

学校编码: 10384
学 号: 21720080150418

分类号_____密级_____
UDC_____

双孢蘑菇耐热相关基因的研究

邓立新

指导教师
沈月毛教授

厦门大学

博 士 学 位 论 文

双孢蘑菇耐热相关基因的研究

Studies on the Thermotolerant Related Genes of *Agaricus Bisporus*

邓立新

指导教师姓名: 沈月毛 教授
专 业 名 称: 生物化学与分子生物学
论文提交日期: 2013 年 6 月
论文答辩时间: 2013 年 6 月
学位授予日期: 年 月

答辩委员会主席: _____
评 阅 人: _____

2013 年 6 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	V
ABSTRACT.....	XI
第 1 章 前言	1
1.1 双孢蘑菇.....	1
1.1.1 双孢蘑菇简介	1
1.1.2 双孢蘑菇的生物学特征.....	1
1.1.3 温度对双孢蘑菇栽培的影响.....	2
1.2 热休克应答.....	2
1.2.1 基础性耐热与获得性耐热.....	3
1.2.2 热休克蛋白	3
1.2.3 泛素与泛素连接酶	6
1.2.4 热休克转录因子	7
1.2.5 亲环素蛋白	9
1.2.6 海藻糖	10
1.3 信号	11
1.3.1 活性氧簇	11
1.3.2 信号通路	12
1.4 自然界中生命体耐热的例子.....	12
1.5 本课题研究背景, 内容和意义.....	13
1.5.1 研究背景	13
1.5.2 研究内容	16
1.5.3 研究意义	16
第 2 章 材料与方.....	17
2.1 实验材料.....	17
2.1.1 仪器与耗材	17
2.1.2 药品与试剂	18
2.1.3 实验生物	18
2.1.4 溶液与缓冲液	19
2.1.5 培养基	23
2.2 实验方.....	25
2.2.1 大肠杆菌感受态细胞的制备.....	25
2.2.2 聚合酶链式反应产物测序.....	25
2.2.3 双孢蘑菇菌丝体培养	26
2.2.4 菌丝体 DNA 提取	26
2.2.5 RNA 提取与纯化及反转录.....	28
2.2.6 5' 和 3' RACE 克隆	30

2.2.7	耐热相关基因 cDNA 全长的克隆.....	35
2.2.8	耐热相关基因 gDNA 全长的克隆.....	36
2.2.9	耐热相关基因 gDNA 5' 侧翼序列的克隆.....	36
2.2.10	实时荧光定量 PCR 分析.....	40
2.2.11	菌丝体总蛋白质提取.....	41
2.2.12	蛋白质印迹分析.....	42
2.2.13	对氨基苯甲酸合成酶基因序列比对分析.....	43
2.2.14	对氨基苯甲酸合成酶基因重组表达载体的构建.....	43
2.2.15	对氨基苯甲酸合成酶重组蛋白在大肠杆菌中表达.....	44
2.2.16	多克隆抗体的制备和效价测定.....	46
2.2.17	酶联免疫吸附测定法检测抗体效价.....	46
2.2.18	双孢蘑菇 <i>pabS</i> 基因重组蛋白的体外生物学活性.....	47
2.2.19	外源对氨基苯甲酸和水杨酸对蘑菇菌丝体抗热胁迫的效应.....	50
2.2.20	拟南芥种子消毒方法.....	51
2.2.21	转耐热相关基因拟南芥表达载体构建.....	51
2.2.22	转基因拟南芥表达载体转化农杆菌.....	52
2.2.23	花序浸渍法转化拟南芥.....	53
2.2.24	转耐热相关基因拟南芥总 DNA 提取.....	54
2.2.25	转耐热相关基因拟南芥聚合酶链式反应鉴定.....	54
2.2.26	转耐热相关基因拟南芥总蛋白质的提取.....	55
2.2.27	转耐热相关基因拟南芥蛋白质印迹鉴定.....	56
2.2.28	转耐热相关基因拟南芥纯合子的筛选和鉴定.....	56
2.2.29	转耐热相关基因拟南芥的耐热表型分析.....	56
2.2.30	转耐热相关基因蘑菇表达载体的构建.....	57
2.2.31	转耐热相关基因农杆菌聚合酶链式反应鉴定.....	59
2.2.32	菌褶侵染法转化双孢蘑菇 8213.....	61

第 3 章 结果与分析..... 62

3.1	双孢蘑菇五个耐热相关基因克隆和表达差异分析.....	62
3.1.1	三株双孢蘑菇菌株基因组 DNA 的 ITS 鉴定.....	62
3.1.2	RNA 提取和纯化和反转录.....	63
3.1.3	耐热相关基因 EST 两侧序列克隆和测序.....	64
3.1.4	耐热相关基因 cDNA 全长的克隆和测序.....	66
3.1.5	DNA 提取.....	68
3.1.6	耐热相关基因 gDNA 全长的克隆和测序.....	68
3.1.7	耐热相关基因 gDNA 5' 侧翼序列的克隆和测序.....	70
3.1.8	实时荧光定量 PCR 分析耐温相关基因表达差异.....	73
3.1.9	蛋白质印迹分析耐温相关蛋白表达差异.....	77
3.1.10	小结与讨论.....	77
3.2	双孢蘑菇 <i>pabS</i> 基因的异源表达和生化特性分析.....	78
3.2.1	氨基酸序列比对分析.....	78
3.2.2	<i>AbpabS</i> -pGEX4t-1 和 <i>EcpabC</i> -pGEX4t-1 重组载体的构建.....	81
3.2.3	<i>AbpabS</i> -pET28a 重组载体的构建.....	81

3.2.4	<i>pabS</i> 基因在大肠杆菌中表达和蛋白纯化.....	82
3.2.5	双孢蘑菇氨基脱氧分支酸合成酶多克隆抗体的制备.....	84
3.2.6	对氨基苯甲酸标准曲线的绘制.....	84
3.2.7	谷氨酰胺依赖的双孢蘑菇氨基脱氧分支酸合成酶酶活分析....	85
3.2.8	温度和 pH 值对双孢蘑菇氨基脱氧分支酸合成酶酶活的影响...	86
3.2.9	阳离子, 有机溶剂及 H ₂ O ₂ 对氨基脱氧分支酸合成酶酶活的影响	87
3.2.10	双孢蘑菇氨基脱氧分支酸合成酶的米氏常数.....	90
3.2.11	双孢蘑菇氨基脱氧分支酸合成酶重组蛋白标签切除.....	91
3.2.12	外源对氨基苯甲酸和水杨酸对双孢蘑菇菌丝体抗热胁迫的效应	91
3.2.13	小结与讨论	92
3.3	利用拟南芥鉴定双孢蘑菇 <i>hsp20</i> 和 <i>pabS</i> 基因的耐温功能	94
3.3.1	转基因拟南芥植株的获得.....	94
3.3.2	转基因拟南芥纯合子鉴定.....	94
3.3.3	转基因拟南芥植株聚合酶链式反应鉴定.....	95
3.3.4	转基因拟南芥植株蛋白质印迹鉴定.....	96
3.3.5	转基因拟南芥植株耐热表型分析.....	97
3.3.6	小结与讨论	98
3.4	转耐热相关基因双孢蘑菇 8213 菌株的初步研究	101
3.4.1	转耐热相关基因蘑菇表达载体的构建.....	101
3.4.2	转耐热相关基因农杆菌鉴定.....	103
3.4.3	农杆菌侵染双孢蘑菇 8213 菌株的初筛和复筛.....	103
第 4 章	总结与展望.....	105
参考文献	107
附录一	引物表	112
附录二	序列数据	114
附录三	琼脂糖凝胶电泳图.....	124
附录四	实时荧光定量图.....	126
附录五	SDS-PAGE 电泳图谱.....	128
附录六	转基因拟南芥苗 PCR 鉴定.....	131
附录七	转基因拟南芥存活苗统计.....	132
缩略语与中英文对照	133

致 谢 134

厦门大学博硕士学位论文摘要库

CONTENTS

Abstract in chinese	V
Abstract	VI
Chapter1 Preface	1
1.1 <i>Agaricus bisporus</i>	1
1.1.1 Introduction of <i>A. bisporus</i>	1
1.1.2 The biological characteristics of <i>A. bisporus</i>	1
1.1.3 Temperature effects on <i>A. bisporus</i> culturing	2
1.2 Heat shock response	2
1.2.1 Basal thermotolerance and acquired thermotolerance	3
1.2.2 Heat shock protein	3
1.2.3 Ubiquitin and ubiquitin ligase	6
1.2.4 Heat shock transcription factor	7
1.2.5 Cyclophilin	9
1.2.6 Trehalose	10
1.3 Signaling	11
1.3.1 Reactive oxygen species	11
1.3.2 Signaling pathways	12
1.4 Sample of thermotolerant organism in nature	12
1.5 Background, contents and significance of this thesis	13
1.5.1 Background	13
1.5.2 Contents	16
1.5.3 Significance	16
Chapter2 Materials and methods	17
2.1 Materials	17
2.1.1 Instrumental and consumptive materials	17
2.1.2 Chemical reagents	18
2.1.3 Experimental organisms	18
2.1.4 Solution and buffer	19
2.1.5 Medium	23
2.2 Methods	25
2.2.1 Preparation for <i>E. coli</i> competent cells	25
2.2.2 Sequencing of PCR product	25
2.2.3 Culturing for <i>A. bisporus</i> mycelium	26
2.2.4 Extraction DNA from mycelium	26
2.2.5 RNA extraction, purification and reverse transcription	28
2.2.6 5' RACE and 3' RACE cloning	30

2. 2. 7	Cloning cDNA full length for thermotolerance-related genes	35
2. 2. 8	Cloning gDNA full length for thermotolerance-related genes	36
2. 2. 9	Cloning 5' flanking sequence of thermotolerance-related gDNA. . .	36
2. 2. 10	Real-time PCR analysis	40
2. 2. 11	Extraction total protein from mycelium	41
2. 2. 12	Western blot analysis	42
2. 2. 13	Sequence alignment analysis for PABA synthase.....	43
2. 2. 14	Construction of recombinant expressing vectors	43
2. 2. 15	Expression of PABA synthase in <i>E. coli</i>	44
2. 2. 16	Preparation of poly-antibody	46
2. 2. 17	ELISA determination for titer of antibody	46
2. 2. 18	<i>In vitro</i> biological activity of <i>pabS</i> gene recombinant protein	47
2. 2. 19	Exogenous PABA and SA effect on mycelium during heat stress ..	50
2. 2. 20	Method for sterilization of <i>Arabidopsis thaliana</i> seeds	51
2. 2. 21	Construction of transgenic <i>Arabidopsis thaliana</i> expressing vectors	51
2. 2. 22	Transformation for <i>Agrobacterium</i> with expressing vectors.....	52
2. 2. 23	Transfection of <i>Arabidopsis thaliana</i> by floral dip.....	53
2. 2. 24	Extraction of transgenic <i>Arabidopsis thaliana</i> total DNA	54
2. 2. 25	PCR identification of transgenic <i>Arabidopsis thaliana</i>	54
2. 2. 26	Extraction of transgenic <i>Arabidopsis thaliana</i> total protein.....	55
2. 2. 27	Western blot identification of transgenic <i>Arabidopsis thaliana</i>	56
2. 2. 28	Selection and identification of homozygotes	56
2. 2. 29	Thermotolerance phenotype analysis	56
2. 2. 30	Construction of transgenic <i>A. bisporus</i> expressing vectors	57
2. 2. 31	PCR identification of transgenic <i>Agarobacterium</i>	59
2. 2. 32	Transfection of <i>A. bisporus</i> 8213 gill	61
Chapter3 results and analysis		62
3.1 Cloning and expression difference analysis of five <i>A. bisporus</i> thermotolerance-related genes		62
3. 1. 1	ITS identification of genomic DNA of three <i>A. bisporus</i> strains ..	62
3. 1. 2	RNA extraction, purification and reverse transcription	63
3. 1. 3	5' RACE and 3' RACE cloning for thermotolerance-related EST ..	64
3. 1. 4	Cloning and sequencing cDNA full length.....	66
3. 1. 5	Extraction DNA from mycelium.....	68
3. 1. 6	Cloning and sequencing gDNA full length	68
3. 1. 7	Cloning and sequencing 5' flanking sequence	70
3. 1. 8	Real-time PCR analysis	73
3. 1. 9	Western blot analysis	77
3. 1. 10	Conclusions and Discussions	77
3.2 Hetero-expression of <i>A. bisporus pabS</i> gene and Biochemical character analysis.....		78
3. 2. 1	Sequence alignment analysis for PABA synthase.....	78

3.2.2	Construction of <i>AbpabS</i> -pGEX4t-1 and <i>EcpabC</i> -pGEX4t-1 recombinant expressing vectors	81
3.2.3	Construction of <i>AbpabS</i> -pET28a recombinant expressing vectors..	81
3.2.4	Expression of <i>pabS</i> gene in <i>E. coli</i> and purification of protein	82
3.2.5	Preparation of poly-antibody of <i>A. bisporus</i> ADCS	84
3.2.6	Draw standard curve of PABA	84
3.2.7	Glutamine dependent <i>Ab</i> ADCS enzyme activity analysis	85
3.2.8	Effect of temperature and pH on <i>Ab</i> ADCS.	86
3.2.9	Effect of Positive ions, solvent and H ₂ O ₂ on <i>Ab</i> ADCS	87
3.2.10	The Michaelis mentan constant of <i>Ab</i> ADCS	90
3.2.11	Cut-off tags of recombinant <i>Ab</i> ADCS	91
3.2.12	Exogenous PABA and SA effect on mycelium during heat stress ..	91
3.2.13	Conclusions and Discussions	92
3.3	Identification thermotolerance function of <i>Abhsp20</i> and <i>AbpabS</i> by <i>Arabidopsis thaliana</i>	94
3.3.1	Acquisition of transgenic <i>Arabidopsis thaliana</i> strains	94
3.3.2	Identification of transgenic <i>Arabidopsis thaliana</i> homozygotes ...	94
3.3.3	PCR identification of transgenic <i>Arabidopsis thaliana</i>	95
3.3.4	Western blot identification of transgenic <i>Arabidopsis thaliana</i>	96
3.3.5	Thermotolerance phenotype analysis	97
3.3.6	Conclusions and Discussions	98
3.4	Preliminary study for transgenic <i>A. bisporus</i> 8213 strain	101
3.4.1	Construction of transgenic <i>A. bisporus</i> expressing vectors.....	103
3.4.2	PCR identification of transgenic <i>Agarobacterium</i>	103
3.4.3	Preliminary secreening and rescreening for <i>A. bisporus</i> 8213 gill transfected with <i>Agarobacterium</i>	103
Chapter4 Innovation and prospect		105
References		107
Appendix I Table of primers		112
Appendix II Data of sequences.....		114
Appendix III Graph of agarose electrophoresis.....		124
Appendix IV Graph of real-time PCR.....		126
Appendix V Graph of SDS-PAGE		128

Appendix VI PCR identification of transgenic *Arabidopsis thaliana*..... 131

Appendix VII Survival seedlings of transgenic *Arabidopsis thaliana*..... 132

Abbreviations 133

Acknowledgement 134

厦门大学博硕士论文摘要

摘要

双孢蘑菇是高经济价值和生态意义的栽培食用菌。在许多因素中，温度是影响其栽培的主要因素。双孢蘑菇 02 菌株是一株耐热菌株，可在 25°C~28°C 下栽培；而 8213 菌株是一株普通菌株，只能在 16°C~22°C 下栽培。目前 02 菌株耐热的本质尚不清楚。本实验室通过构建的两个抑制性消减杂交文库 I(02 热胁迫 vs. 8213 热胁迫) 和 II (02 热胁迫 vs. 02 非热胁迫) 获得一批耐热相关基因的 EST 序列。本文对一些候选 EST 序列进行了以下研究：首先，通过 cDNA 末端快速扩增技术克隆 EST 序列 1F6, 1F146, First8, 2F277 和 2F255 两侧序列；以两侧序列设计引物，通过反转录 PCR 克隆 1F6, First8, 2F277 和 2F255 的 cDNA 全长，序列分析分别预测为 *pabS*, *lectin*, *hsp90* 和 *hsp70* 基因。以克隆 cDNA 的相同的引物，但以 02 菌株 gDNA 为模板，获得了 *pabS*, *lectin*, *hsp90* 和 *hsp70* gDNA 全长。以获得的 gDNA 序列设计引物，通过 SEFA-PCR，克隆了 *pabS*, *hsp90* 和 *hsp70* gDNA 5' 侧翼序列，以便将来研究其转录机制。通过实时荧光定量 PCR 分析预测的 *pabS*, *lactonase*, *lectin*, *hsp20*, *hsp90* 和 *hsp70* 基因在三个双孢蘑菇菌株 (02 菌株, 2796 菌株和 8213 菌株) 中的表达差异，发现 *lectin*, *hsp90* 和 *hsp70* 在 02 菌株中高表达；以 GAPDH 为内参，通过蛋白质印迹验证预测的 PABA 合成酶，HSP90 和 HSP70 蛋白在三个双孢蘑菇菌株中的表达差异。其次，对预测的 PABA 合成酶蛋白的生化特性进行了分析，结果表明它是一个氨基脱氧分支酸合成酶 (ADCS)，需要添加氨基脱氧分支酸裂解酶 (ADCL) 才能将分支酸转化成对氨基苯甲酸。该酶的最适温度 25°C，最适 pH 8.0，对双底物之一分支酸的米氏常数是 116 $\mu\text{mol/L}$ ，而另一底物谷氨酰胺的米氏常数是 2.47 mmol/L；过氧化氢对酶活性有明显的破坏作用，热休克蛋白 20 可使酶活性得到部分恢复，而巯基试剂能够恢复大部分酶活性，提示半胱氨酸基团与酶活性相关。第三，比较转双孢蘑菇 *hsp20* 基因和 *pabS* 基因拟南芥的耐热表型；发现过表达 *hsp20* 基因能够促进拟南芥下胚轴热激后恢复生长，而过表达 *pabS* 基因能够促进根的生长，提示 HSP20 蛋白可能直接参与双孢蘑菇 02 菌株的耐热过程。最后

一点，但也是非常重要的一点，利用本实验室已构建转蘑菇耐热相关基因农杆菌侵染双孢蘑菇 8213 菌褶进行初步研究。

关键词： 双孢蘑菇；热休克蛋白；实时荧光定量 PCR；蛋白质印迹；4-氨基-4-脱氧分支酸合成酶；耐热表型

厦门大学博硕士论文摘要库

Abstract

Agaricus bisporus (*A. bisporus*) is a kind of edible mushroom with high ecological and economical values. Among various factors, temperature is the critical factor restricted for its cultivation. *A. bisporus* 02 is a thermotolerance strain, which can be cultivated at 25°C~28°C, whereas *A. bisporus* 8213 is a normal strain, only adapt for growing at 16°C~22°C. As we know, the mechanism of thermotolerance of *A. bisporus* 02 is unclear. Based on suppression subtractive hybridization (SSH), our laboratory has obtained a number of EST sequences of thermotolerance related genes. In this paper, we studied several selected EST sequences from multi dimension. First, we cloned flanking sequences of *1F6*, *1F146*, *First8*, *2F277* and *2F255* EST sequences by 5' and 3' RACE, and designed primers based on the two flanking sequences. We then cloned cDNA full-length of *1F6*, *First8*, *2F277* and *2F255*. Sequence alignment analysis suggests they were putative *pabS*, *lectin*, *hsp90* and *hsp70* gene. Used the same primers for cloning cDNA but *A. bisporus* 02 total DNA as template, we acquired full-length of putative *pabS*, *lectin*, *hsp90* and *hsp70* gDNA. Used the known gDNA sequence, we designed SEFA-PCR primers and cloned 5' flanking sequence of *pabS*, *hsp90* and *hsp70* gDNA, which can be used for future transcription mechanism analyzing study. We then used real-time PCR for analyzing expressing difference of putative *pabS*, *lactonase*, *lectin*, *hsp20*, *hsp90* and *hsp70* genes among three *A. bisporus* strains (strain 02, strain 2796 and strain 8213), we found *lectin*, *hsp90* and *hsp70* constitutive overexpressing in *A. bisporus* 02; with GAPDH as reference, we also analyzed putative PABA synthase, HSP90 and HSP70 protein expressing difference by western blot. Second, we analyzed biochemical character of putative PABA synthase. In fact, it is a 4-amino-4-deoxychorismate synthase (ADCS), only added with 4-amino-4-deoxychorismate lyase (ADCL) can it transform chorismate into PABA. *In vitro* experiment suggests it has optimum temperature 25°C and optimum pH 8.0, its K_m for one substrate chorismate is 116

$\mu\text{mol/L}$ and for another substrate glutamine is 2.47 mmol/L . The obvious damage of H_2O_2 on enzyme activity can be recovered by HSP20 feebly; whereas sulphhydryl reagents can remarkably promote its activity, suggesting that cysteine residues are essential for catalytic function. Third, we compared thermotolerance phenotype of *Abhsp20* and *AbpabS* transgenic *Arabidopsis thaliana*, we found overexpressing *hsp20* gene can promote hypocotyl elongation, whereas overexpressing *pabS* gene can promote root elongation after heat-stress, which suggests protein HSP20 involve in thermotolerance of *A. bisporus* 02. Last but not the least; we used *Agrobacterium* transformed with *A. bisporus* thermotolerance-related genes for *A. bisporus* 8213 gill tranfection.

Keywords: *Agaricus bisporus*; heat shock protein; real-time PCR; western blot; 4-amino-4-deoxychorismate synthase; thermotolerance phenotype

第1章 前言

1.1 双孢蘑菇

1.1.1 双孢蘑菇简介

双孢蘑菇别名蘑菇、洋蘑菇、白蘑菇等，喜生长在粪草发酵料上，生林地、草地、田野、公园、道旁等处。广泛分布于北半球温带。中国的华南、华东、华中、东北、西北等地均有分布。属蘑菇科（黑伞科）（Agaricaceae）蘑菇属，学名 *Agaricus bisporus*，因担子上通常仅着生两个担孢子而得名。是目前世界上人工栽培最广泛、产量最高、消费量最大的食用菌。双孢蘑菇依菌盖颜色可分为白色种（又称夏威夷种）、奶油色种（又称哥伦比亚种）和棕色种（又称波希米亚种）。三者 in 栽培习性、生产性能、产品品质上均有不同，其中以白色种栽培最为广泛。

1.1.2 双孢蘑菇的生物学特征

双孢蘑菇子实体中等大，菌盖宽5-12 cm，初半球形，后平展，白色，光滑，略干渐变黄色，边缘初期内卷。菌肉白色，厚，伤后略变淡红色，具蘑菇特有的气味（见图1-1）。菌褶初粉红色，后变褐色至黑褐色，密，窄，离生，不等长，菌柄长4.5-9 cm，直径1.5-3.5 cm，白色，光滑，具丝光，近圆柱形，内部松软或中实，菌环单层，白色，膜质，生菌柄中部，易脱落。



图 1-1. 双孢蘑菇 8213 子实体

Fig 1-1. Fruiting body of *Agaricus bisporus* 8213

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 for delivery details.