

乙型肝炎病毒全S蛋白反式激活蛋白1基因的克隆化

白桂芹, 成军, 刘妍, 吴顺华, 蔺淑梅, 黄燕萍, 张树林

白桂芹, 成军, 刘妍, 吴顺华, 蔺淑梅, 黄燕萍, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心, 全军病毒性肝炎防治研究重点实验室 北京市 100039

张树林, 西安交通大学第一医院传染科 陕西省西安市 710061

白桂芹, 女, 1969-06-02, 陕西省西安市人, 汉族, 西安交通大学第一医院内科学博士, 主要从事病毒性肝炎的发病机制的研究。

国家自然科学基金攻关项目, No. C03011402, No. C30070689

军队“九、五”科技攻关项目, No. 98D063

军队回国留学人员启动基金项目, No. 98H038

军队“十、五”科技攻关青年基金项目, No. 01Q138

军队“十、五”科技攻关面上项目, No. 01MB135

项目负责人: 成军, 100039, 北京市西四环中路100号, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心, 全军病毒性肝炎防治研究重点实验室。cj@genetherapy.com.cn

电话: 010-66933392 传真: 010-63801283

收稿日期: 2004-05-28 接受日期: 2004-09-30

Cloning of human gene 1 transactivated by complete surface protein of hepatitis B virus

Gui-Qin Bai, Jun Cheng, Yan Liu, Shun-Hua Wu, Shu-Mei Lin, Yan-Ping Huang, Shu-Lin Zhang

Gui-Qin Bai, Jun Cheng, Yan Liu, Shun-Hua Wu, Shu-Mei Lin, Yan-Ping Huang, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, 302 Hospital of PLA, Beijing 100039, China

Shu-Lin Zhang, Department of Infectious Diseases, First Affiliated Hospital, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, Shaanxi Province, China

Supported by National Natural Science Foundation of China, No. C03011402, No. C30070689, and Returned Scholarship of General Logistics Department of Chinese PLA

Correspondence to: Jun Cheng, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, 302 Hospital of PLA, 100 Xisihuan Zhong Road, Beijing 100039, China. cj@genetherapy.com.cn

Received: 2004-05-28 Accepted: 2004-09-30

Abstract

AIM: To screen and clone the target genes transactivated by complete surface protein of hepatitis B virus (HBV) and to pave the way for further elucidating the pathogenesis of HBV infection.

METHODS: The mRNA was extracted from HepG2 cells, transfected with pcDNA3.1(-)-complete surface and pcDNA3.1(-) empty vector respectively, to synthesize cDNA. After digested by *RsaI*, the cDNA was divided into two groups and connected to different sites, and then suppression subtractive hybridization (SSH) method and reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) were employed to analyze the differentially expressed DNA sequence between the two groups. The coding gene transactivated by HBV complete surface was cloned by bioinformatics methods. The obtained sequences were searched for homologous DNA sequences from GenBank.

RESULTS: One of the obtained sequences had no homology with known genes in GenBank and its function was

unknown. It could be transactivated by complete surface protein of hepatitis B virus, so it was named complete surface transactivated protein 1 (CSTP1). It was also registered in GenBank with the number AY553877. CSTP1 gene had 945 nucleotides and its coding product was made up of amino acid residues.

CONCLUSION: The human gene transactivated by HBV complete surface is successfully cloned. This result will pave the way for the study of the molecular mechanism of the transactivating effects of HBV complete surface protein.

Bai GQ, Cheng J, Liu Y, Wu SH, Lin SM, Huang YP, Zhang SL. Cloning of human gene 1 transactivated by complete surface protein of hepatitis B virus. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(11):2581-2584

摘要

目的: 应用抑制性消减杂交(SSH)技术及生物信息学(bioinformatics)技术筛选并克隆乙型肝炎病毒(HBV)全S反式激活新型靶基因, 进一步阐明HBV感染相关疾病的发病机制。

方法: 以HBV全S蛋白表达质粒pcDNA3.1(-)全S转染HepG2细胞, 以空载体pcDNA3.1(-)为平行对照, 提取mRNA逆转录为cDNA, 经*RsaI*酶切后将实验组cDNA分成2组, 分别与2种不同的接头衔接, 与对照组cDNA进行二次杂交和二次PCR。并结合生物信息学技术, 克隆HBV全S反式激活作用的新型靶基因。

结果: 对于所获基因片段序列分析表明, 其中之一为新型基因片段。成功克隆出他的全长序列并测序证实, 其可以被全S蛋白反式激活, 故命名为全S反式激活蛋白1(CSTP1), 已在GenBank中注册, 注册号: AY553877。CSTP1基因的编码序列全长为945个核苷酸(nt), 编码产物由315个氨基酸残基(aa)组成。

结论: HBV全S蛋白具有反式激活蛋白1基因克隆成功。HBV全S反式激活新靶基因的发现, 为进一步研究HBV全S的分子生物学机制和探索新型治疗技术奠定基础。

白桂芹, 成军, 刘妍, 吴顺华, 蔺淑梅, 黄燕萍, 张树林. 乙型肝炎病毒全S蛋白反式激活蛋白1基因的克隆化. *世界华人消化杂志* 2004;12(11):2581-2584
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2581.asp>

0 引言

乙型肝炎病毒(HBV)为带包膜的肝DNA病毒属, HBV基因组中界定了4个开放读码框(ORF), 分别命名为S、C、P、X去, 其中S区又因不同的起始密码子

(ATG)而又人为的分为前-S1、前-S2和S三个区^[1]。董菁 *et al*^[2]应用长距离并且精确 PCR 技术(long and accurate PCR, LA-PCR)研究了乙型肝炎患者血清中存在的 HBV 病毒基因组发现在前-S1 的 ORF 之前存在一融合编码的 ORF, 该区长 135 bp, 命名为前-前-S 区, 并且证实了在前-前-S 基因上游 277 bp 核苷酸序列有启动子活性^[3], 其功能为调控前-前-S 区与 HBV 大蛋白的融合表达, 并提示前-前-S 区的 HBV 克隆株多来自日本和中国^[4]。抑制性消减杂交(suppression subtractive hybridization, SSH)技术, 具有实验周期短、易操作、可靠性高、假阳性率低等特点, 能有效地分离扩增低丰度特异表达的基因, 可以在较短的时间内获得较理想的实验结果^[5-6]。我们利用 SSH 对 HBV 全 S (包括前-前-S 区)蛋白反式激活作用进行研究, 将真核表达载体 pcDNA3.1(-)-HBV 全 S 基因转染肝母细胞瘤细胞系 HepG2, 并以转染空白载体的相同细胞系作为对照, 以 2 种转染的细胞系中提取的 mRNA 为起始材料, 应用 SSH 方法成功地构建了 HCV 全 S 蛋白反式激活相关基因差异表达的 cDNA 消减文库。同时我们结合生物信息学(bioinformatics)技术克隆了全 S 蛋白反式激活的新型靶基因, 即 HBV 全 S 蛋白反式激活蛋白 1 (CSTP1)基因, 从而为 HBV 全 S 蛋白作用的研究提供新的方向。

1 材料和方法

1.1 材料 HepG2 细胞及感受态大肠杆菌 DH5 α 为本室保存, pcDNA3.1(-)真核表达载体购自 Invitrogen 公司; FuGENE6 转染试剂购自 Roche, mRNA Purification 试剂盒购自 Amersham Pharmacia Biotech, PCR-Select cDNA Subtraction 试剂盒, 50 \times PCR Enzyme Mix、Advantage PCR Cloning 试剂盒购自 Clontech, High Pure PCR Product Purification 试剂盒购自 Boehringer Mannheim 公司, T7、SP6 通用引物及 pGEM-T 载体、pGEM-Teasy 载体购自 Promega 公司。HBV 全 S 蛋白真核表达质粒 pcDNA3.1(-)-全 S 由本室构建。DNA 序列测定由上海博亚公司完成。

1.2 方法 消减杂交文库的建立及克隆分析: 分别将 pcDNA3.1(-)-全 S 及 pcDNA3.1(-)空载体转染 HepG2 细胞, 48 h 后提取 mRNA, 以此 mRNA 为模板逆转录合成双链 cDNA(dscDNA), 并分别标记为 Tester 和 Driver, 经 *Rsa* I (一种识别 4 碱基序列的内切酶)消化后将 Tester cDNA 分为两份, 分别连接特殊设计的寡核苷酸接头 Adapter 1 和 Adapter 2, 与过量的 Driver cDNA 进行 2 次消减杂交和 2 次抑制性 PCR, 使 Tester cDNA 中特异性表达或高表达的片段得到特异性扩增。扩增产物与 pGEM-Teasy 载体连接, 转化 DH5 α 感受态细菌, 平铺于含氨苄青霉素的 LB/X-gal/IPTG 培养板上, 37 $^{\circ}$ C 培养 18 h。挑取白色菌落, 增菌, 以 pGEM-Teasy 载体多克隆位点两端 T7/SP6 引物进行菌落 PCR 扩增, 证明含有插入

片段后(200-1 000 bp), 测序。根据电子拼接的新基因序列(945 bp), 利用生物信息分析软件 Vector NTI 设计新基因的序列特异性的含有特异性核酸内切酶(*Eco*RI/*Bam*HI)的引物, 利用 HepG2 细胞来源的 mRNA, 经过 RT-PCR 扩增, 并与 pGEM-T 载体连接, 转化 DH5 α 感受态细菌, 铺于含有氨苄青霉素的 LB/X-gal/IPTG 培养板上, 37 $^{\circ}$ C 培养 18 h。挑取阳性菌落, 增菌, 使用碱裂解法提取质粒后进行双酶切(*Eco*RI/*Bam*HI)和菌落 PCR 鉴定, 证明目的基因约 945 bp 后测序, 进一步鉴定正确后获得阳性克隆。

2 结果

纯化高质量的 mRNA 是获得 cDNA 高产量的前提。紫外分光检测显示, 转染了全 S 表达质粒及空载体的 HepG2 细胞 mRNA 分别为 4.94 μ g 和 4.75 μ g, $A_{260}/A_{280} = 2.09$ 。10 g/L 琼脂糖凝胶电泳见 mRNA 为大于 0.5 kb 清晰慧尾片状条带, 证实 mRNA 质量足。

2.1 消减杂交文库的构建与分析 dscDNA 两端连接效率检测结果显示两组 dscDNA 已与接头高效率连接。消减效率的鉴定结果显示: 与未消减组 PCR 产物相比, 消减组 PCR 产物中看家基因甘油三磷酸脱氢酶(G3PDH)基因产物大大减少, 说明所构建的消减文库具有很高的消减效率。对差异表达基因片段进行菌落 PCR 扩增, 结果显示为 200-1 000 bp 大小不等的插入片段。挑选克隆测序并与 GenBank 数据库进行初步比较。

2.2 新基因的序列分析及全长基因的获得 利用美国国立卫生院(NIH)国立医学图书馆(NLM)国立生物工程中心(NCBI)建立的核苷酸序列数据库(GenBank)及其同源基因序列的搜索(BLASTN), 发现其中的 1 个克隆序列与 GenBank 中注册的已知功能基因序列没有同源。电子拼接推定该基因的开放读码框架, 设计引物, 从 HepG2 细胞提取总 RNA 后, 进行 RT-PCR, 扩增出约 945 bp 片段(图 1), 经过测序克隆出全长基因片段, 获得 HBV 全长 S 反式激活作用的新型靶基因, 命名为 CSTP1。新基因的开放读码框架(ORF)长度为 945 nt, 编码产物由 315 aa 组成(图 2)。

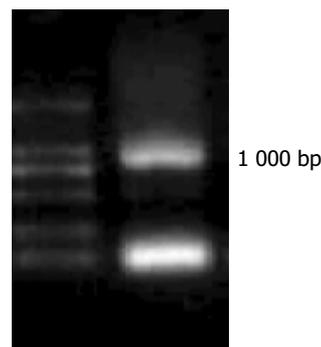


图 1 HBV 全 S 蛋白反式激活靶基因 CSTP1 的 RT-PCR 扩增结果。

ATG TCG GCT GCA GAG GCG GGG GGT GTT TTC
 M S A A E A G G V F
 CAC AGA GCC AGG GGC AGG ACC CTG GAC GCG
 H R A R G R T L D A
 TTT CCC GCA GAA AAG GAA AGC GAA TGG AAA
 F P A E K E S E W K
 GGC CCA TTC TAC TTC ATC CTG GGC GCA GAC
 G P F Y F I L G A D
 CCA CAG TTT GGG CTG ATC AAG GCC TGG TCC
 P Q F G L I K A W S
 ACT GGG GAC TGT GAC AAT GGC GGT GAC GAA
 T G D C D N G G D E
 TGG GAA CAG GAG ATC CGT CTA ACT GAG CAA
 W E Q E I R L T E Q
 GCC GTC CAG GCC ATC AAC AAG CTG AAC CCC
 A V Q A I N K L N P
 AAA CCC AAA TTC TTC GTT CTG TGC GGC GAC
 K P K F F V L C G D
 CTC ATC CAC GCC ATG CCA GGG AAG CCG TGG
 L I H A M P G K P W
 CGG ACG GAG CAG ACG GAG GAC CTG AAG CGA
 R T E Q T E D L K R
 GTG CTT AGG GCA GTG GAC AGG GCC ATC CCA
 V L R A V D R A I P
 CTG GTC CTT GTC AGC GGC AAC CAT GAC ATT
 L V L V S G N H D I
 GGC AAC ACC CCC ACG GCC GAG ACC GTC GAG
 G N T P T A E T V E
 GAG TTC TGC CGG ACT TGG GGA GAT GAC TAC
 E F C R T W G D D Y
 TTC AGC TTC TGG GTC GGG GGC GTC CTG TTC
 F S F W V G G V L F
 CTG GTC CTC AAC TCC CAG TTC TAC GAG AAC
 L V L N S Q F Y E N
 CCC TCC AAA TGC CCC AGC CTG AAG CAG GCT
 P S K C P S L K Q A
 CAG GAC CAG TGG CTG GAC GAG CAG CTG AGC
 Q D Q W L D E Q L S
 ATC GCG AGG CAG CGG CAC TGC CAG CAT GCC
 I A R Q R H C Q H A
 ATC GTC TTC CAG CAC ATC CCG CTG TTC CTG
 I V F Q H I P L F L
 GAG AGC ATC GAC GAG GAC GAC TAC TAC
 E S I D E D D D Y Y
 TTC AAC CTC AGC AAG TCC ACT CGG AAG AAG
 F N L S K S T R K K
 TTG GCA GAC AAG TTC ATC CAC GCA GGT GTC
 L A D K F I H A G V

AGA GTC GTG TTC TCA GGC CAC TAC CAC AGG
 R V V F S G H Y H R
 AAT GCC GGG GGT ACC TAC CAG AAC CTC GAC
 N A G G T Y Q N L D
 ATG GTG GTG TCA TCT GCC ATT GGA TGC CAG
 M V V S S A I G C Q
 CTG GGC AGA GAC CCC CAC GGG CTC CGA GTC
 L G R D P H G L R V
 GTG GTG GTC ACC GCC GAG AAA ATT GTT CAC
 V V V T A E K I V H
 CGA TAC TAC AGT CTA GAT GAG CTG AGT GAG
 R Y Y S L D E L S E
 AAA GGA ATA GAA GAC GAT CTC ATG GAT TTG
 K G I E D D L M D L
 ATC AAG AAA AAA TGA
 I K K K *

图2 HBV 全 S 蛋白反式激活靶基因 CSTP1 的核苷酸序列和蛋白质一级结构序列。

3 讨论

病毒的基因表达调节与真核细胞相似, 主要是转录水平为主的多水平的调节机制, 转录水平的调节根据调节的机制和参与的因素不同, 可以分成顺式(cis)调节和反式(trans)调节 2 种. HBV 基因组编码的蛋白作为反式激活因子, 对肝细胞某些基因表达调控的影响, 可能是 HBV 促进肝细胞恶性和慢性化的主要因素. 早期研究多集中在整合的病毒 DNA 编码的 HBxAg 蛋白广泛的反式激活活性上^[7-10]. 近年研究发现, 从肝癌细胞系或肝癌组织中亚克隆出的截短型前-S2/S 基因表达产物羧基末端的截短型分子 MHBst 也具有反式激活功能^[11-14].

乙型肝炎病毒感染, 不仅引起急、慢性病毒性肝炎, 而且与肝纤维化、肝细胞癌的发生发展密切相关^[15-16]. HBV 为包膜 DNA 病毒, 他的包膜由 3 个相关的表面蛋白组成, 他们是主蛋白(S), 中蛋白(M, 前-S2+S), 大蛋白(L, 前-S1+前-S2+S). 还有前-前-S 区, 由病毒基因组同一开放读码框编码, 但起始位点不同. 那么, 包括前-前-S 在内的全 S 蛋白的功能如何呢? 我们应用 SSH 研究包括前-前-S 在内的全 S 蛋白的反式激活作用, 发现其反式激活的新基因 CSTP1 并对其进行克隆化研究, 将进一步完善全 S 的生物学功能. 并且, 对 HBV 感染的检测、疫苗设计、HBV 进入肝细胞机制(受体学说)、表面抗原的表达过程及功能、宿主抗感染机制、HCC 产生机制研究产生重大影响.

4 参考文献

- 董菁, 李进, 施双双, 皇甫竞坤, 成军, 王勤环, 洪源, 李莉. 乙型肝炎病毒基因组准种与变异特点的研究. 解放军医学杂志 2002; 27:116-118
- 董菁, 成军. 乙型肝炎病毒基因组中前-前-S 区编码基因的界定. 世界华人消化杂志 2003;11:1091-1096
- 杨倩, 董菁, 成军. 乙型肝炎基因组中前-前-S 编码基因启动子

- 序列的确定及转录活性的鉴定. 解放军医学杂志 2003;9:761-762
- 4 成军, 董菁, 洪源, 钟彦伟, 刘妍, 王刚, 王琳. 乙型肝炎病毒中国流行株全基因的克隆与序列分析. 世界华人消化杂志 2003;11:1091-1096
- 5 刘妍, 成军, 王刚. 应用抑制性消减杂交技术克隆丙型肝炎病毒核心蛋白反式激活基因. 解放军医学杂志 2001;26:880-883
- 6 成军, 刘妍, 洪源, 王建军, 杨倩, 王琳. 乙型肝炎病毒和丙型肝炎病毒反式调节靶基因的抑制性消减杂交和基因芯片分析结果的比较. 世界华人消化杂志 2004;12:327-331
- 7 Cheng J. Molecular pathogenesis of viral hepatitis. *J Gastroenterol Hepatol* 2002;16(Suppl):A185
- 8 董菁, 施双双, 张国庆, 皇甫竞坤, 洪源, 成军, 王勤环, 李莉, 斯崇文. 乙型肝炎病毒 C 基因启动子区异质性检测的初步研究. 临床检验杂志 2002;20:72-74
- 9 董菁, 施双双, 王业东, 皇甫竞坤, 洪源, 李莉, 张玲霞, 成军. cDNA 文库噬菌体展示法的建立及乙型肝炎病毒前 S1 蛋白结合蛋白筛选. 解放军医学杂志 2002;27:321-322
- 10 成军, 李莉. 新型抗乙型肝炎病毒药物氟硫胞苷的作用及机制. 世界感染杂志 2002;2:1-4
- 11 Lu YY, Li K, Cheng J, Wang L, Liu Y, Zhang LX. Cloning and expression of pre-S1 gene of hepatitis B virus in yeast. *Hepatobil Pancreatic Dis Int* 2002;1:238-242
- 12 陆荫英, 李克, 成军, 王琳, 刘妍, 张玲霞. 乙型肝炎病毒前-S1 基因酵母表达载体的构建及表达. 解放军医学杂志 2002;27:341-342
- 13 董菁, 施双双, 皇甫竞坤, 成军, 王勤环, 李莉, 斯崇文. 乙型肝炎病毒前 C/C 基因准种与变异特点的研究. 中华微生物学与免疫学杂志 2002;22:27
- 14 刘妍, 成军, 张跃新, 段惠娟, 牟劲松, 韩萍, 李莉, 张玲霞, 陈菊梅. 截短型 HBsAg 中蛋白反式激活基因的克隆. 中华传染病杂志 2002;20:218-221
- 15 夏小兵, 成军, 王刚, 杨继珍, 刘妍, 董菁, 王琳, 李克. 人肝再生增强因子在毕赤酵母中的表达. 世界华人消化杂志 2001;9:743-746
- 16 李克, 王琳, 成军, 张玲霞, 段惠娟, 陆荫英, 杨继珍, 刘妍, 洪源, 夏小兵, 王刚, 董菁, 李莉, 钟彦伟, 陈菊梅. 酵母双杂交技术筛选克隆 HCV 核心蛋白结合蛋白基因 1. 世界华人消化杂志 2001;9:1379-1383

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

World Journal of Gastroenterology 编辑要点

经《World Journal of Gastroenterology, WJG》编委审稿后, 非常优秀的论文可直接录用, 通知作者按照编委审稿意见及本刊的书写格式进行修改, 符合本刊要求的论文经第一和第二编辑语言处理后方可进行排版. 排版后校样由责任编辑审读全文, 无语法及拼写错误方可付印. WJG 为了确保其出版的每篇论文的编辑质量, 特制定了编辑要点如下.

1 题名

应简明扼要有特色, 突出主题, 不宜过长; 应直入主题, 避免使用“探讨、研究、分析、观察、调查、探索”等词语; 不用定冠词 The, 一般不使用缩写字(常用缩写字例外). 具体写作的要求见《科技论文英文题名的撰写》<http://www.wjgnet.com/1009-3079/new/26.asp>.

2 摘要

采用结构式摘要. 目的部分应直入主题, 如 To investigate the, 可简要交代背景或该课题目前开展情况; 方法(包括材料)和结果(包括重要数据)部分使用过去时, 结论部分使用一般现在时. 人称和语态使用应自然, 避免使用“悬垂分词”. 摘要的第一句不要重复文章题名, 应增加变化, 补充一些细节. 具体写作的要求见《科技论文英文摘要的撰写》<http://www.wjgnet.com/1009-3079/new/25.asp>.

3 正文

(1) 短句子: 提倡使用短句子, 尽量避免一个句子使用多个从句. 拼写正确, 时态一致、准确. 方法及结果部分一般使用过去时. 讨论部分, 引用文献叙述一般使用过去时, 结论性语言使用一般现在时. 要注意主句和从句的时态呼应及文中上下文含意的呼应; 应尽量对照其中文稿以求如实表达其原意; 使用分词短语作状语和定语时, 一定要注意其语态的正确使用, 以求其前后呼应; 应注意用词的对照一致及词语的固定搭配等; 在编辑过程中, 一定要核对各基本数据及其百分比. 此外, 还应注意标点符号的正确使用与拉丁语名词的单复数. (2) 数字: 出现在句首的数字应写为: Sixteen cases... 或 A total number of 16 cases 而不能写为: 16 cases, 100 patients, 等. (3) 缩略词: 首次使用词语时, 应先写出全称然后在括号内写出其缩写词. (4) 斜体: 细菌、病毒、动植物的拉丁学名、统计学符号、基因符号、内切酶(前 3 个字符)、量符号、拉丁词如 *in vivo*, *in situ*, *et al* 等及参考文献中的刊名应使用斜体. (5) 图表: 不要重复使用, 已用图表示的内容不再使用表格. 表和图题的说明应与正文的文题一样, 文内图表的标注使用句子表示时应使用一般现在时而不使用过去时, 如 The data are shown in Table 1. 图表置正文内, 图表内注解首字母大写, 其余小写.

4 参考文献

应按先后顺序在正文内标出. 参考文献全体作者是否与首页一致, 题名与首页是否一致, 刊名与首页是否一致, 年与首页是否一致, 卷号与首页是否一致, 起页 - 止页与首页是否一致, PMID 号是否与首页一致.

5 其他

(1) 注意字符间空格, 文稿要隔行打印. (2) 使用正式文体, 不用口语体和非规范缩写词. 如 isn't, aren't, hasn't, hadn't, haven't, don't, can't, wouldn't, a lot of, a bit, too (also), thru (through), exam (examination), lab (laboratory) 等. (3) 要客观地叙述方法和结果, 用词要质朴无华, 避免使用带感情色彩或广告式宣传的词语. (4) 可用动词时应尽量避免使用动词的名词形式. (5) 正确使用冠词, 对可数词应尽量使用复数形式. (6) 应多用预置短语分开或用连字符断开名词词组, 避免使用长系列形容词或名词修饰名词. (7) 尽量应用重要的事实开头, 避免短语或从句开头. (8) 涉及他人的工作或研究成果时, 尽量列出其姓名, 两名以上的作者一定要用“*et al*”. 具体写作的要求见《科技论文的写作要点》<http://www.wjgnet.com/1009-3079/new/31.asp>.