

## 响应面法建立层析纯化去除百日咳丝状血凝素中内毒素工艺

高娜 梁疆莉 马艳 邓燕 姬秋彦 顾琴 李菁 胡文著 史荔 孙明波\*

(中国医学科学院北京协和医学院医学生物学研究所 云南 昆明 650118)

**摘要:**【背景】无细胞组分百日咳疫苗在人群中接种后不良反应发生率大大降低,是未来百日咳疫苗的发展方向,但是新的抗原纯化方式需要工艺中加入内毒素的去除。【目的】使用响应面法优化层析纯化法去除无细胞百日咳疫苗中百日咳丝状血凝素(Filamentous hemagglutinin, FHA)中内毒素的工艺。【方法】通过单因素试验,确定响应面设计范围;根据响应面法设计原理,使用 MiniTAB 软件,以 FHA 的回收率和收获的 FHA 蛋白浓度,同时兼内毒素合格为考察指标,对上样样品量、样品 pH、样品电导 Cond 进行优化,最终确定去除 FHA 内毒素的层析纯化工艺。【结果】使用目前的层析纯化条件获得的 Capto adhere 去除 FHA 的内毒素的最佳工艺条件: pH 5.3, Cond 9.6, Mass 3.0。【结论】用响应面法优化了去除百日咳丝状血凝素中内毒素的层析纯化工艺,这种方法效率高、耗时少,为后续生物制品工艺扩大再生产提供参考。

**关键词:** 百日咳丝状血凝素; 内毒素; 响应面法

## Establishing the chromatographic process of endotoxin removal from Pertussis filamentous hemagglutinin by response surface methodology

GAO Na LIANG Jiang-Li MA Yan DENG Yan JI Qiu-Yan GU Qin LI Jing  
HU Wen-Zhu SHI Li SUN Ming-Bo\*

(Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College,  
Kunming, Yunnan 650118, China)

**Abstract:** [Background] The future development of pertussis vaccine is acellular pertussis (component) vaccine, which could significantly reduce the incidence of adverse events after inoculation. This new type of vaccine needs to remove the endotoxin in the process of production. [Objective] In our study, the removal process of the endotoxin from pertussis filamentous hemagglutinin (FHA) was investigated by optimized chromatography purification with response surface methodology. [Methods] The process of chromatographic purification was verified by the single factor experiment, to ensure the range of response surface methodology; the method of response surface analysis was adopted according to the CCD experimental design principles by using MiniTAB

**Foundation items:** Significant Creation of New Drugs Foundation of China (2015ZX09101031); CAMS Initiative for Innovative Medicine (2016-I2M-1-019)

\*Corresponding author: E-mail: smb@imbcams.com.cn

Received: January 12, 2018; Accepted: April 04, 2018; Published online (www.cnki.net): April 11, 2018

基金项目: 国家科技重大专项重大新药创制(2015ZX09101031); 中国医学科学院医学与健康科技创新工程(2016-I2M-1-019)

\*通信作者: E-mail: smb@imbcams.com.cn

收稿日期: 2018-01-12; 接受日期: 2018-04-04; 网络首发日期(www.cnki.net): 2018-04-11

software: the variable factors were pH, Cond, and Mass; Response values were considered the concentration of FHA protein and recovery of FHA, and finally combined the value of endotoxin.

**[Results]** These results showed that the optimum conditions for chromatographic process of endotoxin removal from pertussis filamentous hemagglutinin were as follows: pH 5.3, Cond 9.6, and Mass 3.0.

**[Conclusion]** The optimum processes of chromatographic purification on endotoxin removal were screened successfully by response surface methodology. This method has advantages of higher efficient and lower energy consumption, which will lay a good foundation for the subsequent biological process of expanded reproduction.

**Keywords:** Pertussis filamentous hemagglutinin, Endotoxin removal, Response surface methodology

百日咳丝状血凝素(Pertussis filamentous hemagglutinin, FHA)是一种直径 2 nm, 长约 40–100 nm 丝状结构的百日咳毒力蛋白因子, 分子量 133 kD, 与百日咳杆菌的粘附与定居有关, 由百日咳 I 相菌株分泌的一种血凝素<sup>[1-2]</sup>, 是无细胞百日咳疫苗中的一种主要保护性抗原<sup>[3]</sup>。共纯化无细胞百日咳疫苗的生产是通过两段盐析和蔗糖密度梯度离心等工艺提取具有保护性免疫作用的抗原成分, 如百日咳毒素(Pertussis toxin, PT)、FHA、百日咳粘着素(Pertactin, PRN)、凝集原(Agglutininogen 2, Agg2)和 Agg3 等, 去掉一些引起副反应的毒性物质, 如不耐热毒素(Heat labile toxin, HLT)、气管细胞毒素(Tracheal cytotoxin, TCT)和腺苷酸环化酶毒素(Adenyl cyclase toxin, ACT)等。但是共纯化技术因为抗原间比例不稳定, 不易于质量控制。而无细胞组分百日咳疫苗, 使用层析纯化方法分别将百日咳保护性抗原组分分离纯化后, 按配方定量加入抗原组分, 混合后制备疫苗<sup>[4-6]</sup>。百日咳杆菌是革兰氏阴性菌, 在生产中产生的内毒素含量极高, 组分疫苗的抗原纯化需要考虑内毒素的去除问题。有厂家使用比较经典的非离子表面活性剂(如 Triton 等)来去除内毒素<sup>[7]</sup>, 实际使用时我们发现该方法虽然简易, 只需在纯化过程中加入合适剂量的表面活性剂, 但是同时会使疫苗中增加与抗原无关的多余成分, 后期还需去除并严格控制残留。我们在无细胞组分百日咳疫苗抗原纯化中使用 Capto adhere 这种新型的复合型阴离子层析填料, 通过层析纯化去除内毒素。

响应面分析是试验设计(Design of experiment, DOE)的一种, 也是通过主动控制自变量来观察自变

量对应变量(响应值)的影响。与其它方法比较, 其优点是可以充分利用试验的时间与资源、发现最佳的因子组合、有效地说明交互效应, 从而得到有意义的试验信息。此方法已在工程学、生态学和食品学等领域广泛应用<sup>[8-9]</sup>。在前期使用 Capto adhere 摸索去除 FHA 内毒素工艺时发现, FHA 的蛋白回收率高低不一, 变化不规律。因此, 本实验引入更为细致的响应面设计方法, 采用 MiniTAB 软件的中心复合表面设计模型进行响应面试验设计, 以期能用合理的试验设计寻到其变化规律, 优化纯化工艺。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

百日咳发酵上清由本课题组提供。调整 pH 值和电导后的样品上样于 Capto SP ImpRes 柱中, 平衡缓冲液冲洗未结合的样品后, 分别以含 0.11、0.15 和 0.35 mol/L NaCl 的洗脱液进行洗脱, 收集需要的 FHA 组分用于离子交换层析柱 Capto adhere<sup>[10]</sup>。

### 1.2 主要试剂和仪器

Capto adhere、其他分离层析介质及层析柱购自美国 GE 公司; 其他试剂均为国产分析纯; 细菌内毒素标准品及鲎试剂购自湛江安度斯生物有限公司。蛋白纯化仪, 美国 GE 公司。

### 1.3 使用 Capto adhere 离子交换层析法去除内毒素

调整收集的 FHA 的电导和 pH, 上样于 Capto adhere 柱(XK-16, 柱高 18 cm), 实验流程: 平衡 6 CV—上样—收集—洗脱—柱再生。收集均为从起

峰大于 5 mAU 开始收集, 15 mAU 停止收集。检测样品内毒素含量、蛋白含量, 计算收获 FHA 抗原蛋白的回收率。内毒素含量的检测和蛋白含量测定分别按照《中国药典》三部(2015 版)通则 1143 细菌内毒素检查法, 凝胶半定量试验法; 通则 0731 蛋白质含量测定法第二法福林酚法(Lowry 法)。

#### 1.4 单因素试验

通过单因素试验来确定自变量及确定响应面设计中的自变量范围, 试验首先比较每毫升层析介质处理蛋白能力差别(后续均称此变量为上样量), 其次比较电导差异, 最后比较 pH 差异。

#### 1.5 响应面试验设计及响应量计算

采用 MiniTAB 软件及中心复合表面设计模型(Central composite design, CCD)<sup>[11]</sup>进行响应面试验设计。以样品 pH、样品电导、样品上样量为自变量, 以内毒素检测合格的 FHA 蛋白收率为响应量, 共设计试验 17 组, 其中有 3 组为中心重复点。

#### 1.6 模型的建立及评估

采用 MiniTAB 软件对 17 组实验的原始数据进行建模, 获得回归方程。对于已建立的模型, 通过原始数据图、残差分布图、预测对比图进行评估。

#### 1.7 响应优化器优化

根据已建立的回归方程, 使用软件的响应优化器功能确认优化响应值的最佳变量组合, 并根据优化结果进行 3 次验证试验, 考察是否达到优化目标。

## 2 结果与分析

### 2.1 单因素试验结果

#### 2.1.1 上样量比较

分别对应上样量为每 mL 层析介质处理蛋白量 8.0、4.0、2.0 mg, 上样总蛋白量分别为 298.0、142.0、82.0 mg, pH 为 6.0, 电导为 10 ms/cm。如表 1 所示, 8.0 mg 组与 4.0 mg 组及 8.0 mg 组与 2.0 mg 组有极显著性差异, 4.0 mg 组与 2.0 mg 组有显著性差异, 虽然 *P* 值 0.047 接近 0.05, 但是我们仍计划在后续响应面设计时将其作为一个因子来考虑。并且考虑胶的最大使用率, 在以后的工艺中最大使用 4.0 mg 组。

#### 2.1.2 电导比较

比较电导为 10 ms/cm 和 6 ms/cm、上样量为 4.0 mg 蛋白/mL 介质、pH 6.0 的收率结果显示, 电导提高后, 回收率明显提高。从表 2 方差分析结果看, 2 个组有显著性差异。在后续响应面设计时将其作为一个因子来考虑, 并且考虑电导的正相关作用, 提高电导至 20 ms/cm。

#### 2.1.3 pH 比较

比较 pH 5.5 与 pH 6.5 时、上样量为 4.0 mg 蛋白/mL 层析介质、电导 10 ms/cm 的收率结果显示, pH 提高后, 回收率降低明显。从表 3 方差分析结果看, 2 个组有极显著性差异。在后续响应面设计时将其作为一个因子来考虑。并且考虑 pH 的负相关作用及 pH 6.5 时低于 20% 的回收率, 调整响应面 pH 范围为 5.3–6.3。

表 1 不同上样量对收率影响的方差分析结果

Table 1 Variance analysis of different mass on FHA yield

组别 Group	差异源 Source of variance	Sum of squares	df	Mean square	<i>P</i> value
8.0 mg & 4.0 mg	组间 Inter-group	0.212 816 667	1	0.212 817	0.000 316
	组内 Intra-group	0.006 333 333	4	0.001 583	
	总计 Total	0.219 150 000	5		
8.0 mg & 2.0 mg	组间 Inter-group	0.277 350 000	1	0.277 350	0.000 166
	组内 Intra-group	0.005 933 333	4	0.001 483	
	总计 Total	0.283 283 333	5		
4.0 mg & 2.0 mg	组间 Inter-group	0.004 266 667	1	0.004 267	0.047 421
	组内 Intra-group	0.002 133 333	4	0.000 533	
	总计 Total	0.006 400 000	5		

表 2 不同电导(6、10 ms/cm)对收率影响的方差分析结果  
Table 2 Variance analysis of different cond (6, 10 ms/cm) on FHA yield

差异源	Sum of squares	df	Mean square	P value
Source of variance				
组间 Inter-group	0.088 817	1	0.088 817	0.042 336
组内 Intra-group	0.041 067	4	0.010 267	
总计 Total	0.129 883	5		

表 3 不同 pH (5.5、6.5)对收率影响的方差分析结果  
Table 3 Variance analysis of different pH (5.5, 6.5) on FHA yield

差异源	Sum of squares	df	Mean square	P value
Source of variance				
组间 Inter-group	0.299 267	1	0.299 267	0.000 944
组内 Intra-group	0.015 667	4	0.003 917	
总计 Total	0.314 933	5		

2.2 响应面数据及模型分析

根据中心复合设计原理设计的响应面试验方案及响应值结果见表 4, 自变量为 pH、电导 Cond、上样量 Mass, 响应值为 FHA 的回收率、收获时的

蛋白浓度、内毒蛋白比值。

2.2.1 原始数据分析

以运行序为 X 轴, 分别以各响应变量值为 Y 轴做散点图, 如图 1 所示, 观察数据运行的趋势情况, 趋势比较正常, 没有明显的连续上升或下降的趋势, 说明实验过程正常, 数据可用。

2.2.2 收获浓度的模型拟合

现在建立收获浓度的模型是因为后期的置换缓冲液工艺对收获浓度有要求。对收获浓度的回归拟合中, 总效果 P 值为  $0.00<0.05$ , 表明本模型总的来说是有效的; 失拟项 P 值为  $0.521>0.05$ , 说明模型无失拟现象。平方项和交互作用项对于本响应值而言不明显。但是简化模型时发现, 虽然平方项和交互作用项, 包括上样量对响应值不明显, 但是没有上样量的模型和只做线性模型的 R-Sq 值、R-Sq (调整)值却不是最好的(表 5), 因此基于简化模型做残差诊断。残差诊断图见图 2。因此选定模型为  $Y=11.954\ 6-4.120\ 03\times\text{pH}+0.196\ 035\times\text{Cond}+$

表 4 响应面设计方案及结果  
Table 4 Protocol of RSM design and result

标准序	运行序	区组	pH	电导	上样量	回收率	收获浓度	内毒蛋白比值	Qualified ratio:
Standard order	Run order	Block		Cond (ms/cm)	Mass (mg)	Recovery (%)	Concentration (mg/mL)	endotoxin value to protein concentration (Eu/mg)	
2	1	1	6.3	6	2.0	33.80	0.29		17.2
7	2	1	5.3	20	4.0	78.20	1.41		6 383
8	3	1	6.3	20	4.0	70.40	0.92		2 910
17	4	1	5.8	13	3.0	72.10	0.95		31.6
14	5	1	5.8	13	4.0	78.30	1.03		19.4
5	6	1	5.3	6	4.0	85.80	0.58		14.1
13	7	1	5.8	13	2.0	53.70	0.66		3.8
15	8	1	5.8	13	3.0	68.30	0.76		39.5
12	9	1	5.8	20	3.0	82.80	1.10		409.1
9	10	1	5.3	13	3.0	88.00	1.15		173.9
1	11	1	5.3	6	2.0	67.10	0.52		4.8
3	12	1	5.3	20	2.0	94.00	1.31		1 374
16	13	1	5.8	13	3.0	66.80	0.88		22.7
6	14	1	6.3	6	4.0	51.30	0.38		26.3
4	15	1	6.3	20	2.0	84.70	1.03		582.5
11	16	1	5.8	6	3.0	65.30	0.39		18.4
10	17	1	6.3	13	3.0	67.00	0.79		31.6

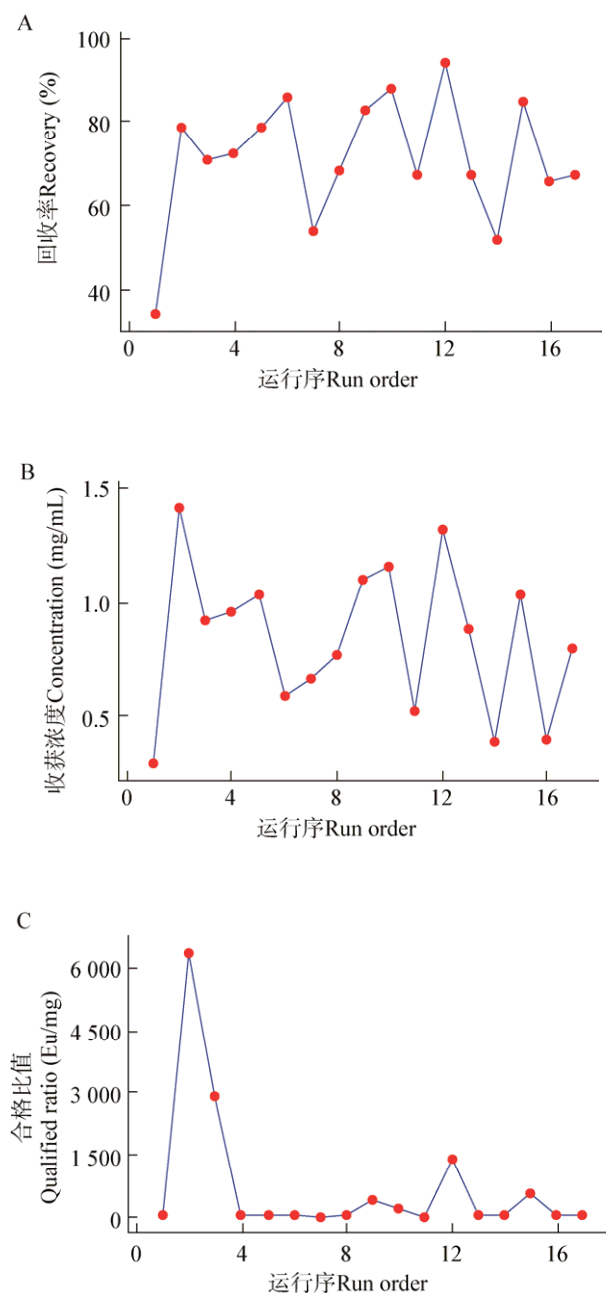


图1 回收率、收获浓度和合格比值与运行序的散点图  
Figure 1 Scatterplot of recovery, concentration and the qualified ratio with run order

0.051 000×Mass+0.341 887×pH×pH-0.002 847 52×Cond×Cond-0.012 142 9×pH×Cond。基于 Mass 的影响不显著,因此只做了 pH 和 Cond 这一对因子对收获浓度的影响图,图 3 和图 4 为对应的等值线

表 5 收获浓度的全模型、简化模型和线性模型效果比较表

Table 5 Effect comparison of full model, simplified model and linear model

模型 Model	R-Sq (%)	R-Sq (aj) (%)	失拟项 P 值 P value of lack of fit
全模型 Full model	95.81	90.43	0.521
简化模型 Simplified model	95.26	92.42	0.640
线性模型 Linear model	90.97	88.88	0.500

图和曲面图。

### 2.2.3 回收率的模型拟合

目的蛋白的回收率是蛋白层析纯化工艺建立的重要指标。对回收率的回归拟合经合理简化,总效果  $P$  值为  $0.000 < 0.05$ , 模型有效; 失拟项  $P$  值  $= 0.179 > 0.05$ , 说明模型无失拟现象。简化模型的 R-Sq 值、R-Sq (调整)值分别为 92.55%、86.76%。简化模型的残差诊断见图 5。因此选定模型为  $Y = 9.416 \ 98 - 2.999 \ 63 \times \text{pH} - 0.054 \ 246 \ 4 \times \text{Cond} + 0.544 \ 554 \times \text{Mass} + 0.220 \ 038 \times \text{pH} \times \text{pH} - 0.059 \ 990 \ 6 \times \text{Mass} \times \text{Mass} + 0.018 \ 107 \ 1 \times \text{pH} \times \text{Cond} - 0.011 \ 839 \ 3 \times \text{Cond} \times \text{Mass}$ 。图 6 和图 7 为各对因子生成的等值线图和曲面图。

### 2.3 验证试验

利用响应优化器对收获浓度模型、回收率模型以及内毒素合格比值共同进行优化,得出回收率的最优条件为 pH 5.3, Cond 9.6, Mass 3.0。在此条件下,进行了 3 次验证试验,实验结果见表 6。

## 3 讨论与结论

本试验依据离子层析纯化特征<sup>[12]</sup>, 首先用单因子试验确认自变量及自变量范围, 因子数小于 3 后, 直接进行响应面设计。完成试验后, 对收获蛋白浓度和目的蛋白总回收率建立模型, 使用

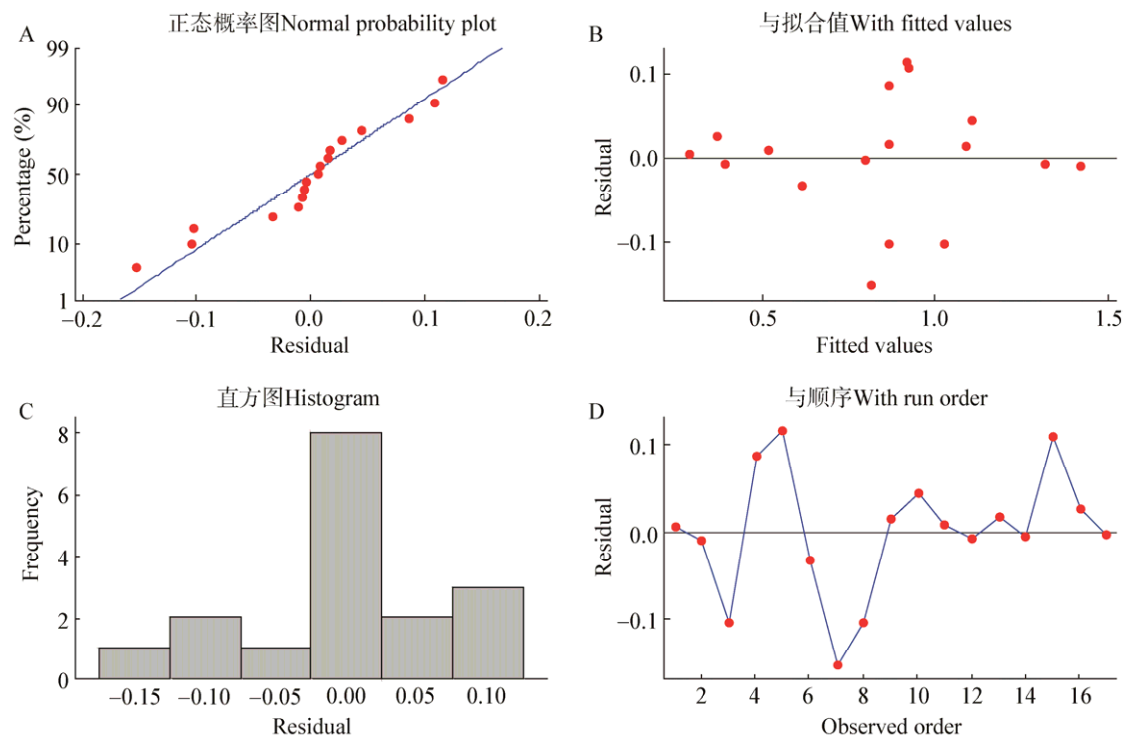


图2 收获浓度模型的残差诊断图

Figure 2 Residual plots of concentration

响应优化器时加入内毒素与蛋白合格比值, 最后利用响应优化器找到了所研究因子水平范围内的最佳点。试验中涉及了3个因素 pH、电导和上样量, 每个因素有3个变量。若用常规的正交设计, 需要至少27次试验才能完成, 而本实验设计执行17次试验即获得结果, 并且依据软件丰富的图形技术,

可以直观的辨别出优化区域, 从而也增加了试验的准确性和可靠性。通过响应面设计, 我们优化了层析纯化 FHA 去除内毒素的工艺, 主要工艺参数为 pH 5.3, Cond 9.6, Mass 3.0, 建立的纯化工艺内毒素含量为小于 100 Eu/mg, 而 FHA 回收率大于 70%。同时, 通过3批次纯化, 实际回收率与理论回收率的相对误差小于 10%, 生产工艺较为稳定。

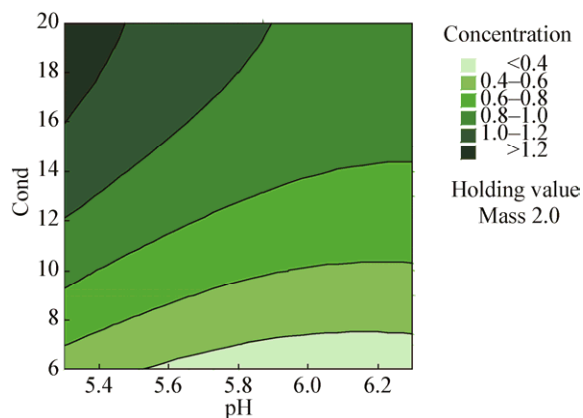


图3 收获浓度的等值线图

Figure 3 Contour plot of concentration

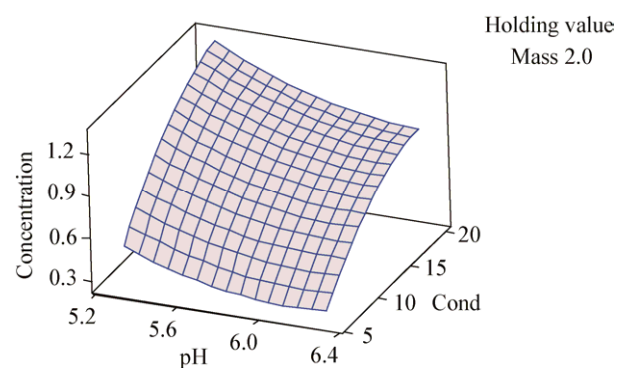


图4 收获浓度的曲面图

Figure 4 Surface plot of concentration

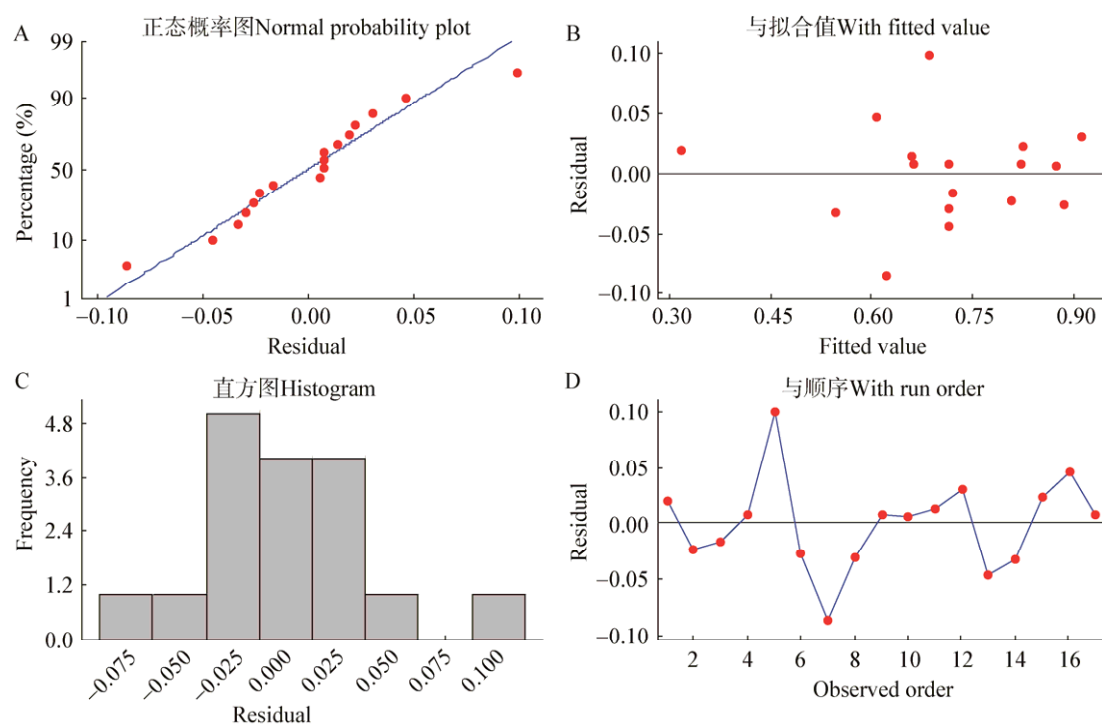


图 5 回收率模型的残差诊断图

Figure 5 Residual plots of Recovery model

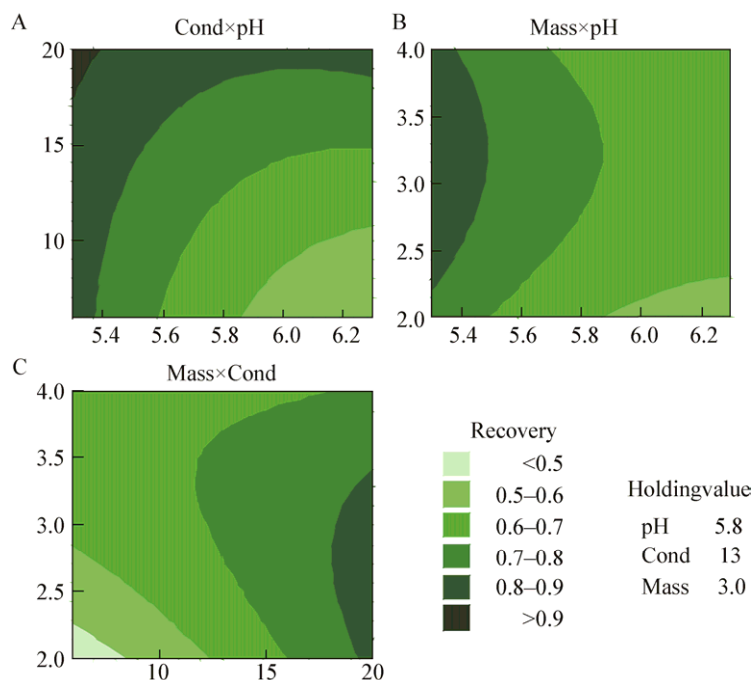


图 6 回收率的等值线图

Figure 6 Contour plot of recovery model of all factors

Note: A: Contour plot of Cond and pH; B: Contour plot of Mass and pH; C: Contour plot of Mass and Cond.

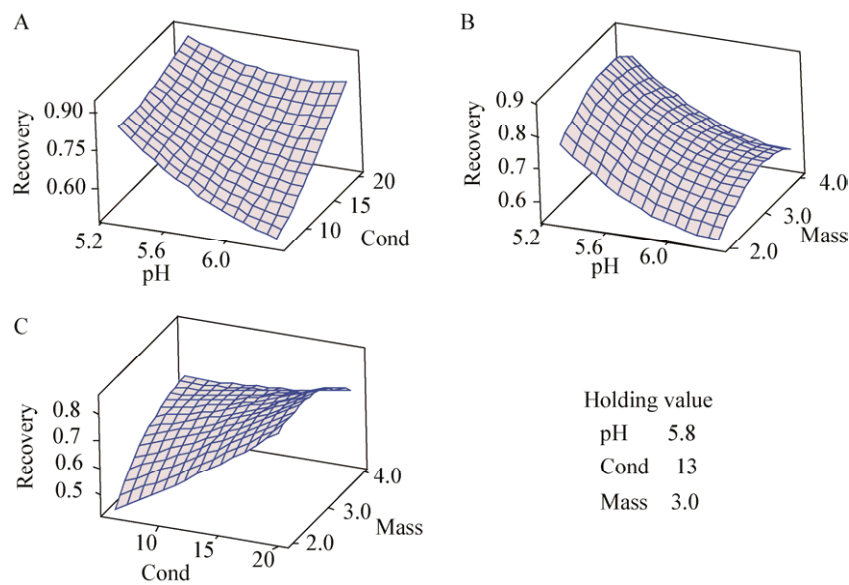


图 7 回收率的曲面图  
**Figure 7 Surface plot of recovery model of all factors**  
Note: A: Surface plot of Cond and pH; B: Surface plot of Mass and pH; C: Surface plot of Mass and Cond.

表 6 3 批验证实验结果  
**Table 6 Result of 3 batches of verification test**

批次 Lot	蛋白浓度 Concentration of protein (mg/mL)	蛋白回收率 Recovery of protein (%)	理论回收率 Recovery of model (%)	相对误差 Relative error (%)	内毒蛋白比值 Ratio of endotoxin with total protein (Eu/mg)
1	0.65	79	85.3	7.3	<100
2	0.73	82		3.8	<100
3	0.79	78		8.5	<100

我们尝试使用响应面设计优化 FHA 的内毒素清除工艺, 得到了比较合乎预期的结果。层析纯化的过程还包括洗脱液使用、平衡液使用等, 这些条件的改变同样会增加层析纯化中的某一项结果。一个产品质量的提高应该从全方面入手, 解决各种条件可能存在的互相影响和交叉问题<sup>[13]</sup>, 如样品上样后的洗脱条件的影响等。因此我们将使用科学的试验方法优化和完善工艺<sup>[14]</sup>。

另外, 本研究使用的响应面设计也为组分疫苗研发及其他生物制品工艺研究提供了一种规范、系统的质量改进方法。生物制品工艺的研究需要正确的设计实验计划和正确的实验数据分析方法, 使得改变过程的输入因素与输出响应的变化更加直观, 从而达到最优化过程的目的, 可应

用于生物制品生产工艺的开发及生产工艺的优化提高。

REFERENCES

[1] Arai H, Sato Y. Separation and characterization of two distinct hemagglutinins contained in purified leukocytosis-promoting factor from *Bordetella pertussis*[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*, 1976, 444(3): 765-782

[2] Sato Y, Kimura M, Fukumi H. Development of a pertussis component vaccine in Japan[J]. *The Lancet*, 1984, 323(8369): 122-126

[3] Zhang SM, Xu YH. Present situation and prospect of pertussis vaccine in China[J]. *China Pharmaceutical*, 2005, 19(11): 685-688 (in Chinese)  
张庶民, 徐颖华. 我国百日咳疫苗现状及展望[J]. *中国药事*, 2005, 19(11): 685-688

[4] Melvin JA, Scheller EV, Miller JF, et al. *Bordetella pertussis* pathogenesis: current and future challenges[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2014, 12(4): 274-288



- [5] Guiso N. *Bordetella pertussis*: why is it still circulating[J]. Journal of Infection, 2014, 68(S1): S119-S124
- [6] Hewlett EL, Burns DL, Cotter PA, et al. Pertussis pathogenesis—what we know and what we don't know[J]. The Journal of Infectious Diseases, 2014, 209(7): 982-985
- [7] Tang H, Zhang FW, Liu XF, et al. Development and validation of a method for determination of residual Triton X-100 content in purified acellular pertussis antigen[J]. Chinese Journal of Biologicals, 2016, 29(1): 89-92,97 (in Chinese)  
唐浩, 张飞伟, 刘晓凤, 等. 无细胞百日咳纯化抗原中 Triton X-100 残留量检测方法的建立及验证[J]. 中国生物制品学杂志, 2016, 29(1): 89-92,97
- [8] Zhang YC, Zhao JD, Cao ZG. The importance of statistical process control in drug production quality management[J]. China Pharmaceuticals, 2010, 19(8): 5 (in Chinese)  
张贻昌, 赵建东, 曹正国. 统计过程控制在药品生产质量管理中的重要性[J]. 中国药业, 2010, 19(8): 5
- [9] Healthcare GE. Design of experiments in protein production and purification[K]. Data File 29-1038-50AA
- [10] Tian Y, Shi QM, Sui LL, et al. Purification of pertussis toxin, filamentous haemagglutinin and pertactin[J]. Chinese Journal of Biologicals, 2013, 26(8): 1186-1189 (in Chinese)  
田阳, 史秋明, 隋礼丽, 等. 百日咳毒素、丝状血凝素和黏附素的纯化[J]. 中国生物制品学杂志, 2013, 26(8): 1186-1189
- [11] Min YN. Application Guide of Design of Experiments (DOE)[M]. Beijing: China Machine Press, 2011 (in Chinese)  
闵亚能. 实验设计(DOE)应用指南[M]. 北京: 机械工业出版社, 2011
- [12] GE Healthcare. Data File 28-9078-88: Capto™ adhere[Z]. 2012
- [13] Chen Q, Zhuo YL, Xu AN, et al. Improved protein-A chromatography for monoclonal antibody purification[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2016, 32(6): 807-818 (in Chinese)  
陈泉, 卓燕玲, 许爱娜, 等. 蛋白 A 亲和层析法纯化单克隆抗体工艺的优化[J]. 生物工程学报, 2016, 32(6): 807-818
- [14] Serdakowski London A, Kerins B, Tschantz WR, et al. Endotoxin removal and prevention for pre-clinical biologics production[J]. Biotechnology Journal, 2012, 7(12): 1509-1516

## 稿件书写规范

### 专论与综述论文的撰写要点

专论与综述是本刊重要栏目之一, 主要反映国内外微生物学及相关领域学科研究最新成果和进展, 其内容要求新颖丰富, 观点明确, 论述恰当, 应包含作者自己的工作内容和见解。因此, 作者在动笔之前必须明确选题, 一般原则上应选择在理论和实践中具有重要意义的学科专题进行论述。围绕专题所涉及的各个方面, 在综合分析和评价已有资料基础上提出其演变规律和趋势, 即掌握其内在的精髓, 深入到专题研究的本质, 论述其发展前景。作者通过回顾、观察和展望, 提出合乎逻辑并具有启迪性的看法和建议。另外, 作者也可以采用以汇集文献资料为主的写作方法, 辅以注释, 客观而有少量评述, 使读者对该专题的过去、现在和将来有一个全面、足够的认识。

需要特别说明的是: (1) 本刊要求作者投稿时在正文前写上主要作者专业和研究背景的简介, 并指出自己的工作(已发表的文章)在综述中的体现, 同时请在稿件中用不同颜色标出来。(2) 在专论与综述中引用的文献应该主要是近 5 年国内外正式发表的研究论文, 引用文献数量不限。