

实验生物学专著选译

病毒的结构与功能

〔美〕H. 弗朗克-康拉著 張友尚譯

上海科学技术出版社

實驗生物学专著选譯

病毒的結構与功能

[美] H. 弗朗克-康拉 著

張 友 尚 譯

鈕 經 义 校 閱

上海科学技术出版社

內 容 提 要

本书原名 «Design and Function at the Threshold of Life: The Viruses», 为切合内容起见, 译为 «病毒的結構与功能», 列为本社实验生物学专著选译之一。

本书深入浅出地介绍了各类病毒的分离和鉴定方法, 以及它们的結構和功能。通过本书, 对病毒的感染和复制过程也能有所理解。

DESIGN AND FUNCTION AT THE THRESHOLD OF LIFE: THE VIRUSES

Heinz Fraenkel-Conrat

Academic Press 1962

实验生物学专著选译

病 毒 的 結 构 与 功 能

张友尚 译 鈕經义 校閱

上海科学技术出版社出版 (上海瑞金二路 45) 号)

上海市书刊出版业营业登记证出 093 号

商务印书馆上海厂印刷 新华书店上海发行所发行

开本 850×1168 1/32 印张 3 插页 4 排版字数 85,000

1964 年 10 月第 1 版 1964 年 10 月第 1 次印刷

印数 1—6,000

統一书号 13119·584 定价(科七) 0.65 元

序 言

在过去的 25 年中，物理和生物等科学经历了惊人的变化。这些科学已变为全世界千千万万人日常所关心的事。

科学在应用方面的发展和纯粹工艺学的界限是难于划分的。报导科学消息的记者觉得：讨论成品比讨论基本原理要容易些，其结果是在很大程度上歪曲了科学界的状况，使外行难以得到基本研究的目的和过程的真实介绍，也难以看到一些新的发现是怎样从意外的观察和错误的学说开始的。

在活跃的研究期间利用余暇编写的这本小册子，企图纠正这种错误的印象。在这个时期，我的研究兴趣正好十分接近在一个领域内的发展主流之一，在此领域内，我们的知识正以前所未有的速度增长着。当我决定对这一问题从事于一般的写作时，似乎可能采取三种方式。我可以对我的同行科学家作学究式的探讨，也可以为任何能够看得懂的人写一篇最新进展的流水账；最后，我或者可以尝试以轻松活泼的方式来叙述这方面的发展，解释所有的术语，使有知识的外行也能了解。我选择了最后一种方式。但是由于首先要从事其他活动，我只能作很简单的叙述，为此，必须在此表示歉意。许多有兴趣和重要的材料也未列入。另一方面，一些还没有为科学界所消化的很新的材料，却被收集进去了。

这本小册子并不打算要满足一切人。只希望它能引起读者的求知欲，使他想钻研书末所列的更多科学文献。还希望通过它能使读者对于迅速进展的科学道路具有更现实的概念，知道科学如何由试验和误差中，由发现和纠正中获得益处。

H. 弗朗克-康拉

Berkeley 城，1962 年 4 月

目 录

序言

一、病毒学的簡史·····	1
二、植物病毒的鉴定与分离·····	5
三、动物病毒和細菌病毒的分离·····	9
四、病毒顆粒的結構·····	15
五、蛋白质的化学結構·····	19
六、核酸的化学·····	43
七、病毒成分的生物功能·····	63
八、复制的化学机制·····	91
九、結論·····	98

一、病毒学的簡史

大約在 100 年以前，“病毒”一詞一直是用来表示一切有害或有毒的因素。到 19 世紀中叶左右，人們对于生物现象的因果关系开始进行认真的研究，从而了解到有几类很不同的有害因素存在。一类物质是典型的毒物或毒素，它們是化学組成简单的物质，如一氧化碳及氰化鉀以至于包括蛋白质在內的复杂有机分子，对这类物质并未产生概念性的問題。另一类物质是致病的微生物，它們的发现对于生物学的发展起了很大的推动作用。Koch, Pasteur 及 Ehrlich 等使世人認識了这些能自我繁殖、显然是活的病原体（疾病的载体），同时給与我們对它們作斗争或将它們除去的物理和化学方法。人們开始满怀希望地瞻望一个无菌和无病的未来。但是，很快就发现有很多致病因素并不遵循細菌学家所规定的一切法則。特別是許多这类因素被发现可以通过足以阻止最小細菌的濾器，同时它們在足以适应要求最苛刻的細菌生长的培养基中也不能繁殖。在这些方面它們类似简单的毒物。然而，当它們进入易感的寄主并引起疾病时，它們显然是很容易繁殖的。因为象細菌一样，它們通过不断地传代可以連續地传播給无数的寄主或牺牲者。这类因子被称为滤过性病毒，以后即簡称为病毒。

关于病毒的最初局部叙述應該归功于 ИВАНОВСКИЙ。这位俄国学者在 1892 年报导：产生所謂烟草花叶病的因子可以自由地通过細菌濾器。然而，只是在几年以后，荷兰的細菌学家 Beijerinck 才作出了大胆的設想，即认为他所研究的是一种新型的生物因子。在以后的 30 年中，由于許多研究者的工作，病毒的生物状态逐渐被清楚地闡明了。最初发现植物与动物是病毒的寄主，但是很快就証明，在第一次世界大战期間由 Twort 和 d'Hérelle 各自单独发现的噬菌体，是專門侵犯細菌的另一类病毒。

下一步重要的进展是 Elford 在 1931 年所作的研究,在此研究中各种病毒的大小可以由它们通过不同等级的有孔膜(所谓筛)的能力来推算,但是这一进展往往被忽视,因为象病毒这种生物现象的物理测定能为人们所接受的时机尚未成熟。病毒一直被认为是相当神秘的侵染因素,它们小得用最高倍的显微镜也看不见,用滤器也不能阻止它们通过;同时,它们不能在体外(在玻璃器皿中)培养,而只能在它们引起疾病时于寄主体内复制。

这样,一直到 20 世纪 30 年代前,病毒学几乎不像是化学家甚至生物化学家感兴趣的领域,因为这些学者所研究的是实质的东西,而不是几乎完全被一些否定论所规定的神秘因子。这种消极的态度是如此的普遍,以至于早在 1887 年,在牛痘液内用显微镜看到并经常在提纯的牛痘病毒制剂中发现的颗粒,被称为基本体而不称为病毒颗粒,因为从定义上讲,病毒不是看不见吗?出于同样的失败情绪,差不多与上述同一时期在几处实验室内分离出来的、具有某种病毒活力的蛋白部分也一般地不认为是病毒。采取一种新的假说需要一个具有特殊科学见解与勇气的人,这一假说是:病毒可以被认为是大的蛋白质分子,具有最高的病毒侵染力的蛋白部分可能实际上就代表病毒。这就是导致 Stanley 在 1935 年描述第一次分离并结晶一个病毒的态度,这一病毒又是烟草花叶病毒(简称 TMV),它好象注定要标志病毒学上的许多里程碑。由于这一发现,或者说由于这一新态度的宣布,病毒在全世界成为大量化学与物理研究的对象。这一发展的后果使得病毒的化学,即生物化学和物理化学研究中最活跃的领域,以及病毒的生物学目前成为书籍、课程,甚至广播和电视节目的主要内容之一。

根据现在的知识,病毒是大小不同的颗粒,大的病毒相当于小的细菌,小的病毒相当于大的蛋白分子(图 1)。它们大部分是蛋白质,并含有由蛋白质包围起来的另一必要成分——核酸。大多数病毒缺乏所有的酶,都没有代谢作用。当进入适当的活细胞后,它们能引起细胞代谢途径的改变而导致病毒核酸和病毒蛋白的生成。这样,病毒诱发病毒的复制,不过进行工作并供给材料的是细胞。

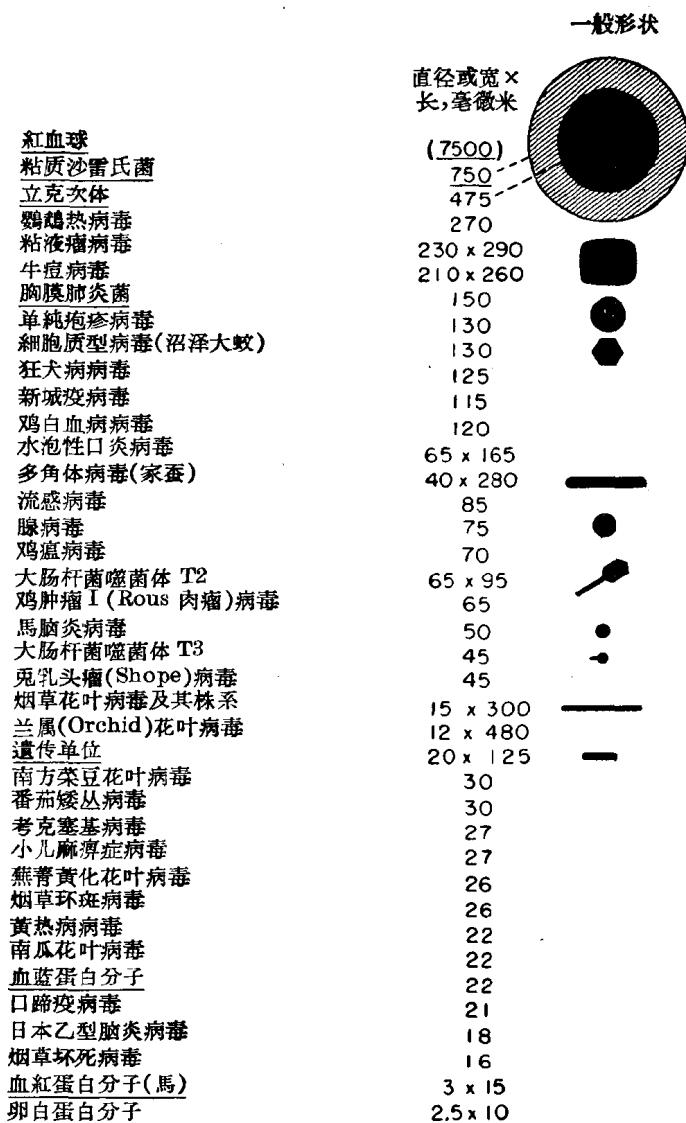


图 1 病毒及参考对象的近似大小。頂上所列的紅血球未表示出来, 因为它的直径为所示細菌的十倍(按重量計为一千倍)。由图可以看出, 有些病毒比最小的細菌(胸膜肺炎菌)大而有些比大的蛋白分子(血藍蛋白)小, 但是大部分病毒介于上述两类之間。非病毒的参考对象用横綫标出。

病毒的化学和物理本质的認識对于公共卫生、医学、兽医学以及植物病理学的推动是巨大的。然而，具有遗传活力的均一颗粒的分离对于整个生物学具有更大的冲击作用。提純病毒的研究激起了新学科——分子生物学的发展，这门学科是以化学家或物理学家看待分子的观点来看待生物过程，即生命的。特别是仅病毒核酸就可以进行一切严格的遗传功能的这一发现，大大提高了对病毒研究的兴趣。因为目前我們对于病毒及病毒核酸的化学知識和有关正常和病理的細胞颗粒，以及細胞遗传物质的发现和結論是紧密地联系着的。生物化学、生物物理学、遗传学、肿瘤学、細胞学以及病毒学这些領域在分子生物学的总范围内融合在一起，而化学提純的病毒是分子生物学最方便和富有成果的研究对象之一。

二、植物病毒的鉴定与分离

对于病毒、激素及酶等生物材料的化学研究，只有在它们以不含其他细胞成分的提纯形式分离出来以后，才能认真地开始。这样的分离常常是一个困难的过程。如果有方便而定量的生物测定可用，则大大有利于分离工作。因为这样就可以检查在与无活性物质分离的过程中活性部分的存在以及其相对的增加。很多病毒可以用比较简单而精确的生物检定法来测定，这样的病毒常被选择为详细的生化研究对象。属于此类的植物病毒可以产生所谓局部病灶，这些病灶常常是褪色的斑点，它们代表接种叶面上的有病组织。每叶上的斑点数大致与接种液中病毒的浓度成比例。如果在叶面的一半接种未知病毒含量的溶液，而另一半接种已知或“标准”病毒的溶液，从两半叶出现病灶的比值，可以推算出未知溶液中病毒的浓度。进一步观察图 2，可以发现烟叶两半面的斑点大小很不一样。这是由烟草花叶病毒两种不同株系或变种所产生的。以后我们还要更多地谈到株系；这个照片说明从病灶的外貌可以很容易地鉴别株系，就象从每半叶的病灶数很容易测定它们的相对浓度一样。

为了分离病毒，我们希望它在寄主组织内的浓度愈高愈好。测定浓度可以研磨一些被侵染的组织并将试样接种于产生局部病灶的寄主上。如果用 TMV 及其他植物病毒作实验，可以发现产生局部病灶的植株中每叶或每一植株的病毒并不多。其他植株，如土耳其烟草，能任病毒在整个植物中自由传播，在这些植株榨出的汁液内，常能发现病毒的浓度最高。这样，如果将 TMV 擦在不产生局部病灶的一小颗土耳其烟草的一两片叶子上，则 TMV 的浓度增加并在整个迅速生长的植物内分布，因而在 3 周后植物长大了 20 倍，其中所含病毒则为接种量的几百万倍。



图2 TMV 及其株系之一在一种烟叶上产生的局部病灶。10天前在烟叶 (*Nicotiana tabacum* var. *Xanthi*) 的左半面接种 TMV 普通株,右半面接种一种化学方法产生的株系(亚硝酸变种)。实际上病灶为棕黄色。由 TMV 普通株所致的病灶在3天后最初出现时要小得多,但是以后继续扩大,而由某些株系所致的病灶并不扩大;另一些株系的病灶和图示者(右半叶)一样细小。病灶的相对数目表示接种液中病毒的浓度。

由以上关于病毒传播的叙述得到的印象,好象病毒并不损害植物。实际上,典型的 TMV 可以使土耳其烟草的生长速度降低,并出现叶的变形、斑纹状的变色以及其他征状。病毒的另一株系或变种能产生更严重的影响,并可能逐渐杀死植物。其他一些则比较温和,同时已知有些株系可在土耳其烟草中顺利地繁殖而不引起寄主的任何可见征状。另一些植物病毒和动物病毒与它们的寄主有类似的友好关系,这与某些高等生物间的共生关系相似。甚至更加特别的但在本书讨论范围以外的是溶菌原状态,这就是

說某些細菌病毒可以在細菌无穷尽的传代中完全沒入細菌的遗传物质中而完全不被觉察，一直到它們的自发复制被紫外綫或某些化学物质人工地引起时为止。

关于病毒生物学的簡單介紹到此为止。在这里我們所关心的不是有病或无病，而是生产病毒以供进一步的研究。因为病毒只能在活細胞中而不能在土壤中生长，为了要获得 TMV，我們的病毒园地是烟草作物。由植物組織中分离出病毒曾經用过多種方法，这里只介紹最常用的一些方法的原理。通常首先是将植物冷冻，因为这样可以容易將它們研磨成浆。为了中和植物的酸，在磷酸鈉緩冲盐类存在时研磨常常是有益的。然后将汁液用粗棉布或其他粗滤器压出，除去不溶的植物残渣。

从植物汁液中分离出病毒的主要原理是利用它們以下的物理性质：病毒是比大多数其他分子更大而又比細胞壁、細胞膜及变性蛋白粒子为小的顆粒。这些原理當我們在以后的章节中討論蛋白质的性质时将更为清楚。采取的步驟是将汁液在 10,000 轉/分的較低速度下离心，这个速度比實驗室的一般离心机为快，但还不足以使病毒顆粒堆集在管底。在这种条件下，大部分残渣，包括植物細胞中含叶綠素的顆粒，即所謂叶綠体，都被沉集下来。将上清液在每分钟 20,000~30,000 轉的超离心机內离心，离心机产生的离心力为重力的 62,000 倍左右，这使典型的病毒以凝胶的形式沉降于管底。将含有一切低分子的植物成分，如糖类、盐类、可溶性蛋白质及自由的叶綠素等的上清液弃去。沉降物在水或盐溶液中可以重新分散，在分散时要有耐心并略加搅拌或搖动。如果病毒的浓度相当大(如每毫升 10 毫克左右)，則溶液看来不象水那样清，因为病毒顆粒很大，可以使光产生散射而使溶液呈乳浊状。为了进一步提純，同样的步驟可以重复几次：低速离心除去大的残渣，高速离心使病毒沉降并除去低分子物质。如果沉降物无色而半透明，則可能全部由病毒顆粒所組成，这时病毒的分离已經完成。

有时候，差別离心的技术不足以使病毒与其他物质分离，因此必須依靠另外的原理。密度梯度离心法可以使病毒与不同密度的

物质分离，此法是将病毒置于浓度由顶部到底部逐渐增加的盐或糖溶液中离心。因为核酸比大部分其他细胞成分具有较高的密度而病毒是含有一定量核酸的核蛋白，所以这一技术有很高的选择性。其他一些方法则是利用杂质蛋白比病毒颗粒常常更易变性而变为不溶解的原理。在小心控制的条件下加热，或用乙醇处理，或用与水不混合的溶剂如丁醇处理，可以达到此目的。病毒的分离也可以用蛋白质化学上的标准方法，如逐渐加入硫酸铵使病毒与其他蛋白质分步被盐析。这一方法在1935年被 Stanley 用来第一次得到纯的 TMV，但是，现在此法已大部分为差别离心法所代替。单独地或综合地利用上述方法，至少有 50 种不同的植物病毒或株系已被提纯并进行了化学研究。其中有許多可以形成美丽的结晶，其形状和规则性与简单化合物如糖类、盐类的结晶没有什么区别。

三、动物病毒和細菌病毒的分离

动物病毒和細菌病毒的提純所依据的原理，一般与提純植物病毒的原理相同。动物病毒在組織中所达到的浓度常常不很高。此外，存在于动物細胞中的細胞蛋白又远較植物細胞中的高。所有这些使得动物病毒的分离要困难得多，因此，只有較少的动物病毒已經被提純。

大多数的化学工作是在两种动物病毒上进行的，即流感病毒和小儿麻痹症病毒。流感病毒及有关病毒的分离大大借助于它們在紅血球上吸附的特性。小儿麻痹症病毒的分离是将丁醇两相系統成功地应用于病毒提純的最初的例子之一。在这里酶的应用也是很有益的，它的根据是：病毒一般比其他細胞成分对于酶的作用具有更大的抵抗力。最近，小儿麻痹症病毒已成为第一个被結晶的动物病毒。但必須指出，象病毒这样大的顆粒結晶，虽然在美学上是滿意的，但并不一定意味着比无定形者具有更高的純度或侵染力(图 3-C, D)。近来，分离大量小儿麻痹症病毒的层析方法已有报导。但是，大量的动物病毒只是指几个毫克，而植物病毒是以克量制备的(1 兩 = 28 克 = 28,000 毫克)。

噬菌体的分离主要靠差別离心的原理，但有时也用差別过滤与沉淀法。

我們已強調过好的生物鉴定法对于研究任何生物活性物质的重要性。对于噬菌体，这一条件可以很好地滿足，因为每一噬菌体顆粒及其后代在細菌层上吞噬細菌而产生明显而易于計数的孔。許多动物病毒现在也可以同样容易地进行定量測定，在这方面要感謝組織培养技术的发展。

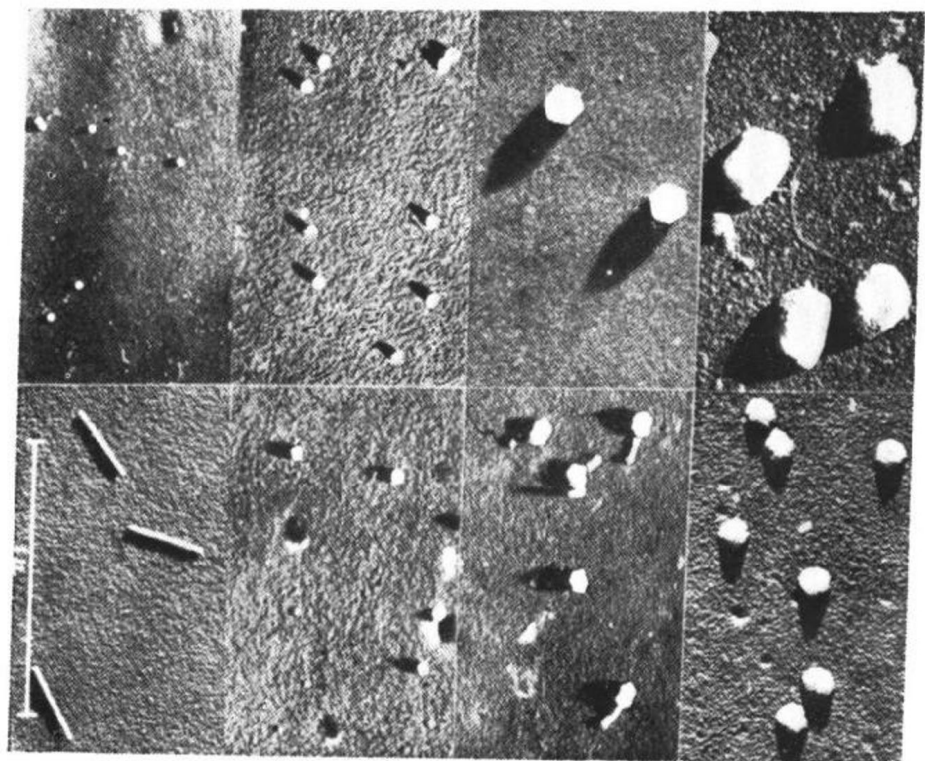


图 3-A 八种典型病毒的电显微镜图，放大倍数相同。上列（自左至右）：小儿麻疹症病毒；小噬菌体；沼泽大蚊虹色病毒（一种昆虫病毒，单个分子，不是结晶）；牛痘病毒。下列：烟草花叶病毒；兔乳头瘤病毒；大噬菌体；流感病毒。

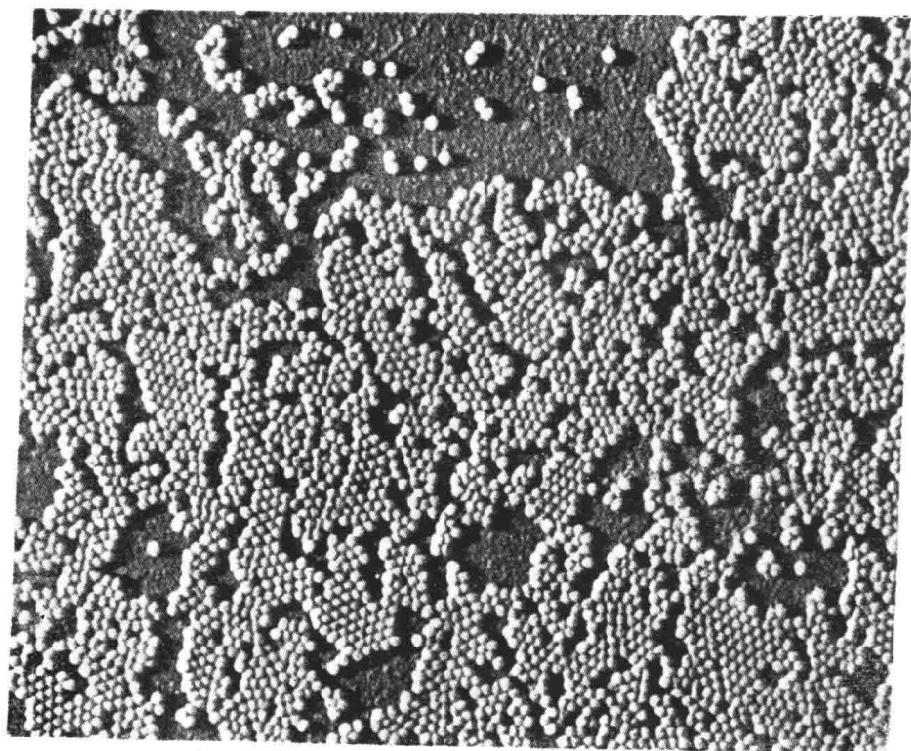


图 3-B 小儿麻痹症病毒;放大倍数:30,000。

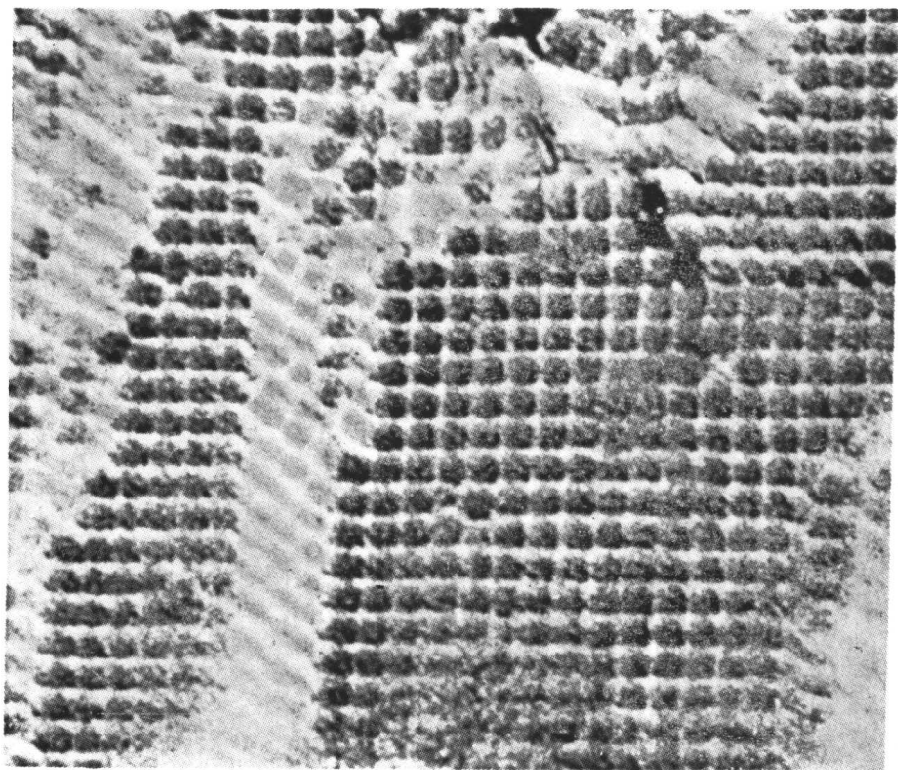


图 3-C 小儿麻疹病毒的結晶行列;放大倍数: 115,000。