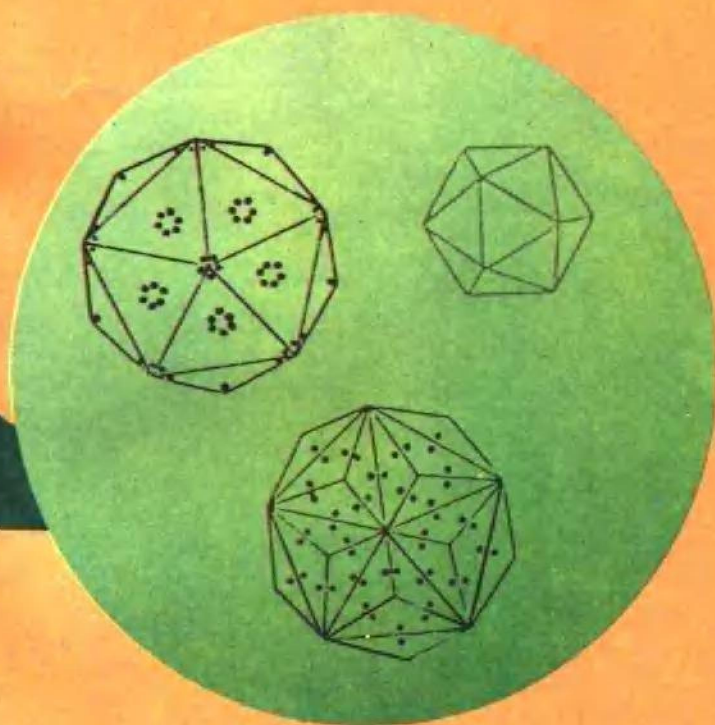


XIANDAI BINGDUXUE DAOLUN

现代病毒学导论

● 项伯衡 编著



中央广

出版社

现代病毒学导论

项伯衡 编著

中央广播电视大学出版社

(京) 新登字 163 号

图书在版编目(CIP)数据

现代病毒学导论 / 项伯衡编著. — 北京: 中央广播电视大学出版社, 1995.9

ISBN 7-304-01197-1

I. 现… II. 项… III. 病毒学-师范学校: 高等学校-教材 IV. Q93

中国版本图书馆CIP数据核字 (95) 第18000号

现代病毒学导论

项伯衡 编著

中央广播电视大学出版社出版

社址: 北京市复兴门内大街 160 号 邮编: 100031

北京密云胶印厂印刷 新华书店北京发行所发行

开本 850×1168 1/32 印张 5.5 千字 130

1995 年 6 月第 1 版 1995 年 9 月第 1 次印刷

印数 1 - 1,000

定价: 7.00 元

ISBN 7-304-01197-1/Q · 18

前 言

编写本书的初衷是想为在高等师范院校生物系开设病毒学选修课之用。

近几年在参与审查中学生物学教材的过程中感到，教材内容要与现代生物学的发展相适应。要解决好这个问题，中学生物教师的继续教育也是一个很重要的问题。这本书的内容如能给他们一点帮助，那将是我最大的荣幸。我希望能有更多的人参与这项工作，并能得到有关部门的支持。

病毒学是一门发展迅速的学科，书中的错误和不当之处在所难免，望给予批评指正。

项伯衡

1994. 12

目 录

第一章 病毒的本质	(1)
病毒的分析	(2)
病毒的繁殖	(3)
在侵染细胞中大分子的合成	(9)
潜伏病毒、卫星病毒、不完全病毒、类病毒和似病毒粒子	(12)
Baltimore 分类系统	(19)
第二章 病毒的结构	(22)
病毒的亚单位结构	(22)
丝状病毒结构	(23)
球状病毒结构	(24)
有被膜病毒结构	(28)
有头尾的病毒结构	(29)
第三章 病毒的核酸	(30)
病毒的 DNA	(32)
病毒的 RNA	(37)
第四章 病毒的吸附和侵入	(40)
噬菌体对细胞壁的吸附	(40)
动物病毒的吸附	(41)
第五章 病毒 DNA 的复制与 RNA 合成	(45)
病毒 DNA 的复制	(45)
环形 DNA 的复制	(49)
RNA 病毒的 RNA 合成	(51)
第六章 病毒基因表达的调节	(61)

DNA 噬菌体的调节	(61)
RNA 噬菌体的调节	(66)
动物病毒的调节	(70)
第七章 病毒的组装	(80)
烟草花叶病毒的组装	(80)
球形植物病毒和细菌病毒的组装	(83)
第八章 溶原	(94)
λ 噬菌体	(95)
λ DNA 的整合	(97)
其它温和的噬菌体	(109)
第九章 病毒和宿主的关系	(116)
病毒与培养细胞之间的关系	(116)
病毒和宿主的相互作用	(120)
病毒与肿瘤	(126)
第十章 免疫系统和干扰素	(129)
免疫系统	(129)
干扰素	(131)
第十一章 主要的病毒类群	(137)
在脊椎动物和其它宿主中繁殖的病毒	(137)
仅在脊椎动物里繁殖的病毒	(143)
仅在无脊椎动物里繁殖的病毒	(148)
仅在植物里繁殖的病毒	(149)
仅在细菌里繁殖的病毒	(153)
第十二章 如何研究动物病毒	(156)
病毒的培养	(156)
病毒的提纯	(164)

第一章 病毒的本质

在上世纪末，提出了疾病的细菌理论。病理学家们确信，每一种传染病菌都将借助于显微镜看到它并且能找到它，经培养基培养后，使用细菌滤器能够获得该病原体。有少数病原体需要复杂的营养，不能在体外培养，但是它们能满足前面提到的两个标准。但是在几年之后的1892年伊万诺夫斯基指出，烟草花叶病的致病因子能通过不透细菌的滤器，而且在显微镜下看不到，也不能进行培养。当时伊万诺夫斯基的发现仍然不能令人信服。1898年贝捷林克（Beijerinck）令人信服的重复了该实验，证实存在一种新的侵染因子。同年Loeffler和Frosch在研究口蹄疫时得到了同样结论。因为口蹄疫能够从一个动物传染到另一个动物，致病因子能够繁殖，在培育时具有很高的稀释度，因此它不是细菌毒素。1908年Ellerman和Bong发现鸡白血病可通过细胞传染。1911年Rous发现鸡的肿瘤致病因子通过细胞滤器能够造成传染，这是首次指出病毒能造成癌的报告。

1915年Twort企图在琼脂平板上培育天花致病因子，但是仅在平板上长出了污染的小球菌。当继续延长培养时，一些菌落变得透明了，而且一旦在细菌上发生，一些受影响的菌落也不能进行再培养。即便把透明样的物质先通过非常细的过滤器，再把它加到正常的菌落中也同样发生类似的现象。

Twort提出存在细菌病毒或潜藏在细菌里有一种酶，致使产生这种现象。

1917年d'He'relle在痢疾杆菌中发现了类似的现象，同时注

意到在纯的痢疾杆菌肉汤培养物中加入粪渣过滤液，看到了培养物的裂解。他立即认识到，存在细菌病毒，因为只有在活细菌存在的情况下，这种病毒才具有复制能力，他称这种病毒为噬菌体。这样第一次确定了一个新的因子——病毒的存在。它在显微镜下看不到，最重要的是能透过细菌滤器。

病毒的分析

d' He' relle 的发现导致了两个重要技术的出现。第一是细菌病毒的分离技术，这项技术在现代病毒学的研究中特别有价值，因为可以用具有放射性的前躯体来标记细菌的液体培养基的成分，通过细菌的裂解，把细菌病毒的原种分离出来。第二项技术是对这些不可见因子的分析方法。其中一种方法是培养大量相同的敏感细菌，然后用包含病毒的液体标本进行接种，假若标本的稀释度太高，便没有一个细菌被裂解，若在中等的稀释度情况下接种，由于不是所有的细菌都能接受一个病毒粒子，因此也不是所有的细菌都被裂解，这就是进行分析的基础。

d' He' rele 发现在细菌菌苔上形成的噬菌斑的数目与加入的噬菌体裂解物的稀释度呈反比关系，这样包含病毒的溶液滴度便很容易地以噬菌斑形成单位 (P. f. u) 被确定出来。但这种方法在分析动物病毒和植物病毒时不适宜。

1929 年 Holman 改进了噬菌斑分析法，他发现用烟草花叶病毒接种在烟草 (Nicotiana) 的叶子，产生可数的坏死损伤，并且局部的损伤取决于接种的病毒数目，而且同一个叶子相对的一半，几乎得到相同数目的损伤。这个发现使得在同一个叶子相对的一半上分别接种两个包含病毒的样本，就可以比较它们的稀释度。

1952 年 Duloecco 发明了适宜分析动物病毒的噬菌斑分析法，极大地促进了动物病毒学的发展。这种方法是将适合的动物组织

经胰蛋白酶将细胞分离开，制成细胞悬浮液，放置在培养器或其它培养容器里培养，细胞附着在玻璃表面上生长，直到形成单层细胞。然后通过所谓细胞连接抑制，使其生长停止。移开营养液中的细胞，并加入适宜稀释度的病毒，在培养一个短时期之后，病毒粒子便吸附在细胞上，再把营养琼脂复盖在细胞上，保温 24 小时到 24 天，在琼脂上加入中性红和其它染料，对细胞进行染色。这时活的细胞被染色而死的细胞却不能着色，因此在染色细胞的一层中看到没有染色的圆形斑。

病毒的繁殖

尽管分析病毒的方法有了发展，但病毒的性质仍然是一个谜。d' He' relle 确信噬菌体是在细菌的里面繁殖的，而且是在寄主细胞裂解之后释放出来的。1939 年 Ellis 和 Delbruck 的一步生长试验提供了对这个假设的令人信服的支持。该试验首先制备噬菌体，然后与细菌悬浮液混合，待使噬菌体吸附几分钟之后，将该培养物稀释 50 倍，以终止进一步的吸附，便获得图 1-1 所看到的结果。

从图中可看到，在 30 分钟的潜伏期中，噬菌体的数目没有增加，而后形成噬菌斑的数目突然增加了 70 倍。生长曲线所描述的是定期间隔取样所测到的噬菌体粒子的数目，它是很多抽样的平均值。

这项研究并没有平息有关噬菌体生产和培养物裂解之间关系的争论。有人认为培养物的裂解是噬菌体诱导细菌内生的裂解酶作用的结果。也有人认为噬菌体能自由出入细菌细胞，细菌裂解是继发现象，与噬菌体的生长没有必然联系。

Delbruck 围绕这些问题又进行了深入的研究，研究结果表明，细菌的裂解有两种情况：一种是当噬菌体的数目很少，侵染率很低时，噬菌体的侵染、复制和裂解细胞是在细菌内部进行的。另

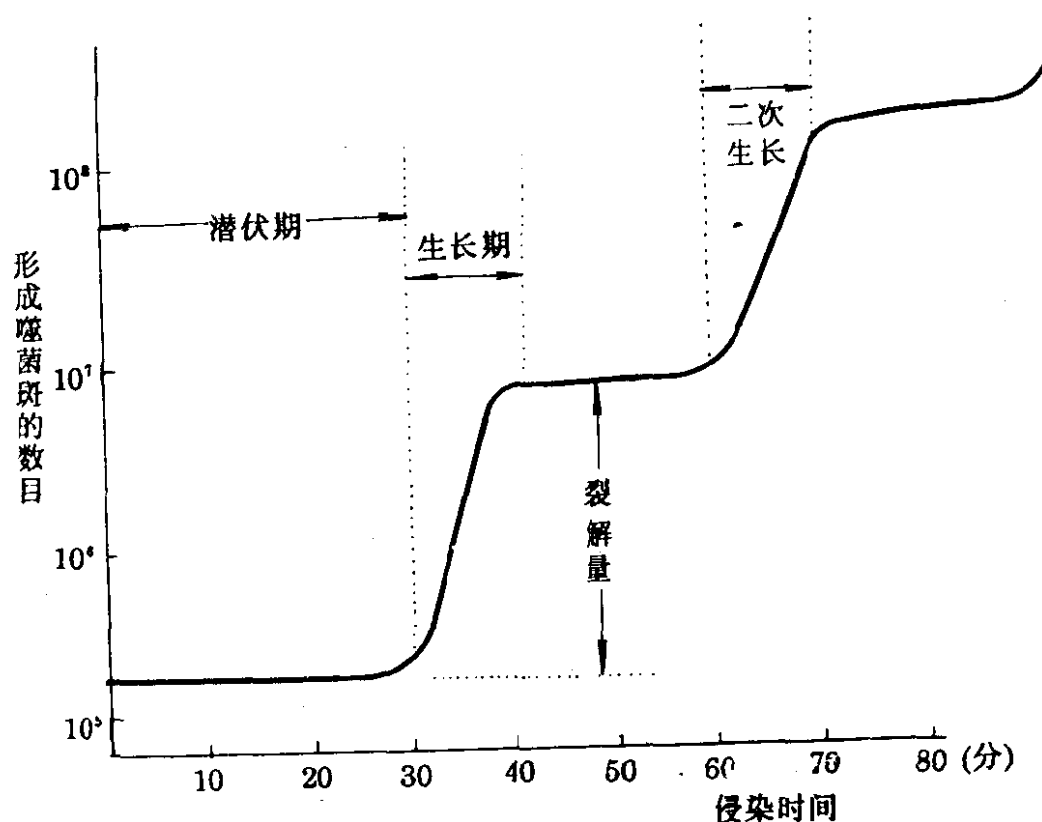


图 1-1 噬菌体在侵染敏感细菌后的繁殖曲线

一种情况是噬菌体的数目远远多于细菌，细菌被裂解，但噬菌体的滴度并没有增加反而降低，这是因为噬菌体在细菌外面大量吸附，由于细胞壁脆弱而造成的。Delbruck 的结论结束了这场争论。

尽管一次生产曲线证实了细菌病毒在敏感的细胞里繁殖的性质和动力学，但并没有指出噬菌体在细胞里形成的全部过程。1952 年 Dormann 使用噬菌体从外面裂解的技术，利用 T4 噬菌体侵染 E. Coli 对生长曲线进行了研究，得出了图 1-2 的结果，这项研究是测定 T4 在细菌里面的数目增加的情况。

从曲线可以看出，侵染之后紧接着是个潜伏期，测不出噬菌体，随之噬菌体斑的单位不断增加直到发生裂解。噬菌体出现的动力学不是指数曲线而是线性的，说明噬菌体不是靠二分裂进行

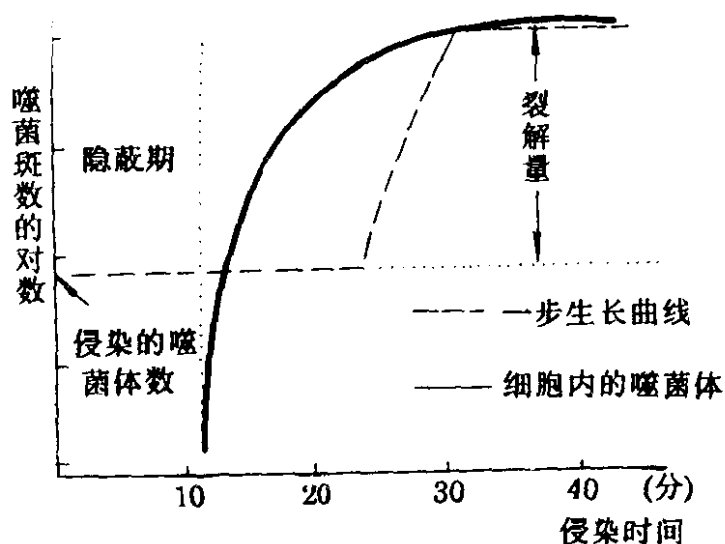


图 1-2 噬菌体在侵染敏感细菌后，在细胞内的发育生长曲线

繁殖而是通过组成成分进行组装。

病毒的化学成分

1933 年 Schlessinger 使用差速离心，第一次提纯了病毒。这项技术广泛地被植物病毒学家所采用。它是由几个循环的高速和低速离心所组成，低速离心使寄主细胞碎片形成小球，高速离心使病毒形成小球。提纯的噬菌体的化学成分分析表明，它是由近似相同比例的蛋白质和脱氧核糖核酸组成。几年之后于 1935 年 Stanleg 分离了烟草花叶病毒类晶体形式，这种具有生物活性物质的结晶，引起了关于生命性质的哲学争论。1937 年 Bawden 和 Pirie 提纯了烟草花叶病毒并指出它是包含 RNA 的核蛋白。

病毒核酸的重要性

提纯的病毒表明它仅是由蛋白质和核酸组成，那时对遗传物质还不清楚。1949 年 Markham 和 Smith 发现制备芜菁黄花叶病毒有两种类型的球型颗粒，其中只有一种包含有核酸，值得注意的是，仅有包含核酸的颗粒才具有侵染性。

几年之后，Hersheg 和 Chase 于 1952 年证实了病毒的蛋白质

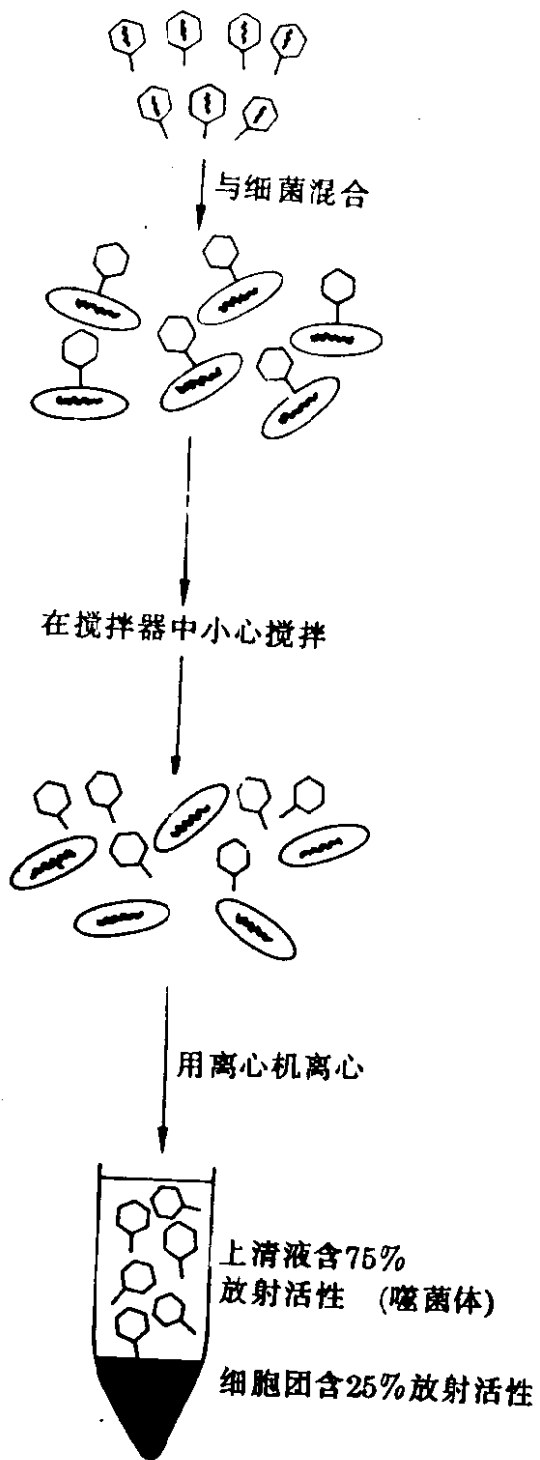
和核酸各自的功能。他用 ^{35}S 做为硫酸盐的成分,以 ^{32}P 做为磷酸盐的成分来培养大肠杆菌 E·Coli,从而将大肠杆菌的蛋白质和核酸进行了标记。再用该菌培养噬菌体 T2。使得标记的噬菌体吸附在敏感的寄主细胞上,然后经过搅拌的力量,去掉任何附在细胞外面的噬菌体成分,但是不影响寄主细胞的生存。当把培养基中的细胞移去之后发现,75%的 ^{35}S 即噬菌体蛋白质的部分,通过搅拌被留下了,而 ^{32}P 即噬菌体的 DNA 仅有 15%被留下了。如图 1-3 所示。

通过这项研究表明,噬菌体的蛋白质在侵染之后没有进一步的作用。而携带遗传信息的是 DNA。另外说明仅靠 DNA 本身不能正常侵染细胞,在侵染时,DNA 从蛋白质外壳中被释放出来,这也表明了病毒在细胞内早期的发育状态。

1957 年 Fraenkel-Conrat 和 Singer 做了一个非常出色的试验,进一步证实了病毒 RNA 的遗传作用。他们试验的根据是,曾发现烟草花叶病毒颗粒可以拆散成为蛋白质和 RNA 两种成分,这两种成分还可以再组装成为形态上成熟的颗粒,并且具有侵染性。他们的试验是把两个在寄主植物上产生不同症状的病毒都拆散,用其中一个的 RNA 与另外一个病毒的蛋白质重新组装成为一个杂种,去侵染寄主植物,繁殖出来的病毒类型总是取决于 RNA 见图 1-4。

病毒核酸是遗传物质的证据来自于很多的发现,上面所谈到的是最典型的例子。在特殊的环境条件下,提纯的病毒核酸具有发动侵染的能力,尽管侵染率很低。1956 年 Grierer 和 Schramn, Fraenkel 和 Conrat 分别独立的指出,纯的烟草花叶病毒的 RNA,在采取相应办法使其保持活性的情况下,能够侵染寄主。事实上马铃薯纺锤块茎病和柑桔裂皮病的致病因子,完全没有蛋白质的成分,仅仅是 RNA 成分,因此它们不能称做病毒而归类于类病毒。

用 ^{35}S 标记 噬菌体



用 ^{32}P 标记 噬菌体

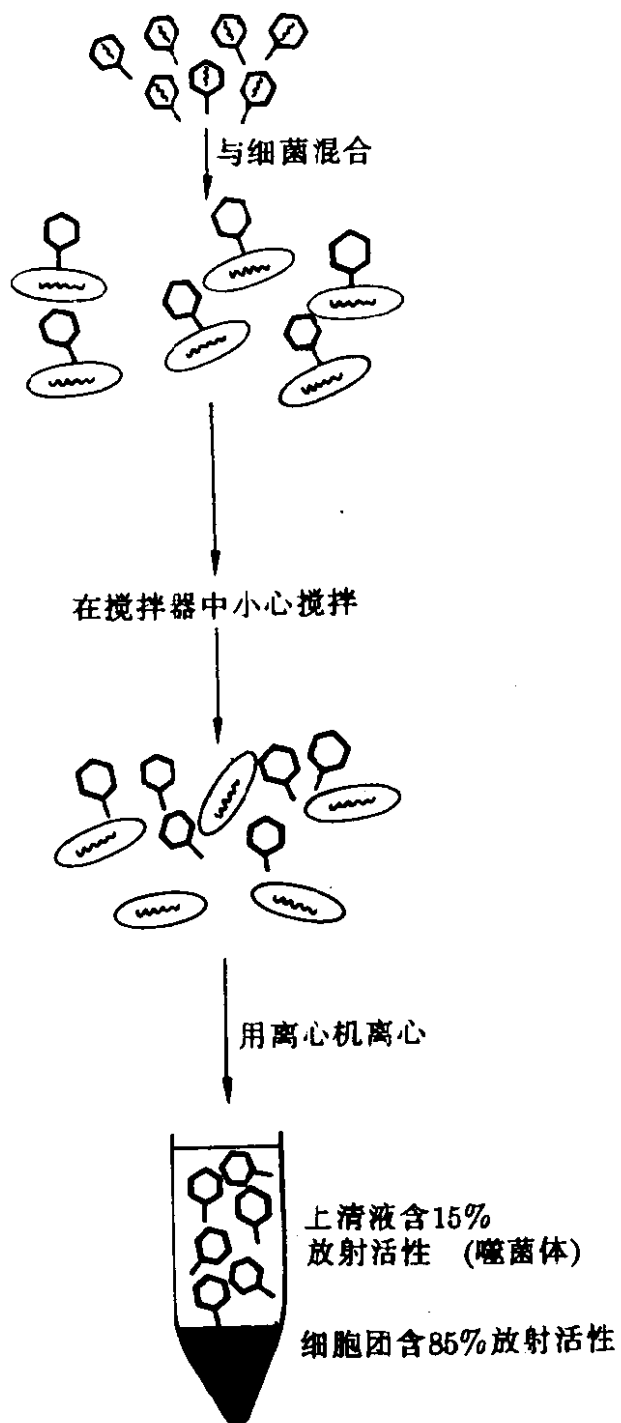


图 1-3 Hershey-Chase 试验

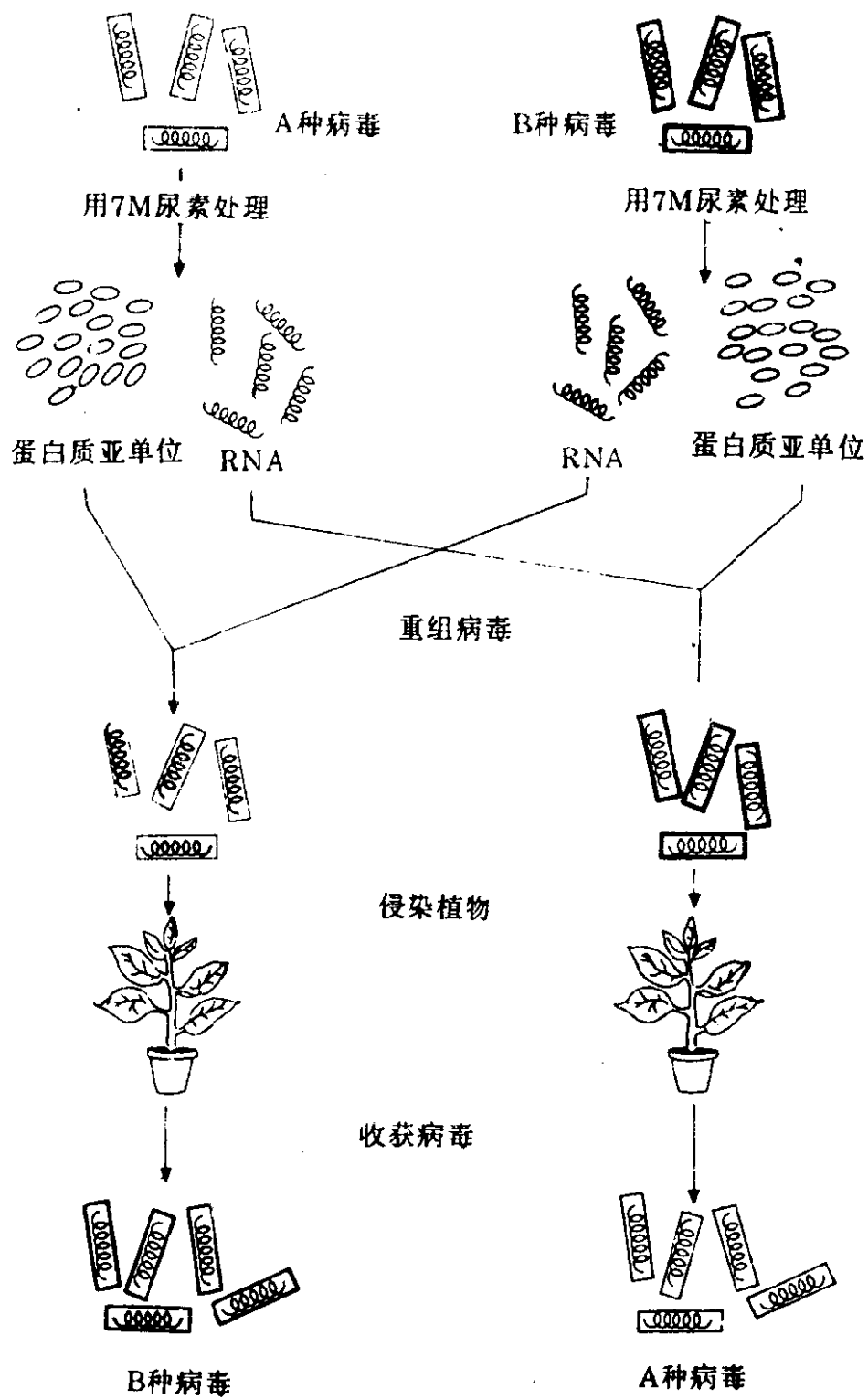


图 1-4 证明 RNA 是菸草花叶病毒遗传物质的试验

在侵染细胞中大分子的合成

在知道了遗传信息是由核酸所携带，而且知道噬菌体进入细胞的仅是核酸之后，研究在细胞内所发生的活动是十分重要的。1953年 Wgatt 和 Cohen 发现，T 偶数噬菌体 T2、T4、T6 的 DNA 包含羟甲基胞嘧啶 (HMC) 而不是胞嘧啶。同年 Hershey Dixon 和 Chase 从 T2 噬菌体侵染的 E·Coli 中，在 T2 生长的不同阶段，提取 DNA 并分析它的羟甲基胞嘧啶的含量。根据完整的 T2 噬菌体 HMC 的含量以及核酸总量中所含有的 HMC 的含量就可以分析出，在任何时候，细胞中所含有的噬菌体的数目。结果表明，对于 T2 来说，噬菌体 DNA 的合成开始于侵染后的六分钟，然后急剧增加，开始有相当于 50~80 个噬菌体 HMC 的合成，然后侵染颗粒直线增加并以同样的速度增长，直到裂解。其后发现噬菌体和 DNA 合成的动力学是重要的，因为它不仅提供了病毒是由单独成分组装而成，而且对研究病毒的发育和调节也是必需的。

Hershey 和他的同事通过细菌的蛋白与其噬菌体抗血清的特殊关系对噬菌体蛋白质的合成进行了卓有成效的研究。使用同位素示踪技术，在噬菌体侵染后的不同时间里，将少量³⁵S 做为培养基中的硫酸盐添加剂的成分加入进去，经过很短暂的时间，随之用大量过剩的非标记的硫酸盐去阻止任何进一步与标记物的结合，通过噬菌体外壳蛋白质的血清学，追踪标记物。在用 T2 侵染 E·coli 的研究中发现噬菌体蛋白质能够被测出来，大约在潜伏期开始之后的 9 分钟，也就是在 DNA 合成开始的时候。

病毒核酸的核苷酸顺序能翻译出蛋白质，McQuillen, Britten 和 Roberts 在研究被病毒侵染的细胞时发现，蛋白质的合成是在核糖体中发生的，而不是在 DNA 上。1959 年 Brenner, Jacob 和 Meselson 利用密度梯度离心技术进行研究指出，病毒 RNA 与寄

主细胞的核糖体是相结合的。

根据密度梯度离心的原理,当少量的大分子,如 DNA、RNA、核糖体等在重金属盐如 CsCl 溶液中离心时,由于沿着离心力方向上持续地增加密度以及沉降力和扩散力的相互作用,便产生了稳定的浓度梯度,使单一的大分子分布成为一个完整的窄带,假若存在几种不同密度的大分子,每一种将形成一个带,在那个区域里 CsCl 密度等于那种大分子的浮力密度。见图 1-5 不同梯度区域的成分带,借助于它们的不同密度,通过穿刺离心管底部便可收集。

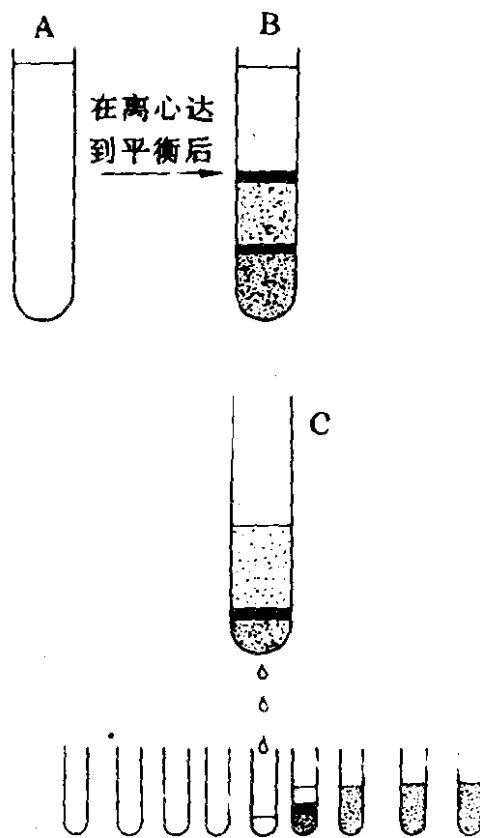


图 1-5 大分子在 CsCl 中的离心

Brenner 等人把生长在重同位素 ($^{13}\text{C}^{15}\text{N}^{32}\text{P}$) 培养基中的细胞里的核糖体与生长在轻同位素培养基 ($^{12}\text{C}^{14}\text{N}^{31}\text{P}$) 中细胞里的核糖体混合,进行 CsCl 密度梯度离心,然后测定重核糖体 ^{32}P 的放射性

和轻核糖体在 254m μ 的吸收, 其结果 (图 1-6) 表明核糖体被分成两个成分, A 成分 (较密集) 和 B 成分 (不密集), 而且从重核糖体得到的 B 成分与从轻核糖体得到的 A 成分在同一个位置

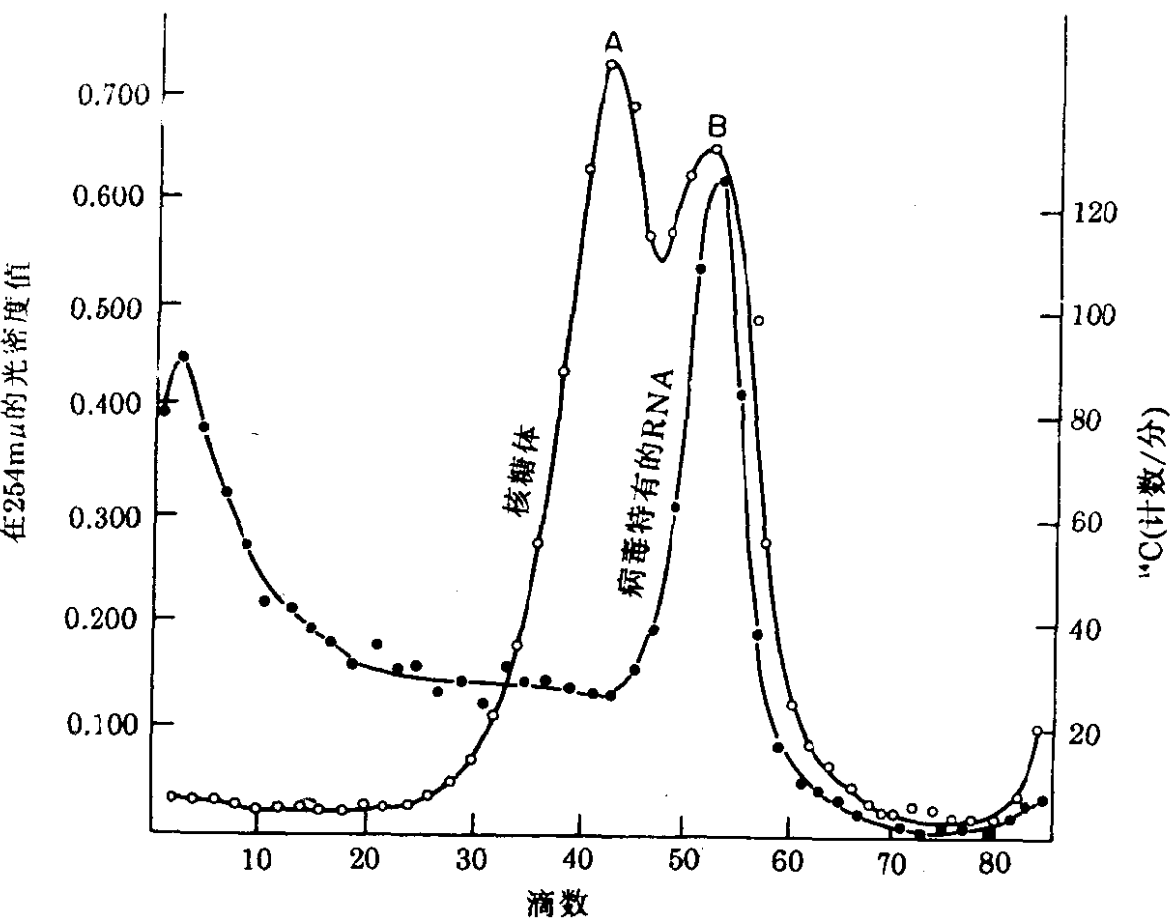


图 1-6 重的和轻的核糖体在 CsCl 密度
梯度离心中的分离

若用 ^{14}C -尿嘧啶使细胞产生脉冲, 侵染后提取核糖体进行 CsCl 密度梯度离心, 发现具有放射性的部分与成分 B 相结合着 (图 1-7), 而具有放射活性的物质就是病毒的 RNA, 也有少量具有放射活性的物质在试管的底部, 部分是游离的病毒 RNA。

进一步的试验是将细胞培养在含有 $^{15}\text{N}^{13}\text{C}$ 的培养基中, 使细胞合成重的核糖体, 用噬菌体侵染, 然后转移到“轻”的培养基中去培养, 用 ^{32}P 去标记病毒的 RNA, 使其发出脉冲。然后将这些