

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2010.01.015

· 基础研究 ·

新基因 *NBEAL1* 的克隆、表达、纯化及其与胶质瘤病理分级的相关性

鲍晨晨¹, 杨浩¹, 李娜¹, 刘彬¹, 宋华¹, 盛平², 胡国汉^{2*}, 崔大祥¹(1. 上海交通大学微纳科学技术研究院生物纳米工程研究室 微纳制造技术国家重点实验室 薄膜与微细技术教育部重点实验室, 上海 200240; 2. 第二军医大学附属长征医院 脑外科, 上海 200003)

[摘要] 目的: 构建新基因 neurobeachin like 1 (*NBEAL1*) 的表达载体, 研究 *NBEAL1* 的表达与胶质瘤病理分级的相关性。方法: 提取人脑胶质瘤细胞 U251 的总 RNA, 构建 pGEX-KG/*NBEAL1* 表达载体, 转化大肠杆菌 BL21, IPTG 诱导 *NBEAL1* 重组蛋白的表达, GST 亲和纯化, Western blotting 鉴定重组蛋白的纯度; 以免疫组化法用纯化蛋白制备的单克隆抗体分析 *NBEAL1* 表达与胶质瘤病理分级的相关性。结果: *NBEAL1* 基因片段被成功地克隆入 pGEX-KG 表达载体, 测序证实克隆片段序列正确。 *NBEAL1* 融合蛋白在大肠杆菌 BL21 包涵体中表达, 表达量占菌体总蛋白的 30% 以上, 纯化的重组蛋白纯度 95% 以上。 Western blotting 证明所纯化的蛋白含有 GST 标签与 *NBEAL1* 肽段。免疫组化法检测显示 *NBEAL1* 蛋白的表达在正常脑组织中较低, 而在低级别的脑胶质瘤组织中表达明显上调, 但随着恶性程度增加 *NBEAL1* 的表达程度降低, 两者呈负相关。结论: 成功地克隆、表达及纯化 *NBEAL1* 蛋白, *NBEAL1* 蛋白在人脑胶质瘤组织中的表达与其恶性程度呈负相关。

[关键词] neurobeachin like 1 (*NBEAL1*); 基因克隆; 基因表达; 脑胶质瘤

[中图分类号] R739.41; R730.2 [文献标志码] A [文章编号] 1007-385X(2010)01-0077-05

Cloning, expression and purification of novel gene *NBEAL1* and its relationship with pathological grades of glioma

BAO Chen-chen¹, YANG Hao¹, LI Na¹, LIU Bin¹, SONG Hua¹, SHENG Ping², HU Guo-han², CUI Da-xiang¹(1. Department of Bio-Nano Science and Engineering, National Key Laboratory of Nano/Micro Fabrication Technology, Key Laboratory for Thin Film and Microfabrication of Ministry of Education, Institute of Micro-Nano Science and Technology, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200240, China; 2. Department of Neurosurgery, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China)

[Abstract] **Objective:** To construct the expression plasmid of a novel gene human *NBEAL1* (neurobeachin like 1), and to study its relationship with the pathological grades of glioma. **Methods:** Total RNA of human glioma cell line U251 was extracted. *NBEAL1* expression plasmid pGEX-KG/*NBEAL1* was constructed and transferred into *E. coli* BL21. Recombinant *NBEAL1* protein was induced by IPTG and further purified by GST affinity chromatographic column. The purity of recombinant *NBEAL1* protein was examined by Western blotting analysis. A *NBEAL1* protein specific monoclonal antibody was prepared and was used to study the relationship of *NBEAL1* expression with pathological grades of glioma. **Results:** The *NBEAL1* gene fragment was successfully cloned into pGEX-KG expression plasmid and verified by DNA sequencing. The recombinant *NBEAL1* protein was expressed in inclusion bodies, with a yield of more than 30% of total bacterial proteins; the purity of purified *NBEAL1* protein was above 95%. Western blotting analysis confirmed that the purified protein containing GST tag and *NBEAL1* protein. *NBEAL1* protein was lowly expressed in normal brain tissues and highly expressed in low grade glioma tissues; and the expression of *NBEAL1* decreased with the increase of glioma malig-

[基金项目] 国家高技术研究发展(863)计划资助项目(No. 2005AA001070);国家自然科学基金资助项目(No. 30672147);国家重点基础研究发展(973)计划资助项目(No. 2010CB933900)。Project supported by the National High Technology Research and Development Program (863) of China (No. 2005AA001070), and the National Natural Science Foundation of China (No. 30672147), and the Major State Basic Research Development Program (973) of China (No. 2010CB933900)

[作者简介] 鲍晨晨(1984-),女,安徽合肥人,硕士研究生,主要从事生物化学与分子生物学方向的研究

[通信作者] 崔大祥(CUI Da-xiang, corresponding author), E-mail: dx cui@sjtu.edu.cn; 胡国汉(HU Guo-han, Corresponding author),

E-mail: guo han hu@163.com.* 为共同通信作者

nancy. **Conclusion:** The NBEAL1 protein has been successfully cloned, expressed and purified. NBEAL1 protein expression in glioma tissues is negatively associated with the pathological grades of glioma.

[**Key words**] neurobeachin like 1 (NBEAL1); gene clone; gene expression; glioma

[Chin J Cancer Biother, 2010, 17(1): 77-81]

人脑胶质瘤是颅内最常见的肿瘤,占颅内肿瘤的44.69%,具有生存期短和病死率高的特点,是颅内肿瘤中致死位列第一的肿瘤,严重危害人类的健康^[1,4]。围绕脑胶质瘤的治疗问题,存在有2大难题:(1)恶性程度高,生长快,病程短;(2)侵袭性强,手术、放疗、化疗或其组合的综合措施均不能根治恶性脑胶质瘤,其总体治疗效果差^[2]。所以,寻求胶质瘤早期标志物并建立胶质瘤早期诊断技术,已成为神经外科的前沿热点课题^[5]。

目前对脑胶质瘤的发病机制还不十分清楚。多年来许多研究结果证实,生物治疗(包括基因治疗)是最有希望根治脑胶质瘤的方法之一^[6-7],但因缺乏特异性靶基因和高效载体系统而停滞不前。因此,寻找和发现特异性更强、灵敏度更高的基因治疗靶点具有重要意义。本研究选择前期cDNA芯片筛选出的在胶质瘤中呈明显上调表达的新基因NBEAL1(neurobeachin like 1)^[8],对其进行原核克隆、表达和纯化,并制备单克隆抗体以探讨新基因NBEAL1在脑胶质瘤发生、发展中的作用和分子机制,为脑胶质瘤临床诊治和判断预后提供新的靶点。

1 材料与方法

1.1 主要实验材料

人脑胶质瘤U251细胞来自中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所。新生牛血清购自Gibco公司,DMEM高糖培养基购自Hyclone公司,大肠杆菌BL21(DE3)和胶回收试剂盒购自北京天根生物有限公司。载体pGEX-KG由美国Purdue大学KunLiang Guan博士惠赠。引物购自Invitrogen公司,限制性内切酶购自Fermentas公司,Taq酶购自TaKaRa公司,T4连接酶购自NEB公司。GST蛋白亲和纯化柱购自GE Healthcare公司。抗GST蛋白一抗(兔源)、过氧化物标记的二抗(羊抗兔、羊抗鼠)购自Proteintech公司,总RNA提取试剂盒、反转录试剂盒、ECL发光试剂盒购自Roche公司。

1.2 病例资料和病理标本

46例人脑胶质瘤组织标本自第二军医大学附属长征医院神经外科手术中获得,另选10例其他手术中切除的正常脑组织标本作为正常对照。新鲜标

本取出后采用石蜡切片,H-E染色。经2007版WHO标准进行病理组织学诊断为WHO I级3例、II级15例、III级15例、IV级13例^[9]。

1.3 U251细胞培养及其总RNA的提取

将U251细胞培养于含20%新生牛血清的高糖DMEM培养液中,在37℃、5%CO₂培养箱中培养至细胞融汇80%以上,经细胞计数调整细胞密度为1×10⁶/ml,按Roche产品说明书进行总RNA提取和反转录。

1.4 NBEAL1表达载体的构建

根据Gene Bank中NBEAL1序列(AY172970),以及载体pGEX-KG的读码框架,通过Laser gene primer select软件设计引物,并引入EcoR I和Xho I酶切位点。上游引物:5'-CCGGAATTCTAGACTTTGTCGACTC-3';下游引物:5'-CCGCTCGAGTAGACGTTAACGCG-3'。预测扩增产物为348 bp。PCR反应条件为:94℃变性30 s,50℃退火30 s,72℃延伸1 min,循环数为35。PCR扩增产物及载体质粒分别用限制性内切酶EcoR I和Xho I消化,回收后在T4 DNA连接酶催化下,将NBEAL1基因克隆至质粒pGEX-KG中,构建成重组质粒pGEX-KG/NBEAL1(图1),转化E. coli BL21(DE3)。重组子进行PCR鉴定、酶切鉴定,阳性克隆送至上海博尚公司测序。

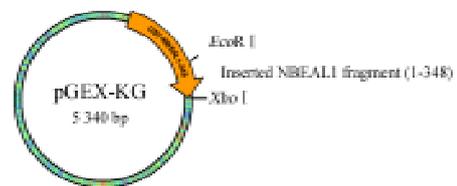


图1 pGEX-KG/NBEAL1表达载体的构建

Fig.1 Construction of pGEX-KG/NBEAL1 expression plasmid

1.5 NBEAL1蛋白的表达和纯化

挑取测序正确的含重组质粒pGEX-KG/NBEAL1的E. coli BL21(DE3)单菌落,37℃振荡培养过夜,按1:100稀释到含Amp的2×YT培养基中,振荡培养至D₆₀₀值0.6~0.8,加入终浓度为0.6 mmol/L的IPTG诱导表达4 h。GST亲和层析纯化参照GST亲和纯化柱说明手册进行。每隔1 h取出

少量纯化物进行 SDS-PAGE 鉴定。

1.6 单克隆抗体的制备与检测

纯化的蛋白委托晨健抗体组药物有限公司制备抗人 *NBEAL1* 单克隆抗体。用制备的抗体进行 Western blotting 鉴定其特异性。

1.7 免疫组织化学染色检测人脑胶质瘤组织中 *NBEAL1* 的表达

取出手术切除的肿瘤组织和正常脑组织,加入固定液,在 4 °C 固定 4 ~ 6 h,常规浸蜡、石蜡包埋。切片厚度为 6 ~ 8 μm。切片经常规脱蜡至水后,采用微波对切片抗原进行修复。其余操作按照 Envision 法,3% H₂O₂ 甲醇封闭内源性过氧化酶,PBS 洗涤后加一抗(鼠抗人 *NBEAL1* 抗体,1:150 稀释),4 °C 过夜后加 HRP 标记二抗(羊抗鼠抗体,1:3 000 稀释),置 37 °C 孵育 30 min,显色,DAB 常规脱水封片。阳性染色呈棕黄色颗粒。依染色细胞数及染色强弱进行阳性程度分级:阴性(-);阳性细胞数 < 25%,染色淡,弱阳性(+);阳性细胞数 25% ~ 50%,染色中等,阳性(++);阳性细胞数 > 50%,染色强,强阳性(+++)。

1.8 统计学处理

利用 SPSS 14.0 系统软件对数据进行 Fisher 检验,判断不同样本间差异的统计学意义。

2 结果

2.1 重组 pGEX-KG/*NBEAL1* 质粒的鉴定

重组子通过 *NBEAL1* 特异引物进行 PCR 鉴定(图 2)。提取阳性克隆的质粒,经 *EcoR* I 和 *Xho* I 酶切后,1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定,分别为 *NBEAL1* 条带(348 bp)、pGEX-KG(5 000 bp)(图 3)。PCR 阳性克隆送上海博尚生物公司测序,测序结果表明获得的重组子序列正确。

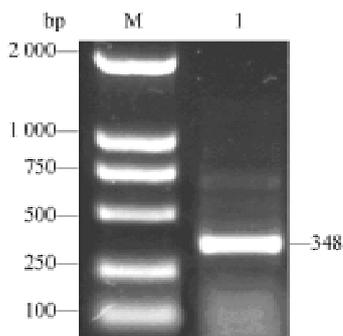


图 2 *NBEAL1* 片段的 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳图
Fig. 1 Agarose gel electrophoresis map of *NBEAL1* fragment PCR product
M: DNA marker; 1: *NBEAL1* fragment

2.2 *NBEAL1* 蛋白在大肠杆菌中的表达和纯化

含重组质粒 pGEX-KG/*NBEAL1* 的 *E. coli* BL21 (DE3) 经 IPTG 诱导,目的蛋白肽在包涵体中表达(预实验中上清液未发现目的肽的表达),表达量约占菌体总蛋白的 30%。包涵体经过短暂超声处理后,参照 GST 亲和纯化柱产品手册进行纯化。纯化蛋白的 SDS-PAGE(图 4)显示,在相对分子质量 39 000 附近有一条特异条带,符合目的蛋白的理论推算值(GST 标签与 *NBEAL1* 融合蛋白)。扫描分析显示目的蛋白的纯度达 95% 以上。对纯化后的蛋白分别进行 GST 和 *NBEAL1* 融合蛋白 Western blotting 检测,结果显示目的条带确实为 GST 标签和 *NBEAL1* 的融合蛋白。

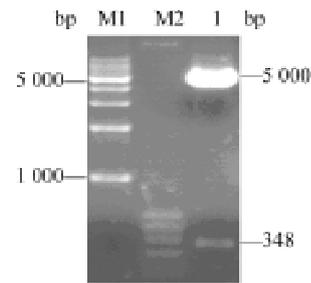


图 3 重组 pGEX-KG/*NBEAL1* 质粒的双酶切鉴定

Fig. 3 Identification of recombinant pGEX-KG/*NBEAL1* plasmid by double endonucleases digestion

M1, M2: Marker; 1: pGEX-KG (5 000 bp), *NBEAL1* (348 bp)

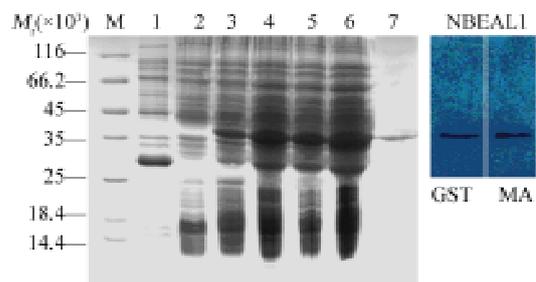


图 4 Western blotting 鉴定 *NBEAL1* 的纯度

Fig. 4 Identification *NBEAL1* protein purity by Western blotting analysis

M: Marker; 1: pGEX-KG + IPTG; 2: pGEX-KG/*NBEAL1*; 3-6: pGEX-KG/*NBEAL1* + IPTG for 1, 2, 3, 4 h, respectively; 7: Purified *NBEAL1*. GST: GST antibody; MA: *NBEAL1* antibody

2.3 胶质瘤以及正常脑组织中 *NBEAL1* 蛋白的表达

免疫组织化学检测结果显示,*NBEAL1* 蛋白在人正常脑组织中表达少,在人脑胶质瘤 I、II 级中表达显著增加,而 III、IV 级中表达显著减少,各组间差异有统计学意义($P < 0.05$;图 5,表 1)。本组 56 例

胶质瘤组织中 NBEAL1 染色阳性程度在早期显著增高;但随着恶性程度的增加,表达量显著性降低。

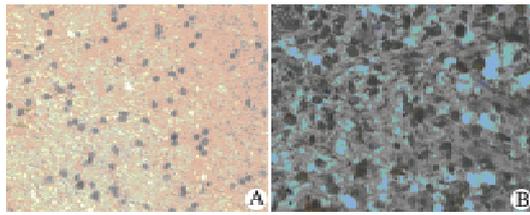


图 5 免疫组化法检测 NBEAL1 在正常脑组织(A)和胶质瘤组织(B)中的表达(×400)

Fig. 5 Expressions of NBEAL1 protein in normal brain tissues (A) and glioma tissues (B) as detected by immunohistochemistry assay(×400)

表 1 人脑胶质瘤组织及正常脑组织中 NBEAL1 的表达
Tab.1 Expressions of NBEAL1 protein in glioma tissues and normal brain tissues

Tissue	N	NBEAL1(n)			Positive rate (%)
		+	++	+++	
Normal brain tissue	10	1	0	0	10.00
Gliomas (I - II)	18	0	3	15	100.00
Gliomas (III)	15	5	1	0	40.00
Gliomas (IV)	13	3	0	0	23.08

3 讨论

NBEAL1 基因于 2004 年首次被发现并命名,它位于人 2 号染色体长臂 3 区 3 带与 4 带之间,包括 25 个外显子,全长为 3 858 bp。在氨基酸残基 311 到 561 位含有 1 个 BEACH 结构域,在氨基酸残基 737 到 962 位含有 3 个重复的 WD40 结构域,与人基因组中该家族其他成员如 FAN、LYST、NBEA 等均具有 50% 或者更高的同源性^[10]。尽管 BEACH 结构域的分子生物学功能尚不清楚,但是推测其可能与信号转导或囊泡转运相关。例如 neurobeachin 与高尔基体转运侧附近的内膜泡囊微管相关,参与神经元后高尔基体的膜运输以及神经递质的转运^[11-12]。LYST 是同型或异型溶酶体融合的负调控分子、细胞分裂的正调控分子,缺乏 LYST 蛋白可导致大量溶酶体堆积^[13-14]。因此, NBEAL1 基因 BEACH 结构域的高度保守性提示其可能与 neurobeachin 或其他同源性蛋白具有相似的作用。最近发现 neurobeachin 为一种肿瘤抑制基因,提示 NBEAL1 与肿瘤发生、发展有关^[15]。前期研究和本

研究发现,作为 BEACH 家族中的一员, NBEAL1 基因在早期恶性脑胶质瘤中表达明显上调,与脑胶质瘤的恶性程度存在负性相关,因而在脑胶质瘤的早期诊断和治疗中具有重要的潜在意义。

本研究成功地从人脑胶质瘤 U251 细胞中获取了包含 6 个推定的线性抗原表位的 NBEAL1 基因片段,并克隆入 pGEX-KG 表达载体,测序证实克隆片段序列正确。转染大肠杆菌后,融合 NBEAL1 肽段在包涵体中表达,表达量占菌体总蛋白的 30% 以上。GST 亲和纯化后的重组蛋白纯度可达 95%。

纯化的蛋白委托晨健抗体组药物有限公司制备出单克隆抗体,采用所制备的单克隆抗体探讨 NBEAL1 蛋白表达与胶质瘤病理分级间的关系。研究表明: NBEAL1 在正常脑组织中表达较低;而在低级别的脑胶质瘤组织中表达明显上调,并且随着恶性程度的升高呈下调趋势,即恶性程度越高, NBEAL1 的表达程度越低,两者呈负相关。研究还发现,胶质瘤 I 级组与 II 级组相比无显著性差异, I 级组、II 级组与 III 级组、IV 级组相比差异有统计学意义。这些结果均提示 NBEAL1 参与胶质瘤恶性进展的过程。

寻找新的胶质瘤生物标志物对于胶质瘤的早期诊断和治疗具有重要的意义^[16-19]。对于低级别的胶质瘤来说,目前只有寥寥数种潜在的生物标志物被发现,如在 1 号染色体短臂和 19 号染色体长臂上的杂合性缺失被发现具有诊断和预后价值; TP53 突变、血小板生长因子和成纤维细胞生长因子以及它们的受体的过表达,还有 22 号染色体长臂缺失被认为与低级别星形胶质瘤相关^[20-21]。此外, Ki-67/MIB-1 被证实与肿瘤的恶性程度相关,因而具有较大的临床应用价值^[22-26]。但上述这些报道中均未见如 NBEAL1 基因和蛋白在早期胶质瘤中的显著上调表达。

总之,本课题选用 pGEX-KG 系统对 NBEAL1 基因进行重组表达和纯化,并制备了单克隆抗体,初步研究了它在胶质瘤恶性进展过程中的作用,为后续研究奠定了良好的基础。

[参 考 文 献]

[1] Davis FG, McCarthy BJ, Freels S, Kupelian V, Bondy ML. The conditional probability of survival of patients with primary malignant brain tumors [J]. Cancer, 1999, 85(2): 485-491.
 [2] Okada H, Kohanbash G, Zhu X, Kasthuber ER, Hoji A, Ueda R, et al. Immunotherapeutic approaches for glioma [J]. Crit Rev Immunol, 2009, 29(1): 1-42.
 [3] Munshi A, Jalali R. Therapy for glioma: Indian perspective [J].

- Indian J Cancer, 2009, 46(2): 127-131.
- [4] Arkar C, Jain A, Suri V. Current concepts in the pathology and genetics of gliomas [J]. Indian J Cancer, 2009, 46(2): 108-119.
- [5] Cavaliere R, Lopes MBS, Schiff D. Low-grade gliomas: an update on pathology and therapy [J]. Lancet Neurol, 2005, 4(11): 760-770.
- [6] Ashby LS. Low-grade glioma: no longer to treat or not to treat, but why to treat [J]? Surg Neurol, 2009, [Epub ahead of print].
- [7] Schwartzbaum JA, Fisher JL, Aldape KD, Wrensch M. Epidemiology and molecular pathology of glioma [J]. Nat Clin Pract Neurol, 2006, 2(9): 494-503.
- [8] Kesari S, Ramakrishna N, Sauvageot C, Stiles CD, Wen PY. Targeted molecular therapy of malignant gliomas [J]. Curr Oncol Rep, 2006, 8(1): 58-70.
- [9] Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, *et al.* The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system [J]. Acta Neuropathol, 2007, 114(2): 97-109.
- [10] Chen J, Lu Y, Xu J, Huang Y, Cheng H, Hu G, *et al.* Identification and characterization of NBEAL1, a novel human neurobeachin-like 1 protein gene from fetal brain, which is up regulated in glioma [J]. Brain Res Mol Brain Res, 2004, 125(1-2): 147-155.
- [11] Wang X, Herberg FW, Laue MM, Wullner C, Hu B, Petrasch-Parwez E, *et al.* Neurobeachin: a protein kinase A-anchoring, beige/Chediak-Higashi protein homolog implicated in neuronal membrane traffic [J]. J Neurosci, 2000, 20(23): 8551-8565.
- [12] Su Y, Balice-Gordon RJ, Hess DM, Landsman DS, Minarcik J, Golden J, *et al.* Neurobeachin is essential for neuromuscular synaptic transmission [J]. J Neurosci, 2004, 24(14): 3627-3636.
- [13] Wilson J, Huynh C, Kennedy KA, Ward DM, Kaplan J, Aderem A, *et al.* Control of parasitophorous vacuole expansion by LYST/Beige restricts the intracellular growth of leishmania amazonensis [J]. PLoS Pathog, 2008, 4(10): e1000179.
- [14] Kaplan J, De Domenico I, Ward DM. Chediak-Higashi syndrome [J]. Curr Opin Hematol, 2008, 15(1): 22-29.
- [15] O'Neal J, Gao F, Hassan A, Monahan R, Barrios S, Kilimann MW, *et al.* Neurobeachin (NBEA) is a target of recurrent interstitial deletions at 13q13 in patients with MGUS and multiple myeloma [J]. Exp Hematol, 2009, 37(2): 234-244.
- [16] Yip S, Iafrate AJ, Louis DN. Molecular diagnostic testing in malignant gliomas: a practical update on predictive markers [J]. J Neuropathol Exp Neurol, 2008, 67(1): 1-15.
- [17] Idbaih A, Omuro A, Ducray F, Hoang-Xuan K. Molecular genetic markers as predictors of response to chemotherapy in gliomas [J]. Curr Opin Oncol, 2007, 19(6): 606-611.
- [18] Eoli M, Silvani A, Pollo B, Bianchessi D, Menghi F, Valletta L, *et al.* Molecular markers of gliomas: a clinical approach [J]. Neurol Res, 2006, 28(5): 538-541.
- [19] Lassman AB, Holland EC. Incorporating molecular tools into clinical trials and treatment for gliomas [J]? Curr Opin Neurol, 2007, 20(6): 708-711.
- [20] Grier JT, Batchelor T. Low-grade gliomas in adults [J]. Oncologist, 2006, 11(6):681-693.
- [21] Hesson LB, Krex D, Latif F. Epigenetic markers in human gliomas: prospects for therapeutic intervention [J]. Expert Rev Neurother, 2008, 8(10): 1475-1496.
- [22] Johannessen AL, Torp SH. The clinical value of Ki-67/MIB-1 labeling index in human astrocytomas [J]. Pathol Oncol Res, 2006, 12(3): 143-147.
- [23] Miller CR, Perry A. Glioblastoma [J]. Arch Pathol Lab Med, 2007, 131(3): 397-406.
- [24] Nakamura M, Shimada K, Ishida E, Higuchi T, Nakase H, Sakaki T, *et al.* Molecular pathogenesis of pediatric astrocytic tumors [J]. Neuro Oncol, 2007, 9(2): 113-123.
- [25] Rathi KR, Radotra BD, Khosla VK. Proliferative index in astrocytic tumours [J]. Indian J Pathol Microbiol, 2007, 50(4): 754-758.
- [26] Sathornsumetee S, Rich JN, Reardon DA. Diagnosis and treatment of high-grade astrocytoma [J]. Neurol Clin, 2007, 25(4): 1111-1139.
- [收稿日期] 2009 - 10 - 19 [修回日期] 2009 - 11 - 28
- [本文编辑] 徐红梅

· 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)卡方检验用希腊文小写 χ^2 ;(7)相关系数用英文小写 r ;(8)自由度用希腊文小写 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)