光磁酶免疫分析法,将食品中肠出血性 *E. coli* O157:H7 的检出限降低至 850 CFU/mL。徐义刚等^[22]利用对退火温度不敏感的 DPO-PCR 技术,检测 *E. coli* O157:H7 的检出限达到 94 CFU/mL。通常,在无预增菌的情况下,普通的 PCR 技术可检测 30 CFU/mL 的 *E. coli*^[12]。姜君等^[17]针对 *E. coli* O157:H7 的同一基因(rfbE)建立了特异性更好的 TaqMan 探针荧光定量 PCR 方法,在无需富集的情况下,检出限可达到 10 拷贝/20 μ L (3 CFU/mL)。本研究中对 O157:H7 的 rfbE 基因所建立的 ddPCR 方法的检测限可到 3 拷贝/20 μ L (1 CFU/mL)。可见,ddPCR 方法检测肠出血性 *E. coli* O157:H7 的灵敏度非常高。

由于前期研究^[18]中用经生化鉴定和血清学鉴定为阳性的 13 株 O157:H7 大肠杆菌、50 株非 O157:H7 大肠杆菌针对同一基因的荧光定量 PCR 方法的特异性进行了验证,本研究中 ddPCR 方法所使用的引物和探针与之前研究相同,而 PCR 方法的特异性主要取决于引物和探针的特异性,经过验证,本研究建立的 ddPCR 方法的特异性与 qPCR 方法的特异性表现一致。

ddPCR 测定 *E. coli* O157:H7 基因组含量的结果与紫外吸收法测定结果相比显著偏低,方法的特异性更强。而紫外方法测定的是所有在 260 nm 处有吸收的物质,无法区分 DNA 与 RNA、蛋白质等杂质^[23,24],通常会导致测定结果偏高,这与文献[20]的结果一致。

References

- 1 NI Da-Xin, WANG Hua, GU Ling. *Chinese J. Epidemiology*, **2002**, 23(2): 102-104
倪大新,汪华,顾玲. 中华流行病学杂志, **2002**, 23(2): 102-104
- 2 YIN Yi-Zheng, CHENG Chun-Rong, YANG Jian-Guo. *Modern Preventive Medicine*, **2007**, 34(21): 4175-4177
殷毅峥,程春荣,杨建国. 现代预防医学, **2007**, 34(21): 4175-4177
- 3 Kehl S C. *Clin. Microbiol.*, **2002**, 40(8): 2711-2715
- 4 CUI Xi, XIONG Qi-Rong, XIONG Yong-Hua, SHAN Shan, LAI Wei-Hua. *Chinese J. Anal. Chem.*, **2013**, 41(12): 1812-1816
崔希,熊齐荣,熊勇华,山珊,赖卫华. 分析化学, **2013**, 41(12): 1812-1816
- 5 LIU Xia, LI Rong-Zuo, LI Lei, LI Wen-Jin, ZHOU Chun-Jiao. *Chem. J. Chinese Universities*, **2013**, 34(6): 1516-1520
刘霞,李蓉卓,李蕾,李文进,周春娇. 高等学校化学学报, **2013**, 34(6): 1516-1520
- 6 CHEN Si, HUANG Kun-Lun, XU Wen-Tao. *J. Agricultural Biotech*, **2006**, 14(5): 779-782
陈思,黄昆仑,许文涛. 农业生物技术学报, **2006**, 14(5): 779-782
- 7 Reischl U, Mohammad T Y, Jochen K. *J. Clin. Microbiol.*, **2002**, 40(7): 2555-2565
- 8 XU Xiao-Ke, WU Qing-Ping, ZHOU Yan-Hong, ZHANG Ju-Mei, YANG Xiao-Juan. *Microbiol.*, **2008**, 35(4): 619-622
徐晓可,吴清平,周艳红,张菊梅,杨小娟. 微生物学通报, **2008**, 35(4): 619-622
- 9 HU Hui, CHEN Ya-Jun, DUAN Zhi-Gang, MENG Zhen-Bei, PENG Xin-Ran, ZHANG Long-Xian, CUI Bao-An, WANG Ya-Bin. *Food Sci.*, **2011**, 32(12): 278-282
胡慧,陈雅君,段志刚,孟振北,彭新然,张龙现,崔保安,王亚宾. 食品科学, **2011**, 32(12): 278-282
- 10 Fratamico P M, DebRoy C. *Food Anal. Methods*, **2010**, 3(4): 330-337
- 11 Vidová B, Tóthová E, Blahut L, Horváthová V, Godány A. *Biologia*, **2011**, 66(3): 401-405
- 12 Bonetta S, Borelli E, Bonetta S, Conio O, Palumbo F, Carraro E. *Environ. Monit. Assess*, **2011**, 177(1-4): 493-503
- 13 Kalinina O, Lebedeva I, Brown J, Silver J. *Nucleic Acids Res.*, **1997**, 25(10): 1999-2004
- 14 Sykes P J, Neoh S H, Brisco M J, Hughes E, Condon J, Morley A A. *Biotechnol.*, **1992**, 13: 444-449
- 15 Vogelstein B, Kinzler K. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, **1999**, 96(16): 9236-9241

- 16 DONG Lian-Hua , MENG Ying , WANG Jing. *J. Microbio.* , **2014** , 54(3) : 179–188
董莲华, 孟 盈, 王 晶. 微生物学报, **2014** , 54(3) : 179–188
- 17 JIANG Jun , WANG Peng-Zhi , LIU Li-Cheng , WU Wei-Li , CHEN Wei-Jun. *Progress in Modern Biomedicine* , **2012** , 12(12) : 2201–2204
姜 君, 王鹏志, 刘利成, 吴伟立, 陈唯军. 现代生物医学进展, **2012** , 12(12) : 2201–2204
- 18 LIU Gang , ZHAI Chao-Yang. *Medical Journal of West China* , **2004** , 16(2) : 111–113
刘 刚, 翟朝阳. 西部医学, **2004** , 16(2) : 111–113
- 19 SN/T1870–2007 , *Detection of Pathogens in Food-Real-Time PCR Method*. Entry-exit Inspection & Quarantine Trade Standard of the People's Republic of China
食品中致病菌检测方法-实时 PCR 法. 中华人民共和国出入境检验检疫行业标准. SN/T1870–2007
- 20 Dong L , Meng Y , Wang J. *Anal. Bioanal. Chem.* , **2014** , 406: 1701–1712
- 21 GUO Xiao-Ying , WANG Yong-Ning , GU Lin-Gang. *J. Cellular Molecular Immunology* , **2006** , 22(3) : 395–398
郭小英, 王永宁, 顾林岗. 细胞与分子免疫学杂志, **2006** , 22(3) : 395–398
- 22 XU Yi-Gang , LI Dan-Dan , CUI Li-Chun , LIU Zhong-Mei , LI Su-Long. *Food Sci.* **2014** , 35(8) : 160–164
徐义刚, 李丹丹, 崔丽春, 刘忠梅, 李苏龙. 食品科学, **2014** , 35(8) : 160–164
- 23 Whale , A S , Huggett J F , Cowen S , Speirs V , Shaw J , Ellison S , Foy C A , Scott , D J. *Nucleic. Acids Res.* , **2012** , 40(11) : 82–87
- 24 Dng L , Zang C , Wang J , Li L , Gao Y , Wu L , Li P. *Anal. Bioanal. Chem.* , **2012** , 402(6) : 2079–2088

Development of Droplet Digital Polymerase Chain Reaction for Quantifying *Escherichia Coli* O157 : H7

DONG Lian-Hua^{* 1} , ZHANG Ling¹ , JING Jun² , WANG Jiang-Nan³ , WANG Jing¹ , CHEN Wei-Jun²

¹(*National Institute of Metrology , Beijing 100013 , China*)

²(*Key Laboratory of Genome Sciences and Information , Beijing Institute of Genomics , Chinese Academy of Sciences , Beijing 100029 , China*)

³(*Beijing Institute of Metrology and Test , Beijing 100029 , China*)

Abstract A droplet digital polymerase chain reaction (ddPCR) method for quantifying *E. coli* O157: H7 by targeting *rfbE* gene was developed. The probe concentration in ddPCR was optimized and the linearity range , precision , limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) were also evaluated. The optimized probe concentration was 300 nmol/L. The ddPCR response was linear over the *E. coli* O157: H7 genome DNA concentration range from 4 to 1.25×10^5 copies in 20 μ L ddPCR system and the linear correlation coefficient (R^2) was 0.999. The ddPCR precision (RSD) was less than 5% over the DNA concentration range from 760 to 88400 copies/20 μ L. The LOD and LOQ was 3 copies in 20 μ L and 4 copies in 20 μ L , respectively. Specificity test showed that the ddPCR was specific for detecting *E. coli* O157: H7. Both ddPCR and standard real time quantitative PCR showed the same results for 16 real samples of chicken meat , pork and beef , which indicated that ddPCR method was suitable for detection of *E. coli* O157: H7 in food.

Keywords Droplet digital polymerase chain reaction; *Escherichia coli* O157: H7; Copy number

(Received 3 July 2014; accepted 1 December 2014)