

海洋球石藻 *Emiliana huxleyi* (Prymnesiophyceae) 病毒主要外壳蛋白基因的克隆与序列分析*

张稚兰¹ 刘静雯¹ 董双林² 苏国成¹ 张彦锋¹

(1. 集美大学生物工程学院 厦门 361021; 2. 中国海洋大学 教育部水产养殖重点实验室 青岛 266003)

提要 在实验室纯培养条件下, 用过滤的海洋球石藻特异性病毒(*Emiliana huxleyi* virus, EhV)EhV-99B1 株感染球石藻(*E. huxleyi*, Eh), 建立病毒与宿主之间稳定的感染体系, 病毒裂解滤液经卷式切向流超滤和 PEG 8000 浓缩、CsCl 密度梯度离心, 获得足量高纯度的病毒颗粒。根据已报道的其它 EhV 株系主要外壳蛋白(MCP)基因内保守片段设计合成一对特异引物, 从 EhV-99B1 病毒基因组中克隆到了长度约为 300bp 的病毒外壳蛋白基因保守片段。该片段与 pBS-T 载体连接后转化 *Escherichia coli* DH5 α , 对筛选到的阳性克隆进行序列测定与分析。结果表明, 该克隆片段与 GenBank 中 EhV163(AF453851)分离株的同源性最高, 该区域内的核苷酸与对应推导的氨基酸序列同源性均为 100%, 证实获得的 DNA 片段是 EhV-99B1 的外壳蛋白基因; 与 EhV203(AF453855)分离株的核苷酸及氨基酸序列的同源性较低, 分别为 93%和 100%。表明该病毒在自然海域中分布广泛并具有一定的多态性, 同时在进化上也存在相当的复杂性。因此, MCP 基因可以作为一种新的分子遗传标记以区分自然群落中 EhV 的不同基因型, 对于理解海洋球石藻类病毒与宿主之间复杂的相互作用关系将是一个十分有价值的工具。

关键词 海洋球石藻病毒(EhV), 病毒主要外壳蛋白(MCP), 基因克隆与序列分析

中图分类号 Q943

海洋病毒是全球生物地化循环的驱动者和海洋环境中最大的生物多样性库, 其在海洋环境中以惊人的高丰度存在(典型的可以达到 10^6 — 10^9 个/ml) (Bergh *et al.*, 1989; Proctor *et al.*, 1990; Fuhrman, 1999), 并且几乎可以感染包括从细菌到海洋哺乳类等所有的有机体, 甚至可能在海洋和陆地上进行迁移(Suttle, 2005; Hamilton, 2006)。藻类病毒的研究起步较晚, 但由于其在宿主种群动力学、水生系统食物网营养流动、全球气候变暖及赤潮调控中所起的重要作用而使该领域的研究发展迅速(Bratbak *et al.*, 1996; Malin *et al.*, 1998; Baudoux *et al.*, 2005; Hamilton, 2006; Lawrence, 2008)。迄今为止, 分离的微藻病毒大部分属于特异性感染真核藻类的双链 DNA 病毒家族。藻类双

链 DNA 病毒科(Phycodnaviridae)的成员均为二十面体、无胞膜和明显的尾部、直径在 100—220nm 之间, 大都含有 100—560kb 大小的双链 DNA 基因组且为裂解性病毒(Wilson *et al.*, 2002; Brussaard, 2004), 是迄今为止已知的基因组最大的病毒。

海洋球石藻是全球性广泛分布的重要赤潮原因种之一, 球石藻中以 *Emiliana huxleyi* 最为重要。目前已分离到十多株海洋球石藻病毒, 均属于藻类双链 DNA 病毒科。该类病毒的基因组结构非常复杂, 与已知的藻类病毒的基因组相差甚远, 具有许多该病毒特有的基因(William *et al.*, 2005)。病毒 DNA 聚合酶(*pol*)基因片段的系统发生学分析结果显示, 迄今分离到的 EhV 病毒株之间相似度非常高, 但与藻类

* “十一五”国家科技支撑计划重大项目子课题, 2006BAD09A06 号; 福建省自然科学基金项目, D0710020 号; 厦门大学近海海洋环境科学国家重点实验室开放基金项目, MEL0608 号。张稚兰, 硕士研究生, E-mail: maratizhang@163.com

通讯作者: 刘静雯, 博士, 教授, E-mail: ljwsbch@163.com

收稿日期: 2008-01-26, 收修改稿日期: 2008-03-18

双链病毒科 (Phycodnaviridae) 中已报道的四个属 (*Chlorovirus*、*Prasinovirus*、*Prymesiovirus* 和 *Phaeovirus*) 均不相同; 而基于病毒主要外壳蛋白 (MCP) 基因片的系统发生学分析却发现, EhV 不但与其它藻类双链 DNA 病毒之间差异甚大, 而且不同的 EhV 分离株之间也存在着很大的差异 (Schroeder *et al.*, 2002; Larsen *et al.*, 2008), 因此, 球石藻病毒已被划分为藻类双链 DNA 病毒科中的一个新的属 (*Coccolithovirus*)。根据藻类双链病毒主要外壳蛋白保守区基因序列设计合适的引物, 克隆和分析有关的 EhV 株系病毒外壳蛋白基因, 研究该病毒的多样性特点及其进化关系, 将有助于进一步了解海洋球石藻类病毒发生、发展及进化的分子基础, 阐明病毒感染的分子机理, 同时, 也为进一步建立快速、准确、高效的海洋球石藻病毒的检测方法提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验用海洋微藻和病毒 EhV-99B1 病毒株是从挪威 Raunefjord 海域一次围隔诱导的海洋球石藻赤潮追踪实验中分离出的一株新的 EhV 病毒。该病毒滤液及其特异性宿主海洋球石藻 *Emiliana huxleyi* (Eh-BOF92) 均由挪威卑尔根大学生物系微生物研究所 Gunnar Bratbak 教授赠送。

1.1.2 菌种和试剂 pBS-T 载体、*Taq* DNA 聚合酶、*T₄* DNA 连接酶、核酸内切酶 *EcoR* I 和 *Not* I 均为 TaKaRa 公司产品, 大肠杆菌菌株 DH5 α 为本实验室保存, 琼脂糖为西班牙进口分装, DNA 凝胶回收试剂盒和质粒提取试剂盒为碧云天产品, 测序由广州英俊公司完成, 其余试剂均为进口分装或国产分析纯。

1.1.3 引物设计 采用 GeneDoc 软件分析 GenBank 中海洋微藻双链 DNA 病毒 MCP 基因序列的同源性, 用 Primer Premier 5.0 软件, 根据已报道的海洋球石藻病毒 (*Coccolithovirus*) MCP 基因内保守区域 (约 300bp) 设计一对特异引物进行 PCR 扩增, 本实验中采用的引物为: MCP-F: 5'-CGGAATTCGTC TTCGTACCAGAAGCACT-3' (画线部分为 *EcoR*I 酶切位点), MCP-R: 5'-AAGGGCGGCCGCGGACGCCT CGGTGTA-3' (画线部分为 *Not*I 酶切位点)。

1.2 实验方法

1.2.1 实验室纯培养条件下球石藻的培养与其特异性病毒 (EhV) 稳定感染体系的建立 采用 70% 的海

水配制 *f*/2-Si 加富培养基, 于 1L 的三角瓶中接种培养微藻, 光照强度为 40—50 $\mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 、温度 15、光周期为 14:10 (光:暗)。对指数生长期的海藻进行病毒感染, 感染前分别测定球石藻细胞密度和病毒丰度, 调整微藻与病毒的比例, 使病毒与宿主感染体系中病毒的起始丰度约为 2.8×10^6 个/ml, 建立稳定的感染体系使病毒能够有效地感染、裂解宿主细胞以大量增殖病毒粒子。病毒感染后约 60—90h 至病毒彻底裂解细胞使培养液变得清澈。

1.2.2 EhV 病毒颗粒的浓缩与纯化 病毒的浓缩: 将病毒裂解液离心除去大的细胞碎片 (1000r/min, 4 离心 10min), 然后分别经 0.45 μm 和 0.2 μm 无菌滤膜过滤, 滤液经卷式切向流超滤浓缩至约 20—50ml, 加入终浓度为 100g/L 的 PEG 8000 浓缩沉淀病毒, 4 搅拌过夜。离心收集病毒沉淀, 沉淀用 SM 缓冲液 (10mmol/L NaCl, 50mmol/L Tris, 10mmol/L MgSO₄ 和 0.1% gelatin, pH 7.5) 悬浮并于 4 静置过夜, PEG 8000 反透析浓缩至适当的体积。

病毒的纯化: 取上述病毒浓缩液, 与 CsCl 制成匀浆液 (CsCl 0.625g/ml), 装入 10ml 梯度离心管中, 水平转头 6000r/min, 4 离心 24h。小心收集离心后形成的病毒区带, 于 SM 缓冲液中透析除去残余的 CsCl, 再用 PEG8000 浓缩后 4 保存备用。

1.2.3 EhV 病毒基因组提取及主要外壳蛋白基因片段的扩增 采用 CTAB 法提取病毒基因组 DNA (Sambrook *et al.*, 2001)。以病毒的 DNA 为模板, 在 50 μl 反应体系中 (无菌 ddH₂O 33.75 μl , 10 \times 缓冲液 5 μl , dNTP 4 μl , DNA 模板 5 μl , 引物 F 1 μl , 引物 R 1 μl , *Taq* 酶 0.25 μl) 进行 PCR, 反应条件为: 95 预变性 3min: 95 30s, 60 60s, 74 90s, 扩增 30 个循环; 74 延伸 7min。PCR 产物经 1.2% 琼脂糖凝胶检测、回收。

1.2.4 DNA 连接与转化 DNA 连接反应: PCR 产物经纯化后与 pBS-T 载体连接。连接反应为 10 μl 体系: 回收 PCR 3 μl , 10 \times DNA 连接缓冲液 1 μl , T₄ DNA 连接酶 1 μl , 载体 1 μl , 无菌 ddH₂O 4 μl , 于 16 连接过夜。

大肠杆菌的转化: 被转化的感受态细胞为 *E. coli* DH5 α , 感受态细胞的制备方法参照《分子克隆实验指南 (第 3 版)》进行 (Sambrook *et al.*, 2001)。将 10 μl T 克隆连接产物加入到 200 μl 的感受态细胞中, 置冰浴 30min, 42 热激 90s, 冰浴 2min。加入到含有 800 μl LB 培养基 (1% 蛋白胨, 0.5% 酵母提取物, 1% NaCl, pH 7.0) 的试管中混匀, 37 培养 1h。取未离心菌液 200 μl

涂布含氨苄青霉素(终浓度为 0.1mg/ml)的 LB 固体平板(1%蛋白胨, 0.5%酵母提取物, 1% NaCl, pH 7.0, 预先涂有 40 μ l 20mg/ml 的 X-gal 与 4 μ l 200mg/ml 的 IPTG), 同时将剩余菌液于 8000r/min 离心 1min, 分别取上清、沉淀各 200 μ l 涂布平板(同上), 于 37 $^{\circ}$ C 倒置培养约 12h。

1.2.5 重组质粒的筛选与鉴定 用灭菌的牙签挑取白斑, 接种于含氨苄青霉素(终浓度 0.1mg/ml)的 LB 液体培养基中(组分包括 1%蛋白胨、0.5%酵母提取物、1% NaCl, pH 7.0), 37 $^{\circ}$ C 摇床上震荡培养 12h。采用碧云天质粒小量抽提试剂盒提取质粒, 经 1%琼脂糖凝胶电泳检测确定重组质粒。重组质粒经 PCR 和双酶切验证目标片段, 双酶切采用 20 μ l 体系: 10 \times 缓冲液 2 μ l, 15U/ μ l *Eco*RI 1.5 μ l, 10U/ μ l *Not*I 1.5 μ l, 重组质粒 237.99ng/ μ l 10 μ l, 无菌 ddH₂O 5 μ l, 37 $^{\circ}$ C 反应 20h, 1%琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.6 阳性克隆的 DNA 序列分析 将酶切鉴定后的阳性克隆送广州英俊生物技术有限公司测序, 测序结果在 GenBank 中进行 BLAST 搜索, 应用 Primer-Premier5.0、DNA Star、seqtool、Clustal X、MEGA 4.1 软件进行序列分析。

2 结果与分析

2.1 病毒的增殖、病毒颗粒的浓缩与纯化

在本实验建立的病毒与宿主感染体系中, 病毒感染宿主藻后 60h 左右可以观察到明显的宿主细胞裂解现象, 并释放出大量病毒粒子。当宿主细胞 90% 以上被病毒裂解(即培养液几乎澄清)后, 经过滤、浓缩和 CsCl 密度梯度离心后出现界限明显、清晰的病毒区带, 获得了高纯度病毒颗粒, 为制备病毒基因组提供充足的病毒材料。

2.2 病毒基因组 DNA 的提取与 PCR 扩增

采用 CTAB 法可以有效提取海洋球石藻病毒的基因组 DNA。以病毒基因组 DNA 为模板, 用 MCP 特异引物 F 和 R 进行 PCR 扩增。扩增产物经 1.2%琼脂糖凝胶电泳检测到大小约为 300bp 的 DNA 片段(图 1)。

2.3 pBS-MCP 重组子的筛选及鉴定

将 PCR 产物与 pBS-T 载体连接, 转化 *E. coli* DH5 α , 通过蓝白斑筛选, 获得了有插入外源 DNA 的阳性克隆(图 2 左), pBS-MCP 重组质粒经 *Eco*R I 和 *Not*I 双酶切及 PCR 鉴定, 大小与其 PCR 产物基本相同(图 1, 图 2 中、图 2 右)。

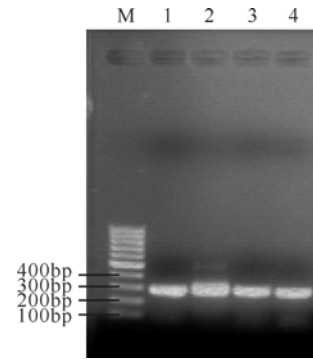


图 1 EhV-99B1 MCP 基因片段 PCR 扩增产物
Fig.1 The PCR product of MCP in EhV-99B1
M 为 100bp 的 DNA 分子量标记; 1—4 为 EhV-99B1 的 MCP 基因片段 PCR 产物

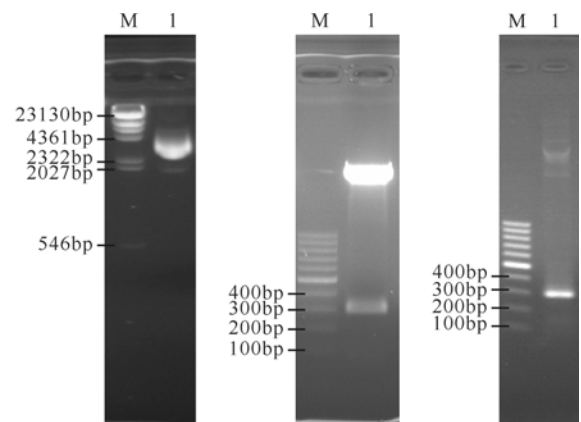


图 2 重组质粒的鉴定

Fig.2 The identification of recombinant plasmid in *E. coli* DH5 positive colonies

左图: 阳性克隆; M 为 λ /*Hind* III DNA 标记, 1 为 pBS-MCP 重组质粒。中图: 重组质粒的双酶切电泳; M 为 100bp DNA Ladder, 1 为 pBS-MCP/*Eco*R I + *Not* I。右图: 重组质粒的 PCR 检测; M 为 100bp DNA Ladder, 1 为 PCR 产物

2.4 克隆片段的序列分析

以 EhV-99B1 基因组为模板, 根据已报道的海洋球石藻病毒(*Coccolithovirus*)MCP 基因内保守区域设计一对特异引物进行 PCR, 扩增产物经测序, 序列大小为 243bp(该序列已提交 GenBank, 登陆号: EU979362)。将测序结果在 GenBank 中进行 BLAST 搜索, 应用 GeneDoc、DNASar、ClustalX 等软件进行核苷酸序列分析(图 3), 多重同源性比对表明: 该克隆片段与 GenBank 中 EhV163 分离株(登陆号 AF453851)同源性最高, 核苷酸和对应推导的氨基酸序列同源性均为 100%段, 进一步验证了阳性克隆中含有 EhV-99B1 的 MCP 基因; 与 EhV203 分离株(登入号 AF453855)的同源性相对较低, 核苷酸和氨基酸

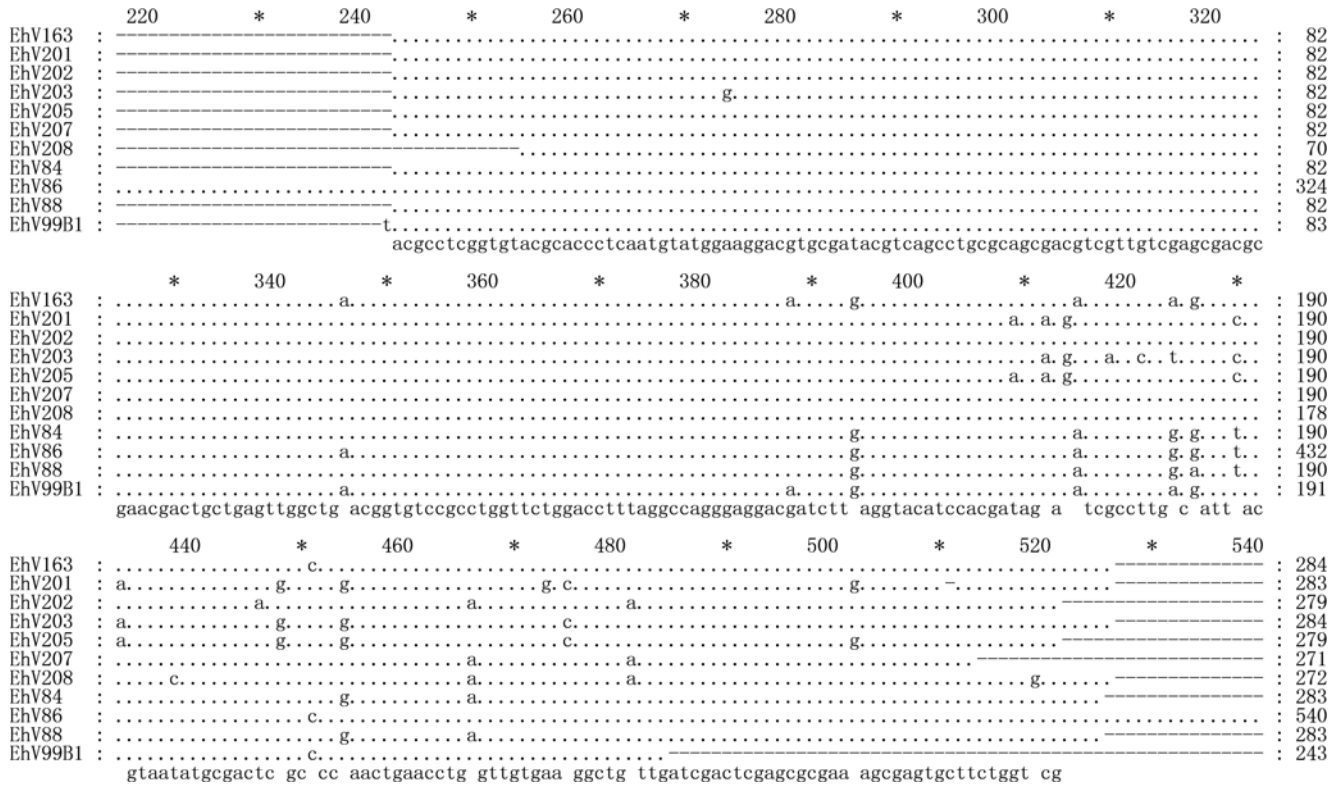


图 3 EhV-99B1 MCP 与 GenBank 中其它 EhV MCP 基因保守区核苷酸序列比对

Fig.3 The alignment of the conserved region of MCP gene from different isolated EhV members

同源性分别为 93%和 100%。

从 GenBank 中搜索到的 EhV MCP 基因片段序列 (表 1) 与该实验病毒株所测的序列进行比对, 绘制系统树 (图 4), 分析显示: 该实验克隆片断与从挪威海域

表 1 GenBank 中提供的 EhV 分离株

Tab.1 *E. huxleyi* virus (EhV) isolates used in this study and GenBank references for their MCP sequence data

病毒株	地点	深度	GenBank 登入号
EhV84	EC ^a	15m	AF453849
EhV86	EC ^b	15m	AF453848
EhV88	EC ^a	5m	AF453850
EhV163	RN ^c	表层	AF453851
EhV201	EC ^b	表层	AF453857
EhV202	EC ^b	15m	AF453856
EhV203	EC ^b	15m	AF453855
EhV205	EC ^b	25m	AF453854
EhV207	EC ^a	表层	AF453853
EhV208	EC ^a	表层	AF453852
EhV99B1	RN ^c	15m	EU979362*

注: 1. 地点中的 EC 表示远离英国普利茅斯港的西英吉利海峡采样位点, RN 表示挪威西部 Raunefjorden 峡湾围隔实验采样。2. MCP 表示编码假定的主要外壳蛋白的基因片段。3. 上标 a、b、c 分别代表不同的采样位点。4. 星号*表示本实验的克隆序列为 242—485bp 的 MCP 基因片段

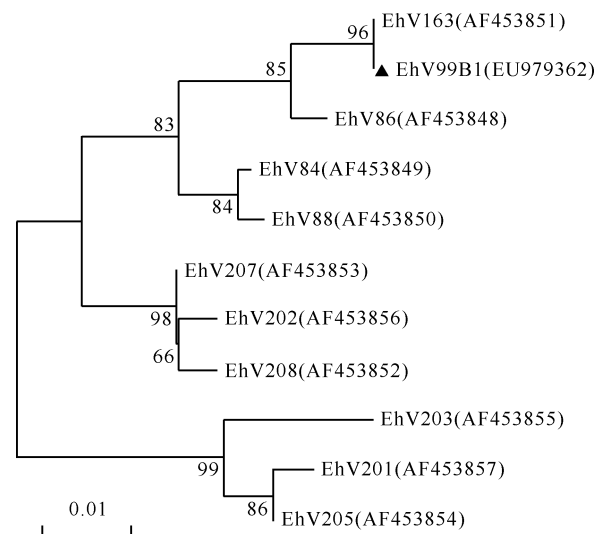


图 4 根据 EhV MCP 基因片段序列绘制的系统树

Fig.4 The distance tree based on the sequence of conserved segment of EhV MCP gene

分离的 EhV163 株 (AF453851) 聚成一类, 自展值较高, 而与英国海域分离的 EhV 株系为不同的分支。可见, 不同水体范围内分离得到的病毒株有时可以聚为一类, 但其自展值相对较低, 如 EhV202 (AF453856) 与 EhV208 (AF453852); 而同一海域不同深度水体中分离的病毒株也有可能出现差异而存在于不同的分支

中,如 EhV201(AF453857)和 EhV86(AF453848),说明该病毒在分布上具有一定的广泛性,同时又具有一定的多态性,并且在进化上存在一定的变异。

3 讨论

本研究在室内纯培养条件下建立了海洋球石藻 Eh-BOF92 与其特异性感染病毒 EhV-99B1 之间稳定的感染体系,成功诱导宿主细胞彻底裂解。由于球石藻病毒的多态性,引物的设计合理与否对于利用 PCR 法检测该病毒是非常重要的。如果引物不在病毒序列的保守区域就可能检测不到某些株系。另外,病毒纯化是病毒研究中的主要步骤难点,与蔗糖密度梯度离心相比,CsCl 密度梯度形成的条带比较紧密,因而可以得到纯度较高的病毒颗粒,该方法重复性好,可以用来纯化足量的病毒。本实验结果表明,CsCl 密度梯度离心是一种从感染细胞培养上清液中分离纯化海洋藻类病毒较好的方法,此方法纯化得到的病毒为其基因组制备及特异基因片段的扩增提供了高质量的病毒样品,也为进一步研究病毒的结构与功能奠定了基础。

本实验成功克隆了海洋球石藻病毒分离株 EhV-99B1 主要外壳蛋白(MCP)基因的部分序列,该序列与 GenBank 中已报道的 EhV163 分离株的序列具有很高的同源性,它们 MCP 基因中的 242—485bp 基因片段的核酸与氨基酸序列均无差异。系统进化分析表明,在同一水体不同深度分离到的 EhV 病毒株可能聚成一类,如 EhV84(AF453849)和 EhV88(AF453850)、EhV163(AF453851)和 EhV99B1(EU979362),而不同水体中分离得到的病毒株有时也可以聚为一类,但其自展值相对较低,如 EhV202(AF453856)与 EhV208(AF453852),说明该病毒在分布上具有一定的广泛性;而同一位点不同深度水体中分离的病毒株也有可能出现差异而存在于不同的分支中,如 EhV201(AF453857)和 EhV86(AF453848),表明该病毒又具有一定的多态性,在进化过程中存在一定的变异。更有趣的是在一次设得兰群岛海洋球石藻赤潮追踪实验中,Brussaard 等(1996)从同一个海洋球石藻细胞中同时分离出两种不同类型的病毒粒子,均为六边形、二十面体对称结构,但病毒颗粒的大小相差很大,大的直径约为 185—200nm,小的直径在 50—60nm 左右,同时发现小病毒颗粒对宿主的感染率高于较大的病毒颗粒。在球石藻赤潮爆发过程中,小病毒颗粒的感染率可以高达 50%,而大病毒颗粒对宿主的感染率

低于 25%。在单一种球石藻赤潮爆发过程中出现不同的球石藻病毒基因型,这一发现提出了一个有趣的问题:这些病毒在微藻种群构建中起何作用?已知在球石藻主要的赤潮种群间也存在广泛的遗传多样性,而且不同的 Eh 藻系可以被同一株系的病毒所感染(Castberg *et al.*, 2002),可见,在海洋球石藻宿主与病毒之间没有很强的种内宿主特异性关系。因此,很可能病毒或通过作为载体直接进行基因交换、或通过转导和潜在的感染、或通过简单地杀死一个优势宿主藻系等种种方式,使另一株系的藻取而代之,从而直接影响种群的多样性(Schroeder *et al.*, 2002; Allen *et al.*, 2007)。有研究发现,在英吉利海峡一次伴随 Eh 赤潮消亡过程中,病毒的出现与浮游植物群落演替之间存在一定的相关性,因次,推测 Eh 被病毒感染对这一演替过程起到协助作用(Wilson *et al.*, 2002)。

另外,DNA 聚合酶(*pol*)基因已被用于藻类双链 DNA 病毒多样性的分析,但基于 DNA 聚合酶基因片段的系统发生学分析结果显示,不同海域分离的 EhV 病毒株之间相似度非常高;而基于病毒 MCP 基因片段的系统发生学分析发现,不同 EhV 分离株之间却存在很大差异(Schroeder *et al.*, 2002)。由此可见,在 EhV 中,似乎 DNA 聚合酶(*pol*)基因比 MCP 基因在进化上更为保守。同时,已发现 MCP 基因中某些碱基的变化与宿主藻系的不同之间存在相关性(Schroeder *et al.*, 2002),因此,MCP 可以作为病毒多样性分析的一个很好的标志。鉴于 EhV MCP 基因的多态性及其在进化过程中复杂的变异性,MCP 可以作为一种新的分子诊断标记,通过分析自然群落中 EhV 病毒的多态性,对于理解这类病毒与宿主之间复杂的相互作用关系无疑是一个十分有价值的工具。同时,MCP 也可以作为一种区分自然海域中藻类双链 DNA 病毒的不同基因型和种属之间进化推论的工具。

在自然海域中病毒感染是调节微藻种群密度恒定的主要因素之一(Brussaard, 2004),由病毒介导的宿主死亡不仅可影响藻类物种的种间演替,也可能影响种内演替、藻类群落的丰度及多样性等。已确认病毒在微藻赤潮消亡过程中起着关键作用,但病毒控制自然界微藻种群的程度如何尚不清楚。在已有的研究基础上推测:病毒可能通过限制尚处于低丰度的藻类种群数量的增加来控制宿主种群密度;而对于那些种群密度已达高峰并具有潜在的崩溃危机的宿主种群进行加速降低,通过减少高丰度的宿主数量,有利于加速减少原本就是高丰度的、并且有密

度潜在危险的宿主种群(Bratbak *et al*, 1993; Brussaard, 2004; Brussaard *et al*, 2007)。病毒的裂解无疑可以导致微藻种群的死亡和数量减少, 但由于缺乏用于病毒诱导的宿主死亡率测定的可靠方法, 有关自然水域中病毒对微藻裂解率的报道很少。同时, 对自然界微藻细胞总裂解率的估计也存在较大的时空差异。目前, 就病毒对宿主的感染率及其导致微藻死亡率的各种计算方法都存在不同程度的缺陷, 如以被感染细胞出现的频率为基础评估病毒介导的死亡率, 这种方法最直接而且不需要对样品进行培养, 但电镜的制样和观察过程仍比较繁琐。本研究结果进一步表明, EhV 不同株系之间的 MCP 在氨基酸序列上具有高的同源性, 根据 EhV MCP 氨基酸保守区结构域的高度同源性及其与其它藻类双链 DNA 病毒 MCP 的较大差异等特点, 通过表达 MCP 建立血清学方法, 将为检测自然海域中 EhV 的存在、估计其对宿主的感染率、裂解及致死情况, 为快速、准确评价病毒感染对宿主种群变动的的影响提供新的方法, 也为进一步揭示海洋病毒在赤潮形成、发展和消亡过程中的作用机制奠定基础。

参 考 文 献

- Sambrook J, Russell D W 著, 2001. 黄培堂译, 2002. 分子克隆实验指南(第三版)(上、下册). 北京: 科学出版社, 1—96
- Allen M J, Martinez M J, Schroeder D C *et al*, 2007. Use of microarrays to assess viral diversity: from genotype to phenotype. *Environ Microbiol*, 9(4): 971—982
- Baudoux A C, Brussaard C P D, 2005. Characterization of different viruses infecting the marine harmful algal bloom species *Phaeocystis globosa*. *Virology*, 34 (1): 80—90
- Bergh O, BØrsheim K Y, Bratbak G *et al*, 1989. High abundance of viruses found in aquatic environments. *Nature*, 340: 467—468
- Bratbak G, Egge J K, Heldal M, 1993. Viral mortality of the marine alga *Emiliana huxleyi* (Haptophyceae) and termination of algal blooms. *Mar Ecol Prog Ser*, 93: 39—48
- Bratbak G, Wilson W, Heldal M, 1996. Viral control of *Emiliana huxleyi* blooms? *J Mar Syst*, 9: 75—81
- Brussaard C P D, 2004. Viral control of phytoplankton populations—a review. *J Eukaryot Microbiol*, 51(2): 125—138
- Brussaard C P D, Bratbak G, Baudoux A C *et al*, 2007. Phaeocystis and its interaction with viruses. *Biochemistry*, 83: 201—215
- Brussaard C P D, Rob S K, Kop A J *et al*, 1996. Virus-like particles in a summer bloom of *Emiliana huxleyi* in the North Sea. *Aquat Microb Ecol*, 10(2): 105—113
- Castberg T, Thyrrhaug R, Larsen A *et al*, 2002. Isolation and characterization of a virus that infects *Emiliana huxleyi* (Haptophyta). *J Phycol*, 38: 767—774
- Fuhrman J A, 1999. Marine viruses and their biogeochemical and ecological effects. *Nature*, 399: 541—548
- Hamilton G, 2006. The gene weavers. *Nature (London)*, 441: 683—685
- Larsen J B, Larsen A, Bratbak G *et al*, 2008. Phylogenetic analysis of members of the phycodnaviridae virus family, using amplified fragments of the major capsid protein gene. *Appl Environ Microbiol*, 74(10): 3048—3057
- Lawrence J E, 2008. Furtive foes: algal viruses as potential invaders. *J Mar Sci*, 65: 716—722
- Malin G, Wilson W H, Bratbak G *et al*, 1998. Elevated production of dimethylsulfide resulting from viral infection of cultures of *Phaeocystis pouchetii*. *Limnol Oceanogr*, 43: 1389—1393
- Proctor L M, Fuhrman J A, 1990. Viral mortality of marine bacteria and cyanobacteria. *Nature*, 343: 60—62
- Schroeder D C, Oke J, Malin G *et al*, 2002. *Coccolithovirus* (Phycodnaviridae): Characterisation of a new large dsDNA algal virus that infects *Emiliana huxleyi*. *Arch Virol*, 147: 1685—1698
- Suttle C A, 2005. Viruses in the sea. *Nature*, 437: 356—361
- William H W, Schroeder D C, Michael J A *et al*, 2005. Transcription profile of a *Coccolithovirus* complete genome sequence and lytic phase. *Science*, 309: 1090—1092
- Wilson W H, Tarran G A, Zubkov M V, 2002. Virus dynamics in a *Coccolithophore* dominated bloom in the North Sea. *Deep-Sea Res Pt II*, 49(15): 2951—2963

CLONE AND SEQUENCE OF MAJOR CAPSID PROTEIN IN COCCOLITHOPHORID *EMILIANA HUXLEYI* VIRUS

ZHANG Zhi-Lan¹, LIU Jing-Wen¹, DONG Shuang-Lin², SU Guo-Cheng¹, ZHANG Yan-Feng¹

(1. College of Bio-Engineering, Jimei University, Xiamen, 361021; 2. The Key Laboratory of Mariculture,
Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao, 266003)

Abstract A stable in culture system of *Emiliana huxleyi* (Eh) host-*Emiliana huxleyi*-specific virus (EhV-99B1 strain) was developed, in which lysed cultures were passed sequentially through 0.45 μm and 0.2 μm filters for removing large cellular debris. The virus filtrates were concentrated by tangential flow ultrafiltration with a 50kMW size cut-off unit (Prep/Scale TFF-1, PTQK50, Millipore) to a final volume of 20—50ml; and the viral particles were then purified with CsCl density gradient centrifugation. Partial EhV gene fragment of major capsid protein (MCP) in about 300bp was cloned from EhV-99B1 strain by PCR using a pair of specific primers designed from conserved region of the MCP genes of *Coccolithovirus*. The PCR product was cloned into pBS-T vector and the linked DNA was transformed into *Escherichia coli* DH5 α . The positive clones were sequenced and analyzed. The results show high identification between the EhV 163 (AF453851) virus isolate and the clone in 100% homology of both nucleotide and deduced amino acid sequences for MCP, which indicates that the cloned fragment is highly identical with known *Coccolithovirus* MCP genes. However, low identification was between the EhV 203 (AF453855) virus isolate and the clone, in 93% of the nucleotide homology and 100% deduced amino acid sequences for MCP, which indicates that the MCP gene of EhV strains has some polymorphism and exists much complexity in evolutionary relationship. Therefore, the major capsid protein (MCP) could be used as a new genetic tool to differentiate viral genotypes in natural communities. In addition, MCP as a diagnostic marker for *E. huxleyi*-specific viruses will be an important tool to study complex interaction between some EhV and their hosts.

Key words *Emiliana huxleyi* virus (EhV), Major capsid protein (MCP), Gene clone and sequence analysis