



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℃±1℃。
- 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/ 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 PCR 引物:浓度为 20 μ mol/L。

正向引物 NC5:5'-GTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATT-3'

反向引物 NC2:5'-TTAGTTTCTTTTCCTCCGCT-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 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 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,虫体多以包裹形式寄生于宿主体内,包裹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裹,用镊子轻轻取出虫体或从包裹内分离出虫体,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 μm ~550 μm ,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 $^{\circ}\text{C}$ 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 $^{\circ}\text{C}$ \pm 1 $^{\circ}\text{C}$ 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 $^{\circ}\text{C}$ 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 μL ,匀浆后加裂解液 500 μL 、蛋白酶 K 10 μL ,混匀,55 $^{\circ}\text{C}$ 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 μL ,混匀,4 $^{\circ}\text{C}$ 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 $^{\circ}\text{C}$ 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 $^{\circ}\text{C}$ 12 000 r/min 离心 10 min,弃上清。加入 75%乙醇 700 μL 冲洗沉淀,4 $^{\circ}\text{C}$ 12 000 r/min 离心 5 min,弃上清液,干燥后加入 50 μL 1 \times TE 溶液溶解 DNA,立即用于检测或-20 $^{\circ}\text{C}$ 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 μL 、MgCl₂ 5.0 μL 、dNTPs 2.0 μL 、正向引物和反向引物各 1.0 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 μ L 与 6 \times 上样缓冲液 2 μ 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 \times 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。

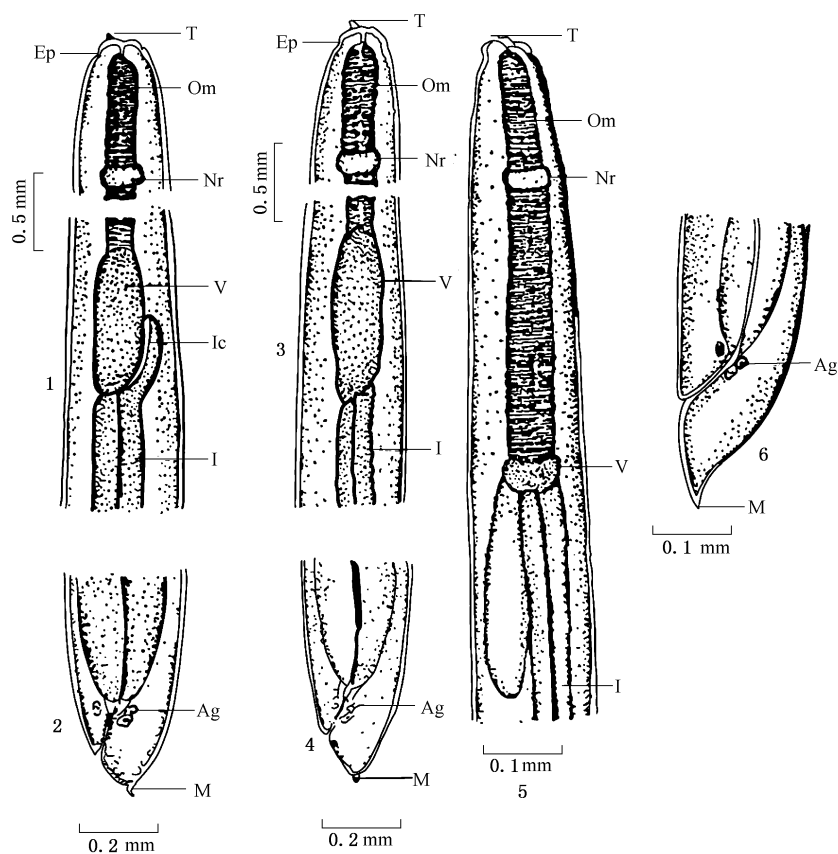
6.2 形态学方法检出疑似异尖线虫科幼虫、PCR 结果为阳性且扩增片段基因序列与任何一条异尖线虫参考序列同源性 $\geq 95\%$,报告检出异尖线虫幼虫。

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。

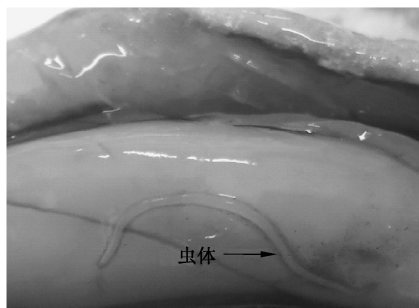


图 A.2 鱼体内的
异尖线虫

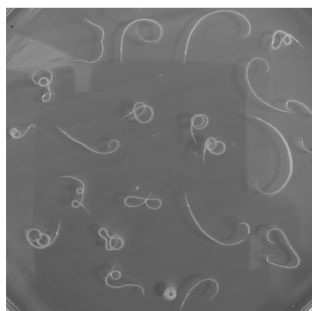


图 A.3 不同形态的
异尖线虫

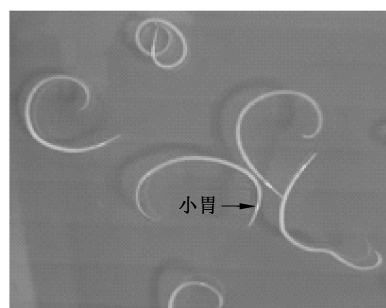


图 A.4 蓝色背景观察的
异尖线虫

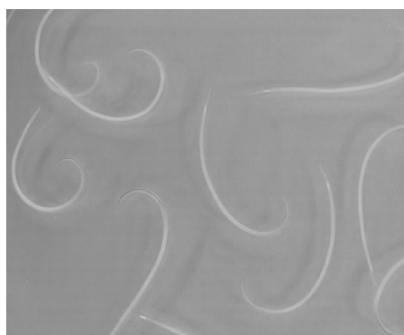


图 A.5 白色背景观察的
异尖线虫



图 A.6 黑色背景观察的
异尖线虫

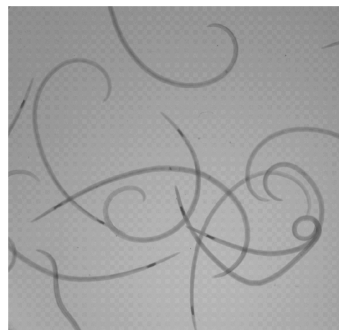


图 A.7 透射光观察的
异尖线虫

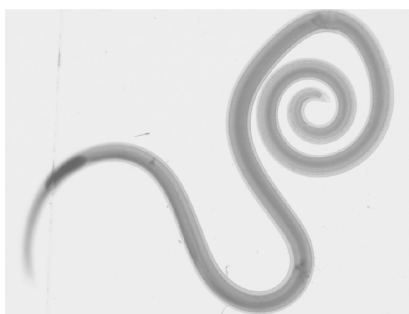


图 A.8 不同显微镜视野下的
异尖线虫(45×)

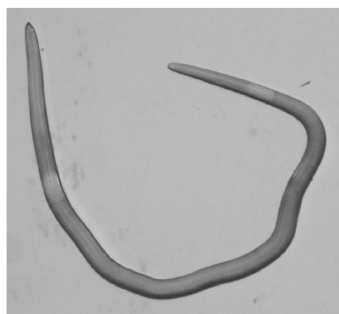


图 A.9 不同显微镜视野下的
异尖线虫(78.2×)

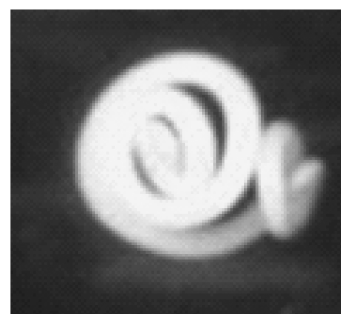


图 A.10 紫外灯下观察的
异尖线虫

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

TAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTATCGAGCGAATCCAAAACGAACGAAAAAGTCTCCCAACGTG
 CATACCTTCCATTTGCATGTTGTTGTGAGCCACATGGAAACTCGTACACACGTGGTGGCAGCCGTCTG
 CTGTGCTTTTTTTAGGCAGACAATGGCTTACGAGTGGCCGTGTGCTTGTGTAACAACGGTGACCAATT
 TGGCGTCTACGCCGTATCTAGCTTCTGCCTGGACCGTCAGTTGCGATGAAAGATGCGGAGAAAGTTC
 CTTTGTTTTGGCTGCTAATCATCATTGATGAGCAGTAGCTTAAGGCAGAGTTGAGCAGACTTAATGAG
 CCACGCTAGGTGGCCGCCAAAACCCAAAACACAACCGGTCTATTTGACATTGTTATTTTCATTGTATGT
 GTTGAAAAATGTACAAATCTTGGCGGTGGATCACTCGGTTTCGTGGATCGATGAAGAACGCAGCCAGCT
 GCGATAAATAGTGCGAATTGCAGACACATTGAGCACTAAGAATTTCGAACGCACATTGCGCTATCGGG
 TTCATTCCCGATGGCACGTCTGGCTGAGGGTCAATTACGGTGAAGTGTCTTCACGGTTTTTCTGGAC
 TGTGAAGCATTTCGGCAAGCAATTGCTGTTGTGTTGTTGGTGATTCTATCATGGACAATATGACGAGCG
 GTTCCTTGCTTAGTGATGACAAAAGAAGACGTCAACACCGAATCTACTATACTACTAATACTAGTAT
 ATAGGTGAGGTGCTTTTGGTGGTCACAAAAGTGACAAGTATGCCATTTTCATAGGGGCAACAACCAGC
 ATACGTGATAAGTTGGCTGGTTGATGAAACGGCAACGGAATGACGGACGTCTATGNGATCAAAAAT
 GATACTATTTGACCTCAGCTCAGTCGTGATTACCCGCTGAATTTAAGCATATAATTAAGCGGAGGAA
AAGAAACTAA

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

TAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTGTGAGCGAATCCAAAACGAAAAAGTCTCCCAACGTGCATAC
 CGCCCATTTACATGTTGTTGTGAGCCGCACGAAACTCGTACACGTTTGTGGTGGTGATAGCCGTCTG
 CTGTGCGTTTCGTTGGGCAGACAATGGCTTACGAGTGGCTGTGCGCTTGTGTAACAACGGTGACCAAT
 TTGGCGTCTACGCCGTATCTAGCCTCCGCCGGACCGTCGGTAGCGATGAAAGATGCGGAGGAAGTT
 CCTCGTCAGAGTTGAGCAGACTTAATGAGCCACGCTCTAGGTGGCCGCCAGAACCCAAAACACACCA
 ATTGTTGTCATTTGACATTGTTGATGATGTTTATGTACAAATCTTGGCGGTGGATCACTCGGTTTCGTG
 GATCGATGAAGAACGCAGCCAGCTGCGATAAATAGTGCGAATTGCAGACACATTGAGCACTAAGAAT
 TCGAACGCACATTGCGCTATCGGGTTCATTCCCGATGGCACGTCTGGCTGAGGGTCAATTGTGCTA
 GAGCATCTTTGCAATCACTTCTCTCAGATTGTGATTGTGAAGCATTTCGGCGAGCGATTGTTGTCTGTG
 TGTGCTTAAGGTGACGATTGAATCGGCACCGCGCGACACGACACGGTTCCTTGCTTAGTTTGATGAA
 CAAAAAGACGTCCCGCACACCCAACGTCTGCTAAACACTAGACTAGAGCTGGTGTCTAGAGGTGTTG
 GGTGTGATTTTGATGGTCACAAAAGTGCCGCCATTTTCATAGTGGCAACAACCAGCATACGTCTATGA
 TACTAGTAGGTTGGCTGGTTGATGAAACGGCAACGGAATGTGCGCATGCATGTGATCGAGAAGCGAT
 AATGTTTCGTATTTGACCTCAGCTCAGTCGTGATTACCCGCTGAATTTAAGCATATAATTAAGCGGAGG
AAAAGAACTAA

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

GTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTATCGAGCGAATCCAAAACGAACGAAAAAGTCTCCCAACGT
 GCATACCTTCCATTTGCATGTTGTTGTGAGCCACATGGAAACTCGTACACACGTGGTGGCAGCCGTCT
 GCTGTGCTTTTTTTAGGCAGACAATGGCTTACGAGTGGCCGTGTGCTTGTGTAACAACGGTGACCAAT

TTGGCGTCTACGCCGTATCTAGCTTCTGCCTGGACCGTCAGTTGCGATGAAAGATGCGGAGAAAAGTT
CCTTTGTTTTGGCTGCTAATCATCATTGATGAGCAGCAGCTTAAGGCAGAGTCGAGCAGACTTAATGA
GCCACGCTAGGTGGCCGCCAAAACCCAAAACACAACCGGTCTATTTGACATTGTTATTTTCATTGTATG
TGTTGAAAAATGTACAAATCTTGCGGTGGATCACTCGGTTTCGTGGATCGATGAAGAACGCAGCCAGC
TGCGATAAATAGTGCGAATTGCAGACACATTGAGCACTAAGAATTGGAACGCACATTGCGCTATCGG
GTTTCATTCCCGATGGCACGTCTGGCTGAGGGTCGAATTACGGTGAACTGTCTTCACGGTTTTTCTGGA
CTGTGAAGCATTTCGCAAGCAATTGCTGTTGTGTTGTTGGTGATTCTATCATGGACAATATGACGAGC
GGTTCCTTGCTTAGTGATGACAAAAGAAGACGTCAACACCGAATCTACTATACTACTAATACTAGTA
TATAGGTGAGGTGCTTTTGGTGGTCACAAAAGTGACAAGTATGCCATTTTCATAGGGGCAACAACAG
CATACGTGATAAGTTGGCTGGTTGATGAAACGGCAACGGAATGACGGACGTCTATGTGATCAAAAAT
GATACTATTTGACCTCAGCTCAGTCGTGATTACCCGCTGAATTTAAGCATATAATTAAGCGGAGGAA
AAGAACTAAA

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

GTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTATCGAGCGAATCCAAAACGAAAAAGTCTCCCAACGTGCAT
ACCATCCATTTGCATGTTGTTGTGAGCCGCATGGAACTCATACACGCGTGGTGGCAGCCGCTGCTG
TGCTTTTTTCGTGCAGACAATGGCTTATGAGTGCCGTGTGCTTGTGTAACAACGGTGACCAATTTGGC
GTCTACGCCGTATCTAGCTTCTGCCTGGACCGTCGGTAGCGATGAAAGATGCGGAGAGAGTTCCCTCT
GTTTTGGTTTCATTTCGTGGACCAACGCAGGGTCGAGCAGACTTAATGAGCCACGCTTGGTGGCCGCCA
AAACCCAAAACACAACCAGTCTATTTGACATTGTTTCGTATGTGTTAACATTATGTTAATGTACAAAT
CTTGGCGGTGGATCACTCGGTTTCGTGGATCGATGAAGAACGCAGCCAGCTGCGATAAATAGTGCGAA
TTGCAGACACATTGAGCACTAAGAATTGGAACGCACATTGCGCTATCGGGTTCATTCCCGATGGCAC
GTCTGGCTGAGGGTCGAATTATGGCAAACTATCTTCGCAGTTTCGGCTGTGAAGCATTTCGGCGAGCA
GTTGTTGTGTTGTTGGTTCGTTTCGTTTCGTTTCGATCGGTTGGCAACATGACGGCTCCTTGCTTAGTT
GTTGTGAATAGACGTTAACACCGAACTATATGCGGTGATATTGGTGGTCGAAAAGCGAGAAGTATG
CCGCTTCATAGGGGCAACAACCAGCATGCGTGTATGACAAGTTGGCTGGTTGATGAACTGTTGGCAA
AGGAGTGACGTGCGTGTAAACGGTGCATCAAGAACGTTTGTATTTGACCTCAGCTCAGTCGTGATTA
CCCGCTGAATTTAAGCATATAATTAAGCGGAGGAAAAGAACTAAA

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

TAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTATCGAGCGAATCCAAAACGAACTAAAAAGTCTCCCAACGTGC
ATACCGTCCATTTGCATGTTGTTGTGAGCCGCATGGAACTCGTACACATGTGGTGGCAGCCGCTGCTG
TGTGCTTTTTTGTGCAGACAATGGCTTACGAGTGGCTGTGTGCTTGTGTAACAACGGTGACCAATTTG
GCGTCTACGCCGTATCTAGCTTCCGCTGGACCGTCGGTTGCGATGAAAGATGCGGAGGAAGTTCCCT
TTGTGTTGGCTTATCATCATTGATCAGCTGATGCAGAGTCGAGCAGACTTAATGAGCCACGCTAGGTG
GCCGCCAAAACCCAAAACACAACCGGTCTATTTGACATTGTTACTTTGTATGTGTTGAAAATGTACAA
ATCTTGGCGGTGGATCACTCGGTTTCGTGGATCGATGAAGAACGCAGCCAGCTGCGATAAATAGTGCG
AATTGCAGACACATTGAGCACTAAGAATTGGAACGCACATTGCGCTATCGGGTTCATTCCCGATGGCAC
GTCTGGCTGAGGGTCGAATTACGGTGAAGTGTCTTCGCGGTTTTTGTGACTGTGAAGCATTTCGGCGA
GCAATTGTTGCTGTGTTGTTGATGATTGAGTCGACAATATGGCACACGGTTCCTTGCTTAGTTATGAAGA
GAAGAAGACGTCAACACCGAACCTACTATACTACTAGTACTAGTGTATAGGTGAGGTGCTTTTGGTGGTC
ACAAAAGTGAAAAGTATGCCATTTTCATAGGGGCAACAACCAGCATACATGATAAGTTGGCTGGTTGATGA
AACGGCAACGGAATGATGTATGTGATCAAAAATGTTTATATTTGACCTCAGCTCAGT
CGTGATTACCCGCTGAATTTAAGCATATAATTAAGCGGAGGAAAAGAACTAA

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

TAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTATCGAGCGAATCCAAAACGAACAAGTCTCCCAACGTGCATAC
 CGTCCATTTGCATGTTGTTGTGAGCCGCATGGAACTCATACACATGTGGTGGCAGCCGTCTGCTGTG
 CTTTATTGTGCAGACAATGGCTTATGAGTGGCCGTGTGCCTGTTGAACAACGGTGACCAATTTGGCGT
 CTACGCCGTATCTAGCTTCTGCCTGGACCGTCAGTAGCGATGAAAGATGCGGAGAAAGTTCCCTCTGTT
 TTGACTCATTCGTGGGCCAACACAGGGTCGAGCAGACTTAATGAGCCACGCTTGGTGGCCGCCAAAA
 CCCAAAACACAACCAGTCTATTTGACATTGTTTCAGTATGCGTTGACATTACGTTAATGTACAAATCTTGG
 CGGTGGATCATTCGGTTCGTGGATCGATGAAGAACGCAGCCAGCTGCGATAAATAGTGCGAATTGCA
 GACACATTGAGCACTAAGAATTCGAACGCACATTGCGCCATCGGGTTCATTCCCGATGGCAGCTCTG
 GCTGAGGGTCGAATTATGGCAAACCTATCTTCGTGGCTCCGGCCGTGAAACATTCGGCAAGCAGTTGT
 CGTGTGTTGGTTGGTTCGGTCTTTGAATCGGTCGATTGGCGGCTCGACGGCTCCTTGCTTAGTTGTT
 GTGTGAGGAGACGTCAACACCGAACGACGGTGATATTGGTGATCGCAAAAGCGAAAAAGTATGCCACT
 TCATAGGGGCAACAACCAGCATACGTGTGTTGGCTGGTTGATGAACTGTTGGCAACGGAGTGACGGT
 GTGATCAGGAACGTTTGTATTTGACCTCAGCTCAGTCGTGATTACCCGCTGAATTTAAGCATATAAT
TAAGCGGAGGAAAAGAACTAA

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

CTGCGGAAGGATCATTATCGAGCGAATCCAAAACGAACGAAAAAGTCTCCCAACATGCATACCGTCC
 ATTTGCATGTTGTTGTGAGCCGCATGGAACTCGTACACACATGTGGTGGCAGCCGTCTGCTGTGCTT
 TTTTGTGCAGACAATGGCTTACGAGTAGCCGTGTGCTTGTGTAACAACGGTGACCAATTTGGCGTCTA
 CGCCGTATCTAGCTTCTGCCTGGACCGTCGGTAGCGATGAAAGATACGGAGGAAGTTCCATTGTTTT
 GGCTTATCATCATTGATAAGTTGAGGCAGTGTGAGCAGACTTAATGAGCCACGCTAGGTGGCCGC
 CAAAACCCAAAACACAACCGGTCTATTTGACATTGTTATTACTTTGTATGTGTTGAAAAATGTACAAATC
 TTGGCGGTGGATCACTCGGTTCGTGGATCGATGAAGAACGCAGCCAGCTGCGATAAATAGTGCGA
 ATTGACAGACATTGAGCACTAAGAATTCGAACGCACATTGCGCTATCGGGTTCATTCCCGATGGCA
 CGTCTGGCTGAGGGTCGAATTACGGTAAACTATCTTCGCACCTCTTAGTGAGTGTGAAGCATTCCGGC
 GAGCAATTGTTGTTGTGTTGTTGATGATAGAATCGACAATATGGCGCGTTTCTCTGCTTAGTTATG
 ACAGCAAGAAGAAGACGTCAACACCTCACTAGTAGTAATATAAGTGAGGTGCTTGTGATGGTCACA
 AGAATGACGTGTATGCCATTTTCATAGGGGCAACAACCAGCATACGTAATAAGTTGGCTGGTTGATG
 AAACGGCAACGGAATGATATACGTGTATGTGATCAAAAAAGTTTATATTTGACCTCAGCTCAGTCG
 TGATTACCCGCTGAATTTAAGCATATAATTA

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

CTGCGGAAGGATCATTATCGAGCGAATCCAAAACGAACAAGTCTCCCAACGTGCATACCATCCATTT
 GCATGTTGTTGTGAGCCGCATGGAACTCATACACATGTGGTGGCAGCCGTCTGCTGTGCTTTATTGT
 GCAGACAATGGCTTATGAGTGGCCGTGTGCCTGTTGAACAACGGTGACCAATTTGGCGTCTACGCCG
 CATCTAGCTTCTGCCTGGACCGTCGGTAGCGATGAAAGATGCGGAGAAAGTTCCCTCTGTTTTGGCTCG
 TTCTTCGAGACCAACTCAGGGTTGAGCAGACTTAATGAGCCGCGCTTGGCGGCCGCCAAAACCCAAAA
 CACAACCAGTCTATTTGACATTGTTTCAGTATGCGTTGACATTATGTTAATGTACAAATCTTGGCGGTGGAT
 CACTCGGTTTCGTGGATCGATGAAGAACGCAGCCAGCTGCGATAAATAGTGCGAATTGCAGACACATTGA
 GCACTAAGAATTGCAACGCACATTGCGCTATCGGGTTCATTCCCGATGGCAGCTCTGGCTGAGGGTCGA
 ATTATGGCAAACCTATCTTCGCGGTTTCGGCTGTGAAGCATTGCGCAAGCAGTTGCTATGTTGTTGGTCGG
 TCGGTCTCGGTCGGTCGATTGACAGCATGATGGCTCCTTGCTTAGTTGTTGTGTGAAGAGACGTTAACAC

CGAACGGCGGTGATATTGGTGATCGCAAAAGCGAGAAGTATGCCACTTCATAGGGGCAACAACCAGCATA
CGTATGTTGGCTGGTTGATGAACTGTTGGCAACGGAGTGACGGTGTGATCAGGAACGTTTGTATTTGACC
TCAGCTCAGTCGTGATACCCGCTGAATTTAAGCATATAATTAA

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

CTGCGGAAGGATCATTATCGAGCGAATCCAAAACGAAAAAGTCTCCCAACGTGCATACCATCCATTT
GCATGTTGTTGTGAGCCACATAGAACTCATAACGTGTGGTGGCAGCCGTCTGATGTGCTTTATCGT
GCAGACAATGGCTTATGAGTGGCTGTGTGATTGTTGAACAACGGTGACCAATTTGGCGTCTACGCCG
TATCTAGCTTCTGCCTGGACCGTCGGTAGCGATGAAAGATGCGGAGGAAGTTCCTCTGTTTTGGTACG
CTAAAGCAGAGTTGAGCAGACTTAATGAGCCACGCTTGGTGGCCGCCAAAACCCAAAACACAACCA
GTCTATTTTAAACGTTTGTGATATGTTAATGTACAAATCTTGGCGGTGGATCACTCGGTTCGTGGATC
GATGAAGAACGCAGCCAGCTGCGATAAATAGTGCGAATTGCAGACACATTGAGCACTAAGAATTTCG
AACGCACATTGCGCTATCGGGTTCATTCCCGATGGCACGTCTGGCTGAGGGTTCGAATTATAGTAAAC
TATCTTCGAGTACTTTTTATGGTCGTGAAGTATTCGGCAAGTAGTGACGTCGGATTGTTTTTGTGGTC
GTCCGTTCGTTCGGTCGGTCAACAACAATATTCTGAGGCTCCTTGCTTAGTTGTGTTCTAGTAGACGT
TAACACCTGAACAATATGTGGTGGTGATATTGGTGATGGCGAGAATCATGCCGCTTCAATGGGGCAG
CAACCAGCATAACGCTAATGACAGTTGGTTGATTGAAGCCAGGGCAACGGAGTGATGTACGTGTGGCG
ATCATTTAACGTTTATATTTGACCTCAGCTCAGTCGTGATTACCCGCTGAATTTAAGCATATAATTAA
GCGGAGGAAAAGAACTAA
