

# 反刍动物营养需要及

FCDWYYXYJSLYYJZPDYYY

# 饲料营养价值评定与应用

莫放 主编

黄洁 姜军 副主编



中國農業大學出版社

ZHONGGUONONGYEDAXUE CHUBANSHE

# 反刍动物营养需要及饲料 营养价值评定与应用

莫 放 主编  
黄 洁 姜 军 副主编

中国农业大学出版社  
· 北京 ·

## 内 容 简 介

随着我畜牧业的快速发展,奶牛、肉牛、羊等养殖逐渐规模化,形成区域的产业带,而养殖业的发展必然在饲料(粮食)上与人类竞争。为了更高效、更合理地利用饲料,减少养殖业饲料利用与人类粮食利用的竞争,我们必须准确、全面地评价各类饲料原料的营养价值以及动物本身对各营养物质的需要量。本书总结了反刍动物营养需要及饲料营养价值评定的各种方法,并将其分章归类,为新饲养标准修订提供方法学的参考依据。本书主要包括反刍动物营养实验技术、反刍动物营养需要量的研究以及反刍动物营养需要量和饲料科学的生产应用与实践。

本书可作为农业院校教师、学生以及从事反刍动物饲养研究的工作人员使用。

### 图书在版编目(CIP)数据

反刍动物营养需要及饲料营养价值评定与应用/莫放主编. —北京:中国农业大学出版社, 2011. 5

ISBN 978-7-5655-0294-1

I. ①反… II. ①莫… III. ①反刍动物-家畜营养学-研究②反刍动物-饲料-营养价值-研究 IV. ①S823. 5

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2011)第 086771 号

书 名 反刍动物营养需要及饲料营养价值评定与应用

作 者 莫 放 主 编

策划编辑 潘晓丽

责任编辑 赵 欢

封面设计 郑 川

责任校对 陈 莹 王晓凤

出版发行 中国农业大学出版社

社 址 北京市海淀区圆明园西路 2 号

邮政编码 100193

电 话 发行部 010-62731190,2620

读者服务部 010-62732336

编辑部 010-62732617,2618

出版部 010-62733440

网 址 <http://www.cau.edu.cn/caup>

e-mail [cbsszs@cau.edu.cn](mailto:cbsszs@cau.edu.cn)

经 销 新华书店

印 刷 北京时代华都印刷有限公司

版 次 2011 年 5 月第 1 版 2011 年 5 月第 1 次印刷

规 格 787×1092 16 开本 21 印张 513 千字

定 价 55.00 元

图书如有质量问题本社发行部负责调换

## 编写人员

主 编 莫 放

副主编 黄 洁 姜 军

编校者 中国农业大学动物营养学国家重点实验室

曹 琼 陈 静 崔京京 葛素云 黄 洁

姜 军 李雪娇 莫 放 申跃宇 王消消

张 艳

中国畜牧兽医学会动物营养学分会 窦志斌

# 序

为配合中国畜牧兽医学动物营养学分会反刍动物营养专题组召开的第三届全国反刍动物营养学术研讨会,特编辑出版了《反刍动物营养需要及饲料营养价值评定与应用》一书供参考。

我国是反刍动物产业大国,改革开放以来发展迅速,出现了一批较先进的规模化饲养场和饲料企业。但小饲养户的副业生产方式仍占较大比例,其产量和效率较低。发达国家配合饲料生产中反刍动物配合饲料产量约占1/3,而我国则缺少现代化的反刍动物配合饲料大型生产企业,配合饲料的技术含量参差不齐。因此,我国成为反刍动物产业强国任重而道远,反刍动物研究肩负着创新和为生产服务的双重任务。

在“五五”至“十二五”期间,反刍动物研究均被列为部委的科研项目,经有关科技工作者辛勤工作,取得了系统的成果,填补了空白,研究水平有很大提高。各国都在研究成果的基础上提出了符合各自国情的饲养营养标准。我国已研究出有特色的净能营养体系、蛋白质和氨基酸营养体系等,为今后进行进一步推广和深入研究打下了基础。

由于反刍动物的生理特性有异于单胃动物,导致研究的复杂性和难度,其中很多问题至今仍是国际研究的热点。反刍动物日粮包括精饲料和粗饲料,各种养分在精粗饲料中的分配及之间的互作和转化效率的表现和内在规律,还需深入研究。此外,我国反刍动物的种类很多,包括奶牛、肉牛、水牛、牦牛、毛用羊和肉用羊、鹿等,其饲料养分转化规律各异,对一些消化代谢规律尚不清楚。我国地域辽阔,各地饲料资源种类繁多,有待进一步的营养价值研究和评定。

学术研讨会是学术交流的重要途径,百家献计,通过研讨,求得今后研究方向的共识,可进一步提高科研水平。

冯仰廉

2011. 4. 24

# 前 言

动物营养需要(饲养标准)、饲料营养价值评定和动物营养代谢是动物营养学的三大永恒主题,也是饲料工业的科学基础,其中饲养标准和饲料营养价值评定是饲料工业向精确化、标准化发展的重要技术支撑。现今动物科学技术突飞猛进,动物生产水平与效率达到了惊人的高度,而我国现行的饲养标准还是十几年前制定的(或者有的畜种没有相应的饲养标准),近些年又出现许多新型饲料,旧的饲养标准已经不再适用于现代养殖业了。

饲养标准和饲料营养价值评定是动物生产和饲料工业发展的重要基础,而反刍动物的基础试验方法又是修订饲养标准和评定饲料营养价值的基础,参与此次反刍动物(奶牛、肉牛、肉羊、绒山羊)饲料标准修订的单位之前的研究方向和研究领域可能与饲料标准制定和饲料营养价值评定的基础试验内容有一定的差异,对反刍动物基础试验方法的了解不是很系统,所以为配合 2011 年 5 月份的反刍动物营养学术研讨会,编者特别收集和整理了有关反刍动物的试验技术和试验方法论文,还对以往有关饲养标准制定和饲料营养价值评定的学术论文进行了整理,为会议讨论及饲料标准和饲料营养价值评定工作提供参考。

在资料收集和整理的过程中,由于参加人员数量有限,时间略显仓促,所以编者在此对本书中的不足之处深表歉意!同时,编者对所有被引用资料的作者和投稿作者表示由衷的感谢!

本书由英联副产品(亚洲)和中国农业大学动物营养学国家重点实验室资助出版,在此表示诚挚的感谢!

编 者

2011 年 3 月

# 目 录

第一章 反刍动物营养实验技术	1
第一节 集粪及标记物应用技术	1
反刍动物营养消化代谢研究的集粪尿技术	1
反刍动物营养研究的标记物技术和瘤胃尼龙袋技术	4
PEG 和 CrEDTA 作为绵羊瘤胃液相标记物的比较研究	13
单、双食糜标记物技术测定真胃食糜干物质流量对比试验	17
反刍家畜降解蛋白质的研究(二)——固态和液态蛋白质补充饲料通过产奶母牛瘤胃速度的研究	19
青粗饲料通过牛瘤胃外流速度的研究	24
全收粪和指示剂法测定肉牛日粮有机物消化率的差异性分析	26
第二节 瘤胃微生物蛋白质产生量的测定与评定	31
用 RNA 和 DAPA 标记法估测牛瘤胃微生物蛋白的研究	31
瘤胃微生物蛋白质合成测定方法的研究	35
日粮降解氮转化为瘤胃微生物氮效率的影响因素研究	39
不同能量水平日粮对肉牛瘤胃微生物氨基酸组成的影响	43
肉牛混合日粮不同进食水平对尿中嘌呤衍生物排出量的影响	46
中国荷斯坦成年公牛可消化有机物进食量与尿嘌呤衍生物排出量的关系分析	51
第三节 饲料营养物质降解率的测定与评定	55
反刍家畜降解蛋白质的研究(一)——用尼龙袋法测定几种中国精饲料在瘤胃中的降解率及该方法稳定性的研究	55
尼龙袋法评定饲料在反刍动物瘤胃内蛋白质降解率	59
饼粕类饲料蛋白质降解率的研究	65
体外持续发酵法评定反刍动物饲料干物质和蛋白质降解率的研究	67
酶解法评定反刍动物饲料干物质和蛋白质降解率的研究	73
酶解法评定青粗饲料有机物降解率的研究	77
瘤胃尼龙袋法测定饼粕饲料总氨基酸降解率	80
蛋白质饲料经瘤胃培养和小肠酶降解后的氨基酸模型	84
我国反刍动物饲料蛋白质降解率评定方法的研究进展	87
常用饲料蛋白质在瘤胃的降解率	93
粗饲料及食品加工副产品的瘤胃有机物降解率的测定	98
化学处理对秸秆秕壳的瘤胃有机物降解率的影响	101

青粗饲料蛋白质及有机物瘤胃降解规律的研究·····	106
日粮中精料比例对稻谷和甘薯淀粉的瘤胃降解率影响·····	108
常用精料干物质和脂肪在瘤胃中降解规律的研究·····	110
<b>第四节 反刍动物能量消化代谢规律的研究·····</b>	<b>113</b>
我国奶牛饲料产奶净能值测算方法的研究·····	113
瘤胃 VFA 产量与瘤胃可发酵有机物质关系的研究·····	118
新闭路循环式面具呼吸测热法的研究·····	121
日粮营养水平对西杂育成母牛日粮消化能和尿能排出量的影响·····	127
肉牛能量和淀粉利用及其对代谢能转化效率、能量、蛋白和脂肪沉积的影响·····	131
低质粗饲料对阉牛能量转化及营养调控的研究·····	135
反刍动物能量转化规律及营养调控总结报告·····	144
奶牛和肉牛日粮淀粉和葡萄糖的营养调控及其评定的建议·····	168
<b>第二章 反刍动物营养需要量的研究·····</b>	<b>176</b>
<b>第一节 反刍动物营养需要量概述·····</b>	<b>176</b>
黑白花奶牛营养需要的研究·····	176
中国反刍家畜营养在某些方面的最新研究进展·····	182
<b>第二节 蛋白质需要量的研究·····</b>	<b>196</b>
反刍动物蛋白质营养饲养(小肠蛋白质)新体系·····	196
瘤胃日粮能氮平衡的研究·····	209
奶牛小肠蛋白质体系的局限性与氨基酸平衡·····	211
奶牛氨基酸营养体系的建议·····	216
生长肥育阉牛饲料蛋白质转化效率的研究·····	226
舍饲拴系饲养条件下肉牛肥育期蛋白质需要的研究·····	229
日粮蛋白质水平对生茸期梅花鹿能量代谢的影响·····	232
<b>第三节 能量需要量的研究·····</b>	<b>235</b>
黑白花成年母牛绝食代谢的研究·····	235
黑白花生长母牛绝食代谢和不同运动量的能量代谢研究·····	239
荷斯坦奶牛维持净能需要量的测定及影响因素·····	240
舍内拴系饲养条件下肉牛肥育期间能量需要量的研究·····	244
梅花鹿生茸能量、蛋白需要量及茸中干物质沉积规律的研究·····	247
不同进食水平对生茸期梅花鹿能量代谢的影响·····	249
<b>第四节 矿物质维生素需要量的研究·····</b>	<b>253</b>
西门塔尔杂交后备母牛日粮植物源磷进食量对表观可消化磷的影响·····	253
日粮磷进食水平对西杂后备母牛日粮磷表观消化的影响·····	257
肉牛日粮补饲硫酸锌对瘤胃发酵代谢的影响·····	260
肉牛日粮添加硫酸锌对粗料纤维和玉米有机物瘤胃降解的影响·····	266



肉牛日粮补饲铜对瘤胃 VFA 浓度和尿中嘌呤衍生物排出量的影响 .....	271
肉牛日粮添加硫酸铜对粗料纤维和玉米有机物瘤胃降解的影响 .....	276
<b>第三章 反刍动物营养需要量和饲料科学的生产应用与实践 .....</b>	<b>282</b>
<b>第一节 需要量的生产应用 .....</b>	<b>282</b>
反刍家畜蛋白质营养新体系在生产中的应用 .....	282
<b>第二节 饲料科学的研究与实践 .....</b>	<b>284</b>
添加酵母糖蜜对奶牛生产性能的影响研究 .....	284
Effects of sugar beet pulp partially substituted for ground corn on dairy cows lactation performance .....	296
奶牛日粮中添加不同水平的大豆磷脂的饲喂效果 .....	304
不同含水率 FTMR 营养成分在奶牛瘤胃内降解率的研究 .....	308
配合日粮蛋白质水平对育成期梅花鹿消化代谢的影响 .....	315

# 第一章 反刍动物营养实验技术

## 第一节 集粪及标记物应用技术

### 反刍动物营养消化代谢研究的集粪尿技术

黄洁 姜军 王消消 陈静 李雪娇 曹琼 莫放

(中国农业大学动物营养学国家重点实验室, 100193, 北京)

#### 一、动物粪和尿样的采集

分离和收集粪尿的装置有专门设计的代谢笼、集粪袋和用挽带系在动物身上的“尿漏斗”。采用何种收集方法依动物种类和性别而异。

一般来说,猪不宜套上收集装置,家禽则采用化学分离法或外科手术分开粪尿。

对于反刍动物许多方法均可采用,不过奶牛有些困难,因其粪便是稀软的。现在已经设计出了可固定的阴户上的各种橡皮或玻璃纤维的“分离器”或“承尿器”。

另外还有一种装置,它是将一根橡皮导管经尿道插入膀胱,然后使橡皮管的头端膨大而固定在膀胱里,这样采收集尿液。

#### 二、肉用育成母牛全收尿方法介绍

长期以来国内外有关母牛营养代谢的研究较少,大部分有关牛的营养代谢研究主要集中在公牛和阉牛上,其原因主要是母牛的粪道和尿道离得很近,粪尿很难分离;同时因为母牛排尿口的位置问题,很难将尿袋固定在阴部而收集全部尿液。鉴于以上原因,牛的代谢试验大多用公牛和阉牛作为试验动物。但是,若需进行母牛不同生理阶段营养需要量的研究,就不可避免地遇到收尿难的问题。现有的母牛集尿方法都存在问题,如漏粪地板易造成粪尿相混,膀胱内置留导尿管的方法会造成母牛损伤或尿路感染,且操作复杂,不能大量使用。笔者在完成毕业论文词养试验的同时,发现并总结一些尿袋安装及使用的注意事项,现介绍如下。

##### 1. 母牛斜漏斗尿袋的制作

(1) 首先将汽车内胎剪成如图1的扇形,用耐酸、耐碱、耐水性能好,并且黏合快而牢固的粘胶剂将剪成扇形的内胎橡胶粘合成下端开口的锥形斜漏斗,每个锥形斜漏斗需要用3~4片的扇形内胎橡胶黏合而成。

(2) 在黏合好的锥形斜漏斗的大开口边缘缝一圈结实的帆布,在帆布的上、下端各打4个孔,用铁片处理孔口边缘的帆布线,将孔做成帆布鞋穿鞋带的孔一样,但比穿鞋带的孔要大几倍。

(3) 将事先准备好的内径为 1.5~2 cm，厚为 2~3 mm，高约 5 cm 的尼龙棒取出，将黏合好的橡胶斜漏斗小开口端裹在尼龙棒外，用铁圈及螺帽和螺丝钉固定好，固定部位靠近尼龙棒顶端的膨大部。

(4) 取内径为 1.5~2 cm，厚为 1~2 mm 的硬质具有良好弹性的塑料管 3~4 m，将尼龙棒的另一端插入该塑料管内，用铁圈、螺帽和螺丝固定好，固定部位靠近尼龙棒的下端。虽然塑料管和橡胶漏斗都包括在尼龙棒外，但是塑料管包裹尼龙棒的下端，橡胶漏斗包裹尼龙棒的上端，橡胶漏斗和塑料管在包裹尼龙棒时不重叠。

## 2. 母牛集尿设备的连接

(1) 将事先准备好的自行车内胎用剪刀剪成 1~1.5 cm 宽的橡胶条。剪切时，应沿一条直线剪切，剪完后的橡胶条应为比较规则的长方形，尽量保持剪切边缘的平整。

(2) 在尿袋帆布的上端 4 个孔以及下端的中间 2 个孔绑上已经剪切好的橡胶条（可用实验室用的乳胶管代替橡胶条），橡胶条的长度约为所用试验牛的体直长的 1.5 倍左右。

(3) 准备好体积为 20~25 L 白色带盖塑料桶，在桶的两侧用黑色记号笔画上体积刻度线，为试验期观察尿液体积做准备。用火将白色塑料桶的桶盖烫出一个孔，其直径应略小于尿袋上塑料管的直径。

(4) 将尿袋上的塑料管末端塞入白色塑料桶桶盖上的孔，并固定好以备试验时试验。整个尿袋的制作过程和集尿设备的连接见图 1。

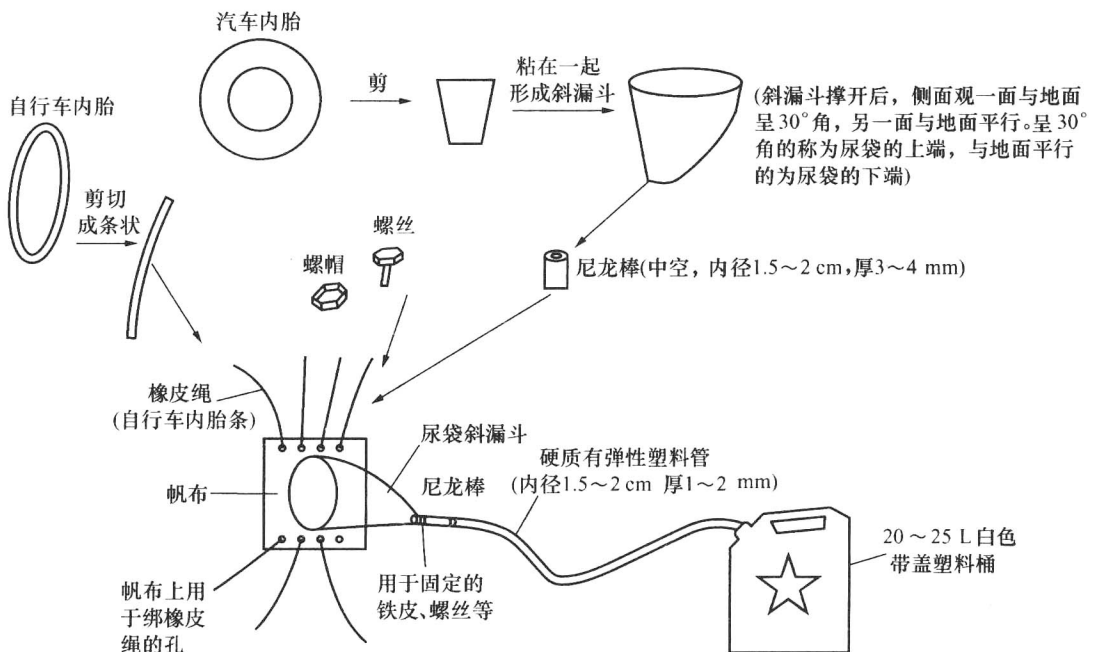


图 1 母牛尿袋制作流程图

## 3. 尿袋的绑定

(1) 分别在肩胛骨后缘和坐骨结节前缘拴一圈帆布绳（其他质地的绳子也可，但要求拴在此处的绳子无弹性），松紧度为牛正常站立时能塞进一根手指头为宜。

(2) 取 4 根有弹性的绳子（可以是橡胶管、由自行车内胎剪成的橡皮绳）绑在尿袋帆布边缘的上端，中间两根与脊柱平行通过坐骨结节前缘的帆布绳，并在此处打结后继续向前系于肩胛骨后缘的帆布绳上。两端的两根绳沿臀部与脊柱平行系于坐骨结节前缘的帆布绳上，见图 2。

(3) 在母牛尿袋帆布边缘的下端的中间两个孔拴两根弹性绳，由母牛胯下经坐骨结节前缘的帆布绳打结后继续沿腹部前行系于肩胛骨后缘的帆布绳上，见图 2。



图 2 母牛绑完尿袋后的效果图

(4) 取一个容积为 20~25 L 白色带盖塑料壶，将塑料壶的盖子用火烫出与尿袋塑料管的尾端大小相近的洞，然后将塑料管的尾端插进白色塑料壶的中，固定接口处，防止尿液渗漏。

#### 4. 肉用育成母牛全收尿的注意事项

(1) 在制作尿袋时，尿袋后段的塑料管要用有弹性的硬质塑料管。无弹性的软质塑料管容易被弯折导致尿液无法顺利排入集尿桶中，尿液倒流回尿袋的斜漏斗，使尿漏出。

(2) 在拴尿袋时，应使尿袋斜漏斗上的帆布边缘低于肛门，否则粪便会排进尿袋的斜漏斗阻塞尿袋，导致尿液漏出；同时尿袋不能绑得太低，防止尿液直接漏出，见图 3。

(3) 试验母牛挽套接尿袋用的 6 根带子应选用有弹性的材料。在母牛肩胛骨后缘和坐骨结节前缘绑一圈的帆布绳应较宽，约 1.5~2 cm，以减小牛的不适应程度。

(4) 在给白色带盖塑料桶的盖子上烫洞时，洞的直径应略小于尿袋塑料管的直径。这样塑料管在塞入桶盖后不易脱落。

(5) 在整个收尿期间，应经常去试验牛舍查看，及时调整尿袋斜漏斗的位置，保证尿液能顺利进入集尿桶。

(6) 在拴尿袋时应注意让牛保持正常的站立姿势，切勿在牛弓背、弯曲身体时绑尿袋，以免牛在恢复正常站姿后尿袋位置改变，不能完全收集尿液。

(7) 由于公牛和母牛的生理特点不同，其尿袋漏斗的形状也不相同。在利用尿袋对母牛进行全收尿的代谢试验时，不能用公牛的尿袋。公牛、母牛尿袋漏斗形状的不同，不可混用。

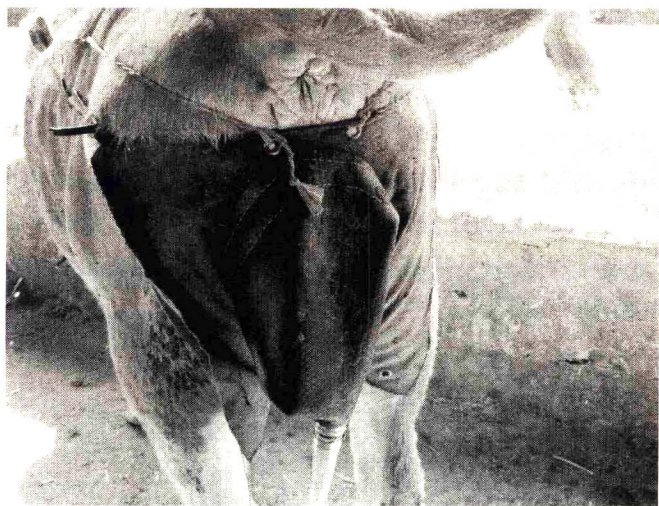


图3 母牛尿袋斜漏斗的位置

### 5. 母牛尿袋全收尿方法的可行性分析

申跃宇(2010)以西杂肉用育成母牛(体重在350 kg左右)为试验动物,利用全收尿方法测得的尿能范围为2.656~4.038 MJ/d;邢壮用同样的方法(试验动物为夏洛莱与本地黄牛的杂交肉公牛,体重为 $(378 \pm 5.6)$  kg,测得的尿能为2.10~2.69 MJ/d;黄洁(2011)用西杂肉用育成母牛所作的试验结果表明,350 kg左右育成母牛的尿能排出量为3.724~4.383 MJ/d。不同研究者在不同条件下用体重在350 kg左右的肉用牛,采取全收尿的方法测得的尿能日排出量值相近,这说明用尿袋全收尿方法可以全部收集参试牛所排出的尿液,且尿能测定值稳定。综上所述,将利用尿袋全收尿的方法用于测定尿能值在研究母牛能量需要和能量代谢中是可行的。

## 反刍动物营养研究的标记物技术和瘤胃尼龙袋技术

黄洁 姜军 王消消 陈静 李雪娇 曹琼 莫放

(中国农业大学动物营养学国家重点实验室,100193,北京)

作为一种标记物,必须具备以下几个条件:①对动物本身无毒、无害。②在动物瘤胃内不被消化吸收。③不与消化道内的其他物质发生化学反应。④不被组织细胞或饲料颗粒所吸附。⑤回收率高。另外标记物必须易与瘤胃内容物或消化道食糜很好混合。

### 一、瘤胃内容物标记物技术测定瘤胃(液)外流速度,更新速率,瘤胃体积

采用液态标记物技术。基本假设是瘤胃处于“稳定状态”,指瘤胃液的体积和稀释率是稳定的,液体的流入和流出也是稳定的,尽管实际上是有变化的。

饲料和水(唾液)不断进入瘤胃,发酵后又不断地从瘤胃中排出,进入后部消化道,测定瘤胃内容物向外排空的速度可从瘤胃后直接收集瘤胃内容物,但需要作瘤胃瘘管手术。所以一般用标记物进行测定。

标记物对动物本身无毒无害；不被动物的瘤胃消化吸收；不与消化道内其他物质发生化学反应；不被组织细胞或饲料颗粒吸附；回收率高；标记物必须容易与瘤胃内容物混合。

### 1. 聚乙二醇 (polyethylene glycol, PEG, MW 4000) 可以用作消化道液体标记物

Hyden (1955) 提出聚乙二醇 (PEG, MW 4000) 可以用作消化道液体标记物。Malarwar 等 (1967) 提出了测定聚乙二醇的改进方法。这一方法后来被广泛应用于反刍动物消化道液体平衡研究中 (Smith, 1957)。这种方法现在也被应用, 但也有不少缺点, 分析测定非常麻烦, 费时较长, 需要多种药品, 达到较高的精确度比较困难。另外, 当饲料中单宁含量较多时易沉淀。对于绵羊, 有一部分 PEG 可能被吸收。

### 2. CrEDTA (铬 EDTA), 乙二铵四乙酸铬或钴 (CrEDTA, CoEDTA)

Downes 和 McDonald (1964) 提出用<sup>51</sup>CrEDTA 测定稀释率精确度很好。<sup>51</sup>Cr 是根据其放射性来测定的。Binnerts 等 (1968) 提出 CrEDTA 也可用作液体标记物, 其效果与<sup>51</sup>CrEDTA 相同, CrEDTA 的应用范围较大, 使用更为方便, 因为不需要测定放射性元素。Uden 等 (1968) 比较了 CrEDTA、CeEDTA 和 CoEDTA 作为液体标记物的效果, 指出 CoEDTA 与 CrEDTA 的效果相同, 并提出了上述标记物的配制方法。Uden 等 (1982) 用 CoEDTA 作为液体标记物比较测定了牛、山羊、绵羊、马及兔子的消化道液体内容物的外流速度。由于 Cr 和 Co 可用原子吸收光谱仪直接测定, 这样就省去了很多药品和步骤, 使分析工作可以快速准确地进行, 特别是在样品量很大的情况下非常方便。

### 3. 标记物的配制

PEG 溶液的配制方法: 称取 300 g 分子量为 4 000 的 PEG, 溶于 1 000 mL 水, 混匀, 即为 30% 的 PEG 溶液。

CrEDTA 的配制方法 (Binnerts 等, 1968): 称取  $\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  14.2 g 于 800 mL 的烧杯中, 溶于 200 mL 蒸馏水。用同样的方法, 将 20 g EDTA 二钠溶于 300 mL 蒸馏水中, 然后与  $\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  溶液混合; 加热至沸腾, 而后微沸 1 h; 加入 4 mL 1 mol/L 的  $\text{CaCl}_2$  溶液, 以中和多余的 EDTA; 加入大约 50 mL 2 mol/L 的 NaOH, 将 pH 调至 6~7; 用 1 L 容量瓶将溶液定容。

CoEDTA 的配制方法 (Uden 等, 1980): 称 25 g 乙酸钴盐, 29.2 g EDTA 和 4.3 g  $\text{LiOH} \cdot \text{H}_2\text{O}$  (或 4.0 g NaOH) 于 2 L 的烧杯中, 加入 200 mL 蒸馏水, 溶解, 需要时可加热; 冷却, 加入 300 mL 95% (V/V) 的乙醇, 放入冰箱, 过夜; 过滤, 用 80% (V/V) 的乙醇冲洗。将  $\text{LiCo-EDTA}$  样品放在显微镜下观察, 呈棒状晶体。

### 4. 标记物的投入方法

(1) 一次性投入法。投入标记物前, 首先估测瘤胃液的体积, 根据瘤胃液中可能的初始浓度及以后各时间点的浓度, 计算应投入标记物的数量。应使各时间点的标记物浓度, 特别是最后一个时间点的标记物的浓度处在可测定的范围内。将标记物溶液在早饲后 1 h 用注射器注入瘤胃, 并用注射器反复抽吸, 以使标记物与瘤胃液混合完全。然后在投入后的各时间点, 抽取瘤胃液样品, 测定其中标记物的含量。固体标记物的投入比较困难。一般的方法是, 将铬标记饲料与精料混合, 让动物在短时间内吃下, 或将瘤胃内容物从瘤胃中取出, 将标记物与内容物混合均匀, 然后再放回瘤胃。这一过程要求内容物的温度要保持在 39℃。

(2) 持续灌注法。一次性投入的最大问题是, 标记物与瘤胃内容物混合不完全。为了解决这一问题, 可以应用持续灌注法 (仅对液体标记物), 即用蠕动泵将液体标记物溶液持续地灌入瘤胃, 连续 3 d, 使瘤胃内容物中标记物分布均匀, 然后停止灌注, 分别在各时间点采取瘤胃液样品, 测定标记物的浓度。

但在实施上一般采用一次性投入法, 投入标记物前, 首先估测瘤胃液的体积, 根据瘤胃液中可能的初始浓度及以后各时间点的浓度, 计算应投入标记物的数量。应使各时间点的标记物浓度, 特别是最后一个时间点的标记物的浓度处在可测定的范围内。在投入后的各时间点, 抽取瘤胃液样品, 测定其中标记物的含量。

标记物投入瘤胃后, 瘤胃内标记物浓度的变化符合  $C=C_0 \times e^{-kt}$ , 其中  $C$  为  $t$  时间标记物浓度,  $k$  为瘤胃液稀释率,  $C_0$  为标记物在瘤胃中初始浓度。

瘤胃体积 = 投入标记物量 / 标记物在瘤胃中初始浓度

## 二、真胃食糜干物质流量标记物技术测定真胃食糜

饲料蛋白质降解率和微生物蛋白质合成量的测定必须收集及测定每天到达真胃或十二指肠的食糜。目前, 真胃或十二指肠食糜收集方法有 2 个, 一是装 1 个十二指肠过桥瘘管的全收集; 另一是在真胃或十二指肠装一单瘘管 (“T” 型瘘管) 的定点收集 (点采样)。

十二指肠过桥瘘管全收集能准确地测定食糜总量, 但收集技术麻烦, 费人力, 实验动物不易护理。在真胃 (或十二指肠前端) 装上单瘘管, 经一定适应期后, 连续 24 h 或 48 h 样, 每隔 2 h 或 3 h 采样。同时使用液态 (多用聚乙二醇) 和固态标记物的方法叫双标记技术, 测定和计算较麻烦, 只使用一种状态的标记物叫单标记技术, 单标记技术多采用固态标记物三氧化二铬。

固态标记物多采用三氧化二铬。

采用持续灌注法。一般与日粮混合后通过采食饲喂。

## 三、瘤胃内饲料的外流速度测定——Cr 标记饲料

尼龙袋法已作为评定饲料蛋白质瘤胃降解率的常规方法, 利用 Orskov 和 McDonald (1979) 提出的蛋白质瘤胃降解模型, 必须结合饲料在瘤胃中的外流速度, 才能计算饲料的动态降解率。饲料通过瘤胃外流速度的测定方法, 常用铬标记饲料的方法, 该方法初为 Martz 等 (1974) 采用, Uden 等 (1980) 对该方法作了详细的报道。用重铬酸钠处理饲料后, 饲料的纤维成分及蛋白质均能与铬形成稳定的络合物, 在瘤胃中几乎不被微生物降解; Eliman 和 Orskov (1981) 研究表明, 从直肠取粪样与从瘤胃中直接取样所测定标记饲料的瘤胃外流速度值二者呈高度相关 ( $r=0.99$ ), 表明可以通过采集粪样分析其铬浓度的变化来确定饲料外流速度值。

饲料的过瘤胃部分外流速度 ( $K_p$ ) 由粪中铬浓度下降曲线来确定, 数学模型为:  $f=e^{-kt}$ , 其中:  $f$  为  $t$  时间点粪中铬的浓度;  $t$  为粪中铬浓度出现高峰后的采样时间;  $k$  为  $K_p$ 。

饲料粒度越细其通过瘤胃的外流速度越快 ( $K_p$  越大), 饲料种类不同, 其  $K_p$  值也不同, 在饲养水平、动物日粮、精粗相近的情况下, 相同种类或比重相近的饲料  $K_p$  值可以相

互借用。

瘤胃食糜的外流速度 ( $k$ ) 对评定饲料动态降解率的影响较大  $dP=a+bc/(c+k)$ , 影响精饲料外流速度起主导作用的因素是饲养水平, 我们进行了较系统的研究, 发现精饲料的瘤胃外流速度与饲养水平存在显著相关。研究出的牛的回归式:

$$Y = 0.03644 + 0.0173x, r = 0.9162, n = 7$$

式中,  $Y$  为精饲料的外流速度,  $X$  为饲养水平, 以维持能量水平为 1。

#### 四、瘤胃微生物样品 (内容物样品) 的分离

饲养管理: 每头牛固定槽位饲养, 日采食干物质 10 kg。日粮等分为两部分别于每日 9:00 和 15:00 各喂 1 次。牛采食后饮水。

样品采集: 通过瘤胃瘘管获得瘤胃腹囊部的瘤胃内容物 3~4 kg 样品袋中,  $-20^{\circ}\text{C}$  保存。

样品分离: 瘤胃内容物室温解冻, 经 4 层纱布过滤后称重, 然后按 4 mL/g 加 0.85% 生理盐水冲洗后分为液相和固相两部分。液相为经 100  $\mu\text{m}$  滤网过滤后的滤液部分, 固相为网上部分。滤液 1 000 g 离心 25 min 后, 弃去沉淀。上清液经 20 000 g 离心 30 min 后收集沉淀, 这部分样本称为存在于液相中的微生物 (Liquid-associated microorganisms, LAM)。固相经 4 层医用纱布挤压过滤后称重, 按 4 mL/g 加 0.85% 生理盐水冲洗一遍, 弃去滤液; 再次按 4 mL/g 添加 0.85% 生理盐水, 高速搅拌机搅拌 3 次, 每次 1 min, 然后拍打 5 min, 经 100  $\mu\text{m}$  滤网过滤后, 滤液于 1 000 g 离心 25 min, 弃去沉淀。上清液经 20 000 g 离心 30 min 后收集沉淀, 这部分样本称为存在于固相中的微生物 (Solid-associated microorganisms, SAM)。上述沉淀收集后经冻干机冷冻干燥后  $4^{\circ}\text{C}$  密封保存。

#### 五、细菌和食糜样品中嘌呤测定 (测定瘤胃微生物蛋白质产生量)

(1) 仪器: 恒温水浴锅, 紫外可见分光光度计及常规试验器具。

(2) 试剂。

A. 0.2 mol/L  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  溶液: 溶解 23 g  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  并定容至 1 000 mL。

B. 0.0285 mol/L  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  溶液: 将 143 mL 0.2 mol/L  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  溶液定容至 1 000 mL 定容。

C. 0.5 mol/L HCl 溶液: 将 42 mL 浓 HCl 至 1 000 mL。

D. 0.4 mol/L  $\text{AgNO}_3$  溶液: 溶解 6.9 g  $\text{AgNO}_3$ , 并定容至 100 mL, 置于棕色试剂瓶中保存。

E. 70% 的高氯酸和标准酵母 RNA。

F. pH2.0 的蒸馏水: 用稀  $\text{H}_2\text{SO}_4$  调节蒸馏水 pH。

(3) 分析方法和步骤。

A. 准确称取 0.1000 g 标准酵母 RNA 和 0.2000 g 微生物冻干样品于 25 mL 带塞试管中, 加入 2.5 mL 高氯酸, 振荡使样品溶解, 置于  $90\sim 95^{\circ}\text{C}$  水浴培养 5 min, 振荡混合后重水浴培养 45 min。



B. 加入 17.5 mL 0.0028 mol/L  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  溶液, 90~95℃ 水浴培养后, 用快速滤纸过滤。

C. 转移 0.5 mL 滤液至 15 mL 离心管中, 边搅拌边加入 0.5 mL 0.4 mol/L  $\text{AgNO}_3$  溶液, 再加入 9 mL 0.2 mol/L  $\text{H}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  缓冲液, 密封, 置 4℃ 冰箱静置过夜。

D. 5 000 g 离心 20 min, 弃上清, 用 pH 2.0 硫酸洗涤残渣, 加 6 mL pH 2.0 硫酸溶液振荡, 离心 20 min 后弃上清。

E. 加 10 mL 0.5 mol/L HCl 溶液振荡, 置于 90~95℃ 培养 30 min, 振荡后离心 20 min, 取上清液在紫外可见分光光度计 260 nm 处比色。

#### (4) RNA 标准曲线制作。

称取 0.1000 g 标准酵母 RNA 作如上处理后, 吸取上清液 0, 100  $\mu\text{L}$ , 200  $\mu\text{L}$ , 300  $\mu\text{L}$ , 400  $\mu\text{L}$ , 500  $\mu\text{L}$  加 0.5 mol/L HCl 溶液 10 mL 在 260 nm 处进行比色, 并制作标准曲线。

#### 氨基酸组成的测定:

冻干样品在 6 mol/L 盐酸下水解 22 h, 然后减压蒸干, 用 0.02 mol/L 盐酸重新溶解定容后在日立 L-8800 型氨基酸自动分析仪上测定氨基酸。上机条件为: 分析柱 4.0 mm × 150 mm, 柱温 59℃, 缓冲液为乙酸。

## 六、瘤胃尼龙袋技术评定瘤胃内饲料营养物质的降解率

进入反刍家畜小肠蛋白质主要包括瘤胃微生物蛋白质和饲料的非降解蛋白质, 瘤胃微生物蛋白质产生量主要取决于瘤胃的可利用能和降解蛋白质, 故饲料蛋白质的瘤胃降解率是衡量反刍家畜饲料蛋白质营养价值的重要指标, 评定饲料瘤胃蛋白质降解率的方法有体内法、体外法和尼龙袋法, 其中尼龙袋法是一种既能反映瘤胃实际环境条件又简单易行的评定方法。

### 1. 瘤胃尼龙袋技术

(1) 计算方法。尼龙袋中不同时间点 ( $t$ ) 的蛋白质或养分的消失率 ( $dP$ ) 符合数学模型:

$$dP = a + b(1 - e^{-ct}) \quad (\text{Orskov \& McDonald 1979})$$

式中:  $dP$  为在  $t$  培养时间, 袋内营养物质的消失率, 单位为%。

$t=0$ ,  $dP=a$ , 快速降解部分;

$t \rightarrow \infty$ ,  $dP=a+b$ , 被降解部分;

$b$  最终降解部分, 即潜在降解, 且以常数  $c$  降解。

根据最小二乘法的原理, 应用计算机将被测饲料的  $a$ 、 $b$ 、 $c$  求得, 结合饲料在瘤胃的外流速度  $K$  用公式  $P = a + bc/(c+k)$  计算该饲料的动态降解率,  $k$  是被测饲料离开瘤胃的外流速度。

测定饲料的瘤胃外流速度的方法:

用 Cr-标记饲料方法: Cr-标记饲料在瘤胃几乎不降解, 在小肠也不消化。多采用粪便中 Cr 的浓度变化可以确定外流速度。

影响饲料外流速度的因素: 主要受日粮的结构和饲喂水平的影响, 其中最重要的是基础