

青蒿植物内生链霉菌中的质粒 pCQ4 与噬菌体 ΦCQ4

成秋香, 钟莉, 覃重军*

中国科学院上海生命科学研究院植物生理生态研究所合成生物学重点实验室, 上海 200032

摘要: 【目的】在青蒿植物的内生链霉菌 W75 中检测到一个大的环型质粒 pCQ4。克隆、测序、分析和功能研究 pCQ4。【方法】Southern 杂交确定质粒的酶切图谱, 利用接合转移和同源重组方法将质粒克隆到了大肠杆菌 BAC 衍生的载体上, 并进行鸟枪测序和分析。【结果】获得了全长为 84833 bp 的 pCQ4 序列, 预测编码 129 个基因, 其中成簇的 40 个基因与其它噬菌体的基因同源。实验证明含有质粒 pCQ4 的菌株能够低频率释放噬菌体 ΦCQ4, 并可以侵染消除了 pCQ4 的 W75X 孢子和形成噬菌斑。在透射电镜下观察到噬菌体颗粒, 脉冲场凝胶电泳显示 ΦCQ4 为线型 DNA。pCQ4 与已发表的链霉菌质粒-噬菌体 pZL12 比对, 编码噬菌体的主要结构蛋白的基因是相似的。【结论】链霉菌大的质粒 pCQ4 也可以转化为噬菌体 ΦCQ4, 其噬菌体相关的基因簇可能是可转移的单元。

关键词: 链霉菌, 质粒, 噬菌体

中图分类号: Q933 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2012) 07-0825-07

链霉菌属于高 GC 含量的革兰氏阳性细菌, 可以进行菌丝分化和产生孢子。链霉菌的不同种产生了约 6000 种抗生素等次级代谢产物, 在医药、农业和畜牧业有重要的应用价值^[1]。链霉菌许多菌株中存在环/线型质粒, 已发表的环型质粒大多数比较小 (8-40 kb)。发现和研究链霉菌大的环型质粒, 有助于构建容纳大片段 DNA 插入的载体, 用于操作巨大的抗生素生物合成基因簇 (20-150 kb)^[2]。

我们实验室从近百种中草药植物中分离到近千株的内生放线菌 (大多数为链霉菌)^[3], 提取质粒 DNA, 检测到一些大的环型质粒。本文报道其中一个约 85 kb 的环型质粒 pCQ4 的克隆、测序以及复制功能的研究, 有趣的是该质粒上携带了一簇噬菌体的同源基因, 实验证明是有功能的。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒: 本实验所用的菌株与质粒见表 1。

1.1.2 主要试剂和仪器: 所用抗生素氨苄青霉素、阿泊拉霉素、硫链丝菌素均购于 Sigma 公司, 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、DNase I、RNase、DNA 分子量标准物购于 MBI 公司。随机引物标记试剂盒购自大连宝生物生物公司。放射性同位素 [α^{32} P] dCTP 购自北京市福瑞生物工程公司核酸研究室。DNA 回收试剂盒购自上海华舜生物技术有限公司。

基金项目: 国家“973 项目” (2011CBA00801); 国家自然科学基金 (31121001); 中国科学院知识创新工程项目 (KSCX2-EW-G-13)

* 通信作者。Tel: +86-21-54924171; Fax: +86-21-54924176; E-mail: qin@sibs.ac.cn

作者简介: 成秋香 (1981-), 女, 江苏苏州人, 博士研究生, 主要从事链霉菌分子遗传学研究。E-mail: qxcheng1981@msn.com

收稿日期: 2012-02-03; 修回日期: 2012-04-01

表 1 菌株和质粒
Table 1 Strains and plasmids

Strain and plasmid	Genotype or description	Sources
<i>Streptomyces</i> sp. W75	Harbors plasmid pCQ4	This work
W75X	Strain W75 cured of pCQ4	This work
<i>E. coli</i> DH5 α	F ⁻ ϕ 80d/ <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>deoR recA1 endA1 hsdR17</i> (rk-mk ⁺) <i>phoA supE44</i>	This lab
<i>E. coli</i> ET12567 (pUZ8002)	λ ⁻ <i>thi-1 gyrA96 relA1 dam dcm hsdM cmkA</i>	[4]
<i>S. lividans</i> ZX7	<i>pro-2 str-6 rec-46 Δdnd HAU3^S SLP2⁻ SLP3</i>	[5]
pSET152	<i>Streptomyces</i> phage Φ C31-derived integration vector, <i>apr</i> ^r	[6]
pQX17	A fragment containing <i>apr/oriT</i> of pIJ773 cloned in a fragment containing <i>rep/sopABC</i> of F plasmid (PCR)	This work
pQX18	A 9-kb <i>Bam</i> HI fragment of pCQ4 cloned in pQX17	This work
pQX19	pQX18 integrated in pCQ4 via a 9-kb <i>Bam</i> HI fragment of pCQ4	This work
pSP72	<i>amp^rcolEI-ori</i>	This lab
pQC156	<i>Thetr</i> and <i>melC</i> genes from pIJ702 cloned into an <i>E. coli</i> plasmid pSP72	[7]
pQX76	A 6-kb <i>Nco</i> I fragment of pCQ4 cloned in pQC156	This work

1.2 培养和基本的遗传操作

大肠杆菌培养、转化和质粒提取、Southern 杂交和磷屏显影等基本操作见文献 [8]。培养链霉菌用的 TSB、MS 和 YMB 培养基,质粒的提取、原生质体的制备及转化,DNB 双层平板法,脉冲场凝胶电泳等参考文献 [4]。16S rRNA 引物为 F(5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3') 和 R(5'-TCA GGC TAC CTT GTT ACG ACT T-3'),PCR 扩增条件为:95℃ 5 min;95℃ 30 s,55℃ 30 s,72℃ 2 min,35 个循环;72℃ 10 min。纯化的质粒 DNA 通过超声波将其打断,利用上海华舜生物技术有限公司胶回收试剂盒回收质粒碎片。探针标记使用大连宝生物生物公司的随机引物标记试剂盒。

1.3 菌株 W75 中质粒 pCQ4 的消除

将菌株 W75 接种于 3 mL 豚豆汤 (typtone soya broth, TSB) 液体摇瓶中,在 30℃ 培养 24 h。转接 100 μ L 培养物于 3 mL TSB (含 0.002% SDS) 中,30℃ 培养 24 h。转接 100 μ L 培养物于 3 mL TSB 中,37℃ 培养 48 h。将培养物按 10 倍进行梯度稀释,每个稀释度取 100 μ L 涂布 Mannitol Soya (MS) 平板,30℃ 培养 4d。挑取单菌落检测质粒 pCQ4,获得了消除质粒的菌株 W75X。

1.4 菌株 W75 中裂解噬菌体的富集

接种 10⁸ 个 W75 的孢子至 100 mL YMB 液体培养基中,30℃ 培养 48 h,8200 \times g 离心 15 min 收菌。用 0.45 μ m 滤膜过滤发酵液,在过滤液中加入 DNase I 和 RNase 至终浓度均为 1 μ g/mL,室温放置 30 min。加入 5.84 g NaCl,冰浴 1 h。于 4℃ 在 11000 \times g 离

心 10 min,在上清中加固体 PEG 至终浓度为 10%,冰浴 3 h。在 11000 \times g 离心 10 min 以回收沉淀的噬菌体,加入 800 μ L SM 缓冲液浸泡噬菌体 1 h。等体积氯仿抽提噬菌体悬浮液,温和振荡 30 s,于 4℃ 在 3000 \times g 离心 15 min,回收含噬菌体颗粒的亲水相。最后得到约 700 μ L 的含噬菌体颗粒的溶液。

1.5 双层平板法检测噬菌斑的形成

取 250 μ L 富集后的噬菌体溶液涂布于 DNB 平板。加入 2 mL 上层营养软琼脂 (含有 10⁸ 个 W75X 孢子),旋转培养皿,使上层营养软琼脂均匀覆盖整个底层培养基。静置 5-10 min,倒置培养皿,30℃ 培养,36 h 后在涂有噬菌体的培养皿上可见噬菌斑。

1.6 透射电镜观察噬菌体颗粒

将效价达 10⁹ PFU/mL 的噬菌体悬液用毛细管吸取,小心滴在覆有火棉胶膜的铜网上,吸附 10 min 后用滤纸吸干。加一滴的 2% PTA 溶液 (pH 7.0),1-2 min 后用滤纸吸除多余液体。在空气中干燥后,样品在透射电子显微镜 H-7650 (Hitachi) 下观察。

1.7 DNA 序列的测定和分析

将含有全长 pCQ4 序列的质粒 pQX19 进行鸟枪克隆,并利用基因组测序 FLX 454 系统 (Roche) 在中国人类基因组南方中心 (上海) 完成测序,以及缺口的填补。链霉菌 DNA 开放阅读框分析软件为 Frameplot 4.0 beta (<http://nocardia.nih.gov/fp4/>) [9]。DNA 二级结构的预测采用软件 "DNA mfold" (<http://frontend.bioinfo.rpi.edu/>

applications/mfold/cgi-bin/dna-form1. cgi)^[10]。pCQ4 全序列已经提交 GenBank 数据库, 编号是 JQ340175。

2 结果和分析

2.1 青蒿植物内生链霉菌 W75 中的质粒 pCQ4 的检测和 Southern 杂交

本实验室从近百种中草药植物中分离到近千株的内生放线菌^[3], 其中从中国科学院上海有机化学研究所园区种植的青蒿植株中分离得到内生放线菌 W75, 经 16S rDNA 测序和比对, 与链霉菌属有 99% 的相似性, 因此, W75 属于链霉菌。抽提质粒 DNA, 进行凝胶电泳, 检测到一个大的环型质粒 pCQ4 (图 1)。与已知大小的质粒电泳比较, pCQ4 位于 cosmidN6-68 (50 kb) 和质粒 pFP2 (90 kb) 之间。

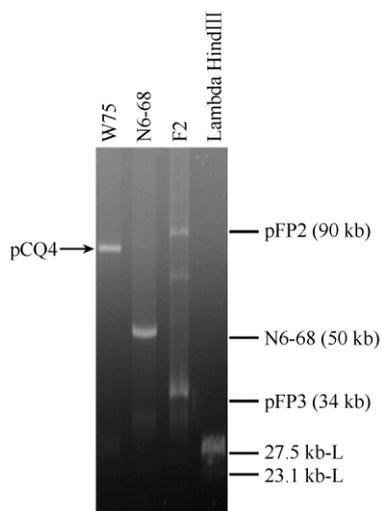


图 1 电泳检测 W75 中的环型质粒 pCQ4

Fig. 1 Detection of circular plasmid pCQ4 from strain W75. Plasmids DNA was electrophoresed in an 0.6% agarose gel at 25 V for 24 h.

进一步利用酶切和 Southern 杂交的方法确定 pCQ4 的大小和初步的酶切图谱。将 W75 总 DNA 用不同的限制性内切酶酶切后, 与从凝胶电泳上回收并用³²PdCTP 标记的 pCQ4 探针进行杂交。图 2 显示, pCQ4 上 *Xba*I 为单酶切位点, 而没有 *Eco*RV

的酶切位点。 *Bgl*III 和 *Cla*I 片段总计大小均约为 85 kb。

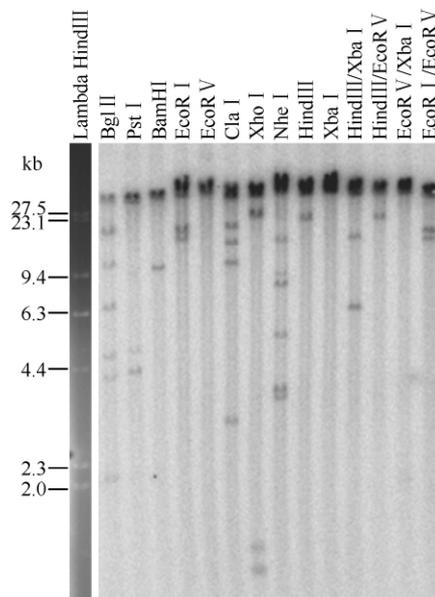


图 2 利用 pCQ4 探针针对酶切的 W75 总 DNA 进行 Southern 杂交

Fig. 2 Southern hybridization of the enzymes-digested genomic DNA of strain W75 with³²PdCTP-labelled probe pCQ4. The digested DNA was electrophoresed in an 0.7% agarose gel at 25 V for 18 h.

2.2 利用接合转移和同源重组将 pCQ4 克隆到大肠杆菌 BAC 质粒

由于在链霉菌中大量提取大的、低拷贝数的质粒 DNA 是困难的, 因此, 拟将 pCQ4 克隆到大肠杆菌人工染色体 BAC 上。图 3 描述了克隆 pCQ4 的原理。

用 *Bam*HI 酶切质粒 pCQ4, 回收约 9 kb 的 DNA 片段 (参见图 2), 克隆到大肠杆菌 BAC 衍生的载体 pQX17 上, 获得 pQX18。将 pQX18 转入大肠杆菌 ET12567 (pUZ8002) 中, 与含有 pCQ4 的链霉菌 W75 进行接合转移。由于有同源片段, pQX18 可以整合到 pCQ4 上, 表现为 *apr*^R。从抗性接合子中提取质粒 DNA, 转化大肠杆菌, 就得到了 pCQ4-pQX18 共整合的质粒 pQX19。

2.3 pCQ4 的测序、分析和复制基因的验证

将得到的大肠杆菌质粒 pQX19 进行测序, 除去载体 pQX17 的部分, 得到 84833 bp 的 pCQ4 序列。pCQ4 基因组的 GC 含量为 69.2%, 预测有 129 个基

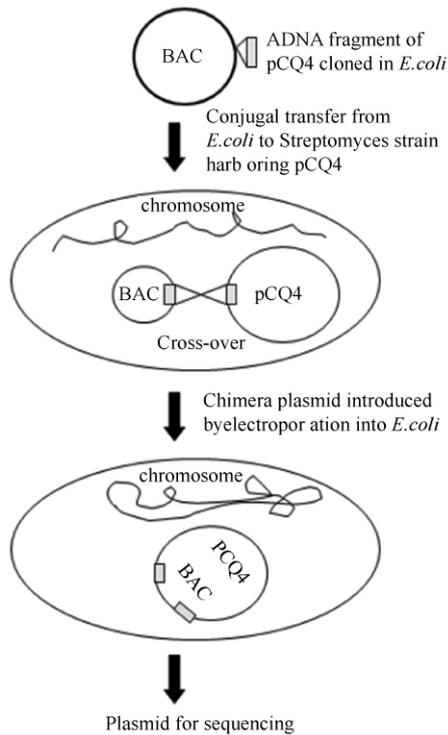


图3 接合转移和同源重组构建 pCQ4-BAC 共整合的质粒

Fig. 3 Schematic of cloning pCQ4 in BAC via conjugation between *Streptomyces* and *E. coli* and homologous recombination.

因,其中 40 个与已知功能的基因同源,89 个为未知功能的基因。如图 4 所示,令人感兴趣的是,从 pCQ4. 56 到 pCQ4. 95 共包括 40 个基因,这一簇基因大多与细菌的噬菌体基因同源,如 pCQ4. 74 预测编码噬菌体尾丝 (tail) 蛋白, pCQ4. 61 编码噬菌体鞘 (capsid) 蛋白, pCQ4. 58 编码噬菌体门 (portal) 蛋白, pCQ4. 95 编码噬菌体整合酶 (Int)。pCQ4. 51 与链霉菌主要接合转移基因 *traB* 同源,暗示具有典型的链霉菌接合转移系统。pCQ4. 113 和 pCQ4. 112 分别与细菌质粒中负责分配的保守的 *parA* 和 *parB* 基因同源。

pCQ4. 37c 与嗜盐菌拟诺卡氏菌的质粒 pSQ10 的复制基因 *rep* 同源, pCQ4. 57 与分支杆菌的复制型 DNA 解旋酶相似,暗示这些可能是质粒复制相关的基因。将包含 pCQ4. 37c 的 DNA 片段 (16683 - 22746 bp) 克隆到大肠杆菌载体 pQC156 上,得到 pQX76。将 pQX76 转化变铅青链霉菌 ZX7 原生质

体,得到约 10^3 个硫链丝菌素抗性转化子,证实该片段包含了质粒 pCQ4 的复制区。而克隆包含 pCQ4. 57 基因 (29478 - 32460 bp) 的片段在 ZX7 中未获得抗性转化子。

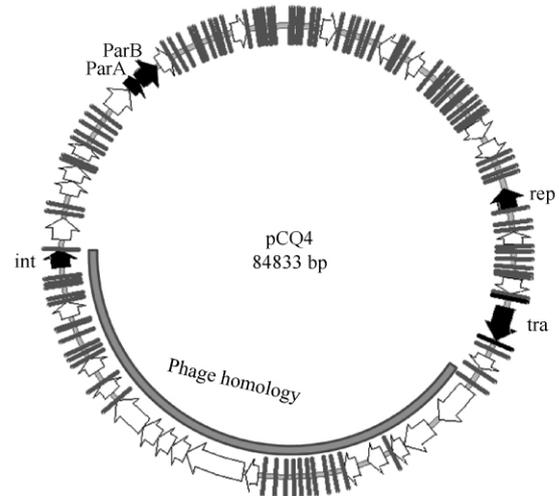


图4 pCQ4 上重要的功能基因

Fig. 4 Diagram of pCQ4. Related genes are filled in arroheads and phage homologous segment are indicated.

2.4 质粒 pCQ4 可以转化成为裂解噬菌体 Φ CQ4

为了验证 pCQ4 上成簇的与噬菌体同源的基因是否具有功能,将菌株 W75 进行液体发酵后,过滤、PEG 沉淀和氯仿抽提。用浓缩抽提液侵染消除内源质粒 pCQ4 后的内生菌 W75 (命名为 W75X)。发现这些噬菌体能够侵染 W75X,在平板上形成了明显的噬菌斑 (图 5)。

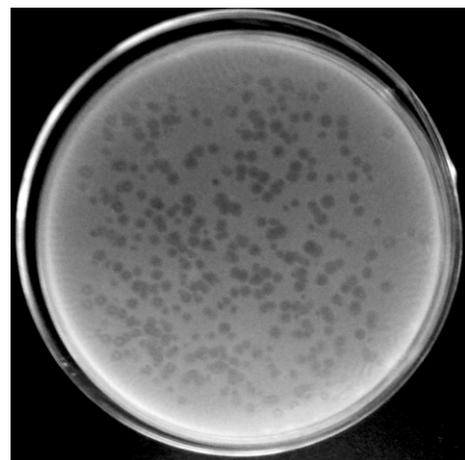


图5 Φ CQ4 侵染 W75X 孢子形成噬菌斑

Fig. 5 Formation of plaques. Lytic Φ CQ4 virions in a DNB plate were overlaid with soft nutrient agar containing W75X spores.

2.5 电镜观察 Φ CQ4 噬菌体颗粒

大量富集噬菌体颗粒, 在透射电镜下能够清楚地看到蝌蚪状的噬菌体 (命名为 Φ CQ4)。它头部为直径约 50 nm 的多面体, 并拖有一条约为 200 nm 长的尾巴。可以看到尾部基板和尾丝, 最长的尾丝有约 40 nm (图 6)。

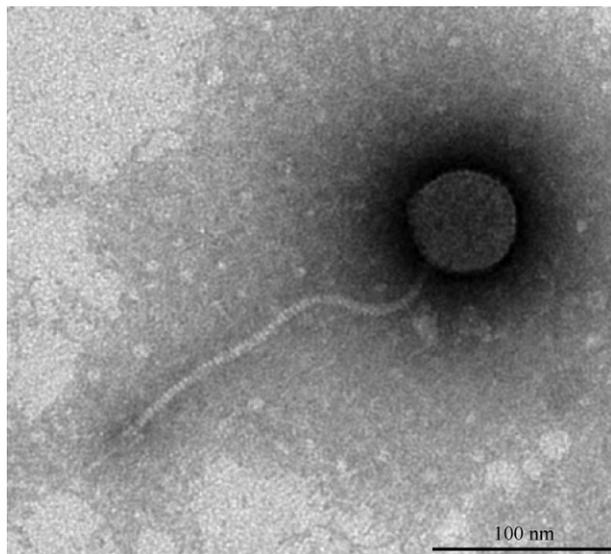


图 6 噬菌体 Φ CQ4 的扫描电镜图

Fig. 6 A phage particle viewed by transmission electron microscopy. Bar, 100 nm.

2.6 脉冲场凝胶电泳检测 Φ CQ4 噬菌体的线型 DNA

在脉冲场凝胶电泳中, 线型结构的 DNA 电泳可以进入凝胶, 而大的环型结构的 DNA 则不能。将 W75 菌株和 Φ CQ4 噬菌体分别包埋在低熔点琼脂糖凝胶中, 图 7 的脉冲场凝胶电泳显示, W75 菌株中的环型质粒 pCQ4 的 DNA 不能电泳进入凝胶, 而 Φ CQ4 噬菌体则有清晰的 DNA 条带。利用质粒 pCQ4 中的 pCQ4.37c 和 pCQ4.57 设计引物, 以噬菌体 Φ CQ4 为模板进行 PCR 扩增, 结果在凝胶电泳上显示预期大小的 DNA 带。质粒 pCQ4 与噬菌体 Φ CQ4 的 DNA 分别用 *Nhe*I 和 *Eco*RI + *Xho*I 酶切, 凝胶电泳显示两者的酶切图谱一致。

2.7 Φ CQ4 噬菌体的宿主范围

噬菌体 Φ CQ4 溶液分别侵染 12 种链霉菌 (变铅青链霉菌 ZX7, 天蓝色链霉菌 M145, 除虫链霉菌

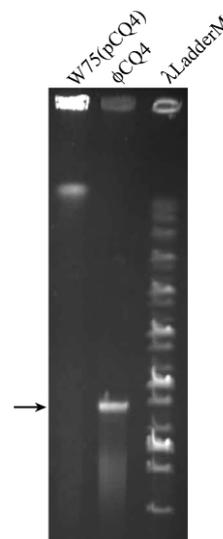


图 7 脉冲电泳检测线型结构的噬菌体 Φ CQ4 DNA

Fig. 7 Detection of W75 genomic and Φ CQ4 DNA by pulsed-field gel electrophoresis. Plug-embedded Φ CQ4 DNA and mycelium of W75 were electrophoresed in a 1.0% agarose gel at 120 V, 1 s to 25 s switch time and 14 °C for 23 h. Linear Φ CQ4 is indicated by arrowhead.

8165, 链霉菌 HK, 娄彻氏链霉菌, 委内瑞拉链霉菌, 灰色链霉菌, 淡青链霉菌, 紫红链霉菌 SANK95570, 高温链霉菌 2C, 植物内生链霉菌 9R-2ax 和链霉菌 F1x), 除了链霉菌 F1x, 其余菌株在平板上均没有检测到噬菌斑。

3 讨论

pZL12 是从白毛夏枯草植物的内生链霉菌 9R-2 中分离得到的 90435 bp 的环型质粒。该质粒上也有成簇的噬菌体同源的基因 (GenBank 编号 NC_013420.1)。前期的工作表明, 质粒 pZL12 可以低频率转化为 Φ ZL12 噬菌体, 当用噬菌体颗粒去侵染消除 pZL12 的宿主菌后, 通过平板影印来筛选溶源菌, 发现 Φ ZL12 噬菌体能够以很高的比例再次环化成质粒 pZL12, 从而完成质粒-噬菌体-质粒的循环周期^[1]。将 pCQ4 与 pZL12 进行比较, 图 8 显示, 这两个质粒在噬菌体基因区域有很好的同源性, 其中编码噬菌体结构的 3 个主要蛋白——鞘 (capsid)、门 (portal) 和尾丝 (tail) 蛋白的基因有很高的相似性。

而 pCQ4 与 pZL12 有功能的 DNA 复制基因是不同的。这些结果暗示质粒上噬菌体相关的功能基因簇可能是一个可以移动的单元,进一步理解其移动转移的机理是有意义的。此外,ΦZL12 和 ΦCQ4 上没

有与链霉菌噬菌体 ΦC31 上控制裂解和溶源的基因同源^[12],暗示存在新的调控质粒-噬菌体周期的调控系统。

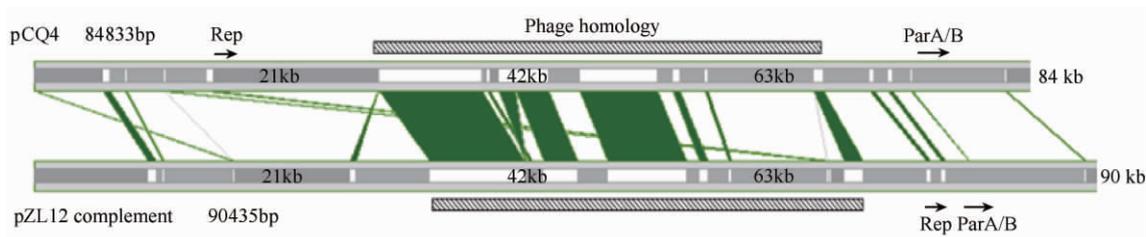


图 8 质粒 pCQ4 与 pZL12 的同源性比较

Fig. 8 Comparison of pCQ4 and pZL12 genomes. Homologous genes are indicated by green lines.

参考文献

- [1] Berdy J. Bioactive microbial metabolites – A personal view. *The Journal of Antibiotics*, 2005, 58: 1-26.
- [2] Hopwood DA, Kieser T. Conjugative plasmids of *Streptomyces* // Clewell DB. ed. *Bacterial Conjugation*. New York: Plenum Press, 1993: 293-311.
- [3] 田新莉, 钟莉, 成秋香, 陈振华, 周敏, 王韬, 范云, 杨勇, 郭鹏, 夏海洋, 覃重军. 从 87 种中草药植物中分离内生放线菌及其规律的初探. *中国抗生素杂志 (Chinese Journal of Antibiotics)*, 2010, 35 (9): 659-662.
- [4] Kieser T, Bibb MJ, Buttner MJ, Chater KF, Hopwood DA. *Practical Streptomyces Genetics*. Norwich: The John Innes Foundation Press, 2000.
- [5] Zhou X, Deng Z, Firmin JL, Hopwood DA, Kieser T. Site-specific degradation of *Streptomyces lividans* DNA during electrophoresis in buffers contaminated with ferrous iron. *Nucleic Acids Research*, 1988, 16 (10): 4341-4352.
- [6] Bierman M, Logan R, O'Brien K, Seno ET, Nagaraja Rao R, Schonher BE. Plasmid cloning vectors for the conjugal transfer of DNA from *Escherichia coli* to *Streptomyces* spp. *Gene*, 1992, 116 (1): 43-49.
- [7] Qin Z, Shen M, Cohen SN. Identification and characterization of a pSLA2 plasmid locus required for linear DNA replication and circular plasmid stable inheritance in *Streptomyces lividans*. *Journal of Bacteriology*, 2003, 185 (22): 6575-6582.
- [8] Sambrook J, Russell D. *Molecular Cloning: A laboratory manual*. 3rd eds. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [9] Ishikawa J, Hotta K, FramePlot: a new implementation of the frame analysis for predicting protein-coding regions in bacterial DNA with a high G + C content. *FEMS Microbiology Letters*, 1999, 174 (2): 251-253.
- [10] Zuker M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Research*, 2003, 31: 3406-3415.
- [11] Zhong L, Cheng Q, Tian X, Zhao L, Qin Z. Characterization of the replication, transfer and plasmid/lytic phage cycle of the *Streptomyces* plasmid-phage pZL12. *Journal of Bacteriology*, 2010, 192: 3747-3754.
- [12] Sinclair RB, Bibb MJ. The repressor gene (c) of the *Streptomyces* temperate phage phi C31: nucleotide sequence, analysis and functional cloning. *Molecular and General Genetics*, 1988, 213 (2): 269-277.

Plasmid pCQ4 and its phage Φ CQ4 of endophytic *Streptomyces* sp. from *Artemisia annua* L.

Qiuxiang Cheng, Li Zhong, Zhongjun Qin*

Key Laboratory of Synthetic Biology, Institute of Plant Physiology and Ecology, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032, China

Abstract: [Objective] Large plasmid pCQ4 was detected in *Streptomyces* sp. W75 from *Artemisia annua* L. We cloned, sequenced, analyzed and characterized pCQ4. [Methods] Southern hybridization was used to determine restriction map of pCQ4. To clone the full-length of pCQ4, conjugation and recombinational cloning in a BAC vector were used. [Results] The complete nucleotide sequence of pCQ4 consisted of 84833-bp, encoding 129 ORFs which 40 ORFs resembled these of bacterial phages. W75 culture could infect W75 cured of pCQ4 and formed plaques on plate. Phage particle (Φ CQ4) was observed by transmission electron microscopy. Linear Φ CQ4 DNA was detected on pulsed-field gel electrophoresis. Comparison to *Streptomyces* plasmid-phage pZL12, genes encoding major phage structural proteins resembled that of pCQ4. [Conclusion] *Streptomyces* plasmid pCQ4 could be transformed into lytic phage Φ CQ4, and the phage segment on pCQ4 might be a mobile unit.

Keywords: *Streptomyces*, plasmid, phage

(本文责编:王晋芳)

Supported by the Key Project of China National Programs for Fundamental Research and Development (2011CBA00801), by the National Natural Science Foundation of China (31121001) and by the Chinese Academy of Sciences Project (KSCX2-EW-G-43)

* Corresponding author. Tel: +86-21-54924171; Fax: +86-21-54924176; E-mail: qin@sibs.ac.cn

Received: 3 February 2012/Revised: 1 April 2012

《微生物学报》综述文章投稿最新要求

2011年12月,第3次修订

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,自2003年本刊对综述类投稿提出了具体的要求,先后又作了两次修订。

1. 篇幅: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. 新意: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. 述和评: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。
4. 结合作: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。
5. 参考文献:控制在40篇以内,近3年发表的文献不少于10篇。
6. 作者:(1)数量不多于3人;(2)提供一份背景材料,内容包括:第一作者科研简介、责任作者(即通讯作者)科研简介、本课题组对相关工作情况介绍(附已发文章)。

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。