

应用 16S rRNA 基因技术研究仔猪结肠梭菌 IV 群变化

边高瑞, 谢飞, 苏勇*, 朱伟云

(南京农业大学消化道微生物研究室, 南京 210095)

摘要:【目的】研究从 7 日龄到 35 日龄(断奶后两周)仔猪结肠中梭菌 IV 群(柔嫩梭菌群, *Clostridium Leptum* group)结构以及数量的变化, 探究该菌群与结肠中丁酸浓度的关系。【方法】选取 3 窝新生仔猪, 分别在 7、14、21(断奶)、24 和 35 日龄每窝随机屠宰 1 头, 收集结肠内容物, 利用气相色谱测定挥发性脂肪酸(Volatile fatty acid, VFA); 提取结肠内容物总细菌 DNA, 利用基于 16S rRNA 基因的变性梯度凝胶电泳(Denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)和 Real-time PCR 技术定性、定量分析梭菌 IV 群。【结果】对仔猪结肠中梭菌 IV 群 DGGE 图谱进行相似性分析显示, 7 日龄仔猪样品归于一族, 数值达 90% 以上, 而与其他日龄的样品间相似性较低, 断奶前(21 日龄)和断奶后 3 天菌群则没有显著变化。Real-time PCR 定量分析显示, 仔猪结肠总细菌拷贝数在断奶后 3 天显著降低, 这一趋势与结肠中的总挥发性脂肪酸和丁酸浓度变化相似, 而梭菌 IV 群拷贝数变化则不显著。克隆和测序分析表明, 仔猪结肠梭菌 IV 群中的优势菌为 *Faecalibacterium prausnitzii*, *Subdoligranulum variabile* 以及一些未培养细菌。【结论】7 日龄至 14 日龄仔猪结肠中梭菌 IV 群发生改变, 但断奶对其影响不大; 该菌群和结肠丁酸浓度关系还需进一步研究。

关键词: 16S rRNA 基因; 变性梯度凝胶电泳(Denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE); 仔猪; 梭菌 IV 群

中图分类号: S811.6 **文献标识码:**A **文章编号:** 0001-6209 (2010) 10-1373-07

健康哺乳动物后肠栖息着数量巨大、种类繁多的微生物, 这些微生物及其代谢产物在营养、免疫等方面对宿主健康有重要的意义^[1]。研究表明, 厚壁菌是人后肠微生物区系中的最优势菌群, 其含量达 60%–70% 左右, 而厚壁菌中优势菌群之一为梭菌 IV 群^[2–3](柔嫩梭菌群, *Clostridium Leptum* group)。近年来, 关于梭菌 IV 群的研究受到广泛关注, 因为该菌群中的多数细菌能够产生丁酸, 而丁酸是结肠上皮细胞重要的能源物质, 它已被证实在宿主的肠道健康上起重要作用^[4–5]。

Guo 等(2008)发现, 厚壁菌也是猪盲肠中的最优势菌群, 其在总菌中的比例与人后肠菌群的相似^[6]。一些研究者对人粪样的梭菌 IV 群进行了定

性、定量分析, 发现其数量可达每克 10¹⁰ 拷贝数以上, 主要的种类有 *Faecalibacterium prausnitzii*, *Subdoligranulum variabile* 以及很多未培养细菌^[7–9]。然而在猪肠道方面, 国内外还未见相关报道, 鉴于梭菌 IV 群对哺乳动物后肠上皮细胞发育和成熟起重要作用^[10], 而且特别是仔猪正处于肠道发育的重要阶段, 因此, 有必要对仔猪结肠中的梭菌 IV 群进行研究。

基于 16S rRNA 基因的分子技术已被广泛用于动物肠道菌群区系的定性、定量分析, 该技术无需培养微生物^[11–12]。本研究利用 DGGE 结合 Real-time PCR 技术, 对仔猪结肠中梭菌 IV 群随日龄的变化进行分析, 为幼年动物肠道菌群研究提供更多的信息。

基金项目:国家自然科学基金青年基金项目(30901036);南京农业大学青年科技创新项目

*通信作者。Tel: +86-25-84395523; E-mail: suney7912@yahoo.com

作者简介:边高瑞(1985–),男,河北景县人,硕士研究生,主要从事消化道微生物研究。E-mail: zy4315456@163.com

收稿日期:2010-03-26;修回日期:2010-05-07

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂和仪器:*Taq* 酶、dNTP 和 PCR 产物纯化试剂盒(上海申能博彩); pGEM-T 载体(Promega); 引物合成和序列测定(Invitrogen); ABI7500 Real-time PCR 仪(ABI); DCode 系统、GS-800 灰度扫描仪和 Molecular Analyst 1.12 分析软件(Bio-Rad)、珠磨仪(BioSpec)。

1.1.2 实验动物和样品采集:选取江苏某猪场产期相近、胎次相似、窝仔数在 8~11 头的 3 窝初生仔猪(杜×长×大),于仔猪 7、14、21、24 和 35 日龄时,每窝随机屠宰 1 头仔猪,于冰面上以无菌方式收集近端结肠食糜样品,-20℃保存。实验期间,试验猪不进行免疫,21 日龄断奶,断奶前不饲喂开食料,断奶后日粮(见表 1)不含抗生素,其它按常规饲养管理。

表 1 断奶后仔猪日粮组成

Table 1 Composition of the diet used for weaned piglets

Diet ingredients (g/kg)	Nutrients parameters		
Corn	525.0	ME (MJ/Kg)	13.37
Soybean meal	304.0	CP (%)	22.09
Wheat middlings	50.0	Ca (%)	0.97
Fish meal	35.0	Available P (%)	0.51
Whey powder	30.0	Lysine (%)	1.31
Soybean oil	15.0		
Limestone	11.7		
Calcium hydrogen phosphate	15.0		
Vitamin and mineral premix ^a	10.0		
Salt	2.5		
L-Lysine	1.8		

^a This mineral and vitamin premix (1%) supplies per kg diet as follows: VA 11000 IU, VD₃ 1000 IU, VE 16 IU, VK1 1 mg, VB₁ 0.6 mg, VB₂ 0.6 mg, d-pantothenic acid 6 mg, VB₃ 10 mg, VB₁₂ 0.03 mg, folic acid 0.8 mg, VB₆ 1.5 mg, choline 800 mg, Fe 165 mg, Zn 165 mg, Cu 16.5 mg, Mn 30 mg, Co 0.15 mg, I 0.25 mg, Se 0.25 mg

1.2 挥发性脂肪酸测定

参照龙黎明等(2008)的方法^[13],采用毛细管气相色谱测定仔猪结肠样品 VFA 浓度,因样品中的 VFA 主要由乙酸、丙酸和丁酸组成,以三者之和作为总挥发性脂肪酸(TVFA)浓度。

1.3 样品总 DNA 的提取与 PCR 反应

参照 Zoetendal 等^[14]的方法,先用珠磨法机械破碎样品,而后用酚和氯仿/异戊醇提取其总 DNA。参照 Shen 等^[7]的方法,采用特异引物 Clept-F 和 CleptGC-R 对梭菌 IV 群 16S rRNA 基因进行 PCR 扩增^[7],PCR 产物用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测,其片段长度约 280 bp。

1.4 DGGE 及图谱分析

参照 Muyzer 等^[15]的方法,对 PCR 扩增产物进

行 DGGE 分析。DGGE 用 8% 聚丙烯酰胺凝胶,尿素浓度梯度为 35%~55%。电泳采用 Dcode DGGE 系统,首先在 200 V 电压下预电泳 5~10 min,随后 85 V 的固定电压下电泳 12 h。电泳结束后,进行硝酸银染色,凝胶显色定影后用 GS-800 灰度扫描仪扫描。DGGE 图谱用 Molecular Analyst 1.12 软件进行相似性分析。

1.5 特殊条带的序列测定和系统进化分析

参照 Shen 等^[7]的方法,利用细菌通用引物 27f 和梭菌 IV 群特异引物 Clept-F 和 CleptGC-R 扩增样品的 16S rRNA 基因,扩增产物经 PCR 产物纯化试剂盒纯化后,插入 pGEM-T 载体并转化入 *E. coli* JM109。特异引物 Clept-F 和 CleptGC-R 对插入子检测正确(约 1150 bp)的克隆进行 PCR 扩增,并与样品 DGGE 图谱进行比对,与原样品有匹配条带的克隆送至 Invitrogen 公司(上海)测序。

序列的同源性通过互联网与 GenBank 进行比对,获取与克隆序列相近菌序列后,采用 Clustalx1.81 和 MEGA 4.1 软件进行系统进化分析,利用 Neighbor-joining 方法建立系统进化树,因各 16S rRNA 基因序列间的长度差异,分析使用的 16S rRNA 基因长度约为 1150 bp。

1.6 Real-time PCR

参照 Su 等^[12]的方法,利用引物 1369F 和 1492R 对样品中总细菌 16S rRNA 基因的拷贝数进行 Real-time PCR 定量分析;参照 Matsuki 等^[9]利用引物 Clept-F 和 Clept-R 测定梭菌 IV 群 16S rRNA 基因拷贝数。PCR 总反应体系为 25 μL:12.5 μL IQ SYBR Green Supermix(Bio-Rad),0.2 μmol/L 的上、下游引物和 5 μL 的样品 DNA 稀释液。利用各自代表性菌群的 16S rRNA 基因克隆核酸作为模板制作标准曲线,样品 DNA 的检测采用 3 个重复,取平均值。

1.7 核苷酸序列的基因库登录号

本试验所测的 12 个 16S rRNA 基因克隆序列已被 GenBank 收录,登录号为:GU451684, GU451685, GU451687-GU451694, GU451696, GU451697。

1.8 数据处理

数据经 Excel 初步处理后,采用 SPSS17.0 统计软件对不同日龄的数据进行单因素方差分析。

2 结果和分析

2.1 梭菌 IV 群 DGGE 分析

对仔猪结肠中梭菌 IV 群 DGGE 分析表明(图

1), 7 日龄仔猪样品图谱已出现较多条带, 随着日龄增加, 一些条带如条带 A, K, P 和 M 始终是多数仔猪样品的优势条带。从 14 日龄起, 各样品图谱中出现一新的优势条带如条带 B 和 M。对 DGGE 图谱

进行相似性分析(图 2)显示, 来自不同窝的 3 头 7 日龄仔猪样品有较高的相似性, 在聚类图上归于一族, 而断奶前、后样品未见有规律性变化。

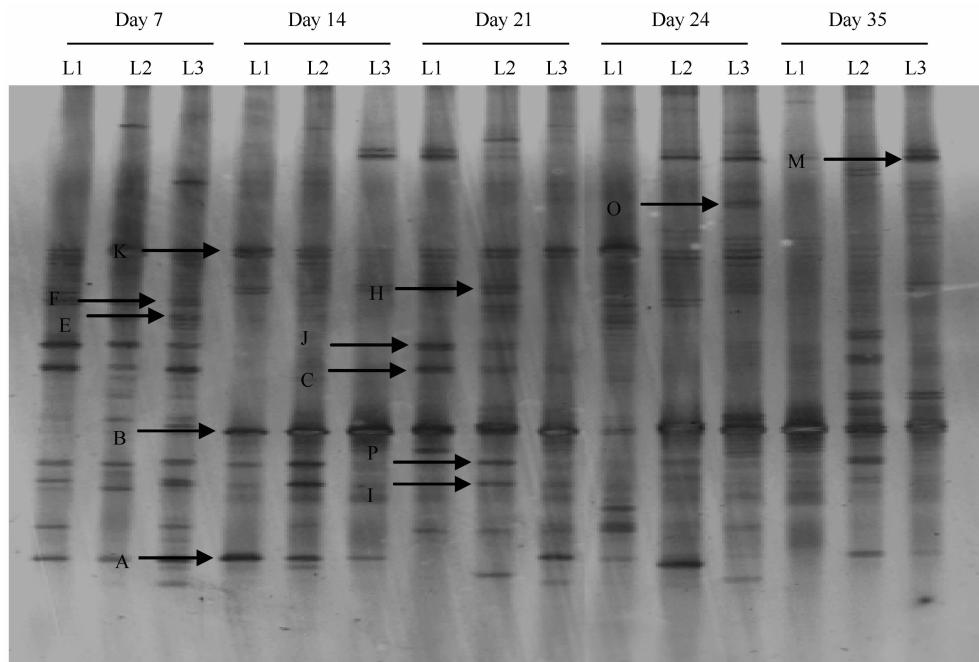


图 1 不同日龄仔猪结肠内梭菌 IV 群 DGGE 图谱

Fig. 1 DGGE profiles from *Clostridium* cluster IV bacterial community in the colon of piglets. Bands marked with arrows in gel were identified as showed in table 1. L1-L3, number of litter, the same as follows.

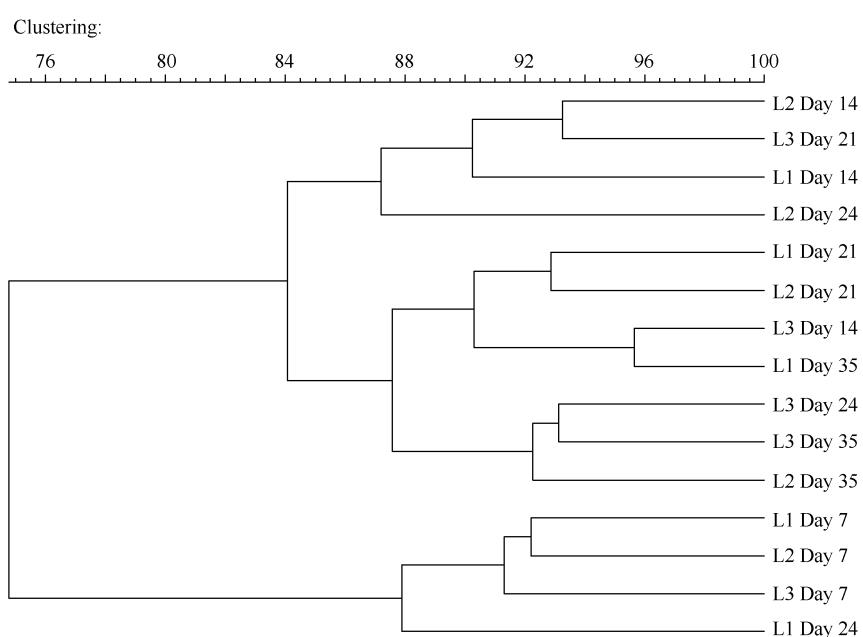


图 2 仔猪结肠中梭菌 IV 群 DGGE 图谱相似性分析

Fig. 2 Similarity analysis of DGGE profiles from *Clostridium* cluster IV bacterial community in the colon of piglets.

2.2 梭菌IV群 DGGE 图谱特殊条带的鉴定

对样品的梭菌IV群 16S rRNA 基因进行克隆、测序，并与样品条带进行比对，得到了与多数条带相匹配的克隆（表2），序列分析及系统进化树分析（图3）表明，克隆所得 16S rRNA 基因序列均归类于梭菌IV群簇，但大多数序列（8/12）与已知菌的相似性低于 97%，并且在 GenBank 中的最相似序列属于未

培养细菌。其中 7 日龄时的优势条带 C, J 和 K 对应的相似菌分别为 *F. prausnitzii* (99.0%)，*S. variabile* (98.6%) 及 *Ruminococcus albus* (94.6%)；7 日龄后样品的最优势条带 B 对应的相似菌为 *S. variabile*，但相似性仅为 95.2%，另外，与 *Anaerotruncus colihominis* (93.3%) 相近的条带 M 也只在 7 日龄后多数仔猪样品图谱中出现。

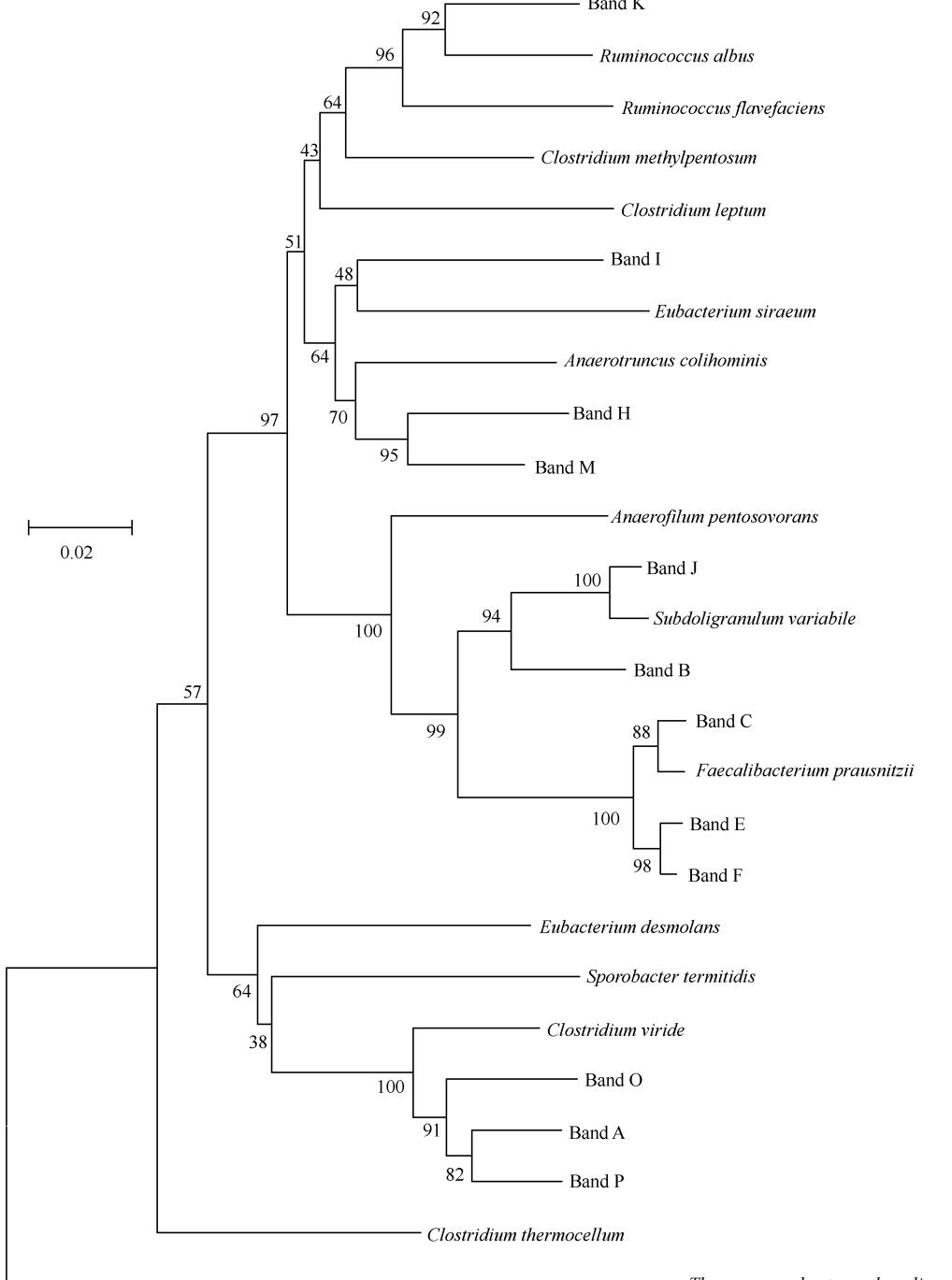


图 3 DGGE 条带对应克隆序列的系统进化树分析

Fig. 3 Phylogenetic tree showing the relationships between DGGE bands matched clones in our study and species belonging to *Clostridium* cluster IV group. *Clostridium thermocellum* (a member of *Clostridium* cluster III) and *Thermoanaerobacter ethanolicus* (a member of *Clostridium* cluster V) are included as outgroups. Bar represents 2% sequence divergence.

表 2 仔猪结肠梭菌 IV 群 DGGE 图谱中条带的鉴定

Table 2 Identification of predominant bands in DGGE profiles from *Clostridium cluster IV* group in the colon of piglets

Band No.	Closest species found in the GenBank database	Percentage of similarity/%	Sequence accession numbers
A	<i>Clostridium viride</i>	94.5	GU451697
B	<i>Subdoligranulum variabile</i>	95.2	GU451684
C	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	99.0	GU451685
E	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	98.3	GU451687
F	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	98.7	GU451688
H	<i>Anaerotruncus colihominis</i>	90.8	GU451689
I	<i>Clostridium methylpentosum</i>	90.4	GU451690
J	<i>Subdoligranulum variabile</i>	98.6	GU451691
K	<i>Ruminococcus albus</i>	94.6	GU451692
M	<i>Anaerotruncus colihominis</i>	93.3	GU451693
O	<i>Clostridium viride</i>	94.7	GU451696
P	<i>Clostridium viride</i>	94.3	GU451694

2.3 仔猪结肠总细菌和梭菌 IV 群数量及 VFA 浓度变化

由表 3 可见, 7 日龄时, 仔猪结肠中的总细菌拷贝数已经达到每克食糜 10^{11} 以上, 断奶 3 天后(24 日龄), 数量显著下降($P < 0.05$), 至 35 日龄数量又逐渐恢复到断奶前水平。梭菌 IV 群拷贝数 14 日龄时较 7 日龄显著升高($P < 0.05$), 随后显著下降($P < 0.05$); 与断奶当日(21 日龄)相比, 断奶后第 3 天(24 日龄)有下降趋势, 但差异不显著, 至 35 日龄时恢复断奶前水平。结肠总挥发性脂肪酸和丁酸浓度变化呈现相同的变化趋势, 7 日龄至断奶前(21 日龄), 浓度逐渐升高, 断奶 3 天后, 浓度急剧下降($P < 0.05$), 至 35 日龄浓度又逐渐升高, 达到断奶前水平。

表 3 仔猪结肠总细菌和 *Clostridium cluster IV* 群数量以及总挥发性脂肪酸和丁酸浓度变化

Table 3 Quantitative real-time PCR analysis of total bacteria and *Clostridium cluster IV* group and concentration of total VFA and butyrate in the colon of piglets

Item	Day of age/d				
	7	14	21	24	35
Total bacteria [Lg (copies/g)]	11.55 ± 0.56^a	11.18 ± 0.18^a	11.36 ± 0.19^a	10.37 ± 0.72^b	11.16 ± 0.63^{ab}
<i>Clostridium cluster IV</i> [Lg (copies/g)]	9.12 ± 0.07^a	10.20 ± 0.21^b	9.45 ± 0.51^a	9.29 ± 0.62^a	9.43 ± 0.41^a
Butyrate (mmol/L)	3.23 ± 0.42^a	11.79 ± 1.68^b	12.30 ± 2.32^b	5.08 ± 1.08^c	12.81 ± 3.76^b
TVFA (mmol/L)	28.70 ± 3.22^a	84.80 ± 10.06^b	98.29 ± 21.88^{hd}	57.01 ± 12.90^c	117.92 ± 11.75^d
Butyrate:TVFA (%)	11.26 ± 0.21^a	13.90 ± 0.87^b	12.59 ± 0.72^b	9.42 ± 3.88^{ab}	10.92 ± 3.16^{ab}

Mean with the different superscript of small letters within same rows were significant different ($P < 0.05$).

3 讨论

研究表明, 仔猪断奶前后肠道菌群会发生很大变化, 如总菌数量降低, 乳酸杆菌比例下降, 潜在病原菌比例上升等^[12]。本研究结果也表明, 断奶 3 天后仔猪结肠中总细菌数量显著下降, 然而, 梭菌 IV 群数量在断奶前后变化不显著, 并且其区系结构也较相似, 同时本研究还发现 7 日龄和 14 日龄样品在菌群数量和结构上均有较大差异, 这提示仔猪可能在哺乳早期(两周内)就建立了稳定的梭菌 IV 群, 而断奶对其影响较小。

本研究中, 仔猪结肠中的总 VFA 和丁酸浓度的变化趋势与总细菌数量的变化趋势相似, 但是与梭菌 IV 群的变化趋势并不一致, 这可能是因为肠道中产丁酸的菌群非常复杂^[4-5], 梭菌 IV 群中少数菌

不产生丁酸, 而梭菌 IV 群外的其它细菌也可以产生丁酸, 再者代谢途径和产丁酸效率有差异, 如某些菌可通过丙酮酸途径经丁酰 CoA 产生丁酸, 而另一些菌可利用乳酸、乙酸转化为丁酸。这表明梭菌 IV 群与其它丁酸产生相关菌群的关系还有待进一步研究, 我们对人和动物肠道丁酸产生的微生物基础还需进一步了解。

研究表明^[5,16], 梭菌 IV 群中的大多数成员可以产生丁酸, 但均为严格厌氧菌, 体外不易培养。本研究的克隆结果也表明, 超过 60% 的测序与已知菌的同源性低于 97%, 这与 Shen 等(2006)及 Lay 等(2007)所研究的人粪样中梭菌 IV 群的结果相似^[7,17], 因此, 除了分子生物学技术外, 在后续的研究中还应利用特殊培养手段培养该菌群中的未知细菌, 并进一步探索它们在肠道中的作用。

参考文献

- [1] Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M, Gill SR, Nelson KE, Relman DA. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science*, 2005, 308: 1635-1638.
- [2] Duncan SH, Hold GL, Harmsen H, Stewart CS, Flint HJ. Growth requirements and fermentation products of *Fusobacterium prausnitzii*, and a proposal to reclassify it as *Faecalibacterium prausnitzii* gen. nov., comb. Nov.. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2002, 52: 2141-2146.
- [3] Ben-Amor K, Heilig H, Smidt H, Vaughan EE, Abee T, de Vos WM. Genetic diversity of viable, injured, and dead fecal bacteria assessed by fluorescence-activated cell sorting and 16S rRNA gene analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71: 4679 - 4689.
- [4] Louis P, Flint H. Diversity, metabolism and microbial ecology of butyrate-producing bacteria from the human large intestine. *FEMS Microbiology Letters*, 2009, 294: 1-8.
- [5] Pryde SE, Duncan SH, Hold GL, Stewart CS, Flint HJ. The microbiology of butyrate formation in the human colon. *FEMS Microbiology Letters*, 2002, 217: 133-139.
- [6] Guo X, Xia X, Tang R, Wang K. Real-time PCR quantification of the predominant bacterial divisions in the distal gut of Meishan and Landrace pigs. *Anaerobe*, 2008, 14: 224-228.
- [7] Shen J, Zhang B, Wei G, Pang X, Wei H, Li M, Zhang Y, Jia W, Zhao L. Molecular profiling of the *Clostridium leptum* subgroup in human fecal microflora by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis and clone library analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72: 5232 - 5238.
- [8] Lay C, Sutren M, Rochet V, Saunier K, Doré J, Rigottier-Gois L. Design and validation of 16S rRNA probes to enumerate members of the *Clostridium leptum* subgroup in human faecal microbiota. *Environmental Microbiology*, 2005, 7: 933 - 946.
- [9] Matsuki T, Watanabe K, Fujimoto J, Takada T, Tanaka R. Use of 16S rRNA gene-targeted group-specific primers for real-time PCR analysis of predominant bacteria in human feces. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70: 7220-7228.
- [10] Woodmansey EJ. Intestinal bacteria and ageing. *Journal of Applied Microbiology*, 2007, 102: 1178 - 1186.
- [11] 苏勇, 姚文, 朱伟云. 益生菌 *Lactobacillus amylovorus* S1 对仔猪后肠菌群的影响. *微生物学报 (Acta Microbiologica Sinica)*, 2006, 46: 961-966.
- [12] Su Y, Yao W, Perez-Gutierrez ON, Smidt H, Zhu WY. Increased abundance of *Lactobacillus* spp. and *Streptococcus suis* in stomach, jejunum and ileum of piglets after weaning. *FEMS Microbiology Ecology*, 2008, 66: 546-555.
- [13] 龙黎明, 毛胜勇, 苏勇, 朱伟云. 一株瘤胃源乳酸利用菌的分离鉴定及其体外代谢特性. *微生物学报 (Acta Microbiologica Sinica)*, 2008, 48: 1571-1577.
- [14] Zoetendal EG, Akkermans ADL, de Vos WM. Temperature gradient gel electrophoresis analysis from human fecal samples reveals stable and host specific communities of active bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64: 3854 - 3859.
- [15] Muyzer G, de Waal EC, Uitterlinden AG. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction amplified genes encoding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, 59: 695-700.
- [16] Franks AH, Harmsen HJ, Raangs GC, Jansen GJ, Schut F, Welling GW. Variations of bacterial populations in human feces measured by fluorescent in situ hybridization with group-specific 16S rRNA targeted oligonucleotide probes. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64: 3336-3345.
- [17] Lay C, Dore J, Rigottier-Gois L. Separation of bacteria of the *Clostridium leptum* subgroup from the human colonic microbiota by fluorescence-activated cell sorting or group-specific PCR using 16S rRNA gene oligonucleotides. *FEMS Microbiology Ecology*, 2007, 60: 513-520.

16S rRNA gene-based molecular methods to monitor *Clostridium* cluster IV community in the colon of piglets

Gaorui Bian, Fei Xie, Yong Su*, Weiyun Zhu

(Laboratory of Gastrointestinal Microbiology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: [Objective] To investigate the change of *Clostridium* cluster IV community in the colon of piglets from 7 to 35 days of age, and its correlation with butyrate concentration. [Methods] Three litters of neonatal piglets were used. One piglet from each litter was sacrificed randomly at the age of 7, 14, 21 (weaning day), 24 and 35 days, digestive samples in the colon were collected. The concentration of volatile fatty acid (VFA) was determined by gas chromatography. 16S rRNA gene-based denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and real-time PCR were used for qualitative and quantitative analysis of *Clostridium* cluster IV community. [Results] Similarity analysis of DGGE profile revealed that samples from piglets at the age of 7 days formed a coherent cluster with indices above 90%, no significant changes in *Clostridium* cluster IV community were found around weaning period. Real-time PCR analysis showed that 16S rRNA gene copies of total bacteria in the colon of piglets decreased significantly 3 days after weaning, this tendency was in accordance with the changes in concentration of total VFA and butyrate in colon, while there was no significant difference in copies of *Clostridium* cluster IV group. Sequencing analysis indicated that *Clostridium* cluster IV group in the colon of piglets were dominated by *Faecalibacterium prausnitzii*, *Subdoligranulum variabile* and other uncultured bacteria. [Conclusion] Changes in *Clostridium* cluster IV community in the colon of piglets were found from the age of 7 days to 14 days, while there was no significant difference during the weaning transition.

Keywords: 16S rRNA gene; DGGE; Piglet; *Clostridium* cluster IV

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Natural Science Foundation for Young Researchers of China(30901036) and the Research Fund for Young Teachers in NAU

* Corresponding author. Tel: +86-25-84395523; E-mail: suney7912@yahoo.com

Received: 26 March 2010/Revised: 7 May 2010

《微生物学报》对摘要的写作要求

- 研究报告摘要:基本要素包括研究目的、方法、结果和结论,并要求在文中给出“【目的】、【方法】、【结果】和【结论】”等字样。具体地讲就是研究工作的主要对象和范围,采用的手段和方法,得出的结果和重要结论。在结果和讨论中应写明本文的创新之处。
- 综述摘要:包括论述内容的发展水平、自己的评论及展望。
- 英文摘要的撰写要点:英文摘要的内容应与中文摘要一致,但比中文摘要更详尽。要求在文中按照[Objective]、[Methods]、[Results]、[Conclusion]顺序分项撰写。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返回编辑部。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。
 - (6)句子的开头处最好不要使用数字。