

SF

中华人民共和国司法行政行业标准

SF/T 0133—2023

HRM 用于致幻蘑菇古巴光盖伞种属鉴定技术
技术规范

Technical specification for species identification of *Psilocybe cubensis* of
hallucinogenic mushroom by high-resolution melting (HRM) method

2023 - 10 - 07 发布

2023 - 12 - 01 实施

中华人民共和国司法部 发布

目 次

前言	II
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
4 缩略语	1
5 总体要求	1
6 检验程序	2
7 鉴定意见	3
8 鉴定文书	4
附录 A (资料性) 致幻蘑菇古巴光盖伞 (阳性对照样本) 的 HRM 检测曲线峰型与 T_m 值结果	5
附录 B (资料性) 致幻蘑菇古巴光盖伞 (阳性对照样本) 在 7 个目标区域的序列信息	6
参考文献	7

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。

本文件由司法鉴定科学研究院提出。

本文件由司法部信息中心归口。

本文件起草单位：司法鉴定科学研究院、复旦大学、深圳海关动植物检验检疫技术中心。

本文件主要起草人：张素华、李成涛、张晓春、夏若成、陶瑞旻、陈安琪、郑晓聪、施妍、陈航。

HRM 用于致幻蘑菇古巴光盖伞种属鉴定技术规范

1 范围

本文件规定了基于高分辨率熔解曲线分析对致幻蘑菇古巴光盖伞进行种属鉴定的总体要求、检验程序、鉴定意见和鉴定文书。

本文件适用于实验室采用高分辨率熔解曲线分析对致幻蘑菇古巴光盖伞进行种属鉴定。

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。

SF/T 0069 法医物证鉴定实验室管理规范

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

致幻蘑菇 hallucinogenic mushroom

一类子实体和/或菌丝体内含有活性色胺类毒素，能引起人或动物产生神经致幻性中毒的大型真菌。

3.2

古巴光盖伞 psilocybe cubensis

归属于真菌界-担子菌门-担子菌纲-伞菌目-球盖菇科-光盖伞属，含有神经致幻型毒素（如赛洛西宾和赛络新等），一般食后不久会产生精神极度愉快、狂欢乱舞、情绪焦虑和自控力降低等症状的真菌。

注：在中国，该类致幻蘑菇属于管制的精神类毒品。

3.3

高分辨率熔解曲线 high-resolution melting; HRM

一种基于单核苷酸熔解温度不同而形成不同形态熔解曲线的基因分析技术。

注：高分辨率熔解曲线具有极高的敏感性，能检测出单个碱基的差异。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

DNA: 脱氧核糖核酸 (Deoxyribonucleic Acid)

ITS: 内转录间隔区域 (Internally Transcribed Spacer)

PCR: 聚合酶链式反应 (Polymerase Chain Reaction)

T_m: 熔解温度 (Melting Temperature)

5 总体要求

5.1 鉴定机构应具有从事法医物证的执业范围，且应满足如下要求：

- 对所有影响鉴定结果的人员岗位规定相应的能力要求，包括教育、资质、培训、专业知识和技能等，并保留相关记录，制定适宜的培训计划并组织实施；
- 依据第 6 章～第 8 章的规定，对鉴定人以及参与鉴定工作的人员进行监督，以评价其鉴定工作的符合性和满意程度，监督的结果作为培训需求评价的依据之一；
- 具有能识别样本的标识系统，并确保样本在鉴定过程期间能得到持续的识别；

d) 建立样本的运输、接收、处置、保护、存储、保留和/或清理的规定，能对接收、内部传递、处置、保留、返还和清理等过程进行记录，确保记录的完整性和可追溯性。

5.2 鉴定人应具有法医物证鉴定执业资格，熟悉并掌握高分辨率熔解曲线分析的原理和操作，并能正确使用相关分析软件对检测结果进行分析与评价。

5.3 鉴定活动应包括检验（采样、DNA 制备、高分辨率熔解曲线分析）、鉴定意见出具和鉴定文书撰写等环节。鉴定活动完毕后，应将各个环节的记录进行归档。

5.4 实验室的基本要求以及样本管理、设备管理、质量管理等应符合 SF/T 0069 的规定。

6 检验程序

6.1 采样

样本的采集、包装和保存要求如下：

- 样本可以是菌盖、菌柄或菌托，也可为孢子或其它制品等。有条件的情况下，宜选择新鲜的检材；
- 样本应分别包装，外包装袋上应注明检材编号、检材外观及状态、采样地点、采样时间和采样人等；
- 样本采集后应干燥保存。

6.2 DNA 制备

6.2.1 样本前处理

应将待测样本剪碎，经液氮速冻进行研磨粉碎，充分破坏组织的细胞壁。有条件的情况下，宜选取样本的内部组织部分，以避免污染。

6.2.2 DNA 提取与定量

宜采用商业化DNA提取试剂盒进行基因组DNA的提取。宜采用荧光定量试剂盒进行DNA定量。具体操作步骤应按照相应的试剂盒说明书及仪器使用指南执行。

6.3 高分辨率熔解曲线分析

6.3.1 目标区域及引物信息

宜检测7个目标区域，分别为ITS、ITS1、ITS2、RPB1 (PC-R1)、tEF1 α (PC-EF)、Psilocybin-related phosphotransferase gene (PC-PT) 和Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase gene (PC-3)。推荐的目标区域及引物信息见表1。

表1 用于致幻蘑菇古巴光盖伞种属鉴定的目标区域及推荐的引物信息

目标区域	扩增引物序列 (5'~3')	扩增片段长度 bp ^a
ITS	F-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	723
	R-TCCTCCGCTTATTGATATGC	
ITS1	F-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	338
	R-GCTGCGTTCTTCATCGATGC	
ITS2	F-GTGAATCATCGAATCTTTGAAC	351
	R-TCCTCCGCTTATTGATATGC	
PC-R1	F-CTCTACTCGTTTCGCACCC	247
	R-CGCACTCCTCGTTCAGC	
PC-EF	F-TTCATCAAGAAGGTCGGTTAC	68
	R-TCTCCGTGCCATCCAG	
PC-PT	F-ATCGGGAGGTCTGGG	146
	R-CGCAAGTGGCGGTTT	

表1 用于致幻蘑菇古巴光盖伞种属鉴定的目标区域及推荐的引物信息（续）

目标区域	扩增引物序列（5'~3'）	扩增片段长度 bp ^a
PC-3	F-CGCTGGTGCTGAATACG	183
	R-CGGAAGCCCTGGAAAG	

^a给出的数据为NCBI数据库（<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>）现有物种在目标区域的产物片段大小。

6.3.2 HRM 检测

应选用合适的PCR扩增试剂盒和实时定量PCR仪进行HRM检测。具体操作应分别按照试剂盒说明书、仪器使用指南进行。

示例：

采用Type-it[®] HRM[™] PCR试剂盒和ROTOR-GENE Q实时定量PCR仪进行HRM检测，推荐的PCR扩增体系见表2，推荐的PCR扩增程序见表3。

表2 PCR 扩增体系

成分	体积 μL
2×HRM PCR 反应预混液	12.5
引物混合液（10 μmol/L）	1.75
无核酸酶水	9.75
DNA（1 ng/μL）	1

表3 PCR 扩增程序

步骤	温度 ℃	时间 s	循环数
1	95	300	1
2	95	10	45
	55	30	
	72	10~24 ^a	
3	65~95 ^b	600	1

^a应根据目标区域片段长度调整延伸时间。延伸时间宜为：ITS（24 s）、ITS1（15 s）、ITS2（16 s）、PC-R1（15 s）、PC-EF（10 s）、PC-PT（12 s）、PC-3（13 s）。

^b以0.1 °C/s的速度进行65 °C~95 °C的熔解。

每批扩增应设置阳性对照样本和不含致幻蘑菇古巴光盖伞基因组DNA的阴性对照样本，其中阳性对照样本是已知目标区域基因序列和HRM结果的致幻蘑菇古巴光盖伞标准品DNA。每个样本应至少重复检测一次。

注：Type-it[®] HRM[™] PCR试剂盒和ROTOR-GENE Q实时定量PCR仪均是QIAGEN公司提供的产品和仪器。给出这一信息是为了方便本文件的使用者，并不代表对该产品/仪器的认可。如果其他等效产品/仪器具有相同的效果，则可使用其他等效产品/仪器。

6.3.3 结果分析

采用实时定量PCR仪上配备的具有高分辨率熔解曲线分析功能的软件对扩增结果进行分析，输出结果包括HRM曲线和对应的T_m值。致幻蘑菇古巴光盖伞（阳性对照样本）采用表1中引物在7个目标区域（ITS、ITS1、ITS2、PC-R1、PC-EF、PC-PT和PC-3）按照表2、表3进行扩增检测，曲线峰型与T_m值结果见附录A，扩增产物的序列信息见附录B。具体操作宜按照相关说明书进行。

未采用表1中推荐的引物序列时，实验室应根据科学文献或自行设计的引物建立阳性对照样本在7个目标区域的曲线峰型和T_m值。采用其它PCR扩增试剂盒和荧光定量PCR仪时，实验室应自行建立阳性对照样本在7个目标区域的曲线峰型和T_m值。

同一实验条件下，重复检测样本T_m值的标准差应在0.10 °C内。

7 鉴定意见

应结合样本在7个目标区域（ITS、ITS1、ITS2、PC-R1、PC-EF、PC-PT和PC-3）的HRM检测结果出具鉴定意见，要求如下：

- a) 样本在 7 个目标区域的曲线峰型重复检测结果一致情况下，曲线峰型均与阳性对照样本结果一致，且平均 T_m 值与阳性对照样本结果偏差在 ± 0.30 °C 范围内，鉴定意见可表述为“倾向于支持样本来源于真菌界-担子菌门-担子菌纲-伞菌目-球盖菇科-光盖伞属-古巴光盖伞”；
- b) 样本在 7 个目标区域的曲线峰型重复检测结果一致情况下，其中 1 个及以上目标区域的曲线峰型与阳性对照样本结果不一致，或者样本在 1 个及以上目标区域的平均 T_m 值与阳性对照样本结果偏差大于 ± 0.30 °C，鉴定意见可表述为“倾向于排除样本来源于真菌界-担子菌门-担子菌纲-伞菌目-球盖菇科-光盖伞属-古巴光盖伞”；
- c) 样本在 7 个目标区域的曲线峰型重复检测结果不一致情况下，鉴定意见可表述为“无法判断样本是否来源于真菌界-担子菌门-担子菌纲-伞菌目-球盖菇科-光盖伞属-古巴光盖伞”。

8 鉴定文书

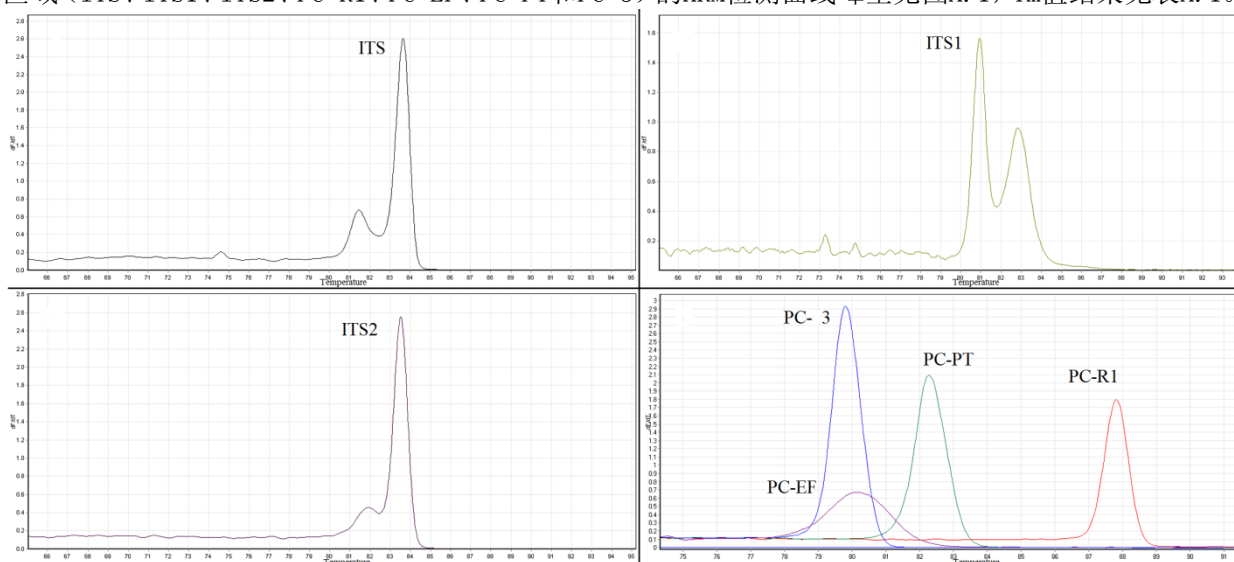
鉴定文书的格式宜按照主管部门的规定或相关标准执行，且内容应符合以下要求：

- a) 描述 HRM 检测所使用的试剂盒和仪器以及目标区域的 HRM 曲线和对应的 T_m 值；
- b) 按照第 7 章的规定出具鉴定意见。

附录 A (资料性)

致幻蘑菇古巴光盖伞（阳性对照样本）的 HRM 检测曲线峰型与 T_m 值结果

以Type-it[®] HRM™ PCR试剂盒和ROTOR-GENE Q实时定量PCR仪为例，致幻蘑菇古巴光盖伞在7个目标区域（ITS、ITS1、ITS2、PC-R1、PC-EF、PC-PT和PC-3）的HRM检测曲线峰型见图A.1， T_m 值结果见表A.1。



图A.1 致幻蘑菇古巴光盖伞在7个目标区域的HRM检测曲线峰型

表A.1 致幻蘑菇古巴光盖伞在7个目标区域的 T_m 值

目标区域	T_m 值 °C
ITS	83.72
ITS1	80.98
ITS2	83.53
PC-R1	87.93
PC-EF	80.11
PC-PT	82.21
PC-3	79.72

附录 B

(资料性)

致幻蘑菇古巴光盖伞（阳性对照样本）在 7 个目标区域的序列信息

致幻蘑菇古巴光盖伞在 7 个目标区域（ITS、ITS1、ITS2、PC-R1、PC-EF、PC-PT 和 PC-3）的序列信息分别如下：

>ITS

GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTATTGAATAACTTTGGCGTGGTTGTAGCTGGCCCTCTCGGGGGCATGTGCTCGCCCGTCATCTTTATATTTCCACCTGTGCACTTTTTGTAGATCATTGTTTTTGAAGCTGGATTGAAGTCAGAGATTACTCTCTGATGAATTGAAGGCTTTCTCAATGATGGTCTACGTTTTTCATATACTCCAATGAATGTAACAGAATGTATCTATATGGCCTTGTGCCTATAAAACAATATAACAACTTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGGCTCCTTGGTATTCCGAGGAGCATGCCTGTTTGTAGTGCATTAAATTCTCAACCTTACCAGCTTTTGTAGCTTGTGTAATGGCTTGGACTTGGGGTTTATTTGCCGGCTTCTTACCAAGTCAGCTCCCTTAAATGCATTAGCCGGCTGCCCGCTGTGGACCGTCTATTGGTGTGATAATTATCTACGCCGTGGATGTCTACTATTAATGGGTGAACTGCTTCAAACCGTCTGTTTACTCAGACAATTAATGACAATTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA

>ITS1

GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTATTGAATAACTTTGGCGTGGTTGTAGCTGGCCCTCTCGGGGGCATGTGCTCGCCCGTCATCTTTATATTTCCACCTGTGCACTTTTTGTAGATCATTGTTTTTGAAGCTGGATTGAAGTCAGAGATTACTCTCTGATGAATTGAAGGCTTTCTCAATGATGGTCTACGTTTTTCATATACTCCAATGAATGTAACAGAATGTATCTATATGGCCTTGTGCCTATAAAACAATATAACAACTTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGC

>ITS2

GTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGGCTCCTTGGTATTCCGAGGAGCATGCCTGTTTGTAGTGCATTAAATTCTCAACCTTACCAGCTTTTGTAGCTTGTGTAATGGCTTGGACTTGGGGTTTATTTGCCGGCTTCTTACCAAGTCAGCTCCCTTAAATGCATTAGCCGGCTGCCCGCTGTGGACCGTCTATTGGTGTGATAATTATCTACGCCGTGGATGTCTACTATTAATGGGTGAAGCTGCTTCAAACCGTCTGTTTACTCAGACAATTAATGACAATTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA

>PC-R1

CTCTACTCGTTTCGCACCCACCATCCAAATTTTCTGGGGGCTCTCTCCACATCCCATGGGGAACCCAAACCCGCACCACGTCAGTCTCTCGACAATCGAGGGCGTCTTCCACCCGTGGTAGGGATCGTAATGGCGCGGTTTTTTCGGTCGTTGACCGCCGCGTCGATCCCATTGCACCTGCCACGGCACCGGTTGGACACGAGGTTGCGTGGTGAATGGGGGCTGAACGAGGAGTGCG

>PC-EF

TTCATCAAGAAGGTCGGTTACAACCCCAAGACTGTTGCCTTCGTCCCCATCTCTGGATGGCACGGAGA

>PC-PT

ATCGGGAGGTTCTGGGAGGCGTGGACGGCATAGTTGCTGTGCCAGAAGGCCTGAACTACGACTTAGAGAATAATGCATTGATCATGCAAGATGTCGGGAAGATGAAGACCCTTTTAGATTATGCCACCGCCAAACCGCCACTTGCG

>PC-3

CGCTGGTGCTGAATACGTTGTTGAGTCCACTGTAAGTCTTTTTCCAGTTTTTCATTTTACGACGCTGATGACTGAATTTTCATATTGGCACTCAGGGTGTTCACCACCATGACAAGTAAATTTGGCATATTTTGGTCATCTGGGTGCTTTCTACTAATTTTCTACTTTCCAGGGCTTCCG

参 考 文 献

- [1] Zhang X, Yu H, Yang Q, Wang Z, Xia R, Chen C, Qu Y, Tan R, Shi Y, Xiang P, Zhang S, Li C. A Forensic Detection Method for Hallucinogenic Mushrooms via High-Resolution Melting (HRM) Analysis. *Genes (Basel)*. 2021, 12(2):199
- [2] Zhang X, Yu H, Wang Z, Yang Q, Xia R, Qu Y, Tao R, Shi Y, Xiang P, Zhang S, Li C. Multi-locus identification of *Psilocybe cubensis* by high-resolution melting (HRM). *Forensic Sci Res*. 2021, 7(3):490-497
- [3] Elkins KM, Perez ACU, Quinn AA. Simultaneous Identification of Four "Legal High" Plant Species in a Multiplex PCR High-Resolution Melt Assay. *J Forensic Sci*. 2017, 62(3):593-601
-