研究简报

DOI号: 10.3724/SP.J.0000.2009.40772

非淀粉多糖酶对罗非鱼肝胰脏淀粉酶活性和基因表达的影响

王纪亭[1]　万文菊[2]　计　成[3]　吴淑勤[4]　石存斌[4]

(1. 山东农业大学动物科技学院, 泰安　271018; 2. 泰山医学院, 泰安　271000;
3. 中国农业大学动物科技学院, 北京　100094; 4. 中国水产科学研究院珠江水产研究所, 广州　510380)

EFFECTS OF NSP-ENZYME ON ACTIVITY AND GENE EXPRESSION FOR LIVER-PANCREATIC AMYLASE

WANG Ji-Ting[1], WAN Wen-Ju[2], JI Cheng[3], WU Shu-Qin[4] and SHI Cun-Bin[4]

(1. *College of Animal Science & Technology, Shandong Agricultural University, Tai'an* 271018; 2. *Tai Shan Medical College, Tai'an* 271000; 3. *College of Animal Science and Technology, China Agricultural University, Beijing* 100094; 4. *Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou* 510380)

关键词: 非淀粉多糖酶; 罗非鱼; 基因表达; 淀粉酶

Key words: NSP-enzyme; Tilapia; Gene expression; Amylase

中图分类号: Q494; Q786　　**文献标识码**: A　　**文章编号**: 1000-3207(2009)04-0772-06

关于非淀粉多糖 (Non-Starch Polysaccharides, NSP)酶对肝胰淀粉酶的影响在畜禽上研究较多。许梓荣研究大麦日粮中添加 NSP酶对仔猪胰脏和小肠消化酶活性的影响时指出, 添加 NSP酶不影响仔猪胰脏中胰淀粉酶活性[1]。艾晓杰等在雏鹅日粮中添加粗酶制剂 (主要含 β葡聚糖酶及少量的果胶酶和纤维素酶)使胰淀粉酶的活性下降了 34.7%, 胰脂肪酶总活性降低了 21.58%[2]。有关淀粉酶合成和分泌的机理并不十分清楚, Evelyne F, *et al.* 认为淀粉酶的合成在转录水平进行调节[3]。目前并无发现有关外源非淀粉多糖酶的添加对水产动物肝胰脏淀粉酶的活性及其基因转录水平的影响的相关报道。RT-PCR半定量是研究基因表达定量而广泛采用的简易方法, 本文以罗非鱼为实验对象, 研究在饲料中添加不同水平非淀粉多糖酶对其肝胰脏淀粉酶活性和 mRNA表达量的影响。

1　材料与方法

1.1　试验动物及试验设计　试验选用奥尼罗非鱼 (90%以上雄性), 平均体重 60g左右, 选择体重一致的健康鱼 560尾, 分养于长 ×宽 ×高为 2m ×1m ×1m的网箱中, 各组初始体重无显著差异。实验分 4个处理组, 对照 1组为小麦-豆粕型基础日粮, 处理组 2、3、4在基础日粮中分别添加 0.01%、0.02%、0.04%非淀粉多糖酶, 每处理组设 7个重复组, 以每个网箱为一重复单位, 每个重复 20尾鱼。

1.2　试验日粮、饲养管理和样品制备　基础日粮组成及营养水平为 (%): 小麦 27、豆粕 17、鱼粉 5、菜籽粕 25、花生粕 9.5、麦芽根 6、统糠粉 3、膨润土 3、磷酸氢钙 1.5、石粉 1.5、预混料 1.5; 消化能 11.88mJ/kg, 粗蛋白 28.7%。饲料饲喂量按鱼体重的 3%—4%进行饲喂, 每天分 2次 (上午 9:00, 下午 16:00)投喂。预试期为 7d, 正式试验期为 8周。正式试验初和试验末, 分别称取每重复组鱼的体重和饲料消耗量, 用于生长性能指标的检测。试验末, 在喂料前 0h和喂料后 5h分别从每重复组取鱼 2条, 解剖取肝胰脏, 每个重复组混合为一个样品, 装袋密封, 置于 -70℃冰箱中保存, 用于淀粉酶活性测定。

1.3　罗非鱼生长性能指标的测定　记录各处理组饲料消耗量, 根据鱼的实验前后体重变化, 计算各组鱼的日增重、饲料转化效率等指标。

特定生长率 (SGR) = ($\ln W_t - \ln W_0$) / t ×100%

饲料系数 (FCR) = F/W

式中, W_t为试验末鱼均重, W_0为试验初鱼均重, t为饲养天数, F为重复组饲料总摄入量, W为重复组总鱼体增重。

1.4　淀粉酶活性测定　将肝胰脏组织在 4℃下解冻后, 称重 (精确至 0.01g), 按 1∶20的组织样品重量比加入 4℃左右的

收稿日期: 2007-12-10; **修订日期**: 2009-02-01

基金项目: 国际合作项目 (GJHZ200586021); 山东省中青年科学家科研奖励基金项目 (2006BS06018)资助

作者简介: 王纪亭 (1969—), 男, 山东阳谷人; 博士, 副教授; 研究方向为水产动物营养。E-mail: jtwang@sdau.edu.cn

通讯作者: 万文菊, E-mail: wwenju2003@yahoo.com.cn

蒸馏水,然后用匀浆机器匀浆,匀浆液用离心机以 5000 r/min 离心 15 min,取上清液,置于 4℃冰箱中保存,8 h内测定完毕。

测定方法采用 DNS还原糖法,以 1%淀粉作为底物,在 pH5.6,反应温度 40℃条件下,1 g样品鲜重反应 5 min产生的麦芽糖的毫克数 (mg maltose/g·5 min)。

1.5 总 RNA的提取 将罗非鱼用 0.1%的高锰酸钾消毒,再用 75%的酒精棉球擦洗,置于无菌的托盘上,解剖鱼体取出肝胰脏,立即用于总 RNA的提取。总 RNA提取采用总 RNA提取试剂盒 (Promega公司)。提纯的 RNA,通过琼脂糖电泳进行鉴定后,贮于 -70℃冰箱备用。

1.6 引物设计与 RT-PCR分析 参考已发表的罗非鱼较近源动物 alpha淀粉酶的 cDNA序列,设计简并引物。

上游引物 (P1): 5′ATC (G) AGGCTCATC (A) TG (T) GGTGGC 3′

下游引物 (P2): 5′CCC (A) CTTCT (C) GGG (T) CTTG-CATTTA 3′

RT-PCR反应按一步法试剂盒 (Takara公司)说明书中的操作步骤进行,以总 RNA为模板,加入相应引物、5U/μL AMV逆转录酶、5U/μL *Taq*酶、5μL 10 ×PCR Buffer制成 50μL的反应体系。alpha淀粉酶 PCR扩增反应条件: 94℃预变性 5 min;然后进行 29个循环反应,其温度循环条件为: 94℃变性 30 s, 54℃ 30 s, 72℃延伸 50 s;循环结束后 72℃再延伸 6 min。取 5μL PCR产物,1.5%琼脂糖凝胶电泳检测 PCR扩增结果。

1.7 PCR产物的克隆与测序 按照 AgaroseGelDNApurificationKitVer. 2.0介绍的方法回收纯化 PCR产物,1%琼脂糖凝胶电泳检测回收产物质量,从琼脂糖凝胶中回收 PCR扩增产物,连接到 PMD18-T载体上,转化 DH5α大肠杆菌感受态细胞,涂布 Amp/X-gal/IPTG/LB平板,挑取白色菌落进行培养,进行菌落 PCR鉴定。选取 2个重组子,送大连宝生物公司进行序列测定,用 DNA分析软件 VECTORNTI6.0和 NCBI上 BLAST程序进行序列分析。

1.8 非淀粉多糖酶对奥尼罗非鱼肝胰脏 α淀粉酶表达影响分析 饲养试验末,在喂料后 5 h和喂前 0 h分别取各处理组罗非鱼的肝胰脏,提取总 RNA,紫外分光光度仪测定 RNA浓度,琼脂糖电泳证实 RNA完整性。

因 β-*actin*基因在各个物种及组织内的高度保守性,所以将 β-*actin*在组织内的 PCR扩增产物作为参照物。参照已发表的罗非鱼 β-*actin*的序列 (AB037865),设计了一对特异性引物:

上游引物: 5′TCACACCTTCTACAACGAGC 3′;

下游引物: 5′GAGGTAGTCAGTCAGGTCAC 3′。

根据测序所得序列对 alpha淀粉酶基因设计特异性引物:

上游引物: 5′ATC AGG CTC ATC TGG GTG GC 3′;

下游引物: 5′CCC CTT CTG GGC TTG CAT TTA 3′。

取等量总 RNA,同 1.6反应体系,利用 RT-PCR一步法试剂盒 (Takara)进行,采用严格一致的 50μL PCR反应体系,分别对 alpha淀粉酶和 β-*actin*进行扩增。alpha淀粉酶扩增反应条件同 1.6。β-*actin*扩增反应条件: 94℃预变性 5 min;然后进行 29个循环反应;其温度循环条件为: 94℃变性 30 s, 53℃ 30 s, 72℃延伸 50 s;循环结束后 72℃再延伸 6 min。反应完成后,从各反应体系准确吸取 5μL PCR产物,1.5%琼脂糖凝胶进行电泳分离,在紫外灯光下观察、拍照。应用 Glyko-bandscan分析系统分别测定样本 alpha淀粉酶及 β-*actin*阳性条带的总灰度,并计算出 alpha淀粉酶/β-*actin*比值。

1.9 数据处理与统计分析 DNA测序结果在 NCBI网站上进行 Blast(Basic Local Alignment Search Tool)分析,根据分析结果及 E-Value值的大小确定基因是否属于 alpha淀粉酶。生长性能指标、酶活性和基因表达数据分析利用 SPSS统计软件进行方差分析,采用最小显著差数法 (LSD)进行多重比较。

2 结　果

2.1 非淀粉多糖酶对奥尼罗非鱼生长性能的影响

方差分析结果表明:奥尼罗非鱼的特定生长率随着日粮中添加酶制剂比例的增多而增加,0.02%组和 0.04%组均显著高于对照组 ($p < 0.05$),比对照组分别提高 10.61%和 11.36%。日粮中添加酶制剂的 0.02%组和 0.04%组明显降低了奥尼罗非鱼的采食量 ($p < 0.05$)。添加酶制剂组饵料系数显著低于对照组 ($p < 0.05$),其中 0.02%组和 0.04%组又显著低于 0.01%组 ($p < 0.05$),0.02%组和 0.04%组的饵料系数比对照组分别降低了 16.13%和 18.99% (表 1)。

表 1 非淀粉多糖酶对奥尼罗非鱼生长性能的影响

Tab. 1 Effect of NSP-enzyme on growth performance of tilapia

指标 Index	对照组 Control	0.01%酶组 0.01% enzyme	0.02%酶组 0.02% enzyme	0.04%酶组 0.04% enzyme
初始体重 *W* (g)	60.6^{a} ±2.33	61.5^{a} ±2.15	60.4^{a} ±2.26	61.2^{a} ±2.39
期末体重 *FW* (g)	126.7^{a} ±2.50	130.2^{a} ±5.93	136.5^{b} ±6.42	139.4^{b} ±4.24
平均耗料量 *AFI* (g)	184.7^{b} ±6.61	181.1^{ab} ±2.00	178.3^{a} ±4.77	176.5^{a} ±2.29
特定生长率 *SGR*	1.32^{a} ±0.04	1.34^{a} ±0.03	1.46^{b} ±0.06	1.47^{b} ±0.02
饵料系数 *F*/*G*	2.79^{c} ±0.12	2.64^{b} ±0.13	2.34^{a} ±0.15	2.26^{a} ±0.06

注:同行中肩标不同者差异显著 ($p < 0.05$);肩标相同字母者差异不显著 ($p > 0.05$);下同

Note: within the same row, values with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$); values with same superscripts are not significantly different ($p > 0.05$); The same as follows

表 2 不同时间采样对各处理组罗非鱼肝胰脏淀粉酶活性比较

Tab. 2 Comparison of amylase activity of liver-pancrea in different time

采样时间 Sample Collection Time	对照组 Control	0.01%酶组 0.01% enzyme	0.02%酶组 0.02% enzyme	0.04%酶组 0.04% enzyme
喂前 0h Before Feeding 0h	212 ±10.5[a]	203 ±9.6[b]	189 ±9.2[b]	164 ±8.8[c]
喂后 5h After Feeding 5h	140 ±6.6[a]	128 ±5.7[a]	130 ±5.3[a]	106 ±5.5[b]

2.2 不同时间采样,各处理组罗非鱼肝胰脏淀粉酶活性比较

由表 2可以看出肝胰脏淀粉酶活性都以 0.04%酶添加量为最低,与其他组差异显著 ($p < 0.05$)。

2.3 α淀粉酶序列分析

PCR扩增产物和质粒酶切产物用 1.5%的琼脂糖凝胶电泳进行分离 (图 1),扩增产物大小 500bp左右,与预期相近,经测序后所得核酸序列与相应的氨基酸序列 (图 2,登陆号:DQ064646),基因进化树分析 (图 3)。经过以上分析后发现本文扩增的序列与其他鱼类的 α淀粉基因和酶氨基酸序列都具有较高的相似性,尤其是与舌齿鲈的 alpha淀粉基因和蛋白质序列同源性都最高 (表 3)。

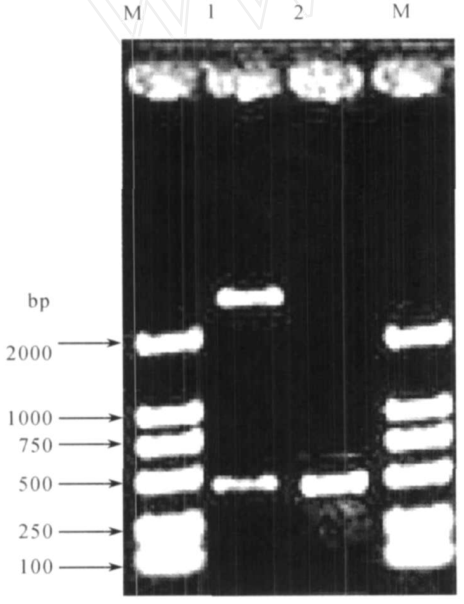


图 1 α淀粉酶 cDNA的 PCR扩增和酶切图

Fig. 1 RT-PCR amplification and graph by restriction enzyme of alpha-amylase gene

M: Marker DL2000; 1:质粒的酶切图谱 Plasmid maps by restriction enzyme; 2:基因的 PCR扩增产物 PCR amplification of gene

2.4 喂前 0h各处理组罗非鱼肝胰脏组织 α-淀粉酶的表达

以肝胰脏组织总 RNA为模板进行 RT-PCR,电泳结果显示,0.04%非淀粉多糖酶添加组 α淀粉酶表达量极显著低于前三组 ($p < 0.01$) (图 4、表 4);各处理组的 β-*actin*基因片段扩增大小与预期相符。

2.5 喂料后 5h各处理组罗非鱼肝胰脏组织 α淀粉酶的表达

喂料后 5h与喂前 0h各处理组罗非鱼肝胰脏组织 α-淀粉酶的表达结果类似,0.04%非淀粉多糖酶添加组 α-淀粉酶表达量极显著低于前三组 ($p < 0.01$) (图 5、表 4)。

3 讨 论

3.1 非淀粉多糖酶对奥尼罗非鱼生长性能的影响

饲料中的可溶性非淀粉多糖可使动物消化道中食糜的黏度增加,减少了消化酶与食糜的接触机会,同时,减慢了已消化养分向肠黏膜的扩散速度。饲料中各种营养成分的消化率和吸收率都有所降低[4]。非淀粉多糖在外源酶的作用下大部分被水解,肠道黏度随之下降,抗营养作用也相应降低,研究表明肠道食糜黏度下降程度与生长性能的提高幅度高度相关[5]。复合酶制剂在畜、禽方面的文献资料较多。Wang, *et al.*[6]在 7—42d的肉鸡日粮中添加以木聚糖酶和 β葡聚糖酶为主的复合酶制剂,显著提高了肉鸡的日增重和饲料转化效率等生产性能。Mathlouthi, *et al.*[7]在火鸡小麦和大麦日粮中添加以木聚糖酶和葡聚糖酶为主的复合酶制剂,显著提高了火鸡的增重率和饲料转化效率。国内许多学者的研究也大部分集中在畜禽方面,而在水产动物上的研究相对较少。周小秋等[8]在含豆粕、菜粕、棉仁粕为主的饲料中添加酶制剂,提高了饲料利用率,降低了鲤鱼消化道的黏性,有利于营养物质吸收,对鲤鱼的增重、饵料系数有着显著的影响。徐国武等[9]在含大麦粉 41.3%的饲料中添加 β葡聚糖酶饲喂鲤鱼,结果表明,添加 β葡聚糖酶于含大麦 (35%)的饲料中,能提高鲤鱼的增重率和降低饵料系数。张春晓等[10]在大黄鱼和鲈鱼的实验结果表明,在饱食条件下,实验饲料中添加非淀粉多糖酶 (含木聚糖酶、葡聚糖酶、纤维素酶等)显著降低了实验鱼的氨氮排泄率 ($p < 0.05$)。本试验的研究结果与上述的研究结果基本一致,在奥尼罗非鱼日粮中添加较高量的木聚糖酶和 β葡聚糖酶为主的复合酶制剂,可以显著提高奥尼罗非鱼的特定生长率,降低饵料系数。

3.2 非淀粉多糖酶对罗非鱼肝胰脏淀粉酶活性和 α淀粉酶基因表达的影响

本研究选取与罗非鱼较近源鱼类已知 alpha淀粉酶基因序列进行比对,设计引物,通过 RT-PCR方法获得了部分 cDNA序列。由测序可知该 cDNA片段有 482bp,与设计预期大小一致,已登陆 genebank。根据 Isobel和 Andy等的统

1	ATC	AGG	CTC	ATC	TGG	GTG	GCT	CTG	TTC	GGG	CTT	GGC	TTG	GCC	CAG
1	I	R	L	I	W	V	A	L	F	G	L	G	L	A	Q
46	CAC	AAC	CCC	CAA	TTT	AAG	AAT	GGA	AGG	ACT	TCC	ATC	GTC	CAC	CTG
46	H	N	P	Q	F	K	N	G	R	T	S	I	V	H	L
91	TTC	GAG	TGG	CGT	TGG	GCT	GAC	ATT	GCT	CAA	GAG	TGT	GAA	CGC	TTC
91	F	E	W	R	W	A	D	I	A	Q	E	C	E	R	F
136	TTG	GGA	CCC	AAA	GGC	TTT	GGT	GGA	GTT	CAG	ATC	TCT	CCT	CCA	AAT
136	L	G	P	K	G	F	G	G	V	Q	I	S	P	P	N
181	GAA	CAC	ATT	CTG	GTG	AAC	AAT	CCC	TTC	AGG	CCC	TGG	TGG	CAG	AGA
181	E	H	I	L	V	N	N	P	F	R	P	W	W	Q	R
226	TAC	CAG	CCA	ATC	AGC	TAC	AAC	CTC	TGC	TCA	AGA	TCT	GGC	AAT	GAG
226	Y	Q	P	I	S	Y	N	L	C	S	R	S	G	N	E
271	GCA	GAA	CTG	AAA	GAC	ATG	ATC	ACC	CGC	TGC	AAC	AAC	GTT	GGG	GTT
271	A	E	L	K	D	M	I	T	R	C	N	N	V	G	V
316	AAC	ATC	TAT	GTG	GAT	GAA	GTT	ATC	AAC	CAC	ACG	TGT	GGA	TCT	GGT
316	N	I	Y	V	D	A	V	I	N	H	T	C	G	S	G
361	GGT	GGA	GCA	GGA	ACC	CAC	TCT	TCA	TGT	GGA	AGC	TGG	TTT	GAT	GCT
361	G	G	A	G	T	H	S	S	C	G	S	W	F	D	A
406	GGC	AAA	GAA	GAT	TTC	CCC	AGT	GTA	CCA	TAT	TCT	AAC	TTG	GAC	TTC
406	G	K	E	D	F	P	S	V	P	Y	S	N	L	D	F
451	AAT	GAC	AAT	AAA	TGC	AAG	CCC	AGA	AGG	GG					
451	N	D	N	K	C	K	P	R	R						

图 2　克隆的罗非鱼 α淀粉酶部分 cDNA序列及相应的氨基酸序列

Fig. 2　Partial alpha-amylase cDNA sequence and deduced aminoa cids equence

Gene Bank No. DQ064646. 1; GI: 67551223; **涂黑者为引物** The blackened word is primer

表 3　罗非鱼 α淀粉酶核酸及氨基酸序列与其他已知近源鱼类 α淀粉酶基因的比对结果

Tab. 3　Comparison of nucleotide and amino acid sequence of seaperch alpha-amylase with other known fish alpha-amylase

种类 Species	GenBank注册号 Accession Number	核苷酸相似性 Nucleotide identity (%)	E	氨基酸相似性 Amino acid identity (%)	E
尖吻鲈 Giant perch	AF416651	85	3e-100	80	2e - 75
舌齿鲈 Sea-bass	AJ310653	86	1e-74	83	5e-66
鳗鲡 Eel	AB070721	79	8e-21	71	7e-68
赤鲷 Red porgy	AY741554	84	3e-17		

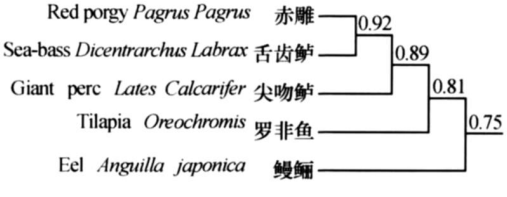


图 3　5种鱼的 α淀粉酶基因的进化树

Fig. 3　The phylogenetic tree for five kinds of alpha-amylase

计学研究结果,当核酸序列比对的 E值小于 0.005时,认为比对的 2个序列之间有显著的相似性[11]。因此将所克隆到的序列用 BLAST程序与 GenBank核酸数据库进行序列比对后,发现核酸及氨基酸与已知近缘鱼类 alpha淀粉酶基因比对的 E值都小于 0.005 (表 3)。从表 3的基因与已知鱼类 alpha淀粉酶基因序列的 Blast分析结果中可见,核酸的相似性达到 85%以上,而氨基酸的同源性也达到 75%%以上,从此可见所克隆到的序列与已知鱼类 alpha淀粉酶基因具有明显的相似性与同源性。这说明所克隆的 cDNA片段为 alpha淀粉酶基因的部分序列,为后面进行罗非鱼 alpha淀粉酶的相关研究打下相关的理论基础。

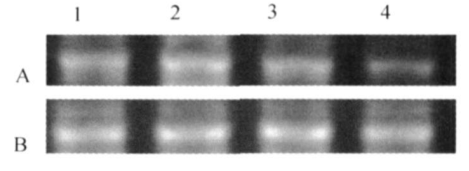


图 4　喂前 0 h各处理组肝胰脏组织 α淀粉酶表达量的比较

Fig. 4　The level of α-amylase mRNA in liver of every group at 0 hours before feeding

A: **α淀粉酶**; B:**相应的** β-*actin***基因片段**

A: fragment cDNA of α-amylase; B: Corresponding β-*actin* gene

1. **对照组** Group 1; 2. 0.01% **酶组** Group 2; 3. 0.02% **酶组** Group 3; 4. 0.04% **酶组** Group 4

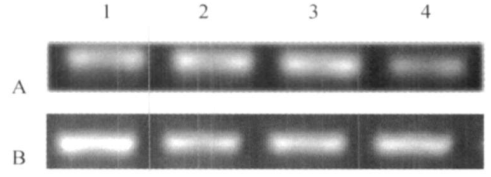


图 5 喂料后 5h各处理组肝胰脏组织的 α淀粉酶表达量的比较

Fig. 5 The level of α-amylase mRNA in liver of every group at 5h after feeding

A: α淀粉酶 cDNA的片段; B:相应的 β-*actin*基因片段

A: fragment cDNA of α-amylase B: Corresponding β-*actin* gene

1. 对照组 Group1; 2. 0.01%酶组 Group 2; 3. 0.02%酶组 Group 3; 4. 0.04%酶组 Group 4

定量研究是分子生物学研究的重要环节,其方法主要有印迹杂交、cDNA微阵列和寡聚核苷酸微阵列技术等[12,13]。RT-PCR半定量是研究基因表达定量而广泛采用的简易方法,其主要原理是起始时系统中不同拷贝数的 cDNA,经 PCR扩增至指数增长期时, PCR产物量与起始拷贝数呈正相关,这时的 PCR产物量间接反映了起始 cDNA的拷贝数。因此,可用来作样品间的比较,加入内参照以消除样品间的误差。此方法的优点是经反转录后数次循环,产物的量以指数形式增长,即使模板浓度较低也能检测到[14,15]。传统的半定量 RT-PCR技术多以 β-*actin*作内参。RT-PCR定量法是目前探讨基因转录水平的有效手段,与传统的 NorthernBlot 法比较,它具有灵敏、简捷、特异性高等优点。

表 4 喂后 5h和喂前 0h罗非鱼肝胰脏 α淀粉酶的 mRNA表达量的比较

Tab. 4 mRNA expression of alpha-amylase in liver at 0h before and 5h after fed (mean ±SE, Alpha-amylase /-actin)

样本 Sample	对照组 Control	0.01%酶组 0.01% Enzyme	0.02%酶组 0.02% Enzyme	0.04%酶组 0.04% Enzyme
喂前 0h Before Feeding 0h	0.96^{a} ±0.015	0.95^{a} ±0.009	0.93^{a} ±0.027	0.81^{b} ±0.009
喂后 5h After Feeding 5h	0.90^{a} ±0.039	0.90^{a} ±0.021	0.89^{a} ±0.034	0.67^{b} ±0.023

关于外源酶的添加对水产动物内源酶的影响研究较少,王爱民[16]等报道,日粮中添加以葡聚糖为主的外源酶后,异育银鲫中肠食糜及组织中蛋白酶、淀粉酶活性均显著提高($p < 0.05$),促进了鱼类对营养物质的分解和消化吸收,从而加速其生长。张璐[17]等报道在大黄鱼饲料中添加适量的非淀粉多糖酶能显著提高大黄鱼胃和肠道中淀粉酶的活性。肝胰脏是鱼类内源酶分泌的重要场所,其分泌的蛋白酶以酶原的形式存在,且与肠道蛋白酶活性有一种消长关系。研究发现日粮中添加不同剂量外源酶后,异育银鲫肝胰脏蛋白酶活性显著下降($p < 0.05$),说明日粮中添加外源酶可提高肠道中肠蛋白酶活性,而降低肝胰脏蛋白酶活性[18]。至于淀粉酶是否呈现类似消长关系值得研究。

本文结果显示,奥尼罗非鱼呈现与畜禽相似规律,即在奥尼罗非鱼饲料中添加 0.01%和 0.02%NSP酶时,对肝胰脏 alpha淀粉酶 mRNA表达无影响,而当添加量较高时(0.04%)将抑制其表达,这说明如果外源添加 NSP酶过高,有可能抑制机体自身肝胰脏淀粉酶的分泌。Hara研究显示,大鼠肠黏膜上消化酶活性可对胰液胆汁分泌具有负反馈的效应。因此食糜中较高的酶活性,是影响胰酶产生的原因之一[19]。粗酶制剂可解除 NSP的抗营养作用,增加淀粉酶在食糜中的作用效果,并反馈致使胰淀粉酶的产生减少,因而胰腺的淀粉酶活性有下降的趋势。所以,消化酶受抗营养因子作用所致的损失大为下降,消化效率显著提高[20]。

参考文献:

[1] Xu Z R, LiW F, Sun J Y. Effects of adding NSP enzymes to barley-based diets on digestive enzyme activity of piglets [J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2002, **22**(1): 99—101 [许梓荣, 李卫芬, 孙建义. 大麦日粮中添加 NS酶对仔猪胰脏和小肠消化酶活性的影响. 中国兽医学报, 2002, **22**(1): 99—101]

[2] Ai X J, Han Z K. Effect of crude enzyme preparation on digestive enzyme activities of pancreatic juice and duodenal chyme in geese [J]. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2001, **24**(4): 55—58 [艾晓杰, 韩正康. 粗酶制剂对鹅胰液和十二指肠食糜酶活性的影响. 南京农业大学学报, 2001, **24**(4): 55—58]

[3] Evelyne F L, Hoste M F. Adaptation of exocrine pancreas to dietary proteins: Effect of the nature of protein and rat strain on enzyme activities and messenger RNA levels [J]. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 1994, **5**(2): 84—94

[4] Choct M, Annison G. Soluble wheat pentosans exhibit different anti-nutritive activities in intact and cecectomised broiler chickens [J]. *Journal of Nutrition*, 1992, **122**: 2457—2465

[5] Bedford M R, Classen H L. Reduction of intestininal viscosity through mainpulation of dietary rye and pentosanase concentration is effected through changes in the carbohydrate composition of the intestinal aqueous phase and results in improved growth rate and food conversion efficiency of broilers [J]. *Journal of Nutrition*, 1992, **122**: 560—569

[6] Wang Z R, Qiao S Y, Lu W Q, *et al*. Effects of enzyme supplementation on performance, nutrient digestibility, gastrointestinal morphology, and volatile fatty acid profiles in the hindgut of broilers fed wheat-based diets [J]. *Poultry Science*, 2005, **84**(6): 875—881

[7] Mathlouthi N, Juin H, Larbier M. Effect of xylanase and β-glucanase supplementation of wheat-or wheat and barley-based diets on the performance of male turkeys [J]. *British Poultry Science*, 2003, **44**(2): 291—298

[8] Zhou X Q. Effects of several enzyme on the growth performance

of common carp [J]. *Feed China*, 2001, **15**: 22—23 [**周小秋. 几种酶制剂对鲤鱼生产性能的影响. 饲料广角**, 2001, **15**: 22—23]

[9] Xu G W, Xu M Q. Effect of β-glucosanase on performance and feed digestibility for common carp [J]. *Feed Industry*, 2000, **21** (3): 23—24 [**徐国武, 许民强. β葡聚糖酶对鲤鱼生长性能及饲料消化率的影响. 饲料工业**, 2000, **21**(3): 23—24]

[10] Zhang C X, Mai K S, Ai Q H, *et al* Effects of exogenous enzyme on ammonia nitrogen and soluble phosphorus excretion in large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*) and japanese seabass (*Lateolabrax japonicaus*) [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2008, **32**(2): 231—236 [**张春晓, 麦康森, 艾庆辉, 等. 饲料中添加外源酶对大黄鱼和鲈氮磷排泄的影响. 水生生物学报**, 2008, **32**(2): 231—236]

[11] Iobel A, Andy B. The studies of statistics in homology [J]. *Biology informatics*, 1998, **14**(4): 349

[12] Duggan D J. Expression profiling using DNA microarrays [J]. *National Gene*, 1999, **21**(1 suppl): 10—14

[13] Kuno N, Muramatsu T, Hamazato F, *et al* Identification by large-scale screening of phytochrome-regulated genes in etiolated seedlings of arabidopsis using a fluorescent differential display technique [J]. *Plant physiology*, 2000, **122**(1): 15—24

[14] Chen D, Klebe R J. Controls for validation of relative reverse transcription-polymerase chain reaction assays [J]. *PCR Methods Application*, 1993, **3**(2): 127—129

[15] Zhang X, Wang H Z, Gong Y T, *et al* Real time analysis of PCR [J]. *Acta Biochimica Biophysica Sinica*, 1998, **30**(1): 70—73 [**张翔, 王寒正, 龚岳亭, 等. RT-PCR测定的荧光定量分析. 生物化学与生物物理学报**, 1998, **30**(1): 70—73]

[16] Wang A M, Liu W B, Wang T. Effects of exogenous enzymes on activity of endogenous enzymes and intestine evacuation velocity of allogynogenetic crucian [J]. *Jiangsu Journal of Agricultural Sciences*, 2006, **22**(1): 46—50 [**王爱民, 刘文斌, 王恬. 外源酶对异育银鲫内源酶活性和肠道食糜排空速度的影响. 江苏农业学报**, 2006, **22**(1): 46—50]

[17] Zhang L, Mai K S, Ai Q H, *et al* Effects of phytase and non-starch polysaccharide enzyme supplementation in diets on growth and digestive enzyme activity in large yellow croaker, pseudosciaena crocea [J]. *Periodical of Ocean University of China*, 2006, **36**(6): 923—928 [**张璐, 麦康森, 艾庆辉, 等. 饲料中添加植酸酶和非淀粉多糖酶对大黄鱼生长和消化酶活性的影响. 中国海洋大学学报**, 2006, **36**(6): 923—928]

[18] Wang H Q, Sun G F, Zhao Y R. Comparative studies of feeding five kinds of animal protein feed on digestive enzyme activity of allogynogenetic silver crucian carp [J]. *Inland Fisheries*, 2000, (2): 9—11 [**王红权, 孙桂芳, 赵玉蓉. 异育银鲫摄食5种不同动物蛋白饲料后消化酶活性变化比较. 内陆水产**, 2000, (2): 9—11]

[19] Hara H, Narakino H, Kiriyama S, *et al* Induction of pancreatic growth and proteases by feeding a high amino acid diet does not depend on cholecystokinin in rats [J]. *Journal of Nutrition*, 1995, **125**: 1143—1149

[20] Ai X J, Zheng Y L, Liu G T. Influences of enzyme preparation on enzyme activities of pancreatic juice and intestinal chyme in gosling [J]. *Chinese Journal of Animal Science*, 2004, **40**(6): 32—34 [**艾晓杰, 郑元林, 刘根桃. 米糠日粮添加酶制剂对雏鹅胰腺和食糜酶活性的影响. 中国畜牧杂志**, 2004, **40**(6): 32—34]