



中华人民共和国国家标准

GB XXXX—XXXX

食品安全国家标准

动物性水产品中并殖吸虫的检验

(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

动物性水产品中并殖吸虫的检验

1 范围

本标准规定了即食生制动物性水产制品中并殖吸虫（*Paragonimus*）囊蚴的形态学和PCR的检验方法。
本标准适用于即食生制动物性水产制品中并殖吸虫囊蚴的检验。

2 原理

动物性水产品中并殖吸虫的囊蚴主要寄生在蟹类、蝾蛄和沼虾等甲壳动物的肌肉组织内。捣碎沉淀分离或使用胃蛋白酶消化动物宿主组织获得囊蚴，根据并殖吸虫囊蚴的形态特征，初步判断囊蚴的种类；通过扩增并殖吸虫核糖体DNA的第二内转录间隔区(ITS-2)基因片段并测序，进行并殖吸虫囊蚴的鉴定。

3 仪器与设备

- 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 2 mm（10 目）；孔径 0.425 mm（40 目）。
- 3.9 微量移液器：0.2 μL~2.5 μL，1 μL~10 μL，10 μL~100 μL，100 μL~1 000 μL。
- 3.10 锥形量杯：1 000 mL。
- 3.11 玻璃珠：425 μm~600 μm。
- 3.12 陶瓷研钵（直径 16 cm）和研磨棒。

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/ μ L 耐热 DNA 聚合酶。
- 4.1.11 10 \times PCR 缓冲液。
- 4.1.12 25 mmol/L MgCl₂。
- 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 引物：浓度为 10 μ mol/L。

ITS-2 引物

正向引物序列3S: 5' -GGTACCGGTGGATCACTCGGCTCGT G-3'

反向引物序列A28: 5' -GGGATCCTGGTTAGTTTCTTTTCCTCCGC-3'

扩增的并殖吸虫ITS-2基因片段长度为520 bp。

4.2 试剂配制

- 4.2.1 胃蛋白酶消化液：胃蛋白酶5 g，加生理盐水900 mL，加盐酸7 mL，混匀，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（pH 8.0）10 mL、0.5 mol/L EDTA溶液（pH 8.0）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（EB）5 μ L，混匀，制备凝胶。

5 检测方法

5.1 形态学方法

5.1.1 捣碎法

5.1.1.1 样品制备

取蟹（蝼蛄、虾）等甲壳类动物水产品 1 只（个），使用消毒过的陶瓷研钵及研磨棒捣碎样品，用生理盐水冲洗经 10 目网筛过滤于锥形量筒内，除去粗的蟹（蝼蛄、虾）壳。滤液再用 40 目网筛过滤，除去细壳，加生理盐水至锥形量杯的最大刻度处，沉淀 15 min 后，弃上清液，用生理盐水洗涤沉淀 3 次~5 次至上清液透明为止，全部沉渣吸入玻璃平皿，在体视显微镜下收集囊蚴。

5.1.1.2 镜检

将含有沉渣的玻璃平皿在体视显微镜下观察，检查挑取其中的囊蚴，在生物显微镜下进行形态鉴定。新鲜水产品中并殖吸虫囊蚴一般呈圆球形或椭圆球形，囊蚴直径在250 μm ~ 435 μm ，壁厚8 μm ~ 20 μm ，通常具有2层囊壁膜，后尾蚴折叠蜷曲在囊内，能看见充满黑色颗粒的排泄囊和两侧弯曲的肠管。不同种的并殖吸虫囊蚴大小有差异，如卫氏并殖吸虫囊蚴直径为250 μm ~ 390 μm ，壁厚14 μm ~ 20 μm ，有两层囊壁，外薄内厚，后尾蚴挤缩囊内，排泄囊稍大；斯氏并殖吸虫囊蚴，直径400 μm ~ 420 μm ，壁厚12 μm ~ 14 μm ，内层囊壁略薄，后尾蚴挤缩囊内，排泄囊小而黑；三平正并殖吸虫囊蚴直径415 μm ~ 435 μm ，壁厚8 μm ~ 12 μm ，内壁层厚，近两端更显增厚，蚴体多作“U”形蜷曲于囊内（见附录A）。在水产品中检查到具备上述特征的囊蚴，可判定为疑似并殖吸虫囊蚴。疑似并殖吸虫囊蚴立即用于DNA提取或-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

5.1.2 胃蛋白酶消化法

5.1.2.1 取样

当蟹（蝾蛄、虾）数量大于20个以上时，可使用胃蛋白酶消化法。分批用研磨棒在消毒过的陶瓷研钵中将样品捣碎，备用。

5.1.2.2 消化

取5.1.2.1样品200g，分批按照样品与胃蛋白酶消化液1:5的比例混匀，置三角烧杯中充分混匀后，于37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱放置4h~6h，使肌肉组织完全消化。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

消化后的悬液经10目网筛过滤，除去粗壳；再用40目网筛过滤，除去细壳，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15min。轻轻倾去上清液，加入生理盐水至锥形量杯的最大刻度处，搅拌后再沉淀15min。通常需用生理盐水洗涤滤液中的沉淀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，分离收集疑似囊蚴，用生物显微镜观察囊蚴形态。具备5.1.1.2形态特征的囊蚴，可判定为疑似并殖吸虫囊蚴，疑似并殖吸虫囊蚴立即用于DNA提取，或保存于-20 $^{\circ}\text{C}$ 。

5.2 PCR方法

5.2.1 DNA提取

取符合并殖吸虫形态特征的单个或多个疑似囊蚴用生理盐水洗净，放入1.5mL离心管中，加DNA裂解液500 μL ，再加入少量玻璃珠振荡5min~10min，匀浆使囊蚴充分裂解。加入蛋白酶K 10 μL ，55 $^{\circ}\text{C}$ 振荡消化2h。在混合液中加入苯酚/三氯甲烷/异戊醇(25:24:1) 240 μL ，混匀，12000 r/min离心10min。吸取上清（约500 μL ）加入新的1.5mL离心管，加入2倍体积-20 $^{\circ}\text{C}$ 预冷的无水乙醇，充分混匀，4 $^{\circ}\text{C}$ 12000 r/min离心15min。沉淀用75%乙醇700 μL 离心洗涤1次~2次，每次4 $^{\circ}\text{C}$ 12000 r/min离心3min。倒干乙醇，37 $^{\circ}\text{C}$ 干燥后加入1 \times TE溶液（pH8.0）100 μL 溶解DNA，立即用于检测或-20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。

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 μL ，MgCl₂ 5.0 μL ，dNTPs 2 μL ，正向引物和反向引物各2 μL ，耐热DNA聚合酶 0.5 μL ，DNA模板2.5 μL ，加灭菌去离子水至总体积50 μL 。每次试验需设阳性对照、空白对照。阳性对照用并殖吸虫囊蚴或成虫的DNA或者相应基因片段的质粒做模板，空白对照用灭菌去离子水做模板。

5.2.3 PCR反应条件

ITS-2: 95 °C预变性1 min; 94 °C变性50 s, 68 °C退火1 min, 68 °C延伸 1 min, 35个循环; 72 °C延伸7 min; 4 °C保存。

5.2.4 电泳

取 PCR 扩增产物 10 μL 与 6 \times 上样缓冲液 2 μL 混合, 点样, 其中的一孔加 DNA 分子量标准。1 \times TAE 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 (520 bp), 空白对照无条带。待测样品扩增出现预期大小条带, 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 形态学方法检出疑似并殖吸虫囊蚴、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 $\geq 95\%$, 报告检出并殖吸虫囊蚴。

6.2 形态学方法鉴定未检出囊蚴、或PCR结果为阴性、或基因序列与参考序列同源性 $< 95\%$, 报告未检出并殖吸虫囊蚴。

附录 A

并殖吸虫囊蚴形态

并殖吸虫囊蚴模式图见图A.1。

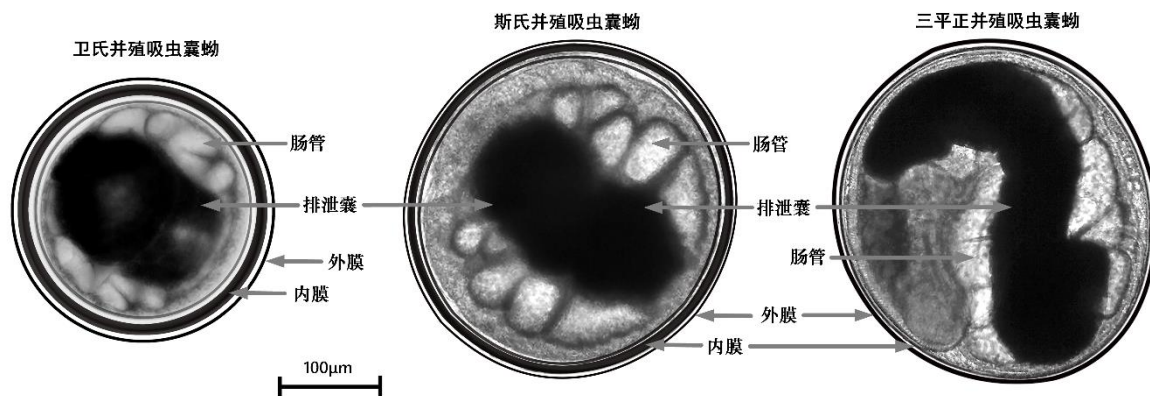


图 A.1 并殖吸虫囊蚴模式图

并殖吸虫囊蚴实物图见图 A.2。



卫氏并殖吸虫囊蚴实物图

斯氏并殖吸虫囊蚴实物图

三平正并殖吸虫囊蚴实物图

图 A.2 三种并殖吸虫囊蚴实物图

附录 B

并殖吸虫参考序列

B.1 卫氏并殖吸虫 (*Paragonimus westermani*) ITS2 参考序列:

TGGTACCGGTGGATCACTCGGCTCGTGTGTCGATGAAGAGCGCAGCCAACTGTGTGAATTAATGCGAA
 CTGCATACTGCTTTGAACATCGACATCTTGAACGCATATTGCGGCCACGGGTTAGCCTGTGGCCACGC
 CTGTCCGAGGGTCGGCTTATAAACTATCGCGACGCCAAAAAGTCGCGGCTTGGGTTTTGCCAGCTGG
 CGTGATCTCCCAATCTGGTCTTGTGCCTGTGGGGTGCCAGATCTGTGGCGTTTCCCTAACATACTCGG
 GCGCACCCACGTTGCGGCTGAAAGCCTTGACGGGGATGTGGCAACGGAATCGTGGCTCAGTGAATGA
 TTTATGTGCGCGTTCCGCTGTCTTTCATCTGTGGTTTATGTTGCGCGTGGTCTGCTTTTCGATGCTG
 ACCTACGTATGTGCCATGTGGTTCATTCTCCTGACCTCGGATCAGACGTGAGTACCCGCTGAACTTAA
 GCATATCACTAAGCGGAGGAAAAGAACTAACCAGGATCCCA

B.2 斯氏并殖吸虫 (*Paragonimus skrjabini*) ITS2 参考序列:

TGGTACCGGTGGATCACTCGGCTCGTGTGTCGATGAAGAGCGCAGCCAACTGTGTGAATTAATGTGAACTGC
 AACTGCTTTGAACATCGACATCTTGAACGCATATTGCGGCCACGGGTTAGCCTGTGGCCACGCCTGTCCGAG
 GGTCGGCTTATAAACTATCGCGACGCCAAAAAGTCGCGGCTTGGGTTTTGCCAGCTGGCGTGATTTCCCA
 ACCTGGCCTCGTGGCTGTGGGGTGCCAGATCTGTGGCGTTTCCCTAACATATCCGGGCGTACCCATGTTGTGG
 CTGAAAGCCTTGATGGGGATGTGGCAACGGAATCGTGGCTCAGTGATTGATTTGTGCGCGTTCCGCTATCCTA
 TCATCGTCTATGGTTGATGTTGCGCGTGGTGTGTGCCTGATGCTGACCTATGATGTGCCATGTGGCTCATTCT
 CCTGACCTCGGATCAGACGTGAGTACCCGCTGAACTTAAGCATATCACTAAGCGGAGGAAAAGAACTAAC
CAGGATCCCA

B.3 三平正并殖吸虫 (*Euparagonimus cenocopiosus*) ITS2 参考序列:

TGGTACCGGTGGATCACTCGGCTCGTGTGTCGATGAAGAGCGCAGCCAACTGTGTGAATTAATGCGAACTGC
 AACTGCTTTGAACATCGACATCTTGAACGCATATTGCGGCCACGGGTTAGCCTGTGGCCACGCCTGTCCGAG
 GGTCGGCTTATAAACTATCGCGACGCCAAAAAGTCGCGGCTTGGGTTTTGCCAGCTGGCGTGATTTCCCA
 AATCTGGCCTCGTGCCTGTGGGGTGCCAGATCTATGGCGTTTCCCTAACATATCCGGGCGTACCCATGTTGTG
 GCTGAAAGCCTTGACGGGGATGTGGTAACGGAATCGTGGCTCAGTGAATGATTTGTGTGCGCGTTTCGTTGT
 CCCGTCTTCATCTATGGTTGATGTTGCACGTGGTCTGCGTCCGATGCTGACCTACGTATGTCCGTTTGGCTCA
 TTTTCCTGACCTCGGATCAGACGTGAGTACCCGCTGAACTTAAGCATATCACTAAGCGGAGGAAAAGAACT
AACCAGGATCCCA