

利用线粒体膜电位测定筛选 参与细胞凋亡的人类新基因*

骆 叶^{1,3)} 王 兰^{1,2)} 高 霞¹⁾ 邓唯唯¹⁾ 于 鹏¹⁾
张晨颖¹⁾ 陆 阳¹⁾ 郝 钰³⁾ 石太平^{1)**}

¹⁾国家人类基因组北方研究中心, 北京 100176;

²⁾北京大学医学部基础医学院医学免疫学实验室, 北京 100083;

³⁾北京中医药大学基础医学院免疫学教研室, 北京 100029)

摘要 细胞凋亡(apoptosis)属于细胞程序化死亡(programmed cell death), 是细胞内涉及到许多生化反应的复杂过程. 建立了基于细胞水平的凋亡筛选模型, 用于筛选人类基因组中功能未知的序列, 以发现与细胞凋亡相关的新基因. 通过构建人类未知基因的表达文库, 并将未知基因表达载体瞬时转染 HeLa 细胞, 用阳离子染料 JC-1 标记 HeLa 细胞线粒体内膜并检测线粒体跨膜电位, 用流式细胞术进行阳性结果的验证. 经过对未知基因表达文库内 600 个新基因的筛选, 得到 7 个线粒体跨膜电位下降相关新基因 (CHMP6、CGI-38、hCAP-H2、NUDT16L1、ARMC1、PHF17 和 FLJ21103), 经实验验证, 其中 3 个基因 (CHMP6、CGI-38 和 hCAP-H2) 与细胞凋亡相关. 结果表明, 所建立的基于细胞的凋亡筛选模型稳定高效, 3 个细胞凋亡相关基因将被进行深入研究.

关键词 高通量筛选, 细胞凋亡, 线粒体膜电位, 荧光, 新基因

学科分类号 Q987, R34

随着人类基因组测序工作的完成, 大量未知功能的基因被发现, 基于细胞的功能基因高通量筛选技术迅速形成和发展^[1]. 人们借助 RNA 干扰^[2]、报告基因^[3]、细胞芯片^[4]等技术手段研究未知基因的功能, 成功地发现了一些具有重要生理病理意义的新基因, 为各种生理病理机制的深入研究提供了条件, 也为疾病治疗靶标的发现和基因药物的开发打下了基础.

细胞凋亡(apoptosis)属于细胞程序化死亡(programmed cell death), 是细胞内涉及到许多生化反应的复杂过程. 凋亡过程中的多种关键事件与线粒体有关, 包括 caspase 激活物的释放 (如细胞色素 c)、电子转移功能的丧失、线粒体跨膜电位的降低乃至消失及 Bcl-2 家族蛋白的参与. 线粒体跨膜电位的下降是细胞凋亡级联反应过程中较早发生的事件. 随着线粒体跨膜电位的下降, 线粒体膜上的 PT 通道(permeability transition pore)开放. PT 通道可以无选择性地允许分子质量低于 1.5 ku 的分子通过, 造成线粒体基质内的高渗透压, 使线粒体内外

H⁺ 梯度消失, 呼吸链脱偶联, 能量产生中断, 由于水和溶质的进入, 基质肿胀并导致外膜破裂, 释放出包括细胞色素 c 在内的各种活性蛋白质^[5]. 正因为线粒体在凋亡中的重要性, 线粒体跨膜电位是常用的早期凋亡的检测指标之一.

JC-1 是一种阳离子染料, 在线粒体中表现出膜电位依赖性聚集, 能灵敏地反映细胞线粒体跨膜电位改变情况. 当线粒体跨膜电位未降低时, JC-1 聚合而被检测到红色发射光; 当线粒体跨膜电位下降时, JC-1 以单体形式存在, 被检测到绿色发射光^[6]. 因此, JC-1 作为一种线粒体探针, 应用于凋亡早期线粒体跨膜电位下降的检测. 基于 JC-1 染料对线粒体膜电位下降的诱导剂和阻滞剂进行筛选的

*科技部“功能基因组与生物芯片”重大专项支持项目 (2002BA711A01-01).

**通讯联系人.

Tel: 010-67883332-868, Fax: 010-67873016, E-mail: tpshi@126.com

收稿日期: 2006-12-05, 接受日期: 2006-12-31

模型早在数年前就已被提出^[7], 近年来也有不少研究者提出将 JC-1 与其他染料相结合进行筛选的方法^[8,9], 但尚未有真正应用 JC-1 进行大规模筛选的报道.

1 材料和方法

1.1 cDNA 文库

从人类 RefSeq 数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/RefSeq/>)^[10]中, 选出“假定”、“预测”、“推定”或“未知”的和功能研究文献少于 3 篇的序列作为候选序列. 使用 EST 数据库对候选序列进行校正和延伸, 得到全长序列, 预测开放读码框. 根据对 Unigene 数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/>)^[11]的分析, 选用包含 20 种人类组织的 cDNA 文库(Clontech, USA), 在这 20 种组织中能检测到绝大多数候选基因的表达.

为了提高 PCR 效率, 使用两步 PCR 法: 首先将候选基因根据编码序列长度与表达谱相似性分组, 用各组共同的 cDNA 模板和混合引物进行第一轮 PCR. 然后将第一轮 PCR 产物进行纯化, 作为第二轮 PCR 的模板, 加入基因特异的引物扩增靶基因. 纯化的 PCR 产物连入 pGEM-T Easy 载体(Promega 公司, USA), 通过使用 ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)测序验证. 正确地插入片段进行酶切 (*EcoR* I), 并连接到哺乳动物表达载体 pcDNA3.1/myc-His(-)B(Invitrogen 公司, USA).

1.2 细胞培养和瞬时转染

HeLa 细胞(ATCC: CCL-2)用含有 10%胎牛血清(Biochrome 公司, 德国)的 DMEM 培养液(Hyclone 公司, 美国), 于 5% CO₂ 孵箱内 37℃ 常规培养. 取处于对数生长期的细胞进行所有实验. 细胞转染采用阳离子转染试剂 VigoFect (威格拉斯公司, 中国), 按照产品说明书进行操作.

1.3 JC-1 染色和检测

将 HeLa 细胞接种到 96 孔培养板, 接种细胞密度为 1.2×10^4 个 / 孔, DMEM 培养基体积为 100 μ l / 孔. 37℃ 培养 24 h, 将待筛选的目的基因真核表达载体转染细胞, 每个基因设 3 个复孔. 转染后 26 h, 用无血清培养基稀释的 JC-1 染料(终浓度为 10 mg/L)对细胞进行染色, 37℃ 孵育 30 min 后吸弃染料, 细胞用 PBS 洗 2 遍, 用 GENios Pro reader (Tecan 公司, 瑞士)检测. 红色荧光强度值(RED)在 590 nm 处检测, 激发波长 535 nm. 绿色荧光强度值

(GREEN)在 535 nm 处检测, 激发波长 484 nm. 以 RED/GREEN 表示细胞线粒体跨膜电位下降情况. 阳性对照为编码 BAX 的表达载体. BAX 是 Bcl-2 家族成员, 当细胞受到凋亡因子诱导时, BAX 可以转位于线粒体并通过寡聚化形成跨膜通道, 导致线粒体膜电位下降, 细胞色素 c 释放, 启动细胞凋亡途径. 阴性对照为 pcDNA3.1/myc-His(-)B 空载体(PCDB). 阳性基因的标准为: 待筛基因 RED/GREEN 值低于阴性对照 RED/GREEN 值 25%以上.

1.4 光镜下观察

对于初筛实验重复 3 次均为阳性的目的基因, 将之转染 HeLa 细胞, 方法如前所述. 转染后 24 h, 将细胞置于显微镜(Olympus IX 70)下观察表型改变, 验证引起细胞线粒体跨膜电位下降的阳性基因在细胞凋亡中的作用.

1.5 流式细胞仪验证筛选结果

采用 Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒(北京宝赛生物技术有限公司)检测细胞凋亡. 目的基因转染 24 h 后, 取 5×10^5 个 HeLa 细胞, 胰酶消化并用 PBS 洗 2 遍. 细胞用 200 μ l 结合缓冲液重悬, 加入 Annexin V-FITC 标记外翻的磷脂酰丝氨酸(终浓度为 0.5 mg/L), PI 标记细胞核(终浓度为 1 mg/L), 室温下避光孵育 20 min 后加入 400 μ l 结合缓冲液, 立即使用 FACS Calibur 流式细胞仪(BD, 美国)检测. 用 FL1 通道 (激发波长 488 nm, 发射波长 530 nm) 检测 Annexin V-FITC 荧光信号, 用 FL2 通道 (>600 nm 滤镜)检测 PI 荧光信号. Annexin V-FITC 和 PI 双染能将样品中的坏死和晚期凋亡细胞 (Annexin V+, PI+) 与早期凋亡细胞 (Annexin V+, PI-) 区分开来.

1.6 凋亡相关新基因的生物信息学分析

用 EST 聚类得到目的 cDNA 片段, 用 PCGENE 软件分析得到预测的氨基酸序列. 参考 HTGS 数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)分析得到染色体定位和结构信息. 使用 GNF SymAtlas v1.0.4 (<http://symatlas.gnf.org/SymAtlas/>)^[12] 和 GEPIS (<http://share.gene.com/share/gepis/>)^[13]检索基因表达谱信息. 对预测的氨基酸序列, 使用 ExPASy Web 站点(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>)^[14]进行跨膜区分析, 使用 Signal P (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)^[15]推测信号肽切割位点, 使用 PSORT II (<http://psort.nibb.ac.jp/>)^[16]软件分析亚细胞定位, 使用 NCBI Conserved Domain 数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml>)^[17]检

索蛋白质结构域.

2 结 果

2.1 筛选模型的建立

在初筛模型的建立中我们改进了染料配制的方法. JC-1 是一种脂溶性的荧光染料, 用无血清培养基稀释时出现难溶性颗粒而无法达到工作液浓度, 细胞染色后经换液, 镜下仍见染料颗粒残存, 影响检测结果. 我们尝试在染料工作液中添加 1:50 000 的非离子型表面活性剂 Tween-80, 增加了 JC-1 的溶解度, 提高了检测的准确性和稳定性. 预实验中, 转染阴性对照 (pcDNA.3.1/myc-His (-) B 空载体) 的细胞 6 个复孔 RED/GREEN 平均值为 (14.32 ± 0.45) , 转染阳性对照 (编码 BAX 的表达载体) 的细胞由于过表达 BAX, BAX 在线粒体膜上的寡聚化导致线粒体膜电位降低, 6 个复孔 RED/GREEN 平均值为 (5.66 ± 0.72) . 该筛选模型步骤精简, 检测快速, 费用经济, 灵敏度高, 适合进行大规模初筛.

2.2 共筛选 600 个新基因, 7 个与线粒体跨膜电位下降有关

经过检索、扩增、克隆及测序, 再将目的基因序列与 RefSeq 数据库 (Release 11, on May 13, 2005) 进行比对, 共得到 600 条功能未知的新基因序列 (基因列表参见 <http://211.101.49.211/gene>). 其中少部分基因有 3 篇以下功能报道的文献, 绝大部分为完全未知或者功能信息极少的新基因. 本实验室仍在进行新基因的克隆工作, 目的基因 cDNA 库将不断扩大.

用 JC-1 染色的方法共筛选了 600 个未知功能的人类新基因, 其中 7 个新基因 (CHMP6、CGI-38、hCAP-H2、NUDT16L1、ARMC1、PHF17 和 FLJ21103) 分别转染细胞后, 荧光检测显示 RED/GREEN 值低于转染了空载体的阴性对照 (PCDB) 25% 以上, 表明这 7 个新基因在 HeLa 细胞

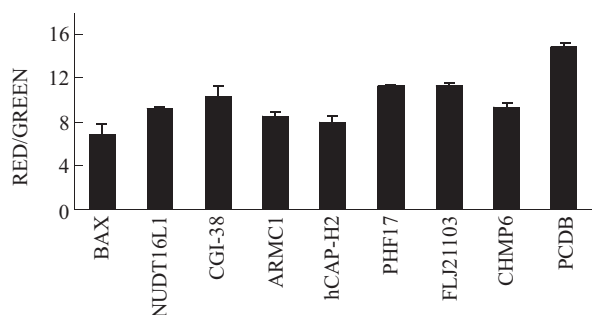


Fig. 1 Fluorescence assay of HeLa cells transfected with novel genes after JC-1 staining

中过表达能引起线粒体跨膜电位降低 (图 1). 其中 BAX 为阳性对照.

2.3 验证得到 3 个凋亡相关人类新基因

将初次筛选得到的 7 个阳性基因表达质粒转染 HeLa 细胞, 24 h 后置光镜下观察, 发现转染了编码 CHMP6、CGI-38 和 hCAP-H2 表达载体的细胞形态发生了明显的改变. 与阳性对照 BAX 组相似, 镜下见典型的凋亡改变, 如核皱缩、凋亡小体形成、贴壁细胞脱离培养瓶壁等, 而转染了空载体的阴性对照 (PCDB) 没有发生这些改变. 表明这 3 个新基因与细胞凋亡相关 (图 2).

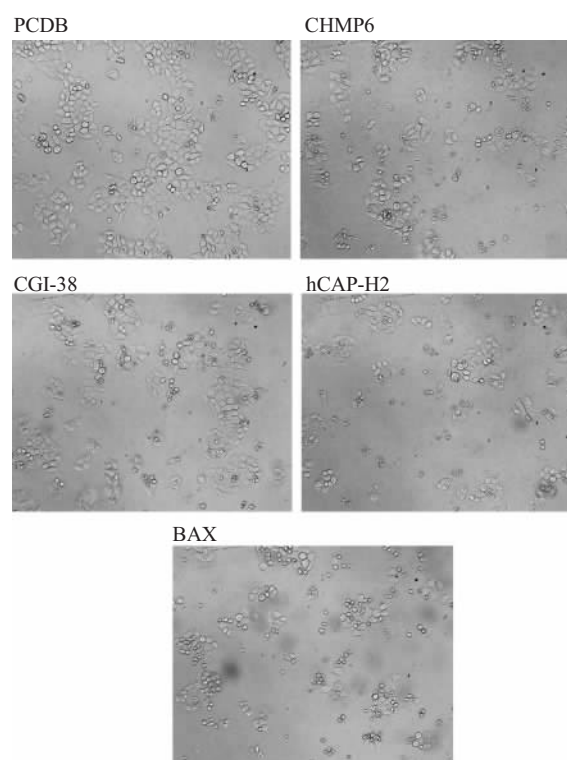


Fig. 2 Morphological changes of cells transfected with target novel genes (100x)

HeLa 细胞分别瞬时表达 3 个使细胞出现凋亡表型的新基因, 经流式细胞仪双染法检测, 与转染了空载体的阴性对照 (PCDB) 相比, 细胞早期凋亡 (Annexin V+, PI-) 比例明显增加, 坏死和晚期凋亡 (Annexin V+, PI+) 比例也相应增加, 从而验证了 CHMP6、CGI-38 和 hCAP-H2 是与细胞凋亡相关的新基因 (图 3).

2.4 凋亡相关新基因的生物信息学分析

筛选得到的 3 个凋亡相关基因 (CHMP6、CGI-38 及 hCAP-H2) 的 RefSeq 号分别是 NM_024591、NM_015964 和 NM_014551 (表 1). 筛

选得到的基因与细凋亡及线粒体跨膜电位下降的关系目前尚无人研究.

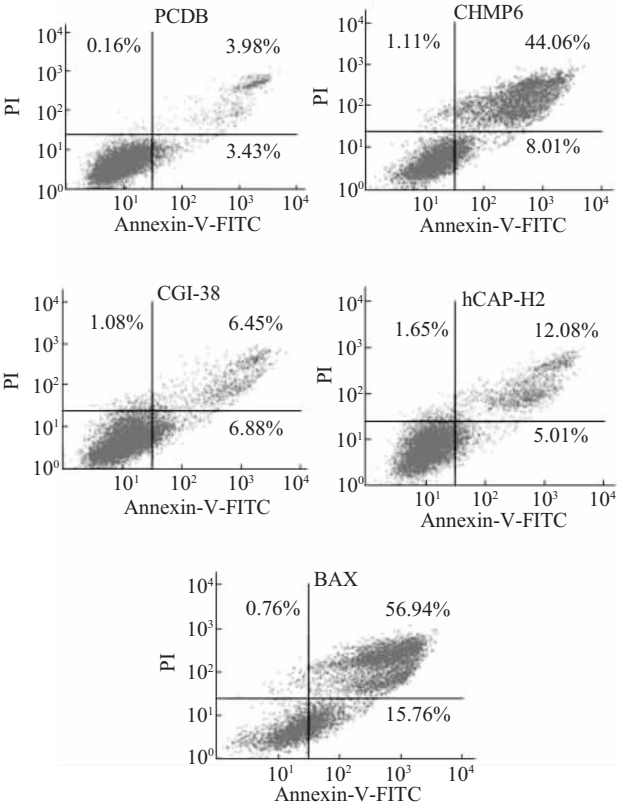


Fig. 3 Significant increase in apoptosis after cells transfected with target novel genes

Table 1 Bioinformatic analysis of the three positive genes

Gene name	CHMP6	CGI-38	hCAP-H2
RefSeq ID	NM_024591	NM_015964	NM_014551
Unigen	Hs.514560	Hs.534458	Hs.180903
Map	17q25.3	16q22.1	22q13.33
GeneID	79643	51673	29781
Exon	8	4	9
Expression profile (top two)	Heart, Lung	Placenta	Brain, Eye
AA number	201	176	249
Signal P (cleavage site)	No	No	19aa
CCD	Snf7	p25-alpha	DUF1032
TMHMM	No	No	No
Subcellular location	Nucl: 14; Mito: 5; Plas: 3; Golg: 3; Cyto: 1; Vacu: 1	Extr: 10; Mito: 4; Plas: 4; Vacu: 4; Golg: 3; Nucl: 2	Cysk: 14; Cyto: 6; Nucl: 4; Mito: 2; Extr: 1
Functional article	1	No	2

3 讨 论

在本研究中，我们应用 JC-1 建立了一个稳定高效的筛选模型. 该模型以荧光检测为基础，反映活细胞线粒体功能状态，适合筛选与线粒体途径凋亡相关的新基因或小分子化合物. 该模型以编码 BAX 的表达载体为阳性对照. 过表达的 BAX 通过在线粒体膜上的寡聚化形成跨膜通道，导致线粒体膜电位下降，启动细胞凋亡途径，表现出强大而稳定的促凋亡作用. 阴性对照为 pcDNA.3.1/myc-His(-)B 空载体.

利用此模型对本实验室克隆的未知基因库内 600 个新基因进行筛选，发现有 7 个新基因具有与线粒体跨膜电位下降相关的作用. 进一步的验证研究发现其中 3 个新基因 (CHMP6、CGI-38 及 hCAP-H2) 与凋亡相关. HeLa 细胞在分别瞬时表达这 3 个新基因时呈现出典型的凋亡改变，如核皱缩、核周边染色质浓集、凋亡小体形成及贴壁细胞脱离培养瓶壁等，流式细胞仪检测发现细胞凋亡比例明显增加. 应用生物信息学分析亚细胞定位，发现这 3 个基因编码的蛋白质均被预测可能定位于线粒体，说明它们的某些功能很可能与线粒体相关. 其中，CGI-38 是未见功能报道的全新基因. CHMP6 是酵母转运必需的胞内分选复合物 III (endosomal sorting complex required for transport-III，ESCRT-III) 的组分囊泡分选蛋白 20 (vacuolar protein sorting 20，Vps20) 在人类的直系同源蛋白，作为内涵体膜上转运必需的胞内分选复合物 III 的接收器在胞内分选中起调节作用^[18]. hCAP-H2 属于 kleisin 超家族成员，含有能与染色体结构维持 (structural maintenance of chromosome，SMC) 蛋白形成环状结构的保守结构域^[19]. 这 3 个新基因与线粒体跨膜电位下降及凋亡的关系目前尚无人研究.

对在验证研究中未表现出促凋亡作用的其他 4 个初筛阳性的基因 (NUDT16L1、ARMC1、PHF17 及 FLJ21103) 进行生物信息学分析. 其中基因 PHF17 的 RefSeq 号是 NM_024900，已有文献报道该基因在肾脏中高表达，能通过促进细胞线粒体途径的凋亡发挥抑制肾肿瘤的作用^[20]. NUDT16L1、ARMC1 及 FLJ21103 是未经功能报道的全新基因，其 RefSeq 号分别为 NM_032349、NM_018120 和 NM_024556. 对这 3 个基因编码的蛋白质进行亚细胞定位分析 (<http://wolfsort.seq.cbrc.jp/>)，结果显示，NUDT16L1 最可能的亚细胞定位是线粒体，

说明该基因的功能很可能与线粒体相关. 另 2 个基因 ARMC1 和 FLJ21103 编码的蛋白质也均具有线粒体定位的可能. 这 4 个基因在凋亡验证实验中并未表现出明显的促凋亡作用, 对实验结果我们分析如下: 某些基因的作用仅仅是引起线粒体膜电位下降, 并不一定导致细胞凋亡; 某些基因在特定细胞系能产生促凋亡作用, 而在 HeLa 细胞中这种作用不强, 或在验证研究的检测时间点凋亡尚未发生. 某些基因在使线粒体跨膜电位发生改变的同时, 可能影响了胞内其他调控信号, 例如上调抗凋亡网络而产生一系列抗凋亡效应, 或缺乏必要的促凋亡协同信号, 因此没有出现后续的凋亡信号级联放大, 不引起细胞凋亡. 这些基因在验证实验中虽未表现出明显的促凋亡作用, 但仍具有潜在的研究价值.

在过去的研究中, 国家人类基因组北方研究中心的研究人员利用报告基因技术发现和报道了 4 个参与诱导细胞坏死与凋亡的新基因^[21]. 由于所有阳性基因均被一一检出的可能性很小, 本研究的结果是与之之前对库内未知功能基因研究结果的相互补充, 而在筛选技术与方法上相互独立. 细胞内蛋白质的功能网络极其复杂, 基于细胞的功能筛选仅能发现某个基因在某方面的作用. 此外, 某个新基因在基于细胞的筛选中表现出一定的功能, 并不意味着该基因在体内具有同样的作用. 对筛选得到的阳性基因, 还需要进一步的功能研究, 包括利用表达谱分析得到功能提示, 利用 RNAi 技术沉默基因表达, 利用 Co-IP 及 Pull-down 技术研究相互作用蛋白等, 对具有重要功能的新基因还需进行动物实验. 我们将对发现的 3 个凋亡相关基因进行深入的研究.

参考文献

- Giese K, Kaufmann J, Pronk G J, *et al.* Unravelling novel intracellular pathways in cell-based assays. *Drug Discov Today*, 2002, **7** (3): 179~186
- Muller P, Kutteneuler D, Gesellchen V, *et al.* Identification of JAK/STAT signalling components by genome-wide RNA interference. *Nature*, 2005, **436** (7052): 871~875
- Domer S, Lum L, Kim M, *et al.* A genomewide screen for components of the RNAi pathway in *Drosophila* cultured cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, **103** (32): 11880~11885
- Narayanaswamy R, Niu W, Scouras A D, *et al.* Systematic profiling of cellular phenotypes with spotted cell microarrays reveals mating-pheromone response genes. *Genome Biol*, 2006, **7** (1): R6
- Green D R, Reed J C. Mitochondrial and apoptosis. *Science*, 1998, **281** (5381): 1309~1312
- Smiley S T, Reers M, Mottola-Hartshorn C, *et al.* Intracellular heterogeneity in mitochondrial membrane potential revealed by J-aggregate-forming lipophilic cation JC-1. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, **88** (9): 3671~3675
- Nuydens R, Novalbos J, Dispersyn G, *et al.* A rapid method for the evaluation of compounds with mitochondria-protective properties. *J Neurosci Methods*, 1999, **92** (1~2): 153~159
- Szilagyi G, Simon L, Koska P, *et al.* Visualization of mitochondrial membrane potential and reactive oxygen species via double staining. *Neurosci Lett*, 2006, **399** (3): 206~209
- Lecoeur H, Langonne A, Baux L, *et al.* Real-time flow cytometry analysis of permeability transition in isolated mitochondria. *Exp Cell Res*, 2004, **294** (1): 106~117
- Pruitt K D, Tatusova T, Maglott D R. NCBI Reference Sequence (RefSeq): a curated nonredundant sequence database of genomes, transcripts and proteins. *Nucleic Acids Res*, 2005, **33** (Database issue): D501~504
- Wheeler D L, Church D M, Federhen S, *et al.* Database resources of the National Center for Biotechnology. *Nucleic Acids Res*, 2003, **31** (1): 28~33
- Su A I, Wiltshire T, Batalov S, *et al.* A gene atlas of the mouse and human protein-encoding transcriptomes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, **101** (16): 6062~6067
- Zhang Y, Eberhard D A, Frantz G D, *et al.* GEPIS--quantitative gene expression profiling in normal and cancer tissues. *Bioinformatics*, 2004, **20** (15): 2390~2398
- Sonnhammer E L, von Heijne G, Krogh A. A hidden Markov model for predicting transmembrane helices in protein sequences. *Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol*, 1998, **6**: 175~182
- Lukashin A V, Borodovsky M. GeneMark.hmm: new solutions for gene finding. *Nucleic Acids Res*, 1998, **26** (4): 1107~1115
- Delcher A L, Harmon D, Kasif S, *et al.* Improved microbial gene identification with GLIMMER. *Nucleic Acids Res*, 1999, **27** (23): 4636~4641
- Marchler-Bauer A, Anderson J B, Cherukuri P F, *et al.* CDD: a Conserved Domain Database for protein classification. *Nucleic Acids Res*, 2005, **33** (Database issue): D192~196
- Yorikawa C, Shibata H, Waguri S, *et al.* Human CHMP6, a myristoylated ESCRT-III protein, interacts directly with an ESCRT-II component EAP20 and regulates endosomal cargo sorting. *Biochem J*, 2005, **387** (Pt 1): 17~26
- Schleiffer A, Kaitna S, Maurer-Stroh S, *et al.* Kleisins: a superfamily of bacterial and eukaryotic SMC protein partners. *Mol Cell*, 2003, **11** (3): 571~575
- Zhou M I, Foy R L, Chitalia V C, *et al.* Jade-1, a candidate renal tumor suppressor that promotes apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, **102** (31): 11035~11040
- Wang L, Gao X, Gao P, *et al.* Cell-based screening and validation of human novel genes associated with cell viability. *J Biomol Screen*, 2006, **11** (4): 369~376

Screening and Validation of Human Novel Genes Associated With Cell Apoptosis*

LUO Ye^{1,3}, WANG Lan^{1,2}, GAO Xia¹, DENG Wei-Wei¹, YU Peng¹,
ZHANG Chen-Ying¹, LU Yang¹, HAO Yu³, SHI Tai-Ping¹**

¹Chinese National Human Genome Center, Beijing 100176, China;

²Laboratory of Medical Immunology, School of Basic Medical Science, Peking University Health Science Center, Beijing 100083, China;

³Laboratory of Immunology, School of Basic Medical Science, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

Abstract With the success of human genome project, a large number of predicted genes were sequenced, requiring functional assays for their characterization in a high-throughput manner. To identify novel human genes associated with cell apoptosis, a high-throughput assay was established. Candidate sequences were amplified and cloned in pcDNA3.1/myc-His(-)B, then were transfected into HeLa cells respectively. The expression vector encoding BAX was used as the positive control, which was widely-known to effectively induce programmed cell death. JC-1 staining was utilized to assess the mitochondrial membrane potential, which could collapse in the early stage of apoptosis. 600 human novel genes were screened and seven positive genes (CHMP6, CGI-38, hCAP-H2, NUDT16L1, ARMC1, PHF17, and FLJ21103) were found out. A subsequent validation by flow cytometry revealed that three of the seven genes (CHMP6, CGI-38, hCAP-H2) were with functions related to cell apoptosis. In HeLa cells transfected with the above three expression vectors, the proportion of single annexin-V-positive cells was evidently increased (8.01%, 6.88%, 5.01%) compared with PCDB-transfected cells (3.43%). Bioinformatics analysis of the three positive genes reveals that their functions are known little and the relationships between the three genes and cell apoptosis have not previously been reported. These results therefore indicate that a rapid and effective screening system has been studied. Further studies will perform on the 3 genes associated with cell apoptosis.

Key words high-throughput screening, cell apoptosis, mitochondrial membrane potential, fluorescence, novel genes

*This work was supported by a grant from The National Key Technologies R&D Program "Functional Genome and Biochips" of Chinese Ministry of Science and Technology (2002BA711A01-01).

**Corresponding author . Tel: 86-10-67883332-868, Fax: 86-10-67873016, E-mail: tpshi@126.com

Received: December 5, 2006 Accepted: December 31, 2006