

# 虎龙杂交斑(*Epinephelus lanceolatus*♂×*E. fuscoguttatus*♀)对 20 种常见氨基酸的嗅觉电生理反应\*

徐文丹<sup>1</sup> 王骥腾<sup>2</sup> 韩涛<sup>2①</sup> 严小军<sup>1</sup>

(1. 浙江海洋大学海洋科学与技术学院 浙江舟山 316022; 2. 浙江海洋大学水产学院 浙江舟山 316022)

**摘要** 虎龙杂交斑(*Epinephelus lanceolatus*♂×*E. fuscoguttatus*♀)是我国重要的石斑鱼养殖品种,为研究其对 20 种常见氨基酸的不同嗅觉反应,筛选出对虎龙杂交斑嗅觉具有高效刺激性的单体氨基酸,通过嗅上皮水下嗅电位法(electro-olfactogram, EOG)得出了虎龙杂交斑对 20 种常见氨基酸的嗅觉反应差异和对 5 种氨基酸的嗅觉反应阈值,并讨论了氨基酸分子结构与嗅觉刺激效果之间的关系。结果表明:氨基酸的种类和浓度均对虎龙杂交斑嗅觉刺激反应有影响,虎龙杂交斑对含 5~6 个碳原子、无支链的中性脂肪族含硫氨基酸反应强烈,一个例外是对含 3 个碳原子的半胱氨酸有较强反应。 $10^{-2}$  mol/L 的蛋氨酸刺激液对虎龙杂交斑嗅觉的刺激最强, $10^{-6}$  mol/L 脯氨酸刺激液对虎龙杂交斑嗅觉的刺激最弱。虎龙杂交斑嗅觉反应幅值( $y$ )随 5 种氨基酸刺激液浓度对数值( $x$ )的增大而呈指数升高趋势,在试验中虎龙杂交斑嗅觉反应幅值没有随 5 种氨基酸刺激液浓度对数值的增大而达到平台期。从反应阈值中反应幅值与氨基酸刺激液浓度的关系方程式可得出反应阈值浓度为  $10^{-10}$ ~ $10^{-6}$  mol/L。研究结果有助于为虎龙杂交斑诱食剂和饲料配制的研究提供依据。

**关键词** 虎龙杂交斑(*Epinephelus lanceolatus*♂×*E. fuscoguttatus*♀); 诱食剂; 氨基酸; 电生理学; 嗅觉; 嗅上皮水下嗅电位法

中图分类号 S963.7 doi: 10.11693/hyhz20211100297

虎龙杂交斑是鞍带石斑鱼(*Epinephelus lanceolatus*♂)与棕点石斑鱼(*Epinephelus fuscoguttatus*♀)杂交产生的新品种,融合了父本生长迅速、母本抗病力强的优势(王燕等, 2014)。其肉质细腻、营养丰富,是我国石斑鱼养殖业中重要的养殖品种。在人工养殖的过程中,往往利用配合饲料来满足其营养需求,但配合饲料存在适口性差等缺点,导致其摄食率不高,生长的潜能没有得到充分的发挥。

诱食剂作为一种食品添加剂具有促进摄食的作用,在配合饲料中添加适当的诱食剂是解决上述问题的良好方案(Tola *et al.*, 2019)。常见的鱼类诱食剂包

括氨基酸、甜菜碱、核苷和核苷酸、复合诱食剂、动物提取物以及其他物质(何贤形等, 2011)。氨基酸是鱼类诱食剂中效果较好的一种,不仅可以满足鱼类的生长需求,还可以促进鱼类的摄食(曹俊明等, 2016)。试验研究表明,鱼类的嗅觉对氨基酸特别敏感(Hansen *et al.*, 2003; Tricas *et al.*, 2009)。嗅觉器官作为化学感受器官存在于所有鱼类中,在摄食过程中起到重要作用(朱光来等, 2013)。

研究诱食剂诱食效果的方法很多,主要包括行为学法、摄食生长法、电生理法等(许诗亮等, 2018),电生理法包括膜片钳法、感受器神经元记录法、嗅上

\* 浙江省重点研发计划项目, 2021C04016 号;舟山市科技计划项目, 2015C41003 号。徐文丹, 硕士研究生, E-mail: xwdxuwendan@outlook.com

通信作者: 韩涛, 硕士生导师, 教授, E-mail: hantao@zjou.edu.cn

收稿日期: 2021-11-25, 收修改稿日期: 2021-12-24

皮水下嗅电位法、嗅球脑电图法等,但是采用嗅上皮水下嗅电位法的研究较为少见(赵红月, 2007)。试验研究表明,嗅上皮水下嗅电位法是研究鱼类嗅觉反应的重要方法(Valenticic *et al.*, 2011; Nikonov *et al.*, 2017)。

虎龙杂交斑生活在底层岩礁间,视觉机能较弱而嗅觉机能相对发达,因此其嗅觉比较敏锐。目前为止,尚未见有以虎龙杂交斑为试验动物,对其嗅觉进行电生理学研究的报道。因此,本试验以虎龙杂交斑为试验动物,采用嗅上皮水下嗅电位法研究了 20 种常见氨基酸对虎龙杂交斑嗅觉反应的影响,旨在探讨 20 种常见氨基酸对虎龙杂交斑的诱食效果,为虎龙杂交斑人工养殖的饲料配制和鱼类诱食剂及钓饵的研究提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验动物

试验用鱼来自浙江省舟山市应博水产科技有限公司,体重为(27.66±2.76) g,全长为(11.84±1.18) cm。试验前在室内循环海水养殖系统中暂养两周,水温(21±1) °C, pH 值为 7.0~7.5, 盐度为 21.0±1.0, 溶解氧含量不低于 6 mg/L, 氨氮含量低于 0.1 mg/L, 亚硝酸盐含量低于 0.05 mg/L, 期间每天 8:00 和 15:00 投喂饲料, 试验期间暂养不投喂。

### 1.2 试验步骤

试验前一天, L-氨基酸用澄清海水配成浓度为  $10^{-2}$  mol/L 的溶液, 保存在 4 °C 的冰箱中, 试验当天用澄清海水稀释至所需浓度。试验时随机选取健康个体, 用 MS-222 (1:8 000) 进行麻醉后背部肌肉注射三碘季胺酚(0.005 mg/g), 使其肌肉保持松弛。待鱼静止不动后, 剪去其一侧前后鼻孔间的表皮组织暴露嗅上皮。将湿毛巾包裹鱼体后, 放入固定装置上, 用软管通入口中, 使用曝气充氧后的新鲜海水不断流经鱼鳃, 用以维持鱼的正常呼吸。用另一根软管向暴露的嗅囊处不断通入新鲜海水(0.5 mL/s), 使其保持在水环境中。用一根记录电极置于嗅囊表面的水环境中, 另一根参考电极置于鱼体同侧眼眶处, 鱼体接地。两根电极均与 BL-420F 生物信息采集和分析系统(成都泰盟软件有限公司)相连, 在计算机上记录反应电信号。通过三通转换器向嗅囊处添加刺激液, 每次添加 1 mL, 待电信号恢复到静息电位(resting potential, RP)后(静息电位是指细胞膜未受刺激时存在于细胞膜内外两侧的外正内负的电位差), 进行下一次刺激液的添加。对照组的刺激液为澄清海水, 每种刺激液测试 3 尾鱼。

### 1.3 相对刺激效应

以  $10^{-2}$  mol/L 丙氨酸为标准刺激液(STD), 以对丙氨酸的嗅觉反应幅值为 100%, 计算其他氨基酸刺激液的相对刺激效应(RSE)。

$$\text{相对刺激效应} = \frac{\text{氨基酸嗅觉反应幅值}}{\text{丙氨酸嗅觉反应幅值}} \times 100\% \quad (1)$$

### 1.4 反应阈值

本试验选取两种反应强烈和两种反应微弱的氨基酸以及丙氨酸来研究氨基酸浓度对虎龙杂交斑嗅觉反应的影响并得出它们的阈值, 浓度梯度为  $10^{-6}$ ~ $10^{-2}$  mol/L。电生理反应阈值, 即导致比对照水平更强反应的最低刺激液浓度, 是通过将反应幅值与刺激液浓度的双对数拟合线与对照水平拟合线相交来确定的, 对照反应被认为主要是由于低水平的化学污染所致(Caprio, 1975; Meredith *et al.*, 2010)。

### 1.5 数据统计与分析

本试验数据采用“平均值±标准误差”(M±SE)表示。利用 IBM SPSS Statistics 25 进行单因素方差分析和非线性相关性检验, 采用 Duncan's 多重比较, 差异的显著性均设为  $P < 0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 波形图

添加刺激液后, 电信号由静息电位迅速上升至波峰, 随后下降, 最终回归静息电位, 典型波形如图 1 所示。不同种类的氨基酸刺激液、不同浓度的氨基酸刺激液形成的峰值具有明显差异, 但波形相似。

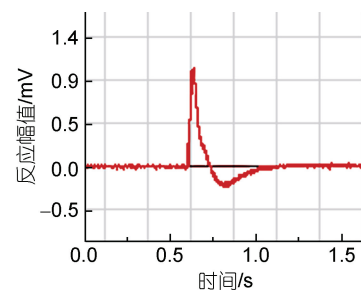


图 1 典型的嗅觉对氨基酸反应  
Fig.1 A typical olfactory response to amino acid

2.1.1 反应幅值 虎龙杂交斑对 20 种  $10^{-2}$  mol/L 常见氨基酸刺激液的嗅觉反应幅值如图 2 所示。蛋氨酸、半胱氨酸、赖氨酸的反应幅值均高于丙氨酸, 其他氨基酸的反应幅值均低于丙氨酸。

根据图 2 选取两种反应强烈(蛋氨酸、半胱氨酸)和两种反应微弱(脯氨酸、天冬氨酸)的氨基酸以及丙

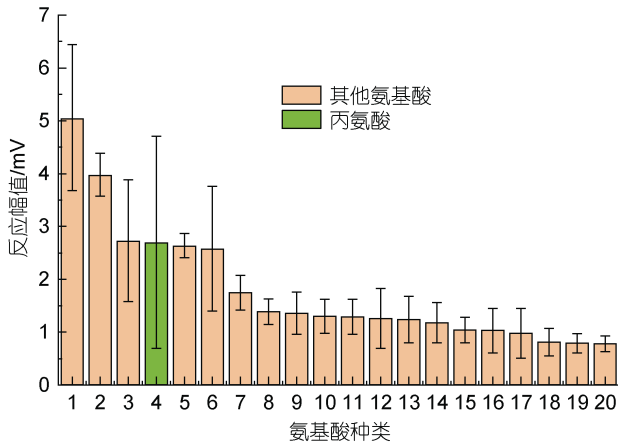


图 2 虎龙杂交斑对 20 种 10<sup>-2</sup> mol/L 常见氨基酸的嗅觉反应

Fig.2 Olfactory responses of hybrid grouper to 20 general amino acids in 10<sup>-2</sup> mol/L

注: 1: 蛋氨酸; 2: 半胱氨酸; 3: 赖氨酸; 4: 丙氨酸; 5: 精氨酸; 6: 苏氨酸; 7: 丝氨酸; 8: 色氨酸; 9: 亮氨酸; 10: 酪氨酸; 11: 组氨酸; 12: 天冬酰胺; 13: 异亮氨酸; 14: 谷氨酰胺; 15: 缬氨酸; 16: 谷氨酸; 17: 甘氨酸; 18: 苯丙氨酸; 19: 天冬氨酸; 20: 脯氨酸

氨酸来研究虎龙杂交斑嗅觉反应幅值与氨基酸浓度的关系。如图 3 所示, 虎龙杂交斑的嗅觉反应幅值随 5 种氨基酸刺激液浓度对数值的增大而呈指数升高趋势。

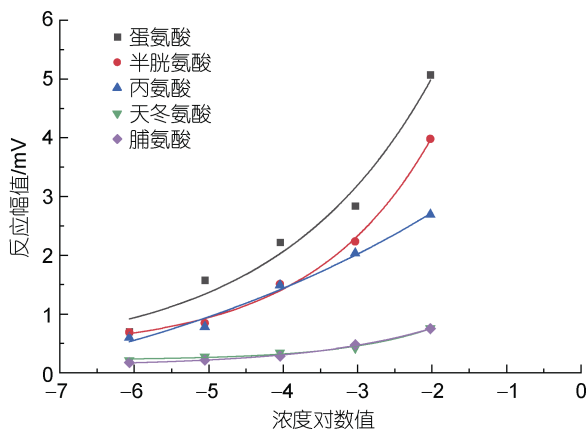


图 3 虎龙杂交斑嗅觉反应幅值与 5 种氨基酸浓度的关系  
Fig.3 Relationships between the concentration of 5 amino acids and the olfactory response of hybrid grouper

2.1.2 反应阈值 在本试验中, 测得的对照水平反应幅值为(0.16±0.06) mV。如图 4 所示, 蛋氨酸的反应阈值为 10<sup>-9.89</sup> mol/L; 半胱氨酸的反应阈值为 10<sup>-9.59</sup> mol/L; 丙氨酸的反应阈值为 10<sup>-9.35</sup> mol/L; 天冬氨酸的反应阈值为 10<sup>-7.25</sup> mol/L; 脯氨酸的反应阈值为 10<sup>-6.33</sup> mol/L。虎龙杂交斑对 5 种氨基酸刺激液的

反应阈值浓度为 10<sup>-10</sup>~10<sup>-6</sup> mol/L, 在 10<sup>-2</sup> mol/L 时氨基酸刺激液引起的反应幅值越高, 对应的反应阈值浓度越低。

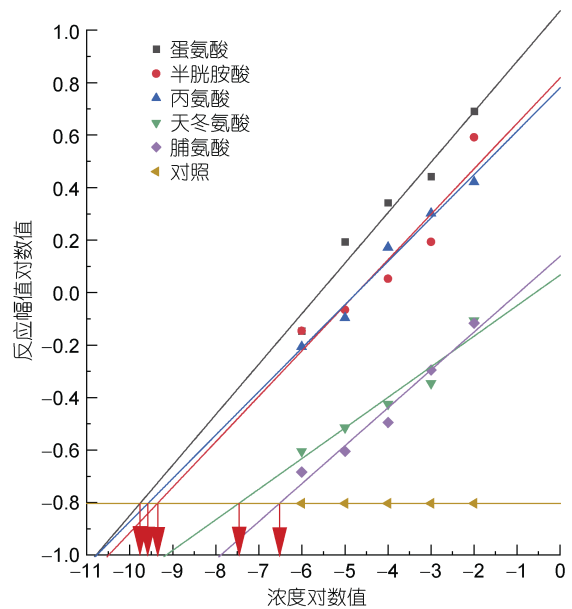


图 4 5 种氨基酸嗅觉反应幅值和浓度双对数图  
Fig.4 Log-log plots of 5 amino acids concentrations vs. olfactory response amplitude

### 2.2 相对刺激效应

酸性、碱性、中性氨基酸的相对刺激效应如图 5 所示。中性氨基酸中蛋氨酸、半胱氨酸的相对刺激效应均高于碱性和酸性氨基酸。碱性氨基酸的相对刺激效应均高于酸性氨基酸, 而且, 酸性氨基酸的相对刺激效应不足 50%。

不同 R 基团氨基酸的相对刺激效应如图 6 所示。脂肪族中蛋氨酸、半胱氨酸、赖氨酸的相对刺激效应均高于丙氨酸。芳香族氨基酸和杂环氨基酸的相对刺激效应均低于丙氨酸。

脂肪族氨基酸中含硫氨基酸、含羟基氨基酸、含酰胺氨基酸的相对刺激效应如图 7 所示。脂肪族氨基酸的相对刺激效应的排列顺序为: 含硫氨基酸>含羟基氨基酸>含酰胺氨基酸。

含不同数量碳原子氨基酸的相对刺激效应如图 8 所示。蛋氨酸和赖氨酸(含 5~6 个碳原子)、半胱氨酸(含 3 个碳原子)的相对刺激效应高于丙氨酸。

支链氨基酸和非支链氨基酸的相对刺激效应如图 9 所示。总体而言, 支链氨基酸的相对刺激效应处于“中间”位置, 但低于丙氨酸。蛋氨酸、半胱氨酸、赖氨酸的相对刺激效应均高于丙氨酸。

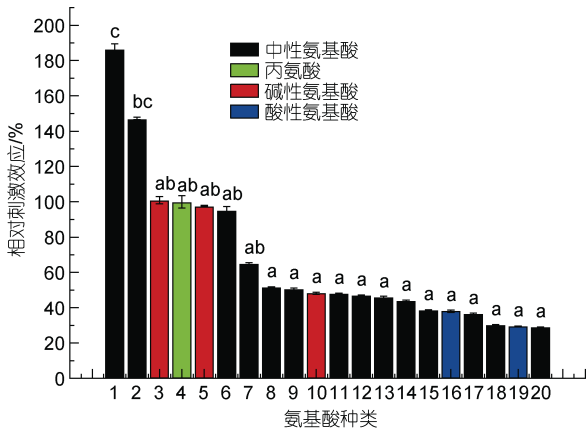


图 5 酸性、碱性、中性氨基酸的相对刺激效应

Fig.5 The RSE (relative stimulus effect) of the acid amino acid, the basic amino acid and the neutral amino acid

注: 1: 蛋氨酸; 2: 半胱氨酸; 3: 赖氨酸; 4: 丙氨酸; 5: 精氨酸; 6: 苏氨酸; 7: 丝氨酸; 8: 色氨酸; 9: 亮氨酸; 10: 酪氨酸; 11: 组氨酸; 12: 天冬酰胺; 13: 异亮氨酸; 14: 谷氨酰胺; 15: 缬氨酸; 16: 谷氨酸; 17: 甘氨酸; 18: 苯丙氨酸; 19: 天冬氨酸; 20: 脯氨酸。图中不同字母表示差异显著( $P < 0.05$ ), 下同

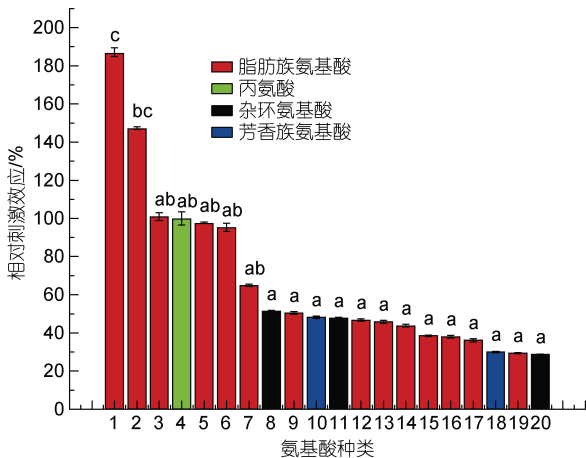


图 6 不同 R 基团氨基酸相对刺激效应

Fig.6 The RSE (relative stimulus effect) of amino acids with different R groups

注: 1: 蛋氨酸; 2: 半胱氨酸; 3: 赖氨酸; 4: 丙氨酸; 5: 精氨酸; 6: 苏氨酸; 7: 丝氨酸; 8: 色氨酸; 9: 亮氨酸; 10: 酪氨酸; 11: 组氨酸; 12: 天冬酰胺; 13: 异亮氨酸; 14: 谷氨酰胺; 15: 缬氨酸; 16: 谷氨酸; 17: 甘氨酸; 18: 苯丙氨酸; 19: 天冬氨酸; 20: 脯氨酸

### 3 讨论

#### 3.1 嗅上皮水下嗅电位法分析

研究鱼类诱食剂的方法中行为学法旨在运用鱼类在刺激物作用后行为学变化程度来评价刺激物的影响, 该方法受到人为影响因素较大(Pittet *et al*, 1996)。摄食生长法以精确的摄食量为指标来评价促摄食物质的好坏, 以周和月计, 试验周期相对较长。

有关文献报道较多的都是长期试验, 主要原因在于鱼类的摄食具有明显的适应现象, 短期试验的数据并不能充分说明问题(Toften *et al*, 1997)。嗅上皮水下嗅电位法具有技术成熟、试验周期短、人为影响因素少、只需要简单的手术过程等诸多优点, 已成为研究鱼类嗅觉合适而准确的方法。

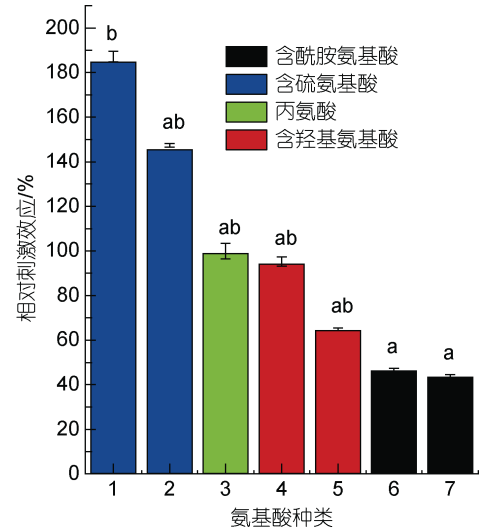


图 7 脂肪族氨基酸中含硫氨基酸、含羟基氨基酸、含酰胺氨基酸的相对刺激效应

Fig.7 The RSE (relative stimulus effect) of the sulphur-containing amino acid, the hydroxyl-containing amino acid, and the amide-containing amino acid in aliphatic amino acids

注: 1: 蛋氨酸; 2: 半胱氨酸; 3: 丙氨酸; 4: 苏氨酸; 5: 丝氨酸; 6: 天冬酰胺; 7: 谷氨酰胺

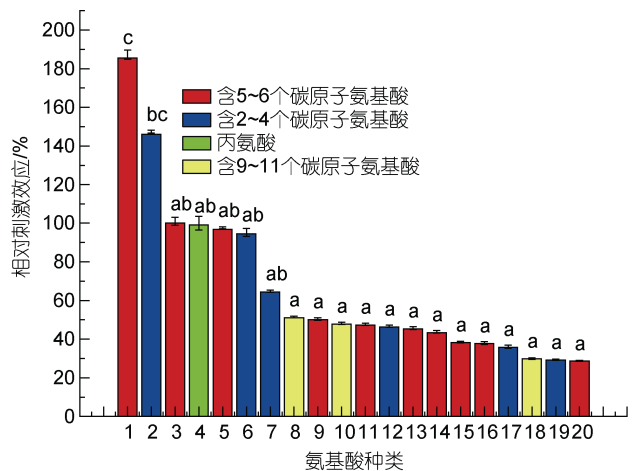


图 8 含不同数量碳原子氨基酸的相对刺激效应

Fig.8 The RSE (relative stimulus effect) of amino acids with different numbers of carbon atoms

注: 1: 蛋氨酸; 2: 半胱氨酸; 3: 赖氨酸; 4: 丙氨酸; 5: 精氨酸; 6: 苏氨酸; 7: 丝氨酸; 8: 色氨酸; 9: 亮氨酸; 10: 酪氨酸; 11: 组氨酸; 12: 天冬酰胺; 13: 异亮氨酸; 14: 谷氨酰胺; 15: 缬氨酸; 16: 谷氨酸; 17: 甘氨酸; 18: 苯丙氨酸; 19: 天冬氨酸; 20: 脯氨酸

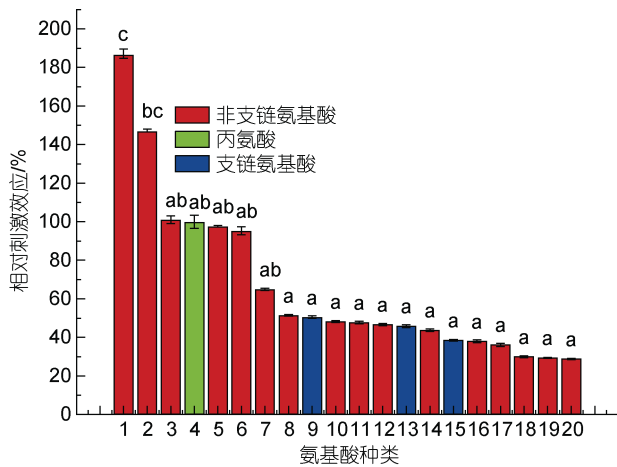


图 9 支链氨基酸和非支链氨基酸的相对刺激效应

Fig.9 The RSE (relative stimulus effect) of branched chain amino acids and unbranched amino acids

注: 1: 蛋氨酸; 2: 半胱氨酸; 3: 赖氨酸; 4: 丙氨酸; 5: 精氨酸; 6: 苏氨酸; 7: 丝氨酸; 8: 色氨酸; 9: 亮氨酸; 10: 酪氨酸; 11: 组氨酸; 12: 天冬酰胺; 13: 异亮氨酸; 14: 谷氨酰胺; 15: 缬氨酸; 16: 谷氨酸; 17: 甘氨酸; 18: 苯丙氨酸; 19: 天冬氨酸; 20: 脯氨酸

反应幅值是流经嗅觉上皮细胞外电阻的总电流, 被认为是引起受体神经冲动电位的总体平均值 (Ottoson, 1971; Getchell, 1974; Tierney *et al*, 2010)。刺激物与嗅觉感受神经元结合后引起一系列细胞膜变化, 最后转换成电变化, 这种电变化和嗅球反应一样可反映嗅觉感受器官的活动(赵红月等, 2011)。在脊椎动物中嗅觉转导启动配体与嗅觉受体的结合, 然后激活含有嗅觉特异性  $\alpha$  亚基的异三聚体 G 蛋白, 进而激活型腺苷酸环化酶, 使 ATP 产生 cAMP, 导致 cAMP 水平的升高并激活了嗅觉特异性的环核苷酸门控通道(CNG 通道), 这是一个非选择性的阳离子通道, 钠离子和钙离子通过激活的通道进入细胞内使嗅觉受体细胞去极化(Restrepo *et al*, 1996)。研究表明嗅上皮水下嗅电位法是研究嗅觉反应的重要方法, 也是研究诱食剂效果的一种有效方法(Byrd *et al*, 1982; Lari *et al*, 2020)。

### 3.2 波形图和相应参数分析

波形图之所以呈现出如图 1 的波形, 是因为鼻囊很深, 呈碗状, 刺激液可能在进入鼻囊后没有及时被澄清海水冲洗干净。随后, 鼻囊内越来越多的澄清海水可能起到了稀释剂的作用, 刺激被逐渐去除, 导致电信号逐渐回归到基线水平(Silver, 1979)。波形的形状和反应幅值由刺激物的种类、浓度以及试验方法决定(Hara *et al*, 1994)。在本试验中, 当向虎龙杂交斑暴露的嗅囊处添加氨基酸刺激液时, 可以在计算机中

清晰地记录其反应波, 反应幅值随着刺激液种类和浓度的变化而变化, 但波形相似。本试验的波形与非洲慈鲷(*Astatotilapia burtoni*)、双髻鲨(Sphyrnidae)、蛇鲷(*Saurogobio dabryi*)、葛氏鲈塘鳢(*Perccottus glenii*)的研究结果相似(Tricas *et al*, 2009; Nikonov *et al*, 2017; 赵雨梦等, 2018; 许诗亮等, 2020)。

3.2.1 反应幅值 嗅觉受体最初是由 Buck 和 Axel 于 1991 年在褐家鼠(*Rattus norvegicus*)中发现的, 是由一个大的多基因家族编码的一种跨 7 次膜的 G 蛋白偶联受体(Buck *et al*, 1991; Alioto *et al*, 2006)。脊椎动物嗅觉系统对不同气味分子的感知和辨别是由激活鼻囊中嗅觉神经元表达的特定气味分子受体的结果(Firestein, 2001; Mombaerts, 2004)。

如图 2 所示, 氨基酸的种类对虎龙杂交斑嗅觉反应幅值产生不同影响。蛋氨酸对虎龙杂交斑嗅觉刺激的反应最强, 脯氨酸反应最弱。不同种类和不同浓度的氨基酸刺激液对虎龙杂交斑的嗅觉反应幅值存在差异, 表明虎龙杂交斑的嗅觉对不同刺激物的反应是有差别的。主要原因是, 脊椎动物嗅觉系统对气味化学结构的识别被认为是通过多个嗅觉受体的组合活动进行的, 每个嗅觉受体都被调节来识别不同的化学特征(Luu *et al*, 2004)。

本试验中, 相对刺激效应较强的氨基酸为蛋氨酸、半胱氨酸、赖氨酸, 氨基酸种类和排列顺序与赤点石斑鱼(*Epinephelus akaara*)、青石斑鱼(*Epinephelus awoara*)的试验结果基本一致(康洁生等, 1988)。本试验中反应强烈的氨基酸种类与胡子鲶(*Claris fuscus*)、黄尾鲷(*Seriola lalandi*)等的试验结果基本一致, 但是排列顺序有所不同(王道宏, 1989; Kohbara *et al*, 2000)。氨基酸对硬骨鱼类的嗅觉刺激强度的排列顺序基本相似, 但是不同物种之间仍然存在一定差异(Hara, 1982)。

如图 3 所示, 虎龙杂交斑对 5 种氨基酸的反应幅值均随氨基酸浓度的对数值增大而呈指数升高趋势, 与双髻鲨、异育银鲫(*Carassius auratus gibelio*)、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)、鲶(*Arius felis*)等的试验结果相一致(Hara, 1976; Caprio, 1980; 赵红月, 2007; Tricas *et al*, 2009)。在胡子鲶的研究中是幂函数曲线, 在褐篮子鱼(*Siganus fuscescens*)的研究中是 S 型曲线, 这主要取决于做图的方法(王道宏, 1989; Ishida *et al*, 1992)。

3.2.2 反应阈值 反应阈值代表了嗅觉对刺激物的敏感度。在本试验中, 虎龙杂交斑对几种氨基酸的反应阈值在  $10^{-10}$ ~ $10^{-6}$  mol/L 之间。在  $10^{-2}$  mol/L 时,

氨基酸刺激液引起的反应幅值越高,对应的反应阈值浓度越低。有研究表明,那些引起嗅觉更大幅度反应的氨基酸会导致较低的反应阈值(Hubbard *et al.*, 2011)。在大西洋鲟(*Dasyatis sabina*)的试验中,反应阈值为  $10^{-8}$ ~ $10^{-6}$  mol/L (Silver, 1979)。在黑点鲷(*Pagellus bogaraveo*)的试验中,反应阈值为  $10^{-7.5}$ ~ $10^{-4.8}$  mol/L (Hubbard *et al.*, 2011)。

### 3.3 不同氨基酸刺激液的相对刺激效应分析

#### 3.3.1 酸性、碱性、中性氨基酸对相对刺激效应的影响

由图 5 可知,反映强烈的氨基酸大多数是中性氨基酸和碱性氨基酸,碱性氨基酸的相对刺激效应均高于酸性氨基酸;中性氨基酸中蛋氨酸、半胱氨酸的相对刺激效应均高于碱性和酸性氨基酸。其中,蛋氨酸、半胱氨酸、赖氨酸的相对刺激效应高于丙氨酸,酸性氨基酸的相对刺激效应不到 50%。有证据表明,鱼类嗅觉受体偏爱中性和碱性氨基酸(Zippel *et al.*, 1993; 柴敏娟等, 2001; Luu *et al.*, 2004)。试验表明,没有分支、中性的 L-氨基酸是最有效的刺激物(Caprio, 1975)。在斑马鱼(*Danio rerio*)的试验中,氨基酸受体组分为三个亚组,最大的氨基酸受体亚组包含所有中性氨基酸(Michel *et al.*, 1997)。嗅觉受体表现出对碱性氨基酸的偏好,推测带负电荷的残基一定有助于远端结合域的局部负静电环境,从而为碱性氨基酸的正电侧链提供了有利结合的环境(Luu *et al.*, 2004)。

#### 3.3.2 不同 R 基团氨基酸对相对刺激效应的影响

由图 6 可知,脂肪族氨基酸中蛋氨酸、半胱氨酸、赖氨酸、精氨酸、苏氨酸、丝氨酸相对刺激效应均高于芳香族氨基酸和杂环氨基酸,蛋氨酸、半胱氨酸、赖氨酸的相对刺激效应均高于丙氨酸,脯氨酸的相对刺激效应最低(28.73%)。芳香族氨基酸与杂环氨基酸相比,相对刺激效应没有显著差异( $P>0.05$ )。在斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)的试验中,脂肪族氨基酸是强烈的嗅觉刺激物(Caprio, 1978)。在黑点鲷和草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)的试验中,脯氨酸(杂环氨基酸)是刺激效应最小的氨基酸(Johnsen *et al.*, 1988; Hubbard *et al.*, 2011)。脯氨酸相对刺激效应最低,可能的原因是由于其属于亚氨基酸,具有相对独立的嗅觉受体(Michel *et al.*, 1997)。

#### 3.3.3 脂肪族氨基酸中含不同基团氨基酸对相对刺激效应的影响

由图 7 可知,脂肪族氨基酸中,相对刺激效应由强到弱的排列顺序为:含硫氨基酸>含羟基氨基酸>含酰胺氨基酸。在本试验中,含硫氨基酸被证明是高效的嗅觉刺激氨基酸,而含羟基氨基

酸和含酰胺氨基酸的刺激效果较弱。在鲟和美洲鳗鲡(*Anguilla rostrata*)的试验中含硫氨基酸被证明是高效的嗅觉刺激氨基酸(Caprio, 1980; Silver, 1982)。在莫桑比克罗非鱼(*Oreochromis mossambicus*)的试验中,含酰胺氨基酸的刺激效应较低(柴敏娟等, 2001)。虎龙杂交斑对含硫氨基酸是比较敏感的,这可能是硫原子相当于一个甲基或是由于末端硫原子与嗅上皮感受位点有特殊亲和力的缘故。含酰胺氨基酸的相对刺激效应低,这可能是由于虎龙杂交斑嗅觉神经元上含酰胺氨基酸受体位点数量少或与含酰胺氨基酸分子的受体位点结合亲和力降低所致。

#### 3.3.4 含碳原子量不同的氨基酸对相对刺激效应的影响

由图 8 可知,除半胱氨酸外,蛋氨酸、赖氨酸、精氨酸(含 5~6 个碳原子)的相对刺激效应均高于含 2~4 个碳原子氨基酸和含 9~11 个碳原子氨基酸,且后两者的相对刺激效应均低于丙氨酸。有研究表明,鱼类嗅觉感受细胞对氨基酸的敏感性与其结构有关,含 5~6 个碳原子的 L-氨基酸被证明是最有效的刺激物(Caprio, 1980; Silver, 1982; 柴敏娟等, 2001)。氨基酸受体位点很可能是根据氨基酸的物理尺寸进化而来的;即氨基酸分子的形状决定了受体位点的结构(Caprio, 1978)。在褐家鼠的试验中,观察到的刺激效果和刺激物分子长度之间的关系,表明了结合位点的尺寸所施加的一些分子约束,较长的分子可能根本不适合进入有限的结合区域,没有刺激效果的短分子可能部分占据结合位点而不能激活受体,或者根本不能稳定地驻留在结合位点(Araneda *et al.*, 2000)。

#### 3.3.5 支链氨基酸和非支链氨基酸对相对刺激效应的影响

由图 9 可知,支链氨基酸的相对刺激效应均低于丙氨酸,而非支链氨基酸中蛋氨酸、半胱氨酸、赖氨酸、精氨酸、苏氨酸、丝氨酸、色氨酸的相对刺激效应均高于支链氨基酸。在赤点石斑鱼、青石斑鱼、斑点叉尾鲷等的试验中,支链氨基酸被认为是低效的嗅觉刺激物(Caprio, 1978; 康洁生等, 1988; Meredith *et al.*, 2010)。

另一方面,在草鱼嗅觉的试验中,刺激性最强的氨基酸为半胱氨酸(Johnsen *et al.*, 1988)。在欧洲鳗鲡(*Anguilla anguilla*)、的嗅觉试验中,天冬酰胺和谷氨酰胺的刺激性最强(Crnjar *et al.*, 1992)。对摄食刺激剂的行为学研究表明,罗非鱼(*Tilapia zillii*)的有效刺激物是谷氨酸、天冬氨酸和丝氨酸,这些氨基酸与肉食性鱼类刺激摄食的氨基酸明显不同(Johnsen *et al.*, 1986)。以上这些不同的情况,可能与研究方法、鱼的

种类、发育阶段、鱼类生活的环境等因素有关。

#### 4 结论

综上所述, 在本试验中, 虎龙杂交斑对常见的 20 种氨基酸均有一定的嗅觉反应。虎龙杂交斑对不同种类氨基酸刺激液的嗅觉反应幅值不同, 其对含 5~6 个碳原子、无支链中性脂肪族含硫氨基酸反应强烈, 一个例外是对含 3 个碳原子的半胱氨酸有较大反应,  $10^{-2}$  mol/L 的蛋氨酸刺激效果最好。嗅觉反应幅值随着 5 种氨基酸浓度对数值的增加而呈指数上升趋势, 虎龙杂交斑对这 5 种氨基酸的嗅觉反应阈值为  $10^{-10}$ ~ $10^{-6}$  mol/L。

#### 参 考 文 献

- 王道宏, 1989. 胡子鲶嗅感受器对氨基酸刺激的电反应[J]. 安徽大学学报(自然科学版)(2): 76-81.
- 王燕, 张勇, 张海发, 等, 2014. 两种杂交石斑鱼及其亲本形态差异分析[J]. 水产学报, 38(6): 778-785.
- 朱光来, 王权, 2013. 鱼类的摄食行为与诱食剂[J]. 河北渔业(2): 41-43.
- 许诗亮, 王士政, 徐瑞, 等, 2020. 几种诱食剂对蛇鲷诱食效果的比较[J]. 饲料工业, 41(2): 15-19.
- 许诗亮, 付蓝仪, 赵雨梦, 等, 2018. 肉食性鱼类诱食剂的评价方法与诱食效果[J]. 饲料工业, 39(18): 29-33.
- 何贤彤, 严小军, 周迎松, 等, 2011. 鱼类诱食剂的研究进展[J]. 宁波大学学报(理工版), 24(2): 14-19.
- 赵红月, 2007. 异育银鲫促摄食物物质研究[D]. 武汉: 中国科学院研究生院(水生生物研究所): 25-34.
- 赵红月, 薛敏, 解绶启, 等, 2011. 鱼用促摄食物物质研究方法[J]. 水产科学, 30(1): 58-62.
- 赵雨梦, 裴欣, 许诗亮, 等, 2018. 葛氏鲈塘鳢对促摄食物物质的嗅觉敏感性分析[J]. 黑龙江畜牧兽医(23): 188-191.
- 柴敏娟, 曾建平, 于森, 2001. 罗非鱼嗅觉对 15 种常见氨基酸的 RSE 探讨[J]. 台湾海峡, 20(S1): 63-68.
- 康洁生, 郑美丽, 1988. 二种石斑鱼对氨基酸刺激的 EOG 反应[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 27(5): 562-566.
- 曹俊明, 邹青, 黄燕华, 等, 2016. 鱼类摄食与促摄食物物质的研究进展[J]. 饲料工业, 37(24): 1-8.
- ALIOTO T S, NGAI J, 2006. The repertoire of olfactory C family G protein-coupled receptors in zebrafish: candidate chemosensory receptors for amino acids [J]. BMC Genomics, 7: 309.
- ARANEDA R C, KINI A D, FIRESTEIN S, 2000. The molecular receptive range of an odorant receptor [J]. Nature Neuroscience, 3(12): 1248-1255.
- BUCK L, AXEL R, 1991. A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition [J]. Cell, 65(1): 175-187.
- BYRD R P JR, CAPRIO J, 1982. Comparison of olfactory receptor (EOG) and bulbar (EEG) responses to amino acids in the catfish, *Ictalurus punctatus* [J]. Brain Research, 249(1): 73-80.
- CAPRIO J, 1975. High sensitivity of catfish taste receptors to amino acids [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology, 52(1): 247-251.
- CAPRIO J, 1978. Olfaction and taste in the channel catfish: an electrophysiological study of the responses to amino acids and derivatives [J]. Journal of Comparative Physiology, 123(4): 357-371.
- CAPRIO J, 1980. Similarity of olfactory receptor responses (EOG) of freshwater and marine catfish to amino acids [J]. Canadian Journal of Zoology, 58(10): 1778-1784.
- CRNJAR R, SLCALERA G, BIGIANI A, et al, 1992. Olfactory sensitivity to amino acids in the juvenile stages of the European eel *Anguilla anguilla* (L.) [J]. Journal of Fish Biology, 40(4): 567-576.
- FIRESTEIN S, 2001. How the olfactory system makes sense of scents [J]. Nature, 413(6852): 211-218.
- GETCHELL T V, 1974. Electrogenic sources of slow voltage transients recorded from frog olfactory epithelium [J]. Journal of Neurophysiology, 37(6): 1115-1130.
- HANSEN A, ROLEN S H, ANDERSON K, et al, 2003. Correlation between olfactory receptor cell type and function in the channel catfish [J]. Journal of Neuroscience, 23(28): 9328-9339.
- HARA T J, 1976. Effects of pH on the olfactory responses to amino acids in rainbow trout, *Salmo gairdneri* [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology, 54(1): 37-39.
- HARA T J, 1982. Chemoreception in Fishes [M]. Amsterdam: Elsevier Scientific Publishers: 222-223.
- HARA T J, KITADA Y, EVANS R E, 1994. Distribution patterns of palatal taste buds and their responses to amino acids in salmonids [J]. Journal of Fish Biology, 45(3): 453-465.
- HUBBARD P C, BARATA E N, OZÓRIO R O A, et al, 2011. Olfactory sensitivity to amino acids in the blackspot sea bream (*Pagellus bogaraveo*): a comparison between olfactory receptor recording techniques in seawater [J]. Journal of Comparative Physiology A, 197(8): 839-849.
- ISHIDA Y, KOBAYASHI H, 1992. Stimulatory effectiveness of amino acids on the olfactory response in an algivorous marine teleost, the rabbitfish *Siganus fuscescens* Houttuyn [J]. Journal of Fish Biology, 41(5): 737-748.
- JOHNSEN P B, ADAMS M A, 1986. Chemical feeding stimulants for the herbivorous fish, *Tilapia zillii* [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology, 83(1): 109-112.
- JOHNSEN P B, ZHOU H, ADAMS M A, 1988. Olfactory sensitivity of the herbivorous grass carp, *Ctenopharyngodon idella*, to amino acids [J]. Journal of Fish Biology, 33(1): 127-134.
- KOHBARA J, FURUKAWA K, TAISHAKU H, et al, 2000. Response changes with growth in the gustatory receptors of young yellowtails (*Seriola quinqueradiata*) [J]. Fisheries Science, 66(6): 1106-1114.
- LARI E, BURKET S R, STEINKEY D, et al, 2020. Interaction of the olfactory system of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)

- with diltiazem [J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, doi: 10.1002/etc.4854.
- LUU P, ACHER F, BERTRAND H O, *et al*, 2004. Molecular determinants of ligand selectivity in a vertebrate odorant receptor [J]. *Journal of Neuroscience*, 24(45): 10128-10137.
- MEREDITH T L, KAJIURA S M, 2010. Olfactory morphology and physiology of elasmobranchs [J]. *Journal of Experimental Biology*, 213(20): 3449-3456.
- MICHEL W C, DERBIDGE D S, 1997. Evidence of distinct amino acid and bile salt receptors in the olfactory system of the zebrafish, *Danio rerio* [J]. *Brain Research*, 764(1/2): 179-187.
- MOMBAERTS P, 2004. Genes and ligands for odorant, vomeronasal and taste receptors [J]. *Nature Reviews Neuroscience*, 5(4): 263-278.
- NIKONOV A A, BUTLER J M, FIELD K E, *et al*, 2017. Reproductive and metabolic state differences in olfactory responses to amino acids in a mouth brooding African cichlid fish [J]. *Journal of Experimental Biology*, 220(16): 2980-2992.
- OTTOSON D, 1971. The electro-olfactogram [M] // AMOORE J E, BEETS M G J, DAVIES J T, *et al*, *Olfaction*. Berlin, Heidelberg: Springer: 95-131.
- PITTET A O, ELLIS J C, LEE P G, 1996. Methodology for the identification and quantitative measurement of chemical stimulants for penaeid shrimp [J]. *Aquaculture Nutrition*, 2(3): 175-182.
- RESTREPO D, TEETER J H, SCHILD D, 1996. Second messenger signaling in olfactory transduction [J]. *Journal of Neurobiology*, 30(1): 37-48.
- SILVER W L, 1979. Olfactory responses from a marine elasmobranch, the atlantic stingray, *Dasyatis sabina* [J]. *Marine Behaviour and Physiology*, 6(4): 297-305.
- SILVER W L, 1982. Electrophysiological responses from the peripheral olfactory system of the American eel, *Anguilla rostrata* [J]. *Journal of Comparative Physiology*, 148(3): 379-388.
- TIERNEY K B, BALDWIN D H, HARA T J, *et al*, 2010. Olfactory toxicity in fishes [J]. *Aquatic Toxicology*, 96(1): 2-26.
- TOFTEN H, JOBLING M, 1997. Feed intake and growth of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., fed diets supplemented with oxytetracycline and squid extract [J]. *Aquaculture Nutrition*, 3(3): 145-151.
- TOLA S, FUKADA H, MASUMOTO T, 2019. Effects of natural feeding stimulants and glutamic acid supplementation on the feed intake, growth performance and digestive enzyme activities of red sea bream (*Pagrus major*) fed fish meal-free soy protein concentrate (SPC)-based diet [J]. *Aquaculture Research*, 50(7): 1912-1920.
- TRICAS T C, KAJIURA S M, SUMMERS A P, 2009. Response of the hammerhead shark olfactory epithelium to amino acid stimuli [J]. *Journal of Comparative Physiology A*, 195(10): 947-954.
- VALENTINCIC T, MIKLAVC P, KRALJ S, *et al*, 2011. Olfactory discrimination of complex mixtures of amino acids by the black bullhead *Ameiurus melas* [J]. *Journal of Fish Biology*, 79(1): 33-52.
- ZIPPEL H P, LAGO-SCHAAF T, CAPRIO J, 1993. Ciliated olfactory receptor neurons in goldfish (*Carassius auratus*) partially survive nerve axotomy, rapidly regenerate and respond to amino acids [J]. *Journal of Comparative Physiology A*, 173(5): 537-547.



## OLFACTORY ELECTROPHYSIOLOGICAL RESPONSES OF HYBRID GROUPEL (*EPINEPHELUS LANCEOLATUS* ♂×*E. FUSCOGUTTATUS* ♀) TO 20 GENERAL AMINO ACIDS

XU Wen-Dan<sup>1</sup>, WANG Ji-Teng<sup>2</sup>, HAN Tao<sup>2</sup>, YAN Xiao-Jun<sup>1</sup>

(1. Marine Science and Technology College, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316022, China; 2. College of Fisheries, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316022, China)

**Abstract** To explore the different olfactory responses of hybrid grouper (*Epinephelus lanceolatus*♂×*E. fuscoguttatus*♀) to 20 general amino acids, and to screen the single amino acids that are highly stimulating to hybrid grouper, the differences of olfactory responses to 20 general amino acids and the olfactory response thresholds to five amino acids were determined in the electro-olfactogram (EOG). Relationship between the molecular structure of amino acids and the effect of olfactory stimulation was clarified. Results show that the type and concentration of amino acids had an effect on hybrid grouper olfactory stimulation. Hybrid grouper had a strong reaction to neutral aliphatic sulfur-containing amino acids with 5~6 carbon atoms and no branched chain, with an exception of strong reaction to cysteine containing 3 carbon atoms. In an experiment of this study,  $10^{-2}$  mol/L methionine stimulation showed the strongest stimulation effect to the hybrid grouper's olfactory, while  $10^{-6}$  mol/L proline stimulation displayed the weakest stimulation effect. The amplitude of hybrid grouper olfactory response increased exponentially with the increase of the logarithmic concentration of the 5 amino acids stimulation. In the experiments of this study, the amplitude of olfactory response of hybrid grouper did not reach the plateau with the increase of logarithmic concentration of 5 amino acids. Relationship between the reaction amplitude and the concentration of amino acids stimulation in the reaction threshold satisfies a correlation equation, and the threshold concentration was  $10^{-10}$ ~ $10^{-6}$  mol/L. This study provide a basis for the formulations of food attractant and feed for hybrid grouper.

**Key words** hybrid grouper (*Epinephelus lanceolatus*♂×*E. fuscoguttatus*♀); feeding stimulant; amino acids; olfactory; electrophysiology; electro-olfactogram