

赵莎莎,周泽伟,郑玲敏,等. 饲用 *L*-色氨酸添加剂的 Ames 试验[J]. 江苏农业科学,2015,43(11):287-289.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.11.089

# 饲用 *L*-色氨酸添加剂的 Ames 试验

赵莎莎<sup>1</sup>, 周泽伟<sup>2</sup>, 郑玲敏<sup>2</sup>, 陈秀云<sup>2</sup>, 张雨梅<sup>2,3</sup>

(1. 江苏农牧科技职业学院,江苏泰州 225300;2. 扬州大学兽医学院,江苏扬州 225009;

3. 江苏省动物重要疫病与人兽共患病防控协同创新中心,江苏扬州 225009)

**摘要:**通过对饲用 *L*-色氨酸进行鼠伤寒沙门氏菌回复突变试验(Ames 试验),评价该饲料添加剂的潜在致突变性。饲用 *L*-色氨酸在 0.008~5.000 mg/皿的范围内分为 5 个剂量组,在加(+)S9、不加(-)S9 的情况下,以 TA97、TA98、TA100、TA102 为试验菌株进行 Ames 试验。以敌克松等作为阳性对照,灭菌水为空白对照,二甲基亚砜为溶剂对照,采用双盲法计算回复突变菌落数。结果表明,阳性对照试验各菌株反应合格;饲用 *L*-色氨酸无论在加(+)S9、不加(-)S9 的情况下,4 株试验菌的平均回变菌落数均小于阴性(溶剂)对照组的 2 倍,未见剂量-反应关系,且 2 次试验结果一致。饲用 *L*-色氨酸的 Ames 试验结果为阴性,表明该饲料添加剂无体外致突变性。

**关键词:** *L*-色氨酸;Ames 试验;饲料添加剂

**中图分类号:** S816.71 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)11-0287-02

*L*-色氨酸是人和动物的必需氨基酸之一,参与机体蛋白质合成和营养代谢调节。色氨酸在体内合成极少,须从外界摄取满足机体需要。国内外在食品中已广泛将 *L*-色氨酸作为食品添加剂,以强化对蛋白质的利用率,对于强化食品提高植物蛋白的利用率具有重要作用<sup>[1]</sup>。

*L*-色氨酸是继赖氨酸、蛋氨酸之后的又一个重要的饲料添加氨基酸。色氨酸的代谢产物 5-羟基色氨酸在动物体内有抗高密度、断奶等应激作用,还能促进  $\gamma$ -球蛋白的产生、增强机体抗病能力<sup>[2-3]</sup>。在低蛋白饲料中添加色氨酸对改善饲料效率、提高畜禽增重和家禽生产性能<sup>[4-6]</sup>、增强免疫功能十分有效<sup>[7-10]</sup>。Li 等在饲料中添加 0.04% *L*-色氨酸可显著提高蛋雏鸭平均日增质量、饲料转化率<sup>[6]</sup>。周斌等研究发现,在含 0.06% *L*-色氨酸的日粮中额外添加 0.03%、0.06%、0.09% *L*-色氨酸,可显著提高 0~3 周龄肉仔鸡平均日增质量<sup>[7]</sup>。*L*-色氨酸有促进骨髓 T 淋巴细胞前体分化为成熟 T 淋巴细胞,具有免疫增强作用<sup>[11-12]</sup>,*L*-色氨酸缺乏则会导致体液免疫功能降低<sup>[13]</sup>。鸡饲料中添加 *L*-色氨酸可显著提高  $\alpha$  干扰素、 $\gamma$  干扰素和 IgG 水平,同时在传染性法氏囊病免疫方面作用显著。

在蛋雏鸭饲料中添加 0.04% *L*-色氨酸可显著提高蛋雏鸭脾脏指数,添加 0.06% *L*-色氨酸可显著提高蛋雏鸭胸腺指数。由于 *L*-色氨酸生产工艺不断改进、生产成本逐渐降低,其作为饲料添加剂在畜禽生产中的应用越来越广泛。本研究通过鼠伤寒沙门氏菌回复突变试验(Ames 试验)评价某企业新的生产工艺生产的饲用 *L*-色氨酸的致突变性。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 受试物及溶液配制 饲用 20% *L*-色氨酸,批号 20130409,黄色颗粒,由浙江某生物股份有限公司提供。

饲用 *L*-色氨酸充分研磨后,称取 5.00 g 溶于 100 mL 灭菌蒸馏水中。用直径 50 mm 的无菌滤膜(孔径 0.22  $\mu$ m)过滤除菌,用灭菌蒸馏水梯度稀释至所需浓度,现配现用。

阳性对照物:2-氨基苄(2-AF),纯度 >99%,日本东京化成工业株式会社;敌克松,纯度 98.8%,美国 DIMA 技术有限公司;4-硝基喹啉-*N*-氧化物、甲基磺酸甲酯,纯度均大于 98%,美国 Amresco 公司;多氯联苯(Aroclor1254),美国 Crescent Chemical 有限公司。阳性对照物均用二甲基亚砜作为溶剂配制成相关浓度。

1.1.2 试验菌株 TA<sub>97</sub>、TA<sub>98</sub>、TA<sub>100</sub>、TA<sub>102</sub> 菌株由江苏省疾病预防控制中心提供,-80℃ 保存。试验菌株生物学特性按 GB 15193.4—2003《鼠伤寒沙门氏菌/哺乳动物微粒体酶试验》标准方法鉴定,符合试验要求。

### 1.2 试验方法

1.2.1 大鼠肝微粒体酶的诱导和 S9 的制备 雄性成年 Wistar 大鼠 2 只,多氯联苯(Aroclor1254)溶于玉米油中制成 200 mg/mL 溶液,按 500 mg/kg 腹腔注射作为诱导剂。按 GB 15193.4—2003《鼠伤寒沙门氏菌/哺乳动物微粒体酶试验》方法制备 S9,生物活性鉴定合格后,-80℃ 保存备用。

1.2.2 平板掺入法 Ames 试验 根据预试验结果,受试物饲用 *L*-色氨酸的剂量设置分别为 5.00、1.00、0.20、0.04、8.00  $\mu$ g/皿;另设阴性(溶剂)对照组和阳性对照组,每个试验组分加(+)S9、不加(-)S9 等 2 个系列,每个系列设 3 个平行皿。阳性对照组:加 S9 时,4 株菌株均用 2-氨基苄(2-AF),浓度为 100  $\mu$ g/mL[0.1  $\mu$ g/( $\mu$ L·皿)];不加 S9 时,TA<sub>97</sub>、TA<sub>98</sub> 用敌克松,浓度为 0.5 mg/mL[0.5  $\mu$ g/( $\mu$ L·皿)],TA<sub>100</sub> 用 4-硝基喹啉-*N*-氧化物,浓度为 5  $\mu$ g/mL

收稿日期:2015-03-23

基金项目:江苏高校优势学科建设工程项目;扬州大学新世纪人才工程。

作者简介:赵莎莎(1979—),女,江苏徐州人,讲师,主要从事实验室教学工作。E-mail:157568300@qq.com。

通信作者:张雨梅,博士,教授。E-mail:zym@yzu.edu.cn。

[0.005 μg/(μL·皿)], TA<sub>102</sub> 用甲基磺酸甲酯, 浓度为 10 μg/mL[0.01 μg/(μL·皿)]。

双盲法记录每皿回变菌落数。按 GB 15193.4—2003《鼠伤寒沙门氏菌/哺乳动物微粒体酶试验》的标准判定 Ames 试验结果为阴性或阳性。

1.2.3 观察指标 整个试验过程中需观察试验菌是否正常生长, 阴性对照组每皿自发回变菌落数是否在正常范围, 阳性对照试验各菌株反应是否合格。

双盲法记录受试物各剂量组、阳性对照组、溶剂对照组和空白对照(自发回变)的每皿回变菌落数。

1.2.4 结果判定 如果受试物的回变菌落数是溶剂对照组回变菌落数的 2 倍或 2 倍以上、受试品的回复突变数的增加

与剂量相关并有统计学意义、某一剂量组呈现可重复的回复突变数增加并有统计学意义, 则判为诱变阳性(有致突变作用), 反之为阴性。

2 结果与分析

4 种试验用鼠伤寒沙门氏菌株菌苔生长正常, 阳性对照试验各菌株反应合格。2 次重复试验结果见表 1、表 2。饲用 L-色氨酸饲料添加剂剂量在 0.008~5.0 mg/皿范围内, 加或不加 S9 时, 4 株试验菌的平均回变菌落数均未超过阴性(溶剂)对照组的 2 倍, 未见剂量-反应关系, 且 2 次试验结果一致。

表 1 第 1 次饲用 L-色氨酸鼠伤寒沙门氏菌回复突变试验结果

组别	TA <sub>97</sub> 菌落数(CFU/皿)		TA <sub>98</sub> 菌落数(CFU/皿)		TA <sub>100</sub> 菌落数(CFU/皿)		TA <sub>102</sub> 菌落数(CFU/皿)	
	- S9	+ S9	- S9	+ S9	- S9	+ S9	- S9	+ S9
5.0 mg/皿	134.67±29.48	128.00±32.19	39.33±4.04	31.33±1.15	160.33±36.53	169.67±4.04	275.00±31.22	255.33±31.02
1.0 mg/皿	138.67±35.08	115.33±13.80	41.67±1.53	33.33±2.52	153.33±10.41	164.00±5.29	268.00±32.51	276.00±29.10
0.2 mg/皿	144.67±26.56	125.00±18.19	39.67±5.51	37.00±5.57	161.33±8.08	162.00±14.42	254.67±5.03	275.67±8.50
0.04 mg/皿	142.67±40.86	100.00±14.00	36.00±3.46	36.67±9.87	148.33±14.57	158.67±30.62	250.00±13.23	266.67±11.55
0.008 mg/皿	133.33±40.81	120.67±34.08	41.33±4.04	35.33±4.04	164.00±14.42	172.33±6.03	250.00±17.06	276.67±15.28
灭菌水	138.67±22.03	116.67±39.46	35.33±1.53	36.33±4.73	160.33±14.57	155.00±14.93	252.33±2.08	249.00±12.17
二甲基亚砷	126.67±30.55	110.67±16.77	34.00±1.73	35.33±3.79	147.67±16.56	158.00±4.36	269.67±25.17	250.67±21.13
阳性对照	敌克松	2-AF	敌克松	2-AF	4-硝基喹啉-N-氧化物	2-AF	甲基磺酸甲酯	2-AF

表 2 第二次饲用 L-色氨酸鼠伤寒沙门氏菌回复突变试验结果

组别	TA <sub>97</sub> 菌落数(CFU/皿)		TA <sub>98</sub> 菌落数(CFU/皿)		TA <sub>100</sub> 菌落数(CFU/皿)		TA <sub>102</sub> 菌落数(CFU/皿)	
	- S9	+ S9	- S9	+ S9	- S9	+ S9	- S9	+ S9
5.0 mg/皿	131.33±39.31	126.33±12.42	37.67±2.52	41.00±2.00	152.00±10.58	153.67±31.88	252.00±15.72	253.33±12.86
1.0 mg/皿	133.33±16.17	111.00±10.54	35.00±3.00	33.67±2.52	161.33±6.66	166.00±19.97	250.33±5.51	258.33±19.60
0.2 mg/皿	115.00±7.00	116.67±7.64	36.00±3.46	38.67±3.21	152.67±10.07	140.00±34.64	280.00±28.51	256.00±19.70
0.04 mg/皿	129.67±34.96	125.33±18.61	39.67±6.03	36.00±6.08	148.00±19.29	153.33±30.55	251.33±18.77	248.00±11.79
0.008 mg/皿	126.67±8.33	116.00±17.78	31.67±1.53	35.00±7.81	143.33±22.55	155.33±22.50	260.33±28.92	247.33±14.47
灭菌水	116.00±8.00	113.67±10.69	40.33±7.51	37.67±3.79	149.67±14.64	144.33±20.03	250.67±8.08	251.67±15.82
二甲基亚砷	132.67±37.23	103.67±6.03	38.33±7.64	37.33±4.62	162.67±12.86	148.33±16.81	257.00±23.52	255.33±19.66
阳性对照	敌克松	2-AF	敌克松	2-AF	4-硝基喹啉-N-氧化物	2-AF	甲基磺酸甲酯	2-AF

3 结论与讨论

在本研究中, 饲用 L-色氨酸饲料添加剂的鼠伤寒沙门氏菌突变试验结果为阴性, 表明饲用 L-色氨酸饲料添加剂对鼠伤寒沙门氏菌试验株无致突变性。

Ames 试验是遗传毒理学的一种体外试验, 遗传学终点是基因突变, 用于检测受试物能否引起鼠伤寒沙门氏菌基因组碱基置换或移码突变。如果对饲用 L-色氨酸进一步进行小鼠微核试验、精子畸形试验、染色体畸变试验、姊妹染色体交换试验或显性致死试验, 则可以更全面地评价其致突变作用。

参考文献:

[1] 李剑欣, 张绪梅, 徐琪寿. 色氨酸的生理生化作用及其应用[J]. 氨基酸和生物资源, 2005, 27(3): 58-62.  
[2] 徐洪利, 赵斐, 左良成, 等. 饲用色氨酸应用研究进展[J]. 安

徽农业科学, 2013(13): 5750-5752.  
[3] Leuchtenberger W, Huthmacher K, Drauz K. Biotechnological production of amino acids and derivatives: current status and prospects[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2005, 69(1): 1-8.  
[4] Eitle T, Roth F X. Specific dietary selection for tryptophan by the piglet[J]. Journal of Animal Science, 2004, 82(4): 1115-1121.  
[5] 王荣发, 李敏, 贺喜等. 低蛋白质饲料条件下生长猪对色氨酸需要量的研究[J]. 动物营养学报, 2011(23): 1669-1676.  
[6] Li Y Z, Kerr B J, Kidd M T, et al. Use of supplementary tryptophan to modify the behavior of pigs[J]. Journal of Animal Science, 2006, 84(1): 212-220.  
[7] 周斌, 李慧, 邹晓庭, 等. 色氨酸对产蛋鸡脂肪代谢的影响[J]. 中国畜牧杂志, 2011, 47(7): 50-53.  
[8] 韩旭峰, 高玉鹏, 侯水生, 等. 1~14 日龄北京鸭色氨酸需要量的研究[J]. 中国饲料, 2009(22): 22-23.  
[9] 刘肖挺, 王安, 杨小燕, 等. 色氨酸对蛋雏鸭生长性能和营养物

尹柏双,王秋竹,付连军,等. 不同程度隐性乳房炎奶牛乳清中结合珠蛋白的变化[J]. 江苏农业科学,2015,43(11):289-290.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.11.090

# 不同程度隐性乳房炎奶牛乳清中结合珠蛋白的变化

尹柏双<sup>1,2</sup>, 王秋竹<sup>1</sup>, 付连军<sup>1</sup>, 郝景锋<sup>1</sup>, 沙万里<sup>1</sup>

(1. 吉林农业科技学院动物科技学院, 吉林吉林 132101; 2. 长白山动植物资源利用与保护吉林省高校重点实验室, 吉林吉林 132101)

**摘要:**为研究奶牛隐性乳房炎发病程度与乳清中结合珠蛋白(HP)含量变化的关系,选取6头健康奶牛和18头患轻、中、重度隐性乳房炎奶牛为试验动物,采集乳样、分离乳清,利用HP ELISA检测试剂盒测定样品中HP含量。结果发现,随着隐性乳房炎病情加重、乳汁体细胞数的增加,乳清中HP含量逐渐升高,与健康对照组比较升高极显著( $P < 0.01$ )。结果表明,乳清中HP含量变化与隐性乳房炎发病具有一定相关性,乳腺损伤程度和乳汁体细胞数与乳清中HP含量呈正相关。

**关键词:**隐性乳房炎;奶牛;乳清;结合珠蛋白

**中图分类号:** S858.232<sup>+</sup>.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)11-0289-02

奶牛乳房炎是危害奶牛养殖业最严重的疾病之一,其中隐性乳房炎发生率最高。隐性乳房炎可引起泌乳奶牛产奶量下降、牛奶品质降低、养殖成本增加、产后发情延长、妊娠时间推迟,给奶牛养殖业带来巨大经济损失<sup>[1]</sup>。结合珠蛋白(HP)是血清 $\alpha_2$ 球蛋白组中的一种酸性糖蛋白,在哺乳动物血液和其他体液中广泛分布,具有结合炎症疾病标记物、游离血红蛋白、抗菌、免疫调节等主要功能<sup>[2-6]</sup>。Grönlund等研究表明,在金黄色葡萄球菌引起奶牛乳房炎的急性期,血清结合珠蛋白的表达量增加<sup>[7]</sup>。杨永新等研究表明,临床型乳房炎奶牛乳汁中结合珠蛋白表达量显著增加<sup>[8]</sup>。本试验研究乳清中结合珠蛋白表达量与不同程度奶牛隐性乳房炎发病的关系,以期对隐性乳房炎判定提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验动物

通过乳汁体细胞计数监测后选择年龄、胎次、产奶量、泌乳期等指标相近的健康奶牛6头和患不同程度奶牛隐性乳房炎奶牛18头,由吉林市某奶牛场提供。

收稿日期:2014-11-10

基金项目:吉林省科技厅重点科技攻关项目(编号:20130206040NY);吉林省教育厅“十二五”科学技术项目(编号:吉教科合字 2013339);吉林市科技局杰出青年培育专项(编号:2013625019);吉林农业科技学院重点学科培育项目(编号:吉农科合字 2013X021)。

作者简介:尹柏双(1978—),男,黑龙江哈尔滨人,博士,副教授,从事奶牛乳腺疾病方向的研究工作。E-mail: ybs3421@126.com。

质代谢影响[J]. 中国饲料,2012,(19):22-25.

[10]王鹏,王安,李丽娟. 饲料中色氨酸对0~3周龄肉仔鸡生长性能及血液生化指标的影响[J]. 饲料工业,2010,31(20):8-11.

[11]程镇燕,陈韶阳,乔秀亭. 鱼类功能性氨基酸营养免疫研究进展[J]. 饲料研究,2014(9):52-57.

[12]Lepage O, Tottmar O, Winberg S. Elevated dietary intake of

### 1.2 主要试剂与仪器

结合珠蛋白(HP)含量测定用HP ELISA试剂盒,购于南京建成生物试剂研究所;主要仪器有Fossmatic 5000体细胞计数仪(FOSS公司,丹麦)、Varioskan酶标仪(Thermo公司,美国)、离心机(Sigma公司,美国)。

### 1.3 试验动物分组

通过乳汁体细胞计数监测后将试验奶牛分成健康对照组[6头,体细胞数量(SCC)  $< 10 \times 10^4$  个/mL]、轻度隐性乳房炎组(6头,  $50 \times 10^4$  个/mL  $< \text{SCC} < 150 \times 10^4$  个/mL)、中度隐性乳房炎组(6头,  $150 \times 10^4$  个/mL  $< \text{SCC} < 500 \times 10^4$  个/mL)、重度隐性乳房炎组(6头,  $\text{SCC} > 500 \times 10^4$  个/mL)。

### 1.4 乳样采集

采集试验奶牛的乳汁,采样前对乳区进行清洗,然后用70%乙醇消毒乳区,弃掉前3把乳汁,分别采10 mL乳装入无菌试管中,将采集的乳样放到冰盒中,带回实验室检测。

### 1.5 乳清制备

将采集的乳样于3 000 r/min离心5 min,除去上层乳脂,然后于16 000 r/min高速离心机中离心10 min,去除沉淀,保留上清,4℃条件下保存、待测。

### 1.6 检测方法

乳汁体细胞计数采用体细胞计数仪测定;HP含量采用HP ELISA试剂盒测定,在酶标仪上比色测定 $D_{450 \text{ nm}}$ 吸光值,根据试剂盒说明绘制标准曲线后计算HP含量。

### 1.7 数据处理

采用SPSS 17.0数据分析系统作单因素方差分析,结果以“均值±标准差”表示, $P < 0.01$ 为差异极显著, $P < 0.05$ 为

*L*-tryptophan counteracts the stress-induced elevation of plasma cortisol in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. The Journal of Experimental Biology, 2002, 205 (Pt 23): 3679-3687.

[13]Koopmans S J, Ruis M, Dekker R, et al. Surplus dietary tryptophan reduces plasma cortisol and noradrenaline concentrations and enhances recovery after social stress in pigs [J]. Physiology & Behavior, 2005, 85 (4): 469-478.