



中华人民共和国国家标准

GB 31610.5—2023

食品安全国家标准

动物性水产品及其制品中并殖吸虫的检验

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并殖吸虫的检验

1 范围

本标准规定了动物性水产品及其制品中并殖吸虫(*Paragonimus*)囊蚴的形态学和 PCR 的检验方法。

本标准适用于动物性水产品及其制品中并殖吸虫囊蚴的检验。

2 原理

动物性水产品及其制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。捣碎沉淀分离或捣碎后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(ITS2)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。
- 3.13 回旋振荡器。

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(pH8.0)。
- 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。

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

反向引物 A28:5'-GGGATCCTGGTTAGTTTCTTTTCCCTCCGC-3'

扩增的并殖吸虫 ITS2 基因片段长度为 520 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 \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 捣碎法

5.1.1.1 样品制备

当送检的甲壳类水产品或其制品的数量较少时,对单个样品 1 只(个)分别检测,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 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 $250\ \mu\text{m}\sim 435\ \mu\text{m}$,壁厚 $8\ \mu\text{m}\sim 20\ \mu\text{m}$,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 $250\ \mu\text{m}\sim 390\ \mu\text{m}$,壁厚 $14\ \mu\text{m}\sim 20\ \mu\text{m}$,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 $400\ \mu\text{m}\sim 420\ \mu\text{m}$,壁厚 $12\ \mu\text{m}\sim 14\ \mu\text{m}$,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 $415\ \mu\text{m}\sim 435\ \mu\text{m}$,壁厚 $8\ \mu\text{m}\sim 12\ \mu\text{m}$,内壁厚,近两端更显增厚,蚴体多作内壁形蜷曲于囊内,其模式图见图 A.1,其实物图见图 A.2。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

当送检的甲壳类水产品或其制品数量大于 20 个以上,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 200 g 或者按样品称重后的实际重量,分批按照样品与胃蛋白酶消化液 1 : 5 的质量体积比混匀,置三角烧杯中充分混匀后,于 $37\ ^\circ\text{C}\pm 1\ ^\circ\text{C}$ 恒温培养箱放置 4 h~6 h,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 15 min。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 15 min。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 $-20\ ^\circ\text{C}$ 保存备用。

5.2 PCR 方法

5.2.1 DNA 提取

取符合并殖吸虫囊蚴形态特征的单个或多个疑似囊蚴用生理盐水洗净,放入 1.5 mL 离心管中,加 DNA 裂解液 500 μL ,再加入少量玻璃珠振荡 5 min~10 min,匀浆使囊蚴充分裂解。加入蛋白酶 K 10 μL ,混匀,55 $^\circ\text{C}$ 振荡消化 2 h。加入苯酚/三氯甲烷/异戊醇 (25 : 24 : 1) 240 μL ,混匀,4 $^\circ\text{C}$ 12 000 r/min 离心 10 min。吸取上清(约 500 μL)加入新的 1.5 mL 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 $^\circ\text{C}$ 12 000 r/min 离心 15 min。沉淀用 75% 乙醇 700 μL 离心洗涤 1 次~2 次,每次 4 $^\circ\text{C}$ 12 000 r/min 离心 3 min。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 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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 $5.0\ \mu\text{L}$ 、 MgCl_2 $5.0\ \mu\text{L}$ 、dNTPs $2.0\ \mu\text{L}$ 、正向引物和反向引物各 $2.0\ \mu\text{L}$ 、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

$95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 $1\ \text{min}$; $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 $50\ \text{s}$, $68\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 $1\ \text{min}$, $68\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 $1\ \text{min}$, 35 个循环; $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 $7\ \text{min}$; $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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 $2.0\ \mu\text{L}$ 混合,加样于含溴化乙锭的 1.5% 琼脂糖凝胶中,其中的一孔加DNA分子量标准。 $1\times$ TAE缓冲液, $5\ \text{V/cm}$ 恒压电泳 $30\ \text{min}\sim 40\ \text{min}$,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($520\ \text{bp}$),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,将测序结果与并殖吸虫的参考序列(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并殖吸虫参考序列同源性 $\geq 95\%$,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、或基因序列与并殖吸虫参考序列同源性 $< 95\%$,报告未检出并殖吸虫囊蚴。

附录 A
并殖吸虫囊蚴形态

A.1 并殖吸虫囊蚴的模式图见图 A.1。

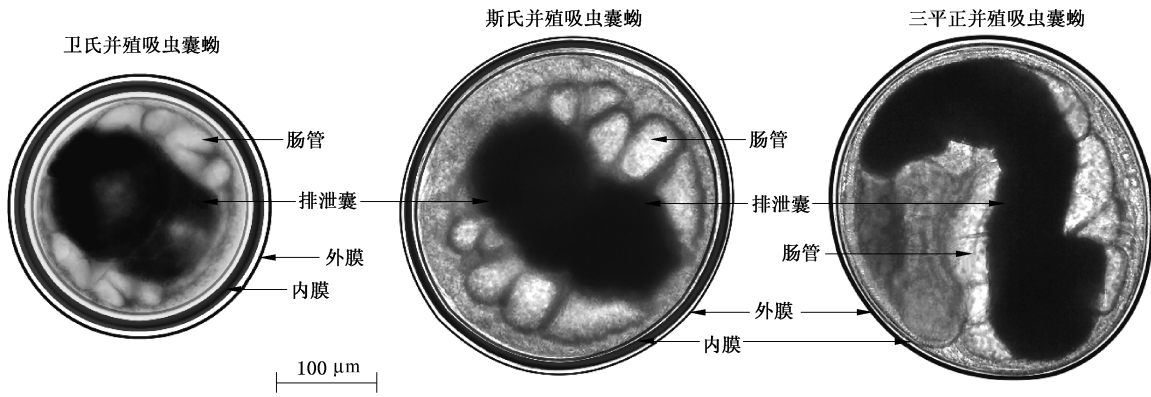


图 A.1 并殖吸虫囊蚴模式图

A.2 并殖吸虫囊蚴的实物图见图 A.2。

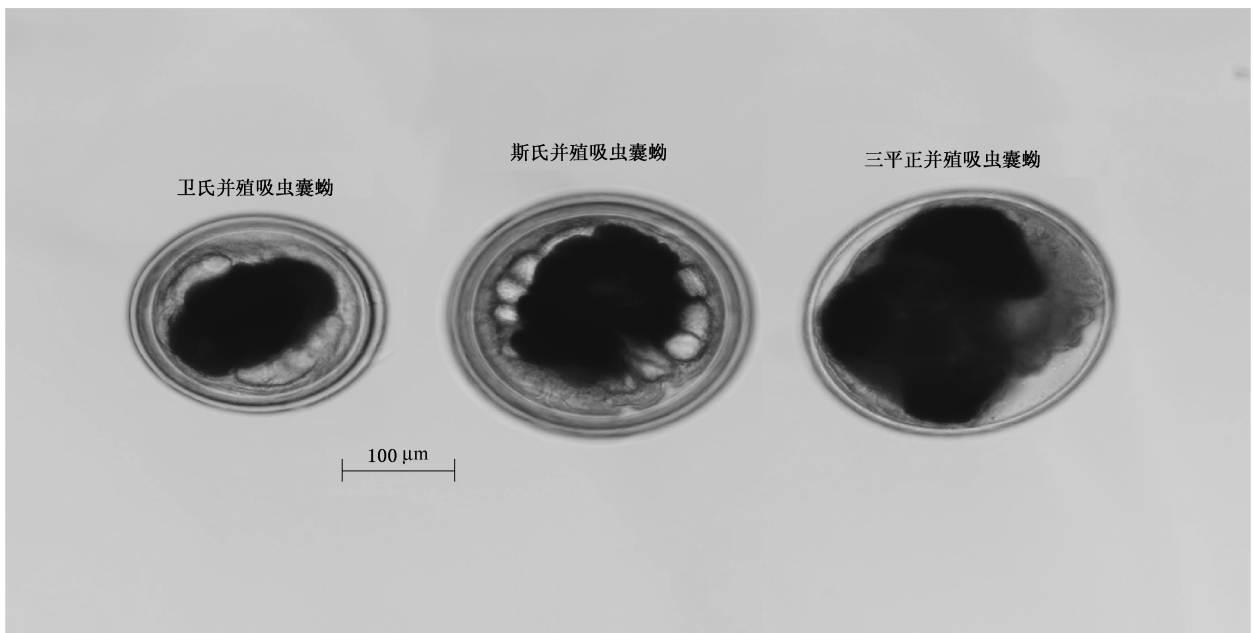


图 A.2 三种并殖吸虫囊蚴的实物图

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

TGGTACCGGTGGATCACTCGGCTCGTGTGTCGATGAAGAGCGCAGCCAACTGTGTGAATTAATGCGAACTGC
ATACTGCTTTGAACATCGACATCTTGAACGCATATTGCGGCCACGGGTTAGCCTGTGGCCACGCCTGTCCGAG
GGTCGGCTTATAAACTATCGCGACGCCAAAAAAGTCGCGGCTTGGGTTTTGCCAGCTGGCGTGATCTCCCA
ATCTGGTCTTGTGCCTGTGGGGTGCCAGATCTGTGGCGTTCCCTAACATACTCGGGCGCACCCACGTTGCGG
CTGAAAGCCTTGACGGGGATGTGGCAACGGAATCGTGGCTCAGTGAATGATTTATGTGCGCGTTCGGCTGTC
CTGTCTTCATCTGTGGTTTATGTTGCGCGTGGTCTGCTTTTCGATGCTGACCTACGTATGTGCCATGTGGTTCAT
TCTCTGACCTCGGATCAGACGTGAGTACCCGCTGAACTTAAGCATATCACTAAGCGGAGGAAAAGAACTA
ACCAGGATCCCA

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

TGGTACCGGTGGATCACTCGGCTCGTGTGTCGATGAAGAGCGCAGCCAACTGTGTGAATTAATGTGAACTGC
ATACTGCTTTGAACATCGACATCTTGAACGCATATTGCGGCCACGGGTTAGCCTGTGGCCACGCCTGTCCGAG
GGTCGGCTTATAAACTATCGCGACGCCAAAAAAGTCGCGGCTTGGGTTTTGCCAGCTGGCGTGATTTCCCA
ACCTGGCCTCGTGGCTGTGGGGTGCCAGATCTGTGGCGTTCCCTAACATATCCGGGCGTACCCATGTTGTGG
CTGAAAGCCTTGATGGGGATGTGGCAACGGAATCGTGGCTCAGTGAATGATTTGTGCGCGTTCGGCTATCCTA
TCATCGTCTATGGTTGATGTTGCGCGTGGTGTGTCCTGATGCTGACCTATGTATGTGCCATGTGGCTCATTCT
CCTGACCTCGGATCAGACGTGAGTACCCGCTGAACTTAAGCATATCACTAAGCGGAGGAAAAGAACTAAC
CAGGATCCCA

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

TGGTACCGGTGGATCACTCGGCTCGTGTGTCGATGAAGAGCGCAGCCAACTGTGTGAATTAATGCGAACTGC
ATACTGCTTTGAACATCGACATCTTGAACGCATATTGCGGCCACGGGTTAGCCTGTGGCCACGCCTGTCCGAG
GGTCGGCTTATAAACTATCGCGACGCCAAAAAAGTCGCGGCTTGGGTTTTGCCAGCTGGCGTGATTTCCCA
AATCTGGCCTCGTGCCTGTGGGGTGCCAGATCTATGGCGTTCCCTAACATATCCGGGCGTACCCATGTTGTG
GCTGAAAGCCTTGACGGGGATGTGGTAACGGAATCGTGGCTCAGTGAATGATTTGTGTGCGCGTTCGTTGT
CCCGTCTTCATCTATGGTTGATGTTGCACGTGGTCTGCGTCCGATGCTGACCTACGTATGTGCCGTTTGCTCA
TTTTCTGACCTCGGATCAGACGTGAGTACCCGCTGAACTTAAGCATATCACTAAGCGGAGGAAAAGAACT
AACCAGGATCCCA
