**浙江万里学院**

硕士专业学位论文

**中文论文题目 ： 低蛋白胁迫对中华鳖Th长Th理指标的**

**影响及应用研究**

**英文论文题目： Effect of low protein stress on growth**

**and physiological in *Pelodiscus sinensis***

**and it’s application research**

申请人姓名： 赵彩胜 校内导师： 钱国英 校外导师： 何中央

专业学位类别： 工程硕士专业学位专业学位领域： 生物工程 所在学院： 生物与环境学院

**论文提交日期**  **2014.03.31**

**低蛋白胁迫对中华鳖Th长Th理指标的影响及应用研究**

院 系：生物与环境学院 工程领域：生物工程

校内导师：钱国英 教授校外导师：何中央 研究员工程硕士：赵彩胜

学 号：2012881006

**浙江万里学院**

**2014 年 03 月**

**Effect of low protein stress on growth and physiological in**

***Pelodiscus sinensis* and it’s application research**

**M.D. Candidate**： Zhao Caisheng **Supervisor（I）**： Qian Guoying **Supervisor（II）**： He Zhongyang **Speciality**：Bioengineering

Zhejiang Wanli University Ningbo,P.R.China

May, 2014

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 中图分类号： Q819 | 单位代码： | 10876 |
| 学号： 2012881006 | 密级： | 公开 |

**浙江万里学院**

10876



硕士专业学位论文

**中文论文题目：低蛋白胁迫对中华鳖生长生理指**

**标的影响及应用研究**

**英文论文题目：Effect of low protein stress on growth and physiological in *Pelodiscus sinensis* and it's application research**

申请人姓名： 赵彩胜 校内教师： 钱国英 校外导师： 何中央

专业学位类别： 工程硕士专业学位专业学位领域： 生物工程 所在学院： 生物与环境学院

**论文提交日期**  **2014.3.31**

浙江万里学院研究生学位论文独创性声明

本人声明所呈交的学位论文是本人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得 **浙江万里学院** 或其他教育机构的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示谢意。

学位论文作者签名：签字日期：年月 日

浙江万里学院学位论文版权使用授权书

本学位论文作者完全了解浙江万里学院有关保留、使用学位论文的规定，同意**浙江万里学院**保留并向国家有关部门或机构送交论文的

复印件和电子版，允许论文被查阅和借阅。本人授权**浙江万里学院**可

以将本学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存和汇编本学位论文。

（保密的学位论文在解密后适用本授权书）

**保密**□**在**  年解密后适用本授权书。

本学位论文属于

**不保密**□。

（请在以上方框内打“**√**”）

学位论文作者签名：指导教师签名：

**低蛋白胁迫对中华鳖Th长Th理指标的影响及应用研究**

摘 **要**

本实验以中华鳖为研究对象，探讨了在低蛋白胁迫下中华鳖的补偿生长效应、

HSPs和IGF-1 mRNA表达丰度、RNA/DNA比值的变化以及对机体生化组成和消化酶活力的影响。整个试验阶段为90天，分为低蛋白胁迫阶段和恢复投喂阶段，处理组在低蛋白胁迫阶段分别投喂36%和30%低蛋白饲料，在恢复投喂阶段投喂42%蛋白含量的正常饲料，处理组中华鳖经低蛋白饲料分别胁迫90天、30天和60天后，

再分别恢复投喂正常蛋白饲料0天、60天和30天，对照组始终投喂正常蛋白饲料。每个试验阶段结束后，计算中华鳖的生长指标及摄食指标，并随机取样用于HSPs和IGF-1 mRNA的表达丰度、RNA/DNA比值变化以及生化组成和消化酶活力的测定。本实验可以为科学合理地确定中华鳖的饲料配制，建立高效养殖模式提供理论依据，对降低饲料成本、促进中华鳖养殖业的可持续发展具有重要意义。主要研究结果如下：

（1）中华鳖经低蛋白胁迫后，体重增长缓慢甚至出现负增长现象，T12组和T23组中华鳖在恢复投喂后，特定生长率和相对增重率显著高于对照组（P<0.05），蛋白质效率最高，分别为2。。44和2.17。

（2）经低蛋白胁迫后，中华鳖肝脏和肌肉中RNA/DNA比值显著降低（P<0.05），恢复投喂后显著升高（P<0.05），T23组中华鳖肝脏中RNA/DNA比值显著高于对照组（P<0.05）。

（3）在低蛋白胁迫阶段，HSP70 mRNA 在各个组织中的表达量显著升高

（P<0.05），在恢复投喂后恢复至正常水平，而HSC70和HSP90 mRNA在整个试验阶段中的表达量不稳定；IGF-I mRNA与HSP mRNA具有相反的表达趋势，在低蛋白胁迫阶段，IGF-I表达量显著下降（P<0.05），恢复投喂后表达量上升。

（4）随着饲料中蛋白含量的下降和胁迫时间的延长，中华鳖机体中灰分含量呈上升趋势，而粗蛋白和脂肪含量呈下降趋势，恢复投喂后，中华鳖各项生化组成指标与对照组相比均无显著差异（P> 0.05）。

（5）在低蛋白胁迫阶段，中华鳖肠道中淀粉酶和脂肪酶活力显著升高（P<0.05），胰蛋白酶活力显著降低（P<0.05），恢复投喂后，消化酶活力与对照组相比均无显著

差异（P> 0.05），胃蛋白酶活力在整个试验阶段无显著变化（P> 0.05）。通过对以上结果分析，可以得出如下结论：

（1）低蛋白胁迫可以诱导中华鳖出现补偿生长效应，且补偿生长效应主要是通过提高饲料中蛋白质效率实现的。

（2）RNA/DNA比值可以作为评价中华鳖生长状况的指标。

（3）HSP70和IGF-I基因的表达量对饲料中蛋白含量的变化敏感，HSP70和IGF-I

可以作为低蛋白胁迫过程中敏感的响应分子标志。

（4）随着饲料中蛋白含量下降和胁迫时间的延长，中华鳖体内粗蛋白含量呈下降趋势，恢复投喂正常蛋白含量的饲料后，与对照组无显著差异，说明中华鳖获得补偿生长的过程与体组成的变化过程是相关的。

（5）当饲料中蛋白含量降低时，中华鳖肠道中胰蛋白酶活力降低，使蛋白质的净摄入量减少甚至摄入的蛋白质用来提供能量，表现为中华鳖生长迟缓或出现负增长现象；恢复投喂后，胰蛋白酶活力升高，使蛋白质的净摄入量增高，表现为中华鳖生长速度加快或者超过正常生长速度。

**关键词：**中华鳖； 补偿生长； RNA/DNA 比值； 应激蛋白； 胰岛素样生长因子； 生化组成； 消化酶活性

**THE EFFECT OF GROWTH AND PHYSIOLOGICAL TO NUTRIENT STRESS AND IT'S APPLICATION RESEARCH ON PELODISCUS SINENSIS.**

**Abstract**

The objective of this study was to investigate the effect of low protein stress on compensatory growth、HSPs and IGF-1 mRNA expression abundance、RNA/DNA ratio、biochemical composition and digestive enzyme activity of Chinese soft-shelled turtle

*Pelodiscus sinensis*. The whole stage of experiment was 90 days, including protein stress stage and refeeding stage. In protein stress stage, the treated groups were fed the feed with 36% and 30% protein content, respectively. While in protein refeeding stage, normal feed with 42% protein content was fed, turtles from the control group were fed the feed with 42% protein content. Turtles of experimental group treated with low protein diet for 90

Days、60 days and 30 days, then refeeding normoal diet for 0 days、30 days and 60 days,

Expectively. Control group has fed normoal diet. At the end of each stage, the turtles' growth and feeding index were calculated and turtles were randomly selected for HSPs and IGF-1 mRNA expression, RNA/DNA ratio and biochemical composition and digestive enzyme activity determination. The results are as follows:

(1) Under low protein stress, the turtles' body weight growth was slow or even negative growth. After refeeding, the specific growth rate and relative growth rate of T12 group and T23 group were significantly higher than that in control group(P<0.05), protein efficiency were also the highest, were 2.44 and 2.17 respectively.

(2) Under low protein stress, the RNA/DNA ratio in liver and muscle decreased significantly(P<0.05), increased significantly after refeeding (P<0.05). The RNA/DNA ratio of T23 group in liver was significantly higher than that in the control group (P<0.05).

(3) In the low protein stress stage, HSP70 mRNA expression in different tissues were significantly increased (P<0.05), and return to normal level after refeeding. While the expression of HSC70 and HSP90 mRNA were unstable in the experiment; IGF-I mRNA

III

Expression was opposite with HSP mRNA, In the low protein stress stage, the expression of IGF-I mRNA decreased significantly (P<0.05), after refeeding its expression increased.

(4) With the decline of protein content in feed and stress time prolonged, the ash content increased in Pelodiscus sinensis, while the crude protein and fat content decreased. After refeeding, the biochemical composition had no significant difference compared with the control group (P> 0.05).

(5) In the low protein stress stage, amylase and lipase activity in gut increased significantly (P<0.05), trypsin activity decreased significantly (P<0.05). After refeeding, digestive enzyme activity had no significant difference with the control group (P> 0.05), pepsin activity had no significant changes throughout the experiment period (P> 0.05).

Based on the above results, we can draw the following conclusions:

(1) Compensatory growth effect could be induced by low protein stress, and it was caused by increased protein efficiency in feed.

(2) The RNA/DNA ratio can be used as evaluation of Pelodiscus sinensis' growth index.

(3) HSP70 and IGF-I mRNA expression was more sensitive to the protein content in feed, HSP70 and IGF-I can be used as a sensitive molecular index in low protein stress.

(4) With the decline of protein content in feed and stress time prolonged, the cude protein decreased, after refeeding, it had no significant difference compared with the control group.

(5) When the lower protein content in feed, the turtles' trypsin activity decreased, made net protein intake reduced or even intake of protein used to provide energy, characterized by the turtles' slow growth or negative growth phenomenon. When recovery the normal protein content feed, the trypsin activity increased, made the net protein intake increased, performanced of the turtles grow faster even more than the normal growth rate.

**KEY WORDS:**: Pelodiscus sinensis; Compensatory growth; RNA/DNA ratio; HSP; IGF; Biochemical composition; Digestive enzyme activity

IV

# 英文缩略词

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **HSP** | **Heat shock protein** | **热休克蛋白（应激蛋白）** |
| **HSC** | **Heat shock cognate protein** | **热休克保守蛋白** |
| **IGF** | **Insulin-like growth factors** | **胰岛素样生长因子** |
| **SGR** | **Specific growth rate** | **特定生长率** |
| **mRNA** | **Messenger RNA** | **信使核糖核酸** |
| **INS** | **Insulin** | **胰岛素** |
| **EF** | **Elongation factor** | **延伸因子** |
| **DEPC** | **Diethy pyrocarbonate** | **焦碳酸二乙酯** |

V

目 录

[摘](#_Toc686916272)[要](#_Toc686916272) 4

**[Abstract](#_Toc686916273)** 4

[英文缩略词](#_Toc686916274) 5

[目录](#_Toc686916275) 7

[第一章 绪论](#_Toc686916276) 8

**[1.1](#_Toc686916277)** [水产动物补偿Th长效应](#_Toc686916277) 8

**[1.1.1](#_Toc686916278)** [补偿Th长的定义](#_Toc686916278) 8

**[1.1.2](#_Toc686916279)** [影响补偿Th长的因素](#_Toc686916279) 8

**[1.1.3](#_Toc686916280)** [水产动物补偿Th长的研究现状](#_Toc686916280) 9

**[1.2](#_Toc686916281)** [热休克蛋白（](#_Toc686916281)**[HSP](#_Toc686916281)**[）的研究进展](#_Toc686916281) 9

**[1.2.1](#_Toc686916282)** [热休克蛋白的分类](#_Toc686916282) 9

**[1.2.2](#_Toc686916283)** [热休克蛋白的功能](#_Toc686916283) 9

**[1.2.3](#_Toc686916284)** [热休克蛋白在水产动物中的研究进展](#_Toc686916284) 10

**[1.2.4](#_Toc686916285)** [中华鳖热休克蛋白研究的意义](#_Toc686916285) 10

**[1.3](#_Toc686916286)** [胰岛素样Th长因子（](#_Toc686916286)**[IGF](#_Toc686916286)**[）的研究进展](#_Toc686916286) 10

**[1.3.1](#_Toc686916287)** [胰岛素样Th长因子的表达调控](#_Toc686916287) 10

**[1.3.2](#_Toc686916288)** [中华鳖](#_Toc686916288)**[IGF](#_Toc686916288)**[研究前景](#_Toc686916288) 10

**[1.4 RNA/DNA](#_Toc686916289)**[比值在水产动物中的应用·](#_Toc686916289) 10

**[1.4.1](#_Toc686916290)****[RNA/DNA](#_Toc686916290)**[比值评价水产动物的Th长](#_Toc686916290) 10

**[1.4.2](#_Toc686916291)****[RNA/DNA](#_Toc686916291)**[比值评价水产动物的营养状况](#_Toc686916291) 10

**[1.4.3](#_Toc686916292)****[RNA/DNA](#_Toc686916292)**[比值评价饲料品质的优劣](#_Toc686916292) 10

**[1.5](#_Toc686916293)** [水产动物对营养胁迫的适应性机制](#_Toc686916293) 11

**[1.5.1](#_Toc686916294)** [营养胁迫对水产动物Th化组成的影响](#_Toc686916294) 11

**[1.5.2](#_Toc686916295)** [营养胁迫对水产动物消化酶活力的影响](#_Toc686916295) 11

**[1.6](#_Toc686916296)** [中华鳖的蛋白质营养研究现状](#_Toc686916296) 11

**[1.7](#_Toc686916297)** [中华鳖低蛋白研究的必要性](#_Toc686916297) 11

**[1.8](#_Toc686916298)** [本研究的目的意义和主要内容](#_Toc686916298) 11

[第二章 低蛋白胁迫对中华鳖补偿Th长和](#_Toc686916299)**[RNA/DNA](#_Toc686916299)**[比值的影响](#_Toc686916299) 11

**[2.1](#_Toc686916300)** [材料与方法](#_Toc686916300) 11

**[2.1.1](#_Toc686916301)** [试验材料](#_Toc686916301) 11

**[2.1.2](#_Toc686916302)** [试验试剂](#_Toc686916302) 13

**[2.1.3](#_Toc686916303)** [试验设计](#_Toc686916303) 13

**[2.1.4](#_Toc686916304)** [实验方法](#_Toc686916304) 13

**[2.1.4](#_Toc686916305)** [观察指标](#_Toc686916305) 16

**[2.1.5](#_Toc686916306)** [数据统计](#_Toc686916306) 16

**[2.2](#_Toc686916307)** [结果与分析](#_Toc686916307) 16

**[2.2.1](#_Toc686916308)** [低蛋白限制对中华鳖Th长性能的影响](#_Toc686916308) 16

**[2.2.2](#_Toc686916309)** [低蛋白胁迫对中华鳖摄食指标的影响](#_Toc686916309) 18

**[2.2.3](#_Toc686916310)** [低蛋白胁迫对中华鳖肝脏和肌肉中](#_Toc686916310)**[RNA/DNA](#_Toc686916310)**[比值的影响](#_Toc686916310) 19

**[2.3](#_Toc686916311)** [讨论](#_Toc686916311) 19

**[2.3.1](#_Toc686916312)** [低蛋白胁迫与补偿Th长](#_Toc686916312) 19

**[2.3.2](#_Toc686916313)** [中华鳖补偿Th长的机制](#_Toc686916313) 20

**[2.3.3](#_Toc686916314)****[RNA/DNA](#_Toc686916314)**[比值研究进展及低蛋白胁迫对中华鳖](#_Toc686916314)**[RNA/DNA](#_Toc686916314)**[比值的影响](#_Toc686916314) 20

[第三章 低蛋白胁迫对中华鳖应激蛋白和](#_Toc686916315)**[IGF-1](#_Toc686916315)**[表达的影响](#_Toc686916315) 21

**[3.1](#_Toc686916316)** [材料与方法](#_Toc686916316) 21

**[3.1.1](#_Toc686916317)** [试验材料](#_Toc686916317) 21

**[3.1.2](#_Toc686916318)** [试验试剂](#_Toc686916318) 21

**[3.1.3](#_Toc686916319)** [试验设计](#_Toc686916319) 21

**[3.2](#_Toc686916320)** [结果与分析](#_Toc686916320) 24

**[3.2.1](#_Toc686916321)** [低蛋白胁迫对中华鳖应激蛋白](#_Toc686916321)**[mRNA](#_Toc686916321)**[表达的影响](#_Toc686916321) 24

**[3.2.2](#_Toc686916322)** [低蛋白胁迫对中华鳖不同组织](#_Toc686916322)**[IGF-I mRNA](#_Toc686916322)**[表达的影响](#_Toc686916322) 32

**[3.3](#_Toc686916323)** [讨论](#_Toc686916323) 34

**[3.3.1](#_Toc686916324)** [应激蛋白](#_Toc686916324)**[mRNA](#_Toc686916324)**[表达的影响因素](#_Toc686916324) 34

**[3.3.2](#_Toc686916325)** [营养状况对](#_Toc686916325)**[IGF-I mRNA](#_Toc686916325)**[表达的影响](#_Toc686916325) 34

[第四章 低蛋白胁迫对中华鳖Th化组成和消化酶活力的影响](#_Toc686916326) 35

**[4.1](#_Toc686916327)** [材料与方法](#_Toc686916327) 35

**[4.1.1](#_Toc686916328)** [试验材料](#_Toc686916328) 35

**[4.1.2](#_Toc686916329)** [试验试剂](#_Toc686916329) 35

**[4.1.3](#_Toc686916330)** [试验设计](#_Toc686916330) 35

**[4.2](#_Toc686916331)** [结果与分析](#_Toc686916331) 35

**[4.2.1](#_Toc686916332)** [低蛋白胁迫及恢复投喂后中华鳖体组成的变化](#_Toc686916332) 35

**[4.2.2](#_Toc686916333)** [低蛋白胁迫及恢复投喂后对中华鳖消化酶比活力的影响](#_Toc686916333) 37

**[4.3](#_Toc686916334)** [讨论](#_Toc686916334) 39

**[4.3.1](#_Toc686916335)** [低蛋白胁迫及恢复投喂对中华鳖Th化组成的影响](#_Toc686916335) 39

**[4.3.2](#_Toc686916336)** [低蛋白胁迫及恢复投喂对中华鳖消化酶活力的影响](#_Toc686916336) 40

[第五章 结论与展望](#_Toc686916337) 40

[参 考 文 献](#_Toc686916338) 41

[攻读硕士学位期间的学术成果](#_Toc686916339) 47

VII

# 第一章 绪论

## **1.1** 水产动物补偿Th长效应

### **1.1.1** 补偿Th长的定义

由于自然界中季节变化、环境突变以及食物分布不均匀等因素的影响，动物在生长和存活中经常会受到饥饿或营养不足的胁迫，造成生长停滞甚至负生长现象，当环境胁迫得以改善或消失后动物表现出快速生长，其生长速度超过正常生长速度，称为补偿生长（Compensatory growth）或获得性生长（Catch-up growth）[1, 2]。水产的补偿生长一般分为以下四类[3]：（1）超补偿生长（Over-compensatory growth），是指经过一段时间的饥饿或营养限制后再恢复投喂一段时间，水产动物的体重净增量超过了同以时间内持续投喂水产动物的体重净增量[4]，张波等[5]研究表明真鲷在饥饿后获得超补偿生长；（2）完全补偿生长（Completely compensatoxy growth），补偿程度稍低，指饥饿或营养限制后恢复生长的水产动物体重净增量接近或达到（并未超过）持续投喂组的体重增长水平，斑点叉尾鮰饥饿3周后恢复喂食获得了完全补偿生长[6]；（3）部分（有限）补偿生长（Partly compensatory growth），是指水产动物在饥饿或营养限制后恢复投喂过程中可以正常生长，甚至生长速度在短期内有所加快，但体重最终不能赶上持续投喂组；（4）不能补偿生长（Non-compensatoxy growth），指水产动物在恢复生长时，不仅体重赶不上持续投喂组，连生长速度也不及正常水平。一般认为出现这种情况是因为饥饿或营养限制太严重，已经对水产动物的生理状况造成一定的伤害，以致无法恢复到正常水平。

### **1.1.2** 影响补偿Th长的因素

目前，关于水产动物补偿生长的研究已成为新的热点，涉及到的主要影响因素主要有限食程度、饲料的营养水平、恢复生长时间和性成熟程度等这四个方面。

#### **1.1.2.1** 限食程度

关于限食程度对水产动物补偿生长的研究就多，结果因不同物种而不一致，如

Russell[7]研究结果表明，饥饿和限量投喂对真鱥恢复投喂阶段的生长率、摄食水平、以及食物利用率影响无显著差别；王岩等[8]研究了不同日粮水平对福寿鱼补偿生长的影响，表明不同粮水平限食后的个体在恢复投喂特定生长率和摄食率均不相同。补偿

1

生长的强度还与限食期时间的长短有关，Jobling等[9]揭示了禁食处理三周后恢复投喂不足以引起大西洋鳕（*Gudus morhua*）的补偿生长，而禁食处理8周后的鱼在在恢复投喂阶段获得完全补偿生长。

#### **1.1.2.2** 恢复Th长时间

水产动物补偿生长过程中其特定生长率（specific growth rate, SGR）在恢复生长过程中表现为先上升后恢复至正常水平。如果恢复生长的时间太短，则不能充分发挥出补偿生长效应[6]，反之，则会掩盖补偿生长效应[10]。一般根据水产动物在恢复生长阶段的生长率和摄食率作为恢复生长时间长短的依据[6]。

#### **1.1.2.3** 营养物质

有关营养物质限制对补偿生长的影响在哺乳动物中研究的较多，有关水产动物营养因素如蛋白质限制后的补偿生长报道甚少，结果也不一致。Scwharz等[11]发现，建鲤（*Cyprinus carpio*）继蛋白质限制（低于正常水平30%）或能量限制（低于正常水平37%）后均没有明显的补偿生长效应。而Wu等[12]则发现，开始摄食低蛋白质饲料的中国对虾（*Fenneropenaeus chinensis*），在解除低蛋白质限制后获得了明显的补偿生长。吴立新等[13]报道，牙鲆（*Paralichthys olivaceus*）幼鱼继蛋白质限制后的恢复投喂阶段出现了完全补偿生长效应。

#### **1.1.2.4** 性成熟度

鱼类的性成熟度对补偿生长有一定的影响，大西洋鲑（*Salmo salar*）在洄游过程中一部分个体在淡水中达到性成熟，另一部分则入海后达到性成熟。在淡水中性成熟的幼鲑个体较小，入海后生长速度明显快于未成熟的个体[14]。Jobling等[15]研究发现性成熟的北极红点鲑（*Salivelinus alpinus*）的补偿生长能力不及未成熟的北极红点鲑。

### **1.1.3** 水产动物补偿Th长的研究现状

鱼类补偿生长问题在20世纪70年代以来逐渐受到人们重视，现已成为水产动物营养生理学研究的热点之一。迄今为止世界上已研究了鲑科（*Salmonidae*）、鲤科

（*Cyprinidae*）、鳕科（*Gadidae*）、鲽科（*Pleuronetida*）、丽鱼科（*Cichlidae*）、鮰科

（*Ictaluridae*）、鳎科（*Soleidae*）、鲆科（*Bothidae*）、刺鱼科（*Gasterosteidae*）、鲱科

（*Clupeidae*）、鲟科（*Acipenseridae*）等近三十种鱼类[16]的补偿生长。相对而言，我国这方面的研究起步较晚，90年代以后才开始对某些鱼类进行研究，如邓利等[17]对

2

南方鲇的继饥饿后的恢复生长研究，王燕妮等[18]对鲤鱼的补偿生长研究，王岩[19]对海水养殖罗非鱼补偿生长的生物能量学机制研究，姜志强等[20]对美国红鱼的补偿生长机制研究等。合理利用补偿生长效应，可以提高饲料利用效率，节约成本，降低动物排泄物导致的环境污染，同时改善动物的生长性能。目前，国内外关于中华鳖补偿生长效应的研究较少，研究报道仅见齐占会[21]、颉志刚等[22]、谢全森等[23]、Roark等[24]、Bjorndal等[25]，其中通过蛋白质限制后恢复投喂引起补偿生长的报道仅在谢全森[26]和齐占会[21]中涉及，其研究结果表明：适当降低饲料中蛋白质含量，可以提高蛋白质的利用率。谢全森等[23]研究了中华鳖稚鳖（4.47g左右）继饥饿后的补偿生长，发现经过饥饿3d后恢复摄食的稚鳖可达到完全补偿，且补偿生长效应主要通过提高摄食率实现的。颉志刚等[22]对中华鳖群养10周的试验中，饥饿1、2、3、4周或食物限制4周后再饱食投喂，发现完全的食物剥夺可以诱发幼鳖部分补偿，而部分食物剥夺则不能诱发此效应。

## **1.2** 热休克蛋白（**HSP**）的研究进展

热休克蛋白(Heat Shock Protein, HSP) 又名应激蛋白，是生物体在不利环境因素

（如缺氧、高温、重金属污染、病毒、饥饿和营养不足等）刺激下应激合成的一组特殊的蛋白质[27]。近几年研究发现，有机体（包括原核生物和真核生物）受到环境、生理或病理胁迫时诱导产生热休克蛋白是一种普遍存在的生物学现象，而且在正常的生理条件下，许多HSP也有组成型表达[28]。HSP主要参与一些如蛋白质转位、拆叠和装配等重要的生理活动[29]，此外多种刺激因素可诱导HSP的合成以维持细胞正常生理功能，使机体具有对外界刺激的适应能力。

### **1.2.1** 热休克蛋白的分类

HSP种类加多，广泛存在于真核和原核生物中。根据分子量的不同分为4个家族：HSP70 家族（66~78kDa）、HSP90 家族（83~110kDa）、HSP60 家族以及小分子量smHSP家族（12~43kDa），不同生物的同种HSP的核酸序列和蛋白的氨基酸序列具有高度的同源性[27]。HSP70家族是生物体内高度保守且被人们研究最为广泛最重要的热休克蛋白，包括分子量为68、72、73、75、78kDa等多种蛋白质。其中，研究最多的白是诱导型HSP70（Heat Shock Protein70, HSP70）和组成型HSC70（Heat Shock Cognate Protein70, HSC70），前者在正常细胞内表达量极低甚至不表达，受到外界刺激后表达量显著增加，后者在正常细胞内有一定量的表达，经外界刺激后，表达量上升[30]。

3

### **1.2.2** 热休克蛋白的功能

#### **1.2.2.1** 分子伴侣

分子伴侣（molecular chaperones）[是在细胞](http://baike.baidu.com/view/3687.htm)内帮助其他含[多肽](http://baike.baidu.com/view/83652.htm)的结构完成正确的组装，而且在组装完毕后与之分离，不构成这些[蛋白质结构](http://baike.baidu.com/view/380971.htm)执行功能时的组份，同时还降解和清除某些变性的蛋白，它对维持细胞的完整性具有重要意义[31]。栾东东[32]研究表明，在高温和低温胁迫过程中，HSP70基因的过量表达对大肠杆菌细胞有保护作用。

#### **1.2.2.2** 抗氧化作用

HSP可抑制产生氧自由基的关键酶，通过反馈作用减少氧自由基的产生，Nied Ieck Ia等在37℃果蝇中发现SOD-RNA水平的增高是与HSP70-RNA表达的增高相一致的[33]。Ou yang等人的研究表明HSP70的功能片断及全长肽链能维持线粒体膜电位，改善呼吸功能和减少氧自由基生成[34]。此外，HSP影响糖皮质激素的释放，并与激素受体结合，将受体由细胞质运送到细胞核中发挥受体的作用。有研究表明

HSP70在阻断糖皮质激素受体后会影响糖皮质激素抗炎功能的发挥，从而导致创伤后继发性肝损伤的发生，但其作用机制有待进一步研究[35]。

#### **1.2.2.3** 胚胎发育

在胚胎发育时期，蛋白质大量合成，基因转录活跃，HSP在这个时期的作用至关重要，其表达具有组织特异性和时间顺序性。小鼠胚胎中有HSP90表达，至囊胚发育中期表达广泛，主要位于中枢神经系统及骨骼形成区[36]。HSC70在细胞有丝分裂过程中起作用，HSP22和HSP23与胚胎形态分化有关[36]。此外，热休克蛋白作为分子伴侣，帮助胚胎发育过程中蛋白的正确组装以及清除和降解某些变性蛋白，进而保护胚胎免受外界不良刺激的影响。

#### **1.2.2.4** 免疫调节

病原菌侵入宿主后引起宿主细胞内HSP的大量合成，进而使其他相关蛋白的合成减少，宿主细胞合成的HSP与病原菌有共同的抗原决定簇，引起宿主细胞的免疫反应[37]。有研究表明，病原菌感染宿主后，可使宿主细胞内大量HSP的表达[38]。研究发现HSP70家族可能参与了鱼类病原菌感染及抗体产生的免疫应答，但免疫系统和HSP70之间的关系还需进一步研究[37]。

4

#### **1.2.2.5** 作为Th物学指标或Th物标记物

由于HSP在受到外界不良的刺激（营养胁迫、环境污染、重金属等）时会大量表达，因此，HSP可能成为一种判定水产动物生理状况的指标，也可以作为判定环境污染程度的生物学标志物[39]。沈骅[40]等研究了HSP70在重金属污染条件下的分子响应。Webb[41]将HSP作为机体在应激状态下的分子标记。有关研究表明：HSP应用于病理学研究的一个指标，比传统生物学指标更具有研究价值[42]。

### **1.2.3** 热休克蛋白在水产动物中的研究进展

近年来，水产动物HSP的研究越来越受到人们的关注。Wang等[43]研究表明，细菌感染后，珍珠贝血细胞中的PFHSP70表达增加，因此可以推断HSP70涉及免疫反应。Dong等[44]在研究盐度对海参的生长影响发现，不同盐度都能诱导HSP70表达，这可以在一定程度上解释在不同盐度下海参的生长差异性；Sung等[45]发现HSP可保护丰年虾幼体对抗恶性弧菌；Deng等[46]研究发现，热休克显著诱导肝脏中HSP70的表达水平，指出HSP70是更敏感的生物指标；张娟[47]等发现，热激后HSC70表达量在部分组织中的表达量显著上升；Li等[48]研究指出，中国对虾在低溶氧胁迫2h后，血细胞和鳃中的HSP90被诱导表达；有研究发现，缺氧应激状态下，西部锦龟组织中HSP73表达量基本不变，而HSP72高度被诱导[49]；之后的研究又发现，水生动物的HSP90在细胞应激下也可被诱导[50]，包括在西部锦龟中[51]。

### **1.2.4** 中华鳖热休克蛋白研究的意义

在养殖过程中，中华鳖经常会遇到各种应激因素的胁迫，这些天然或人为的应激因素会引发很多疾病，甚至死亡。因此，选择合适的应激检测指标，提高中华鳖对环境的适应性和耐受性显得尤为重要[39]。将HSP作为中华鳖分子水平的反应指标比机体生理水平的指标更为敏感，在描述应激反应过程方面具有明显的优势，鉴于HSP在抗病抗逆中的重要作用，有必要研究HSP在中华鳖面临各种因素应激或胁迫下的分子响应。此外，利用HSP跟抗原结合设计针对病原菌的疫苗，可减少甚至不用抗生素来达到预防疾病的目的，具有非常广阔的应用前景。

## **1.3** 胰岛素样Th长因子（**IGF**）的研究进展

胰岛素样生长因子(insulin-like growth factors, 简称IGFs)是一类多功能细胞增殖调控因子。在[细胞的分化](http://baike.baidu.com/view/257547.htm)、增殖、个体的生长发育中具有重要的促进作用。主要包括IGF-I和IGF-II两种类型，IGF-I是一种由70个氨基酸组成的蛋白质，分子量约

5

7500Da，由于其结构与胰岛素原相似，故和胰岛素（Insulin, INS）、IGF-II、松弛素

（Relaxin）一起被称为INS/IGF/Relaxin家族蛋白[52]。IGF-I的生理功能主要包括：介导生长激素的促生长作用；胰岛素样作用；促进乳腺发育；促进1, 25-(OH) 2D3的生成、促性腺活性[53]。

### **1.3.1** 胰岛素样Th长因子的表达调控

IGF-I几乎存在于动物的所有组织，其中在肝组织最高。其中营养因素是IGF-I表达的重要调节因子。营养物质可以通过调节IGF-I的表达继而影响动物的生长，这在动物界具有一定的普遍性，禁食或营养不足都将导致血清和组织IGF-I mRNA丰度下降。近年来，有关IGF-I的研究已取得了一定的进展，禁食或投喂能量和蛋白质等摄入量的变化都将引起IGF-I水平的变化[54]。与测定其它营养相关蛋白（如白蛋白、转铁蛋白）相比，IGF-I的测定更敏感并且特异[54]。生长激素也是水产动物IGF-I表达调控的主要影响因子之一，这一点与哺乳动物相似。生长激素能提高鱼类IGF-I

mRNA表达水平，但生长激素对IGF-II基因的转录调控可能在不同的物种中具有不同的作用模式[55]。但关于生长激素和营养协同作用对IGF-I表达的影响仍需进一步研究。

### **1.3.2** 中华鳖**IGF**研究前景

目前，国内外关于鱼类IGF在促进生长和调节渗透压方面研究较多并取得一定进展，但关于中华鳖IGF的研究尚未见报道，研究低蛋白胁迫对中华鳖不同组织中IGF-I mRNA表达丰度的影响，对深入研究IGF-I对中华鳖的生理功能和作用机制具有重要意义。此外，研究IGFs的分子调控、信号转导以及在胚胎发育、免疫中的机理对中华鳖生理学和发育学具有重要价值。

## **1.4** **RNA/DNA**比值在水产动物中的应用·

在渔业养殖过程中，水产动物的生长状况受到养殖者的广泛的关注。而长期以来，人们一直采用连续取样法测定水产动物的生长指标来监督其生长状况，这种方法费时费力，且不能精确反映近期水产动物的生长状况。鱼类的生长实际上是通过蛋白质合成完成的。生长中的鱼类合成的蛋白质除了修补和更新组织外，还不断增生新组织，表现为细胞数量增多，组织体积的增加以及物质和能量的积累，在外观上就表现为个体的增长和体重的增加。蛋白质的合成取决于RNA数量的变化，而DNA作为遗传物质，其含量一般保持稳定，而DNA浓度是与细胞以及核体积密切相关的。一般来

6

讲，DNA浓度高，说明单位组织中细胞体积小但数目多，RNA/DNA比值能够排除细胞数量的影响而反映出细胞内RNA的浓度[56]。从20世纪70年代起，学者们开始研究鱼类RNA/DNA比值与生长发育的关系，认为RNA/ DNA比值可以作为鱼类生长状况的评价指标[57, 58]。赵振ft等[59]用RNA/DNA比值评价水产动物配合饲料优劣的指标，用来定量研究饲料中蛋白质和必需氨基酸含量与生长和RNA/DNA比值的关系。并且发现绿海龟血液中RNA/DNA比值与特定生长率(SGR)呈显著正相关[60]。此外，RNA/DNA比值还被用来检测水环境的污染程度[61]。因此，RNA/DNA比值在水产动物的研究和生产中是一种非常重要的指标。

### **1.4.1** **RNA/DNA**比值评价水产动物的Th长

水产动物生长与RNA/DNA比值的关系的研究可追溯到上世纪70年代，Bullow[62]研究发现RNA/DNA比值与鱼类生长呈正相关。Clemmesen[63]研究表明该随着鲱鱼年龄和体长的增加RNA/DNA比值也相应增大。司亚东[64]研究发现鲤鱼肌肉RNA/

DNA比值在饥饿时和饱食时有显著差别，并且与增重率呈正相关，得出RNA/DNA比值可用于判断鱼体的营养状况和饮食状态。赵振ft[59]用RNA/DNA比值评定鲤鱼生长状况，认为肌肉中RNA/DNA比值可以用来评价鱼类的生长性能。刘存歧[65]等人发现日本沼虾RNA/DNA 的比值与体长、体重有密切关系。刘慧吉[66]探讨了用

RNA/DNA比值与增重率的关系来评价花鲈的生长和营养状况，并根据RNA/DNA指标评价饲料品质的优劣。谢全森[26]在中华鳖补偿生长和RNA/DNA比值研究中指出，

RNA/DNA比值可以替代SGR作为评价中华鳖的生长指标。

### **1.4.2** **RNA/DNA**比值评价水产动物的营养状况

在外界环境条件改变的情况下，DNA作为遗传信息的承载者，其数量一般是比较稳定的，而直接与蛋白质合成有关的RNA受生物体外界其他环境条件的影响。因此，RNA/DNA比值是生物体内蛋白质合成能力的体现，反映了机体的生长和营养状况[63]。近年来研究表明RNA/DNA比值是水产动物在营养胁迫下一个可靠、敏感的指标[67]，已被广泛应用于评价鱼类、软体动物类和甲壳类等水产动物中。杨天燕等[68]研究发现，随着白斑狗鱼饥饿时间的延长，其体内RNA/DNA比值也不断下降，表明白斑狗鱼体内RNA/DNA比值与营养状况是相关的，可以作为评价鱼类在某一阶段的营养水平和饮食状况的指标。谢全森[26]研究了中华鳖肝脏和肌肉RNA/DNA比值的研究，发现随着饲料中蛋白含量的下降，肝脏和肌肉中RNA/DNA比值均呈下降趋势，且与摄食率呈正相关。

7

### **1.4.3** **RNA/DNA**比值评价饲料品质的优劣

对于水产动物的饲料营养价值的评价指标主要是饵料系数。在研究过程中一般要通过一定周期的养殖实验来进行，浪费了大量的财力、物力和人力，而且不能在短时间内反映出饲料的营养价值，用RNA/DNA比值作为评价饲料营养价值的指标具有快速、准确和科学的特点[65]。梁萌青[69]等研究发现添加剂品质的优劣直接影响红鳍东方鲀（*Takifugu rubripes*）RNA/DNA比值，因此，推断该指标可作为评价饲料添加剂品质优劣的指标。吕景才[70]等研究了5种不同的配合饲料投喂成鳖60天，发现

RNA/DNA比值与增重率呈正相关，得出RNA/DNA比值可代替增重率评定成鳖的生长情况及其配合饲料营养价值。王桂芹等[71]探讨了不同蛋白水平的饲料对翘嘴鲌

（*Erythroculter*）体内蛋白质合成能力的影响，结果表明翘嘴鲌肌肉RNA/DNA比值随饲料蛋白质水平的提高而升高。

## **1.5** 水产动物对营养胁迫的适应性机制

水产动物经常会面临食物的缺乏或营养不足而胁迫，而不同种类的水产动物对营养胁迫的适应机制也不尽相同[72, 73]。

### **1.5.1** 营养胁迫对水产动物Th化组成的影响

水产动物营养状况的变化对机体的生化组成有较大的影响，近些年来国内外研究者通过测定水产动物的生化组成来分析鱼类的营养状况。大部分水产动物的主要能源物质是糖类和脂肪，在受到饥饿或营养胁迫时，首先消耗体内的糖类和脂肪，这两种物质，而对蛋白质的利用较少[74]。大西洋鳕（*Anguilla japonica*）在受到饥饿胁迫时首先利用自身的脂类[75]，而鲽（*Pleuronectes platessa*）在饥饿至一定程度时开始利用自身的蛋白质[76]。龙章强等[77]研究发现，但随着饥饿时间的延长，黑鲷幼鱼肌肉中蛋白含量显著降降低。在糖类、脂肪和蛋白质被用作能源物质而含量下降时，机体内水分和灰分含量明显上升。

### **1.5.2** 营养胁迫对水产动物消化酶活力的影响

水产动物体内酶的活力变化是分析机体的新陈代谢、营养状况的一个重要指标。水产动物在受到饥饿或营养胁迫时，机体的新陈代谢发生适应性变化，通过调节自身各种酶的活性达到充分利用体内的能源物质来维持自身的生命活动。近年来，很多学者开始研究饥饿对消化酶的影响，由于饥饿对消化酶的影响因酶的种类、饥饿程度不同而不同，但并未系统给出明显的规律和解释，目前处于探讨的阶段[78]。宋昭彬等[79]

8

在研究饥饿对南方鲇（*Silurus meridionalis*）仔稚鱼消化系统的形态和组织学研究中发现，南方鲇稚鱼胃腺收缩，酶原颗粒逐渐减少；钱云霞[80]对饥饿胁迫下养殖鲈

（*Lateolabrax maculatus*）蛋白酶活力的变化进行了研究，发现饥饿使鱼体各部分蛋白酶活力均有所下降；王燕妮等[81]研究发现，饥饿后鲤鱼（*Cyprinus carpio*）的酶活性升高，而恢复投喂后则有所下降，但总体呈上升趋势；龙章强等[77]在饥饿与再投喂对黑鲷幼鱼体质量变化、生化组成及肝脏消化酶活性的影响中的结果表明，肝脏中类胰蛋白酶和脂肪酶的活性在饥饿阶段呈上升趋势，恢复投喂后则有所下降。淀粉酶活力在饥饿过程中呈下降趋势，恢复投喂后有所回升，但在整个实验期间淀粉酶活性并无显著性的变化；柳敏海等[82]在研究短期饥饿胁迫对鮸鱼幼鱼的生长、生化组成、及消化酶活力的影响中研究表明，在试验期间，蛋白酶活力呈现出先低后高的趋势，脂肪酶和淀粉酶随着时间的延长而逐渐降低，体内粗蛋白、粗脂肪含量逐渐减少。

## **1.6** 中华鳖的蛋白质营养研究现状

蛋白质是动物生长、发育和维持机体正常生命活动的必需物质，蛋白质在中华鳖营养上的功能是其他物质不能替代的。中华鳖需要摄入足够的蛋白质来满足机体的需要。中华鳖的生长是蛋白质在中华鳖体内的逐步积累的过程。因此，饲料中蛋白质水平对中华鳖的生长代谢有十分重要的作用。中华鳖作为一种肉食性的水产动物，当饲料中蛋白质含量高时，中华鳖的生长速度加快，当蛋白质供给量不能达到其正常生长发育所需的水平时，就构成了对其的营养胁迫，引起应激反应，进而引起体内一系列生理生化的反应。但是蛋白质含量过高，则是一种浪费，且加重中华鳖的代谢负担，排出体外后，还会造成水质污染。因此，近几年来，适当降低中华鳖配合饲料中蛋白水平成为研究的热点之一。

上世纪90年代，国内开始研究关于中华鳖饲料中最适蛋白含量，王风雷等[83]以平均体重为100g的幼鳖为研究对象，结果得到蛋白质的适宜添加量为47.5%；涂涝等[84]以255克左右的中华鳖为研究对象，经25天养殖得出配合饲料中蛋白质的适宜含量为45%~48.3%。何瑞国等[85]以150g左右的中华鳖胃研究对象，经过一个月的养殖试验，得到饲料中蛋白质的最适含量为42.49%。然而，代替白鱼粉的研究是中华鳖饲料的另一个研究热点，钱国英[86]以14~15g的幼鳖为研究对象，将饲料中蛋白含量固定在45%，白鱼粉和豆粕进行不同配比，得到59%白鱼粉和5%豆粕组合最好，平均个体日增重比未添加豆粕组高出8%。这是因为白鱼粉的必需氨基酸也并非完全平衡，用豆粕代替一部分白鱼粉可使饲料中必需氨基酸达到平衡。饲料氨基酸平衡，不仅可以满足中华鳖生长所需要的物质基础、促进生长，还可以提高蛋白质利用率和

9

降低饵料系数，降低养殖成本和减少对环境的污染。目前，关于鳖体氨基酸组成的报道很多[87-90]，这为确定中华鳖配合饲料中氨基酸的比例提供了理论依据。

## **1.7** 中华鳖低蛋白研究的必要性

中华鳖（*Pelodiscus Sisnensis*）属爬行纲（Repitlia）、龟鳖目（Testudinata）、鳖科

（Tironychidae）、鳖属（Peoldsiucs）。在我国大部分地区均有分布，中华鳖味道鲜美，营养价值高，是一种高级滋补品，其蛋白质含量极为丰富，维生素、矿物质含量极高且全面，滋补力强，是深受人们喜爱的名贵水产品。中华鳖还是一种名贵的中药材，其成分含动物胶、角蛋白、维生素D及碘等，具有滋阴清热、平肝益肾、破结软坚及活血化瘀之功效。近年来，我国的中华鳖养殖业正在蓬勃发展，已成为水产养殖业中的佼佼者。然而中华鳖作为一种肉食性水产动物，对饲料的品质要求很高，白鱼粉一直是其饲料的主要蛋白源，而且中华鳖对饲料中蛋白质含量的要求也很高，达

40%~50%，使得白鱼粉用量很大，因此就造成了中华鳖饲料成本很高。饲料中高蛋白含量不但造成蛋白质的浪费，还会造成鳖体代谢负担、诱发多种疾病、造成水体污染、增加换水等方面的额外开支，所以中华鳖低蛋白的研究是重要的发展方向之一。到目前为止，关于中华鳖低蛋白饲料研究的报道较少，而鱼类低蛋白饲料的研究已有报道，日本学者通过提高鲫鱼饲料中脂肪和糖的含量来降低蛋白含量，使饲料中蛋白质含量降低10%左右[91]。

## **1.8** 本研究的目的意义和主要内容

本研究以中华鳖为研究对象，探讨饲料中低蛋白胁迫对中华鳖的补偿生长效应，通过测定机体HSP73、HSP72、HSP90、IGF-I等相关基因表达规律以及肝脏和肌肉中RNA/DNA比值变化的水平、中华鳖机体组成和消化酶活力的变化，研究低蛋白营养胁迫下中华鳖应激反应、内分泌调控及生理效应的分子响应。旨在阐明中华鳖低蛋白限制下补偿生长的分子机制和内分泌调控机理。本课题可以为科学合理地确定中华鳖的饲料配制，建立高效投饵模式提供理论依据，对降低饲料成本、提高养殖效益、减少环境污染、减轻我国水产养殖业对进口鱼粉的依赖、促进水产业的可持续发展具有重要意义。主要研究内容主要有以下几点：

（1）中华鳖继低蛋白胁迫后的补偿生长效应及RNA/DNA比值的变化；

（2）低蛋白胁迫对中华鳖HSPs和IGF-I mRNA表达的影响；

（3）低蛋白胁迫对中华鳖机体的生化组成和消化酶比活力的研究。

10

# 第二章 低蛋白胁迫对中华鳖补偿Th长和**RNA/DNA**比值的影响

水产动物的补偿生长问题自20世纪70年代以来逐渐受到人们重视，现已成为水产动物营养生理学研究的热点之一。中华鳖是一种重要的水产动物，其肉味鲜美，滋补力强，具有较高的经济价值。目前，国内外学者对中华鳖营养研究较多，但关于中华鳖补偿生长的研究较少，谢全森等[23]研究了中华鳖稚鳖（4.47g左右）继饥饿后的补偿生长，发现经过饥饿3d后恢复摄食的稚鳖可达到完全补偿生长，且补偿生长效应主要通过提高摄食率实现的；颉志刚等[22]对中华鳖群养10周的试验中，饥饿1、2、

3、4周或食物限制4周后再饱食投喂，发现完全的食物剥夺可以诱发幼鳖部分补偿，而部分食物剥夺则不能诱发此效应。本实验通过对中华鳖进行低蛋白胁迫，再恢复其正常蛋白水平，通过测定其特定生长率等指标来判断其补偿生长效应及程度。若其生长速度超过正常生长速度，则可以充分利用补偿生长效应，改变传统的投喂模式，采用“低蛋白—正常蛋白”循环投模喂式来降低饲料成本和减轻高蛋白饲料对水环境的污染。

RNA/DNA是体内蛋白质合成能力的体现，近年来的研究证实，RNA/DNA比值是评价营养状况的一个可靠和敏感的指标[92]，已经被应用于评价生物体的营养状况，包括鱼类、甲壳类、软体动物和水生爬行动物。并且发现绿海龟血液中RNA/DNA比值与特定生长率(SGR)呈显著正相关[24]。鉴于RNA/DNA与水产动物的生长存在定量关系，监测RNA/DNA比值的变化对进一步揭示营养胁迫下的动物生长状况非常有意义。而关于中华鳖RNA/DNA 比值的研究较少，报道中，仅见谢全森[26]对中华鳖

RNA/DNA比值的研究，其研究结果表明，肝脏和肌肉组织的RNA/DNA比值存在显著的相关性。本实验通过对中华鳖“低蛋白胁迫—正常蛋白恢复”的投喂模式下，测定中华鳖在养殖过程中肝脏和肌肉中RNA/DNA比值变化特点为中华鳖的健康养殖提供理论依据。

## **2.1** 材料与方法

### **2.1.1** 试验材料

养殖试验用中华鳖购自浙江省绍兴市大畈水产专业合作社，体重为100g左右，中华鳖饲料原料购自宁波天邦股份有限公司，其营养成分如表2-1所示。

11

**表2-1** **饲料的原料组成和营养成分**

**Tab.** **2-1** **Ingredients and nutritional composition of the diets**

| 原料 | 蛋白/% | 脂肪/% | 水分/% | 灰分/% | 纤维素/% | 碳水化合物/% |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 白鱼粉 | 67.79 | 7.94 | 6.46 | 16.60 | — | 1.21 |
| 膨化豆粕 | 45.26 | 5.97 | 8.23 | 6.32 | 0.85 | 33.37 |
| α-淀粉 | — | 0 | 6.96 | 0.52 | — | 95.52 |
| 酵母粉 | 42.70 | 0.725 | 4.32 | 6.09 | 12.78 | 37.7 |
| 鱼油 | — | 100 | — | — | — | — |
| 矿物质混合物 | — | — | 6.07 | 75.39 | — | — |
| 维生素复合物 | — | — | 9.89 | 4.40 | — | — |

**注：“—”表示饲料原料中无此营养成分或含量极微忽略不计。**

### **2.1.2** 试验试剂

Trizol购自上海英骏生物技术公司，氯仿、酒精、异丙醇、柠檬酸钠、氢氧化钠等核酸抽提试剂（均为分析纯）购自国药化学集团有限公司，焦碳酸二乙酯（DEPC）购自生工生物工程（上海）股份有限公司。

### **2.1.3** 试验设计

采用两因素实验设计，以饲料中蛋白质水平和低蛋白胁迫时间为处理因素，其中蛋白质水平设42%、36%和30%三个水平，低蛋白胁迫时间设0天、30天和60天三个水平，根据投喂饲料和胁迫时间的不同，将试验分为7组，分别是对照组（C组）、

T11组、T12组、T13组、T21组、T22组和T23组，T11组和T21组始终投喂两种低蛋白饲料，T12组和T22组经低蛋白胁迫60d后，恢复投喂正常蛋白饲料30d, T13组和T23组经低蛋白胁迫30d后，恢复投喂正常蛋白饲料60d，饲料配方如表2-2所示，试验设计如表2-3所示。

### **2.1.4** 实验方法

中华鳖养殖试验在浙江万里学院生物与环境学院的鱼类养殖实验室进行，正式试验前，中华鳖要进行2周的驯化饲养，使中华鳖适应试验环境。每天8点和17点各投喂一词，并记录饵料投喂量。试验用水经二氧化氯（1 ppm）消毒后，曝气24小时，再调节pH值为7.0~8.0、水温28℃~32℃。实验开始时，对所有中华鳖称重作为其初始体重，低蛋白限制结束时对中华鳖称重作为其恢复投喂正常蛋白饲料时的初始体重，整个实验结束时，对中华鳖称重作为其终末体重，并计算恢复投喂正常蛋白饲料阶段的特定生长率（SGR）、增重率、摄食率、饵料系数等指标。在每个试验阶段，

12

随机选取三只鳖取其肝脏和肌肉组织，经液氮速冻后置于-80℃冷冻保存备用。采用

Trizol法同时提取RNA和DNA，用Nanodrop 2000/2000C分光光度计测定RNA 和

DNA浓度并计算RNA/DNA比值。

**表2-2** **中华鳖不同蛋白含量饲料配方（1Kg）**

**Tab.** **2-2** **Different protein content feed formula of Pelodiscus sinensis**

| 原料/g | 42% | 36% | 30% |
| --- | --- | --- | --- |
| 鱼粉 | 560 | 472 | 383 |
| α-淀粉 | 300 | 388 | 477 |
| 豆粕 | 70 | 70 | 70 |
| 鱼油 | 35 | 35 | 35 |
| 酵母 | 20 | 20 | 20 |
| 矿物质混合物 | 10 | 10 | 10 |
| 维生素复合物 | 5 | 5 | 5 |
| 实际蛋白含量 | 42.23% | 36.11% | 30.08% |

**表2-3** **中华鳖养殖试验设计**

**Tab.** **2-3** **Experiment design of*Pelodiscus sinensis***

| 蛋白含量 | 分组 | 样本数量 | 1-30d | 31-60d | 61-90d |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 对照组 | C | 9 | 在整个试验阶段投喂 42%蛋白含量饲料 | | |
| 30%  T1 组 | T11 | 7 | 30%低蛋白饲料 | 30%低蛋白饲料 | 30%低蛋白饲料 |
| T12 | 7 | 30%低蛋白饲料 | 30%低蛋白饲料 | 42%正常蛋白饲料 |
|  | T13 | 7 | 30%低蛋白饲料 | 42%正常蛋白饲料 | 42%正常蛋白饲料 |
| 36%  T2 组 | T21 | 7 | 36%低蛋白饲料 | 36%低蛋白饲料 | 36%低蛋白饲料 |
| T22 | 7 | 36%低蛋白饲料 | 36%低蛋白饲料 | 42%正常蛋白饲料 |
|  | T23 | 7 | 36%低蛋白饲料 | 42%正常蛋白饲料 | 42%正常蛋白饲料 |

### **2.1.4** 观察指标

摄食期的摄食率%=

摄食总量

实际摄食天数摄食初体重 末体体重

2

100%

摄食期增重量=摄食末体重—摄食初体重（g）

饵料系数=

摄食总重摄食期增重量

13

摄食末体重—摄食初体重



摄食期相对增重率%= 100%

摄食初体重

摄食特定生长率%= *Ln*摄食末体重- *Ln*摄食初体重100%

实验天数

增重总量

蛋白质效率=摄食蛋白质质量

### **2.1.5** 数据统计

实验数据采用SPSS19.0软件进行统计分析，利用方差分析各处理组之间相应指标的差异，多重比较采用Duncan检验，采用P<0.05表示差异显著水平，采用P<0.01表示差异极显著水平。

## **2.2** 结果与分析

### **2.2.1** 低蛋白限制对中华鳖Th长性能的影响

经过90天的养殖生长试验，比较不同蛋白含量饲料投喂下的中华鳖体重的变化，

结果如表2-4所示，处理组的中华鳖经不同时间的低蛋白胁迫后，其体重增长缓慢，与初始体重相比无显著性差异（P> 0.05），其中，持续胁迫组（T11、T12组）的中华鳖体重出现负增长现象。与对照组相比，T12、T22组（蛋白质恢复时间均为30天）、

T13、T23组（蛋白质恢复时间均为60天）的中华鳖体重均显著性增加（P<0.05）。说明中华鳖经过低蛋白胁迫后再恢复投喂正常蛋白饲料，可使中华鳖获得补偿生长。在养殖过程中除了T22组中因病死亡一只中华鳖外，其他组中华鳖均无发现死亡现象。

**表2-4 低蛋白胁迫对中华鳖生长的影响（平均值±标准差）**

**Tab.2-4 The effect of low protein stress on growth of *Pelodiscus sinensis* (M±S )**

| 组别 | 初始体重/g | 胁迫后体重/g | 末体重/g | 成活率/% |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| T11 | 101.68±1.06 | 98.04±9.90 | 98.04±9.90 | 100 |
| T12 | 105.63±6.56 a | 111.75±6.23 a | 151.28±13.00 b | 100 |
| T13 | 126.06±3.07 a | 132.18±7.87 a | 163.93±8.09 b | 100 |
| T21 | 106.01±7.50 | 92.05±9.95 | 92.05±9.95 | 100 |
| T22 | 103.26±6.08 a | 103.96±9.77 a | 133.90±13.36 b | 85.72 |
| T23 | 126.95±6.22 a | 128.18±10.54 a | 181.04±15.01 b | 100 |
| C | 130.53±4.48 a | — | 163.48±18.83 b | 100 |

注：同一行数据不同字母表示差异显著

14

### **2.2.2** 低蛋白胁迫对中华鳖摄食指标的影响

低蛋白营养胁迫对中华鳖生长和摄食的影响如表2-5所示，处理组的饵料系数低于对照组，其中以T12组和T23组饵料系数最低，分别为1.50和1.48；对照组中华鳖摄食率普遍高于对照组，而处理组的蛋白质效率高于对照组，T12组和T23组中华鳖对蛋白质利用效率最高，分别为2.44和2.17。T12和T23组特定生长率和相对增重率显著高于对照组（P<0.05），而T13和T22组与对照组相比无显著性差异（P> 0.05）。因此，T12组和T23组中华鳖获得了完全补偿生长，且补偿生长主要通过提高饲料中蛋白质的利用率实现的。

**表2-5 低蛋白胁迫对中华鳖生长和摄食指标的影响**

**Tab.** **2-5** **Effect of low protein stress on turtles’growth and feeding index**

| 组别 | 特定生长率/% | 相对增重率/% | 饵料系数 | 摄食率/% | 蛋白质效率 |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| T11 | — | — | — | — | — |
| T12 | 0.7878±0.0861 b | 25.68±9.96 b | 1.50 | 2.85 | 2.44 |
| T13 | 0.5519±0.0765 a | 16.53±3.15 a | 1.73 | 2.41 | 1.85 |
| T21 | — | — | — | — | — |
| T22 | 0.5319±0.0861 a | 22.64±7.18 a | 1.67 | 4.40 | 1.89 |
| T23 | 0.8361±0.4256 b | 33.63±7.72 b | 1.48 | 2.41 | 2.17 |
| C | 0.6348±0.1673 a | 17.02±2.86a | 1.67 | 4.97 | 1.41 |

注：同一列数据不同上标字母表示差异显著

### **2.2.3** 低蛋白胁迫对中华鳖肝脏和肌肉中**RNA/DNA**比值的影响

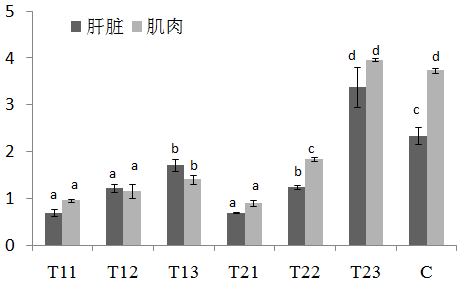
如图2-1所示，在始终投喂低蛋白含量饲料的T11组（投喂30%含量的饲料）和T21组（投喂36%含量的饲料）中，其RNA/DNA比值显著低于其他实验组（P<0.05），在恢复投喂正常蛋白后的T12组、T13组和T22组RNA/DNA比值显著高于始终胁迫的T11组和T21组（P<0.05），但仍显著低于对照组（P<0.05），T23组（低蛋白胁迫30天，恢复投喂正常蛋白饲料60天）中华鳖肝脏中RNA/DNA比值显著高于对照组（P<0.05）。在肌肉组织中，RNA/DNA比值的变化趋势与肝脏相同，但T23组中

RNA/DNA比值与对照组相比无显著差异（P> 0.05）。RNA/DNA比值是中华鳖体内蛋白质合成的体现，也是评价中华鳖生长状况的指标，在低蛋白胁迫阶段，中华鳖肝脏和肌肉中RNA/DNA比值较低，再恢复投喂之后，RNA/DNA比值逐渐升高，并高于对照组，说明在低蛋白胁迫阶段，中华鳖体内合成的蛋白质较少，甚至没有蛋白质的合成，恢复投喂之后，中华鳖体内蛋白质合成量增加，表现为RNA/DNA比值的升高。

15

比值

RNA/DNA



**图2-1** **低蛋白胁迫对中华鳖肝脏和肌肉中RNA/DNA比值的影响**

**Fig.** **2-1** **Effect of low protein stress on RNA/DNA ratio in the liver and muscle of Pelodiscus sinensis**

## **2.3** 讨论

### **2.3.1** 低蛋白胁迫与补偿Th长

从补偿量角度可将补偿生长分为4类[16]：超补偿生长、完全补偿生长、部分（有限）补偿生长和不能补偿生长。影响动物补偿生长的因素很多，大多数学者利用食物限制（饥饿和限制投喂）来诱发动物的补偿生长效应。有关水产动物营养因素如蛋白质限制后的补偿生长报道较少，结果也不一致，Scwharz等[11]发现，建鲤（*Cyprinus*

*carpio*）继蛋白质限制（低于正常水平30%）或能量限制（低于正常水平37%）后均没有明显的补偿生长效应；而Wu[12]则发现，开始摄食低蛋白质饲料的中国对虾

（*Fenneropenaeus chinensis*），在解除低蛋白质限制后获得了明显的补偿生长；吴立新，等[11]报道，牙鲆（*Paralichthys olivaceus*）幼鱼继蛋白质限制后的恢复投喂阶段出现了完全补偿生长效应。本实验中，T11组和T21组（始终低蛋白胁迫组）中华鳖体重出现负增长现象；T12组（30%低蛋白胁迫60天，恢复30天）和T23组（36%低蛋白胁迫30天，恢复60天）中华鳖末体重均显著高于初始体重（P<0.05），且与对照组体重相比无显著性差异（P> 0.05），这两组中华鳖在蛋白质恢复时期的特定生长率差异不显著（P> 0.05），T23组中华鳖的特定生长率稍高于T12组，但显著高于对照组（P<0.05）；T13组（30%低蛋白胁迫30天，恢复60天）和T22组（36%低蛋

16

白胁迫60天，恢复30天）中华鳖末体重和在蛋白质恢复时期的特定生长率与对照组相比无显著性差异（P> 0.05）。

通过以上结果可以得出以下结论：T12组和T23组中华鳖在低蛋白胁迫后出现完全补偿生长，T13组合T22组中华鳖则出现部分补偿生长，而始终胁迫情况下的T11组和T21组中华鳖出现负增长现象。考虑到实际养殖过程中的经济效益，36%低蛋白饲料胁迫投喂30天，而后正常蛋白饲料恢复投喂60天，即低蛋白胁迫和恢复投喂循

环周期为1: 2的投喂模式更符合养殖实际。

### **2.3.2** 中华鳖补偿Th长的机制

关于水产动物的补偿生长机制一般有以下几种：提高饲料中营养物质的转化率[93,

94]；提高摄食率[95]；上述两种因素的共同作用。目前，国内外关于中华鳖补偿生长效

应机制的研究较少，谢全森等[23]研究了中华鳖稚鳖继饥饿后的补偿生长，发现经过饥饿3d后恢复摄食的稚鳖可达到完全补偿，且补偿生长效应主要通过提高摄食率实现的。本实验中，T12组和T23组中华鳖在蛋白质恢复阶段的饵料系数偏低于对照组，蛋白质效率高于对照组；T13组和T22组中华鳖在蛋白质恢复阶段的饵料系数与对照组无显著差异，蛋白质效率略高于对照组；各处理组的中华鳖在蛋白质恢复阶段的摄食率低于对照组。因此，经低蛋白胁迫后的中华鳖在恢复投喂正常蛋白含量的饲料时出现的补偿生长可能是通过提高饲料中蛋白质的利用效率而实现的。

### **2.3.3** **RNA/DNA**比值研究进展及低蛋白胁迫对中华鳖**RNA/DNA**比值的影响

关于RNA/DNA比值的在鱼类和虾类等水产动物中研究已经成熟，刘存歧[65]等人研究表明：日本沼虾RNA/DNA比值可以反映其生长的状况；薛明[96]等人研究发现：RNA/DNA比值可作为预测方斑东风螺营养状态的良好生理指标；龙良启[97]研究了鲫鱼RNA/DNA比值与体长和体重的关系，认为RNA/DNA比值可以作为衡量鲫鱼生长状况的综合指标；而黄国强[98]等人研究褐牙鲆幼鱼时发现：RNA/DNA比值并不呈现明显的相关性；国外学者Miglavs [92]者指出：用RNA/DNA比值衡量鱼类的生长有一定的局限性，即使RNA/DNA比值变化趋势与生长速率的相同，但测定处于补偿生长阶段鱼类的RNA/DNA比值时，其RNA/DNA比值与生长率不呈现相关性。中华鳖生长的过程是体内新陈代谢的过程，主要通过合成蛋白质来实现的，中华鳖从外界吸收营养物质，不断增生新的组织，表现为体重的增加和体型的变大。目前，关于中华鳖RNA/DNA比值研究较少，报道中仅见谢全森[26]、吕景才[70]等人的研究发现中华鳖RNA/DNA比值与生长速率和增重率呈线性相关。本实验研究了中华鳖在低

17

蛋白胁迫及恢复投喂正常蛋白饲料后肝脏和肌肉组织的RNA/DNA比值的变化，肝脏和肌肉中的RNA/DNA比值与中华鳖特定生长速率的变化趋势相同，但与特定生长率并不呈现出明显的相关性，可能由于胁迫条件下的中华鳖RNA/DNA比值较低，处于补偿生长阶段生长速度加快，蛋白质合成速度高于正常中华鳖，RNA/DNA比值升高，与中华鳖特定生长速率非线性相关。

18

# 第三章 低蛋白胁迫对中华鳖应激蛋白和**IGF-1**表达的影响

第二章研究了中华鳖在低蛋白胁迫下的补偿生长效应和RNA/DNA比值的变化，本章主要从mRNA水平研究中华鳖在低蛋白胁迫下的应激反应和对胰岛素样生长因子-I（IGF-I）基因表达的影响。

热休克蛋白（HSP）又名应激蛋白，是细胞水平一般性应激反应产生的标志物[99]，普遍存在于原核和真核生物细胞中[100]。机体的营养状况与应激能力密切相关，有研究表明，营养物质对HSP的合成起着重要的调控作用，动物饲料中蛋白质含量影响HSP的表达[101]。IGF-I是一种由70个氨基酸组成的蛋白质，分子量约7500Da，动物的营养状态、发育水平、年龄和激素水平等均能影响IGF-I的表达、合成及其生理作用，其中营养因素是IGF-I mRNA表达的重要调节因子。营养物质可以通过调节IGF-I的表达继而影响动物的生长，这在动物界具有一定的普遍性。研究蛋白水平对中华鳖HSP和IGF-I mRNA表达的影响，对探讨低蛋白应激的产生机制、寻找缓解应激反应和促进中华鳖生长的方法具有重要意义。

## **3.1** 材料与方法

### **3.1.1** 试验材料

试验材料同2.1.1

### **3.1.2** 试验试剂

试验试剂同2.1.2，引物由生工生物工程（上海）股份有限公司合成，SuperQuickRT cDNA第一链合成试剂盒（货号：CW2381）购自北京康为世纪生物科技有限公司，GoTaq®Real-Time PCR Systems试剂（货号：A6001）购自普洛麦格（北京）生物技术有限公司。

### **3.1.3** 试验设计

试验方法同2.1.3，试验设计同表2-3，试验分组表格如表3-1所示，在蛋白质限制阶段和恢复投喂阶段，每个实验组分别随机选取3只健康中华鳖鳖，取其肝脏、心脏、肌肉、脾脏和肾脏等组织，经液氮速冻后置于-80℃超低温冰箱中保存备用，用Trizol法提取RNA，用SuperQuickRT cDNA试剂盒合成cDNA第一条链，根据已获得的中华鳖HSP70 mRNA序列（JN582024）、HSC70 mRNA序列（HQ219723）、HSP90

19

mRNA序列（XM006119990）、IGF-1 mRNA序列（JN698984）和真核生物的延伸因子（EF-1α）mRNA序列（AB124568）设计引物用于荧光定量PCR检测，引物序列如表3-2所示。荧光定量PCR采用三步法，反应程序为预变性94℃，30s，变性94℃，

3s、退火63.3℃，30s、延伸72℃，30s，50个循环。同时以真核生物的延伸因子（EF-1α）为内参，反应程序同上。荧光定量结果用2-△△Ct法[102]分析。

**表3-1** **中华鳖养殖试验分组**

**Tab.** **3-1** **Experiment groups of Pelodiscus sinensis**

| 不同蛋白含量饲料投喂时间 | | | | |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  | 组别 | 36% | 30% | 42% |
|  | 36-1-0 | 30 | 0 | 0 |
|  | 36-2-0 | 60 | 0 | 0 |
| T2 组 | 36-3-0 | 90 | 0 | 0 |
| 36-1-1 | 30 | 0 | 30 |
|  | 36-2-1 | 60 | 0 | 30 |
|  | 36-1-2 | 30 | 0 | 60 |
|  | 30-1-0 | 0 | 30 | 0 |
|  | 30-2-0 | 0 | 60 | 0 |
| T1 组 | 30-3-0 | 0 | 90 | 0 |
| 30-1-1 | 0 | 30 | 30 |
|  | 30-2-1 | 0 | 60 | 30 |
|  | 30-1-2 | 0 | 30 | 60 |
| C | 对照组 | — | — | — |

注：对照组始终投喂正常蛋白饲料，不存在低蛋白胁迫和恢复投喂为阶段

**表3-2** **中华鳖HSP70、HSC70、HSP90、IGF-1和内参（EF-1α）基因相关引物**

**Tab.3-2 Gene primers of HSP70、HSC70 、HSP90、IGF-1and EF-1α(Pelodiscus sinensis)**

| 引物名称 | 引物序列（5＇—3＇） |
| --- | --- |
| HSP70 F | TTCCTACCAAGCAGACCCAGAT |
| HSP70 R | TGCCCAGCAGATTGTTGCCTTAGT |
| HSC70 F | CAGCGTGACAAAGTTTCCTCT |
| HSC70 R | GCCGTCTGATTCTTATCCAGCAG |
| HSP90F | ACCAAGCCAATATGGACCCG |
| HSP90R | CCAGTTGCCCTTCCACAGAA |
| IGF-1F | TGGAAATGTACTGCGCTCCT |
| IGF-1R | TTCCTGTGTTCCCTCGACTTG |
| EF-1α F | GGATTCCACTGAGCCACCATA |
| EF-1α R | CATCCTTACGGGTAACCTTCCATC |

20

## **3.2** 结果与分析

### **3.2.1** 低蛋白胁迫对中华鳖应激蛋白**mRNA**表达的影响

中华鳖不同组织中不同应激蛋白mRNA表达水平受到饲料中蛋白质含量的影响，肝脏中应激蛋白mRNA表达水平结果见表3-3，投喂低蛋白饲料组的中华鳖肝脏中HSP70 mRNA表达量显著高于恢复投喂正常蛋白饲料的中华鳖（P<0.05），HSP70

mRNA表达量随着胁迫时间的增长而升高；在低蛋白胁迫阶段，HSC70 mRNA表达量显著高于恢复投喂阶段（P<0.05）；而HSP90 mRNA表达量在整个试验阶段中无显著差异（P> 0.05）。肌肉中应激蛋白mRNA表达水平如表3-4所示，在低蛋白胁迫阶段，肌肉中HSP70 mRNA 的表达量显著高于蛋白质恢复阶段（P<0.05），其中，36%和30%蛋白含量的饲料胁迫90天后，肌肉中HSP70 mRNA表达量分别是对照组的

8.20倍和10.33倍，极显著高于蛋白质恢复阶段（P<0.01）；30%蛋白含量饲料胁迫阶段和36%饲料胁迫三个月后，肌肉中HSC70 mRNA 表达量显著高于其它试验组

（P<0.05）；在整个试验阶段，HSP90 mRNA表达量较稳定，各个试验组的表达量差异不显著（P> 0.05）。

心脏和脾脏中应激蛋白mRNA表达水平分别见表3-5和表3-6，在低蛋白胁迫下

HSP70和HSP90 mRNA表达量显著高于蛋白质恢复组中华鳖（P<0.05）；而HSC70

mRNA表达量相对稳定（P> 0.05），只有在低蛋白胁迫三个月后中华鳖心脏中HSC70

mRNA表达量显著高于其它实验组（P<0.05）。在肾脏中（表3-7），这三种应激蛋白mRNA的表达量都相对稳定（P> 0.05），HSP70 mRNA只有在36%蛋白饲料胁迫三个月和HSC70 mRNA 在30%蛋白饲料胁迫三个月后其表达量显著高于其它实验组

（P<0.05）。

21

**表3-3** **低蛋白胁迫对中华鳖肝脏中HSP70、HSC70和HSP90 mRNA表达的影响**

Tab. 3-3 Effect of low protein stress on the expression of HSP70 HSC70 and HSP90 mRNA in liver of Pelodiscus sinensis

| 组别 | HSP70 | HSC70 | HSP90 |
| --- | --- | --- | --- |
| 36-1-0 | 3.15±0.28 b | 6.18±1.21 e | 1.17±0.22 b |
| 36-2-0 | 4.63±0.80 c | 1.28±0.19 b | 0.62±0.03 a |
| 36-3-0 | 5.93±0.35 d | 2.43±0.65 bcd | 0.96±0.05 ab |
| 36-1-1 | 0.85±0.07 a | 0.95±0.08 a | 1.00±0.12 ab |
| 36-2-1 | 0.86±0.09 a | 1.34±0.05 ab | 0.67±0.04 a |
| 36-1-2 | 0.83±0.07 a | 1.12±0.18 ab | 1.19±0.20 b |
| 30-1-0 | 1.36±0.15 a | 3.28±0.26 d | 0.88±0.10 ab |
| 30-2-0 | 2.74±0.23 b | 2.75±0.20 cd | 0.94±0.14 ab |
| 30-3-0 | 4.96±0.38 c | 1.59±0.22 bc | 0.92±0.28 ab |
| 30-1-1 | 0.93±0.33 a | 0.92±0.12 a | 1.21±0.12 b |
| 30-2-1 | 1.02±0.09 a | 1.01±0.10 a | 0.97±0.17 ab |
| 30-1-2 | 0.85±0.06 a | 0.76±0.04 a | 0.95±0.04 ab |

注：（1）“36-1-0”中，“36”指的是饲料中蛋白含量为36%，“1”是指低蛋白胁迫时间为1 个月，“0”是指恢复投喂正常蛋白饲料时间为0个月，下同。（2）同一列数据，上标字母不同表示差异显著（P<0.05），下同。

**表3-4** **低蛋白胁迫对中华鳖肌肉中HSP70、HSC70和HSP90 mRNA表达的影响**

Tab. 3-4 Effect of low protein stress on the expression of HSP70 HSC70 and HSP90 mRNA in muscle of Pelodiscus sinensis

| 组别 | HSP70 | HSC70 | HSP90 |
| --- | --- | --- | --- |
| 36-1-0 | 5.13±0.29 c | 1.01±0.05 a | 1.02±0.24 a |
| 36-2-0 | 6.04±0.22 d | 0.87±0.12 a | 0.99±0.06 a |
| 36-3-0 | 8.20±0.41 e | 3.65±0.15 b | 1.20±0.06 a |
| 36-1-1 | 1.31±0.04 a | 0.95±0.02 a | 1.02±0.17 a |
| 36-2-1 | 1.10±0.11 a | 0.93±0.13 a | 1.07±0.13 a |
| 36-1-2 | 0.54±0.05 a | 0.87±0.01 a | 0.83±0.21 a |
| 30-1-0 | 2.70±0.25 b | 2.86±0.21 b | 0.83±0.05 a |
| 30-2-0 | 4.92±0.62 b | 6.11±0.10 c | 0.94±0.31 a |
| 30-3-0 | 10.33±0.48 e | 2.34±0.68 b | 0.91±0.07 a |
| 30-1-1 | 1.05±0.03 a | 1.01±0.14 a | 0.95±0.14 a |
| 30-2-1 | 0.89±0.06 a | 0.76±0.14 a | 0.75±0.04 a |
| 30-1-2 | 1.08±0.03 a | 0.93±0.08 a | 1.16±0.19 a |

22

**表3-5** **低蛋白胁迫对中华鳖心脏中HSP70、HSC70和HSP90 mRNA表达的影响**

Tab. 3-5 Effect of low protein stress on the expression of HSP70 HSC70 and HSP90 mRNA in heart of Pelodiscus sinensis

| 组别 | HSP70 | HSC70 | HSP90 |
| --- | --- | --- | --- |
| 36-1-0 | 3.29±0.30 fh | 0.94±0.11ab | 1.96±0.64 bc |
| 36-2-0 | 1.88±0.18 de | 1.23±0.25 ab | 4.03±0.15 e |
| 36-3-0 | 2.81±0.14 f | 2.12±0.14 c | 1.10±0.12 ab |
| 36-1-1 | 0.92±0.02 ab | 0.98±0.18 ab | 0.71±0.04 a |
| 36-2-1 | 0.48±0.01 a | 0.85±0.12 ab | 1.10±0.20 ab |
| 36-1-2 | 0.50±0.04 a | 0.77±0.05 a | 1.11±0.20 ab |
| 30-1-0 | 2.42±0.39 e | 0.84±0.0 3ab | 3.09±0.18 de |
| 30-2-0 | 2.30±0.14 e | 1.14±0.06 ab | 2.18±0.19 cd |
| 30-3-0 | 1.41±0.16 bc | 2.46±0.06 c | 4.05±0.74 e |
| 30-1-1 | 0.65±0.05 a | 0.90±0.03 ab | 1.07±0.21 ab |
| 30-2-1 | 0.51±0.08 a | 1.24±0.26 b | 0.92±0.08 ab |
| 30-1-2 | 0.64±0.02 a | 0.91±0.08 ab | 1.10±0.17 ab |

**表3-6低蛋白胁迫对中华鳖脾脏中HSP70、HSC70和HSP90 mRNA表达水平的影响Tab.3-6 Effect of low protein stress on the expression of HSP70 HSC70 and HSP90 mRNA in spleen of Pelodiscus sinensis**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 组别 | HSP70 | HSC70 | HSP90 |
| 36-1-0 | 1.74±0.56 d | 0.95±0.31 ab | 1.08±0.10 ab |
| 36-2-0 | 1.52±0.09 cd | 0.83±0.16 ab | 3.11±0.10 d |
| 36-3-0 | 1.40±0.18 bc | 1.13±0.20 b | 3.18±0.29 d |
| 36-1-1 | 0.89±0.06 a | 0.58±0.11 a | 1.05±0.11 ab |
| 36-2-1 | 0.88±0.02 a | 0.83±0.03 ab | 1.28±0.08 ab |
| 36-1-2 | 0.79±0.02 a | 1.14±0.27 b | 1.11±0.19 ab |
| 30-1-0 | 1.91±0.13 d | 0.76±0.03 ab | 3.52±0.38 d |
| 30-2-0 | 4.67±0.67 e | 1.04±0.11 ab | 1.88±0.30 c |
| 30-3-0 | 1.28±0.05 bc | 0.83±0.13 ab | 1.59±0.06 bc |
| 30-1-1 | 0.63±0.06 a | 0.92±0.04 ab | 1.11±0.03 ab |
| 30-2-1 | 0.82±0.02 a | 1.05±0.07 ab | 0.89±0.13 a |
| 30-1-2 | 0.69±0.02 a | 1.10±0.09 ab | 0.90±0.18 a |

23

**表3-7低蛋白胁迫对中华鳖肾脏中HSP70、HSC70和HSP90 mRNA表达水平的影响Tab.3-7 Effect of low protein stress on the expression of HSP70 HSC70 and HSP90 mRNA in kidney of Pelodiscus sinensis**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 组别 | HSP70 | HSC70 | HSP90 |
| 36-1-0 | 0.71±0.04 a | 0.92±0.11 a | 0.87±0.17 a |
| 36-2-0 | 0.65±0.18 a | 1.06±0.24 a | 0.88±0.09 ab |
| 36-3-0 | 2.17±0.39 c | 0.66±0.03 a | 0.94±0.12 ab |
| 36-1-1 | 0.99±0.14 ab | 0.82±0.04 a | 0.68±0.01 a |
| 36-2-1 | 1.04±0.09 ab | 0.68±0.12 a | 0.91±0.18 ab |
| 36-1-2 | 1.01±0.15 ab | 1.01±0.15 a | 0.98±0.16 ab |
| 30-1-0 | 0.87±0.12 ab | 1.06±0.11 a | 1.04±0.09 ab |
| 30-2-0 | 1.16±0.15 ab | 0.99±0.24 a | 0.74±0.06 a |
| 30-3-0 | 0.83±0.10 ab | 3.39±0.08 b | 1.18±0.06 b |
| 30-1-1 | 1.34±0.16 b | 0.77±0.05 a | 0.89±0 .13ab |
| 30-2-1 | 0.84±0.05 ab | 0.98±0.13 a | 0.93±0.08 ab |
| 30-1-2 | 0.90±0.09 ab | 0.92±0.10 a | 0.87±0.07 ab |

### **3.2.2** 低蛋白胁迫对中华鳖不同组织**IGF-I mRNA**表达的影响

由表3-8可知，中华鳖不同组织中IGF-I mRNA表达量与饲料中蛋白质含量密切相关，30%蛋白含量的饲料投喂中华鳖后，其肝脏和心脏中IGF-I mRNA表达量与其它实验组相比显著降低（P<0.05）；经36%蛋白含量饲料胁迫后再恢复投喂正常蛋白饲料（36-2-1和36-1-2组）使肌肉中IGF-I表达量显著高于其他实验组（P<0.05），而其他实验组之间IGF-I的表达量维持在正常范围之内；心脏中IGF-I表达量在30%低蛋白胁迫组中显著低于其他实验组（P<0.05），恢复投喂正常蛋白饲料后，其表达量逐步恢复到正常水平，36%低蛋白胁迫后投喂正常蛋白饲料后，心脏中IGF-I mRNA表达量显著高于IGF-I在心脏中的正常表达水平（P<0.05）；在脾脏和肾脏中，IGF-I

mRNA表达量在低蛋白胁迫组中表达量显著低于正常表达水平（P<0.05），恢复投喂正常蛋白含量饲料时，其表达量恢复正常水平。

24

**表3-8** **低蛋白胁迫对中华鳖不同组织中IGF-I mRNA表达水平的影响**

Tab. 3-8 Effect of low protein stress on the expression of IGF-I mRNA in different tissue of Pelodiscus sinensis

| 组别 | 肝脏 | 肌肉 | 心脏 | 脾脏 | 肾脏 |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 36-1-0 | 0.84±0.13 cde | 1.03±0.06 a | 0.89±0.07 b | 0.59±0.02 bcd | 0.54±0.02 ab |
| 36-2-0 | 0.57±0.05 bc | 0.97±0.09 a | 0.87±0.06 b | 0.51±0.04 abc | 0.36±0.07 ab |
| 36-3-0 | 0.66±0.06 de | 0.90±0.24 a | 0.56±0.09 ab | 1.09±0.08 e | 0.54±0.03 ab |
| 36-1-1 | 0.72±0.10 cde | 0.63±0.07 a | 1.64±0.19 c | 1.08±0.07 e | 1.26±0.09 cd |
| 36-2-1 | 0.94±0.18 e | 1.20±0.07 b | 1.54±0.17 c | 1.58±0. 04f | 1.34±0.09 cd |
| 36-1-2 | 0.96±0.11 e | 1.35±0.07 b | 4.24±0.17 e | 0.99±0.39 de | 1.14±0.05 cd |
| 30-1-0 | 0.37±0.01 ab | 0.69±0.01 a | 0.66±0.12 b | 0.35±0.08 ab | 0.63±0.07 b |
| 30-2-0 | 0.21±0.02 a | 0.87±0.12 a | 0.70±0.13 b | 0.14±0.02 a | 0.35±0.04 ab |
| 30-3-0 | 0.20±0.01 a | 0.83±0.09 a | 0.13±0.06 a | 0.17±0.03ab | 0.20±0.01 a |
| 30-1-1 | 0.69±0.07 cde | 0.91±0.08 a | 0.63±0.11 b | 0.97±0.08 de | 1.08±0.06 c |
| 30-2-1 | 0.97±0.11 e | 0.88±0.08 a | 0.79±0.14 b | 1.10±0.04 e | 0.65±0.04 b |
| 30-1-2 | 1.43±0.08 f | 1.02±0.15 a | 2.31±0.21 d | 0.90±0.02 de | 1.51±0.21 d |

## **3.3** 讨论

### **3.3.1** 应激蛋白**mRNA**表达的影响因素

HSP70（也称为HSP72）通常在正常细胞中并不表达或表达量很少，但是在热应激或其它应激原的作用下，则表达量迅速增加，属于诱导型HSP70；HSC70（热应激同源蛋白70，heat shock cognate 70），也称为HSP73，是哺乳动物细胞内的结构蛋白，在所有的细胞内均能表达，并且受热诱导，属于结构型HSP70；这两种HSP具有高度的序列同源性（95%）和相似的生物化学特性[103-105]. HSP90是热休克蛋白家族的成员之一，是一种组成型表达的蛋白质，包括α和β两种构型[106]。HSP90在受热诱导时表达进一步增加，帮助错误折叠的蛋白质再折叠以及促进己变性的蛋白降解，在应激条件下为细胞提供保护，使细胞免于凋亡[107]。Scott等[49]研究发现，缺氧应激状态下，西部锦龟组织中HSP73表达量基本不变，而HSP72高度被诱导。Carrizo等[108]有研究表明，营养物质对HSP的合成起着重要的调控作用，动物饲料中蛋白质含量影响HSP的表达。缪凌鸿等[109]在高碳水化合物日粮对异育银鲫HSP70表达研究中表明：高碳水化合物实验组35天时，异育银鲫肝脏和心脏HSP70基因表达量明显高

25

于对照组，且70 d时高碳水化合物组肝、心脏、脾和肾HSP70 基因mRNA表达与对照组相比全部增强。林天势等[110]研究发现：在不同水温下，HSP90基因在不同组织中的表达量变化不同，用病原菌感染大黄鱼后，大黄鱼各个组织HSP90基因表达量都显著增加。在本实验中，中华鳖经低蛋白胁迫后，HSP70基因在中华鳖各个组织中的表达量均明显升高（P<0.05），再恢复投喂正常蛋白含量的饲料时，其表达量恢复正常。HSC70基因在脾脏和肾脏中的表达量较稳定；在低蛋白胁迫下，HSC70基因在肝脏、心脏、肌肉中表达量均有不同程度的提高，但在肝脏和肌肉中，HSC70基因表达量的变化最为显著（P<0.05）。HSP90基因在肝脏、肌肉和肾脏中表达较稳定，但在心脏和脾脏中，低蛋白胁迫对HSC70基因的表达有显著的影响（P<0.05）。有研究表明，水产动物对饲料中碳水化合物的水平有一定的耐受范围，当饲料中碳水化合物水平超出耐受范围时，体内发生热休克反应，从而保护机体细胞不受损伤[111]。本实验不同蛋白含量配方中，用α-淀粉将饲料调成大致能量相等，饲料中蛋白含量越低，碳水化合物的含量越高，进而使中华鳖体内发生热休克反应。因此，HSP mRNA表达量的变化是否为饲料中低蛋白含量和高碳水化合物含量协同作用的结果将有待于进一步研究。

### **3.3.2** 营养状况对**IGF-I mRNA**表达的影响

营养物质通过调节IGF-I的表达继而影响动物的生长，这在动物界具有一定的普遍性。营养状况对不同组织中IGF-I mRNA表达的影响在哺乳动物中研究的较为普遍

[112]. 在水产动物方面，国外学者进行了一些经济鱼类的营养状况对IGF-I mRNA在组织中的表达与内分泌学方面的研究[113, 114]。我国学者华益民[115]研究了营养状况对鲤鱼肝脏中IGF-I mRNA表达的影响，其研究结果表明：营养对肝组织IGF-I mRNA的表达有调节作用。在本实验中，饲料中蛋白质含量对中华鳖不同组织中IGF-I mRNA表达量有一定影响，低蛋白胁迫使中华鳖组织中IGF-I mRNA表达量下降，恢复投喂正常蛋白含量饲料后，其表达量逐渐恢复甚至高于正常水平。有研究表明，IGF-I

mRNA表达量与内分泌调控有关[116]，因此，对中华鳖IGF-I mRNA表达水平的观测可以反映其营养、生长和代谢等状态，有助于从分子水平和内分泌水平上更加深入开展鱼类营养和饲料学研究。但是，对中华鳖IGF-I mRNA的表达与内分泌调控的关系尚未有研究的报道，今后应当更深一步研究IGF-I mRNA的表达与内分泌调控与各种营养素（如氨基酸、矿物质、维生素、能量等）之间的关系，以更进一步了解营养对中华鳖IGF-I的调节作用，从而指导中华鳖的健康养殖和饲料的配制。

26

# 第四章 低蛋白胁迫对中华鳖Th化组成和消化酶活力的影响

第二章和第三章分别研究了低蛋白胁迫对中华鳖补偿生长、RNA/DNA比值和应激蛋白以及IGF-I mRNA表达的影响，本章主要从机体生化组成和消化酶活力的角度中华鳖对低蛋白胁迫的适应性机制。水产动物体内酶的活力变化是分析机体的新陈代谢、营养状况的一个重要指标。水产动物在受到饥饿或营养胁迫时，机体的新陈代谢发生适应性变化，通过调节自身各种酶的活性达到充分利用体内的能源物质来维持自身的生命活动。本实验通过配制不同蛋白含量的饲料，来探究其对中华鳖生化组成和消化酶活力的影响，研究中华鳖对低蛋白饲料适应性的机制，以丰富对中华鳖在低蛋白营养胁迫下的生理学研究，为中华鳖的健康养殖和饲料配制提供理论指导。

## **4.1** 材料与方法

### **4.1.1** 试验材料

试验材料同2.1.1

### **4.1.2** 试验试剂

中华鳖体成分测定所需试剂（均为分析纯）购自国药化学试剂有限公司，消化酶活力测定试剂盒购自南京建成生物技术有限公司。

### **4.1.3** 试验设计

试验设计同3.1.2，其中T1和T2组分别为30%低蛋白胁迫组和36%低蛋白胁迫组，低蛋白胁迫时间设30天、60天和90天三个因素，试验设计见表2-3，试验分组如表3-1所示，在蛋白质限制阶段和恢复投喂阶段，每个实验组分别随机取样，取胃和肠道组织，经液氮速冻后-80℃保存用于消化酶活性检测。去除内脏后的中华鳖胴体用于生化组成测定。其中，水分测定采用直接干燥法（GB6435-86）；粗灰分采用马弗炉灼烧法（GB6438-92）；粗蛋白采用凯氏定氮法（GB6432-94）；粗脂肪采用索氏提取法（GB6433-94）；消化酶活性参照试剂盒方法测定。

27

## **4.2** 结果与分析

### **4.2.1** 低蛋白胁迫及恢复投喂后中华鳖体组成的变化

中华鳖机体中粗蛋白含量如图4-1所示，在低蛋白胁迫下，粗蛋白含量差异并不显著（P> 0.05），但随着饲料中蛋白质含量降低和胁迫时间的增长，中华鳖体内蛋白含量也呈现出下降的趋势。如图4-2所示，在对照组和36%低蛋白胁迫组（T2组）中，中华鳖体内脂肪含量在整个实验过程中差异并不显著（P> 0.05），30%低蛋白饲料胁迫30d和60d后（T1组），粗脂肪含量显著低于其它实验组（P<0.05）。

如图4-3所示，随着饲料中蛋白含量下降和胁迫时间的延长，中华鳖体内灰分含量大致呈现出上升的趋势，对照组和30%低蛋白胁迫（T1组）60d和90d后，灰分含量显著升高（P<0.05），投喂36%低蛋白饲料后（T2 组），随着胁迫时间的延长，灰分含量呈现出下降的趋势（P> 0.05）。如图4-4，在低蛋白胁迫下，随着养殖时间的延长，中华鳖体内的水分含量显著下降（P<0.05），在对照组中，其水分含量在试验过程中差异不显著（P> 0.05）。在恢复投喂正常蛋白饲料后，中华鳖体内各成分均恢

复到正常水平，与对照组相比无显著差异（P> 0.05）（图4-5）。

粗蛋白含量

（

%

）

**图4-1 低蛋白胁迫对中华鳖机体粗蛋白含量的影响**

**Fig.** **4-1** **Effect of low protein stress on crude protein content of Pelodiscus sinensis’body**

28

粗脂肪含量

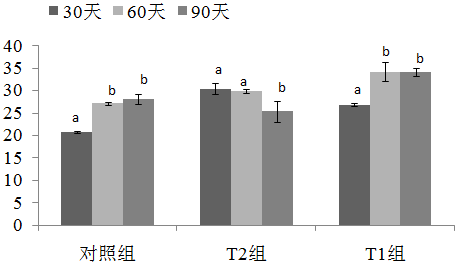
（

%

）

**图4-2 低蛋白胁迫对中华鳖机体粗脂肪含量的影响**

**Fig.** **4-2** **Effect of low protein stress on crude fat content of Pelodiscus sinensis’body**



灰

分含量

（

）

**图4-3 低蛋白胁迫对中华鳖机体灰分含量的影响**

%

**Fig.** **4-3** **Effect of low protein stress on ash content of Pelodiscus sinensis’body**

29

**水分含量**

**（**

**%**

**）**

**图4-4 低蛋白胁迫对中华鳖机体水分含量的影响**

**Fig.** **4-4** **Effect of low protein stress on water content of Pelodiscus sinensis’body**

****

**含量**

**（**

**%**

**）**

**图4-5 恢复投喂后中华鳖机体的生化组成**

**Fig.** **4-5** **Pelodiscus sinensis’biochemical composition after refeeding**

### **4.2.2** 低蛋白胁迫及恢复投喂后对中华鳖消化酶比活力的影响

如表4-1所示，随着胁迫时间的延长，中华鳖肠道中的淀粉酶和脂肪酶活力呈上升趋势，且显著高于对照组（P<0.05），胃蛋白酶活力与对照组相比则无显著差异

（P> 0.05），而肠道中胰蛋白酶活力显著低于对照组（P<0.05）。在恢复投喂后中华鳖

30

肠道消化酶活力变化如表4-2所示，肠道中淀粉酶活力逐渐下降，低蛋白胁迫30天再恢复投喂60天后，淀粉酶活力恢复到正常水平（P> 0.05），脂肪酶和胰蛋白酶活力在恢复投喂后与对照组相比无显著差异（P> 0.05）。胃蛋白酶活力在整个试验阶段与对照组相比则无显著差异（P> 0.05）（表4-1, 表4-2）。

**表4-1 低蛋白胁迫对中华鳖消化酶活力的影响**

**Tab.4-1 Effect of low protein stress on the activities of digestive enzymes (M±S)**

| 组别 | 淀粉酶 | 脂肪酶 | 胃蛋白酶 | 胰蛋白酶 |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 30-1-0 | 0.52±0.09 a | 25.21±0.26 a | 15.91±0.64 | 478.00±11.84 b |
| 30-2-0 | 0.64±0.03 a | 27.98±0.19 a | 17.07±0.53 | 462.58±17.12 b |
| 30-3-0 | 1.41±0.18 c | 35.07±0.10 b | 12.67±1.80 | 391.29±9.85 a |
| 36-1-0 | 0.92±0.05 b | 41.15±0.38 c | 17.36±1.46 | 508.75±11.72 b |
| 36-2-0 | 1.54±0.08 c | 47.42±2.54 c | 20.20±0.55 | 521.44±11.97 b |
| 36-3-0 | 2.61±0.02 d | 36.78±0.43 b | 19.51±1.07 | 511.25±7.04 b |
| 对照组 | 0.43±0.01 a | 24.30±1.01 a | 15.79±0.41 | 547.27±10.67 c |

注：酶活力单位为U/mgprot，下同。

**表4-2** **恢复投喂后中华鳖消化酶活力的变化**

**Tab.** **4-2** **Variation of the digestive enzymes’activities of Pelodiscus sinensis after refeeding（M±S）**

| 组别 | 淀粉酶 | 脂肪酶 | 胃蛋白酶 | 胰蛋白酶 |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 30-1-1 | 0.43±0.02 ab | 28.02±1.04 | 20.28±0.32 | 548.39±14.05 |
| 30-2-1 | 0.82±0.26 d | 27.52±1.21 | 12.98±0.58 | 538.89±11.70 |
| 30-1-2 | 0.40±0.26 a | 25.35±2.30 | 20.79±1.05 | 511.25±7.04 |
| 36-1-1 | 0.64±0.08 c | 24.68±3.59 | 16.41±0.97 | 525.36±4.01 |
| 36-2-1 | 0.60±0.04 bc | 29.38±0.85 | 16.80±1.60 | 538.82±19.47 |
| 36-1-2 | 0.42±0.01 a | 26.05±2.01 | 16.59±1.51 | 556.26±19.26 |
| 对照组 | 0.43±0.01 ab | 24.30±1.01 | 15.79±0.41 | 547.27±10.67 |

## **4.3** 讨论

### **4.3.1** 低蛋白胁迫及恢复投喂对中华鳖Th化组成的影响

在饥饿或营养不足情况下，动物体靠消耗自身贮存的能量以维持生命活动，对自身储能物质的利用因动物种类而异，大部分动物主要利用糖原和脂肪[117-119]，很少动物利用蛋白质，而且一般是在脂肪被大量消耗以后，极少数动物在营养不足时直接消耗蛋白质维持生长[120]。在本实验中，随着饲料中蛋白含量下降和养殖时间的延长，中华鳖体内灰分含量呈上升趋势；在对照组和36%低蛋白胁迫组，中华鳖体内脂肪含量在整个实验过程中差异并不显著（P> 0.05），30%低蛋白饲料胁迫30d和60d后，

31

中华鳖体内粗脂肪含量显著低于其它实验组（P<0.05）（图4-2），而中华鳖体内粗蛋白含量在整个实验过程中无显著差异（P> 0.05），但随着饲料中蛋白质含量降低和胁迫时间的增长，粗蛋白含量呈下降趋势（图4-1）；在恢复投喂正常蛋白含量的饲料后，各个实验组中华鳖的生化组成与对照组相比均无显著差异（P> 0.05）（图4-5）。因此通过这些结果可以得出，中华鳖在低蛋白胁迫期间首先消耗糖类和脂肪，饲料中蛋白含量越低，脂肪消耗量越高，而后消耗少量蛋白质来维持基本生命活动。由于脂肪和少量蛋白质的利用，使中华鳖体内更多矿物质沉积，导致灰分含量上升。而恢复投喂正常蛋白含量的饲料后，中华鳖各项生化组成指标均达到正常水平，与表2-4中特定生长率和相对增重率吻合，说明中华鳖在低蛋白胁迫后再恢复正常蛋白水平后获得补偿生长的过程与生化组成的变化过程是相关的。

### **4.3.2** 低蛋白胁迫及恢复投喂对中华鳖消化酶活力的影响

水产动物的食性与消化器官和消化机能相一致，并且与消化酶活力具有直接关系。不同的消化器官具有不同的消化机能，因而消化酶的活力也不相同[121]。本实验研究发现，当饲料中蛋白含量降低时，中华鳖肠道中淀粉酶、脂肪酶活性升高，胰蛋白酶活力降低。在本实验不同蛋白含量配方中，用α-淀粉将饲料调成大致能量相等，因此，饲料中蛋白含量越低，则淀粉含量就越高。中华鳖是以蛋白质为主的肉食性水产动物，在正常情况下，对蛋白质有一定的依赖性，当配合饲料中蛋白含量降低时，作为低蛋白胁迫的一种适应性，中华鳖肠道内淀粉酶和脂肪酶活力升高，消耗更多的淀粉和脂肪以维持自身生命活动的需要，胰蛋白酶活力降低使蛋白质的净摄入量减少甚至摄入的蛋白质用来提供能量，表现为中华鳖生长迟缓或出现负增长现象。当恢复投喂正常蛋白含量饲料时，中华鳖肠道内胰蛋白酶活力升高，使蛋白质的净摄入量增高，提高了蛋白质的利用率，表现为中华鳖生长速度加快或者超过正常生长速度。这与第二章中的实验结果相吻合。在整个试验阶段，中华鳖胃蛋白酶活力始终无显著性变化（P> 0.05），可能是胃蛋白酶活性是由特定的酸性环境决定的，本实验中投喂的饲料并不能改变中华鳖消化道中的pH值；胃蛋白酶只是将大分子蛋白质切割成小的多肽片段，最终蛋白质被彻底消化和吸收实是在肠道中完成的。因此，处理组中华鳖胃蛋白酶活力在整个实验过程中与对照组无显著差异（P> 0.05）。

32

# 第五章 结论与展望

1、低蛋白胁迫可以诱发中华鳖的补偿生长效应，中华鳖经蛋白含量为36%的低蛋白饲料胁迫后效果最好，可出现完全补偿生长，且“胁迫—恢复”周期为1: 2。本实验为中华鳖合理的投喂模式的推广、减轻高蛋白饲料对水环境的污染以及降低养殖成本提供了可行性依据。

中华鳖补偿生长在养殖过程中具有广阔的应用前景，但关于中华鳖的补偿生长的研究还仅限于实验室阶段，本实验验证了中华鳖在低蛋白胁迫后可以诱导中华鳖的补偿生长效应，但影响中华鳖的生长的因素还有很多，如群体效应、温度昼夜变化、光照、水质条件等外界因素。因此，对中华鳖补偿生长应从多方面进行研究，以找出诱导中华鳖补偿生长的最佳条件，为中华鳖养殖业创造出更大的经济效益。

2、肝脏和肌肉中RNA/DNA 变化与中华鳖特定生长率的变化相吻合，说明

RNA/DNA比值可以作为评价中华鳖生长状况的指标。但由于处于补偿生长阶段的中华鳖生长速度加快，蛋白质合成速度远高于正常中华鳖，即使中华鳖在补偿生长阶段其RNA/DNA比值的变化趋势与生长速率相同，却非线性相关。另外，其他许多因素如饲料中添加剂品质的优劣、水质状况、重金属污染等均会影响对中华鳖RNA/DNA比值，因此，通过中华鳖RNA/DNA比值判断养殖环境的优劣，并及时改善中华鳖养殖环境具有广阔的应用前景。

3、HSP70和IGF-I mRNA表达量对饲料中蛋白含量的变化比较敏感，HSP70 和

IGF-I可以作为低蛋白胁迫过程中敏感的响应分子标志。已有研究表明，水产动物中

HSP的表达，可以增强水产动物对外界环境的适应能力，而IGF-I是生长激素促生长效应的主要因子，其表达量的增加可以加速水产动物的增长。如果通过某种手段可以提高中华鳖HSP和IGF-I的表达，这对增强中华鳖对不同外界环境的适应能力和加快中华鳖的生长速率具有重要应用前景，必定会给中华鳖养殖业带来巨大的经济效益。

4、随着饲料中蛋白含量下降和胁迫时间的延长，中华鳖体内灰分含量呈现出上升的趋势，粗蛋白含量和脂肪含量呈下降趋势；恢复投喂正常蛋白含量的饲料后，中华鳖各项生化组成指标均达到正常水平，说明中华鳖在低蛋白胁迫后再恢复正常蛋白水平后获得补偿生长的过程与生化组成的变化过程是相关的。

5、当配合饲料中蛋白含量降低时，作为低蛋白胁迫的一种适应性，中华鳖肠道

33

内淀粉酶和脂肪酶活力升高，胰蛋白酶活力降低，消耗更多的淀粉和脂肪以维持自身生命活动的需要，胰蛋白酶活力降低使蛋白质的净摄入量减少甚至摄入的蛋白质用来提供能量，表现为中华鳖生长迟缓或出现负增长现象。当恢复投喂正常蛋白含量饲料时，中华鳖肠道内胰蛋白酶活力升高，使蛋白质的净摄入量增高，提高了蛋白质的利用率，表现为中华鳖生长速度加快或者超过正常生长速度。

通过对中华鳖生化组成和消化酶的研究，可以优化中华鳖养殖业中饲料问题，如配合饲料的配方、消化酶对饲料的适应性等；此外，中华鳖消化酶的研究仍有很大的空白，如消化酶活力的影响因素及对饲料的适应程度等，通过这方面的研究，可以中华鳖的健康高效养殖提供理论基础。因此，对中华鳖生化组成和消化酶活力的研究在中华鳖养殖业中具有广阔的应用前景。

34

参 考 文 献

[1] Miglvasl L, Jobling M. Effects of feeding regime on food consumption, growth rates and tissue nucleic acids in juvenile Arctic charr, *Salvelinus alpinus*, with particular respect to compensatory growth [J]. *Journal of Fish Biology*, 1989, 34(6): 947-957.

*[2]* Weatherley A H, Gill H S. The biology of fish growth [M]. *London: academic Press,*

1987, 133-216.

[3]邱岭泉，赵吉伟，崔喜顺，等．水产养殖动物补偿生长的研究概况[J]．水产学杂志，2004, 17(2)：93-99．

[4] Dobson S H, HolmesR M. Compensatory growth in the rainbow trout, *Salmo gairdneri*[J]. *Journal of Fish Biology*,1984, 25: 649-656.

[5]张波．真绸在饥饿后恢复生长中的生态转换效率[J]．海洋水产研究，1999, 20（2）：

38-41．

[6] Kim M L, Lovell R T. Effects of dietary protein level on growth and utilization of protein and energy by juvenile haddock[J]. *Aquaculture*, 2001, 195(3): 311-319.

[7] Russell N R, Wootton R J. Appetite and growth compensation in European minnows ( Phoxinus phoxinus) following short periods of food restriction[J]. *Environ Biol Fish*, 1992, 34: 277-285.

[8] Wang Y. Compensatory growth and related bioenergetic mechanism in hybridtilapia[D]. *Post-doctor Research Paper, Wuhan: Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Science*. 1999.

[9] Jobling M, Meloy O H, Santos J D, et al. The compensatory growth response of the Atlantic cod: effects of nutritional history[J]. *Aquaculture International* 1994, 2: 75-90.

[10] Calow P. On the regulation nature of individual growth: some observations from fresh water snail[J]. Journal of Zoology, 1973, 170: 415-428.

[11] Schwarz F J, Plank J, Kirchgessner M. Effect of protein or energy restriction with subsequent realimentation on performance parameters of carp (Cyprinus carpio L) [J]. *Aquaculture*, 1985, 48: 23-33.

[12] Wu L X, Dong S L. Effects of protein restriction with subsequent realimentation on growth performance of juvenile Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*) [J].

35

*Aquaculture*, 2002, 210: 343-358.

[13]吴立新，邓宏相，耿志孚，等．蛋白质限制后恢复投喂对牙鲆幼鱼生长的影响

[J]．生态学报，2006, 26(11): 3711-3717．

[14] Skilbrei O T. Compensatory sea growth of male Atlantic salmo, *Salmo salar*, which previously mature as parr[J]. *Journal of Fish Biology*, 1990, 37: 425-438.

[15] Jobling M, Jorgensen E H, Siikavuopio S I. The influence of previous feeding regime on the compensatory growth response of maturing and immature Arctic charr, *Salveli- nus alpinus*[J]. *Journal of Fish Biology*, 1993, 43: 409-419.

[16]吴立新，董双林．水产动物继饥饿或营养不足后的补偿生长研究进展[J]．应用

生态学报，2000, 11(6)：943-946．

[17]邓利，张波，谢小军．南方鲇继饥饿后的恢复生长[J]．水生生物学报，1999，

23(2): 167-173.

[18]王燕妮，张志蓉，郑曙明．鲤鱼的补偿生长及饥饿对淀粉酶的影响[J]．水利渔业，2001, 21(5)：6-7．

[19]王岩．海水养殖罗非鱼补偿生长的生物能量学机制[J]．海洋与湖沼，2001, 32（3）：

233-239．

[20]姜志强，贾泽梅，韩延波．美国红鱼继饥饿后的补偿生长及其机制[J]．水产学报，2002, 26(1)：67-72．

[21]齐占会．中华鳖对饲料蛋白质水平适应性研究[D]．石家庄：河北师范大学硕士学位论文，2006．

[22]颉志刚，牛翠娟．完全或部分的食物剥夺对中华鳖（*Pelodiscus sinensis*）幼体补偿生长反应的影响：生长率的时间变化模式与体组成的变化（英文）[J]．水生生物学报，2007, 31(2)：214-219．

[23]谢全森，李俊伟，杨振才．中华鳖稚鳖继饥饿后的补偿生长研究[J]．淡水渔业，

2008，38(3)：23-26．

[24] Roark A M, Bjorndal K A, Bolten A B. Compensatory responses to food restriction in juvenile green turtles (*Chelonia mydas*). *Ecology*, 2009, 90(9): 2524-2534.

[25] Bjorndal K A, Bolten A B, Dellinger T, et al. Compensatory growth in oceanic loggerhead sea turtles: response to a stochastic environment[J]. *Ecology*, 2003, 84(5): 1237-1249.

[26]谢全森．中华鳖(*Pelodiscus sinensis*)补偿生长和RNA/DNA比值的研究[D]．石家

36

庄：河北师范大学，2008．

[27] Juliann G K, George C T. Heat shock protein70 kDa: Molecular biology, biochemistry and physiology[J]. *Pharmacol and Therapeutics*, 1998, 80(2): 183-201.

[28] Feder M E, Hofmann G E. Heat- shock proteins, molecular chaperones and the stress response [J]. *Annual Review Physiology*, 1999, 61: 243-282.

[29] Beckmann R P, M izzen L A, Welch W J. Interaction of HSP70 newly synthesized proteins: Implications for protein folding and assembly events[J]. *Science*, 1990, 248: 850-854.

[30] Deane E E, Woo N Y S. Impact of heavy metals and organochlorines on hsp70 and hsc70 gene expression in black sea bream fibroblasts[J]. *Aquatic Toxicol*, 2006, 79:

9-15.

[31] Srivastava P. Roles of heat-shock proteins in innate and adaptive inmunity[J]. *Nature Review Immunol*, 2002, 2(3): 185-194.

[32]栾东东．刺ft柑热休克蛋白基因克隆及原核表达[D]．乌鲁木齐：新疆农业大学，

2008.

[33]崔彦婷，刘波，谢俊，等．热休克蛋白研究进展极其在水产动物中的研究前景

[J]．江苏农业科学，2011，39 (3)：303-306．

[34] Ouyang Y B, Xu L J, Sun Y, et al. Over expression of inducible heatshock protein-70 and its mutants in astrocytes is associated with maintenance of mitochondrial physiology during glucose deprivation stress[J]. *Cell Stress Chaperones*, 2006, 11(2):180-186.

[35]朱梅菊，高顺生，李红．螺旋藻复方对递增大负荷运动小鼠肝脏、心肌、骨骼

肌的保护作用和HSP70表达的关系[J]．天津体育学院学报，2005, 20(3)：35-37．

*[36]* Regulation of heat shock gene induction and expression during *Drosophila*

Development[J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 1997, 53(1): 104-113.

[37]万文菊．剑尾鱼HSP70家族两成员的分子克隆及溶藻弧菌感染与免疫对其基因的诱导表达[D]．泰安：ft东农业大学，2006．

[38] Eisenhut M. Mediators of cellular stress response in bacterialmeningitis[J]. *Critial Care Medicine*, 2008, 36(1): 365-366.

[39]王伟，李彩燕，葛楚天，等．龟鳖类动物热休克蛋白研究进展[J]．江西农业学

报，2012, 24(4)：149-152．

37

[40]沈骅，王晓蓉，张景飞.应用应激蛋白HSP70作为生物标志研究锌、铜及其联合毒性对鲫鱼肝脏的影响[J]．环境科学学报，2004, 24（9）：895-899．

[41] Webb D, Gagnon M M. The value of stress protein 70 as an environmental biomarker of fish health under field conditions[J]. *Environ Toxicol*, 2009, 24(3):287-295.

[42]王薇，韩岚岚，赵奎军．昆虫热休克蛋白HSP70的研究进展[J]．东北农业大学

学报，2009, 40(11)：129-132．

[43] Wang Z, Wu Z, Jian J, et al. Cloning and expression of heat shock protein70 gene in the haemocytes of pearl oyster(*Pinctada fucata,* Gould 1850) responding to bacterial ch- allenge [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2009, 26(4):639-645.

[44] Dong Y W, Dong S L, Men X L. Effects of thermal and osmotic stress on growth, osmo regulation and Hsp70 in sea cucumber( *Apostichopusjaponicus Selenka*)[J]. *Aquaculture*, 2008, 276(4):179-186.

[45] Sung Y, Damme E J M, Sorgeloos P, et al. Non-lethal heat shock protects gnotobiotic A-rtemia franciscana larvae against virulent Vibrios[J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2007, 22(4):318-326.

[46] Deng D F, Wang C F, Lee S Y, et al. Feeding rates affect heat shock protein levels in liver of larval white sturgeon (*Acipenser transmontanus*) [J]. *Aquaculture*, 2009, 287(2): 223-226.

[47]张娟，张其中，张占会，等.黄颡鱼HSC70基因及其组织表达分析[J]. 水生生物

学报，2009，33(3)：426-436.

[48] Li F, Luan W, Zhang C, et al. Cloning of cytoplasmic heat shock protein 90 from *Feneropenaeus chinensis* and its expression response to heat shock and hypoxia[J]. *Cell Stress and Chaperones*, 2009, 14(2):161-172.

[49] Scott M A, Locke M, Buck L T. Tissue-specific expression of inducible and constitutive Hsp70 isoforms in the western paited turtle [J]. *Journal Experimental Biology*, 2003, 206:303-311.

[50] Cara J B, Aluru N, Moyano F J, et al. Food-deprivation induces HSP70 and HSP90 protein expression in larval gilthead sea bream and rainbow trout [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology B*, 2005, 142(4):426-431.

[51] Ramaglia V, Buck L T. Time-dependent expression of heat shock proteins 70 and 90 in tissues of the anoxic western painted turtle [J]. *Journal Experimental Biology*, 2004,

38

207: 3775-3784.

[52]赵红霞，詹勇．胰岛素样生长因子-I研究与应用[J]. 畜牧兽医，2002, 34(6)：36-37．

[53]杨美霞，吴翠兰，齐景伟，等．营养限制和补偿生长对蒙古绵羊类胰岛素生长因子-I(IGF-I) mRNA表达水平的影响[J]．内蒙古农业大学学报，2007, 28(2)：9-12．

[54] Thissen J P, Ketelslegers J M, Underwood L E. Nutritional regulation of the insulin-like growth factors[J]. *Endocrine Reviews*, 1994, 15(1): 80-101.

[55]张殿昌．鱼类胰岛素样生长因子的研究进展[J]．上海水产大学学报，2005，14

（1）：66-71．

[56]陈庆堂，胡兵，张蕉南．RNA/DNA比值在水产动物研究中的应用[J]．饲料工业，

2008，29(2)：30-31．

[57] Bulow F J. RNA/DNA ratio as indicator of recent growth rate of fish [J]. *Journal of Fish Research Board Canada*, 1970, 27(12):2343-2349.

[58] Haines T A. An evaluation of RNA/DNA ratio as a measure of long\_term growth in fish populations[J]. *Journal of Fish Research Board Canada*, 1973, 30(2): 19-24.

[59]赵振ft，赵可椒，张益明，等．用RNA/DNA比值评定鲤鱼的生长及其配合饲

料的营养价值[J]．水产学报，1994, 18(4)：257-264．

[60] Roark A M, Bjorndal K A, Bolten A B, et al. Biochemical indices as correlates of recent growth in juvenile green turtles (*Chelonia mydas*)[J]. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2009, 376:59-67.

[61]甘居利，金有坤，用鱼肌核酸指示水体污染的初步研究[J]．农业环境保护，1997，

16(2): 68-73.

[62] Bullow F J. RNA/DNA ratio as indicator of recent growth rates of fish [J]. *Journal of Fish Research Board Canada*, 1970, 27(12): 2343-2349.

[63] Clemmesen C. The effect of food availability, age or size on the RNA/DNA of individually measured herring larvae: laboratory calibration[J]. *Marine Biology*, 1994, 118(3): 377-382.

[64]司亚东，金有坤，周洪琪，等．鲤鱼白肌中的RNA/DNA值与其生长的关系[J]．上

海水产大学学报，1992, 1(3-4): 159-167．

[65]刘存歧，沈会涛，吴玲玲．日本沼虾体内RNA/DNA比值与其生长关系的研究

[J]．河北大学学报（自然科学版），2006, 26（5）：524-528．

39

[66]刘慧吉，刘刚，李耕，等．复方中草药添加剂对花鲈幼鱼生长和消化酶活性的影响[J]．饲料工业，2008, 29（6）：4-7．

[67] Desai D V, Anil A C. Comparison of nutritional status of field and laboratory reared Balanus amphitrite Darwin (Cirripedia: Thoracica) larvae and implication of starvation [J]. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2002, 280(1-2): 117-134.

[68]杨天燕，杜劲松，孟玮，等．饥饿和再投喂对白斑狗鱼体内RNA/DNA比值影

响的研究[J]．水产学杂志，2009, 22（3）：43-46．

[69]粱萌青，王成刚，陈超，等．几种添加剂对红鳍东方鲀的促生长效果与RNA/DNA

关系[J]．海洋水产研究，2001, 22（6）：38-41．

[70]吕景才，赵元凤，刘靖，等．用RNA/DNA比率评定鳖的生长及配合饲料的营养价值[J]．饲料研究，2006, 9: 1-3．

[71]王桂芹，周洪琪，陈建明，等．饲料蛋白水平对翘嘴鲌蛋白质合成能力的影响

[J]．南京农业大学学报，2008, 31（2）：149-153．

[72]张波，孙耀，唐启升．饥饿对真鲷生长及生化组成的影响[J]．水产学报，2000，

24(3): 206-2l0．

[73]尹秀芬．饥饿和再投喂对花尾胡椒鲷生化和形态性状指标的影响[D]．汕头：汕头大学，2002．

[74] Stirling H P. Effects of experimental feeding and starvation on the proximate composition of the European bass, *Picentrachus labrax*[J]. *Marine Biology*. 1975, 34: 85-91.

[75] Bernard, Lnce W, Alan T. The effect of starvation and force feeding on themetabolism of the Northern pike, *Esax Lucius L* [J]. *Fish Biology*,1976, 8:79-88.

[76] Jobling M. Effects of starvation on proximate chemical composition and enery utilization of plaice, *Pleuronectes platessa L.* [J]. *Fish Biology*, 1980, 17:325-334.

[77]龙章强，彭士明，陈立桥，等．饥饿与再投喂对黑鲷幼鱼体质量变化、生化组

成及肝脏消化酶活性的影响[J]．中国水产学报，2008，（4）：21-26．

[78]王常安．饥饿对鱼体生化组成和消化生理的研究进展[J]．中国科技论文在线．

[79]宋昭彬，何学福．饥饿对南方鲇仔稚鱼消化系统的形态和组织学影响[J]．水生生物学报，2000, 24(2)：155-160．

[80]钱云霞．饥饿对养殖鲈蛋白酶活力的影响[J]．水产科学，2002, 21(3)：6-7．

[81]王燕妮，张志蓉，郑曙明．鲤鱼的补偿性生长及饥饿对淀粉酶的影响[J]．水利

40

渔业，2001, 21(5)：6-7．

[82]柳敏海，施兆鸿，罗海忠，等．短期饥饿胁迫对鮸鱼的生长、生化组成及其消化酶活力影响[J]．中国水产科学，2007, 14(7)：23-28．

[83]王风雷，李爱杰，景水才．甲鱼对蛋白质、脂肪、糖及钙磷的适宜需求量[J]．中国水产科学，1996, 3(2)：34-40．

[84]涂涝，黄勇军．甲鱼配合饲料中蛋白质、脂肪以及糖类适宜含量初探[J]．水产利技情报，1995, 22(1) 17-20．

[85]何瑞国，毛学英，王玉莲，等．生长期中华鳖饲料适宜能量、蛋白质含量及必需氨基酸模式的研究[J]．水产学报，2000, 24(1)：46-51．

[86]钱国英．甲鱼对蛋白质的需求量及其消化利用[J]．浙江农业大学学报，1995，

21(5): 547-550．

[87]占秀安，许梓荣，钱利纯．中华鳖肉脂品质的研究[J]．浙江大学学报（农业与生命科学版），2000, 26(4)：457-460．

[88]刘栓桃，聂向庭，刘桂林，等．中华鳖不同组织器官生化指标的测定及其营养和药用价值的探讨[J]．ft西农业大学学报，1997, 17(1)：55-58．

[89]汤峥嵘，王道尊，谭玉钧．中华鳖生化组成的分析—Ⅲ.肌肉氨基酸的组成[J]．水生生物学报，1998, 22(4)：307-313．

[90]李卫芬，夕秀安，陆清儿．中华鳖不同发育阶段氨基酸组成的研究[J]．江西农业大学学报，1998, 20(3)：358-360．

[91]刘恩生．日本利用碳水化合物和高能低蛋自饵料养鲤鱼的动向[J]．饲料研究，

1994，(2)：32-33．

[92] Tanaka Y, Satoh K, Yamada H, et al. Assessment of the nutritional status of field-caught larval Pacific bluefin tuna by RNA/DNA ratio based on a starvation experiment of hatchery-reared fish [J]. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2008, 354(1): 56-64.

[93] Miglavs I, JoblingM. Effects of feeding regime on food consumption, growth rates and tissuenucleic acids in juvenile Arctic chart, *Salvelinus alpinus*, with particular respect to compensatory growth [J]. *Journal of Fish Biology*, 1989, 34: 947-957.

[94] Dobson S H, Holmes R M. Compensatory growth in the rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson[J]. *Journal of Fish Biology*, 1984, 25: 649-656.

[95] Myung K K, Richard T L, Effect of restricted feeding, regimens on compensatory

41

Weight gain and body tissue changes in channel catfish *lcwdurus punctatus* in ponds[J]. *Aquaculture*, 1995, 135: 285-293.

[96]薛明，柯才焕，王德祥，等．饥饿与再投喂对方斑东风螺生长、基本营养成分

及RNA/DNA比值的影响[J]．水产学报，2010, 34(3)：481-488．

[97]龙良启，汤保贵，白东清．鲫鱼体尺及RNA/DNA比值与体重关系的研究[J]．华中农业大学学报，1998, 17(5)：489-492．

[98]黄国强，李洁，唐夏，等．温度胁迫及恢复过程中褐牙鲆幼鱼GH、IGF-I、RNA/DNA

比值和糖原的变化[J]．南方水产科学，2012, 8(6)：16-21．

[99] Iwama, G K, Afonso L O B, Todgham A A, et al. Are Hsps suitable for indicating stressed states in fish [J]. *Journal of Experimental Biology*, 2004, 207: 15-19.

[100] Basu N, Todgham A E, Ackerman P A, et al. Heat shock protein genes and their functional significance in fish [J]. *Gene*, 2002, 295: 173-183.

[101] Carrizo L C, Ruete C M, Manucha W A, et al. Heat shock protein 70 expression is associated with inhibition of renal tubule epithelial cell apoptosis during recovery from low-protein feeding [J]. *Cell Stress Chaperones*, 2006,11(4): 309-324.

[102] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2 (-Delta Delta C(T)) method [J]. *Methods*, 2001, 4: 402-408.

[103] E A Craig, K Jacobsen. Mutations in cognate genes of *saccharomyces cerevisiae* hsp70 result in reduced growth rates at Low temperatures[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 1985, 5(12): 3517-3524.

[104] Cathy H. Wu, Timothy Caspar, John Browse, et al. Characterization of an HSP70 cognate gene family in *Arabidopsis*[J]. *Plant Physiology*, 1988, 88: 731-740.

[105] Kim L. Milarski, Richard I. Morimoto. Expression of human HSP70 during the synthetic phase of the cell cycle[J]. *Proceeding of National Academy Science*. USA, 1986, 83: 9517-9521.

[106]曲凌云，孙修勤，相建海，等．热休克蛋白研究进展[J]．海洋科学进展，2004，

22(3): 385-391．

[107]李晓燕．hsp90基因的信号传导以及调控机制的研究[D]．北京中国协和医科大学，2002．

[108] Carrizo L C, Ruete C M, Manucha W A, et al. Heat shock protein 70 expression is

42

Associated with inhibition of renal tubule epithelial cell apoptosis during recovery from low-protein feeding [J]. *Cell Stress Chaperones*, 2006, 11(4): 309-324.

[109]缪凌鸿，戈贤平，谢骏，等．高碳水化合物日粮对异育银鲫血浆皮质醇含量和

HSP70 基因mRNA表达的影响[J]．中国水产科学，2011, 18(4)：819-827．

[110]林天势，薛良义，孙爱飞，等．温度和病原菌感染对大黄鱼热激蛋白90基因表达的影响[J]．中国生物细胞学学报，2012, 34(6)：555-564．

[111]王广宇．不同碳水化合物含量日粮对翘嘴红如血液免疫指标和HSC70基因表达的影响[D]．南京：南京农业大学，2009．

[112] Straus D S．Nutritional regulation of hormone and growth factors that control mammalian growth[J]. *FTRAUSJ*, 1994, 8:6-12

[113] Uchida K, Kajimura S, Reliy L G, et al. Efects offasting on growth hormone/insulin-like growth factor I axis in the tilapia, Oreochromismossambicus [J]. *Comparative Biochemistry Physiollogy Part A*, 2003, 134: 429-439.

[114] PetersonB C, WaldbieserG C. Efects of fasting onIGF-I, IGF-II, and IGF-binding

Protein mRNA concentrations in channel catfish(*Ictalurus punctatus*)[J]. *Domest Anita Endoerinol*, 2009, 37: 74-83．

[115]华益民，林浩然．营养状况对幼年鲤鱼肝脏IGF-I mRNA表达的影响[J]．动物学报，2001, 47(3)：94-100．

[116] Pedroso F L, Ayson E G, Cortado H H, et a1. Changes in mRNA expression of grouper(Ep-inepnelus coioides) growth hormone and insulin-like growth factor I in response to nutritional status[J]. *Gen Comp Endocrinol*, 2006, 145:237-246.

[117]姜志强，贾泽梅，韩延波．美国红鱼继饥饿后的补偿生长及其机制[J]．水产学

报，2002，26(1)：67-72.

[118] Barelay M C, Dall W, Smith D M, e t al. Changes in lipid and protein during starvation and the moulting cycle in the tiger prawn[J]. *Fish Research Board Canada*, 30: l-5.

[119] Kimm M K, Lovell R T. Effect of restricted feeding regimens on compensatory weight gain and body tissue changes in channel catfish *Ictalurs puntatus* in ponds[J]. *Aquaculture*, l995, 135: 285-293.

[120]谢小军，邓利，张波．饥饿对鱼类生理生态学影响的研究进展[J]．水生生物

报，1998, 22(2)：181-188．

43

[121]吴莉芳，秦贵信，刘春力，等．饲料大豆蛋白对鲤鱼消化酶活力和血液主要生化指标的影响[J]．西北农林科技大学学报（自然科学版），2009, 37(8)：63-69．

44

致 **谢**

光阴荏苒，硕士研究生的学习即将结束，两年的学习生活使我受益匪浅。经历大半年时间的磨砺，硕士毕业论文终于完稿，回首大半年来收集、整理、思索、停滞、修改直至最终完成的过程，我得到了许多的关怀和帮助，现在要向他们表达我最诚挚的谢意。

首先，我要深深感谢我的导师钱国英老师。钱老师为人谦和，平易近人。在论文的选题、搜集资料和写作阶段，钱老师都倾注了极大的关怀和鼓励。在论文的写作过程中，每当我有所疑问，钱老师总会放下繁忙的工作，不厌其烦地指点我；在我初稿完成之后，钱老师又在百忙之中抽出空来对我的论文认真的批改，字字句句把关，提出许多中肯的指导意见，使我在研究和写作过程中不致迷失方向。他严谨的治学之风和对事业的孜孜追求将影响和激励我的一生，他对我的关心和教诲我更将永远铭记。借此机会，我谨向钱老师致以深深地谢意。

其次，我还要感谢李彩燕老师，正是因为有了他们严格、无私、高质量的教导，我才能在这两年的学习过程中汲取专业知识和迅速提升能力；我还要感谢我的辅导员李平老师这两年来对我的关心、帮助与支持；同时也感谢这两年来与我互勉互励的诸位同学，在各位同学的共同努力之下，我们始终拥有一个良好的生活环境和一个积极向上的学习氛围，能在这样一个团队中度过，是我极大的荣幸.

同时也感谢我们实验室的本科生徐梦艳等人，他们以极大的热情，帮助我完成了部分试验工作，感谢他们对本论文所提供的大力帮助与支持。

最后，我要感谢参与我论文评审和答辩的各位老师，他们给了我一个审视两年来学习成果的机会，让我能够明确今后的发展方向，他们对我的帮助是一笔无价的财富。我将在今后的工作、学习中加倍努力，以期能够取得更多成果回报他们、回报社会。

45

# 攻读硕士学位期间的学术成果

已刊登发表

[1] 赵彩胜、李彩燕、钱国英． 低蛋白胁迫对中华鳖补偿生长和热休克蛋白mRNA表达影响的初探[A]． 厦门: 第九届世界华人鱼虾营养学术研讨会论文摘要集.

专利

[1] 李彩燕、钱国英、王伟、赵彩胜、葛楚天、尹尚军、朴龙斗． 一种中华鳖早期性腺石蜡切片的制作方法[P]．中国, 201410132532.0.

46