



新型聚球藻噬藻体 Yong-L2-223 的分离及基因组分析

胡嘉琪¹, 潘灵婷¹, 周钦¹, 钱敏桦¹, 蔡汝倩¹, 王飞¹, 任晓清¹, 林威²,
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

胡嘉琪, 潘灵婷, 周钦, 钱敏桦, 蔡汝倩, 王飞, 任晓清, 林威, 李登峰, 童贻刚. 新型聚球藻噬藻体 Yong-L2-223 的分离及基因组分析[J]. 微生物学报, 2024, 64(1): 189-207.

HU Jiaqi, PAN Lingting, ZHOU Qin, QIAN Minhua, CAI Ruqian, WANG Fei, REN Xiaoping, LIN Wei, LI Dengfeng, TONG Yigang. Isolation and genome analysis of a novel *Synechococcus* cyanophage Yong-L2-223[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(1): 189-207.

摘要: 【目的】噬藻体(cyanophages)是特异性侵染蓝藻(cyanobacteria)的病毒, 广泛分布于各类水体中, 在调节蓝藻种群动态和密度、推动生物地球水生生态系统循环中起着重要作用。本研究的目的在于分离、鉴定噬藻体。【方法】本研究以海洋聚球藻(*Synechococcus* sp.) PCC 7002 为指示宿主, 从淡水水样中分离培养一株新型噬藻体 Yong-L2-223, 对其进行了宿主范围实验、全基因组测序、基因功能注释和系统进化分析。【结果】针对 31 株供试蓝藻的宿主范围实验, 结果除指示藻 PCC 7002 [属于聚球藻目(*Synechococcales*)]外, Yong-L2-223 能够感染 2 株淡水蓝藻, 分别是来源于滇池的绿色微囊藻(*Microcystis viridis*) FACHB-1342 [属于色球藻目(*Chroococcales*)]和水华束丝藻(*Aphanizomenon flos-aquae*) FACHB-1209 [属于念珠藻目(*Nostocales*)]。既可在高盐条件下感染海洋蓝藻, 又可在低盐条件下感染淡水蓝藻, Yong-L2-223 具有广盐性。透射电镜观察表明, Yong-L2-223 呈肌尾病毒样(myovirus-like), 头部直径约 60 nm, 尾部长约 136 nm。Yong-L2-223 的双链 DNA 基因组全长为 65 725 bp, G+C 含量为 58.6%, 含有 100 个开放阅读框(open reading frame, ORFs)。Yong-L2-223 基因组中含有编码 *Cas4*、基因转移因子(gene transfer factor, GTA)的基因, 含有辅助代谢基因(auxiliary metabolic genes, AMGs), 含有 pre-Q₀ 生物合成基因簇(gene cluster)。

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

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

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

Received: 2023-05-26; Accepted: 2023-09-15; Published online: 2023-09-22

这些基因的编码产物可能有助于该噬藻体对宿主的适应、感染，从而实现跨 3 个目(order)感染蓝藻。将 Yong-L2-223 基因组与现有数据库中所有病毒基因组进行序列配对比较(pairwise sequence comparison, PASC)，结果最高 PASC 值仅为 3.78%，远远低于国际病毒分类委员会(International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV)界定属的边界值(70%)。在基于全基因组的蛋白谱系统进化树中，Yong-L2-223 形成一个独立的分支(branch)，与其他病毒间进化距离远。【结论】Yong-L2-223 在有尾纲中代表一个新的未知的属。本研究首次以海洋蓝藻为指示藻从淡水中分离获得噬藻体，且该噬藻体序列新颖，拓宽了对噬藻体的认知，丰富了噬藻体库、噬藻体基因库，为噬藻体资源开发奠定了基础。

关键词：海洋聚球藻；淡水噬藻体；基因组分析

Isolation and genome analysis of a novel *Synechococcus* cyanophage Yong-L2-223

HU Jiaqi¹, PAN Lingting¹, ZHOU Qin¹, QIAN Minhua¹, CAI Ruqian¹, WANG Fei¹, REN Xiaoqing¹, LIN Wei², LI Dengfeng^{1*}, TONG Yigang²

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] Cyanophages, the viruses specifically infecting cyanobacteria, are ubiquitous in water environments. They play a role in regulating the population dynamics and density of cyanobacteria and promote the biogeochemical cycling of the aquatic ecosystem. This study aims to isolate and identify a cyanophage. [Methods] A novel cyanophage Yong-L2-223 was isolated from fresh water samples with marine *Synechococcus* sp. PCC 7002 as the indicator host. The host range, genome sequence, open reading frames (ORFs), and phylogenetic relationship of Yong-L2-223 were studied. [Results] The host range tests against 31 strains of cyanobacteria showed that Yong-L2-223 could infect the indicator host PCC 7002 (*Synechococcales*) and two freshwater strains *Microcystis viridis* FACHB-1342 (*Chroococcales*) and *Aphanizomenon flos-aquae* FACHB-1209 (*Nostocales*) from the Dianchi Lake. The infection of the cyanobacterial strains from both the seawater and freshwater samples indicated that Yong-L2-223 was a euryhaline cyanophage. Yong-L2-223 was myovirus-like, consisting of an icosahedral head (about 60 nm in diameter) and a contractile tail (about 136 nm in length). The genome (double-stranded DNA) of Yong-L2-223 had a length of 65 725 bp, with the G+C content of 58.6% and 100 ORFs. It was predicted to carry the *Cas4* gene, gene transfer factor (GTA) gene, auxiliary metabolic genes (AMGs), and a gene cluster for the synthesis of pre-Q₀. These genes may contribute to the adaptation and infection of the cyanophage in cyanobacteria of three orders. The pairwise sequence comparison (PASC) illustrated that the highest similarity sharing by cyanophage Yong-L2-223 and all the viruses in the current genome databases was only 3.78%, far below the genus boundary cut-off of 70% defined by the International Committee

on Taxonomy of Viruses. In the phylogenetic tree based on the whole proteomes, Yong-L2-223 formed an independent branch, with long evolutionary distances from other phages. **[Conclusion]** Yong-L2-223 is a new genus of the *Caudoviricetes* class. For the first time, we used a marine cyanobacterial strain as the indicator host to isolate and obtain a novel cyanophage from freshwater, which broadened the understanding of cyanophages, enriched cyanophage genome database, and laid a foundation for the development of cyanophage resources.

Keywords: marine *Synechococcus*; freshwater cyanophage; genome analysis

噬藻体(cyanophages)是特异性感染蓝藻即蓝细菌(cyanobacteria)的病毒(噬菌体),广泛分布在各种水生生态系统中,通过裂解宿主细胞控制水生生态系统中蓝藻的种群分布和代谢活动,影响全球生态系统的能量流动和碳氮循环^[1-3]。在近岸表层海水中,噬藻体的浓度可以达到 10^6 PFU/mL,每天有>80%的聚球藻细胞与噬藻体接触^[4]。人们普遍认为,在地表水中,细菌总死亡率的10%–50%是由病毒导致的;在对原生生物不友好的环境中,如富营养化的低氧湖水中,细菌总死亡率的50%–100%归因于病毒^[5-6]。此外,噬藻体还会通过水平基因转移和拮抗协同进化影响宿主与其自身的基因组多样性和进化^[7-9],如噬藻体P-SSP7会获取宿主蓝藻基因组中的光合作用基因并整合到自身的基因组中,而后在宿主细胞中表达该类基因,并可将基因带到其他宿主细胞中,在这一过程中宿主和噬藻体之间发生了基因转移,而这种基因转移对两者的协同进化起到了驱动作用^[10]。

聚球藻(*Synechococcus*)在各类淡水水域分布广泛,Shi等的研究发现湖泊超微蓝藻(*Picocyanobacteria*)主要为聚球藻^[11-12]。同样地,聚球藻是海洋蓝藻中最主要的代表性类群之一,在海洋中分布广泛,从赤道到极地,从沿海到远洋的广阔环境中都存在^[13],在沿海水域中的丰度可高达 10^3 – 10^5 cell/mL。研究表明,聚球藻的能量转换迅速,是众多浮游动物的饵料,在整个水生生态系统中占有重要地位,

对海洋总初级生产力的贡献高达20%以上^[14],影响着生物地球化学循环和能量代谢^[15]。噬藻体是聚球藻死亡的重要驱动因素,对其进行分离鉴定与研究,将为深入研究聚球藻的种群动态与进化提供重要依据^[16]。

海洋聚球藻噬藻体的分离与鉴定始于20世纪90年代^[17]。1993年Wilson^[18]分离得到的聚球藻噬藻体中,分别具有肌尾样(myovirus-like)、长尾样(siphovirus-like)和短尾样(podovirus-like)形态。随着噬藻体逐渐成为研究热点,近年来,分离报道的噬藻体愈来愈多。通过检索,发现截至2023年3月15日,在文献及NCBI数据库中公布了361株聚球藻噬藻体的完整基因组序列,其中绝大多数为海洋噬藻体,淡水聚球藻噬藻体仅有9株(表1)。绝大多数噬藻体只是被提交了基因组序列到NCBI数据库中。针对这些聚球藻噬藻体进行基因组系统分析和系统进化分析的文献报道少之又少,限制了对聚球藻噬藻体的认知。以往报道的聚球藻噬藻体,要么是用海洋噬藻体从海水、咸淡水中分离的,要么是用淡水聚球藻从淡水中分离的。

为了获得新型噬藻体,拓宽对噬藻体的认知,为噬藻体水华治理应用研究奠定基础,并探究淡水中是否有广盐性噬藻体,本研究首次尝试以来自海洋的、用高盐培养基培养的蓝藻聚球藻(*Synechococcus* sp.) PCC 7002为指示宿主,从淡水中分离噬藻体。对获得的噬藻体Yong-L2-223进行了基因组序列测定、注释和基于全基因比对的系统进化分析。

表 1 已报道的淡水聚球藻噬藻体

Table 1 A full list of reported freshwater cyanophages capable of infecting *Synechococcus* cyanobacteria

Cyanophage (reference)	Accession No.	Genome length (bp)	Host	Morphology
Yong-L2-223	OM868081	65 725	<i>Synechococcus</i> sp. PCC 7002 <i>Microcystis viridis</i> FACHB-1342 <i>Aphanizomenon flos-aquae</i> FACHB-1209	Myovirus-like
S-SRM01 ^[19]	NC_070963	240 842	<i>Synechococcus</i> sp. SR-C6	Myovirus-like
S-CRM01 ^[20]	NC_015569	178 563	<i>Synechococcus</i> sp.	Myovirus-like
S-SRP01 ^[19]	MW015080	45 017	<i>Synechococcus</i> sp. SR-R4S1	Podovirus-like
S-SRP02 ^[21]	MW822601	42 143	<i>Synechococcus</i> sp. SR-C1	Podovirus-like
SM-1 ^[22]	—	—	<i>Synechococcus elongatus</i> IU 563, <i>Microcystis aeruginosa</i> NRC-1	Podovirus-like
S-EIV1 ^[23]	KJ410740	79 178	<i>Synechococcus</i> sp. PCCC-A2c	Siphovirus-like
SM-2 ^[24]	—	—	<i>Synechococcus elongates</i> IU 563, <i>Microcystis aeruginosa</i> NRC-1	Siphovirus-like
S-2L ^[25]	MW334946	45 087	<i>Synechococcus</i> sp. 698, <i>Synechococcus elongatus</i> 58, <i>Synechococcus elongatus</i> 6907	Siphovirus-like
S-4L ^[26-27]	—	—	<i>Synechococcus elongatus</i>	Siphovirus-like

—: No information was reported.

1 材料与方 法

1.1 实验藻种

海洋聚球藻(*Synechococcus* sp.) PCC 7002: 作为指示藻, 用于分离聚球藻噬藻体, 由宁波大学海洋学院姜海波教授馈赠。

其余藻株: 用于宿主范围实验, 均购自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)。

1.2 实验培养基配制

A+液体培养基(A-plus medium)^[28]: 氯化钠 18 g, 氯化钾 0.6 g, 硝酸钠 1 g, 七水合硫酸镁 5 g, 氯化钙 0.275 g, 用蒸馏水定容至 1 000 mL, 121 °C 灭菌 20 min, 冷却后加入 1 mol/L 的三羟甲基氨基甲烷盐酸盐(pH 8.2) 8.3 mL、32.5 mmol/L 的乙二胺四乙酸二钠 2 mL、7.5 mmol/L 的乙二胺四乙酸铁钠 2 mL、D6 微量元素(配方见表 2) 1 mL、磷酸二氢钾 370 μL 和维生素 B₁₂ 100 μL。

表 2 D6 微量元素成分表

Table 2 Composition of D6 trace elements

Ingredient	Concentration (g/L)	Liquor concentration (mmol/L)
H ₃ BO ₃	34.26	550
MnCl ₂ ·4H ₂ O	4.32	20
ZnSO ₄ ·7H ₂ O/ZnCl ₂	0.665/0.315	2.3
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.050 4	0.2
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.003	0.012
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.012 15	0.000 05

BG11 液体培养基: 称取 BG11 粉剂 1.7 g, 用蒸馏水定容至 1 000 mL, 121 °C 灭菌 20 min。BG11 粉剂配方同王飞等^[29]。

1.3 藻株培养

海洋聚球藻(*Synechococcus* sp.) PCC 7002 用 A+培养基培养; 其他藻株用 BG11 培养基培养。

在锥形瓶中按照藻液:培养基体积比为 1:10 加入实验所需藻液和相应的无菌液体培养基, 置于 25 °C 的温控光照培养箱中(光照强度: 2 000 lx, 光暗周期: 12 h/12 h)。

1.4 水样采集及处理

2020 年 12 月采集浙江省宁波市北仑区江北区路林市场下水道(29.906 349°N, 121.605 659°E), 于 4 °C 低温转运至实验室。4 °C 下 12 000×g 离心 15 min, 取上清液, 依次用 0.45 μm 和 0.22 μm 孔径的聚醚砜过滤器过滤, 滤液用于后续实验。

1.5 噬藻体的初步富集

于锥形瓶中, 按照水样上清滤液:A+液体培养基:对数期 PCC 7002 藻液(体积比)=4:1:1 的比例, 配制 120 mL 混合液作为实验组; 用纯水代替水样上清滤液作为对照组。置于 25 °C 的温控光照培养箱中培养, 每日观察实验组与对照组的状态。待实验组藻液黄化后, 将其在 4 °C 下 8 000×g 离心 10 min, 取上清液依次经 0.45 μm 和 0.22 μm 孔径的聚醚砜过滤器过滤。取 20 mL 过滤液与 200 mL 对数期 PCC 7002 藻液, 倒入锥形瓶中混匀, 置于 25 °C 的温控光照培养箱中培养, 至实验组藻液黄化, 即得到噬藻体富集液。

1.6 噬藻体的分离纯化

将经高温灭菌的 A+半固体培养基(含 0.7% 琼脂)分装成 8 mL/管, 置于 42 °C 的恒温水浴锅中, 使其温度恒定。取 1.5 所述噬藻体富集液, 于 4 °C 下 8 000×g 离心 10 min, 取上清液, 依次用 0.45 μm 和 0.22 μm 孔径的聚醚砜过滤器过滤。

用 A+液体培养基对上清滤液进行梯度系列稀释(10^{-1} – 10^{-7})。各取 100 μL 不同稀释度的噬藻体上清滤液, 分别与 900 μL 的对数期 PCC 7002 藻液混匀, 置于转速为 70 r/min 的恒温振荡培养箱中, 25 °C 孵育 30 min。将孵育好的混合液分别加入含 A+半固体培养基(含 0.7% 琼脂)的试管中, 混匀后倒至提前准备好的 A+固体培养基(含 1.5% 琼脂)平板上, 凝固后封口。将平板倒置于 25 °C 的温控光照培养箱中培养(光照强度: 2 000 lx, 光暗周期: 12 h/12 h)。待平板上长出噬藻斑后, 挖取独立的噬藻斑, 将其悬浮于 500 μL 的 A+液体培养基中, 置于 4 °C 冰箱, 过夜。在 4 °C 下 8 000×g 离心 10 min, 取 100 μL 上清液与 900 μL 对数期 PCC 7002 藻液混匀, 将其置于 25 °C 温控光照培养箱中培养(光照强度: 2 000 lx, 光暗周期: 12 h/12 h)。待藻液黄化后重复上述实验步骤, 直至得到大小、形态均一的噬藻斑。挖取最后一代噬藻斑时, 将独立的噬藻斑悬浮于 3 mL 对数期 PCC 7002 藻液中培养, 黄化后 8 000×g 离心 10 min, 取上清液, 用 0.45 μm 和 0.22 μm 孔径的聚醚砜过滤器过滤。

按照滤液:对数期 PCC 7002 藻液(体积比)=1:9 的比例, 将两者混匀、培养。黄化后, 取黄化的藻裂解液离心、过滤, 再按照 1:9 的体积比与对数期 PCC 7002 藻液进行混匀、培养。如此逐级扩大培养。

1.7 噬藻体的电镜观察

取新鲜的噬藻体-藻培养液培养黄化液, 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% 乙酸铀酰负染色 30 s, 用中性滤纸从侧面吸去染色剂。静置 10 min 后, 使用透射电镜(Hitachi)观察噬藻体形态。

1.8 噬藻体的宿主范围测定

淡水水华的优势藻通常是蓝藻, 而海水藻华的优势藻通常不是蓝藻。虽然, 噬藻体

Yong-L2-223 是用高盐培养基(A-plus medium)和来自海洋的聚球藻 PCC 7002 分离获得的, 而 PCC 7002 是广盐性模式生物, Yong-L2-223 分离自淡水水样, 为了初步探究 Yong-L2-223 对淡水蓝藻的侵染力, 除 PCC 7002 外, 针对 30 株(表 3)淡水蓝藻开展了人工感染试验。分别取表 3 所列的藻株, 培养至对数期, 分别取对数期蓝藻 600 μL 和噬藻体上清滤液 200 μL , 混匀后, 加入到 48 孔板中作为实验组; 用 200 μL 的 A+液体培养基代替噬藻体上清滤液作为 PCC 7002 的对照组, 用 200 μL 的 BG11 液体培养基代替噬藻体上清滤液作为其他藻株的对照组。将 48 孔板置于 25 $^{\circ}\text{C}$ 的温控光照培养箱中培养(光照强度: 2 000 lx, 光暗周期: 12 h/12 h), 实验设置 3 组平行。每日使用光学显微镜观察实验组和对照组的藻细胞状态, 并使用酶标仪测定各孔的 OD_{680} 值, 若实验组发现藻液黄化且 OD_{680} 呈下降趋势(对照组与实验组的 OD_{680} 比值不小于 1.2), 则判定其对噬藻体易感。

1.9 噬藻体基因组提取、全基因组测序及拼接

噬藻体基因组提取、全基因组测序与拼接方法参照王飞等^[29]的研究。简而言之, 取噬藻体上清滤液, 用 Dnase I 和 Rnase A 去除污染的宿主遗传物质, 用经典法提取噬藻体 DNA, 用试剂盒 NEBNext Ultra II DNA Library Prep Kit for Illumina (NEB)构建文库, 在 Illumina MiSeq 上进行测序, 用 Trimmomatic v0.36 软件去除低质量测序数据($Q < 20$), 使用 SPAdes v3.13.0 软件(<http://cab.spbu.ru/software/spades/>)对高质量数据进行拼接, 用 Bandage^[30]分析拼接产物可否环化。

1.10 噬藻体基因组注释

Yong-L2-223 基因组开放阅读框(open reading frame, ORFs)功能预测: 综合运用 RAST

(rapid annotation using subsystem technology, <http://rast.nmpdr.org/>)^[31]、Hhpred (<https://toolkit.tuebingen.mpg.de/tools/hhpred>) (possibility>96% and $E\text{-value} < 10^{-5}$)^[32]、BLASTp (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) ($E\text{-value} < 10^{-5}$)和 HMMER (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/hmmer/search/hmmscan>) (domain 完整且 $E\text{-value} < 10^{-5}$)^[33]进行 ORF 功能注释。

Yong-L2-223 基因组末端分析: 使用童贻刚教授团队研发的方法^[34]和 PhageTerm 软件^[35]进行噬藻体基因组末端分析。

Yong-L2-223 基因谱图绘制: 用 Perl 绘制, 用 Inkscape 软件^[36]美化。

耐药基因搜索: 用 CARD 数据库(<https://card.mcmaster.ca/>)^[37]分析 Yong-L2-223 基因组中是否含有耐药基因。

毒力因子基因搜索: 用 VFBD 数据库(<http://www.mgc.ac.cn/VFs/main.htm>)^[38]分析 Yong-L2-223 基因组中是否含有毒力因子基因。

tRNA 基因分析: 用软件 tRNAscan-SE (<http://lowelab.ucsc.edu/tRNAscan-SE/>)^[39]搜索 Yong-L2-223 基因组中的 tRNA 基因。

1.11 系统进化分析

将 Yong-L2-223 基因组用 BLASTn (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome)与 Nr 数据库中所有序列进行比对(2023 年 3 月 15 日); 用 PASC (pairwise sequence comparison) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/pasc/>)^[40], 将 Yong-L2-223 基因组与公共数据库中所有病毒基因组进行的核苷酸序列相似性比对(2023 年 3 月 15 日)。用在线平台 ViPTree (<https://www.genome.jp/viptree/>)^[41], 基于 tBLASTx 计算的全基因组序列相似性, 以公共数据库中所有病毒基因组作为参考序列与 Yong-L2-223 一同构建原始蛋白谱系统进化树(2023 年 3 月 15 日)。

将 BLASTn 比对、PASC 比对和原始蛋白谱

表 3 噬藻体 Yong-L2-223 的宿主范围测定结果

Table 3 Results of the host range test of cyanophage Yong-L2-223

Orders	Families	Species	Strains	Susceptible	Origin		
<i>Synechococcales</i>	<i>Synechococcaceae</i>	<i>Synechococcus</i> sp.	PCC 7002	+	America		
			PCC 7942 (FACHB-805)	-	Australia		
<i>Chroococcales</i>	<i>Microcystaceae</i>	<i>Microcystis aeruginosa</i>	FACHB-942	-	China		
			FACHB-924	-	Australia		
			FACHB-925	-	Australia		
			<i>M. wesenbergii</i>	FACHB-908	-	China	
			FACHB-929	-	Japan		
			FACHB-1112	-	China		
			FACHB-1318	-	China		
			FACHB-1317	-	China		
			<i>M. flos-aquae</i>	FACHB-1323	-	China	
			<i>M. elabens</i>	FACHB-916	-	Japan	
			<i>M. panniformis</i>	FACHB-1757	-	China	
				FACHB-1409	-	China	
			<i>M. viridis</i>	FACHB-979	-	Japan	
			FACHB-1342	+	China		
			<i>Microcystis</i> sp.	FACHB-915	-	France	
			<i>Chroococcaceae</i>	<i>Chroococcus</i> sp.	FACHB-193	-	China
		<i>Nostocales</i>	<i>Aphanizomenonaceae</i>	<i>Aphanizomenon flos-aquae</i>	FACHB-1209	+	China
					FACHB-1040	-	China
				<i>Anabaena</i> sp.	FACHB-245	-	America
					FACHB-418	-	China
	<i>Dolichospermum flos-aquae</i>			FACHB-1255	-	France	
	<i>Nostocaceae</i>			<i>Nostoc</i> sp.	FACHB-596	-	China
<i>Oscillatoriales</i>	<i>Microcoleaceae</i>	<i>Planktothrix agardhii</i>	FACHB-1166	-	China		
			FACHB-1243	-	China		
			FACHB-1261	-	China		
	<i>Oscillatoriaceae</i>	<i>Oscillatoria planctonica</i>	FACHB-708	-	China		
		<i>Planktothricoides raciborskii</i>	FACHB-881	-	China		
<i>Hormogonales</i>	<i>Scytonemataceae</i>	<i>Plectonema boryanum</i>	FACHB-402	-	America		
			FACHB-240	-	America		

+: Infection; -: Non-infection.

系统进化树中与 Yong-L2-223 具有最高同源性的 7 株噬菌体(*Paracoccus* phage vB_PmaS-R3、*Schmittlotzvirus* sv771、*Rigallicivirus* P106B、*Shewanella* sp. phage 1/44、*Gorganvirus* isfahan、*Sashavirussasha* 和 *Nonanavirus* nv9NA)、6 株淡水聚球藻噬藻体(*Synechococcus* phage S-SRM01、*Synechococcus* phage S-SRP01、*Synechococcus* phage S-SRP02、*Synechococcus* phage S-EIV1、

Synechococcus phage S-CRM01 和 Cyanophage S-2L)、3 株肌尾病毒样(myovirus-like)海洋聚球藻噬藻体(*Shenzhenivirus* sszbl1、*Synechococcus* phage S-B43、*Synechococcus* phage S-B05)和代表有尾纲 33 个科的 39 株噬菌体, 共计 56 株噬菌体的基因组作为参考序列, 与噬藻体 Yong-L2-223 的基因组一起上传至在线平台 ViPTree(<https://www.genome.jp/viptree/>)^[41], 构

建蛋白谱系统进化树(proteomic tree)。

分别用在线平台 EZBioCloud (<http://www.ezbiocloud.net/ezgenome/ani>)^[42]、Genome-to-Genome Distance Calculator (<http://ggdc.dsmz.de>)^[43]和 The Virus Inter genomic Distance Calculator (<http://rhea.icbm.uni-oldenburg.de/VIRIDIC/>)^[44] 计算噬藻体 Yong-L2-223 与其亲缘关系最近的噬菌体之间的平均核苷酸一致性(average nucleotide identity, ANI)、DNA 分子原位杂交值(*in silico* DNA-DNA hybridization, isDDH)和成对基因组间相似性(pairwise intergenomic similarities amongst viral genomes, VIRIDIC)。用 Easyfig 软件^[45]构建噬藻体 Yong-L2-223 和与之亲缘关系最近的噬菌体之间的基因组相似性比较图。

2 结果与分析

2.1 噬藻体的分离和鉴定

分离得到的噬藻体能在 5 d 内使聚球藻(*Synechococcus* sp.) PCC 7002 藻液黄化(图 1A), 能在 8 d 内在 PCC 7002 藻苔上形成圆形的噬藻斑(图 1B)。将该噬藻体命名为聚球藻噬藻体(*Synechococcus* cyanophage) Yong-L2-223, 简称为 Yong-L2-223。其中 Yong 为宁波的简称“甬”的拼音。

2.2 噬藻体的形态学观察

在透射电子显微镜下观察到噬藻体 Yong-L2-223 呈现肌尾病毒样形态特性, 头部直径约 60 nm, 尾部长约 136 nm, 尾部直径约 23 nm (图 1C)。其头部直径与尾部长度的比值为 44.1%, 尾部直径与头部直径的比值约 38.3%。

在已报道的 9 株淡水聚球藻噬藻体中, 有 2 株呈肌尾病毒样形态特征, 分别是 S-SRM01 和 S-CRM01 (表 1)。S-SRM01 的头部直径约 85 nm, 尾部长约 100 nm, 尾部直径约 23 nm^[19]。S-SRM01 的头部直径与尾部长度的比值为 85.0%,

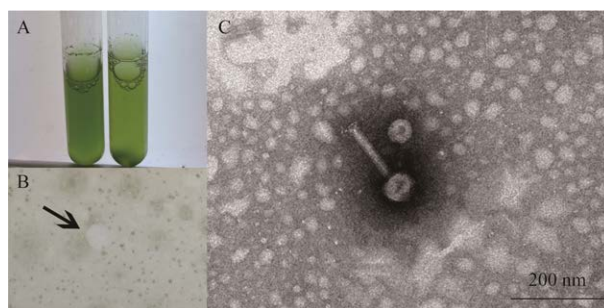


图 1 PCC 7002 藻液(A)和 Yong-L2-223 的噬藻斑(B)与透射电子显微图(C)

Figure 1 *Synechococcus* sp. PCC 7002 cultures (A), plaques developed by cyanophage Yong-L2-223 (B), and transmission electron micrograph of negatively stained cyanophage Yong-L2-223 (C). A: Normal culture of *Synechococcus* sp. PCC 7002 (left) and the PCC 7002 culture infected with cyanophage Yong-L2-223 (right). B: Plaques developed by cyanophage Yong-L2-223 on *Synechococcus* sp. PCC 7002 lawn (arrow). C: Negatively stained cyanophage Yong-L2-223 (scale bar=200 μ m).

尾部直径与头部直径的比值约为 27.1%。S-CRM01 的头部约 92.5 nm, 尾部长约 155 nm, 尾部直径约 17.5 nm^[20]。S-CRM01 的头部直径与尾部长度的比值为 59.7%, 尾部直径与头部直径的比例约为 18.9%。从形态上看, Yong-L2-223 与 S-SRM01、S-CRM01 差异显著, 后二者的头部均大于 Yong-L2-223, 它们的直径均超过其尾部长度的一半, 而 Yong-L2-223 则反之。Yong-L2-223 的尾部直径与头部直径的比值(38.3%)则远大于 S-SRM01 (27.1%)与 S-CRM01 (18.9%)。

2.3 噬藻体的宿主范围

宿主范围实验结果显示, 在 31 株供试蓝藻中, 噬藻体 Yong-L2-223 能跨 3 个目感染 3 株蓝藻: 分别是属于聚球藻目(*Synechococcales*)的 *Synechococcus* sp. PCC 7002、属于色球藻目(*Chroococcales*)的绿色微囊藻(*Microcystisviridis*) FACHB-1342 和属于念珠藻目(*Nostocales*)的水华束丝藻(*Aphanizomenon flos-aquae*) FACHB-1209。

聚球藻 PCC 7002 分离自海洋, 虽然其在实验室被发现具有广盐性^[46-47], 其在自然水域中分布于海洋。本研究按照常规, 采用用于培养海洋藻的高盐培养基(A+培养基)来进行 PCC 7002 的培养。反常规地用 PCC 7002 从淡水中分离噬藻体 Yong-L2-223, 在噬藻体富集、双层平板法制备噬藻斑等噬藻体分离过程中均采用高盐的 A+培养基。而另 2 株对噬藻体 Yong-L2-223 易感的淡水蓝藻藻株(FACHB-1342 和 FACHB-1209)则是用低盐的 BG11 培养基培养的。结果表明噬藻体 Yong-L2-223 具有广盐性。

在已分离报道的 9 株淡水聚球藻噬藻体(表 1)中, 有 6 株具有严格的宿主特异性, 仅能感染其指示宿主; S-2L 可感染 3 株聚球藻; SM-1 和 SM-2 均可跨 2 个目感染 2 株蓝藻, 分别是 *Synechococcus elongates* IU 563 和 *Microcystis aeruginosa* NRC-1。相对而言, 噬藻体 Yong-L2-223 能跨 3 个目感染蓝藻, 具有更广的宿主范围。

2.4 噬藻体的基因组分析

噬藻体 Yong-L2-223 基因组全长为 65 725 bp, G+C 含量为 58.6%, 至少存在 1 个固定末端。Yong-L2-223 的基因组较已报道的 2 个肌尾病毒样(myovirus-like)淡水聚球藻噬藻体 S-SRM01 (240 842 bp)和 S-CRM01(178 563 bp)小, 不到 S-SRM01 的 1/3, 约为 S-CRM01 的 36.8%。噬藻体 Yong-L2-223 含有 100 个 ORFs (图 2), 所有 ORFs 覆盖长度为 61 133 bp, 占基因组总长的 93.01%。经 CARD 和 VFBD 搜索, 在噬藻体 Yong-L2-223 的基因组中未发现已知的毒力因子基因和抗生素耐药基因, 这显示其在基因水平上的应用安全性。经在线平台 tRNAscan-SE 分析, 在噬藻体 Yong-L2-223 基因组中未发现编码 tRNA 的基因。已将噬藻体 Yong-L2-223 的完整基因组序列上传至 GenBank 数据库中, 登录

号为 OM868081。

噬藻体 Yong-L2-223 的 100 个 ORFs 中, 仅 32 个被预测为编码已知功能的蛋白, 占总数的 32%; 余下的 68 个 ORFs 被预测为编码未知功能的蛋白(假设蛋白 hypothetical protein), 占总 ORFs 的 68%。这与该噬藻体基因组序列非常新颖有关。根据注释结果构建的基因组图谱见图 2。噬藻体 Yong-L2-223 基因组中被注释的基因基于功能呈模块化分布(图 2): 12 个 ORFs 被注释为编码噬菌体结构和组装相关的蛋白(ORF 8、9、10、16、17、20、23、24、25、26、27 和 28); 2 个 ORFs 被注释为编码参与 DNA 包装的蛋白(ORF 7、100); 16 个 ORFs 被注释成编码参与 DNA 复制与调控的蛋白(ORF 40、42、45、46、47、48、49、51、52、56、60、62、65、69、73 和 99); ORF15 被注释为编码基因转移因子(gene transfer agent, GTA); ORF 34 被注释为编码 L-丙氨-D-谷氨酸肽酶(L-alanyl-D-glutamate peptidase)。

在噬菌体结构和组装模块中, ORF 8 被注释成编码噬藻体门户蛋白(portal protein), 噬藻体门户蛋白在衣壳组装, 基因组包装和头部蛋白附着中起关键作用^[48]。ORF 9 被注释为有尾病毒头部丝氨酸蛋白酶(caudovirus prohead serine protease), 丝氨酸蛋白酶作为衣壳蛋白组装的触发因素参与衣壳组装和成熟过程^[49]。ORF 10 编码噬藻体衣壳主结构蛋白(major capsid protein)。ORF 16 编码头尾连接蛋白(head-tail joining protein), 是噬藻体形态发生的最后一步连接头部和尾部所必需的^[50]。ORF 17 编码噬藻体衣壳组装蛋白(putative capsid assembly protein G)。ORF 20 编码噬藻体尾鞘蛋白(tail sheath protein), 尾鞘蛋白组成噬菌体可收缩的尾鞘。ORF 23 编码噬藻体卷尺蛋白(tail tape measure protein), 通常卷尺蛋白质的长度

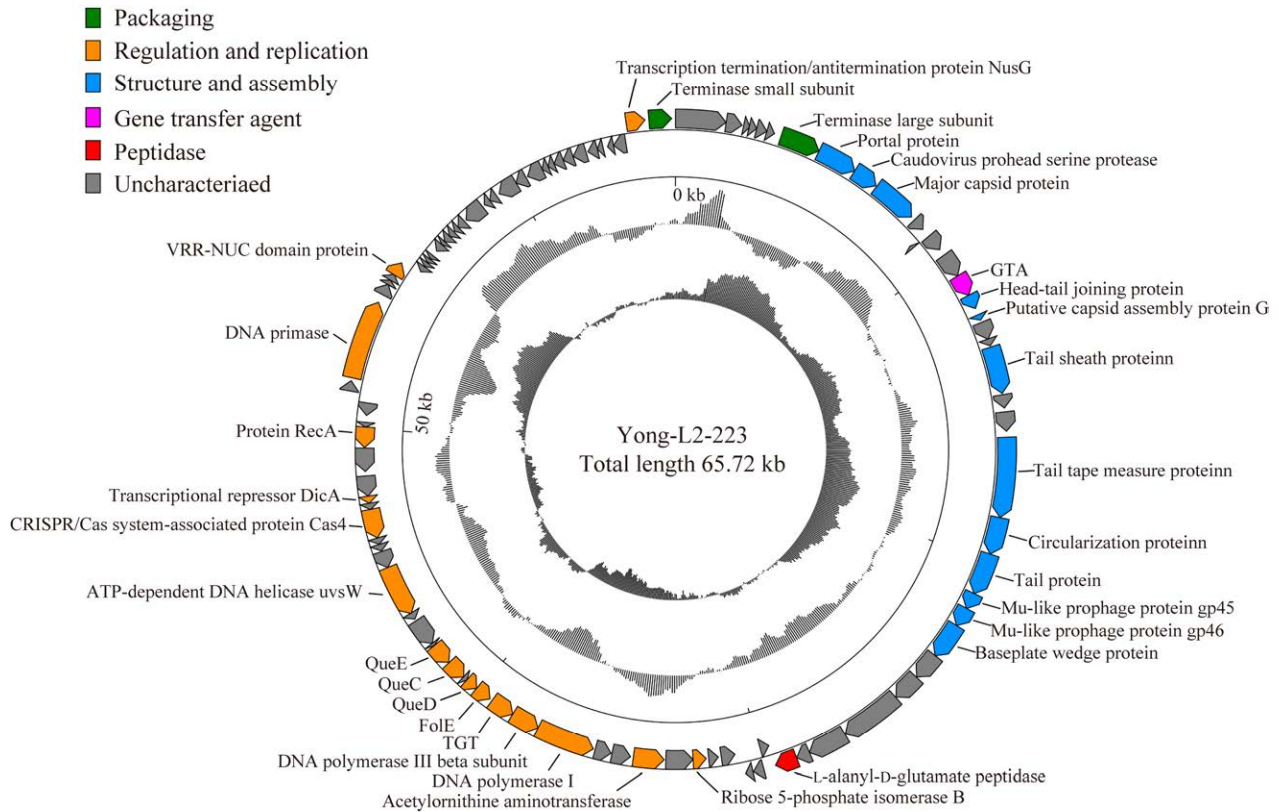


图 2 噬藻体 Yong-L2-223 的基因组图谱

Figure 2 Genome map of cyanophage Yong-L2-223. The outermost circle represents 100 ORFs encoded in the genome, with different colors representing different functions (a clockwise arrow indicates the forward reading frame, and a counterclockwise arrow indicates the reverse reading frame). The dark circles in the middle frame represent the GC content (outwards indicates greater than the average GC content compared with the whole genome, and inwards indicates the opposite). The innermost circle represents the GC skew ($G-C/G+C$; Outwards indicates >0 , and inwards indicates <0).

与噬菌体尾巴的长度成正比^[51]。ORF 24 编码噬藻体环化蛋白(circularization protein), 在噬菌体将基因组 DNA 注射到宿主细胞后, 负责对其进行环化, 并保护病毒基因组的线性双链 DNA 免受宿主核酸外切酶降解^[52]。ORF 25 编码噬藻体尾部蛋白(tail protein)。ORF 26 和 ORF27 分别编码 mu-like prophage proteins。ORF 28 编码噬藻体基板组装蛋白(baseplate wedge protein)。

末端酶(terminase)是寡聚体多功能蛋白, 是 dsDNA 病毒包装过程中所必需的功能蛋白。噬菌体的末端酶由大小亚基组成。噬藻体 Yong-L2-223 的 ORF 7 编码末端酶大亚基

(terminase large subunit), 大亚基在噬菌体 DNA 包装中起主要作用。ORF 100 编码末端酶小亚基(terminase small subunit), 末端酶小亚基会在包装开始过程中识别病毒 DNA, 并在 DNA 易位过程中调节末端酶大亚基的 ATP 酶和核酸酶活性^[53]。

在 DNA 复制和调控模块中, ORF 40 编码核糖 5-磷酸异构酶 B (ribose 5-phosphate isomerase B)。ORF 42 编码乙酰鸟氨酸转氨酶(acetylornithine aminotransferase)。ORF 45 编码 DNA 聚合酶 I (DNA polymerase I)。ORF 46 编码 DNA 聚合酶 III β 亚基(DNA polymerase III beta

subunit)。DNA 聚合酶 III 是一种复杂的多链全酶, 负责细菌中大多数 DNA 的复制、合成^[54]。DNA 聚合酶 III β 亚基作为 DNA 聚合酶 III 全酶的一部分, 会在细菌中形成一个环形二聚体包围 dsDNA^[55]。ORF 47 编码奎因(queuine) tRNA 鸟嘌呤转糖苷酶(queuine tRNA-guanine transglycosylase, TGT), TGT 是一种参与修饰 tRNA 反密码子的酶^[56]。ORF 48 编码 GTP 环水解酶 I (GTP cyclohydrolase I, FolE), FolE 能够通过一系列复杂的反应催化 GTP 生成三磷酸二氢新蝶呤和甲酸。ORF 49 编码喹嗪生物合成蛋白 D (queuosine biosynthesis protein, QueD)。ORF51 编码喹嗪生物合成蛋白 C (queuosine biosynthesis protein, QueC), 和 QueD 一同参与从 GTP 合成 pre-Q₀ 到喹嗪修饰 tRNA 的过程^[57]。ORF52 被注释为编码 7-羧基-7-脱杂胍合成酶(7-carboxy-7-deazaguanine synthase, QueE), QueE 能够催化含有 7-脱氮嘌呤的生物合成^[58]。ORF56 编码 DNA 螺旋酶(DNA helicase, uvsW), 在重组依赖性 DNA 修复和病毒 DNA 合成过程中停滞的复制分叉的重组中起重要作用。ORF 60 被注释为 CRISPR/Cas 系统中的 Cas4 核酸酶(CRISPR/Cas system-associated protein Cas4), Cas4 含有外切核酸酶 RecB 家族的 motif, Cas4 蛋白广泛分布于 CRISPR-Cas 系统, 可能参与间隔序列的获取^[59]。ORF 62 编码转录抑制因子(transcriptional repressor, DicA), DicA 是细胞分裂抑制剂的负调节因子^[60]。ORF 65 编码重组酶 RecA, 细菌的 RecA 蛋白在 DNA 损伤修复系统的复杂系统中起重要作用, RecA 蛋白催化单链 DNA (single-stranded DNA, ssDNA) 和同源双链 DNA (dsDNA) 分子之间的链交换反应, 并通过 SOS 反应调控网络诱导 DNA 修复蛋白的表达^[61]。ORF 69 编码 DNA 引物酶(DNA primase)。ORF 73 被注释为编码含有 VRR-NUC 结构域蛋白

(VRR-NUC domain protein), 这类蛋白是一种结构选择性 DNA 修复核酸酶, 具有 5'内切酶活性, 参与链间 DNA 交联的修复。该蛋白通常作为独立结构域存在于许多细菌和病毒中。晶体结构表明, 其在结构上类似于 holliday 连接分离酶(holliday ligase separating enzymes, HJRs), 这些结构域在噬藻体中可能参与 DNA 重组、复制和包装^[62]。ORF99 编码转录终止/抗终止蛋白(transcription termination/antitermination protein, NusG)。NusG 是一种保守的调节蛋白, 与 RNA 聚合酶(RNA polymerase, RNAP)和其他蛋白质相互作用, 形成调节转录的多组分复合物^[63]。

噬藻体 Yong-L2-223 基因组中的 ORF 15 被注释为编码基因转移因子(gene transfer agent, GTA)。GTA 携带宿主基因组随机片段。近年来, 大量细菌基因组被测定, 结果发现在海洋细菌基因组上广泛存在编码 GTA 的基因, 表明 GTA 是在海洋环境中种间实现水平基因转移的重要模式^[64]。Xu 等从南海中分离到的噬菌体 *Paracoccusmarcusii* phage vB_PmaS-R3 中含有 4 个 GTA 样基因(GTA-like genes)^[65]。在此前报道的聚球藻噬藻体中未发现编码 GTA 的相关基因。在噬藻体 Yong-L2-223 基因组中, 发现了 GTA 的存在。GTA 可能介导蓝藻种间水平基因转移、病毒与细菌之间的基因转移, 促使适应性进化。基因组中的 *gta* 基因可能与噬藻体 Yong-L2-223 为在不同环境中生存, 与海水藻之间进行了基因转移有关。

噬藻体 Yong-L2-223 基因组中的 ORF 34 编码 L-丙氨-D-谷氨酸肽酶(L-alanyl-D-glutamate peptidase), 肽酶能够水解细菌细胞壁糖肽中 L-丙氨酸和 D-谷氨酸残基之间的连接^[66], 帮助噬藻体裂解宿主细胞。

基因注释结果显示噬藻体 Yong-L2-223 基因组中含有至少 10 个辅助代谢基因(AMGs)。AMGs 是指病毒感染宿主的过程中表达并参与

调控宿主的代谢过程的与宿主同源的基因, 其有利于子代病毒更高效地组装和释放, 对于病毒种群的繁衍具有重要意义^[67]。病毒基因组中的 AMGs 通常编码参与中央碳代谢、氮代谢、磷与硫循环、核酸合成与代谢, 以及与氧化应激反应相关的蛋白。例如, 从肌尾病毒样海洋聚球藻噬藻体 S-B43 基因组^[68]中鉴定出 14 个 AMGs, 其中包括 5 个光合相关基因和几个与适应高浊度与低氮磷比(HNLP)的富营养化沿海环境有关的 AMGs。肌尾病毒样海洋聚球藻噬藻体 S-B05 基因组^[69]中含有参与光合作用的基因、参与碳代谢、DNA 生物合成等功能的 14 个 AMGs。再如, 肌尾病毒样淡水聚球藻噬藻体 S-SRM01^[19]含有 4 个与光合作用相关的辅助代谢基因、1 个磷酸盐诱导基因 *PhoH* 和 1 个碳代谢调节基因 *CP12*。在噬藻体 Yong-L2-223 基因组中, ORF 40 编码核糖 5-磷酸异构酶 B (ribose 5-phosphate isomerase B, Rpi), 核糖-5-磷酸异构酶催化 D-核糖 5-磷酸(R5P)向 D-核酮糖 5-磷酸的转化, 这是磷酸戊糖途径非氧化途径和光合作用卡尔文循环的重要步骤^[70]。噬藻体 Yong-L2-223 基因组中含有 5-磷酸异构酶 B 基因, 意味着 Yong-L2-223 可能通过中央碳代谢系统中的关键酶参与并调控碳循环。Yong-L2-223 的 ORF 42 编码乙酰鸟氨酸转氨酶 (acetylornithine aminotransferase), 乙酰鸟氨酸转氨酶作用于碱性氨基酸及其衍生物, 通过参与氨基酸转运和代谢影响宿主细胞的代谢活动^[71]。ORF 47、48、49、51 和 52 分别编码奎因 tRNA 鸟嘌呤转糖苷酶(TGT)、GTP 环水解酶 I (FolE)、喹啉生物合成蛋白 *QueD*、喹啉生物合成蛋白 *QueC* 和 7-羧基-7-脱杂胍合成酶 *QueE*, 这些基因构成一个完整的 pre-Q₀ 生物合成基因簇(pre-Q₀ biosynthesis genes cluster)。pre-Q₀ 生物合成基因簇参与 tRNA-喹啉生物合

成通路, 是 tRNA 修饰的一部分。这些基因的产物可能会帮助噬藻体 Yong-L2-223 转化宿主或自身的 tRNA 和 DNA, 提高宿主翻译效率, 更加高效地组装子代病毒, 进而有助于噬藻体适应各类宿主, 这可能是 Yong-L2-223 可跨 3 个目(orders)感染蓝藻的重要原因。在 2 株可跨目感染 2 株蓝藻的淡水聚球藻噬藻体 SM-1 和 SM-2 中, 未发现 pre-Q₀ 生物合成基因簇的相关基因。在已报道的 2 株肌尾病毒样淡水聚球藻噬藻体 S-SRM01、S-CRM01 基因组中也未发现 pre-Q₀ 生物合成基因簇的相关基因。与 Yong-L2-223 类似的, 可跨 3 个目感染 12 株蓝藻的广谱噬藻体 vB_MelS-Me-ZS1 中, 也有一个完整的 pre-Q₀ 生物合成基因簇^[72]。

此外, 近年来有学者在对噬菌体基因组中编码 *Cas4* 的同源物进行研究时有了新的发现^[73], 研究表明含有编码 *Cas4* 样蛋白基因的噬菌体可利用该蛋白刺激弯曲杆菌属 II 型 CRISPR-Cas 系统(campylobacter type II-CRISPR-Cas system) (该系统缺乏 *Cas4*), 获取源自宿主的间隔区, 噬菌体似乎利用这种机制来规避宿主的防御系统, 其具体机制尚待鉴定。Yong-L2-223 基因组中的被发现含有 *Cas4* 基因(ORF 60), 这可能有助于噬藻体抵抗宿主防御, 可能是 Yong-L2-223 可跨 3 个目感染蓝藻的另一个原因。

2.5 噬藻体的系统进化分析

在 BLASTn 中(默认参数)上传噬藻体 Yong-L2-223 的基因组序列, 与 NCBI 数据库中的全基因组序列进行比对, 结果显示与噬藻体 Yong-L2-223 同源性最高的噬菌体是 *Paracoccus phage vB_PmaS-R3* (GenBank: NC_026608.1, E-value: 7e-06; percent identity: 72.97%), 但是 Query Coverage 低至 0%。该结果表明 *Paracoccus phage vB_PmaS-R3* 只有很少的核苷酸序列与 Yong-L2-223 同源, Yong-L2-223 的基因组序列非常新颖。

将噬藻体 Yong-L2-223 的基因组序列上传至蛋白谱树在线分析平台 ViPTree (<https://www.genome.jp/viptree/>), 与该数据库中所有病毒(共计 6 238 株)构建原始蛋白谱进化树。结果显示与 Yong-L2-223 亲缘关系最近的有 6 株噬菌体:

Schmittlotzvirus sv771、*Rigallicivirus P106B*、*Shewanellasp. phage 1/44*、*Gorganvirusisfahan*、*Sashavirussasha* 和 *Nonanavirus nv9NA*。

在选取参考序列重新构建的精细蛋白谱进化树(图 3)中, Yong-L2-223 形成一个独立的分

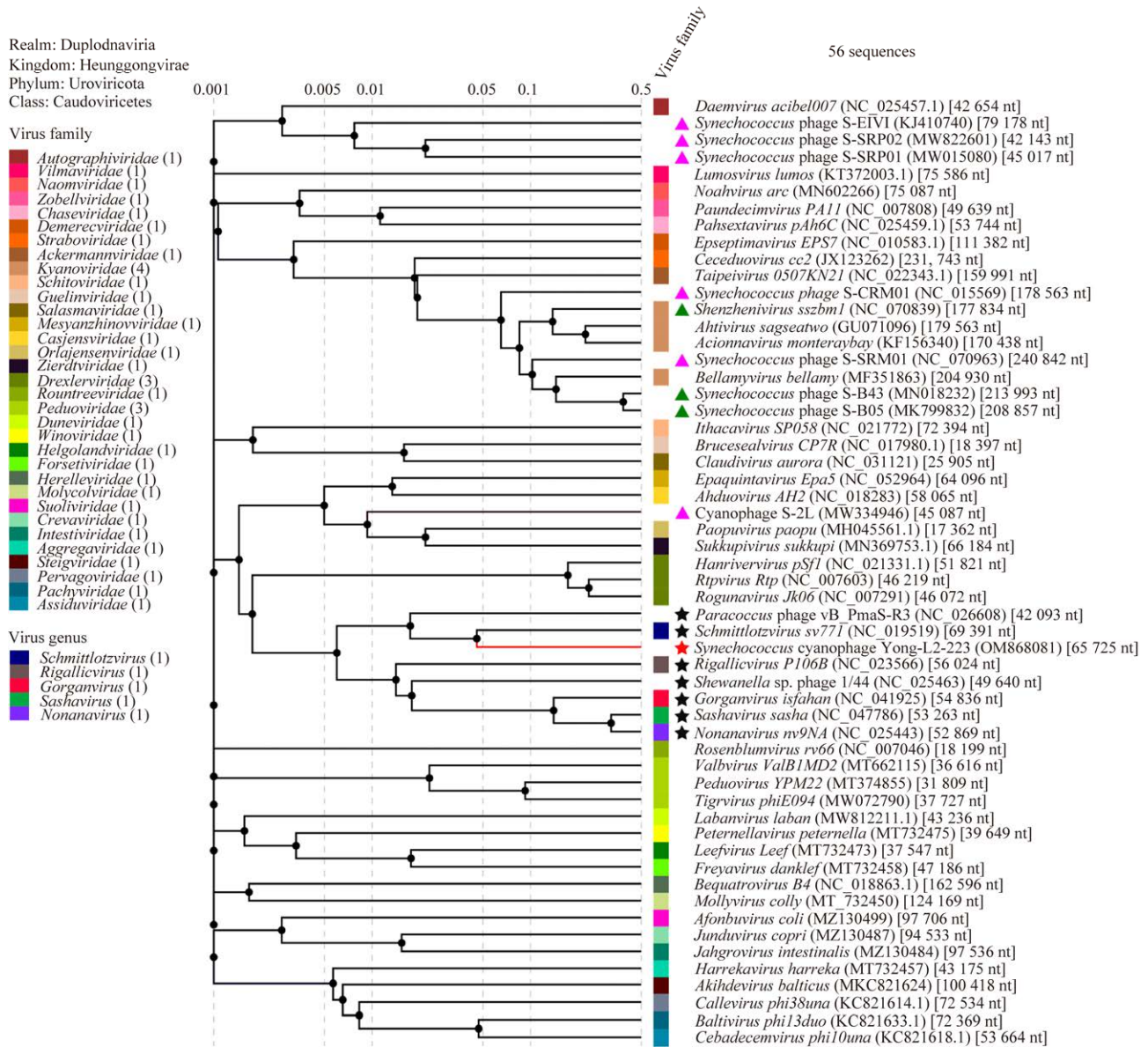


图 3 噬藻体 Yong-L2-223 的蛋白谱系统进化树

Figure 3 Phylogenetic proteomic tree of cyanophage Yong-L2-223. The proteomic tree was generated using ViPTree online, based on the genome-wide similarities determined by tBLASTx. The proteomic tree was based on the complete genome sequences of *Synechococcus* cyanophage Yong-L2-223 (red star), 7 top-hit bacteriophages in BLASTn and in original proteomic tree (black star), 6 freshwater *Synechococcus* cyanophages (pink triangle), 3 marine myovirus-like *Synechococcus* cyanophages (green triangle), and 39 representative bacteriophages of 33 families of the *Caudoviricetes* class.

支(branch), 与其他病毒间进化距离远(>0.45)。在进化树中, 噬菌体 *Schmittlotzvirus sv771* 是与噬菌体 Yong-L2-223 进化距离最小的病毒(图 3)。为进一步阐明噬藻体 Yong-L2-223 的进化地位, 分别计算了噬藻体 Yong-L2-223 与 *Schmittlotzvirus sv771* 之间的平均核苷酸一致性(ANI)和 DNA 分子原位杂交值(DNA molecule *in situ* hybridization values, isDDH), 结果分别为 55.50%和 0%, 均小于种的边界值(ANI \geq 95%, isDDH \geq 70%), Yong-L2-223 与 *Schmittlotzvirus sv771* 基因组间的比较图(图 4)也显示了二者间同源性很低。结果表明 Yong-L2-223 是一个新

种。运用国际病毒分类委员会(ICTV)下的细菌与古菌病毒小组委员会(Bacterial and Archaeal Viruses Subcommittee, BAVS)推荐的 PASC 分析平台(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/pasc/>)和 VIRIDIC 分析平台(<http://rhea.icbm.uni-oldenburg.de/VIRIDIC/>), 比对分析噬藻体 Yong-L2-223 与数据库中所有病毒间的核苷酸序列相似度(PASC)和成对基因组间相似性(VIRIDIC), 结果最高的 PASC 值仅有 3.78%, 最高 VIRIDIC 值(图 5)仅有 2.5%, 二者均远低于 70%的属边界值。结果表明噬藻体 Yong-L2-223 代表一个新的未知的属。

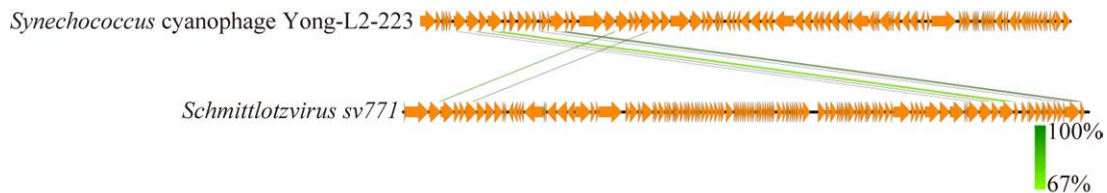


图 4 噬藻体 Yong-L2-223 和 *Schmittlotzvirus sv771* 的基因组比较

Figure 4 Genome comparison of cyanophage Yong-L2-223 and *Schmittlotzvirus sv771*.

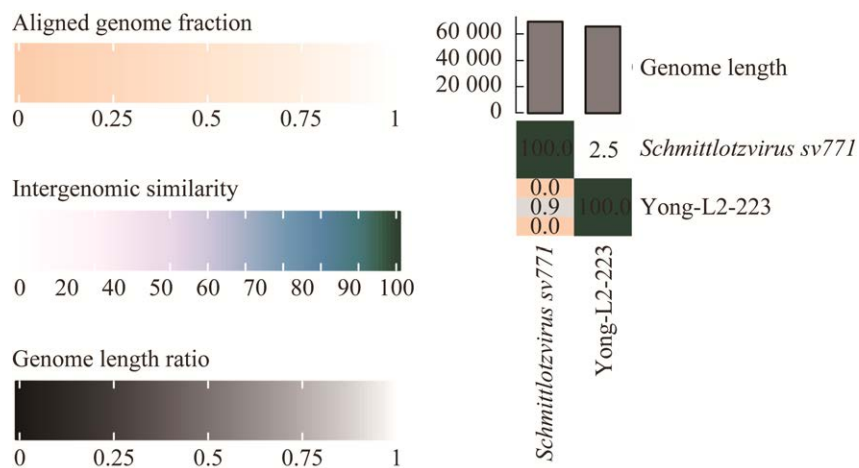


图 5 噬藻体 Yong-L2-223 和 *Schmittlotzvirus sv771* 的基因组间 VIRIDIC 比对图

Figure 5 Intergenomic similarities heatmap between cyanophage Yong-L2-223 and *Schmittlotzvirus sv771*.

3 讨论与结论

噬藻体 Yong-L2-223 是首株以海洋蓝藻为指示藻用高盐培养基从淡水中分离获得的噬藻体。Yong-L2-223 具有广盐性, 既可在高盐条件下感染海洋蓝藻又可在低盐条件下感染淡水蓝藻。

在 BLASTn 比对中, 噬藻体 Yong-L2-223 与 Top hit 间同源覆盖度低至 0%, 表明 Yong-L2-223 的基因组序列非常新颖; 在蛋白谱系统进化树中, 虽然噬藻体 Yong-L2-223 与 *Schmittlotzvirus sv771* 聚集在一个 clade 上, 二者间的 ANI 值、isDDH 值、PASC 值和 VIRIDIC 值却很低, 进一步表明噬藻体 Yong-L2-223 非常新颖, 是一种新的病毒, 在有尾纲中至少代表一个新的未知的属。噬藻体 Yong-L2-223 与海洋聚球藻肌尾病毒样噬藻体有着很远的进化距离(图 3), 这也许和本研究独创性的以海洋聚球藻 PCC 7002 为宿主藻株, 分离淡水水样的方法有关。

Yong-L2-223 可以跨 3 个目(*Synechococcales*、*Chroococcales* 和 *Nostocales*)感染蓝藻藻株。在宿主范围试验中, 除指示藻——海洋聚球藻 PCC 7002 外, Yong-L2-223 还能够跨目感染 2 株淡水蓝藻: 色球藻目(*Chroococcales*)的绿色微囊藻(*M. viridis*) FACHB-1342 和念珠藻目(*Nostocales*)的水华束丝藻(*A. flos-aquae*) FACHB-1209。

噬藻体 Yong-L2-223 的基因组中含有辅助代谢基因(AMGs)、*Cas4* 基因、pre-Q₀ 生物合成基因簇和编码基因转移因子(GTA)的基因。这些基因的编码产物可能有助于该噬藻体对宿主的适应、感染, 从而实现跨目感染蓝藻。类似

地, 广谱微囊藻噬藻体 vB_MelS-Me-ZS1 的基因组也有 pre-Q₀ 生物合成基因簇。噬藻体 Yong-L2-223 基因组中含有在海洋细菌基因组上广泛存在的编码 GTA 的基因, 而在此前分离报道的聚球藻噬藻体中并未发现编码 GTA 的相关基因, 这可能与噬藻体 Yong-L2-223 的广盐性有关, 具体机制有待试验验证分析。

在 Yong-L2-223 的基因组中未发现已知的毒力因子基因和抗生素耐药基因, 这显示其具有良好的生物安全性。且该噬藻体具有宿主范围较广的特点, 这也对其在藻华治理中的应用有利, 因水华往往不是由单一藻株而是由数株优势蓝藻爆发引起的。然而, 虽然 Yong-L2-223 可以在 5 d 内使宿主藻液黄化, 但无法使藻液彻底裂解成无色或白色、透明的澄清液。其基因组中有编码可裂解细菌胞壁的肽酶的基因(ORF 34), 但也含有溶藻相关的基因。其 ORF 26 和 ORF 27 则分别编码 mu 样原噬菌体蛋白(mu-like prophage proteins)。噬菌体 mu 可以随机整合其基因组至宿主染色体上, 成为原噬菌体(prophage)。Yong-L2-223 基因组的这一特性, 可能是其呈现溶藻活性(lytic activity), 但溶藻并不彻底的表型的原因。这限制了该噬藻体在藻华防控中的运用。但通过合成生物学手段, 去除基因组中编码 mu-like prophage proteins 的基因可能可提高其溶藻能力、提高其可应用性。

噬藻体 Yong-L2-223 的分离与鉴定开了以海洋蓝藻为指示宿主, 从淡水中分离淡水噬藻体的先河, 获得了广盐性噬藻体, 这丰富了聚球藻噬藻体库、噬藻体基因库, 并为今后进一步研究噬藻体与其宿主的相互作用和适应性进化, 以及噬藻体的应用开发奠定了基础。

参考文献

- [1] ROITMAN S, HORNING E, FLORES-URIBE J, SHARON I, FEUSSNER I, BÉJÀ O. Cyanophage-encoded lipid desaturases: oceanic distribution, diversity and function[J]. *The ISME Journal*, 2018, 12(2): 343-355.
- [2] MURATA K, ZHANG QF, GERARDO GALAZ-MONTOYA J, FU C, COLEMAN ML, OSBURNE MS, SCHMID MF, SULLIVAN MB, CHISHOLM SW, CHIU W. Visualizing adsorption of cyanophage P-SSP7 onto marine *Prochlorococcus*[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 44176.
- [3] 张奕妍, 黄兰兰, 王夕予, 丁士明, 刘子鹤, 童银栋. 噬藻体对蓝藻种群密度的调控及其对水体中物质循环的影响[J]. *湖泊科学*, 2022, 34(2): 376-390.
- ZHANG YY, HUANG LL, WANG XY, DING SM, LIU ZH, TONG YD. Regulation of cyanobacteria population density by cyanophage and its effect on material circulation in water[J]. *Journal of Lake Sciences*, 2022, 34(2): 376-390 (in Chinese).
- [4] 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.
- [5] FUHRMAN JA. Marine viruses and their biogeochemical and ecological effects[J]. *Nature*, 1999, 399(6736): 541-548.
- [6] SUTTLE CA. The significance of viruses to mortality in aquatic microbial communities[J]. *Microbial Ecology*, 1994, 28(2): 237-243.
- [7] PUXTY RJ, EVANS DJ, MILLARD AD, SCANLAN DJ. Energy limitation of cyanophage development: implications for marine carbon cycling[J]. *The ISME Journal*, 2018, 12(5): 1273-1286.
- [8] GREGORY AC, SOLOMONENKO SA, IGNACIO-ESPINOZA JC, LaBUTTI K, COPELAND A, SUDEK S, MAITLAND A, CHITTICK L, dos SANTOS F, WEITZ JS, WORDEN AZ, WOYKE T, SULLIVAN MB. Genomic differentiation among wild cyanophages despite widespread horizontal gene transfer[J]. *BMC Genomics*, 2016, 17(1): 1-13.
- [9] XU YL, ZHANG R, WANG NN, CAI LL, TONG YG, SUN Q, CHEN F, JIAO NZ. Novel phage-host interactions and evolution as revealed by a cyanomyovirus isolated from an estuarine environment[J]. *Environmental Microbiology*, 2018, 20(8): 2974-2989.
- [10] REDFIELD RJ, SOUCY SM. Evolution of bacterial gene transfer agents[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 2527.
- [11] SHI XL, LI SN, FAN F, ZHANG M, YANG Z, YANG YF. *Mychonastes* dominates the photosynthetic picoeukaryotes in Lake Poyang, a river-connected lake[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2019, 95(1): fiy211.
- [12] SHI XL, LI SN, LIU CQ, ZHANG M, LIU MX. Community structure of photosynthetic picoeukaryotes differs in lakes with different trophic statuses along the middle-lower reaches of the Yangtze River[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2018, 94(4): fiy011.
- [13] YINON M, BAR-ON. The biomass composition of the oceans: a blueprint of our blue planet[J]. *Cell*, 2019, 179(7): 1451-1454.
- [14] PARTENSKY F, HESS WR, VAULOT D. *Prochlorococcus*, a marine photosynthetic prokaryote of global significance[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 1999, 63(1): 106-127.
- [15] BRATBAK G, THINGSTAD F, HELDAL M. Viruses and the microbial loop[J]. *Microbial Ecology*, 1994, 28(2): 209-221.
- [16] LI WKW, RAO DVS, HARRISON WG, SMITH JC, CULLEN JJ, IRWIN B, PLATT T. Autotrophic picoplankton in the tropical ocean[J]. *Science*, 1983, 219(4582): 292-295.
- [17] CHEN F, SUTTLE CA, SHORT SM. Genetic diversity in marine algal virus communities as revealed by sequence analysis of DNA polymerase genes[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62(8): 2869-2874.
- [18] WATERBURY JB, VALOIS FW. Resistance to co-occurring phages enables marine *Synechococcus* communities to coexist with cyanophages abundant in seawater[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, 59(10): 3393-3399.
- [19] ZHANG D, HE YL, GIN KYH. Novel freshwater cyanophages provide new insights into evolutionary relationships between freshwater and marine cyanophages[J]. *Microbiology Spectrum*, 2021, 9(2): e0059321.
- [20] DREHER TW, BROWN N, BOZARTH CS, SCHWARTZ AD, RISCOE E, THRASH C, BENNETT SE, TZENG SC, MAIER CS. A freshwater cyanophage whose genome indicates close relationships to photosynthetic marine cyanomyoviruses[J]. *Environmental Microbiology*, 2011, 13(7): 1858-1874.

- [21] ZHANG D, HE YL, GIN KYH. Genomic characterization of a novel freshwater cyanophage reveals a new lineage of cyanopodovirus[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 12: 768868.
- [22] SAFFERMAN RS, SCHNEIDER IR, STEERE RL, MORRIS ME, DIENER TO. Phycovirus SM-1: a virus infecting unicellular blue-green algae[J]. *Virology*, 1969, 37(3): 386-395.
- [23] CHÉNARD C, CHAN AM, VINCENT WF, SUTTLE CA. Polar freshwater cyanophage S-EIV1 represents a new widespread evolutionary lineage of phages[J]. *The ISME Journal*, 2015, 9(9): 2046-2058.
- [24] FOX JA, BOOTH SJ, MARTIN EL. Cyanophage SM-2: a new blue-green algal virus[J]. *Virology*, 1976, 73(2): 557-560.
- [25] KHUDYAKOV IY, KIRNOS MD, ALEXANDRUSHKINA NI, VANYUSHIN BF. Cyanophage S-2L contains DNA with 2,6-diaminopurine substituted for adenine[J]. *Virology*, 1978, 88(1): 8-18.
- [26] XIA H, LI TX, DENG F, HU ZH. Freshwater cyanophages[J]. *Virologica Sinica*, 2013, 28(5): 253-259.
- [27] KHUDYAKOV IY, MATVEEV AV. New cyanophages S-4L and S-5L lysing *Synechococcus elongatus*[J]. *Microbiology*, 1982, 51: 102-106.
- [28] STEVENS SE Jr, PATTERSON COP, MYERS J. The production of hydrogen peroxide by blue-green algae: a survey[J]. *Journal of Phycology*, 1973, 9(4): 427-430.
- [29] 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[J]. *微生物学报*, 2022, 62(10): 3784-3800.
- WANG F, PAN LT, QIAN MH, CAI RQ, LIN W, HONG BX, YANG JH, LI L, LI DF, TONG YG. Isolation and genome analysis of a new freshwater *Microcystis* cyanophage vB_MweS-yong2[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(10): 3784-3800 (in Chinese).
- [30] WICK RR, SCHULTZ MB, ZOBEL J, HOLT KE. Bandage: interactive visualization of *de novo* genome assemblies[J]. *Bioinformatics*, 2015, 31(20): 3350-3352.
- [31] 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.
- [32] 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.
- [33] 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.
- [34] ZHANG X, WANG YH, LI SS, AN XP, PEI GQ, HUANG Y, FAN H, MI ZQ, ZHANG ZY, WANG W, CHEN YB, TONG YG. A novel termini analysis theory using HTS data alone for the identification of *Enterococcus* phage EF4-like genome termini[J]. *BMC Genomics*, 2015, 16(1): 414.
- [35] GARNEAU JR, DEPARDIEU F, FORTIER LC, BIKARD D, MONOT M. PhageTerm: a tool for fast and accurate determination of phage termini and packaging mechanism using next-generation sequencing data[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 8292.
- [36] YUAN SG, CHAN HCS, FILIPEK S, VOGEL H. PyMOL and inkscape bridge the data and the data visualization[J]. *Structure (London, England: 1993)*, 2016, 24(12): 2041-2042.
- [37] ALCOCK BP, RAPHENYA AR, LAU TTY, TSANG KK, BOUCHARD M, EDALATMAND A, HUYNH W, NGUYEN AL V, 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 resistome surveillance with the comprehensive antibiotic resistance database[J]. *Nucleic Acids Research*, 2020, 48(D1): D517-D525.
- [38] 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.
- [39] SCHATTNER P, BROOKS AN, LOWE TM. The tRNAscan-SE, snoscan and snoGPS web servers for the detection of tRNAs and snoRNAs[J]. *Nucleic Acids Research*, 2005, 33(suppl_2): W686-W689.
- [40] 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.
- [41] 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.
- [42] 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.
- [43] 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.
- [44] 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.
- [45] SULLIVAN MJ, PETTY NK, BEATSON SA. Easyfig: a genome comparison visualizer[J]. *Bioinformatics*, 2011, 27(7): 1009-1010.
- [46] NOMURA CT, SAKAMOTO T, BRYANT DA. Roles for heme-copper oxidases in extreme high-light and oxidative stress response in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7002[J]. *Archives of Microbiology*, 2006, 185(6): 471-479.
- [47] LUDWIG M, BRYANT DA. *Synechococcus* sp. strain PCC 7002 transcriptome: acclimation to temperature, salinity, oxidative stress, and mixotrophic growth conditions[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2012, 3: 354.
- [48] HUET A, DUDA RL, HENDRIX RW, BOULANGER P, CONWAY JF. Correct assembly of the bacteriophage T5 procapsid requires both the maturation protease and the portal complex[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2016, 428(1): 165-181.
- [49] ZIVANOVIC Y, CONFALONIERI F, PONCHON L, LURZ R, CHAMI M, FLAYHAN A, RENOUEAU M, HUET A, DECOTTIGNIES P, DAVIDSON AR, BREYTON C, BOULANGER P. Insights into bacteriophage T5 structure from analysis of its morphogenesis genes and protein components[J]. *Journal of Virology*, 2014, 88(2): 1162-1174.
- [50] CASJENS S. Bacteriophage lambda FII gene protein: role in head assembly[J]. *Journal of Molecular Biology*, 1974, 90(1): 1-20.
- [51] BELCAID M, BERGERON A, POISSON G. The evolution of the tape measure protein: units, duplications and losses[J]. *BMC Bioinformatics*, 2011, 12(suppl 9): S10.
- [52] HEISIG P, KAHMANN R. The sequence and *mom*-transactivation function of the *C* gene of bacteriophage Mu[J]. *Gene*, 1986, 43(1/2): 59-67.
- [53] BÜTTNER CR, CHECHIK M, ORTIZ-LOMBARDÍA M, SMITS C, EBONG IO, CHECHIK V, JESCHKE G, DYKEMAN E, BENINI S, ROBINSON CV, ALONSO JC, ANTONSON AA. Structural basis for DNA recognition and loading into a viral packaging motor[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109(3): 811-816.
- [54] HERENDEEN DR, KELLY TJ. DNA polymerase III: running rings around the fork[J]. *Cell*, 1996, 84(1): 5-8.
- [55] GEORGESCU RE, KIM SS, YURIEVA O, KURIYAN J, KONG XP, O'DONNELL M. Structure of a sliding clamp on DNA[J]. *Cell*, 2008, 132(1): 43-54.
- [56] SEBASTIANI M, BEHRENS C, DÖRR S, GERBER HD, BENAZZA R, HERNANDEZ-ALBA O, CIANFÉRANI S, KLEBE G, HEINE A, REUTER K. Structural and biochemical investigation of the heterodimeric murine tRNA-guanine transglycosylase[J]. *ACS Chemical Biology*, 2022, 17(8): 2229-2247.
- [57] ZALLOT R, YUAN YF, de CRÉCY-LAGARD V. The *Escherichia coli* COG1738 member YhhQ is involved in 7-cyanodeazaguanine (preQ0) transport[J]. *Biomolecules*, 2017, 7(4): 12.
- [58] BRUENDER NA, GRELL TAJ, DOWLING DP, McCARTY RM, DRENNAN CL, BANDARIAN V. 7-carboxy-7-deazaguanine synthase: a radical *S*-adenosyl-L-methionine enzyme with polar tendencies[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2017, 139(5): 1912-1920.
- [59] JANSEN R, EMBDEN JD, GAASTRA W, SCHOOLS LM. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes[J]. *Molecular Microbiology*, 2002, 43(6): 1565-1575.
- [60] BÉJAR S, BOUCHÉ JP. A new dispensable genetic locus of the terminus region involved in control of cell division in *Escherichia coli*[J]. *Molecular and General Genetics MGG*, 1985, 201(2): 146-150.
- [61] LEITE WC, GALVÃO CW, SAAB SC, IULEK J, ETTO RM, STEFFENS MBR, CHITTENI-PATTU S, STANAGE T, KECK JL, COX MM. Structural and functional studies of *H. seropedicae* RecA protein-insights into the polymerization of RecA protein as nucleoprotein filament[J]. *PLoS One*, 2016, 11(7): e0159871.

- [62] PENNELL S, DÉCLAIS AC, LI JJ, HAIRE LF, BERG W, SALDANHA JW, TAYLOR IA, ROUSE J, LILLEY DMJ, SMERDON SJ. FAN₁ activity on asymmetric repair intermediates is mediated by an atypical monomeric virus-type replication-repair nuclease domain[J]. *Cell Reports*, 2014, 8(1): 84-93.
- [63] WANG CY, MOLODTSOV V, FIRLAR E, KAELEBER JT, BLAHA G, SU M, EBRIGHT RH. Structural basis of transcription-translation coupling[J]. *Science*, 2020, 369(6509): 1359-1365.
- [64] 蔡海元. 基因转移因子: 一类在海洋中广泛存在的介导水平基因转移的新型生物因子[J]. *微生物学报*, 2012, 52(1): 12-21.
CAI HY. Gene Transfer agent-a novel and widespread occurrence mechanism of gene exchange in ocean-a review[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2012, 52(1): 12-21 (in Chinese).
- [65] XU YL, ZHANG R, JIAO NZ. Complete genome sequence of *Paracoccus marcusii* phage vB_PmaS-R3 isolated from the South China Sea[J]. *Standards in Genomic Sciences*, 2015, 10: 94.
- [66] LOESSNER MJ, WENDLINGER G, SCHERER S. Heterogeneous endolysins in *Listeria monocytogenes* bacteriophages: a new class of enzymes and evidence for conserved holin genes within the siphoviral lysis cassettes[J]. *Molecular Microbiology*, 1995, 16(6): 1231-1241.
- [67] CRUMMETT LT, PUXTY RJ, WEIHE C, MARSTON MF, MARTINY JBH. The genomic content and context of auxiliary metabolic genes in marine cyanomyoviruses[J]. *Virology*, 2016, 499: 219-229.
- [68] WANG MW, GAO C, JIANG T, YOU SY, JIANG Y, GUO C, HE H, LIU YD, ZHANG XR, SHAO HB, LIU HB, LIANG YT, WANG M, McMINN A. Genomic analysis of *Synechococcus* phage S-B43 and its adaptation to the coastal environment[J]. *Virus Research*, 2020, 289: 198155.
- [69] JIANG T, GUO C, WANG M, WANG MW, YOU SY, LIU YD, ZHANG XR, LIU HB, JIANG Y, SHAO HB, LIANG YT, McMINN A. Isolation and complete genome sequence of a novel cyanophage, S-B05, infecting an estuarine *Synechococcus* strain: insights into environmental adaptation[J]. *Archives of Virology*, 2020, 165(6): 1397-1407.
- [70] TANG HT, JU X, ZHAO J, LI LZ. Engineering ribose-5-phosphate isomerase B from a central carbon metabolic enzyme to a promising sugar biocatalyst[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2021, 105(2): 509-523.
- [71] JOHN RA. Pyridoxal phosphate-dependent enzymes[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1995, 1248(2): 81-96.
- [72] 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*[J]. *Molecular Biology Reports*, 2020, 47(10): 7979-7989.
- [73] HOOTON SPT, BRATHWAITE KJ, CONNERTON IF. The bacteriophage carrier state of *Campylobacter jejuni* features changes in host non-coding RNAs and the acquisition of new host-derived CRISPR spacer sequences[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 355.