

中国对虾必需氨基酸的研究*

何海琪

(中国科学院海洋研究所, 青岛)

提要 实验对虾注射¹⁴C葡萄糖后,经过6天的饲养,然后用柱层析法分离对虾蛋白氨基酸,用液体闪烁计数器测定每一种氨基酸的放射性。结果发现:对虾蛋白中的半胱氨酸(Cys)、天冬氨酸(Asp)、丝氨酸(Ser)、谷氨酸(Glu)、脯氨酸(Pro)和丙氨酸(Ala)都有明显的放射性,表明上述几种氨基酸是中国对虾自身能够合成的非必需氨基酸;而苏氨酸(Thr)、甘氨酸(Gly)、缬氨酸(Val)、蛋氨酸(Met)、异亮氨酸(Ile)、亮氨酸(Leu)、酪氨酸(Tyr)、苯丙氨酸(Phe)、赖氨酸(Lys)、组氨酸(His)、精氨酸(Arg)和色氨酸(Trp),都没有放射性标记,说明这些氨基酸是中国对虾不能从葡萄糖来合成的,其中除酪氨酸被认为可能从苯丙氨酸来合成和甘氨酸尚需进一步验证外,其它氨基酸对于中国对虾的生长可能都是必需的。

必需氨基酸是动物体内所不能合成或合成的速率和数量不能满足动物正常生长需要而必须直接从食物中获取的一些氨基酸^[1]。食物中必需氨基酸的组成和含量直接影响饲养动物的氨基酸营养平衡和食物的生物价。因此,必需氨基酸的研究一直是动物营养生理研究的重要方面。

动物必需氨基酸研究的方法主要有两种,一种是经典的营养缺失测定法^[2],另一种是放射性同位素标记测定法^[3]。由于放射性同位素标记测定法不需要纯营养成分的精制配合饵料进行饲养,因而特别适用于低等动物,尤其是水生无脊椎动物的必需氨基酸研究。几乎所有关于甲壳类动物氨基酸代谢的研究都是用放射性同位素标记测定法进行的^[4]。

在动物氨基酸代谢的比较生理生化研究中,尽管许多实验结果表明甲壳类动物的氨基酸代谢与高等动物类似,具有相似的必需氨基酸组成,但有的研究提出了一些不同的结果和尚未清楚的问题^[5]。

中国对虾 *Penaeus orientalis* 是我国重要的水产养殖动物。研究其必需氨基酸的组成,搞清其合成氨基酸的能力,不仅可以为甲壳类动物氨基酸代谢的比较生理生化研究提供有用的资料,更重要的是还可为今后深入开展中国对虾蛋白质营养生理的研究以及当前对虾人工配合饵料的研制提供依据,并且,对于开发和利用各种饵料原料进行合理搭配也有一定的参考价值。

本实验是用[U-¹⁴C]葡萄糖为标记前体的放射性同位素测定法研究中国对虾的必需氨基酸。这方面的研究在国内尚未见报道。

* 中国科学院海洋研究所调查研究报告第1316号。本研究是在姜康后研究员指导下完成的。
收稿日期:1986年4月15日。

一、材料和方法

1. 材料 中国对虾取自山东海阳县对虾养殖场。实验前在充气、流动海水的水箱内暂养,投喂颗粒饵料。

2. 试剂 ($U-^{14}C$) 葡萄糖购自中国医学科学院放射医学研究所,放射性比活度 $>200 \mu Ci/m mol$;阳离子交换树脂 Dowex $\times 50 \times 8, 200-400$ 目,购自美国 Sigma 公司;其它均为分析试剂。

3. 方法 选取 2 尾生长良好、体长 10cm 左右的对虾,在抗菌海水^[3]内暂养,饥饿 24 小时。然后用注射器吸取约 100 μl (约 40 μCi) 的 ($U-^{14}C$) 葡萄糖溶液,在对虾腹部关节膜处作肌肉注射。注射后,对虾用抗菌海水淋洗一遍,立即放入内盛 10L 抗菌海水的有机玻璃水箱(50 \times 25 \times 25 cm^3)内。开始时对虾侧卧,约十几分钟后逐渐恢复正常。水箱配有可移动的密封盖,盖顶安装进、出气孔和投饵孔。实验过程中,除换水外,水箱均加盖密封,通过进气管由微型充气泵给水体充气,出气孔排出的气体经洗气瓶后排放到下水道(图 1)。洗气瓶内盛 100ml 0.5 mol/L KOH 溶液,用来吸收经过洗气瓶的 CO_2 ,其中包括实验对虾呼吸排出的 CO_2 。注射后经 1, 2, 4, 8, 16, 24, 48, 72, 96 小时,分别取 CO_2 吸收液和培养海水各 1ml 测定放射性,同时更换新的 KOH 溶液和培养海水。每天投饵两次,饲养 6 天。

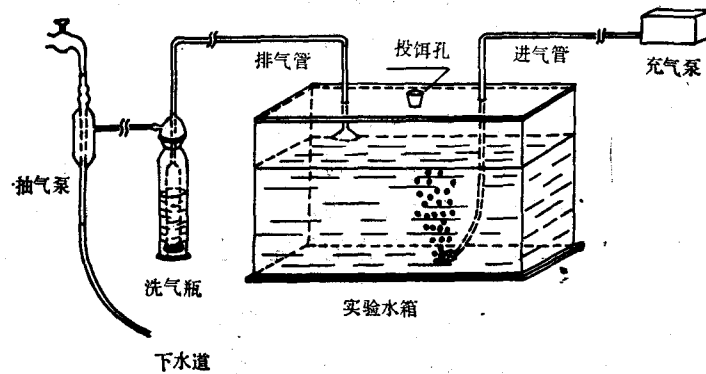


图 1 实验水箱装置

Fig. 1 Diagram of experimental chamber

(1) 对虾蛋白质的分离和水解:按 Shibko 等^[17]的方法,将对虾分步分离成酸溶部分, RNA, DNA, 脂溶性部分和蛋白质部分。

(2) 对虾蛋白质样品按 Moore 和 Steir^[15]方法水解:注入 5.7mol/L 恒沸 HCl, 抽真空封管,烘箱内 110 \pm 1 $^{\circ}C$ 下水解 24 小时,制备成蛋白水解液样品。

取部分酸水解液,用过甲酸氧化法¹⁾将其中的半胱氨酸氧化成半胱磺酸。

对虾蛋白中的色氨酸在酸水解中被破坏。因此,取部分蛋白样品,按 Oelshlegel 等人^[16]的方法,用 6mol/L NaOH 溶液进行碱水解 (120 $^{\circ}C$, 20h)。

1) 山东海洋学院水产系,1983。高级生化实验技术讲义。

(3) 对虾蛋白氨基酸的分离和测定: 运用以下方法。

离子交换柱层析: 本实验根据潘家秀等^[1]介绍的方法, 用阳离子交换树脂 Dowex 50 × 8, (200—400 目) 分离蛋白水解液中的氨基酸。所用玻璃层析柱 (0.9 × 165cm, 0.9 × 60cm) 配有恒温水浴套管。长柱(树脂床高 150cm) 分离中、酸性氨基酸, 短柱(树脂床高 45cm) 分离碱性氨基酸和过甲酸氧化水解液中的半胱氨酸。柱温 (50 ± 0.5°C) 由超级恒温水浴器维持。洗脱液^[20]经恒流泵从层析柱顶加入, 下端流出液由自动分部收集器收集, 每管收集 1ml, 由计滴器控制。

淀粉柱层析: 按 Oelshlegel 等人^[6]的方法, 用马铃薯淀粉柱层析分离测定对虾蛋白碱水解液中的色氨酸。

柱层析流出液的比色分析: 由收集器收集的层析柱流出液, 每隔一管或二管, 取一管收集液按 Zmrhal 等人^[20]的方法比色测定。根据测定结果绘出氨基酸的洗脱曲线, 再根据洗脱曲线, 取每一氨基酸峰处的二管收集液合并混匀, 然后取其中 1ml 作氨基酸含量测定, 另 1ml 作放射性测定。

放射性测定: 取培养海水、CO₂ 吸收液、各氨基酸峰收集液及每一氨基酸峰前和峰后的空白收集液 1ml, 分别置于 20ml 的低钾计数瓶内, 加入 10ml Bray^[4] 闪烁液, 混匀。用 FJ-2101 双道液体闪烁计数器测定样品中的放射性。

二、结果和讨论

注射(U-¹⁴C)葡萄糖后, 对虾呼吸排出的 ¹⁴CO₂ 含量随时间的变化趋势如表 1 所示。在注射后的 8—16 小时之间, 对虾呼吸排出的 ¹⁴CO₂ 达到最大; 24 小时后, 在 CO₂ 吸收液中基本上测不出放射性。呼吸排出 ¹⁴CO₂ 量的变化反映了对虾体内葡萄糖氧化的进程。本实验的结果表明葡萄糖在对虾体内的代谢速率比起老鼠^[6]和某些鱼类^[7]要慢得多, 而类似于另一种甲壳类动物——黄道蟹^[13]。这一点也许有助于说明对虾对糖类物质的利用率较低。培养海水中放射性含量的变化不明显。

表 1 注射 ¹⁴C 葡萄糖后对虾呼吸排出的 CO₂ 中放射性含量随时间的变化

Tab. 1 The change of radioactivity in respiratory carbon dioxide from the prawn after injection of (U-¹⁴C) glucose

间隔 (h)	0—1	1—2	2—4	4—8	8—16	16—24	24—36	36—48	48—72	72—96
CO ₂ 中的放射性										
累积 (CPM)	50	70	160	350	830	740	700	25	25	27
平均 (CPM/h)	50	70	80	88	104	93	8			

CPM: Counts per minute.

本实验用柱层析分离氨基酸仅是为了获得各种单一的氨基酸组分, 用于其放射性的测定。因此, 没有利用柱层析进行氨基酸组成的定量分析。在放射性测定时, 将含氨基酸的样品计数减去氨基酸峰前或峰后空白洗脱液样品的计数(本底计数), 即得到测定样品中的氨基酸放射性计数。同时, 对每一氨基酸样品的计数值和本底计数值之间差异用统计量

检验,当 $P < 0.05$ 时,则认为该样品中的氨基酸带有放射性标记。表 2 是 3 份蛋白水解液中各种氨基酸放射性的测定结果。

表 2 对虾蛋白氨基酸的放射性比活度

Tab. 2 Specific radioactivities of amino acids from the protein of the prawn

氨基酸	蛋白水解液(1)			蛋白水解液(2)			蛋白水解液(3)			平均比活度
	浓度	放射性计数	比活度	浓度	放射性计数	比活度	浓度	放射性计数	比活度	
Cys†	0.070	49±2**	670±29	0.082	52±3**	639±36	0.075	51±5**	680±61	663±76
Asp	0.300	52±5**	174±17	0.228	39±4**	171±18	0.250	53±6**	211±22	185±33
Thr	0.178	-5±6	—	0.115	1±3	—	0.183	6±7	—	—
Ser	0.188	12±4*	64±21	0.170	17±7*	100±40	0.213	12±4*	57±20	74±49
Glu	0.250	76±6**	306±23	0.223	86±6**	386±28	0.293	91±6**	309±20	334±41
Pro	0.133	12±5*	90±38	0.098	7±3*	75±30	0.078	11±5	141±64?	83±48
Gly	0.183	3±4	—	0.133	3±3	—	0.213	8±5	—	—
Ala	0.280	58±4**	206±15	0.130	54±6**	415±47?	0.248	65±6**	261±23	234±27
Val	0.278	1±5	—	0.063	-6±3	—	0.363	-3±6	—	—
Met	0.080	0±5	—	0.055	0±4	—	0.108	-5±6	—	—
Ile	0.180	0±7	—	0.093	-3±6	—	0.203	1±5	—	—
Leu	0.203	-2±5	—	0.130	-5±4	—	0.268	0±4	—	—
Tyr	0.058	5±3	—	0.060	1±4	—	0.060	4±7	—	—
Phe	0.068	-3±5	—	0.065	0±5	—	0.070	0±5	—	—
Lys	0.158	-1±5	—	0.080	3±6	—	0.090	4±4	—	—
His	0.058	-6±4	—	0.020	0±5	—	0.048	0±4	—	—
Arg	0.045	-4±4	—	0.030	-4±4	—	0.035	-1±4	—	—
Trp	0.045	2±3	—	0.034	1±3	—	0.040	0±5	—	—

注: 浓度单位: $\mu\text{mol/ml}$; 放射性计数: CPM/ml; 比活度: CPM/ μmol 。

** 标记非常明显 ($P < 0.01$); * 标记明显 ($P < 0.05$); † 半胱氨酸的放射性由半胱磺酸测定。

如表 2 所示,中国对虾在注射 ($U-^{14}\text{C}$) 葡萄糖后,其蛋白氨基酸中的半胱氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、丙氨酸、丝氨酸和脯氨酸都有明显的放射性。这一结果表明,中国对虾在体内能够合成上述几种氨基酸,因而,这些氨基酸可能是中国对虾的非必需氨基酸。其中天冬氨酸、谷氨酸和丙氨酸的放射性比活度较高,反映了中国对虾合成这几种氨基酸的能力较强。这是与它们在动物体内糖代谢和氨基酸代谢中所起的重要作用是一致的^[6,12]。在本实验中,半胱氨酸的放射性比活度最高,表明它在对虾体内的合成能力很强;但在对虾蛋白氨基酸的组成中,半胱氨酸的含量是很低的,这种现象似乎表明对虾体内可能存在富含半胱氨酸或胱氨酸而又代谢活跃的蛋白质。在高等动物^[12]及昆虫^[9]中,半胱氨酸是以丝氨酸为前体合成的。但在本实验中半胱氨酸的放射性比活度远比丝氨酸高,这种情况在别的甲壳动物^[2,11]及软体动物^[3]中也有发现,而且在甲壳类动物中至今尚未发现上述合成途径的直接证据^[6]。这可能是由于甲壳类动物还有另外的合成半胱氨酸的途径。丝氨酸在动物体内是由磷酸甘油酸转变来的^[12],从放射性标记的结果看,这种转变可能是比较慢的,有人认为这是十足目动物的共同特点^[6]。在甲壳类动物中,虽然脯氨酸的合成途径还不清楚^[6,11],但本实验的结果说明中国对虾和其它甲壳类动物^[6]一样,能够合成脯氨酸。

表 3 10 种水生动物氨基酸合成能力的比较
 Tab. 3 The comparison of the ability in amino acid biosynthesis of ten aquatic animals

动物	中国对虾 <i>Penaeus orientalis</i>	日本对虾 <i>P. japonicus</i>	长臂虾 <i>Palaeomon serratus</i>	螯虾 <i>Aspacus astacus</i>	鳌虾 <i>A. leptodactylus</i>	黄道蟹 <i>Cancer magister</i>	招潮蟹 <i>Uca pugilator</i>	鲍 <i>Haliotis rufescens</i>	鲷 <i>Solea solea</i>	鳎 <i>Pleuronectes platessa</i>
Cys	+	+	+	n.d.	+	+	-	+	+	+
Asp	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Thr	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-
Ser	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glu	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Pro	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Gly	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ala	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Val	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Met	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ile	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Leu	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tyr	-	-	-	+(if Phe)	-	+(if Phe)	-	-	-	-
Phe	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lys	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
His	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Arg	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Trp	-	-	n.d.	n.d.	n.d.	-	-	n.d.	n.d.	n.d.
放射性前体	(U- ¹⁴ C)G	(³ H)A	(U- ¹⁴ C)A	(U- ¹⁴ C)G (^{1-¹⁴C})A (^{3-¹⁴C})Phe	(U- ¹⁴ C)G (^{1-¹⁴C})A	(U- ¹⁴ C)G (U- ¹⁴ C)Glu (U- ¹⁴ C)Phe	(^{3-¹⁴C})P	(U- ¹⁴ C)G	(U- ¹⁴ C)G	(U- ¹⁴ C)G
文献		[2]	[8]	[19]	[13]	[11]	[5]	[3]	[7]	[7]

注: n.d.: 未测定; +?: 不能确定; G: 葡萄糖; A: 乙酸; P: 丙酮酸。

在本实验中,对虾蛋白中的甘氨酸、苏氨酸、缬氨酸、蛋氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸、赖氨酸、组氨酸、精氨酸和色氨酸均无明显的放射性,意味着这 12 种氨基酸在中国对虾体内是不能由葡萄糖合成或至少是不能进行有效的合成。这一结果,除甘氨酸外,是与多数动物的氨基酸合成能力相吻合的^[6,12]。

甘氨酸在多数动物体内是以丝氨酸为前体合成的^[12]。并且也已证明许多甲壳类动物能够合成甘氨酸^[6]。但也有少数文献报道,有的甲壳类动物不能从葡萄糖^[10]或丙酮酸^[5]来合成甘氨酸。另外,有些研究结果还表明:用 ¹⁴C 或 ³H 乙酸盐作标记前体时,甘氨酸的放射性比活度高于丝氨酸^[2,8,19],而在用 ¹⁴C 葡萄糖作标记前体时,甘氨酸的放射性比活度均低于丝氨酸,甚至没有^[11,13]。这些结果表明,甲壳类动物经糖酵解由丝氨酸合成甘氨酸可能不是唯一有效的途径。也有可能在本实验中,由于丝氨酸本身的放射性比活度就很低,使得由它合成的甘氨酸的放射性比活度更低而不能被检出。因此,本实验只能说明中国对虾不能从葡萄糖有效地合成甘氨酸,至于甘氨酸对于中国对虾是不是必需的,需要作进一步的验证。另外,中国对虾也有可能象有的甲壳类动物那样,在成体期间,尽管甘氨酸的含量丰富,但它的合成却是非常慢的^[6]。

在大多数动物中,酪氨酸是从苯丙氨酸合成的^[12]这一途径,在甲壳类动物——螯虾 *Astacus astacus*^[19] 和黄道蟹 *Cancer magister*^[11] 中也被证实。因此,推测中国对虾虽不能从葡萄糖合成酪氨酸,但也有可能从苯丙氨酸来合成。

表 3 中比较了包括中国对虾在内的 10 种水生动物的氨基酸合成能力,结果表明在动物界,氨基酸的合成能力基本上是一致的。

三、小 结

根据本研究的实验结果及以上对有关文献报道的比较讨论,中国对虾的必需氨基酸组成与多数动物基本相似,也是以下 10 种:苏氨酸、缬氨酸、蛋氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸、赖氨酸、组氨酸、精氨酸和色氨酸。与多数动物不同的是中国对虾不能从葡萄糖有效地合成甘氨酸,对于甘氨酸是不是中国对虾所必需的,尚需作进一步的验证。

参 考 文 献

- [1] 潘家秀、徐俊杰、任梅轩等,1962。蛋白质化学技术。科学出版社。71—89 页。
- [2] 金沢沼夫、手島新一,1981。クルマエビ必須アミノ酸。日本水産学会誌 47(10): 1375—1377。
- [3] Allen, W. V. & J. Kilgore, 1975. The essential amino acid requirements of the red abalone, *Haliotis rufescens*. *Comp. Biochem. Physiol.* 50A: 771—775.
- [4] Bray, G. A., 1960. A simple efficient liquid scintillator for counting aqueous solutions in a liquid scintillation counter. *Anal. Biochem.* 1: 279—285.
- [5] Claybrook, D. L., 1976. Biosynthesis of amino acids from (3-¹⁴C) pyruvate in the fiddler crab, *Uca pugilator*. *Comp. Biochem. Physiol.* 54B: 63—68.
- [6] Claybrook, D. L., 1983. Nitrogen Metabolism. In: *The Biology of Crustacea, Vol. 5, Internal Anatomy and Physiological Regulation*, ed. by L. H. Mantel. Academic Press. New York, 163—213.
- [7] Cowey, C. B., J. B. Adron & A. Blair, 1970. Studies on the nutrition of marine flatfish. The essential amino acid requirements of plaice and sole. *J. Mar. Biol. Ass. U. K.* 50: 87—95.
- [8] Cowey, C. B. & J. R. M. Forster, 1971. The essential amino acid requirements of the prawn, *Palaeomon serratus*. The growth of prawns on diets containing proteins of different amino acid compositions. *Mar. Biol.* 10: 77—81.
- [9] Dadd, R., 1973. Insect nutrition: current developments and metabolic implications. *A. Rev. Ent.* 18: 381—

- 420.
- [10] Gilles, R. & J. F. Gerard, 1974. Amino acid metabolism during osmotic stress in isolated axons of *Callinectes sapidus*. *Life Sci.* 14: 1221—1229.
- [11] Lasser, G. W. & W. V. Allen, 1976. The essential amino acid requirements of the Dungeness crab, *Cancer magister*. *Aquaculture* 7: 235—244.
- [12] Lehninger, A. L., 1970. *Biochemistry*. Worth Publishers, N. Y., pp. 539—565.
- [13] Marrewijk, W. van, & D. Zandee, 1975. Amino acid metabolism of *Astacus leptodactylus*—II. Biosynthesis of the nonessential amino acids. *Comp. Biochem. Physiol.* 50: 449—455.
- [14] Maynard, L. A., J. K. Loosli, H. F. Hintz et al, 1979. The proteins and their metabolism. In: *Animal Nutrition*, ed. by C. Robert Zappa. McGraw-Hill Book Company, pp. 146—149.
- [15] Moore, S. & W. H. Stein, 1963. Chromatographic determination of amino acid by the use of automatic recording equipment. In: *Method in Enzymology* Vol. VI, ed. by Colowick, S. P. & Kaplan, N. O. Acad. Press, N. Y. pp. 819—831.
- [16] Oelshlegel, E. J., J. R. Jr. Shroeder & M. A. Stahmann, 1970. A rapid simple procedure for basic hydrolysis of proteins and rapid determination of tryptophan using a starch column. *Analyt. Biochem.* 34: 331—337.
- [17] Shibko, S., P. Koivistoinen, C. A. Tratnyek et al, 1967. A methods for sequential quantitative separation and determination of protein, RNA, DNA, lipid, and glycogen from a single rat liver homogenate or from a subcellular fraction. *Analyt. Biochem.* 19: 541—528.
- [18] Steele, R., 1952. The formation of amino acids from carbohydrate carbon in the mouse. *J. Biol. Chem.* 198: 237—244.
- [19] Zandee, D. I., 1966. Metabolism in the crayfish *Astacus astacus* (L.) I: Biosynthesis of amino acids. *Arch. Int. Physiol. Biochem.* 74: 35—44.
- [20] Zmrhal, Z. J., J. G. Heathcote & R. J. Washington, 1975. Amino acids. In: *J. Chromatography Lib. Vol. 3, Liquid Column Chromatography—A Survey of Modern Techniques and Applications*, ed. by Z. Deyl, K. Macek, & J. Tanak. pp. 666—711.

A STUDY ON THE ESSENTIAL AMINO ACIDS OF THE PRAWN *PENAEUS ORIENTALIS**

He Haiqi

(Institute of Oceanology, Academia Sinica, Qingdao)

ABSTRACT

The problem of the essential amino acids of the prawn, *Penaeus orientalis*, which is important in preparing its diet and in studying its nutritional physiology, was investigated by means of radiometric method using ($U-^{14}C$) glucose.

After injecting ($U-^{14}C$) glucose, the prawns were reared for six days and then the constituent amino acids of its proteins were isolated by column chromatography and the radioactivity of individual amino acids was measured by liquid scintillation counter.

The injection of ($U-^{14}C$) glucose into prawns resulted in the labeling of the amino acids cysteine, aspartic acid, serine, glutamic acid, proline, alanine. These amino acids were supposed to be nonessential for the prawn. Threonine, glycine, valine, methionine, isoleucine, leucine, tyrosine, phenylalanine, lysine, histidine, arginine, tryptophan, incorporated no significant radioactivity from ($U-^{14}C$) glucose. These amino acids except tyrosine being thought to be nonessential if phenylalanine was supplied and glycine needing to be further tested and verified, were inferred not to be synthesized, or to be synthesized insufficiently, de novo and were probably essential for the growth of the prawn.

* Contribution No. 1316 from the Institute of Oceanology, Academia Sinica.