

草菇病毒——一种新的食用菌 ds-RNA 病毒

陈开英 梁平彦

(中国科学院微生物研究所, 北京)

张树庭 尤美莲

(香港中文大学, 香港)

自草菇 (*Volvariella volvacea*) 子实体中分离到一种等轴对称直径为 35nm 左右的病毒颗粒。病毒样品经琼脂糖电泳显示一条区带, 并具有典型核蛋白的紫外吸收光谱。最大吸收为 E257, 最低吸收为 E230, $A_{260}/A_{280} = 1.96$ 。经 SDS-不连续聚丙烯酰胺凝胶电泳解离病毒, 出现一条主要衣壳多肽的电泳带, 分子量为 60,000 道尔顿。病毒核酸的最大吸收在 258 nm, 最低吸收在 232nm, $A_{260}/A_{280} = 2.0$, 琼脂糖电泳为一个组分。

以产黄青霉病毒 (*Penicillium chrysogenum* virus) ds-RNA 和枯草杆菌噬菌体 DNA 作参照物, 对草菇病毒核酸的性质进行了鉴定。病毒核酸抗 DNase (5 μ g/ml), 并在高离子强度 ($2\times$ SSC) 下抗 RNase (20 μ g/ml)。但经过 106 $^{\circ}$ C 10 分钟处理, 变性后样品对 RNase 敏感, 结果表明草菇病毒是 ds-RNA 病毒。

关键词 草菇病毒; 衣壳多肽; 免疫双扩散

栽培蘑菇 (*Agaricus bisporus*) 病毒病害的研究导致真菌病毒的首次发现^[1,2]。以后, 相继在许多真菌中发现了病毒或类似病毒状颗粒^[3,4]。在香菇^[5]、茯苓 (*Poria cocos*)、银耳 (*Tremella fuciformis*)^[6]、平菇 (*Pleurotus ostreatus*)^[7] 等食用菌中所发现的病毒或类似病毒状的颗粒中, 已证实为 ds-RNA 病毒的有双孢蘑菇的球形病毒 (直径 25 和 34—36nm) 和香菇的球形病毒 (直径 39nm)^[9]。已证实为 ss-RNA 的有双孢蘑菇的杆状病毒颗粒 (19 \times 50 nm)^[10], 其余病毒颗粒的性质待定。

本文报道了自草菇子实体中提取到的病毒的形态、理化性质及病毒核酸的 ds-RNA 特性的研究结果。

材料和方 法

(一) 材料来源

草菇来自香港中文大学生物系菇房, 子实体

处于成熟阶段, 采集后保存在 -20 $^{\circ}$ C 备用。

(二) 病毒提取

洗净子实体, 加入 6 倍 (W/V) 0.1M pH 7.6。Tris-HCl 缓冲液, MSE 搅碎机破碎组织, 尼龙布过滤, 上清经 12,000r/min 离心 30 分钟, 弃沉淀后加 7% 聚乙二醇 (MW = 6,000) 和 0.1M NaCl, 4 $^{\circ}$ C 过夜。6,000r/min 收集沉淀, 并将沉淀悬浮在 0.05M Tris-HCl, 1M NaCl, 1mM EDTA, pH 7.6 的缓冲液中, 低速离心弃沉淀, 上清经 34,000r/min 离心 90 分钟, 沉淀悬浮在同一缓冲液中, 低速离心后的上清液为病毒粗制品。

(三) 不连续垂直平板凝胶电泳测定衣壳多肽分子量

病毒内加入解离液 (0.02M Tris, 0.001M EDTA, 1% SDS, pH 9.0) 4 $^{\circ}$ C 过夜。按病毒+解离液: 0.2% 溴酚蓝蔗糖溶液: β -巯基乙醇以 10:1:1 的量混合后, 100 $^{\circ}$ C 水浴内加热 5 分钟, SDS-不连续聚丙烯酰胺凝胶电泳及标准蛋白处理

本文于 1986 年 7 月 11 日收到。
国家自然科学基金资助课题。

按照 King 和 Laemmli^[11] 的方法, 浓缩胶为 3%, 分离胶为 13%, 电压 100V, 电泳 6 小时。

(四) 免疫双扩散

提纯的草菇病毒按照常规方法制备兔抗血清并进行免疫双扩散试验。

(五) 病毒核酸提取及琼脂糖凝胶电泳

病毒提取液加等量苯酚: 氯仿: 异戊醇(50:50:1)抽提两次, 取液相, 加乙醚去除苯酚。液相内加入 0.2M 乙酸钠后, 再加 3 倍体积冷乙醇沉淀核酸。10,000r/min 离心 20 分钟, 收集沉淀, 以 2 × SSC 缓冲液悬浮沉淀, -20℃ 保存备用。电泳条件与 Locning^[12] 的相同。

(六) 病毒核酸的酶解试验

病毒核酸经 106℃ (水-乙二醇) 处理 10 分钟后, 放入冰浴内骤然冷却, 加入 RNase A (Sigma 生产) 20μg/ml, 37℃ 保温 30 分钟。对照不加 RNase 处理, 并以产黄青霉病毒 ds-RNA (分子量为 1.89, 1.99, 2.18 × 10⁶) 为参照物^[13,14], 0.8% 琼脂糖电泳, 电压 100V, 电泳 2 小时或 50V, 4 小时。

病毒核酸加入 DNase I (Sigma 生产) 5μg/ml, 30℃ 保温 60 分钟, 以枯草杆菌噬菌体 SPP1 DNA 加入 DNase 和 SPP1 + EcoRI 加 DNase 或不加 DNase 作酶解参照, 电泳条件同上。

(七) 电镜观察

样品点在覆有 Formvar 膜的铜网上, 2% 磷酸钠或醋酸氧铀染色, 日立 H500 电镜观察。

结果和讨论

(一) 病毒形态、紫外吸收光谱和凝胶电泳

病毒在电镜下呈等轴对称颗粒, 直径为 35nm 左右(图版 I-1)。病毒样品的最大吸收在 257nm, 最小吸收在 230nm, A_{260/280} = 1.96, 为典型的核蛋白吸收光谱。在 0.5% 琼脂糖电泳中有一条病毒带(图版 I-2)。

(二) 病毒的衣壳多肽的电泳组分及分子量测定

病毒经解离液、SDS、巯基乙醇 100℃

解离后, 在聚丙烯酰胺凝胶电泳中得到一条主要多肽, 泳动距离为 2.2cm。牛血清蛋白 (MW = 67,000) 和卵蛋白 (MW = 43,000) 的泳动距离分别为 1.9 和 3.1cm 推算出草菇病毒衣壳多肽分子量为 60,000 道尔顿(图版 I-3)。

(三) 血清反应

用香港草菇病毒制备的抗血清与香港、石家庄及保定栽种的草菇子实体病毒提取物进行免疫双扩散反应, 在抗血清与香港、保定的草菇病毒提取物之间可见两条清晰沉淀带, 而与石家庄的草菇提取物之间无反应, 与食用菌鸡枞提取物之间也无反应(图版 I-4)。这与电镜观察到的保定提取物中有病毒颗粒, 其大小同香港草菇病毒颗粒一样, 而石家庄的草菇提取物中未见病毒颗粒的结果一致。

(四) 病毒核酸的紫外吸收光谱、电泳组分及酶解试验

病毒核酸样品的最大吸收在 258nm, 最低吸收在 232nm, A_{260/280} = 2.0 (图 1)。0.8% 或 1% 琼脂糖电泳均可见一条电泳带, 泳动距离较产黄青霉病毒 ds-RNA 和枯草杆菌噬菌体 SPP1 + EcoRI 短(图版 I-5)。

为了确定病毒核酸的性质, 进行了以下酶解试验。用枯草杆菌噬菌体 SPP1 + EcoRI 作为参照, SPP1 + EcoRI 加 DNase, 或 SPP1 + EcoRI 而不加 DNase 保温处理。前者全部酶解, 无电泳带(图版 I-6A), 后者可见分子量不同的电泳带(图版 I-6B)。病毒核酸内加入 DNase 保温后与未加 DNase 者相同, 均有泳动距离一样的电泳带(图版 I-6C、D)。结果表明草菇病毒并非 DNA 病毒。

鉴于真菌病毒多数是 ds-RNA 病毒, 试验在高离子条件下(2 × SSC 缓冲液)的病毒核酸内加入 RNase, 并用产黄青霉病

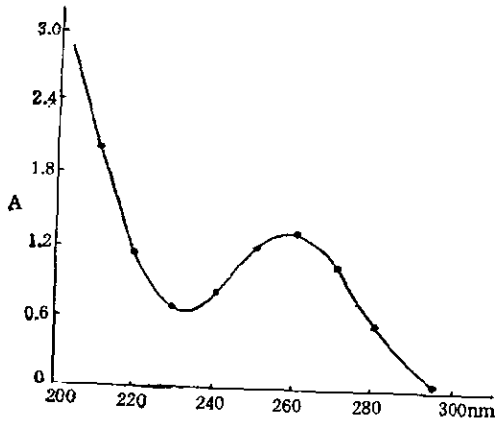


图 1 草菇病毒核酸的紫外吸收光谱

Fig. 1 Ultra violet spectrum of *Volvarstella volvacea* viral nucleic acid

毒 ds-RNA 为参照。结果表明,原有电泳带无变化(图版 I-6E、G、H),而经过 106°C 10 分钟变性后,再加 RNase 处理的电泳带不复存在(图版 I-6F、I)。热变性后,双链解开,增加了对 RNase 的敏感性是 ds-RNA 的特性,酶解试验表明,草菇病毒是 ds-RNA 病毒。

草菇 ds-RNA 病毒的存在,是食用菌中继双孢蘑菇和香菇之后,发现的又一个 ds-RNA 病毒。日本 Ushiyama^[15]在发现香菇病毒之后,曾试图从草菇子实体中分离病毒,但未能成功。此病毒含量低,核酸

占病毒的比例高,分子量大是其特点。病毒对草菇生长的影响及病毒存在的普遍性及 ds-RNA 的作用等尚待研究。

参 考 文 献

- [1] Hollings, M.: *Nature* (London), 196: 962—965, 1962.
- [2] Hollings, M. et al.: *Endeavour*, 22: 112—117, 1963.
- [3] Lemke, P.: *Annu Rev Microbiol.*, 30: 105—145, 1976.
- [4] Lemke, P.: *Am. Soc. Microbiol.*, Washington DC, pp. 568—570, 1977.
- [5] Ushiyama, R.: *Proc. Int. Intersect Cong. IAMS*, 3: 402—406, 1975.
- [6] 梁平彦等: *微生物学通报*, 26(3): 23—27, 1982.
- [7] 刘宏迪等: *微生物学报*, 26(3): 221—225, 1986.
- [8] Marine, R. et al.: *Appl. Environ Microbiol.*, 31: 433—438, 1976.
- [9] Ushiyama, R. et al.: *Virology*, 77: 880—883, 1977.
- [10] Molin, G. et al.: *Ann. Phytopathology*, 5: 233—240, 1973.
- [11] King, J. et al.: *J. Mol. Biol.*, 62: 465—472, 1971.
- [12] Loening, U. E.: *Biochemical Journal*, 102: 251—257, 1967.
- [13] Wood, H. et al.: *Virology*, 47: 604—609, 1972.
- [14] Buck, K. et al.: *J. Gen. Virology*, 34: 145—154, 1977.
- [15] Ushiyama, R.: In "Fungal viruses", XIth International Congress of Microbiology, Mycology Section, Munich, 3—8 September, 1978, pp. 25—33, 1979.

VOLVARIELLA VOLVACEA VIRUS—A NEW FUNGAL dsRNA VIRUS FROM MUSHROOM

Chen Kaiying Liang Pinyan

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing)

S. T. Chang M. L. Yu

(Department of Biology, The Chinese University of Hong Kong)

Icosahedral virus particles of 35 nm in diameter have been found in the fruit body of straw mushroom, *Volvariella volvacea*, collected in the Chinese University of Hong Kong. The virus preparations had a typically nucleoprotein ultraviolet spectrum with the maximum absorption at 257 nm and the minimum at 230 nm, the A 260/280 ratio was 1.96. One electrophoresis band appeared in 0.5% agarose gel. One band of coat polypeptide with molecular weight of 60,000 dalton was obtained during 13% SDS discontinuous polyacrylamide gel electrophoresis.

Nucleic acid prepared by phenol: chloroform: isoamyl alcohol (50 : 50 : 1) extraction of virus particles revealed a single band at

0.8% agarose gel electrophoresis.

The properties of nucleic acid have been detected by DNase or RNase treatment with *Penicillium chrysogenum* viral dsRNA and *Bacillus subtilis* bacteriophage SPP1 DNA as controls and showed that viral nucleic acid resisted to DNase and to RNase at a high ionic concentration (2SSC), but was sensitive to RNase after denaturing at 106°C for 10 min. Results indicated that *Volvariella volvacea* viral nucleic acid was dsRNA.

Key words

Volvariella volvacea virus; Capsid polypeptide; Immune double diffusion

图 版 说 明

Explanation of plate

1. 草菇子实体中病毒颗粒, 左: PTA 负染; 右: 醋酸双氧铀染色。
2. 0.5% 琼脂糖凝胶电泳图, 示草菇病毒一条带。
3. 13% SDS-不连续聚丙烯酰胺凝胶电泳图, 示一条分子量为 60,000 道尔顿的衣壳多肽。
4. 免疫双扩散:
 - 中心孔穴: 用香港草菇病毒制备的抗血清。
 - 孔 1. 自香港草菇提取的病毒。
 - 2、3. 食用菌鸡枞提取物的病毒的分部。
 - 4. 自保定草菇提取的病毒。
 - 5. 石家庄草菇提取物的病毒的分部。
5. 草菇病毒核酸的电泳图:
 - A. 产黄青霉病毒核酸(分子量为 1.89, 1.99, 2.18 × 10⁶);
 - B. 草菇病毒核酸;
 - C. SPP1 + *EcoRI*。
6. 草菇病毒核酸酶解后的 0.8% 琼脂糖电泳图:
 - A. SPP1 + *EcoRI* + DNase
 - B. SPP1 + *EcoRI*

- C. 草菇病毒核酸+DNase
 - D. 草菇病毒核糖
 - E. 草菇病毒核酸+RNase
 - F. 变性后的草菇病毒核酸+RNase
 - G. 产黄青霉病毒 ds-RNA
 - H. 产黄青霉病毒 ds-RNA + RNase
 - I. 变性后的产黄青霉病毒 ds-RNA + RNase
1. Electron micrograph of virus particles from *Volvariella volvacea*.
Left: Negative stained with sodium phosphotungstate.
Right: Positive stained with uranyl acetate.
 2. 0.5% agarose gel electrophorogram of *Volvariella volvacea* virus showing one band.
 3. 13% SDS-discontinuous polyacrylamide gel electrophoresis showing one major coat polypeptide band with M. W. of 60,000 dalton.
 4. Ouchterlony immune double diffusion test.
Central well: Antiserum to *Volvariella volvacea* virus Hong Kong.
Well: 1. *Volvariella volvacea* virus Hong Kong.
2,3. Extracts from *Collybia albuminosa*.
4. *Volvariella volvacea* virus Baoding.
5. Extracts from *Volvariella volvacea* Shijiazhuang.
 5. Gel electrophorogram of *Volvariella volvacea* virus nucleic acid.
A. *Penicillium chrysogenum* virus dsRNA, M. W. $1.89, 1.99, 2.18 \times 10^6$.
B. *Volvariella volvacea* virus nucleic acid.
C. SPP1 + EcoRI.
 6. 0.8% agarose gel electrophorogram of *Volvariella volvacea* virus nucleic acid treated with RNase or DNase with *Penicillium chrysogenum* virus dsRNA or SPP1 + EcoRI as controls.
A. SPP1 + EcoRI + DNase.
B. SPP1 + EcoRI.
C. *Volvariella volvacea* virus nucleic acid treated with DNase.
D. *Volvariella volvacea* virus nucleic acid untreated.
E. *Volvariella volvacea* virus nucleic acid treated with RNase.
F. *Volvariella volvacea* virus nucleic acid at 106°C for 10min after RNase treatment showing no band.
G. *Penicillium chrysogenum* virus dsRNA untreated.
H. *Penicillium chrysogenum* virus dsRNA treated with RNase.
I. *Penicillium chrysogenum* virus dsRNA at 106°C for 10min before being treated with RNase.