

钙调素拮抗剂 E6 对大鼠脑一氧化氮合酶活性和突触体谷氨酸释放的影响

丁启龙, 刘国卿¹

(中国药科大学生理学教研室, ¹药理学教研室, 南京 210009)

摘要 目的 探讨钙调素拮抗剂 E6 的抗脑缺血作用机制。方法 用 [³H]-L-Glu (glutamic acid, Glu) 标记大鼠脑突触体, 测定突触体的 Glu 释放量和用一氧化氮合酶 (nitric oxide synthase, NOS) 试剂盒测定成年大鼠脑匀浆上清中 NOS 活性。结果 E6 促进 Glu 释放 (与对照组比, 10^{-5} mol·L⁻¹ 组增加 81.0%), 但对 KCl (50 mmol·L⁻¹) 引起的 Glu 释放有抑制作用, 10^{-5} mol·L⁻¹ E6 的抑制率为 23.2%。E6 浓度依赖性地抑制 NOS 活性。钙调素 (calmodulin, CaM) ($30 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) 可逆转 E6 的抑制作用 (10^{-5} mol·L⁻¹ E6 的抑制率为 13.7%), *N*-硝基-精氨酸 (*N*-nitro-arginine, *L*-NNA) ($10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 可加强 E6 的抑制作用 (10^{-5} mol·L⁻¹ 的抑制率为 76.5%)。结论 E6 是与 CaM 结合后发挥抑制 NOS 活性效应的, E6 对 Glu 释放的影响可能与其对 NOS 活性及其对神经细胞内 Ca²⁺ 影响有关。

关键词 钙调素拮抗剂; E6; 突触体; 谷氨酸; 一氧化氮合酶

中图分类号: R965, R972 **文献标识码**: A **文章编号**: 1000-5048(2002)05-0434-05

脑缺血以后, 首先引起兴奋性氨基酸 (如 Glu) 释放, 作用于兴奋性氨基酸受体, 导致细胞内钙超载, 引发兴奋性氨基酸的兴奋性毒性, 包括细胞内 Ca²⁺ 超载、氧自由基产生、一氧化氮大量释放等^[1]。缺血早期的 NO 可能具有生理性的保护作用, 但缺血后期和复灌期间过量的 NO 扩散作用于邻近的神经元, 造成大量神经元死亡。NO 还可能作为逆行性神经递质, 作用于突触前膜, 促进多种神经递质如 γ -氨基丁酸 (GABA)、谷氨酸 (glutamate acid, Glu)、多巴胺 (dopamine, DA)、去甲肾上腺素和乙酰胆碱 (ACh) 的释放, 调节 NMDA 受体的活性, 从而扩大病理信号^[2]。如果药物能作用于 Glu 释放环节, 使得缺血缺氧后, 神经细胞外 Glu 浓度不升高或升高程度降低, 或通过抑制 Ca²⁺/CaM 依赖性的 NOS, 减少或中断其毒性作用, 最终可表现出抗脑缺血作用。四氢异喹啉类化合物小檗碱的衍生物 E6, 和经典钙调素拮抗剂三氟拉嗪 (trifluoperazine, TFP) 一样, 在显示较强钙调素拮抗作用的同时^[3], 还显示抗整体动物脑缺血和培养神经细胞缺血样损伤的作用^[4,5]。为探讨 E6 抗脑缺血作用机制, 本研究用大鼠脑突触体和脑匀浆, 分别观察其对突触

体 Glu 的释放和对 NOS 活性的影响。

1 材料与方法

1.1 动物

SD 大鼠, 体重 180~220 g, 由中国药科大学动物中心提供。

1.2 药品与溶液

E6: 本校药化研究室黄文龙教授合成。CaM 和 TFP: 进口分装, 生化研究室刘猛六老师惠赠。*N*-硝基-精氨酸 (*L*-NNA): Sigma 公司产品。³H-Glu (6Ci/mmol, 1 mCi/ml): 中科院上海原子核研究所。取 10 μl 加入到 90 μl Krebs 液中备用。闪烁液: PPO 4 g, POPOP 0.4 g, 二甲苯加至 1000 ml。蔗糖溶液: 蔗糖 0.32 mmol·L⁻¹, 葡萄糖 10 mmol·L⁻¹, 用 Tris 调 pH 至 7.4。磷酸盐缓冲液 (PBS): NaCl 8 g, KCl 0.2 g, Na₂HPO₄·12H₂O 3.49 g, KH₂PO₄ 0.2 g。Krebs-bicarbonate 缓冲液 (mmol·L⁻¹): NaCl 115.6, KCl 4.7, CaCl₂ 1.3, MgCl₂ 1.2, KH₂PO₄ 1.2, Na₂SO₄ 1.2, NaHCO₃ 25, Glucose 11.1。用 Tris 调 pH 至 7.4。Hepes-Hanks 液 (mmol·L⁻¹): NaCl 137, CaCl₂ 1.3, MgSO₄ 0.4, MgCl₂ 0.5, KCl 5.0, KH₂PO₄ 0.4,

Na₂HPO₄ 0.6, NaHCO₃ 3.0, Glucose 5.6, Hepes 20, pH 7.4。NO 测定试剂盒:南京建成生物工程公司。

1.3 仪器

751-分光光度计:上海分析仪器厂。RS-20 III 型高速冷冻离心机:日本, Tomy Seiko Co. Ltd.。Beckman LS5000TD 型闪烁仪。

1.4 突触体和脑匀浆制备

按文献方法^[6-8]制备突触体和脑匀浆。考马氏亮兰法测定的突触体蛋白质浓度为 33.5 μg·ml⁻¹, 脑匀浆上清蛋白质含量为 1.32 g·L⁻¹。

1.5 释放实验^[6,8,9]

每管取 900 μl 突触体悬液, 加入 1 μl ³H-Glu, 25℃ 水浴中振荡 10 min, 4℃ 10000 r/min 离心 30 min, 冰冷 PBS 洗 2 次, 加入 Krebs 液重悬。加入药物(对照组加生理盐水)后 37℃ 复温 20 min, 4℃ 中止反应, 上玻纤膜, 用闪烁仪测定 dpm 值。观察药物对 KCl 去极化引起 Glu 释放的影响时, 在复温结束前 1 min 内加入终浓度为 50 mmol·L⁻¹ 的 KCl, 以后立即中止反应。以 KCl 组释放的 dpm 为 100%, 给药组与 KCl 组 dpm 差值占 KCl 组 dpm 的百分数为释放抑制率。

1.6 NOS 活性测定

用南京建成生物工程研究所一氧化氮合酶(NOS)测定试剂盒。加入药物与上清液后, 于 37℃ 温育 15 min, 再按试剂盒说明书要求操作。观察 CaM 和 L-NNA 对 E6 抑制 NOS 活性影响实验中, 在加药前加入 CaM 或 L-NNA, 加入药物 37℃ 温育 15 min 后再加中止液和显色液。测定原理: NOS 催化 L-Arg 和分子氧反应生成 NO, NO 与亲核性物质生成有色化合物。在 530 nm 波长下, 测定 OD 值, 代表组织 NOS 活性。脑组织 NOS 活性定义为: 每 mg 组织蛋白质每 min 生成 1 nmol NO 为一个酶活性单位。

2 结果

2.1 E6 对突触体 Glu 释放的影响

[³H]-L-Glu 标记后测定值为 26.12 ± 1.33 (× 10³ dpm/mg·protein·10 min)。25℃ 温育 10 min 后, 对照组释放出 1.21 ± 0.14 (× 10³ dpm/mg·protein·10 min)。与对照组比, 高浓度 E6 (10⁻⁵ ~ 10⁻⁴ mol·L⁻¹) 的释放增加(分别增加 81% 和 114%, $P < 0.05$)。说明 E6 对 [³H]-L-Glu 的释放有一定的促进

作用。而维拉帕米对 Glu 释放无明显影响(与对照组比较, $P > 0.05$)。见表 1。

Tab 1. Effect of E6 on [³H]-L-Glutamate release from synaptosomes ($\bar{x} \pm s, n=4$)

Groups	Concentration (mol·L ⁻¹)	[³ H]-L-Glu release (× 10 ³ dpm/mg·protein·10 min)	Release (%)
Control		1.21 ± 0.14	
E6	10 ⁻⁶	1.65 ± 0.27	36
	10 ⁻⁵	2.19 ± 0.13*	81
	10 ⁻⁴	2.59 ± 0.31*	114
TFP	10 ⁻⁵	2.38 ± 0.14*	97
Verapamil	10 ⁻⁶	1.37 ± 0.18	13

* $P < 0.05$, compared with control group.

2.2 E6 对 KCl 引起突触体 Glu 释放的抑制作用

KCl (50 mmol·L⁻¹) 可使 [³H]-L-Glu 的释放增加, 促释放率为 31%。与 KCl 组比, E6 (10⁻⁶ ~ 10⁻⁵ mol·L⁻¹) 可轻度抑制 KCl 促突触体释放 [³H]-L-Glu, 抑制率分别为 20.4% 和 23.2%。维拉帕米 (10⁻⁶ mol·L⁻¹) 的抑制率为 28.8%。结果见表 2。

Tab 2. Effect of E6 on [³H]-L-Glutamate release evoked by KCl (50 mmol·L⁻¹) from synaptosomes ($\bar{x} \pm s, n=4$)

Groups	Concentration (mol·L ⁻¹)	[³ H]-L-Glu release (× 10 ³ dpm/mg·protein·10 min)	Release (%)
KCl		8.09 ± 0.51	
E6 + KCl	10 ⁻⁷	7.04 ± 0.66	12.9
	10 ⁻⁶	6.48 ± 0.56*	20.4
	10 ⁻⁵	6.21 ± 0.31*	23.2
TFP + KCl	10 ⁻⁵	6.27 ± 0.20*	22.5
Verapamil + KCl	10 ⁻⁶	5.76 ± 0.24*	28.8

* $P < 0.05$, compared with KCl group.

2.3 E6 对大鼠脑匀浆 NOS 活性的抑制作用

E6 和 TFP 可剂量依赖性的抑制脑组织 NOS 活性, 10⁻⁶ mol·L⁻¹ E6 即可使 NOS 活性下降近一半 (48.7%), 相同浓度的 TFP 对 NOS 的抑制率为 31.2%。见表 3。

2.4 CaM 对 E6 抑制 NOS 活性的影响

30 μg·ml⁻¹ CaM, 可使 NOS 活性增加到 7.42 ± 0.34 u/min·mg protein, 上升 41.9%。同时较大强度地逆转 E6 和 TFP 对 NOS 活性的抑制。10⁻⁶ mol·L⁻¹ E6 的抑制率仅为 13.7%。表明 E6 可能是通过抑制 CaM 活性, 间接表现出对 NOS 活性的抑制。见表 4。

Tab 3. Effect of E6 on NOS activity in rat brains ($\bar{x} \pm s, n=4$)

Groups	Concentration (mol·L ⁻¹)	NOS (u/min·mg protein)	Inhibition (%)
control		5.23±0.31	
E6	10 ⁻⁸	4.25±0.35**	19.1
	10 ⁻⁷	3.39±0.28**	35.2
	10 ⁻⁶	2.68±0.38**	48.7
	10 ⁻⁵	2.37±0.27**	54.6
TFP	10 ⁻⁷	4.61±0.24*	11.9
	10 ⁻⁶	3.60±0.32**	31.2
	10 ⁻⁵	3.08±0.34**	41.1

** $P < 0.01$, vs control group.Tab 4. Effect of CaM on E6 inhibiting of NOS activity in rat brains ($\bar{x} \pm s, n=4$)

Groups	Concentration (mol·L ⁻¹)	NOS (u/min·mg protein)	Inhibition (%)
Control		5.23±0.31	
CaM		7.42±0.34**	
CaM+E6	10 ⁻⁸	7.27±0.37	2.0
	10 ⁻⁷	6.68±0.36**	9.9
	10 ⁻⁶	6.40±0.23**	13.7
	10 ⁻⁵	5.68±0.30**	23.5
CaM+TFP	10 ⁻⁷	7.18±0.21	3.2
	10 ⁻⁶	6.80±0.32**	8.4
	10 ⁻⁵	6.34±0.44**	14.5

** $P < 0.01$, vs control group; * $P < 0.01$, vs CaM group.

2.5 L-NNA(*N*-硝基-精氨酸)对 E6抑制 NOS 活性的影响

Tab 5. Effect of L-NNA on E6 inhibiting NOS activity in rat brains ($\bar{x} \pm s, n=4$)

Groups	Concentration (mol·L ⁻¹)	NOS (u/min·mg protein)	Inhibition (%)
Control		5.23±0.31	
L-NNA		3.40±0.22**	
L-NNA+E6	10 ⁻⁸	2.49±0.24**	26.8
	10 ⁻⁷	2.08±0.17**	38.5
	10 ⁻⁶	1.23±0.31**	63.8
	10 ⁻⁵	0.89±0.18**	73.2
L-NNA+TFP	10 ⁻⁷	2.39±0.21**	29.7
	10 ⁻⁶	1.79±0.37**	47.4
	10 ⁻⁵	1.51±0.33**	55.6

** $P < 0.01$, vs control group; * $P < 0.01$, vs L-NNA group.

L-NNA 是 NOS 活性抑制剂, 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ L-NNA 可使 NOS 活性显著降低(降低35.0%), 同时可大大增强 E6 和 TFP 对 NOS 的活性抑制作用。10⁻⁶ mol·L⁻¹ E6 的抑制率上升到63.8%。结果表明 E6 与 L-NNA 是通过作用于不同的环节, 表现出对 NOS 活性的抑制作用。

3 讨论

正常生理状况下, Glu 的释放和其它递质释放过程相似: 当神经冲动到达神经末梢时, 神经末梢去极化, 开放膜上的 Ca²⁺ 通道, Ca²⁺ 内流, 升高细胞内 Ca²⁺ 浓度。升高的细胞内 Ca²⁺ 有两个作用, 一是减少轴浆的粘滞度, 二是中和突触前膜内的负电荷, 使含有神经递质的囊泡易于向前膜移动而与前膜融合^[10]。因此内 Ca²⁺ 浓度升高, 有利于递质释放。

低血糖症和缺氧时, 脑组织主要是以 Ca²⁺ 非依赖性方式释放大量的 Glu^[11]。脑缺血引起的 Glu 释放分为两个不同阶段: 一是在脑缺血和低氧供期间, Glu 通过 Glu 摄取载体的反相开放而释放。这个阶段释放的 Glu 可激活 NMDA 受体, 使细胞内 Ca²⁺ 浓度增加, 触发 NMDA 受体门控电流的持续加强。缺血期后, Ca²⁺ 依赖性的 Glu 释放激活 Ca²⁺ 通过非 NMDA 受体通道大量内流, 进而引起神经元死亡^[12]。

KCl 引起的突触体 Glu 释放在机理上不能完全等同于脑缺血缺氧期间的 Glu 释放。KCl 引起的 Glu 从豚鼠脑皮层突触体 Ca²⁺ 依赖性释放呈双相: 快速相在2s 内完成, 接着的缓慢相中在52s 达到半数最大释放量。减少去极化程度, 抑制 Glu 释放量, 同时延长 Ca²⁺ 依赖性释放到达半数最大释放量的时间。KCl 引起的这种 Glu 双相释放需要外钙内流和细胞内 ATP, 反映了可释放 Glu 的囊泡位于突触前膜释放活性区和分散于细胞质中的双重定位。KCl 使突触体去极化, 引起细胞内钙瞬间升高, 并逐渐到达一个平台。大部分 Glu 是在这个平台期释放的^[13]。

维拉帕米可抑制 KCl 引起的大鼠突触体内 Ca²⁺ 升高^[14], 因此它抑制 KCl 引起的 Glu 释放是可以理解的。E6 促进大鼠脑突触体 Glu 释放和抑制 KCl 引起的 Glu 释放, 可能也是 E6 影响神经细胞内钙的结果: E6 可升高神经细胞静息内钙、抑制 KCl 引起的神经细胞内钙升高^[15]。

Ca²⁺/CaM 依赖的蛋白磷酸化调节着神经末梢递质的释放。自发磷酸化激活的 Ca²⁺/CaM 依赖的蛋白激酶 II (Ca²⁺/CaM-dependent PK-II), 可增加大鼠突触体释放 Glu 和 NE 的速率, 而此酶活性的抑制剂则降低释放速率^[16]。NO 引起 Glu 释放的持

续时间和 KCl 相似。与 KCl 和 A23187 不同的是 NO 引起的释放不依赖于细胞内钙。NO 本身减低细胞内钙,钙通道阻滞剂 Cd^{2+} 并不影响 NO 引起的 Glu 释放。推测 NO 可能是作用于囊泡上 Ca^{2+} 敏感池^[17]。NO 可使突触体 Ca^{2+} 非依赖性 Glu 释放增加,在缺氧溶液中释放量更大。NO 与氧竞争细胞色素氧化酶,表现为可逆地抑制此酶的活性。NO、精胺/NO 复合物和 KCN 抑制突触体呼吸链与促进 Glu 的 Ca^{2+} 非依赖性释放强度顺序一致。说明 NO 升高可导致线粒体功能失调、引发 Glu 释放和神经元的兴奋性毒性^[18]。

从本实验结果可以看出,E6 和 TFP 都具有 NOS 活性抑制作用。 CaM 可部分拮抗 E6 和 TFP 的抑制作用,而 L-NNA 可加强 E6 和 TFP 的抑制作用。神经细胞内的 nNOS 和脑微血管中 eNOS 都是 $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ 依赖性酶,iNOS 上也有 CaM 的结合部位。用荧光分光光度计法进行的研究表明,E6 可以依赖于 Ca^{2+} 的方式直接与 CaM 结合^[3]。而 NOS 是 $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ 依赖性的酶。因此也不能排除具有较强钙调素拮抗活性的 E6 抑制某些参与调节 Glu 释放的 $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ 依赖的酶(包括 NOS)活性,而使 Glu 释放减少的可能性。

参考文献

- [1] Szatkowski M, Attwell D. Triggering and execution of neuronal death in brain ischemia: Two phases of glutamate release by different mechanisms. *Trends Neurosci*, 1994, 17(9):359-365.
- [2] Meldrum BS. The role of nitric oxide in ischemic damage. *Advance in Neurology (Cellular and Molecular Mechanism of Ischemic Brain Damage)*, 1996, 71:355-363.
- [3] 陈少林(Chen SL),胡卓逸(Hu ZY),郝奇志(Hao QZ),等.钙调素拮抗剂双苄基异喹啉化合物结构与活性关系的研究. *生物化学杂志(Clin Biochem J)*, 1990, 6(5):413-416.
- [4] 丁启龙(Ding QL),皋 聪(Gao C),刘国卿(Liu GQ),等.钙调素拮抗剂 E6 抗整体动物脑缺血作用. *江苏医药(Jiangsu Med J)*, 1998, 24(suppl):214-219.
- [5] 丁启龙(Ding QL),张 珙(Zhang H),刘国卿(Liu GQ),等.钙调素拮抗剂 E6 对缺血性损伤神经细胞的保护作用. *中国药理学杂志(Clin Pharm J)*, 1999, 34(11):742-745.
- [6] Hans Schoemaker, Victor J. Nickolson. Dopamine uptake by rat striatal synaptosomes: time and temperature-dependent decay and protection by dithiothreitol and dopamine. *J Neurochem*, 1983, 40(4):922-928.
- [7] Takagaki G. Properties of the uptake and release of glutamic acid by synaptosomes from rat cerebral cortex. *J Neurochem*, 1976, 27:1417-1425.
- [8] 朱晓峰(Zhu XF),朱长庚(Zhu CG),赵锦程(Zhao JC). 马桑内酯对大鼠大脑皮层突触体和脑片谷氨酸摄取和释放功能的影响. *中国药理学杂志(Clin Pharm J)*, 1997, 32(2):81-81.
- [9] 高国全(Gao GQ),欧阳佩珍(Quyang PZ),姚志彬(Yao ZB). 老年大鼠突触体谷氨酸和 γ -氨基丁酸的代谢变化. *中国老年学杂志*, 1994, 14(6):370-372.
- [10] Fillenz M. Physiological release of excitatory amino acid. *Behav Brain Res*, 1995, 71(1-2):51-67.
- [11] Kauppinen RA, McMahon HT, Nicholls DG. Ca^{2+} -dependent and Ca^{2+} -independent glutamate release, energy status and cytosolic free Ca^{2+} concentration in isolated nerve terminals following metabolic inhibition: possible relevance to hypoglycaemia and anoxia. *Neuroscience*, 1988, 27(1):175-182.
- [12] Paschen W. Glutamate excitotoxicity in transient global cerebral ischemia. *Acta Neurobiol Exp(Warsz)*, 1996, 56(1):313-322.
- [13] McMahon HT, Nicholls DG. The relationship between cytoplasmic free Ca^{2+} and the release of glutamate from synaptosomes. *Biochem Soc Trans*, 1990, 18(3):375-377.
- [14] 高 红(Gao H),冯亦璞(Feng YP). 用 Fura-2 测定突触体内的游离 Ca^{2+} 浓度及 Ca^{2+} 通道激动剂和阻断剂的影响. *药理学报(Acta Pharm Sin)*, 1993, 28(6):404-409.
- [15] 丁启龙(Ding QL),刘国卿(Liu GQ). 钙调素拮抗剂 E6 对神经细胞内钙的影响. *中国药理学通报(Chin Pharmacol Bull)*, 2000, 16(4):391-394.
- [16] Nichols RA, Sihra TS, Czernik AJ, et al. Calcium/Calmodulin dependent protein kinase II increases glutamate and noradrenaline release from synaptosomes. *Nature*, 1990, 343(6259): 647-651.
- [17] Meffer MK, Premack BA, Scholman H. Nitric oxide stimulates Ca^{2+} -independent synaptic vesicle release. *Neuron*, 1994, 12(6): 1235-1244.
- [18] McNaught KS, Brown GC. Nitric oxide causes glutamate release from brain synaptosomes. *J Neurochem*, 1998, 70(4): 1541-1546.

Effects of E6, a Calmodulin Antagonist, on Nitric Oxide Synthase in Rat's Brain and $[^3\text{H}]$ -Glutamic Acid Release from Synaptosome

DING Qi-Long, ¹LIU Guo-Qing

Department of physiology, ¹Department of Pharmacology, China Pharmaceutical University Nanjing 210009

ABSTRACT **AIM** To study the mechanism of E6, a calmodulin antagonist, on ischemic neuronal injury. **METHODS** By measuring $[^3\text{H}]$ -Glutamic acid released from synaptosome and the activity of nitric oxide synthase (NOS) in adult rat brains. **RESULTS** E6 promoted glutamic acid release from synaptosome, with a increasing rate of 81.0%. However, E6 ($10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) inhibited the $[^3\text{H}]$ -Glu release caused by KCl ($50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) with a inhibitory rate of 20.4%. Verapamil, a calcium channel antagonist, could inhibit $[^3\text{H}]$ -Glu release caused by KCl too. But its inhibition was stronger than that of E6, and the rate in $10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ group was 28.8%. E6 inhibited NOS activity with a concentration-dependent manner. Calmodulin (CaM) obviously reversed the inhibition of E6, while *N*-nitro-arginine (*L*-NNA) enhanced it. **CONCLUSION** These results indicated that E6, in combination with CaM, inhibits the exposition of active center in CaM and decreases the NOS activity which depends on Ca^{2+} / CaM in neurons. And effects of E6 on glutamic acid release from synaptosome may be the results of E6 influencing calcium concentration in neurons.

KEY WORDS Calmodulin Antagonist; E6; Nitric Oxide Synthase; $[^3\text{H}]$ -Glutamic Acid; Synaptosome

医药科学技术政策(节选)

(2002—2010年)

积极发展生物制药技术,推动医药产业结构调整

以基因技术为代表的现代生物技术的发展,导致了以基因工程制药为主的一个新兴生物制药业的产生与发展,并且成为各国制药领域竞争的热点。生物制药是国际制药业未来发展的重要方向。因此,大力发展以基因技术为代表的生物制药技术是今后一项重要的战略任务。

针对我国人群的重大疾病,研究开发新型生物药物、疫苗和生物治疗方案;研究并建立疾病与药物筛选和安全评价模型;研究哺乳动物细胞大规模培养技术、转基因和治疗用单克隆抗体;研究开发产品过程优化技术。

建立和完善规模化、高效率的功能基因组研发体系,寻找重要遗传疾病致病基因、重大多因素多基因疾病的易感基因以及具有重要生理功能的基因,用于疾病诊断和药物、疫苗、生物靶点的开发利用。

研究病原及特殊功能微生物功能基因组,寻找微生物致病、主要免疫靶点及代谢调节基因,用于疫苗、诊断及药物筛选的开发利用。

发展生物信息技术,结合功能基因组研究和蛋白质组研究,建立国家生物信息获取、管理、分析和服务体系;建立和发展生物芯片研究开发和服务系统;建立高通量药物筛选、药物分子设计技术体系。

重点突破主要抗生素、维生素、甾体激素和氨基酸生产的基因工程菌构建与高效表达,确定工程菌大规模发酵工艺参数,研究高效分离纯化手段,实现商品化生产。

研究基因工程药物的检测分析和安全评价,建立规范的检测分析方法与评价标准;研究生物治疗所涉及的伦理学问题,确保基因工程药物和生物治疗方案的安全性。