

上海第一医学院
师资进修教材

医学病毒学基础

一九八三

305
11
言

近年来，分子生物学、分子遗传学、免疫学的发展促进了医学病毒学理论的进展。不少疾病都发现与病毒直接或间接有关。随着诊断技术的改进，病毒学诊断已被用于临床及流行病学。多种新的病毒疫苗也先后被制成。病毒免疫学也有不少新成就。为适应我院研究生及进修生学习病毒学的需要，我们在较短时间内编写了这本讲义。

在内容方面，我们以本室编写的医学微生物学讲义中病毒学部分为基础，予以补充和加深。在该讲义中已阐述的部分，本讲义一般不予重复。对病毒总论部分，我们作全面介绍，但对病毒各论，则根据本院科研课题而突出重点，不一一叙述。例如小RNA病毒科中突出柯萨奇病毒以联系病毒性心肌炎课题，呼肠病毒科中突出轮状病毒等。

本讲义仅介绍一些主要内容，在使用时应参阅、辅以必要的专著、综述等，以培养研究生的自学能力和启发思维。

有关分子病毒学部分本讲义仅作一般介绍，详细内容可参阅另编的医学分子病毒学讲义。

由于本讲义编写时间短促，错误之处望同志们提出批评、改进意见。

微生物学教研室

1983·7

目 录

第一章	病毒学发展史	(1)
第二章	病毒的本质与起源	(3)
第三章	病毒的研究方法	(5)
第四章	病毒的化学组成与形态结构	(10)
第五章	病毒的增殖	(19)
第六章	病毒的遗传与变异	(26)
第七章	病毒的致病作用	(31)
第八章	持续性病毒感染	(39)
第九章	抗病毒感染免疫	(45)
第十章	干扰素	(52)
第十一章	病毒学诊断	(61)
第十二章	病毒疫苗	(70)
第十三章	抗病毒治疗	(79)
第十四章	病毒的分类	(86)
第十五章	流感病毒	(90)
第十六章	小RNA病毒科	(98)
第十七章	呼肠孤病毒科	(103)
第十八章	本雅病毒科	(108)
第十九章	疱疹病毒科	(111)
第二十章	肝炎病毒	(118)
第二十一章	逆转录病毒科	(124)

第一章 病毒学发展史

病毒的发现至今还不到一百年，但病毒病却和细菌病一样有很悠久的历史。古代和中世纪就有天花流行的记载，并造成极大的灾害。天花和脊髓灰质炎的遗迹已在距今三千多年前的木乃伊中被发现。最早以病毒为研究对象的是英国医生 Jenner(1798)，他创用牛痘苗接种以预防天花。以后 Pasteur(1884)应用兔脑制备狂犬疫苗进行预防，但当时对这些病毒都未直接进行研究。

病毒学起源于植物病毒学。1892年俄国学者 Iwanovsky 发现将患烟草花叶病毒(Tobacco mosaic virus, TMV)的叶片，经磨碎后，过滤除菌的浸出液擦于新的烟草叶上仍可使之发病。当时他只认为存在一种体积微小的细菌或一种毒素而未深入研究。1899年 Beijerinck 用这种“滤过物质”在烟草花叶上连续传代，而证实为一种具有繁殖力的生物体，以后称之为病毒。TMV是病毒学研究中的重要对象。有些理论研究，如将病毒结晶或提纯病毒核酸并证实其感染性等，均通过TMV获得重要进展。

动物病毒中，首先发现的是口蹄疫病毒；而对人致病者首先证实的是黄热病病毒。1908年 Lansteiner 将除菌的含脊髓灰质炎病毒的脑组织过滤后注入猴脑而实验感染成功。当时，通过动物接种对很多病毒引起的疾病开始有所了解。直到1930年左右 Goodpasture 开始探讨利用鸡胚培养病毒。这一方法一直沿用至今，在对流感病毒的生物学及流行病学研究以及疫苗生产上均占重要地位。牛痘苗病毒、单纯疱疹病毒在鸡胚绒毛尿囊膜上增殖引起的痘疱，在了解这两种病毒上也很有价值。与此同时，也开始探讨用组织培养繁殖病毒，并先后有科学家报道可用组织培养病毒（如牛痘苗病毒），其效价可增加五万多倍。但由于缺乏病毒增殖的明确指标和经常发生细菌污染，当时组织培养方法未被广泛采用。随着抗生素的应用及组织培养方法的改进，我国病毒学家黄桢祥于1943年报道应用鸡胚细胞悬浮培养可滴定马脑炎病毒的效价。1949年 Enders 等报道脊髓灰质炎病毒可在非神经细胞中增殖并引起组织学变化，即细胞病变作用(CPE)，从而可以在光学显微镜下观察病变而作出病毒是否增殖的判断。这一方法学的革新成为诊断病毒病的一大突破。数以百计过去未被发现的病毒被成功地分离并鉴定。组织培养已成为研究病毒的主要工具。在此基础上，多种病毒疫苗如脊髓灰质炎病毒、麻疹病毒、乙脑病毒，风疹病毒等疫苗被先后制成。甚至最近证明可在组织培养中生长的甲型肝炎病毒和引起小儿腹泻的轮状病毒，也被考虑用组织培养来制备疫苗。组织培养还提供了大量获得病毒，进行分子生物学研究的基础。

在人与动物病毒学蓬勃发展的同时，在1915年，Twort 和 D'Herelle 分别发现了细菌菌落可自发地被溶解，从而确定了存在一种寄生于细菌的病毒——噬菌体。噬菌体的发现促使病毒学家利用这一模型开展理论性研究。1930年以来以 Burnet, Schlesinger, Delbruck, Luria 等为代表，对噬菌体的遗传变异、增殖过程、溶菌、转导及溶原(Lysogeny)等特性进行了深入研究，从而为以后的分子生物学、分子遗传学的发展提供了大量材料。噬菌体以后还被应用于医学微生物学的诊断实践及阐明某些细菌的致病机理（如白喉杆菌产生毒素种等）。

早在20世纪初已发现了病毒可引起肿瘤，但这一重要发现直到近来才真正受到应有的重视。1908年 Ellerman 和 Bang 已报道鸡的“自发性”白血病可由无细胞滤液传给另一鸡。1911年 Rous 发现鸡肉瘤也可由病毒所传播。以后陆续发现野兔乳头状瘤、蛙肾脏腺瘤也由病毒引起。虽然动物中肿瘤病毒均为RNA病毒，一些哺乳类动物和人中的DNA病毒也与一些肿瘤有关。1970年 Baltimore 与 Temin 在禽类与鼠类RNA致癌病毒中发现了逆转录酶，从而对逆转录病毒科有了进一步的认识。最近还发现存在于肿瘤细胞中的致癌基因(oncogene)与逆转录病毒中的一些基因片段类似，因此对逆转录病毒的研究又进入一个新阶段。

病毒的研究与应用物理、化学研究方法互相紧密配合。在1940~1950年间，电子显微镜及超薄切片技术的发展及应用，使病毒得以在电子显微镜下清晰地显示其结构。利用磷钨酸负染，可以详细观察病毒子粒等微细结构。此外，还应用于多种生物物理学及生物化学方法以提纯及研究病毒，如X线衍射、凝胶过滤、密度梯度离心、区带电泳等。目前对病毒的核酸、蛋白质的研究水平已深入到分析其全部基因组的核苷酸序列及各种多肽的分子量及氨基酸顺序。最近，分子遗传学的精华——基因工程也被用于病毒的理论及实践研究。例如已将乙型肝炎病毒DNA克隆入大肠杆菌、酵母菌中以表达病毒抗原，试图生产疫苗。通过核酸分子杂交，研究了病毒整合于细胞的状态。这些成就都正在丰富分子病毒学的内容。

人群中的传染病绝大多数由病毒引起。一些原因不明的疾病(如系统性红斑狼疮，糖尿病，自身免疫病)也可能与病毒有关，因此医学病毒学还包括病毒与宿主的关系以及对病毒病因的诊断、预防及治疗。病毒学诊断方法正在朝快速、简便、准确方面发展。目前，电镜、免疫电镜、各种血清抗体测定法如放射免疫分析法、酶免疫测定以及分子杂交等均正被广泛应用。生产新的病毒疫苗及改进现有的各种疫苗，特别是研制多肽疫苗、基因工程疫苗等都是重要的课题。然而迄今为止抗病毒治疗还存在不少问题。病毒感染中机体的免疫应答，干扰素、各种免疫细胞反应、各种抗体的作用及其机制的研究，不仅取得了不少成果，也吸引了不少病毒学家和免疫学家。

因此，病毒学通过其本身的演变与进展，已成为有一定地位的、独立的一门基础科学。正如 Stanley 曾说过的：“研究病毒核酸比研究原子结构的任何一门科学为重要，因为核酸的结构与生命本身有关，是造福于人类的一条独特的途径”。

(闻玉梅)

第二章 病毒的本质与起源

从医学观点来看,病毒是一类有特殊性质的感染因子。病毒结构极简单,形态十分微小(以毫微米为单位),必须在活细胞中以特有的复制形式增殖。病毒与其他微生物根本不同点为:其他微生物为细胞,有DNA及RNA,能产生能量以合成大分子成份(核酸、蛋白质、多糖及类脂)和进行二分裂繁殖;而病毒只有一种核酸和蛋白衣壳,无细胞结构,必须依赖宿主细胞提供原料、能量、酶以合成大分子成份,以病毒核酸为模板复制后代。因此有人主张病毒不能与细菌等并列,而应另列为基因水平的感染因子。

表 2—1 病毒与各类微生物特性的比较

微生物种类	培养基上 生长	二分裂	RNA 和 DNA	核糖体	对抗菌素 敏感性	对干扰素 敏感性
细菌	+	+	+	+	+	-
支原体 (霉形体)	+	+	+	+	+	-
立克次氏体	-	+	-	+	+	-
衣原体	-	+	+	+	+	+
病毒	-	-	-	-	-	+

从生物学观点来看,病毒是一种可以自身复制的基因物质(RNA或DNA)。它是一包外面有蛋白衣壳保护的基因,有时还附加一层囊膜。病毒基因在衣壳的保护下可将遗传信息传递给宿主细胞。病毒比一般基因片段更富有生命力,因病毒基因受到蛋白衣壳保护而耐受外界环境因素的作用。病毒基因赖其蛋白衣壳与细胞受体间的相应性,可比较容易地传递到另一细胞中进行复制。细菌DNA在转化(Transformatin)时也可进入适当的其他细菌,但这一过程需特殊条件,而且转化的成功率不高。因此虽然有人认为病毒与一般基因片段一样,只有在细胞内才表现其功能而具有活性,多数人仍认为病毒不同于基因片段,是有生命性的生物。美国植物病毒学家Diener(1971)自马铃薯块茎病中分离到不具有蛋白质,仅有分子量为 10^6 左右的RNA传染因子,称为类病毒(viroid)。以后,在人中也有类病毒致病的可能迹象。因此医学及生物学界都对病毒(包括类病毒)发生了兴趣。了解病毒的起源及其在生物界中的地位,不仅有理论价值,对了解病毒的致病性和防治也有一定重要的实际意义。

在噬菌体研究中,早已发现噬菌体与细菌的关系有两类,一是噬菌体自身复制而裂介细

菌；一是以前噬菌体(Prophage)的溶原状态(Lysogeny)而整合于细菌染色体中。在动物与人类病毒中也有相同情况。病毒可以复制、增殖而裂解宿主细胞释放完整病毒；也可形成缺损病毒(defective virus)或以核酸片段整合于宿主细胞DNA中。可以认为病毒有双重表现形式：一是“病毒”形式，一是“染色体基因”形式。当以“病毒”形式存在时，病毒核酸指令病毒的复制，合成并装配成完整病毒；当转为缺损病毒而失去原有的复制功能时，病毒开始向细胞“染色体基因”形式转化，而持续地存在于宿主细胞中。后一种形式在有非缺损病毒配合下，常可协同而使原来缺损的病毒重新复制。根据这一假说，病毒基因中应存在一些与细胞基因相同的片段。近来，在正常细胞中确发现有与某些逆转录病毒(Retro-virus)相同的基因；而且发现肿瘤细胞中的致癌基因(Oncogene)和某些病毒基因同源性。因此探讨病毒的起源对认识病毒的本质有其重要价值。

关于病毒的起源共有三种学说：

一、病毒起源于原始生命状态。本学说认为在生命起源过程中，当生命物质由前细胞状态演变为细胞时，有些非细胞的生命物质寄生于后者而演变进化。当细胞朝更高级生命状态进化时，寄生物（即病毒）也随之进化。开始阶段，寄生于细胞的病毒并不损害细胞而潜伏于细胞中，以后则获得增殖及破坏宿主细胞的能力。这一学说因缺乏实验根据而未被广泛接受。

二、病毒是细菌等其他寄生物退化的结果。由于细菌中有胞内寄生物，而立克次氏体和衣原体等也必须在活细胞中增殖，因此病毒可能是这些胞内寄生的微生物在寄生过程中的退化型。大的病毒，如痘类病毒，含有数百个基因，似可能较适用这一学说来解释；但即使是这类病毒，也缺乏类似细菌的结构。立克次氏体和衣原体则均为二分裂繁殖，并有类似细菌细胞壁中的粘肽样成份，因此在演变过程，衣原体与病毒之间有很大的差距。如果后者确为前者的退化型，则应存在介于二者之间的寄生微生物。但迄今尚未发现介于衣原体和病毒间的微生物，因此这一学说也缺乏必要的证据。

三、病毒起源于正常细胞。认为目前的病毒基因组可能过去是细胞基因，存在于染色体或细胞器（线粒体与质粒）。这些基因可能逃逸了正常的调控机制而自主地、独立地进行复制。它利用细胞器、细胞内原料及能量复制并合成蛋白质，从而获得衣壳而赖以保护核酸的稳定性。这样，病毒得以在细胞与细胞间进行传播。通过分析哺乳类动物病毒发现，这类病毒中的小病毒（微小病毒、小DNA病毒与乳多空病毒）与宿主DNA的核酸碱基序列比较接近；而大病毒（痘类病毒与疱疹病毒）则与宿主DNA的核酸碱基序列相差较大。因此有人认为不同病毒可有不同起源：小病毒起源于宿主细胞，而大病毒可能有细胞外起源。至于RNA病毒如何起源于细胞，有两种观点：一是RNA病毒可能是细胞DNA中的片段经转录而产生的一段RNA；一是，RNA病毒可能起源于核蛋白复合物。这一复合物将mRNA自核内转入浆内，进一步的突变和选择导致核蛋白复合物形成了双股，单股，分节段等形式的RNA。

（闻玉梅）

第三章 病毒的研究方法

对病毒本质的认识是通过一系列研究方法所获得的。医学上对病毒病因的诊断以及病毒流行病学调查等也需采用一些特殊方法。现将常用的方法分述如下。

(一)形态学方法

病毒形态微小(大小以毫微米nm计算),因此需用电子显微镜观察。分辨率为0.4~1 nm的电子显微镜可以显示多数病毒的微细结构。某些临床标本以及经过纯化的病毒需观察其形态时常用负染方法。本法具有简单、快速的优点。其原理为,利用重金属盐类染料作为背景,染料可以不同程度地穿入病毒表面的凹陷部分。由于重金属盐类和病毒标本对电子散射能力的差异,构成反差,使病毒表面的亚单位得以清晰地显在黑色背景上,一般常用2—4%的磷钨酸钾作为负染剂。磷钨酸染液的pH与染色结果直接有关。病毒标本可滴于Formvar(聚乙烯醇缩甲醛)膜或火棉胶膜上进行观察。当病毒颗粒量过少时,需辅以其他方法(如琼脂扩散浓缩法)加以浓缩。免疫电镜法也是一种在少量病毒颗粒存在的条件下快速检出病毒的方法。其原理为利用适量稀释的相应抗体加入病毒悬液,37℃孵育30~60分钟后使形成抗原抗体复合物,经15,000 rpm离心30分钟后,将沉淀再悬浮于少量蒸馏水中观察。凡欲观察病毒与宿主细胞的关系,则需将组织或细胞经固定,包埋后做超薄切片。这一方法有利于直接观察病毒在宿主细胞中增殖的场所及装配成熟的部位。一般需先用3%戊二醛固定,然后再用1%锇酸作后固定,通过脱水、浸透、包埋、聚合后进行切片。切片厚度以1000 Å以下为理想。为确认电镜下的病毒,还可用铁蛋白(ferritin)或辣根过氧化物酶标记特异抗体,染色后在电镜下观察与鉴别病毒,对研究组织和细胞内的病毒尤为有用。有时为研究病毒和细胞的关系需避免用化学药品固定与处理标本,可用冰冻蚀刻技术:即将标本快速冷冻,在真空条件下用冷却的刀将样品切断而露出内部结构。通过使切片的水升华,可将埋在水中的结构显露,然后将蒸发的铂和炭喷镀到切片上制成复型。将复型膜剥下则可在电镜下进行观察。这一方法的优点为可以观察微细结构,甚至可识别病毒结构中的单个蛋白质分子。

在分子病毒学中还需采用核酸电镜技术作为病毒基因组的结构分析,病毒核酸分子量的测定以及突变病毒株核酸结构异常的分析等。由于病毒核酸大多是很细很长的线状或环状分子,又是由碳、氢、氧、氮等原子序数较小的原子所构成,这类物质对电子射线的散射力极差,因此必须提高其反差才能看到。此外,病毒核酸是有立体构形的超螺旋,在自然状态下,核酸分子内可能有折叠,因此要识别每个核酸分子,观察其形态,测定其长度,必须使核酸分子展开。展开法是核酸电镜技术中最基本的技术。其原理为将核酸(2微克/毫升)及一种蛋白质(常为细胞色素C)在展开液中,沿成一定倾斜度的玻片缓慢流至盐浓度不同的下相液的表面而展开,然后用复有膜的铜网捞取标本。固定后,用喷镀方法改善反差而可观察到核酸的形态。

(二)培养方法

1. 实验动物:除个别病毒外,(如柯萨奇病毒、乙型脑炎病毒)本法已不再用于临床

病毒的诊断；但作为研究，对一些尚不能在组织培养中增殖的病毒（乙型肝炎病毒、亚急性海绵状病变因子等）仍用一些灵长类动物（如黑猩猩、狨猴等）进行实验。在肿瘤病毒研究中常用地鼠，因对这类病毒高度敏感，接种后可产生肿瘤并可获得免疫血清。为研究病毒的致病机理和免疫反应，必须采用实验动物，从中可获得大量有关免疫反应和病毒存在状态的材料。此外，有些动物本身的病毒（土拨鼠、地松鼠、鸭肝炎病毒，小鼠CMV病毒、小鼠白血病病毒）因其特性与人病毒类似，也作为研究对象。

2. 鸡胚：除用于流感病毒研究和诊断外，已很少应用。近来，应用鸭胚进行鸭肝炎病毒(DHBV)的研究，提供了经卵传播病毒的材料。因此在这方面有一定应用价值。

3. 细胞(组织)培养：除应用细胞培养作病毒分离培养用于诊断和疫苗生产外，理论研究上也很有价值。如建立体外持续性病毒感染模型、探讨引起病毒持续的因素、研究缺损干扰病毒颗粒(DI颗粒)的产生机理、病毒整合的机理、病毒复制过程中的生化变化、干扰素诱生及作用机理、各种免疫因子对病毒感染靶细胞的作用等等，都需使用细胞培养技术。

在应用细胞培养进行研究中，应注意量的概念。空斑试验是病毒学研究的重要方法，在诊断上很有价值。利用空斑形成可以准确地滴定感染性的病毒。其原理为将病毒作一定稀释后，接种于单层细胞，然后复以半固体营养琼脂层代替培养液。病毒增殖后产生的子代则被局限于感染细胞的邻近范围内而形成空斑。一般情况下，一个病毒可引起一个空斑，因此病毒感染性可用pfu/ml（每毫升空斑形成单位）来表达。一般每只平板（或每瓶）细胞形成20~100个空斑时误差最小。当细胞悬液与病毒标本混合时，每一个细胞可被不同数量的病毒所感染，因此需了解二者的比例。每个细胞受多少病毒感染，常以感染幅度(MOI Multiplicity of infection)来表示。

由于在一般情况下，每一空斑是一个病毒颗粒(毒粒Virion)所引起，空斑中的病毒群体起源于同一个毒粒，即为一个克隆。自一个空斑分离到的病毒代表基因组完全相同的子代；因此通过空斑法可选择有特殊基因标记的病毒株。疫苗生产中常需要通过反复克隆以选择疫苗株。

细胞培养还可用于测定细胞引起的转化(Transformation)。有些致瘤病毒或有潜在致肿瘤性质的病毒感染细胞后，可致细胞转化而发现生长特性的改变：细胞失去正常的接触抑制(contact inhibition)而互相重叠；细胞失去生长的正常定向性(orientation)而排列杂乱；细胞膜发生改变而被某些物质如刀豆蛋白A(ConA)的凝集能力增加；在含低浓度血清的培养基中细胞可以生长(表示对营养的要求降低)；细胞分裂快生长能力增加；在软琼脂(softagar)内，细胞能成堆生长而形成转化灶(transforming foci)。有些转化的细胞可注入动物而引起肿瘤。

(三)免疫学方法

常被应用的是抗原抗体反应，即血清学反应。可用已知抗体鉴定病毒，也可用已知病毒检测抗体。在鉴定病毒方面，在致细胞病变(CPE)的病毒中，最可靠的是中和反应(包括血凝抑制反应)。抗体可特异地中和病毒。在不致CPE的病毒，或难以在细胞培养中培养的病毒可用放射免疫测定(RIA)及酶联免疫吸附测定(ELISA)法以鉴定病毒。检测抗体则采取病人双份血清，与已知病毒做血凝抑制、补体结合或中和反应等。以抗体效价有4倍以上升高作为阳性。因病人血清中早期产生的是IgM，所以也可检测对病毒特异的IgM抗体以早期诊断。(详见病毒学诊断章)

在研究中,近年来采用了多种检测对病毒的外周血淋巴细胞免疫方法。这些方法主要是检测机体对病毒的免疫反应,在临床研究中有一定重要性。近来有不少学者认为接种疫苗后,不仅需测抗体反应,还需检测细胞免疫反应以评价该疫苗的免疫效果。对病毒的细胞免疫体外测定法共分四类:淋巴细胞的激活、巨噬细胞移动抑制试验、淋巴细胞对靶细胞的杀伤试验以及 r 干扰素的测定。

1. 病毒抗原刺激的淋巴细胞转化试验。致敏淋巴细胞经特异病毒抗原刺激后,可发生一系列的形态学、生物学及生物化学的变化,常用 ^3H 标记的TdR掺入DNA合成来检测是否有DNA合成增加。所用抗原可为灭活或活病毒,也可用病毒感染的细胞。后者的优点为,可能含有与细胞膜结合的抗原成份,而比单纯病毒抗原更有利于刺激致敏淋巴细胞反应。同时应包括未经病毒感染的同样细胞为对照。应计算激活指数(加抗原的细胞cpm/对照抗原的细胞cpm)。各种病毒抗原引起的激活指数可不同,应通过大量对照实验以确定是否有意义。

2. 巨噬细胞移动抑制因子的测定。原理为致敏淋巴细胞在病毒抗原作用下,释放巨噬细胞移动抑制因子(MIF),从而抑制巨噬细胞或白细胞的移行。需经放大,量取移动面积并计算移动抑制指数。

3. 淋巴细胞对靶细胞的杀伤(Lymphocytotoxicity)。目前认为这一试验最能代表机体对病毒的细胞免疫,但由于所用靶细胞与病人淋巴细胞在HLA上不相配,可能测定的仅为NK细胞的作用而非T杀伤细胞的作用。采用的靶细胞均为经病毒感染后,并用 ^{51}Cr 进行标记。通过测定被释放同位素的量可以检测病人淋巴细胞的杀伤功能。这一测定方法受选用的靶细胞种类、靶细胞感染病毒后的生理状态(是急性感染还是持续性感染)、靶细胞与效应细胞数的比例以及测定的时间等因素所影响。

4. r 干扰素的测定: r 干扰素是由致敏T细胞所产生的淋巴因子。通过测定致敏淋巴细胞在抗原作用下,或淋巴细胞在促有丝分裂原作用下而释放的 r 干扰素作为检测细胞免疫的指标。由于 r 干扰素的滴定可以有标准干扰素为参比单位,各次实验结果可以比较,在各项细胞免疫反应检测中有其优越性。

(四)生物化学与生物物理方法

病毒与细胞关系密切,因此要获取纯的病毒颗粒,须在不破坏和灭活病毒的情况下除去宿主细胞成份。提纯原则依赖于病毒的两大特点:首先,病毒表面由大分子蛋白质组成,有时还有类脂,因此可应用提纯蛋白质的各种技术。其次,病毒有一定大小、形状和密度,因此可根据这些性质进行分离。各种病毒根据其特性均有不同的具体提纯方法,因此没有一种共同的提纯方法。

1. 离心沉淀法,包括分级离心沉淀法和密度梯度离心沉淀法。前者适用于病毒悬液中所含的杂质(如细胞自然死亡破裂的碎片、血球碎片等)与病毒颗粒大小相差悬殊者。通过不同离心速率反复离心,可达到将病毒颗粒与杂质分开的目的。这一方法对从感染细胞或组织匀浆中提取病毒则效果较差,因为有与病毒大小或质量相近的细胞亚单位,如核糖体、线粒体等存在。因此需采用密度梯度离心法。速度区带密度梯度离心法是利用比重较水为高的某些物质,此蔗糖、氯化铯等制成含有连续递加或降低密度的离心介质,然后将待提纯的病毒悬液置于已形成梯度的离心介质的上层进行离心。根据病毒的密度,以及病毒颗粒大小、形状和介质的粘度,病毒颗粒逐渐与其他杂质分开而形成一条区带,达到提纯。在这种离心法

中需用摆动水平式转头，一般经70,000~170,000g离心1~3小时后，颗粒可按其沉降速度而在区带中分布，因此称为速度区带密度梯度离心法。平衡（等密度）梯度离心法则根据病毒的浮密度(buoyant density)不同而分离病毒。在密度高的离心介质，如氯化铯或酒石酸钾中（有囊膜的病毒密度较低者可用蔗糖），经长时间（一般为24~48小时）的超速离心，病毒可达到与悬浮介质同等密度点而集中于一条密度与之相同的离心介质窄带中。平衡梯度离心法可以高度提纯病毒，并可测定病毒的浮密度。一般病毒的浮密度为1.15~1.4 g/ml (CsCl)。

2. 层析法：利用吸附剂（如氢氧化铝，磷酸钙）或离子交换纤维素，在不同离子强度或pH下使病毒吸附，然后再以适当洗脱液（改变pH，离子强度）洗脱。根据病毒与杂质具有不同吸附力，洗脱时可以分离出不同组分，从而可获得较纯的物质。此外还有排斥层析法：葡萄糖、聚丙烯酰胺、琼脂等高分子物质聚合成的柱层，由于交联程度以及凝胶颗粒自身大小的差异，构成大小不同的间隙。当分子量不同的物质通过柱床时，分子量较小的比较容易扩散而全部或部分进入凝胶颗粒内的水相中，分子量较大的则相反。在洗脱时，分子量较大者先通过柱层洗出，分子量较小者则需更长时间方能通过。这样，病毒蛋白质亚单位得以提纯。葡聚糖（如Sephadex G₁₅和G₁₀₀的有效分离范围分别为分子量在5,000和200,000以内的物质）并不适宜于提纯病毒，因病毒分子量均大于数百万甚至千万以上，但通过阻留低分子量的杂质仍可达到部分纯化病毒的目的。

3. 沉淀法：病毒一般在45%以上的饱和硫酸铵的酸性溶液中可被沉淀而保持其感染性。但盐析法实际中用以浓缩病毒而不是纯化病毒。利用甲醇、正丁醇、氯仿以及氟化碳等有机溶剂也可沉淀与提纯病毒。利用有机溶剂提纯病毒对含类脂质的病毒有灭活作用，因此常用于提纯肠道病毒。如自粪便中提纯甲肝病毒则可用氯化钠及聚乙二醇沉淀病毒后，利用氯仿或氟化碳去除杂质以纯化。这一方法需配合其他方法以提纯病毒。

4. 病毒核酸与蛋白质亚单位的分离、纯化与分析：对纯化的病毒常需分别研究病毒的核酸或其蛋白质亚单位。病毒核酸常用酚提取的方法。通过激烈振荡使病毒核酸分布于水相而蛋白质则存在于酚水交界层。经过几次酚抽提后，收集合并水相，再经乙醚或氯仿、异戊醇去酚。分离病毒蛋白质的亚单位常用阴离子去垢剂如SDS（十二烷基硫酸钠）以裂解病毒蛋白质。聚丙烯酰胺凝胶电泳可用以分析和提取分子量在一百万以下的核酸和蛋白质亚单位。琼脂糖电泳可用以分析和提取病毒核酸。电泳后的区带可通过染色与标准品比较而计算其分子量。为提高敏感性，还可使病毒核酸或蛋白质标记同位素后电泳并做放射自显影。通过制备电泳将核酸或蛋白质亚单位分成不同部分后，还可分别提取所需部分进一步研究。

5. 核酸分子杂交：以DNA—DNA杂交为例。用提纯的病毒核酸或通过基因工程克隆的病毒核酸，经切口翻译法(Nick translation)，以 $\alpha^{32}\text{P}$ -ATP标记，成为探针。将欲检测的病毒、感染病毒的细胞，或考虑有病毒核酸整合的细胞DNA提取后，经过核酸电泳分成区带。将核酸区带用Southern吸印法(Southern Blot)转移到硝酸纤维素滤膜上，并烤干而固定。用上述探针与吸有核酸的硝酸纤维素滤膜在一定温度条件下进行杂交。杂交前，探针可以先煮沸变性，使双股成单股。吸附在滤膜上的DNA也经处理后成为单股。这样根据多核苷酸链之间的碱基互补配对，在与探针DNA相应的部分可杂交成双股而带有同位素。因此，用核酸杂交可以比较核酸之间碱基序列的同源性。核酸杂交有DNA—DNA，DNA—RNA和RNA—RNA杂交三种。核酸杂交技术为研究病毒株间的亲缘关系、细胞基因和病毒

基因间的同源性提供了一种方法。此外，通过核酸杂交还可研究病毒复制的机制，例如可对细胞在病毒感染后不同时间合成的DNA量、早期与晚期mRNA合成的动态等进行研究。

(闻玉梅)

第四章 病毒的化学组成和形态结构

一、病毒的化学组成:

(一)病毒的一般组成:

病毒的组成可作如下概括:除少数病毒仅由核酸构成外,绝大多数的病毒主要由一种或几种蛋白质和核酸构成。在病毒的组成上,有的简单,有的复杂,现将病毒组成几个主要特征列于表4—1

表4—1 某些病毒的近似组成

病 毒	RNA %	DNA %	蛋白质 %	脂 类 %	非核酸碳 水化合物 %
腺病毒		13	82		
鸟类成髓细胞白血病毒	2		62	35	1
大肠杆菌噬菌体 T ₂ 、T ₄ 、T ₆	55		40		
口蹄疫病毒	31		69		
单纯疱疹病毒		9	67	22	2
流感病毒	1		74	19	6
新城鸡瘟病毒	1		73	20	6
脊髓灰质炎病毒	26		74		
假单孢菌噬菌体 PM ₂		14	76	10	
狂犬病毒	4		96		
呼肠孤病毒	21		79		
Rous肉瘤病毒	2		62	35	1
SV ₄₀		13	87		
烟草花叶病毒	5		95		
痘苗病毒	5		88	4	3

从表4—1中可以看出,一切病毒都含有一种核酸,绝大部分病毒基本组成成分是蛋白质和核酸,一些比较简单的病毒(如腺病毒、口蹄疫病毒等)只由核蛋白构成,而另一些构造比较复杂的病毒(如单纯疱疹病毒、新城鸡瘟病毒等),除含有核蛋白外,尚含有脂类和

非核酸的碳水化合物。

目前已知少数病毒，它们只由单一的核酸分子构成，不含其它成分，由于它们比普通病毒更小，又不含蛋白质，目前称这类病毒为类病毒(Viroid)。

(二)病毒的核酸

1. 病毒核酸的含量：病毒核酸的含量因病毒而异，且差异甚大，有的病毒（如流感病毒）其核酸含量只占整个病毒组成的1%；而另一些病毒（如T偶数噬菌体）其核酸含量要占整个病毒组成的半数以上，病毒核酸的分子量也差别很大，病毒的DNA分子量从大约 10^6 （大肠杆菌噬菌体M₁₃等）到大于 10^8 （如鸡痘病毒），病毒RNA的分子量从不到 10^6 （如烟草坏死卫星病毒）到大于 10^7 （呼肠孤病毒）。个别病毒RNA的分子尚不到 10^5 （如马铃薯纺锤病毒）。

不同病毒的核酸含量和分子量为何有如此大的差异，这与核酸是病毒的遗传物质有关——即每个病毒颗粒中的核酸量无疑与病毒结构及功能的复杂性有关。因此，一个复杂的病毒需要更多的核酸（多基因），而一个简单的病毒则需较少核酸（少数几个基因）。

2. 病毒的核酸组成：

一切生物的核酸，都是由戊糖、磷酸和碱基构成的，病毒自不例外。根据核酸组成中核苷酸糖的种类不同，将核酸分为RNA和DNA。RNA和DNA都含A、C、G三种碱基，不同的是DNA含T而RNA含U。

DNA分子是由两条螺旋状的多核苷酸链构成，两条链围绕着一个轴盘绕，形成一个双螺旋。在一条链的一个末端在5'位上带有游离羟基称之为5'-端，另一末端在3'位上有一个游离的羟基称为3'-端。利用酶法把核酸降解，结合双向的电泳和纸层析分析法，测定核酸5'-端3'-端的部分核苷酸的序列，发现病毒核酸的两个末端有不少特点。很多病毒的3'-端有与转移RNA(tRNA)相同的结构。tRNA在蛋白质合成过程的重要功能，是利用3'-端—C—C—AOH的结构接受特定的氨基酸，并将氨基酸转移到核糖体上进行肽链的合成，很多病毒的3'-端也有一C—C—AOH的类似结构，也能接受特异的氨基酸，如TMV—RNA的3'-端能特异地接受组氨酸。为什么病毒的3'端较普遍地进行选择性的氨基酸乙酰化作用，尚不十分了解，可能与病毒基因组的转录与复制有关。

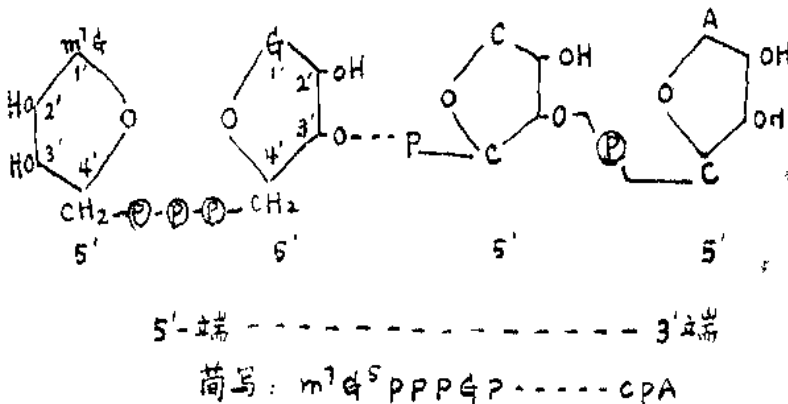


图4—1 某些病毒核糖核酸的封闭结构

mRNA, too.

近年来，发现动物、植物病毒的RNA或病毒的mRNA的5'-端带有一种特殊的结构（如图4-1所示）。图4-1示为TMV 5'端和3'端的结构。5'-端的这种结构特殊之处在于，末端的鸟嘌呤碱基的第7位上有个甲基(CH₃)，m⁷G与相邻的G相连接的方式是通过磷酸把两个核酸的第5'位连起来，而不是像核酸链内部的核苷酸是通过3'—5'相连的。这样的末端结构不能被脾脏磷酸二酯酶切断（5'-端在5'位上带游离的羟基时才能被该酶切掉），所以简称这样的结构叫7'位甲基化封闭结构，或称“帽状”结构（把RNA的5'端看作是核酸的“头”）已知无“帽状”结构的TMV-RNA几乎完全丧失其感染性。因此，“帽状”结构可能对病毒mRNA的翻译起重要作用。

在一条链上的核苷酸之间的链是3'→5'，而另一条链则是5'→3'，在这个意义上说，这两条链的极性相反，两条链由碱基对之间的氢链连接起来。碱基配对有一定规律性，即A和T配对，G和C配对，所以DNA的两条链是互补的，一条链上的碱基排列顺序由另一条链上的碱基排列顺序决定，这点在核酸的复制中有极大的重要性。

3. 病毒核酸组成中的特点：

(1) 一般生物体的DNA呈双股，大多数病毒DNA也呈双股（如腺病毒、单纯疱疹病毒），此外，病毒DNA也有呈单股的，如微小DNA病毒。在自然界，单股环状DNA只发现存在于少数病毒中，在病毒DNA中还发现有双股环状的，如多瘤病毒、人和兔的乳头状病毒和SV₄₀病毒等均发现有双股环状DNA。

一般生物的RNA是单链的，RNA噬菌体、脊髓灰质炎病毒等以及大多数植物病毒（如TMV）的每一病毒颗粒均含有一根单链的RNA分子；但也有极少数病毒含有双链RNA，如呼肠孤病毒。

(2) 不论是双股DNA或是双股RNA，其碱基组成有一个规律：嘌呤的总数等于嘧啶的总数；含氨基的碱基总数（A和C或5-羟甲基胞嘧啶）等于含酮基的碱基（G和T或U）的总数；腺嘌呤和胸腺嘧啶或尿嘧啶的克分子数相同，而鸟嘌呤和胞嘧啶的克分子数也相同，即

$$\frac{A}{T(或U)} = \frac{G}{C} = \frac{A+C}{G+T(或U)} = 1 \quad (\text{Chargaff 定则})$$

这一规律对DNA或RNA双螺旋的形成是非常重要的。如碱基组成中A+C≠G+T(或U)，A≠T(或U)，G≠C的病毒核酸都不是双股DNA或RNA，而是单股DNA或RNA。

(3) 在双股DNA病毒中，不同病毒的碱基成分相当不同，某些则甚至含有异常的碱基，如T偶数噬菌体的DNA中5-羟甲基胞嘧啶(HMC)替代了通常的胞嘧啶，这有可能使人们在宿主细胞DNA存在下测定病毒DNA的增殖。在某些枯草杆菌和噬菌体中，胸腺嘧啶可为5-羟甲基尿嘧啶或5-双羟戊基尿嘧啶所取代，而在假单胞菌噬菌体中则由丁二胺胸腺嘧啶所取代，这些取代物可改变DNA的某些物理性状，如溶解温度或在CsCl中的浮密度。

在双股RNA病毒中，如呼肠孤病毒，有基因组分节段的特性，呼肠孤病毒含有10个或更多的无重迭的节段，每个节段可以转录单独的mRNA，并可产生一个单独的多肽链。而单股RNA，有的不分节段，有的也可分成节段。这些病毒的大多数有一个RNA正链，即在细胞内起着mRNA作用，并有3'-端的poly(A)序列和5'-端的帽状结构。负链病毒的RNA依靠三磷酸核苷（而非帽状结构）终止于5'-端。在病毒内转录酶作用下，每个负链病毒RNA

可转录到互补mRNA上。

(4) 在病毒DNA或RNA有缺陷的毒粒中，有些仅含有一段正常核酸的互补链；另有些核酸长度虽接近正常，但由有限的病毒序列重复组成，甚至由细胞的核酸组成。这些颗粒无感染性，但可在同时感染正常病毒的细胞内增殖，甚至比正常病毒增殖更快，在感染的同一细胞内可干扰正常病毒增殖。

(5) 不同种病毒的核酸组成有显著的差别，但同种不同株的病毒核酸组成似乎相同。例如，不同株的TMV的核酸组成相同，5株流感A病毒核酸组成相同，而脊髓灰质炎病毒及T偶数噬菌体各都由一个核酸组成。不过应注意的是，目前的分析方法约有3%的误差。

4. 病毒核酸的功能：

核酸是病毒增殖、遗传、变异的物质基础。在病毒以及高等有机体中，核酸的主要功能是作为遗传信息的储藏所，但病毒核酸与高等有机体不同的是，若是正股RNA时，则起mRNA的作用；若是DNA时，它不能直接行使mRNA的功能，但可作为转录mRNA的模板。

(四)病毒的蛋白质：

这里所指的病毒蛋白质，是指构成一个完整的病毒颗粒所需要的蛋白质，称为病毒的结构蛋白质。病毒基因组的核酸中所储存的遗传信息，在适当寄主中被转录和翻译出来的蛋白质中还有非结构蛋白质，与病毒增殖有关，将在另章叙述。

1. 病毒蛋白质的组成和结构：

蛋白质最基本的组成成分是氨基酸，在自然界通常发现的氨基酸也存在于病毒结构蛋白质和非结构蛋白质中，尚未发现病毒蛋白质中有异常氨基酸的存在。

病毒蛋白质的结构，根据其分子组成和盘曲折叠方式可以分为四级结构，氨基酸在蛋白质分子中以肽链结合依次相排列而形成的多肽链是蛋白质的基本结构，一般称之为蛋白质分子的一级结构，一个蛋白质可能只有一条肽链，也可能有两条或多条肽链。肽链之间的连接

方式，最常见的是二硫键($-S-S-$)，此外，还有酯键($C=O$)和盐键($C \begin{matrix} \nearrow O \\ \searrow C \end{matrix}$)。某些病毒衣壳蛋白质亚基的氨基酸排列顺序已完全清楚。蛋白质分子的二级结构是指多肽本身呈

α 螺旋状盘曲。这种构型的稳定因素主要靠肽链上的羰基($\cdots C=O$)和另一肽链上的亚氨基

($-NH-$)之间形成的氢键来维系。所谓三级结构是指蛋白质的二级结构进一步按一定方式盘绕成一种更复杂的构型。三级结构由氢键、盐键、疏水键来维系。这样盘绕和弯曲后，蛋白质的多肽链虽然很长，但由于二、三级结构的存在，多数蛋白质在空间构型上形成紧密的球状分子。由一条或多条多肽链盘绕折叠而形成具有三级结构单位称为亚基，它是构成病毒衣壳蛋白质的最小单位。许多亚基借助于一些次级键(如疏水键、氢键)或静电引力，互助聚合而成的多聚体，即蛋白质的四级结构。

2. 亚基结构原则及其重要意义：

据目前所知，一切病毒衣壳蛋白质都不是由相同亚基构成的。病毒蛋白质的亚基可用X线衍射法、电镜观察及化学分析观察加以证实。

以亚基方式构成的病毒衣壳蛋白质具有很重要的意义：(1) 如果病毒蛋白质分子是一个很长的肽链，要使之成为一个包被核酸的空球则很困难，如要形成螺旋结构则更困难。现由许多较小的单位组成一种“装配式”，则有较大的伸缩性；(2) 而且氨基酸残基装配而组成的亚基可以保证及早排除不合格的亚基。假如病毒整个蛋白质结构是一个很长的多肽，则一个误差将毁坏全部结构。以TMV为例，它的蛋白质衣壳由2,300亚基构成，如有一个错误只不过毁坏全部结构的1/2,300；(3) 亚基结构最重要的原则是需要最少量的核酸。形成一个包围病毒核酸的保护性衣壳，需要大量蛋白质。如果一个分子量为 2×10^6 的RNA分子，紧紧地卷曲成球形，其直径最少有150 Å，若以一层蛋白质包绕球形，其厚度估计要有20 Å，其分子量即应达到 7×10^6 蛋白质量。现已知，病毒蛋白质的合成，需要核酸为其编码，而病毒核酸量是有限的，它仅能携带有限的信息，不可能合成如此大的蛋白质，这就限制了病毒蛋白质的大小。所以亚基排列是构成病毒蛋白质衣壳最简单、占有空间最小和需核酸最经济的结构原则。

3. 蛋白质的功能：

大多数病毒的蛋白质构成病毒颗粒的衣壳，衣壳内存有病毒的核酸，故有保护遗传物质的作用。有的蛋白质对病毒的寄主范围特异性很起作用。某些较大、结构复杂的病毒颗粒中还携有酶。有的酶，如噬菌体的溶菌酶对宿主细胞膜有降解的功能；有的酶在病毒核酸的合成上起重要作用，如Rous肉瘤病毒的逆转录酶，呼肠孤病毒的RNA转录酶，流感病毒中的RNA聚合酶。

(五)病毒的脂类：

部分病毒可含有脂类，含有脂类的病毒可有以下几种特性：

1. 某些病毒核衣壳外面常为一层膜状囊膜所包绕。这层囊膜由脂类、蛋白质、有时还有碳水化合物所构成。

2. 新的子代病毒在成熟过程中，从宿主细胞核或胞浆膜上获得类脂结构的囊膜，并以出芽的方式释放到周围环境中。

3. 用有机溶剂（如甲醇、氯仿或乙醚）、某些去垢剂、或溶脂酶（如磷酸脂酶A）处理，可以使大多数含有脂类的病毒分解并失去感染性。除去病毒囊膜中的脂类，使病毒失去吸附和侵入易感宿主的能力。

(六)病毒的糖类：

目前已在所有的病毒中发现了糖类，病毒均含有核酸，而核酸含有核糖或脱氧核糖的一种。此外，病毒也含有非核酸糖类，一般可在以下两种情况下观察到：(1) 葡萄糖残基附着在一定细菌病毒DNA的嘧啶上；(2) 某些有囊膜的病毒在其囊膜结构的亚单位上有与蛋白质和脂肪结合的多糖。

糖类在有囊膜病毒中的特殊功能尚不十分清楚。T偶数噬菌体葡萄糖基化对核酸酶的降解有抵抗力。在粘病毒和付粘病毒囊膜的亚单位中，糖蛋白有二种类型：(1) 构成这些病毒的血凝素；(2) 构成神经氨基酶。如用一种特异性糖苷酶分解还原糖，则血凝能力也随之消失，表明糖类在血凝作用中具有重要作用。

二、病毒的形态和结构：

电镜下观察证实，绝大多数的病毒呈杆状或球状。内为核酸外包的蛋白衣壳。杆状病毒的蛋白质亚基具有螺旋对称的结构，而球形多具有二十面体对称结构。从病毒所含种类与