DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.11.030
第25卷第11期 第三军医大学学报 Vol.25, No.11
1004 2003年6月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jun. 2003

论著

文章编号:1000-5404(2003)11-1004-05

人毛乳头细胞凝集性生长差异表达基因cDNA文库的构建

宋志强,郝 飞,杨希川,杨卫兵,程 波,麦 跃,叶庆俏 (第三军医大学附属西南医院皮肤科,重庆 400038)

提 要:目的 构建毛乳头细胞凝集性生长状态下差异表达基因的消减cDNA文库。方法 分别提取凝集性生长和非凝集性生长状态下毛乳头细胞中的总RNA,应用SMART cDNA合成技术和抑制性消减杂交技术分离毛乳头细胞凝集性生长状态下差异表达基因的cDNA片段并建立消减cDNA文库;利用PCR对随机挑选的100个白色菌落进行插入片段的验证,对其中证实有插入片段的30个克隆进行cDNA斑点杂交验证。结果 所构建的消减cDNA文库扩增后得到320个阳性克隆,随机挑选的100个阳性克隆中95%的均有长度在100~600 bp的插入片段,cDNA斑点杂交验证显示27个(90.0%)克隆为阳性。结论 结合SMART cDNA合成技术,应用抑制性消减杂交成功地构建了毛乳头细胞凝集性生长差异表达基因消减cDNA文库,为进一步筛选和克隆毛乳头细胞凝集性生长相关基因奠定了基础。

关键词:毛乳头细胞;抑制性消减杂交;文库
中图法分类号:R322.991;R342.3;R394.2 文献标识码:A

Construction and identification of a differentially expressed genes subtracted cDAN library of human dermal papillae cells with aggregative behavior

SONG Zhi-qiang, HAO Fei, YANG Xi-chuan, YANG Wei-bing, CHENG Bo, MAI Yue, YE Qing-yi (Department of Dermatology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To construct a differentially expressed genes subtracted cDNA library of dermal papillae cells(DPC) with aggregative behavior. Methods Total RNA was extracted from DPC with and without aggregative behavior and double-strand cDNA was synthesized by using SMART cDNA synthesis, respectively. The cDNA fragments of differentially expressed genes in dermal papillae cells with aggregative behavior were isolated by suppression subtractive hybridization and then directly inserted into T/A cloning vector to set up the subtracted library. Verification of the insert fragment was performed on 100 positive clones randomly screened by PCR method and among which 30 clones with insert fragments were verified by cDNA dot blot. Results The amplified library contained approximately 320 positive bacteria clones. Random analysis of 100 clones with nested PCR method showed that 95% clones contained 100~600 bp inserts. cDNA dot blot showed that 27 clones (90%) were positive. Conclusion A differentially expressed genes subtracted cDNA library of dermal papillae cells(DPC) with aggregative behavior is constructed by suppression subtractive hybridization combining with SMART cDNA synthesis. The library is a highly efficient one and lays sol
of DPC.

Key words: dermal papilla cell; suppression subtractive hybridization; library

研究表明,位于毛囊基底部的毛乳头在毛囊的生长发育、周期调控及维持毛发生长中起主导作用,而毛乳头细胞(Dermal papillae cell, DPC)的凝集性生长特性可能与其诱导/调控毛囊生长功能有紧密联系[1,2]。因此,了解毛乳头细胞凝集性生长相关基因对阐明凝集性生长的分子机制、毛乳头生物学功能乃至毛囊周期调控的机制无疑是重要的,也是首先必须阐明的。本研究采用抑制性消减杂交(Suppression subtractive hybridization, SSH)成功地构建了毛乳头细胞在凝集性生长状态下差异表达基因的cDNA文库,为进一步筛选和克隆阐明毛乳头细胞凝集性生长相关基因奠定了基础。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30200249);重庆市科委攻关重点课题(2001-8-4)
作者简介:宋志强(1972-),男,河南省上蔡县人,博士,主治医师,主要从事毛囊/毛乳头基因表达调控方面的研究,发表论文10篇。电话:(023)68754773-3
通信作者:郝 飞,E-mail:haofei@mail.tmmu.com.cn;电话:(023)68754416
收稿日期:2002-07-01;修回日期:2002-09-16

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

1　材料和方法

1.1　主要材料

1.1.1　标本来源　　用于体外毛乳头细胞培养的全层头皮来自 18~35 岁尸体标本(死后 6 h)。

1.1.2　主要试剂　　毛乳头分离所用的胶原酶 D(Collagenase D)、分离酶(Dispase)均为 Roche 公司产品, Superscript™ Ⅱ RNase H-逆转录试剂盒为 Gibco 公司产品; 长片段/热启动 Taq 酶混合物(Advantage® cDNA Polymerase Mix)、PCR-select™ cDNA Subtractioon 试剂盒为 Clontech 公司产品; pUCm T 载体购自上海生工生物技术公司; [α-^{32}P] dCTP 为北京亚辉生物工程公司产品; 培养基及新生小牛血清均为 Hyclone 产品。cDNA 合成引物共 3 条(参照 Clontech 公司 SMART™ PCR cDNA Synthesis Kit), 分别如下: P1 (*SMART* Ⅱ *Oligonucleotide*): 5′-AAGCAGTGGTAACAACGCAGAGTACGCGGG-3′; P2(cDNA Synthesis (CDS) Primer): 5′-AAGCAGTGGTAACAACGCAGAGTACT (30)N-1 N-3′(N= A, C, G, or T; N－1= A, G, or C); P3(PCR Primer): 5′-AAGCAGTGGTAACAACGCAGAGT-3′。由上海生工生物技术公司合成并纯化。

1.1.3　主要仪器　　Biofuge 22R 高速冷冻离心机(Heaeus); Gel Doc 2000 凝胶图像分析系统(Bio-Rad); DU® 640 紫外分光光度仪(Beckman); PTC-100 PCR 仪(MJ research); DYY-Ⅲ型核酸水平电泳仪(北京东方仪器厂); THZ-C 恒温振荡器(江苏太仓仪器厂)。

1.2　主要方法

1.2.1　毛乳头细胞的分离、培养　　分离适当大小全层头皮后, 立即采用已建立的二步酶消化法[3] 分离毛乳头, 简要步骤如下: 于净化台剔除头发、75% 乙醇擦 2 遍, 用 D-Hanks 冲洗 3 遍, 每遍后均换用新的无菌平皿; 剪去皮下筋膜层; 剪成 0.3~0.5 cm 宽、3~4 cm 长的皮条; 从真皮与皮下脂肪层交界处剪开; 脂肪层置于 0.5% 分离酶中, 37 ℃热消化 1 h, D-Hanks 漂洗 2 次, 将脂肪层剪成米粒大小, 以 0.2% 胶原酶 D 37 ℃消化 6 h, 2 000 r/min 离心 5 min; 弃上清, 管底沉淀移入含 DMEM 的平皿中清洗; 200~300 r/min 离心 3~4 次, 每次 2 min, 弃上清, 管底为毛乳头。加入适量完全培养基, 置 37 ℃含 5% 的 CO_2 培养箱, 每 3~5 天部分更换培养基。

1.2.2　细胞总 RNA 提取　　分别取凝集性和非凝集性生长状态的 DPC 约 1× 10^7 个, 采用异硫氰酸胍一步法[4] 分别提取总 RNA, 紫外分光光度仪检测提取结果, 以 A_{260}/A_{280}接近 2.0 为纯度满意, 同时进行甲醛变性琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性。

1.2.3　cDNA 第一、二链的合成　　分别以 P1、P2 为引物对总 RNA 进行逆转录, 反应体系为 10 μl, 每管含 RNA 1 μg、引物各 1 μl、50× dNTP 1 μl、M-MLV 逆转录酶 1 μl, 42 ℃空气浴 1 h, 反应产物 5 倍稀释后用于第二链 cDNA 合成。按下列条件建立反应体系: 稀释后的第一链 cDNA 反应液 10 μl、PCR 缓冲液 10 μl、Advantage cDNA Polymerase Mix 2 μl、P3 引物 2 μl、50× dNTP 2 μl、灭菌水 74 μl, 总反应体系 100 μl; 先经 95 ℃变性 1 min, 然后在 PCR 仪上按下列条件进行扩增, 95 ℃ 30 s, 65 ℃ 30 s, 68 ℃ 8 min, 反应 26 个循环。反应结束后取 5 μl 产物在 1.2% 琼脂糖凝胶进行电泳分析。

1.2.4　cDNA 的 *Rsa*Ⅰ 酶切　　将 43.5 μl 双链 cDNA 经 1.5 μl *Rsa*Ⅰ (Clontech)酶切 1.5 h 后, 用饱和酚∶氯仿∶异戊醇(25∶24∶1)和氯仿/异戊醇(24∶1)各抽提 1 次后, 经 80% 乙醇沉淀酶切产物, 并溶于 5.5 μl 灭菌水中。

1.2.5　抑制性消减杂交

1.2.5.1　接头连接及其效率分析　　以凝集性生长状态毛乳头细胞为实验组(Tester), 非凝集性生长状态毛乳头细胞为对照组(Driver)。Tester 双链 cDNA 在 T4 连接酶作用下, 分别与接头 1、2 R 在 16 ℃连接过夜。以连接接头的 Tester 为模板, 分别用 G3PDH 3′、5′端引物及 G3PDH 3′端引物和 PCR Primer1(接头的外侧序列)为引物进行 PCR 扩增。1.2% 琼脂糖凝胶电泳鉴定连接效率。

1.2.5.2　两轮消减杂交　　检测连接效率> 25% 后, 取连接有接头 1 和接头 2R 的实验组双链 cDNA 分别与 1.5 μl 对照组酶切后双链 cDNA 混合, 68 ℃杂交 8 h 后, 立即加入新鲜变性的对照组 cDNA 1 μl, 68 ℃杂交 16 h, 用 200 μl 稀释缓冲液稀释杂交产物。

1.2.5.3　两轮 PCR 扩增　　取 1 μl 稀释后杂交产物, 以接头 1 和接头 2R 的外侧序列为引物, 先经 94 ℃变性 25 s, 然后按 94 ℃ 10 s、66 ℃ 30 s、72 ℃ 1.5 min 进行第 1 轮 PCR 扩增, 30 个循环后, 取 3 μl 产物进行 10 倍稀释后用于第 2 轮 PCR 反应。以 Nested primer1、Nested primer2R 为引物, 反应条件同第 1 轮 PCR, 15 个循环后, 72 ℃延伸 10 min。取 5 μl 产物进行凝胶电泳分析。

1.2.6　cDNA 消减文库的构建、初步筛选和克隆

1.2.6.1　PCR 产物的 T/A 克隆及插入片段的验证　　取 2 μl 第 2 轮 PCR 产物与 2 μl 线性化的 pUAM18 质粒混合, 在 1 μl T4 连接酶作用下, 按摩尔比 1∶1 建立 10 μl 反应体系, 16 ℃连接过夜, －20 ℃保存。取 2 μl 连接反应产物与 50 μl 感受态大肠杆菌 TOP10F′ 混合, 经 42 ℃热休克 90 s 后, 加入 250 μl SOC 液、37 ℃、225 r/min 摇菌 1 h, 取 200 μl 菌液接种于含 100 μg/ml 氨苄青霉素 X-gal/IPTG 琼脂平板上, 37 ℃培养 18 h, 随机挑选直径大于 1 mm 的白色克隆, 点种于含 800 μl 100 μg/ml 氨苄青霉素 LB 培养基的 EP 管中, 37 ℃培养过夜。取 5 μl 菌液, 加水 15 μl, 98 ℃变性 10 min, 用 Nested PCR Primer 1 和 2R 为引物按第 2 轮 PCR 反应条件进行扩增, 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分析确认有插入片段后, 分别加入 200 μl 甘油, 分装成 2 管, －70 ℃保存。

1.2.6.2　插入片段的斑点杂交　　取菌落插入片段验证后的 PCR 产物 0.7 μl, 经 98 ℃变性 5 min, 点种于尼龙膜(Roche), 80 ℃固定 2 h 后置于 4 ℃备用。各取 1 μl 凝集组和非凝集组 cDNA 第 1 链, 用 1 μl [α-^{32}P] dCTP 随机引物标记纯化后备用。42 ℃预杂交 2 h、杂交 16 h 后, 洗膜(66 ℃, 0.1× SSC 15 min 3 次), －20 ℃放射自显影 36 h。

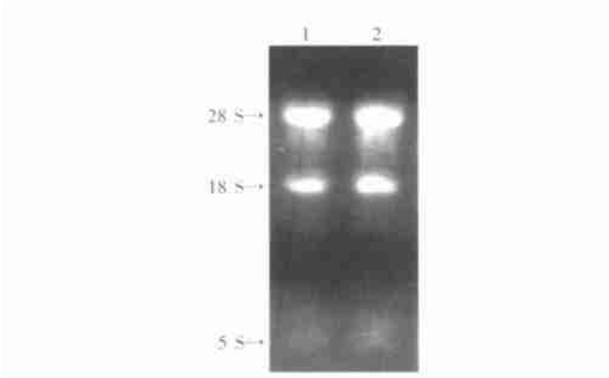
2　结果

2.1　总 RAN 的定性定量分析

提取总 RAN 后, 在紫外分光光度仪检测显示凝集组和非

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

凝集组 RNA A_{260}/A_{280}均大于 1.9，浓度分别为 357 μg/ml、292 μg/ml。1%琼脂糖甲醛变性凝胶电泳可见总 RNA 为明显的 28S(约 4.5 kb)和 18S(约 1.9 kb)条带，条带亮度比值为 2∶1，表明总 RNA 完整，见图 1。



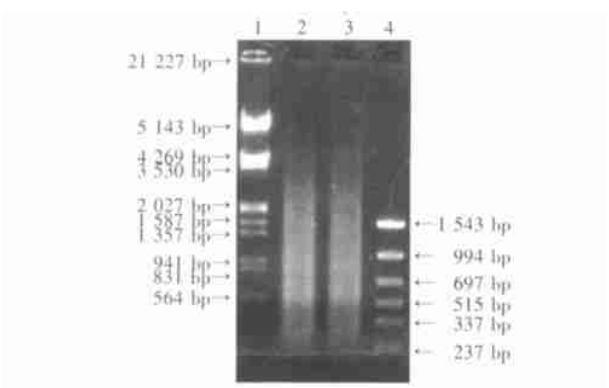
Lane 1: RNA from cultured dermal papilla cells with aggregative behavior; Lane 2: RNA from cultured dermal papilla cells without aggregative behavior

图 1 毛乳头细胞总 RNA 甲醛变性琼脂糖凝胶电泳

Fig 1 Formaldehyde agarose gel electrophoresis of total RNA

2.2 cDNA 合成及酶切

为得到最好的合成结果，我们按照说明书对PCR 循环参数进行了优化。结果显示，当循环次数达到 27 个循环后，PCR 反应达到平台期，也就是说，再增加循环次数并不能明显增加 PCR 产量，所以我们在正式实验中选择 26 个循环作 cDNA 第二链合成的最佳循环次数。合成的双链 cDNA 长度约在 0.2～5 kb，其中在 560 bp 有一较亮条带，可能代表着毛乳头细胞中表达较丰富的基因，见图 2。经 *Rsa* Ⅰ 酶切后，cDNA 长度明显缩短，条带前移，cDNA 酶切成功，见图 3。



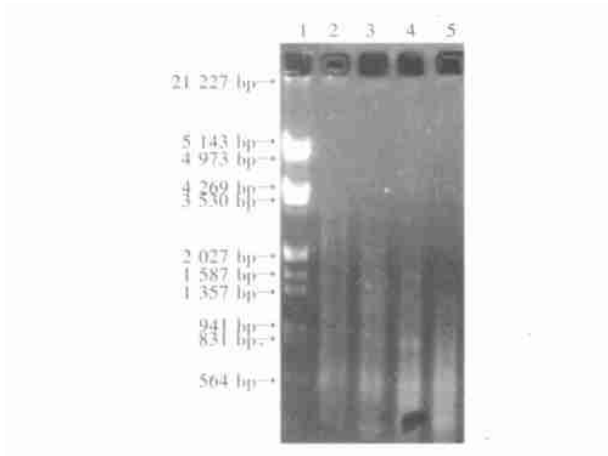
Lane 1: *Lambda* DNA/*Eco*RⅠ＋*Hind* Ⅲ; Lane 2: ds cDNA from DPC with aggregative behavior; Lane 3: ds cDNA from DPC without aggregative behavior; Lane 4: PCR Marker

图 2 合成的双链 cDNA 凝胶电泳分析

Fig 2 Electrophoretic analysis of synthesized ds cDNA

2.3 接头连接效率分析

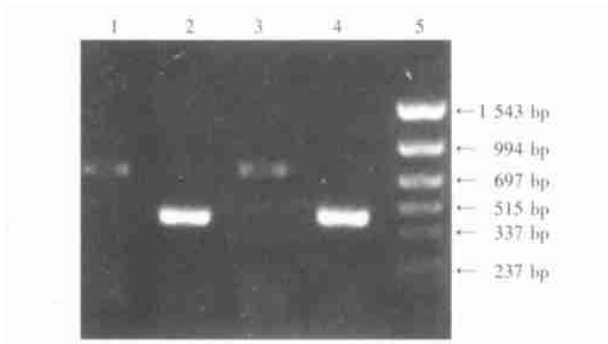
双链 cDNA 与接头的连接效率高低是决定抑制性消减杂交成败的关键步骤。接头连接后，通过扩增跨接头/G3PDH 基因的片段可验证接头的连接效率。通过 PCR 扩增 30 个循环后，用G3PDH 3′引物与 PCR Primer 1 引物扩增的产物条带亮度与 G3PDH 3′引物和 G3PDH 5′引物扩增的产物条带亮度经灰度值比较相差大于 25%，表明 25%的 cDNA 片段上连有接头，连接效率到达实验要求，见图 4。



Lane 1: *Lambda* DNA/*Eco*RⅠ＋*Hind* Ⅲ; Lane 2: ds cDNA from DPC with aggregative behavior before *Rsa* Ⅰ digestion; Lane 3: ds cDNA from DPC without aggregative behavior before *Rsa* Ⅰ digestion; Lane 4: ds cDNA from DPC with aggregative behavior after *Rsa* Ⅰ digestion; Lane 5: ds cDNA from DPC without aggregative behavior after *Rsa* Ⅰ digestion

图 3 ***Rsa*** Ⅰ 酶切效果分析

Fig 3 Analysis of *Rsa* Ⅰ digestion



Lane 1: PCR product using tester 1-1 as the template and the G3PDH 3′ primer and PCR primer 1; Lane 2: PCR product using tester 1-1 as the template and the G3PDH 3′ primer and 5′ primer; Lane 3: PCR product using tester 1-2 as the template and the G3PDH 3′ primer and PCR primer; Lane 4: PCR product using tester 1-2 as the template and the G3PDH 3′ primer and 5′ primer; Lane 5: PCR marker

图 4 连接效率分析

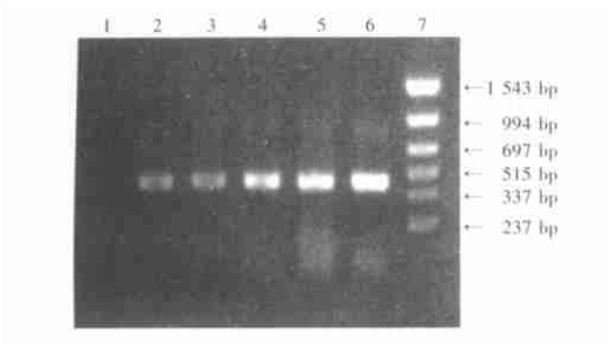
Fig 4 Analysis of the ligation efficiency

2.4 cDNA 消减杂交效率

两次抑制性消减后，有两个验证实验可观察消减效率：一是通过 PCR 扩增消减前后的看家基因 G3PDH，观察其量的改

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

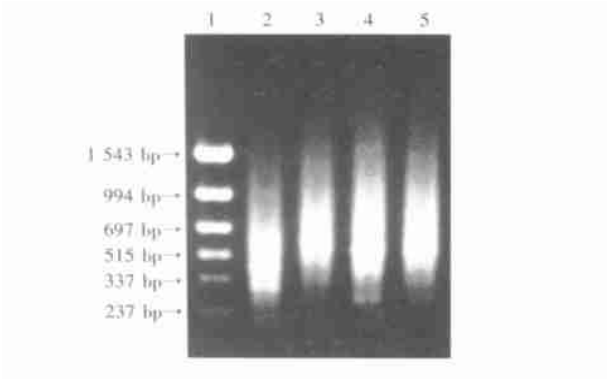
变, 二是观察第 2 次抑制性 PCR 扩增产物的异同也可初步了解消减效率。用 G3PDH 基因验证的结果表明, 见图 5, 以未进行消减杂交的第 2 次 PCR 产物为模板扩增 23 个循环即可观察到产物条带, 而以消减杂交后的第 2 次 PCR 产物为模板则需扩增 28 个循环方可观察到产物条带, 且条带亮度较弱, 说明通过抑制性消减杂交后, 凝集组和非凝集组毛乳头细胞中共同表达的基因在第 2 次 PCR 产物中已明显减少。从未进行消减杂交和消减杂交后的第 2 次 PCR 产物电泳, 见图 6, 可以看出, 两者的条带明显不同, 在消减杂交后第 2 次抑制 PCR 产物泳道的 0.1 ~1.5 kb 区域内可见未消减杂交第 2 次 PCR 扩增产物所没有的条带, 而且主要出现在正向消减后的 PCR 产物, 这些条带可能含有差异基因 cDNA 片段的扩增产物。说明通过消减杂交后差异表达基因得到有效扩增, 也进一步说明消减效果较好。



PCR was performed on subtracted (Lanes 1—3) or unsubtracted (Lanes 4—6) secondary PCR product with the G3PDH 3′ and 5′ primers; Lane 1, 4: 23 cycles; 2, 5: 28 cycles; 3, 6: 33 cycles; Lane 7: PCR Marker

图 5　G3PDH 消减效率分析

Fig 5　Analysis of G3PDH subtraction efficiency



Lane 1: PCR Marker; Lane 2: Secondary PCR products of forward subtracted tester cDNA; Lane 3: Secondary PCR products of forward unsubtracted tester cDNA; Lane 4: Secondary PCR products of reverse subtracted tester cDNA; Lane 5: Secondary PCR products of reverse unsubtracted tester cDNA Ⅱ

图 6　第 2 次抑制性 PCR 产物分析

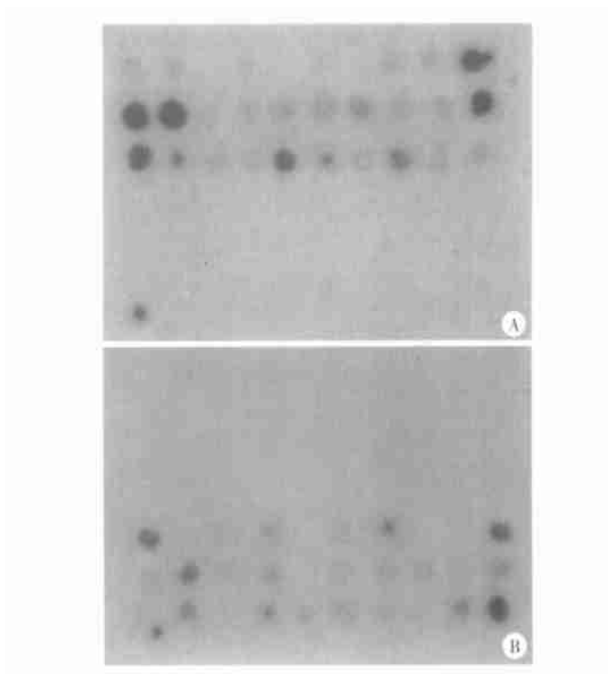
Fig 6　Analysis of the secondary PCR product

2.5　消减 cDNA 文库的构建和筛选结果

正向和反向消减杂交产物的第 2 次 PCR 产物与 pUCm-T 载体连接后, 转化 TOP10F′, 每 50 μl 菌液涂布的平皿上约有 100 个克隆菌落中生长, 80% 的菌斑为白色。质粒自连对照的两个平皿均未见白色菌落。表明转化效率较高。随机挑选正向和反向消减杂交文库保存菌液各 50 管, PCR 扩增检测插入效率和插入片段的长度, 凝胶电泳显示分别有 48 个正向和 47 反向克隆质粒有插入判断, 片段长度在 100~600 bp, 表明消减文库构建成功。

2.6　cDNA 斑点杂交结果

见图 7, 来自正向消减杂交文库的 30 个 cDNA 克隆有 27 个克隆与凝集组 cDNA 杂交时, 信号较强, 而与非凝集组 cDNA 杂交时, 无信号或信号明显变弱或无, 表明他们均可能为毛乳头细胞凝集性生长状态下表达上调基因的片段。来自反向消减 cDNA 文库的 30 个克隆中, 有 22 个克隆与凝集组 cDNA 杂交时, 无信号或信号弱, 但与非凝集组 cDNA 杂交时信号强, 表明他们可能是毛乳头细胞在凝集性生长状态下表达下调基因的片段。



A: Dot blots hybridized with cDNA probe made from aggregative growth; B: Dot blots hybridized with cDNA probe made from non-aggregation growth

图 7　cDNA 斑点杂交结果

Fig 7　Results of cDNA by dot blot

3　讨论

位于毛囊基底部的特殊间质成分——毛乳头在毛囊的生长发育、周期调控及维持毛发生长中起主导作用。毛乳头的功能障碍是导致毛囊周期失衡和脱发现象的主要起始因素。因此研究毛囊的生长发育、调控机制应不能脱离毛乳头细胞的功能状态, 这方面的研究已逐渐成为毛囊生长、发育及周期调控的热点[1,2]。

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

目前从对毛乳头细胞的研究中已发现一些活性蛋白及细胞因子对毛囊/毛乳头的生长有调节作用，但这些成分在毛囊/毛乳头生长调节中并不是关键因素，作用也缺乏特异性，而是在生理/病理发展过程中起辅助调节。虽然，不少研究者用毛乳头细胞移植动物体内诱导了毛囊形成，但以毛乳头移植来治疗脱发性疾病存在诸多问题，如细胞来源，移植的有效性、安全性等。了解毛乳头细胞在凝集性和非凝集性生长状态下基因表达的差异来筛选毛乳头/毛囊生长相关因子，对阐明凝集性生长的分子机制、诱导毛囊形成的决定因素以及发展有效的治疗脱发性疾病治疗策略无疑是重要的。

研究表明，细胞在发育、增殖、分化和疾病等不同状态中，可伴随不同的、具有特定功能基因的表达开放或关闭。通过分析不同状态下细胞或组织间基因表达的差异，可为揭示生命活动过程（生殖、发育、分化、疾病等）的规律提供重要信息，并能发现一些与致病或分化表达相关的基因（差异表达基因）[5]。

SSH是近年来发展起来的一种寻找差异表达基因的有效方法。该方法通过两轮消减杂交和两次抑制性PCR扩增使假阳性率明显减少（阳性率可达95%），尤其在克隆低丰度差异表达基因具有极大的优势，已成为克隆差异表达基因的重要方法[6~9]。近年来用SSH来克隆差异表达基因的报道逐渐增多。通常，进行SSH需要2 μg mRNA（约需200 μg总RNA来纯化），这对与来源有限的临床标本是非常困难的。SMART PCR cDNA合成技术可以可以从Poly A+ RNA或微量总RNA（0.025~1 μg Poly A+或0.05~1 μg总RNA）开始合成cDNA。它使用两条改进的Oligo（dT）引物来完成cDNA第1链的合成即逆转录过程，合成的cDNA可用于全长cDNA文库的构建、Virtual Northern验证、探针标记等实验。可以说，与常规合成cDNA的方法相比，SMART技术具有极大的优势，不仅省去了大量抽提RNA和纯化mRNA的繁琐工作，减少人力、物力的投入，一次合成的cDNA可反复无限扩增满足不同实验要求，而且可得到绝大部分mRNA尤其是长片段mRNA分子的序列，极大地扩大了抑制性消减杂交的应用范围，使利用微量标本，尤其是临床标本来进行抑制性消减杂交成为可能。

本研究应用SMART cDNA合成技术和抑制性消减杂交成功地构建了毛乳头细胞凝集性生长状态下差异表达基因cDNA文库，并随机挑取了30个上调表达克隆和30个下调表达克隆进行cDNA斑点杂交验证，发现分别有27个（90.0%）和22个（73.3%）为真阳性。对部分克隆的测序结果显示，载体序列和引物序列均与预期结果吻合，而且只有实验组cDNA才有连接接头，说明本实验筛选出的差异表达基因的特异性好。生物信息学分析发现，所得到序列多数是已知基因，而且这些基因在细胞的同源性聚集、细胞间连接、细胞内信号传导以及细胞生长和周期调控中起重要作用，这与我科前期的体外细胞水平的研究结果相吻合，进一步说明本课题构建的文库是成功的，为准确获得毛乳头细胞凝集性生长相关基因和拓展抑制性消减杂交的应用范围打下了一定基础。

参考文献：

[1] Stenn K S, Paus R. Controls of hair follicle cycling[J]. Physiol Rev, 2001, 81(1): 449-494.

[2] Matsuzaki T, Yoshizato K. Role of hair papilla cells on induction and regeneration processes of hair follicles[J]. Wound Repair Regen, 1998, 6(6): 524-528.

[3] 伍津津，刘荣卿，叶庆俏，等. 毛乳头细胞高效培养方法探索[J]. 中华皮肤科杂志，1997，30(5)：383-385.

[4] Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction[J]. Anal Biochem, 1987, 162(1): 156-159.

[5] Kozian D H, Kirschbaum B J. Comparative gene-expression analysis[J]. Tibtech, 1999, 17(2): 73-78.

[6] Stein O D, Thies W G, Hofmann M, *et al*. A high throughout screening for rarely transcribed differentially expressed genes[J]. Nucleic Acids Res, 1997, 25(13): 2598-2602.

[7] Diatchenko L, Lau Y F, Campbell A P, *et al*. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated of tissue-specific cDNA probes and libraries[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93(12): 6025-6030.

[8] Kuang W W, Thompson D A, Hoch R V, *et al*. Differential screening and suppression subtractive hybrization identified genes differentially expressed in an estrogen receptor-positive breast carcinoma cell line[J]. Nucleic Acids Res, 1998, 26(4): 1116-1123.

[9] Girard J P, Baekkevold E S, Yamanaka T, *et al*. Heterogeneity of endothelial cells[J]. Am J Pathol, 1999, 155(6): 2043-2055.

（编辑 冯崇英）

更 正

本刊2003年25卷第9期750页“CpG基元在细菌DNA诱导小白鼠THP-1释放细胞因子中的作用”一文文题应去掉“小白鼠”。

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