

# 中华人民共和国国家标准

GB 31610.2—2023

食品安全国家标准

动物性水产品及其制品中异尖线虫的检验

2023-09-06 发布

2024-03-06 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

## 动物性水产品及其制品中异尖线虫的检验

### 1 范围

本标准规定了动物性水产品及其制品中异尖线虫(Anisakidae)幼虫的形态学和 PCR 检验方法。

本标准适用于动物性水产品及其制品中异尖线虫幼虫的检验。

### 2 原理

动物性水产品及其制品中的异尖线虫幼虫主要寄生于海洋鱼类、甲壳类、软体类动物的肌肉和脏器表面等组织内。解剖分离或用胃蛋白酶消化动物性水产品及其制品的肌肉或脏器等组织获得虫体,根据幼虫的形态特征,判断异尖线虫科幼虫。对可疑虫体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,进行常见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 °C±1 °C。
- 3.7 高速离心机:转速≥12 000 r/min。
- 3.8 网筛:孔径 2 mm(10 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×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×TAE 缓冲液:使用前用去离子水稀释成 1×TAE 缓冲液。
- 4.1.16 1×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×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'-TTAGTTCTTTCCCTCCGCT-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 生理盐水:称取 8.5 g NaCl 溶解于 900 mL 去离子水,再加去离子水至 1 000 mL。
- 4.2.2 1 mol/L Tris-HCl 溶液:称取 121.1 g Tris(三羟甲基氨基甲烷)溶解于 800 mL 去离子水,用盐酸调节 pH 至 8.0,加去离子水至 1 000 mL。
- 4.2.3 0.5 mol/L EDTA 溶液:称取 186.1 g Na<sub>2</sub>EDTA · 2H<sub>2</sub>O(二水合乙二胺四乙酸二钠)溶解于 800 mL 去离子水,搅拌溶解,用 NaOH 调节 pH 至 8.0,加去离子水至 1 000 mL。
- 4.2.4 5 mol/L NaCl 溶液:称取 292.5 g NaCl 溶解于 900 mL 去离子水,再加水至 1 000 mL。
- 4.2.5 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。
- 4.2.6 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。
- 4.2.7 1.5% 琼脂糖凝胶:琼脂糖 1.5 g,加入 1×TAE 缓冲液至 100 mL,加热至完全融化后冷却至 60 ℃~70 ℃,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

#### 5.1.1 直接解剖观察法

##### 5.1.1.1 样品制备

取动物性水产品或其制品,剖解,肉眼或体视显微镜观察腹腔、消化道、肠系膜、肝、生殖腺等器官及肌肉等组织。动物性水产品及其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  $\mu\text{m}$ ~550  $\mu\text{m}$ ,无侧翼;活虫肉眼可见距头端 2 mm~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,异尖线虫第三期幼虫模式图见图 A.1,实物图见图 A.2~图 A.10。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。

注:如直接解剖观察法未检出异尖线虫科幼虫,则需用蛋白酶消化法进行检测。

## 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科幼虫,需采集动物性水产品或其制品的肌肉或脏器等组织用剪刀剪成小块。

### 5.1.2.2 消化

取处理好的样品 200 g,按照样品与胃蛋白酶消化液 1:5 的质量体积比加入消化液混匀,于 37 ℃ ±1 ℃ 恒温培养箱放置 4 h~16 h,使肌肉或脏器等组织完全消化,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

消化后的悬液用网筛过滤,并用生理盐水冲洗网筛上的残留物,用肉眼或放大镜观察残留物是否附着可疑虫体。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科幼虫的虫体,放入 1.5 mL 离心管中,加入无菌生理盐水 200  $\mu\text{L}$ ,匀浆后加裂解液 500  $\mu\text{L}$ 、蛋白酶 K 10  $\mu\text{L}$ ,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  $\mu\text{L}$ ,混匀,4 ℃ 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,4 ℃ 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  $\mu\text{L}$  冲洗沉淀,4 ℃ 12 000 r/min 离心 5 min,弃上清液,干燥后加入 50  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$ 、 $\text{MgCl}_2$  5.0  $\mu\text{L}$ 、dNTPs 2.0  $\mu\text{L}$ 、正向引物和反向引物各 1.0  $\mu\text{L}$ 、耐热 DNA 聚合酶 0.5  $\mu\text{L}$ 、DNA 模板 2.5  $\mu\text{L}$ ,加灭菌去离子水至总体积 50  $\mu\text{L}$ 。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

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, 将测序结果与异尖线虫 ITS 参考序列(见附录 B)进行同源性比对。

## 6 结果报告

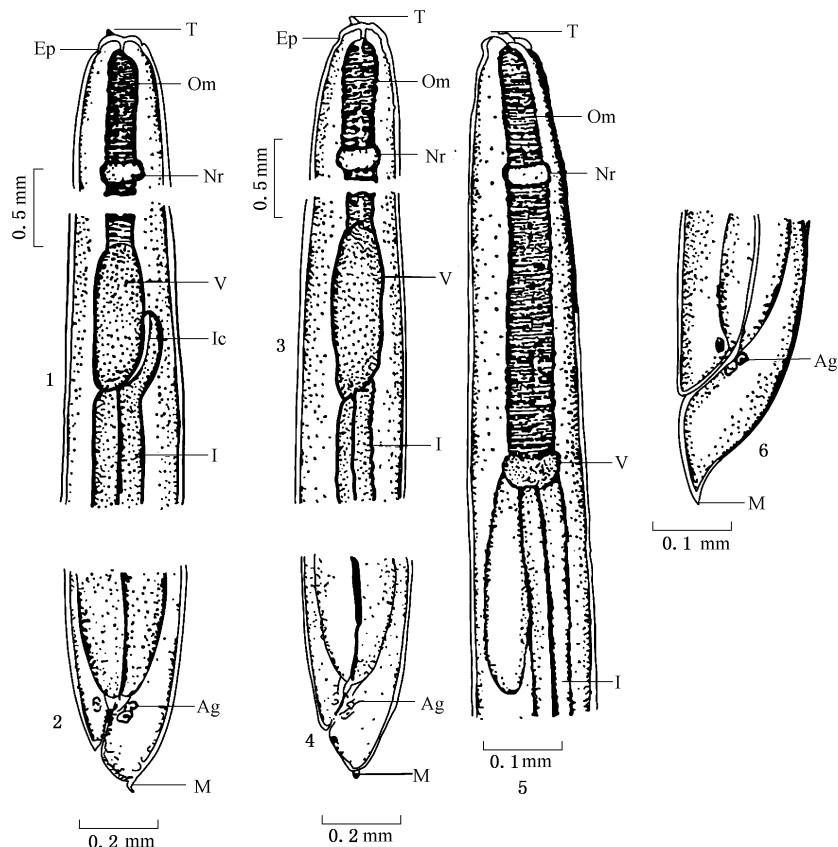
6.1 形态学方法检出异尖线虫科幼虫, 报告检出异尖线虫幼虫。

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异尖线虫参考序列同源性  $\geq 95\%$ , 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异尖线虫参考序列同源性均  $< 95\%$ , 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

A.1 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；

3、4——异尖线虫 I 型；

5、6——针蛔线虫；

T —— 钻齿(Boring tooth)；

Ep —— 排泄孔(Excretory pore)；

V —— 胃(Ventriculus)；

I —— 肠管(Intestine)；

M —— 尾棘(Mucron)。

Om —— 食道肌(Oesophageal muscle)；

Nr —— 神经环(Nerve ring)；

Ic —— 肠盲囊(Intestinal cecum)；

Ag —— 侧尾腺(Aside caudal gland)；

图 A.1 异尖线虫第三期幼虫模式图(仿罗朝科,2005)

A.2 异尖线虫第三期幼虫实物图见图 A.2~图 A.10。

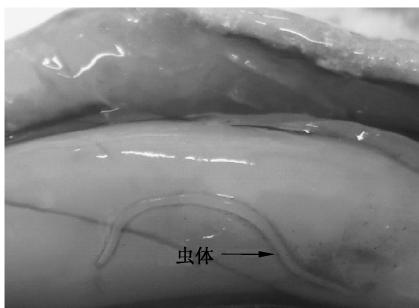


图 A.2 鱼体内的  
异尖线虫

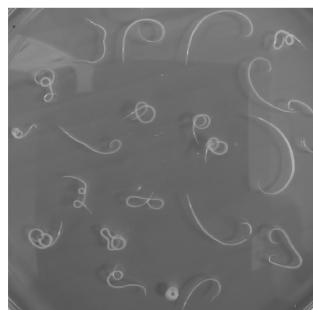


图 A.3 不同形态的  
异尖线虫

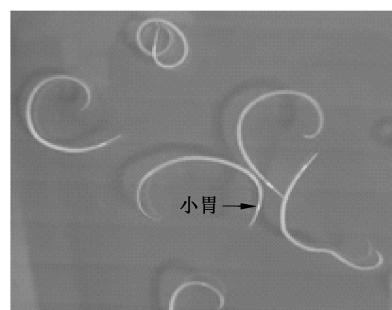


图 A.4 蓝色背景观察的  
异尖线虫

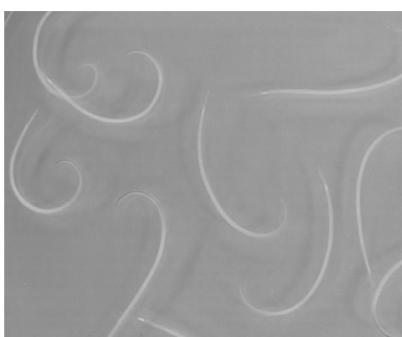


图 A.5 白色背景观察的  
异尖线虫



图 A.6 黑色背景观察的  
异尖线虫



图 A.7 透射光观察的  
异尖线虫



图 A.8 不同显微镜视野下的  
异尖线虫(45×)



图 A.9 不同显微镜视野下的  
异尖线虫(78.2×)

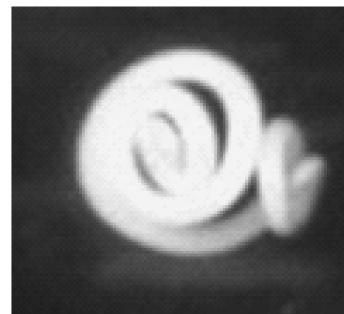


图 A.10 紫外灯下观察的  
异尖线虫

**附录 B**  
**异尖线虫 ITS 参考序列**

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

TAGGTGAAACCTCGGAAGGATCATTATCGAGCGAATCCAAAACGAACGAAAAAGTCTCCAACGTG  
 CATACCTTCATTGCATGTTGTGAGCCACATGGAAACTCGTACACACGTGGTGGCAGCCGTCTG  
 CTGTGCTTTTTAGGCAGACAATGGCTACGAGTGGCGTGTGCTTGAACAACGGTGACCAATT  
 TGGCGTCTACGCCGTATCTAGCTCTGCCTGGACCGTCAGTTGCGATGAAAGATGCGGAGAAAGTTC  
 CTTTGTGCTGCTAATCATCATTGATGAGCAGTAGCTTAAGGCAGAGTTGAGCAGACTTAATGAG  
 CCACGCTAGGTGGCCAAAACCCAAAACACAACCGGTCTATTGACATTGTTATTCAATTGTATGT  
 GTGAAAATGTACAAATCTGGCGGTGGATCACTCGGTTCTGGATCGATGAAGAACGCAGCCAGCT  
 GCGATAAAATAGTGCAGATTGCAAGACACATTGAGCAGTAAGAATTGAAACGCACATTGCGCTATCGGG  
 TTCATTCCCGATGGCACGTCTGGCTGAGGGTCGAATTACGGTGAACTGTCTTCACGGTTTCTGGAC  
 TGTGAAGCATTGGCAAGCAATTGCTGTTGTTGGTATTCTATCATGGACAATATGACGAGCG  
 GTTCCTTGCTTAGTGATGACAAAAGAACGTCAACACCGAATCTACTATACTAATACTAGTAT  
 ATAGGTGAGGTGCTTTGGTGGTACAAAAGTGACAAGTATGCCATTGATAGGGCAACAACCAGC  
 ATACGTGATAAGTTGGCTGGTGTGATGAAACGGCAACGGAATGACGGACGTCTATGNGATCAAAAAT  
 GATACTATTGACCTCAGCTCAGTCGTGATTACCCGCTGAATTAAAGCATATAATTAAGCGGAGGAA  
AAGAAACTAA

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

TAGGTGAAACCTCGGAAGGATCATTGTCAGCGAATCCAAAACGAACGAAAAAGTCTCCAACGTGCATAC  
 CGCCCATTACATGTTGTGAGCCGCACGGAAACTCGTACACGTTGTTGGTGGTGTGATAGCCGTCTG  
 CTGTGCGTCTGGCAGACAATGGCTACGAGTGGCTGTGCGCTTGTGAAACAACGGTGACCAATT  
 TTGGCGTCTACGCCGTATCTAGCCTCCGCCTGGACCGTCGGTAGCGATGAAAGATGCGGAGGAAGTT  
 CCTCGTCAGAGTTGAGCAGACTTAATGAGCCACGCTCTAGGTGGCCGAGAACCCAAAACACACCA  
 ATTGTTGTCATTGACATTGTTGATGATGTTATGTACAAATCTTGGCGGTGGATCACTCGGTTCTG  
 GATCGATGAAAGAACGCCAGCTCGGATAAATAGTGCAGACACATTGAGCAGTAAGAAT  
 TCGAACGCACATTGCGCTATCGGGTCATTCCGATGGCACGTCTGGCTGAGGGTCGAATTGCTA  
 GAGCATTTGCAATCACTCTCAGATTGTTGATGAGCAGTGGCAGCGATTGTTGTCGTGT  
 TGGTCTTAAGGTGACGATTGAAATCGGCACCGCGACACGACACGGTTCTTGCTTAGTTGATGAA  
 CAAAAGACGTCCCGCACACCCAAACGTCTGCTAAACACTAGACTAGAGCTGGTGTCTAGAGGTGTTG  
 GGTGTGATTTGATGGTCACAAAAGTGCAGCCATTGATAGTGGCAACAACCAGCATACGTCTATGA  
 TACTAGTAGGTTGGCTGGTTGATGAAACGGCAACGGAATGTGCGCATGTCATGAGAACGAT  
 AATGTTCGTATTGACCTCAGCTCAGTCGTGATTACCCGCTGAATTAAAGCATATAATTAAGCGGAGG  
AAAAGAAACTAA

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

GTTAGGTGAAACCTCGGAAGGATCATTATCGAGCGAATCCAAAACGAACGAAAAAGTCTCCAACGT  
 GCATACCTTCATTGCATGTTGTGAGCCACATGGAAACTCGTACACACGTGGTGGCAGCCGTCT  
 GCTGTGCTTTTTAGGCAGACAATGGCTACGAGTGGCGTGTGCTTGAACAACGGTGACCAATT

TTGGCGTCTACGCCGTATCTAGCTTCTGCCTGGACCGTCAGTTGCGATGAAAGATGCGGAGAAAGTT  
CCTTGTTTGGCTGCTAATCATCATTGATGAGCAGCAGCTTAAGGCAGAGTCGAGCAGACTTAATGA  
GCCACGCTAGGTGGCCAAAACCCAAAACACAACCGGTCTATTGACATTGTTATTCAATTGTATG  
TGTGAAAATGTACAATCTTGGCGGTGGATCACTCGGTTCGTGGATCGATGAAGAACGCAGCCAGC  
TGCGATAAAATAGTGCAGATTGCAGACACATTGAGCACTAAGAATTGAAACGCACATTGCGCTATCGG  
GTTCATTCGGATGGCACGTCTGGCTGAGGGTCGAATTACGGTAACGTCTTCACGGTTTCTGGA  
CTGTGAAGCATTGGCAAGCAATTGCTGTTGTTGGTATTCTATGGACAATATGACGAGC  
GGTCCTGCTTAGTGTGACAAAAGAACGACGTCAACACCGAATCTACTATACTACTAATAACTAGTA  
TATAGGTGAGGTGCTTTGGTGGTCACAAAAGTGACAAGTATGCCATTTCATAGGGCAACAAACCAG  
CATACGTGATAAGTTGGCTGGTTGATGAAACGGCAACCGAATGACGGACGTCTATGTGATCAAAAAT  
GATACTATTGACCTCAGCTCAGTCGTGATTACCGCTGAATTAAAGCATATAATTAAAGCGGAGGAA  
AAGAAACTAAA

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

GTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTATCGAGCGAATCCAAAACGAAAAAGTCTCCAACGTGCAT  
ACCATCCATTGCATGTTGAGGCCATGGAAACTCATACACCGTGGTGGCAGCCGTCTGCTG  
TGCTTTTCGTCAGACAATGGCTTATGAGTGGCGTGTGCTTGAACAACGGTACCAATTGGC  
GTCTACGCCGTATCTAGCTCTGCCTGGACCGTCGGTAGCGATGAAAGATGCGGAGAGAGTTCCCT  
GTTTGGTTCATCGTGGACCAACGCAGGGTCGAGCAGACTTAATGAGCCACGCTGGTGGCCGCCA  
AAACCCAAAACACAACCAGTCTATTGACATTGTTGTTATGTTAACATTGTTAATGTACAAT  
CTTGGCGGTGGATCACTCGGTTCGTGGATCGATGAAGAACGCAGCCAGCTGCGATAAATAGTGC  
TTGCAGACACATTGAGCACTAAGAATTGCAACGCACATTGCGCTATCGGTTCATCCGATGGC  
GTCTGGCTGAGGGTCGAATTATGGCAAACACTATCTCGCAGTTGGCTGTGAAGCATTGGCGAGCA  
GTTGTTGTGTTGGTCGTTCGTTCGTTGATCGATCGGTTGGCAACATGACGGCTCCTGCTTAGTT  
GTTGTAATAGCCTAACACCGAAACTATATGCGGTGATATTGGTGGTCGAAAGCGAGAAGTATG  
CCGCTCATAGGGCAACACCAGCATCGTGTATGACAAGTTGGCTGGTTGATGAACTGTTGGCAA  
AGGAGTGACGTGCGTGAACGGTGCATCAAGAACGTTGTTATTTGACCTCAGTCAGTCGTGATTA  
CCCGCTGAATTAAAGCATATAATTAAAGCGGAGGAAAAGAAACTAAA

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

TAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTATCGAGCGAATCCAAAACGAACTAAAAGTCTCCAACGTGC  
ATACCGTCCATTGCATGTTGAGGCCATGGAAACTCGTACACATGTGGTGGCAGCCGTCTG  
TGTGCTTTTGTGAGACAATGGCTTACGAGTGGCTGTGCTTGAACAACGGTACCAATTG  
GCGTCTACGCCGTATCTAGCTCCGCTGGACCGTCGGTTGCGATGAAAGATGCGGAGGAAGTTCC  
TTGTGTTGGCTTATCATCATTGATCAGCTGATGCAGAGTCGAGCAGACTTAATGAGCCACGCTAGGT  
GCCGCCAAAACCCAAAACACAACCGGTCTATTGACATTGTTACTTGTATGTTGAAAATGTACAA  
ATCTTGGCGGTGGATCACTCGGTTCGTGGATCGATGAAGAACGCAGCCAGCTGCGATAAATAGTGC  
AATTGCAGACACATTGAGCACTAAGAATTGCAACGCACATTGCGCTATCGGTTCATCCGATGGC  
GTCTGGCTGAGGGTCGAATTACGGTGAACACTGTCTTCGCGGTTTAGTGACTGTGAAGCATTGGCG  
GCAATTGTTGCTGTGTTGATGATTGAGTCGACAATATGGCACACGGCTCCTGCTTAGTTATGAAGA  
GAAGAACGCTAACACCGAACCTACTATACTACTAGTACTAGTGTATAGGTGAGGTGCTTTGGTGGTC  
ACAAAAGTAAAAGTATGCCATTTCATAGGGCAACACCGACATGATAAGTTGGCTGGTTGATGA  
AACGGCAACCGAATGATGTATGATCAAAAATGTTATTTGACCTCAGTCAGT  
CGTGATTACCGCTGAATTAAAGCATATAATTAAAGCGGAGGAAAAGAAACTAA

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

TAGGTGAAACCTCGCGAAGGATCATTATCGAGCGAACATCCAAAACGAACAAGTCTCCAACGTGCATAC  
CGTCCATTGCATGTTGAGCCGCATGGAAACTCATACACATGTGGTGGCAGCCGTCTGCTGTTG  
CTTTATTGTGCAGACAATGGCTTATGAGTGGCCGTGCGCTGTTGAACAAACGGTACCAATTGGCGT  
CTACGCCGTATCTAGCTTCTGCCTGGACCGTCAGTAGCGATGAAAGATGCGGAGAAAGTCCCTGTT  
TTGACTCATTGCGGGCCAACACAGGGTCGAGCAGACTTAATGAGCCACGCTGGTGGCCGCAAAA  
CCCAAAACACAACCAGTCTATTGACATTGTCAGTAGCGTGCACATTACGTTAATGTACAAATCTGG  
CGGTGGATCATTGGCTCGTGGATCGATGAAGAACGCCAGCTGCGATAAAATAGTGCACATTGCA  
GACACATTGAGCACTAAGAACATCGAACGCACATTGCGCCATCGGGTCATTCCCGATGGCACGTCTG  
GCTGAGGGTCGAATTATGGCAAACACTATCTCGTGGCTCCGGCGTGAACACATTGGCAAGCAGTTGT  
CGTGTGAGGAGACGTCAACACCGAACGACGGTGATATTGGTGATCGCAAAAGCAGAAAGTATGCCACT  
TCATAGGGCAACAACCAGCATACGTGTTGGCTGGTGATGAACCTGGCAACGGAGTGACGGT  
GTGATCAGGAACGTTGTATTGACCTCAGTCGTGATTACCGCTGAATTAAAGCATATAAT  
TAAGCGGAGGAAAAGAAACTAA

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

CTGCGGAAGGATCATTATCGAGCGAACATCCAAAACGAACGAAAAAGTCTCCAACATGCATACCGTCC  
ATTTGCATGTTGAGCCGCATGGAAACTCGTACACACATGTGGTGGCAGCCGTCTGCTGCTT  
TTTGTCAGACAATGGCTTACGAGTAGCCGTGCTGTTGAACAAACGGTACCAATTGGCGTCTA  
CGCGTATCTAGCTTGCCTGGACCGTCGGTAGCGATGAAAGATACGGAGGAAGTCCATTGTTT  
GGCTTATCATCATTGATAAGTGAGGCACTGAGCAGACTTAATGAGCCACGCTAGGTGGCCGC  
CAAAACCCAAAACACAACCGGTCTATTGACATTGTTATTACTTGTATGTGTTGAAATGTACAAATC  
TTGGCGGTGGATCACTCGGTTGGATCGATGAAGAACGCCAGCTGCGATAAAATAGTGCAG  
ATTGCAGACACATTGAGCACTAAGAACATCGAACGCACATTGCGCTATCGGGTCATTCCGATGGCA  
CGTCTGGCTGAGGGTCGAATTACGGTAAACTATCTCGCACTTCTAGTGAGTGTGAAGCATTGGC  
GAGCAATTGTTGTTGTTGATGATAGAACATCGACAATATGGCGCTTCCTCGCTTAGTTATG  
ACAGCAAGAAGAACGTCAACACCTCACTAGTAGTAATATAAGTGAGGTGTTGATGGTCACA  
AGAATGACGTGTATGCCATTTCATAGGGCAACAACCAGCATACGTAATAAGTTGGCTGGTGATG  
AAACGGCAACGGAATGATACGTGATGTGATCAAAAAGTTATTTGACCTCAGCTCAGTCG  
TGATTACCGCTGAATTAAAGCATATAATTAA

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

CTGCGGAAGGATCATTATCGAGCGAACATCCAAAACGAACAAAGTCTCCAACGTGCATACCATCCATT  
GCATGTTGAGCCGCATGGAAACTCATACACATGTGGTGGCAGCCGTCTGCTGCTTATTGTC  
GCAGACAATGGCTTATGAGTGGCCGTGCGCTGTTGAACAAACGGTACCAATTGGCGTCTACCGCG  
CATCTAGCTTGCCTGGACCGTCGGTAGCGATGAAAGATGCGGAGAAAGTCCCTGTTGGCTCG  
TTCTCGAGACCAACTCAGGGTTGAGCAGACTTAATGAGCCCGCTGGCGGCCAAAACCCAAA  
CACAACCAGTCTATTGACATTGTCAGTAGCGTTGACATTATGTTAATGTACAAATCTGGCGGTGGAT  
CACTCGGTTGAGCGATGAGAACGACATTGCGCTATCGGGTCATTCCGATGGCACGTGCTGAGGGTCGA  
GCACTAAGAACATCGAACGCACATTGCGCTATCGGGTCATTCCGATGGCACGTGCTGAGGGTCGA  
ATTATGGCAAACATCTCGCGGTTGGCTGTGAAGCATTGGCAAGCAGTTGCTATGTTGTTGGCTCGG  
TCGGTCTCGGTCGGTCATTGACAGCATGATGGCTCCTGCTTAGTTGTTGTAAGAGAGACGTTAACAC

CGAACGGCGGTGATATTGGTGATCGCAAAAGCGAGAAGTATGCCACTTCATAGGGCAACAACCAGCATA  
CGTATGTTGGCTGGTTGATGAACGTGGCAACGGAGTGACGGTGTGATCAGGAACGTTGTATTGACC  
TCAGCTCAGTCGTGATACCCGCTGAATTAAGCATATAATTAA

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

CTGCGGAAGGATCATTATCGAGCGAATCCAAAACGAAAAAGTCTCCAACGTGCATACCATCCATT  
GCATGTTGTTGAGGCCACATAGAAACTCATACACGTGTGGTGGCAGCCGTCTGATGTGCTTATCGT  
GCAGACAATGGCTTATGAGTGGCTGTGATTGTTGAAACAACGGTGACCAATTGGCGTCTACGCCG  
TATCTAGCTTCTGCCTGGACCGTCGGTAGCGATGAAAGATCGGGAGGAAGTCCCTGTGTTTGGTACG  
CTAAAGCAGAGTTGAGCAGACTTAATGAGCCACGCTTGGTGGCCAAAACCCAAAACACAACCA  
GTCTATTAAACGTTGTTGATATGTTAATGTACAAATCTTGGCGTGGATCACTCGGTTCGTGGATC  
GATGAAGAACGCAGCCAGCTGCATAAAATAGTGCAGATTGCAGACACATTGAGCACTAAGAATTG  
AACGCACATTGCGCTATCGGTTCATTCGGATGGCACGTCTGGCTGAGGGTCGAATTATAGTAAAC  
TATCTCGAGTACTTTTATGGTCGTGAAGTATTGCAAGTAGTGCAGTCGGATTGTTTGGTC  
GTCCGTTCGTTCGGTCGGTCAACAAACAAATTCTGAGGCTCCTGCTTAGTTGTTCTAGTAGACGT  
TAACACCTGAACAATATGTGGTGGTGAATTGGTGATGGCGAGAACATGCCGTTCAATGGGCAG  
CAACCAGCATACTGCTAATGACAGTTGGTTGATTGAAGGCCAGGGCAACGGAGTGATGTACGTGGCG  
ATCATTAAACGTTATATTGACCTCAGCTCAGTCGTGATTACCCGCTGAATTAAGCATATAATTAA  
GCGGAGGAAAAGAAACTAA

---