

## 抑制素基因免疫黄牛的黄体发育与免疫纯度及剂量的关系

姜卫星<sup>1</sup>, 刘友生<sup>2</sup>, 薛立群<sup>3</sup>, 陈小军<sup>3</sup>, 杨利国<sup>4\*</sup>, 王水莲<sup>3\*</sup>

(1. 湖南省野生动物救护繁殖中心, 湖南 长沙 410116; 2. 怀化正大有限公司, 湖南 怀化 418000; 3. 湖南农业大学 动物医学院, 湖南 长沙 410128; 4. 华中农业大学 动物科学技术学院, 湖北 武汉 430070)

**摘要:**为探讨双拷贝抑制素 pcISI 基因疫苗纯度和剂量对肉牛黄体发育的影响, 将 150 头同期发情的南阳黄牛随机分为 8 个试验组和 2 个对照组, 试验组用 pcISI 按 2 种纯度、4 种剂量(0.75、1.50、2.25、3.00 mg/头)进行免疫处理, 2 个对照组分别用空质粒和生理盐水进行处理; 初次免疫 21 d 后进行加强免疫。结果表明: 无论用高纯度还是低纯度疫苗免疫, 2.25 mg/头剂量处理对黄体的作用效果最明显, 且抗体水平与黄体发育密切相关, 2.25 mg/头抑制素融合表达质粒组的黄体显著大于 0.75 mg/头组( $P<0.05$ ), 抗体阳性牛两侧黄体显著比抗体阴性牛的大( $P<0.05$ )。

**关键词:** 肉牛; 抑制素; 基因免疫; 黄体发育

中图分类号: S823.8<sup>+1</sup> 文献标志码: A 文章编号: 1007-1032(2012)03-0300-05

### Effect of purity and dose of inhibin gene vaccine on corpus luteum development of beef cattle

JIANG Wei-xin<sup>1</sup>, LIU You-sheng<sup>2</sup>, XUE Li-qun<sup>3</sup>, CHEN Xiao-jun<sup>3</sup>, YANG Li-guo<sup>4</sup>, WANG Shui-lian<sup>3\*</sup>

(1. Hunan Wild Life Protecting and Breeding Center, Changsha 410116, China; 2. Huaihua Zhengda Group Co., Ltd, Huaihua, Hunan 418000, China; 3. Collge of Veterinary Medicine, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China; 4. College of Animal Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

**Abstract:** Estrus synchronized yellow cattle ( $n=150$ ) were divided into 8 experimental groups immunized with different dosages (0.75, 1.50, 2.25, 3.00 mg per animal) of highly- or lowly-purified inhibin fusion expressing plasmid pcISI and 2 control groups immunized with plasmid pcISI or physiological saline to investigate the effect of purity and dosage on corpus luteum development of yellow cattle immunized with inhibin gene expressing plasmid pcISI. Booster immunization was done 21 d after the primary immunization. The results showed that regardless of the highly- or lowly-purified plasmid immunization, inhibin fusion expressing plasmid in dosage of 2.25 mg per animal showed the best effect on corpus luteum size, which in experimental group with dosage of 2.25 mg per animal was remarkably larger than that in experimental group with dosage of 0.75 mg per animal ( $P<0.05$ ). Inhibin antibody level is closely related to the development of corpus luteum. Corpus luteum sizes on both sides in inhibin antibody-positive cattle were bigger than those in inhibin antibody-negative ones ( $P<0.05$ ).

**Key words:** beef cattle; inhibin; gene immunization; corpus luteum development

抑制素(inhibin, INH)是由卵巢分泌的糖蛋白质激素, 能抑制垂体促卵泡素(FSH)分泌。有研究<sup>[1-4]</sup>表明, 应用INH主动或被动免疫动物, 均能促进卵

泡发育, 提高产仔数, 并能诱导单胎动物孪生。抑制素基因疫苗具有制备简单, 成本较低, 易储藏或运输, 免疫原性好, 免疫效果持久、安全等优点。

收稿日期: 2011-05-02

基金项目: 国家自然科学基金项目(31101774, 309972099); 湖南省科技计划项目(2009FJ); 现代农业产业体系项目(CCARS-37-04B)

作者简介: 姜卫星(1973—), 男, 湖南株洲人, 硕士, 工程师, 主要从事野生动物繁殖生理与繁殖疾病研究; \*通信作者, wangshuilian1234@yahoo.com.cn, yangliguo@yahoo.com.cn

姜勋平等<sup>[4]</sup>将编码抑制素 $\alpha$ 亚基(1-32)片段和 $pCMV-S$ 基因中的乙肝表面抗原 $S$ 基因片段与真核表达质粒 $pcDNA3.1(-)$ 融合后得到 $pcIS$ 真核表达质粒。茆达干等<sup>[5-6]</sup>用 $pcIS$ 免疫大鼠,结果表明 $pcIS$ 免疫源性低。在此基础上,曹少先等<sup>[7]</sup>构建了双拷贝抑制素真核表达质粒 $pcISI$ ,并证实了 $pcISI$ 的免疫效果高于 $pcIS$ 质粒。质粒纯度不影响抑制素基因疫苗的免疫反应性<sup>[8]</sup>,但在使用高或低纯度质粒免疫时要选择多大免疫剂量才可以获得最适抗体水平,目前尚无比较研究。另外, $pcISI$ 免疫剂量能影响黄牛的黄体发育<sup>[9]</sup>,但目前揭示质粒纯度与黄牛黄体大小关系的研究尚少。笔者比较分别经4种剂量、2种纯度抑制素 $pcISI$ 基因免疫处理后黄牛的抗体水平和黄体大小,分析抗体 $P/N$ 值与黄体大小的关系,旨在为进一步开发诱导肉牛双胞胎的技术提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

供试黄牛为来自河南省唐河县集约化黄牛养殖场的年龄、体质量和大小相近的,无病史并定期接种抗病毒和驱虫的4~5岁经产空怀青年黄牛178头。

双拷贝抑制素与乙肝表面抗原基因融合表达质粒 $pcISI$ 由曹少先博士<sup>[7]</sup>构建。HRP兔抗牛IgG为Sigma公司产品。脂质体和酶标板为GIBCOBRL公司产品。抑制素抗原肽 $\alpha(1-26Tyr-Gly)$ 由中国科学院上海生命科学研究院崔大敷研究员合成。

### 1.2 质粒的纯化

按文献<sup>[10]</sup>碱裂解法抽提、纯化质粒,按文献<sup>[11]</sup>方法浓缩质粒后,用生理盐水稀释至终质量浓度为1 g/L。用电泳法结合分光光度法检测质粒DNA的纯度,其中,高纯度质粒DNA的 $OD_{260\text{ nm}}/OD_{280\text{ nm}}$ 为1.8~2.0,低纯度质粒DNA的 $OD_{260\text{ nm}}/OD_{280\text{ nm}}$ 为1.7~<1.8或>2.0~2.1。

### 1.3 黄牛的同期发情处理和免疫处理

采用二次注射法进行同期发情处理<sup>[12]</sup>。

随机选取同期发情母黄牛150头,根据抑制素 $pcISI$ 基因免疫的剂量和纯度将供试黄牛随机分为8个试验组和2个对照组,每组15头。8个试验组为0.75、1.50、2.25、3.00 mg/头高纯度 $pcISI$ 处理组(分

别用 $H_1$ 、 $H_2$ 、 $H_3$ 和 $H_4$ 表示)和0.75、1.50、2.25、3.0 mg/头低纯度 $pcISI$ 处理组(分别用 $L_1$ 、 $L_2$ 、 $L_3$ 和 $L_4$ 表示); $CK_1$ 为每头注射3.0 mg/头  $pcMV-S$ 组; $CK_2$ 为每头注射3 mL生理盐水组。

分别于8个试验组每头母牛臀部肌肉注射0.5、1.0、1.5、2.0 mg高或低纯度 $pcISI$ 质粒。初次免疫后21 d再分别在相同部位进行半剂量加强免疫。用空质粒和生理盐水分别对 $CK_1$ 和 $CK_2$ 进行处理。

### 1.4 血样采集

分别在初次免疫当天和初次免疫后10、21 d及加强免疫后10、45 d对所有试验黄牛进行颈静脉采血。初次免疫和加强免疫分别用“PM”和“BM”表示,采血时间点用下标表示,即 $PM_0$ 、 $PM_{10}$ 、 $BM_{10}$ 、 $BM_{45}$ 分别表示初次免疫当天、初次免疫后10 d和加强免疫后10、45 d。将血样于室温静置约2 h,分离血清,-20℃保存,用于测定抗体。

### 1.5 抑制素抗体检测

对文献<sup>[13]</sup>中的方法略加修改,即以人工合成的抑制素 $\alpha$ 亚基(1~26)为包被抗原,黄牛血清稀释50倍,用 $P/N$ 值表示抗体水平,大于2为阳性,其中 $P$ 为待测血样的吸光值, $N$ 为阴性对照血样吸光值。

### 1.6 黄体检测

待 $pcISI$ 处理后的母牛发情后,通过人工授精技术进行配种<sup>[14]</sup>。用B超测定怀孕60~62 d妊娠黄体的大小(用纵向直径表示)<sup>[15]</sup>。

### 1.7 数据分析

采用SAS8.2软件包进行统计学分析。采用单因素方差分析法对组间差异进行分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同剂量高纯度抑制素 $pcISI$ 基因免疫对黄牛抗体 $P/N$ 值的影响

对每组(15头黄牛) $pcISI$ 基因免疫黄牛抗体 $P/N$ 值进行分析。从表1可以看出,使用不同剂量高纯度质粒免疫时,除 $H_1$ 组外,其他3个组在初次免疫期( $PM_{10}$ 和 $PM_{21}$ )均与对照组差异显著( $P<0.05$ );4种不同剂量高纯度质粒组在加强免疫期( $BM_{10}$ 和 $BM_{45}$ )均与对照组差异显著( $P<0.05$ ),且整个检测期均是

H<sub>3</sub>组抗体 $P/N$ 值最高, H<sub>1</sub>组最低; 无论是初次免疫期还是加强免疫期, H<sub>1</sub>组与其他3个试验组(H<sub>2</sub>、H<sub>3</sub>、H<sub>4</sub>)均差异显著( $P<0.05$ )。可见, 4种不同剂量高纯度质粒免疫均可诱导黄牛产生抗抑制素抗体, 2.25 mg/头是最佳免疫剂量。

表1 不同剂量高纯度质粒免疫黄牛的抗体 $P/N$ 值  
Table 1  $P/N$  value of yellow cattle immunized with different dosages of highly-purified plasmid

组别	$P/N$ 值			
	PM <sub>10</sub>	PM <sub>21</sub>	BM <sub>10</sub>	BM <sub>45</sub>
H <sub>1</sub>	(1.14±0.05)b	(1.17±0.07)b	(1.43±0.08)b	(1.31±0.07)b
H <sub>2</sub>	(1.64±0.09)a	(1.70±0.09)a	(1.96±0.07)a	(1.67±0.09)a
H <sub>3</sub>	(1.71±0.08)a	(1.82±0.11)a	(2.06±0.05)a	(1.85±0.10)a
H <sub>4</sub>	(1.61±0.09)a	(1.80±0.12)a	(2.05±0.11)a	(1.77±0.10)a
CK <sub>1</sub>	(1.05±0.10)b	(0.99±0.09)b	(1.09±0.16)c	(1.05±0.03)c
CK <sub>2</sub>	(1.00±0.02)b	(1.00±0.02)b	(1.05±0.01)c	(1.02±0.03)c

## 2.2 不同剂量低纯度抑制素 pcISI 基因免疫对黄牛抗体 $P/N$ 值的影响

从表2可以看出, 使用不同剂量低纯度质粒免疫时, 除了L<sub>1</sub>组外, 其他3个试验组抗体 $P/N$ 值均显著高于对照组( $P<0.05$ )。4种不同剂量低纯度质粒组在整个免疫期均是L<sub>3</sub>组抗体 $P/N$ 值最高, L<sub>1</sub>组最低, 且L<sub>1</sub>与其他3个试验组均差异显著( $P<0.05$ )。可见, 4种不同剂量低纯度质粒免疫均可诱导黄牛产生抗体, 2.25 mg/头是最佳免疫剂量。

表2 不同剂量低纯度质粒免疫黄牛的抗体 $P/N$ 值  
Table 2  $P/N$  value of yellow cattle immunized with different dosages of lowly-purified plasmid

组别	$P/N$ 值			
	PM <sub>10</sub>	PM <sub>21</sub>	BM <sub>10</sub>	BM <sub>45</sub>
L <sub>1</sub>	(1.12±0.05)b	(1.19±0.08)b	(1.48±0.08)b	(1.29±0.04)b
L <sub>2</sub>	(1.54±0.12)a	(1.69±0.13)a	(1.99±0.12)a	(1.63±0.12)a
L <sub>3</sub>	(1.73±0.09)a	(1.88±0.07)a	(2.13±0.05)a	(1.87±0.10)a
L <sub>4</sub>	(1.69±0.08)a	(1.87±0.07)a	(2.00±0.06)a	(1.68±0.12)a
CK <sub>1</sub>	(1.05±0.10)b	(0.99±0.09)b	(1.09±0.16)c	(1.05±0.03)c
CK <sub>2</sub>	(1.00±0.02)b	(1.00±0.02)b	(1.05±0.01)c	(1.02±0.03)c

## 2.3 不同剂量高纯度抑制素 pcISI 基因免疫对黄牛黄体发育的影响

于每组随机抽取6头黄牛分析pcISI基因免疫对黄体发育的影响。结果表明, 黄牛妊娠位置有的在左侧, 有的在右侧。从表3可以看出, 各试验组两

侧黄体均比对照组大, 且H<sub>3</sub>和H<sub>4</sub>均与对照组差异显著( $P<0.05$ )。各试验组间, 无论左侧还是右侧均是H<sub>3</sub>组的黄体最大, H<sub>1</sub>组最小, 但4个试验组两侧黄体差异不显著( $P>0.05$ )。

表3 不同剂量高纯度质粒免疫黄牛两侧妊娠黄体的纵向直径

Table 3 Comparison of the corpus luteum size in cattle immunized with different dosages of highly-purified plasmid

组别	黄体纵向直径/mm	
	左侧黄体	右侧黄体
H <sub>1</sub>	(22.42±0.97)ab	(22.77±1.06)ab
H <sub>2</sub>	(22.75±0.75)ab	(23.15±0.88)ab
H <sub>3</sub>	(24.65±1.34)a	(25.48±0.99)a
H <sub>4</sub>	(23.33±0.87)a	(24.76±0.87)a
CK <sub>1</sub>	(19.26±0.59)b	(19.13±0.87)b
CK <sub>2</sub>	(18.80±0.70)b	(19.81±1.00)b

## 2.4 不同剂量低纯度抑制素 pcISI 基因免疫对黄牛黄体发育的影响

于每组随机抽取6头黄牛分析pcISI基因免疫对黄体发育的影响。结果(表4)表明, 各试验组两侧黄体均比对照组大, L<sub>3</sub>组两侧黄体与对照组差异显著( $P<0.05$ ), 其他3个试验组均与对照组差异不显著( $P>0.05$ )。各试验组间, 无论左侧还是右侧均是L<sub>3</sub>组的黄体最大, L<sub>1</sub>组最小, 但4个试验组间差异不显著( $P>0.05$ )。

表4 不同剂量低纯度质粒免疫黄牛两侧妊娠黄体的纵向直径

Table 4 Corpus luteum size in cattle immunized with different dosages of lowly-purified plasmid

组别	黄体纵向直径/mm	
	左侧黄体	右侧黄体
L <sub>1</sub>	(24.16±0.97)ab	(24.23±0.70)ab
L <sub>2</sub>	(24.44±0.94)ab	(24.52±0.70)ab
L <sub>3</sub>	(26.00±1.80)a	(26.23±0.93)a
L <sub>4</sub>	(24.82±1.33)ab	(24.75±1.01)ab
CK <sub>1</sub>	(19.26±0.59)b	(19.13±0.87)b
CK <sub>2</sub>	(18.80±0.70)b	(19.81±1.00)b

## 2.5 抗体水平与黄体发育的关系

比较抗体阳性牛(所有抗体 $P/N$ 值大于2的抑制素基因疫苗免疫处理的黄牛)与抗体阴性牛(所有抗体 $P/N$ 值小于2的抑制素基因疫苗免疫处理的黄牛)两侧黄体大小, 抗体阳性牛黄体比抗体阴性牛的

大,但左侧黄体差异不显著( $P>0.05$ ),右侧黄体差异显著( $P<0.05$ )。

### 3 结论与讨论

在本试验条件下,无论高纯度还是低纯度质粒pcISI免疫黄牛,4种剂量pcISI免疫均使黄体增大,以2.25 mg/头剂量组增大最明显;抗体水平与黄体发育密切相关。

外源性抑制素可通过免疫调节中和体内的抑制素而降低卵泡抑制素的生物学活性,导致机体循环FSH升高,排卵率和产仔数增加。孙晓萍等<sup>[16]</sup>发现抑制素生物活性中心在 $\alpha$ 亚基的1-32氨基酸上。Li<sup>[17]</sup>等将抑制素基因 $\alpha_{1-32}$ 与HBsAg融合构建了抑制素融合表达质粒pcIS,3次免疫大鼠后55.6%(20/36)的个体产生了抑制素阳性抗体。张德坤等<sup>[18]</sup>用pcIS免疫绵羊,检测到了抗体,抗体阳性率达46.7%(14/30)。王水莲等<sup>[19]</sup>用pcIS免疫黄牛,发现免疫组抗体 $P/N$ 值显著高于对照组( $P<0.05$ )。以上结果说明抑制素基因与乙肝表面抗原融合形成的重组质粒具有一定的抑制素免疫学活性。本研究结果表明pcISI免疫可诱导黄牛产生抑制素抗体,说明该重组质粒在大型动物体内的表达产物同样具有抑制素免疫学活性。

按照实验室分子生物学的常规要求,纯度较高的重组质粒 $OD_{260\text{ nm}}/OD_{280\text{ nm}}$ 应为1.8~2.0,此时所含的RNA、蛋白质、染色体DNA等杂质较少<sup>[10]</sup>。如果比值小于1.8,说明有蛋白质、细胞碎片和苯酚等杂质;如果比值大于2.0,说明有RNA等杂质。各种报道对重组质粒 $OD_{260\text{ nm}}/OD_{280\text{ nm}}$ 要求不一,有的要求其比值在1.70以上即可<sup>[20]</sup>。梅玲玲等<sup>[21]</sup>采用3种方法(CTAB法、酶裂解法、SDS沉淀法)提取得到的质粒DNA  $OD_{260\text{ nm}}/OD_{280\text{ nm}}$ 为1.6~1.9,PCR扩增效果较好,可满足大规模检测的需要。本研究中4种剂量高纯度抑制素质粒DNA的 $OD_{260\text{ nm}}/OD_{280\text{ nm}}$ 为1.8~2.0,4种剂量低纯度抑制素质粒DNA的 $OD_{260\text{ nm}}/OD_{280\text{ nm}}$ 为1.7~1.8和>2.0~2.1。无论是高纯度还是低纯度

质粒处理,均以2.25 mg/头免疫剂量的效果最好。

文献[9]中用pcISI免疫黄牛,发现抑制素基因免疫黄牛能促进黄体发育,但没有研究抑制素重组质粒纯度与黄体发育的关系。本研究中无论用高纯度还是低纯度质粒免疫黄牛,2.25 mg/头pcISI免疫处理组两侧黄体均显著大于对照组( $P<0.05$ ),因此,抑制素基因疫苗处理可促进妊娠黄体发育,但质粒纯度对黄体发育没有明显影响。本试验中,抗体阳性牛右侧黄体明显大于抗体阴性牛( $P<0.05$ ),这可能是由于抑制素基因免疫后右侧卵巢的敏感性高于左侧,右侧卵巢产生了更多的大卵泡。卵泡发育成熟后产生黄体细胞的分化和增殖能力比左侧更强,从而右侧黄体更大。受孕60 d左右的抑制素基因免疫肉牛的妊娠黄体纵向直径为22~25 mm,对照组黄体纵向直径为18~20 mm,这与马会明等<sup>[22]</sup>的报道一致,他认为正常黄体直径小于30 mm。可以推测,就黄体大小而言,抑制素基因免疫对于提高母牛的繁殖力具有重要的实践意义。

### 参考文献:

- [1] Medan M S, Takedomi T, Aoyagi Y, et al. The effect of active immunization against inhibin on gonadotropin secretions and follicular dynamics during the estrous cycle in cows[J]. J Reprod Dev, 2006, 52(1): 107-113.
- [2] Sasaki K, Medan M S, Watanabe G, et al. Immunization of goats against inhibin increased follicular development and ovulation rate[J]. J Reprod Dev, 2006, 52(4): 543-550.
- [3] Takedomi T, Kishi H, Medan M S, et al. Active immunization against inhibin improves superovulatory response to exogenous FSH in cattle[J]. J Reprod Dev, 2005, 51(3): 341-346.
- [4] 姜勋平, 杨利国, 刘桂琼, 等. 猪卵泡抑制素 $\alpha$ 模拟肽在大肠杆菌中的融合表达[J]. 中国兽医学报, 2002, 22(3): 273-275.
- [5] 茆达干, 杨利国, 曹少先, 等. 抑制素 $\alpha(1-32)$ 与乙肝表面抗原融合基因表达质粒的构建与表达[J]. 中国免疫学杂志, 2003, 19(11): 775-778.
- [6] 茆达干, 杨利国, 何晓红, 等. 抑制素与乙肝表面抗原融合基因免疫对大鼠生殖能力的影响[J]. 畜牧兽医

- 学报, 2006, 37(11): 1160-1166.
- [7] 曹少先, 刑朝芳, 张德坤, 等. 双拷贝抑制素基因疫苗 pcISI 的构建和表达及免疫[J]. 畜牧兽医学报, 2008, 39(5): 672-676.
- [8] 王水莲, 杨利国, 薛立群, 等. 不同因素对抑制素基因免疫肉牛反应性的影响[J]. 湖南农业大学学报: 自然科学版, 2006, 32(6): 644-647.
- [9] 王水莲, 薛立群, 邓立新, 等. 双拷贝抑制素基因免疫对肉牛卵泡和黄体的影响[J]. 中国农业科学, 2010, 43(2): 404-410.
- [10] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南[M]. 2版. 北京: 科学出版社, 1998.
- [11] 孙树汉, 戴建新, 张平武, 等. 核酸疫苗[M]. 上海: 第二军医大学出版社, 2000.
- [12] 韩春梅, 文智举, 曹振华, 等. 氯前列烯醇对黄牛同期发情控制试验[J]. 塔里木大学学报, 2007, 19(1): 10-12.
- [13] 杨利国, 胡少昶, 魏平华, 等. 酶免疫测定技术[M]. 南京: 南京大学出版社, 1998.
- [14] 王修刚, 尹秀杰, 尹峰, 等. 提高牛人工授精受胎率的技术措施[J]. 吉林畜牧兽医, 2010, 31(7): 34-35.
- [15] 邓立新, 贾翔征, 贺丛, 等. B超检查奶牛同期发情和超数排卵期卵巢发育研究[J]. 畜牧兽医杂志, 2004, 23(1): 1-4.
- [16] 孙晓萍, 杨博辉, 程胜利, 等. 抑制素免疫及其基因工程疫苗的构建[J]. 家畜生态学报, 2006, 27(1): 84-86.
- [17] Li H, Mao D G, Zhang D K, et al. Development and evaluation of a novel DNA vaccine expressing inhibin  $\alpha(1-32)$  fragment for improving the fertility in rats and sheep[J]. Anim Reprod Sci, 2008, 109: 251-265.
- [18] 张德坤, 杨利国, 曹少先, 等. 抑制素基因免疫对母羊生殖内分泌的影响[J]. 南京农业大学学报, 2005, 28(4): 76-79.
- [19] 王水莲, 薛立群, 陈小军, 等. 抑制素 pcIS 基因免疫对黄牛卵泡发育和生殖激素的影响[J]. 畜牧兽医学报, 2009, 40(6): 830-835.
- [20] Stepanov V G, Nyborg J. Preparative purification of plasmid DNA templates for *in vitro* transcription assays by consecutive differential precipitations [J]. Biotechnology, 2003, 102(3): 223-231.
- [21] 梅玲玲, 徐艺珍, 程苏云, 等. 转基因食品 DNA 提取技术研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2005, 15(6): 689-690, 749.
- [22] 马会明, 刘贤侠, 李飞. 应用 B超诊断荷斯坦奶牛卵巢囊肿的研究[J]. 石河子大学学报, 2005, 23(2): 203-206.

责任编辑: 王赛群