

实验技术与方法

基于可视化和实时荧光环介导等温扩增技术快速鉴定日本红菇

赵兰馨^{1,2}, 赵晓燕², 易思亮³, 田恩静⁴, 范婷婷², 赵志勇², 周昌艳²

(1. 上海海洋大学食品学院, 上海 201306; 2. 上海市农业科学院农产品质量标准与检测技术研究所, 农业农村部农产品质量安全风险评估实验室(上海), 上海 201403; 3. 湖南农业大学动物医学院, 湖南长沙 410128; 4. 吉林农业大学食用菌教育部工程研究中心, 吉林长春 130118)

摘要:目的 利用可视化和实时荧光环介导等温扩增(LAMP)技术, 建立日本红菇的快速鉴别方法。方法 基于日本红菇内转录间隔区的基因序列设计了特异性的 LAMP 引物, 在 23 种蘑菇物种间进行特异性验证, 通过检测 10 ng/ μ L~1 fg/ μ L 系列浓度的基因组 DNA, 评估方法的灵敏度。结果 设计的 LAMP 引物可特异性鉴别日本红菇, 不与其他蘑菇种类发生交叉反应。建立的 LAMP 方法检测灵敏度为 1% 混合蘑菇样本, 或终浓度为 2 pg/ μ L 的日本红菇 DNA。结论 本方法可用于新鲜/干制蘑菇及烹饪后蘑菇的检测, 检测时间<1 h, 其中可视化方法无需专业仪器设备, 适用于日本红菇的现场快速鉴别。

关键词: 日本红菇; 可视化环介导等温扩增; 实时荧光环介导等温扩增; 快速鉴定; 蘑菇及其制品

中图分类号: R155 文献标识码: A 文章编号: 1004-8456(2023)10-1440-08

DOI: 10.13590/j.cjfh.2023.10.006

Rapid identification method for *Russula japonica* based on visual and real-time fluorescent loop-mediated isothermal amplification strategies

ZHAO Lanxin^{1,2}, ZHAO Xiaoyan², YI Siliang³, TIAN Enjing⁴, FAN Tingting²,
ZHAO Zhiyong², ZHOU Changyan²

(1. College of Food Science & Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Institute for Agro-food Standards and Testing Technology, Laboratory of Quality & Safety Risk Assessment for Agro-products (Shanghai), Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 201403, China; 3. College of Veterinary Medicine, Hu'nan Agricultural University, Hu'nan Changsha 410128, China; 4. Institute of Mycology, Engineering Research Center of Chinese Ministry of Education for Edible and Medicinal Fungi, Jilin Agricultural University, Jilin Changchun 130118, China)

Abstract: Objective A method for the rapid detection of *Russula japonica* was established based on a visual or real-time fluorescent loop-mediated isothermal amplification (LAMP) strategy. **Methods** A LAMP primer group targeting the internal transcribed spacer sequence of *R. japonica* was designed and primer specificity was tested in 23 mushroom species. The sensitivity of the method was assessed by detecting DNA at a series of concentrations ranging from 10 ng/ μ L to 1 fg/ μ L. **Results** The designed primers specifically identified *R. japonica* without cross-reaction with the other 22 mushroom species. Both developed LAMP methods could detect as low as 2 pg/ μ L of a DNA template or 1% *R. japonica* in different mushroom mixtures. **Conclusion** The established method is suitable for rapid on-site identification of *R. japonica* and can be applied to fresh, dried, or cooked mushroom samples, with a detection time of <1 h. This visualization strategy does not require professional equipment and is suitable for the rapid identification of *R. japonica*.

Key words: *Russula japonica*; visual loop-mediated isothermal amplification; real-time loop-mediated isothermal amplification; rapid identification; mushroom products

收稿日期: 2022-07-17

基金项目: 国家重点研发计划课题(2019YFC1604703)

作者简介: 赵兰馨 女 硕士研究生 研究方向为农产品质量安全和快速检测技术 E-mail: zhaolanxin2021@163.com

通信作者: 周昌艳 女 研究员 研究方向为农产品质量安全和标准化 E-mail: zhouchangyan@saas.sh.cn

蘑菇因其味道鲜美、营养丰富而广受消费者喜爱。据统计,全世界约有 14 000 种蘑菇,在我国约 4 000 种被发现,其中有毒蘑菇约 480 种^[1]。某些毒蘑菇与野生食用菌形态十分相似,非专业人士难以准确鉴别,因而导致我国误食毒蘑菇中毒的事件频频发生^[2]。据国家食品安全风险评估中心统计,2003—2017 年我国毒蘑菇中毒事件占总食源性中毒事件的 31.8%,位居各类食源性中毒诱因之首^[3]。

日本红菇(*Russula japonica*)隶属于担子菌门、伞菌纲、红菇目、红菇科、红菇属的有毒蘑菇,误食后可引发急性胃肠炎,出现呕吐、腹泻等症状。日本红菇子实体中大型,菌盖呈乳白色,中间下凹,边缘反卷,近漏斗状,夏秋季于阔叶林地上群生或单生,北温带及热带地区均有分布^[4]。在我国其主要分布于华中、华南地区,于 2013 年首次在我国被发现报道^[5]。日本红菇与一些野生食用菌的形态十分相似,仅凭外观形态难以鉴别。据已知数据统计 2020 年因误食日本红菇导致的全国中毒事件 58 起,中毒病例 151 例,对人民健康造成较大的危害^[6-7]。

目前已有多种检测技术用于有毒蘑菇的检测鉴别,如化学显色法、酶联免疫吸附测定法、免疫层析法、液相色谱串联质谱法等。这些鉴别方法的检测对象均为毒蘑菇中的蘑菇毒素,然而日本红菇中的毒性成分至今仍不明确,无法通过此类方法进行鉴别。真菌内转录间隔区(Internal transcribed spacers, ITS)被认为是高等真菌分类鉴定的 DNA 条形码,可用于真菌的分子鉴别^[8]。当前基于 ITS 序列的 PCR 扩增技术已被用于有毒蘑菇的鉴定^[9],该技术具有较好的特异性和稳定性,但反应过程依赖 PCR 仪器,反应时间约 2 h,并不适用于现场快速检测。核酸等温扩增技术因其无需循环温度的优势被广泛应用于病原菌检测,其中环介导等温扩增(Loop-mediated isothermal amplification, LAMP)技术是 2000 年首次被提出的一种核酸等温扩增方法,其原理为针对目标基因的 6 个区域设计 2 对特异性引物,在具有链置换活性的 DNA 聚合酶作用下 60 °C~65 °C 恒温扩增,1 h 内即可得到 10⁹~10¹⁰ 倍的核酸扩增^[10],扩增产物通过浊度变化、颜色变化、侧向流动试纸条、实时荧光法和分子探针等进行鉴定。目前已有将 LAMP 技术用于剧毒鹅膏菌、大青褶伞等毒蘑菇的鉴定^[11-12]。

本研究根据日本红菇的 ITS 序列,设计了 LAMP 引物并进行特异性验证,建立了可视化和实时荧光 LAMP 两种检测方法,并利用煮熟的蘑菇混合物验证了方法的适用性。本研究建立的方法可用于现场快速准确鉴别日本红菇,为毒蘑菇中毒事

件及临床诊断提供有效技术手段。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂

96E 多样品冷冻研磨仪(上海万柏生物科技有限公司);5424r 高速冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司);Nanodrop 2000c 超微量分光光度计(美国 Thermo scientific 公司);HWS-12 恒温水浴锅(上海生工生物工程技术有限公司);LightCycler[®] 96 荧光定量 PCR 仪(瑞士 Roche 公司)。

供试的蘑菇样本共计 23 种,部分采集自上海市和云南省普洱市,所采蘑菇均经过形态学和分子生物学 ITS 测序鉴定,部分由吉林农业大学田恩静博士提供并鉴定。蘑菇种类包含日本红菇等 7 种红菇属和 16 种其他属蘑菇,样本信息详见表 1;WarmStart[®] LAMP 变色预混液、LAMP 荧光染料(分子生物学级,美国 New England Biolabs 公司);Nuclease-free Water(分子生物学级,北京全式金生物技术有限公司);CTAB, tris-HCl 缓冲液和石英砂(纯度 99.0%,美国 Sigma-Aldrich 公司)。

1.2 DNA 提取

称取烘干蘑菇样本 25 mg 于 2 mL 离心管中,分别加入 200 μ L 石英砂、650 μ L CTAB 缓冲液(55 mmol/L CTAB, 1.4 mol/L NaCl, 100 mmol/L Tris-HCl, 20 mmol/L EDTA 调 pH 至 8.0)、550 μ L 氯仿/异戊醇溶液(v/v, 24/1),置于样品冷冻研磨仪中 70 Hz 研磨 260 s。随后 13 523 g 离心 5 min,吸取 500 μ L 上清液于 1.5 mL 离心管中,加入 500 μ L 的异丙醇,50 μ L 5 mol/L 的乙酸钠(pH 5.2),上下轻轻颠倒混匀后静置 3 min。13 523 g 离心 5 min,弃掉上清液后,加入 500 μ L 70% 的冰乙醇轻轻振荡离心管底使 DNA 悬浮。13 523 g 离心 5 min,小心倒去乙醇,DNA 室温自然干燥 30 min;最后,加入 50 μ L 无核酸酶水于 4 °C 过夜溶解 DNA。使用 NanoDrop-2 000C 超微量分光光度计测量所提 DNA 的浓度,260/280 nm 比值评价所提 DNA 的纯度。提取的 DNA 稀释至 10 ng/ μ L 备用,并于 4 °C 短期保存,-20 °C 长期保存。

1.3 特异性 LAMP 引物设计

采用在线引物设计工具 NEB LAMP Primer Design Tool (<https://lamp.neb.com/#/>)进行多组特异性 LAMP 引物设计。在 NCBI GenBank 数据库上检索下载日本红菇 ITS 序列(No. MN648957.1, MN648956.1, MK167414.1),同时检索同属的美味红菇、短柄红菇序列作为背景基因序列。根据日本红菇与其他红菇的序列差异性设计引物,引物包括

表1 采集的蘑菇样本

Table 1 Collected mushroom specimens used in this study

属	种	试验编号	采集地点	Gene Bank 登录号	特异性
红菇属 <i>Russula</i>	毒红菇 <i>Russula emetica</i>	REM	云南省普洱市	—	-
	菱红菇 <i>Russula resca</i>	RRE	上海市	KU237465.1	-
	亚稀褶红菇 <i>Russula subnigricans</i>	RSU	浙江省湖州市	—	-
	铜绿红菇 <i>Russula aeruginea</i>	RAE	内蒙古根河市	—	-
	稀褶黑红菇 <i>Russula nigricans</i>	RNI	贵州省毕节市	KX812835.1	-
	密褶红菇 <i>Russula densifolia</i>	RDN	云南省普洱市	AB291761.1	-
	日本红菇 <i>Russula japonica</i>	RJA	云南省普洱市	AB509603.1	+
鹅膏属 <i>Amanita</i>	芥橙黄鹅膏 <i>Amanita subjunquillea</i>	ASU	吉林省蛟河市	KR996715.1	-
	锥鳞白鹅膏 <i>Amanita virgineoides</i>	AVI	云南省普洱市	—	-
	杵柄鹅膏 <i>Amanita sinocitrina</i>	ASI	安徽省合肥市	MK388152.1	-
	小豹斑鹅膏 <i>Amanita parvipanthera</i>	APAR	贵州省毕节市	MW192484.1	-
	淡红鹅膏 <i>Amanita pallidorosea</i>	APAL	河南省驻马店市	KY616971.1	-
	异味鹅膏 <i>Amanita kotohiraensis</i>	AKO	湘西土家族苗族自治州	MH508415.1	-
	欧式鹅膏 <i>Amanita oberwinklerana</i>	AOB	江苏省南京市	—	-
	爪哇鹅膏 <i>Amanita javanica</i>	AJA	云南省普洱市	LC100003.1	-
	球基鹅膏 <i>Amanita subglobosa</i>	ASUB	云南省普洱市	MH508619.1	-
	豹斑鹅膏 <i>Amanita pantherina</i>	APA	云南省普洱市	AB015701.1	-
蘑菇属 <i>Agaricus</i>	球基蘑菇 <i>Agaricus abruptibulbus</i>	AAB	云南省普洱市	MW192484.1	-
青褶伞属 <i>Chlorophyllum</i>	大青褶伞 <i>Chlorophyllum molybdites</i>	CMO	上海市	AY081243.1	-
白环蘑菇属 <i>Leucoagaricus</i>	橙褐白环蘑 <i>Leucoagaricus tangerinus</i>	LTA	云南省普洱市	KF981791.1	-
裸脚伞属 <i>Gymnopus</i>	裸脚伞 <i>Gymnopus subnudus</i>	GYS	云南省普洱市	MW816520.1	-
皮伞属 <i>Marasmius</i>	紫皮小红伞 <i>Marasmius pulcherripes</i>	MPU	上海市	MW291124.1	-
香菇属 <i>Lentinus</i>	香菇 <i>Lentinus edodes</i>	LED	上海市	—	-

注:香菇(*L. edodes*)为人工栽培物种,购于上海某超市;毒红菇(*R. emetica*)、亚稀褶红菇(*R. subnigricans*)、铜绿红菇(*R. aeruginea*)、锥鳞白鹅膏(*A. virgineoides*)和欧式鹅膏(*A. oberwinklerana*)由菌物专家田恩静老师根据宏观形态和微观特征鉴定

4条核心引物:即正向外引物(F3)、反向外引物(B3)、正向内引物(FIP)由F1c与F2构成,反向内引物(BIP)由B1c与B2构成,还有1条正向环引物(LF),所设计的引物由生工生物(上海)有限公司合成。

1.4 可视化LAMP方法建立

可视化检测方法的LAMP反应体系总体积为10 μL ,包括2 \times WarmStart[®] LAMP 变色预混液(New

England Biolabs,美国)5 μL 、DNA模板2 μL 、引物混合液1.09 μL (包括12.8 $\mu\text{mol/L}$ 的内引物FIP/BIP,1.2 $\mu\text{mol/L}$ 的外引物F3/B3和6.4 $\mu\text{mol/L}$ 的环引物LF),补水至10 μL 。在62 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴锅中进行等温扩增,反应持续45 min。根据反应前后颜色变化判断是否为日本红菇。当样本中含有日本红菇时,反应体系颜色由粉红色变为黄色;当样本中无日本红菇时,体系颜色则保持粉红色不变。

1.5 实时荧光 LAMP 方法建立

实时荧光检测法的 LAMP 反应体系总体积为 10 μ L,包括 WarmStart LAMP 预混液 5 μ L、DNA 模板 2 μ L、5 \times LAMP 荧光染料(New England Biolabs,美国)1 μ L,引物混合液 1.09 μ L(包括 12.8 μ mol/L 的内引物 FIP/BIP,1.2 μ mol/L 的外引物 F3/B3 和 6.4 μ mol/L 的环引物 LF),补水至 10 μ L。使用 LightCycler[®] 96 荧光定量 PCR 仪(Roche,瑞士)进行恒温扩增,程序设置为预热 62 $^{\circ}$ C 15 s,扩增反应 62 $^{\circ}$ C 恒温 60 s/循环,每 45 s 收集一次荧光信号,共设 60 个循环,总时间约为 1 h。采用荧光信号强度随时间变化的扩增曲线反映扩增结果,荧光阈值默认为系统预设值,Ct 值反映每个管内的荧光信号达到设定的荧光阈值时所经历的循环数。

1.6 LAMP 方法的特异性验证

为验证 LAMP 方法的特异性,以 ddH₂O 为空白,日本红菇为阳性样本,其他 22 种蘑菇为阴性样本,包括毒红菇、密褶红菇、亚稀褶红菇、菱红菇、铜绿红菇等(表 1)。按照 1.3.3 和 1.3.4 所建立的反应体系进行等温扩增,根据颜色变化和荧光信号值来判断可视化和荧光 LAMP 检测方法的特异性。

1.7 LAMP 方法的灵敏度分析

为测定 LAMP 检测方法的灵敏度,将日本红菇基因组 DNA 梯度稀释为 10、1、0.1、0.01 ng/ μ L、0.1、0.01 pg/ μ L 和 1 fg/ μ L,按照 1.3.3 和 1.3.4 所建立的方法进行等温扩增,根据颜色变化和荧光信号值来确定可视化和荧光 LAMP 检测方法的灵敏度。

1.8 方法应用

实际生活中,有毒蘑菇往往混杂于其他蘑菇中经烹饪加工后食用。为验证所建立的两种 LAMP 检测方法的适用性,将研磨后的日本红菇与香菇按不同质量比充分混合,日本红菇与香菇质量比分别为 1:0、1:1、1:3、1:19、1:99 和 0:1。取 50 mg 混合蘑菇粉末样本和 1.5 mL 纯水于 2 mL 离心管中,涡旋混合 1 min 后,将离心管固定于泡沫漂浮板,然后置于 100 $^{\circ}$ C 水浴锅中加热 15 min,模拟蘑菇烹煮过程。直接取蘑菇蒸煮后的汤水 10 μ L 稀释 10 倍后,分别按照 1.3.3 和 1.3.4 所建立的方法进行等温扩增,评价两种 LAMP 检测方法在实际样本中的适用性。

1.9 统计学分析

所得数据以均数 \pm 标准差(Mean \pm SD)表示,统计学分析采用 SPSS 26.0 软件(IBM Corporation,美国)。统计比较采用单因素方差分析(ANOVA)进行邓肯事后检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 引物设计

通过在 NCBI 上搜索日本红菇基因序列,采用 5.8S rDNA 两侧的 ITS 序列作为目标基因,进一步与同亚属的美味红菇、短柄红菇基因序列比对,找到种内保守、种间特异的序列片段。本研究设计的日本红菇特异性 LAMP 引物在靶标序列上的位置和方向如图 1 所示,共靶向 7 个结合位点,对应 LAMP 引物序列信息见表 2。

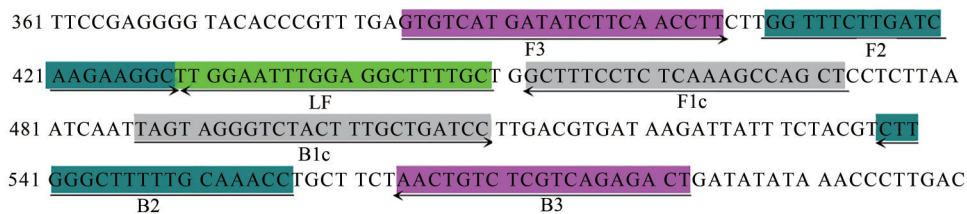


图 1 日本红菇 LAMP 引物设计位置

Figure 1 LAMP primer designing sites for *Russula japonica*

表 2 日本红菇引物序列

Table 2 Primer sequences of *Russula japonica*

引物	序列(5'-3')	长度/bp
F3	GTGTCATGATATCTTCAACCTT	22
B3	AGTCTCTGACGAGACAGTT	19
FIP	AGCTGGCTTTGAGAGGAAAGCGGTTTCTTGATCAAGAAGGC	41
BIP	TAGTAGGGTCTACTTTGCTGATCCGGTTTGCAAAAAGCCCAAG	43
LF	GCAAAAAGCCTCCAAATTCCAA	21

2.2 引物特异性验证

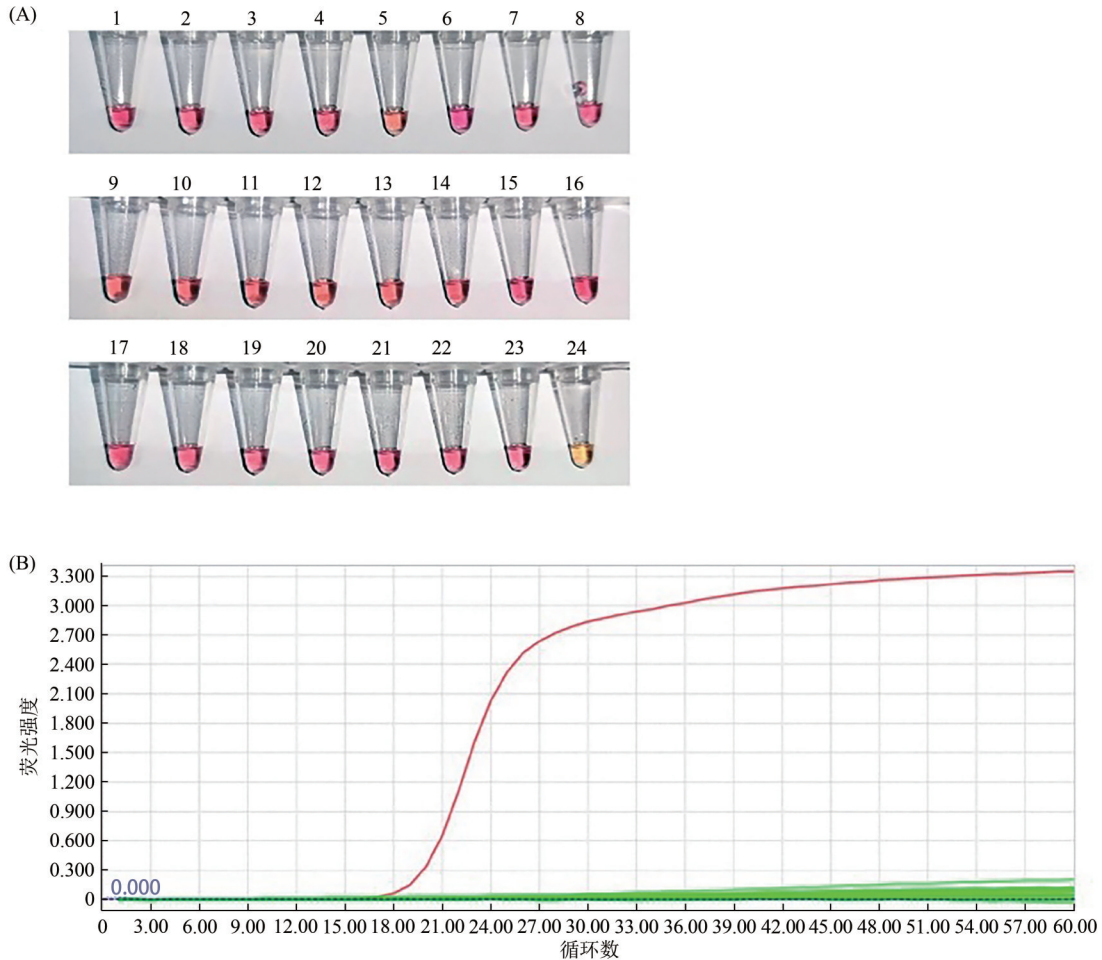
利用自行设计的日本红菇特异性引物,分别采用可视化 LAMP 法和荧光 LAMP 法在 23 种不

同蘑菇物种间进行特异性验证。如图 2(A)所示,ddH₂O 为空白对照(No. 1),日本红菇为阳性样本(No. 24),其他 22 种蘑菇为阴性样本(No. 2~

23)。结果显示第 1~23 反应管的颜色保持粉红色不变,无扩增反应发生;第 24 反应管的颜色由粉红色变为黄色,发生了扩增反应导致体系颜色变化。

同时采用该引物组进行实时荧光 LAMP 扩增

反应。如图 2(B)所示,只有日本红菇发生扩增反应产生了 S 型荧光曲线,Ct 值为 19.32,其他蘑菇样本及空白对照未产生任何荧光信号。结果表明本研究设计的引物具有良好的特异性,未出现交叉反应和假阳性结果。



注:图(A)为可视化 LAMP 法的引物特异性验证结果.1: ddH₂O; 2: ASU; 3: AVI; 4: ASI; 5: APAR; 6: APAL; 7: AKO; 8: AOB; 9: AJA; 10: ASUB; 11: APA; 12: AAB; 13: CMO; 14: LTA; 15: GYS; 16: MPU; 17: LED; 18: REM; 19: RRE; 20: RSU; 21: RAE; 22: RNI; 23: RDN; 24: RJA; 图(B)为实时荧光 LAMP 法的引物特异性验证结果,红色曲线为日本红菇;绿色曲线为其他物种和 ddH₂O

图 2 引物特异性验证

Figure 2 Specificity test of primers

2.3 方法灵敏度分析

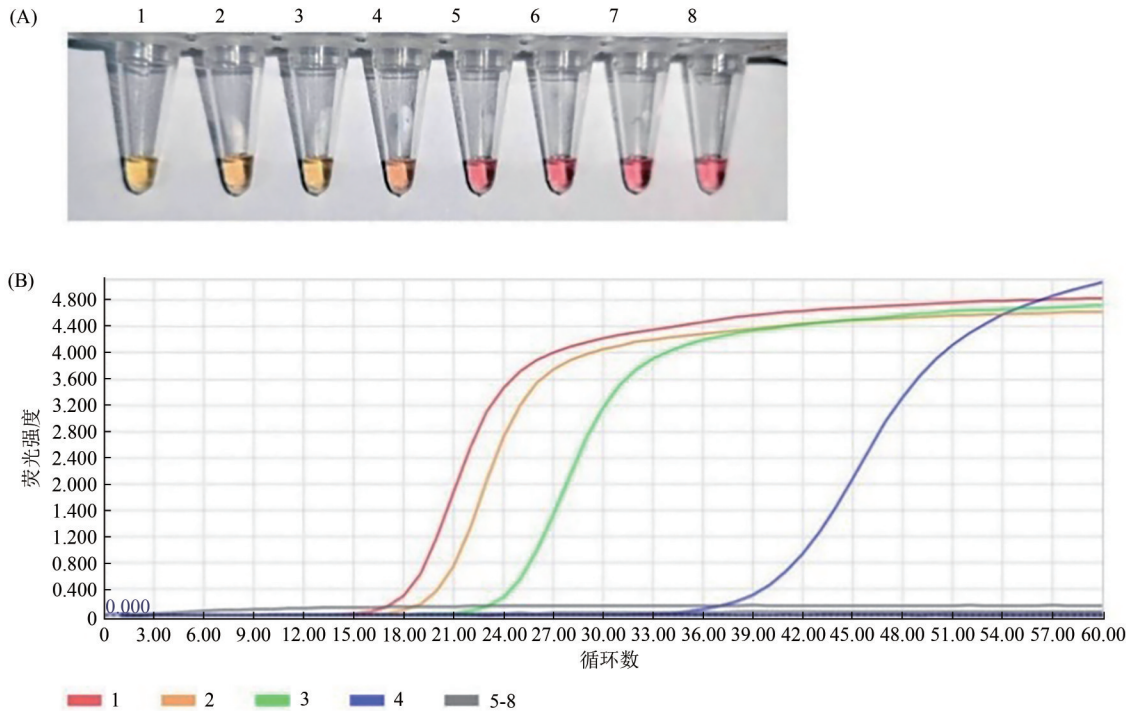
将获得的日本红菇 DNA 模板进行梯度稀释,浓度范围为 10¹~10⁻⁶ ng/μL,按照 1.4 和 1.5 步骤分别进行可视化和实时荧光 LAMP 扩增反应,每个浓度水平重复 3 次实验。如图 3(A)和 3(B)所示,可视化和实时荧光 LAMP 方法均可检出 20 pg 的样本添加量,即终浓度为 2 pg/μL 的样本 DNA。

2.4 方法适用性验证

利用开发的 LAMP 方法用于煮沸后的混合蘑菇样本中。如图 4(A)和 4(B)所示,可视化法和实时荧光 LAMP 法均可检测到混合样品中 1% 的日本红菇添加量,空白对照无反应。结果表明该方法可用于蘑菇及加工蘑菇中日本红菇的鉴定。

3 讨论

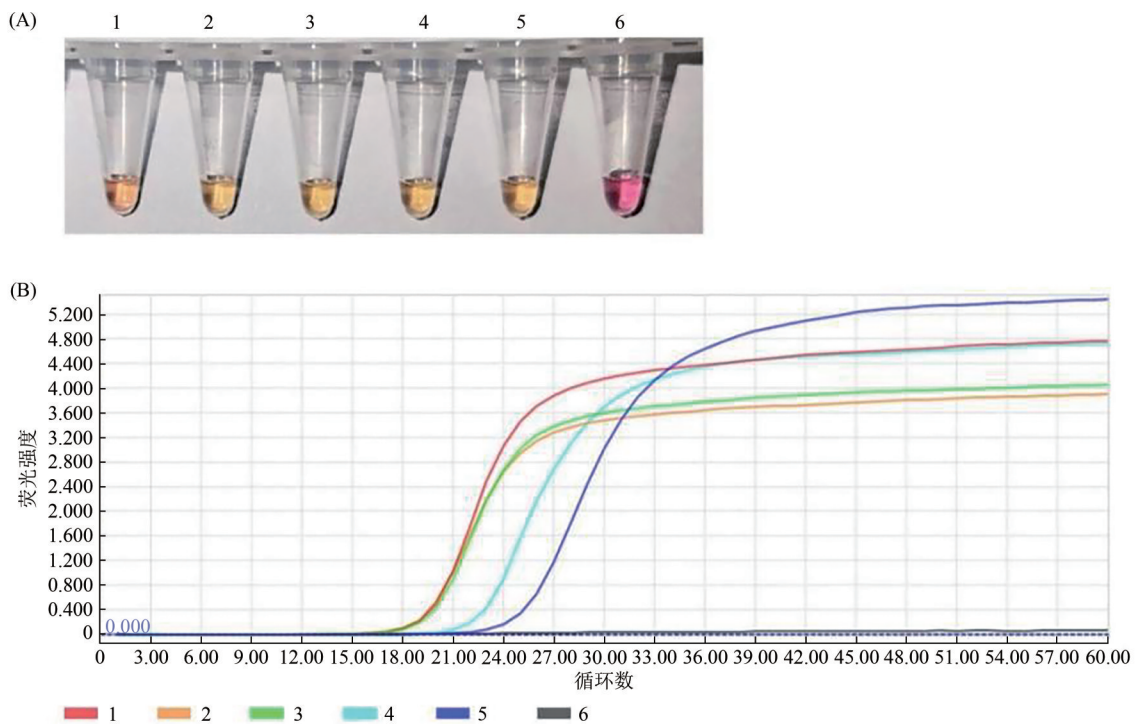
红菇属是大型野生真菌类群之一,种类丰富,分布广泛。全世界共有 800 余种,我国报道的约 180 种,其中可食红菇种类 78 种,有毒种类 18 种,如日本红菇、毒红菇、臭黄菇、拟臭黄菇、点柄黄红菇和亚稀褶红菇等^[13-15]。除亚稀褶红菇引起横纹肌溶解症状外,其他红菇类误食后均可导致胃肠炎症状。近年来,由日本红菇引起的中毒事件逐年上升,在我国湖南、江西、重庆、浙江和贵州等地均有中毒事件发生^[16]。然而,目前尚无任何日本红菇的快速鉴别方法被报道。LAMP 技术具有恒温高效、无需外加温度循环仪可实现扩增的特点,反应时间 <1 h,相比传统的 PCR 检测手段具有显著优势。此



注:图(A)为可视化LAMP法的灵敏度结果图;图(B)为实时荧光LAMP法的灵敏度结果.1~8对应模板DNA浓度:
10、1、0.1、0.01 ng/ μ L、1、0.1、0.01、1 fg/ μ L

图3 灵敏度分析

Figure 3 Method sensitivity analysis



注:图(A)为可视化LAMP法适用性验证结果;图(B)为实时荧光LAMP法适用性验证结果.1~6对应日本红菇与香菇样本不同质量比混合,日本红菇与香菇质量比例分别为1:0、1:1、1:3、1:19、1:99和0:1

图4 方法适用性验证

Figure 4 Method applicability

外 LAMP 扩增产物检测方法多样,其中颜色变化法是最为直接快速的检测方法,其原理是由于扩增反应产生大量的 $P_2O_7^{4-}$ 与体系金属离子结合,导致反应体系组分或 pH 改变而引起染料颜色变化。本

研究中可视化染料为粉红色与黄色的转变,相较于 HNB 法的颜色变化(天蓝和紫罗兰),更易于区分。此外,为了更好地验证设计引物的特异性及了解扩增反应的实时动态,本研究也建立了实时荧光

LAMP方法,作为另一种方法验证手段,可通过 Ct 值来进一步确定所建立的 LAMP 方法达到信号阈值的最短时间。

为设计出特异的 LAMP 引物,目标序列的选择尤为重要。在真菌中,核糖体 DNA 具有较高的保守性,其中 5.8S rDNA 及其两侧的 ITS 区域,具有进化速率快,序列片段小,遗传信息丰富等特点,更能够反映出种属间的差异^[17],因此优先选择 ITS 作为日本红菇 LAMP 引物的靶标序列。当前, GeneBank 中共记录 5 条被鉴定为日本红菇的基因序列,经分析后发现仅有的 5 条序列相似性较低^[18],其中 GeneBank 号为 AB509603.1(2009)和 AB154697.1(2003)的基因序列相似较高,来源于日本; GeneBank 号为 MN648957.1、MN648956.1(2019)和 MK167414.1(2018)的基因序列相似度较高,来源于中国。经过进一步比较分析发现,来源于日本的两条序列中,AB154697.1 包含 ITS2 和 28S rDNA 区域,AB509603.1 包含 5.8S rDNA、ITS2 和 28S rDNA 部分序列,序列片段较小。而来源于中国的 3 条基因序列均含有 5.8S rDNA 及其两侧的 ITS 序列,序列长度相近,相比前一组更适合作为引物设计的目标序列。基于此,本研究共设计了 3 组备选引物,通过试验筛选了一组无交叉污染且扩增效果最优的引物,并用 22 种不同种属的蘑菇样本验证了其特异性,结果显示引物特异性良好,无交叉反应。

本研究基于 LAMP 技术分别建立了快速鉴定日本红菇可视化和实时荧光方法,二者均具有良好的特异性和灵敏度,可检测出终浓度为 2 pg/ μ L 的模板 DNA。此外直接将煮熟的混合菌汤作为扩增模板仍可得到良好的结果,可检出低至 1% 的日本红菇添加量,整个 LAMP 检测过程用时不到 1 h,其中可视化检测结果通过肉眼观察颜色变化即可判断,方便快捷,可用于现场诊断;实时荧光法则可以监测反应进程实时跟踪,适用于实验室检测。本研究建立日本红菇快速鉴别技术,对毒蘑菇中毒的预防和临床诊断具有重要意义。

参考文献

- [1] WU F, ZHOU L W, YANG Z L, et al. Resource diversity of Chinese macrofungi: Edible, medicinal and poisonous species [J]. Fungal Diversity, 2019, 98(1): 1-76.
- [2] 李林静, 李高阳, 谢秋涛. 毒蘑菇毒素的分类与识别研究进展[J]. 中国食品卫生杂志, 2013, 25(4): 383-387.
LI L J, LI G Y, XIE Q T. Research progress on poisonous mushroom toxins classification and recognition [J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2013, 25(4): 383-387.
- [3] LI W W, PIRES S M, LIU Z T, et al. Surveillance of foodborne disease outbreaks in China, 2003-2017 [J]. Food Control, 2020, 118: 107359.
- [4] 穆新华, 涂磊, 吴小冬, 等. 江西九岭山保护区毒蘑菇一新记录种——日本红菇[J]. 食品安全导刊, 2021(29): 162-163, 165.
MU X H, TU L, WU X D, et al. A new record species of poisonous mushrooms in Jiangxi Jiuling Mountain Reserve - *Russula japonica* [J]. China Food Safety Magazine, 2021(29): 162-163, 165.
- [5] CHEN Z H, ZHANG P, ZHANG Z G. Investigation and analysis of 102 mushroom poisoning cases in Southern China from 1994 to 2012[J]. Fungal Diversity, 2014, 64(1): 123-131.
- [6] LI H J, ZHANG H S, ZHANG Y Z, et al. Mushroom poisoning outbreaks - China, 2020[J]. China CDC Weekly, 2021, 3(3): 41-45.
- [7] 孙莹莹, 陈潇荣, 赵光举, 等. 日本红菇中毒致消化道出血一例[J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2021, 39(9): 694-695.
SUN Y Y, CHEN X R, ZHAO G J, et al. A case of alimentary tract hemorrhage caused by Japanese red mushroom poisoning [J]. Chinese Journal of Industrial Hygiene and Occupational Diseases, 2021, 39(9): 694-695.
- [8] 蔡箐, 唐丽萍, 杨祝良. 大型经济真菌的 DNA 条形码研究——以我国剧毒鹅膏为例[J]. 植物分类与资源学报, 2012, 34(6): 614-622.
CAI Q, TANG L P, YANG Z L. DNA barcoding of economically important mushrooms: A case study on lethal amanitas from China [J]. Plant Diversity and Resources, 2012, 34(6): 614-622.
- [9] ROMANO M C, DOAN H K, POPPENGA R H, et al. Fatal *Amanita muscaria* poisoning in a dog confirmed by PCR identification of mushrooms[J]. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 2019, 31(3): 485-487.
- [10] NOTOMI T, OKAYAMA H, MASUBUCHI H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA [J]. Nucleic Acids Research, 2000, 28(12): e63.
- [11] HE Z M, SU Y T, LI S N, et al. Development and evaluation of isothermal amplification methods for rapid detection of lethal *Amanita* species[J]. Frontiers in Microbiology, 2019, 10: 1523.
- [12] WANG N, ZHAO Z Y, GAO J, et al. Rapid and visual identification of *Chlorophyllum molybdites* with loop-mediated isothermal amplification method[J]. Frontiers in Microbiology, 2021, 12: 638315.
- [13] 图力古尔, 包海鹰, 李玉. 中国毒蘑菇名录[J]. 菌物学报, 2014, 33(3): 517-548.
BAU T, BAO H Y, LI Y. A revised checklist of poisonous mushrooms in China[J]. Mycosystema, 2014, 33(3): 517-548.
- [14] 陈作红, 杨祝良, 图力古尔, 等. 毒蘑菇识别与中毒防治[M]. 北京: 科学出版社, 2016: 246-253.
CHEN Z H, YANG Z L, BAU T, et al. Poisonous mushrooms: recognition and poisoning treatment [M]. Beijing: Science Press, 2016: 246-253.
- [15] 章轶哲, 李宏锡, 张凯平, 等. 基于 Taqman-MGB 探针的亚稀褶红菇实时荧光定量 PCR 检测方法[J]. 菌物学报, 2020, 39

- (5): 937-943.
- ZHANG Y Z, LI H X, ZHANG K P, et al. A method of real-time fluorescent quantitative PCR for detection of *Russula subnigricans* based on Taqman-MGB probe [J]. *Mycosystema*, 2020, 39(5): 937-943.
- [16] LI H J, ZHANG H S, ZHANG Y Z, et al. Mushroom poisoning outbreaks - China, 2019 [J]. *China CDC Weekly*, 2020, 2(2): 19-24.
- [17] 尹军华, 张平, 龚庆芳, 等. 亚稀褶黑菇和稀褶黑菇的 ITS 序列分析 [J]. *菌物学报*, 2008, 27(2): 237-242.
- YIN J H, ZHANG P, GONG Q F, et al. Sequence analysis of the internal transcribed spacer of gene coding for rDNA in *Russula subnigricans* and *R. nigricans* [J]. *Mycosystema*, 2008, 27(2): 237-242.
- [18] 王向华. 红菇科可食真菌的若干分类问题 [J]. *菌物学报*, 2020, 39(9): 1617-1639.
- WANG X H. Taxonomic comments on edible species of *Russulaceae* [J]. *Mycosystema*, 2020, 39(9): 1617-1639.

《中国食品卫生杂志》投稿须知

《中国食品卫生杂志》是中华预防医学会、中国卫生信息与健康医疗大数据学会共同主办的国家级食品卫生学术期刊,为中文核心期刊、中国科技核心期刊。《中国食品卫生杂志》的办刊方针是普及与提高并重。设专家述评、论著、研究报告、实验技术与方法、监督管理、调查研究、风险监测、风险评估、食品安全标准、食物中毒、综述等栏目。《中国食品卫生杂志》既报道食品安全领域的重大科研成果,也交流产生、发现于实际工作的研究结论;既涉足实验室,又深入监督管理现场;全方位报道国内外食品安全的政策、理论、实践、动态。

1 投稿的基本要求

文稿应具有创新性、科学性、实用性,文字精练,数据准确,逻辑性强。文章一般不超过 5000 字,如遇特殊情况请与编辑部联系。投稿时邮寄单位推荐信,介绍该文的作者、单位,文章的真实性,是否一稿两投,是否属于机密,是否受各类基金资助。如为基金资助项目,应附带资助的合同文本封面和课题参加者名单页复印件或获奖证书复印件。

2 文稿中应注意的问题

投稿前最好先阅读本刊,以便对本刊有基本的了解。尤其要注意以下问题。

- 2.1 作者和单位的中英文名字、所在地、邮编分别列于中英文题目之下,单位的英文名称应是系统内认可的、符合规范的。
- 2.2 个人署名作者在 2 人(含 2 人)以上以及集体作者,应指定一位通信作者 (corresponding author)。第一作者及通信作者应有简短的中文自传:姓名、性别、学位、职称、主攻研究方向,放在文稿第一页的左下方。副高职称以上的作者应有亲笔签名。
- 2.3 受资助的情况(资助单位、项目名称、合同号)用中英文分别列于文稿左下方。
- 2.4 所有稿件都应有中英文摘要。一般科技论文的摘要包括:目的、方法、结果、结论。作者应能使读者通过阅读摘要就能掌握该文的主要内容或数据。为便于国际读者检索并了解文章的基本信息,英文摘要应比中文摘要更详细。
- 2.5 每篇文章应标注中英文关键词各 3~8 个。
- 2.6 缩略语、简称、代号除了相邻专业的读者清楚的以外,在首次出现处必须写出全称并注明以下所用的简称。如新术语尚无合适的中文术语译名可使用原文或译名后加括号注明原文。
- 2.7 用于表示科学计量和具有统计意义的数字要使用阿拉伯数字。
- 2.8 研究对象为人时,须注明试验组、对照组受试者的来源、选择标准及一般情况等。研究对象为试验动物时需注明动物的名称、种系、等级、数量、来源、性别、年龄、体重、饲养条件和健康状况等。动物试验和人体试验均需伦理审查文件。
- 2.9 药品、试剂使用化学名,并注明主要试剂的剂量、单位、纯度、批号、生产单位和日期。
- 2.10 主要仪器、设备应注明名称、型号、生产单位、精密度或误差范围。
- 2.11 图、文字和表格的内容不要重复,图、表应有自明性,即不看正文就能理解图意、表意。
- 2.12 所引的参考文献仅限于作者亲自阅读过的。未公开发表或在非正式出版物上发表的著作如确有必要引用,可用圆括号插入正文或在当页地脚加注释说明。原文作者若不超过 3 人应将作者姓名依次列出,中间用“,”隔开,3 位以上作者则列出前 3 位,逗号后加“等”。参考文献格式如下:

期刊文章:[序号] 主要责任者(外文人名首字母缩写,缩写名后不加缩写点). 文献题名[文献类型标志]. 刊名, 年,卷(期): 起页-止页.

举例 [1] 汪国华,马进,季适东,等. 急性出血坏死性胰腺炎的手术治疗 [J]. *中级医刊*, 1995, 30(8): 22-25.

[下转第 1453 页]