

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学号: 200326084

UDC _____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

重金属诱导下海兔口腔神经节差异蛋白质
组的研究

Differential Proteome of Buccal Ganglion in *Aplysia* Induced by
Heavy Metal

陈东仕

指导教师姓名: 黄河清

专 业 名 称: 生物化学与分子生物学

论文提交日期: 2006 年 7 月 日

论文答辩时间: 2006 年 8 月 日

学位授予日期: 2006 年 月 日

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2006 年 07 月

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

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使用本规定。

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:

日前: 年 月 日

导师签名:

日前: 年 月 日

中文摘要

海兔(*Aplysia*)归属于腹足纲软体动物,它是开展分子神经生物学研究的经典模式之一。相对而言,海兔神经系统不仅简单且细胞分子尺寸大,而且适合于采用常规细胞生物学技术进行形态学与细胞生物学研究。近十几年来,在神经分子生物学研究领域中所获得部分突破性研究成果均取材于海兔或其它软体动物的中枢神经系统 (central nervous system, CNS)。深入开展海兔 CNS 功能蛋白质和神经多肽 (neuropeptide, NP) 结构与功能的研究可能有助于理解和阐明人及高等动物神经系统的活动规律和调控机制;例如:记忆形成、神经性生理调控和神经系统疾病起因等。

本论文选用蓝斑背肛海兔 (*Notarcus leachii cirrosus* Stimpson, NLCS) 的口腔神经节 (buccal ganglion, BG) 为研究对象。实验前,将 NLCS 饲养于无重金属污染源环境中,供实验所需。采用常规解剖技术分离 NLCS 的 BG,并按 BG 形态有效分割为左 BG 和右 BG,简称为 BGL 和 BGR,供比较蛋白质组学研究。选用双向凝胶电泳技术优化分离 BGL 和 BGR 蛋白质组,比较两者差异蛋白质组,并选用蛋白质组学及相关分析技术对这些差异蛋白质组进行逐一鉴定。实验结果表明,BGL 和 BGR 之间不仅含有与细胞结构有关的差异蛋白质,而且还表现出功能酶和蛋白质的差异性。经相关数据库检索分析后,发现这些差异蛋白质组主要由活性多肽的前体蛋白或降解后的大片段多肽等组成,对维持 BG 的生理功能起到重要的作用。

人工配置镉盐和铅盐,构成有毒重金属污染源。通过养殖 NLCS 途径,诱导 NLCS 的 BG 细胞表达受污染前后的差异蛋白质组;通过双向凝胶电泳技术分离和筛选由镉盐和铅盐污染源分别诱导前后 BG 的差异蛋白质组,并选定为指示蛋白质组,为监测流动水体污染程度和科学地评价污染物对海洋生物所产生的危害性提供科学依据。选择差异蛋白质组,并采用肽指纹图谱技术和数据库检索方法初步鉴定这些差异蛋白质组的种类与功能。检索结果发现,BG 经镉盐污染后,表达差异的蛋白质有下调的肌球蛋白、钙结合蛋白和上调的热休克蛋白、硫氧还蛋白;而经铅盐污染后,表达差异的蛋白有下调的磷酸二酯酶和转氨酶 I。通过比对分析后,作者认为这些差异蛋白质组可能与 BG 细胞抗镉、铅毒性有关,并阐明镉盐、铅盐的毒性和 BG 细胞抗毒性机制。更值得一提的是这些差异蛋白组可作为

海生动物受流动海水中镉盐、铅盐污染的标志蛋白质组，适合于监测流动海水中受镉盐、铅盐污染程度和危害性，所建立的分析技术也适合于开展环境蛋白质组学和环境毒理学系列研究，研究意义重大。

关键词：海兔；口腔神经节；蛋白质组；重金属；污染监测

厦门大学博硕士论文摘要库

Abstract

Aplysia is a kind of mollusk animal belonging to gastropod class. It is also one of the most important model creatures for molecular neuroscience research. The central nerve system (CNS) of *Aplysia* is relatively simple, and the size of its cell is relatively large, making it ideal for carrying out cytological and biochemical investigations. In recent 10 years, many outstanding achievements in neurobiology have been obtained using *Aplysia* and other mollusk animals as research material. The structure and function of proteins and peptides in *Aplysia* CNS were studied further, which in resulted that living behavior and regulation mechanism of the CNS in higher animals including human were well understood and elucidated, such as formation of long memory, neuronal modulation and the pathology of CNS diseases.

The buccal ganglion (BG) of *Notarcus leachii cirrosus* Stimpson (NLCS) was chosen as the experiment materials. Under the non-pollted environment, NLCS were cultured for several days before used. By adopting ordinary dissecting technique, BG in NLCS was separated into two parts, named BGL and BGR. Two dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2DE-PAGE) technique was selected to separate the proteome both BGL and BGR. In addition, differential proteins between BGL and BGR were compared and identified by the proteomic techniques. The experimental results indicated that both BGL and BGR not only had differential proteins being related to the cell structure, but also showed different types among the enzyme and other functional proteins. Based on the analogy of database, it was found that these diserential proteins were almost precursor proteins or large segments of active peptides, which played an important role in maintaining the physiological function of BG.

The poisonous contamination source with heavy metal salts were prepared by artificial approaches for culturing NLCS, indicating that this culturing approach can induce the differential proteins in the BG cell. These differential proteins separated with 2D-PAGE availably were identified as biomarkers for supplying scientific proofs in monitoring the contamination level and evaluating crisis in the flowing seawater.

Using the differential analytical techniques, the structure and function of these differential proteome have been identified by peptides finger printing (PMF) and database search.

With the inducement of cadmium, the research results indicated that these differential proteins in BG cell were found to have down-regulated proteins such as ropomyosin and 16 kDa calcium-binding, and have the up-regulated proteins such as heat shock protein and thioredoxin. Moreover, with the inducement of lead, the differential proteins such as phosphodiesterase and aminotransferase I were still found to be down-regulated proteins.

It was considered that these differential proteins were likely related to the BG cells' resisting capacity to cadmium and lead, and helped to elucidate the mechanism of the cadmium and lead's toxicity. Moreover, these proteins were suggested to be effective biomarkers for monitoring the contamination level as an early alarm signal. Analytical technique of proteome described here is suit for monitoring the contamination level in the flowing water continuously and for studying the pollution pathway and toxicology, which shows highly significance and worth for research.

Keywords: *aplysia*; buccal ganglion; proteomics; heavy metal; contamination monitor.

第一章 前言	1
一、海兔的研究进展	1
二、BG 蛋白质与多肽组成与分布概况	4
三、蛋白质组学分析及研究进展	5
3.1 双向凝胶电泳 (2DE) 分离与分析技术.....	错误! 未定义书签。
3.2 生物质谱分析技术.....	错误! 未定义书签。
3.3 肽与蛋白质质谱分析.....	错误! 未定义书签。
四、蛋白质组学分析及研究进展	8
4.1 神经结构的功能蛋白质组学.....	错误! 未定义书签。
4.2 建立神经系统功能蛋白质组模式.....	错误! 未定义书签。
4.3 神经系统疾病的功能蛋白质组学.....	错误! 未定义书签。
4.4 神经网络蛋白质组学.....	错误! 未定义书签。
五、海兔 BG 功能蛋白质研究进展	错误! 未定义书签。
六、重金属对 CNS 的影响	错误! 未定义书签。
6.1 重金属污染概述	错误! 未定义书签。
6.2 重金属毒性的机理.....	错误! 未定义书签。
6.3 镉对 CNS 的毒性与机理.....	错误! 未定义书签。
6.4 铅对 CNS 的毒性与机理.....	错误! 未定义书签。
6.5 重金属污染的监测与生物标志物.....	错误! 未定义书签。
七、本论文的主要研究内容和意义	错误! 未定义书签。
第二章 材料和方法	错误! 未定义书签。
一、材料	错误! 未定义书签。
二、主要仪器设备	错误! 未定义书签。
三、主要试剂	错误! 未定义书签。
四、试剂的配制	错误! 未定义书签。
4.1 样品裂解液.....	错误! 未定义书签。
4.2 水相提取液.....	错误! 未定义书签。
4.3 第一向柱状等电聚焦电泳配方.....	错误! 未定义书签。
4.4 第二向 SDS-PAGE 配方.....	错误! 未定义书签。
4.5 等电聚焦电泳缓冲液.....	错误! 未定义书签。
4.6 平衡液.....	错误! 未定义书签。
4.7 胶内酶解试剂.....	错误! 未定义书签。
4.8 银染试剂.....	错误! 未定义书签。
4.9 质谱基质.....	错误! 未定义书签。

五、实验方法	错误! 未定义书签。
5.1 样品的制备.....	错误! 未定义书签。
5.2 蛋白含量的测定.....	错误! 未定义书签。
5.3 第一向采用柱状等电聚焦法的双向电泳	错误! 未定义书签。
5.4 第二向 SDS-PAGE 电泳.....	错误! 未定义书签。
5.5 银染色法	错误! 未定义书签。
5.6 银染后的肽质量指纹图谱分析.....	错误! 未定义书签。
5.7 肽质量指纹图谱的数据库检索.....	错误! 未定义书签。
5.8 组织切片.....	错误! 未定义书签。
5.9 染色.....	错误! 未定义书签。
5.10 显微镜观察.....	错误! 未定义书签。
第三章 结果和讨论	错误! 未定义书签。
一、优化双向凝胶电泳分离 BG 蛋白质组	错误! 未定义书签。
1.1 样品制备.....	错误! 未定义书签。
1.2 优化上样量.....	错误! 未定义书签。
1.3 两性电解质的选择.....	错误! 未定义书签。
二、蛋白点的肽指纹鉴定	错误! 未定义书签。
三、BGR 和 BGL 之间的差异蛋白质组	错误! 未定义书签。
四、在重金属诱导下, BGL 与 BGR 表达的差异蛋白质组	错误! 未定义书签。
4.1 在镉盐环境中, BGL 和 BGR 表达的差异蛋白质	错误! 未定义书签。
4.2 在铅盐环境中, BGL 与 BGR 表达的差异蛋白质	错误! 未定义书签。
第四章 小结	错误! 未定义书签。
附件	62
参考文献	67
致谢	82
缩略语表	83
发表论文一览表	85

CONTENTS

Chapter 1 Foreword	1
1. Progress of study in Aplysia	10
2. Composition and distribution of proteins and peptides in BG	4
3. Generation and progress of proteomics	5
3.1 Technology of 2DE.....	6
3.2 Technology of biological mass spectrum.....	6
3.3 Analysis of bioinformation	7
4. Application of proteomics in neuroscience	8
4.1 Functional proteomics of neuron structure	8
4.2 Establishment of Functional proteomics in nerve system.....	8
4.3 Functional proteomics of nerve disease.....	9
4.4 Neuron net and functional proteomics	9
5. Signification and status of study in protein of BG in aplysia	10
6. Influence of heavy metal to BG	11
6.1 Summarize of pollution caused by heavy metal	11
6.2 Mechanism of heavy metal's toxicity	12
6.3 Mechanism and toxicity of cadmium to CNS.....	13
6.4 Mechanism and toxicity of lead to CNS	14
6.5 Inspection of pollution caused by heavy metal and biomarkers	16
7. Content and sense of this paper	20
Chapter Materials and Methods	21
1. Materials	21
2. Main equipment	21
3. Main reagent	21
4. Prescription of reagent	22
4.1 Lysis of sample	22
4.2 Distilled liquid	22
4.3 Prescription of IEF gel.....	22
4.4 Prescription of SDS-PAGE gel	22
4.5 Buffer of IEF.....	23
4.6 Equilibration solution.....	23
4.7 Reagents of enzyme digestion in gel.....	23
4.8 Reagents of silver stain	24
4.9 Matrix.....	24
5. Methods	24

5.1 Preparation of sample	24
5.2 Mensuration of protein concentration.....	24
5.3 IEF electrophoresis	25
5.4 SDS-PAGE.....	25
5.5 Silver stain	25
5.6 PMF analysis.....	25
5.7 Database searching of PMF	27
5.8 Slice of tissue	27
5.9 Dyeing.....	28
5.10 Observation under microscope	29
Chapter 3 Results and Discussion	30
1. Optimizing 2DE of BG proteome	30
1.1 Preparation of sample	30
1.2 Optimization of sample's quantity	31
1.3 Selection of ampholyte	31
2. Identification of protein spots by PMF	32
3. Differential proteome of BGL and BGR	38
4. Differential proteome of BGL and BGR induced by heavy metal	41
4.1 Differential proteome of BGL and BGR after induced by cadmium.....	43
4.2 Differential proteome of BGL and BGR after induced by lead.....	54
Chapter 4 Conclusion	61
Attachments	62
References	67
Acknowledgement	82
Table of brief words	83
Table of papers	85

第一章 前言

一、海兔的研究进展

海兔属于软体动物门 (*Molluse*) 腹足纲 (*Gastropoda*) 后鳃亚纲 (*Opisthobranchia*) 海兔科 (*Aplysiidae*)。广泛分布于北纬 40°~南纬 40°的世界暖海海域, 生活环境的盐度以 30‰左右为宜, 水温要求在 16~21℃。海兔的运动能力较弱, 喜栖息流速缓慢或是风浪小的海区, 营底栖生活, 在繁殖季节常成群栖息在海滩上。海兔体外无皮毛, 与常见的腹足类动物不同; 没有石灰质的外壳, 只有一层薄而半透明的角质膜覆盖着身体。它的体呈琵琶形, 前部为细长的头颈部, 下接卵圆的胴体, 腹面是平坦广宽的足, 运动时身体可变形。头上长有一前一后的二对触角, 型貌类似兔子耳朵。海兔系杂食性动物, 以底栖矽藻和沉积在海滩上的有机质、绿藻和底栖桡足类等为食。海兔属于雌雄同体类动物, 既有雌雄性生殖器官。海兔在我国福建、广东、山东, 尤其是西沙群岛、海南、南澳、厦门等地海域均有分布。

早在公元前一世纪, 人们就认识了海兔并对其有过描述。当时, 人们普遍认为海兔属于剧毒性动物, 甚至以为用眼看它也会致命。19 世纪末 20 世纪初, 欧洲的海兔由于体型大, 并容易获得, 因而成为生理学实验的常用模型之一。在 1941 年, Arvanitaki 夫人了解了海兔神经节内的大神经细胞特性, 指出它对开展神经生物学研究产生重要的作用, 并首次将海兔神经节应用于电生理学研究, 开创新的电生理实验。采用微电极直接插进单个大神经元内, 即可记录海兔的动作行为, 以及兴奋与突触信号的关系^[1]。海兔中枢神经系统的某些神经元特征可依据它们的物理特征 (如: 大小、颜色、位置) 和电生理特征进行区别, 这一现象为后来科学家们选用海兔中枢神经系统作为研究经典模型提供科学依据。

在诸多无脊椎动物种群中, 许多无脊椎动物均适合于某些特殊科学研究需求, 神经科学家们现已利用这些特性获得卓有成效的研究成果。例如: 枪乌贼巨大神经纤维或轴突已成为了解活神经元细胞活动规律的重要实验标本^[2]。海兔生命力很强, 比较容易饲养; 实验室内, 它能从受精卵长大到成年动物。海兔成年动物个体很大, 有利于开展多种类型的生理生化研究。海兔具有中等复杂和有趣的行为, 主要表现出学习动机类型; 其中最重要的一个特点是它能够被单独鉴别出来的大神经元, 部分神经元细胞可达 1 mm, 呈鲜橙色或无色透明, 易在显微

镜下被辨认。另外，神经元的突触区和胞体在电学性质上很类似，因而从胞体中所获得电活动现象将准确地反应出总的突触传入结果^[3,4]。

海兔的 CNS 主要由口腔神经节 (Buccal Ganglion, BG)、大脑神经节 (Cerebral Ganglion, CG)、胸膜与足部神经节 (Pleural/Pedal Ganglion, PLG/PDG)、腹部神经节 (Abdominal Ganglion, AG) 和神经元连索等部分组成。美国加州海兔 (*Aplysia California*, AC) 和杂斑海兔 (*Aplysia juliana* Quoy & Gaimard, AJQG) 的中枢神经系统均由 BG、CG、PLG/PDG 和 AG 组成^[5]。图 1.1 是蓝斑背肛海兔 (*Notarcus leachii cirrosus* Stimpson, NLCS) 中枢神经系统示意图。它与 AC 或 AJQG 相比之下，缺少 AG。图 1.2 是 AC 中枢神经系统示意图，粗估每个神经节内约有 2000 个神经细胞，它不同于节螯虾的 CNS (100 个神经元组成) 和其他复杂神经系统的脊椎动物。但海兔 CNS 有可能成为在某些脊椎动物表达高级行为的基础上进行细胞水平层次的研究，尤其是海兔的学习与动机的调控作用；其中这些有些类型和状态均与哺乳动物很相似^[6]。因而，海兔的 CNS 一直成为神经生物学研究的经典模型之一。

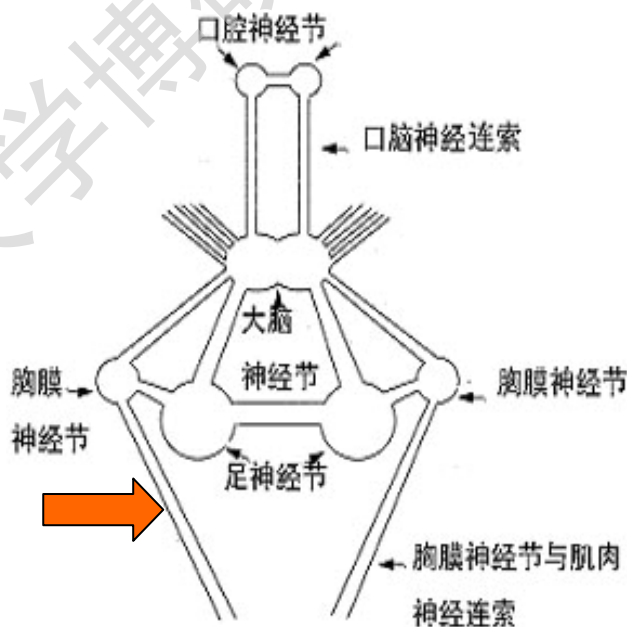


图 1.1 蓝斑背肛海兔中枢神经系统示意图

Fig 1.1 sketch map of central nervous system from NLCS

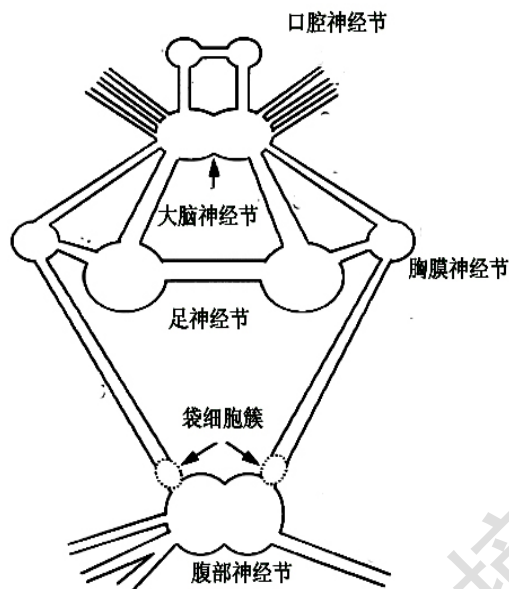


图 1.2 加州海兔中枢神经系统示意图

Fig 1.2 sketch map of central nervous system from the AC

已知诸多不同品种的海兔中，AC 已成为研究海兔的经典品种之一，尤其在 CNS、形态学、电生理学和生物化学方面。NLCS 与 AC 中枢神经系统相比之下，前者更为简单，缺少 AG，推测 AG 的生理功能可能由其他神经节和组织器官所替代。作者选用 NLCS 为研究对象，由于神经系统稍微简单，也许更适合于开展蛋白质组学研究和易获得一些具有科学价值的成果。

坎德尔（Eric Kandel）曾以海兔为研究对象，完成了一系列重大科学成果，因而获得 2000 年诺贝尔生理及医学奖。海兔神经系统仅由 20 000 个神经细胞组成，而且多数细胞体积相对较大，易分离（在普通显微镜下）。它具有一种保护鳃的简单保护性反射行为，可以用来研究学习基本机制。海兔反射行为受二十四感觉神经亚元 (sensory neuron)，少量中间神经亚元 (interneuron) 及六个运动神经亚元 (motor neuron) 调控，其中运动神经亚元活化鳃收缩肌肉 (gill retractor muscle)。坎德尔还发现，刺激可引起海兔保护性反射增强；这种反射的加强可以持续几天或几周，是一种学习的简单过程。后来他又发现，学习过程与连接感觉神经细胞所产生保护性反射肌群活化的神经细胞之间的突触加强有关。较弱的刺激形成短期记忆，一般持续数分钟到数小时。“短期记忆”的机制受离子通道的影响，使更多的钙离子进入神经末梢；导致神经突触释放更多的神经递质，从而使反射得到加强。这些转变是由几个离子通道蛋白质受磷酸化所致。强大和持续的刺激将导

致能持续几周的长期记忆形成。强刺激可引起信使分子 cAMP 和蛋白激酶 A 水平增高，这些信号到达细胞核，引起突触蛋白质水平的变化。一些蛋白质增加了，而另一些蛋白质的数量减少，结果使突触体积变大，使得突触功能持续增强。与短期记忆不同的是，长期记忆需要生成新的蛋白质。如果新蛋白质的合成受阻，长期记忆将会被阻断，而对短期记忆却无影响。坎德尔用海兔证明，短期记忆与长期记忆均发生在突触部位。事实上，对于海兔的腮缩反射现在已认为不单单是一种简单地适应行为，而是在突触前后的位点区域中由多调节分子协同完成的^[7]。由此来看，整个神经网络与执行生理功能均呈复杂化特征。

鉴于上述科学研究和论点，可以直观地看出蛋白质在神经科学研究中起到极其重要的作用。随着新分析工具-蛋白质组学的出现，神经科学已经呈现出一个崭新的发展机遇。高通量筛选技术研究通道蛋白质的特性、活动水平、神经递质及其受体结构和作用机制、以及神经网络的运作方式均成为可能。

二、BG 蛋白质与多肽组成与分布概况

BG 支配咽，唾液腺、食道、嗦囊、胃以及口腔肌肉的活动，起着控制舌头的伸缩的作用。BG 是海兔中枢神经系统中体积最小的神经节，但它由许多体积相对较大的细胞（直径从 100 到 200 μm ）组成。BG 位于口腔腹面，在大脑神经节的前面，并与许多神经连索相连接。BG 负责调节食道的蠕动节律，用电击阻断食道的蠕动节律，可导致快速有力的纵向收缩和舌的横向扩张，嗦囊的收缩，以及肠的偶然运动等。

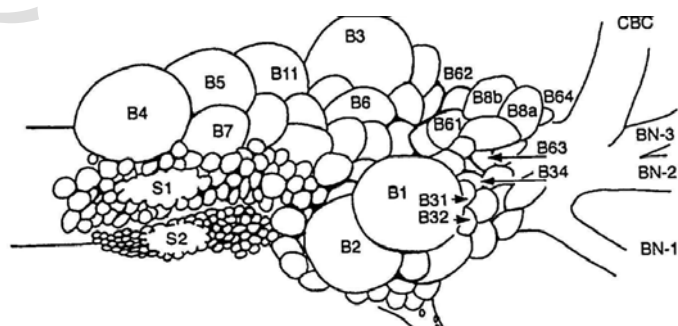


图1.3 BG部分神经细胞分区图谱

Fig 1.3 the subarea map of nervous cell of BG in part

在解剖镜下，很容易把BG分割为左右对称的两个BG亚节，它们之间靠一段细小的神经连索紧密相连。当前对BG的研究主要从细胞学角度出发，并已绘制出数种神经节细胞簇分类图谱。图1.3是BG部分神经细胞簇分布情况，它的分类

及特异生理功能与神经节细胞簇有着密切联系^[8]。

BG是如何行使其控制口腔及其附属器官活动的功能，如何调控海兔的摄食活动，这些问题一直引起了科学家们的关注。人们从不同的角度对海兔BG进行系列研究。电生理法是一种常见的分析方法，譬如利用直径在60-100 μm 之间的特制尖端管状电极检测了AC在进食过程中与行为相关的神经元B4、B5。这项技术可以快速测定神经节细胞的活性，而且无需去除BG鞘，减少了实验步骤。另外就是利用多种不同的分离技术对口腔神经蛋白质与多肽组进行分离、纯化，并进行组成、结构和功能的研究。

探明BG是如何行使各种生理功能，并协调口腔执行生理功能的途径可为今后开展人类复杂的饮食行为机理研究提供科学依据和实验证据；尤其对由于饮食而造成肥胖病症的认知奠定良好的研究基础。本论文选用蛋白质组学及相关分析技术，开展BG、BGL和BGR蛋白质组学研究，筛选与鉴定差异蛋白质组，揭示BG蛋白质组和多肽组成与分布，阐明部分蛋白质和多肽生理功能，为今后深入阐明BG的调控行为提供科学依据和理论研究基础。

三、蛋白质组学分析技术及研究进展

随着人类基因组序列的测序工作不断完善，其科学研究的重心已开始从揭示生命科学的遗传信息转移到对蛋白质功能的研究^[9-11]。人类基因组约含有 3 万个基因^[9]，其数量只相当于果蝇或线虫的两倍。人类基因如何控制人类表达和执行如此复杂的生命过程？是一项亟待解决重大科学问题和复杂生命科学研究工作。蛋白质组学及相关分析技术有可能为揭示这一奥秘提供部分科学依据。

目前，蛋白质组学及相关分析技术已较为广泛地应用在生命科学研究^[11-14]。目前蛋白质组研究趋势主要包括以下 3 方面：（1）细胞蛋白质组微量特征（micro-characterization）的大规模鉴定及对蛋白质翻译后修饰的研究；（2）选用差异蛋白质组学（different-display proteomics）获得差异蛋白质组，并供于比较研究。筛选差异蛋白质组学，挑选诊断人类重大疾病标志物，是一项不仅具有科学意义，而且具有应用价值的研究内容；（3）简单快速地构建细胞功能的蛋白质连锁图^[15]。

对于基因组、转录组及蛋白质组这 3 者之间的联系，Raj Parekh 的解释再恰当不过，“基因组告诉您理论上能够发生什么，mRNA 告诉您可能发生什么，而蛋白质组告诉您正在发生什么”^[16]。目前常见的蛋白质组分离与鉴定技术为：

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