

· 研究快报 ·

## 应用三元递减法筛选特异性心脏生长相关基因\*

陈光慧 周子振 张继峰 陈春蕾  
李凌松 关新元 周爱儒 马大龙 汤 健\*\*

(北京医科大学心血管基础研究所, 北京 100083)

**摘要** 心脏是由胚胎干细胞特异性分化而来的,但其分化的分子生物学机制尚不了解.为建立一种新的筛选特异性心脏相关基因的方法,克隆特异性心脏生长相关基因.从胚胎心、成年心和去胎心的胚胎中提取 mRNA,建立胎心/成年心和胎心/胎身两个递减性 cDNA 文库,通过 DNA 芯片和微阵列杂交筛选和克隆,建立了三元递减克隆的新方法.获得了一个全长为 1 006 bp 可编码 194 个氨基酸的新的与心脏生长相关的基因,它是 LM 家族的新成员,可特异性在心肌细胞表达,并可促进心肌细胞的生长.结果表明,三元递减筛选法可以应用于寻找新的组织特异性表达的基因.并且获得了一个新的与心脏生长相关的新基因,它可能在心肌生长和心肌肥厚的发生中发挥重要作用.

**关键词** 心脏生长相关基因,递减杂交,心脏发育

**中图分类号** Q 785, R 541

### Identification of the Specifically Cardiac Growth Related Gene by Three Elements PCR-select cDNA Subtraction

CHEN Kuang-hueih, ZHOU Zi-zhen, ZHANG Ji-feng, CHEN Chun-lei,  
LI Ling-song, GUAN Xin-yuan, ZHOU Ai-ru, MA Da-long, TANG Jian  
(Institute of Cardiovascular Research, Beijing Medical University, Beijing 100083, China)

**Abstract** Heart is specifically derived from embryonic stem cells. The molecular mechanism of heart differentiation, however, still remains undefined. To develop a new means for searching genes specifically related to heart and to clone genes specific to heart growth, the mRNA was isolated from embryonic heart, mature heart, and embryonic body without heart and established two subtractive cDNA libraries (embryonic heart/mature heart and embryonic heart/embryonic body without heart). Utilizing DNA chips and microarray hybridization selection, a novel method - three-element subtraction was established. Using this new method, a new heart-related gene was obtained. The full-length of it was 1 006 bp and it encoded a protein with 194 amino acids. It is a new member of LM gene family. It can specifically express in cardiac muscle cells and can promote the growth of cardiac myocytes. Taken together, the results indicate that the three-element subtraction method can be used to search novel tissue specific genes and a new gene related to the growth of heart was obtained. The gene may play an important role in the growth of cardiac myocytes and may be involved in the pathogenesis of hypertrophy.

**Key words** hhLM gene, Subtractive hybridization, Heart development

\* 国家攀登计划, 重大基础发展规划, 国家自然科学基金(39825507)和北京市自然科学基金资助项目

\*\* 联系人 Tel: (010)62091159

E-mail: tangj@mail.bjnu.edu.cn

陈光慧, 女, 1964 年 2 月生, 博士, 教授

收稿日期: 2000-03-20, 修回日期: 2000-04-03

心脏是由胚胎干细胞分化而来的。人体的胚胎干细胞可以特异性分化成体内 600 多种细胞, 几十种组织器官。这种细胞的分化是由一系列基因调节的结果, 其中包括组织特异性分化基因和非组织特异性的分化基因。心脏是人体内的一个特化的器官<sup>[1,2]</sup>, 在胚胎时心脏细胞可以生长和增殖。在出生后心肌细胞一般则不能增殖, 心肌罕见肿瘤, 其机制尚不十分了解。近年来的研究证明, 调节心脏生长发育的基因有近百个, 主要有 HLH、HAND、Shh、MEF-2、RXR、TEF-1、TGF- $\beta$ 、PAX3——同源框等基因家族, 都是非器官组织特异性的调节基因, 它们不仅可以调节心肌的生长和发育, 亦可以调节其它组织器官的生长和发育, 目前特异性心肌生长发育相关基因还未最终确认, 现在仅有 GATA-4 和 NK2.5, 被认为可能是心特异性心肌发育相关基因。因此, 克隆特异性心肌发育相关基因仍然是一个重要的研究课题<sup>[3-5]</sup>。

本工作建立了一种三元递减筛选法。从胎心中筛选出一种新的特异性心肌生长相关基因, 它特异性在心肌细胞表达, 可促进心肌细胞的生长, 它可能在心肌肥厚的发病中发挥重要作用。

## 1 方法与结果

### 1.1 三元递减法的基本原理

三元递减法的基本原理如图 Fig 1 所示。在胚胎干细胞 (ES) 主要存在着所有细胞共有的表达基因(A), 胚胎干细胞固有的表达基因(E), 非特异性细胞生长分化相关的表达基因(C<sub>g</sub>), 和发育成各种组织器官特异性生长分化相关的表达基因(C<sub>sn</sub>)等 4 类基因。胚胎细胞发育成胚胎心脏 (H<sub>d</sub>), 仍可继续分化, 它具有所有细胞固有的表达基因(A), 心肌细胞特有的表达基因(H), 非特异心肌发育和生长相关的表达基因(C<sub>g</sub>)和特异性心肌生长发育分化相关的表达基因(C<sub>SH</sub>); 在去除胚胎心脏剩余的胚身组织 (B<sub>-H</sub>) 中含有所有细胞固有的表达基因(A), 胚胎组织中特有表达基因(B), 非特异性组织器官生长发育相关的表达基因(C<sub>g</sub>)和特异性其它组织器官发育生长的相关表达基因(C<sub>SN-SH</sub>)。通过胎心 (H<sub>d</sub>) 和去胎心的胎身 (B<sub>-H</sub>) cDNA 递减 (H<sub>2</sub>), 可以获得心肌固有 (H) 和特异性心肌生长发育相关的表达基因 (C<sub>SH</sub>)。成年心肌 (H<sub>m</sub>) 是一种终末分化的细胞, 它不能再分化和增殖, 因此它主要含有细胞固有表达基因 (A) 和心肌细胞固有表达基因 (H)。通过胎心 (H<sub>d</sub>) 和成年心脏 (H<sub>m</sub>) cDNA 递减 (H<sub>1</sub>), 则可

以获得特异性心肌生长发育相关 (C<sub>SH</sub>) 和非特异性生长发育相关 (C<sub>g</sub>) 两组表达基因。再通过对 H<sub>1</sub> 和 H<sub>2</sub> 杂交筛选即可能获得特异性心脏生长发育相关表达基因 (C<sub>SH</sub>)<sup>[6,7]</sup>。

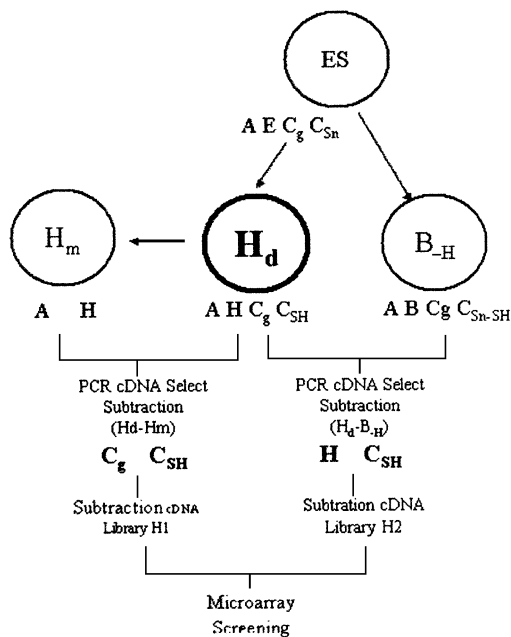


Fig 1 The flow chart of three elements PCR-select cDNA subtraction

The definition of symbols can be found in the text

### 1.2 三元递减筛选

取 700 只纯种来亨鸡蛋, 孵育 3 d, 取鸡胚分离胎心 (H<sub>d</sub>) 和去胎心的胎身 (B<sub>-H</sub>) 及出生 8 个月以上成年鸡心 (H<sub>m</sub>), 应用酚-异硫氰酸胍抽提总 RNA, 再以美国 Invitrogen 公司提供的 mRNA 提取试剂盒提取 mRNA<sup>[8]</sup>。以胎心 mRNA 为试验者 (tester), 胎身或成年心 mRNA 为驱动者 (driver), 利用美国 Clontech 公司提供的 PCR Select cDNA Subtraction 试剂盒, 进行 Hd-Hm 和 Hd-B<sub>-H</sub> cDNA 递减筛选, 并将递减筛选出的 cDNA 克隆进 Clontech 公司提供的 T/A 克隆载体中, 构建出 Hd-Hm 和 Hd-B<sub>-H</sub> 两个递减性 cDNA 文库。再从每个 cDNA 文库各挑选 1 000 个菌落, 并将这 2 000 个菌落中的质粒提取出来, 依据 Clontech 公司的 PCR Select cDNA Subtraction 试剂盒中的衔接子 (adaptor) 的序列合成二引物, 进行 PCR 反应, 扩增出这 2 000 个插入 T/A 载体中的 cDNA 片段, 经分离纯化后, 将 PCR 产物通过机器人定量点样和固定在玻璃芯片上, 封片后分别以 Fluoro link Cy3dU TP (红色) 荧光标记胎心 cDNA, 以 Fluoro link Cy5dU TP (绿色)

荧光标记去胎心的身体 cDNA, 在玻璃芯片上进行杂交, 并进行图象处理. 其结果如 Fig 2(见图版 I) 所示. 由图可以看出, 呈红色荧光反应的杂交点为胎心特有的 cDNA, 呈绿色荧光反应的为身体组织细胞特有的 cDNA, 呈黄色荧光反应的为非特异性心肌和身体组织共有的 cDNA. 以上实验均在美国 NIH 癌症研究中心进行.

为了进一步筛选和确定心脏特异性生长发育相关的表达基因, 依据以上实验结果, 选取在 DNA 芯片上呈红色荧光反应的阳性克隆, 点样并固定在尼龙膜上, 分别以 <sup>32</sup>P-dCTP 标记的胎心、胎身 mRNA

为探针, 进行第三次杂交, 结果见 Fig 3(见图版 I) 所示. 比较二次杂交的结果, 选取 48 个胎心 mRNA 杂交为阳性, 成心或胎身 mRNA 杂交为阴性的阳性克隆, 提取质粒, 应用美国 Promega 公司 fmol/DNA 测序试剂盒进行核苷酸序列分析, 并应用 NCB I 提供的 Blasta 分析软件, 进行同源性序列比较, 结果见 Table 1. 在 48 个检测序列中, 有 23 个与已知基因的 EST 高度同源, 其中有一些是已知与心脏发育相关基因 EST 如 Pax-3、GATA 等; 有 13 个为新的 EST. 其中 H2-3-7B cDNA 片段(No. 45) 最长, 为 820 个核苷酸(nt).

```

GTTGAGCTGAACGGAGTCCACACAUGCAGACTTGACCTTGACCAGATAGTCTTCAAGATGCCAACTGGGGCGGAGGCGCAAAATGTGGAGCCTGTGAA
M P N W G G G A K C G A C E
AAGACCGTCTACCATGGAGAAGAAATCCAGTGCAATGGAAGGAGTTTCCACAAGACGTGTTTCCACTGCATGGCCTGCAGGAAGGCTCTTGACAGCAGC
K T V Y H A E E I Q C N G R S F H K T C F H C M A C R K A L D S T
ACAGCTCGGGCTCATGAGTCGGAGATCTACTGCAAGGTGTGCTATGGGCGCAGATATGGCCCCAAAGGGATCGGGTATGGACAAGGCGCTGGCTGTCTC
T V A A H E S E I Y C K V C Y G R R Y G P K G I G Y G Q G A G C L
AGCACAGACACGGGCGAGCATCTCGGCCTGCAGTTCCAACAGTCCCAAGCCGGCAGCTCAGTTACCACCAGCAACCCTTCCAATTCAGTGCAGG
T D T G E H L G L Q F Q Q S P K P A R S V T T S N P S K F T A K F
TTTGGAGAGTCCGAGAAGTGCCCTCGATGTGGCAAGTCAGTCTATGCTGCTGAGAAGGTTATGGGAGGTGGCAAGCCTTGGCACAAGACCTGTTTCCG
S G E S E K C P R C G K S V Y A A E K V M G G G K P W H K T C F R
TGTGCCATCTGTGGGAAGAGTCTGGAGTCCACAAATGTCAGTACAAAGATGGGGAACCTTTATGCAAGTTGCTATGCCAAAAATTTTGGCCCCACG
C A I C G K S L E S T N V T D K D G E L Y C K V C Y A K N F G P T
GGTATTGGGTTTGGAGGCTTACACAACAAGTGGAAAAGAAAGAAATGAAGAGGTGCGCCGTTTCTCAGATTTTTGCGAGCCTAAAACACTTGCCAAGT
G I G F G G L T Q Q V E K K E ***
AATCTGCACAGATCGATACCTTCCCAATAGCCTCTCTTGTAGTCGTACATTATGTGTTTCTCCTCAGAAGTATCAGGTCTTTACTGAATGTT
AGAAGAGGCCTTTGGAAGAAAATATTGTAAGTTAATCTATAACAAATGCTTTATTATTATAATGCTTGAATGGGAGGCAATAAATAAATGTTT
TAGTGCTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

Fig 4 The nucleotide and amino acid sequences of hhL M  
\* \* \* : stop codon

### 1.3 人的特异性心脏生长发育相关基因的克隆

以鸡 H2-3-7B cDNA (45) 为探针, 从 Clontech 公司提供的人胎心 cDNA 文库中, 筛选阳性克隆. 并进行核苷酸序列分析. 再用 Clontech 公司提供的 Marathon cDNA 进行 3' 端和 5' 端延伸反应, 获得人全长 cDNA. 其核苷酸序列和编码的氨基酸如图 4 所示. 由图可以看出, 其氨基酸序列中含有二个典型 CXXCX<sub>17</sub>hXXCXCXXCX<sub>17</sub>CXXC 的 LM 结构. 并与许多已知 LM 家族蛋白质同源. 因此它可能是 LM 家族的一个新成员. 并定名为 hhL M. 结果见图 5.

### 1.4 特异性心脏生长相关基因的鉴定

以全长 hhL M 为探针, 应用 <sup>32</sup>P-dCTP 进行标记, 与 Clontech 公司提供的含有 50 个人组织器官 mRNA 的 microarray 尼龙膜进行杂交, 其结果见图 6(见图版 I) 所示. 由图可以看出, 在人胚胎和成年 50 个组织器官中, hhL M 仅在心脏高表达, 除骨骼肌有轻度表达外, 其它所有组织和器官均无表达. 为了进一步证明心肌细胞表达的特异性, 取流产 4 个月胎儿的心、肝、肾、肺和脑, 应用分子克隆的方法提取总 RNA, 以 <sup>32</sup>P-dCTP 标记的全长 hhL M 编码 cDNA 为探针, 进行 Northern 印迹分析. 其结果见图 7 所示. 证明 hhL M 仅在心肌组织中表达, 而在其它组织中表达.

**Table 1** Searching for homology by Blast program through GenBank data bases

No.	Title	Homology	Result
1	H1-1-7A	High	Chick mRNA for lam in B
2	H1-2-10F	New	
3	H1-2-10G	New	Maybe profilin II mRNA
4	H1-2-10F	New	
5	H1-2-12F	High	Maybe protein kinase
6	H1-2-12G	New	
7	H1-2-6H	New	
8	H1-3-10F	High	Maybe chicken mRNA for nucleolar protein No. 38
9	H1-3-11G	High	Maybe coturnix coturnix paired-box transcription factor protein (pax-3) mRNA
10	H1-3-3C	High	Maybe lecithinase C- $\alpha$
11	H1-3-3E		
12	H1-3-4D	High	Maybe chicken vimentin gene
13	H1-3-6F	New	
14	H1-4-10H	High	Maybe mRNA ribonucleoprotein S5
15	H1-4-11F	High	Maybe protein kinase
16	H1-4-12F	High	Maybe histone gene
17	H1-4-8C	High	Maybe mouse mRNA for mM IS5
18	H1-5-1F	New	
19	H1-5-3A	New	
20	H1-5-3D	New	
21	H1-5-4H	High	mRNA for DNA topoisomerase
22	H1-5-5A	New	
23	H1-5-5B	New	
24	H1-5-6G	New	
25	H1-5-8F	New	
26	H1-5-8H	New	
27	H1-7-1B	High	GATA mRNA
28	H1-7-1C	High	Maybe mRNA for KIAA0587 protein
29	H1-7-1D	High	mRNA for Mus Musculus protein kinase
30	H1-7-2D	New	
31	H1-7-2G	New	
32	H1-7-3G	New	
33	H1-7-4D	High	mRNA for chicken delta-crystallin
34	H1-7-4G	High	mRNA for pantothen/ribonucleoprotein
35	H1-7-6D	New	
36	H1-7-8G	High	mRNA for ribonucleoprotein S6
37	H1-7-8H	High	mRNA for ribonucleoprotein S11
38	H2-3-10E	High	Maybe myosin binding protein C or cardiac-C protein mRNA
39	H2-3-12E	High	Maybe mRNA for nebulin
40	H2-3-3F	New	
41	H2-3-4G	New	
42	H2-3-5D	New	
43	H2-3-5G	High	Maybe correcting protein of G/T false pair
44	H2-3-6G	High	Maybe mRNA for supervillin
45	H2-3-7B	New	
46	H2-3-7G	New	
47	H2-3-8F	New	
48	H2-3-8G	New	

<b>hhLIM</b>	<b>M P N E G G G A K C G A C E K T V Y H A E E I Q C N G R S F H K T C F H C M A C R K A L D S T T V</b>
h-MLP/CRP3	m p n w g g g a k c g a c e k t v y h a e e i q c n g r s f h k t c f h c m a c r k a l d s t t v
r-MLP/CRP3	m p n w g g g a k c g a c d k t v y h a e e i q c n g r s f h k t c f h c m a c r k a l d s t t v
h-CRP1	m p n w g g g k k c g v c g k t v y r a e e v q c e g n s f h k s c f l c m v c k k n l d s t t v
r-CRP1	m p n w g g g k k c g v c g k t v y r a e e v q c e g n s f h k s c f l c m v c k k n l d s t t v
h-SmLIM/CRP2	m p v w g g g n k c g a c g r t v y h a e e v q c d g r s f h r c c f l c m v c r k n l d s t t v
r-SmLIM/CRP2	m p v w g g g n k c g a c g r t v y h a e e v q c d g r t f h r c c f l c m v c r k n l d s t t v
consensus	m p w g g g k c g a c t v y a e e q c g f h c f c m c k l d s t t v
<b>hhLIM</b>	<b>A A H E S E I Y C K V C Y G R R Y G P K G I G Y G Q G A G C L S T D T G E H L G L Q F Q Q S P K P</b>
h-MLP/CRP3	a a h e s e i y c k v c y g r r y g p k g i g y g q g a g c l s t d t g e h l g l q f q q s p k p
r-MLP/CRP3	a a h e s e i y c k v c y g r r y g p k g i g y g q g a g c l s t d t g e h l g l q f q q s p k p
h-CRP1	a v h g e e i y c k s c y g k k y g p k g y g y g q g a g t l s t d k k g e s l g i k h e e a p g h
r-CRP1	a v h g e e i y c k s c y g k k y g p k g y g y g q g a g t l s m d k k g e s l g i k h e e a p g h
h-SmLIM/CRP2	a i h d e e i y c k s c y g k k y g p k g y g y g q g a g t l n m d r g e r l g i k p e s v q p h
r-SmLIM/CRP2	a i h d e e i y c k s c y g k k y g p k g y g y g q g a g t l n m d r g e r l g i k p e s a q p h
consensus	a h e i y c k c y g y g p k g g y g q g a g l n m d r g e r l g i k p e s a q p h
<b>hhLIM</b>	<b>A R S V T T S N P S K F T A K F G E S E K C P R C G K S V Y A A E K V M G G G K P W H K T C F R C</b>
h-MLP/CRP3	a r s v t t s n p s k f f a k f g e s e k c p r c g k s v y a a e k v m g g g k p w h k t c f r c
r-MLP/CRP3	a r a a t t s n p s k f s a k f g e s e k c p r c g k s v y a a e k v m g g g k p w h k t c f p c
h-CRP1	r p t t n p n a s k f a q k i g g s e r c p r c s q a v y a a e k v i g a g k s w h k a c f r c
r-CRP1	r p t t n p n a s k f a q k i g g s e r c p r c s q a v y a a e k v i g a g k s w h k s c f r c
h-SmLIM/CRP2	r p t t n p n t s k f a q k y g g a e k c s r c g d s v y a a e k i i g a g k p w h k n c f r c
r-SmLIM/CRP2	r p t t n p n t s k f a q k y g g a e k c s r c g d s v y a a e k i i g a g k p w h k n c f r c
consensus	r t n s k f k g e c r c g d s v y a a e k i i g a g k p w h k c f r c
<b>hhLIM</b>	<b>A I C G K S L E S T N V T D K D G E L Y C K V C Y A K N F G P T G I G F G G L T Q Q V E K K E</b>
h-MLP/CRP3	a i c g k s l e s t n v t d k d g e l y c k v c y a k n f g p t g f g f g g l t q q v e k k e
r-MLP/CRP3	a i c g k s l e s t n v t d k d g e l y c k v c y a k n f g p t g f g f g g l t h q v e k k e
h-CRP1	a k c g k g l e s t t l a d k d g e i y c k g c y a k n f g p k g f g f g q g a g a l v h s e
r-CRP1	a k c g k g l e s t t l a d k d g e i y c k g c y a k n f g p k g f g f g q g a g a l v h s e
h-SmLIM/CRP2	a k c g k s l e s t t l t e k e g e i y c k g c y a k n f g p k g y g y g q g a g a l v h a q
r-SmLIM/CRP2	a k c g k s l e s t t l t e k e g e i y c k g c y a k n f g p k g y g y g q g a g a l v h a q
consensus	a c g k l e s t k g e y c k c y a k n f g p g g g

Fig 5 Comparison between hhL M and many other known L M proteins

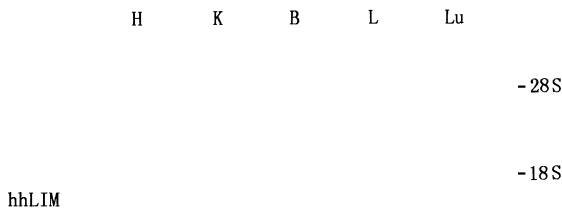


Fig 7 The expression of hhL M gene in human tissues (Northern blot)  
H: Heart; K: Kidney; B: Brain; L: Liver; Lu: Lung

## 2 讨 论

递减筛选是 Chomczynski 等报告的一种克隆新基因的方法。由于它能通过递减排除一些“试验者”和“驱动者”样品中共有的序列,而被广泛使用,并已成功克隆出许多新的功能基因。本工作在递减筛选的基础上首次建立了一种三元递减的方法,并且应用此方法筛选出一个新的心脏特异性的表达基因。通过多元递减可排除几种组织中共同表达的基因,获得更加特异的功能基因。但是它和递减筛选一样,由于基因表达的丰度不同,亦可以出现一些递减和递减不完全的误差。此外,心肌与骨骼肌同属横

纹肌,在结构和基因水平可能有某些类同。因此,本工作所克隆心肌特异性表达基因,在骨骼肌亦有轻度表达。

hhL M 由于它具有 L M 蛋白的典型结构<sup>[9]</sup>,通过 Blast 分析,它又与已知 L M 不同。因此,它属于 L M 家族的新成员。目前发现的 L M 家族的成员有 10 多种,多为转录因子,其中主要的有 CRP-1, SmL M 等。它们广泛分布在体内不同组织和细胞中,我们曾用 RT-PCR 证明 CRP-1, SmL M 可以在内皮细胞、平滑肌细胞、成纤维细胞、成肌细胞、上皮细胞和心肌细胞表达<sup>[10]</sup>,而 hhL M 主要在心肌细胞表达(未发表资料)提示 hhL M 是一种心肌细胞特异表达的基因。为了分析 hhL M 心特异性表达的机制,我们曾应用基因步移法克隆出包括启动子在内的 5 端上游 2 600 bp 的调控序列,并与 CRP-1 L M 的 5 端调控序列进行比较,发现除具有 AP、CRE、SP1 等相同的调控序列以外,其它都与 CRP-1 L M 不同。目前正在进行分析与研究,期望能寻找出心肌特异性表达的调控序列。

关于 hhL M 的功能目前尚不十分了解。我们曾经构建 hhL M 真核表达载体(PcD<sub>2</sub>/hhL M),应用电脉冲转移至原代培养的心肌细胞。结果发现,其心肌生长速度明显增加,其<sup>3</sup>H-亮氨酸的参入率较对照组增加 40% 以上;应用内皮素可以促进心肌细胞的

生长,亦可以促进心肌细胞中 *hhLM* 基因的表达,揭示它可能是一个促进心肌生长的基因.此外,我们还发现在自发性高血压大鼠,腹主动脉部分夹闭和异丙肾上腺素所引起的心肌肥厚的动物模型中,心肌中 *hhLM* 基因表达亦都明显升高.提示它可能参与心肌肥厚的发病过程.但是关于它在心肌生长发育中的作用及其机制还有待进一步研究.

### 参考文献(References)

- 1 汤健,朱小君.心肌形成和心脏发育的分子机理.心血管分子生物学(汤健主编).北京医科大学出版社(Tang Jian, Zhu Xiao-jun Molecular mechanism of cardiomyogenesis and heart development. In: Tang Jian ed *Cardiovascular Molecular Biology*. Beijing: Beijing Medical University Press), 1999: 41~ 51
- 2 Harvey R P, Rosenthal N. *Heart Development* Academic Press, 1998
- 3 Olson E, Svivastave D. Molecular pathway controlling heart development *Science*, 1996, **272**: 671~ 672
- 4 Sacov H M. Molecular insights into cardiac development *Annu Rev Physiol*, 1998, **60**: 287~ 307
- 5 Baldwin H S. Advances in understanding the molecular regulation of cardiac development *Curr Opin Pediatr*, 1999, **11**: 413~ 418
- 6 Liang P, Parde A B. Differential display: A general protocol *Mol Biotechnol*, 1998, **10**: 261~ 267
- 7 Blumberg B, Belmonte J C. Subtractive hybridization and construction of cDNA libraries *Mol Biol*, 1999, **97**: 555~ 574
- 8 Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction *Anal Biochem*, 1987, **162**: 156~ 159
- 9 周子振,张继峰.LM 蛋白及其在心血管系统的作用.见:汤健主编.心血管分子生物学.北京医科大学出版社(Zhou Zizhen, Zhang Jifeng LM protein and its role in cardiovascular system. In: Tang Jian ed *Cardiovascular Molecular Biology*. Beijing: Beijing Medical University Press), 1999: 164~ 173
- 10 Henderson J R, Macaluso T, Brown D. The LM protein-CRP-1 *Dev Dyn*, 1999, **214**: 229~ 238