

鹅膏肽类毒素检测方法的历史与现状

陈作红¹, 胡劲松^{1,2}

(1. 湖南师范大学生命科学学院, 湖南 长沙 410081; 2. 南华大学生物学研究所, 湖南 衡阳 421001)

摘要: 每年因误食毒蘑菇导致中毒死亡事件在各国都有发生, 也是我国食物中毒事件中导致死亡的重要因素之一。鹅膏菌属中某些种类含有的肽类毒素是主要的致死原因, 快速而有效地检测样品(包括有毒蘑菇子实体、食物剩余物、呕吐物、中毒患者血液和尿液等)中的毒素对于食物中毒的毒源鉴定和中毒后的针对性治疗具有重要意义。本文从化学显色反应、生物化学法、物理法、色谱法等4个方面对鹅膏肽类毒素检测方法的历史和研究进展进行整理和总结, 并对其在我国的应用加以讨论和展望。

关键词: 鹅膏菌; 鹅膏毒肽; 鬼笔毒肽; 检测方法

Historical Development and Present Situation of Detection Methods for *Amanita* Peptide Toxins

CHEN Zuo-hong¹, HU Jin-song^{1,2}

(1. College of Life Sciences, Hunan Normal University, Changsha 410081, China;

2. Biology Institute, University of South China, Hengyang 421001, China)

Abstract: Fatal mushroom poisoning incidents occur annually all over the world and it is one of the important causes of human death due to food poisoning in China. The peptide toxins in some *Amanita* species are mainly responsible for the mortality. Rapid and effective detection of toxins from samples of poisonous mushroom, food residue, vomit, blood and urine has important significance for the identification of toxic sources and the development of targeted therapies. This paper reviews the historical development and present situation of detection methods for *Amanita* peptide toxins including chemical color reaction, biochemical, physical and chromatographic methods. The application and prospects of these detection methods in China are also discussed.

Key words: *Amanita*; amatoxins; phallotoxins; detection methods

中图分类号: Q949.32

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2014)08-0011-06

doi:10.7506/spkx1002-6630-201408003

每年因误食毒蘑菇而引起的中毒死亡事件在各国都有发生。在我国, 蘑菇中毒事件更是频频发生, 2004—2009年全国共报告毒蘑菇中毒事件311起, 中毒1954人, 死亡409人, 病死率为20.93%, 毒蘑菇中毒是我国食物中毒事件中导致死亡的主要原因之一^[1-2]。在欧洲和北美, 90%以上的蘑菇中毒死亡是由含鹅膏肽类毒素的蘑菇引起^[3], 主要的剧毒种类包括有: 绿盖鹅膏(*Amanita phalloides* Secr.)、春生鹅膏(*A. verna* (Bull.) Lam.)、鳞柄鹅膏(*A. virosa* Secr.)、双孢鹅膏(*A. bisporigera* G. F. Atk.)和赭鹅膏(*A. ocreata* Peck)等^[4]。1993—2012年期间, 我国南方地区共报告102起蘑菇中毒事件, 其中64.69%中毒起数、78.05%中毒人数和70.49%死亡数是由含鹅膏肽类毒素的蘑菇种类引起, 主要的剧毒种类包括有: 灰花纹鹅膏菌(*A. fuliginea* Hongo)、致命鹅膏菌(*A. exitialis* Zhu L. Yang & T. H. Li)、黄盖鹅膏白

色变种(*A. subjunquillea* var. *alba* Zhu L. Yang)^[5]。含有鹅膏肽类毒素的有毒蘑菇除鹅膏菌属的一些种类外, 还包括有盔孢伞属(*Galerina*)和环柄菇属(*Lepiota*)中的一些种类^[3-4]。人们对于鹅膏肽类毒素的研究已有100多年的历史, 根据其氨基酸的组成和结构可把鹅膏肽类毒素分为鹅膏毒肽、鬼笔毒肽和毒伞素3类。目前已分离鉴定的天然毒素有22种^[6], 它们都是环肽化合物。其中鹅膏毒肽是一类双环八肽, 已发现的有9种; 鬼笔毒肽类为双环七肽, 已发现的有7种; 毒伞素是一类单环七肽, 已发现的有6种。鹅膏肽类毒素化学性质稳定, 耐高温、耐干燥和酸碱, 一般的烹调加工不会破坏其毒性, 该类毒素易溶于甲醇、乙醇、液态氨、吡啶和水。

含有鹅膏肽类毒素的蘑菇引起的中毒属于急性肝损害型, 中毒症状明显表现出潜伏期、肠胃炎期、假愈期和肝脏损害期4个阶段, 最后导致肝、肾、心、脑、肺

收稿日期: 2014-03-17

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(31372118; 30972073)

作者简介: 陈作红(1964—), 男, 教授, 博士, 研究方向为有毒蘑菇及其毒素。E-mail: chenzuohong@263.net

等器官功能衰竭,中毒患者一般在5~8 d内死亡^[3,5]。由于鬼笔毒肽不被肠道所吸收,因此在鹅膏菌中毒事件中起主要作用的是鹅膏毒肽,其中的 α -鹅膏毒肽和 β -鹅膏毒肽含量最高并且也是主要的致死毒素。鹅膏毒肽能抑制真核生物的RNA聚合酶II的活性,即与RNA聚合酶II的RBP1亚基结合形成一个复合体,使RBP1亚基降解,导致mRNA转录、蛋白质合成受阻,最终导致细胞坏死^[7-8]。Wang Dong^[9]、Kaolan^[10]、Brueckner^[11]等利用晶体结构分析方法,进一步阐述了RNA聚合酶II与 α -鹅膏毒肽之间的结构与功能关系,表明 α -鹅膏毒肽与RNA聚合酶II RBP1亚基启动环上的氨基酸残基His1085能发生直接作用,此外 α -鹅膏毒肽与启动环、桥螺旋之间存在其他的间接作用,这种相互作用限制了启动环和桥螺旋的运动,从而削弱了核苷酸的结合和易位,导致转录的抑制。

由于鹅膏肽类毒素在蘑菇中毒死亡事件中起着重要的作用,因此快速而有效地检测样品(包括有毒蘑菇子实体、食物剩余物、呕吐物、中毒患者血液和尿液或者胃抽取物等)中的毒素对于食物中毒的毒源鉴定、蘑菇中毒预防和中毒后的针对性治疗具有重要意义。本文对鹅膏肽类毒素检测方法的历史和研究进展进行总结和梳理,对其在我国的应用加以讨论,并进一步对其未来发展做出展望。

1 早期化学检测技术(显色反应)

早在1909年人们就开始试图分离研究鹅膏毒素,但直到1941年才在德国Wieland教授的实验室真正获得2种鹅膏毒素,一种是快作用毒素,被命名为鬼笔毒肽;一种是慢作用毒素,被命名为鹅膏毒肽^[12]。二次大战之后,随着新的分析方法如纸层析、纸电泳、薄层层析和柱层析等的发展,一种可灵敏区分鹅膏毒肽和鬼笔毒肽的化学显色方法随之建立,即肉桂醛在盐酸环境下与鹅膏毒肽反应显深紫色,而鬼笔毒肽呈浅蓝色^[13]。利用这些分析工具,在随后的20世纪50—70年代里,Wieland^[6]实验室陆续发现了鹅膏菌中的22种天然肽类毒素,之后再也没有从鹅膏菌中发现新的肽类毒素。

上述的肉桂醛显色反应在鹅膏肽类毒素的分离与发现中发挥了重要作用,1955年Block等^[14]即利用该显色反应原理发明了一种快速而简单的纸层析检测蘑菇中毒素的方法,该方法可检测0.1 g鲜菇组织中的毒素。除上述显色反应外,还有一些其他显色反应应用于鹅膏肽类毒素的鉴定^[6],例如:巴豆酸与鹅膏毒肽反应呈酒红色,而与鬼笔毒肽反应呈淡黄色;茴香醛和磷酸在100℃时遇鹅膏毒肽产生蓝紫色,遇鬼笔毒肽产生浅蓝红色;1,2-二羟基环丁烯二酮在HCl存在时,会使鹅膏毒肽产生蓝绿色反

应;鹅膏毒肽与Ehrich试剂(二甲氨基苯甲醛)在浓硫酸作用下呈红色,与Hopkins-Cole试剂(乙醛酸和浓硫酸)反应显亮蓝色。但是除肉桂醛显色反应外,以上这些显色反应很少被后人采用。

Wieland^[6]1949年还报道了一个简便的检测鹅膏毒肽的显色反应方法。该方法通过将一片鲜菇的汁液压在一张报纸上,待印迹干后,在印迹处滴上一滴浓HCl溶液,如鲜菇含有鹅膏毒肽,5~10 min后便产生蓝绿色反应。这一显色反应不仅可检测鲜菇而且也可检测干菇中的鹅膏毒肽,其检测限可达50~100 ng。由于该方法操作简便易行,因此特别适宜于野外采集时对毒菇的初步鉴别。

2 生物化学检测技术

2.1 放射免疫检测法

鹅膏毒肽的放射免疫(radioimmunoassay, RIA)检测方法最早由Fiume^[15]和Faustich^[16]等于1975年建立。Fiume等^[15]首先从大鼠中获得了抗体,Faustich等^[16]于用同样的结合体,但经过戊二醛交联改造,从兔中也获得了抗体,毒素采用木炭吸附或者利用硫酸铵沉淀获得,用³H作放射性标记,2种方法的检出限可达到0.5 ng/mL。Faustich等^[17]通过将 α -鹅膏毒肽与胎球蛋白的结合体用作(制备)兔的抗体,该抗原具有更低毒性和更高的免疫原性,此外,利用 α -鹅膏毒肽衍生物获得的抗体不会与其他鹅膏毒肽产生交叉反应,获得的免疫球蛋白IgG组分以共价键结合在尼龙纤维网上,该网再结合上带有放射性活性的鹅膏毒肽一起制成小片,即可用于检测,检出限达3 ng/mL。该方法已用于鹅膏中毒病人的血浆、尿液、十二指肠和胃液中鹅膏毒肽的检测。

Andres等^[18]1986年报道了一种新的检测尿和血浆中鹅膏毒肽的放射免疫检测方法。该方法采用无毒的 α -鹅膏毒肽衍生物作抗原,用¹²⁵I作放射性标记,整个检测时间只需100 min。其检出限为:尿液1 mg/L、血浆0.1 mg/L。这种¹²⁵I标记方法在速度、简便性和抗干扰方面相对³H的RIA均有显著的改进。

RIA虽然灵敏度高、特异性强,但由于涉及放射性核素,在很大程度上已经被酶联免疫吸附测定法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)所取代。

2.2 鹅膏毒肽的ELISA

ELISA具有方便快捷、灵敏度高、特异性好等优点,在生命科学各领域得到广泛应用。瑞士Bühlmann Laboratories公司于2000年开发生产出鹅膏毒肽ELISA试剂盒,Staak等^[19]最先用该方法检测了100份尿液中的鹅膏毒肽。Abuknesha等^[20]报道了用ELISA检测中毒患者体液中的 β -鹅膏毒肽的方法,其检出限约为80 pg/mL。近年来该试剂盒广泛用于鹅膏毒肽中毒的临床检验^[21-22]。

2.3 鹅膏毒肽的RNA聚合酶II抑制检测法

鹅膏毒肽在很低的质量浓度时(5 ng/mL)能专一性地抑制RNA聚合酶II的作用,从而影响转录中尿苷三磷酸掺入RNA的能力。Preston等^[23]依据这一理论建立了定量检测鹅膏毒肽的方法,即在变性DNA和RNA聚合酶II存在条件下,测定10 min内³H标记的尿苷三磷酸并入合成RNA的能力,100~2 000的液闪计数对应于20~2 ng/mL的鹅膏毒肽。在20世纪70—80年代该方法被应用于检测几种鹅膏菌的毒素含量。

张志光等^[24]依据鹅膏毒肽能专一性地抑制RNA聚合酶II的作用,从而影响RNA的转录和蛋白质的合成、抑制种子萌发的原理,建立了一种“抑芽法”检测鹅膏毒肽的方法:水提法提取粗毒液(质量浓度为0.025~0.05 g/mL),绿豆种子在28℃培养24~72 h时,其下胚轴生长被抑制率在95%以上时,可能是剧毒鹅膏菌;当被抑制率在60%~80%,可能为微毒鹅膏菌;当被抑制率在30%以下时可能是无毒鹅膏菌。该方法简便、实用、准确。

2.4 鬼笔毒肽的丝状肌动蛋白结合测定法

Schafer等^[25]依据鬼笔毒肽能专一性地与丝状肌蛋白(F-actin)结合的原理,建立了鬼笔毒肽的肌动蛋白结合测定法。

将放射性标记的鬼笔毒肽与兔肌F-actin混合于待检测鬼笔毒肽的溶液中,待反应平衡后,用活性炭吸附并离心去除没有结合的鬼笔毒肽。如果含有F-actin上清液中放射性比较弱,说明待测样品中鬼笔毒肽与F-actin竞争结合的能力比较强,其浓度比较高。该方法的检出限为160 ng/mL。

利用鬼笔毒肽可以调节保护牛胰腺脱氧核糖核酸酶I(DNase I)不受F-actin的抑制这一特性,Mullersman等^[26]发展了一个更为灵敏的检测鬼笔毒肽的方法。DNase I在G-actin与F-actin共同存在条件下,鬼笔毒肽会专一性的与F-actin结合,使F-actin竞争性抑制DNase I作用减轻,DNase活性增强,检测DNase I的活性即可对鬼笔毒肽进行定量分析。这一方法的检测灵敏度达到6.3 ng/mL。然而以上2种方法很少得到实际应用。

3 物理检测技术

3.1 紫外吸收光谱检测技术

早在20世纪50年代就发现鹅膏毒肽的紫外吸收最大峰位于300 nm波长处,鬼笔毒肽的最大吸收峰在290 nm波长处,该特性广泛用于薄层层析、液相色谱和高效液相色谱法检测毒素中。

3.2 荧光检测技术

Vlaskin^[27]、Gulikova^[28]等分别报道了一种利用荧光

光谱快速检测鹅膏毒肽的方法,发现将鹅膏毒肽加入到溴化乙啶中,会有新的荧光波段产生。溴化乙啶最大吸收峰波长为610 nm,加入 α -、 β -鹅膏毒肽后,会分别在560 nm和525 nm波长处出现新的波峰,稳定性可保持15~30 min,其检出限达1 μ mol/L。

4 色谱检测技术

4.1 早期的纸层析、薄层层析、柱层析法

早期的纸层析、薄层层析和柱层析法多用于鹅膏肽类毒素的分离纯化,目前已经发现的22种鹅膏肽类毒素都是20世纪50—70年代采用这些方法分离获得。Wieland等^[29]首次采用纸层析技术分离检测毒素,用正丁醇:丙酮:水(20:2:5, *V/V*)作层析系统,后来于1960年被改进为正丁醇:丙酮:水(30:3:5)作为适宜的层析系统^[30]。Block等^[14]发明了一种快速而简单的利用纸层析法检测蘑菇中毒素的方法,可检测0.1 g鲜菇组织中的毒素,其所使用的层析溶液为甲基乙基酮:丙酮:水:丁醇(20:6:5:1)。以上层析结果都采用显色反应来检测。

在20世纪60年代中期,Sullivan等^[31]首次用硅胶薄层层析分离检测 α -、 β -、 γ -鹅膏毒肽,流动相系统为甲醇:甲基乙基酮(1:1)。之后有大量的溶剂系统被使用,Wieland^[6]以硅胶作固定相,用A液(正丁醇:乙酸乙酯:水(14:12:4))、B液(氯仿:甲醇:水(65:25:4))作流动相,建立了一个有效的双向薄层层析系统,并采用该方法检测了欧洲的绿盖鹅膏中的鹅膏毒肽含量^[32]。

Stijve等^[33]发明了快速、灵敏的高效薄层层析检测绿盖鹅膏粗提取液中鹅膏毒素的方法。这个方法是在薄层层析的基础上,应用紫外吸收光谱与标样进行比较进行测定的,检出限达到50 ng。

相对于纸层析及薄层层析,柱层析法,尤其是以葡聚糖凝胶Sephadex G25、Sephadex LH20为固定相的柱层析系统,在分离纯化和发现含量低的鹅膏毒素方面起到了重要作用,例如从鳞柄鹅膏(*A. virosa*)分离出的毒伞素都是通过Sephadex LH20分离获得而发现^[34]。

Yocum等^[35]利用Sephadex LH20柱系统结合紫外光谱和薄层层析分析方法对美国东北部的几种剧毒鹅膏菌中的鹅膏毒肽和鬼笔毒肽进行了定量分析,认为该方法的检出限达到0.03 mg/g干子实体。

4.2 高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)法

Beutler等^[36]首次利用HPLC检测鹅膏菌的肽类毒素,但其采用的是硅胶柱。Pastorello等^[37]采用Spherisorb ODS柱进行反相HPLC,检测了中毒患者血清中 α -鹅膏毒肽的含量,检出限达50 ng/mL。在20世纪80年代主要利用HPLC检测中毒病人的体液以及子实体中鹅膏毒肽的含

量,直至1992年Enjalbert等^[38]用反相HPLC建立了一种可以同时检测绿盖鹅膏子实体中8种鹅膏毒肽和鬼笔毒肽的方法,提取液中每种毒素的检出限达10 ng/mL。此后,HPLC法广泛应用于不同采集地点的各种剧毒鹅膏菌子实体不同部位、不同发育时期以及中毒患者体液中肽类毒素的检测^[39-42],其检出限可达2 ng/mL^[43]。同时也用于鹅膏肽类毒素的分离纯化和制备^[44-45]。HPLC法具有速度快、灵敏度高、分辨率好、用量少等优点,但是它主要依据被检测成分紫外吸收峰与毒素标样的保留时间来确定毒素的种类,如果样品的吸收峰比较多,就有可能存在不确定性。

4.3 液相色谱-质谱联用 (liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS) 法

随着LC-MS联用,尤其是串联质谱 (tandem mass spectrometry, MS-MS) 新技术的出现和不断改进,LC-MS-MS已成为现代分析化学中的重要方法,这些检测技术需要的样品量更少、具有更高的灵敏度。Maurer等^[46]首先报道了应用LC-MS检测经免疫亲和提取的尿液中 α -和 β -鹅膏毒肽的方法,其检出限达2.5 ng/mL。Filigenzi等^[47]采用液相色谱-多级线性离子阱质谱联用法,以MS-MS-MS模式测定了中毒病人血清和肝脏中 α -鹅膏毒肽,其检出限分别为0.25 ng/g和0.5 ng/g。Ahmed等^[48]采用液相色谱与电喷雾离子化飞行时间质谱检测了有毒蘑菇中的 α -、 β -鹅膏毒肽和二羟鬼笔毒肽,其检出限分别为30、30 ng/g和10 ng/g。Gonmori等^[49]利用基质辅助激光解析电离飞行时间质谱技术检测了尿液中的以上3种毒素,其检出限达5 ng/g。

Nomura^[50]和Leite^[51]等分别报道了利用超高压液相色谱与MS-MS检测体液和肝组织中的 α -和 β -鹅膏毒肽,其在尿液中的检出限分别为0.22 ng/g和0.20 ng/g,在肝组织中的检出限分别为10.9 ng/g和9.7 ng/g。柳洁^[52]、张秀尧^[53]等也分别采用超高压液相色谱与MS-MS检测了有毒蘑菇子实体、血浆和尿液中的鹅膏肽类毒素。

Helfer等^[54]建立了一种新型的基于涡流色谱 (turbulent flow chromatography, TFC) 的在线萃取技术,并结合LC-MS-MS技术直接检测了人体尿液中的鹅膏毒肽,TFC技术可以在线处理生物样品,速度快、选择性好、灵敏度高、易于实现自动化。

4.4 毛细管区带电泳法

该方法与HPLC相比效率更高、样品和试剂耗量更少且其仪器结构也简单,紫外、荧光、电化学、质谱、激光等多种类型检测器均可结合用于该方法的检测。Brüggemann等^[55]首次利用毛细管区带电泳法结合光电二极管阵列检测器检测了绿盖鹅膏提取液和中毒病人尿液中的 α -和 β -鹅膏毒肽的含量,但其检出限只达到1 μ g/mL; Robinson-Fuentes等^[56]通过利用硼酸盐缓冲液

代替磷酸盐缓冲液做背景电解质并优化主要参数,极大地提高了灵敏度,其检出限可达1.5 ng/mL。Rittgen等^[57]也报道了利用毛细管电泳结合质谱法检测鹅膏菌子实体中 α -、 β -、 γ -鹅膏毒肽的含量,其检出限可达13~79 ng/mL。

5 鹅膏肽类毒素检测方法在我国的应用及展望

在20世纪90年代中期之前,尽管我国的毒蘑菇中毒事件每年都有发生,但有关鹅膏肽类毒素的认识仅仅停留在一些有毒蘑菇种类识别及其毒素的知识传播方面^[58-60],从未有过实验室分析检测毒素的报道。直到1997年,李东屏等^[61]首次报道利用反相HPLC从黑鹅膏 (现在称为灰花纹鹅膏) 子实体中分离鉴定6种鹅膏肽类毒素。2000年之后,我国在有毒蘑菇,尤其是鹅膏菌属的资源分类和中毒事件调查及毒素研究方面开展了一些研究并取得了很好的进展,在毒素检测方面主要利用HPLC开展了我国各地不同种类的鹅膏菌子实体、不同部位、不同发育时期的肽类毒素检测^[40,62-63]; 龚庆芳等^[64]利用HPLC检测了中毒患者体液 (血清液和尿液) 中的 α -鹅膏毒肽,其检出限可达0.1 μ g/mL。并且其研究表明中毒病人早期 (前3 d) 血液中 α -鹅膏毒肽浓度明显要高于第6天;同时也利用HPLC开展了鹅膏肽类毒素的分离纯化和制备^[44-45]。此外,近年来在我国也采用超高压液相色谱与串联质谱检测了有毒蘑菇子实体、血浆和尿液中的鹅膏肽类毒素,检出限达0.01 μ g/mL^[52-53]。

由于含鹅膏肽类毒素的毒蘑菇所引起的中毒明显表现出潜伏期、肠胃炎期、假愈期和肝脏损害期4个阶段,在进入肝损害期的前几天内,中毒病人和没有经验的医疗机构容易轻估其严重性,而耽误了最佳治疗时期,第4~5天后导致严重的肝肾等器官损害,一般在5~8 d后死亡。因此如果能够在假愈期之前及时的诊断出中毒类型并加以正确的治疗方法可大大降低死亡率。蘑菇中毒后的早期诊断在很多情况下难以获得毒蘑菇标本或者剩余物,此时可以通过检测中毒病人的呕吐物、血液和尿液中的鹅膏肽类毒素来确定。欧洲和北美的一些治疗机构就是利用ELISA试剂盒或者HPLC方法通过检测早期中毒病人血液和尿液中的 α -鹅膏毒肽而得以诊断^[21,65]。但是在我国没有一例这样的临床病例报告,因此,建议疾病预防控制中心和医疗机构在条件具备的情况下能开展鹅膏肽类毒素的早期检测工作,为毒蘑菇中毒诊断和治疗提供强有力的依据,减少我国因误食毒蘑菇而导致死亡的食物中毒事件。

参考文献:

- [1] 牛姬飞, 涂文校, 倪大新. 2004—2009年全国毒蕈中毒突发公共卫生事件分析[J]. 疾病监测, 2011, 26(3): 231-233.
- [2] 金连梅, 李群. 2004—2007年全国食物中毒事件分析[J]. 疾病监测, 2009, 24(6): 459-461.
- [3] BERGER K J, GUSS D A. Mycotoxins revisited: Part I [J]. The Journal of Emergency Medicine, 2005, 28(1): 53-62.
- [4] KARLSON-STIBER C, PERSSON H. Cytotoxic fungi-an overview[J]. Toxicon, 2003, 42(4): 339-349.
- [5] CHEN Zuohong, ZHANG Ping, ZHANG Zhiguang. Investigation and analysis of 102 mushroom poisoning cases in Southern China from 1994 to 2012[J]. Fungal Diversity, 2014, 64(1): 123-131.
- [6] WIELAND H. Peptides of poisonous *Amanita* mushrooms[M]. Germany: Springer-Verlag, 1986: 1-256.
- [7] LINDELL T J, WEINBERG F, MORRIS P W, et al. Specific inhibition of nuclear RNA polymerase II by alpha-amanitin[J]. Science, 1970, 170: 447-449.
- [8] NGUYEN V T, GIANNONI F, DUBOIS M F, et al. *In vivo* degradation of RNA polymerase II largest subunit triggered by alpha-amanitin[J]. Nucleic Acids Research, 1996, 24(15): 2924-2929.
- [9] WANG Dong, BUSHNELL D A, WESTOVER K D, et al. Structural basis of transcription: role of the trigger loop in substrate specificity and catalysis[J]. Cell, 2006, 127(5): 941-954.
- [10] KAPLAN C D, LARSSON K M, KORNBERG R D. The RNA polymerase II trigger loop functions in substrate selection and is directly targeted by alpha-amanitin[J]. Molecular Cell, 2008, 30(5): 547-556.
- [11] BRUECKNER F, CRAMER P. Structural basis of transcription inhibition by alpha-amanitin and implications for RNA polymerase II translocation[J]. Nature Structural & Molecular Biology, 2008, 15(8): 811-818.
- [12] WIELAND H, HALLERMAYER R. Über die Giftstoffe des Knollenblätterpilzes VI. Amanitin, das Hauptgift des Knollenblätterpilzes[J]. Liebigs Annalen der Chemie, 1941, 548(1): 1-18.
- [13] WIELAND T, WIRTH L, FISCHER E. Über die Giftstoffe des Knollenblätterpilzes VII. β -Amanitin, eine dritte Komponente des Knollenblätterpilzgiftes[J]. Liebigs Annalen der Chemie, 1949, 564(2): 152-160.
- [14] BLOCK S S, STEPENS R L, BARETTO A, et al. Chemical identification of the *Amanita* toxin in mushroom[J]. Science, 1955, 121: 505-506.
- [15] FIUME L, BUSIC E, CAMPADELLI-FIUME G, et al. Production of antibodies to amanitins as the basis for their radioimmunoassay[J]. Experientia, 1975, 31(10): 1233-1234.
- [16] FAULSTICH H, TRISCHMANN H, ZOBELG S. A radioimmunoassay for amanitin[J]. FEBS Letters, 1975, 56(2): 312-315.
- [17] FAULSTICH H, ZOBELG S, TRISCHMANN H. A rapid radioimmunoassay, using a nylon support, for amatoxins from *Amanita* mushrooms[J]. Toxicon, 1982, 20(5): 913-924.
- [18] ANDRES R, FREI W, GAUTSCHI K. Radioimmunoassay for amatoxins by use of a rapid 125 I-tracer-based system[J]. Clinical Chemistry, 1986, 32(9): 1751-1755.
- [19] STAACK R F, MAURER H H. New Bühlmann ELISA for determination of Amanitins in urine: are there false positive results due to interferences with urine matrix, drugs or their metabolites[J]. Aus dem Arbeitskreis Klinische Toxikologie, 2000, 68(2): 68-71.
- [20] ABUKNESHA R A, MARAGKOU A. A highly sensitive and specific enzyme immunoassay for detection of beta-amanitin in biological fluids[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2004, 379(5/6): 853-860.
- [21] BERGIS D, FRIEDRICH-RUST M, ZEUZEM S, et al. Treatment of *Amanita phalloides* intoxication by fractionated plasma separation and adsorption (Prometheus®)[J]. Journal of Gastrointestinal and Liver Diseases, 2012, 21(2): 171-176.
- [22] PARANT F, PELTIER L, LARDET G, et al. Phalloidin syndrome: role of ELISA-based assay for the detection of alpha- and gamma-amanitins in urine. Preliminary results[J]. Acta Clinica Belgica Supplementum, 2006(1): 11-17.
- [23] PRESTON J, STARK H J, KIMBROUGH J W. Quantitation of amanitins in *Amanita verna* with calf thymus RNA polymerase B[J]. Lloydia, 1975, 38(2): 153-161.
- [24] 张志光, 刘建强, 张晓元, 等. 一种简便、快速测定鹅膏多肽毒素的方法-抑芽法[J]. 菌物系统, 2001, 20(3): 381-386.
- [25] SCHAFER A, FAULSTICH H. A protein-binding assay for phallotoxins using muscle actin[J]. Analytical Biochemistry, 1977, 83(2): 720-723.
- [26] MULLERSMAN J E, PRESTON J F. A microassay for phallotoxins: quantification of phallotoxins in *Amanita* species[J]. Analytical Biochemistry, 1982, 119(2): 266-273.
- [27] VLASKIN D N, GAINULLINA E T, KLYUSTER O V, et al. Express method for detection of *Amanita phalloides* amanitine toxins[J]. Bulletin of Experimental Biology and Medicine, 2006, 141(1): 110-111.
- [28] GULIKOVA D K, GAINULLINA E T, PONSOV M A, et al. A rapid test for toxins from *Amanita phalloides* mushrooms[J]. Journal of Analytical Chemistry, 2003, 68(12): 1089-1092.
- [29] WIELAND T, SCHMIDT G, WIRTH L. Über die giftstoffe des knollenblätterpilzes VIII[J]. Liebigs Annalen der Chemie, 1952, 577(3): 215-233.
- [30] WIELAND T, BOEHRINGER W. Über die giftstoffe des grünen knollenblätterpilzes, XIX. Umwandlung von β -amanitin in α -amanitin[J]. Liebigs Annalen der Chemie, 1960, 635(1): 178-181.
- [31] SULLIVAN G, BRADY L R, Jr, TYLER V E. Identification of alpha- and beta-amanitin by thin-layer chromatography[J]. Journal of Pharmaceutical Science, 1965, 54(6): 919-921.
- [32] ANDARY C, ENJALBERT F, PRIVAT G, et al. Dosage des amatoxines par spectrophotométrie directe sur chromatogramme chez *Amanita phalloides* Fr. (Basidiomycetes)[J]. Journal of Chromatography, 1977, 132(3): 525-532.
- [33] STIJVE T, SEEGER T. Determination of alpha-, beta-, and gamma-amanitin by high performance thin-layer chromatography in *Amanita phalloides* (Vaill. ex Fr.) secr. from various origin[J]. Zeitschrift für Naturforschung Section C: Biosciences, 1979, 34(12): 1133-1138.
- [34] FAULSTICH H, BUKU A, BODENMULLER H, et al. Virotoxins: actin-binding cyclic peptides of *Amanita virosa* mushrooms[J]. Biochemistry, 1980, 19(14): 3334-3343.
- [35] YOCUM R, SIMONS D M. Amatoxins and phallotoxins in *Amanita* species of the North-Eastern United States[J]. Lloydia, 1977, 40(2): 178-190.
- [36] BEUTLER J A, der-MARDEROSIAN A H. Chemical variation in *Amanita*[J]. Journal of Natural Products, 1981, 44(4): 422-431.
- [37] ENJALBERT F, GALLION C, JEHL F, et al. Simultaneous assay for amatoxins and phallotoxins in *Amanita phalloides* Fr. by high performance liquid chromatography[J]. Journal of Chromatography, 1992, 598(2): 227-236.
- [38] ENJALBERT F, GALLION C, JEHL F, et al. Toxin content, phallotoxin and amatoxin composition of *Amanita phalloides* tissues[J]. Toxicon, 1993, 31(6): 803-807.

- [39] ENJALBET F, CASSANAS G, SALHI S L, et al. Distribution of the amatoxins and phallotoxins in *Amanita phalloides*. Influence of the tissues and the collection site[J]. Comptes Rendus de l'Académie des Sciences. Series III: Sciences de la Vie, 1999, 322(10): 855-862.
- [40] HU Jinsong, ZHANG Ping, ZENG Jun, et al. Determination of amatoxins in different tissues and development stages of *Amanita exitialis*[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2012, 92(13): 2664-2267.
- [41] MCKNIGHT T A, MCKNIGHT K B, SKEELS M C. Amatoxin and phallotoxin concentration in *Amanita bisporigera* spores[J]. Mycologia, 2010, 102(4): 763-765.
- [42] DEFENDENTI C, BONACINA E, MAURONI M, et al. Validation of a high performance liquid chromatographic method for alpha amanitin determination in urine[J]. Forensic Science International, 1998, 92(1): 59-68.
- [43] TAGLIARO F, SCHIAVON G, BONTEMPELLI G, et al. Improved high-performance liquid chromatographic determination with amperometric detection of alpha-amanitin in human plasma based on its voltammetric study[J]. Journal of Chromatography, 1991, 563(2): 299-311.
- [44] DENG Wangqiu, LI Taihui, XI Penggen, et al. Peptide toxin components of *Amanita exitialis* basidiocarps[J]. Mycologia, 2011, 103(5): 946-949.
- [45] 魏宝阳, 陈作红, 张平, 等. 二羟鬼笔毒肽(PHD)的制备及毒理研究[J]. 菌物学报, 2005, 24(1): 93-97.
- [46] MAURER H H, SCHMITT C J, WEBER A A, et al. Validated electrospray liquid chromatographic-mass spectrometric assay for the determination of the mushroom toxins alpha- and beta-amanitin in urine after immunoaffinity extraction[J]. Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications, 2000, 748(1): 125-135.
- [47] FILIGENZI M S, POPPENG R H, TIWARY A K, et al. Determination of alpha-amanitin in serum and liver by multistage linear ion trap mass spectrometry[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007, 55(8): 2784-2790.
- [48] AHMED W H A, GONMORI K, SUZUKI M, et al. Simultaneous analysis of α -amanitin, β -amanitin, and phalloidin in toxic mushrooms by liquid chromatography coupled to time-of-flight mass spectrometry[J]. Forensic Toxicology, 2010, 28(2): 69-76.
- [49] GONMORI K, MINAKATA K, SUZUKI M, et al. MALDI-TOF mass spectrometric analysis of α -amanitin, β -amanitin, and phalloidin in urine[J]. Forensic Toxicology, 2012, 30(2): 179-184.
- [50] NOMURA M, SUZUKI Y, KANEKO R, et al. Simple and rapid analysis of amatoxins using UPLC-MS-MS[J]. Forensic Toxicology, 2012, 30(2): 185-192.
- [51] LEITE M, FREITAS A, AZUL A M, et al. Development, optimization and application of an analytical methodology by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for determination of amanitins in urine and liver samples[J]. Analytica Chimica Acta, 2013, 799: 77-87.
- [52] 柳洁, 丁文婕, 何碧英, 等. 超高效液相色谱-电喷雾离子化-四极杆飞行时间串联质谱指纹图谱检测毒蕈中4种鹅膏蕈类毒素[J]. 分析化学, 2013, 41(4): 500-508.
- [53] 张秀尧, 蔡欣同. 超高效液相色谱三重四极杆质谱联用法快速检测尿液和血浆中鹅膏毒肽和鬼笔毒肽[J]. 分析化学, 2010, 38(1): 39-44.
- [54] HELFERA G, MEYER M R, MICHELY J A, et al. Direct analysis of the mushroom poisons α - and β -amanitin in human urine using a novel on-line turbulent flow chromatography mode coupled to liquid chromatography-high resolution-mass spectrometry/mass spectrometry[J]. Journal of Chromatography A, 2014, 1325: 92-98.
- [55] BRÜGGEMANN O, MEDER M, FREITAG R. Analysis of amatoxins alpha-amanitin and beta-amanitin in toadstool extracts and body fluids by capillary zone electrophoresis with photodiode array detection[J]. Journal of Chromatography A, 1996, 744(1/2): 167-176.
- [56] ROBINSON-FUENTES V A, JAIME-SANCHEZ J L, GARCIA-AGUILAR L, et al. Determination of alpha- and beta-amanitin in clinical urine samples by capillary zone electrophoresis[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2008, 47(4/5): 913-917.
- [57] RITTGEN J, PUTZ M, PYELL U. Identification of toxic oligopeptides in *Amanita* fungi employing capillary electrophoresis-electrospray ionization-mass spectrometry with positive and negative ion detection[J]. Electrophoresis, 2008, 29(10): 2094-2100.
- [58] 中国科学院微生物研究所真菌组. 毒蘑菇[M]. 北京: 科学出版社, 1975: 1-112.
- [59] 杨仲亚. 毒菌中毒防治手册[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1984: 1-57.
- [60] 卯晓岚. 中国鹅膏菌科毒菌及毒素[J]. 微生物学通报, 1991, 18(3): 160-165.
- [61] 李东屏, 张志光. 黑鹅膏菌(*Amanita fuliginea*)毒素的HPLC初步分离鉴定[J]. 生命科学研究, 1997, 1(1): 41-46.
- [62] 陈作红, 胡劲松, 张志光, 等. 我国28种鹅膏菌主要肽类毒素的检测分析[J]. 菌物系统, 2003, 22(4): 565-573.
- [63] 包海鹰, 图力古尔, 李玉, 等. 长白山鹅膏菌肽类毒素的HPLC分析[J]. 菌物系统, 2002, 21(2): 234-238.
- [64] 龚庆芳, 魏宝阳, 肖桂林, 等. RP-HPLC法测定鹅膏菌中毒患者体液中的 α -amanitin[J]. 湖南师范大学: 自然科学学报, 2005, 28(2): 67-69.
- [65] GOMOLKA E, SZPAK D, MORAWSKA A, et al. Amanitin determination in mushroom poisoning diagnostics[J]. Przegląd Lekarski, 2010, 67(8): 576-579.