



中国教师发展基金会教师出版专项基金资助

反刍动物营养学 研究方法

王加启 主编



Methods in Ruminant
Nutrition Research



中国出版集团现代教育出版社

中国教师发展基金会教师出版专项基金资助

反刍动物营养学研究方法

Methods in Ruminant Nutrition Research

王加启 主编

现代教育出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

反刍动物营养学研究方法 / 王加启 主编. —北京: 现代教育出版社, 2011. 6

ISBN 978 - 7 - 5106 - 0730 - 1

I. ①反… II. ①王… III. ①反刍动物—家畜营养学—研究方法 IV. ①S823.5 - 3

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2011) 第 128091 号

反刍动物营养学研究方法

王加启 主编

责任编辑: 李浩研

封面设计: 陈四雄

出版发行: 现代教育出版社

社 址: 北京市朝阳区安定门外安华里 504 号 E 座 **邮编:** 100011

电 话: 010-87677512

印 刷: 北京长阳汇文印刷厂

开 本: 787mm×1092mm 1/16

印 张: 36.25

字 数: 844 千字

版 次: 2011 年 10 月第 1 版

印 次: 2011 年 10 月第 1 次印刷

书 号: ISBN 978 - 7 - 5106 - 0730 - 1

定 价: 120.00 元

版权所有 翻印必究

撰写人员名单

主 编	王加启			
副主编	于建国	卜登攀	杨红建	周凌云
撰写人员	王加启	于建国	卜登攀	王建平
	杨红建	赵国琦	周凌云	魏宏阳
	邓露芳	刘光磊	刘仕军	王 俊
	李 旦	刘开朗	胡 菡	彭 华
	刘 蕾	许晓敏	吕中旺	哈 斯
	岳 群	赵圣国	南雪梅	杨永新
	刘 萍	李珊珊	甄云鹏	付晓革
	叶巧燕	奚晓琦	沈维军	郭同军



国家重点基础研究发展计划

感谢国家重点基础研究发展计划（973 计划）项目“牛奶重要营养品质形成与调控机理研究（2011CB100800）”资助。

前言

INTRODUCTION

十年磨一剑。《反刍动物营养学研究方法》一书中方法的探索、提炼和应用历时18年。1993年中国农科院畜牧所反刍动物营养研究室（以下简称研究室）成立时，面临的重大难题就是研究方法，或者支离破碎，或者相互矛盾，或者查找不到。这个团队刻骨铭心地感到，可靠、先进、系统的研究方法，不仅是反刍动物营养学科的重要组成部分，更是支撑学科发展的基石。这些年来，面对困难，在寂寞中坚持、在失败中总结、在争论中完善，《反刍动物营养学研究方法》一书终于成稿。

消化吸收再创新。本书9篇26章共收集了138个研究、测定和评价方法，其中由研究室总结、提炼并建立的方法（含标准、专利）73个，收集国家和国际标准方法38个，引用其他重要文献的方法27个。为了让读者不再遭遇我们以前的困境，本书特别注意可操作和可对比两个关键点，每个方法都独立成文，由前言、原理、操作步骤、结果分析和注意事项等5部分组成，并对105个方法进行了实例解释，其中83个实例解释源自研究室的反复实践。书中附有153个试验表格和250张图解，为的是让方法更加鲜活、清晰，使读者在应用后立即能判断出方法的适用性和结果的有效性。对于一些较新的研究方法，如奶牛乳腺基因组学研究方法、营养代谢的蛋白质基因组学研究方法、奶牛乳腺上皮细胞体外培养方法、饲料中动物源性成分PCR检测方法和牛奶中活性成分的检测方法等，还专门介绍了国内外研究进展，以便读者在应用方法的同时，了解相关背景知识。持续动态人工瘤胃法、液态奶中复原乳与过热处理的区别方法等还是首次与读者谋面。

鲜明的时代特征。近20年来，反刍动物营养学科得到了巨大发展。消费者对食品质量安全越来越关注，使得反刍动物营养学科从传统的以养为主扩展到畜产品品质与安全领域，同时，整合生理学、分子生物学和微生物生态学等引领时代前沿的新兴学科与传统学科在研究方法上交叉融合，大大深化了反刍动物营养学科的内涵。为此，本书针对产业需求，包括了牛奶品质研究方法和牛奶安全指标评价方法等内容，针对新兴学科的应用，包含了瘤胃微生物分子生态学、基因组学和蛋白组学等方面的研究方法。

团队的两次争论。在本书编写过程中，研究室成员发生了两次争论。一次是关于“吃力不讨好”的争论，这是因为研究方法是供同行在实验室中一步一步操作使用的，难免被发现错误或漏洞，结果是费了很大力气，可能换来很多骂声；另一次是关于知识产权的争论，团队的很多同志想不通，研究室辛辛苦苦摸索出来的方法，有些还是确保团队领先地位的“法宝”，就这么轻而易举公布了，真舍不得。为此，研究室组织了两次辩论，最后统一了思想，如果书中存在的不足能够得到指正，对我们也是学习的机会；至于知识产权，如果我们的方法能为学科发展尽绵薄之力，那就是最大的知识产权，也是最好的回报。我们之所以能编成这本书，不仅仅是因为每个人付出了辛勤的汗水，更是因为历史的机遇和国家的繁荣，相比之下，个人得失就不那么重要了。

集体的汗水。本书是研究室全体人员共同努力的结果。我作为这个团队的班长，由于在工作中要求严格，使大家有压力，也产生过困惑，但是最终收获了成熟、自信和奉献社会的幸福。我为这样一个甘于寂寞、学以致用、奉献农业的团队由衷地感到自豪。在跋语中列出了18年来研究室为反刍动物营养学研究方法做出贡献的人员，以示感谢。

巨人的肩膀。老一辈科学家对本书编写给予了无私的教诲与指导。感谢冯仰廉教授、卢德勋研究员、桂荣研究员、吴克谦研究员、常碧影研究员和南春波研究员等前辈对本书的认真审阅和指正。感谢现代教育出版社的支持和资助。

在开放中更新。受作者能力所限，管窥蠡测挂一漏万在所难免。但是从四年前开始编写时，作者就已经下定决心，要把这本书建设成为一个开放的系统，能者修之，贤者居之，做到流水不腐。希望再次修订时能有更多的同行参与，奉献出更多更好的研究方法。书中所用单位严格执行国家计量法，例如 mg/100mL 和 mg/100g 等，按“在单位中不得有数字只能有词头”的规定，一律改为 mg/dL 和 mg/hg。书末汇编了缩略语表，以便读者查阅。

王加启

2011年9月于中国农业科学院北京畜牧兽医研究所
反刍动物营养研究室

跋 语

CLOSING REMARKS

18年来，在反刍动物营养研究室学习和工作过的同志都为科研工作做出了贡献，在此一并表示衷心地感谢。

1997届

硕 士：卢庆萍

1998届

硕 士：李树聪

1999届

硕 士：李瑞国 黄虎平 许朝芳 杨明明

2000届

硕 士：魏宏阳 边四辈 郑颖

2001届

硕 士：张文举 晏向华

2002届

硕 士：黄庆生 李声永

2003届

博士后：杨红建

博 士：魏宏阳

硕 士：臧彦全 龙玲 王平 郑雪莉 王海珍 张素华 唐新燕 王宁娟

2004届

博 士：王吉峰

硕 士：高军肖 汪水平 刘辉 姚美蓉 朱新民

2005届

博士后：邓先德 赵青余

博 士：李树聪 赵玉华 万发春

硕 士：张幸开 杨瑞红 张丽萍 王文娟

2006届

博士后：李发弟 王林枫

博 士：卜登攀 郭玉琴 李大刚 高艳霞 张民
 硕 士：孙宏选 李栋 朱雅新 杨鹏标 崔立莉 隋恒凤 张瑞超
 叶纪梅 禹爱兵 刘莹 王典 李建才 郝忠义 赵智兴

2007 届

博 士：杨舒黎
 硕 士：胡志勇 王治国 黄萌萌 李长皓 李旦 曹荣 张思维 王丽
 张祥 贾磊 杨库 张之宣 周凌云

2008 届

博士后：贺云霞 朱文涛
 博 士：刘光磊 刘仕军 张佩华
 硕 士：程金波 梁松 刘亮 臧长江 姜艳美 王连群 王传蓉
 张春刚 赵连生

2009 届

博士后：雷连成 王晶
 博 士：邓露芳 王建平
 硕 士：张海涛 于萍 赵圣国 栾绍宇 王蕾 陈强 郭同军 国卫杰
 霍小凯 董晓丽 栾广春

2010 届

博士后：乔光华 刘开朗
 博 士：哈斯 张乐颖 周振峰 胡菡
 硕 士：申军士 颜志辉 奚晓琦 兰欣怡 张俊瑜 王萌 杨光
 刘庆生 张春林

2011 届

博士后：杨永新
 博 士：彭华 张养东 崔海
 硕 士：周荣 李珊珊 李喜燕 胡涛 康海英 章玉涛 蒋亚军 冯薇
 刘云祥 贾连平 鲍萍



目 录

CONTENTS

第 1 篇 瘤胃微生物研究方法

第 1 章 瘤胃微生物传统研究方法	2
第 1 节 瘤胃细菌的培养、计数、分类和保藏	2
第 2 节 瘤胃真菌的培养、计数和保藏	10
第 3 节 瘤胃原虫的培养、计数、分类和保藏	14
第 2 章 瘤胃微生物分子生态学研究方法	22
第 1 节 瘤胃微生物样品采集与前处理	22
第 2 节 瘤胃微生物总 DNA 提取	25
第 3 节 瘤胃微生物的实时定量 PCR 方法	30
第 4 节 瘤胃微生物多样性的变性梯度凝胶电泳分析	40
第 5 节 瘤胃微生物多样性的 RFLP 和 T-RFLP 分析	45
第 6 节 瘤胃微生物 16S/18S rDNA 文库构建	53
第 3 章 瘤胃微生物元基因组学研究方法	62
第 1 节 瘤胃微生物细菌人工染色体 (BAC) 文库构建与鉴定	63
第 2 节 瘤胃微生物 BAC 文库中纤维素酶活性克隆的筛选	73
第 3 节 瘤胃微生物 BAC 文库中脲酶活性克隆的筛选	79
第 4 节 瘤胃微生物 BAC 文库中脂肪酶活性克隆的筛选	85

第 2 篇 营养消化吸收研究方法

第 4 章 体外模拟瘤胃发酵研究方法	92
第 1 节 体外发酵产气法	92
第 2 节 短期静态体外发酵批次培养法	96
第 3 节 持续动态人工瘤胃法	99
第 5 章 消化道瘘管安装方法	104
第 1 节 术前准备	104
第 2 节 瘤胃瘘管安装手术	111

第3节	十二指肠近端 T 型瘘管安装手术	115
第4节	回肠末端 T 型瘘管安装手术	120
第5节	术后动物护理	121
第6章	瘤胃营养代谢研究方法	124
第1节	瘤胃营养灌注方法	124
第2节	瘤胃液 pH 检测	127
第3节	瘤胃甲烷排放量测定	129
第4节	饲料养分瘤胃降解率测定	133
第5节	瘤胃液氨态氮的检测	136
第6节	瘤胃液中挥发性脂肪酸的测定	139
第7节	瘤胃液共轭亚油酸的测定	141
第8节	瘤胃液中脂肪酸的测定	143
第9节	瘤胃纤维素酶活性测定	145
第10节	瘤胃亚油酸异构酶和共轭亚油酸还原酶活性测定	149
第11节	瘤胃液蛋白酶活性测定	151
第12节	瘤胃细菌脲酶活性的测定	154
第13节	瘤胃细菌脂肪酶活性的测定	156
第7章	小肠营养物质消化吸收研究方法	161
第1节	小肠营养灌注方法	161
第2节	小肠食糜流量测定	164
第3节	移动尼龙袋法测定饲料小肠养分消化率	168
第4节	酶解法评定饲料小肠消化率	171
第5节	小肠冻干粉法评定饲料消化率	174

第3篇 血液生化指标研究方法

第8章	血管插管手术方法	180
第1节	颈动脉插管和皮管安装手术	180
第2节	颈静脉留置针安装手术	183
第3节	小肠间膜静脉血管插管安装手术	184
第4节	肝脏门静脉血管插管安装手术	186
第5节	瘤胃壁静脉血管插管安装手术	188
第6节	子宫卵巢静脉血管插管安装手术	190
第9章	血液生化指标分析方法	192
第1节	血样的采集	193
第2节	血样的制备	195
第3节	血液抗凝剂的制备	197

第 4 节	无蛋白质血液的制备	198
第 5 节	用自动生化分析仪测定血液生化指标	199
第 6 节	血清蛋白质的电泳法测定	201
第 7 节	血糖的光谱法测定	205
第 8 节	血酯的光谱法测定	207
第 9 节	血液中共轭亚油酸 (CLA) 的测定	209

第 4 篇 组织和细胞生物学研究方法

第 10 章	活体组织取样方法	214
第 1 节	肝脏活体微创取样方法	214
第 2 节	乳腺活体取样方法	217
第 3 节	瘤胃液口腔采样方法	220
第 11 章	奶牛乳腺上皮细胞体外培养方法	225
第 1 节	奶牛乳腺上皮细胞体外培养研究概述	225
第 2 节	原代乳腺上皮细胞分离培养方法	226
第 3 节	乳腺上皮细胞的传代、冻存和复苏	232
第 4 节	乳腺上皮细胞生长的生物学鉴定	235
第 5 节	乳腺上皮细胞染色体核型分析	242
第 6 节	乳腺上皮细胞标志性蛋白的免疫组化检测	244
第 7 节	乳腺上皮细胞特异性分泌蛋白的检测	246

第 5 篇 分子生物学研究方法

第 12 章	营养代谢蛋白质组学研究方法	254
第 1 节	蛋白质组学研究方法概述	254
第 2 节	奶牛血浆和乳蛋白质组学研究方法	258
第 13 章	奶牛乳腺基因组学研究方法	269
第 1 节	基因组学研究方法概述	269
第 2 节	PAGE 法克隆奶牛乳腺上皮细胞中的 miRNA	277
第 3 节	基因芯片检测奶牛乳腺上皮细胞基因表达谱	283

第 6 篇 牛奶品质研究方法

第 14 章	生乳理化指标评价方法	300
第 1 节	新鲜度	300
第 2 节	酸度	301

第3节	杂质度	303
第4节	相对密度	305
第5节	冰点	307
第6节	感官指标	309
第15章	生乳营养成分评价方法	311
第1节	蛋白质	311
第2节	脂肪	314
第3节	乳糖	318
第4节	全脂乳固体及非脂乳固体	323
第5节	氨基酸	325
第6节	维生素	333
第7节	微量元素	340
第8节	乳成分的快速测定方法	347
第16章	液态奶热加工质量评价方法	351
第1节	液态奶热加工质量评价方法概述	351
第2节	巴氏杀菌乳热加工质量评价	354
第3节	超高温灭菌乳加工质量评价	365
第4节	液态奶中复原乳的鉴定	375
第17章	牛奶中活性成分检测方法	384
第1节	牛奶中活性成分检测方法概述	384
第2节	牛奶中 CLA 等脂肪酸的测定方法	389
第3节	免疫单扩散法检测牛初乳 IgG 含量	392
第4节	SDS - PAGE 法测定牛奶中乳铁蛋白含量	396
第5节	间接 ELISA 方法测定牛奶中特异性抗体效价	401
第6节	夹心 ELISA 方法测定乳中免疫球蛋白含量	405
第7篇 牛奶安全指标评价方法		
第18章	生乳中污染物评价方法	414
第1节	铅	414
第2节	汞	416
第3节	无机砷	419
第4节	铬	421
第19章	生乳中真菌毒素和微生物评价方法	424
第1节	黄曲霉毒素 M ₁	424
第2节	菌落总数	428
第3节	致病菌	430

第 20 章 生乳中农药残留和兽药残留评价方法	432
第 1 节 六六六、滴滴涕和林丹	432
第 2 节 有机磷	435
第 3 节 微生物法	436
第 4 节 青霉素类	437
第 5 节 四环素类	440
第 6 节 磺胺类	443
第 21 章 生乳中违禁添加物评价方法	446
第 1 节 三聚氰胺	446
第 2 节 硫氰酸根	449
第 3 节 工业用火碱	451
第 4 节 革皮水解物	453
第 5 节 β -内酰胺酶	456
第 6 节 玉米赤霉醇	460
第 22 章 生乳中体细胞评价方法	465
第 1 节 测定牛奶中体细胞数的显微镜法	465
第 2 节 测定牛奶中体细胞数的荧光光电计数法	467
第 3 节 测定牛奶中体细胞数的电子粒子计数法	468
第 8 篇 饲料中纤维素和动物源性成分检测及饲用微生物研究方法	
第 23 章 饲料中纤维素成分检测方法	472
第 1 节 粗纤维的测定	473
第 2 节 中性洗涤纤维、酸性洗涤纤维和木质素的测定	475
第 3 节 酸性洗涤不溶氮和中性洗涤不溶氮的测定	478
第 24 章 饲料中动物源性成分 PCR 检测方法	482
第 1 节 饲料中动物源性成分检测方法研究概述	482
第 2 节 饲料样品的采集和制备	488
第 3 节 饲料中牛、羊、猪、鸡和鱼源性成分的 PCR 检测方法	491
第 4 节 饲料中乳粉与肉骨粉的 PCR 区分	498
第 25 章 饲用微生物研究方法	504
第 1 节 饲用乳酸菌的筛选鉴定	504
第 2 节 饲用酵母菌的筛选鉴定	512
第 3 节 饲用芽孢杆菌的筛选鉴定	522
第 4 节 饲用微生物的评价方法	529

第9篇 试验设计与数据处理

第26章 常用试验设计与数据分析	542
第1节 试验方案设计	542
第2节 重复观测试验数据的统计分析	551
缩略词表	557

第 1 篇

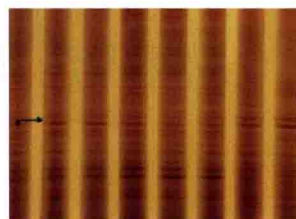
瘤胃微生物研究方法

Methods for Rumen Microbiology

第1章 瘤胃微生物传统研究方法

第2章 瘤胃微生物分子生态学研究方法

第3章 瘤胃微生物元基因组学研究方法



第1章 瘤胃微生物传统研究方法

瘤胃微生物传统的研究方法一般是先采集瘤胃内容物，然后利用特定培养基培养获得单一菌株后，对其形态特性进行描述，或者直接通过显微镜对瘤胃微生物的形态特征进行观察和描述。本章主要介绍瘤胃细菌、真菌和原虫的培养、计数、分离和保藏等传统研究方法。

第1节 瘤胃细菌的培养、计数、分类和保藏

1 前言

Hungate (1966) 根据细菌分解功能的不同将瘤胃细菌分成 11 类，即纤维素分解菌、半纤维素分解菌、淀粉分解菌、利用糖的细菌、利用酸的细菌、蛋白质分解菌、产氨细菌、产甲烷菌、脂肪分解菌、尿素分解菌和维生素合成菌。也可以根据形态大致分为球菌、链状球菌、短杆菌、长杆菌、链状杆菌、卵形杆菌、尖端杆菌、弧菌和螺旋菌等 9 类。但无论如何确定某一菌株的类别，都要首先对其进行分离和培养。

本节介绍的瘤胃细菌分离、培养和计数的方法是在 McSweeney 等 (2005)，杨舒黎和王加启 (2007)，邓露芳和王加启 (2009) 研究的基础上建立的。

2 材料

2.1 试剂

2.1.1 基础溶液

(1) 盐溶液 A：将 3.0g K_2HPO_4 用蒸馏水溶解定容至 1000mL。

(2) 盐溶液 B：将 3.0g KH_2PO_4 、6.0g $(NH_4)_2SO_4$ 、6.0g NaCl、0.6g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 和 0.2g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 用蒸馏水溶解并定容至 1000mL。

(3) 盐溶液 C：将 6.0g K_2HPO_4 用蒸馏水溶解并定容至 1000mL。

(4) 盐溶液 D：将 6.0g KH_2PO_4 、6.0g $(NH_4)_2SO_4$ 、12.0g NaCl、2.5g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 和 1.6g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 用蒸馏水溶解并定容至 1000mL。

(5) 厌氧稀释液：将 3.8mL 盐溶液 C、3.8mL 盐溶液 D、5mL 8% 碳酸钠 (Na_2CO_3) 和 1mL 0.1% 刃天青用蒸馏水溶解并定容至 1000mL。

(6) 微量元素溶液：将 300g 硼酸 (H_3BO_3)、100g $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 、30g $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 、20g $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 、30g 二水合钼酸钠 ($Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$)、10g 硒酸钠 (Na_2SeO_3)、20g 氯化镍 ($NiCl_2$)、10g $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ 和 150g $FeCl_2 \cdot 4H_2O$ 溶于 100mL 0.25mol/L 盐酸溶液中，然后用蒸馏水定容至 1000mL。