

## 微囊藻的原噬藻体基因组特征分析

洪彬鑫<sup>1</sup>, 潘灵婷<sup>1</sup>, 谭隆<sup>1</sup>, 张靖昊<sup>1</sup>, 杨佳豪<sup>1</sup>, 徐舒燕<sup>1</sup>, 徐锦鹏<sup>1</sup>,  
景晓盈<sup>1</sup>, 李登峰<sup>1\*</sup>, 童贻刚<sup>2</sup>

1 宁波大学 海洋学院, 浙江 宁波

2 北京化工大学 生命科学学院, 北京

洪彬鑫, 潘灵婷, 谭隆, 张靖昊, 杨佳豪, 徐舒燕, 徐锦鹏, 景晓盈, 李登峰, 童贻刚. 微囊藻的原噬藻体基因组特征分析[J]. 微生物学报, 2025, 65(9): 4042-4059.

HONG Binxin, PAN Lingting, TAN Long, ZHANG Jinghao, YANG Jiahao, XU Shuyan, XU Jinpeng, JING Xiaoying, LI Dengfeng, TONG Yigang. Genomic characterization of the procyanophages in *Microcystis* spp.[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2025, 65(9): 4042-4059.

**摘要:** 蓝细菌(cyanobacteria), 俗称蓝藻, 是水生生态系统中重要的初级生产者, 也是常见的水华优势藻。噬藻体(cyanophage), 尤其是原噬藻体(prophage)是重要的浮游生态因子, 影响蓝藻的进化和水生微生物群落结构。然而, 有关原噬藻体的信息极为有限, 迄今尚未有关于微囊藻(*Microcystis*)原噬藻体的研究报道。【目的】探讨微囊藻的溶原性及其原噬藻体的基因组特征。【方法】从 NCBI 数据库中下载了所有微囊藻基因组(共计 354 个)序列, 利用 PHASTER 软件预测其携带的原噬藻体, 并分析原噬藻体的携带率、基因组大小和 G+C 含量; 通过毒力因子数据库(virulence factors of bacterial pathogens, VFDB)和综合抗生素研究数据库(comprehensive antibiotic resistance database, CARD)平台, 分析完整型原噬藻体与疑似型原噬藻体中携带的耐药因子与毒力因子; 综合运用生物信息学工具对完整型原噬藻体和疑似型原噬藻体进行基因功能注释和系统进化分析。选取含有完整型原噬藻体的水华微囊藻(*Microcystis aeruginosa*) FACHB-1326, 用丝裂霉素 C 进行原噬藻体活化诱导, 并采用点斑法进一步验证活化噬藻体的感染活性。【结果】在全部 354 个微囊藻基因组中, 98.3% 的藻株被预测出携带原噬藻体或原噬藻体样片段; 共发现完整型原噬藻体 13 个, 疑似型原噬藻体 5 个, 不完整型原噬藻体 725 个。将完整型原噬藻体和疑似型原噬藻体分别命名为 WZ1-WZ13 和 YS1-YS5。在其基因组中均未发现耐药因子与毒力因子基因。蛋白谱发育树(phylogenomic tree)显示, 这 18 株微囊藻原噬藻体与其他已知病毒的进化距离较远。生物信息学分析提示, YS5 揭示了一个以往未知的新属; WZ2、WZ3、WZ4、WZ5、WZ6、WZ7、WZ9、WZ10、WZ11、WZ12 与 YS3 共同揭示了一个以往未知的新科; WZ1 与

资助项目: 国家重点研发计划(2018YFA0903000); 宁波市重点研发计划(2022Z170, 2024Z234)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2018YFA0903000) and the Ningbo Key Research and Development Project (2022Z170, 2024Z234).

\*Corresponding author. E-mail: lidengfeng@nbu.edu.cn

Received: 2025-02-26; Accepted: 2025-03-24; Published online: 2025-05-19

YS1 共同揭示了一个新科; YS2、YS4、WZ8 和 WZ13 则各自揭示了一个新科。FACHB-1344 和 FACHB-1326 各被预测出一个完整型原噬藻体, 试验表明丝裂霉素 C 可成功将其诱导活化。【结论】溶原现象在微囊藻中普遍存在, 微囊藻基因组中整合的原噬藻体代表了以往未知的病毒进化谱系。本研究拓宽了对浮游病毒的认知。

关键词: 微囊藻; 原噬藻体; 基因组; 溶源性; 新属; 新科; 噬菌体进化; 基因水平转移

## Genomic characterization of the procyanophages in *Microcystis* spp.

HONG Binxin<sup>1</sup>, PAN Lingting<sup>1</sup>, TAN Long<sup>1</sup>, ZHANG Jinghao<sup>1</sup>, YANG Jiahao<sup>1</sup>, XU Shuyan<sup>1</sup>, XU Jinpeng<sup>1</sup>, JING Xiaoying<sup>1</sup>, LI Dengfeng<sup>1\*</sup>, TONG Yigang<sup>2</sup>

<sup>1</sup> School of Marine Sciences, Ningbo University, Ningbo, Zhejiang, China

<sup>2</sup> College of Life Science and Technology, Beijing University of Chemical Technology, Beijing, China

**Abstract:** Cyanobacteria, commonly known as blue-green algae, are important primary producers in aquatic ecosystems and common dominant algae causing algal blooms in freshwater. Cyanophages, especially procyanophages, are important planktonic ecological factors that affect the evolution of blue-green algae and aquatic microbial communities. Yet studies on procyanophages in cyanobacteria remain scarce. So far, few studies have reported the procyanophages in *Microcystis*. **[Objective]** To investigate the prevalence of lysogeny in *Microcystis* and characterize the genomic features of procyanophages in *Microcystis*. **[Methods]** All the 354 genome sequences of *Microcystis* spp. in GenBank were downloaded. PHASTER was used to predict procyanophage regions in the *Microcystis* genomes. Resistance and virulence factors in intact procyanophages and questionable procyanophages were annotated *via* the virulence factors of bacterial pathogens (VFDB) and comprehensive antibiotic resistance database (CARD). Bioinformatics tools were used for gene annotation and phylogenetic analysis of the procyanophages in *Microcystis*. *Microcystis flos-aquae* FACHB-1344 and *M. aeruginosa* FACHB-1326 each was predicted to harbor an intact procyanophage by PHASTER. To evaluate the infection activities of these two procyanophages, mitomycin C induction assays and dot-ELISA were conducted. **[Results]** Among all the 354 *Microcystis* genomes, 98.3% were predicted to harbor intact procyanophages, questionable or incomplete procyanophages. A total of 13 intact procyanophages, 5 questionable procyanophages and 725 incomplete procyanophages were predicted by PHASTER. The 13 intact procyanophages and 5 questionable procyanophages were named as WZ1–WZ13 and YS1–YS5, respectively. No antibiotic resistance or virulence gene was detected in them. The phylogenomic tree displayed distant evolutionary relationships between the 18 procyanophages and other known viruses. Bioinformatics analysis suggested that YS5 revealed a previously unknown novel genus. WZ2, WZ3, WZ4, WZ5, WZ6, WZ7, WZ9, WZ10, WZ11, WZ12 and YS3 together revealed a novel family. WZ1 and YS1 together revealed a novel family.

YS2, YS4, WZ8 and WZ13 each revealed a novel family. The procyanophages in *M. flos-aquae* FACHB-1344 and FACHB-1326 were verified to be activated by mitomycin C. **[Conclusion]** Lysogeny widely exists in *Microcystis* spp. The novel procyanophages in *Microcystis* spp. unlock novel viral evolutionary lineages previously unknown. This study enriches the understanding about cyanobacterium-virus interactions and the diversity of aquatic viruses.

**Keywords:** *Microcystis*; procyanophage; genome; lysogeny; novel genus; novel family; bacteriophage evolution; horizontal gene transfer

蓝细菌(cyanobacteria), 又称为放氧细菌(oxyphotobacteria), 俗称蓝藻(blue-green algae), 是能通过光合作用捕获太阳能的单细胞藻类, 广泛分布于淡水、海水及咸淡水环境中, 是水生生态系统中重要的初级生产者。随着全球工业化的发展, 水体富营养化日益普遍且严重, 蓝藻水华在世界各地的出现次数和频率不断增加。蓝藻水华不仅使淡水生态系统退化<sup>[1]</sup>, 还对供水安全构成严重威胁<sup>[2]</sup>。在所有水华蓝藻中, 微囊藻(*Microcystis*)是最常见且危害最大的一种, 广泛存在于温带与亚热带的湖泊、水库和河流中, 遍布全球六大洲至少 108 个国家<sup>[3]</sup>, 是我国富营养化湖泊(如滇池、太湖和巢湖等)在高温季节暴发水华的主要优势藻<sup>[4-6]</sup>。微囊藻产生微囊藻毒素(microcystin, MCs)对水环境、水产养殖对象以及人畜健康构成严重威胁<sup>[7]</sup>。饮用水源中的淡水微囊藻毒素是原发性肝癌的潜在诱发因素<sup>[8]</sup>, 也是急性致死因子。在巴西曾发生一起著名的群体中毒事件, 因水源暴发微囊藻水华, 肝毒性微囊藻毒素在透析患者的组织中蓄积, 导致许多患者死于肝衰竭<sup>[9]</sup>。微囊藻水华已成为全球关注的重大环境问题之一, 如何有效治理蓝藻水华也越来越成为研究的热点。

噬藻体(cyanophage)是能够特异性侵染蓝藻的噬菌体。虽然噬藻体本身极其微小, 但其数量庞大, 广泛分布于全球水环境中, 具有丰富的遗传多样性, 是水体微生态的重要组成部分<sup>[10]</sup>。噬藻体通过选择性感染和裂解蓝细菌, 改变水体生物群落结构, 是重要的水生生态因子<sup>[11]</sup>。根据生命周期, 噬藻体可分为烈性

(virulent)和溶原性(lysogenic) 2 类<sup>[12]</sup>。烈性噬藻体在感染蓝藻后可快速裂解宿主, 而溶原性噬藻体(温和噬菌体)在感染宿主后并不裂解宿主, 而是将其基因组整合入宿主染色体的特定位点中, 成为原噬藻体(prophage)。这些原噬藻体可随宿主基因组的复制而长期复制。含有溶原噬菌体的细菌宿主被称为溶源菌(lysogen)。由于被认为是最具潜力的水华控制生物因子, 烈性噬藻体近年来已成为研究热点, 迄今在公共数据库中已有 400 余株噬藻体的基因组被报道。然而原噬藻体和蓝细菌的溶源性信息却很罕见。原噬菌体能够介导外源基因的水平转移, 是细菌获得外源性遗传物质(如毒力基因、抗性基因和耐药基因)的重要方式<sup>[13]</sup>。原噬菌体的整合主要取决于噬菌体的物种, 不同物种的整合点差异很大<sup>[14]</sup>。在诱导条件下(如紫外线照射、丝裂霉素 C 处理等), 原噬菌体的基因组可从宿主基因组中切除, 形成具有感染活性的病毒粒子, 并使宿主细胞裂解<sup>[15]</sup>。原噬菌体在细菌演化和环境适应等方面发挥着关键作用, 已被广泛研究。

人们对蓝细菌的原噬藻体知之甚少, 迄今尚无关于微囊藻原噬藻体的研究报道。本研究采用生物信息学手段, 对 NCBI 数据库中公布的微囊藻序列进行原噬藻体分析, 解析溶原率、原噬藻体的基因组特征、多态性及进化地位, 以期深入探索微囊藻与病毒之间的相互作用关系以及微囊藻水华的生物防治奠定基础。

# 1 材料与方法

## 1.1 微囊藻全基因组的来源

从美国国家生物技术信息中心(NCBI) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>)检索微囊藻序列, 总计发现了354株微囊藻的基因组数据(截至2023年12月30日), 将其全部下载。

## 1.2 原噬藻体预测

PHASTER (<http://phaster.ca/>)<sup>[16]</sup>是一个功能全面的原噬菌体预测在线工具, 该软件可快速识别和标注细菌基因组和质粒中的噬菌体序列, 能够注释所测菌株中原噬菌体的数量、原噬藻体的基因片段长度、G+C含量、ORF数量, 以及噬菌体在宿主染色体上整合的位置等信息。PHASTER根据细菌基因组中噬菌体基因编码序列(coding sequence, CDS)的数量和含有的噬藻体序列对样本进行评分。得分>90的被评定为完整型原噬菌体(intact prophage); 得分在70–90之间的被评定为疑似型原噬菌体(questionable prophage); 得分<70的被评定为非完整型原噬菌体(incomplete prophage)。本研究应用PHASTER对微囊藻的基因组进行分析, 共得到13株完整型原噬藻体和5株疑似型原噬藻体, 以“预测类型+编号”将其命名为WZ1、WZ2……WZ13和YS1、YS2……YS5, 其中WZ即完整型原噬藻体的简称, YS即疑似型原噬藻体的简称。

## 1.3 原噬藻体携带抗生素耐药基因预测

分别将注释出的各个完整型原噬藻体和疑似型原噬藻体的基因组序列输入到抗生素耐药基因(antibiotic resistance genes, ARGs)数据库(<https://card.mcmaster.ca/>), 检索耐药基因和耐药基因家族, 分析耐药表型、耐药机制等<sup>[17]</sup>。

## 1.4 原噬藻体携带毒力因子分析

利用毒力因子数据库(VFDB) (<http://www.mgc.ac.cn/VFs/>)中的“Search”功能, 提交原噬藻体基因组FASTA格式序列, 在DNA sequences from VFDB core dataset (setA)和DNA

sequences from VFDB full dataset (setB) 2个数据库中进行BLAST搜索<sup>[18]</sup>, 检索原噬藻体基因组中的毒力因子基因。

## 1.5 系统进化地位分析

以2023年8月国际病毒分类委员会(international committee on taxonomy of viruses, ICTV) (<https://ictv.global/>)最新发布的病毒分类系统为标准, 运用在线软件ViPTree (<https://www.genome.jp/viptree/>)<sup>[19]</sup>构建基于全基因组序列比对的蛋白谱系统发育树(phylogenomic tree)。用于构建phylogenomic tree的基因组序列包括: 截至2024年10月30日NCBI中已公布的全部15株微囊藻噬藻体; 本研究预测出的13株完整型原噬藻体与5株疑似型原噬藻体; 用在线工具PHASTER发现的与本研究的完整型、疑似型原噬藻体最相似的噬菌体(most common phages); ICTV分类系统中有尾纲下不属于任何目的独立的32个科的噬菌体代表种, 以及有尾纲各目的代表种。

用EzBioCloud平台(<https://www.ezbiocloud.net/tools/ani>)<sup>[20]</sup>计算各个完整型原噬藻体、疑似型原噬藻体与其近缘病毒间的平均核酸一致性值(average nucleotide identity value, ANI)。使用GGDC平台(<http://ggdc.dsmz.de/>)<sup>[21]</sup>计算各个完整型原噬藻体、疑似型原噬藻体与其近缘病毒间的DNA分子原位杂交值(*in silico* DNA-DNA hybridization value, isDDH)。用在线平台PASC(pairwise sequence comparison) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/pasc/>)<sup>[22]</sup>将预测得到的完整型原噬藻体和疑似型原噬藻体与已知数据库中的病毒进行比对, 分别计算它们与近缘病毒间的全基因组成对核苷酸序列相似度(PASC值)。用Virus Intergenomic Distance Calculator (<http://rhea.icbm.uni-oldenburg.de/VIRIDIC/>)<sup>[23]</sup>计算噬藻体基因组间相似性(VIRIDIC值)。用在线软件VirClust (<https://rhea.icbm.uni-oldenburg.de/VIRCLUST/>)<sup>[24]</sup>计算发育树中完整型和疑似型原噬藻体与其近亲之间的核心基因占比。上述

ANI、isDDH、PASC、VIRIDIC 值和核心基因占比是国际病毒分类委员会细菌与古菌病毒分会 (bacterial and archaeal viruses subcommittee, BAVS) 推荐的用于分析噬菌体间亲缘关系的工具, 原则为: 种间各病毒株间分享的 ANI 值 < 95%、isDDH 值 < 70%; 属间各病毒间分享的 PASC < 70%、VIRIDIC < 70%; 在基于全基因组比对构建的发育树中, 同一科的病毒聚在一个枝簇 (clade) 中, 科内各病毒分享的核心基因占比  $\geq 17\%$ , 亚科内各病毒间共享的核心基因占比为 27%–79%, 属内病毒间共享的核心基因占比  $\geq 80\%$ 。

### 1.6 完整型原噬藻体和疑似型原噬藻体的基因组注释

使用 RAST 在线工具 (<https://rast.nmpdr.org/rast.cgi>)<sup>[25]</sup> 对微囊藻原噬藻体的 ORF 进行初步预测和注释, 用 HHpred (<https://toolkit.tuebingen.mpg.de/tools/hhpred>) ( $E\text{-value} < 10^{-5}$ )、HMMER (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/hmmer/search/hmmscan>) (domain 完整且  $E\text{-value} < 10^{-5}$ )<sup>[26-27]</sup> 和 BLASTp (<http://blast.ncbi.nlm.gov>) ( $E\text{-value} < 10^{-5}$ ) 进行校准与补充。

### 1.7 原噬藻体的活化诱导

用 PHASTER 软件在水华微囊藻 (*Microcystis flos-aquae*) FACHB-1344 和铜绿微囊藻 (*Microcystis aeruginosa*) FACHB-1326 中各发现一个完整型噬藻体, 分别为 WZ7 和 WZ12; 铜绿微囊藻 FACHB-905 中有一个疑似型噬藻体, 为 YS2。为了验证其是否为具有活性的原噬菌体 (active prophage), 参照文献 [28-30] 描述的方法分别将 FACHB-1344、FACHB-1326 和 FACHB-905 培养至对数期, 分装成 5 mL/管, 随后分别用丝裂霉素和环境因子诱导: 实验组 I 中每管加入 5  $\mu\text{L}$  丝裂霉素 C (5 mg/mL), 对照组 I 则添加 5  $\mu\text{L}$  BG11 液体培养基, 用锡纸将试管包裹, 置于 25  $^{\circ}\text{C}$  培养箱 (4 000 lx) 中诱导孵育 24 h; 将实验组 II、III 各管分别放置于光照

强度为 7 000 lx 和 10 000 lx 的 25  $^{\circ}\text{C}$  培养箱中, 而对照组则置于光照强度为 4 000 lx 的 25  $^{\circ}\text{C}$  培养箱中, 孵育 24 h 后观察结果; 将实验组 IV、V、VI 分别倾倒至培养皿中, 开盖后置于紫外线 B (312 nm)、紫外线 C (254 nm) 下照射, 剂量分别为 50、100、200  $\text{J}/\text{m}^2$ , 对照组不进行紫外照射, 随后将各组用锡纸包裹, 置于 25  $^{\circ}\text{C}$  培养箱 (4 000 lx) 中诱导孵育 24 h 后观察结果; 将实验组 VII、VIII、IX 组各管分别置于 30、35 和 40  $^{\circ}\text{C}$  培养箱 (4 000 lx) 中, 将对照组置于 25  $^{\circ}\text{C}$  培养箱 (4 000 lx) 中, 诱导孵育 24 h 后观察结果; 微囊藻生长 pH 范围为 5.7–10.5, 将实验组 X、XI、XII、XIII 各管分别调整至 pH 6.0、7.0、8.0、9.0、10.0, 将各管置于培养箱 (4 000 lx) 中诱导孵育 24 h 后观察结果。各组设置 3 个平行。对照组继续保持浑浊蓝绿色, 实验组裂解澄清黄化则标注为阳性。

### 1.8 原噬藻体的活性检验与宿主范围检测

原噬菌体基因组稳定性、宿主适应性和生态功能等受诱导条件的影响。丝裂霉素 C 诱导活化的噬菌体通常对原宿主 (指示菌) 具有典型的裂解活性和感染能力<sup>[31]</sup>, 可在包括指示菌在内的易感菌的菌苔上形成不完全透明的噬菌斑, 所以点斑法常用于此类噬菌体的活性验证和宿主范围检测<sup>[32-33]</sup>。参照文献 [32-33], 采用点斑法进一步验证 1.7 节所诱导的原噬藻体的活性。分别将 1 mL 新鲜培养的对数期水华微囊藻 FACHB-1344 和铜绿微囊藻 FACHB-1326 与 8 mL BG11 半固体培养基 (含 0.75% 琼脂) 混合后倾倒至 BG11 固体培养基平板 (含 1.5% 琼脂) 上, 冷却凝固, 获得双层平板。取 1.7 节诱导的原噬藻体裂解液在 4  $^{\circ}\text{C}$ 、8 000 $\times g$  条件下离心 10 min, 取上清液依次经 0.45  $\mu\text{m}$  和 0.22  $\mu\text{m}$  的聚醚砜滤器过滤, 将滤液分别滴到 FACHB-1344 和 FACHB-1326 双层平板上为实验组, 每个平板点 4 个区域, 每个区域点 3  $\mu\text{L}$ 。未滴加活化的噬藻体上

清过滤液的双层平板设为对照组。自然晾干后,倒置于 25 °C 光照培养箱中,每天观察噬斑是否出现。每组设 3 个平行。

参照文献[30-31],采用点斑法检测 1.7 节所诱导的原噬藻体的宿主范围。取 1.7 节诱导的原噬藻体裂解液在 4 °C、8 000×g 条件下离心 10 min,取上清液依次经 0.45 μm 和 0.22 μm 的聚醚砜滤器过滤,将滤液分别滴到实验室已有的 21 株微囊藻双层平板上,做原噬藻体的宿主范围实验。

### 1.9 活化的原噬藻体粒子的电镜观察

取 1.7 节诱导的原噬藻体裂解液在 4 °C、8 000×g 条件下离心 10 min,取上清液加入到 300 kDa 的透析袋中,于 4 °C 下在 PBS 溶液中透析 2 h。取透析后的原噬藻体,滴至铜网(200 目)上,静置 10 min 后,用中性滤纸从侧面吸去多余水分,用 2% 磷钨酸负染色 1 min,用中性滤纸从侧面吸去染色剂。静置 10 min 后,使用透射电镜(transmission electron microscope, TEM)观察病毒粒子形态。

## 2 结果与分析

### 2.1 原噬藻体预测情况

截至 2023 年 12 月 30 日,NCBI 中共有 354 株微囊藻噬藻体基因组,其中 98.3% 的藻株携带原噬藻体基因组或原噬藻体样基因组片段。共发现完整型原噬藻体基因组 13 个,疑似型原噬藻体基因组 5 个,非完整型原噬藻体 725 个(图 1A)。完整型原噬藻体和疑似型原噬藻体的宿主藻株和基因组大小等信息见表 1-2,其基因组序列原始数据存储在 国家微生物科学数据中心 (<http://nmcdc.cn>),编号为 NMDCX0002089。

分别将 13 个完整型噬藻体命名并编号为 WZ1-WZ13;将 5 个疑似型噬藻体命名并编号为 YS1-YS5。微囊藻原噬藻体基因组大小为 3.2-74.5 kb,其中,完整型噬藻体基因组大小在 13.4-45.2 kb 之间(图 1B、表 1),疑似型噬藻体基因组大小在 9.3-74.5 kb 之间(图 1B、表 2),

非完整型噬藻体基因组大小在 3.2-65.3 kb 之间(图 1B)。微囊藻原噬藻体基因组的 G+C 含量区间为 34.94%-68.22%,其中,完整型原噬藻体的 G+C 含量在 41.83%-47.41% 之间(图 1C、表 1),疑似型原噬藻体 G+C 含量在 40.65%-47.53% 之间(图 1C、表 2),不完整型噬藻体 G+C 含量在 34.94%-68.22% 之间(图 1C)。

### 2.2 完整型原噬藻体与疑似型原噬藻体毒力因子与耐药基因预测

用 CARD 平台对所有完整型与疑似型微囊藻原噬藻体进行分析,均未发现抗生素耐药基因(ARGs);用 VFDB 平台对所有完整型与疑似型微囊藻原噬藻体进行分析,均未发现毒力因子(virulence factors, VFs)的基因。

### 2.3 完整型原噬藻体与疑似型噬藻体的进化分类分析

全部 13 个完整型原噬藻体和 5 个疑似型原噬藻体与数据库中已知的所有病毒间分享的 PASC 值都<12%,这些值均远小于 ICTV 界定的属内病毒间的阈值(≥70%),结果表明这 18 个原噬藻体均不属于任何已知的属,而属于以往未知的病毒进化谱系,代表以往未知的新的分类单元。

在基于全基因组构建的蛋白谱发育树(图 2)中,YS3、WZ2、WZ4、WZ6 与 WZ7 近源地聚成一个枝簇(clade);WZ3、WZ5、WZ9、WZ10、WZ11 与 WZ12 近源地聚成一个枝簇;这 2 个枝簇间进化距离较近,共同构成一个更大的枝簇。疑似型原噬藻体 YS5 与已被分离报道的微囊藻烈性噬藻体 Ma-LMM01、Mamv-DH01 和 MaMV-DC 近源地一起构成一个枝簇;YS1、YS2 和 WZ1 远源地聚成一个枝簇;YS4 与 *Puniceispirillum* 的噬菌体 HMO-2011 远源地聚成一个枝簇;WZ8 与慢生杆菌属(*Lentibacter*)的噬菌体 Siovirus germanense 远源地聚成一个枝簇;WZ13 与伯克霍尔德氏菌属(*Burkholderia*)的噬菌体 K9 远源地聚成一个枝簇。

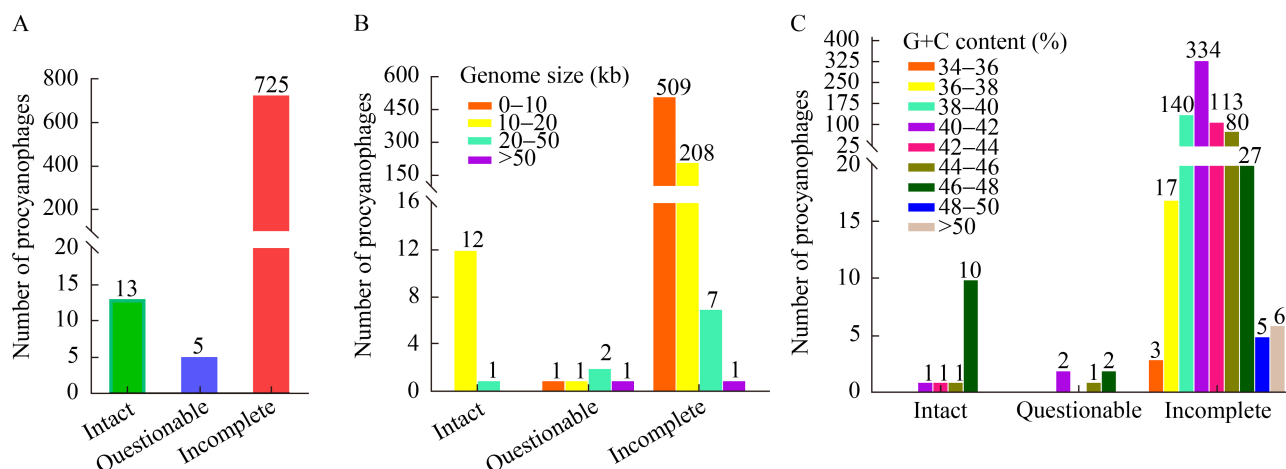


图1 微囊藻原噬藻体基因组特征的综合预测分析。A: 预测的微囊藻原噬藻体类型与数目; B: 预测的微囊藻原噬藻体的基因组大小分布; C: 微囊藻原噬藻体的G+C含量分布。

Figure 1 Comprehensive predictive analysis of procyanophage genomic features in *Microcystis* spp. A: Predicted types and numbers of the *Microcystis* procyanophages; B: The distribution of the genome size of the *Microcystis* procyanophages; C: The distribution of G+C content of the *Microcystis* procyanophages.

如前所述,在ICTV网站中可查询到最新的分类版本(#39)和分类标准:科内成员聚在同一个枝簇(clade)中,它们共享的核心基因占比不小于17%;亚科内成员共享的核心基因占比在27%–79%之间;属内成员共享80%的核心基因,属内成员间基因组相似度至少为70%;种内成员间的ANI值和isDDH值分别不小于95%和70%。

在YS3、WZ2、WZ4、WZ6、WZ7共同构成的枝簇中,各原噬藻体间进化距离很短,彼此间的基因组序列相似度很高,VIRIDIC值和PASC值均超过了属阈值(70%),结果提示它们可能归为同一个属。虽然这些原噬藻体间共享的核心基因占比为61.64%,但导致其共享基因占比不足80%的可能原因是YS3的基因组太小,使得其ORF数太少,这拉低了计算核心基因占比时的分子值。进一步地,这些原噬藻体间分享的ANI值(表3)均高于种内阈值(95%)、分享的isDDH值(表3)均高于种内阈值(70%),结果提示它们可能归为同一个种。它们共享的核心基因编码尾丝蛋白(tail fibers protein)、尾部

蛋白(tail protein)、基板蛋白(baseplate protein)、Pam3基板楔形结构(Pam3 baseplate wedge)蛋白、尾部溶菌酶(tail lysozyme)、毒素与PAAR结构域(Tox-PAAR-like)蛋白等。它们的宿主菌均为铜绿微囊藻和水华微囊藻FACHB-1344(表1、表2)。

WZ3、WZ5、WZ9和WZ11的进化距离很短,它们之间分享的ANI值、isDDH值(表3)均高于种内阈值,结果提示它们可能归为同一个种。虽然WZ10、WZ12与WZ3、WZ5、WZ9、WZ11聚成一个枝簇,但WZ10、WZ12与这四者之间分享的ANI与isDDH值(表3)低于种内阈值,结果提示WZ10、WZ12各自是不同的新种。这6个原噬藻体间的共享基因占比高达91.3%(图2),高于80%的属阈值,而且它们间分享的VIRIDIC值和PASC值均超过了属阈值(70%),结果提示它们可以归为同一个属。它们共享的核心基因分别编码尾部组装蛋白(tail assembly protein)、尾管蛋白(tail tube protein)、尾鞘蛋白(tail sheath protein)、尾部蛋白、基板蛋白、Pam3基板楔形结构蛋白、尾部溶菌酶、毒

表1 微囊藻完整型原噬藻体信息汇总表

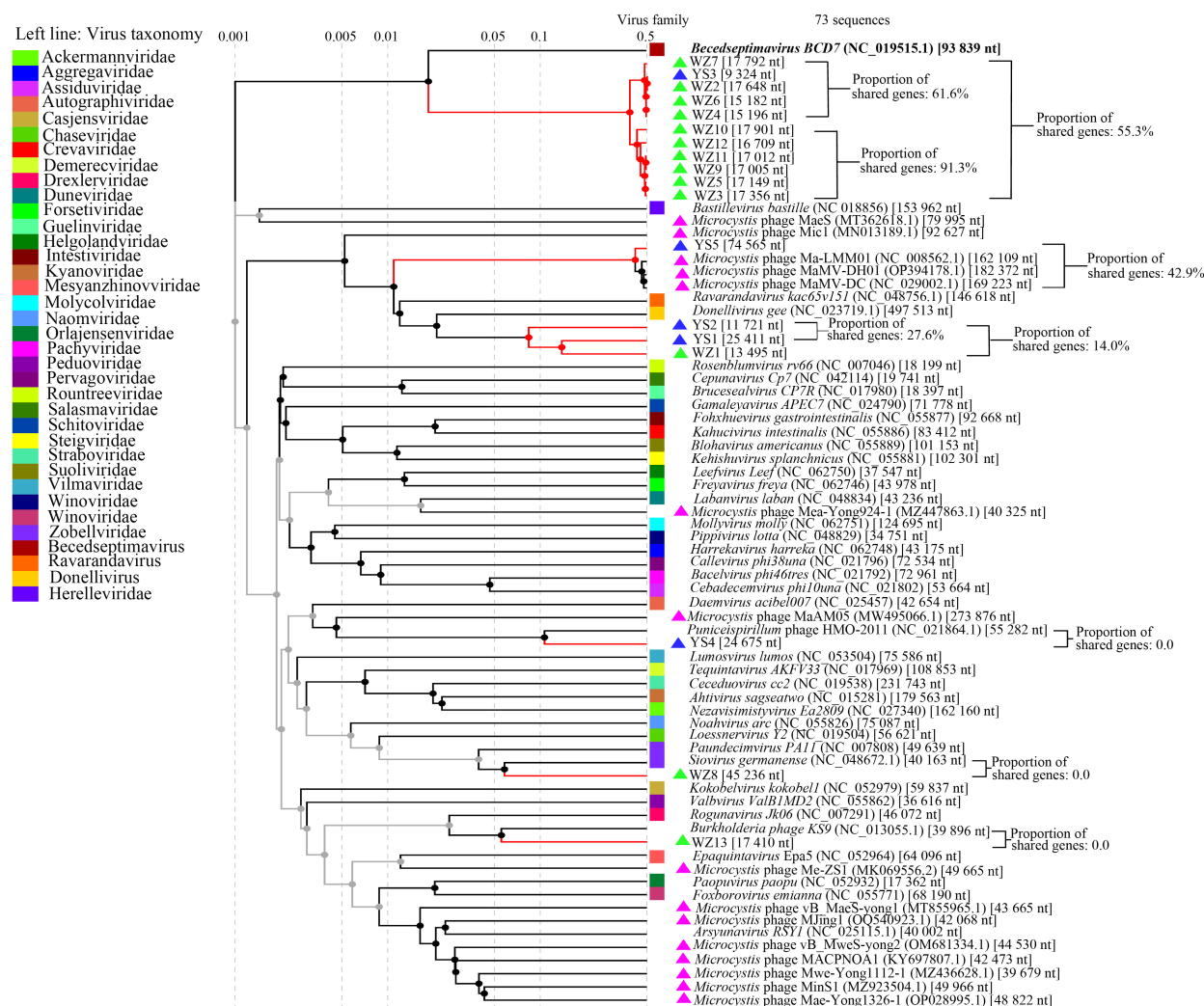
Table 1 Summary of intact procyanophages of *Microcystis* spp.

| Name | Host (accession number)                                       | Genome size (kb) | G+C content (%) | Number of ORFs | PHASTER score |
|------|---------------------------------------------------------------|------------------|-----------------|----------------|---------------|
| WZ1  | <i>Microcystis viridis</i> NIES-102 (AP019314.1)              | 13.4             | 41.83           | 22             | 110           |
| WZ2  | <i>Microcystis aeruginosa</i> 11-30S32 (BHVU01000019.1)       | 17.6             | 46.95           | 15             | 100           |
| WZ3  | <i>Microcystis aeruginosa</i> PCC 9443 (HE973005.1)           | 17.3             | 47.05           | 17             | 100           |
| WZ4  | <i>M. aeruginosa</i> BS11-05 (JAADAD010000119.1)              | 15.1             | 47.41           | 15             | 110           |
| WZ5  | <i>M. aeruginosa</i> F13-15 (JAADAG010000087.1)               | 17.1             | 47.07           | 17             | 100           |
| WZ6  | <i>M. aeruginosa</i> L111-01 (JAADAX010000123.1)              | 15.1             | 47.38           | 16             | 110           |
| WZ7  | <i>M. flos-aquae</i> FACHB-1344 (JACJSW010000233.1)           | 17.7             | 47.03           | 16             | 100           |
| WZ8  | <i>Microcystis</i> sp. M110S1 (JADBRY010000143.1)             | 45.2             | 42.12           | 56             | 100           |
| WZ9  | <i>Microcystis</i> sp. M41BS1 (JADBVJ010000056.1)             | 17.0             | 47.25           | 16             | 100           |
| WZ10 | <i>Microcystis</i> sp. LE17-20D (JAPZQZ010000103.1)           | 17.9             | 46.71           | 16             | 100           |
| WZ11 | <i>Microcystis</i> sp. LE19-84 (JAPZSR010000022.1)            | 17.0             | 47.13           | 16             | 100           |
| WZ12 | <i>M. aeruginosa</i> CHAOHU 1326 (MOLZ01000045.1)             | 16.7             | 47.12           | 15             | 110           |
| WZ13 | <i>M. wesenbergii</i> Mw_MB_S_20031200_S109D (SFAP01000237.1) | 17.4             | 44.44           | 20             | 110           |

表2 疑似型原噬藻体汇总表

Table 2 Summary of questionable procyanophages of *Microcystis* spp.

| Name | Host (accession number)                           | Genome size (kb) | G+C content (%) | Number of ORFs | PHASTER score |
|------|---------------------------------------------------|------------------|-----------------|----------------|---------------|
| YS1  | <i>M. aeruginosa</i> NIES-298 (CP046058.1)        | 25.4             | 40.65           | 24             | 70            |
| YS2  | <i>M. aeruginosa</i> FACHB-905 (CP089094.1)       | 11.7             | 40.63           | 13             | 70            |
| YS3  | <i>M. aeruginosa</i> G13-05 (JAADAN010000102.1)   | 9.3              | 46.79           | 9              | 70            |
| YS4  | <i>Microcystis</i> sp. M31BS1 (JADBE010000095.1)  | 24.6             | 47.53           | 37             | 90            |
| YS5  | <i>Microcystis</i> sp. M20BS1 (JADBUZ010000015.1) | 74.5             | 45.01           | 77             | 90            |



**图2** 完整型原噬藻体和疑似型原噬藻体的蛋白谱系统发育树。绿色的三角形表示完整型原噬藻体，蓝色的三角形表示疑似型原噬藻体，粉红色的三角形表示微囊藻噬藻体。

Figure 2 Phylogenomic tree of protein profiles of intact and questionable procyanophages. Green triangles indicate intact procyanophages, blue triangles indicate questionable procyanophages, and pink triangles indicate *Microcystis* cyanophages.

素与 PAAR 结构域蛋白等。

WZ3、WZ5、WZ9、WZ10、WZ11、WZ12 所在的枝簇与 YS3、WZ2、WZ4、WZ6、WZ7 所在的枝簇共同构成一个更大的枝簇，它们间的共享基因占比为 55.3% (图 2)，小于属阈值 (80%)，大于 17% 的科阈值，在亚科阈值区间 (27%–79%) 中，2 个枝簇的病毒间的 VIRIDIC 和 PASC 值也小于属阈值，结果提示它们分别属于

2 个新属, 共同属于一个新的亚科。它们共享的核心基因分别编码尾部蛋白、尾管蛋白、尾部组装蛋白、尾鞘蛋白、基板蛋白、Pam3 基板楔形结构、尾部溶菌酶、毒素与 PAAR 结构域蛋白。该亚科与芽孢杆菌的噬菌体 Becedseptimavirus BCD7 远源地聚集, 但无共享的核心基因, 结果显示这 11 个微囊藻原噬藻体构成的亚科实际揭示一个以往未知的科。

在基于全基因组比对的发育树中,微囊藻原噬藻体 YS5 与微囊藻烈性噬藻体 Ma-LMM01、MaMV-DH01、MaMV-DC 共同构成的枝簇与其他病毒间的进化距离遥远(>0.45) (图 2)。YS5 与这些微囊藻的烈性噬藻体之间分享的 VIRIDIC 值分别为 54.6%、50.7%、52.2%,均小于属阈值(70%); YS5 与这些烈性噬藻体共享的核心基因占比为 42.9%,处于亚科的阈值区间(27%–79%)。结果提示 YS5 代表一个以往未知的新的属,它与这些尚未分类的微囊藻烈性噬藻体 Ma-LMM01、MaMV-DH01、MaMV-DC 共同构成一个以往未知的亚科,该亚科中的噬藻体内共享的核心基因分别编码末端酶大亚基(terminase large subunit)、DNA 聚合酶(DNA polymerase)、DNA 引发酶(DNA primase)、转座酶(transposase)、裂解酶(lysis)、核糖核苷酸还原酶(ribonucleotide reductase)、RNA 连接酶(RNA ligase)、DNA 解旋酶(DNA helicase)、RecA 蛋白(RecA protein)、外切酶(exonuclease)、非褪色蛋白 A (NblA)以及 48 个未能注释出功能的假设蛋白。

在基于全基因组比对的发育树中, WZ1 与 YS1 聚成一簇(图 2),两者间共享的核心基因占比为 27.6%,小于属内阈值(80%),落在亚科的阈值区间(27%–79%);两者间的 VIRIDIC 和 PASC 值也小于属阈值。结果提示 WZ1 与 YS1 各自代表一个以往未知的属,它们可能归为同一个新的亚科。二者与 YS2 构成一个更大的枝簇,三者之间共享的核心基因占比为 14.0%,小于科阈值(17%),结果提示 YS2 揭示一个以往未知的新科, WZ1 与 YS1 一起揭示一个以往未知的科。WZ1 与 YS1 共享的核心基因编码转座酶。

在基于全基因组比对的发育树中(图 2), YS4 与 *Puniceispirillum* 菌的噬菌体 HMO-2011 远源地聚成一个枝簇; WZ8 与慢生杆菌属(*Lentibacter*)的噬菌体 *S. germanense* 远源地聚成一个枝簇; WZ13 与伯克霍尔德氏菌属

(*Burkholderia*)的噬菌体 KS9 远源地聚成一个枝簇。VirClust 分析显示, YS4 与 HMO-2011 间、WZ8 与 *S. germanense* 间、WZ13 与 KS9 间均无共享的核心基因, VIRIDIC 和 PASC 比对也显示它们两两间的基因组相似度很低( $\leq 0$ ),结果显示 YS4、WZ8、WZ13 各自代表以往未知的新的科。

## 2.4 完整型原噬藻体与疑似型原噬藻体的基因组注释

使用在线注释软件 RAST、HHpred、HMMER 和 BLASTp 进行注释后,将 ORFs 基于功能归为 4 个基因模块:复制与调节、裂解、溶原与转座、结构(图 3、表 4)(编号为 NMDCX0002089)。未能被功能注释的 ORFs 编码的蛋白被称作假设蛋白(hypothetical protein)。与一般噬菌体类似,原噬藻体中存在重叠基因。原噬藻体 YS1 的基因组末端有短的正向末端重复序列: attL (ATAGAAGTCCGA, 区域位置: 17 226–17 237 bp)和 attR (ATAGAAGTCCGA, 区域位置: 42 636–42 647 bp)。

在 WZ1 基因组中注释出编码 sleeping beauty 转座酶的基因,在 WZ1 和 YS2 中都注释出编码 Mariner Mos1 转座酶的基因。Sleeping beauty 转座酶是一种 Tc1/mariner 超家族 DNA 转座子,可在多种生物体中提供一种流行的基因组工程工具,由转座酶动员,转座酶催化 DNA 切割和整合在转座子末端的短特异性序列上<sup>[34]</sup>。Mariner Mos1 转座酶最早是在毛里求斯果蝇中发现的转座因子,属于 Mos1-mariner/Tc1 家族,通过剪切和粘贴机制转座,在 TA 二核苷酸处插入并编码转座酶<sup>[35]</sup>。

在 13 个完整型原噬藻体和 5 个疑似型原噬藻体中,除 WZ1 和 YS2 外,其他 12 个完整型原噬藻体和 4 个疑似型原噬藻体均被注释出与溶菌相关的基因。将完整型原噬藻体和疑似型原噬藻体的各 ORF 编码的蛋白与公共数据库中所有的参考序列进行 BLASTp 比对,发现除了

表3 完整型和疑似型微囊藻原噬藻体间分享的ANI值和isDDH值

Table 3 ANI and isDDH values shared between intact and questionable *Microcystis* spp. procyanophages

| ANI<br>(%) | isDDH (%) |      |      |       |      |       |      |     |      |      |      |      |      |      |      |       |     |     |
|------------|-----------|------|------|-------|------|-------|------|-----|------|------|------|------|------|------|------|-------|-----|-----|
|            | WZ1       | WZ2  | WZ3  | WZ4   | WZ5  | WZ6   | WZ7  | WZ8 | WZ9  | WZ10 | WZ11 | WZ12 | WZ13 | YS1  | YS2  | YS3   | YS4 | YS5 |
| WZ1        |           | 0.0  | 0.0  | 0.0   | 0.0  | 0.0   | 0.0  | 0.0 | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 88.2 | 83.9 | 0.0   | 0.0 | 0.0 |
| WZ2        | 0.0       |      | 51.4 | 76.9  | 51.3 | 77.1  | 77.9 | 0.0 | 51.6 | 49.9 | 51.8 | 58.1 | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 78.1  | 0.0 | 0.0 |
| WZ3        | 0.0       | 95.2 |      | 54.7  | 85.6 | 54.6  | 54.2 | 0.0 | 80.5 | 45.6 | 80.7 | 64.9 | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 47.3  | 0.0 | 0.0 |
| WZ4        | 0.0       | 97.0 | 95.6 |       | 54.2 | 99.5  | 71.7 | 0.0 | 58.1 | 49.3 | 58.1 | 58.7 | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 100.0 | 0.0 | 0.0 |
| WZ5        | 0.0       | 95.4 | 98.0 | 96.6  |      | 54.2  | 55.4 | 0.0 | 78.9 | 44.9 | 80.1 | 62.4 | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 48.4  | 0.0 | 0.0 |
| WZ6        | 0.0       | 97.0 | 95.7 | 100.0 | 96.6 |       | 71.9 | 0.0 | 58.1 | 49.4 | 58.2 | 58.6 | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 99.9  | 0.0 | 0.0 |
| WZ7        | 0.0       | 97.1 | 97.0 | 96.3  | 96.8 | 96.3  |      | 0.0 | 54.0 | 45.9 | 53.6 | 58.8 | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 72.6  | 0.0 | 0.0 |
| WZ8        | 0.0       | 0.0  | 0.0  | 0.0   | 0.0  | 0.0   | 0.0  |     | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0   | 0.0 | 0.0 |
| WZ9        | 0.0       | 92.6 | 97.1 | 93.9  | 97.4 | 93.9  | 92.9 | 0.0 |      | 47.6 | 94.4 | 72.4 | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 47.4  | 0.0 | 0.0 |
| WZ10       | 0.0       | 92.4 | 91.9 | 91.6  | 93.4 | 91.6  | 91.0 | 0.0 | 92.3 |      | 47.4 | 52.0 | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 39.1  | 0.0 | 0.0 |
| WZ11       | 0.0       | 92.6 | 97.0 | 93.9  | 97.6 | 94.0  | 92.8 | 0.0 | 99.2 | 92.2 |      | 69.1 | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 47.0  | 0.0 | 0.0 |
| WZ12       | 0.0       | 95.4 | 97.2 | 96.8  | 94.6 | 96.8  | 96.9 | 0.0 | 96.9 | 93.7 | 96.6 |      | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 50.7  | 0.0 | 0.0 |
| WZ13       | 0.0       | 0.0  | 0.0  | 0.0   | 0.0  | 0.0   | 0.0  | 0.0 | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  |      | 0.0  | 0.0  | 0.0   | 0.0 | 0.0 |
| YS1        | 98.8      | 0.0  | 0.0  | 0.0   | 0.0  | 0.0   | 0.0  | 0.0 | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  |      | 0.0  | 0.0   | 0.0 | 0.0 |
| YS2        | 98.8      | 0.0  | 0.0  | 0.0   | 0.0  | 0.0   | 0.0  | 0.0 | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  |      | 0.0   | 0.0 | 0.0 |
| YS3        | 0.0       | 97.9 | 90.2 | 100.0 | 93.5 | 100.0 | 96.7 | 0.0 | 96.1 | 92.2 | 96.0 | 97.5 | 0.0  | 0.0  | 0.0  |       | 0.0 | 0.0 |
| YS4        | 0.0       | 0.0  | 0.0  | 0.0   | 0.0  | 0.0   | 0.0  | 0.0 | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0   |     | 0.0 |
| YS5        | 0.0       | 0.0  | 0.0  | 0.0   | 0.0  | 0.0   | 0.0  | 0.0 | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0   | 0.0 |     |

WZ13 外，其他原噬藻体的编码蛋白的 Top hit 均为微囊藻或者微囊藻噬藻体 (编号为 NMDCX0002089)。

在对 WZ13 的 ORF 进行 BLASTp 比对时，其中 12 个蛋白与多核杆菌属(*Fusobacterium*)的蛋白同源性最高，1 个与劳特罗普氏菌属(*Lautropia*)的同源性最高，其他 7 个的 Top hit 为惠氏微囊藻(*Microcystis wesenbergii*)的蛋白(编号为 NMDCX0002089)。

在这些微囊藻原噬藻体中，WZ8 和 YS5 被注释出较多的辅助代谢基因。WZ8 的 ORF 34 被预测为编码谷氨酰环转移酶 (glutamyl transferase, GT)，ORF36 预测为编码氨基甲酰磷酸合成酶(carbamoyl phosphate synthetase, CPS)，ORF37 预测为编码天冬酰胺合成酶(asparagine synthase, ASNS)，ORF57 预测为编码胸苷酸合成酶(thymidylate synthase, TS)，ORF59 预测为编码黄素依赖型胸苷酸合成酶(flavin-dependent thymidylate synthase, FDTS or ThyX)。谷氨酰胺转氨酶(又称转谷氨酰胺酶)可催化蛋白质多肽发

生分子内和分子间共价交联，从而改善蛋白质的结构和功能，对改善蛋白质的性质(如发泡性、乳化性、乳化稳定性、热稳定性、保水性和凝胶能力等)效果显著，进而改善食品的风味、口感、质地和外观等，作为一种新型食品添加剂，被广泛应用于食品加工领域，如水产加工品、肉丸、火腿、香肠、豆腐等的制作<sup>[36]</sup>。氨基甲酰磷酸合成酶是一种关键的代谢酶，催化氨基甲酰磷酸的生成，是连接氮代谢与核苷酸合成的核心酶，参与尿素循环和嘧啶核苷酸合成途径<sup>[37]</sup>。天冬酰胺合成酶是一种关键的代谢酶，催化天冬氨酸 (aspartate, Asp) 和谷氨酰胺 (glutamine, Gln)合成天冬酰胺(asparagine, Asn)，在氮代谢和转运、氨基酸代谢、细胞增殖和应激响应中起着至关重要的作用，其功能跨越多物种，在基础代谢与疾病防控中具有重要研究价值<sup>[38]</sup>。胸苷酸合成酶是参与 DNA 合成与修复的不可或缺的关键酶，负责催化脱氧尿苷酸 (deoxyuridine monophosphate, dUMP)甲基化生成脱氧胸苷酸 (deoxythymidine monophosphate,

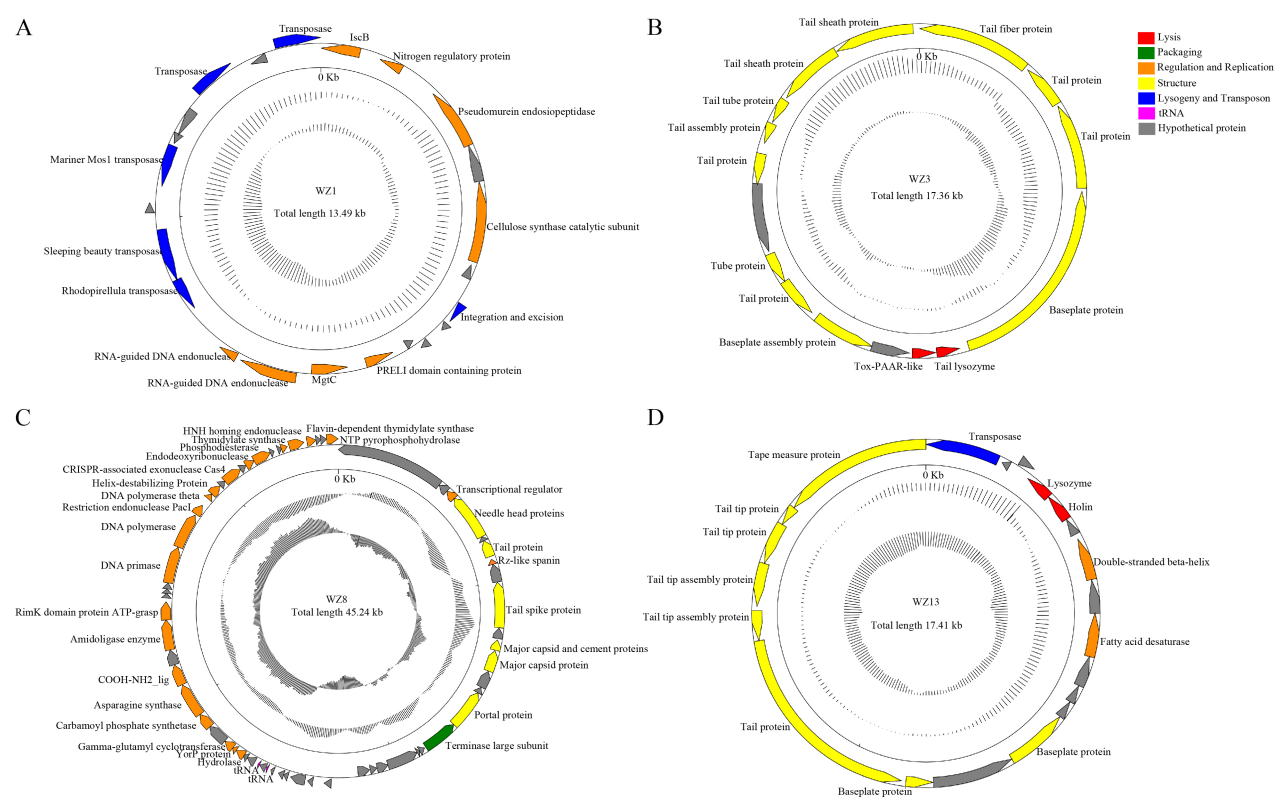


图3 微囊藻原噬藻体WZ1、WZ3、WZ8与WZ13的基因组图谱

Figure 3 Genome maps of procyanophages WZ1, WZ3, WZ8, and WZ13.

表4 完整型原噬藻体和疑似型微囊藻原噬藻体基因功能归类

| Procyanophages | Lysis | Lysogeny and transposon | Packaging | Replication and regulation | Structure | Hypothetical protein | Total ORFs |
|----------------|-------|-------------------------|-----------|----------------------------|-----------|----------------------|------------|
| WZ1            | —     | 6                       | —         | 8                          | —         | 9                    | 23         |
| WZ2            | 2     | —                       | —         | —                          | 12        | 2                    | 16         |
| WZ3            | 2     | —                       | —         | —                          | 12        | 2                    | 16         |
| WZ4            | 3     | —                       | —         | —                          | 12        | 1                    | 16         |
| WZ5            | 2     | —                       | —         | —                          | 12        | 2                    | 16         |
| WZ6            | 2     | —                       | —         | —                          | 12        | 2                    | 16         |
| WZ7            | 2     | —                       | —         | —                          | 12        | 2                    | 16         |
| WZ8            | 1     | —                       | 1         | 21                         | 6         | 33                   | 62         |
| WZ9            | 2     | —                       | —         | —                          | 12        | 1                    | 15         |
| WZ10           | 2     | —                       | —         | —                          | 13        | —                    | 15         |
| WZ11           | 2     | —                       | —         | —                          | 12        | 1                    | 15         |
| WZ12           | 2     | —                       | —         | —                          | 12        | 1                    | 15         |
| WZ13           | 2     | 1                       | —         | 2                          | 8         | 8                    | 21         |
| YS1            | 1     | 11                      | —         | 14                         | —         | 11                   | 37         |
| YS2            | —     | 6                       | —         | 5                          | —         | 1                    | 12         |
| YS3            | 2     | —                       | —         | 2                          | 5         | —                    | 9          |
| YS4            | 2     | —                       | 2         | 8                          | 5         | 20                   | 37         |
| YS5            | 4     | 3                       | 1         | 22                         | 2         | 63                   | 95         |

dTMP), dTMP 是 DNA 中胸腺嘧啶的直接前体<sup>[39]</sup>。FDTS 是一种不同于经典胸苷酸合成酶的嘧啶合成关键酶, 利用黄素辅因子(flavin adenine dinucleotide, FAD/FMN)和烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH)催化脱氧尿苷酸转化为 dTMP, 为 DNA 合成提供胸腺嘧啶前体。FDTS 主要存在于细菌、古菌和部分真核微生物(如藻类)中, 已成为抗微生物药物开发的重要靶点<sup>[40]</sup>。

在 YS5 中, ORF2 被预测为编码腐胺 N-羟化酶(putrescine N-hydroxylase, PNH), ORF24 被预测为编码辅酶 PQQ 合成蛋白(coenzyme PQQ synthesis protein, PQQ synthase), ORF64 被预测为编码去磷酸辅酶 A 激酶(dephospho-CoA kinase, DPCK), ORF73 被预测为编码尿嘧啶-DNA 糖基化酶(uracil-DNA glycosylase, UDG), ORF91 被预测为编码核糖核苷二磷酸还原酶(ribonucleoside-diphosphate reductase, RNR)。腐胺 N-羟化酶催化腐胺(putrescine)的 N-羟化反应, 生成 N-羟基腐胺(N-hydroxyputrescine), 是铁载体合成的重要参与者, 对细菌在低铁环境中的生存至关重要。在合成生物学领域, 该酶被引入大肠杆菌, 用于生产高附加值产品<sup>[41]</sup>。辅酶 PQQ 合成蛋白(又称吡咯喹啉酮合成酶)催化合成吡咯喹啉酮(pyrroloquinoline quinone, PQQ), PQQ 是一种具有氧化还原活性的醌类辅酶, 广泛存在于微生物、植物和动物中, 参与多种生物代谢过程。PQQ 可广泛应用于生物传感器、生物燃料、植物促生、环境修复、医药与保健等领域。作为人体必需的营养素(水溶性类维生素), PQQ 具有抗衰老、改善认知、抗糖尿病、修复和保肝等功能。目前 PQQ 的微生物发酵产量较低, 需优化合成元件以提高产率, 如果 YS5 的 ORF24 编码的 PQQ synthase 具有高水平的 PQQ 合成能力, 则有望提升该产业, 值得深入研究<sup>[42]</sup>。去磷酸辅酶 A 激酶催化合成辅酶 A (coenzyme A, CoA)的最后一步, 是连接能量代谢与生物合成的核心元件<sup>[43]</sup>。尿嘧啶-DNA

糖基化酶催化含尿嘧啶的 DNA 去除尿嘧啶, 形成嘧啶缺失位点(即 AP 位点), 是 DNA 修复研究的模式分子, 该酶是 DNA 碱基切除修复(base excision repair, BER)途径中的关键起始酶, 可修复胞嘧啶自发脱氨产生的突变, 并特异性识别并切除 DNA 中错误掺入的尿嘧啶, 维持表观遗传标记。在分子生物学领域, 尿嘧啶-DNA 糖基化酶被用于控制 PCR 污染、修复古 DNA 损伤<sup>[44]</sup>。核糖核苷二磷酸还原酶是负责将核糖核苷酸(ribonucleoside triphosphates, NTPs)催化为脱氧核糖核苷酸(deoxyribonucleotides, dNTPs)的关键酶, 其产物 dNTPs 是 DNA 复制与修复的必需原料<sup>[45]</sup>。

## 2.5 原噬藻体的诱导活化与活性验证

水华微囊藻 FACHB-1344 和铜绿微囊藻 FACHB-1326 的基因组中各有 1 个完整型原噬藻体, 分别为 WZ7 和 WZ12; 铜绿微囊藻 FACHB-905 中有 1 个疑似型噬藻体, 为 YS2。为了验证其活性, 开展了诱导试验和点斑试验。FACHB-1344 和 FACHB-1326 的藻液在 25 °C 培养箱中用诱导剂丝裂霉素 C 处理 3 d 后均黄化或裂解澄清(图 4A、4B), 而同期对照组藻液保持蓝绿色。丝裂霉素 C 处理的 FACHB-905 藻液不出现黄化或澄清。结果显示, 完整型原噬藻体 WZ7 和 WZ12 可被丝裂霉素 C 诱导活化, 而疑似型原噬藻体 YS2 不可被丝裂霉素 C 诱导活化。环境应激(光照、温度、pH 和紫外线胁迫)无法将上述原噬藻体诱导活化。

分别将丝裂霉素 C 诱导的噬藻体悬液的离心上清过滤液点到含有 FACHB-1344 藻液和 FACHB-1326 藻液的双层平板上, 在 25 °C 光照培养箱中培养 5 d 后, 在藻平板上出现藻苔, 且在点样区域均出现明显的噬藻斑(图 4C、4D 的箭头), 这进一步验证了被活化的噬藻体的溶藻活性。

## 2.6 诱导活化的原噬藻体的宿主范围

宿主范围如表 5 所示, 从水华微囊藻

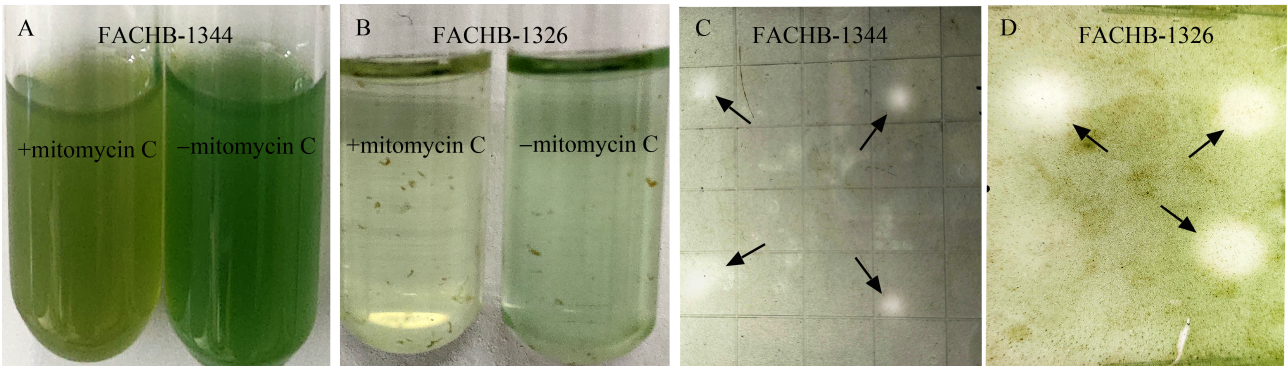


图4 FACHB-1344与FACHB-1326的裂解液与正常藻液(A、B)和噬藻体在藻苔上造成的噬斑(C、D)

Figure 4 Normal cultures and lysates of FACHB-1344 and FACHB-1326 with (A, B) and phagoliths causing phagolithic spots on algal moss (C, D).

表5 诱导活化的FACHB-1344原噬藻体WZ7和FACHB-1326原噬藻体WZ12的宿主范围

Table 5 Host range of induced WZ7 of *Microcystis flos-aquae* FACHB-1344 and WZ12 of *Microcystis aeruginosa* FACHB-1326

| Strains                           | WZ7 of <i>M. flos-aquae</i> FACHB-1344 | WZ13 of <i>M. aeruginosa</i> FACHB-1326 |
|-----------------------------------|----------------------------------------|-----------------------------------------|
| <i>M. aeruginosa</i> FACHB-905    | –                                      | –                                       |
| <i>M. aeruginosa</i> FACHB-942    | –                                      | –                                       |
| <i>M. aeruginosa</i> FACHB-1326   | –                                      | +                                       |
| <i>M. aeruginosa</i> FACHB-924    | –                                      | –                                       |
| <i>M. aeruginosa</i> FACHB-925    | –                                      | –                                       |
| <i>M. aeruginosa</i> FACHB-469    | –                                      | –                                       |
| <i>M. wesenbergii</i> FACHB-908   | –                                      | –                                       |
| <i>M. wesenbergii</i> FACHB-1112  | –                                      | –                                       |
| <i>M. wesenbergii</i> FACHB-1318  | –                                      | –                                       |
| <i>M. wesenbergii</i> FACHB-1317  | –                                      | –                                       |
| <i>M. wesenbergii</i> FACHB-929   | +                                      | +                                       |
| <i>M. flos-aquae</i> FACHB-1028   | +                                      | –                                       |
| <i>M. flos-aquae</i> FACHB-1351   | –                                      | +                                       |
| <i>M. flos-aquae</i> FACHB-1323   | +                                      | +                                       |
| <i>M. flos-aquae</i> FACHB-1344   | +                                      | –                                       |
| <i>M. elabens</i> FACHB-916       | –                                      | +                                       |
| <i>M. Panniformis</i> FACHB-1757  | –                                      | –                                       |
| <i>M. Ichthyoblabe</i> FACHB-1409 | –                                      | –                                       |
| <i>M. viridis</i> FACHB-979       | –                                      | –                                       |
| <i>M. viridis</i> FACHB-1342      | –                                      | –                                       |
| <i>Microcystis</i> sp. FACHB-915  | –                                      | –                                       |

+表示易感藻；–表示抗性藻。

+: Susceptible; -: Resistant.

FACHB-1344 诱导活化的噬藻体能够感染水华微囊藻 FACHB-1323、FACHB-1028 和惠氏微囊藻 FACHB-929；从铜绿微囊藻 FACHB-1326 诱导活化的噬藻体能够感染惠氏微囊藻 FACHB-929、

华美微囊藻 FACHB-916 和水华微囊藻 FACHB-1351、FACHB-1323。

2.7 诱导活化的原噬藻体粒子的形态

活化的 WZ7 和 WZ12 病毒粒子(图 5)均呈

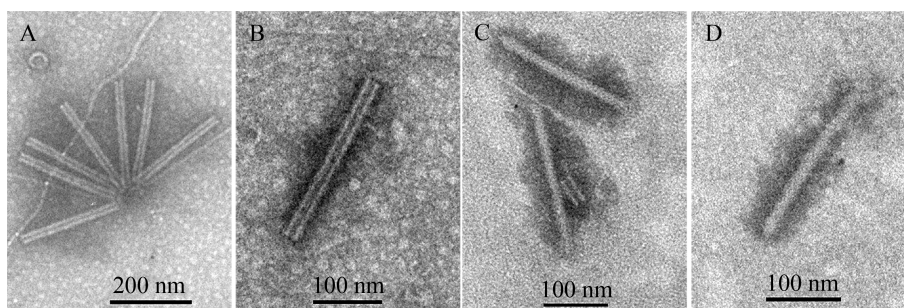


图5 活化的WZ7 (A、B)和WZ12 (C、D)的电镜图

Figure 5 Transmission electron microscopy photos of activated WZ7 (A, B) and WZ12 (C, D).

现杆状结构。WZ7 的长度为 $(247\pm6)$  nm, 直径为 $(23\pm2)$  nm; WZ12 的长度为 $(219\pm12)$  nm, 直径为 $(17\pm6)$  nm。

### 3 讨论与结论

本研究对现有微囊藻基因组中携带的原噬藻体进行了预测和较为系统的分析, 阐释了微囊藻溶原率、微囊藻原噬藻体的基因组特征、系统进化地位, 对完整型原噬藻体和疑似型原噬藻体进行了基因功能注释和耐药基因与毒力基因的搜索分析, 并用试验验证了含有完整型原噬藻体的 FACHB-1344 与 FACHB-1326 藻株中的原噬藻体的可诱导活性。本研究填补了微囊藻原噬藻体研究的空白, 丰富了噬藻体知识库。系统进化分析表明, 本研究所发现的原噬藻体非常新颖, 揭示了诸多以往未知的病毒进化谱系。

溶原现象普遍存在于微囊藻中, 在全部 354 个微囊藻基因组中 98.3% 的藻株被预测出携带原噬藻体或原噬藻体样片段。已报道的烈性微囊藻噬藻体的 G+C 含量为 35.17%–71.80%, 而本研究中预测的完整型和疑似型原噬藻体的 G+C 含量为 40.63%–47.53%。在已报道的真细菌原噬菌体中大多数含有毒力因子与耐药基因, 而在已报道的烈性微囊藻噬藻体中通常不含毒力因子与耐药基因。本研究发现的所有完整型和疑似型微囊藻原噬藻体也不含已知的毒力因子或耐药基因。可能的原因有: 一方面, 水体中

的蓝藻不像细菌一样广泛受到抗生素的影响, 因此在蓝藻基因组中未广泛出现耐药基因, 原噬藻体基因组中也不会因基因水平转移而出现耐药性; 另一方面, 蓝藻本身具有编码拮抗竞争者的藻毒素基因, 无需噬藻体来提供毒性基因来提高竞争力<sup>[46]</sup>。

依据 ICTV 的分类原则, 基于全基因组的系统比对分析表明 WZ3、WZ5、WZ9、WZ10、WZ11、WZ12 与 YS3、WZ2、WZ4、WZ6、WZ7 一起代表一个以往未知的新科; YS5 代表一个以往未知的新属, 它与分类地位待定的微囊藻烈性噬藻体 Ma-LMM01、MaMV-DH01、MaMV-DC 共同构成一个以往未知的新亚科; WZ1、YS1 与 YS2 各自代表一个以往未知的属, 它们共同构成一个以往未知的新科; YS4、WZ8、WZ13 各自代表以往未知的新科。综上所述, 大部分的微囊藻原噬藻体与现有的微囊藻噬藻体具有遥远的进化距离, 本研究揭示了诸多以往未知的新病毒进化谱系, 这与以往原噬藻体研究的空白性、微囊藻噬藻体研究信息的欠缺相关。

在原噬藻体 WZ1 和 YS2 中发现编码 Mariner Mos1 转座酶的基因, 而该基因在昆虫的转录实验中大量被使用<sup>[47-48]</sup>; 在原噬藻体 WZ1 中发现编码 *Sleeping Beauty* 转座酶的基因, 而 *Sleeping Beauty* 转座酶在哺乳动物的转录实验中被大量使用<sup>[49-50]</sup>。本研究在原噬藻体中注释出编码 Mariner Mos1 转座酶、*Sleeping Beauty*

转座酶的基因。在完整型原噬藻体 WZ8 和疑似型原噬藻体 YS5 中, 本研究鉴定出多类具有重要代谢功能的辅助基因。WZ8 携带的谷氨酰环转移酶可增强食品加工特性, 其氨基甲酰磷酸合成酶和天冬酰胺合成酶分别参与氮代谢调控及氨基酸合成, 而胸苷酸合成酶与黄素依赖型胸苷酸合成酶通过互补机制驱动 DNA 前体合成, 揭示其基因冗余策略。YS5 则编码腐胺 N-羟化酶和辅酶 PQQ 合成酶, 前者参与铁载体生物合成, 后者催化具有多重生理功能的醌类辅因子合成, 暗示其在微生物工程中的潜在应用价值。此外, YS5 的去磷酸辅酶 A 激酶、尿嘧啶-DNA 糖基化酶及核糖核苷二磷酸还原酶分别调控辅酶 A 代谢、DNA 修复损伤及脱氧核苷酸生成, 构成完整的代谢网络。这些发现为噬藻体代谢多样性及其在生物技术领域的应用提供了新见解, 原噬藻体的基因是一个宝贵的资源库等待我们去发掘。

原噬菌体、细菌间可发生基因的水平转移<sup>[51-52]</sup>, 相互促进彼此的进化, 细菌可获得整合在其基因组上的原噬菌体的某些基因, 从而获得新功能强化某些功能, 提高适应性; 原噬菌体也可以从宿主那里获得某些基因<sup>[28]</sup>。本研究在原噬藻体 YS5 的基因组中注释出编码 NblA 蛋白的 ORF (编号为 NMDCX0002089)。NblA 在蓝藻中起着至关重要的双重作用: 它保护细胞免受高光强度的影响, 并在营养限制条件下增加细胞内氮库。藻胆体是蓝藻的捕光复合物, 藻胆素可占细胞可溶性蛋白含量的一半。在营养饥饿时, 尤其氮不足时, 蓝藻会迅速将其降解, 以增加细胞内氮库, 从而给重要生化过程提供营养, NblA 是藻胆体降解过程中的关键调节因子<sup>[53]</sup>。此外, 在 WZ13 的 ORF 在 BLASTp 比对时, 其大部分的 Top hit 并非微囊藻或者微囊藻噬藻体的基因, 而是真细菌, 这也从侧面显示出原噬藻体在原核生物与原核生物之间的基因组水平转移中发挥了关键性的作用。

## 作者贡献声明

洪彬鑫: 数据收集与分析、图表制作和稿件写作; 潘灵婷: 数据处理和稿件修改; 谭隆: 思路讨论; 张靖昊: 语言润色; 杨佳豪: 数据分析; 徐舒燕: 图表制作; 徐锦鹏: 优化表格; 景晓盈: 优化图片; 李登峰: 稿件选题、研究思路和稿件修改; 童贻刚: 研究思路和稿件修改。

## 作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

## 参考文献

- [1] 周诗颖, 冯兵, 王强, 祝栋梁, 夏威, 姚娜, 张萌. 水华藻类群体的形成、影响因素及竞争优势[J/OL]. 水生态学杂志, 2024: 1-10. DOI: 10.15928/j.1674-3075.202308130218.  
ZHOU SY, FENG B, WANG Q, ZHU DL, XIA W, YAO N, ZHANG M. The formation, influencing factors and competitive advantage of bloom algae colony[J/OL]. Journal of Hydroecology, 2024: 1-10. DOI: 10.15928/j.1674-3075.202308130218 (in Chinese).
- [2] 姜锦林, 宋睿, 任静华, 王晓蓉, 杨柳燕. 蓝藻水华衍生的微囊藻毒素污染及其对水生生物的生态毒理学研究[J]. 化学进展, 2011, 23(1): 246-253.  
JIANG JL, SONG R, REN JH, WANG XR, YANG LY. Advances in pollution of cyanobacterial blooms-producing microcystins and their ecotoxicological effects on aquatic organisms[J]. Progress in Chemistry, 2011, 23(1): 246-253 (in Chinese).
- [3] HARKE MJ, STEFFEN MM, GOBLER CJ, OTTEN TG, WILHELM SW, WOOD SA, PAERL HW. A review of the global ecology, genomics, and biogeography of the toxic *Cyanobacterium*, *Microcystis* spp.[J]. Harmful Algae, 2016, 54: 4-20.
- [4] 钟力, 徐文琦, 胡静文, 张大海. 微囊藻毒素的危害及其分析方法进展[J]. 分析化学进展, 2018, 8(3): 91-102.
- [5] 金晓龙, 邓学良, 戴睿, 徐倩倩, 吴月, 范裕祥. 基于多源数据的巢湖蓝藻水华时空分布及驱动因素分析[J]. 环境科学, 2024, 45(5): 2694-2706.  
JIN XL, DENG XL, DAI R, XU QQ, WU Y, FAN YX. Analysis of the spatiotemporal distribution of algal blooms and its driving factors in Chaohu Lake based on multi-source datasets[J]. Environmental Science, 2024, 45(5): 2694-2706 (in Chinese).
- [6] 杨柳燕, 杨欣妍, 任丽曼, 钱新, 肖琳. 太湖蓝藻水华暴发机制与控制对策[J]. 湖泊科学, 2019, 31(1): 18-27.  
YANG LY, YANG XY, REN LM, QIAN X, XIAO L. Mechanism and control strategy of cyanobacterial bloom

- in Lake Taihu[J]. *Journal of Lake Sciences*, 2019, 31(1): 18-27 (in Chinese).
- [7] 龚铭, 王百群, 赵方凯, 于洋. 滇池蓝藻水华时空变化特征及环境影响因素[J]. *水土保持研究*, 2024, 31(4): 419-429.
- GONG M, WANG BQ, ZHAO FK, YU Y. Spatiotemporal variations of cyanobacteria blooms in Lake Dianchi and the relationship with environmental factors[J]. *Research of Soil and Water Conservation*, 2024, 31(4): 419-429 (in Chinese).
- [8] CHEN J, XIE P, LI L, XU J. First identification of the hepatotoxic microcystins in the serum of a chronically exposed human population together with indication of hepatocellular damage[J]. *Toxicological Sciences*, 2009, 108(1): 81-89.
- [9] MELARAM R, NEWTON AR, CHAFIN J. Microcystin contamination and toxicity: implications for agriculture and public health[J]. *Toxins*, 2022, 14(5): 350.
- [10] YOSHIDA T. II-4. application of genome information of cyanophage to biological control of cyanobacterial bloom[J]. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 2011, 77(2): 253.
- [11] LIN W, LI DF, SUN ZT, TONG YG, YAN XJ, WANG CL, ZHANG X, PEI GQ. A novel freshwater cyanophage vB\_MeS-Me-ZS1 infecting bloom-forming cyanobacterium *Microcystis elabens*[J]. *Molecular Biology Reports*, 2020, 47(10): 7979-7989.
- [12] BRUNEAUX M, ASHRAFI R, KRONHOLM I, LAANTO E, ÖRMÄLÄ-TIZNADO AM, GALARZA JA, CHEN ZH, KUBENDRAN SUMATHI M, KETOLA T. The effect of a temperature-sensitive prophage on the evolution of virulence in an opportunistic bacterial pathogen[J]. *Molecular Ecology*, 2022, 31(20): 5402-5418.
- [13] CASTILLO D, KAUFFMAN K, HUSSAIN F, KALATZIS P, RØRBO N, POLZ MF, MIDDELBOE M. Widespread distribution of prophage-encoded virulence factors in marine *Vibrio* communities[J]. *Scientific Reports*, 2018, 8: 9973.
- [14] 司宇. DBSCAN-SWA 快速检测并注释原噬菌体集成工具[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2021.
- SI Y. DBSCAN-SWA: an integrated tool for rapid prophage detection and annotation[D]. Harbin: Harbin Institute of Technology, 2021 (in Chinese).
- [15] 陈学梅, 魏云林, 季秀玲. 前噬菌体研究进展[J]. *遗传*, 2021, 43(3): 240-248.
- CHEN XM, WEI YL, JI XL. Research progress of prophages[J]. *Hereditas (Beijing)*, 2021, 43(3): 240-248 (in Chinese).
- [16] ARNDT D, GRANT JR, MARCU A, SAJED T, PON A, LIANG YJ, WISHART DS. PHASTER: a better, faster version of the PHAST phage search tool[J]. *Nucleic Acids Research*, 2016, 44(W1): W16-W21.
- [17] ALCOCK BP, RAPHENYA AR, LAU TTY, TSANG KK, BOUCHARD M, EDALATMAND A, HUYNH W, NGUYEN AV, CHENG AA, LIU SH, MIN SY, MIROSHNICHENKO A, TRAN HK, WERFALLI RE, NASIR JA, OLONI M, SPEICHER DJ, FLORESCU A, SINGH B, FALTYN M, et al. CARD 2020: antibiotic resistance surveillance with the comprehensive antibiotic resistance database[J]. *Nucleic Acids Research*, 2020, 48(D1): D517-D525.
- [18] LIU B, ZHENG DD, ZHOU SY, CHEN LH, YANG J. VFDB 2022: a general classification scheme for bacterial virulence factors[J]. *Nucleic Acids Research*, 2022, 50(D1): D912-D917.
- [19] NISHIMURA Y, YOSHIDA T, KURONISHI M, UEHARA H, OGATA H, GOTO S. ViPTree: the viral proteomic tree server[J]. *Bioinformatics*, 2017, 33(15): 2379-2380.
- [20] FIGUERAS MJ, BEAZ-HIDALGO R, HOSSAIN MJ, LILES MR. Taxonomic affiliation of new genomes should be verified using average nucleotide identity and multilocus phylogenetic analysis[J]. *Genome Announcements*, 2014, 2(6): e00927-14.
- [21] MEIER-KOLTHOFF JP, AUCH AF, KLENK HP, GÖKER M. Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions[J]. *BMC Bioinformatics*, 2013, 14: 60.
- [22] BAO YM, CHETVERNIN V, TATUSOVA T. Improvements to pairwise sequence comparison (PASC): a genome-based web tool for virus classification[J]. *Archives of Virology*, 2014, 159(12): 3293-3304.
- [23] MORARU C, VARSANI A, KROPINSKI AM. VIRIDIC: a novel tool to calculate the intergenomic similarities of prokaryote-infecting viruses[J]. *Viruses*, 2020, 12(11): 1268.
- [24] MORARU C. VirClust: a tool for hierarchical clustering, core protein detection and annotation of (prokaryotic) viruses[J]. *Viruses*, 2023, 15(4): 1007.
- [25] AZIZ RK, BARTELS D, BEST AA, DeJONGH M, DISZ T, EDWARDS RA, FORMSMA K, GERDES S, GLASS EM, KUBAL M, MEYER F, OLSEN GJ, OLSON R, OSTERMAN AL, OVERBEEK RA, McNEIL LK, PAARMANN D, PACZIAN T, PARRELLO B, PUSCH GD, et al. The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology[J]. *BMC Genomics*, 2008, 9: 75.
- [26] POTTER SC, LUCIANI A, EDDY SR, PARK Y, LOPEZ R, FINN RD. HMMER web server: 2018 update[J]. *Nucleic Acids Research*, 2018, 46(W1): W200-W204.
- [27] ZIMMERMANN L, STEPHENS A, NAM SZ, RAU D, KÜBLER J, LOZAJIC M, GABLER F, SÖDING J, LUPAS AN, ALVA V. A completely reimplemented MPI bioinformatics toolkit with a new HHpred server at its core[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2018, 430(15): 2237-2243.
- [28] 刘文才, 钱敏桦, 潘灵婷, 林威, 许丽华, 任晓清, 李登峰, 童贻刚. 一株枯草芽孢杆菌原噬菌体 Bsu-yong1 的基因组分析[J]. *微生物学报*, 2023, 63(10): 3905-3922.
- LIU WC, QIAN MH, PAN LT, LIN W, XU LH, REN XQ, LI DF, TONG YG. Genomic analysis of a *Bacillus subtilis* prophage vB\_Bsu-yong1[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2023, 63(10): 3905-3922 (in Chinese).
- [29] YUE WF, DU M, ZHU MJ. High temperature in combination with UV irradiation enhances horizontal transfer of stx2 gene from *E. coli* O157:H7 to non-pathogenic *E. coli*[J]. *PLoS One*, 2012, 7(2): e31308.
- [30] CHU TC, MURRAY SR, HSU SF, VEGA Q, LEE LH. Temperature-induced activation of freshwater Cyanophage AS-1 prophage[J]. *Acta Histochemica*, 2011,

- 113(3): 294-299.
- [31] VILLIONI M, MOINEAU S. Mitomycin C-induced activation of prophages in lactic acid bacteria[J]. *Journal of Dairy Science*, 2013, 96(9): 5516-5525.
- [32] PAN LT, LI DF, TONG YG, LIN W, QIN WN, XU LH, ZHAN PP. Induction and genomic analysis of a lysogenic phage of *Hafnia paralvei*[J]. *Current Microbiology*, 2022, 79(2): 50.
- [33] GHOSH K, SENEVIRATHNE A, KANG HS, HYUN WB, KIM JE, KIM KP. Complete nucleotide sequence analysis of a novel *Bacillus subtilis*-infecting bacteriophage BSP10 and its effect on poly-gamma-glutamic acid degradation[J]. *Viruses*, 2018, 10(5): 240.
- [34] VOIGT F, WIEDEMANN L, ZULIANI C, QUERQUES I, SEBE A, MÁTÉS L, IZSVÁK Z, IVICS Z, BARABAS O. *Sleeping Beauty* transposase structure allows rational design of hyperactive variants for genetic engineering[J]. *Nature Communications*, 2016, 7: 11126.
- [35] ZHANG L, DAWSON A, FINNEGAN DJ. DNA-binding activity and subunit interaction of the mariner transposase[J]. *Nucleic Acids Research*, 2001, 29(17): 3566-3575.
- [36] KIELISZEK M, MISIEWICZ A. Microbial transglutaminase and its application in the food industry: a review[J]. *Folia Microbiologica*, 2014, 59(3): 241-250.
- [37] IP YK, LOONG AM, CHNG YR, HIONG KC, CHEW SF. Hepatic carbamoyl phosphate synthetase (CPS) I and urea contents in the hylid tree frog, *Litoria caerulea*: transition from CPS III to CPS I[J]. *Journal of Comparative Physiology B*, 2012, 182(8): 1081-1094.
- [38] LOMELINO CL, ANDRING JT, McKENNA R, KILBERG MS. Asparagine synthetase: function, structure, and role in disease[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2017, 292(49): 19952-19958.
- [39] KOEHN EM, KOHEN A. Flavin-dependent thymidylate synthase: a novel pathway towards thymine[J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2010, 493(1): 96-102.
- [40] POZZI C, LOPRESTI L, TASSONE G, MANGANI S. Targeting methyltransferases in human pathogenic bacteria: insights into thymidylate synthase (TS) and flavin-dependent TS (FDTS)[J]. *Molecules*, 2019, 24(8): 1638.
- [41] ESUOLA CO, BABALOLA OO, HEINE T, SCHWABE R, SCHLÖMANN M, TISCHLER D. Identification and characterization of a FAD-dependent putrescine N-hydroxylase (GorA) from *Gordonia rubripertincta* CWB<sub>2</sub>[J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2016, 134: 378-389.
- [42] URAKAMI T, SUGAMURA K, NIKI E. Characterization of imidazopyrroloquinoline compounds synthesized from coenzyme PQQ and various amino acids[J]. *BioFactors*, 1995, 5(2): 75-81.
- [43] AGHAJANIAN S, WORRALL DM. Identification and characterization of the gene encoding the human phosphopantetheine adenylyltransferase and dephospho-CoA kinase bifunctional enzyme (CoA synthase) [J]. *Biochemical Journal*, 2002, 365(Pt 1): 13-18.
- [44] FU JH, YANG DH, CHEN ZP, YANG FR, ZHAO YJ, CHEN Y. ATP-driven AP endonuclease-active Exo III@zeolitic imidazolate framework for uracil-DNA glycosylase imaging in living cells[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2025, 423: 136701.
- [45] XING MY, LI BQ, CHEN Y, TIAN SP. Ribonucleoside diphosphate reductase plays an important role in patulin degradation by *Enterobacter cloacae* subsp. *dissolvens*[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2020, 68(18): 5232-5240.
- [46] YI Y, LIU SZ, HAO YL, SUN QY, LEI XJ, WANG YC, WANG JH, ZHANG MJ, TANG S, TANG QX, ZHANG Y, LIU XP, WANG YZ, XIAO X, JIAN HH. A systematic analysis of marine lysogens and proviruses[J]. *Nature Communications*, 2023, 14: 6013.
- [47] PLEDGER DW, COATES CJ. Mutant Mos1 mariner transposons are hyperactive in *Aedes aegypti*[J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2005, 35(10): 1199-1207.
- [48] VALLY KJ, MARAGATHA. Use of Gal4-Mos1 chimeric mariner transposase for germ-line transformation in drosophila melanogaster and *Aedes aegypti*[J]. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-animal*, 2004, 40: 26A.
- [49] BELL JB, ARONOVICH EL, SCHREIFELS JM, BEADNELL TC, HACKETT PB. Duration of expression and activity of *Sleeping Beauty* transposase in mouse liver following hydrodynamic DNA delivery[J]. *Molecular Therapy*, 2010, 18(10): 1796-1802.
- [50] MÁTÉS L, CHUAH MKL, BELAY E, JERCHOW B, MANOJ N, ACOSTA-SANCHEZ A, GRZELA DP, SCHMITT A, BECKER K, MATRAI J, MA L, SAMARA-KUKO E, GYSEMANS C, PRYPUTNIEWICZ D, MISKEY C, FLETCHER B, VandenDRIESSCHE T, IVICS Z, IZSVÁK Z. Molecular evolution of a novel hyperactive *Sleeping Beauty* transposase enables robust stable gene transfer in vertebrates[J]. *Nature Genetics*, 2009, 41(6): 753-761.
- [51] MEZA-PADILLA I, McCONKEY BJ, NISSIMOV JI. Structural models predict a significantly higher binding affinity between the NblA protein of cyanophage Ma-LMM01 and the phycocyanin of *Microcystis aeruginosa* NIES-298 compared to the host homolog[J]. *Virus Evolution*, 2024, 10(1): veae082.
- [52] 祝希辉, 薛希娟, 李艳兰, 李玉保. 噬菌体介导基因转移的研究进展[J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2022(6): 27-31.
- ZHU XH, XUE XJ, LI YL, LI YB. Research progress of phage-mediated gene transfer[J]. *Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine*, 2022(6): 27-31 (in Chinese).
- [53] NADEL O, ROZENBERG A, FLORES-URIBE J, LAROM S, SCHWARZ R, BÉJÀ O. An uncultured marine cyanophage encodes an active phycobilisome proteolysis adaptor protein NblA[J]. *Environmental Microbiology Reports*, 2019, 11(6): 848-854.