

医学分子病毒学

闻玉梅 主编
汪家禄 副主编

医学分子病毒学

闻玉梅 主编
汪家禄 副主编

人民卫生出版社

医学分子病毒学

闻玉梅 主编

人民卫生出版社出版

(北京市崇文区天坛西里10号)

北京市房山区印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行

787×1092毫米 16开本 14印张 328千字

1990年1月第1版 1990年1月第1版第1次印刷

印数：00,001—1,670

ISBN 7-117-01059-2/R·1060 定价：10.00元

(科技新书目208—176)

前 言

病毒是一类具有独特生物学性状的非细胞生物。病毒对人类所致疾病涉及临床各学科，感染人数可属首屈一指。从古老的天花、狂犬病到流行性感冒以及当今深受各国关注的艾滋病，病因均为病毒。除急性感染外，病毒尚可构成持续性感染，此外，病毒与肿瘤及一些自身免疫性疾病、内分泌性疾病的发病也有关。因病毒的增殖与宿主细胞有密切关系，绝大多数病毒性疾病的治疗目前尚无有效药物。

为了有效地防治病毒性疾病，必须对病毒的复制、致病、引起免疫应答机理等问题进行深入探讨。为此，近年学者们利用分子生物学理论与技术开展了病毒基因克隆，研究了病毒基因的结构与功能，对病毒编码或诱生的蛋白质也从抗原决定簇及免疫原性、酶功能活性、基因调控等不同角度进行了研究。病毒在生物工程中作为载体也已被广泛应用。病毒基因工程疫苗的研制是十分活跃的领域，有些产品已开始被应用。

为适应医学、生物学工作者、大专院校师生及临床医生、卫生防疫人员对发展迅速的医学分子病毒学有所了解的需要，本书对医学分子病毒学作了深入浅出的介绍。全书共分二十四章，前十一章介绍较为基础、具有共性的理论与技术，后十三章从国内实际出发，选择常见病毒分别介绍其分子生物学。每章后附有主要参考文献。

由于我们的水平有限，其中错误之处，恳请读者批评指正。

本书还得到《国外医学》微生物学分册编辑部王龙妹等同志的大力协助，特此致谢！

阎玉梅

目 录

第一章	病毒的核酸与蛋白质	1
第二章	病毒的复制	8
第三章	病毒糖蛋白	15
第四章	持续性病毒感染	29
第五章	干扰素的分子生物学	36
第六章	癌基因与病毒	48
第七章	病毒基因工程	52
第八章	病毒的提纯	62
第九章	电子显微镜技术在分子病毒学中的应用	69
第十章	核酸杂交在分子病毒学中的应用	77
第十一章	单克隆抗体在病毒分子生物学研究中的应用	87
第十二章	痘病毒的分子生物学	93
第十三章	单纯疱疹病毒的分子生物学	101
第十四章	巨细胞病毒的分子生物学	111
第十五章	EB 病毒的分子生物学	121
第十六章	乳多空病毒的分子生物学	133
第十七章	嗜肝DNA 病毒的分子生物学	141
第十八章	正粘病毒的分子生物学	151
第十九章	轮状病毒的分子生物学	160
第二十章	虫媒病毒的分子生物学	168
第二十一章	肠道病毒的分子生物学	176
第二十二章	甲型肝炎病毒的分子生物学	187
第二十三章	逆转录病毒的分子生物学	193
第二十四章	人类免疫缺陷病毒的分子生物学	202

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)。病毒的核酸携带其遗传信息，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节蛋白等。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，对病毒核酸的认识有了较大进展。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以了解病毒核酸的结构与功能等等，都加深了人们对病毒核酸的认识以便于对它的利用。

病毒核酸 (基因组) 的分子量差别十分显著。最小的细小病毒 (parvovirus)，为单链 DNA 病毒，仅有约 4500 个硷基，分子量为 1.5×10^6 道尔顿。最大的痘类病毒有 200,000 个硷基对 (200kb)，分子量为 1.5×10^8 道尔顿。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吡啶橙进行染色。将提纯并浓缩的病毒颗粒滴在玻片上，用 Carnoy's 液固定后，可用吡啶橙染色。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，分析其硷基组成，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) 之间的克分子数是不等的。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 用吡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，故病毒的基因可以有重叠。

在噬菌体 ϕ X174 的 DNA 序列中, A 基因的终止与 C 基因的起始之间有重叠, C 基因的终止与 D 基因的起始也有重叠。同样, D 基因与 J 基因间也有重叠。此外, 大基因中可以包括有小基因。如 B 基因包括在 A 基因中, E 基因存在于 D 基因中。随读码框架的不同, 病毒的基因可重复利用同一段核酸, 即随读码框架起始点的改变, 同一段核酸可翻译出不止一种的多肽。这些特点可使病毒仅有分子量很小的核酸得到充分利用而编码数量较多的蛋白质。此外, 病毒的基因结构与真核细胞的基因结构相似, 大多数是不连续性的, 有内含子。转录后需经拼接 (splicing) 加工而成为成熟的 RNA。如果病毒转录形成的前 RNA 经过多种形式的拼接, 则也可以使翻译的蛋白产物各异。这些现象均可以看作是病毒为节省其核酸, 最有效地利用其基因组合成数量较多的蛋白质。这种情况主要见于小病毒。

(一) 病毒的 DNA

病毒 DNA 的生物学特性与真核细胞及细菌的 DNA 基本相同, 绝大多数均为双链 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。因此利用测定 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, 因此可以利用超速离心法将病毒 DNA 与宿主细胞 DNA 分离, 提纯病毒 DNA。

1. 噬菌体中有仅含单链的 DNA 病毒, 动物病毒中, 仅微小病毒 (Parvovirus) 为单链 DNA 病毒。单链 DNA 噬菌体 (如 ϕ X174 或 M_{13}) 中的 DNA 为环形, 均为同一单链, 因此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, 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, 在有些病毒 (乳多空病毒科) 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, 所以对一些 DNA 的外切酶有抵抗性, 不易被降解。环形双链 DNA 有一些特殊的物理学特性。用超速离心沉淀法可将环形双链 DNA 分成三种形式: 即闭环型 (covalently closed circle, CCC) 有时又称为 I 型, 开环型 (nicked circle) 又称为 II 型, 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 分子内的硷基对数与 DNA 螺旋转数间出现了误差。正常情况下, DNA 螺旋出现一个旋转相当于 10 个硷基对。当并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。当用溴化乙啶 (ethidium bromide) 染色时, 因该染料可以螯合入双链 DNA 中, 在紫外线下可显出红色, 以上三型可在超速离心沉淀后形成三条条带。

3. 在某些线型双链 DNA 病毒中, 其 DNA 可有些特殊的结构, 主要存在于 DNA

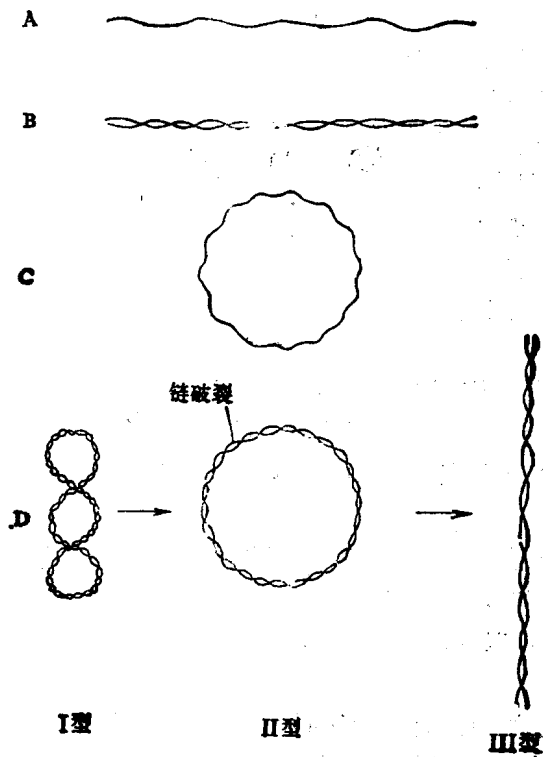


图 1-1 双链环形 DNA 的三种不同型

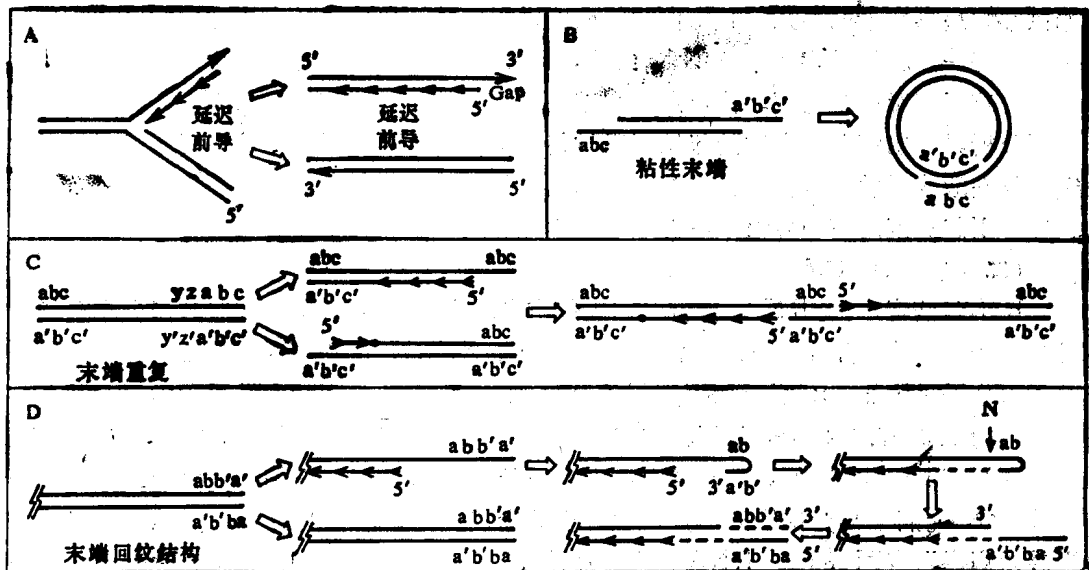


图 1-2 病毒核酸DNA的末端特殊结构

链的末端 (图 1-2)。

(1) 粘性末端 (图 1-2B): 病毒 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, 两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 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时, 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 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。近年来发现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, 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 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。利用物理图谱可以进行分子流行病学调查, 如巨细胞病毒感染的婴儿, 其毒株的物理图谱与自其母亲体内分离到的巨细胞病毒毒株物理图谱一致。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作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份等是医学分子病毒中极为重要的领域。

(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 2.5×10^6 道尔顿, 而最大的 RNA 病毒如副粘病毒与逆转录病毒的基因组则为 $5.5 \sim 7.5 \times 10^6$ 道尔顿。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, 如呼肠孤病毒科 (Reoviridae)。逆转录病毒可有两条正链 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, δ 病毒 (又称 hepatitis D virus, HDV)。 δ 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、植物、动物病毒有共同起源。

1. 单链 RNA 病毒可以是螺旋对称或二十面体对称。其内部 RNA 长度为 1~17kb, 可以由一条 RNA 组成, 亦可分节段, 然而均有一定的二级结构。二级结构在决定病毒核酸的复制及翻译中占重要地位。病毒的 RNA 起类似细胞 mRNA 作用者为正链。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 50~200 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 N₁ 核苷酸以 5'-5' 相连接。N₂ 和 N₃ 可以是四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 病毒的核酸为与 mRNA 序列互补的核苷酸组成。负链 RNA 病毒核酸的互补链相当于 mRNA, 故其 5' 端也有“帽状”结构, 然而负链 RNA 的 5' 端则仅为三磷酸核苷。病毒的 mRNA 在 3' 端有 Poly (A), 但呼肠孤病毒则例外。多数情况下, 病毒核酸转录后, 利用宿主细胞来源的 Poly (A) 多聚酶合成 Poly (A) 片段加到 3' 端。正链 RNA 病毒则不然, 在其病毒 RNA 的 3' 端已存在 Poly (A) 片段, 当复制时, 其负链的 3' 端转录有 Poly (U), 再合成新的病毒 mRNA 时, Poly (U) 再转录为互补的 Poly (A), 因此不需利用宿主细胞来源的 Poly (A) 多聚酶。

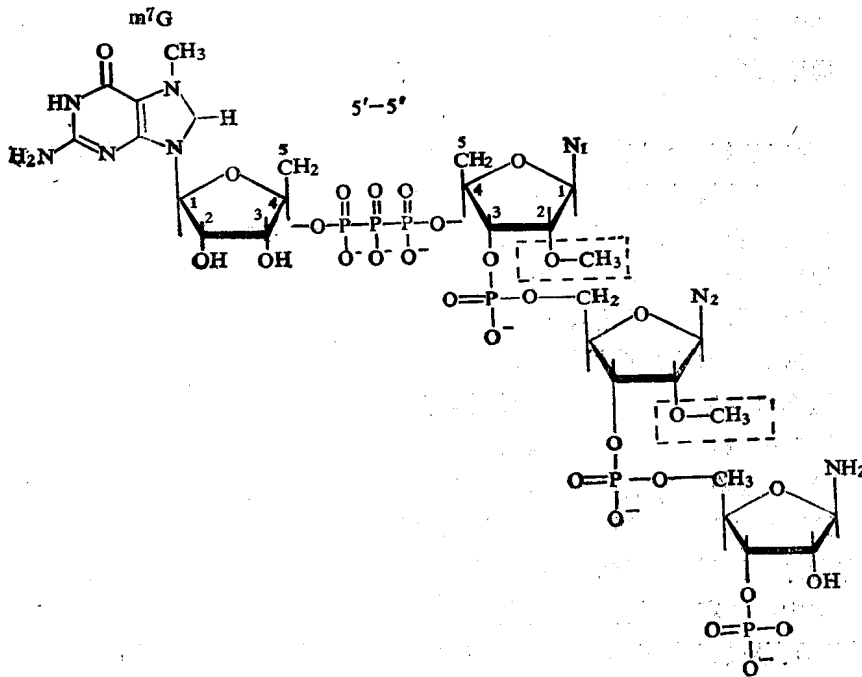


图 1-3 RNA 的帽状结构

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 个以下的不重叠的核酸

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。但自某些 C 型病毒中提取 RNA 后在电镜下观察，可见每一病毒体内有两个 RNA 分子，在 5'端有一连接结构将两个 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”结构可能在病毒复制中有特殊意义。

4. RNA 病毒的核酸可通过用 ^{32}P 标记后，以对鸟嘌呤核苷酸特异有消化作用的 RNA 酶 T_1 消化，然后进行双相电泳分离寡核苷酸片段。获得的寡核苷酸指纹图谱可作为分析 RNA 用。这一种方法亦可作为某些病毒 RNA，如流感病毒的分子流行病学调查。

二、病毒的蛋白质

前已述及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。病毒囊膜中的蛋白将在病毒的糖蛋白章中叙述。

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。动物病毒至少具有三种不同的多肽组成病毒衣壳，有些大病毒，如痘类病毒、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硷性蛋白与其相连。这些硷性蛋白有的来自细胞，如乳多空病毒科；有些如腺病毒则合成病毒本身的硷性蛋白。有囊膜的病毒则具有糖蛋白在囊膜的外侧面，囊膜内侧面的蛋白称为基质蛋白 (matrix)，是疏水性蛋白，很难溶解于水。

2. 病毒具有一些病毒所编码的酶。首先是在痘类病毒中发现有病毒所编码的依赖 DNA 的 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的依赖 DNA 的 RNA 多聚酶，说明病毒颗粒本身具有酶，从而得以复制。以后在其他病毒中亦发现有病毒编码的酶。例如在负链 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核糖核酸酶 H 也是病毒所编码的。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。流感病毒等还具有神经氨酸酶，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。乙型肝炎病毒编码的 DNA 多聚酶与单纯疱疹病毒的胸苷激酶分别与各病毒复制有关，是寻找药物阻断病毒复制的环节。

3. 某些病毒蛋白质起调节蛋白的作用, 如 DNA 病毒复制所形成的早期蛋白可有抑制宿主细胞核酸及蛋白质正常代谢的作用: SV₄₀ 病毒早期 T 蛋白为一种蛋白激酶, 可使蛋白质磷酸化, 并具有转化细胞的作用。因此有些病毒的蛋白质在研究肿瘤病毒病因及细胞生物学中也占重要地位。

4. 病毒蛋白质中存在于其表面 (如衣壳、囊膜), 并暴露于三维结构表面者, 常为重要的抗原决定簇。在抗病毒免疫中比较重视的是起中和作用的抗体, 引起中和抗体的抗原基团或位点 (epitope) 是研究结构蛋白的重要对象。利用基因工程生产疫苗时特别重视中和抗原的表达。考虑合成多肽以制备疫苗时也把重点放在这些位点多肽。

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磺酸钠 (SDS) 与蛋白质作用, 使后者变为可溶性。当在含十二烷基磺酸钠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 P₇₂, 代表分子量为 72 千道尔顿的蛋白多肽; 或以 Vp₁、Vp₂、Vp₃ 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 Vp₁。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 ¹⁴C、或 ³H-亮氨酸, 或 ³⁵S-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, 可通过十二烷基磺酸钠-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的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。蛋白质可通过加入十二烷基磺酸钠自核酸上去除。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 柱 (oligo dT), 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吸印法 (Southern 吸印或 Northern 吸印) 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吸印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。

由于病毒核酸是决定病毒遗传特性的物质, 因此提取病毒核酸进行基因克隆, 以进一步分析病毒基因的结构与功能是分子病毒学的重要内容。在医学实践中, 以病毒核酸为探针进行核酸分子杂交, 已用于多种病毒感染的诊断, 如乙型肝炎病毒、EB 病毒、巨细胞病毒等。对于一些有病毒核酸整合的细胞或组织, 从核酸水平进行研究, 可以发现一些无病毒抗原表达的潜在病毒。这些在研究肿瘤病毒病因中已被广泛采用。通过分析研究病毒的 mRNA 还可了解病毒的复制与表达蛋白质, 在理论及实际应用中亦有一定价值。

(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. Galasso G J, et al. *Antiviral Agents and Viral Diseases of Man*, Raven Press, NY, 1979, 2~11
3. Howard C R. *New Developments in Practical Virology*, Alan R. Liss Inc, NY, 1982, 144~180, 186~224

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周期。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, 同位素标记法在其中占了十分重要的地位。应用同位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, 还可对硷基组成、存在形式等进行研究。例如在 RNA 病毒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. 病毒复制过程中，宿主细胞提供合成病毒核酸与蛋白质的原料(低分子量的前体成份)，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，停止合成细胞成份；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份，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、囊膜上的糖蛋白，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 10,000 个。对不同科的病毒可有不同受体，因此一个细胞表面可有对不同病毒的受体。受体的研究可通过应用未标记的病毒作为阻断病毒，再用同位素标记的病毒为攻击病毒。结果发现，鼻病毒、柯萨奇病毒、脊髓灰质炎病毒与腺病毒间一般无交叉共同受体，但个别型，如柯萨奇 B₂ 病毒与腺病毒 2 型间有共同受体。研究病毒的受体组成、功能与病毒感染细胞的过程，对了解病毒的发病机理以及探讨抗病毒治疗，有重要意义。病毒的吸附还受一定环境条件的影响，如离子强度、pH、温度、多糖成分等。

病毒入细胞后的脱衣壳是病毒核酸复制与翻译的前提。各类病毒的方式不一。无囊膜的病毒可在吸附于细胞受体的过程中已有蛋白衣壳的变化，如已发现脊髓灰质炎病毒吸附于易感细胞时，其中 VP₁ 多肽已失去。有的病毒衣壳在吞噬体内被溶酶体中的酶降解后脱壳。也有些病毒自身有脱壳酶，如痘类病毒先经细胞溶酶体酶脱去外层衣壳，然后通过自身制造的脱壳酶脱去内层衣壳。

4. 无蛋白衣壳的“裸”核酸在一定条件下也可致病毒复制。病毒体固有蛋白衣壳可以保护核酸免受核酸酶或其他因素作用而使病毒失活，但“裸”核酸在一定条件下也可引起感染。一般需用磷酸钙沉淀、硷性聚合物(如 DEAE-dextran) 或甚至电转染(electroporation)，促进核酸进入细胞。以病毒核酸导入细胞称为转染(transfection)，与完整病毒感染有所区别。以核酸导入细胞致病毒复制的效率远低于病毒感染，仅为病毒感染的 1%。因核酸进入细胞可不受细胞表面受体的限制，因此比病毒感染的宿主细胞范围更为广泛。虽然在自然条件下，很少有核酸单独引起感染的可能，但由于病毒的核酸与蛋白质对一些灭活因子的反应可有所差别，在制备疫苗时，有蛋白衣壳破裂而释放“裸”核酸的可能，应予以注意。此外，以某种细胞培养繁殖病毒时，可能有来自细胞的核酸成份，也应加以注意。

5. 病毒有多种核酸型，因此其复制形式亦非相同。核心问题是病毒核酸如何复制，以及病毒基因组的信息如何转录而翻译出相应的蛋白质。这一过程称为生物合成，将重点予以介绍。

二、DNA 病毒的生物合成

各类 DNA 病毒复制均不相同。多数 DNA 病毒（微小病毒、乳多空病毒、腺病毒与疱疹病毒）的 DNA 均在细胞核内复制，病毒蛋白质则先在胞浆内合成，再移行至核内装配。痘类病毒却例外地在细胞浆内复制。这是由于痘类病毒内部带有合成 mRNA，加帽状结构及添 Poly-(A) 尾的全部酶，因此这些过程并不需要细胞核中的酶参与。而且还发现痘类病毒的 mRNA 并不需经过拼接（这一过程是在细胞核内进行的过程）。以足量 DNA 病毒感染细胞后，病毒释放的时间也各不相同。疱疹病毒为在感染后 5~10 小时，腺病毒为 15~20 小时，多瘤病毒为 25~30 小时。DNA 病毒复制的一些特性比较见表 2-1。

表 2-1 DNA 病毒复制的比较

	痘类病毒	疱疹类病毒	腺病毒	乳多空病毒
抑制宿主细胞 RNA 和蛋白质	早	早	迟	无影响
抑制宿主细胞 DNA	早	早	迟	刺激宿主细胞 DNA
病毒 DNA 的合成部位及病毒装配的部位	细胞浆	细胞核	细胞核	细胞核
病毒的释放	少、迟	少、较迟	较迟	最迟

(一) 双链 DNA 病毒

疱疹类病毒、腺病毒、乳多空病毒均属这一大组。这些病毒本身不携带以 DNA 为模板的 RNA 多聚酶，因此其转录必须依赖细胞核的转录酶。病毒 DNA 必须在细胞核内复制。根据转录发生于病毒 DNA 合成前与后，分别称为早期转录与晚期转录。通过对腺病毒的研究，发现在转录时，并不是整段 DNA 均可转录，而是需经过加工拼接，在 5'端加“帽状”结构，3'端加 Poly (A) 尾，并拼接去除内含子后，才能连接成为成熟的 mRNA。真核细胞的转录过程与之相同。在利用腺病毒的研究中，还发现早期转录是自病毒 DNA 的 5 个区域分别进行的。其中 3 个区来自一条 DNA 链，另 2 个区来自另一条 DNA 链。每一个区转录的 mRNA 都分别有加帽的 5'端。各种病毒早期和晚期转录 DNA 的情况有所不同，如疱疹病毒早期转录的 mRNA 与晚期转录的 mRNA 的核苷酸序列是相同的，但腺病毒和乳多空病毒早、晚期转录的 DNA 部分则显然不同。因此在各种病毒的复制中，生物合成的细节有所不同。

早期转录不需要病毒 DNA 的复制，因此在有核酸合成抑制物 Ara-C 存在时，并不影响早期蛋白的合成。早期 mRNA 翻译的早期蛋白除包括病毒 DNA 复制所需酶外，还包括抑制细胞核酸转录与翻译的调节蛋白。晚期转录合成的蛋白则为病毒蛋白衣壳，为结构蛋白。

病毒 DNA 的复制采用半保留复制形式。双链解旋后，每一条链分别复制出互补链。其中一条链以连续性形式复制出一条完整的互补链，另一条 DNA 链则通过不连续性形式复制，即新合成的 DNA 以 100~200 个核苷酸长度合成片段，每一段均有 9~

10个 RNA 分子作为引物。当 DNA 合成后则该 RNA 片段被除去, 然后最终通过连接酶将全条互补链补齐成为一条完整的 DNA 链。病毒 DNA 在核内复制后, 晚期 mRNA 移行到胞浆翻译成病毒蛋白质衣壳再进入细胞核, 装配成完整的病毒颗粒。

乳多空病毒的双链 DNA 因属环形, 故有其特殊性, 在病毒 DNA 复制时由一特殊起始点 (origin) 开始, 以顺时针与逆时针两个方向进行。

痘类病毒的复制将在第十二章中叙述。

(二) 单链 DNA 病毒

微小病毒 (parvovirus) 只具有单链线形 DNA, 因此复制时需形成复制中间体。这类病毒的复制需利用细胞的 DNA 多聚酶。病毒的 DNA 末端核苷酸序列有重复序列或倒置重复序列, 因此本类病毒 DNA 可以自身在重复序列间配对而构成发夹样结构 (图 2-1), 图中 A 与 a 代表互补核苷酸序列, 病毒 DNA 由 5' 端合成配对延长而形成发夹样结构。然后病毒 DNA 在形成的发夹样复制中间体内, 经限制性内切酶在有重复序列部位切断, 从而分别获得正链与负链两条单链 DNA。新合成的 DNA 一般均为过量, 仅一部分被装配入病毒衣壳蛋白。剩下的多余病毒 DNA 常不被利用, 而组成细胞内的包涵体。

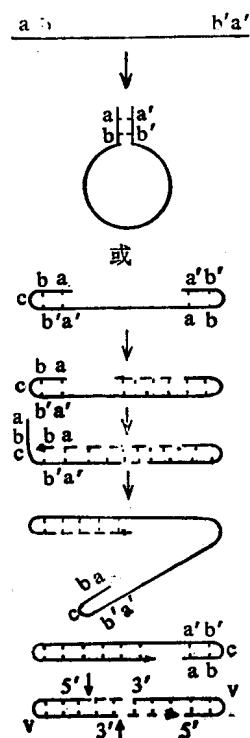


图 2-1 微小病毒复制模式图

三、RNA 病毒的生物合成

RNA 病毒的基因组是 RNA, 其转录、翻译和复制与 DNA 病毒及细胞均不相同。与 DNA 病毒相比, RNA 病毒所携带的遗传信息较少。因此只编码少数几种酶。正链 RNA 病毒的 RNA 既可起模板作用复制出子代 RNA, 又可起 mRNA 作用, 直接翻译出病毒所编码的蛋白质。负链 RNA 病毒的 RNA 不能作为 mRNA, 必须转录互补的 RNA, 后者才是 mRNA。由于宿主细胞中不具备依赖 RNA 的 RNA 多聚酶, 因此病毒必须携带依赖 RNA 的 RNA 多聚酶, 才能完成整个复制过程。当以足量 RNA 病毒感染细胞时, 病毒释放的时间为几小时至十几小时。肠道病毒所需时间最短, 仅为 3~4 小时, 而流感病毒则需 8~10 小时, 呼肠孤病毒需 10 多小时。根据病毒 RNA 的极性 (正链或负链) 以及其是否分节段等性质。可将 RNA 病毒分为单正链、单负链、单负链分节段, 双链分节段 RNA 病毒及逆转录病毒五大类。RNA 病毒的复制及装配 (除流感病毒及逆转录病毒外) 均在胞浆中进行 (表 2-2)。

(一) 单正链 RNA 病毒

小 RNA 病毒科 (肠道病毒、鼻病毒) 以及披盖病毒均属此类。其特点为单一 RNA 分子可作为模板复制子代 RNA, 又可作为 mRNA 编码病毒的非结构蛋白 (如 RNA 复制酶) 与结构蛋白 (衣壳)。因此单独提取的病毒 RNA 具有感染性。病毒的 RNA 可在宿主细胞的核糖体 (为特殊的与膜相结合的核糖体) 上翻译出一个大分子的多肽, 随即很快被断裂成数个小分子多肽。具有非结构蛋白或结构蛋白的性质。非结构

表 2-2 主要 RNA 病毒的核酸性质比较

病毒科	RNA 链数	RNA 分子数	mRNA 功能	感染性	是否需要依赖 RNA 的 RNA 多聚酶
小 RNA 病毒科 披盖病毒科	单链	1	+	+	-
副粘病毒科 冠状病毒科 弹状病毒科	单链	1	-	-	+
正粘病毒科	单链	7	-	-	+
逆转录病毒科	单链	4	+	-	+ (逆转录酶)
呼肠孤病毒科	双链	10	-	-	+

蛋白中有一种为复制酶，可使病毒 RNA 复制出子代 RNA，另一些蛋白质则可组成病毒的蛋白衣壳。

单链 RNA 病毒复制子代 RNA 时需经过双链 RNA 的复制中间体 (replicative intermediate) 阶段。这是通过³H-磷酸尿嘧啶核苷追踪实验所证实。在感染后很短时间提取 RNA，可发现同位素存在于一部分为双链同时又有单链 RNA 分子结构中。因为双链 RNA 可抵抗 RNA 酶的作用，而单链 RNA 则对 RNA 酶敏感，上述复制中间体中有双链 RNA 部分，故对 RNA 酶有一定的抵抗力。在电镜下观察，也可见到具有双链结构，又有几个单链尾部的 RNA 分子。随培养时间的延长，动态地追踪，发现同位素在后期存在于单链 RNA 中，自病毒感染的细胞中可提取获得两种形式的病毒 RNA 的复制型。一种是完整的双链 RNA，含有一条正链及一条负链 RNA，称为复制中间型 (replicative form)；另一种是有一条完整的负链及有数条正在生成的正链 RNA，称为复制中间体。目前认为可能复制中间型是在提取病毒 RNA 过程中退火而形成的假象，在病毒 RNA 复制中并不一定存在，而复制中间体才是病毒复制 RNA 的真实型别。因此 RNA 复制的过程是：以病毒正链 RNA 为模板，利用病毒编码的复制酶经过复制中间体合成负链 RNA。新合成的负链 RNA 自复制中间体上解离下来后，新生的子代 RNA，则以负链 RNA 为模板经过复制中间体形式再次合成多个正链 RNA 分子，从而成为子代病毒的 RNA。自感染细胞提取物中，未发现过游离存在的负链 RNA，这可能是由于负链一旦形成后，立即就开始形成了复制中间体。病毒 RNA 分子在复制过程中可同时有数个新生的 RNA 分子与一条 RNA 模板配对 (表现为有数个单链 RNA 分子尾部) 反映了病毒复制子代 RNA 的高效率。以脊髓灰质炎病毒 RNA 为例，发现其每秒钟可复制约 100 个碱基。一个复制中间体往往有 5 条新生的子代 RNA 配对，因此每个细胞每分钟约可合成近 3000 个 RNA 拷贝。

新生成的 RNA 在其 5' 端均有一蛋白质 (Vpg) 以共价键与之相连。在一半的正链 RNA 中，Vpg 可被断裂，该正链 RNA 以后则起 mRNA 的作用。另一半保留 Vpg 的正链 RNA 则在胞浆中由病毒所编码的结构蛋白组成衣壳，装配而构成病毒体。小 RNA 病毒科与披盖病毒科的 mRNA 有所不同。后者可形成两种不同的