

一株海洋牟勒氏角毛藻(*Chaetoceros muelleri*) 病毒的分离与初步鉴定*

吴庆喜^{1,2} 程 凯² 杨季芳¹ 陈吉刚¹ 赵以军² 许 敏²

(1. 浙江万里学院 宁波市微生物与环境工程重点实验室 宁波 315100; 2. 华中师范大学
城市水环境生态学湖北省重点实验室 武汉 430079)

提要 以海洋赤潮藻为材料,从宁波市象山港附近海域采取水样,经反冲超滤法对水样进行浓缩处理后,用其对培养的赤潮藻细胞进行感染,分离到了一株能裂解牟勒氏角毛藻的病毒,经反复的液体感染,建立了稳定的藻病毒-宿主藻系统,命名为牟勒氏角毛藻病毒。该病毒具有很强的感染力,稀释 10^8 倍以后仍然具有明显的感染效果。病毒纯化后,电镜观察显示此株病毒为球形多面体结构,直径约为 58nm;电镜切片观察显示,感染后的藻细胞中充满了大量的游离的和组装好尚未释放的病毒粒子。经宿主范围鉴定,此株病毒具有严格的宿主专一性。通过分子生物学初步鉴定,其基因组大小约为 23kb。此株病毒尚未有报道,是一种新发现的海洋藻类病毒,具有进一步研究的价值。

关键词 牟勒氏角毛藻,病毒,分离,鉴定

中图分类号 Q939.46

近年来,赤潮的频繁爆发已经造成了养殖鱼类和海洋动物的大量死亡与中毒现象,对海洋渔业造成了巨大损失(王丹等, 2005);甲藻和硅藻是引起赤潮的主要藻种,同时硅藻也是海水养殖中的优质育种饵料(梁妍等, 2008)。牟勒氏角毛藻作为一种广温、广盐性的海洋浮游硅藻(林丽芬, 2006),对海洋经济和海洋生态环境意义重大。如何减少和控制浮游植物的生长,解决赤潮事件,成为人们当前所遇到的一大难题(Imai *et al.*, 1998)。藻类病毒可能对藻类的生长起到一定的控制作用,已有研究证实,病毒能导致有害赤潮藻类细胞的裂解死亡(Suttle *et al.*, 1990)。藻类病毒作为一种新型的控藻因子,越来越引起了人们的关注。

迄今为止,人们已经研究发现真核藻类细胞中普遍存在有大量的病毒类粒子(Van Etten *et al.*, 1991)。已有研究发现,在赤潮消亡期的藻类细胞中发现了病毒粒子,如赫胥黎藻(*Emiliania huxleyi*)、赤潮异弯藻(*Heterosigma akashiwo*)、金球藻(*Aureococcus*

anophagefferens)和普氏棕囊藻(*Phaeocystis pouchetii*)等,这些病毒粒子会大量感染藻类细胞导致其裂解死亡,从而终止藻类细胞的生长和繁殖(Nagasaki *et al.*, 1994a, b; Milligan *et al.*, 1994)。

因此,藻类病毒作为水体中初级生产力的主要控制者,应用于生物防治赤潮的潜力巨大。在大量相关研究的基础上,本文研究利用藻类病毒来控制藻类生长的生物学方法,以期通过藻类病毒或病毒与其他生物相结合的方法来控制藻类引起的赤潮。

1 材料与方法

1.1 赤潮藻种与培养条件

选取 12 种容易引发赤潮或海洋中的优势藻种,培养所用的光照强度为 2000 lx,光暗比 12:12,其他培养条件如表 1 所示。

1.2 藻病毒的分离

1.2.1 采样 2008 年 6 月 4 日从浙江省宁波市宁海县桥头胡镇桥头胡、强蛟镇码头用有机玻璃采水器

* 国家海洋公益性行业科研专项, 200705014 号; 浙江省海洋与渔业局项目, 浙海渔计(2009)214 号。吴庆喜, E-mail: qxwu126@yahoo.com.cn

通讯作者: 程 凯, 博士, E-mail: chengkaicn@163.com; 杨季芳, 研究员, E-mail: jfkwqlq@163.com

收稿日期: 2010-04-20, 收修改稿日期: 2010-07-15

表 1 赤潮藻种与培养条件
Tab.1 Red tide algae and culture conditions

门	属	种	编号	培养温度(°C)	培养基
甲藻	原甲藻	利玛原甲藻 ^a	无	22	f/2
		东海原甲藻 ^c	无	22	f/2
		海洋原甲藻 ^c	无	22	f/2
		微小原甲藻 ^b	1058	22	f/2
		共生甲藻 ^a	无	22	f/2
	亚历山大藻	链状亚历山大藻 ^a	无	22	f/2
		塔玛亚历山大藻 ^c	无	22	f/2
	斯克里普藻	锥状斯克里普藻 ^c	无	22	f/2
硅藻	骨条藻	中肋骨条藻 ^b	1115	22	f/2
	角毛藻	牟勒氏角毛藻 ^b	862	20	851
黄藻	卡盾藻	海洋卡盾藻 ^c	无	22	f/2
	异弯藻	赤潮异弯藻 ^a	无	22	f/2

注: a. 由中国海洋大学提供; b. 由中国科学院水生生物研究所提供; c. 由暨南大学提供

各采样 10L, 玻璃瓶冰浴保存, 回实验室后立即处理。

1.2.2 切向流超滤浓缩 取回水样经 Sartorius 系列 SARTOBRAN P Sterile Capsule 微孔膜包预过滤后, 用 Sartorius 系列 SARTOCON Slice Cassette 膜包进行超滤浓缩(罗文清等, 2003), 按 100:1 体积比浓缩, 最终获取约 100ml 浓缩病毒液, 整个过程在冰浴中进行。

1.2.3 液体感染 取静置培养 2 周左右的新鲜海洋藻培养液, 藻细胞浓度约为 $(1-2) \times 10^8$ cells/ml, 与上述浓缩病毒液按体积比 2:1 感染, 设置 3 管平行和 1 管对照, 置光照培养箱静置培养, 摇匀观察; 如有感染现象重复感染 5 次以上至稳定感染。

1.3 牟勒氏角毛藻病毒的纯化

病毒经五轮纯化后液体感染, 用最大或然数法(Ortmann *et al*, 2002)(Most-Probable-Number, MPN)测效价大于 10^8 个/ml; 扩增病毒感染液约 300ml, 加 1mg/ml 的粗制 DNAase 酶和 RNAase 酶各 300 μ l, 室温静置 30min 酶解(Sambrook *et al*, 2001); 加氯化钠至终浓度为 1mol/L, 溶解后 4°C, 10000g (Beckman JA30.50 角转头)高速离心 30min, 弃藻细胞; 取上清液, 转置超速离心管中, 4°C, 100000g (Beckman JS-24.38 水平转头)超速离心 3.5h; 弃上清留沉淀, 用 PBS 缓冲液悬浮沉淀, 4°C 冰箱保存备用。

按照一般蔗糖密度梯度制备方法(Sambrook *et al*, 2001), 分别配制 4 种浓度梯度的蔗糖溶液: 30%、40%、50%和 60%, 分别用针取 1.3ml 置于 5ml 的超速离心管中, 4°C 冰箱静置过夜分层; 取 250—270 μ l

的浓缩病毒液于 5ml 蔗糖梯度的离心管中至满; 4°C, 44000r/min (Beckman optimaTM MAX and MAX-E, MLS-50rotor)超速离心 2h; 分层(一般分上下 2 层, 约管 2/3 处), 用针取出分别置于另外 2 个干净的 5ml 离心管中, 分别加入 PBS 缓冲液至满, 4°C, 44000r/min (Beckman optimaTM MAX and MAX-E, MLS-50rotor)超速离心 2h 脱糖, 弃上清, 用 2ml 的 PBS 缓冲液洗脱沉淀, -20°C 冰箱中保存备用。

1.4 牟勒氏角毛藻病毒的电镜观察

将经过蔗糖密度梯度离心纯化后高浓度的病毒液, 经磷酸钨负染, 在 HITACH7000-FA 型号的透射电镜下观察病毒颗粒形态。同时按体积比 1:4 接种病毒后, 从第 3 天开始每隔 8h 取样 1 次, 共取样 5 次, 经高速度离心后, 收集沉淀, 用 2.5%的戊二醛固定后制备切片, 并在 FEI Tecnai G2 20 TWIN 型号的电镜下观察宿主被感染的过程中的超微结构变化。

1.5 牟勒氏角毛藻病毒的核酸分析

取上述经蔗糖密度梯度离心纯化后高浓度的病毒液, 按常规的酚/氯仿/异戊醇抽提方法提取核酸, 然后保存在含有 RNA 酶的 0.1 \times Tris-EDTA 溶液中(Sambrook *et al*, 2001); 取适量核酸用 0.6%的琼脂糖凝胶电泳检测, 用 BIO-RAD 系统进行成像及分子量的估算。

1.6 牟勒氏角毛藻病毒的宿主范围鉴定

取经蔗糖密度梯度离心纯化以后的牟勒氏角毛藻病毒的新鲜感染液, 4°C, 10000g, 高速离心 30min, 去除藻细胞及碎片, 弃沉淀取上清, 分别对上述 12 种生长至对数期的赤潮藻进行再感染试验, 按体积

比病毒液 藻细胞液 = 1 2 接种感染, 3 管平行 1 管对照, 摇匀后置光照培养箱中培养观察, 重复试验 3 次。

2 结果与分析

2.1 牟勒氏角毛藻病毒的分离与纯化

经反复的液体感染后, 在宁海桥头胡和强蛟镇码头等附近海域均分离得到了一株能稳定感染牟勒氏角毛藻的病毒, 经最大或然数法纯化感染显示, 此株病毒的最大稀释感染倍数为 10^8 , 且感染稳定, 效果明显。

2.2 牟勒氏角毛藻病毒的电子显微镜观察

经磷钨酸负染后的电镜照片与藻细胞电镜切片照片分析显示(图 1), 此株病毒为球形, 二十面体结构, 直径约为 58nm, 与国外已经分离报道的硅藻门麦尼埃角毛藻病毒(*Chaetoceros tenuissimus meunier* Virus) (Yoko *et al*, 2008)和刚毛根管藻病毒(*Diatom rhizosolenia setigera* virus) (Nagasaki *et al*, 2004)在形态上具有一定的相似性。

2.3 牟勒氏角毛藻病毒的基因组估测

纯化的牟勒氏角毛藻病毒反复抽提核酸后, 用 0.6% 的琼脂糖凝胶电泳检测经 BIO-RAD 系统成像后分析得出病毒的基因组大小约为 23kb, 如图 2 所示。

2.4 牟勒氏角毛藻病毒的宿主范围鉴定

经牟勒氏角毛藻病毒与其他 11 株海洋真核藻的重复感染试验可以看出, 此株病毒具有严格的宿主专一性, 只对牟勒氏角毛藻细胞具有感染性, 对其它藻细胞均无感染性, 其宿主藻隶属于硅藻门、中心硅藻纲、盒形藻目、角毛藻科, 暖水性海洋硅藻类, 在我国南北沿海均有分布。

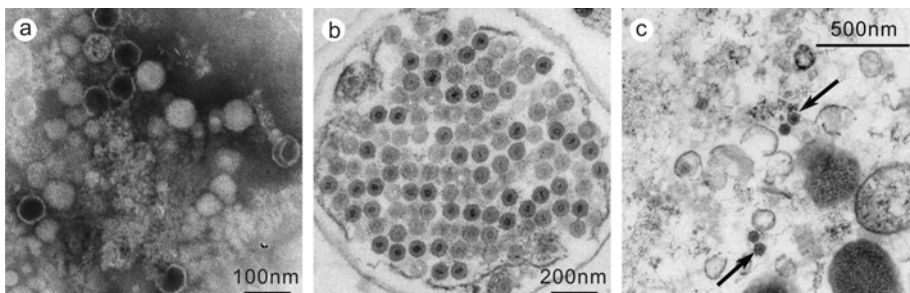


图 1 牟勒氏角毛藻病毒的负染照片与电镜切片

Fig.1 The phosphotungstic acid negative staining and electron microscopic sectioning of *C. muelleri* virus

a. 病毒颗粒(磷钨酸负染); b. 组装好但未释放的病毒颗粒切片; c. 游离于细胞外的病毒颗粒切片

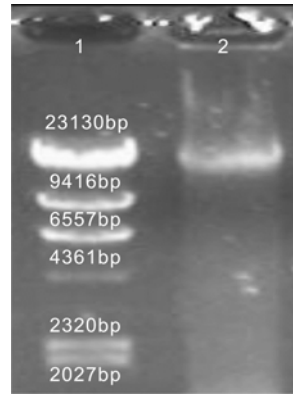


图 2 牟勒氏角毛藻病毒的基因组大小检测照片

Fig.2 The electrophoresis detection analysis of the nucleic acid of *C. muelleri* virus
注: 条带 1 为 λ Hind digest Marker; 条带 2 为抽提的病毒核酸

对牟勒氏角毛藻具有同样的感染效果, 说明此病毒在该片海域是普遍存在的。同时, 经最大或然数法纯化感染可知, 此病毒具有很强的感染能力, 稀释 10^8 倍以后仍然具有明显的感染效果。

牟勒氏角毛藻是一种广温、广盐性的海洋浮游硅藻(林丽芬, 2006), 是海水养殖中的优质育种饵料(梁妍等, 2008)。在我国沿海贝类的饵料中, 硅藻占首要地位。因此海洋浮游硅藻的数量会直接影响海洋经济动物产量的高低。同时, 吕华庆等(2009)研究已证实, 象山港附近海域的氮、磷污染与日俱增, 如果海洋或养殖区等环境受到富营养化等污染, 常常会造成硅藻等的过度繁殖, 从而引起水污染, 对海洋生态系统和养殖业造成巨大危害。

近年来, 赤潮呈现频发态势(Zhou *et al*, 2001), 已严重威胁海洋经济发展和社会安定, 如何治理尤为迫切(杨小茹等, 2005)。Bratbak 等(1993)研究表明, 病毒在由海洋赫胥黎藻(*Emiliania huxleyi*)引起的赤潮的消亡中起着重要作用, 因此认为藻病毒是赤潮的主要控制因子。早在 1999 年, Nagasaki 等(1999)就初步探讨了利用异弯藻(*Heterosigma akashiwo*)病毒 HaV01 来治理异弯藻赤潮的

3 讨论

此株牟勒氏角毛藻病毒目前在世界上尚未有报道, 是一种新发现的真核海洋藻类病毒, 与 Yoko 等(2008)所分离的麦尼埃角毛藻病毒以及其它藻类病毒在形态上具有一定的相似性, 即大都为球形多面体结构; 但在病毒粒子的直径和基因组大小上又具有明显差异, 详见表 2。

此株病毒在宁海桥头胡和强蛟镇码头等附近海域均分离得到, 并

表 2 部分已分离的海洋真核藻类病毒对比表
Tab.2 The comparison of some of the Eukaryotic algae virus isolated from the sea

病毒株	病毒大小(nm)	病毒基因组大小(kb)	病毒形态	参考文献
本文中分离的牟勒氏角毛藻病毒(<i>Chaetoceros muelleri</i> Virus)	58	23	球形多面体结构	
麦尼埃角毛藻病毒(<i>Chaetoceros tenuissimus meunier</i> Virus)	31	4.3/8.9	二十面体结构	Yoko <i>et al</i> , 2008
刚毛根管藻病毒(<i>Diatom rhizosolenia setigera</i> Virus)	32	11.2	二十面体结构	Nagasaki <i>et al</i> , 2004
赤潮异弯藻病毒(<i>Heterosigma akashiwo</i> Virus)	25	9.1	球形多面体结构	Tai <i>et al</i> , 2003
赫胥黎藻病毒(<i>Emiliania huxleyi</i> Virus)	170—200	410	二十面体结构	Schroeder <i>et al</i> , 2002
刺猜金色藻病毒(<i>Chrysochromulina ericina</i> virus)	160	510	球形多面体结构	Sandaa <i>et al</i> , 2001
普氏棕囊藻病毒(<i>Phagocystis pouchetii</i> Virus)	130—160	485	球形多面体结构	Jacobsen <i>et al</i> , 1996

可能性, 该研究初步表明, 从理论上来说, HaV01 是控制赤潮异弯藻的一个很有前景的微生物制剂。

因此, 如果想寻求病毒治理赤潮的新方法, 藻类病毒的分离工作显得尤为重要。作者期望通过此株牟勒氏角毛藻溶藻病毒的研究, 初步探索治理赤潮或藻类饵料病害的新方法。

参 考 文 献

- 王丹, 孙军, 汪岷等, 2005. 海洋浮游植物病毒的研究进展. 海洋科学进展, 23(1): 108—111
- 吕华庆, 常抗美, 石钢德, 2009. 象山港氮、磷营养盐环流和分布规律的研究. 海洋与湖沼, 40(2): 138—144
- 杨小茹, 郑天凌, 苏建强等, 2005. 海洋病毒——一种新的、潜力巨大的赤潮防治工具. 应用与环境生物学报, 11(5): 651—656
- 林丽芬, 2006. 牟氏角毛藻培养技术要点. 水产养殖, 27(2): 28
- 罗文清, 鞠川, 程凯等, 2003. 一种浓缩噬藻体的反冲超滤技术. 中国病毒学, 18(4): 397—400
- 梁妍, 邹宁, 潘曰磊, 2008. 角毛藻培养研究进展. 生命科学仪器, 6: 25—27
- 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, 45—193
- Bratbak G, Egge J K, Heldal M, 1993. Viral mortality of the marine alga *Emiliania huxleyi* (Haptophyceae) and termination of algal blooms. Mar Ecol Prog Ser, (83): 273—280
- Imai I, Muchan K, Nagasaki K *et al*, 1998. Detection and enumeration of microorganisms that are lethal to harmful phytoplankton in coastal waters. Plankton Biol Ecol, 45(1): 19—29
- Jacobsen A, Bratbak G, Heldal M, 1996. Isolation and characterization of a virus infecting *Phaeocystis pouchetii* (Prymnesiophyceae). J Phycol, 32: 923—927
- Milligan K L D, Cospser E M, 1994. Isolation of Virus Capable of Lysing the Brown Tide Microalga, *Aureococcus anophagefferens*. Science, 266: 805—807
- Nagasaki K, Ando M, Imai I *et al*, 1994a. Virus-like particles in *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae): A possible red tide disintegration mechanism. Mar Biol, 119: 307—312
- Nagasaki K, Ando M, Itakura S *et al*, 1994b. Viral mortality in the final stage of *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae) red tide. J Plankton Res, 16: 1595—1599
- Nagasaki K, Tarutani K, Yamaguchi M, 1999. Growth characteristics of *Heterosigma akashiwo* virus and its possible use as a microbiological agent for red tide control. Appl Environ Microbiol, 65: 898—902
- Nagasaki K, Tomaru Y, Katanozaka N *et al*, 2004. Isolation and Characterization of a Novel Single-Stranded RNA Virus Infecting the Bloom-Forming Diatom *Rhizosolenia setigera*. Applied and Environmental Microbiology, 70(2): 704—711
- Ortmann A C, Lawrence J E, Suttle C A, 2002. Lysogeny and lytic viral production during a bloom of the cyanobacterium *Synechococcus* spp. Microb Ecol, 43: 225—231
- Sandaa R A, Heldal M, Castberg T *et al*, 2001. Isolation and characterization of two viruses with large genome size infecting *Chrysochromulina ericina* (Prymnesiophyceae) and *Pyramimonas orientalis* (Prasinophyceae). Virology, 290: 272—280
- Schroeder D C, Oke J, Malin G *et al*, 2002. Coccolithovirus (Phycodnaviridae): Characterisation of a new large dsDNA algal virus that infects *Emiliania huxleyi*. Arch Virol, 147: 1685—1698
- Suttle C A, Chan A M, Cottrell M T, 1990. Infection of phytoplankton by viruses and reduction of primary production. Nature, 347: 467—469
- Tai V, Lawrence J E, Lang A S *et al*, 2003. Characterization of HaRNAV, a single-stranded RNA virus causing lysis of *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae). J Phycol, 39: 343—352
- Van Etten J L, Lane L C, Meints R H, 1991. Viruses and viruslike particles of eukaryotic algae. Microbiol Rev, 55: 586—620
- Yoko Shirai, Yuji Tomaru, Yoshitake Takao *et al*, 2008. Isolation and Characterization of a Single-Stranded RNA Virus Infecting the Marine Planktonic *Diatom chaetoceros tenuissimus* Meunier. Applied and Environmental Microbiology, 74(13): 4022—4027
- Zhou M J (周名江), Zhu M Y (朱明远), Zhang J (张经), 2001. Status of harmful algal blooms and related research activities in China. Chin Bull Life Sci (生命科学), 13(2): 54—60

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF A MARINE *CHAETOCEROS MUELLERI* VIRUS

WU Qing-Xi^{1,2}, CHENG Kai², YANG Ji-Fang¹, CHEN Ji-Gang¹,
ZHAO Yi-Jun², XU Min²

(1. Municipal Key Laboratory of Microorganism and Environmental Engineering, Zhejiang Wanli University, Ningbo, 315100;
2. Hubei Key Laboratory of Urban Environmental Ecology, Central China Normal University, Wuhan, 430079)

Abstract Water from Xiangshan harbor and the East China Sea were collected and concentrated by backflushing ultrafiltration, and then were used as infecting medium for growing marine red-tide algae as host. A novel virus named *Chaetoceros muelleri* virus was found that lysed *C. muelleri*. The virus was isolated by repeated liquid infection and a stable Phycoviruses-Host system of algae was established. Infection via Most-Probable-Number analysis revealed that the virus had a strong infectious power; it was found significantly infectious even after 108-fold dilution. The virus was purified through saccharose gradient ultracentrifugation. Phosphotungstic acid negative staining analysis revealed the viral capsid of *C. muelleri* virus had a distinct icosahedral shape with a diameter of 58nm. Electron microscopic section revealed that there were many free particles and some assembled viral particles ready to be released in the infected algae cells. Identification of the host range confirmed that the virus had a strict host specificity for *C. muelleri* cells but not others. This novel *C. muelleri* virus genome is about 23kb through molecular characterization. No known report for this virus, it is a novel marine phycovirus worthy to be studied.

Key words *Chaetoceros muelleri*, Virus, Isolation, Characterization