

文章编号: 1000-0615(2019)06-1423-15

DOI: 10.11964/jfc.20180811418

## 中间球海胆乳酸脱氢酶基因克隆及其对海水酸化的响应

崔东遥, 任丽媛, 邢冬飞, 孙景贤, 李莹莹, 常亚青, 湛垚垚\*

(大连海洋大学, 农业农村部北方海水增养殖重点实验室, 辽宁大连 116023)

**摘要:** 为明确中间球海胆乳酸脱氢酶(LDH)基因序列及表达特征, 研究其对海水酸化胁迫的响应, 实验利用cDNA末端快速扩增(RACE)技术获得中间球海胆LDH基因(命名为*SiLDH*)的全长cDNA, 并且比较了海水酸化胁迫下, 中间球海胆不同组织*SiLDH*基因表达及总LDH活性的变化情况。结果显示: ①*SiLDH*基因的cDNA全长为1 499 bp, 包含133 bp的5'非编码区, 349 bp的3'非编码区和1 017 bp编码338个氨基酸的开放阅读框(ORF)。SiLDH编码蛋白的相对分子量为36.40 ku, 理论等电点为6.55, 属于无信号肽的非跨膜、温和疏水蛋白。②生物信息学分析显示, SiLDH蛋白序列与紫球海胆LDH X4蛋白序列一致性最高(90.88%)。③实时荧光定量PCR(qRT-PCR)发现, *SiLDH*基因在检测的4种组织中均有表达, 相对表达量从高到低为性腺>管足>肠>体腔液; 总LDH活性检测显示, 中间球海胆总LDH活性从高到低为性腺>管足>体腔液>肠; ④海水酸化处理60 d后发现, 与自然海水组(pH 8.06 ± 0.01)相比, *SiLDH*基因在中间球海胆性腺、管足和肠道中呈现总体降低趋势, 在体腔液中则呈现随海水pH降低先降低后显著升高的趋势; 总LDH活性在性腺、管足和体腔液中呈现随海水pH降低而降低的趋势, 在肠道中则呈现随海水pH降低先降低后显著升高的趋势。研究表明, 中间球海胆面对海水酸化时可能通过调节*SiLDH*基因的表达和LDH活性来缓解海水酸化带来的负面影响。

**关键词:** 中间球海胆; 乳酸脱氢酶; 海水酸化; 基因克隆; 基因表达; 酶活性

**中图分类号:** Q 785; S 968.9

**文献标志码:** A

乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)是生物体糖代谢无氧酵解过程中重要的调节酶, 在科里循环(Cori cycle)中可催化无氧酵解产生的乳酸与丙酮酸之间的相互转化<sup>[1]</sup>。目前, LDH同工酶作为重要的分子标记已经被广泛地应用于医学诊断、疾病防治等领域。在水产养殖领域, LDH被认为是衡量水产动物无氧代谢能力的重要代谢酶, 其活性水平常常受到海洋环境因子变化的影响。比如, 贾旭颖等<sup>[2]</sup>的研究显示, 非离子氨胁迫可显著降低养殖凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)鳃和肌肉中LDH活性。李泽健<sup>[3]</sup>证实, 低氧胁迫可显著提高中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)肌肉中LDH酶活性。陶易凡等<sup>[4]</sup>研究表明, 短

期的高pH胁迫会使克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*)LDH酶活性升高。然而, 相较于哺乳动物等高等陆生动物LDH的研究, 海洋生物LDH的研究仍相对匮乏, 资料较少。

海水酸化(seawater acidification), 又称海洋酸化(ocean acidification, OA), 指海水因富集了过量的二氧化碳(CO<sub>2</sub>)气体而导致其酸碱度(pH值)下降的现象<sup>[5]</sup>。大量研究显示, 海水酸化不仅可以影响海洋生物的生物矿化作用<sup>[6]</sup>、生长与存活<sup>[6]</sup>, 改变海洋生物遗传变异速率和进化方向<sup>[7]</sup>, 降低海洋生物多样性<sup>[8]</sup>, 甚至与三叠纪海洋生物大灭绝都存在着直接关系<sup>[9]</sup>。更有专家预测, 未来海洋酸化的程度要比现有模型预测的结果更为

收稿日期: 2018-08-22 修回日期: 2019-01-11

资助项目: 国家自然科学基金(31672652); 辽宁省自然科学基金(20170540104); 农业农村部农业科研人才及其创新团队项目

通信作者: 湛垚垚, E-mail: zhanyaoyao@dlou.edu.cn

严重<sup>[10]</sup>。大量早期的研究表明,海水酸化引起海水pH值降低所导致的最严重和直接的结果是使海水中的 $[\text{CO}_3^{2-}]$ 浓度降低,引起海洋中碳酸盐的不断溶解,这将影响具有 $\text{CaCO}_3$ 骨架(外壳)或生物钙化过程(calcification)的海洋生物<sup>[8]</sup>,包括珊瑚虫<sup>[11-12]</sup>、软体动物<sup>[13]</sup>、棘皮动物<sup>[14]</sup>等。随着研究的深入,人们发现海水酸化效应会改变海洋生物的能量收支(energy budget)<sup>[15]</sup>,导致海洋生物将用于生长、钙化结构形成等生理过程的部分能量,用于平衡海水pH下降而引起的体内酸碱失衡,最终导致海洋生物生长发育缓慢和钙化面积的减少<sup>[6]</sup>。需氧代谢和无氧代谢是海洋生物能量收支中用于提供能量的关键环节,有研究显示,随着海水中 $\text{CO}_2$ 分压的不断增大,海水中的相对溶解氧量也会逐渐降低。研究显示,海水pH值下降0.25个单位,海洋生物的摄氧和运氧能力将会显著降低,这意味着,由海洋酸化引起的低氧胁迫会破坏海洋生物体内原有的有氧代谢和无氧代谢在供给能量比例上的平衡,导致其代谢率的变化,进而影响其能量供应<sup>[6]</sup>。最近的研究显示,海水酸化可抑制海蛇尾(*Amphiu-  
ra filiformis*)的触手再生,分析其原因是由于海水酸化通过显著降低海蛇尾体内参与无氧代谢过程的LDH基因相对表达量,降低海蛇尾在触手再生期间的代谢率(resting metabolic rate, RMR)及能量的产生,导致其没有充足的能量供给以供损伤触手在一定时间内充分再生<sup>[16]</sup>。然而,就其他海洋生物LDH分子响应海水酸化的研究,目前尚未见报道。

中间球海胆(*Strongylocentrotus intermedius*),又称虾夷马粪海胆,原产于日本北海道和俄罗斯远东等地沿海,1989年由大连海洋大学(原大连水产学院)自日本引入,现已经在辽宁、山东等地形成了一定的人工养殖规模,是我国重要的经济海胆养殖种类<sup>[17]</sup>。为明确中间球海胆LDH基因的序列及表达特征,研究该基因及其编码蛋白对海水酸化胁迫的响应,本实验利用cDNA末端快速扩增(RACE)技术首次获得中间球海胆LDH基因(命名为*SiLDH*)的全长cDNA序列,比较了不同海水酸化条件下,中间球海胆不同组织*SiLDH*基因表达及总LDH的活性变化情况,以期为深入研究海洋生物对未来海洋环境改变的响应机制及未来海水酸化条件下商业渔业可持续发展提供参考。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 实验材料

实验用中间球海胆购自大连旅顺龙王塘养殖场,随机选取120只健康、活力较好的海胆[平均壳径 $(4.8\pm 0.1)$  cm,平均体质量 $(55.27\pm 3.56)$  g],于大连海洋大学农业农村部北方海水增殖重点实验室暂养1周后开始实验。暂养条件:pH $8.13\pm 0.03$ ,盐度 $31.16\pm 0.24$ ,海水温度 $(20\pm 0.5)$  °C,溶解氧含量充足;暂养期间投喂海带(*Saccharina japonica*),每隔2 d进行全量换水1次。

体腔液、管足、性腺和肠组织分别担负着海胆渗透调节和免疫防御、食物摄取和运动、生殖以及食物消化等重要功能<sup>[17]</sup>,因此,本实验重点研究了这4种组织中LDH分子的相对表达规律以及总催化活性(总酶活性)水平。具体的提取方法:选择健康、活力好的中间球海胆3只[平均体质量 $(54.56\pm 3.31)$  g],于冰上分别提取其体腔液、管足、性腺和肠组织,做好标记后,一部分样品直接冻存于 $-80$  °C冰箱,用于总LDH酶活性测定;另一部分样品存于RNAlater(Ambion,美国)溶液中,于4 °C平衡一夜后存于 $-80$  °C冰箱,用于*SiLDH*基因的克隆和组织表达规律检测。

### 1.2 海水酸化处理

按照参考文献<sup>[18]</sup>的方法制备实验所需酸化海水。据联合国政府间气候变化专门委员会(Intergovernmental Panel on Climate Change, IPCC)对全球海洋表层海水2100年平均pH的预测<sup>[19]</sup>,实验设置了1个自然海水组(对照组)和3个酸化胁迫组,分为 $\text{OA}_1$ ( $\Delta\text{pH}=-0.3$ )、 $\text{OA}_2$ ( $\Delta\text{pH}=-0.4$ )、 $\text{OA}_3$ ( $\Delta\text{pH}=-0.5$ )。每个实验组设置3个平行组,每个平行组10只海胆。实验期间,利用pH计(HI9124, HANNA,意大利)和水质仪(YSI6920, YSI,美国)实时监测各实验组海水的pH、盐度和温度。总碱度(total alkalinity, TA)依据参考文献<sup>[20]</sup>描述的pH滴定法进行测定。运用SWCO<sub>2</sub>软件([http://neon.otago.ac.nz/research/mfc/people/keith\\_hunter/software/software.htm/](http://neon.otago.ac.nz/research/mfc/people/keith_hunter/software/software.htm/)),根据测定的海水pH、盐度、温度和总碱度计算出各组 $\rho\text{CO}_2$ 。实验时间为20170615—20170813,持续60 d,实验期间各实验组海水参数如表1所示。实验期间,每天投喂海带1次,每天换水量为总水量的1/2,每2天全换水1次,换水时及时清除残饵及粪便;为避

表 1 实验期间海水参数

Tab. 1 Seawater parameters during the experiment

实验组 group	温度/°C temperature	盐度 salinity	酸碱度 pH	总碱度/( $\mu\text{mol/kg}$ ) AT	二氧化碳浓度/ $\mu\text{atm}$ $\rho\text{CO}_2$
对照 control	20±2	31.26±0.09	8.10±0.03	2 367.63±10.18	526.22±21.41
OA <sub>1</sub>	20±2	31.28±0.12	7.82±0.03	2 362.58±20.04	1 058.92±72.42
OA <sub>2</sub>	20±2	31.30±0.11	7.68±0.03	2 366.42±18.37	1 566.05±62.70
OA <sub>3</sub>	20±2	31.36±0.10	7.55±0.04	2 372.33±19.51	2 125.14±94.44

免海水pH的剧烈波动,换水前后需进行海水参数检测,待海水参数稳定后再开始实验。

实验结束后,将各实验组中间球海胆禁食48 h以排空肠道。每个平行组随机选取5只中间球海胆,于冰上迅速解剖,分别收集体腔液、管足、性腺和肠组织样品。将所获得的每种组织样品平均分成2部分,一部分样品直接冻存于-80 °C冰箱,用于总LDH酶活性测定;另一部分样品存于RNAlater(Ambion,美国)溶液中,于4 °C平衡一夜后存于-80 °C冰箱,用于各组*SiLDH*基因的组织表达规律检测。

### 1.3 中间球海胆*SiLDH*基因的克隆

采用总RNA提取试剂盒(天根,北京)并按照说明书推荐方法提取中间球海胆体腔液中的总RNA。用浓度为1%的琼脂糖凝胶电泳检测总RNA的完整性,使用核酸纯度定量仪(AB,英国)检测RNA的浓度及纯度,5'RACE及3'RACE的反转录参照Smarter RACE cDNA试剂盒(Clontech,美国)说明书进行,进而获得后续用以5'/3'RACE的cDNA模板。根据中间球海胆转录组文库获得*SiLDH*基因的核心片段和引物设计原则,设计5'/3'RACE和核心片段克隆的特异性引物(表2)。5'RACE PCR扩增以5'RACE cDNA为模板,UPM和LDH-5-out为引物进行第1轮PCR扩增。第1轮扩增产物稀释10倍后,用NUP与LDH-5-in进行第2轮PCR扩增。3'RACE PCR扩增以3'RACE cDNA为模板,UPM和LDH-3-out为引物进行第1轮PCR扩增,第1轮扩增产物稀释10倍后,用NUP与LDH-3-in进行第2轮PCR扩增<sup>[21]</sup>;使用LaTaq试剂盒(宝生物,大连)完成PCR的扩增,10  $\mu\text{L}$ 体系:cDNA 0.5  $\mu\text{L}$ ,上下游引物各0.4  $\mu\text{L}$ ,LaTaq 0.2  $\mu\text{L}$ ,10 $\times$  LA PCR Buffer II 1  $\mu\text{L}$ ,dNTP Mixture 0.8  $\mu\text{L}$ ,ddH<sub>2</sub>O 6.7  $\mu\text{L}$ ;PCR反应条件:94 °C预变性5 min;94 °C 30 s,55~62 °C 30 s,72 °C 60 s,共35个循环,72 °C 10 min。中间球海胆*SiLDH*基因核心片

段PCR反应体系及条件同上;PCR产物经琼脂糖凝胶电泳检测后,切取目的条带,胶回收则采用柱式DNA胶回收试剂盒(生工生物工程,上海);然后将回收的PCR产物与pEASY<sup>®</sup>-T1克隆载体(全式金,北京)连接,转化到Trans1-T1噬菌体抗性的感受态细胞(全式金,北京)中;向转化后的感受态细胞中加入含0.1%氨苄青霉素LB液体培养基,37 °C摇菌培养1 h后,涂平板,于37 °C恒温箱中培养12 h,挑取单一菌落至LB液体培养基中继续扩大培养;取1  $\mu\text{L}$ 培养的菌液为模板,通过菌落PCR筛选阳性克隆,送至生工生物工程上海有限公司进行测序。所用引物(除通用引物)均使用Primer Premier 5.0软件设计。

### 1.4 中间球海胆*SiLDH*基因序列的生物信息学分析

利用DNAMAN 6.0软件对获得的中间球海胆*SiLDH*基因的3'端和5'端的序列与核心片段序列进行拼接组装,最终得到*SiLDH*基因的全长cDNA序列。登录NCBI网站,利用BLAST(BLASTX,<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)进行*SiLDH*基因核苷酸及其所编码的氨基酸序列进行相似性分析;使用ORF Finder(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder>)软件确定*SiLDH*基因的开放阅读框(Open reading frame, ORF);利用EXPASY Proteomics Server(<http://www.expasy.org>)软件对*SiLDH*基因编码的蛋白序列进行理化性质分析;利用SMART(<http://smart.embl-heidelberg.de/>)和PSIPRED v3.3(<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>)软件预测*SiLDH*蛋白质的结构域和二级结构;利用SWISS-MODEL(<https://swissmodel.expasy.org/>)预测中间球海胆*SiLDH*蛋白质的三维结构;应用DNAMAN 6.0软件对*SiLDH*基因编码的氨基酸序列进行多重序列比对;利用MEGA 7.0软件,基于邻接法(neighbor-joining, NJ)构建18种生物的LDH氨基酸序列的系统进化树。

表2 PCR引物序列

Tab. 2 Primers used in this study

引物名称 primer name	序列(5'-3') sequence(5'-3')	用途 usage
LDH-3-out	TGGTCATCAACAACAGTAGCAGGAG	3'RACE
LDH-3-in	TTGAATACCAAAGAACAGGCACA	3'RACE
LDH-5-out	GGCAAGCCGCTCAGTTTCCA	5'RACE
LDH-5-in	CCAGGGCTATCTCACTCGCAAT	5'RACE
Universal Primer Mix(UPM)	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTAACAACGCAGAGT	RACE
Nested Universal Primer Mix(NUP)	CTAATACGACTCACTATAGGGC	RACE
LDH-3	ACTGCCCCTGGAAGAGTGTGCCGTCT	核心扩增
LDH-5	AGGGGAATGGAGCTACTTTGCTTGTG	核心扩增
LDH-F	ATGCAGCACGGTCAAGCCTTC	qPCR
LDH-R	GGACTGTAGCGCACGAGATTGG	qPCR
Actin-F	ACAGGGAAAAGATGGCACAGA	qPCR
Actin-R	AGAGGCGTAGAGGGAAAAGCAC	qPCR
M13-F	TGTA AACGACG GCCAGT	菌落PCR
M13-R	CAGGAAACAGCTATGACC	菌落PCR

### 1.5 qRT-PCR检测中间球海胆*SiLDH*基因的相对表达规律

中间球海胆各个组织样品总RNA的提取方法, RNA完整性、纯度及浓度的检验方法与上述过程相同。使用PrimeScript RT Enzyme Mix I反转录酶的试剂盒(宝生物, 大连), 按推荐方法合成cDNA第一链(反应体积及条件参照说明书进行)。以 $\beta$ -actin(表2)为内参基因, 利用ABI 7500荧光定量PCR仪(ABI, 美国), SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> II Kit(宝生物, 大连)进行实时定量PCR。20  $\mu$ L反应体系中含有2 $\times$ SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> II 10  $\mu$ L, 正反向引物各0.8  $\mu$ L(10  $\mu$ mol/L), ROX Reference Dye II 0.4  $\mu$ L, cDNA模板2  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 6  $\mu$ L。荧光定量PCR反应条件: 预变性95  $^{\circ}$ C 30 s; 95  $^{\circ}$ C 5 s, 60  $^{\circ}$ C 30 s, 40个循环; 反应后进行熔解曲线分析, 以排除非特异性扩增的污染。反应条件: 95  $^{\circ}$ C 15 s, 60  $^{\circ}$ C 1 min, 95  $^{\circ}$ C 15 s, 60  $^{\circ}$ C 15 s。采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法计算*SiLDH*基因的相对表达量。

### 1.6 中间球海胆组织总LDH酶活性测定

取1.0 g组织样品经液氮研磨后, 按重量(g): 体积(mL)=1: 9的比例加入真空抽滤法制备的无菌海水(体腔液样品稀释1倍即可, 若稀释倍数过

多, 试剂盒可能无法检测出蛋白浓度), 低温离心(4  $^{\circ}$ C, 2 500 r/min)10 min后留取上清液。乳酸脱氢酶(LDH)活性、总蛋白含量测定均采用南京建成生物工程研究所生产的试剂盒, 按照试剂盒说明书进行操作。利用Epoch酶标仪(Biotek, 美国)测定反应底物吸光度。

### 1.7 数据分析

实验数据以平均值 $\pm$ 标准差(mean $\pm$ SD)来表示。采用Excel 2016和Origin 8.0进行数据整理和图表绘制, 采用SPSS 22.0统计软件对数据进行统计学分析, 利用方差(One-Way ANOVA)结合Duncan氏多重比较进行差异显著性分析, 差异显著性水平设置为 $P<0.05$ , 差异极显著性水平设置为 $P<0.01$ 。

## 2 结果

### 2.1 中间球海胆乳酸脱氢酶*SiLDH*基因全长cDNA序列分析结果

利用RACE技术获得中间球海胆*SiLDH*基因的cDNA序列(GenBank登录号: MH748033)全长为1 499 bp, 包含1个长度为1 017 bp, 编码338个氨基酸的开放阅读框, 1个长度为133 bp的5'非编码区(5'UTR)和1个长度为349 bp的3'非编码区

(3'UTR); 起始密码子(ATG)位于序列的第134 bp处, 终止密码子(TAG)位于序列的第1 151 bp处(图1); 经生物信息学分析发现, SiLDH蛋白的理论分子量为36.4ku, 理论等电点为6.55; 使用SMART和NCBI保守域搜索预测软件, SiLDH蛋白的编码氨基酸序列经分析, 发现SiLDH的氨基酸序列含有LDH\_1\_N结构域和LDH\_1\_C结构域; 二级

结构预测结果显示, SiLDH蛋白共包含9个 $\alpha$ -螺旋、12个 $\beta$ -折叠和22个无规则卷曲(图2); 以已知的小鼠LDH(PDB登录号4aj4.1.A)为模板, 同源建模预测产生SiLDH蛋白质的三维结构模型与模板之间的一致性为59.04%(图3); 进一步的生物信息学分析表明, SiLDH蛋白属于非跨膜、温和疏水蛋白且无信号肽存在(图4, 图5, 图6)。

```

ACTCTCCGATACACTGCCCTGGAAGAGTGTGCCGTCTCCGAGAGTATACCTAGCAGATTCTGACATTCGGATGGTTTATTATTGCTAGA
CCAATTTTCGAGCTCGAGTTTTTTGGAGAAGTGCAGAAACAAGATGACGGCCATCACCAAGTAACTGATGGATATGGTCGTTGACCATCT
M T A I T S K L M D M V V D H L
GGACGACAGCTCTCCGACCAAAGTACTATTGTTGGTGTCCGACAAGTGGGCATGGCTTGCCTATAGCATTATGACACAGAAATATTGC
D D S S P F K V T I V G V G O V G M A C A Y S I M T O N I A
GAGTGAGATAGCCCTGGTAGATGTGATTGCTGATAAATAAAAGCGAGGTTTATGACATGCAGCACGGGCAAGCTTTCGTCGAAGGGCTG
S E I A L V D V I A D K I K G E V Y D M Q H G O A F V Y K G G Q
CTCAGTCAAAGGATACAGATTACAAAGTAAACCGTGGATCTAGACTATGTATCCTGACTGCTGGAGCCAGGCAGAGAGAGGGAGAAAG
S V K G D T D Y K V T I A G S R L C I L E T A G A R O R E G E S
CAGACTTAATCTCGTACAAGAAATGTCAAATATTTGAAGGTATTGTTCCCAATCTAGTGCCTACAGTCCAAACACGGTTCTTCTGGT
R L N L V Q R N V K I F E G I V P N L V R Y S P N T V L L V
CGTCTTAATCTGTTGATATTCTCACATACGTTGCATGGAACCTGAGCGGCTTGCAGCAAACAGGGTCAATGGTGCAGGGACCAACTT
V S N P V D I L I T Y V A W K L S G L P A N R V I G A G T N I
GGACACAGCAGCCTTTCGTTTCTCCTCGGAGAAAAGTTAGGGATAGCGCCCTCTAGTGTCCATGGGTACATCATCGGGGAGCATGGTGA
D T A R F R F L L G E K L G I A P S S V H G Y I I G E H G D
TTCAGTGTGGCTGTGGTGCATCAACAACAGTAGCAGGAGTGAGCCTTCAGCATCTCGACCCTCAGATAGGCACTGCCAAGATCCTGA
S S V A V W S S T T V A G V S L O H L D P O I G T A K D P E
GAATATGCACCAAGTTCATCAAGAAGTCATAGACAGTGCATATGAGATCATCAAACCTGAAAAGGCTATACATCATGGGCCATTGGACTGAG
N M H Q V H O E V I D S A Y E I I K L K G Y T S W A I G L S
CTGTGCAACGCTTGTCTCAGCAGTGTGAGGAACAGAGGGAGTCTATGCCGTTTCTACCCTCGCCAGAGGATACCATGGTATTGAACA
C A T L A S A V L R N O K G V Y A V S T V A R G Y H G I E H
TCCAGTATTCCTAAGTCTCCCATGCATTCTAGGACAAGATGGAATCACCTATGTGATCAAGCAGACCTTGAATACCAAAGAGCAGGCTCA
P V F L S L P C I L G O D G A I T C H V I K O T L N T K E O A Q
GCTTCAGGCCAGCCCAACACCTTTGGGACATTTGCCACTTGCCTGGATCTCCGCGAGCCTTCAAGTAAGGGGACCTTCTTTATGAAAC
L O A S A N T L W D I A T S L D L R E P S K *
AAGGTCAATATCCACTCAGAAAAACAACAATAACAAGCTGTTTATGTCAAAGCCTAACACAAGCAAAGTAGCTCCATTCCCCTCTGCT
GAAATAACATGCTAATTTTTAAAAAAGGTAGAGAAAAATCATGCAACATTTGTAATCCTTTTAAACAGCAGGTGATCACATTTCCATT
TCTCTTCAAACCTCGTCAATTTATTTCCATAACCATTAGCTCAGTCAATTTTCATCATTTTCTGTTTTTTTCTTCTTCCACACTACTTCAAT
GCTACTGTAATCACCTGTTGATGTCAGTCCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

图1 中间球海胆乳酸脱氢酶SiLDH基因的核苷酸序列及其编码的氨基酸序列

5'UTR方框中的字母为起始密码子(ATG), 星号表示终止密码子(TAA); 下划线表示SiLDH蛋白编码的氨基酸序列; 绿色区域表示Ldh\_1\_N结构域, 氨基酸序列间隔区(22~161); 黄色区域表示Ldh\_1\_C结构域, 氨基酸序列间隔区(164~324); 紫色区域字母(ATTTA)为3'UTR中的不稳定因素

Fig. 1 Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of SiLDH gene in *S. intermedius*

The letter in the 5'UTR box is the starting codon (ATG), the asterisk (\*) indicates the terminating codon (TAA); the underline represents the amino acid sequence encoded by the SiLDH protein; the green region represents the Ldh\_1\_N domain, the amino acid sequence spacer (22-161); the yellow region shows the Ldh\_1\_C domain, the amino acid sequence spacer (164-324); the purple area (ATTTA) is the unstable factor in 3'UTR

## 2.2 中间球海胆乳酸脱氢酶SiLDH基因生物信息学分析

SiLDH基因序列BLAST结果显示, 中间球海胆乳酸脱氢酶SiLDH基因核苷酸序列与紫球海胆(*S. purpuratus*)LDH X1基因核苷酸序列相似性最高, 为67.26%; 从NCBI数据库中选取17种生物的LDH蛋白氨基酸序列与SiLDH蛋白氨基酸序列进行多重比对发现, 中间球海胆SiLDH蛋白氨基酸序列与其他所选物种LDH蛋白氨基酸序列的平均相似性为60.24%, 其中, 与紫球海胆SpLDH X4蛋白氨基酸序列(NCBI登录号: XP\_011667435.1)的相似性最高, 为90.88%(图7)。系统进化分析结果显示, 推导的中间球海胆SiLDH蛋白氨基酸序列与紫球海胆的LDH(SpLDH X1~X5)、长刺海

星(*Acanthaster planci*)LDH(ApLDH X2~X3)及仿刺参(*Apostichopus japonicus*)AjLDHX3蛋白序列聚为一支, 与紫球海胆的SpLDH X2蛋白氨基酸序列的遗传距离最小, 亲缘关系最近(图8)。

## 2.3 中间球海胆SiLDH基因及总LDH酶活性的组织分布

qRT-PCR定量检测结果显示, 中间球海胆SiLDH基因在其体腔液、管足、性腺和肠组织中均有表达, 相对表达量从高到低为性腺>管足>肠>体腔液, 具有一定的组织特异性。其中, 中间球海胆性腺组织中SiLDH基因相对表达量最高, 显著高于其他3种检测组织( $P<0.05$ )(图9-a)。酶活性检测结果显示, 中间球海胆不同组织中总LDH活性大小各不相同, 具有一定的组织特异性。统

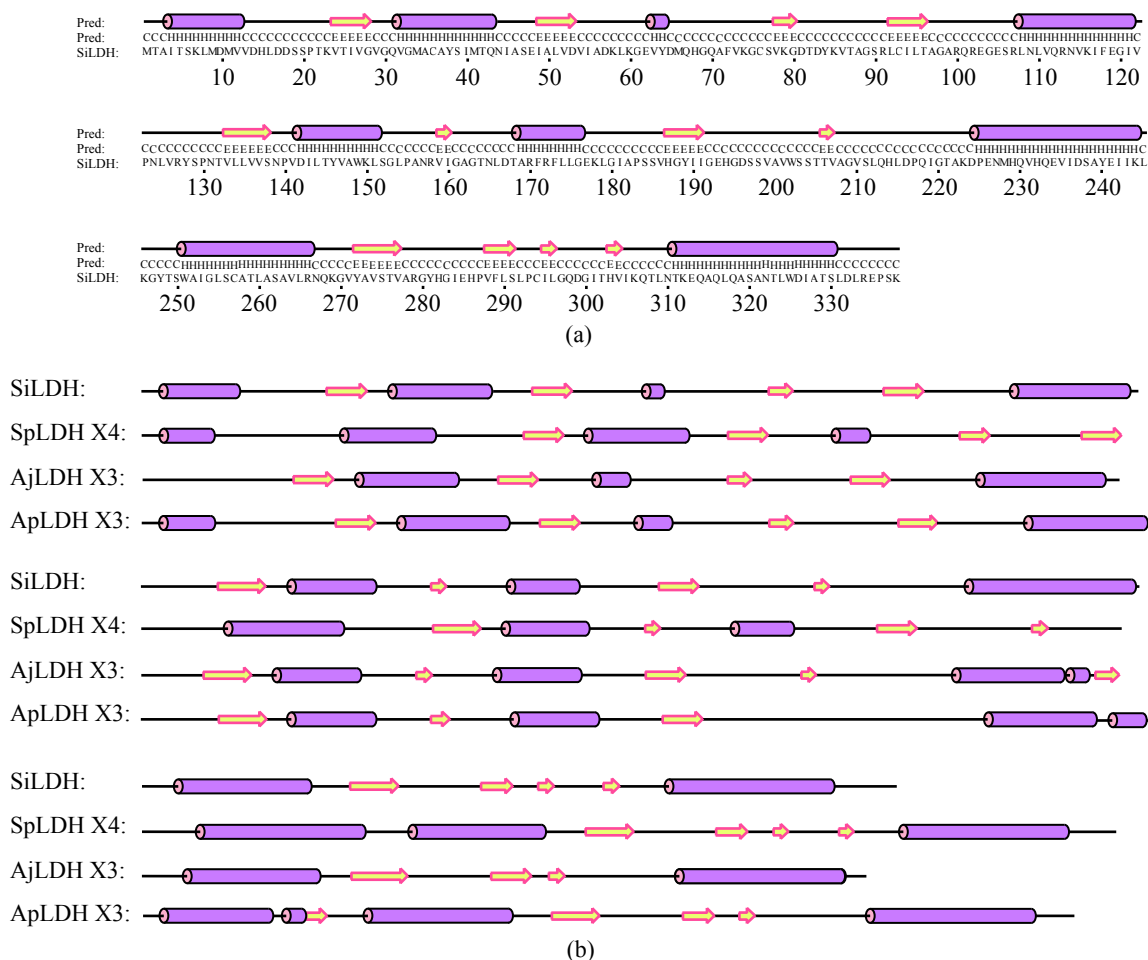


图2 中间球海胆与其他3种棘皮动物乳酸脱氢酶(SiLDH)二级结构的比较

(a)中间球海胆SiLDH二级结构预测结果；(b)中间球海胆SiLDH、紫球海胆SpLDH X4、仿刺参AjLDH X3和长刺海星ApLDH X3的二级结构比对结果。黑线、黄色箭头和粉红色圆筒分别代表无规则卷曲、 $\beta$ -折叠和 $\alpha$ 螺旋

Fig. 2 Secondary structure prediction and comparison of lactate dehydrogenase (LDH) between *S. intermedius* and other three echinoderms

(a)predicted secondary structure of SiLDH in *S. intermedius*; (b)LDH secondary structure comparison among *S. intermedius*, *S. purpuratus*, *A. japonicus* and *A. planci*. The black line, the yellow arrow and the pink cylinder represent coils, strands and helices, respectively

计学分析显示, 中间球海胆不同组织中总LDH活性存在显著差异( $P < 0.05$ ), 其活性大小从高到低依次为性腺、管足、体腔液和肠组织(图9-b)。

#### 2.4 海水酸化对中间球海胆各组织中SiLDH基因相对表达量的影响

与自然海水组(对照)相比, 经过60 d海水酸化胁迫, 中间球海胆体腔液、管足、性腺和肠组织中SiLDH基因的相对表达量均呈现一定变化(图10)。当 $\Delta\text{pH} = -0.3$ 时, 中间球海胆体腔液、管足、性腺和肠组织中SiLDH基因的相对表达量均低于自然海水组, 其中管足和肠组织中SiLDH基因的相对表达量与自然海水组相比呈显著降低趋势( $P < 0.05$ ); 当 $\Delta\text{pH} = -0.4$ 和 $\Delta\text{pH} = -0.5$ 时,

中间球海胆管足、性腺和肠组织中SiLDH基因的相对表达量均极显著低于自然海水组( $P < 0.01$ ), 而体腔液中SiLDH基因的相对表达量与自然海水组相比, 呈现出极显著升高的趋势( $P < 0.01$ )。

#### 2.5 海水酸化对中间球海胆各组织中总LDH活性的影响

总LDH活性分析显示, 60 d海水酸化胁迫后, 中间球海胆体腔液、管足、性腺和肠组织中总LDH活性相较于自然海水组均呈现组织特异性变化(图11)。当 $\Delta\text{pH} = -0.3$ 时, 中间球海胆管足中总LDH活性与自然海水组相比, 差异不显著( $P > 0.05$ ), 而体腔液、性腺和肠组织中总LDH活性则呈现下降趋势; 其中, 海水酸化组中间球

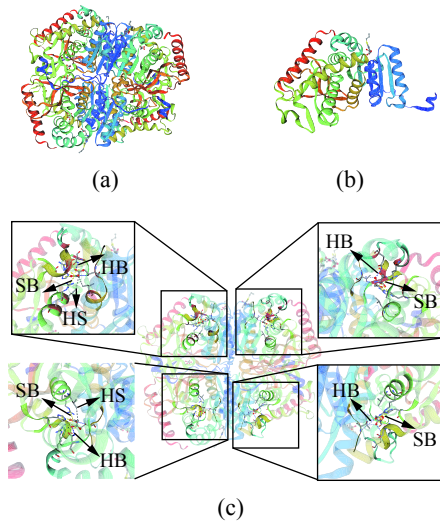


图 3 中间球海胆乳酸脱氢酶(SiLDH)的三级结构预测 (a)预测的中间球海胆乳酸脱氢酶(SiLDH)三级结构; (b)建模所用小鼠乳酸脱氢酶蛋白A链; (c)中间球海胆乳酸脱氢酶(SiLDH)4个亚基内部的三维结构, HB. 氢键, SB. 盐桥, HS. 疏水结构

Fig. 3 3D structure prediction of lactate dehydrogenase (SiLDH) in *S. intermedius*

(a)predicted 3D structure of SiLDH in *S. intermedius*; (b)3D structure template from lactate dehydrogenase (chain A) in *Mus musculus*; (c)predicted tetramer composition of SiLDH in *S. intermedius*, HB. hydrogen bond, SB. salt bridge, HS. hydrophobic structure

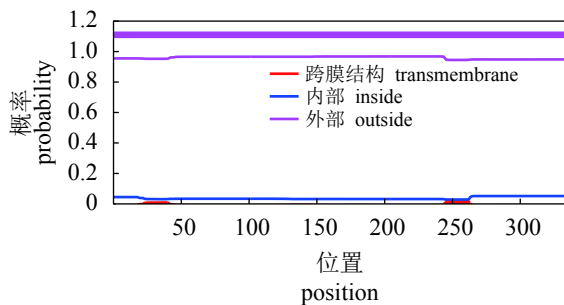


图 4 中间球海胆乳酸脱氢酶(SiLDH)跨膜结构分析结果

图中横坐标表示氨基酸所在位置, 图5和图6同

Fig. 4 Transmembrane structure analysis of SiLDH in *S. intermedius*

In this figure, the abscissa indicates the position of the amino acid, the same below as Fig.5 and Fig.6

海胆性腺总LDH活性显著低于自然海水组( $P < 0.05$ ), 海水酸化组中间球海胆肠组织总LDH活性则极显著低于自然海水组( $P < 0.01$ )。当 $\Delta pH = -0.4$ 时, 酸化处理组中间球海胆性腺和管足中总LDH活性与自然海水组的相比, 呈现极显著降低趋势( $P < 0.01$ ), 酸化处理组中间球海胆体腔液中总LDH活性与自然海水组相比呈现显著降低趋势( $P < 0.05$ )。酸化

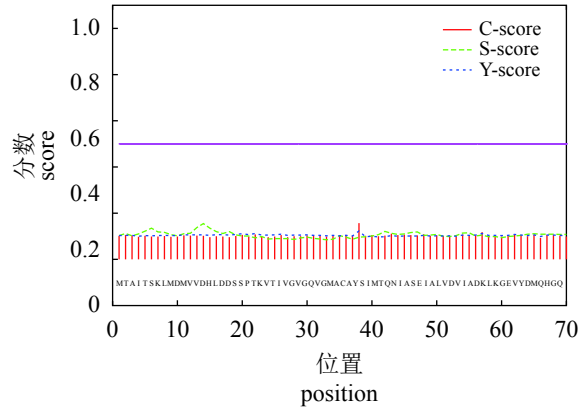


图 5 中间球海胆乳酸脱氢酶(SiLDH)信号肽分析结果

Fig. 5 Signal peptide analysis of SiLDH in *S. intermedius*

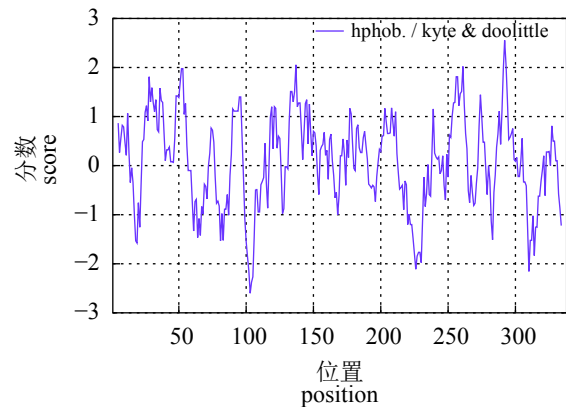


图 6 中间球海胆乳酸脱氢酶(SiLDH)疏水性/亲水性分析结果

Fig. 6 Hydrophobic/hydrophilic analysis of SiLDH in *S. intermedius*

处理组中间球海胆肠组织中总LDH活性和自然海水组相比差异不显著( $P > 0.05$ )。当 $\Delta pH = -0.5$ 时, 酸化处理组中间球海胆性腺和管足中总LDH活性极显著低于自然海水组( $P < 0.01$ ), 酸化处理组中间球海胆体腔液中总LDH活性显著低于自然海水组( $P < 0.05$ ), 而肠组织中总LDH活性和自然海水组相比, 不具有显著性差异( $P > 0.05$ )。

### 3 讨论

乳酸脱氢酶具有多种同工酶, 在脊椎动物中有LDH1、LDH2、LDH3、LDH4、LDH5和LDH-X 6种存在形式, 其中LDH1~5由A和B 2种基因编码, LDH-X由C基因编码。目前, 在无脊椎动物中, 发现的乳酸脱氢酶同工酶有LDH1~5、LDH X1~X5这几种存在形式, 在棘皮动物中发

人类	<i>Homo sapiens</i> LDHA3 NP_001158886.1	MTLTKDGLIYNLKEEQTPONKIVVGGVACASISILMLKLAELALAVIIEKIKGEMMLGHSLFLRTPKIVSGKQYN	84
人类	<i>Homo sapiens</i> LDHB AAH71860.1	MTLTKKELIAPVAEEATVPNNKIVVGGVACASISILGKSLAELALAVIIEKIKGEMMLGHSLFLRTPKIVSGKQYN	84
人类	<i>Homo sapiens</i> LDHC4 ADG58108.1	MTVTRCEIEXLIEDDENSCKRPIVGGVACASISILRLKLAELALAVIIEKIKGEMMLGHSLFLRTPKIVSGKQYN	84
小鼠	<i>Mus musculus</i> LDHA3 NP_034829.1	MTLTKKELIAPVAEEATVPNNKIVVGGVACASISILMLKLAELALAVIIEKIKGEMMLGHSLFLRTPKIVSGKQYN	84
小鼠	<i>Mus musculus</i> LDHB EDL10644.1	MTLTKKELIAPVAEEATVPNNKIVVGGVACASISILGKSLAELALAVIIEKIKGEMMLGHSLFLRTPKIVSGKQYN	85
小鼠	<i>Mus musculus</i> LDHC NP_038608.1	MTVTRCEIEXLIEDDENSCKRPIVGGVACASISILRLKLAELALAVIIEKIKGEMMLGHSLFLRTPKIVSGKQYN	85
鸚喙海狗	<i>Gallus gallus</i> LDHB AAG48560.1	MTLTKKELIAPVAEEATVPNNKIVVGGVACASISILRLKLAELALAVIIEKIKGEMMLGHSLFLRTPKIVSGKQYN	84
韦德尔氏海狗	<i>Tursiops truncatus</i> LDHB NP_001267564.1	MTLTKKELIAPVAEEATVPNNKIVVGGVACASISILMLKLAELALAVIIEKIKGEMMLGHSLFLRTPKIVSGKQYN	84
韦德尔氏海狗	<i>Leptonychotes weddellii</i> LDHA1X1 XP_006746796.1	MTLTKDGLIYNLKEEQTPONKIVVGGVACASISILMLKLAELALAVIIEKIKGEMMLGHSLFLRTPKIVSGKQYN	84
高原鼠兔	<i>Ochotona curzoniae</i> LDHB AE91096.1	MTLTKKELIAPVAEEATVPNNKIVVGGVACASISILGKSLAELALAVIIEKIKGEMMLGHSLFLRTPKIVSGKQYN	85
高原鼠兔	<i>Ochotona curzoniae</i> LDHC AE91097.1	MTVTRCEIEXLIEDDENSCKRPIVGGVACASISILRLKLAELALAVIIEKIKGEMMLGHSLFLRTPKIVSGKQYN	84
非洲爪哇蝮	<i>Xenopus laevis</i> LDHB NP_001080852.1	MTVTRCEIEXLIEDDENSCKRPIVGGVACASISILRLKLAELALAVIIEKIKGEMMLGHSLFLRTPKIVSGKQYN	85
鲷	<i>Cyprinus carpio</i> LDHA AAD40736.1	MTVTRCEIEXLIEDDENSCKRPIVGGVACASISILRLKLAELALAVIIEKIKGEMMLGHSLFLRTPKIVSGKQYN	85
鲷	<i>Cyprinus carpio</i> LDHB AAV54512.1	MTVTRCEIEXLIEDDENSCKRPIVGGVACASISILRLKLAELALAVIIEKIKGEMMLGHSLFLRTPKIVSGKQYN	85
斑马鱼	<i>Danio rerio</i> LDHA NP_571321.1	MTVTRCEIEXLIEDDENSCKRPIVGGVACASISILRLKLAELALAVIIEKIKGEMMLGHSLFLRTPKIVSGKQYN	85
斑马鱼	<i>Danio rerio</i> LDHB AAF02131.1	MTVTRCEIEXLIEDDENSCKRPIVGGVACASISILRLKLAELALAVIIEKIKGEMMLGHSLFLRTPKIVSGKQYN	85
尼罗罗非鱼	<i>Oreochromis niloticus</i> LDHA XP_003440440.1	MTVTRCEIEXLIEDDENSCKRPIVGGVACASISILRLKLAELALAVIIEKIKGEMMLGHSLFLRTPKIVSGKQYN	85
尼罗罗非鱼	<i>Oreochromis niloticus</i> LDHB XP_003456076.1	MTVTRCEIEXLIEDDENSCKRPIVGGVACASISILRLKLAELALAVIIEKIKGEMMLGHSLFLRTPKIVSGKQYN	85
虹鳟	<i>Oncorhynchus mykiss</i> LDHA XP_021419099.1	MTVTRCEIEXLIEDDENSCKRPIVGGVACASISILRLKLAELALAVIIEKIKGEMMLGHSLFLRTPKIVSGKQYN	85
虹鳟	<i>Oncorhynchus mykiss</i> LDHB XP_021419099.1	MTVTRCEIEXLIEDDENSCKRPIVGGVACASISILRLKLAELALAVIIEKIKGEMMLGHSLFLRTPKIVSGKQYN	85
泥鳅	<i>Misgurnus anguillicaudatus</i> LDHA AB94572.1	MTVTRCEIEXLIEDDENSCKRPIVGGVACASISILRLKLAELALAVIIEKIKGEMMLGHSLFLRTPKIVSGKQYN	84
凡纳滨对虾	<i>Litopenaeus vannamei</i> AEC12821.1	MTVTRCEIEXLIEDDENSCKRPIVGGVACASISILRLKLAELALAVIIEKIKGEMMLGHSLFLRTPKIVSGKQYN	84
凡纳滨对虾	<i>Litopenaeus vannamei</i> LDH1 AF147929.1	MTVTRCEIEXLIEDDENSCKRPIVGGVACASISILRLKLAELALAVIIEKIKGEMMLGHSLFLRTPKIVSGKQYN	84
凡纳滨对虾	<i>Litopenaeus vannamei</i> LDH2 AF147930.1	MTVTRCEIEXLIEDDENSCKRPIVGGVACASISILRLKLAELALAVIIEKIKGEMMLGHSLFLRTPKIVSGKQYN	84
细纹叶切叶螺	<i>Pseudomyx gracilis</i> LDHX2 XP_020290527.1	MTVTRCEIEXLIEDDENSCKRPIVGGVACASISILRLKLAELALAVIIEKIKGEMMLGHSLFLRTPKIVSGKQYN	84
细纹叶切叶螺	<i>Pseudomyx gracilis</i> LDHX1 XP_020290528.1	MTVTRCEIEXLIEDDENSCKRPIVGGVACASISILRLKLAELALAVIIEKIKGEMMLGHSLFLRTPKIVSGKQYN	84
中间球海胆	<i>Strongylocentrotus intermedius</i> SILDH	MTVTRCEIEXLIEDDENSCKRPIVGGVACASISILRLKLAELALAVIIEKIKGEMMLGHSLFLRTPKIVSGKQYN	84
紫球海胆	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i> LDHX1 XP_011667433.1	MTVTRCEIEXLIEDDENSCKRPIVGGVACASISILRLKLAELALAVIIEKIKGEMMLGHSLFLRTPKIVSGKQYN	85
紫球海胆	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i> LDHX2 XP_791548.3	MTVTRCEIEXLIEDDENSCKRPIVGGVACASISILRLKLAELALAVIIEKIKGEMMLGHSLFLRTPKIVSGKQYN	85
紫球海胆	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i> LDHX3 XP_011667434.1	MTVTRCEIEXLIEDDENSCKRPIVGGVACASISILRLKLAELALAVIIEKIKGEMMLGHSLFLRTPKIVSGKQYN	85
紫球海胆	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i> LDHX4 XP_011667435.1	MTVTRCEIEXLIEDDENSCKRPIVGGVACASISILRLKLAELALAVIIEKIKGEMMLGHSLFLRTPKIVSGKQYN	85
长刺海星	<i>Acanthaster planci</i> LDHX2 XP_02085964.1	MTVTRCEIEXLIEDDENSCKRPIVGGVACASISILRLKLAELALAVIIEKIKGEMMLGHSLFLRTPKIVSGKQYN	85
长刺海星	<i>Acanthaster planci</i> LDHX3 XP_02085965.1	MTVTRCEIEXLIEDDENSCKRPIVGGVACASISILRLKLAELALAVIIEKIKGEMMLGHSLFLRTPKIVSGKQYN	85
仿刺参	<i>Apostichopus japonicus</i> LDHX3 PIK34979.1	MTVTRCEIEXLIEDDENSCKRPIVGGVACASISILRLKLAELALAVIIEKIKGEMMLGHSLFLRTPKIVSGKQYN	81
Consensus		...MCKRMVNAEGASVSHSKVTVGGVACASISILQVASEVALVMEVKIKGEMMLGHSLFLRTPKIVSGKQYN	81
人类	<i>Homo sapiens</i> LDHA3 NP_001158886.1	VTANSKLIITACAGRCCELRNLVGRNVNFRFIPGVKYSKCIHIVSNPVIITVYWKLSGGRVIRVIGSCTNLELR	169
人类	<i>Homo sapiens</i> LDHB AAH71860.1	VTANSKLIITACAGRCCELRNLVGRNVNFRFIPGVKYSKCIHIVSNPVIITVYWKLSGGRVIRVIGSCTNLELR	170
人类	<i>Homo sapiens</i> LDHC4 ADG58108.1	VTANSKLIITACAGRCCELRNLVGRNVNFRFIPGVKYSKCIHIVSNPVIITVYWKLSGGRVIRVIGSCTNLELR	169
小鼠	<i>Mus musculus</i> LDHA3 NP_034829.1	VTANSKLIITACAGRCCELRNLVGRNVNFRFIPGVKYSKCIHIVSNPVIITVYWKLSGGRVIRVIGSCTNLELR	169
小鼠	<i>Mus musculus</i> LDHB EDL10644.1	VTANSKLIITACAGRCCELRNLVGRNVNFRFIPGVKYSKCIHIVSNPVIITVYWKLSGGRVIRVIGSCTNLELR	169
小鼠	<i>Mus musculus</i> LDHC NP_038608.1	VTANSKLIITACAGRCCELRNLVGRNVNFRFIPGVKYSKCIHIVSNPVIITVYWKLSGGRVIRVIGSCTNLELR	169
鸚喙海狗	<i>Gallus gallus</i> LDHB AAG48560.1	VTANSKLIITACAGRCCELRNLVGRNVNFRFIPGVKYSKCIHIVSNPVIITVYWKLSGGRVIRVIGSCTNLELR	169
韦德尔氏海狗	<i>Tursiops truncatus</i> LDHB NP_001267564.1	VTANSKLIITACAGRCCELRNLVGRNVNFRFIPGVKYSKCIHIVSNPVIITVYWKLSGGRVIRVIGSCTNLELR	169
韦德尔氏海狗	<i>Leptonychotes weddellii</i> LDHA1X1 XP_006746796.1	VTANSKLIITACAGRCCELRNLVGRNVNFRFIPGVKYSKCIHIVSNPVIITVYWKLSGGRVIRVIGSCTNLELR	169
高原鼠兔	<i>Ochotona curzoniae</i> LDHB AE91096.1	VTANSKLIITACAGRCCELRNLVGRNVNFRFIPGVKYSKCIHIVSNPVIITVYWKLSGGRVIRVIGSCTNLELR	169
高原鼠兔	<i>Ochotona curzoniae</i> LDHC AE91097.1	VTANSKLIITACAGRCCELRNLVGRNVNFRFIPGVKYSKCIHIVSNPVIITVYWKLSGGRVIRVIGSCTNLELR	170
非洲爪哇蝮	<i>Xenopus laevis</i> LDHB NP_001080852.1	VTANSKLIITACAGRCCELRNLVGRNVNFRFIPGVKYSKCIHIVSNPVIITVYWKLSGGRVIRVIGSCTNLELR	170
鲷	<i>Cyprinus carpio</i> LDHA AAD40736.1	VTANSKLIITACAGRCCELRNLVGRNVNFRFIPGVKYSKCIHIVSNPVIITVYWKLSGGRVIRVIGSCTNLELR	170
鲷	<i>Cyprinus carpio</i> LDHB AAV54512.1	VTANSKLIITACAGRCCELRNLVGRNVNFRFIPGVKYSKCIHIVSNPVIITVYWKLSGGRVIRVIGSCTNLELR	170
斑马鱼	<i>Danio rerio</i> LDHA NP_571321.1	VTANSKLIITACAGRCCELRNLVGRNVNFRFIPGVKYSKCIHIVSNPVIITVYWKLSGGRVIRVIGSCTNLELR	170
斑马鱼	<i>Danio rerio</i> LDHB AAF02131.1	VTANSKLIITACAGRCCELRNLVGRNVNFRFIPGVKYSKCIHIVSNPVIITVYWKLSGGRVIRVIGSCTNLELR	170
尼罗罗非鱼	<i>Oreochromis niloticus</i> LDHA XP_003440440.1	VTANSKLIITACAGRCCELRNLVGRNVNFRFIPGVKYSKCIHIVSNPVIITVYWKLSGGRVIRVIGSCTNLELR	170
尼罗罗非鱼	<i>Oreochromis niloticus</i> LDHB XP_003456076.1	VTANSKLIITACAGRCCELRNLVGRNVNFRFIPGVKYSKCIHIVSNPVIITVYWKLSGGRVIRVIGSCTNLELR	169
虹鳟	<i>Oncorhynchus mykiss</i> LDHA XP_021419099.1	VTANSKLIITACAGRCCELRNLVGRNVNFRFIPGVKYSKCIHIVSNPVIITVYWKLSGGRVIRVIGSCTNLELR	170
虹鳟	<i>Oncorhynchus mykiss</i> LDHB XP_021419099.1	VTANSKLIITACAGRCCELRNLVGRNVNFRFIPGVKYSKCIHIVSNPVIITVYWKLSGGRVIRVIGSCTNLELR	170
泥鳅	<i>Misgurnus anguillicaudatus</i> LDHA AB94572.1	VTANSKLIITACAGRCCELRNLVGRNVNFRFIPGVKYSKCIHIVSNPVIITVYWKLSGGRVIRVIGSCTNLELR	169
凡纳滨对虾	<i>Litopenaeus vannamei</i> AEC12821.1	VTANSKLIITACAGRCCELRNLVGRNVNFRFIPGVKYSKCIHIVSNPVIITVYWKLSGGRVIRVIGSCTNLELR	169
凡纳滨对虾	<i>Litopenaeus vannamei</i> LDH1 AF147929.1	VTANSKLIITACAGRCCELRNLVGRNVNFRFIPGVKYSKCIHIVSNPVIITVYWKLSGGRVIRVIGSCTNLELR	169
凡纳滨对虾	<i>Litopenaeus vannamei</i> LDH2 AF147930.1	VTANSKLIITACAGRCCELRNLVGRNVNFRFIPGVKYSKCIHIVSNPVIITVYWKLSGGRVIRVIGSCTNLELR	169
细纹叶切叶螺	<i>Pseudomyx gracilis</i> LDHX2 XP_020290527.1	VTANSKLIITACAGRCCELRNLVGRNVNFRFIPGVKYSKCIHIVSNPVIITVYWKLSGGRVIRVIGSCTNLELR	169
细纹叶切叶螺	<i>Pseudomyx gracilis</i> LDHX1 XP_020290528.1	VTANSKLIITACAGRCCELRNLVGRNVNFRFIPGVKYSKCIHIVSNPVIITVYWKLSGGRVIRVIGSCTNLELR	169
中间球海胆	<i>Strongylocentrotus intermedius</i> SILDH	VTANSKLIITACAGRCCELRNLVGRNVNFRFIPGVKYSKCIHIVSNPVIITVYWKLSGGRVIRVIGSCTNLELR	170
紫球海胆	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i> LDHX1 XP_011667433.1	VTANSKLIITACAGRCCELRNLVGRNVNFRFIPGVKYSKCIHIVSNPVIITVYWKLSGGRVIRVIGSCTNLELR	170
紫球海胆	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i> LDHX2 XP_791548.3	VTANSKLIITACAGRCCELRNLVGRNVNFRFIPGVKYSKCIHIVSNPVIITVYWKLSGGRVIRVIGSCTNLELR	170
紫球海胆	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i> LDHX3 XP_011667434.1	VTANSKLIITACAGRCCELRNLVGRNVNFRFIPGVKYSKCIHIVSNPVIITVYWKLSGGRVIRVIGSCTNLELR	170
紫球海胆	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i> LDHX4 XP_011667435.1	VTANSKLIITACAGRCCELRNLVGRNVNFRFIPGVKYSKCIHIVSNPVIITVYWKLSGGRVIRVIGSCTNLELR	170
长刺海星	<i>Acanthaster planci</i> LDHX2 XP_02085964.1	VTANSKLIITACAGRCCELRNLVGRNVNFRFIPGVKYSKCIHIVSNPVIITVYWKLSGGRVIRVIGSCTNLELR	170
长刺海星	<i>Acanthaster planci</i> LDHX3 XP_02085965.1	VTANSKLIITACAGRCCELRNLVGRNVNFRFIPGVKYSKCIHIVSNPVIITVYWKLSGGRVIRVIGSCTNLELR	170
仿刺参	<i>Apostichopus japonicus</i> LDHX3 PIK34979.1	VTANSKLIITACAGRCCELRNLVGRNVNFRFIPGVKYSKCIHIVSNPVIITVYWKLSGGRVIRVIGSCTNLELR	166
Consensus		VTANSKLIITACAGRCCELRNLVGRNVNFRFIPGVKYSKCIHIVSNPVIITVYWKLSGGRVIRVIGSCTNLELR	166
人类	<i>Homo sapiens</i> LDHA3 NP_001158886.1	FRVLAERKLGHPSSGCVLGEVSSVAVSVCNMGVSLNLPENADTNDSEWKEVHKVAVESAVYIKRGYTSMAIGL	254
人类	<i>Homo sapiens</i> LDHB AAH71860.1	FRVLAERKLGHPSSGCVLGEVSSVAVSVCNMGVSLNLPENADTNDSEWKEVHKVAVESAVYIKRGYTSMAIGL	255
人类	<i>Homo sapiens</i> LDHC4 ADG58108.1	FRVLAERKLGHPSSGCVLGEVSSVAVSVCNMGVSLNLPENADTNDSEWKEVHKVAVESAVYIKRGYTSMAIGL	254
小鼠	<i>Mus musculus</i> LDHA3 NP_034829.1	FRVLAERKLGHPSSGCVLGEVSSVAVSVCNMGVSLNLPENADTNDSEWKEVHKVAVESAVYIKRGYTSMAIGL	254
小鼠	<i>Mus musculus</i> LDHB EDL10644.1	FRVLAERKLGHPSSGCVLGEVSSVAVSVCNMGVSLNLPENADTNDSEWKEVHKVAVESAVYIKRGYTSMAIGL	254
小鼠	<i>Mus musculus</i> LDHC NP_038608.1	FRVLAERKLGHPSSGCVLGEVSSVAVSVCNMGVSLNLPENADTNDSEWKEVHKVAVESAVYIKRGYTSMAIGL	254
鸚喙海狗	<i>Gallus gallus</i> LDHB AAG48560.1	FRVLAERKLGHPSSGCVLGEVSSVAVSVCNMGVSLNLPENADTNDSEWKEVHKVAVESAVYIKRGYTSMAIGL	254
韦德尔氏海狗	<i>Tursiops truncatus</i> LDHB NP_001267564.1	FRVLAERKLGHPSSGCVLGEVSSVAVSVCNMGVSLNLPENADTNDSEWKEVHKVAVESAVYIKRGYTSMAIGL	254
韦德尔氏海狗	<i>Leptonychotes weddellii</i> LDHA1X1 XP_006746796.1	FRVLAERKLGHPSSGCVLGEVSSVAVSVCNMGVSLNLPENADTNDSEWKEVHKVAVESAVYIKRGYTSMAIGL	254
高原鼠兔	<i>Ochotona curzoniae</i> LDHB AE91096.1	FRVLAERKLGHPSSGCVLGEVSSVAVSVCNMGVSLNLPENADTNDSEWKEVHKVAVESAVYIKRGYTSMAIGL	254
高原鼠兔	<i>Ochotona curzoniae</i> LDHC AE91097.1	FRVLAERKLGHPSSGCVLGEVSSVAVSVCNMGVSLNLPENADTNDSEWKEVHKVAVESAVYIKRGYTSMAIGL	254
非洲爪哇蝮	<i>Xenopus laevis</i> LDHB NP_001080852.1	FRVLAERKLGHPSSGCVLGEVSSVAVSVCNMGVSLNLPENADTNDSEWKEVHKVAVESAVYIKRGYTSMAIGL	254
鲷	<i>Cyprinus carpio</i> LDHA AAD40736.1	FRVLAERKLGHPSSGCVLGEVSSVAVSVCNMGVSLNLPENADTNDSEWKEVHKVAVESAVYIKRGYTSMAIGL	254
鲷	<i>Cyprinus carpio</i> LDHB AAV54512.1	FRVLAERKLGHPSSGCVLGEVSSVAVSVCNMGVSLNLPENADTNDSEWKEVHKVAVESAVYIKRGYTSMAIGL	255
斑马鱼	<i>Danio rerio</i> LDHA NP_571321.1	FRVLAERKLGHPSSGCVLGEVSSVAVSVCNMGVSLNLPENADTNDSEWKEVHKVAVESAVYIKRGYTSMAIGL	254
斑马鱼	<i>Danio rerio</i> LDHB AAF02131.1	FRVLAERKLGHPSSGCVLGEVSSVAVSVCNMGVSLNLPENADTNDSEWKEVHKVAVESAVYIKRGYTSMAIGL	255
尼罗罗非鱼	<i>Oreochromis niloticus</i> LDHA XP_003440440.1	FRVLAERKLGHPSSGCVLGEVSSVAVSVCNMGVSLNLPENADTNDSEWKEVHKVAVESAVYIKRGYTSMAIGL	254
尼罗罗非鱼	<i>Oreochromis niloticus</i> LDHB XP_003456076.1	FRVLAERKLGHPSSGCVLGEVSSVAVSVCNMGVSLNLPENADTNDSEWKEVHKVAVESAVYIKRGYTSMAIGL	255
虹鳟	<i>Oncorhynchus mykiss</i> LDHA XP_021419099.1	FRVLAERKLGHPSSGCVLGEVSSVAVSVCNMGVSLNLPENADTNDSEWKEVHKVAVESAVYIKRGYTSMAIGL	255
虹鳟	<i>Oncorhynchus mykiss</i> LDHB XP_021419099.1	FRVLAERKLGHPSSGCVLGEVSSVAVSVCNMGVSLNLPENADTNDSEWKEVHKVAVESAVYIKRGYTSMAIGL	255
泥鳅	<i>Misgurnus anguillicaudatus</i> LDHA AB94572.1	FRVLAERKLGHPSSGCVLGEVSSVAVSVCNMGVSLNLPENADTNDSEWKEVHKVAVESAVYIKRGYTSMAIGL	254
凡纳滨对虾	<i>Litopenaeus vannamei</i> AEC12821.1	FRVLAERKLGHPSSGCVLGEVSSVAVSVCNMGVSLNLPENADTNDSEWKEVHKVAVESAVYIKRGYTSMAIGL	254
凡纳滨对虾	<i>Litopenaeus vannamei</i> LDH1 AF147929.1	FRVLAERKLGHPSSGCVLGEVSSVAVSVCNMGVSLNLPENADTNDSEWKEVHKVAVESAVYIKRGYTSMAIGL	254
凡纳滨对虾	<i>Litopenaeus vannamei</i> LDH2 AF147930.1	FRVLAERKLGHPSSGCVLGEVSSVAVSVCNMGVSLNLPENADTNDSEWKEVHKVAVESAVYIKRGYTSMAIGL	254
细纹叶切叶螺	<i>Pseudomyx gracilis</i> LDHX2 XP_020290527.1	FRVLAERKLGHPSSGCVLGEVSSVAVSVCNMGVSLNLPENADTNDSEWKEVHKVAVESAVYIKRGYTSMAIGL	254
细纹叶切叶螺	<i>Pseudomyx gracilis</i> LDHX1 XP_020290528.1	FRVLAERKLGHPSSGCVLGEVSSVAVSVCNMGVSLNLPENADTNDSEWKEVHKVAVESAVYIKRGYTSMAIGL	254
中间球海胆	<i>Strongylocentrotus intermedius</i> SILDH	FRVLAERKLGHPSSGCVLGEVSSVAVSVCNMGVSLNLPENADTNDSEWKEVHKVAVESAVYIKRGYTSMAIGL	255
紫球海胆	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i> LDHX1 XP_011667433.1	FRVLAERKLGHPSSGCVLGEVSSVAVSVCNMGVSLNLPENADTNDSEWKEVHKVAVESAVYIKRGYTSMAIGL	255
紫球海胆	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i> LDHX2 XP_791548.3	FRVLAERKLGHPSSGCVLGEVSSVAVSVCNMGVSLNLPENADTNDSEWKEVHKVAVESAVYIKRGYTSMAIGL	255
紫球海胆	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i> LDHX3 XP_011667434.1	FRVLAERKLGHPSSGCVLGEVSSVAVSVCNMGVSLNLPENADTNDSEWKEVHKVAVESAVYIKRGYTSMAIGL	255
紫球海胆	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i> LDHX4 XP_011667435.1	FRVLAERKLGHPSSGCVLGEVSSVAVSVCNMGVSLNLPENADTNDSEWKEVHKVAVESAVYIKRGYTSMAIGL	255
长刺海星	<i>Acanthaster planci</i> LDHX2 XP_02085964.1	FRVLAERKLGHPSSGCVLGEVSSVAVSVCNMGVSLNLPENADTNDSEWKEVHKVAVESAVYIKRGYTSMAIGL	255
长刺海星	<i>Acanthaster planci</i> LDHX3 XP_02085965.1	FRVLAERKLGHPSSGCVLGEVSSVAVSVCNMGVSLNLPENADTNDSEWKEVHKVAVESAVYIKRGYTSMAIGL	255
仿刺参	<i>Apostichopus japonicus</i> LDHX3 PIK34979.1	FRVLAERKLGHPSSGCVLGEVSSVAVSVCNMGVSLNLPENADTNDSEWKEVHKVAVESAVYIKRGYTSMAIGL	251
Consensus		FRVLAERKLGHPSSGCVLGEVSSVAVSVCNMGVSLNLPENADTNDSEWKEVHKVAVESAVYIKRGYTSMAIGL	251

图7 中间球海胆乳酸脱氢酶与其他17种生物乳酸脱氢酶氨基酸序列的多重比对结果

Fig. 7 Multiple sequence alignments of LDH from *S. intermedius* and other 17 species



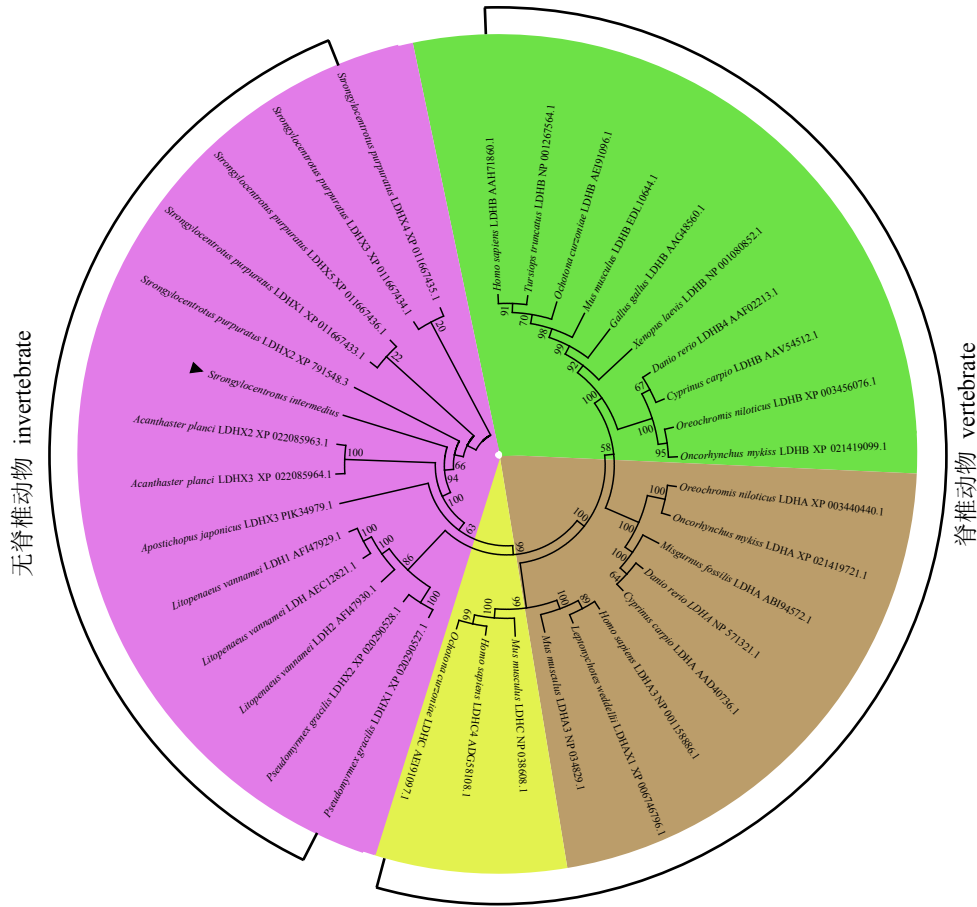


图 8 基于邻接法构建的中间球海胆乳酸脱氢酶和其他17种生物乳酸脱氢酶遗传进化树

“▲”.中间球海胆乳酸脱氢酶(SiLDH), 节点上的数字表示1 000次重复之后的百分比; 脊椎动物为LDH A类(棕色), LDH B类(绿色)和LDH C类(黄色), 无脊椎动物为LDH X类(紫色)

Fig. 8 Neighbor-joining phylogenetic tree of the lactate dehydrogenase (SiLDH) from *S. intermedius* and the lactate dehydrogenase (LDH) of other 17 species

The lactate dehydrogenase (SiLDH) of *S. intermedius* was marked with “▲”, and the number on the tree nodes indicate the percentage after 1 000 replicates; vertebrates include LDH A (brown), LDH B ( green) and LDH C (yellow), invertebrates are LDH X (purple)

现的同工酶种类主要有紫球海胆的LDH(LDH X1~X5)、仿刺参的LDH X3和长刺海星的LDH(LDH X2和LDH X3)。本实验利用RACE技术首次获得了中间球海胆*SiLDH*基因全长cDNA序列, 经过序列比对发现, 该序列的核苷酸序列与紫球海胆*LDHX1*的核苷酸序列相似度最高, 达到67.26%, 而其开放阅读框所编码长度为338个氨基酸的多肽, 与紫球海胆LDHX4蛋白序列的相似性最高, 为90.88%, 二者蛋白序列中存在28个氨基酸残基的差异。分析产生的原因可能是在物种进化过程中, 编码二者的基因序列被分离于不同的海胆种类中, 由于种属特异性进化而采用了不同的碱基替换策略产生的。生物信息学分析显示, 中间球海胆SiLDH蛋白与紫球海胆LDH

X4蛋白的二级结构均具有超过50%的无规则卷曲和12个β-折叠, 但在α螺旋的数量上, 中间球海胆SiLDH蛋白氨基酸序列与紫球海胆LDH X4蛋白氨基酸序列相比少了1个; 三维空间结构预测结果发现, 中间球海胆SiLDH蛋白具有典型的四聚体结构, 由4条多肽链组成4个亚基, 每个亚基的空间结构稳定性由疏水结构、氢键和盐桥等维持; 系统进化分析显示, 中间球海胆SiLDH与紫球海胆LDH X类聚为最近的一支, 这一结果提示, 中间球海胆SiLDH在进化过程中具有较高的保守性, 这一关系也符合目前中间球海胆的进化和分类地位。此外, 本研究中推导的中间球海胆SiLDH蛋白与紫球海胆LDH X4的氨基酸序列最为相似, 但却与紫球海胆LDH X2蛋白的亲

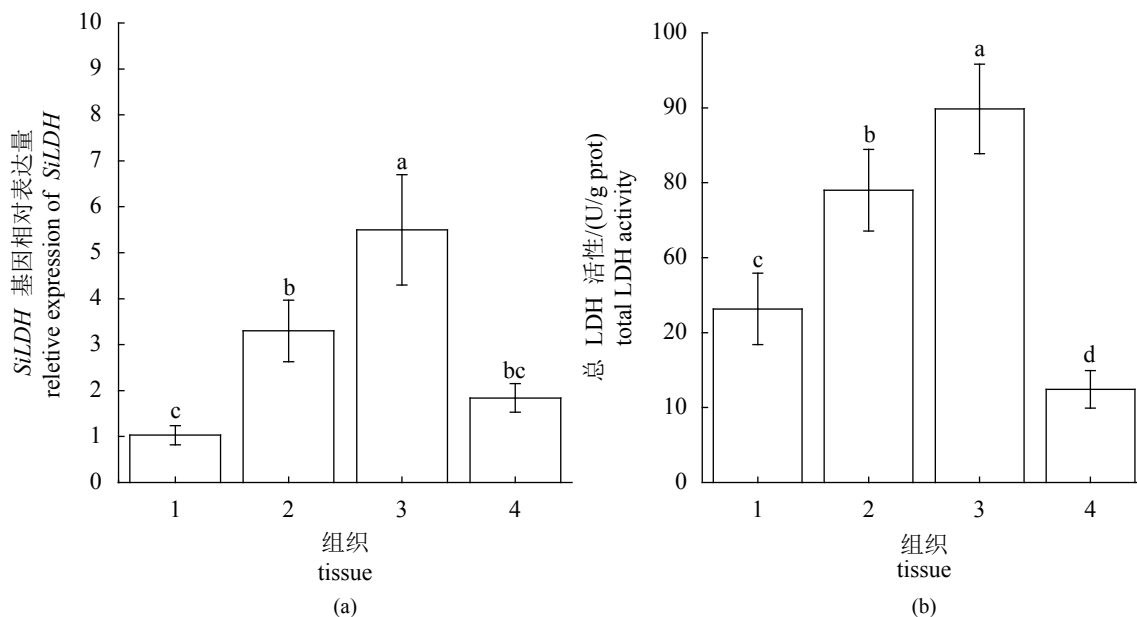


图9 中间球海胆不同组织中*SiLDH*基因的相对表达量及总LDH活性

(a)*SiLDH*基因在中间球海胆各组织中的表达水平, (b)中间球海胆各组织中的总LDH活性分布情况: 1.体腔液, 2.管足, 3.性腺, 4.肠。字母不同表示差异显著( $P < 0.05$ )

Fig. 9 *SiLDH* gene expression level and total LDH activity in different tissues of *S. intermedius*

(a)the expression level of *SiLDH* gene in tested tissues of *S. intermedius*, (b)the total LDH activity in tested tissues of *S. intermedius*; 1. coelomic fluid, 2. tubefoot, 3. gonad, 4. intestines. Different letters indicate significant difference ( $P < 0.05$ )

缘关系最近, 因此, 就本研究获得的中间球海胆*SiLDH*基因编码蛋白的亚型归属仍需进一步研究和确认。

qRT-PCR和酶活性检测结果显示, *SiLDH*基因在中间球海胆体腔液、管足、性腺和肠组织中均有表达, 相对表达量从高到低为性腺>管足>肠>体腔液; 各组织总LDH活性检测显示, 总LDH活性从高到低为性腺>管足>体腔液>肠, 这一结果与真核生物乳酸脱氢酶的分布具有鲜明的组织器官特异性<sup>[22]</sup>这一观点相一致。有研究显示, 人的LDH X是精子糖代谢的关键酶, 在整个生精过程被积累起来直至精子成熟, 可作为衡量精液质量的重要指标<sup>[23]</sup>。值得注意的是, 本研究所检测组织中, 中间球海胆性腺中*SiLDH*基因的相对表达量和总LDH活性都是最高的, 结合本研究取样正值繁殖期这一特点, 推测中间球海胆乳酸脱氢酶可能参与中间球海胆配子活性调节和性成熟等繁殖相关过程。此外, 研究还发现, 体腔液中*SiLDH*基因的相对表达量虽然是所检测组织中最底的, 但是其总LDH活性却高于肠道组织, 分析这一结果产生的原因可能是由于本研究中使用的*SiLDH*基因特异性引物扩增出的

仅仅是中间球海胆LDH同工酶中某一亚型的转录本, 而酶活性测定针对的则是中间球海胆LDH同工酶活性的总和, 因此, 导致中间球海胆组织*SiLDH*基因表达与总LDH活性的不一致。

研究显示, 海水酸化可影响和改变海洋生物的能量代谢水平和获取方式<sup>[6]</sup>。本研究发现, 中间球海胆各组织中*SiLDH*基因的相对表达量和总LDH活性对海水酸化胁迫的响应具有鲜明的组织特异性。与自然海水组相比, 海水酸化处理组中间球海胆性腺中*SiLDH*基因的相对表达量和总LDH酶活性呈现总体降低趋势, 且当海水 $\Delta\text{pH} < -0.4$ 时, 中间球海胆性腺中*SiLDH*基因的相对表达量和总LDH活性与自然海水组相比均呈现极显著降低趋势( $P < 0.01$ )。性腺不仅是中间球海胆的繁殖器官, 更是衡量中间球海胆品质的重要指标<sup>[17]</sup>。Uthicke等<sup>[24]</sup>的研究显示, 海水酸化可影响长海胆(*Echinometra* sp.)性腺的发育及成熟, 结合本研究结果, 推测海水酸化可能是通过降低中间球海胆*SiLDH*基因的相对表达量和总LDH活性而改变中间球海胆性腺的发育及成熟等繁殖相关过程, 进而影响中间球海胆的繁殖能力。

有报道指出, 海胆的体腔液类似于脊椎动

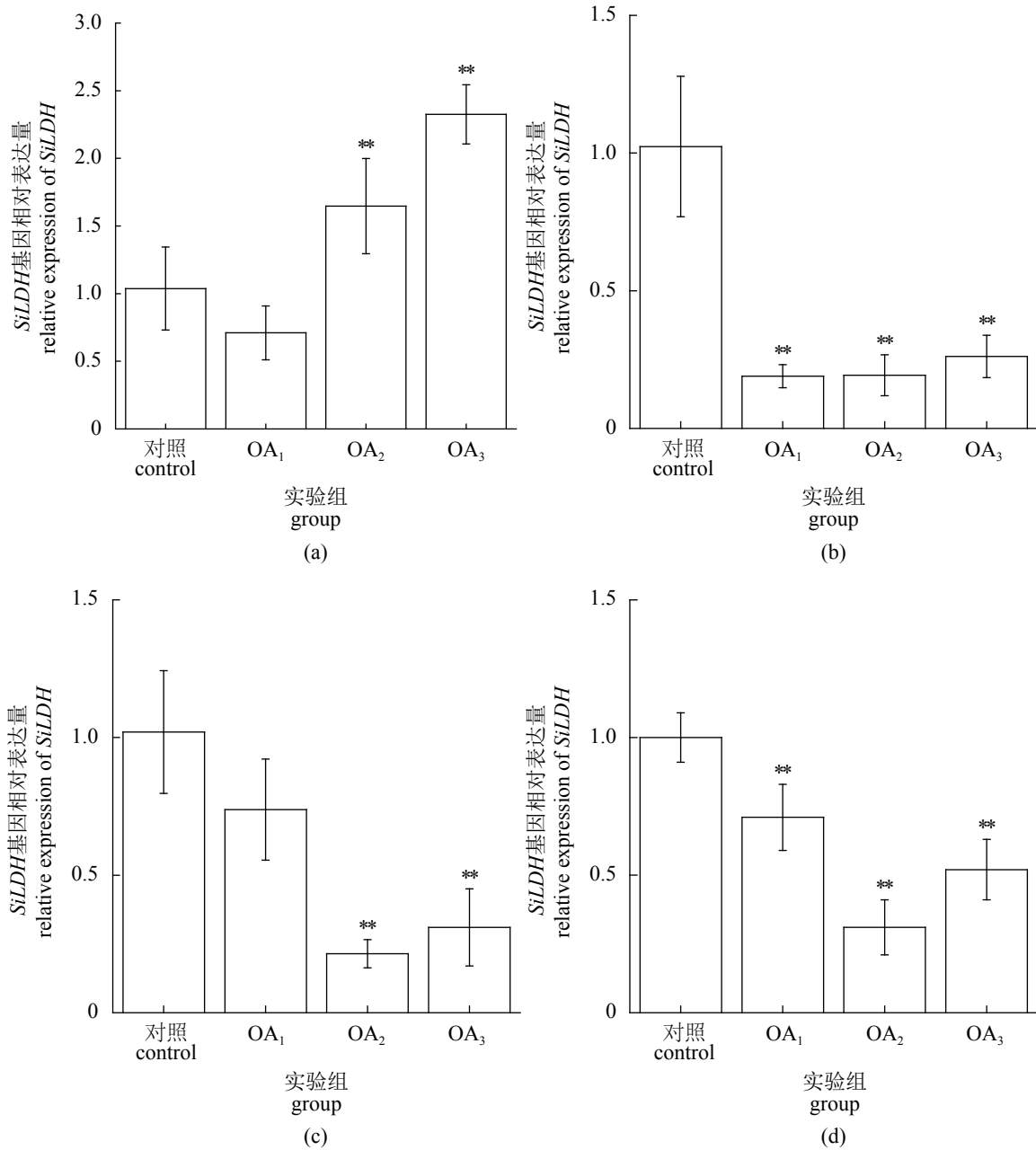


图 10 不同海水酸化条件下中间球海胆各组织中 SiLDH 基因的相对表达量

(a)体腔液, (b)管足, (c)性腺, (d)肠; \*表示与对照组相比差异显著( $P<0.05$ ), \*\*表示与对照组相比差异极显著( $P<0.01$ ), 下同

Fig. 10 Relative expression levels of SiLDH genes in different tissues of *S. intermedius* under different seawater acidification conditions

(a)coelomic fluid, (b)tubefoot, (c) gonad, (d)intestines;\* indicates that the difference is significant ( $P<0.05$  vs control), \*\* indicates that the difference is extremely significant ( $P<0.01$  vs control), the same below

物的淋巴, 含有参与免疫反应的细胞以及多种体液免疫因子, 可直接作用于入侵病原体, 是海胆等无脊椎动物先天性免疫防御的重要组织<sup>[25]</sup>, 同时, 海胆体腔液也是调节体内外渗透压平衡和进行气体交换的关键场所。本研究结果显示, 不同酸化处理组中间球海胆体腔液中 SiLDH 基因

的相对表达量相比于自然海水组呈现随海水 pH 降低先降低后极显著上升的趋势( $\Delta\text{pH}=-0.4$ ,  $P<0.01$ ;  $\Delta\text{pH}=-0.5$ ,  $P<0.01$ )。An 等<sup>[26]</sup>研究发现, 高原鼠兔可能通过提高骨骼肌中 LDH-C4 基因的表达来从无氧酵解中获取能量以适应高原的低氧环境, 本研究中中间球海胆体腔液中 SiLDH 基因

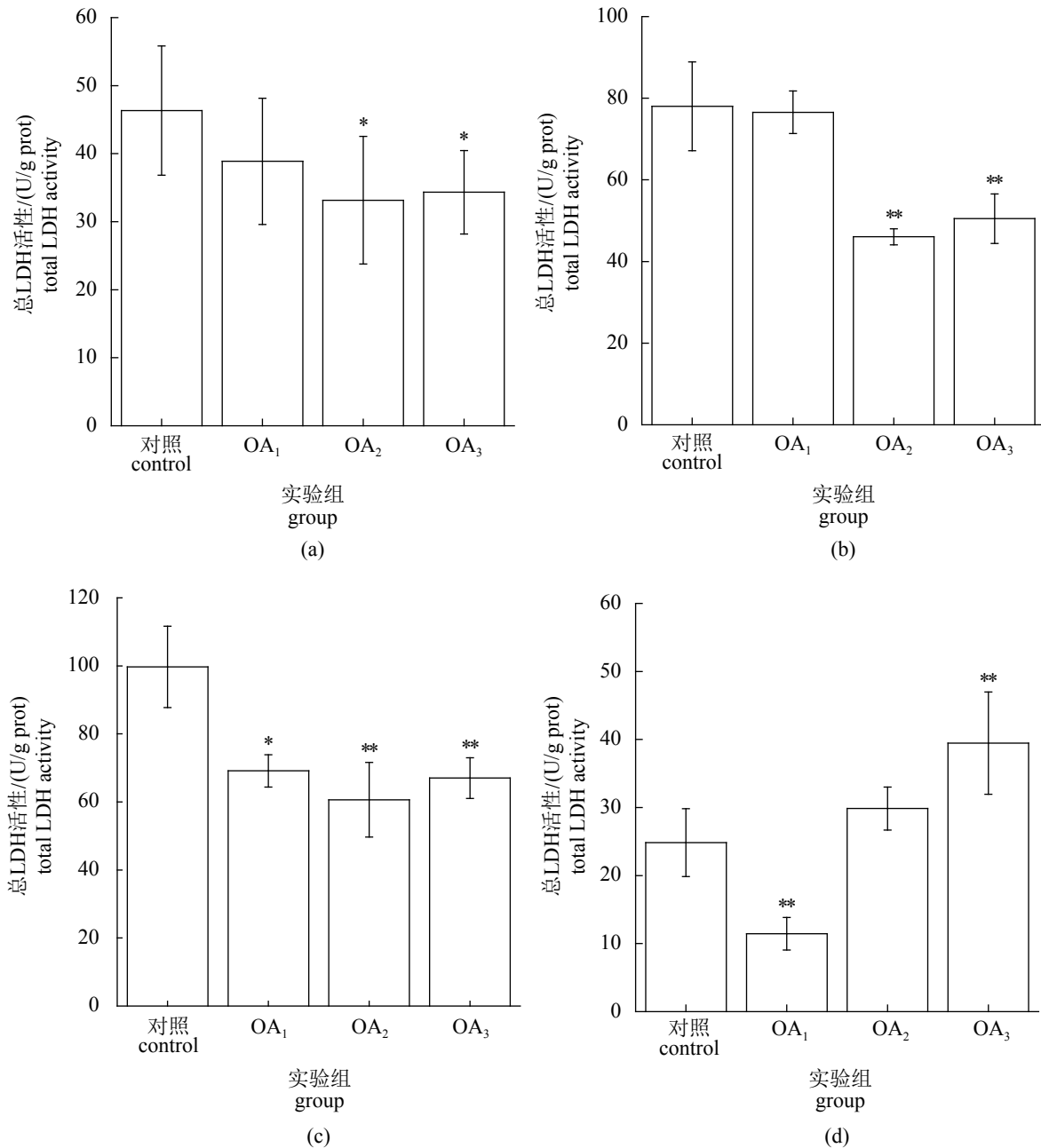


图 11 不同海水酸化条件下中间球海胆各组织中总LDH活性变化

Fig. 11 Total LDH activities in different tissues of *S. intermedius* under different seawater acidification conditions

的相对表达情况与之具有一定的相似之处。值得注意的是，本研究发现，中间球海胆体腔液中*SiLDH*基因的相对表达量呈随海水pH降低而升高的趋势，而管足、性腺、肠组织中*SiLDH*基因的相对表达量则在海水酸化条件下呈现总体下降趋势，这一方面反映出中间球海胆不同组织对海水酸化响应的组织特异性，也进一步提示，体腔液作为中间球海胆进行气体交换和调节体内酸碱平衡的重要组织，可能采取全面调动代

谢、防御等相关基因的相对表达的策略应对海水酸化的胁迫，这与Collard等<sup>[27]</sup>的研究结果较为一致。此外，研究还发现不同酸化处理组中间球海胆体腔液中总LDH活性并没有随其相应*SiLDH*基因相对表达量的升高而表现出逐渐升高的趋势，而是呈现随海水pH降低而降低的相反趋势( $\Delta\text{pH}=-0.4$ ,  $P<0.05$ ;  $\Delta\text{pH}=-0.5$ ,  $P<0.05$ )。这一结果提示，海水酸化不仅能影响中间球海胆体腔细胞能量代谢的生物化学过程，还会影

响其组织细胞内基因的转录、转录后调控以及翻译等过程。

管足是中间球海胆的主要运动和触觉器官, 能够对外界环境变化做出迅速响应<sup>[17]</sup>, 本研究结果显示, 与自然海水组相比, 不同酸化处理组中间球海胆管足中*SiLDH*基因的相对表达量和总LDH活性呈现总体下降趋势, 尤其是当 $\Delta\text{pH} < -0.4$ 时, 酸化组中间球海胆管足中*SiLDH*基因的相对表达量和总LDH活性与自然海水组相比均呈现极显著降低趋势( $\Delta\text{pH} = -0.4$ ,  $P < 0.01$ ;  $\Delta\text{pH} = -0.5$ ,  $P < 0.01$ )。与本研究中的其他3种组织相比, 不同海水酸化条件下, 管足中*SiLDH*基因的相对表达量最低。这一方面提示, 海水酸化可降低中间球海胆运动器官的无氧代谢, 进而改变其能量代谢水平; 另一方面也说明, 中间球海胆可能会采取减少其运动器官活动的方式以节省能量的消耗, 用于补偿海水酸化引起的体内酸碱失衡。但是, 就海水酸化影响中间球海胆的运动和触觉以及运动能量消耗的机体机制仍需进一步研究。

肠道是中间球海胆主要的消化器官, 也是中间球海胆代谢产能的重要组织, 本研究结果显示, 不同酸化处理组中间球海胆肠道中*SiLDH*基因的相对表达量相比于自然海水组呈现极显著降低趋势( $P < 0.01$ )。值得注意的是, 与自然海水组相比, 中间球海胆肠道总LDH活性却呈现随海水pH降低先极显著降低( $\Delta\text{pH} = -0.3$ ,  $P < 0.01$ )后逐渐升高的趋势, 且当 $\Delta\text{pH} = -0.5$ 时, 中间球海胆肠道总LDH活性极显著高于自然海水组( $P < 0.01$ )。Wang等<sup>[28]</sup>发现海水中 $\rho\text{CO}_2$ 从401.5升高至3 126.1  $\mu\text{atm}$ 时, 紫海胆的摄食率及耗氧率呈现先下降后升高的趋势。Heuer等<sup>[29]</sup>研究表明, 海水酸化引起的酸中毒会使海湾豹蟾鱼(*Opsanus beta*)肠道阴离子交换增加, 进而对其肠道组织造成严重损伤。因此推测, 一方面海水酸化可通过影响肠道离子交换平衡, 造成中间球海胆肠道组织细胞损伤, 进而影响肠道细胞基因的表达; 另一方面, 中间球海胆肠道组织可能通过提高其总LDH等无氧代谢相关酶活性, 来增强其无氧代谢水平, 从中获取能量以抵御和适应海水酸化胁迫。但是, 就海水酸化导致中间球海胆肠道总LDH活性随海水pH降低而先降低后升高的具体分子机制及调控方式仍需进一步的研究。

本研究通过克隆得到中间球海胆乳酸脱氢

酶*SiLDH*基因的全长序列, 生物信息学分析显示*SiLDH*蛋白符合进化和分类地位, 具有较高的保守性。中间球海胆乳酸脱氢酶能够参与对海水酸化条件的响应过程, 中间球海胆可能通过调节*SiLDH*基因的表达和LDH活性来缓解海水酸化带来的负面影响, 为探究海水酸化对棘皮动物的影响提供参考。

#### 参考文献:

- [1] Reichard G A Jr, Moury N F Jr, Hochella N J, *et al.* Quantitative estimation of the Cori cycle in the human[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1963, 238(2): 495-501.
- [2] 贾旭颖, 国先涛, 王芳, 等. 非离子氨胁迫对淡水和海水养殖凡纳滨对虾呼吸代谢酶活力影响的比较[J]. *水产学报*, 2014, 38(11): 1837-1846.  
Jia X Y, Guo X T, Wang F, *et al.* Comparison of the effect of nonionic ammonia stress on respiratory metabolic enzyme of *Litopenaeus vannamei* in seawater and freshwater[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2014, 38(11): 1837-1846(in Chinese).
- [3] 李泽健. 低氧胁迫对中华绒螯蟹能量代谢、呼吸代谢及抗氧化代谢的影响[D]. 保定: 河北大学, 2012.  
Li Z J. Effects of hypoxia stress on energy metabolism, respiratory metabolism and antioxidant metabolism of *Eriocheir sinensis*[D]. Baoding: Hebei University, 2012(in Chinese).
- [4] 陶易凡, 强俊, 王辉, 等. 高pH胁迫对克氏原螯虾的急性毒性和鳃、肝胰腺中酶活性及组织结构的影响[J]. *水产学报*, 2016, 40(11): 1694-1704.  
Tao Y F, Qiang J, Wang H, *et al.* Acute toxicity of high pH stress and its effect on enzymes activity and histological structure of gill and hepatopancreas in *Procambarus clarkii*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2016, 40(11): 1694-1704(in Chinese).
- [5] Caldeira K, Wickett M E. Oceanography: anthropogenic carbon and ocean pH[J]. *Nature*, 2003, 425(6956): 365.
- [6] 丁兆坤, 王福平, 许友卿. 海水酸化对海洋生物代谢的影响及机理[J]. *水产科学*, 2015, 34(5): 331-334.  
Ding Z K, Wang F P, Xu Y Q. Effect of ocean acidification on metabolism of marine organisms[J]. *Fisheries Science*, 2015, 34(5): 331-334(in Chinese).
- [7] Gaitán-Espitia J D, Marshall D, Dupont S, *et al.* Geographical gradients in selection can reveal genetic constraints for evolutionary responses to ocean acidification[J]. *Biology Letters*, 2017, 13(2):

- 10.1098/rsbl.2016.0784.
- [ 8 ] 湛垚垚, 黄显雅, 段立柱, 等. 海洋酸化对近岸海洋生物的影响[J]. *大连大学学报*, 2013, 34(3): 79-84.  
Zhan Y Y, Huang X Y, Duan L Z, *et al.* Review on the impacts of ocean acidification on nearshore marine life[J]. *Journal of Dalian University*, 2013, 34(3): 79-84(in Chinese).
- [ 9 ] Comeau S, Jeffree R, Teysssié J L, *et al.* Response of the arctic pteropod *Limacina helicina* to projected future environmental conditions[J]. *PLoS One*, 2010, 5(6): e11362.
- [10] Wootton J T, Pfister C A, Forester J D. Dynamic patterns and ecological impacts of declining ocean pH in a high-resolution multi-year dataset[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008, 105(48): 18848-18853.
- [11] Anthony K R N, Kline D I, Diaz-Pulido G, *et al.* Ocean acidification causes bleaching and productivity loss in coral reef builders[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008, 105(45): 17442-17446.
- [12] Albright R, Caldeira L, Hoffelt J, *et al.* Reversal of ocean acidification enhances net coral reef calcification[J]. *Nature*, 2016, 531(7594): 362-365.
- [13] Beniash E, Ivanina A, Lieb N S, *et al.* Elevated level of carbon dioxide affects metabolism and shell formation in oysters *Crassostrea virginica*[J]. *Marine Ecology Progress Series*, 2010, 419: 95-108.
- [14] Zhan Y Y, Hu W B, Zhang W J, *et al.* The impact of CO<sub>2</sub>-driven ocean acidification on early development and calcification in the sea urchin *Strongylocentrotus intermedius*[J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2016, 112(1/2): 291-302.
- [15] Fang J K H, Schönberg C H L, Mello-Athayde M A, *et al.* Effects of ocean warming and acidification on the energy budget of an excavating sponge[J]. *Global Change Biology*, 2014, 20(4): 1043-1054.
- [16] Hu M Y, Casties I, Stumpp M, *et al.* Energy metabolism and regeneration are impaired by seawater acidification in the infaunal brittlestar *Amphiura filiformis*[J]. *Journal of Experimental Biology*, 2014, 217: 2411-2421.
- [17] 常亚青, 丁君, 宋坚, 等. 海参、海胆生物学研究与养殖[M]. 北京: 海洋出版社, 2004.  
Chang Y Q, Ding J, Song J, *et al.* Biology research and breeding of sea cucumber and sea urchin[M]. Beijing: China Ocean Press, 2004(in Chinese).
- [18] 湛垚垚, 黄显雅, 段立柱, 等. 实验室模拟海水酸化系统: 201320267332.7[P]. 2013-12-11.  
Zhan Y Y, Huang X Y, Duan L Z, *et al.* Laboratory simulation of ocean acidification system: 201320267332.7[P]. 2013-12-11.
- [19] Stocker T F, Qin D, Plattner G K, *et al.* Climate change 2013: the physical science basis. Contribution of working group I to the fifth assessment report of the intergovernmental panel on climate change[R]. Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA: Cambridge University Press, 2014.
- [20] Mehrbach C, Culbertson C H, Hawley J E, *et al.* Measurement of the apparent dissociation constants of carbonic acid in seawater at atmospheric pressure[J]. *Limnology and Oceanography*, 1973, 18(6): 897-907.
- [21] 姬南京, 杨芸菲, 丁君, 等. 虾夷马粪海胆溶菌酶基因全长cDNA的克隆与表达分析[J]. *中国水产科学*, 2013, 20(5): 950-957.  
Ji N J, Yang Y F, Ding J, *et al.* Cloning and expression analysis of a sea urchin (*Strongylocentrotus intermedius*) lysozyme gene[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2013, 20(5): 950-957(in Chinese).
- [22] 王群, 赵云龙, 陈立侨. 中华绒螯蟹雄性生殖系统生化组成及精子代谢[J]. *水产学报*, 2002, 26(5): 411-416.  
Wang Q, Zhao Y L, Chen L Q. Biochemical composition and sperm metabolism in the reproductive system of the male, *Eriocheir sinensis*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2002, 26(5): 411-416(in Chinese).
- [23] 孙华宾, 刘雅峰, 刘燕, 等. 男性不育者精浆及精子乳酸脱氢酶活性的研究[J]. *中华全科医学*, 2010, 8(8): 974, 1011.  
Sun H B, Liu Y F, Liu Y, *et al.* Activity of lactate dehydrogenase isoenzyme in seminal plasma or spermatozoa of male infertility patients[J]. *Chinese Journal of General Practice*, 2010, 8(8): 974, 1011(in Chinese).
- [24] Uthicke S, Liddy M, Nguyen H D, *et al.* Interactive effects of near-future temperature increase and ocean acidification on physiology and gonad development in adult Pacific sea urchin, *Echinometra* sp.[J]. *Coral Reefs*, 2014, 33(3): 831-845.
- [25] 张颖. 虾夷马粪海胆体腔液免疫因子及吞噬细胞活性的研究[D]. 大连: 大连海洋大学, 2014.  
Zhang Y. Studies on immune factor and activity of

- phagocytes in coelomic fluid of *Strongylocentrotus intermedius*[D]. Dalian: Dalian Ocean University, 2014(in Chinese).
- [26] An Z F, Wei D B, Wei L, *et al.* The expression of *Ldh-c* in the skeletal muscle of plateau pika (*Ochotona curzoniae*) enhances adaptation to a hypoxic environment[J]. *Biology Open*, 2017, 6(9): 1336-1341.
- [27] Collard M, Laitat K, Moulin L, *et al.* Buffer capacity of the coelomic fluid in echinoderms[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2013, 166(1): 199-206.
- [28] Wang G N, Yagi M, Yin R, *et al.* Effects of elevated seawater CO<sub>2</sub> on feed intake, oxygen consumption and morphology of Aristotle's lantern in the sea urchin *Anthocidaris crassispina*[J]. *Journal of Marine Science and Technology*, 2013, 21(Suppl.1): 192-200.
- [29] Heuer R M, Esbaugh A J, Grosell M. Ocean acidification leads to counterproductive intestinal base loss in the gulf toadfish (*Opsanus beta*)[J]. *Physiological and Biochemical Zoology: Ecological and Evolutionary Approaches*, 2012, 85(5): 450-459.

## Identification and characterization of *LDH* gene and its response to seawater acidification in the sea urchin (*Strongylocentrotus intermedius*)

CUI Dongyao, REN Liyuan, XING Dongfei, SUN Jingxian,  
LI Yingying, CHANG Yaqing, ZHAN Yaoyao\*

(Key Laboratory of Mariculture & Stock Enhancement in North China's Sea,  
Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Dalian Ocean University, Dalian 116023, China)

**Abstract:** In order to identify and characterize the lactate dehydrogenase (LDH) gene and investigate its expression and activity alterations in response to seawater acidification stress in sea urchins, we used database data mining and rapid amplification of cDNA ends (RACE) to identify a novel *LDH* gene in the sea urchin *Strongylocentrotus intermedius* (here designated *SiLDH*). The full-length cDNA of *SiLDH* was 1 499 bp, including a 1 017 bp open reading frame encoding 338 amino acid residues. Sequence analysis indicated that the predicted *SiLDH* protein was similar to the LDH homolog in the sea urchin *S. purpuratus*. Quantitative real-time PCR analysis showed that *SiLDH* was ubiquitously expressed in coelomic fluid, gonad, tube foot and intestine of healthy adult *S. intermedius*, with the highest level of expression identified in the gonad. Total LDH enzyme activity in different tissues of *S. intermedius* from high to low was as gonad > tubefoot > coelomic fluid > intestine. Both *SiLDH* mRNA expression profiles and total LDH enzyme activity were altered in the coelomic fluid, gonad, tube foot and intestine after 60-day seawater acidification treatments (Control: natural seawater; OA<sub>1</sub>: pH=-0.3; OA<sub>2</sub>: pH=-0.4; OA<sub>3</sub>: pH=-0.5). Our results provide more information about the characteristics and biological functions of the LDH homolog in sea urchins.

**Key words:** *Strongylocentrotus intermedius*; lactate dehydrogenase; seawater acidification; gene cloning; expression profile; enzyme activity

**Corresponding author:** ZHAN Yaoyao. E-mail: zhanyaoyao@dlou.edu.cn

**Funding projects:** National Natural Science Foundation of China (31672652); Natural Science Foundation of Liaoning Province (20170540104); the Grant for Chinese Outstanding Talents in Agricultural and Rural Affairs Scientific Research