



中华人民共和国国家标准

GB XXXX—XXXX

食品安全国家标准

动物性水产品中广州管圆线虫的检验

(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

动物性水产品中广州管圆线虫的检验

1 范围

本标准规定了即食生制动物性水产制品中广州管圆线虫 (*Angiostrongylus cantonensis*) 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广州管圆线虫幼虫的检验。

2 原理

动物性水产制品中的广州管圆线虫幼虫主要寄生于福寿螺等水产品的肌肉等组织内。解剖分离或使用胃蛋白酶消化宿主动物组织获得虫体，根据幼虫的形态特征，初步判断幼虫种类；通过扩增广州管圆线虫核糖体DNA的内转录间隔区 (ITS) 基因片段并测序，进行广州管圆线虫幼虫的鉴定。

3 仪器和设备

- 3.1 生物显微镜：40×~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0.15 mm（100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 三氯甲烷/异戊醇 (24:1)。
- 4.1.11 5 U/ μ L 耐热 DNA 聚合酶。
- 4.1.12 10 \times PCR 缓冲液。
- 4.1.13 25 mmol/L MgCl₂。
- 4.1.14 dNTPs: dATP、dTTP、dCTP、dGTP, 每种浓度为 2.5 mmol/L。
- 4.1.15 琼脂糖: 电泳级。
- 4.1.16 50 \times TAE 电泳缓冲液, 使用前用去离子水稀释成 1 \times TAE 缓冲液。
- 4.1.17 1 \times TE 溶液 (pH 8.0)。
- 4.1.18 10 mg/mL 溴化乙锭 (EB) 或其他核酸染料。
- 4.1.19 6 \times 上样缓冲液。
- 4.1.20 100 bp~2 000 bp DNA 分子量标准。
- 4.1.21 引物: 浓度为 10 μ mol/L。

正向引物 F1674: 5'-GTCGTAACAAGGTATCTGTAGGTG-3'

反向引物 58SR4: 5'-TAGCTGCGTTTTTCATCGATA-3'

扩增广州管圆线虫 ITS 基因片段长度为 827 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 μ L, 混匀, 制备凝胶。

5 检测方法

5.1 形态学方法

5.1.1 肺囊检查法

5.1.1.1 样品制备

解剖受检的螺类, 敲除外壳, 沿外套膜的左侧至右侧基部剪开铺平, 剪开翻开肺囊袋。

5.1.1.2 镜检

体视显微镜观察幼虫结节。广州管圆线虫幼虫在肺囊上虫体卷曲, 形成凸起状结节。轻轻剥开结节, 生物显微镜观察幼虫。广州管圆线虫第三期幼虫白色透明, 长度为 0.4 mm~0.5 mm, 虫体头端钝圆, 尾部末端尖细, 体表有微细环状横纹 (见附录 A)。在螺类中检查到具备上述特征的虫体, 可判断为疑似广州管圆线虫幼虫。虫体立即用于 DNA 提取或 -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

5.1.2 胃蛋白酶消化法

5.1.2.1 取样

取动物性水产制品的肌肉等组织用剪刀剪成小块, 或用均质器低速搅碎。

5.1.2.2 消化

取 5.1.2.1 样品 200 g, 按照样品与胃蛋白酶消化液 1:5 的比例混匀, 37 °C 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, 沉淀 15 min~30 min。轻轻倾去上清液, 加入适量的生理盐水, 搅拌后再沉淀 15 min~30 min。重复洗涤 3 次~5 次, 至上清液透明为止, 沉淀备用。

5.1.2.4 镜检

全部沉淀分次转移至玻璃平皿, 在体视显微镜下收集沉淀中的虫体, 用生物显微镜进行形态鉴定。具备 5.1.1.2 特征的虫体, 可判断为疑似广州管圆线虫幼虫。虫体立即用于 DNA 提取或 -20 °C 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 分离出的虫体, 放入 1.5 mL 离心管中, 加裂解液 500 μ L, 加入蛋白酶 K 10 μ L, 55 °C 水浴至虫体被完全消化 (1 h~3 h)。在混合液中加入苯酚/三氯甲烷/异戊醇 (25:24:1) 500 μ L, 混匀, 12 000 r/min 离心 5 min。取上层水相, 加入等体积的三氯甲烷/异戊醇 (24:1), 混匀, 12 000 r/min 离心 5 min。取上层水相加入 2 倍体积预冷的无水乙醇, -20 °C 放置 30 min 至过夜, 12 000 r/min 离心 15 min。倾去上清液, 加入 75% 乙醇 700 μ L 冲洗沉淀, 12 000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 干燥后加入 20 μ L 1 \times TE 溶液溶解 DNA, 立即检测或 -20 °C 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 \times PCR 缓冲液 5.0 μ L, MgCl₂ 5.0 μ L, dNTPs 2.0 μ L, 正向引物和反向引物各 2.0 μ L, 耐热 DNA 聚合酶 0.5 μ L, DNA 模板 2.5 μ L, 加灭菌去离子水至总体积 50 μ L。每次试验需设阳性、阴性和空白对照。阳性对照用广州管圆线虫 DNA 或含有目标基因序列的质控品, 阴性对照用不含虫体的动物性水产制品 DNA 做模板, 空白对照用灭菌去离子水做模板。

5.2.3 PCR 反应条件

94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 65 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 扩增 35 个循环; 72 °C 延伸 10 min, 4 °C 保存。

5.2.4 电泳

取 PCR 扩增产物 10 μ L 与 6 \times 上样缓冲液 2 μ 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 \times 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 (827 bp), 阴性对照和空白对照没有该条带, 待测样品扩增出预期大小的条带, 可判定 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 结果为阴性。

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 形态学方法检出疑似幼虫、PCR 结果为阳性且扩增片段基因序列与参考序列同源性 \geq 95%, 报告检出广州管圆线虫。

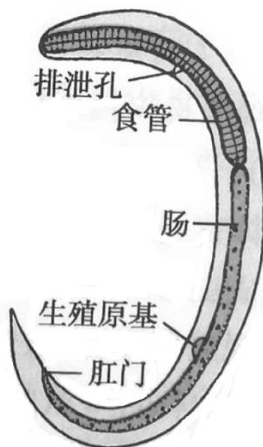
6.2 形态学方法未检出幼虫、或 PCR 结果为阴性、或扩增片段基因序列与参考序列同源性 $<$ 95%,

报告未检出广州管圆线虫。

附录 A

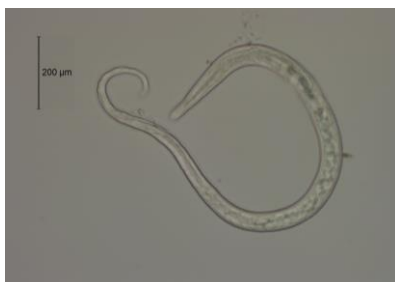
广州管圆线虫第三期幼虫形态

广州管圆线虫第三期幼虫模式图见图A.1。



图A.1 广州管圆线虫第三期幼虫模式图（仿诸欣平等 2019）

广州管圆线虫第三期幼虫实物图见图A.2。



图A.2 广州管圆线虫第三期幼虫实物图

附录 B

广州管圆线虫参考序列

B.1 广州管圆线虫参考序列

GTCGTAACAAGGTATCTGTAGGTGAACCTGCAGATGGATCATCGCTAATCTCACAACCACC
ACAAAACACAAACAACACTAGCATCATCTACGTCGTCGTTACGATCGATGATGTAGTGGTGGG
TGGGTGGTTGATGATGAGAGAATGTGATCAACAACGAGAAACCACCAACACATATACACG
TTCACCTAGTGTATGATGGTGATGATAATTTGGCGGCTATGTCGCTAAAGTTGGTGGTATCG
TCGTATAACACCGTTAGAGCTCAACACACAAGGTGTCTACATGTATAAGCATGAGTCGTT
TAGAGTGACGGTTATGATTGCTTATACGAGCGAAAGCACACACACACAAACTGTCGCGC
ATGTATGAATTAATGGTGCGGCGATTTGCTTCGTGATTGTGTGGTGAAGACTTAATGAGCAT
TGCATGAATGCCACCTTGAATTGCTGGATATGGTTGATAGTGCCTGTATGCATGTGTGTGCA
CGTTTTGCGTTGTTGGTGATTATGCATGAGATGTAGCTATGCGTAATATACGGCGTATGTCA
CTCGTTGTCTTTCATGGATGGCGAACTGATAGTATCATCGCATATCTACTATACGCATGTGA
CACCTGATTGACAGGAAATCTTAATGACCCAAGTATAATGTTTCAATGGGCGCCAACGTAG
CAACAGAACAGTTTTTCTACACGTGAAAATGTGGAACGAGATACACAGGATGTATATATAT
ATATATACACATATATATATGTGTATGGAAATTGATATACTAGCTTCAGCGATGGATCGGTC
GATTCGCGTATCGATGAAAAACGCAGCTA
