

微流控芯片检测肺癌患者血浆中 p16 基因异常甲基化在临床应用的评价*

汪 洋¹⁾** 邹丽娟³⁾** 许冠东²⁾ 宫琳琳¹⁾ 周小棉⁴⁾ 邵淑娟^{1,2)}***

(¹⁾大连医科大学组织学与胚胎学教研室, 大连 116027; ²⁾中国医学科学院肿瘤医院病因研究室, 北京 100021;

³⁾大连医科大学附属第二医院肿瘤科, 大连 116027; ⁴⁾中国科学院化学物理研究所, 大连 116025)

摘要 肺癌是常见的恶性肿瘤之一, 其死亡率和发病率在世界范围的肿瘤性疾病中均居高不下. p16 基因启动子区异常甲基化被认为是肺癌发生中的一起早期事件. 为了提高检测异常甲基化方法的灵敏度及特异性, 利用微流控芯片检测 p16 基因的异常甲基化, 通过对肺癌患者血浆标本的检测, 使病人血浆中的 p16 基因甲基化的异常改变可能成为辅助肺癌早期诊断和高危人群筛选的分子标记物, 以期建立一种崭新而可靠的早期肺癌临床诊断方法.

关键词 p16 基因, 甲基化, 微流控芯片, 甲基化特异性 PCR

学科分类号 R730

肺癌是全球性的恶性肿瘤, 其死亡率和发病率在世界范围的肿瘤性疾病中均居首位^[1]. 在我国, 肺癌的死亡率及发病率也一直呈上升趋势. 因此肺癌已经成为严重危害人民身体健康的疾病. 但是, 迄今为止, 肺癌病人的早期诊断依然是一个没有解决的世界性难题. 主要原因是缺乏早期发现肿瘤的标记物. 近年来, 随着对肺癌发生、发展的细胞分子生物学机理的了解, 利用有效的细胞分子生物学标志, 对肺癌的早期诊断有着令人乐观的前景^[2-4].

甲基化是抑癌基因失活的主要机制之一, 而 p16 基因启动子区异常甲基化被认为是肺癌发生中的一起早期事件, 血浆中 p16 基因异常甲基化的检测, 作为一种微创的检测方法在临床中有潜在的应用价值. 目前人们检测 p16 基因甲基化的经典方法之一是甲基化特异性 PCR (methylation-specific PCR, MSP) 法^[5]. 该方法进行 PCR 扩增后, 再利用琼脂糖凝胶电泳进行检测, 由于琼脂糖凝胶电泳检测的灵敏度有限, 对于一些血浆中脱落肿瘤细胞少的患者, 检测结果容易造成假阴性, 于是发展一种快速、简便、准确、灵敏、高效的检测方法十分必要. 微流控芯片是目前分析化学研究的热点之一, 具有高灵敏度、体积小、成本低、分析过程自动化、分析速度快、所需样品和试剂少等特点^[6], 并且可以实现以往毛细管电泳所不能实现的阵列检测^[7].

本研究利用微流控芯片检测血浆中 p16 基因异常甲基化^[8], 通过盲性实验检测该方法的灵敏度

及特异性等, 以期建立一种崭新而可靠的肺癌临床诊断方法.

1 材料和方法

1.1 仪器与试剂

PCR 扩增反应是在 Thermoltybaid SPRT001 PCR 扩增仪 (UK); 微流控芯片是中国科学院大连化学物理研究所自行研制的通用型激光诱导荧光微流控芯片.

提取血浆 DNA 时所使用的蛋白酶 K 及 PCR 反应中所使用的 dNTP、TaqDNA 聚合酶及引物均购自大连宝生物公司; DNA ladder Marker, RNase A 购自北京华美公司; 甲基转化用亚硫酸氢钠购自 Sigma 公司, Wizard DNA Clean-up system 购自 Promega 公司, 氢醌购自 Sigma 公司, 糖原购自德国 Boehringer Mannheim 公司, 其他分析纯均购自北京化学试剂公司.

1.2 标本

血浆标本取自中国协和医科大学肿瘤医院和大连医科大学附属第一医院胸外科. 其中包括: 90 例肺癌患者血浆标本, 其中肺鳞癌标本 42 例, 肺腺癌标本 33 例, 腺鳞癌 15 例, 另外还设有 30 例甲基化阳性对照及 30 例甲基化阴性对照标本.

* 国家重点基础研究发展规划资助项目 (973) (2002CB513106) 和辽宁省教委科技资助项目 (202203248).

*** 并列第一作者. *** 通讯联系人.

Tel: 0411-4720228, E-mail: shaoshujuan@sohu.com

收稿日期: 2004-06-17, 接受日期: 2004-08-02

1.3 引物

p16 MS: TTATTAGAGGGTGGGGGGGATCGC;
p16 MAS1: GACCCGAACCGCGACCGTAA; p16
MAS2: CCACCTAAATCGACCTCCGACCG; p16 US:
TTATTAGAGGGTGGGGTGGATTGT; p16 UAS1: C-
AACCCCAAACCACAACCATAA; p16 UAS2: CC-
ACCTAAATCAACCTCCAACCA (大连宝生物公司)。

1.4 DNA 的提取

1.4.1 肺癌肿瘤组织标本及细胞基因组 DNA 的提取: 参见《分子克隆实验指南》。

1.4.2 血浆 DNA 的提取: 取 5 ml 全血在常温下离心 10~30 min (2 000 r/min), 将上清 (血浆) 取出于 -80℃ 保存。取于 -80℃ 保存的血浆, 加入蛋白酶 K, 离心 5 min (8 000 r/min), 将上清转移到新的 Eppendorf 管中, -20℃ 保存备用。

1.5 甲基化特异性 PCR 分析

1.5.1 DNA 碱基转化: 参考 Herman 等^[5]的方法。

1.5.2 DNA 纯化回收: 参考 Herman 等^[5]的方法。

1.5.3 PCR 反应:

a. 第一轮 PCR 反应: 以 50 μ l 反应体系进行。40 μ g DNA, 25 pmol/L 的引物 p16 MS/US 及 p16 MAS2/UAS2, 各 2.5 mmol/L dNTP, 15 mmol/L $MgCl_2$, 500 mmol/L KCl, 100 mmol/L Tris-HCl (pH 8.3), 2.5 U TaqDNA 聚合酶于 Thermohybrid 扩增仪中进行。循环参数: 95℃ 10 min; 95℃ 45 s, 60~65℃ 45 s, 72℃ 45 s, 35 个循环; 72℃ 7 min, 1 个循环后于 4℃ 保存。

b. 第二轮 PCR 反应: 以 50 μ l 体系进行。第一步 PCR 反应产物稀释 10 倍后做为模板 DNA, 25 pmol/L 的引物 p16 MS/US 及 p16 MAS1/UAS1, dNTP、 $MgCl_2$ 、KCl、Tris-HCl、TaqDNA 聚合酶等同第一轮 PCR 反应。循环参数: 95℃ 10 min; 95℃ 45 s, 60~65℃ 45 s, 72℃ 45 s, 35 个循环; 72℃ 7 min, 1 个循环后于 -80℃ 保存。

实际实验中, 每份标本均分别用两对引物扩增, 紫外扫描仪下观察, 未见 PCR 产物的标本再进行半巢式 PCR。每次 PCR 反应均重复 2 次。p16 双等位基因甲基化的前列腺癌细胞系 Tsu-PR1 基因组 DNA 作为阳性对照^[9]。

1.6 电泳及结果判断

1.6.1 琼脂糖凝胶电泳方法: 取 8 μ l 样品加样于 1.5% 的琼脂糖凝胶上, 电泳缓冲液为 TBE (0.5 $\times$), 在 60 V 电压下进行 40 min 后, 溴化乙锭染色紫外灯下观察结果。以甲基化引物和非甲基

化引物都得到扩增带, 来判断此样品相应的基因发生了甲基化。

1.6.2 微流控芯片电泳方法: 电泳缓冲液为 100 mmol/L TBE 缓冲液, pH 8.5; 分离电压 150~250 V/cm, 由正极至负极, 抑制电压 340~400 V/cm; 进样电压 400 V/cm, 由正极至负极; 在分离 DNA 时, 100 mmol/L TBE 缓冲液中加入 2% 的 HPMC, 芯片在使用前用双蒸水冲洗干净, 然后灌注电泳缓冲液, 同时将样品 (5 μ l PCR 产物 + 5 μ l marker) 加入样品池中, 尽量保持各池中液面高度一致。每次电泳完毕后, 吸出各池中液体, 然后用双蒸水冲洗通道 5 min^[7]。

2 结 果

2.1 琼脂糖凝胶电泳方法检测结果

2.1.1 甲基化阳性对照和阴性对照标本检测结果: 利用琼脂糖凝胶电泳检测 30 例甲基化阳性对照标本均为阳性, 30 例甲基化阴性对照标本均为阴性 (图 1)。

在对阳性对照进行 PCR 扩增时, 将循环数由原来的 35 个循环分别降低到 30 个循环、25 个循环、20 个循环, 结果除 35 个循环的 PCR 产物有一条明亮的条带, 30 个循环的 PCR 产物有一条极其微弱的条带外, 其余则未见任何产物条带 (图 2)。

我们还将扩增 35 个循环的阳性对照 PCR 产物分别稀释 20 倍、50 倍、100 倍、500 倍、1 000 倍、2 000 倍, 结果稀释 20 倍的 PCR 产物可以显示出一条极其微弱的条带, 稀释 50 倍以上的产物则观察不到产物条带 (图 3)。

2.1.2 90 例血浆标本检测结果: 利用琼脂糖凝胶电泳检测 90 例肺癌患者血浆标本甲基化水平, 结果 22 例为阴性, 68 例为阳性。

2.2 微流控芯片方法检测结果

2.2.1 甲基化阳性对照和阴性对照检测结果: 利用微流控芯片检测 30 例甲基化阳性标本, 结果均为阳性; 30 例甲基化阴性标本中, 1 例阳性, 其余 29 例为阴性。其检测灵敏度为 100% (30/30), 检测特异性为 96.67% (29/30) (图 1)。

在对阳性对照进行 PCR 扩增时, 将循环数由原来的 35 个循环分别降低到 30 个循环、25 个循环、20 个循环, 结果可以观察到 25 个循环的 PCR 产物仍有峰出现, 即该产物也被检测到了 (图 2)。

还将扩增 35 个循环的阳性对照 PCR 产物分别稀释 20 倍、50 倍、100 倍、500 倍、1 000 倍、

2 000 倍，结果直至将产物稀释到 2 000 倍时，仍然可以被检测到（图 3）。

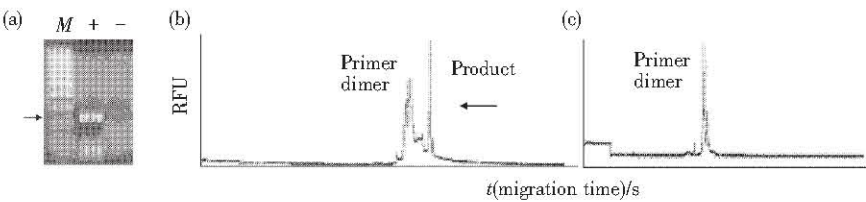


Fig. 1 Methylation positive and negative controls detecting by agarose gel electrophoresis and microfluidic chip
(a) agarose gel electrophoresis; (b) methylation positive; (c) methylation negative.

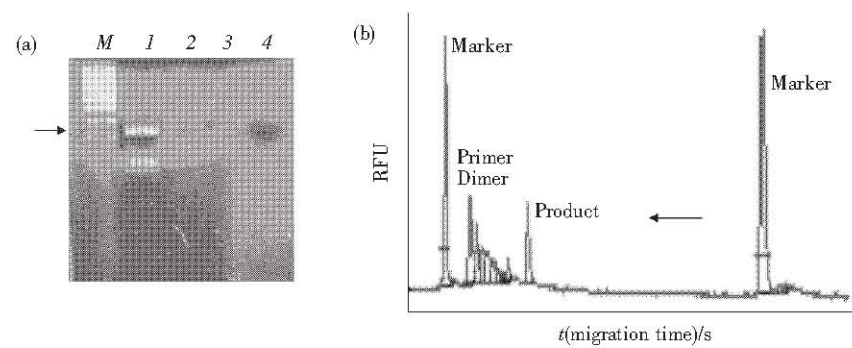


Fig. 2 The results of agarose gel electrophoresis (a) and microfluidic chips (b)
(a) *M*: marker; *I*: the results of positive DNA amplified 35 cycles; 2 ~ 4: the results of positive DNA amplified 30, 25, 20 cycles respectively. (b) amplified 25 cycles.

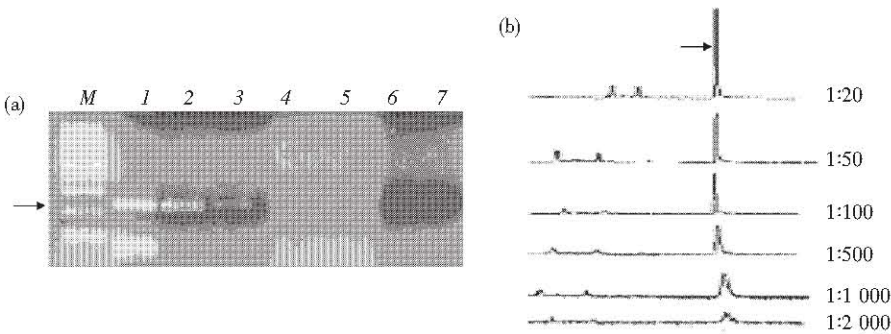


Fig. 3 The results of agarose gel electrophoresis (a) and microfluidic chips (b)
(a) *M*: marker; *I*: the results of positive DNA amplified 35 cycles; 2 ~ 7: the results of PCR products diluting by 20, 50, 100, 500, 1 000, 2 000 times respectively. (b) shows the results detecting by microfluidic chips, which is diluted by 20, 50, 100, 500, 1 000, 2 000 times respectively.

2.2.2 90 例血浆标本检测结果：在 90 例肺癌患者血浆标本中，76 例甲基化检测为阳性，其余 14 例为阴性；利用琼脂糖凝胶电泳检测出的 68 例甲基化阳性标本，经微流控芯片方法检测均为阳性，利用琼脂糖凝胶电泳检测为甲基化阴性的 22 例标本中，有 8 例经微流控芯片方法检测为阳性，其中有 5 例为鳞癌，2 例为腺癌，1 例为腺鳞癌，其灵

敏度比琼脂糖凝胶电泳提高了 36.36%。经配对资料 χ^2 检验分析证明：利用微流控芯片方法与传统的琼脂糖凝胶电泳方法相比较，两者的检出率分别为 84.44% 和 75.56%，两者之间存在明显差异 ($P < 0.005$)，微流控芯片方法的灵敏度明显高于传统的琼脂糖凝胶电泳方法。

2.3 讨论

近几年来,随着分子生物学技术在肿瘤研究中的发展,越来越多的癌变过程中特征性的分子遗传学改变被逐步揭示出来,为肺癌的分子诊断提供了新的思路.许多研究表明,肺癌组织中的遗传或遗传外改变可以在血浆/血清、支气管脱落的细胞中检测出来,如微卫星不稳定性的改变、抑癌基因和癌基因的突变以及基因的异常甲基化等^[10].

许多研究表明,在正常人和肿瘤病人的外周循环血中都可以检测到游离的 DNA.但是两者的浓度有很大的不同.有研究发现,在对照组中,血浆中 DNA 的平均浓度是 14 ~ 18 $\mu\text{g/L}$,而在不同类型的肿瘤病人中,其 DNA 平均浓度是 180 ~ 318 $\mu\text{g/L}$ ^[11].肿瘤病人血浆中升高的 DNA 被证明是实体瘤的肿瘤 DNA^[12],包含了和肿瘤 DNA 相同的遗传学或遗传外的改变.甚至有研究认为血浆中 DNA 的浓度可以作为高危人群中发现肿瘤和判断肺癌复发的指标之一^[13,14].

在 Esteller 等^[15]的研究中:73% 肺癌患者的肿瘤 DNA 与其相对应的血浆 DNA 中同时发生了 p16 基因异常甲基化. An 等^[16]研究了 p16 基因在非小细胞肺癌的肿瘤组织和其对应的血浆标本中的异常甲基化状况,发现在肿瘤组织标本中其甲基化的频率是 79.3% (73/92),而在对应的血浆标本中,其甲基化的频率是 73.3% (77/105),在发生甲基化的肿瘤组织对应的血浆标本中, p16 甲基化的检出率是 87.7% (64/73).在不同的肿瘤临床分期中,血浆中 p16 基因异常甲基化的频率与其在肿瘤中发生的频率大致相等.因此,由于肿瘤患者血浆中 p16 基因异常甲基化与其在肿瘤组织中的对应性,使检测血浆中 p16 基因异常甲基化可能对高危人群的筛选具有一种潜在的意义.

尽管肿瘤病人血浆中的 DNA 含量比正常人血浆中的 DNA 含量有所升高,但仍然是非常微量的、低拷贝的,利用以往的琼脂糖凝胶电泳进行检测,由于其灵敏度受到一定限制,所以难以满足诊断的要求.因此,在检测中提高灵敏度至关重要,而利用微流控芯片电泳方法恰恰有效地解决了在检测血浆中 p16 基因异常甲基化所遇到的困难,微流控芯片具有体积小、成本低、分析过程自动化、分析速度快、所需样品和试剂少等特点^[17],并且可以实现以往毛细管电泳所不能实现的阵列检测.其最主要的特点是可以大大提高检测的灵敏度.

本研究利用微流控芯片的方法检测了 30 例阳

性对照标本及 30 例阴性对照标本,其检测灵敏度为 100% (30/30),检测特异性为 96.67% (29/30).另外琼脂糖凝胶电泳检测为阴性的 8 例肺癌患者血浆标本中检测出阳性结果,其灵敏度比琼脂糖凝胶电泳提高了 36.36%.经配对资料 χ^2 检验分析证明,利用微流控芯片方法与传统的琼脂糖凝胶电泳方法相比较,两者的检出率不同 ($P < 0.005$),且微流控芯片方法的灵敏度明显高于传统的琼脂糖凝胶电泳方法.这样使 p16 基因异常甲基化在肿瘤患者血浆中的检出率大大提高,可能有助于低丰度 p16 甲基化异常的检出,更加准确地反映出肿瘤患者 p16 甲基化状态.

本文还通过检测甲基化阳性的前列腺癌 TSU 细胞系,进一步验证了微流控芯片的高灵敏度,其灵敏度可以比琼脂糖凝胶电泳检测方法的灵敏度提高近 100 倍.由此可见,利用微流控芯片大大提高检测的灵敏度.

利用琼脂糖凝胶电泳对 30 例甲基化阴性对照标本进行检测,以上结果均为阴性;在盲性实验中利用微流控芯片方法进行检测时,以上结果出现 1 例假阳性,其余 29 例均为阴性,其特异性为 96.67% (29/30).在重复实验中,我们严格控制实验条件,防止 PCR 产物受到污染所致,比如防止反应试剂、加样器枪头、微流控芯片通道等受到阳性产物的污染,结果检测的特异性提高了 100% (30/30),这也提示我们一定要防止产物在扩增前及扩增后的污染.在进行 PCR 扩增时一定要设立空白对照,并且每次 PCR 扩增反应都应该至少重复进行一次,使结果更加可信,更进一步提高检测的特异性.

毛细管电泳技术是近年来发展起来的一种微分离技术,在对 DNA、蛋白质等生物大分子的分离检测及分析中发挥了重要作用.而微流控芯片是在毛细管电泳基础上发展起来的,是当今分析科学的重要发展前沿.目前,在一般的分子生物学实验室中,检测 PCR 的方法是琼脂糖凝胶电泳,电泳后在紫外照射仪上进行观察,灵敏度受到 DNA 量和裸眼分辨率的制约,随着电泳过程的载体从平板转为毛细管,由于 PCR 产物在封闭的毛细管中进行,可防止产物在琼脂糖凝胶中弥漫带来的交叉污染,同时也可以节省上样量.此外,由于实验结果由计算机显示,避免了实验结果中的人为误差.检测的灵敏度、特异性、准确性也随之有了极大提高.微流控芯片与普通的毛细管电泳相比,体积更小,时

间更短, 灵敏度更高, 利用该方法检测肺癌患者肿瘤及血浆中的 p16 基因异常甲基化的方法不但比传统的方法大大提高了灵敏度, 并同时具有较高的特异性。我们坚信, 随着该技术方法的不断完善, 其最终会对肺癌的临床早期诊断起到指导作用。

3 结 论

微流控芯片与琼脂糖凝胶电泳相比, 其检测灵敏度较后者提高至少 36.36%, 其特异性为 96.67%, 进一步提高其检测特异性, 可以使其高灵敏度更加可信, 从而有助于低丰度 p16 甲基化异常的检出, 更加准确地反映出病人 p16 甲基化状态, 使病人血浆中的 p16 基因甲基化的异常改变可能成为辅助肺癌早期诊断和高危人群筛选的分子标记物, 而且在提示肺癌病人的预后和治疗方面有广阔的应用前景。

致谢 中国医学科学院中国协和医科大学程书钧院士在实验设计中给予的指导, 中国科学院大连化学物理研究所林炳承研究员在实验检测中给以的帮助, 在此一并表示感谢。

参 考 文 献

- 1 Parkin D M. Global cancer statistics in the year 2000. *The Lancet Oncology*, 2001, **2** (9): 533 ~ 543
- 2 Esteller M, Sanchez-Cespedes M, Rosell R, *et al.* Detection of aberrant promoter hypermethylation of tumor suppressor genes in serum DNA from non-small lung cancer patients. *Cancer Res*, 1999, **59** (1): 67 ~ 70
- 3 Allan J M, Hardie L J, Briggs J A, *et al.* Genetic alteration in bronchial mucosa and plasma DNA from individuals at high risk of lung cancer. *Int J Cancer*, 2001, **91** (3): 359 ~ 365
- 4 Kennedy T C, Miller Y, Prindicille S. Screening for lung cancer revisited and the role of sputum cytology and fluorescence bronchoscopy in a high-risk group. *Chest*, 2000, **117** (Suppl 1): 72s ~ 79s
- 5 Herman J G, Graff J R, Myohanen S, *et al.* Methylation-specific

- PCR: A novel PCR assay for methylationstatus of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **93** (19): 9821 ~ 9826
- 6 Tian H, James P, Fan S, *et al.* Capillary and microchip electrophoresis for rapid detection of known mutations by combining allele-specific DNA amplification with heteroduplex analysis. *Clin Chem*, 2001, **47** (2): 173 ~ 185
- 7 周小棉, 戴忠鹏, 罗 勇, 等. 多通道微流控芯片. 中国专利, ZL02353129, 0. 2002-07-18
- Zhou X M, Dai Z P, Luo Y, *et al.* multichannel microfluidic chips. China Patent, ZL02353129, 0. 2002-07-18
- 8 Kersting M, Friedl C, Kraus A, *et al.* Differential frequencies of p16^{INK4A} promoter hypermethylation, p53 mutation, and K-ras mutation in exfoliative material mark the development of lung cancer in symptomatic chronic smokers. *Clinical Oncology J*, 2000, **18** (18): 3221 ~ 3229
- 9 Jarrard D F, Bova G S, Ewing C M, *et al.* Deletional, mutational, and methylation analyses of CDKN2 (p16/MTS1) in primary and metastatic prostate cancer. *Genes Chromosomes Cancer*, 1997, **19** (2): 90 ~ 96
- 10 Salgia R, Skarin A T. Molecular abnormalities in lung cancer. *J Clin Oncol*, 1998, **16** (3): 1207 ~ 1217
- 11 Widschwendter M, Jones P A. The potential prognostic, predictive, and therapeutic values of DNA methylation in cancer. *Clin Cancer Res*, 2002, **8** (6): 17 ~ 21
- 12 Zou H Z, Yu B M, Wang Z W, *et al.* Detection of aberrant p16 methylation in the serum of colorectal cancer patients. *Clin Cancer Res*, 2002, **8** (1): 188 ~ 191
- 13 Lecomte T, Berger A, Zinzindohoue F, *et al.* Detection of free-circulating tumor-associated DNA in plasma of colorectal cancer patients and its association with prognosis. *Int J Cancer*, 2002, **100** (5): 542 ~ 548
- 14 Jahr S, Hannes H, Englisch S, *et al.* DNA fragment in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer Res*, 2001, **61** (4): 1659 ~ 1665
- 15 Esteller M, Sanchez M C, Rosell R, *et al.* Detection of aberrant promoter hypermethylation of tumor suppressor genes in serum DNA from nonsmall cell lung cancer patients. *Cancer Res*, 1999, **59** (1): 67 ~ 70
- 16 An Q, Liu Y, Gao Y, *et al.* Detection of p16 hypermethylation in circulating plasma DNA of non-small cell lung cancer patients. *Cancer Lett*, 2002, **188** (1 ~ 2): 109 ~ 114
- 17 Fraga M F, Rodroguex R, Canal J. Rapid qualification of DNA methylation by high performance capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, 2000, **21** (4): 2990 ~ 2994

The Evaluation in Clinical Application of Detecting Aberrant Methylation of p16 Gene by Microfluidic Chips in Lung Cancer Patients *

WANG Yang¹⁾ **, ZOU Li-Juan³⁾ **, XU Guan-Dong²⁾ ,
GONG Lin-Lin¹⁾ , ZHOU Xiao-Mian⁴⁾ , SHAO Shu-Juan^{1,2)} ***

¹⁾ Department of histology and embryology, Dalian Medical University, Dalian 116027, China;

²⁾ Department of Chemical Etiology and Carcinogenesis, Cancer Institute,

Peking Union Medical College & Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100021, China;

³⁾ Department of Oncology, The Second Affiliated Hospital, Dalian Medical University, Dalian 116027, China;

⁴⁾ Dalian Institute of Chemical Physics, The Chinese Academy of Sciences, Dalian 116025, China)

Abstract Lung cancer is one of the malignant tumors. The death rate and incidence are very high through the whole world. Aberrant methylation of p16 gene promoter is thought to be an early event in lung cancer development. To improve the sensitivity and specificity, the microfluidic chip method was established to detect the aberrant methylation of p16 gene. The plasma samples of lung cancer patients were detected. The p16 gene methylation can perhaps become a biomarker for early lung cancer. It may become a new and reliable method for early diagnosis of lung cancer.

Key words p16 gene, methylation, microfluidic chips, methylation-specific PCR

* This work was supported by grants from The Special Funds for Major State Basic Research of China (2002CB513106) and Educational Department of Liaoning Province (202203248).

** WANG Yang and ZOU Li-Juan contributed equally the work.

*** Corresponding author. Tel: 86-411-4720228, E-mail: shaoshujuan@sohu.com

Received: June 17, 2004 Accepted: August 2, 2004

关于“研究快报”栏目的几点说明

本刊自2004年6月起将“研究快报”栏目开辟为论文快速发表通道,这一举措受到作者和读者的广泛关注和积极支持,目前本刊已收到大量“研究快报”栏目投稿。在此,本刊对关心该栏目的作者、读者表示感谢。半年来,本刊在处理“研究快报”栏目论文的过程中发现了一些问题,现围绕这些问题做几点说明,敬请作者投稿时注意:

1. 在“研究快报”栏目发表的论文必须是高创新性科研成果或高创新性科研工作的阶段性成果。
2. 投送“研究快报”栏目的论文须同时附2份同行专家推荐信,对稿件的创新性和内容的真实可靠性作出客观的评价。本刊在收到全部推荐信之前一律将论文按照普通投稿处理。
3. 本刊对投送“研究快报”栏目的论文实行专人催审、简化审稿程序,一旦录用随时安排发表,免收论文发表费。
4. 自2005年1月1日起,“研究快报”栏目的稿件审理费由120元/篇调整到300元/篇。