

田雪, 蔡伟聪, 苏金净, 等. 病毒感染海洋球石藻 *Emiliana huxleyi* 的转录组分析[J]. 海洋学报, 2019, 41(12): 103–112, doi:10.3969/j.issn.0253-4193.2019.12.010

Tian Xue, Cai Weicong, Su Jinjing, et al. Transcriptome analysis of marine microalga *Emiliana huxleyi* in response to virus infection[J]. Haiyang Xuebao, 2019, 41(12): 103–112, doi:10.3969/j.issn.0253-4193.2019.12.010

病毒感染海洋球石藻 *Emiliana huxleyi* 的转录组分析

田雪^{1,2}, 蔡伟聪^{1,2}, 苏金净^{1,2}, 吴书燕^{1,2}, 刘静雯^{1,2*}

(1. 集美大学 食品与生物工程学院, 福建 厦门 361021; 2. 福建省食品微生物与酶工程重点实验室, 福建 厦门 361021)

摘要: 海洋球石藻 *Emiliana huxleyi* 及其特异性裂解病毒 *E. huxleyi* virus (EhVs) 在调节海洋碳、硫循环及全球气候变化中起着重要作用, 也是开展真核生物病毒-宿主相互作用研究的良好模型系统之一。为了探究病毒感染条件下 *E. huxleyi* 基因表达水平的变化, 以海洋球石藻 *E. huxleyi*-BOF 92 及其专一性裂解病毒 EhV-99B1 为研究对象, 利用 Illumina HiSeq 2000 高通量测序技术, 分别对 *E. huxleyi* 病毒感染组 (Exp) 和非感染对照组 (Con) 6 h 和 45 h 的藻细胞样品进行转录组测序分析。共得到 32 909 条平均长度为 1 153 bp 的基因。病毒感染 6 h 和 45 h 分别得到 2 617 和 5 229 个差异表达基因, 其中共差异表达基因 465 个。随机选取 10 条差异表达基因, 采用 qRT-PCR 进行实验验证, 结果证实转录组分析可靠。GO 功能注释和 KEGG 通路富集, 发现大量基因与氧化应激反应、脂类代谢、碳水化合物代谢及信号转导等代谢过程相关, 其中变化最显著的是谷胱甘肽代谢途径。从病毒感染球石藻转录组中筛选出部分与氧化应激反应相关的基因, 其中 9 个基因显著上调, 11 个基因显著下调, 表明宿主能够通过体内的氧化应激反应响应病毒胁迫。

关键词: 海洋球石藻 *Emiliana huxleyi*; 病毒感染; 转录组; 差异表达基因; qRT-PCR; 氧化应激反应

中图分类号: Q78

文献标志码: A

文章编号: 0253-4193(2019)12-0103-10

1 引言

海洋球石藻 (Coccolithophores) 是一种全球广泛分布且具有重要生态功能的真核微型浮游植物, 其中赫氏圆石藻 (*Emiliana huxleyi*) 是球石藻中最为重要, 也是迄今研究最多的一种, 几乎每年都在大洋中形成大面积赤潮^[1-2]。*E. huxleyi* 因其可以产生由碳酸钙构成的“球石粒”及高产二甲基巯基丙酸内盐 (dimethylsulfoniopropionate, DMSP) 的能力, 在海洋碳、硫生物地化循环中具有重要作用^[3-5]。自然海域中, 某些株系的 *E. huxleyi* 能够被特异性病毒 (*E. huxleyi* virus, EhVs) 感染, 并通过诱导宿主细胞凋亡及自噬 (即细胞程序性

死亡, Programmed Cell Death, PCD) 控制赤潮消亡及宿主的种群动力学过程^[6-8]。因此, *E. huxleyi* 已成为当今研究海洋碳、硫生物地化循环及气候变化的一个关键物种, 而且由于该藻赤潮的瓦解有赖于病毒感染而更显重要。

EhVs 是一种大型核质双链 DNA 病毒, 属于球石藻病毒属 (*Coccolithoviruses*)。目前分离到的大部分病毒株系为裂解性病毒, 其基因组大小为 320~407 kb^[9-11]。该病毒与宿主之间具有高度的特异性, 即一株病毒只专一地感染一个宿主株系, 这种藻类病毒宿主范围的高度特异性对浮游植物多样性和种群结构具有很大影响, 改变着我们对微藻种群动力学过程

收稿日期: 2018-12-19; 修订日期: 2019-05-30。

基金项目: 国家自然科学基金项目 (41576166); 福建省自然科学基金项目 (2019J01696)。

作者简介: 田雪 (1992—), 女, 河南省南阳市人, 主要从事海洋微生物生化与分子生物学研究。E-mail: yxtx1216@126.com

* 通信作者: 刘静雯, 教授, 主要从事海洋微型生物分子生物学研究。E-mail: ljwsbch@163.com; jwliu@jmu.edu.cn

的认识。因此, *E. huxleyi*-EhV 相互作用是决定海洋碳命运的一个主要因素, 并在重塑海洋生物群落结构、全球生态系统物质循环及地质演变中占据重要地位。随着对该病毒-宿主复杂的基因组结构、基因间水平转移现象以及病毒和宿主丰富的遗传多样性特点等的逐渐认识, *E. huxleyi*-EhV 已成为研究真核生物宿主-病毒相互作用关系的关键模式系统^[11-13]。但迄今为止, 对其相互作用机制尚不十分清楚, 不能在分子水平上系统阐释病毒-藻类宿主的互作机制。

近年来, 随着各种组学和系统生物学的兴起, 为揭示病毒-宿主互作网络关系提供了有力的实验和理论工具。Kegel 等^[14] 利用表达序列标签(EST)结合微阵列法, 分析 EhV-86 感染海洋球石藻 *E. huxleyi*-CCMP 1516 后基因差异表达情况, 发现病毒感染对宿主光合作用、转录与翻译、信号转导、新陈代谢(特别是脂质代谢和糖酵解)等多种生物过程产生明显影响。随后的研究表明病毒感染抑制宿主光系统 II 的功能, 叶绿体结构受损、光合效率显著下降^[15]。采用 RNA-seq 高通量测序技术结合代谢组学比较 EhV-201 感染 *E. huxleyi*-CCMP 2090 后早期(1 h)和中期(24 h)宿主和病毒转录组差异表达情况, 发现 EhV 感染重构了宿主靶向脂肪酸合成的转录组以支持病毒组装, 如感染早期脂肪酸合酶(Fatty Acid Synthase, FAs)显著上调并伴随多数游离脂肪酸(C8-C16 脂肪酸)水平升高^[16]。有趣的是, 对 EhV-86 和 *E. huxleyi*-CCMP 1516 全基因组测序注释发现, 在共进化过程中, EhV 通过基因水平转移从宿主基因组中“劫获”了一组鞘脂类从头生物合成途径(Sphingolipid Biosynthesis Pathway, SBP)中的关键酶基因, 这些基因从未在任何其他病毒基因组中发现^[10]。在感染过程中 EhV 通过表达这些鞘脂代谢相关酶在一定程度上掌控了宿主鞘脂代谢途径, 合成病毒特有的新型鞘糖脂(Virus Glycosphingolipid, vGSL)^[17-18], 这些 vGSL 似乎被定位在膜质“脂筏”区域作为病毒出入宿主细胞的门户^[19]。另外, vGSL 还能作为一种脂质信号分子严格控制 EhV 的产生和宿主的胞内应答, 诱发自由基(Reactive Oxygen Species, ROS)^[20]及 NO^[21]的产生, 进而诱导宿主 PCD 过程^[22-24]。病毒诱导的氧化胁迫导致宿主细胞裂解死亡, 这一过程加剧了对海洋碳、硫生物地化循环的影响。尽管 *E. huxleyi*-EhV 相互作用过程在调节海洋碳、硫生物地化循环及全球气候变化过程中具有举足轻重的作用。但目前我们对调控 EhV 感染的细胞、生化和分子过程的了解仍十分有限。本文以海洋球石藻 *E. huxleyi*-BOF 92 及其特异

性裂解病毒 EhV-99B1 为研究对象, 利用 Illumina HiSeq 2000 高通量测序技术分析 EhV 感染的转录组差异表达特点, 从中挖掘关键基因及其调控途径, 深度解析海洋球石藻与病毒之间的互作关系特别是 EhV 感染诱导的细胞胁迫应答反应, 了解 *E. huxleyi*-EhV 在激烈的互利共生和敌对(Jekyll-and-Hyde)“双重”关系相互转化过程中的共进化意义。

2 材料与方法

2.1 微藻的培养

本研究所用的海洋球石藻株系 *Emiliania huxleyi*-BOF 92 及其特异性裂解病毒株系 *E. huxleyi* virus-99B1 均由挪威卑尔根大学生物系微生物研究所 Gunnar Bratbak 教授赠送并保存于作者的实验室。球石藻的培养采用 70% 海水配制 *f*/2-Si 加富培养基, 光照强度为 40~50 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 、温度(16±1)℃、光周期为 14:10(光:暗)。

2.2 病毒制备、感染及样品收集

将海洋球石藻接种于 2 L 的 *f*/2-Si 加富培养基中培养至指数生长期, 加入适量 EhV-99B1 病毒超滤液, 继续培养直至藻细胞彻底裂解, 培养物变得澄清(约 7~10 d 左右), 于 8 000 r/min 离心去除细胞碎片(4℃, 5 min), 上清液分别经 0.45 μm 和 0.22 μm 滤膜过滤后, 用切向流超滤系统(MASTERFLEX, Sigma 公司, Minimate TM TFF Capsule 82213D)进行超滤浓缩, 病毒浓缩液保存于 4℃ 备用。

将 4 L 处于指数生长期(密度约为 2.37×10^6 个/mL)的 *E. huxleyi*-BOF 92 平均分成两组, 一组不作病毒处理设为对照组(Con), 一组按 1:50(EhV: Eh)的体积比加入浓缩的病毒裂解液作为实验组(Exp)(感染体系中病毒的起始丰度约为 2.8×10^6 个/mL)。在病毒加入后的 6 h 和 45 h, 分别离心(7 000 r/min, 5 min)收集实验组和对照组细胞样品, 立即置于液氮中速冻, 然后 -80℃ 保存备用。每个时间点的每组样品设置 2 个平行, 共 4 组, 8 个样品。

2.3 RNA 提取、cDNA 文库构建及测序

藻细胞样品的后续处理包括总 RNA 的提取(天根生化科技有限公司植物总 RNA 提取试剂盒)、纯化、质控分析、cDNA 文库构建以及转录组测序工作由深圳华大基因完成。将去除接头和低质量序列后得到的有效读段(Clean reads)使用 Bowtie2^[25]和 HISAT^[26]软件比对球石藻 *E. huxleyi*-CCMP1516 参考基因组(https://genome.jgi.doe.gov/Emihul/Emihul_home.html)。

2.4 转录组数据分析

使用 RSEM^[27] 工具进行基因表达水平的定量。在实验过程中, 病毒对宿主细胞的感染是非同步的, 即细胞被感染的时间或被感染的藻细胞的生理状态不尽相同, 因此感染和非感染不同时间点的每组样品的定量结果显示的是这一过程中的平均值^[14]。将 $P \leq 0.05$ 且 \log_2^{FC} 绝对值大于 1 作为差异表达筛选条件, 并将所有差异表达基因映射到 Gene Ontology (GO) 数据库 (<http://www.geneontology.org/>) 和 KEGG 公共数据库进行功能注释和代谢通路富集分析。

2.5 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR)

随机选择 10 个差异表达基因, 用 Primer 5.0 设计引物 (表 1), 进行 qRT-PCR 分析。将建库使用的总 RNA 采用第一链 cDNA 合成试剂盒 (Promega 公司)

反转录为 cDNA, 以反转录产物为模板, 以微管蛋白 (β -tubulin) 为内参, 使用 ChamQ™ Universal SYBR qPCR Master Mix 荧光定量预混酶 (诺唯赞生物科技有限公司), 利用 7300 qRT-PCR 系统 (Applied Biosystems) 进行荧光定量检测。每个样品每个基因设置 3 个实验重复, 采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法进行相对定量计算^[28]。

3 结果

3.1 转录组数据组装与分析

RNA-Seq 测序 8 个样品, 平均产生 23 651 203 条原始读段, 去除低质量读段数据, 剩余的有效读段平均数目为 23 508 824, 每个样品测序数据量统计情况见表 2 (NCBI 登录号为 SRP189555)。有效读段比对到 *E. huxleyi*-CCMP 1516 参考基因组, 平均比率为

表 1 实验所用的引物

Tab. 1 Primers used in the experiments

基因	正向引物序列 (5'-3')	反向引物序列 (5'-3')
β -Tublin (17257729)	TCATGTGCTCCTACTCGGTCTTC	TTCAGCGTGC GGAAACAGA
ATG13 (17261891)	GCGAAACTGCGTCCAGAAGA	CGCTCGAGAAGCAGCAGATG
MC1 (17277722)	TTATCAGCGACGAGGACAGTTC	GCTCAACATGCCCTCCCTAG
MC2 (17251088)	TGGGGCTTTTCAGAGGAAGAT	CCGTCGCCTGAGTAAAAGATAA
MC3 (17269785)	CGACTGGCTGAATGAGGAGAA	ACCTTGTGGCTCTTGAGCATG
MC4 (17283241)	TCGCTGATGGTCTTTATGGA	TCCCTCGGAGGTCTCGTA
hSPT (17255778)	TCTCGGACACGCTCAACCA	CCCTCGACGATGATGATGATC
ATG3 (17287351)	TCAAGACAGTCACCCCTCGAGTC	GGATGACGGAGGAGATGAACT
FADS (17253431)	CTTCTCCGAGATGCCCTTCTA	CAGTAGCCGAGAAAACCTCGGA
AMO (17252058)	GCTTGTGGTAACCTTCGTCC	GTCACCGCGTGAAACCACT
DLD2 (19046437)	AATCATCGGGTCGGGGTAC	CATGGGGCTGGGCTACTAA

表 2 测序数据量统计结果

Tab. 2 Statistics results of the sequencing data

样品	原始数据大小/bp	原始读段量	有效数据大小/bp	有效读段量	有效数据比率/%
Con_45_1	1 206 811 650	24 136 233	1 197 441 650	23 948 833	99.22
Con_45_2	1 206 812 550	241 362 51	1 197 176 200	23 943 524	99.20
Con_6_1	1 200 867 450	24 017 349	1 194 086 550	23 881 731	99.43
Con_6_2	1 206 840 250	24 136 805	1 200 300 350	24 006 007	99.45
Exp_45_1	1 206 808 350	24 136 167	1 200 167 600	24 003 352	99.44
Exp_45_2	1 206 837 050	24 136 741	1 200 482 550	24 009 651	99.47
Exp_6_1	1 206 850 000	24 137 000	1 200 301 150	24 006 023	99.45
Exp_6_2	1 018 654 150	20 373 083	1 013 573 600	20 271 472	99.50

68.10%, 每个样品与参考基因组比对情况见表 3

对组装获得的 32 909 条基因进行长度统计。基因平均长度为 1 153 bp, 主要集中于 2 500 bp 以下。其中, 数目最多的是分布在 500~1 000 bp 之间的转录本, 有 12 397 条, 占转录本总数的 37.67%; 其次是

分布在 1 000~1 500 bp 之间和小于等于 500 bp 的转录本, 分别有 7 874 条(占总转录本 23.93%)和 5 446 条(占总转录本 16.55%)(图 1)。对转录本进行开放阅读框(ORF)预测, 88.6% 的转录本 ORF 的长度小于等于 600 bp, 其中 56.10% 的 ORF 长度小于 300 bp。

表 3 有效读段与参考基因组比对结果

Tab. 3 Clean reads mapped to reference genome

样品	总读段量	总映射读段占比/%	单一位点映射占比/%	多位点映射占比/%	未映射读段占比/%
Con_45_1	23 948 833	78.52	30.71	47.81	21.48
Con_45_2	23 943 524	80.59	30.67	49.92	19.42
Con_6_1	23 881 731	62.24	24.60	37.64	37.77
Con_6_2	24 006 007	76.02	31.18	44.84	23.99
Exp_45_1	24 003 352	42.84	16.69	26.15	57.16
Exp_45_2	24 009 651	53.74	20.94	32.80	46.26
Exp_6_1	24 006 023	75.69	30.36	45.33	24.31
Exp_6_2	20 271 472	75.19	30.54	44.65	24.81

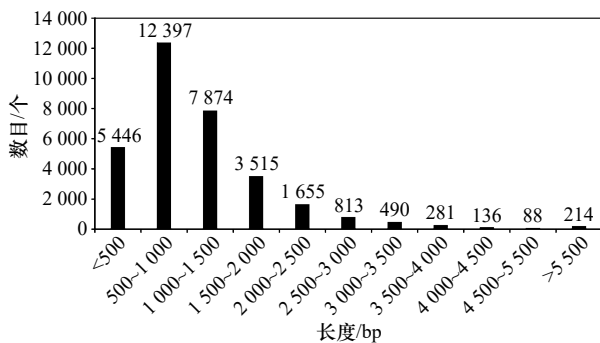


图 1 转录本的长度分布

Fig. 1 Length distribution of the transcripts

3.2 转录本的表达水平分析

对实验组和对照组不同时间点的转录本表达水平进行比较分析, 病毒感染 6 h(Exp 6 vs Con 6) 差异

表达基因 2 617 个, 其中上调 674 个, 下调 1 943 个; 病毒感染 45 h(Exp 45 vs Con 45) 差异表达基因 5 229 个, 其中上调 828 个, 下调 4 401 个; 病毒感染 6 h 和 45 h 共差异表达基因 465 个(图 2)。

3.3 实时荧光定量 PCR 验证基因的表达变化

随机选取 10 个病毒感染条件下差异表达的基因(其中 6 个上调基因和 4 个下调基因), 分别是宿主丝氨酸棕榈酰转移酶(hSPT)、半胱天冬蛋白酶(MC1、MC2、MC3、MC4)、自噬相关蛋白(ATG3、ATG13)、脂肪酸去饱和酶(FADS)、硫辛酰胺脱氢酶(DLD2)以及烷烃单加氧酶(AMO)等。利用 qRT-PCR 进行实验组和对照组基因差异表达分析, qRT-PCR 结果与转录组测序结果的表达趋势基本一致(图 3), 转录组测序结果可靠。

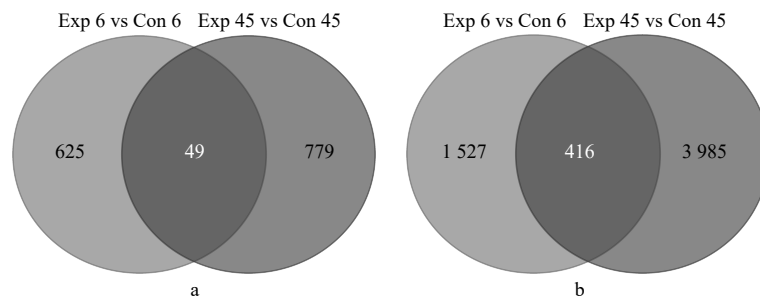


图 2 病毒感染不同时间点差异表达基因的韦恩图

Fig. 2 The Venn diagram of differentially expressed genes in 6 h and 45 h post infection

a. 上调差异基因韦恩图; b. 下调差异基因韦恩图

a. The number of up-regulation differentially expressed genes; b. the number of down-regulation differentially expressed genes

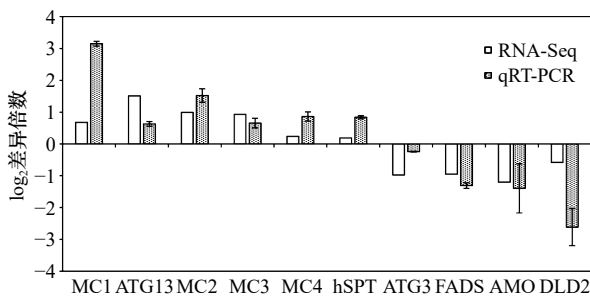


图3 10个差异表达基因的qRT-PCR验证

Fig. 3 Verification of ten differentially expressed genes by qRT-PCR

3.4 差异基因的功能分析

测序得到的基因中共有 20 872 条获得 GO 功能注释, 包括生物过程、细胞组分及分子功能 3 个本体化。其中, 注释到分子功能上的基因数目最多, 为 9 602 个, 其次是细胞组分 6 473 个, 生物过程 4 797 个。KEGG 功能注释 11 959 条基因, 归属于 218 条代谢通路, 包括细胞过程、环境信息、遗传信息处理、代谢途径及生物系统等 5 类代谢途径。其中, 数量最多的是参与代谢途径相关的基因, 包括脂类代谢、能量代谢、碳水化合物代谢、氨基酸代谢及核苷酸代谢等多种代谢途径。

3.4.1 差异基因的 GO 功能显著性富集分析

差异表达基因 GO 功能富集分析显著的术语结果见图 4。在这些功能分类中, 与 ATP 结合、锌离子结合、DNA 结合、核酸结合、膜的整体组分及细胞核功能相关的差异表达基因数目较多。其中, 感染早期

(6 h)(图 4a), 膜的整体组分类别中涉及的差异表达基因最多, 感染晚期(45 h)(图 4b), ATP 结合类别中涉及的差异表达基因最多。

3.4.2 差异基因的 Pathway 显著性富集分析

差异表达基因 KEGG Pathway 显著性富集分析显示, 感染早期, 富集较显著的是碳代谢、DNA 复制、嘧啶代谢、核糖体生物发生、次生代谢物的生物合成、糖酵解/糖异生、氨基酸的生物合成与代谢、谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 代谢、甘油磷脂代谢及过氧化物酶体参与的代谢等过程。感染晚期, 除上述代谢过程外, 内质网蛋白质加工、剪接、泛素介导的蛋白降解、自噬调节、三羧酸循环 (TCA 循环) 及氨酰基-tRNA 生物合成等代谢途径也显著富集。选择其中与细胞氧化胁迫相关且变化显著的 GSH 代谢绘制代谢通路图(图 5), 感染过程中参与 GSH 合成的大多数酶基因表达下调, 而参与 GSH 降解及氧化的大多数酶基因表达上调。

3.5 病毒胁迫下氧化应激反应相关基因的差异表达

氧化应激是指机体在遭受各种有害刺激时, 体内高活性分子产生过多, 如 ROS 的积累, 从而产生的一种负面作用。一方面, 病毒感染引起 ROS 释放; 另一方面, ROS 在病毒感染的进程中也能激活机体免疫系统, 起到正面的调节作用。本文筛选 36 个与氧化应激反应相关的差异表达基因, 如超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、过氧化物酶 (peroxidase, POD)、硫氧还蛋白 (thioredoxin, Trx)、谷胱甘肽 S-转移酶 (glutathione S-transferase, GST)、谷胱甘肽过氧

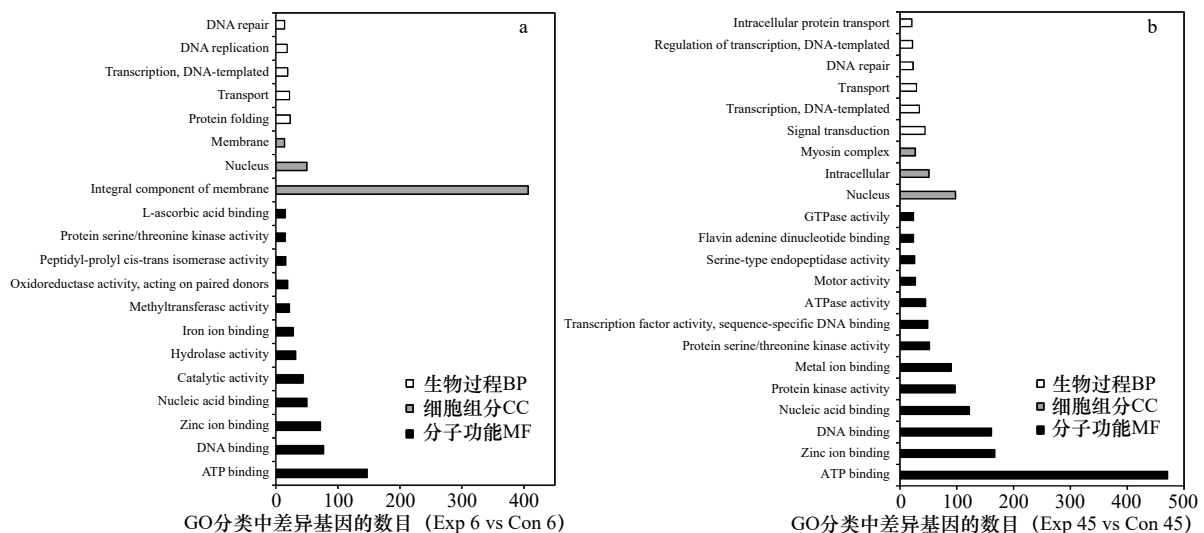


图4 差异表达基因 GO 富集结果

Fig. 4 The most enriched GO terms and corresponding differentially expressed gene numbers of each term

病毒感染 6 h(a) 和 45 h(b)

Cells infected by the virus at 6 h (a) and 45 h (b)

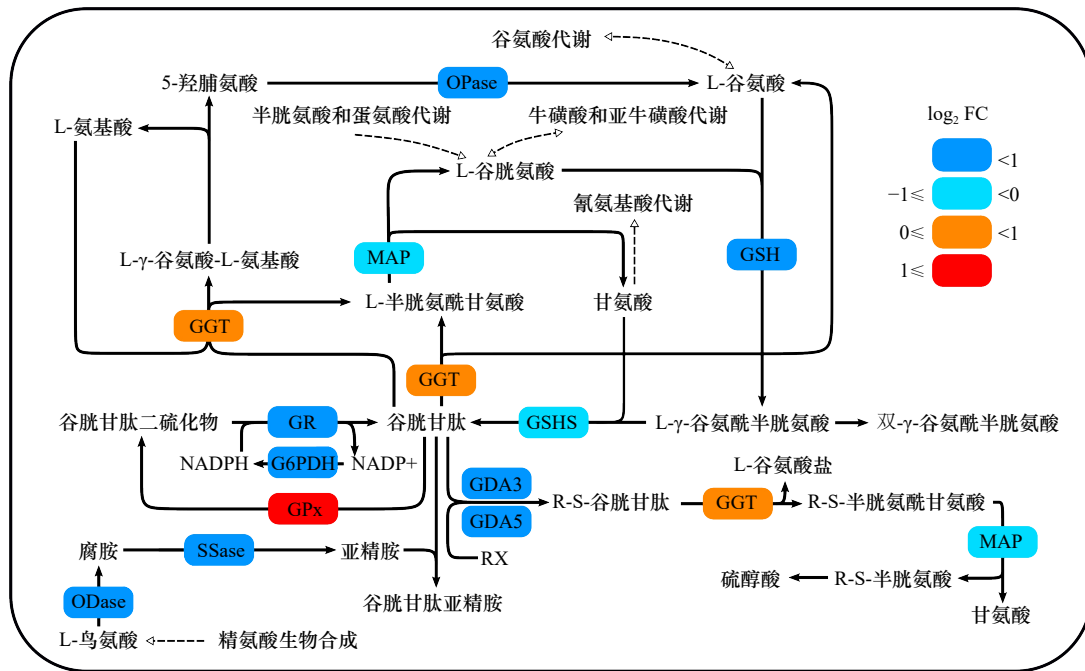


图 5 EhV 感染重塑宿主谷胱甘肽代谢通路图

Fig. 5 Glutathione metabolic pathways responding to virus infection

OPase: 羟脯氨酸酶; MAP: 膜氨肽酶 I; GSH: γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶; GGT: γ -谷氨酰转移酶; GSHS: 谷胱甘肽合成酶; GR: 胱甘肽还原酶; G6PDH: 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶; GPx: 谷胱甘肽过氧化物酶; GDA: 谷胱甘肽脱氢酶; SSase: 亚精胺合成酶; ODase: 鸟氨酸脱羧酶。基因名称框的颜色表示基因表达水平的倍数变化, $\log_2 FC > 0$ 表示上调, $\log_2 FC < 0$ 表示下调

OPase: oxoprolinase; MAP: membrane aminopeptidase I; GSH: γ -glutamylcysteine synthetase; GGT: γ -glutamyl transferase; GSHS: glutathione synthetase; GR: glutathione reductase; G6PDH: glucose-6-phosphate dehydrogenase; GPx: glutathione peroxidase; GDA: glutathione dehydrogenase; SSase: spermidine synthase; ODase: ornithine decarboxylase. Color filling of gene name box depicts the fold change of expression levels of the gene based on RNA-seq data, $\log_2 FC > 0$ indicating up-regulation, $\log_2 FC < 0$ indicating down-regulation.

物酶 (glutathione peroxidase, GPx)、谷胱甘肽还原酶及硫氧还蛋白还原酶等, 其中感染早期 6 个基因显著下调, 2 个基因显著上调 (表 4); 感染晚期 5 个基因显著下调, 7 个基因显著上调 (表 5)。

4 讨论

自然海域中病毒感染、杀死和裂解浮游植物是海洋生态系统中的普遍现象, 且病毒感染是导致浮游植物自然死亡的主要因素之一。病毒可以通过减少宿主种群数量或防止藻类宿主种群数量达到高峰的方式控制浮游植物动力学指标^[7]。因此, 病毒-宿主之间相互作用对于海洋生态系统的重塑具有重要的生态学意义和进化动力学作用。目前关于海洋真核微藻类病毒与宿主相互关系的知识了解甚少, 病毒的感染和宿主的防御机制在分子水平上体现为两者在基因传递与表达、信号转导及代谢调控等方面的变化。海洋病毒 (特别是噬菌体) 在感染过程中通过创建“病毒细胞代谢”这一独特新兴代谢模式, 触发了一个显著的代谢重构过程, 为病毒生产另辟蹊径^[13]。尽

管有明确证据表明感染过程中, 病毒在一定程度上掌控了宿主某些代谢通路, 但目前我们对病毒劫持策略及宿主防御反应之间的关系及其分子机制尚不清楚, 特别是在这一具有重要生态意义的 *E. huxleyi*-EhV 互作模式系统中。

本实验中, EhV-99B1 感染球石藻 *E. huxleyi* BOF92 平均产生 23 508 824 条有效读段, 68.10% 能够比对到 *E. huxleyi*-CCMP 1516 参考基因组, 与 Bochenek 等^[29]报道的 *E. huxleyi*-CCMP 1516 硫限制条件下 82.22% 的比对率相比偏低, 这可能是由于 *E. huxleyi*-BOF 92 与 *E. huxleyi*-CCMP 1516 株系基因组间存在一定的种内差异所致^[30-31]。病毒感染早期差异表达基因 2 617 个, 感染晚期差异表达基因 5 229 个, 显著大于硫限制条件下差异表达的 1 718 个基因, 表明病毒感染导致转录组发生了较大规模的变化, 病毒与宿主相互作用过程更为复杂。如, *E. huxleyi* 的生活史中存在具有球石粒的二倍体世代和具有鞭毛可游动的单倍体世代, 病毒感染过程中, 宿主可以通过改变其倍性来抵御病毒侵染^[32]。这种复杂的生活史可能伴随着

表 4 病毒感染 6 h 显著差异表达的氧化应激反应酶

Tab. 4 Oxidative stress enzymes that are significantly differentially expressed in 6 hpi

基因ID	log ₂ (倍数)	P	描述
jgi Emihu1 434150	-1.65	2.79×10 ⁻¹³	L-ascorbate peroxidase L-抗坏血酸过氧化物酶
jgi Emihu1 444342	-2.36	3.57×10 ⁻¹⁹	L-ascorbate peroxidase L-抗坏血酸过氧化物酶
jgi Emihu1 63449	9.58	1.24×10 ⁻²⁰	thioredoxin reductase 硫氧还蛋白还原酶
jgi Emihu1 74843	-11.38	1.39×10 ⁻¹⁵	Thioredoxin 硫氧还蛋白
jgi Emihu1 109275	-6.71	1.30×10 ⁻³	glutathione S-transferase 谷胱甘肽 S-转移酶
jgi Emihu1 447453	-1.59	5.98×10 ⁻⁶	glutathione-S-transferase 谷胱甘肽 S-转移酶
jgi Emihu1 439607	7.16	2.10×10 ⁻⁵	glutathione dehydrogenase 谷胱甘肽脱氢酶
jgi Emihu1 115948	-1.50	1.65×10 ⁻⁵	glutathionedehydrogenase 谷胱甘肽脱氢酶

注: hpi为感染后小时数。

表 5 病毒感染 45 h 显著差异表达的氧化应激反应酶

Tab. 5 Oxidative stress enzymes that are significantly differentially expressed in 45 hpi

基因ID	log ₂ (倍数)	P	描述
jgi Emihu1 103927	8.21	6.41×10 ⁻⁴	glutathione peroxidase 谷胱甘肽过氧化物酶
jgi Emihu1 433534	6.03	1.87×10 ⁻¹⁶	glutathione peroxidase 谷胱甘肽过氧化物酶
jgi Emihu1 464198	1.24	4.00×10 ⁻³	peroxidase/catalase 过氧化物酶/过氧化氢酶
jgi Emihu1 241133	-8.61	1.89×10 ⁻⁵	cytochrome c peroxidase 细胞色素c过氧化物酶
jgi Emihu1 74843	11.08	4.51×10 ⁻¹²	thioredoxin 硫氧还蛋白
jgi Emihu1 59424	10.06	7.34×10 ⁻⁶	thioredoxin 硫氧还蛋白
jgi Emihu1 198128	-1.25	5.00×10 ⁻⁴	thioredoxin 硫氧还蛋白
jgi Emihu1 66962	1.49	6.48×10 ⁻⁵	glutathione S-transferase 谷胱甘肽 S-转移酶
jgi Emihu1 446089	1.31	2.33×10 ⁻⁷	glutathione S-transferase 谷胱甘肽 S-转移酶
jgi Emihu1 109275	-8.32	1.89×10 ⁻⁵	glutathione S-transferase 谷胱甘肽 S-转移酶
jgi Emihu1 63987	-1.22	1.18×10 ⁻⁹	glutathione reductase 谷胱甘肽还原酶
jgi Emihu1 63016	-1.03	7.00×10 ⁻³	glutathione reductase 谷胱甘肽还原酶

注: hpi为感染后小时数。

与 DNA 损伤、减数分裂及单倍体特异性转录因子等相关的转录组基因表达水平的变化。病毒感染诱导的差异表达基因中, 下调转录本的数量(早期 1 943 个, 晚期 4 401 个)明显高于上调的数量(早期 674 个, 晚期 828 个), 这与 Rosenwasser 等^[16]报道的 EhV-201 感染 *E. huxleyi*-CCMP 2090 转录组大部分基因(30 658/42 385)的表达水平下调的结果类似, 表明病毒感染在很大程度上抑制了宿主基因的表达。

EhV-201 感染 *E. huxleyi*-CCMP 2090 导致与转录和翻译、脂肪酸生物合成、氨基酸和核苷酸生物合成、脂质代谢、糖酵解及信号转导等代谢通路发生明

显变化^[15]。本文 EhV-99B1 感染 *E. huxleyi*-BOF 92 的转录组研究结果进一步强调病毒感染重塑了宿主脂质代谢、糖酵解、氨基酸及核苷酸等关键代谢过程。作为大的 DNA 双链病毒, EhV 具有更高的代谢需求以满足构建自身的脂类、DNA 及蛋白合成。特别是细胞脂质代谢在病毒感染中具有重要意义, 脂类不仅提供了代谢需要的能量, 参与多重防御信号级联过程, 而且是细胞内膜的重要结构成分^[19, 33]。另外, 鞘磷脂、鞘糖脂及胆固醇等还是作为病毒出入宿主细胞门户——“脂筏”的主要脂质成分^[19]。EhV 正是利用“脂筏”作为进出细胞的策略, 借助自身基因编码合成

病毒特有的鞘糖脂胞膜与宿主细胞膜融合、内吞侵入宿主细胞;子代病毒粒子同样可以借助其鞘糖脂膜包裹以出芽的方式释放到细胞外^[17-19]。因此在 EhV 感染早期,宿主细胞的膜组分发生了大规模的重构以利于病毒的识别与感染。感染晚期,随着病毒粒子的大量复制、组装和释放,对核酸、蛋白及脂质等资源的需求大幅度增加,进而诱导 ATP 结合组分中如 ATP 酶的大量合成以提供充足的能量供给。特别是由 ABC 转运蛋白(ATP-Binding Cassette Transporter)介导的脂质合成、分泌及跨膜转运过程加速了 ATP 的水解。可见,病毒感染通过构建倾向于脂质生物合成的代谢流为自身的复制、组装及释放营造良好的细胞环境。最近,我们对病毒 EhV-99B1 感染 *E. huxleyi*-BOF 92 的脂质组学研究结果也进一步支持了本研究中病毒介导脂质代谢的转录组重构特点,如感染早期宿主脂代谢向着三酰甘油(Triacylglycerol, TGAs)生物合成方向进行重编程以支持病毒生产,同时 TGAs 还可以对宿主在感染早期产生的脂毒性 FAs 进行解毒,防止 ROS 的产生,在预防宿主细胞过早死亡方面起着至关重要的作用;而在感染后期,宿主细胞面临高水平的氧化胁迫,动员和利用储备的 TGAs 有助于感染后期脂肪酸的积累,以支持病毒的装配(未发表数据)。另外,EhV 感染还通过调控宿主 SBP 途

径合成病毒特有的 vGSL,该物质作为一种脂质信号分子严格控制 EhV 的产生和宿主的胞内应答,诱发 ROS (H_2O_2)^[20] 和 NO^[21] 的产生。表明 EhV 通过重塑宿主脂质代谢、诱导宿主氧化还原代谢过程的失衡,从而增加了宿主对病毒入侵的易感性并最终导致宿主细胞死亡。

值得注意的是,除了上述代谢通路外,EhV 感染早期和晚期与氧化应激反应相关的 GSH 代谢酶(图 5)及过氧化物酶基因如 GST、Trx、POD 及 GPx 等均发生显著差异表达。GSH 是生物体内普遍存在的小分子抗氧化物质,在氧化还原敏感的信号传导调节以及响应生物与非生物环境胁迫中起着重要作用。EhV 感染导致了诸如 H_2O_2 及 O_2 等活性氧细胞信号分子的合成^[20,23],同时也通过调节氧化胁迫相关基因的表达以应答细胞的氧化胁迫,如 GSH 水平的升高可以防止在高度氧化的细胞环境中过早地诱导宿主细胞 PCD^[22],而 H_2O_2 和 GSH 的共同作用在触发细胞自噬过程中起着重要作用^[22-23]。因此,病毒感染一方面引起 ROS 释放;同时,ROS 在病毒感染的进程中也激活机体免疫系统,起到正面的调节作用。可见,氧化应激反应也是海洋球石藻宿主响应病毒胁迫的一种天然免疫应激反应。

参考文献:

- [1] Pagarete A, Corguillé G L, Tiwari B, et al. Unveiling the transcriptional features associated with coccolithovirus infection of natural *Emiliana huxleyi* blooms[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2011, 78(3): 555-564.
- [2] Feldmesser E, Rosenwasser S, Vardi A, et al. Improving transcriptome construction in non-model organisms: integrating manual and automated gene definition in *Emiliana huxleyi*[J]. *BMC Genomics*, 2014, 15(1): 1-16.
- [3] Sheyn U, Rosenwasser S, Lehahn Y, et al. Expression profiling of host and virus during a coccolithophore bloom provides insights into the role of viral infection in promoting carbon export[J]. *ISME Journal*, 2018, 8(3): 704-713.
- [4] Jakob I, Weggenmann F, Posten C. Cultivation of *Emiliana huxleyi* for coccolith production[J]. *Algal Research*, 2018, 31: 47-59.
- [5] Tsuji Y, Yamazaki M, Suzuki I, et al. Quantitative analysis of carbon flow into photosynthetic products functioning as carbon storage in the marine Coccolithophore, *Emiliana huxleyi*[J]. *Marine Biotechnology*, 2015, 17(4): 428-440.
- [6] Schatz D, Shemi A, Rosenwasser S, et al. Hijacking of an autophagy-like process is critical for the life cycle of a DNA virus infecting oceanic algal blooms[J]. *New Phytologist*, 2015, 204(4): 854-863.
- [7] Brussaard C P. Viral control of phytoplankton populations-a review I[J]. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 2004, 51(2): 125-138.
- [8] Martínez J M, Schroeder D C, Wilson W H. Dynamics and genotypic composition of *Emiliana huxleyi* and their co-occurring viruses during a coccolithophore bloom in the North Sea[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2012, 81(2): 315-323.
- [9] Schroeder D C, Oke J, Malin G, et al. Coccolithovirus (phycodnaviridae): characterisation of a new large dsDNA algal virus that infects *Emiliana huxleyi*[J]. *Archives of Virology*, 2002, 147(9): 1685-1698.
- [10] Wilson W H, Schroeder D C, Allen M J, et al. Complete genome sequence and lytic phase transcription profile of a coccolithovirus[J]. *Science*, 2005, 309(5737): 1090-1092.
- [11] Malitsky S, Ziv C, Rosenwasser S, et al. Viral infection of the marine alga *Emiliana huxleyi* triggers lipidome remodeling and induces the production of highly saturated triacylglycerol[J]. *New Phytologist*, 2016, 210(1): 88-96.
- [12] Ruiz E, Oosterhof M, Sandaa R, et al. Emerging interaction patterns in the *Emiliana huxleyi*-EhV system[J]. *Viruses*, 2017, 9(3): 61-75.
- [13] Rosenwasser S, Ziv C, Van Creveld S G, et al. Virocell metabolism: metabolic innovations during host-virus interactions in the ocean[J]. *Trends in Microbiology*, 2016, 24(10): 821-832.
- [14] Kegel J U, Blaxter M, Allen M J, et al. Transcriptional host-virus interaction of *Emiliana huxleyi* (haptophyceae) and EhV-86 deduced

- from combined analysis of expressed sequence tags and microarrays[J]. *European Journal of Phycology*, 2010, 45(1): 1–12.
- [15] Kimmance S A, Allen M J, Pagarete A, et al. Reduction in photosystem II efficiency during a virus-controlled *Emiliana huxleyi* bloom[J]. *Marine Ecology Progress Series*, 2014, 495: 65–76.
- [16] Rosenwasser S, Mausz M A, Schatz D, et al. Rewiring host lipid metabolism by large viruses determines the fate of *Emiliana huxleyi*, a bloom-forming alga in the ocean[J]. *Plant Cell*, 2014, 26(6): 2689–2707.
- [17] Pagarete A, Allen M J, Wilson W H, et al. Host–virus shift of the sphingolipid pathway along an *Emiliana huxleyi* bloom: survival of the fittest[J]. *Environ Microbiol*, 2009, 11(11): 2840–2848.
- [18] Ziv C, Malitsky S, Othman A, et al. Viral serine palmitoyltransferase induces metabolic switch in sphingolipid biosynthesis and is required for infection of a marine alga [Microbiology][J]. *Proceeding of the National Academy of Sciences*, 2016, 113(13): E1907.
- [19] Rose S L, Fulton J M, Brown C M, et al. Isolation and characterization of lipid rafts in *Emiliana huxleyi*: a role for membrane microdomains in host-virus interactions[J]. *Environmental Microbiology*, 2014, 16(4): 1150–1166.
- [20] Sheyn U, Rosenwasser S, Ben-Dor S, et al. Modulation of host ROS metabolism is essential for viral infection of a bloom-forming coccolithophore in the ocean[J]. *The ISME Journal*, 2016, 10(7): 1742–1754.
- [21] Vardi A, Haramaty L, Van Mooy B A S, et al. Host-virus dynamics and subcellular controls of cell fate in a natural coccolithophore population[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2012, 109(47): 19327–19332.
- [22] Bidle K D. Programmed cell death in unicellular phytoplankton[J]. *Current Biology*, 2016, 26(13): R594–R607.
- [23] Bidle K D. The molecular ecophysiology of programmed cell death in marine phytoplankton[J]. *Annual Review of Marine Science*, 2015, 7(7): 341.
- [24] Liu J W, Cai W C, Fang X, et al. Virus-induced apoptosis and phosphorylation form of metacaspase in the marine coccolithophorid *Emiliana huxleyi*[J]. *Archives of Microbiology*, 2018, 200(3): 413–422.
- [25] Langmead B, Trapnell C, Pop M, et al. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome[J]. *Genome Biology*, 2009, 10(3): R25.
- [26] Kim D, Langmead B, Salzberg S L. HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements[J]. *Nature Methods*, 2015, 12(4): 357–360.
- [27] Demey C N, Li B. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome[J]. *BMC Bioinformatics*, 2011, 12(1): 323–323.
- [28] 张丽丽, 张富春. 短期盐胁迫下盐穗木的转录组分析[J]. *植物研究*, 2018, 38(1): 91–99.
Zhang Lili, Zhang Fuchun. Transcriptomic analysis of the *Halostachys caspica* in response to short-term salt stress[J]. *Plant Research*, 2018, 38(1): 91–99.
- [29] Bochenek M, Etherington G J, Koprivova A, et al. Transcriptome analysis of the sulfate deficiency response in the marine microalga *Emiliana huxleyi*[J]. *New Phytologist*, 2013, 199(3): 650–662.
- [30] Read B A, Kegel J, Klute M J, et al. Pan genome of the phytoplankton *Emiliana* underpins its global distribution[J]. *Nature*, 2013, 499(7457): 209–213.
- [31] Von Dassow P, John U, Ogata H, et al. Life-cycle modification in open oceans accounts for genome variability in a cosmopolitan phytoplankton[J]. *ISME Journal*, 2015, 9(6): 1365–1377.
- [32] Dassow P V, Ogata H, Probert I, et al. Transcriptome analysis of functional differentiation between haploid and diploid cells of *Emiliana huxleyi*, a globally significant photosynthetic calcifying cell[J]. *Genome Biology*, 2009, 10(10): R114.
- [33] Fulton J M, Fredricks H F, Bidle K D, et al. Novel molecular determinants of viral susceptibility and resistance in the lipidome of *Emiliana huxleyi*[J]. *Environmental Microbiology*, 2014, 16(4): 1137–1149.

Transcriptome analysis of marine microalga *Emiliana huxleyi* in response to virus infection

Tian Xue^{1,2}, Cai Weicon^{1,2}, Su Jinjing^{1,2}, Wu Shuyan^{1,2}, Liu Jingwen^{1,2}

(1. Food and Bioengineering College of Jimei University, Xiamen 361021, China; 2. Key Laboratory of Food Microbiology and Enzyme Engineering of Fujian Province, Xiamen 361021, China)

Abstract: *Emiliana huxleyi*, the numerically dominant coccolithophore in the modern oceans and its specific lytic virus EhV exert a critical impact upon the oceanic carbon, sulfur cycle and global climate, thus serving as a key host-pathogen model system. Despite their impact on biogeochemical cycling, the transcriptional dynamics of these

important oceanic events is still poorly understood. To understand the host-virus interaction in *E. huxleyi*-EhV system, the transcriptome of *E. huxleyi* BOF92 involved in virus infection was investigated by using Illumina HiSeq 2 000 high-throughput sequencing technology. Two cDNA libraries, generated 6 h and 45 h after viral infection (Exp) were compared with two libraries from the corresponding times uninfected cultures (Con). A total of 32 909 unigenes with an average length of 1 153 bp were generated. Totally 2 617 and 5 229 differentially expressed genes (DEGs) associated with viral infection were identified in 6 hpi and 45 hpi, respectively, among which 465 genes were the common DEGs in the two time points. Ten DEGs were random selected for quantitative RT-PCR (qRT-PCR) analysis, and the results confirmed that the transcriptome analysis was reliable. Furthermore, the DEGs were subject to GO and KEGG enrichment analysis. The results showed that most of the DEGs were involved in oxidation-reduction reactions, glutathione metabolism, lipid metabolism, carbohydrate metabolism and signal transduction. Some of the reactive oxygen species (ROS) scavenging genes were screened out, in which 9 genes were up-regulated and 11 genes were down-regulated. These results suggested that ROS signaling molecules might play a central role during host-virus interaction.

Key words: *Emiliana huxleyi*; virus infection; transcriptome sequencing; differentially expressed genes; qRT-PCR; oxidative stress