

医学和实验病毒学

湖北医学院病毒研究所译

说 明

这本《医学和实验病毒学》是1982年10月以熊菊真教授为首的来自美国和加拿大的九位病毒学专家在武昌湖北医学院举办的医学和实验病毒学高级研习班的讲课和实验内容的译稿。这次有全国病毒工作者200人参加听课和40人参加实验的着重于临床病毒学的研习活动，是由湖南医学院和湖北医学院联合申请中央卫生部批标举办的，并得到了美国雅礼学会的帮助。由于思想水平、学术水平的限制，再加以时间仓促，这本讲义的译文，难免有差错和不完美之处，请予使用时加以改正。有个别题目的讲稿未能按时收到不得不另行分装，有失整体，亦希谅解。拟在研习班结业后，再根据录音加以整理，以期完整。如有可能，将正式付印。

向 近 敏

一九八二年八月于武昌

湖北医学院病毒研究所

目 录

第一部分

一、医学病毒学

第一章	一般原则和现代进展.....	4
第二章	RNA病毒.....	13
第三章	DNA病毒.....	26
第四章	抗病毒治疗.....	36
第五章	干扰素.....	56
第六章	病毒的致病作用和单克隆抗体.....	65
第七章	电镜技术与病毒性疾病的快速诊断.....	69
第八章	病毒性肝炎及其疫苗预防.....	78
第九章	病毒抗原核酸及早期抗体的检测.....	85
第十章	病毒性疾病的防治.....	90

二、实验分子病毒学

第十一章	疱疹病毒的转化和潜伏感染.....	101
第十二章	EB病毒的基因与抗原.....	105
第十三章	脊髓灰质炎病毒的蛋白处理过程.....	107
第十四章	病毒转录的调节.....	108
第十五章	核酸杂交方法.....	111
第十六章	DNA电镜(EM)技术.....	117
第十七章	流感病毒抗原变异的分子基础.....	127
第十八章	逆转病毒的转化的转化作用.....	141

第二部分

实 验 方 法

一、医学病毒学

实验一：病毒的分离和鉴定.....	151
实验二：病毒检查，细胞病变，空斑形成，血凝试验.....	156
实验三：显微镜和电子显微镜检查.....	169
实验四：干扰素检查.....	179
实验五：单克隆抗体.....	185
实验六：电镜技术与病毒诊断.....	187
实验七：RIA与ELISA检查抗原抗体.....	188

二、实验分子病毒学

实验八：内切酶处理DNA.....	194
实验九：DNA片段电泳.....	195
实验十：DNA片段连接.....	198
实验十一：大肠杆菌转化与质粒DNA.....	199
实验十二：生物标本中DNA的点杂交.....	261
实验十三：DNA转移与DNA-DNA杂交.....	203
实验十四：带有特异DNA插入物的细菌集落的挑选.....	206
实验十五：DNA电泳分析.....	207
实验十六：周血中单核细胞的EBV转化.....	209
实验十七：甲型流感病毒的核酸重组.....	211

第 一 部 分

一、医 学 病 毒 学

美国耶鲁大学医学院和
荣军医学中心病毒实验室 熊菊贞博士

第 一 章 一 般 原 则 和 现 代 进 展

A、绪 言

病毒的定义

病毒的理化性质

病毒的分类

引起培养细胞病变的病毒

B、实验室诊断

分离病毒标本的收集

标本的选择

病毒分离和鉴定的标准方法

病毒感染的血清学诊断

快速诊断新方法

用电镜观察和检测病毒

分子病毒学在病毒诊断中的应用

C、人们对病毒组兴趣的改变

第 二 章 RNA 病 毒

A、小RNA病毒科 肠道病毒和鼻病毒

概 况

病毒的性质

肠道病毒

致病作用

临床表现

治疗

鼻病毒

B、粘病毒科：流感和付流感病毒

概 况

病毒的性质

流感病毒

致病作用

临床表现

实验室诊断

流感病毒疫苗

副流感病毒

致病作用

临床表现

实验室诊断

呼吸道合胞病毒

病毒的特征

致病作用

实验室诊断

疫苗问题

C、呼肠病毒科：呼肠病毒和轮状病毒

概 况

轮状病毒

病毒的特征

致病作用

临床表现

实验室诊断

第 三 章 DNA 病 毒

A、疱疹病毒科

概 况

病毒的特征

单纯疱疹病毒

致病作用

临床表现

实验室诊断

治 疗

水痘——带状疱疹病毒

致病作用

临床表现

实验室诊断

治 疗

巨细胞病毒

致病作用

临床表现

实 验室诊 断

治 疗

EB—B 病毒

小 结

B、腺病毒

概 况

病毒的特征

致病作用

临床表现

实验室诊断

C、乳头多瘤 空泡病毒、疣病毒和SV40

疣病毒

概况

病毒的特征

临床特征和诊断

诊断，流行病学和治疗

猴病毒40

第一章 一般原则和现代进展

A、绪言

病毒的定义

病毒是什么？从功能方面来讲，病毒是一种包裹的基因。从化学方面来讲，病毒是一个以DNA或RNA作为它的遗传物质，以蛋白质作为它的外壳的颗粒。毒粒是病毒颗粒的技术名称。从生物学方面来考虑，病毒是最小的传染因子。

RNA病毒的RNA有的是单股，有的是双链，分子量2~15百万道尔顿，呈线型结构，有的为一个完整分子，有的分为几个片段。

DNA病毒的DNA有的是单股，有的是双股，或不完全双股，呈线型或环状结构，分子量 $2 \sim 200$ 百万道尔顿。

有些病毒的衣壳外面还有一层脂蛋白膜。这种病毒包膜或囊膜是从宿主细胞的核膜或浆膜获得的，它由宿主细胞的脂质和病毒的蛋白组成。图1-1为病毒毒粒的示意图，内含核酸分子（RNA或DNA，而不是两者）即病毒基因所在，外被蛋白外壳，简称核衣壳。有些病毒在核衣壳外还被有一层包膜。

病毒的核酸，或为RNA，或为DNA，它们可能是单股也可能是双股。在无囊膜的毒粒，衣壳保护核酸免于核酸酶的破坏，并促进毒粒吸附到敏感细胞上。衣壳的蛋白单位是由病毒的基因编码的，对于20面体衣壳来说，衣壳的形态和大小决定于它的遗传物质（Protomeres）的特征。对于螺旋衣壳来说，决定于病毒核酸的长度。

包膜由双脂层和具有特殊功能的蛋白组成。膜蛋白有两类，一类为糖蛋白，另一类为基质蛋白（matrix protein）。

毒粒的大小可以通过负染色或超薄切片在电子显微镜下直接测定。然而，通过这种方法得到的大小实际比含水的颗粒小，因为电镜标本需要脱水，因而引起固缩。

病毒的理化性质，见表1-1

表 1-1 感染人的病毒的理化性质

核 类	核衣壳 对称性	毒粒 ^a	大小 (微米)	病毒科	临床实验室 常见的病毒 ^b
RNA (S)	20 面体	N	25-30	小RNA病毒科	脊髓灰质炎病毒 柯萨奇病毒 埃可病毒 鼻病毒
(S)	"	E	30-40	披盖病毒科	乙媒病毒 黄热病毒
"	"	"	60	风疹病毒科	风疹病毒
(D)	"	N	70-80	① 轮状病毒科	轮状病毒
(S)	螺旋对称	E	80-120	粘病毒科	流感病毒
"	"	E	150-300	付粘病毒科	付粘病毒, 腮腺炎病毒
(S)	"	"	"	伪粘病毒科	麻疹病毒 呼吸道合胞病毒 (RSV)
(S)	"	"	60X180	弹状病毒科	狂犬病毒
DNA (D)	20 面体	N	45-55	乳头多瘤病毒科	疣, BK, JC病毒
"	"	N	70-80	腺病毒科	腺病毒
"	"	E	150-200	疱疹病毒科	单纯疱疹病毒 巨细胞病毒 水痘-带状疱疹病毒 EB 病毒
(D)	复杂型	E	230X300	痘病毒科	痘病毒

a E = 有包膜, 对乙醚敏感。 (S) = 单股

N = 裸露, 对乙醚不敏感。 (D) = 双股

b 没有列在本表中的其它病毒是: 冠状病毒, 沙粒病毒和逆转录病毒都是 RNA 病毒, 大小范围为 80-160nm, 有一个螺旋核衣壳, 都有包膜; 微病毒是单股 DNA 病毒, 直径 18-20nm, 核衣壳无包膜。

病毒的分类(图1-2和1-3)

动物病毒有许许多多的分类方法,但是一般同意按理化性质分类,核酸的类型,大小,结构和对化学灭活的敏感性等都是分类的主要特征。

引起培养细胞病变的病毒 (表1-2)

病毒感染后的细胞病变			
病毒	选择的细胞培养系统	细胞病变	包涵体形成
RNA			
—小RNA病毒 (脊灰炎病毒)	MK	迅速变圆或溶解	无
—囊膜病毒 (EBV)	BHK, Vero	同上	无
—风疹病毒	Vero	缓慢变圆和变大	胞浆内
—呼肠病毒	MK or GDE	同上	核周或胞浆内
—粘病毒 (流感病毒)	MK	缓慢变圆	无
(付流感病毒)	MK	偶见合胞细胞或广泛合胞细胞形成	胞浆内
—伪粘病毒 (麻疹)	HEK, HEp-2	广泛的多核细胞化和泡沫(foamy)出现	核内和胞浆内
(呼吸道合胞病毒RS)	HEp-2, A549	广泛的合胞细胞形成	胞浆内
DNA			
—乳多空病毒 (SV40)	GEM	个别细胞广泛的囊泡	核内
—腺病毒	HEp-2, HK	成团和变圆	"
—疱疹病毒	RK, GDE HEp-2	迅速变圆溶解	"
—痘病毒 (牛痘病毒)	RK, HEp-2	多核细胞过度增生灶	胞浆内

病毒感染对细胞的影响决定于病毒的特性和细胞的敏感性。细胞可以不同的方式反映病毒的感染。(1)不出现病变,(2)发生细胞病变和细胞死亡,(3)失去生长控制,如病毒性转化。

在许多情况下,可以出现细胞病变,但无子代病毒合成,而在某些情况下,流产感染可以引起不完全的病毒合成。

许多病毒在细胞内包涵体,这些包涵体是由于毒粒集聚或没有装配的成分集聚在核内或胞浆内,或二者之内。有些包涵体不能检出毒粒或其成分,但可视为病毒增殖的痕迹。

B. 实验室断

分离病毒标本的收集

从临床标本分离病毒成功的关键,在很大程度上依赖于标本的恰当收集和处理。病毒分离的理想材料应在床边收集,并在床边接种,因为许多病毒放置过久即会灭活或失活。此外,这些标本还应尽可能在病程的早期收集(图1~4)。

标本的选择主要决定于临床症状或所怀疑的病毒的性质。由于许多病毒可引起同样的临床症状,因此实际工作时常从一个患者收集多种标本(表1—3)。

1-3 收集和选择标本举例

临床疾病	常伴有的病毒	标本收集
呼吸道疾病	流感 付流感 呼吸道合胞病毒 腺病毒 鼻病毒	洗鼻拭子 喉拭子 痰 急性和恢复期血清
胃肠炎	轮状病毒 Norwalk 因子 腺病毒 肠道病毒	咽拭子 直肠拭子、大便、血
肝炎	甲、乙型肝炎 巨细胞病毒 EB病毒	急性和恢复期血清
皮肤和粘膜疾病	水痘一带状疱疹病毒 单纯疱疹病毒 麻疹、风疹 肠道病毒	皮肤擦拭 疱液或拭子 咽拭子，直肠拭子 急性和恢复期血清
脑膜炎和无菌性脑膜炎	单纯疱疹病毒 囊膜病毒 肠道病毒	脑组织 血和脑脊液 急性和恢复期血清

应当注意，实验室工作人员必须对病史或所怀疑的病毒有所了解，否则要想作出恰当的试验是不可能的。

病毒分离和鉴定的标准方法

细胞培养系统、动物或胚卵接种

虽然有关病毒的培养和鉴定的基本原理与细菌学方法基本相似，由于没有一种细胞培养系统能培养绝大多数或所有的病毒，所以培

图1—5列出了临床病毒实验室从病人标本分离病毒和鉴定病毒常用到的方法和步骤。实验系统的选择，细胞培养或动物接种都根据所怀疑的病毒类型以及病史和临床诊断。然而，一般认为，使用的检查技术越多，发现临床标本传染因子的机会就越大。

悬液或感染的培养液中的病毒可通过各种方法测定。病毒感染性滴度可用细胞病变，空斑形成或包涵体检查等方法测定。悬液中病毒的颗粒数可用电子显微镜来计算。

病毒感染血清学诊断

诊断病毒感染的最常用和最原始的方法是各种血清学试验。在某些不可能从怀疑为病毒感染的病人分离到病毒的情况下，血清学方法常可为某些特殊的临床疾病提供病毒病原学的重要证据。常用的方法有补体结合试验，中和试验和血凝抑制试验以及免疫荧光技术。

快速诊断的新方法

用免疫学方法测定病毒抗原

随着许多新技术和新设备的发展，越来越多的病毒被发现与某些原因不明的疾病有病因关系。病毒学家不再只依赖于实验动物或组织培养的方法了，还可采用其它的病毒诊断方法，如放射免疫法(RIA)和酶联免疫吸附试验(ELISA)等。ELISA试验克服了RIA检测病毒抗原或抗体的某些缺点。ELISA试验的试剂安全，保存时间长，以比色法测得的终点的敏感性为与RIA相当。

用电镜观察和检测病毒

病毒的大小和形态可以通过电镜(EM)直接测定。最常用的技术是用电子密度的磷钨酸盐负染病毒颗粒，或以怀疑含有病毒的细胞或组织作超薄切片进行电镜观察。电子显微镜用来诊断痘病毒和疱疹病毒感染几乎有30年的历史，但是直到现在才被广泛应用。在肝炎病人的血清中几种形态的与肝炎有关的澳大利亚抗原的病毒样颗粒，只

有通过电子显微镜才能作到。最近，从患急性胃肠炎的婴儿的大便标本中，用电镜和免疫电镜观察到轮状病毒。这在临床病毒学上是一个很大的进展。

限制性内切酶的切割分析及其应用

限制性内切酶在特殊的核武酸序列上切割DNA，可产生病毒基因组的一系列DNA片段，再通过凝胶电泳技术将这些片段分开即可获得病毒基因组的特殊“指印”，即所谓基因图谱。这项新技术的发展已用于对疱疹病毒组，特别是单纯疱疹病毒的鉴定和分类。

6. 人们对病毒组兴趣的改变

新技术的发展大大影响人们对某些病毒组的兴趣。兴趣的起伏，研究的动向，和逐年对病毒诊断的要求，可从下面根据医学文献报道的论文篇数所得到的统计曲线（图1—6）看得出来。十分明显，由于60年代初成功地使用了脊髓灰质炎病毒疫苗，减少了脊髓灰质炎的发生率，因而研究脊髓灰质炎的兴趣大大下降。另一方面，流感病毒常发生小流行，甚至大流行，经常引起人们的关注。所以，多年来对这一病毒的兴趣未减是可以理解的。1975—1976年反猪型流感病毒出现，有引起世界性流行的威胁，也许可以说明在这一期间关于流感论文篇数增加的原因。

虽然病毒性肝炎早已看作是一种重要的临床疾病，但是有关肝炎的文献数量一直不多。由于现在有了突破在病人血清中发现乙型肝炎抗原，通过电子显微镜看到病毒颗粒，能够应用放射免疫和其它血清学方法测定乙型肝炎病毒抗原和抗体等，这无疑是对乙型肝炎的兴趣增加的原因。此外，应用电镜和免疫电镜对甲型肝炎病毒的认识，也是引起肝炎文献增多的另一原因。

（总刊论译）

第二章 RNA 病毒

A、小RNA病毒科：肠道病毒和鼻病毒

概 况

小RNA病毒科包括肠道病毒和鼻病毒。命名采用国际病毒分类委员会的名称，小RNA病毒(Picornaviridae)一词中的“Pico”意即根小“rna”即RNA，意指这一组病毒的所有成员都是RNA型(表2-1)。

肠道病毒包括3个型号的脊髓灰质炎病毒，24个型号的柯萨奇A和6个型号的柯萨奇B病毒，以及34个型号的埃可病毒或肠道细胞致病性人孤儿病毒。从68型肠道病毒开始，所有的肠道病毒将按数字命名。人消化道是病毒的天然场所。它们可以从各种疾病的病人，如脊髓灰质炎，无菌性脑炎，心肌炎，心包炎等病人中发现。它们除了引起人类疾病以外，脊髓灰质炎病毒还引起猴子麻痹。柯萨奇病毒对新生小白鼠是高度致病的，但是埃可病毒很少引起实验动物发病。

病毒的特征

在形态学方面，所有的肠道病毒，不论是在感染细胞内或在感染组织内，都是相似的。病毒颗粒小，25~30nm，20面体对称，有32个衣壳子粒和一个单股的RNA核心。本组病毒对PH3.0相当稳定，对乙醚不敏感。在负20℃下可保存几年。

肠道病毒

a、致病作用

本病毒通过口腔途径进入，随着在咽部和肠道淋巴组织复制，引起病毒血症，进而病毒在呼吸(RE)系统增殖，引起第二次病毒血症，最后到达各种靶器官。脊髓灰质炎病毒特别嗜好脊髓前角细胞，在那儿病毒增殖，毁坏细胞，引起麻痹无力。值得特别注意的是，切除扁桃