

定量检测牛雌性发育候选基因 *FOXL2* 表达方法的建立

徐超^{1,2}, 杜卫华², 赵家平¹, 余大为², 王栋², 郝海生², 李光玉¹, 朱化彬²

(1. 中国农业科学院特产研究所, 吉林吉林 132109; 2. 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所, 北京 100193)

摘要:本研究根据 GenBank 中登录的剂量敏感的翼状螺旋/叉头转录因子 2(forkhead transcription factor 2, *FOXL2*) 设计引物, 构建包含 *FOXL2* 基因 cDNA 片段的质粒, 作为中国荷斯坦牛 *FOXL2* 基因 mRNA 定量检测的标准品, 建立了 *FOXL2* 基因 mRNA 表达实时荧光定量 PCR 检测方法。结果表明, 该方法特异性好, 检测灵敏度达 10^1 拷贝, 线性范围为 $10^1 \sim 10^6$ 拷贝, 阈值循环数(Ct)与 PCR 体系中起始模板量的对数值之间有着良好的线性关系($r=0.998689$), 扩增效率高($E=99.62\%$), 可以作为检测牛 *FOXL2* 基因 mRNA 定量检测方法。

关键词: *FOXL2* 基因; 荧光定量 PCR; *TaqMan* 探针; 标准曲线

中图分类号: Q786

文献标识码: A

文章编号: 1671-7236(2012)01-0001-05

动物的性别与许多重要的经济性状有直接关系, 奶牛场希望拥有更多母牛; 而牛肉生产中, 公犊因为生长速度、屠宰率、胴体重等性状优势却更受欢迎。性别性状在畜牧业中具有重要价值, 调控生产中性别比例具有重要意义(文国艺, 2004; 贾敬敦, 2006)。然而, 性别发育是一极其复杂的过程, 是包括多种基因参与的级联反应过程。大量研究结果表明, 哺乳动物性别形成过程表现为以 *SRY* 基因为主导、多基因共同参与协调表达的调控串模式(McElreavey 等, 1993)。最近人们发现还有其他基因能起到类似 *SRY* 基因的作用, 如翼状螺旋/叉头转录因子 2(forkhead transcription factor 2, *FOXL2*) 基因就是一个良好的候选者(Uhlenhaut 等, 2006)。雄性和雌性性别决定路径可能都依赖于显性作用, *SRY* 通过上调 *SOX9* 表达启动雄性通路; *FOXL2* 或 *DAX1* 通过抑制 *SOX9* 表达启动雌性途径(Dewing 等, 2006)。

人 *FOXL2* 基因作为一个分叉头型转录因子位于 3q23, 整个基因全长 2917 bp, 只有 1 个外显子, 能编码 376 个氨基酸残基类的核蛋白, 仅特异性的表达于眼睑和卵巢组织(Cocquet 等, 2002, 2003),

在 54~148 残基间为 1 个特异的含 101 个氨基酸残基的叉头 DNA 结构域和 1 个与此分离、高度保守但功能尚未阐明的多聚丙氨酸束区(其编码序列为 GCGGCAGCCGCGAGCGGCTCCAGCAGCTGCG-GCTGCAGCCGCG)(史少阳等, 2008), 并不含信号肽和跨膜结构域(张晶晶等, 2009), 推测多聚丙氨酸肽段可能在眼睑和卵巢的发育及功能的维持中起重要作用(Uda 等, 2004; 李武修等, 2006)。小鼠的 *FOXL2* 基因位于 9 E4, 1128 bp CDS 编码 375 个氨基酸残基; 牛的 *FOXL2* 基因位于牛 1 号染色体上, 1134 bp 的 CDS 能编码 377 个氨基酸残基。哺乳动物间 *FOXL2* 氨基酸序列相似性达 96%; 非哺乳动物不含甘氨酸重复区、脯氨酸重复区和多聚丙氨酸束等低复杂性区域, 其长度明显比哺乳动物短(张晶晶等, 2009)。

准确度量性别分化过程中各个相关基因表达情况成为目前发育生物学领域所关注的热点之一, 荧光定量 PCR (fluorescence quantitative PCR, FQ-PCR) 是近几年开发成功的一种可精准定量 mRNA 表达水平的方法, 目前已被广泛应用于各个领域的研究, 与 Northern 印迹法、斑点印迹法相比, 具有准确、敏感、简便等特点(高东等, 2009)。常用的方法有 *TaqMan* 探针和 SYBR Green I 两种方法, SYBR Green I 虽然通用性很好(朱祥明等, 2007), 但是非特异性产物也可产生荧光信号, 影响了最后基因拷贝数的计算, *TaqMan* 探针是一种寡核苷酸探针, 它克服了 SYBR Green I 的缺点, 检测的结果更为准确。本研究旨在通过 T-A 克隆法克隆中国

收稿日期: 2011-06-20

作者简介: 徐超(1985—), 男, 山东人, 硕士, 研究实习员, 研究方向: 胚胎工程与繁殖生物技术。

通信作者: 朱化彬(1965—), 男, 博士, 研究员, 研究方向: 胚胎工程与繁殖生物技术。E-mail: huabinzhu @ yahoo.com.cn

基金项目: 863 项目(2007AA10Z154); 转基因重大专项(2009ZX08007-007B; 2009ZX08011-031B)。

荷斯坦奶牛 *FOXL2* 基因部分片段,建立 *FOXL2* 荧光定量 PCR 技术平台,以准确、简便检测及定量 *FOXL2* 基因的表达,为研究牛性别决定过程和性别控制方法做技术准备。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器 大肠杆菌 DH5 α 购自天根生化科技;TBE 缓冲液购自上海实生生物技术有限公司;pMD18-T 载体连接试剂盒购自 TaKaRa 公司;AxyPrep DNA 凝胶回收试剂盒购自 AxyGEN 公司;其余试剂均购自 Invitrogen 公司。

1.2 引物设计与探针合成 参照 GenBank 中已公布的牛 *FOXL2* 基因 mRNA 序列(登录号:NM_001031750.1)设计 *FOXL2* mRNA 的 *TaqMan* 引物及探针,并运用 BLAST 初步检测引物和探针的特异性。最佳引物序列为:上游引物:DF1: 5'-TGTCCGGCATCTACCAGTACAT-3';下游引物:DR1: 5'-ACTCGTTGAGGCTGAGGTTGT-3', 预计扩增长度 102 bp;配套 *TaqMan* 荧光探针为 5'-AGCCAAGTTCCCGTTCTACGAGAAG-3', 引物由英潍捷基(上海)贸易有限公司合成。

1.3 方法

1.3.1 牛生殖嵴的获得 选择中国农业科学院特产研究所实验室牛场优良荷斯坦奶牛,通过同期发情和人工授精(同一种公牛精液)技术获得胎龄明确的胎儿,在预定日期通过剖腹产手术获得胎儿,立即解剖,分离生殖嵴于液氮保存,取部分剩余组织做性别鉴定,整个过程应避免 RNA 酶污染。

1.3.2 牛生殖嵴 RNA 的提取 取性别鉴定后同一日龄雌雄牛胎儿生殖嵴各一,Trizol 法提取总 RNA。将 RNA 沉淀溶于 20 μ L DEPC 水中。通过琼脂糖凝胶电泳鉴定 RNA 的质量, -80 $^{\circ}$ C 下保存备用。

1.3.3 逆转录反应(RT) 按照 Invitrogen SuperScriptTM III First-Strand Synthesis System for RT-PCR Kit 使用说明进行操作。

1.3.4 牛 *FOXL2* 基因片段 PCR 扩增 反应在 ABI 9700 基因扩增仪(美国),反应体系为 50 μ L: 10 $\times$ *Taq* Buffer 5 μ L, 25 mmol/L 的 dNTPs 0.4 μ L, 上、下游引物(10 μ mol/L)各 1 μ L, Platinum *Taq*(5 U/ μ L, 11304-029) 0.3 μ L, 镁离子(25 mmol/L) 3 μ L, cDNA 1.5 μ L, ddH₂O 37.8 μ L。PCR 扩增程序为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 56 $^{\circ}$ C 退火 45 s, 68 $^{\circ}$ C 延伸 60 s, 共 35 个循环; 68 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 产物按 AxyPrep DNA 凝胶回收试剂盒

操作说明进行操作。

1.3.5 连接与转化 将回收的 PCR 产物用 TaKaRa 公司 pMD18-T 载体连接试剂盒进行连接,在 0.2 mL 的 PCR 管中, 16 $^{\circ}$ C 连接 2 h。连接体系如下: PCR 回收产物 4 μ L, pCR[®] 2.1-TOPO[®] Vector 1 μ L, Ligation Mix 1 μ L。取出 1 管冻存的 DH5 α (200 μ L/tube) 感受态细胞, 冰中溶解。取 5 μ L 连接产物加入菌液中, 轻轻混匀, 冰浴 30 min。42 $^{\circ}$ C 热激 90 s, 冰浴 2 min。加入 500 μ L 无抗性 LB 培养基在摇床中 37 $^{\circ}$ C 200 r/min 培养 45 min。取 200 μ L 预转化的菌液涂布至含 100 μ g/mL 氨苄的平板上, 37 $^{\circ}$ C 倒置培养过夜, 至克隆长出。

1.3.6 小量培养和质粒鉴定 从每块平板上挑取 3 个克隆接种于 3 mL 100 μ g/mL 氨苄的 LB 培养基中, 37 $^{\circ}$ C 摇床过夜培养。取 2 mL 过夜培养菌液, 用 Axygen 质粒小量提取试剂盒抽提质粒。质粒送上海英骏生物技术有限公司测序。

1.3.7 重组质粒浓度测定及标准曲线的建立 将测序结果正确的质粒, 把原液稀释 1/25 来测定 $D_{260\text{ nm}}$ 和 $D_{280\text{ nm}}$ 值, 计算 $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 值分析纯度, 备用。根据重组质粒提取物 $D_{260\text{ nm}}$, 并通过如下公式计算纯化产物原液的浓度。

每微升质粒的绝对模板数量/(copies/ μ L) = $(D_{260\text{ nm}} \times 25 \times 50) \mu\text{g/mL} \times 6.02 \times 10^{23} / \text{mol} / [(2692 + \text{片段长度}) \text{bp} \times 660 \text{ g}/(\text{mol} \times \text{bp})]$

其中, 1 个碱基的平均分子质量是 330 g/mol (每对碱基/bp 是 660), 载体长 2692 bp, 阿佛伽德罗常数是 6.02×10^{23} 个/mol, 1 $D_{260\text{ nm}}$ 双链 DNA = 50 μ g/mL (奥斯伯等, 2005)。

制备 1×10^{10} copies/ μ L 的溶液作为标准品原液, -80 $^{\circ}$ C 保存。将标准品原液稀释成: 10^6 、 10^5 、 10^4 、 10^3 、 10^2 copies/ μ L 梯度数量级的标准品, 进行实时荧光定量 PCR 检测, 每个样品 3 次重复, 根据阈值循环数(threshold cycle, Ct)及模板起始拷贝数制作标准曲线和标准方程。

1.3.8 实时荧光定量 PCR 检测 取牛生殖嵴 mRNA 在荧光定量 PCR 仪上扩增并检测荧光。反应体系 20 μ L: 10 $\times$ PCR Buffer 2 μ L, 镁离子(25 mmol/L) 1 μ L, dNTPs (25 mmol/L) 0.4 μ L, 上、下游引物(10 μ mol/L) 各 0.5 μ L, *TaqMan* 探针(10 μ mol/L) 0.2 μ L, Platinum[®] *Taq* DNA Polymerase High Fidelity(5 U/ μ L) 0.2 μ L, 模板 1 μ L, 超纯水补足体系。PCR 扩增程序为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 2 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 10 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 收集荧光, 40 个循环。

2 结果与分析

2.1 生殖嵴总 RNA 提取 提取的生殖嵴总 RNA 较好,电泳结果见图 1。由图 1 可知,在雌、雄牛生殖嵴提取的总 RNA 泳道中,能明显观察到 28S 和 18S 两条带,RNA 质量可满足后续试验的要求。

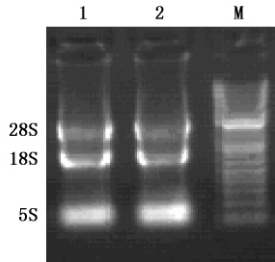


图 1 RNA 提取电泳图

注:1 为雄性;2 为雌性;M 为 1 kb Plus DNA Ladder。

2.2 牛 *FOXL2* 基因片段 PCR 扩增结果 牛 *FOXL2* 基因片段 PCR 扩增结果见图 2。由图 2 可知,仅有一条特异性条带且大小与预计条带一致,说明引物设计和 PCR 条件均优化良好,同时也说明 *FOXL2* 基因在雄性和雌性都有的表达。

2.3 重组质粒的序列分析 用 M13 引物对重组质粒 DNA 进行双向测序,测序结果经 BLAST 比对,与已知牛 *FOXL2* 基因 mRNA 序列相似性 100%,

说明目的片段已经成功重组于载体中,并保持了序列的完整性。

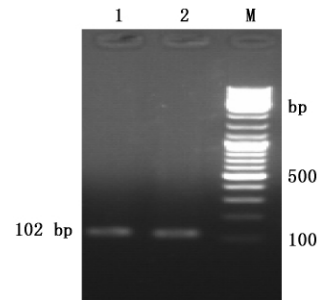


图 2 *FOXL2* 基因片段 PCR 扩增结果

注:1 为雄性;2 为雌性;M 为 1 kb Plus DNA Ladder。

2.4 标准曲线的建立及线性检测范围 常态型扩增曲线见图 3。由图 3 可知,总体看所有曲线拐点清楚,指数期明显,扩增曲线整体平行性好,基线平无上扬现象,低浓度样本扩增曲线指数期明显;曲线指数期斜率大,说明扩增效率高,试剂灵敏度、引物和探针效果好;相邻浓度标准品扩增曲线与曲线之间的间距都十分接近理想值 3.32,说明扩增效率较高;低浓度曲线指数期明显,一方面不易出现假阴性误判,另一方面说明灵敏度高;扩增曲线的 C_t 值范围都大致在 16~30 范围内,保证了定量准确性。

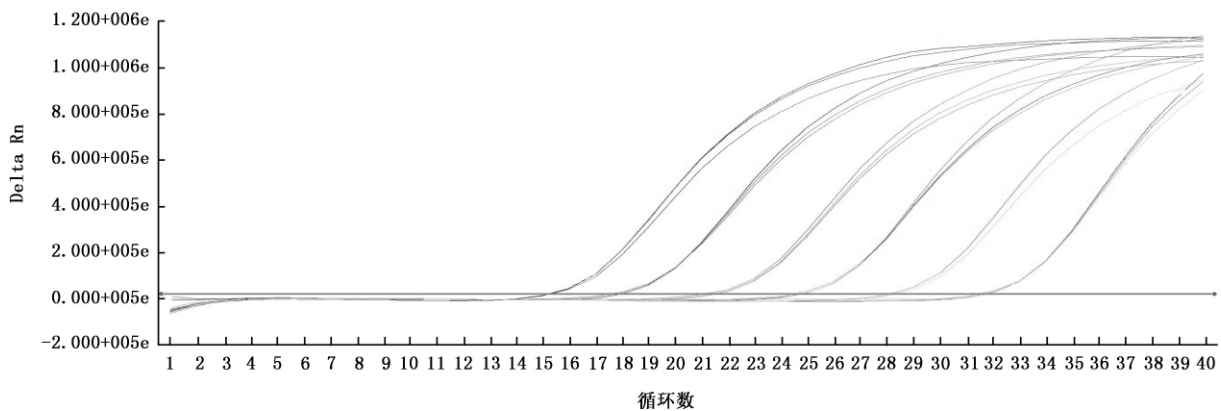


图 3 *FOXL2* 基因的实时荧光定量 PCR 扩增曲线(常态型)

由图 4 可知,本研究成功地建立牛 *FOXL2* 基因实时荧光 PCR 定量标准曲线方程: $Y = -3.33X + 38.5269$, $r^2 = 0.997381$,其中 Y 代表 C_t 值, X 代表模板量的对数值。其线性范围可达 6 个数量级, C_t 值和起始模板拷贝数的相关性均较好 ($r = 0.998689$),标准曲线的斜率接近理想值 -3.32 ,扩增效率为 99.62%。试验建立的克隆质粒标准品检测范围宽、灵敏度高, 10^1 数量级拷贝数的初始模板也可准确检测到,定量结果可靠。

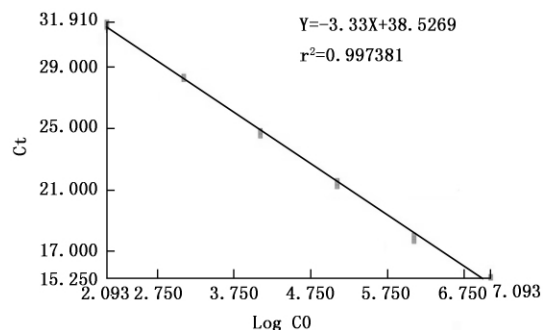


图 4 *FOXL2* 基因的实时荧光定量 PCR 标准曲线

3 讨论

FOXL2 基因是目前发现的第一个脊椎动物维持卵巢功能方面的重要常染色体基因,也是目前研究发现的哺乳动物中最早的卵巢性别分化标志,是参与早期卵巢生成分化过程的重要调控因子(Loffler 等,2003),在性别决定前的生殖嵴开始表达,可以影响胚胎的雌性性别决定(Yao,2005)。目前 *FOXL2* 功能已在山羊的无角雌雄间体综合征(PIS)的 XX 雄性性别逆转中作为候选基因得到确定(Uhlenhaut 等,2006)。在小鼠中,从 12.5dpc 起 *FOXL2* 只在卵巢中表达,XX 动物纯合子的无效突变使卵巢表型在婴儿出生后不久发生了巨大的变化。卵母细胞丢失,卵泡转分化为看起来更像生精管与 Sertoli 样细胞的结构,而在间质中发现有睾丸间质细胞产生的睾酮(Schmidt 等,2004;Ottolenghi 等,2005)。推测在奶牛性别决定上 *FOXL2* 可能也具有重要功能,研究其在奶牛中表达情况有一定意义。

目前 mRNA 表达检测最采用的方法是荧光定量 PCR,具有很高的灵敏度和非常好的动力学检测范围(Giulietti 等,2001),其中 *TaqMan* 探针法包括 1 对 PCR 引物和 1 条探针,探针的 5' 和 3' 端分别标记报告基团和荧光淬灭基团。每经过一个 PCR 循环,荧光信号也同步指数增长,信号强度代表了模板的拷贝数,具有污染小、定量范围宽的优点(陆姣等,2011;Bustin,2000),根据样品的循环阈值参照标准曲线准确计算出标本内目标基因的拷贝数(王梁燕等,2004)。应用荧光定量 RT-PCR 技术检测牛 *FOXL2* 基因表达鲜见报道。本研究选择 *TaqMan* 荧光探针法对荷斯坦奶牛胎儿的 *FOXL2* 基因 mRNA 表达进行定量检测。考虑到 mRNA 的易降解性可能导致标准品的不稳定而引起结果的不准确,笔者克隆 *FOXL2* 基因 cDNA 重组质粒 DNA 作为标准品制备法(Bielefeldt-Ohmann 等,1997),所设计引物及探针序列特异,扩增测序显示与 NCBI 公布的序列同源率为 100%。经反应条件优化,成功地建立了优化的标准曲线。靶基因 *FOXL2* 标准曲线方程为: $Y = -3.33X + 38.5269$, $r^2 = 0.997381$,其线性范围可达 6 个数量级, C_t 值和起始模板拷贝数的相关性均较好($r = 0.998689$),扩增效率为 99.62%。比普通 PCR 的灵敏性强 100 倍,标准曲线的斜率及相关系数显示,本研究建立的 *TaqMan* 荧光定量 RT-PCR 法能够准确检测牛

FOXL2 基因的 mRNA 表达量,与传统检测方法相比更为迅速、准确、灵敏。

参 考 文 献

- 1 文国艺. 动物性别控制任重而道远[J]. 动物科学与动物医学, 2004,6:1~3.
- 2 王梁燕,张耀洲. 实时定量 PCR 技术及其在应用[J]. 细胞生物学杂志,2004,1:62~67.
- 3 史少阳,冯雪梅. 先天性睑裂狭小综合征与 *FOXL2* 基因突变研究进展[J]. 国际眼科杂志,2008(8):1661~1663.
- 4 朱祥明,杨通汉,杨国庆,等. 弓形虫 SYBR-Green 1 荧光定量 PCR 检测方法的建立及应用[J]. 中国病原生物学杂志,2007,(6):428~432.
- 5 张晶晶,李祥龙,周荣艳,等. 不同物种 *FOXL2* 基因的生物信息学分析[J]. 黑龙江畜牧兽医,2009(11):7~9.
- 6 李武修,孙岩. Forkhead 转录因子超家族成员——*FOXL2*[J]. 口腔医学研究,2006(2):208~210.
- 7 陆姣,杨蓉,黄昆仑等. 标准分子构建及其在转基因玉米 59122 定量检测中的应用[J]. 食品科学,2011(2):136~140.
- 8 徐超,杜卫华,王宗礼,等. 荧光定量 PCR 检测牛性别相关基因 *DAX1* 表达的标准质粒和标准曲线的构建[J]. 中国畜牧兽医,2010,37(9):94~99.
- 9 贾敬敦. 中国奶业科技发展战略[M]. 北京:中国农业出版社,2006,18~21.
- 10 高东,何霞红,王云月,等. 水稻 *GA20ox-2* 基因 mRNA 的 *TaqMan* 荧光定量 RT-PCR 检测[J]. 中国水稻科学,2009(3):309~314.
- 11 奥斯伯 F M,金斯顿 R E,塞德曼 J G,等. 精编分子生物学实验指南[M]. 第 4 版. 北京:科学出版社,2005,999.
- 12 Bielefeldt-Ohmann H,Fitzpatrick D R. High-efficiency T-vector cloning of PCR products by forced A tagging and post-ligation restriction enzyme digestion[J]. Biotechniques,1997,23(5):822~826.
- 13 Bustin S A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays[J]. J Mol Endocrinol,2000,25(2):169~193.
- 14 Cocquet J,De Baere E,Gareil M,et al. Structure, evolution and expression of the *FOXL2* transcription unit[J]. Cytogenet Genome Res,2003,101(3~4):206~211.
- 15 Cocquet J,Pailhoux E,Jaubert F,et al. Evolution and expression of *FOXL2*[J]. J Med Genet,2002,39(12):916~921.
- 16 Dewing P,Chiang C W,Sinchak K,et al. Direct regulation of adult brain function by the male-specific factor *SRY*[J]. Curr Biol,2006,16(4):415~420.
- 17 Giulietti A,Overbergh L,Valckx D,et al. An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression[J]. Methods,2001,25(4):386~401.
- 18 Loffler K A,Zarkower D,Koopman P. Etiology of ovarian failure in blepharophimosis ptosis epicanthus inversus syndrome: *FOXL2* is a conserved, early-acting gene in vertebrate ovarian

- development[J]. Endocrinology, 2003, 44(7): 3237~3243.
- 19 McElreavey K, Vilain E, Abbas N, et al. A regulatory cascade hypothesis for mammalian sex determination: SRY represses a negative regulator of male development[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1993, 90(8): 3368~3372.
- 20 Ottolenghi C, Omari S, Garcia-Ortiz J E, et al. Foxl2 is required for commitment to ovary differentiation[J]. Hum Mol Genet, 2005, 14(14): 2053~2062.
- 21 Schmidt D, Ovitt C E, Anlag K, et al. The murine winged-helix transcription factor Foxl2 is required for granulosa cell differentiation and ovary maintenance[J]. Development, 2004, 131(4): 933~942.
- 22 Uda M, Ottolenghi C, Crisponi L, et al. Foxl2 disruption causes mouse ovarian failure by pervasive blockage of follicle development[J]. Hum Mol Genet, 2004, 13(11): 1171~1181.
- 23 Uhlenhaut N H, Treier M. Foxl2 function in ovarian development[J]. Mol Genet Metab, 2006, 88(3): 225~234.
- 24 Yao H H. The pathway to femaleness: current knowledge on embryonic development of the ovary[J]. Mol Cell Endocrinol, 2005, 230(1~2): 87~93.

Construction of Bovine Sex Related Genes *FOXL2* Standard Plasmid and Standard Curve by Real-time RT-PCR

XU Chao^{1,2}, DU Wei-hua², ZHAO Jia-ping¹, YU Da-wei², WANG Dong², HAO Hai-sheng²,
LI Guang-yu¹, ZHU Hua-bin²

(1. Institute of Special Economic Animals and Plants, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Jilin 132109, China;

2. Institute of Animal Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

Abstract: The primer was designed based on forkhead transcription factor 2 (FOX L2), according to the sequence which was submitted on GenBank. A recombinant plasmid contained cDNA fragment of *FOX L2* gene was constructed and used for the standard substance for quantitative detection of mRNA of the *FOX L2* gene of Holstein, a Real-time PCR was developed for detection of *FOX L2* gene. The results revealed this method had a good specificity, and the sensitivity was up to 10^1 , range from 10^1 to 10^6 . The cutoff value Ct had a good linear correlation with PCR samples. This method can detect *FOX L2* gene in bovine quantitatively.

Key words: *FOX L2* gene; Real-time quantitative PCR; *TaqMan* probe; standard curve

精油对泌乳奶牛瘤胃发酵、乳产量和采食行为的影响

Tager L R. 等著 姜雅慧摘译 臧长江校

摘要: 选取 7 头安装瘤胃瘘管的荷斯坦泌乳奶牛为试验动物, 采用不完全拉丁方设计用于评价 2 种商业精油 (EO) 对瘤胃发酵、乳产量和动物采食行为的影响。动物饲喂精粗比为 58 : 42 的全混合日粮 (DM 基础)。试验处理为: ①添加 0.5 g/d 的 CE Lo (含 85 mg 肉桂醛和 140 mg 丁香酚); ②添加 10 g/d 的 CE Hi (1700 mg 的肉桂醛和 2800 mg 的丁香酚); ③0.25 g/d 的 CAP (50 mg 的辣椒); ④无添加组 (对照组)。正试期 21 d 内试验动物每天饲喂 2 次并自由采食。添加精油对动物的干物质采食量、每天采食次数、采食时间、采食时间的长短、反刍动作、反刍时间和反刍时间的长短都无影响。饲喂 CE Hi (47.2 min) 和 CAP (49.4 min) 比对照组日粮 (饲喂后 65.4 min) 会缩短动物饲喂精油后第一次采食时间。添加精油对总挥发性脂肪酸、各挥发性脂肪酸、乙丙酸比例和氨浓度无影响。各处理组间瘤胃 pH 均值同过度采食、过度采食总时间、平均过度采食时

间、总面积和在 pH 5.6 下的平均过度采食面积无显著差异。精油对日粮的有机物、干物质、中性洗涤纤维、酸性洗涤纤维、粗蛋白质和淀粉的总肠道消失率无影响。添加 EO 对乳产量和乳成分无影响, 并对脱粒豆壳的原位干物质消失率无影响。但 CE Hi 处理组较对照组的大豆壳的有机物消失率有下降趋势。与对照组相比, 添加 CE Hi 的中性洗涤纤维 (41.5% 和 37.6%) 和酸性洗涤纤维 (44.5% 和 38.8%) 的消失率降低。CE Lo 处理组对瘤胃发酵、乳产量和动物摄食行为无影响; 但 CAP 处理组减少第一次采食时间但不影响瘤胃发酵及产物。这可能将 CAP 作为添加剂调节动物的采食行为。CE 处理组对瘤胃发酵有负面影响并减少第一次采食时间, 说明添加 10 g/d 的 CE 对泌乳奶牛无益。

关键词: 精油; 奶牛; 瘤胃发酵; 采食行为

(原载: J Dairy Sci, 2011, 94: 2455~2464)