DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.01.024
第23卷第1期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 1
48 2001年1月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jan. 2001

论著

文章编号:1000-5404(2001)01-0048-04

嵌合跨膜型人CD55基因的重组逆病毒表达质粒的构建

杜瑞琴,白 云,黎万玲,姜 曼 (第三军医大学基础医学部全军免疫学研究所,重庆 400038)

提 要:目的 构建嵌合跨膜型CD55基因的重组逆病毒表达质粒。方法 采用PCR技术扩增编码CD55信号肽及成熟蛋白胞外区(-34~304aa)的DNA片段,双侧引入*EcoR*Ⅰ、*Ssp*Ⅰ位点,与编码CD46分子的跨膜区及膜内区(270~350aa)的DNA片段的5′末端自身的Stu Ⅰ位点连接,构建嵌合跨膜型CD55 DNA片段,序列测定后将此嵌合CD55片段与pLXSN逆病毒载体连接构建重组表达质粒,酶切鉴定插入片段的方向。结果 DNA序列测定证实所构建的嵌合跨膜型CD5 DNA阅读框完整、连接部位序列正确;*Hind*Ⅲ酶切鉴定得到了正向插入的CD55TM-pLXSN重组表达质粒。结论 我们成功构建了嵌合跨膜型CD55 DNA片段及含此片段的重组逆病毒表达载体CD55TM-pLXSN,为进一步在真核细胞中表达嵌合分子,比较研究GPI锚固型CD55分子与细胞活化信号转导的关系建立良好对照并为应用跨膜型的CD55分子对PNH进行基因治疗奠定了分子生物学基础。

关键词:CD55;嵌合跨膜型分子;重组逆转录病毒表达载体
中图法分类号:R394.3 文献标识码:A

Construction of recombinant retrovirus vector of chimeric transmembrane form of human CD55 gene

DU Rui-qin, BAI Yun, LI Wan-ling, JIANG Man (Institute of Immunology PLA, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To construct recombinant retrovirus vector of chimeric transmembrane form of CD55 gene. **Methods** Two primers P1, P2 were used to amplify the sequence of extracellular portion of CD55 by PCR. A *Ssp*I site was designed in the P2 to ligate with the *Stu*I site which was at the 5′ end of the sequence of the transmembrane and cytoplasmic domains of MCP, so the transmembrane form of CD55(CD55-TM) gene was constructed. The chimeric CD55 DNA fragment was cloned into pGEM-T-Easy plasmid and sequenced, then the CD556-TM gene was ligated with the retrovirus vector pLXSN. **Results** The CD55TM DNA sequence was exactly consistent with our expectation, the open reading frame was right, and no frame shift, gene mutation; and digestion with HindⅢ showed that the gene had inserted into the retrovirus vector correctly. **Conclusion** We chimeric transmembrane form of CD55 gene have acquired its recombinant retrovirus vector constructed (CD55 TM-pLXSN), which will be contribute to the investigation of the signal transduction of GPI form CD55 as on excellent control and provide a molecular biological basis for the new way for the gene therapy of PNH.

Key words: human CD55; transmembrane form chimeric molecule; recombinant retrovirus vector

CD55又名衰变加速因子,是一种GPI锚型的补体调节蛋白。它以同源限制的方式通过加速两条补体激活途径C3及C5转化酶的衰变、阻止两条途径C3及C5转化酶的装配,保护自身正常组织免受补体损伤[1,2]。现已知CD55的异常和缺损是引起夜间阵发性血红蛋白尿(Paroxymal nocturnal hemoglobinuria, PNH)的直接原因之一[3,4],而大多数CD55的异常并非是CD55基因缺失,而是由于其GPI锚合成障碍所致,因此导入并表达有功能的跨膜型CD55分子为PNH的基因治疗提供了一条可尝试的途径。此外,GPI锚固型分子的信号转导作用近日已成为人们关注的焦点,而CD55作为GPI锚固蛋白,已有实验证实其可参与单核细胞及T细胞的活化[5,6]。本研究构建嵌合跨膜型CD55的重组表达质粒,为应用跨膜型CD55分子对PNH进行基因治疗奠定实验基础,也为进一步在真核细胞中表达该分子,比较研究GPI锚固型蛋白及跨膜蛋白的不同信号转导模式提供良好的对照细胞模型奠定了分子生物学基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

质粒载体pGEM-T Easy购自Promega公司;pUC19质粒、pLXSN逆病毒表达载体为本室保存;CD55-Bluescript M13-质粒由访美学者馈赠,含全长CD55 cDNA;重组CD46 TM-pGEM-T Easy质粒由本室白云教授构建[7],含编码CD46蛋白的跨膜区及膜内区的DNA片段;限制性内切酶*EcoR*Ⅰ、*Ssp*Ⅰ、*Hind*Ⅲ、*Pst*Ⅰ、*Stu*Ⅰ,Taq DNA聚合酶及DNA分子量Marker购于华美公司,T_4 DNA连接酶、High Pure™ PCR Product Purification Kit购于Boehriger Mannheim公司。

1.2 引物的设计和合成

根据Medof-ME[8] 1987年发表的人CD55的cDNA序列,按构建嵌合跨膜型CD55 DNA的要求设计引物1和2,用于扩增编码CD55信号肽34个氨基酸和胞外区304个氨基酸的DNA序列。上游引物P1的5′端引入*EcoR*Ⅰ酶切位点及保护碱基;下游引物P2的5′端引入*Ssp*Ⅰ酶切位点。根据公布的CD46

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39630296)
作者简介:杜瑞琴(1972-),女,河北省唐山市人,硕士研究生,助教,主要从事补体分子生物学方面的研究。电话:(023)68752238
收稿日期:2000-03-21;修回日期:2000-06-10

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

cDNA 序列, 设计合成一条下游引物 P3。利用 P3 与 P1 扩增 CD55TM DNA片段。各引物由上海生工生物公司合成。

Primer1: 5′-GGAATTCCGCCATGACCGTCGC-3′

Primer2: 5′-CGAATATTCTTGGTTGTCCTGG-3′

Primer3: 5′-CGTCTAGACTATTCAGCCTCTCTGCTCTGC-3′

1.3　PCR 扩增 CD55 信号肽及胞外区 cDNA 片段及初步酶切鉴定

将 CD55-Bluescript M13 用 *EcoR* Ⅰ 酶切回收 CD55 cDNA 作为PCR 反应的模板。用引物 1 和引物 2 终浓度约 1 μmol/L, 50 μl体系扩增。反应条件: 95 ℃ 5 min ; 95 ℃ 60 s, 45 ℃ 45 s, 72 ℃ 70 s, 20 循环; 72 ℃延伸 7 min。取 8 μl PCR 产物在 1% 琼脂糖凝胶中电泳观察结果, 用 High Pure™ PCR Product Purification Kit 分离纯化 PCR 产物。将上述 PCR 产物与 pGEM-T Easy 载体连接, 转化入 *E. coli* DH5α 后经氨苄青霉素及α-互补筛选, 用 *EcoR*Ⅰ、*Hind*Ⅲ、*EcoR*Ⅰ + *Ssp*Ⅰ 酶切鉴定。

1.4　CD55TM DNA 片段的连接、基因克隆

将上述重组质粒用 *EcoR*Ⅰ 和 *Ssp*Ⅰ 双酶切, 纯化回收约 1 kb 的目的片段; CD46-TM-pGEM-T Easy 质粒用 *Pst*Ⅰ、*Stu*Ⅰ 双酶切, 纯化回收 280 bp 片段, pUC19 质粒用 *EcoR*Ⅰ、*Pst*Ⅰ 双酶切, 纯化回收载体片段。连接三片段如图 1。将连接物转化入 *E. coli* DH5α, 经氨苄青霉素及α-互补筛选, 用 *EcoR*Ⅰ、*Pst*Ⅰ 双酶切筛选重组质粒, 并用 *Hind*Ⅲ、*Ssp*Ⅰ, *Stu*Ⅰ 对重组质粒进一步酶切鉴定。

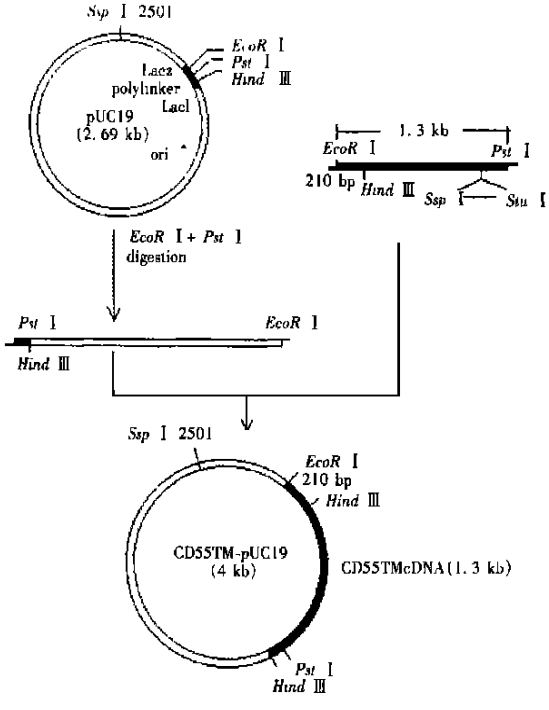


图 1　**CD55TM-pUC19 重组质粒的构建示意图**

Fig 1　Diagram of the construction of CD55TM-pUC19 recobinant plasmid

1.5　CD55TM DNA 片段的序列分析

用 *EcoR*Ⅰ、*Pst*Ⅰ 双酶切 pUC19-CD55TM, 回收 1.3 kb 片段作为 PCR 模板, 用引物 1 和引物 3 扩增 CD55TM DNA 片段。将得到的PCR 产物与 pGEM-T Easy 载体连接, 转化入 *E. coli* DH5α 后经氨苄青霉素及α-互补筛选, 用 *EcoR*Ⅰ 酶切筛选出阳性重组子。序列测定由北京赛百盛公司完成。

1.6　CD55TM-pLXSN 重组逆病毒表达质粒的构建及鉴定

*EcoR*Ⅰ 酶切 CD55TM-pGEM-T Easy 回收嵌合 CD55TM DNA 片段, 与 *EcoR*Ⅰ 线性化的 pLXSN 连接, 转化 MC1061 菌株, *EcoR*Ⅰ 酶切鉴定及 *Hind*Ⅲ鉴定插入方向均按常规方法进行。

2　结果

2.1　CD55 信号肽及胞外区 cDNA 片段的扩增及初步鉴定

我们以 CD55 全长的 cDNA 为模板, 扩增编码 CD55 信号肽 34 个氨基酸和胞外区 304 个氨基酸的 DNA 序列, 用较低的退火温度(45 ℃)和较少的循环数(20)得到了特异性和产量都极高的目的片段。将回收的 PCR 产物与质粒 pGEM-T Easy 载体连接, 用 *EcoR*Ⅰ 酶切筛选出阳性重组子。

进一步用 *Hind*Ⅲ、*EcoR*Ⅰ + *Ssp*Ⅰ 对重组质粒酶切鉴定, 见 *Hind*Ⅲ将重组质粒线性化, 因 pGEM-T Easy 载体上不含 *Hind*Ⅲ位点, 质粒线性化说明插入片段可能含一个 *Hind*Ⅲ位点, 初步鉴定了插入的 PCR 产物的正确性; *EcoR*Ⅰ + *Ssp*Ⅰ 双酶切可切出2 144、1 033、595、185、24、10、8 bp 大小片段(24、10、8 bp 者凝胶看不见), 证实插入片段两端确实引入了 *Ssp*Ⅰ 和 *EcoR*Ⅰ 两个酶切位点。

2.2　CD55 TM 的连接及鉴定

如 1.4 所述, 纯化回收编码 CD55 信号肽及胞外区的 cDNA 片段、CD46 TM-pGEM-T Easy 用 *Pst*Ⅰ + *Stu*Ⅰ 双酶切的片段、pUC19 的酶切片段, 将三个片段连接, 见图 1。连接、转化及初筛后, 经 *EcoR*Ⅰ + *Pst*Ⅰ 双酶切电泳可见切下 1.3 kb 片段, 与插入片段大小吻合; *Stu*Ⅰ 酶切质粒未切动, 符合因 *Ssp*Ⅰ 与 *Stu*Ⅰ 平端连接导致位点消失。*Ssp*Ⅰ 的酶切使载体线性化, 符合载体本身具有 1 个位点, 插入片段中 *Ssp*Ⅰ 位点与 *Stu*Ⅰ 平端连接后酶切位点消失的结果。*Hind*Ⅲ酶切得到 2.9、1.1 kb 两条片段, 证明此重组质粒除本身具有一个 *Hind*Ⅲ位点外, 还有一个位点在插入片段上, 与 CD55 TM 片段上有一个 *Hind*Ⅲ位点相符, 见图 2。



图 2　**CD55TM-pUC19 重组质粒的酶切鉴定 1% 琼脂糖电泳图谱**

Fig 2　Electrophoresis for restriction map of recombinant CD55TM-pUC19 on 1% agarose gel

Line 1: λDNA *EcoR*Ⅰ + *Hind*Ⅲ DNA marker; Line 2: CD55TM-pUC19/*EcoR*Ⅰ + *Pst*Ⅰ 2.69 kb, 1.3 kb; Line 3: CD55TM-pUC19/*Stu*Ⅰ; Line 4: CD55TM-pUC19/*Hind*Ⅲ 2.9 kb, 1.1 kb; Line 5: CD55TM-pUC19/*Ssp*Ⅰ

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

2.3 CD55TM DNA 片段的序列分析

采用 PCR 技术用 P1 和 P3 扩增得到 CD55TM DNA 片段，电泳见目的片段大小约 1.3 kb，目的带特异、产量高。将 CD55TM PCR 产物与 pGEM-T Easy 载体连接，*EcoR* Ⅰ 酶切切下 1.3 kb 片段证实插入片段为 CD55TM DNA 片段。序列测定结果证实阅读框完整，无移码和错码，两个片段的连接部位除因 *Ssp* Ⅰ 位点(AAT)的引入导致此 cDNA 多出了三个碱基(编码天门冬氨酸)外序列正确无误，见图 3，与预测的包括 34 个信号肽序列的嵌合跨膜型 CD55DNA 的序列一致，表明我们已获得了嵌合跨膜型 CD55 分子的全部编码序列。

```
GTAAGTGGTA CTAACCTCTC GTGACATAAA TAACATGACA CTTATTACTA CTTCCTCTCA CCTCACCGGG TGGTGGACTT ACGTCTCCTT
GATTCACCAT GATTGGAGAG CACTCTATTT ATTGTACTGT GAATAATGAT GAACGAGAGT GGAGTGGGGG ACCACCTGAA TGCAGAGGAA
Hinf Ⅰ
TTAGAGATTG AAGGTTCCAG GGTGGTTGTC AAGTCTTTGG ATGGTGTCAT TTAGAAGGTT GATGTCTTCA GAGTGGTTGA AGAGTCTTTT
AATCTCTAAC TTCCAAGGTC CCACCAACAG TTCAGAAACC TACCACAGTA AATGTTCCAA CTACAGAAGT CTCACCAACT TCTCAGAAAA
GGTGGTGTTT TTGGTGGTGT GGTTTACGAG TTCGTTGTGC CTCATGTGGA CAAAGGTCCT GTTGGTTCTT AGGATGAATG TTCGGAGGTC
CCACCACAAA AACCACCACA CCAAATGCTC AAGCAACACG GAGTACACCT GTTTCCAGGA CAACCAAGAA TCCTACTTAC AAGCCTCCAG
                                                                  Primer 2   Ssp Ⅰ  Stu Ⅰ
AGAGTTTAAT AGGTCCTATA GGATTTGGAC TCCTTCCTTA TGAACTGTCA AACCTACAAA CCCAGTAACG ACACTAACAA TAACGGTATC
TCTCAAATTA TCCAGGATAT CCTAAACCTG AGGAAGGAAT ACTTGACAGT TTGGATGTTT GGGTCATTGC TGTGATTGTT ATTGCCATAG
          EcoR Ⅴ
AACAACCTCA ACGTCATTAA ACACTTCAGG GCATGTCTAT AGAAGTTTCC TCCTTCTTCT TTCCCTTTCG TCTACCACCT CGACTTATAC
TTGTTGGAGT TGCAGTAATT TGTGTTGTCC CGTACAGATA TCTTCAAAGG AGGAAGAAGA AAGGGAAAGC AGATGGTGGA GCTGAATATG
                              EcoR Ⅴ
GGTGAATGGT CTGATTTAGT TGGTGAGGTC GTCTCGTCTC TCCGACTTA  TCAGATCTGCT
CCACTTACCA GACTAAATCA ACCACTCCAG CAGAGCAGAG AGGCTGAAT  AGTCTAGACGA
                                 Primer 3              Xba Ⅰ
```

图3 嵌合跨膜型 **CD55 DNA** 片段的部分序列

Fig 3 Partial sequence of recombinant CD55TM DNA

2.4 CD55TM-pLXSN 重组表达质粒的构建及鉴定

CD55TM DNA 片段与线性化 pLXSN 的连接物转化后挑取若干单菌落，小量快速抽提质粒 DNA，电泳挑选迁移率滞后者为可疑阳性重组子。将上述可疑阳性重组子用 *Hind* Ⅲ酶切，能切割出 5.72 kb 和 1.45 kb DNA 片段的为正向插入重组质粒；能切割出 570 bp 和 6.6 kb DNA 片段的为反向插入重组质粒，结果见图 4。挑取正向插入质粒为本研究的人 CD55TM-pLXSN 重组逆转录病毒载体。

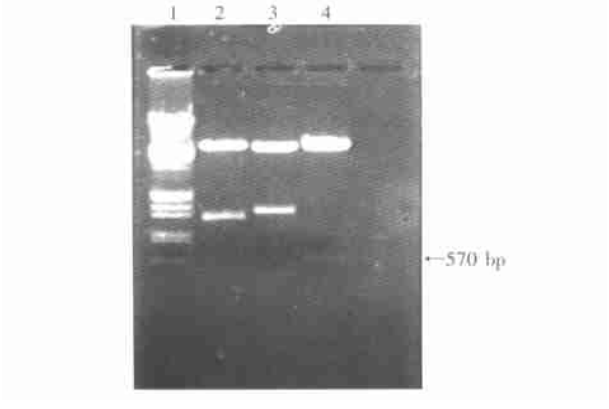


图4 **CD55TM-pLXSN** 重组质粒的酶切鉴定 1%琼脂糖电泳图谱

Fig 4 Electrophoresis for restriction map of recombinant CD55TM-pLXSN plasmid on 1% agarose gel

Line 1: λDNA/*EcoR* Ⅰ + *Hind* Ⅲ; Line 2: CD55TM-pLXSN/*EcoR* Ⅰ 5.8 kb, 1.3 kb; Line 3: CD55TM-pLXSN/*Hind* Ⅲ 5.72 kb, 1.45 kb; Line 4: CD55TM-pLXSN/*Hind* Ⅲ (Reverse) 6.6 kb, 570 bp

3 讨论

CD55 又名衰变加速因子，是一种糖基磷脂酰肌醇(Glycosyl-phosphatidylinsitol, GPI)锚固型补体调节蛋白，其主要作用是通过加速两条补体激活途径 C3 及 C5 转化酶的衰变，阻止两条途径 C3 及 C5 转化酶的装配，保护自身正常组织免受补体介导的损伤。CD55 cDNA 编码区包括信号肽区、4 个 SCR 区，一个 STP 富含区以及 3' 一疏水区。现已证明，CD55 的 SCR3 区为 C3b、C4b 结合的特异性功能区，SCR2 和 SCR4 起辅助作用。STP 富含区为 CD55 的 O-糖基化部位。此区的存在对上述功能是必要而非特异性的，可能仅仅作为一空间位阻作用以保证 SCR 区的空间折叠[9]。CD46，又名膜辅蛋白(MCP)，是一种跨膜型的补体调节蛋白，它辅助 I 因子裂解 C4b、C3b，与 CD55 作用相似，通过抑制两条补体激活途径显示同源限制作用。在结构上，它是一种跨膜型的补体调节蛋白，但同样具有 SCR 区及 ST 富含区，它的 ST 富含区也为 O-糖基化部位，与 CD55 的 STP 富含区相似。正因为 CD55 与 CD46 在结构及功能上的这种相似的特征，我们选取编码 CD55 成熟蛋白信号肽及胞外区蛋白(包括 SCR1-SCR4 及大部分 STP 区)的 DNA 片段，与编码 CD46 的跨膜区及膜内区(第 270～350 氨基酸，包括 STP 富含区的 8 个氨基酸)的 DNA 片段(简称 TM)连接，构建嵌合跨膜型 CD55(CD55TM)，以便与天然锚固型 CD55 形成良好的参照。在扩增 CD55 目的基因时，我们在 3' 端引入一个 *Ssp* Ⅰ 平端位点，目的是获得平端的酶切产物，以便与 CD46 的 TM DNA 片段自身 5' 端的 *Stu* Ⅰ 平端位点连接，构建嵌合 CD55TM DNA 片段。此重组嵌合 CD55TM DNA 片段因引入了 *Ssp* Ⅰ 位点导致连接部位多出了 3 个碱基(AAT)，编码天门冬氨酸，因位于 STP 区对分子的构

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

象和功能影响不大。

CD55 分子是一个多功能的分子, 除具有补体同源限制作用外, 还能参与对微生物的粘附作用和与单核细胞、T 细胞的活化等免疫反应过程。已知 CD55 和 CD59、C8 bp 的异常和缺损可导致红细胞对自身补体的敏感性增加, 是引起夜间阵发性血红蛋白尿(PNH)的直接原因[3,4,10,11]。

GPI 锚结构的缺失或异常可导致 CD55 等 GPI 锚固蛋白表达的缺失。目前的研究表明, 大多数 PNH 是由于与合成 GPI 糖脂链核心部分有关的 PIG-A 类基因突变, 导致 GPI 锚合成障碍所致[12]。

在这种情况下, GPI 锚合成障碍导致天然 GPI 锚固型蛋白在细胞表面不能表达, 因此不能通过导入天然的 GPI 锚固型 CD55、CD59 基因来对 PNH 实行基因治疗, 而导入并表达有功能的跨膜型 CD55、CD59 分子则为其基因治疗提供了一条可尝试的途径。此外, CD55 作为 GPI 锚固蛋白, 已有实验证实其可参与单核细胞及 T 细胞的活化, 其中它作为共刺激因子参与 T 细胞的活化倍受人们关注。GPI 锚固蛋白参与信号转导的机制是目前国内外研究的热点之一。由于这类蛋白不含跨膜区和膜内区, 它转导活化信号至胞内的方式一直是令研究者困扰的问题。近期国外研究资料表明 GPI 锚固蛋白在细胞膜上的分布方式与跨膜蛋白随机不同, 它是以脂微区形式分布于细胞表面, 且已证实 GPI 脂微区是介导 GPI 蛋白信号转导的重要结构[15,16]。因而建立表达具有不同膜结合形式的同一种分子的细胞模型, 将为进一步比较研究 GPI 蛋白和跨膜型蛋白的信号转导模式提供可靠的前提条件。本研究构建的嵌合跨膜型 CD55 的逆病毒表达载体为下一步得到表达跨膜型 CD55 蛋白的细胞克隆奠定了分子生物学基础, 从而为深入研究 GPI 锚固的 CD55 分子与细胞活化信号转导的关系建立良好对照并为探讨应用跨膜型的 CD55 分子对 PNH 进行基因治疗奠定了一定的实验基础。

参考文献:

[1] Fujita T, Inoue T, Ogawa K, *et al*. The mechanism of action of decay-accelerating factor (DAF). DAF inhibits the assembly of C3 convertases by dissociating C2a and Bb[J]. J Exp Med, 1987, 166(5): 1 221—1 228.

[2] Medof M E, Kinoshita T, Nussenzweig V, *et al*. Inhibition of complement activation on the surface of cells after incorporation of decay-accelerating factor (DAF) into their membranes[J]. J Exp Med, 1984, 160(5): 1 558—1 578.

[3] Telen M J, Hall S E, Green A M, *et al*. Identification of human erythrocyte blood group antigens on decay-accelerating factor (DAF) and an erythrocyte phenotype negative for DAF[J]. J Exp Med, 1988, 167(6): 1 993—1 998.

[4] Yomtovian R, Prince G M, Medof M E, *et al*. The molecular basis for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria[J]. Transfusion, 1993, 33(10): 852—873.

[5] Shibuya K, Abe T, Fujita T, *et al*. Decay-accelerating factor functions as a signal transducing molecule for human monocytes[J]. J Immunol, 1992, 149(5): 1 758—1 7620.

[6] Davis L S, Patel S S, Atkinson J P, *et al*. Decay-accelerating factor functions as a signal transducing molecule for human T cells[J]. J Immunol, 1988, 141(7): 2 246—2 252.

[7] 白　云, 姜　曼, 韩根成, 王更银, 等. 跨膜型 CD59 分子的构建及其在小鼠 NIH3T3 和 EL-4 细胞表达的研究[J]. 免疫学杂志, 1999, 15(3): 156.

[8] Medof M E, Lubin D M, Holers V M, *et al*. Cloning and characterization of cDNAs encoding the complete sequence of decay-accelerating factor of human complement[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1987, 84(7): 2 007—2 011.

[9] Coyne K E, Hall S E, Thompson S, *et al*. Mapping of epitopes, glycosylation sites, and complement regulatory domains in human decay accelerating factor[J]. J Immunol, 1992, 149(9): 2 906—2 913.

[10] Okada N, Harada R, Okada H, *et al*. Erythrocytes of patients with paroxysmal nocturnal haemoglobinuria acquire resistance to complement attack by purified 20-kD homologous restriction factor[J]. Clin Exp Immunol, 1990, 80(1): 109—113.

[11] Parker C J. Molecular basis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria[J]. Stem Cells, 1996, 14(4): 396—411.

[12] Kinoshita T. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and complement regulatory factors[J]. Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi, 1995, 18(6): 634—636.

[13] Harder T, Scheiffele P, Verkade P, *et al*. Lipid domain structure of the plasma membrane revealed by patching of membrane components[J]. J Cell Biol, 1998, 141(4): 929—942.

[14] Kasahara K, Sanai Y. Possible roles of glycosphingolipids in lipid rafts [J]. Biophys Chem, 1999, 82(2—3): 121—127.

(编辑　郭建秀)

(上接 47 页)

2.2　鳖甲粉样品钙镁分析结果对照

按实验方法分析中华鳖甲粉样品钙镁元素并与混酸溶液法[根据重庆市卫生防疫站"氨基酸钙"(中华鳖甲)检验报告书, 1999 年 5 月] 对照, 见表 1。

表 **1**　测定结果

样品号	样品重	微乳法测值(mg/L)		含量(mg/g)		混酸溶液法测值	
(mg/g)	(mg)	钙	镁	钙	镁	钙	镁
1	10.8	25.97	0.79	240.5	7.32		
2	9.3	22.15	0.69	238.2	7.43		
3	12.5	28.91	0.88	231.3	7.07		
平均值(mg/g)				236.7	7.27	232.2	7.13

关键词: 火焰原子吸收法; 中华鳖甲; 钙镁
中图法分类号: R446.1　　文献标识码: B

参考文献:

[1] 金　捷. 龟鳖养生丸的免疫作用研究[J]. 浙江中医学院学报, 1995, 19(3): 41.

[2] 任建敏, 杨明莉, 向明章, 等. 火焰原子吸收法测鼠肺组织总钙[J]. 光谱学与光谱分析, 1998, 12(6): 727.

[3] 任建敏, 杨明莉, 魏　泽英, 等. 混合微乳液火焰原子吸收法同时测定奶粉中钙和镁[J]. 分析化学, 1998, 10: 1 287.

(编辑　薛国文)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net