

100-105
2939.4
②
蓝藻病毒(噬藻体)的研究进展*

赵以军 石正丽** 黄国锦 王旭

(华中师范大学生命科学学院, 武汉 430079)

**(中国科学院武汉病毒研究所, 武汉 430071)

Blue-Green Algal Viruses (Cyanophages)

Zhao Yijun Shi Zhengli** Huang Guojin Wang Xu

(College of Life Science, Central China Normal University, Wuhan 430079)

**(Wuhan Institute of Virology, The Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430071)

关键词 蓝藻, 蓝藻病毒, 噬藻体

Key words Blue-green algae, Blue-green algal viruses, Cyanophages

蓝藻(Bule-green algae)是一类原核生物,具有细菌的一些特征,因此又常称为蓝细菌(Cyanobacterium),相应地,把感染蓝细菌的病毒称为噬藻体(Cyanophage)^[1-2],这是由于噬藻体与噬菌体非常相似的缘故。除蓝藻外,所有其它的藻类均是真核生物,通常将感染真核藻类的病毒称作“藻病毒”(Phycovirus)^[3],它们的绝大多数是多角体的粒子(Polyhedral particles),只有个别如珊瑚轮藻(*Chara corallina*)病毒是杆状的^[4]。真核藻类病毒和病毒类粒子(VLPs)前文有过综述^[4],蓝藻病毒或噬藻体则完全不同于真核藻类的病毒,二者是藻类病毒的重要组成部分,蓝藻病毒的研究情况有必要专门介绍。

1 类型和性质

藻类病毒最先是在蓝藻中发现的。1963年 Safferman 和 Morris^[5]在做蓝藻的降解试验时分离了一类病毒,它们同时侵染鞘丝藻(*Lynbya*)、席藻(*Phormidium*)及织线藻(*Plectonema*),这类最早发现的病毒被命名为“LPP”病毒。以后陆续又发现了其它的蓝藻病毒,其宿主在两类蓝藻(丝状蓝藻和单细胞蓝藻)中均有分布,包括:(1)丝状宿主,如颤藻(*Oscillatoria*)、项圈藻(*Anabaenopsis*)、筒胞藻(*Cylindrospermum*)、*Raphidiopsis*、鱼腥藻(*Anabaena*)、念珠藻(*Nostoc*);(2)单细胞宿主,如微囊藻(*Microcystis*)、组囊藻(*Anacystis*)、聚球藻(*Synechococcus*)等。其中研究较多的有 LPP 型病毒、聚球藻病毒、念珠藻病毒等。

蓝藻病毒的命名是根据宿主的名称即取宿主的拉丁文的第一个字母,如上述提到的最先

收稿日期:1998-04-07,修回日期:1998-08-10

* 国家自然科学基金资助课题,批准号:39600004

发现的“LPP”病毒^[5],后来分离的宿主为 *Anabaena* (鱼腥藻)的病毒,简称“A”病毒^[6]、感染 *Nostoc* (念珠藻)的“N”病毒^[7]等。有的病毒感染“共专一宿主”(Cospecific host),如同时侵染 *Anacystis* (组囊藻)和 *Synechococcus* (聚球藻)的病毒被命名为“AS”病毒^[8],同时侵染 *Synechococcus* 和 *Microcystis* (微囊藻)的病毒命名为“SM”病毒^[9]以及上述“LPP”病毒等;有的发现不同的血清学亚型,字母后加上阿拉伯数字来表示,如“SM-1”病毒、SM-2 病毒及“LPP”系列等^[10,11](表 1)。

表 1 主要蓝藻病毒的形态特征和理化性质

Table 1 Morphological and biological characteristics of major cyanophages

主要参数	丝状宿主			单细胞宿主		
	LPP-1	LPP-2	N1	SM1	S1	AS1-M
形态						
衣壳特征						
形状	二十面体	二十面体	六面体	二十面体	六面体	六面体
直径	58.6±2	57.3±2	61.4±3	67±1.8	50	90±2
尾巴的性质						
形状	短,不能收缩	短,不能收缩	长,不能收缩	很短,有附丝	长,不能收缩	长,能收缩
长×宽(nm)	20×15	20×15	100×16	—	140×5(?)	240×20
类别	短尾病毒科	短尾病毒科	肌病毒科	短尾病毒科	<i>Styloviridae</i>	肌病毒科
对应的噬菌体	T7	T7	T-偶数	T7	λ	T-偶数
生理特性						
沉降系数	526~550	490	539	820	353	754
干重(D)	53.4×10 ⁴	50.9×10 ⁴	未知	未知	未知	未知
CsCl 浮力密度	1.48	1.48	1.498	1.48	1.501	1.49
对 Mg ²⁺ 的信赖	依赖(1 mol/L)	依赖(1 mol/L)	依赖	不依赖	依赖	不依赖
致失活温度(℃)	55	55	—	55	—	55
稳定性						
pH 范围	5~11	5~11	—	5~11	—	4~10
温度范围(℃)	4~40	4~40	—	4~40	—	—
主要蛋白质(kD)	44.14	42.11	37.14	40.25	39.11	90.45
生长情况						
潜伏期(h)	6	6	7	32	慢	8
溶解周期(h)	14	14	14	48	—	12
病毒效价(pfu/c)	200~350	200~350	100	—	50	—
DNA 特性						
分子量(D)	27×10 ⁶	28×10 ⁶	41~45×10 ⁶	56~62×10 ⁶	23~26×10 ⁶	57×10 ⁶
沉降系数	33	34.2	40.9	48	30.8	45.6
分子长度(μ)	13.2	—	20	24.3	13.3	29.5
CsCl 浮力密度	1.714	1.709	1.696	1.725	1.729	1.714
G+C 含量(%)	53	52	37~41	66	70~74	52~55

根据蓝藻病毒的形态不同,国际病毒学分类委员会(ICTV)细菌病毒分会参照噬菌体的分类方式,将蓝藻病毒分为三个科^[12]:

(1)肌病毒科(*Myoviridae*),特征是含有一条中央管和能伸缩的尾巴。常见的有:AS-1, N-1, A-1(L), A-2 等;

(2) *Styloviridae*,特征是含有长的、不能伸缩的尾巴。常见的有:S-1, S-2L, SM-2 等;

(3)短尾病毒科(*Podoviridae*),其尾巴较短。常见的有:LPP-1, LPP-2, SM-1, A-4(L), AC-

1等。

上面已经提到,蓝藻有丝状和单细胞两种基本形态,由于病毒在这两类蓝藻细胞中的感染和复制明显不同,因此蓝藻病毒通常也有两类,即丝状蓝藻病毒和单细胞蓝藻病毒,前者常见的有:“LPP”型(宿为主 *Lynbya*、*Phormidium* 和 *Plectonema*)、“N”型(宿主为 *Nostoc*)、“A”型(宿为主 *Anabaena*)等;后者包括:“SM”型(宿主为 *Synechococcus* 和 *Microcystis*)、“AS”型(宿主为 *Anacysttis* 和 *Synechococcus*)及“S”型(宿主为 *Synechococcus*)等。它们的形态特征和理化性质归纳于表1中^[13]。

2 感染和复制

如上所述,蓝藻病毒对丝状宿主和单细胞宿主的感染是完全不同的,其原因是两类蓝藻细胞的新陈代谢差异很大,故病毒的感染和复制差异也很大^[8],如丝状蓝藻被病毒感染后,细胞超微结构迅速遭到破坏,且CO₂的固定被封锁;而单细胞蓝藻受到病毒感染后,细胞的超微结构并不发生显著的改变,CO₂的固定也并不受到影响;此外,病毒在两类宿主中复制的部位也不同,感染后,丝状宿主的细胞中很快产生一种由类囊体内陷形成的结构,即所谓的“病毒生长基质空间”(Virogenic stroma space),该部位将成为病毒繁殖的场所。这种结构在单细胞蓝藻中并不形成,而病毒的复制则在核质中完成。不仅如此,这两类病毒的生活史和复制周期也十分悬殊,丝状蓝藻病毒一般在3~5 h内完成感染并释放出大量的病毒粒子,而单细胞蓝藻病毒的复制时间则长得多^[13]。以下介绍这方面的情况。

2.1 对单细胞蓝藻的感染

AS1-M感染雪松聚球藻(*Synechococcus cedrorum*)的一步生长曲线的基本特征是:开始有3 h的静止期和随后6~8 h的潜伏期,至第12小时时宿主细胞裂解。病毒释放量为40~55 PFU/mL^[14]。

AS-1的生长情况相同,只是时间稍长。

另一类单细胞蓝藻病毒SM-1的生长速度要慢得多,潜伏期高达32 h,随后的上升期为16 h,细胞裂解时病毒的释放量为100 PFU/mL^[15]。

AS1-M接触到宿主的细胞壁后,利用尾巴的收缩将DNA注射进细胞,即开始合成自身的早期蛋白质,其中一种是DNase,感染后2 h DNase降解掉宿主的DNA;另一种早期蛋白质是启动病毒中期蛋白酶的合成,这些中期蛋白酶有许多功能,最重要的功能是合成病毒的DNA,另一个重要功能是启动病毒后期蛋白质即结构蛋白的合成。大约在感染后4~6 h,病毒的头部形成,装入病毒DNA,并将尾巴连接到衣壳上。整个过程完成后,细胞裂解,病毒释放^[14]。

病毒对单细胞蓝藻的感染并不引起宿主细胞的超微结构的变化,不影响CO₂的固定,例如AS1-M在感染后8 h,宿主CO₂的固定、O₂的释放、光系统I及光系统II的活性与对照组相比,仍然保持80%的水平^[14]。

2.2 对丝状蓝藻的感染

病毒对丝状蓝藻的感染最明显的影响是抑制宿主的CO₂的固定^[16]。在形态上,病毒的早期侵染造成类囊体光合片层内陷,使片层与质膜之间形成一种特殊的“病毒生长基质空间”,病毒就在该部位繁殖。类囊体光合片层内陷的同时,宿主的DNA被降解,CO₂的固定也被彻底封锁,内含物渗漏出细胞。LPP-1侵染鲍氏织线藻(*P. boryanum*)后就立刻中止宿主所有大分子的合成,降解掉宿主DNA和蛋白质,大约2.5~3 h后,病毒利用宿主提供的ATP和各种

酶,开始合成自身所需要的蛋白酶,并利用宿主的降解产物合成病毒的 DNA 和蛋白质。感染后 4 h,病毒的头部开始形成,感染后 7 h,在 80% 的宿主细胞中早期形成的“病毒生长基质空间”内挤满了成熟的病毒粒子^[10,17]。

需要提到的是,LPP 型病毒是极烈性的病毒,同时也是一类较少依赖环境的病毒,这也许能够解释,在差异甚大的各种水体中,LPP 型病毒均有广泛的分布^[13,17]。

3 分子生物学

虽然蓝藻病毒的发现已三十余年,但一直未形成病毒学重要的研究方向,近年来由于富营养化程度加剧,蓝藻“水华”(俗称“湖靛”)的发生加重,美国和西欧一些发达国家加强了藻类环境生物学的研究力度,其中包括蓝藻病毒的基础研究,以寻找对付“水华”的生物防治方法。这几年蓝藻病毒的研究主要集中在分子生物学和生态学方面^[18,19],同时也在不断探索更先进、更便捷的研究方法^[19,20]。

分子生物学一直是蓝藻病毒的主要研究方向之一。最先对 LPP-1 的核酸、蛋白质进行了较深入的研究,至九十年代大多数研究是有关聚球藻病毒的。聚球藻是由 2~4 个单细胞组成、结构简单、易于培养的蓝藻,不仅在淡水水体中生长,在海水中也广泛分布,因此是研究病毒感染理想宿主^[21~23]。

淡水中的蓝藻病毒研究较多,海水中的蓝藻病毒研究十分有限,总之分子生物学研究深度还不够。迄今对聚球藻(单细胞蓝藻)和念珠藻(丝状蓝藻)的病毒报道较多^[19,24~26]。Wilson 等^[27]分离得到 5 个感染 *Synechococcus* sp. WH 7803 品系的病毒,分属于肌病毒科和 *Stylouviridae*,它们的基因组和结构蛋白有很大的差异,通过内切酶图谱分析,肌病毒科病毒的基因组大小为 80~85 kb, *Stylouviridae* 病毒的基因组 90~100 kb;经 CsCl 密度梯度离心后用 SDS-PAGE 分析病毒多肽,发现两类病毒结构蛋白尽管大小均为 53~54 kD,但是多肽结构和氨基酸组成大不相同。此外,将两类病毒的 DNA 用几种内切酶如 Hind III、Mlu I、Xho I、Sau3A、Sma I 和 Pvu II 作用后发现,它们的 DNA 受到宿主不同程度的修饰。值得注意的是, EcoR I 消化病毒 DNA 后, DNA 有不同程度的甲基化。Park 等^[19]对同样宿主的病毒核酸用各种酶消化,发现该双链 DNA 基因组大小约为 227 kb,是已知的最大的蓝藻病毒核酸,因而该病毒也具有最大的头部(90 nm)。

英国 Lancaster 大学的 Bancroft^[28]等人对丝状蓝藻的病毒进行了细致的研究,他们建立了五株共同宿主为多变鱼腥藻(*Anabaena variabilis*)病毒的限制内切酶图谱。他们为绘制图谱准备了这五株病毒的克隆 DNA,由于病毒对 Na⁺ 特别敏感,加上提取的 DNA 极易附着在细胞碎片上,使得天然 DNA 的提取得率很低,所以他们使用 Hind III 和 EcoR I 酶切病毒 DNA,并将其片段连接到 pBR322 上,用此方法获得病毒的克隆 DNA。这些克隆 DNA 的限制性内切酶图谱表明,两对病毒 AN-13 与 AN-23、A-1L 与 AN-10 分别有很近的亲缘关系,A-1L 与 AN-10 病毒均含有 67 kb 大小的环状 DNA, AN-13 与 AN-23 病毒含有 67 kb 大小的线形 DNA,而另外一组病毒 A-4L 则含大小约 40 kb 的线形 DNA。他们认为这些数据能有效区分病毒、反映彼此的亲缘关系与进化特征。

多数蓝藻病毒是裂解性的,但是也有少数是非裂解性或温和性的,如 LPP-ID 和 LPP-2SP1 溶源性的原理还不很清楚,紫外线、X 射线及丝裂霉素 C 均不能诱导裂解的发生^[29~31],但是温度达到 40℃ 时可对溶源性进行诱导,光对诱导也是需要的^[14,22]。此外,溶源性病毒对

别的病毒“超级感染”有免疫力^[24]。

Suttle 等人重点对蓝藻病毒的研究技术进行探讨,他们提到的方法有:电镜技术(TEM)、噬斑技术(PFU)、超滤及超速离心技术等^[20,32]。分子生物学的技术手段和限制性酶切图谱、PCR 和噬斑杂交(Plaque hybridization)等也应用于噬藻体的研究^[19,33,34]。Suttle 等人^[20]最近建立了一种不用浓缩病毒即可直接计数的表面荧光显微术(Epifluorescence microscopy),比较了该方法与透射电镜技术的优劣,例如用于病毒计数比透射电镜的精确度高出 25%。通过大量的实践,他们认为,技术的综合应用将大大提高研究蓝藻病毒及其同宿主关系的广度和深度。

4 生态影响

噬藻体的生态地位正在被重新认识,比较一致的是,藻类病毒被认为是水体微型生物群落系统中重要的动态因子,已观察到其昼夜间数量的快速增减,说明它们在不断地进入和退出该系统^[35]。由于病毒的专性寄生,对宿主的种群密度起到调控作用,它们对蓝藻的致死率达到 72%^[36]。尽管在生态学上还难以解释病毒的调控机制,但不少现象如“水华”与“赤潮”的消长过程,病毒浓度和效价相应地发生明显的变化^[21,23,34,37],病毒直接影响宿主的种群密度乃至存亡^[4]。

由于我国经济的发展,近年来人类活动增加,水体富营养化程度和蓝藻“水华”发生日益严重,已经跃居世界前列,“水华”的防治尤其生物防治显得十分紧迫,蓝藻病毒的基础研究在我国还相当薄弱,需要藻类学和病毒学方面的研究人员加强合作,共同努力,把具有良好应用前景的藻类病毒学这一新型学科开展起来,并逐步提高我国的研究水平。

参 考 文 献

- 1 Sherman L A, Brown R M. Cyanophage and virus of eukaryotic algae. In: H. Fraenkel-Conrat *et al.* eds. Comprehensive Virology. New York: Plenum Press, 1978. 145~243
- 2 Koltukova NV, Lysenko TG, Mendzhul MI *et al.* Certain physicochemical properties of proteolytic complexes of intact and cyanophage-infected culture *Plectonema boryanum*. Mikrobiol Zhurn, 1996, 58: 50~57 (Russian)
- 3 Van Etten J L, Lane L C, Meints R N. Virus and virus-like particles of eukaryotic algae. Microbiol Rev, 1991, 55: 586~620
- 4 赵以军, 石正丽. 真核藻类的病毒和病毒类粒子. 中国病毒学, 1996, 11(2): 93~102
- 5 Safferman R S, Morris M E. Algal virus: isolation. Science, 1963, 140: 679~680
- 6 Rippka R, Deruelles J, Waterbury J B *et al.* Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. J Gen Microbiol, 1979, 111: 1~61
- 7 Adolph K W, Haselkorn R. Isolation and characterization of a virus infecting the blue-green alga *Nostoc muscorum*. Virology, 1971, 46: 200~208
- 8 Sherman L A, Cornelly M. Isolation and characterization of a cyanophage infecting unicellular blue-green algae. *A. nudaans* and *S. cedrerum*. Virology, 1976, 72: 540~544
- 9 Safferman R S, Schnerder J R, Steere R L *et al.* Phycovirus SM-1. a virus infecting unicellular blue-green algae. Virology, 1969, 37: 3 860~3 895
- 10 Brown R M, Smith K M, Walne P L. Replication cycle of blue-green algal virus LPP-1. Nature (London), 1966, 212: 729
- 11 Mendzhul MI, Koltukova NV, Lysenko TG *et al.* Effect of reproduction of cyanophage LPP-3 on activity of glutamate dehydrogenase and glutamine synthetase in the cells of cyanobacterium *Plectonema boryanum*. Ukrain Biokhim Zhur, 1995, 67: 33~38 (Russian)
- 12 Safferman R S, Cannon R E, Desjardins P R *et al.* Classification and nomenclature of viruses of cyanobacteria. Intervirology, 1983, 19: 61~66

- 13 Adolph K W, Haselkorn R. Isolation and characterization of a virus infecting the blue-green alga of the genus *Synechococcus*. *Virology*, 1973, 54:230~236
- 14 Sherman L A. Infection of *Synechococcus cedrorum* by the cyanophage AS1-M, cellular metabolism and phage development. *Virology*, 1976, 71:199
- 15 MacKenzie J J, Haselkorn R. An electron microscope study of infection by the blue-green algal virus SM-1. *Virology*, 1972, 49:505
- 16 Ginzberg O, Padan E, Shilo M *et al.* Effects of cyanophage infection on CO₂ photoassimilation in *Plectonema boryanum*. *J Virol*, 1968, 2:695
- 17 Ali Humayra, Dhaliwal A S, Jones W *et al.* Electron microscopy of cyanobacteria treated with the extracts of *Zingiber officinale* and infected with cyanophage LPP-1. *Transactions II. State Acad Sci*, 1993, 86:23~55
- 18 Ackmann H W. Frequency of morphological phage description in 1995. *Arch Virol*, 1996, 141:209~218
- 19 Jony-Geum Park, Minkim, Yong-Keel Choi *et al.* Restriction pattern of the nucleic acid of *Synechococcus* sp. cyanophage. *J Microbiol*, 1996, 34(1):1~6
- 20 Weinbauer M G, Suttle C A. Comparison of epifluorescence and transmission electron microscopy for counting viruses in natural waters. *Aquat Microb Ecol*, 1997, 13:225~232
- 21 Suttle C A. Viruses as biological control agent for blooms of marine phytoplankton. *Proceedings of the Brown Tide Summit, New York Sea Grant Institution*. 1996. 71~76
- 22 Henses K P, Chan A M, Suttle C A. Large double-stranded DNA viruses which cause the lysis of marine heterotrophic nanoflagellates (*Bodo* sp.) occur in natural marine virus communities. *Aquat Microb Ecol*, 1995, 9:203~210
- 23 Suttle C A, Chan A M. Dynamics and distribution of cyanophages and their effect on marine *Synechococcus* sp. *Appl Environ Microbiol*, 1994, 60:3 167~3 174
- 24 Carr N G, Mann N H. Oceanic cyanobacterial picoplankton. In: Donald A. Bryant ed. *Molecular Biology of Cyanobacteria (Blue-green algae)*. Kluwer Academic Publisher. 1994. 33~35
- 25 Schneider G J, Lang J D, Haselkorn R. Promoter recognition by the RNA polymerase from vegetative cells of the cyanobacterium *Anabaena* 7120. *Gene*, 1991, 105:51~60
- 26 Sarma T A, Singh R. Characterization of TS-mutants of cyanophage N-1 by their inactivation by physical and chemical agents. *Acta Virol*, 1995, 35:65~68
- 27 Wilson W H, Carr N G, Mann N H. The effect of phosphate status on the kinetics of cyanophage infection in the oceanic cyanobacterium *Synechococcus* sp. WH7803. *J Phycol*, 1996, 32:506~516
- 28 Bancroft I, Smith R J. Restriction mapping of five cyanophages. In: Roger L J, Gallon J R ed. *Biochemistry of the algae and cyanobacteria*. 1989(28):315
- 29 Sarma T A, Singh R. Isolation and characterization of temperature-sensitive mutants of cyanophage N-1. *Acta Virol*, 1994, 38:11~16
- 30 Weinbauer M G, Wilhelm S W, Suttle C A *et al.* Photoreactivation compensates for UV damage and restores infectivity to natural marine viral communities. *Appl Environ Microbiol*, 1997, 63:2 200~2 205
- 31 Ohki K, Fujita Y. Occurrence of a temperate cyanophage lysogenizing the marine cyanophyte *Phormidium persicinum*. *J Phycol*, 1996, 32:365~370
- 32 Suttle C A, Chan A M, Cottrell M T. Use of ultrafiltration to isolate viruses from seawater which are pathogens to marine phytoplankton. *Appl Environ Microbiol*, 1991, 57:721~726
- 33 Mendzhul M I, Syrchin S A, Rebentish B A *et al.* The resistance of the DNA of cyanophage LPP-3 to the action of different restriction endonucleases. *Mikrobiol Z*. 1993, 55:47~53
- 34 Henses K P, Chan A M, Suttle C A. Fluorescently labeled virus probes: natural virus populations can control the structure of microbial communities. *Appl Environ Microbiol*, 1995, 61:3 673~3 677
- 35 Maranger R, Bird D F. High concentrations of viruses in the sediments of Lac Gilbert, Quebec. *Microb Ecol*, 1996, 31:141~151
- 36 Proctor L M, Fuhrman J A. Viral mortality of marine bacteria and cyanobacteria. *Nature*, 1990, 343:60~62
- 37 Heldal M, Bratbak. Production and decay of viruses in aquatic environments. *Mar Ecol Prog Ser*, 1991, 72:205~212