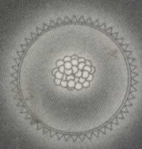


Diagnostic

主编 杨占秋 刘建军
肖 红 丁晓华

And Experimental Virology 诊断

与实验病毒学



郑州大学出版社

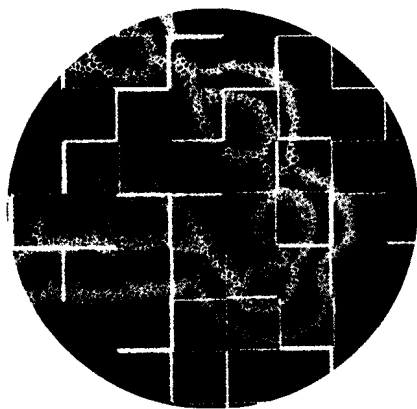
ZHENGZHOU UNIVERSITY PRESS

R373
V29

Diagnostic

诊断 与实验病毒学

主编 杨占秋 刘建军 肖 红 丁晓华



郑州大学出版社
ZHENGZHOU UNIVERSITY PRESS

图书在版编目(CIP)数据

诊断与实验病毒学/杨占秋等主编. —郑州:郑州大学出版社,2002.3

ISBN 7-81048-517-2

I. 诊… II. 杨… III. 人体病毒学 IV. R373

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2002) 第 004919 号

郑州大学出版社出版发行

(郑州市大学路 40 号)

邮政编码:450052)

出版人:谷振清

全国新华书店经销

河南第二新华印刷厂印制

开本:787 mm × 1 092 mm

1/16

印张:15.875

插页:1

字数:367 千字

印数:1 ~ 3 000 册

版次:2002 年 6 月第 1 版

印次:2002 年 6 月第 1 次印刷

书号:ISBN 7-81048-517-2/R·478 定价:32.00 元

前 言

21 世纪是信息技术、生物技术的时代。病毒则是生物技术中研究最为活跃的领域。病毒作为一种最小的生命形式,在真核细胞的基因表达与调控以及重组 DNA 技术的研究中发挥了功不可没的作用。如 mRNA 加工过程的观察均来自于呼肠孤病毒的研究、逆转录酶的发现提供了制备 cDNA 的工具等都是例证。另一方面,病毒作为一种致病因子,它所引起的疾病已涉及生命科学的各个领域,特别是病毒引起的人类疾病严重威胁着人体的健康,以病毒成分检测为目的的生物技术不仅为病毒性疾病的诊断提供了手段,它又推动了生命科学研究,特别是分子生物学技术的发展。最初的克隆技术就是用 SV40 病毒完成的,第一个限制性内切酶也是在 SV40 中发现的又是有力的证据。因此,病毒学与生命科学的许多领域已相互交叉、相互促进、相互依存,病毒学研究推动了生物技术革命,生物技术的发展又离不开病毒学技术。

我们在多年研究生教学实践的基础上,结合新世纪生物技术发展的需要,编著了这本《诊断与实验病毒学》。该书第一章至第四章介绍了病毒、病毒感染与检测的基本理论;第五章至第二十章介绍了病毒学研究的常用技术和最新方法,实际上这些内容仅是以病毒为主线,所涉及的技术都是当代医学科学研究的基本方法,它反映了 20 世纪 90 年代以来现代病毒学研究的新技术。由于时间紧迫,纳米技术等已来不及编入本书,将在再版时补充。

在本书即将出版之际,我们向为本书出版付出辛勤劳动的郑州大学出版社的全体同志致以由衷的感谢。同时也要感谢武汉大学医学院领导的支持。

本书的作者都是工作在第一线的中青年科技工作者和一批博士、硕士研究生。我们用自己的亲身经历编写本书,并在实践中得以提高。由于水平所限,本书仍存在许多错误和不足,恳切希望读者和同行们指正。

杨占秋

2002 - 02 - 18

目 录

第一章 病毒学概论	(1)
第一节 病毒的发现与病毒学科的发展	(1)
第二节 病毒的形态与结构	(2)
第三节 病毒的增殖	(4)
第四节 病毒的遗传与变异	(7)
第五节 理化因素对病毒的影响	(9)
第六节 病毒的分类与命名	(11)
第七节 亚病毒	(12)
第二章 病毒的感染与传播	(16)
第一节 病毒的感染类型	(16)
第二节 病毒的传播途径	(18)
第三节 病毒感染的流行病学	(21)
第三章 病毒感染的诊断学基础	(24)
第一节 病毒诊断的意义	(24)
第二节 病毒核酸	(25)
第三节 病毒抗原	(26)
第四节 病毒抗体	(27)
第四章 病毒病的临床表现	(31)
第一节 呼吸系统病毒病	(31)
第二节 消化系统病毒病	(33)
第三节 泌尿生殖系统病毒病	(34)
第四节 先天性病毒病	(36)
第五节 神经系统病毒病	(38)
第六节 血液系统病毒病	(40)

第五章 细胞培养技术	(43)
第一节 细胞培养常用器材的处理	(43)
第二节 细胞培养常用液体的配制	(45)
第三节 组织细胞培养	(48)
第四节 细胞培养技术在病毒测定中的应用	(51)
第六章 病毒分离与鉴定	(59)
第一节 病毒的分离	(59)
第二节 病毒的鉴定	(62)
第三节 病毒分离与鉴定存在的问题	(68)
第七章 动物实验技术	(70)
第一节 实验动物的种类与特征	(70)
第二节 动物实验的基本方法	(72)
第三节 动物实验与病毒学研究	(78)
第八章 荧光免疫技术	(85)
第一节 荧光的物理基础	(85)
第二节 荧光的原理与方法	(87)
第三节 荧光抗体的制备	(88)
第四节 荧光抗体染色	(92)
第九章 酶免疫技术	(97)
第一节 原理与分类	(97)
第二节 酶结合物	(100)
第三节 酶免疫测定方法的其他主要组成部分及条件	(104)
第十章 放射免疫技术	(109)
第一节 基本原理与分类	(109)
第二节 放射免疫测定	(113)
第三节 免疫放射测定	(114)
第四节 固相放射免疫测定	(115)
第十一章 电子显微镜技术	(118)
第一节 透射电镜的原理	(118)
第二节 超薄切片和染色技术	(119)
第三节 负染色技术	(123)

第四节	免疫电镜技术	(124)
第十二章	病毒的纯化	(127)
第一节	概 述	(127)
第二节	病毒的物理和化学纯化方法	(128)
第三节	超速离心法	(131)
第四节	病毒提取与纯化的应用举例	(134)
第十三章	核酸分子杂交技术	(136)
第一节	核酸分子杂交的基本原理	(136)
第二节	探针标记	(138)
第三节	核酸分子杂交方法	(140)
第十四章	基因克隆技术	(151)
第一节	基因克隆的原理	(151)
第二节	常用基因克隆技术及其分类	(152)
第十五章	聚合酶链反应	(166)
第一节	概述和原理	(166)
第二节	常用的几种 PCR	(167)
第三节	PCR 条件的优化	(169)
第四节	PCR 扩增产物的凝胶电泳分析鉴定	(172)
第五节	PCR 操作指南	(174)
第十六章	转基因技术	(179)
第一节	原理与方法	(179)
第二节	转基因动物的分类	(181)
第三节	转基因小鼠的建立	(182)
第四节	转基因大鼠的研究方法	(193)
第十七章	基因芯片技术	(198)
第一节	概 念	(198)
第二节	原理与方法	(199)
第三节	应用范围	(202)
第十八章	病毒蛋白检测技术	(207)
第一节	病毒蛋白的分离	(207)
第二节	盘状电泳	(210)

第三节	SDS - PAGE	(212)
第四节	Western Blot	(214)
第十九章	核苷酸序列分析.....	(217)
第一节	原理与分类	(217)
第二节	操作程序	(220)
第二十章	计算机技术在生命科学研究中的应用	(225)
第一节	利用因特网查阅生命科学期刊文献	(225)
第二节	生物软件技术在生命科学研究中的应用	(231)

第一章 病毒学概论

生命的最小单位是单细胞。单细胞微生物按其大小和结构复杂性分为原虫、细菌、某些真菌、支原体、立克次体和衣原体。这些微生物虽小,但均有细胞结构和自身的代谢系统,并以 DNA 作为遗传物质。病毒(virus)则不然,它不具有细胞结构,只含有 DNA 或 RNA,甚至不含有核酸,自身不能进行新陈代谢,只能寄生在活的细胞内增殖复制,它是所有生命形式中最小的一种复制性非细胞型微生物。病毒与人类的关系极为密切,它不仅可引起传染病,还可引起非传染病。虽然旧的病毒与病毒病得到了根除和控制,但是新的病毒与病毒病又在不断地出现。因此,掌握病毒学的理论知识,尤其是诊断病毒学的方法和技术,对病毒性疾病的诊断与防治具有指导意义。

第一节 病毒的发现与病毒学科的发展

早在我国春秋战国时代《黄帝内经》就有关于病毒性疾病的记载,如现今所述的腮腺炎,就被认为属于时疫(流行病、传染病)。而希腊医药之父 Hippocrates 也有关于本病的描述。在唐宋时代,中国民间就有采用天花患者病变部位浸出液鼻腔接种来预防天花,此后这种方法传到朝鲜、日本、英国等地。利用这种被动免疫预防传染病可以认为是现代免疫学与病毒学的开端,但仍未见关于病毒的描述。1892 年俄国科学家 Ivanovski 首先报道烟草花叶病的病叶提取液有致病性,但他认为其致病因子是细菌毒素。1898 年,Beijerinck 等在描述烟草花叶病的致病因子时,发现其有 3 个特点:①能通过细菌滤器;②仅能在感染的活细胞内增殖;③不能在体外生长。因而他提出这种致病因子不是细菌毒素,而是一种新的致病因子,称为“感染性活菌液”,实际上,这就是病毒。到了 20 世纪初期,人

们对病毒的认识日趋深入,如黄热病、脊髓灰质炎等均是由过滤因子引起的疾病,但对病毒本质缺乏认识。而在 20 世纪 30 ~ 50 年代,人们主要是集中研究病毒的本质,即病毒是有生命的还是无生命的。1935 年 Stanley 报道烟草花叶病毒性物质是一种结晶体蛋白质,以后在 1937 年 Bawden 报道这种病毒含有核酸,这就对病毒的认识前进了一大步。20 世纪病毒概念的发展有 3 个方面:①所有病毒都有一个共同的结构,即蛋白质外壳加核酸核心;②病毒有共同的复制机制,即病毒基因组的复制来保证遗传信息的传递;③所有病毒均以 2 种形式存在,即细胞内和细胞外形式。病毒的发现经历了一个世纪,但病毒学的发展速度却十分惊人。

自分子生物学特别是分子生物技术问世以来,产生了越来越多的交叉学科,如分子遗传学、分子微生物学、分子免疫学、分子药理学等,分子病毒学也应运而生。回顾病毒学发展的历史,可以将分子病毒学归纳为下列几个明显的特征:①所谓的分子病毒学就是病毒学的本身,由于它引入了新的分子研究技术,使它的面貌和内容全部改观;②分子病毒学是通过病毒分子结构以及分子结构间的相互作用来阐明病毒的结构、功能以及与宿主相互作用的关系;③分子病毒学是分子生物学的前沿阵地,自 1945 年 William Astbury 提出分子生物学的概念以来,分子生物学的发展是利用噬菌体(细菌病毒)的研究才取得了今天令人兴奋的成就;④医学分子病毒学是在分子水平探讨病毒的本质与疾病现象产生的可能性,从而寻找控制和消灭病毒的措施;⑤诊断与实验病毒学是研究病毒分子的基本方法,是分子病毒学的重要分支。因此,可以认为 21 世纪不仅是分子病毒学的发展时期,也将是原子病毒学和量子病毒学的形成时期。

第二节 病毒的形态与结构

一、病毒的形态

电子显微镜的问世,才使人们可以去研究病毒形态。病毒颗粒比其他微生物小,成熟的完整病毒颗粒称为病毒体(virion),它是病毒的细胞外存在形式。用于测量病毒体大小的单位为纳米(nanometer, nm, 为 10^{-9} m)。病毒大小差异明显,最大的约 300 nm,如痘病毒,最小的约 20 nm,如口蹄疫病毒。大多数病毒为 50 ~ 150 nm,它们均超出了光学显微镜的分辨能力,必须用电子显微镜放大几千乃至几万倍才能观察到。痘病毒等一些较大的病毒经过适当染色后,可在光学显微镜下观察,这种光镜下的病毒颗粒称为原生小体。病毒大小的测量方法,最早都用过滤法,根据病毒能否通过已知孔径大小的滤膜,来测出病毒直径的大小。此外,通过超速离心测定沉降系数也可计算病毒体大小。

病毒种类繁多,形态各异。有球形,如流感病毒;砖形,如痘病毒;弹状,如狂犬病毒;蝌蚪状,如噬菌体;丝状或杆状,如植物病毒、副流感病毒。

二、病毒的结构与组成

1. 病毒的基本结构

(1) 病毒的基本结构 除亚病毒外,病毒体由核酸、蛋白质和少量其他成分组成(图 1-1)。核心为核酸,是由单链或双链 DNA 或 RNA 组成,是一套完整的基因所组成的病毒基因组(genome),亦为病毒增殖、遗传与变异及致病性等提供信息,从而保证了病毒遗传特征的连续性与稳定性。核酸的外层是蛋白质外壳,称衣壳(capsid)。衣壳由大量的壳粒(capsomere)组成,并由非共价键结合,在电镜下可见,称为形态亚单位(morphologic subunit)。每一个壳粒又由一个或多个多肽分子组成,这些多肽分子又被称为化学亚单位(chemical subunit)或结构亚单位(structure subunit)。衣壳与核酸核心共同组成核衣壳(nucleocapsid)。无包膜的病毒,核衣壳即是病毒体。衣壳起保护核酸的作用,亦能介导病毒核酸进入宿主细胞,并具有抗原性。由于病毒核酸与衣壳蛋白结构的不同,在形态上显示不同的对称形式,已明确的有 20 面体立体对称、螺旋对称和复合对称 3 种形式。

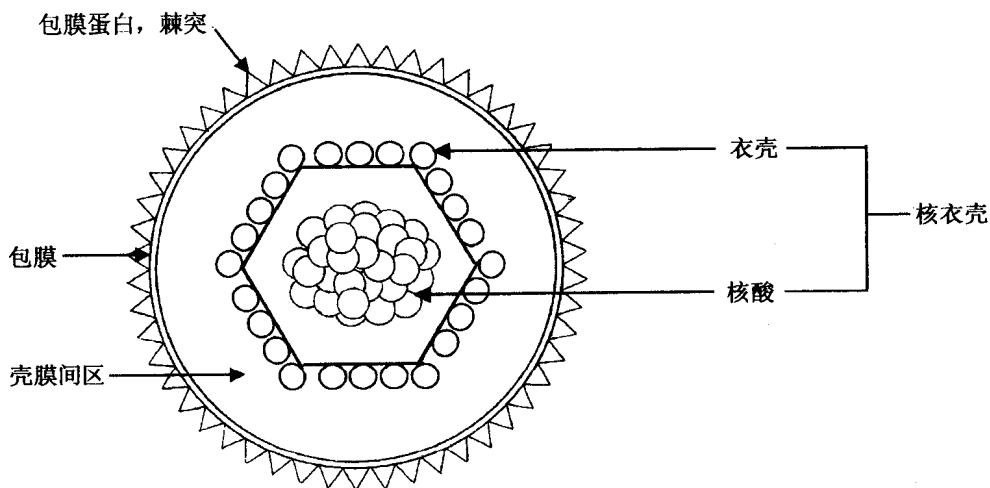


图 1-1 病毒的基本结构

1) 20 面体立体对称(icosahedral symmetry) 壳粒按立体对称排列成规则的 20 面体,一个 20 面体有 12 个顶、20 个面和 30 个棱,呈 2:3:5 重旋转对称轴,每个面都是等边三角形,由许多壳粒镶嵌组成,面和棱上的壳粒与 6 个相邻壳粒相连称为六邻体(hexon),顶上的壳粒与 5 个相邻的壳粒相连,称为五邻体(penton)。大多数球形病毒呈这种对称性排列。

2) 螺旋对称(helical symmetry) 壳粒沿着螺旋形的病毒核酸链盘绕成丝状、杆状或球形的对称排列,见于大多数杆状病毒、弹状病毒、正黏病毒等。

3) 复合对称(complex symmetry) 病毒体壳粒的排列既有立体对称,又有螺旋对称,

这见于噬菌体、痘病毒。

(2) 病毒的特殊结构 有些病毒在核衣壳外,还包被有包膜(envelope)。包膜是病毒成熟释放过程中通过芽生从宿主细胞膜获得,它既含有病毒特异的物质,同时又含有宿主细胞膜的成分,有的包膜表面还有钉状突起,称为包膜子粒(peplomere)或刺突(spike)。包膜与病毒的致病性和免疫性有关,亦是病毒分类的依据。

包膜不仅见于螺旋对称的病毒,也见于 20 面体立体对称的病毒。除包膜外,有时亦可见到其他空泡样病毒颗粒。

2. 病毒的化学组成 病毒的化学组成包括核酸、蛋白质、脂质以及糖类,现叙述如下:

(1) 核酸 病毒核心主要为核酸,其化学成分为 DNA 或 RNA,以此为依据将病毒分为 DNA 病毒或 RNA 病毒两大类,它是由 4 种核苷酸碱基加糖和磷酸组成,病毒 DNA 或 RNA 可以是双链或单链,根据极性又有正链和负链之分。有的病毒基因组又分节段,相对分子质量为 $1 \times 10^6 \sim 160 \times 10^6$,核酸的类型、链数以及相对分子质量均为病毒分类的主要特征。人和动物的 DNA 病毒大多数为双链, RNA 病毒大多数为单链。如果对不同病毒的核心酸结构进行比较,就可知病毒分类进化的相互关系。病毒 DNA 的鸟嘌呤与胞嘧啶(G+C)含量在不同病毒中差别很大,因此 G+C 含量也作为病毒分类的依据。

病毒核酸含有复制自身并记录其全部特征所必需的遗传信息,是决定遗传与变异的物质基础,病毒核酸进入宿主细胞后,具有感染性。因此,它也是决定病毒致病性的物质基础,但这并不意味着任何病毒核酸都去启动感染任何细胞,有时可使感染失败。

(2) 蛋白质 蛋白质是病毒颗粒的主要成分,约占病毒总量的 70%,少数为 30% ~ 40%。所有病毒都含有一种或几种蛋白,衣壳蛋白是病毒的结构成分,因此也称为结构蛋白(structure protein),由病毒基因组编码,具有保护病毒核酸的功能,并可促使病毒进入细胞,决定病毒对宿主的嗜性。现在发现衣壳蛋白还含有少量专一性的酶分子,或者说结构蛋白本身亦具有酶活性。除结构蛋白外,在有包膜病毒中,还有其他类型的蛋白质,称为包膜蛋白,这种蛋白是糖蛋白,与病毒吸附细胞有关。在包膜蛋白和衣壳蛋白之间还有一种蛋白质,称为基质蛋白,它参与病毒感染的启动与恢复。

第二大类蛋白是非衣壳(结构)蛋白(nonstructure protein, NS 蛋白),这种蛋白主要参与病毒核酸的复制,也有诱导机体免疫应答作用。

病毒蛋白质是很好的抗原,可诱导机体产生免疫应答,病毒蛋白质也引起机体出现发热、血压下降或其他全身症状等毒性反应。

(3) 糖类和脂类 病毒包膜含有糖蛋白、中性脂类、磷脂与糖脂。脂质是有包膜病毒的结构成分,故有包膜病毒对脂溶剂敏感,脂类的破坏与消失可导致病毒的感染性丧失,脂类还参与病毒吸附与穿入细胞。糖蛋白是重要的病毒抗原,与机体的免疫应答有关。

第三节 病毒的增殖

病毒作为一种细胞内寄生物,其增殖与其他微生物不同,它是以自身基因组为模板,借助宿主的细胞器和酶系统先合成互放核酸或 mRNA,再经过聚合酶以互放核酸为模板,

合成原来的模板,这种以病毒核酸分子为模板进行增殖的方式称为自我复制(self replication)。因此,病毒的增殖亦称为病毒的复制,不同的病毒复制机制并不完全相同,但均需要经过吸附、穿入、脱壳、病毒基因调控、病毒蛋白质合成、组装与释放等过程。从病毒进入细胞,经过基因组表达与复制到子代病毒从感染细胞中释放,称为一个复制周期(replication cycle)。

1. 病毒的复制周期 由于病毒基因组形式多样,各种病毒均有其独特的复制方式,但也有共同的特征,其过程如图 1-2 所示。

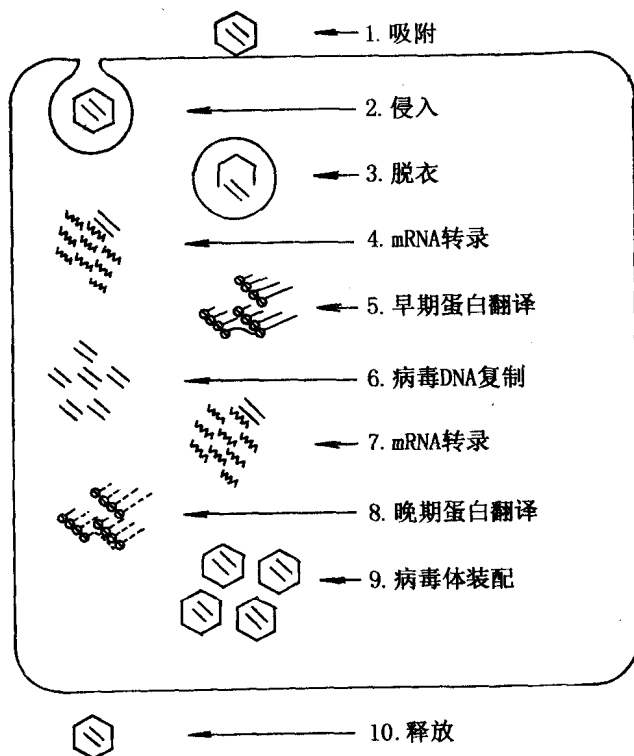


图 1-2 病毒的复制周期

(1) 吸附和侵入细胞 病毒吸附易感细胞是病毒增殖的第一步,介导这一过程的是存在于病毒表面的病毒吸附蛋白(viral attachment protein, VAP)与位于细胞表面的病毒受体(viral receptor)。病毒吸附细胞与否,取决于 VAP 与细胞表面受体的特异性。病毒与受体的结合为非共价键结合,可分为 2 个阶段,早期结合是一种可逆性静电引力结合,易受 pH 影响,当 pH 值改变使两者的排斥力大于吸引力时,病毒颗粒就可从细胞表面解脱,使吸附终止,温度对其影响不大,0~3℃均可结合。晚期结合则是不可逆性的特异性结合,此过程需要一定的温度和阳离子参与,通常病毒吸附细胞在 0~37℃下进行,温度升高,吸附效率加快,整个过程在几分钟至几十分钟内完成,如狂犬病毒吸附 BHK-21 细胞只需 30 min。Na⁺、Mg²⁺、Ca²⁺等阳离子强度也影响病毒吸附细胞的效率,但受体是主要的。如流感病毒的血凝素是它的吸附蛋白,细胞表面的唾液酸为病毒受体,两者作用

后,病毒进入细胞。病毒吸附蛋白通常以多聚体形式存在,并含有不同的功能位点,而细胞受体亦是由一个或几个受体单位组成,它与病毒颗粒的结合是多价的,当病毒颗粒与细胞受体结合后,病毒吸附蛋白与细胞表面受体均发生一系列变化,特别是分子构型改变,这种变化有利于病毒进入细胞,亦有利于增加病毒与细胞结合的牢固性。

病毒结合细胞表面受体后,必须越过浆膜进入细胞内复制,这个过程称为穿入(penetration)。它包括2种途径,一是病毒包膜与细胞浆膜间的融合,病毒核衣壳直接进入细胞内;二是病毒表面的吸附蛋白与细胞膜上受体结合后,由细胞表面酶协助脱壳,病毒核酸直接进入细胞内。无包膜病毒通过吞饮(virophagocytosis)作用进入细胞,亦有人认为受体参与病毒的吞饮作用。目前认为病毒还可通过其他途径进入细胞。

(2)脱衣壳 病毒核酸从衣壳释放的过程称为脱衣壳(uncoating)。不同病毒脱衣壳方式不一,大多数病毒在侵入宿主细胞时已在溶酶体酶的作用下使衣壳裂解释放出病毒基因组,有包膜病毒的包膜与细胞膜融合时即已脱去外衣壳,然后再进一步脱去内衣壳。如痘病毒就需经过2次脱衣壳过程。脱衣壳可发生在细胞的表面、胞浆核膜或核内。RNA病毒在吸附细胞时,其衣壳蛋白构型发生改变,即激发了脱衣过程,而且这种改变有利于稳定病毒核酸构型,保护其免受核酸酶破坏。

(3)病毒基因组的复制与表达 病毒基因组从核壳中释放后,一般能在感染细胞中产生新的病毒颗粒。在这个过程中,须合成更多的病毒核酸、结构蛋白与病毒特异性酶类,以及一些控制蛋白,用以封闭正常细胞代谢与指导病毒成分的合成。病毒在复制亦即生物合成(biosynthesis)阶段,所需的大部分酶类是由宿主细胞供应的,在这阶段中已不能自细胞内检出感染性病毒颗粒,这一时期称隐蔽期(eclipse)。

病毒蛋白质合成包括转录和翻译2个步骤。在病毒核酸复制之前所进行的转录为早期转录,翻译出的蛋白为早期蛋白,早期蛋白是功能性蛋白,主要是病毒复制所需要的酶和抑制宿主细胞正常代谢的调节蛋白。以子代病毒核酸为模板所进行的转录为晚期转录,翻译出晚期蛋白,即病毒的结构蛋白。

在病毒基因控制下,蛋白质与核酸的合成部位,因病毒种类不同而异。多数DNA病毒在宿主细胞核内合成核酸,但痘病毒类则为例外(此类病毒的所有成分均在宿主细胞浆中合成)。多数RNA病毒在胞浆内合成病毒成分,但正黏病毒与一些副黏病毒以及白血病毒例外(部分在胞核中合成),病毒蛋白则只能在胞浆中合成。

根据病毒基因组的复制与表达特征,病毒的生物合成可归为6类。

1)双链DNA病毒 利用宿主细胞核内的依赖DNA的RNA多聚酶,转录早期mRNA,再在胞浆内转译成早期蛋白。早期蛋白主要是依赖DNA的DNA多聚酶和脱氧胸嘧啶激酶,亲代DNA以半保留复制方式复制子代DNA分子,然后以子代DNA分子为模板,转录大量晚期mRNA,继而转译出主要是病毒衣壳蛋白和其他结构蛋白的大量晚期蛋白。

2)单链DNA病毒 以亲代DNA作为模板,产生互补链与亲代单链DNA形成双链DNA作为复制中间型(replicative intermediate, RI)或称复制型(replicative form, RF)。由复制型按半保留形式复制而产生的双链DNA分子中,不含亲代DNA的DNA分子作为模板转录mRNA以转译病毒结构蛋白;由含有亲代DNA的DNA分子则转录完整的子代DNA。

3)单正链 RNA 病毒 其本身具有 mRNA 的功能,可直接转译出早期蛋白,早期蛋白主要是依赖 RNA 的 RNA 多聚酶,后者催化转录一条与亲代正链 RNA 互补的负链 RNA,形成双链 RNA($\pm$ RNA),即复制中间型。其中正链 RNA 起 mRNA 作用转译出晚期蛋白,包括衣壳蛋白和其他结构蛋白。而负链 RNA 则起模板作用,转录与负链 RNA 互补的子代病毒 RNA。

4)单负链 RNA 病毒 本身不能起 mRNA 作用,但病毒含有依赖 RNA 的 RNA 多聚酶,因此,病毒首先依赖多聚酶转录出互补的正链 RNA 形成复制中间型($\pm$ RNA),然后正链 RNA 为模板起 mRNA 作用,即转录出与之互补的子代负链 RNA,又转译出病毒的结构蛋白和酶蛋白。

5)逆转录病毒 这是一类特殊的 RNA 病毒,其基因组由 2 条相同的正链 RNA 组成,并具有反转录酶,先在反转录酶的作用下合成互补的负链 DNA 形成 RNA-DNA 杂交体,再由反转录酶将杂交体中亲代正链 RNA 降解去除,再以负链 DNA 为模板产生双链 DNA,并整合到宿主细胞 DNA 上形成前病毒(provirus),前病毒可转录子代 RNA 和 mRNA,后者再翻译成病毒结构蛋白。

6)双链 RNA 病毒 由病毒所含的依赖 RNA 的 RNA 多聚酶转录出 mRNA。双链 RNA 病毒由负链复制出正链,正链再复制出新负链,因而子代 RNA 全部为新合成的 RNA。

(4)组装、成熟与释放 病毒的核酸与蛋白质成分合成后,DNA 病毒(除痘病毒外)均在细胞核内组装(assembly),RNA 病毒与痘病毒类则在胞浆内组装。不同病毒组装的方式也不相同,有的病毒以核酸为支架,将壳粒结构亚单位聚在上面,按立体对称或螺旋对称进行排列,核酸包埋在其中,互相连接构成核衣壳;有的病毒先形成衣壳,病毒核酸通过衣壳上留有的裂缝进入壳内,最后封闭裂口而构成核衣壳。在此阶段,无包膜的病毒已在细胞内发育成为病毒体。至于有包膜病毒,则仅合成核衣壳,而其包膜须于病毒穿过宿主细胞胞浆膜或核膜时始能获得,宿主细胞膜的某些成分已整合由病毒编码的特异蛋白中,使宿主细胞膜的成分发生改变,当病毒核衣壳从此部位以“出芽”方式释出时,即带有细胞膜成分形成包膜与突起。成熟病毒在细胞中出现,即表示隐蔽期的结束。

成熟的病毒体能以爆破的方式使宿主细胞破裂而释出,同时破坏宿主细胞的正常代谢,如肠道病毒。病毒也可以通过浆膜缓慢释出,如正黏病毒,因细胞膜在出芽后可被修复,故不直接引起宿主细胞死亡。

第四节 病毒的遗传与变异

病毒的生物学性状遗传给子代称为遗传,病毒对环境的适应叫做变异。生物经过遗传与变异,才能发生进化,病毒也一样经过遗传与变异,保证了基因组的稳定性与连续性。由于病毒没有细胞结构,更易受细胞内环境的影响而发生变异。病毒的变异包括几个方面。

1. 突变 病毒基因组核苷酸序列发生改变,而不是由于他种病毒或生物体遗传物质的介入所引起的变异称突变(mutation)。病毒增殖过程中常发生自发突变。因为 DNA 病毒与真原核细胞中 DNA 复制遵循同样的校读外核酸酶错误及更正的机制,故自发点突变

率(mutation rate)大致相同,为 $10^{-8} \sim 10^{-11}$ 。由于 RNA 病毒复制中无校读机制,故 RNA 病毒自发点突变率远高得多,如疱疹性口炎病毒突变率为 $10^{-3} \sim 10^{-4}$ 。物理因素(如 UV 或 X 射线)或化学因素(如亚硝酸、羟胺等)可诱导突变发生,使自发突变频率增高,称诱变(mutagenesis)。人为地于一个 DNA 分子某个特定位点上制造的突变称定点诱变(sited-directed mutagenesis)。此项技术开辟了新的研究领域:①可仔细分析单个或某段基因及其所编码蛋白质的功能;②可于特定基因中引入突变,如引入关于病毒毒力的突变,可生产适于作为减毒活疫苗的突变株。

突变按核酸的改变分类,最普遍的是点突变、缺失性突变、插入突变。突变也常按表型变化分类如温度敏感突变、冷适应突变、耐药突变等。突变的表型表达不仅取决于突变的种类和位置,还取决于其他基因的活性,即突变表型表达不仅可由于同一位置上碱基回复突变而被抑制,而且还可被同一或不同基因上其他位置出现的抑制性突变所抑制。

突变可导致病毒性性状变异,如毒力变异、抗原性变异、空斑变异。这些变化可单独出现,但大多是相伴发生,如温度敏感(temperature sensitive, ts)突变株又表现为毒力变异。

多数重要的突变株为条件致死性突变株(conditional lethal mutants)。突变株因发生了核酸碱基替代,引起由其编码的氨基酸也发生替代,合成的酶或结构蛋白的特性是在容纳性温度(较低温)下发挥作用,并保持构型的活性,在非容纳性温度(较高温度下 $36 \sim 41^\circ\text{C}$)则其作用受到限制,故此时病毒不能增殖。野生株的产物此时也发挥作用,故野生毒株可在较大温度范围内增殖。ts 株有较高的恢复原来病毒特性的回复突变率(10^{-4}),但经多次诱变后,可获得稳定的病毒突变株,脊髓灰质炎减毒活疫苗就是这种稳定性突变株。

缺陷性干扰突变株(defective-interfering mutants, DI 株),此类型突变存在于所有 RNA 病毒科内及某些 DNA 病毒中。病毒通过高浓度传代都易产生此类缺损性干扰颗粒,此类突变株能干扰正常病毒的复制,并改变疾病类型。DI 突变株主要有以下特征:①缺损性和依赖性,即自身无复制能力,在辅助病毒存在时有补助和复制能力;②干扰性和富集性,即使标准病毒产量下降和使自身产量增加。

2. 重组 当 2 个有亲缘关系而性状不同病毒同时感染同一细胞时,可以出现基因互换并产生兼有 2 个亲本特性的子代,称为重组(recombination)。在新合成的核酸中会出现几种基因重组类型,即分子内重组、重排、复活和标记获救。

(1)分子内重组(intramolecular recombination) 常发生于不分节段基因组病毒间,常为不同但有亲缘关系的 2 种病毒核酸分子发生断裂并交叉连接,核酸分子内部序列重新排列的结果,如脊髓灰质炎病毒。在少数情况下,分子内重组亦可出现在 2 个无亲缘关系的病毒间,如 SV40 与腺病毒。当持续感染 SV40 的恒河猴细胞再感染腺病毒时,由于 SV40 DNA 和腺病毒 DNA 同时整合入细胞 DNA 中,不仅出现互补作用即 SV40 作为流产性感染的腺病毒的辅助病毒,还可出现两病毒基因分子内重组的杂合子基因,此基因组被包裹于腺病毒核衣壳中。许多 DNA 肿瘤病毒在与宿主细胞 DNA 重组过程中,病毒携带的原癌基因将会被感染细胞转化为致瘤状态。通过分子内重组,逆转录病毒原病毒 DNA 与宿主细胞 DNA 整合是其复制循环的必要过程。

(2)重排(reassortment) 常发生在具有分节段基因病毒间的基因重组,是由不同亲

代病毒产生的子代核酸各个分子间的交换。因这些病毒的每个节段相当于一个基因,能独立复制,最后才组合纳入衣壳中。因此,当两株病毒在同一细胞内复制时,它们的核酸节段就可能随机分配而构成重组子代病毒,这种重组的发生频率远高于不分节段病毒。自然界存在重排,如产生新型流感病毒亚型的流行病学方面,重排有重要意义。

(3)复活(reactivation) 同种大量灭活病毒间能经基因重组而出现感染性病毒后代称多重复活作用(multiple reactivation)。例如以紫外线灭活的病毒,则可能发生多重复活作用,因此,紫外线照射不宜于制备灭活病毒疫苗。交叉复活或标记获救是指一个感染性病毒和灭活的亲缘病毒之间的基因重组,而不是不同的病毒原型与这一病毒的DNA片段间的重组。

3. 病毒基因产物间的相互作用

(1)互补作用(complementation) 发生在双重感染的细胞中的过程,由其中一个病毒提供另一个病毒增殖所必需而不能生成的基因产物,因而使后者能增殖。侵染病毒的遗传型不会改变,子代病毒具有亲本的基因型,虽然它们可能有一些非亲本的结构蛋白如另一个病毒特异性的外壳。例如腺病毒伴随病毒只有在辅助的腺病毒存在下才能复制。一种感染性病毒和一种灭活病毒以及2种缺陷病毒或条件致死性变种间,都可以发生互补现象。

(2)表型混合(phenotypic mixing) 一种病毒体的衣壳或包膜可包在另一种病毒体的核酸外面,称为表型混合,因为不是遗传物质变异,所以是不稳定的。例如几种肠道病毒感染细胞时,常发生衣壳转移,甚至有由两亲代编码的壳粒混合所组成的衣壳。包膜病毒之间发生的表型混合导致产生相嵌包膜,例如甲型、乙型流感病毒感染细胞所产生的后代,可来自两亲代的刺突。因病毒衣壳与包膜都可发生表型混合,若在自然界也发生这种现象,则可能改变病毒的宿主范围,并使某些病毒感染的血清学诊断发生困难。

(3)多倍体(polyploidy) 除逆转录病毒为二倍体外,所有脊椎动物病毒均为单倍体。但在借助胞膜芽生成熟的病毒中如副黏病毒,几个核衣壳(即基因组)包裹于同一个包膜中从而形成多倍体的情况很常见。如果不同株此类病毒同时感染同一细胞,许多基因组的子代病毒常是异源性多倍体,它们也带有表型混合的包膜抗原。

第五节 理化因素对病毒的影响

病毒受理化因素作用后失去感染性,称为灭活(inactivation)。灭活的病毒仍保留其抗原性、红细胞吸附、血凝和细胞融合等活性。

一、物理因素

1. 温度 大多数病毒耐冷不耐热,在0℃以下温度能良好生存,特别是在干冰温度(-70℃)和液氮温度(-196℃)下更可长期保持其感染性,大多数病毒于56~60℃ 30 min,100℃则几秒钟即被灭活。有包膜病毒比无包膜病毒更不耐热,有包膜病毒在37℃也能迅速灭活,立体对称型病毒在37℃则可维持其活性数小时。热对病毒的灭活