

产黄青霉病毒的稳定性和体内病毒的滴度*

梁平彦 陈开英

(中国科学院微生物研究所, 北京)

产黄青霉 (*penicillium chrysogenum*) 病毒 (PcV) 在 0.02M、pH 7.0 磷酸缓冲液 (4℃) 中经乙醚、氯仿、0.1% SDS、甲醛等处理和 -20℃ 冻融及 4℃ 下保存 230 天以上均仍保持抗原性。但用 0.5—1% SDS 处理和 5 次以上反复冻融便全部丧失或只保留极微弱的抗原性。随着保存时间延长抗原性逐渐降低, 在凝胶电泳中两区带间隔和迁移率明显增加。

病毒经乙醚处理后沉降常数由原来的 149.5 S 降到 130 S。电镜观察 130 S 颗粒见负染染料易于透入核心, 外壳松散, 亚基零乱排列, 同时增加了对低浓度 SDS 的敏感性; 此外, 在奥氏免疫双扩散中产生沉淀线的稀释度由 1:12 提高到 1:20。经乙醚处理后 PcV 的上述变化可能与亚基的构象变化有关。迄今试验结果认为 PcV 属于乙醚敏感类型。

用 ^3H 标记 7 株 PcV, 比较了病毒滴度、青霉素效价和菌丝干重等, 证明菌株间体内病毒滴度有显著差别, 同一菌株的病毒滴度也可以改变, 营养缺陷型菌株内仍然含有大量病毒。7 株 PcV 均属同一血清型, 与球形香菇 (*Lentinus edodes*) 病毒 (LeV) 及稻瘟病菌 (*Pyricularia oryzae*) 病毒 (PoV) 之间无亲缘关系。

1967 年 Ellis 和 Kleinschmidt 首次证明了来源于匍枝青霉菌 (*Penicillium stoloniferum*) 的抗病毒制品中含有直径 30 毫微米的病毒颗粒以后, 有关感染病毒的真菌的报道不断增加^[1]。1969 年 Banks 报道产黄青霉病毒^[2,3], 1974 年 Lemke^[4] 报道此病毒通过异核体传播, 并以菌丝联合完成对治愈的无毒真菌的再侵染, 真菌内携带了抗蚀斑的核基因。提纯的病毒颗粒中证明有 dsRNA 它的合成依赖于 RNA 多聚酶, 以后 Buck 和 Ratti 提出了 dsRNA 真菌病毒所特有的复制模型^[5]。

我们从新鲜的或 -20℃ 冰冻的菌丝体中提取 PcV, 加与不加丙酮所得病毒样品的紫外吸收光谱和负染的透入性均不同, 最终影响病毒的保存^[6]。由于目前真菌病毒直接侵染尚未成功, 因此我们试从经过保存和处理后的 PcV 颗粒在免疫双

扩散及凝胶电泳中的稳定性了解病毒的性质。本文报道有关结果及菌丝内病毒的滴度。

材料和方法

(一) 菌种

1. 产黄青霉菌 r₃、5562 由中国医学科学院药物研究所供给。6205, 6205-DSU-11 (黄嘌呤营养缺陷型), 3109-U-18 (菸酸或菸酰胺营养缺陷型), Q176, 816 由华北制药厂供给。

2. 香菇由福建三明真菌站供给。

3. 稻瘟病菌由湖南农学院供给。

(二) 培养基、培养方法、病毒提取、电镜观察:

同文献[6]。

(三) 菌丝体生长量测定

本文于 1979 年 8 月 6 日收到。

* 工作经周家炽教授指导及审阅文稿, 裘维蕃教授、李季伦教授审阅文稿, 深表感谢。

见文献[7]。

(四) 抗血清的制备

PcV 6205 按沉淀法提取,经超速离心及蔗糖密度梯度离心后作抗原。采用完全佐剂,羊毛脂和石蜡油(1:9)均匀混合,灭菌后加入结核菌 0.5 毫克/毫升,抗原和佐剂比例是 1:1,每只兔每次肌肉注射 10 毫克病毒,5 天一次,共 3 次,20 天取血。以后每 30 天抽血一次,冷冻保存。试管滴定度为 1/8,192,免疫双扩散稀释度见图版(I-1),冷冻干燥后稀释度为 1/70。3 次注射后半年内兔血清中始终保持相当数量的抗体。加强注射一次后,效价提高,多次冻融及保存 3 年以上活性无明显下降,用 ^3H 标记病毒与注射后不同时间取的抗血清作沉淀反应得到的沉淀的放射活性见图 1。

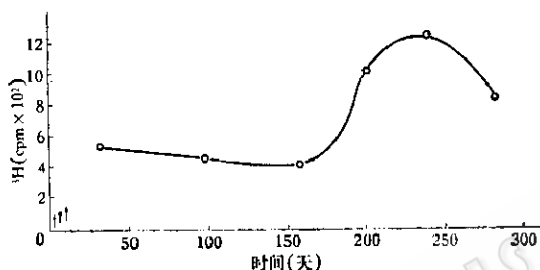


图 1 ^3H 标记的 PcV 与抗血清作用后沉淀物的放射活性

箭头示注射时间: ○——○ 示放射活性

(五) 免疫双扩散及免疫电泳

1. Quichterlony 双扩散: 用 0.8% 琼脂溶于生理盐水或 0.02 M 磷酸缓冲液, 加入 0.01% 硫柳汞, 具体方法见参考文献[8]。

2. 免疫电泳: 将 1.2% 琼脂溶于 0.025 M、pH 8.2 巴比妥酸钠缓冲液, 加 0.01% 硫柳汞, 电泳槽内为 0.05 M 的同一缓冲液, 琼脂厚度 2—4 毫米, 3—6 伏/厘米, 电泳 4 小时。

(六) 聚丙烯酰胺盘状凝胶电泳

2.4% 凝胶, 含 0.75% 双丙烯酰胺, 圆管长 8 厘米, 电泳槽盛 Tris-乙酸盐-EDTA 缓冲液, pH 7.5, 电泳 2.5 小时, 每管 5 毫安。7% 乙酸固定后, 可见病毒的闪光带, 在未固定的相应区带上切下凝胶, 加磷酸缓冲液, 经冻融后匀浆离心, 取上清点样, 电泳观察。

(七) 病毒定量

用下列两种方法:

1. 放射免疫法: 50 毫升三角瓶内盛 14 毫升

拉氏培养基^[1], 接种 10^6 孢子悬浮液, 25℃ 摇瓶培养 24 小时, 加入 ^3H 尿嘧啶(1 毫居/毫克分子, 上海原子核研究所生产) 最终浓度为 1 微居/1 毫升。24 小时后提取病毒, 方法见[6]。加等体积 1:5 抗血清于病毒内, 37℃ 温育 3 小时。5,000 转离心, 弃上清, 洗沉淀 2 次后悬浮沉淀。在 Whatman 3 号滤纸片上点样。5% 三氯乙酸固定, 冲洗, 酒精和乙醚脱水后放入盛有闪烁液的测量瓶内, 用液体闪烁计数器 (NE 8312) 测量放射活性。以病毒作抗原, 在免疫双扩散试验中得沉淀线。取沉淀线, 融化琼脂后加 Brays 闪烁液, 测放射活性, 证明此沉淀线内有大量标记病毒。

2. 测病毒区带的相对吸收值: 取定量标准样品在紫外分光光度计 265 毫微米测吸收值, 并在凝胶紫外扫描仪 (Joyce Loebl) 的同一波段上确定吸收百分数, 得到二者之间的相关数值, 并测得吸收峰的面积, 按上述相关数计算出 265 毫微米相对吸收值。

(八) 乙醚、氯仿、SDS 处理病毒

比色管内按病毒体积加入 20% 乙醚后摇匀, 置 4℃ 下 18—24 小时, 然后使乙醚挥发掉^[9]。

按病毒体积加入氯仿至 5%, 室温振荡 10 分钟, 低速离心取上清^[9]。

病毒中分别加入 SDS 达 0.1%、0.5%、1% 浓度, 25℃ 温育 30—60 分钟。

(九) 沉降常数的测定

PcV 3 毫克/毫升在 UCAEA 分析超离心机离心, 转速分别为 29,000 转/分和 25,000 转/分, 每隔 2 分钟拍照 1 次, 共 6 次。

实验结果

一、菌丝体内病毒滴定度

用免疫及放射化学相结合的方法对 7 株青霉素效价不同的菌种进行了病毒滴定度的比较, 标记物是氘尿嘧啶。结果见表 1。

由表 1 可见, 在同样条件下, 不同菌种间病毒量差别显著, 并且能相对稳定地保持。如 6205 病毒滴定度最高, 经诱变后 6205-DSU-11 的病毒滴定度仍然相当高,

表 1 7 株 PcV 滴定度、菌丝干重和青霉素产量的比较

菌 株	病毒滴定度 (cpm)	青霉素效价* (单位/毫升)	菌丝干重 (毫克)	孢子颜色
6205	42,695	8,000—10,000	42.3	肉 色
6205-DSU-11 (黄嘌呤营养缺陷型)	33,552	3,300—4,800	67.8	肉 色
Q 176	23,065	1,000—1,500	144.4	绿 色
3109-U-18 烟酸或烟酰胺营养缺陷型	16,746	6,300—9,500	75.7	秸秆黄
816	1,696	2,030	80	秸秆黄
5562	1,587	1,000	204.6	绿 色
r ₃	279	1,000	124.2	绿 色

* 华北制药厂供给,用碘量法测定。

而 5562 和 r₃ 的病毒量始终很少。这与电镜观察及血清反应结果完全一致。

其次,菌种的病毒滴定度是可变的,如 6205-DSU-11 的病毒滴定度较诱变前减少 20%,青霉素效价减少 50%。816 的病毒浓度原来与 6205 接近,连续转管后,病毒量明显减少,远较 6205 为低(表 1),与此同时青霉素效价由原来 12,000—15,000 单位/毫升,降到 2,030 单位/毫升。

此外,在上述试验中还可看出,在静止培养条件下, r₃, 5562, Q 176 比其它菌株的干物重增加迅速,孢子形成早,表明病毒在真菌内长期存在,未明显地影响真菌的生长。

二、PcV 和其它真菌病毒之间的血清关系

以 6205, 816, 6205-DSU-11, 3109-U-18 以及 Q 176 的病毒作抗原在免疫双扩散试验中各得到一条特异性的抗原—抗体沉淀线[图版 I-1、2]。不同菌株间沉淀线末端相互连接而无交叉,属同一血清型。沉淀线经磷酸缓冲液洗涤及流水冲洗过夜仍然稳定。取出沉淀线,匀浆过滤,电镜观察见典型病毒颗粒(图版 I-3)。6205

病毒经平板电泳后,再加抗血清作免疫扩散,在(一)极得到一条弧形沉淀线(图版 I-4)。

PcV 抗血清与形态相同的球形香菇病毒(直径为 30、35、46 毫微米 3 种)和稻瘟病菌病毒之间无沉淀线发生(图版 I-2),它们之间无亲缘关系。

三、病毒抗原性的变化

1. PcV 沉降常数分析: 6205 病毒通过超离心沉降分析,未经乙醚处理及处理过的病毒颗粒均得到一个主峰及 3 个小峰。通过计算测得主峰的 $s_{20,w}$ 分别为 149.5 S 及 130 S。未经乙醚处理的病毒的结果与 Buck^[10] 和 Wood^[11] 等所得 4 个峰中的主峰 150 S 的结果一致。

2. 病毒处理后的抗原性: 同一批病毒经乙醚、氯仿处理后沉淀线较对照出现早而清晰,经 0.1% SDS、1.5% 甲醛处理及 -20℃ 冻融后仍有反应,沉淀相互联接(图版 I-5) 0.5, 1% SDS 处理及冻融 5 次均无沉淀产生(表 2 及图版 I-6)。

经乙醚处理及未处理病毒在免疫双扩散中作稀释度比较,出现沉淀线的稀释度分别为 1:20 和 1:12(见表 3)。结果表明

表 2 PcV 处理后抗原性的变化

血清类型	不同处理病毒在双扩散中沉淀线表现*							
	甲 醛	乙 醚	氯 仿	0.1% SDS	0.5—1% SDS	-20℃ 冻 融	反复冻融	不处理
PcV 6205 抗血清	沉淀线出现早, 色深厚	沉淀线出现最早, 色深厚	沉淀线出现早, 色深厚	沉淀线略浅, 扩散	无沉淀线或极微弱沉淀线	沉淀线略浅	无沉淀线	沉淀线色深厚
正常兔血清	无 沉 淀 线							

* 均用产黄青霉 6205 病毒, 每孔 20 微升(3 毫克/毫升)。病毒保存于 0.02 M、pH 7.0 磷酸缓冲液中。

表 3 PcV 经乙醚处理后在免疫双扩散中的稀释度

处 理	稀 释 倍 数				
	1:6	1:10	1:12	1:15	1:20
乙 醚	沉 淀 线 清晰色深	线 明 显	线 明 显	线 明 显	线浅而窄
氯 仿	沉 淀 线 清晰	可 见	可 见	可 见	极 浅
未处理	沉 淀 线 清晰	可 见	隐约可见	未 见	未 见

乙醚处理后抗原性有增加趋向, 电镜观察见负染染料透入性增加, 亚基零乱排列显然与未处理的不同(图版 I-7、8), 与此同时沉降系数由 149.5 S 降到 130 S。

3. 病毒保存后的抗原性: 保存在 0.02 M、pH 7.0 的磷酸缓冲液, 4℃ 中的同一批病毒, 不同时间取样作抗原性鉴定。经过 20 到 230 天后, 抗原性仍然良好(图版 I-5)。-20℃ 冷冻 2 年以上样品仍有抗原性。一些有抗原性的病毒经电镜观察形态已发生明显变化, 外壳模糊不清(图版 I-9)。

四、病毒的稳定性

1. 在凝胶电泳中的表现: PcV 在 2.4% 凝胶电泳中常可分出两条密切靠近的区带(图 2) 少数是一条带, 这与 Nash 等在氯化铯平衡密度梯度离心中的结果一致^[12]。PcV 在磷酸缓冲液中保存一段时间后两区带间

隔和迁移率均有显著增加(图版 I-10)。取区带中病毒作双扩散试验, 有抗原活性, 电镜观察形态完整。经保存 5 个月的病毒只出现一条区带。

2. 经保存和处理后的稳定性: (1) 保存在 4℃ 的同批病毒自菌丝破碎后第六天起, 每隔 10 天取 30 微升(3 毫克/毫升)测定凝胶电泳后的吸收值, 由图 3 可见随着保存时间延长吸收值降低。病毒在磷酸缓

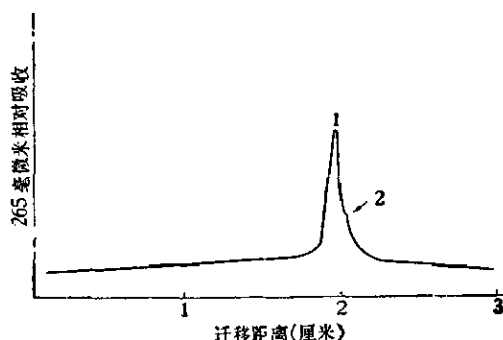


图 2 PcV 6205 凝胶电泳图谱

表 4 PcV 处理后的稳定性

处理 项目	未 处 理	乙 醚		0.1% SDS	乙醚 + 0.1% SDS
		新 病 毒	老 病 毒		
免疫双扩散 (沉淀线)	一条带, 窄而清晰	出现早、窄、 色深, 抗原性增 加	出现略晚, 宽而色浅, 示 病毒降解	宽而色浅, 示病毒降解	无沉淀线, 病毒严重降解
聚丙烯酰胺 凝胶电泳	一条带, 扫描一个峰	一条带, 扫 描一个峰	一条带较 宽, 二个峰, 迁 移率增加	一条带, 吸 收值降低	无 带
电镜形态	球形颗粒	负染透入性 增加, 外壳亚 基排列零乱	负染透入性 增加, 外壳模 糊	外壳模糊	无典型病毒

冲液中保存有降解现象, 在凝胶电泳中也有同样反应。

(2) 免疫双扩散结果见表 4。目前所知, 凝胶电泳决定于分子量的大小和带电荷性质, 而免疫扩散反映了衣壳蛋白的抗原结构、位置和数目。通过这两方面的试验可以间接了解 PcV 的性质。

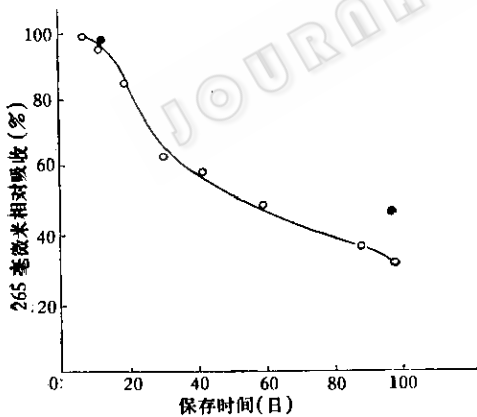


图 3 PcV6205 保存不同时间后的稳定性
○——○ 4°C; ●——● -20°C

讨 论

经乙醚、氯仿、丙酮等处理后病毒颗粒透性增加、沉降常数下降, 同时, 构象及稳定性发生变化。电镜观察 130 S 颗粒的核心中 PTA 明显的透入并积累, 亚基零乱

排列。与 Schgal 等^[13]报道用 EDTA 处理南方菜豆花叶病毒 (SBMV) 后颗粒沉降系数由 115S 减到 100S, 衣壳松散, 核心负染料透入性增加的现象有类同之处。但乙醚对于 PcV 的作用显然不同于 SBMV, 后者因 EDTA 带走了二价金属离子从而影响到病毒的稳定性。乙醚对稳定性的影响是否与病毒的脂肪的位置有关, 有待研究。

130 S 颗粒较 149.5 S 增加抗原滴定度的原因, 结合沉降常数的变化和电镜结果考虑, 作者倾向于 Jerne^[14]提出的隐蔽抗原决定簇存在的说法。PcV 结构亚基表面很可能存在某些抗原决定簇, 其位置朝向衣壳的内部, 因而在空间上无法起作用, 经乙醚处理后衣壳松散, 结构单位解离才显露其抗原性。

我们支持 Andrews^[9], Sunaga 和 Harry^[15,16]等主张把病毒对乙醚的敏感性列为病毒分类标准之一, 迄今试验结果认为 PcV 属于乙醚敏感类型。

参 考 文 献

- [1] 周家炽: 生物科学参考资料, 第四集, 科学出版社, 北京, 1974, 13—18 页。
- [2] Banks, G. T. et al.: *Nature*, **218**: 542—45, 1968.
- [3] Banks, G. T. et al.: *Nature*, **222**: 89—90,

- 1969.
- [4] Lemke P. A.: Proceedings of the First Intersectional Sectional Congress of IAMS, 3: 380—395, 1974.
- [5] Buck, K. W., G. Ratti.: *Biochemist. Soc. Trans.*, 3: 542—44, 1975.
- [6] 中国科学院微生物研究所真菌病毒组: 微生物学报, 16(1):21—27, 1976.
- [7] 林傅光, 梁平彦: 微生物学报, 11(4):470—479, 1965.
- [8] Habel, K., Salzman N. P.: *Fundamental Techniques in Virology*. Academic Press, 1969.
- [9] Andrews, C. H., M. H. Doratley: *J. Gen. Microb.*, 3: 290—297, 1949.
- [10] Buck, K. W., G. F. Kempson-Jones: *Jour. Gen. Virology*, 18: 223—235, 1973.
- [11] Wood, H. A., R. F. Bozarth: *Virology*, 47: 604—609, 1972.
- [12] Nash, C. H. et al.: *Can. J. Microbiol.*, 19 (1): 97—103, 1973.
- [13] Sehgal, O. P., E.E. Pickett: *Virology*, 69 (2): 587—597, 1976.
- [14] Jerne N. K.: *Ann. Rev. Microbiol.*, 14: 341—358, 1960.
- [15] Sunaga, M.: *Am. J. Trop. Med. and Hyg.*, 9: 419, 1960.
- [16] Harry, A. F., S. W. Stephen: *Pro. Soc. Exp. Biol. (N.Y.)* 106: 736—738, 1961.

STUDIES ON THE STABILITY OF THE VIRUS OF *PENICILLIUM CHRYSOGENUM* AND THE VIRAL TITRE IN VIVO

Liang Pingyan Chen Kaiying

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing)

After being treated with ether, chloroform, 0.1% SDS, formaldehyde, -20°C and preserved for 230 days at 4°C *Penicillium chrysogenum* virus (PcV) in phosphate buffer still retained the antigenicity with the corresponding antiserum in double diffusion tests, but completely or chiefly lost the antigenicity after being treated with 0.5—1% SDS or frozen and thawed for five times. With the advance of storage periods, the absorbance at 265 nm in gel was decreased and the interspace between the two narrow bands increased.

Exposure of PcV to ether caused relaxation of its capsid leading to a penetration of the negative stain into the virion core, and a concomitant reduction in the virion sedimentation coefficient (149.5—

130S), such virions (130S) became more sensitive to SDS. In addition, a higher dilution rate (1:20) of the ether treated virus preparation can give positive result in immunodiffusion test. It seems likely that ether treatment of the particles may result in the subunit conformation change.

^3H labelled viruses from extracts of seven fungal strains were obtained. All strains were comparatively studied in respects of virus titre, the ability to synthesize Penicillin, the mycelial dry weight, the colong colouration and serological relationship. The antiserum PcV reacted with the purified virus preparations from all seven strains of *P. chrysogenum* but did not react with those from *Lentinus edodes* and *Piricularia oryzae*.