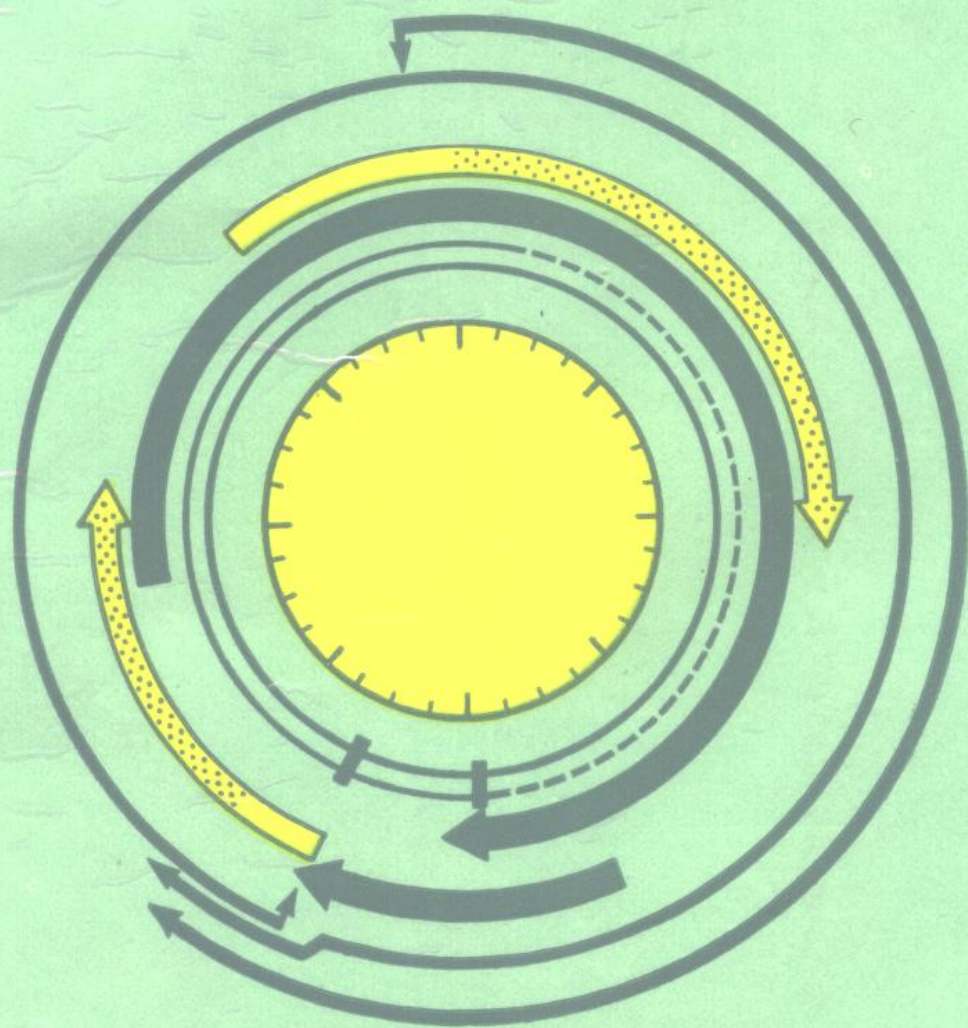


# 医学分子病毒学 及其应用

主编 闻玉梅



上海医科大学出版社

17-14/17

# 医学分子病毒学及其应用

主 编 闻玉梅

编写者 (以姓氏笔画为序)

|     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|
| 田慕贞 | 何丽芳 | 陈南海 | 张昌贤 |
| 杭长寿 | 侯云德 | 闻玉梅 | 袁正宏 |
| 顾健人 | 戚中田 | 梁米芳 | 黎孟枫 |



上海医科大学出版社

R373  
WYM-1



**(沪)新登字 207 号**

**责任编辑 王珑玫**

**封面设计 陈统雄**

**责任校对 陶安迪**

**医学分子病毒学及其应用**

**主编 闻玉梅**

**上海医科大学出版社出版发行**

**上海市医学院路 138 号**

**邮政编码 200032**

**新华书店上海发行所经销**

**常熟市人民印刷厂印刷**

**开本 787×1092 1/16 印张 13.75 字数 334 000**

**1995 年 7 月第 1 版 1997 年 6 月第 2 次印刷**

**印数 2 001—5 000**

**ISBN 7-5627-0254-3/R·237**

---

**定价: 28.50 元**

# 前 言

以研究病毒基因的结构与功能为核心的医学分子病毒学是基础医学中发展十分迅速的一个领域。目前,医学分子病毒学的研究成果已广泛应用于病毒的诊断、预防与治疗。在当今医学研究的热点——基因治疗的研究中,病毒作为载体,已成为多学科的研究对象。病毒的致病与免疫机理也随医学分子病毒学的发展而不断得以深入阐明,其中,病毒引起的持续性感染,病毒与肿瘤的关系以及病毒对机体免疫系统的作用等,尤其受人瞩目。病毒与自身免疫病、内分泌疾病发病关系的研究,也进入了启动阶段。病毒作为一类独特的非细胞型生物,对其基本特性的研究,也是生命科学基础研究的一个主要方面。因此无论从基础理论或应用基础研究来看,医学分子病毒学均占有很重要的地位。

为供医学、生物学工作者及大专院校师生及临床医生、卫生防疫人员学习与了解医学分子病毒学,本书力求深入浅出。前九章为总论部分,在阐述病毒分子生物学共性的基础上,联系实际应用,专列章节介绍病毒诊断学、抗病毒治疗及病毒疫苗;后十一章为各论部分,针对我国临床常见的病毒性疾病,介绍各种(各科)病毒的分子生物学特性,并加强了理论与实际应用间的联系。为便于读者选择某些方面深入学习,各章后均附有参考文献。

值得提出的是,有一批青、中年医学分子病毒学者(包括现在国外从事研究的我国学者)承担或参加了本书的编写,他们已经或即将成为我国医学分子病毒学研究的骨干力量。

在编写过程中,得到《国外医学》微生物学分册编辑部同志们的支持与帮助,特此致谢。

在此,还向曾直接指导我成长的三位老师:谢少文、林飞卿教授及已故的余潋教授致敬,并表示亲切怀念。

由于本人水平有限,书中错误之处还望读者不吝指正。

上海医科大学  
卫生部医学分子病毒学重点实验室 闻玉梅

1994年8月

# 目 录

|      |                           |                |
|------|---------------------------|----------------|
| 第一章  | 病毒的核酸与蛋白质 .....           | 闻玉梅( 1 )       |
| 第二章  | 病毒的复制 .....               | 闻玉梅( 12 )      |
| 第三章  | 持续性病毒感染 .....             | 闻玉梅( 21 )      |
| 第四章  | 干扰素的分子生物学.....            | 侯云德 黎孟枫( 30 )  |
| 第五章  | 抗病毒免疫的分子生物学 .....         | 闻玉梅( 40 )      |
| 第六章  | 分子病毒学在诊断中的应用.....         | 何丽芳 闻玉梅( 52 )  |
| 第七章  | 抗病毒治疗 .....               | 袁正宏( 60 )      |
| 第八章  | 病毒疫苗 .....                | 袁正宏( 68 )      |
| 第九章  | 癌基因、抗癌基因与逆转录病毒.....       | 顾健人( 79 )      |
| 第十章  | 痘病毒的分子生物学 .....           | 侯云德 陈南海( 88 )  |
| 第十一章 | 单纯疱疹病毒的分子生物学 .....        | 闻玉梅( 103 )     |
| 第十二章 | EB 病毒的分子生物学 .....         | 张昌贤( 111 )     |
| 第十三章 | 乳多空病毒的分子生物学 .....         | 闻玉梅( 122 )     |
| 第十四章 | 嗜肝DNA病毒的分子生物学 .....       | 闻玉梅( 131 )     |
| 第十五章 | 正粘病毒的分子生物学 .....          | 闻玉梅 田慕贞( 145 ) |
| 第十六章 | 肠道病毒的分子生物学 .....          | 闻玉梅( 157 )     |
| 第十七章 | 甲型肝炎病毒与戊型肝炎病毒的分子生物学 ..... | 闻玉梅( 167 )     |
| 第十八章 | 丙型肝炎病毒的分子生物学 .....        | 戚中田( 175 )     |
| 第十九章 | 出血热病毒的分子生物学.....          | 杭长寿 梁米芳( 184 ) |
| 第二十章 | 人类免疫缺陷病毒的分子生物学 .....      | 闻玉梅( 196 )     |

# 第一章 病毒的核酸与蛋白质

病毒的基本构造是由核酸与蛋白衣壳两部分组成。病毒与其他生物不同,仅含有一种核酸,即或为核糖核酸(RNA),或为脱氧核糖核酸(DNA)。病毒的核酸所携带的遗传信息,是决定病毒的遗传特性(包括传染性、致病性)与增殖特性的物质。病毒核酸编码的蛋白质分为结构蛋白与非结构蛋白,前者构成病毒的衣壳,包裹核酸;后者包括病毒的酶及调控蛋白等。病毒的衣壳起保护病毒基因组的作用,因此可将病毒视为一包基因。

## 一、病毒的核酸

近20年来,由于分子生物学的发展,发现并应用限制性内切酶,开展重组基因技术,对病毒基因组进行分子克隆,应用核苷酸序列分析技术定向点突变及缺失突变等技术以了解病毒核酸的结构与功能等,都加深了人们对病毒核酸的认识。

病毒核酸(基因组)的分子量差别十分显著。最小的微小病毒(parvovirus)为单链DNA病毒,仅有约5000个碱基,分子量为 $1.5 \times 10^6$ 。最大的痘类病毒有 $2 \times 10^5$ 个碱基对(200kb),分子量为 $1.5 \times 10^7$ 。病毒核酸可以多种形式存在,如有单链RNA病毒、双链RNA病毒、双链DNA病毒及单链DNA病毒。病毒的核酸根据其能否起mRNA的作用,还可分为正链(能起mRNA的作用)及负链(其互补链能作为mRNA进行翻译)。核酸可为线形或环形。为确定病毒的核酸型,可以用吖啶橙进行染色。将提纯并浓缩的病毒颗粒滴在玻片上,用Carnoy's液固定后,用吖啶橙染色。用磷酸氢二钠或钼酸处理后,在紫外线下观察,可见到不同的颜色(表1-1)。但更好的方法为提取核酸后,分析其碱基组成,测定对核酸酶的敏感性和浮密度等。单链核酸中的腺嘌呤(A)与胸腺嘧啶(T)或尿嘧啶(U)及鸟嘌呤(G)与胞嘧啶(C)之间的摩尔数是不等的。DNA与RNA均可分别被DNA酶、RNA酶所降解。各种不同的病毒核酸可以不同形式复制,如半保留形式复制、全保留形式复制以及逆转录形式复制等。

表1-1 用吖啶橙染色确定病毒的核酸型

| 核酸型别   | 处 理 方 法 |      |
|--------|---------|------|
|        | 磷酸氢二钠   | 钼 酸  |
| 双链 DNA | 绿       | 绿    |
| 单链 DNA | 红       | 浅绿   |
| 双链 RNA | 绿       | 绿色褪去 |
| 单链 RNA | 红       | 浅红   |

病毒的基因组一般比较小,而编码的蛋白质种类却较多,故有些病毒的基因间可互相重叠。例如,在噬菌体 $\phi$ X174的DNA序列中,A基因的终止与C基因的起始部分之间有重

叠；又如嗜肝 DNA 病毒的 P 基因与 preS/S 基因全部重叠，与 X 及 C 基因部分重叠。随读码框架的不同，病毒的基因可重复利用同一段核酸；随读码框架起始点的改变，同一段病毒核酸可翻译出几种多肽。这些特点可使病毒仅有分子量很小的核酸，但可以被充分利用而编码种类较多的不同蛋白质。

与细菌不同，动物病毒的基因结构并不与原核细胞相近，而是与真核细胞的基因结构相似。这可能是由于动物病毒(包括对人致病的病毒)的天然宿主是真核细胞。病毒的基因结构多数是不连续性的，有内含子；转录后需经拼接加工才能成为成熟的 RNA。病毒的基因表达与调控也与真核细胞的表达与调控类似，它的调控信号不能被原核细胞系统所正确识别，因此利用病毒基因进行基因工程疫苗或表达其产物时应注意这一特点。

在某些小病毒中，病毒基因转录形成的前 RNA 可经过不止一种形式的拼接，这样翻译出来的蛋白质也可不同。这一情况也可看作是病毒在其有限核酸量的条件下，更有效地利用其基因组合成数量较多蛋白质的一种形式。一些大病毒(如痘病毒科)的基因组有某些部分并非复制或表达蛋白产物所必需，因此可以插入外源基因，作为载体用。病毒基因组中有编码蛋白区与非编码蛋白区，其中非编码区(non-coding region, NCR)核酸的二级结构或其一级结构，通过分析已发现具有一些重要的调控等功能。

### (一) 病毒的 DNA

绝大多数病毒的 DNA 均为双链 DNA，其中鸟嘌呤-胞嘧啶核苷(G+C)所占的比例在不同病毒科及同科不同种病毒间有显著差别，因此测定 G+C 的含量，可以区别不同的病毒科及种。由于 G+C 含量所占百分比不同会影响病毒核酸的浮密度，因此可以用超速离心法将病毒的 DNA 与宿主细胞的 DNA 分离，提纯病毒的 DNA。

1. 噬菌体中仅含单链 DNA：在动物病毒中，仅微小病毒为单链 DNA 病毒。单链 DNA 噬菌体(如  $\phi$ X174 或 M13)中的 DNA 为环形，均为同一单链，因此从不同噬菌体中提取的 DNA 互相不会退火而构成双链体。然而在微小病毒中，不同病毒体内所含的单链 DNA 可以有不同极性，即在有的病毒体内单链 DNA 为正链，在有的病毒体内为负链，因此，来源于不同病毒体内的单链 DNA 之间可以互补而退火后形成双链体。

2. 多数动物病毒均含双链 DNA：有些病毒(乳多空病毒科)的双链 DNA 为环形，而另一些病毒(疱疹病毒科、腺病毒科、痘病毒科)的双链 DNA 为线型。环形 DNA 因没有游离的 DNA 末端，所以对某些 DNA 的外切酶有抵抗性，不易被降解。环形双链 DNA 有特殊的物理学特性。用超速离心沉淀法可将环形双链 DNA 分成 3 种形式：①闭环型(covalently closed circle, CCC)，有时又称为 I 型；②开环型(nicked circle)，又称为 II 型；③线型(linear)，又称为 III 型(图 1-1)。闭环型与一般环形不同，因它在成环的基础上又进一步扭曲而成为超螺旋型(supercoil)。超螺旋型形成的原因是由于 DNA 分子内的碱基对数与 DNA 螺旋转数间出现了误差。在正常情况下，DNA 螺旋出现一个旋转相当于 10 个碱基对。当非按这一比例出现旋转时，DNA 分子则代偿而进一步旋转，出现超螺旋型。保持闭环型(即超螺旋型)需有一定张力。由于这一型有特殊形状，故在超速离心沉淀时沉降最快。如果在双链 DNA 的任何一条链上出现断裂，则上述保持闭环型的张力失去，超螺旋型则失去原有结构，而转变为开环型(又称为松弛型)。如果两条 DNA 链上均在同一部位断裂，则环型转为线型，并在超速离心沉淀时最慢沉降。当用溴化乙锭(ethidium bromide)染色时，因该染料可以整合入双链 DNA 中，在紫外线下可显出红色。以上 3 型可在超速离心沉淀后形成 3 条条带。

3. 在某些线型双链 DNA 的病毒中, 其 DNA 可有某些特殊结构, 主要存在于 DNA 链的末端(图1-2)。

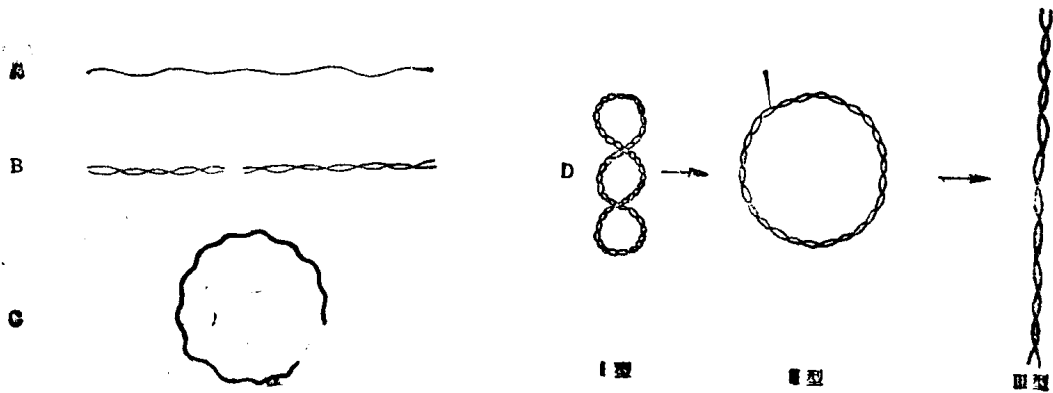


图 1-1 双链环形 DNA 的 3 种不同型

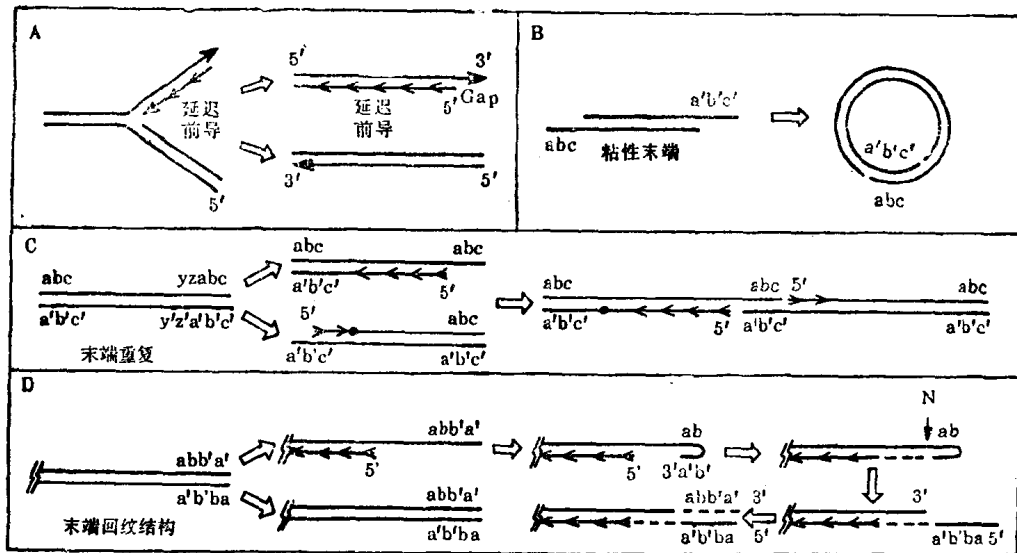


图 1-2 病毒核酸 DNA 的末端特殊结构

(1) 粘性末端(图 1-2B): 病毒的 DNA 用外切酶消化后, 形成的两条单链有可为互补的粘性末端。当将单链片段在一定退火条件下, 2 条单链因有粘性末端而构成环形。

(2) 末端重复序列(图 1-2C): 病毒的 DNA 双链有末端重复序列 abc 时, 在复制过程中, 两条 DNA 链分别进行半保留复制, 在尚未完成复制的子代 DNA 间, 一条 DNA 链的 abc 可与另一条 DNA 链的 a'b'c' 间配对而形成双体(dimer)。

(3) 末端回纹结构 (palindrome) (图 1-2D): 在病毒的 DNA 双链末端有回纹结构者, 在半保留复制过程中, 在 3' 端可形成发夹, 经过 DNA 外切酶对亲代 DNA 链在 3' 端切割后, 可以通过重新组合而完成复制。

上述这些特殊结构的意义尚不十分清楚。有学者认为这是病毒线形 DNA 为克服复制过程中, 延迟链上不连续合成而最末段 DNA 可能不被完全复制的措施(图 1-2A)。

(4) 痘苗病毒: 虽为线形双链 DNA, 但并不与其他双链 DNA 分子一样可被处理而变性, 已知痘苗病毒的两条多核苷酸链在末端以共价键相连, 因此痘苗病毒 DNA 可被视为

一个大环形。痘苗病毒的 DNA 变性后可很快复性,并且很难将 DNA 的 2 条链分开,故与其他线性 DNA 病毒不同。

4. 有些病毒(如腺病毒)在 DNA 的两条链的 5' 端有一共价键连接的蛋白质,这一蛋白质在 DNA 复制时,可暂时与 DNA 链的 3' 端相连,从而使原来与该蛋白质相连的核苷酸可作为引物,以合成互补链。这种与 5' 端相连的蛋白质在嗜肝 DNA 病毒科中也存在。

5. 病毒 DNA 的物理图(physical mapping)与基因图在分析病毒的 DNA 中有很重要的作用。利用各种限制性内切酶对病毒 DNA 进行酶解,然后根据酶解后片段在凝胶电泳中的分子量大小,可以对病毒 DNA 的酶切点作出酶切图,即为物理图。有些病毒的不同毒株可有不同的物理图谱,有些毒株变异后可改变原有的酶切图谱,利用物理图谱可以进行分子流行病学调查,如巨细胞病毒(CMV)感染的婴儿,其毒株的物理图谱与自其母亲体内分离到的 CMV 毒株物理图谱一致。根据病毒的 DNA 结构,可对其所编码的各种蛋白质进行定位分析,从而可获得病毒的基因图。分析病毒的基因图一般需经克隆病毒的 DNA,进行核苷酸序列分析,找出编码蛋白质的起始密码与终止密码,并可与已了解的病毒所编码的蛋白质做氨基酸分析后进行核对。目前,研究病毒基因的结构与功能,进而了解病毒致病的机理,引起免疫应答的各组成成分等是医学分子病毒学中极为重要的领域。

## (二) 病毒的 RNA

RNA 病毒中的 RNA 携带全部遗传信息。虽然 RNA 病毒的基因组大小之间的悬殊不如 DNA 病毒显著,但也有明显的差别。小 RNA 病毒科(Picornaviridae)基因组分子量为  $2.5 \times 10^6$ ,而最大的 RNA 病毒如副粘病毒与逆转录病毒的基因组则为  $5.5 \sim 7.5 \times 10^6$ 。有些 RNA 病毒在形成 mRNA 时也有类似 DNA 病毒的拼接,因此在 RNA 病毒中也可由一段 RNA 编码不止一种蛋白质。绝大多数动物 RNA 病毒均为单链线形,但也有少数为双链,如呼肠病毒科(Reoviridae)。逆转录病毒可有 2 条正链 RNA。有些 RNA 病毒的基因组分节段。植物病毒中有少数 RNA 病毒的核酸呈环形,没有游离末端。最近发现动物病毒中的第一个 RNA 环状病毒, $\delta$  病毒(又称 hepatitis D virus, HDV)。 $\delta$  病毒是一种缺损病毒,只能在受乙型肝炎病毒(HBV)感染的基础上增殖。然而发现动物病毒中也有 RNA 环状病毒,提示昆虫病毒、植物病毒和动物病毒有共同起源。

1. 单链 RNA 病毒的内部核酸长度可为  $1 \sim 17\text{kb}$ ,可由一条完整的 RNA 组成,亦可分为几个节段。当病毒 RNA 可起类似细胞的 mRNA 作用时,称为正链 RNA 病毒。当病毒 RNA 的互补核苷酸链可起 mRNA 作用时,称为负链 RNA 病毒。正链 RNA 病毒的核酸结构类似宿主细胞中的 mRNA,5' 端有“帽状”结构,3' 端有 poly(A) 区(由  $50 \sim 200$  个腺苷酸组成)。图 1-3 显示 RNA 的“帽状”结构,图中甲基鸟核苷酸与  $N_1$  核苷酸以 5'-5' 相连接。 $N_2$  可以是 4 个核苷酸碱基中任何一个核苷酸。5' 端修饰后有“帽状”结构的意义在于保护核酸 5' 端免受核酸酶或磷酸酶降解,并可促进 mRNA 起始翻译。小 RNA 病毒科 RNA 的 5' 端没有这一“帽状”结构,由特殊的核苷酸序列及与之共价结合的一个小分子蛋白质所取代。负链 RNA 病毒因其基因组的互补链相当于 mRNA,故互补链的 5' 端有“帽状”结构(图 1-3),而其基因组的 5' 端仅为三磷酸核苷。正链 RNA 病毒因其基因组 RNA 的 3' 端已存在 poly(A) 片段,复制时,由正链 RNA 为模板复制成复制中间体时,其负链的 3' 端形成 poly(U)。当以负链为模板再合成新的病毒 RNA 时,poly(U) 为模板形成了正链 RNA,具有 poly(A),仍可起 mRNA 的作用,故不需利用宿主细胞来源的 poly(A) 多聚酶。负链 RNA 病毒的基因组

3'端不带有 poly(A), 多数情况下是病毒核酸转录后, 需利用宿主细胞来源的 poly(A) 多聚酶, 合成 poly(A) 片段后加到病毒基因组互补链的 3'端, 方可起 mRNA 的作用。

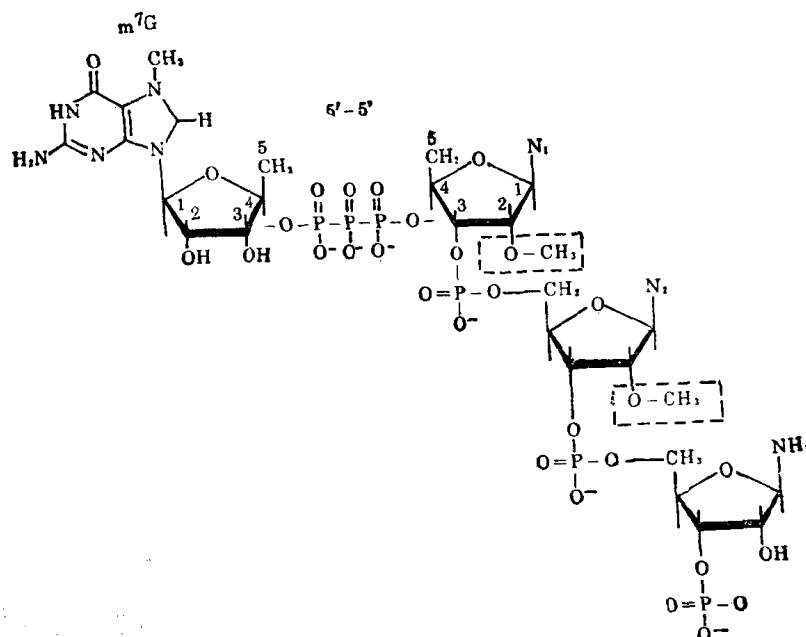


图 1-3 RNA 的帽状结构

2. 双链 RNA 病毒的核酸有某些性质类似双链 DNA 病毒, 如有互补成对的碱基对、对 RNA 酶有抵抗力、有较狭的熔点等。动物病毒中仅有呼肠孤病毒为双链 RNA 病毒, 昆虫中的蚕多角体病毒(polyhedrosis virus of silkworm)亦属双链 RNA 病毒。双链 RNA 病毒的核酸均分节段。呼肠孤病毒即含有 10 个不重叠的核酸节段, 每段均可分别转录并编码不同的多肽链。由于在细胞内不可能出现一段 mRNA 翻译多种蛋白质, 因此分节段的 RNA 必须分别编码不同的蛋白质。

3. 逆转录病毒的 RNA 是正链 RNA, 但因复制中有逆转录过程, 即由 RNA 为模板复制出 DNA, 故是一种特殊的 RNA 病毒。病毒的 RNA 是单链, 约有 10kb。5' 端有“帽”, 3' 端有 poly(A) 尾。自某病毒中提取 RNA 后在电泳下观察, 可见每一病毒体内有 2 个 RNA 分子, 在 5' 端有一连接结构将 2 个 RNA 分子相连。变性后 RNA 双体可分成 2 个完全相同的分子, 因此这种病毒体为“双倍体”。这种“双倍体”结构与逆转录病毒中重组发生率高及与基因组如发生损伤后, 可有效地及时修复有关。

4. 环状单链小的 RNA 病毒基因。HDV 的基因结构是独特的, 只有 ~1700 个核苷酸长, 单链, 但因其中 70% 碱基为互补的, 故可自身相互配对而形成似双链的环棒状结构。这种基因结构与植物病毒中的类病毒, 卫星 RNA 或卫星病毒相似。在病毒基因组中有可以使自身 RNA 断裂的结构, 属一种核酶(ribozyme)。有学者认为 HDV 可能起源于一个 mRNA 与一个自由存在并有活性的 RNA 相结合而形成。

## 二、病毒的蛋白质

病毒的蛋白质由其基因组编码, 可分为结构蛋白与非结构蛋白。由于病毒基因组小, 能

编码的蛋白多肽种类不多,因此病毒的衣壳必须由相同的多肽重复组成。这是病毒衣壳并非由单一大分子蛋白组成,而是由为数众多,但种类不多的亚单位组成的原因。病毒的衣壳可有螺旋对称、二十面体对称或复合对称不同形式。非结构蛋白乃是病毒的酶或调节蛋白,在病毒复制中占重要地位。有包膜的病毒表面具有糖蛋白,其蛋白质组分的合成是由病毒的基因组编码,但其寡糖链的组分则主要由宿主细胞所决定。因此在不同细胞中生长的同一病毒,其包膜的糖蛋白可具有不同的寡糖链。

1. 病毒蛋白质的氨基酸组成与其他动物中存在的蛋白质相同:对于其氨基酸成分的研究,一般并不是通过氨基酸分析而获得,主要是通过对病毒基因组的核苷酸序列分析,间接推算而了解病毒衣壳蛋白的成分。动物病毒衣壳至少由3种不同的多肽组成,有些大病毒,如痘类病毒科、疱疹病毒科则含有20余种不同的多肽。病毒DNA常有类似细胞组蛋白的碱性蛋白与其相连,这些碱性蛋白有的来自细胞,如乳多空病毒科;有些则合成病毒本身的碱性蛋白,如腺病毒。

2. 病毒的糖蛋白是由多肽骨架与寡糖侧链结合而成:两者是通过糖链的N-乙酰葡萄糖胺与蛋白质的门冬酰胺残基相连接。糖蛋白的寡糖链可分为两类:高甘露糖型糖链与复合型糖链(侧支单糖为半乳糖、岩藻糖、唾液酸等)(图1-4)。如轮状病毒仅含高甘露糖型寡糖链,粘病毒、逆转录病毒则兼有复合型与高甘露糖型糖链(表1-2)。病毒包膜蛋白的合成顺序是:①多肽骨架在粗面内质网的多核糖体上合成;②特异蛋白酶作用,将多肽N端的高度疏水性信号肽切除;③当多肽链继续向内质网腔内伸入并折叠过程中,通过脂质载体的脂联作用将

表 1-2 几种动物病毒的糖蛋白

| 病毒组别  | 基因组核酸 | 有无包膜 | 病毒糖蛋白<br>种类 名称 |                                                    | 寡聚糖类型     |
|-------|-------|------|----------------|----------------------------------------------------|-----------|
| 粘病毒   | ssRNA | 有    | 2              | HA<br>NA                                           | 高甘露糖型和复合型 |
| 副粘病毒  | ssRNA | 有    | 2              | HN<br>F                                            | 高甘露糖型和复合型 |
| 披膜病毒  | ssRNA | 有    | 2~3            | E <sub>1</sub><br>E <sub>2</sub><br>E <sub>3</sub> | 高甘露糖型和复合型 |
| 疱疹病毒  | dsDNA | 有    | 5              | gB<br>gC<br>gD<br>gE<br>gG                         |           |
| 弹状病毒  | ssRNA | 有    | 1              | G                                                  | 复合型       |
| 逆转录病毒 | ssRNA | 有    | 2              | gp85<br>gp37                                       | 高甘露糖型和复合型 |
| 本雅病毒  | ssRNA | 有    | 2              | G <sub>1</sub><br>G <sub>2</sub>                   | ?         |
| HBV   | dsDNA | 无    | 1              | gp30                                               | ?         |
| 轮状病毒  | dsRNA | 无    | 1              | VP7                                                | 高甘露糖型     |

整个高甘露糖前体附着于新生的肽链上；④病毒糖蛋白向光面内质网及高尔基复合体移行时，藉后者膜上的水解酶及核苷酸糖基转移酶的作用，对高甘露糖链进行修饰，并同时加入支链的各种(或单一种)糖残基；⑤最后形成糖蛋白分子，并被转送到质膜。通过与病毒的核衣壳蛋白结合而以出芽形式将病毒体排出细胞外。

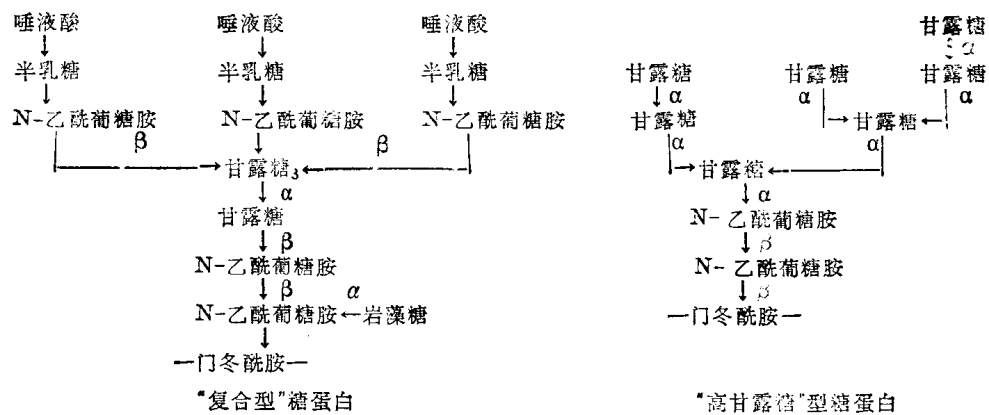


图 1-4 病毒糖蛋白寡糖链的种类

3. 病毒的结构蛋白中，存在于病毒表面(如衣壳、包膜)，并暴露于三维结构表面者，常为重要的抗原决定簇。病毒体的表面决定簇可识别并与细胞的受体结合，是引起感染的第一步。针对这些决定簇(抗原基因或表位)的免疫应答(体液或细胞免疫)是有保护性的中和抗体或杀伤性 T 细胞(Tc 细胞)。

在动物病毒中，对病毒的包膜糖蛋白研究最多的是粘病毒与副粘病毒。如副粘病毒科的包膜有血凝素(HA)和神经氨酸酶(NA)糖蛋白分子(称HN)与融合蛋白(F)分子。前者具有凝集红细胞和 NA 的活性，后者有融合细胞、溶血和穿入细胞的活性。HN 糖蛋白分子在病毒包膜表面藉二硫键连成二聚体。副粘病毒是通过 HN 糖蛋白吸附于宿主细胞后而起动感染，但吸附后能否穿入细胞则需赖于 F 糖蛋白所致的病毒包膜与宿主细胞质膜的融合。F 蛋白需经宿主细胞的蛋白水解酶将其大分子前体(F<sub>0</sub>)裂解为 F<sub>1</sub>与F<sub>2</sub> 后方能被激活。由于不同的副粘病毒具有不同的 F 糖蛋白，它们对宿主细胞蛋白水解酶的敏感又不同，因此不同副粘病毒的组织亲嗜性和病毒感染的宿主范围可有差异。例如在鸡胚绒毛尿囊膜细胞中繁殖的仙台病毒(Ch-仙台病毒)株和从传代培养的 L 株鼠成纤维细胞中繁殖的仙台病毒(L-仙台病毒)株，虽然都有 HN 糖蛋白，但 Ch-仙台病毒株还有 F<sub>1</sub>、F<sub>2</sub> 活性，而 L-仙台病毒株仅有 F<sub>0</sub>，不能在吸附后穿入鸡胚细胞，故表现为对鸡胚细胞无感染性。如用低浓度的胰蛋白酶(10μg/ml)处理 L-仙台病毒株，使 F<sub>0</sub> 裂解为 F<sub>1</sub> 和 F<sub>2</sub>，则可对鸡胚细胞有感染性(图 1-5，表 1-3)。

表 1-3 由鸡胚绒毛尿囊膜细胞和由小鼠 L 细胞增殖的仙台病毒生物活性的比较

| 性 状       | 鸡胚绒毛尿囊膜中的<br>仙台病毒                   | 小鼠 L 细胞仙台病毒        |                                     |
|-----------|-------------------------------------|--------------------|-------------------------------------|
|           |                                     | 胰酶处理前              | 胰酶处理后                               |
| 凝集红细胞     | +                                   | +                  | +                                   |
| NA        | +                                   | +                  | +                                   |
| 溶 血       | +                                   | —                  | +                                   |
| 细胞融合      | +                                   | —                  | +                                   |
| 对细胞培养的感染性 | +                                   | —                  | +                                   |
| 对鸡胚的感染性   | +                                   | ±                  | +                                   |
| 病毒包膜糖蛋白   | HN, F <sub>1</sub> , F <sub>2</sub> | HN, F <sub>0</sub> | HN, F <sub>1</sub> , F <sub>2</sub> |

通过分析 3 种副粘病毒(仙台病毒、新城鸡瘟病毒、SV<sub>5</sub> 病毒)的 F<sub>0</sub> 蛋白,经胰蛋白酶处理后,三者生成的 F<sub>1</sub> 蛋白 N 端的短肽中,有一段高度保守的氨基酸序列。这段序列可能是使病毒包膜与细胞膜融合所必需的(图 1-6)。因此,可能合成类似寡肽段会通过竞争性抑制作用,来阻断这些病毒穿入宿主细胞。

3 种副粘病毒 F<sub>1</sub> 多肽 N 端的氨基酸序列见图 1-7。

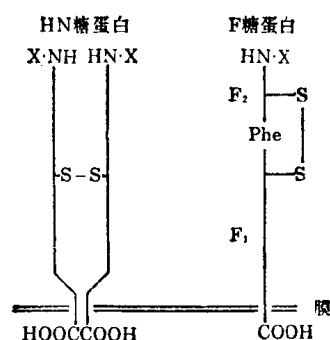


图 1-5 副粘病毒表面 HN 与 F 糖蛋白结构图解

注: F<sub>1</sub> 蛋白 N 端的苯丙氨酸(Phe)是 F 蛋白被蛋白水解酶裂解的位点

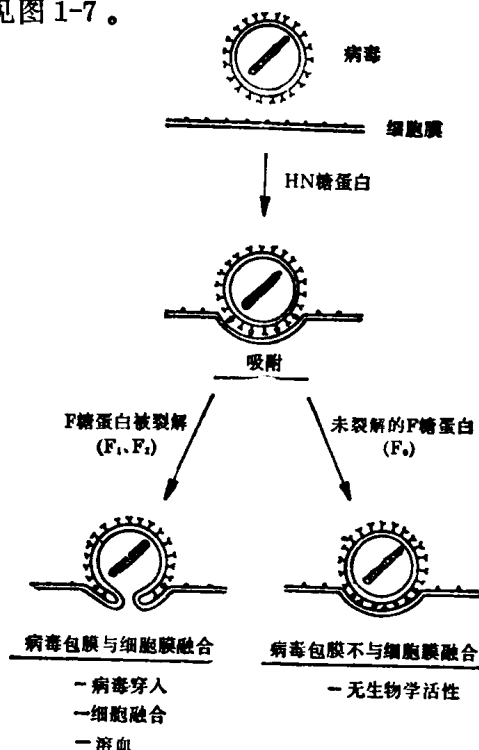


图 1-6 副粘病毒糖蛋白在启动感染细胞中的作用示意图

仙台病毒 Phe-Phe-Gly-Ala-Val-Ile-Gly-Thr-Ile-Ala-Leu-Gly-Val-Ala-Thr-Ala-Ala-Gln  
SV<sub>5</sub> 病毒 Phe-Ala-Gly-Val-Val-Ile-Gly-Leu-Ala-Ala-Leu-Gly-Val-Ala-Thr-Ala-Ala-Gln  
新城鸡瘟病毒 Phe-Ile-Gly-Ala-Ile-Ile-Gly-Gly-Val-Ala-Leu-Gly-Val-Ala-Thr-Ala-Ala-Gln

图 1-7 仙台病毒、SV<sub>5</sub> 病毒和新城鸡瘟病毒 F<sub>1</sub> 多肽 N 端的氨基酸序列

注: Phe: 苯丙氨酸; Gly: 甘氨酸; Ala: 丙氨酸; Val: 缬氨酸; Ile: 异亮氨酸; Thr: 苏氨酸; Leu: 亮氨酸; Gln: 谷氨酰胺

除粘病毒与副粘病毒外,近年来对其他病毒糖蛋白的融合细胞作用亦进行了研究,并对构成细胞融合作用的条件进行了具体分析。例如单纯疱疹病毒(HSV)的 gB 糖蛋白在病毒包膜中可诱导细胞融合。当形成突变株缺失 gB 糖蛋白时,病毒仅能吸附于易感细胞表面,但不能穿入细胞引起感染。另一些病毒如肾病综合征出血热病毒、Semliki 森林病毒等的细胞融合活性需在一定 pH 条件下方可发挥。前者感染 Vero-E<sub>6</sub> 细胞仅在 pH5.1~6.5 条件下才能出现细胞融合活性。带包膜病毒糖蛋白的吸附与融合细胞功能见表 1-4。

通过对病毒衣壳蛋白及包膜糖蛋白的研究,对病毒感染宿主细胞的致病机理、设计预防疫苗及治疗策略均有重要价值。

4. 病毒的酶是由病毒基因所编码的又一类蛋白质: 根据酶的功能可分为: ①与病毒复制有关的酶; ②与病毒致病性有关的酶; ③其他。

(1) 与病毒复制有关的酶: 首先是在痘类病毒中发现有病毒所编码依赖 DNA 的

表 1-4 带包膜病毒糖蛋白的吸附与融合细胞功能

| 病 毒           | 糖 蛋 白              | 功 能  |      |
|---------------|--------------------|------|------|
|               |                    | 吸附细胞 | 融合细胞 |
| 正粘病毒          | HA                 | +    | +    |
|               | NA                 | (+)  | *    |
| 副粘病毒          |                    |      |      |
| 仙台病毒          | HN                 | +    |      |
|               | F                  |      | +    |
| 呼吸道合胞病毒       | gp70               | +    |      |
|               | gp90               |      | +    |
| 疱疹病毒          | gB                 |      | +    |
| 弹状病毒          | G                  | +    | +    |
| 披膜病毒          |                    |      |      |
| Semliki 森林病毒  | E <sub>1</sub>     | +    | +    |
| 本雅病毒          |                    |      |      |
| 出血热肾病综合征病毒    | G <sub>1</sub> (?) | +    | +    |
| 人类免疫缺陷病毒(HIV) | gp120              | +    | +    |

注：\*：融合细胞活性依赖于酸性pH

RNA 多聚酶。因痘类病毒可在宿主胞浆中增殖，并不依赖宿主细胞核中依赖 DNA 的 RNA 多聚酶，说明病毒颗粒本身具有酶，从而得以复制。在负链 RNA 病毒中，具有依赖 RNA 的 RNA 多聚酶，宿主细胞中并不存在这种酶，而负链 RNA 病毒必须具有这种酶，否则负链 RNA 病毒将不可能转录出正链 RNA。只有出现正链 RNA 后，才能作为 mRNA 翻译出病毒的衣壳蛋白，完整病毒才能释放。逆转录病毒中逆转录酶以及 RNase H 也是病毒所编码。前者可以 RNA 为模板转录 DNA，后者仅能水解与 DNA 配对的 RNA，都是病毒所特有的。HBV 编码的 DNA 多聚酶具有逆转录酶活性，也有 RNase H 的作用，因此该病毒的复制周期有逆转录过程。HSV 的 DNA 多聚酶在病毒复制中也占重要地位。HSV-1 还有一种碱性 DNA 酶，通过用温度敏感性突变株(ts)研究，已知这种酶的活性不仅与病毒的生长，还与 DNA 复制有关。这些与病毒复制相关的酶是抗病毒药物研究的靶。某些病毒如 HSV 的酶可受核苷类药物作用(如无环鸟苷)，但耐药毒株也已发现。

(2) 与病毒致病性有关的酶：流感病毒及一些副粘病毒(如副流感病毒、麻疹病毒等)有 HN，可以水解 N-乙酰神经氨酸，在病毒侵入机体时，穿过粘多糖层时有重要作用。前已述及的副粘病毒 F 蛋白与病毒穿入易感细胞有关。HSV 的胸腺嘧啶核苷激酶(thymidine kinase, TK)显示与病毒的致病性可能有关，因失去该酶的 TK<sup>-</sup> 变异株的神经毒性作用减低，并自潜伏的神经节中被激活的能力也减弱。此外还发现 HSV 的 DNA 多聚酶基因发生变异后，也有毒力降低，因此这些酶可能与病毒的致病性有关。

(3) 其他：单正链 RNA 病毒具有可裂解多聚蛋白的蛋白酶(proteinases)，如小 RNA 病毒基因组有一个长的读码框架，编码一个长的多聚蛋白(polyprotein)，通过病毒编码的蛋白酶，可将该多聚蛋白水解为 11 种最终产物，其中有些蛋白是组成病毒蛋白衣壳的成分。

5. 起调控作用的病毒蛋白：DNA 病毒复制过程中出现的早期蛋白可抑制细胞的核酸及蛋白质进行正常代谢。SV<sub>40</sub> 病毒复制早期出现的 T 蛋白是一种蛋白激酶，可使蛋白质磷

酸化,并具有转化细胞的作用。EB病毒在“永生化”(即转化成为能在体外长期培养及传代的细胞系)的细胞中有10种病毒基因编码的蛋白,均或多或少与细胞的“永生化”有关。其中EBNA-2是最主要的蛋白。HIV基因可编码多种调节蛋白,如tat、rev蛋白等,tat蛋白是只有86个氨基酸存在细胞核内的蛋白,可反式激活HIV的转录,rev蛋白则是有选择性作用的调节蛋白,作用于高分子量的RNA,使其稳定地自细胞核内转移到细胞浆内。对这些蛋白的研究可部分揭示病毒和(或)真核细胞的基因调控。

### 三、分析病毒蛋白质与核酸的方法与原则

#### (一) 病毒蛋白质的标记、提取与分析

病毒蛋白质在非变性条件下很难溶解,因此可用强阴离子去垢剂,十二烷基硫酸钠(SDS)与蛋白质作用,使后者变为可溶性。当在含SDS的聚丙烯酰胺凝胶中电泳时,蛋白多肽所带的电荷将不会影响蛋白的迁移率,而蛋白的迁移率仅代表蛋白分子量的大小。与标准品分子量比较,不同迁移率的蛋白条带代表不同分子量。一般或以分子量的千道尔顿来命名,如P<sub>72</sub>,代表分子量为72×10<sup>3</sup>的蛋白多肽;或以VP<sub>1</sub>、VP<sub>2</sub>、VP<sub>3</sub>来命名,即根据分子量由大至小依次命名。分子量最大的蛋白质在该病毒中命名为VP<sub>1</sub>。当含有糖蛋白时,则以GP来表示。

标记病毒蛋白质常通过细胞培养病毒时进行,即先用缺少某种氨基酸(即待用标记的氨基酸)的培养基造成细胞处于“饥饿”状态,然后以<sup>14</sup>C,或<sup>3</sup>H-亮氨酸,或<sup>35</sup>S-蛋氨酸,加入有病毒感染的细胞培养液中,经一段时间孵育后,提取病毒蛋白质。也可以用放线菌素D特异性地阻断宿主细胞mRNA的合成,使标记的病毒蛋白质合成更为显著。

提取病毒蛋白质还可利用抗病毒蛋白质的特异抗体,与病毒感染细胞的裂解物混合孵育后,再加入第二抗体或葡萄球菌A蛋白进行免疫沉淀,自沉淀物中再次将病毒蛋白质释放后,可通过SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳或双相电泳以分离不同的多肽条带。

对于在一般条件下可溶性的病毒蛋白质则可利用一般分离蛋白质的方法获得,如离子交换层析柱、分子筛等。

#### (二) 病毒核酸的提取与分离

病毒核酸的提取主要用酚-氯仿、异戊醇法,蛋白质可通过加入SDS自核酸中去除。加入蛋白酶可消化蛋白质,酚可沉淀蛋白质,使蛋白质存在于酚相而核酸保留在水相。如温度为60℃,则DNA变性而存在于酚相,从而可达到提取RNA的目的。提取mRNA时则采用寡聚dT(oligo dT)柱,使带有poly(A)尾的mRNA在高离子强度时与之结合,在低离子强度时解离。

通过电泳法可以分离纯化或分析病毒核酸。可用聚丙烯酰胺、琼脂糖或琼脂糖-聚丙烯酰胺凝胶进行电泳,电泳后的病毒核酸可经印迹法(Southern印迹或Northern印迹)转移至硝酸纤维素膜上,利用体外标记的病毒核酸探针可与印迹转移的材料进行核酸分子杂交作出诊断。纯化的病毒核酸可通过限制性内切酶消化,与载体(质粒、λ噬菌体等)连接后进行基因克隆,然后进行核苷酸序列分析,并进一步分析病毒的基因结构与功能。应用点突变或缺失突变,或利用自然界存在的变异株做基因分析或比较,是很有效地分析病毒核酸的方法。通过分析病毒mRNA还可了解病毒表达产物的情况与水平,也可间接研究病毒的蛋白质。

(上海医科大学 闻玉梅)

### 参 考 文 献

- [1] Erik L et al. Textbook of Medical Virology. Butterworths, London, 1983, 17~27
- [2] Howard C R. New Developments in Practical Virology, Alan R. Liss Inc, NY, 1982, 144~180, 186~224
- [3] Choppin PW et al. The role of viral glycoproteins in adsorption, penetration, and pathogenicity of viruses. Rev Infect Dis, 1980, 2(1):40
- [4] Carlson GA et al. 朊病毒感染遗传学. <国外医学>微生物学分册, 1992, 15(3):110

## 第二章 病毒的复制

病毒的复制又称为病毒的增殖,是病毒在活细胞中繁殖的过程。这一过程非常特殊,与其他微生物迥然不同,而且形式多样化,是医学分子病毒学研究的重要方面。对病毒的致病机理、宿主免疫应答以及抗病毒治疗等研究均需了解病毒的复制。在 50 年代研究病毒的复制仅限于表面了解病毒-宿主的相互关系,即将细胞暴露于大量病毒之下,使细胞感染为“同步化”,然后中和在细胞外的游离病毒。早年用电镜观察,检测细胞内、外的病毒,发现有一段隐蔽期(eclipse phase),在细胞内、外均不能发现病毒;然而再经过数小时,细胞内见到有完整的病毒,细胞培养的上清液中也可发现病毒。对病毒复制的深入了解是在应用生物化学方法以后,放射性核素标记法在其中占了十分重要的地位。应用放射性核素标记核酸的方法可以追踪核酸的合成过程;同时应用凝胶电泳、柱层析和密度梯度离心法以分离核酸,还可对碱基组成、存在形式等进行研究。例如在 RNA 病毒的复制过程中存在双链 RNA 的复制中间体,就是通过纯化核酸,发现这类 RNA 比单链 RNA 对核糖核酸酶水解的耐受性为强,沉降系数及浮密度比单链 RNA 为低。通过应用一些对核酸、蛋白质的抑制药物,也促进了对病毒生物合成的认识。如抑制 DNA 合成的化学药物阿糖胞苷,抑制 DNA 转录的药物放线菌素 D,抑制蛋白质合成的药物环己亚胺(cycloheximide)都曾被用以研究病毒的生物合成。本章将介绍有关病毒复制的基本特点与规律。各病毒的复制细节将在各有关章节中详细叙述。

### 一、病毒复制的基本特点

1. 病毒只能在活细胞内复制,即仅在活细胞内,病毒才能表现其生物活性。在细胞外,病毒处于无活性或静止状态。

2. 在病毒的复制过程中,宿主细胞提供合成病毒核酸与蛋白质的原料(低分子量的前体成分)、能量和必要的酶。病毒的核酸在复制过程中起“指令”作用,有条不紊地指令宿主细胞按病毒核酸所携带的遗传信息,分别合成病毒的核酸、蛋白质,然后进行装配。一般情况下,宿主细胞的新陈代谢在病毒核酸指令下,停止合成细胞成分;但有时宿主细胞的新陈代谢并未受到显著影响,而继续进行细胞固有的新陈代谢。个别情况下,病毒核酸指令的结果是增强了宿主细胞合成其成分,而出现增生性的病变。

3. 因病毒复制需其核酸(即基因组)指令,故病毒需进入易感细胞并使其核酸释放至细胞内而起指令作用。病毒侵入易感细胞一般需经吸附、穿入、脱蛋白衣壳、生物合成及装配释放等阶段。

病毒的吸附涉及病毒表面成分与细胞受体的特异性结合。病毒表面蛋白衣壳中的多肽,包膜上的糖蛋白,或某些病毒(如腺病毒)的纤突均可分别特异地吸附于细胞表面的受体。实验发现,对腺病毒、脊髓灰质炎病毒与鼻病毒的受体,每个细胞可达  $10 \times 10^3$  个。对不同科的