

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学 号: 21620101152448

UDC_____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

产蛋白酶海洋细菌的筛选及其酶学性质研究

The Screening of Protease Producing Marine Bacteria and
Research of its Enzymatic Properties

许 树 钦

指导教师姓名: 邵宗泽 研究员

周梅先 副研究员

专业名称: 细胞生物学

论文提交日期: 2013 年 05 月

论文答辩时间: 2013 年 06 月

学位授予日期: 2013 年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2013 年 06 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

厦门大学博士

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.....	1
第一章 前言	5
1.1 蛋白酶在生物体中的生理功能.....	6
1.1.1 为细胞或生物体提供营养.....	6
1.1.2 孢子的萌发.....	6
1.1.3 蛋白质的周转.....	6
1.1.4 基因表达的调控.....	7
1.1.5 酶的修饰.....	7
1.2 蛋白酶的来源.....	7
1.2.1 动物蛋白酶.....	7
1.2.2 植物蛋白酶.....	7
1.2.3 微生物蛋白酶.....	7
1.3 微生物蛋白酶的分类.....	9
1.3.1 按照最适作用温度的分类.....	9
1.3.2 按最适 pH 分类.....	10
1.3.3 按水解肽链的方式分类.....	11
1.3.4 按作用机制的不同分类.....	11
1.4 蛋白酶的的应用	13
1.4.1 食品工业.....	13
1.4.2 皮革加工业.....	13
1.4.3 动物饲料行业.....	14
1.4.4 洗涤行业.....	14
1.4.5 纺织业.....	14
1.4.6 营养和医药行业上的应用.....	15
1.5 羧肽酶.....	15
1.5.1 羧肽酶的分类及其特点.....	16
1.5.2 羧肽酶研究现状.....	17
1.6 海洋微生物资源及其酶的开发应用	18
1.7 选题背景及意义.....	18
第二章 蛋白酶高产海洋细菌的筛选及酶学性质研究.....	21
2.1 实验材料.....	21
2.1.1 菌株.....	21
2.1.2 培养基.....	21
2.1.3 主要试剂及其配制.....	23
2.1.4 主要仪器.....	24

2.2 实验方法	26
2.2.1 蛋白酶高产菌株的筛选.....	26
2.2.2 细菌 16S rDNA 的扩增及其序列测定.....	26
2.2.3 蛋白酶活性的检测.....	31
2.2.4 菌株 2761 产酶条件的优化.....	35
2.2.5 菌株 2761 蛋白酶性质的初步研究.....	37
2.2.6 蛋白酶 VFPro 的纯化.....	38
2.2.7 纯化过的蛋白酶性质研究.....	40
2.3 实验结果与分析	42
2.3.1 产蛋白酶海洋细菌的筛选和纯化.....	42
2.3.2 菌株 2761 16S rDNA 的扩增及测序.....	43
2.3.3 菌株 2761 的产酶培养基和产酶条件的优化.....	44
2.3.4 菌株 2761 蛋白酶性质的初步研究.....	49
2.3.5 蛋白酶 VFPro 的纯化及其性质研究.....	51
2.4 讨论	56
2.4.1 高产蛋白酶海洋细菌的筛选及产酶优化.....	56
2.4.2 蛋白酶 VFPro 的分离纯化.....	56
2.4.3 蛋白酶 VFPro 酶学性质的鉴定.....	57
2.4.4 问题和展望.....	57
第三章 产蛋白酶高温菌株的筛选及其羧肽酶基因克隆表达	58
3.1 实验材料	58
3.1.1 深海火山热液口沉积物.....	58
3.1.2 菌株.....	58
3.1.3 质粒.....	58
3.1.4 培养基.....	58
3.1.5 主要试剂.....	59
3.1.6 主要仪器.....	59
3.2 实验方法	60
3.2.1 菌株初筛.....	60
3.2.2 菌株的分离纯化.....	60
3.2.3 菌株 TVG18-1 的 16SrDNA 测序鉴定.....	60
3.2.4 菌株 TVG18-1 系统发育树的构建.....	60
3.2.5 菌株 TVG18-1 蛋白酶基因的扩增.....	60
3.2.6 菌株 TVG18-1 羧肽酶 (SCP18) 重组载体的构建.....	63
3.2.7 羧肽酶 SCP18 序列分析.....	65
3.2.8 菌株 TVG18-1 羧肽酶的表达.....	65
3.2.9 菌株 TVG18-1 羧肽酶的透析复性及初步纯化.....	66
3.3 实验结果与分析	67
3.3.1 菌株的初筛及其分离纯化.....	67
3.3.2 菌株 TVG18-1 的 16S rDNA 测序鉴定.....	67
3.3.3 菌株 TVG18-1 蛋白酶基因的扩增及序列测定.....	68
3.3.4 羧肽酶序列分析.....	73

3.3.5 菌株 TVG18-1 丝氨酸羧肽酶重组表达载体的构建	75
3.3.6 SCP18 的异源表达及初步纯化	77
3.4 结果讨论	81
3.4.1 产蛋白酶高温菌株的筛选及其初步鉴定	81
3.4.2 菌株 TVG18-1 羧肽酶基因的克隆	81
3.4.3 菌株 TVG18-1 羧肽酶蛋白的异源表达	81
3.4.4.存在问题与展望	82
参考文献	83
致谢	91

厦门大学博士

CONTENTS

ABSTRACT.....	3
----------------------	----------

Chapter I Introduction	5
-------------------------------------	----------

1.1 The physiological functions of protease in the organism	6
--	----------

1.1.1 Provide nutrition for cell or organism.....	6
---	---

1.1.2 Spore germination.....	6
------------------------------	---

1.1.3 Protein turnover	6
------------------------------	---

1.1.4 The regulation of gene expression	7
---	---

1.1.5 Modification of enzyme	7
------------------------------------	---

1.2 The source of the protease	7
---	----------

1.2.1 Animal protease	7
-----------------------------	---

1.2.2 Plant Protease.....	7
---------------------------	---

1.2.3 Microbial protease	7
--------------------------------	---

1.3 Classification of microbial protease.....	9
--	----------

1.3.1 Classification according to the optimum temperature	9
---	---

1.3.2 Classification according to the optimum pH	10
--	----

1.3.3 Classification according to hydrolysis of a peptide	11
---	----

1.3.4 Classification according to different mechanisms	11
--	----

1.4 The application of protease.....	13
---	-----------

1.4.1 Food Industry	13
---------------------------	----

1.4.2 Leather Industry	13
------------------------------	----

1.4.3 Animal feed industry.....	14
---------------------------------	----

1.4.4 Detergent industry.....	14
-------------------------------	----

1.4.5 Textile industry	14
------------------------------	----

1.4.6 Nutrition and pharmaceutical industry.....	15
--	----

1.5 Carboxypeptidase.....	15
----------------------------------	-----------

1.5.1 Classification and features of carboxypeptidase.....	16
--	----

1.5.2 The present situation of Carboxypeptidase Research	17
--	----

1.6 The development and application of marine microbial resources and their enzymes.....	18
---	-----------

1.7 The background and significance	18
--	-----------

Chapter II The screening and characterization of protease

hyper-producing marine bacteria and its protease	21
---	-----------

2.1 Materials.....	21
---------------------------	-----------

2.1.1 Strains.....	21
2.1.2 Medium	21
2.1.3 Main reagents and their preparation	23
2.1.4 The main instrument	24
2.2 Methods	26
2.2.1 The screening of protease hyper-producing marine bacteria	26
2.2.2 Amplification and sequencing The bacterial 16S rDNA	26
2.2.3 Determination The The protease activity	31
2.2.4 Optimization of the fermentation conditions for strain 2761.....	35
2.2.5 A preliminary study of the protease nature	37
2.2.6 Purification of the protease	38
2.2.7 Characterization of the purified protease	40
2.3 Results and analysis.....	42
2.3.1 The screening of protease hyper-producing marine bacteria	42
2.3.2 Amplification and sequencing The bacterial 16S rDNA	43
2.3.3 Optimization of the fermentation conditions for strain 2761.....	44
2.3.4 preliminary study of the protease nature.....	49
2.3.5 Purification and Characterization of the purified protease VFPro.....	51
2.4 Discussion	56
2.4.1Protease hyper-producing strains and the the optimal condition to protease producing	56
2.4.2Purification of the protease	56
2.4.3 Characterization of the protease.....	57
2.4.4 Problems and prospects.....	57

Chapter III Screening and carboxypeptidase gene expression of

the protease producing thermophile58

3.1 Materials.....	58
3.1.1 Sediments from Deep-sea volcanic vents	58
3.1.2 Strains.....	58
3.1.3 Plasmid.....	58
3.1.4 Medium	58
3.1.5 Main reagents and their preparation	59
3.1.6 The main instruments.....	59
3.2 Methods	60
3.2.1 The initial screening of the strain.....	60
3.2.2 Purification of the strain.....	60
3.2.3 Amplification and sequencing of The TVG18-1 16S rDNA	60
3.2.4 The construction of the phylogenetic tree.....	60
3.2.5 Amplification and sequencing of the protease gene	60
3.2.6The construction of the recombinant plasmid.....	63
3.2.7The analysis of the SCP18 sequence	65
3.2.8 The expression of the serine carboxypeptidase SCP18	65

3.2.9 Dialysis and preliminary purification for SCP18.....	66
3.3 Results and analysis.....	67
3.3.1 Initial screening and purification of the strain	67
3.3.2 Sequencing of The TVG18-1 16S rDNA.....	67
3.2.3 Amplification and sequencing of the protease gene	68
3.3.4 Analysis of the sequence of SCP18	73
3.3.5 Struction of expression recombinant vector for the SCP18.....	75
3.3.6 Heterologous expression and initial purification of SCP18.....	77
3.4 Discussion	81
3.4.1 Screening of protease producing thermophile and it's identification	81
3.4.2 Cloning of the carboxypeptidase gene from the isolated thermophile	81
3.4.3 Heterologous expression of the serine carboxypeptidase	81
3.4.4. Problems and prospects.....	82
References	83
Acknowledgements	91

摘要

蛋白酶广泛应用于食品、洗涤剂、医药等行业。我国近二十年来对蛋白酶的研究取得了重大的进展，但与国外的研究相比，我国的蛋白酶研究目前还存在着微生物资源开发不足、蛋白酶品种较少、菌株的产酶量不高等问题。而海洋中蕴藏着大量的微生物资源，目前对海洋微生物资源的开发只占不到总数的1%。从海洋微生物中，尤其是从深海环境下分离出来的微生物中筛选蛋白酶，对于弥补我国蛋白酶研究的不足具有重要的意义。

利用牛奶平板筛选法及福林酚法从 120 多株海洋细菌中筛选蛋白酶高产菌株，其中一株海洋弧菌 *Vibrio fluvialis* 2761 在其原始培养基 2216E 中即可产生大量的蛋白酶，其发酵液的蛋白酶活力高达 1800U/ml 以上。对该菌株产蛋白酶培养基及其发酵条件的优化结果表明：菌株 2761 在以玉米粉为碳源、以蛋白胨为氮源、碳氮比为 0.2、起始 pH 值为 7.0 的培养基中具有最佳的蛋白酶产量；其最佳的发酵温度为 25℃；最佳接种量为 1%。通过优化后，菌株 2761 的发酵液中蛋白酶活力提高到了 2700U/ml 以上，比优化前提升了 50% 左右。通过对该菌株发酵液中的蛋白进行 SDS-PAGE 电泳检测及蛋白酶酪素酶谱初步鉴定，该菌产生的蛋白酶表观分子量大小约为 39.3kDa。将蛋白酶粗酶液通过硫酸铵沉淀透析和 DEAE 阴离子交换层析等步骤进行纯化后，对该蛋白酶酶学性质进行了鉴定：其最适作用温度为 55℃，且在 40-60℃ 之间具有良好的酶活性，在低于 50℃ 时，具有良好的热稳定性；最适作用 pH 值为 7.5 左右，且在 pH5.0-11.0 之间具有良好的酸碱稳定性； Mn^{2+} 对该蛋白酶具有明显的激活作用， Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 对该酶活性基本无影响，而 Cu^{2+} 和 Zn^{2+} 对该酶活性具有一定抑制作用；EDTA、SDS 和 DTT 对该酶具有较强烈的抑制作用；而该酶对 PMSF、乙醇、尿素和 Triton 具有一定的耐受性。经过纯化后的蛋白酶比活力高达 13.3 万 U/mg，具有良好的工业应用潜能。

从东太平洋深海火山热液口的沉积物中筛选得到一株产蛋白酶的高温菌株 TVG18-1，其生长温度为 70℃。经 16S rDNA 鉴定，该菌株为海洋嗜热盐菌属 (*Rhodothermus marinus*)。将与 TVG18-1 亲缘关系相近菌株的基因组中的蛋白酶序列进行同源比对，设计引物，从 TVG18-1 菌株的基因组中成功克隆出

一个丝氨酸羧肽酶基因。通过分子克隆技术，构建重组表达载体，将该丝氨酸羧肽酶基因于大肠杆菌中进行了异源表达，并对表达出的羧肽酶蛋白包涵体进行了初步的复性和纯化，为高温羧肽酶的酶学性质研究提供了良好的基础。

关键词：蛋白酶高产海洋细菌；产酶优化；酶活性质；嗜热菌羧肽酶

Abstract

Protease is widely used in food, detergent, pharmaceutical and other industries. Study of protease in recent 20 years in our country also made significant progress, however, there still exists some problems in domestic protease research compare with foreign research, such as the deficiencies of the study and development of microbial resources, the lack of the enzyme varieties and the low amount of the enzyme production from the bacterial strains. Although there contains a large number of microbial resources in the ocean, current development of marine microbial resources only accounts for less than 1% of the total. Therefore, the screening of protease from marine microorganisms, especially the microorganisms isolated from the special habitat under the deep-sea, is of great significance.

A protease-hyperproducing marine bacterial strain named 2761 was screened with skim-milk plate and Folin-phenol Reagent Method from more than one hundred marine bacterias. Informations obtained from the CMCC indicates that the strain belongs to *Vibrio fluvialis*. The strain in the original 2216E medium can produce large amounts of protease, protease activity of the fermented liquid is as high as 1800 u/ml. Fermentation condition optimizing indicates that, the best medium for 2761 to produce protease is using corn starch as its carbon source, and Tryptone as its nitrogen source. And the best carbon nitrogen ratio is 0.2. In the condition that the initial pH of culture medium was 7.0, inoculums was 1%, culture temperature was 25°C, and culture time was 48h, the strain can grow well and reach a total protease activity peak to about 2700U/ml, promoted by about 50% than before optimization. After the preliminary appraisal based on the SDS-PAGE of fermentation liquor and proteinase casein zymography, the protease molecule weight was discovered at about 39.3 kDa. The protease was characterization after purification with ammonium sulfate precipitation and DEAE anion exchange chromatography. The optimal temperature

for the protease activity is 55 °C, and it can keep a good enzyme activity between 40 to 60°C. At the temperature under 50°C, the protease can keep an good thermostability. The optimal pH for the protease activity is at about pH7.5, and it has good pH stability between pH5.0 to 11.0. Mn^{2+} can activate the protease obviously, while Ca^{2+} and Mg^{2+} have no effect on the enzyme activity. However, Cu^{2+} and Zn^{2+} has certain inhibition of this enzyme. EDTA, SDS and DTT have a strong inhibitory effect on the protease activity. The enzyme has an certain tolerance towards to PMSF, ethanol, urea and Triton. In conclusion, protease 2761 was preliminary identified as a neutral moderate temperature metalloprotease.

We isolated an protease producing thermophilic bacteria named TVG18-1 from the the sediments of the deep-sea volcanic vents in the eastern Pacific, it's culture temperature is 70°C. The strain was preliminary identified as *Rhodothermus marinus* based on the analysis of 16S rDNA sequence. Throuth the protease gene seeking from the whole genome sequence of a high similar strain, we design several pairs of primers, and successfully amplified a carboxypeptidase gene of the targeted strain. And through the molecular cloning technology, we successfully constructed an expression recombinant vektor of the serine carboxypeptidase. Then ,the recombinant protein was heterologous expressed in *E.coli*. At last we preliminary renatured and purified the carboxypeptidase from expressed recombinant inclusion body , and layed an good foundation for the future study of enzyme.

Key word:

protease-hyperproducing strain; optimum for protease producing; characterization of enzyme ; carboxypeptidase from thermophile

第一章 前言

蛋白酶广泛存在于动植物及微生物中，是一类催化肽键水解的酶，在生物体中执行着不同的生理功能^[1]。在自然界的生物中，大约有 2% 的基因是用来编码蛋白酶或蛋白酶类似物的^[2]。蛋白酶的英文单词有诸如 protease，Proteinase，peptidase 和 proteolyticenzyme 等，这些不同单词之间原本存在的一些差异^[3]现在已经逐渐模糊。因为很多水解肽键的酶并不直接作用于蛋白质，所以 peptidase 使用的越来越普遍^[4]。

蛋白酶所催化水解的肽键由于具有共振结构使得 C-N 键拥有一些双键的性质（图 1-1），非常稳定，在中性条件下，如果没有酶的催化作用，肽键的水解则需要多达十到一百年时间^[5]。而通过蛋白酶的催化作用可使得生化反应中的肽键在毫秒内被水解。

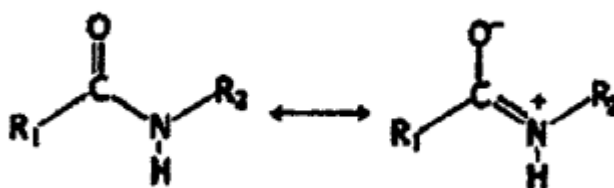


图 1-1 肽键的共振双键结构^[6]

Fig1-1 Resonance double bond of peptide bond

近现代以来，随着生命科学技术的快速发展，基因工程、分子技术等日益成熟，发酵技术以及新型先进发酵设备的出现，利用微生物发酵制备的酶制剂成为工业酶制剂的主要来源。与传统的来源于动植物的蛋白酶，如菠萝、木瓜、猪胰脏等相比，微生物显然具有更多的优势：首先，微生物的生长繁殖速度之快，是一般动植物都望尘莫及的，在适合条件下，微生物在 30 分钟左右就可以繁殖一代；其次，微生物种类繁多，能产生可适应各种不同环境的蛋白酶，如各种温度、pH、离子浓度以及耐受各种有机溶剂等；再次，微生物培养方法相对简单，容易批量生产；最后，微生物产生的蛋白酶多为胞外酶，提纯制备相对容易，有利于降低生产成本。

1.1 蛋白酶在生物体中的生理功能

蛋白酶在各种生物体中都执行着各种各样的复杂的生理功能，其在代谢调控和机能调控方面十分重要。蛋白酶同时在许多病理过程和生理过程中扮演着重要的角色，例如炎症的发生、肿瘤的生长和转移、激素的释放、分泌蛋白的隔膜传送、凝血作用、细胞的生长和复制、组织排列、蛋白转移等。胞外蛋白酶主要催化大分子的蛋白质水解为小分子，为细胞的吸收利用做好准备，而胞内蛋白酶则主要在生物体的新陈代谢中扮演重要角色。到目前为止，我们对大多数蛋白酶的作用机制及其在生物体中的具体作用了解还十分有限。许多针对蛋白酶在代谢途径中扮演的作用的研究正相继展开，这将丰富我们对蛋白酶的了解。

1.1.1 为细胞或生物体提供营养

蛋白酶可以分解大分子蛋白为小分子的肽段和氨基酸，从而促进细胞对蛋白质的吸收利用。胞外蛋白酶由于其具有较强的降解能力从而在生物体营养方面具有重要作用。如动物消化器官上腺体分泌的各种蛋白酶，其主要功能就是降解食物中的蛋白质，促进机体对食物的吸收。

1.1.2 孢子的萌发

处于休眠状态的孢子缺乏萌发所必须的氨基酸。而在丝氨酸蛋白酶的作用下，孢子内的蛋白质降解为氨基酸，为孢子内新的蛋白质的合成提供了氮源。这些蛋白酶对蛋白的降解具有特异性，而对于一些重要的孢子的蛋白则有影响。而且随着孢子的萌发，这些蛋白酶也会迅速丧失活性。研究表明，一些特定的碱性丝氨酸蛋白酶也参与着微生物分生孢子的萌发和菌丝的溶解^[7]；一些胞外蛋白酶还与孢子微孢囊形成时期细胞壁的破裂以及多肽的连接相关^[8]。

1.1.3 蛋白质的周转

在活着的细胞中，都保持着蛋白质降解和合成的一个特定而且连续的平衡。细胞吸收的蛋白质降解成氨基酸，然后再以氨基酸为原料合成新的的蛋白，催化蛋白质降解的是各种蛋白水解酶。在大肠杆菌中，Lon 基因的产物，即依赖 ATP 的蛋白酶 La，负责水解细胞内异常的蛋白质^[9]。ATP 依赖的蛋白酶降解蛋白质的过程比较复杂，包括蛋白酶的激活、肽键的断裂和 ATP 的水解^[10]。在该蛋白酶缺失的突变体中，不能发生蛋白质的周转，说明该蛋白酶参与控制了细

胞内蛋白质的周转。

1.1.4 基因表达的调控

ATP 依赖的蛋白酶除了调控蛋白质周转，在基因表达调控中也发挥着重要作用。如 *Bacillus thuringiensis* RNA 聚合酶 B 亚基的翻译特异性的改变与它的蛋白水解的修饰有关^[11]；而一些核糖体蛋白的蛋白酶的修饰被认为与翻译的调控相关^[12]。

1.1.5 酶的修饰

在生物体内，有一些酶在合成之后以酶原的形式存在，这些酶原需要再一定的蛋白内切酶作用下，切掉相应的肽段才能表现出相应的活性。生物体内有些多肽激素的合成亦需要经过蛋白酶的相关修饰后才能发挥作用。

以上几个方面只是蛋白酶在生物体中的一小部分作用，蛋白酶的许多新的功能及其作用机制亦正在被研究当中。

1.2 蛋白酶的来源

蛋白酶在生物体内执行着各种各样的生理及代谢活性，其对于自然的生物有机体来说是不可或缺的，因此，蛋白酶广泛存在于动植物及微生物中。目前商业上所生产的蛋白酶来源主要有动物蛋白酶、植物蛋白酶以及微生物蛋白酶。

1.2.1 动物蛋白酶

胰岛素、胰蛋白酶、胃蛋白酶、凝乳蛋白酶等是动物来源的主要蛋白酶^[13]。这些蛋白酶已在工业上被大量提取纯化后应用于各个领域。然而，由于动物屠宰量的限制，动物生长周期长，以及相关政策的限定，动物来源的蛋白酶成本较高，使得动物蛋白酶的大量生产存在一定的障碍。

1.2.2 植物蛋白酶

目前在工业上应用的植物蛋白酶主要为木瓜蛋白酶、菠萝蛋白酶、生姜蛋白酶、无花果蛋白酶等，并广泛应用于洗涤行业和食品行业。然而，在植物中，蛋白酶的生产是一个长时间的过程，而且植物本身的生产也受到诸多因素的限制，如天气条件、耕地面积等，因而，其产量有限。

1.2.3 微生物蛋白酶

由于产量的限制，植物和动物来源的蛋白酶远不能满足社会的需求，这使得人们把目光投向了微生物身上。微生物由于生长速度快、可控性强、所需空

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.

廈門大學博