

学校编码: 10384
学号: 200426049

分类号 _____ 密级 _____
UDC _____

廈門大學

碩 士 學 位 論 文

不同生态型芦苇适应自然干旱和盐渍环境
的比较蛋白质组学研究

Comparative proteome of different ecotypes of reed (*Phragmites
communis* Trin.) adapted to natural drought and saline habitats

林文芳

指导教师姓名: 朱学艺 副教授

专业名称: 发育生物学

论文提交日期: 2007年4月28日

论文答辩时间: 2007年5月30日

学位授予日期: 2007年 月

答辩委员会主席: 田惠桥 教授

评 阅 人: _____

2007年 5 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

目 录

摘要.....	1
Abstract.....	3
第一章 前言	6
1 植物蛋白质组学研究	7
1.1 植物蛋白质组学的产生背景	7
1.2 植物蛋白质组学的研究内容	7
1.3 植物蛋白质组学的研究方法	8
1.4 蛋白质组学在植物科学研究中的应用	10
2 本论文的研究内容及意义	13
第二章 不同生态型芦苇遗传多样性分析	15
1 材料与方法	16
2 结果与分析	18
2.1 不同生态型芦苇的生境特点及植株特征	18
2.2 模板DNA的提取及检测	19
2.3 不同生态型芦苇DNA的多态性	20
3 讨论	24
第三章 植物叶片全蛋白双向电泳系统的改进和优化	26
1 实验材料与方法	27
2 实验结果	29
2.1 蛋白质样品制备	29
2.2 裂解液的筛选	30
2.3 筛选体系用于其它植物材料的 2-DE分析	33
3 讨论	34
第四章 不同生态型芦苇叶片全蛋白差异蛋白质组研究	36
1 材料与方法	37
2 结果与分析	39
2.1 4种不同生态型芦苇叶片全蛋白的 2-DE分析	39
2.2 不同生态型芦苇的差异点质谱鉴定	45

3 讨论	52
第五章 不同生态型芦苇叶绿体全蛋白差异蛋白质组研究	55
1 材料与方法	56
2 结果与分析	58
2.1 叶绿体提取	58
2.2 叶绿体荧光显微镜镜检	58
2.3 叶绿体蛋白双向电泳	59
2.4 不同生态型芦苇叶绿体差异蛋白的质谱分析	62
3 讨论	70
3.1 叶绿体的提取	70
3.2 叶绿体双向电泳	70
3.3 叶绿体蛋白的质谱鉴定	70
小结	74
参考文献	75
本文缩写词	84
致 谢	86
附录 不同生态型芦苇图片	87

catalogue

Abstract(in Chinese)	1
Abstract(in English)	3
I Preface	6
1 Advances in plant proteomics	7
1.1 Background of plant proteomics	7
1.2 Method in studys of plant proteomics	7
1.3 Content in studys of plant proteomics	8
1.4 The role of proteomic in plant research	10
2 Meaning and content of this research	13
II Getic diversity analysis of different ecotypes of reed by molecular marker techniques	15
1 Materials and Methods	16
2 Result and Analysis	18
2.1 Differences in habitat conditions and morphological characteristics of 4 reed ecotypes	18
2.2 DNA extraction and concentration confirmation	19
2.3 Polymorphism of 4 ecotypes of reed	20
3 discussion	24
III Technical improvement to 2-DE for analysis of leaf total protein in plant proteomics	26
1 Materials and Methods	27
2 Result	29
2.1 Preparation of leaf total protein	29
2.2 Choice of the lysis buffer	30

2.3 Analysis of other plant using the optimized 2-DE system	33
3 Discussion	34
IV Comparative proteome of total leaf proteins of different ecotypes of reed	36
1 Materials and Methods	37
2 Result and Analysis	39
2.1 The proteomic profiles of different ecotypes of reed analyzed by 2-DE	39
2.2 Identification of 2-DE spots of different ecotypes of reed with MS.....	45
3 Discussion	52
V Chloroplast subproteome of different ecotypes of reed	55
1 Materials and Methods	56
2 Result and Analysis	58
2.1 Preparation of chloroplast.....	58
2.2 Fluorescence of reed's chloroplast by fluorescence microscopy	58
2.3 2-DE of chloroplast proteins	59
2.4 Identification of 2-DE spots of different ecotypic reeds' chloroplast proteins with MS.....	62
3 Discussion	70
3.1 Preparation of chloroplast.....	70
3.2 The proteomic profiles of different ecotypic reeds' chloroplast proteins analyzed by 2-DE	70
3.3 Identification of 2-DE spots with MS	70
conclusion	74
reference	75
Abbreviations.....	85
Acknowledgements.....	86
Appendix Photos of different ecotypic reeds.....	87

摘要

芦苇是禾本科多年生水生草本植物,其典型生境为淡水、含盐的沼泽或湖边,然而,芦苇可适应多种生境条件,并演化为对干旱、盐渍或低温等陆生胁迫环境有较强抗旱性的、具有基因型差异的不同生态型。我国河西走廊荒漠地区广泛分布有水生芦苇、盐生芦苇、盐渍-沙丘过渡带芦苇和沙丘芦苇 4 个不同生态型,这一长期稳定的自然变异生态型式研究植物适应逆境机制的理想材料体系。为了从分子水平上确证由生理生化及生态学方面综合研究结果推定的 4 个生态型的演化趋势,本研究首先采用 ISSR 及 RAPD 分子标记方法对四种不同生态型芦苇进行了遗传多样性分析,在此基础上,运用蛋白质组学技术并结合生物信息学方法,对不同生态型芦苇叶片全蛋白及叶绿体亚蛋白质组进行了对比分析,以期寻找参与芦苇植物适应逆境发生光合调节及与各自抗逆性相关的蛋白质分子成员,研究结果如下:

1 应用 ISSR 和 RAPD 分子标记技术对水生、盐渍、盐渍-沙丘过渡地带及沙丘生境的四种不同生态型芦苇进行了遗传多态性分析。分别从 30 条 ISSR 引物和 45 条 RAPD 引物中筛选出适合芦苇 4 种不同生态型分析的 9 条 ISSR 引物和 13 条 RAPD 引物用于分析,其中,9 条 ISSR 引物共扩增出 99 条带,多态性位点数为 51;多态性位点比率为 51.5%;13 条 RAPD 引物共扩增出 195 条带,多态性位点数为 87;多态性位点比率为 44.6%。两种分子标记的分析结果呈极显著正相关($r=0.845$, $P<0.05$)。基于扩增位点数据库运用 UPGMA 进行聚类分析,建立样品间的亲缘关系树图。结果表明,在长期适应各自不同生境的不断演化中,芦苇四种生态型 DNA 分子发生了一定变异,表现出由水生芦苇经盐渍芦苇向沙丘芦苇逐渐演化的趋势。

2 通过优化组合植物蛋白质提取方法及与之匹配的蛋白质裂解液,采用改进的 O'Farrel 双向电泳系统,以自然生境野生芦苇叶片为材料,筛选出一种适合植物叶片蛋白质分析的双向电泳制样和分析系统:以饱和酚-醋酸铵/甲醇沉淀法提取叶片蛋白质样品,经裂解液裂解后按 80ug 上样,银染后获得背景清晰,蛋白分辨率较高的双向电泳图谱。该系统用于实验室培养植物材料和其他植物材料双向电泳分析,同样获得较好的电泳行为和分辨率。

3 应用双向电泳技术对 4 种不同生态型芦苇的叶片全蛋白进行分析, 在 4 种芦苇中共找到 102 个表达差异显著的蛋白质点, 对这些差异蛋白质点进行切割后经胰酶消化酶切后, 运用 MAIDI-TOF MS 对酶解肽段进行解析, 通过与蛋白质序列库比对分析后鉴定出 25 个蛋白质, 其中包括在三种陆生型芦苇中表达丰度明显高于水生型芦苇的 RuBisCO 相关蛋白(14 个), ATP 酶 β 亚基 (6 个)、过氧化氢酶和 GADPH, 这些酶的表达显示出明显的与环境相适应的演化趋势。此外还有 RuBisCO 活化酶、具有降解达到快速周转的 D1 蛋白的功能的 FtsH 等。

4 利用 percoll 梯度离心提取水生芦苇和沙丘芦苇完整叶绿体, 并对其叶绿体全蛋白进行双向电泳。在二者的双向电泳图谱上共找到 119 个差异蛋白, 通过 MAIDI-TOF MS 解析, 在 MSDB 数据库比对确定了 10 个蛋白。其中 3 个蛋白质点被鉴定为 RuBisCO 的大亚基, 1 个点被鉴定为 RuBisCO 小亚基; 4 个蛋白质点被鉴定为 ATP 酶亚基; 此外, 还包括参与液泡质子转移的 (液泡) V 型 H^+ -ATP 酶 ($V-H^+$ -ATPase), 作为分子伴侣、与多种细胞活性相关的 ATP 酶家族蛋白类似蛋白 (AAA-ATPase-like) 以及其它匹配率稍低的蛋白, 如细胞色素 P450 单加氧酶, 萜合成酶等。这些蛋白在沙芦中的表达丰度大都高于水芦, 而且 RuBisCO 和 ATPase 亚基组分在叶绿体蛋白质组和叶片全蛋白质组的分析中表现出一致性, 暗示这些蛋白分子与沙丘芦苇适应干旱环境直接相关。

关键词: 芦苇; 生态型; 干旱; 盐渍; 遗传多样性; 比较蛋白质组; 双向电泳; 质谱

Abstract

In the desert regions of northwest China, Hexi Corridor of Gansu province, *Phragmites communis*, a hydrophytic species whose typical habitats are the fresh and brackish water area of swamp and riversides, adapted itself to adverse terrestrial habitats and evolved into other three terrestrial reed ecotypes under natural selection pressure, and thus developed a unique habitat distributing four reed ecotypes (swamp reed, SR; light salt meadow reed, LSMR; high salt meadow reed, HSMR; dune reed, DR) within the scope of several kilometers. These stable reed ecotypes are ideal experimental system for mechanism research into plants tolerance or resistance to drought or salinity. In the present study, ISSR (inter-simple sequence repeat) and RAPD (random-amplified polymorphic DNA) markers were used to detect genetic diversity of 4 different ecotypes of reed so as to confirm the evolving trends originated from the physiological and ecological research. Secondly, in order to find the proteins involving in the reed ecotypes' tolerance and resistance to natural drought and salinity, proteomics and bioinformatics techniques were used to analysis leaf total proteins and chloroplast protein components of 4 different ecotypes of reed, to soil drought and salinity. The main results were summarized as follows:

1. Nine effective primers were screened from 30 ISSR arbitrary primers, and a total of 99 DNA bands were amplified, among which 51 (51.5%) were polymorphic. Thirteen effective primers were screened from 45 RAPD 10-oligonucleotide arbitrary primers, and a total of 195 DNA bands were amplified, among which 87 (44.6%) were polymorphic. Genetic identity based on ISSR and RAPD data showed a positive correlation ($r=0.845$, $P<0.05$). Based on unweighted pair-group method with arithmetic averages (UPGMA) cluster analysis on DNA bands amplified, together with the correlation analysis between genetic distance and soil water contents and soluble salt contents as well, the present results suggest that the genetic diversity occurs among the four ecotypes of reed in adaptation to long term natural drought and salinity, showing an obvious evolutionary tendency from swamp reed via salt meadow

reed to dune reed.

2. To optimize two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2-DE) system for the separation and quantification of plant protein species, a suitable 2-DE system was developed by selecting different components and concentrations in isolation solutions and lysis buffers, and by improving IEF and SDS-PAGE procedures originated by O'Farrell. This included sample preparation with water-saturated phenol and then mixed with 5 volumes of 0.1M ammonium acetate in methanol (NH₄Ac/methyl). The isolated proteins were lysed in lysis buffer consisting of 8M urea, 2M Thiourea, 4% CHAPS, 2% Ampholine (pH3.5-10: pH5-8=1: 4) and 65mM DTT. Isoelectric focusing gels were made in glass tube (140×1.5mm inside diameter). 1.45mL Gel mixture contained urea 0.825g, 30% acrylamide 200uL, 10% NP-40 300uL, ddw 295uL, Ampholines 50uL (pH3.5-10:pH5-8=1:4), 10% APS/TEMED 1.6uL. The separated proteins in the 2D gel were detected by silver staining. Each protein sample (80μg) extracted from different plant materials, such as cultured rice, maize and the other 3 terrestrial ecotypes of reed growing in natural habitats, were separated and analyzed, and high-quality and quantity separation of leaf total proteins obtained by this 2-DE system. This 2-DE system is recommended as a suitable tool for analysis of plant proteomics.

3. Two-dimensional gel electrophoresis was used to analysis protein expression profiles of leaf total proteins of 4 reed ecotypes. After electrophoresis, 102 differentially expressed proteins were cut out, digested in gel by trypsin and analyzed by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). Based on the information of the mass fingerprinting (PMF) obtained from peptides for each protein spot, 25 of these 102 proteins were identified by searching database online. This included fourteen Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase, six ATP synthase beta subunit, catalase and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, which are much more abundant in three terrestrial reeds than swamp reed, showing an obvious evolutionary tendency in adaptation to long term natural drought and salinity. Otherwise, some proteins, such as rubisco activase precursor and FtsH protease, were also identified.

4. Chloroplasts of swamp reed and dune reed isolated by Percoll gradients. Chloroplast proteins were analyzed by two-dimensional gel electrophoresis. 119 different protein spots were found, which were digested, analyzed and identified as described in leaf total proteins. Based on the information of PMF, 10 of these 119 discrepant proteins were identified by searching data from MSDB database online. Among the identified proteins, 3 spots are RuBisCO, 4 were subunits of ATPase. Moreover, V-H⁺-ATPase, ATPase family associated with various cellular activities (AAA-ATPase-like) and many other lower matching proteins, such as cytochrome P450 monooxygenase and terpene synthase, were also identified. Interestingly, expressed abundance of the most identified proteins was higher in the dune reed ecotype than that in the swamp reed one, implying that these proteins might involve in dune reed's adaptation to drought habitat. And the result of RuBisCO large subunit and ATPase β subunit obtained from chloroplast proteins coincided with that of the leaf total proteins.

Key Words: *Phragmites communis* Trin.; ecotype; drought; salinity; genetic diversity; comparative proteome; two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2-DE); matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS)

第一章 前言

在植物和其生存环境的相互关系中，一反面，环境对植物具有生态作用，能影响和改变植物的形态结构和生理生化特征；另一方面，植物对环境也具有适应性，植物以自身的变异来适应外界环境的变化^[1]。

土壤干旱和盐渍胁迫是自然逆境因子中最常见、最普遍的两个胁迫因子，也是对作物产量影响最大的两个环境因子。随着世界人口的不断增加和可耕地面积的逐渐减少，土壤干旱和盐渍化已成为世界农业发展的主要制约因素。所以，通过提高农作物的抗逆性从而扩大种植面积，尤其是开发利用干旱、半干旱地区和荒芜滩涂、盐渍地区的土地资源，将是提高粮食产量和培育耐旱、耐盐作物品种的重要发展方向。

随着分子生物学的迅猛发展，生物技术在植物抗性品种培育中的应用已成为研究的热点，参与胁迫抗性的基因也越来越多地被克隆出来，人们寄望于通过这一技术路线大规模地生产出胁迫条件下抗性提高地丰产植株。然而，植物对逆境胁迫的响应是多基因的，涉及多种生理代谢的综合响应，通过转入单个基因获得的抗旱、抗盐植物/作物真正能付诸于实践并获得稳定遗传者并不多，究其主要原因是：胁迫条件下，植物/作物响应胁迫环境的主要机制还不明确，外源基因转入后，对植物/作物自身的生理代谢的影响缺乏全面的分析；同时也说明在干旱和盐渍响应可能存在一些共同响应机制，但将二者做对比研究匮乏。

近年来，涉及特定功能机理的功能蛋白质组学的研究在植物抗逆基因功能鉴定方面显示出不可替代的重要作用，干旱和盐渍胁迫条件下，水稻、马铃薯、玉米等作物中与干旱和盐渍胁迫相关的部分蛋白质已分离鉴定。Costa 等^[2]研究海岸松水分亏缺响应蛋白变化研究，发现 38 个蛋白与胁迫相关，其中，已鉴定出参与氧化胁迫响应的酶类、热休克蛋白及木脂素合成蛋白；Riccardi 等^[3]发现在渐进水分胁迫条件下，玉米叶中 78 个受干旱胁迫影响的蛋白中，50 个含量明显上调，除已知的参与水分胁迫的亲水蛋白外，还有几种参与细胞代谢途径（如糖酵解）和 Krebs 循环的酶。这些结果表明，干旱和盐渍胁迫环境下，植物的诸多代谢网络都受到影响，但对植物逆境响应中诸多代谢网络的综合响应机制并不十分清楚。

所以,从蛋白质水平上系统、深入地探讨植物耐旱、耐盐的生理生化机制和光合作用调节变化,对抗性品种的选育提供重要的理论依据。

1 植物蛋白质组学研究

1.1 植物蛋白质组学的产生背景

植物蛋白质组学是在基因组学的研究成就和高通量的蛋白质分析技术得到突破的背景下产生的新兴学科,基因组研究的发展是蛋白质组学产生的重要前提。基因组密码的破译,拉开了生命科学研究的序幕,但是,要真正揭示生命活动的奥秘,基因组研究本身又无能为力。因为基因组仅仅是遗传密码和遗传信息的载体,在生命活动的不同过程中恒定不变,不能反映有机体在生命活动过程中基因表达的时空关系和网络调控。在这样的背景下,1994年 Wilkins 和 Williams^[4]提出了蛋白质组学(Proteomics)的概念。作为一个整体的概念,它是基因组表达的全部蛋白,它随着组织、甚至环境状态的不同而改变。在转录时,一个基因可以以多种 mRNA 形式剪接,并且,同一蛋白可能以许多形式进行翻译后的修饰,故一个蛋白质组不是一个基因组的直接产物,蛋白质组中蛋白质的数目有时可以超过基因组的数目。所以蛋白质组学是研究复杂基因之间相互作用,细胞内部的活动和环境所致的基因表达及蛋白质翻译后加工的动态过程。

目前植物蛋白质组学的研究主要集中在陆生模式植物拟南芥和水稻上,其它植物如玉米、小麦、松树等的蛋白质组学研究也已经有人报道^[5-7]。

1.2 植物蛋白质组学的研究内容

蛋白质组学研究主要包括蛋白质的表达模式和蛋白质的功能模式两个方面。蛋白质表达模式的研究是蛋白质组学研究的基础内容,主要是研究特定条件下某一细胞或组织的所有蛋白质的表征问题。常规的方法是提取蛋白质,经双向电泳(Two-dimensional electrophoresis, 2-DE)分离形成一个蛋白质组的二维图谱,通过计算机图像分析得到各蛋白质的等电点、分子量、表达量等,再结合以质谱分析为主要手段的蛋白质鉴定,建立起细胞或组织或机体在所谓“正常生理条件下”的蛋白质组图谱和数据库。然后,在此基础上,可以比较分析在变化了的条件下

蛋白质组所发生的变化,如蛋白质表达量的变化、翻译后的加工修饰、蛋白质在亚细胞水平上定位的改变等,从而发现和鉴定出特定功能的蛋白质及其基因。蛋白质功能模式的研究是蛋白质组学研究的重要目标。无论是基因组研究还是蛋白质组研究,最终目标是揭示所有基因或蛋白质功能及其作用模式。一方面,蛋白质与蛋白质、蛋白质与 DNA 之间的相互作用、相互协调是细胞进行信号传导及代谢活动的基础。另一方面,蛋白质的结构是蛋白质发挥其功能的前提,对蛋白质结构的认识也成为了解大量涌现的新基因功能的一个重要途径。

1.3 植物蛋白质组学的研究方法

1.3.1 双向聚丙烯酰胺凝胶电泳(2-DE)

2-DE 方法的应用始于 20 世纪 70 年代^[8],但迄今为止,它仍然是分离蛋白质的最有效的方法。与基因组研究不同的是,蛋白质组学并没有类似于 PCR 反应的扩增方法,因此,分离样品的精确性就成了至关重要的问题。目前常用的大规格胶(20 cm × 20 cm)是可再生的,并且借助于考马斯亮蓝和银染,可以对蛋白质进行定量;应用荧光染料,还可以使一定范围内的上千种蛋白质定量地显现出来,这些都大大提高了 2-DE 的精确性^[9],当然 2-DE 技术还远远没有达到完善的地步,例如要使低水平表达的蛋白质(即“低拷贝数蛋白质”,每细胞 10~1000 个拷贝)显现出来仍有困难,而高水平表达的蛋白质(即所谓“管家蛋白质”,每细胞大于 1000 个拷贝)有时也会出现小部分的模糊。尤其是材料中含有某些极高含量的蛋白时,如植物的 RuBisCO,也会使 2-DE 应用受到一定影响。最近一些 2-DE 相关技术,如高度敏感的质谱(Mass-spectrometric)和 ESTs(expressed sequence tags)数据库的发展,使分离和鉴定蛋白质的工作又大大前进了一步,质谱结合固相免疫亲和柱的使用,使低丰度蛋白鉴定成为可能。

1.3.2 质谱技术

质谱技术是近年来蛋白质组学研究最重要的技术突破之一^[10],其原理是将样品分子离子化,根据离子间质荷比(m/z)的差异来分离并确定质量,是高灵敏度高特异性地快速鉴定生物分子的技术。质谱测定中首先将通过 2-DE 分离到的蛋白质用特定的蛋白质酶(例如胰蛋白酶)消化成肽段,然后用质谱仪进行分析。质谱鉴定有两条主要途径。一是“肽链质量图谱”途径。测量质谱的方法是基质辅助激

光解吸附/电离法(Matrix-assisted laser desorption/ ionization, MALDI),通过测定一个蛋白质酶解混合物中肽段的电离飞行时间来确定其分子量等数据,所以也称为基质辅助激光解吸/ 电离飞行时间质谱法(MALDI-TOF MS),最后通过相应的数据库搜索鉴定蛋白质^[11]。随着数据库中的全长基因序列越来越多,MALDI 鉴定的成功率也越来越高。二是串联质谱途径,将胰蛋白酶消化后的蛋白质单个肽链直接从液相经“电喷雾离子化”而被电离,分解为氨基酸或含有 C 末端的片段,片段化离子被喷射到“串联质谱仪”进行质量测定,以得到序列信息。它的主要优点是:对鉴定蛋白质来说,由几个肽链片段化得到的序列信息比一系列的肽链质量更具有特异性^[12]。片段的数据不仅可以在蛋白质序列数据库中搜寻,还可以在核酸数据库,例如 EST 数据库,甚至原始的基因组数据库中搜寻。最近发展起了一种新型的质谱仪,它将 MALDI 离子源与高效的串联质谱仪系统结合起来(可将单个肽链片段化)^[13],把高产量的肽链图谱法与高特异性的肽链序列法结合起来。并将两步的质谱分析合并为一步。质谱技术还可用于蛋白质磷酸化、硫酸化、糖苷化以及其它一些修饰的研究^[12]。

1.3.3 植物蛋白质组数据库

目前标准而且可重复的 2-DE 蛋白质分析方法使得大规模的蛋白质组研究成为可能,再加上其它技术的辅助(如蛋白质免疫检测、微序列分析、质谱等),可以使获得大量的蛋白质表达的信息。这些信息可以贮存在蛋白质数据库中,并与其它数据库相联接。通过互联网可以查到的植物蛋白质组数据库有:

<http://www.rs.noda.sut.ac.jp/~kamon/2de>

<http://www.pierroton.inra.fr/genetics/2D/>

<http://www.edi.ac.uk/swissprot>

<http://psort.nibb.ac.jp/>

<http://www.cbs.dtu.dk/services/>

<http://www.inra.fr/Internet/?Produita/Predotar>

<http://spinx.rug.ac.be:8080/ppmdb/index.html>

<http://www.biokemi.su.se/chloroplast/>

目前的数据库集中在模式植物拟南芥,重要的粮食作物水稻、玉米,以及松树等植物上,这些数据库都提供可以点击的 2-DE 图像,还包括植物各器官(根、茎、

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