

学校编码：10384

密级\_\_

学号：22320121151319

廈門大學

硕士学位论文

强壮前沟藻的碱性磷酸酶的诱导表达以及酶活性中心金属离子的初步鉴定

Study of the expression of alkaline phosphatase in  
*Amphidinium carterae* Hulbert and Cofactor requirement

指导教师姓名：林森杰教授

专业名称：海洋生物学

论文提交日期：2015年5月

论文答辩时间：2015年5月

2015年5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（近海海洋环境科学国家重点实验室）课题（组）的研究成果，获得（海洋生态基因组）课题（组）经费或实验室的资助，在（林森杰教授）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）： 郭辰涛

2015 年 5 月 29 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、缩印或者其他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）：郭辰涛

2015 年 5 月 29 日

## 目录

缩写语中英文对照表.....	I
摘要.....	I
Abstract.....	I
第 1 章 绪论.....	1
1.1 磷.....	1
1.1.1 海洋中的磷.....	1
1.1.2 海洋环境中的无机磷限制.....	2
1.2 海洋浮游植物对无机磷限制的生理响应.....	3
1.2.1 浮游植物体内磷的储存和利用.....	3
1.2.2 浮游植物体内的高亲和磷转运系统.....	4
1.2.3 浮游植物对溶解态有机磷的利用.....	5
1.3 碱性磷酸酶研究进展.....	6
1.4 本论文的研究目的和内容.....	9
第 2 章 强壮前沟藻碱性磷酸酶 (AcaAP) 蛋白表达研究.....	11
2.1 引言.....	11
2.2 实验材料.....	12
2.2.1 实验藻种及培养条件.....	12
2.2.2 菌株.....	12
2.2.3 实验试剂.....	12
2.2.4 引物合成.....	12
2.2.5 常用试剂与培养基的配置.....	12
2.2.6 实验仪器.....	15

2.2.7 应用软件与生物信息学网站.....	16
2.3 实验方法.....	16
2.3.1 AcaAP 信号肽预测.....	16
2.3.2 AcaAP 疏水性分析.....	17
2.3.3 <i>Acaap</i> 目的基因片段的制备.....	17
2.3.4 pEASY-E2 与目的片段重组表达载体的构建、转化和鉴定.....	19
2.3.5 pEASY-E2/AcaAP 重组质粒在大肠杆菌的诱导表达.....	20
2.3.6 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 检测蛋白表达量.....	21
2.3.7 重组质粒在大肠杆菌中表达产物的可溶性分析.....	21
2.3.8 分离纯化大肠杆菌表达产物 AcaAP 蛋白.....	22
2.3.9 应用 Bradford 法测定重组蛋白浓度.....	22
2.3.10 Western blotting 检测抗体特异性.....	23
2.3.11 无机磷限制培养实验.....	24
2.4 实验结果.....	27
2.4.1 AcaAP 原核表达.....	27
2.4.2 AcaAP-180 原核表达.....	30
2.4.3 AcaAP 蛋白表达研究.....	32
2.5 讨论.....	36
2.5.1 原核表达 pEASY-E2/AcaAP 重组蛋白.....	36
2.5.2 碱性磷酸酶活性和 AcaAP 的表达对磷的响应.....	37
第 3 章 甲藻碱性磷酸酶活性影响因子研究.....	39
3.1 引言.....	39
3.2 实验材料.....	40
3.2.1 实验藻种及培养条件.....	40
3.2.2 实验试剂.....	40
3.2.3 常用试剂与培养基的配置.....	41
3.2.4 实验仪器.....	41

3.3 实验方法 .....	42
3.3.1 无机磷限制培养实验 .....	42
3.3.2 测定不同金属对甲藻碱性磷酸酶活性的影响 .....	42
3.3.3 测定不同 pH 对甲藻碱性磷酸酶活性的影响 .....	43
3.3.4 利用 ELF 在非变性胶中鉴定碱性磷酸酶 .....	43
3.3.5 测定不同金属对纯化的 AcaAP 的活性的影响 .....	44
3.3.6 测定不同 pH 对纯化的 AcaAP 的活性的影响 .....	44
3.4 结果 .....	44
3.4.1 甲藻中碱性磷酸酶活性中心的研究 .....	44
3.4.2 AcaAP ELF 标记活性研究 .....	48
3.4.3 重组蛋白 pEASY-E2/AcaAP 活性研究 .....	49
3.5 讨论 .....	51
3.5.1 甲藻碱性磷酸酶活性的研究 .....	51
3.5.2 AcaAP 活性研究 .....	53
第 4 章 结语 .....	54
4.1 主要结果 .....	54
4.2 主要创新点 .....	55
4.3 问题与展望 .....	55
第 5 章 参考文献 .....	57
致谢 .....	66

**Table of Content**

Lists of abbreviation.....	I
Abstract in Chinese.....	I
Abstract in English.....	I
Chapter 1 Introduction.....	1
1.1 Phosphorus.....	1
1.1.1 Phosphorus in marine environment.....	1
1.1.2 Phosphate limitation in marine environment.....	2
1.2 Physiological response of marine phytoplankton to phosphorus limitation.....	3
1.2.1 Storage and usage of phosphorus in phytoplankton.....	3
1.2.2 High affinity phosphorus transport system in phytoplankton.....	4
1.2.3 DOP usage by phytoplankton.....	5
1.3 Research progress of alkaline phosphatase.....	6
1.4 Objects and contents of the research.....	9
Chapter 2 Alkaline phosphatase protein expression in <i>Amphidinium carterae</i> .....	11
2.1 Introduction.....	11
2.2 Metrials.....	12
2.2.1 Experimental algal and culture conditions.....	12
2.2.2 Bacterial Strains.....	12
2.2.3 Other reagents.....	12
2.2.4 Primers.....	12
2.2.5 Preparation of solutions.....	12
2.2.6 Experimental apparatus.....	15

2.2.7 Application software and bioinformatics website.....	16
2.3 Methods .....	16
2.3.1 Prediction of signal peptide cleavage cite for AcaAP propeptide .....	16
2.3.2 Analysis of hydrophilicity for AcaAP .....	17
2.3.3 Preparation <i>Acaap</i> fragment .....	17
2.3.4 Construction, transformation and identification of recombinant expression vector pEASY-E2/AcaAP.....	19
2.3.5 Recombinant plasmid pEASY-E2 /AcaAP expression in <i>Escherichia coli</i> induced by IPTG .....	20
2.3.6 Detection of fusion protein expression product by SDS-PAGE.....	21
2.3.7 Dissolubility analysis of fusion protein expression product.....	21
2.3.8 Purification of AcaAP.....	22
2.3.9 Measure the concentration of recombinant protein by Bradford method....	22
2.3.10 Determination of titer, specificity and purity of anti-AcaAP polyclonal antibody.....	23
2.3.11 Inorganic phosphorus restrictions culture experiments .....	24
2.4 Results .....	27
2.4.1 Prokaryotic expression of AcaAP .....	27
2.4.2 Prokaryotic expression of AcaAP-180.....	30
2.4.3 Alkaline phosphatase in <i>A. carterae</i> .....	32
2.5 Discussion .....	36
2.5.1 Prokaryotic expression of AcaAP .....	36
2.5.2 APA and AcaAP protein expression were regulated by DIP availability....	37
Chapter 3 Factors of Alkaline phosphatase activity in dinoflagates .....	39
3.1 Introduction .....	39
3.2 Metrials.....	40
3.2.1 Experimental algal and culture conditions.....	40
3.2.2 Other reagents .....	40
3.2.3 Preparation of solutions .....	41



3.2.4 Experimental apparatus.....	41
3.3 Methods .....	42
3.3.1 Inorganic phosphorus restrictions culture experiments .....	42
3.3.2 Determine the effect of different metals on alkaline phosphatase activity of dinoflagellates.....	42
3.3.3 Determine the effect of different pH on alkaline phosphatase activity of dinoflagellates.....	43
3.3.4 ELF identification alkaline phosphatase in non-denaturing gel.....	43
3.3.5 Determine the effect of different metals on AcaAP.....	44
3.3.6 Determine the effect of different pH on AcaAP .....	44
3.4 Results .....	44
3.4.1 The cofactor of alkaline phosphatase of dinoflagellates.....	44
3.4.2 The cofactor of alkaline phosphatase of <i>A. carterae</i> .....	48
3.4.3 The activity of recombinant protein pEASY-E2/AcaAP.....	49
3.5 Discussion .....	51
3.5.1 The alkaline phosphatase activity of dinoflagellates .....	51
3.5.2 The alkaline phosphatase activity of <i>A. carterae</i> .....	53
Chapter 4 Summary.....	54
4.1 The main results .....	54
4.2 The main innovation.....	55
4.3 Problems and Prospects.....	55
Chapter 5 References .....	57
Acknowledgements .....	66

## 缩写语中英文对照表

- Amp: Ampicillin, 氨苄青霉素
- AP: Alkaline phosphatase, 碱性磷酸酶
- APA: Alkaline phosphatase activity, 碱性磷酸酶活性
- AcaAP: *Amphidinium carterae* alkaline phosphatase 强壮前沟藻碱性磷酸酶
- BLAST: Basic Local Alignment Search Tool
- bp: Base pair, 碱基对
- DIP: Dissolved inorganic phosphorus, 溶解态无机磷
- DOP: Dissolved organic phosphorus, 溶解有机磷
- ELF: Enzyme labeled fluorescence, 酶标记荧光
- GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, 甘油醛-3-磷酸脱氢酶
- HAB: Harmful Algal Bloom, 有害藻华
- His: Histidine, 组氨酸
- kDa: Kilodalton, 千道尔顿
- N: Nitrogen, 氮
- ORF: Open reading frame, 开放阅读框
- PBS: Phosphate buffered saline, 磷酸盐缓冲液
- P: Phosphorus, 磷
- pNPP: p-Nitrophenyl Phosphate, 对硝基苯磷酸盐
- pNP: p-Nitrophenol, 对硝基苯酚
- PP: Particulate phosphorus, 颗粒磷
- SDS: Sodium dodecyl sulfate, 十二烷基硫酸钠
- SDS-PAGE: SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳
- SNP: Soluble nonreactive phosphorus, 溶解态非活性磷
- SRP: Soluble reactive phosphorus, 溶解态活性磷
- TBS: Tris buffered saline, Tris盐缓冲液
- TDP: Total dissolved phosphorus, 总溶解态磷
- TP: Total phosphorus 总磷

## 摘要

磷 (P) 是浮游植物生长发育必需的营养元素之一, 当环境中的无机磷浓度不足时 (磷限制), 浮游植物就会通过表达碱性磷酸酶 (AP), 以分解环境中的有机磷来维持自己的生长所需。甲藻是海洋生态系统中重要的浮游植物类群, 同时也是形成有害藻藻华的主要类群, 开展对AP的研究可以帮助我们更清楚地了解在自然海区和形成水华过程中, 甲藻利用磷的分子机制及其对自身生长的影响。碱性磷酸酶基因表达的分子机制研究在甲藻中的研究目前刚刚起步, 目前该基因的报道仅限于甲藻中个别代表种, 如强壮前沟藻 (*Amphidinium carterae* Hulbert), 已知该基因的表达水平受环境中无机磷浓度的调控。在海洋浮游植物中存在多种不同类型的AP, 其所需的金属离子活性中心也各有不同。本研究以*A. carterae*为主要研究对象, 开展以下实验研究, 包括: (1) 设计特异抗体, 检测在不同磷营养条件下, 碱性磷酸酶蛋白在细胞中的表达水平; (2) 选取代表常见甲藻类群的米氏凯伦藻 (*Karenia mikimotoi*), 微小原甲藻 (*Prorocentrum minimum*), 链状亚历山大藻 (*Alexandrium catenella* Clade IIC), 虫黄藻 (*Symbiodinium kawagutii* Clade F, *Symbiodinium* sp. Clade E) 和*A. carterae*为研究对象, 鉴定甲藻中碱性磷酸酶所需的金属离子。

主要结果如下:

1. 构建 *A. carterae* 碱性磷酸酶蛋白的原核表达体系。根据已报道的 *A. carterae* 中 AP 基因的全长编码序列 (*Acaap*), 构建了 pEASY-E2/*AcaAP* 基因表达载体。将表达载体质粒转化到大肠杆菌 (*Escherichia coli*), IPTG 诱导表达, 产物经 Ni-NTA 纯化后, 主要以可溶形式存在, 分子量大约为 70 kDa。

2. 根据已报道的 *A. carterae* 中 AP 基因的全长编码序列 (*Acaap*) 翻译的氨基酸序列分析, 选择蛋白 N-端附近亲水区长度为 180 个氨基酸 (220-400) 的肽段 *AcaAP-180* 进行原核表达, 构建了 pEASY-E2/*AcaAP-180* 基因表达载体。原核表达产物经纯化后用于制备特异性多克隆抗体。

3. 实验发现当 *A. carterae* 培养基中的无机磷耗尽后, 磷限制组在培养开始后没有明显的指数增长期, 而是很快进入平台期, 细胞浓度仅为对照组的一半, 碱性磷酸酶活性 (APA) 呈现出显著的上调趋势 ( $p < 0.01$ ; two-tailed T-test)。

4. Western blot 实验表明, 磷限制组中碱性磷酸酶蛋白 (AcaAP) 的表达量呈显著增高趋势, 而对照组的 AcaAP 的表达量一直处于较低的水平。通过甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 内参校正后, 半定量的分析结果显示, 磷限制组和对照组的之间的 AcaAP 的表达量差异显著, 前者的表达量是后者的 50-fold。另外, AcaAP 的蛋白表达量和 APA 活性存在良好的正相关关系 ( $p < 0.05$ ,  $R^2 > 0.8$ )。

5. 利用在线软件预测 AcaAP 高级结构, AcaAP 的二级结构主要由  $\alpha$  螺旋和  $\beta$  折叠组成, 且以  $\beta$  折叠为主, 发现 AcaAP 的三级结构是由两个相似的部分组成, 中间的空隙部分预测是结合金属离子的部分。结果显示的模型为 2cn3A02, 该模型来自梭菌的水解酶, 活性中心是  $\text{Ca}^{2+}$ 。

6. 通过检测不同金属离子添加后的甲藻 AP 活性, 结果显示甲藻 AP 依赖于  $\text{Ca}^{2+}$  或  $\text{Mg}^{2+}$  作为其金属活性中心, 而典型 AP-phoA 活性中心所需的  $\text{Zn}^{2+}$  对甲藻中 AP 的酶活性不但无明显促进作用, 反而产生一定程度的抑制作用。例如 *A. carterae*, *A. catenella* 经检测, 原核表达的 AcaAP 具备一定碱性磷酸酶活性, 活性所需的金属离子同样为  $\text{Ca}^{2+}$  或  $\text{Mg}^{2+}$ 。*A. carterae* 的细胞全蛋白的 SDS-PAGE 胶酶活性分析显示其活性蛋白的活性中心是  $\text{Ca}^{2+}$ , 分子量约为 130 kDa。

7. 本实验中检测的甲藻 (*A. carterae*, *P. minimum*) 的碱性磷酸酶活性最适 pH 范围为 pH 7-10, 当 pH < 7 或 > 10 时, 酶活性受到显著抑制, 而 *A. catenella* 和 *K. mikimotoi* 中的 AP 活性保持稳定, 并不会随着 pH 升高而呈现出显著变化。

综上所述, 甲藻中的 AP 为一类新型的碱性磷酸酶, 其活性中心所需的金属离子为  $\text{Ca}^{2+}$  或  $\text{Mg}^{2+}$ , 并且其活性蛋白可能以二聚体形式存在。

**关键词:** 甲藻; 碱性磷酸酶; 磷限制; 诱导表达; 活性中心; 最适 pH; Western blot

## Abstract

Phosphorus (P) is one of the major nutrients required for the growth of phytoplankton, while dissolved inorganic phosphorus (DIP) is the preferred form of P, phytoplankton can utilize dissolved organic phosphorus (DOP) when DIP is limited. Under phosphate-deficient conditions, alkaline phosphatase (PtAPase) is expressed and hydrolyzes DOP to release phosphate in order to maintain cell growth and metabolisms. Dinoflagellates are an important group of phytoplankton in marine ecosystems, but many species are also the main contributors of harmful algal blooms (HABs). Consequently, research on their AP can help us more clearly understand the process of harmful algal bloom development and the molecular mechanism of phosphorus utilization in dinoflagellates. Research on molecular mechanism of alkaline phosphatase gene expression in dinoflagellates has just begun; report to date has been limited to the isolation and transcriptional regulation characterization of AP gene (*ap*) in three representative species of dinoflagellates. For instance, AP gene transcriptional level in *Amphidinium carterae* has been shown to be regulated by inorganic phosphorus concentration in the environment. There are many different types of AP in marine phytoplanktons, which require different cofactor, yet it remains unexplored what metal ions AP in dinoflagellates require.

In this study, we chose to study AP in *A. carterae*, with the following objectives: (1) Over-producing *A. carterae* AP (AcaAP) in generating a polyclonal antibody against AcaAP; (2) Using the antibody in Western blot, determining the abundance of alkaline phosphatase protein in cultures grown under different concentrations of DIP; (3) Identifying the optimal cofactor and pH for alkaline phosphatase in *A. carterae*, *Karenia mikimotoi*, *Prorocentrum minimum*, *Alexanderium catenella* (Clade IIC), *Symbiodinium kawagutii* (Clade F) and *Symbiodinium* sp. (Clade E).

The main results are as follows:

1. AcaAP recombinant protein was over-produced in *Escherichia coli* transformed with expression vector pEASY-E2/AcaAP. The recombinant protein was soluble and can be used for the study of AP activity. It was found that the molecular

of AcaAP is 70 kDa.

2. Recombinant AcaAP N-terminus 180 amino acid peptide was over-produced in *E. coli* transformed with pEASY-E2/AcaAP-180. The recombinant protein was shown to be soluble and used to immunize a rabbit to produce a polyclonal antibody.

3. Compared to the DIP-replete group, cultures in the DIP-depleted group did not show noticeable exponential growth phase, and grew only slightly, but reaching a plateau earlier and with a lower biomass yield. The APA (Alkaline phosphatase activity) exhibited a clear rising trend in the DIP-depleted group and APA in the DIP-replete group maintained stable. Statistical analysis showed a significant difference between the two treatments ( $p < 0.01$ ; two-tailed T-test).

4. In Western blot, the expression of AcaAP in the DIP-depleted group increased remarkably over time, with a much higher abundance than in the control group in which the abundance remained at a stable level. AcaAP expression in the DIP-depleted group was 50 times than that in the DIP-replete group after it was normalized to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH). Regression analysis showed that APA was significantly correlated with AcaAP abundance in the cultures ( $p < 0.05$ ), and AcaAP abundance accounted for 80% of variations in APA ( $R^2 > 0.8$ ).

5. Protein structure simulation showed that the secondary structure of AcaAP was mainly composed of alpha helix and beta folding, with the latter being dominant. We found that the tertiary structure of AcaAP was composed of two similar parts, and the gap between the two parts was supposed to be filled with metal ions. This prediction model is 2cn3A02, which is from the *clostridium* hydrolase with the cofactor of  $Ca^{2+}$ .

6. Under the DIP-depleted condition, APA of all dinoflagellate species examined was promoted by the addition of  $Ca^{2+}$  or  $Mg^{2+}$  following EDTA chelating of metal ions. But as the cofactor of the typical AP-PhoA,  $Zn^{2+}$  addition did not promote APA in dinoflagellates, instead of the inhibitory effects on the APA of *A. carterae* and *A. catenella*. Further gel assay of AcaAP showed that the molecular mass of AcaAP was 130 kDa and the cofactor appeared to be  $Ca^{2+}$  alone.

7. In APA assays for several dinoflagellate species to investigate pH effects, these AP showed a pH optimum in the range of pH7-10, and when the pH<7 or >10, APA was significantly inhibited. This contrasts with AP in bacteria of activity of which increases with the increase of pH. Unexpectedly, our research showed that AP activity was not dramatically affected by the change of pH in *A. catenella* and *K. mikimotoi*.

In conclusion, our study showed that AP of dinoflagellates is a new type of alkaline phosphatase with  $\text{Ca}^{2+}$  or  $\text{Mg}^{2+}$  as the required cofactors and neutral to slight basic pH as optimal pH condition, and the *in vivo* active form may be a dimer.

**Key words:** Dinoflagellate; Alkaline phosphatase; Phosphate limitation; Inducible expression; Cofactor; Optimum pH; Western blot

# 第1章 绪论

## 1.1 磷

磷是生物体的基本元素之一，在海洋中磷是初级生产力必需的营养元素之一 (Froelich et al., 1982)，为生物的生长提供必要的元素。磷是细胞重要组成部分 (Paytan & McLaughlin, 2007)，组成了与之相关的各种活性物质如蛋白质、核苷酸、磷脂等，而且对基因的储存和表达中都起着重要的作用，并且参与了生物体的新陈代谢以及细胞的应激反应 (Karl, 2000)。因此，磷营养盐的缺乏将限制海洋藻类的生长繁殖 (Tetu et al., 2009)。

### 1.1.1 海洋中的磷

海洋中各种不同形式的溶解磷构成了海洋总溶解态磷库 (total dissolved phosphorus, TDP)，TDP 主要分为三种：颗粒态磷 (particulate phosphorus, PP)，溶解态活性磷 (soluble reactive phosphorus, SRP) 和溶解态非活性磷 (soluble nonreactive phosphorus, SNP) (Paytan & McLaughlin, 2007)。

对于浮游植物来讲，主要利用的磷源是溶解态无机磷 (dissolved inorganic phosphorus, DIP)，是 SRP 中的主要组成部分，其存在形式为正磷酸盐 ( $\text{HPO}_4^{2-}$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ ) (Suzumura & Ingall, 2004)。然而，海洋中正磷酸盐的溶解度很低 ( $[\text{PO}_4^{3-}] = 1 \mu\text{mol/L}$ , pH 7.0, 25 °C)。而且由于浮游植物的光合作用会消耗磷营养盐，使得表层水中 DIP 的含量较低，其中北太平洋和北大西洋表层水中的 DIP 含量最低 (Benitez-Nelson, 2000; Paytan & McLaughlin, 2007)，太平洋表层水的 DIP 浓度约为 0.01-0.43  $\mu\text{mol/L}$  (Suzumura & Ingall, 2004)，北大西洋的 Sargasso 海区，因为固氮生物的大量生长使得磷酸盐的含量只有纳摩尔级 (Karl, 2000)。在沿岸海区的夏季，由于浮游植物发生水华，表层海水的 SRP 常常低于 0.2  $\mu\text{mol/L}$  (Benitez-Nelson, 2000)。

海洋环境中的溶解态有机磷 (dissolved organic phosphorus, DOP) 在 SNP 中占有很高的比重，这其中包括磷脂、磷酸酯、蛋白质、核酸等 (Benitez-Nelson, 2000; Paytan & McLaughlin, 2007)。已有报道称，在全球海洋的表层海水中，SNP 占总溶解态磷库 (total dissolved phosphorus, TDP) 一半左右



Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”.

Fulltexts 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](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.