

生物科学研究方法丛书

病毒学方法

中国生物技术的发展中心
中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所

编著



科学出版社

生物科学研究方法丛书

病毒学方法

中国生物技术发展中心
中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所

编著

主 编 李德新 舒跃龙
副主编 董小平 谭文杰 王健伟
主 审 侯云德

主要参编人员 (按姓氏汉语拼音排序)

毕胜利	曹经瑗	陈书安	崔 胜	董 婕
董小平	杜海军	段招军	范 玲	冯 霞
高瑛瑛	韩 俊	黄保英	金 聪	旷 苗
李德新	李建东	李 杰	李金松	梁米芳
刘宏图	卢学新	鲁茁壮	吕 志	马学军
孟 昕	秘晓林	彭俊平	齐香荣	邱宏伟
任仙文	阮 力	舒跃龙	宋敬东	孙丽娜
谭文杰	唐浏英	童贻刚	王环宇	王健伟
王 晶	王 涛	王文玲	王 莹	王玉梅
王 岳	王 湛	卫灿东	吴小兵	杨 剑
姚 雪	余双庆	袁 卿	詹林盛	张福顺
张 硕	张晓光	张智清	赵 莉	赵饮虹
郑丽舒	周剑芳	周 玲	周 卓	朱武洋

科 学 出 版 社

北 京

181342

· 版权所有 侵权必究 ·

举报电话:010-64030229;010-64034315;13501151303(打假办)

内 容 简 介

病毒学是生物科学的重要学科之一,尤其是分子生物学方法的发展与病毒学方法的发展有着密切的联系。病毒是寄生于宿主细胞的最小生物体,由病毒核酸和病毒结构蛋白组成。病毒学方法研究的历程在整个生物学方法研究历程中体现了其重要的地位。

本书为“生物科学研究方法丛书”的《病毒学方法》分册,本书介绍了病毒学创新方法的创新特色和发展历程,包括病毒生物学特征、病毒致病性研究、病毒诊断、疫苗、药物和流行病学等研究方法发展以及对其他学科的贡献;介绍了当今病毒学研究领域的各类新方法;病毒学方法发展策略、需求与展望以及其与其他学科的交叉的发展趋势。

本书将对病毒学及相关生物技术等领域的广大科研技术人员以及相关专业的研究生具有较好的参考作用。

图书在版编目(CIP)数据

病毒学方法 / 中国生物技术发展中心,中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所编著. —北京:科学出版社,2012. 11

(生物科学研究方法丛书)

ISBN 978-7-03-035884-4

I. 病… II. ①中… ②中… III. 病毒学-研究方法 IV. Q939. 4-3

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2012)第 254948 号

责任编辑:邹梦娜 / 责任校对:宋玲玲

责任印制:肖 兴 / 封面设计:范璧合

版权所有,违者必究。未经本社许可,数字图书馆不得使用

科学出版社 出版

北京东黄城根北街16号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

双青印刷厂 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2012年11月第 一 版 开本:787×1092 1/16

2012年11月第一次印刷 印张:19

字数:446 000

定价:85.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

序

病毒学在生命科学中占有极其重要的地位,原因有二:第一,从学科领域来说,病毒是迄今所知最为简单的生命单位,病毒学研究曾经为并继续为生命科学的发展做出重要贡献,许多生命科学的重要规律是从研究病毒中发现的,例如,病毒逆转录酶的发现,修正了生命科学的“中心法则”;第二,从转化医学的角度来说,病毒与人类健康有着密切关系,病毒不仅可以引起人类许多传染病,包括席卷全球的艾滋病,肝炎,以及近年来流行的 SARS,新甲型 H1N1 流感,对人类的健康,社会活动,经济发展均带来严重危害;病毒感染还与癌症以及一些慢性疾病密切相关。据此,医学病毒学在病毒学科中更具有现实的重要地位。当前,医学病毒学在生物信息学,组学,系统生物学,合成生物学,医学的研究中是最为活跃的一门学科。

由李德新和舒跃龙主编的《病毒学方法》作为“生物科学研究方法”的大型系列丛书之一,将重点放在医学病毒学上是十分正确的。该书包括三篇、六章,全面概括了当今国际前沿研究的进展,系统地介绍了病毒学基本概念和历史发展,病毒学特征和病毒学领域主要的创新性技术与方法以及病毒学与交叉学科领域,颇有特色,可读性强。难能可贵的是,该书是由中国疾病预防控制中心、中国医学科学院、中国科学院和军事医学科学院的工作在第一线的、有实践经验的中青年和资深科学家所编写,内容全面,章节分明,文字流畅,适合于从事生命科学和医学的科研、教学、疾病控制、疫苗、诊断、治疗等科研人员参考阅读。我相信该书的出版必将推动我国病毒学的发展,对我国病毒病的控制也将会作出更大的贡献。



2012年9月10日于北京

前 言

病毒学是生物科学的重要学科之一,尤其是分子生物学方法的发展与病毒学方法的发展有着密切的联系。病毒是寄生于宿主细胞的最小生物体,由病毒核酸和病毒结构蛋白组成。自1892年发现烟草花叶病毒以来,各类不同病毒引起的人类和动植物疾病书写了一遍又一遍的历史,成就了一代又一代的病毒学家,以最终消灭病毒性疾病为目标的辉煌历程,逐渐形成了当今的医学病毒学、动物病毒学、植物病毒学、分子病毒学,分子流行病学、疫苗学、诊断方法学以及生物制药学等多种学科。病毒学家们利用病毒独特的结构特点及其与宿主细胞的相互作用,对分子生物学概念和各类研究工具的形成、生命体遗传物质解析、基因调控表达、重组DNA技术、疾病诊断、疫苗制备及药物研发等做出了不可磨灭的重要贡献。病毒学方法研究的历程在整个生物学方法研究历程中体现了其重要的地位,而随着新发突发传染病的不断发生,病毒学方法研究在传染病的预防控制中将越来越重要。

本书为国家“生物科学研究方法丛书”的《病毒学方法》分册。全书共包括三篇,第一篇为历史篇,介绍了病毒学创新方法的创新特色和发展历程,包括病毒生物学特征、病毒致病性研究、病毒诊断、疫苗、药物和流行病学等研究方法发展以及对其他学科的贡献;第二篇为方法篇,介绍了当今病毒学研究领域的各类新方法;第三篇为展望篇,介绍了病毒学方法发展策略、需求与展望以及其与其他学科的交叉的发展趋势。本书将对致力于病毒学、疾病预防控制、医学生物学、生物工程、诊断试剂、疫苗药物等研究的广大科研工程技术人员具有较好的参考作用。

本书参与编写的科研人员主要来源于如下单位即中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所(主要编写单位)、中国医学科学院病原生物学研究所、军事医学科学院、中国科学院。大多数为从事病毒学及相关领域研究多年的研究员、副研究员和海外归来学子,他们用各自的学习和工作阅历以及丰富的实践经验书写了书中各个篇章,并进行了审核校对。本书同时受到中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所和中国医学科学院病原生物学研究所等有关单位的多位教授专家指导,《病毒学报》编辑部对本书的组织、编撰以及书稿汇编整理给予大力支持,在此表示感谢!由于编写时间仓促等因素,不当之处,敬请读者指正,以利于今后修订补充。



2012年9月8日

目 录

序 前言

第一篇 病毒学创新方法特色和发展历程

第一章 病毒学领域生物技术科学创新特色	(1)
第一节 病毒特征与病毒学	(1)
第二节 病毒学领域生物技术科学创新	(6)
第二章 病毒学创新方法的发展历程	(12)
第一节 病毒生物学特征研究方法的发展历程	(12)
第二节 病毒致病机制研究方法的发展历程	(17)
第三节 病毒诊断学研究方法的发展历程	(24)
第四节 病毒疫苗学研究方法的发展历程	(29)
第五节 抗病毒治疗研究方法的发展历程	(53)
第六节 病毒流行病学研究方法的发展历程	(64)
第七节 病毒载体工具研究方法的发展历程	(70)

第二篇 病毒学主要创新方法

第一章 病毒鉴定与检测创新方法	(76)
第一节 组织培养基础上的指示细胞系技术	(76)
第二节 透射电子显微镜技术在病毒研究中的应用	(79)
第三节 病毒的荧光定量 PCR 检测技术	(93)
第四节 分子荧光标记的病毒示踪技术	(100)
第五节 病毒的酶联免疫学检测技术	(106)
第六节 Luminex 液相抗原与抗体芯片检测技术	(115)
第七节 异常朊蛋白错误折叠循环扩增技术	(118)
第八节 流式细胞检测技术在病毒学研究中的应用	(121)
第九节 酶联免疫斑点检测技术	(125)
第十节 新病毒的发现与鉴定技术	(130)
第十一节 超高通量基因组测序方法	(139)
第十二节 POC 现场快速检测技术与自动化	(146)
第十三节 病毒的进化和分子流行病学分析技术	(153)
第二章 病毒疫苗和药物研究创新方法	(168)
第一节 基因工程亚单位疫苗	(168)
第二节 病毒样颗粒疫苗制备	(179)

第三节	病毒反向遗传学	(186)
第四节	DNA 疫苗	(191)
第五节	非复制型痘苗病毒载体疫苗	(198)
第六节	黄病毒载体疫苗	(203)
第七节	腺病毒载体疫苗	(207)
第八节	腺病毒伴随病毒载体	(213)
第九节	假病毒技术	(218)
第十节	抗病毒基因工程抗体	(223)

第三篇 病毒学创新方法发展策略与展望

第一章	我国病毒学创新方法发展的需求	(239)
第一节	病毒资源的调查收集与数据化管理	(239)
第二节	病毒致病机制研究需求	(242)
第三节	诊断技术发展需求	(247)
第四节	病毒疫苗发展需求	(248)
第五节	抗病毒药物发展需求	(253)
第六节	抗病毒抗体治疗	(257)
第二章	病毒学创新方法发展趋势与交叉学科	(263)
第一节	诊断技术的高通量与现场应用性	(263)
第二节	结构生物学与病毒学	(265)
第三节	数学建模与生物信息学在病毒学研究中的应用	(274)
第四节	纳米技术在病毒学中的应用	(278)
第五节	SNP 和 CNV 技术在病毒学中的应用	(288)
第六节	组学技术与系统生物学	(292)

第一篇 病毒学创新方法特色 和发展历程

第一章

病毒学领域生物技术科学创新特色

第一节 病毒特征与病毒学

病毒(virus)是由核酸(DNA 或 RNA)和蛋白质构成的、披背或不披背磷脂外膜、具备感染能力、依赖宿主细胞自我复制的最小生命体。从病毒概念的形成到数以千计的病毒发现,从病毒结构生物学特征到病毒分类,从病毒的生命周期到病毒病的发病机理,从抗病毒药物的设计开发到疫苗研发,从病毒的检测到病毒病的诊断与治疗等逐步形成了病毒学及其相关生物技术科学创新特色。

一、病毒发现和病毒概念

1886年,德国科学家阿道夫·麦尔(Adolf Mayer)在多年研究烟草花叶病后指出此病可能由病菌引起。1892年,俄国科学家迪米特里·伊万诺夫斯基(Dimitri Ivanofsky)在类似的研究中发现染病植物的汁液里包含的病原体可以通过钱伯兰过滤器(一种可以阻止多数细菌通过的滤器)并保留感染特性,提示这种病原体比当时所知的任何一种病原体都小。但受当时观念和科技水平的限制,阿道夫·麦尔认为烟草花叶病是由产生毒素的细菌引起的。1898年,曾与阿道夫·麦尔合作过的荷兰科学家马蒂纽斯·贝杰林克(Martinus Beijerinck)在不知道伊万诺夫斯基研究工作的情况下,从患花叶病的烟草叶中挤出汁液,并使之通过钱伯兰过滤器,证明滤液仍有侵染性,且可以自我繁殖,从而否定了它是毒素的说法。贝杰林克认为这种病原体是“有传染性活的汁液”(contagium vivum fluidum),并称之为“病毒”,拉丁名叫“Virus”。上述三人发现并证实了这种在光学显微镜下不能看到的细小病原体能够在活细胞中繁殖并引起疾病。1898年,洛夫勒(Loeffler)和弗罗什(Frosch)从动物上分离出口蹄疫病毒;1901年,沃尔特·里德(Walter Reed)等发现了第一个人类病毒即黄热病病毒。进入20世纪后,分子生物技术的广泛应用使得人们对病毒的认识进入新阶段。

病毒本身不具有进行独立生命过程的条件,完整的生活史必须建立在与宿主细胞的寄

生关系上。因此,在很长的一段时间内,病毒被定义为“一种亚显微的、细胞内的专性寄生物”。这个定义具有局限性,因为一些专性细胞内寄生的细菌和其他微生物也具有特定的细胞内寄生生活史。一般来说,病毒具有以下重要特性使之有别于其他的生物体:病毒颗粒的形成主要基于病毒蛋白、核酸成分的组装,而其他生命体是通过细胞分裂以达到细胞复制;病毒颗粒不存在生长发育过程;病毒的遗传物质不编码参与能量代谢和蛋白质合成的功能蛋白。

一般而言,病毒由病毒基因组(DNA 或 RNA)和蛋白质外壳构成,基因组只包含一类核酸(DNA 或 RNA)。然而,1971年德尼尔(Diener)发现了一种只含 RNA 而不含蛋白质的类病毒(Viriods),说明自然界中存在比病毒更简单的致病因子,这一发现对病毒的定义提出了挑战。1981年至1983年科学家发现在四种多面体 RNA 病毒颗粒中伴随存在一种与类病毒相似的 RNA 分子,被称为拟病毒(virusioids)或卫星(satellites),其复制和衣壳化都需要依赖于辅助病毒。1982年 Prusiner 发现引起羊瘙痒病的病原体是一种分子量约 27kD 的不含核酸的蛋白质,称之为蛋白侵染子或朊病毒(prions)。类病毒、卫星、朊病毒等的发现,极大地丰富了病毒学的内容,使人们对病毒的本质又有了新的认识。

二、病毒结构特征及分类

病毒的种类繁多,形态各异。电子显微镜、负染、X 射线衍射、超速离心、真空喷镀等技术的应用极大地促进了病毒形态学的发展。病毒颗粒的直径大多在 20 至 300nm 之间,在电镜下主要表现为球形、丝形、弹形、砖形和蝌蚪形五种形态。病毒颗粒的立体结构大致可分为三种类型:二十面体对称、螺旋对称和复合对称。二十面体对称的病毒壳体由蛋白亚基排列成一个由 20 个等边三角形组成的正二十面体对称结构,有 20 个面,12 顶角,30 棱,如脊髓灰质炎病毒、腺病毒、乳头瘤病毒等;螺旋对称的病毒壳体由蛋白亚基沿轴心螺旋排列,呈螺旋状的空心圆桶,如流感病毒、麻疹病毒、新城疫病毒等;还有一些病毒表现为较复杂的复合对称,如 T4 噬菌体。

病毒的基本结构一般由内部的核酸(RNA 或 DNA)和外部的蛋白衣壳两部分组成。病毒中心的核酸携带了病毒的遗传信息,决定其遗传特性和增殖特性,呈线形或环形,分子量在 10^6 至 10^8 之间。病毒核酸包括 4 种类型:双链 DNA(dsDNA),单链 DNA(ssDNA),双链 RNA(dsRNA)和单链 RNA(ssRNA)。核酸外面包被着的一层有规律地排列的蛋白亚单位,称为衣壳。它是病毒颗粒的主要支架结构和抗原成分,有保护核酸等作用。衣壳是由病毒核酸编码的衣壳蛋白通过一定的方式聚集而成的。构成衣壳的形态亚单位称为壳粒,由核酸和衣壳蛋白所构成的粒子称为核衣壳。许多病毒外边还有一层由脂质和糖蛋白构成包膜。包膜中的类脂来自宿主细胞膜。许多病毒在脂质的包膜上还有包膜突起,如流感病毒的血凝素和神经氨酸酶。包膜的有无及其性质与该病毒的宿主专一性和侵入等功能有关。病毒的结构蛋白决定着病毒的基本形态,如艾滋病毒是由 1800~2000 个 gag-pol 蛋白构成其独特的拓扑学特点,这些结构蛋白大多数具备识别和结合自身病毒基因的能力,对病毒基因组有保护作用。对于有包膜病毒来说,其包膜蛋白不但决定着受体特异性还作为主要抗原影响着宿主免疫反应的有效性。

1950年,第五届国际微生物学会提出了有关病毒分类的八项原则;1963年国际微生物命名委员会病毒分会根据安德鲁斯的建议提出了新的病毒分类八项原则,并在1966年成立的国际病毒命名委员会(International Committee on Nomenclature of Virus, ICNV)上通

过。这八项原则包括：①病毒核酸的类型、结构和分子量；②病毒颗粒的形状和大小；③病毒颗粒的结构；④病毒颗粒对乙醚、氯仿等脂溶剂的敏感性；⑤血清学性质和抗原关系；⑥病毒在细胞培养上的繁殖特性；⑦对除脂溶剂以外的理化因子的敏感性；⑧流行病学的特征。1971年，ICNV公布了关于病毒分类和命名的第一次报告，将500多种病毒分为43个病毒属(组)。1973年，国际病毒命名委员会更名为国际病毒分类委员会(International Committee on Taxonomy of Virus, ICTV)，目前下属6个附属委员会：真菌病毒附属委员会(Fungus Virus Subcommittee)、无脊椎动物病毒附属委员会(Invertebrate Virus Subcommittee)、植物病毒附属委员会(Plant Virus Subcommittee)、原核生物病毒附属委员会(Prokaryote Virus Subcommittee)、脊椎动物病毒附属委员会(Vertebrate Virus Subcommittee)和病毒数据附属委员会(Virus Data Subcommittee)。ICTV拟定了病毒的分类方案，多次修订了病毒的命名和分类原则，建立了由目(order)、科(family)、亚科(subfamily)、属(genera)和种(species)构成的等级分类系统，并根据研究进展发布报告。ICTV已分别于1976年、1979年、1982年、1991年、1995年、2000年、2005年和2009年公布了关于病毒分类和命名的第二次、第三次、第四次、第五次、第六次、第七次、第八次和第九次报告。在第七次报告中，首次明确病毒的种(species)是最低的分类单元。第九次报告将已知的病毒归属为6个目、87个科、19个亚科、349个属、2284个种。目前最新的2011年名录(Virus Taxonomy List 2011)包括了6个目(order, 后缀为-virales)、94个科(family, 后缀为-viridae)、22个亚科(subfamily, 后缀为-virinae)、395个属(genera, 后缀为-virus)、2475个种(species, 后缀为-virus)(www.ictvonline.org)。2003年暴发的严重急性呼吸综合征(SARS)的病原体，SARS冠状病毒(SARS-coronary virus, SARS-CoV)属于套病毒目，冠状病毒科，冠状病毒亚科；2009年由我国病毒学家发现报道的引起出血伴血小板减少综合征的新型布尼亚病毒(Bunia virus)属于布尼亚病毒科，白蛉病毒属。

病毒的种、属、亚科、科、目等分类学概念有利于科学家借鉴100年以上的病毒学知识，迅速掌握新病毒结构生物学特点、生活周期、传染及发病特征、预防控制策略、抗病毒药物选择及疫苗研制策略。

三、病毒的生命周期

病毒的生活周期一般都要经过附着、侵入、脱壳、病毒基因复制及蛋白质合成、新病毒组装和释放等过程。病毒的生命周期重现着绝大部分的分子生物学原理，病毒生命周期的研究几乎需要使用人类目前所拥有的一切科学技术。病毒生命周期的研究成果大大推进和发展了分子生物学的认识及内涵，参与病毒生命周期的每个病毒基因元件及蛋白几乎都被广泛用于生物医学技术及其他领域。

1. 附着 病毒感染过程始于无包膜病毒衣壳蛋白或有包膜病毒的包膜蛋白与宿主细胞表面特定受体之间发生特异亲合，这种特异亲合决定着病毒的宿主范围和器官嗜性。如，禽流感病毒H5N1包膜蛋白-血凝素一般只附着于表面含唾液酸、寡糖以2,3键形成的2,3-N-乙酰神经氨半乳糖的细胞，因此禽流感病毒一般只感染水鸟等禽类的呼吸道上皮，而人的呼吸道上皮细胞膜几乎只有2,6-N-乙酰神经氨半乳糖，因此这种禽流感病毒很少感染人。

2. 侵入 病毒与受体结合后，通过受体介导的胞吞或膜融合进入细胞，该过程涉及比较复杂的分子生物学原理。有些病毒，如烟草花叶病毒可以直接通过细胞间连接结构的孔

洞从感染细胞进入到未感染细胞。细菌及植物细胞由于有细胞壁结构,有些病毒进化出一种感染这些细胞的机制,如噬菌体能将自己的基因注入宿主细胞内,而衣壳留在细胞外,从而达到感染目的。

3. **脱壳** 病毒的壳粒通过病毒蛋白构象变化和宿主细胞因子的参与发生解离从而使病毒遗传物质得以释放到胞质为病毒的复制做好准备。

4. **病毒基因复制和蛋白质合成** 病毒基因通过其结构特点及宿主细胞核酸复制机制完成复制,有些病毒基因复制只发生在细胞质中,如丙型肝炎病毒,其是依靠病毒核酸复制酶和胞质中各种原材料完成复制的。病毒蛋白的合成根据病毒基因结构特点基本都需要经过相应信使 RNA 过程,正链 RNA 病毒,如丙型肝炎病毒其核酸本身就可以直接实施蛋白翻译。大量参与病毒基因复制和蛋白质合成的病毒基因元件及病毒蛋白被广泛运用于病毒载体、反向遗传、蛋白表达及新型疫苗开发等技术领域。逆转录病毒的逆转录酶不但丰富修正了“中心法则”还为 RNA 的研究及检测提供了方便。

5. **新病毒的组装及释放** 合成的病毒蛋白及核酸在细胞内通过不同机制组装成新病毒颗粒,有些病毒蛋白会发生翻译后修饰,如艾滋病毒,这种修饰作用可以发生在病毒出芽之后。无包膜病毒需要在细胞裂解之后才能得以释放,对于有包膜病毒来说,释放过程也叫出芽。

四、病毒感染与宿主反应

病毒感染(viral infection)一般指病毒在宿主细胞中完成生活史的过程,这个过程主要包括病毒的复制以及在宿主体内的扩散。病毒的高度多样性和宿主免疫反应的不同决定其感染过程也非常繁杂,病毒学上,一般还要考虑宿主细胞是否容许病毒在其内部进行病毒复制,因而我们对宿主细胞往往有许可性、半许可性以及非许可性的定义方式。半许可性和非许可性细胞缺乏病毒完整复制所需的相关因子,其中非许可性宿主细胞往往指缺乏病毒受体以及缺乏病毒侵入相关因子的细胞,而半许可性细胞是指可以完成不完全但非常少量的病毒复制的细胞。从上述宿主细胞出发,结合病毒感染,病毒感染特征分为以下几类:

1. **顿挫型感染(abortive infection)** 即不成功的感染,一般是指发生在前述非许可性宿主细胞中的病毒感染,由于没有完成完整的病毒复制,感染过程不可再生。虽然顿挫型感染无法产生新的病毒,在某些情况下,会对人类产生非常不利的结局,例如细胞转化(transformation),而部分的细胞转化往往能够形成肿瘤。

2. **急性感染(acute infection)** 指病毒感染人类后短时间内即被宿主免疫系统清除的过程,伴随或者不伴随症状。临床上大多数急性感染病程多在几周以内,如流感病毒感染,能够在短时间内引起呼吸道感染,除极端的情况下可以造成死亡外,绝大多数患者能在一周左右康复。

3. **慢性感染(chronic infection)** 与前述急性感染相反,病毒可以存在宿主体内较长的时间。临床上对于慢发性感染、持续性感染以及潜伏感染无法区分,因此,这三个名词往往代表类似的意义。但是,对于病毒感染的机制来说,上述名词却代表着非常不同的含义,慢发型感染(slow infection),其特点是病毒感染后,宿主免疫系统激活,大部分病毒被清除,仅有少量残留宿主体内,并维持较低的滴度,无明显临床症状。有时经过数十年,可复发并有

进行性加重,可导致包括死亡等严重后果。这类感染涉及慢病毒、黄病毒、风疹病毒等。持续感染(persistent infection)是指病毒感染宿主后,病毒一直存在并维持终生,同时没有明显的病毒感染症状。多数疱疹病毒均属于这一类。而潜伏感染(latent infection)通常指病毒入侵机体后,没有发生明显的症状,特别是没有病毒颗粒的大量复制,仅在部分组织中存在。例如,单纯疱疹病毒 I 型,感染后潜伏存在于面部三叉神经,不引起明显的症状。这种感染往往潜伏很长时间,甚至人的终生。

病毒感染人体后,首先引起的是宿主非特异性免疫。非特异性免疫包括病毒入侵部位的屏障作用,吞噬细胞的吞噬作用,补体、备解素和溶菌酶以及干扰素和 NK 细胞等,在病毒侵入和感染早期,特别在特异性免疫反应尚未形成时,对防止病毒入侵、杀灭和清除病毒、终止感染起着主要的免疫作用。病毒感染后,经过诱导期(约 1 周)后,宿主还能产生特异性免疫反应。特异性免疫主要分为体液免疫反应和细胞免疫反应。病毒的体液免疫反应是针对该种病毒产生相应的特异性抗体,抗体可清除细胞外及体液中的病毒并防止病毒侵入健康细胞。病毒感染也可引起细胞免疫反应,可以通过 T 细胞直接溶解和破坏感染病毒的细胞而消除病毒;或通过它分泌的淋巴因子,增强 T 细胞和其他免疫活性细胞如巨噬细胞、B 淋巴细胞等对病毒的免疫反应也可以通过抗体依赖性 K 细胞介导的细胞毒(ADCC)反应。由于病毒是细胞内寄生的微生物,特异性抗体不能直接进入细胞内,抗病毒免疫主要依靠细胞免疫破坏感染病毒的细胞,释出病毒后,抗体及吞噬细胞才能中和、吞噬及杀灭病毒。细胞免疫和体液免疫共同组成宿主抗病毒免疫。

抗病毒感染的免疫能保护人体、抵御病毒侵入、清除体内病毒及消除感染,但另一方面也能由于免疫反应造成人体的免疫性损害,称为免疫病理。病毒感染人体后,引起体液免疫反应产生特异性抗体,和病毒的抗原结合再摄取补体,形成免疫复合物,可以被吞噬细胞吞噬或由尿排出体外,清除病毒。然而,免疫复合物亦可沉积于组织,产生组织损伤引起免疫复合物病,如血清病样反应(表现有发热、荨麻疹、关节炎等)、结节性动脉周围炎和肾小球性肾炎等。此外,病毒引起的细胞免疫,免疫活性细胞可以大量破坏感染病毒的细胞,出现组织损伤及临床症状,如乙型肝炎和汉坦病毒导致的肾综合征出血热的发病和病情轻重与免疫病理有关。病毒感染与发病学的研究不但推进了人类对病毒感染相关疾病的预防控制水平还促进了免疫学、病理学、病理生理学及诊断学等学科的发展。

参考文献

- Bolton DC, MP McKinley, SB Prusiner. 1982. Identification of a protein that purifies with the scrapie prion. *Science*, 218: 1309~1311.
- Dawood F S, S Jain, L Finelli, et al. 2009. Emergence of a novel swine-origin influenza A(H1N1) virus in humans. *N Engl J Med*, 360: 2605~2615.
- Hoffmann E, G Neumann, Y Kawaoka, et al. 2000. A DNA transfection system for generation of influenza A virus from eight plasmids. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97: 6108~6113.
- Levine AE, LW. 2007. History of Virology. *Fields Virology*, 5th ed: p. 3~23.
- Shinde V, CB Bridges, TM Uyeki, et al. 2009. Triple-reassortant swine influenza A(H1N1) in humans in the United States, 2005~2009. *N Engl J Med*, 360: 2616~2625.

撰稿:彭俊平 刘宏图
审校:李德新

第二节 病毒学领域生物技术科学创新

很多重大科学原理的发现来源于对简单模型的研究,因为简单模型能将某项最重要的科学原理最为突出地表现出来。病毒是最简单地生命单元,其蕴含着大量重要生命科学原理,因此病毒学研究必然会对生物技术科学的创新做出贡献。

一、病毒与“中心法则”

20世纪40年代开始,在 M. Delbruck, S. Luria 和 A. D. Hershey 的带领下,科学家开始以大肠埃希菌 T 噬菌体为模式生物进行研究,他们在美国纽约长岛的冷泉港实验室,被称为噬菌体小组。1952 年噬菌体小组的两个成员 M. Hershey 和 M. Chase 用³²P 标记 T2 噬菌体的 DNA, ³⁵S 标记噬菌体的蛋白质,侵染大肠埃希菌。结果只有³²P-DNA 进入细胞内,³⁵S-蛋白质留在了细胞外,从而有力地证明了 DNA 是噬菌体的遗传物质。1955 年美国的 Fraenkel-Conrat 等用植物病毒重建实验进一步证实了这一结论。他们用来自烟草花叶病毒(TMV)和霍氏车前花叶病毒(HP)两个品系的 RNA,这两种病毒感染植物产生的病斑形态不同。若将 M 和 HR 品系重建,即将两种病毒蛋白质外壳互换一下,可重建成“嵌合”TMV,但仍具有感染能力,所产生的病斑形态和“嵌合”TMV 的 RNA 一致,而和蛋白质无关。由此看来病斑的遗传信息不是由蛋白质传递的而是由 RNA 来传递的。根据以上实验表明 RNA 也是遗传物质。Waston 是噬菌体小组的最年轻的成员,1950 年在 Luria 的指导下获得了博士学位,1951 年在剑桥大学遇到了 Crick,两人和富兰克林于 1953 年正式提出双螺旋结构,开启了分子生物学的帷幕。1958 年 Crick 总结了当时分子生物学的成果,提出了“中心法则”,即遗传物质从 DNA 到 RNA,再转化成蛋白质。“中心法则”为分子生物学这门学科的诞生与发展奠定了基础。

二、病毒与逆转录酶

1910 年美国病理学家劳斯就用实验证明了病毒可以致癌,但具体机制并未阐明。这引起了科学家的注意。DNA 为遗传物质的病毒可以通过前病毒的形式引起癌症,这点由美国科学家杜尔贝科提出。但 RNA 病毒的致癌机制无法获得解释。1970 年 Temin 从 RSV 中分离到了一种 RNA 依赖的 DNA 聚合酶,同时麻省理工的 Baltimore 也从小鼠白血病病毒中分离到这种酶。这种酶被称作逆转录酶。他们并因此获得 1975 年度诺贝尔生理学或医学奖。当 RNA 致癌病毒,如鸟类劳氏肉瘤病毒(Rous sarcoma virus)进入宿主细胞后,其逆转录酶先催化合成与病毒 RNA 互补的 DNA 单链,继而复制出双螺旋 DNA。含有逆转录酶的病毒叫做逆转录病毒,逆转录酶催化的反应叫逆转录(reverse transcription)。在这个过程中,遗传信息流动的方向是从 RNA 到 DNA,正好与转录过程相反,故称逆转录。病毒逆转录酶某些二价阳性离子存在的条件下,以脱氧核苷三磷酸为底物,从 5' 到 3' 合成与模板 RNA 互补的 DNA,反应需要引物。逆转录酶的发现和产品化,大大推进了 RNA 研究。对于病毒学本身,逆转录酶的出现,使得各种 RNA 病毒的克隆测序和基因操作成为可能。同时,逆转录酶使聚合酶链式反应检测 RNA 病毒核酸成为可能。还有很多病毒基因元件及蛋白在病毒学领域生物技术创新上发挥着作用,如 T4 连接酶和 T7 RNA 聚合酶等

等。逆转录酶和朊病毒的发现,完整了现在的“中心法则”,中心法则阐明了生物界的信息流动方式,中心法则的发现、完善及发展与病毒学的发展是分不开的。

三、病毒与基因调控

病毒本身不具有进行独立的生命过程的条件,完全依赖于宿主细胞,它们必须利用宿主细胞信号和调节途径。因此,病毒可用于研究宿主细胞的生命过程。对信使 RNA (mRNA)的加工步骤的所有知识几乎都通过对病毒观察所获得。通过观察腺病毒的感染发现新转录产物的 RNA 拼接;研究痘病毒和 SV40 的感染分别发现 mRNA 的多聚腺苷酸化和多聚腺苷酸化的信号;在 mRNA 5'末端帽状结构和碱基的甲基化最初是用呼肠孤病毒发现的。蛋白酶对蛋白质的翻译后加工、蛋白质在高尔基体糖基化作用、细胞内多种重要的蛋白激酶的磷酸化或者膜相关蛋白质添加脂肪酸,蛋白质在细胞内的运输,所有这一切都通过病毒进行了有益的研究。基因调控的元件和原理许多依赖于病毒感染调控基本原则的发现。Phillip Sharp 在研究腺病毒基因时发现了 mRNA 的剪接现象,为研究真核生物的表达调控奠定了基础。病毒基因结构和表达的研究,相继揭示了真核基因表达的很多方式,如基因重叠,内含子,重复序列和增强子的存在等,大大地丰富了分子生物学的内容。最典型的重叠基因的代表是 ψ X174 噬菌体,这是单链 DNA 病毒,宿主为大肠埃希菌,感染后合成 10 种蛋白,相对分子量为 25 000,相当于 6078 个核苷酸容纳的容量,而 ψ X174 的基因组仅仅 5375 个核酸,Sanger 测序后发现这 10 个基因有些是重叠的。有些是一个基因完全包含于另一个基因里面,有的是一个碱基的重叠或者是部分的重叠。重叠基因虽然 DNA 顺序大部分相同,但是转录为 mRNA 的开放阅读框(ORF)不同,产生的蛋白分子大大不同。除 ψ X174 之外,基因重叠现象也发现于人乳头瘤病毒(HPV)、SV40、乙肝病毒等。

四、病毒反向遗传学与疫苗

病毒的基因组较小,易于在基因水平上对其改造。将病毒 DNA(DNA 病毒)或 cDNA (RNA 病毒)克隆入合适载体,通过体外或体内转录,翻译,最终产生具有感染性病毒颗粒的技术称为反向遗传学技术。利用反向遗传技术,通过病毒基因水平的操作,可以有效地研究病毒基因结构、功能,调控机理和病毒-宿主相互作用,甚至还可以得到减毒毒株,开发新型的疫苗。2009 年新型 H1N1 甲型流感大流行疫苗株的研制就是采用了反向遗传技术。自 2009 年 5 月 26 日 WHO 宣布推荐/California/7/2009(H1N1)类似株作为疫苗推荐株,WHO 合作中心和重要的规范实验室(essential regulatory laboratories)按照推荐制备疫苗种子株和相应的标准试剂。在疫苗种子株制备技术方面有两种方法,传统的两种病毒混合重配和反向遗传技术。前者通过血清压力筛选出疫苗种子株;这种技术存在不确定性和费时缺点。而反向遗传技术制备流感大流行疫苗的步骤就是:将遗传背景清楚的 PR8 毒株作为内部基因供体毒株,表面抗原 HA,NA 基因来自大流行 H1N1 病毒,通过反向遗传技术获得重配的疫苗株。从 2009 年 5 月 27 以后,一系列反向遗传技术制备的疫苗种子株通过 WHO 全球流感监测网络向全世界发布,临床试验结果满意,大规模的人群接种计划顺利实施,及时有效地控制了疫情的蔓延和 H1N1 甲型病毒造成的危害。

五、病毒载体与基因治疗

早期人们发现了一种腺病毒和 SV40 病毒杂合的病毒,也就是说在腺病毒的基因组中携带了 SV40 病毒基因组,说明病毒是可以“承载”外源基因片段的。随着病毒细胞培养技术和分子病毒学的发展,对病毒生活周期、基因组及元件的认识逐渐深入,对病毒基因组的克隆和分子操作使人们在分子水平改造病毒成为可能,主动地用病毒来携带和表达外源基因成为现实,病毒载体作为基因转移的工具就诞生了。腺病毒载体和逆转录病毒载体是最早被作成载体的病毒,随后更多的病毒被发展成载体,包括痘病毒、单纯疱疹病毒、腺相关病毒、甲病毒等。反向遗传学技术的发展使包装更为复杂的病毒如流感病毒、仙台病毒等负链 RNA 病毒的包装和制备成为可能。

病毒基因组中的基因元件可分为两类,一是病毒复制和包装所必需的顺式作用元件,这些元件必须留在基因载体上;另一类是病毒的结构蛋白和功能蛋白,这些蛋白往往可以反式提供。因此,通过删除部分病毒基因组中的反式作用元件序列,可以为装载外源基因腾出更多的空间。早期人们发现了一种腺病毒和 SV40 病毒杂合的病毒,也就是说在腺病毒的基因组中携带了 SV40 病毒基因组,说明病毒是可以“承载”外源基因片段的。随着病毒细胞培养技术和分子病毒学的发展,对病毒生活周期、基因组及元件的认识逐渐深入,对病毒基因组的克隆和分子操作使人们在分子水平改造病毒成为可能,主动地用病毒来携带和表达外源基因成为现实,病毒载体作为基因转移的工具就诞生了。腺病毒载体和逆转录病毒载体是最早被作成载体的病毒,随后更多的病毒被发展成载体,包括痘病毒、单纯疱疹病毒、腺相关病毒、甲病毒等。反向遗传学技术的发展使包装更为复杂的病毒如流感病毒、仙台病毒等负链 RNA 病毒的包装和制备成为可能。随着病毒载体系统的产生和发展,其用途不断被发掘,在产业中的需求也显现出来。首先病毒载体刚产生就被科学家尝试用于基因治疗研究。

腺相关病毒(AAV)是单链 DNA 病毒,长度为 4.6kb。现在已经开发和开发了 AAV 载体,该病毒在腺病毒的帮助下,可以包装成成熟的病毒颗粒。不能特异的整合到靶细胞的基因组中。与腺病毒载体相比,AAV 载体携带的外源基因可以长期表达,失去了载体本身的蛋白,所以免疫原性和毒性较低。由于其属于缺陷病毒,需要腺病毒的辅助才能繁殖,不易得到高滴度的病毒颗粒。病毒载体对外源基因的容量较小,约 4kb。目前已经有多种疾病用 AAV 载体开展治疗。

在过去的十年中,以 HIV-1 型(慢病毒典型代表)为基础的病毒载体得到很好的发展,这种载体突破了细胞必须出于分裂期的限制,稳定的整合基因到宿主的基因组中,长期表达目的基因。这种载体的外源基因插入总量可达到 10kb。使用很多种不同的包装蛋白可形成假病毒颗粒。水泡性口炎病毒 G 蛋白就是很常用的一种蛋白,它结合到病毒膜中,使得病毒可以转化很多类型的细胞,包括原代细胞、干细胞和早期胚胎细胞。转移载体还可以加上土拨鼠嗜肝病毒调节元件使得转基因的表达增强,中心多聚嘌呤管道的加入可以增加向细胞核输入前整合复合体的效率。另外病毒的 3' 端的长末端重复序列的删除,阻止了从整合病毒产生病毒基因组 RNA,提高了安全性。在 293T 人类胚胎肾细胞培养后,通过超速离心可获得分泌在上清中的高滴度的病毒颗粒。慢病毒虽然具有强大的功能,但是可以通过同源重组产生具有复制功能的病毒或与人体内的病毒发生重组等危险因素。慢病毒的整合是随机整合的,有诱使靶细胞突变的可能。

基于 HIV-2 改造的病毒载体,相比之下具有更小的致病能力,在 HIV-1 型的感染者治疗中更有用处,因为在感染细胞中不易与 HIV-1 重组。如今我们已经取得了许多关于慢病毒载体系统的进展。除去 HIV 外,还有猴免疫缺陷病毒系统,以及非灵长类的猫免疫缺陷病毒(FLV)载体。其他的逆转录病毒载体还有莫罗尼鼠白血病毒(Mo-MLV)和基于脾坏死病毒载体。Mo-MLV 载体降低了基因的表达,而且还易于整合到活跃的基因启动子区域造成转染细胞容易癌变。慢病毒载体倾向于结合到活跃的启动子下游,降低了癌变的可能。在转染非分裂的细胞时,预结合复合物能够穿越完整的核膜,这对于不活跃分裂的神经细胞治疗很有价值。

世界上 FDA 批准的第一例基因治疗人体临床试验是 1990 年用逆转录病毒载体携带腺苷脱氨酶基因(ADA)治疗 SCID 病。之后腺病毒载体、单纯疱疹病毒载体、AAV 病毒载体、痘病毒载体、Sindbis 病毒载体等都被用于基因治疗的人体试验。另经过 20 多年的发展,基因治疗已经看到了成功的曙光。黑矇症、血友病、帕金森病和一些单基因遗传性疾病将成为第一批被治愈的疾病。基因治疗产业化发展趋势已经明朗。而病毒载体的设计、包装系统、生产工艺方法、质量检定等则是基因治疗产业化的基础。病毒载体在发展新型疫苗尤其是病毒病疫苗、结核疫苗、肿瘤疫苗等方面也大有可为。此外,病毒载体作为基因转染试剂用于基础研究、细胞修饰和体外检测等方面也具有广阔的市场前景,正在成为一种重要的生物试剂。

六、噬菌体与噬菌体展示技术

噬菌体(bacteriophage, phage)是感染细菌、真菌、放线菌或螺旋体等微生物的病毒的总称,因部分能引起宿主菌的裂解,故称为噬菌体。作为病毒的一种,噬菌体具有病毒特有的一些特性:个体微小;不具有完整细胞结构;只含有单一核酸。噬菌体基因组含有许多个基因,但所有已知的噬菌体都是在细菌细胞中利用细菌的核糖体、蛋白质合成时所需的各种因子、各种氨基酸和能量产生系统来实现其自身的生长和增殖。一旦离开了宿主细胞,噬菌体既不能生长,也不能复制。目前研究较多的有 M13, fd 和 f1 这三种丝状噬菌体,其复制型 DNA 被用来作基因克隆的载体,基因组是一个单链环状 DNA,外面绕着管状蛋白外壳,其中丝状噬菌体外壳蛋白 III 或蛋白 VIII 基因被应用于噬菌体表面呈现(phage display)。将蛋白分子或肽段的基因克隆到丝状噬菌体的基因组 DNA 中,使噬菌体表面表达该异源分子,其主要特点是将特定分子的基因型和表型统一在同一病毒颗粒内,即在噬菌体表面表达特定蛋白,在噬菌体核心 DNA 中含有该蛋白的结构基因。由于丝状噬菌体易于在大肠埃希菌系统中分离扩增,这个技术将选择能力和扩增能力联系到了一起,即通过与配体的结合从数量众多的多样化群体中选择出表达有相应配体的噬菌体颗粒,再通过感染大肠埃希菌使选择出的噬菌体颗粒得到扩增,经过反复富集筛选从而获得特异性的目的基因及其表达的蛋白。

1985 年 Smith 首先阐明利用噬菌体表面呈现系统(phage display)表达筛选随机多肽库以来,抗体分子是噬菌体表面表达的第一个具有其天然蛋白功能的蛋白质分子,通过噬菌体表面呈现技术将抗体分子 Fab 段基因或 Fv 基因通过与噬菌体外壳蛋白 III 或蛋白 VIII 基因连接以融合蛋白形式表达在噬菌体表面,从而形成噬菌体抗体。从 B 淋巴细胞中扩增全套抗体的轻链和重链基因文库经噬菌体表面呈现系统表达后而形成的噬菌体抗体文库即为噬菌体抗体库(phage antibody library)。1989 年 Huse 等将轻链基因插入噬菌体载体的

左臂,重链基因插入噬菌体载体的右臂,连接后包装成噬菌体,建立了第一个噬菌体抗体文库。随着噬菌体载体系统的改进,噬菌体抗体技术获得广泛的应用,为了提高抗体库的多样性,在 CDR 区随机引入核苷酸序列而构成人工合成噬菌体抗体库;在已获得的阳性克隆的基础上,在特异性抗体基因 CDR 区进行基因突变筛选,以获的高亲和力的特异性抗体,噬菌体表面呈现技术的问世和噬菌体抗体表达筛选系统的逐步完善,使基因工程抗体得以绕过杂交瘤细胞系,直接从免疫动物或人体淋巴细胞中获得抗体基因。更有意义的是噬菌体抗体可以绕过抗原免疫这一关,直接人工合成和建立人噬菌体抗体库,筛选针对任何一种抗原的特异性抗体。从而远远超越了常规杂交瘤细胞系制备单抗的限制,而使基因工程单抗的研究进入一个崭新的创造性阶段。

七、病毒进化与分子流行病学

病毒同自然的任何其他物种一样都在不断自发地发生变异,经过自然选择,呈现出进化的趋势。然而,病毒发生和进化的研究与其他物种相比,有其自身特点。首先,病毒特别小;其次,在漫长的演化史中没有“化石”或“遗体”可供研究;第三,病毒聚合酶缺少校对功能,传代快,因而进化的随机性强。我们只能通过研究同时代的病毒基因来推测病毒的演化过程。通过对不同毒株的序列进行分析,能够使人们清楚地了解它们之间的遗传学关系。认识到特定毒株的起源及地理分布,毒株在宿主间的传播等,这为病毒学工作者流行病学工作者及卫生政策部门制定流行病控制策略和进行疫苗研究提供了重要线索。以 2009 年突发于北美并造成了世界性大流行的甲型 H1N1 流感为例,疫情初期,美国 CDC 的研究人员就迅速的测定了流行毒株的基因组序列,并通过比较基因组学和分子进化研究,揭示了此次流行的甲型 H1N1 流感病毒的起源。在我国 2012 年脊髓灰质炎野毒暴发疫情时,我国研究人员同样快速测定了流行毒株的基因组序列,并由病毒分子进化研究确定此脊髓灰质炎野毒的输入地点和时间,并据此制定了有效的防控措施。显然,快速准确的澄清新出现的导致疫情的病毒的起源,对于疫情的有效控制起到了至关重要的作用。

八、交叉学科创新发展推进了病毒学领域生物技术发展

病毒的发现、鉴定、检测、治疗、疫苗等技术严重依赖各种科学技术的进步并伴随各项科学技术的发展而发展。如核酸测序技术,20 世纪 60~70 年代,人们运用当时病毒学领域的各种技术无法发现和鉴定丙型肝炎病毒,1989 年,美国病毒学家迈克尔杭同(Michael Houghton)运用当时比较成熟的核酸测序技术鉴定出当时非甲非乙型肝炎是由一种新型肝炎病毒感染引起,并定义为丙型肝炎病毒。随着测序技术的飞速发展,科学家们发现,人类基因组中,包含有大量病毒基因信息,单单就逆转录病毒来说,人类基因组中有高至 8% 的基因信息来自逆转录病毒,目前对于其原因和作用还不清楚。再如酶联免疫反应技术,是综合免疫学、生物工程、化学、物理光学及电子工学的一项检测技术,运用于病毒检测已有几十年历史,不但可以检测患者对某一特定病毒的抗体,还能检测病毒抗原。随着抗体标记技术及其他检测技术的发展,现在的酶链免疫反应技术可以对病毒抗原及其相应抗体的检测从定性发展到定量,不但大大推进了病毒检测的敏感性和特异性,还有利于病毒感染及宿主免疫的深入研究。

总之,对病毒的生活周期、基因组结构和功能、病毒基因元件的作用、病毒的复制机制