

## 盐度胁迫对三疣梭子蟹肌肉和血淋巴中 游离氨基酸含量的影响

付萍<sup>1,2,3</sup>, 吕建建<sup>1,3</sup>, 刘萍<sup>1,3\*</sup>, 李健<sup>1,3</sup>, 高保全<sup>1,3</sup>

(1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 山东 青岛 266071;

2. 大连海洋大学水产与生命学院, 辽宁 大连 116023;

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, 山东 青岛 266200)

**摘要:** 为探究不同盐度环境下三疣梭子蟹肌肉和血淋巴中游离氨基酸(free amino acids, FAAs)的含量及浓度的变化规律, 明确FAAs的组成以及在盐度适应中发挥的作用, 丰富FAAs在甲壳动物盐度适应领域的研究, 为后续分子机理的研究提供依据, 实验设定胁迫盐度分别为10、20、40、50, 以正常海水(盐度33)为对照, 用日立835-50型氨基酸自动分析仪测定三疣梭子蟹血淋巴与肌肉组织中游离氨基酸的组分, 分析不同盐度环境下三疣梭子蟹肌肉和血淋巴中FAAs的含量及变化规律。结果显示, 在正常海水中三疣梭子蟹血淋巴和肌肉中含量较高的FAAs主要为牛磺酸(Tau)、精氨酸(Arg)、甘氨酸(Gly)、脯氨酸(Pro)和丙氨酸(Ala)。盐度为10~50, 梭子蟹肌肉和血淋巴总游离氨基酸(total free amino acid, TOFAA)的含量随盐度的增加而显著升高, 非必需氨基酸(non-essential free amino acid, NEAA)的含量随盐度的升高而上升, 而必需氨基酸(essential free amino acid, EAA)的含量变化不显著, 因此, TOFAA在渗透压调节方面的作用主要取决于NEAA。发挥主要渗透压调节作用的FAAs为脯氨酸(Pro)、丙氨酸(Ala)、甘氨酸(Gly)、天冬氨酸(Asp)、谷氨酸(Glu)。Ala、Gly、Asp、Glu属于鲜味氨基酸(taste amino acid, TAA), 研究表明, NEAA中的TAA在渗透压调节方面作用显著, Pro含量的升高对TOFAA含量的增加作用显著, 盐度为40~50尤甚, 表明Pro在梭子蟹高渗调节中发挥重要作用。

**关键词:** 三疣梭子蟹; 血淋巴; 肌肉; 盐度; 非必需氨基酸(NEAA); 鲜味氨基酸(TAA); 脯氨酸(Pro)

中图分类号: S 968.2

文献标志码: A

在自然界中, 动物的生活环境是复杂多变的, 和其他水生生物一样, 在诸多变化的水化学因子中, 盐度是影响甲壳动物生理状态的重要因子之一<sup>[1-3]</sup>。随着生存环境中盐度的改变, 在神经内分泌系统的调控下, 渗透调节器官的结构、血淋巴渗透压和离子转运等都会发生一系列变化以适应外界环境的盐度变化<sup>[4]</sup>, 因此对甲壳动物而言在适应不同的盐度环境时最重要的

是调节机体的渗透压以维持正常的生命活动<sup>[5]</sup>。甲壳动物主要依靠两种形式的渗透压调节机制即非等渗细胞外调节(anisosmotic extracellular regulation, AER)和等渗细胞内调节(intracellular isosmotic regulation, IIR)<sup>[6]</sup>。当外界渗透压发生变化时, 机体首先通过AER方式进行调节。AER主要发生在鳃与触角腺, 鳃组织中主要依靠的是Na<sup>+</sup>和Cl<sup>-</sup>的转运以及水分的渗透作用, 触角腺组织

收稿日期: 2016-02-14 修回日期: 2016-09-08

资助项目: 国家自然科学基金面上项目(41576147);国家自然科学基金青年基金(41306177);泰山领军人才工程高效生态农业创新类计划(LJNY2015002)

通信作者: 刘萍, E-mail: liuping@ysfri.ac.cn

中则主要是借助排尿从而调节血淋巴中无机离子的含量。这种调节方式可起到稳定血淋巴渗透压的作用,但在极端盐度环境下,AER调节方式存在一定的局限性,此时IIR调节方式将发挥重要的作用,通过调节组织与血淋巴中FAAs含量从而稳定胞内的渗透压<sup>[7]</sup>。

众所周知,当外界盐度发生改变时甲壳动物主要是依靠机体调控血淋巴渗透压来实现,因此血淋巴是直接参与机体渗透压调节的场所<sup>[6]</sup>,其FAAs也直接参与渗透压的调节。研究发现,甲壳动物肌肉组织是FAAs发挥渗透压调节最常见的场所,同时也是调动、存储、代谢FAAs最适合的场所,因此肌肉通常被称为“FAAs库”<sup>[8-10]</sup>。Gread等<sup>[8]</sup>研究认为蓝蟹(*Callinectes sapidus*)肌肉中的FAAs对渗透压调节的贡献率高达70%,因此,肌肉组织和血淋巴是研究FAAs参与渗透压调节的关键<sup>[8]</sup>。然而至今未见三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)的相关报道,FAAs在三疣梭子蟹中是否也发挥渗透压调节作用,以及参与渗透压调节作用的FAAs是否与其他甲壳动物类似值得深入地研究。本实验进行了三疣梭子蟹血淋巴与肌肉组织中游离氨基酸(free amino acids, FAAs)组分测定与分析,以期为进一步阐明FAAs在三疣梭子蟹盐度适应中的作用提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

实验于2015年8月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,实验材料选用100日龄的三疣梭子蟹“黄选1号”,个体平均体质量(100±10.0)g,暂养于3 m<sup>3</sup>的室内水池中,水温24~26 °C,盐度33,持续充氧,每天更换1/3体积的海水,定时喂食蓝蛤,暂养一周。

### 1.2 实验方法

实验盐度分别为10、20、40、50,每组3个重复,对照组为正常海水(盐度33),每组放120只梭子蟹,盐度胁迫5 d后,随机从每个实验组中抽取12只蟹,分别取肌肉和血淋巴,加入8%的三氯乙酸(TCA),沉淀蛋白,超声波破碎,使之均质,在1 °C,13 000 r/min离心15 min,保留上清,剩余液用TCA再提取两次。上清液收

集,加乙醚30 mL,振荡30 s,水层用低压旋转蒸发浓缩为一黏稠液体,以日立835-50型氨基酸自动分析仪测定FAAs。

### 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氏多重比较,结果用平均数±标准差表示, $P<0.05$ 为差异显著。

## 2 结果

### 2.1 正常海水肌肉和血淋巴中游离氨基酸(FAAs)的组成与含量

实验共检测了18种FAAs,肌肉和血淋巴中总游离氨基酸(total free amino acid, TOFAA)分别为23.57和502.67 mg/L。肌肉中含量最高的FAAs为Arg(5.22 mg/g),占TOFAA的22.15%,其次分别为Gly(3.71 mg/g)、Pro(3.55 mg/g)、Tau(3.30 mg/g)、Ala(2.47 mg/g),含量最低的为半胱氨酸(Cys, 0.13 mg/g)分别占TOFAA的15.74%、15.06%、14.00%、10.48%、0.55%。血淋巴中Tau含量最高(142.68 mg/L),占TOFAA 28.38%,其次分别为Arg(61.50 mg/L,占12.23%),Gly(60.43 mg/L,占12.02%),Pro(53.95 mg/L,占10.73%),Ala(39.71 mg/L,占7.90%),含量最低的为甲硫氨酸(Met, 1.56 mg/L,占0.31%)(表1和表2)。

### 2.2 盐度胁迫下肌肉中游离氨基酸(FAAs)含量的变化

盐度10~50时,梭子蟹肌肉中TOFAA的含量随盐度的增加从18.48 mg/g增加到36.65 mg/g,升高1.98倍,增加幅度显著( $P<0.05$ )。Pro、Ala、Gly、Asp和Glu的含量与盐度呈显著正相关性( $P<0.05$ ),其中含量变化倍数最大的为Pro,盐度50时其含量为盐度10时的7.22倍,其次Ala(3.99倍),Gly(3.83倍),Asp(3.83倍),Glu(2.51倍)。另外,含量较高的Arg、Tau与其他FAAs随着盐度的升高无明显的变化(表1)。

### 2.3 盐度胁迫下血淋巴中游离氨基酸(FAAs)含量的变化

随盐度改变,血淋巴中TOFAA的含量随着外界盐度的升高而升高( $P<0.05$ ),从403.97 mg/L增加到652.78 mg/L,升高1.62倍,增加幅度显著

表 1 不同盐度下肌肉中游离氨基酸(FAA)的含量  
 Tab. 1 The free amino acid concentrations in the muscle of *P. trituberculatus* at different salinities mg/g

FAA	盐度 salinity				
	10	20	33	40	50
天冬氨酸 Asp	0.06±0.01 <sup>d</sup>	0.12±0.01 <sup>c</sup>	0.17±0.03 <sup>b</sup>	0.12±0.03 <sup>c</sup>	0.23±0.04 <sup>a</sup>
苏氨酸 Thr	0.28±0.06 <sup>b</sup>	0.23±0.04 <sup>b</sup>	0.37±0.04 <sup>a</sup>	0.39±0.03 <sup>a</sup>	0.37±0.05 <sup>a</sup>
丝氨酸 Ser	0.26±0.02 <sup>b</sup>	0.13±0.03 <sup>c</sup>	0.33±0.07 <sup>ab</sup>	0.38±0.06 <sup>a</sup>	0.26±0.04 <sup>b</sup>
谷氨酸 Glu	0.43±0.03 <sup>c</sup>	0.83±0.05 <sup>b</sup>	0.74±0.08 <sup>b</sup>	0.81±0.04 <sup>b</sup>	1.08±0.10 <sup>a</sup>
甘氨酸 Gly	1.51±0.39 <sup>c</sup>	2.21±0.21 <sup>c</sup>	3.71±0.39 <sup>b</sup>	4.43±0.74 <sup>b</sup>	5.79±0.54 <sup>a</sup>
丙氨酸 Ala	1.63±0.10 <sup>c</sup>	2.03±0.03 <sup>d</sup>	2.47±0.08 <sup>c</sup>	3.79±0.10 <sup>b</sup>	6.50±0.01 <sup>a</sup>
半胱氨酸 Cys	0.19±0.04 <sup>b</sup>	0.17±0.01 <sup>bc</sup>	0.13±0.03 <sup>c</sup>	0.17±0.03 <sup>bc</sup>	0.25±0.04 <sup>a</sup>
缬氨酸 Val	0.51±0.01	0.52±0.03	0.49±0.03	0.50±0.02	0.53±0.05
甲硫氨酸 Met	0.29±0.07 <sup>a</sup>	0.12±0.02 <sup>c</sup>	0.25±0.05 <sup>ab</sup>	0.18±0.05 <sup>bc</sup>	0.21±0.02 <sup>ab</sup>
异亮氨酸 Ile	0.33±0.03 <sup>b</sup>	0.17±0.03 <sup>d</sup>	0.24±0.03 <sup>c</sup>	0.23±0.04 <sup>c</sup>	0.41±0.04 <sup>a</sup>
亮氨酸 Leu	0.69±0.11 <sup>a</sup>	0.42±0.04 <sup>c</sup>	0.53±0.05 <sup>bc</sup>	0.48±0.07 <sup>c</sup>	0.63±0.04 <sup>ab</sup>
酪氨酸 Tyr	0.52±0.03 <sup>b</sup>	0.30±0.02 <sup>c</sup>	0.34±0.04 <sup>c</sup>	0.33±0.03 <sup>c</sup>	0.62±0.06 <sup>a</sup>
苯丙氨酸 Phe	0.55±0.07 <sup>b</sup>	0.38±0.06 <sup>c</sup>	0.35±0.05 <sup>c</sup>	0.37±0.08 <sup>c</sup>	0.67±0.06 <sup>a</sup>
组氨酸 His	0.70±0.06 <sup>ab</sup>	0.66±0.03 <sup>b</sup>	0.75±0.07 <sup>ab</sup>	0.70±0.10 <sup>ab</sup>	0.80±0.04 <sup>a</sup>
赖氨酸 Lys	0.42±0.04	0.46±0.05	0.46±0.10	0.38±0.07	0.51±0.08
精氨酸 Arg	5.23±0.13 <sup>bc</sup>	6.14±0.14 <sup>a</sup>	5.22±0.11 <sup>bc</sup>	5.45±0.12 <sup>b</sup>	5.07±0.25 <sup>c</sup>
脯氨酸 Pro	1.05±0.05 <sup>c</sup>	1.56±0.08 <sup>d</sup>	3.55±0.15 <sup>c</sup>	3.81±0.09 <sup>b</sup>	7.58±0.11 <sup>a</sup>
牛磺酸 Tau	3.83±0.05 <sup>c</sup>	4.92±0.16 <sup>a</sup>	3.30±0.20 <sup>d</sup>	4.53±0.05 <sup>b</sup>	5.14±0.06 <sup>a</sup>
总量 TOFAA	18.48±0.47 <sup>c</sup>	21.37±1.02 <sup>d</sup>	23.57±0.03 <sup>c</sup>	27.30±1.53 <sup>b</sup>	36.65±0.69 <sup>a</sup>

注：同行数据中上标字母不同表示差异显著( $P<0.05$ )，下同

Notes: The superscript in the same column means significant difference ( $P<0.05$ ), the same below

( $P<0.05$ )，尤其当盐度从40增加到50时，TOFAA增幅最大，达26.43%。Pro、Ala、Gly和Glu的含量与盐度呈显著正相关性( $P<0.05$ )。其中含量变化倍数最大的为Pro，盐度50时其含量为盐度10时的7.83倍，其次为Ala(2.54倍)，Gly(2.12倍)，Glu(1.91倍)。含量较高的Arg、Tau与其他FAAs随着盐度的升高无显著变化(表2)。

#### 2.4 必需氨基酸(EAA)和非必需氨基酸(NEAA)对盐度胁迫的响应

18种FAAs分两为大类：必需氨基酸(essential free amino acid, EAA)和非必需氨基酸(non-essential free amino acid, NEAA)。NEAA和EAA在肌肉和血淋巴的占比分别为62.54%、37.46%和73.57%、26.43%。EAA和NEAA在盐度胁迫下的含量变化趋势表明：盐度10~50时，肌肉和血淋巴中的

NEAA总量显著高于EAA总量(约1~3倍)，且NEAA总量随外界盐度的升高而显著增加，盐度50时肌肉和血淋巴中NEAA的含量分别为盐度10时的2.90倍和1.95倍，特别在盐度40~50时总量上升幅度最大，而EAA的总量并无显著性改变( $P>0.05$ )。此外，受Glu、Gly和Ala含量增加的影响，TAA的总量也与外界盐度呈显著正相关( $P<0.05$ )(图1和图2)。

### 3 讨论

正常海水中三疣梭子蟹肌肉和血淋巴中FAAs测定结果表明，肌肉中FAAs的含量显著高于血淋巴，拟穴青蟹(*Scylla paramamosain*)、蓝蟹、日本对虾(*Penaeus japonicus*)中同样发现FAAs在肌肉中的含量显著高于其他组织<sup>[6, 8, 11]</sup>，说明该

表 2 不同盐度下血淋巴中游离氨基酸(FAAs)的含量  
**Tab. 2 The free amino acids concentrations in hemolymph of *P. trituberculatus* at different salinities** mg/L

FAA	盐度 salinity				
	10	20	33	40	50
天冬氨酸 Asp	5.21±0.23 <sup>b</sup>	8.21±1.00 <sup>a</sup>	6.42±0.75 <sup>ab</sup>	7.62±0.73 <sup>a</sup>	7.42±1.50 <sup>a</sup>
苏氨酸 Thr	15.12±1.19 <sup>a</sup>	13.21±1.36 <sup>ab</sup>	10.22±0.45 <sup>c</sup>	11.41±1.29 <sup>bc</sup>	10.62±0.86 <sup>c</sup>
丝氨酸 Ser	7.43±0.36 <sup>bc</sup>	6.84±0.38 <sup>cd</sup>	27.50±0.52 <sup>a</sup>	8.21±0.56 <sup>b</sup>	6.24±0.25 <sup>d</sup>
谷氨酸 Glu	14.95±0.51 <sup>d</sup>	18.73±0.75 <sup>c</sup>	22.60±0.93 <sup>b</sup>	26.54±1.43 <sup>a</sup>	28.51±3.73 <sup>a</sup>
甘氨酸 Gly	26.71±1.50 <sup>c</sup>	45.44±4.25 <sup>b</sup>	60.43±1.66 <sup>a</sup>	58.37±3.46 <sup>a</sup>	56.73±3.08 <sup>a</sup>
丙氨酸 Ala	29.72±2.02 <sup>d</sup>	33.95±5.19 <sup>cd</sup>	39.71±2.14 <sup>c</sup>	57.20±4.65 <sup>b</sup>	75.51±3.04 <sup>a</sup>
半胱氨酸 Cys	7.96±1.15	6.87±0.98	7.91±1.10	7.60±1.41	7.53±0.55
缬氨酸 Val	11.78±1.67	13.73±2.11	12.32±1.89	14.13±0.86	12.31±0.42
甲硫氨酸 Met	1.42±0.21	1.76±0.55	1.56±0.23	1.31±0.28	1.60±0.22
异亮氨酸 Ile	7.74±0.40 <sup>a</sup>	4.63±0.79 <sup>c</sup>	6.32±0.17 <sup>b</sup>	6.61±0.40 <sup>b</sup>	5.41±0.40 <sup>c</sup>
亮氨酸 Leu	8.94±0.73 <sup>b</sup>	9.25±1.24 <sup>b</sup>	8.55±0.34 <sup>b</sup>	11.73±0.75 <sup>a</sup>	9.62±0.51 <sup>b</sup>
酪氨酸 Tyr	11.47±0.99 <sup>a</sup>	3.93±0.95 <sup>d</sup>	8.62±0.49 <sup>b</sup>	3.11±0.09 <sup>d</sup>	5.70±1.02 <sup>c</sup>
苯丙氨酸 Phe	8.58±0.57 <sup>a</sup>	5.93±0.50 <sup>c</sup>	8.71±0.67 <sup>a</sup>	7.32±0.60 <sup>b</sup>	9.10±0.83 <sup>a</sup>
组氨酸 His	13.65±2.34	14.63±1.97	13.81±2.60	17.11±1.58	15.21±1.32
赖氨酸 Lys	10.21±0.77 <sup>b</sup>	13.36±2.07 <sup>a</sup>	9.86±0.75 <sup>b</sup>	8.21±1.31 <sup>b</sup>	9.80±0.81 <sup>b</sup>
精氨酸 Arg	59.64±2.24 <sup>a</sup>	51.53±2.76 <sup>b</sup>	61.50±2.73 <sup>a</sup>	57.62±1.40 <sup>a</sup>	59.87±3.88 <sup>a</sup>
脯氨酸 Pro	23.23±1.99 <sup>c</sup>	30.12±0.58 <sup>d</sup>	53.95±2.84 <sup>c</sup>	71.21±1.31 <sup>b</sup>	181.81±5.48 <sup>a</sup>
牛磺酸 Tau	140.21±1.33 <sup>c</sup>	161.21±6.88 <sup>a</sup>	142.68±3.92 <sup>bc</sup>	141.00±3.64 <sup>c</sup>	149.78±4.45 <sup>b</sup>
总量 TOFAA	403.97±3.56 <sup>c</sup>	443.33±5.05 <sup>d</sup>	502.67±8.96 <sup>c</sup>	516.31±7.77 <sup>b</sup>	652.78±1.36 <sup>a</sup>

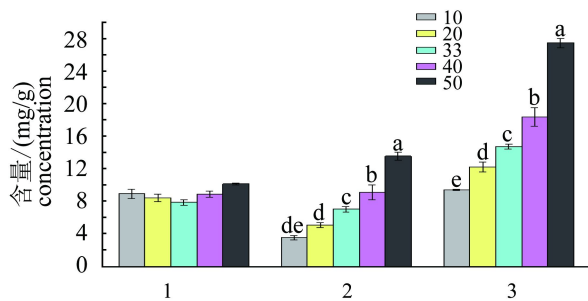


图 1 盐度胁迫下肌肉中必需氨基酸(EAA)和非必需氨基酸(NEAA)的变化情况

1. 必需氨基酸, 2. 鲜味氨基酸, 3. 非必需氨基酸  
 字母不同表示差异显著(P<0.05), 下同

Fig. 1 Variations in the concentrations of EAA and NEAA in muscle at different salinities

1. EAA, 2. TAA, 3. NEAA the different letters mean significant difference (P<0.05), the same below

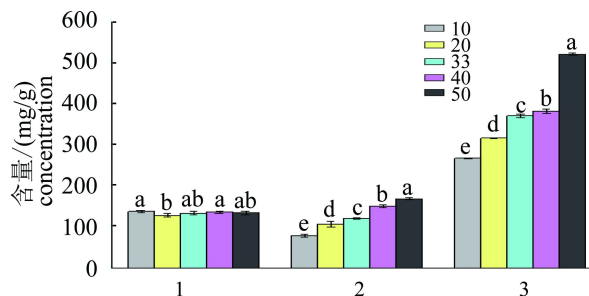


图 2 盐度胁迫下血淋巴中必需氨基酸(EAA)和非必需氨基酸(NEAA)的变化情况

1. 必需氨基酸, 2. 鲜味氨基酸, 3. 非必需氨基酸

Fig. 2 Variations in the concentrations of EAA and NEAA in hemolymph at different salinities

1. EAA, 2. TAA, 3. NEAA

组织是FAAs富集的最佳场所。以往研究表明甲壳动物中含量较高的FAAs主要是集中在Glu、Ala、Gly、Tau和Pro<sup>[12-14]</sup>。梁萌青等<sup>[15-16]</sup>认为凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)血淋巴和肌肉中含量最高的FAAs均为Gly, 其他含量较高的主要是Arg、Ala和Glu等, Vincent-Marique等<sup>[12]</sup>研究认为, 中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)血淋巴和肌肉中Pro含量均为最高, 其次含量较高的依次分别为Gly、Ala、Arg、Tau和Ala、Gly、Tau、Ser。海水中三疣梭子蟹肌肉组织中含量最高的为Arg, 其次分别为Gly、Pro、Tau、Ala, 血淋巴中含量最高的为Tau, 其次依次为Arg、Gly、Pro、Ala。该结果与其他甲壳动物中的研究结果类似。同时发现, 虽然梭子蟹肌肉和血淋巴中18种氨基酸在正常海水下含量存在差异, 但是每种FAAs的占比却相对稳定。

盐度10~50时, 梭子蟹肌肉和血淋巴中TOFAA的含量随盐度的增加分别从18.48增加到36.65和403.97增加到652.78 mg/L, 分别升高1.98倍与1.62倍, 增加幅度显著( $P<0.05$ ), 以往的学者研究发现, 南美蓝对虾(*Penaeus stylirostris*)在盐度为10~50时, Gly、Pro、Ala随着外界盐度的增加而增加, Gly为主要的渗透压调节剂<sup>[17]</sup>, 梁萌青等<sup>[15]</sup>对凡纳滨对虾的研究发现, 当盐度为0~30时, Gly、Glu、Arg和Ala是凡纳滨对虾体内渗透压调节的主要氨基酸。Lu等<sup>[6]</sup>认为, 拟穴青蟹在低渗环境中Glu、Gly、Pro、Ala含量呈下降的趋势, 其中Glu含量下降的幅度最大, 因此, 不同物种的不同组织具渗透压调节作用的FAAs存在一定的差异。盐度为10~50时, 三疣梭子蟹肌肉组织中含量升高幅度最高的Pro (7.22倍), 其次依次为Ala (3.99倍), Gly (3.83倍), Asp (3.83倍), Glu (2.51倍), 而梭子蟹血淋巴中含量升高幅度最高的同样是Pro (7.83倍), 其次Ala (2.54倍), Gly (2.12倍), Glu (1.91倍), Asp (1.42倍)。因此, Pro、Ala、Gly、Asp和Glu是梭子蟹机体主要的渗透压调节因子, 该结果与其他甲壳动物相类似<sup>[12-13, 18]</sup>, 且梭子蟹中具渗透压调节作用的FAAs符合其他甲壳动物的组成模式。实验发现, NEAA的含量变化与外界盐度的改变呈正相关, 而EAA的含量相对稳定( $P<0.05$ ), 因此说明梭子蟹中NEAA是起到主要渗透压调节作用, 该结果与在其他甲壳动物中的结果一致<sup>[10, 17, 19]</sup>, 同时NEAA的占比也显著高于EAA, 因此从含量

上看NEAA较EAA在渗透压调节中更易发挥作用。实验结果表明, 具渗透压调节作用的Asp、Glu、Gly和Ala都为TAA, 因此, NEAA中TAA在渗透压调节方面作用较显著。

Pro在甲壳动物体内存在两种合成途径分别为鸟氨酸(ornithine)途径与Glu途径, 其中Glu途径以Glu为直接前体物质<sup>[20-21]</sup>。Glu的生成主要通过谷氨酸脱氢酶(glutamic acid dehydrogenase, GDH)作用于 $\alpha$ -酮戊二酸发生还原胺化反应。Glu不仅本身是一种重要的渗透压效应物, 同时还能对其他发挥渗透压调节作用的FAAs提供氨基酸骨架, 如Asp、Ala、Gly等, 此外Glu还是Pro直接的前体物质, 因此Glu积累可以有效地促进其他发挥渗透压调节的FAAs的合成<sup>[3, 6, 22]</sup>。Lu等<sup>[6]</sup>和Wang等<sup>[10]</sup>分别在拟穴青蟹与中华绒螯蟹的研究中发现, 低盐能够抑制GDH表达, 而高盐显著促进GDH的表达, GDH的表达情况与FAAs含量的变化相吻合, 因此GDH可能在合成FAAs方面起到重要的调控作用。本实验结果发现, 盐度从10升高到50时, Pro在肌肉和血淋巴中均表现出最大的升高幅度, 特别是从盐度40升高到50时, 对TOFAA含量的增加贡献最大。以往的研究表明, Pro在许多甲壳动物渗透压调节方面起到重要作用<sup>[23-24]</sup>。黄凯等<sup>[16]</sup>认为低盐度中凡纳滨对虾肌肉中Pro含量受盐度的影响较小, 主要在高盐中发挥渗透压调节作用, 本实验结果与其相符, 因此推测Pro在梭子蟹盐度适应中特别是在高渗环境中发挥着最重要的渗透压调节作用。Burton等<sup>[22, 25]</sup>曾主要以虎斑猛水蚤(*Tigriopus californicus*)为对象, 研究GDH是否也能调控Pro的合成, 放射性同位素标记结果表明虎斑猛水蚤中Pro合成与分解受自身代谢途径的调控, 而非受到GDH的调控。Pro在梭子蟹高渗适应中发挥着重要的渗透压调节作用, 然而目前未见梭子蟹Pro代谢通路的相关报道, 因此在盐度适应过程中Pro代谢通路的作用值得后续深入研究。

#### 参考文献:

- [1] 李庭古. 盐度对克氏原螯虾幼虾耗氧率和排氨率的影响[J]. 水产科学, 2009, 28(11): 698-700.  
Li T G. The effects of salinity on oxygen consumption and ammonia excretion in juvenile crayfish *Procambarus clarkii*[J]. Fisheries Science, 2009, 28(11): 698-700(in Chinese).

- [ 2 ] 潘鲁青, 栾治华. 盐度对日本囊对虾仔虾生长发育和  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  活力的影响[J]. 水生生物学报, 2005, 29(6): 699-703.  
Pan L Q, Luan Z H. The effect of salinity on development and  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  activity of *Marsupenaeus japonicus* post-larvae[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2005, 29(6): 699-703(in Chinese).
- [ 3 ] 金彩霞, 潘鲁青. 盐度变化对克氏原螯虾渗透调节影响机制的初步研究[J]. 水生生物学报, 2008, 32(6): 894-899.  
Jin C X, Pan L Q. Preliminary studies on physiological adaptive mechanism of *Procambarus clarkii* osmoregulation under different ambient salinities[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2008, 32(6): 894-899(in Chinese).
- [ 4 ] 潘鲁青, 刘泓宇. 甲壳动物渗透调节生理学研究进展[J]. 水产学报, 2005, 29(1): 109-114.  
Pan L Q, Liu H Y. Review on the osmoregulation of crustacean[J]. Journal of Fisheries of China, 2005, 29(1): 109-114(in Chinese).
- [ 5 ] Yancey P H, Clark M E, Hand S C, et al. Living with water stress: Evolution of osmolyte systems[J]. Science, 1982, 217(4566): 1214-1222.
- [ 6 ] Lu J Y, Shu M A, Xu B P, et al. Mud crab *Scylla paramamosa* in glutamate dehydrogenase: Molecular cloning, tissue expression and response to hyposmotic stress[J]. Fisheries Science, 2015, 81(1): 175-186.
- [ 7 ] Shinji J, Okutsu T, Jayasankar V, et al. Metabolism of amino acids during hyposmotic adaptation in the whiteleg shrimp, *Litopenaeus vannamei*[J]. Amino Acids, 2012, 43(5): 1945-1954.
- [ 8 ] Gerard J F, Gilles R. The free amino-acid pool in *Callinectes sapidus* (Rathbun) tissues and its role in the osmotic intracellular regulation[J]. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 1972, 10(2): 125-136.
- [ 9 ] 姚翠鸾, 王维娜, 王安利. 虾体内氨基酸含量变化及其影响因素的研究进展[J]. 海洋科学, 2000, 24(9): 39-42.  
Yao C L, Wang W N, Wang A L. Advance in the research on the influence of amino acid content variations in the body of shrimps[J]. Marine Sciences, 2000, 24(9): 39-42(in Chinese).
- [ 10 ] Wang Y R, Li E C, Yu N, et al. Characterization and expression of glutamate dehydrogenase in response to acute salinity stress in the Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*[J]. PLoS One, 2012, 7(5): e37316.
- [ 11 ] Marangos C, Brogren C H, Alliot E, et al. The influence of water salinity on the free amino acid concentration in muscle and hepatopancreas of adult shrimps, *Penaeus japonicus*[J]. Biochemical Systematics and Ecology, 1989, 17(7-8): 589-594.
- [ 12 ] Vincent-Marique C, Gilles R. Modification of the amino acid pool in blood and muscle of *Eriocheir sinensis* during osmotic stress[J]. Comparative Biochemistry and Physiology, 1970, 35(2): 479-485.
- [ 13 ] Fang L S, Tang C K, Lee D L, et al. Free amino acid composition in muscle and hemolymph of the prawn *Penaeus monodon* at different salinities[J]. Nippon Suisan Gakkaishi, 1992, 58(6): 1095-1102.
- [ 14 ] Meng J, Zhu Q H, Zhang L L, et al. Genome and transcriptome analyses provide insight into the euryhaline adaptation mechanism of *Crassostrea gigas*[J]. PLoS One, 2013, 8(3): e58563.
- [ 15 ] 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[J]. 渔业科学进展, 2009, 30(2): 34-39.  
Liang M Q, Wang S Y, Wang J L, et al. Effects of different salinities on free amino acid composition in muscle and hemolymph of the shrimp *Litopenaeus vannamei*[J]. Progress in Fishery Sciences, 2009, 30(2): 34-39(in Chinese).
- [ 16 ] 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[J]. 海洋渔业, 2010, 32(4): 422-426.  
Huang K, Jiang H C, Wu H Y, et al. Salinity responses of free amino acids in the muscle of *Litopenaeus vannamei* [J]. Marine Fisheries, 2010, 32(4): 422-426(in Chinese).
- [ 17 ] Cobb B F, Conte F S, Edwards M A. Free amino acids and osmoregulation in penaeid shrimp[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1975, 23(6): 1172-1174.
- [ 18 ] McCoid V, Miget R, Finne G. Effect of environmental salinity on the free amino acid composition and concentration in penaeid shrimp[J]. Journal of Food Science, 1984, 49(2): 327-330.
- [ 19 ] Nakamura K, Iwaizumi K, Yamada S. Hemolymph patterns of free amino acids in the brine shrimp *Artemia franciscana* after three days starvation at different

- salinities[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2007, 147(1): 254-259.
- [20] Boggess S F, Aspinall D, Paleg L G. Stress metabolism. IX. The significance of end-product inhibition of proline biosynthesis and of compartmentation in relation to stress-induced proline accumulation[J]. *Australian Journal of Plant Physiology*, 1976, 3(4): 513-525.
- [21] Hare P D, Cress W A, van Staden J. Proline synthesis and degradation: A model system for elucidating stress-related signal transduction[J]. *Journal of Experimental Botany*, 1999, 50(333): 413-434.
- [22] Burton R S. Proline synthesis during osmotic stress in megalopa stage larvae of the blue crab, *Callinectes sapidus*[J]. *The Biological Bulletin*, 1992, 182(3): 409-415.
- [23] Boone W R, Claybrook D L. The effect of low salinity on amino acid metabolism in the tissues of the common mud crab, *Panopeus herbstii* (Milne-Edwards)[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology -Part A: Physiology*, 1977, 57(1): 99-106.
- [24] Bishop J S, Burton R S. Amino acid synthesis during hyperosmotic stress in *Penaeus aztecus* post larvae[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part A: Physiology*, 1993, 106(1): 49-56.
- [25] Burton R S. Regulation of proline synthesis in osmotic response: Effects of protein synthesis inhibitors[J]. *Journal of Experimental Zoology*, 1991, 259(2): 272-277.

## Effects of different salinity level on free amino acid composition in muscle and hemolymph of the swimming crab *Portunus trituberculatus*

FU Ping<sup>1,2,3</sup>, LÜ Jianjian<sup>1,3</sup>, LIU Ping<sup>1,3\*</sup>, LI Jian<sup>1,3</sup>, GAO Baoquan<sup>1,3</sup>

(1. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;

2. College of Fisheries and Life Science, Dalian Ocean University, Dalian 116023, China;

3. Function Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266200, China)

**Abstract:** Salinity is one of the most important factors influencing distribution, abundance and the physiology of aquatic animals. Changes in ambient salinity are directly related to osmoregulation capacity. During acclimation to salinity, the main challenge for aquatic animals is to regulate their osmotic pressure to maintain normal life activities. As the predominant aquatic animal, crustaceans can dwell in seawater and fresh water due to their various osmoregulatory mechanisms. The two forms of osmoregulatory mechanisms are anisosmotic extracellular regulation (AER) and intracellular isosmotic regulation (IIR). AER can mainly control the osmolality of the body fluid through regulation of gills and antennal glands, while IIR maintains intracellular osmolality and maintain the balance between tissues and the hemolymph primarily by regulating amino acids (FAAs) especially non-essential amino acids (NEAA). Under excessive changes in environmental salinity, it's difficult for body fluid osmolality to be maintained at a completely stable level through AER. At that point, it's believed that IIR compensates for AER by accumulating or degrading some particular NEAA as osmolytes, effectively moderating fluctuations in extracellular osmolality and facilitating volume readjustment. Hemolymph is directly involved in responding to salinity exposure and muscle is the major tissue for protein deposition and possibly represents the main pool of amino acids. Therefore muscle tissue and hemolymph are very important to study FAAs's involvement in osmotic pressure regulation. The experiment analyses the free amino acids content and concentration variation in muscle and hemolymph of *Portunus trituberculatus* at different salinities. Clarify the composition of FAAs and its function in the salinity adaptation. Enrich the FAAs in the field of salinity adaptation and provide the basis for further study of the molecular mechanism. The contents of FAAs were measured at salinities and the experiment lasted for 5 days. Determination of FAAs extraction solution of muscle and hemolymph with Hitachi 835-50 automatic amino acid analyzer. Results showed that the highest amounts of individual FAA in seawater-adapted *P. trituberculatus* was exhibited by Tauine, Arg, Gly, Pro and Ala. As salinity increased, the total free amino acids (TOFAA) of the hemolymph and muscle increased significantly. NEAA increased significantly when the salinity varied from 10 to 50 while Essential FAA (EAA) was not affected by external salinity change. The result showed that FAAs played an important role in salinity adaptation, especially Pro, Ala, Gly, Asp and Glu. Because Ala, Gly, Asp, Glu belong to the taste amino acids (TAA), so TAA played an important role in osmoregulation. The content of Pro increased significantly both in muscle and hemolymph, especially from 40 to 50 period. Therefore Pro played the most important role in hyperosmotic stress.

**Key words:** *Portunus trituberculatus*; hemolymph; muscle; salinity; NEAA; TAA; Pro

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

**Funding projects:** National Natural Science Foundation of China (41576147); National Natural Science Foundation of China (41306177); Taishan Leading Talent Project Eco-efficient Agriculture Innovation Project (LJNY2015002)