

图2 0.50 mg/ml 偶氮甲酰胺标准溶液色谱图

Figure 2 Chromatogram of standard solution

$10^6 x + 2.0$  ( $y$  为峰面积,  $x$  为偶氮甲酰胺的质量浓度, mg/ml),  $r = 0.999 2$ , 偶氮甲酰胺在 0.01 ~ 1.00 mg/ml 范围内线性关系良好。定量限为 1.0 mg/kg ( $S/N > 10$ ), 可满足我国限量标准要求 45 mg/kg 的检测范围。

### 2.5 面粉样品的检测

本次检测 85 份样品来自山东省 6 个地市农贸市场及超市。试验结果显示, 本次检测的市售小麦粉中偶氮甲酰胺含量均小于检出限 ( $< 1.0$  mg/kg), 均合格。

### 3 小结

试验结果表明, 本文建立的 HPLC 测定小麦粉中的偶氮甲酰胺含量, 前处理方法简单, 缩短了分

析时间, 操作方便快捷, 线性范围广, 灵敏度及准确度均达到检测要求。应用本方法对山东地区面粉样品进行检测, 取得理想结果。

### 参考文献

- [1] 陈胜城, 黄韡, 马芬丽, 等. 一种低密度偶氮甲酰胺的检测方法研究[J]. 广东微量元素科学, 2013, 20(4): 27-30.
- [2] 吴正双, 梁焯琼, 钟海娟, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定面粉中的偶氮甲酰胺[J]. 现代食品科技, 2012, 28(9): 1239-1242.
- [3] Becalski A, Lau B P, Lewis D, et al. Semicarbazide formation in azodicarbonamide-treated flour: a model study [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004, 52(18): 5730-5734.
- [4] Stadler R H, Mottier P, Guy P, et al. Semicarbazide is a minor thermal decomposition product of azodicarbonamide used in the gaskets of certain food jars [J]. Analyst, 2004, 129(3): 276-281.
- [5] 陈志峰, 李成, 孙利, 等. 食品接触材料中的氨基脲问题 [J]. 食品与科技, 2009, 25(2): 5-7.
- [6] 袁丽红, 丁洪流, 陈英, 等. 面粉添加剂偶氮甲酰胺代谢物联二脲的 HPLC-MS/MS 检测 [J]. 食品工业科技, 2013, 34(10): 73-76.
- [7] 中华人民共和国卫生部. GB 2760—2011 食品安全国家标准食品添加剂使用标准 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2011.
- [8] 中华人民共和国卫生部, 第 8 号公告. D-甘露糖醇等 58 个食品添加剂产品核准 [S]. 2011.
- [9] 陈颖, 祁广建, 王熠, 等. HPLC 法测定面粉及其制品中偶氮甲酰胺的含量 [J]. 中国卫生检验杂志, 2010, 20(2): 274-275.

## 实验技术与方法

# 金黄色葡萄球菌分型方法的建立及应用

冯震, 杨燕, 范一灵, 鲍英, 杨美成

(上海市食品药品检验所, 上海 201203)

**摘要:**目的 建立食源性金黄色葡萄球菌的分型与溯源方法。方法 以血浆凝固酶为目标基因, 通过 PCR 方法对食源性金黄色葡萄球菌进行鉴定, 同时借助全自动微生物基因指纹鉴定系统 (RiboPrinter) 对其进行分型和类聚状况分析。结果 PCR 方法可特异性鉴定金黄色葡萄球菌, RiboPrinter 方法可将金黄色葡萄球菌分为 6 个亚型, 各亚型类聚状况平均分布。结论 上述方法的建立可准确地将金黄色葡萄球菌进行鉴定和分型, 分析类聚分布与同源性关系, 为食源性致病菌的快速鉴定与分型溯源提供技术手段。

**关键词:**金黄色葡萄球菌; 血浆凝固酶; 全自动微生物基因指纹鉴定系统; 基因分型; 食源性致病菌

中图分类号: R155.5; R378.1<sup>+</sup>1 文献标志码: A 文章编号: 1004-8456(2014)05-0475-06

DOI: 10.13590/j.cjfh.2014.05.017

## Development and application of molecular typing method for *Staphylococcus aureus*

FENG Zhen, YANG Yan, FAN Yi-ling, BAO Ying, YANG Mei-cheng

(Shanghai Institute for Food and Drug Control, Shanghai 201203, China)

收稿日期: 2014-04-19

作者简介: 冯震 男 主管药师 研究方向为食源性致病菌的鉴定与分型 E-mail: zfeng929@sina.cn

通讯作者: 杨美成 女 主任药师 研究方向为药理学 E-mail: yangmeicheng@vip.sina.com

**Abstract: Objective** To develop a genotyping and tracing method for foodborne pathogenic *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*). **Methods** Foodborne *S. aureus* isolates were identified through PCR method targeting coagulase gene and subtyped by RiboPrinter. **Results** 62 isolates were identified as *S. aureus* and classified into six subtypes, and each subtype was hypodispersion. **Conclusion** Cooperative use of PCR method and RiboPrinter method could precisely identify and classify *S. aureus* contamination, analyze the distribution and characteristic, and trace the possible fingerprint. This research may provide experimental data for pathogenic bacteria typing, and give technical support for food supervision and administration.

**Key words:** *Staphylococcus aureus*; coagulase; RiboPrinter; gene typing; food-borne pathogenic bacteria

食品安全日益成为人民关注的焦点,食源性致病微生物的检测和研究工作备受关注,特别在当前国家机构改革的新形势下,食品药品监督管理局新的职能要求对食品生产、流通和餐饮环节的全过程进行监控,食品安全的监管形势异常严峻。上海市食品药品检验所作为上海市食品药品监管部门重要的技术支撑单位,每年承担食源性致病菌的风险监测工作,其中金黄色葡萄球菌的阳性检出率高,居所有致病菌之首,并呈现逐年上升的趋势。

金黄色葡萄球菌是典型的食源性致病性微生物,其所含致病因子血浆凝固酶和 10 余种肠毒素对肠道破坏性极大,也可引起局部化脓感染和肺炎、伪膜性肠炎、心包炎、败血症、脓毒症等全身感染,对百姓生活和健康造成了不良影响<sup>[1-2]</sup>。虽然我国对于食源性金黄色葡萄球菌的监控工作由来已久,但 GB 4789. 10—2010《食品微生物学检验金黄色葡萄球菌检验》<sup>[3]</sup>中对金黄色葡萄球菌检验的判定方法却始终停留在生化鉴定的层面<sup>[4]</sup>,无法满足风险评估和产品监管的任务要求。新的监管形势不仅要求食品检测实验室具有阳性样品筛查和鉴定的能力,而且需要完成阳性检出样品的分子生物学鉴定、分型和溯源工作,将食源性致病菌的鉴定层面推向“种”的水平,因此,完善食品微生物检验技术,建立食源性致病菌分型和溯源数据库的工作迫在眉睫。

本实验室参加 2012 年食源性致病菌风险监测工作,餐饮和部分流通环节的食品检验样品中共收集到金黄色葡萄球菌 62 株,在参照 GB 4789. 10—2010 进行生化鉴定的基础上,本研究拟建立金黄色葡萄球菌的分子生物学快速鉴定技术:设计特异性引物扩增金黄色葡萄球菌血浆凝固酶基因 3' 非编码区重复序列片段<sup>[5]</sup>,根据扩增片段大小进行金黄色葡萄球菌的鉴定<sup>[6-7]</sup>;借助全自动微生物基因指纹鉴定系统(RiboPrinter)对其进行分型和溯源<sup>[8-9]</sup>,旨在完成分子生物学鉴定的基础上,建立食源性金黄色葡萄球菌的分型和溯源数据库,为金黄色葡萄球菌污染物的分类、各亚型的类聚状况和不同污染源的判定提供技术依据和数据支持。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株来源

金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)标准菌株(CMCC 26003、ATCC 6538、CICC 23656),表皮葡萄球菌(*S. epidermidis*)标准菌株(CICC 10294)均为实验室保藏;食源性金黄色葡萄球菌(共 62 株)来源于 2012 年食源性致病菌风险监测任务中的阳性检出样品,样品采集于熟肉制品、凉拌菜、水果沙拉、自制饮料、豆制品等;木糖葡萄球菌(*S. xylosus*),沃氏葡萄球菌(*S. warneri*),松鼠葡萄球菌(*S. sciuri*)等对照菌株均收集于日常检验工作。

#### 1.1.2 主要仪器与试剂

PCR 扩增仪(美国 Life Technology),琼脂糖凝胶电泳仪和凝胶成像系统均购自美国 BioRad,全自动微生物基因指纹鉴定系统(美国 Dupont)。

基因组 DNA 提取试剂盒、PCR Premix DNA 聚合酶试剂盒均购自于宝生物工程大连有限公司。DNA 测序委托上海英俊生物科技有限公司完成。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 引物的设计与合成

从 NCBI 官方网站上检索金黄色葡萄球菌血浆凝固酶基因序列信息(*Staphylococcus aureus* coagulase gene mRNA; AJ306908. 1),选择读码框下游,即基因 3' 非编码区域,设计 PCR 引物,其序列信息为:

Forward: 5'-ACCACAAGGTAAGTCAACG-3' (bases 1432 to 1453);

Reverse: 5'-TGCTTTTCGATTCGATGC-3' (bases 2399 to 2418),

引物设计完成后,委托上海英俊生物科技有限公司进行引物合成。

#### 1.2.2 核酸的提取与 PCR 检测

基因组 DNA 的提取参照试剂盒(DV810A)说明书进行。

DNA 浓度和纯度的测定:采用核酸蛋白紫外分光光度计测定基因组 DNA 的 OD<sub>260</sub> 和 OD<sub>280</sub> 的光密度值,确定核酸的浓度和纯度后,制备成 100 ng/ul 的

DNA 溶液供后续试验用。

PCR 反应体系: *Taq* DNA 聚合酶 0.5  $\mu$ l; 10  $\times$  PCR buffer 5  $\mu$ l; dNTP mix 4  $\mu$ l; DNA 模板 (100 ng/ $\mu$ l) 0.1  $\mu$ l; 上下游引物 (均 25 pmol/ $\mu$ l) 各 0.5  $\mu$ l; 加入 ddH<sub>2</sub>O 补齐至 50  $\mu$ l 反应体系。

PCR 程序设置: 94  $^{\circ}$ C 2 min; 94  $^{\circ}$ C 30 s; 58  $^{\circ}$ C 30 s; 72  $^{\circ}$ C 1 min; 72  $^{\circ}$ C 3 min; 30 个反应循环。取 PCR 产物 3  $\mu$ l, 经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 于紫外凝胶成像仪下观察 PCR 扩增结果。

### 1.2.3 核糖体鉴定与分型

细菌的核糖体分型由 RiboPrinter 系统自动完成, 限制性内切酶采用 *EcoR* I, 相关操作流程参照仪器标准化操作规程。细菌分型图谱在 Bionumerics v 6.6 软件中采用非加权组平均法 (UPGMA) 进行聚类分析<sup>[10-11]</sup>。

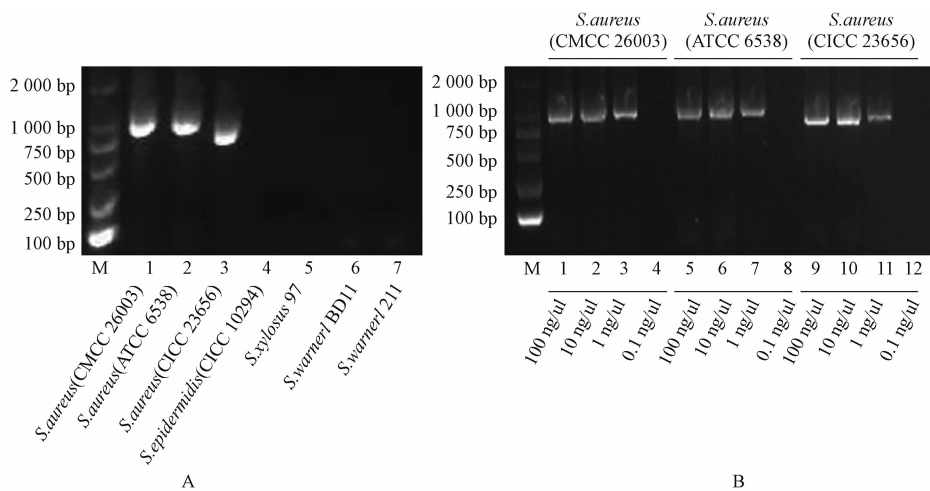
## 2 结果

### 2.1 血浆凝固酶基因的扩增与标准菌株的鉴定

编码金黄色葡萄球菌血浆凝固酶基因的 3' 末端存在一系列 81 bp 的 DNA 重复序列, 且在不同菌株中重复数可能不同, 通过 PCR 扩增此可变区域, 根据扩增片段的特异性和片段长度, 可对金黄色葡萄球菌进行鉴定<sup>[4]</sup>。本研究首先选取葡萄球菌属标准菌株进行引物特异性和灵敏度验证, 如图 1 所

示, 3 株金黄色葡萄球菌标准菌株 (CMCC 26003, ATCC 6538, CICC 23656) 均可特异性地扩增血浆凝固酶基因片段, 其中 CMCC 26003 与 ATCC 6538 扩增片段大小相同, 亲缘关系较近, 而 CICC 23656 扩增片段较短, 亲缘关系较远。表皮葡萄球菌 (CICC 10294)、木糖葡萄球菌 (97) 和沃氏葡萄球菌 (BD11; 211) 均未见目标扩增片段。分别制备浓度为 100、10、1 和 0.1 ng/ $\mu$ l 的 DNA 模板, 在相同试验条件下进行 PCR 反应, 由图 1 可知, 模板浓度  $\geq$  1 ng/ $\mu$ l 时, 目的基因片段可得到有效扩增, 提示该检测方法的灵敏度可达到 100 pg。结果表明, 可以通过血浆凝固酶基因片段的扩增对金黄色葡萄球菌进行鉴定。

为进一步验证葡萄球菌属各分离株之间的同源性, 本研究采用 RiboPrinter 全自动微生物基因指纹鉴定系统对上述 7 株葡萄球菌进行核糖体分型。如图 2 所示, 金黄色葡萄球菌 CMCC 26003 和 ATCC 6538 的相似度达到 97.4%, 提示 2 个菌株之间的亲缘关系较近; 而金黄色葡萄球菌 CICC 23656 与 CMCC 26003 和 ATCC 6538 的亲缘关系较远, 相似度仅为 46.5%。这与核糖体 PCR 结果一致。葡萄球菌属其它菌株的分型条带各不相同, 与金黄色葡萄球菌的相似度均小于 60%, 其中木糖葡萄球菌与金黄色葡萄球菌的相似度为 59.8%, 沃氏葡萄球菌和表皮葡萄球菌与金黄色葡萄球菌的相似度均小于 45%。



注: A. 特异性试验; B. 灵敏度试验

图 1 血浆凝固酶基因片段凝胶电泳图谱

Figure 1 Agarose gel electrophoresis of coagulase gene in *Staphylococcus aureus*

### 2.2 基于血浆凝固酶基因片段的扩增

本研究收集整理了 2012 年食源性致病菌风险监测工作中分离的 62 株金黄色葡萄球菌, 以金黄色葡萄球菌标准菌株为阳性对照、以松鼠葡萄球菌和沃氏葡萄球菌为阴性对照, 在相同的 PCR 体系和反应条件下, 扩增血浆凝固酶基因片段, 对金黄色葡萄球菌进行筛查和鉴定, 如图 3 所示, 62 株金黄色

葡萄球菌均可产生特异性的扩增条带, 而阴性对照菌均未见扩增片段; 不同金黄色葡萄球菌的扩增片段大小略有差异, 扩增片段的大小在 750 ~ 1 000 bp 之间, 根据 PCR 扩增片段的大小, 可将金黄色葡萄球菌分为三类: 血浆凝固酶亚型 I 扩增片段约 1 000 bp, 经统计共有 16 株, 占有阳性菌株的 25.8%; 血浆凝固酶亚型 II 扩增片段位于 750 ~ 1 000 bp 之间, 包含 26 株,

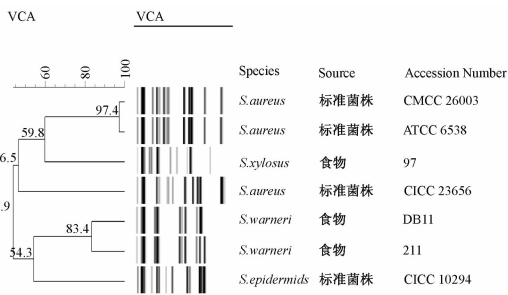
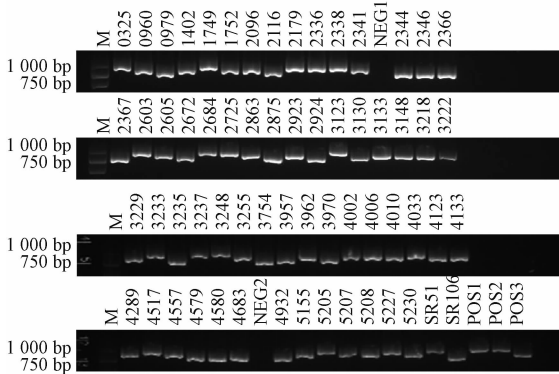


图2 RiboPrinter系统对葡萄球菌属菌株的分型图谱

Figure 2 Dendrogram of RiboPrinter patterns of *Staphylococcus* strain

占所有阳性菌株的41.9%；血浆凝固酶亚型Ⅲ扩增片段约750 bp，包含20株，占所有阳性菌株的32.3%。由于扩增片段大小差异不明显，且琼脂糖凝胶电泳的分辨率有限，该方法仅能对金黄色葡萄球菌进行初步分类，但不同来源的菌株PCR扩增片段大小有所差异，因此该方法在菌株溯源分析中仍具有意义。



注：M为DL2000 Marker；NEG1为*S. sciuri*；NEG2为*S. warneri*；POS1为*S. aureus* (CMCC 26003)；POS2为*S. aureus* (ATCC 6538)；POS3为*S. aureus* (CICC 23656)

图3 62株食源性金黄色葡萄球菌血浆凝固酶基因片段扩增图

Figure 3 Amplification of coagulase gene in 62 foodborne *Staphylococcus aureus* isolates

### 2.3 RiboPrinter系统的鉴定与分型

本研究采用RiboPrinter系统，*EcoR* I限制性酶切，将62株金黄色葡萄球菌进行核糖体分型，分别将试验结果导入Bionumerics v6.6软件，采用UPGMA类聚分析法，建立菌株之间的类聚分布树状图，如图4显示：以相似度大于70%为分类依据，所有金黄色葡萄球菌可分为6个亚型，每个亚型中又可分为若干亚类，其中金黄色葡萄球菌亚型I包含13株，占所有菌株的20.97%；亚型II包含11株，占所有菌株的17.74%；亚型III包含14株，占所有菌株的22.58%；亚型IV包含6株，占所有菌株的9.68%；亚型V包含12株，占所有菌株的19.35%；亚型VI包含6株，占所有菌株的9.68%，各亚型呈现均匀分布。金黄色葡萄球菌

分型数据库的建立可为污染物的分类、各亚型的类聚状况和不同污染源的判定提供实验依据。

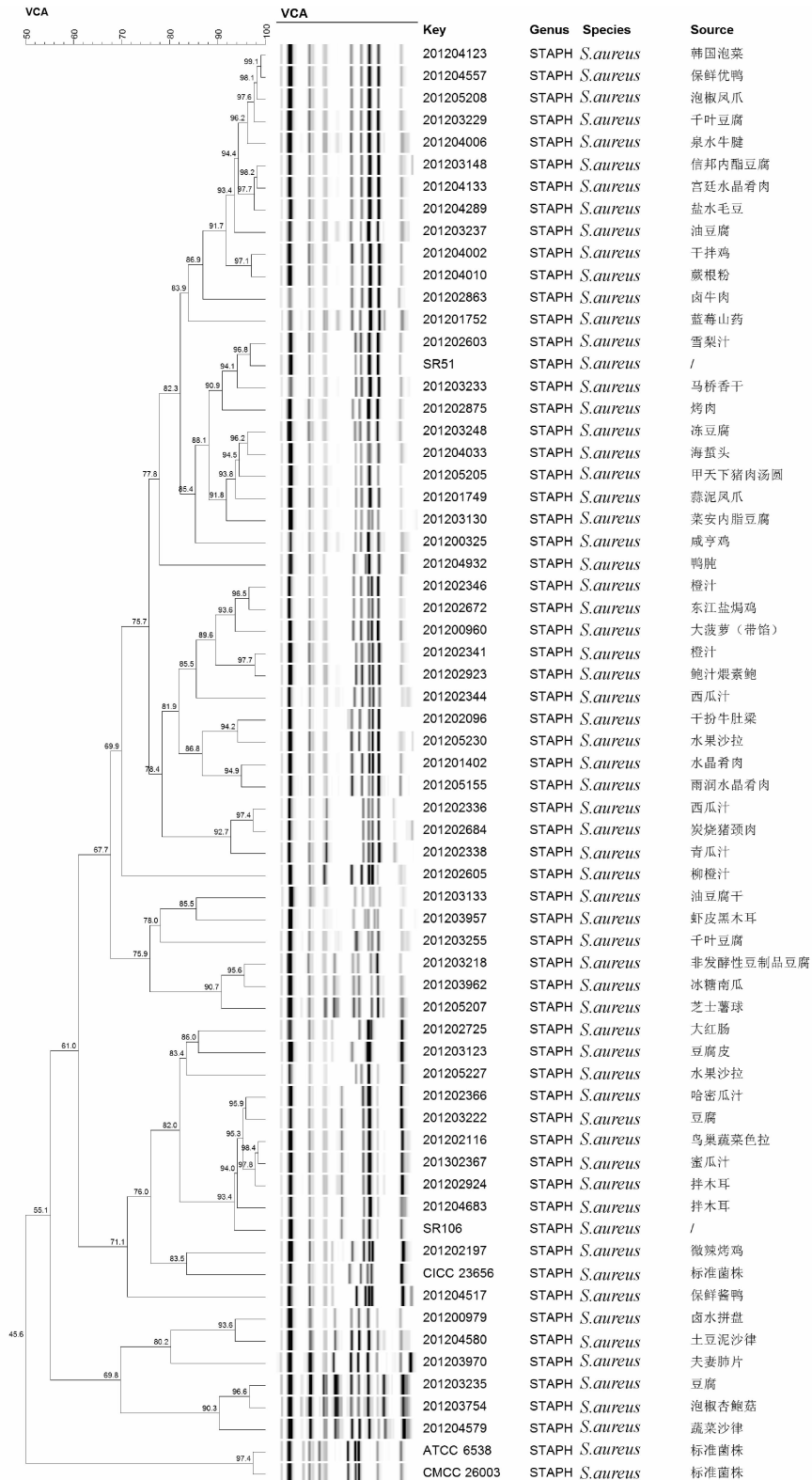
血浆凝固酶基因片段的扩增与RiboPrinter病原微生物鉴定分型技术相结合，可以准确分析污染物的分布与同源性关系，为污染物的追踪和溯源提供数据支持，如图5所示：201204002（干拌鸡）与201204010（蕨根粉）两个编号的菌株同源关系近，相似度达到97.1%，编号201204006（泉水牛腱）菌株与前两者相似度也达到93.4%；PCR扩增结果显示3个菌株的扩增片段大小完全相同；结合采样信息，发现上述三个编号样品均采集于2012年8月上海某餐饮公司的凉拌菜食品，因此可以判定：三份样品存在交叉污染的可能性较大，提示应加强对食品生产和加工环境的清洁和消毒，尽快改善卫生状况。

如图6所示，201202336（西瓜汁）和201202338（青瓜汁）两个编号的菌株同源关系较近，相似度为92.7%；PCR扩增结果显示2个菌株的扩增片段大小相同；结合采样信息发现，上述两个编号样品均采集于2012年6月上海某餐饮公司，因此同源性污染可能较大；同时发现201202684号菌株与前两者的同源性也很高，但因采样时间与地点不同，可排除交叉污染的可能。另外，201202672（东江盐焗鸡）和201202684（碳烧猪颈肉）两个编号的菌株来源于相同的采样时间和地点，但PCR和RiboPrinter分型结果均显示，两者是不同来源的菌株，因此判定该生产环境中可能存在不止一种来源的金黄色葡萄球菌，两份样品为独立污染的可能性较大。

### 3 小结

金黄色葡萄球菌是反映食品生产和加工环境优劣的常见食源性致病菌<sup>[12-13]</sup>，加强对金黄色葡萄球菌的监控，可为食品生产和加工环境的改善、污染物的控制和污染源的排查提供重要的试验依据。为适应国家食品安全监管的最新要求，本文首先以血浆凝固酶基因为研究对象，建立了金黄色葡萄球菌的分子生物学鉴定方法，该方法的建立不仅可将菌种鉴定由“属”的水平推向“种”的水平，而且可为阳性菌株的快速鉴定奠定基础；由于PCR扩增片段大小差异不明显，基于血浆凝固酶基因扩增的方法仅能对金黄色葡萄球菌进行初步分类，为此本文借助RiboPrinter系统，完成了对62株金黄色葡萄球菌的核糖体分型，初步建立了食源性金黄色葡萄球菌的分型与溯源数据库。

建立食源性致病菌的分型与溯源方法，是开



注:/表示未确定样品来源

图4 62株食源性金黄色葡萄球菌 RibiPrinter 亚型类聚分布树状图

Figure 4 Dendrogram of RibiPrinter patterns from 62 foodborne *Staphylococcus aureus*

展食品生产、流通、餐饮等环节监控,追溯污染源、改善卫生状况、降低致病风险的必然要求。本实验室历年承担各类食源性致病菌风险监测工作,累积了大量金黄色葡萄球菌阳性检出样品,借助PCR和RibiPrinter分型技术,初步建立了食源性

金黄色葡萄球菌的分型与溯源数据库,并希望能够逐年积累数据,不断完成数据库的扩充和维护,为食品污染物溯源、致病菌风险评估与应对食品安全突发事件做好技术储备。

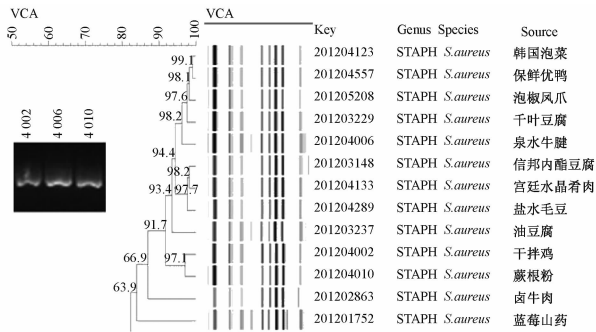


图5 金黄色葡萄球菌污染物同源性分析 I

Figure 5 Homologous analysis of *S. aureus* isolates I

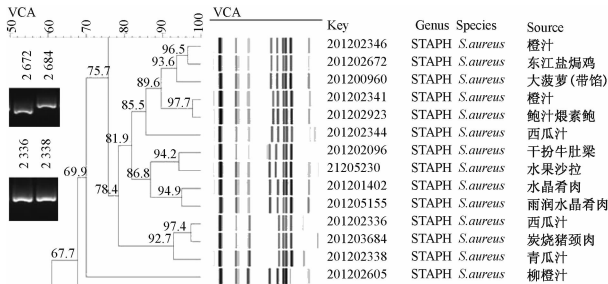


图6 金黄色葡萄球菌污染物同源性分析 II

Figure 6 Homologous analysis of *S. aureus* isolates II

参考文献

[ 1 ] Johnson W M, Tyler S D, Ewan E P, et al. Detection of genes for enterotoxins, exfoliative toxins, and toxic shock syndrome toxin 1 in *Staphylococcus aureus* by the polymerase chain reaction [J]. *Clinical Microbiology*, 1991, 29(3): 426-430.

[ 2 ] 柳旭伟, 葛文霞, 金黄色葡萄球菌肠毒素[J]. *微生物学杂志*, 2008, 28(5): 86-90.

[ 3 ] 中华人民共和国卫生部, 中国国家标准化管理委员会. GB 4789.10—2010 食品微生物学检验 金黄色葡萄球菌检验[S]. 北京: 中国标准出版社, 2012.

[ 4 ] 钟玮, 冯震, 鲍英, 等. 金黄色葡萄球菌的 API-STAPH 生化鉴定及核糖体分型分析[J]. *中国抗生素杂志*, 2013, 38(5): 354-359.

[ 5 ] Aarestrup F M, Dangler C A, Sordillo L M. Prevalence of coagulase gene polymorphism in *Staphylococcus aureus* isolates causing bovine mastitis [J]. *Can J Vet Res*, 1995, 59(2): 124-128.

[ 6 ] Rodrigues da Silva E, Da Silva N. Coagulase gene typing of *Staphylococcus aureus* isolated from cows with mastitis in southeastern Brazil [J]. *Can J Vet Res*, 2005, 69(4): 260-264.

[ 7 ] Raimundo O, Deighton M, Capstick J, et al. Molecular typing of *Staphylococcus aureus* of bovine origin by polymorphisms of the coagulase gene [J]. *Vet Microbiol*, 1999, 66(4): 275-284.

[ 8 ] Steven M G. Riboprint analysis of *Listeria monocytogenes* isolates obtained by FDA from 1999 to 2003 [J]. *Food Microbiol*, 2004, 21(2): 187-191.

[ 9 ] 杨燕, 冯震, 鲍英, 等. 全自动基因指纹分析仪 Riboprinter 在药品中大肠埃希菌的鉴定分析中的应用[J]. *中国抗生素杂志*, 2013, 38(7): 536-539.

[ 10 ] Botes J, Williamson G, Sinickas V, et al. Genomic typing of *Pseudomonas aeruginosa* isolates by comparison of riboprinting and PFGE: correlation of experimental results with those predicted from the complete genome sequence of isolate PAO1 [J]. *J Microbiol Met*, 2003, 55(1): 231-240.

[ 11 ] 白莉, 李薇薇, 王岗, 等. 我国 4 省肉鸡屠宰场沙门氏菌脉冲场凝胶电泳分子分型[J]. *中国食品卫生杂志*, 2013, 25(4): 303-308.

[ 12 ] 徐进, 庞璐. 食品安全微生物学指示菌国内外标准应用的比较分析[J]. *中国食品卫生杂志*, 2011, 23(5): 472-477.

[ 13 ] 巢国祥, 焦新安, 周丽萍, 等. 食源性金黄色葡萄球菌流行特征、产肠毒素特性及耐药性研究[J]. *中国卫生检验杂志*, 2006, 16(8): 904-907.

欢迎订阅 2015 年《农产品质量与安全》  
中国科技核心期刊

主管 中华人民共和国农业部 主办 中国农业科学院

支持单位 农业部农产品质量安全监管局

协办单位 农业部农产品质量安全中心 中国绿色食品发展中心

承办单位 中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所

主要栏目: 本刊特稿、本刊专稿、政策法规、质量安全监管、无公害农产品、绿色食品、有机农产品、农产品地理标志、农业标准化、检验检测、学科建设与发展、研究与探讨、安全生产技术、地方经验交流、海外博览、农业标准公告、信息与动态等。

读者对象: 与农产品质量安全、农业质量标准和检验检测有关的各级行政管理、科研教学、检验监测、技术推广、生产企业等部门的相关人员。

本刊为双月刊, 逢双月 10 日出版。大 16 开本, 彩色四封, 80 页。全国各地邮局(所)均可订阅, 也可直接到本刊编辑部办理订阅手续。邮发代号: 82-223。每册定价: 10.00 元, 全年共 60.00 元。

通讯地址: 北京市中关村南大街 12 号中国农科院质标所《农产品质量与安全》编辑部, 邮政编码: 100081。

联系电话/传真: (010)82106521、82106522 E-mail: aqs@caas.cn

欢迎各界朋友订阅、赐稿和刊登广告