

# 我国首株噬藻体(蓝藻病毒)的分离与鉴定\*

赵以军<sup>1</sup> 程凯<sup>1</sup> 石正丽<sup>2\*\*</sup> 郭亚新<sup>1</sup> 祝海燕<sup>1</sup> 张建红<sup>2</sup> 刘永定<sup>3</sup>

1. 华中师范大学生命科学学院, 武汉 430079; 2. 中国科学院武汉病毒研究所, 武汉 430071;

3. 中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072

**摘要** 分离得到一株裂解织线藻和席藻的噬藻体. 对该噬藻体的研究发现: 光照条件是感染所必需的, 但不依赖于金属离子(如镁离子); 裂解织线藻的周期(27℃条件下)为4 h, 其中潜伏期为3 h, 最后的1 h为裂解期, 病毒释放量约200 PFU/细胞, 感染过程中, 织线藻的放氧速率急剧下降. 此外还发现: 40℃下处理10 min, 噬藻体保持100%活性; 50℃下处理1 min, 失活率小于25%; 50℃下处理10 min, 失活率为40%; 60℃下处理1 min, 失活率为85%; 60℃下处理10 min, 失活率大于99%. 在电子显微镜下可以观察到此病毒为噬菌体形态, 头部直径为52 nm, 尾部很短, 几乎不可见. 该噬藻体的遗传物质为双链DNA, 基因组约36 kb.

**关键词** 噬藻体 蓝藻病毒 织线藻

蓝藻又称蓝细菌, 是能进行产氧光合作用的原核生物, 其中的某些种类也能固定空气中的氮气<sup>[1]</sup>, 据推测, 地球上蓝藻占生物固氮总量的20%<sup>[1]</sup>. 这种既能固定空气中氮气又能固定二氧化碳的双重能力, 使得蓝藻在地球的碳、氮循环中扮演着极其重要的角色. 此外, 水体富营养化问题也备受世人瞩目, 蓝藻是淡水中形成“水华”的主要藻类, 而“水华”的出现也使碳、氮和磷的循环出现了新的变化, 这些变化与蓝藻有直接关系. 近期的研究表明, 藻类病毒在控制水体初级生产力和有害藻类水华方面发挥着重要作用<sup>[2,3]</sup>, 有人甚至提出了浮游病毒的概念, 并首次将藻类病毒作为食物链的重要成员加以认识<sup>[4]</sup>.

藻类病毒分为原核藻病毒(即蓝藻病毒)和真核藻病毒, 两者是完全不同的病毒类群. 原核藻病毒或蓝藻病毒又称“噬藻体”, 是一类与噬菌体相似的双链DNA病毒<sup>[5]</sup>; 真核藻病毒则是形态独特的多角体的粒子<sup>[6]</sup>. 最先报道噬藻体(当时称“藻病毒”)是在1963年, 它感染鞘丝藻(*Lyngbya*)、席藻(*Phormidium*)和织线藻(*Plectonema*), 命名为LPP藻病毒<sup>[7]</sup>. 尽管噬藻体的发现已有40年, 但研究还不够全面和深入, 迄今为止仅分离了10余个新

种<sup>[8]</sup>, 在“GenBank”中查不到噬藻体基因组的全序列, 我国还未见噬藻体分离的文献报道. 由于我国是世界上蓝藻“水华”暴发最严重的国家之一, 所以分离噬藻体并用于生物防治水华研究的意义与应用的前景都是显而易见的.

本文报道在我国分离的第一株噬藻体, 它感染的宿主为织线藻和席藻, 对其他所试验的蓝藻不感染, 具体报道如下.

## 1 材料和方法

### 1.1 噬藻体分离

从不同水体中采集的14个水样, 通过0.45 μm的微孔滤膜, 按1:2的体积比接种到用AA培养基<sup>[9]</sup>培养的织线藻、鱼腥藻(*Anabaena*)及念珠藻(*Nostoc*)的混合培养液中, 27℃下静置培养7 d, 在混合培养物中加入10%体积的氯仿, 剧烈振荡5 min, 静置, 待分层后收集上层水样. 将水样分别接种到织线藻、鱼腥藻、念珠藻的液体培养物和固体平板上, 在上述条件下培养. 24 h后发现7个接种了水样的织线藻液体培养物发黄, 96 h后观察到接种了水样的织线藻固体平板上出现空斑.

2002-02-28 收稿, 2002-04-12 收修改稿

\* 国家自然科学基金(批准号: 39600004、39970064)和中国科学院院长基金资助项目

\*\* 联系人, E-mail: zlishi@pentium.whiov.ac.cn

## 1.2 噬藻体纯化

将得到的空斑挑取一环,放入2 mL的AA培养基中,稀释至 $10^6$ 倍后用PFU法倒平板<sup>[10]</sup>,2 d后可见单个的噬藻斑出现,如此重复4次得到7个纯化的噬藻体样品,挑取其中的一个进行感染试验.

## 1.3 噬藻体感染

用纯化的噬藻体分别在固体和液体培养基上感染两种鲍氏织线藻(*P. boryanum* IU594, IU1542)、坑形席藻(*P. foveolarum* IU427)、贺氏伪枝藻(*Scytonema hofmanni* IU1581)、顾氏鞘丝藻(*L. ketzingii* IU1547)、念珠藻(*N. sp* 96)、鱼腥藻(*A. sp* IU1444, PCC7120, 595)、爬行颤藻(*Oscillatoria animalis* IU1309)、极大螺旋藻(*Spirulina maxima*)、雪松聚球藻(*Synechococcus cedrorum* IU1191)、组囊藻(*Anacystis nidulans*)、铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa* 7820)、小球藻(*Chlorella sp* 32)、斜生栅藻(*Scenedesmus obligus* 416).藻种全部来自中国科学院水生生物研究所的藻种保藏中心,其中织线藻、伪枝藻、鞘丝藻、念珠藻、鱼腥藻、颤藻、雪松聚球藻、组囊藻、铜绿微囊藻使用的是AA培养基,席藻、小球藻、斜生栅藻使用SE培养基<sup>[11]</sup>,螺旋藻使用ZOK培养基<sup>[11]</sup>,对螺旋藻只在液体培养基中进行了感染实验.发现噬藻体对两种织线藻和席藻在固体和液体培养基上均具感染力,而对其他藻类不产生感染.

## 1.4 温度对噬藻体活性的影响

将氯仿处理后的噬藻体感染液分别在40℃下保持10 min,50℃下保持1和10 min,60℃下保持1和10 min,然后以鲍氏织线藻IU594为感染对象用PFU法测定噬藻体的活性<sup>[10]</sup>.

## 1.5 $Mg^{2+}$ 对噬藻体感染的影响

将正常培养的对数期鲍氏织线藻IU594 10000 g离心5 min,用无 $Mg^{2+}$ 的AA培养基洗涤2次,最后培养在无 $Mg^{2+}$ 的AA培养基中,再加入1/1000体积的氯仿处理后的噬藻体感染液,在上述条件下培养观察.

## 1.6 光照对噬藻体感染的影响

使用美国产Nuair DS72GD光照培养箱,光照强度 $E = 25 \text{ lx}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ ,光暗比16:8.将氯仿处理后的噬藻体感染液和对数期鲍氏织线藻IU594按体积比1:10接种,分别在25℃下光照和遮光培养,

各设3个重复,每6 h比较感染结果.

## 1.7 噬藻体的一步生长曲线和感染过程中宿主光合效率的变化

将噬藻体和处于对数生长期的鲍氏织线藻IU594以一定的体积进行混合,使噬藻体与藻细胞的个数比达1:100000,在光照下于28℃静置30 min使噬藻体充分吸附.8000 g离心5 min收集藻细胞,用AA培养基洗涤,重复3次.然后于28℃光照下培养,每隔1 h用PFU法测定噬藻体的数量.测定感染过程中宿主光合效率的变化时,除了将噬藻体与藻细胞的个数比提高到1:1以外,其他的操作均与测定生长曲线相同,所使用的仪器是英国产Hansatech Oxylab DW1光合放氧测定仪.

## 1.8 噬藻体的电子显微镜观察

取感染的浓缩鲍氏织线藻IU594藻液,用1/10体积的氯仿处理,5000 g离心30 min去细胞碎片,再将上清液用蔗糖密度梯度(30%~60%)110000 g离心1 h,得到纯化的噬藻体,用磷钨酸负染,在HITACH 7000-FA透射电子显微镜下观察.

## 1.9 噬藻体核酸的提取与酶切

将上述经密度梯度离心得到的噬藻体按常规的酚/氯仿/异戊醇抽提方法提取核酸,最后保存在含有RNA酶的 $0.1 \times \text{Tris-EDTA}$ 溶液中;然后分别用EcoRI, BamHI, HindIII, SmaI, SalI, PstI, XhoI, SacI, NcoI, XbaI, AccI(Takara公司出品)等酶切(反应条件按照产品说明书),反应时间加倍,中间补充酶一次.待酶切完全后,经0.8%的琼脂糖凝胶电泳,再用BIO-RAD系统进行照像及分子量估算.

## 2 结果

### 2.1 噬藻体的生态分布

采样点的设置既有污水处理厂的曝气池那样的极度富营养化的池塘,也有校园喷水池这样的清水池塘,还有像武昌东湖这样的大中型湖泊;采样时间分别设定在2001年的5月下旬、8月中旬和11月中旬.共采集了14个样品,通过上述方法,其中的7个样品可以形成噬藻斑(图1).这7个样品全部来自富营养化较高的池塘,而清水池塘和湖泊的水样均未见形成噬藻斑;在时间上,5月和8月样品中有90%是含有噬藻体的,而11月的样品中则只有不到30%的样品能形成噬藻斑,其中污水处

理厂的曝气池只有在5月和8月才含有噬藻体, 11月份的则未检出。

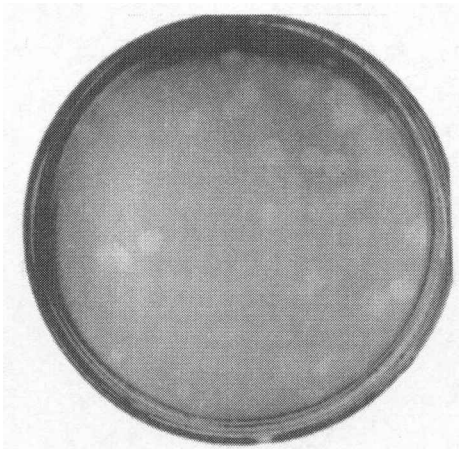


图1 感染鲍氏织线藻 IU594 3 d 后的噬藻斑

### 2.2 温度对噬藻体活性的影响

在 40℃ 下处理 10 min, 病毒的失活率为 0; 50℃ 下处理 1 min, 失活率小于 25%; 50℃ 下处理 10 min, 失活率为 40%; 60℃ 下处理 1 min, 失活率为 85%; 60℃ 下处理 10 min, 失活率大于 99%。

### 2.3 Mg<sup>2+</sup> 对噬藻体感染的影响

在添加 Mg<sup>2+</sup> 和不添加 Mg<sup>2+</sup> 时, 噬藻体的感染完全没有变化, 因此 Mg<sup>2+</sup> 并非噬藻体感染所必需。

### 2.4 光照对噬藻体感染的影响

25℃ 时, 在光照下, 噬藻体完全裂解织线藻 IU594 的周期小于 12 h, 而在遮光的条件下培养长达 2 周都未见明显的裂解, 可见光照对噬藻体的感染是必需的。

### 2.5 噬藻体的一步生长曲线和感染过程中宿主光合效率的变化

此噬藻体在 28℃ 下裂解鲍氏织线藻 IU594 的生长曲线见图 2。

由图 2 可见, 噬藻体的溶藻周期为 4 h, 释放量约为 200 PFU/细胞, 在光学显微镜下对藻细胞进行观察, 发现这个周期中开始的 3 h 为潜伏期, 最后的 1 h 藻丝断裂, 藻细胞的数量急剧减少(图 3)。从图 2 还可看出, 从感染一开始, 宿主的光合效率就开始下降, 到 2 h 后, 呼吸作用已超过光合作用, 故测得的光合速率为负值。

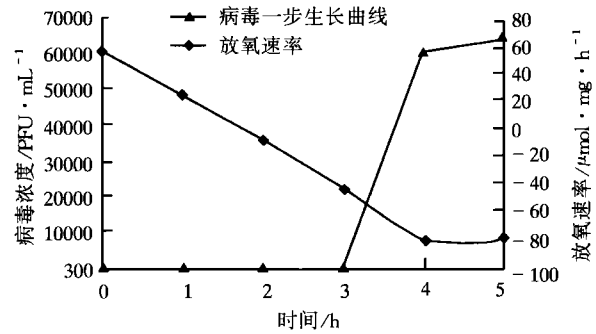


图2 噬藻体的生长曲线和宿主光合放氧速率的变化曲线

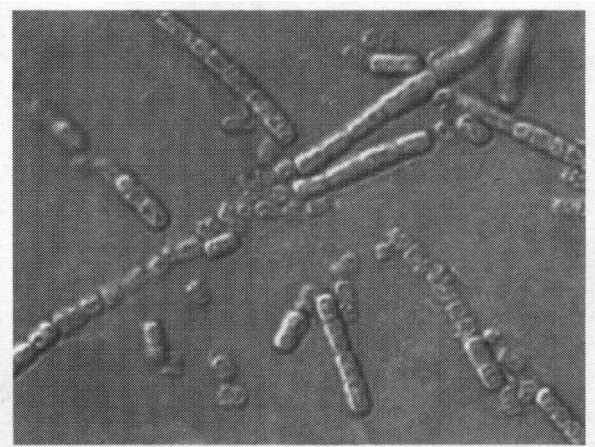


图3 感染鲍氏织线藻 IU594 3 h 后的裂解现象

### 2.6 噬藻体的电子显微镜观察

经磷钨酸负染的电子显微镜照片(图 4)显示此噬藻体为噬菌体形态, 头部直径为 52 nm, 尾部很短, 几乎不可见。因此推测它属于短尾病毒科<sup>[5]</sup>。

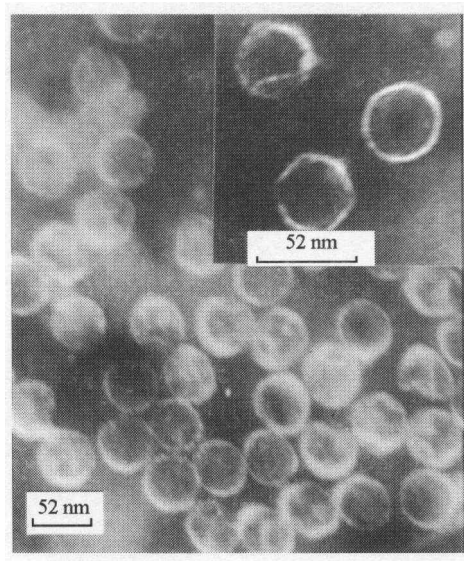


图4 噬藻体负染的电子显微镜照片

## 2.7 噬藻体核酸的酶切图谱

用 *Hind*III, *Xba*I 和 *Acc*I 可以得到较为理想的酶切图谱(图 5), 根据这 3 种酶切图谱推算噬藻体基因组的大小约为 36 kb. 其他内切酶如 *Eco*RI, *Bam*HI 等酶切的效果很差.

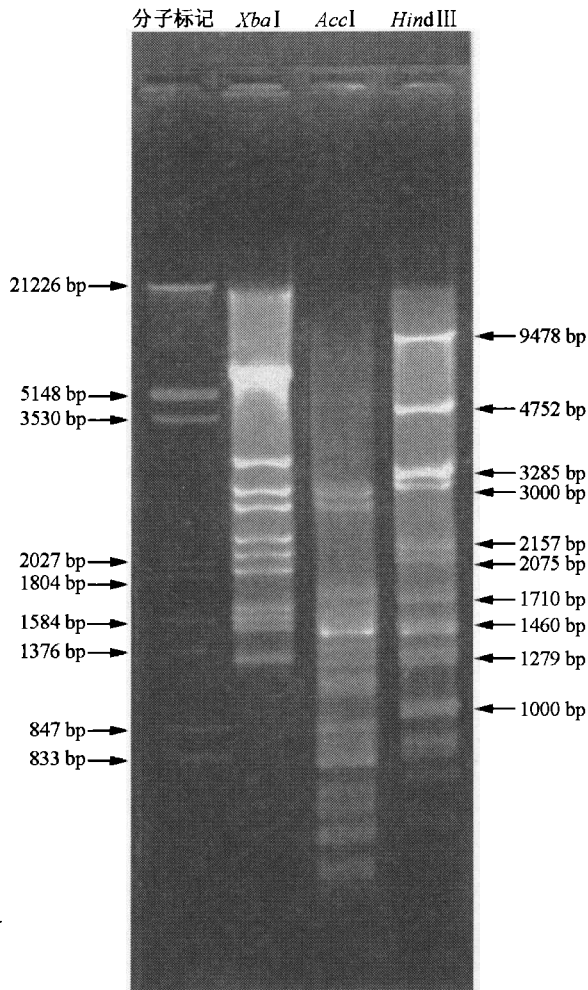


图 5 噬藻体 DNA 的酶切图谱

## 3 讨论

对武汉市各种水体所做的初步调查表明, 噬藻体在富营养化水体中具有较广泛的分布, 这与世界各地报道噬藻体的分离情况是相似的, 即使水样经微滤后, 未经浓缩的滤液就有较强的裂解性和较高的效价, 说明武汉市富营养化水体中噬藻体在生态系统中扮演着较为重要的角色. 同时我们对贵州、云南、广东的一些水体的调查也得到同样的结果(随后报道), 这说明噬藻体在我国淡水中是普遍存在的. 由于富营养化水体中蓝藻水华易于出现, 噬藻体也大量存在, 并通过裂解宿主来调节蓝藻种群

的密度和种群的变化, 这对水华的防治具有重要的意义.

噬藻体对宿主藻的吸附是感染的第一步, 并被认为是重要的步骤, 吸附的具体机制不详, 但一个普遍的现象是噬藻体的吸附速率比噬菌体要慢得多<sup>[12]</sup>. 噬藻体接触宿主并发生吸附的频率受环境因子的影响很大, 通常需要一价或二价阳离子等辅助因子来完成, 最常见的是  $\text{Ca}^{2+}$  及  $\text{Mg}^{2+}$  等离子, 据认为, 阳离子能够稳定、维持噬藻体对宿主的感染<sup>[13,14]</sup>, 如 LPP-1, SM-2 及 AS-1 等噬藻体. 但是也有一些噬藻体对阳离子并无依赖性, 如 SM-1<sup>[8]</sup>. 我们的感染实验证明, 该噬藻体对  $\text{Mg}^{2+}$  并无依赖性, 而通常认为感染织线藻的噬藻体是依赖  $\text{Mg}^{2+}$  的<sup>[15]</sup>.

温度会影响噬藻体感染的能力, 噬藻体一般可在 4℃ 下保存一个月或更长, 而只损失少量的效价<sup>[15]</sup>; 一些噬藻体的效价可在 40℃ 下维持恒定达 1 h 或更长<sup>[7]</sup>; 当温度升高到 50℃ 以上时, 感染力一般会迅速消失<sup>[16,17]</sup>. 我们所获得的噬藻体的感染力和稳定性要更强一些, 在 4℃ 冰箱中放置近半年, 其效价没有明显减弱的迹象; 同时在 40℃ 下处理 10 min, 病毒效价亦没有改变. 值得一提的是, 该病毒与已报道的噬藻体相比, 它的裂解性很强, 这不但表现在它的潜伏期和裂解期较短, 而且也表现在噬藻斑形成较快(2 d). 如此强的裂解能力在已知的噬藻体中是不多见的.

光照和金属离子对病毒感染的影响, 很可能是通过作用于藻的生长状态来实现的<sup>[18]</sup>. 国外的很多报道都曾指出过大部分噬菌体只能裂解处于对数期的宿主细胞, 而对稳定期的细胞虽能吸附和入侵, 但不能造成宿主的裂解和病毒的增殖<sup>[4,12]</sup>. 在用空斑法纯化病毒时, 我们也发现该病毒形成的噬藻斑在 1~6 d 时可快速增长, 至 12 d 时噬藻斑就不再扩大. 这一现象表明该病毒的裂解对象很可能是对数期和早稳定期的宿主, 而对晚稳定期的细胞没有裂解效应. 进一步的工作将研究该病毒对晚对数期的细胞是否具有吸附和入侵的能力, 以及在细胞衰老过程中病毒感染的潜伏期和释放量的变化, 这一系列研究的结果不但可以用于查明噬藻体在生态系统中得以维持的原因, 而且还将有助于深入认识藻类细胞衰老的生理过程.

噬藻体对光合作用的影响因宿主类型的不同而不同. 在丝状蓝藻中, 病毒复制刚刚发生时光合作

用即被终止, 包括对 CO<sub>2</sub> 固定的封锁, O<sub>2</sub> 释放受抑制. 病毒的复制和增殖是在宿主体内形成的所谓“病毒基质空间”中进行的<sup>[19]</sup>, 而在单细胞或单细胞群体蓝藻中, 噬藻体的感染并不造成类囊体的明显变化, 一般不会减小光合速率, 病毒的增殖是在核质中进行的<sup>[20]</sup>. 通过对丝状宿主光合作用的测定, 我们支持丝状蓝藻受到病毒感染时其光合作用会被强烈抑制的结论.

Safferman 等<sup>[21]</sup>在形态上对噬藻体进行了分类, 将其分为短尾病毒科、肌病毒科和长尾病毒科, 尽管这一分类方法未被国际病毒委员会采纳, 但是却很实用. 我们对所分离的噬藻体的超微结构进行观察, 认定它归于短尾病毒科; 同时, 取宿主拉丁文的第一个大写字母, 将该噬藻体取名为“PP”噬藻体, 因为它感染的宿主分别为“*Plectonema*”和“*Phormidium*”.

该噬藻体核酸的限制性内切酶图谱表明, 其基因组为双链 DNA, 大小为 36 kb 左右. 基因组不能被大多数内切酶酶解, 推测可能是由于该噬藻体核酸被修饰或缺少这些酶切位点. 目前, 我们已经建立了该噬藻体的基因组文库, 准备对相关基因的功能进行深入研究. 今后的工作着重分离、鉴定新的噬藻体, 并从生态学的角度对噬藻体对蓝藻种群的影响进行深入研究, 从而确定噬藻体的生态地位.

### 参 考 文 献

- 1 张宪孔, 等. 蓝藻的固氮及其生物学意义. 见: 中国藻类学研究. 武汉: 武汉出版社, 2001. 212~222
- 2 Suttle C A, et al. Infection of phytoplankton by viruses and reduction of primary productivity. *Nature*, 1990, 347: 467
- 3 Fuhrman J A. Marine viruses and their biogeochemical and ecological effects. *Nature*, 1999, 399: 541
- 4 Wommack K E, et al. Virioplankton: Viruses in aquatic ecosystems. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2000, 64(1): 1092
- 5 赵以军, 等. 蓝藻病毒(噬藻体)的研究进展. 中国病毒学,

- 1999, 14(2): 100
- 6 赵以军, 等. 真核藻类的病毒和病毒类粒子(VLPs). 中国病毒学, 1996, 11(2): 93
- 7 Safferman R S, et al. Algal virus: Isolation. *Science*, 1963, 140: 679
- 8 Suttle C A. Cyanophages and their role in the ecology of cyanobacteria. In: *The Ecology of Cyanobacteria*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2000. 563~589
- 9 Carr N G, et al. Notes on isolation and laboratory culture. In: *The Biology of Blue-Green Algae*. Berkeley: Blackwell Scientific Publications, 1973. 525~531
- 10 Suttle C A. Enumeration and isolation of viruses. In: *Aquatic Microbial Ecology*. Boca Raton: Lewis Publishers, 1993. 121~134
- 11 Richard W C. Culturing methods for cyanobacteria. In: *Methods in Enzymology: Cyanobacteria*. San Diego: Academic Press, 1988. 167: 68~92
- 12 Singh S. Cyanophages, A unique group of cyanobacterial viruses: Present status and future prospects. In: *Algal Ecology-An Overview*. Dehra dun: International Book Distributors, 1995. 381~400
- 13 Gromov B V. Cyanophage. *Ann Microbiol*, 1983, 134: 43
- 14 Benson R, et al. Physicochemical characterization of cyanophage SM-2. *Arch Microbiol*, 1984, 140: 212
- 15 Saferman R S. Phycoviruses. In: *The Biology of Blue-Green Algae*. Berkeley: Blackwell Scientific Publications, 1973. 214~237
- 16 Padan E, et al. A thermosensitive cyanophage attacking the blue-green alga *Plectonema boryanum*. *Virology*, 1971, 45: 773
- 17 Sarma T A, et al. Characterization of TS-mutants of cyanophage N-1 by their inactivation by physical and chemical agents. *Acta Virol*, 1995, 39(2): 65
- 18 Cseke C S, et al. Effect of light on the attachment of cyanophage AS-1 to *Anacystis nidulans*. *J Bacteriol*, 1979, 137(1): 667
- 19 Humayra A, et al. Electron microscopy of cyanobacteria treated with the extracts of *Zingiber officinale* and infected with cyanophage LPP-I. *Transactions IL State Acad Sci*, 1993, 86: 23
- 20 Adolph K W, et al. Isolation and characterization of a virus infecting the blue-green alga of the genus *Synechococcus*. *Virology*, 1973, 54: 230
- 21 Safferman R S, et al. Classification and nomenclature of viruses of cyanobacteria. *Intervirology*, 1983, 19: 61