

文章编号: 1000-0615(2019)04-1116-10

DOI: 10.11964/jfc.20171211083

饲料牛磺酸含量对斜带石斑鱼幼鱼生长性能、体成分、*TauT* mRNA表达量及牛磺酸合成关键酶活性的影响

王彦飞, 周铭文, 李家旭, 何凌云, 叶继丹*

(集美大学水产学院, 厦门市饲料检测与安全评价重点实验室, 福建 厦门 361021)

摘要: 为探讨饲料牛磺酸含量对斜带石斑鱼幼鱼生长性能、体成分、*TauT* mRNA表达量及牛磺酸合成关键酶(CSD和CDO)活性的影响, 实验在以酪蛋白和明胶为蛋白源的基础饲料(ODT)中分别添加0.5%(0.5DT)、1.0%(1.0DT)、1.5%(1.5DT)的牛磺酸, 配制成4种不同牛磺酸含量的饲料。将平均体质量为(13.85±0.25) g的320尾斜带石斑鱼幼鱼随机分为4组, 每组4个循环水族箱, 每箱放养20尾鱼, 每组分别投喂一种相同实验饲料, 每天定时投喂实验饲料至表观饱食状态, 实验为期84 d。结果显示, 在ODT饲料中补充外源牛磺酸能显著提高饲料效率、摄食率、增重率和全鱼粗蛋白含量, 而显著降低肝体比和全鱼粗脂肪含量。组织中肝脏、肌肉、肠道*TauT* mRNA表达量在1.0DT组时达到最大值, 且显著高于其他各组, 当饲料牛磺酸含量继续增加至1.5DT组时明显降低, 但仍显著高于ODT和1.0DT组。斜带石斑鱼幼鱼血浆、肝脏、肠道和肌肉中牛磺酸含量与饲料牛磺酸含量之间呈正相关。饲料中补充外源牛磺酸能够显著降低肝脏、肌肉中CSD活性, 同时降低血浆、肝脏、肠道和肌肉中CDO活性, 但对血浆CSD活性无显著影响。研究表明, 饲料中补充外源牛磺酸能够明显促进斜带石斑鱼幼鱼生长, 增加鱼体蛋白沉积, 同时降低鱼体脂肪沉积, 上调组织中*TauT* mRNA表达水平及提高牛磺酸蓄积, 降低牛磺酸合成关键酶活性。研究表明, 以增重率为目标, 通过二次多项式回归分析, 饲料中牛磺酸的适宜含量为0.92%。

关键词: 斜带石斑鱼; 牛磺酸; 牛磺酸转运蛋白; 半胱次磺酸脱羧酶; 半胱胺双加氧酶

中图分类号: S 963.73⁺¹

文献标志码: A

牛磺酸是动物体内生物学功能众多、含量最为丰富却不参与机体蛋白质合成的一种含硫氨基酸^[1]。猫是典型的牛磺酸合成能力缺乏动物, 牛磺酸缺乏时会引起猫的视网膜病变^[2]、心肌炎^[3]等病征。除了猫等少数动物外, 大多数哺乳动物具有一定的牛磺酸合成能力, 但在幼龄时期机体内牛磺酸合成能力相对较弱, 合成量相对不足, 满足不了机体生长发育的需求, 需要外源补充。动物机体内需要半胱次磺酸脱羧酶(CSD)和半胱胺双加氧酶(CDO)2种关键酶的参与才能完成牛磺酸的合成^[4], 其合成能力又与动

物种类、个体营养状况、蛋白质进食量和胱氨酸有效性等因素有关^[5-6], 因此, 牛磺酸被视为动物的条件性氨基酸。牛磺酸的这种作用在鱼类中也同样如此, 而且肉食性鱼类在幼龄时期机体内牛磺酸合成能力更弱^[7]。由于植物蛋白原料几乎不含牛磺酸, 因此, 在以植物蛋白为主要蛋白源的饲料中适当补充牛磺酸可有效地维持黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)^[8]和尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)^[9]的正常生长发育。动物组织中心、脑、肌肉、肝和视网膜等牛磺酸含量丰富, 这些组织维持高浓度的牛磺酸与质膜Na⁺

收稿日期: 2017-12-11 修回日期: 2018-04-22

资助项目: 国家自然科学基金(31772861, 31372546); 福建省科技重大专项/专题(2016NZ0001-3)

通信作者: 叶继丹, E-mail: yjjjd@sina.com

依赖的牛磺酸转运蛋白(TauT)的表达有关^[10]。广泛分布于细胞膜上的TauT携带牛磺酸穿梭于细胞膜以完成其生物学功能^[11-12]。研究表明,敲除*TauT*基因能够引起小鼠心肌和骨骼肌发生病变^[13]、引发慢性肝病^[14]等。目前科学家已对莫桑比克罗非鱼(*O. mossambicus*)^[15]和鲤(*Cyprinus carpio*)^[16]等鱼类中的*TauT*基因进行了克隆及表达分析。

斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides*), 鲈形目(Perciformes), 鲈亚目(Percoidei), 鲷科(Serranidae), 石斑鱼属(*Epinephelus*), 是我国重要的海水养殖鱼类之一^[17]。有研究前期探讨了饲料牛磺酸含量与不同生长阶段斜带石斑鱼生长、组织牛磺酸沉积、游离氨基酸含量及组织中*TauT* mRNA表达量等之间的关系^[18-19], 证明在饲料牛磺酸含量不足的情况下适当添加牛磺酸能促进斜带石斑鱼生长, 是斜带石斑鱼生长发育的必需氨基酸, 但饲料牛磺酸含量是否影响斜带石斑鱼体内牛磺酸合成能力目前还未见报道。为了进一步探讨牛磺酸对斜带石斑鱼的营养生理学作用, 本实验探讨了饲料牛磺酸含量对斜带石斑鱼幼鱼组织中牛磺酸合成关键酶CSD和CDO活性的影响, 为牛磺酸在斜带石斑鱼养殖中的合理应用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验饲料

本实验以酪蛋白和明胶为蛋白源配制低牛磺酸含量的基础饲料作为对照组(0DT), 向对照组饲料中分别添加0.5%(0.5DT)、1.0%(1.0DT)、1.5%(1.5DT)的牛磺酸(国药集团化学试剂有限公司), 配制成4种不同牛磺酸含量的实验饲料。将所有饲料原料粉碎后过80目筛, 按照饲料配方中原料比例采用逐级扩大法混匀, 加适量的水制成直径为2.5 mm的颗粒饲料, 自然晾干后储存于-20 °C冰箱。斜带石斑鱼幼鱼实验饲料组成及营养水平见表1。

1.2 实验分组与日常饲养管理

养殖实验在集美大学水产养殖实验场进行, 实验所用的斜带石斑鱼幼鱼购自厦门某水产养殖场, 实验前放入3个900 L的循环体系中暂养15 d, 使其适应养殖环境。暂养结束后将实验用鱼饥饿处理24 h, 挑选平均体质量为(13.85±0.25) g

的幼鱼随机分配到16个相同的120 L循环水族箱中, 每箱放养20尾, 每4个循环水族箱随机作为一个相同饲料处理组, 实验为期84 d。实验期间每日定时(08:30和18:30)投喂饲料至表观饱食状态, 30 min后收集残饵, 烘干称重用于计算摄食量。同时, 清除循环水族箱底部排泄物, 排出的水量用过滤的海水补足。每天观察实验用鱼的活动状况和摄食情况, 养殖实验期间水体温度为26~32 °C, 硝酸盐含量为0.11~0.45 mg/L, 溶解氧高于6.15 mg/L。

1.3 实验样品采集

饲养实验结束后, 将每个循环水族箱的鱼用MS-222麻醉后称总重、计数, 随机挑选5尾鱼逐尾称重、测量体长用于计算肥满度, 用7%肝素钠溶液润湿后的无菌注射器尾静脉采集血液, 并立即在3 500 r/min、4 °C条件下离心10 min分离血浆。将采集血液后的鱼进行解剖并记录肝脏重, 用于计算肝体比, 采集肝脏、肌肉和肠道组织迅速放入冻存管中, 置于液氮冷冻后储存于-80 °C冰箱中。3尾鱼用于组织中牛磺酸合成关键酶活性测定和*TauT* mRNA表达量分析, 将3尾鱼剩余的组织另外2尾鱼用于组织中牛磺酸含量分析。再随机挑选3尾鱼存放于-20 °C冰箱中, 用于全鱼体常规成分分析。

1.4 样品测定

常规营养成分的测定 水分含量的测定采用105 °C烘箱恒重干燥法(DHG-9123A型电热恒温鼓风干燥箱), 粗蛋白质含量的测定采用凯氏定氮法(Kjeltec 8400型凯氏定氮仪), 粗脂肪含量的测定采用索式提取法(乙醚为溶剂), 灰分含量的测定采用550 °C马弗炉恒重灼烧法(HG-12-4B型陶瓷纤维马弗炉)。

肝脏组织总RNA提取与反转录 使用Trizol Reagent (Invitrogen)提取斜带石斑鱼幼鱼肝脏组织中总RNA, 提取的总RNA用1.5%琼脂糖凝胶电泳和微量紫外分光光度计(Nano Drop 2000)检测其质量和完整性, 按照Thermo试剂盒的使用方法, 取3 μg总RNA作为反转录模板合成cDNA第一条链, 按照DNA片段TaKaRa纯化试剂盒(TaKaRa)的操作说明对cDNA第一条链纯化, 纯化后的cDNA 3'末端添加poly C, 利用β-actin和1.5%琼脂糖凝胶电泳对纯化的cDNA进行检测。

表 1 斜带石斑鱼幼鱼饲料组成及营养水平(风干基础)
 Tab. 1 Formulations and nutrient levels on experimental diets of juvenile *E. coioides* (dry basis) g/kg

原料 ingredients	组别 groups			
	0DT	0.5DT	1.0DT	1.5DT
酪蛋白 casein	470	470	470	470
明胶 gelatin	80	80	80	80
玉米淀粉 corn starch	240	240	240	240
鱼油 fish oil	30	30	30	30
大豆油 soybean oil	30	30	30	30
大豆卵磷脂 soybean lecithin	30	30	30	30
维生素预混物 vitamin mix ^a	2	2	2	2
矿物质预混物 mineral mix ^b	3	3	3	3
维生素C vitamin C	0.2	0.2	0.2	0.2
磷酸二氢钙 dicalcium phosphate	20	20	20	20
氯化胆碱 choline chloride	3	3	3	3
虾粉 shrimp meal	30	30	30	30
微晶纤维素 microcrystalline cellulose	61.8	56.8	51.8	46.8
牛磺酸 taurine	0	5	10	15
营养水平 nutrient level				
干物质 dry matter	908.1	907.6	902.4	902.1
粗蛋白 crude protein	495.5	492.1	491.3	495.6
粗脂肪 crude lipid	87.8	86.1	85.4	87.1
灰分 ash	22.1	25.4	23.5	24.2
牛磺酸 taurine	1.0	4.9	9.6	14.7

注: a. 维生素预混物(每千克饲料)提供, 维生素A 10 mg, 维生素D 10 mg, 维生素E 500 mg, 维生素B₁ 60 mg, 维生素B₂ 70 mg, 维生素B₆ 80 mg, 维生素B₁₂ 0.4 mg, 烟酸200 mg, 泛酸钙200 mg, 生物素2 mg, 肌醇500 mg, 叶酸8 mg。 b. 矿物质预混物(每千克饲料)提供, 柠檬酸铁800 mg, 五水硫酸铜24 mg, 五水硫酸锌190 mg, 五水硫酸锰100 mg, 七水硫酸钴 50 mg, 碘化钾8 mg, 亚硒酸钠 2 mg

Notes: a. vitamin premix (per kg diet), V_A 10 mg, V_D 10 mg, V_E 500 mg, V_{B1} 60 mg, V_{B2} 70 mg, V_{B6} 80 mg, V_{B12} 0.4 mg, nicotinic acid 200 mg, calcium pantothenate 200 mg, biotin 2 mg, inositol 500 mg, folic acid 8 mg. b. mineral premix (per kg diet), ferric citrate 800 mg, CuSO₄·5H₂O 24 mg, ZnSO₄·5H₂O 190 mg, MnSO₄·5H₂O 100 mg, CoSO₄·7H₂O 50 mg, KI 8 mg, NaSeO₃ 2 mg

斜带石斑鱼幼鱼 *TauT* mRNA 保守序列的克隆 根据已知的花鲈 (*Lateolabrax japonicus* JN897395)、莫桑比克罗非鱼 (AB033497.1) 和大西洋鲑 (*Salmo salar* NP_001117102) 等序列的 *TauT* 基因序列, 用 BioEdit 软件进行多重比较后查找其保守序列, 并在保守序列上设计出斜带石斑鱼幼鱼 *TauT* 兼并引物 LY-*TauT*-F (5'-GGGACTGTA-TGCTGCTGGGATG-3') 和 LY-*TauT*-R (5'-RACC-CACAAAAGGCATACACC-3'), 按照琼脂糖凝胶回收试剂盒 (上海捷锐生物工程有限公司) 说明书回收目的片段, 与 pMD19-T 载体连接后转化至

TOP10 感受态细胞, 进行菌液 PCR 检测重组子, 将符合要求的阳性克隆菌液测序, 将得到的核心序列分别设计 2 条正向特异性引物和反向特异性引物, 进而全长扩增, 测序得到序列长度为 2 038 bp。

斜带石斑鱼幼鱼体组织中 *TauT* mRNA 的表达量 根据克隆得到的斜带石斑鱼幼鱼结构功能区序列设计荧光定量引物 *TauT*-F 和 *TauT*-R (表 2), 通过对提取的总 RNA 质量和引物检测后进行实时荧光定量分析。运用 SYBR[®] Green I 嵌合荧光法, 使用 Thermal cycler 仪 (ABI Step One

Plus™测定斜带石斑鱼幼鱼肝脏、肌肉和肠道中*TauT* mRNA表达量。

表2 引物序列

Tab. 2 Sequences of primer

引物名称 primer name	引物序列 primer sequence (5'-3')
<i>β-actin</i> -F	TGCTGTCCCTGTATGCCTCT
<i>β-actin</i> -R	CCTTGATGTCACGCACGAT
<i>TauT</i> -F	TAAGGACACTCTGAAGCCATCTC
<i>TauT</i> -R	AGCACCTCCACCATTCTTATAGC

牛磺酸含量的测定 参照周铭文等^[20]的方法测定实验原料、饲料、血浆、肠道、肝脏和肌肉中牛磺酸含量,使用氨基酸自动分析仪(日立L-8900型)测定样品中牛磺酸含量。

斜带石斑鱼幼鱼体内牛磺酸合成途径中CSD和CDO的活性 采用双抗体一步夹心法酶联免疫吸附实验(上海江莱生物科技有限公司)测定组织中CSD和CDO活性,按照试剂盒说明书进行操作,具体操作步骤:称取样品0.5 g加入适量PBS匀浆,4 °C、3 000 r/min条件下离心20 min,收集上清液后放置于-80 °C冰箱。用稀释液将样品稀释5倍,加样品稀释液50 μL于样品孔中(空白孔除外),37 °C条件下孵育30 min,用蒸馏水洗涤后加50 μL酶标试剂(空白孔除外),37 °C条件下孵育30 min,用蒸馏水洗涤后加显色剂A和显色剂B各50 μL轻轻摇晃混匀,37 °C避光条件下显色15 min,直至蓝色转为黄色后加50 μL终止液。测定波长为450 nm,使用酶标仪(Thermo Scientific™ Varioskan™ LUX)依序读取OD值,空白孔调零,用标准品的OD值绘制标准曲线,通过标准曲线计算组织中CSD和CDO活性。

1.5 计算公式

生长性能指标的计算公式:

增重率(weight gain rate, WGR , %) $= (W_f - W_i) / W_i \times 100\%$

饲料效率(feed efficiency, FE) $= (W_f - W_i) / W_F$

摄食率feeding rate, FR , % $= W_F / [(W_i + W_f) / 2] / t \times 100\%$

肝体比(hepatosomatic index, HSI , %) $= W_h / W_b \times 100\%$

式中, W_f 为末均重(g), W_i 为初均重(g), W_F 为总

摄食量(g), t 为饲养时间(d), W_b 为鱼体质量(g), W_h 为肝脏质量(g)。

1.6 数据分析

采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法分析*TauT*基因表达量, β -actin作为内参基因。所有实验数据均以平均值±标准差(mean±SD)表示,图表使用Prism 5软件绘制,采用SPSS 20.0软件进行单因素方差分析(One-Way ANOVA),若实验数据存在显著性差异,运用Student-Newman-Keuls检验法进行多重比较,显著性差异水平为 $P < 0.05$ 。

2 结果

2.1 饲料牛磺酸含量对斜带石斑鱼幼鱼生长性能的影响

与对照组相比,牛磺酸处理组饲料效率和摄食率均显著升高($P < 0.05$),肝体比显著下降($P < 0.05$),但是各牛磺酸处理组之间肝体比差异不显著($P > 0.05$),牛磺酸处理组末均重和增重率显著升高,至1.0DT组最高,之后显著降低($P < 0.05$),增重率在各牛磺酸处理组之间差异显著($P < 0.05$)(表3)。以饲料牛磺酸含量为自变量(X),增重率为因变量(Y),通过二次多项式回归分析可知, $Y = -601.32X^2 + 1107.5X + 230.41$, $R^2 = 0.7935$,以增重率为目标,当饲料牛磺酸含量为0.92%时,增重率最大。

2.2 饲料牛磺酸含量对斜带石斑鱼幼鱼体成分的影响

牛磺酸处理组全鱼粗蛋白含量与对照组相比显著升高,而粗脂肪含量显著降低($P < 0.05$),且各牛磺酸处理组之间无显著性差异($P > 0.05$)。饲料牛磺酸含量对斜带石斑鱼幼鱼全体水分和灰分含量无显著影响($P > 0.05$)(表4)。

2.3 饲料牛磺酸含量对斜带石斑鱼幼鱼体组织中*TauT* mRNA表达量的影响

与对照组相比,牛磺酸处理组肝脏、肠道、肌肉中*TauT* mRNA表达量显著升高($P < 0.05$),当饲料牛磺酸含量增加至0.96%时,斜带石斑鱼幼鱼肝脏、肠道、肌肉中*TauT* mRNA表达量逐渐上升至最大值,饲料牛磺酸含量继续增加至1.47%时,斜带石斑鱼幼鱼肝脏、肠道和肌肉中*TauT* mRNA表达量显著降低($P < 0.05$),且各牛磺酸处理组之间*TauT* mRNA表达量差异显著($P < 0.05$)(图1)。

表3 饲料牛磺酸含量对斜带石斑鱼幼鱼生长性能的影响

Tab. 3 Effects of dietary taurine content on growth performance of juvenile *E. coioides*

饲料 diets		0DT	0.5DT	1.0DT	1.5DT	集合标准误 pooled SE	P值 P-value
初均重/g	initial body weight	13.85±0.35	13.83±0.26	13.87±0.31	13.85±0.13	0.02	0.321
末均重/g	final body weight	66.56±8.18 ^a	83.86±7.58 ^b	101.03±2.68 ^c	88.27±2.92 ^b	4.12	<0.001
增重率/%	WGR	380.58±8.18 ^a	506.36±7.58 ^b	828.41±9.68 ^d	537.47±7.92 ^c	20.24	<0.001
饲料效率/%	FE	0.44±0.01 ^a	0.59±0.03 ^b	0.59±0.02 ^b	0.57±0.04 ^b	0.04	0.002
摄食率/(%/d)	FR	3.07±0.10 ^a	3.46±0.09 ^b	3.61±0.11 ^b	3.43±0.02 ^b	0.11	<0.001
肝体比/%	HSI	2.20±0.44 ^b	1.34±0.17 ^a	1.34±0.12 ^a	1.58±0.18 ^a	0.02	<0.001

注：同一行肩标小写字母不同表示差异显著(P<0.05)。下同

Notes: value in the same line with no common superscripts are significantly different (P<0.05). The same below

表4 饲料牛磺酸含量对斜带石斑鱼幼鱼全鱼体成分的影响(湿重基础)

Tab. 4 Effects of dietary taurine content on body composition of juvenile *E. coioides* (wet weight basis)

饲料 diets		0DT	0.5DT	1.0DT	1.5DT	集合标准误 pooled SE	P值 P-value
水分	moisture	697.31±6.80	697.15±4.65	695.60±9.80	695.37±1.90	1.50	0.921
粗蛋白	crude protein	170.21±6.11 ^a	178.81±1.54 ^b	179.91±2.95 ^b	179.65±0.31 ^b	0.72	<0.001
粗脂肪	crude lipid	69.82±6.23 ^b	66.93±0.63 ^a	65.67±1.63 ^a	66.62±2.84 ^a	0.65	0.009
灰分	ash	48.74±0.30	49.0±1.61	48.5±1.81	49.3±3.16	0.21	0.452

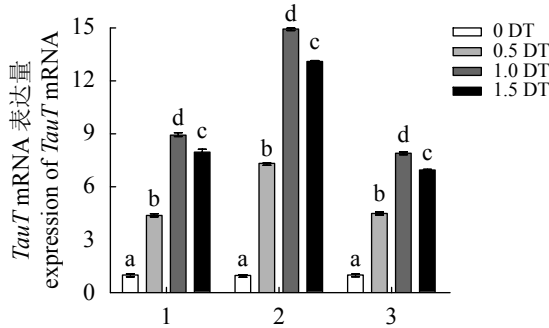


图1 饲料牛磺酸含量对斜带石斑鱼幼鱼组织中TauT mRNA表达量的影响

1. 肝脏; 2. 肠道; 3. 肌肉。图中标注小写字母不同表示差异性显著(P<0.05)。下同

Fig. 1 Effects of dietary taurine content on expression of TauT mRNA in tissues of juvenile *E. coioides*

1. liver; 2. intestine; 3. muscle. Different lowercase letters in the bar chart mean significant difference (P<0.05). The same below

2.4 饲料牛磺酸含量对斜带石斑鱼幼鱼体组织中牛磺酸含量的影响

斜带石斑鱼幼鱼血浆、肝脏、肠道和肌肉中牛磺酸含量随饲料牛磺酸含量的增加而显著升高(P<0.05), 且各牛磺酸处理组之间差异显著(P<0.05)(图2)。以饲料牛磺酸含量为自变量(X),

斜带石斑鱼幼鱼血浆、肝脏、肠道和肌肉中牛磺酸含量为因变量(Y), 用二次多项式来拟合二者的相关关系(表5)。

2.5 饲料牛磺酸含量对斜带石斑鱼幼鱼体组织中牛磺酸合成关键酶活性的影响

随着饲料牛磺酸含量的不断增加, 斜带石斑鱼幼鱼血浆CSD活性与对照组相比无显著性差异(P>0.05), 但肝脏、肌肉CSD活性显著低于对照组(P<0.05), 且各牛磺酸处理组之间无显著性差异(P>0.05)。斜带石斑鱼幼鱼1.0DT组肠道中CSD活性显著低于对照组和0.5DT组(P<0.05), 但与1.5DT组相比无显著性差异(P>0.05)。牛磺酸处理组中斜带石斑鱼幼鱼血浆、肝脏、肠道和肌肉中CDO活性显著低于对照组(P<0.05), 但各牛磺酸处理组之间无显著性差异(P>0.05)(表6)。

3 讨论

3.1 斜带石斑鱼幼鱼生长性能

本研究表明, 在斜带石斑鱼幼鱼饲料中适量补充外源牛磺酸能够显著促进其生长。随着饲料牛磺酸含量的不断增加, 增重率呈现先升高后降低的趋势, 当饲料牛磺酸含量增至0.96%

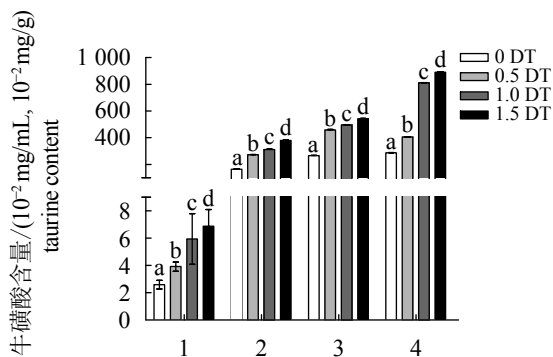


图2 饲料牛磺酸含量对斜带石斑鱼幼鱼组织中牛磺酸含量的影响

1. 血浆; 2. 肝脏; 3. 肠道; 4. 肌肉

Fig. 2 Effects of dietary taurine content on taurine content in tissues of juvenile *E. coioides*

1. plasma; 2. liver; 3. intestine; 4. muscle

时, 增重率达到峰值; 当饲料牛磺酸含量继续上升至1.47%时, 增重率明显下降。有研究表明, 牛磺酸是一种非蛋白含硫氨基酸, 能够起到诱食剂的作用^[4], 从而显著提高真鲷(*Pagrus major*)^[21]和牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)^[22]的饲料效率和摄食率, 与本实验结果一致, 说明饲料牛磺酸不

足会明显影响斜带石斑鱼幼鱼的摄食及其对饲料的利用率。以增重率为目标, 通过二次多项式回归分析, 饲料中牛磺酸的适宜含量为0.92%。而1.5DT组饲料中牛磺酸含量为1.47%, 高于斜带石斑鱼对牛磺酸的需求量。当饲料牛磺酸含量高于适宜值时, 斜带石斑鱼增重率明显降低, 本实验结果与报道的金头鲷(*Sparus aurata*)^[23]和虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)^[24]结果一致。当饲料牛磺酸含量过高时, 鱼体牛磺酸的排出增加以维持机体内适宜的牛磺酸浓度, 引起机体耗能增加, 从而导致增重率下降^[25]。另外, 牛磺酸呈弱酸性, 牛磺酸浓度过高会影响饲料的适口性^[26]。本实验表明, 当饲料牛磺酸含量超过0.96%时, 斜带石斑鱼摄食率出现下降的趋势, 这可能是引起增重率下降的又一个原因, 但确切的原因仍待今后进一步探讨。

3.2 斜带石斑鱼幼鱼体成分

饲料中外源牛磺酸的添加能够使斜带石斑鱼幼鱼体蛋白质沉积显著升高, 体脂肪沉积显著下降。有研究表明, 饲料中添加牛磺酸能够显著促进异育银鲫(*Carassius auratus gibelio*)^[27]、

表5 饲料牛磺酸含量(X)与斜带石斑鱼幼鱼组织中牛磺酸含量(Y)的关系

Tab. 5 Relationship between dietary taurine content (X) and taurine content in tissues of juvenile *E. coioides* (Y)

组织 tissues	回归方程 regression equations	相关系数 correlation coefficients	P值 P-value
血浆 plasma	$Y = -0.6257X^2 + 3.984X + 2.4722$	$R^2 = 0.9889$	<0.001
肝脏 liver	$Y = -69.03X^2 + 254.77X + 148.88$	$R^2 = 0.9641$	<0.001
肠道 intestine	$Y = -202.3X^2 + 499.21X + 234.04$	$R^2 = 0.9376$	<0.001
肌肉 muscle	$Y = -167.6X^2 + 746.99X + 179.44$	$R^2 = 0.9511$	<0.001

表6 饲料牛磺酸含量对斜带石斑鱼幼鱼组织中CSD和CDO活性的影响

Tab. 6 Effects of dietary taurine content on CSD and CDO activity in tissues of juvenile *E. coioides* nmol/(min·mg prot)

组织 tissues		0DT	0.5DT	1.0DT	1.5DT	集合标准误 pooled SE	P值 P-value
血浆 plasma	CSD	0.67±0.02	0.66±0.01	0.65±0.01	0.63±0.01	0.06	0.072
	CDO	1.35±0.02 ^b	1.15±0.01 ^a	1.14±0.01 ^a	1.13±0.01 ^a	0.19	<0.001
肝脏 liver	CSD	0.76±0.03 ^b	0.62±0.02 ^a	0.63±0.04 ^a	0.60±0.04 ^a	0.02	<0.001
	CDO	1.27±0.01 ^b	0.83±0.02 ^a	0.76±0.01 ^a	0.59±0.01 ^a	0.09	<0.001
肠道 intestine	CSD	0.52±0.05 ^b	0.48±0.01 ^b	0.39±0.05 ^a	0.40±0.03 ^{ab}	0.02	<0.001
	CDO	1.34±0.02 ^b	1.18±0.01 ^a	1.10±0.02 ^a	1.07±0.01 ^a	0.04	<0.001
肌肉 muscle	CSD	0.79±0.03 ^b	0.67±0.07 ^a	0.65±0.01 ^a	0.64±0.03 ^a	0.06	<0.001
	CDO	1.34±0.02 ^b	0.98±0.02 ^a	0.86±0.01 ^a	0.81±0.02 ^a	0.06	<0.001

大西洋鲑^[28]和花鲈^[29]等鱼类蛋白质沉积, 由于在低牛磺酸饲料中补充外源牛磺酸, 相应的减少了机体内牛磺酸的生物合成, 使得蛋氨酸和胱氨酸等含硫氨基酸能够更多地参与到蛋白质合成代谢中, 进而增加机体内蛋白质沉积^[30]。另外, 有研究表明饲料中适量补充外源牛磺酸能够显著提高花鳗鲡(*Anguilla marmorata*)^[31]和军曹鱼(*Rachycentron canadum*)^[32]蛋白酶活性, 说明饲料中适量补充外源牛磺酸能够刺激机体增加蛋白酶分泌, 继而提高机体内蛋白质沉淀。饲料中外源牛磺酸的添加不仅能够显著提高牛磺酸结合胆汁酸成为牛磺胆酸和牛磺鹅脱氧胆酸的能力^[33], 还能够提高限速酶胆固醇7 α -羧化酶(CYP7A1)的活性^[34], 而且还具有促进脂肪酸氧化和减少脂肪合成的作用^[35], 产生降脂效应, 从而使斜带石斑鱼幼鱼体脂沉积减少。

3.3 斜带石斑鱼幼鱼体组织中牛磺酸含量和 *TauT* mRNA表达

本研究结果表明, 饲料牛磺酸含量与各组织中牛磺酸含量呈显著正相关, 但不同组织牛磺酸的蓄积能力却存在较大差异^[36], 同时也反映出不同组织对牛磺酸的需求量存在明显差异。斜带石斑鱼幼鱼组织中牛磺酸含量随着饲料牛磺酸含量的升高而不断增加, 与报道的尼罗罗非鱼^[37]和裸盖鱼(*Anoplopoma fimbria*)^[38]结果一致。牛磺酸从细胞膜外向膜内的跨膜转运是由 *TauT* 负责完成, 随着饲料牛磺酸含量的不断增加, 大量牛磺酸经消化吸收后随血液循环进入外周组织, 细胞外高浓度的牛磺酸需要通过 *TauT* 转运至细胞内, 因此需要有更多的 *TauT* 来完成。本研究表明, 饲料牛磺酸含量从0.49%逐渐上升至0.96%时, 上调了组织中 *TauT* mRNA表达, 该结果与组织中牛磺酸含量和生长性能结果一致。然而牛磺酸并不参与组织代谢, 当饲料牛磺酸含量继续增加至1.47%时, 细胞内牛磺酸含量达到某个阈值后相应下调了组织中 *TauT* mRNA表达。

3.4 斜带石斑鱼幼鱼牛磺酸合成关键酶活性

有研究表明, 饲料中添加牛磺酸降低了大菱鲂(*Scophthalmus maximus*)体内CDO和CSD酶活性^[39]。在本实验中, 这2种酶的活性随着饲料牛磺酸含量的增加呈现明显下降的趋势, 由于在不同组织中牛磺酸的合成能力不同^[40], CSD活性

在不同组织中下降的程度也存在差异, 但是组织中CDO活性受到外源牛磺酸的影响大致相同。研究表明, 鱼类体内牛磺酸合成关键酶活性明显受到外源牛磺酸供给的影响, 牛磺酸合成关键酶活性升高说明饲料牛磺酸供给不足, 需要及时调整饲料配方, 适时补充牛磺酸以满足鱼类生长对牛磺酸的需要。

4 小结

饲料中牛磺酸含量可显著促进斜带石斑鱼的生长, 以增重率为目标, 通过二次多项式回归分析, 饲料中牛磺酸的适宜含量为0.92%。

随着饲料中牛磺酸含量的增加, 斜带石斑鱼组织中牛磺酸含量逐渐增加, 但牛磺酸合成关键酶活性则逐渐降低。组织中 *TauT* mRNA表达量先上升后下降。说明饲料牛磺酸不足时, 外源补充牛磺酸能够促进牛磺酸在斜带石斑鱼体内的转运, 以满足自身对牛磺酸的需求。

参考文献:

- [1] Kuzmina V V, Gavrovskaya L K, Ryzhova O V. Taurine. Effect on exotrophia and metabolism in mammals and fish[J]. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*, 2010, 46(1): 19-27.
- [2] Hayes K C, Carey R E, Schmidt S Y. Retinal degeneration associated with taurine deficiency in the cat[J]. *Science*, 1975, 188(4191): 949-951.
- [3] Pion P D, Kittleson M D, Rogers Q R, *et al.* Myocardial failure in cats associated with low plasma taurine: a reversible cardiomyopathy[J]. *Science*, 1987, 237(4816): 764-768.
- [4] 王和伟, 叶继丹, 陈建春. 牛磺酸在鱼类营养中的作用及其在鱼类饲料中的应用[J]. *动物营养学报*, 2013, 25(7): 1418-1428.
Wang H W, Ye J D, Chen J C. Taurine: effect in fish nutrition and application in fish feed[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2013, 25(7): 1418-1428(in Chinese).
- [5] De Luca A, Pierno S, Camerino D C. Taurine: the appeal of a safe amino acid for skeletal muscle disorders[J]. *Journal of Translational Medicine*, 2015, 13(1): 243.
- [6] Wang X, He G, Mai K S, *et al.* Differential regulation of taurine biosynthesis in rainbow trout and Japanese floun-

- der[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 21231.
- [7] Goto T, Tiba K, Sakurada Y, *et al.* Determination of hepatic cysteinesulfinate decarboxylase activity in fish by means of OPA-prelabeling and reverse-phase high-performance liquid chromatographic separation[J]. *Fisheries Science*, 2001, 67(3): 553-555.
- [8] Li M, Lai H, Li Q, *et al.* Effects of dietary taurine on growth, immunity and hyperammonemia in juvenile yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco* fed all-plant protein diets[J]. *Aquaculture*, 2016, 450: 349-355.
- [9] Al-Feky S S A, El-Sayed A F M, Ezzat A A. Dietary taurine enhances growth and feed utilization in larval Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed soybean meal-based diets[J]. *Aquaculture Nutrition*, 2016, 22(2): 457-464.
- [10] Lang F, Busch G L, Ritter M, *et al.* Functional significance of cell volume regulatory mechanisms[J]. *Physiological Reviews*, 1998, 78(1): 247-306.
- [11] Chow S C, Ching L Y, Wong A M F, *et al.* Cloning and regulation of expression of the Na⁺-Cl⁻-taurine transporter in gill cells of freshwater Japanese eels[J]. *Journal of Experimental Biology*, 2009, 212(Pt 20): 3205-3210.
- [12] 张小龙, 邓欢, 陈澄, 等. 牛磺酸转运体的调节机制及其在动物营养研究中的意义[J]. *动物营养学报*, 2013, 25(10): 2222-2230.
- Zhang X L, Deng H, Chen C, *et al.* Taurine transporter: Regulation mechanism and significance in animal nutrition studies[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2013, 25(10): 2222-2230(in Chinese).
- [13] Ito T, Oishi S, Takai M, *et al.* Cardiac and skeletal muscle abnormality in taurine transporter-knockout mice[J]. *Journal of Biomedical Science*, 2010, 17(S1): S20.
- [14] Warskulat U, Borsch E, Reinehr R, *et al.* Chronic liver disease is triggered by taurine transporter knockout in the mouse[J]. *FASEB Journal: Official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 2006, 20(3): 574-576.
- [15] Takeuchi K, Toyohara H, Kinoshita M, *et al.* Ubiquitous increase in taurine transporter mRNA in tissues of tilapia (*Oreochromis mossambicus*) during high-salinity adaptation[J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2000, 23(2): 173-182.
- [16] Takeuchi K, Toyohara H, Sakaguchi M. A hyperosmotic stress-induced mRNA of carp cell encodes Na⁺- and Cl⁻-dependent high affinity taurine transporter 1[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 2000, 1464(2): 219-230.
- [17] 艾春香, 李少菁, 王桂忠, 等. 石斑鱼的营养需求及其饲料的研制[J]. *海洋水产研究*, 2004, 25(6): 86-92.
- Ai C X, Li S J, Wang G Z, *et al.* A review of nutrient requirements and diets of groupers[J]. *Marine Fisheries Research*, 2004, 25(6): 86-92(in Chinese).
- [18] 王学习, 周铭文, 黄岩, 等. 饲料牛磺酸水平对不同生长阶段斜带石斑鱼幼鱼生长性能和体成分的影响[J]. *动物营养学报*, 2017, 29(5): 1810-1820.
- Wang X X, Zhou M W, Huang Y, *et al.* Effects of dietary taurine level on growth performance and body composition of juvenile grouper (*Epinephelus coioides*) at different growth periods[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2017, 29(5): 1810-1820(in Chinese).
- [19] 李家旭, 叶继丹. 斜带石斑鱼牛磺酸转运蛋白基因的克隆及饲料牛磺酸含量对其表达的影响[J]. *水产学杂志*, 2016, 29(5): 48-54.
- Li J X, Ye J D. Cloning and expression of taurine transporter(*TauT*)gene and effect dietary taurine level on expression of *TauT* gene in Orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*)[J]. *Chinese Journal of Fisheries*, 2016, 29(5): 48-54(in Chinese).
- [20] 周铭文, 王和伟, 叶继丹. 斜带石斑鱼生长性能、体成分和组织游离氨基酸含量对饲料中牛磺酸含量的响应[J]. *动物营养学报*, 2015, 27(3): 785-794.
- Zhou M W, Wang H W, Ye J D. Responses of growth performance, body composition and tissue free amino acid contents of grouper (*Epinephelus coioides*) to dietary taurine content[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2015, 27(3): 785-794(in Chinese).
- [21] Matsunari H, Furuita H, Yamamoto T, *et al.* Effect of dietary taurine and cystine on growth performance of juvenile red sea bream *Pagrus major*[J]. *Aquaculture*, 2008, 274(1): 142-147.
- [22] Kim S K, Takeuchi T, Akimoto A, *et al.* Effect of taurine supplemented practical diet on growth performance and taurine contents in whole body and tissues of juvenile Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*[J]. *Fisheries Science*, 2005, 71(3): 627-632.
- [23] Pinto W, Figueira L, Santos A, *et al.* Is dietary taurine supplementation beneficial for gilthead seabream (*Spar-*

- us aurata*) larvae?[J]. *Aquaculture*, 2013, 384-387: 1-5.
- [24] Yokoyama M, Nakazoe J I. Accumulation and excretion of taurine in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed diets supplemented with methionine, cystine and taurine[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 1992, 102(3): 565-568.
- [25] Yue Y R, Liu Y J, Tian L X, *et al.* The effect of dietary taurine supplementation on growth performance, feed utilization and taurine contents in tissues of juvenile white shrimp (*Litopenaeus vannamei*, Boone, 1931) fed with low-fishmeal diets[J]. *Aquaculture Research*, 2013, 44(8): 1317-1325.
- [26] Takaoka O, Takii K, Nakamura M, *et al.* Identification of feeding stimulants for marbled rockfish[J]. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 1990, 56(2): 345-351.
- [27] 赵小锋, 贾丽, 周剑平. 牛磺酸对鲫鱼蛋白质消化吸收的影响[J]. *水产养殖*, 2006, 27(5): 5-6.
Zhao X F, Jia L, Zhou J P. Effect of taurine on protein digestibility of crucian carp[J]. *Journal of Aquaculture*, 2006, 27(5): 5-6(in Chinese).
- [28] Espe M, Ruohonen K, El-Mowafi A. Effect of taurine supplementation on the metabolism and body lipid-to-protein ratio in juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*)[J]. *Aquaculture Research*, 2012, 43(3): 349-360.
- [29] 柳茜, 王成强, 梁萌青, 等. 牛磺酸及相关氨基酸对鲈鱼(*Lateolabrax japonicus*)幼鱼生长及组织氨基酸含量的影响[J]. *渔业科学进展*, 2017, 38(4): 44-52.
Liu X, Wang C Q, Liang M Q, *et al.* Effects of dietary taurine and related amino acids on growth and amino acid composition of Japanese seabass (*Lateolabrax japonicus*)[J]. *Progress in Fishery Sciences*, 2017, 38(4): 44-52(in Chinese).
- [30] Li P, Mai K, Trushenski J, *et al.* New developments in fish amino acid nutrition: towards functional and environmentally oriented aquafeeds[J]. *Amino Acids*, 2009, 37(1): 43-53.
- [31] 何明, 刘利平, 曲恒超, 等. 牛磺酸对花鳗鲡生长和消化酶活力的影响[J]. *上海海洋大学学报*, 2017, 26(2): 227-234.
He M, Liu L P, Qu H C, *et al.* Effects of dietary taurine on growth performance and digestive enzyme activity of *Anguilla marmorata*[J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2017, 26(2): 227-234(in Chinese).
- [32] Salze G, McLean E, Craig S R. Dietary taurine enhances growth and digestive enzyme activities in larval cobia[J]. *Aquaculture*, 2012, 362-363: 44-49.
- [33] Kim S K, Kim K G, Kim K D, *et al.* Effect of dietary taurine levels on the conjugated bile acid composition and growth of juvenile Korean rockfish *Sebastes schlegeli* (Hilgendorf)[J]. *Aquaculture Research*, 2015, 46(11): 2768-2775.
- [34] Yun B, Ai Q H, Mai K S, *et al.* Synergistic effects of dietary cholesterol and taurine on growth performance and cholesterol metabolism in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.) fed high plant protein diets[J]. *Aquaculture*, 2012, 324-325: 85-91.
- [35] 郑宗林, 曾本和, 向泉, 等. 饲料中胆汁酸添加水平对齐口裂腹鱼幼鱼生长性能、形体指标及体成分的影响[J]. *动物营养学报*, 2016, 28(8): 2423-2430.
Zheng Z L, Zeng B H, Xiang X, *et al.* Effects of bile acid supplemental level on growth performance, physical indices and body composition of juvenile *Schizothorax prenanti*[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2016, 28(8): 2423-2430(in Chinese).
- [36] Pinto W, Figueira L, Ribeiro L, *et al.* Dietary taurine supplementation enhances metamorphosis and growth potential of *Solea senegalensis* larvae[J]. *Aquaculture*, 2010, 309(1-4): 159-164.
- [37] 周铭文, 王和伟, 叶继丹. 饲料牛磺酸对尼罗罗非鱼生长、体成分及组织游离氨基酸含量的影响[J]. *水产学报*, 2015, 39(2): 213-223.
Zhou M W, Wang H W, Ye J D. Effects of taurine supplementation on the growth, body composition and tissue free amino acid concentrations in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2015, 39(2): 213-223(in Chinese).
- [38] Johnson R B, Kim S K, Watson A M, *et al.* Effects of dietary taurine supplementation on growth, feed efficiency, and nutrient composition of juvenile sablefish (*Anoplopoma fimbria*) fed plant based feeds[J]. *Aquaculture*, 2015, 445: 79-85.
- [39] 齐国山. 饲料中牛磺酸、蛋氨酸、胱氨酸、丝氨酸和半胱氨酸对大菱鲆生长性能及牛磺酸合成代谢的影响[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2012.
Qi G S. Effects of dietary taurine, methionine, cysteine, serine and cysteamine on growth performance and metabo-

lism of taurine synthesis in turbot[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2012(in Chinese). [40] Salze G P, Davis D A. Taurine: a critical nutrient for future fish feeds[J]. *Aquaculture*, 2015, 437: 215-229.

Effects of dietary taurine content on growth performance, body composition, expression of taurine transporter (*TauT*) mRNA and key enzyme activities of taurine synthesis in juvenile grouper (*Epinephelus coioides*)

WANG Yanfei, ZHOU Mingwen, LI Jiaxu, HE Lingyun, YE Jidan*

(Xiamen Key Laboratory for Feed Quality Testing and Safety Evaluation,
Fisheries College of Jimei University, Xiamen 361021, China)

Abstract: The study was conducted to investigate the effects of different dietary taurine concentrations on growth performance, body composition, tissue mRNA expression of taurine transporter (*TauT*) and key enzyme activities of taurine synthesis (cysteine sulfinic acid decarboxylase and cysteine dioxygenase, i.e. CSD and CDO) in juvenile grouper (*Epinephelus coioides*). Four diets at 0 (0DT), 0.5% (0.5DT), 1.0% (1.0DT) and 1.5% (1.5DT) taurine levels were formulated using casein and gelatin as the protein source. A total of 320 juvenile fish with an average weight of (13.85±0.25) g were randomly divided into 4 groups with 4 replicate tanks at a stock density of 20 fish per tank, and each group of fish was fed one of the same experimental diets to apparent satiation each time during a feeding period of 84 days. Results showed that the feed efficiency, feeding rate, weight gain rate and whole-body crude protein content for fish fed the diets with taurine administration were significantly increased, but hepatosomatic index and whole-body crude lipid content were significantly decreased in comparison with 0DT. The dietary taurine addition significantly upregulated tissue mRNA expression levels of *TauT* and 1.0DT had the highest level of tissue mRNA expression, which declined with concentrations of taurine, but still was significantly higher than 0DT and 0.5DT. There was a positive correlation between concentrations of taurine in serum, liver, intestine and muscle of juvenile *E. coioides* and dietary taurine content. The CSD activities in liver, muscle and the CDO activities in plasma, liver, intestine and muscle were significantly decreased by dietary taurine administration, however, the plasma CSD activity was not affected by dietary taurine administration. The results suggested that dietary taurine addition could improve the growth performance of juvenile *E. coioides*, increase whole-body protein deposit, decrease whole-body lipid deposit, enhance the expression level of *TauT* mRNA and taurine content in tissues, reduce key enzyme activities of taurine synthesis. The optimal dietary taurine content for juvenile *E. coioides* was 0.92% based on the regression analysis between weight gain rate and dietary taurine content.

Key words: *Epinephelus coioides*; taurine; taurine transporter; cysteine sulfinic acid decarboxylase; cysteine dioxygenase

Corresponding author: YE Jidan. E-mail: yjyjd@sina.com

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (31772861, 31372546); Science and Technology Major/Special Project of Fujian Province (2016NZ0001-3)