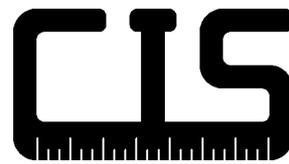


ICS 67.050
CCS X 04



中国仪器仪表学会标准

T/CIS 67002—2021

3 种剧毒鹅膏菌的物种鉴别 PCR 扩增-Sanger 测序法

Species identification of three lethal amanitas—PCR amplification-
Sanger sequencing

2021-11-01 发布

2022-01-01 实施

中国仪器仪表学会 发布



本标准由中国仪器仪表学会制定,其著作权为中国仪器仪表学会所有。除了用于法律许可范围或事先得到中国仪器仪表学会文字上的许可外,不许以任何形式再复制本标准。如果关于本标准有任何著作权/版权或相关咨询,请联系中国仪器仪表学会或本标准出版社!

中国仪器仪表学会(China Instrument and Control Society)简称 CIS,是中国仪器仪表与测量控制科学技术工作者自愿组成并依法登记成立的学术性、公益性、非营利性社团法人,是联系仪器仪表与测量控制科技工作者的桥梁和纽带,是发展中国仪器仪表与测量控制科学技术事业的重要社会力量。

地址:北京市海淀区知春路 6 号锦秋国际大厦 A 座 23 层

邮编:100088

电话:86-10-82800385

传真:86-10-82800485

网址:www.cis.org.cn

电子邮箱:scis@cis.org.cn

目 次

前言	III
引言	IV
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
4 缩略语	2
5 原理	2
6 试剂及配制	2
7 仪器和设备	3
8 鉴别分析步骤	3
8.1 采样	3
8.2 试样制备	4
8.3 DNA 提取	4
8.4 PCR 扩增	4
8.5 PCR 产物电泳检测	5
8.6 PCR 产物纯化及胶回收	5
8.7 克隆纯化	5
8.8 测序	5
8.9 序列分析	5
9 结果判断与表述	5
9.1 结果判断	5
9.2 结果表述	6
10 检测过程中防止交叉污染的措施	6
11 危害性废弃物处理	6
附录 A (资料性) PCR 产物纯化及胶回收示例	7
附录 B (资料性) 克隆纯化示例	9
附录 C (资料性) 参考序列	10

前 言

本文件按照 GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第 1 部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

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专利的责任。

本文件由中国仪器仪表学会提出并归口。

本文件起草单位：国家食品安全风险评估中心、湖南师范大学、江西省疾病预防控制中心、浙江省疾病预防控制中心、辽宁省疾病预防控制中心。

本文件主要起草人：李楠、陈作红、江涛、王佳慧、何正蜜、张眉眉、刘洋、陈鸿鹄、耿英芝。

引 言

采用 PCR 扩增-Sanger 测序法鉴别致命鹅膏等 3 种剧毒鹅膏菌,以鹅膏菌基因组 DNA 为模板,针对 ITS1-5.8S rDNA-ITS2 区域进行 PCR 扩增、克隆和测序,通过与参考序列比对进而对物种进行鉴别。其优点在于突破了形态学鉴定的局限性,不受样品个体形态特征、发育阶段的影响和限制,从 DNA 水平为引发食物中毒或相关研究的鹅膏菌的物种鉴别提供依据。

本文件的制定目的是为致命鹅膏等 3 种剧毒鹅膏菌的物种鉴别提供统一的操作程序,使其鉴别实现标准化,从而显著提升蘑菇中毒事件的检测、鉴别和防控能力。

3 种剧毒鹅膏菌的物种鉴别 PCR 扩增-Sanger 测序法

1 范围

本文件给出了 3 种剧毒鹅膏菌物种鉴别的 PCR 扩增-Sanger 测序法。

本文件适用于致命鹅膏 (*Amanita exitialis*)、灰花纹鹅膏 (*Amanita fuliginea*) 和裂皮鹅膏 (*Amanita rimosa*) 的物种鉴别。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中,注日期的引用文件,仅该日期对应的版本适用于本文件;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—2008 分析试验用水规格和试验方法

GB/T 19495.2—2004 转基因产品检测 实验室技术要求

GB/T 27403—2008 实验室质量控制规范 食品分子生物学检测

GB/T 35918—2018 动物制品中动物源性检测基因条码技术 Sanger 测序法

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

鹅膏菌 amanita

隶属于真菌界、担子菌门、担子菌纲、伞菌目、鹅膏菌科、鹅膏属的真菌。

3.2

Sanger 测序法 Sanger sequencing

双脱氧链终止法

以单链或双链 DNA 为模板,在 DNA 聚合酶的催化下延伸结合在模板上的引物,直到掺入一种链终止核苷酸为止。每个反应含有四种 dNTP,并混入用同位素或荧光标记的 ddNTP,使延长的寡聚核苷酸选择性终止,通过高分辨率变性毛细管电泳分离片段获得碱基顺序的方法。

[来源:GB/T 35918—2018,3.1.2]

3.3

可疑蘑菇样品 suspicious mushroom samples

在蘑菇中毒事件中,中毒者食用剩余的蘑菇样品,或流行病学调查中采集到的经中毒者确认其所进食的蘑菇样品。

3.4

呕吐物样品 vomit samples

中毒者呕吐的胃内容物。