

黑曲霉病毒的形态和特性及其在细胞内的表现

刘宏迪 梁平彦

(中国科学院微生物研究所, 北京)

从产生糖化酶的黑曲霉(*Aspergillus niger*)菌株中分离到一种等轴对称、衣壳表面有突起、内含双链RNA的病毒颗粒。病毒颗粒在电镜下直径为28—33nm,呈六面体晶格排列。病毒在蔗糖密度梯度离心中有三个分部,分析超离心所得沉降系数为161S, 118S和94S。病毒在凝胶电泳中为一条带,在SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳中外壳蛋白分子量为90,000、82,000、76,000、52,000、42,000道尔顿。提取的病毒与其抗血清在免疫双扩散实验中出现一条沉淀线。病毒核酸有5个组分,与聚肌苷:聚胞苷[poly(1):poly(C)]抗血清反应中出现一条沉淀线。在早期菌丝细胞超薄切片中,病毒颗粒多近似球状紧密聚集,外被以膜结构,聚生或散生于胞质中;后期菌丝细胞中病毒颗粒则多散生于胞质中。

关键词 黑曲霉病毒;病毒形态;理化性质;感病细胞的超薄切片

自从在栽培蘑菇 [*Agaricus bisporus* (Lange) Sing]^[1] 中发现病毒以来,在100多种真菌中已报道存在病毒或病毒样颗粒,其中霉菌有15种,有些是重要的产抗生素真菌^[2]或是现代化食品发酵工业生产用菌。曲霉属中已报道感染病毒的有泡盛曲霉(*Aspergillus awamori*)、黄曲霉(*A. flavus*)、臭曲霉(*A. foetidus*)灰绿曲霉(*A. glaucus*)和黑曲霉(*A. niger*)5种。本文报道从产生糖化酶的黑曲霉菌株中分离到的病毒的形态、理化性状、血清反应、病毒核酸和衣壳蛋白的性状,以及寄主孢子和菌丝细胞超薄切片中的观察。

材 料 和 方 法

(一) 菌种和培养方法

菌种由本所提供。

培养基:察氏培养基和马铃薯葡萄糖加入0.02—0.05%维生素B₁的液体培养基。

用新鲜菌种孢子悬浮液接种,32℃摇床培养3天或静止培养10天以上。

(二) 病毒的提取

收集培养的菌丝体,先用蒸馏水洗涤,再用

0.1M的磷酸缓冲液冲洗2次以上,用滤纸吸干,称重菌丝,加菌丝体重量10倍体积的pH7.0、0.05M磷酸缓冲液、0.1%巯基乙醇(V/V),用捣碎器破碎5次,两层尼龙布过滤,9,000rpm离心30分钟,去除破碎菌丝体。上清液中加入6%聚乙二醇(分子量为6,000)和0.3M的NaCl,室温中搅拌120分钟、再经15,000rpm离心20分钟,上清液35,000rpm离心2小时,沉淀用上述缓冲液悬浮后,再经两次低速离心得到病毒粗制品,然后密度梯度离心进一步提纯。

(三) 病毒的蔗糖密度梯度离心

将10、20、30、40%的蔗糖溶液,按2、2、3、4ml依次加入12ml的离心管中,置冰箱过夜。加入1ml病毒粗提液,用SW40T1水平转头以27,000rpm,离心2小时。管底穿刺后用紫外监测仪(ISCO TYPE6, Optical unit, UA-5, E254)分部收集。合并各管相应紫外吸收峰的收集物,稀释后用35,000rpm离心2小时,得到提纯的病毒。

(四) 病毒沉降常数的计算

提纯的病毒经UCAEA, 30,000rpm离心,2分钟拍照一次, $T = 16.4$ 校正到 $T = 20$,分析超离心后,用作图法计算沉降常数。

本文于1984年11月20日收到。

承周家炽、张树政教授审阅,特此致谢。

本课题受中国科学院科学基金资助。

(五) 病毒核酸的提取

病毒经 10% SDS 裂解后, 用 2 倍体积的酚: 氯仿(1:1)萃取, 酚相再加入 0.1% SDS 后, 用 1/2 体积的酚: 氯仿(1:1)萃取, 混合两次水相, 加入 2 倍体积冷无水乙醇和 1/10 体积的 pH 4.5, 3M NaAc 置冰箱过夜; 离心后沉淀用无菌水悬浮, 悬浮液再加入 2 倍体积的冷无水乙醇和 3M NaAc 后放置冰箱过夜, 离心得到病毒核酸。

(六) 病毒和病毒核酸的理化性状的测定

按 Loening^[3] 方法, 在已预走 1 小时的 2.4% 聚丙烯酰胺管状凝胶 (0.6 × 8cm) 中加病毒样品 20 μl (2—3 μg/μl), 8℃ 电泳 3 小时 (5mA/管), 缓冲液为 0.04M Tris、0.02M NaAc、0.002M EDTA。电泳后凝胶扫描 (日立 557 型扫描仪) 和以 0.5% 考马斯亮蓝染色。

将病毒加到裂解液中 (0.02M Tris、0.001M EDTA、1% SDS, pH 9.0) 置冰箱中过夜。然后按病毒和裂解液: β-巯基乙醇: 溴酚蓝蔗糖溶液 (10:1:1) 的比例混合。样品在 100℃ 水浴中加热 5 分钟后, 加在 7.5% 的含 SDS 不连续聚丙烯酰胺垂直平板电泳胶中, 电泳 6 小时, 进行病毒外壳蛋白的凝胶电泳。蛋白参照物及电泳缓冲系统按 Laemmli^[4]。

将 15 μl 病毒核酸样品加在预走后的 2.4% 聚丙烯酰胺管状胶 (0.6 × 9cm) 顶部, 8℃ 下电泳 3 小时 (5mA/管), 电泳缓冲液与病毒电泳所用相同。电泳后凝胶扫描和 0.5% 氨基黑染色。

(七) 抗血清制备、免疫双扩散、显色反应

用提取的病毒按常规方法注射家兔, 制备抗血清。用聚肌苷: 聚胞苷 [poly(I):poly(C)] 注射家兔, 制备特异性 dsRNA 抗血清^[5]。通过平板免疫双扩散观察抗原抗体结合的沉淀线, 并观察二苯胺和地衣酚显色反应^[6]。

(八) 孢子和菌丝体细胞的超薄切片

取培养在铺有玻璃纸的培养基上生长的孢子和不同培养时间的菌丝, 分别经 5% 戊二醛和 1% 的四氧化锇双固定, 乙醇系列脱水, 用英国 Epon 812 环氧树脂包埋, 在 LKB-8800 III 型超薄切片机上切片, 再经醋酸氧钽, 柠檬酸铅双染色^[7]。

取不同培养时间的菌丝体细胞超薄切片的电镜照片各 5 张, 用 BIOTRN 型计数器统计, 每

张照片中统计同样大小的 5 个不同区域。

提取的病毒用 2%, pH 4.5 磷钨酸负染。在日立 H-500 型电子显微镜下进行观察。

结果与讨论

(一) 病毒及其核酸的紫外吸收曲线

提取的病毒紫外吸收光谱 $A_{260/280} = 1.42$, $A_{260/240} = 1.11$ 为核蛋白吸收峰 (图 1)。从提纯的病毒中提取的核酸, 在 220—300 nm 测定其 $A_{260/280} = 2.89$ (图 2)。

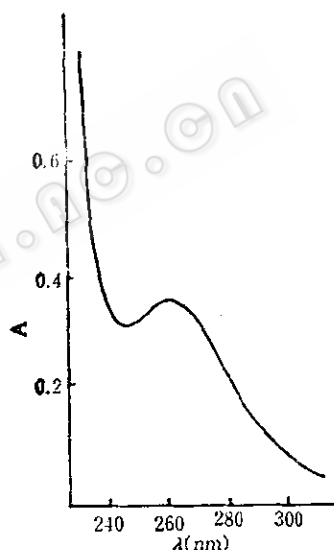


图 1 病毒的紫外吸收曲线

Fig. 1 Ultraviolet absorption spectrum of *A. niger* virus

(二) 病毒的电泳

在 2.4% 聚丙烯酰胺凝胶电泳中病毒呈现一条带 (图 3)。

(三) 病毒核酸的电泳

在 2.4% 聚丙烯酰胺凝胶电泳中病毒核酸呈现 5 条带 (图 4)。

(四) 病毒蔗糖密度梯度离心

在蔗糖连续梯度液中离心, 病毒呈现 3 个分部 (图 5)。

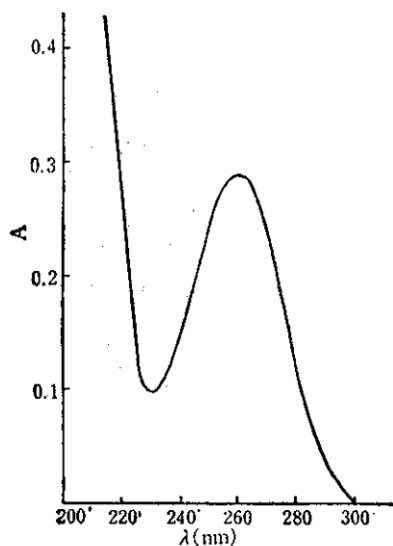


图2 病毒核酸的紫外吸收曲线

Fig. 2 Ultraviolet absorption spectrum of *A. niger* virus RNA

图3 病毒在 2.4% 凝胶中的电泳图

Fig. 3 2.4% polyacrylamide gel electrophoresis of virus preparation for 180 min 5mA/tube

(五) 病毒的沉降系数

经分析超离心后所得病毒的沉降系数分别为 $S_{20,w} = 161$, $S_{20,w} = 118$, $S_{20,w} = 94$ 。病毒样品沉降图谱如图 6。

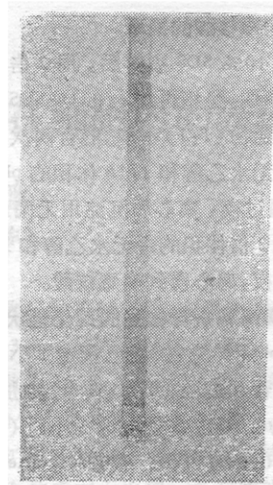


图4 病毒核酸凝胶电泳

Fig. 4 Polyacrylamide gel electrophoresis of dsRNA

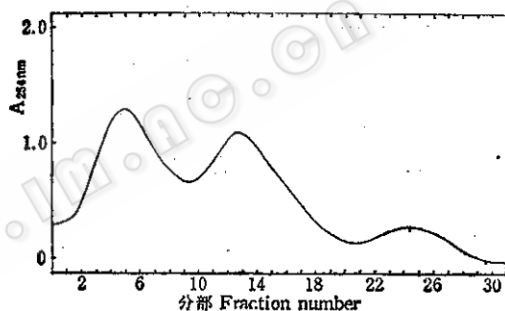


图5 病毒蔗糖梯度离心后的紫外吸收曲线

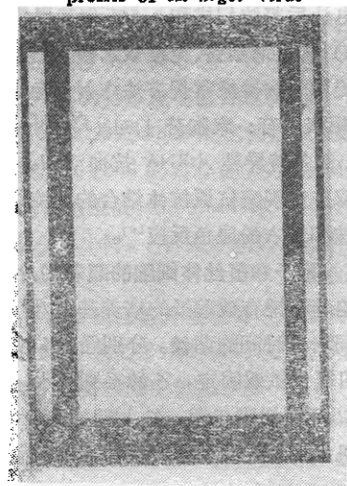
Fig. 5 Sucrose density gradient sedimentation profile of *A. niger* virus

图6 病毒的沉降图谱

Fig. 6 Sedimentation profile of *A. niger* virus, from left to right

(六) 病毒外壳蛋白的电泳

在 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳中测定病毒外壳蛋白有一条主要多肽, 分子量为 90,000 和次要多肽分子量为 82,000、76,000、52,000、42,000 (图 7、8)。

(七) 病毒及其核酸的免疫双扩散和显色反应

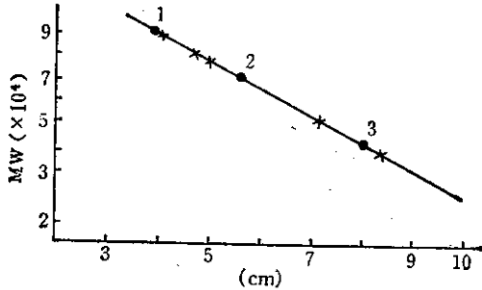


图 7 病毒外壳蛋白分子量的测定

Fig. 7 Molecular weight determination of virus protein coat

7.5% SDS 不连续 PAGE. 标准蛋白: 1. 磷酸化酶 b 分子量 94,000; 2. 牛血清蛋白分子量 67,000; 3. 卵蛋白分子量 43,000; × 病毒外壳蛋白

7.5% SDS discontinuous PAGE

Markers 1. Phosphorylase b MW 94,000.

2. Bovine serum albumin MW 67,000.

3. Ovalbumin MW 43,000.

4. Protein coat of virus (×).

提取的病毒与制备的病毒抗血清在免疫双扩散中, 产生一条清晰的沉淀线(图 9 A)。提取的病毒核酸以及聚肌苷: 聚胞

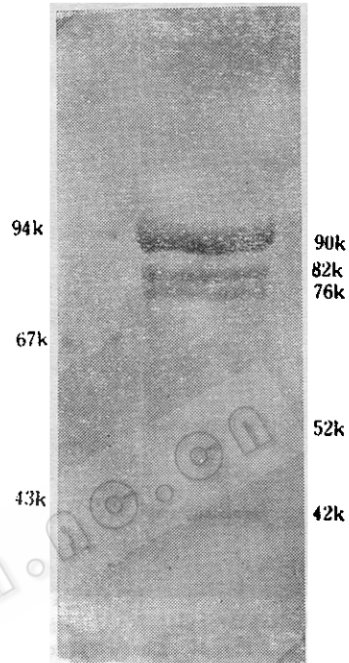


图 8 图 7 的相片, 标准蛋白(左); 衣壳蛋白(右)

Fig. 8 Photograph of Fig. 7. Protein markers (left) Coat proteins (right).

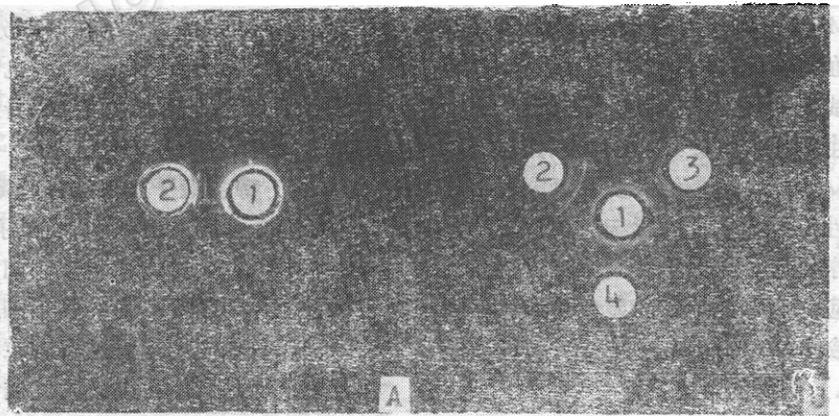


图 9 病毒和病毒核酸的免疫双扩散图

Fig. 9 Immune double diffusion test

A. 病毒与其抗血清的反应: (1) 抗血清; (2) 病毒。 B. 病毒核酸与聚肌苷: 聚胞苷的抗血清反应: (1) 抗血清; (2) 病毒核酸; (3) 聚肌苷: 聚胞苷; (4) TMV-RNA。

(A) Viral antiserum (1) *A. niger* virus (2); (B) Antiserum from poly

(I): poly (C) (1); Virus dsRNA (2); poly(I): poly(C) (3); TMV-ssRNA (4)

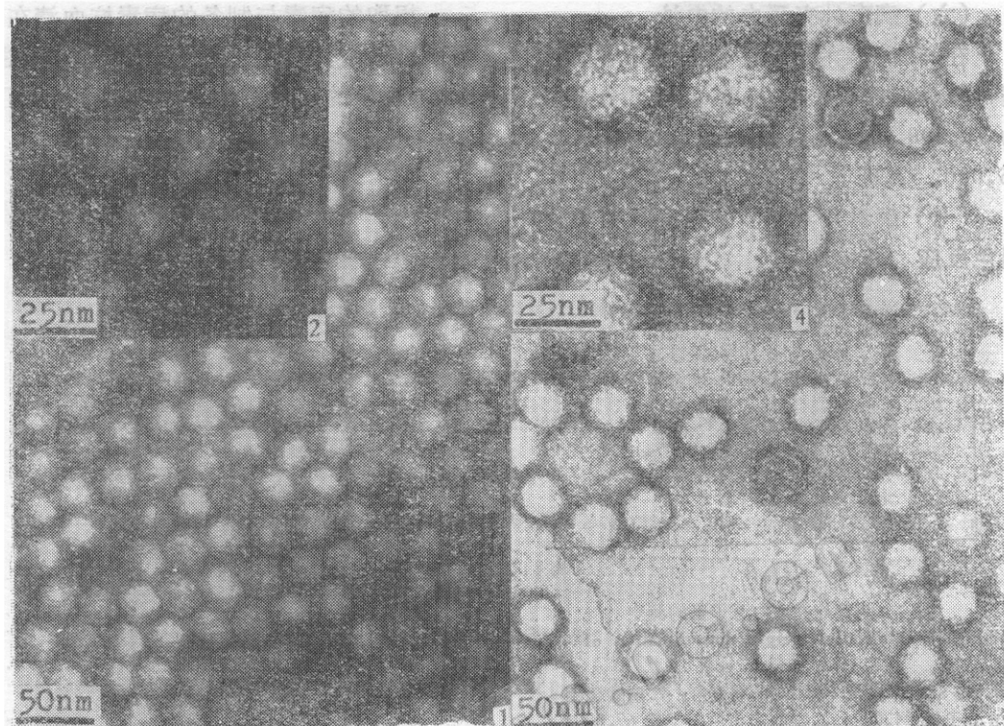


图 10 电镜下观察提纯的病毒

Fig. 10 Characteristics of virus particles extracted from *Aspergillus niger*

1—2. 样品可见呈六面体晶格排列。 3—4. 等轴对称衣壳表面具有突起的病毒颗粒。

1. Showing crystalline arrangements of virus particles; 2. High magnification photograph of (1); 3. Showing morphology and projects of icosahedral virus particles; 4. High magnification photograph of (3).

昔和 TMV 的 RNA 为对照,与聚肌昔:聚胞昔抗血清在免疫双扩散中, TMV-ssRNA 无沉淀线,而病毒核酸以及聚肌昔:聚胞昔则产生明显的沉淀线。表明黑曲霉病毒为 dsRNA 病毒,这是绝大多数真菌病毒的共同特性(图 9B)。病毒与产黄青霉病毒无血清学反应,与聚肌昔:聚胞昔抗血清也无反应。病毒经地衣酚显色为绿色,表明它是含 RNA 的病毒。

(八) 病毒的形态

在电镜下病毒样品多为典型六面体晶格状排列(图 10-1—2),蔗糖密度梯度离心后第三分部的样品为表面有突起的等轴对称颗粒(图 10-3—4)。毒粒直径为 28—31nm,包括突起两端的直径为 33nm。在

第一分部未见此种颗粒,在第二分部偶见,多数为中心电子致密的颗粒。电镜下这些颗粒形态的差别是属于颗粒本身还是人为的尚难以判断。

(九) 寄主孢子及菌丝体超薄切片

培养 9 天和 12 天的黑曲霉孢子的超薄切片中可见大量病毒分散在细胞质内,病毒直径为 26—28.5 nm。其它细胞器如线粒体、液泡、核内均未见病毒颗粒。在孢子内大量出现病毒,可以认为此病毒可以通过孢子进行传毒(图版 I-1)。早期菌丝体超薄切片中,在细胞质内可见近似球状紧密聚集的病毒颗粒,并有一层膜包裹着(图版 I-2-5)。但随着菌丝体培养时间延长,这种聚集的颗粒可离散于细胞质内,聚集

内,病毒颗粒的近似球状紧密聚集物及其在胞质内离散状态(见图 11)。

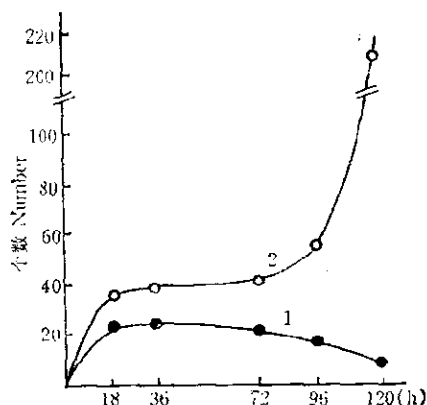


图 11 病毒在寄主细胞内的状态

Fig. 11 Organization of virus in hyphal cells

1. 病毒颗粒的聚集物 clusters of closely aggregated virus particles
2. 单独分散的病毒颗粒 scattered virus particles

根据上述实验结果认为,在黑曲霉菌株中存在一种含有 5 个组分 dsRNA 核酸的病毒,其颗粒直径为 28—33nm。衣壳表面具有突起,衣壳蛋白由 5 种分子量不同的多肽组成。孢子中有病毒存在,说明能自然传毒,但却并不降低孢子本身的活性。看来通过孢子本身传毒,是自然界中真菌病毒传代并得以保存的重要原因。菌丝体细胞超薄切片中,早期包裹病毒颗粒的膜可能是寄主本身具有的防御反应,使病毒局限在一定范围内。这同过去在泡盛曲霉中的报道相同^[8]。但早期病毒颗粒呈近似球状的聚集尚未见报道。通常感染病毒的丝状真菌寄主无明显症状。在现有条件下,也观察不到黑曲霉病毒对寄主有明显的致

的病毒^[9],是从两个亲缘关系相近种的两个菌种中找到的,即 [*A. foetidus* (IMI 41871) 和 *A. niger* (IMI 14689)]。两种菌的病毒形态相近,直径为 40—42nm 的等轴对称颗粒,具有共同的血清反应。以后 Buck 等 (1972, 1973)^[10-11]从 *A. niger* 中得到形态相同而电泳迁移率不同的快和慢的两种病毒颗粒,这两种病毒有不同的血清学反应。外壳由分子量为 130,000 道尔顿的同一种蛋白亚基所组成,沉降常数为 $S_{20w} = 145, 164, 149, 176, 189$ 和 206^[12],与本文报道的黑曲霉病毒的不同。

参 考 文 献

- [1] Hollings, M.: *Nature* (London), 169: 962—965, 1962.
- [2] Hollings, M.: *Advances in Virus Research*, 22: 1—53, 1978.
- [3] Loening, U. E.: *Biochemical Journal*, 102: 251, 1967.
- [4] King, J. and U. K. Laemmli: *J. Mol. Biol.* 62: 465—472, 1971.
- [5] Moffit, E. M. and R. M. Lister: *Phytopath*, 65: 851—859, 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] Reynolds, E. S.: *J. Cell Biol.* 17: 208—212, 1963.
- [8] Wiber, H. et al.: in "Viruses and Plasmids in Fungus", edited by P. A. Lemke. Marcel Dekker Inc. pp. 363—464, 1977.
- [9] Banks, G. C. et al.: *Nature* (London), 227: 505—507, 1970.
- [10] Ratti, G. K. and W. Buck: *J. Gen. Virol.* 14: 165—175, 1972.
- [11] Buck, K. W.: *Biochemical Society Transactions*, 1: 1138—1140, 1973.
- [12] Bozarth, R. F.: in "Viruses and Plasmids in Fungi", pp. 43—91, 1979.

INTRACELLULAR APPEARANCE, MORPHOLOGICAL FEATURE AND PROPERTIES OF *ASPERGILLUS* *NIGER* VIRUS

Liu Hongdi Liang Pingyan

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing)

Icosahedral virus particles of 28—33 nm in diameter were obtained from the glucoamylase producer—*Aspergillus niger*. A typical nucleoprotein absorption spectrum of the virus preparation was shown with a maximum at 260 nm, a minimum at 240 nm and 260:280 ratio of 1.42. A single band on 2.4% polyacrylamide gel electrophoresis and three bands in sucrose density gradients at levels corresponding to 20—30% of the preparation were determined. In immune double diffusion test virus to its antiserum produced a single reaction line.

The nucleic acid derived from virus had an absorption maximum at 260 nm, and 260:280 ratio of 2.89. It was proved to be dsRNA by positive orcinol reaction and immune double diffusion test that a single precipitated line was obtained be-

tween viral nucleic acid and antiserum of poly(I):poly(C). The molecular weight of capsid polypeptides was estimated as 4.2×10^4 — 9.0×10^4 daltons.

Virus particles with dense core have been found in ultrathin sections. These particles were distributed separately or closely aggregated into clusters with granular appearance in cytoplasm of hyphal cells. The clusters were surrounded by membrane. During the growth of cells aggregated virus particles separated and finally scattered in the ground cytoplasm. Incubated cells from aged cultures, most virus particles distributed individually.

Key words

Aspergillus niger virus; Morphological Feature; Properties; Ultrastructure of infected cell

图 版 说 明

孢子和菌丝细胞的超薄切片

1. 孢子的切片中有大量病毒。2—5. 菌丝的超薄切片, 病毒紧密聚集近似球状, 外被一层膜。2—4. 18 小时的菌丝体。5. 36 小时的菌丝体。6—11. 紧密聚集的病毒颗粒减少, 而以单独颗粒分散于细胞质内。6—7. 72 小时的菌丝体。8—9. 96 小时的菌丝体。10—11. 120 小时的菌丝体。

N = 核 Nu = 核仁 L = 类脂体 M = 线粒体 W = 细胞壁 Me = 膜

Ultrasections of hypha and conidium of *Aspergillus niger*

1. A large number of rambling distributed virus particles in the cytoplasm of conidium; 2—5. Ultrasection of hypha showed that the virus particles closely aggregated into cluster enclosed in membrane; 2—4. Hypha incubated after 18 hours; 5. 35 hours; 6—11. During the growth of cells virus particles scattered in the ground cytoplasm and the cluster number of virus particles decreased; 6—7. Hypha incubated after 72 hours; 8—9. 96 hours; 10—11. 120 hours.

N = nucleus Nu = nucleolus L = lipid inclusion M = mitochondrion
Me = membrane W = cell wall