

## 浙 江 省 地 方 标 准

DB33/ 399.4 -2006

代替DB33/T 464-2004

---

### 无公害南美白对虾 第 4 部分：苗种

Non-environmental pollution *Penaeus Vannamei* Larva

Part 4: Larva

2006-10-10 发布

2006-11-10 实施

---

浙江省质量技术监督局 发布



## 前 言

本部分第 5 章为强制性条款。

DB33/ 399《无公害南美白对虾》分为四个部分：

- 第 1 部分：苗种生产技术规范；
- 第 2 部分：养殖技术规范；
- 第 3 部分：产品质量标准；
- 第 4 部分：苗种。

本部分为 DB33/T 399 的第 4 部分。

本部分代替 DB33/T 464—2004《无公害南美白对虾苗种》，本部分与 DB33/T 464—2004 相比主要变化如下：

- 标准属性由推荐性调整为强制性；
- 质量安全要求中增加了氯霉素残留、呋喃西林代谢物和呋喃唑酮代谢物三个检验项目；
- 调整了质量安全要求中的部分技术参数指标；
- 增加了二个资料性附录。

本部分附录 A 和附录 B 为资料性附录。

本部分由浙江省水产标准化委员会提出并归口。

本部分起草单位：浙江省水产引种育种中心。

本部分主要起草人：徐晓林、杜建明、梅凯先、张海琪、黄家庆。

本部分所代替标准的历次版本发布情况为：DB33/T 464—2004。



# 无公害南美白对虾

## 第4部分：苗种

### 1 范围

本部分规定了无公害南美白对虾（*Penaeus vannamei* Booen）苗种的术语和定义、感官要求、质量安全要求、检验方法和检验规则。

本部分适用于无公害南美白对虾苗种质量安全评定。

### 2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本部分的引用而成为本部分的条款。凡是注日期的引用文件，其随后所有的修改单（不包括勘误的内容）或修订版均不适用于本部分，然而，鼓励根据本部分达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件，其最新版本适用于本部分。

- DB33/ 399.3 无公害南美白对虾 第3部分：产品质量标准  
DB33/T 599-2006 水产品中硝基呋喃类代谢物残留量的测定 液相色谱-串联质谱法  
FDA/ORL/DFS LIB# 4303 高效液相色谱—串联质谱法分析小龙虾肉中的氯霉素

### 3 术语和定义

下列术语和定义适用于本部分。

#### 3.1

##### SPF 虾苗

无特定病原的虾苗。

#### 3.2

##### 淡化苗出苗池盐度

虾苗淡化至出苗时育苗池水的盐度。

#### 3.3

##### 淡化时间

虾苗从开始淡化至淡化到池水一定盐度所需的时间。

#### 3.4

##### 规格合格率

符合全长规格要求（0.7 cm）的个体数占苗种总数的百分比。

#### 3.5

##### 附着性纤毛虫带病率

患有附着性纤毛虫的个体数占苗种总数的百分比。

#### 3.6

##### 死亡率

死亡个体数占苗种总数的百分比。

### 4 感官要求

虾苗个体大小均匀，体色透明，体表干净，活力强，并符合 DB33/ 399.3 的规定。

## 5 质量安全要求

苗种质量安全要求应符合表 1 的规定。

表1 无公害南美白对虾苗种质量安全指标

序号	项 目	要 求
1	虾苗全长 cm	$\geq 0.7$
2	规格合格率 %	$\geq 80$
3	*淡化苗淡化时间 d	$\geq 5$
4	*淡化苗出苗池盐度	$\leq 3$
7	附着性纤毛虫带病率 %	$\leq 1$
8	死亡率 %	$\leq 0.2$
9	白斑病毒和桃拉病毒	不得检出
8	绿霉素残留 $\mu\text{g}/\text{kg}$	不得检出
9	呋喃西林代谢物 $\mu\text{g}/\text{kg}$	不得检出
10	呋喃唑酮代谢物 $\mu\text{g}/\text{kg}$	不得检出

※为低盐度 ( $\leq 3$ ) 和淡水地区养殖用苗时的质量检测要求。

## 6 检验方法和规则

## 6.1 组批

以待出售虾苗的育苗池为一个检验批，销售前按批抽检，抽检率为同批待出售虾苗育苗池数量的 10%~20%。

## 6.2 规格合格率

虾苗先用碘液杀死，在解剖镜下或用游标卡尺进行测量。每次抽检数量不少于 50 尾。

## 6.3 淡化苗出苗池盐度

从苗池随机取水样三次，测量水样的盐度，以三次的算术平均值为其结果。

## 6.4 死亡率

从苗池的表、中、底三层各随机取样一次，每次抽检数量不少于 2000 尾，直接观察检验，以三次的算术平均值为其结果。

## 6.5 附着性纤毛虫带病率

从苗池的表、中、底三层各随机取样一次，每次抽检数量不少于 2000 尾，用肉眼或解剖镜检查，以三次的算术平均值为其结果。

## 6.6 白斑病毒(WSSV)和桃拉病毒(TSV)

从苗池随机取样三次，每次抽检数量为 100 尾~200 尾，用聚合酶链反应(PCR)方法检测(参见附录 A 和附录 B)。

## 6.7 氯霉素测定

按 FDA/ORL/DFS LIB # 4303 的规定执行。

## 6.8 呋喃西林代谢物和呋喃唑酮代谢物的测定

按 DB33/T 599-2006 的规定执行。

## 6.9 判定规则

6.9.1 苗种质量检验结果全部达到第五章规定的各项指标要求，则判本批次苗种合格。

6.9.2 检验结果中有一项指标要求不合格，允许加倍抽样复检此项指标一次，复检仍不合格的，则判本批次苗种不合格。检验结果中有两项及两项以上指标不合格，则判本批次苗种不合格。

## 附录 A

### (资料性附录)

#### 对虾白斑杆状病毒 (WSBV) PCR 检测方法

##### A.1 试剂和仪器

###### A.1.1 试剂

对虾白斑杆状病毒 (WSBV) -PCR 检测试剂盒 (国家海洋局第三研究所开发)。其中, 要求 4℃ 冷藏保存的有: DNA 提取裂解液 1 瓶, 吸附液 1 支, 洗涤液 1 瓶, 电泳缓冲液 1 瓶, 灭菌牙签 1 包, 琼脂糖粉 (含 EB) 1 支; -20℃ 冷冻保存的有: 含 PCR 混合液反应管 12 支, WSBV-PCR 稳定液 1 支, 阳性对照和阴性对照各 1 支, 蒸馏水 1 支。

注: 琼脂糖粉因含核酸染色剂溴化乙啶, 有毒! 制胶时带手套操作, 避免接触皮肤。

###### A.1.2 仪器及耗材

A.1.2.1 PCR 扩增仪。

A.1.2.2 台式高速离心机。

A.1.2.3 微型混合器。

A.1.2.4 加样枪。

A.1.2.5 电泳仪。

A.1.2.6 电泳槽。

A.1.2.7 紫外检测灯。

A.1.2.8 0.5 毫升离心管。

A.1.2.9 200 微升加样枪头。

A.1.2.10 不锈钢镊子。

A.1.2.11 一次性手套。

###### A.1.3 检测步骤

###### A.1.3.1 样品的选取

取 10 毫克对虾或其它虾池生物组织。仔虾或幼虾可取整只, 成虾可用镊子取其心脏、真皮、鳃、肠或消化腺等组织。

###### A.1.3.2 样品的处理

- a) 将取得的虾组织置于 0.5 毫升规格小管内, 滴入 10 滴 DNA 提取裂解液, 用灭菌牙签捣绞 1 分钟~2 分钟。
- b) 将内置捣碎后虾组织的小管放入台式高速离心机, 12000 转/分钟离心 3 分钟, 将上清液转移至新管内, 加入 20 微升吸附液 (内含白色物质, 用前充分摇匀), 混匀。室温放置 5 分钟, 其间摇匀 3 次。
- c) 将混匀后的新管以 10000 转/分钟离心 30 秒, 弃去上清液, 再离心 5 秒, 用加样枪吸干残余液体, 滴入 10 滴洗涤液于沉淀中, 用加样枪头轻轻搅动使沉淀充分悬浮起来。
- d) 再以 10000 转/分钟离心 30 秒, 弃去上清液, 再离心 5 秒, 用加样枪吸干残余液体, 将沉淀置于 PCR 仪上 60℃ 加热 3 分钟 (打开离心管盖)。
- e) 加 20 微升蒸馏水, 充分悬浮沉淀。再以 10000 转/分钟离心 30 秒, 吸取上清液 2 微升于反应管中 (内含红色反应液), 再补加 WSBV-PCR 稳定液 13 微升, 用混合器混匀, 10000 转/分钟离心 30 秒, 即可作 PCR 反应。阳性及阴性对照组不需处理, 直接取 2 微升于反应管中再补加 WSBV-PCR 稳定液 13 微升做 PCR 即可。

###### A.1.3.3 PCR 反应

**A. 1. 3. 3. 1 PCR反应参数设置**

先 95℃2 分钟；然后 94℃30 秒/68℃60 秒，共 40 个循环；最后 68℃延伸 2 分钟。

**A. 1. 3. 3. 2 电泳检测**

PCR 反应完毕后，取下层红色液体 10 微升作电泳检测，时间 20 分钟~30 分钟。

**A. 1. 3. 4 检测结果判定**

将电泳完毕后的样品，置于紫外灯下观察，阳性对照泳道应有一条 300bp 的清晰亮带；阴性对照组在此平行位置无带；对样品如在此平行位置有一条带，则表明该样品含有病毒，若在此平行位置无带则该样品不含病毒。

**A. 1. 4 注意事项**

- a) 试剂盒中含有液体的离心管使用前先在离心机上离心几秒钟，将液体离心到管底；
- b) 塑料滴瓶在使用前先摇匀，旋下盖子，轻轻挤压瓶子，正确滴下所需的滴数；
- c) 加样枪头和牙签均一次性使用，以防止交叉污染；
- d) 电泳缓冲液用前请稀释 50 倍。琼脂糖粉加入 25 毫升稀释的电泳缓冲液，置于三角烧瓶中，煮沸 2 次~3 次，琼脂糖粉溶解变清即可用制胶板制凝胶，也可以用微波炉加热溶解制胶。
- e) 本试剂盒在-20℃保存时，有效期为一年。



## 附 录 B

(资料性附录)

## 对虾桃拉病毒 (TSV) PCR 检测方法

## B.1 试剂和仪器

## B.1.1 试剂

对虾桃拉病毒 (TSV) -PCR 检测试剂盒 (国家海洋局第三研究所开发)。其中, 要求 4℃ 冷藏保存的有: DNA 提取裂解液 1 瓶, 吸附液 1 支, 洗涤液 1 瓶, 电泳缓冲液 1 瓶, 灭菌牙签 1 包, 琼脂糖粉 (含 EB) 1 支; -20℃ 冷冻保存的有: 含 RT 混合液反应管 12 支, TSV-PCR 稳定液 1 支, 阳性对照和阴性对照各 1 支, 蒸馏水 1 支, 红色反应液 1 支。

注: 琼脂糖粉因含核酸染色剂溴化乙啶, 有毒! 制胶时带手套操作, 避免接触皮肤。

## B.1.2 仪器及耗材

B.1.2.1 PCR 扩增仪。

B.1.2.2 台式高速离心机。

B.1.2.3 微型混合器。

B.1.2.4 加样枪。

B.1.2.5 电泳仪。

B.1.2.6 电泳槽。

B.1.2.7 紫外检测灯。

B.1.2.8 0.5 毫升离心管。

B.1.2.9 200 微升加样枪头。

B.1.2.10 不锈钢镊子。

B.1.2.11 一次性手套。

## B.1.3 检测步骤

## B.1.3.1 样品的选取

取 10 毫克对虾或其它虾池生物组织。仔虾或幼虾可取整只, 成虾可用镊子取其心脏、真皮、鳃、肠或消化腺等组织。

## B.1.3.2 样品的处理

- a) 将取得的虾组织置于 0.5 毫升规格小管内, 滴入 10 滴 DNA 提取裂解液, 用灭菌牙签捣绞 1 分钟~2 分钟。
- b) 将内置捣碎后虾组织的小管放入台式高速离心机, 12000 转/分钟离心 3 分钟, 将上清液转移至新管内, 加入 20 微升吸附液 (内含白色物质, 用前充分摇匀), 混匀。室温放置 5 分钟, 其间摇匀 3 次。
- c) 将混匀后的新管以 10000 转/分钟离心 30 秒, 弃去上清液, 再离心 5 秒, 用加样枪吸干残余液体, 滴入 10 滴洗涤液于沉淀中, 用加样枪头轻轻搅动使沉淀充分悬浮起来。
- d) 再以 10000 转/分钟离心 30 秒, 弃去上清液, 再离心 5 秒, 用加样枪吸干残余液体, 将沉淀置于 PCR 仪上 60℃ 加热 3 分钟 (打开离心管盖)。
- e) 加 20 微升蒸馏水, 充分悬浮沉淀。再以 10000 转/分钟离心 30 秒, 吸取上清液 2 微升于反应管中 (内含红色反应液), 用混合器混匀, 于 42℃ 保温半小时, 再补加红色反应液 5 微升及 TSV-PCR 稳定液 15 微升, 10000 转/分钟离心 3 秒, 即可作 PCR 反应。阳性对照及阴性对照组不需处理, 直接取 2 微升于反应管中于 42℃ 保温半小时, 再补加红色反应液 5 微升及 TSV-PCR 稳定液 15 微升做 PCR 即可。

## B.1.3.3 PCR 反应

## B.1.3.3.1 PCR 反应参数设置

先 95℃2 分钟；然后 94℃30 秒/68℃60 秒，共 40 个循环；最后 68℃延伸 2 分钟。

#### B. 1. 3. 3. 2 电泳检测

PCR 反应完毕后，取下层红色液体 10 微升作电泳检测，时间 20 分钟~30 分钟。

#### B. 1. 3. 4 检测结果判定

将电泳完毕后的样品，置于紫外灯下观察，阳性对照泳道应有一条 210bp 的清晰亮带；阴性对照组在此平行位置应无带；对样品如在此平行位置有一条带，则表明该样品含有病毒，若在此平行位置无带则该产品不含病毒。

#### B. 1. 4 注意事项

- a) 试剂盒中含有液体的离心管使用前先在离心机上离心几秒钟，将液体离心到管底；
  - b) 塑料滴瓶在使用前先摇匀，旋下盖子，轻轻挤压瓶子，正确滴下所需的滴数；
  - c) 加样枪头和牙签均一次性使用，以防止交叉污染；
  - d) 电泳缓冲液用前请稀释 50 倍。琼脂糖粉加入 25 毫升稀释的电泳缓冲液，置于三角烧瓶中，煮沸 2 次~3 次，琼脂糖粉溶解变清即可用制胶板制凝胶，也可以用微波炉加热溶解制胶。
  - e) 本试剂盒在-20℃保存时，有效期为半年。
-