

文章编号 1006-8147(2019)04-0324-05

论 著

伯氏疟内质网塑形蛋白 SEY1 敲除质粒的构建及转染

刘 影¹, 史小雨¹, 王 倩¹

(1. 天津医科大学基础医学院免疫学系, 天津 300070)

摘要 目的: 为了研究重要内质网塑形蛋白 SEY1 在疟原虫致病性方面的作用, 本研究构建敲除伯氏疟原虫 *PbSEY1* 的质粒, 结合疟原虫转染技术筛选 *PbSEY1* 缺失疟原虫突变体。方法: 选取 *PbSEY1* 编码区中相邻的两个片段作为同源臂进行 PCR 扩增, 并引入特定酶切位点, 借助 T4 DNA 连接酶和 In-Fusion 无缝克隆的方法将其插入载体 pL0034 中; 利用疟原虫同步化培养及电转染技术将该质粒转入疟原虫, 基于基因同源重组原理在疟原虫中敲除 *PbSEY1* 并进行药物筛选。结果: (1) 获得可用于基因敲除及回复实验的重组质粒 pL0034- Δ *PbSey1*; (2) 在伯氏疟原虫中敲除 *PbSEY1*。结论: 利用重组质粒 pL0034- Δ *PbSey1* 和疟原虫转染技术初步获得 *PbSEY1* 缺失疟原虫突变体, 为进一步研究 *PbSEY1* 在疟原虫致病性中的作用提供了必要工具。

关键词 伯氏疟原虫; *PbSEY1*; pL0034; 疟原虫转染

中图分类号 R784

文献标志码 A

Construction of *Plasmodium berghei* ER-shaping protein SEY1 knockout plasmid and *Plasmodium* transfectionLIU Ying¹, SHI Xiao-yu¹, WANG Qian¹

(1. Department of Immunology, School of Basic Medical Sciences, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

Abstract Objective: To investigate the role of endoplasmic reticulum-shaping protein SEY1 in *Plasmodium* virulence, and to construct pL0034- Δ *PbSey1* plasmid to transfect it to *Plasmodium berghei* to obtain *PbSEY1*-deleted parasite strain. **Methods:** Two adjacent segments within *PbSEY1* coding sequence were amplified by PCR as the homologous recombination arms and inserted into the pL0034 vector by T4 DNA ligase and In-Fusion cloning kit. The recombinant plasmid was transfected into *Plasmodium berghei* by synchronized culture and electro-transfection in order to delete *PbSEY1* based on homologous recombination. **Results:** (1) The plasmid pL0034- Δ *PbSey1* aiming at knockout and rescue experiments was obtained. (2) *PbSey1* was deleted in *Plasmodium berghei*. **Conclusion:** Utilizing the recombinant plasmid pL0034- Δ *PbSey1* and *Plasmodium* transfection, *PbSey1*-deleted parasites could be acquired, and may be a necessary tool for further study of *PbSey1* in *Plasmodium* virulence.

Key words *Plasmodium*; *PbSEY1*; pL0034; *Plasmodium* transfection

疟疾(Malaria)是由疟原虫(*Plasmodium*)引起的, 以按蚊为主要传播媒介的全球性寄生虫病, 以非洲地区的发病率和死亡率最高。我国的疟疾传染由于灭蚊等努力一度绝迹, 但近年来在南方一些省份已显死灰复燃之势, 且面临着严重耐药问题^[1-3]。目前疟疾相关研究过多的集中在疫苗和药物研发, 却忽略了对疟原虫生物学机理的探索。

疟原虫作为一种真核生物, 其致病性及宿主的免疫应答都与疟原虫的蛋白质分泌密切相关。疟原虫分泌的蛋白不仅嵌入自身质膜, 还会进入纳虫泡腔以及宿主细胞的胞浆, 甚至还会嵌入宿主细胞的质膜中^[4-5], 在细胞黏附、免疫隔离、信号传递等多个过程发挥重要作用^[6-7], 以创造更利于自身生长发育的环境。因此, 研究疟原虫蛋白质分泌过程, 特

别是与蛋白分泌密切相关的细胞器—内质网(endoplasmic reticulum, ER), 对探究疟原虫的致病机制尤为重要。

内质网是真核生物中最大的膜包被细胞器, 由不间断的片状和管状结构组成。内质网参与多种重要细胞活动, 均与其形态特征密切相关, 特别是蛋白质分泌功能^[8]。多个整合膜蛋白家族成员已被发现参与内质网形态的维持, 如 DP1、Atlastin 和 RTN 等。笔者在前期研究中发现, 真核细胞的内质网塑形蛋白(ER-shaping protein)Atlastin, 属于 dynamin 超家族的 GTP 酶, 主要通过介导同源膜融合来构建内质网管状网络^[9-10], 其缺失会减少 COP II 囊泡的形成, 从而影响内质网中合成加工蛋白的运输^[11], 说明内质网正常形态的维持与蛋白质分泌功能密切相关。此前已有研究尝试观察红外期和红内期疟原虫内质网形态^[12], 但疟原虫内质网的具体功能及其在疟原虫致病性方面的作用目前尚无研究。通过疟原

基金项目 天津市教科科研项目(11601501/2016KJ0138)

作者简介 刘影(1993-), 女, 硕士在读, 研究方向: 免疫学; 通信作者: 王倩, E-mail: wangq@tmu.edu.cn。

虫基因组分析,笔者在伯氏疟原虫(*Plasmodium berghei*, *P. berghei*)中找到哺乳动物 Atlastin 蛋白的同源蛋白 *PbSEY1*(*P. berghei* SEY1)。SEY1 在其他细胞内质网形态和功能维持中很重要,然而,笔者目前并不了解它如何在疟原虫中发挥功能,以及这些功能与蛋白质分泌及疟原虫致病性之间的关系。

为了探究伯氏疟原虫内质网塑形蛋白 *PbSEY1* 在疟原虫寄生及致病过程中的作用,本研究利用敲除-回复载体 pL0034,构建 pL0034- Δ *PbSEY1* 重组质粒,结合疟原虫转染技术,基于单交换(single crossover)的同源重组(homologous recombination)原理,将 *PbSEY1* 从疟原虫基因组中敲除,构建 *PbSEY1* 缺失的疟原虫突变体,且在后续回复实验中,该突变体在药物作用下可直接恢复 *PbSEY1* 的表达,为探究内质网塑形蛋白 *PbSEY1* 在疟原虫致病性方面的作用提供了有力的工具。

1 材料与方法

1.1 实验材料 伯氏疟原虫 *P. berghei* ANKA 由罗格斯大学新泽西医学院 Purnima Bhanot 教授赠予,大肠杆菌载体 pL0034 于本实验室保存(图1),克隆感受态细胞 Mach1-T1 购自北京博迈德基因技术有限公司,质粒提取试剂盒购自 QIAGEN 公司,质粒小量抽提试剂盒和 DNA 凝胶回收试剂盒均购自 TransGen Biotech 公司,限制性核酸内切酶 *EcoRV*、*NotI*、*KpnI* 及 T4 DNA 连接酶购自 ThermoFisher 公司,乙胺嘧啶购自 Sigma 公司,细胞核转染试剂盒购自 Lonza 公司。

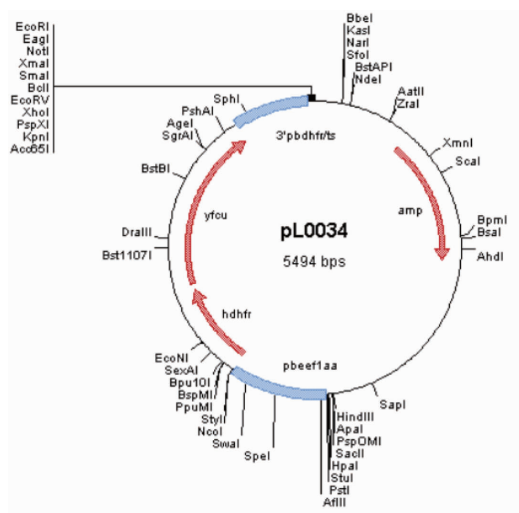


图1 pL0034 质粒图谱

Fig 1 Plasmid profile of pL0034

1.2 实验方法

1.2.1 目的基因片段 Segment I 和 Segment II 的获取 以野生型伯氏疟原虫 *PbSEY1* 基因的编码区

(1-2742bp)为模板,分别扩增两个片段 Segment I(S I, 26-1059bp)和 Segment II(S II, 1050-1958bp),并在两个片段上下游分别引入 *KpnI*、*EcoRV* 和 *KpnI*、*NotI* 酶切位点(PCR 引物见表1)。PCR 条件为:94 °C 预变性 30 s, 以 98 °C 10 s, 58 °C 1 min, 68 °C 1 min, 循环 35 次, 68 °C 5 min, 4 °C 终止反应。琼脂糖凝胶电泳确定 PCR 产物片段大小正确后切胶回收,再将片段 S II 经 *KpnI*、*NotI* 酶切,酶切产物纯化后备用。

表1 目的片段 PCR 扩增引物

Tab 1 PCR primers

目的片段	引物名称	引物序列(5'→3')
Segment I	F311	CCTTCAATTTCGATGGGTACCTAATCGACTATGATG
	R312	TAAACTTTTTTCAATGATATCTTTTCTGCCAGG
Segment II	F402	GGTACCAAAGATATCATTC
	R414	CGGCGCGCTTATTTTGGTCTATTTC

下划线部分表示引入的酶切位点

1.2.2 重组质粒 pL0034- Δ *PbSEY1* 的构建 先将片段 S II 通过酶切位点 *KpnI* 和 *NotI* 与 pL0034 在 T4 DNA 连接酶的催化下 16 °C 连接过夜,次日将连接产物转化至感受态细胞 Mach1-T1 中,在含有氨苄的固体培养基上 37 °C 倒置培养 12 h,挑取阳性单克隆后摇菌扩增提取质粒。酶切鉴定及 DNA 测序确认片段 S II 插入无误后,利用 In-Fusion 无缝克隆的方法将片段 S I 与 *KpnI* 和 *EcoRV* 双酶切后的质粒 pL0034-S II 连接(条件为 50 °C, 30 min),将连接产物转化至感受态细胞后进行氨苄筛选培养,挑取单克隆进行扩增并提取质粒,酶切鉴定及 DNA 测序确认片段 S I 插入正确。

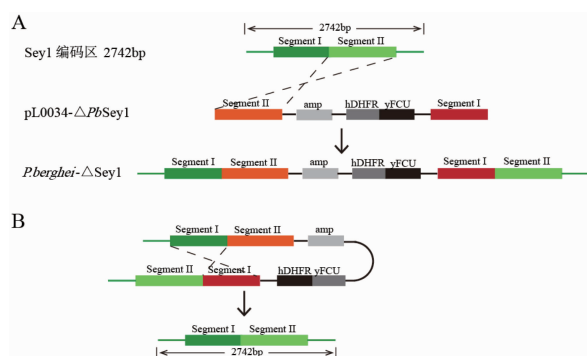
1.2.3 疟原虫转染 将液氮中冻存的伯氏疟原虫感染血液通过尾静脉注射感染 Wistar 大鼠。每日鼠尾取血制备薄血片, Giemsa 染色,油镜观察并计算虫血率。待虫血率升至 3%~5% 时,心脏取血收集大鼠血液,加入 10 mL 完全培养基,离心(200 g, 8 min),弃去上清后将全部血细胞沉淀转移至 150 mL 完全培养基中,充入 5% CO₂、5% O₂、90% N₂ 混合气体,于 500 mL 密封锥形瓶中, 37 °C、77~80 r/min 条件下培养 16~23 h。次日制备血涂片检查培养状况,若 80% 左右疟原虫发育为成熟裂殖体即可进行分离纯化。将培养液体分至 4 个 50 mL 离心管中,每管 35 mL,在底部缓慢加入 10 mL Nycodenz/PBS 溶液(密度梯度溶液),使二者产生明显界面,离心(200 g, 25 min)。离心后在培养基与密度梯度离心液之间形成一个棕色液体薄层,即为裂殖体细胞层,用吸管小心将该层吸出,完全培养基洗涤 1 次,弃净上清后置于冰上备用。将 100 μ L Nucleofector 溶液、10 μ g 重组

质粒及 30 μ L 分离得到的裂殖体混合电击后,尾静脉注入 BALB/c 小鼠,再经乙胺嘧啶筛选获得成功转染的疟原虫。

2 结果

2.1 疟原虫 *PbSey1* 基因敲除及回复策略 以野生型伯氏疟原虫 *Sey1* 基因编码区为模板构建的质粒 pL0034- Δ *PbSey1*,转染后首先进行第一次同源重组(图 2A),发生重组的同源臂为 Segment II,使 *Sey1* 因片段缺失及无启动子而无法表达,即只有发生 Segment II 重组的疟原虫才能产生 Δ *Sey1* 的基因型,同时表达抗药标签 hDHFR(human dihydrofolate reductase),可在乙胺嘧啶(pyrimethamine)筛选中存活,最终经单克隆筛选即可得到敲除 *Sey1* 的疟原虫。

获得 *PbSey1* 缺失疟原虫突变体后即可观察其表型并进行相关功能实验。为了满足后续回复实验的需求,本文所使用的基因敲除策略在进行回复实验时无需重新构建回复质粒,只需在药物筛选作用下发生第二次单交换的同源重组即可得到 *PbSey1* 回补的野生基因型。在 5-氟胞嘧啶的作用下,*Pb*- Δ *Sey1* 将进行第二次同源重组(图 2B),同源臂为 Segment I,重组可导致耐药标签 hDHFR-yFCU 的丢失而 *PbSey1* 重新表达。未发生第二次重组的疟原虫因含有标签 yFCU (yeast enzyme cytosine deaminase and uridyl phosphoribosyl transferase),可将 5-氟胞嘧啶转化为有毒性的 5-氟尿嘧啶而被杀死,由此即可得到 *PbSey1* 回补的野生型疟原虫。



A.质粒 pL0034- Δ *PbSey1* 以 Segment II 为同源臂进行第一次同源重组,得到 Δ *PbSey1* 疟原虫。B.质粒 pL0034- Δ *PbSey1* 以 Segment I 为同源臂进行第二次同源重组,得到 *PbSey1* 回补后的野生型疟原虫

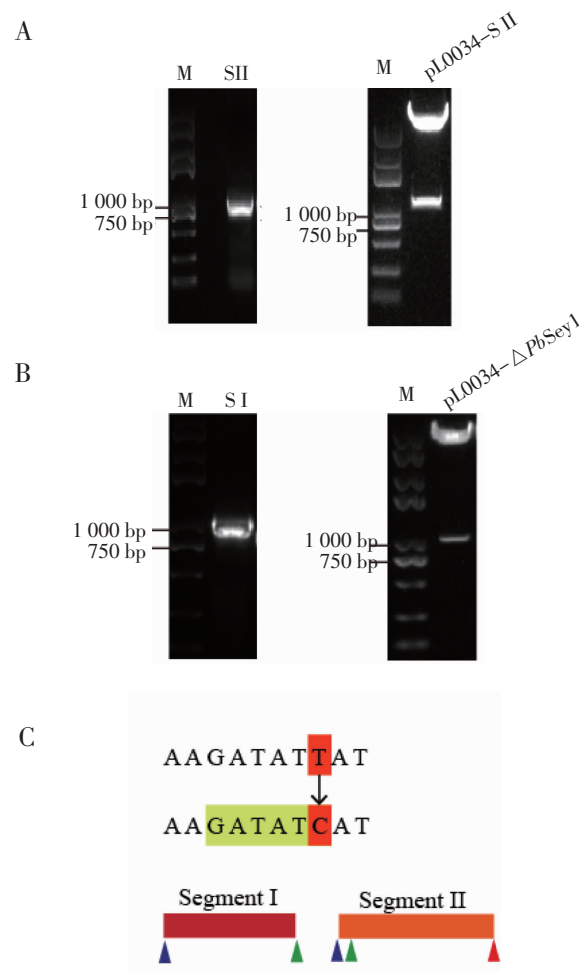
图 2 疟原虫 *PbSey1* 基因敲除及回复策略

Fig 2 *PbSey1* knockout and rescue strategy in *Plasmodium*

2.2 重组质粒 pL0034- Δ *PbSey1* 的构建和鉴定 由于酶切位点设计的不同,首先扩增和插入的片段是 Segment II(909bp)(图 3A)。在其 5'端第 10 位碱基引入一个点突变(T>C)(图 3C),在不影响其氨基

酸编码的前提下产生酶切位点 *EcoRV*(GATATC),同时在 *EcoRV*(绿色箭头显示)的上游引入酶切位点 *KpnI*(蓝色箭头显示);在 Segment II 的 3'端引入酶切位点 *NotI*(红色箭头显示)(图 3C)。利用 *KpnI* 和 *NotI* 两个酶切位点插入 S II 即可得到质粒 pL0034-S II,酶切鉴定及 DNA 测序证明插入片段正确(图 3A)。

pL0034-S II 构建成功后,扩增、插入片段 Segment I(1034 bp)(图 3B)。在 S I 的 5'端引入酶切位点 *KpnI*(蓝色箭头显示),与 S II 相同,在 3'端的末位碱基引入点突变(T>C)而产生酶切位点 *EcoRV*(绿色箭头显示)(图 3C)。利用 In-Fusion 无缝克隆方法将 S I 插入质粒 pL0034-S II,即得到质粒 pL0034- Δ *PbSey1*,*KpnI* 和 *NotI* 酶切鉴定及 DNA 测序证明插入片段正确(图 3B)。最后经 *EcoRV* 酶切将质粒线性化后即可用于疟原虫转染。



A: 目的片段 S II 的获取及质粒 pL0034-S II 的双酶切鉴定。B: 目的片段 S I 的获取及质粒 pL0034- Δ *PbSey1* 的双酶切鉴定。C: 片段 S II 中利用碱基点突变(T>C)引入 *EcoRV*;S I、S II 的酶切位点图示

图 3 重组质粒 pL0034- Δ *PbSey1* 的构建和鉴定

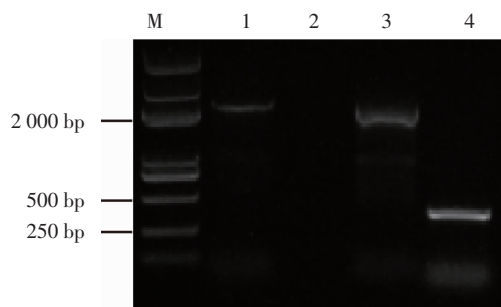
Fig 3 Construction and identification of recombinant plasmid pL0034- Δ *PbSey1*

2.3 疟原虫转染及重组子的鉴定 伯氏疟原虫经同步化培养后约 80%的疟原虫均已发育为成熟裂殖体,在此阶段进行转染效率最高。经电转后的疟原虫在小鼠体内生长,每日监测血涂片,100 倍油镜下观察 100 个视野,若观察到疟原虫即为阳性,未找到则为阴性。转染后次日即出现疟原虫阳性,于小鼠饮水中加入乙胺嘧啶,给药 2 d 后血涂片疟原虫转为阴性,遂撤药。停药后第 5 天疟原虫再次转为阳性,至停药后第 9 天虫血率增长至 5%,心脏取血纯化疟原虫,提取基因组 DNA,PCR 鉴定及 PCR 产物 DNA 测序结果提示成功获得 *PbSey1* 缺失疟原虫突变体,但为混合克隆,PCR 条带灰度分析显示 *PbSey1* 缺失疟原虫突变体约占 50%(表 2,图 4)。

表 2 PCR 鉴定 *PbSey1* 敲除疟原虫引物

Tab 2 PCR identification primers of *PbSey1*-deleted parasites

疟原虫株	引物名称	引物序列(5'→3')	产物长度
Wildtype	F28	ATGACGGATGTAAACAAAACCTC	2 056 bp
Parasites	R34	TTAAATCATTATTTATCGTACTAAC	
$\Delta PbSey1$	F32	TATATCTGAAAGGTATGTCTTC	379 bp
Parasites	R105	TACATGCATGTGCATGCACA	



M.Marker; 1.模板为野生型疟原虫基因组 DNA,引物为 F28+R34; 2.模板为野生型疟原虫基因组 DNA,引物为 F32+R105; 3.模板为转染后药物筛选出的疟原虫基因组 DNA,引物为 F28+R34; 4.模板为转染后药物筛选出的疟原虫基因组 DNA,引物为 F32+R105

图 4 疟原虫转染后重组子的鉴定

Fig 4 PCR identification of *PbSey1*-deleted *Plasmodium* integrants

3 讨论

内质网作为真核细胞蛋白质合成、脂质合成和钙储存的关键细胞器,其结构和功能对真核生物的生存和繁殖极为重要,对于疟原虫也是如此。内质网塑形蛋白 SEY1 通过介导内质网同源膜融合参与管状网络结构的形成,若 SEY1 缺失将会对内质网的形态和功能以及细胞的生长发育造成影响。在哺乳动物中,Atlastin GTP 酶(同源蛋白 SEY1)的缺失会影响 COP II 包被囊泡的出芽生长,从而对内质网合成蛋白的运输产生负作用;人体内 Atlastin(ATL)的缺失会造成遗传性痉挛性截瘫(hereditary spastic

paraplegia, HSP)^[13];在拟南芥植物,其同源蛋白 RHD3(root hair defective 3)的缺失则会影响生长素水平及生长素运输机制稳态,从而引起植物矮小,根毛变短和卷曲^[14];在果蝇中,ATL 缺失会导致其神经元缺陷^[15];在白色念珠菌中,内质网的膜融合延迟甚至片段化则会使其毒力和致病力降低^[16]。这些研究结果都为笔者研究 *PbSey1* 在疟原虫内质网中的作用提供了依据和方向,促使笔者继续探究内质网塑形蛋白 *PbSey1* 在疟原虫生长和致病过程中的作用。

在疟原虫中进行某种蛋白功能研究时,除了敲除该种蛋白外,对敲除株进行蛋白回补也是必不可少的实验步骤。在本研究中,笔者利用基因同源重组原理及质粒 pL0034 上药物筛选标签 hDHFR 和 yFCU,将基因敲除和基因回复两个截然相反的实验目的融合在一个重组质粒中,避免了后期因回复实验而重复构建质粒及再次进行疟原虫转染^[17]。此外,该质粒在进行 *PbSey1* 的基因回复时是在疟原虫基因组中 *PbSey1* 的原位进行回复,其表达量仍与野生型疟原虫一致,对基因组的其他序列也不会产生影响,确保了回复后疟原虫基因组的完整性和准确性。

通过疟原虫同步化培养和转染技术成功在伯氏疟原虫中敲除 *PbSey1*,获得了 *PbSey1* 缺失疟原虫与野生型疟原虫的混合克隆。这是由于在乙胺嘧啶药物筛选过程中少量未发生同源重组的野生型疟原虫自发突变,获得耐药性而存活下来。对于混合克隆,常规应进行单克隆筛选,但笔者在进行单克隆筛选时却遇到了重重困难。笔者常规采用稀释法进行单克隆筛选,即每只小鼠仅尾静脉注射 1 个疟原虫,经多次尝试却始终无法得到 *PbSey1* 缺失的单克隆虫株。据此,推测 *PbSey1* 与其他物种中的同源蛋白有所不同,可能在疟原虫血液阶段的生长发育过程中发挥着至关重要的作用,以至于 *PbSey1* 敲除虫株无法单独存活,其在疟原虫致病性方面的具体作用机制还有待于结合其它分子工具进一步深入研究。

综上所述,内质网膜塑形蛋白 SEY1 及其同源蛋白在细胞内有着不可或缺的作用,笔者推测在疟原虫体内更是如此。本研究成功构建了 *PbSey1* 敲除-回复重组质粒 pL0034- $\Delta PbSey1$,建立了稳定的疟原虫转染平台,为后续深入研究 SEY1 蛋白在疟原虫中的具体功能提供了有利工具。

参考文献:

[1] Caraballo H, King K. Emergency department management of mosquito-

- borne illness: malaria, dengue, and west nile virus[J]. *Emerg Med Pract*, 2014,16(5):1
- [2] Karnad D R, Nor M B M, Richards G A, et al. Intensive care in severe malaria: Report from the task force on tropical diseases by the world federation of societies of intensive and critical care medicine[J]. *J Crit Care*, 2018,43:356
- [3] Huang F, Tang L, Yang H, et al. Molecular epidemiology of drug resistance markers of *Plasmodium falciparum* in Yunnan Province, China[J]. *Malar J*, 2012,11:243
- [4] Baruch D I, Pasloske B L, Singh H B, et al. Cloning the *P. falciparum* gene encoding PfEMP1, a malarial variant antigen and adherence receptor on the surface of parasitized human erythrocytes[J]. *Cell*, 1995,82(1):77
- [5] Ingmundson A, Alano P, Matuschewski K, et al. Feeling at home from arrival to departure: protein export and host cell remodelling during *Plasmodium* liver stage and gametocyte maturation[J]. *Cell Microbiol*, 2014,16(3):324
- [6] Rijpma S R, van der Velden M, Gonzalez-Pons M, et al. Multidrug ATP-binding cassette transporters are essential for hepatic development of *Plasmodium* sporozoites[J]. *Cellular microbiology*, 2016, 18(3):369
- [7] Storm J, Craig A G. Pathogenesis of cerebral malaria-inflammation and cytoadherence[J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2014,4:100
- [8] Baumann O, Walz B. Endoplasmic reticulum of animal cells and its organization into structural and functional domains[J]. *Int Rev Cytol*, 2001,205:149
- [9] Anwar K, Klemm R W, Condon A, et al. The dynamin-like GTPase Sey1p mediates homotypic ER fusion in *S. cerevisiae*[J]. *J Cell Biol*, 2012,197(2):209
- [10] Hu J, Shibata Y, Zhu P P, et al. A class of dynamin-like GTPases involved in the generation of the tubular ER network[J]. *Cell*, 2009,138(3):549
- [11] Shibata Y, Hu J, Kozlov M M, et al. Mechanisms shaping the membranes of cellular organelles[J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2009,25:329
- [12] van Dooren G G, Marti M, Tonkin C J, et al. Development of the endoplasmic reticulum, mitochondrion and apicoplast during the asexual life cycle of *Plasmodium falciparum*[J]. *Mol Microbiol*, 2005, 57(2):405
- [13] Salinas S, Proukakis C, Crosby A, et al. Hereditary spastic paraplegia: clinical features and pathogenetic mechanisms[J]. *Lancet Neurol*, 2008,7(12):1127
- [14] Stefano G, Renna L, Lai Y, et al. ER network homeostasis is critical for plant endosome streaming and endocytosis[J]. *Cell Discov*, 2015, 1:15033
- [15] Yan L, Sun S, Wang W, et al. Structures of the yeast dynamin-like GTPase Sey1p provide insight into homotypic ER fusion[J]. *J Cell Biol*, 2015,210(6):961
- [16] Yamada -Okabe T, Yamada -Okabe H. Characterization of the CaNAG3, CaNAG4, and CaNAG6 genes of the pathogenic fungus *Candida albicans*: possible involvement of these genes in the susceptibilities of cytotoxic agents[J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2002, 212(1):15
- [17] Braks J A, Franke -Fayard B, Kroeze H, et al. Development and application of a positive-negative selectable marker system for use in reverse genetics in *Plasmodium*[J]. *Nucleic Acids Res*, 2006,34(5):e39

(2018-10-25 收稿)

(上接第 323 页)

- [9] Tuma D J, Casey C A, Sorrell M F. Effects of ethanol on hepatic protein trafficking: impairment of receptor-mediated endocytosis[J]. *Alcohol Alcoholism*, 1990, 25(2/3):117
- [10] Lin Y L, Wang P Y, Hsieh L L, et al. Determination of linear aliphatic aldehydes in heavy metal containing waters by high-performance liquid chromatography using 2, 4-dinitrophenylhydrazine derivatization[J]. *J Chromatography A*, 2009, 1216(36): 6377
- [11] Barman B N. Accurate determination of aldehydes in amine catalysts or amines by 2, 4-dinitrophenylhydrazine derivatization[J]. *J Chromatography A*, 2014, 1327: 19
- [12] Uchiyama S, Inaba Y, Kunugita N. Derivatization of carbonyl compounds with 2,4-dinitrophenylhydrazine and their subsequent determination by high-performance liquid chromatography[J]. *J Chromatography B*, 2011, 879(17/18): 1282
- [13] Guan X, Rubin E, Anni H. An optimized method for the measurement of acetaldehyde by high-performance liquid chromatography[J]. *Alcohol Clin Exp Res*, 2012, 36(3): 398
- [14] de Lima L F, Brandão P F, Donegatti T A, et al. 4-Hydrazinobenzoic acid as a derivatizing agent for aldehyde analysis by HPLC-UV and CE-DAD[J]. *Talanta*, 2018, 187:113
- [15] Heit C, Eriksson P, Thompson D C, et al. Quantification of neural ethanol and acetaldehyde using headspace GC-MS[J]. *Alcohol Clin Exp Res*, 2016, 40(9): 1825
- [16] Uebelacker M, Lachenmeier D W. Quantitative determination of acetaldehyde in foods using automated digestion with simulated gastric fluid followed by headspace gas chromatography[J]. *J Autom Methods Manag Chem*, 2011, 2011:907317
- [17] Abualhasan M N, Zaid A N, Jaradat N, et al. GC method validation for the analysis of menthol in suppository pharmaceutical dosage form[J]. *Int J Anal Chem*, 2017, 2017: 1728414
- [18] Edwardson P A, Bhaskar G, Fairbrother J E. Method validation in pharmaceutical analysis[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 1990, 8(8):929

(2018-10-09 收稿)