

FENZI BINGDUXUE YUANLI YU SHIYAN JISHU

# 分子病毒学原理 与实验技术

杜平 戚中田 潘卫 主编

4



第二军医大学出版社

# 分子病毒学原理 与 实验技术

主 编 杜 平 戚中田 潘 卫  
编 者 (按出现先后为序)  
杜 平 王 路 朱分禄  
王 文 潘 欣 曹 洁  
潘 卫 朱诗应 赵 平  
任 浩 胡卫江 戚中田  
学术秘书 潘 欣

第二军医大学出版社

## 内 容 简 介

本书分为理论篇和技术篇。理论篇共 8 章,详细介绍了病毒共性中的不同个性特征,突出了病毒结构特点和生活规律各个环节的横向比较,具有“内容新颖”、“少而精”的特点。技术篇共 12 章,详细介绍了常用的、实用的和最新的一些分子病毒学研究技术。本书可用作各医学院校相关专业的研究生教材和本科生选修课教材,可作为综合性大学、研究院(所)、农林院校等相关学科的教材,亦可作为病毒学、分子生物学、医学及医学防疫系统专业人员的专业参考书。

### 图书在版编目(CIP)数据

分子病毒学原理与实验技术/杜平,戚中田,潘卫主编. —上海:第二军医大学出版社, 2002. 11

ISBN 7-81060-271-3

I. 分... II. ①杜...②戚...③潘... III. 分子生物学:病毒学 IV. Q939.4

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2002)第 078511 号

### 分子病毒学原理与实验技术

主 编 杜 平 戚中田 潘 卫

责任编辑 余 翔

第二军医大学出版社出版发行

(上海翔殷路 818 号 邮政编码:200433)

全国各地新华书店经销

上海长阳印刷厂印刷

开本: 787×1092 1/16 印张: 14.5 字数: 361 千字

2002 年 11 月第 1 版 2002 年 11 月第 1 次印刷

印数: 1~3 000

ISBN 7-81060-271-3/Q·010

定价: 29.00 元

# 前 言

现已发现有 4 000 多种病毒,其中与人类疾病相关的约有 400 种。随着现代分子生物学理论、技术和方法的进步,病毒学早已进入了分子病毒学的时代。不仅病毒学的知识急剧增长,而且产生了许多新的理论和新的概念,深刻地影响着人类对待病毒的行为,包括病毒的控制、预防、改造、生产和使用等。作为医科大学的教师,我们很想将这些病毒学的新知识、新理论和新概念介绍给我们的医学生,尤其是研究生。所遇到的最大的困难,就是要在相对较短的学时内系统、全面、完整地介绍信息量如此巨大的内容。因此,编写一本精练、系统和完整的教科书的需求是非常迫切的。

在国内已有多本专著非常全面、详尽、系统地介绍了病毒学尤其是医学病毒学的这些进展,其中包括侯云德院士主编的《分子病毒学》、闻玉梅院士主编的《现代医学微生物学》、杜平教授主编的《现代临床病毒学》和金奇教授主编的《医学分子病毒学》等。但是,对一个初次系统接触这些内容的大学生或研究生而言,上述的专著用作教材显然是内容太多。由英国 Leicester 大学微生物系教授 Alan J. Cann 编写的《Principles of Molecular Virology》是一本能达到这一目的非常好的教材,该书在国际已被广泛用于有关专业研究生和大学的教学。第二军医大学微生物教研室年轻的教学工作者们,在我国著名病毒学家杜平教授的倡导下,以该书为主要参考书并查阅了大量国内外最新的文献资料,编写了这本《分子病毒学原理与实验技术》。全书共分两篇,上篇为理论篇,共 8 章,从分子生物学角度对病毒的结构和生活的各个侧面进行了详细、全面的介绍。下篇为技术篇,共 12 章,选择了目前分子病毒学研究中一些重要的常用技术、实用技术及新出现的有应用前景的新技术作了系统、全面和深入浅出的介绍。在实践中,我们以此为教材在我校研究生和本科生中开设选修课,取得了较好的效果。

由于本书的编者多为年轻人,知识面和水平有限,难免有许多错误和不当之处,欢迎各位同行和读者批评指正。

本书的出版得到了第二军医大学研究生教材出版基金的资助,在此表示由衷的感谢!

主 编

2002 年 8 月



**杜平**，教授，著名医学病毒学家。早年从事抗病毒研究，现从事癌症的生物治疗和基因治疗研究，发表研究论文120余篇，编著出版《现代临床病毒学》、《实验医用病毒学》、《现代癌症生物治疗学》、《干扰素免疫学》、《癌症的干扰素临床治疗》、《干扰素临床应用》等专著12本。获军内科技进步二等奖4次，获政府特殊津贴奖励，立三等功4次。



**威中田**，教授，博士，博士生导师，第二军医大学微生物学教研室主任，微生物学学科带头人，全军医学微生物学重点实验室主任。在肝炎病毒分子生物学研究方面有较深造诣，先后赴美国、日本从事客座研究，数项研究成果分别获得国家科技进步二等奖、军队科技进步一等奖、国家发明专利各1项。在中外期刊上发表论文120余篇，主编学术专著3本，培养博士和博士后10多名。目前主持国家重点项目等多项课题，在国内外10多个学术组织或刊物兼任学术职务。



**潘卫**，博士。1986年毕业于第二军医大学，现任第二军医大学微生物学教研室副教授、副主任。先后从事过原核增强子、肝炎病毒、噬菌体展示等方面的研究，目前正从事病毒性疾病和肿瘤疾病的基因治疗基础研究、噬菌体靶蛋白随机展示肽库构建及在医学中的应用研究。发表论文60余篇。曾获国家科技进步奖、卫生部医药卫生科技进步奖、军科技进步奖等奖励。

# 目 录

## 上 篇 分子病毒学原理

第1章 引论 .....	(3)
一、病毒是一种独特的生命体 .....	(3)
二、病毒学的起源 .....	(3)
三、宿主系统实验研究 .....	(4)
四、细胞培养技术 .....	(5)
五、血清学或免疫学方法 .....	(6)
六、超级结构研究技术的应用 .....	(6)
七、“分子生物学”的应用 .....	(8)
八、抗病毒治疗的划时代意义 .....	(9)
九、基因医学研究进展 .....	(11)
第2章 病毒体 .....	(13)
一、病毒体的结构和功能 .....	(13)
二、衣壳的对称性和病毒的结构 .....	(13)
三、螺旋对称性衣壳 .....	(14)
四、立体对称性衣壳 .....	(17)
五、复合对称性衣壳 .....	(22)
六、蛋白与核酸的相互作用和基因组包装 .....	(25)
七、病毒受体——识别与结合 .....	(28)
八、病毒衣壳与宿主细胞的其他相互作用 .....	(29)
九、小结 .....	(29)
第3章 基因组 .....	(38)
一、病毒基因组的结构和复杂性 .....	(38)
二、分子遗传学基础 .....	(39)
三、病毒遗传学 .....	(41)
四、“大”DNA基因组 .....	(47)



五、“小”DNA 基因组 .....	(48)
六、正链 RNA 病毒 .....	(51)
七、负链 RNA 病毒 .....	(52)
八、“节段性”及“多部分”病毒基因组 .....	(53)
九、逆转录和基因转座 .....	(55)
十、进化与流行 .....	(60)
十一、小结 .....	(62)
<b>第 4 章 复制</b> .....	(63)
一、病毒复制概述 .....	(63)
二、病毒复制研究的回顾 .....	(64)
三、复制周期 .....	(66)
四、吸附 .....	(66)
五、穿入 .....	(72)
六、脱壳 .....	(73)
七、基因组复制与基因表达 .....	(74)
八、装配 .....	(77)
九、成熟 .....	(79)
十、释放 .....	(80)
十一、小结 .....	(81)
<b>第 5 章 表达</b> .....	(82)
一、遗传信息的表达 .....	(82)
二、基因组编码策略 .....	(82)
三、表达的转录调控 .....	(91)
四、表达的转录后调控 .....	(96)
五、 $\lambda$ 噬菌体的表达调控 .....	(100)
六、小结 .....	(102)
<b>第 6 章 感染</b> .....	(105)
一、植物病毒感染 .....	(105)
二、动物病毒感染的免疫应答 .....	(106)
三、病毒与宿主的相互作用 .....	(112)
四、病毒感染过程 .....	(116)
五、病毒感染的预防与治疗 .....	(118)
六、病毒载体与基因治疗 .....	(120)
七、病毒感染的化疗 .....	(120)
八、病毒感染的基因治疗 .....	(123)
九、小结 .....	(123)
<b>第 7 章 致病机制</b> .....	(125)
一、细胞损伤的机制 .....	(125)
二、病毒和免疫缺陷 .....	(127)

三、病毒相关性疾病·····	(132)
四、病毒介导的细胞转化·····	(133)
五、病毒和癌·····	(139)
六、病毒感染的免疫病理作用·····	(141)
七、新现性和再现性病毒·····	(142)
八、小结·····	(147)
<b>第 8 章 新型感染因子</b> ·····	(148)
一、卫星病毒和类病毒·····	(148)
二、朊粒·····	(150)
三、小结·····	(159)

## 下 篇 分子病毒学实验技术

<b>第 9 章 间接酶联免疫吸附试验</b> ·····	(163)
一、概述·····	(163)
二、间接 ELISA 法检测 HCV 抗体·····	(164)
<b>第 10 章 斑点杂交</b> ·····	(167)
一、概述·····	(167)
二、实验材料与试剂·····	(167)
三、实验步骤·····	(168)
<b>第 11 章 菌落原位杂交</b> ·····	(172)
一、概述·····	(172)
二、实验材料与试剂·····	(172)
三、实验步骤·····	(173)
<b>第 12 章 多聚酶链反应-ELISA 技术</b> ·····	(175)
一、概述·····	(175)
二、实验原理·····	(175)
三、操作步骤·····	(178)
<b>第 13 章 多聚酶链反应-膜杂交技术</b> ·····	(181)
一、概述·····	(181)
二、实验方法·····	(182)
三、结果判定·····	(183)
四、注意事项·····	(183)
五、讨论·····	(184)
<b>第 14 章 DNA 序列测定</b> ·····	(185)
一、概述·····	(185)
二、试剂与仪器·····	(186)
三、测序胶的制备·····	(187)
四、测序样的制备与电泳·····	(188)
五、测序凝胶的放射自显影与序列的读取·····	(189)



<b>第 15 章 生物芯片技术的原理与应用</b> .....	(191)
一、概述.....	(191)
二、基因芯片实验操作.....	(195)
<b>第 16 章 基因治疗重组腺病毒载体的构建</b> .....	(198)
一、概述.....	(198)
二、重组腺病毒基因治疗载体的构建.....	(203)
三、材料和试剂.....	(204)
四、实验步骤.....	(205)
<b>第 17 章 重组腺病毒的包装、收获与扩增</b> .....	(208)
一、概述.....	(208)
二、试剂和器材.....	(209)
三、实验步骤.....	(209)
<b>第 18 章 重组腺病毒的鉴定</b> .....	(212)
一、概述.....	(212)
二、材料与试剂.....	(213)
三、实验步骤.....	(214)
<b>第 19 章 重组腺病毒感染靶细胞及其生物学活性测定</b> .....	(217)
一、概述.....	(217)
二、材料和试剂.....	(217)
三、实验步骤.....	(218)
<b>第 20 章 裸鼠体内基因治疗实验</b> .....	(220)
一、概述.....	(220)
二、材料和试剂.....	(220)
三、实验步骤.....	(220)

# 上 篇

# 分子病毒学原理

---



# 第1章 引 论

病毒与其他生物相比有很多独特的生物学性质,正是因为这些特性才使它们得以在活的生物体内寄生,而了解这些特性是理解病毒与宿主相互作用的关键。病毒与蛋白质、蛋白质与核酸、蛋白质与脂类之间的分子相互作用不仅决定了病毒颗粒的结构,还决定了病毒基因组的合成与表达以及病毒对宿主细胞的影响,这就是分子水平上的病毒学。

## 一、病毒是一种独特的生命体

病毒是专一性活细胞内寄生的亚显微寄生物。这个简明扼要的定义,可以清楚地将病毒与其他高级生物区分开。这里的高级生物是指包括原核生物及诸如藻类、原生动物、真菌等微小真核生物在内的广义微生物。但有少数具有专一性寄生生活周期的原核生物并不属于病毒,它们与病毒相比已有所进化,可在宿主细胞外短期存活,如立克次体、衣原体和胞内寄生菌。因此,有必要对病毒的定义作一些补充。

- 病毒颗粒由前体成分装配而成,而其他专一性细胞寄生生物则以整体形式扩增,并以分裂方式繁殖。

- 病毒颗粒(病毒体)自身不能生长或分裂。

- 病毒缺乏编码代谢过程中能量产生或蛋白质合成(如核糖体)的遗传信息。

已知病毒在生化或遗传学角度上并没有能力合成各种生命活动所必需的物质(例如大分子化合物),这一点使它们必须绝对依赖宿主。常常有人会问到病毒是否具有生命,一个观点认为在宿主细胞内是有生命的,而在细胞外它们只是由代谢化合物组装成的无效装配物。尽管病毒颗粒在细胞外也有化学反应发生(有关此部分内容将在有关章节给予解释),但这决对不是生命体的生长现象。

然而,某些传染因子的生物学特性并不完全符合上面的定义。一些新型病原体的性质很像病毒,被称为类病毒、拟病毒和朊病毒。类病毒是一类很小的环状 RNA 分子(200~400 bp),具有竿状二级结构,没有衣壳和囊膜,跟某些植物疾病有关。它们也是专一性细胞内寄生,复制方式跟病毒很相似。拟病毒被认为是一种病毒的卫星结构,组成似类病毒,但比类病毒大(约1 000 bp),依靠病毒的复制而增殖(因此被叫作“卫星”);它们借助病毒衣壳进行包装。朊病毒通常被认为是由单一蛋白分子组成的一类感染因子,无核酸成分。令人迷惑的是:在正常的非感染性细胞中也发现朊病毒蛋白及其编码基因。这些因子与“慢病毒感染性疾病”关系密切,例如人类 Creutzfeldt-Jakob 病、羊瘙痒病、牛海绵状脑病。第8章将会对这些异常的传染因子做详细阐述。此外,分子遗传学研究揭示5%~10%的真核细胞基因组是由可转移的逆转录病毒样单元(反转录转座子)组成,它们对构成复杂的基因组有重要作用(见第3章)。此外,某些噬菌体基因组不仅结构跟细菌质粒很相似,并且复制方式也很相近。事实上,最近研究表明病毒与其他生物间的关系比想象中要复杂。

## 二、病毒学的起源

史前时期人们就认识到了病毒的危害,并且对某些疾病的起因和预防有一定的研究。关于病毒感染最早的文字记录大约是公元前1400年以前埃及首都孟菲斯的象形文字,描述了一

名教堂神父典型的脊髓灰质炎症状。另外,开罗博物馆至今保存着公元前 1196 年死于天花的 Ramsas 五世法老的木乃伊,目前正将其脸上的脓疱损害与现代患者病损作比较研究。

中国于公元前 1000 年发生天花大流行,人痘接种技术由此得以发展。人们发现天花的幸存者可免受再次感染,因此开始通过吸入天花病损部位的结痂来预防天花,后经改进,采取前臂接种天花脓汁的方法来预防。这种接种方法沿用了几个世纪,有效但也存在一定危险。Edward Jenner 7 岁时几乎死于人痘接种,这次经历促使他去寻找其他更为安全的预防方法。1796 年 5 月 14 日,他用从一位名叫 Sarab Nemes 的挤奶女工手上得到了一份牛痘感染物,用它成功地为一位 8 岁男童(James Phipps)做了预防接种。尽管开始阶段对这个方法有所争议,但在 19 世纪在世界范围内广泛应用。

这个早期的成就,虽然是人类在科学观察和推理上取得的巨大胜利,但它还缺乏对传染因子本质的真正理解。对传染因子的真正认识和理解,要从荷兰商人 Antony van Leewenhoek (1632~1723)发明第一台简单显微镜开始,由此人类第 1 次观察到被称为“微小动物”的细菌。直至 19 世纪 80 年代 Robert Koch 和 Louis Pasteur 共同提出疾病的病菌学说,才使人们真正认识到这些微小生物的重要性。Koch 总结了被称为“Koch 法则”的 4 个规律,至今仍被普遍认为是鉴定一种致病因子的标准,它们是:①在特殊疾病中能发现同一种病原体;②能从特殊疾病中分离出病原体的纯培养;③接种至敏感动物能引起相同的疾病;④能从实验动物再获得病原体的纯培养。

随后,Pasteur 深入地研究了狂犬病并认为此病是由病毒(virus 来自拉丁语“poison”)所引起,但他未能将细菌与其他致病因子区分开。1892 年,俄国植物学家 Dimitry Iwanowski 发现害病烟草植物的提取物经过滤菌器后仍能感染其他植物,可惜当时没有意识到这个结果的重大意义。6 年后 Martinus Beijerinck 证实了 Iwanowski 的发现,并对其作了深入研究。他将这种病原体称为“可溶性活菌”。同年 Freudrich Loeffler 和 Paul Frosch 发现了导致牛口蹄疫的致病因子,但当时只认识到该因子可使动物和植物致病,还未意识到它与人类疾病亦有关。直到 1909 年,Karl Landsteiner 和 Popper E 发现了一种“可滤过病原体”可引起人类脊髓灰质炎,这是第一种被认为由病毒引起的人类疾病。

感染细菌的病毒是由 Frederick Teort 和 Felix d'Herelle 分别于 1915 年和 1917 年发现,并由 Felix d'Herelle 命名为细菌噬菌体。在 20 世纪 30 年代以及随后的几十年中,病毒学先驱 Luria SE 和 Delbruck M 等以这种病毒为模型对病毒学的各个方面进行了研究,包括病毒结构、病毒遗传学、病毒复制等等。这些研究对我们认识所有的病毒非常重要,包括那些难以传代和研究的人类病毒。同时病毒学史也是实验手段和体系的发展史,促进了病毒检验技术和生物学新领域(包括病毒生物学及宿主细胞生物学)研究的发展。

### 三、宿主系统实验研究

Louis Pasteur 自 1881 年开始研究动物狂犬病,并利用新的方法从实验室感染的家兔脊髓中分离到病毒减毒株。将其接种于其他动物,可防止病毒感染。当时这是人类接种史上(包括古代人痘接种和 Jenner 的牛痘接种)第一个人工病毒疫苗。自从 Iwanowski 发现烟草花叶病毒以来,人们用病毒标本接种几乎所有植物,以研究其感染后的影响。

在 19 世纪美国和西班牙的战争中以及随后的巴拿马运河的建造中,很多美国人死于黄热病,随后这种病慢慢向北传播到美国大陆。1900 年,Walte Reed 通过小鼠实验证实了黄热病是由病毒引起,并且通过蚊子传播。在此基础上,Max Theiler 于 1937 年通过鸡胚培养得到减

毒疫苗-17D株,并且沿用至今。

这项突破促使许多研究人员建立致病病毒的动物宿主模型,以鉴定和扩增病毒。真核细胞可在体外(组织培养基)生长,病毒也在这些培养物中繁殖。但这些技术代价昂贵,要求极高。一些病毒必须培养在活的鸡胚组织中,例如流感病毒。流感病毒鸡胚适应株在鸡胚中可得到很好繁殖并获得高效价的病毒。20世纪初的几十年中采用鸡胚做病毒培养,对于分离和培养多种病毒都有效,尤其是流感病毒和各种痘病毒(如牛痘病毒)。鸡胚尿囊膜病毒空斑计数是最早的病毒定量试验。

动物宿主系统对病毒学研究的用途体现在:①可以获得不能通过体外培养增殖的病毒,如HBV;②研究病毒感染的致病机制,如柯萨奇病毒;③检验疫苗的安全性,如口服脊髓灰质炎病毒疫苗。

然而,动物宿主系统现已逐渐不被使用,原因主要是:①感染动物的饲养成本高昂;②动物体系复杂,有时难以进行结果判断;③存在宿主变异,实验结果重复性不佳;④不必要或不经济地使用动物,违背道德标准;⑤现代的细胞培养和分子生物学有望将其取代。

各种植物宿主系统的运用并没有像动物那样引起道德上的反对。尽管这种系统有时得出结果很慢,并且培养费用昂贵,但在植物病毒的研究方面意义重大。

近几年,一些全新技术已经应用于研究病毒对宿主影响,其中包括转基因动物和转基因植物技术的发明,即:把病毒全部或部分基因插入目的细胞DNA中,使病毒的mRNA和蛋白质在宿主体细胞(有时在生殖细胞)内表达。因此,可以逐个或以各种组合方式研究病毒蛋白的致病机制。SCID-hu小鼠是移植了人类组织的免疫缺陷品系,它是研究HIV致病性较理想的工具,而其他动物模型在研究该病毒的体内致病特征方面均不理想。虽然这些技术也引起道德上的反对,但它们是研究病毒致病性极为有用的新工具。越来越多的动植物病毒基因就是通过这种方法得以分析,但有些结果往往很难如愿,很多情况下转基因的结果和实验感染的结果并不一致。然而,随着更多技术难点的解决,转基因体系无疑将得以广泛的应用。

#### 四、细胞培养技术

20世纪初,细胞培养技术是从整块组织的培养开始,随后发展到单个细胞的培养,既包括原代细胞培养(从实验动物或患者身上取得体细胞在培养基中短期存活),也包括那些在适宜环境下能无限生长传代的建株细胞。

Enders JF及其同事于1949年成功地在人原代细胞中培养了脊髓灰质炎病毒,这标志着“病毒学黄金时代”的开始。在随后的一二十年里分离、鉴定和明确许多病毒及其与疾病的关系,包括肠道病毒和呼吸道病毒(如腺病毒)。随着流行性病毒的分离,我们认识到病毒的亚临床感染非常普遍,例如:脊髓灰质炎病毒强毒株大流行时,大约100个亚临床感染者中才有一个麻痹患者。

1952年,Renato Dulbecco第1次通过空斑测定法给动物病毒作精确定量。他们用稀释的病毒去感染培养在软琼脂上(可限制病毒扩散)的单层细胞,结果造成局灶性细胞杀伤,经染色后出现空斑,通过计算空斑个数可以确定培养皿中感染病毒颗粒的数目。这项技术使真核病毒复制的研究得以快速发展,并可用于病毒的克隆,即从混合病毒中分离提纯病毒。斑点测定技术已很大程度上取代了以前的终点稀释技术,比如TCID<sub>50</sub>(组织培养感染剂量,tissue culture infectious dose)测定,它是用统计学的方法测定病毒数目。然而在某些情况下仍应用终点技术,比如那些不能在培养基里繁殖的病毒,或那些不会使细胞病变产生斑点的病毒如HIV。

### 五、血清学或免疫学方法

20 世纪初随着病毒学的出现,免疫学诊断技术也得以发展。近年来分子生物学的发展使这两门学科的联系日益紧密,这对于了解病毒感染的免疫机制非常重要。最近免疫系统自身的致病作用已被人们所认识,免疫学作为一门学科为病毒学提供了很多经典的研究技术。

1941 年,George Hirst 通过研究流感病毒发现了病毒的血凝现象。实践证明这一发现不仅对流感病毒的研究具有重要意义,而且对其他病毒(如风疹病毒)亦具有重要作用。具体表现在可以测定标本中病毒的效价(相对数量)及确定其抗原类型。当标本中存在可中和病毒血凝素的抗体时,病毒的血凝作用就会受到抑制。将稀释后的抗血清与一定的血凝单位混合,可以测定抗血清的效价和特异性。同样,用已知的特异性抗血清去抑制血凝,可以确定出未知病毒的抗原类型。20 世纪 60 年代起,出现了许多改良的病毒检测方法,如:①补体结合实验;②放射免疫分析;③免疫荧光(在感染的细胞和组织中直接测定病毒抗原);④酶联免疫分析(ELISA);⑤放射免疫沉淀;⑥Western 印迹检测。这些技术灵敏、快速,且可定量。

Kohler 和 Milstein 于 1975 年第一次从体外培养的细胞克隆中分离到单克隆抗体,它可以特异性与特定抗原结合。这项技术不仅使病毒学家可以研究整个病毒体,而且能进一步研究单个病毒抗原的特定区域——抗原表位。近年来,它使我们对特定病毒蛋白的功能理解更加深刻。同时单克隆抗体技术也越来越广泛地应用于其他血清学检测(如 ELISA),使它们的灵敏度、特异性和可重复性得以提高。

### 六、超级结构研究技术的应用

超级结构研究涉及到 3 个领域:物理方法、化学方法和电子显微镜技术。物理法测量病毒颗粒始于 20 世纪 30 年代,主要测定病毒通过不同孔径胶质膜的能力。通过这种方法第 1 次估算了病毒颗粒的大小。20 世纪 60 年代的超速离心技术,使得病毒颗粒的测量精确性大为提高。超速离心对获得高浓度纯化的不同病毒颗粒极为有用,获得的样品没有宿主细胞成分的污染,可直接用于化学分析。通过测定病毒颗粒在蔗糖或氯化铯溶液中的相对密度,揭示了其中核酸和蛋白所占的比例。病毒的物理特性可以通过光谱进行测量,主要包括用紫外线检测核酸组分、可见光测定其光散射性。凝胶电泳在分析不同病毒蛋白以及基因组方面非常有用。然而,在阐明病毒结构的方法中最重要的是用 X 射线衍射方法测定纯病毒的晶体结构。这项技术使得病毒体结构的测定达到了原子水平。

一些典型病毒完整结构的测定,已精确到几埃( $\text{\AA}$ ,  $1 \text{\AA} = 10^{-10} \text{m}$ )(详见第 2 章),这使我们对病毒颗粒功能的理解更加深化。然而,由于这种高性能技术中存在着一些先天缺憾,使得有些病毒不能用这种方法进行研究。一个问题是要求病毒必须得到高度纯化,否则不能获得精确信息。其先决条件是:①可从感染组织或患者以及体外培养中获得足够量的病毒;②有方法获得高纯度的病毒颗粒并保证其完整性。在一些重要的研究项目中,这项要求极为严格(如 HCV)。纯化的病毒必须还能够形成足够大的酞晶点阵,以保证能引起明显的射线衍射。一些病毒(尤其是一些植物病毒)形成的单纯晶体大到肉眼可见,容易形成强烈的衍射,例如烟草花叶病毒(TMV)(由 Stanley WM 于 1935 年首次结晶)和芜菁黄病毒(TYMV),它们的结构于 20 世纪 50 年代被测出。具有重要意义的是:这两个病毒代表了病毒颗粒的两个基本形态,即螺旋对称(TMV)和复合对称(TYMV)。然而多数病毒只能制备得到微晶体,使用更强的射线源有助于这个问题的解决。产生强射线束的大功率同步加速器在这项研究中得以广泛应用,它可以从微晶体中收集到必要的信息。但是,这种强力方式并不能解决所有问题,一些重



要的病毒并不能够形成晶体状结构,尤其是那些形状不规则病毒。那些带有外层脂质膜的病毒(如 HIV),到目前为止还不能完全测得其原子结构。对基本衍射技术的修整(如膜相关蛋白点阵的电子散射及低温电子显微镜)有望将来获得更多的信息,但这并不意味着这个问题可以得以完全解决。还有一个问题,一些很大的病毒(如痘病毒)含有几百种蛋白,目前难以用这些技术来分析其复杂的结构。

核磁共振(NMR)越来越多地用于测定所有分子的原子结构,包括蛋白和核酸。它的局限性在于只可以对相对较小的分子进行测定,而对大分子信号易混淆,目前的技术还不可能将其加以鉴别。目前,用这种技术对所测病毒分子相对分子质量的上限是 30 000~40 000,明显低于最小的病毒颗粒。这种方法将来可能很有应用价值,即使不能用于完整的病毒颗粒,也可以对分离的病毒蛋白进行测定。

化学研究不仅能够用于测定病毒的全部组成和构成其基因组的核酸性质,而且可以阐明病毒颗粒的构建过程以及衣壳蛋白之间的组成关系。改变 pH 值或加入诸如尿素、酚和去垢剂等蛋白变性剂可以逐渐降解病毒颗粒,许多有关病毒结构的经典研究都是建立在此基础上,通过一些相对简单的方法获得有价值的信息。例如,当尿素逐渐加入纯化的腺病毒颗粒中后,蛋白将按装配信息有顺序、逐渐地降解下来,从而揭示了病毒颗粒的装配过程信息。对 TMV 衣壳组成的研究,是通过检测不同条件下衣壳蛋白的复性方式进行的(图 1-1)。通过对病毒衣壳的变性研究,可以揭示衣壳蛋白间的稳定构成方式。靠静电引力连接的蛋白可以用盐溶液或改变 pH 值进行洗脱;靠非离子键和疏水键连接的蛋白,可以被尿素类试剂洗脱;靠脂质连接的蛋白则可能被非离子去垢剂或有机溶剂洗脱。

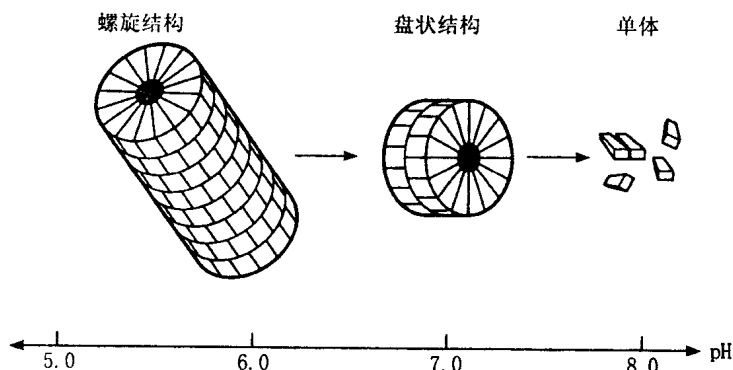


图 1-1 病毒体的结构和稳定性可通过逐渐变性及复性进行检测

在特定的离子强度下,纯化的烟草花叶病毒(TMV)蛋白衣壳可根据溶液的 pH 值自动装配成不同结构。当 pH 大约为 6.0 时,该颗粒可形成近似于感染性病毒颗粒的螺旋状结构;当 pH 升高至 7.0 时,则形成盘状结构;当 pH 值更高时,衣壳蛋白单体不能装配成复杂的结构

除基本结构外,进一步变性可以检测病毒颗粒表面抗原表位的改变或缺失,并可绘制出病毒颗粒的生理状态图。暴露在病毒表面的蛋白,可以被多种物质标记(如碘),从而揭示蛋白在病毒体的分布。一些交联剂(如补骨脂素或带有特定长度侧臂的合成剂)已被用于测定病毒内部蛋白与核酸的空间关系。

从 20 世纪 30 年代发展起来的电子显微镜技术,克服了光学显微镜本身固有的限制,这种

限制是在可见光的波长范围内不能分辨单个病毒颗粒。TMV 的第 1 张电镜图谱于 1939 年发表,随后几年技术得以发展,在 10 000 倍的放大倍率下,可以直接观察病毒。电镜有两种基本类型,即透射电镜(TEM)和扫描电镜(SEM)。尽管 SEM 可以提供美观的三维图像,但对病毒结构的研究来说,TEM 更高的放大倍率会更有用途。病毒电镜可以提供给我们两种主要信息:样品中病毒颗粒的绝对量(病毒总数)以及病毒体的外观和结构。电镜观察是病毒检测和诊断的一种快速方法,但也可能为我们提供一些误导信息。许多细胞成分(如核糖体)与病毒样颗粒非常相似,这在粗制品中尤其明显。这个问题可以通过用抗血清特异结合特定病毒抗原来解决,前者连接了电子密度标志物(如含铁蛋白和胶体金)。这种被叫做免疫电镜的高度特异检测方法,已成熟地应用于病毒的诊断。

近年来,随着电镜技术的发展,已能够对以往不能用 X 射线测定的脆弱病毒进行研究。这包括:①冰冻电镜:病毒颗粒标本保存在低温状态,并将其包被在透明冰层中检测;②低辐射电镜:可以减少电子对样本的破坏性轰击;③复杂图像分析和图像重建技术:可以将那些单独难以判断的图像进行综合,以形成精确的三维图像。传统的电镜可以对低至 $(50\sim 70)\times 10^{-10}$  m 的结构进行测定[典型的原子直径是 $(2\sim 3)\times 10^{-10}$  m,一个蛋白的  $\alpha$  螺旋是 $10\times 10^{-10}$  m, DNA 双螺旋为 $20\times 10^{-10}$  m]。应用更新的技术,其分辨率可望达 $(25\sim 30)\times 10^{-10}$  m。

在 20 世纪 50 年代晚期,Brenner 和 Horne 及其他同事建立了一些尖端技术,可以通过电镜揭示病毒颗粒的结构细节。其中最有价值的技术是利用电子密度染色(如磷钨酸或二氧铀磷酸盐)对病毒颗粒进行负染,染料中的金属离子可以透过病毒衣壳蛋白间的狭窄缝隙来揭示颗粒的精细结构。应用这些数据,Francis Crick 和 James Watson(1956)第 1 次揭示了病毒衣壳是由大量的蛋白亚单位组成,以螺旋形式或二十面体对称形式排列。1962 年,Caspar 和 Klug 对这一发现做了进一步研究,并阐明了这些对称的基本规则,即允许重复的启动子按半平衡原则(quasi-equivalence)装配形成病毒衣壳。这种理论和实际的结合,使我们当前对病毒颗粒结构有了恰当理解。

### 七、“分子生物学”的应用

上面所提的所有研究技术就其本身含义来讲都属于“分子生物学”范畴。然而,在过去的 20 年中“分子生物学”(“基因工程”或“基因操作”)这一概念有了新的含义。这些体外(即活细胞或组织外)核酸实验技术虽然没有创造出新法则,但却是对过去 50 年生物化学和细胞生物学早期成果的重大突破。这一新技术使病毒学的研究发生了变革:研究的焦点由病毒颗粒转移到基因组上。

病毒感染很久以来就应用于研究“正常”(非感染)细胞的功能,如大分子的合成。应用噬菌体研究细菌的遗传性以及通过对真核细胞病毒的研究,揭示了高等生物细胞生物学和基因组构成的基本信息。在 1970 年,John Kate 首先发现了牛痘病毒 mRNA 的 3' 端具有 polyA 尾;同年 Howard Temin 和 David Baltimore 联合发现了反转录病毒感染细胞中的反转录酶。这就推翻了生物界所谓的“中心法则”,即只存在由 DNA 到 RNA 再到蛋白质这一种信息通路。这一发现同时也揭示了真核基因组的可塑性。随着反转录酶得以纯化,使得 cDNA 克隆发展起来,从而大大加速了对 RNA 病毒的研究。1977 年 Philip Sharp 发现腺病毒 mRNA 中的插入片段可以被切除,提示病毒与细胞基因组之间存在着一定的相似性。

至少这种新技术使研究重点由蛋白质转到核酸。随着这项技术的发展,测定病毒全基因组的核酸序列已成为可能。自 20 世纪 70 年代至今,从最小的噬菌体到最大的病毒(包括肝炎