

研究报告

极端嗜盐多形性古菌病毒 HRPV13 的分离鉴定及生物学特性

宋珊珊, 邓晓园, 杜鑫成, 欧阳淑珊, 陈向东*

武汉大学生命科学学院 病毒学国家重点实验室, 湖北 武汉 430072

宋珊珊, 邓晓园, 杜鑫成, 欧阳淑珊, 陈向东. 极端嗜盐多形性古菌病毒 HRPV13 的分离鉴定及生物学特性[J]. 微生物学通报, 2022, 49(5): 1563-1580

Song Shanshan, Deng Xiaoyuan, Du Xincheng, Ouyang Shushan, Chen Xiangdong. Isolation, identification, and biological characterization of extremely halophilic pleomorphic archaeal virus HRPV13[J]. Microbiology China, 2022, 49(5): 1563-1580

摘要:【背景】与感染细菌和真核生物的病毒相比, 目前发现的古菌病毒数量很少, 但是却展现出形态多样性。因此, 分离和鉴定新的古菌病毒具有重要意义。【目的】为了进一步了解古菌病毒的多样性, 我们从青海省翡翠湖水样中分离到一株新的嗜盐古菌病毒株, 研究其生物学特性并进行分类。【方法】首先通过挑取单菌落法分离嗜盐古菌, 通过噬菌斑法获得嗜盐古菌病毒, PEG 6000 两步沉淀法和 CsCl 密度梯度离心对病毒颗粒进行浓缩和纯化, 用醋酸双氧铀对病毒负染染色, 在透射电镜下观察病毒形态, 提取病毒基因组后进行测序并进行生物信息学分析, 以三氯乙酸法制备病毒蛋白样品并进行 SDS-PAGE 分析, 分别用考马斯亮蓝和苏丹黑 B 染色并观察其蛋白和脂质条带。【结果】在以 *Halorubrum* 属极端嗜盐古菌 K2 菌株为敏感菌的双层平板上分离到了一株嗜盐古菌病毒, 其噬菌斑为浊斑, 透射电镜下呈多形性包膜病毒状, 直径 60 nm 左右; 含有 9 333 bp 大小的双链环状 DNA 基因组, 与已报道的 β 多形包膜病毒属(Betapleolipovirus)的 HRPV11、HRPV12 和 HRPV10 具有约 75% 的一致性, 是该属的一个病毒新种。根据形态及基因组特征, 将其归属于 β 多形包膜病毒属, 命名为 *Halorubrum pleomorphic virus 13* (HRPV13)。该病毒在 50 °C 以下及 pH 5.0–9.0 具有较好活性, 高盐浓度下具有侵染能力, 而且病毒侵染宿主后不会造成宿主的大量裂解。【结论】通过电镜观察和生物学特性研究以及基因组测序分析, 证实 HRPV13 为 β 多形包膜病毒属的新种, 其分离和鉴定丰富了多形性病毒种类, 这为研究不同区域多形性病毒的进化奠定了基础。

关键词: 嗜盐古菌; 环境病毒; 多形性病毒; 分离纯化

基金项目: 国家自然科学基金(31570174)

Supported by: National Natural Science Foundation of China (31570174)

*Corresponding author: E-mail: xdchen@whu.edu.cn

Received: 2022-02-28; Accepted: 2022-04-10; Published online: 2022-04-21

Isolation, identification, and biological characterization of extremely halophilic pleomorphic archaeal virus HRPV13

SONG Shanshan, DENG Xiaoyuan, DU Xincheng, OUYANG Shushan, CHEN Xiangdong*

State Key Laboratory of Virology, College of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072, Hubei, China

Abstract: [Background] Compared with viruses infecting bacteria and eukaryotes, archaeal viruses are limited in number but morphologically diverse. Therefore, it is of great significance to isolate and identify new archaeal viruses. [Objective] To gain an in-depth understanding of the diversity of archaeal viruses, we isolated a new halophilic archaeal virus from water samples of Feicui Lake in Qinghai Province and analyzed its biological characteristics and taxonomic status. [Methods] Halophilic archaea were isolated by picking single colonies and the archaeal virus was obtained by plaque assay. Virus particles were concentrated and purified by two-step precipitation with PEG 6000 and CsCl density gradient centrifugation. After the negative staining with uranyl acetate, viruses were observed under a transmission electron microscope. Viral genome was extracted and sequenced and the bioinformation was analyzed. Virus samples were concentrated by trichloroacetic acid (TCA) and applied to SDS-PAGE gels for separation of viral proteins, followed by Coomassie brilliant blue staining and Sudan Black B staining, respectively, to observe the protein and lipid bands. [Results] A halophilic archaeal virus was isolated on a double-layer plate with *Halorubrum* sp. K2 as sensitive bacteria. The plaques were hazy with a polymorphic enveloped virus-like shape under transmission electron microscope, with a diameter of about 60 nm. It had the double-stranded circular DNA genome of 9 333 bp in size and shared about 75% identity to the reported HRPV11, HRPV12, and HRPV10 in Betapleolipovirus, which was a new viral species of this genus. According to morphology and genome characteristics, it was named *Halorubrum pleomorphic virus 13* (HRPV13) in Betapleolipovirus. The virus can still infect bacteria at high salt concentration and had high viability at below 50 °C and pH 5.0–9.0. Moreover, it failed to cause significant lysis of host after infection. [Conclusion] HRPV13 is a new polymorphic species in Betapleolipovirus, as verified by electron microscopy, biological characterization, and genome sequencing. The result lays a foundation for research on the evolutionary relationship of polymorphic viruses in different regions.

Keywords: halophilic archaea; environmental viruses; pleomorphic viruses; isolation and purification

嗜盐古菌及其病毒构成了世界各地高盐环境的主要微生物。据报道,电子显微镜下每毫升高盐水样中约含有 10^9 个病毒样颗粒^[1-3]。通过形成噬菌斑的方法,截至目前已从高盐环境中分离出 100 多株病毒,其中大多数感染极端嗜盐的广古菌(*Euryarchaeota*),所有这些病毒都属于嗜盐古菌 DNA 病毒^[4]。虽然通过宏观基因

组分析发现古菌病毒中有 RNA 病毒,但是至今尚未分离出可培养的 RNA 古菌病毒^[5]。由于完成全基因组测序的嗜盐古菌病毒还较少,这限制了基于序列相似性对这类病毒之间及它们与其他病毒进化关系的分析。因此,有必要从高盐环境中分离更多的嗜盐古菌病毒。

截至目前,感染嗜盐古菌的病毒主要为有

尾二十面体病毒和多形性病毒^[5-6]。自 2009 年发现第一个多形性古菌病毒 HRPV1 后^[7], 越来越多的多形性病毒被分离鉴定出来。多形性病毒缺乏刚性的蛋白外壳, 病毒颗粒约 40–80 nm, 具有柔性膜囊泡结构^[8], 膜囊泡结构中的脂质非选择性地来自宿主细胞膜。多形性病毒具有两个主要的蛋白, 内部膜相关蛋白和不规则分布在表面的刺突蛋白, 还有一种假定的核苷三磷酸酶(nucleoside triphosphatases, NTPase)^[9]。目前已知的古菌多形性病毒主要以盐红菌属(*Halorubrum*, *Hrr.*)、盐盒菌属(*Haloarcula*, *Har.*)、盐几何菌属(*Halogeometricum*, *Hgm.*)和钠线菌属(*Natrinema*, *Nnm.*)的古菌为宿主^[8], 其中从 *Halorubrum* 中分离到的病毒最多。经国际病毒分类委员会(International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV)确认的多形包膜病毒科(Pleolipoviridae)共有 15 株病毒, 分为 3 个属^[10]。其中, 5 株(HHPV1、HHPV2、HRPV6、HRPV2 和 HRPV1)为 α 多形包膜病毒属(Alphapleolipovirus), 其基因组可编码假定的滚环复制起始蛋白(putative rolling-circle replication initiation protein); 9 株(HRPV3、HGPV1、HHPV3、HHPV4、HRPV9、HRPV10、HRPV11、HRPV12 和 SNJ2)为 β 多形包膜病毒属(Betapleolipovirus), 预测其基因组可编码具有翼螺旋状 DNA 结合结构域(winged-helix DNA-binding domain)的保守蛋白^[11]; 1 株(His2)为 γ 多形包膜病毒属(Gammapleolipovirus), 该病毒基因组编码假定的蛋白起始 B 家族 DNA 聚合酶(putative protein-primed family B DNA polymerase)^[12]。另外, 还有 3 个多形性病毒(HAPV2、HRPV7 和 HRPV8)暂未分类^[8]。多形性病毒的基因组形式多样, 有双链或单链环状, 以及双链线性和有单链部分的双链环状, 但均为 DNA 病毒^[13-14]。尽管它们的基因组形式不同

且序列一致性低, 但目前已知的多形性病毒基因组的基因排布一致并包含编码主要结构蛋白和其他假定蛋白的保守基因簇。

中国盐湖众多, 近年来陆续从盐湖中分离到了许多嗜盐古菌及细菌, 但分离到的古菌病毒较少。我国科学家分离的多形性古菌病毒仅有 2 株, 分别是辽宁省葫芦岛分离的 HHPV2 和本实验室从湖北应城一株嗜盐古菌 *Natrinema* sp. J7-1 中分离到的溶源病毒 SNJ2^[11,15]。本研究从青海省翡翠湖盐湖中分离到了一株新的嗜盐古菌 β 多形包膜病毒 HRPV13, 并对其形态、基因组特征等基本性质进行研究, 以期扩展嗜盐古菌病毒的多样性, 以及尝试在遗传可控的嗜盐古菌宿主中建立病毒-宿主系统奠定实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂和仪器

PEG 6000, BioFroxx 公司; CsCl, Vetec 公司; 苏丹黑 B, Sigma Aldrich 公司; 限制性内切酶和蛋白 Marker, Thermo Fisher Scientific 公司; 2×Hieff Mix, 上海翊圣生物有限公司; DNaseI、RNaseA、Mung bean nuclease (MBN) 和 Exonuclease III (EXO III), TaKaRa 公司。

恒温培养箱, 上海一恒科学仪器有限公司; 恒温摇床, 上海智诚分析仪器制造有限公司; 小型高速离心机, Eppendorf 公司; 大型高速冷冻离心机, Thermo Fisher Scientific 公司。

1.1.2 培养基和溶液配制

23% MGM 培养基和 18% SW 病毒缓冲液的配方参考 Halohandbook (<http://www.haloarchaea.com/resources/halohandbook/>), 半固体和固体培养基分别加 5 g/L 和 15 g/L 的琼脂, 101 kPa 高温高压灭菌 30 min。

苏丹黑 B 染色液：0.5 g 苏丹黑 B 加到 20 mL 丙酮与 15 mL 冰乙酸中溶解，再加入去离子水 85 mL，磁力搅拌器搅拌 30 min 至完全溶解，4 000 r/min 离心 10 min 后取上清用于染色。

脱色液：取冰乙酸 150 mL，丙酮 200 mL，加入去离子水定容至 1 L。

1.2 方法

1.2.1 菌株的分离

用来筛选嗜盐病毒的宿主菌株是分离自中国青海翡翠湖湖水样的 *Halorubrum* sp. K2，简称 K2 菌株。将 100 μ L 水样涂布在 23% MGM 培养基固体平板上，37 $^{\circ}$ C 培养 14 d，待平板上长出单菌落后，用灭菌的牙签挑取不同颜色和形态的菌落，用古菌 16S rRNA 基因的通用引物^[16]进行 PCR 扩增。PCR 反应体系(25 μ L)：2 \times Hieff Mix 12.5 μ L，无菌水 9.5 μ L，DNA 模板 1 μ L，上、下游引物(10 μ mol/L)各 1 μ L。PCR 反应条件参考产品使用说明书。PCR 扩增后用 1%琼脂糖凝胶电泳进行检测，阳性产物送至武汉奥科鼎盛测序。

1.2.2 基于 16S rRNA 基因序列的系统发育分析

根据文献[17]将测序得到的序列运用 NCBI 的 BLAST 在线分析软件(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)进行相似性比较并记录最相近菌种的信息，用分子进化遗传分析软件(MEGA 7.0)绘制菌株的进化树，用邻接法(neighbor-joining method)构树并设置 bootstrap 为 1 000，使用 Kimura-2-parameter model 模式对进化树进行评估。

1.2.3 病毒的分离和病毒原液的制备

将 5 mL 古菌 K2 培养至 OD_{600} 为 0.4–0.6 时，接入 200 μ L 的翡翠湖样品浓缩液，培养 24 h 后倒双层培养基。MGM 半固体培养基加热后放入 55 $^{\circ}$ C 水浴锅保温，取 400 μ L 混合培养物加入 3 mL 的半固体，迅速倒在固体 MGM 平板

上，摇匀，室温放 1 h 至凝固，包裹保鲜膜，37 $^{\circ}$ C 培养 3 d。

挑取单个长有噬菌斑的半固体，于 400 μ L 液体 MGM 培养基中孵育，37 $^{\circ}$ C、200 r/min 振荡培养 1.5 h，4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 10 min，取上清作为病毒原液，反复挑取单个噬菌斑，重复 3 次。

1.2.4 病毒的纯化

将病毒原液以感染复数(multiplicity of infection, MOI)约为 10 加入培养至对数生长期(OD_{600} 为 0.4–0.6)的 K2 菌液中，继续培养 24 h，4 $^{\circ}$ C、8 000 r/min 离心 10 min 收取上清液。上清液中加入 6%的 PEG 6000，4 $^{\circ}$ C 搅拌 2 h 后，4 $^{\circ}$ C、8 000 r/min 离心 40 min，收取上清，补加 PEG 6000 至终浓度为 11%，同样 4 $^{\circ}$ C 搅拌 2 h 后离心(条件同上)，弃上清，沉淀用 18% SW 孵育过夜，次日重悬，1 000 r/min 离心 10 min 去不溶杂质。将获得的病毒液加入含 18% SW (pH 7.5)的 CsCl 溶液中进行密度梯度离心，溶液的浮密度为 $\rho=1.30$ g/mL (贝克曼 Optima XE-100 SW40Ti，10 $^{\circ}$ C、20 000 r/min 离心 17 h)，收集每一层的病毒液(自上向下每毫升为一层)，用 18% SW (pH 7.5)等体积稀释，10 $^{\circ}$ C、45 000 r/min 离心 2 h，在 18% SW 中 4 $^{\circ}$ C 过夜孵育后重悬，得到最终病毒液。

1.2.5 透射电镜观察

将 10 μ L 纯化后的病毒液用去离子水稀释 4 倍后迅速加到铜网上，室温吸附 5 min，用滤纸轻轻吸去多余的病毒液，1%的醋酸双氧钨染色 10 s，吸去残留的染色液。晾干后用透射电子显微镜在 100 kV 下观察病毒形态。

1.2.6 病毒基因组的提取及酶切

氯化铯密度梯度离心后的病毒样品用 OMEGA Viral Kit 按照说明书的步骤提取基因组，分别用 DNaseI、RNaseA 及限制性内切酶

37 °C 处理 30 min, 确定核酸类型, 用 EXO III、MBN 酶 30 °C 处理 30 min, NaOH 室温处理 5 min, 判断基因组的特点^[11]。

1.2.7 病毒基因组测序及分析

将提取好的基因组送武汉奥科鼎盛进行二代测序, 并对基因组注释。测序方法是将样本 DNA 随机打断为约 500 bp 的片段, 收集所需长度的 DNA 片段, 之后使用 NEB 标准建库试剂盒选择特定接头, 对该样本进行文库制备并使用 Agilent 2100 检测文库片段大小, qPCR 检测文库摩尔浓度。库检合格后使用 Illumina NovaSeq 进行 PE 2×150 测序。测序后运用 Spades 软件进行序列拼接, 注释用常规 Prokka 预测蛋白编码区 (coding sequence, CDS) 区域, 并用 eggNOG 数据库进行 HMM 算法对 CDS 注释。

1.2.8 吸附效率测定

病毒吸附测定参考之前分离多形性病毒 HHPV4 的方法^[18], 将 K2 菌株培养至 OD_{600} 为 0.7 (5×10^8 CFU/mL), 8 000 r/min 离心 10 min, 收集菌体, 重悬在新鲜的 MGM 培养基中, 10 倍体积浓缩, 用 MOI 约为 0.1 的比例加入 HRPV13 病毒液, 并在 37 °C、200 r/min 振荡培养。从感染后 (p.i) 0–4 h 取不同时间间隔的菌液, 以 1:100 的比例在冰冷的 MGM 中稀释, 4 °C、8 000 r/min 离心 10 min, 收取上清液用噬菌斑法测定病毒的滴度。根据公式计算吸附速率常数 (k)。

$$k = \frac{2.3}{B \times t} \times \lg \frac{p_0}{p}$$

其中, p_0 和 p 分别代表感染时和时段 t 后的游离病毒的效价, B 是活细胞的浓度。

1.2.9 病毒的生长特性

将 50 mL 的 K2 菌液培养至 OD_{600} 为 0.7 (5×10^8 CFU/mL), 以 MOI 为 10 的 HRPV13 病毒感染细胞, 感染后从培养物上清液中测量游

离后代病毒的数量。侵染 2 h 后, 8 000 r/min 离心 15 min 收集菌体, 将细胞洗涤 2 次, 洗去未吸附的病毒, 将细胞重新悬浮到原始体积的新鲜 MGM 中。每隔 1 h 取菌液, 通过噬菌斑测定游离病毒的滴度, 稀释涂布平板统计活菌数, 同时监测感染和未感染组培养物的 OD_{600} 值。

1.2.10 病毒的稳定性

病毒对氯仿敏感性的测定: 将氯仿和非离子去污剂 Triton X-100 与病毒液分别以体积比 1:5 和 1:1 000 混合均匀后 22 °C 处理 15 min, 用噬菌斑法测定病毒的效价。

病毒对温度敏感性的测定: 将病毒原液 (500 μ L) 分别在 4–60 °C 不同温度梯度下孵育 30 min, 测定其效价。

病毒对 NaCl 敏感性的测定: 分别配制含 0%–30% (质量体积分数) NaCl 的 18% SW 的缓冲液, 将病毒液按照 1:1 000 的比例加入, 混匀后于 4 °C 分别放置 3 h 和 24 h, 测定效价。

对病毒所需盐离子成分敏感性的测定: 将病毒液与缺少某一种或两种离子的 18% SW 的缓冲液按照 1:1 000 的比例加入, 混匀后于 4 °C 分别放置 3 h 和 24 h, 测定效价。

测定 HRPV13 对 pH 的敏感性: 以未加 Tris-HCl 的 18% SW 为基础缓冲液, 分别配制含 61 mmol/L 的磷酸二氢钾 (pH 调至 4.0 和 5.0)、61 mmol/L 的 bis-Tris (pH 调至 6.0 和 7.0) 和 61 mmol/L 的 Tris (pH 调至 8.0 和 9.0) 的缓冲液, 将病毒液按照 1:1000 的比例加入, 混匀后 4 °C 分别放置 3 h 和 24 h, 测定效价。

以上实验均做 3 次重复。

1.2.11 病毒的宿主范围

将实验室已有的菌株和从翡翠湖中分离的菌株在 37 °C、200 r/min 摇床培养至 OD_{600} 为 0.4–0.6 后倒双层平板, 取 2 μ L 的 HRPV13 病毒液滴在对应的双层平板上, 37 °C 培养, 若

产生噬菌斑, 则该菌株为 HRPV13 的敏感菌。

1.2.12 病毒的蛋白和脂质分析

取适量经超速离心处理的病毒样品, 加 10% 三氯乙酸(trichloroacetic acid, TCA)后吹吸混匀, 冰上沉淀 30 min, 4 °C、12 000 r/min 离心 30 min。倒去上清后吸干残余液体, 烘干。加 500 μL 预冷的丙酮充分吹吸重悬至溶液变均匀, 4 °C、12 000 r/min 离心 30 min。倒尽上清, 37 °C 放置 10 min, 至底部呈干粉状。加适量 1×SDS 上样 buffer (50 μL)充分重悬粉末后, 用 NaOH 调节至蓝色, 95 °C 金属浴 10 min。用含有 15% (质量体积分数) 丙烯酰胺的分离胶进行聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE), 通过考马斯亮蓝 R250 染色观察蛋白质。为了检测 SDS-PAGE 凝胶中的脂质, 用苏丹黑 B 对凝胶进行染色和脱色。

1.2.13 病毒的质谱鉴定

将病毒颗粒用 TCA 法制成的蛋白样进行电

泳, 预染 Marker 最大的条带跑进分离胶 1 mm 时停止跑胶, 此时浓缩胶与分离胶分界线距 Marker 下沿约 0.5 cm, 将此区域的全部蛋白胶切下, 送四级杆轨道阱高分辨质谱仪(Thermo Fisher, Q Exactive HF)对 HRPV13 的全蛋白进行定性定量检测。

2 结果与分析

2.1 从翡翠湖分离嗜盐古菌

将从翡翠湖分离的嗜盐古菌进行菌落 PCR 并测序, 测序结果在 BLASTn 上比对后显示这些古菌都是 *Halorubrum*, 但它们的 16S rRNA 基因序列并不完全相同, 一致性为 99.22%–99.57%, 说明它们之间应该是属于同种不同株的关系。基于最终所筛病毒 K2 菌株的 16S rRNA 基因序列进行发育树构建, 并将其序列上传至 GenBank, 登录号是 ON287093。系统发育树结果(图 1)显示, 其与 *Halorubrum yunnanense* strain Q85 和 Q86^[19]

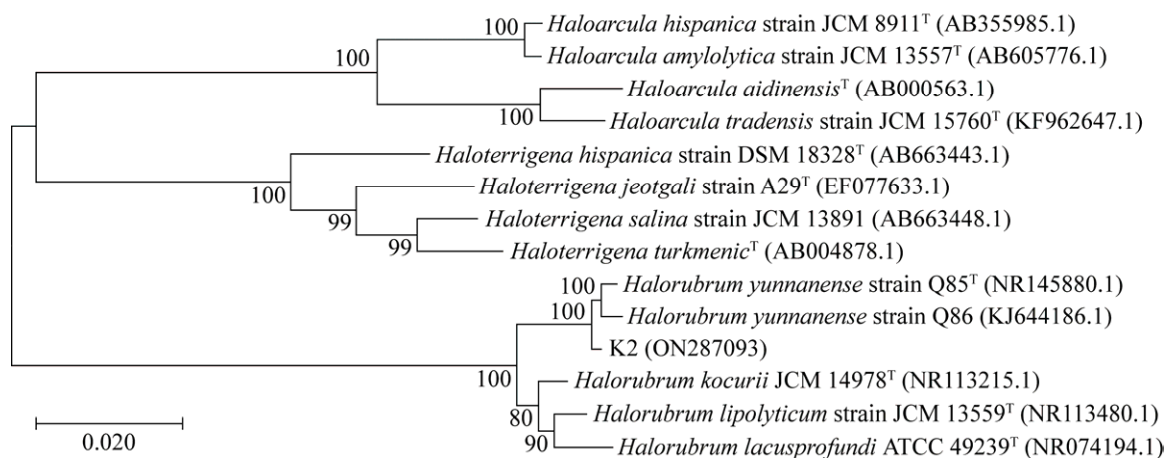


图 1 嗜盐古菌 K2 与相近种的系统发育树 用分子进化遗传分析软件(MEGA 7.0)绘制菌株的进化树, 用邻接法(neighbor-joining method)构树并设置 bootstrap 为 1 000, 分支上面的数字表示 1 000 次重复的引导支持值, 标尺表示遗传距离, 括号中的序号是每个菌的 GenBank 序列号

Figure 1 Phylogenetic tree of halophilic archaea K2 and related species. The phylogenetic tree was constructed by neighbor-joining method and bootstrap was set to 1 000, the number on the branch was the leading support value of 1 000 replications, and the scale was the genetic distance. The serial number in parentheses is the GenBank serial number of each archaea.

最相似。*Halorubrum* sp. K2 菌株已送至中国典型培养物保藏中心保存, 编号是 CCTCC AB 2021151。

2.2 病毒的分离结果

以上述分离的菌株为宿主, 与翡翠湖盐水浓缩样品共孵育后倒双层平板进行病毒筛选, 结果在以 *Halorubrum* sp. K2 为宿主的双层平板上分离到一种浊斑病毒, 命名为 S2, 经过后续实验鉴定后, 该病毒被命名为 HRPV13。该噬菌斑形态为圆形, 浊斑, 倒双层平板后 36 h 可观察到噬菌斑, 48 h 后, 噬菌斑直径最大可达 7–8 mm (图 2)。HRPV13 病毒原液的效价约为 10^{11} PFU/mL, 在 4 °C 保存数月后效价基本不变。

2.3 病毒的纯化和形态观察结果

通过对 HRPV13 病毒进行 CsCl 密度梯度离心, 并从上向下每取 1 mL 为一层, 可在第 3 层观察到明显的光散射带(图 3A), 测量每一层病毒液的浮密度和效价, 由图 3B 可知, 目的层所

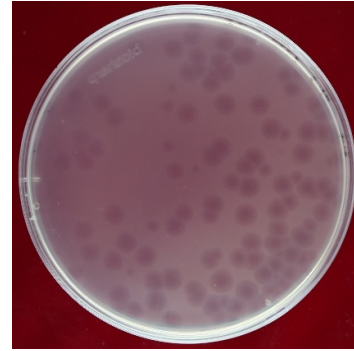


图 2 *Halorubrum* sp. K2 双层平板上 HRPV13 病毒的噬菌斑形态

Figure 2 Morphology of the plaques produced by HRPV13 on *Halorubrum* sp. K2 lawn.

处的浮密度约为 1.26 g/mL, 该层对应的效价最高, 约为 1.5×10^{12} PFU/mL。

透射电镜观察纯化后的 HRPV13 病毒颗粒, 如图 3C 所示, 病毒为近似球状的多形性病毒, 直径约为 60 nm。

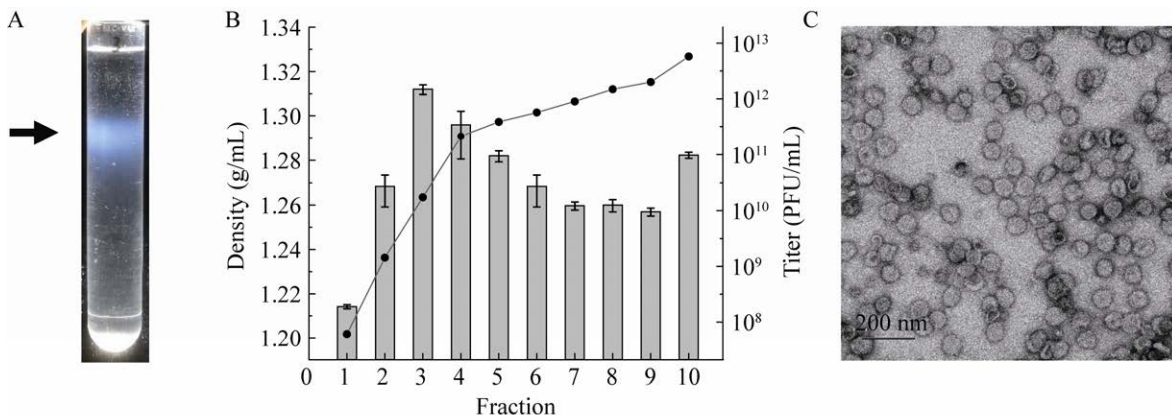


图 3 HRPV13 病毒的纯化及电镜观察结果 A: PEG 6000 沉淀浓缩后的 HRPV13 病毒液进行 CsCl (1.3 g/mL) 密度梯度离心后形成的光散射带(箭头所示); B: 横坐标为 CsCl 密度梯度离心后从上到下每次取 1 mL 病毒液的层数, 线形图表示每一层的浮密度, 条形图表示每层病毒液对应的效价; C: TEM 观察 1% 醋酸双氧铀负染后 HRPV13 的形态

Figure 3 Purification and electron microscope observation of HRPV13 virus. A: Light scattering band formed after PEG 6000 precipitation of concentrated HRPV13 virion by CsCl (1.3 g/mL) density gradient centrifugation (shown by arrow); B: The horizontal axis is the number of layers of 1 mL of viral solution taken from top to bottom each time after centrifugation of the CsCl density gradient, the line graph indicates the density of each layer, and the bar graph indicates the titer corresponding to each layer of virus; C: TEM observation of HRPV13 after negative staining with 1% uranyl acetate.

2.4 病毒的基因组测序及分析

将提取到的 HRPV13 基因组用不同的核酸酶及限制性内切酶处理, 发现其对 DNaseI 和限制性内切酶敏感, 对 RNaseA 不敏感(图 4A), 说明基因组是双链 DNA。图 4A 中, RNaseA 处理后条带比未处理组大, 其原因是 RNaseA 使用的浓度为 5 $\mu\text{g}/\mu\text{g-DNA}$, 酶浓度略高, 可能与基因组有结合, 造成条带凝胶迁移率改变, 从而导致比未处理组条带偏大。EXO III 可作用于双链 DNA 的平末端或 3'凹陷末端, 具有 3'→5'外切酶活性, HRPV13 基因组可被 EXO III 消化, 说明基因组上存在单链缺刻部分, 同时, 基因组还可以被绿豆核酸酶(mung bean nuclease, MBN)和 NaOH 消化成不同条带(图 4C), 也说明其基因组上有单链部分, 这种情况在多样性

病毒属的其他病毒中也存在。图 4 中未处理的病毒基因组出现多条电泳带, 其原因很可能存在缺刻的双链环状 DNA 在纯化过程中产生了不同形态的 DNA, 如超螺旋、单链缺刻和双链缺刻等。根据文献报道, 多形性病毒 HRPV3^[13] 和 SNJ2^[11] 的基因组单链部分与一段“GCCCA”的基序有关, 测序后同样可在 HRPV13 基因组中找到这个基序, 数目为 12 个。当然, 目前并不确定该基序是否在 HRPV13 病毒中也发挥功能。

病毒全基因组测序结果显示, HRPV13 的基因组是 9 333 bp 的双链环状 DNA, 含有 15 个开放阅读框(open reading frame, ORF), 其相关信息整理成表 1。根据基因组的酶切位点, 用不同的限制性内切酶处理, *EcoR* I (1 个位点)、

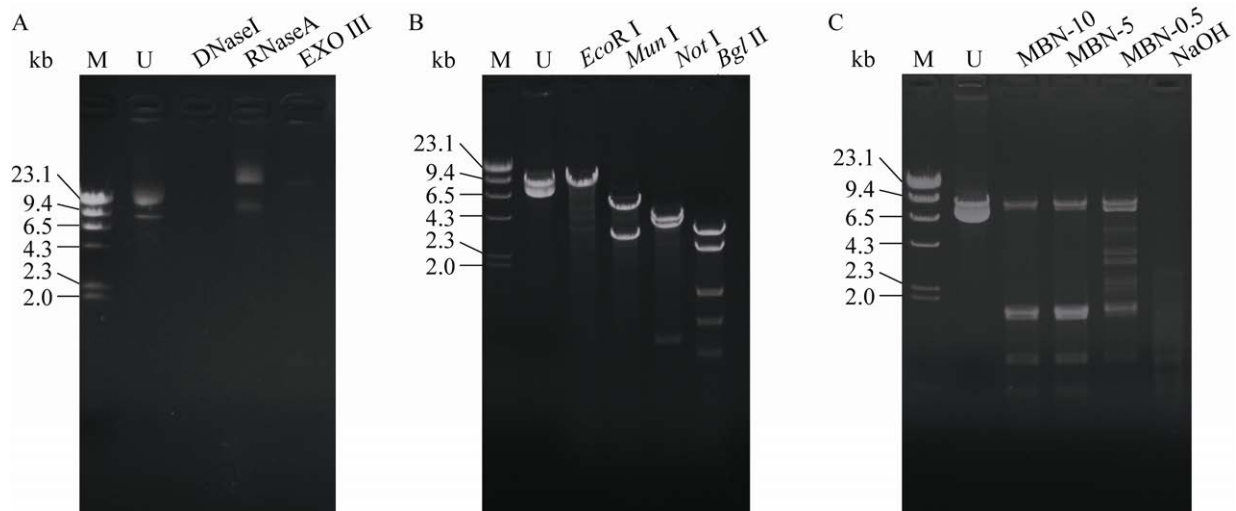


图 4 HRPV13 基因组用不同酶消化处理的结果 A: 分别用 DNaseI (终浓度为 1 U/ $\mu\text{g-DNA}$)、RNaseA (终浓度为 5 $\mu\text{g}/\mu\text{g-DNA}$)、EXO III (终浓度为 10 U/ $\mu\text{g-DNA}$) 消化 HRPV13 基因组; B: 用不同种类的限制性内切酶处理 HRPV13 基因组; C: 用不同浓度的 MBN (10、5 和 0.5 U/ $\mu\text{g-DNA}$) 和 NaOH (终浓度为 0.1 mmol/L) 处理 HRPV13 基因组。M: λ -Hind III DNA 单切 marker; U: 未处理的基因组

Figure 4 The HRPV13 genome was digested with different enzymes. A: HRPV13 genome was digested with DNaseI (final concentration of 1 U/ $\mu\text{g-DNA}$), RNaseA (final concentration of 5 $\mu\text{g}/\mu\text{g-DNA}$), and EXO III (final concentration of 10 U/ $\mu\text{g-DNA}$), respectively; B: HRPV13 genome was treated with different kinds of restriction enzymes; C: HRPV13 genome was treated with different concentrations of MBN (10 U/ $\mu\text{g-DNA}$, 5 U/ $\mu\text{g-DNA}$ and 0.5 U/ $\mu\text{g-DNA}$) and NaOH (0.1 mmol/L). M: The λ -Hind III DNA single cleavage marker; U: The untreated genome.

表 1 HRPV13 预测的 ORF 和功能

Table 1 HRPV13 predicted ORFs and functions

ORF	Direction ^a	ORF coordinates (nt)	GC ^b (%)	ORF product	Length, aa res. (MW, kDa ^c)	Calc. pI ^d	Predicted function
ORF1	F	37–435	59.1	Putative protein 1	132/13.8	3.08	Internal membrane protein
ORF2	F	432–689	56.6	Putative protein 2	85/8.7	3.30	–
ORF3	F	689–1 234	60.3	Putative protein 3	181/18.2	3.67	–
ORF4	F	1 281–3 032	54.7	Putative protein 4	583/61.8	4.05	Spike protein
ORF5	F	3 040–3 618	58.0	Putative protein 5	192/21.0	5.16	–
ORF6	F	3 618–4 397	60.4	Putative protein 6	259/29.1	4.53	–
ORF7	F	4 397–5 509	58.4	Putative protein 7	370/40.2	4.58	NTPase
ORF8	F	5 502–5 675	56.3	Putative protein 8	57/6.1	7.94	–
ORF9	F	5 672–6 070	55.9	Putative protein 9	132/14.9	6.83	–
ORF10	R	6 073–6 318	53.7	Putative protein 10	81/9.3	9.89	–
ORF11	R	6 681–8 300	56.4	Putative protein 11	539/60.3	5.16	–
ORF12	R	8 297–8 596	64.7	Putative protein 12	99/9.9	5.00	–
ORF13	R	8 593–8 727	57.8	Putative protein 13	44/5.3	4.69	–
ORF14	R	8 724–8 855	59.8	Putative protein 14	43/5.0	4.29	–
ORF15	R	9 055–9 297	46.9	Putative protein 15	80/9.1	4.41	–

注: 保守的 ORF 加粗表示; –: 未能预测到功能; ^a: 序列方向: F 为正向, R 为反向; ^b: G+C 的含量; ^c: 蛋白质序列氨基酸残基长度和预测分子量; ^d: 计算的等电点

Note: Conservative ORFs are indicated in bold; –: The function was not predicted; ^a: Sequence direction: F: Forward, R: Reverse; ^b: Guanine (G) and cytosine (C) content; ^c: Protein length in amino acid residues and calculated molecular weight; ^d: Calculated isoelectric point.

Mun I (2 个位点)、*Not* I (3 个位点)和 *Bgl* II (5 个位点)酶切后分别得到 1、2、3 和 5 个条带, 再次验证了 HRPV13 的基因组是环状的(图 4B)。将基因组在 NCBI 上用 BLASTn 比较, 发现 HRPV13 与已发现的多形性病毒 HRPV11、HRPV12 和 HRPV10 最相似, 序列一致性分别是 76.52%、76.48%和 76.57%, 关于病毒分类目前尚无统一的标准, 但最近刚提出的应用于病毒分类的基因组关系(genome relationship applied to virus taxonomy, GRAViTy)^[20]采用的是病毒之间 composite generalized Jaccard (CGJ) 距离的算法, 主要是基于病毒基因之间的同源性检测和基因组组织特征(基因顺序和方向)的相似性。根据 Demina 等提议的 GRAViTy 分析时核苷酸序列同一性 $\leq 95\%$ 作为划分病毒

属中新物种的标准^[8], HRPV13 应该与这 3 个病毒同属但不同种。因此, 基于 HRPV13 病毒的形态和基因组分析结果, 可以确定其为 β 多形包膜病毒属的一个病毒新种, 我们将其命名为 Betapleolipovirus HRPV13 (*Halorubrum pleomorphic virus* 13), 在 NCBI 上的序列号是 OM747534。

与已知多形性病毒科的病毒一样, HRPV13 含有 5 个核心保守 ORF (表 1 粗体的 ORF), 此外还含有 β 属特有的 2 个 ORF (ORF9 和 ORF11)^[13,21-22]。其基因线性排布与已知多形性病毒一致。如图 5 所示, HRPV13 的核心蛋白与 HRPV11、HRPV12 和 HRPV10 的相似度很高, 序列一致性大部分都在 65%以上, 除了 ORF4 的一致性在 20%左右, 其与 HRPV9 的 ORF14 的序列一致性最高, 达 48.6%, 即使

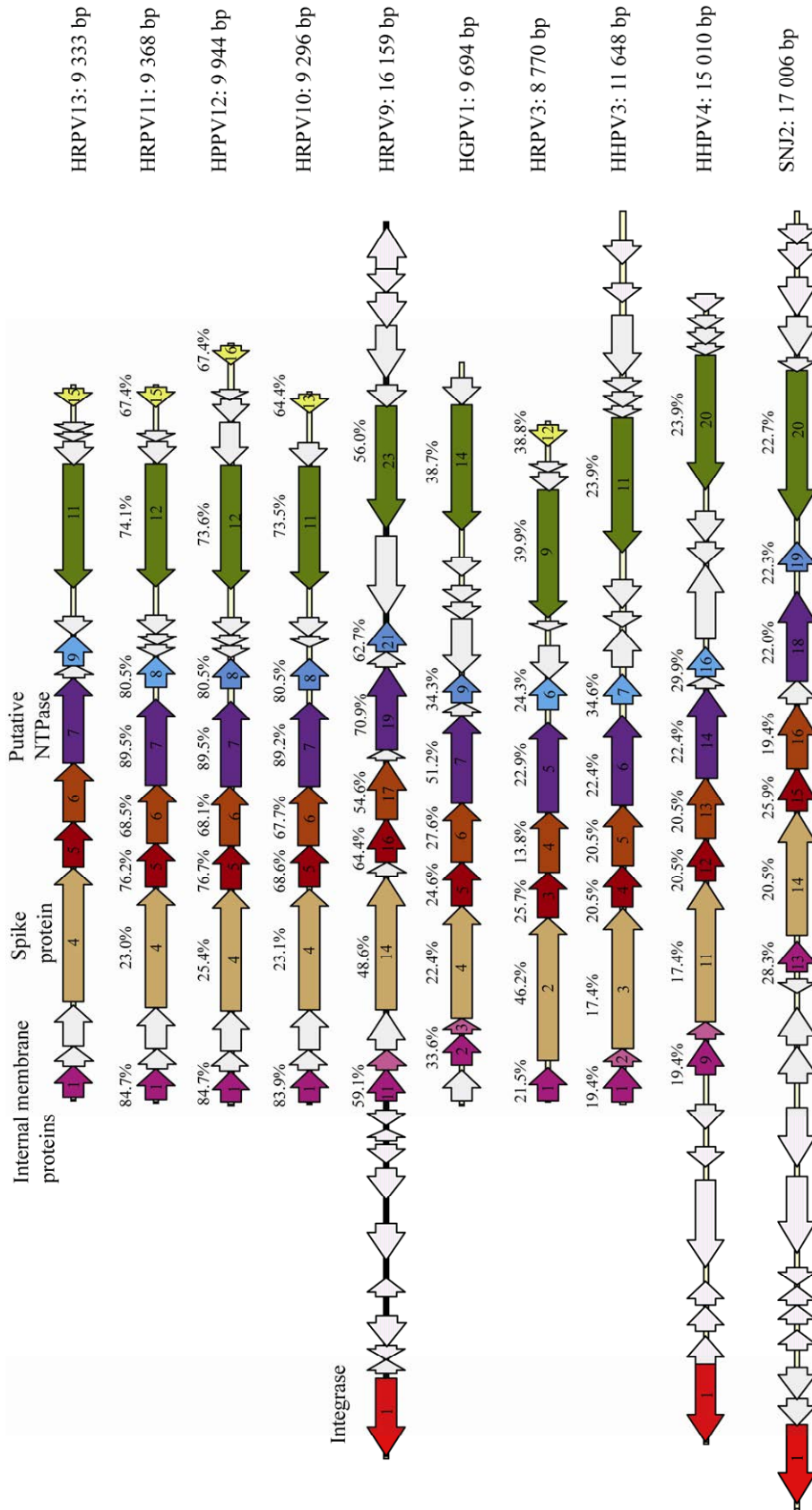


图 5 HRPV13与其他β多形包膜病毒基因组比较 同源的基因用相同的颜色表示。HRPV13的各ORF与其他β属多形性病毒对应的ORF用EMBOSS Needle进行氨基酸比对得到的相似度标在对应的位置上

Figure 5 Genome comparison of HRPV13 with other Betapleolipoviruses. Homologous genes are indicated with the same color. The similarity between each ORF of HRPV13 and the ORFs corresponding to other Betapleolipoviruses was marked on the corresponding positions by the amino acid alignment obtained by EMBOSS Needle.

HRPV11、HRPV12 和 HRPV10 之间的相似度达 90% 以上, 它们之间的 ORF4 差别也很大, 可能由于该区域编码的是假定的受体结合刺突蛋白, 其高变性被认为与宿主识别和病毒进入有关^[23]。

相较于 HRPV11 和 HRPV12, HRPV13 多了 2 个较小的 ORF, 分别是 ORF8 和 ORF14, BLASTn 结果未比对到相似蛋白。虽然 HRPV11 和 HRPV12 无此 2 个 ORF, 但是 2 个病毒的 ORF7 和 ORF8 之间以及 HRPV11 的 ORF14 到 ORF15 之间和 HRPV12 的 ORF15 到 ORF16 之间都有一段间隔, 与 HRPV13 的 2 个 ORF 序列一致性在 85% 以上, 说明这些病毒可能是从共同祖先分化而来, HRPV11 和 HRPV12 的 2 个 ORF 在进化的过程中逐渐丢失, 而在 HRPV13 中保存了下来。同样地, HRPV11 和 HRPV12 共有的 ORF9 和 ORF10 在 HRPV13 中未找到对应的 ORF, 说明这些多形性病毒可能存在共同祖先。由于地理位置的不同, 所处环境发生变化, 病毒在不同的环境中向着不同的方向进化, 致使基因间的差异性越来越大, 但是其重要的结构蛋白却很保守。

将 HRPV13 的序列与多形性病毒 3 个属的基因组进行 BLAST 的全基因组比对, 在 VICTOR (<http://ggdc.dsmz.de/victor.php>) 的基因组 BLAST 距离与系统发育(genome BLAST distance phylogeny, GBDP)上构建进化树, 在核酸和氨基酸水平上都是 74% 的平均支持率。图 6A 和 6B 均有 2 个主要的分支, 分别来自多形性病毒科的 3 个属。与预期一致, HRPV13 与 HRPV11、HRPV12 和 HRPV10 在同一个分支, 与 Betapleolipovirus 属聚集在一起。

2.5 病毒的繁殖特性

当 MOI 值为 0.1 时, K2 对 HRPV13 的吸附作用快速且高效, 侵染 2 h 后吸附效率最高可达 82.8% (图 7A), 前 30 min 吸附速率最快,

由方法 1.2.8 中公式计算, 前 30 min 内 K2 菌对病毒的吸附速率可达 7.83×10^{-12} mL/min。

当病毒以 MOI 值为 10 侵染 K2 时, 10 h 左右效价基本稳定在 10^{11} PFU/mL, 感染组的 OD_{600} 值开始明显低于未感染组(图 7B)。同时, 相较于未感染组, 感染组的活细胞数目较低, 而未感染组的活菌数目均在 10^8 CFU/mL 以上(图 7C)。这些结果说明 HRPV13 在侵染 K2 菌株时其生长有所延迟, 并未造成菌的大量死亡。

2.6 HRPV13 病毒的稳定性

为了测定病毒的稳定性, 将病毒分别放在不同温度、pH、盐离子浓度及种类的缓冲液中处理, 并测定其效价。如图 8A 所示, 温度为 4–50 °C 时, HRPV13 的效价保持在相对稳定的状态, 温度为 55 °C 时效价下降 2 个数量级, 而 60 °C 处理 30 min 后病毒全部失活, 说明病毒不耐受 55 °C 以上的高温。

用不同浓度的 NaCl 的 SW 缓冲液处理病毒时, HRPV13 不仅可一定程度上耐受低盐离子浓度, 而且对几乎饱和的盐溶液也保持很高的侵染能力(图 8B), 这与 HGPV1 和 HRPV3 所表现出可耐受较低的盐度是一致的^[22]。然而, 同属于 Betapleolipovirus 的 HHPV3 和 HHPV4 需要超过 3 mol/L 的 NaCl 才能稳定存在^[18]。如图 8C 所示, 在用不同种类盐离子处理时, HRPV13 仍保持稳定的侵染能力。在 pH 4.0 时其侵染能力明显下降, 而 pH 5.0 及以上时病毒侵染力几乎不受影响(图 8D)。

2.7 HRPV13 的宿主范围

选取 18 株分别来自 *Halorubrum*、*Haloarcula*、*Natrinema* 和 *Haloterrigena* 属的嗜盐古菌进行病毒敏感性实验(表 2), 其中仅有部分 *Halorubrum* 属的菌株可以被 HRPV13 侵染。HRPV13 可以侵染与其从同一地方分离的 *Halorubrum* 属古菌 K2、K12、K4 和 K9, 但不

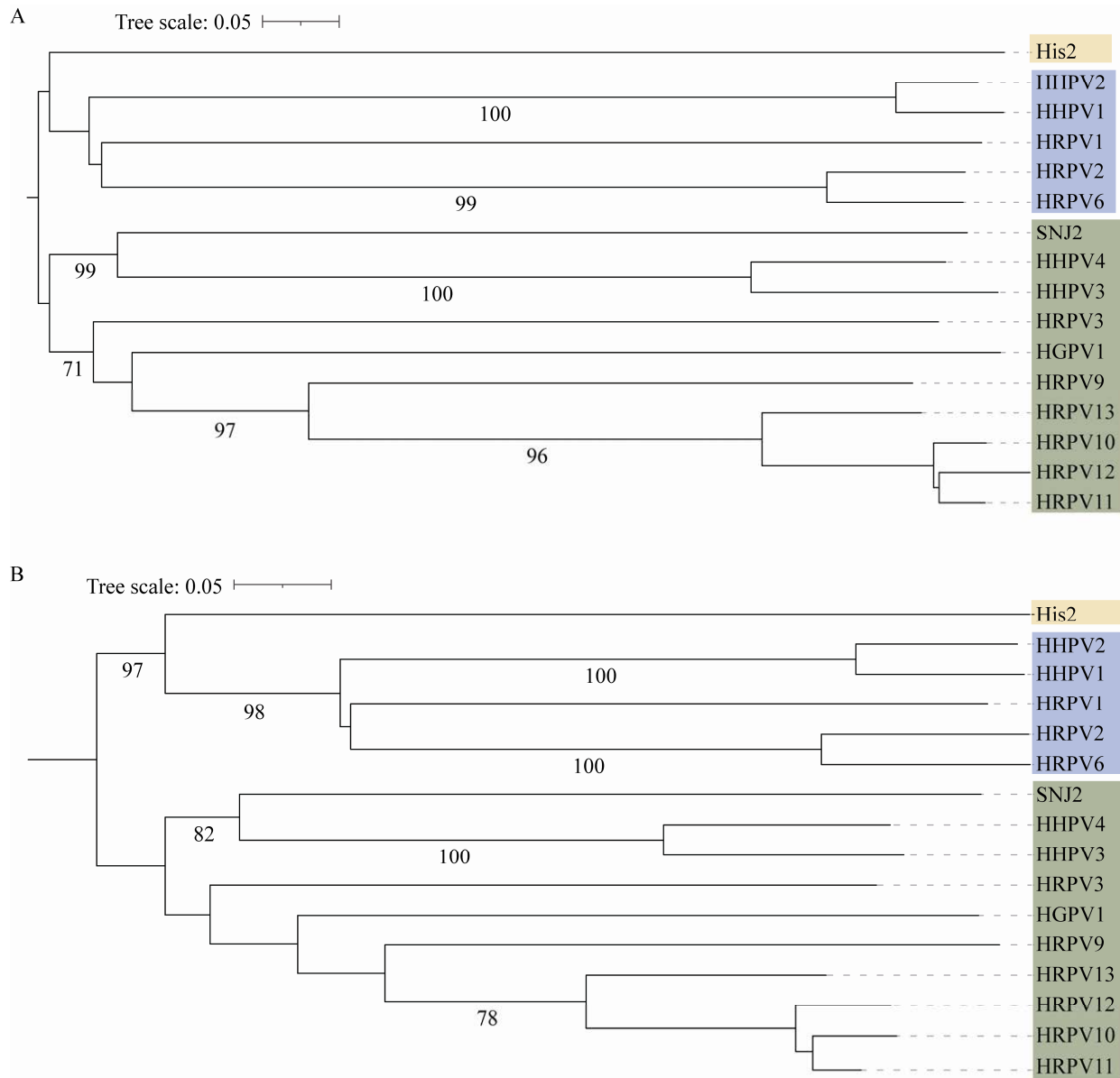


图 6 HRPV13 和多形性病毒科病毒 GBDP 进化树构建 在核酸水平(A)和氨基酸水平(B)用 GBDP 构建的进化树, 以上的 GBDP 的假定 bootstrap 均为 100 次。图 A 和 B 用的 GBDP 距离公式分别是 D0 和 D6^[24]。当前属于(或拟属于)多形病毒科同一属的病毒用相同的颜色标记, 蓝色区域代表 α 多形包膜病毒, 绿色区域代表 β 多形包膜病毒, 黄色区域表示代表 γ 多形包膜病毒

Figure 6 Phylogenomic GBDP trees for HRPV13 and other pleolipoviruses. The phylogenetic tree constructed with GBDP at the nucleic acid level (A) and amino acid level (B), the assumed bootstrap of GBDP above is 100 times. The GBDP distance formulas used in A and B are D0 and D6, respectively. Viruses currently belonging (or are proposed to belong) to the same genus of the Polyplipoviridae family are marked with the same color. The blue regions represent Alphapleolipovirus, the green regions represent Betapleolipovirus, and the yellow regions represent Gammapleolipovirus.

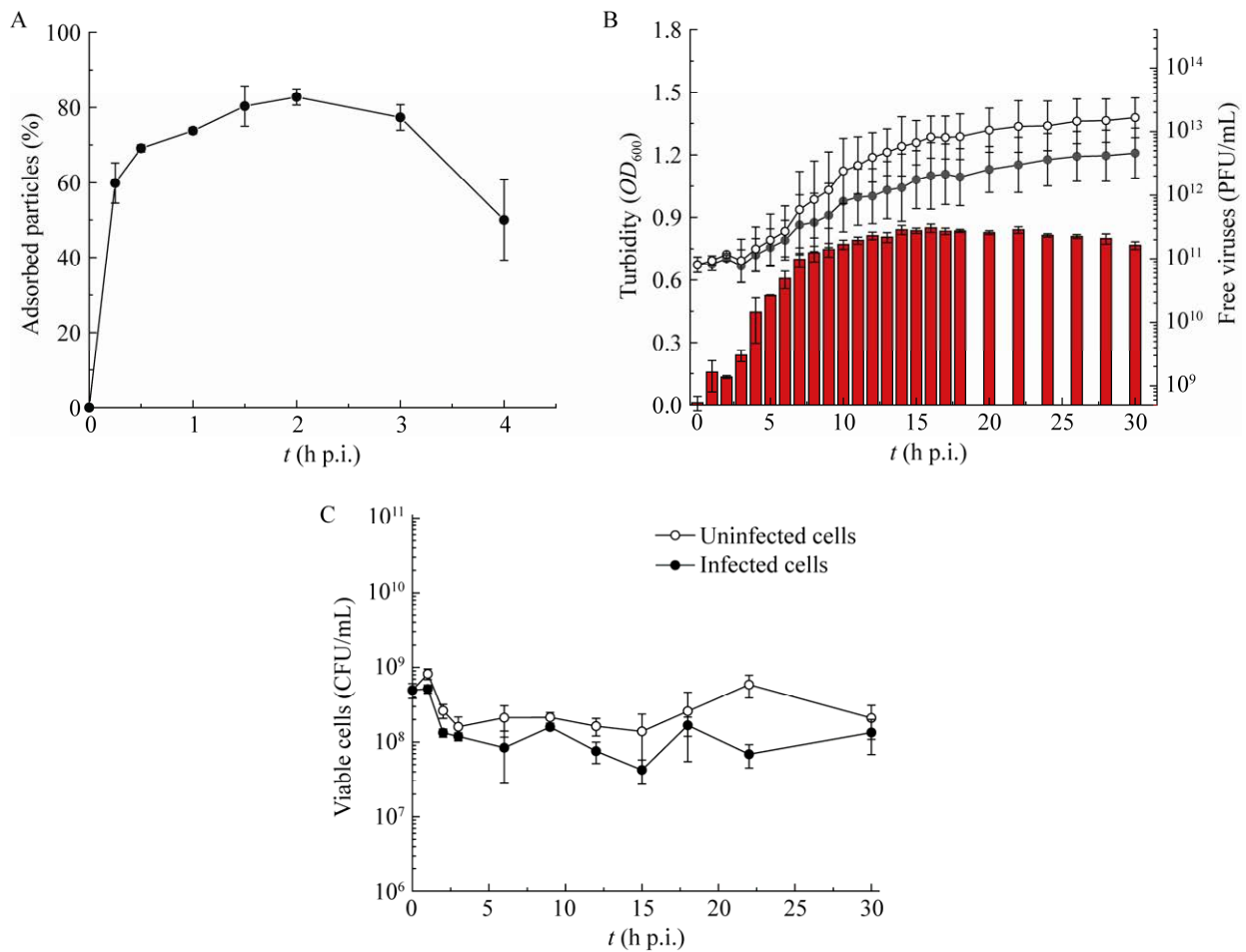


图 7 HRPV13 的吸附和繁殖特性 A: 37 °C 时 *Halorubrum* sp. K2 对 HRPV13 的吸附率; B: 感染 (实心圆圈) 和未感染 (空心圆圈) *Halorubrum* sp. K2 培养物的 OD_{600} 值, 红色条形图表示感染后不同时间采集的培养物的游离病毒的效价; C: 侵染 (实心圆圈) 和未侵染 (空心圆圈) 病毒的活菌计数。A–C 中误差线代表标准偏差 ($n=3$)

Figure 7 Adsorption and life characteristics of HRPV13. A: The adsorption rate of HRPV13 by *Halorubrum* sp. K2 at 37 °C; B: Turbidity of infected (closed circles) and uninfected (open circles) *Halorubrum* sp. K2 cultures; The red bars indicate the potency of the free virus in cultures collected at different times after infection; C: Viable counts of infected virus (filled circles) and uninfected (open circles). Error bars represent one standard deviation in A, B and C ($n=3$).

能侵染 K1, 同时也不能侵染从其他地区分离的 *Halorubrum* 属的菌株, 说明 HRPV13 的宿主范围较窄。

2.8 HRPV13 病毒的蛋白和脂质成分

如图 9A 所示, HRPV13 病毒主要有 2 个条带, 可能是其结构蛋白。由于未将每个条带对应

的蛋白进行质谱检测, 而是将所有蛋白一起进行质谱检测, 并且预测的蛋白分子量均在 100 kDa 以下, 说明迁移率与分子量的关系与理论计算出来的不完全吻合。用苏丹黑 B 染色结果说明该病毒含脂质成分 (图 9B), 用氯仿处理后病毒效价降低 5 个数量级 (结果未展示), 说明 HRPV13

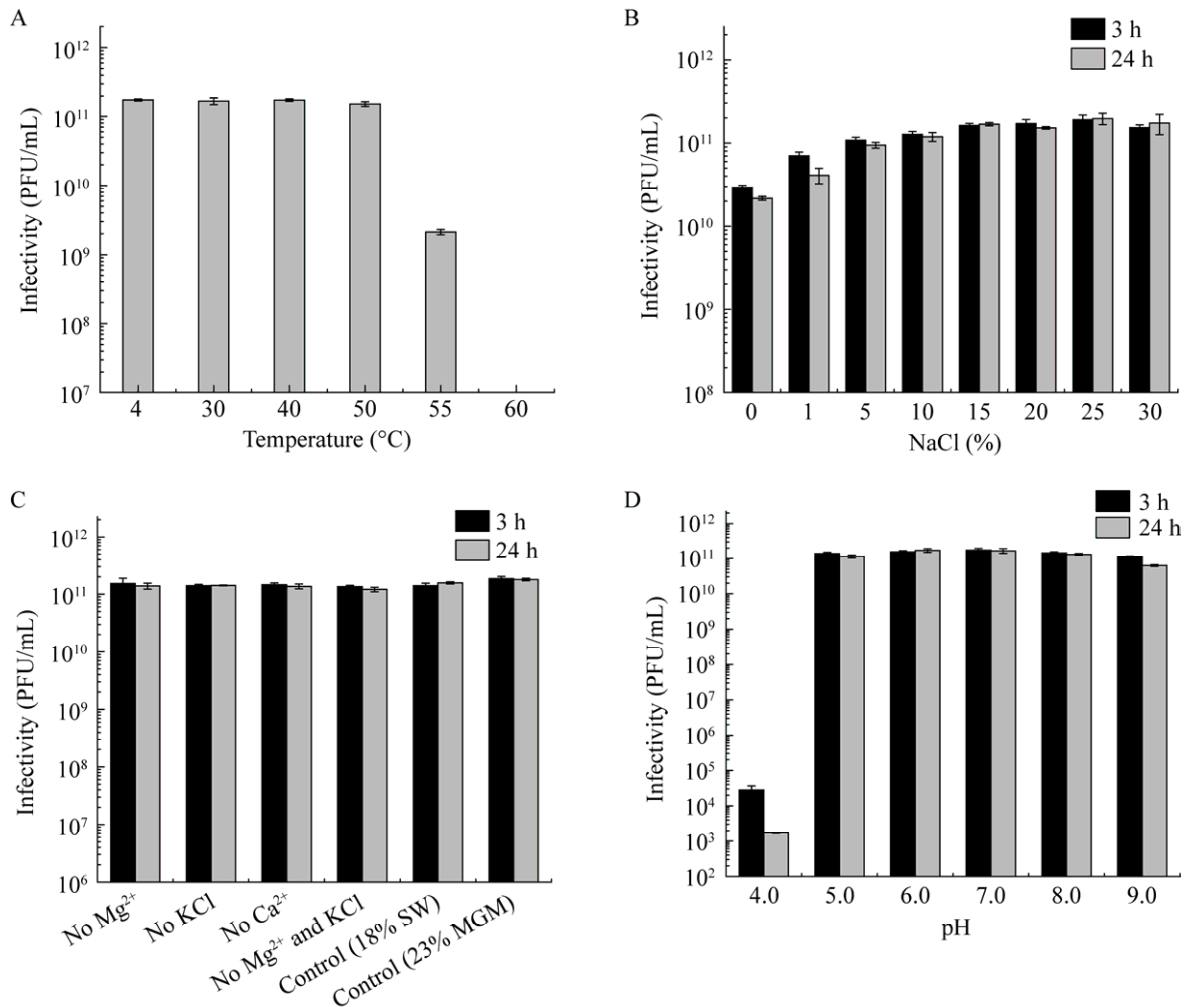


图 8 HRPV13 在不同条件处理时的稳定性 A: HRPV13 在不同温度处理时的效价; B: HRPV13 用不同浓度 NaCl 处理 3 h 和 24 h 的效价; C: HRPV13 在缺少一种或两种盐离子时处理 3 h 和 24 h 的效价; D: HRPV13 在不同 pH 时处理 3 h 和 24 h 的效价。误差线代表标准偏差($n=3$)

Figure 8 Stability of HRPV13 under different conditions. A: The titer of HRPV13 when treated at different temperatures; B: The titers of HRPV13 treated with different concentrations of NaCl for 3 h and 24 h; C: The titers of HRPV13 in the absence of one or both salt ions for 3 h and 24 h; D: The titers of HRPV13 treated at different pH for 3 h and 24 h. Error bars represent one standard deviation ($n=3$).

病毒确实对氯仿非常敏感。用 Triton X-100 处理后, 病毒侵染能力几乎完全丧失。这些结果都说明 HRPV13 病毒含有脂质成分。

2.9 HRPV13 病毒的质谱分析结果

通过质谱检测, HRPV13 的蛋白胶中共检测到 7 种蛋白的多肽, 其中 2 个(ORF11, ORF15)

可信度较低(表中未显示), 其余 5 种检测结果见表 3。检测到覆盖率和肽段数目最多的是 ORF4, 预测为病毒的刺突蛋白(spike protein), 也是多形性病毒结构蛋白的一种。然而另一种保守的内膜蛋白(ORF1)却未检测到, 但基因组预测存在该蛋白。

表 2 HRPV13 的宿主范围

Table 2 Host range of HRPV13

Strains	Source	Form phage plaques
<i>Halorubrum</i> sp. K2	青海省翡翠湖分离 Isolated from Feicui Lake in Qinghai province, China	+
<i>Halorubrum</i> sp. K12	青海省翡翠湖分离 Isolated from Feicui Lake in Qinghai province, China	+
<i>Halorubrum</i> sp. K4	青海省翡翠湖分离 Isolated from Feicui Lake in Qinghai province, China	+
<i>Halorubrum</i> sp. K9	青海省翡翠湖分离 Isolated from Feicui Lake in Qinghai province, China	+
<i>Halorubrum</i> sp. K1	青海省翡翠湖分离 Isolated from Feicui Lake in Qinghai province, China	-
<i>Halorubrum</i> sp. N6	青海省东台吉乃尔湖分离 Isolated from Jiner Lake in Dongtai, Qinghai province, China	-
<i>Halorubrum</i> sp. N8	青海省东台吉乃尔湖分离 Isolated from Jiner Lake in Dongtai, Qinghai province, China	-
<i>Halorubrum</i> sp. N12	青海省东台吉乃尔湖分离 Isolated from Jiner Lake in Dongtai, Qinghai province, China	-
<i>Haloarcula</i> sp. B18	青海省东台吉乃尔湖分离 Isolated from Jiner Lake in Dongtai, Qinghai province, China	-
<i>Haloarcula</i> sp. B42	青海省东台吉乃尔湖分离 Isolated from Jiner Lake in Dongtai, Qinghai province, China	-
<i>Halorubrum</i> sp. B38	青海省东台吉乃尔湖分离 Isolated from Jiner Lake in Dongtai, Qinghai province, China	-
<i>Haloarcula hispanica</i>	本实验室保存 Our laboratory	-
<i>Halorubrum</i> AB 209310 ^T	CCTCC	-
<i>Natrinema</i> sp. CJ7	本实验室保存 ^[25] Our laboratory ^[25]	-
<i>Natrinema gari</i> JCM 14663	崔恒林老师惠赠 ^[26] From CUI Henglin ^[26]	-
<i>Haloterrigena jeotgali</i> A29	陈实老师惠赠 ^[27] From CHEN Shi ^[27]	-
<i>Haloterrigena sacchareritans</i> CGMCC 1.3730	CGMCC ^[28]	-
<i>Haloterrigena thermotolerans</i> CGMCC 1.5399	CGMCC ^[29]	-

注: +: HRPV13 可以形成噬菌斑; -: 不能形成噬菌斑

Note: +: HRPV13 can form plaques; -: It cannot form plaques.

3 讨论与结论

古菌病毒是一些比较特殊并且了解比较少的类群, 其研究目前还处于一个早期阶段, 尽管如此, 目前已发现的古菌病毒形态却十分丰富。这些病毒颗粒形态的独特性与基因组的独特性是一致的, 约 75% 的基因编码独特的蛋白质, 很难通过序列分析来研究蛋白功能^[6]。因此, 古菌病毒基因组仍然是未知基因的丰富来源, 在研究

生态系统的角色、病毒-宿主相互作用、病毒的进化及与其他两域为宿主的病毒间关系等方面具有潜在价值^[30]。

多形性包膜病毒是近年来发现较多的嗜盐古菌病毒。多形性包膜病毒科和 Plasmaviridae 科的病毒是截至目前唯一已知的在结构上具有类似于细胞膜泡的病毒, 都是由 3 个生命域(细菌、古菌、真核生物)的成员共同组成的^[18]。本研究从青海省翡翠湖中分离得到一株新的多形

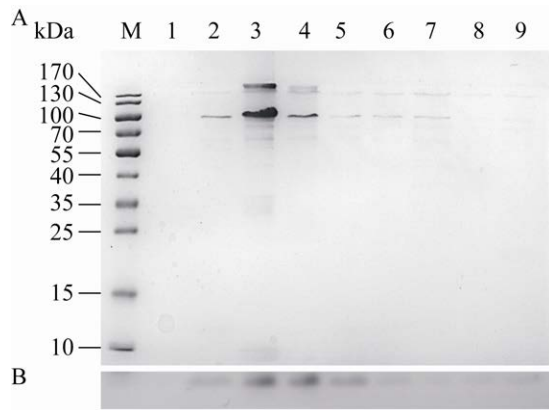


图 9 HRPV13 病毒蛋白及脂质成分 A: 病毒蛋白用考马斯亮蓝染色的 SDS-PAGE 图, 1-9 表示 CsCl 密度梯度离心后从上往下每 1 mL 为一层取的样, 其中 3 为目的层; B: 苏丹黑 B 检测病毒脂质成分, 位于 10 kDa 条带下方。M: 蛋白 marker

Figure 9 HRPV13 viral protein and lipid components. A: SDS-PAGE of viral proteins stained with Coomassie brilliant blue, line 1-9 represent samples taken from top to bottom after CsCl density gradient centrifugation as one layer per 1 mL, of which line 3 is the target layer; B: Sudan Black B detects viral lipid components, located below the 10 kDa band. M: Protein marker.

性病毒 HRPV13, 其宿主菌为同一地区分离的一株嗜盐古菌 *Halorubrum* sp. K2, 并详细研究了其生物学和基因组的特点。透射电镜观察显示 HRPV13 是一种多形性病毒, 其大小约为 60 nm。与多形包膜病毒科的病毒一样, 其宿主范围非常窄, 通常侵染相同地理位置分离出

的古菌, 其具有脂质包膜, 对氯仿等试剂很敏感。通过测定繁殖特性, 发现 HRPV13 在复制过程中不会引起细胞的大量裂解, 在侵染后 10 h 左右, 子代病毒保持在一个较高的滴度, 约为 10^{11} PFU/mL。这种非裂解型的复制方式普遍存在于多形性病毒科中。

在多形性包膜病毒科的病毒中, 一些成员已被证明可以耐受广泛的 NaCl 浓度, 而另一些则对低水平的 NaCl 或其他离子更敏感^[9,22], HRPV13 病毒属于前者, 在盐浓度低到几乎饱和的盐溶液中依然保持较高的侵染力。这种对各种盐度都有较好耐受性的病毒更容易在高盐环境中存活。

多形性包膜病毒科的另一大特点是其基因组的多样性, 既有环状单链或双链 DNA, 也有线性双链 DNA^[13]。另外, 有些病毒的双链 DNA 基因组上通常都有单链部分, 如 β 属多形包膜病毒中的 HGPV1、HRPV3、SNJ2、HHPV4 和 HRPV11 等。经酶切鉴定, HRPV13 的基因组也有单链部分, 但它们的功能还是未知的, 需要更多类似病毒的深入研究来阐明单链断裂在病毒生命活动中具有的作用^[18]。

HRPV13 的基因排布与已报道的其他多形性病毒基本一致, 而且都具有保守的蛋白簇, 特别是与 HRPV11、HRPV12 和 HRPV10 在核酸和氨基酸水平上有很高的序列一致性。之前的研究发现^[31], 在同一个地方分离的 HRPV11、

表 3 HRPV13 的质谱检测结果

Table 3 HRPV13 mass spectrometry detection results

ORF	Description	Coverage (%)	Unique peptides	Amino acids (AAs)	MW (kDa)
ORF4	Spike protein	65.9	35	583	61.7
ORF7	Putative NTPase	46.8	13	370	40.2
ORF9	Hypothetical protein	61.4	8	132	14.9
ORF6	Hypothetical protein	23.6	7	259	29.1
ORF5	Hypothetical protein	33.9	5	192	20.9

HRPV12 和 HRPV10 这 3 株病毒的遗传相似性非常接近, 共有 92%–95% 的核苷酸序列一致性, 但它们与所有从其他地方分离的多形性包膜病毒的差异均很大; 而 HRPV13 是目前新发现的一株与这 3 种病毒基因序列一致性较高的病毒, 这对研究病毒的遗传进化具有重要的研究意义。原核生物和真核生物的分类大多用核糖体和复制相关基因, 而病毒不具有普遍存在的类似基因组, 可能有多个独立的起源^[32]。细菌和古菌病毒的分类以前在很大程度上是根据形态学和宿主标准确定的, 但近年来病毒分类正逐渐从形态向基于基因组分析进行转变, 最近刚提出的基于基因组学的 GRAViTy^[20] 采用的是病毒之间 CGJ 距离的算法, 主要是基于病毒基因之间的同源性检测和基因组组织特征(基因顺序和方向)的相似性。从不同地理位置根据基因组的 GBDP 发育树结果及 GRAViTy 分析, HRPV13 与数据库中 HRPV11、HRPV12 和 HRPV10 的序列一致性最高, 分别是 76.52%、76.48% 和 76.57%, 因此属于 Betapleolipovirus 的一个病毒新种。虽然多形性病毒目前已经分离了十几株, 但其遗传多样性还是不足, 需要继续挖掘。

REFERENCES

- [1] Jiang S, Steward G, Jellison R, Chu W, Choi S. Abundance, distribution, and diversity of viruses in alkaline, hypersaline Mono Lake, California[J]. *Microbial Ecology*, 2004, 47(1): 9-17
- [2] Guixa-Boixareu N, Calderón-Paz JI, Heldal M, Bratbak G, Pedrós-Alió C. Viral lysis and bacterivory as prokaryotic loss factors along a salinity gradient[J]. *Aquatic Microbial Ecology*, 1996, 11: 215-227
- [3] Oren A, Bratbak G, Heldal M. Occurrence of virus-like particles in the Dead Sea[J]. *Extremophiles: Life Under Extreme Conditions*, 1997, 1(3): 143-149
- [4] Atanasova NS, Bamford DH, Oksanen HM. Haloarchaeal virus morphotypes[J]. *Biochimie*, 2015, 118: 333-343
- [5] Prangishvili D, Bamford DH, Forterre P, Iranzo J, Koonin EV, Krupovic M. The enigmatic archaeal virosphere[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2017, 15(12): 724-739
- [6] Krupovic M, Cvirkaite-Krupovic V, Iranzo J, Prangishvili D, Koonin EV. Viruses of archaea: structural, functional, environmental and evolutionary genomics[J]. *Virus Research*, 2018, 244: 181-193
- [7] Pietilä MK, Roine E, Paulin L, Kalkkinen N, Bamford DH. An ssDNA virus infecting archaea: a new lineage of viruses with a membrane envelope[J]. *Molecular Microbiology*, 2009, 72(2): 307-319
- [8] Demina TA, Oksanen HM. Pleomorphic archaeal viruses: the family Pleolipoviridae is expanding by seven new species[J]. *Archives of Virology*, 2020, 165(11): 2723-2731
- [9] Pietilä MK, Atanasova NS, Manole V, Liljeroos L, Butcher SJ, Oksanen HM, Bamford DH. Virion architecture unifies globally distributed pleolipoviruses infecting halophilic archaea[J]. *Journal of Virology*, 2012, 86(9): 5067-5079
- [10] Pietilä MK, Roine E, Sencilo A, Bamford DH, Oksanen HM. Pleolipoviridae, a newly proposed family comprising archaeal pleomorphic viruses with single-stranded or double-stranded DNA genomes[J]. *Archives of Virology*, 2016, 161(1): 249-256
- [11] Liu Y, Wang J, Liu Y, Wang YC, Zhang ZQ, Oksanen HM, Bamford DH, Chen XD. Identification and characterization of SNJ2, the first temperate pleolipovirus integrating into the genome of the SNJ1-lysogenic archaeal strain[J]. *Molecular Microbiology*, 2015, 98(6): 1002-1020
- [12] Bath C, Cukalac T, Porter K, Dyal-Smith ML. His1 and His2 are distantly related, spindle-shaped haloviruses belonging to the novel virus group, *Salterprovirus*[J]. *Virology*, 2006, 350(1): 228-239
- [13] Sencilo A, Paulin L, Kellner S, Helm M, Roine E. Related haloarchaeal pleomorphic viruses contain different genome types[J]. *Nucleic Acids Research*, 2012, 40(12): 5523-5534
- [14] Bamford DH, Pietilä MK, Roine E, Atanasova NS, Dienstbier A, Oksanen HM, Consortium IR. ICTV virus taxonomy profile: pleolipoviridae[J]. *Journal of General Virology*, 2017, 98(12): 2916-2917
- [15] Li M, Wang R, Zhao DH, Xiang H. Adaptation of the *Haloarcula hispanica* CRISPR-Cas system to a purified virus strictly requires a priming process[J]. *Nucleic Acids Research*, 2014, 42(4): 2483-2492

- [16] Cui HL, Zhou PJ, Oren A, Liu SJ. Intraspecific polymorphism of 16S rRNA genes in two halophilic archaeal genera, *Haloarcula* and *Halomicrobium*[J]. *Extremophiles: Life Under Extreme Conditions*, 2009, 13(1): 31-37
- [17] 李杨. 大连盐场与茶卡盐湖嗜盐古菌多样性及胞外蛋白酶研究[D]. 镇江: 江苏大学硕士学位论文, 2018
Li Y. Biodiversity and extracellular protease of haloarchaea isolated from Dalian marine solar saltern and Chaka salt lake[D]. Zhenjiang: Master's Thesis of Jiangsu University, 2018 (in Chinese)
- [18] Atanasova NS, Heiniö CH, Demina TA, Bamford DH, Oksanen HM. The unexplored diversity of pleolipoviruses: the surprising case of two viruses with identical major structural modules[J]. *Genes*, 2018, 9(3): 131
- [19] Chen SX, Liu HC, Zhao DH, Yang J, Zhou J, Xiang H. *Halorubrum yunnanense* sp. nov., isolated from a subterranean salt mine[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2015, 65(Pt_12): 4526-4532
- [20] Aiewsakun P, Adriaenssens EM, Lavigne R, Kropinski AM, Simmonds P. Evaluation of the genomic diversity of viruses infecting bacteria, archaea and eukaryotes using a common bioinformatic platform: steps towards a unified taxonomy[J]. *The Journal of General Virology*, 2018, 99(9): 1331-1343
- [21] Atanasova NS, Demina TA, Krishnam Rajan Shanthi SNV, Oksanen HM, Bamford DH. Extremely halophilic pleomorphic archaeal virus HRPV₉ extends the diversity of pleolipoviruses with integrases[J]. *Research in Microbiology*, 2018, 169(9): 500-504
- [22] Demina TA, Atanasova NS, Pietilä MK, Oksanen HM, Bamford DH. Vesicle-like virion of *Haloarcula hispanica* pleomorphic virus 3 preserves high infectivity in saturated salt[J]. *Virology*, 2016, 499: 40-51
- [23] Pietilä MK, Laurinavicius S, Sund J, Roine E, Bamford DH. The single-stranded DNA genome of novel archaeal virus halorubrum pleomorphic virus 1 is enclosed in the envelope decorated with glycoprotein spikes[J]. *Journal of Virology*, 2010, 84(2): 788-798
- [24] Meier-Kolthoff JP, Göker M. VICTOR: genome-based phylogeny and classification of prokaryotic viruses[J]. *Bioinformatics*, 2017, 33(21): 3396-3404
- [25] Wang YC, Sima LS, Lü J, Huang SY, Liu Y, Wang J, Krupovic M, Chen XD. Identification, characterization, and application of the replicon region of the halophilic temperate sphaerolipovirus SNJ1[J]. *Journal of Bacteriology*, 2016, 198(14): 1952-1964
- [26] Tapingkae W, Tanasupawat S, Itoh T, Parkin KL, Benjakul S, Visessanguan W, Valyasevi R. *Natrinema gari* sp. nov., a halophilic archaeon isolated from fish sauce in Thailand[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2008, 58(10): 2378-2383
- [27] Cha IT, Lee MH, Kim BY, Cho YJ, Kim DW, Yim KJ, Song HS, Seo MJ, Rhee JK, Choi JS, et al. Genome sequence of the haloarchaeon *Haloterrigena jeotgali* type strain A29(T) isolated from salt-fermented food[J]. *Standards in Genomic Sciences*, 2015, 10: 49
- [28] Xu XW, Liu SJ, Tohty D, Oren A, Wu M, Zhou PJ. *Haloterrigena saccharevitans* sp. nov., an extremely halophilic archaeon from Xin-Jiang, China[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2005, 55(6): 2539-2542
- [29] Montalvo-Rodríguez R, López-Garriga J, Vreeland RH, Oren A, Ventosa A, Kamekura M. *Haloterrigena thermotolerans* sp. nov., a halophilic archaeon from Puerto Rico[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2000, 50(Pt 3): 1065-1071
- [30] Wirth J, Young M. The intriguing world of archaeal viruses[J]. *PLoS Pathogens*, 2020, 16(8): e1008574
- [31] Mizuno CM, Prajapati B, Lucas-Staat S, Sime-Ngando T, Forterre P, Bamford DH, Prangishvili D, Krupovic M, Oksanen HM. Novel haloarchaeal viruses from Lake Retba infecting *Haloferax* and *Halorubrum* species[J]. *Environmental Microbiology*, 2019, 21(6): 2129-2147
- [32] Koonin EV, Senkevich TG, Dolja VV. The ancient virus world and evolution of cells[J]. *Biology Direct*, 2006, 1: 29