

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学号: 200326093

UDC _____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

南美白对虾 N-乙酰- β -D 氨基葡萄糖苷酶的活力
调控及动力学研究

Studies on activity regulation and kinetics of the
N-Acetyl- β -D-glucosaminidase from Prawn (*Penaeus vannamei*)

龚 敏

指导教师姓名: 陈清西 教授

专 业 名 称: 生物化学与分子生物学

论文提交日期: 2006 年 4 月 15 日

论文答辩时间: 2006 年 5 月 20 日

学位授予日期: 2006 年 月 日

答辩委员会主席: 黄河清

评 阅 人: _____

2006 年 6 月

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人完全了解厦门大学有关保留、使用学位论文的规定。厦门大学有权保留并向国家主管部门或其指定机构送交论文的纸质版和电子版,有权将学位论文用于非赢利目的的少量复制并允许论文进入学校图书馆被查阅,有权将学位论文的内容编入有关数据库进行检索,有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

本学位论文属于

1、保密 (), 在 年解密后适用本授权书。

2、不保密 ()

(请在以上相应括号内打“√”)

作者签名:

日期: 年 月 日

导师签名:

日期: 年 月 日

厦门大学学位论文原创性声明

兹提交的学位论文，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的其他个人或集体的研究成果，均在文中以明确方式标明。本人依法享有和承担由此论文而产生的权利和责任。

声明人（签名）：

年 月 日

目 录

中文摘要	9
英文摘要	10
1 引 言	12
1.1 南美白对虾	12
1.1.1 南美白对虾简介	12
1.1.2 N-乙酰- β -D-氨基葡萄糖苷酶对南美白对虾的意义	13
1.2 N-乙酰- β -D-氨基葡萄糖苷酶的研究概况	13
1.2.1 N-乙酰- β -D-氨基葡萄糖苷酶简介	13
1.2.2 酶的纯化和性质研究	14
1.2.3 酶的分子生物学研究	16
1.2.4 酶的抑制失活研究	17
1.2.5 酶的活性基团研究	17
1.2.6 酶的应用研究	18
1.3 本论文的研究意义及研究内容	19
2 实验材料、仪器与方法	21
2.1 材料与试剂	21
2.2 仪器	22
2.3 方法	22
2.3.1 蛋白质浓度的测定	22
2.3.2 酶活力和比活力的测定	22
2.3.3 酶的分离纯化	23
2.3.4 效应物对酶活力的影响	24
2.3.4.1 金属离子对酶活力的影响	24
2.3.4.2 有机物对酶活力的影响	24
2.3.4.3 效应物对酶的抑制机理判断	25
2.3.5 酶的抑制作用动力学	25

2.3.5.1 锌离子对酶的抑制作用动力学	25
2.3.5.2 汞离子对酶的抑制作用动力学	25
2.3.6 酶的失活作用动力学	25
2.3.6.1 酶在二甲基甲酰胺溶液中的失活动力学	25
2.3.6.2 酶在二甲亚砷溶液中的失活动力学	26
2.3.6.3 酶在脲溶液中的失活动力学	26
2.3.7 效应物对酶的紫外吸收光谱的影响	26
2.3.8 效应物对酶的内源荧光光谱的影响	26
3 实验结果	27
3.1 南美白对虾 NAGase 的分离纯化	27
3.2 金属离子对 NAGase 活力的影响	27
3.2.1 普通金属离子对酶活力的影响	27
3.2.2 重金属离子对酶活力的影响	28
3.2.3 银离子对酶的抑制作用	30
3.2.3.1 银离子对酶活力的影响	30
3.2.3.2 银离子对酶抑制作用类型及抑制速度常数的测定	31
3.3 锌离子对酶的抑制动力学及对酶分子构象的影响	32
3.3.1 锌离子对酶活力影响	32
3.3.2 锌离子对酶抑制作用类型及抑制速度常数的测定	33
3.3.3 锌离子对酶抑制作用的动力学模型	34
3.3.4 锌离子对酶的抑制动力学的微观速度常数测定	37
3.3.5 锌离子对酶荧光光谱的影响	42
3.3.6 锌离子对酶紫外光谱的影响	42
3.4 汞离子对酶催化活性及构象的影响	43
3.4.1 汞离子对酶催化活性的影响	43
3.4.2 汞离子对酶抑制作用的动力学模型建立	45
3.4.3 固定底物浓度下汞离子对酶的抑制动力学	46
3.4.4 汞离子存在下酶催化不同浓度底物水解的动力学	47
3.4.5 汞离子失活作用的微观速度常数测定	49

3.4.6 汞离子作用后酶的荧光光谱变化.....	51
3.4.7 汞离子作用后酶的紫外吸收光谱变化.....	52
3.5 丙酮对酶活力的影响	52
3.5.1 不同 pH 下丙酮对酶活力的影响.....	52
3.5.2 丙酮对酶的激活与抑制机理.....	54
3.5.3 丙酮对酶的失活作用类型.....	55
3.5.4 丙酮作用后酶荧光发射光谱的变化.....	56
3.5.5 丙酮作用后酶荧光激发光谱的变化.....	57
3.6 酶在二甲基甲酰胺溶液中的失活动力学	58
3.6.1 二甲基甲酰胺对酶活力的影响.....	58
3.6.2 酶在二甲基甲酰胺溶液中的失活类型.....	60
3.6.3 二甲基甲酰胺对酶失活作用的动力学模型.....	60
3.6.4 二甲基甲酰胺对酶的抑制动力学的微观速度常数测定.....	63
3.7 酶在二甲亚砷溶液中的失活动力学	67
3.7.1 二甲亚砷对酶活力的影响.....	67
3.7.2 酶在二甲亚砷溶液中的失活类型.....	68
3.7.3 酶在二甲亚砷溶液中的失活动力学.....	69
3.7.4 二甲亚砷对酶的抑制动力学的微观速度常数测定.....	70
3.7.5 二甲亚砷作用后酶的荧光光谱变化.....	74
3.8 酶在脲变性作用下的失活与去折叠	75
3.8.1 酶经不同浓度脲变性后活力与构象变化的比较.....	75
3.8.1.1 酶经不同浓度脲变性的活力变化.....	75
3.8.1.2 酶经不同浓度脲变性的构象变化.....	75
3.8.1.3 在脲变性后酶的活力变化与构象变化的比较.....	76
3.8.2 酶在脲溶液中的失活作用动力学.....	77
3.8.2.1 酶在脲溶液中的失活机理判断.....	77
3.8.2.2 酶在脲溶液中的失活动力学模型的建立.....	77
3.8.2.3 酶在脲溶液中的失活动力学常数求法.....	78
3.8.2.4 酶在脲溶液中的失活动力学的微观速度常数测定.....	79

4 讨 论	83
4.1 南美白对虾 NAGase 的分离纯化	83
4.2 金属离子对 NAGase 活力的影响	83
4.3 锌离子对酶的抑制动力学及对酶分子构象的影响	84
4.4 汞离子对酶催化活性及构象的影响	85
4.5 丙酮对酶活力的影响	86
4.6 酶在 DMF 溶液及 DMSO 溶液中的失活动力学	87
4.7 酶在脲变性作用下的失活与去折叠研究	88
结 论	90
参考文献	92
已发表的学术论文	100
致 谢	101

Contents

Chinese Abstract	9
English Abstract	10
1 Introduction	12
1.1 <i>Penaeus vannamei</i>	12
1.1.1 Brief introduction of <i>Penaeus vannamei</i>	12
1.1.2 The significance of NAGase for <i>Penaeus vannamei</i>	13
1.2 Review of Research on N-Acetyl-β-D- glucosaminidase	13
1.2.1 Brief introduction of N-Acetyl-β-D- glucosaminidase	13
1.2.2 The researches of enzyme purification and characterization	14
1.2.3 The researches of enzyme molecule biology	16
1.2.4 The researches of enzyme inhibition and inactivation	17
1.2.5 The researches of enzyme functional groups	17
1.2.6 The researches of enzyme applications	18
1.3 Significance and Contents of the Research	19
2 Materials and Methods	21
2.1 Materials and Reagents	21
2.2 Instruments	22
2.3 Methods	22
2.3.1 Assay of Protein Concentration	22
2.3.2 Assay of the NAGase Activity	22
2.3.3 Purification of the NAGase	23
2.3.4 Effect of effector on the activity of NAGase	24
2.3.4.1 Effect of metal ions on the activity of NAGase	24
2.3.4.2 Effect of organic matter on the activity of NAGase	24
2.3.4.3 Determination of the inhibitory mechanism of effector	25
2.3.5 Assay of the Inhibition kinetic	25
2.3.5.1 Kinetic study of inhibition of NAGase by Zn ²⁺	25

2.3.5.2 Kinetic study of inhibition of NAGase by Hg^{2+}	25
2.3.6 Assay of the Inactivation kinetic	25
2.3.6.1 Kinetic study of inactivation of NAGase by DMF	25
2.3.6.2 Kinetic study of inactivation of NAGase by DMSO	26
2.3.6.3 Kinetic study of inactivation of NAGase by Urea	26
2.3.7 Effects of some effectors on the UV-absorption Spectra	26
2.3.8 Effects of some effectors on the Intrinsic Fluorescence Spectra	26
3 Results	27
3.1 Purification of the NAGase	27
3.2 Effects of Metal Ions on the NAGase	27
3.2.1 Effects of common Metal ions on the activity of NAGase	27
3.2.2 Effects of heavy Metal ions on the activity of NAGase	28
3.2.3 The inhibitor of Ag^+ on NAGase	30
3.2.3.1 Effects of Ag^+ on the activity of NAGase	30
3.2.3.2 Inhibitory Type and Inhibition Constants of Ag^+	31
3.3 The inhibitor kinetic and conformational effect of Zn^{2+} on NAGase	32
3.3.1 Effects of Zn^{2+} on the activity of NAGase	32
3.3.2 Inhibitory Type and Inhibition Constants of Zn^{2+}	33
3.3.3 Inhibition Kinetics Model of Zn^{2+}	34
3.3.4 Microscopic Inhibition Rate Constants of Zn^{2+}	37
3.3.5 Fluorescence Spectra of NAGase in the Zn^{2+} Solution	42
3.3.6 UV-absorption Spectra of NAGase in the Zn^{2+} Solution	42
3.4 Effect of Hg^{2+} on the Activity and Conformation of NAGase	43
3.4.1 Effect of Hg^{2+} on the activity of NAGase	43
3.4.2 Inhibition Kinetics Model of Hg^{2+}	45
3.4.3 Kinetics of the substrate reaction in the different concentrations of Hg^{2+}	46
3.4.4 Kinetics of the reaction at different substrate concentrations	47
3.4.5 Determination of microscopic rate constants of Hg^{2+}	49
3.4.6 Fluorescence Spectra of NAGase in the Hg^{2+} Solution	51

3.4.7 UV-absorption Spectra of NAGase in the Hg ²⁺ Solution.....	52
3.5 Effect of acetone on the Activity of NAGase	52
3.5.1 Effect of acetone on the activity of NAGase at different pH.....	52
3.5.2 The activation and inactivation mechanism of acetone on NAGase	54
3.5.3 Inactivate Type of acetone on NAGase.....	55
3.5.4 Fluorescence emission Spectra of NAGase in the acetone solution	56
3.5.5 Fluorescence excitation Spectra of NAGase in the acetone solution.....	57
3.6 Inactivation Kinetics of NAGase in DMF solution.....	58
3.6.1 Effect of DMF on the activity NAGase	58
3.6.2 Inactivation type of DMF on NAGase.....	60
3.6.3 Inactivation Kinetics Model of DMF.....	60
3.6.4 Microscopic Inactivation Rate Constants of DMF	63
3.7 Inactivation Kinetics of NAGase in DMSO solution	67
3.7.1 Effect of DMSO on the activity NAGase	67
3.7.2 Inactivation type of DMSO on NAGase.....	68
3.7.3 Inactivation Kinetics Model of DMSO.....	69
3.7.4 Microscopic Inactivation Rate Constants of DMSO	70
3.7.5 Fluorescence Spectra of NAGase in the DMSO solution.....	74
3.8 Inactivation and Unfolding of NAGase in Urea Solution.....	75
3.8.1 Comparison of Changes of NAGase Activity and Conformation.....	75
3.8.1.1 Changes of NAGase Activity.....	75
3.8.1.2 Changes of NAGase Conformation	75
3.8.1.3 Comparison of Changes of Activity and Conformation	76
3.8.2 Inactivation Kinetics of Urea	77
3.8.2.1 Inactivation Mechanism of Urea.....	77
3.8.2.2 Inactivation Kinetics Model of Urea.....	77
3.8.2.3 Method of Determination of Inactivation Rate Constants of Urea.....	78
3.8.2.4 Determination of Inactivation Rate Constants of Urea.....	79
4 Discussion.....	83

4.1 Purification of NAGase	83
4.2 Effects of Metal ions on the NAGase	83
4.3 Effect of Zn²⁺ on the Activity and Conformation of NAGase	84
4.4 Effect of Hg²⁺ on the Activity and Conformation of NAGase	85
4.5 Effects of Acetone on NAGase	86
4.6 Inactivation Kinetics of NAGase in DMF and DMSO solution	87
4.7 Inactivation and Unfolding of NAGase in Urea Solution	88
Conclusions	90
References	92
Papers	100
Acknowledgements	101

摘要

N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酶(N-Acetyl-β-D-glucosaminidase, 简称 NAGase, EC. 3.2.1.52)在南美白对虾(*Penaeus vannamei*)的蜕壳发育和营养代谢中起重要作用, 且具有多种应用价值。

本文以南美白对虾内脏为提酶材料, 获得电泳单一纯的 NAGase 酶制剂, 本文以此酶制剂为对象展开研究。

常见金属离子 Li^+ 、 Na^+ 、 K^+ 对酶活力没有影响, Co^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Ba^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Al^{3+} 、 Pb^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Ag^+ 、 Hg^{2+} , 有不同程度的抑制。 Ag^+ 离子对酶表现为反竞争性抑制 (K_{IS} 为 2.39 mmol/L), Zn^{2+} 离子对酶表现为非竞争性抑制 (K_{I} 为 11.95 mmol/L), 并研究了 Zn^{2+} 离子对酶的抑制动力学。

Hg^{2+} 离子对酶为不可逆抑制作用, IC_{50} 为 0.16 mmol/L。通过抑制动力学研究, 可求出微观速率常数 k_{+0} 和 k'_{+0} 。酶经 Hg^{2+} 离子作用后的荧光强度下降, 酶在 276 nm 处的紫外特征吸收峰逐渐下降至几乎消失。

丙酮在 pH4.8~pH5.0 范围内表现为抑制作用, pH5.2~pH8.0 范围内为先激活后抑制, 其中在 pH6.2 和 pH6.8 处达到激活的最大值。酶经丙酮作用后的荧光发射强度迅速下降, 荧光激发峰在强度下降的同时还伴随着最大激发波长的红移 (由 280 nm 红移到 290 nm)。

DMF 和 DMSO 使酶失活的 IC_{50} 分别为 1.35 mol/L 和 1.20 mol/L。二者对酶的失活机理都为可逆, 失活类型表现为混合型类型。研究了 DMF 和 DMSO 对酶的失活作用动力学, 测定微观速度常数。游离酶的失活速度常数明显的大于 ES 结合酶的失活速度常数, 说明底物对酶的失活有保护作用。酶经 DMSO 作用后的荧光强度随着 DMSO 浓度增大逐渐上升, 但未出现明显红移。

以荧光发射光谱研究酶经不同浓度脲变性后的分子构象变化。比较酶经脲变性后的活力与构象变化的关系, 表明酶在脲溶液中的失活先于其去折叠的过程, 这种活力丧失快于酶分子整体构象变化的现象表明酶活性中心处于对变性剂较为敏感的区域。

关键词: 南美白对虾N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酶; 酶活调控; 动力学

Abstract

N-Acetyl-β-D-glucosaminidase (NAGase, EC3.2.1.52) plays an important role in molting and nutrition assimilation of *Penaeus vannamei*, and uses in other applications.

The NAGase was purified from viscera of Prawn (*Penaeus vannamei*) and determined to be homogeneous by polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and SDS-PAGE. This purified enzyme will be used in the following studies.

The effects of metal ions on the enzyme were studied. Li^+ , Na^+ and K^+ had no influence on enzyme activity. Co^{2+} , Cd^{2+} , Ba^{2+} , Zn^{2+} , Al^{3+} , Pb^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} , Ag^+ , Hg^{2+} showed various degrees of inhibitory effects on the enzyme. Some inhibition types and inhibition constants had been determined. The results showed that the Ag^+ was an uncompetitive inhibitor with K_{IS} of 2.39 mmol/L, and the Zn^{2+} was a noncompetitive inhibitor with K_I of 11.95 mmol/L. The kinetics of inhibition of the enzyme at different concentration of Zn^{2+} was also study.

The effect of Hg^{2+} on the enzyme activity is irreversible. The inhibitor concentration leading to 50% (IC_{50}) activity lost was estimated to be 0.16 mmol/L. The microscopic rate constants for the reaction of Hg^{2+} with free enzyme and the enzyme-substrate complex are determined. Comparison of the microscopic rate constants shows that the presence of substrate has a certain protective effect against inactivation by Hg^{2+} . The fluorescence intensity of the enzyme gradually decreased with increasing Hg^{2+} concentrations, and the ultraviolet spectrum decreased to almost disappear.

The acetone inhibited the enzyme at the pH ranged form 4.8 to 5.0. When the pH ranging form 5.2 to 8.0, the acetone activated the enzyme at low concentration and inhibited the enzyme at high concentration. The fluorescence emission intensity of the enzyme gradually decreased with increasing acetone concentrations. The fluorescence excitation intensity of the enzyme also gradually decreased with increasing acetone concentrations, and at the same time the fluorescence excitation peak (at 280 nm) of the enzyme was red-shifted to 290 nm.

N,N-Dimethylformamide (DMF) and dimethylsulfoxide (DMSO) both can obviously inactive the enzyme activity. The inactivation mechanisms of DMF and DMSO were reversible. The inactivator concentrations leading to 50% (IC_{50}) activity

lost were estimated to be 1.35 mol/L and 1.20 mol/L, respectively. Both DMF and DMSO belong to be mixed type inhibitor. The inactivations of the enzyme by DMF and DMSO had been studied using the kinetic method of the substrate reaction during inactivation of enzyme activity previously described by Tsou. The inactivation of the enzyme was a slow, reversible reaction. The microscopic rate constants for the reaction of these inactivators with free enzyme and the enzyme-substrate complex were determined. Comparison of these rate constants indicates that the presence of substrate offers marked protection of the enzyme against inactivation by these inactivators. The fluorescence intensity of the enzyme gradually increased with increasing DMSO concentrations without any fluorescence emission peak red-shifted.

The conformational changes of the enzyme in presence of urea at different concentrations were studied by means of measuring the fluorescence emission spectra. The fluorescence intensity of the enzyme gradually increased with increasing urea concentrations. Inactivation and unfolding of the *Penaeus vannamei* NAGase during denaturation in urea at different concentrations had been compared. The results indicated that the active site of the enzyme is also situated in a limited region of the enzyme molecule that is more fragile to denaturants than the enzyme as a whole.

Key words: *Penaeus vannamei* N-Acetyl-β-D-glucosaminidase; Enzyme Activity regulation; Kinetics

1 引言

1.1 南美白对虾

1.1.1 南美白对虾简介

南美白对虾 (*Penaeus vannamei*)，又称白肢虾、白对虾和凡纳对虾，分类学上隶属节肢动物门、甲壳纲、十足目、游泳亚目、对虾科、对虾属，原产于南美太平洋沿岸水域，以厄瓜多尔沿岸的分布最为集中，是集约化高产养殖的优良品种，占据全球虾类养殖产量的很大一部分。

其外形与中国对虾、墨吉对虾相似，成体最长可达 23 cm，甲壳较薄，正常体色为浅青灰色，全身不具斑纹，步足常呈白垩状，体长而侧高，略呈梭形（图 1）。

南美白对虾繁殖周期长，周年可进行苗种生产；营养要求低，饵料中蛋白质的含量占 20 %-25 %时，即可满足其正常的生长需求；适应性和抗病能力强，盐度适应范围 0~45‰、温度适应范围 11~36 °C、pH 适应范围 7.3~8.6、溶氧阈值为 1.2 mg/L；生长迅速、产量高、规格整齐，可以进行高密度养殖，成活率一般在 70%以上；离水存活时间长，肉质鲜美，既可活虾销售，又可加工出口，加工出肉率达 65 %以上。除此之外，南美白对虾不仅适合沿海地区养殖，也适合内陆地区淡水养殖^[1]。



图 1 南美白对虾外观

Fig. 1 *Penaeus vannamei*

1988 年，南美白对虾 (*Penaeus vannamei*) 由中国科学院海洋研究所张伟权教授引进我国，1992 年全人工繁殖获得成功，1994 年人工育苗和批量生产获得成功，1998 年起开始规模养殖，1999 年起全国各地开始试验养殖。截至 2005 年，南美白对虾的养殖在全国遍地开花，不仅沿海地区、中部的江西、西南的重庆、甚至新疆地区都试养成功，在使各地人们尝到鲜活、味美虾品的同时，

还给当地的水产养殖带来巨大的经济效益和新的经济增长点。

1.1.2 N-乙酰- β -D-氨基葡萄糖苷酶对南美白对虾的意义

甲壳类动物的成长与蜕壳密切相关,南美白对虾也不例外,虾类的生长速度与两大因素有关,一是蜕壳频率,即每次蜕壳的间隔时间,二是成长增殖率,即每次蜕完壳后到下次蜕壳前所能增加的体重。每当成长至一定的阶段后,外壳老化,新壳由内部产生,并在新旧两壳之间出现裂缝,由外表观之,有时状似片关灰白色斑块。时间一到,由身体肌肉强力一弹,由头胸甲与身体间的裂缝往后弹出,挣脱而出,健康的虾只须 3-5 分钟即完成此动作。刚脱去旧壳的虾体虚弱无力,但色泽鲜艳,刚蜕壳的虾缓慢浮游于水面,或侧躺于池底,1-3 克的幼虾,需要数小时的时间,新壳才会硬实。而大虾则可能需要 1-2 天的时间,新壳会变硬。对虾每一次蜕壳都是对生长的一大考验^[2]。

N-乙酰- β -D-氨基葡萄糖苷酶对于南美白对虾的重要生理功能之一就是协助其顺利完成孵化和生理周期性蜕壳^[3],此外内脏中的 N-乙酰- β -D-氨基葡萄糖苷酶还帮助南美白对虾消化食物获取营养。虾蟹外壳主要成分为矿化的几丁质蛋白聚糖,几丁质含量大约在 20% 至 80% 之间。新壳的几丁质来源于原先食物消化积累以及旧壳部分几丁质的降解和再利用。研究发现虾表皮与内脏消化道都存在 N-乙酰- β -D-氨基葡萄糖苷酶,其中表皮 N-乙酰- β -D-氨基葡萄糖苷酶是分泌型糖蛋白^[4]。甲壳动物蜕壳前,体液中蜕壳激素浓度升高,表皮几丁质酶表达量随之明显增加。旧壳内层和中层的部分蛋白质与几丁质被新表皮分泌的蛋白酶和几丁质酶包括 N-乙酰- β -D-氨基葡萄糖苷酶降解和重吸收^[5]。内脏主要的 N-乙酰- β -D-氨基葡萄糖苷酶可能位于胞质内,一些研究表明虾在蜕壳前后内脏 N-乙酰- β -D-氨基葡萄糖苷酶浓度并未随蜕壳激素的分泌而发生明显改变^[6,7,8],但也有实验表明蟹的内脏 N-乙酰- β -D-氨基葡萄糖苷酶活力在蜕壳前期最高是因为受蜕壳激素的影响^[9],说明该酶很可能主要执行食物消化功能,但同时兼具协助消化道完成蜕皮的功能^[10,11]。

1.2 N-乙酰- β -D-氨基葡萄糖苷酶的研究概况

1.2.1 N-乙酰- β -D-氨基葡萄糖苷酶简介

N-乙酰- β -D-氨基葡萄糖苷酶 (N-Acetyl- β -D-glucosaminidase 或

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