

## 淋球菌 nspA 和大肠杆菌 ltB 融合基因的构建、表达及鉴定

秦勇, 胡四海\*, 张愉快, 余敏君, 唐莹, 刘刚

(南华大学病原生物研究所, 衡阳 421001)

**摘要:** 通过基因工程的方法构建奈瑟氏淋球菌表面蛋白 A(*Neisseria gonorrhoeae* surface protein A, nspA)和大肠杆菌不耐热肠毒素 B 亚单位(B subunit of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin, ltB)融合基因的原核表达载体, 对其进行表达与鉴定, 为后续融合蛋白 LTB-NspA 的生物活性分析及其作为淋球菌粘膜免疫疫苗的研究奠定基础。用 PCR 法从标准菌株分别扩增出 nspA、ltB 基因, 用重组 PCR 法通过接头将 ltB 与 nspA 融合, 将其插入 pET-30a 中, 转入 BL21 中表达。经测序、SDS-PAGE 和 Western blot 分析, 证实成功构建了 ltB-nspA 融合基因的原核表达载体, 并在 BL21 中表达。ltB-nspA 融合基因的成功表达, 为进一步研究其生物活性及淋球菌粘膜免疫疫苗的研究奠定了一定基础。

**关键词:** 奈瑟氏淋球菌表面蛋白 A; 大肠杆菌不耐热肠毒素 B 亚单位; 克隆; 基因融合; 表达; 鉴定  
中图分类号: S852.6 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2008) 02-0197-05

正文淋病奈瑟菌(简称淋球菌)在漫长的进化过程中已经形成了一套逃避人体免疫系统作用的机制, 从而严重阻碍了高效淋球菌疫苗的研制<sup>[1]</sup>。通过对淋球菌主要外膜蛋白(又称孔蛋白)、菌毛蛋白、热修饰蛋白以及脂寡糖等外膜抗原的研究, 人们发现大多数淋球菌外膜抗原都具有较大的变异性。因此, 选择免疫原性强且高度保守的淋球菌表面抗原, 并辅之以高效的粘膜佐剂以提高机体抗淋球菌感染的特异性粘膜免疫水平, 是淋球菌疫苗研究的一种新策略。Plante 等首先克隆了奈瑟氏淋球菌的表面蛋白 A (*Neisseria gonorrhoeae* surface protein A, NspA)基因, 发现 NspA 抗原不但在细菌表面持续表达, 而且高度保守, 并具有较强免疫原性, 是一个很好的淋球菌疫苗候选抗原<sup>[2]</sup>。大肠杆菌不耐热肠毒素 B 亚单位 (B subunit of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin, LTB) 是继霍乱毒素 B 亚单位(Cholera toxin B-subunit, CTB) 之后发现的一种新的粘膜佐剂, 它去除了大肠杆菌不耐热肠毒素的毒性 A 亚单位, 仍保留较好的佐剂活

性<sup>[3,4]</sup>。该研究克隆了 nspA、ltB 基因和融合基因 ltB-nspA, 构建了相应的原核表达载体并进行了表达、鉴定, 为后续 LTB 作为分子内佐剂的生物活性分析以及进一步研究高效的淋球菌粘膜免疫疫苗奠定了基础。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

**1.1.1 菌株和质粒:** 淋球菌 WHO-A 标准株、*E. coli* DH5 $\alpha$ 、*E. coli* BL21、pET-30a 由本室保存, *E. coli* H44815 株购自中国卫生部药品生物制品检定所。

**1.1.2 主要试剂和仪器:** PCR 试剂盒、限制性内切酶、T4 连接酶、DNA Marker、核酸纯化回收试剂盒均购自大连宝生物公司; 质粒提取试剂盒、蛋白分子量 Marker、IPTG 购自上海生物工程公司; 兔抗 CT 抗体、HRP 标记羊抗兔 IgG 抗体购自 Sigma 公司; 兔抗淋球菌血清由本室制备保存; 其他试剂为进口分装或国产分析纯。

基金项目: 国家自然科学基金(30771931); 湖南省自然科学基金(05jj30045); 衡阳市科研基金(2005KS01-057)

\*通讯作者。Tel: +86-734-8282907; E-mail: hhssh\_518@163.com

作者简介: 秦勇(1979-), 男, 湖北宜昌人, 硕士, 主要从事淋球菌核酸疫苗的研究。E-mail: qyyp03@yahoo.com.cn

收稿日期: 2007-04-18; 修回日期: 2007-11-15

## 1.2 模板 DNA 制备

分别收集淋球菌 WHO-A 株和 *E.coli* H44815 株的新鲜培养物, 常规苯酚-氯仿法提取细菌基因组 DNA, 经无 DNA 酶的 RNA 酶消化后再次苯酚-氯仿法提取 DNA, 溶于 TE buffer 贮存作为模板。

## 1.3 NspA 与 LTB 基因的扩增

根据 GENBANK 报道的 NSPA(GI: 26324161)、LTB(GI: 145830)核苷酸序列, 利用 PRIMER 5.0 设计引物。NSPA 引物序列: 上游 (BAMHI): 5'-GCGGATCCATGAAAAAGCACTTGCC-3', 下游 (HINDIII): 5'-CGTTCGAAGCTTTCAGAATTTG\_ACGCGCAC-3'。LTB 引物序列: 上游 (BAMHI): 5'-GCCGGGATCC ATG AATAAAGTAAAAT-3', 下游引物 (HINDIII): 5'-TCGC AAGCTTCTAGTTTTCCATACTGAT-3', 引物由上海生工公司合成(下划线处为酶切位点)。NSPA、LTB PCR 反应体系(50 $\mu$ L): PCR 反应参数: 94 $^{\circ}$ C 5MIN, 94 $^{\circ}$ C 30S, 62 $^{\circ}$ C 45S(NSPA)/53 $^{\circ}$ C 45S(LTB), 72 $^{\circ}$ C 45S, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10MIN。扩增产物在 1.2% 琼脂糖凝胶中电泳分析。

## 1.4 融合基因 ItB-nspA 的构建

先用 PCR 法在 ItB 的下游和 nspA 的上游同时引入一段编码 6 个氨基酸(Asp-Pro-Arg-Val-Pro-Ser)的特殊核苷酸序列, 得到 ItB-Linker(ItB-L)和 Linker-NspA(L-nspA), 再以编码 6 个氨基酸的 18 个碱基序列作为接头, 以纯化回收的上述产物互为模板互为引物, PCR 扩增得到融合基因 ItB-nspA。ItB-L 的引物序列(下划线处为酶切位点)为: P1 (BamHI): 5'-GCCGGATCCATGGCTCCTCAGTCTATTACAGAACTATG-3', P2: 5'-GCTCGGACTCTCGGATCGTTTTCCATAC TGATTGCC-3'; L-NSPA 的引物序列为: P3: 5'-GATCCGAGAGTACCGAGCATGAAAAAGCACTTC-3', P4 (HindIII): 5'-CGTTCGAAGCTTTCAGAATTTAGCGCGCAC-3'。ItB-L、L-nspA PCR 反应体系及参数同上述 ItB、nspA 的 PCR 反应。利用试剂盒纯化回收产物 ItB-L、L-nspA, 并调两者至等浓度。融合基因 ItB-nspA 的 PCR 体系(50 $\mu$ L): PCR 反应参数: 94 $^{\circ}$ C 3min; 94 $^{\circ}$ C 30s, 52 $^{\circ}$ C 1min, 72 $^{\circ}$ C 1min 20s, 15 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10min; 为提高效率再向体系中加入 P1、P4 引物各 1 $\mu$ L, 94 $^{\circ}$ C 3min; 94 $^{\circ}$ C 30s, 62 $^{\circ}$ C 1min; 72 $^{\circ}$ C 1min 20s, 20 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10min。扩增产物在 1.2% 琼脂糖凝胶中电泳分析。

## 1.5 原核重组表达载体的构建

用试剂盒从 *E.coli* DH5 $\alpha$  提取质粒 pET-30a, 将

上述所得产物 nspA、ItB、ItB-nspA 及 pET-30a 行 BamHI、HindIII 双酶切, 酶切体系(20 $\mu$ L): PCR 产物或载体 10 $\mu$ L, BamHI、HindIII 各 1 $\mu$ L, 10 $\times$  K buffer 2 $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 6 $\mu$ L, 37 $^{\circ}$ C 过夜(载体 37 $^{\circ}$ C 3h)。试剂盒纯化回收上述酶切产物, 与 pET-30a 行连接反应(20 $\mu$ L 反应体系): 目的片段 5 $\mu$ L, 载体 5 $\mu$ L, T4 ligase 0.5 $\mu$ L, T4 ligase buffer 2 $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 7.5 $\mu$ L; 16 $^{\circ}$ C 反应过夜。将上述连接产物转化入 *E.coli* BL21。

## 1.6 阳性克隆的筛选及 PCR、酶切鉴定

从卡那抗性的 LB 平板上挑选菌落行 PCR 鉴定及提取质粒酶切鉴定, 确定阳性重组子。

## 1.7 核苷酸序列测定及 Blast 分析

将经 PCR、酶切鉴定的阳性重组子送上海生工测序, 测序结果与 GenBank nspA(gi: 26324161)、ItB(gi: 145830)核苷酸序列作 Blast 分析。

## 1.8 重组蛋白的表达及鉴定

将确认正确的重组子表达菌扩增培养, IPTG 诱导目的蛋白的表达, SDS-PAGE 初步鉴定其表达及蛋白分子量大小。

按参考文献[5]进行, 所用一抗分别为兔抗淋球菌抗血清(1:1280 倍稀释)和兔抗 CT 抗体(1:1280 倍稀释), 二抗为 HRP 标记的羊抗兔 IgG(1:3000 倍稀释), OPD 显色。

## 2 结果

### 2.1 nspA、ItB、融合基因 ItB-nspA 的获得

用 PCR 从标准菌株中扩增出 nspA、ItB 及融合基因 ItB-nspA, 经在 1.2% 琼脂糖凝胶中电泳, 得到一条与预期 ItB 相符大小约为 372bp 的清晰条带, 以及一条比 ItB 大小稍大(约为 390bp)的清晰条带 ItB-L; 可见一条与预期 nspA 相符大小约为 525bp 的清晰条带, 以及一条比前者稍滞后(约为 540bp)的预期的 L-nspA 的清晰条带; 还可见一条与预期 ItB-nspA 相符大小约为 900bp 的清晰条带。

### 2.2 原核表达载体构建、筛选阳性克隆、PCR 及酶切鉴定

经酶切过的 PCR 产物与载体通过 BamHI、HindIII 酶切位点相连接, 转化入 *E.coli* BL21 后, 筛选阳性克隆, 经 PCR 及 BamHI、HindIII 双酶切鉴定, 1% 琼脂糖凝胶电泳显示 PCR 和双酶切均能得到预期目的条带, 初步说明目的基因成功克隆至 pET-30a 表达载体中(见图 1)。

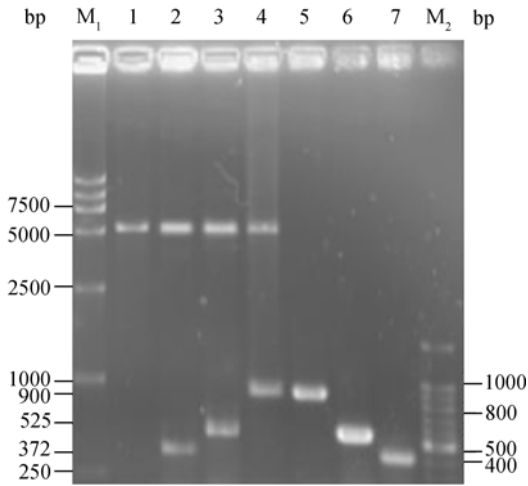


图1 重组表达载体经 *Bam*H I、*Hind*III 琼脂糖凝胶电泳酶切鉴定图谱(1%琼脂糖凝胶电泳)

Fig. 1 1%Agarose gel electrophoresis profile of digestion product of the recombinant vectors. M<sub>1</sub>. DNA Marker; 1. pET-30a; 2. pET-30a-ltB; 3. pET-30a-nspA; 4. pET-30a-ltB-nspA; 5. ltB-nspA; 6. nspA; 7. ltB; M<sub>2</sub>. 100bp DNA Ladder

### 2.3 核苷酸序列测定及 Blast 分析

对上海生工测序结果作 Blast 分析, 重组表达载体中 nspA 序列与淋球菌 WHO-A 株 nspA(gi:26324161) 序列同源性达 100%(525/525), 重组表达载体中 ItB 序列与 *E.coli* H44815 株 ItB(gi:145830) 序列同源性达 99.99%(374/375), 其中编码第 23 位氨基酸 Pro (CCT→CCC) 而氨基酸不改变, 同时分析开放读码框正确, 确认我们成功获得了 pET-30a-nspA, pET-30a-ltB, pET-30a-ltB-nspA 的原核表达载体。

### 2.4 重组蛋白的表达与 SDS-PAGE 鉴定

将上述重组表达菌增菌培养, 加入浓度梯度的 IPTG(0.5mmol/L, 1.0mmol/L, 1.5mmol/L, 2.0mmol/L) 37℃ 诱导表达, 超声裂解细菌经 SDS-PAGE, 发现 IPTG 浓度对蛋白表达几乎无影响(图略); 以 0.5mmol/L

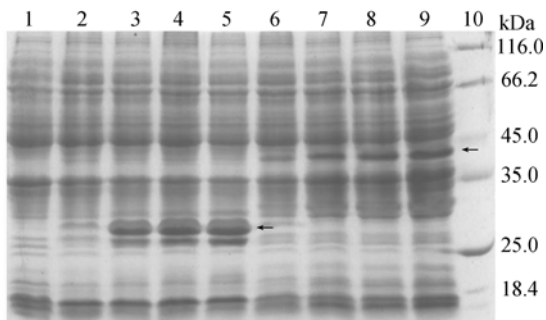


图2 不同诱导时间的重组蛋白表达 SDS-PAGE 结果图

Fig. 2 SDS-PAGE of expressed recombinant bacteria induced with different time in *E. coli* BL21.1. bacteria with pET-30a induced by 4h; 2 - 5. bacteria with pET-30a-NspA induced by 1h, 2h, 3h, 4h; 6 - 9. bacteria with pET-30a-LTB-NspA induced by 1h, 2h, 3h, 4h; 10. protein MW Marker.

IPTG 诱导表达 1h、2h、3h、4h, 显示 NspA(约 26kDa) 和 LTB-NspA(约 39kDa) 均在 3h 表达趋于饱和(图 2)。同时发现, 在 12% 或 15% SDS-PAGE 中均未能发现 LTB, 其具体原因不清。

### 2.5 重组蛋白的 Western blot 鉴定

对重组蛋白 NspA 和 LTB-NspA 同用兔抗淋球菌血清作为一抗进行 Western blot 分析, 与对照组比较都出现了清晰的特异性条带(图 3); 同时用兔抗 CT 血清(LT 与 CT 结构高度相似, 可用兔抗 CT 血清替代抗 LT 血清<sup>[5]</sup>) 作为一抗, 对融合蛋白 LTB-NspA 进行 Western blot 分析, 也出现了清晰的特异性条带(图 4)。

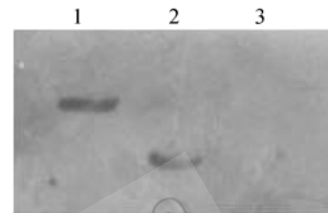


图3 重组蛋白 NspA 和 LTB-NspA 的 Western blot 鉴定(兔抗淋球菌血清)

Fig. 3 Western blot of the recombinant NspA and LTB-NspA protein(rabbit anti-NG serum). 1. fusion protein LTB-NspA; 2. NspA; 3. pET-30a.

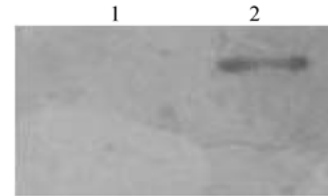


图4 融合蛋白 LTB-NspA 的 Western blot 鉴定(兔抗 CT 血清)

Fig. 4 Western blot of the LTB-NspA fusion protein (rabbit anti-CT serum). 1. pET-30a; 2. fusion protein LTB-NspA.

## 3 讨论

许多病原体通过粘膜组织感染人而致病, 机体广泛的粘膜组织共同组成的粘膜免疫系统在人体抵抗病原体感染中起着十分重要的第一道防线作用。淋球菌直接侵袭人体泌尿生殖道粘膜, 在对抗机体的免疫作用过程中其外膜抗原产生变异以逃避机体的免疫。因此, 研究开发能对其产生高效粘膜免疫应答的疫苗尤为重要。Plante 等<sup>[2]</sup>克隆了淋球菌 nspA 基因, 发现淋球菌 NspA 氨基酸序列和脑膜炎球菌 NspA 的同源性为 93%, 淋球菌菌株之间的同源性高

达 98%。用放射性标记的 NspA 单抗检测 NspA 在细胞膜表面的暴露情况,证实淋球菌 NspA 位于完整的细菌表面。可见 NspA 抗原高度保守,在菌体表面持续表达,并具有较强免疫原性,是一个很好的淋球菌疫苗候选者<sup>[6]</sup>。我们近期的研究工作也证实 NspA 具有较强的免疫原性,能诱导小鼠产生有效的体液免疫和细胞免疫<sup>[7]</sup>。

LTB 是一种公认的新型粘膜佐剂,国内外许多学者将其与目的抗原混合或偶联于目的抗原,通过鼻饲、胃肠道、生殖道等粘膜免疫途径免疫动物,不仅可以广泛地激活粘膜免疫系统,在粘膜表面产生高效价的特异性的 sIgA,而且在血循环中可产生高效价的 IgG,同时也可诱发细胞免疫应答<sup>[8,9,10,11]</sup>。刘正祥等构建表达了幽门螺杆菌的融合疫苗 LTB-HpaA 并口服免疫小鼠,检测显示免疫小鼠获得了高水平的粘膜 sIgA 和血清 IgG<sup>[12]</sup>。E. Fingerut 等将 LTB 与 IDDV 的 VP2 融合在酵母中表达,用融合蛋白滴眼和口服两种方式免疫雏鸡,获得了对 IDDV70%~100% 的免疫保护力<sup>[13]</sup>。本实验中经测序证实成功克隆了淋球菌高度保守的 NspA 和 *E.coli* LTB, Blast 分析显示 NspA 序列与淋球菌 WHO-A 株 GenBank nspA (gi:26324161)序列同源性达 100%, LTB 序列与 *E.coli* H44815 株 GenBank ItB(gi: 145830)序列同源性达 99.99%。我们选取一段含 6 个氨基酸(Asp-Pro-Arg-Val-Pro-Ser)的短肽作为接头,构建了 ItB-nspA 的融合基因,短肽的两个 Pro 分子结构中含有  $\beta$  转角利于融合蛋白中 LTB 与 NspA 可自由旋转而维持各自的正确空间构象,为重组蛋白的有效表达、保持其生物活性以及有效发挥 LTB 的分子内佐剂活性提供了保障。

本实验在 SDS-PAGE 分析中,显示我们成功表达了相对分子质量约为 26kDa 的重组蛋白 NspA 和相对分子质量约为 39kDa 的重组蛋白 LTB-NspA。但在 12%或 15%SDS-PAGE 中均未能发现 LTB,我们推测很可能由于变性处理后形成的 LTB 单体分子量太小(约 11.2kDa)而不易检出,也可能表达出的 LTB 极不稳定被降解或其表达量太小等因素引起不表达,确切原因尚不清楚。在 Western blot 分析中,用兔抗淋球菌血清和兔抗 CT 血清分别作为一抗,证实了融合蛋白中 NspA 和 LTB 的存在,表明融合蛋白仍保持了 NspA 和 LTB 各自的免疫反应性。综上所述,该研究初步构建了淋球菌 nspA 和大肠杆菌 ItB 融合基因的原核表达载体,并能有效表达融合蛋白 LTB-NspA,

为进一步研究淋球菌 NspA 的生物活性和粘膜保护性免疫打下了基础。

## 参 考 文 献

- [1] 季明春. 淋球菌外膜蛋白疫苗的研究进展. 国外医学免疫学分册(*Foreign Medical Sciences, Section of Immunology*), 2003, 26(3): 158-160.
- [2] Plante M, Cadieux N, Rioux CR, et al. Antigenic and molecular conservation of the gonococcal NspA protein. *Infect Immun*, 1999, 67(6): 2855-2861.
- [3] Pizza M, Giuliani MM, Fontana MR, et al. Mucosal vaccines: nontoxic derivatives of LT and CT as mucosal adjuvants. *Vaccine*, 2001, 19: 2534-2541.
- [4] Sixma TK, Pronk SE, Kalk KH, et al. Crystal structure of a cholera toxin-related heat-labile enterotoxin from *E. coli*. *Nature*, 1991, 351: 371-377.
- [5] J Sambrook, DW Russell. 分子克隆实验指南. 黄培堂等译. 第三版. 北京: 科学出版社, 2002.
- [6] 季明春, 陈红菊. 奈瑟氏淋球菌表面蛋白 A 基因克隆及在真核细胞中的表达研究. 微生物学报(*Acta Microbiologica Sinica*), 2004, 44(1): 104-106.
- [7] 谢良伊, 胡四海, 唐湘云, 等. 奈瑟淋球菌表面蛋白 A 基因疫苗的构建及其诱导小鼠的免疫应答. 中华传染病杂志(*Chinese Journal of Infectious Diseases*), 2007, 25(7): 392-397.
- [8] Isaka M, Yasuda Y, Kozuka S, et al. Induction of systemic and mucosal antibody responses in mice immunized intranasally with aluminium-non-adsorbed diphtheria toxoid together with recombinant cholera toxin B subunit as an adjuvant. *Vaccine*, 1999, 18: 743-751.
- [9] Walmsley AM, Alvarez ML, Jin Y, et al. Expression of the B subunit of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin as a fusion protein in transgenic tomato. *Plant Cell Rep* 2003, 21(10): 1020-1026.
- [10] Verweij WR, de Haan L, Holtrop M, et al. Mucosal immunoadjuvant activity of recombinant *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin and its B subunit: induction of systemic IgG and secretory IgA responses in mice by intranasal immunization with influenza virus surface antigen. *Vaccine*, 1998, 16(20): 2069-2076.
- [11] O'Dowd AM, Botting CH, Precious B, et al. Novel modifications to the C-terminus of LTB that facilitate sitedirected chemical coupling of antigens and the development of LTB as a carrier for mucosal vaccines. *Vaccine*, 1999, 17: 1442-1453.
- [12] 刘正祥, 邹全明, 洪愉, 等. 幽门螺杆菌粘附素与大肠杆菌 ItB 融合疫苗的口服免疫与预防试验. 中国人兽共患病杂志

(*Chinese Journal of Zoonoses*), 2004, 20(7): 577-581.

activity of recombinant subunit B of *E. coli* enterotoxin produced in yeast. *Vaccine*, 2005, 23: 4685-4696.

[13] Fingerut E, Eliahoo D, Pitcovski J, *et al.* *Vaccine and adjuvant*

## Cloning, expression and identification of the fusion gene between *Neisseria gonorrhoeae* nspA and *Escherichia coli* ltB

Yong Qin, Sihai Hu<sup>\*</sup>, Yukuai Zhang, Minjun Yu, Ying Tang, Gang Liu

(*Institute of Pathogenic Biology, Nanhua University, Hengyang 421001, China*)

**Abstract:** Neisserial surface protein A (NspA) of *Neisseria gonorrhoeae* is a potential anti-gonorrhea vaccine, and the heat-labile enterotoxin subunit B (LTB) of *Escherichia coli* is a kind of mucosal adjuvant that can assist mucosal immune response. We constructed a prokaryotic expression vector of the fusion gene ltB-nspA, and expressed and identified the fusion protein LTB-NspA. The nspA gene and the ltB gene were amplified from the genomic DNA of standard strains of *Neisseria gonorrhoeae* and *Escherichia coli* respectively by polymerase chain reaction(PCR). Two fragments were obtained by agarose gel electrophoresis. One was about 525bp of nspA gene, and the other was about 372bp of ltB gene. Fragment nspA and fragment ltB were fused with a linker encoding 6 amino acids (Asp-Pro-Arg-Val-Pro-Ser) by recombination PCR and a 900bp fragment of the fusion gene ltB-nspA was found on the gel. The fusion gene ltB-nspA was cloned into the prokaryotic expression vector pET-30a after digestion with *BamH* I and *Hind* III. Recombinants were selected by enzyme digestion and sequencing. The recombinant plasmid with ltB-nspA gene was then transformed into *E.coli* BL21 with IPTG to induce and express the fusion protein. SDS-PAGE analysis showed that the relative molecular weight of the expressed recombinant protein was about 39 kDa equivalent to the theoretically predicted value. The specificity of the expressed fusion protein was confirmed by Western-blot. The prokaryotic expression vector was constructed correctly and the fusion protein LTB-NspA was successfully expressed, which provided a basis of investigating its biological functions and developing of a *Neisseria gonorrhoeae* mucosal vaccine.

**Keywords:** nspA; ltB; cloning; gene fusion; expression; identification

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30771931), the Hunan Province Natural Science Foundation (05jj30045) and the Scientific Research Foundation of Hengyang City (2005KS01-057)

<sup>\*</sup> Corresponding author. Tel: +86-734-8282907, E-mail: hhssh\_518@163.com

Received: 18 April 2007/ Revised: 25 November 2007

### 《微生物学报》对英文摘要的要求

(2007年10月修订)

1. 英文摘要的内容应与中文摘要一致, 但比中文摘要更详尽。
2. 英文摘要完成后, 务必请英文较好、且专业知识强的专家审阅定稿后再投到编辑部。根据英文摘要、文中的图和表, 不懂中文的同行就可以了解论文概况。
3. 撰写要点: 凡不符合要求的, 即使学术上可以达到刊出的水平, 本刊也将推迟发表。
  - (1) 在英语摘要中, 不要使用任何汉字字符, 包括标点, 括号, 温度, 希腊字母等。
  - (2) 建议使用第一人称, 以此可区分研究结果是引用文献的还是作者的。
  - (3) 建议用主动语态, 被动语态表达拖拉模糊尽量不用, 这样可以免好多长句, 以求简单清晰。
  - (4) 摘要应当使用过去时态, 语法正确, 句子通顺。
  - (5) 摘要中不用缩写语, 除非是人人皆知的, 如: DNA, ATP 等。