



新型淡水微囊藻噬藻体 vB_MweS-yong2 的分离与基因组分析

王飞¹, 潘灵婷¹, 钱敏桦¹, 蔡汝倩¹, 林威^{1,2}, 洪斌鑫¹, 杨佳豪¹, 李靓¹, 李登峰^{1*}, 童贻刚^{2*}

1 宁波大学海洋学院, 浙江 宁波 315000

2 北京化工大学生命科学与技术学院, 北京 100029

王飞, 潘灵婷, 钱敏桦, 蔡汝倩, 林威, 洪斌鑫, 杨佳豪, 李靓, 李登峰, 童贻刚. 新型淡水微囊藻噬藻体 vB_MweS-yong2 的分离与基因组分析. 微生物学报, 2022, 62(10): 3784–3800.

Wang Fei, Pan Lingting, Qian Minghua, Cai Ruqian, Lin Wei, Hong Binxing, Yang Jiahao, Li Liang, Li Dengfeng, Tong Yigang. Isolation and genome analysis of a new freshwater *Microcystis* cyanophage vB_MweS-yong2. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(10): 3784–3800.

摘要: 【目的】蓝藻(cyanobacteria)水华频繁暴发, 引起水质恶化, 使水生生物大量死亡, 给水产养殖业造成巨大的经济损失; 其代谢产物藻毒素具有肝毒性、神经毒性、生殖毒性、遗传毒性和肿瘤促进作用, 并可在水生生物中富集, 造成饮用水安全风险和水产品食用安全风险。噬藻体(cyanophages)是一类特异性侵染蓝藻的病毒, 参与调控蓝藻的种群密度和丰度, 被认为是极具潜力的蓝藻水华生物防控工具。以往的研究报道多集中于海水噬藻体, 有关淡水噬藻体的报道寥寥无几, 迄今尚无惠氏微囊藻(*Microcystis wesenbergii*)噬藻体的研究报道。本研究的目的在于分离、鉴定惠氏微囊藻噬藻体。【方法】以惠氏微囊藻 FACHB-1112 为指示宿主, 采用双层平板法从淡水中分离出噬藻体 vB_MweS-yong2, 对其进行全基因组测序、基因功能注释和系统进化分析。【结果】vB_MweS-yong2 的基因组长 44 530 bp, G+C 含量为 71.6%, 有 61 个开放阅读框(ORF)、1 个 tRNA 基因。成对序列比较 (pairwise sequence comparison, PASC)表明, vB_MweS-yong2 与所有已知噬菌体间的全基因组核苷酸序列相似度最高只有 20.21%, 小于<50%的属边界值。没有在 vB_MweS-yong2 基因组中发现抗生素耐药基因和毒力因子基因, 显示该噬藻体在基因水平

基金项目: 国家重点研发计划(2018YFA0903000)

Supported by the National Key Research and Development Program of China (2018YFA0903000)

*Corresponding authors. E-mail: LI Dengfeng, lidengfeng@nbu.edu.cn; TONG Yigang, tong.yigang@gmail.com

Received: 16 February 2022; Revised: 13 April 2022; Published online: 7 June 2022

上的安全性。【结论】vB_MweS-yong2 在有尾目的长尾科中代表一个新的属。本研究丰富了淡水噬藻体库、基因库, 并为以后研发该噬藻体的功能基因、进一步研发用于治理以惠氏微囊藻为优势种引起的水华的产品与技术奠定了基础。

关键词: 惠氏微囊藻; 噬藻体; 基因组; 系统进化分析

Isolation and genome analysis of a new freshwater *Microcystis* cyanophage vB_MweS-yong2

WANG Fei¹, PAN Lingting¹, QIAN Minhua¹, CAI Ruqian¹, LIN Wei^{1,2}, HONG Binxin¹, YANG Jiahao¹, LI Liang¹, LI Dengfeng^{1*}, TONG Yigang^{2*}

1 School of Marine Sciences, Ningbo University, Ningbo 315000, Zhejiang, China

2 College of Life Science and Technology, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China

Abstract: [Objective] Cyanobacterial blooms break out frequently and cause water quality deterioration. Cyanobacterial toxins (cyanotoxins) have hepatotoxicity, neurotoxicity, reproductive and genetic toxicity and tumor promoting effects, threatening the drinking water safety. Cyanobacterial blooms contribute to toxin accumulation or death of aquatic organisms, risking edible safety of aquatic products and causing huge economic losses to aquaculture industry. Cyanophages are viruses that specifically infect cyanobacteria and regulate its population density and abundance. They are considered as an important potential biological control tool for cyanobacterial blooms. Study on freshwater cyanophage is rarely reported, which is far less than that on seawater cyanophage. So far, little is known about *Microcystis wesenbergii* cyanophage. [Methods] In this study, we isolated a virulent freshwater cyanophage vB_MweS-yong2 by double-layer agar plate method using *M. wesenbergii* FACHB-1112 as the indicator host. Genome sequencing, open reading frame (ORF) annotation and phylogenetic analysis of cyanophage vB_MweS-yong2 were performed. [Results] vB_MweS-yong2 genome was a double-stranded DNA of 44 530 bp, with a G+C content of 71.6% and containing 61 ORFs and 1 tRNA gene. No vB_MweS-yong2 ORF was found to be associated with virulence factors and antibiotic resistance genes. The pairwise sequence comparison (PASC) scanning illustrated that the highest nucleotide sequence similarity between vB_MweS-yong2 and all known phages in databases was 20.21%, which was <50% (the boundary to define a genus). [Conclusion] vB_MweS-yong2 was proposed to represent a new genus in the Siphoviridae family of Caudovirales order. These works enriched the freshwater cyanophage database and laid a foundation for the research and development of the functional genes of cyanophages and the control of cyanobacterial blooms with *M. wesenbergii* as the dominant species.

Keywords: *Microcystis wesenbergii*; cyanophage; genome; phylogenetic analysis

水华是淡水水体中浮游生物尤其是蓝藻 (又名蓝细菌, cyanobacteria) 异常增殖并高度聚集于水面, 引起水体变色的一种灾害性生态现象^[1]。随着社会经济的迅速发展, 水体富营

养化日益普遍和严重,导致蓝藻水华频繁、广泛地发生,使水生生物大量死亡,且一些蓝藻的代谢产物藻毒素具有肝毒性、神经毒性、生殖毒性、遗传毒性和肿瘤促进作用,造成饮用水安全风险;藻毒素可在水生生物中富集,造成水产品食用安全风险。蓝藻水华已成为世界性的环境难题。我国的蓝藻水华已经达到了非常严重的地步,十余年来,太湖^[2]、巢湖^[3]、滇池^[4]等频繁地暴发大面积水华,甚至长江、黄河也在近年来出现了蓝藻藻华问题。解决蓝藻水华造成的环境问题刻不容缓。

当前,蓝藻水华治理常用手段主要有物理法和化学法。物理手段主要有曝气、人工换水、过滤打捞、超声波除藻等^[5]。物理法需要消耗大量的人力与物力,成本高、效率低。化学法主要是利用金属元素抑制蓝藻的繁殖^[6],或用化学杀藻剂、絮凝剂杀除蓝藻^[7]。化学法“好坏通杀”,过量、繁多的化学物质进入水体容易对水环境造成破坏,危害有益微生物和水生动植物。相较于物理和化学法,生物法更为环保,符合环境友好的原则,已成为研究热点。生物法主要包括以下几种方法:一是利用水生高等植物对氮、磷等的吸收进行治理;二是利用滤食生物对藻类的捕食和消化来进行治理;三是利用微藻间的化感拮抗作用调节水体中的微藻种类;四是利用微生物(细菌或病毒)直接或间接控制水华藻类^[8]。水生高等植物生长相对缓慢,不能有效杀抑蓝藻,难以高效快速净化水体;蓝藻细胞常聚集成大的群落,超过滤食尺寸,难滤食,且细胞群落外被胶被,难消化,因而较少被纤毛虫、轮虫、枝角类、桡足类和虑食性鱼类食用,采用滤食法很难得到快速有效的控制效果;高温季节,蓝藻较其他微藻在富营养化水体中具有显著的生态优势,其分泌的藻毒素对其他水生生物具有化感拮抗或

毒性作用,难以利用微藻间拮抗作用来有效控制蓝藻水华。噬藻体(cyanophage)是特异性侵染蓝藻的病毒,在调控生物生产量、藻类多样性及结构演替、生物地球化学循环和调节水生生态系统中微生物个体之间的基因转移等方面起到非常重要的作用^[7]。烈性噬藻体可以选择性地快速裂解蓝藻而不感染其他生物,可快速调控藻相,被认为是极具潜力的蓝藻水华生物防控因子^[9-10]。噬藻体已成为水生微生物、生态领域的研究热点。不同的噬藻体具有不同的基因组特性和生物学特性^[11-12]。噬藻体的生物学特性很大程度上决定于基因组特性。噬藻体的分离与基因组测定是噬藻体研究及其应用生态学研究的基础。

以往,有关噬藻体的分离与基因组分析的研究报道主要集中于海洋噬藻体,其宿主聚焦于聚球藻(*Synechococcus*)和原绿球藻(*Prochlorococcus*)^[7]。淡水噬藻体的研究远远滞后于海洋噬藻体,已报道的淡水噬藻体少之又少。在 GenBank 等数据库已报道的近 250 株噬藻体的基因组中,仅 18 株来自淡水水体,其中微囊藻噬藻体仅 6 株,分别为 MaMV-DC、Ma-LMM01、Mic1、vB_MelS-Me-ZS1、Mac-Yong924-1 和 PhiMa05^[13-17]。

惠氏微囊藻(*Microcystins wesenbergii*)是一种分布广泛的、常见的产毒蓝藻^[18]。我国的淡水水体中常常含有大量的惠氏微囊藻,它与水华微囊藻(*M. fles-quae*)、铜绿微囊藻(*M. aeruginosa*)被并称为三大水华蓝藻,是水华水体中最常见的优势藻种之一,经常引起大面积的蓝藻水华暴发^[19]。然而,上述 6 种淡水微囊藻噬藻体均为铜绿微囊藻、华美微囊藻或未定种微囊藻的噬藻体,迄今尚无惠氏微囊藻噬藻体的研究报道。本研究以惠氏微囊藻为指示菌,运用双层琼脂平板法,从淡水中分离获得了一株噬藻体,将其命名为 vB_MweS-yong2。

迄今为止,在已报道的绝大部分噬藻体基

基因组中, ORF 可以被 NCBI 等数据库注释的不超过 50%, 其他 ORF 只能被注释为假设蛋白 (hypothetical protein) 基因^[20]。例如, 从新加坡实龙岗水库中分离出来的蓝藻噬藻体 PA-SR01 中有 166 个 ORF, 其中仅有 47 个功能可注释, 占 28%^[21]。分离自波罗的海的噬藻体 vB_AphaS-CL131 基因组所含 149 个 ORF 中仅 34 个的功能可被注释, 占 23%^[22]。分离自巢湖的侵染铜绿微囊藻的长尾噬藻体 Mic1 基因组的 98 个 ORF 中仅 36 个蛋白的功能被注释, 占 37%^[23]。

噬藻体基因组全序列的测定对于噬藻体的生物学特性分析、分类鉴定、应用开发及其与宿主间相互作用关系研究具有重要的意义。随着分子生物学技术的不断发展, 各种分子生物学手段已逐渐运用到噬藻体的研究中。噬藻体遗传多样性研究中常用的靶基因是 *g20* 基因^[24]、光合基因和 DNA 聚合酶基因。在部分噬藻体中存在一些特异性基因, 如 *MazG* 基因和 *g91* 基因等。但是由于噬藻体种类很多, 并没有统一的保守序列, 尤其是淡水噬藻体, 往往缺乏海洋噬藻体中常见的核心基因。如科学家们发现 88% 的海洋噬藻体中存在光合基因^[25], 而淡水噬藻体却罕见光合相关基因; 再如 *g20* 基因主要存在于肌尾噬藻体。迄今, 尚未找到适用于所有噬藻体的靶基因。此外, 由于噬菌体与宿主间长期互作, 可能会获得一些辅助代谢基因 (AMGs), 如抗生素抗性基因、毒力因子基因等, 这些基因的存在与表达有损于噬菌体的应用安全性。再者, 近年来, 科学家们惊讶地发现地球水生浮游病毒资源极其丰富, 具有巨大的研发价值^[12]。综上所述, 对淡水噬藻体进行基因组测定与分析意义重大。

本研究针对新分离的惠氏微囊藻噬藻体 vB_MweS-yong2, 提取核酸、构建测序文库、测定了其全基因组序列, 通过生物信息学分析

对其进行注释, 未发现抗生素抗性基因、毒力因子基因; 通过系统发生分析讨论了其分类学地位。本研究填补了惠氏微囊藻噬藻体研究空白, 为今后研究该噬藻体及其功能基因以及治理以惠氏微囊藻为优势种引起的水华问题奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 实验藻种

惠氏微囊藻 (*M. wesenbergii*) FACHB-1112, 购自中国科学院淡水藻种库。

1.2 培养基

BG11 液体培养基 (配方见表 1); BG11 半固体培养基: 含 0.75% (W/V) 琼脂的 BG11 培养基; BG11 固体培养基: 含 1.5% (W/V) 琼脂的 BG11 培养基。

1.3 藻种培养

将 *M. wesenbergii* FACHB-1112 藻种接种在 BG11 液体培养基中, 放置于 25 °C 的控温光照培养箱中培养, 光照强度为 2 000 lx, 光暗周期

表 1 BG-11 培养基成分

Table 1 Composition of BG-11 medium

| Ingredients | Concentration/(g/L) |
|---|---------------------|
| NaNO ₃ | 1.500 |
| K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O | 0.040 |
| MgSO ₄ ·7H ₂ O | 0.075 |
| CaCl ₂ ·2(H ₂ O) | 0.036 |
| C ₆ H ₈ O ₇ | 0.006 |
| C ₇ H ₁₃ FeNO ₇ | 0.006 |
| EDTA | 0.001 |
| Na ₂ CO ₃ | 0.020 |
| H ₃ BO ₃ | 0.002 860 |
| MnCl ₂ ·H ₂ O | 0.001 810 |
| ZnSO ₄ ·7H ₂ O | 0.000 222 |
| CuSO ₄ ·5H ₂ O | 0.000 079 |
| Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O | 0.000 390 |
| CoH ₁₂ N ₂ O ₁₂ | 0.000 049 |

为 12 h/12 h。待藻生长到 OD_{680} 值为 0.6–0.8 (对数生长期) 时, 用于后续实验。

1.4 水样采集及处理

2019年3月10日从浙江宁波月湖公园内开阔水域水样(北纬 29.868 094°, 东经 121.543 259°), 经低温冷藏转运到实验室后, 立即对水样进行处理。首先 4 °C、10 000×g 离心 20 min 去除沉淀, 再取上清依次经 0.80 μm 和 0.45 μm 孔径的微孔滤膜过滤。取滤液进行后续实验。

1.5 噬藻体富集

往锥形瓶中加入 80 mL 上述处理好的水样滤液、20 mL 的 5× BG11 培养基和 20 mL 对数期 *M. wesenbergii* FACHB-1112 藻液, 混匀, 置于光照培养箱中培养, 每天手动摇藻 2–3 次。同时用纯水代替水样上清液与藻液混合作为对照组。感染组藻液裂解黄化后, 将其经 10 000×g 离心 10 min, 取上清依次经 0.45 μm 和 0.22 μm 孔径的硝酸纤维素滤膜过滤。取滤液加到 2–10 倍体积的对数生长期的 FACHB-1112 藻液中混匀, 培养至藻液出现黄化。

1.6 噬藻体纯化

制备 1:20–1:40 倍的浓缩藻细胞悬液: 取对数期 FACHB-1112 藻液, 10 000×g 离心 10–20 min, 保留相当于原体积 1:20–1:40 的上清, 悬浮沉淀。

将高温灭菌的 BG11 半固体培养基分装成 8 mL/管, 置于 42 °C 的恒温水浴锅中 30 min, 至半固体培养基内温度恒定。取由 1.5 方法获得的噬藻体富集液, 用 BG11 液体培养基做系列梯度稀释(10^{-1} – 10^{-6}); 取各稀释液按体积比 1:9 的比例添加到 0.9 mL 浓缩靶标藻液 FACHB-1112 中, 混匀, 置于转速 70 r/min 的摇床中, 25 °C 孵育 20–30 min, 使病毒充分吸附到藻细胞; 取出半固体培养基, 分别将上述噬藻体-藻混合液倒入各管, 用旋涡振荡器振荡 3–5 s 使其充分混匀后, 倒至含 1.5% 琼脂的

BG11 培养基底层平板上, 凝固后封口, 封口膜上戳孔, 倒置于培养箱中培养。培养条件为 2 000 lx, 25 °C, 光照周期为 12 h/12 h。每日观察。实验组于 10–15 d 长出清晰、透明的噬藻斑。

挖取独立的噬藻斑, 悬浮于 500 μL 的 BG11 培养基中, 放置于 4 °C 冰箱过夜或 25 °C 避光孵育 1 h, 使其彻底释放出噬藻体, 12 000×g 离心 10 min, 取上清即得到第一代噬藻体。将其以体积比 1:9 与对数期 FACHB-1112 藻液混匀, 置于光照培养箱中培养, 黄化后, 取藻裂解液离心、过滤(条件同 1.5 所述), 10 倍梯度稀释。取 10^{-6} 稀释液按体积比 1:9 的比例添加到 0.9 mL 浓缩靶标藻液 FACHB-1112 中, 按照上述流程制备双层琼脂平板, 获得第二代清晰、透亮的噬藻斑后, 挖取独立的噬藻斑重复上述操作, 制作第 3 代噬藻斑。如此重复操作, 直至得到大小、形态均一的噬藻斑, 挖取最后一代噬藻斑至新鲜的对数期 FACHB-1112 藻液中培养, 待藻液黄化后, 取藻裂解液于 10 000×g 离心 10 min, 取上清, 依次经 0.45 μm 和 0.22 μm 孔径的硝酸纤维素滤膜过滤。取滤液加到 9 倍体积的对数生长期 FACHB-1112 藻液中混匀, 培养至藻液出现黄化, 如此逐级扩大培养。将藻裂解液于 4 °C 避光保存备用。

1.7 噬藻体基因组提取

1.7.1 噬藻体 DNA 提取

取上述噬藻体保存液 30 mL 于 10 000×g 离心 10 min, 取上清, 依次经 0.45 μm 和 0.22 μm 硝酸纤维素滤膜过滤。往噬藻体滤液中加入 Dnase I 和 RNase A 至终浓度 1 μg/mL, 37 °C 过夜消化, 80 °C 灭活 15 min。向体系中加入裂解液(0.5% SDS, 50 μg/mL 蛋白酶 K, 20 nmol/L EDTA, 均为终浓度), 56 °C 孵育 1 h。加入等体积平衡酚, 温和振荡后 4 °C、10 000×g 离心 5 min。收集上层液体, 加入等体积酚-氯仿-异戊

醇(25:24:1), 温和振荡后 4 °C、10 000×g 离心 5 min。收集上层液体, 加入等体积氯仿, 充分混匀后 10 000×g 离心 5 min, 收集上层液体, 重复 2 次。加入等体积异丙醇, -20 °C 放置至少 30 min, 4 °C、10 000×g 离心 20 min, 沉淀用 75% 乙醇洗 2 次。将核酸沉淀用去离子水重悬。

1.7.2 噬藻体的基因组文库构建

使用试剂盒 NEBNext Ultra II DNA Library Prep Kit for Illumina (#E7645)按照说明书构建基因组文库。步骤包括: 基因组片段化; 末端修复; 添加测序接头; 磁珠片段筛选; 添加 Index、PCR 扩增; PCR 产物纯化。

1.8 噬藻体的全基因组测序与拼接

上机测序: 按照 Agilent High sensitivity DNA Kit 2100 说明书鉴定纯化后 PCR 产物的片段分布。通过实时荧光定量 PCR 进行定量, 根据上机需求量将 DNA 样品进行混合, 最后加入 NaOH 使 DNA 变性为单链。使用 Illumina PE300 试剂盒, 在 Illumina MiSeq 上进行测序。

序列拼接: 运用 FastQC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>)对测序数据进行质量评估, 然后用 Trimmomatic v0.36 软件去除低质量值的测序 reads (Q -value<20), 使用 SPAdes v3.13.0 软件对过滤后的数据进行拼接。

基因组末端分析: 利用基因组的高通量测序结果分析噬藻体末端序列。首先, 将各 reads 截成 20 个碱基的序列片段, 并按出现频率由高到低进行排列。然后, 将高通量测序原始数据与拼接好的全基因组进行比对。查看是否存在测序深度明显高于其上下游的区域。若高频率序列位于高测序深度区域, 该高频率序列所在区域即为噬藻体基因组的末端^[26]。

1.9 生物信息学分析

首先用在线工具 RAST (Rapid Annotation using Subsystem Technology, <http://rast.nmpdr.org>)

对 vB_MweS-yong2 基因组进行初步注释。然后, 所有的 ORF 均使用 NCBI (National Center for Biotechnology Information)的蛋白比对工具 BLASTp (Protein BLAST, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)进行手动验证 (E -value<0.5); 并进一步使用 Hhpred (<https://toolkit.tuebingen.mpg.de/#/tools/hhpred>) (参数设定为 possibility>96%)、使用 HMMER (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/hmmer/search/hmmscan>) (以 domain 完整、且 E -value<0.5 为基准), 进一步校正 ORF 注释结果。分别在 CARD 数据库(<http://arpcard.mcmaster.ca>)和 VFDB 数据库(<http://www.mgc.ac.cn/VFs/main.htm>)中搜索噬菌体是否含有毒力因子和抗生素抗性基因。运用在线工具 PASC (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/pasc/>)分析全基因组核苷酸序列相似度。从国际病毒分类委员会(the International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV)中有尾噬菌体目(Caudovirales)下的 14 个科中选取 52 个代表种, 从 GenBank 数据库下载其基因组序列, 和 vB_MweS-yong2 及引言所述的 6 个微囊藻噬藻体、其他 5 株淡水噬藻体的基因组一起用于进化树的构建。所述的有尾目 14 科是 Myoviridae、Ackermannviridae、Herelleviridae、Chaseviridae、Podoviridae、Autographiviridae、Siphoviridae、Demereciviridae、Drexelvriidae、Zobellviridae、Schitoviridae、Salasmaviridae、Guelinviridae 和 Rountreeviridae。运用在线软件 ViPTree1.9 (<https://www.genome.jp/viptree>), 基于这些病毒的全基因组构建蛋白谱树 (proteomic tree)。运用 MEGA 11 软件采用 neighbor-joining 法构建噬藻体 DNA 聚合酶的系统发育树。

2 结果与分析

2.1 噬藻体的分离和鉴定

从 2019 年 3 月 10 号取自浙江宁波月湖公

园内月湖开阔水域的水样中，分离到一株惠氏微囊藻噬藻体，该噬藻体能在一周内使惠氏微囊藻液裂解黄化。将该噬藻体命名为微囊藻噬藻体 *Microcystis* phage vB_MweS-yong2，简称为 vB_MweS-yong2。

2.2 噬藻体的全基因组分析

噬藻体 vB_MweS-yong2 的基因组全长为 44 530 bp，G+C 含量为 71.6%。测序深度为 333.9×。在高通量测序数据中，未发现高频率的 reads，噬藻体 vB_MweS-yong2 的基因组可能没有固定的末端。已将 vB_MweS-yong2 的完整基因组序列提交并保存在 GenBank 中，接收号为 OM681334。将惠氏微囊藻噬藻体 vB_MweS-yong2 全基因组进行 BLASTn 比对，结果

GenBank 数据库中与其相似度最高的序列是噬菌体 vB_RieM_PPF1 的基因组 (GenBank : KJ746502.1)，相似度为 80.1%，但是同源覆盖度显示为 0%，表明二者只有极少的序列有相似性。结果显示 vB_MweS-yong2 的基因组序列很新颖，在现有数据库中没有与其高度同源的病毒。

噬藻体 vB_MweS-yong2 的基因组含有 61 个预测的开放阅读框 (ORF) (表 2)。利用 tRNAscan-SE (<http://lowelab.ucsc.edu/tRNAscan-SE>) 在线软件预测，发现其含有 1 个 tRNA。CARD 和 VFDB 分析，没有发现已知的毒力因子和抗生素耐药基因，显示了该噬藻体在基因水平上的安全性。

表 2 噬藻体 vB_MweS-yong2 ORF 功能预测及 BLASTp 比对结果

Table 2 Function prediction and top BLASTp hits of vB_MweS-yong2 ORFs

| ORF | Size/aa | Prediction function | Top BLASTp hit ^a | Identity ^b /aa | E value ^c |
|-----|---------|--------------------------------------|--|---------------------------|----------------------|
| 1 | 210 | Terminase small subunit | ref TCR69703.1 hypothetical protein EV560_101100 [<i>Bosea</i> sp. BK604] | 48% (95/197) | 8.00E-46 |
| 2 | 683 | Terminase large subunit | ref WP_126112365.1 MULTISPECIES: phage terminase large subunit family protein [unclassified <i>Bosea</i>] | 65% (437/674) | 0.0 |
| 3 | 67 | Head-to-tail joining protein W (GpW) | ref WP_192641905.1 unnamed protein product [<i>Bosea</i> sp. OAE506] | 64% (45/70) | 4.00E-22 |
| 4 | 497 | Portal protein | ref WP_126112360.1 MULTISPECIES: phage portal protein [unclassified <i>Bosea</i>] | 64% (315/490) | 0.0 |
| 5 | 666 | Major head protein | ref WP_131852925.1 HK97 family phage prohead protease [<i>Bosea</i> sp. BK604] | 65% (429/663) | 0.0 |
| 6 | 109 | Phage recombinase | ref WP_192641902.1 DUF2190 family protein [<i>Bosea</i> sp. OAE506] | 63% (69/109) | 3.00E-36 |
| 7 | 53 | Hypothetical protein | No hits | | |
| 8 | 197 | Minor tail protein | ref WP_043240993.1 hypothetical protein [<i>Bosea</i> sp. LC85] | 63% (123/196) | 8.00E-72 |
| 9 | 135 | Phage head-tail attachment | ref WP_126112348.1 MULTISPECIES: hypothetical protein [unclassified <i>Bosea</i>] | 44% (60/135) | 1.00E-32 |
| 10 | 256 | Tail tube terminator protein | ref WP_131852917.1 hypothetical protein [<i>Bosea</i> sp. BK604] | 50% (129/259) | 6.00E-58 |
| 11 | 64 | Sheath terminator protein | ref WP_131311513.1 hypothetical protein [<i>Sicilibacillus lacustris</i>] | 51% (29/57) | 2.00E-05 |
| 12 | 501 | Tail sheath protein | ref WP_052514267.1 hypothetical protein [<i>Bosea</i> sp. LC85] | 49% (246/497) | 7.00E-140 |

(待续)

(续表 2)

| | | | | | |
|----|-------|-------------------------------|---|---------------|-----------|
| 13 | 127 | Tail tube protein | ref WP_192641896.1 unnamed protein product [<i>Bosea</i> sp. OAE506] | 59% (75/127) | 5.00E-47 |
| 14 | 128 | Tail assembly protein | ref WP_043240981.1 hypothetical protein [<i>Bosea</i> sp. LC85] | 53% (62/116) | 7.00E-33 |
| 15 | 672 | Tape measure protein | ref WP_043240979.1 phage tail tape measure protein [<i>Bosea</i> sp. LC85] | 51% (351/683) | 0.0 |
| 16 | 395 | DNA circularization protein | ref WP_126112325.1 MULTISPECIES: DNA circularization N-terminal domain-containing protein [unclassified <i>Bosea</i>] | 48% (193/399) | 2.00E-103 |
| 17 | 367 | Baseplate hub protein gp44 | ref WP_131852901.1 hypothetical protein [<i>Bosea</i> sp. BK604] | 58% (217/373) | 3.00E-136 |
| 18 | 155 | Mu-like prophage protein gp45 | ref WP_192641887.1 unnamed protein product [<i>Bosea</i> sp. OAE506] | 58% (95/163) | 2.00E-59 |
| 19 | 175 | Baseplate protein W | ref WP_149133418.1 phage GP46 family protein [<i>Bosea</i> sp. F3-2] | 68% (119/175) | 5.00E-79 |
| 20 | 371 | Baseplate protein gp47 | ref PZR94178.1 hypothetical protein DI537_08800 [<i>Pseudomonas stutzeri</i>] | 62% (227/369) | 4.00E-152 |
| 21 | 209 | Baseplate protein gp48 | ref WP_047576487.1 DUF2313 domain-containing protein [<i>Methylobacterium</i> sp. ZNC0032] | 59% (120/205) | 3.00E-78 |
| 22 | 510 | Hypothetical protein | ref WP_131852891.1 hypothetical protein [<i>Bosea</i> sp. BK604] | 37% (33/90) | 4.00E-29 |
| 23 | 68 | Hypothetical protein | No nits | | |
| 24 | 113 | L-shaped tail fiber protein | ref WP_149821310.1 hypothetical protein [<i>Salinarimonas</i> sp. BN140002] | 39% (45/116) | 1.00E-16 |
| 25 | 1 038 | Carbohydrate esterase | ref WP_141985777.1 hypothetical protein [<i>Sphingomonas trueperi</i>] | 36% (312/864) | 5.00E-108 |
| 26 | 132 | Hypothetical protein | ref WP_088582296.1 hypothetical protein [<i>Brevundimonas vesicularis</i>] | 47% (64/136) | 3.00E-25 |
| 27 | 197 | Hypothetical protein | ref WP_068295584.1 hypothetical protein [<i>Labrys</i> sp. WJW] | 36% (66/182) | 4.00E-07 |
| 28 | 286 | Lysozyme | ref WP_161676058.1 N-acetylmuramoyl-L-L-alanine amidase [<i>Pannonibacter</i> sp. XCT-34] | 65% (90/138) | 4.00E-57 |
| 29 | 89 | Hypothetical protein | No nits | | |
| 30 | 95 | Hypothetical protein | ref MBC7148083.1 hypothetical protein [<i>Rhizobium</i> sp.] | 33% (36/109) | 3.00E-08 |
| 31 | 377 | Integrase | ref WP_139333738.1 hypothetical protein [<i>Bosea</i> sp. TND4EK4] | 48% (184/384) | 6.00E-103 |
| 32 | 81 | Hypothetical protein | ref WP_074257963.1 hypothetical protein [<i>Vanniella litorea</i>] | 38% (25/65) | 0.01 |
| 33 | 76 | Hypothetical protein | No nits | | |
| 34 | 72 | Hypothetical protein | ref WP_063703598.1 hypothetical protein [<i>Bradyrhizobium centrolonii</i>] | 59% (34/58) | 4.00E-14 |
| 35 | 80 | Hypothetical protein | No nits | | |
| 36 | 173 | Endonuclease YncB | ref WP_152015703.1 MULTISPECIES: thermonuclease family protein [unclassified <i>Bosea</i>] | 50% (74/147) | 2.00E-33 |

(待续)

(续表 2)

| | | | | | |
|----|-----|--|---|---------------|-----------|
| 37 | 133 | Pyrophosphohydrolase | ref WP_047580566.1 DUF550 domain-containing protein [<i>Methylobacterium</i> sp. ZNC0032] | 87% (89/102) | 1.00E-57 |
| 38 | 365 | Hypothetical protein | ref WP_138423692.1 phage Gp37/Gp68 family protein [<i>Maritimibacter</i> sp. LZ-17] | 60% (231/384) | 4.00E-147 |
| 39 | 219 | HNH endonuclease | ref WP_133572294.1 HNH endonuclease [<i>Maritalea mobilis</i>] | 59% (124/210) | 3.00E-87 |
| 40 | 92 | Hypothetical protein | ref WP_172227729.1 hypothetical protein [<i>Mesorhizobium</i> sp. NZP2077] | 66% (51/77) | 7.00E-27 |
| 41 | 186 | Hypothetical protein | ref PZR82554.1 hypothetical protein DI537_36405 [<i>Pseudomonas stutzeri</i>] | 33% (48/147) | 7.00E-09 |
| 42 | 612 | Chromosome segregation protein | ref OJV06223.1 hypothetical protein BGO20_08175 [<i>Bosea</i> sp. 67-29] | 36% (222/615) | 7.00E-66 |
| 43 | 134 | DNA gyrase inhibitor YacG | ref SEE60114.1 hypothetical protein SAMN05519104_6687 [<i>Rhizobiales</i> bacterium GAS188] | 56% (51/91) | 3.00E-23 |
| 44 | 46 | Hypothetical protein | No nits | | |
| 45 | 76 | Hypothetical protein | No nits | | |
| 46 | 157 | Hypothetical protein | No nits | | |
| 47 | 95 | Hypothetical protein | No nits | | |
| 48 | 88 | Hypothetical protein | ref WP_146237129.1 helix-turN-helix domain-containing protein [<i>Ensifer</i> sp. AP48] | 47% (26/55) | 5.00E-04 |
| 49 | 136 | Hypothetical protein | ref WP_072715508.1 SHOCT domain-containing protein [<i>Rhodothermus profundus</i>] | 27% (27/100) | 8.00E-08 |
| 50 | 198 | Repressor protein C | ref WP_141098457.1 helix-turN-helix transcriptional regulator [<i>Rhodoblastus acidophilus</i>] | 51% (99/195) | 2.00E-50 |
| 51 | 91 | Transcriptional regulator | ref WP_113892636.1 helix-turN-helix transcriptional regulator [<i>Roseiarcus fermentans</i>] | 52% (29/56) | 1.00E-07 |
| 52 | 168 | Regulatory protein CII | ref WP_068285753.1 hypothetical protein [<i>Labrys</i> sp. WJW] | 50% (75/150) | 8.00E-39 |
| 53 | 392 | DNA polymerase III holoenzyme | ref WP_112310243.1 DNA polymerase III subunit beta [<i>Pseudogemmobacter bohemicus</i>] | 34% (130/381) | 3.00E-36 |
| 54 | 138 | Hypothetical protein | ref WP_186419180.1 DUF2312 domain-containing protein [<i>Bosea</i> sp. CS1GBMeth4] | 86% (66/77) | 2.00E-37 |
| 55 | 216 | Hydrolases of HD superfamily | ref RYE48308.1 hypothetical protein EOP24_07825 [<i>Rhizobiales</i> bacterium] | 42% (44/106) | 4.00E-12 |
| 56 | 234 | Modification methylase CviRI | ref WP_047571326.1 hypothetical protein [<i>Mesorhizobium</i> sp. F7] | 58% (126/218) | 1.00E-75 |
| 57 | 203 | Hypothetical protein | No nits | | |
| 58 | 100 | Hypothetical protein | No nits | | |
| 59 | 151 | Type II restriction endonuclease | ref MBA3715646.1 HNH endonuclease [<i>Pyrinomonadaceae</i> bacterium] | 58% (32/55) | 4.00E-10 |
| 60 | 382 | Pyocin large subunit | ref WP_103873760.1 hypothetical protein [<i>Bosea lathyri</i>] | 38% (150/394) | 3.00E-59 |
| 61 | 221 | Transcription termination/antitermination protein NusG | ref WP_066878108.1 hypothetical protein [<i>Sinorhizobium saheli</i>] | 35% (55/156) | 8.00E-13 |

利用 RAST、BLASTp、Hhpred、HMMER 对噬藻体 vB_MweS-yong2 编码的 ORF 注释, 发现噬藻体 vB_MweS-yong2 中有 38 个 ORF 可以注释为已知功能基因, 约占总 ORF 的 62.3%; 余下的 23 个 ORF, 约占总 ORF 的 37.7%, 只能注释为未知功能蛋白或假设蛋白(表 2)。而对噬藻体 vB_MweS-yong2 注释的所有功能蛋白进行分类, 则主要涉及到 5 个功能模块: DNA

复制与调控(ORFs: 6, 36, 39, 42, 43, 50, 51, 53, 55, 56, 59, 60, 61)、结构(ORFs: 3, 4, 5, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 24)、包装(ORFs: 1, 2)、溶原(ORFs: 31, 52), 以及与宿主溶解相关的蛋白(ORF28)。噬藻体 vB_MweS-yong2 各 ORF 的大小、预测的功能、BLASTp 比对结果、方向等详情汇总于表 2 和图 1。

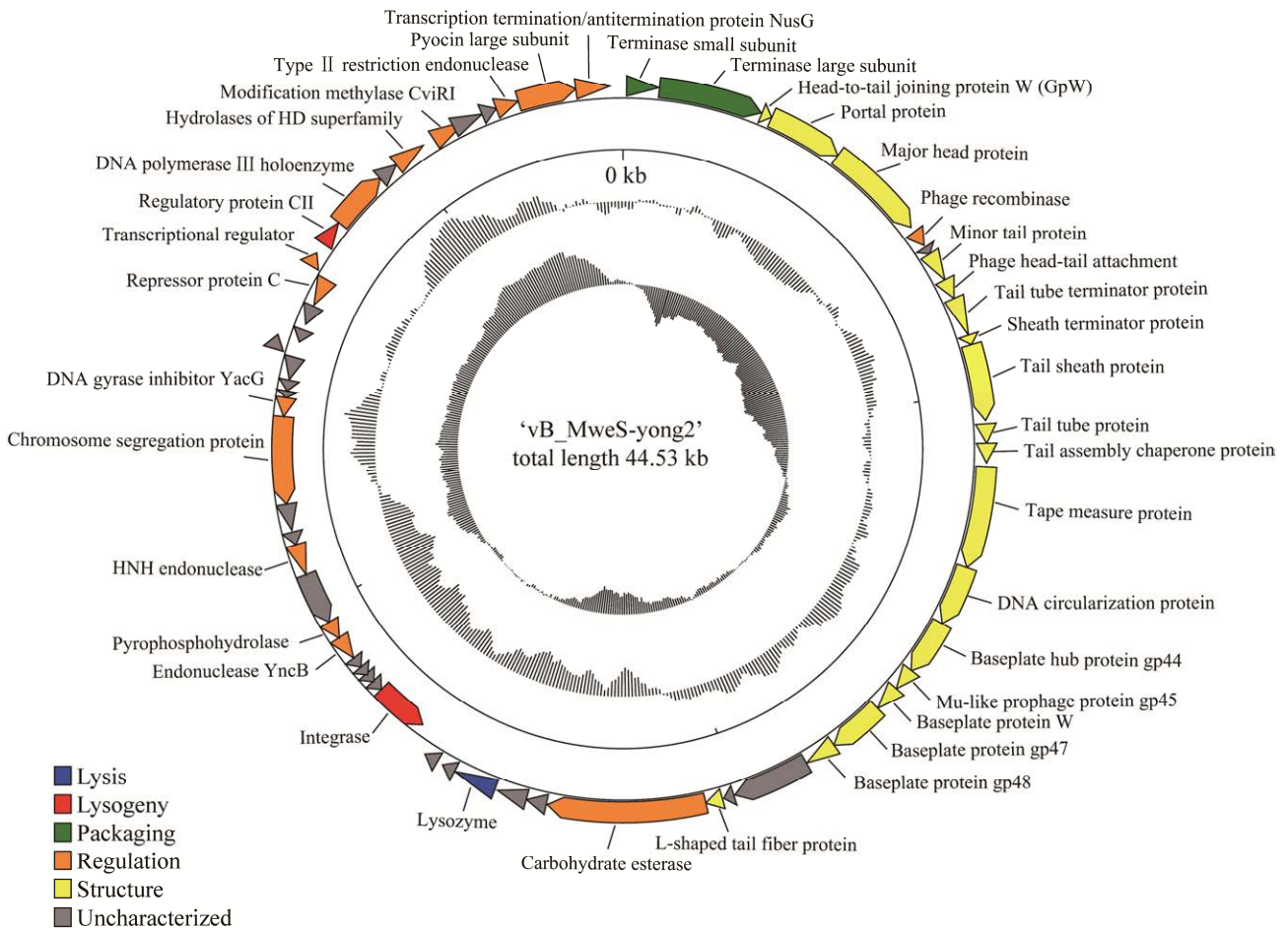


图 1 微囊藻噬藻体 vB_MweS-yong2 的基因组图谱

Figure 1 Genome map of *Microcystis* cyanophage vB_MweS-yong2. The outermost circle represents 61 ORFs encoded in the genome, with different colors represent different functions (clockwise arrow indicates the forward reading frame, counterclockwise arrow indicates the reverse reading frame); the dark circles in the middle represent the GC content (“Black” indicates greater than the average GC content compared with the whole genome, and “Gray” indicates the opposite); the innermost circle represents the GC skew ($G-C/G+C$: outwards indicates >0 and inwards indicates <0).

在 DNA 复制和调控模块中, ORF1 和 ORF2 分别编码噬菌体末端酶小亚基(terminase small subunit)和大亚基(terminase large subunit), 主要功能是在 DNA 易位、切割和包装中起作用^[27]。ORF6 编码重组酶(phage recombinase), 在 DNA 双链断裂修复中起着重要作用^[28]。ORF36 编码核酸内切酶 YncB 同源蛋白(endonuclease YncB)。ORF39 和 ORF59 均编码 HNH 核酸内切酶(HNH endonuclease)。自然界中已经有超过 1 000 种含有 HNH 结构域的蛋白被发现, 位点特异性的归巢核酸内切酶是 HNH 蛋白中数量最多的。HNH 核酸内切酶广泛分布于细菌、古菌、真核生物、病毒(包括噬菌体)中, 具有切割核酸的活性。噬菌体的 HNH 核酸内切酶在噬菌体的生命周期中发挥着很重要的作用^[29]。ORF42 被预测为编码染色体分离蛋白质(chromosome segregation protein)。ORF43 被预测编码 DNA 促旋酶抑制剂 YacG (DNA gyrase inhibitor YacG)。YacG 有抑制促旋酶活性的作用^[30]。ORF50 和 ORF51 编码转录抑制因子(repressor protein C、transcriptional regulator), 转录抑制因子可以使病毒能够较长时间潜伏而不被宿主发现^[31]。ORF53 编码 DNA 聚合酶 III (DNA polymerase III holoenzyme)。ORF55 编码 HD 超家族水解酶(hydrolases of HD superfamily), 可以用来水解磷酸酯键, 可能与 DNA 修复有关^[32]。ORF56 编码甲基化酶(modification methylase CviRI), 能够保护噬菌体 DNA 不被宿主核酸内切酶切割^[33]。ORF60 编码 Pyocin 大亚基(Pyocin large subunit), 功能是参与次生代谢物的生物合成、运输和分解代谢^[34]。ORF61 编码转录终止/抗终止蛋白 NusG (transcription termination/antitermination protein NusG)。在细菌中转录和翻译是耦合过程, 耦合受转录因子 NusG 和 NusA 的调节, NusG 被认为是桥接 RNA 聚合酶(RNAP)和核糖

体的桥梁^[35]。

噬菌体结构蛋白基因模块中, ORF3 被注释为编码头尾连接蛋白 GpW (head-to-tail joining protein W)。ORF4 编码噬菌体门户蛋白(portal protein), portal 通常形成一个孔或者门户, 使得 DNA 能够在包装和弹出的过程中顺利通过, 它还在噬菌体衣壳和尾巴蛋白之间形成连接。ORF5 被注释为编码噬菌体头部主结构蛋白(major head protein)。ORF8 编码噬菌体小尾蛋白(minor tail protein)。ORF9 编码噬菌体头尾附件(phage head-tail attachment)。ORF10 编码噬菌体尾管蛋白(tail tube terminator protein), 该蛋白在尾部组装中起着重要作用。ORF11 编码噬菌体鞘终止蛋白(sheath terminator protein)。ORF12 编码噬菌体尾鞘蛋白(tail sheath protein)。ORF13 编码噬菌体尾管蛋白(tail tube protein)。ORF14 编码噬菌体尾部组装伴侣蛋白(tail assembly protein)。ORF15 编码噬菌体卷尺蛋白(tape measure protein)。ORF16 编码噬菌体 DNA 环化蛋白(DNA circularization protein)。ORF17、ORF18、ORF19、ORF20、ORF21 编码噬菌体基板蛋白。ORF8、ORF9、ORF10、ORF11、ORF12、ORF13、ORF14、ORF15、ORF16、ORF17、ORF18、ORF19、ORF20、ORF21、ORF24 均编码噬菌体尾部蛋白。

噬菌体溶解与溶原功能模块中, ORF28 预测为编码溶菌酶(lysozyme), 溶菌酶可以切割细菌细胞壁中的酰胺键, 并可与 T7 RNA 聚合酶结合并抑制其转录^[36]。ORF31 预测为编码 DNA 整合酶(integrase), 整合酶参与噬菌体基因组整合到宿主染色体中或从宿主染色体中切除、游离出来的过程^[37]。ORF52 编码噬菌体调节蛋白 CII, 调节蛋白 CII 是 DNA 结合蛋白, 参与溶原菌的建立^[38]。在本研究中, vB_MweS-yong2 对惠氏微囊藻 FACHB-1112 呈现裂解特性, 而

非溶原性, 这可能与培养条件有关, 具体机制有待深入研究。

此外, 不少研究发现噬藻体基因组存在一些与宿主新陈代谢相关的同源基因, 被称为“辅助代谢基因”(AMGs)^[39], 可协助微生物驱动生物地球化学循环^[40-42]。AMGs 主要影响宿主蓝藻的光合作用和磷酸戊糖途径等^[43]。如噬藻体 P-SSP7 中含有负责编码光合系统 II 核心蛋白 D1 和 D2 的 *psbA* 和 *psbD* 基因^[44], 噬藻体 P-SSM2 中含有负责编码磷酸盐调节蛋白的 *phoH* 基因^[45] 以及 S-CBS2 含有可以保护宿主免受强光损伤的 *hli* 基因^[46]。在噬藻体 vB_MweS-yong2 中同样也含有 AMGs, 其中 ORF25 编码碳水化合物酯酶(carbohydrate esterase), 表明病毒可能通过复杂多糖的生物分解直接调控碳循环, 揭示了病毒在有机碳分解中的重要作用。ORF37 编码焦磷水解酶(pyrophosphohydrolase), 该酶能催化三磷酸腺嘌呤脱氧核苷酸(dATP)/三磷酸鸟嘌呤脱氧核苷酸(dGTP)水解为焦磷酸和腺嘌呤脱氧核苷酸(dAMP)/鸟嘌呤脱氧核苷酸(dGMP), 使得宿主细胞中的 dATP 浓度降低, 从而更容易地进行噬菌体 DNA 合成^[47]。

2.3 噬藻体 vB_MweS-yong2 的系统进化分析

国际病毒分类委员会(ICTV)的细菌、古菌病毒分会 (Bacterial and Archaeal Viruses Subcommittee, BAVS)关于噬菌体属的界定标准是与其他所有已分类噬菌体的核苷酸序列相似度大于或等于 50%, 如果低于此值则说明所比对的噬菌体代表一个新的属^[48]。PASC (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/pasc/>)是 ICTV 推荐的用于分析核苷酸序列相似度的工具, PASC 比对表明 vB_MweS-yong2 与所有已知噬菌体间的全基因组核苷酸序列相似度最高值为 20.21%, 这个值远低于 50%的属边界值。

vB_MweS-yong2 代表一个新的属。从 ICTV 中有尾噬菌体目(Caudovirales)下的 14 个科中选取 42 个代表种, 从 GenBank 数据库下载这 42 个代表种及引言所述的 5 个微囊藻噬藻体、其他 5 株淡水噬藻体的基因组序列, 运用在线软件 ViPTree1.9, 基于这些病毒和 vB_MweS-yong2 的全基因组构建了系统发育进化树 proteomic tree (图 2)。结果显示 vB_MweS-yong2 与长尾科 Siphoviridae 的成员聚在一起, 与 *Gordonia* 的噬菌体 BaxterFox 同源关系最为接近, 表明 vB_MweS-yong2 属于长尾科。vB_MweS-yong2 与 *Gordonia* phage BaxterFox 间的同源性非常低(图 3), 其平均核酸一致性(average nucleotide identity, ANI)值为-1, DNA 分子原位杂交值(in silico DNA-DNA hybridization, isDDH value)为 0。综上, vB_MweS-yong2 在长尾科中代表一个独立、新颖的新属。

DNA 聚合酶通常较为保守, 也常用作病毒进化分析工具。基于 16 种噬藻体的 DNA 聚合酶序列比对, 运用 MEGA 11 软件的 neighbor-joining 算法构建了 DNA 聚合酶的系统发育树(图 4)。系统发育树显示噬藻体 DNA 聚合酶的系统发育与噬藻体的系统分类地位并无耦合关系, 噬藻体 DNA 聚合酶的系统发育与宿主的分类地位并无耦合关系。此外, 海水与淡水噬藻体的 DNA 聚合酶并没有分开成簇, 表明噬藻体 DNA 聚合酶的进化并不一定存在地域隔离。

3 讨论与结论

惠氏微囊藻噬藻体 vB_MweS-yong2 的基因组中的基因依其功能而处于不同区域, 具有典型的模块化特征。vB_MweS-yong2 的基因组序列非常新颖, 基于全基因组的 BLASTn 比对中同源覆盖度为 0%、PASC 比对显示其与现有病毒序列相似度最高值仅为 20.21%, 远低于 50%

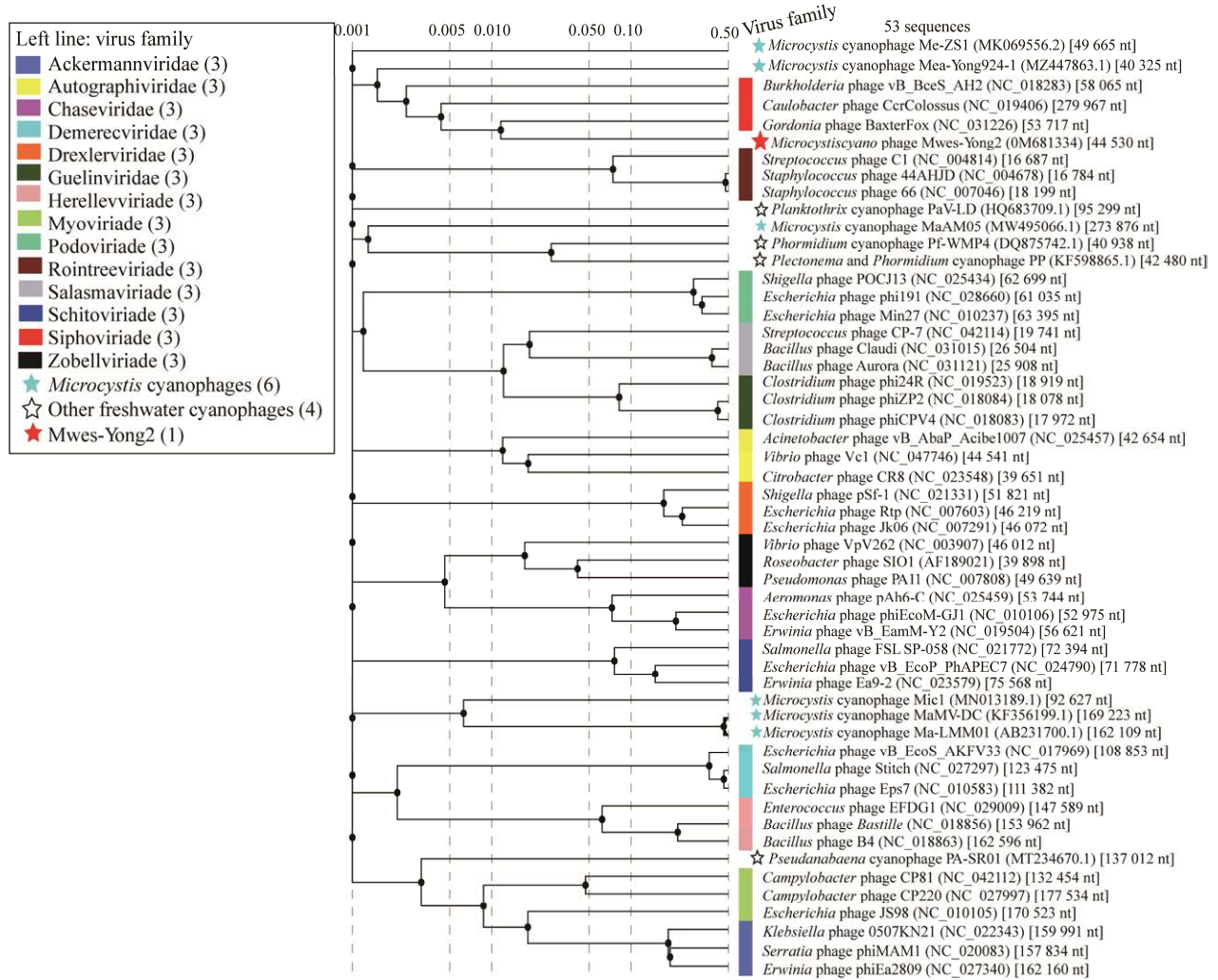


图 2 基于全基因组的 proteome tree

Figure 2 Phylogenetic proteomic tree of vB_MweS-yong2, 6 reported *Microcystis* cyanophages, 4 other fresh cyanophages and 42 classified phages of the 14 families.

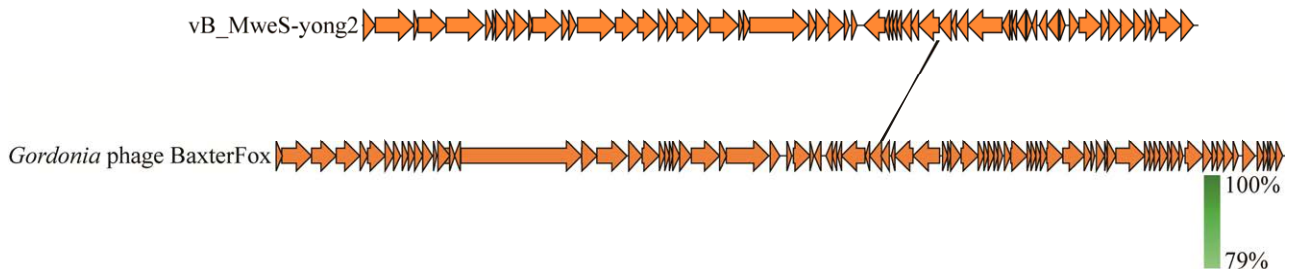


图 3 vB_MweS-yong2 和 Gordonia phage BaxterFox 的基因组比较

Figure 3 Genome comparison of the vB_MweS-yong2 and *Gordonia* phage BaxterFox.

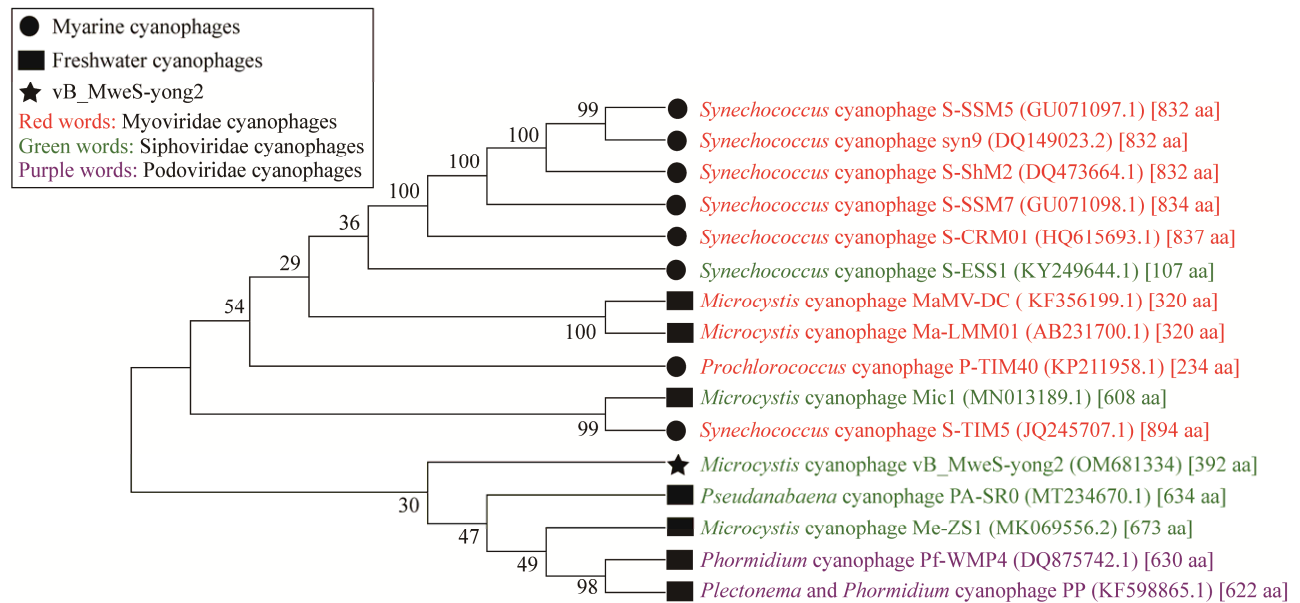


图 4 噬藻体 DNA 聚合酶的系统发育树

Figure 4 Phylogenetic tree of cyanophage DNA polymerases.

的属边界值, 进化树中, vB_MweS-yong2 虽与长尾科病毒聚在一起, 却与其他长尾科病毒有着长远的进化距离。总之, vB_MweS-yong2 序列新颖, 进化上代表着一个新的噬菌体属, 丰富了噬菌体知识体系。

常规的病毒系统进化分析往往借助 1–2 个保守基因如噬菌体的 *gp20*、DNA 聚合酶、末端酶大亚基等的序列比对而构建系统进化树。国际病毒分类委员会(ICTV)曾长期使用末端酶大亚基序列比对作为噬菌体分类的重要依据, 由于病毒的高度多样性和不保守性, 近年来国际病毒分类委员会推荐^[49]使用基于全基因组比对的进化分析如 PASC 分析和 proteomic tree 分析, 并在此基础上将有尾目 3 个科改为 14 个科加 1 个未分科的属。PASC 和 proteomic tree 是新型原核病毒系统进化分析的有力工具, 基于二者所作的分析结果往往较基于单一基因所做的分析更加贴合国际病毒分类委员会的分类界定。本研究所建的噬藻体 DNA 聚合酶系统发育树中, 海水与淡水噬藻体的 DNA 聚合酶并没

有分开成簇。噬藻体 DNA 聚合酶的进化关系与噬藻体本身的分类地位相矛盾。在 Šulčius 等基于末端酶大亚基构建的噬藻体系统进化树中, 海水与淡水噬藻体的末端酶大亚基也没有按海水和淡水来源分开成簇^[22], 同时肌尾、长尾和短尾科噬藻体亦没有按照系统分类地位分别成簇, 而是各科相互穿插。本课题组前期基于末端酶大亚基构建的噬藻体系统进化树中, 这 3 个科的噬藻体也没有规律性地依据分类地位聚集, 而是各科犬牙交错^[14]。而在 Šulčius 等基于全基因组构建的系统进化树中, 各科非常规律地按照 ICTV 的系统分类地位成簇、按照淡水与海水来源分别成簇、按照单细胞宿主和丝状宿主规律成簇。在此, 我们呼吁在进行噬藻体系统进化分析中, 尽量使用全基因组同源性比较分析法, 而非单一基因的比对。

如引言所述, 已发现的绝大部分噬藻体基因组中的 ORF 可以被 NCBI 等数据库注释的不超 50%。本研究中, 虽然 vB_MweS-yong2 序列新颖, 却有 62.3% 的 ORF 被注释出功能。这

可能与本研究中综合运用了多种注释工具有关。

如引言所述, 惠氏微囊藻是水体中常见的蓝藻, 是常见的水华优势藻, 对其进行有效的控制, 便可能控制以惠氏微囊藻为优势藻的蓝藻水华暴发。此前, 有关惠氏微囊藻噬藻体的分离及基因组的研究报道处于空白状态。引言所述的已被报道基因组序列的 6 个微囊藻噬藻体中, MaMV-DC、Ma-LMM01、Mic1 和 Mae-Yong924-1 的指示菌是铜绿微囊(*M. aeruginosa*); vB_MeIS-Me-ZS1 的指示菌是华美微囊藻(*M. elabens*); PhiMa05 的指示菌是一种未定种的微囊藻(*Microcystis* sp.)。虽然 Mic1 最先被报道是使用惠氏微囊藻 FACHB-1339 株为指示藻分离获得的, 后续文献却做了订正, 指出该指示藻实为铜绿微囊藻^[23]。本研究分离鉴定的淡水微囊藻噬藻体 vB_MweS-yong2 弥补了有关惠氏微囊藻噬藻体研究的空白, 同时因为惠氏微囊藻是淡水水体藻华中常见的优势藻, 本研究也为蓝藻水华治理提供了潜在的研发应用材料。在 vB_MweS-yong2 基因组中没有发现已知的毒力因子和抗生素耐药基因, 这为该噬藻体的应用安全性奠定了基础。

噬藻体是以蓝藻为宿主的病毒类群, 它在水体中的广泛分布以及对蓝藻种群的丰度和密度的调控作用使它可以成为藻类水华治理的潜在力量, 然而有关噬藻体的研究仍处于初级阶段。如果今后的研究中能够分离出更多的噬藻体, 并对其进行研究, 以及拓宽噬藻体的宿主范围, 噬藻体必将会在环境治理领域大放异彩。

参考文献

- [1] 王永平, 郭萧, 谢瑞, 姬昌辉, 于剑. 过氧化氢消除小型水体蓝藻水华的效果评价. *人民珠江*, 2019, 40(11): 95–98.
Wang YP, Guo X, Xie R, Ji CH, Yu J. Evaluation of the effect of H₂O₂ on controlling cyanobacteria bloom in a small water body. *Pearl River*, 2019, 40(11): 95–98. (in Chinese)
- [2] 方爱红, 黄银芝, 钱瑾. 浅谈太湖蓝藻暴发的原因、危害及其预防治理. *净水技术*, 2008, 27(3): 70–72.
Fang AH, Huang YZ, Qian J. Causes and harmful effects of blue-green algae disaster in Taihu lake and control measures introduction. *Water Purification Technology*, 2008, 27(3): 70–72. (in Chinese)
- [3] 刘伟. 巢湖蓝藻重度发生时的水质特征分析. *中国环境监测*, 2007, 23(4): 101–102.
Liu W. The water quality analysis of lake Chaohu when the cyanobacteria was occurred. *Environmental Monitoring in China*, 2007, 23(4): 101–102. (in Chinese)
- [4] 刘丽萍. 滇池水华特征及成因分析. *环境科学研究*, 1999, 12(5): 36–37.
Liu LP. Characteristics of blue algal bloom in Dianchi lake and analysis on its cause. *Research of Environmental Sciences*, 1999, 12(5): 36–37. (in Chinese)
- [5] 陈贺林, 李芸, 储昭升, 叶碧碧, 李国宏. 超声波控藻技术现状及研究进展. *环境工程技术学报*, 2020, 10(1): 72–78.
Chen HL, Li Y, Chu ZS, Ye BB, Li GH. Present situation and research progress of ultrasonic algae control technology. *Journal of Environmental Engineering Technology*, 2020, 10(1): 72–78. (in Chinese)
- [6] Jayme-Torres G, Hansen AM. Nutrient loads in the river mouth of the Río Verde Basin in Jalisco, Mexico: how to prevent eutrophication in the future reservoir? *Environmental Science and Pollution Research International*, 2018, 25(21): 20497–20509.
- [7] Lee TA, Rollwagen-Bollens G, Bollens SM, Faber-Hammond JJ. Environmental influence on cyanobacteria abundance and microcystin toxin production in a shallow temperate lake. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2015, 114: 318–325.
- [8] 陈识文, 毛涛, 袁科平, 余知和. 水华治理方法研究进展. *长江大学学报: 自科版*, 2014, 11(35): 69–73.
Chen SW, Mao T, Yuan KP, Yu ZH. Advances in the treatment of blooms. *Journal of Yangtze University: Natural Science Edition*, 2014, 11(35): 69–73. (in Chinese)
- [9] Jassim SAA, Limoges RG. Impact of external forces on cyanophage-host interactions in aquatic ecosystems. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2013, 29(10): 1751–1762.

- [10] Gerphagnon M, MacArthur DJ, Latour D, Gachon CMM, Van Ogtrop F, Gleason FH, Sime-Ngando T. Microbial players involved in the decline of filamentous and colonial cyanobacterial blooms with a focus on fungal parasitism. *Environmental Microbiology*, 2015, 17(8): 2573–2587.
- [11] Proctor LM, Fuhrman JA. Viral mortality of marine bacteria and cyanobacteria. *Nature*, 1990, 343(6253): 60–62.
- [12] Zhang QY, Gui JF. Diversity, evolutionary contribution and ecological roles of aquatic viruses. *Science China Life Sciences*, 2018, 61(12): 1486–1502.
- [13] 周科, 杜康, 朱洁, 周丛照, 李琼. 也西湖噬藻体的分离与鉴定. *微生物学通报*, 2020, 47(10): 3161–3170.
Zhou K, Du K, Zhu J, Zhou CZ, Li Q. Isolation and characterization of cyanophages from the pond in the west campus of University of Science and Technology of China. *Microbiology China*, 2020, 47(10): 3161–3170. (in Chinese)
- [14] Lin W, Li DF, Sun ZT, Tong YG, Yan XJ, Wang CL, Zhang X, Pei GQ. A novel freshwater cyanophage vB_MelS-Me-ZS1 infecting bloom-forming cyanobacterium *Microcystis elabens*. *Molecular Biology Reports*, 2020, 47(10): 7979–7989.
- [15] Jaskulska A, Mankiewicz-Boczek J. Cyanophages specific to cyanobacteria from the genus *Microcystis*. *Ecohydrology & Hydrobiology*, 2020, 20(1): 83–90.
- [16] Naknaen A, Suttinun O, Surachat K, Khan E, Pomwised R. A novel jumbo phage PhiMa05 inhibits harmful *Microcystis* sp. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 660351.
- [17] Qian MH, Li DF, Lin W, Pan LT, Liu WC, Zhou Q, Cai RQ, Wang F, Zhu JQ, Tong YG. A novel freshwater cyanophage, mae-Yong924-1, reveals a new family. *Viruses*, 2022, 14(2): 283.
- [18] 何家苑, 李络平, 俞家禄, 赵以军, 刘永定. 我国产毒微囊藻的新发现——惠氏微囊藻及其毒性的初步研究. *水生生物学报*, 1996, 20(2): 192–194.
He JW, Li LP, Yu JL, Zhao YJ, Liu YD. Preliminary studies on a Chinese new record of blue-green algae-*Microcystis wesenbergii* and its toxicity. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1996, 20(2): 192–194. (in Chinese)
- [19] 王捷, 石瑛, 刘琪, 李砧, 张猛, 谢树莲. 汾河太原河段水华藻类分类及分子系统研究. *湖泊科学*, 2018, 30(5): 1332–1342.
Wang J, Shi Y, Liu Q, Li Z, Zhang M, Xie SL. Taxonomic and molecular phylogenetics of bloom-forming algae from the Taiyuan section of Fenhe river, China. *Journal of Lake Sciences*, 2018, 30(5): 1332–1342. (in Chinese)
- [20] Clokie MRJ, Millard AD, Letarov AV, Heaphy S. Phages in nature. *Bacteriophage*, 2011, 1(1): 31–45.
- [21] Zhang D, You F, He YL, Te SH, Gin KYH. Isolation and characterization of the first freshwater cyanophage infecting *Pseudanabaena*. *Journal of Virology*, 2020, 94(17): e00682-20.
- [22] Šulčius S, Šimoliūnas E, Alzbutas G, Gasiūnas G, Jauniškis V, Kuznecova J, Miettinen S, Nilsson E, Meškys R, Roine E, Paškauskas R, Holmfeldt K. Genomic characterization of cyanophage vB_AphaS-CL131 infecting filamentous diazotrophic cyanobacterium *Aphanizomenon flos-aquae* reveals novel insights into virus-bacterium interactions. *Applied and Environmental Microbiology*, 2019, 85(1): e01311-18.
- [23] Yang F, Jin H, Wang XQ, Li Q, Zhang JT, Cui N, Jiang YL, Chen YX, Wu QF, Zhou CZ, Li WF. Genomic analysis of Mic1 reveals a novel freshwater long-tailed cyanophage. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 484.
- [24] Baena Lozada LP, Hoppert M, Hertel R. Phage vB_BmeM-Goe8 infecting *Bacillus megaterium* DSM319. *Archives of Virology*, 2020, 165(2): 515–517.
- [25] 韩颖. 一株噬藻体的全基因组测序及 CO₂ 浓度和温度同步升高对集胞藻 6803 紫外损伤修复基因转录的影响. 湖北工业大学硕士学位论文, 2017.
- [26] Li SS, Fan H, An XP, Fan HH, Jiang HH, Chen YB, Tong YG. Scrutinizing virus genome termini by high-throughput sequencing. *PLoS One*, 2014, 9(1): e85806.
- [27] Duffy C, Feiss M. The large subunit of bacteriophage λ's terminase plays a role in DNA translocation and packaging termination. *Journal of Molecular Biology*, 2002, 316(3): 547–561.
- [28] Leipe DD, Aravind L, Grishin NV, Koonin EV. The bacterial replicative helicase DnaB evolved from a RecA duplication. *Genome Research*, 2000, 10(1): 5–16.
- [29] 徐丹丹. 深海嗜热噬菌体 GVE2 HNH 核酸内切酶结构与功能的研究. 安徽大学硕士学位论文, 2017.
- [30] Sengupta S, Nagaraja V. YacG from *Escherichia coli* is a specific endogenous inhibitor of DNA gyrase. *Nucleic Acids Research*, 2008, 36(13): 4310–4316.
- [31] Villanueva VM, Oldfield LM, Hatfull GF. An unusual

- phage repressor encoded by mycobacteriophage BPs. *PLoS One*, 2015, 10(9): e0137187.
- [32] Makarova KS, Aravind L, Grishin NV, Rogozin IB, Koonin EV. A DNA repair system specific for thermophilic archaea and bacteria predicted by genomic context analysis. *Nucleic Acids Research*, 2002, 30(2): 482–496.
- [33] Stefan C, Xia YN, Van Etten JL. Molecular cloning and characterization of the gene encoding the adenine methyltransferase M.CviRI from *Chlorella* virus XZ-6E. *Nucleic Acids Research*, 1991, 19(2): 307–311.
- [34] Lu SN, Wang JY, Chitsaz F, Derbyshire MK, Geer RC, Gonzales NR, Gwadz M, Hurwitz DI, Marchler GH, Song JS, Thanki N, Yamashita RA, Yang MZ, Zhang DC, Zheng CJ, Lanczycki CJ, Marchler-Bauer A. CDD/SPARCLE: the conserved domain database in 2020. *Nucleic Acids Research*, 2020, 48(D1): D265–D268.
- [35] Wang CY, Molodtsov V, Firlar E, Kaelber JT, Blaha G, Su M, Ebright RH. Structural basis of transcription-translation coupling. *Science*, 2020, 369(6509): 1359–1365.
- [36] Cheng X, Zhang X, Pflugrath JW, Studier FW. The structure of bacteriophage T7 lysozyme, a zinc amidase and an inhibitor of T7 RNA polymerase. *PNAS*, 1994, 91(9): 4034–4038.
- [37] Biswas T, Aihara H, Radman-Livaja M, Filman D, Landy A, Ellenberger T. A structural basis for allosteric control of DNA recombination by λ integrase. *Nature*, 2005, 435(7045): 1059–1066.
- [38] Kalionis B, Dodd IB, Egan JB. Control of gene expression in the P2-related template coliphages: III. DNA sequence of the major control region of phage 186. *Journal of Molecular Biology*, 1986, 191(2): 199–209.
- [39] Thompson LR, Zeng QL, Kelly L, Huang KH, Singer AU, Stubbe J, Chisholm SW. Phage auxiliary metabolic genes and the redirection of cyanobacterial host carbon metabolism. *PNAS*, 2011, 108(39): E757–E764.
- [40] Anantharaman K, Duhaime MB, Breier JA, Wendt KA, Toner BM, Dick GJ. Sulfur oxidation genes in diverse deep-sea viruses. *Science*, 2014, 344(6185): 757–760.
- [41] York A. Algal virus boosts nitrogen uptake in the ocean. *Nature Reviews Microbiology*, 2017, 15(10): 573.
- [42] Roux S, Brum JR, Dutilh BE, Sunagawa S, Duhaime MB, Loy A, Poulos BT, Solonenko N, Lara E, Poulain J, Pesant S, Kandels-Lewis S, Dimier C, Picheral M, Searson S, Cruaud C, Alberti A, Duarte CM, Gasol JM, Vaqué D, Bork P, Acinas SG, Wincker P, Sullivan MB. Ecogenomics and potential biogeochemical impacts of globally abundant ocean viruses. *Nature*, 2016, 537(7622): 689–693.
- [43] 高恶斌, 宁德刚. 噬藻体辅助代谢基因(AMGs)研究进展. *微生物学通报*, 2014, 41(8): 1667–1674. Gao EB, Ning DG. Advances in researches on cyanophage auxiliary metabolic genes. *Microbiology China*, 2014, 41(8): 1667–1674. (in Chinese)
- [44] Millard A, Clokie MRJ, Shub DA, Mann NH. Genetic organization of the *psbAD* region in phages infecting marine *Synechococcus* strains. *PNAS*, 2004, 101(30): 11007–11012.
- [45] Sullivan MB, Coleman ML, Weigele P, Rohwer F, Chisholm SW. Three *Prochlorococcus* cyanophage genomes: signature features and ecological interpretations. *PLoS Biology*, 2005, 3(5): e144.
- [46] Huang SJ, Wang K, Jiao NZ, Chen F. Genome sequences of siphoviruses infecting marine *Synechococcus* unveil a diverse cyanophage group and extensive phage-host genetic exchanges. *Environmental Microbiology*, 2012, 14(2): 540–558.
- [47] Zhou Y, Xu XX, Wei YF, Cheng Y, Guo Y, Khudyakov I, Liu FL, He P, Song ZY, Li Z, Gao Y, Ang EL, Zhao HM, Zhang Y, Zhao SW. A widespread pathway for substitution of adenine by diaminopurine in phage genomes. *Science*, 2021, 372(6541): 512–516.
- [48] Adriaenssens E, Brister JR. How to name and classify your phage: an informal guide. *Viruses*, 2017, 9(4): 70.
- [49] Adriaenssens EM, Sullivan MB, Knezevic P, Van Zyl LJ, Sarkar BL, Dutilh BE, Alfenas-Zerbini P, Lobočka M, Tong YG, Brister JR, Moreno Switt AI, Klumpp J, Aziz RK, Barylski J, Uchiyama J, Edwards RA, Kropinski AM, Petty NK, Clokie MRJ, Kushkina AI, Morozova VV, Duffy S, Gillis A, Rumnieks J, Kurtböke I, Chanishvili N, Goodridge L, Wittmann J, Lavigne R, Jang HB, Prangishvili D, Enault F, Turner D, Poranen MM, Oksanen HM, Krupovic M. Taxonomy of prokaryotic viruses: 2018–2019 update from the ICTV bacterial and archaeal viruses subcommittee. *Archives of Virology*, 2020, 165(5): 1253–1260.