

学校编码: 10384

分类号 \_\_\_\_\_ 密级 \_\_\_\_\_

学号: 21720081152644

UDC \_\_\_\_\_

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

选择性剪接与 DNA 甲基化相互关系的研究

Research on Interactions between Alternative Splicing and  
DNA Methylation

林 志 忠

指导教师姓名: 韩家淮 教授

专业名称: 生物化学与分子生物学

论文提交日期: 2011 年 04 月

论文答辩时间: 2011 年 06 月

学位授予日期: 2011 年 月

答辩委员会主席: 俞春东 教授

评 阅 人: \_\_\_\_\_

2011 年 06 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它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

## 摘要

选择性剪接是真核生物中基因表达的一种重要的调控机制，也是高等生物中蛋白质多样性的主要来源。最近的研究工作揭示了表观遗传学(如组蛋白修饰)在调控选择性剪接方面的重要作用。DNA 甲基化是一种重要的表观遗传学修饰，它与肿瘤发生密切相关。人们推测 DNA 甲基化也可能参与选择性剪接的调控，但是目前尚无任何实验证据。

近年来大量生物学实验的数据积累，形成了当前数以万计的生物信息数据库。本论文通过对数据库的检索，筛选出 6 个基因，这些基因的选择性剪接和 DNA 甲基化状态同时在分化前和分化后的人类胚胎干细胞 (hESC) 之间发生相应的变化。后来，我们通过在不同的细胞系及小鼠组织中的实验发现选择性剪接和 DNA 甲基化之间存在相关性。

为了进一步阐明选择性剪接和 DNA 甲基化的相互关系，首先，我们通过诱导小鼠成肌细胞 C2C12 分化来改变基因的选择性剪接后发现，DNA 甲基化并没有发生明显的变化。同时，我们尝试先利用 DNA 甲基化抑制剂或敲低 DNA 甲基化相关基因来改变细胞的甲基化水平后，再检测基因的选择性剪接，但也未发现明显变化；后来，我们通过构建外源的 minigene 来模拟内源基因的选择性剪接，再用点突变的方法将 minigene 上的甲基化位点突变使之无法被甲基化，我们发现正常的和突变的 minigene 之间的选择性剪接并没有明显的差异。鉴于外源和内源基因的染色体结构无法完全一致，我们认为应该先通过基因敲入 (knock-in) 改变内源基因的目的位点从而改变甲基化水平，然后再分析其选择性剪接情况，虽然其周期长且难度大，但我们正致力于解决这个重要问题。

本论文的研究工作证实了选择性剪接和 DNA 甲基化的相关性，而且为深入研究 DNA 甲基化调控选择性剪接的机制提供了思路，并且对该调控机制的深入研究将有可能为许多遗传病以及肿瘤的治疗找到新的靶位、开辟新的途径，具有非常重要的意义。

**关键词：**选择性剪接；DNA 甲基化；表观遗传学

## Abstract

Alternative splicing is a crucial mechanism for gene regulation and also a major source for protein diversity in higher eukaryotes. Recent studies indicate an important role for epigenetics (e.g. histone modifications) in alternative splicing regulation. Although it is highly likely that DNA methylation, one of principal epigenetic factors which plays a significant role in tumor genesis, may also regulate alternative splicing, there is no experimental evidence at present.

In recent years, accumulation of numerous experimental data produces lots of bioinformation databases. By means of database retrieval, we screened out six genes whose alternative splicing and DNA methylation patterns changed simultaneously before and after differentiation of hESCs. Afterwards, our researches based on different cell lines and mouse tissues identified the correlation between alternative splicing and DNA methylation.

To get more information about the relations between them, firstly, we induced differentiation of mouse myoblasts C2C12 to change gene's splicing pattern, but we found no effect on DNA methylation. In the meantime, after altering the DNA methylation level by treatment of inhibitor or knock-down of DNA methylation associated genes, we found no change in alternative splicing. Then, we generated minigene to imitate the alternative splicing pattern of endogenous gene and several methylation sites-mutant minigenes. However, there wasn't any difference in alternative splicing of these minigenes. Finally, we plan to change DNA methylation pattern of endogenous genes by generating point mutations via knock-in.

In this study, we have identified the correlation between DNA methylation and alternative splicing, and provided elicitation for further researches on mechanism of alternative splicing regulation which may give rise to discovery of new molecular targets and associated drugs for many hereditary diseases.

**Keywords:** alternative splicing; DNA methylation; epigenetics

# 目 录

中文摘要.....	I
英文摘要.....	III
中文目录.....	III
英文目录.....	IV
<b>第一章 前 言 .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 mRNA 选择性剪接.....</b>	<b>1</b>
1.1.1 mRNA 选择性剪接及其生物学意义.....	1
1.1.2 选择性剪接的基本模式.....	3
<b>1.2 选择性剪接的分子调控机制.....</b>	<b>4</b>
1.2.1 剪接位点的识别和选择.....	4
1.2.1.1 RNA 剪接体及其组装.....	4
1.2.1.2 顺式作用元件和反式作用因子.....	5
1.2.1.3 剪接位点识别的正调控.....	6
1.2.1.4 剪接位点识别的负调控.....	7
1.2.1.5 正负调控的协同效应.....	8
1.2.1.6 剪接末端的选择调控.....	8
1.2.2 转录和剪接相偶联.....	9
<b>1.3 表观遗传学和选择性剪接.....</b>	<b>10</b>
1.3.1 表观遗传学.....	10
1.3.2 组蛋白修饰和 DNA 甲基化.....	11
1.3.3 组蛋白修饰对选择性剪接的调控.....	12
1.3.4 DNA 甲基化对选择性剪接的调控.....	13
<b>1.4 立题背景 .....</b>	<b>14</b>
<b>第二章 材料与方 法 .....</b>	<b>15</b>
<b>2.1 实验材料.....</b>	<b>15</b>
2.1.1 哺乳动物细胞株.....	15
2.1.2 实验相关药品和试剂.....	15
2.1.2.1 分子生物学相关试剂.....	15

2.1.2.2	细胞实验相关试剂.....	15
2.1.2.3	蛋白分析相关试剂.....	16
2.1.3	实验室主要仪器.....	16
<b>2.2</b>	<b>分子相关实验方法.....</b>	<b>16</b>
2.2.1	质粒载体介绍.....	16
2.2.2	质粒的构建.....	18
2.2.2.1	RNAi 质粒的构建.....	20
2.2.2.2	表达质粒的构建.....	20
2.2.2.2.1	引物设计及 PCR 反应.....	20
2.2.2.2.2	限制性内切酶消化 PCR 产物和质粒载体.....	20
2.2.2.2.3	DNA 的胶回收.....	20
2.2.2.2.4	DNA 的连接反应.....	21
2.2.2.2.5	PCR 产物的克隆.....	22
2.2.2.3	质粒突变体的构建.....	22
2.2.2.3.1	引物设计.....	22
2.2.2.3.2	点突变流程.....	22
2.2.3	大肠杆菌感受态细胞的制备和转化.....	24
2.2.3.1	感受态细胞的制备.....	24
2.2.3.2	感受态细胞的转化.....	24
2.2.4	质粒 DNA 的提取.....	25
2.2.4.1	小量提取质粒 DNA (STET 煮沸法).....	25
2.2.4.2	中量提取质粒 DNA (碱裂解法).....	25
2.2.4.3	大量提取质粒 DNA (CsCl 密度梯度离心法).....	26
2.2.5	应用 RT-PCR 检测特定基因的表达情况.....	27
2.2.5.1	细胞总 RNA 提取.....	27
2.2.5.2	逆转录合成 cDNA.....	27
2.2.5.3	PCR 检测 mRNA 选择性剪接的方式.....	28
2.2.5.4	实时荧光定量 PCR.....	28
<b>2.3</b>	<b>细胞相关实验方法.....</b>	<b>29</b>
2.3.1	细胞培养基及相关溶液的配制.....	29
2.3.2	细胞的培养和传代.....	30
2.3.3	细胞转染.....	30

2.3.3.1	磷酸钙转染法.....	30
2.3.3.2	脂质体 2000 转染法.....	31
2.3.4	慢病毒的包装与感染.....	32
2.3.4.1	慢病毒的包装.....	32
2.3.4.2	慢病毒的感染目的细胞.....	32
2.3.4.3	稳定表达细胞株的筛选.....	33
2.3.5	体外诱导小鼠成肌细胞 C2C12 分化为肌管 .....	33
<b>2.4</b>	<b>蛋白质相关实验方法.....</b>	<b>34</b>
2.4.1	免疫印迹.....	34
2.4.2	相关溶液的配制.....	35
<b>2.5</b>	<b>DNA 甲基化分析方法 .....</b>	<b>36</b>
2.5.1	原理.....	36
2.5.2	步骤.....	37
2.5.2.1	亚硫酸氢盐修饰 DNA.....	37
2.5.2.2	亚硫酸氢盐修饰 DNA 简化版.....	37
2.5.2.3	PCR 扩增.....	38
2.5.2.4	TA 克隆和测序.....	39
<b>第三章</b>	<b>结果与分析 .....</b>	<b>40</b>
<b>3.1</b>	<b>通过数据检索筛选基因.....</b>	<b>40</b>
3.1.1	AS 数据库和 DM 数据库.....	40
3.1.2	通过数据库筛选出 6 个候选基因.....	41
<b>3.2</b>	<b>选择性剪接与 DNA 甲基化存在相关性 .....</b>	<b>43</b>
3.2.1	基因 MARK3 的选择性剪接与 DNA 甲基化存在相关性.....	43
3.2.2	基因 PKM2 的选择性剪接与 DNA 甲基化存在相关性 .....	46
<b>3.3</b>	<b>改变 DNA 甲基化水平对 MARK3 的选择性剪接的影响 .....</b>	<b>48</b>
3.3.1	DNA 甲基化抑制剂处理对 MARK3 的选择性剪接没有影响.....	48
3.3.2	敲低 DNA 甲基化相关基因对 MARK3 的选择性剪接没有影响.....	49
3.3.3	构建 MARK3 的野生型 minigene 和突变型 minigene.....	51
3.3.4	MARK3 的野生型和突变型 minigene 的剪接方式没有差别.....	52
<b>3.3</b>	<b>改变 PKM2 的选择性剪接对 DNA 甲基化水平的影响.....</b>	<b>53</b>
3.4.1	诱导 BJ 细胞衰老后其 PKM2 的选择性剪接没有明显差异.....	53
3.4.2	C2C12 分化后其 PKM2 的选择性剪接发生变化.....	53



3.4.3 C2C12 分化后其 PKM2 的 DNA 甲基化水平没有发生变化.....	54
3.5 总结与讨论 .....	56
附录 1 图表索引 .....	58
附录 2 缩略语及中英文对照 .....	60
参考文献.....	62
致谢.....	67

厦门大学博硕士学位论文摘要库

## Table of Contents

<b>Abstract in Chinese</b> .....	<b>I</b>
<b>Abstract in English</b> .....	<b>VII</b>
<b>Contents in Chinese</b> .....	<b>III</b>
<b>Contents in English</b> .....	<b>IV</b>
<b>Chapter 1 Introduction</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 Alternative splicing</b> .....	<b>1</b>
1.1.1 Definition and biological significances .....	1
1.1.2 Basic patterns of alternative splicing .....	3
<b>1.2 Mechanisms of alternative splicing regulation</b> .....	<b>4</b>
1.2.1 Splice site recognition and selection.....	4
1.2.1.1 Spliceosome assembly .....	4
1.2.1.2 cis-acting elements and trans-acting factors .....	5
1.2.1.3 Facilitating splice site recognition .....	6
1.2.1.4 Inhibiting splice site recognition.....	7
1.2.1.5 Combinatorial effects of activators and inhibitors.....	8
1.2.1.6 Splice terminal selection and regulation .....	8
1.2.2 Coupling of transcription and splicing.....	9
<b>1.3 Epigenetics and alternative splicing</b> .....	<b>10</b>
1.3.1 Epigenetics .....	10
1.3.2 Histone modifications and DNA methylation.....	11
1.3.3 Histone modifications in alternative splicing regulation .....	12
1.3.4 DNA methylation in alternative splicing regulation .....	13
<b>1.4 Background of this thesis</b> .....	<b>14</b>
<b>Chapter 2 Materials and methods</b> .....	<b>15</b>
<b>2.1 Experimental materials</b> .....	<b>15</b>
2.1.1 Mammalian cell lines .....	15
2.1.2 Drugs and reagents.....	15
2.1.2.1 Molecular related reagents.....	15

2.1.2.2	Cell culture related reagents.....	15
2.1.2.3	Protein analysis related reagents.....	16
2.1.3	Instruments.....	16
<b>2.2</b>	<b>Experiments and methods for DNA.....</b>	<b>16</b>
2.2.1.	Introduction of plasmid vectors.....	16
2.2.2	Construction of plasmids.....	18
2.2.2.1	Construction of RNAi plasmid.....	18
2.2.2.2	Construction of expression plasmid.....	20
2.2.2.2.1	Primers design and PCR.....	20
2.2.2.2.2	Digestion of plasmid DNA with restriction enzymes.....	20
2.2.2.2.3	Gel extraction.....	20
2.2.2.2.4	Ligation reaction.....	21
2.2.2.2.5	Cloning of PCR product.....	22
2.2.2.3	Construction of mutant plasmid.....	22
2.2.2.3.1	Primer design.....	22
2.2.2.3.2	Site-directed mutagenesis.....	22
2.2.3	Preparation of competent cell and transformation.....	24
2.2.3.1	Preparation of competent cell.....	24
2.2.3.2	Transformation of DNA into competent cell.....	24
2.2.4	Preparation of plasmid DNA.....	25
2.2.4.1	Mini-preparation od plasmid DNA.....	25
2.2.4.2	Midi-preparation od plasmid DNA.....	25
2.2.4.3	Maxi-preparation od plasmid DNA.....	26
2.2.5	Determination of mRNA level of target genes by real-time PCR.....	27
2.2.5.1	Isolation of total RNA.....	27
2.2.5.2	Synthesis of first strand cDNA by reverse transcription.....	27
2.2.5.3	Identification of mRNA splicing pattern.....	28
2.2.5.4	Real-time PCR.....	28
<b>2.3</b>	<b>Experiments and methods for cell.....</b>	<b>29</b>
2.3.1	Media and solutions for cell culture.....	29
2.3.2	Cell culture and passage.....	30
2.3.3	Transfection.....	30

2.3.3.1	Calcium phosphate transfection.....	30
2.3.3.2	Lipofectamine 2000 transfection.....	31
2.3.4	Lentivirus packaging and infection.....	32
2.3.4.1	Lentivirus packaging.....	32
2.3.4.2	Infection.....	32
2.3.4.3	Selecton for stable cell line.....	33
2.3.5	Induce differentiation of mouse myoblast C2C12 into myotube.....	33
<b>2.4</b>	<b>Experiments and methods for protein .....</b>	<b>34</b>
2.4.1	Western blot.....	34
2.4.2	Preparation of solutions.....	35
<b>2.5</b>	<b>DNA methylation analysis.....</b>	<b>36</b>
2.5.1	Principle.....	36
2.5.2	Procedure.....	37
2.5.2.1	Bisulfite conversion of DNA.....	37
2.5.2.2	Bisulfite conversion of DNA (Simplicity version).....	37
2.5.2.3	PCR amplification.....	38
2.5.2.4	TA cloning and sequencing.....	39
<b>Chapter 3</b>	<b>Results and analysis.....</b>	<b>40</b>
<b>3.1</b>	<b>Gene screening by data retrieval.....</b>	<b>40</b>
3.1.1	AS database and DM database.....	40
3.1.2	Six genes were screened out by data retrieval.....	41
<b>3.2</b>	<b>Identification of the correlation between alternative splicing and DNA methylation.....</b>	<b>43</b>
3.2.1	Correlation of alternative splicing and DNA methylation of gene MARK3.....	43
3.2.2	Correlation of alternative splicing and DNA methylation of gene PKM2.....	46
<b>3.3</b>	<b>Change of DNA methylation pattern of MARK3 didn't affect the alternative splicing .....</b>	<b>48</b>
3.3.1	Treatment of DNA methylation inhibitor didn't affect alternative splicing.....	48
3.3.2	Knock-down DNA methylation associated genes didn't affect alternative splicing.....	49
3.3.3	Construction of WT and Mutant MARK3-minigenes.....	51

3.3.4	No difference of alternative splicing between WT and Mutant MARK3-minigenes.....	52
<b>3.4</b>	<b>Change of splicing pattern of PKM2 didn't affect the DNA methylation</b>	<b>53</b>
3.4.1	Alternative splicing of PKM2 didn't change after ras-induced senescence of BJ cells.....	53
3.4.2	Alternative splicing pattern changed after induced differentiation of C2C12 .....	53
3.4.3	DNA methylation pattern of PKM2 didn't change after induced differentiation of C2C12 .....	54
<b>3.5</b>	<b>Conclusions and discussion.....</b>	<b>56</b>
<b>Appendix 1</b>	<b>Index of figures and tables .....</b>	<b>58</b>
<b>Appendix 2</b>	<b>Abbreviation .....</b>	<b>60</b>
<b>Reference.....</b>	<b>.....</b>	<b>62</b>
<b>Acknowledge.....</b>	<b>.....</b>	<b>67</b>

## 第一章 前言

### 1.1 mRNA 选择性剪接

#### 1.1.1 mRNA 选择性剪接及其生物学意义

真核细胞的基因序列中，包含了内含子（Intron）和外显子（Exon），其中内含子在基因转录成前体 mRNA（Precursor mRNA, pre-mRNA）后会被 RNA 剪接体（RNA spliceosome）移除。选择性剪接（Alternative splicing），也称变位剪接或可变剪接，是指选择性地对 mRNA 前体中不同的剪接位点的组合剪接方式。通过选择性剪接，由一条 mRNA 前体可生成多条不同的成熟 mRNA<sup>[1]</sup>。也就是说，一条未经剪接的 RNA，含有多种外显子被剪成的不同组合，通过选择性剪接，最终可翻译出多种不同的蛋白质（图 1.1）。

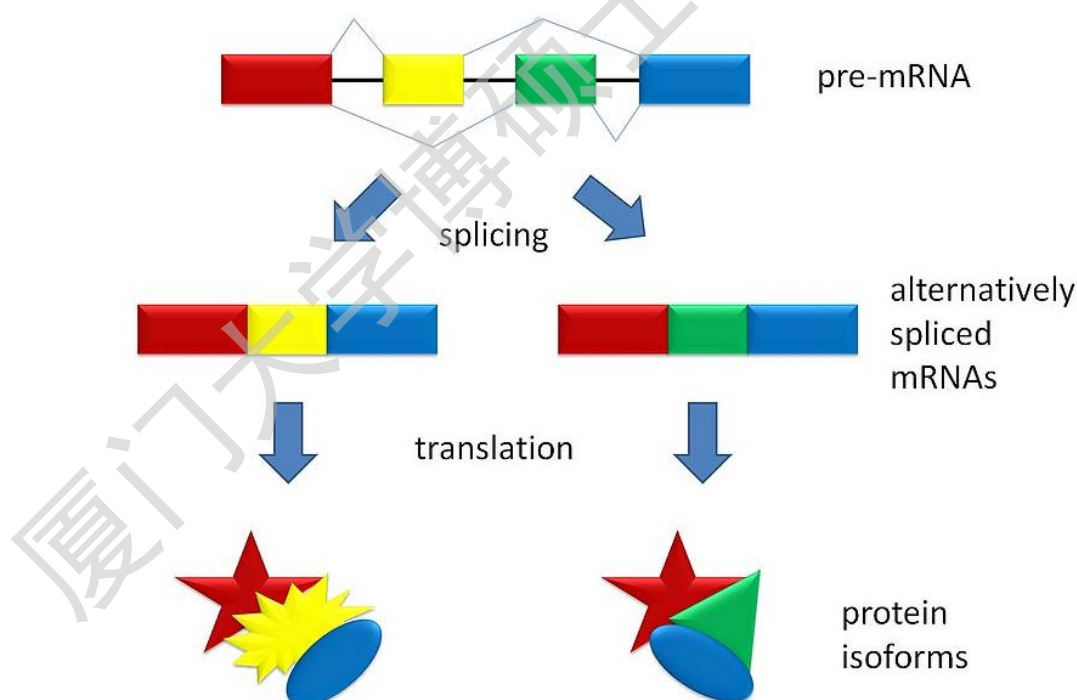


图 1.1 mRNA 选择性剪接

Fig. 1.1 mRNA alternative splicing

选择性剪接最早于 1977 年被人们发现<sup>[2, 3]</sup>。当时，人们发现 II 型腺病毒在

其生活史晚期只生成一条初级转录产物，但是却翻译出多个病毒蛋白质，后来的研究表明这是由于这条初级转录产物可通过不同的方式被剪接后生成多条不同的成熟 mRNA 所导致的<sup>[4-6]</sup>。1981 年，人们首次在哺乳动物细胞中发现了存在选择性剪接的基因<sup>[5]</sup>。该基因的 pre-mRNA 包含 6 个外显子，可被选择性剪接生成两种成熟 mRNA：第一条是编码 calcitonin 的成熟 mRNA，包含第 1 至 4 个外显子，并终止于第 4 个外显子后面的多腺苷酸化信号位点（polyadenylation signal site）；而另一条编码 CGRP（calcitonin gene related peptide）<sup>[7, 8]</sup>的成熟 mRNA 则跳过了第 4 个外显子，包含另外 5 个外显子。后来，越来越多的基因被发现，如免疫球蛋白基因等<sup>[9]</sup>，这说明选择性剪接在真核细胞中是普遍存在的。

近年来，随着测序技术的迅速发展，通过对人类基因组的高通量深度测序，人们发现选择性剪接及其剪接异构体的规模比过去预计的要广泛、复杂得多。在人类基因组中，大约有 95% 的含多个外显子的基因可发生选择性剪接<sup>[10, 11]</sup>。有时候，一个基因在生成 mRNA 的过程中需要经历许多次剪接，例如人类基因 Titin 含有 316 个外显子，Ryr1 含有 106 个外显子，它们至少要经过上百次剪接才能完成 mRNA 的加工。

同时，外显子的限定和剪接反应的执行是一个非常精细的、被严格调控的过程，因此，选择性剪接的复杂程度越高，它对错误剪接的敏感程度就越高。事实上，有许多人类疾病是由剪接过程的失调及剪接体相关基因的突变造成的<sup>[12]</sup>。据统计，超过 60% 的由人类疾病引起的基因突变并非直接影响编码而是影响选择性剪接<sup>[13]</sup>，例如 DNMT3B 是维持细胞 DNA 甲基化的重要蛋白，在一些肿瘤和癌细胞中发现被异常剪接的 DNMT3B 的 mRNA，当在哺乳动物细胞中过表达这些异常的 mRNA 后会改变细胞的 DNA 甲基化状态，并加快细胞生长速度，可见其对肿瘤发育的促进作用<sup>[14]</sup>。另外，研究表明一些与 RNA 剪接相关的顺式作用元件（cis-acting RNA elements）和反式作用剪接因子（trans-acting protein splicing factors）的突变会导致许多人类疾病，如色素性视网膜炎（retinitis pigmentosa）、囊泡性纤维症（cystic fibrosis）、肌萎缩性侧索硬化症（amyotrophic lateral sclerosis）、帕金森症（Parkinsonism）和癌症等<sup>[15]</sup>。

综上所述，选择性剪接不仅能够极大地增加蛋白质的多样性和基因表达的

复杂程度，而且选择性剪接的正常与否与人类健康及疾病密切相关。因此，选择性剪接的调控机制已经越来越受到人们的重视。

### 1.1.2 选择性剪接的基本模式

在不同的真核生物基因中，外显子和内含子长度往往有很大差别，大多数脊椎动物基因的外显子较短，而内含子很长。对于小内含子基因，剪接因子识别内含子两侧的剪接位点形成剪接复合物，称为内含子限定 (intron definition)；对于大内含子基因，剪接因子寻找外显子两侧相匹配的 3' 和 5' 剪接位点形成剪接复合体，称为外显子限定 (exon definition) [16]。

如图 1.2 所示,现在人们普遍认为选择性剪接主要存在以下 5 种基本模式<sup>[17, 18]</sup>：

1. Exon skipping: 指在 pre-mRNA 中一个或多个外显子被移除，这是真核细胞中最常见的一种模式。
2. Mutually exclusive exons: 指两个外显子竞争性地被剪接进 mRNA，即这两个外显子无法同时被保留。
3. Alternative donor site: 指可变的 5' 剪接供体位点导致上游外显子的 3' 边界改变。
4. Alternative acceptor site: 指可变的 3' 剪接受体位点导致上游外显子的 5' 边界改变。
5. Intron retention: 指一段序列可以作为内含子被移除或者被保留，这种模式与 Exon skipping 的区别在于被保留的这段序列两侧没有内含子，属于最少见的一种。

上文列出的 5 种模式是最基本的剪接方式，实际的选择性剪接要复杂得多。例如小鼠基因 hyaluronidase 可通过选择性剪接生成三种异构体，其中有两种异构体的差别属于 intron retention，同时有两种异构体的差别却属于 exon skipping<sup>[17]</sup>。因此，这些不同的剪接方式可以形成不同的剪接组合，产生不同的剪接产物，有时候产生的剪接产物的数目是极其惊人的，例如果蝇的 Dscam 基因经选择性剪接产生的产物达 38,000 余种，超过果蝇整个基因组基因数目的两倍<sup>[19]</sup>。



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](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库