

盐度胁迫对三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*) 鳃中游离氨基酸含量的影响*

付 萍¹ 吕建建² 刘 萍^{2,3①} 李 健^{2,3}

(1. 大连海洋大学水产与生命学院 大连 116023; 2. 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室
中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071; 3. 青岛海洋科学与技术国家实验室
海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 青岛 266071)

摘要 本研究分析了不同盐度环境下三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)鳃组织中游离氨基酸(FAAs)的含量及浓度变化规律,明确 FAAs 的组成及其在盐度适应中发挥的功能。结果显示,在正常海水中,三疣梭子蟹鳃组织中牛磺酸(Tau)的浓度最高(2.54 mg/g),其次分别为丙氨酸(Ala, 0.65 mg/g)、谷氨酸(Glu, 0.64 mg/g)、精氨酸(Arg, 0.58 mg/g)、甘氨酸(Gly, 0.48 mg/g)和脯氨酸(Pro, 0.25 mg/g);在盐度 10–50 范围内,梭子蟹鳃中总游离氨基酸(TOFAA)的含量随盐度的增加而显著升高($P < 0.05$),盐度 50 时,TOFAA 的含量为盐度 10 时的 1.48 倍。进一步分析发现,非必需氨基酸(NEAA)(Gly、Glu、Ala 和 Pro)的浓度随盐度的升高而上升,而必需氨基酸(EAA)的浓度变化不显著($P > 0.05$)。研究表明,FAAs 在三疣梭子蟹盐度适应中具有重要功能,其中发挥渗透调节功能的主要为 NEAA。

关键词 三疣梭子蟹;鳃;盐度;游离氨基酸(FAAs);总游离氨基酸(TOFAA);非必需氨基酸(NEAA);必需氨基酸(EAA)

中图分类号 S917 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2016)05-0122-05

三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)隶属甲壳纲(Crustacea)、十足目(Decapoda)、梭子蟹科(Portunidae)、梭子蟹属(*Portunus*),广泛分布于中国近海、日本、朝鲜半岛及马来西亚群岛等海域,是我国重要的海产经济蟹类,也是海水人工养殖的主要种类之一(戴爱云等,1977、1986),具有产量大、营养价值高等优点,1981 年以来已被列为我国海洋水产养殖对象(孙颖民等,2005)。盐度是三疣梭子蟹养殖中重要的环境因素之一,对其呼吸、代谢、生长、存活以及免疫防御有着极其重要的影响(周双林等,2001)。

甲壳类渗透压调节机理研究主要集中于离子转运机制,其中主要依靠 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 调节细胞内 Na^+ 、 K^+ 含量的稳定(江山等,2011)。游离氨基酸(FAAs)

在甲壳动物渗透压调节中也具有重要作用(Clark, 1968; Boone *et al*, 1977; Dalla-Via, 1986)。Dalla-Via (1986)发现,甘氨酸(Gly)、脯氨酸(Pro)、精氨酸(Arg)、丝氨酸(Ser)、苏氨酸(Thr)及丙氨酸(Ala)是凡纳滨对虾(*Litopenaeus vanamei*)渗透压调节的主要贡献者。Fang 等(1992)研究发现,当外界盐度发生变化时,Gly、Pro、Ala、Arg、Tau 在调节斑节对虾(*Penaeus monodon*)体内渗透压方面具有主要作用。本课题组通过比较转录组学研究发现,不同盐度胁迫下,差异表达基因也富集于一些 FAAs 通路(Lv *et al*, 2013)。然而,目前尚未见蟹类相关研究报道,其体内的 FAAs 是否在渗透压调节中发挥相似或有别于对虾类的功能值得进一步研究。

* 国家自然科学基金面上项目(41576147)、国家自然科学基金青年科学基金项目(41306177)和青岛海洋科学与技术国家实验室鳌山科技创新计划项目(2015ASKJ02)共同资助。付 萍, E-mail: fuping198708@163.com

① 通讯作者:刘 萍,研究员, E-mail: liuping@ysfri.ac.cn

收稿日期:2015-09-06, 收修改稿日期:2015-10-19

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验于 2015 年 7 月在中国水产科学研究院黄海水产研究所昌邑市海丰水产养殖有限公司实验基地进行, 取健康三疣梭子蟹, 个体平均体重为(100±10.0) g, 暂养于 3 m³ 的室内水池中, 水温为(25.0±3.0)℃, 盐度为 33, 持续充氧, 每天更换 1/3 体积的海水, 定时喂食蓝蛤。

1.2 实验方法

实验盐度分别为 10、20、40 和 50, 每组 3 个重复, 对照组为海水(盐度为 33), 盐度胁迫 5 d 后, 随机从每个实验组中抽取 10 只蟹, 取其鳃组织约 1.5 g 左右, 加入 5 ml 8% 的三氯乙酸(TCA), 沉淀蛋白, 超声波破碎, 使之均质, 1℃、13000 r/min 离心 20 min, 保留上清液, 用 TCA 再提取 2 次, 收集上清液, 加乙醚 30 ml, 振荡 30 s, 水层用低压旋转蒸发器浓缩至近干, 浓缩物用 0.02 mol/L 盐酸定容至 10 ml, 以日立 835-50 型氨基酸自动分析仪进行 FAAs 测定(Dalla-Via, 1986; Shewbart *et al*, 1972; McCoid *et al*, 1984)。

1.3 数据的统计学分析

采用 STATISTIC 软件对数据进行统计学分析。先对数据作方差分析, 若有显著差异, 再作 Duncan's 多重比较。结果用“平均数±标准差”表示, $P < 0.05$ 为差异显著。

2 结果

2.1 正常海水鳃组织中游离氨基酸的组成与含量

实验共检测了 18 种 FAAs, 总含量为 6.34 mg/g, 其中 Tau 含量最高(2.54 mg/g), 占总量的 40.06%, 其次分别为 Ala (0.65 mg/g)、Glu (0.64 mg/g)、Arg (0.58 mg/g)、Gly (0.48 mg/g) 和 Pro (0.25 mg/g), 含量最低的为甲硫氨酸(Met, 0.02 mg/g), 分别占总游离氨基酸(TOFAA)的 10.25%、10.09%、9.15%、7.57%、3.94% 和 0.32% (表 1)。所检测 FAAs 中包含 9 种必需氨基酸(EAA) (Thr、Val、Met、Ile、Leu、Phe、Lys、His 和 Arg) 和 9 种非必需氨基酸(NEAA) (Glu、Ala、Gly、Asp、Ser、Cys、Tyr、Pro 和 Tau), 分别占 TOFAA 含量的 20.88% 和 79.12%。其中, NEAA 中的 Asp、Glu、Gly 和 Ala 属鲜味氨基酸(TAA), 分别占 TOFAA 和 NEAA 含量的 29.07% 和 36.74%。

2.2 盐度胁迫下鳃组织中游离氨基酸的组成与含量

随盐度改变, 鳃中大多数 FAAs 含量发生显著变化, 总体趋势为 FAAs 含量随着外界盐度的升高而升高 ($P < 0.05$), 盐度 50 时, TOFAA 为盐度 10 时的 1.48 倍。Gly、Glu、Ala 和 Pro 的含量与盐度呈现显著正相关, 其中, 浓度变化最大的为 Pro, 盐度 50 时, 其浓度为盐度 10 时的 5.60 倍, 其次为 Gly(3.47 倍)、Glu(1.84 倍)、Ala(1.59 倍)。另外发现, Arg 含量与盐度呈显著负相关, 盐度 50 时的浓度为盐度 10 时浓度的 0.67 倍。含量较高的 Tau 与其他 FAAs 随着盐度的升高无显著变化(图 1、表 1)。

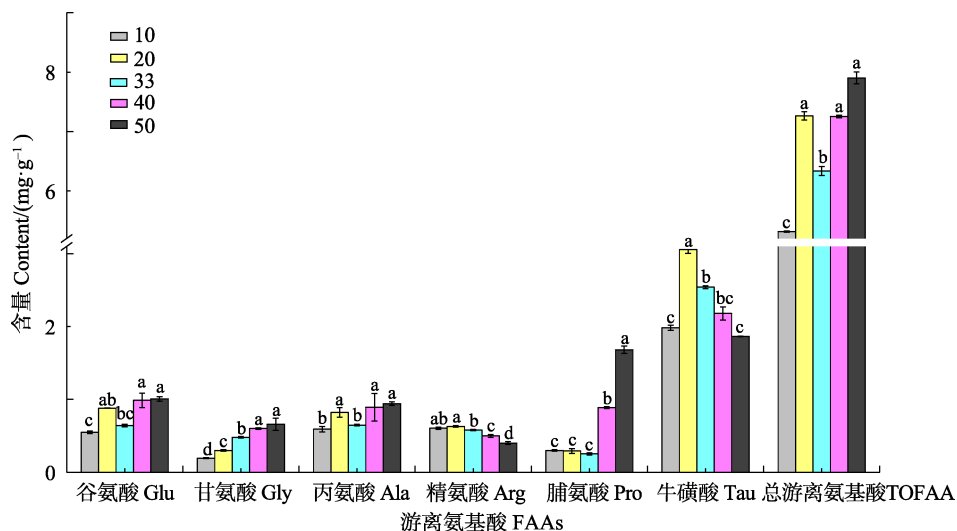


图 1 盐度胁迫下三疣梭子蟹鳃组织中游离氨基酸的变化情况

Fig.1 Variations in the concentrations of free amino acids in the gills of *P. trituberculatus* under different salinities

相同字母为差异不显著($P > 0.05$), 不同字母表示差异显著($P < 0.05$)。下同
the same letters indicate no significant difference ($P > 0.05$) and the different letters indicate significant difference ($P < 0.05$). The same as below

表 1 不同盐度下三疣梭子蟹鳃中游离氨基酸的含量

FAAs	S10	S20	S33	S40	S50
Asp	0.08±0.02 ^{ab}	0.09±0.03 ^a	0.07±0.01 ^{ab}	0.08±0.01 ^{ab}	0.06±0.02 ^b
Thr	0.06±0.01 ^b	0.08±0.01 ^a	0.06±0.01 ^{ab}	0.05±0.01 ^b	0.08±0.03 ^a
Ser	0.09±0.01 ^b	0.12±0.01 ^{ab}	0.11±0.03 ^{ab}	0.10±0.03 ^{ab}	0.15±0.04 ^a
Glu	0.55±0.02 ^c	0.88±0.01 ^{ab}	0.64±0.02 ^{bc}	0.99±0.10 ^a	1.01±0.32 ^a
Gly	0.19±0.01 ^d	0.30±0.01 ^c	0.48±0.01 ^b	0.60±0.08 ^a	0.66±0.19 ^a
Ala	0.59±0.04 ^b	0.82±0.07 ^a	0.65±0.01 ^b	0.89±0.19 ^a	0.94±0.03 ^a
Cys	0.15±0.01	0.20±0.03	0.15±0.02	0.20±0.05	0.18±0.01
Val	0.10±0.01 ^b	0.14±0.01 ^a	0.14±0.04 ^a	0.12±0.03 ^{ab}	0.15±0.01 ^a
Met	0.03±0.01 ^c	0.02±0.01 ^c	0.02±0.01 ^c	0.06±0.04 ^b	0.12±0.05 ^a
Ile	0.05±0.01 ^b	0.07±0.01 ^{ab}	0.08±0.02 ^a	0.05±0.01 ^b	0.07±0.01 ^{ab}
Leu	0.11±0.01 ^b	0.14±0.02 ^a	0.10±0.01 ^b	1.00±0.01 ^b	0.13±0.01 ^a
Tyr	1.00±0.01 ^b	0.11±0.01 ^b	0.12±0.05 ^a	0.07±0.03 ^b	0.10±0.01 ^b
Phe	0.07±0.01 ^b	0.08±0.02 ^{ab}	0.09±0.01 ^{ab}	0.10±0.03 ^a	0.08±0.01 ^{ab}
His	0.15±0.01 ^b	0.14±0.01 ^b	0.13±0.01 ^b	0.17±0.02 ^a	0.15±0.01 ^b
Lys	0.12±0.01 ^a	0.09±0.01 ^b	0.13±0.02 ^a	0.09±0.02 ^b	0.09±0.01 ^b
Arg	0.60±0.02 ^{ab}	0.63±0.01 ^a	0.58±0.01 ^b	0.50±0.02 ^c	0.40±0.02 ^d
Pro	0.30±0.01 ^c	0.29±0.03 ^c	0.25±0.02 ^c	0.89±0.01 ^b	1.68±0.23 ^a
Tau	1.99±0.04 ^c	3.06±0.51 ^a	2.54±0.02 ^b	2.18±0.09 ^{bc}	1.87±0.01 ^c
TOFAA	5.32±0.01 ^c	7.26±0.33 ^a	6.34±0.08 ^b	7.25±0.02 ^a	7.90±0.76 ^a

注: 同行数据中上标字母不同表示差异显著($P<0.05$)

Note: Data within the same column with different superscript are significantly different ($P<0.05$)

2.3 必需氨基酸和非必需氨基酸对盐度胁迫的响应

实验分析了 EAA 和 NEAA 在盐度胁迫下的浓度变化趋势, 结果显示, 鳃组织中 EAA 的总量随盐度的变化并无显著性的改变, 而 NEAA 的总量随外界盐度的升高而显著增加, 盐度 50 时 NEAA 的含量为盐度 10 时的 1.64 倍。另外, TAA 的浓度也与外界盐度呈显著正相关($P<0.05$)(图 2)。

3 讨论

鳃是甲壳动物渗透压调节的重要场所与器官(潘鲁青等, 2005), 本研究通过检测和分析不同盐度环境下三疣梭子蟹鳃组织中 FAAs 的含量及浓度变化规律, 明确 FAAs 的组成及在盐度适应中发挥的功能, 丰富 FAAs 在甲壳动物盐度适应中的重要作用, 为深入研究其分子机理提供数据支持。

研究发现, Tau 在正常海水三疣梭子蟹鳃中含量最高, 其次为 Ala、Glu、Arg、Gly、Pro。该结果与 Gerard 等(1972)研究蓝蟹(*Callinectes sapidus*)中得到

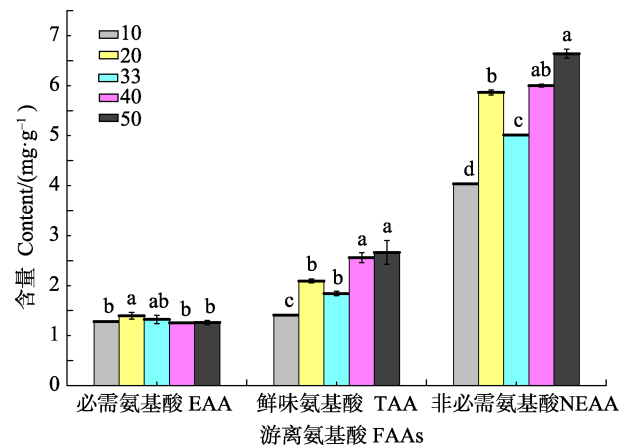


图 2 三疣梭子蟹鳃组织中必需氨基酸和非必需氨基酸对盐度胁迫的响应

Fig.2 Concentrations of essential amino acids and non-essential amino acids in the gills of *P. trituberculatus* in response to different salinities

的结果一致, 而相对对虾存在一定的差别。梁萌青等(2009)、黄凯等(2010)研究发现, 凡纳滨对虾血淋巴和肌肉中含量最高的 FAAs 为 Gly, 可能是因为物种的差异性或分析的组织不同所造成的。当盐度升高

时, 三疣梭子蟹鳃中的 TOFAA 的含量显著增加 ($P<0.05$), 盐度 50 时 TOFAA 为盐度 10 时的 1.48 倍, 上升幅度最大的 FAAs 依次为 Pro (5.60 倍)、Gly (3.47 倍)、Glu (1.84 倍) 和 Ala (1.59 倍), 表明其在三疣梭子蟹盐度适应中发挥渗透压调节功能。该结果与 McCoid 等(1984)与 Fang 等(1992)认为的 FAAs 在对虾体内具有渗透压调节作用相吻合, 然而具体到每种 FAAs 又有所不同。McCoid 等(1984)认为, 日本对虾 (*Marsupenaeu japonicus*) 中 Gly、Pro 和 Ala 是主要的渗透压调节剂, Fang 等(1992)研究发现, Gly、Pro、Ala、氨及 Tau 在斑节对虾体内起着重要的渗透压调节作用, 表明在虾蟹中发挥渗透压调控的 FAAs 大致相同, 且又存在一定的特殊性。

在许多海洋生物中已经证实, FAAs 中具有渗透压调节作用的是 NEAA, 随着外界盐度的升高, NEAA 的含量显著增加, 而 EAA 的含量保持稳定 (McNamara *et al*, 2004; Hosoi *et al*, 2007)。本研究同样发现, NEAA 的总量随盐度的升高而增加 ($P<0.05$), 其中包括与盐度显著正相关的 FAAs (Gly、Glu、Ala 和 Pro) ($P<0.05$), 而与 NEAA 相对的 EAA, 其总量变化不显著 ($P>0.05$), 表明在三疣梭子蟹体内发挥渗透压调节作用的 FAAs 主要为 NEAA。值得注意的是, TAA 的浓度在 NEAA 浓度随盐度上调中占很大比例 (34% 以上), 暗示其在渗透调节中发挥重要作用。

有趣的是, 本研究发现, 盐度 20 时三疣梭子蟹体内 FAAs 含量较高, 仅次于盐度 50。已有研究表明, 在等渗条件下, 水生生物不需要消耗能量调节渗透压, 生长速度较快, 摄食量也较大, 体内氨基酸合成旺盛。当外界水环境盐度高于或者低于三疣梭子蟹的等渗点时, 摄食欲望降低, 且需要付出一些能量来满足离子和渗透压调节的新陈代谢消耗, 许多广盐类生物都具有这种特性 (周裕华等, 2014; 王云峰等, 2002)。在实验过程中, 同样观察到类似现象, 盐度 20 时三疣梭子蟹摄食量大、活力较强且死亡率低。另外, 隋延鸣等(2012)研究表明, 三疣梭子蟹最适生长盐度为 18.7–28.7, 据此推测, 三疣梭子蟹等渗点临近盐度 20。然而, 体内 FAAs 浓度是否与甲壳动物等渗点盐度相关尚需进一步研究证实。

参 考 文 献

王云峰, 朱鑫华. 盐度对鱼类生态生理学特征的影响. 海洋科学集刊, 2002, 44(5): 151–158
江山, 许强华. 盐度胁迫对三疣梭子蟹鳃 Na^+/K^+ -ATPase 酶活的影响. 水产学报, 2011, 35(10): 1475–1480

孙颖民, 闫愚, 孙进杰. 三疣梭子蟹的幼体发育. 水产学报, 2005, 8(3): 219–226
周双林, 姜乃澄, 卢建平, 等. 甲壳动物渗透压调节的研究进展 I. 鳃的结构与功能及其影响因子. 东海海洋, 2001, 19(1): 44–51
周裕华, 潘桂平, 周文玉, 等. 水体盐度对三疣梭子蟹生长及存活的影响. 湖南农业科学, 2014(10): 64–66
黄凯, 蒋焕超, 吴宏玉, 等. 盐度对凡纳滨对虾肌肉中游离氨基酸含量的影响. 海洋渔业, 2010(4): 422–426
梁萌青, 王士稳, 王家林, 等. 不同盐度对凡纳滨对虾血淋巴及肌肉游离氨基酸组成的影响. 渔业科学进展, 2009, 30(2): 34–39
隋延鸣, 高保全, 刘萍, 等. 三疣梭子蟹“黄选 1 号”盐度耐受性及适宜生长盐度分析. 大连海洋大学学报, 2012, 27(5): 398–401
潘鲁青, 刘泓宇. 甲壳动物渗透调节生理学研究进展. 水产学报, 2005, 29(1): 109–114
戴爱云, 冯钟琪, 宋玉枝, 等. 三疣梭子蟹渔业生物资源的初步调查. 动物学杂志, 1977(2): 30–33
戴爱云, 杨思凉, 宋玉枝, 等. 中国海洋蟹类. 北京: 海洋出版社, 1986, 213–214
Boone WR, Claybrook DL. The effect of low salinity on amino acid metabolism in the tissues of the common mud crab, *Panopeus herbstii* (Milne-Edwards). Comp Biochem Physiol A: Physiol, 1977, 57(1): 99–106
Clark ME. A survey of the effect of osmotic dilution on free amino acids of various polychaetes. Biol Bull, 1968, 134(2): 252–260
Dalla-Via GJ. Salinity responses of the juvenile penaeid shrimp *Penaeus japonicus*: II. Free amino acids. Aquaculture, 1986, 55(4): 307–316
Fang LS, Tang CK, Lee DL. Free amino acid composition in muscle and hemolymph of the prawn *Penaeus monodon* in different salinities. Bull Jap Soc Fish Sci, 1992, 58(6): 1095–1102
Gerard JF, Gilles R. The free amino-acid pool in *Callinectes sapidus* (Rathbun) tissues and its role in the osmotic intracellular regulation. J Exp Mar Biol Ecol, 1972, 10(2): 125–136
Hosoi M, Shinzato C, Takagi M, *et al*. Taurine transporter from the giant Pacific oyster *Crassostrea gigas*: function and expression in response to hyper- and hypo-osmotic stress. Fish Sci, 2007, 73(2): 385–394
Lv J, Liu P, Wang Y, *et al*. Transcriptome analysis of *Portunus trituberculatus* in response to salinity stress provides insights into the molecular basis of osmoregulation. PLoS One, 2013, 8(12): e82155
McCoid V, Miget R, Finne G. Effect of environmental salinity on the free amino acid composition and concentration in penaeid shrimp. J Food Sci, 1984, 49(2): 327–330
McNamara JC, Rosa JC, Greene LJ, *et al*. Free amino acid pools as effectors of osmotic adjustment in different tissues of the freshwater shrimp *Macrobrachium olfersii* (Crustacea, Decapoda) during long-term salinity acclimation. Mar

Freshwat Behav Physiol, 2004, 37(3): 193–208
Shewbart KL, Mies WL, Ludwig PD. Identification and quantitative

analysis of the amino acids present in protein of the brown
shrimp *Penaeus aztecus*. Mar Biol, 1972, 16(1): 64–67

(编辑 冯小花)

Effects of Different Salinities on the Free Amino Acids Composition in the Gill of *Portunus trituberculatus*

FU Ping¹, LÜ Jianjian², LIU Ping^{2,3①}, LI Jian^{2,3}

(1. College of Fisheries and Life Sciences, Dalian Ocean University, Dalian 116023;

2. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Chinese Academy of Fishery Sciences, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Qingdao 266071; 3. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266071)

Abstract In this study, we investigated the composition and function of free amino acids (FAAs) in the gill of *Portunus trituberculatus* under different salinities. In a 5-day experiment, the contents of FAAs were measured under a series of salinities. We found that in seawater-adapted *P. trituberculatus*, the concentration of taurine (2.54 mg/g) was the highest, followed by alanine (0.65 mg/g), glutamate (0.64 mg/g), arginine (0.58 mg/g), glycine (0.48 mg/g) and proline (0.25 mg/g). The level of total free amino acids (TOFAA) in the gill increased significantly with the rise in salinity ($P < 0.05$). When salinity was 10, 20, 33, 40, and 50, the concentration of TOFAA in the gill was 5.32 mg/g, 7.26 mg/g, 6.34 mg/g, 7.25 mg/g, and 7.90 mg/g respectively. Non-essential amino acids (NEAA) increased significantly as the salinity was elevated from 10 to 50. Essential amino acids (EAA) was not affected by external salinity change ($P > 0.05$). NEAA includes glutamate (Glu), alanine (Ala), glycine (Gly), aspartic acid (Asp), serine (Ser), cysteine (Cys), tyrosine (Tyr), proline (Pro), and Tauine (Tau), and the rest are EAA. TAA include aspartic acid (Asp), glutamate (Glu), glycine (Gly), and alanine (Ala). The concentrations of free Gly, Glu, Ala, Pro in the gill of *P. trituberculatus* were raised sharply ($P < 0.05$) with the increase in salinity, whereas the concentration of free Arg decreased ($P < 0.05$). The results suggested that FAAs, especially individual Gly, Glu, Ala, and Arg, could play an important role in salinity adaption. During adaptation, the FAAs pool (mainly NEAA) in the gill may be directly associated to osmoregulation. Change in the FAAs pool in the gill after acclimatization suggested that mainly NEAA might be involved in intracellular osmoregulation. It was also demonstrated that the salinity change mainly affected the NEAA content in the gill.

Key words *Portunus trituberculatus*; Gill; Salinity; Free amino acids; TOFAA; NEAA; EAA

① Corresponding author: LIU Ping, E-mail: liuping@ysfri.ac.cn