

# 鸟类组织稳定同位素分析样品的预处理方法

李继荣<sup>①②</sup> 李来兴<sup>②</sup> 杨 乐<sup>①\*</sup>

① 西藏自治区高原生物研究所 拉萨 850000; ② 中国科学院西北高原生物研究所 中国科学院高原生物适应与进化重点实验室  
西宁 810001

**摘要:** 稳定同位素分析样品在进行同位素质谱分析之前需要适当的处理, 然而如何处理尚未形成统一的标准。本文结合鸟类组织稳定同位素分析样品的测试流程, 介绍了鸟类学研究领域稳定同位素技术应用中涉及的分析样品解冻清洗、干燥、分离纯化、研磨和储存等前处理方法, 并对不同组织常用的处理方法及分析样品测定中有待解决的问题展开了讨论。旨在抛砖引玉, 为利用稳定同位素技术开展鸟类学方面的研究提供科学参考和技术支持。

**关键词:** 稳定同位素; 鸟类; 组织; 前处理

**中图分类号:** Q955 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263 (2016) 03-477-10

## Pretreatment Methods for Stable Isotope Analysis of Avian Tissues

LI Ji-Rong<sup>①②</sup> LI Lai-Xing<sup>②</sup> YANG Le<sup>①\*</sup>

① *Tibet Plateau Institute of Biology, Lhasa 850000*; ② *Key Laboratory of Adaptive and Evolution of Plateau Biology, Northwest Plateau Institute of Biology, Chinese Academy of Science, Xining 810001, China*

**Abstract:** Stable isotope analysis samples require proper treatment before isotope mass spectrometry analysis, but there is still no standard method for sample pretreatment. Combining with the stable isotope analysis testing process of avian tissues, this paper introduces the sample pretreatment methods, such as thawing and cleaning, drying, isolation and purification, grinding and storage, which are useful for isotope technology applications in Ornithology. Different tissues pretreatment methods and problems in sample analysis are also discussed. We hope this review will provide some scientific references and technical supports for the application of stable isotope technique in Ornithology.

**Key words:** Stable isotope; Avian; Tissues; Pretreatment

稳定性同位素技术早在 20 世纪 70 年代末期就被引入生态学研究领域(易现峰等 2005)。目前该技术在动物生态学研究方面得到广泛应用, 包括食性 (Denadai et al. 2008)、生活史

(Phillips et al. 2009)、营养级关系 (Muñoz-Gil et al. 2012)、动物迁徙 (Hobson et al. 2001, Jason et al. 2010) 以及相近的古环境重建 (Johnson et al. 1997) 等方面的多项研究都涉及该技术。

**基金项目** 国家自然科学基金项目 (No. 31360141, 31071936);

\* 通讯作者, E-mail: yangletibet@126.com;

**第一作者介绍** 李继荣, 女, 硕士; 研究方向: 动物生态学及生物地球化学; E-mail: ljr18697179656@163.com。

收稿日期: 2015-08-08, 修回日期: 2016-01-21 DOI: 10.13859/j.cjz.201603015

鸟类学研究中, 稳定同位素技术用于建立迁徙鸟类繁殖地与越冬地之间的联系 (Hobson et al. 1997a, McKinnon et al. 2012), 测定繁殖过程中的营养分配 (Hobson et al. 1997b, Klaassen et al. 2004, Carleton et al. 2006), 明确某种鸟类的食性 (Polito et al. 2009), 判定物种的营养级位置 (杨月琴等 2009)。稳定同位素技术在国外鸟类学研究中的应用较为广泛, 但在国内研究相对较少。

国外研究中常见的测量样品主要有非损伤性组织样品, 如卵壳、羽毛和爪等组织 (Mabee 1997, Opper et al. 2009, Barquete et al. 2013), 轻度损伤组织样品血液 (全血、血细胞和血浆) 以及重度损伤组织样品, 卵内容物、肌肉、内脏和骨骼 (Yohannes et al. 2012, Barquete et al. 2013, 王玄等 2015)。目前国内有关动物稳定同位素测定样品用于鸟类组织分析的部位主要是羽毛 (丛日杰 2013)、肌肉 (易现峰等 2004, 宋大伟等 2007, 杨月琴等 2009)、卵壳膜 (李继荣等 2015) 和血液 (张璇等 2013), 对于其他组织的应用相对较少, 有关样品前处理方法仅在李银凤等 (2015) 的研究中提及。

然而分析样品的前处理是控制样品测定值准确与否的关键因素之一, 不同的样品处理方法也许会影响稳定同位素比值的结果 (刘瑀等

2013)。本文结合国内外稳定同位素技术应用的相关研究, 介绍了鸟类组织样品的解冻清洗、干燥、分离纯化、研磨和储存等预处理方法, 并对不同组织常用的处理方法及分析样品测定中有待解决的问题展开了讨论。旨在抛砖引玉, 为利用稳定同位素技术开展鸟类学方面的研究提供科学参考和技术支持。

## 1 样品测量流程

稳定同位素样品的处理流程如图 1 所示, 样品处理首先需要解冻并对样品表面的附着污染物进行清洗, 根据不同的实验研究目的对干燥后的样品进行特定的组织成分分离, 不同成分的分离方法不同, 分离得出的样品再次进行干燥, 干燥后的样品需要进行研磨, 使样品的均质性良好, 测定所需的样品至少要过 60 目筛, 处理好的样品可以直接进行包样测定或储存备用。

## 2 样品前处理

### 2.1 解冻与清洗

低温条件下保存的鸟卵内容物、血液 (全血、血细胞和血浆)、肌肉、内脏和骨骼样品首先需要进行解冻处理, 但反复冻融会对样品的稳定同位素比值产生影响 (de Lecea et al.

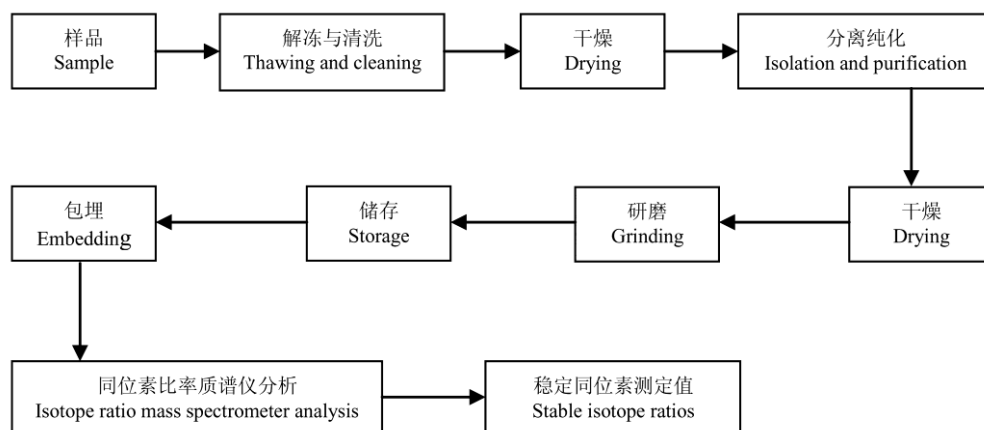


图 1 样品测定流程示意图

Fig. 1 The flow chart of sample measurement

2011)。de Lecea 等 (2011) 在对拟海虾属生物 (*Haliporoides triarthrus*) 和短吻角鲨 (*Squalus megalops*) 的研究中发现, 常温下解冻 1 次和解冻 2 次, 其肌肉的  $\delta^{15}\text{N}$  和  $\delta^{13}\text{C}$  值各不相同。

非损伤性组织样品如羽毛、爪、卵壳样品表面需要清洗去除表面附着的污染物, 爪一般用乙烷将表面污染物冲洗干净后放入通风橱中自然干燥 (Hahn et al. 2014)。对于羽毛来说一般要用有机试剂进行浸洗或冲洗, 然后用去离子水或蒸馏水冲洗羽毛表面残留的有机溶剂或者直接放入通风橱中自然晾干去除有机溶剂, 常用的有机溶剂有氯仿和甲醇混合溶液 (氯仿与甲醇体积比为 2:1) (Hobson et al. 2003, Cherel et al. 2005, Norris et al. 2005, Wunder et al. 2005, Perez et al. 2010, Storm-Suke et al. 2012)、氯仿 (Hobson et al. 1993a)、乙醚 (Hobson et al. 1993a)。也有一些研究中使用碱性溶液对羽毛进行浸洗或冲洗, 然后用蒸馏水冲洗去除羽毛表面附着的碱性溶液, 用到的碱性试剂有氢氧化钾 (KOH) (Natsumeda et al. 2015)、0.25 mol/L 氢氧化钠 (NaOH) (Bearhop et al. 2002)。爪的处理方法为蒸馏水超声清洗 5 min, 清洗过程重复 3 次 (Barquete et al. 2013)。卵壳外表面的污染物可以使用次氯酸钠 ( $\text{NaClO}$ ) 溶液 (Segalen et al. 2009, Maurer et al. 2011)、蒸馏水 (Hobson et al. 1997b) 冲洗去除, 而卵壳内表面附着的污染物可以用有机溶剂丙酮冲洗 (Rock et al. 2013)。损伤性组织样品肌肉和内脏样品解冻后使用蒸馏水冲洗 (Hobson et al. 2012), 骨骼可以使用蒸馏水冲洗或超声清洗, 机械打磨去除表面的污染物 (Steele 2005, Mori et al. 2007, 管理等 2008)。

不同的研究在清洗样品时使用的化学试剂不同, 样品的清洗和分离过程中使用不同的化学试剂是否造成样品稳定同位素比值不同需要进一步研究。Mateo 等 (2008) 有关样品前处理对于海洋无脊椎动物  $\delta^{13}\text{C}$  和  $\delta^{15}\text{N}$  影响的研究结果显示, 酸化后的水洗会导致样品稳定同位素值改变, 不同物种的改变情况不同, 因此,

在对于特定物种的特定组织进行稳定同位素比值测定前, 样品是否能够进行水洗需要进一步研究。

## 2.2 干燥

样品干燥通常使用烘干、自然干燥、冷冻干燥 3 种方法, 烘干法处理的组织种类最多, 包括损伤性组织: 卵内容物 (卵黄、卵壳膜和卵清)、肌肉 (胸肌和腿肌)、内脏 (胃、小肠、胰腺、心、肝、肾) 和脑 (Polito et al. 2009, Bauchinger et al. 2010, Natsumeda et al. 2015), 50 ~ 60°C 24 ~ 48 h 烘干至恒重 (Alisauskas et al. 1993, Bearhop et al. 2002)。除此之外, 卵内容物 (卵黄、卵壳膜和卵清) (Hobson et al. 1997b, Ricca et al. 2007, Polito et al. 2009, Sharp et al. 2009, Opper et al. 2010, Rock et al. 2013)、肌肉 (胸肌和腿肌) 和肝样品还可使用冷冻干燥。冷冻干燥方法同样用于血液 (全血、血细胞和血浆) (Hobson et al. 1993b, Bearhop et al. 2002, Norris et al. 2005)、胃容物 (Cherel et al. 2005) 和骨骼样品 (Hobson et al. 1993a, Hobson et al. 1994), 12 ~ 36 h 冷冻干燥至恒重 (Ricca et al. 2007)。惰性组织, 爪、羽毛、卵壳, 一般使用自然干燥法, 即将样品放在室内通风橱中, 常温下自然干燥至恒重, 干燥时间为 12 ~ 72 h (Hobson et al. 1997b, 2003, Cherel et al. 2005, Norris et al. 2005, Wunder et al. 2005, Storm-Suke et al. 2012, Hahn et al. 2014)。

使用的干燥方法不同对样品稳定同位素比值影响的研究, 有少量的报道, 刘瑀等 (2013) 的研究结果显示, 烘干与冷冻干燥两种干燥方法对不同样品稳定同位素值的测量差异不同, 对于一些样品来说两种干燥方法无差异, 而对于另一些样品来说, 冷冻干燥的样品  $\delta^{13}\text{C}$  比烘干的样品偏负, 因此, 不同的样品选用何种干燥方法有待进一步研究。冷冻干燥能够确保生物样品中的有机物质不发生变化, 最大限度地保持原有物质成分, 有效地防止干燥过程中物质的氧化、转化和状态变化 (刘瑀等 2013), 因此, 我们建议在冷冻干燥与低温烘干对样品

稳定同位素比值无影响的情况下使用冷冻烘干的方法进行样品处理。

## 2.3 分离和提纯

### 2.3.1 损伤性组织

**2.3.1.1 卵内容物** 鸟卵中的卵壳、卵壳膜、卵清、卵黄可以通过煮熟后冷冻分离 (Hahn et al. 2012), Gloutney 和 Hobson (1998) 的研究结果显示, 煮沸后冷冻鸟卵的处理方法对卵黄脂肪、脱脂卵黄和卵清中  $\delta^{13}\text{C}$ 、 $\delta^{15}\text{N}$  值无影响。卵壳和卵壳膜可以使用不锈钢镊子分离开, 卵黄、卵清可以使用注射器 (Hobson et al. 1997b) 或移液管取出 (Rock et al. 2013)。由于卵清中包含大部分的蛋白质, 卵黄包含大比例的脂质 (Ferrari et al. 2006), 脂质合成过程中丙酮酸转化为乙酰辅酶 A 的过程偏向于吸收较轻的  $^{12}\text{C}$ , 导致脂质的  $\delta^{13}\text{C}$  值较低, 使得未脱脂样品  $\delta^{13}\text{C}$  相对同一脱脂样品  $\delta^{13}\text{C}$  贫化 (Oppel et al. 2010, Elliott et al. 2014), 不同组织所含脂质的比例不同, 因此卵黄需要进行脱脂处理, 而卵清样品无需脱脂处理。

**2.3.1.2 血液** 血液静置 30 min 后离心分离血细胞和血浆 (Hobson et al. 1993b), 离心转速为 5 000 ~ 14 000 g, 离心时间为 3 ~ 15 min (Morrison et al. 2004, Norris et al. 2005, Bauchinger et al. 2010, Storm-Suke et al. 2012)。一些研究指出, 由于血液中脂质的比例较少, 所以血液样品不用脱脂处理 (Hobson et al. 1993b, Bearhop et al. 2002, Hobson et al. 2003, Morrison et al. 2004, Carleton et al. 2005, Cherel et al. 2005, Norris et al. 2005, Podlesak et al. 2005, Bauchinger et al. 2010, Therrien et al. 2011, Wolf et al. 2011, Storm-Suke et al. 2012)。

**2.3.1.3 骨骼** 一种方法是将骨骼研磨为 0.2 mm 的颗粒, 颗粒经脱脂干燥后, 放入 20°C 8% (2.2 mol/L) 的 HCl 溶液中浸泡 20 min, 去除骨碎片中的矿物和有机污染物, 然后将剩余物放入 90°C pH 为 3 的水溶液中浸泡 10 h 进行提取, 骨胶原形成明胶, 杂质剩余在残渣中, 可以通过离心去除, 注意在 8% (2.2 mol/L) 的

HCl 溶液中浸泡时间不宜过长, 否则蛋白链会发生水解溶解在冷水中, 进而丢失 (Longin 1971, Braune et al. 2005)。

另一种方法是将大约 5 mg 的骨放入 1 mol/L 的磷酸溶液中浸泡 24 h, 去除骨胶原中的无机物和碳酸盐, 然后再在 NaOH 中浸泡 6 h, 获得骨胶原 (Yohannes et al. 2012)。提取出的骨胶原经脱脂处理后进行样品测定 (Harding et al. 2001)。

**2.3.1.4 肌肉和内脏** 由于脂质中含有相对较贫化的  $\delta^{13}\text{C}$  值 (Hobson 1995), 而不同物种或相同物种的不同个体体内的脂质组成和含量存在高度异质性, 且个体内不同组织中的脂类种类和含量也存在差异 (贡艺等 2014), 这些差异会直接影响  $\delta^{13}\text{C}$  值的测定结果, 进而导致实验研究得出不同的结果, 为了减少脂质对实验结果的影响, 需要对脂质含量较多的肌肉 (胸肌和腿肌) 和内脏器官如肝、心、小肠、脑、脾、胃、肾等进行脱脂处理 (Hobson et al. 1992, Bauchinger et al. 2009, 2010)。

常用的脱脂方法是将需要脱脂的样品放入索氏提取装置中, 使用有机溶剂 40 ~ 60°C 脱脂 4 ~ 8 h, 将样品中的脂质抽提出来, 其利用的原理即相似相溶原理 (Cherel et al. 2005, Polito et al. 2009, Mori et al. 2013)。最常用的有机溶剂为体积比 2 : 1 的氯仿与甲醇混合溶液 (Sharp et al. 2009, Oppel et al. 2010, Hahn et al. 2012, Ito et al. 2012), 除此之外, 其他研究中用到的有机溶剂有体积比 1 : 1 的甲醇与石油醚混合溶液 (Bearhop et al. 2002)、体积比 1 : 1 的石油醚与乙醚混合溶液 (Polito et al. 2009)、氯仿溶液 (Cherel et al. 2005)、乙醚 (Ricca et al. 2007, Mori et al. 2013)。

研究中用到的一些其他的脱脂方法有漂洗脱脂法, 即直接用体积比为 2 : 1 的氯仿甲醇有机溶剂漂洗样品, 进行脱脂处理 (Ogden et al. 2004); 或者将处理样品放入 50 ml 离心管中, 倒入体积比为 2 : 1 的氯仿甲醇有机溶剂, 离心后收集沉淀物, 重复操作两次, 进行脱脂处理

(Rock et al. 2013); 亦有研究使用超声波萃取法将样品中的脂质抽提出去。脱脂后的样品放入通风橱中 8 ~ 12 h, 使有机溶剂从样品中挥发掉 (Ricca et al. 2007)。

生物体内的脂类包括非极性的脂类 (甘油酯、固醇等) 以及脂蛋白化合物 (糖脂、磷酸酯、鞘脂等) (Rock et al. 2013)。脱脂过程中极性有机溶剂的使用会导致脂蛋白化合物中的氨基酸溶解到有机溶剂中, 进而使测得的样品  $\delta^{15}\text{N}$  偏正或偏负或者无变化 (Yurkowski et al. 2015), 因此, 对特定组织稳定碳、氮同位素比值同时测量时, 选用那种有机试剂进行样品处理需要根据样品中脂肪、脂肪酸和脂蛋白化合物的含量而定。脱脂处理会影响样品中稳定氮同位素的测定, 因此在样品含量允许的条件下, 一般需将样品分为两份, 一份直接测定稳定氮同位素, 一份脱脂后测定稳定碳同位素 (王玄等 2015)。

目前, 一些研究尝试使用建模的方式避免脱脂处理对样品稳定同位素比值的影响, 但研究表明, 不同的物种所适用的模型不同, 模型的适用范围较窄 (Yurkowski et al. 2015), 因此该方法的应用仍需要做进一步的研究。

### 2.3.2 非损伤性组织

**2.3.2.1 羽毛** 鸟类的羽毛一般在很短的时间内或者在特定的地区长成, 且羽毛一旦形成, 羽片和羽枝内的成分不再发生化学反应或同位素置换, 羽毛的稳定同位素比值反应的是其换羽地的稳定同位素比值特征 (Hobson et al. 2008)。根据羽毛的生长规律, 即羽毛尖端早于根部羽毛长出 (郑光美 2012)。在测量羽毛稳定同位素比值时一般剪取羽毛尖端的羽片作为测量样品 (Gow et al. 2012, Hobson et al. 2012)。又有一些研究发现, 羽毛中的一部分氢容易受到周围水蒸气中氢的影响, 因此, 野外采集的羽毛样品在测量氘值前, 需要将样品在测样实验室内放置 2 ~ 3 周, 使受外界影响的那部分氢与周围水蒸气中的氢达到平衡状态 (Wassenaar et al. 2000, Lott et al. 2003)。

**2.3.2.2 卵壳** 虽然卵壳中的有机碳和无机碳  $\delta^{13}\text{C}$  值均能反映周围环境中的  $\delta^{13}\text{C}$  (Johnson et al. 1998), 但是获取有机物和无机碳酸盐的方法不同。卵壳中有机物稳定同位素测量的过程中需要去除无机碳酸盐成分, 一般的处理方法为酸化, 但不同的研究中使用的盐酸 (HCl) 浓度不同, Hobson 等 (2005) 使用 0.1 mol/L HCl 处理白颊鸭 (*Bucephala islandica*) 卵壳中的碳酸盐。Emslie 和 Patterson (2007) 处理阿德利企鹅 (*Pygoscelis adeliae*) 卵壳, 测量卵壳中有机物的  $\delta^{13}\text{C}$ 、 $\delta^{15}\text{N}$  值时, 使用 10% HCl (即 2.74 mol/L HCl) 去除碳酸盐, 用去离子水冲洗沉淀物, 离心弃上清液, 直到样品 pH 达到中性, 冷冻干燥得有机物。Polito 等 (2009) 称取 10 mg 巴布亚企鹅 (*P. papua*) 卵壳放入银杯中与 20  $\mu\text{l}$  6 mol/L HCl 反应, 去除卵壳中的碳酸盐, 酸化的样品常温下放入通风橱中 24 h, 然后放入 60°C 烘箱内 48 h 烘干, 得到卵壳中的有机物。Giardina 等 (2014) 对两种美洲鸵鸟 (*Rhea americana* and *Rhea pennata*) 卵壳的处理方法为取大约 10 mg 的一小片蛋壳, 用去离子水清洗, 去除表面污染物, 与 2 mol/L HCl 反应, 酸化的样品用去离子水冲洗 3 次, 放入通风橱中自然干燥。Johnson 等 (1998) 有关非洲鸵鸟 (*Struthio camelus*) 卵壳的研究中利用 2 mol/L 盐酸去除卵壳内表面和外表面附带的污染物, 再用 7 mol/L 盐酸 (每毫克卵壳的盐酸用量为 0.02 ml) 与卵壳反应获得有机成分。Johnson 等 (1997) 测定非洲鸵鸟化石蛋壳中有机物  $\delta^{13}\text{C}$ 、 $\delta^{15}\text{N}$  值时使用的是 30% HCl (即 8.22 mol/L HCl)。

卵壳中无机碳酸盐稳定同位素的测量需要去除有机物的影响, 去除方法为真空条件下取 2 ~ 3 mg 干燥样品与 100% 磷酸反应 15 min, 产生的二氧化碳 ( $\text{CO}_2$ ) 直接用于稳定同位素分析 (Hobson et al. 1997b, Johnson et al. 1997), 但不同的研究中设置的反应温度不同, 大部分研究设置的反应稳定为 70°C (Hobson et al. 1997b, Polito et al. 2009, Segalen et al. 2009,

Maurer et al. 2011), 也有研究将温度设为 90°C (Johnson et al. 1997)。

## 2.4 研磨

组织样品的研磨多采用机械研磨方法, 对于非损伤性组织蛋壳样品来说, 干燥后的样品脆性较大, 可以使用粉碎机进行样品粉碎; 而对于羽毛样品来说, 其韧性较大, 使用粉碎机研磨达不到要求的粒度, 常规的方法是使用剪刀直接剪碎, 或者使用液氮在研钵中研磨。对于损伤性组织肌肉、内脏等组织可以在样品获得后, 使用陶瓷刀将样品剁碎。

仪器设备的日趋精密对于样品的研磨程度提出了至少 60 目标准筛的要求 (王慧文等 2008), 个别机器甚至提出了 200 目甚至更高的要求 (郭波莉等 2006)。直接剪碎和液氮研磨两种处理方法对于大样本量的样品处理来说相对困难 (杨乐 2011), 目前市场上研发的臼式研磨仪和高通量组织研磨仪, 对羽毛样品的处理提供了很大的帮助, 但在这些仪器的使用中, 样品经过长时间高频率的研磨后, 可能出现磨焦的情况, 这些处理方法对样品的稳定同位素比值有无影响, 有待进一步研究。

## 2.5 储存

样品的储存包括样品采集过程中的样品储存和测样前的样品储存, 不同研究储存样品的方法不同, Ito 等 (2012) 将卵黄样品放入 - 30°C 冰箱中保存, 而 Morrison 和 Hobson (2004)、Hahn 等 (2012) 将卵清、卵黄、血细胞、血浆储存在 - 20°C 条件下, Storm-Suke 等 (2012) 将样品储存在 - 80°C 冰箱。Tsahar 等 (2008) 将粪便和尿液放入 0.01 mol/L HCl 中储存, 但文章中指出这种储存方法可能对氮值有影响。陈立雷等 (2014) 研究了不同的储样容器, 是否会对样品的  $\delta^{13}\text{C}$  和  $\delta^{15}\text{N}$  值有影响, 得出使用聚丙烯和玻璃离心管进行酸处理所得样品的  $\delta^{13}\text{C}$  和  $\delta^{15}\text{N}$  基本无差别。这一研究提醒我们在样品处理过程中应考虑到使用容器的选择, 避免因容器选用不当造成的测量数据不准。蔡先峰等 (2011) 提到有关储存时间对肌肉组织  $\delta^{18}\text{O}$

值的影响, 不同的实验研究得出的结果不同, 因此, 我们建议样品采集后尽快进行测样, 避免因样品储存时间过长造成稳定同位素比值的改变。

## 3 展望

近年来, 稳定同位素技术的应用已引起了生态学家广泛注意, 逐渐成为现代生态和环境科学研究中最有效的方法之一 (林光辉 2010)。随着稳定同位素测定技术的不断进步和方法的日益完善, 稳定同位素样品的预处理方法将在相关研究中发挥越来越重要的作用, 进一步明确生物组织样品的清洗方法、干燥形式、纯化步骤、研磨方式、储存条件差异对样品稳定同位素比值造成的影响, 并基于此确定样品的标准化预处理模式, 对于推动稳定同位素技术的应用具有重大意义。

## 参 考 文 献

- Alisauskas R T, Hobson K A. 1993. Determination of lesser snow goose diets and winter distribution using stable isotope analysis. *Journal of Wildlife Management*, 57(1): 49-54.
- Barquete V, Strauss V, Ryan P G. 2013. Stable isotope turnover in blood and claws: A case study in captive african penguins. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 448(10): 121-127.
- Bauchinger U, Keil J, McKinney R A, et al. 2010. Exposure to cold but not exercise increases carbon turnover rates in specific tissues of a passerine. *Journal of Experimental Biology*, 213(3): 526-534.
- Bauchinger U, McWilliams S. 2009. Carbon turnover in tissues of a passerine bird: Allometry, isotopic clocks, and phenotypic flexibility in organ size. *Physiological and Biochemical Zoology*, 82(6): 787-797.
- Bearhop S, Waldron S, Votier S C, et al. 2002. Factors that influence assimilation rates and fractionation of nitrogen and carbon stable isotopes in avian blood and feathers. *Physiological and Biochemical Zoology*, 75(5): 451-458.
- Braune B M, Hobson K A, Malone B J. 2005. Regional differences in collagen stable isotope and tissue trace element profiles in

- populations of long-tailed duck breeding in the canadian arctic. *Science of the Total Environment*, 346(1/3): 156–168.
- Carleton S A, Bakken B H, del Rio C M. 2006. Metabolic substrate use and the turnover of endogenous energy reserves in broad-tailed hummingbirds (*Selasphorus platycercus*). *Journal of Experimental Biology*, 209(14): 2622–2627.
- Carleton S A, del Rio C M. 2005. The effect of cold-induced increased metabolic rate on the rate of  $(^{13}\text{C})$  and  $(^{15}\text{N})$  incorporation in house sparrows (*Passer domesticus*). *Oecologia*, 144(2): 226–232.
- Cherel Y, Hobson K A, Bailleul F R, et al. 2005. Nutrition, physiology, and stable isotopes: New information from fasting and molting penguins. *Ecology*, 86(11): 2881–2888.
- de Lecea A M, Smit A J, Fennessy S T. 2011. The effects of freeze/thaw periods and drying methods on isotopic and elemental carbon and nitrogen in marine organisms, raising questions on sample preparation. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 25(23): 3640–3649.
- Denadai J C, Ducatti C, Sartori J R, et al. 2008. The traceability of animal meals in layer diets as detected by stable carbon and nitrogen isotope analyses of eggs. *Brazilian Journal of Poultry Science*, 10(3): 189–194.
- Elliott K H, Davis M, Elliott J E. 2014. Equations for lipid normalization of carbon stable isotope ratios in aquatic bird eggs. *Plos One*, 9(1): 1–7.
- Emslie S D, Patterson W P. 2007. Abrupt recent shift in  $\delta^{13}\text{C}$  and  $\delta^{15}\text{N}$  values in adelic penguin eggshell in antarctica. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(28): 11666–11669.
- Ferrari R P, Martinelli R, Saino N. 2006. Differential effects of egg albumen content on barn swallow nestlings in relation to hatch order. *Journal of Evolutionary Biology*, 19(3): 981–993.
- Giardina M A, Neme G A, Gil A F. 2014. Rheidae egg human exploitation and stable isotopes: Trends from west central argentina. *International Journal of Osteoarchaeology*, 24(2): 166–186.
- Gloutney M L, Hobson K A. 1998. Field preservation techniques for the analysis of stable-carbon and nitrogen isotope ratios in eggs. *Journal of Field Ornithology*, 69(2): 223–227.
- Gow E A, Stutchbury B J M, Done T, et al. 2012. An examination of stable hydrogen isotope ( $\delta\text{D}$ ) variation in adult and juvenile feathers from a migratory songbird. *Canadian Journal of Zoology*, 90(5): 585–594.
- Hahn S, Dimitrov D, Rehse S, et al. 2014. Avian claw morphometry and growth determine the temporal pattern of archived stable isotopes. *Journal of Avian Biology*, 45(2): 202–207.
- Hahn S, Hoyer B J, Korthals H, et al. 2012. From food to offspring down: Tissue-specific discrimination and turn-over of stable isotopes in herbivorous waterbirds and other avian foraging guilds. *Plos One*, 7(2): 1–6.
- Harding E K, Stevens E. 2001. Using stable isotopes to assess seasonal patterns of avian predation across a terrestrial-marine landscape. *Oecologia*, 129(3): 436–444.
- Hobson K A. 1995. Reconstructing avian diets using stable-carbon and nitrogen isotope analysis of egg components—patterns of isotopic fractionation and turnover. *Condor*, 97(3): 752–762.
- Hobson K A, Alisauskas R T, Clark R G. 1993a. Stable-nitrogen isotope enrichment in avian-tissues due to fasting and nutritional stress—implications for isotopic analyses of diet. *Condor*, 95(2): 388–394.
- Hobson K A, Bairlein F. 2003. Isotopic fractionation and turnover in captive garden warblers (*Sylvia borin*): Implications for delineating dietary and migratory associations in wild passerines. *Canadian Journal of Zoology: Revue Canadienne De Zoologie*, 81(9): 1630–1635.
- Hobson K A, Bond A L. 2012. Extending an indicator: Year-round information on seabird trophic ecology from multiple-tissue stable-isotope analyses. *Marine Ecology Progress Series*, 461(3): 233–243.
- Hobson K A, Clark R G. 1992. Assessing avian diets using stable isotopes. 1. Turnover of  $\text{C-13}$  in tissues. *Condor*, 94(1): 181–188.
- Hobson K A, Clark R G. 1993b. Turnover of  $\text{C-13}$  in cellular and plasma fractions of blood—implications for nondestructive sampling in avian dietary studies. *Auk*, 110(3): 638–641.
- Hobson K A, Hughes K D, Ewins P J. 1997b. Using stable-isotope analysis to identify endogenous and exogenous sources of nutrients in eggs of migratory birds: Applications to great lakes contaminants research. *Auk*, 114(3): 467–478.
- Hobson K A, McFarland K P, Wassenaar L I, et al. 2001. Linking breeding and wintering grounds of bicknell's thrushes using stable isotope analyses of feathers. *Auk*, 118(1): 16–23.

- Hobson K A, Piatt J F, Pitocchelli J. 1994. Using stable isotopes to determine seabird trophic relationships. *Journal of Animal Ecology*, 63(4): 786–798.
- Hobson K A, Thompson J E, Evans M R, et al. 2005. Tracing nutrient allocation to reproduction in barrow's goldeneye. *Journal of Wildlife Management*, 69(3): 1221–1228.
- Hobson K A, Wassenaar L I. 1997a. Linking brooding and wintering grounds of neotropical migrant songbirds using stable hydrogen isotopic analysis of feathers. *Oecologia*, 109(1): 142–148.
- Hobson K A, Wassenaar L I. 2008. *Tracking Animal Migration with Stable Isotopes*. San Diego: Elsevier Academic Pressinc.
- Ito M, Kazama K, Niizuma Y, et al. 2012. Prey resources used for producing egg yolks in four species of seabirds: Insight from stable-isotope ratios. *Ornithological Science*, 11(2): 113–119.
- Jason B W, Gabriel J B, Todd E D, et al. 2010. *Isoscapes-Understanding Movement, Pattern, and Process on Earth Through Isotope Mapping*. Berlin: Springer Netherlands.
- Johnson B J, Fogel M L, Miller G H. 1998. Stable isotopes in modern ostrich eggshell: A calibration for paleoenvironmental applications in semi-arid regions of southern africa. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 62(14): 2451–2461.
- Johnson B J, Miller G H, Fogel M L, et al. 1997. The determination of late quaternary paleoenvironments at equus cave, south africa, using stable isotopes and amino acid racemization in ostrich eggshell. *Palaeogeography Palaeoclimatology Palaeoecology*, 136(1/4): 121–137.
- Klaassen M, Baarspul T, Dekkers T, et al. 2004. The relationship between carbon stable isotope ratios of hatchling down and egg yolk in black-headed gulls. *Journal of Field Ornithology*, 75(2): 196–199.
- Longin R. 1971. New method of collagen extraction for radiocarbon dating. *Nature*, 230(5291): 241–242.
- Lott C A, Meehan T D, Heath J A. 2003. Estimating the latitudinal origins of migratory birds using hydrogen and sulfur stable isotopes in feathers: Influence of marine prey base. *Oecologia*, 134(4): 505–510.
- Mabee T J. 1997. Using eggshell evidence to determine nest fate of shorebirds. *Wilson Bulletin*, 109(2): 307–313.
- Mateo M A, Serrano O, Serrano L, et al. 2008. Effects of sample preparation on stable isotope ratios of carbon and nitrogen in marine invertebrates: Implications for food web studies using stable isotopes. *Oecologia*, 157(1): 105–115.
- Maurer G, Portugal S J, Boomer I, et al. 2011. Avian embryonic development does not change the stable isotope composition of the calcite eggshell. *Reproduction Fertility and Development*, 23(2): 339–345.
- McKinnon E A, Fraser K C, Diamond A W, et al. 2012. Stable-hydrogen isotope turnover in red blood cells of two migratory thrushes: Application to studies of connectivity and carry-over effects. *Journal of Field Ornithology*, 83(3): 306–314.
- Mori C, Ducatti C, Pizzolante C C, et al. 2013. Traceability of animal meals in japanese quail eggs using the technique of  $^{13}\text{C}$  e  $^{15}\text{N}$ \* stable isotopes. *Brazilian Journal of Poultry Science*, 15(1): 59–64.
- Mori C, Garcia E A, Ducatti C, et al. 2007. Traceability of animal byproducts in quail (*Coturnix coturnix japonica*) tissues using carbon (c-13/c-12) and nitrogen (n-15/n-14) stable isotopes. *Brazilian Journal of Poultry Science*, 9(4): 263–269.
- Morrison R I G, Hobson K A. 2004. Use of body stores in shorebirds after arrival on high-arctic breeding grounds. *Auk*, 121(2): 333–344.
- Muñoz-Gil J, Marín-Espinoza G, Andrade-Vigo J, et al. 2012. Trophic position of the neotropic cormorant (*Phalacrocorax brasilianus*): Integrating diet and stable isotope analysis. *Journal of Ornithology*, 154(1): 13–18.
- Natsumeda T, Sakano H, Tsuruta T, et al. 2015. Immigration of the common cormorant *phalacrocorax carbo hanedae* into inland areas of the northern part of nagano prefecture, eastern japan, inferred from stable isotopes of carbon, nitrogen and sulphur. *Fisheries Science*, 81(1): 131–137.
- Norris D R, Marra P P, Kyser T K, et al. 2005. Tracking habitat use of a long-distance migratory bird, the american redstart *setophaga ruticilla*, using stable-carbon isotopes in cellular blood. *Journal of Avian Biology*, 36(2): 164–170.
- Ogden L J E, Hobson K A, Lank D B. 2004. Blood isotopic ( $\delta^{13}\text{C}$  and  $\delta^{15}\text{N}$ ) turnover and diet-tissue fractionation factors in captive dunlin (*Calidris alpina pacifica*). *Auk*, 121(1): 170–177.
- Oppel S, Federer R N, O'Brien D M, et al. 2010. Effects of lipid extraction on stable isotope ratios in avian egg yolk: Is arithmetic correction a reliable alternative? *Auk*, 127(1): 72–78.
- Oppel S, Powell A N, O'Brien D M. 2009. Using eggshell membranes as a non-invasive tool to investigate the source of nutrients in avian eggs. *Journal of Ornithology*, 150(1): 109–115.



- Perez G E, Hobson K A, Garde E J, et al. 2010. Deuterium ( $\delta D$ ) in feathers of mongolian waterbirds uncovers migratory movements. *Waterbirds*, 33(4): 438–443.
- Phillips R A, Bearhop S, McGill R A, et al. 2009. Stable isotopes reveal individual variation in migration strategies and habitat preferences in a suite of seabirds during the nonbreeding period. *Oecologia*, 160(4): 795–806.
- Podlesak D W, McWilliams S R, Hatch K A. 2005. Stable isotopes in breath, blood, feces and feathers can indicate intra-individual changes in the diet of migratory songbirds. *Oecologia*, 142(4): 501–510.
- Polito M J, Fisher S, Tobias C R, et al. 2009. Tissue-specific isotopic discrimination factors in gentoo penguin (*Pygoscelis papua*) egg components: Implications for dietary reconstruction using stable isotopes. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 372(1/2): 106–112.
- Ricca M A, Miles A K, Anthony R G, et al. 2007. Effect-of lipid extraction on analyses of stable carbon and stable nitrogen isotopes in coastal organisms of the aleutian archipelago. *Canadian Journal of Zoology-Revue Canadienne De Zoologie*, 85(1): 40–48.
- Rock L, Rowe S, Czerwiec A, et al. 2013. Isotopic analysis of eggs: Evaluating sample collection and preparation. *Food Chemistry*, 136(3/4): 1551–1556.
- Sedgen L, Lee-Thorp J A. 2009. Palaeoecology of late early miocene fauna in the namib based on c-13/c-12 and o-18/o-16 ratios of tooth enamel and ratite eggshell carbonate. *Palaeogeography Palaeoclimatology Palaeoecology*, 277(3/4): 191–198.
- Sharp C M, Abraham K F, Burness G. 2009. Embryo development influences the isotopic signatures of egg components in incubated eggs. *Condor*, 111(2): 361–365.
- Steele W K. 2005. Stable isotope ratios of antarctic petrel (*Thalassoica antarctica*) and snow petrel (*Pagodroma nivea*) bone collagen. *Polar Biology*, 28(9): 672–679.
- Storm-Suke A, Wassenaar L I, Nol E, et al. 2012. The influence of metabolic rate on the contribution of stable-hydrogen and oxygen isotopes in drinking water to quail blood plasma and feathers. *Functional Ecology*, 26(5): 1111–1119.
- Therrien J F, Fitzgerald G, Gauthier G, et al. 2011. Diet-tissue discrimination factors of carbon and nitrogen stable isotopes in blood of snowy owl (*Bubo scandiacus*). *Canadian Journal of Zoology-Revue Canadienne De Zoologie*, 89(4): 343–347.
- Tsahar E, Wolf N, Izhaki I, et al. 2008. Dietary protein influences the rate of n-15 incorporation in blood cells and plasma of yellow-vented bulbuls (*Pycnonotus xanthopygos*). *Journal of Experimental Biology*, 211(3): 459–465.
- Wassenaar L I, Hobson K A. 2000. Stable-carbon and hydrogen isotope ratios reveal breeding origins of red-winged blackbirds. *Ecological Applications*, 10(3): 911–916.
- Wolf N, Bowen G J, del Rio C M. 2011. The influence of drinking water on the  $\delta D$  and  $\delta O-18$  values of house sparrow plasma, blood and feathers. *Journal of Experimental Biology*, 214(1): 98–103.
- Wunder M B, Kester C L, Knopf F L, et al. 2005. A test of geographic assignment using isotope tracers in feathers of known origin. *Oecologia*, 144(4): 607–617.
- Yohannes E, Lee R, Popenko V, et al. 2012. Bone collagen and muscle  $\delta C-13$  in relation to the timing of the migration of garden warblers sylvia borin during return migration from africa. *Journal of Ornithology*, 153(3): 783–791.
- Yurkowski D J, Hussey N E, Semeniuk C, et al. 2015. Effects of lipid extraction and the utility of lipid normalization models on  $\delta C-13$  and  $\delta N-15$  values in arctic marine mammal tissues. *Polar Biology*, 38(2): 131–143.
- 蔡先峰, 郭波莉, 魏益民, 等. 2011. 基于动物组织器官中稳定性同位素组成变化的溯源研究进展. *核农学报*, 25(2): 302–307.
- 陈立雷, 张媛媛, 贺行良, 等. 2014. 海洋沉积物有机碳和稳定氮同位素分析的前处理影响. *沉积学报*, 32(06): 1046–1051.
- 丛日杰. 2013. 利用稳定性同位素建立斑背大尾莺的迁徙连接 (migration connectivity). 哈尔滨: 东北林业大学硕士学位论文.
- 贡艺, 陈新军, 高春霞, 等. 2014. 脂类抽提对北太平洋柔鱼肌肉碳、氮稳定同位素测定结果的影响. *应用生态学报*, 25(11): 3349–3356.
- 管理, 胡耀武, 胡松梅, 等. 2008. 陕北靖边五庄果犏动物骨的 c 和 n 稳定同位素分析. *第四纪研究*, 28(6): 1160–1165.
- 郭波莉, 魏益民, 潘家荣, 等. 2006. 牛不同组织中稳定性碳同位素组成及变化规律研究. *中国农业科学*, 39(9): 1885–1890.
- 李继荣, 杨乐, 曹建, 等. 2015. 青藏高原 3 种常见鸟类卵壳膜稳定碳、氮同位素组成特征. *四川动物*, 34(5): 683–687+694.
- 李银凤, 张哲乾, 尚占环. 2015. 我国动物组织器官稳定同位素研究进展. *核农学报*, 29(3): 605–615.
- 林光辉. 2010. 稳定同位素生态学: 先进技术推动的生态学新分支. *植物生态学报*, 34(2): 119–122.

- 刘瑀, 刘保占, 李颖, 等. 2013. 样品前处理方法对海洋食物网稳定同位素组成分析的影响. *海洋环境科学*, 32(2): 295–299.
- 宋大伟, 李明财, 李来兴, 等. 2007. 高寒草甸消费者种群稳定碳、氮同位素组成的海拔分异. *生态学杂志*, 26(1): 40–45.
- 王慧文, 杨曙明, 程永友. 2008. 鸡肉中稳定同位素组成与饲料和饮水关系的研究. *分析科学学报*, 24(1): 47–50.
- 王玄, 江红星, 张亚楠. 2015. 稳定同位素分析在鸟类食性及营养级结构中的应用. *生态学报*, 35(16): 5556–5569.
- 杨乐. 2011. 利用稳定同位素进行迁徙鸟类溯源的初步研究. 北京: 中国科学院研究生院硕士学位论文.
- 杨月琴, 易现峰, 李宁. 2009. 利用稳定同位素技术分析青海湖优势水鸟的营养级结构. *动物学研究*, 30(4): 418–422.
- 易现峰, 张晓爱, 李来兴, 等. 2004. 高寒草甸生态系统食物链结构分析——来自稳定性碳同位素的证据. *动物学研究*, 25(1): 1–6.
- 易现峰, 张晓爱. 2005. 稳定性同位素技术在生态学上的应用. *生态学杂志*, 24(03): 306–314.
- 张璇, 华宁, 汤臣栋, 等. 2013. 崇明东滩黑腹滨鹬 (*Calidris alpina*) 食物来源和组成的稳定同位素分析. *复旦学报: 自然科学版*, 52(1): 112–118.
- 郑光美. 2012. 鸟类学. 2 版. 北京: 北京师范大学出版社.