

产黄青霉菌 (*Penicillium chrysogenum*) 的病毒及其双链核糖核酸的鉴定

中国科学院微生物研究所真菌病毒组*

(北京)

用电子显微镜检查了 4 个青霉素产生菌产黄青霉 (*Penicillium chrysogenum*) 菌株, 在其中 3 个 P1001、6205 和 r₃, 观察到球形病毒颗粒。5562 在平面培养中产生“蚀斑”, 但未看到病毒颗粒。菌丝匀浆经 15000—23000g 离心的上清液加柠檬酸调到 pH 4.8, 可使病毒沉淀, 简化了提取方法。病毒在 pH 7.0 0.02M 磷酸钠缓冲液, 4℃ 中保存 20 天后大部分破坏, 而保存在 -5℃ 经一次冻融则影响较小。

病毒核酸白色线状, 二苯胺显色反应阴性, 苔黑酚显色反应阳性, 2.4% 聚丙烯酰胺凝胶电泳出现 3 条带, 经热变性、对核糖核酸酶抵抗性和甲醛作用的实验证明是双链核糖核酸。

六十年代, 国外先后在蘑菇和植物病原真菌以及一些医药发酵生产真菌中相继发现了病毒^[1]。已报告能感染病毒的真菌有 60 多种, 分布于 50 个属内。其中大多数真菌病毒只是用电子显微镜进行了形态观察, 少数进行了病毒的理化性状或侵染性的研究。

从近代生物分类观点来看, 真菌和高等植物、动物更相近, 都是真核类。因此, 真菌病毒的研究将有助于揭露病毒在真核细胞内增殖的规律, 例如: 溶原性、胞质遗传和双链核糖核酸(ds-RNA)的作用等。在实践上, ds-RNA 能诱导产生干扰素^[3,4,5], 具有抗病毒感染的作用。利用真菌病毒防治植物病原菌也在受到注意。

青霉素生产菌产黄青霉 (*Penicillium chrysogenum*) 的病毒 (PcV) 最早是由 Banks (1969) 提出的, 以后 Lemke, Buck, Wood, Nash 等^[2,4,6,9,10] 证实并报道了病毒和病毒核酸的生物化学和生物物理等性状。迄今国外发现病毒的青霉素生产菌都是 *Penicillium chrysogenum* NRRL 1951,

或由此诱变选育而来的菌株。本文报道从我国产黄青霉的 3 个菌株中用改良的方法提取的病毒, 并观察了蚀斑现象, 提取了病毒核酸, 进行了核酸双链性的鉴定和探讨了病毒保存方法。

菌的培养和病毒的提取

(一) 菌种

表 1 菌种及其来源

菌 名	特 征	来 源
<i>Penicillium chrysogenum</i> r ₃	孢子深绿色	产生棕色色素 中国医学科学院药物所供给
<i>P. chrysogenum</i> 5562	同上	
<i>P. chrysogenum</i> 6205	灰—肉色	不产棕色色素 华北制药厂供给
<i>P. chrysogenum</i> P1001	灰色	

(二) 培养基

高乳糖培养基: 乳糖 180 克, 蛋白胨 10 克, 琼脂 20 克, 蒸馏水 1000 毫升。

* 华北农业大学李季伦同志参加部分试验工作。

拉氏培养基: KCl 0.5 克, 甘油 15 克, NaCl 5 克, 蛋白胨 6 克, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05 克, 葡萄糖 15 克, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 15 微克, KH_2PO_4 0.3 克, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 20 微克, $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 微克, 蒸馏水 1000 毫升。pH 6.8—7.0。

3000 毫升三角瓶, 加入 600—700 毫升培养液, 接种孢子, 25℃ 振荡培养 (频率 200 次/分钟) 3—4 天, 或 30 升发酵罐, 培养 5 天。

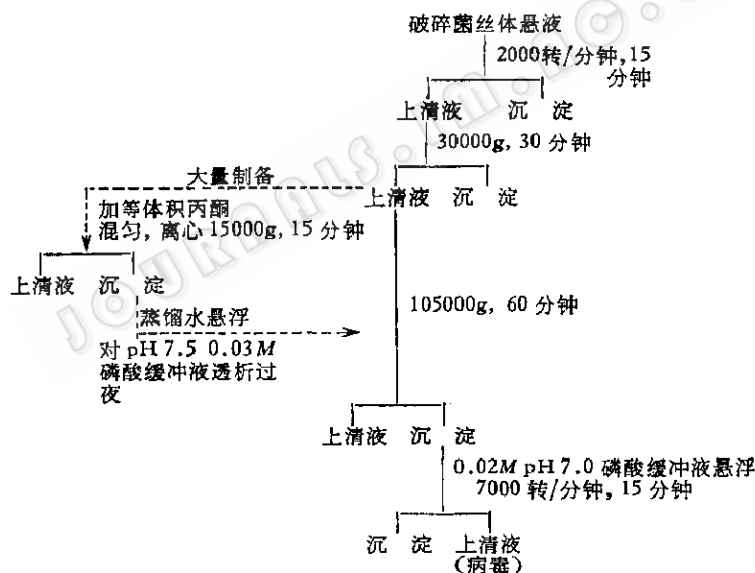
(三) 病毒提取

1. 超速离心法^[2,6,9]

发酵液经真空过滤, 收集菌丝体, 用蒸馏水冲洗, 冰冻过夜, 加 5—10 倍 pH 7.2

0.03M 磷酸钠缓冲液 (含有 0.1% 巯基乙酸), 和少量金刚砂, 用匀浆器破碎, 放入磨口三角瓶中, 缓缓滴入 8.5% (体积/体积) 正丁醇, 边加边摇, 振荡 45 分钟。15000g 离心 30 分钟, 取上清液经 105000g 离心 60 分钟, 将沉淀复悬浮在 0.03M 磷酸缓冲液, 7000 转离心 20 分钟, 上清液是病毒粗制品。

后来, 用蒸馏水冲洗菌丝体后, 改用 pH 5.0 0.02M 柠檬酸缓冲液悬浮洗菌丝 2 次, 再用蒸馏水冲洗抽干。加 5—10 倍体积 pH 7.5 0.03M 磷酸钾缓冲液, 在 4℃, 用捣碎机破碎 3 次, 每次 3 分钟, 搅拌 1—2 小时, 然后用差速离心提纯。



2. 沉淀法^[5,8]

取经上述处理的, 30000g 离心的上清液, 加入柠檬酸粉调 pH 4.8, 次日超速离心后见病毒颗粒有聚合趋势 (图版 I-3)。后改用 15000g、23000g 离心上清液, 加入柠檬酸粉调 pH 5.1, 4.8、4.6 (100 毫升上清液中约加入 400 毫克柠檬酸粉), 4℃ 静置过夜, 次日可见白色沉淀。6000 转离心 15 分钟, 再用 pH 7.0 0.02M 磷酸钠缓冲液

悬浮沉淀, 经 MSe 型离心机 18 × 5 水平转头 9000 转离心 20 分钟去沉淀。在 pH 4.8 的提取液中, 在电镜下见到大量病毒颗粒, 紫外光测定为核蛋白吸收光谱。用醋酸调 pH 效果不如柠檬酸。在上清液中加入柠檬酸后冻融一次并不影响沉淀效果。

柠檬酸等电点提取病毒操作简单, 比用丙酮成本低较易保持病毒稳定性, 适宜大量提取病毒并可用于浓缩病毒提取液。

用丙酮沉淀有以下缺点：磷钨酸染色时极易透入病毒外壳，内部结构易受破坏，不利于保存；大小分子同时沉淀需要超速离心除去小分子，如在提 P_cV-RNA 时，需除去转移核糖核酸 (tRNA)；加等体积丙酮使样品体积增加一倍，沉淀悬浮液需透析去丙酮增加了操作步骤。

用 6% 聚乙二醇 (6000 分子量), 0.5M NaCl 沉淀结合超速离心也得到较纯病毒，其效果尚待进一步比较。

电子显微镜检查和 蚀斑分析观察

对产黄青霉 6205、P1001、r₃ 和 5562 四个菌株的提取液作了电镜检查。6205 和 P1001 两菌株中有大量病毒颗粒，球形，六面形，平均直径约 40 毫微米，磷钨酸负染后核心暗色 [图版 I-1, 2]。6205 及 P1001 两菌株病毒无明显区别。病毒提取液在 260 毫微米有吸收峰，最小吸收峰是 245 毫微米，260/280 = 1.49 (图 1)。苔黑酚显色反应阳性。

r₃ 病毒提取液经活性炭处理，吸附棕色色素后，在电镜下可找到典型病毒颗粒。5562 菌株中未发现病毒。

从以上电子显微镜形态观察、紫外吸收光谱和苔黑酚反应，证明我国青霉素生产菌产黄青霉中有病毒。

将产黄青霉 6205、r₃、5562、P1001 四个菌株在高乳糖固体培养基上作平面培养。每个平面接种孢子 10⁵—10⁶，25℃ 培养 4 周，用折射光观察培养皿反面，5562、6205 两菌株出现局部过渡生长的白色气生菌丝，培养基反面呈圆斑，在折射光下有明显蚀斑，类似 Nash 等^[7]记载的“蚀斑”。5562 随着培养衰老，菌落由深绿色转为暗灰褐色，但蚀斑并不消失。

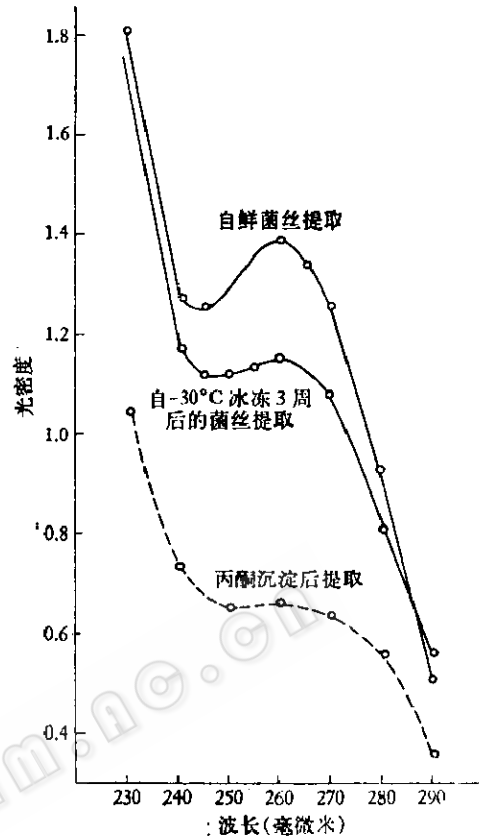


图1 产黄青霉 (*Penicillium chrysogenum*) P1001 病毒紫外吸收光谱。30000g，上清超速离心提取。

病毒核酸的提取和鉴定

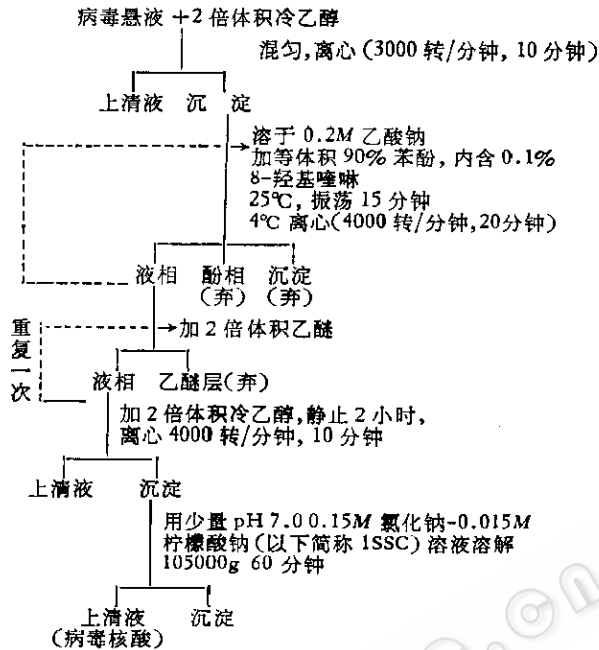
(一) 核酸的提取

从病毒提取液中用苯酚去蛋白质，提取核酸，其操作步骤如下：

核酸从乙醇中沉淀下来时呈絮状，高度聚合时呈白色线状。吸收峰为 258 毫微米，260/280 是 2.17，260/230 是 2.4。二苯胺显色反应阴性，苔黑酚反应阳性，证明是核糖核酸。从 200 克鲜菌丝中用柠檬酸沉淀病毒，得到 2.4 毫克病毒核酸。

(二) 核酸双链性的鉴定

6205 菌株病毒核酸，经 2.4% 聚丙烯酰胺凝胶电泳，5 毫安/每管，2 小时，得 3 条靠近的带，说明核酸有 3 个组分。以 E.



coli 核糖核酸为标准, 测得分子量为 $2.0 - 2.3 \times 10^6$ 。通过热变性试验对核糖核酸酶的抵抗性和甲醛反应, 鉴定为 ds-RNA。

1. 热变性

取 P_cV-RNA 和酵母核糖核酸 (Y-RNA), 分别溶解在 1SSC 中。自室温起在水浴锅中分别加温到 80、85、90、95、100、106℃, 保温处理 10 分钟, 立即放入冰浴中冷却, 防止恢复双链。用紫外分光光度

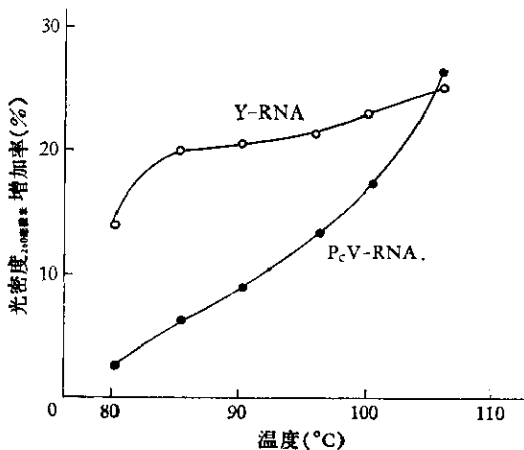


图2 P_cV-RNA 和 Y-RNA 的增色效应。
(○—○): Y-RNA; (●—●): P_cV-RNA。

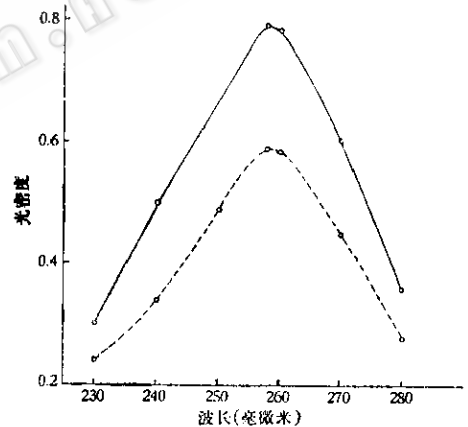


图3 P_cV-RNA 分别经 100、106℃ 处理 20 分钟后骤冷的紫外吸收光谱。

○—○ 表示 P_cV-RNA;
●—● 表示热变性 P_cV-RNA。

计测 260 毫微米光密度, 80℃ 10 分钟处理的 Y-RNA 增色效应为 14%, 而 P_cV-RNA 则为 2%, 经 106℃ 处理 10 分钟后 P_cV-RNA 增色效应显著, 最终超过 Y-RNA。对温度的稳定性, 热变性后增色效应显著增加是 ds-RNA 的特性(图 2, 3)。

当 1SSC 的离子强度降低到 0.1 时, ds-RNA 对温度敏感性增加。如加入 1.5% 甲

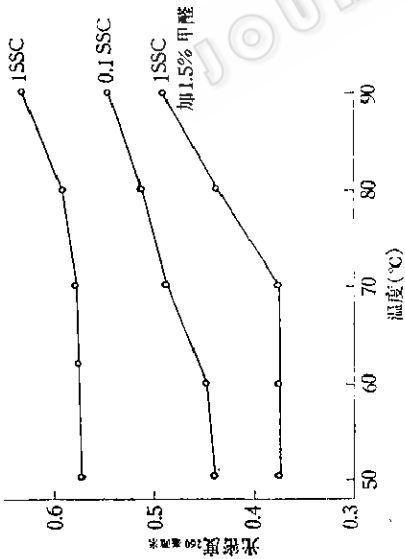


图4 P_cV-RNA 在 1 SSC, 0.1 SSC 以及加入 1.5% 甲醛时的增色效应 (处理时间 10 分钟)。

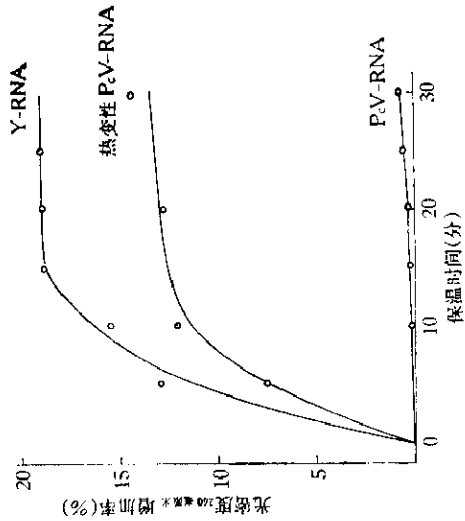


图5 P_cV-RNA、热变性 P_cV-RNA 和 Y-RNA 经牛胰核糖核酸酶降解的增色效应。

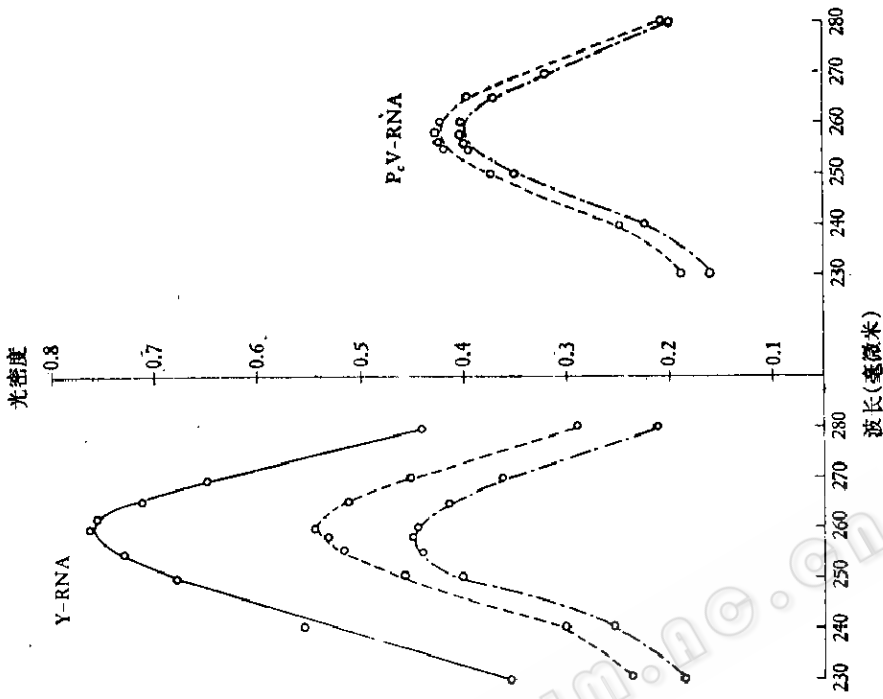


图6 P_cV-RNA 和 Y-RNA 加入 1.5% 甲醛后 32°C 保温 4 小时的紫外光吸收光谱。

○—○—○ 未处理
○—○—○ 1.5% 甲醛处理
○—○—○ 1.7% 甲醛处理

醛到 1SSC 的 P_cV-RNA 中,经 80℃ 处理 10 分钟,增色效应为 11%,90℃ 处理 10 分钟增色效应为 23%,未加甲醛则分别为 2% 和 8%。说明甲醛可以降低以氢键结合的螺旋形多核 武酸链的熔点(T_m)(图 5)。

2. 对核糖核酸酶降解的抵抗性

将 P_cV-RNA、变性 P_cV-RNA 和 Y-RNA 分别溶解在 1SSC 中,浓度为 35 微克/毫升,用牛胰核糖核酸酶(20 微克/毫升,东风试剂厂出品)30℃ 处理 30 分钟,用紫外分光光度计测 260 毫微米的光密度。Y-RNA 增色效应为 19.6%。P_cV-RNA 则只有微量增加,表现出能抵抗 RNA 酶的降解作用。经过 106℃ 处理后骤冷的变性 P_cV-RNA 光密度显著增加,是由于热变性的 P_cV-RNA 双链解开从而降低了对 RNA 酶的抵抗性(图 5)。

在高离子浓度(1SSC)下,对 RNA 酶的稳定性是 ds-RNA 的共同特性。

3. 甲醛的作用

取 Y-RNA 及 P_cV-RNA 分别溶解于 1SSC 中,再各自加入 1.5% 甲醛,32℃ 保温 4 小时,测 230-280 毫微米的光密度。结果:① Y-RNA 的光密度显著增加,在 260 毫微米的增色效应为 16—21%,并且最高吸收峰由 258 毫微米向 260 毫微米移动。这表示甲醛与单链 RNA 的游离氨基基团起作用;② P_cV-RNA 的光密度只有少量增加,增色效应为 2.7—6%。最高吸收峰 258 毫微米不变。说明 P_cV-RNA 的游离氨基基团较少,是一高度有秩序的二级结构,这是 ds-RNA 的特性(图 6)。

病毒保存方法的探讨

从图 1 看出,提取病毒的样品保存方法不同,对病毒的紫外吸收光谱有影响。电子显微镜观察结果(表 2)表明,样品未

表 2 提取条件对 *Penicillium chrysogenum* P1001 病毒的影响

病毒来源*	病毒形态	紫外光吸收光谱
自新鲜菌丝提取	球形,外壳完整	呈现核蛋白吸收光谱 260 毫微米有明显吸收峰
菌丝经 -30℃ 冰冻 3 周后提取	部分外壳似不完整	260 毫微米有吸收峰
丙酮沉淀后提取	球形,磷钨酸易进入核心,外壳似有绉褶	无明显 260 毫微米吸收峰

* 病毒在 0.02M 磷酸缓冲液中, pH 7.0, 均用超速离心法提取。

表 3 产黄青霉(*Penicillium chrysogenum*)病毒保存中形态的变化

病毒来源*	保 存 时 间(天)		
	4	10	20
自新鲜菌丝提取	球形,外壳完整	可见球形外壳完整颗粒	多数病毒颗粒不见,少数轮廓模糊,小黑点均匀整齐
丙酮沉淀后提取	球形,核心染色深	多数病毒颗粒不清,少数病毒圆形	未见病毒颗粒,小黑点均匀整齐

* 病毒保存在 0.02M 磷酸钠缓冲液中, 4℃ 冰箱内。

经丙酮或低温冻融处理提取的病毒,较能保持自然状态;病毒在 0.02M 磷酸缓冲液中于 4℃ 冰箱内存放一段时间后,则看不到典型病毒颗粒。

对悬浮液中病毒存活情况的电子显微镜观察结果(表 3)指出,从不同样品提纯的病毒保存时间不同。自新鲜菌丝提取的病毒保存 10 天形态完整。

如将病毒置 -5℃ 下冰冻,然后在室温缓慢融化,结果凡冻融 1—2 次者在电镜下尚能见到不少正常病毒颗粒,而 4 次冻融者只见聚合小黑点,似病毒核酸部分,外壳已不清,只有极少数病毒仍模糊可辨。

从以上结果来看,提取的病毒可在悬液中于 2—4℃ 保存,如果超过 20 天,可以冰冻保存,但冻融以 1—2 次为限,超过 4 次,则大部分遭破坏。

结 束 语

我国青霉素生产菌 6205 是经人工选育产生, P1001 是一突变型, 两个菌株细胞内均有大量病毒。青霉素产生和病毒的关系有过不同的看法。Banks 设想过, 抗菌素的合成可能是由于病毒的存在, 但在产青霉素的一个 *Penicillium notatum* 菌株中却没有病毒, 并且除去病毒的青霉素产生菌中却保持合成青霉素的能力。这些似乎否定了上述看法。如此大量病毒在细胞内增殖对寄主有什么影响, 病毒怎样随着菌种选育而传到下代, ds-RNA 在细胞内是怎样复制的, 目前还不清楚。

Lemke^[7] 报告了青霉素生产菌中有产生或不产生“蚀斑”的带病毒菌株。6205 菌株有病毒, 产生“蚀斑”; 5562 菌株中未找

到病毒, 但“蚀斑”却明显而不消失。上述问题都有待研究。

参 考 资 料

- [1] 周家炽: 生物科学参考资料, 第四集 13—18 页, 科学出版社, 1974。
- [2] Banks, G. T.: *Nature* **222**: 89—90, 1969.
- [3] Banks, G. T. et al.: *Nature* **218**: 542—545, 1968.
- [4] Buck, K. W., Chain, E. B. & Himmelweit, F.: *J. Virology* **12**: 131—139, 1971.
- [5] Lampson, G. P., et al.: *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **58**: 782—789, 1967.
- [6] Lemke, L. A. & Torence, M. N.: *J. Virology*, **6** (6): 813—819, 1970.
- [7] Lemke, L. A., Nash, C. H. & Pieper, S. W.: *J. Gen. Microbiol.*, **76**: 265—275, 1973.
- [8] Lewis, U. V. & Rickes, E. L.: *J. Amer. Chem. Soc.*, **82**: 5178, 1960.
- [9] Nash, C. H. et al.: *Can. J. Microbiol.*, **19**: 97—103, 1973.
- [10] Wood, H. A. & Bojarth, R. F.: *Virology*, **47**: 604—609, 1972.

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF VIRUS AND DERIVED DOUBLE-STRANDED RNA FROM *PENICILLIUM CHRYSOGENUM*

FUNGAL VIRUS RESEARCH GROUP, INSTITUTE OF MICROBIOLOGY,
ACADEMIA SINICA, BEIJING

Spherical virus particles in three strains of penicillin producing strains of *Penicillium chrysogenum*, 6205, P1001 and r₃ were found by electron microscope. “Plaque” appeared in plate culture of 6205 and 5562. Virus was precipitated from 15000—23000 g supernatant of mycelium homogenate adjusted by adding citric acid to pH 4.8. Most of the virus particles were destroyed over 20 days when stored in 0.02 M phosphate

buffer, pH 7.0, 4°C, but storage at -5°C through once freezing and thawing resulted in a smaller loss.

The RNA extracted from the virus particles contained double-stranded RNA as indicated by positive orcinol and negative diphenylamine reaction and by the hyperchromicity profile of thermal denaturation, ribonuclease resistance and 1.5% formaldehyde.