

## 黑曲霉病毒含量与寄主葡萄糖淀粉酶产量之间的相关性

刘宏迪 梁平彦

(中国科学院微生物研究所, 北京)

我国工业上广泛应用的葡萄糖淀粉酶生产菌黑曲霉 (*Aspergillus niger*) 体内含有大量病毒。选择在育种筛选中葡萄糖淀粉酶产量不同的菌株, 挑选不同方式保藏传代造成葡萄糖淀粉酶产量不同的菌株, 以及经化学试剂处理后葡萄糖淀粉酶产量不同的菌株。分别进行病毒提取, 电镜观察、免疫双扩散、 $^3\text{H}$  标记放射免疫测定病毒在体内的滴定度,  $^3\text{H}$  标记后提取病毒及病毒核酸测定对体内病毒核酸的参入, 及 PAS-ELISA (酶联 A 蛋白夹层酶联免疫吸附法 Staphylococcus protein A sandwich ELISA) 与 SA-test (病毒葡萄球菌共凝集试验 Virus staphylococcal co-agglutination test) 检测病毒含量, 并且测定了葡萄糖淀粉酶的产量。证实了黑曲霉细胞内病毒的含量与黑曲霉的葡萄糖淀粉酶产量之间呈正相关性。

**关键词** 黑曲霉病毒; 葡萄糖淀粉酶

真菌病毒与代谢产物关系的研究表明, 病毒通常并不参与次生代谢产物的产生<sup>[1]</sup>。不少研究证明真菌毒素, 如真菌酚酸、棒曲霉素和胶毒素具有控制或限制病毒或病毒 dsRNA 的复制作用<sup>[2-4]</sup>, 但上述研究多以青霉如匍枝青霉 (*Penicillium stoloniferum*) 为材料。在曲霉中, 尤其是工业用酶的产生菌却很少研究。1979 年 Vitale 以泡盛曲霉 (*Aspergillus awamori*) 为材料, 比较了亲本及经温度处理的后代中病毒含量与葡萄糖淀粉酶的产生量, 提出了酶产量与病毒浓度之间有相关性的现象<sup>[5]</sup>。作者采用含有直径 28—33nm 的等轴对称病毒<sup>[6]</sup>的工业葡萄糖淀粉酶生产菌株 AS 3.4309UV-11 经不同剂量放线菌素 D、溴化乙锭、紫外线处理, 以及不同方式保存后得到的后代进行了病毒含量及葡萄糖淀粉酶产量的比较研究, 证实了病毒含量浓度与酶产量之间呈正相关。

## 材料和方法

### (一) 菌种

#### 1. 育种筛选中获得的菌株:

① AS 3.4309 UV-11 本所供给 (从土壤中分离出 202 经  $^{60}\text{Co}$ 、紫外线、亚硝基胍 (NTG) 等物理和化学诱变因子交替处理后获得的 UV-11 变异株)。

② AS 3.4309 UV-11-48、3.4309 UV-11-21、UV-1 再诱变获得, 本所供给。

③ AS 3.4309 UV-11-17 由 UV-11 原生质体经紫外线照射后再生获得。

#### 2. 不同保藏方式传代后的菌株:

① AS 3.4309 UV-11 (a) 牛奶冷冻干粉保藏。

② AS 3.4309 UV-11 (f) 麸皮孢子保藏。

上述两株菌多次传代的菌株。

本文于 1988 年 11 月 11 日收到。

本研究项目由中国科学院青年基金资助。

张科政教授审阅此文, 特此致谢。

表1 不同变异株的处理方法及时间

Table 1 Methods of treatment of experimental strains in *Aspergillus niger*

菌株 Strains	处理方法( $\mu\text{g/ml}$ ) Treatment	时间(d) Time
D-1	放线菌素 D Actinomycin D 400 $\mu\text{g}$	120
D-25	200 $\mu\text{g}$	120
D-29	300 $\mu\text{g}$	120
D-50	50 $\mu\text{g}$	150
D-100	100 $\mu\text{g}$	30
EB-23	溴化乙锭 Ethidium bromide 2000 $\mu\text{g}$	150
EB-27	1500 $\mu\text{g}$	120
EB-32	2000 $\mu\text{g}$	120
EB-35	50 $\mu\text{g}$	120
EB-39	100 $\mu\text{g}$	180
EB-50	500 $\mu\text{g}$	180
AS 3.4309 UV-11 (原始菌株)	未处理 Untreated	

3. 以 AS 3.4309 UV-11 作为原始菌经不同化学试剂诱变得到的变异株(表1)。

#### (二) 培养基及培养方法

马铃薯葡萄糖(PTA)加入0.02—0.05% 维生素 $B_1$ 的液体培养基。新鲜孢子接种,摇床或静止培养。

#### (三) 化学试剂处理菌体

最初培养适应浓度放线菌素D为5 $\mu\text{g/ml}$ ,溴化乙锭(EB)为17.5 $\mu\text{g/ml}$ ,在液体培养基中30 $^{\circ}\text{C}$ 培养两周,将长出的菌丝按表1内的浓度转换,连续转代培养,最终转换到斜面培养基上。

#### (四) 病毒提取、电镜观察、免疫双扩散

方法同文献[6]。

#### (五) 放射免疫法测定病毒

50ml三角瓶内装15ml上述培养基,定量接种孢子悬浮液,30 $^{\circ}\text{C}$ 摇瓶培养24h,按1 $\mu\text{Ci/ml}$ 加入 $^3\text{H}$ 尿嘧啶(上海原子核研究所生产),继续培养48h后收集菌丝体,充分洗涤后用滤纸压干,定量称取后加10倍(W/V)0.05mol/L磷酸缓冲液(pH7.0)组织捣碎机充分破碎后,经9000r/min离心,上清液按(W/V)加入6%的PEG(聚乙二醇,分子量为6000)和0.3mol/L NaCl沉淀过夜,9000r/min离心弃上清,沉淀充分悬浮,15000r/min离心。上清液中加入等体积按1:8稀释的抗血清,37 $^{\circ}\text{C}$ 温育3h,置冰箱过夜,6000r/min离心,弃上清液。将沉淀洗涤2次后定量悬

浮,在Whatman 3号纸上点样,干燥后经10%三氯乙酸固定,乙醇、乙醚洗涤吹干,加入装有5ml闪烁液的测量瓶中,用液体闪烁计(BECKMAN LS 9800 LS 5801A)测量放射活性<sup>[7]</sup>。

#### (六) 检测标记病毒及病毒核酸的 $^3\text{H}$ 参入

按上述方法标记菌丝体,收集菌体,各待测样品均取10g。按文献[6]提取病毒及病毒核酸,最终病毒样品悬浮1.2ml取200 $\mu\text{l}$ 按上述方法点样检测。

各检测样品的核酸取6 $\mu\text{l}$ ,各检测样品的核酸参照不同的记数,均取500CPM相同记数所相应的 $\mu\text{l}$ 数,将样品加入预走后的5%聚丙烯酰胺平板胶中。然后400mA 100V走3h,银染色检测。

#### (七) PAS-ELISA 检测病毒

定量称取10g静止培养一周的菌丝体,加10倍(W/V)上述缓冲液及少许金钢砂,研钵中磨碎,9000r/min离心20min,取上清液,各待测样品均按照10、20、40、80、160、320、640、1280、2360倍稀释。具体步骤参照文献[8,10]。

#### (八) SA-test 检测病毒

取上述离心后的匀浆上清液与包被AnV抗血清的葡萄球菌菌体各20 $\mu\text{l}$ ,在载玻片上用玻璃棒混匀,2min后观察。方法参照文献[9,10]。

#### (九) 葡萄糖淀粉酶产量的测定

按文献[11]。

## 结 果

### (一) 葡萄糖淀粉酶产生菌亲株及后代病毒的检测

电镜观察及免疫双扩散试验检测了原始菌株 AS 3.4309 UV-11, 以及经过 50—400  $\mu\text{g/ml}$  放线菌素 D 或 50—2000  $\mu\text{g/ml}$  溴化乙锭培养获得的突变株, 诱变得到的高产工业用菌株和不同保藏方式传代的菌株。从 18 株菌的检测中看出, 经溴化乙锭处理后, 病毒含量减少或检测不出病毒, 经放射菌素 D 处理的病毒含量减少或变化不明显, 原生质体经紫外处理后再生株也有变化, 如表 2 所示。从中选出 11 株菌, 体内  $^3\text{H}$  标记测定病毒滴度并比较酶的产生量。

### (二) 放射免疫测定亲株及后代病毒滴度及酶产量比较

首先对本实验室经放线菌素 D 及溴化

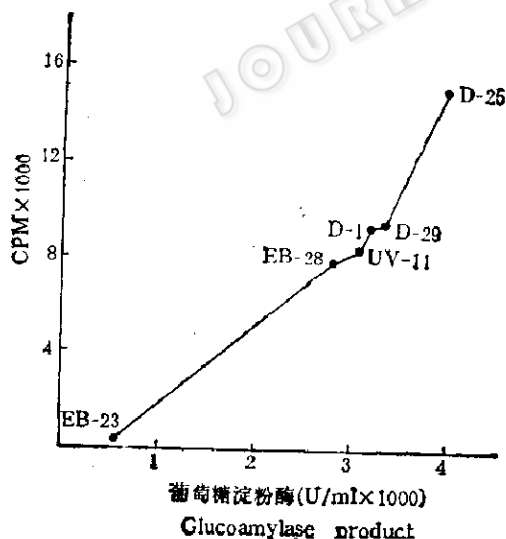


图1 放射免疫测定病毒与酶产量的比较

Fig. 1 Correlation of glucoamylase product and virus contain in *A. niger*  
(The virus contain was measured by radion immune test)

乙锭处理后的 10 株产酶水平不同、形态性状各异的菌株进行了  $^3\text{H}$  尿嘧啶标记后放射免疫测定病毒滴度, 以亲本 AS 3.4309 UV-11 为对照。以产酶能力作为横轴,  $^3\text{H}$  参入记数为纵轴, 各菌株在体内病毒的滴度与其寄主本身葡萄糖淀粉酶的产生能力之间存在的相关性见图 1、2。

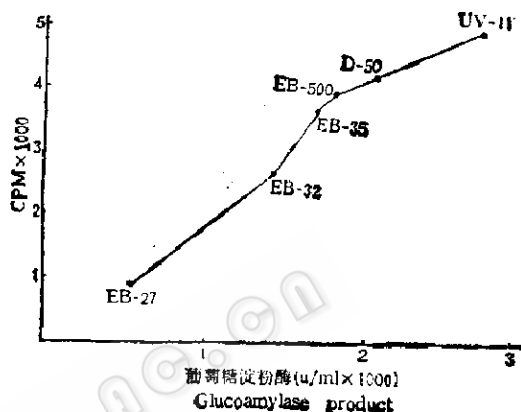


图2 放射免疫测定病毒滴度与酶产量的比较

Fig. 2 Correlation of glucoamylase product virus contain in *A. niger*  
(The virus contain was measured by radion immune test)

### (三) 对病毒及病毒核酸 $^3\text{H}$ 参入的检测

为了进一步比较酶产量与病毒含量的关系, 采用  $^3\text{H}$  体内标记后提纯病毒及病毒核酸直接检测  $^3\text{H}$  的参入, 对我国现在广泛用于工业生产菌 AS 3.4309 UV-11、AS 3.4309 UV-11-48 和 AS 3.4309 UV-11-21 以及经上述方法证实酶产量和病毒含量均低的 EB-23 和 EB-27 进行了测定(上述各菌均在本实验室斜面传代保藏一年半以上)。同时测定了葡萄糖淀粉酶的产量, 对其结果进行了比较。两者之间的相关性如图 3 所示。

聚丙烯酰胺凝胶平板电泳的检测结果表明, 不同菌株在  $^3\text{H}$  标记后, 提纯的病毒核酸加样量为 6  $\mu\text{l}$  时, 其银染的结果可以

表 2 不同菌株病毒的电镜观察及免疫双扩散检测

Table 2 Detection of virus in parent and offspring in *A. niger* by means of EM and immune double diffusion test

菌 株 Strains	电 镜 观 察 Electron microscopy	免 疫 双 扩 散 Immune double diffusion test
AS 3.4309 UV-11	+++	+
AS 3.4309 UV-11-48	+++	+
AS 3.4309 UV-11-21	+++	+
AS 3.4309 UV-11-17	+++	+
AS 3.4309 UV-11(n)	+++	
AS 3.4309 UV-11(f)	+++	
D-1	+++	+
D-25	+++	+
D-29	+++	+
D-50	++	+-
D-100	++	+
EB-23	-	-
EB-27	-	-
EB-28	+	+-
EB-32	-	-
EB-35	++	+
EB-39	+	+-
EB-500	++	+

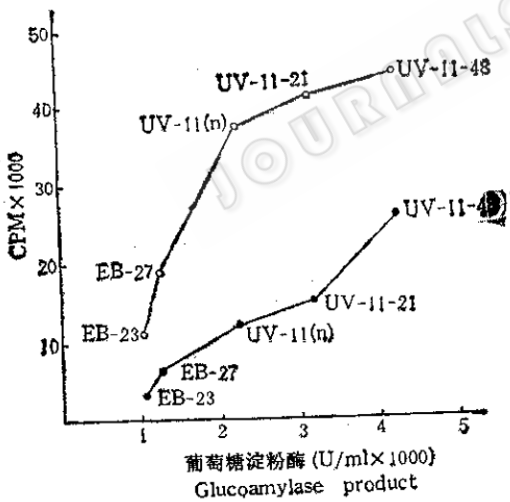


图 3 病毒及病毒核酸 <sup>3</sup>H 参与与酶产量的比较  
Fig. 3 Correlation of glucoamylase product and virus contain *A. niger*

- <sup>3</sup>H 在病毒中的参与与酶产量的比较
- <sup>3</sup>H 在病毒核酸中的参与与酶产量的比较
- <sup>3</sup>H labelled viruses
- <sup>3</sup>H labelled viral dsRNA

看出,核酸量的不同,而各菌株病毒核酸均

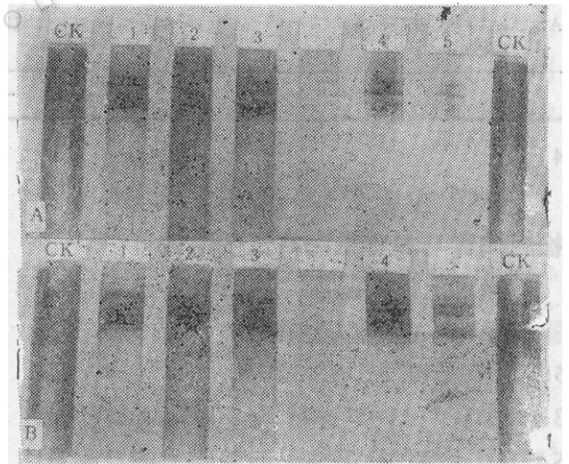


图 4 病毒核酸 5% 聚丙烯酰胺凝胶电泳  
Fig. 4 5% polyacrylamide gel electrophoresis of viruses in parent strain and offspring in *A. niger*

- A. 加样 6μl B. 加样 500CPM
- 1. UV-11(n) 2. UV-11-48 3. UV-11-21
- 4. EB-27 5. EB-23 CK. UV-11

调整记数在 500CPM 时加样,银染结果证实核酸含量趋于一致,在同一水平上(图

表 3 PAS-ELISA 和 SA-test 检测病毒与酶产量比较

Table 3 Comparison of virus and glucoamylase product in *A. niger* by PAS-ELISA and SA-test

菌株 Strains	PAS-ELISA (492 nm)										SA-test	酶量 (U/ml) Glucoamylase
AS 3.4309 UV-11(n)	0.55	0.55	0.43	0.42	0.41	0.40	0.36	0.29	0.25		++	2223
AS 3.4309 UV-11-48	0.72	0.64	0.60	0.55	0.46	0.44	0.38	0.32	0.22		+++	4360
AS 3.4309 UV-11-21	0.63	0.60	0.60	0.58	0.54	0.45	0.36	0.30	0.25		++	3078
EB-27	0.50	0.40	0.42	0.36	0.08	0.04	0.03	—	—		—	1282
EB-23	0.40	0.25	0.30	0.08	0.04	—	—	—	—		—	1026
AS 3.4309 UV-11-17	0.44	0.26	0.22	0.10	0.05	—	—	—	—		—	726
D-50	0.70	0.54	0.46	0.46	0.22	0.14	0.08	0.04	—		—	1667
D-100	0.70	0.68	0.64	0.50	0.42	0.34	0.24	0.20	0.22		++	2257
AS 3.4309 UV-11(f)	0.83	0.62	0.62	0.32	0.06	0.04	0.02	0.01	—		+	1624
EB-32	0.45	0.45	0.22	0.20	0.07	0.04	0.02	—	—		—	1368
EB-39	0.80	0.78	0.64	0.42	0.34	0.24	0.22	0.14	0.08		+	1539
提纯的病毒 AS 3.4309 UV-11 ng/ml				0.45	0.43	0.37	0.25	0.09	0.09		+++	
				700	350	175	87.5	43.7	21.8			
<i>A. oryzae</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—		—	

4)。

#### (四) 应用 PAS-ELISA 和 SA-test 检测病毒与其寄主酶产量的比较

除对上述实验所用菌株外,还对本实验室保存一年半以上的变异株 D-39、D-50、D-100 和 AS 3.4309 UV-11 (f)、AS 3.4309 UV-11-17进行了 PAS-ELISA 及 SA-test 检测,检测结果与其寄主酶产量进行了比较。两实验以米曲霉 (*Aspergillus oryzae*) 为阴性对照,以提纯的病毒为阳性对照。经多次实验表明两者之间的相关性如表 3。这两项实验探讨了非放射性标记的高灵敏度的病毒检测方法。

## 讨 论

黑曲霉病毒同大多数真菌病毒一样以

隐蔽状态存在于寄主中。在菌丝体通过胞质分裂形成孢子时,病毒同时被就位分配到每个孢子中,从而世代传递下去。黑曲霉孢子不耐高温(试验证明 AS 3.4309 UV-11 的孢子 60℃ 处理时即丧失活性),故不能像双孢蘑菇 (*Agaricus bisporus*)、酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)、青霉 (*Penicillium*) 所使用的 70—74℃ 的热处理脱毒。已知 AS 3.4309 UV-11 是反复使用各种物理方法如 <sup>60</sup>Co、紫外线辐射及化学试剂亚硝基胍等大剂量处理后得到的变异株。目前工业上使用的菌株 AS 3.4309 UV-11-21、AS 3.4309 UV-11-48 也是以原生产用菌 AS 3.4309 UV-11 作为原始菌株,采用上述方法选育得到的变异株。作者用同一原始菌株经放线菌素

D、溴化乙锭处理等处理方法得到的变异株,与上述菌株一起,进行了体内病毒含量及寄主葡萄糖淀粉酶产量的测定,并进行了两者之间相关性的比较。

Votera 1975 年在研究桔青霉 (*P. citrinum*) 中的直径 19 和 28nm 的病毒时曾报道过,抗生素的产生和生长速度上的差别都可能与病毒有关系。1978 年 Vitale 等也用血清学免疫双扩散的方法对泡盛曲霉中病毒含量与葡萄糖淀粉酶产量进行了研究,证实两者之间存在相关性。本实验室在 1981 年发现产黄青霉 (*P. chrysogenum*) 体内病毒滴定度较诱变前减少 20% 时,青霉素效价减少 50%<sup>[11]</sup>。

本试验结果表明,各诱变菌株中体内病毒含量低时,寄主的葡萄糖淀粉酶产生能力也相应减低。与原始菌株 AS 3.4309 UV-11 相比,当 EB-23 病毒含量比诱变前低 62%,其葡萄糖淀粉酶产生能力也相应低 84%。而当菌株 AS 3.4309 UV-11-48 中病毒含量高于 AS 3.4309 UV-11 诱变前 129%,其葡萄糖淀粉酶的产生能力也相应高 103%。证实在黑曲霉体内病毒的含量与其寄主本身的代谢产物葡萄糖淀粉酶产量两者之间呈正相关。

根据 Buck 的观点,真菌病毒量取决于病毒开始感染细胞内最初病毒量。一旦病毒与寄主之间的共存关系固定后,病毒就与细胞同步平行复制<sup>[12]</sup>。已知黑曲霉病毒是孢子传的<sup>[6]</sup>,经诱变的菌株中病毒与寄主的关系固定后,也就决定了与其呈正相关的葡萄糖淀粉酶的产量。从真菌病毒复制的角度看,病毒与细胞的同步平行复制决定了体内病毒含量的相对稳定。在我们连续传代一年半以上的各诱变株中这种关系也相当稳定。

已知真菌的双链 dsRNA 病毒不同于呼肠孤病毒,其聚合酶的活性依赖于二价

镁离子受 EB 的抑制。当 EB 诱变的各菌株中病毒量下降,在传代时可看作最初感染细胞的病毒量少,连续传代一年半以上病毒量还在同一水平上。我们认为这一现象支持了上述 Buck 的观点。另外,在植物 dsRNA 病毒的报道中,认为放线菌素 D 能抑制依赖于 DNA 的 RNA 合成,当放线菌素 D 抑制寄主的依赖于 DNA 的 RNA 合成后,病毒的 RNA 复制水平将提高<sup>[13]</sup>。在我们的实验中用放线菌素 D 处理的菌株中也能见到此现象,虽然对植物的 dsRNA 病毒复制中放线菌素 D 的作用至今还有不同看法,但这一现象在真菌 dsRNA 病毒的研究中是值得注意的。

真菌的许多胞质遗传特性常与病毒的 dsRNA 有关,如玉米黑粉菌 (*Ustilago maydis*)、酿酒酵母存在的致死体系等。而黑曲霉的葡萄糖淀粉酶产生能力是否与胞质基因有关,目前尚不清楚。病毒含量与其寄主代谢产物葡萄糖淀粉酶产量两者之间的正相关,能否看作是病毒与寄主长期共存中高度适应相互调节造成的结果,待进一步研究。

## 参 考 文 献

- [1] Detroy, R. W.: 1979 in Fungal Viruses. XIIth international Congress of Microbiology, Mycology Section, Section, Munich, 3—8 September, pp. 94—107, 1978.
- [2] Detroy, R. W. et al.: *Can. J. Microbiol.*, **19**: 1459—1462, 1973.
- [3] Benigni, A. J.: *Mycovirus News*, **6**: 5—9, 1978.
- [4] Borre, C. et al.: *Natur (London)*, **229**: 568—569, 1971.
- [5] Vitale, L. J. et al.: *Fungal Viruses*, p. 187, 1979.
- [6] 刘宏迪等: *微生物学报*, **25**(2): 108—114, 1985.
- [7] 梁平彦等: *微生物学报*, **21**(1): 77—82, 1981.
- [8] Skaug, K. et al.: *Acta Path Microbiol. Immunol Scand*, **91B**: 175, 1983.
- [9] 刘宏迪等: *病毒学报*, **4**(2): 157—161, 1988.
- [10] Edwards, M. L.: *J. Virol. Methods*, **11**: 309, 1985.

[11] Browne, C. A. et al.: *Physical and Chemical Methods of Sugar Analysis*, Third Edition, pp. 895—896, 1948.

[12] Buck, K. W. S.: *Nucl. Acids Res.*, 2: 1889—1902, 1979.

[13] 田颖川等: 微生物学报, 22(4): 516, 1982.

## VIRUS OF *ASPERGILLUS NIGER* AND THE PRODUCTION OF GLUCOAMYLASE

Liu Hongdi    Liang Pingyan

(*Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing*)

Icosahedral virus particles of 26—33 nm in diameter have been found in *Aspergillus niger* AS 3.4309 an industrial glucoamylase producer. But little is known about effects of virus on enzyme production. We have examined for the presence of virus in 18 strains and the correlation between the virus concentration and glucoamylase product.

Antiserum to virus from *A. niger* AS 3.4309 was prepared and used in an immune radioactive assay for quantitative determination of virus. Concentration of  $^3\text{H}$  labelled virus or viral-dsRNA were determined in

mycelia of *A. niger* parent strain and offspring obtained after being treated with Actinomycin D, ethidium bromide, UV and being stored in different conditions. Results indicated that the virus titre was correlated with the glucoamylase product, that is, strains with higher output of enzyme associated with higher concentrations of virus.

### Key words

*Aspergillus niger* virus; Glucoamylase production