

99-105

一种含有单链RNA的香菇球状病毒

沈学仁 沈菊英 陈作义 龚祖埏

(中国科学院上海生物化学研究所, 上海200031)

陈明杰 潘迎捷 汪昭月 方炳初

(上海农业科学院食用菌研究所, 上海)

王鸣歧

(复旦大学生命科学院微生物及微生物工程系, 上海)

S432.41

提 要

从生长不正常的香菇 (*Lentinus edodes* (Berk.) Sing) 菌株中分离到一种等轴对称含单链RNA的病毒颗粒。病毒颗粒在电镜下直径为33~34nm, 在SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳中病毒外壳蛋白分子量为22000道尔顿。病毒核酸经DNase I和SI酶解试验及热变性紫外吸收曲线试验证明为单链RNA, 在1.5%的琼脂糖凝胶电泳中, 病毒核酸呈现一条带, 分子量为 2.38×10^6 道尔顿。

关键词: 香菇病毒 病毒形态 理化性质

人类栽培食用菌已有几个世纪, 但对食用菌病毒的研究则只有40年左右的历史。食用菌病毒的主要危害是由于广泛感染所造成的不同程度减产和品质下降, 甚至完全无收成^[1,2]。自从1948年在美国首次发现蘑菇病毒后, 相继在茯苓、银耳、平菇、草菇、香菇等食用菌中分别发现不同种类的类似病毒颗粒^[3,4,6,9,10,17,18,19]。

香菇是世界上产量仅次于蘑菇的第二大菇类, 日本的Inouye(1970)首次从香菇中分离出香菇病毒 (Shiitake Mushroom Virus, SMV)^[6], 以后又有许多报告, 对香菇病毒作了较为详细的报道^[16]。

我国是香菇生产大国, 产量占世界香菇总产量的40%以上, 近几年来在部分产区陆续发现有不同程度的病毒感染, 1984年于善谦和王鸣歧等人从菌丝生长不正常的“7402”栽培菌种中分离出了球状病毒颗粒^[10], 推测这些病毒颗粒的存在与菌丝生长异常有一定的关系, 但没有进一步的研究报道。我们在近几年上海香菇生产中发现, 香菇病毒病症状主要表现在菌丝的营养生长阶段, 感染病毒的菌种菌丝长势减弱, 出现各种不同类型的花斑和缺刻, 严重的造成培养料中大部分菌丝退化, 这种病毒病的发生已对香菇生产造成了极大的危害和损失。我们以表现病毒病症状的香菇菌丝为材料, 从中分离纯化

本文于1991年4月1日收到, 8月30日修回

241

出一种直径为33~37nm的球状病毒,并测定了其理化特性。

材 料 与 方 法

一、菌种来源:香菇 (*Lentinus edodes* (Berk.) Sing) 菌株0676系从美国引进,由上海食用菌研究所菌种保藏中心保存。

二、供试菌株的分离:菌株0676接种在木屑培养基中,25℃恒温培养,60天后栽培种菌丝出现明显缺刻、花斑和菌丝退化的异常现象。把这些不正常部位的菌丝体分离到马铃薯、葡萄糖、琼脂(PDA)培养基上,待菌丝萌发后,进行扩大培养。

三、菌丝体培养:分离纯化的菌种接种到麸皮、葡萄糖、黄豆饼粉等发酵培养基中,25℃100转/分振荡培养7~10天,发酵液经5000转/分离心10分钟,收集菌丝体作为抽提病毒的材料。

四、主要生化试剂:鱼精DNA为华美公司的产品,低分子量标准蛋白为上海生物化学研究所东风生化试剂厂产品,DNase I (RNase-free)、0.24~9.5kb标准分子量为Bethesda Research Laboratories公司产品,SI核酸酶为Boehringer公司产品,RNase I为西德Merck公司产品。

五、病毒的抽提与纯化:收集的菌丝体用pH7.0 0.05mol/L磷酸缓冲液洗涤一次,再用含0.1% (V/V)巯基乙醇的pH7.0 0.05mol/L的磷酸缓冲液匀浆抽提,5000转/分离心15分钟,取上清,沉淀用同样缓冲液重复匀浆抽提一次,合并两次上清,-20℃保存过夜后,于20~25℃融化,加入25% Triton X-100至终浓度1%,4℃搅拌30分钟,10000转/分离心30分钟,上清液45000转/分离心1小时,沉淀用少量磷酸缓冲液悬浮后,在10%~40%的蔗糖梯度中28000转/分离心4小时,取出病毒带后,稀释,45000转/分离心1小时,沉淀用0.05mol/L pH7.0的磷酸缓冲液悬浮后即成为纯化的病毒制剂。

六、电镜观察:纯化的病毒样品用2%的磷钨酸负染,在日本的JEL 100-CX电子显微镜下进行观察。

七、病毒核酸的提取:病毒样品用2倍体积的饱和酚抽提后,再重复抽提一次,水相加入1/2体积的氯仿、异戊醇(24:1)萃取两次后,水相加入2.5~3倍体积的无水乙醇置于冰浴沉淀60分钟,14000转/分离心20分钟,沉淀用70%的乙醇洗一次,沉淀抽干后,加入TE缓冲液溶解后,即为病毒核酸^[1]。

八、病毒和病毒核酸理化特性的测定:将提纯的SMV样品加入样品裂解缓冲液后,在100℃水浴中加热2分钟,上样于12%的含SDS的不连续聚丙烯酰胺垂直板凝胶,进行SMV外壳蛋白的凝胶电泳4小时,电泳缓冲液按King和Laemmli的系统^[11],用低分子量标准蛋白计算病毒外壳蛋白分子量。

病毒核酸加入样品缓冲液后,加在含0.5μg/ml EB的1.0%琼脂糖凝胶中电泳2小时,核酸参照物选用BRL公司的0.24~9.5kb RNA标准分子量,电泳采用TBE缓冲系统^[11,12]。

核酸类型鉴定:(1)RNase I和DNase I酶解试验:1μg的鱼精DNA,1μg的家蚕胞质型多角体双链RNA(CPV-dsRNA),1μg SMV核酸分别与35单位的DNase I(RNase-free)和1单位的经100℃10分钟处理去除DNase的RNase I混合37℃保温反应1小时,酶解结果通过1.0%琼脂糖凝胶电泳进行观察。(2)SI核酸酶酶解试验:1μg的CPV-dsRNA,1μg烟草花叶病毒单链RNA(TMV-ssRNA),1μg SMV核酸中分别加入1单位的SI混合后,与对照1μg CPV-dsRNA,1μg TMV-ssRNA,1μg SMV核酸同时37℃保温反应1小时,酶解结果通过1.0%琼脂糖凝胶电泳进行观察。

(3)热变性紫外吸收试验:CPV-dsRNA,SMV核酸从40℃~100℃每升高10℃在紫外260nm处测定紫外吸收值,并作出对温度的变化曲线。

结 果

一、病毒的分离和形态

经纯化的SMV样品在电镜下观察,病毒颗粒主要是直径为33~34nm的等轴对称球状病毒颗粒,颗粒表面光滑无外膜(图1),常呈晶格排列。此外,偶而尚可发现浓度极低的大小约为26×186nm的棒状颗粒(图1中箭头所示),但未见其它球状和长线状颗粒。

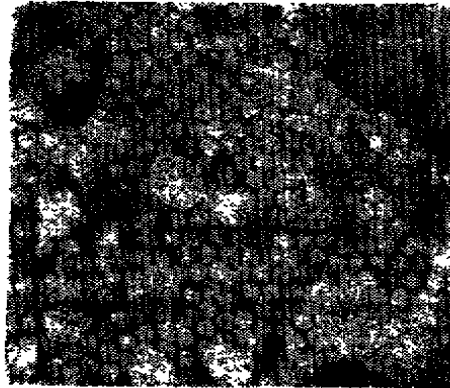


图1 电镜下观察提纯的SMV
放大150000倍,箭头所示为棒状颗粒
Fig.1 Electronmicrography of the
SMV with diameters of approximated
34nm, Negatively stained with uranyl
acetate. 20000X7.5. The arrow indicates
the rigid rod

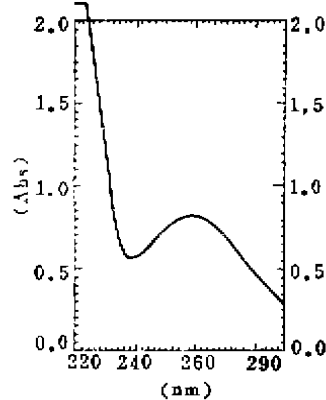


图2 SMV的紫外吸收曲线
Fig.2 Ultraviolet absorption
curve of SMV

二、病毒的理化特性

纯化的病毒颗粒的紫外吸收 $A_{260}/A_{280} = 1.72$, 为核蛋白峰(图2)。纯化的SMV样品经12%的SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,测出病毒外壳蛋白由一种多肽组成,以五种



图3 病毒外壳蛋白分子量的测定电泳照片
12% SDS 不连续 PAGE. (A)低分子量标准蛋白
(B)SMV 外壳蛋白
标准蛋白: 1.磷酸化酶b 2.牛血清蛋白 3.肌动
蛋白 4.碳酸酐酶 5.烟草花叶病毒外壳蛋白
Fig.3 12% SDS-polyacrylamide gel elec-
trophoresis of SMV
(A) protein markers (B) BMV

标准分子量为对照，测出病毒的外壳多肽的分子量为 22000 道尔顿（图 3）。

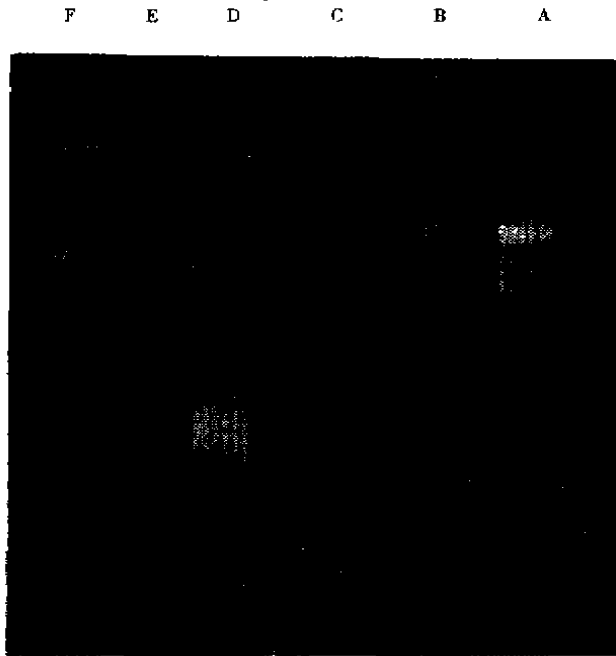


图 4 DNase I RNase I 酶解图谱

- (A) 经 DNase I 处理的 CPV-RNA
- (B) 经 DNase I 处理的 SMV 核酸
- (C) 经 DNase I 处理的鱼精 DNA
- (D) 经 RNase I 处理的 CPV-RNA
- (E) 经 RNase I 处理的 SMV 核酸
- (F) 经 RNase I 处理的鱼精 DNA

Fig.4 Digestions of nucleic acid of SMV and controls with RNase I and DNase I

- (A) CPV-RNA after digestions with DNase I
- (B) Nucleic acid of SMV after digestions with DNase I
- (C) DNA of fish sperm after digestions with DNase I
- (D) CPV-RNA after digestions with RNase I
- (E) Nucleic acid of SMV after digestions with RNase I
- (F) DNA of fish sperm after digestions with RNase I

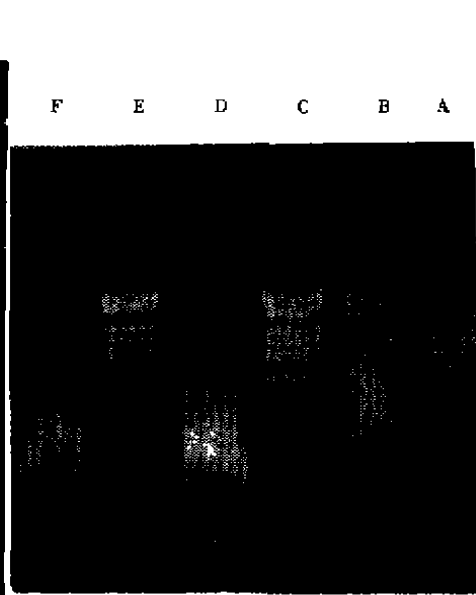


图 5 SI 酶解图谱

- (A) 未经 SI 处理的 SMV 核酸
- (B) 未经 SI 处理的 TMV-ssRNA
- (C) 未经 SI 处理的 CPV-dsRNA
- (D) 经 SI 处理的 TMV-ssRNA
- (E) 经 SI 处理的 CPV-dsRNA
- (F) 经 SI 处理的 SMV 核酸

Fig.5 Digestions of nucleic acid of SMV and controls with SI

- (A) Nucleic acid of SMV
- (B) TMV-ssRNA
- (C) CPV-dsRNA
- (D) TMV-ssRNA after digestions with SI
- (E) CPV-dsRNA after digestions with SI
- (F) Nucleic acid of SMV after digestions with SI

SMV 核酸在 DNase I 酶解试验中和对照 RNA 一样不被 DNase I 而被 RNase I 所酶解，证明该病毒核酸为 RNA（图 4）。在核酸酶 S I 消化试验中，SMV-RNA 与等量对照的 TMV-ssRNA 表现相同结果，均被 S I 消化，而等量的 CPV-dsRNA 不能被 S I 酶解，证明 SMV 核酸为 ssRNA（图 5）。同时 SMV-RNA 的热变性曲线实验结果也证明该病毒核酸为 ss-RNA（图 6）。

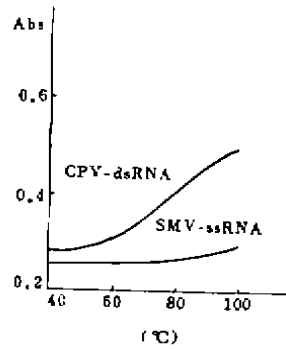


图6 热变性紫外吸收曲线

Fig.6 Hyperchromic effect of slowly increasing the temperature of preparation of viral RNA

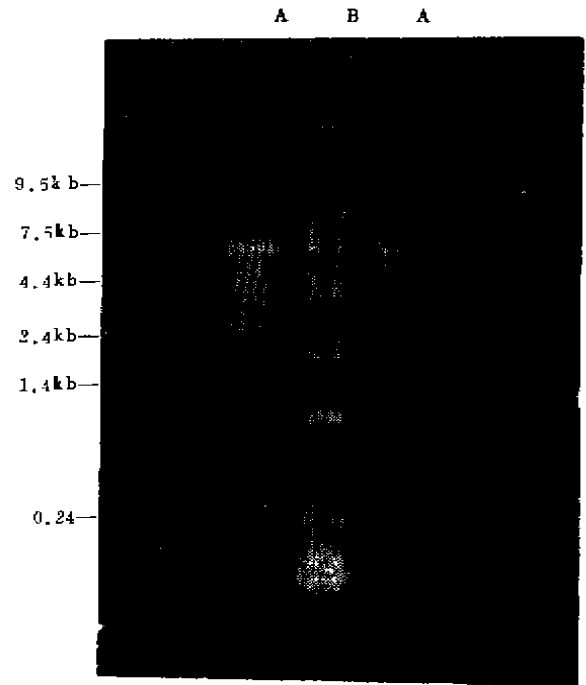


图7 SMV核酸分子量测定的电泳照片

(A) SMV核酸 (B) 0.24—9.5kb的标准核酸

Fig.7 Agarose gel electrophoresis of SMV-ssRNA

(A) SMV-ssRNA (B) ssRNA markers

在1.0%琼脂糖凝胶电泳中, SMV核酸呈现一条带, 用BRL公司的ss-RNA 0.24~9.5kb的标准分子量为参照, 测出SMV-ssRNA分子量为 2.38×10^4 道尔顿(图7)。

讨 论

我们使用差速离心和蔗糖梯度离心相结合的方法, 配合低温冻融及非离子型去污剂处理等步骤, 从生长不正常的香菇菌丝体中抽提和纯化到大量的直径为34nm左右的球状病毒, 纯化后的病毒制剂经负染后在电镜下观察, 常可见到34nm的病毒颗粒呈晶格整齐排列, 颗粒表面光滑无突起或外膜。在纯化的球状病毒制剂中偶而尚可见到极少量大小约为 $23 \sim 26 \times 53 \sim 186$ nm不等的棒状颗粒, 但未见其它大小的球状病毒颗粒和线状颗粒。Ushiyama^[15]曾经报道从不正常香菇子实体中获得三种大小约为25、30和39nm的球状病毒以及长度可达1500nm的长线状和大小为 $25 \sim 28 \times 280 \sim 300$ nm的棒状病毒。从生长不正常的香菇菌丝体中, 日本工作者也分离到一种直径为39nm的球状病毒和少量长线状病毒。我们所分离的34nm和已经报道的39nm球状病毒是否为同一种病毒目前尚缺少实验证据加以判断, 但其大小差异是在样品制备和电镜观察的实验误差范围之内。

虽然迄今为止从香菇中已发现了不少种类的类似病毒颗粒(VLPs), 但它们的理化特性研究得不多, 主要原因在于纯化的病毒制剂中常常含有几种很难分离开的颗粒和这

些 VLPs 的含量通常都很低。我们使用比较简单的方法能获得高浓度的 34nm 的纯病毒制剂,使研究其核酸的性质与病毒结构蛋白的种类和大小有了可能。研究结果指出,这一病毒的结构蛋白是由一种分子量为 22000 道尔顿的多肽所组成,国外研究者以前未有此类数据报道。最令人感兴趣的是,无论 SMV 的 S1 的酶解实验和热变性紫外吸收实验均证明此 SMV 核酸基因组为分子量 2.38×10^6 道尔顿的 ss-RNA。球状的 ss-RNA 病毒在香菇病毒中尚为首次发现,因为过去所发现香菇球状病毒均被认为含有 ds-RNA。我们认为,我们的结果证实了下述二种可能:(1)我们发现的 34nm ss-RNA 的 SMV 是一种新的、过去从来未报道过的香菇病毒。(2)过去所报道的 39nm 含有分子量为 4.49×10^6 道尔顿的 ds-RNA 并不是病毒真正的基因组,其理由是,我们在分离病毒核酸的过程中也常常发现有分子量类似的 ds-RNA 条带,但随着病毒的提纯和浓度的增高,高分子量的核酸条带逐渐消失,最后只剩下了一条分子量为 2.38×10^6 道尔顿的 ss-RNA 条带。因此有理由认为这一 ds-RNA 可能是病毒 ss-RNA 的双链复制型形式或寄主内本身存在的核酸。Tsunoda 和 Suzuki^[14] 也曾报道从香菇分离物中存在有可能成为干扰素诱导物的 ds-RNA。

目前菌类病毒的致病性尚未能完全阐明,因为“柯氏法则”尚未能应用到这一领域。日本科学工作者曾报道在正常生长的香菇菌株内也能分离到 VLPs,尽管浓度上有一些差异,我们对正常生长的对照菌株曾进行过同样步骤的病原物分离抽提,但至今尚未发现有类似的球状病毒存在。

参 考 文 献

- [1] Candy D.G. 1958, Mushroom Disease, Report of the Glasshouse Crops Research Institute, pp129-133.
- [2] Gandy D.G. 1960, *Annals of Applied Biology* 48(2): 427-430.
- [3] Hollings M., 1962, *Nature*. 196: 962-965.
- [4] Hollings M., 1963, *Endeavour*. 22(87): 112-117.
- [5] Inouye, T., 1970, *Ann. Phytopathol. Soc. Japan* 36(Abstr). p. 356.
- [6] K. Chen, P. Liang., 1988, *Mycologia*. 80(6): 849-853.
- [7] King L. and U.K. Laemmli., 1971, *J. Mol. Biol.* 62: 465-473.
- [8] K.S. Kirby., 1965, *Biochim. J.* 64: 405.
- [9] Lemke P.A., 1977, *Am. Soc. Microbiol. Washington DC*, pp. 568-570.
- [10] Lemke P.A., 1976, *Annu Rev Microbiol.* 30: 105-145.
- [11] McDoull M.W., 1977, *Journal of Molecular Biology*. 100: 119-146.
- [12] Miura k., 1968, *J. Virol.* 2: pp. 1211-1222.
- [13] Barton R.J., 1979, *J. Gen. Virol.* 42: pp. 231-240.
- [14] Tsunoda, A. and Ishida, N., 1970, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 173: 719-720.
- [15] Uehiyama R. 1983, Studies on a virus associated with shiitake mushroom, *L. edodes* (Berk.) Sing. *Rep. Tottori. Mycol. Inst. (Japan)* 21: 1-60.
- [16] Yamashita S.Y. Doi., 1975, *Proc. 1st. Intersee, Cong. IANS.* 5: 340-350.

- [17] 梁平彦等, 1982, 微生物学通报 25(3): 23—27。
[18] 刘宏迪等, 1986, 微生物学报 26(3): 221—225。
[19] 陈开英等, 1988, 微生物学报 28(1): 19—23。
[20] 于善谦等, 1984, 真菌学报 4(2): 125—129。

A Single-Stranded Virus Isolated from Shiitake Mushroom *Lentinus edodes*(Berk.) Sing.

Shen Xue-ren Shen Jue-ying Chen Zou-yi Gong Zu-xun
(Shanghai Institute of Biochemistry, Academia Sinica, Shanghai 200031)

Chen Ming-jie Pan Ying-jie Wang Zhao-yue Fang Bing-chu

(Edible Fungi Research Institute, Shanghai Academy of
Agricultural Sciences, Shanghai)

Wang Ming-qi

(Department of Microbiology, Fudan University, Shanghai)

A isometric virus-like particles (VLPs), which are approximately 34nm in diameter containing ss-RNA, have been purified from abnormal mycelial of shiitake mushroom *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. The SDS-polyacrylamide gel electrophoresis demonstrated that the virions contain a single capsid polypeptide band with molecular weight about 22000 dalton. The nucleic acid extracted from purified preparations of 34nm VLPs showed only one band with molecular weight approximately 2.38×10^4 dalton on the 1.5% agarose gel. The experiments of RNase 1, DNase 1, S1 digestions and of thermal denaturation suggested that the viral genome is a single-stranded RNA. The isometric single-stranded RNA virus isolated from shiitake mushroom has not been reported in all previous papers.

Key Words: Shiitake mushroom virus (*Lentinus edodes* virus)
Size and morphology of virions Properties