

吸水链霉菌谷氨酰胺转胺酶基因的阻断及其对细胞分化的影响

陈康康², 刘松², 鞠晓辉², 马腾博², 张东旭^{2*}, 堵国成^{1,2}, 陈坚^{1,2*}

(江南大学,¹ 食品科学与技术国家重点实验室,² 工业生物技术教育部重点实验室, 无锡 214122)

摘要:【目的】通过对吸水链霉菌(*Streptomyces hygroscopicus*)中谷氨酰胺转胺酶基因的阻断,以期深入了解谷氨酰胺转胺酶生理功能,并为谷氨酰胺转胺酶发酵优化提供新的研究思路。【方法】以温敏型质粒 pKC1139 为出发质粒,构建阻断吸水链霉菌谷氨酰胺转胺酶编码基因的重组质粒 pKC1139-TG1,转化吸水链霉菌原生质体,通过抗性筛选和 PCR 验证,成功得到一株谷氨酰胺转胺酶阻断菌株,命名为 *S. h-ΔTG*。【结果】以原始菌株为对照,重组子基内菌丝生长不受影响,但是由基内菌丝分化形成气生菌丝的过程受到影响,重组子基本不产气生菌丝。【结论】谷氨酰胺转胺酶对吸水链霉菌气生菌丝的形成有着重要的影响,参与链霉菌气生菌丝的形成。

关键词: 吸水链霉菌;谷氨酰胺转胺酶;基因阻断;菌丝分化

中图分类号: Q933 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2010) 12-1626-07

微生物谷氨酰胺转胺酶(蛋白质-谷氨酸-谷氨酰胺转胺酶, Microbial transglutaminase, EC2.3.2.13, 简称 MTG)是一种催化酰基转移反应的转移酶。它能催化蛋白质分子内、分子间发生交联、蛋白质和氨基酸之间的连接以及蛋白质分子内谷氨酰胺基的水解反应,从而直接改变蛋白质本身以及蛋白质所附着的细胞、组织等的结构与功能性质的特性^[1]。因此,MTG 在食品、纺织、生物制药等领域有着广泛的应用前景。谷氨酰胺转胺酶存在于在动物、植物、微生物中,目前工业生产谷氨酰胺转胺酶的主要菌株为茂源链霉菌(*Streptomyces mobaraensis*)^[2]。

链霉菌(*Streptomyces*)是一类生活在土壤中的革兰氏阳性丝状细菌,具有典型的分化过程,在固体培养基中,由孢子萌发成基内菌丝,基内菌丝分化成气生菌丝,再由气生菌丝分化成为孢子丝。前期的研

究工作中,本研究室筛选出一株高产谷氨酰胺转胺酶的菌株,鉴定为吸水链霉菌^[3](*Streptomyces hygroscopicus*),对谷氨酰胺转胺酶生理功能及由酶原到成熟酶的活化机制进行了研究,发现在营养菌丝的生长阶段并不分泌谷氨酰胺转胺酶,而在分化形成气生菌丝时才开始启动表达和分泌,并在形成孢子后停止谷氨酰胺转胺酶的酶源到成熟酶的激活过程^[4-5],因此推测谷氨酰胺转胺酶很可能参与了链霉菌的气生菌丝分化过程。

动物组织谷氨酰胺转胺酶参与细胞凋亡过程已有文献报道^[6-7],但链霉菌中 MTG 的生理功能还未见报道。基于以上研究,本文以吸水链霉菌(*S. hygroscopicus*)为出发菌株,通过单交换方式阻断谷氨酰胺转胺酶的编码基因^[8],为研究谷氨酰胺转胺酶的生理功能奠定了基础,也为基因阻断技术在吸

基金项目: 国家杰出青年基金(20625619);国家自然科学基金重点项目(20836003);国家“973 项目”(2007CB 714306);食品科学与技术国家重点实验室自由探索项目(SKLF-TS-200902);国家自然科学基金(30770055);国家自然科学基金(20776063)

* 通信作者。 +86-510-85329079; E-mail: jchen@jiangnan.edu.cn; zhangdongxu@jiangnan.edu.cn

作者简介: 陈康康(1986-),男,江苏徐州人,硕士研究生,主要从事发酵工程方面的研究。E-mail: jnckkang@126.com

收稿日期: 2010-05-26; **修回日期:** 2010-07-11

水链霉菌基因功能分析中的应用做了有益尝试。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒:吸水链霉菌(*S. hygrosopicus*) CCTCCM203062 系本实验室从土壤中筛选得到,大肠杆菌 *E. coli* JM109, 双功能温敏型穿梭质粒 pKC1139(上海交通大学邓子新院士惠赠),大肠杆菌 ET12567(由英国 John Innes 研究所提供)。

1.1.2 培养基:大肠杆菌用 LB 培养基,链霉菌液体生长培养基 YEME,原生质体再生培养基 R2YE 及链霉菌固体培养基 MS^[9]。

1.1.3 主要试剂和仪器:限制性内切酶、连接酶, Taq 酶,质粒提取试剂盒、DNA 回收试剂盒均购自 TaKaRa;安普霉素(Apramycin, Am)、卡那霉素(Kanamycin, Km)购自上海生工生物工程技术有限公司。

1.2 MTG 片段基因获得方法

1.2.1 链霉菌总 DNA 提取:按照文献[9]进行。

1.2.2 MTG 片段基因 TG1 的获得:为将 MTG 编码基因阻断,设计缺少 MTG 完整编码基因的 5'和 3'端 100 bp 的片段基因 TG1。根据 MTG 基因序列,分别以其 5'和 3'端 100 bp 核苷酸开始设计正、反引物序列,分别引入 *Hind* III 和 *Eco* RI 酶切位点:正向序列 Y1:5'-TTTAAGCTTCCACTGTGACTGCGGCGATA'(下划线,黑体字为 *Hind* III 位点);反向引物序列为 Y2:5'-AAAGAATTCTTCCGTCTGAGCCCCAAACC-3'(下划线,黑体字为 *Eco* RI 位点)(上海生工生物工程技术有限公司合成)。PCR 反应的总体系为 25 μ L,以 1 μ L 的吸水链霉菌总 DNA 为模板进行反应。反应条件为:95 $^{\circ}$ C 5 min;95 $^{\circ}$ C 1 min, 65 $^{\circ}$ C 1 min,72 $^{\circ}$ C 10 min,30 个循环。PCR 产物为 MTG 基因片段,命名为 TG1。

1.3 转化

1.3.1 单交换质粒 pKC1139-TG1 构建和去甲基化:用 *Eco* RI 和 *Hind* III 双酶切双功能温敏型穿梭质粒 pKC1139(6.5 kb),然后与 TG1 基因进行连接,转化 *E. coli* DH5 α 感受态。从抗性平板上挑取单菌落,通过 PCR 和质粒酶切验证。验证正确后,将重组质粒转化大肠杆菌 ET12567,从阳性菌落中提取的质粒即为去甲基化的重组质粒。

1.3.2 链霉菌转化方法:链霉菌原生质体制备及转化参照文献[9]。

1.3.3 转化子 PCR 鉴定:由于野生型吸水链霉菌不含安普霉素(Apramycin)抗性基因 aac,而重组质粒是以整合的方式插入到基因组中,从而使重组吸水链霉菌带有了安普霉素(Apramycin)抗性基因。因此以 Apramycin 抗性基因设计正向引物 P2:5'-TGCAATACGAATGGCGAAAAG-3'和反向引物 P3:5'-TCGGCCCAGTTGACCCAGGG-3'。PCR 反应总体系为 25 μ L,以 1 μ L 的总 DNA 为模板。反应条件为:95 $^{\circ}$ C 5 min 后;95 $^{\circ}$ C 1 min,65 $^{\circ}$ C 1 min,72 $^{\circ}$ C 1 min,30 个循环。

1.4 PCR 鉴定转化子的整合方式

由于 pKC1139-TG1 上只含 TG 基因片段,分别缺少 5'和 3'端 100 bp 片段,以基因组上 TG 5'端核苷酸序列设计正向引物 P1:5'-TGTACAAGCGT CCGAGTTTAC-3',以 Apramycin 抗性基因(aac)3'端设计反向引物 P3:5'-TCGGCCCAGTTGACCCAGG G-3',PCR 产物则包括了 TG 基因的上游部分序列、质粒中的 TG1 基因片段及 Apramycin 抗性基因 aac 的核苷酸序列。

1.5 谷氨酰胺转氨酶活力测定

比色法测定酶活:以 N- α -CBZ-GLN-GLY 为作用底物,L-谷氨酸- γ 单羟胺酸做标准曲线。1 个单位谷氨酰胺转氨酶酶活定义为:37 $^{\circ}$ C 时每分钟催化形成 1 μ mol L-谷氨酸- γ 单羟胺酸的酶量(U/mL)^[10]。

2 结果和分析

2.1 重组质粒 pKC1139-TG1 构建和转化

以吸水链霉菌基因组为模板,按照 1.2 所述,通过 PCR 扩增出一段 1020 bp 的基因片段(TG1),与 TG 的完整编码基因相比缺失了前后各 100 bp 片

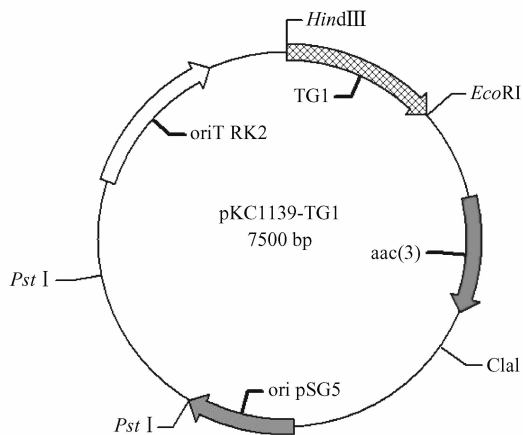


图 1 pKC1139-TG1 质粒图谱

Fig. 1 Map of recombinant pKC1139-TG1 plasmid.

段。将 PCR 扩增纯化产物与用 *Eco* R I 和 *Hind* III 双酶切的 pKC1139 载体片断连接构建出约 7500 bp 的重组质粒 pKC1139-TG1(图 1)。

提取重组质粒 pKC1139-TG1 经酶切验证后转 *S. hygrosopicus* 原生质体,在 R2YE 再生培养基上生长 18 h,加入适宜浓度的安普霉素,28℃培养 5-7 d。

2.2 重组转化子筛选

由于 pKC1139-TG1 带有温敏型启动子,当培养

温度超过 39℃ 时,该游离质粒不能自我复制,但 pKC1139-TG1 所携带的 TG1 基因片段可与染色体上的同源区段进行同源重组,整个质粒可通过单交换插入到染色体上的 TG 基因中(图 2)。

将 Apramycin 抗性平板上长出的菌落转接至另一含有 Apramycin 的 MS 抗性平板上置于 39℃ 培养,平板上长出的菌落即可能为重组质粒 pKC1139-TG1 整合于吸水链霉菌染色体上的重组菌株。

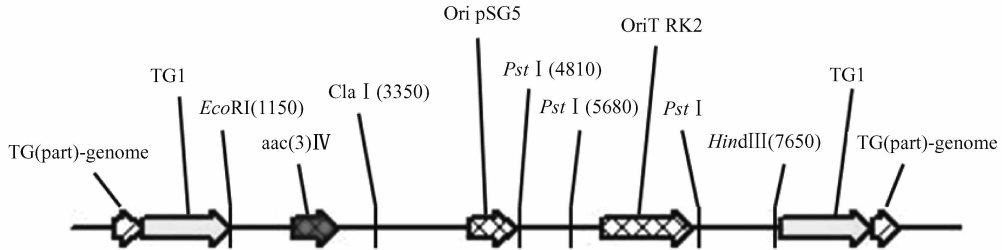


图 2 pKC1139-TG1 交换到吸水链霉菌染色体上示意图

Fig. 2 Sketch map of pKC1139-TG1 location in chromosome of *S. hygrosopicus* after single crossover.

2.3 重组转化子验证

单交换过程中,整个质粒或插入到链霉菌基因组中(图 3-A),以抗性片段基因 *aac* 存在与否及质粒整合方式来验证 pKC1139-TG1 质粒是否整合到染色体上。阳性重组子不仅含有 TG1 基因片段,还

从质粒 pKC1139-TG1 的单交换重组过程中获得抗性基因。按 1.4 中所述进行 PCR 鉴定,PCR 产物理论大小为 3.0 kb(图 3-B)左右。在挑选的 3 株菌中只有菌株 1 得到与目的片段大小相同的片段,对照组 4 野生菌没有条带。进一步以菌株 1 的 PCR

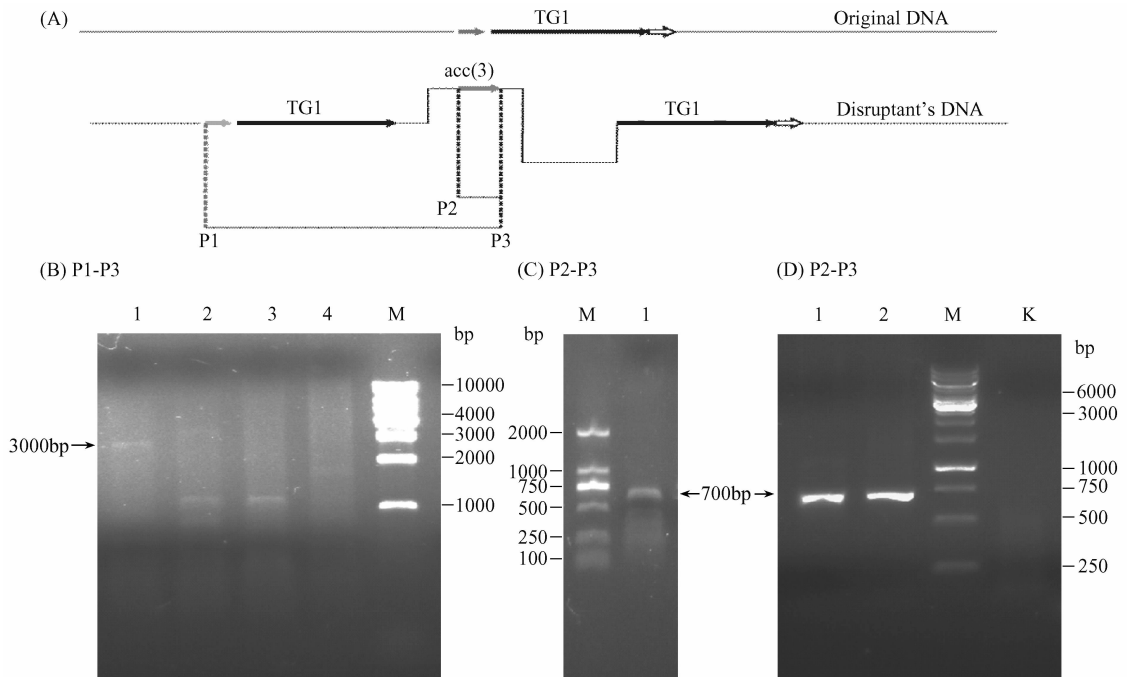


图 3 基因阻断菌株 PCR 验证

Fig. 3 Confirmation of MTG gene disruption mutants by PCR. A: Primers for confirming gene disruption MTG mutants. B: Electrophoresis of typical colonies using the primers P1 and P3, giving PCR products of 3000bp in A. 1, 2, 3; MTG mutants; 4: *S. hygrosopicus*; M: Marker. C: Electrophoresis for PCR products of the sample in B-1. D: Electrophoresis for PCR products of *aac*.

产物为模板,以 *aac* 基因设计的正反向引物 PCR 扩增出 700 bp 的 *aac* 基因(图 3-C)。说明质粒整合进入了链霉菌染色体,整合位点也正确。

同时按 Apramycin 抗性基因设计上下游引物 P2、P3 进行 PCR 鉴定。如图 3-D 所示,以阳性转化子的基因组和 pKC1139-TG1 质粒为模板 PCR 均能够获得 700 bp 左右的 Apramycin 抗性基因 *aac*。将得到的 PCR 片段进行测序,碱基序列一致。

PCR 验证重组子的整合分析及 *aac* 抗性基因测序结果,证实了重组质粒 pKC1139-TG1 整合到吸水链霉菌染色体 TG 基因中,获得菌株为 TG 阻断的阳性重组子,命名为 *S. h-ΔTG*。

2.4 重组子与野生菌固体平板生长比较

将重组菌株进行液体和固体培养,不同时间段检测酶活,如图 4 所示,野生菌株可以检测到 MTG 酶活,但重组子在固体及液体培养过程中均检测不到 MTG 酶活(图 4)。

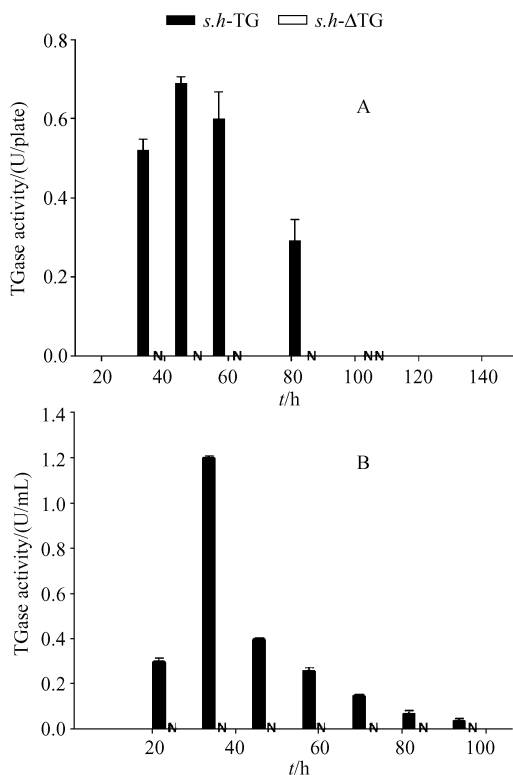


图 4 野生菌株和重组子谷氨酰胺转胺酶酶活比较

Fig. 4 MTG activities of *S. h* and *S. h-ΔTG* during cultivation. A: MTG activities of *S. h* and *S. h-ΔTG* in solid culture. B: MTG activities of *S. h* and *S. h-ΔTG* in submerged culture. N: none-detected.

同时对 *S. h-ΔTG* 进行固体平板培养,以野生菌株为对照,分别将野生菌和重组子接种到同一平

板不同区域(图 5),32℃ 培养。在菌体前期生长过程中,基内菌丝可以正常生长,48 h 时野生菌株已经全部分化形成气生菌丝,而重组子 *S. h-ΔTG* 还是处于营养菌丝生长状态,没有气生菌丝生成。继续培养至 120 h,野生菌株 *S. h* 已经开始形成大量孢子,重组子 *S. h-ΔTG* 没有孢子形成。谷氨酰胺转胺酶阻断使重组菌株无法正常的形成气生菌丝和产生孢子。将野生菌株及阻断菌株培养 6 d,通过相差显微镜观察(图 6),野生菌株可以产气生菌丝并最终分化形成孢子,而阻断菌株没有气生菌丝及孢子链的形成,以上结果表明谷氨酰胺转胺酶是吸水链霉菌正常生长分化所必须的。

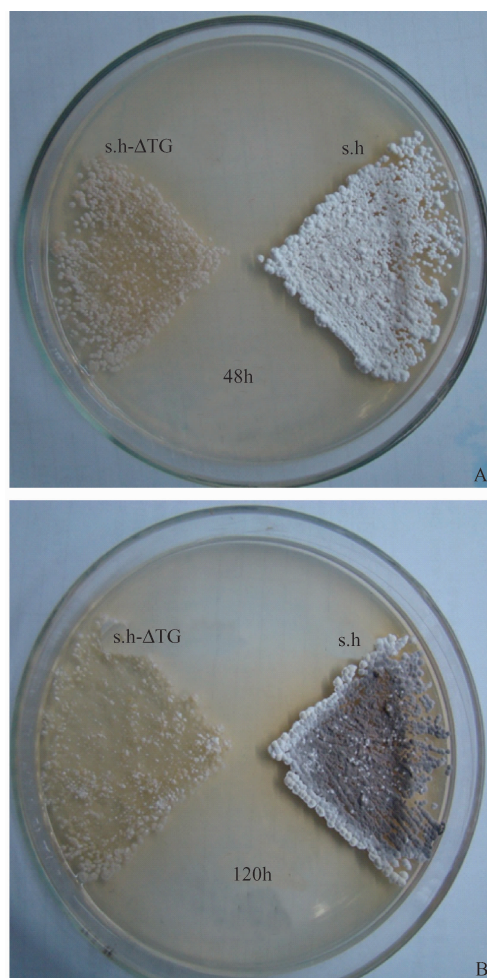


图 5 谷氨酰胺转胺酶基因阻断菌株的表型观察

Fig. 5 Phenotype of MTG gene disruption mutants. (A) *S. h* and *S. h-ΔTG* were cultured for 48 h. (B) *S. h* and *S. h-ΔTG* were cultured for 120 h.

2.5 *S. h-ΔTG* 基因阻断株互补实验

为证实阻断菌株不能分化形成气生菌丝是由于 MTG 基因被阻断所致,将阻断菌株培养在平板上,

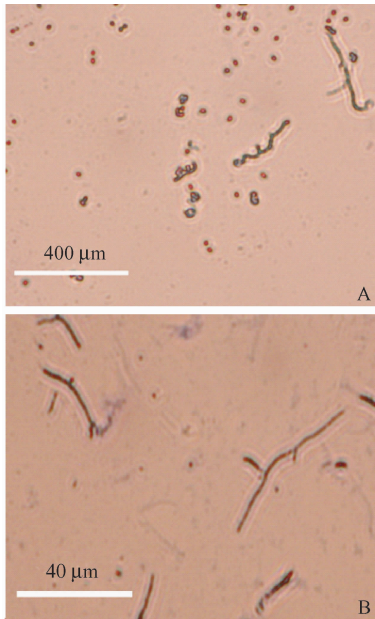


图 6 谷氨酰胺转胺酶基因阻断菌株显微观察

Fig. 6 Phase contrast microscope observation of MTG gene disruption mutants. (A) *S. h* were cultured for 6 d. (B) *S. h-ΔTG* were cultured for 6 d.

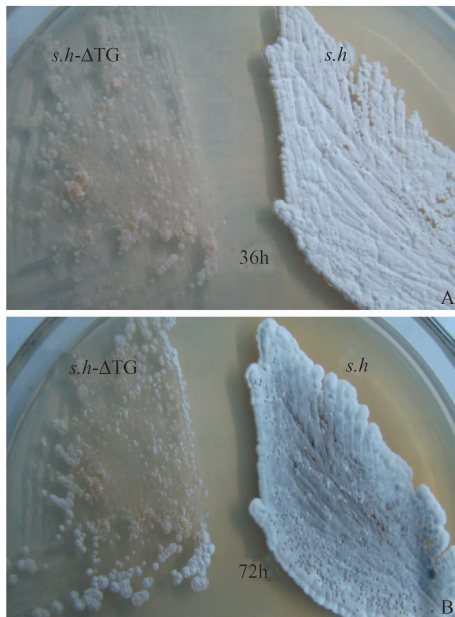


图 7 基因阻断菌株互补实验

Fig. 7 Phenotypes of MTG gene disruption mutants by adding MTG. A: *S. h* and *S. h-ΔTG* were cultured for 36 h without additional MTG. B: *S. h* and *S. h-ΔTG* were cultured for 72 h with additional MTG. MTG was added at 36 h.

培养 36 h, 此时野生菌株 36 h 已经形成大量气生菌丝, 但阻断株 *S. h-ΔTG* 仍处于营养生长菌丝生长阶段(图 7-A), 同时根据 2.4 实验可知, 阻断菌株继续培养也不会形成气生菌丝。向阻断菌株上面添加

2 U 的 MTG 酶液, 继续培养至 72 h, 如图 7-B 所示, 此时阻断菌株也可以看到明显的气生菌丝形成。通过将 MTG 酶液加入到阻断菌株上, 使阻断菌株重新获得了分化形成气生菌丝的能力, 证明了阻断菌株不产气生菌丝确实是由于 MTG 基因被阻断所致。

3 讨论

本文利用基因阻断技术, 在基因水平上研究谷氨酰胺转胺酶的生理功能。基因阻断技术是研究链霉菌中特定基因生理功能的一种重要方法, 具有准确、方便的优点^[11-13]。在构建吸水链霉菌谷氨酰胺转胺酶基因阻断菌株的过程中, 我们曾尝试利用不同的阻断策略, 包括不同阻断质粒、同源臂的选择及将质粒导入到链霉菌中的方式。这些方法中只有利用重组质粒 pKC1139-TG1 转化吸水链霉菌原生质体的方法成功获得了突变株。该阻断方法的成功, 为后续吸水链霉菌中其它基因的阻断研究提供了可行的方法。

通过对 MTG 编码基因的阻断, 验证了对 MTG 在链霉菌中生理功能的推测, 明确了 MTG 参与吸水链霉菌气生菌丝的生成。链霉菌气生菌丝由基内菌丝分化形成, 分化前期基内菌丝会经历细胞程序性死亡^[14-15], 在这过程中基内菌丝胞内物质被降解, 为气生菌丝生长提供营养, 但细胞在一定时间内保持完整性, 保证细胞的正常分化^[16], 但在这过程中细胞是容易受到外界环境破坏, 因此需要特定保护措施。例如, 抗生素的分泌可以看做是链霉菌的一种保护策略, 同时在特定情况下还会改变细胞壁组成来增强保护机制^[17]。由于 MTG 催化蛋白质交联的功能, 很可能使链霉菌在营养菌丝凋亡过程中通过交联蛋白质形成刚性结构保护菌丝体免受外来攻击及避免内部营养外溢, 参与了细胞的完整性的维持。

MTG 参与链霉菌的气生菌丝形成, 由于其特殊的生理功能及严密的活化机制, 可能是制约产量提高的关键因素。在发酵优化中, 可以采取胁迫及补料等策略, 以链霉菌分化作为切入点, 保证菌体正常生长分化, 从而提高 MTG 产量。同时有关 MTG 参与链霉菌分化的分子机制, 还需要在分子水平上进一步对 MTG 催化反应进行分析和定位等研究来实现。

致谢 感谢上海交通大学邓子新院士惠赠质粒, 感谢中国科学院杨克迁研究员在实验中给予的宝贵意见。

参考文献

- [1] Griffin M, Casadio R, Bergamini CM. Transglutaminases: nature's biological glues. *The Biochemical Journal*, 2002, 368(2): 377-396.
- [2] Yokoyama K, Nio N, Kikuchi Y. Properties and application of microbial transglutaminase. *Applied Microbiology Biotechnology*, 2004, 64(4): 447-454.
- [3] 柏映国, 燕国梁, 堵国成, 陈坚. *Streptomyces hygroscopicus* 产谷氨酰胺转氨酶摇瓶发酵条件的优化. 食品与发酵工业 (*Food and Fermentation Industries*), 2004, 30(2): 27-32.
- [4] Zhang DX, Wang M, Wu J, Cui L, Du GC, Chen J. Two different proteases from *Streptomyces hygroscopicus* are involved in transglutaminase activation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2008, 56(21): 10261-10264.
- [5] Zhang DX, Wang M, Du GC, Zhao QX, Wu J, Chen J. Surfactant protein of the *Streptomyces* subtilisin inhibitor family inhibits transglutaminase activation in *Streptomyces hygroscopicus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2008, 56(9): 3403-3408.
- [6] Fesus L, Madi A, Balajthy Z, Nemes Z, Szondy Z. Transglutaminase induction by various cell death and apoptosis pathways. *Experientia*, 1996, 52(10): 942-949.
- [7] Nicholas B, Smethurst P, Verderio E, Jones R, Griffin M. Cross-linking of cellular proteins by tissue transglutaminase during necrotic cell death: a mechanism for maintaining tissue integrity. *The Biochemical Journal*, 2003, 371(2): 413-422.
- [8] 刘志勇, 郭美锦, 钱江潮, 庄英萍, 张嗣良. 龟裂链霉菌 *zwf2* 基因阻断提高土霉素生物合成. 微生物学报 (*Acta Microbiologica Sinica*), 2008, 48(1): 21-25.
- [9] Hopwood D, Bibb M, Chater KF. Genetic manipulation of *Streptomyces*. A Laboratory Manual. 2nd ed. Norwich: John Innes Foundation Press, 2000.
- [10] Grossowicz N, Wainfan E, Borek E, Waelsch H. The enzymatic formation of hydroxamic acids from glutamine and asparagine. *The Journal of Biological Chemistry*, 1950, 187(1): 111-125.
- [11] Kuscer E, Coates N, Challis I, Matt G, Barrie W. Roles of rapH and rapG in positive regulation of rapamycin biosynthesis in *Streptomyces hygroscopicus*. *Journal of Bacteriology*, 2007, 189(13): 4756-4763.
- [12] Gust B, Challis GL, Fowler K, Kieser T, Chater KF. PCR-targeted *Streptomyces* gene replacement identifies a protein domain needed for biosynthesis of the sesquiterpene soil odor geosmin. *Proceeding of National Academy Sciences of the United States of America*, 2003, 100(4): 1541-1546.
- [13] Li W, Ying X, Guo YZ, Yu Z, Zhou XF, Deng ZX, Chater KF. Identification of a gene negatively affecting antibiotic production and morphological differentiation in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Journal of Bacteriology*, 2006, 188(24): 8368-8375.
- [14] Miguélez EM, Hardisson C, Manzanal MB. *Streptomyces*: a new model to study cell death. *Internat Microbiol*, 2000, 3: 153-158.
- [15] Manteca A, Alvarez R, Salazar N, Yague P, Sanchez J. Mycelium Differentiation and Antibiotic Production in Submerged Cultures of *Streptomyces coelicolor*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74(12): 3877-3886.
- [16] Novotna J, Vohradsky J, Berndt P, Gramajo H, Langen H. Proteomic studies of diauxic lag in the differentiating prokaryote *Streptomyces coelicolor* reveal a regulatory network of stress-induced proteins and central metabolic enzymes. *Molecular Microbiology*, 2003, 48(5): 1289-1303.
- [17] Haiser HJ, Yousef MR, Elliot MA. Cell wall hydrolases affect germination, vegetative growth, and sporulation in *Streptomyces coelicolor*. *Journal of Bacteriology*, 2009, 191(21): 6501-6512.

Effect of transglutaminase-gene disruption in *Streptomyces hygroscopicus* on cell differentiation

Kangkang Chen², Song Liu², Xiaohui Ju², Tengbo Ma², Dongxu Zhang^{2*}, Guocheng Du^{1,2}, Jian Chen^{1,2*}

(¹ State Key Laboratory of Food Science and Technology, ² Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: [**Objective**] To provide theoretical basis for understanding the physiological function of transglutaminase in *Streptomyces*, which would benefit for improving the production of this enzyme, transglutaminase gene was disrupted in *Streptomyces hygroscopicus*. [**Methods**] First, the interruption plasmid pKC1139-TG1 was constructed by inserting a segment of transglutaminase gene in the temperature-sensitive vector pKC1139. Second, pKC1139-TG1 was transformed into *S. hygroscopicus* protoplast and the interruption plasmid was inserted into the chromosome by homogenous recombination. Third, the strain with disrupted transglutaminase gene was screened by apramycin resistance and named as *S. h-ΔTG*. [**Results**] Compared with the parent strain, *S. h-ΔTG* was able to grow as substrate mycelium, but not able to form aerial hyphae. [**Conclusion**] Transglutaminase may be involved in the aerial hyphae formation of *S. hygroscopicus*.

Keywords: *Streptomyces hygroscopicus*; transglutaminase; gene disruption; mycelium differentiation

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Outstanding Youth Foundation of China (20625619), by the Key Program of National Natural Science Foundation of China (20836003), by the Major Project of Chinese National Programs for Fundamental Research and Development (2007CB714306), by the Research Program of State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University (SKLF-TS-200902), by the National Natural Science Foundation of China (30770055) and by the National Natural Science Foundation of China (20776063)

* Corresponding author. E-mail: jchen@jiangnan.edu.cn, zhangdongxu@jiangnan.edu.cn

Received: 26 May 2010/Revised: 11 July 2010

《微生物学报》综述文章投稿要求

2010年11月修订

为了避免篇幅庞大、罗列文献、内容空泛、缺乏观点,力求内容更加新颖、并更具可读性,本刊对综述类投稿提出以下几点要求。

1. 本刊主要刊登微型综述(mini review),来稿字数最好控制在5000字以内(不包括参考文献)。
2. 综述的选题要有新意,对读者及同行确有一定的启发作用和参考价值。
3. 参考文献应控制在40篇以内,近3年发表的文献不少于10篇。
4. 应结合文献扼要评述国内外学者在本领域的研究进展,不要泛泛罗列文献,只述不评。
5. 应结合自己的研究工作,就该研究领域存在的问题和解决的途径提出自己的观点。
6. 综述文章不同于研究报告,规定作者的数量应不多于3人。
7. 要求文章的第一作者提供一份不少于200字的研究经历的简介。
8. 欢迎投送“能够反映国际研究热点、对学科发展有指导意义”的述评类文章。