

# SpHtp1 基因在不同种属水霉菌株中的分布

叶鑫 赵依妮 曹海鹏 胡鲲 杨先乐

上海海洋大学国家水生动物病原库, 上海 201306

**摘要** 为研究 *SpHtp1* 基因在不同种属水霉菌株中的分布, 以寄生水霉 ATCC200013™ 的基因组 DNA 为模板, 设计 1 对特异性引物, 进行 PCR 扩增。将扩增片段回收, 并克隆入 T 载体, 转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 挑取阳性克隆测序。将测序结果与 GenBank 中登录的 *SpHtp1* 基因序列进行比较, 同源性为 99%。以该方法调查从水霉病主要流行地区分离的 17 株水霉菌 *SpHtp1* 基因的分布情况, 结果发现: 在 17 株水霉菌株中, 有 8 株水霉菌检测到 *SpHtp1* 基因, 阳性率为 47%, 且所有含 *SpHtp1* 基因的菌株在分类地位上均隶属于寄生水霉 (*Saprolegnia parasitica*)。 *SpHtp1* 基因可能在寄生水霉中特异性存在, 该基因有望用于寄生水霉的分离鉴定。

**关键词** 水霉; *SpHtp1* 基因; 聚合酶链式反应; 致病性

**中图分类号** S 917.1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2014)05-0099-06

卵菌纲(Oomycete)是一类类似真菌的真核微生物, 包括一些动物或植物性病原菌, 植物性病原菌主要包括霜霉目和腐霉目, 动物病原菌包括水霉菌目和水节霉目<sup>[1]</sup>。卵菌纲病原菌与宿主在长期协同进化过程中, 通过分泌效应蛋白(effector proteins)到宿主细胞的不同部位来操纵宿主的防卫反应, 形成一个对病原感染有利的环境, 从而干扰宿主的防御反应。效应蛋白是由病原菌分泌的一类可以改变宿主细胞的结构和代谢途径, 从而促进对宿主成功侵染或者触发宿主防卫反应的外泌型蛋白分子, 效应因子就是毒力因子<sup>[2]</sup>。目前对于效应蛋白的研究主要集中于植物病原效应蛋白功能的分子解析, 特别是晚疫属及霜霉属的效应蛋白的研究<sup>[3]</sup>。这类效应蛋白的生物信息学分析表明它们含有一个高度保守的氨基酸序列 RxLR(R 代表精氨酸, x 表任意氨基酸, L 代表亮氨酸)结构域<sup>[4]</sup>。目前认为卵菌纲病原菌可以分泌几百个效应蛋白分别作用于宿主植物的不同位点。一类是定位于宿主细胞质外体的效应蛋白, 由病原菌分泌到宿主植物胞外空间作用于胞外靶标和膜表面受体; 另外一类细胞内效应蛋白通过特殊的结构如吸器、侵入泡等结构运输到植物细胞质<sup>[5]</sup>。

2010 年 Peter 等<sup>[6]</sup>在寄生水霉中首次发现了一个类似于 RXLR 结构的效应蛋白, 并命名为 *SpHtp1* (*Saprolegnia parasitica* host-targeting protein)。通过体外细胞感染实验证实 *SpHtp1* 基因在水霉菌株的各个生长阶段都存在, 并且感染早期高于其他阶段。在感染宿主细胞过程中 *SpHtp1* 基因被易位至宿主细胞核中, 对水霉成功感染宿主细胞起了重要的作用<sup>[6]</sup>。目前国外对于 *SpHtp1* 基因的研究主要集中在水霉菌株属寄生水霉, 而对于其他致病水霉菌株是否含有这种基因仍不确定, 笔者通过 PCR 方法检测 *SpHtp1* 基因在我国主要水霉流行区域分离水霉菌中的分布, 旨在为进一步分析该基因在感染过程中的具体功能提供理论基础, 并为后期从分子以及细胞水平研究水霉感染机制提供理论参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试菌株

17 株水霉病原菌, 分离自全国不同水霉病原采集地(表 1), 由国家水生动物病原库收集保藏; 寄生水霉菌株 ATCC200013™, 购自美国菌种保藏中心。

收稿日期: 2013-12-10

基金项目: 国家“863”项目(2011AA10A216)、公益性行业(农业)科研专项(201203085)、上海市科技兴农重点攻关项目(沪农科攻字(2011)第 4-8 号)、国家自然科学基金项目(31172430)、国家水产种质资源平台运行服务项目和上海高校知识服务平台项目

叶鑫, 硕士研究生, 研究方向: 水产动物疾病. E-mail: yexin0923@163.com

通信作者: 胡鲲, 博士, 副教授. 研究方向: 水产品药物安全使用技术. E-mail: khu@shou.edu.cn

表 1 供试菌株及其来源

Table 1 Materials used in this study

菌株编号 Strain	地理来源 Geographical origin	菌株编号 Strain	地理来源 Geographical origin
O2	湖北仙桃(黄颡鱼卵) Xiantao, Hubei( <i>Pelteobagrus fulvidraco</i> eggs)	Y1	上海(草鱼) Shanghai( <i>Ctenopharyngodon idellus</i> )
O4	广东佛山(鲫鱼) Foshan, Guangdong( <i>Carassius auratus</i> eggs)	Y2	广州(鲮) Guangzhou( <i>Cirrhinus molitorella</i> )
O9	湖北仙桃(黄颡鱼卵) Xiantao, Hubei( <i>Pelteobagrus fulvidraco</i> eggs)	Y3	浙江(鲟) Zhejiang( <i>Sturgeon</i> )
O10	湖北仙桃(黄颡鱼卵) Xiantao, Hubei( <i>Pelteobagrus fulvidraco</i> eggs)	Y4	黑龙江(鲫) Heilongjiang( <i>Carassius auratus</i> )
O11	湖北仙桃(黄颡鱼卵) Xiantao, Hubei( <i>Pelteobagrus fulvidraco</i> eggs)	Y5	湖南(鲤鱼卵) Hunan(Carp and crucian carp eggs)
O12	上海(神仙鱼卵) Shanghai( <i>Pterophyllum scalare</i> eggs)	Y6	上海(斑马鱼卵) Shanghai( <i>Zebrafish</i> eggs)
O14	湖北仙桃(黄颡鱼卵) Xiantao, Hubei( <i>Pelteobagrus fulvidraco</i> eggs)	Y7	江西(草鱼) Jiangxi( <i>Ctenopharyngodon idellus</i> )
O15	上海(鳖) Shanghai(Turtle)	Y8	江西(草鱼) Jiangxi( <i>Ctenopharyngodon idellus</i> )
O17	上海(黄颡鱼卵) Shanghai( <i>Pelteobagrus fulvidraco</i> eggs)	ATCC	日本(鲑鳟) Japan( <i>Salmon</i> )

## 1.2 供试菌株的培养

取保藏于试管中的菌株接种于放有无菌油菜籽粒的 PDA 平板上,于 20 °C 恒温培养直至油菜籽粒上长满菌丝,然后将长有菌丝的油菜籽转至装有 4 mL 无菌水的 6 孔板中,于 20 °C 恒温培养。将培养菌丝的 6 孔板显微观察发现有孢子在游动,直至出现孢子,然后去除菜籽,加入 2 mL 的沙氏葡萄糖液体培养液,4 d 后即可获得菌丝。

## 1.3 供试菌株的分子鉴定

将菌丝在无菌水中漂洗 3~4 次后,装入灭菌后的 EP 管中,然后参照可小丽等<sup>[7]</sup>的方法对 17 株水霉菌株病原菌及寄生水霉 ATCC200013 提取基因组 DNA,并对 17 株水霉菌株进行 ITS rDNA 序列 PCR 扩增,PCR 产物测序由上海生工生物工程有限公司完成。将测得菌株的 ITS rDNA 序列用 DNA-MAN 软件编辑后,利用 NCBI 在线 BLAST 软件与 GenBank 数据库中已知序列进行同源性比较,并选取同源性较高的序列用 MEGA5.0 软件构建系统发育树进行系统发育分析,以验证供试菌株分类地位的准确性。

## 1.4 PCR 检测 *SpHtp1* 基因

1) *SpHtp1* 基因的引物设计与合成。以 GenBank 中已知的寄生水霉 *SpHtp1* 基因序列(登录号为:GU345745)作为模板,用 Primer premier 5.0 软件设计 1 对特异性引物(SP-F 5'-GAAAACAA-CAACTCGCAGGAG-3'; SP-R 5'-AGCATTT-

GTCGGTACGTCATC-3'),预期扩增片段长度为 222 bp,引物由上海生工生物工程有限公司合成。

2) PCR 反应。PCR 反应条件为:95 °C 预变性 3 min,95 °C 变性 30 s,58 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 1 min,35 个循环,72 °C 延伸 10 min;PCR 反应体系为:25 μL 反应体系中含 10×PCR Buffer 2.5 μL; dNTP Mixture(各 2.5 mmol/L) 2 μL;引物(10 μmol/L)各 0.5 μL;模板 DNA(从寄生水霉 ATCC200013 中提取的 DNA) 1 μL;TaKaRa *Taq* (5 U/μL) 0.125 μL;加灭菌蒸馏水至 25 μL。

3) PCR 反应产物电泳、回收、测序。PCR 反应产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测,扩增产物用试剂盒[(TaKaRa MiniBEST Agarose Gel DNA Extraction Kit)]进行目的片段纯化回收,并连接到 pMD18-T 载体上、转化到大肠杆菌 DH5α。挑取阳性克隆,提取质粒,PCR 检测,结果送至上海生工生物工程有限公司进行测序。将测序结果通过 NCBI Blast 软件与 GenBank 中已知的水霉菌株 *SpHtp1* 基因序列进行同源性比对。

4) 供试水霉菌株 *SpHtp1* 基因的检测。以本文“1.3”中提取的 17 株水霉菌株的 DNA 为模板,按照标准菌株 ATCC200013<sup>TM</sup>建立的 PCR 检测方法进行扩增,产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测该基因在不同种属水霉菌株中的分布,同时将 PCR 产物送至上海生工生物工程有限公司测序。

## 2 结果与分析

### 2.1 17 株供试水霉菌株的分子鉴定与分析

将 17 株水霉菌株的 ITS 序列测序结果通过 NCBI 进行同源性比对,以邻接法构建系统发育树,从分子生物学手段初步判定菌株的种属(表 2)。结果显示,Strain Y1 与菌株 *Saprolegnia* sp. (JX535255)序列相似性为 99%,Strain Y5 与菌株 *Saprolegnia* sp. (JQ974986)序列相似性为 100%。因此,Strain Y1、Y5 隶属于水霉属。Strain O14 与菌株 *Achlya klebsiana* (AF119579)序列相似性为 100%,因此为异丝绵霉。Strain O4 与菌株 *Sapro-*

*legnia australis* (AM228826)序列相似性为 99%,为南方水霉。Strain Y2、Y7、O9、O10 与菌株 *Saprolegnia parasitica* (JN400038)序列相似性为 99%,Strain O15、Y4、Y6 与菌株 *Saprolegnia parasitica* (JX213147)相似性为 99%,Strain Y3 与菌株 *Saprolegnia parasitica* (GQ183896)相似性为 99%,因此,Y2、Y7、O9、O10、O15、Y4、Y6、Y3 为寄生水霉。Strain O2、O11、Y8 与菌株 *Saprolegnia ferax* strain HS1(JX535250)相似性为 99%,Strain O12、O17 与菌株 *Saprolegnia ferax* strain HP (JN400035)相似性为 99%,O2、O11、Y8、O12、O17 为多子水霉。

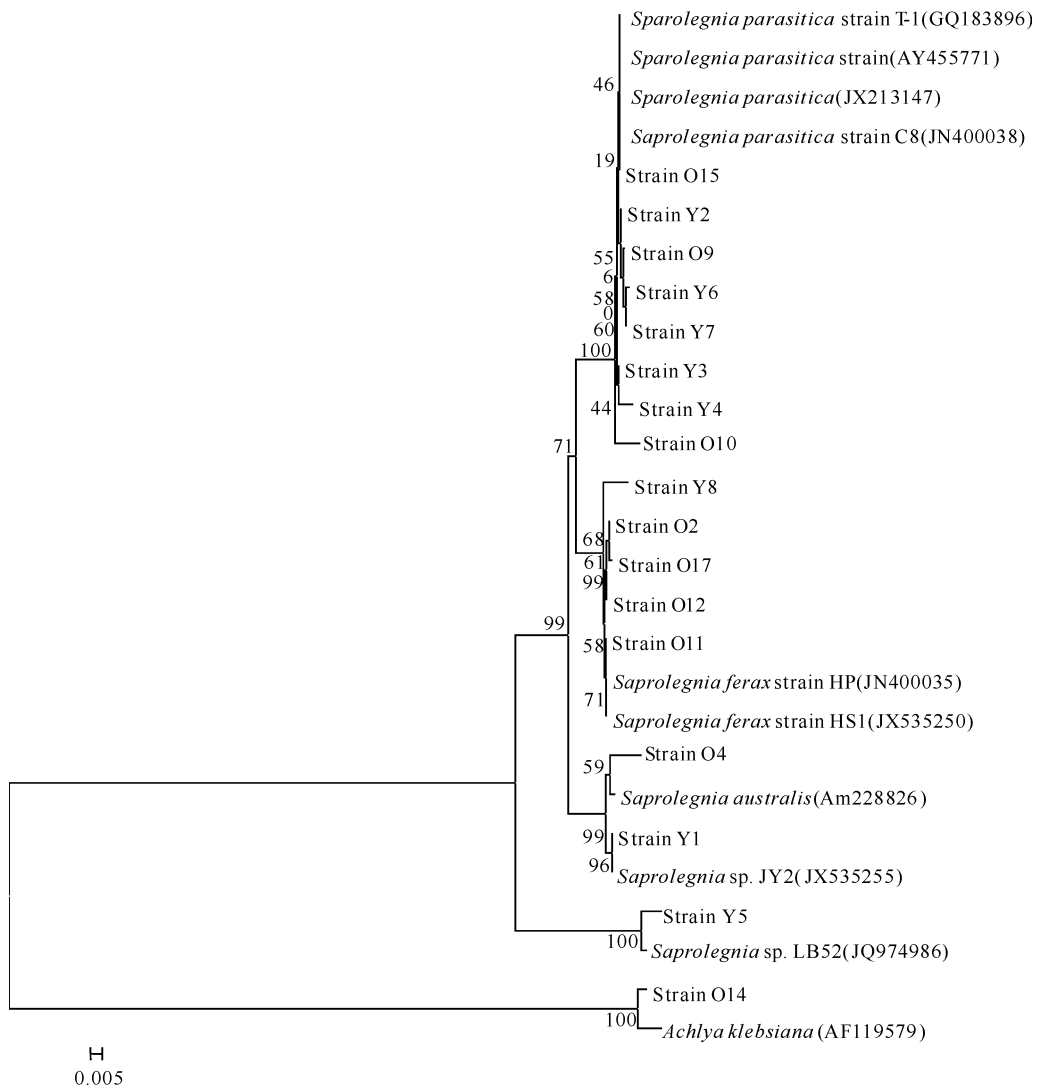


图 1 基于菌株 ITS rDNA 序列所构建的系统发育树

Fig. 1 The constructed phylogenetic tree based on the ITS rDNA sequence of isolated strains

表 2 分离菌株鉴定结果

Table 2 Identification of the isolated strains

菌株编号 Strain	种名 Species	菌株编号 Strain	种名 Species
O2	<i>Saprolegnia ferox</i>	Y1	<i>Saprolegnia</i> sp.
O4	<i>Saprolegnia australis</i>	Y2	<i>Saprolegnia parasitica</i>
O9	<i>Saprolegnia parasitica</i>	Y3	<i>Saprolegnia parasitica</i>
O10	<i>Saprolegnia parasitica</i>	Y4	<i>Saprolegnia parasitica</i>
O11	<i>Saprolegnia ferox</i>	Y5	<i>Saprolegnia</i> sp.
O12	<i>Saprolegnia ferox</i>	Y6	<i>Saprolegnia parasitica</i>
O14	<i>Achlya klebsiana</i>	Y7	<i>Saprolegnia parasitica</i>
O15	<i>Saprolegnia parasitica</i>	Y8	<i>Saprolegnia ferox</i>
O17	<i>Saprolegnia ferox</i>	ATCC	<i>Saprolegnia parasitica</i>

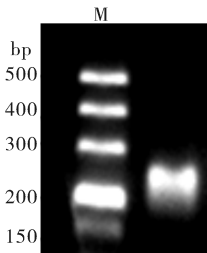


图 2 标准菌株 ATCC PCR 特异性扩增

Fig. 2 The specificity PCR amplification of standard strain ATCC

2.2 SpHtp1 基因在标准菌株 ATCC 中的检测

用特异性引物对标准菌株 ATCC200013™ 进行 PCR 扩增,扩增出一条大小约 220 bp 左右的片段(图 2)。

经测序,该基因序列与 GenBank 中已知的寄生水霉 *SpHtp1* (GenBank 登录号:GU345745) 基因序列的同源性高达 99%。说明所扩增的 *SpHtp1* 基因特异性片段是正确的(图 3)。

2.3 17 株供试水霉菌株 SpHtp1 基因检测结果

1)电泳分析结果。PCR 产物的电泳结果显示(图 4),17 株水霉菌株基因组 DNA 经 PCR 扩增后,其中 8 株菌株产生与预期片段大小相吻合的产物,阳性率为 47%。另外 9 株未见任何产物。

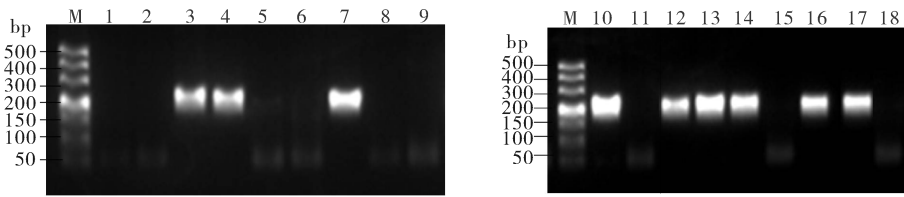
2)序列测定、分析结果。随机选取几个阳性对照的 PCR 扩增产物送至上海生工生物工程有限公司进行克隆测序,并与 GenBank 中已知的寄生水霉 *SpHtp1* (GenBank 登录号:GU345745) 基因序列比对,同源性高达 99%。说明所扩增的基因即为目的基因。

<i>SpHtp1</i>	1	ATGCGCAITCACCACCCGTTGACCCCTCGCTGCTTGTGCGTCGCTTGCACGAGTCGCTCGG	62
ATCC	1		0
<i>SpHtp1</i>	63	TGCCGCCAGCATTCAAACAACGTGGCTCGTCTGGAGCACTACAGGATCGCCGAATCGAGC	124
ATCC	1		0
<i>SpHtp1</i>	125	ACTGGGAGAAGCGCCACCTTCGGAGTGATAGCCGCGGCCACCGCCACCACGCCCATCATGGA	186
ATCC	1		0
<i>SpHtp1</i>	187	CAAGTTATCGACAAGCAAAAACAACAACCTCGCAGGAGCAAGCCACGACTGGCAACAGCGTCGA	248
ATCC	1	TEAAAACAACAACCTCGCAGGAGCAAGCCACGACTGGCAACAGCGTCGA	48
<i>SpHtp1</i>	249	GACCAACCTAGTGCCATCCACCAGCCGACGAAAGACAAGACAACCTCCGATGAAGAAGCGCTT	310
ATCC	49	GACCAACCTAGTGCCATCCACCAGCCGACGAAAGACAAGACAACCTCCGATGAAGAAGCGCTT	110
<i>SpHtp1</i>	311	TGTTCAAGTITGTTCCGCGAAAAGAAAACCTCAAAAACCAAAAAATGCTGGCAACGGGCATGCTCAC	372
ATCC	111	TGTTCAAGTITGTTCCGCGAAAAGAAAACCTCAAAAACCAAAAAATGCTGGCAACGGGCATGCTCAC	172
<i>SpHtp1</i>	373	GACGACGACGACGATTCGGATTTCTCCGATGATGACGTACCGACAAAATGCTCCACAGACGC	434
ATCC	173	GACGATGACGACGATTCGGATTTCTCCGATGATGACGTACCGACAAAATGCTA	224
<i>SpHtp1</i>	435	TCCCACGGGCGCCTACTGATGCTCCGACCGATGCTCCGACCGTAGCACCCACCGACGCTC	496
ATCC	225		224
<i>SpHtp1</i>	497	CTACCAGCGCTCCACCGAAGCACCTACCAACGCGCCTACCGGTACCGATGCCCGACCGAT	558
ATCC	225		224
<i>SpHtp1</i>	559	GCTCCCACGGACGCCAGGTCGTCGCCGACATTCGATTAG	597
ATCC	225		224

图 3 标准菌株 ATCC *SpHtp1* 基因序列与 GenBank 中已知的 *SpHtp1*(GU345745) 基因序列的比较分析

Fig. 3 The blast comparative analysis of nucleotide sequence of *SpHtp1* in standard strain ATCC and *SpHtp1* gene (GU345745) nucleotide sequence published in GenBank





1:O2; 2:O4; 3:O9; 4:O10; 5:O11; 6:O12; 7:O15; 8:O17; 9:O14; 10:ATCC; 11:Y1; 12:Y2; 13:Y3; 14:Y4; 15:Y5; 16:Y6; 17:Y7; 18:Y8; M:DL 500 marker.

图4 不同来源水霉菌株 *SpHtp1* 基因检测

Fig. 4 Testing of *SpHtp1* gene of different *Saprolegnia* strains

### 3 讨论

水霉病是我国大宗淡水鱼类养殖中比较常见疾病之一,鱼体损伤、鱼卵死亡都会造成大规模的水霉病暴发,水霉病的暴发每年给我国水产养殖业造成重大经济损失<sup>[8-9]</sup>。由于水霉菌分布范围广,对宿主无选择性,各种淡水鱼类均可感染此病,并且从卵到成鱼各个发育阶段均可感染<sup>[10]</sup>。自2002年孔雀石绿禁用以后,水霉病的防控成为一个难题。

现阶段国内外对于水霉病的研究主要集中在水霉病的症状的描述、病原菌的鉴定、致病条件的探讨以及防治方法的摸索<sup>[11]</sup>。关于致病机理的研究还较少,而涉及分子和细胞水平的研究几乎没有。过去对于水霉菌致病机理主要有2种假说:一种是推测有生命力的胚胎和健康鱼的表皮细胞经常能分泌一种抗毒素粘液来抵抗菌丝夺取其养料,如悬浮在卵间质中的菌丝,因得不到养料就不能继续生长。另一种是水霉菌产生的孢子具有趋化性、电极性以及自主性<sup>[12]</sup>。*SpHtp1* 基因是目前为止发现的与水霉菌致病相关的基因<sup>[6]</sup>。同时证实宿主细胞表面蛋白上存在化学修饰性氨基酸(tyrosine-O-sulphate)作为病原菌停靠和入侵的分子锚(molecular anchor),*SpHtp1* 就是依靠这种方式进入宿主细胞的<sup>[13]</sup>。因此,对*SpHtp1* 基因的研究可为进一步研究水霉菌感染机制提供理论基础。

目前关于基因分布的研究方法主要以聚合酶链式反应-限制片段长度多态性(PCR-RFLP)、聚合酶链式反应(PCR)、Southern blot 为主。其中,以PCR检测较为常见。本试验以17株水霉菌基因组DNA为模板,PCR检测*SpHtp1* 基因在这些水霉菌株中的分布情况。其中8株水霉菌扩增出了目的基因。结合分子鉴定结果,出现阳性结果的菌株(Y2、Y7、O9、O10、O15、Y4、Y6、Y3),在分类地位上隶属于寄生水霉(*Saprolegnia parasitica*)。此

结果与可小丽等<sup>[7]</sup>在寄生水霉中发现了该基因存在的结果一致。说明*SpHtp1* 基因在寄生水霉中广泛存在,且对于地域及宿主来源无严格选择性。本试验不仅检测寄生水霉,也检测了其他不同种属的菌株,出现阴性结果的菌株包括异丝绵霉(O14)、多子水霉菌株(O2、O11、Y8、O12、O17)、南方水霉菌株(O4),以及分类地位上隶属于水霉菌属的2株菌株(Y1、Y5)。说明,*SpHtp1* 基因在寄生水霉中特异性存在。针对该结果,在未来的研究中可将该基因作为鉴定寄生水霉的一种DNA条形码,为菌株鉴定到种提供参考。而在其他菌株中没能扩增出目的基因片段,说明其他种属菌株可能存在其他与感染相关的基因,而造成这一结果的原因可能是水霉菌株种属间的差异性<sup>[1]</sup>导致致病机制不同。以往关于水霉*SpHtp1* 基因的研究主要是从mRNA水平,但由于RNA的难提取、易降解等原因,本试验通过提取水霉菌株的DNA成功扩增出了目的基因片段,说明以DNA为模板用PCR法检测*SpHtp1* 基因是可行的、简单的、方便的。

### 参 考 文 献

- [1] ANDREW J, VICTORIA L, EMMA J, et al. New insights into animal pathogenic oomycetes [J]. Trends in Microbiology, 2008, 16(1): 13-19.
- [2] KAMOUN S. A catalogue of the effector secretome of plant pathogenic oomycetes [J]. Annual Review of Phyto Pathology, 2006, 44: 41-60.
- [3] 王新乐. 大豆疫霉 RXLR 效应分子的筛选及 Avh238 的功能研究[D]. 南京: 南京农业大学图书馆, 2008.
- [4] 黄茜. 大豆疫霉 RXLR 效应分子靶标的筛选[D]. 南京: 南京农业大学图书馆, 2010.
- [5] 顾彪, 窦道龙, 康振生, 等. 植物病原真菌效应物蛋白 RxLR 结构域功能分析[C]. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2009.
- [6] PETER W, DE BRUIJN I, MINOR K L, et al. The putative RxLR effector protein SpHtp1 from the fish pathogenic oomycete *Saprolegnia parasitica* is translocated into fish cells [J].

- FEMS Microbiology Letters, 2010, 310(2):127-137.
- [7] 可小丽,汪建国,顾泽茂,等.水霉菌菌株的形态及 ITS 区分子鉴定[J].水生生物学报,2010,34(2):293-301.
- [8] 周志明,朱俊杰.水霉病研究概况[J].现代渔业信息,2009,24(5):9-12.
- [9] 杨先乐,曹海鹏.大宗淡水鱼类粘性卵水霉病的发生与控制策略[J].科学养鱼,2011(2):41.
- [10] 战文斌,杨先乐,汪开毓,等.水产动物病害学[M].北京:中国农业出版社,2004:150-151.
- [11] 吕利群,刘丽玲,刘浩,等.一株芽孢杆菌用作水霉病防治的研究[J].渔业现代化,2010(4):31-34.
- [12] 倪达书.鱼类水霉病的防治研究[M].北京:农业出版社,1982:4-10.
- [13] WAWRA S, BAIN J, DURWARD E, et al. Host-targeting protein 1 (SpHtp1) from the oomycete *Saprolegnia parasitica* translocates specifically into fish cells in a tyrosine-O-sulphate-dependent manner [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2012, 109(6):2096-2101.

## Distribution of *SpHtp1* gene among different *Saprolegnia* strains

YE Xin ZHAO Yi-ni CAO Hai-peng HU Kun YANG Xian-le

Shanghai Ocean University, National Pathogen Collection Center for Aquatic Animals,  
Shanghai 201306, China

**Abstract** In order to understand the distribution of the *SpHtp1* gene among different *saprolegnia* strains, using *Saprolegnia parasitica* (ATCC200013<sup>TM</sup>) genomic DNA as the template, a pair of gene-specific primers was designed, a PCR method was developed and the parameters for PCR amplification was optimized. The PCR product was extracted, linked into pMD18-T vector and then cloned into *E. coli* DH5 $\alpha$ . The recombination plasmid was identified by PCR and sequenced to prove the amplification of the target gene. As a result, a 224 bp DNA fragment of the *SpHtp1* gene can be amplified from the *saprolegnia* genome, which had an identity of 99% in sequence with that of other *Saprolegnia* strains. Additionally, 17 samples from all over China were tested using this method and the *SpHtp1* gene was present in 8 (47%) samples. The results indicated that the *SpHtp1* gene is expressed specifically in *S. parasitica*, which can be used potentially for detection of *Saprolegnia*.

**Key words** *Saprolegnia*; *SpHtp1* gene; polymerase chain reaction(PCR); pathogenicity

(责任编辑:边书京)