

肝片吸虫 Ftn - 1 蛋白分子特征、抗原性及其抗体制备

王熙凤¹,孟庆玲^{1*},乔 军¹,陈 英¹,钟文强¹,贡莎莎¹,黄运福¹,才学鹏²

(1. 石河子大学 动物科技学院,新疆 石河子 832003; 2. 中国农业科学院 兰州兽医研究所,甘肃 兰州 730046)

摘要: 为研究肝片吸虫 Ftn - 1 蛋白的免疫学特性,根据 GenBank 中已发表的 *Ftn - 1* 基因序列设计特异性引物,以肝片吸虫总 RNA 为模板,进行 *Ftn - 1* 基因的 RT - PCR 扩增,将扩增产物连接到 pMD19 - T 载体中,筛选出阳性克隆后测序,分析其分子特征。将 *Ftn - 1* 基因克隆入表达载体 pET - 32a (+) 中,将其转化至感受态细胞 *E. coli* BL21 (DE3) 中,IPTG 诱导表达并获得纯化的重组蛋白 Ftn - 1,经 SDS - PAGE 检测后,进行 Western blot 和小鼠免疫试验,分析其抗原性。结果显示,成功克隆了肝片吸虫 *Ftn - 1* 基因,其 cDNA 全长为 477 bp,推测编码 158 个氨基酸,编码蛋白质分子的抗原表位区主要集中在第 33—57、83—87、113—146 位,为亲水性蛋白,无跨膜区和信号肽。经 SDS - PAGE 检测,重组蛋白 Ftn - 1 分子质量约为 33.5 ku,与预期大小相符;Western blot 分析结果表明,重组蛋白 Ftn - 1 可被肝片吸虫阳性血清特异性识别,证明具有良好的反应原性。小鼠免疫试验证实,重组蛋白 Ftn - 1 具有良好的免疫原性。

关键词: 肝片吸虫;铁蛋白样蛋白;分子特征;抗原性

中图分类号: S855.9 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004 - 3268(2018)02 - 0119 - 06

Molecular Characterization, Antigenicity and Antibody Preparation of Ftn-1 Protein of *Fasciola hepatica*

WANG Xifeng¹, MENG Qingling^{1*}, QIAO Jun¹, CHEN Ying¹, ZHONG Wenqiang¹,
GONG Shasha¹, HUANG Yunfu¹, CAI Xuepeng²

(1. College of Animal Science and Technology, Shihezi University, Shihezi 832003, China; 2. Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730046, China)

Abstract: In order to study the immunological characteristics of the Ftn-1 protein of *Fasciola hepatica*, specific primers were designed based on the *Ftn - 1* gene sequence published in GenBank and the total RNA of *Fasciola hepatica* was used as template to amplify the *Ftn - 1* gene by RT-PCR. The amplified product was ligated into pMD19-T vector to screen positive clones for sequencing to analyze its molecular characteristics. Then *Ftn - 1* gene was subcloned into the expression vector pET-32a (+) and transformed into the competent cell *E. coli* BL21 (DE3). The recombinant protein *Ftn - 1* was induced by IPTG and purified, and then analyzed by SDS-PAGE. Western blot and immunization tests in mice were performed for antigenicity analysis. The results showed that the *Ftn - 1* gene of *Fasciola hepatica* was successfully cloned and the cDNA was 477 bp, which was deduced to encode 158 amino acids. The epitope regions of coding protein molecules are mainly concentrated in the 33—57, 83—87, 113—146 sites, which was hydrophilic protein and had no transmembrane zone and signal peptide. The molecular weight of the recombinant protein Ftn-1 was about 33.5 ku by SDS-PAGE, which was consistent with

收稿日期:2017 - 08 - 22
基金项目:国家十三五重点研发计划项目(2017YFD0501200); 国家公益性农业行业专项(201303037 - 5)
作者简介:王熙凤(1994 -),女,新疆吐鲁番人,在读硕士研究生,研究方向:动物寄生虫学。E - mail:1510552283@qq.com
* 通讯作者:孟庆玲(1969 -),女,江苏徐州人,博士,教授,主要从事动物寄生虫学研究。E - mail:xjmqqlqj@163.com

expected size. Western blot analysis showed that the recombinant protein Ftn-1 could be specifically identified by the positive serum of the *Fasciola hepatica* and proved it had good reactivity, the immune test in mice confirmed that the Ftn-1 protein had good immunogenicity.

Key words: *Fasciola hepatica*; Ftn-1; Molecular characterization; Antigenicity

肝片吸虫 (*Fasciola hepatica*, Fh) 属于吸虫纲、片行科、片行属的一种常见寄生虫,中间宿主主要是椎实螺科的淡水螺。肝片吸虫病在全球具有广泛的流行性^[1-2],在我国呈地方性流行,多发于夏秋两季,内蒙古、青海、甘肃、新疆等畜牧业发达的省(区)发病较为严重,其中,羊的感染率一般为 20% ~ 60%,个别养羊业发达的地区可高达 90% 以上,发病率达 10% ~ 100%^[3],成为低洼、潮湿牧区羊场羊病死的重要原因之一。肝片吸虫可感染多种哺乳动物宿主,特别是绵羊、山羊和牛,人也可以被感染,被感染后成虫主要寄生在肝脏、胆管内,以食血为主^[4],可引起急性或者慢性肝炎和胆管炎。

近年来,随着环境和气候的变化,该病的流行率和发病率逐渐升高^[5]。据统计,全球约有 2.5 亿 ~ 3.0 亿牛羊和 240 万 ~ 1 700 万人感染肝片吸虫,给家畜生产和人类健康带来严重危害,可引发家畜肝损坏、消化道感染、急性肾损伤等并发症,每年造成的经济损失可达 200 万美元^[6-10]。但由于动物肝片吸虫感染初期无特征性临床症状,很难确诊,因此,建立该病感染的早期诊断方法具有重要的意义。

新疆是我国五大牧区之一,也是我国牛羊重要的养殖基地。然而,在新疆许多放牧地区,牛羊肝片吸虫病长期流行,给畜牧养殖业和牧民身体健康带来了严重的危害。因此,有效地防治该病对畜牧业的发展至关重要。目前,肝片吸虫病主要依靠药物防治,但易产生耐药性、药物残留等问题。因此,研究高效、安全的防治肝片吸虫病的疫苗意义重大。研究发现,铁蛋白样蛋白 (Ftn-1) 具有作为肝片吸虫早期诊断抗原的潜力,是抗肝片吸虫病的候选抗原。鉴于此,本研究对肝片吸虫 *Ftn-1* 基因进行克隆和分子特征分析,构建了原核表达载体并进行诱导表达,对表达的重组蛋白进行抗原性分析,旨在筛选特异性高、反应原性强的肝片吸虫诊断抗原。

1 材料和方法

1.1 菌株、质粒及试剂

菌株 *E. coli* DH5 α 和 *E. coli* BL21 (DE3)、表达载体 pET-32a(+) 均由石河子大学寄生虫实验室保存。

限制性核酸内切酶 *EcoR* I 和 *Xho* I、DNA Marker、

pMD19-T 克隆载体、T4 DNA 连接酶、IPTG、PCR Mixture、蛋白质 Marker 均购自 TaKaRa 公司;琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒和质粒小量提取试剂盒均购自诺维森生物科技有限公司;辣根过氧化物酶标记的兔抗羊 IgG、低背景化学发光检测试剂盒均购自康为世纪生物公司;DAB 显色剂购自天根生化科技(北京)有限公司。

绵羊肝片吸虫阳性血清、羊肝片吸虫 IgG 抗体 EISA 检测试剂盒均由沙湾兽医站提供。

1.2 引物设计及合成

根据 GenBank 中已发表的 *Ftn-1* 基因序列,应用 Primer Premier 5.0 软件设计特异性引物,分别在上、下游引物 5' 端加入 2 个保护性碱基以及 *EcoR* I 和 *Xho* I 限制性酶切位点(下划线部分),上游引物: 5' - CGGAATTCATGCGTGGTGGAAAATT - 3' (*EcoR* I);下游引物: 5' - CCCTCGACTCAATTC-CATATGGGAGC - 3' (*Xho* I),引物由华大基因生物公司合成。

1.3 肝片吸虫总 RNA 的提取

肝片吸虫成虫采自新疆乌鲁木齐市活畜屠宰场绵羊的肝脏,虫体采回后用 PBS 缓冲液清洗 3 ~ 5 遍,剪虫体的 1/3(约 20 mg),加入 800 μ L Trizol 充分研磨,加 200 μ L 氯仿静置后吸取上清,加入 500 μ L 异丙醇静置离心后留下白色沉淀,沉淀中加入 30 μ L DEPC 水,测定 RNA 浓度,于 -80 $^{\circ}$ C 保存。

1.4 *Ftn-1* 基因的 RT-PCR 扩增

利用 RT-PCR 技术扩增 *Ftn-1* 基因。将提取后的肝片吸虫总 RNA 用反转录试剂盒反转录为 cDNA,以反转录产物 cDNA 为模板,应用设计的特异性引物进行 *Ftn-1* 基因的扩增。PCR 扩增体系为: ddH₂O 10 μ L, PCR Mixture 7 μ L, cDNA 模板 2 μ L,上、下游引物各 0.5 μ L。PCR 扩增条件为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min;94 $^{\circ}$ C 变性 40 s,64 $^{\circ}$ C 退火 40 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 55 s,35 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳进行检测,预期扩增片段大小为 477 bp。

1.5 PCR 产物的克隆、测序与分子特征分析

琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒回收目的片段,将目的片段与 pMD19-T 克隆载体于 4 $^{\circ}$ C 连接过夜,转化入 *E. coli* DH5 α 感受态细胞内,通过 PCR 和双

酶切进行阳性克隆的筛选。将阳性克隆测序,用在线软件 ExPasy、BepiPred 1.0 Server、Predictprotein、Swiss-mode 对测序结果及 *Ftn-1* 基因编码的蛋白质的理化性质、抗原表位、二级结构和三级结构等进行分析。

1.6 *Ftn-1* 基因原核表达载体的构建

将胶回收目的片段和原核表达载体 pET-32a(+)分别用 *EcoR* I 和 *Xho* I 进行双酶切,回收双酶切产物,与 T4 DNA 连接酶 4 ℃ 连接过夜。将连接产物转化入 *E. coli* DH5 α 感受态细胞,用 PCR 和双酶切进行阳性克隆的筛选和鉴定,将验证正确的重组质粒命名为 pET-*Ftn-1*。

1.7 重组蛋白 *Ftn-1* 的诱导表达

将重组质粒 pET-32a(+)-*Ftn-1* 转化入 *E. coli* BL21(DE3)感受态细胞,用含有 Amp 抗性的 LB 液体培养基培养至 OD₆₀₀ 值为 0.6~0.8 时,加入液体 1.0 mmol/L IPTG(终浓度)进行诱导,在诱导后 8 h 分别收集菌液,采用 SDS-PAGE 检测重组蛋白是否表达。

1.8 重组蛋白包涵体的纯化

收集重组菌菌体,加入 20 mL Lysis Buffer 吹打混匀,反复冻融 4 次,用超声波破碎 45 min,至菌体不再黏稠为止。破碎后将菌体 9 000 r/min,离心 30 min 弃去上清,沉淀中加入 8 mol/L 尿素 16 mL,室温过夜放置使沉淀溶解,经 0.45 μ m 过滤器过滤后用蛋白质纯化仪纯化,进行 SDS-PAGE 检测。将纯化后的蛋白质在透析袋中分别置于 8、6、4、2、1 mol/L 尿素溶液中各透析 6 h,透析后用蔗糖浓缩至终质量浓度为 1 g/L,放置在 -80 ℃ 保存备用。

1.9 重组蛋白 Western blot 分析

将浓缩后的重组蛋白进行 SDS-PAGE 电泳后,用半干式转移盒转移到硝酸纤维素膜(NC膜)上,用含 5% 脱脂奶粉的 TBST^[11] 封闭 1 h, TBST 洗涤 3 次,加入绵羊肝片吸虫阳性血清(1:1 000 稀释) 37 ℃ 孵育 1 h, TBST 洗涤 4 次,辣根过氧化物酶标记的兔抗羊 IgG(1:3 000 稀释)为二抗,37 ℃ 孵育 1 h,洗涤 3 次后用 DAB 显色,去离子水终止显色。

1.10 重组蛋白 *Ftn-1* 免疫原性检测

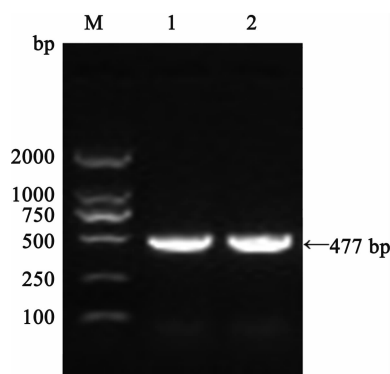
取 15 只雌性小鼠,10 只为试验组,5 只为对照组。将纯化后重组蛋白与等体积弗氏完全佐剂乳化混匀后,试验组每只小鼠皮下注射 200 μ L,间隔 14 d 后进行第 2 次免疫,将弗氏完全佐剂更换成弗氏不完全佐剂,免疫 14 d 后心脏采血,静置分离血清。用羊肝片吸虫 IgG 抗体 ELISA 检测试剂盒检测免疫

小鼠血清是否产生抗体。

2 结果与分析

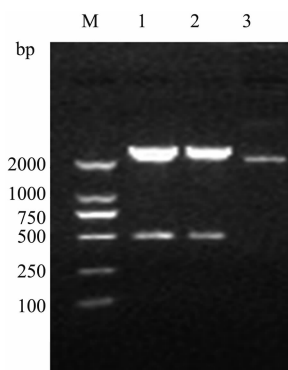
2.1 *Ftn-1* 基因的 RT-PCR 扩增及双酶切鉴定结果

琼脂糖凝胶电泳检测发现,PCR 扩增产物大小约 477 bp,与预期目的大小一致,证明成功克隆到了 *Ftn-1* 基因(图 1)。将克隆成功的 *Ftn-1* 基因转化入 *E. coli* DH5 α 感受态细胞,筛选出阳性菌株,提质粒后经 *EcoR* I、*Xho* I 双酶切,得到 1 条约 2 692 bp 的载体片段和 1 条约 477 bp 的插入片段,表明 pMD19-*T* 克隆载体中成功插入了目的片段(图 2)。



M:DL2000 DNA Marker;1,2:*Ftn-1* 基因

图 1 *Ftn-1* 基因 RT-PCR 扩增结果



M:DL2000 DNA Marker;1,2:*Ftn-1* 基因双酶切

3:未经酶切的 *Ftn-1* 基因

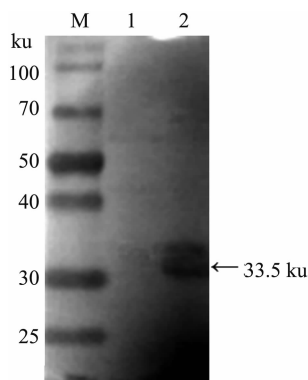
图 2 *Ftn-1* 基因的双酶切鉴定结果

2.2 *Ftn-1* 基因测序结果及分子特征分析

测序结果表明,*Ftn-1* 基因 cDNA 全长 477 bp,编码 158 个氨基酸,与 GenBank 中已上传的肝片吸虫 *Ftn-1* 基因同源性为 98.74%,推导出的氨基酸序列同源性为 97.47%。在编码的氨基酸序列中有 4 个氨基酸差异,分别在第 9(Q-R)、55(V-I)、100(L-S)、106(K-R)位。软件预测结果表明,*Ftn-1* 蛋白为亲水性蛋白,无跨膜区和信号肽;其多肽抗原表位区集中在第 33—57、83—87、113—

2.5 重组蛋白 Ftn - 1 的 Western blot 分析结果

将纯化的重组蛋白 Ftn - 1 经 SDS - PAGE 后转移到 NC 膜上,以绵羊肝片吸虫阳性血清为一抗,以 HRP 标记的兔抗羊 IgG 为二抗,经显色后在目的条带处可见到单一的特异性条带(图 7),证明表达产物具有良好的反应原性。



M:蛋白质 Marker;1:重组蛋白 Ftn - 1 上清液;2:重组蛋白 Ftn - 1 沉淀

图 7 重组蛋白 Ftn - 1 的 Western blot 检测

2.6 重组蛋白免疫小鼠后血清检测结果

重组蛋白免疫小鼠后获得的血清用羊肝片吸虫 IgG 抗体 ELISA 检测试剂盒检测,结果显示,试验组 10 只小鼠血清均为阳性,对照组 5 只均为阴性,表明重组蛋白 Ftn - 1 能够刺激机体产生相应的抗体,具有较强的免疫原性。

3 结论与讨论

目前,肝片吸虫病的诊断主要依赖于粪便中虫卵检查和免疫学检测方法。然而,虫体一般都在感染后 2 ~ 3 个月才能成熟排卵,因而虫卵检查不适用于肝片吸虫病的早期诊断。常用的免疫学诊断方法有间接血凝试验(IHA)、ELISA、斑点酶联免疫吸附试验(dot - ELISA)等。然而,目前免疫学诊断所使用的肝片吸虫诊断抗原多为虫体粗提抗原,其特异性较差。张雪娟等^[12]以肝片吸虫提纯抗原为诊断液,该方法虽能检出 1 ~ 3 周龄的病羊,敏感性较高,但特异性较低。

筛选和鉴定特异性高、敏感性强的肝片吸虫抗原是建立特异敏感的血清学诊断方法的前提。McNulty 等^[13]对绵羊肝片吸虫成虫的全基因组进行了测序,共预测出 14 642 个编码基因,并预测分析了其中一些抗原基因。国内外学者对肝片吸虫一些重要抗原蛋白如鞘脂激活样蛋白 2(SAP - 2)、组织蛋白酶 L(CatL)、谷胱甘肽 S - 转移酶(GST)、脂肪酸结合蛋白(FABP)^[14 - 15]、血红蛋白(Hb)、亮氨酸氨基肽酶(LAP)等多个肝片吸虫蛋白进行了免疫学特性研究。Kazantseva 等^[16]纯化了肝片吸虫分泌代谢

抗原 Fas2 蛋白,建立了检测肝片吸虫特异性抗体 IgM 的间接 ELISA 法,用建立的方法对 76 份感染肝片吸虫人阳性血清和 24 份感染其他寄生虫人血清及 84 份健康人血清样品进行了 IgM 抗体检测,结果表明,Fas2 - ELISA 检测方法的敏感性为 43.4%,特异性为 100%,与其他寄生虫阳性血清无交叉反应,提示分泌代谢抗原 Fas2 蛋白在肝片吸虫早期急性感染中具有一定的诊断价值。

Ftn - 1 蛋白是细胞内维持铁平衡的一种重要蛋白,具有吸收铁的能力,在寄生虫的发育和成熟过程中起调节作用,并参与生化反应^[17-19];经二级结构分析发现,肝片吸虫 Ftn - 1 蛋白中特殊螺旋 E 和 F 的存在可稳定蛋白质的构象,调节蛋白质功能^[20]。Cabán-Hernández 等^[21]选择肝片吸虫 Ftn - 1 重组蛋白作为包被抗原,通过 ELISA 方法检测健康人和感染肝片吸虫人的血清,发现该蛋白具有良好的反应原性。Espino 等^[22]通过荧光定量 PCR 分析发现,肝片吸虫 Ftn - 1 基因在成虫和虫卵阶段的表达量均显著高于童虫和毛蚴阶段,提示 Ftn - 1 蛋白具有作为肝片吸虫诊断抗原的潜力。对肝片吸虫 Ftn - 1 蛋白的分子特征及其免疫学特性进行了研究,并高效表达了 Ftn - 1 重组蛋白。Western blot 分析证实,Ftn - 1 重组蛋白可被绵羊肝片吸虫阳性血清特异性识别,且具有良好的免疫原性,提示该蛋白在肝片吸虫免疫学诊断和亚单位疫苗研发中具有潜在的应用价值。

参考文献:

- [1] Valero M A, Bargues M D, Khoubbane M, et al. Higher physiopathogenicity by *Fasciola gigantica* than by the genetically close *F. hepatica*; Experimental long-term follow up of biochemical markers[J]. Trans R Soc Trop Med Hyg, 2016, 110(1): 55-66.
- [2] Ashrafi K, Bargues M D, O'Neill S, et al. Fascioliasis: A worldwide parasitic disease of importance in travel medicine[J]. Travel Med Infect Dis, 2014, 12: 636-649.
- [3] 谢风云, 张钦凯, 王百川, 等. 肝片吸虫的特性及肝片吸虫病的预防与治疗[J]. 畜牧与饲料科学, 2014(1): 72-74.
- [4] Dalton J P, Neill S O, Stack C, et al. *Fasciola hepatica* cathepsin L-like proteases; Biology, function, and potential in the development of first generation liver fluke vaccines[J]. Int J Parasitol, 2003, 33(11): 1173-1181.
- [5] Fox N J, White P C, McClean C J, et al. Predicting impacts of climate change on *Fasciola hepatica* risk[J]. PLoS One, 2011, 6(1): e16126.
- [6] Marcos L A, Yi P, Machicado A, et al. Hepatic fibrosis and *Fasciola hepatica* infection in cattle[J]. J Hel-

- minthol,2007,81(4):381-386.
- [7] Singh U C, Kumar A, Srivastava A, *et al.* Small bowel stricture and perforation: An unusual presentation of *Fasciolopsis buski* [J]. Trop Gastroenterol, 2011, 32 (4): 320-322.
- [8] Karthikeyan G, Ramkumar V, Kumar S P, *et al.* Intestinal infestation with *Fasciolopsis buski* leading to acute kidney injury [J]. Assoc Physicians India, 2013, 61 (12): 936-938.
- [9] 张吉丽, 朱阵, 李冰, 等. 肝片吸虫病的研究进展[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2016(11): 58-61.
- [10] Mas-Coma S, Bargues M D, Valero M A. Fascioliasis and other plant-borne trematode zoonoses [J]. International Journal for Parasitology, 2005, 35 (11/12): 1255-1278.
- [11] 胡政香. 绵羊肺炎支原体新疆塔城流行株的分离鉴定及油佐剂灭活苗免疫原性初步研究[D]. 新疆: 石河子大学, 2015.
- [12] 张雪娟, 黄熙照, 杨继宗, 等. 肝片吸虫诊断抗原提纯方法的研究[J]. 中国兽医科技, 1992, 22(6): 8-9.
- [13] McNulty S N, Tort J F, Rinaldi G, *et al.* Genomes of *Fasciola hepatica* from the Americas reveal colonization with neorickettsia endobacteria related to the agents of potomac horse and human sennetsu fevers[J]. PLoS Genet, 2017, 13(1): 1-25.
- [14] Lopez-Aban J, Esteban A, Vicente B, *et al.* Adaptive immune stimulation is required to obtain high protection with fatty acid binding protein vaccine candidate against *Fasciola hepatica* in Balb/C mice [J]. Parasitol, 2012, 98: 527-535.
- [15] Martínez-Fernández A R, Nogal-Ruiz J, López-Abán J, *et al.* Vaccination of mice and sheep with Fh12 FABP from *Fasciola hepatica* using the new adjuvant/immunomodulator system ADAD [J]. Vet Parasitol, 2004, 126 (3): 287-298.
- [16] Kazantseva L, Herrera-Velitz P, Espinoza J R, *et al.* Anti-Fas2 IgM antibodies in *Fasciola hepatica* infected patients with positive IgG serology [J]. Trans R Soc Trop Med Hyg, 2017, 111(3): 102-106.
- [17] Jones M K, McManus D P, Sivadurai P, *et al.* Tracking the fate of iron in early development of human blood flukes [J]. Int J Biochem Cell Biol, 2007, 39 (9): 1646-1658.
- [18] Levi S, Yewdall S J, Harrison P M, *et al.* Evidence of H- and L-chains have co-operative roles in the iron-uptake mechanism of human ferritin [J]. Biochem Journal, 1992, 288(2): 591-596.
- [19] Harrison P M, Arosio P. The ferritins: Molecular properties, iron storage function and cellular regulation [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 1996, 1275 (3): 161-203.
- [20] Espino A M, Hillyer G V. A novel *Fasciola hepatica* saposinlike recombinant protein with immunoprophylactic potential [J]. The Journal of Parasitol, 2004, 90 (4): 876-879.
- [21] Cabán-Hernández K, Gaudier J F, Ruiz-Jiménez C, *et al.* Development of two antibody detection enzyme-linked immunosorbent assays for serodiagnosis of human chronic fascioliasis [J]. Journal of Clinical Microbiology, 2014, 52(3): 766-772.
- [22] Espino A M, Cabán-Hernández K, José F. Characterization and differential expression of a ferritin protein from *Fasciola hepatica* [J]. Molecular and Biochemical Parasitology, 2012, 182(1): 54-61.

(上接第 118 页)

- [14] 王钦. 放牧绵羊的生物学效率[J]. 草业科学, 1996, 13(1): 32-37.
- [15] NRC. Nutrient requirements of sheep [M]. Washington DC: National Academy Press, 1985.
- [16] 许琴. 利用体外产气法研究玉米秸秆瘤胃发酵的影响因素[D]. 乌鲁木齐: 新疆农业大学, 2002.
- [17] 易现峰, 贾桂英, 师生波, 等. 高寒草甸矮蒿草种群光合作用及群落生长季节变化[J]. 中国草地, 2000 (1): 13-16.
- [18] 李英年. 高寒草甸地区冷季水分资源及对牧草产量的可能影响[J]. 草业学报, 2001, 10(3): 15-20.
- [19] 薛艳锋, 郝力壮, 刘书杰. 玉树州藏嵩草草地牧草营养价值评定与营养载畜量[J]. 草业科学, 2015, 32 (10): 1660-1667.
- [20] 任继周. 草业科学研究方法 [M]. 北京: 中国农业出版社, 1998: 201-213.
- [21] 孙鹏飞, 崔占鸿, 刘书杰, 等. 三江源区不同季节放牧草场天然牧草营养价值评定及载畜量研究[J]. 草业学报, 2015, 24(12): 92-101.
- [22] Russell J B, O'connor J D, Fox D G, *et al.* A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: I. Ruminal fermentation [J]. Journal of Animal Science, 1992, 70(11): 3551-3561.
- [23] Sniffen C J, O'connor J D, Van Soest P J, *et al.* A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: II. Carbohydrate and protein availability [J]. Journal of Animal Science, 1992, 70(11): 3562-3577.
- [24] 茹彩霞. 模拟瘤胃条件下苜蓿对粗饲料产气特性和发酵特性的研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2006.