



中华人民共和国水产行业标准

SC/T 7210—2011

鱼类简单异尖线虫幼虫检测方法

Method for detection of *Anisakis simplex* larva in fish

2011-09-01 发布

2011-12-01 实施

中华人民共和国农业部 发布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别这些专利的责任。

本标准由中华人民共和国农业部渔业局提出。

本标准由全国水产标准化技术委员会(SAC/TC 156)归口。

本标准主要起草单位:中国科学院水生生物研究所、全国水产技术推广总站。

本标准主要起草人:吴山功、王桂堂、孙喜模、陈爱平、姚卫建、朱泽闻。

鱼类简单异尖线虫幼虫检测方法

1 范围

本标准规定了简单异尖线虫(*Anisakis simplex*)幼虫形态学鉴定和聚合酶链式反应(PCR)检测方法。

本标准适用于鱼类简单异尖线虫幼虫的检测。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法(eqv ISO 3696:1987)

GB/T 18088 出入境动物检疫采样

3 试剂和溶液

除另有说明外,所有试剂均为分析纯,试验用水符合 GB/T 6682 中一级水的指标。

- 3.1 生理盐水:0.85 g 氯化钠溶于 100 mL 蒸馏水中,室温保存。
- 3.2 巴氏液:0.85 g 氯化钠和 3 mL 甲醛溶液溶于 97 mL 蒸馏水中,室温保存。
- 3.3 10%的甘油酒精:10 mL 甘油溶于 90 mL 70%的酒精中,室温保存。
- 3.4 乙醇:70%、80%的乙醇以及无水乙醇。
- 3.5 乳酸酚透明液:按甘油:苯酚:乳酸:蒸馏水的体积比 2:1:1:1 的比例配置,室温保存。
- 3.6 TE:10 mmol/L Tris-Cl(pH 8.0)1 mmol/L EDTA(pH 8.0),在 1.05 kg/cm² 高压下蒸汽灭菌 20 min,于 4℃贮存。
- 3.7 10% SDS 溶液:10 g SDS 溶于 90 mL 蒸馏水中,68℃助溶,调 pH 至 7.2,最后加水定容至 100 mL,室温保存。
- 3.8 抽提缓冲液 I:400 μL TE、16 μL 蛋白酶 K(5 mg/mL)和 20 μL 10% SDS 的混合溶液。
- 3.9 抽提缓冲液 II:按 Tris 溶液饱和过的重蒸酚:氯仿:异戊醇以 25:24:1 的比例混合,密闭避光 4℃保存。
- 3.10 MgCl₂:25.0 mmol/L。
- 3.11 TAE 缓冲溶液:按 Tris 碱 4.84 g、冰乙酸 1.142 mL 和 Na₂EDTA·2H₂O 0.744 mL 加水定容到 1 000 mL。
- 3.12 1.0%琼脂糖:琼脂糖 1 g 溶于 100 mL TAE 中。
- 3.13 Taq 酶:—20℃保存,避免反复冻融。
- 3.14 蛋白酶 K:—20℃保存,避免反复冻融。
- 3.15 dNTPs:含 dATP、dTTP、dGTP 和 dCTP 各 10 mmol/L。
- 3.16 10×PCR buffer:500.0 mmol/L pH8.8 的 Tris-HCl、500.0 mmol/L 的 KCl 和 1%的 TritonX-100 混合溶液。
- 3.17 矿物油:要求无 DNA 酶和 RNA 酶,用于无热盖的 PCR 扩增仪。
- 3.18 分子量标准:推荐使用 DL 2000 marker,4℃保存;长期贮存应分装置于—20℃,避免反复冻融。

3.19 溴酚蓝指示剂溶液:溴酚蓝 100 mg,双蒸水 5 mL,室温下过夜。待溶解后再称取蔗糖 25 g,加双蒸水溶解后与溴酚蓝溶液混合,摇匀后定容至 50 mL,加入 NaOH 调至蓝色。

4 仪器和设备

- 4.1 电子天平。
- 4.2 剪刀、镊子、昆虫针和手术刀。
- 4.3 体视显微镜及普通光学显微镜。
- 4.4 酒精灯。
- 4.5 培养皿。
- 4.6 普通台式离心机和高速冷冻离心机。
- 4.7 普通冰箱和超低温冰箱。
- 4.8 微量移液器和 Tip 头。
- 4.9 PCR 扩增仪。
- 4.10 离心管和 PCR 管。
- 4.11 紫外透射仪。
- 4.12 水平电泳仪。

5 寄生虫分离和固定

5.1 分离

按 GB/T 18088 的标准采样抽样检查。从鱼腹腔、胃、肠系膜、肝脏、生殖腺、肌肉等组织中分离虫体。

5.2 固定

将虫体置于有生理盐水的培养皿中,然后将部分虫体置于巴氏液中固定用于形态学观察;部分虫体置于 80%的乙醇溶液中用于后续分子生物学检测。

6 形态鉴定

6.1 样品处理

将用巴氏液固定的虫体取出后置于 10%的甘油酒精中透明,在显微镜下观察其形态特征;对于透明不好的结构,用乳酸酚透明液透明后再观察形态特征。

6.2 形态特征

幼虫活体呈乳白色、半透明,在生理盐水中时而卷曲呈盘状,时而如蚯蚓样蠕动。虫体长圆筒形,两端略细,体长 10 mm~30 mm。前端钝圆,口唇尚未发育完全,无间唇,排泄孔位于两亚腹唇间。头部顶端有一钻孔齿,平均高 10.5 μm 。食道为肌肉质,中间较细,前端和后端均膨大。神经环位于食道前端约 1/7 距离处。食道之后是腺体胃,胃长圆筒形,黑色不透明(活体时胃呈乳白色),长为宽的 3 倍~5 倍,腺胃与中肠交接处分界线明显。肠管粗大,直肠明显,尾部很短,末端圆钝。无胃盲囊和肠盲囊。性腺未发育(参见附录 A)。简单异尖线虫食道椭圆形(oblong),通常呈 S 形,长度超过宽度,交合刺超过 0.7 mm,长交合刺长度很少超过短交合刺的 2 倍,比例大约是 1:1.6。

7 分子生物学检测法

7.1 DNA 的提取

取 80%酒精溶液保存的异尖线虫样品放入 1.5 mL 的离心管中,加入 1 mL 的 TE(pH 8.0)室温浸

泡过夜。移除 TE,再加入 500 μ L 抽提缓冲液 I 于 55℃ 消化 3 h,4℃ 放置至室温后加入 500 μ L 抽提缓冲液 II,摇匀,轻缓摇动 10 min,11 000 g 离心 10 min,收集上清。加入 500 μ L 抽提缓冲液 II 重复抽提两次,然后加入 2 倍上清体积的 0℃ 无水乙醇于 -20℃ 放置 1 h。5 000 g 离心 10 min 收集沉淀,70% 乙醇洗涤沉淀两次,干燥后溶于 40 μ L TE(pH 8.0),-20℃ 保存备用。

7.2 28S 和 ITS rDNA 的 PCR 扩增

7.2.1 引物

引物 391,5'-AGC-GGA-GGA-AAA-GAA-ACT-AA-3' 和 390,5'-ATC-CGT-GTT-TCA-AGA-CGG-G-3'

引物 538,5'-AGC-ATA-TCA-TTT-AGC-GGA-GG-3' 和 501,5'-TCG-GAA-GGA-ACC-AGC-TAC-TA-3'

引物 93,5'-TTG-AAC-CGG-GTA-AAA-GTC-G-3' 和 94,5'-TTA-GTT-TCT-TTT-CCT-CCG-CT-3'

用引物(391 和 390)和引物(538 和 501)扩增异尖线虫细胞核核糖体 RNA 大亚基(28 S rDNA)5' 末端包含 D2 和 D3 区域的片段;用引物(93 和 94)扩增核核糖体 DNA 内部转录间隔区 1、内部转录间隔区 2 和 5.8 S 亚单位序列。

7.2.2 PCR 扩增

PCR 反应体系(25 μ L)包括 0.5 μ L 20 μ mol/L 的上下游引物各一条,0.5 μ L 10 mmol/L 的 dNTPs,2.5 μ L 25 mmol/L 的 $MgCl_2$,2.5 μ L 10×PCR buffer,0.2 U DNA Taq 酶以及模板基因组 DNA 1 μ L,最后用水定容到 25 μ L。PCR 反应条件为:94℃ 变性 5 min;94℃ 30 s,55℃ 30 s,72℃ 1 min,35 个循环;72℃ 延伸 8 min,PCR 反应同时做阴性对照和阳性对照。

7.3 PCR 产物电泳与测序

取 5 μ L PCR 产物加入 1 μ L 溴酚蓝指示剂溶液,混匀,用 1.0% 琼脂糖于 TAE 缓冲溶液中电泳分离,紫外透射仪下检查是否存在大约 1 000 bp 和 800 bp~1 100 bp(28 S rDNA;391 与 390 引物对约 800 bp;538 与 501 引物对约 1 100 bp)的目的条带。

存在目的条带,则取 PCR 扩增产物测序。得到的序列与 GenBank 数据库中的参考序列进行比对,参考序列 *A. simplex* 的 28 S rDNA(AY821754 和 AY821755)和 ITS rDNA(AY821739)见附录 B。

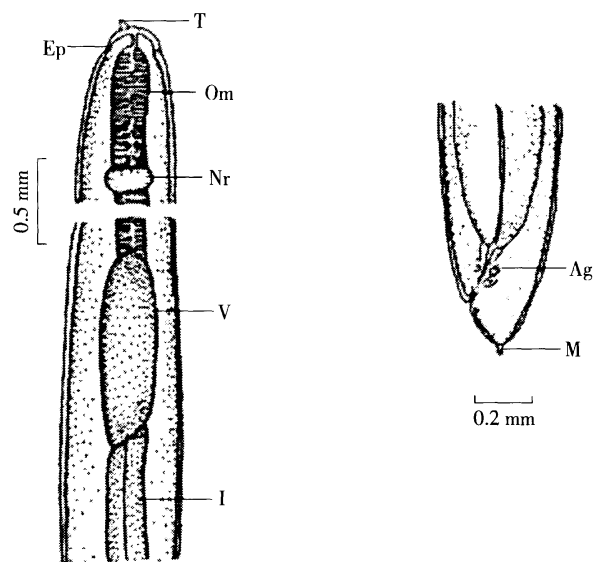
8 结果判定

8.1 虫体形态特征符合 7.2 描述的,判定为简单异尖线虫幼虫。

8.2 PCR 扩增产物测序,序列与参考序列(参见附录 B)进行比较,序列相似性在 98% 以上者,判定虫体为简单异尖线虫幼虫。

符合上述结果之一者判定为简单异尖线虫幼虫。

附录 A
(资料性附录)
简单异尖线虫形态结构



说明:

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)。

附 录 B
(资料性附录)
简单异尖线虫核酸序列

B.1 28 S rDNA 序列

AY821755(引物:391 和 390)

```

1 AAAGAAACTA ACGAGGATTC CCATAGTAAC GGCGAGTGAA ATGGGAAAAG CCCAGCGCTG
61 AATCCATCGA TCACTGGTCG CTTGGAATTG TAGCGTATAG GTGCGGCTGT CCGCTCGTTT
121 CGTGCACCCA AAGTCCCCCTT GAGCGGGGCC ATAGTCCAAA GAAGGTGCTA GACCTGTACG
181 GGTGGCGAGA CGGTCGGTTG GTCGCTCCTT GGAGTCGGGT TGCCTGGGAT CGCAGCCCAA
241 AGTTGGTGGT AGACCTCATC TAAGGCTAAA TATGGCCACG AAACCGATAG CAAACAAGTA
301 CCGTGAGGGA AAGTTGCAAA GAACTTTGAA GAGAGAGTTC AAGAGGGCGT GAAACCGCCG
361 AGATTGAAAC GGATAGAGTT GACGAAACTC GATCGCATTC ATCCGATCCG CTAGCGGTT
421 CGGCGGTTGT TGA CTTCCTC GATGAGGGCA ACGCCGTCGC TGGCTGTTGG GTGTTAGATG
481 GGTGTATTTG CGGTCGGTAT GCGCCGAGAG CTTTGCGAAC GCATGTTGGC GTTGATGTAG
541 TGGACCACTC CCTTCGGGCG TGGAAACCTG CACTGACTGA GGCATGTCGT TTGTAGGGTG
601 TTGCTGGTTG ACGTCTCCGC TATGGTTCGT CGGCTTTGTC GGACTGTTGT GGCTACTGGG
661 TGATCGCATG CGAGCGCCTG TGGTTTATGA TCGTACGATG AGGTGCAGAC GCGCTTGAGA
721 CGTGCATCTC GGTGTGAACG TTGACCACCT ATCCGA

```

B.2 AY821754(引物:538 和 501)

```

1 TTCCCATAGT AACGGCGAGT GAAATGGGAA AAGCCCAGCG CTGAATCCAT CGATCACTGG
61 TCGCTTGGA TGTAGCGTA TAGGTGCGGC TGTCCGCTCG TTTCGTGCAC CC AAAGTCCC
121 CTTGAGCGGG GCCATAGTCC AAAGAAGGTG CTAGACCTGT ACGGGTGGCG AGACGGTCGG
181 TTGGTCGCTC CTTGGAGTCG GGTTGCCTGG GATCGCAGCC CAAAGTTGGT GG TAGACCTC
241 ATCTAAGGCT AAATATGGCC ACGAAACCGA TAGCAAACAA GTACCGTGAG GGAAAGTTGC
301 AAAGAACTTT GAAGAGAGAG TTCAAGAGGG CGTGAAACCG CCGAGATTGA AACGGATAGA
361 GTTGACGAAA CTCGATCGCA TTCATCCGAT CCGCCTAGCG GTTCGGCGGT TGTTGACTTC
421 CTCGATGAGG GCAACGCCGT CGCTGGCTGT TGGGTGTTAG ATGGGTGTAT TTGCGGTCGG
481 TATGCGCCGA GAGCTTTGCG AACGCATGTT GCGCTTGATG TAGTGGACCA CTCCCTTCGG
541 GCGTGGAACC CTGCACTGAC TGAGGCATGT CGTTTGTAGG GTGTTGCTGG TTGACGTCTC
601 CGCTATGGTG CGTCGGCTTT GTCGGA CTGT TGTGGCTACT GGGTGATCGC ATGCGAGCGC
661 CTGTGGTTTA TGATCGTACG ATGAGGTGCA GACGCGCTTG AGACGTGCAT CTCGGTGTGA
721 ACGTTGACCA CCTATCCGAC CCGTCTTGAA ACACGGACCA AGGAGTCTAG CATATGCGCG
781 AGTCATTGGG TGGTAAACCT AAAGCGCTAA TGAAAGTAAA GGCTGTCTTG TTACGGCTGA
841 TATGGGATCT GTGTGGCTTT CGAGCCATAC GGCGCACCAT AGCCCCGTCC CGGTTGCTTG
901 CAATGGGGCG GAGGTAGAGC GCATACGCTG GGACCCGAAA GATGGTGAAC TATGCCTGAG
961 CAGGATGAAG CCAGAGGAAA CTCTGGTGGA AGTCCGAAGC GGTTCTGACG TGCAAATCGA
1021 TCGTCTGACT TGGGTATAGG GGCGAAAGAC TAATCG

```

B.3 ITS rDNA 序列

AY821739

1 AAGGTTTCCG TAGGTGAACC TGCGBAAGGA TCATTATCGA GCGAATCCAA AACGAACGAA
61 AAAGTCTCCC AACGTGCATA CCTTCCATTT GCATGTTGTT GTGAGCCACA TGGAAACTCG
121 TACACACGTG GTGGCAGCCG TCTGCTGTGC TTTTTTTAGG CAGACAATGG CTTACGAGTG
181 GCCGTGTGCT TGTTGAACAA CGGTGACCAA TTTGGCGTCT ACGCCGTATC TAGCTTCTGC
241 CTGGACCGTC AGTTGCGATG AAAGATGCGG AGAAAGTTCC TTTGTTTTGG CTGCTAATCA
301 TCATTGATGA GCAGCAGCTT AAGGCAGAGT TGAGCAGACT TAATGAGCCA CGCTAGGTGG
361 CCGCCAAAAAC CCAAAACACA ACCGGTCTAT TTGACATTGT TATTTTCATTG TATGTGTTGA
421 AAATGTACAA ATCTTGCGCG TGGATCACTC GGTTCGTGGA TCGATGAAGA ACGCAGCCAG
481 CTGCGATAAA TAGTGCGAAT TGCAGACACA TTGAGCACTA AGAATTTCGAA CGCACATTGC
541 GCTATCGGGT TCATTCCCGA TGGCACGTCT GGCTGAGGGT CGAATTACGG TGAACGTGTCT
601 TCACGGTCTT TCTGGACTGT GAAGCATTCG GCAAGCAATT GCTGTTGTGT TGTTGGTGAT
661 TCTATCATGG ACAATATGAC GCGCGGTTCC TTGCTTAGTG ATGATAAAAG AAGACGTCAA
721 CACCGAATCT ACTATACTAC TAATACTAGT ATATAGGTGA GGTGCTTTTG GTGGTCACAA
781 AAGTGACAAG TATGCCATTT CATAGGGGCA ACAACCAGCA TACGTGATAA GTTGGCTGGT
841 TGATGAAACG GCAACGGAAT GACGGACGTC TATGTGATCA AAAATGATAC TATTTGACCT
901 CAGCTCAGTC GTGATTACCC GCTGAATTTA AGCA

中 华 人 民 共 和 国
水 产 行 业 标 准
鱼 类 简 单 异 尖 线 虫 幼 虫 检 测 方 法
SC/T 7210—2011

* * *

中 国 农 业 出 版 社 出 版
(北京市朝阳区麦子店街 18 号楼)
(邮政编码: 100125 网址: www.ccap.com.cn)

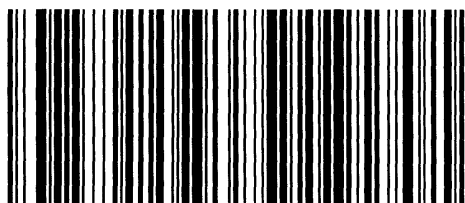
北 京 昌 平 环 球 印 刷 厂 印 刷
新 华 书 店 北 京 发 行 所 发 行 各 地 新 华 书 店 经 销

* * *

开 本 880mm×1230mm 1/16 印 张 0.75 字 数 7 千 字
2011 年 12 月 第 1 版 2011 年 12 月 北 京 第 1 次 印 刷

书 号: 16109·2466

定 价: 18.00 元



SC/T 7210—2011