

研究报告



也西湖噬藻体的分离与鉴定

周科 杜康 朱洁 周丛照* 李琼*

中国科学技术大学生命科学学院 安徽 合肥 230027

摘要:【背景】噬藻体是一类特异性侵染蓝藻的病毒,广泛存在于淡水和海水水体中,参与调控宿主蓝藻的丰度和种群密度,被认为是潜在的蓝藻水华生物防控工具。但目前的研究多集中于海洋噬藻体,对淡水噬藻体的生物学特性和结构生物学等研究较少。【目的】分离更多种类的淡水噬藻体,为研究淡水噬藻体的三维结构、侵染机制、与宿主的共进化关系,及其在蓝藻水华防治中的应用提供理论基础。【方法】采集中国科学技术大学西校区内景观湖也西湖水华暴发水域的水样,利用液体培养基和双层固体平板法对 17 种宿主蓝藻进行筛选,通过 NaCl-PEG 沉淀法和氯化铯密度梯度离心分离和纯化噬藻体,并利用负染电镜观察噬藻体的形态,同时采用梯度稀释法测定裂解液的效价。【结果】发现也西湖的水样可特异性侵染本实验室分离自巢湖的一株拟鱼腥藻 Pan。侵染后的裂解液中存在 4 株形态各异的噬藻体,包括 1 株短尾噬藻体和 3 株长尾噬藻体,其中包括首次发现的 1 株含有非典型长轴状头部结构的淡水噬藻体。【结论】也西湖作为巢湖流域的一个小型水体,具有与巢湖类似的水华蓝藻及其噬藻体分布谱,因此可以用于模拟大型湖泊进行相关分子生态学和生物防控的研究。

关键词: 水华, 噬藻体, 拟鱼腥藻 Pan, 密度梯度离心

Isolation and characterization of cyanophages from the pond in the west campus of University of Science and Technology of China

ZHOU Ke DU Kang ZHU Jie ZHOU Cong-Zhao* LI Qiong*

School of Life Sciences, University of Science and Technology of China, Hefei, Anhui 230027, China

Abstract: [Background] Cyanophages, the viruses that specifically infect cyanobacteria, are abundant in both marine and fresh waterbodies. They are involved in the regulation of the abundance and population density of cyanobacteria, thus considered as potential agents to prevent and control cyanobacterial bloom. However, previous studies mostly focus on marine cyanophages, rather than on those from freshwater. [Objective] Isolation of as many as possible types of freshwater cyanophages for further studies of the 3-D

Foundation items: National Key Research and Development Program of China (2018YFA0903100); National Natural Science Foundation of China (U19A2020)

*Corresponding authors: ZHOU Cong-Zhao: Tel: 86-551-63600407; E-mail: zcz@ustc.edu.cn
LI Qiong: Tel: 86-551-63602491; E-mail: liqiong@ustc.edu.cn

Received: 27-03-2020; Accepted: 20-06-2020; Published online: 23-07-2020

基金项目: 国家重点研发计划(2018YFA0903100); 国家自然科学基金(U19A2020)

*通信作者: 周丛照: Tel: 0551-63600407; E-mail: zcz@ustc.edu.cn

李琼: Tel: 0551-63602491; E-mail: liqiong@ustc.edu.cn

收稿日期: 2020-03-27; 接受日期: 2020-06-20; 网络首发日期: 2020-07-23

structures, infection mechanism and co-evolution with the host cyanobacterium, in addition to potential application on prediction and control of cyanobacterial blooms. **[Methods]** We collected water samples from the surface rich of cyanobacterial blooms in a small pond named Yexihu on the west campus of the University of Science and Technology of China, Hefei, China. In total 17 strains of cyanobacteria were applied to the screening against the collected water samples using liquid culture medium and double-layer plate. Cyanophages in the lysate were purified via NaCl-PEG precipitation followed by CsCl density gradient centrifugation, and further applied to morphology check using transmission electron microscopy. The titer of the lysate was determined by the serial dilution method. **[Results]** The water samples could specifically infect a strain of *Pseudanabaena* termed Pan, which was isolated from the Lake Chaohu. The lysate contains four types of cyanophages with different morphology, one type of *Podovirus* and three types of *Siphovirus*. Notably, we found an atypical freshwater cyanophage with a prolate head for the first time. **[Conclusion]** The water sample of Yexihu contains cyanophages that could specifically infect cyanobacteria of the Lake Chaohu, indicating that the pond Yexihu and the Lake Chaohu share a similar pattern of cyanobacteria and cyanophages. Thus, we can use Yexihu as a waterbody to mimic the related molecular ecology studies and cyanobacterial bloom control in the Lake Chaohu.

Keywords: Cyanobacterial bloom, Cyanophage, *Pseudanabaena* Pan, Density gradient centrifugation

蓝藻, 广泛分布于水体环境中, 属于光合自养型原核微生物, 起源于约 35 亿年前^[1]。蓝藻作为迄今为止发现最早的光合产氧生物, 在地球大气环境从无氧向富氧的转化过程中起着重要作用^[2-3], 并且是地球上主要的初级生产力^[4]。此外, 有些种属的蓝藻还可利用营养细胞分化的异形胞将大气中的氮气还原为氨, 发挥生物固氮作用^[5], 是潜在的能源生物。因此, 蓝藻常被作为光合反应、碳固定和氮同化研究的模式生物。然而, 近年来随着城市化和工业化进程的加快, 大量污染物流入河流、湖泊和海洋, 使得水体富营养化程度日益加重, 同时全球变暖使得水体温度升高, 这都加速了蓝藻的增殖, 导致全球许多水生生态系统暴发严重的蓝藻水华, 危害水质、人畜健康和生态系统^[6-10]。巢湖是我国五大淡水湖之一, 是长江中下游重要的渔业基地和淡水资源, 但由于河岸附近水利工程的修建、生活污水的随意排放等原因, 每年都会暴发严重的蓝藻水华。据报道, 2015 年巢湖的水华面积达到 321.8 km², 约占全湖面积的 42.2%, 为近 10 年来最高^[11]。这限制了巢湖流域的经济发展, 带来了严重的环境和社会问题。尽管每年人们都要投入大量的人力和物力用于水华的治理, 但收效甚微,

尚未找到好的方法来控制蓝藻水华的频繁暴发。

噬藻体是一类特异性侵染蓝藻的病毒, 在海洋和淡水水体中广泛存在^[12]。噬藻体参与调控蓝藻的丰度和种群密度, 且在蓝藻的群落演替过程中发挥重要作用^[13-14]。研究发现, 海洋噬藻体对蓝藻的日致死率可达 5%–14%^[15]。相较于物理防控的费力、高成本和化学防控带来的水体污染, 利用噬藻体裂解蓝藻的特性在一定程度上对水华进行生物干预, 或许具有更广阔的应用前景^[1, 16-18]。目前已鉴定的噬藻体都属于双链 DNA 病毒, 正二十面体头部直径在 50–150 nm 之间。它们可根据尾部形态的不同分为三类: 尾巴较长且不可收缩的长尾噬藻体(*Siphoviridae*), 尾巴较长但可收缩的肌尾噬藻体(*Myoviridae*), 以及尾部很短且不可收缩的短尾噬藻体(*Podoviridae*)^[19-20]。2009 年, 张奇亚研究组自武汉东湖分离的侵染阿氏浮丝藻(*Planktothrix agardhii*)的 PaV-LD 被认为是无尾噬藻体^[21-22]。2002 年, 第 1 株噬藻体的基因组序列被测定, 来自于侵染聚球藻 WH7803 的海洋噬藻体 P60^[14], 随后, 人们陆续测定了 112 株噬藻体的基因组序列, 但多集中于海洋噬藻体, 仅 15 株来自淡水水体(占已分离和鉴定的淡水噬藻体数目的一半)。而

且, 噬藻体的基因组中超过 50% 的开放阅读框不可基于 NCBI 等数据库中已知功能的蛋白而被注释, 只能被命名为假定的蛋白 (hypothetical protein)^[23], 需要进一步的结构和功能研究以鉴定它们的功能。例如, 由我们实验室分离自巢湖的感染铜绿微囊藻的长尾噬藻体 Mic1 基因组编码了 98 个开放阅读框, 其中仅 36 个蛋白的功能已知^[24]。此外, 噬藻体的结构生物学研究方面, 仅有 3 株噬藻体的头部衣壳结构被解析, 它们分别是海洋短尾噬藻体 P-SSP7 4.6 Å、海洋短尾噬藻体 Syn5 4.7 Å 和淡水长尾噬藻体 Mic1 3.5 Å^[25-27]。总之, 目前人们对噬菌体和海洋噬藻体的研究较为充分, 而对淡水噬藻体的研究则少之又少。如果要将淡水噬藻体应用于蓝藻水华的防治, 则需要对淡水噬藻体的基因组、三维结构及其与宿主的识别和共进化机制有更为深入的认识, 这就首先需要分离和鉴定更多种的淡水噬藻体, 尤其是从蓝藻水华暴发水域。

也西湖是中国科学技术大学西区校园内的景观湖, 每年夏天会暴发蓝藻水华, 严重影响校园景观和水体生态环境。为了研究淡水噬藻体, 我们基于实验室前期建立的噬藻体筛选和分离平台, 就近选择也西湖的水样首先进行淡水噬藻体的分离和鉴定。也西湖作为巢湖流域的一个小型水体, 具有与巢湖类似的水华蓝藻及其噬藻体分布谱, 因此我们对其的研究结果将为后续深入研究淡水噬藻体, 以及探索如何利用噬藻体对蓝藻水华进行生物防控奠定实验基础和提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器及培养基

BG11 培养基参考文献^[24]配制; CsCl, 上海西格玛奥德里奇贸易有限公司; DNase I、RNase A、PEG 6 000 和 PEG 8 000, 生工生物工程(上海)股份有限公司。光照控温摇床, 上海智成公司; 人工气候箱, 上海博迅医疗生物仪器股份有限公司; 多功能倒置荧光显微镜, 蔡司公司; 密度梯度离心制备仪和密度梯度离心分离器, 博瑞公司。

1.2 藻种来源和培养

用于噬藻体筛选的 17 株宿主蓝藻菌株, 3 株为模式蓝藻, 12 株购买于中国科学院水生生物研究所藻种保藏中心 (Freshwater Algae Culture Collection at the Institute of Hydrobiology, FACHB), 2 株由本实验室通过对巢湖水样进行过滤处理后在 BG11 固体平板上进行多轮单克隆筛选分离得到(表 1)。藻种均接种至 BG11 培养基, 放置于 28 °C 的控温光照摇床中培养, 光照强度为 30–40 μmol-photons/(m²·s)^[28], 光暗周期为 14 h:10 h。待生长到 OD₆₈₀ 为 0.6–0.8 (对数生长期) 时, 用于后续实验。

1.3 水样收集与处理

2019 年 5 月 28 日取安徽省合肥市中国科学技术大学西校区也西湖表层水样, 低温运回实验室后立即进行处理。水样首先使用 6 层纱布过滤, 以去除浮萍、泥沙一类较大的杂质, 然后使用 5、2、1.2、0.8 和 0.45 μm 的微孔滤膜依次过滤。过滤后的水样用 100 kD 的超滤杯浓缩 100 倍, 4 °C 避光储存。

表 1 实验使用的 17 株蓝藻菌株
Table 1 17 strains of cyanobacteria used in this study

| 属 | 种 | 菌株 | 来源 |
|---------------|-------------------------|-----------|-------------|
| Genus | Species | Strains | Origin |
| Microcystis | Microcystis aeruginosa | FACHB1317 | Lake Chaohu |
| | | FACHB1318 | Lake Chaohu |
| | | FACHB1339 | Lake Chaohu |
| | | FACHB1319 | Lake Chaohu |
| | | FACHB1320 | Lake Chaohu |
| | | FACHB1326 | Lake Chaohu |
| | | FACHB1328 | Lake Chaohu |
| | | FACHB1338 | Lake Chaohu |
| | | FACHB1249 | Lake Chaohu |
| Aphanizomenon | Aphanizomenon flosaquae | | |
| Nostoc | Anabaena sp. | PCC7120 | Iowa |
| | | FACHB1241 | Lake Chaohu |
| | | FACHB1091 | Lake Donghu |
| | | FACHB1194 | Dianchi |
| | Pseudanabaena mucicole | Pam | Lake Chaohu |
| | Pseudanabaena sp. | Pan | Lake Chaohu |
| Synechococcus | Synechococcus elongatus | PCC7942 | California |
| Synechocystis | Synechocystis sp. | PCC6803 | California |

1.4 侵染实验

在温度为 28 °C、光照强度为 30–40 $\mu\text{mol}\cdot\text{photons}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 、光暗周期为 14 h:10 h 的条件下^[27,29], 用浓缩的水样分别侵染表 1 中的宿主蓝藻, 而且使用 BG11 液体培养基筛选后进一步用固体平板进行验证。

1.4.1 液体培养基筛选

在 24 孔细胞培养板中加入 900 μL 处于对数生长期的蓝藻, 再加入 100 μL 浓缩的水样, 混匀后放置于光照培养箱中培养。每种蓝藻设置 3 个孔, 一个孔为不加水样的对照组, 两个孔为加入水样的平行实验组。观察藻液是否出现黄化现象, 若出现黄化则初步判断为侵染阳性。

1.4.2 固体平板验证

首先在平板底部倒入用 BG11 配制并高温灭菌(1×10^5 Pa, 20 min)的 1.5%琼脂糖培养基, 待完全凝固后, 再在上层加入 0.6%低熔点琼脂糖培养基和对数生长期的藻液, 以及液体培养基筛选得到的黄化藻液(预先用 0.22 μm 的滤膜过滤), 均匀混合后放置于 28 °C 光照培养箱中培养。若出现噬藻斑, 则进一步验证为侵染阳性。

1.5 噬藻体的分离和纯化

1.5.1 PEG 沉淀

400 mL 裂解液中加入 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DNase I 和 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ RNase A 室温孵育 2 h, 再加入 0.5 mol/L NaCl 后冰水浴中孵育 2 h, 8 000 $\times g$ 离心 20 min 后收集上清。随后加入 10% PEG 6 000, 置于 4 °C 避光静置过夜。8 000 $\times g$ 离心 20 min 后弃上清, 沉淀用 SM 缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl pH 7.5, 100 mmol/L NaCl, 50 mmol/L MgSO_4)重悬。

1.5.2 密度梯度离心

由于噬藻体的密度较大, 使用 CsCl 充当密度梯度离心的介质。将上步的重悬液上样至已预先装有不连续密度 CsCl 的高速离心管上层, 于 4 °C、100 000 $\times g$ 离心 4 h。然后, 利用密度梯度分离系

统收集噬藻体, 并使用 SM 缓冲液透析以去除 CsCl^[30]。

1.6 负染电镜观察

吸取 4 μL 透析至 SM 缓冲液中的噬藻体样品, 滴在有碳膜的铜网上, 孵育 1 min, 吸干样品后使用 2%的醋酸铀染色 1 min, 用滤纸吸去多余的醋酸铀, 自然干燥之后利用 120 kV 透射电子显微镜进行观察(FEI 公司 Tecnai 系列)。

1.7 噬藻体效价测定

使用噬藻斑法(plaque formation units, PFU)测定裂解液的效价。将裂解液稀释 10、 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 倍, 每个梯度取出 100 μL 与 4 mL 宿主蓝藻、12 mL 0.6%的上层琼脂糖培养基混合, 铺在下层平板上, 置于光照培养箱中静置培养。培养温度为 28 °C, 光强为 30–40 $\mu\text{mol}\cdot\text{photons}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$, 光暗周期为 14 h:10 h。约 5 d 后记录噬藻斑的数量, 3 次平行取均值推算噬藻体的效价。计算公式:

$$\text{效价(PFU/mL)} = \frac{\text{噬藻斑数量} \times \text{稀释倍数}}{\text{噬藻体接种量}}$$

2 结果与分析

2.1 侵染实验

将浓缩的水样在液体培养基中以 1:9 的比例侵染处于对数生长期的 17 种蓝藻(表 1), 3 d 后发现也西湖的水样仅可以使本实验室分离自巢湖的拟鱼腥藻 Pan 发生黄化, 且 5 d 后藻液变得澄清(图 1A)。为排除捕食蓝藻的原生动物或溶藻细菌的因素, 将 24 孔板筛选得到的黄化裂解液用 0.22 μm 的微孔滤膜进行过滤, 以除去原生动物和细菌, 然后在锥形瓶中进行二次筛选, 2 d 后拟鱼腥藻 Pan 藻液仍然发生黄化(图 1B)。同时, 还将过滤后的黄化裂解液与拟鱼腥藻 Pan 混合后铺在固体平板上, 1 周后出现明显的噬藻斑(图 1C)。这些都说明也西湖的水样中含有可侵染巢湖拟鱼腥藻 Pan 的噬藻体。

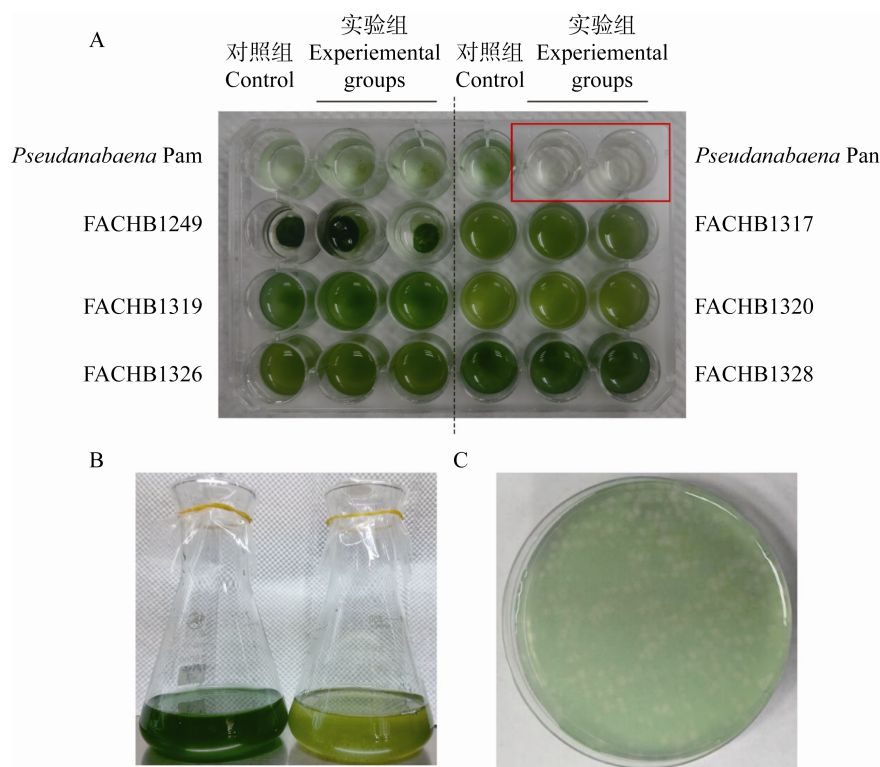


图 1 侵染实验结果

Figure 1 Infection assays

注：A：宿主筛选。每种蓝藻横向往使用三个孔，左边第一孔为对照，加入 900 μL 的藻液和 100 μL 的 BG11，后两个孔为实验组，加入 900 μL 的藻液和 100 μL 的浓缩水样，两侧为藻种名称；B：液体培养基二次筛选。左边为对照组，未加入裂解液，右边为实验组，加入预先用 0.22 μm 过滤后的裂解液；C：固体平板验证。过滤后的裂解液与藻液混合后涂布双层平板。

Note: A: Screening by liquid culture medium. Each strain of cyanobacteria was put in three wells, the left one is control containing 900 μL cyanobacterial cells and 100 μL BG11 medium, whereas the other two wells in the right are a parallel experiment group containing 900 μL cyanobacterial cells and 100 μL concentrated water sample. Names of the cyanobacteria are labeled; B: Secondary screening in liquid medium. Left is the control without filtered lysate, right is the experiment group with the filtered lysate; C: Screening by solid culture medium.

拟鱼腥藻 Pan 由本实验室分离自巢湖,显微镜下观察发现该藻呈丝状,多由 3–8 个细胞构成,略长于我们分离自巢湖的另一株拟鱼腥藻 Pam (*Pseudanabaena mucicole*) (图 2A)。对该藻进行 16S rRNA 基因测序的结果表明其属于拟鱼腥藻 (*Pseudanabaena* sp., Pan)。拟鱼腥藻 Pan 16S rRNA 基因的 V3–V4 可变区与拟鱼腥藻 Pam 的序列一致性高达 100% (图 2B),但也西湖的水样却不可侵染 Pam,这说明也西湖水样中含有的噬藻体具有很强的宿主特异性,即使同一属的不同种都不可被侵染。

2.2 噬藻体的分离和纯化

扩大培养也西湖水样侵染拟鱼腥藻 Pan 的裂解液,然后使用 NaCl 和 PEG 6 000 处理,离心取沉淀。沉淀用 SM 缓冲液重悬后上样至 CsCl 密度梯度介质上,超速离心后可在 1.35 g/mL 和 1.40 g/mL 的 CsCl 浓度之间观察到一白色条带(图 3A),由噬藻体富集后形成。随后,将高速离心管中的样品上样密度梯度分离系统,基于检测 260 nm 紫外吸收,在 17–18 min 可见一个噬藻体峰(图 3B),即对应于上述白色条带。收集该噬藻体峰的样品进行浓缩,并透析至 SM 缓冲液中,以去除 CsCl。

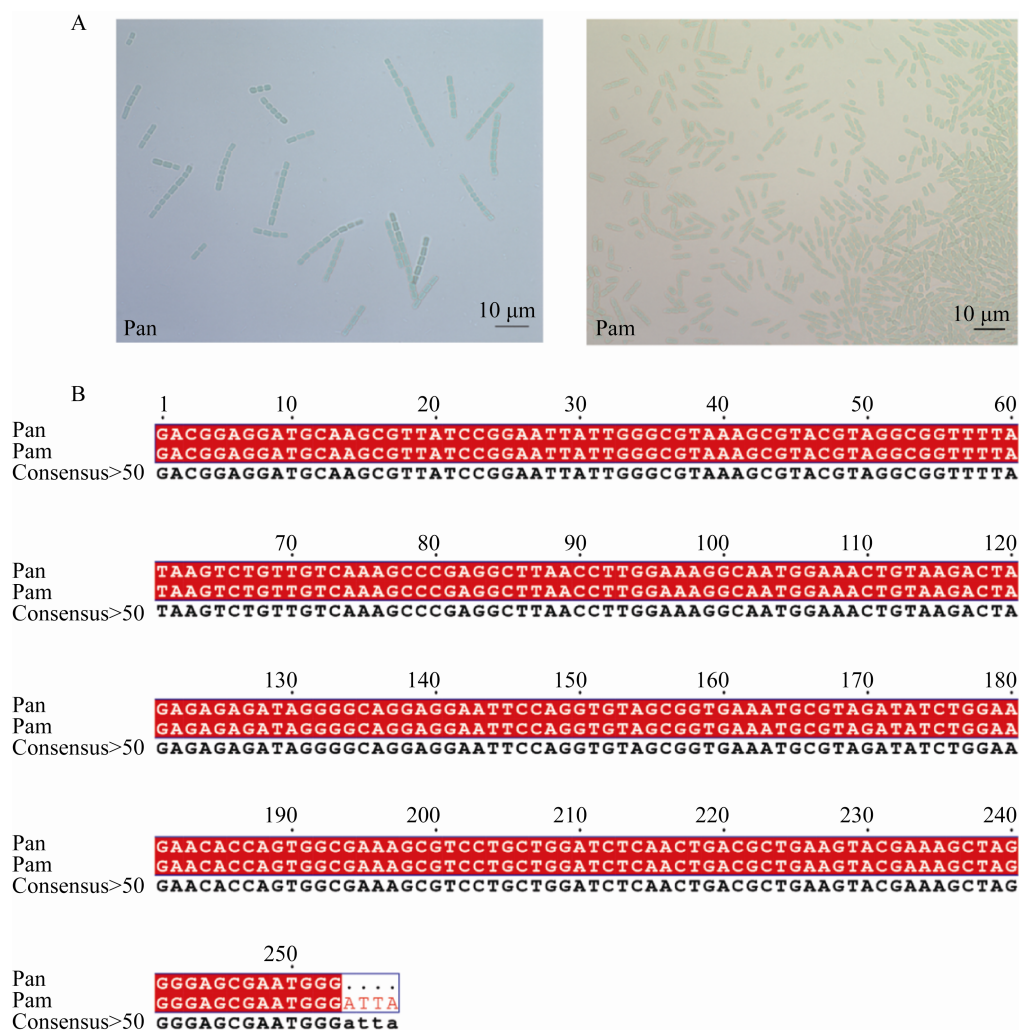


图 2 宿主拟鱼腥藻 Pan 的鉴定

Figure 2 Identification of *Pseudanabaena* Pan

注: A: 显微镜下的细胞形态, 左图为拟鱼腥藻 Pan, 右图为拟鱼腥藻 Pam. 比例尺为 10 μ m; B: 拟鱼腥藻 Pan 与 Pam 的 16S rRNA 基因 V3-V4 可变区序列比对。

Note: A: Microscopy images of *Pseudanabaena* Pan and Pam, scale bar=10 μ m; B: Sequence alignment of the V3-V4 variable region of 16S rRNA gene between *Pseudanabaena* Pan and *Pseudanabaena* Pam, both isolated from the Lake Chaohu.

2.3 噬藻体形态观察

使用 120 kV 透射电镜对上述浓缩后的噬藻体进行观察, 发现样品中存在长尾和短尾两种尾型的噬藻体(图 4)。因为它们是侵染拟鱼腥藻 Pan 的噬藻体, 因此以宿主名后加序号来命名。其中, 短尾噬藻体 Pan1 的头部为正二十面体, 直径约为 50 nm; 而长尾噬藻体根据形态可分为 3 种类型: Pan2 头部为正二十面体, 直径约为 50 nm, 尾部长

度约为 200 nm; Pan3 头部为正二十面体, 直径约为 50-60 nm, 尾部长约为 300 nm; Pan4 头部与 T4 噬菌体相似, 为长轴状, 大小为 50 \times 80 nm, 尾部长约为 120 nm。统计结果显示 Pan2 和 Pan3 两种长尾噬藻体占 80%的比例。

2.4 噬藻体的效价

将也西湖水样侵染拟鱼腥藻 Pan 的裂解液稀释 10^7 倍和 10^8 倍后, 仍然在固体平板上可见噬藻

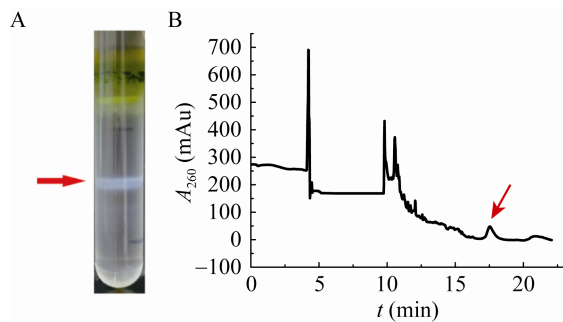


图3 噬藻体的分离纯化

Figure 3 Purification of cyanophages from the lysate

注: A: 裂解液的 CsCl 密度梯度离心; B: 密度梯度分离系统收集噬藻体的峰图. 检测 260 nm 紫外吸收. 红色箭头代表所纯化的噬藻体.

Note: A: A visible band corresponding to cyanophages after the density gradient centrifugation of CsCl; B: The peak profile of the Density Gradient Fractionation System. Red arrows indicate the cyanophages.

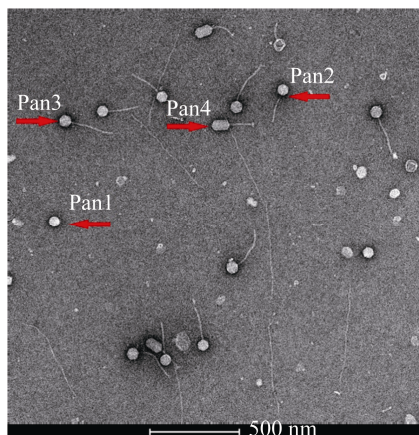


图4 120 kV 电镜下的噬藻体照片

Figure 4 Negative staining electron microscopy image of the cyanophages in the lysate

斑。3 组平行实验显示裂解液稀释 10^8 倍后涂布的平板上分别长出了 2、3 和 5 个噬藻斑, 计算可得裂解液的效价约为 3×10^9 PFU/mL。

3 讨论与结论

近年来, 蓝藻水华的季节性暴发给淡水和海水水体造成了严重的生态和环境问题, 损害附近流域人民的居家生活和生命健康, 也威胁人类饮用水源的安全和渔业的发展。尽管人们投入了大量的人力

和物力, 尝试了各种物理、化学和生物的方法来治理水华, 但都收效甚微。因此, 人们希望找到更有效, 更具体的方法来预测和暂时控制蓝藻水华的季节性暴发。由于噬藻体可以特异性地侵染蓝藻, 被认为是一种潜在的方法, 具有生物安全性和环境友好性, 这就需要对噬藻体的结构、分子生物学特性和侵染宿主的机制进行全面深入的研究。然而, 人们从各种环境水体中分离得到的一百多株噬藻体中仅有 27 株分离自淡水水体; 目前对于噬藻体的研究也大多集中于海洋噬藻体, 对淡水噬藻体的研究少之又少。但是, 研究表明噬藻体是淡水湖泊中微生物生态系统的重要组成部分, 具有显著的形态和遗传多样性^[29,31-32], 因此, 对不同种类淡水噬藻体的分离和鉴定, 以及后续对其基因组、三维结构、与宿主互作等的研究都具有重要的前景, 并且也有利于将其应用于淡水蓝藻水华的防治。

自然界中存在一些同种尾型噬藻体侵染同一株宿主的现象, 例如分离自北京大学未名湖的短尾噬藻体 Pf-WMP3 和 Pf-WMP4 均能侵染窝形席藻^[13,33], 分离自美国的肌尾噬藻体 A-1 和 N-1 均以鱼腥藻 PCC 7120 为宿主^[34]。然而, 很少发现不同尾型的噬藻体可以侵染同一株蓝藻。本研究中, 我们发现也西湖水样侵染拟鱼腥藻 Pan 的裂解液中含有 4 种尾型不同的噬藻体, 包括 1 株短尾噬藻体和 3 株长尾噬藻体, 这为后续进一步研究不同尾型的噬藻体对同一宿主的侵染机制, 以及它们之间的共进化关系奠定了基础。目前已鉴定的噬藻体基本都具有正二十面体的头部结构, 通常由主要衣壳蛋白构成, 一般没有或者只有一种装饰蛋白^[35-36], 头部的大小及复杂程度仅由一个三角函数 T 决定。我们在对也西湖的噬藻体进行分离和鉴定时首次发现类似于 T4 噬菌体、具有长轴状头部结构的淡水噬藻体。此种头部结构需要更多种的装饰蛋白来帮助组装, 例如 T4 噬菌体就含有 Soc 和 Hoc 两种装饰蛋白; 并且, T4 噬菌体的头部结构由两端的三角函数 $T_{cap}=13$ 和中央延伸部分的三角函数

$T_{mid}=20$ 共同决定^[37-38]。后续,我们将对这种非典型二十面体头部结构噬藻体与典型正二十面体头部结构噬藻体的头部自组装机制以及侵染机制的异同进行研究,以加深我们对淡水噬藻体的认识。

通过对 17 种宿主蓝藻进行筛选,我们发现也西湖蓝藻水华暴发水域的水样仅可侵染本实验室分离自巢湖的拟鱼腥藻 Pan,甚至不侵染与其 16S rRNA 基因的 V3-V4 可变区序列一致性高达 100% 的另一株我们分离自巢湖的拟鱼腥藻 Pam。因此,我们认为该水样中含有的噬藻体具有较窄的宿主谱。16S rRNA 基因由约 1 540 个核苷酸组成,其恒定区序列基本保守,而可变区序列因细菌不同而有所差异,通常被用来对不同种属的微生物做分类鉴定^[39]。然而,有的微生物由于种间差异小,单独依靠 V3-V4 可变区序列并不能精确鉴定。这就首先需要测定 Pan 和 Pam 的 16S rRNA 基因全长序列,甚至全基因组序列来区分这两种同属不同种的拟鱼腥藻。噬藻体侵染宿主细胞需要经过吸附、遗传物质注射、合成、装配和释放这 5 个过程^[40]。噬藻体首先通过尾部的受体识别蛋白识别宿主的受体,从而吸附于宿主细胞,这是侵染成功的前提。同时,宿主细胞还进化出一系列的屏障来阻止噬藻体的吸附:(1) 宿主可以改变细胞表面受体的结构或其三维构象,使受体不能被噬藻体识别^[41];(2) 产生新的细胞外基质,封闭噬藻体识别的受体,阻碍吸附的发生^[42];(3) 产生与细胞表面受体结合能力更强的竞争性抑制剂,从而导致噬藻体无法吸附到宿主细胞上^[43]。此外,有研究表明革兰氏阴性菌中存在的重复感染排除系统可以快速抑制 DNA 注入细胞,从而避免细胞被裂解;部分细菌进化出了限制修饰系统和 CRISPR-Cas 系统,可以切割注入的 DNA,阻断噬藻体在宿主细胞内的复制^[44-45]。不同种属的蓝藻可能进化出不同的策略来抵抗噬藻体的侵染。虽然 Pam 和 Pan 同属不同种,但可能由于自身进化程度、细胞表面受体类型和内部环境的不同,导致不能被同一噬藻体侵染。

因此,在全基因组测序的基础上,我们还需要对这两种拟鱼腥藻的宿主受体,以及其与噬藻体相互作用的分子机制进行研究来阐明也西湖水样中噬藻体的宿主特异性。

也西湖位于中国科学技术大学西校区,距离巢湖仅 20 km。由于地下水系相通,我们提出了两个猜想去解释为何也西湖的噬藻体可以侵染从巢湖分离出的蓝藻:第一种猜想是也西湖中也存在拟鱼腥藻 Pan;第二种猜想则是也西湖与巢湖的蓝藻和噬藻体各自之间发生水平基因转移。后续我们将对也西湖的蓝藻进行分离和鉴定,对巢湖和也西湖分离的蓝藻和噬藻体进行全基因组测序,以揭示它们的共进化关系,并结合噬藻体三维结构的解析和受体识别蛋白的鉴定来阐述为何也西湖水样中的噬藻体会仅以巢湖的拟鱼腥藻 Pan 为特异性宿主。

通过 PEG 和密度梯度离心,我们从也西湖水样侵染拟鱼腥藻 Pan 的裂解液中纯化到 4 株形态各异的噬藻体,即 1 株短尾噬藻体和 3 株长尾噬藻体。为进一步获得纯系噬藻体,我们尝试了优化 CsCl 浓度梯度、延长密度梯度离心时间,以及利用固体平板迭代挑选噬藻斑的方法。虽然提高了噬藻体的得率,但都未能成功获得纯系噬藻体。这可能是由于虽然头部直径和尾部长度的有所差异,但各噬藻体的密度却相差不大,所以不能简单地通过密度梯度离心达到完全分离。在接下来的研究中,我们将尝试不同的纯化方法,例如根据噬藻体所带电荷的不同而采用离子交换柱进行纯化,以分离得到纯系噬藻体。2010 年, Petra 研究组就利用离子交换的方法成功从金黄色葡萄球菌 ATCC 19685 中分离得到了较高纯度的噬菌体 VDX-10^[46]。本文对也西湖噬藻体的分离和鉴定工作,将为今后进一步对淡水噬藻体进行结构生物学和分子生物学研究,以及利用淡水噬藻体对蓝藻水华进行生物防治奠定实验基础。

REFERENCES

- [1] Zhang QY, Gui JF. Diversity, evolutionary contribution and ecological roles of aquatic viruses[J]. Science China Life

- Sciences, 2018, 61(12): 1486-1502
- [2] Hamilton TL, Bryant DA, Macalady JL. The role of biology in planetary evolution: cyanobacterial primary production in low-oxygen Proterozoic oceans[J]. *Environmental Microbiology*, 2016, 18(2): 325-340
 - [3] Nutman AP, Bennett VC, Friend CRL, et al. Rapid emergence of life shown by discovery of 3,700-million-year-old microbial structures[J]. *Nature*, 2016, 537(7621): 535-538
 - [4] Weigele PR, Pope WH, Pedulla ML, et al. Genomic and structural analysis of Syn9, a cyanophage infecting marine *Prochlorococcus* and *Synechococcus*[J]. *Environmental Microbiology*, 2007, 9(7): 1675-1695
 - [5] Muro-Pastor AM, Hess WR. Heterocyst differentiation: from single mutants to global approaches[J]. *Trends in Microbiology*, 2012, 20(11): 548-557
 - [6] Paerl HW, Huisman J. Climate: Blooms like it hot[J]. *Science*, 2008, 320(5872): 57-58
 - [7] Kosten S, Huszar VLM, Bécáres E, et al. Warmer climates boost cyanobacterial dominance in shallow lakes[J]. *Global Change Biology*, 2012, 18(1): 118-126
 - [8] Beaulieu M, Pick F, Gregory-Eaves I. Nutrients and water temperature are significant predictors of cyanobacterial biomass in a 1147 lakes data set[J]. *Limnology and Oceanography*, 2013, 58(5): 1736-1746
 - [9] Michalak AM, Anderson EJ, Beletsky D, et al. Record-setting algal bloom in Lake Erie caused by agricultural and meteorological trends consistent with expected future conditions[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, 110(16): 6448-6452
 - [10] Taranu ZE, Gregory-Eaves I, Leavitt PR, et al. Acceleration of cyanobacterial dominance in north temperate-subarctic lakes during the Anthropocene[J]. *Ecology Letters*, 2015, 18(4): 375-384
 - [11] Tang XX, Shen M, Duan HT. Temporal and spatial distribution of algal blooms in Lake Chaohu, 2000-2015[J]. *Journal of Lake Sciences*, 2017, 29(2): 276-284 (in Chinese)
唐晓先, 沈明, 段洪涛. 巢湖蓝藻水华时空分布 (2000-2015 年)[J]. *湖泊科学*, 2017, 29(2): 276-284
 - [12] Sullivan MB, Waterbury JB, Chisholm SW. Cyanophages infecting the oceanic cyanobacterium *Prochlorococcus*[J]. *Nature*, 2003, 424(6952): 1047-1051
 - [13] Liu XY, Kong SL, Shi M, et al. Genomic analysis of freshwater cyanophage Pf-WMP3 infecting cyanobacterium *Phormidium foveolarum*: the conserved elements for a phage[J]. *Microbial Ecology*, 2008, 56(4): 671-680
 - [14] Chen F, Lu JR. Genomic sequence and evolution of marine cyanophage P60: a new insight on lytic and lysogenic phages[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(5): 2589-2594
 - [15] Suttle CA, Chan AM. Dynamics and distribution of cyanophages and their effect on marine *Synechococcus* spp.[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1994, 60(9): 3167-3174
 - [16] Suttle CA. Marine viruses—major players in the global ecosystem[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2007, 5(10): 801-812
 - [17] Hambly E, Suttle CA. The virosphere, diversity, and genetic exchange within phage communities[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2005, 8(4): 444-450
 - [18] Fuhrman JA. Marine viruses and their biogeochemical and ecological effects[J]. *Nature*, 1999, 399(6736): 541-548
 - [19] Nobrega FL, Vlot M, de Jonge PA, et al. Targeting mechanisms of tailed bacteriophages[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2018, 16(12): 760-773
 - [20] Safferman RS, Cannon RE, Desjardins PR, et al. Classification and nomenclature of viruses of cyanobacteria[J]. *Intervirology*, 1983, 19(2): 61-66
 - [21] Gao EB, Yuan XP, Li RH, et al. Isolation of a novel cyanophage infectious to the filamentous cyanobacterium *Planktothrix agardhii* (Cyanophyceae) from Lake Donghu, China[J]. *Aquatic Microbial Ecology*, 2009, 54(2): 163-170
 - [22] Gao EB, Gui JF, Zhang QY. A novel cyanophage with a cyanobacterial nonbleaching protein A gene in the genome[J]. *Journal of Virology*, 2012, 86(1): 236-245
 - [23] Clokie MRJ, Millard AD, Letarov AV, et al. Phages in nature[J]. *Bacteriophage*, 2011, 1(1): 31-45
 - [24] Yang F, Jin H, Wang XQ, et al. Genomic analysis of Mic1 reveals a novel freshwater long-tailed cyanophage[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 484
 - [25] Liu XA, Zhang QF, Murata K, et al. Structural changes in a marine podovirus associated with release of its genome into *Prochlorococcus*[J]. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2010, 17(7): 830-836
 - [26] Gipson P, Baker ML, Raytcheva D, et al. Protruding knob-like proteins violate local symmetries in an icosahedral marine virus[J]. *Nature Communications*, 2014, 5: 4278
 - [27] Jin H, Jiang YL, Yang F, et al. Capsid structure of a freshwater cyanophage siphoviridae Mic1[J]. *Structure*, 2019, 27(10): 1508-1516.e3
 - [28] Giovannoni SJ, Turner S, Olsen GJ, et al. Evolutionary relationships among cyanobacteria and green chloroplasts[J]. *Journal of Bacteriology*, 1988, 170(8): 3584-3592
 - [29] Yoshida T, Takashima Y, Tomaru Y, et al. Isolation and characterization of a cyanophage infecting the toxic cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(2): 1239-1247
 - [30] Nasukawa T, Uchiyama J, Taharaguchi S, et al. Virus purification by CsCl density gradient using general centrifugation[J]. *Archives of Virology*, 2017, 162(11): 3523-3528
 - [31] Yoshida M, Yoshida T, Kashima A, et al. Ecological dynamics of the toxic bloom-forming cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* and its cyanophages in freshwater[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74(10): 3167-3174

- 3269-3273
- [32] Ou T, Li SH, Liao XY, et al. Cultivation and characterization of the MaMV-DC cyanophage that infects bloom-forming cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*[J]. *Virologica Sinica*, 2013, 28(5): 266-271
- [33] Liu XY, Shi M, Kong SL, et al. Cyanophage Pf-WMP4, a T7-like phage infecting the freshwater cyanobacterium *Phormidium foveolarum*: complete genome sequence and DNA translocation[J]. *Virology*, 2007, 366(1): 28-39
- [34] Chénard C, Wirth JF, Suttle CA. Viruses infecting a freshwater filamentous cyanobacterium (*Nostoc* sp.) encode a functional CRISPR array and a proteobacterial DNA polymerase B[J]. *mBio*, 2016, 7(3): e00667-16
- [35] Fokine A, Islam MZ, Zhang ZH, et al. Structure of the three N-terminal immunoglobulin domains of the highly immunogenic outer capsid protein from a T4-like bacteriophage[J]. *Journal of Virology*, 2011, 85(16): 8141-8148
- [36] Wang ZQ, Hardies SC, Fokine A, et al. Structure of the marine siphovirus TW1: evolution of capsid-stabilizing proteins and tail spikes[J]. *Structure*, 2018, 26(2): 238-248.e3
- [37] Chen ZG, Sun L, Zhang ZH, et al. Cryo-EM structure of the bacteriophage T4 isometric head at 3.3-Å resolution and its relevance to the assembly of icosahedral viruses[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2017, 114(39): E8184-E8193
- [38] Fokine A, Leiman PG, Shneider MM, et al. Structural and functional similarities between the capsid proteins of bacteriophages T4 and HK97 point to a common ancestry[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, 102(20): 7163-7168
- [39] Johnson JS, Spakowicz DJ, Hong BY, et al. Evaluation of 16S rRNA gene sequencing for species and strain-level microbiome analysis[J]. *Nature Communications*, 2019, 10(1): 5029
- [40] Ofir G, Sorek R. Contemporary phage biology: from classic models to new insights[J]. *Cell*, 2018, 172(6): 1260-1270
- [41] Uhl MA, Miller JF. Integration of multiple domains in a two-component sensor protein: the *Bordetella pertussis* BvgAS phosphorelay[J]. *The EMBO Journal*, 1996, 15(5): 1028-1036
- [42] Perry LL, SanMiguel P, Minocha U, et al. Sequence analysis of *Escherichia coli* O157:H7 bacteriophage ΦV10 and identification of a phage-encoded immunity protein that modifies the O157 antigen[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2009, 292(2): 182-186
- [43] Destoumieux-Garzón D, Duquesne S, Peduzzi J, et al. The iron-siderophore transporter FhuA is the receptor for the antimicrobial peptide microcin J25: role of the microcin Val¹¹-Pro¹⁶ β-hairpin region in the recognition mechanism[J]. *The Biochemical Journal*, 2005, 389(3): 869-876
- [44] Labrie SJ, Samson JE, Moineau S. Bacteriophage resistance mechanisms[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2010, 8(5): 317-327
- [45] Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, et al. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes[J]. *Science*, 2007, 315(5819): 1709-1712
- [46] Kramberger P, Honour RC, Herman RE, et al. Purification of the *Staphylococcus aureus* bacteriophages VDX-10 on methacrylate monoliths[J]. *Journal of Virological Methods*, 2010, 166(1/2): 60-64