

## 两种氨基修饰的基因芯片表面制备方法比较

吴清华<sup>1</sup>, 马文丽<sup>1</sup>, 王洪敏<sup>1</sup>, 毛向明<sup>1</sup>, 张宝<sup>1</sup>, 李凌<sup>1</sup>, 郑文岭<sup>2</sup> (<sup>1</sup>南方医科大学分子生物学研究所, 广东广州 510515; <sup>2</sup>广州军区总医院分子肿瘤学研究所, 广东广州 510010)

**摘要:**目的 探讨两种氨基化方法修饰玻片表面的过程及其在基因芯片制备中应用的可行性。方法 玻片经清洗、硅烷化后, 一种用多组分多氨化合物包被, 经次亚苯基二异硫氰酸盐表面活化; 另一种方法采用的包被剂是丙烯酸-丙烯酰胺单体, 活化剂是碳二亚胺/N-羟基琥珀亚胺酯官能团分子。将被修饰好的玻片用于λ噬菌体基因组 DNA 芯片的制备, 并进行杂交检测分析。结果 经两种方法修饰后玻片表面分别形成分支结构和聚合物涂层, 与商业化的芯片比较发现, 两种芯片杂交、扫描检测后显示所得点阵的杂交信号均匀、稳定、清晰, 杂交点饱满、同一性好。结论 两种方法修饰的玻片用于制备基因芯片均取得了成功, 其中丙烯酸-丙烯酰胺聚合物包被法处理过程简单、成本低廉、能大规模生产, 是一种较理想的芯片表面制备方法。

**关键词:** 基因芯片; 氨基修饰; 表面化学; λ噬菌体

中图分类号: Q789 文献标识码: A 文章编号: 1000-2588(2005)07-0794-05

## Comparison of two amine-modified chemical platforms for DNA microarray preparation

WU Qing-hua<sup>1</sup>, MA Wen-li<sup>1</sup>, WANG Hong-min<sup>1</sup>, MAO Xiang-ming<sup>1</sup>, ZHANG Bao<sup>1</sup>, LI Ling<sup>1</sup>, ZHENG Wen-ling<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Institute of Molecular Biology, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China; <sup>2</sup>Institute of Molecular Oncology, Guangzhou General Hospital of Guangzhou Command, Guangzhou 510010, China

**Abstract: Objective** To study two amine modification procedures for DNA microarray preparation based on polymeric coatings. **Methods** One of the proposed approaches utilized poly-amine coating of silanized slides activated by 1,4-phenylene diisothiocyanate, and the other employed acrylic acid-co-acrylamide copolymer and 1-(3-dimethylamino propyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride/N-hydroxysuccinimide as the coating agents and activator, respectively. The modified slides were used for preparing λ phage DNA microarrays, whose properties were analyzed by hybridization. **Results** Formation of dendritic structure and polymer was observed on the surface of the slides. The signal spots in uniform, steady and regular shape, in comparison with the commercial CMT-GAPS slides, indicated successful manufacture of the microarrays. **Conclusion** The two platforms are suitable for microarray preparation, and the method of acrylic acid-co-acrylamide copolymer modification is more preferred.

**Key words:** DNA microarray; amine-modification; surface chemistry; lambda phages

基因芯片(DNA 微阵列)已逐渐成为现代分子生物学中一项强有力的工具,它具有高通量、微型化和平行分析的特点,在基因突变检测与多态性分析<sup>[1-3]</sup>、药物筛选<sup>[4]</sup>、基因表达变化监控<sup>[5,6]</sup>以及法医鉴定、环境监测等领域有着广泛的应用。

基因芯片表面的制备是芯片制作中一个关键步骤,它采用合适的功能基团修饰表面以便 DNA (cDNA 或寡核苷酸)连接在固相载体上。在基因芯片技术中化学通式为(RO)<sub>3</sub>Si(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>X 的双官能硅烷试剂已广泛地用于修饰和活化玻片<sup>[7,8]</sup>。许多化学反应如氨基修饰<sup>[9,10]</sup>、醛基修饰<sup>[7,11]</sup>、巯基修饰<sup>[12]</sup>、多糖修饰等<sup>[13]</sup>被研究,但是氨基修饰表面在芯片中应用更广

泛。虽然玻片在化学修饰和低荧光背景上有优势,但是平整致密的表面结构使其在芯片制作时探针上样量受到限制,为了克服这一缺点,在本研究中对玻片进行表面化学处理,衍生出多分支连接系统或在玻片表面聚合上具有溶胀性的聚合物分子来克服上样量不足的缺点,同时对玻片进行化学预活化,使玻片带有 3D 活性功能。本研究设计了两种方法利用表面化学反应将富含氨基的化合物或聚合物以共价键方式连接到预先硅烷化的显微载玻片上,然后利用官能团交联分子活化玻片表面,使 DNA 能快速、稳定地结合在玻片上;为了确定玻片的性能,将两种表面化学处理的玻片应用在入噬菌体基因组芯片的研制中,并与商业化玻片进行了比较。

收稿日期: 2004-12-29

基金项目: 国家自然科学基金(39880032)

Supported by National Natural Science Foundation of China (39880032)

作者简介: 吴清华(1974-),女,1999年硕士毕业于国防科技大学,现为第一军医大学基因工程研究所在读博士研究生,电话:020-61640114-89098, Email: wuqh@fimmu.com

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

玻片处理的化学试剂部分购自 Sigma-Aldrich 公

司 (US), 一些常用的有机溶剂为国内生产; Cy3-Amidite 购自 Amersham Pharmacia (UK); CMT-GAPS 氨基硅烷化玻片购自 Corning 公司; 自处理的玻片为国产的光学显微载玻片 (25×75×1mm); λ 噬菌体 (Bacteriophage λc I857 Sam 7, 48 502 bp)、大肠杆菌 *E.coli* XL-1 为本室保存; Taq 酶、dNTP、X-Gal、IPTG、pMD-18T 载体等购自 TaKaRa Biotech; 3S PCR 产物纯化试剂盒购自上海博采公司; 通用引物 U (5'-GTTTGGCTGGTGTGGATC-3'), Cy3 标记的通用引物 U (5'-Cy3-TTTGGCTGGTGTGGATC-3'), 接头 (SIP:5'-pGATCmCACACCAGCCAAACCCA-3') 和 SIR:5'-GGTTTGGCTGGTGTG-3'), λ 噬菌体 PCR 扩增引物 F1/F2 和 S1/S2: F1 (5'-ACGAATTCGAGCTCGTACC-3'), F2 (5'-AGTGCCAAGCTTGCATGCCT-3'), S1 (5'-CCGGGGATCCTCTAGAGATT-3'), S2 (5'-ATGCCTGCAGGTCGACGATT-3'), 上述引物由本室 ABI3900DNA 合成仪合成。

## 1.2 玻片的清洗与硅烷化

将玻片浸于 1 M 的 NaOH 中 2 h, 浸泡过程中放在摇床上震动, 用灭菌水清洗干净后放入 1 M HCL 中浸泡过夜, 再用灭菌水清洗干净。

玻片的硅烷化: 清洗后的玻片放入硅烷化溶液中 (9%的氨丙基三甲氧基硅烷 (APS) 溶于 90%的甲醇) 硅化 30 min, 用纯甲醇溶液清洗, 再用灭菌水清洗三遍, 110 °C 烘干。

## 1.3 两种氨基敏感表面的生成与表面活化

1.3.1 多组分的多氨基化合物包被与表面活化 (1) 酰化反应: 硅烷化的玻片浸于 1 mmol 二异丙基乙胺和 1 mmol 丙烯酰氯的无水二氯乙烷溶液中摇晃反应 2 h, 随后用二氯乙烷清洗, 烘干。(2) 氨化反应: 1 mmol 氨化反应液的配制: 0.67 ml 的四亚乙基五胺、0.65 ml 1,4-对-(3-氨丙氧基)-丁烷、0.56 ml 4-氨基-1,8-辛二胺、0.66 ml 4,7,10-三氧-三二唑啉硫酮二胺、0.52 ml N,N-二甲胺-1,6-己二胺、0.30 ml 2-(2-氨乙氧基)乙醇、0.021 ml 氨基-1,2-丙二醇和 0.73 ml Jeffamine 八种氨基化合物溶解于 100 ml 无水的二甲基甲酰胺 (DMF) 中, 将酰化好的玻片置于氨化反应溶液中过夜, 反应时摇晃, 然后玻片依次用 DMF, 甲醇和丙酮清洗, 烘干。以上两个反应可以重复, 直至所需的连接分子衍生在玻片表面。(3) 表面活化: 将上述氨化液处理的玻片用次亚苯基二异硫氰酸盐溶液 (phenylenediisothiocyanate, PDITC) 活化 2 h, 192 mg PDITC 溶于 40 ml 含 10% 无水吡啶的 DMF 中, 然后用 DMF, 二氯乙烷清洗, 干燥。

1.3.2 丙烯酸-丙烯酰胺聚合物包被与表面活化 (1) 包被液的配制: 0.8% 的国产丙烯酸和 0.2% 的国产丙

烯酰胺溶于 ddH<sub>2</sub>O 中并 70 °C 加热, 加热过程中缓慢加入 0.8% 的过硫酸胺做催化剂。包被液可以在 4 °C 保存备用。(2) 表面活化: 活化液组分: 0.1 M 碳二亚胺 (EDC) 和 20 mM N-羟基琥珀亚胺酯 (NHS) 溶于 0.1 M PH 为 6.0 的 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 和 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 的缓冲液中。将 APS 硅烷化的玻片浸入 1:1 包被液和活化液的混合液中 3 h, 反应时不断摇晃, 随后用的 ddH<sub>2</sub>O 清洗玻片 3 次, 玻片放入离心机中 500 r/min 离心 5 min, 烘干, 暗盒保存备用。

## 1.4 λ 噬菌体基因组 DNA 探针的制备

λ 噬菌体基因组 DNA 探针的制备主要步骤包括: (1) 酶切反应: λDNA 用 Sau3AI 酶切; (2) 补平加 A 反应; (3) A-T 克隆 (载体为 PMD18-载体, 感受态细胞为新鲜制备的大肠杆菌 JM109 感受态细胞); (4) 克隆鉴定; (5) 第一次 PCR 反应、电泳 (引物为 F1, F2); (6) 第二次 PCR 反应、电泳 (引物为 S1, S2); (7) PCR 产物纯化, 收集探针, 详细的实验操作步骤参见文献 [14]。

## 1.5 λ 噬菌体基因芯片的制备

将收集好的探针溶解在 50% DMSO 中, 调整浓度为 1 mg/ml, 用 Cartesian PixSys 5500 robot (Cartesian Technologies) 芯片打印仪将探针打印到所处理的两种氨基化玻片上, 并用 CMT-GAPS 氨基硅烷化玻片 (Corning 公司) 做比较。共打印 396 个样品, 其中 λ 噬菌体 DNA 探针有 381 个, 阳性对照有 4 个, 阴性对照 (非 λ 噬菌体 DNA 探针) 有 4 个, 空白对照 7 个 (50% DMSO, 其中 4 个定位边角); 每个样品打印 3 个点, 打印成 33×36 的阵列; 每张玻片打印 6 个阵列。打印完毕后将芯片正面朝下至于 3×SSC 盐水湿盒上方再水合化, 然后迅速的置入 100 °C 温箱中干燥, 紫外交联仪以 65 mJ/cm<sup>2</sup> 的总能量进行交联固定, 使探针进一步交联在玻片表面, 干燥后室温、暗盒保存备用。

## 1.6 杂交样品的制备

1.6.1 λDNA 用 Sau3AI 进行酶切 在 200 μl 的 PCR 反应管内加入 10×H buffer 1 μl, λDNA (0.4 μg/μl) 2 μl, Sau3AI (10 U/μl) 1 μl, 补加超纯水 6 μl 至总体积 10 μl。旋摇混匀后, 在 37 °C 水浴 3 h; 然后于 70 °C 温育 15 min, 终止反应。

1.6.2 酶切片段加接头 酶切片段两端加上的通用接头由两条单链寡核苷酸 SIP (500 μg/μl)、SIR (600 μg/μl) 逐渐降温退火而成, 含有可与 Sau3AI 酶切位点互补的粘性末端。在 EP 管中加入 10 μl cDNA 酶切反应液, 1 μl 通用接头, 1 μl T4 DNA 连接酶, 2 μl 10× buffer, 6 μl ddH<sub>2</sub>O, 反应总体积 20 μl, 16 °C 保持 2 h。

1.6.3 λDNA 样品荧光标记 根据接头序列和内切酶

粘端序列设计荧光标记的通用引物 U (Cy3-UP), 于 PE 公司 9700 型 PCR 仪进行扩增并荧光标记, 反应体系为 1 μl Cy3-UP, 5 μl 加接头的 cDNA 反应液, 10 μl 2×PCR 预混液, 4 μl ddH<sub>2</sub>O, 反应总体积 20 μl。反应参数为 95 °C 变性 5 min, (95 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 60 s) 共 25 个循环, 72 °C 延伸 5 min, -20 °C 储存。使用 3S PCR 产物纯化试剂盒对标记的 λDNA 样品 (PCR 产物) 进行纯化。

1.7 杂交与检测

在标记的样品 5 μl 中加入 5 μl 2×杂交液(50% 甲酰胺, 10×SSC, 0.2%SDS), 混匀; 95 °C 变性 5 min; 最大转速离心 2 min; 滴加到阵列上, 盖上盖玻片封

闭, 42 °C 杂交 2 h。然后依次在 2×SSC/0.1%SDS, 0.1×SSC/0.1%SDS, 0.1×SSC 溶液中清洗玻片, 灭菌水漂洗后, 无水乙醇脱水, 室温下干燥。用 Agilent 基因芯片扫描仪进行扫描。

2 结果

在本研究中我们设计了两种方法来制备氨基修饰的基因芯片表面, 玻片表面处理完毕后, 并将目的 DNA 固定在芯片表面, 化学反应过程如图 1A、B 所示。图 1A 代表性地画出了多氨化合物四亚乙基五胺和 1.4-对-(3-氨基氧基)-丁烷在玻片上分支结构形成的过程。

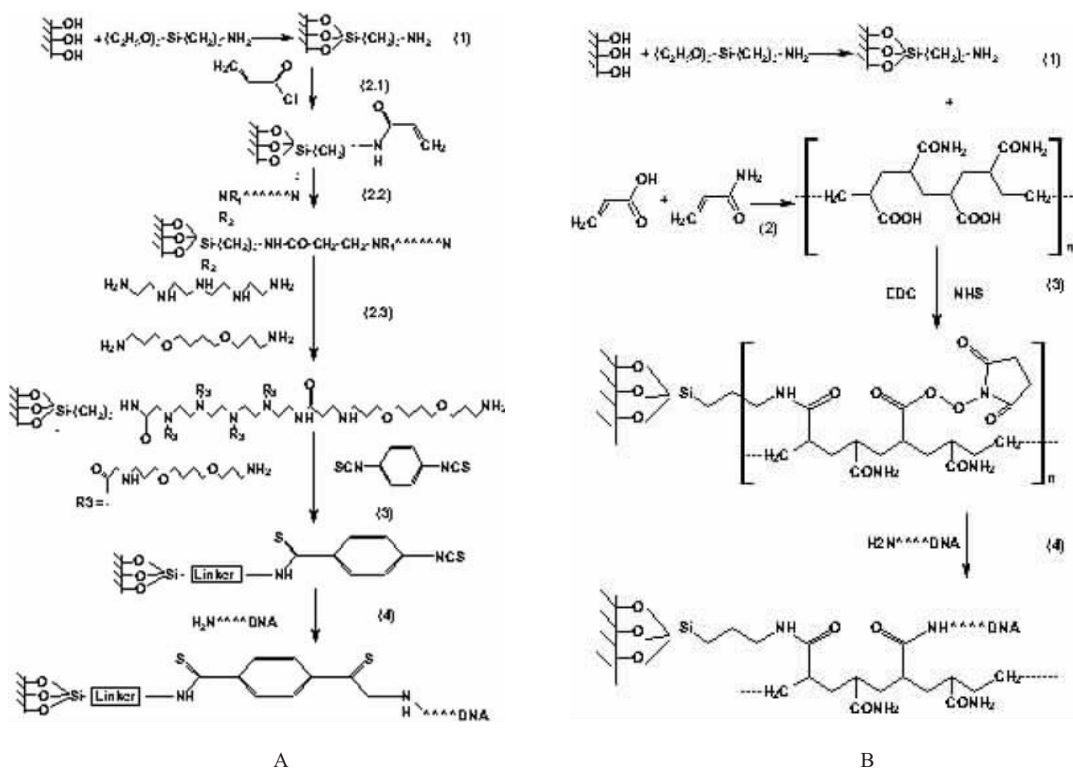


图 1 玻片修饰的化学过程

Fig.1 Chemical process of microslide modification

A: Microslide modified by poly-amine chemicals; B: Microslide modified by poly (acrylic acid-co-acrylamide) copolymer

在 λ 噬菌体基因组 DNA 探针收集过程中, 对二次 PCR 反应后电泳条带单一、清晰、片段大小在 200~1000 bp 的 PCR 产物纯化后作为探针、共收集 381 个不同大小的基因片段。λ 噬菌体部分探针收集的第一、二次 PCR 克隆鉴定结果如图 2、3 所示。

所制得的 λDNA 芯片用于限制性荧光标记的样品杂交后扫描。扫描参数: Green PMT (%)=70, Scan resolution=10 μm; Dye channel=green。用 Feature Extraction 软件阅读和分析所扫描的芯片杂交结果, 两种芯片和对照的 CMT-GAPS 氨基硅烷化芯片杂交结果如图 4A、B、C 所示。

3 讨论

在基因芯片研究中, 能否快速、稳定、精确地将目的 DNA 片段连接到被修饰的表面, 直接影响到基因芯片的质量。本研究中我们衍生了两种氨基化敏感芯片表面: 一种是多组分的多氨化合物连接系统, 另一种是丙烯酸-丙烯酰胺聚合物系统。这两种方法在硅烷化反应和化学结合到表面的主要过程基本相同, 主要包括以下化学反应步骤: (1) 玻片的硅烷化; (2) 用氨基化合物 (或聚合物) 包被玻片, 形成氨基化表面; (3) 表面活化; (4) DNA 固定到活化表面。在多组分的多氨化合物连接系统中, 硅烷化的玻片先经过酰化试

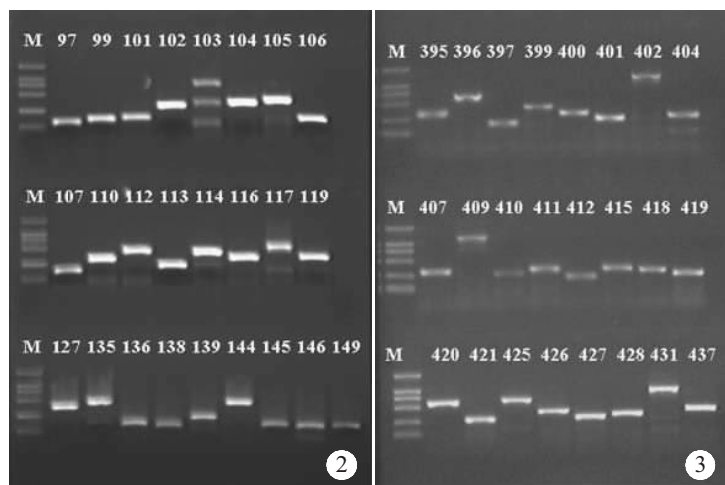


图 2 第一次 PCR 克隆鉴定电泳图  
Fig.2 Electrophoresis of the first PCR products from the white clones of lambda phage genomic fragments

图 3 第二次 PCR 产物电泳图  
Fig.3 Electrophoresis of the second PCR products

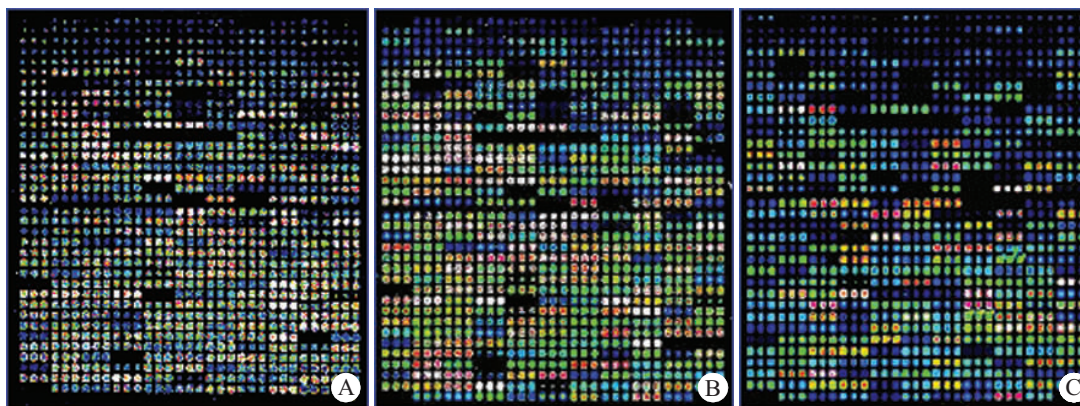


图 4 芯片的杂交结果  
Fig.4 Results of microarray hybridization

A, B, C: Display the hybridization results of poly-amine slides, poly(acrylic acid -co-acrylamide)copolymer slides and Corning CMT-GAPS slides respectively

剂反应后,再与氨化物反应,产生多元胺分支,形成树状结构。因此,玻片表面的上样量以与多氨化合物反应提高的方式而高效增加。同时表面经 PDITC 交联分子活化在聚合物表面形成多重活化位点,能沿着表面的修饰链牢固的固定目的 DNA 片段。在丙烯酸-丙烯酰胺聚合物系统中,丙烯酸和丙烯酰胺在玻片表面发生聚合反应,以共价键连接的方式形成聚合物分子层,经 EDC 和 NHS 官能团分子活化,能与 DNA 中的氨基发生共价结合将目的片段稳定地固定在玻片上;且利用聚合物溶胀性的特点,进一步增加上样量。以上两种玻片有一个共性,即表面富含带正电的氨基,氨基的数量控制着正电荷的数量,从而影响表面的性能。在基因芯片中,特别是对短的寡核苷酸芯片而言,正电有利于杂交。另一方面,带正电的表面探针片段因静电反应不易脱落而有利于提高芯片的性能。

本研究中所制备两种玻片在入噬菌体基因组 DNA 芯片制备中取得了良好结果,对扫描后三个微阵列用 Genepix pro 提取全部点阵数据并进行阵列相

关性分析。分析结果表明,三个阵列的一致性很高,平均荧光信号强度达到  $2.6 \times 10^4$ ,所有点的直径在  $350 \sim 500 \mu\text{m}$  的范围,完全符合芯片检测分析的要求。从图 4a,b,c 杂交结果可以看出,芯片点阵所显示的探针杂交信号均匀、稳定、清晰、信号强度高,杂交点饱满。与商业化的 CMT-GAPS 氨基硅烷化玻片(Corning 公司)比较,本研究芯片的信号强度、背景和点的同一性都好,完全适宜于基因芯片的研制,玻片的处理也能实现国产化生产。比较两种芯片表面的研制过程,多组分的多氨化合物玻片修饰中玻片表面处理流程较复杂、处理能力小、成本较高(处理所用试剂种类多)、毒性大(用到甲酮、丙酮、二氯乙烷等有毒溶剂),而丙烯酸-丙烯酰胺聚合物玻片的表面处理毒性低,成本低,能进行大规模的生产,是一种更理想的芯片载体表面的制备方法。

参考文献:

[1] Hacia JG, Collins FS. Mutational analysis using oligonucleotide microarrays[J]. J Med Genet, 1999, 36(10): 730-6.

- [2] Hacia JG, Sun B, Hunt N, *et al.* Strategies for mutational analysis of the large multiexon ATM gene using high-density oligonucleotide arrays [J]. *Genome Res*, 1998, 8(12): 1245-58.
- [3] Hacia JG. Resequencing and mutational analysis using oligonucleotide microarrays [J]. *Nat Genet*, 1999, 21(1 Suppl): 42-7.
- [4] Milner N, Mir KU, Southern EM. Selecting effective antisense reagents on combinatorial oligonucleotide arrays [J]. *Nat Biotechnol*, 1997, 15(6): 537-541.
- [5] Hyung-Lae Kim. Comparison of oligonucleotide-microarray and serial analysis of gene expression (SAGE) in transcript profiling analysis of megakaryocytes derived from CD<sup>34+</sup> cells [J]. *Exp Mol Med*, 2003, 35(5): 460-6.
- [6] Li S, Ross DT, Kadin ME, *et al.* Comparative genome-scale analysis of gene expression profiles in T cell lymphoma cells during malignant progression using a complementary DNA microarray [J]. *Am J Pathol*, 2001, 158(4): 1231-7.
- [7] Zammateo N, Jeanmart L, Hamels S, *et al.* Comparison between different strategies of covalent attachment of DNA to glass surfaces to build DNA microarrays [J]. *Anal Biochem*, 2000, 280:143-50.
- [8] Halliwell CM, Cass AE. A Factorial Analysis of silanization conditions for the immobilization of oligonucleotide on glass surfaces [J]. *Anal Chem*, 2001, 73: 2476-83.
- [9] Strother T, Hamers RJ, Smith LM, *et al.* Covalent attachment of oligodeoxyribonucleotides to amine-modified Si (001) surfaces [J]. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28(18): 3535-41.
- [10] Véronique Le Berre, Emmanuelle Trévisiol, Adilia Dagkessamanskaia, *et al.* Dendrimeric coating of glass slides for sensitive DNA microarrays analysis [J]. *Nucleic Acids Res*, 2003, 31: e88.
- [11] Schena M, Shalon D, Heller R, *et al.* Parallel human genome analysis: microarray-based expression monitoring of 1000 genes [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93:10614-9.
- [12] Anderson S, Roger YH, Huang ZI, *et al.* Immobilization of oligonucleotides onto a glass support via disulfide bonds: A method for preparation of DNA microarrays [J]. *Anal Biochem*, 1999, 266: 23-30.
- [13] Afanassiev V, Hanemann V, Stefan W, *et al.* Preparation of DNA and protein micro arrays on glass slides coated with an agarose film [J]. *Nucl Acids Res*, 2000, 28 (12): 66e-66.
- [14] Wang HM, Ma WL, Huang H, *et al.* DNA microarray probes preparation by gel isolation nested PCR [J]. *J Biochem Mol Biol*, 2004, 37(3): 281-7.

(上接 783 页)

### 3 讨论

随着膜片钳技术的发展,研究发现 EOS 膜上离子通道与 EOS 脱颗粒、EOS 呼吸爆发、EOS 凋亡等都密切相关。随着对 EOS 离子通道与其功能的关系研究越来越多,探索一种简单高效而对其功能影响小的适合膜片钳试验的 EOS 分离方法显得越来越重要。本分离方法不采用 NH<sub>4</sub>Cl 裂解红细胞而用 Dextran 沉淀红细胞,避免了 NH<sub>4</sub>Cl 裂解红细胞过程中对 EOS 的影响,而 Dextran T500 主要促进红细胞聚集,对 EOS 无毒无细胞膜损伤。虽然沉淀法残留有红细胞,红细胞和 EOS 密度有重叠,所以分离的 EOS 中含有 5% 左右红细胞,但在光学显微镜下未染色的 EOS 和红细胞形态特征区别明显,不影响膜片钳试验。fMLP 可以增加 EOS 和中性粒细胞的密度差<sup>[2]</sup>,但 Blom M<sup>[3]</sup>在实验中发现 fMLP 孵育后 STZ (serum-treated zymosan) 刺激合成的血小板活化因子 (PAF) 降低,证实对 EOS 功能有影响。所以本实验没有加入 fMLP 而单用小牛血清孵育,仍然达到了较好的分离效果。

密度液配置准确是 percoll 不连续密度梯度分离法成功的关键,采用微量加样枪和分析天平称量校正,同时保持每次使用微量加样枪相同力度及松开控制按钮缓慢,密度液能准确到要求的 ±0.005。

膜片钳实验时,未染色的 EOS 和红细胞及中性粒细胞在显微镜下观察形态特征区别明显,红细胞呈透明圆盘状,无核,胞质无颗粒,而中性粒细胞较 EOS 小,核多为 3 到 4 叶,胞质无颗粒,而 EOS 核多为两分叶,胞质内充满均匀细小颗粒。所以分离纯度稍低时注意区分,不影响膜片钳试验。

本分离方法分离时间短,对细胞膜及细胞功能影响小,分离纯度较高,经济实用,适宜于膜片钳试验中分离采用。

### 参考文献:

- [1] 徐劲松,蔡绍曦,邹飞,等.应用抑制消减杂交克隆支气管哮喘病人嗜酸细胞差异表达基因 [J]. *第一军医大学学报*, 2004, 24(5): 509-13.
- XU JS, CAI SX, ZOU F, *et al.* Cloning of differentially expressed genes of eosinophils from asthmatic patients by suppression subtractive hybridization [J]. *J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao*, 2004, 24(5): 509-13.
- [2] Laviolette M, Bosse M, Rocheleau H, *et al.* Comparison of two modified techniques for purifying blood eosinophils [J]. *J Immunol Methods*, 1993, 165(2): 253-61.
- [3] Blom M, Tool AT, Mul FP, *et al.* Eosinophils isolated with two different methods show different characteristics of activation [J]. *J Immunol Methods*, 1995, 178(2): 183-93.
- [4] Saito M, Sato R, Munoz NM, *et al.* Association of granular exocytosis with Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels in human eosinophils [J]. *Am J Physiol*, 1997, 273(1 Pt 1): L16-21.