

[文章编号] 1007-385X(2008)03-0254-05

酵母双杂交技术筛查与 vasostatin 相互作用的蛋白质

赵 阳¹, 饶春明¹, 黄 鹤², 甘一如², 王军志^{1*} (1. 中国药品生物制品检定所, 北京 100050; 2. 天津大学化工学院, 天津 300072)

[摘 要] 目的: 通过酵母双杂交技术筛查与血管生长抑制因子 vasostatin 相互作用的蛋白质, 为进一步阐明其抑制血管生成作用的分子机制奠定基础。方法: 应用第 3 代酵母双杂交系统, 构建 vasostatin 诱饵质粒, 经过表达和自激活验证后筛选预转化的人内皮细胞 cDNA 文库。将在四缺培养基中筛选得到的阳性克隆提取酵母质粒转化大肠杆菌, 进行限制性酶切和测序, 寻找可能与 vasostatin 具有相互作用的蛋白序列。结果: 经过酵母双杂交共获得 21 个克隆, 经过验证, 有 3 个阳性克隆; 经过 NCBI 的 BLAST 进行同源性分析, 它们的核酸和蛋白序列与已知基因高度同源, 它们分别为层黏连蛋白 $\alpha 5$ (7 547 ~ 8 112) 和整合素 αV (1 257 ~ 1 820, 316 ~ 878) 片段, 均为重要的配体结合部位。Vasostatin 蛋白通过与该区域结合, 影响 FAK、VEGF 和 bFGF 等的信号通路, 抑制血管生成。结论: 酵母双杂交筛选获得的层黏连蛋白和整合素蛋白的 3 个蛋白片段, 它们与肿瘤内血管内皮细胞增殖和迁移等密切相关。

[关键词] 酵母双杂交; vasostatin; 基因功能**[中图分类号]** Q71; R730.2 **[文献标志码]** A

Yeast two-hybrid technique in screening for interacting proteins with vasostatin

ZHAO Yang¹, RAO Chun-ming¹, HUANG He², GAN Yi-ru², WANG Jun-zhi¹ (1. National Institute for Control of Pharmaceutical and Biological Products, Beijing 100050, China; 2. School of Chemical Engineering, Tianjin University, Tianjin 300072, China)

[Abstract] Objective: To screen for proteins interacting with angiogenesis inhibitor vasostatin by yeast-two hybrid technique, so as to further elucidate its molecular mechanism of inhibiting angiogenesis. **Methods:** The 3rd generation yeast-two-hybrid system was applied to construct a bait plasmid of vasostatin gene. After validation and self-activating, the bait plasmid was used to screen human endothelial cells cDNA library to be transformed. The yeast plasmids extracted from positive clones, which were obtained in SD/-Trp-Leu-Ade-His medium, were transformed into *E. coli*. By restriction digestion and sequencing, the potential proteins interacting with vasostatin were identified. **Results:** Twenty one clones were obtained with the system and 3 of them were positive; and their nucleic acid sequences and protein sequences were highly homologous to the known genes by BLAST homology analysis of NCBI: they were both important ligand-binding sites, including Laminin protein $\alpha 5$ (7 547-8 112) and Integrin αV (1 257-1 820, 316-878) fragments. By binding to these sites, vasostatin affected the signal pathway of FAK, VEGF and bFGF and subsequently inhibited angiogenesis.

Conclusion: The laminin protein and integrin obtained by the yeast two-hybrid system are closely related to the proliferation and migration of intratumoral vascular endothelial cells.

[Key words] yeast-two-hybrid; vasostatin; gene function

[Chin J Cancer Biother, 2008, 15(3): 254-258]

肿瘤是威胁人类健康的重大疾病之一, 传统的放、化疗法具有毒性作用大、易于产生耐药性等缺点, 临床效果并不理想。血管生成(angiogenesis) 是肿瘤生长、转移过程所必需的。因此, 抑制血管生成来阻断转化细胞的营养供应, 使肿瘤无法形成, 或饿死已形成的肿瘤细胞、阻止肿瘤的转移, 正成为癌症治疗中的一种新策略^[1-3]。1998 年, Pike 等人^[4] 从经 EB 病毒转化的 B 细胞系 VDS-O 的培养上清液

中分离出一种血管生长抑制因子 vasostatin, 经鉴定

[基金项目] 国家高技术研究发展计划(863) 资助项目(No. 2003AA2Z3480); 天津市自然科学基金资助项目(No. 06YFJMJC13200)。Supported by the National High Technology Research and Development Program of China(No. 2003AA2Z3480); Natural Science Foundation of Tianjin (No. 06YFJMJC13200)

[作者简介] 赵 阳(1976-) 男, 吉林省长春市人, 硕士, 助理研究员, 主要从事生物技术药物质量标准的研究。Email: zhyfy@tom.com

* Corresponding author. E-mail: wangjz@nicpbp.org.cn

证实为一种多功能蛋白质 calreticulin 的 N 端结构域片段。将 vasostatin 以 MBP 融合蛋白形式在大肠杆菌中表达并纯化, 体外活性实验证实对上皮细胞的增殖有剂量依赖性的抑制作用^[5]。Vasostatin 作为一种强效血管生成抑制剂, 有望克服放、化疗法的缺点, 为肿瘤治疗提供一条新的有效途径。目前对于 vasostatin 的研究甚少, 为了深入了解 vasostatin 的分子作用机制, 本实验利用酵母双杂交系统 (yeast two-hybrid system)^[6], 以融合 Gal4 DNA 结合区 (DNA binding domain, DBD) 的 vasostatin 为诱饵蛋白, 筛选了人内皮细胞 cDNA 文库, 寻找与 vasostatin 蛋白相互作用的蛋白质。

1 材料与方法

1.1 主要材料

人 vasostatin 基因由本室克隆鉴定保存, 大肠杆菌 DH5 α 为本室保存。预转化的人内皮细胞 cDNA 文库 (Y187), 由质粒 pACT2 表达 AD/cDNA 文库融合蛋白由中国科学院遗传学研究所惠赠。人内皮细胞 cDNA 文库 (Y187), 由质粒 pACT2 表达 AD/cDNA 文库融合蛋白由本室构建。酵母双杂交系统 3 包括的 GAL4 DNA 结合区克隆载体 pGBKT7DNA-BD、Gal4 转录激活区 (Gal4AD) 克隆载体 pGADT7AD、pGBKT7-53 对照质粒、pGADT7-T 对照质粒、pGBKT7-Lam 对照质粒、pCL1 对照质粒、酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) AH109 酵母株、Y187 酵母株均购自 BD 公司。限制性内切酶、T4 DNA 连接酶为美国 Promega 公司产品。Platinum Pfx DNA Polymerase 购自美国 invitrogen 公司, c-Myc 单克隆抗体, 酵母培养基 YDPA、SD/-Trp、SD/-Leu、SD/-Trp/-Leu、SD/-Trp/-Leu/-His、SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade 购自美国 BD 公司。大量质粒提取试剂盒购自美国 QIAGEN 公司, ABC 试剂盒购自美国 Vector 公司, 琼脂糖凝胶 DNA 提取试剂盒、PCR 产物回收试剂盒均购自美国 Promega 公司。

1.2 pGBKT7-vaso 表达载体的构建

用于克隆 vasostatin 的引物为: 上游引物 5'-CTCGAATTCATGGAGCCCGCCGTCTACTTCAA-3'; 下游引物 5'-GCCGATCCTTATTCGAAGGAGCCG-GACTCCA-3'。PCR 扩增人 vasostatin 基因, 将扩增产物用 *Eco*R I 和 *Bam*H I 消化, 琼脂糖凝胶电泳回收 vasostatin 基因片段。以同样的方法将 pGBKT7 质粒 (图 1) 酶切, 将酶切后的 vasostatin 基因连接到酶切后的 pGBKT7 线性载体上, 所得重组质粒命名为 pGBKT7-vaso。

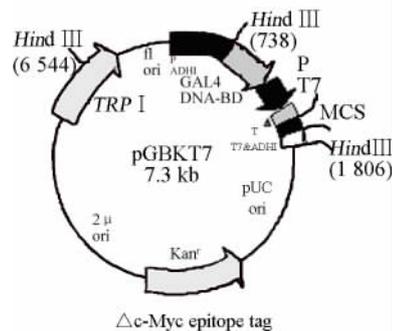


图 1 诱饵蛋白表达载体 pGBKT7 的结构示意图

Fig. 1 Diagram of bait protein expression vector pGBKT7

1.3 Western blotting 检测 vasostatin 融合蛋白在酵母细胞 AH109 中的表达

醋酸锂法将 pGBKT7-vaso 转入酵母细胞 AH109, 使用一抗 c-myc 抗体进行 Western blotting 分析, 鉴定 vasostatin 融合蛋白是否在酵母中表达: 上清液进行 15% SDS-PAGE, 将凝胶、PVDF 浸于 EBM 缓冲液中 30 min, 用半干胶转移仪 20 V 电压转移 60 min。取出 PVDF, 浸入 TTBS 缓冲液振荡封闭 60 min。更换 10 ml TTBS 缓冲液, 加入 c-myc 抗体, 室温振荡过夜。PVDF 膜用 TTBS 缓冲液浸洗 3 次, 更换 10 ml TTBS 缓冲液, 加入 HRP 酶联兔抗鼠抗体 50 μ l, 室温振荡 40 min。用 TTBS 缓冲液浸洗 3 次, 更换 10 ml TTBS 缓冲液, 加入适量 ABC 试剂盒的 A 液和 B 液, TTBS 缓冲液淋洗后加入适量底物缓冲液避光显色。为了排除表达的诱饵融合蛋白具有自身转录活性的可能, 将 pGBKT7-vaso 转入酵母宿主 AH109 中, 检测报告基因 β -半乳糖苷酶的表达, 同时作阳性对照。

1.4 文库的筛选

进行文库的酵母接合筛选。将转化有 pGBKT7-vaso 的 AH109 酵母菌涂在 SD/-Trp 平板上, 挑取单克隆菌落接种于 50 ml SD/-Trp, 30 $^{\circ}$ C、250 r/min 培养 16~24 h 直至 D_{600} 值大于 0.8。重悬于 5 ml 培养液中, 室温水浴融化 1 ml cDNA 酵母文库。共同转入三角瓶中, 加入 2 \times YDPA/Kan 至终体积 50 ml, 于 30 $^{\circ}$ C、30~50 r/min 培养过夜, 铺 SD/-Trp/-Leu/-His 平板, 30 $^{\circ}$ C 温育 3 d。将在三缺培养基上长出的阳性克隆接种到 SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade 四缺培养基上, 30 $^{\circ}$ C 倒置培养, 挑单克隆作 β -糖苷酶显色反应, 变蓝者即为阳性克隆。挑阳性克隆菌落培养并提取阳性酵母质粒, 转化大肠杆菌涂板, 提取相应的质粒酶切鉴定后测序。

1.5 序列比较分析

序列结果通过美国国立生物信息中心(NCBI)的 BLAST(basic local alignment search tool)进行同源性分析,对比数据库包括 NCBI 的 EST 库和 NR 库,检索主要采用的工具为 BLASTN。

2 结果

2.1 诱饵蛋白质粒的成功构建及表达

pGBKT7-vaso 经酶切鉴定(图 2)及 DNA 测序,表明 vasostatin 基因正确插入到 pGBKT7 载体中(与 Gal4DNA 结合区具有相同的阅读框架)。pGBKT7-vaso 转化到酵母 AH109 后能够稳定表达相应的融合蛋白,而对对照则没有相应的表达产物(图 3)。

2.2 内皮抑制素自身转录激活活性鉴定

转化了质粒 pGBKT7-vaso 的 AH109 在二缺和三缺平板上不能生长。从 SD/-Trp 平板上挑选生长良好的菌落作 β -半乳糖苷酶分析,菌落在 8 h 后不变蓝(图 4),提示构建的 vasostatin 诱饵蛋白没有自身转录激活活性。

2.3 阳性克隆的筛选结果

cDNA 文库的筛选和阳性克隆的鉴定,30 °C 培养 8 d 后,挑选三缺培养基上的菌落转入四缺培养板,并作 β -半乳糖苷酶显色分析,获得 21 个阳性克隆(图 5)。全部挑选,提取酵母质粒转化大肠杆菌。提取质粒进行测序,最后对测序结果进行生物信息学分析,获得感兴趣的 3 个阳性克隆。

2.4 序列比较分析结果

同源性比较分析表明,核酸和蛋白序列与已知基因高度同源,3 个蛋白片段的具体结果为:层黏连蛋白 $\alpha 5$ (laminin $\alpha 5$)为 7 547 ~ 8 112;整合素 αV (integrin αV)为 1 257 ~ 1 820;整合素 αV (integrin αV)为 316 ~ 878。

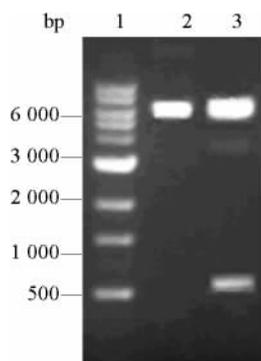


图 2 pGBKT7-vaso 表达载体酶切鉴定结果

Fig.2 Enzyme analysis of pGBKT7-vaso expression vector
1: DNA Marker; 2: pGBKT7 vector digested by EcoRI and BamHI ;
3: pGBKT7-vaso vector digested by EcoRI and BamHI

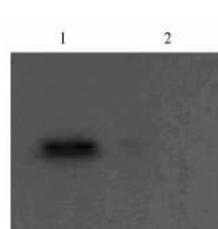


图 3 Western blotting 鉴定 vasostatin 在酵母细胞 AH109 中的表达

Fig.3 Western blotting identification of vasostatin in *Saccharomyces cerevisiae* cell AH109

1: Expression of pGBKT7-vaso in *Saccharomyces cerevisiae* cell AH109; 2: Negative control

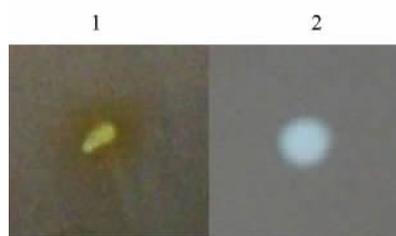


图 4 Vasostatin 自激活活性鉴定

Fig.4 Self-activation identification of vasostatin

1: Positive control; 2: AH109 transfected with pGBKT7

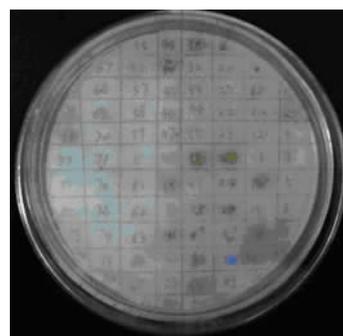


图 5 阳性克隆在四缺培养基上的 β -半乳糖苷酶的显色分析

Fig.5 β -galactosidase's colorimetric detection of positive clones in SD/-Trp-Leu-Ade-His medium

3 讨论

已知 vasostatin 可由血管内皮细胞表达,所以本研究选用人内皮细胞文库进行筛选,以期尽可能多地获得与 vasostatin 相互作用的蛋白信息。vasostatin 被发现后,由于其能抑制肿瘤的形成、转移,使已形成的肿瘤缩小,活性稳定,且反复应用无耐药性和毒性的产生,引起众多学者的关注。此外与 angiostatin 和 endostatin 相比,vasostatin 在小鼠上的作用要强 4 ~ 10 倍,但 vasostatin 的真正作用机制目前还不清楚^[4,8-10]。为进一步研究 vasostatin 的功

能,发现和验证在生物体中相互作用的蛋白质是认识它们生物学功能的第一步。

本课题利用目前使用较多的酵母双杂交的方法^[6],克隆与 vasostatin 相互作用的蛋白基因。酵母双杂交技术是在真核细胞内从基因水平分析蛋白与蛋白之间相互作用的一种灵敏的分子生物学方法。此系统的特点是通过基因水平上的操作而获得蛋白间相互作用的结果,融合蛋白之间的作用是在真核酵母的细胞内进行,蛋白质有可能保持天然的折叠状态,类似其在生理状态下的情况,因此所证实的蛋白质间相互作用将更接近体内的真实水平。另外,用双杂交系统筛选 cDNA 文库时,可以简捷地得到编码相互作用蛋白的基因序列,只需进行载体构建而不必准备抗体或纯化蛋白,省略了蛋白抽提纯化等步骤。本研究所采用的双杂交系统是 BD 公司的第 3 代酵母双杂交系统,与第一代双杂交技术相比,它是利用酵母 a 型与 α 型单倍体细胞相互接合的原理,使得诱饵蛋白与文库质粒蛋白在二倍体细胞内直接相互作用,避免了共转染诱饵质粒和文库质粒所带来的低效率问题;同时,由于使用了 3 个报告基因筛选相互作用蛋白,使得系统效率大大提高。

通过对人内皮细胞 cDNA 文库的筛选,本实验共得到 3 个阳性克隆。酵母双杂交调出的层黏连蛋白基因编码的多肽序列富含精氨酸、甘氨酸和天冬氨酸,结构分析提示这段序列可能与 vasostatin 蛋白的结合相关。酵母双杂交调出的整合素 αV 编码的片段则富含甘氨酸、精氨酸,这段多肽含有 Dx-Dx-DGxxD 序列和类似的氨基酸序列,与 vasostatin 蛋白的结合区域是 repeat 14 cysteine-rich tandem repeats 和 VWFA-like domain,这些区域与整合素分子结合二价阳离子有关,并与 β 亚单位共同构成整合素分子的配体结合部位,可能与 vasostatin 蛋白结合相关。

本研究表明 vasostatin 蛋白与整合素与层黏连蛋白家族相互作用,而这些蛋白与细胞迁移等密切相关^[11-14],提示有可能与 vasostatin 蛋白的作用机制有关。整合素家族是一类黏附分子,表达于内皮细胞,在肿瘤的血管生成过程中起着极为重要的作用。许多细胞因子促进肿瘤的血管生成是通过整合素的介导作用实现的,先引起整合素表达的变化,进一步引起内皮细胞的增殖、迁移。整合素介导的与细胞外基质黏附在调节细胞的存活、增殖和运动中起重要作用^[15-19]。 $\alpha V\beta 3$ 整合素参与 bFGF 诱导的血管生成。 $\alpha V\beta 5$ 整合素参与 VEGF 的通路。Vasostatin 蛋白与整合素和层黏连蛋白结合,影响了 FAK、

VEGF 和 bFGF 等的信号通路,从而影响肿瘤内血管的生成,进而抑制肿瘤生长。Yao 等^[20]发现, Vasostatin 蛋白与内皮细胞表达细胞外基质蛋白层黏连蛋白 $\alpha 5\gamma 1$ 链可特异地结合,从而阻止内皮细胞与层黏连蛋白结合,并通过这种机制减缓内皮细胞的生长,但未能阐明 vasostatin 蛋白与层黏连蛋白相互作用的结合位点和机制,vasostatin 蛋白与整合素家族的相互作用及结合位点目前国内外文献中均未见相关报道。本课题通过酵母双杂交实验得到的阳性克隆编码区提示可能作为 vasostatin 蛋白的结合位点,从而在蛋白质相互作用的分子结构层面上进一步提示了该类血管生成抑制剂的药效分子结构方面机制,为深入进行 vasostatin 蛋白相关药物结构和药效分析研究奠定了良好的基础。

[参 考 文 献]

- [1] Pandya NM, Dhalla NS, Santan DD, *et al.* Santani angiogenesis—a new target for future therapy[J]. *Vascul Pharmacol*, 2006, 44(5): 265-274.
- [2] Folkman J, Brauwald E. Harrison's textbook of internal medicine [M]. 15th. New York: McGraw Hill, 2001: 517-530.
- [3] Hanahan D, Folkman J. The hallmarks of cancer[J]. *Cell*, 2000, 100(1): 57-70.
- [4] Pike SE, Yao L, Jones KD, *et al.* Vasostatin, a calreticulin fragment, inhibits angiogenesis and suppresses tumor growth[J]. *Exp Med*, 1998, 188(12): 2349-2356.
- [5] Coppolino MG, Woodside MJ, Demareux N, *et al.* Calreticulin is essential for integrin-mediated calcium signaling and cell adhesion[J]. *Nature*, 1997, 386(6627): 843-847.
- [6] Hong S, Choi G, Park S, *et al.* Type D retrovirus Gag polyprotein interacts with the cytosolic chaperonin[J]. *J Virol*, 2001, 75(6): 2526-2534.
- [7] Lange Asschenfeldt B, Velasco P, Streit M. The angiogenesis inhibitor vasostatin dose not impair wound healing at tumor inhibiting doses[J]. *J Invest Dermatol*, 2001, 117(5): 1036-1041.
- [8] Yao L, Pike SE, Setsuda J, *et al.* Effective targeting of tumor vasculature by the angiogenesis inhibitors vasostatin and interleukin12[J]. *Blood*, 2000, 96(5): 1900-1905.
- [9] Pike SE, Yao L, Setsuda J, *et al.* Calreticulin and calreticulin fragments are endothelial cell inhibitors that suppress tumor growth[J]. *Blood*, 1999, 94(7): 2461-2468.
- [10] Max R, Gerritsen RR, Noolij PT, *et al.* Immunohistochemical analysis of integrin $\alpha V\beta 3$ expression on tumor associated vessels of human carcinomas[J]. *Int J Cancer*, 1997, 71(3): 320-324.
- [11] Authur M, Mercurio, Lanket, *et al.* Integrin lajninin receptors and breast carcinoma progression[J]. *J Mamary Gland Biol Neoplasia*, 2001, 6: 299-309.
- [12] Tanaka M, Narumi K, Isemura M, *et al.* Expression of the 37-kDa laminin binding protein in murine lung tumor cell correlates with tumor angiogenesis[J]. *Cancer Lett*, 2000, 153(1-2): 161-168.

[13] Givant - Horwitz V, Davidson B, Reich R, *et al.* Laminin-induced signaling in tuamr cells:the role of the M(r)67 000 laminini receptor[J]. *Cancer Res*, 2004, 64 (10): 3572-3579.

[14] Chu YQ, Ye ZY, Tao HQ,*et al.* Relationship between cell adhesion molecules expression and the biological behavior of gastric carcinoma[J]. *World J Gastroenterol*, 2008, 14(13): 1990-1996.

[15] Serini G, Napione L, Bussolino F,*et al.* Integrins team up with tyrosine kinase receptors and plexins to control angiogenesis[J]. *Curr Opin Hematol*, 2008, 15(3): 235-242.

[16] Maubant S, Saint-Dizier D, Boutillon M,*et al.* Blockade of alpha v beta3 and alpha v beta5 integrins by RGD mimetics induces anoikis and not integrin- mediated death in human endothelial cells [J]. *Blood*, 2006, 108(9): 3035- 3044.

[17] Dijkgraaf I, Kruijtz JA, Frielink C, *et al.* Synthesis and biological evaluation of potent alpha v beta3-integrin receptor antagonists [J]. *Nucl Med Biol*, 2006, 33(8): 953-961.

[18] Cai W, Chen X. Anti-angiogenic cancer therapy based on integrin alpha v beta3 antagonism[J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2006, 6(5): 407-428.

[19] Serini G, Valdembri D, Bussolino F, *et al.* Integrins and angiogenesis: a sticky business[J]. *Exp Cell Res*. 2006,312 (5): 651-658.

[20] Yao L, Pike SE, Tosato G. Laminin binding to the calreticulin fragment vasostatin regulates endothelial cell function[J]. *J Leukoc Biol*, 2002, 71(1): 47-53

[收稿日期] 2008 -02 -21 [修回日期] 2008 -04 -15

[本文编辑] 王 莹

• 科技动态 •

Neuropilin-2 与肿瘤转移的相关研究

肿瘤转移是导致肿瘤患者死亡的重要原因,对于肿瘤转移的机制以及如何预防和抑制肿瘤的转移一直是肿瘤研究的重点和热点。目前研究认为,肿瘤相关淋巴管的形成能够促进肿瘤的转移扩散,所以现在有很多研究聚焦于如何抑制肿瘤环境淋巴管的形成。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor,VEGF)家族成员之一的 VEGF-C 是目前比较清楚的促进淋巴管形成的因子之一。VEGF-C 的受体有两类:VEGFR 和 neuropilin-2(Nrp2)。Caunt M 和他的同事们认为 Nrp2 对于肿瘤条件下淋巴管的形成具有非常重要的作用。Nrp2 在发现之初是在神经系统中起作用的,后来发现它与血管形成和淋巴管形成有密切关系;由于 Nrp2 胞内段较短,所以目前认为 Nrp2 是通过增强 VEGF-C 与 VEGFR 的结合而发挥效应的。

为了研究 Nrp2 在肿瘤转移中的作用以及作用机制,作者成功制备了 Nrp2 的功能抑制性抗体 Anti-Nrp2^B。用这个抗体进行体外研究表明,Nrp2 在淋巴管内皮细胞的迁移方面起着非常重要的作用,而且 Nrp2 发挥作用并不只是通过增强 VEGF-C 与 VEGFR 之间的相互作用而实现的,肯定还存在目前还不清楚的其他方式。利用成年小鼠用 Nrp2 抑制性抗体做体内实验,结果表明该抗体能够明显抑制肿瘤相关淋巴管的形成。进一步通过两个肿瘤(66c14 和 C6 肿瘤模型)的肺脏转移的模型进行研究,发现注射 Anti-Nrp2^B 能够抑制肿瘤向局部淋巴结和远处脏器转移,这个作用可能是通过延迟肿瘤细胞从原位进入引流淋巴结的速度而实现的。

本文作者通过制备 Nrp2 的功能抑制性抗体,从体内和体外实验两方面证明 Nrp2 在肿瘤转移方面的重要作用,从而为肿瘤转移提出了新的机制,并为肿瘤治疗提供了新的线索。

[陈朱波 摘译,韩岩梅 审阅. Caunt M,Mak J,Liang WC,*et al.* *Cancer Cell*,2008,13(4):331-342]

• 读者 • 作者 • 编者 •

文稿中统计学符号规范化书写的要求

本刊严格遵守国家标准 GB 3358 -93《统计学术语》的有关规定。为此,请作者书写统计学符号时注意以下要求:(1)样本的算术平均数用英文小写 \bar{x} ,不用大写 X,也不用 Mean 或 M;(2)标准差用英文小写 s ,不用 SD;(3)标准误用英文小写 s_x ,不用 SE;(4)t 检验用英文小写 t ;(5)F 检验用英文大写 F ;(6)卡方检验用希腊小写 χ^2 ;(7)相关系数用英文小写 r ;(8)自由度用希腊小写 ν ;(9)样本数用英文小写 n ;(10)概率用英文大写 P ;(11)以上符号 \bar{x} 、 s 、 s_x 、 t 、 F 、 χ^2 、 r 、 ν 、 n 、 P 均为斜体。请作者注意遵照执行。

(本刊编辑部)