

中华人民共和国国家标准

GB 31610.1—2023

食品安全国家标准

动物性水产品及其制品中颚口线虫的检验

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颤口线虫的检验

1 范围

本标准规定了动物性水产品及其制品中颤口线虫(*Gnathostoma*)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颤口线虫幼虫的检验。

2 原理

动物性水产品及其制品中的颤口线虫幼虫主要寄生于淡水鱼类、两栖类等水产品的肌肉等组织内。用胃蛋白酶消化动物宿主组织获得虫体。根据幼虫的形态特征,判断颤口线虫属幼虫。对可疑虫体通过扩增颤口线虫线粒体细胞色素 C 氧化酶第 I 亚基(*cox1*)基因片段并测序,进行常见颤口线虫幼虫的鉴定。

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 磁力搅拌器。
- 3.8 高速离心机:转速≥12 000 r/min。
- 3.9 网筛:孔径 2 mm(10 目)。
- 3.10 锥形量杯:1 000 mL。
- 3.11 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/ μ L 耐热 DNA 聚合酶。
- 4.1.11 10×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×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 引物:浓度为 10 μ mol/L。
正向引物 FH5: 5'-TTTTTGCGCATCCTGAGGTTA-3'
反向引物 MCO1B: 5'-TAAAGAAAGAACATAATGAAAATGAGC-3'
扩增颤口线虫 *cox1* 基因片段长度为 441 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 Na₂EDTA · 2H₂O(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,再加去离子水至 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 μ L,混匀,制备凝胶。

5 检测方法

5.1 形态学方法

5.1.1 取样

取动物性水产品或其制品肌肉组织,剪成小块。

5.1.2 消化

取 5.1.1 样品 200 g 置烧杯中,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 ℃恒温培养箱应用磁力搅拌器恒温搅拌消化 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。

5.1.3 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，搅拌后静置沉淀 15 min~30 min。轻轻倾去上清液，加入适量生理盐水，搅拌后再静置沉淀 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。

5.1.4 镜检

全部沉淀分次转移至玻璃平皿，在体视显微镜下去除沉淀中的杂质，分离收集沉淀中的虫体或含虫体的包裹（鉴定时撕开包裹，取出虫体）。淡水鱼类、两栖类等动物性水产品及其制品中的颚口线虫为第三期幼虫，虫体呈圆柱形，较粗壮。活虫体呈淡红色、淡黄色或粉红色，半透明，头部和尾部均弯向腹面，部分呈卷曲“G”状。虫体长度因虫种不同而异，为 0.6 mm~11 mm。头部近似球形（称头球），尾部逐渐变细呈锥形。食道、肠管颜色较深。

挑出具备上述特征的虫体在生物显微镜下进一步观察。颚口线虫第三期幼虫头球与虫体躯体部分分界明显。头球前端有两片向外突起的肉质唇围绕口，头球表面排列有 3 环或 4 环小钩。体表环列有横纹和小棘，体前部棘明显大而密，体后部棘渐小而疏，尾部光滑圆钝。有 1 对颈乳突，1 个排泄孔。食道呈棒状，分肌质部和腺质部，食道周围有 4 个肌质管状的颈囊环绕；肠管粗大或细长，肠内充满黄褐色颗粒。颚口线虫第三期幼虫的形态特征见附录 A，其模式图见图 A.1，实物图见图 A.2~图 A.13。

5.1.5 结果判定

在动物性水产品及其制品中检测到具备 5.1.4 特征的虫体，可判断为颚口线虫属幼虫。对疑似颚口线虫属幼虫立即用于 DNA 提取或保存于 -20 °C，用于 PCR 方法鉴定。

5.2 PCR 方法

5.2.1 DNA 提取

取 5.1.5 判断为疑似颚口线虫幼虫的虫体 1 条，用生理盐水洗净，放入 1.5 mL 离心管中，加裂解液 500 μL 和蛋白酶 K 10 μL，55 °C 振荡消化至虫体被完全消化（1 h~3 h）。在混合液中加入苯酚/三氯甲烷/异戊醇（25：24：1）240 μL，混匀，4 °C 12 000 r/min 离心 10 min。吸上清液（约 500 μL）加入新的 1.5 mL 离心管，加入 500 μL 预冷的无水乙醇（-20 °C），充分混匀，放入 -20 °C 沉淀 1 h，4 °C 12 000 r/min 离心 15 min。沉淀用 70% 乙醇 500 μL 离心洗涤 2 次，每次 4 °C 12 000 r/min 离心 3 min。倒干乙醇，37 °C 干燥后加入 1×TE 溶液 100 μL 溶解 DNA，立即用于检测或 -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×PCR 缓冲液 5.0 μL、MgCl₂ 5.0 μL、dNTPs 4.0 μL、正向引物和反向引物各 1.0 μL、耐热 DNA 聚合酶 0.4 μL、DNA 模板 2.0 μL，加灭菌去离子水至总体积 50 μL。每次试验需设阳性对照和空白对照。阳性对照用颚口线虫 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

94 °C 预变性 3 min；94 °C 变性 30 s，58 °C 退火 30 s，72 °C 延伸 45 s，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 $10 \mu\text{L}$ 与 $6\times$ 上样缓冲液 $2 \mu\text{L}$ 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。在 $1\times$ TAE 电泳缓冲液, 5 V/cm 恒压电泳 $30 \text{ min}\sim40 \text{ min}$, 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(441bp), 空白对照无条带, 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, 将测序结果与颤口线虫参考序列(见附录 B)进行同源性比对。

6 结果报告

6.1 形态学方法检出颤口线虫属幼虫, 报告检出颤口线虫幼虫。

6.2 形态学方法检出疑似颤口线虫属幼虫、PCR 结果为阳性且扩增片段基因序列与颤口线虫任何一条参考序列同源性 $\geqslant 96\%$, 报告检出颤口线虫幼虫。

6.3 形态学方法未检出颤口线虫属幼虫、或 PCR 结果为阴性、或扩增片段基因序列与颤口线虫参考序列同源性 $<96\%$, 均报告未检出颤口线虫幼虫。

附录 A

颚口线虫第三期幼虫形态

A.1 颚口线虫第三期幼虫模式图见图 A.1。

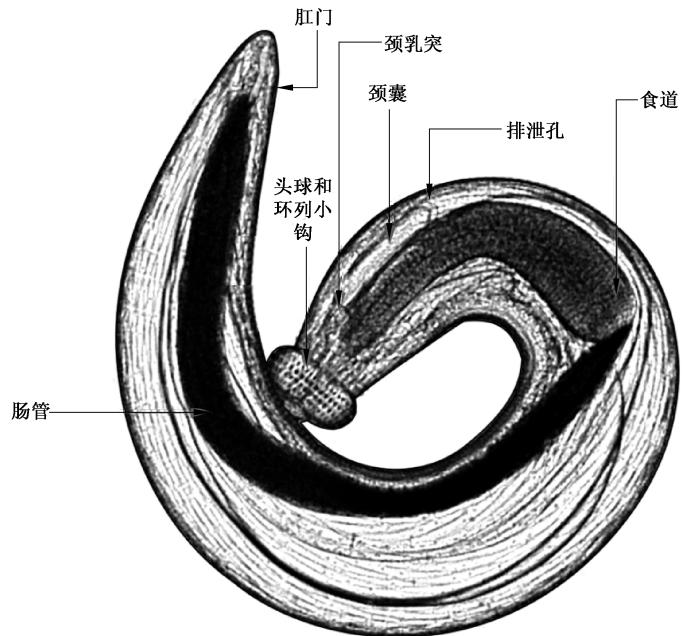


图 A.1 颚口线虫第三期幼虫模式图

A.2 颚口线虫第三期幼虫实物图见图 A.2~图 A.13。

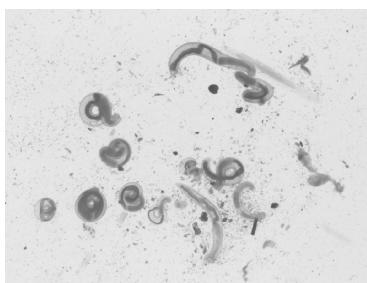


图 A.2 消化沉淀中的虫体



图 A.3 虫体外观



图 A.4 包囊中的虫体

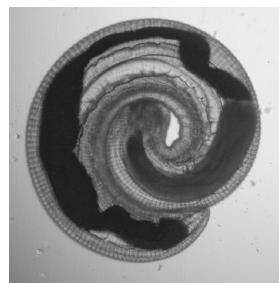


图 A.5 虫体呈粉红色

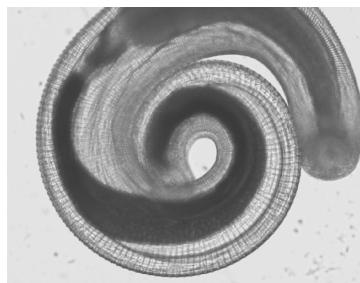


图 A.6 虫体呈淡红色



图 A.7 虫体呈淡黄色

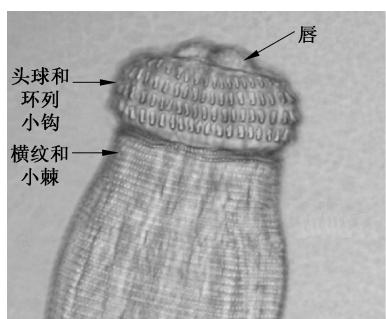


图 A.8 示头部及体表

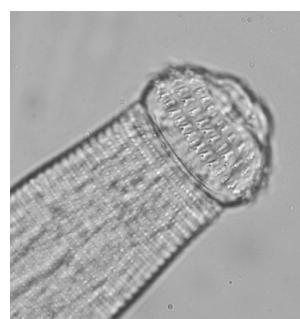


图 A.9 示头球上 3 环小钩

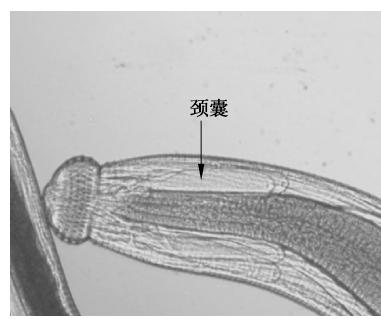


图 A.10 示颈囊

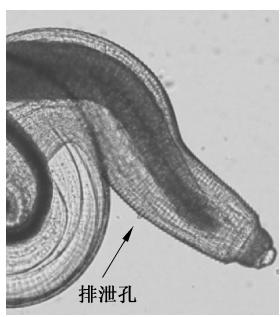


图 A.11 示排泄孔

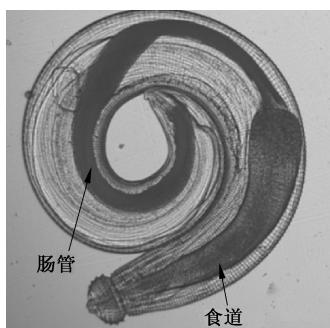


图 A.12 示食道与肠管

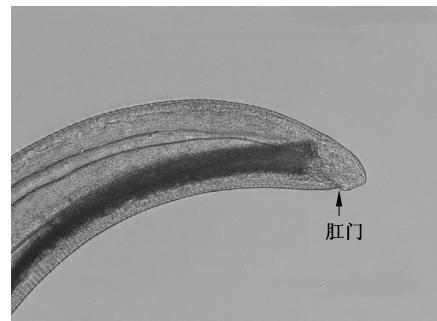


图 A.13 示肛门

附录 B
颚口线虫参考序列

B.1 棘颚口线虫(*Gnathostoma spinigerum*)*cox1*参考序列

TTTTTGGCATTCTGAGGTTATATTTAATTGCCTGCTTGGATTGTTAGTCAGAGTAGT
TTGTATTTGACAGGAAAAAGAGATTTGGCTCATAGGTATGGTTATGCTATTAAAGGAT
TGGTTGATTGGTTGTGGTTGGGCTCATCATATATACGGTGGGGATGGATTGGATTCTC
GTGCTTATTTACAGCTGCTACTATGGTGATTGCTGACCTACGGGGTGAAGGTTTAGATGG
TTGGCTACTTGTATGGTTTCGTATGATGTTCTCCTTGTGTTGGGTATTGGGTTTATT
TTTGTTACTGTTGGGGGTTGACTGGCGTAATGTTGCTAATTCTAGTTGGATATTATTCTC
ATGATACTTATTATGTTGCTCATTTCATTATGTTCTTCTTA

B.2 日本颚口线虫(*Gnathostoma nipponicum*)*cox1*参考序列

TTTTTGGCATTCTGAGGTTATATTTGATTGCCAGCTTGGATCGTTAGTCAAAGAAC
ATTGTATTGACTGTAAGAAGGAAATTGGTTCTTGGGATAGTATATGCTATTAAAGAA
TTGGTTAATTGGTTGTGGTTGGGCTCATCATATGTATACGGTAGGTATAGATTAGATTCT
CGTGCTTATTTACTGCTGCTACTATGTAATTGCTGTTCCACTGGAGTTAAAGTTTAGATG
ATTGGCTACTTATATGGTTTCGTATAATGTTCTCCTTATTATGGGTTAGGGTTATT
TTTTTATTACAGTGGGAGGTTAACGGTGTAACTATCTAATTCTAGTTAGATATTATTCTT
CACGATACTTATTATGTTGCTCATTTCATTATGTTCTTCTTA

B.3 杜氏颚口线虫(*Gnathostoma doloresi*)*cox1*参考序列

TTTTTGGCATTCTGAGGTTATATTTGATTGCCAGCTTGGATTGAGTCAGAGAAC
TTGTATTTGACTGGTAAGAAGGAGGTATTGGATCTTGGGATGGTTATGCTATTAAAGTAT
TGGGCTGATTGGTTGTGGTTGAGCGCATCATATGTATACGGTGGTATAGATTGGATTCTC
GGGCCTATTTACGGCTGCTACTATAGTGATTGCTGTTCCACTGGGGTGAAGGTTTAGATGG
TTGGCTACTTGTATGGGTTCATATAGTTCTCCTTGTGTTAGGGTTAGGGTTATT
TTTGTTACTGTTGGGGGTTGACTGGTGTAACTGTCTAACTCTAGTTGGATATTATTAC
ATGATACTTATTATGTTGCTCATTTCATTATGTTCTTCTTA

B.4 刚刺颚口线虫(*Gnathostoma hispidum*)*cox1*参考序列

TTTTTGGCATTCTGAGGTTATATTTAATTGCCTGCTTGGATTGTTAGTCAGAGAAC
TTGTATTTGACTGGTAAGAAGGAGATTTGGCTTCTAGGAATGGTATATGCTATTAAAGGAT
TGGTTAATTGGTTGTGGTTGGGCTCATCATATGTATACAGTAGGGATGGATTGGATTCTC
GTGCTTATTTACAGCTGCTACTATGTAATTGCTGTCGACTGGGGTAAAGGTATTAGTTGG
TTGGCGACTTGTATGGGTTTCGGATGGTTCTCCTTGTGTTGGGTGTTGGGTTATT
TTTTGTTACTATGGGTGGGTTAACAGGAGTTATGTTGCTAATTCAAGTTGGATATTATTAA
CATGATACTTATTATGTTGCTCATTTCATTATGTTCTTCTTA