

一对同时鉴定 8 种动物源性成分的通用引物的制备及应用

薛超波¹, 王萍亚¹, 李素芳², 管峰²

(1. 舟山市食品药品检验检测研究院, 浙江舟山 316021) (2. 中国计量大学生命科学学院, 浙江杭州 310018)

摘要: 肉类真假鉴定是食品检测工作的内容之一, 目前已有多种基于 PCR 的肉类鉴定方法, 但是鉴定种类和效率受限。本研究设计了一对基于普通 PCR 技术可同时鉴定 8 种动物源性成分的通用引物并建立了鉴定方法。该引物以线粒体 DNA 为靶标, 利用扩增产物中不同物种间的插入缺失多态性片段大小即可鉴定山羊、绵羊、鹿、水牛、牛、牦牛、猪和骆驼 8 个物种, 扩增后分别得到 728 bp、704 bp、504 bp、453 bp、448 bp、431 bp、396 bp 和 326 bp 的片段, 每种 PCR 产物经 *SspI* 酶切后产生数量和大小不同的片段, 可以进一步清晰鉴别 8 个物种。引物特异性测试表明和其他常见肉类动物 DNA 无交叉反应, DNA 检测最低限度在 0.01~0.05 ng。应用本方法对 40 份市场肉类及产品的检测表明, 羊肉串、羊肉卷以及特色畜产品如驴肉、鹿肉和驴肉存在较多的掺假行为。与其他现有 PCR 检测方法相比, 该方法具有简便易行和高通量的优点, 可以作为肉类掺假筛选检测的常规方法。

关键词: 物种鉴定; 通用引物; 肉类掺假; 多物种检测

文章编号: 1673-9078(2017)6-271-275

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.6.040

Preparation and Application of a Pair of Universal Primers for the Simultaneous Detection of Eight Animal-derived Ingredients

XUE Chao-bo¹, WANG Ping-ya¹, LI Su-fang², GUAN Feng²

(1. Zhoushan Institute for Food and Drug Inspection and Testing, Zhoushan 316021, China)

(2. College of Life Sciences, China Jiliang University, Hangzhou 310018, China)

Abstract: Identification of fraud in meat products is one of the aims of food inspection. Many meat identification methods have been developed based on polymerase chain reaction (PCR), but the number of species and detection efficiency are limited. In the present study, a pair of universal primers was designed for the simultaneous identification of eight animal-derived ingredients and a corresponding detection method was developed. Mitochondrial DNA was used as the target of this pair of primers, and insertion-deletion polymorphisms (variation in the fragment length) of the amplified products of different species was used to identify eight species, including goat, sheep, deer, buffalo, cattle, yak, pig, and camel. The PCR amplifications generated 728 bp, 704 bp, 504 bp, 453 bp, 448 bp, 431 bp, 396 bp, and 326 bp length fragments from goat, sheep, deer, buffalo, cattle, yak, pig, and camel in a single amplification reaction, respectively. The eight PCR products could be cut into different numbers of fragments with different lengths using the restriction enzyme *SspI*, to further distinguish between the eight species. The primer specificity test indicated that this assay had no cross-reactivity with other common meat animals. The detection limit of the DNA samples for eight animal species varied from 0.01 to 0.05 ng. The developed assay was applied to the analysis of 40 commercially available meat products, and the results showed that adulteration often occurred in mutton rolls, mutton kebabs, and other characteristic animal meats, such as deer meat, camel meat, and donkey meat. Compared with other existing PCR-based technologies, this method is a simple high throughput assay that can be used in routine screening for the detection of fraud and adulteration in various meat food products.

Key words: species identification; universal primers; meat adulteration; multi-species detection

收稿日期: 2016-02-01

基金项目: 浙江省食品药品监督管理局项目 (2014020); 浙江省公益项目 (2016C37114)

作者简介: 薛超波 (1978-), 男, 硕士, 高级工程师, 研究方向: 食品安全检测技术

通讯作者: 管峰 (1977-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 动物食品溯源及计量检测技术

食品掺假尤其是肉类掺假已经成为一个国际性问题,中国也早就有“挂羊头卖狗肉”的说法。2013年欧洲“马肉风波”更是把这一焦点问题推向舆论的高潮,肉类掺假成了全球消费者关注的对象。我国每年也有多起肉品掺假事件被媒体曝光,给肉类消费市场带来诸多负面影响,甚至还影响到宗教信仰和社会稳定。随着我国西部的开发,大量特色肉类休闲食品如牦牛肉、鸵肉和鹿肉等成了消费者喜爱的产品,但是价格较普通肉类贵。另一方面,这些产品缺乏相应的鉴定标准,因此成了不法商贩掺假的对象。当今的食品种类更加丰富多样,尤其深加工食品改变了外观和气味,加上复杂的包装,使之难以凭感官鉴别真假。因此,建立相应的鉴定方法是食品监管部门打击肉品掺假行为的前提条件和执法的重要依据。

早期肉类成分的鉴定主要依赖于感官和形态学检验,这些检验方法受到仪器、人员经验和样本处理过程等诸多因素的影响,且局限性大、准确性低,尤其对于深加工的肉类基本无法鉴别。随着分子生物学的发展,基于DNA分析的肉类和物种鉴别技术在精度和灵敏度方面均有极大提高,显示出对加工产品检测的优越性。而线粒体DNA(mtDNA)在物种鉴定中具有比基因组DNA更高的准确度和精度以及良好的重复性,成为近年来物种鉴定和“DNA条形码”技术发展的首选靶标,并在此基础上建立了更为高效的多重PCR技术,在实际检测中得到广泛应用,显示出在检测常见肉类物种中的优势。但是另一方面,多重PCR由于反应体系中引物数量多,存在条件优化难度大、引物和模板配对效率低以及检测物种数量受限等制约,一般来说检测物种数量在4-5个为宜^[1,2],且目前现有的多重PCR方法无法实现对牦牛、牛、水牛、羊以及鹿的同步检测。因此,建立更加简便高效的检测方法是提高肉类掺假检测与市场监管的技术需求,也是提高食品检疫检验工作效率与执法的重要基础。本研究以mtDNA为检测靶标,在全面对比分析常见肉类物种mtDNA序列的基础上,充分利用各物种特有的可变序列,建立了一种能同时检测8个物种的常规PCR方法。该方法简便易行,成本低,提高了物种鉴定的效率,可以作为肉类成分筛选鉴定的备用方法。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

实验所用黄牛、山羊、绵羊、猪、驴和水牛样品采自浙江杭州周边的屠宰场,兔、狗和鼠的样品购自浙江省实验动物中心,鸡、鸭、蛙和鲫鱼样品购自超

市,马、牦牛、鹿、骆驼样品为新疆农垦科学院畜牧所实验室馈赠。商品肉类购自火锅店、烧烤夜市和网店,样品包括腌制成的烤羊肉串、烤鹿肉、烤羊排和冷藏包装的牛肉卷、羊肉卷,还有真空包装的五香驴肉、手撕鸵肉和牦牛肉小包装的休闲食品,不同时间分5次各收集5份样品;杭州某熟食店购买了一份五香水牛肉。

动物组织DNA提取试剂盒、dNTP、Taq DNA聚合酶和Buffer购自杭州康捷生物有限公司;琼脂糖、DNA Marker GM334、核酸染料4S Red等均购自上海生工生物技术有限公司。

1.2 仪器设备

高速冷冻离心机(Sigma公司);水平电泳仪(Tanon Eps300);微量移液器(Bio-Rad);凝胶成像分析系统(Gene Genius);PCR仪(Bio-Rad);Nanodrop 2000(Thermo),电子分析天平;高压灭菌蒸汽菌锅(三洋);微波炉,水浴锅。

1.3 通用引物和参照引物

下载并对比GenBank所公布的多个物种的mtDNA全序列,设计一对可用于山羊、鹿、水牛、牛、绵羊、牦牛、猪和骆驼8个物种检测的通用引物(专利申请号201510443269.1),上游引物序列:5'-CC TCCCTAAGACTCAGGGAA-3';下游引物序列:5'-AG CGGGTTGCTGGTTTCACG-3'。同时,根据文献报道^[3]引入16S rRNA基因引物做阳性参照,和本研究设计的引物组成双重PCR。引物由杭州擎科生物技术公司合成。

1.4 实验方法

1.4.1 DNA提取

按照动物组织DNA提取试剂盒操作说明提取全基因组DNA,提取的DNA溶解于试剂盒提供的TE缓冲液中,经Nanodrop 2000检测确认后稀释至10 ng/ μ L放置于4 °C备用。同时,本研究中还使用大豆基因组DNA做参照。

1.4.2 PCR扩增及检测

对研究中的样本DNA进行PCR扩增,反应体系为20 μ L,其中包含2.0 μ L的10 \times Buffer缓冲液,各1.2 μ L的上下游引物(10 μ M),1.6 μ L的dNTP mix(2.5 μ M),1.6 μ L的MgCl₂(2.5 μ M)缓冲液,3.0 μ L的DNA模板(约30 ng DNA),Taq DNA聚合酶0.2 μ L(5 U/ μ L),最后加超纯水补充至20 μ L。商品肉类的检测使用双重PCR体系,即在原来PCR体系基础上

加入一对 16S rRNA 参照引物, 各 0.2 μL (10 μM), 其他试剂不变, 相应减少 0.4 μL 水。PCR 及双重 PCR 使用相同的反应程序, 过程如下: 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 40 s, 62 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 40 s 为一个循环, 共计 30 个循环; 然后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。

PCR 产物经 2% 琼脂糖电泳检测, 4S Red 核酸染料按照说明书添加至融化的凝胶中。90 V 恒压电泳 45 min 后凝胶成像系统下拍照观察。

1.4.3 特异性和灵敏度

特异性测试即使用通用引物对山羊、绵羊、鹿、水牛、黄牛、牦牛、猪和骆驼 8 个物种以及鸡、鸭、鲫鱼、马、驴、狗、鼠、蛙和兔的基因组 DNA 进行扩增反应, 依据有无 PCR 产物判定特异性。灵敏度测试则采用 DNA 梯度稀释法进行, 直至无法检出 PCR 产物的 DNA 用量即为最低检测量, 同时设置阴性对照。

1.4.4 测序和酶切验证

为了进一步验证本方法的准确性, PCR 产物送往生物公司测序 (杭州擎科生物技术公司)。同时, 用生物学软件 DNASTAR 比较扩增片段的序列差异并用 Primer 5.0 预测酶切位点, 经对比后选择 *SspI* 内切酶进行酶切, 对 PCR 产物进行鉴定。

1.4.5 PCR 重复性及商品肉类产品的检测

对建立的 PCR 方法进行重复性测试, 使用新提取的 DNA 模板, 均重复三次。对收集的 49 份肉类样品使用试剂盒提取 DNA, 按照 PCR 和双重 PCR 方法进行检测, 不能确定成分的样品进行酶切或测序鉴定, 驴肉鉴定参照现行国标或文献报道方法进行检测, 统计结果。

2 结果与讨论

2.1 DNA 提取质量

按照动物组织 DNA 提取试剂盒的说明, 对肉类样品进行 DNA 提取, 检测结果表明提取的 DNA 浓度在 10~200 $\text{ng}/\mu\text{L}$, 纯度测试结果 ($A_{260}/A_{280}=1.82\sim 1.96$) 表明适于进行 PCR 扩增。所有 DNA 样品进行 16S rRNA 基因扩增结果表明, 均能扩增出预期大小 (234~262 bp) 的片段, 说明总 DNA 中 mtDNA 可以用于 PCR 检测。

动物肉类及加工产品中 DNA 提取方法已经非常完善且有很多可选的商业化试剂盒, 甚至可以从深加工的牛和猪源性来源的明胶中提取 DNA 用于溯源鉴定^[4]。本研究主要针对肉类初加工产品或休闲食品, 这些产品经过分割、冷冻、腌制和熏烤等加工过程,

尽管改变了外观颜色和气味, 但是 mtDNA 的稳定性和无组织特异性的优点足以满足后期检测的需要。因此, 本研究中采用商业化的试剂盒按照操作说明即可完成 DNA 提取且质量足以满足后期检测的需要。

2.2 PCR 扩增及特异性和灵敏度

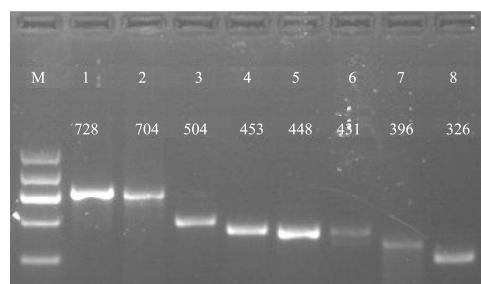


图1 通用引物对 8 种动物的特异性扩增结果

Fig.1 Results of PCR amplifications for eight animal species using universal primers

注: 泳道 1~8 依次为山羊、绵羊、鹿、水牛、黄牛、牦牛、猪和骆驼。

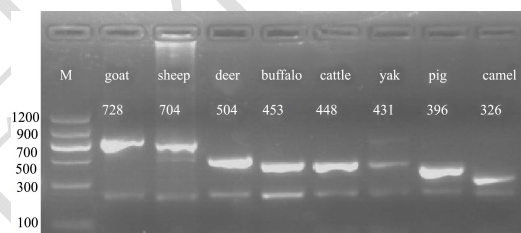


图2 双重 PCR 特异性扩增结果

Fig.2 Results of duplex PCR amplification

利用本研究设计的通用引物, 经 PCR 条件优化后对山羊、绵羊、鹿、水牛、黄牛、牦牛、猪和骆驼以及鸡、鸭、鱼、马、驴、狗、蛙、鼠和兔的基因组 DNA 进行了扩增反应。结果表明该引物能特异性扩增山羊、绵羊、鹿、水牛、黄牛、牦牛、猪和骆驼 8 个物种的 DNA, 且获得与预期大小一致的特异性扩增片段 (图 1), 其大小分别为 728 bp、704 bp、504 bp、453 bp、448 bp、431 bp、396 bp 和 326 bp。而与鸡、鸭、鱼、马、驴、狗、鼠和兔的基因组 DNA 无交叉反应。双重 PCR 结果显示, 具有特异性 PCR 扩增产物的模板 DNA 同时扩增出 16S rRNA 产物 (图 2), 扩增产物在 230~260 bp 之间^[3,5], 大小与预期一致。

引物的特异性是建立 PCR 鉴定方法的关键, 本研究中的通用引物选择了山羊、绵羊、鹿、水牛、黄牛、牦牛、猪和骆驼 8 个物种的高度保守区, 以提高引物的通用性。同时提交 GenBank 进行对比, 对引物序列优化, 避免与其他物种的交叉反应。PCR 特异性测试结果表明该引物能对 8 个靶标物种进行特异性扩增, 扩增片段大小与预期结果一致, 而对其他物种的 DNA

无交叉反应,说明引物具有高度特异性。与 16S rRNA 引物组成的双重 PCR 结果证明,扩增产物中具有两条特异性片段,参照引物可以避免人为和仪器误差带来的结果误判,降低假阳性率,提高检测效率。同时,作为对照的 16S rRNA 扩增产物还能用于初步判断物种来源^[5,6],具有一举两得的效果。相比现有的多重 PCR 技术和荧光 PCR 物种鉴定技术,本方法简单方便,成本低,几乎适于所有生物鉴定实验室开展应用。

基于常规 DNA 分析的物种鉴定方法主要有物种特异性引物扩增及其相应的多重 PCR 技术,这类方法目前广泛用于肉类及其产制品的鉴定研究领域。基于对 mtDNA 的结构和多样性序列的研究成果,Kitano 等^[7]用两对通用引物的双重 PCR 分别扩增 12S rRNA 和 16S rRNA 基因后用直接测序的方法,成功鉴别哺乳类、鸟类、两栖类和鱼类,甚至还可以鉴别物种种类。Tobe 等^[8]以 Cyt B 为靶标建立了通用引物与荧光多重 PCR 结合的物种鉴定方法,可以鉴定欧洲 18 种哺乳动物,包括了常见的牛、狗、狐狸、鼠、鹿、马、人、猪、兔、鹿和绵羊等。但另一方面这些方法所需仪器昂贵,不便开展应用。例如, Tobe^[8]在鉴定欧洲 18 种哺乳动物方法中使用了三条荧光标记的通用引物和其他 35 条引物,更重要的是分析 PCR 产物使用了昂贵的遗传分析仪。与之相比,本研究建立的方法虽然鉴定物种只有 8 种,但超过了目前一般多重 PCR 技术检测物种数量 4~5 个的局限^[1],且检测过程更为简单方便,不需要昂贵的仪器,也不需要荧光标记的引物,更具有推广和应用价值。

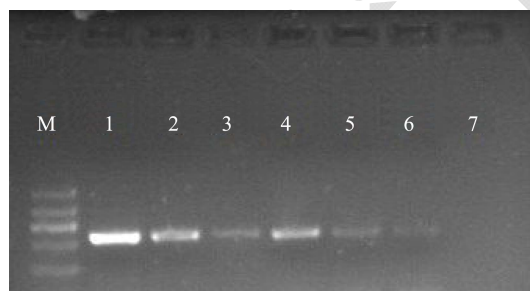


图3 鹿 DNA 检测灵敏度测试

Fig.3 Sensitivity test for deer DNA sample

注:泳道 1~6 所示鹿 DNA 用量(ng): 50.0、25.0、10.0、1.0、0.1 和 0.01,第 7 泳道为阴性对照。

本研究用 DNA 模板连续稀释法对 PCR 体系进行灵敏度测试,DNA 稀释至 0.001 ng/ μ L 进行 PCR 扩增,扩增后经 2%琼脂糖电泳检测,以肉眼可见最低亮度的条带为最低检测限度。电泳结果表明在 20 μ L 体积的 PCR 反应体系中猪 DNA 的最低检测量为 0.008 ng,其他物种在 0.008~0.05 ng 之间,鹿的 DNA 最低检测量为 0.01 ng (图 3)。对于 DNA 分析的 PCR 技术,

目前有不同的灵敏度计量方法,从报道来看主要以待检物掺入重量比和 PCR 体系中 DNA 绝对含量来计量,也有使用基因的拷贝数来计量灵敏度。Safdar 等^[9]建立的 6 重 PCR 方法用以检测马、羊、禽、猪、牛和豆类 DNA,检测灵敏度为掺入成分比重的 0.01%。Hanapi 等^[10]以 mtDNA 的 NADH 基因为靶标建立了多重 PCR 肉类鉴定方法,灵敏度为 0.1 ng 基因组 DNA。Hou 等^[11]建立了鸡、鸭和鹅的多重 PCR 检测方法,使用两种灵敏度计量方法,分别达到 1%和 0.05 ng。本研究中鹿的灵敏度以 PCR 体系中 DNA 含量计算为 0.01 ng,猪 DNA 为 0.008 ng,虽然与之前报道的普通 PCR 检测的 0.001 ng 的灵敏度^[12]有一定差距,但是明显优于 7 重 PCR 体系 2.5 ng 的灵敏度^[13],与其他常规 PCR 物种鉴定技术的灵敏度基本一致。

2.3 PCR-RFLP 和测序方法验证

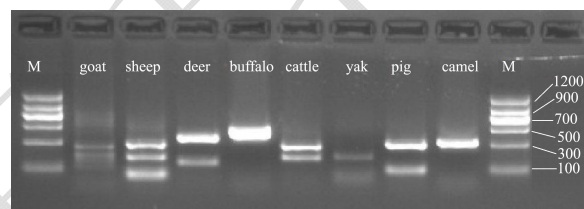


图4 PCR 产物 *SspI* 酶切验证

Fig.4 Validation of the developed assay using *SspI* digestion

为了验证本研究建立方法的准确性,对 PCR 产物进行了测序和限制性内切酶酶切验证。对山羊等 8 个物种 PCR 产物测序后结果在线 BLAST 对比,结果表明山羊、绵羊、鹿、黄牛、牦牛、猪和骆驼的序列同源性系数均在 98%以上,确定为相应物种;而水牛的相似系数为 94%,测试样品中存在 5 个 SNP 位点,推测和本实验中使用的温州水牛物种特异性有关。PCR 产物经 *SspI* 酶切后,结果显示各物种 PCR 产物产生大小不同的片段,能够进一步鉴别上述 8 个物种。*SspI* 酶切后山羊 PCR 产物分成 258 bp、192 bp、160 bp 和 118 bp 共 4 个片段;绵羊 PCR 产物酶切后分成 300 bp、180 bp 和 3 个 75 bp 的片段;鹿的 PCR 产物产生 358 bp 和 146 bp 两个片段;水牛和骆驼 PCR 产物没有切点,因此分别保留原来的 453 bp 和 326 bp 大小;牛 PCR 产物酶切后产生 270 bp 和 178 bp 两个片段,而牦牛则有 181 bp、178 bp 和 73 bp 三个片段;猪的 PCR 产物酶切后有 300 bp 和 96 bp 两个片段,依据这些片段数量和大小差异能够清晰鉴别各个物种,酶切后图谱如图 4 所示。PCR 产物酶切鉴定技术既是物种鉴定的重要方法,也是验证 PCR 扩增片段特异性的重要手段,在物种特异性检测早期建立的方法中得到广泛应用。但由于酶切耗时长、增加费用和过程相对繁

琐,在实际应用中逐步被其他技术所取代,但为本方法的建立提供了重要依据。

2.4 PCR 重复性和商品肉类检测

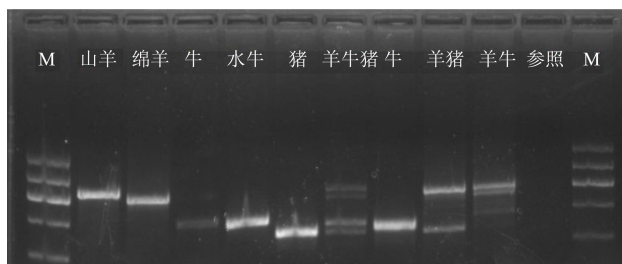


图5 部分商品肉类检测结果

Fig.5 Detection results for commercial meat products

注:泳道标注了商品肉类实际检测成分。

按照本方法的操作过程,使用新提取的DNA,不同时间、不同操作人员,三次重复实验,结果一致。对收集的肉类样品DNA检测,PCR鉴定结果表明5份烤羊肉串中2份含有猪肉成分,5份羊肉卷中4份含有猪肉成分;5份烤鹿肉中2份为真鹿肉,3份全部为牛肉;5份牛肉卷中一份掺入猪肉成分;5份烤羊排全部为绵羊肉,一份水牛肉则完全为猪肉。网店购买的五香驴肉中只有2份为驴肉,3份全部为牛肉;5份手撕驼肉中2份完全为牛肉;5份大漠驼肉中也有3份检测到牛肉成分,5份高原牦牛肉也有3份完全为牛肉。选取部分掺假样品的PCR产物进行直接测序,结果和电泳鉴定结果一致(图5),掺假肉类均出现大小不同的条带。由此可见,特色肉类深加工产品成为掺假的主要对象,也是未来市场肉品监督的重要对象之一。从本方法对肉类鉴定的过程来看,该方法简便易行,掺假肉类直接可以通过电泳图谱判定,相比现行其他的DNA检测技术,本方法相对简单,实验设备要求不高,更适合大多检测单位应用。

3 结论

本研究设计了一对检测8种动物源性成分的通用引物,通过对样品DNA的PCR扩增产物大小即可鉴别物种来源。具体地,可以在一次PCR反应中鉴定山羊、绵羊、鹿、水牛、牛、牦牛、猪和骆驼8个物种,其产物大小分别为728 bp、704 bp、504 bp、453 bp、448 bp、431 bp、396 bp和326 bp。且与其他常见物种无交叉反应,检测灵敏度为0.01 ng。相比现有同技术平台的物种鉴定方法,本方法在一定程度上提高了检测工作效率,且简单易行,所需仪器设备简单,检测成本低,适于大多数检测和研究单位作为物种鉴定方法推广应用。

参考文献

- [1] Bottero M T, Dalmaso A. Animal species identification in food products: evolution of biomolecular methods [J]. *Vet. J.*, 2011, 190(1): 34-38
- [2] Pan W, Byrne-Steele M, Wang C, et al. DNA polymerase preference determines PCR priming efficiency [J]. *BMC Biotechnol*, 2014, 14(1): 1-17
- [3] Bottero M T, Civera T, Nucera D, et al. Design of universal primers for the detection of animal tissues in feedstuff [J]. *Vet Res Commun*, 2003, 27 Suppl 1: 667-669
- [4] Shabani H, Mehdizadeh M, Mousavi S M, et al. Halal authenticity of gelatin using species-specific PCR [J]. *Food Chem.*, 2015, 184: 203-206
- [5] Zhao L N, Wang D, Hu F Y, et al. Detection of animal-derived ingredients in edible vegetable oils by PCR method [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2012, 28(5): 588-592
- [6] Xu J, Zhao W, Zhu M, et al. Molecular identification of adulteration in mutton based on mitochondrial 16S rRNA gene [J]. *Mitochondrial DNA*, 2016, 27(1): 628-632
- [7] Kitano T, Umetsu K, Tian W, et al. Two universal primer sets for species identification among vertebrates [J]. *Int. J. Legal Med*, 2007, 121(5): 423-427
- [8] Tobe S S, Linacre A M. A multiplex assay to identify 18 European mammal species from mixtures using the mitochondrial cytochrome b gene [J]. *Electrophoresis*, 2008, 29(2): 340-347
- [9] Safdar M, Junejo Y. The development of a hexaplex-conventional PCR for identification of six animal and plant species in foodstuffs [J]. *Food Chem.*, 2016, 192: 745-749
- [10] Hanapi U K, Desa M N, Ismail A, et al. A higher sensitivity and efficiency of common primer multiplex PCR assay in identification of meat origin using NADH dehydrogenase subunit 4 gene [J]. *J. Food Sci. Technol.*, 2015, 52(7): 4166-4175
- [11] Hou B, Meng X, Zhang L, et al. Development of a sensitive and specific multiplex PCR method for the simultaneous detection of chicken, duck and goose DNA in meat products [J]. *Meat Sci.*, 2015, 101: 90-94
- [12] Rea S, Chikuni K, Branciarri R, et al. Use of duplex polymerase chain reaction (duplex-PCR) technique to identify bovine and water buffalo milk used in making mozzarella cheese [J]. *J. Dairy Res.*, 2001, 68(4): 689-698

[13] 冯海永,韩建林.羊肉产品中若干动物源性成分的七重 PCR 检测技术应用研究[J].中国畜牧兽医,2010,37(9):85-90
FENG Hai-yong, HAN Jian-lin. Application of septenary

multiplex PCR detection for some animal components in sheep and goat meat products [J]. China Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2010, 37(9): 85-90

