

学校编码: 10384

密级_____

学号: 21620060153310

厦门大学

博士学位论文

Importin 13蛋白在胚胎小鼠脑组织中的表达及分布研究

Expression and localization of importin 13
in fetal mouse brain tissues

游攀

指导教师姓名: 陶涛教授

专业名称: 细胞生物学

论文提交日期: 2010年 月

论文答辩日期: 2010年 月

2010年 月

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

目 录

摘 要	I
ABSTRACT	III
主要英文缩略表	V
1. 前 言	1
1.1 核质转运通路的基本构成和主要结构	1
1.2 核输入的分子机制以及 IMPORTIN A/B 家族表达和分布的研究现状	10
1.3 IMP13 的结构与功能介绍	15
2 材料与amp;方法	26
2.1 实验材料	26
2.2 荧光定量 PCR 实验	27
2.3 WESTERN BLOTTING (免疫印迹分析)	33
2.4 免疫组化	36
3.结果与amp;讨论	39
3.1 实时荧光定量 PCR 可行性验证	39
3.2 WESTERN BLOT 检测	48
3.3 不同发育时期小鼠胚胎 (脑) 组织切片 HE 染色	50
3.4 不同发育时期 IMP13 蛋白在脑神经组织细胞中的分布	54
3.5 讨论	67
3.6 结论	70
参考文献	72
致谢	82

Catalogue

Abstract in Chinese	I
Abstract in English	III
Table of abbreviations	V
1. Foreword	1
1.1 The components and their structure in nucleocytoplasmic transport channel ·	1
1.2 The molecular mechanism of protein transportation to the nucleus and the advances in the study of the expression and localization of importin α/β ...	10
1.3 The structure and function of Imp13 protein	15
2 Materials and methods	26
2.1 Materials	26
2.2 Real-time PCR	27
2.3 Western blotting	33
2.4 Immunohistochemistry	36
3. Results and discussion	39
3.1 The feasibility of Real-time PCR test	39
3.2 Western Blot	48
3.3 Mouse embryo (brian) section with HE staining during development	50
3.4 Localization of Imp13 in cells of brain neural tissue at different development stage	54
3.5 Discussion	67
3.6 Conclusions	67
References	72
Acknowledgement	82

摘要

由于真核细胞的基因复制、转录与蛋白质的表达翻译在细胞内分区进行，蛋白质及核酸等生物大分子跨核膜转运成为细胞中最重要的生物学功能之一。

Importin β 家族成员是一类真核生物中广泛分布的核质转运受体蛋白。Importin13 (Imp13) 是这个家族成员之一，也是目前所知的哺乳动物细胞中少数能双向转运底物蛋白的蛋白质之一。目前研究已发现目前研究已发现Imp13的底物有hUbc9, RBM8 (也称Y14), Pax3, Pax6, NF-YB/NF-YC, GR, myopodin, negative cofactor 2, CHRAC-15 /17, p12/CHR AC-17和eIF-1A。这些底物大多与发育有关，因此，Imp13可能在机体发育中有重要的生物学功能。Imp13的表达和在细胞中核质分布的异常可能导致其各种底物发挥的功能受到影响。

为了研究内源Imp13蛋白的表达和分布，我们在本研究中构建了融合表达载体pGEX-4T-2-IPO13，将构建好的表达载体转化大肠杆菌E.coli BL21，诱导表达，把表达的全长Imp13蛋白纯化后做抗原，用其制备抗体，并验证了得到的多克隆抗体的纯度和特异性。用该抗体做Western Blot，研究Imp13蛋白在小鼠胚胎不同发育时期的表达水平的变化情况。另外，分别提取E13.5, E15.5, E17.5, P0以及成年小鼠的脑组织总RNA，用相对荧光定量RT-PCR的方法，检测IPO13 mRNA在小鼠脑组织发育过程的表达变化。荧光定量PCR结果显示IPO13在“C57BL-6”小鼠不同发育时期的脑组织 (brain) 中的表达随着发育的进程而变化，E13.5 IPO13 mRNA达到最高峰，其次是E15.5，随后慢慢降低，新生鼠脑组织IPO13 mRNA比发育早期相比明显降低，这一结果与Western Blot的结果相符。

通过对E11.5, E13.5, E15.5, E17.5和P0等各个不同发育时期小鼠脑神经组织进行免疫组化染色，观察发现Imp13蛋白在神经组织细胞内的分布随胚胎的发育过程逐渐由细胞质向细胞核转移。在胚胎发育后期，Imp13蛋白主要集中在细胞核。

在胚胎发育早期，神经上皮细胞不断分裂增殖，分化为成神经细胞。后期成神经细胞迁移、分化为各种类型的神经元细胞。Imp13的分布变化是与脑神经组织发育成熟时间大体并行的，随着脑神经组织在胚胎发育后期进一步分化、成

熟，Imp13蛋白逐渐由细胞质向细胞核转移。在本研究中，我发现Imp13蛋白的表达和分布受发育过程的调控，Imp13在神经组织中的功能可能随发育时期的不同而被调控。

关键词： Importin13(Imp13)；核质转运；脑神经发育

厦门大学博硕士论文摘要库

Abstract

Since DNA replication and protein expression take part in the different compartments of an eukaryotic cell, nucleocytoplasmic trafficking plays an important role in the cell activities. Importin- β family members act as nuclear transport receptor in many nuclear transport activities. Interestingly, importin13 (Imp13), a member of importin- β family, is found to be one bidirectional transport receptor in mammals which not only functions as an importin, but also an exportin. Several cargoes of Imp13 have been identified: hUbc9, RBM8, Pax3, Pax6, NF-YB/NF-YC dimer, the glucocorticoid receptor (GR), myopodin, negative cofactor 2, CHRAC-15/17, p12/CHRAC-17 and eIF-1A. Most of these are essential factors involved in the development and cell cycle. Thus, Imp13 may participate in the regulation of the development and cell cycle. The expression and location abnormalities of Imp13 may influence its cargoes in playing their roles in appropriate time and space.

To study the function of Imp13 protein, we developed an anti-Imp13 antibody. A recombinant protein of IPO13 fused to a GST tag was expressed in E.coli BL21, purified, and used as antigen. A rabbit anti- Imp13 polyclonal antibody was obtained after immunization of rabbits. This antibody was purified and its specificity was proved. We conducted Western Blot using this antibody to study the changes of Imp13 expressions in the mouse brains during the development, including E13.5, E15.5, E17.5, P0 and adult. In parallel, we analyzed IPO13 mRNA expressions in the mouse brains during development using relative quantification real-time RT-PCR. A significant decrease in relative quantity of IPO13 mRNA in the mouse brains during development was consistent with Western Blot results.

In addition, to determine the distribution of Imp13 in brain neural tissues during the development, we performed immunohistochemical analysis using this antibody. We

found that the localization of Imp13 is different in brain neural tissues at different developmental stages, including E11.5, E13.5, E15.5, E17.5 and P0. In nerve cells, Imp13 tends to localize in the cytoplasm in the early stages and transfer to the nucleus in late stages.

Since neuroepitheliums proliferate continuously in the early stages of development and differentiate into the neuroblast cells in the late stages, our results suggested that the expression and localization of Imp13 in brain nerve cells is regulated developmentally and Imp13 may play different roles in brain development in different stages by changing its expression and subcellular distribution.

Key Words: Importin13(Imp13); Nucleocytoplasmic transport; Brain development

主要英文缩略表

缩写	全称(英文)	全称(中文)
bp	Base pair	碱基对
BSA	Bovine serum albumin	牛血清白蛋白
cDNA	Complimentary deoxyribonucleic acid	互补链脱氧核糖核酸
Ct	Cycle threshold	循环阈值
CV	Coefficient variation	变异系数
DAB	diaminobenzidine	二氨基联苯胺
DEPC	diethyl pyrocarbonate	二乙基焦磷酸胺
DMSO	Dimethyl sulfoxide	二甲亚砜
dNTP	Deoxynucleotide triphosphate	脱氧核苷三磷酸
DTT	Dithiothreitol	二硫代苏糖醇
EB	Ethidium bromide	溴化乙锭
ECL	Enhanced chemiluminescence	化学发光增强剂
FAM	6-carboxy-fluorescein	6-羧基荧光素
HRP	Horseradish peroxidase	辣根过氧化物酶
Ig	immunoglobulin	免疫球蛋白
IPO	IMPORTIN	核输入受体基因
Imp	importin	核输入受体蛋白
LGL2	Late gestation lung 2	胚胎发育后期肺蛋白
M-MuLV	revertant M-MuLV reverse Transcriptase	莫洛尼氏鼠白血病病毒逆转录酶
NES	nuclear export signal	核输出信号序列
NF	Nuclear factor	基因转录因子
NF- κ B	Nuclear factor - κ B	真核细胞转录因子亚基

主要英文缩略表

NLS	nuclear location signal	核定位信号
NPC	Nuclear pore complex	核孔复合体
PBS	Phosphate-buffer saline	磷酸缓冲液
PCR	Polymerase chain reaction	聚合酶链式反应
PVDF	Polyvinylidene difluoride	聚偏氟乙烯
Rnasin	RNA inhibitor	核糖核酸酶抑制剂
RT-PCR	Reverse-transcriptase polymerase chain reaction	反转录-聚合酶链式反应
SDS	Sodiumdodecyl sulfate	十二烷基硫酸钠
siRNA	Small interfering RNA	小分子干扰RNA
SUMO	Small ubiquitin-related modified	小泛素相关修饰因子
Taq	Thermos aquaticus	嗜热水生菌

1. 前言

1.1 核质转运通路的基本构成和主要结构

1.1.1 核孔复合体

1949-1950年间, H.G.Callan与S.G.Tomlin在用透射电子显微镜观察两栖类卵母细胞的核被膜时发现了核孔, 随后人们逐渐认识到核孔并不是一个简单的孔洞, 而是一个相对独立的复杂结构。1959年M.L.Waston将这种结构命名为核孔复合体(nuclear pore complex, NPC)。

真核细胞质和细胞核是功能不同的两个亚细胞部位, 细胞核膜是二者分隔的重要屏障, 核膜上分布的核孔复合体(NPC) 是沟通细胞核内外物质交流和信息交流的主要通道。生物大分子经NPC跨核膜转运(nucleocytoplasmic transport)是真核细胞基因复制、转录和翻译的必要环节, 也是联系细胞内信号转递、参与细胞核反应(即细胞增殖、分化、凋亡等核反应) 调控的重要环节。

细胞核膜是由外膜和内膜组成的磷脂双分子层结构, 同时镶嵌一些核孔复合体(NPC)。每个NPC由位于细胞核膜内的基本框架结构和附着在胞质面环上的纤维状结构(cytoplasmic filaments)及核质面环上的篮状结构(nuclear basket)所组成。NPC的孔径为25 nm, 中心通道的直径约为9 nm。核膜孔内外口的周边均有对称排列的8个球状颗粒, 中央有一个中心颗粒(又称孔栓)。从位于核孔中心的中心颗粒放射状发出细丝与16个亚单位连。NPC是一种具有分子筛功能的孔状结构, 可以允许分子量少于40~50kD的小分子物质(如离子、代谢底物和小分子蛋白等)以弥散方式自由通过; 而分子量超过此范围或直径大于6 nm的生物大分子(如RNA与蛋白质等)则必须在胞浆内可溶性转运受体蛋白的介导下, 以能量依赖的方式进行主动转运[Kurz et al., 1997]。NPC是蛋白出入细胞核的生理屏障, 其数目、分布和密度与细胞代谢活性有关。NPC是一个多蛋白复合体, 其分子量达到125 MD。在蛋白质构成上, 无论是脊椎动物还是酵母, NPC均大约由30个不同的核孔蛋白(nucleoporin, Nup)组成[Fahrenkrog et al., 2002]。脊椎动物核孔蛋白 Nup214 [Napetschnig et al., 2007], Nup58/45 [Melcak et al., 2007]

和Nup98 [Sun et al., 2008]的结构域的晶体结构已被阐明,就Nup58/45而言,它是Nup62复合体的组成成分,它位于中央孔道的壁上,结构域富含 α 螺旋,使得中央孔道具有弹性,有利于分子间的滑动[Sun et al., 2008]。

已有26个脊椎动物的核孔蛋白和30个酵母的核孔蛋白分别被克隆和鉴定,每个核孔蛋白由对称的8聚体的形式存在 [Rout et al., 2000; Cronshaw et al., 2002; Alber et al., 2007; Antonin et al., 2008; Beck et al., 2007; Lim et al., 2008; Suntharalingam and Wente, 2003; Terry et al., 2007; Degrasse et al., 2009]。核孔蛋白分三类:“结构核孔蛋白(structure Nups)”,“孔膜蛋白(pore membrane proteins, Poms)”以及“FG-核孔蛋白(FG-Nups)”。这些核孔蛋白在进化上高度保守,其中FG-核孔蛋白均包含一簇由苯丙氨酸(phe, F)和甘氨酸(Gly, G)组成的FG重复序列 [Ryan et al., 2000; Vasu et al., 2001],这个FG重复区能够与核转运受体Importin β 或Importin β 的同系物发生交互作用,并提供核转运受体与底物蛋白复合体的结合位点,从而使之通过核孔复合体进入细胞核内[Rout et al., 2000; Ribbeck et al., 2001]。

有研究表明,非对称分布的FG重复区在蛋白的核浆转运过程中作用不明显,但对称分布的FG重复区在蛋白的核浆转运和细胞生存过程中发挥十分关键的作用[Strawn et al., 2004; Zeitler et al., 2004]。通过免疫电镜发现,大多数核孔蛋白同时位于NPC中央通道的胞质面或核质面,少部分蛋白不对称地分布于NPC中央通道的两侧。核孔蛋白是NPC核质面篮状结构或胞质面纤维细丝的重要组成部分 [Ryan et al., 2000; Vasu et al., 2001]。在脊椎动物中, RanBP2 (Nup358) 是NPC胞质面纤维细丝的主要组分[Walther et al., 2002; Wilken et al., 1995], CAN (Nup214)也是NPC胞质面的组分之一[Walther et al., 2002; Kraemer et al., 1994]。大量研究发现, RanBP2、CAN 及其它不对称分布的核孔蛋白在核输入前后“核转运受体-底物蛋白复合体”的组装和解离中充当“核心平台” [Rout et al., 2000; Ryan et al., 2000; Vasu et al., 2001; Forler et al., 2004]。许多核孔蛋白在NPC上的定位不是一成不变的,而是呈现出一定的流动性,如脊椎动物的Nup98 最先发现它仅定位在NPC的核质面篮状结构,但后来在NPC的胞质面也发现其分布的存在。这种分布特征在RNA的核浆输出和转录过程中发挥重要作用[Griffis et al., 2002; Griffis et al., 2004]。

1.1.2 核定位信号

核定位信号(nuclear localization signals, NLS)是核内功能蛋白进入细胞核的结构基础, NLS是一段含碱性氨基酸的短肽, 是介导某些蛋白入核的一段充分而必要的信息片段[Kalderon et al., 1984], 核输入受体蛋白通过结合和识别底物蛋白的核定位信号才能以底物-转运受体蛋白复合体的形式通过核膜的NPC进入核内。1982年Laskey发现核内含量丰富的核质蛋白(nucleoplasmin)的C端有一个信号序列, 可引导蛋白质进入细胞核, 称作核定位信号(NLS)[Dingwall et al., 1982]。第一个被确定的NLS是病毒SV40的T抗原(MW=92kDa), 它在胞质中合成后很快积累在核内, 是病毒DNA在核内复制所必需的蛋白质。其NLS为: Pro-Pro-Lys-Lys-Lys-Arg-Lys-Val, 主要氨基酸残基为中间5个连续带正电的碱性氨基酸残基(Lys-Lys-Lys-Arg-Lys), 其反向序列就丧失了核输入的功能[Adam et al., 1989]。而且此NLS的第3个氨基酸, 即Lys突变为Thr, 其核输入功能也丧失[Kalderon et al., 1984]。在多种其他蛋白质中也发现SV40的T抗原的NLS的同源序列, 其基本结构为Lys-Arg/Lys-X-Arg/Lys。

经典的核定位信号由核心NLS及其旁侧的调控顺序构成[Boulikas T, 1994]。其氨基酸残基的组成决定了信号的强弱, 通常碱性氨基酸形成强的入核信号, 而中性或酸性氨基酸的存在会减弱其信息的强度以致成为不完全的NLS。核心的NLS旁侧为调控顺序, 以多个丝氨酸或苏氨酸残基为特征。这些羟基氨基酸残基是胞内多种激酶-磷酸酶系统的靶点, 通过其磷酸化和去磷酸化作用调节NLS信号的强度。经典的NLS的结构标准为: ①核心NLS由含4个赖氨酸或者精氨酸的六肽构成; ②不含酸性氨基酸和大分子的氨基酸; ③核心NLS的旁侧为脯氨酸或甘氨酸; ④旁侧顺序中部存在疏水氨基酸以保证NLS位于蛋白质的分子表面[Hall et al., 1990]。

核定位信号通常由4~8个碱性氨基酸残基(Pro、Lys和Arg)组成, 对其连接的蛋白质无特殊要求, 并且完成核输入后不被切除。核定位信号在构成特点上, 有的由一簇碱性氨基酸残基组成[Kalderon et al., 1984; Dingwall et al., 1991; Dang et al., 1988], 有的由两簇和两簇以上的碱性氨基酸残基组成[Dingwall et al., 1982; Zhou et al., 2006; Hanaka et al., 2002], 有的在构成特点上没有明显特征[Antoine et al., 2005; Chan et al., 2002]。按照碱性氨基酸残基的分布情况, 核定位信号通

常分2类，第一类是经典的核定位信号，包括两种：第1种由5~10个富含碱性氨基酸残基的基序构成，即单簇碱性氨基酸残基组成，称作monopartite NLS，如SV40的T抗原[Kalderon et al., 1984]和c-Myc[Dang et al., 1988]等。第2种由两簇碱性氨基酸残基组成的核定位信号(bipartite NLSs)或称双向核靶序列(bipartite nuclear target sequence)，其中间包含一段5~20个氨基酸残基组成的间隔序列，如nucleoplasmin[Dingwall et al., 1982]和BRD7[Zhou et al., 2006]等；在由两簇碱性氨基酸残基组成的核定位信号序列中，这两簇氨基酸相互依存、缺一不可，共同决定蛋白的胞核定位；通常上游碱性氨基酸残基较短，仅含2个赖氨酸或精氨酸残基，而下游碱性氨基酸残基则类似于完整的单簇碱性氨基酸残基组成的核定位信号。在构成上由于上游碱性氨基酸残基的存在使要求相对宽松(Robbins et al., 1991)。第2类是非经典的核定位信号，该核定位信号在序列构成上没有明显的特征，其碱性氨基酸残基不单独成簇，没有明显的富集现象，如PTHrP, ribosomal protein S2[Antoine et al., 2005; Chan et al., 2002]等。经典核定位信号，通常由核转运受体importin α/β 1识别，非经典核定位信号在构成上没有明显规律，由Importin β 同系物识别。Eguchi H等在研究ARNT (arylhydrocarbon receptor nuclear translocator)的亚细胞定位时发现，ARNT中负责有效核转位的NLS也是由分离的两个区域构成的，但两个碱性序列之间的一段酸性氨基酸序列是必不可少的，它起着一种空间占位作用。这种结构与经典的两部分构成的NLS序列有显著不同，是一类新的NLS [Eguchi et al., 1997]。

NLSs一级结构不同，但均存在多个碱性氨基酸，提示它们可通过NLSs的正电荷与细胞表面的负电荷相互作用进入细胞[Silhol et al., 2002]。增加肝素的浓度可竞争TAT-NLS的入核转运。细胞表面带有负电荷的硫酸乙酰肝素(heparinsulfate, HS)，与肝素在结构上非常相似，推测HS是体内NLSs的入核转运的中介物。与这种推断一致的是，不能合成完整HS蛋白多糖的细胞，或多或少地降低NLS2融合蛋白的入核转运。HS介导入核的更直接的证据是用主要作用于HS的肝素酶III(heparinase III)或抗HS抗体处理细胞后，入核转运的减弱程度与酶或抗体的量成正比。另外，使用糖胺聚糖裂合酶选择性地降解HS侧链可竞争性抑制TAT-NLS的跨膜转运。

核定位信号的调节还表现出一种弱信号的加合作用。Roberts等将SV40T抗原

的一种微弱激活的NLSK128R融合到丙酮酸激酶分子上，融合方式分为一倍、二倍和三倍[Roberts et al., 1987]。一倍者丙酮酸激酶在核内和胞浆中的量相等，二倍者在核内的定位多于在胞浆的，三倍者全部在核内。另外一些实验也证实，一些蛋白质的结构内部没有典型的NLS，但它可能含有几个弱匹配的(poor matches)信号，这些信号可以加合性地驱动入核运送。

由于经典的核定位信号序列在构成特点上具有明显的规律性，因而通过生物信息学的手段容易预测，目前核定位信号常见的在线预测手段包括<http://www.expasy.org/tools/scanprosite/>、<http://cubic.bioc.columbia.edu/predictNLS/>和<http://psort.nibb.ac.jp/form.html>等。但不管怎样，核定位信号预测的结果均必须通过实验手段来进一步证实它是否具有功能性核定位信号的特征。目前常见的证实方法包括：①是否具有介导异源胞浆蛋白或胞浆胞核泛表达蛋白(如GFP等)胞核定位的功能[Jain et al., 2005]；②缺失突变或关键碱性氨基酸残基点突变后的蛋白突变体是否改变原有野生型蛋白的定位模式，如胞核定位转变为胞浆定位或胞浆胞核分布转变为单纯的胞浆分布等[Zhang et al., 2005]；③确定这个潜在核定位信号区域是否是该蛋白与核转运受体蛋白交互作用的结构基础[Kovac et al., 2000]。

1.1.3 核质转运的输入输出转运受体

核转运受体在底物(cargo)的运载过程中发挥了决定性的作用。Karyopherin是一类与核孔选择性运输有关的蛋白家族，相当于受体蛋白。大多数核转运受体属于结构上比较保守的Ran GTP结合蛋白家族的成员[Conti et al., 2001]。核转运受体包括importin α (karyopherin α)和Importin β (karyopherin β)两个家族。

典型的核孔输入方式是有NLS的转运物直接或靠配体与胞质中的转运受体结合，以转运复合物的形式穿过NPC，释放于核中。转运受体(和配体)随后又被输出到胞质。第一个被发现的核孔输入受体是 importin β (Imp β , Kap β 1, p97, PTAC β)，它与配体 importin α (Imp α , Kap α , NLS受体)一起完成具有典型NLS转运物的核内输入。在此过程中，importin α 结合于转运物NLS而Importin β 介导转运复合物结合于NPC中的核孔蛋白。所有的importin α 都有一个相同的结构：在其N端有一个由碱性氨基酸组成的结构域可以和Importin β 结合，在中间有一个由8~10个armadillo-like(ARM)组成的结构域[Izaurre et al., 1998; Mattaj et al., 1998]。酵母importin α 结合NLS的结晶分析表明其结合于NLS的位点即位于ARM

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