

白色念珠菌 CYP51 蛋白功能性氨基酸残基定点突变、蛋白表达及活性测定

陈双红^{1,2} 盛春泉² 徐晓辉² 姜远英^{2*} 张万年² 何成²

(1. 海军医学研究所 上海 200433)

(2. 第二军医大学 上海 200433)

摘要: 实验设计了白色念珠菌 CYP51 蛋白功能性氨基酸残基突变体 Y118A、Y118F、Y118T、S378A、S378T、H310A、H310R, 并转入基因工程菌 D12667 中表达。用 Western 及紫外分光光度法定性、定量检测蛋白, 用 GC-MS 法测定蛋白代谢活性。结果表明, 成功表达目标蛋白, 蛋白诱导表达量接近微粒体蛋白总量的 25%。活性测定表明, 表达的野生型蛋白保持其对天然底物的代谢能力; 相较于野生型蛋白, 突变体蛋白代谢活性不同程度改变, 最多可下降 1/2 左右。因此, 本研究中成功表达了野生型和突变型 CYP51 蛋白, 表达的蛋白保留了对天然底物的代谢活性。

关键词: 白念珠菌, 14 α -去甲基化酶, 突变, 活性

Expression and Detection the Enzyme Activity of the Wild and Mutation Type of CYP51 Protein of *Candida albicans*

CHEN Shuang-Hong^{1,2} SHENG Chun-Quan² XU Xiao-Hui²
JIANG Yuan-Ying^{2*} ZHANG Wan-Nian² HE Cheng²

(1. The Institution of Naval Medicine, Shanghai 200433, China)

(2. Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

Abstract: The Y118A, Y118F, Y118T, S378A, S378T, H310A, H310R mutants of *Candida albicans* sterol 14 α -demethylase (CACYP51) were constructed and heterologously expressed in D12667, the reconstructed strain with the deletion of *CYP51* gene of the Y12667. With the strains obtained and microsome enzymes separated, the western blot and the ultraviolet absorption spectrophotometry were used to qualitative and quantitative detect the expressed protein, the GC-MS was used to detect the metabolism activity of the protein. The results showed that, the target protein expressed successfully in the reconstructed strains, with the expression level up to 25% of the total microsome proteins. The results also showed that, the wild type protein had the catalytic activity to its nature substrate. While after alteration the wild gene with Y118A, Y118F, Y118T, S378A, S378T, H310A, H310R by a single base substitution, the catalytic activity of protein markedly decreased respectively. So the wild type and mutation CYP51 were expressed successfully in *Saccharomyces cerevisiae* and the expression products preserved the activity to metabolism their nature substrate.

基金项目: 国家自然科学基金重点项目(No. 30430750)

*通讯作者: Tel: 86-21-25070230; 信箱: yyjiang163@163.com

收稿日期: 2009-03-19; 接受日期: 2009-05-31

Keywords: *Candida-albicans*, Cytochrome14 α -demethylase, Mutation, Activity

白念珠菌 14 α -去甲基化酶(*Candida albicans* sterol 14 α -demethylase, CACYP51)是唑类药物与白色念珠菌作用的靶酶,该酶是麦角固醇生物合成通路中的关键酶。唑类抗真菌药物的咪唑环或三唑环上的第3位或第4位氮原子镶嵌在此酶蛋白中心的铁离子上,阻碍底物与羊毛甾醇的接触,抑制酶的催化活性^[1,2],从而发挥药理效应。由于唑类药物与靶酶亲和力的减弱是耐药性出现的主要原因之一,因此唑类药物与靶酶 CYP51 的相互作用机制一直是国外学者研究的热点。本课题组前期的同源建模研究发现,底物与 CACYP51 的柔性对接时,底物3-羟基与靶酶 His310 残基形成氢键,建模数据显示该氢键在底物进入底物进出通道时引导整个药物分子在酶活性位点准确定位起重要作用;靶酶 Tyr118 残基的 phenol 侧链结构能与我们合成并筛选的含 phenyl 侧链的唑类抗真菌化合物形成 π - π 键,增强化合物的抗菌活性;Ser378 也是一个高度保守的氨基酸残基能与我们筛选的含哌嗪侧链的极性基团形成氢键,影响化合物的抗菌功能^[3-5]。以此为基础我们认为 Tyr118、His310、Ser378 在化合物与底物相互作用的过程中,对化合物的侧链有较强的选择性,并且这一选择性进一步影响化合物的抗菌活性。为证明在分子水平建模的这一结论,本研究选择了 Tyr118、His310、Ser378 三个最有意义的残基作为研究对象,进行关键残基定点突变,并表达、纯化野生型及突变蛋白,测定其对底物底代谢活性,为进一步研究靶酶的功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌株

大肠杆菌 DH5a; 白念珠菌标准株 Sc5314, 酵

母菌株(*Saccharomyces cerevisiae*)见表1。以上菌株为本实验室保存或为以往研究以及本研究中构建^[6]。

1.2 质粒, 引物和 DNA 序列的测定

PYC/NT/C 表达载体购自 Invitrogen 公司, 实验中构建的载体见表2, 引物合成由赛百盛公司完成, DNA 序列测定由基康公司完成。

1.3 各种酶类、试剂盒和特殊进口试剂

限制性内切酶、碱性磷酸酶 CIP, T4 DNA 连接酶和 Klenow 酶均购自大连宝生物工程有限公司; PCR 试剂盒购自 Promega 公司; DNA 片段回收、质粒纯化试剂盒均购自华舜生物工程公司; Protein Ladder 购自 Gibco-BRL 公司; Pfu 高保真 Taq 酶, 购自 Invitrogen 公司; Dnp I 购自晶美生物工程公司。离体酶活性测定主要试剂: NADP⁺、6-磷酸葡萄糖、NADPH、6-磷酸葡萄糖脱氢酶, 均购自 Sigma 公司。

1.4 酵母细胞转化, DNA 的提取、酶切鉴定

白念珠菌 *ERG11* 基因的扩增等方法参见《分子克隆》第四版^[7]。根据 GenBank 数据库收录白念珠菌 *ERG11* 基因序列信息, 以基因文库登录号 X13296 为已知序列设计扩增引物, 见表3。正确扩增序列与 GenBank 数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)提供的已知基因序列(X13296)进行对比分析。PCR 介导体外定点突变按试剂盒的操作进行。

1.5 Western 方法鉴定表达蛋白

Western 操作具体方法参见《分子克隆》第四版^[7]。使用 12% 分离胶、5% 积层胶分离目的蛋白。用一抗 anti-Xpress 和 anti-CYP51 鉴定表达的目的蛋白。

1.6 蛋白含量的检测

将微粒体蛋白配制成 0.2 mg/mL 的溶液, 置于

表1 研究中使用的菌株
Table 1 Strains used in this study

Strains	Parental strains	Genotype	Transformants	Description
Y12667	Yeast2880C	<i>Δerg3</i>		
D12667	Y12667	<i>Δerg3, Δerg11</i>	pTEF1/zeocin/up/down	Reconstructed in past study
Re12667WT	D12776	<i>Δerg3</i>	PYC/NT/C/ <i>ERG11</i>	Reconstructed in this study
Re12667YA	D12776	<i>Δerg3</i>	PYC/NT/C/ <i>RG11/Y118A</i>	Reconstructed in this study
Re12667YF	D12776	<i>Δerg3</i>	PYC/NT/C/ <i>RG11/Y118F</i>	Reconstructed in this study
Re12667YT	D12776	<i>Δerg3</i>	PYC/NT/C/ <i>RG11/Y118T</i>	Reconstructed in this study
Re12667HA	D12776	<i>Δerg3</i>	PYC/NT/C/ <i>RG11/H310A</i>	Reconstructed in this study
Re12667HR	D12776	<i>Δerg3</i>	PYC/NT/C/ <i>RG11/H310R</i>	Reconstructed in this study
Re12667SA	D12776	<i>Δerg3</i>	PYC/NT/C/ <i>RG11/S378A</i>	Reconstructed in this study
Re12667ST	D12776	<i>Δerg3</i>	PYC/NT/C/ <i>RG11/S378T</i>	Reconstructed in this study

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

表 2 研究中使用的载体
Table 2 Plasmids used in this study

Reconstructed plasmid name	Core plasmid	Inserting description
RePYC/NT/C/ERG11/WT	PYC/NT/C	ERG11 ORF of <i>Candida albicans</i> S5314
RePYC/NT/C/RG11/YA	PYC/NT/C/RG11	ERG11 ORF with Y118A mutation
RePYC/NT/C/RG11/YF	PYC/NT/C/RG11	ERG11 ORF with Y118F mutation
RePYC/NT/C/RG11/YT	PYC/NT/C/RG11	ERG11 ORF with Y118T mutation
RePYC/NT/C/RG11/HA	PYC/NT/C/RG11	ERG11 ORF with H310A mutation
RePYC/NT/C/RG11/HR	PYC/NT/C/RG11	ERG11 ORF with H310R mutation
RePYC/NT/C/RG11/SA	PYC/NT/C/RG11	ERG11 ORF with S378A mutation
RePYC/NT/C/RG11/ST	PYC/NT/C/RG11	ERG11 ORF with S378T mutation

表 3 研究中合成的引物
Table 3 Primers used in this study

Name	Sequence
Sc5314forward1	5'-TGT TGA AAC TGT CAT TGA TGG C-3'
Sc5314reverse1	5'-CAC TGA ATC GAA AGA TTG C-3'
Sc5314forward2	5'-AAA GGA TCC ATG GCT ATT GTT GAA ACT GTC ATT GAT GGC-3'
Sc5314reverse2	5'-AAA GAA TTC TTA AAA CAT ACA AGT TTC TC-3'
Y118-Aforward	5'-TCT GCT G AA GAT GCT GCT AAA CAT TTA ACT ACT-3'
Y118-A reverse	5'-AGT AGT TAA ATG TTT AGC AGC ATC TTC AGC AGA-3'
Y118-Fforward	5'-TCT GCT GAA GAT GCT TTC AAA CAT TTA ACT ACT-3'
Y118-F reverse	5'-AGT AGT TAA ATG TTT GAA AGC ATC TTC AGC AGA-3'
Y118-Tforward	5'-TCT GCT GAA GAT GCT CAG AAA CAT TTA ACT ACT-3'
Y118-T reverse	5'-AGT AGT TAA ATG TTT CTG AGC ATC TTC AGC AGA-3'
H310-Aforward	5'-CTT ATG GGT GG T CAA GCT ACT TCT GCT TCT ACT-3'
H310-A reverse	5'-AGT AGA AGC AGA AGT AGC TTG ACC ACC CAT AAG-3'
H310-Tforward	5'-CTT ATG GGT GG T CAA CAG ACT TCT GCT TCT ACT-3'
H310-T reverse	5'-AGT AGA AGC AGA AGT CTG TTGACC ACC CAT AAG-3'
S378-Aforward	5'-CAT ATG CCA TTA CAT GCT ATT TTT AGA AAA GTT-3'
S378-A reverse	5'-AAC TTT TCT AAA AAT AGC ATG TAA TGG CAT ATG-3'
S378-Rforward	5'-CAT ATG CCA TTA CAT CGG ATT TTT AGA AAA GTT-3'
S378-R reverse	5'-AAC TTT TCT AAA AAT CCG ATG TAA TGG CAT ATG-3'

冰浴中并加入 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_2$ 2 mg/mL 混匀, 然后将样品置于比色杯中从 550 nm~350 nm 进行基线扫描, 扫描结束后取出并持续对样品杯中充 CO 气体 30 s, 再次扫描并记录结果。计算公式如下:

$$P450 \text{ mg/mg protein} = \frac{A(450 \text{ nm} - 490 \text{ nm}) \times 1000 \mu\text{m} \times 1}{91 \text{ nm}^{-1} (\text{克分子消光系数}) \times \text{蛋白终浓度}(\text{mg/mL}) \times 55 \times 10^{-3}}$$

*A 从波长 490 nm 到 450 nm 的 OD 值之差

1.7 蛋白活性的测定

见药理学实验方法第三版。1 mL 反应体系中含底物 23.5 nmol, 微粒体蛋白 0.15 mg。气相色谱 - 质谱联用仪 (Gas chromatography-mass spectrometer, GC-MS) 检测。活性计算公式:

$$\text{Activity (nmol/min} \cdot \text{mg)} = \frac{\text{产物百分含量}(\%) \times \text{加入底物总量}(\text{nmol})}{\text{反应时间}(\text{min}) \times \text{加入酶蛋白量}}$$

2 结果

2.1 Sc5314 基因组及 ERG11 基因的 DNA 酶切鉴定、测序验证

从白色念珠菌 Sc5314 中抽提基因组 DNA, 用特异性引物扩增 ERG11 基因 ORF 并于读码框上下游分别插入限制性酶切位点 BamHI 和 EcoRI, 以该酶切位点将 ERG11 ORF 连接入 PYC 载体中, 进行酶切验证, 结果正确, 见图 1。酶切验证正确的阳性克隆载体送经测序, 测序分 3 段进行。测序结果显示, 第 1 至 108 位序列与载体 PYC/NT/C 的多克隆位点及其侧翼序列完全一致, 第 109 至 1734 位为插入载体中的 DNA 片段, 长度是 1625 bp。将该序列与白色念珠菌数据库 CandidaDB (<http://genolist.pasteur.fr/CandidaDB/>) 进行基因组序列 Blast 比较显示, ERG11 所含序列与数据库中的白念珠菌染色体 YHR007C 序列一致性达 100%。

2.2 *ERG11* 基因突变体的 DNA 鉴定及测序验证

以氨基酸侧链的长度、氨基酸的极性、酸碱碱性将 3 个待突变碱基 Y118、H310 和 S378 分别进行一点

对多点的突变, DNA 电泳验证结果表明插入序列正确; DNA 测序和 Blast 比对结果表明, 残基定点突变成功。突变插入序列的 DNA 验证见图 1, 突变序列测序验证结果见图 2。

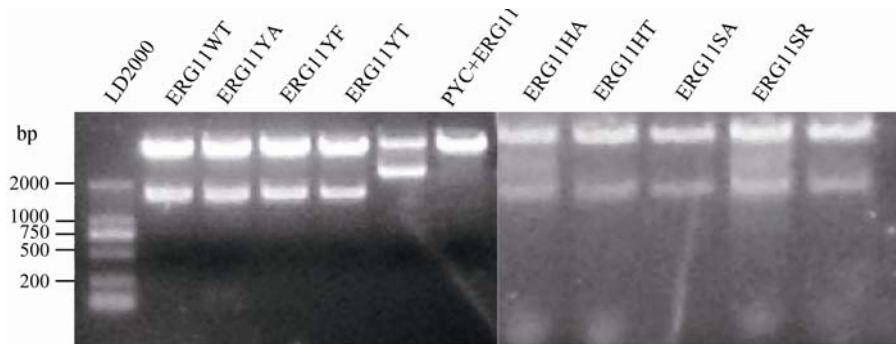


图 1 重组载体的酶切验证

Fig. 1 The restriction map of PYC/*ERG11*WT and PYC/*ERG11* mutants The positive fragment and standard DNA marker had been marked

118 mutation sequence and blast:

```
Query 301 ATCATAAATAACCCCTTTACCGAAAACCTGGAGTAGTTAAATGTTTGAAAGCATCTTCAGC 360
          |||
Sbjct 546 ATCATAAATAACCCCTTTACCGAAAACCTGGAGTAGTTAAATGTTTATAAGCATCTTCAGC 487
```

Y118F

```
Query 301 CATAAATAACCCCTTTACCGAAAACCTGGAGTAGTTAAATGTTTCTGAGCATCTTCAGCAG 360
          |||
Sbjct 547 CATAAATAACCCCTTTACCGAAAACCTGGAGTAGTTAAATGTTTATAAGCATCTTCAGCAG 488
```

Y118T

```
Query 301 GAATTTGGACAATCATAAATAACCCCTTTACCGAAAACCTGGAGTAGTTAAATGTTTAGCA 360
          |||
Sbjct 557 GAATTTGGACAATCATAAATAACCCCTTTACCGAAAACCTGGAGTAGTTAAATGTTTATAA 498
```

Y118A

310 mutation sequence and blast :

```
Query 181 GTAACAAGAACCAAGCAGAAGTAGAAGCAGAAGTAGCTTGACCACCATAAGAATACCAA 240
          |||
Sbjct 1111 GTAACAAGAACCAAGCAGAAGTAGAAGCAGAAGTAGTGTGACCACCATAAGAATACCAA 1052
```

H310A

```
Query 181 AGAAGTAGAAGCAGAAGTCTGTTGACCACCATAAGAATACCAATTAAGATTAGCAAT 240
          |||
Sbjct 1095 AGAAGTAGAAGCAGAAGTAGTGTGACCACCATAAGAATACCAATTAAGATTAGCAAT 1036
```

H310R

378 mutation sequence and blast :

```
Query 181 TGCCATTACATGCTATTTTGTAGAAAAGTTACTAACCATTAAAGAATCCCTGAAACCAATT 240
          |||
Sbjct 1268 TGCCATTACATGCTATTTTGTAGAAAAGTTACTAACCATTAAAGAATCCCTGAAACCAATT 1327
```

S378A

```
Query 181 CCGTATTTTGTAGAAAAGTTACTAACCATTAAAGAATCCCTGAAACCAATTATATTGTTCC 240
          |||
Sbjct 1278 TTCTATTTTGTAGAAAAGTTACTAACCATTAAAGAATCCCTGAAACCAATTATATTGTTCC 1337
```

S378T

图 2 *ERG11* ORF 基因突变点的测序验证

Fig. 2 The sequencing and blastn results of mutation point in *ERG11* ORF

2.3 野生型及突变体蛋白表达验证

半乳糖诱导 20 h, 破菌后的上清经 SDS - PAGE 蛋白凝胶电泳。结果表明, 与转入空载体的 D12667 相比, Re12667WT 样品在 55 kD 附近有一个明显的诱导蛋白条带, 经超速离心能得到较为单一的 55 kD 蛋白条带。Anti-Xpress 抗体的 Western 结果显示此蛋白带 Xpress 标签, 为目的载体插入序列的表达产物。Anti-CYP51 抗体 Western 结果显示目的条带为 CYP51 蛋白(图 3A, 3B)。

2.4 表达蛋白的定量及活性测定

本研究中用以分光光度法进行微粒体蛋白和 CYP51 蛋白定量测定, 见表 4。目标蛋白的表达量占诱导后微粒体总量的 25%左右。将超速离心后的目的蛋白-80°C 储存。用 GC-MS 法测量微粒体蛋白活性。结果显示野生型蛋白的活性为 11.6 nmol/(min·mg), 突变体蛋白活性不同程度降低, Y118 突变体分别为 6.25 nmol/(min·mg)、

6.54 nmol/(min·mg)、5.82 nmol/(min·mg), H310 突变体为 6.74 nmol/(min·mg)、6.40 nmol/(min·mg), 而 S378 为 8.22 nmol/(min·mg)、8.05 nmol/(min·mg), 见图 4。图 5 为蛋白活性检测的气质联用图, 直观表现不同突变酶对同一底物的代谢能力差异。

3 讨论

蛋白基因表达系统包括原核表达系统、真核表达系统、病毒表达系统。对 CYP51 酶的研究中, 3 种表达系统都有应用。早期研究认为 CYP51 是跨膜蛋白, 原核表达难以得到有活性的功能蛋白, 但 Waterman 研究小组经过多年的研究和改进, 通过改变起始密码子下游连续的八个密码子, 而获得高效表达 CYP51 的表达体系, 这一改建的原核表达系统已被多家实验室运用。病毒表达系统由于操作难以控制, 并未被广泛应用。目前, CYP51 表达应用较多的还是酵母表达系统, 不同实验室都建立了自己偏



图 3 重组蛋白的 Western 验证

Fig. 3 The western results of the expression protein ReCYP51

Note: A: The anti-CYP51 results of protein from Re12667WT, Re12667YA, Re12667YF, Re12667YT, Re12667 HA, Re12667HR, Re12667SA, Re12667 ST; B: The anti-Xpress results of the same protein.

表 4 蛋白的表达效率			
Table 4 The expression ratio of target protein			
Microsome	Total microsome protein after-induced (mg/100 mL)	CYP51 (mg/100 mL)	Expression ratio (%)
ReCYP51WT	20.40±5.05	5.18±2.14	0.25
ReCYP51YA	19.79±3.32	4.81±2.09	0.24
ReCYP51YF	21.50±6.89	6.19±2.45	0.28
ReCYP51YT	21.11±3.54	5.66±2.99	0.26
ReCYP51HA	19.75±3.67	4.42±1.78	0.22
ReCYP51HR	19.58±4.88	4.95±1.43	0.25
ReCYP51SA	18.74±4.23	4.32±1.62	0.23
ReCYP51ST	20.29±6.75	4.30±2.87	0.21

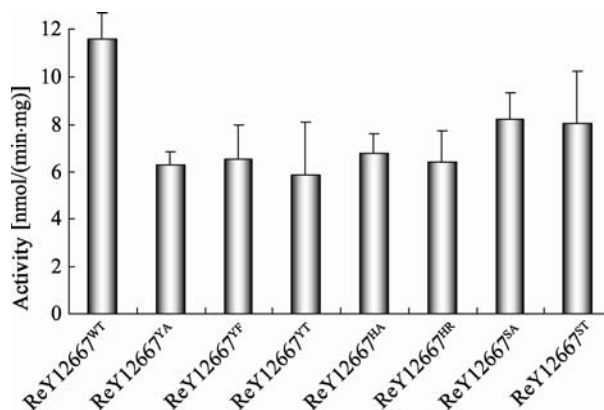


图 4 蛋白的催化活性

Fig. 4 The activity of expression protein

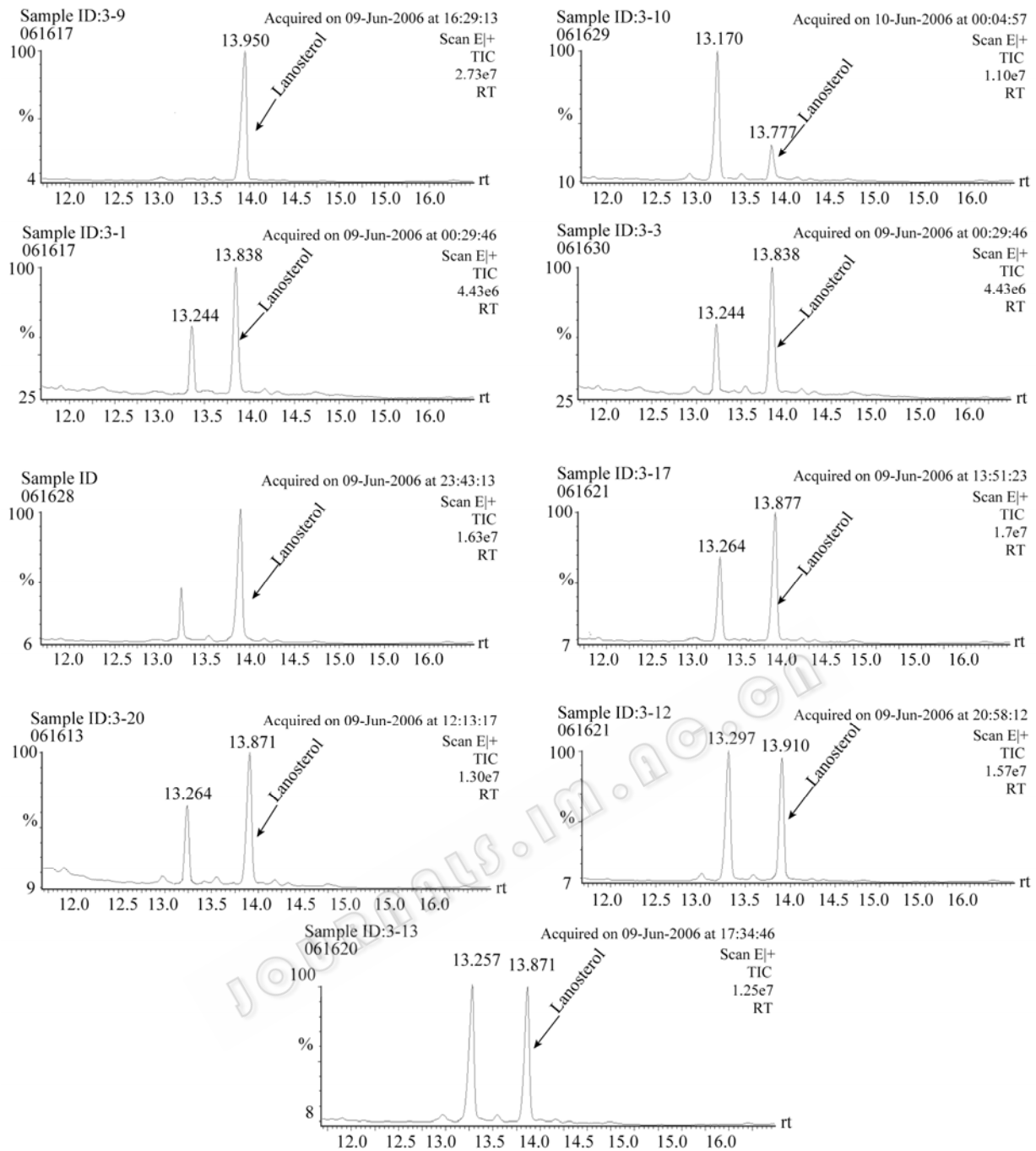


图 5 活性测定酶底物及代谢产物的气-质联用图谱

Fig. 5 The GC-MS map of protein activity reaction

Note: The substrate is lanosterol and the product is 4,4-dime-ergo-trienol. A is the purified substrate; B, C, D, E, F, G, H, I are the reactions initiated by ReCYP51WT, ReCYP51YA, ReCYP51YF, ReCYP51YT, ReCYP51HA, ReCYP51HR, ReCYP51SA and ReCYP51ST respectively.

好的表达载体^[6-10]。本研究中应用的 PYC 载体是一种低拷贝载体,可以在细胞水平控制因载体拷贝数差异而引起表达量的明显变化,以减少在细胞水平研究蛋白功能的影响因素。同时, PYC 载体在启动子的下游带有一个 6 个氨基酸的 X-press 多肽,可用于对表达蛋白的鉴定和纯化。

以往的研究表明,蛋白某些特定氨基酸残基的突变可引起蛋白抗原性的改变,从而影响特异性抗体的有效识别。本实验中引入 X-press 融合表达标签以弥补实验中可能带来的问题。Anti-CYP51 抗体和 Anti-Xpress 的 Western 检测蛋白表达皆为阳性。表明野生型和突变体目标蛋白都保持较好的抗原性。

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

根据 CYP51 蛋白与 CO 结合在 490 nm 处有一特征性 Soret 吸收峰, 用紫外分光光度法可对蛋白进行定量测定。结果表明目标蛋白的相对近似表达量占总微粒体蛋白的 25% 左右, 并且不同突变体的表达量无显著性差异。应用 GC-MS 方法对野生型及突变蛋白进行底物代谢活性测定, 表明野生型表达蛋白具有良好的对天然底物的代谢能力, 但 Y118、H310 和 S378 位点的突变影响酶蛋白的代谢活性, 以 Y118 改变较为明显而 S378 的影响最弱。

综上所述, 本研究进行了 CYP51 酶蛋白关键氨基酸残基的定点突变、表达相应蛋白并对酶蛋白进行定性、定量及活性测定, 研究结果为后续进一步开展药物与酶相互作用研究奠定了基础。

参 考 文 献

- [1] Sheng CQ, Zhang WN, Ji HT, *et al.* Structure-based optimization of azole antifungal agents by CoMFA, CoMSIA, and molecular docking. *J Med Chem*, 2005, **49**(8): 474-485.
- [2] Ji H, Zhang W, Zhou Y, *et al.* A three-dimensional model of lanosterol 14 α -demethylase of *Candida albicans* and its interaction with azole antifungals. *J Med Chem*, 2000, **43**(13): 2493-2505.
- [3] 盛春泉, 张万年, 张 珉, 等. 新型三唑类抗真菌化合物的三维定量构效关系研究. *化学学报*, 2005, **63**(7): 617-624.
- [4] Sheng C, Zhang W, Zhang M, *et al.* Homology modeling of lanosterol 14 α -demethylase of *Candida Albicans* and *aspergillus fumigatus* and insights into the enzyme-substrate interactions. *J Biomol Struct Dyn*, 2004, **22**(1): 91-99.
- [5] Ji H, Zhang W, Zhang M, *et al.* Structure based de novo design, synthesis, and biological evaluation of nonazole inhibitors specific for lanosterol 14 α -demethylase of fungi. *J Med Chem*, 2003, **46**(4): 474-485.
- [6] 陈双红, 盛春泉, 徐晓辉, 等. 酵母菌 Y12667 *ERG11* 基因删除及验证研究. *生命科学研究*, 2009, **13**(2): 116-121.
- [7] 马学军, 舒跃龙. 精编分子生物学实验指南. 北京: 科学出版社, 2005, pp.55-121, 406-407, 545-601.
- [8] Sanglard D, Kuchler K, Ischer F, *et al.* Mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *Candida albicans* isolates from AIDS patients involve specific multidrug transporters. *Antimicrob Agents Chemother*, 1995, **39**(11): 2378-2386.
- [9] Sanglard D, Ischer FF, Koymans L, *et al.* Amino acid substitutions in the cytochrome P-450 lanosterol 14 α -demethylase (CYP51A1) from azole-resistant *Candida albicans* clinical isolates contribute to resistance to azole antifungal agents. *Antimicrob Agents Chemother*, 1998, **42**(2): 2451-2453.
- [10] Lamb DC. The mutation T315A in *Candida albicans* sterol 14 α -demethylase causes reduced enzyme activity and fluconazole resistance through reduced affinity. *J Biol Chem*, 1997, **272**(9): 5682-5688.

稿件书写规范

论文中统计学符号书写规则

统计学符号一般用斜体。本刊常用统计学符号介绍如下, 希望作者参照执行。

样本的算术平均数用英文小写 x , 不用大写 X , 也不用 $Mean$ 。标准差用英文小写 s , 不用 SD 。标准误用英文小写 $s_{\bar{x}}$, 不用 $S E$ 。 t 检验用英文小写 t 。 F 检验用英文大写 F 。卡方检验用希腊小写 χ^2 。相关系数用英文小写 r 。样本数用英文小写 n 。概率用英文大写 P 。