

学校编码: 10384

分类号 \_\_\_\_\_ 密级 \_\_\_\_\_

学号: 20120051302010

UDC \_\_\_\_\_

厦门大学

\_\_\_\_\_ 硕士 \_\_\_\_\_ 学 位 论 文

利用酵母双杂交系统筛选铜绿微囊藻生物  
钟蛋白 KaiC 的相互作用蛋白

Screening interacting proteins of clock protein KaiC from  
*Microcystis aeruginosa* by the yeast two-hybrid system

王 靖

指导教师姓名: 徐 虹 副教授

专 业 名 称: 水生生物学

论文提交日期: 2008年10月

论文答辩时间: 2008年11月

学位授予日期: \_\_\_\_\_ 年 月

答辩委员会主席: 郑天凌 教授

评 阅 人: 齐雨藻 教授

胡鸿钧 研究员

2008年11月

利用酵母双杂交系统筛选铜绿微囊藻生物钟蛋白 KaiC 的相互作用蛋白

王 靖

指导教师: 徐虹 副教授

厦门大学

## 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

厦门大学博硕

# 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

摘要.....	I
Abstract.....	III
前 言.....	1
1 铜绿微囊藻简介和蓝藻生物钟研究进展.....	1
1.1 铜绿微囊藻简介.....	1
1.2 生物钟介绍.....	2
1.3 蓝藻生物钟研究进展.....	2
2 酵母双杂交系统介绍.....	7
2.1 酵母双杂交原理.....	7
2.2 用于酵母双杂交筛选的铜绿微囊藻基因组文库.....	9
3 本论文研究的目的和意义.....	10
材料与amp;方法.....	11
1 实验材料.....	11
2 实验方法.....	20
实验流程.....	34
实验结果与分析.....	35
1 铜绿微囊藻基因文库的构建.....	35
1.1 铜绿微囊藻染色体DNA的不完全酶切.....	35
1.2 基因组文库构建.....	35
2 重组质粒pGBKT <sub>7</sub> -kaiC的有效性检测.....	38
3 利用酵母双杂交筛选与生物钟蛋白KaiC相互作用的蛋白.....	39
3.1 筛选基因组文库中与KaiC的相互作用蛋白.....	39
3.2 回复验证阳性克隆的有效性.....	41
3.3 测序结果分析.....	41
4 集胞藻PCC 6803的ompR基因的克隆、表达及其与KaiC相互作用的验证.....	46
4.1 集胞藻PCC 6803的ompR基因的克隆表达.....	46
4.2 蛋白OmpR与KaiC相互作用的检验.....	49

5 铜绿微囊藻中 <i>c196</i> 基因的克隆、表达及其与KaiC蛋白相互作用的验证.....	51
5.1 铜绿微囊藻 <i>c196</i> 基因基因的扩增.....	51
5.2 重组表达载体的构建.....	52
5.3 GST-C196蛋白的表达与纯化.....	53
5.4 Far-western验证C196与KaiC间的相互作用.....	53
讨论.....	55
1 铜绿微囊藻基因文库的构建.....	55
2 酵母双杂交的筛选.....	56
3 基因组文库筛选的蛋白功能.....	58
小结与展望.....	60
参考文献.....	62
附录.....	67
致谢.....	72

## CONTENTS

Chinese abstract.....	I
English Abstract.....	III
Forwards.....	1
1 Summary on <i>Microcystis aeruginosa</i> and Advances on circadian clock in cyanobacteria.....	1
1.1 Summary on <i>Microcystis aeruginosa</i> .....	1
1.2 Introduction of circadian clock.....	2
1.3 Advances on circadian clock in cyanobacteria.....	2
2 Introduction of Yeast two-hybrid system.....	7
2.1 Principle of Yeast two-hybrid system.....	7
2.2 Genomic library for screening by Yeast two-hybrid system.....	9
3 Purpose and significance of this study.....	10
Materials and Methods.....	11
1 Materials.....	11
2 Methods.....	20
Technology flow chat.....	34
Results and Analysis.....	35
1 Construction of genomic library of <i>Microcystis aeruginosa</i> .....	35
1.1 Partial digestion of chromosome DNA of <i>Microcystis aeruginosa</i> .....	35
1.2 Construction of genomic library.....	35
2 Verification of recombinant plasmid pGBKT <sub>7</sub> - <i>kaiC</i> .....	38
3 Screen proteins interactive with KaiC by Yeast two-hybrid system.....	39
3.1 Screen proteins interactive with KaiC from genomic library.....	39
3.2 Verification of positive clones.....	41
3.3 Analysis of sequence results.....	41
4 Clone and expression of <i>ompR</i> gene from <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 and verification of its interaction with KaiC.....	46
4.1 Clone and expression of <i>ompR</i> gene from <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803.....	46
4.2 Verification of interaction between OmpR and KaiC.....	49
5 Clone and expression of <i>c196</i> gene from <i>Microcystis aeruginosa</i> and	

verification of its interaction with KaiC.....	51
5.1 Amplification of <i>c196</i> gene from <i>Microcystis aeruginosa</i> .....	51
5.2 Construction of recombinatant carrier.....	52
5.3 Expression and purification of GST-C196 protein.....	53
5.4 Verification of interaction between C196 and KaiCby far-western...53	
<b>Discussion.....</b>	<b>55</b>
1 Construction of genomic library of <i>Microcystis aeruginosa</i> .....	56
2 Screening by Yeast two-hybrid system.....	56
3 The function of proteins screened from genomic library.....	58
<b>Summary and prospect.....</b>	<b>60</b>
<b>Reference.....</b>	<b>62</b>
<b>Appendix.....</b>	<b>67</b>
<b>Acknowledgements.....</b>	<b>72</b>

廈門大學博碩

## 摘要

生物钟是调控生物代谢和行为的内源计时系统，它广泛存在于自然界的各种生物体内。蓝藻是目前已知的具有生物钟的最简单的生物。其生物钟核心是 *kai* 基因簇及其编码的 KaiA、KaiB、KaiC 蛋白。其中 KaiC 蛋白是蓝藻生物钟机制的核心部分，通过对 *kai* 基因簇转录的调控，可以调节 Kai 蛋白的表达，并且这 3 种蛋白则通过自身的相互作用，能够对 KaiC 的磷酸化状态进行调节，从而产生昼夜节律信息。KaiC 磷酸化状态的变化会影响它与其他蛋白的相互作用，并使许多与生物钟相关的基因表达呈现出昼夜节律性。

为了研究铜绿微囊藻 (*Microcystis aeruginosa*) 的钟基因 KaiC 的功能，寻找与其相互作用的蛋白，本文利用酵母双杂交的方法来钓取未知的相关基因。

在取得 pGBKT7-*kaiC* 后，我们检测了其能够在酵母 AH109 中正常表达，并且不会产生毒性影响酵母 AH109 的生长，且不具自激活性。实验表明，可以将 pGBKT7-*kaiC* 作为酵母 GAL4 双杂交系统的钓饵载体，从铜绿微囊藻基因组文库中钓取与 KaiC 相互作用的蛋白。

利用载体 pGADT7 构建了铜绿微囊藻 *Microcystis aeruginosa* PCC 7820 的染色体 DNA 文库，通过上述酵母双杂交系统的反复筛选和验证，共找到了 11 个不同的与 KaiC 蛋白有相互作用的蛋白，其中 3 个蛋白 C99、C196 及 C10 为铜绿微囊藻的蛋白。根据比对结果，我们对 C99 和 C196 进行了异源表达，并对其与 KaiC 蛋白的相互作用进行了进一步研究。

由于铜绿微囊藻 C99 蛋白的基因序列未知，我们采用 KaiC 蛋白与铜绿微囊藻 PCC 7820 的 KaiC 蛋白具有很高的相似性的集胞藻中的 OmpR 代替 C99 进行研究。将集胞藻 OmpR 基因在大肠杆菌中得到可溶性表达后，通过体外 pull-down 的方法验证了其在体外与 KaiC 蛋白不会发生相互作用，同时酵母双杂交方法验证结果表明集胞藻中的 OmpR 蛋白与 KaiC 蛋白在体内也不会发生相互作用。

另外，对铜绿微囊藻 C196 蛋白进行了在大肠杆菌的异源表达后，通过 Far-western 的方法验证了该蛋白在体外与 KaiC 蛋白有相互作用，进而推断 C196 很可能是与铜绿微囊藻生物钟调控有关的蛋白。

本实验对与铜绿微囊藻生物钟蛋白复合体的核心部分 KaiC 蛋白的相互作用蛋白进行了初步的研究，对于阐明生物钟节律的信号输出途径提供了理论依据，

为铜绿微囊藻生物钟分子机制的研究奠定了基础。

**关键词：**铜绿微囊藻；生物钟蛋白KaiC；酵母双杂交；蛋白质相互作用

厦门大学博硕

## Abstract

Circadian clock is an endogenous timing system for regulating biological metabolism and behavior, which have been observed ubiquitously in various organisms. Cyanobacteria are the simplest organisms exhibiting circadian rhythms which enhance their fitness in a day/night alternating environment. The *kai* gene cluster, which is composed of three genes, *kaiA*, *kaiB* and *kaiC*, has been identified as essential time-keeping component. The protein-protein association among three Kai proteins and other proteins may be a critical process in the generation of circadian rhythms. KaiC protein is the key part in the biochronometer mechanism of cyanobacteria, The phosphorylation state of KaiC affects the interaction between KaiC and other proteins, which makes many gene expressions rhythmicity.

In order to study the function of clock gene KaiC of *Microcystis aeruginosa*, the yeast two-hybrid technique was used to screen the interacting proteins with KaiC.

After *kaiC* was subcloned into bait plasmid pGBKT<sub>7</sub>, the recombinant plasmids pGBKT<sub>7</sub>-*kaiC* were transferred into AH109 and its expression product were assayed. The result indicates that the KaiC protein was not toxic to AH109 and could not activate the reporter gene. This lay a basis for further screening of proteins interacting with KaiC from the genome of *Microcystis aeruginosa*.

To isolate proteins interacting with KaiC from *M. aeruginosa*, the genomic DNA library of *Microcystis aeruginosa* was constructed and then screened by two-hybrid system. The total of 11 positive clones interaction with KaiC were picked out. Then, C99 and C196 proteins were further studied.

C196 protein of *Microcystis aeruginosa* was expressed in *E. coli*. Affinity purification of GST-C196 from cell extracts, and subsequent far-western analysis confirm heterotypic interaction between KaiC and C196 protein in vitro. Thus, we speculated that C196 might be a protein related to the regulation of the *Microcystis aeruginosa* biochronometer.

Because the C99 sequence of *Microcystis aeruginosa* was unknown, C99 from *Synechocystis* sp. PCC 6803 instead of *Microcystis aeruginosa* was used for further

research. The pull-down and the yeast two hybrid technique both show no interaction between C99 protein of *Synechocystis* sp. PCC 6803 and KaiC of *Microcystis aeruginosa* in vitro or in vivo.

**Keywords:** *Microcystis aeruginosa*; clock protein KaiC; yeast two hybrid system; protein interaction

廈門大學博碩

## 前言

### 1 铜绿微囊藻简介和蓝藻生物钟研究进展

#### 1.1 铜绿微囊藻简介

铜绿微囊藻 (*Microcystis aeruginosa*) 是蓝藻门,蓝藻纲,色球藻目,色球藻科,微囊藻属的单细胞藻<sup>[1]</sup>。幼植物体为球形或圆形的实心群体,后长成为网络状的中空囊状体,随后,由于不断扩展,囊状体破裂而形成网状胶群体。群体胶被透明无色。细胞球形或近球形,直径 3~7 $\mu\text{m}$ ,蓝绿色,一般具气囊。多生长于污水中,在春、夏季节生长旺盛,常形成水华。发生水华时,水面常形成蓝绿或黄绿色藻膜。

铜绿微囊藻是中国湖泊、水库及其他水域生态系统发生、形成富营养化危害的主要藻类。铜绿微囊藻产生微囊藻毒素,由于铜绿微囊藻分布广泛,它所产生的微囊藻毒素是最常见的一种藻毒素<sup>[2-5]</sup>。微囊藻毒素 (microcystin) 是一种肝毒素,约有 50 余种异构体,有的为一种多肽类物质,有的为一种环状多肽。分子量 1300~2600Da,也有的分子量为 654 或 19400Da 的。其中毒性最大的是 M-LR。

目前铜绿微囊藻的研究主要集中在以下几方面:一、对铜绿微囊藻水华成因的探讨;二、研究营养物质(如氮、磷)、微量元素(如镍、铁、锌等)和生理环境对铜绿微囊藻生长的影响;三、研究铜绿微囊藻水华的防治(如紫外线辐射、粘土絮凝、化学除藻等);四、对铜绿微囊藻毒素的毒性和作用机理的研究。另外,研究人员还从分子水平上开展对铜绿微囊藻的研究,例如种属鉴定,光合作用的相关基因克隆及分子机制的研究等。不过在有关铜绿微囊藻的生物钟方面的研究却较少。虽然早在 1996 年 Sato M 等人就报道了铜绿微囊藻 *psbA2* 基因的表达具有昼夜节律的现象<sup>[6]</sup>,但在那之后就没有再见到与铜绿微囊藻生物钟相关的研究报道。目前在蓝藻生物钟的研究方面,研究的较为深入的是聚球藻 (*Synechococcus* sp. strain PCC 7942, 蓝藻的模式生物),本实验室根据聚球藻生物钟研究的经验,经过研究发现铜绿微囊藻的光合作用和细胞分裂具有明显的昼夜节律性<sup>[7]</sup>,并且通过染色体步移法从铜绿微囊藻中克隆出了它的生物钟基因 *kaiA*,*kaiB*,*kaiC* (Genbank 登录号为 DQ156152)<sup>[8]</sup>,为了进一步研究 Kai 蛋白的昼夜节律和计时机制,分别制备了 KaiA、KaiB、KaiC 的多克隆抗体<sup>[9]</sup>。

## 1.2 生物钟介绍

生物钟是指一种由于地球的自转和公转产生昼夜更替和季节交换,引起了各种环境影响因子如光、温度、湿度等的周期性变化,大多数生物为适应这种变化,体内生理活动和外在行为也随之发生节律性变化的现象。生物钟是广泛存在于蓝藻及所有真核细胞中的内源计时系统,它对各种代谢和行为进行实时调控<sup>[10-14]</sup>。生物钟基本结构包括三部分:输入途径(input)、中央震荡器(centraloscillator)和信息输出途径(output)。中央震荡器是生物钟的核心,产生昼夜节律信息。输入途径将环境信号如光、温度、化学物质等传给震荡器,使机体内在周期与外界环境变化同步化。输出途径将节律信息放大并传递到下游钟控基因(clock-controlled genes),实现对各种生理活动的调控。

生物钟的节律变化具有三个基本特点:1、在稳定条件下保持近乎24 h的节律变化,也就是说,在没有光/暗、温度或湿度等环境信号的变化时,依然能够表现出内源性的节律;2、某些物理、化学条件(如光/暗和温度信号)能重置生物钟时相;3、生物钟周期长度具有温度补偿性,即在生理温度或营养条件变化范围内,当存在不同温度或营养条件时,能够保持独立运行的节律周期。现有的大量研究表明,生物钟现象普遍存在于生物界中,无论从单细胞的原核生物蓝藻到多细胞的真核生物脉胞霉,或者高等植物拟南芥、昆虫类果蝇、哺乳动物小鼠,它们的各种生命活动包括光合作用、分裂生殖、蛹的羽化、激素分泌等都离不开生物钟的调控<sup>[15,16]</sup>。

## 1.3 蓝藻生物钟研究进展

### 1.3.1 蓝藻生物钟简介

蓝藻是目前已知具有生物钟的最简单生物,它的一些生理活动如光合作用、呼吸作用、固氮活性、氨基酸吸收、细胞分裂和碳水化合物合成都受到生物钟的调节<sup>[15]</sup>。即使在一天内细胞分裂速度超过一次,生理节律也仍然以近昼夜周期运行<sup>[16,17]</sup>。

生物钟的存在对于单细胞原核生物蓝藻而言具有非常特殊的适应意义,与其它单细胞原核生物不同,在蓝藻细胞中呼吸作用、光合作用或者固氮活动(某些固氮蓝藻)以及各种营养物质的新陈代谢等多种生理活动同时进行,如何避免放氧的光合作用与厌氧的固氮活动二者之间的矛盾,如何充分利用外界各种环境因素如光、温度、化学物质的变化来协调自身生理活动等等,所有这些问题都在生

物钟的准确调控下得到了很好的解决<sup>[18-21]</sup>。另外, Ouyang 等人的实验<sup>[14]</sup>以及 Didier 等人构建的模型<sup>[22]</sup>都已证明, 当生物钟周期与环境光暗周期接近时, 藻细胞具有更强的竞争优势。如果考虑到生物钟对于蓝藻生命活动的重要性, 那么在众多蓝藻藻类中都能发现同源生物钟基因也就不足为奇了<sup>[23]</sup>。

蓝藻的生物钟跟脉胞霉、果蝇、小鼠等生物的一样, 主要由 3 环节构成: 输入途径、中央振荡器和信号输出途径。通过输入途径将环境信号(光、温度、化学物质等)传输到中央振荡器, 处于生物钟核心的中央振荡器发出相应的节律变化信号, 然后通过信息输出途径放大后传递给受生物钟调控的相关基因, 最后与其它非钟控基因协作共同反映出具有节律的生理活动<sup>[18,24]</sup>。生物钟的每一环节都是由许多基因和反式作用因子共同完成, 作为生物钟的核心部分: 中央振荡器, 则是由几个关键基因, 也就是通常说的生物钟基因构成的, 生物钟的调控正是通过钟基因表达产物和钟相关基因表达产物间接或直接的相互作用来实现。

虽然蓝藻生物钟具有跟真核生物同样的基础特征, 但蓝藻的生物钟基因和相关蛋白质与真核生物不具同源性<sup>[25]</sup>。对蓝藻昼夜节律的研究有助于从生理上和遗传上阐明生物节律的基本分子机制。

### 1.3.2 蓝藻生物钟基因调控机制

目前蓝藻中已克隆得到许多钟基因和钟相关基因: 聚球藻的钟基因 *kai*<sup>[26]</sup>, 相关基因 *sasA*<sup>[27]</sup>, *pex*<sup>[28]</sup>, *cikA*<sup>[29]</sup>, *rpoD2*, *rpoD3*, *rpoD4*, *sigC*<sup>[30]</sup>, *cpmA*<sup>[31]</sup>, *LdpA*<sup>[32]</sup>, *psbA*<sup>[33]</sup>等, *Anabaena* sp. PCC 7120, *Thermosynechococcus vulcanus*, *Acaryochloris marina*, *Nostoc cycadae*, *Nostoc* sp. PCC 9709 和 *Synechocystis* sp. PCC6803 等的钟基因 *kai*, 以及本实验克隆 *Microcystis aeruginosa* PCC 7820 的钟基因 *kai*。

蓝藻中首先克隆鉴定的生物钟基因是聚球藻的 *kai* 基因<sup>[34]</sup>, *kai* 是一个基因簇, 由 3 个单拷贝基因 *kaiA*, *kaiB*, *kaiC* 成簇排列构成, *kaiA* 单独转录, *kaiB*, *kaiC* 在同一启动子( $P_{kaiBC}$ ) 的控制下共同转录<sup>[26]</sup>。*kaiA*, *kaiB*, *kaiC* 这三个基因是维持聚球藻生理节律所必需的, 突变或缺失其中任何一个基因都会使聚球藻正常的昼夜节律发生改变甚至消失<sup>[35]</sup>。作为生物钟的核心部分, *kai* 基因自身的表达也具有节律性, 它是通过表达产物对自身基因的反馈调节作用来实现近 24 h 的周期性震荡<sup>[36]</sup>。

*kaiA*, *kaiB*, *kaiC* 分别编码三种蛋白质 KaiA, KaiB 和 KaiC, 在这三种生物



钟蛋白，具有N-端和C-端两个结构域，N-端缺乏保守天冬氨酸残基的伪接受域能与输入途径的某种蛋白（目前未知）发生相互作用而感受环境信号并引起自身C-端构象的改变，而C-端构象变化将影响KaiA和KaiC的相互作用，改变KaiC的磷酸化状态，促使KaiC发生磷酸化<sup>[42-47]</sup>。KaiB蛋白则起到与KaiA相反的作用，它能够抑制KaiC的磷酸化。图A是蓝藻生物钟的基本调控模型。

### 1.3.3 Kai 蛋白的分子结构、功能及相互作用

KaiA 蛋白是*kaiBC* 表达的正调控因子，包含约180个氨基酸的N 端和约100个氨基酸的C 端两个结构域，C端氨基酸序列在不同种类蓝藻中高度保守，而N端氨基酸序列则具有多样性。KaiA 的C端呈新型的4螺旋束结构<sup>[48,49]</sup>，能够形成二聚体，具有KaiC 结合位点，与KaiC 结合后刺激KaiC自磷酸化，与KaiB 结合后则促进KaiB减弱KaiC自磷酸化作用。核磁共振研究表明，KaiA 的N 端具有伪接受域，该区域可能是计时输入结构，接受信息后能调控KaiA的C端结构以激活KaiC的自激酶活性。同型二聚体KaiA的结晶结构是一个功能区转换(domain-swapping)结构，一个单体亚基的N 端和另一亚基的C 端可以相互作用<sup>[49]</sup>。

KaiC蛋白全长519个氨基酸，由2个重复的结构域(即1~260 位氨基酸的C I 区和261~519位的C II 区，中间由13 个氨基酸残基连起来，248到260位组成，C I 区和C II 区十分相似，但二者功能并不相同。KaiC 可以结合叉状DNA<sup>[50]</sup>，对基因整体表达有重要调控作用。

KaiC 形成六聚体环状结构，在电子显微镜下观察到六聚体形成的颗粒<sup>[51]</sup>。聚球藻的KaiC 同型六聚体晶体结构是由C I 和C II 平行相叠而成的双圆环结构，各个亚基围成一圈，在中央形成一条沟。中央沟的一端，C I 端开口较宽，而C II 端则由6个精氨酸残基将沟封闭起来，可以控制开和关<sup>[52]</sup>。每个亚基具有2 个ATP 结合位点，结合ATP 或GTP 形成稳定的环状同型六聚体结构。C I 区和C II 区各有一个保守的谷氨酸残基，被认为具有ATP 酶活性。C II 区ATP 结合区域附近存在3 个重要的磷酸化位点T432, S431, T426，这些位点突变使昼夜节律消失<sup>[53, 54]</sup>。但磷酸化位点突变并不影响KaiC 六聚体的形成<sup>[53,54]</sup>。KaiC 蛋白的自磷酸化活性，是和KaiA、KaiB 和SasA 形成大分子复合物所必需的<sup>[53]</sup>，具有昼夜节律性。

KaiC 是形成同型/异型钟蛋白复合物的核心，为KaiA-KiaB-KaiC 大分子复合物的形成提供支架<sup>[51]</sup>。KaiC 单体分子质量(58kDa)大约是KaiB (11kDa) 和

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.

廈門大學博碩