



# 中华人民共和国国家标准

GB XXXX—XXXX

## 食品安全国家标准

### 动物性水产品中异尖线虫的检验

(征求意见稿)

XXXX-XX-XX 发布

XXXX-XX-XX 实施

中华人民共和国国家卫生健康委员会  
国家市场监督管理总局 发布

# 食品安全国家标准

## 动物性水产品中异尖线虫的检验

### 1 范围

本标准规定了即食生制动物性水产制品中异尖线虫 (*Anisakidae*) 幼虫的形态学和 PCR 检验方法。本标准适用于即食生制动物性水产制品中异尖线虫幼虫的检验。

### 2 原理

动物性水产制品中的异尖线虫幼虫主要寄生于海洋鱼类、甲壳类、软体类动物的肌肉等组织内。解剖分离或用胃蛋白酶消化动物性水产制品的肌肉组织获得虫体，根据幼虫的形态特征，初步判断幼虫种类。通过扩增异尖线虫核糖体 DNA 内转录间隔区 (ITS) 基因片段并测序，进行异尖线虫幼虫的鉴定。

### 3 仪器和设备

- 3.1 生物显微镜：100×~400×。
- 3.2 体视显微镜：7.5×~150×。
- 3.3 PCR扩增仪。
- 3.4 凝胶成像系统。
- 3.5 电泳仪。
- 3.6 恒温培养箱：37℃±1℃。
- 3.7 高速离心机：转速≥12 000 r/min。
- 3.8 网筛：孔径0.25 mm (60 目)。
- 3.9 锥形量杯：1 000 mL。
- 3.10 微量移液器：0.2 μL~2.5 μL，1 μL~10 μL，10 μL~100 μL，100 μL~1 000 μL。

### 4 试剂和材料

#### 4.1 试剂

- 4.1.1 盐酸：36%~38% HCl 溶液。
- 4.1.2 生理盐水：0.85% NaCl 溶液。
- 4.1.3 1 mol/L Tris-HCl 溶液 (pH 8.0)。
- 4.1.4 0.5 mol/L EDTA 溶液 (pH 8.0)。
- 4.1.5 10% SDS 溶液。

- 4.1.6 5 mol/L NaCl 溶液。
- 4.1.7 3 000 U/mg 胃蛋白酶。
- 4.1.8 20 mg/mL 蛋白酶 K。
- 4.1.9 苯酚/三氯甲烷/异戊醇 (25:24:1)。
- 4.1.10 5 U/ $\mu$ L 耐热 DNA 聚合酶。
- 4.1.11 10 $\times$ PCR 缓冲液。
- 4.1.12 25 mmol/L MgCl<sub>2</sub>。
- 4.1.13 dNTPs: dATP、dTTP、dCTP、dGTP, 每种浓度为 2.5 mmol/L。
- 4.1.14 琼脂糖: 电泳级。
- 4.1.15 50 $\times$ TAE 缓冲液: 使用前用去离子水稀释成 1 $\times$ TAE 缓冲液。
- 4.1.16 1 $\times$ TE 溶液 (pH 8.0)。
- 4.1.17 10 mg/mL 溴化乙锭 (EB) 或其他核酸染料。
- 4.1.18 6 $\times$ 上样缓冲液。
- 4.1.19 100 bp~2 000 bp DNA 分子量标准。
- 4.1.20 PCR 引物: 浓度为 20  $\mu$ mol/L。

正向引物 NC5: 5'-GTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATT-3'

反向引物 NC2: 5'-TTAGTTTCTTTTCCTCCGCT-3'

扩增异尖线虫 ITS 基因片段长度为 800 bp~1 100 bp。

## 4.2 试剂配制

- 4.2.1 胃蛋白酶消化液: 取胃蛋白酶 5 g, 溶解于 900 mL 生理盐水中, 加盐酸 7 mL, 混匀, 再加生理盐水至 1 000 mL, 临用现配。
- 4.2.2 裂解液: 10% SDS 溶液 100 mL、1 mol/L Tris-HCl 溶液 10 mL、0.5 mol/L EDTA 溶液 200 mL、5 mol/L NaCl 溶液 20 mL, 加灭菌去离子水至 1 000 mL。
- 4.2.3 1.5% 琼脂糖凝胶: 琼脂糖 1.5 g, 加入 1 $\times$ TAE 缓冲液至 100 mL, 加热至完全融化后冷却至 60  $^{\circ}$ C~70  $^{\circ}$ C, 加入 10 mg/mL 溴化乙锭 5  $\mu$ L, 混匀, 制备凝胶。

## 5 检测方法

### 5.1 形态学方法

在取样和样本制备过程中, 可采用直接解剖观察法进行检测, 如果检出可疑虫体, 则进一步做 PCR 检测; 如果采用直接解剖观察法未检出异尖线虫, 则需要用蛋白酶消化法进行检测。

也可直接对样本采用蛋白酶消化法进行检测。

#### 5.1.1 直接解剖观察法

##### 5.1.1.1 样品制备

取动物性水产制品, 剖解, 肉眼或体视显微镜观察肌肉等组织。动物性水产制品中的异尖线虫为第三期幼虫, 虫体多以包囊形式寄生于宿主体内, 包囊往往是一种圆形或长形套, 紧包住虫体, 若发现黄白色、无色微透明或乳白色的虫体或包囊, 用镊子轻轻取出虫体或从包囊内分离出虫体, 将虫体置于加有生理盐水的培养皿中, 清除虫体周围杂物。

##### 5.1.1.2 镜检

用生物显微镜观察分离到的虫体形态, 异尖线虫第三期幼虫的虫体呈黄白色、乳白色或无色微透明, 外形呈长纺锤形, 体长 10 mm~30 mm 不等, 头端较尾端尖细, 头部有唇块, 在腹侧有一明显的钻齿, 中肠部体宽为 430  $\mu$ m~550  $\mu$ m, 无侧翼; 活虫肉眼可见距头端 2~3 mm 处有一个 1 mm 的白点,

即为长形小胃，显微镜下观察呈深色不透明（见附录 A）。具备以上特征的虫体，可判定为异尖线虫科幼虫。对疑似异尖线虫科幼虫虫体立即用于 DNA 提取或-20℃保存备用。

## 5.1.2 胃蛋白酶消化法

### 5.1.2.1 取样

如果用直接解剖法未检出异尖线虫，需采集动物性水产制品的肌肉组织用剪刀剪成小块。

### 5.1.2.2 消化

取处理好的样品 200 g，按照 1:5 的比例加入胃蛋白酶消化液，充分搅拌均匀，于 37℃恒温箱放置 4 h~16 h，使肌肉完全消化，可根据不同水产品种类以及消化时间对胃蛋白酶浓度和使用量进行调整。

### 5.1.2.3 过滤

消化后的悬液用网筛过滤，并用生理盐水冲洗网筛上的残留物。收集滤液置于锥形量杯内，搅拌后沉淀 15 min~30 min。轻轻倾去上清液，加入适量生理盐水，搅拌后再沉淀 15 min~30 min。重复洗涤 3 次~5 次，直至上清液透明为止，沉淀备用。

### 5.1.2.4 镜检

全部沉淀物分次转移至玻璃平皿，在体视显微镜下去除沉淀中的杂质，分离收集疑似虫体，用生物显微镜观察分离到的虫体形态。具备 5.1.1.2 特征的虫体，可判定为异尖线虫科幼虫。对疑似异尖线虫科幼虫虫体立即用于 DNA 提取或-20℃保存备用。

## 5.2 PCR 方法

### 5.2.1 DNA 提取

取 5.1.1.2 或 5.1.2.4 判断为疑似异尖线虫幼虫的虫体，放入 1.5 mL 离心管中，加入无菌生理盐水 200  $\mu$ L，匀浆后加裂解液 500  $\mu$ L、蛋白酶 K 10  $\mu$ L，混匀，55℃温浴至虫体被完全消化（1 h~3 h）。加入苯酚/三氯甲烷/异戊醇（25:24:1）500  $\mu$ L，混匀，12 000 r/min 离心 5 min。吸取上清液加入等体积的三氯甲烷，混匀，12 000 r/min 离心 5 min。吸取上清液加入 0.8 倍体积的异丙醇，充分混匀，4℃12 000 r/min 离心 10 min，弃上清。加入 75% 乙醇 700  $\mu$ L 冲洗沉淀，12 000 r/min 离心 5 min，弃上清，干燥后加入 50  $\mu$ L 1×TE 溶液溶解 DNA，立即用于检测或-20℃保存备用。

注：根据实验室实际情况，可使用经验证的商品化组织 DNA 提取试剂盒提取 DNA。

### 5.2.2 PCR 反应体系

在 PCR 管中依次加入 10×PCR 缓冲液 5.0  $\mu$ L，MgCl<sub>2</sub> 5.0  $\mu$ L，dNTPs 2.0  $\mu$ L，正向引物和反向引物各 1.0  $\mu$ L，耐热 DNA 聚合酶 0.5  $\mu$ L，DNA 模板 2.5  $\mu$ L，加灭菌去离子水至总体积 50  $\mu$ L。每次试验需设阳性和空白对照。阳性对照用异尖线虫 DNA 或含有目标基因序列的质控品，空白对照用灭菌去离子水做模板。

### 5.2.3 PCR 反应条件

反应程序为 95℃预变性 4 min；94℃变性 30 s，55℃退火 30 s，72℃延伸 30 s，进行 35 个循环；72℃延伸 10 min；4℃保存。

### 5.2.4 电泳

取 PCR 扩增产物 10  $\mu$ L 与 6×上样缓冲液 2  $\mu$ L 混合，加样于 1.5% 琼脂糖凝胶中，其中一孔加入 DNA 分子量标准，1×TAE 电泳缓冲液，5 V/cm 恒压电泳 30 min~40 min，用凝胶成像系统观察和记录结果。

### 5.2.5 PCR 结果判定

阳性对照出现预期大小的条带（800 bp~1100 bp），空白对照无条带，待测样品扩增出预期大小的条带，可判 PCR 结果为阳性；无扩增条带或未扩增出预期大小的条带均判为 PCR 结果阴性。

取PCR结果为阳性的PCR产物进行基因序列双向测序,将测序结果与DNA序列数据库参考序列(见附录B)进行同源性比对。

## 6 结果报告

6.1 形态学方法检出异尖线虫科幼虫,报告检出异尖线虫幼虫。

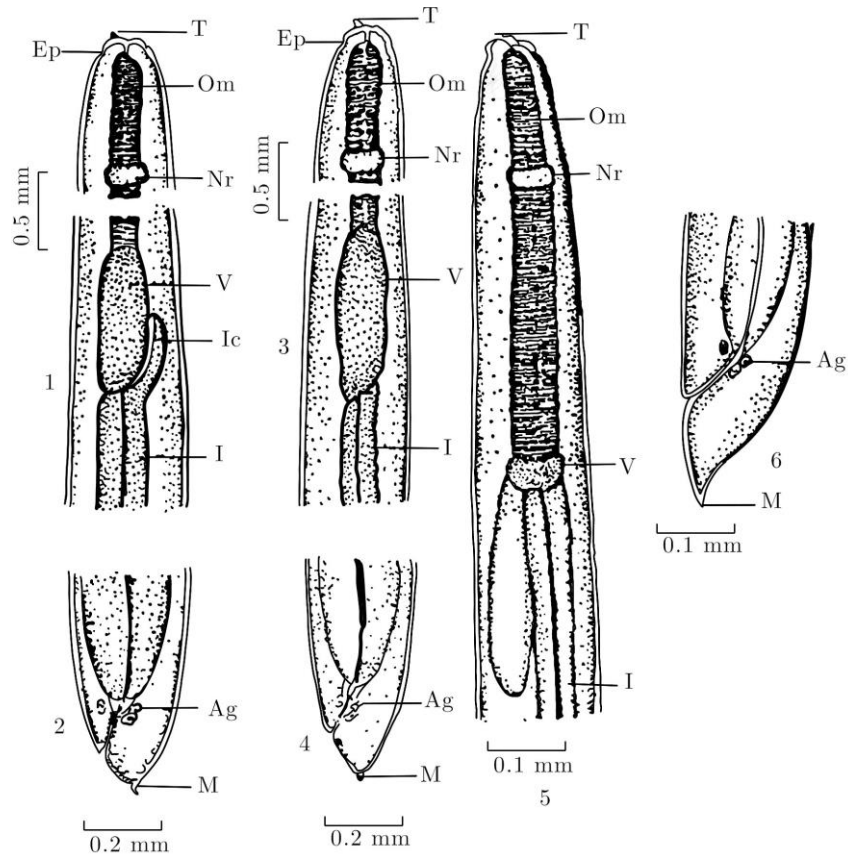
6.2 形态学方法检出疑似异尖线虫科幼虫、PCR 结果为阳性且扩增片段基因序列与任何一条参考序列同源性 $\geq 95\%$ ,报告检出异尖线虫幼虫。

6.3 形态学方法未检出异尖线虫科幼虫、或 PCR 结果为阴性、或扩增片段基因序列与参考序列同源性 $< 95\%$ ,报告未检出异尖线虫幼虫。

附录 A

异尖线虫第三期幼虫形态

异尖线虫第三期幼虫模式图见图 A.1。



说明:

1、2——海豹线虫 A 型幼虫 (*Phocascaris larval type A*);

3、4——异尖线虫 I 型幼虫 (*Anisakis larval type I*);

5、6——针蛔线虫幼虫 (*Raphidascaris*);

T——钻齿 (Boring tooth);

Om——食道肌 (Oesophageal muscle);

Ep——排泄孔 (Excretory pore);

Nr——神经环 (Nerve ring);

V——胃 (Ventriculus);

Ic——肠盲囊 (Intestinal cecum);

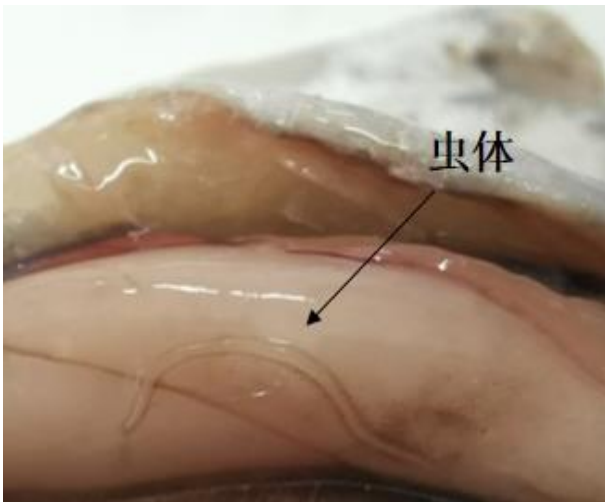
I——肠管 (Intestine);

Ag——侧尾腺 (Aside caudal gland);

M——尾棘 (Mucron)。

图 A.1 异尖线虫第三期幼虫模式图 (仿罗朝科, 2005)

异尖线虫第三期幼虫实物图见图 A.2~A.6。



A. 2 鱼体内的异尖线虫



图 A. 3 肉眼观察分离的异尖线虫



图 A. 4 不同视野下的异尖线虫 (78. 2×)



图 A. 5 不同视野下的异尖线虫 (45×)



图 A. 6 紫外灯下观察到的异尖线虫

## 附录B

## 异尖线虫的参考序列

B.1 简单异尖线虫 (*A. simplex complex*) 参考序列, 长度 952 bp

TAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTATCGAGCGAATCCAAAACGAACGAAAAAGTCTCCCAACGTG  
CATACCTTCCATTTGCATGTTGTTGTGAGCCACATGGAACTCGTACACACGTGGTGGCAGCCGTCTG  
CTGTGCTTTTTTTAGGCAGACAATGGCTTACGAGTGGCCGTGTGCTTGTGAACAACGGTGACCAATT  
TGGCGTCTACGCCGTATCTAGCTTCTGCCTGGACCGTCAGTTGCGATGAAAGATGCGGAGAAAGTTC  
CTTTGTTTTGGCTGCTAATCATCATTGATGAGCAGTAGCTTAAGGCAGAGTTGAGCAGACTTAATGAG  
CCACGCTAGGTGGCCGCCAAAACCCAAAACACAACCGGTCTATTTGACATTGTTATTTCAATTGTATGT  
GTTGAAAATGTACAAATCTTGGCGGTGGATCACTCGGTTTCGTGGATCGATGAAGAACGCAGCCAGCT  
GCGATAAATAGTGCGAATTGCAGACACATTGAGACTAAGAATTCGAACGCACATTGCGCTATCGGG  
TTCATTCCCGATGGCACGTCTGGCTGAGGGTCAATTACGGTGAAGTGTCTTCACGGTTTTTCTGGAC  
TGTGAAGCATTCGGCAAGCAATTGCTGTTGTGTTGTTGGTGATTCTATCATGGACAATATGACGAGCG  
GTTCCCTGCTTAGTGATGACAAAAGAAGACGTCAACACCGAATCTACTATACTACTAATACTAGTAT  
ATAGGTGAGGTGCTTTTTGGTGGTCACAAAAGTGACAAGTATGCCATTTTCATAGGGGCAACAACCAGC  
ATACGTGATAAGTTGGCTGGTTGATGAAACGGCAACGGAATGACGGACGTCTATGNGATCAAAAAT  
GATACTATTTGACCTCAGCTCAGTCGTGATTACCCGCTGAATTTAAGCATATAATTAAGCGGAGGAA  
AAGAAACTAA

B.2 典型异尖线虫 (*A. typica*) 参考序列, 长度 955 bp

TAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTGTCGAGCGAATCCAAAACGAAAAAGTCTCCCAACGTGCATAC  
CGCCATTTACATGTTGTTGTGAGCCGCACGGAACTCGTACACGTTTGTGGTGGTGATAGCCGTCTG  
CTGTGCGTTCGTTGGGCAGACAATGGCTTACGAGTGGCTGTGCGCTTGTGAACAACGGTGACCAAT  
TTGGCGTCTACGCCGTATCTAGCCTCCGCCTGGACCGTTCGGTAGCGATGAAAGATGCGGAGGAAGTT  
CCTCGTCAGAGTTGAGCAGACTTAATGAGCCACGCTCTAGGTGGCCGCCAGAACCCAAAACACACCA  
ATTGTTGTCATTTGACATTGTTGATGATGTTTATGTACAAATCTTGGCGGTGGATCACTCGGTTTCGTG  
GATCGATGAAGAACGCAGCCAGCTGCGATAAATAGTGCGAATTGCAGACACATTGAGCACTAAGAA  
TTCGAACGCACATTGCGCTATCGGGTTCAATCCCGATGGCACGTCTGGCTGAGGGTCAATTGTGCTA  
GAGCATCTTTGCAATCACTTCTCTCAGATTGTGATTGTGAAGCATTTCGGCGAGCGATTGTTGTCGTGT  
TGTTGCTTAAGGTGACGATTGAATCGGCACCGCGCGACACGACACGGTTCCTTGCTTAGTTTGATGAA  
CAAAAAGACGTCCCGCACACCCAACGTCTGCTAAACACTAGACTAGAGCTGGTGTCTAGAGGTGTTG  
GGTGTGATTTTGATGGTCACAAAAGTGCCGCCATTTTCATAGTGGAACAACCAGCATACTGCTATGA  
TACTAGTAGTTGGCTGGTTGATGAAACGGCAACGGAATGTGCGCATGCATGTGATCGAGAAGCGAT  
AATGTTTCGATTTGACCTCAGCTCAGTCGTGATTACCCGCTGAATTTAAGCATATAATTAAGCGGAGG  
AAAAGAACTAA

B.3 派式异尖线虫 (*A. pegreffii*) 参考序列, 长度 954 bp

GTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTATCGAGCGAATCCAAAACGAACGAAAAAGTCTCCCAACGT  
GCATACCTTCCATTTGCATGTTGTTGTGAGCCACATGGAACTCGTACACACGTGGTGGCAGCCGTCT  
GCTGTGCTTTTTTTAGGCAGACAATGGCTTACGAGTGGCCGTGTGCTTGTGAACAACGGTGACCAAT



TTGGCGTCTACGCCGTATCTAGCTTCTGCCTGGACCGTCAGTTGCGATGAAAGATGCGGAGAAAGTT  
 CCTTTGTTTTGGCTGCTAATCATCATTGATGAGCAGCAGCTTAAGGCAGAGTCGAGCAGACTTAATGA  
 GCCACGCTAGGTGGCCGCCAAAACCCAAAACACAACCGGTCTATTTGACATTGTTATTTTCATTGTATG  
 TGTTGAAAATGTACAAATCTTGGCGGTGGATCACTCGGTTTCGTGGATCGATGAAGAACGCAGCCAGC  
 TCGATAAATAGTGCGAATTGCAGACACATTGAGCACTAAGAATTCGAACGCACATTGCGCTATCGG  
 GTTCATTCCCGATGGCACGTCTGGCTGAGGGTCAATTACGGTGAACCTGTCTTCACGGTTTTTCTGGA  
 CTGTGAAGCATTTCGGCAAGCAATTGCTGTTGTGTTGTTGGTGATTCTATCATGGACAATATGACGAGC  
 GGTCCTTGCTTAGTGATGACAAAAGAAGACGTCAACACCGAATCTACTATACTACTAATACTAGTA  
 TATAGGTGAGGTGCTTTTTGGTGGTCACAAAAGTGACAAGTATGCCATTTTCATAGGGGCAACAACCAG  
 CATACTGATAAGTTGGCTGGTTGATGAAACGGCAACCGAATGACGGACGTCTATGTGATCAAAAAT  
 GATACTATTTGACCTCAGCTCAGTCGTGATTACCCGCTGAATTTAAGCATATAATTAAAGCGGAGGAA  
AAGAACTAAA

B.4 小抹香鲸异尖线虫 (*A. paggiae*) 参考序列, 长度 921 bp

GTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTATCGAGCGAATCCAAAACGAAAAAGTCTCCCAACGTGCAT  
 ACCATCCATTTGCATGTTGTTGTGAGCCGCATGGAACTCATAACACGCGTGGTGGCAGCCGTCTGCTG  
 TGCTTTTTTCGTGCAGACAATGGCTTATGAGTGGCCGTGTGCTTGTGTAACAACGGTGACCAATTTGGC  
 GTCTACGCCGTATCTAGCTTCTGCCTGGACCGTCGGTAGCGATGAAAGATGCGGAGAGAGTTCTCTCT  
 GTTTTGGTTCATTCGTGGACCAACGCAGGGTCGAGCAGACTTAATGAGCCACGCTTGGTGGCCGCCA  
 AAACCCAAAACACAACCAGTCTATTTGACATTGTTTCGTATGTGTTAACATTATGTTAATGTACAAAT  
 CTTGGCGGTGGATCACTCGGTTTCGTGGATCGATGAAGAACGCAGCCAGCTGCGATAAATAGTGCGAA  
 TTGCAGACACATTGAGCACTAAGAATTCGAACGCACATTGCGCTATCGGGTTCATTCCCGATGGCAC  
 GTCTGGCTGAGGGTCAATTATGGCAAACCTATCTTCGCAGTTTCGGCTGTGAAGCATTTCGGCGAGCA  
 GTTGTGTGTTGTTGGTTCGTTTCGTTTCGTTTCGATCGGTTGGCAACATGACGGCTCCTTGCTTAGTT  
 GTTGTGAATAGACGTTAACACCGAACTATATGCGGTGATATTGGTGGTTCGAAAAGCGAGAAGTATG  
 CCGCTTCATAGGGGCAACAACCAGCATGCGTGTATGACAAGTTGGCTGGTTGATGAACTGTTGGCAA  
 AGGAGTGACGTGCGTGTAAACGGTGCATCAAGAACGTTTGTATTTGACCTCAGCTCAGTCGTGATTA  
 CCCGCTGAATTTAAGCATATAATTAAAGCGGAGGAAAAGAACTAAA

B.5 剑吻鲸异尖线虫 (*A. ziphidarum*) 参考序列, 长度 930bp

TAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTATCGAGCGAATCCAAAACGAACTAAAAAGTCTCCCAACGTGC  
 ATACCGTCCATTTGCATGTTGTTGTGAGCCGCATGGAACTCGTACACATGTGGTGGCAGCCGTCTGC  
 TGTGCTTTTTTGTGCAGACAATGGCTTACGAGTGGCTGTGTGCTTGTGTAACAACGGTGACCAATTTG  
 GCGTCTACGCCGTATCTAGCTTCCGCCTGGACCGTCGGTTGCGATGAAAGATGCGGAGGAAGTTCTT  
 TTGTGTTGGCTTATCATCATTGATCAGCTGATGCAGAGTCGAGCAGACTTAATGAGCCACGCTAGGTG  
 GCCGCCAAAACCCAAAACACAACCGGTCTATTTGACATTGTTACTTTGTATGTGTTGAAAATGTACAA  
 ATCTTGGCGGTGGATCACTCGGTTTCGTGGATCGATGAAGAACGCAGCCAGCTGCGATAAATAGTGCG  
 AATTGCAGACACATTGAGCACTAAGAATTCGAACGCACATTGCGCTATCGGGTTCATTCCCGATGGC  
 ACGTCTGGCTGAGGGTCAATTACGGTGAACCTGTCTTCGCGGTTTTTGTGACTGTGAAGCATTTCGGC  
 GAGCAATTGTTGCTGTGTTGTTGATGATTGAGTCGACAATATGGCACACGGTTCCTTGCTTAGTTATG  
 AAGAGAAGAAGACGTCAACACCGAACCTACTATACTACTAGTACTAGTGTATAGGTGAGGTGCTTTT  
 GGTGGTCACAAAAGTGAAAAGTATGCCATTTTCATAGGGGCAACAACCAGCATAATGATAAGTTGGC  
 TGGTTGATGAAACGGCAACCGAATGATGTATGTGATCAAAAATGTTTATATTTGACCTCAGCTCAGT

CGTGATTACCCGCTGAATTTAAGCATATAATTAAGCGGAGGAAAAGAACTAA

B.6 抹香鲸异尖线虫 (*A. physeteris*) 参考序列, 长度 899 bp。

TAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTATCGAGCGAATCCAAAACGAACAAGTCTCCCAACGTGCATAC  
 CGTCCATTTGCATGTTGTTGTGAGCCGCATGGAAACTCATACACATGTGGTGGCAGCCGTCTGCTGTG  
 CTTTATTGTGCAGACAATGGCTTATGAGTGGCCGTGTGCCTGTTGAACAACGGTGACCAATTTGGCGT  
 CTACGCCGTATCTAGCTTCTGCCTGGACCGTCAGTAGCGATGAAAGATGCGGAGAAAGTTCCTCTGTT  
 TTGACTCATTTCGTGGGCCAACACAGGGTCGAGCAGACTTAATGAGCCACGCTTGGTGGCCGCCAAAA  
 CCCAAAACACAACCAGTCTATTTGACATTGTTTCAGTATGCGTTGACATTACGTTAATGTACAAATCTT  
 GCGGTGGATCATTTCGGTTCGTGGATCGATGAAGAACGCAGCCAGCTGCGATAAATAGTGCGAATTG  
 CAGACACATTGAGCACTAAGAATTCGAACGCACATTGCGCCATCGGGTTCATTCCCGATGGCACGTC  
 TGGCTGAGGGTTCGAATTATGGCAAACCTATCTTCGTGGCTCCGGCCGTGAAACATTCGGCAAGCAGTT  
 GTCGTGTTGTTGGTTCGGTCTTTGAATCGGTTCGATTGGCGGCTCGACGGCTCCTTGCTTAGTTGTT  
 GTGTGAGGAGACGTCAACACCGAACGACGGTGATATTGGTGATCGCAAAGCGAAAAGTATGCCAC  
 TTCATAGGGGCAACAACCAGCATAACGTGTGTTGGCTGGTTGATGAACTGTTGGCAACGGAGTGACGG  
 TGTGATCAGGAACGTTTGTATTTGACCTCAGCTCAGTCGTGATTACCCGCTGAATTTAAGCATATAAT  
TAAGCGGAGGAAAAGAACTAA

B.7 娜氏异尖线虫 (*A. nascettii*) 参考序列, 长度 900 bp

CTGCGGAAGGATCATTATCGAGCGAATCCAAAACGAACGAAAAAGTCTCCCAACATGCATACCGTCC  
 ATTTGCATGTTGTTGTGAGCCGCATGGAAACTCGTACACACATGTGGTGGCAGCCGTCTGCTGTGCTT  
 TTTTGTGCAGACAATGGCTTACGAGTAGCCGTGTGCTTGTGAAACAACGGTGACCAATTTGGCGTCTA  
 CGCCGTATCTAGCTTCTGCCTGGACCGTCGGTAGCGATGAAAGATACGGAGGAAGTTCATTGTTTTG  
 GCTTATCATCATTGATAAGTTGAGGCAGTGTGAGCAGACTTAATGAGCCACGCTAGGTGGCCGCCA  
 AAACCCAAAACACAACCGGTCTATTTGACATTGTTACTTTGTATGTGTTGAAAATGTACAAATCT  
 TGGCGGTGGATCACTCGTTCGTGGATCGATGAAGAACGCAGCCAGCTGCGATAAATAGTGCGAATT  
 GCAGACACATTGAGCACTAAGAATTCGAACGCACATTGCGCTATCGGGTTCATTCCCGATGGCACGT  
 CTGGCTGAGGGTTCGAATTACGGTAAACTATCTTCGCACTTCTTAGTGAGTGTGAAGCATTTCGGCGAG  
 CAATTGTTGTTGTGTTGTTGATGATAGAATCGACAATATGGCGCGTTTCCTCGCTTAGTTATGACAGC  
 AAGAAGAAGACGTCAACACCTCACTAGTAGTAATATAAGTGAGGTGCTTGTGATGGTCACAAGAATG  
 ACGTGTATGCCATTTATAGGGGCAACAACCAGCATAACGTAATAAGTTGGCTGGTTGATGAAACGGC  
 AACGGAATGATATACGTGTATGTGATCAAAAAAGTTTATATTTGACCTCAGCTCAGTCGTGATTACCC  
 GCTGAATTTAAGCATATAATTA

B.8 短棘异尖线虫 (*A. brevispiculata*) 参考序列, 长度 849 bp

CTGCGGAAGGATCATTATCGAGCGAATCCAAAACGAACAAGTCTCCCAACGTGCATACCATCCATTT  
 GCATGTTGTTGTGAGCCGCATGGAAACTCATACACATGTGGTGGCAGCCGTCTGCTGTGCTTTATTGT  
 GCAGACAATGGCTTATGAGTGGCCGTGTGCCTGTTGAACAACGGTGACCAATTTGGCGTCTACGCC  
 CATCTAGCTTCTGCCTGGACCGTCGGTAGCGATGAAAGATGCGGAGAAAGTTCCTCTGTTTTGGCTCG  
 TTCTTCGAGACCAACTCAGGGTTGAGCAGACTTAATGAGCCGCGCTTGGCGGCCGCCAAAACCCAAA  
 ACACAACCAGTCTATTTGACATTGTTTCAGTATGCGTTGACATTATGTTAATGTACAAATCTTGGCGGT  
 GGATCACTCGGTTTCGTGGATCGATGAAGAACGCAGCCAGCTGCGATAAATAGTGCGAATTGCAGACA  
 CATTGAGCACTAAGAATTCGAACGCACATTGCGCTATCGGGTTCATTCCCGATGGCACGTCGGCTG

AGGGTCGAATTATGGCAAACCTATCTTCGCGGTTTCGGCTGTGAAGCATTTCGGCAAGCAGTTGCTATGT  
TGTTGGTCGGTCGGTCTCGGTCGGTCGATTGACAGCATGATGGCTCCTTGCTTAGTTGTTGTGTGAAG  
AGACGTTAACACCGAACGGCGGTGATATTGGTGATCGCAAAGCGAGAAGTATGCCACTTCATAGG  
GGCAACAACCAGCATACGTATGTTGGCTGGTTGATGAACTGTTGGCAACGGAGTGACGGTGTGATCA  
GGAACGTTTGTATTTGACCTCAGCTCAGTCGTGATACCCGCTGAATTTAAGCATATAATTAA

B.9 伪新地线虫属 (*Pseudoterranova*) 参考序列, 长度 895 bp

CTGCGGAAGGATCATTATCGAGCGAATCCAAAACGAAAAAGTCTCCCAACGTGCATACCATCCATT  
GCATGTTGTTGTGAGCCACATAGAACTCATACACGTGTGGTGGCAGCCGTCTGATGTGCTTTATCGT  
GCAGACAATGGCTTATGAGTGGCTGTGTGATTGTTGAACAACGGTGACCAATTTGGCGTCTACGCCG  
TATCTAGCTTCTGCCTGGACCGTCGGTAGCGATGAAAGATGCGGAGGAAGTTCCTCTGTTTTGGTACG  
CTAAAGCAGAGTTGAGCAGACTTAATGAGCCACGCTTGGTGGCCGCCAAAACCCAAAACACAACCA  
GTCTATTTTAACGTTTGTGATATGTTAATGTACAAATCTTGGCGGTGGATCACTCGGTTTCGTGGATC  
GATGAAGAACGCAGCCAGCTGCGATAAATAGTGCGAATTGCAGACACATTGAGCACTAAGAATTTCG  
AACGCACATTGCGCTATCGGGTTCATTCCCGATGGCACGTCTGGCTGAGGGTCGAATTATAGTAAAC  
TATCTTCGAGTACTTTTTATGGTCGTGAAGTATTCGGCAAGTAGTGACGTCGGATTGTTTTTGTGGTC  
GTCCGTTTCGTTTCGGTCGGTCAACAACAATATTCTGAGGCTCCTTGCTTAGTTGTGTTCTAGTAGACGT  
TAACACCTGAACAATATGTGGTGGTGATATTGGTGATGGCGAGAATCATGCCGCTTCAATGGGGCAG  
CAACCAGCATACGCTAATGACAGTTGGTTGATTGAAGCCAGGGCAACGGAGTGATGTACGTGTGGCG  
ATCATTAAACGTTTATATTTGACCTCAGCTCAGTCGTGATTACCCGCTGAATTTAAGCATATAATTAA  
GCGGAGGAAAAGAACTAA

---