

文章编号: 1000-0615(2005)02-0216-06

## 饵料蛋白质对中华绒螯蟹仔蟹消化酶活性 及胰蛋白酶 mRNA 丰度的影响

江洪波<sup>1</sup>, 陈立侨<sup>1,2</sup>, 王群<sup>1</sup>, 赵晓勤<sup>1</sup>, 禹娜<sup>1</sup>, 倪娟<sup>1</sup>

(1. 华东师范大学生命科学学院, 上海 200062;

2. 上海高校水产养殖学 E-研究院, 上海水产大学, 上海 200090)

**摘要:** 设计了蛋白质含量为 45%、35% 和 25% 的三种饵料, 以鲜活饵料作对照, 研究饵料蛋白质对中华绒螯蟹仔蟹 ( $6 \pm 0.5\text{g}$ ) 消化酶活性的影响。分别于饲养后第 10 天、20 天和 40 天时取其肝胰腺, 测定胰蛋白酶和淀粉酶活性, 结果表明: (1) 肝胰腺胰蛋白酶活性在投喂鲜活饵料时, 整个实验过程中无明显差异 ( $P > 0.05$ ); 三个实验饵料组蛋白质至第 20 天对胰蛋白酶活性才产生显著影响, 其中 25% 蛋白饵料组显著低于其它三个饵料组 ( $P < 0.05$ )。 (2) 投喂鲜活饵料的仔蟹肝胰腺中淀粉酶比活力在第 10d 时为  $49.39 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ , 此后逐渐递减; 比较三个蛋白饵料组淀粉酶活性, 发现淀粉酶活性自第 10 天起即受饵料蛋白质的显著影响 ( $P < 0.05$ ), 至第 20 天时 45% 蛋白饵料组比活力为  $23.85 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ , 较其它两个蛋白饵料组及对照组相比显著降低 ( $P < 0.05$ ), 而第 40 天对对照组和 25% 蛋白饵料组的淀粉酶比活力显著高于 45% 和 35% 二个蛋白饵料组 ( $P < 0.05$ )。 (3) 胰蛋白酶 mRNA 丰度以 25% 蛋白饵料组为最低, 仅 0.140, 与 35% 蛋白饵料组较为接近 ( $P > 0.05$ ), 而对照组和 45% 蛋白饵料组的 mRNA 丰度分别为饵料 3 组的 4.5 倍和 3.5 倍, 显著高于 25% 和 35% 两个蛋白饵料组 ( $P < 0.05$ )。结果提示仔蟹饵料蛋白质对肝胰腺胰蛋白酶具有显著促进作用, mRNA 丰度的变化反映了饵料蛋白质水平导致胰蛋白酶活性的变化是由基因转录水平的差异造成的。

**关键词:** 中华绒螯蟹; 饵料蛋白质; 淀粉酶; 胰蛋白酶; 肝胰腺; mRNA 丰度

中图分类号: S963

文献标识码: A

## Effects of dietary protein on activities of digestive enzyme and trypsin mRNA abundance in *Eriocheir sinensis* juveniles

JIANG Hong-bo<sup>1</sup>, CHEN Li-qiao<sup>1,2</sup>, WANG Qun<sup>1</sup>, ZHAO Xiao-qin<sup>1</sup>, YU Na<sup>1</sup>, NI Juan<sup>1</sup>

(1. School of Life Science, East China Normal University, Shanghai 200062, China;

2. E-Institute of Shanghai Municipal Education Commission, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China)

**Abstract:** Three experimental feeds with dietary protein content of 45, 35 and 25% were formulated to rear juvenile *Eriocheir sinensis*, for 40 days, with initial mean weight of  $6 \pm 0.5\text{g}$ , taking live food as control. Juvenile crabs were dissected after feeding 10, 20 and 40 days respectively and hepatopancreas obtained. Then activities of trypsin and amylase in hepatopancreas were measured. The results were as follows: (1) activities of trypsin in hepatopancreas of juvenile crab fed with live food did not show significant difference throughout the trials ( $P > 0.05$ ). Effects of dietary protein on trypsin activities indicated remarkable difference after feeding 20 days, trypsin activities fed with 25% protein diet was lower than the others ( $P < 0.05$ ). (2) the highest value of amylase activities in hepatopancreas of juvenile crabs fed with live food occurred on the 10th day, reaching 49.39, then decreased gradually. Activities of amylase were significantly affected by dietary protein for three diets with different protein levels from the 10th day ( $P < 0.05$ ). On the 20th day, amylase activity of 45% protein diet was 23.85, significantly lower than that of the two others ( $P < 0.05$ ). And on the 40th day, amylase activity of the control group and 25% protein diet was significantly higher than that of 45% and 35% protein diet ( $P < 0.05$ ). The experimental results suggested that trypsin in hepatopancreas of juvenile *E. sinensis* had good adaptation to

收稿日期: 2004-11-16

资助项目: 国家自然科学基金项目(30271012, 30300265); 上海市教育委员会 E-研究院建设项目(E03009)

作者简介: 江洪波(1970-), 男, 江西都昌人, 博士, 主要从事水生动物营养学的研究 E-mail: bgjjhb@21cn.com

dietary protein, whereas amylase was inhibited by higher dietary protein level. Higher trypsin activities due to higher dietary protein help to digest more of dietary protein. Trypsin mRNA abundance in hepatopancreas of *E. sinensis* juveniles fed with live food was the highest of 0.628, and significantly higher than that fed with 35% and 25% protein diets ( $P < 0.05$ ), but there was no significant difference between control group and 45% protein diet group. Neither was between 35% and 25% protein diet group. It suggested that molecular regulation of trypsin adaptation to dietary protein levels might attribute to transcription for trypsin.

**Key words:** *Eriocheir sinensis*; dietary protein; amylase; trypsin; hepatopancreas; mRNA abundance

有关甲壳动物消化酶的研究已有较长的历史<sup>[1]</sup>,但大多集中于虾类,内容包括各种消化酶在个体发育阶段,特别是幼体发育阶段的变化趋势<sup>[2-6]</sup>,以及食性和饵料营养组成对幼体期消化酶活性的影响<sup>[7-13]</sup>。Jones 等还综述了甲壳动物幼体食性不同与消化酶活性变化之间的关系<sup>[14]</sup>。

已有的研究结果证实,消化酶活性可作为虾蟹饵料各营养成分消化吸收和利用的重要指标<sup>[15]</sup>,并建议采用淀粉酶与蛋白酶之比(A/P)或淀粉酶与类胰蛋白酶之比(A/T)作为甲壳动物幼体的食性指标,比值高表明食性为植物性或偏植物性,比值低则为肉食性或偏肉食性。并试图通过建立消化酶活性与饵料之间的某种关系来反映幼体对饵料营养素的需要<sup>[16]</sup>。对虾蟹类动物而言,肝胰腺是其消化食物和吸收各种营养物质的主要场所,同时作为机体内物质代谢的主要器官,还可合成多种消化酶<sup>[1]</sup>,因此研究肝胰腺消化酶活性与饵料营养组成之间的关系,对于了解虾蟹

的消化生理具有较为重要的意义。故本实验拟探讨饵料蛋白质对中华绒螯蟹仔蟹肝胰腺消化酶活性及基因表达的影响,旨在丰富十足目甲壳动物消化生理方面的内容,同时也为中华绒螯蟹仔蟹全价饲料的研制提供基础资料。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

实验用仔蟹取自上海漕泾水产养殖公司。选取四肢完整、健康和规格整齐的个体用于实验,规格为  $6 \pm 0.5$  g。

### 1.2 实验设计

**实验分组及饲养管理** 实验于 2001 年 4-7 月在华东师范大学生物系水生动物实验室进行。实验共分四组,每组设三平行,实验饵料的蛋白质含量分别为 45%、35% 和 25%,以投喂鲜活饵料(河蚌、螺蛳)为对照组,各组实验饲料组成见表 1。

表 1 实验饵料的组成

Tab.1 Composition of experimental diets

成分 ingredients	饲料 diets		
	1	2	3
鱼粉 (%) fish meal	57.3	34.2	14.2
豆粕 (%) soybean meal	22.9	22.7	21.7
麦麸 (%) wheat bran	8.9	32.2	53.2
鱼油 (%) fish oil	3.0	3.0	3.0
卵磷脂 (%) lecithin	3.0	3.0	3.0
胆固醇 (%) cholesterol	0.5	0.5	0.5
复维 (%) vitamin mix a	1.2	1.2	1.2
复矿 (%) mineral mix b	1.2	1.2	1.2
粘合剂 (%) binder c	2.0	2.0	2.0
粗蛋白 (%) crude protein	45.49	34.60	24.93
总能 (kcal·g <sup>-1</sup> ) gross energy	3.37	3.52	3.43

注:(1)复合维生素(每 100 g 饲料): V<sub>B1</sub> 0.06 g, V<sub>B2</sub> 0.12 g, V<sub>B3</sub> 0.24 g, V<sub>B5</sub> 0.02 g, V<sub>B6</sub> 0.06 g, V<sub>B7</sub> 0.04 g, V<sub>B11</sub> 0.02 g, V<sub>E</sub> 0.02 g, V<sub>A</sub> 0.6 g, V<sub>C</sub> 0.06 g, 肌醇 0.6 g。(2)复合无机盐(每 100 g 饲料): NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10.0 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 21.5 g, Ca(H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 26.5 g, CaCO<sub>3</sub> 10.5 g, KCl 2.8 g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 10.0 g, AlCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O 1.2 g, ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.511 g, MnSO<sub>4</sub>·4-6H<sub>2</sub>O 0.143 g, KI 0.058 g, CuCl<sub>2</sub>·0.05 g, CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 0.176 g, 乳酸钙 16.50 g, 柠檬酸铁 0.061 g。(3)粘合剂为琛宝牌 HJ-I 水产饲料粘合剂,购自浙江湖州水产饲料厂。

Notes: (1) Vitamin mixture: each 100 g of diet contained thiamin, 60 mg; riboflavin, 120 mg; pantothenic acid, 240 mg; vitamin B<sub>5</sub>, 20mg; pyridoxine, 60 mg; biotin, 40mg; vitamin B<sub>11</sub>, 20mg; vitamin E, 20mg; vitamin A 600mg; vitamin C, 60 mg; and inositol, 600 mg. (2) Composition of mineral mixture (%): NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10.0 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 21.5 g, Ca(H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 26.5 g, CaCO<sub>3</sub> 10.5 g, KCl 2.8g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 10.0 g, AlCl<sub>3</sub>·2H<sub>2</sub>O 1.2 g, ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.511 g, MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O 0.143 g, KI 0.058 g, CuCl<sub>2</sub>·0.051 g, CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 0.176 g, Ca-lactate 16.5 g, Fe-citrate 0.061 g. (3) Jingbao HJ-I Aquabinder from Huzhou Aquafeed Factor, Zhejiang, China.

实验用蟹暂养一周后,移入规格为98 cm×82 cm×55 cm的周转箱中开始正式实验。实验水体体积为120 L,每箱养蟹20只,实验用水为曝气后的深井水,自然水温, pH 7.40±0.25, DO 6.22~6.80 mg·L<sup>-1</sup>, NH<sub>3</sub>-N < 0.2mg·L<sup>-1</sup>。自然光照;每日排污、换水一次,换水量约1/3;每日投饵两次,日投饵量为蟹体重的5%左右,间歇充气。逐日记录蜕皮、死蟹等情况。

**取样** 分别在饲养实验进行至第10天、20天和40天是各实验组随机抽取三个仔蟹,解剖取其胰腺置-70℃保存,备用用于消化酶活性及胰蛋白酶 mRNA 含量的测定。

**酶活性测定** 取胰腺样品0.5 g置于冰浴中,加入10倍体积预冷重蒸水中,在玻璃匀浆器中匀浆,于4℃下,10 000 r·min<sup>-1</sup>高速冷冻离心机离心30 min,取上清液用于胰蛋白酶和淀粉酶活性的测定。

改进潘鲁青等<sup>[17]</sup>方法测定仔蟹胰腺胰蛋白酶与淀粉酶活性。其中胰蛋白酶以在37℃下,每分钟水解干酪素产生1 μg酪氨酸作为一个酶活力单位 U(μg·min<sup>-1</sup>),淀粉酶以在25℃下,每分钟催化淀粉产生1 μg麦芽糖作为一个酶活力单位 U(μg·min<sup>-1</sup>)。在得到酶活力以后,再将其换算为酶比活力(每毫克蛋白质中所具有的酶活力)。

胰蛋白酶(Trypsin)基因引物设计及序列测定 DNA提取按高露姣等<sup>[18]</sup>方法提取中华绒螯蟹肌肉组织DNA。引物设计及测序参照Klein等的方法<sup>[19]</sup>,以Primer 5设计多对引物,扩增胰蛋白酶基因。所获得的Trypsin引物序列为:上游引物5'-AAGTCCATGCGCCAC-3',下游引物:5'-AGATGCACAAACATCCCC-3'。Beta-actin引

物序列为:上游引物5'-TGGACTTCGAGCAAGAGATGG-3',下游引物5'-ATCTCCTTCTGCATCCTG TCG-3'。引物合成及测序于赛百胜生物科技有限公司。

**胰腺蛋白酶 mRNA 定量** 采用异硫胲酸/酚/氯仿一步法抽提组织总RNA。紫外分光光度计测定 OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> nm 鉴定纯度,并对总RNA定量。取总RNA 2 μg于20 μL逆转录体系中进行逆转录反应,再进行PCR扩增,获得目的基因片段。取10 μL PCR产物于1.8%琼脂糖凝胶电泳,用紫外透射仪观察并拍照。胰蛋白酶 mRNA 含量以胰蛋白酶基因表达量与Beta-actin基因表达量之比值来定量。

### 1.3 数据分析

实验数据均以平均值±标准偏差(Mean±SD)表示。对实验数据先采用Microsoft Excel 2000进行单因素方差分析,若存在显著性差异,则用Duncan氏多重比较法确定组间差异,显著性水平设为0.05。

## 2 结果

### 2.1 饵料蛋白质对胰腺蛋白酶活性的影响

各饵料组胰蛋白酶活性测定结果见表2。从表中可看出,对于鲜活饵料组而言,第10天胰蛋白酶比活力为0.398 U·mg<sup>-1</sup>,与第20天和第40天两个阶段无明显差异(P>0.05);比较四个饵料组之间酶比活力发现,各饵料组在第10天时亦未出现显著性差异(P>0.05),至第20天,25%蛋白质饵料组与其它三个饵料组差异显著(P<0.05),而且这种差异至第40天时进一步增大,其中25%蛋白质饲料组的比活力仅为45%蛋白质饲料组的44.6%。

表2 投喂各实验饵料后仔蟹胰腺中胰蛋白酶活性

Tab.2 Trypsin activities in hepatopancreas of *E. sinensis* juvenile fed with experimental diets U·mg<sup>-1</sup>

取样时间 days	饵料 diets			
	鲜活饵料 control	45%蛋白质 diet 1	35%蛋白质 diet 2	25%蛋白质 diet3
10d	0.398±0.042 <sup>a</sup>	0.329±0.027 <sup>a</sup>	0.367±0.021 <sup>a</sup>	0.319±0.024 <sup>a</sup>
20d	0.408±0.054 <sup>a</sup>	0.351±0.021 <sup>a</sup>	0.364±0.023 <sup>a</sup>	0.253±0.007 <sup>b</sup>
40d	0.395±0.026 <sup>a</sup>	0.442±0.032 <sup>a</sup>	0.358±0.035 <sup>a</sup>	0.197±0.010 <sup>b</sup>

注:各饵料组相同取样时间的酶活性均值上标字母不同表明组间差异显著或极显著(P<0.05或P<0.01)

Notes: mean with different superscripts in the same column are significantly different (P<0.05 or P<0.01)

## 2.2 饵料蛋白质对仔蟹淀粉酶活性的影响

对照组肝胰腺淀粉酶比活力在第 10 天时最高, 为  $49.392 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ , 然后逐渐递减, 至第 40 天时其下降趋势略为平缓(见表 3); 尽管第 10 天时三个实验饵料组之间相比未表现出显著性差异, 但这三个饵料组淀粉酶比活力均显著低于对照组 ( $P < 0.05$ ), 至第 20 天时 45% 蛋白饵料组比活力为  $23.851 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ , 与其它两个蛋白饵料组及对照组相比均存在显著性差异 ( $P < 0.05$ ), 而第 40 天时, 对照组和 25% 蛋白饵料组的淀粉酶比活力显著高于 45% 和 35% 两蛋白饵料组 ( $P < 0.05$ )。

## 2.3 肝胰腺胰蛋白酶基因的部分序列

扩增后的肝胰腺胰蛋白酶基因的部分序列共 690 bp, 结果如图 1。

## 2.4 饵料蛋白质对仔蟹肝胰腺胰蛋白酶基因 mRNA 丰度的影响

第 40 天时各饵料组仔蟹肝胰腺胰蛋白酶基因 mRNA 丰度对比结果见图 2。胰蛋白酶 mRNA 含量以饵料 3 组为最低, 仅 0.140, 与饵料 2 组较为接近 ( $P > 0.05$ ), 而对照饵料组和饵料 1 组的 mRNA 含量分别达饵料 3 组的 4.5 倍和 3.5 倍, 显著高于饵料 2 组和饵料 3 组 ( $P < 0.05$ )。

表 3 各实验组仔蟹肝胰腺淀粉酶活性

Tab.3 Amylase activities in hepatopancreas of *E. sinensis* juvenile fed with experimental diets  $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$

取样时间 days	饵料 diets			
	鲜活饵料对照 control	45% 蛋白质 diet 1	35% 蛋白质 diet 2	25% 蛋白质 diet 3
10d	$49.392 \pm 7.536^a$	$37.656 \pm 4.115^b$	$39.421 \pm 2.874^b$	$36.416 \pm 5.142^b$
20d	$35.657 \pm 5.231^a$	$23.851 \pm 3.953^c$	$28.271 \pm 3.568^b$	$29.293 \pm 3.652^{ab}$
40d	$32.555 \pm 1.969^a$	$20.976 \pm 2.649^c$	$23.671 \pm 2.296^c$	$28.072 \pm 3.873^{ab}$

注: 饵料组相同取样时间的酶活性均值上标字母不同表明组间差异显著或极显著 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )

Notes: Mean with different superscripts in the same column are significantly different ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ )

1 TCGGCACCTC	CTGGAGTTCC	TGGCGGCCTC	AGACCCGACC	TTGCAGGGGT	50
51 ACAGGTGCCA	GGAGGGGCAC	AACCTGGCCA	ACACCATCTT	GCCGCACATC	100
101 AGCAGGTCCC	TCTTCAACTG	TTTCGGTGCT	AATTTCTCCA	AGGACGTGAC	150
151 CTCAGAAGCG	AGGAAGAACA	AGGCCTTGAA	GCAGCCGACC	GGCAGGAAGA	200
201 GGAGCAGTAT	CGAGGAGGGC	AGGAAGGAGA	CGGCGAGGAA	CAGGGACGTG	250
251 TACAAGTCCA	GGAAACTGAC	CGGGGCCAC	AAGTCATAGG	CCAAAAGGCT	300
301 AAAGTGATTG	TTCAGGGACG	AGGGCCAGAT	AGCCGGCAAG	ACGTGCTGCG	350
351 GCAATAGTGA	CATCGGAATT	CAACCAAAAT	AAGTTGTGAT	TGTATATAGA	400
401 AAAATGAATA	TTTTGCTTTT	GTTGAGTAAA	ATTAAGATGT	TTCTGCATGC	450
451 TTTCTCAAG	TATTAAGTTT	CTAATGTGAA	AATTAAGTGA	TTTATIAGAT	500
501 GTTAAAAACT	TACGTAAAAA	ATTGCACTAA	ATAAAAAAAA	AATAAGTAGC	550
551 TATTTGCGGC	AAAAACTTAT	AAGATATGCT	AAATATTGCT	ATTGATTCTG	600
601 AAAATATAAG	TGATTATCTC	TGCATTTGGG	GATGTTTGTG	CATCTAGCGT	650
651 AAAATCTGAG	GATTTTTIAG	CCCTTTTTAA	GTTTIGTIAT		700

图 1 中华绒螯蟹肝胰腺胰蛋白酶基因部分序列

Fig.1 Partial nucleotide sequence of trypsin from *E. sinensis*

## 3 讨论

### 3.1 饵料蛋白质对胰蛋白酶活性及基因表达的影响

影响甲壳动物消化酶活性的因素可分为两

类, 一是内在因素, 如生长发育期<sup>[3,8]</sup>和蜕皮周期等<sup>[20]</sup>; 二是外界因素, 如饵料和温度等<sup>[21]</sup>。其中, 饵料营养素的质和量是影响甲壳动物消化酶活力变化的关键因素, 其影响主要表现为消化酶对饵料中的营养物质有着明显的适应性, 这种特

性可以作为对虾饵料中各种营养物质消化、吸收和利用的重要指标<sup>[22,23]</sup>。

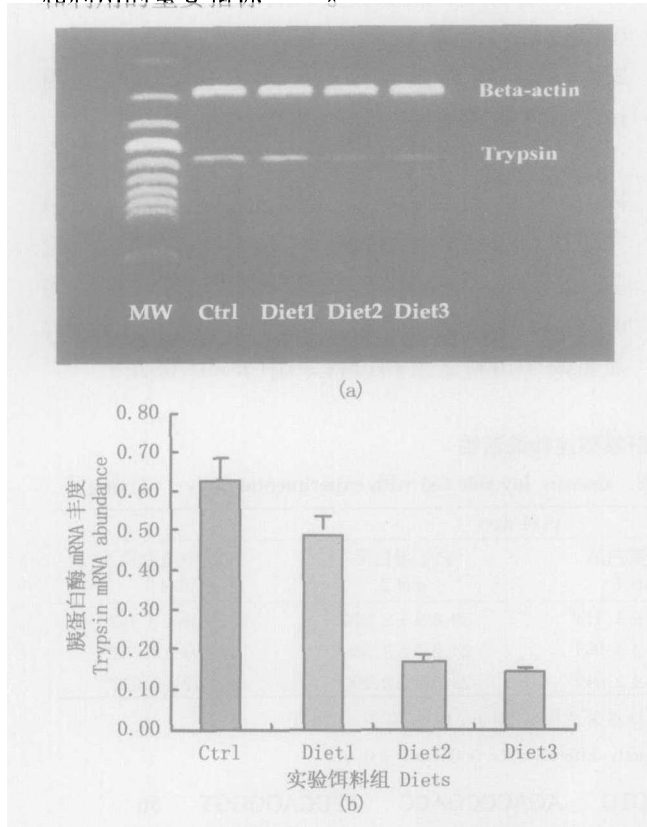


图2 各实验组仔蟹肝胰腺胰蛋白酶 mRNA 丰度比较  
Fig.2 Trypsin mRNA abundance in hepatopancreas of *E. sinensis* fed experimental diets

图(a)为 RT-PCR 产物电泳图谱,其中 MW 为分子量标准, Ctrl 为对照组, Diet1, Diet2, Diet3 分别为 45%、35% 和 25% 蛋白饵料组;图(b)为图 a 的 RT-PCR 产物产量的柱状图分析。总 mRNA 从各实验饵料组仔蟹肝胰腺中提取, RT-PCR 产物以电泳分析。

(a) Electrophoresis map of RT-PCR products, MW is marker, Ctrl is the control group, Diet1, Diet2 and Diet3 stand for experimental groups of 45%, 35% and 25% dietary protein; (b) Bar chart of RT-PCR products of (a). mRNA isolated from hepatopancreas fed on different protein level diets, RT-PCR products were analyzed by electrophoresis.

饵料蛋白质的不同来源和水平对胰蛋白酶活性具有明显的影响,如酪蛋白可刺激胰蛋白酶的活性,而明胶(gelatin)和鱼蛋白浸出物(fish protein soluble concentrate)则可抑制其活性<sup>[10]</sup>;酪蛋白(casein)水平在 10%~60% 范围内与胰蛋白酶活性呈正相关<sup>[9]</sup>。本次实验结果表明,投喂人工饲料中华绒螯蟹仔蟹肝胰腺中消化酶活性与鲜活饵料相比,其胰蛋白酶活性均较低,这与螺狮、河蚌

等鲜活饵料中蛋白含量较高直接相关。而随着仔蟹的生长,胰蛋白酶活性与饲料中蛋白质水平之间呈现了一定的正相关,具体表现为第 10 天时各蛋白饵料组胰蛋白酶活性较为接近,至第 20 天时酶活性开始产生差异,这不仅说明胰蛋白酶对饲料蛋白质具有适应作用,而且提示这种影响所导致的差异要经过一定的时间,体内物质(如氨基酸)逐渐累积后才会表现出来。由于胰蛋白酶参与饵料中半数以上的蛋白质的分解<sup>[24]</sup>,当饵料蛋白质水平较高时,因对适应饵料蛋白质水平而产生的较高的胰蛋白酶活性有利于更多蛋白质的消化和吸收,从而也有效地促进仔蟹的生长及存活。

从饵料蛋白质与胰蛋白酶基因表达的关系来看,随着饵料中蛋白水平的递增,胰蛋白酶的活性逐渐增强,而相应的 mRNA 丰度也在提高,即基因表达水平上升。由此可见,胰蛋白酶活性的变化是由基因转录(transcription)水平的差异造成的。此外,胰蛋白酶活性受饵料蛋白质水平影响的变化趋势还提示了饵料蛋白质(氨基酸)对酶基因转录的诱导作用具有一定的累积效应<sup>[25]</sup>。

也有不少学者提出消化酶对饵料的适应作用表现在消化酶与饲料成分的负相关方面。研究发现投喂角毛藻的(*Chaetoceros gracilis*)日本对虾幼体胰蛋白酶要高出投喂卤虫无节幼体时的六倍以上,认为这是藻类蛋白含量较低造成的<sup>[26]</sup>,对锯额长臂虾(*Palaemon serratus*)的研究也得到相同的结果<sup>[7]</sup>,并提出只有这样才能最大程度地消化吸收饵料中的蛋白质。这是针对饲料或饲料中的蛋白质消化率较低的一种调节机制<sup>[11,26,27]</sup>。

### 3.2 饵料蛋白质对淀粉酶活性的影响

研究表明,饲料中蛋白质对中华绒螯蟹仔蟹肝胰腺淀粉酶活性具有明显的抑制作用,而且这种抑制作用在投喂人工饲料前期表现显著,而后期下降趋势减缓。虽然鲜活饵料组与各人工蛋白饵料组相比,淀粉酶活性表现出显著性差异,且在整个实验过程中均呈下降的趋势,这与处于该生长期的仔蟹食性以偏草食性有关。在任何时期,个体都是优先吸收蛋白质,但在蛋白质含量有限时,加大对糖类的利用,因此淀粉酶活力并不一直下降(如第 20 天和 40 天时的酶活力基本相当)。

虽然有不少学者的研究支持上述观点<sup>[9,28]</sup>,然而也有部分研究显示饲料成分与消化酶活性没有某种必然的联系,如饲料中不同蛋白源对罗氏

沼虾淀粉酶的活性没有显著影响<sup>[29]</sup>。

总之, 消化酶活性与饲料及其营养成分的关系较为复杂, 可能与不同种属、生长发育期、生理状况和饲料蛋白源及其消化率均具有一定的关系。对中华绒螯蟹而言, 蛋白质水平在 25% ~ 45% 范围内, 胰蛋白酶活性随饵料蛋白质水平的增加而提高, 而淀粉酶则受到饵料蛋白质的抑制; 胰蛋白酶对饵料蛋白质的适应作用是由于转录水平的差异造成的。

### 参考文献:

- [1] Ceccaldi H J. Anatomy and physiology of the digestive system [A]. In: Louis R. D' Abramo (Eds), Crustacean nutrition, advances in world aquaculture, Vol. 6 [C]. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, 1997. 269 - 270.
- [2] Van Wormhoudt A. Variation of the levels of the digestive enzymes during the intermolt cycle of *Palaemon serratus*: Influence of the season and effect of eyestalk ablation [J]. Comp Bioch and Physiol, 1974, 49A: 707 - 714.
- [3] Lovett D L, Felder D L. Ontogenetic change in digestive enzyme activity of larval and postlarval white shrimp *Penaeus setiferus* (Crustacea, Decapoda, Penaeidea) [J]. Biol Bull, 1990, 178: 144 - 159.
- [4] Ribeiro F A L T, Jones D A. Growth and ontogenetic change in activities of digestive enzymes in *Fennero Penaeus indicus* postlarvae [J]. Aquaculture Nutrition, 2000, 6: 53 - 64.
- [5] Figueiredo M S R B, Anderson A J. Ontogenetic changes in digestive proteases and carboglydrases from the Australian freshwater crayfish, redclaw *Cherax quadricarinatus* (Crustacea, Decapoda, Parastacidae) [J]. Aquaculture Research, 2003, 34: 1235 - 1239.
- [6] Gamboa-Delgado J, Molina-Poveda C, Cahu C. Digestive enzyme activity and food ingesta in juvenile shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) as a function of body weight [J]. Aquaculture Research, 2003, 34: 1403 - 1411.
- [7] Van Wormhoudt A, Ceccaldi H J, Martin B. Adaptation de la teneur en enzymes digestive de l'hepatopancreas de *Palaemon serratus* (Crustacea Decapoda) a la composition d'aliments experimentaux [J]. Aquac, 1980, 21: 63 - 78.
- [8] Lee P G, Smith L L, Lawrence A L. Digestive proteases of *Penaeus vannamei* Boone: Relationship between enzyme activity, size and diet [J]. Aquac, 1984, 42: 225 - 239.
- [9] Le Moullac G, Van Wormhoudt A. Adaptation of digestive enzymes to dietary protein, carbohydrate and fibre levels and influence of protein and carbohydrate quality in *Penaeus vannamei* larvae (Crustacea, Decapoda) [J]. Aquatic Living Resources, 1994, 7(3): 203 - 210.
- [10] Le Moullac G, Klein B, Sellos D, et al. Adaptation of trypsin, chymotrypsin and alpha-amylase to casein level and protein source in *Penaeus vannamei* (Crustacea, Decapoda) [J]. J Exp Mar Biol and Ecol, 1996, 208(1-2): 107 - 125.
- [11] Lemos D, Rodriguez A. Nutritional effects on body composition, energy content and trypsin activity of *Penaeus japonicus* during early postlarval development [J]. Aquac, 1998, 160: 103 - 116.
- [12] Brito R, Rosas C, Chimal M E, et al. Effect of different diets on growth and digestive enzyme activity in *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) early post-larvae [J]. Aquaculture Research, 2001, 32: 257 - 266.
- [13] Puello-Cruz A C, Sangha R S, Jones D A, et al. Trypsin enzyme activity during larval developmental of *Litopenaeus vannamei* (Boone) fed on live feeds [J]. Aquaculture Research, 2002, 33: 333 - 338.
- [14] Jones D A, Kumlu M, Le Vay L, et al. The digestive physiology of herbivorous, omnivorous and carnivorous crustacean larvae: a review [J]. Aquac, 1997: 285 - 295.
- [15] Maugle P D. Effects of short-neck clam diets on shrimp growth and digestive enzyme activities [J]. Bull Jap Soc Fish, 1982, 48(12): 1759 - 1764.
- [16] Biesiot P M, Capuzzo J M. Digestive protease, lipase and amylase activities in stage I larvae of the American lobster, *Homarus americanus* [J]. Comp Bioch and Physiol, 1990, 95A (1): 47 - 54.
- [17] 潘鲁青, 王奎琪. 三疣梭子蟹幼体消化酶活力及氨基酸组成的研究 [J]. 水产学报, 1997, 21(3): 246 - 251.
- [18] 高露姣, 陈立侨. 中华绒螯蟹长江、瓯江、辽河三种群基因组 DNA 的 RAPD 研究 [A]. 中国动物科学研究报告 [C]. 北京: 中国林业出版社, 1999. 955 - 961.
- [19] Klein B, Sellos D, Van Wormhoudt A. Genomic organisation and polymorphism of a crustacean trypsin multi-gene family [J]. Gene, 1998, 216: 123 - 129.
- [20] Van Wormhoudt A, Favrel P. Electrophoretic characterization of *Palaemon elegans* (Crustacea, Decapoda) alpha-amylase system: study of amylase polymorphism during the intermolt cycle [J]. Comp Bioch and Physiol, 1988, 89B: 201 - 207.
- [21] Galgani F, Benyamin Y, Van Wormhoudt A. Purification, properties and immunoassay of trypsin from shrimp *Penaeus japonicus* [J]. Comp Bioch and Physiol, 1985, 81B: 447 - 452.
- [22] 许实荣, 孙 凤, 姜康后. 中国对虾营养研究-B 族维生素 (B<sub>1</sub>, B<sub>6</sub>) 对对虾蛋白酶和淀粉酶活力的影响 [J]. 海洋科学, 1987, 11(4): 34 - 37.
- [23] 林仕梅, 罗 莉, 叶元土. 中华绒螯蟹营养生理的研究 II. 蛋白能量比对中华绒螯蟹蛋白酶活力和饲料消化率的影响 [J]. 浙江海洋学院学报 (自然科学版), 2001, 20 (增刊): 62 - 65.
- [24] Galgani F G, Benyamin Y, Ceccaldi H J. Identification of digestive proteinase of *Penaeus japonicus* Bate [J]. Comp Bioch and Physiol, 1984, 78B: 355 - 361.
- [25] Peres A, Zambonino Infante J L, Cahu C. Dietary regulation of activities and mRNA levels of trypsin and amylase in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae [J]. Fish Physiol and Bioch, 1998, 19: 145 - 152.
- [26] Rodriguez A, Le Vay L, Mourente G, et al. Biochemical composition and digestive enzyme activity in larvae and postlarvae of *Penaeus japonicus* during herbivorous and carnivorous feeding [J]. Marine Biology (Berlin), 1994, 118 (1): 45 - 51.
- [27] Kumlu M, Jones D A. The effect of live and artificial diets on growth, survival, and trypsin activity in larvae of *Penaeus indicus* [J]. Journal of World Aquaculture Society, 1995, 26 (4): 406 - 415.
- [28] Le Moullac G, Klein B, Sellos D, et al. Adaptation of trypsin, chymotrypsin and alpha-amylase to casein level and protein source in *Penaeus vannamei* (Crustacea, Decapoda) [J]. J Exp Mar Biol and Ecol, 1996, 208(1-2): 107 - 125.
- [29] 董云伟, 牛翠娟, 杜 丽. 饲料蛋白水平对罗氏沼虾生长和消化酶活性的影响 [J]. 北京师范大学学报 (自然科学版), 2001, 37 (1): 96 - 99.