

学校编码：10384
学号：200326107

分类号_____密级_____
UDC _____

厦 门 大 学
硕 士 学 位 论 文

银环蛇蛇毒相关基因的克隆和表达研究
Cloning and Expression of Genes from Venom
Gland of *Bungarus multicinctus*

林鲁萍

指导教师姓名：王义权 教授

专业名称：生物化学与分子生物学

论文提交日期：2006 年 5 月

论文答辩时间：2006 年 7 月

学位授予日期：2006 年 月

答辩委员会主席：章晓波

评 阅 人：_____

2006 年 7 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人郑重声明：所呈交的学位论文，是本人在导师的指导下，独立进行研究工作所取得的成果。除文中已经注明引用的内容外，本论文不含任何其他个人已经发表或撰写过的作品成果。对本文的研究作出重要贡献的个人和集体，均已在文中以明确方式标明。本人完全意识到本声明的法律结果由本人承担。

学位论文作者签名：

日期： 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

目 录

摘要.....	II
Abstract.....	V
前言.....	1
1 神经毒素.....	1
2 C型凝集素.....	4
第一章 重组 α-银环蛇毒素 P22-A31 的原核表达及活性检测	
引言.....	10
材料和方法.....	11
1 材料.....	11
2 方法.....	11
结果和分析.....	13
1 重组 α -银环蛇毒素的表达和纯化.....	13
2 α -银环蛇毒素抗原性的检测.....	14
3 重组 α -银环蛇毒素的毒性试验.....	15
4 重组 α -银环蛇毒素的外周镇痛试验.....	15
讨论.....	17
第二章 α - 银环蛇毒素基因的克隆及其 cDNA 序列多态性的相关分	
析	
引言.....	21
材料和方法.....	21
1 材料.....	21
2 方法.....	23
结果和分析.....	24
1 α - 银环蛇毒素基因和 NGF 基因的克隆.....	24
2 α - 银环蛇毒素基因序列及相关分析.....	24
3 神经生长因子 3'RACE 产物序列的测定.....	28
4 基因突变率计算及相关分析.....	31
5 不同来源 α -银环蛇毒素 cDNA 及基因外显子序列比较.....	32

6 PCR 过程可能造成的错误率统计	35
讨论	36
1 α -银环蛇毒素 cDNA 多态性不是由于基因组不同转录本造成.....	36
2 造成 α -银环蛇毒素 cDNA 多态性的原因分析.....	36
第三章 银环蛇 C 型凝集素基因的克隆和表达研究	
引言	41
材料和方法	45
1 材料.....	45
2 方法.....	56
结果和分析	56
1 C 型凝集素基因 3' RACE、5' RACE 扩增及序列的测定.....	56
2 银环蛇 C 型凝集素蛋白序列与其它蛇的 C 型凝集素蛋白序列比对结果.....	58
3 重组 C 型凝集素表达载体的构建.....	60
4 重组 C 型凝集素蛋白的表达.....	60
5 重组 C 型凝集素蛋白的复性及纯化.....	62
6 抗体制备、纯化及效价的测定.....	64
7 检测天然银环蛇蛇毒中的 C 型凝集素的表达情况.....	64
8 重组 C 型凝集素凝集活性的测定.....	65
9 用制备的抗体纯化银环蛇粗蛇毒中的 C 型凝集素蛋白.....	66
讨论	67
1 银环蛇 2 种 C 型凝集素全长 cDNA 序.....	67
2 重组 C 型凝集素的表达研究.....	68
3 重组银环蛇 C 型凝集的活性研究.....	68
4 天然银环蛇蛇毒中的 C 型凝集素.....	69
参考文献	85
硕士在学期间发表的论文	87
致谢	88

Table of Contents

Abstract(in Chinese)	II
Abstract	V
Introduction	1
1 Neurotoxin.....	4
2 C-type lectin.....	9
Part I Expression and functional analysis of recombinant α-bungarotoxin (P22-A31)	
Introduction	10
Materials and Methods	11
1 Materials.....	11
2 Methods.....	11
Results	13
1 Expression and purification of recombinant α -bungarotoxin	13
2 Detection of α -bungarotoxin 's immunogenicity	14
3 Toxicity of the recombinant α -bungarotoxin.....	15
4 Analgesic effects of recombinant α -bungarotoxin.....	15
Discussion	17
Part II Cloning of α-bungarotoxin genes and analysis on polymorphism of α-bungarotoxin cDNA	
Introduction	21
Materials and Methods	21
1 Materials.....	21
2 Methods.....	23
Results	24
1 Cloning of α -bungarotoxin and NGF	24
2 Analysis of α -bungarotoxin genomic sequences	24
3 Sequencing of NGF 3'RACE products.....	28

4 Calculation and analysis of mutation rates.....	31
5 Alignment of different α -bungarotoxin cDNA sequences.....	32
6 Analysis of artificial mutation from PCR process.....	35
Discussion	36
1 polymorphism of α -bungarotoxin cDNA is not result from different transcrip...36	
2 Analysis of reasons for polymorphism of α -bungarotoxin cDNA.....	36

Part III Cloning and Expression of C-type lectin from *Bungarus multicinctus*

Introduction	41
Materials and Methods	45
1 Materials.....	45
2 Methods.....	56
Results	56
1 Amplification of C-type lectins full length cDNA.....	56
2 Alignment of several C-type lectins from different snakes.....	58
3 Construction of expression vectors.....	60
4 Recombinant expression of C-type lectins.....	60
5 Expression, refolding and purification of recombinant C-type lectins.....	62
6 Production, purification and detection of antibody for C-type lectins.....	64
7 Detection of natural C-type lectin in <i>Bungarus multicinctus</i>	64
8 Hemagglutination assay of recombinant C-type lectins.....	65
9 Purification of natural C-type lectins by antibody.....	66
Discussion	67
1 Two full length cDNAs of C-type lectins.....	67
2 Expression of recombinant C-type lectins.....	68
3 Bioactivity of recombinant C-type lectins.....	68
4 Natural C-type lectins in <i>Bungarus multicinctus</i>	69
Reference	85
Published papers	87
Acknowledgements	88

银环蛇蛇毒相关基因的克隆和表达研究

摘要

本研究利用前期研究中构建的 pGEX-BgTX(P22-A31)质粒在大肠杆菌 BL21 (DE3) 中表达并纯化后得到了较纯的重组 α -银环蛇毒素同工毒素, 得率约为 1.225 mg/L。用重组蛋白与天然 α -银环蛇毒素的抗原性一致。重组 α -银环蛇毒素同工毒素的半致死剂量 LD_{50} 为 1.598 mg/kg, 约为天然 α -银环蛇毒素的 1/5 且有一定的镇痛药效, 1/4 LD_{50} 剂量的镇痛百分率为 55.2%, 1/8 LD_{50} 剂量的镇痛百分率为 20.5%, 在外周镇痛作用中呈一定的量效关系。以上结果表明, 本研究重组表达的 α -银环蛇毒素同工毒素 (P22-A31) 具有与天然 α -银环蛇毒素相似的生物学活性。

α -银环蛇毒素 cDNA 序列的多态性及其引起这种多态性的原因一直存在争议。本文从同一银环蛇个体中克隆并测序了 5 个 α -银环蛇毒素基因组序列, 又在同一次反转录的 cDNA 中克隆神经生长因子的 cDNA, 并通过计算多个克隆间的突变情况, 与同一体系中得到的 12 种 α -银环蛇毒素 cDNA 序列突变率做比较, 并统计了前人克隆到的多种 α -银环蛇毒素 cDNA 序列突变的情况, 得出结论: α -银环蛇毒素 cDNA 序列的多态性不是由于基因组不同而来的, 也不是由 RNA 编辑造成, 很可能是由于反转录过程, PCR, 基因克隆及 DNA 测序过程人为引入的。

运用 RACE 技术从银环蛇毒腺 cDNA 中克隆到 2 个 C 型凝集素基因的全长 cDNA 序列, *BML-1* 和 *BML-2*, 其中 *BML-2* 是首次从银环蛇 (*Bungarus multicinctus*) 中克隆到。并将这 2 个蛋白 135 个氨基酸的成熟肽部分和 137 个氨基酸的成熟肽部分分别连入 pET-His 载体后在 BL21 (DE3) *plysS* 中表达, 重组蛋白以包涵体的形式存在, 复性后的重组 C 型凝集素具有凝集红细胞活性。其中由 135 个氨基酸组成的重组 C 型凝集素以单体形式存在, 由 137 个氨基酸组成的重组 C 型凝集素有 50% 以二聚体的形式存在, 另 50% 以单体形式存在。Western blotting 和亲和纯化结果表明, 天然 C 型凝集素是以更小分子量的单体形成的二聚体。纯化到的 4 种分子量不同的蛋白中 14.4KD 左右的蛋白可以形成二聚体, 认为是目的蛋白。银环蛇 C 型凝集素基因的克隆和表达研究对阐明银

环蛇蛇毒中 C 型凝集素的性质、组成及其功能起到重要的作用。

关键词：蛇毒蛋白， α -银环蛇毒素，C 型凝集素，克隆，重组表达

厦门大学博硕士论文摘要库

Cloning and Expression of Genes from Venom Gland of *Bungarus multicinctus*

ABSTRACT

α -bungarotoxin plays very important role in neuroscience research, clinical application and the pharmaceutical industry. In order to acquire quantites of α -bungarotoxin, we expressed GST- α -bungarotoxin fusion protein using constructed plasmid pGEX-BgTX (P22-A31) in *E. coli* BL21 (DE3) cell and finally obtained recombinant α -bungarotoxin with yields of about 1.225 mg/L. The results of both ELISA and Western blot showed that recombinant α -bungarotoxin has the same antigenicity as natural α -bungarotoxin. In vivo toxicity tests showed that the LD₅₀ of recombinant α -bungarotoxin was 1.598 mg/kg, about 1/5 that of natural α -bungarotoxin. Analgesis percentages with doses of 1/4 LD₅₀ and 1/8 LD₅₀ were 55.2% and 20.5% respectively, indicating that recombinant α -bungarotoxin possesses analgesic efficiency.

It is disputed whether there is polymorphism in cDNA of α -bungarotoxin, and what is the mechanism to result of this phenomenon. In order to further study this question, we cloned and sequenced α -bungarotoxin gene from the same individual and nerve growth factor cDNA from the same reverse transcription products by Wang et al, and analyzed their mutation rates. Those results indicate that polymorphism of α -bungarotoxin cDNA is not transcribed from genomic DNA or RNA editing, but results from reverse transcription process, PCR, and gene cloning.

C-type lectins are found in many animals and bind in a Ca²⁺-dependent fashion to mono- and oligosaccharides. In our research, we cloned two C-type lectin full-length cDNA from *Bungarus multicinctus* venom gland by RACE technology, named *BML-1*, *BML-2*. It is the first report to clone *BML-2* cDNA from venom gland of *Bungarus multicinctus*. We also constructed expression vector using 135 and 137 amino acids of two C-type lectins ligated into pET-His plasmid and then expressed

then in BL21(DE3)plysS cell. Recombinant protein is inclusion body and account for 30% full protein of expression bacteria and the refolding rate is 30%. The refolded recombinant C-type lectins are able to agglutinate rabbit erythrocytes, Recombinant BML-1, BML-2 with 135 amino acids are the monomers, and recombinant BML-1, BML-2 with 137 amino acids are dimmers of 50%, monomers of 50%. Western blotting and purification of natural C-type lectins showed that C-type lectins form dimers in physiological condition. Cloning and expression of C-type lectins from *Bungarus multicinctus* venom is very important to further study characteristics, structure and functions of C-type lectins in *Bungarus multicinctus*.

Keywords: venom protein, α -bungarotoxin, C-type lectin, cloning, recombinant expression

前 言

蛇毒是由蛇毒腺分泌的一种天然毒蛋白，含多种蛋白质、多肽、酶类和其它小分子物质，具有广泛的生物学活性。蛇毒是一类复杂的混合物，其中含有 10~15 种酶，12~18 种非酶类的蛋白和多肽，以及少量的中性脂、磷酸和游离单糖；无机盐中以钠、钾、锌离子含量较高，其次是钙、锰离子。有毒成分主要是蛋白质和多肽，占干毒的 85%~90%，而蛋白质中 90%是白蛋白和球蛋白。

1 神经毒素

神经毒素广泛存在于眼镜蛇科和海蛇科，相对分子质量 6,000~12,000，pH 9 以上，其含量在不同种类的蛇中有较大区别，一般含量在 20%~50% 之间。可通过多种不同的方式改变中枢和周围神经系统正常的兴奋传导，从而影响正常的神经活动。根据其一级结构可分为三类：短链神经毒素（60~62 氨基酸残基，4 对二硫键）^[1]、长链神经毒素（70~74 氨基酸残基，5 对二硫键）^[2]、 κ -神经毒素（66 氨基酸残基，5 对二硫键）^[3, 4]。短链神经毒素和长链神经毒素主要是竞争性地与神经肌肉接头处的乙酰胆碱受体结合，从而阻断神经递质的传导；其中短链神经毒素的阻断作用与长链神经毒素相比较，具有一定的可逆性。 κ -神经毒素则可能主要特异性地结合神经系统中的乙酰胆碱受体。另一些具体生物学活性还不十分清楚的统称为神经毒素类似物^[5~9]。

另一方面，根据其作用机制和作用位点，并结合其分子结构特征，又可分为 4 大类，即突触前神经毒素(presynaptically-acting neurotoxin)或 β -神经毒素(β -neurotoxin)^[10]、突触后神经毒素(postsynaptically-acting neurotoxin)或 α -神经毒素(α -neurotoxin)^[11]、离子通道型神经毒素(ion-channel neurotoxin)和抗胆碱酯酶神经毒素(anticholinesterase neurotoxin)。

从 *Elapidae* 和 *Hydrophiidae* 中分离的突触后 α -神经毒素可以选择性地与 N-乙酰胆碱受体结合来阻断神经肌肉的传递。到目前为止有 80 种以上的 α -神经毒素的一级序列被测定，且可以分为短链神经毒素（60~62 个氨基酸，4 对二硫键）和长链神经毒素（66~74 个氨基酸，5 对二硫键）。2 种毒素的氨基酸序列和拓扑结构十分相似。3 条反向平行的 β 折叠和三指型环状结构从一个球状中心突出。序列比对的结果表明， β -神经毒素的序列比对表明短链神经毒素和长链神经毒素

有 12 个氨基酸非常保守。这些基团可能都直接或间接地与 N-乙酰胆碱受体结合。对 α -神经毒素化学修饰和突变研究为他们结构功能关系提供一定依据，暗示 α -神经毒素几个保守不变的基团可能参与它们毒素的功能。一系列的毒素蛋白，心脏毒素（60-62 氨基酸残基，4 对二硫键），也被从蛇毒中分离出来。心脏毒素和神经毒素序列比对结果表明，半胱氨酸残基都在相同的位置出现。而且心脏毒素晶体结构解析后发现它也具有三指结构。然而心脏毒素却没有 α -神经毒素的药用效果，它没有特定的细胞受体。而且心脏毒素的 5' 非编码区和 3' 非编码区，还有信号肽系列与 α -神经毒素同源性很高，暗示这两种蛋白可能是同一起源。系统分析表明 α -神经毒素与心脏毒素的关系比与长链神经毒素近^[12]。

蛇毒神经毒素是蛇毒蛋白的重要组成部分，在不同种类的蛇中存在较大的区别，差异百分比一般在 20%~50%之间。 α -神经毒素是一种由 74 氨基酸组成的碱性多肽，属于典型的长链神经毒素，晶体结构如图 1 所示， α -银环蛇毒素与鱼雷烟酰胆碱受体 a 亚基 185-196 片段结合复合物的晶体结构如图 2 所示。

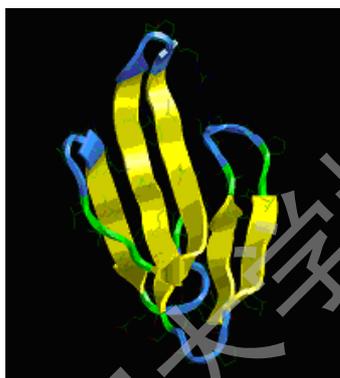


图 1. α -银环蛇毒素晶体结构^[13]。

FIG 1. Crystal structure of α -bungarotoxin.



图 2. α -银环蛇毒素与乙酰胆碱受体 a 亚基 185-196 片段结合复合物的晶体结构^[13]。

FIG 2. NMR Structure of α -Bungarotoxin Free and Bound to a Mimotope of the Nicotinic Acetylcholine Receptor.



图 3. κ -银环蛇毒素晶体结构^[14]。

FIG 3. Crystal structure of κ -bungarotoxin.

Aird 等人^[15]从银环蛇毒素中分离到 γ -银环蛇毒素，晶体结构的解析表明它在 N-末端区域多出 1 个二硫键和 1 个 RGD 序列区。但它的功能还未被阐明，值得

注意的是,在 γ -银环蛇毒素的序列中不包含 α -神经毒素中高度保守又发挥重要功能的氨基酸残基。 κ -银环蛇毒素结构如图3所示。 κ -银环蛇毒素表现出一定的作用在神经元烟碱受体上而且可以阻断 α -神经毒素不起作用的神经系统的传递。结构-功能研究表明, κ -银环蛇毒素的 Arg-34 和 Pro-36 参与了毒素分子与神经元受体的结合。虽然 α -神经毒素和 κ -银环蛇毒素在氨基酸序列和功能上分化较大但他们的 cDNA 序列在 3'非编码区、和信号肽部分同源性很高,暗示 α -神经毒素和 κ -银环蛇毒素可能有共同的起源。

长链神经毒素的基因组结构相似,都是3个外显子被2个内含子隔开^[16]。如图四所示:

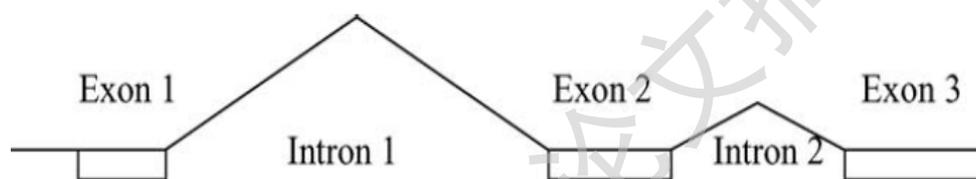


图4. 长链神经毒素基因结构图。

FIG 4. Gene organization of long neurotoxin.

目前的对神经毒素的研究内容主要有:(1)确定毒素作用的分子靶位;(2)研究毒素与靶位点之间作用方式及过程;(3)研究毒素的结构与功能之间的关系;(4)研究毒素分子的基因表达调控等。蛇神经毒素既是研究的对象和材料,也是开展其它理论研究的工具和手段。

蛇神经毒素应用领域主要有以下的几方面:(1)蛇神经毒素的特异性好、亲和力强,用作研究神经递质受体组织及细胞特异性分布的探针;(2)用蛇神经毒素的特异性好的特点,分离提纯特异的神经递质受体;(3)蛇神经毒素的稳定性好、种类丰富且来源广泛,易于结晶,是研究构效关系的极好模型;(4)蛇神经毒素的免疫原性强,而分子量小,可用来探讨抗原结构与免疫原性的关系;(5)蛇神经毒素是探讨神经信号的运输过程以及其它神经活动的重要工具。(6)蛇毒神经毒素及其改构的神经毒素在临床上主要用于治理神经性疼痛、癌痛及神经硬化症等,用于诊断重症肌无力等神经性疾病。由于蛇毒神经毒素止痛无瘾,没有药物依赖性,因此在吸毒者戒毒方面前景广阔。美国FDA已批准了2种蛇毒神经毒素作为药物,

一个用于治疗顽固性神经痛和癌痛的 Cobroxin，一个是治疗关节疼痛的 Nyloxin。我国分离的蛇毒神经毒素（商品名克痛宁）用于临床，曹宜生研制的复方可痛宁在治疗神经性疼痛、癌痛及戒毒方面显示了很好的疗效；但还存在生效慢、效能不高的缺点。

2 C 型凝集素

蛇毒包含多种有着不同药用活性的蛋白质，这些蛋白已经被分离并测定一级结构。他们属于一个多蛋白家族，比如说磷脂酶 A₂，丝氨酸蛋白酶，C 型凝集素、C 型凝集素样蛋白、 κ unitz-type 蛋白酶抑制剂，以及前文介绍的三指型毒素，他们都是由多基因编码的。进化分析表明这些蛋白家族的进化大都遵循达尔文加速度进化的理论，现在很多通过抑制或激活特异的血小板的膜受体和血液凝集因子影响凝血和出血的 C 型凝集素样蛋白已经从各种各样的蛇毒中被分离^[17]。

2.1 C 型凝集素样蛋白家族

C 型凝集素是在很多动物中都存在的非酶类蛋白，它们是钙离子依赖性的与单糖或寡糖结合。他们大多具有多个结构域，包括一个或多个高保守的，由 115~130 氨基酸组成的区域，这个区域具有唯一一个 $\alpha\beta$ 拓扑结构，被称为碳水化合物结合结构域（CRD）^[18]。在有钙离子存在的条件下，C 型凝集素表现出广泛的生物学活性，例如说黏附、内吞作用、病原体中和等^[19]。这些蛋白根据他们结构不同可以分为七个类型^[19,20]。I 型包括四个成员，versican, aggrecan, neurocan 和 brevican^[21]，他包括一个蛋白多糖中心肽和一个在 C 端附近的 C 型凝集素结构域。II 型 C 型凝集素有一个跨膜结构域，一个细胞外的羧基端和一个细胞内的氨基端，这一组一个典型的例子就是细胞 asialo 糖蛋白受体。III 型 C 型凝集素是 collectins，它通过补充激活参与宿主的防御机制，这型 C 型凝集素包括血清甘露糖结合蛋白，肺表面活性剂 SP-A 和 SP-D，牛血清蛋白和 conglutinin，还包含一个氨基末端的胶原蛋白基团和一个羧基末端的 C 型凝集素基团。IV 型的凝集素，或者叫做 selectin，他们参与白细胞和血管表皮细胞的黏附相互作用，这是白细胞溢出的一个重要步骤。现在已发现有 3 种 selectins：L-selectin（白细胞），E-selectin（表皮

细胞), 和 P-selectin (血小板)。V 型 C 型凝集素有一个与 II 型 C 型凝集素相似的 II 型跨膜结构, 参与白细胞受体相关的信号转导过程, 其中最典型的例子就是自然杀伤细胞受体^[22]和低亲和力的 IgE 受体^[23]。VI 型 C 型凝集素是 I 型跨膜蛋白, 具有 1 个富含丝氨酸的胞外区域, 紧接着是 fibronectin II 型结构域, 和一前一后的 CRD 紧随在跨膜基团和羧基端的细胞质结构域。这型的 C 型凝集素包括巨嗜细胞表面甘露糖受体和 1 个树枝细胞表面分子 DEC-205。VII C 型凝集素, 在胰腺和蛇毒中都有发现, 包括简单的 CRD, 只能和糖结合^[17]。

2.2 C 型凝集素样蛋白

没有碳水化合物结合活性, 只在蛇毒中发现。例如, Russel's viper (*Vipera russeli*) 中发现的血液凝集因子 X 激活因子 (RVV-X)^[24], 一种异质二聚体金属蛋白酶, 包含一个 C 型凝集素类似结构域作为它的轻链, 虽然轻链与半乳糖特异凝集素同源性很高, 但 RVV-X 并没有半乳糖结合活性。虽然与 C 型凝集素高度同源, 但这些蛋白与 C 型凝集素在生理活性上并不同。例如, 抗凝集蛋白, IX/X 结合蛋白^[25], IX 结合蛋白^[26], 都已经从竹叶青蛇毒中分离到。从 *Agkistrodon acutus* 中也分离到 X-结合蛋白^[27, 28], botrocetin 可以加强 VWF 因子与糖蛋白 Ib 结合, 而且可以阻止血小板的凝集^[29, 30]; bothrojaracin, 一种从 *Bothrops jararaca* 中分离到的 hirudin 具有类似的 α 凝血酶抑制剂^[31]。

约有 80 种从蛇毒中分离的 C 型凝集素和 C 型凝集素样蛋白的一级序列被测定^[17]。虽然 C 型凝集素样蛋白在结构上与 C 型凝集素相似, 包括一个 CRD 结构域, 他们都属于 VII C 型凝集素家族, 表现出广泛的抗凝集因子、抗血小板并且影响出血和凝血的药物活性。根据功能大致将蛇毒 C 型凝集素分为几类: 凝集素、凝集蛋白、血小板凝集激活剂、血小板拮抗剂。非常有趣的是, 蛇毒 C 型凝集素或者是由两个相同亚基组成的同质二聚体, 或者是有 A 亚基和 B 亚基组成的异质二聚体。

2.3 蛇毒中的 C 型凝集素

半乳糖特异的 C 型凝集素已经在响尾蛇 (*Crotalus atrox*)^[32], *B. jararaca*^[33], 和其他属于眼镜蛇科和蝰科毒蛇的毒素中被分离。这些凝集素可以引起红细胞的凝

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.

厦门大学博硕士学位论文摘要库