

# 团 体 标 准

T/JPMA 016—2022

## 致病性弧菌和类志贺邻单胞菌的检测 多重 PCR-毛细管电泳法

Detection of pathogenic *Vibrio* and *Plesiomonas shigelloides*

Multiplex PCR-capillary electrophoresis

2022 - 08 - 09 发布

2022 - 08 - 16 实施

江苏省预防医学会 发布

## 目 次

前言 .....	II
引言 .....	III
1 范围 .....	1
2 规范性引用文件 .....	1
3 定义、术语和缩略语 .....	1
4 方法原理 .....	2
5 设备和材料 .....	2
6 培养基和试剂 .....	3
7 检验程序 .....	3
8 操作步骤 .....	4
附录 A （规范性） 培养基和试剂 .....	8
附录 B （资料性） 参考菌株多重 PCR-毛细管电泳图 .....	10
参考文献 .....	11



## 前 言

本文件按照GB/T 1.1-2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由无锡市疾病预防控制中心提出。

本文件由江苏省预防医学会归口。

本文件起草单位：无锡市疾病预防控制中心、中国疾病预防控制中心传染病预防控制所、江苏省疾病预防控制中心、无锡市惠山区疾病预防控制中心。

本文件主要起草人：管红霞、张京云、王雅静、蒋露、樊玲芳、阚飙、曹文婷、沙丹、韩毅、肖勇、马广源、鲍静、焦建栋、齐倩倩、谈忠鸣、曹军、周虹、毛菲菲、倪虹、徐泽、姚国君。



## 引 言

常见的致病性弧菌包括霍乱弧菌、副溶血性弧菌、河弧菌、拟态弧菌和创伤弧菌等。霍乱弧菌引起的霍乱发病急、传播快、波及范围广，是《中华人民共和国传染病防治法》规定的甲类传染病之一，《国内交通卫生检疫条例》也将其列为检疫传染病。在霍乱弧菌的 220 多个血清群中，只有 O1 和 O139 血清群与大流行有关，霍乱毒素（CT）是霍乱弧菌最重要的毒力因子。副溶血弧菌感染的疾病主要表现为急性胃肠炎、伤口感染和败血症，严重时可导致多器官衰竭甚至死亡，耐热直接溶血素（TDH）和耐热相关溶血素（TRH）是副溶血性弧菌的主要致病因素。河弧菌主要引起腹泻和败血症（伤口暴露及免疫力低下人群），危害性仅次于霍乱弧菌和副溶血性弧菌。拟态弧菌是危害水产养殖的重要病原微生物，能引起人类胃肠疾病、中耳炎和外伤感染等。创伤弧菌不仅可导致皮肤和软组织感染，引发胃肠炎等，还可能引起原发性败血症，致死率高达 50%。类志贺邻单胞菌感染症状从分泌性或水样腹泻到更严重的类似痢疾的腹泻，它与常见的致病性弧菌有许多相似之处，包括其生存环境、培养特性、感染症状等。

了解这类菌群在我国沿海地区的分布特点及致病规律，可为评价相关疾病负担、及时发现潜在的暴发和流行并采取应对措施、减少对公众的健康损害提供依据。国家在 2005 年即制定了《全国霍乱监测方案》，并于 2012 年进行方案的修订，在腹泻病例、水产品 and 环境水体中开展多种致病性弧菌和类志贺邻单胞菌的监测。但在大部分公共卫生实验室，相关检测仍以培养法为主，分离和鉴定步骤繁琐，对实验人员主观判断的依赖性高，导致标本的假阴性率高。建立一套高通量、简便、快速、准确的病原菌检测体系，是高效开展监测工作所需要的。

基于上述原因，现制定《致病性弧菌和类志贺邻单胞菌的检测 多重PCR-毛细管电泳法》团体标准供大家参考。本文件规定了一种可同时检测粪便标本、水产品、环境水体中霍乱弧菌、副溶血性弧菌、河弧菌、拟态弧菌、创伤弧菌和类志贺邻单胞菌的多重PCR-毛细管电泳法。

# 致病性弧菌和类志贺邻单胞菌的检测 多重 PCR-毛细管电泳法

## 1 范围

本文件规定了一种可同时检测霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)、副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)、河弧菌(*Vibrio fluvialis*)、拟态弧菌(*Vibrio mimicus*)、创伤弧菌(*Vibrio vulnificus*)和类志贺邻单胞菌(*Plesiomonas shigelloides*)的多重PCR-毛细管电泳法。

本文件适用于粪便标本、水产品、环境水体中霍乱弧菌、副溶血性弧菌、河弧菌、拟态弧菌、创伤弧菌和类志贺邻单胞菌的快速定性检测。

## 2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中,注日期的引用文件,仅该日期对应的版本适用于本文件;不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB 19489 实验室生物安全通用要求

## 3 定义、术语和缩略语

### 3.1 定义和术语

下列术语和定义适用于本文件。

#### 3.1.1

**多重聚合酶链式反应** multiplex polymerase chain reaction

在同一个反应体系中加上两对或两对以上的引物,并能同时扩增出多个靶基因核酸片段的方法。

#### 3.1.2

**毛细管电泳** capillary electrophoresis

以高压电场为驱动力,以毛细管为分离通道,依据样品中各组成之间淌度和分配行为上的差异,而实现分离的一类液相分离技术。

#### 3.1.3

**致病性弧菌** pathogenic *Vibrio*

一类能引起人体胃肠炎或伤口感染的弧菌,可通过污染水、食物或伤口暴露导致人类发病。常见的致病性弧菌主要包括霍乱弧菌、副溶血性弧菌、河弧菌、拟态弧菌和创伤弧菌。

#### 3.1.4

**类志贺邻单胞菌** *Plesiomonas shigelloides*

能够引起人体胃肠炎的病原菌,可通过污染食物导致人类发病。症状表现为水样腹泻,感染人群无年龄差别。

### 3.2 缩略语

PCR: 聚合酶链式反应, polymerase chain reaction  
 DNA: 脱氧核糖核酸, deoxyribonucleic acid  
 CE: 毛细管电泳, capillary electrophoresis  
*ompW*: 外膜蛋白OmpW编码基因, outer membrane protein OmpW  
*ctxA*: 霍乱毒素A亚单位基因, Cholera toxin A subunit  
*rfbN*: 酰基蛋白合成酶/酰基辅酶A还原酶基因, acyl protein synthase/acyl-CoA reductase  
*wbfR*: 天冬酰胺合成酶基因, asparagine synthase  
*tlh*: 不耐热溶血素基因, thermolabile hemolysin  
*tdh*: 耐热直接溶血素基因, thermostable direct hemolysin  
*trh*: 耐热相关溶血素基因, thermostable related hemolysin  
*toxR*: 跨膜调节蛋白ToxR基因, transmembrane regulatory protein ToxR  
*vmhA*: 拟态弧菌不耐热溶血素基因, *Vibrio mimicus* heat-labile hemolysin  
*vvhA*: 创伤弧菌溶细胞素基因, *Vibrio vulnificus* cytolysin  
 23S rRNA: 23S核糖体RNA基因, 23S ribosomal RNA

### 4 方法原理

在同1个PCR反应管中, 加入1对高浓度的通用引物和12对低浓度的嵌合引物。每条嵌合引物均由两部分组成: 5'端与通用引物序列相同, 3'端为针对靶基因的特异性寡核苷酸序列。在PCR反应起始阶段, PCR扩增由低浓度的嵌合引物引发, 随嵌合引物的消耗, 随后的PCR扩增主要由高浓度的通用引物引发。扩增过程先后使用三个退火温度, 以适应不同阶段引物扩增的需要。扩增产物采用毛细管电泳仪检测, 通过测定PCR产物长度判断被扩增的基因, 实现对样品中致病菌的快速检测。本方法能同时检测12个靶基因, 鉴别五种致病性弧菌(霍乱弧菌、副溶血性弧菌、创伤弧菌、河弧菌、拟态弧菌)和类志贺邻单胞菌, 鉴定霍乱弧菌的血清型和毒力基因及副溶血性弧菌的毒力基因。

### 5 设备和材料

- 5.1 微生物实验室常规灭菌及培养设备。
- 5.2 生物安全柜。
- 5.3 微量离心管: 1.5 mL 或 2.0 mL。
- 5.4 微量移液器: 量程 0.5  $\mu\text{L}$ ~10  $\mu\text{L}$ 、10  $\mu\text{L}$ ~100  $\mu\text{L}$ 、20  $\mu\text{L}$ ~200  $\mu\text{L}$ 、100  $\mu\text{L}$ ~1 000  $\mu\text{L}$ 。
- 5.5 漩涡混匀器。
- 5.6 高速离心机(最大相对离心力不小于 12 000 $\times g$ )。
- 5.7 恒温金属浴或水浴: 100  $^{\circ}\text{C}$   $\pm$  1  $^{\circ}\text{C}$ 。
- 5.8 核酸蛋白分析仪或紫外分光光度计。
- 5.9 PCR 反应管或 PCR 反应板。
- 5.10 PCR 仪。
- 5.11 毛细管电泳仪。

## 6 培养基和试剂

- 6.1 仅使用分析纯试剂和符合 GB/T 6682 规定的一级水。
- 6.2 碱性蛋白胨水：见附录 A.1。
- 6.3 十倍浓度碱性蛋白胨水：见附录 A.2。
- 6.4 磷酸盐缓冲液（PBS）：见附录 A.3。
- 6.5 灭菌去离子水。
- 6.6 细菌基因组 DNA 提取试剂盒。
- 6.7 TE 缓冲液（pH 8.0）：见附录 A.4。
- 6.8 阳性对照：霍乱弧菌、副溶血性弧菌、河弧菌、拟态弧菌、创伤弧菌和类志贺邻单胞菌参考菌株的 DNA 或含目的片段的 DNA。
- 6.9 阴性对照：大肠埃希氏菌标准菌株 DNA。
- 6.10 2×多重 PCR 反应预混液。
- 6.11 毛细管电泳凝胶卡夹：高分辨率卡夹（对 500 bp 以下的片段，分辨率达到 3 bp~5 bp）。
- 6.12 毛细管电泳分子量标准：DNA Alignment Marker, DNA Size Marker。

## 7 检验程序

致病性弧菌和类志贺邻单胞菌检验程序见图1。

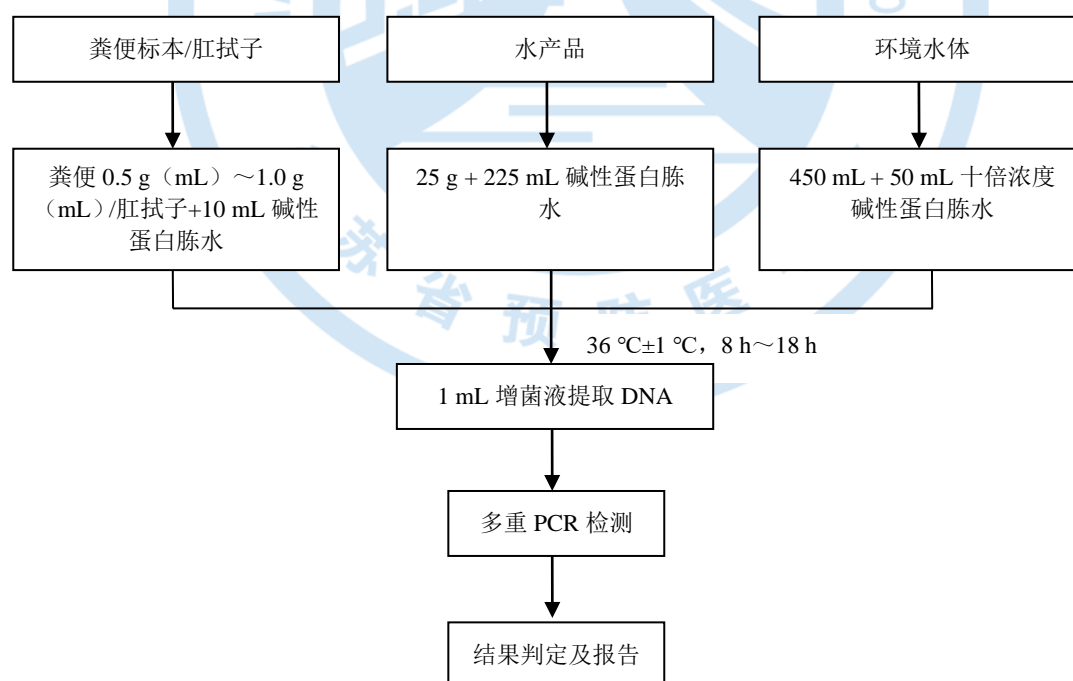


图1 致病性弧菌和类志贺邻单胞菌检验程序

## 8 操作步骤

### 8.1 样品制备和增菌

8.1.1 粪便标本取 0.5 g~1.0 g 或 0.5 mL~1.0 mL 接种于 10 mL 碱性蛋白胨水, 36 °C±1 °C 培养 8 h~18 h。肛拭子整支接种于 10 mL 碱性蛋白胨水, 充分混匀, 36 °C±1 °C 培养 8 h~18 h。

8.1.2 鱼类和头足类动物取表面组织、肠内容物或鳃。贝类取全部内容物, 包括贝肉和体液; 甲壳类取整个动物, 或者动物的中心部分, 包括肠内容物和鳃。如为带壳贝类或甲壳类, 则应先在自来水中洗刷外壳并用干表面水分, 然后以无菌操作打开外壳, 按上述要求取相应部分。以无菌操作取样品 25 g, 加入碱性蛋白胨水 225 mL, 制成样品匀液, 36 °C±1 °C 培养 8 h~18 h。

8.1.3 环境水样取 450 mL, 加入 50 mL 十倍浓度碱性蛋白胨水, 制成样品匀液, 36 °C±1 °C 培养 8 h~18 h。

### 8.2 多重 PCR 检测

#### 8.2.1 DNA 模板的制备

吸取 8.1 中的表层增菌培养液 1 mL 加入 1.5 mL 无菌离心管中, 12 000×g 离心 1 min, 弃去上清液。向沉淀中加入 1 mL PBS 将其悬浮并充分清洗后, 12 000×g 离心 1 min, 弃去上清液, 按此步骤再清洗沉淀 1 次~2 次, 弃去最后一遍上清液, 将沉淀以 50 μL 灭菌去离子水重悬, 于 100 °C±1 °C 恒温金属浴或水浴加热 10 min, 冰浴 2 min~3 min 后, 12 000×g 离心 1 min, 上清液即为制备好的 DNA 模板, 可直接用于 PCR 反应或暂存于 4 °C 并于 24 h 内进行 PCR 反应; 否则, 应在 -20 °C 以下保存备用。也可用细菌基因组提取试剂盒提取细菌 DNA, 操作按照试剂盒说明书进行。剩余增菌液室温保存备用。

#### 8.2.2 引物

根据表 1 和表 2 序列合成引物。

表1 多重 PCR 嵌合引物

病原菌	目的基因	引物名称	嵌合引物序列 (5'-3')	菌株编号及对应 Genbank 编码	引物扩增区间	片段长度/bp
霍乱弧菌 <i>V. cholerae</i>	<i>ompW</i>	N-VC5	<u>CTAACCTTCGTGATGAGCAATCGTT</u> TGGTGAAGCTAATTCGAC	N16961 (AE003853)	819612~819920	354
		N-VC6	<u>GATCAGCTACGTGAGGTCCTACGA</u> ACTTATAACCACCCGCGAT			
	<i>ctxA</i>	N-VCctx9	<u>CTAACCTTCGTGATGAGCAATCGCT</u> TTGACCGAGGTACTCA	N16961 (AE003852)	1567565~1567971	452
		N-VCctx10R2	<u>GATCAGCTACGTGAGGTCCTACCT</u> GCCAATCCATAACCAT			
	<i>rfbN</i>	N-VC01.3	<u>CTAACCTTCGTGATGAGCAATCGC</u> AGATTGTAAGCAGGATGG	N16961 (AE003852)	258133~258293	206
		N-VC01.4	<u>GATCAGCTACGTGAGGTCCTACGT</u> CATCTGTAAGTACAACATTCC			
	<i>wbfR</i>	N-VC013 9.1	<u>CTAACCTTCGTGATGAGCAATCGC</u> ATACCAACGCCCTTATCCATT	MO45 (AB012956)	33192~33311	165
		N-VC013 9.2	<u>GATCAGCTACGTGAGGTCCTACGC</u> ATGACTGGCATCCCAAAT			



表 1 (续)

病原菌	目的基因	引物名称	嵌合引物序列 (5'-3')	菌株编号及对应 Genbank 编码	引物扩增区间	片段长度/bp
副溶血弧菌 <i>V. parahaemolyticus</i>	<i>tlh</i>	N-VP3	<u>CTAACCTTCGTGATGAGCAATCGA</u> AAGCGGATTATGCAGAAGCACTG	10329 (CP045795)	559389~559838	495
		N-VP4	GATCAGCTACGTGAGGTCCTACGC <u>TACTTTCTAGCATTTTCTCTGC</u>			
	<i>tdh</i>	N-VPtdh7	<u>CTAACCTTCGTGATGAGCAATCGTC</u> CATCTGTCCCTTTTCCTG	10329 (CP045795)	1662577~1662823	292
		N-VPtdh8	GATCAGCTACGTGAGGTCCTACAG <u>ACACCGCTGCCATTGTAT</u>			
	<i>trh</i>	N-VPtrh1	<u>CTAACCTTCGTGATGAGCAATCGTT</u> GGCTTCGATATTTTCAGTATCT	10329 (CP045795)	1677013~1677498	531
		N-VPtrh2	GATCAGCTACGTGAGGTCCTACCA <u>TAACAAACATATGCCCATTTCCG</u>			
河弧菌 <i>V. fluvialis</i>	<i>toxR</i>	N-VF7	<u>CTAACCTTCGTGATGAGCAATCGTC</u> TCAACCCTACGTAAAATGC	ATCC 33809 (CP014035)	1866503~1866640	183
		N-VF8	GATCAGCTACGTGAGGTCCTACCG <u>ATGGCATCAGGATCTTTAC</u>			
拟态弧菌 <i>V. mimicus</i>	<i>toxR</i>	N-VM5	<u>CTAACCTTCGTGATGAGCAATCGC</u> AAAACGACATGGATGAGGTA	2011V-1073 (CP035682)	179363~179625	308
		N-VM6	GATCAGCTACGTGAGGTCCTACAT <u>AGGCATATTGACGGCTACA</u>			
	<i>vmhA</i>	N-VM3	<u>CTAACCTTCGTGATGAGCAATCGCT</u> TGATGGCAACTACCTGT	2011V-1073 (CP035683)	682099~682301	248
		N-VM4	GATCAGCTACGTGAGGTCCTACCA <u>CCGTAAACACATTGCTC</u>			
创伤弧菌 <i>V. vulnificus</i>	<i>vvhA</i>	N-VV3	<u>CTAACCTTCGTGATGAGCAATCGCT</u> CACTGGGGCAGTGGC	FJ03-X2 (KC821520)	731~1113	428
		N-VV4	GATCAGCTACGTGAGGTCCTACCC <u>AGCCGTTAACCGAACCA</u>			
类志贺邻单胞菌 <i>P. shigelloides</i>	23S <i>rRNA</i>	N-ples3	<u>CTAACCTTCGTGATGAGCAATCGCT</u> CCGAATACCGTAGAGTGCTATCC	NCIMB 9242 (X65487.1)	906~1188	329
		N-ples4	GATCAGCTACGTGAGGTCCTACCT <u>CCCCTAGCCCAATAACACCTAAA</u>			

注：嵌合引物中，下划线标记部分与通用引物序列相同。

表2 通用引物

引物名称	通用引物序列 (5'-3')	片段长度/bp
IAC-f	CTAACCTTCGTGATGAGCAATCG	145
IAC-r	GATCAGCTACGTGAGGTCCTAC	

### 8.2.3 PCR 反应体系

使用 TE 缓冲液 (pH 8.0) 将合成的引物干粉配制成 100 μmol/L 的储存液。将 12 对嵌合引物的上、下游引物等体积混合，补充适量的灭菌去离子水，配制成嵌合引物混合物工作液 (含每种嵌合引物 0.5 μmol/L)。将通用引物的上、下游引物等体积混合，补充适量的灭菌去离子水，配制成 5 μmol/L 的通用引物工作液。将嵌合引物混合物工作液、通用引物工作液、2×多重 PCR 预混液、灭菌去离子水、DNA 模板按照表 3 的加液量配制反应体系。

表3 PCR 反应体系

试剂名称	加样体积/ $\mu\text{L}$
2×多重 PCR 反应预混液	5
嵌合引物混合物工作液（含每种嵌合引物 0.5 $\mu\text{mol/L}$ ）	1
通用引物工作液（5 $\mu\text{mol/L}$ ）	1
灭菌去离子水	2
DNA 模板	1
总体积	10

#### 8.2.4 对照设置

每次PCR反应以霍乱弧菌、副溶血性弧菌、河弧菌、拟态弧菌、创伤弧菌和类志贺邻单胞菌参考菌株的DNA或含目的片段的DNA作为阳性对照。制备方法：按步骤8.2.1提取细菌DNA，将每种DNA（ $\geq 1 \text{ ng}/\mu\text{L}$ ）等比例进行混合，混合物中不同DNA浓度相近。同时，以大肠埃希氏菌标准菌株DNA作为阴性对照，以灭菌去离子水作为空白对照。

#### 8.2.5 PCR 反应条件

多重PCR反应条件见表4。

表4 多重 PCR 反应条件

程序	温度/ $^{\circ}\text{C}$	反应时间	循环数
1	95	15 min	1
2	95	30 s	10
	60	90 s	
	72	60 s	
3	95	30 s	10
	65	90 s	
	72	60 s	
4	95	30 s	20
	54	90 s	
	72	60 s	
5	72	3 min	1

#### 8.2.6 CE 检测

将DNA Alignment Marker和DNA Size Marker装入缓冲液槽特定位置，安装高分辨率卡夹，将多重PCR产物加入毛细管电泳仪样品孔中，设定程序并启动运行，检测完成后进行数据分析。具体操作按仪器说明书进行。

#### 8.3 结果判定

8.3.1 质控系统：空白对照和阴性对照均未出现扩增条带，阳性对照出现预期大小的扩增条带（参见附录B），则检测系统正常。

- 8.3.2 阴性结果：在质控系统正常的情况下，待测样品未出现预期大小的扩增条带，判定 PCR 结果为阴性。
- 8.3.3 阳性结果：在质控系统正常的情况下，待测样品出现预期大小的扩增条带，判定 PCR 结果为阳性。
- 8.3.4 根据待测样品出现的扩增条带大小，判断目的基因的种类。
- 8.3.5 记录目的基因的种类，在表 5 中查找不同目的基因种类及组合所对应的病原菌种类。
- 8.3.6 高分辨率卡夹在毛细管电泳仪上的判读结果可能存在一定范围的偏差，但不超过预期条带大小的±5%。

表5 多重 PCR 结果判定

目的基因及片段长度	目的基因的种类组合	病原菌种类
<i>ompW</i> (354 bp)	<i>ompW</i> 阳性; <i>rfbN</i> 、 <i>wbfR</i> 阴性	非 O1/非 O139 群霍乱弧菌
<i>rfbN</i> (206 bp)	<i>ompW</i> 和 <i>rfbN</i> 阳性; <i>ctxA</i> 阳性或阴性	O1 群霍乱弧菌 ( <i>ctxA</i> 阳性时为产毒株)
<i>wbfR</i> (165 bp)		
<i>ctxA</i> (452 bp)		
<i>tlh</i> (495 bp)	<i>tlh</i> 阳性; <i>tdh</i> 阳性或阴性; <i>trh</i> 阳性或阴性	副溶血性弧菌 ( <i>tdh</i> 和/或 <i>trh</i> 阳性时为产毒株)
<i>tdh</i> (292 bp)		
<i>trh</i> (531 bp)		
<i>toxR</i> (183 bp)	<i>toxR</i> 阳性	河弧菌
<i>toxR</i> (308 bp)	<i>toxR</i> 和 <i>vmhA</i> 一条或两条阳性	拟态弧菌
<i>vmhA</i> (248 bp)		
<i>vvhA</i> (428 bp)	<i>vvhA</i> 阳性	创伤弧菌
23S <i>rRNA</i> (329 bp)	23S <i>rRNA</i> 阳性	类志贺邻单胞菌

#### 8.4 结果报告

根据PCR判定结果，报告样品中检出或未检出霍乱弧菌、副溶血性弧菌、河弧菌、拟态弧菌、创伤弧菌和类志贺邻单胞菌。

附 录 A  
(规范性)  
培养基和试剂

### A.1 碱性蛋白胨水

#### A.1.1 成分

蛋白胨	10.0 g
氯化钠	10.0 g
蒸馏水	1 000 mL

#### A.1.2 制法

将A.1.1中成分溶于蒸馏水中，校正pH至 $8.5\pm 0.2$ ，121 °C高压灭菌15 min。

### A.2 十倍浓度碱性蛋白胨水

#### A.2.1 成分

蛋白胨	100.0 g
氯化钠	100.0 g
蒸馏水	1 000 mL

#### A.2.2 制法

将A.2.1中成分溶于蒸馏水中，校正pH至 $8.5\pm 0.2$ ，121 °C高压灭菌15 min。

### A.3 磷酸盐缓冲液 (PBS)

#### A.3.1 成分

磷酸二氢钾 ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	34.0 g
氢氧化钠	7.0 g
蒸馏水	1 000 mL

#### A.3.2 制法

贮存液：将A.3.1中成分溶于蒸馏水中，校正pH至 $7.2\pm 0.2$ ，2 °C~8 °C冰箱保存。

稀释液：取贮存液1.25 mL，用蒸馏水稀释至1 000 mL，分装于适宜容器中，121 °C高压灭菌15 min。

### A.4 TE缓冲液 (pH8.0)

#### A.4.1 成分

1 mol/L Tris-HCl (pH 8.0)	10.0 mL
0.5 mol/L EDTA (pH 8.0)	2.0 mL
灭菌去离子水	988 mL

#### A. 4.2 制法

将1 mol/L Tris-HCl缓冲液 (pH 8.0)、0.5 mol/L EDTA溶液 (pH 8.0) 加入约800 mL灭菌去离子水均匀, 再定容至1 000 mL, 121 °C高压灭菌15 min, 2 °C~8 °C冰箱保存。

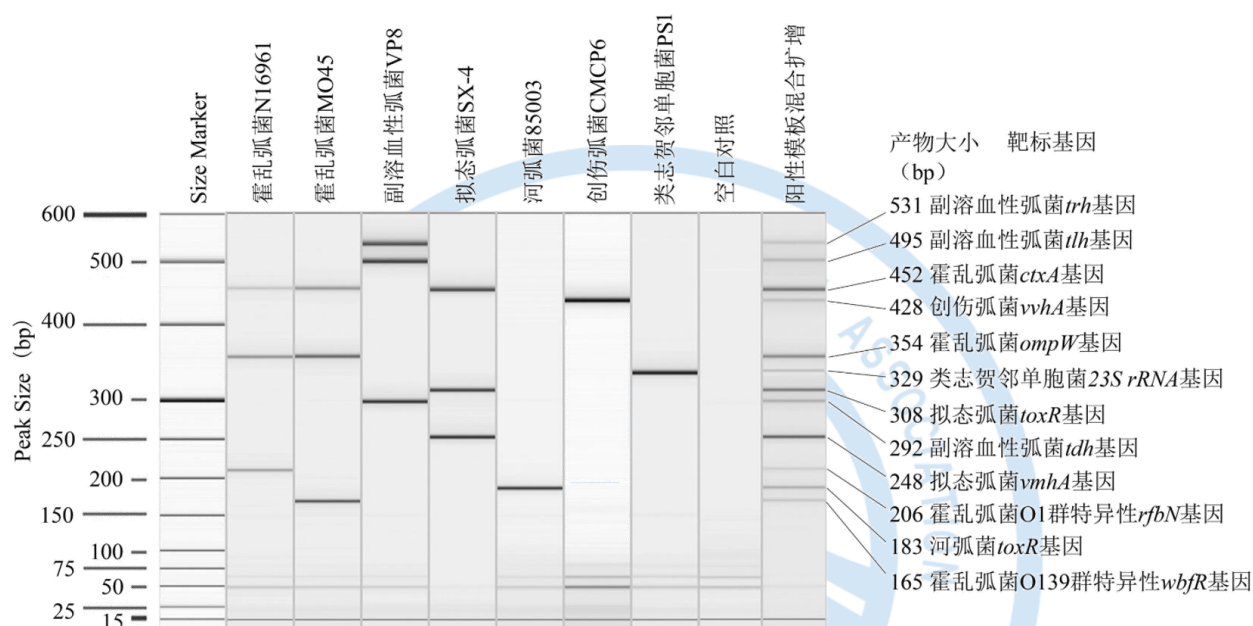


## 附录 B

(资料性)

## 参考菌株多重 PCR-毛细管电泳图

## B.1 参考菌株多重PCR-毛细管电泳图



注1：本示例图中所用参考菌株为霍乱弧菌 N16961、霍乱弧菌 MO45、副溶血性弧菌 VP8、河弧菌 85003、拟态弧菌 SX-4、创伤弧菌 CMCP6 和类志贺邻单胞菌 PS1。其中拟态弧菌 SX-4 携带 *ctxA* 基因。

注2：本示例图高分辨率卡夹（15 bp~5 kp），DNA Alignment Marker（15 bp/600 bp），DNA Size Marker（25 bp~500 bp）。

## 参 考 文 献

- [1] GUAN H, XUE P, ZHOU H, et al. A multiplex PCR assay for the detection of five human pathogenic *Vibrio* species and *Plesiomonas* [J]. *Molecular and Cellular Probes*, 2021, 55:101689.
- [2] HUANG J, ZHU Y, WEN H, et al. Quadruplex real-time PCR assay for detection and identification of *Vibrio cholerae* O1 and O139 strains and determination of their toxigenic potential [J]. *Applied and environmental microbiology*, 2009, 75(22): 6981-5.
- [3] ESPINEIRA M, ATANASSOVA M, VIEITES J M, et al. Validation of a method for the detection of five species, serogroups, biotypes and virulence factors of *Vibrio* by multiplex PCR in fish and seafood [J]. *Food microbiology*, 2010, 27(1): 122-31.
- [4] FUKUSHIMA H, KAWASE J, ETOH Y, et al. Simultaneous Screening of 24 Target Genes of Foodborne Pathogens in 35 Foodborne Outbreaks Using Multiplex Real-Time SYBR Green PCR Analysis [J]. *International journal of microbiology*, 2010, 2010:864817.
- [5] CHEN W, YU S, ZHANG C, et al. Development of a single base extension-tag microarray for the detection of pathogenic *Vibrio* species in seafood [J]. *Applied microbiology and biotechnology*, 2011, 89(6): 1979-90.
- [6] FUKUSHIMA H, TSUNOMORI Y, SEKI R. Duplex real-time SYBR green PCR assays for detection of 17 species of food- or waterborne pathogens in stools [J]. *Journal of clinical microbiology*, 2003, 41(11): 5134-46.
- [7] GONZALEZ-REY C, SVENSON S B, BRAVO L, et al. Specific detection of *Plesiomonas shigelloides* isolated from aquatic environments, animals and human diarrhoeal cases by PCR based on 23S rRNA gene [J]. *FEMS immunology and medical microbiology*, 2000, 29(2): 107-13.
- [8] DEER D M, LAMPEL K A, GONZALEZ-ESCALONA N. A versatile internal control for use as DNA in real-time PCR and as RNA in real-time reverse transcription PCR assays [J]. *Letters in applied microbiology*, 2010, 50(4): 366-72.