温度和 pH 对南美白对虾主要消化酶活性的影响

黄燕华,王国霞,刘襄河,周晔,程军德 (珠海市农业科学研究中心,广东珠海 519070)

摘要:通过改变酶反应温度和 pH,分析了南美白对虾蛋白酶、脂肪酶和淀粉酶活性的变化. 结果表明,胃、肝胰脏、肠道脂肪酶的最适温度分别为 $50\ 30\ 40\$ °、淀粉酶的最适温度均为 $30\$ °、蛋白酶的最适 pH 分别为 $6.0\ 6.0\ 7.5\$,脂肪酶的最适 pH 均为 $7.0\$,淀粉酶的最适 pH 分别为 $6.0\ 7.0\$ 。说明脂肪酶在中性时活力最高,淀粉酶在中性偏酸性时活力最高,蛋白酶在胃和肝胰脏偏酸性、在肠道中性偏碱性时活力最高。在一定温度和 pH 范围内,脂肪酶、淀粉酶的活力均呈先上升后下降的趋势。

关键词:南美白对虾;消化酶活性;温度;pH

中图分类号:S912

文献标识码:A

文章编号:1001-411X(2008)04-0087-05

Effects of Temperature and pH on Activities of Digestive Enzymes in *Penaeus vannamei*

HUANG Yan-hua, WANG Guo-xia, LIU Xiang-he, ZHOU Ye, Cheng Jun-de (Zhuhai Agriculture Research Center, Zhuhai 519070, China)

Abstract: The effects of different temperature and pH on activities of three digestive enzymes in Penaeus vannamei were examined. In stomach, hepatopancreas and intestine, the optimal temperature for lipase were 50,30,40 °C, respectively and for amylase were all 30 °C. In stomach, hepatopancreas and intestine, the optimal pH for protease were 6.0,6.0,7.0, respectively at water temperature of 40 °C, that for amylase were 6.0,7.0,6.5, and that for lipase were all 7.0. The results indicated that protease was conductive to weak acidic condition in stomach and hepatopancreas and to weak alkaline condition in intestine, lipase was conductive to neutral condition and amylase to acidic condition. The activities of lipase and amylase increased, then decreased within the test temperature or pH range.

Key words: Penaeus vannamei; activity of digestive enzymes; temperature; pH

南美白对虾 Penaeus vannmei 于 1988 年引入我国,因其具有对水环境抗逆能力强、营养要求低、生长速度快、对盐度适应范围广、离水存活时间长、抗病力强等优点,成为世界养殖三大虾种之一. 目前,关于南美白对虾的研究主要集中在人工繁育和病害防治等方面^[13],对其消化酶的研究报道较少,常见的有关于南美白对虾幼体和仔虾^[45]消化酶的研究. 本文研究了温度和 pH 对南美白对虾胃、肝胰脏、肠道主要消化酶活力的影响,为南美白对虾的消化生

理和饲料配制提供基础数据和理论依据,也为其人工饲料中添加酸化剂和外源酶制剂等提供参考.

1 材料与方法

1.1 试验材料与酶液样品制备

试验虾来源于珠海市农业科学研究中心斗门区养殖示范推广基地,属于人工淡化养殖种类,其体长8.5~10.5 cm,体质量4.7~7.3 g. 对虾运回实验室禁食暂养24 h 后用于试验.

随机选取 50 尾虾,将活虾置于冰盘内玻璃平面 皿上解剖,并将 50 尾虾的胃、肠道和肝胰脏分别混合,用 pH 计测 pH,再用预冷超纯水(4 $\,^\circ$ C,pH7.0)清洗胃、肠道内容物,滤纸吸干表面水分后分别称质量. 将胃、肝胰脏、肠道样本,按其质量分别加入 10 倍体积(m/V)预冷超纯水(4 $\,^\circ$ C,pH7.0),用玻璃匀浆器在冰浴中匀浆,取部分匀浆液直接用于测定脂肪酶活力,其余部分以 5 000 r/min,4 $\,^\circ$ C 离心 10 min,然后取上清液(即酶粗提取液)用于测定蛋白酶和淀粉酶活力,立即置 -20 $\,^\circ$ C 冰箱中备用.

1.2 方法

用 pH 计对消化道各部位的 pH 进行测定. 根据测得消化道各部位的 pH 来设定 pH 范围,以 pH 0.5 为 1 个梯度. 采用柠檬酸 – 柠檬酸钠缓冲液和磷酸氢二钠 – 磷酸二氢钠缓冲液,分别在各测定 pH 下、设定不同温度(20~60 $^{\circ}$)测酶活力来确定最适温度. 温度 40 $^{\circ}$ 0时,设不同 pH 测定酶活力,酶活力最高的为最适 pH.

1.2.1 蛋白酶活力测定 按 Folin - 酚法 $^{[6]}$ 测定鲜活组织内的蛋白酶活力. 定义在一定温度和 pH 条件下,该测定体系水解酪蛋白每分钟产生 1 μ g 酪氨酸所需的酶量为 1 个蛋白酶活力单位(U/g).

1.2.2 淀粉酶活力测定 按3,5-二硝基水杨酸显

色法(DNS 法) $^{[7]}$ 测定鲜活组织内的淀粉酶活力. 定义在一定温度和 pH 条件下,该测定体系水解淀粉每分钟产生 1 mg 麦芽糖所需的酶量为 1 个淀粉酶活力单位(1 U/g).

1.2.3 脂肪酶活力测定 按聚乙烯醇橄榄油乳化液水解法^[8]测定鲜活组织内的脂肪酶活力 定义在一定温度和 pH 条件下,该测定体系水解脂肪每分钟产生 1 μmol 脂肪酸所需的酶量为 1 个脂肪酶活力单位(U/g).

1.2.4 数据处理 结果用平均值 ± 标准误表示,用 SPSS11.5 中 ANOVA 进行方差分析,LSD 法进行多重比较.

2 结果与分析

2.1 温度对蛋白酶、脂肪酶和淀粉酶活力的影响

由表 1 知,在一定温度范围内,不同部位的脂肪酶和淀粉酶活力均呈先上升后下降的趋势,而蛋白酶活力持续升高,没有出现拐点.胃、肝胰脏和肠道脂肪酶的最适温度分别为 50、30 和 40 ℃;胃、肝胰脏和肠道淀粉酶的最适作用温度均为 30 ℃.不同部位的 3 种酶活力比较,不同温度时,蛋白酶活力的变化最大;同一温度条件下,蛋白酶活力为肝胰脏显著大于胃,胃大于肠道.

表 1 温度对蛋白酶、脂肪酶和淀粉酶活力的影响1)

 $(\bar{x} \pm SE, n = 3)$

Tab. 1 The effects of temperature on the activities of protease, lipase and amylase

————————— 器官			蛋白酶活力	脂肪酶活力	淀粉酶活力
organ	pН	t∕°C	protease activity/(U·g ⁻¹)	lipase activity/(U·g ⁻¹)	amylase activity/(U·g ⁻¹)
胃	5.5	20	96.58 ± 6.98A	33.72 ± 12.26a	65. 22 ± 0. 52 bBC
stomach		30	$285.97 \pm 3.76B$	$35.25 \pm 7.66a$	$75.11 \pm 3.32 \text{ cD}$
		40	$608.30 \pm 2.51C$	$30.65 \pm 0a$	73.99 ± 0.53 cCD
		50	1 626.74 ± 18.98D	$61.31 \pm 0b$	$63.83 \pm 0.19 \text{ bB}$
		60	$1.776.01 \pm 6.21E$	$27.03 \pm 4.49a$	$45.73 \pm 2.84 \text{ aA}$
肝胰脏	7.0	20	$1\ 216.60 \pm 45.07$ A	45.23 ±4.97 aA	108.79 ± 1.47 cC
hepatopancreas		30	$2\ 307.78 \pm 92.91B$	$110.32 \pm 7.88 \text{ cB}$	$112.10 \pm 1.77 \text{ eC}$
		40	4 808.72 ± 27.13C	$104.22 \pm 6.13 \text{ cB}$	$108.68 \pm 1.46 \text{ cC}$
		50	$7.524.13 \pm 69.53D$	$78.80 \pm 15.76 \text{ bcAB}$	$63.83 \pm 0.19 \text{ bB}$
		60	$8 341.89 \pm 0E$	$50.22 \pm 4.94 \text{ abA}$	$26.31 \pm 0.87 \text{ aA}$
肠道	7.5	20	90.58 ± 3.09 A	22.99 ±7.66 abAB	$19.23 \pm 0.79 \text{ bAB}$
intestine		30	$175.70 \pm 4.16B$	$45.27 \pm 14.62 \text{ bcAB}$	$30.37 \pm 0.88 \text{ dC}$
		40	412.64 ± 11.15C	$122.61 \pm 0 dC$	$23.80 \pm 0.88 \text{ cB}$
		50	$708.57 \pm 12.86D$	$68.97 \pm 15.33 \text{ cBC}$	$22.52 \pm 0.89 \text{ cB}$
		60	$785.05 \pm 9.20E$	0 aA	$15.64 \pm 0.55 \text{ aA}$

¹⁾以鲜活组织测定;同一部位的同列数据后小写字母不同者,示差异显著(P < 0.05);大写字母不同者,示差异极显著(P < 0.01)

2.2 3 种消化酶反应的温度系数(Q_{10})

从表 2 知,肝胰脏、肠蛋白酶和肠脂肪酶的 Q_{10} (Q_{10} = [(t + 10) $^{\circ}$ 时的酶活力]/t $^{\circ}$ 时的酶活力)随温度的升高是先升高后下降,除肠道外,胃和肝胰脏淀粉酶反应的 Q_{10} 均随温度的升高而下降,但不同组织中各种酶的 Q_{10} 有差异. 各种酶活力的上升幅度不同,以 Q_{10} 为指标. 在 20 ~ 60 $^{\circ}$ 时,不同组织蛋白酶的 Q_{10} > 1;不同组织的淀粉酶 Q_{10} 在 20 ~ 30 $^{\circ}$ 时, Q_{10} > 1,30 ~ 60 $^{\circ}$ 时, Q_{10} < 1.

2.3 pH 对蛋白酶、脂肪酶和淀粉酶活力的影响

从表 3 知,在一定 pH 范围内,除肝胰脏蛋白酶外,不同部位的蛋白酶、脂肪酶和淀粉酶的活力基本均呈先上升后下降的趋势;不同的消化酶具有不同的最适 pH,且不同部位的同一消化酶活力也有差异. 胃、肝胰脏和肠道蛋白酶的适宜pH分别为5.5

表 2 3 种消化酶反应的温度系数 (Q_{10})

Tab. 2 The temperature quotient (Q_{10}) of protease, lipase and amylase

冰小睡钟来		Q_{10}			
消化酶种类	t∕°C	胃	肝胰脏	肠道	
digestive enzyme		stomach	hepatopancreas	intestine	
蛋白酶	20 ~ 30	2.96	1.90	1.94	
protease	30 ~40	2.13	2.08	2.35	
	40 ~ 50	2.67	1.56	1.72	
	50 ~ 60	1.09	1.11	1.11	
脂肪酶	20 ~ 30	1.05	2.44	1.97	
lipase	30 ~40	0.87	0.94	2.71	
	40 ~ 50	2.00	0.76	0.56	
	50 ~ 60	0.44	0.64	0	
淀粉酶	20 ~ 30	1.15	1.03	1.58	
amylase	30 ~40	0.99	0.97	0.78	
	40 ~ 50	0.86	0.59	0.95	
	50 ~60	0.72	0.41	0.69	

表 3 pH 对蛋白酶、脂肪酶和淀粉酶活力的影响 $^{1)}$ $(t=40 \text{ }^{\circ}\text{C})$

Tab. 3 The effects of pH on the activities of protease, lipase and amylase

·		TE 台面 The activities of prof		かか 東 かて 上
器官 organ	pН	蛋白酶活力	脂肪酶活力	淀粉酶活力
		protease/(U·g ⁻¹)	lipase/(U·g ⁻¹)	amylase/(U·g ⁻¹)
胃 stomach	3.0	$70.24 \pm 6.64 \text{ aA}$		$6.49 \pm 0.08 \text{ aA}$
	3.5	$89.05 \pm 8.78 \text{ aA}$		$7.53 \pm 0.96 \text{ aA}$
	4.0	$234.54 \pm 11.15 \text{ bB}$		$17.55 \pm 1.68 \text{ bB}$
	4.5	$233.29 \pm 0 \text{ bB}$		47.20 ± 0.57 cC
	5.0	$252.10 \pm 3.76 \text{ bBC}$		$71.64 \pm 0.33 \text{ dD}$
	5.5	$278.44 \pm 3.76 \text{ cCD}$		$90.95 \pm 0.08 \text{ fE}$
	6.0	$287.85 \pm 1.89 \text{ cD}$	$15.33 \pm 3.07 \text{ bB}$	$100.96 \pm 1.60 \text{ gF}$
	6.5	$246.54 \pm 1.68 \text{ bBC}$	$39.85 \pm 3.07 \text{ dC}$	$86.62 \pm 1.52 \text{ eE}$
	7.0	$240.02 \pm 5.82 \text{ bB}$	$91.96 \pm 0 \text{ eD}$	$89.27 \pm 1.77 \text{ efE}$
	7.5		$30.65 \pm 0 \text{ eC}$	$71.64 \pm 0.97 \text{ dD}$
	8.0		$12.26 \pm 0 \text{ bB}$	$48.08 \pm 0.16 \text{ eC}$
	8.5		0 aA	
肝胰脏 hepatopancreas	6.0	$677.28 \pm 5.75 \text{ cB}$	$30.65 \pm 0 \text{ bA}$	$43.03 \pm 0.40 \text{ deD}$
	6.5	$668.51 \pm 1.25 \text{ bcAB}$	$98.09 \pm 6.13 \text{ dC}$	$44.71 \pm 0.1 \text{ eD}$
	7.0	$672.27 \pm 4.52 \text{ cAB}$	$104.22 \pm 6.13 dC$	$45.03 \pm 0.16 \text{ eD}$
	7.5	$655.96 \pm 1.25 \text{ aA}$	$58.25 \pm 3.07 \text{ cB}$	$42.15 \pm 0.16 \text{ dD}$
	8.0	$677.28 \pm 0 \text{ cB}$	$21.46 \pm 3.07 \text{ abA}$	35.74 ± 1.61 eC
	8.5	$660.35 \pm 1.88 \text{ abAB}$	$12.26 \pm 0 \text{ aA}$	$31.17 \pm 0.08 \text{ bB}$
	9.0	$658.47 \pm 0 \text{ abA}$		$26.76 \pm 0.16 \text{ aA}$
肠道 intestine	6.0	$116.11 \pm 5.06 \text{ aA}$	0 aA	$28.05 \pm 0.17 \text{ eE}$
	6.5	$124.88 \pm 7.48 \text{ abAB}$	$21.46 \pm 3.07 \text{ cdBC}$	$30.05 \pm 0.72 \text{ fE}$
	7.0	$134.93 \pm 3.31 \text{ bBC}$	$122.61 \pm 0 \text{ eD}$	$29.41 \pm 0.40 \text{ efE}$
	7.5	$184.92 \pm 3.30 \text{ dD}$	$26.06 \pm 1.54 \text{ dC}$	$23.48 \pm 0.24 \text{ dD}$
	8.0	$147.75 \pm 1.43 \text{ eC}$	$18.40 \pm 3.07 \text{ bcBC}$	$17.07 \pm 0.08 \text{ eC}$
	8.5	$137.26 \pm 0.78 \text{ bcBC}$	$12.26 \pm 0 \text{ bB}$	$12.82 \pm 0.64 \text{ bB}$
	9.0	$133.49 \pm 2.79 \text{ bABC}$		$10.10 \pm 0.32 \text{ aA}$

¹⁾以鲜活组织测定;同一部位的同列数据后小写字母不同者,示差异显著(P < 0.05);大写字母不同者,示差异极显著(P < 0.01)

 \sim 6.0、6.0 \sim 7.0 和 7.5; 胃、肠脂肪酶的均为 7.0, 而 肝胰脏的为 6.5 \sim 7.0; 胃淀粉酶的为 6.0, 肝胰脏、肠淀粉酶的均为 6.5 \sim 7.0.

3 讨论

本试验中淀粉酶和肝胰脏、肠脂肪酶的最适温 度与吴垠等[9] 对中国对虾 Fenneropenaeus chinensis、 日本对虾 Marsupenaeus japonicus 及沈文英等[10]对南 美白对虾的研究结果相吻合. 蛋白酶的最适温度在 本研究范围 20~60 ℃未出现,沈文英等[10] 的结果为 50~65 ℃, 高于吴垠等^[9]和 Maugle^[11]报道的中国对 虾、日本对虾蛋白酶最适温度分别为45~55、40~55 和 47、40 ℃. 可见,南美白对虾蛋白酶的最适温度高 于中国对虾和日本对虾,可能是由于其适宜生长在 水温较高的水域所致. 南美白对虾的最佳生长水温 为 23~28 ℃[1],3 种消化酶的最适温度均高于或接 近最佳生长温度,尤其是蛋白酶. 比较消化酶的最适 温度与环境温度,水体环境的温度一般都比酶作用 的最适温度低,目前所研究的鱼虾基本都存在这种 现象. 消化酶最适温度的测定是在试验规定的反应 时间条件下进行的,而实际虾体内酶作用的时间要 长得多,因此最适温度只在一定条件下才具有意义, 但在一定程度上却反映了消化酶的耐热性和温度对 消化酶活力的影响规律. 本试验中不同消化部位蛋 白酶活力随温度的变化变异幅度极大,与吴垠等[9] 报道的结果类似. 另外,在酶活定义一致的条件下, 本文不同组织中的蛋白酶、脂肪酶和淀粉酶活力大 于沈文英等[10]报道的南美白对虾酶活力结果,可能 与粗酶液的制备条件、对虾规格和生长环境等不同 有关.

酶作用的 Q_{10} 是温度每升高 10 ℃时反应速度增加的倍数,是酶在一定条件下的一个特征值. 本试验结果与吴垠等^[9] 报道的在 $5 \sim 60$ ℃ 时中国对虾、日本对虾的 Q_{10} 均随温度的升高而降低不完全一致,可能是种间差异. 关于对虾这方面的报道不多,有待更多的验证研究.

蛋白酶在不同部位的最适 pH 不同,胃蛋白酶的为 5.5~6.0,与南美白对虾胃内 pH(5.4~5.5)基本一致,表明对虾胃蛋白酶在偏酸性条件下活性最高,这与沈文英等^[10]的报道吻合.本文数据显示,肝胰脏蛋白酶适宜 pH 为 6.0~7.0,肠道为 7.5,与组织检测结果较为相似.在各自最适 pH 条件下,不同部位蛋白酶活力为肝胰脏显著大于胃和肠的,说明蛋白酶主要分布于肝胰脏,肝胰脏蛋白酶分泌进入胃、

肠道后,活力迅速下降,这与刘玉梅等^[12]、潘鲁青等^[7]和许培玉等^[13]报道的主要消化酶活性研究的结果基本一致,而 Dask 等^[14]研究发现,肝胰脏主要分泌蛋白酶原,其蛋白酶活力微弱或几乎没有,而肠道分泌肠激酶,能激活蛋白酶原,共同促进肠道对食物蛋白质的消化吸收,梅景良等^[15]对黑鲷 Sparus macroce phalus 体内蛋白酶活力的研究有类似的报道. 这些差异说明甲壳类与鱼类消化酶的分泌机制不同,同时也说明甲壳动物分类地位相近的种类的消化酶活力规律类似.

南美白对虾脂肪酶的活力较低,与一些学者在其他甲壳类动物中得到的结果一致. 沈文英等^[10]报道南美白对虾脂肪酶最适 pH 均为 7.7,为弱碱性. 本文南美白对虾肝胰脏和肠的蛋白酶、脂肪酶的最适 pH 均偏碱性,说明偏碱性条件有利于蛋白酶、脂肪酶活力的发挥,这可能与南美白对虾适宜生长在 pH 为 8.0~9.0 的偏碱性水环境有关.

大多数甲壳类动物淀粉酶的最适 pH 偏酸性,在 pH 为 5~7 范围内^[16].本文淀粉酶的适宜 pH 范围为 6.0~7.0,偏酸性,与南美白对虾消化道内的 pH 范围保持基本一致.李广丽等^[17]对中华绒鳌蟹 *Eriocheir sinensis* 淀粉酶活性测定,表明河蟹淀粉酶在偏酸性的情况下活性最高.于书坤^[18]报道中国对虾淀粉酶的最适 pH 为 5.0~6.0,本试验进一步证实了淀粉酶在偏酸性条件下活性较高.

参考文献:

- [1] 王吉桥. 南美白对虾健康养殖技术: I 南美白对虾的生物学[J]. 水产科学,2002,21(5):43-46.
- [2] 叶海辉,王桂忠,金朱兴,等. 南美白对虾视神经节和脑免疫细胞化学研究[J]. 海洋与湖沼,2004,35(1):78-83.
- [3] ZARAIN H M, ASCENSIO V F. Taura syndrome in Mexico: follow-up study in shrimp farms of sinaloa [J]. Aquac, 2001,193:1-9.
- [4] 迟淑艳,杨奇慧,周歧存,等.南美白对虾幼体和仔虾淀粉酶和脂肪酶活力的研究[J].水产科学,2005,24(4):
- [5] 王淑红,陈昌生,刘志勇,等.南美白对虾幼体消化酶活力的初步研究[J].厦门大学学报,2004(3):389-392.
- [6] 北京大学生物系生物化学教研室. 生物化学实验指导 [M]. 北京:人民教育出版社,1979:73-74.
- [7] 潘鲁青,王克行.中国对虾幼体消化酶活力的试验研究 [J].水产学报,1997,21(1):26-31.
- [8] 朱俭,曹凯鸣,周润琦,等.生物化学试验[M].上海:上海科学技术出版社,1981;190-193.

(下转第94页)

目的基因的重组子和缺失部分基因的竞争质粒采用同一对引物进行扩增时,出现扩增片段上大小差异的2个分子,通过二者的拷贝数比值与初始时相应目的基因加入的分子数间的相关性,构建标准竞争曲线和直线回归方程,进而采用曲线及方程对含有目的基因的样品与缺失部分基因的竞争质粒间竞争结果计算出含目的基因样品的模板含量.与实时定量 PCR 相比,该方法经济、方便且不需要高端设备,更适合拥有常规 PCR 仪且需对靶基因的定量分析.

根据 qc-PCR 采用的竞争模板不同又可分为 DNA 或 RNA 模板两类^[9-10].采用 RNA 作为竞争模 板虽然兼顾反转录效率对试验的影响,但难以确定竞争模板的稀释范围.据相关研究结果,即便采用 RNA 作为竞争模板也难保证扩增效率一致,因为对于来自 SP6、T7 或 T3 RNA 聚合酶体外转录获得的 RNA,除了要完全消化掉线性化的模板 DNA 外,一些未能完全转录的大小不一且占较高比例 RNA,对于真正起到竞争作用的 RNA 存在一定程度的干扰,进而影响试验结果的可信度^[9-10].本研究采用 DNA 作为竞争模板,尽管存在忽略反转录效率对构建曲线的影响之不足,但因其稳定、操作简单、容易确定竞争模板的稀释范围等优点而显示出较好的应用前景.

参考文献:

- [1] 金伯泉. 细胞和分子免疫学[M]. 北京:科学出版社, 2001:232-239.
- [2] 杨汉春,姚火春,王君伟. 动物免疫学[M]. 2版. 北京:中国农业大学出版社,2003:66-178.
- [3] 萨姆布鲁克 J,拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南[M]. 3 版. 黄培堂等译. 北京:科学出版社,2003:26-701.

- [4] 郑洁,郭鑫,杨汉春,等. PRRS 病毒感染对猪细胞因子 IL-2、IL-4、IL-10 mRNA 转录的影响[J]. 畜牧兽医学 报,2003,34(5):484-489.
- [5] DUFOUR V, ARNAULD C, LANTZ O, et al., Quantification of porcine cytokine gene expression using RT-PCR, a homologous internal control and chemiluminescence for miroplate detection [J]. J Immunol Methods, 1999, 229: 49-60.
- [6] IN-SOO C, ELLEN W C, SAMUEL K M, et al. Evalutation of cytokine gene expression in porcine spleen cells, peripheral blood mononuclear cells, and alveolar macrophages by competitive RT-PCR [J]. FEMS Immunol Med Microbiol, 2002,34: 119-126.
- [7] BRUNBORG I M, MOLDAL T, JONASSEN C M. Quantitation of porcine circovirus type 2 isolated from serum/plasma and tissue samples of healthy pigs and pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome using a TaqMan-based real-time PCR [J]. J Virol Methods, 2004, 123(2): 171-178.
- [8] CHUNG W B, CHAN W H, CHAUNG H C, et al. Realtime PCR for quantitation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus type 2 in naturally-infected and challenged pigs [J]. J Virol Methods, 2005, 124(1-2): 11-19.
- [9] MANSFIELD LS, URBAN JF, MURTAUGH MP, et al. Const ruction of internal cDNA competitors for mearuring IL-10 and IL-12 cytokine gene expression in swine [J]. Vet Immunol Immuno-Pathol, 1998, 65: 63-74.
- [10] JOHN S B, SIVADASAN K, BARRY T. Rouse limitation and modifications of quantitative polymerase chain reaction [J]. J Immunol Methods, 1993, 65: 207-216.

【责任编辑 柴 焰】

(上接第90页)

- [9] 吴垠,孙建明,周遵生.温度对中国对虾、日本对虾主要消化酶活性的影响[J].大连水产学院学报,1997,12 (2):15-22.
- [10] 沈文英,胡洪国,潘雅娟. 温度和 pH 值对南美白对虾 消化酶活性的影响[J]. 海洋与湖沼,2004,35(6):543-548.
- [11] MAUGLE PAUL D. Effects of shot-necked clam diet on shrimp growth and digestive enzyme activities [J]. Bull Jap Soc Sci Fish, 1982, 48 (12):1759-1754.
- [12] 刘玉梅,朱谨钊. 中国对虾幼体和仔虾消化酶活力及氨基酸组成的研究[J]. 海洋与湖沼,1991,22(6):571-575.
- [13] 许培玉,周洪琪. 小肽制品对凡纳滨对虾蛋白酶和淀粉酶活力的影响[J]. 上海水产大学学报,2005,14(2): 133-137.

- [14] DAS K M, TRIPATHI S D. Studies on the digestive enzymes of grass carp, Ctenopharyngodon idella (Val) [J]. Aquac, 1991, 92:21-32.
- [15] 梅景良,马燕梅,王宏,等. pH 值对黑鲷胃肠道及肝胰脏主要消化酶活力的影响[J]. 云南农业大学学报, 2004,19(5):592-596.
- [16] 潘鲁青,刘涨宇,肖国强. 甲壳动物幼体消化酶研究进展[J]. 中国水产科学,2006,13(3):492-501.
- [17] 李广丽,李思发. 长江、瓯江、辽河中华绒鳌蟹消化酶的 初步研究[J]. 上海水产大学学报,1996,5(2):134-137.
- [18] 于书坤. 中国对虾消化酶的研究[J]. 海洋科学集刊, 1987,28(10):89-90.

【责任编辑 柴 焰】