

学校编码: 10384

分类号__密级__

学号: 21620131152581

UDC_

廈門大學

碩 士 学 位 论 文

对虾白斑综合症病毒感染相关分子的筛选

Screening of signal transducing molecules involved in the
infection of White spot syndrome virus

郭广然

指导教师姓名: 徐洵 教授

专 业 名 称: 生物化学与分子生物学

论文提交日期:

论文答辩时间:

学位授予日期:

答辩委员会主席: __

评阅人: __

2016 年 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

目录

摘要.....	1
Abstract.....	VIII
1 前言	1
1.1 对虾免疫研究现状	1
1.1.1 对虾免疫系统组成.....	1
1.1.2 对虾细胞免疫系统.....	1
1.1.3 对虾体液免疫系统.....	3
1.2 对虾信号通路的研究	5
1.2.1 JAK-STAT 信号通路.....	6
1.2.2 MAPKs 信号通路.....	6
1.2.3 NF- κ B 信号通路.....	7
1.2.4 Wnt 信号通路.....	7
1.3 白斑综合症病毒 (WSSV)	10
1.3.1 白斑综合症病毒研究进展.....	10
1.3.2 白斑综合症病毒的宿主和传播途径.....	10
1.3.3 白斑综合症的症状及病理特征.....	11
1.3.4 白斑综合症病毒显微结构及基因组信息.....	11
1.3.5 白斑综合症病毒极早期基因研究现状.....	12
1.4 克氏原螯虾造血干细胞的研究现状	13
1.4.1 螯虾造血干细胞的发现 (Hematopoietic stem cells).....	14
1.4.2 螯虾造血干细胞的分离.....	14
1.4.3 造血组织分化过程的调控.....	15
1.4.4 螯虾造血干细胞的应用.....	16
1.5 本论文研究的内容, 目的及意义	17
2 材料与方法	18
2.1 实验材料	18

2.1.1 克氏原螯虾	18
2.1.2 WSSV 病毒粒子	18
2.1.3 试剂	18
2.1.4 引物	18
2.2 实验方法	19
2.2.1 克氏原螯虾 WSSV 检测	19
2.2.2 克氏原螯虾人工感染 WSSV	19
2.2.3 WSSV 病毒粒子的提取	20
2.2.4 螯虾造血干细胞调节细胞信号转导分子的化合物半定量 PCR 筛选平台的建立	20
2.2.5 螯虾造血干细胞调节细胞信号转导分子的化合物定量 PCR 筛选平台的建立	23
2.2.6 对细胞信号转导分子具有调节功能的化合物的细胞毒性分析	25
3 结果与分析	26
3.1 螯虾造血组织的分离	26
3.2 螯虾造血干细胞的显微观察	27
3.3 WSSV 病毒粒子的提取及电镜观察	27
3.4 克氏原螯虾 WSSV 病毒检测结果	28
3.5 半定量 PCR 方法检测化合物样品处理后 WSSV 基因转录变化	29
3.6 定量 PCR 方法检测化合物样品处理后 WSSV 基因转录变化	30
3.6.1 调节细胞信号转导分子的化合物初次筛选结果	32
3.6.2 调节细胞信号转导分子的化合物重复筛选结果	54
3.6.3 调节细胞信号转导分子的化合物的细胞毒性实验	59
4 讨论	67
4.1 调节 Wnt 信号转导通路的化合物	67
4.2 调节组蛋白乙酰化/去乙酰化的化合物	68
4.3 调节刺猬信号转导通路 (SHH Signal Pathway) 的化合物	69
4.4 调节泛素蛋白酶体途径 (UPP) 的化合物	70
4.5 调节 NF- κ B 信号转导通路的化合物	71

4.6 调节细胞凋亡的化合物.....	71
4.7 调节其他信号通路的化合物.....	74
5 展望.....	76
参考文献.....	77
附录.....	86
致谢.....	91

厦门大学博硕士论文摘要库

Contents

Chinese abstract	1
English abstract	VIII
1 Introduction	1
1.1 Overview of shrimp immune system	1
1.1.1 Composition of shrimp immune system.....	1
1.1.2 Cellular immunity	1
1.1.3 Humoral immunity	3
1.2 Profiles of shrimp signal pathways	5
1.2.1 JAK-STAT signal pathway	6
1.2.2 MAPKs signal pathway	6
1.2.3 NF- κ B signal pathway	7
1.2.4 Wnt signal pathway	7
1.3 White spot syndrome virus (WSSV)	10
1.3.1 Research progress of WSSV	10
1.3.2 Host and spread of WSSV	10
1.3.3 Symptom and pathological features	11
1.3.4 Structure and genome of WSSV	11
1.3.5 Research status of WSSV immediate-early gene.....	12
1.4 Research status of crayfish hematopoietic stem cells	13
1.4.1 Discovery of hematopoietic stem cells.....	14
1.4.2 Separation of hematopoietic stem cells	14
1.4.3 Differentiation regulating of hematopoietic stem cells	15
1.4.4 Application of hematopoietic stem cells	16
1.5 The purpose and significance of this study	17
2 Materials and Methods	18
2.1 Materials	18
2.1.1 <i>Procambarus clarkii</i>	18

2.1.2 WSSV virions	18
2.1.3 Reagents	18
2.1.4 Primers.....	18
2.2 Methods.....	19
2.2.1 WSSV detecting of crayfish	19
2.2.2 WSSV infecting of crayfish.....	19
2.2.3 Extracting of WSSV virions	20
2.2.4 Screening of signal transducting molecules by semi-quantitative PCR	20
2.2.5 Screening of signal transducting molecules by a quantitative PCR.....	23
2.2.6 Cytotoxicity analysis of signal transducting molecules	25
3 Results and analysis.....	26
3.1 Separating of hematopoietic stem cells	26
3.2 Structure of hematopoietic stem cells.....	27
3.3 Extraction and structure of WSSV	27
3.4 WSSV detection of crayfish	28
3.5 Transcriptional analysis of WSSV ie1 by semi-quantitative PCR.....	29
3.6 Transcriptional analysis of WSSV ie1 by Real-Time PCR	30
3.6.1 Screening results of signal transducting molecules for the first time ..	32
3.6.2 Re-screening results of signal transducting molecules	54
3.6.3 Cytotoxicity analysis results of signal transducting molecules	59
4 Discussion	67
4.1 Molecules of Wnt signal pathway.....	67
4.2 Molecules of histone acetyltransferase/ deacetylase	68
4.3 Molecules of SHH signal pathway.....	69
4.4 Molecules of UPP pathway	70
4.5 Molecules of NF-kB signal pathway.....	71
4.6 Molecules of apoptosis	71
4.7 Molecules of other signal pathway	74

5 Perspectives	76
References	77
Appendix	86
Acknowledgement	91

厦门大学博硕士论文摘要库

摘要

对虾为水产养殖产业中的重要经济品种,每年为人们带来大量的海鲜食材并创造了巨大的经济效益。但近年来不断的病害尤其是对虾白斑综合症病毒(White spot syndrome virus, WSSV)导致对虾大量减产,造成的直接或间接的经济损失十分巨大。研究对虾先天性免疫机制对于对虾抗病害十分重要。

本实验室收集了 365 种对细胞信号转导分子具有调节功能的化合物,在高等哺乳类如人和小鼠细胞中已经通过使用这些化合物对其靶基因激活/抑制即控制信号通路的开关来研究信号通路的功能。本实验室在此方法基础上,分离螯虾造血组织并使用胶原酶制备单细胞悬液,将这些化合物处理细胞并人工感染 WSSV 病毒粒子,提取螯虾造血干细胞总 RNA 并反转录得到 cDNA 进行 Real-Time PCR,以螯虾 40S 核糖体小亚基片段作为内参基因,通过分析 WSSV 极早期基因 ie1 的转录水平来判断化合物处理后能够促进 WSSV 基因转录还是抑制其转录,最终实现筛选出具有抗病原微生物功能的信号通路。

经过两轮筛选实验,我们从 365 种对细胞信号转导分子具有调节功能的化合物中筛选出 55 种能够影响 WSSV 基因转录的化合物,其中 17 种能够促进病毒基因 ie1 转录,38 种能够抑制其转录。随后,通过细胞毒性实验对 55 种化合物对细胞的毒性作用进行分析,以期排除因化合物本身对细胞的毒性作用而产生的影响。

本研究初步筛选出部分能够影响 WSSV 基因 ie1 转录的化合物,并对其在靶信号通路中的作用机制尝试阐明。该论文为抗病原微生物信号通路的研究以及对虾免疫的探究奠定了基础。

关键词: 对虾, 信号转导, 造血干细胞, WSSV

Abstract

Shrimp is one of the important species of the aquaculture industry. But, many virulent pathogens especially the White spot syndrome virus (WSSV) has caused a high shrimp mortality and great economic losses. So, it is crucial to study the shrimp immune system and breed the virus-resistant shrimp.

We collected 365 molecules which could modulate the signal pathway transduction. These molecules had been used to activate/inhibit target gene to study the function of relevant signal pathways. Based on this idea, the crayfish hematopoietic stem cells were separated and digested with collagenase. Then the molecules were added into hematopoietic stem cells followed by WSSV infection. Subsequently, the crayfish hematopoietic stem cells total RNA was extracted and reverse transcribed into cDNA to perform Real-Time PCR and the WSSV immediate early gene (ie1) transcriptional level was analysed with a fragment of ribosomal 40S protein as a internal control. According to the Real-Time PCR results, we intend to screen out the signal pathways that were related to the shrimp immunity or viral infection.

Of all the 365 signal transducing molecules, 55 molecules were screened out which were proved to involved in the infection of WSSV. 17 molecules could up-regulate the transcriptional level of WSSV ie1 while 38 could down-regulate. Then, the cytotoxicity of 55 molecules were analysed. Taken together, these works contributed to the studies of signal pathways which were involved in the shrimp immunity.

Keywords: Shrimp, signal transduction, crayfish hematopoietic stem cell, WSSV

1 前言

1.1 对虾免疫研究现状

对虾分类学上属于节肢动物门 (Arthropoda), 甲壳动物纲 (Crustacea), 十足目 (Decapoda), 游泳亚目 (Natantia), 对虾科 (Penaeidae), 对虾属 (Penaeus), 为广温广盐性热带虾类。对虾是现代世界范围内水产养殖的主要经济品种, 我国又是最大的养殖国, 每年可为我国水产养殖业带来巨额的经济收益。

对虾具有生长迅速、抗病能力强、营养要求较低、能较快适应生长环境等特点。但是近年来, 由于对虾养殖业饱受各种病害困扰而导致大量减产, 直接导致了沿海养殖企业的巨大经济损失以及对虾市场的供不应求。所以, 研究对虾免疫系统、提高抗病害能力以及培育优良品种抗病对虾显得尤其迫切, 各国学者也在为此而孜孜不倦的努力。目前, 对于对虾的免疫研究已经取得一定的成果。

1.1.1 对虾免疫系统组成

与脊椎动物不同的是, 对虾属于无脊椎动物, 拥有一套完善的非特异性免疫系统 (先天性免疫), 包括体液免疫系统和细胞免疫系统, 两者相辅相成, 并没有严格的界限, 细胞免疫系统所分泌的免疫因子、调控因子等是构成体液免疫的主要成分, 淋巴也是发挥细胞免疫的主要执行者^[1,2]。对虾开放式的循环系统注定其相对于闭锁式循环系统更容易遭受病原微生物的侵害, 在此情况下一旦对虾免疫系统遭遇病毒、细菌等的侵害, 对虾可以迅速启动其免疫系统来抵抗病原菌入侵: 一方面体液免疫系统会分泌大量的溶菌酶、氧化酶、免疫因子等对其进行消化作用; 另一方面, 细胞免疫系统也被激发来抵抗病毒入侵, 血细胞可以对其进行吞噬并进行胞内消化水解作用, 如此, 对虾依靠其非特异性免疫系统可以成功抵抗大部分的病原菌的感染^[3]。但是在外力作用较强如大规模病害爆发的情况下, 对虾的免疫系统则不足以抵抗以至造成对虾大量死亡。

1.1.2 对虾细胞免疫系统

对虾细胞免疫主要由血淋巴细胞来完成, 对虾造血干细胞分化出的血细胞随血流遍布全身形成一个完整且庞大的网络, 同时血细胞还可产生多种抗病因子、酶等, 当有外来病原菌侵袭, 血细胞会与之相互识别、吞噬以致最终消化, 发挥着重要的功能。

有研究发现, 对虾血细胞在体内有三种不同类型, 依据细胞表面的颗粒有无

多少分为：第一类：颗粒细胞（Granular cells, GC），主要通过产生抗菌肽、通过黑化作用参与到免疫过程中；第二类：半颗粒细胞(Semi-granular cells, SGC)，这类细胞在黑化作用、识别异己、包裹及凝集作用过程中发挥重要功能；第三类：透明细胞（无颗粒细胞:Hyaline cells, HC），当对虾受到外来病原微生物刺激时能够发挥吞噬功能将其吞噬并利用各种水解酶进行消化^[4]。

1.1.2.1 吞噬作用

前文已经阐述，当外来病原菌入侵时，细胞免疫可以发挥作用将其吞噬并于细胞内通过酶的作用将其消化水解从而保护机体。吞噬作用包括几个重要的步骤如：病原微生物的识别、粘附、聚集、摄入、清除等^[5]。首先，外来病原微生物会与血细胞进行相互识别，在此过程中模式识别受体（Pattern recognition proteins, PRPs）发挥着关键的作用^[6]，它能快速、准确的区分对虾自身及外来物质并引发包括吞噬、包裹、酚氧化酶原级联等一系列免疫反应。实际上，对虾体内有许多种不同的 PRPs，如肽聚糖识别蛋白（PGRPs）、革兰氏阴性菌结合蛋白（GNBP）、脂多糖（Lipopolysaccharide）、 β -1,3-葡聚糖结合蛋白（LGBPs）^[7]、C-型凝集素、纤维蛋白原相关蛋白（FREPs）、清道夫受体（SRs）、细胞黏附分子（DSCAMs）^[8,9]以及 Toll-like 受体（TORs）^[10]，这些 PRPs 分别识别不同的病原微生物上的糖蛋白来完成病原微生物与宿主的相互识别过程。此后，非特异性的细胞粘附因子如丝氨酸蛋白酶类似物（c-SPH）等将会扮演一个磁铁的作用将外来病原微生物牢牢吸附于血细胞的表面^[11,12]，并且进一步由血细胞吞噬形成吞噬小泡进入血细胞内，进而由细胞内的各种降解酶等杀伤该病原微生物。

1.1.2.2 包裹作用

血细胞的吞噬作用是有局限性的，即：血细胞只能吞噬较小的物质。但是，当外来物质的颗粒较大时，对虾血细胞就会联接构成纤维网格从而将之包裹其中，此时细胞会分泌大量黑色素通过黑化作用从而杀伤外来物质。此过程中，由颗粒型血细胞所分泌的大量蛋白质参与了形成这种纤维网格^[13]。

1.1.2.3 结节作用

前面两种免疫作用分别针对病原微生物个体较小和较大的不同情况。但是有些疾病的侵袭是呈现爆发性的，即极短时间内大量病毒迅速感染对虾细胞，此时吞噬作用和包裹作用已经不足够保护对虾。这种情况下，不仅血细胞之间会联接

形成纤维网格状结构,血细胞和病原微生物之间也会形成这种结构,即血细胞(主要为半颗粒型血细胞)包围病原微生物形成一个更大型的纤维状网格联接,并引发对虾的炎症反应来杀灭外来病原微生物^[14,15]。

1.1.3 对虾体液免疫系统

同细胞免疫系统一样,对虾体液免疫同样发挥着极为重要的作用。体液中的多种免疫因子、酶等非特异性酶、免疫因子等相互协同作用,共同组成对虾的体液免疫系统。

1.1.3.1 超氧化物歧化酶系统 (Superoxide dismutase, SOD)

超氧化物歧化酶在无脊椎动物的免疫系统中发挥着不可或缺的作用。前面已经提及,在病原微生物入侵对虾细胞时,细胞会诱发一系列的反应来保护自身,但是与此同时细胞由于病原刺激而变得极为活跃,所带来的负面影响就是大量产生远高于正常水平的氧自由基($O_2^{\cdot-}$)及过氧化物等,当这些物质过剩时对细胞的损伤极大^[16]。所以,能够清除这些氧自由基及过氧化物的超氧化物歧化酶就显得尤其重要,该酶清除这些过剩的负作用细胞产物,使得细胞维持在一种健康平衡的状态,从而时刻应对来自于外界的病原微生物侵害。

1.1.3.2 溶菌酶系统 (Lysozyme)

溶菌酶又称胞壁质酶 (Muramidase) 或 N-乙酰胞壁质聚糖水解酶,是一种能够水解病原菌黏多糖的碱性酶。溶菌酶主要通过破坏病原微生物细胞壁中的 N-乙酰胞壁酸和 N-乙酰葡萄糖胺之间的 β -1,4-糖苷键,细胞壁中的粘多糖分解生成水溶性的糖肽,最终导致细胞壁破裂、细胞内容物流出而解体死亡。除此之外,溶菌酶还能够与负电荷的病毒蛋白质相互结合从而使得病毒失活起到免疫防御功能。

1.1.3.3 酚氧化酶原-激活系统 (Phenoloxidase)

酚氧化酶亦称酪氨酸酶 (Tyrosinase),辅基含有铜,故为一种铜蛋白酶。酚氧化酶在对虾体内以酚氧化酶原 (Prophenoloxidase, proPO) 的形式存在。当对虾受到外界如细菌、病毒的刺激时,半颗粒细胞、颗粒细胞所产生的酚氧化酶原即能被酚氧化酶原激活酶水解成为成熟的酚氧化酶^[17]。酚氧化酶与其底物酚类物质作用后所生成的终产物黑色素是无脊椎动物免疫系统中的重要成分,其能够引发黑化作用从而杀灭外来病原微生物;与此同时,蓝蟹和烟草天蛾酚氧化酶原

激活酶 PPA 的 N 端发夹区域在水解后能产生抗菌肽进而巩固其免疫机制^[18,19]。

另有研究表明,当对虾体内的酚氧化酶原基因被沉默之后,对虾血细胞数量及细胞中的酚氧化酶含量都明显降低,此时检测对虾受感染情况发现外来病原微生物含量明显升高。由此也说明酚氧化酶系统的确在对虾免疫防御机制中所起到的重要作用。

1.1.3.4 凝集素

凝集素是从植物、无脊椎动物及高等动物中所提纯的一种能够和糖类相结合的蛋白质,因为其能够凝集红血球故命名为凝集素。凝集素最大的特点即是能识别细胞膜上复杂的碳水化合物结构,即糖基,这也同时反应出凝集素在细胞识别方面的重要作用。在甲壳动物免疫系统中,凝集素正是通过识别并结合细胞表面的糖基决定簇来区分异己物质^[20];同时凝集素还使得外来病原微生物凝集,这样又抑制了外来物质的进一步扩散感染,随后联合其他免疫因子的作用共同防御。

1.1.3.5 抗菌肽 (Antimicrobial peptides)

抗菌肽原本是由瑞典科学家 G. Boman 发现,其在给天蚕蛹人工注射细菌进行感染实验时发现天蚕蛹产生了一种具有抗菌活性的多肽,并将其命名为天蚕素 (Cecropins)^[21],随后该研究组又从中国橡木蚕中分离出两种不同类型的抗菌肽并命名为 Cecropin-B 和 Cecropin-D^[22]。自 1980 年发现以来,各国学者陆续从细菌、真菌、昆虫、两栖类、动植物等几乎所有生物中分离得到抗菌肽。

这类多肽一般分子量较小,大小在 2KD-7KD 之间,含有 20-60 个氨基酸残基不等,往往具有强碱性、热稳定性以及广谱抗菌性等特点。随着研究的不断深入,科学家们发现抗菌肽对于病毒、细菌、真菌、原生类甚至癌细胞都有强力杀伤作用,所以医学领域更倾向于将之称为多肽抗生素。

1997 年,对虾中首次分离到的抗菌肽 Penaeidin 以及随后 1999 年又分离到的 Crustins 构成如今对虾免疫系统中的两大类抗菌肽^[23,24],两种抗菌肽对于革兰氏阳性细菌、革兰氏阴性细菌以及真菌都具有较强抗菌活性。此外,体外表达的对虾抗菌肽在对虾感染病毒之后也能够明显提高其生存率^[25]。

虽然抗菌肽的研究已经开展了 20 余年并有了较为深入的了解,但是对于抗菌肽具体是如何杀灭病原菌的,目前还不清楚。可以肯定的是,抗菌肽作用于细

胞膜，在细胞膜上形成跨膜离子通道而导致细胞膜不完整，内外屏障丧失，细胞内容物流出最终杀灭病原菌。此间是否存在特异性膜受体、有无其他分子辅助该过程，尚需进一步研究以获得答案。

1.1.3.6 血蓝蛋白 (Hemocyanin)

血蓝蛋白又称为血蓝素，是一类存在于某些软体动物（头足类等）及节肢动物（虾、蟹等）血液中的蛋白质。不同于哺乳类动物血液中耦联铁离子的血红蛋白，血蓝蛋白因其结合有两个铜离子，所以含有血蓝蛋白的动物血液呈现蓝色。血蓝蛋白中的铜离子能够与氧结合，也容易解离，所以血蓝蛋白在血液中扮演着氧气运输者的角色，与血红蛋白共为呼吸蛋白。

研究发现，血蓝蛋白在无脊椎动物中并不只是单纯作为一种氧气输送蛋白，它在免疫、调节渗透压、能量的输送等过程当中都扮演着极为重要的角色。其中，提取自海洋软体动物中的匙孔咸血蓝蛋白（Keyhole Limpet Hemocyanin, KLH）在高等动物的免疫学方面已经有非常深入的研究。有学者发现该蛋白质能够在日本血吸虫病的诊断^[26]、膀胱癌的治疗方面有着较好的效果^[27]，进一步探索证实 KLH 由于其与人体蛋白相比同源性远、免疫原性强以及能够和抗原较好的耦联等特点而作为抗原载体蛋白广泛用于疫苗研制^[28]。

节肢动物门中，血蓝蛋白分子量大小一般 70-80KD，通常以 2-8 个单体蛋白聚合而成多聚体的形式存在于动物体内^[29]。血蓝蛋白在对虾中除了已述的作为呼吸蛋白运输氧气之外，还被报道表现出对多种病毒（如 WSSV、虹彩病毒等）的抗病毒活性^[30,31]，进一步，在感染桃拉病毒（Taura Syndrome Virus, TSV）后对虾血液中的血蓝蛋白也会发生明显上调^[32]；此外，对虾血蓝蛋白通过结合病原菌细胞膜表面的膜蛋白而高效凝集这些细菌如溶血弧菌、金黄色葡萄球菌等^[33]。这些研究结果表明，对虾血蓝蛋白与病毒感染、病原菌侵袭密切相关。

1.2 对虾信号通路的研究

前文已经提到，无脊椎动物对虾的免疫系统为先天性免疫系统，能帮助无脊椎动物在抵御病害侵袭时进行迅速有效的防御。在先天性免疫防御机制中，细胞信号转导通路的调控发挥着极其重要的功能。细胞信号转导通路是指细胞膜接收到来自胞外的刺激如激素、蛋白质、小分子化合物等等完成相互识别过程，此后

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库