

采用 PCR-DGGE 技术分析蒙古羊瘤胃液相和固相细菌的多样性

曾燕 倪学勤* 曾东 简平 王剑 唐雨蕊

(四川农业大学 动物医学院/动物疫病与人类健康四川省重点实验室,四川 雅安 625014)

摘要 为探讨蒙古羊瘤胃液相和固相细菌的多样性,采用变性梯度凝胶电泳技术结合聚合酶链式反应(PCR-DGGE)及条带的克隆测序,比较瘤胃液相和固相细菌的差异,同时采用聚类分析和主成分分析(PCA)方法分析瘤胃液相和固相细菌的多样性。结果表明:1)瘤胃液相和固相样品均含有物种丰富的细菌菌群,但液相比固相具有更高的平均条带数,分别为30条和24条;2)瘤胃液相样品比固相样品具有更高的多样性指数、均匀度和丰富度,其数值分别为3.45、0.90和30.20及3.23、0.84和24.62;3)同一动物个体瘤胃液相样品和固相样品聚类在一起,相似性系数均高达0.81;4)共性条带测序结果表明瘤胃的优势细菌主要是Uncultured rumen bacterium和Uncultured *Bacteroidetes* bacterium,而特异性条带主要是*Alcaligenes* sp.。不同动物个体的瘤胃液相和固相均含有丰富的细菌菌群,且物种丰富度均较高;同一动物个体的液相与固相相比具有更高的细菌多样性。

关键词 蒙古羊;PCR-DGGE;液相;固相;聚类分析;PCA

中图分类号 S 182

文章编号 1007-4333(2015)02-0131-06

文献标志码 A

Evaluate the diversity of bacteria associated with liquid and solid phases of rumen contents of Mongolian Sheep using PCR-DGGE analysis

ZENG Yan, NI Xue-qin*, ZENG Dong, JIAN Ping, WANG Jian, TANG Yu-rui

(College of Veterinary/Key Laboratory of Animal Disease and Human Health of Sichuan Province,
Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China)

Abstract This experiment is to explore the diversity of bacteria associated with liquid phase samples and solid phase samples of rumen contents of Mongolian Sheep. This study choice the research methods of polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis(PCR-DGGE). The results were analyzed by cluster analysis and PCA. Some common and special bands were identified at the same time. The results showed that both the bacteria from the liquid phase samples and solid phase samples had a high diversity, and the liquid phase samples had higher number of bands compared with the solid phase, were 30 and 24, respectively. Compared with the solid phase samples, the shannon diversity index, evenness and richness of liquid phase samples were higher, were 3.45, 0.90, 30.20 and 3.23, 0.84, 24.62, respectively. Samples of rumen liquid phase samples and solid phase samples from the same individual clustered together, and the similarity coefficient were up to 0.81. Uncultured rumen bacterium and Uncultured *Bacteroidetes* bacterium were predominadt in the rumen of sheep. The special bancterial in rumen content was *Alcaligenes* sp.. Furthermore, both the liquid phase samples and solid phase samples of rumen contents of Mongolian Sheep had abundant bacteria and highest diversity in the liquid phase samples.

Key words Mongolian Sheep; PCR-DGGE; liquid phase; solid phase; cluster analysis; PCA

收稿日期: 2014-07-02

基金项目: 教育部留学回国人员科研启动基金资助项目(200835-1); 四川省学术带头人培养基金资助

第一作者: 曾燕, 硕士研究生, E-mail: zengyanA@foxmail.com

通讯作者: 倪学勤, 教授, 博士生导师, 主要从事动物微生态研究, E-mail: xueqinni@foxmail.com

瘤胃是反刍动物特有的消化器官,其中栖息的微生物种类多且数量巨大,包括真菌、细菌、古菌和原虫。瘤胃微生物能将纤维素等物质有效地转化为动物产品,因而反刍动物及其瘤胃微生物成为了目前的研究热点^[1],其中,起着重要作用是瘤胃细菌^[2]。近年来,国内外研究学者对瘤胃细菌进行了大量研究,但大多数局限于瘤胃混合内容物的研究^[3-4]。实际上,存在于瘤胃内与饲料相互作用的微生物分别来自瘤胃液相内容物和瘤胃固相内容物,且其因含有不同的化学组成^[5-6]而使得微生物发挥着不同的重要功能。所以,研究瘤胃微生物,特别是详细地研究瘤胃液相和固相细菌及其功能具有非常重要的意义。

目前,利用微生物的纯培养技术仅能分离培养11%的微生物^[7],仍有大量的微生物信息处于未知状态。1993年,Muyzer等^[8]首次将PCR-DGGE技术应用于研究微生物的多样性,目前已被广泛地用于海洋微生物、土壤微生物和肠道微生物的菌群结构及组成的研究。本研究通过PCR-DGGE技术结合条带的克隆和测序,评估蒙古羊瘤胃液相和固相细菌的多样性,旨在为后续瘤胃细菌的研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验动物

试验动物来自四川省雅安市名山县屠宰场,选择5只同批次成年雄性蒙古羊(记为羊1、羊2、羊3、羊4和羊5)作为采样对象,平均体重为(48.16±1.48)kg。

1.2 试验材料

1.2.1 样品的采集

无菌操作采集蒙古羊瘤胃内容物,用灭菌四层纱布过滤得到瘤胃液相和固相样品,各采集3份,每份采集5mL或5g,分装至灭菌EP管中至液氮速冻,将样品带回实验室后置-80℃冰箱保存。

1.2.2 主要试剂及仪器

大肠杆菌16S rDNA V3区通用引物(上海英潍捷基贸易有限公司);2×Taq MasterMix(北京康为世纪生物科技有限公司);Gel Extraction Kit(美国OMEGA公司);DGGE成套试剂(美国Bio-Rad公司);银染药品和试剂(四川瑞进特科技有限公司);pMD[®]19-T Vector(大连宝生物工程有限公司);NanoDrop[®]ND-1000核酸蛋白浓度测定仪(Wilmington, DE 1981, USA);MJ Research PRC-

200和DGGE电泳仪(Bio-Rad Canada, Mississauga, Ontario)。

1.3 酚/氯仿/异戊醇法提取细菌总DNA

1.3.1 样品的预处理

样品的预处理参照Zhou等^[9]方法。称取200mg瘤胃固相样品于2mLEP管,加入600μLPBS溶液,震荡均匀后同瘤胃液相样品(每份200μL)1000r/min离心10min,保留上清液并加入600μLPBS溶液1000r/min离心10min后转移上清液,所有样品在4℃条件下13000r/min离心5min,收集沉淀。

1.3.2 样品细菌总DNA的制备

在预处理后的样品中加入20μL溶菌酶和600μL的TE溶液,充分混匀后37℃水浴30min;加入15μL蛋白酶K和500μL裂解液,55℃水浴4h后加入体积比为25:24:1的酚:氯仿:异戊醇混合液,4℃13000r/min离心10min;转移上清液至新EP管后加入体积比为24:1的氯仿:异戊醇混合液,混匀后4℃13000r/min离心10min,保留沉淀;加入等体积的100%异丙醇,-20℃过夜;4℃13000r/min离心沉淀过夜样品20min,保留沉淀,用80%异丙醇洗涤一次;干燥后的细菌总DNA用60μLTE溶液溶解。用NanoDrop[®]ND-1000核酸蛋白浓度测定仪检测DNA浓度,置-20℃保存备用。

1.4 细菌总DNA 16S rDNA V3区扩增

大肠杆菌16S rRNA V3区(339~539)上游和下游引物,分别为5'-CGC CCG GGG CGC GCC CCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GAC TCC TAC GGG AGG CAG CAG T-3',和5'-GTA TTA CCG CGG CTG CTG GCA C-3'^[10]。PCR扩增体系包括上游引物、下游引物、2×Taq MasterMix、模板DNA和ddH₂O,加样量分别为1.0、1.0、12.0、1.0和10.0μL。PCR扩增条件为94℃预变性4min;94℃变性30s,58℃退火30s,72℃延伸2min,35个循环;72℃延伸10min。PCR产物用浓度为1.0%琼脂糖凝胶电泳检测。

1.5 PCR-DGGE分析

选取35%~65%的变性凝胶电泳梯度(40%甲酰胺和7mol/L尿素)^[11],并采用Bio-Rad Dcode进行PCR-DGGE凝胶电泳,电泳缓冲液为1×TAE溶液,电泳条件为100V电压和60℃温度电泳15h,电泳结束后用硝酸银染色方法处理结果,并采

用 Bio-Rad GS800 Calibrated Densitometer 扫描成像。

1.6 共性及特异性条带的克隆测序

DGGE 图谱上的共性和特异性条带割胶回收后浸泡于 1×TE 缓冲液中,按 1.4 方法做 PCR 扩增,PCR 产物做 DGGE 电泳确认回收目的片段的正确性,重复该步骤 3 次^[3]。用大肠杆菌通用引物(不带 GC 发夹)扩增回收纯化的 DNA。按照文献^[3]的方法,采用载体连接转化试剂盒(pMD[®] 19-T Vector)连接目标模板的 PCR 产物,用大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞转入连接产物后涂布营养琼脂平板(含氨苄青霉素),每个条带选取 3 个阳性克隆送上海英潍捷基贸易有限公司测序。选用 Chromas 2 序列分析软件分析整理序列,然后在 GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) 数据库中比对出亲缘关系接近的序列进行分析。

1.7 数据分析

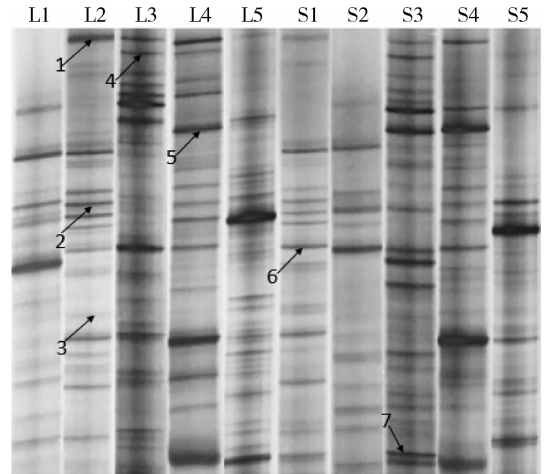
所有试验数据应用 SAS 9.1 软件、NTSYS 2.1 软件和 Excel 2013 进行统计分析,获得 PCR-DGGE 指纹图谱的主成分图、聚类分析图和多样性指数图。

2 结果与分析

2.1 瘤胃液相及固相样品细菌的 PCR-DGGE 图谱分析

瘤胃样品的电泳图谱中深色条带颜色反应优势菌群,而浅色条带反应特有菌群;条带位置的复杂性和数量代表细菌菌群的多样性。绵羊瘤胃液相和固相样品均产生了丰富的电泳条带(图 1),但条带颜色深浅和条带数目存差异:液相样品具有较高的物种丰富度,其平均条带数为 30 条,且 5 个样品的平均条带数均高于 20 条;固相样品具有较低的物种丰富度,其平均条带数仅为 24 条,且不同个体间存在较大差异,S2 样品的条带数仅 13 条,而 S3 样品的

条带数达 25 条。因此,瘤胃液相细菌的多样性高于固相细菌。



L1~L5 为瘤胃液相样品;S1~S5 为瘤胃固相样品。下图同。1、2、3、4、5、6 和 7 为条带 1、2、3、4、5、6 和 7。
L1-L5, Rumen liquid samples; S1-S5, Rumen solid samples. The same as below. 1, 2, 3, 4, 5, 6 and 7 stand for band 1, 2, 3, 4, 5, 6 and 7.

图 1 瘤胃液相及固相样品细菌的 PCR-DGGE 图谱

Fig. 1 PCR-DGGE profiles of the liquid and solid samples from the rumen

2.2 PCR-DGGE 图谱的多样性指标分析

PCR-DGGE 图谱(图 1)的条带数反映瘤胃样品细菌种群的遗传多样性;条带的丰富度(S)、多样性指数(H)和均匀度(EH)反映样品细菌个体数、群落物种数及其分布均匀度。由表 1 和图 2 可知,液相样品细菌的多样性指数、均匀度和丰富度均较高,分别为 3.45、0.90 和 30.20;固相样品细菌的多样性指数、均匀度和丰富度均较低,分别为 3.23、0.84 和 24.62。因此,瘤胃液相样品细菌具有更高的多样性,此结果与 PCR-DGGE 图谱结果一致。

表 1 瘤胃液相和固相细菌种群的多样性指数、均匀度及丰富度

Table 1 Shannon diversity index, richness and evenness of DGGE profiles of the liquid and solid samples from the rumen

样品编号 Sample No.	多样性指数(H) Shannon diversity index	均匀度(EH) Evenness	丰富度(S) Richness
L1~L5	3.15±0.30	0.82±0.08	24.00±6.20
S1~S5	2.96±0.27	0.77±0.07	19.80±4.82

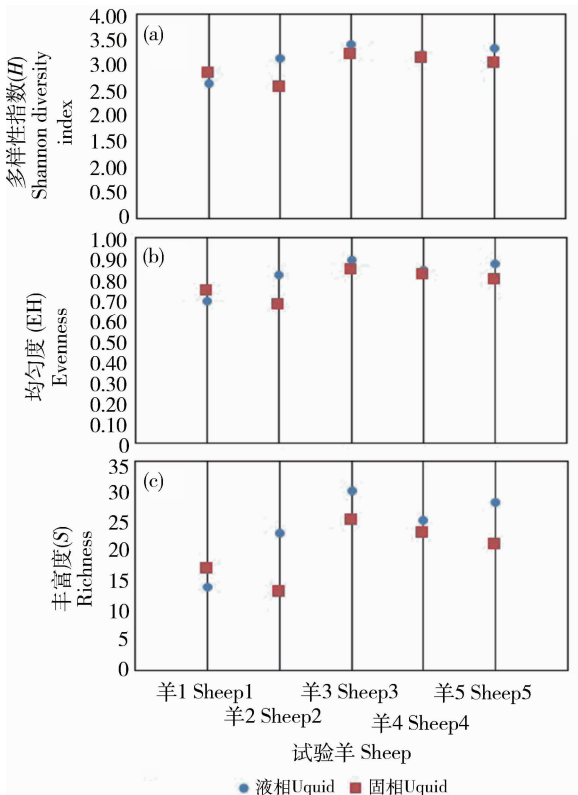


图2 瘤胃液相和固相细菌种群的多样性指数、均匀度及丰富度

Fig. 2 Shannon diversity index, evenness and richness of bacteria in the liquid and solid samples from the rumen

2.3 PCR-DGGE 图谱的聚类分析

聚类分析显示(图3),同一动物个体的瘤胃液相和固相样品细菌菌群结构和组成相似性较高且分别聚在一起;但其相似性存在差异:L1样品和S1样品间的相似性系数为0.81,而L3样品和S3样品间的相似性系数高达0.95,可能由动物个体差异导致。

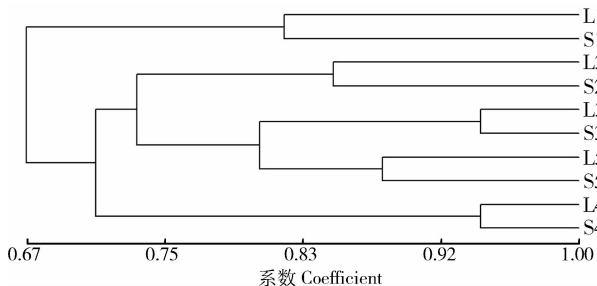


图3 PCR-DGGE 图谱条带的聚类分析

Fig. 3 Cluster dendrogram of PCR-DGGE bands in gel

2.4 PCR-DGGE 图谱条带的 PCA 分析

PCR-DGGE 图谱的 PCA 分析(图4)与聚类分析的结果相一致。PC1 的贡献率为 28.78%, PC2 的贡献率为 20.88%; PC1 明显地将 L1 样品和 S1 样品与其他样品分开,而 PC2 则明显的将 L4 样品和 S4 样品与其他样品分开,表明来自第 1 和第 4 只蒙古羊的瘤胃样品因动物个体不同而与其它样品相区别;同一动物个体的液相和固相样品聚在一起,表明不同动物个体对同一动物个体的液相和固相样品细菌的多样性影响较小。

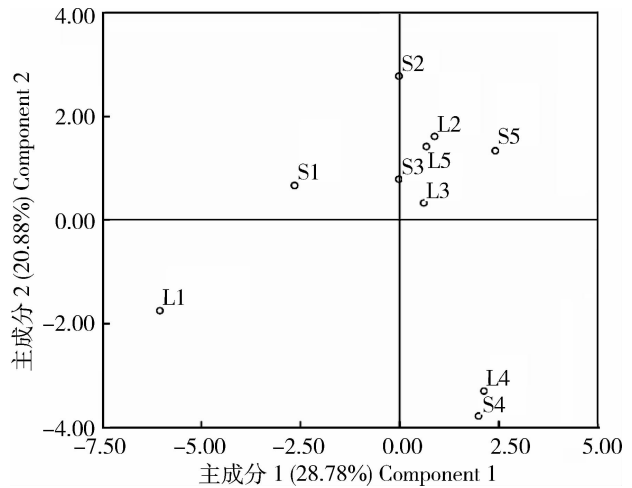


图4 PCR-DGGE 图谱条带的 PCA 分析

Fig. 4 PCA analysis of PCR-DGGE profiles

2.5 瘤胃液相和固相样品共性和特异性条带的克隆测序结果

DGGE 图谱测序的条带如图 1 所示,测序结果见表 2。瘤胃液相和固相样品细菌菌群结构均较丰富,含有大量未培养瘤胃细菌(Uncultured rumen bacterium)和未培养拟杆菌门细菌(Uncultured Bacteroidetes bacterium);液相样品中的含有大量特异性的条带,分别为产碱杆菌属(Alcaligenes sp.)、未培养瘤胃细菌(Uncultured bacterium)和未培养拟杆菌门细菌(Uncultured Bacteroidetes bacterium)。

所有的测序结果与 GenBank 数据库中微生物的同源性均达到 99%,且条带 3、6 和 7 相似性均高达 100%,说明获得的序列同数据库中已鉴定的微生物有较高的亲缘性。

表 2 DGGE 共性条带和特异性条带的基因片段序列的对比结果

Table 2 Comparison of genomic sequences in common bands and special bands by sequencing and BLAST analysis

条带号 Band name	序列长度/bp Sequence size	GenBank 数据库中最相近的菌种名称(登录号) Closest relatives found in the GenBank database(Access number)	相似性/% Similarity	备注* Note
Band(1)	196	Uncultured rumen bacterium clone GRC147 (DQ673612.1)	99	常见条带
Band(2)	194	Uncultured <i>Bacteroidetes</i> bacterium clone L2n11UD (HM105463.1)	99	常见条带
Band(3)	199	<i>Alcaligenes</i> sp. VV1(EU817657)	100	
Band(4)	194	Uncultured bacterium clone GDIC2IK01ALEXO (JF657965.1)	99	
Band(5)	175	Uncultured rumen bacterium clone L102RT-6-G11 (GU304000.1)	99	
Band(6)	175	Uncultured rumen bacterium clone L102RT-2-C03 (HQ400097.1)	100	常见条带
Band(7)	194	Uncultured <i>Bacteroidetes</i> bacterium clone L2k19UD (HM105424.1)	100	常见条带

注: * 空白部分表示特异条带。

Note: * Blank part of note in the table represent specific bands.

3 讨论

3.1 瘤胃液相及固相细菌的 PCR-DGGE 图谱分析

反刍动物瘤胃栖息着种类复杂、多样,且数量巨大的微生物^[12]。PCR-DGGE 图谱显示蒙古羊瘤胃液相和固相样品均含有物种丰富的细菌菌群。巴西山羊的瘤胃液相和固相微生物菌群结构和组成存在一定差异,Cunha 等^[13]首次研究并发现巴西山羊的瘤胃液相和固相的样品均含有丰富的细菌,且主要为厚壁菌门和拟杆菌门,在科上的分类上的优势菌主要来自梭菌属(*Clostridium*)和拟杆菌属(*Bacteroidetes*),该类菌在降解纤维类物质方面具有重要的作用。然而,Derrick 等^[14]通过 454 高通量测序技术研究了 12 头奶牛的瘤胃液相和固相微生物后,发现瘤胃固相和液相中的细菌差异较大,且瘤胃液相的优势细菌主要来源于普雷沃氏菌属(*Prevotella*)和拟杆菌属(*Bacteroidetes*),而瘤胃固相的优势细菌却来源于丁酸弧菌属(*Butyrivibrio*)和拟杆菌属(*Bacteroidetes*)。同样,本研究的 PCR-DGGE 图谱的多样性指标结果表明瘤胃固相和液相细菌存在差异,且瘤胃液相细菌多样性高于固相细菌。研究表明^[15-16],瘤胃内容物主要是由纤维类物质组成,而附着在纤维植物细胞壁上的优势细菌主要是产琥珀酸丝状杆菌(*Fibrobacter succinogenes*)、白色瘤胃球菌(*Ruminobacter albus*)和黄色瘤胃球菌(*Ruminococcus flavefaciens*),且该类菌仅少量的存在于瘤胃液,而瘤胃液中还存在大量的淀粉降解菌、蛋白降解菌和脂肪降解菌等。因此,瘤胃液相比

固相含有的细菌种类更多,这与本试验的结果相一致。

3.2 PCR-DGGE 图谱的聚类分析及 PCA 分析

尽管 PCR-DGGE 图谱表明来自瘤胃液相的细菌种类多于固相,但聚类分析显示:在不同动物个体间,来自同一部位(液相或固相)的样品未聚类在一起,而来自同一动物个体不同部位的样品聚类在一起。这表明动物个体对瘤胃细菌的影响<相邻生境对瘤胃细菌的影响,可能是由采样部位的紧密相连导致的。Carberry 等^[17]采用 PCR-DGGE 和 RT-PCR 技术研究了改变日粮对 24 只肉牛瘤胃细菌的影响,结果发现同种日粮条件下的细菌多样性相似,而不同日粮条件下的细菌差异较大,说明日粮对瘤胃细菌的影响大于动物个体对细菌的影响。本试验的 PCA 分析显示部分样品的聚类无明显的规律,说明动物个体对样品的聚类产生了一定的影响。同样,Jami 等^[18]对健康荷斯坦奶牛个体间瘤胃微生物的组成和相似性的研究发现虽然所有个体都有共同优势菌群,但个体间仍存在一定差异。

3.3 PCR-DGGE 图谱的共性条带及特异性条带分析

研究表明,反刍动物瘤胃内的细菌主要来自厚壁菌门和拟杆菌门^[19]。孔庆亮等^[20]应用 PCR-16S rDNA 成功鉴定出奶牛瘤胃液中具有代表性的细菌种类,主要为地衣芽孢杆菌、牛链球菌、蜡芽孢杆菌和嗜热链球菌。同样,本研究应用 PCR-DGGE 图谱条带的克隆测序获得了 7 个测序结果,主要来源于厚壁菌门和拟杆菌门。与瘤胃固相样品相比,液相样品鉴定出 3 个特异性条带,分别是产碱杆菌

(*Alcaligenes* sp.)、未培养瘤胃细菌(Uncultured bacterium 和 Uncultured rumen bacterium)。同样,曾燕等^[21]从牛瘤胃内容物的 PCR-DGGE 图谱中也鉴定出了产碱杆菌(*Alcaligenes* sp.),说明该菌在绵羊和牛瘤胃中普遍存在。由于本试验仅对5只蒙古羊瘤胃样品进行了检测,今后仍需进一步对不同品种的反刍动物瘤胃液相和固相细菌进行大量深入的研究。

4 结 论

不同动物个体的瘤胃液相和固相均含有丰富的细菌菌群,且物种丰富度均较高;同一动物个体的液相比固相具有更高的细菌多样性。

参 考 文 献

- [1] 刘开朗,王加启,卜登攀. 2008—2009年反刍动物营养研究进展 I. 瘤胃微生物多样性与功能[J]. 中国畜牧兽医, 2010, 37(2): 5-14
- [2] 祁茹,林英庭,程明,等. 瘤胃微生物区系及其相互关系的研究进展[J]. 饲料博览, 2011(8): 9-13
- [3] 曾燕,孙朋,倪学勤,等. 不同纤维素培养基及温度对体外培养瘤胃细菌多样性的影响[J]. 中国农业大学学报, 2013, 18(6): 148-152
- [4] Kittelmann S, Seedorf H, Walters W A, et al. Simultaneous amplicon sequencing to explore co-occurrence patterns of bacterial, archaeal and eukaryotic microorganisms in rumen microbial communities[J]. Plos One, 2013, 8(2): e47879
- [5] Martín-Orúe S M, Balcells J, Zakraoui F, et al. Quantification and chemical composition of mixed bacteria harvested from solid fractions of rumen digesta: Effect of detachment procedure[J]. Animal Feed Science and Technology, 1998, 71(3): 269-282
- [6] Volden H, Mydland L T, Harstad O M. Chemical composition of protozoal and bacterial fractions isolated from ruminal contents of dairy cows fed diets differing in nitrogen supplementation[J]. Acta Agriculturae Scandinavica, Section A-Animal Science, 1999, 49(4): 235-244
- [7] Edwards J E, McEwan N R, Travis A J, et al. 16S r DNA library-based analysis of ruminal bacterial diversity [J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 2004, 86(3): 263-281
- [8] Muyzer G, De Waal E C, Uitterlinden A G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1993, 59(3): 695-700
- [9] Zhou J, Bruns M A, Tiemdjé J M. DNA recovery from soils of diverse composition[J]. Appl Environ Microbiol, 1996, 62(2): 316-322
- [10] Walter J, Hertel C, Tannock G W, et al. Detection of *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* and *Weissella* species in human feces by using group-specific PCR primers and denaturing gradient gel electrophoresis [J]. Appl Environ Microb, 2001, 67: 2578-2585
- [11] 倪学勤,曾东,周小秋. 采用 PCR-DGGE 技术分析蛋鸡肠道细菌种群结构及多样性[J]. 畜牧兽医学报, 2008, 39(7): 955-961
- [12] 荆元强,宋恩亮,杨维仁,等. 牛瘤胃微生物定量测定方法研究进展[J]. 动物医学进展, 2011, 32(7): 93-96
- [13] Cunha I S, Barreto C C, Costa O Y A, et al. Bacteria and archaea community structure in the rumen microbiome of goats (*Capra hircus*) from the semiarid region of Brazil [J]. Anaerobe, 2011, 17(3): 118-124
- [14] Fouts D E, Szpakowski S, Purushe J, et al. Next generation sequencing to define prokaryotic and fungal diversity in the bovine rumen[J]. Plos One, 2012, 7(11): e48289
- [15] Forsberg C W, Cheng K J, White B A. Polysaccharide degradation in the rumen and large intestine[C]// Mackie R I, White B A. Gastrointestinal Microbiology, New York: Chapman and Hall, 1997: 319-379
- [16] Russell J B, Rychlik J L. Factors that alter rumen microbial ecology[J]. Science, 2001, 292(5519): 1119-1122
- [17] Carberry C A, Kenny D A, Han S, et al. Effect of phenotypic residual feed intake and dietary forage content on the rumen microbial community of beef cattle [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2012, 78(14): 4949-4958
- [18] Jami E, Mizrahi I. Composition and similarity of bovine rumen microbiota across individual animals[J]. Plos One, 2012, 7(3): e33306
- [19] Singh K M, Ahir V B, Tripathi A K, et al. Metagenomic analysis of Surti buffalo (*Bubalus bubalis*) rumen: A preliminary study[J]. Molecular Biology Reports, 2012, 39(4): 4841-4848
- [20] 孔庆亮,王振勇,柴同杰,等. 奶牛瘤胃需氧及兼性厌氧菌的 PCR-16SrDNA 鉴定及日粮的影响[J]. 畜牧兽医学报, 2008, 39(10): 1367-1372
- [21] 曾燕,孙朋,倪学勤,等. 采用 PCR-DGGE 技术分析瘤胃菌群在不同纤维素富集条件下的多样性[J]. 动物营养学报, 2013, 25(9): 2136-2142

责任编辑: 苏燕