



# 山东农业大学微生物学课程



# 微生物学教程

(第二版)

周德庆

 高等教育出版社  
HIGHER EDUCATION PRESS

## 山东农业大学生命科学学院



# 第三章

# 病毒与亚病毒



# 人类对病毒的认识历程

由于形体小，不易被发现，病毒很晚才被发现；亚病毒的出现更迟。

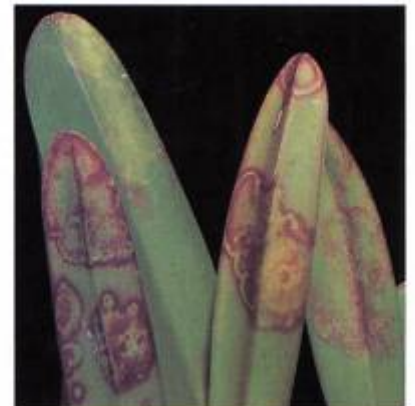
已知植物病毒600多种，昆虫病毒1700余种，人类病毒300多种，噬菌体3000多种。

- ① 公元1500，埃及壁画，小儿麻痹症
- ② 19世纪末，德国人A.Mayer发现烟草花叶病；1892年俄国D.Ivanovsky 发现滤过性病原体；1898年荷兰学者M.W.Beijerinck提出病毒概念。
- ③ 1935年美国Stanley首次结晶TMV。
- ④ 1952年Hershey和Chase利用噬菌体证明遗传物质是核酸。



(a)

烟草花叶病





## 郁金香碎色病

第一个记载的植物病毒病。荷兰博物馆保存着1619年的一幅得病的郁金香静物画，使我们知道在17世纪就存在一种植物病毒病----郁金香碎色病。

据记载，一个得病郁金香球茎竟能换来牛、猪、羊甚至成吨的谷物或上千磅的奶酪。在1634-1637年的荷兰，这种嗜好达到了可称做“郁金香热”的高潮。





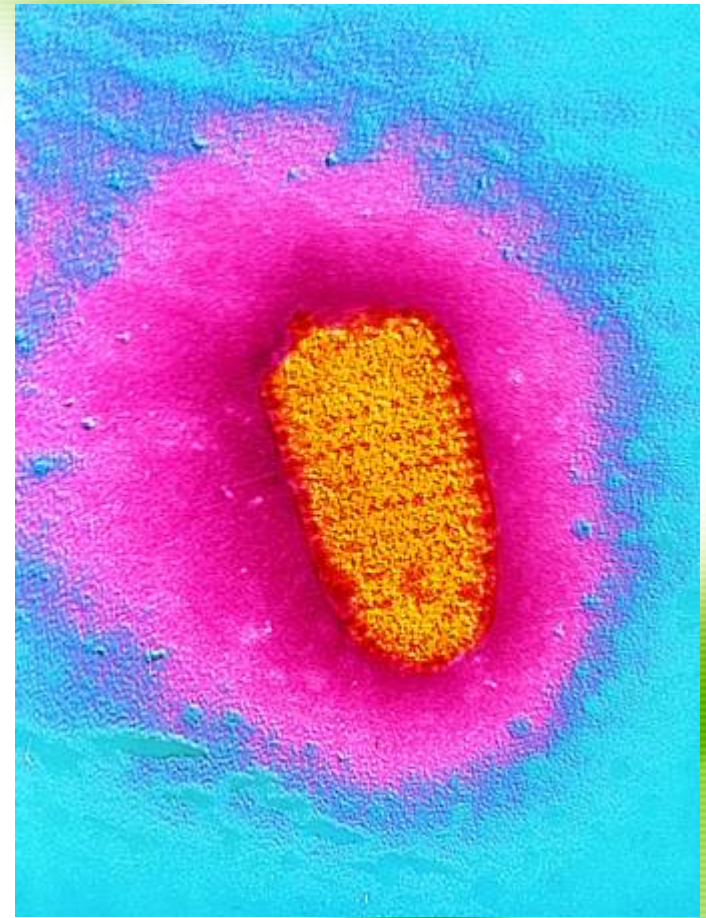
# 病毒与人类关系

人类传染病中，约70—80%属于病毒病，每一种植物至少有一种病毒引起的病害。

引起人类的病毒相当多，如肝炎，天花，狂犬病，艾滋病，风湿关节炎等，也有多种病毒可以致人癌症。

如果它的宿主是人有益，就会给人类带来巨大损害。反之，如它们所寄生的对象是对人类有害，则会对人类带来巨大的利益。

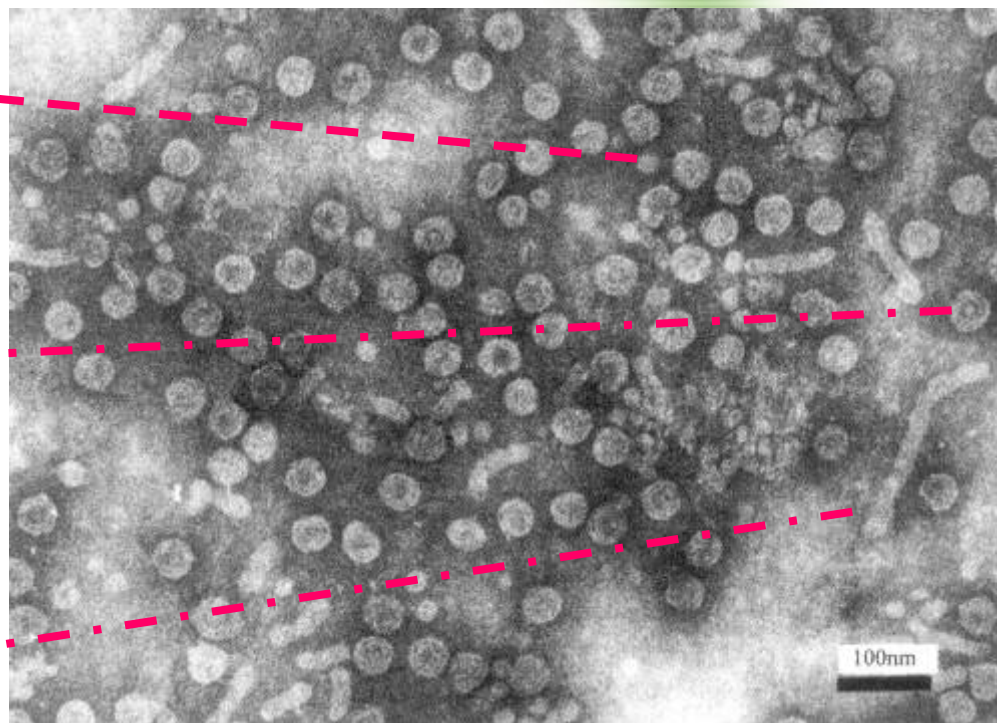
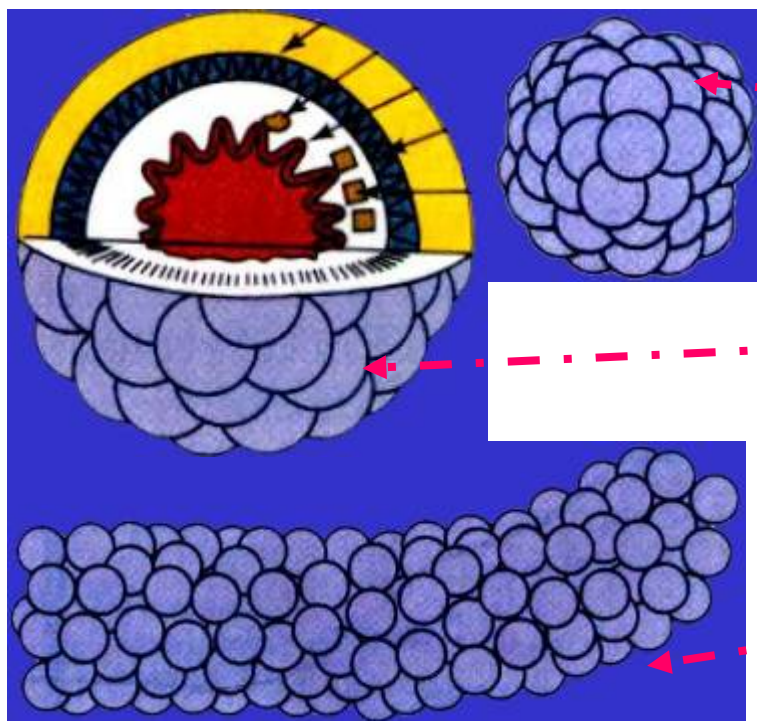
天花



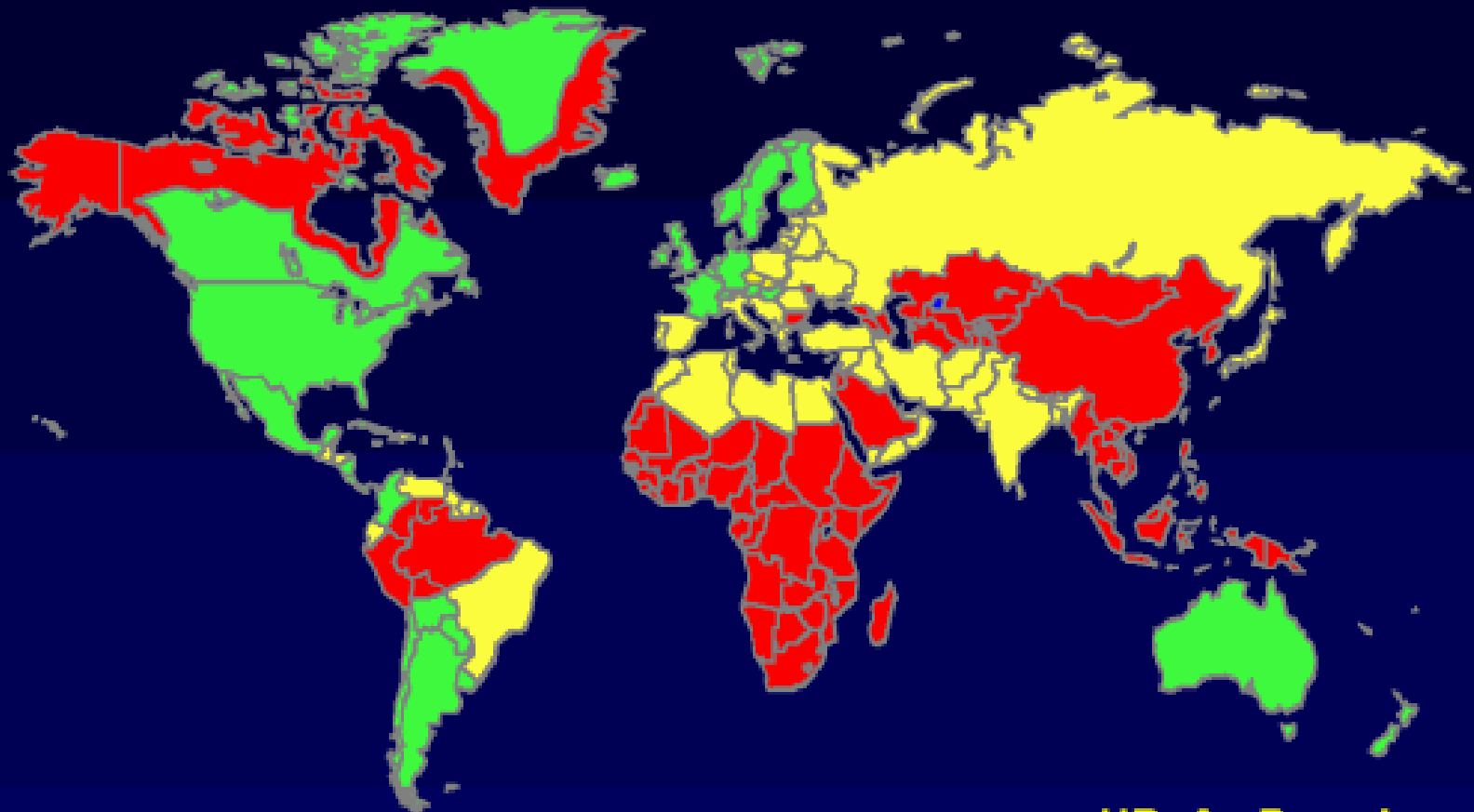
狂犬病病毒电镜照片



# 电镜下的HBV



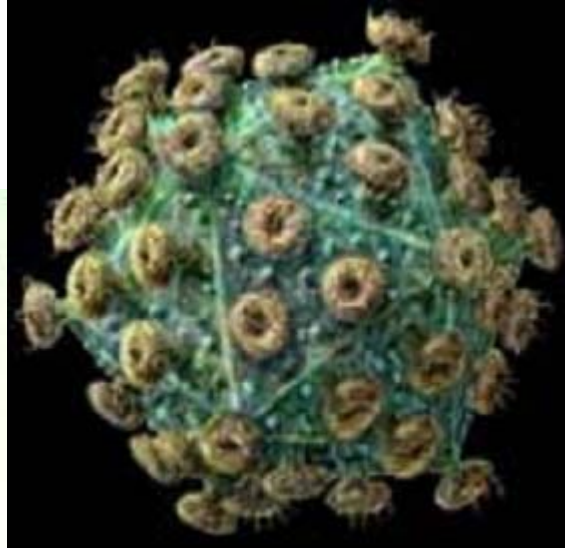
# Global Distribution of Chronic HBV Infection



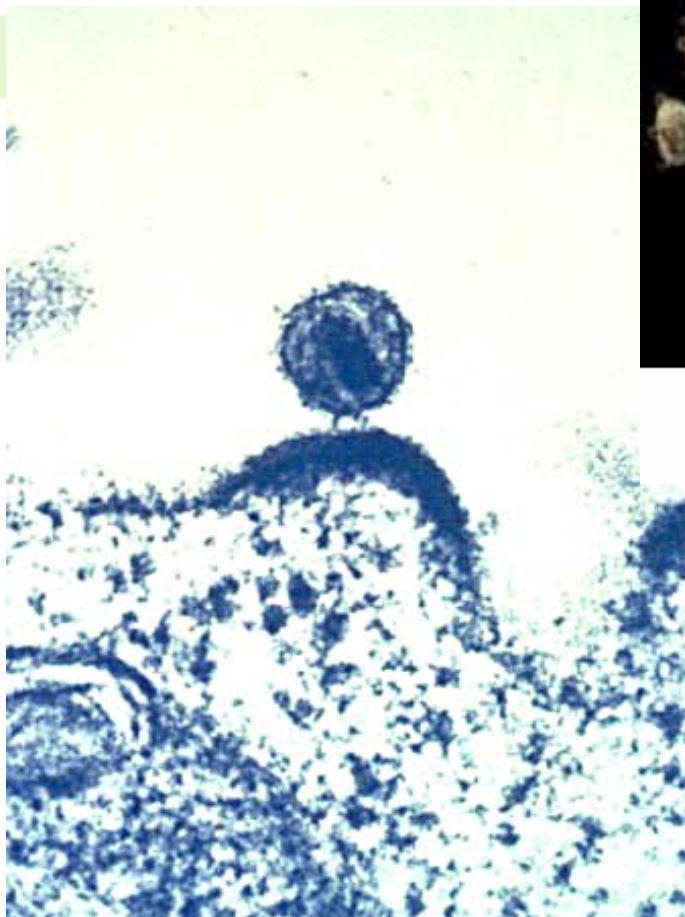
- 350 million chronic carriers worldwide
- Ninth leading cause of death
- Nearly 75% of HBV chronic carriers are Asian

## HBsAg Prevalence (%)

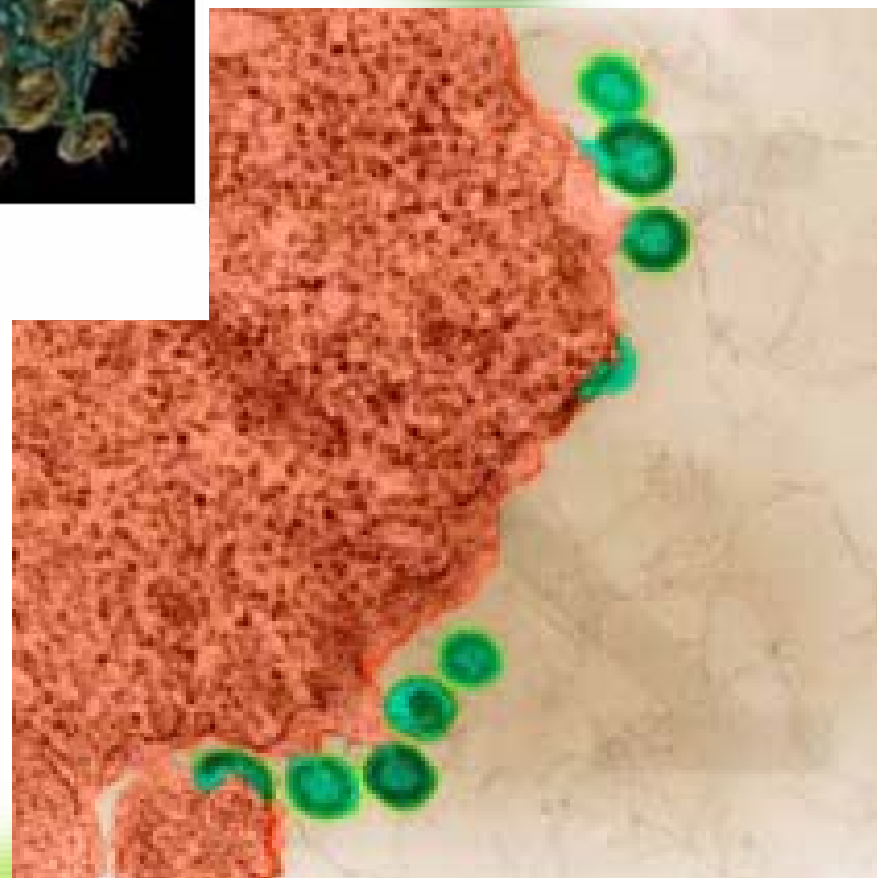
- $\geq 8$ : High
- 2-7: Intermediate
- $< 2$ : Low

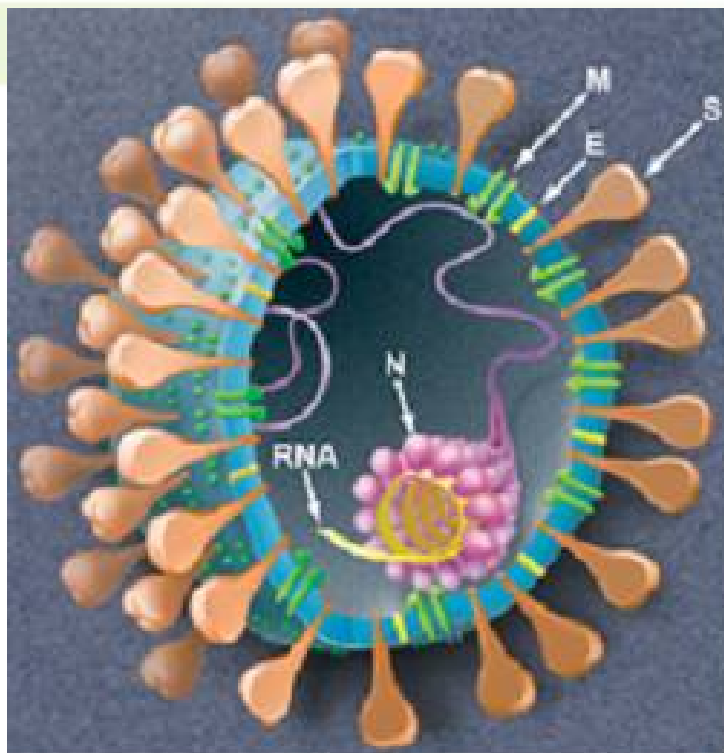


Aids图片

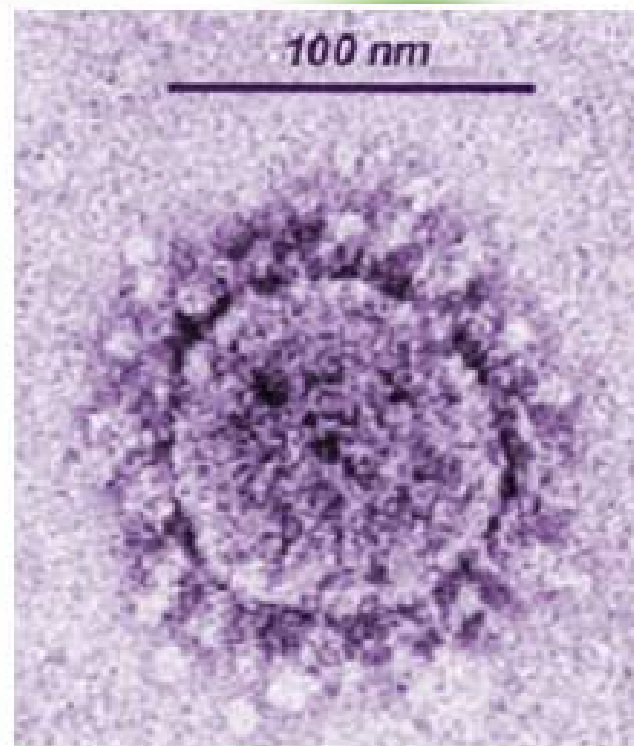


AIDS爱滋病病毒

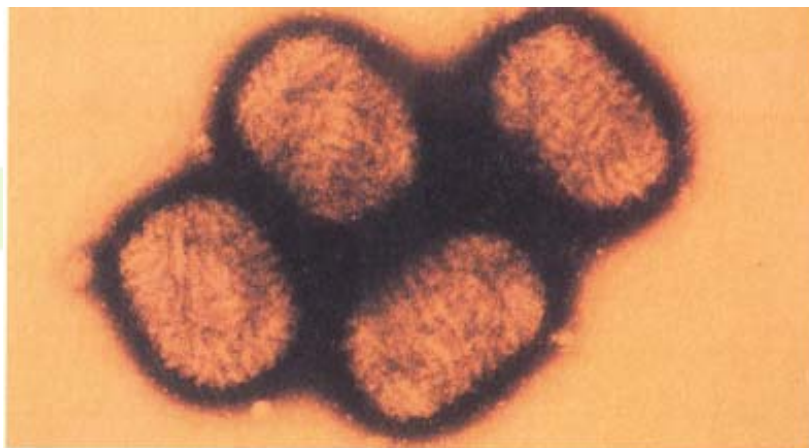




冠状病毒模式图



Sars 电镜



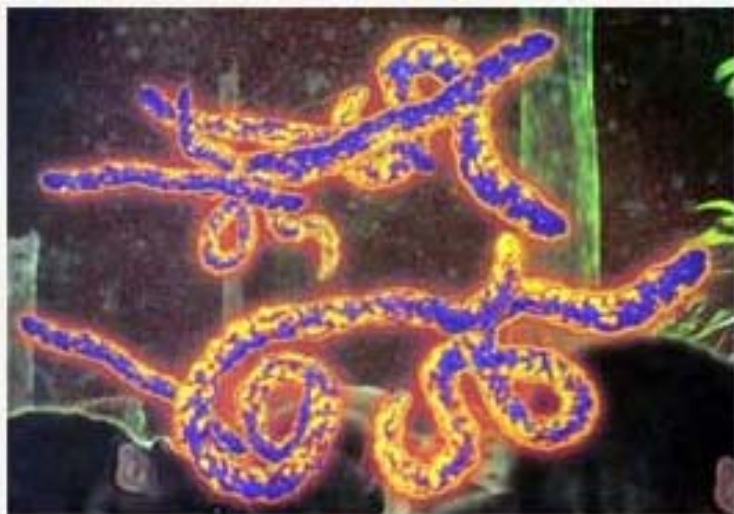
右: Orf virus: 口疮病毒  
(接触性脓疱皮炎病毒)  
(负染技术)



上: Ebola virus: 埃博拉病毒 (正染技术)



上: Vaccinia virus 痘苗病毒  
(投影技术)



埃博拉病毒是一种 RNA 病毒，呈长细绳状、U 字形、圆形、弹簧头状等多种形状，约 80-800 毫微米。

埃博拉病毒真的来自热带丛林中的某种动物吗？以前这些动物一直在丛林中安静地生活，与人类素无往来。但是，随着人类农地的扩大以及对树木的滥砍滥伐，失去家园的动物也许就带着病毒一起出现在人类面前了。随着近些年新兴病毒的不断出现，人类是到了该审慎考虑自己每一个行为的时候了。





一家被疯牛病侵袭的牧场。疯牛病使欧洲许多国家的畜牧业和食品业损失惨重。

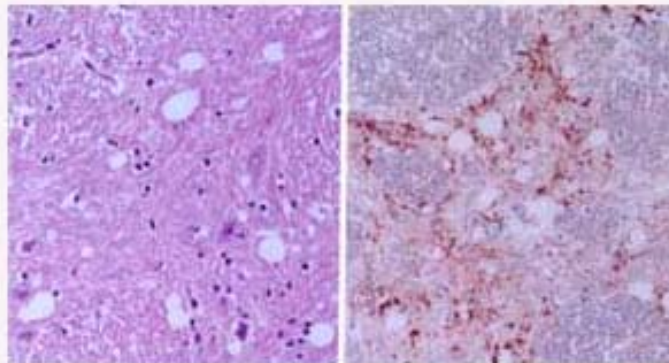


一头患有疯牛病的牛，虽然它很努力地想站起来，但显然已经力不从心。



一家英国焚化厂正在焚烧疯牛病病牛的尸体。引发疯牛病和其它海绵样脑病的病原体生命力极强，需要在  $8000^{\circ}\text{C}$  的高温焚化，才能将其消灭。

左为日本第 1 头患疯牛病的病牛的脑组织显微照片，可见神经组织出现空洞，呈海绵状；右图中染成红褐色的是朊毒体，可见许多地方出现空洞。





## 部分疫苗、抗毒血清的发明时间与发明者

时 间	疫苗名称	对抗疾病名称	发明者
1796 年	牛痘苗	天花	琴纳
1880 年	鸡霍乱菌苗	鸡瘟	巴斯德
1881 年	炭疽菌苗	炭疽病	巴斯德
1885 年	狂犬病疫苗	狂犬病	巴斯德
1890 年	破伤风抗毒血清	破伤风	贝林和北里柴三郎
1891 年	白喉抗毒血清	白喉	贝林和北里柴三郎
1921 年	卡介苗	结核病	卡尔梅特和介兰
1897 年	鼠疫苗苗	鼠疫	勒斯蒂格和加莱奥蒂
1952 年	注射用脊髓灰质炎灭活疫苗	脊髓灰质炎	沙克
1954 年	口服用脊髓灰质炎减毒活疫苗	脊髓灰质炎	萨宾
1958 年	麻疹疫苗	麻疹	恩德斯





# 第一节 病毒



病毒至少在3个方面不同于活细胞：

- ① 结构简单，没有细胞结构
- ② 几乎所有的毒粒中只含有DNA或RNA
- ③ 在细胞外不能增殖，不能象原核和真核一样进行细胞分裂。

**病毒(virus)：** 是一类没有细胞核、细胞质和细胞壁结构，但有遗传复制等生命特征，主要由核酸和蛋白质组成的大分子生物。



# 病毒的特点

病毒在宿主细胞外，不能独立地进行代谢和繁殖，它们是严格的寄生物，并与其它生物相比显然不同，具有其本身的特点。

- ① 个体极小
- ② 专性寄生
- ③ 没有细胞结构
- ④ 只有一种核酸类型
- ⑤ 对抗生素不敏感
- ⑥ 复制方式繁殖



微生物 种类	在无生 命的培 养基中 生长	繁殖	核酸类 型	有无 自己 的核 糖体	敏感性		干扰 素
					抗生素		
					抗真菌 的	抗细菌 的	
真菌	+	有性 无性	D+R	+	+	-	-
细菌	+	无性 二分 裂	D+R	+	-	+	-
病毒	-	复制	D或R	-	-	-	+



## 单细胞微生物与病毒性质的比较

性质	细菌	立克次氏体	支原体	衣原体	病毒
直径大于 300nm	+	+	±	±	-
在无生命培养基生长	+	-	±	-	-
专性活细胞内寄生	-	+	±	+	+
双分裂	+	+	+	+	-
含有 DNA 和 RNA	+	+	+	+	-
核酸感染性	-	-	-	-	+a
核糖体	+	+	+	+	-
产能代谢	+	+	+	+	-
细胞膜	+	+	+	+	-
对抗生素的敏感	+	+	+	+	-b
对干扰素的敏感	-	-	-	-	+



# 病毒的种类

由于病毒是专性活细胞内寄生物，因此，凡有生物生存之处，都有其相应的病毒存在。从理论上来分析，在自然界存在的病毒总数应大大高于一切细胞生物的总和。

非细胞生物 { (真)病毒：至少含有核酸和蛋白质两种组分  
                  { 亚病毒 { 类病毒：只含具单独侵染性的RNA组分  
                                  { 拟病毒：只含不具单独侵染性的RNA组分  
                                  { 朊病毒：只含蛋白质一种组分\*



# 一、病毒的形态构造和化学成分

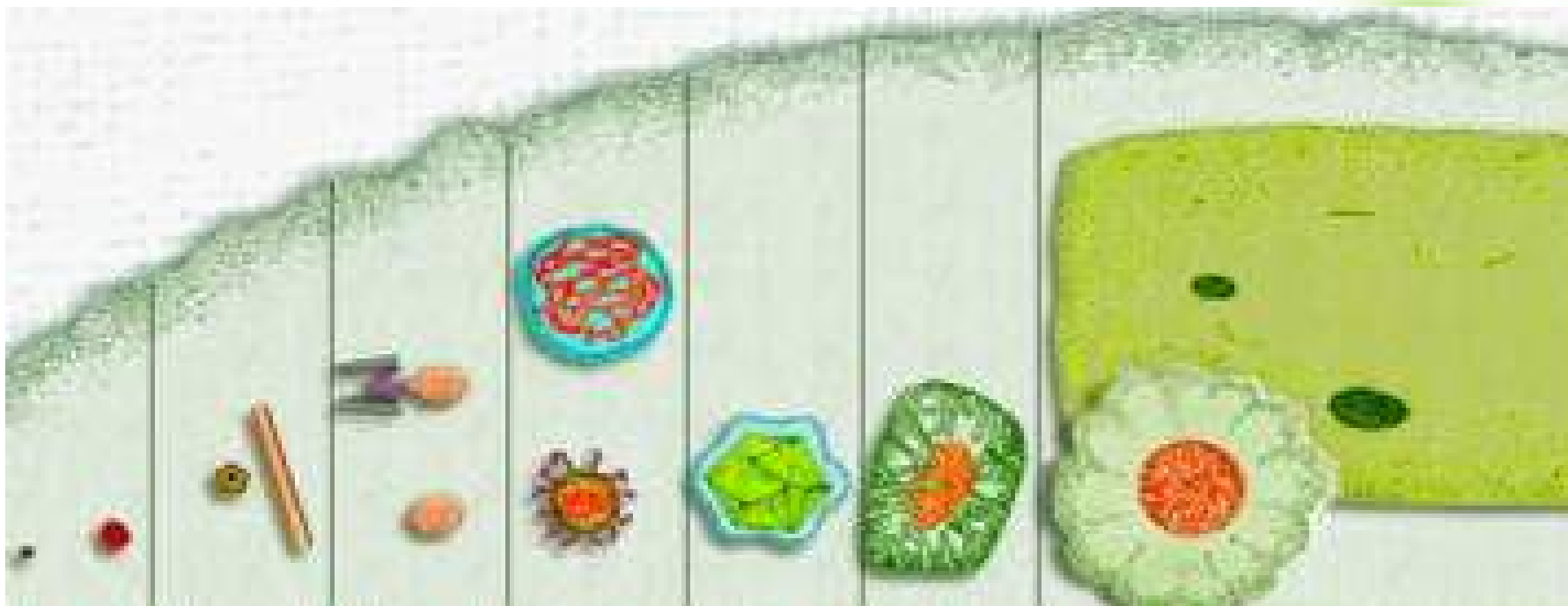
## (一) 病毒的大小

病毒大小之最	最大	虫痘病毒: 450nm 牛痘苗病毒: $300 \times 250 \times 100$ nm
	最长	柑桔衰退病毒: 2000nm 甜菜黄花病毒: $1250 \times 10$ nm 铜绿假单胞菌噬菌体: $1300 \times 10$ nm
	最小*	口蹄疫病毒: 21nm 乙型肝炎病毒: 185nm 苜蓿花叶病毒: 16.5nm 玉米条纹病毒: 12~18nm 烟草坏死病毒: 16nm 菜豆畸矮病毒: 9~11nm
	最细:	大肠杆菌的f1噬菌体: $5 \times 800$ nm

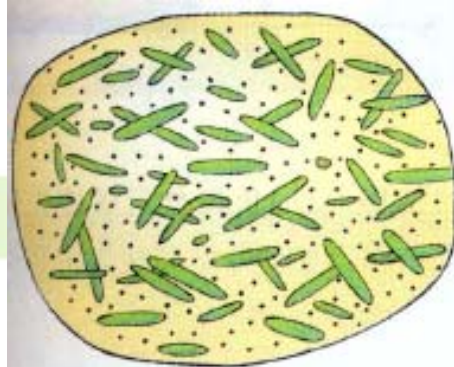
病毒、细菌、真菌个体直径比=1: 10: 100



最大的病毒如牛痘苗病毒的直径超过**250nm**，通过姬姆萨、荧光染料或镀银法染色后，可在光学显微镜下观察；最小的病毒如脊髓灰质炎病毒，直径仅为**28nm**。







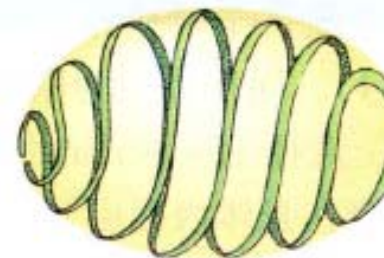
(a)痘苗病毒



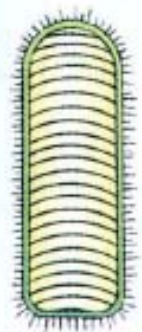
(b)副粘病毒(流行性腮腺炎)



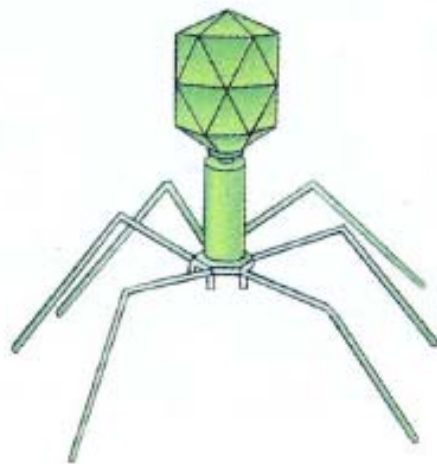
(c)疱疹病毒



(d)口疮病毒



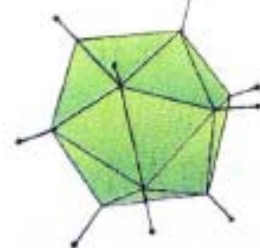
(e)棒状病毒



(f)大肠杆菌T偶数噬菌体



(g)有弯曲尾噬菌体



(h)腺病毒



(i)流感病毒



(j)多瘤病毒



(k)小核糖核酸病毒



(l) $\phi$ x174 噬菌体



(m)管状病毒

1  $\mu$ m

图 16.10 部分病毒的大小和形态。以上病毒按比例绘制。1  $\mu$ m 显示如图下方。



## (二) 病毒的形态

由于病毒是非细胞生物，故单个病毒个体不能称作“单细胞”，这样，就产生了病毒粒子(virion，即病毒体)的名词。病毒粒子有时也称病毒颗粒(virus particle)，是指成熟的、结构完整的单个病毒。

**噬菌体** (bacteriophage)，原核生物的病毒。



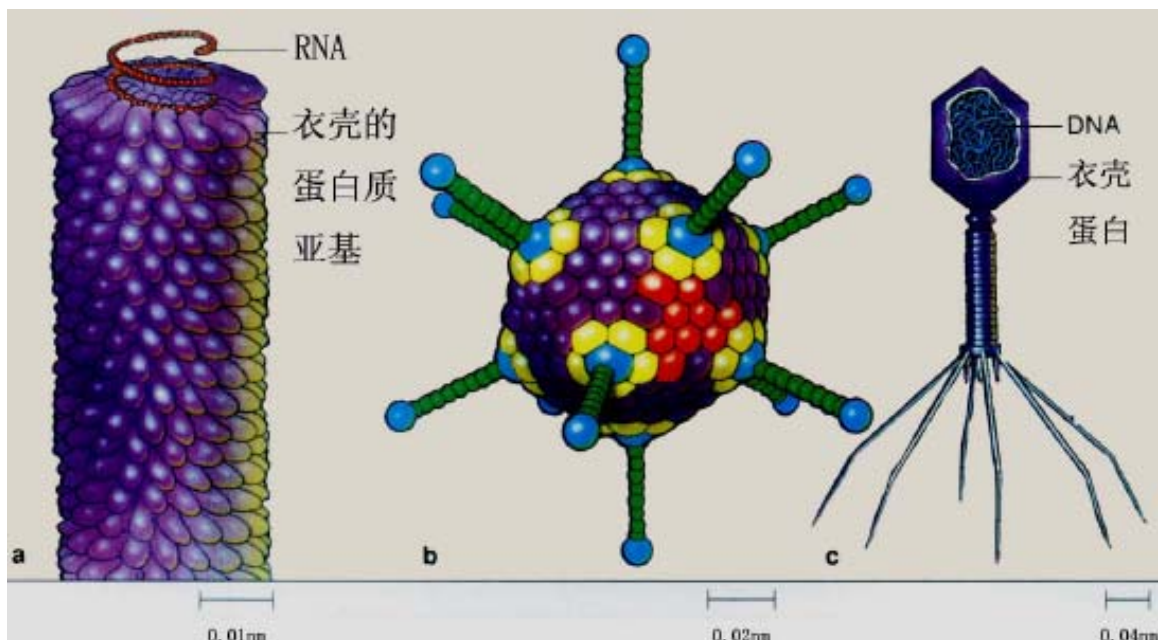
病毒形态多样，有球状、棒状、杆状、螺旋状、丝状等。主要有三种基本形态：

球状：接近球形的颗粒，大多数动物人、真菌病毒

杆状：砖形、线形、子弹状，包括大多数植物昆虫病毒

蝌蚪状：由球状的头部和杆状的尾部结合而成的颗粒，

如大肠杆菌T-噬菌体。





# 1. 典型病毒粒的构造

## (1) 病毒粒

主要由核酸和蛋白质组成。核酸位于中心，称为**核心**，在核酸外周是蛋白质外壳，称**衣壳**，衣壳由壳粒组成。

衣壳的功能是：保护基因组（核酸）免受核酸酶或其它不利因素的破坏；决定病毒感染的特异性，并能介导病毒核酸进入宿主细胞；具有抗原性。

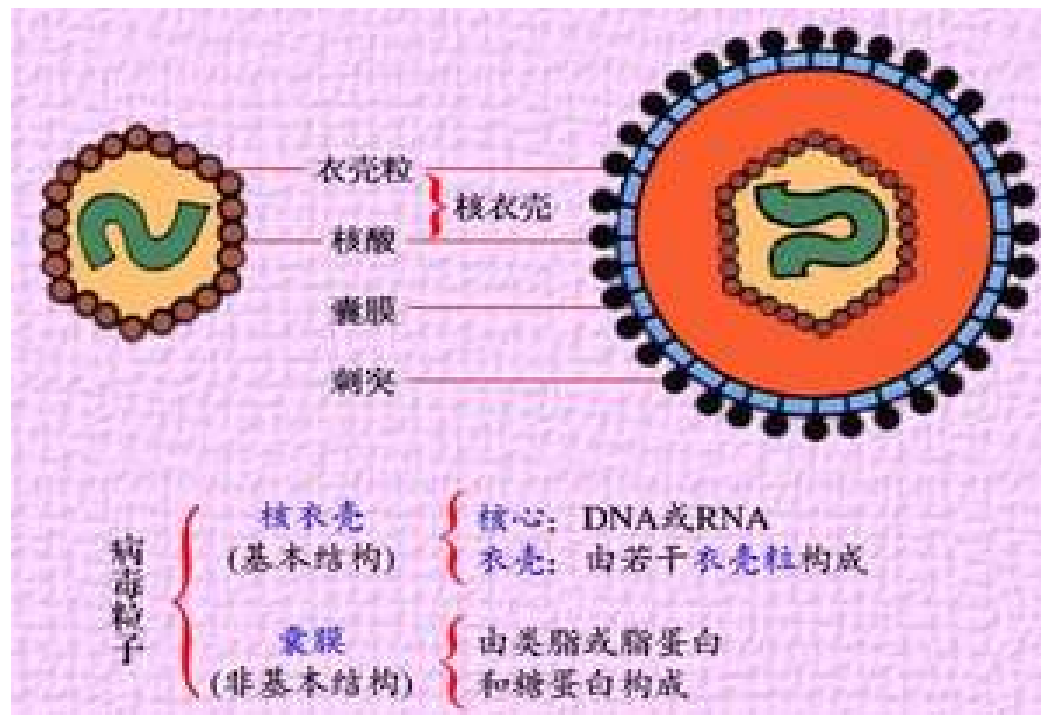
衣壳是由许多在电镜下可辨别的形态学亚单位——**衣壳粒** (capsomere or capsomer) 所构成。核心和衣壳合在一起称为**核衣壳** (nucleocapsod)，它是任何病毒(指“真病毒”)所必须具备的基本结构。

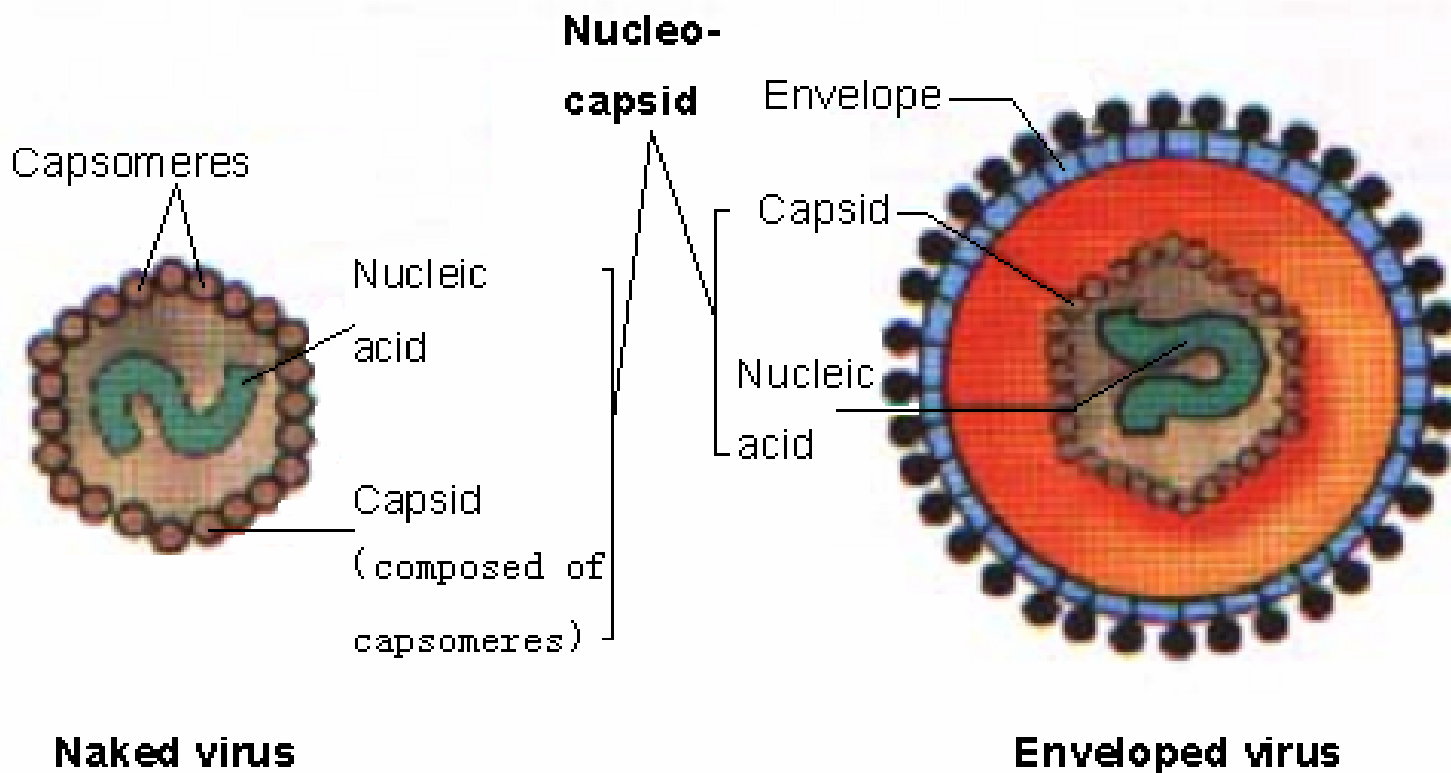


## (2) 包膜

某些病毒在核衣壳外面，还包围着一层由类脂或脂蛋白组成的结构比较复杂的包膜。包膜含有宿主细胞膜的化学成分。在少数病毒的包膜表面，还有针状突起，称为刺突。

包膜实际上是来自宿主细胞膜但被病毒改造成具有其独特抗原特性的膜状结构，故易被乙醚等脂溶剂所破坏。



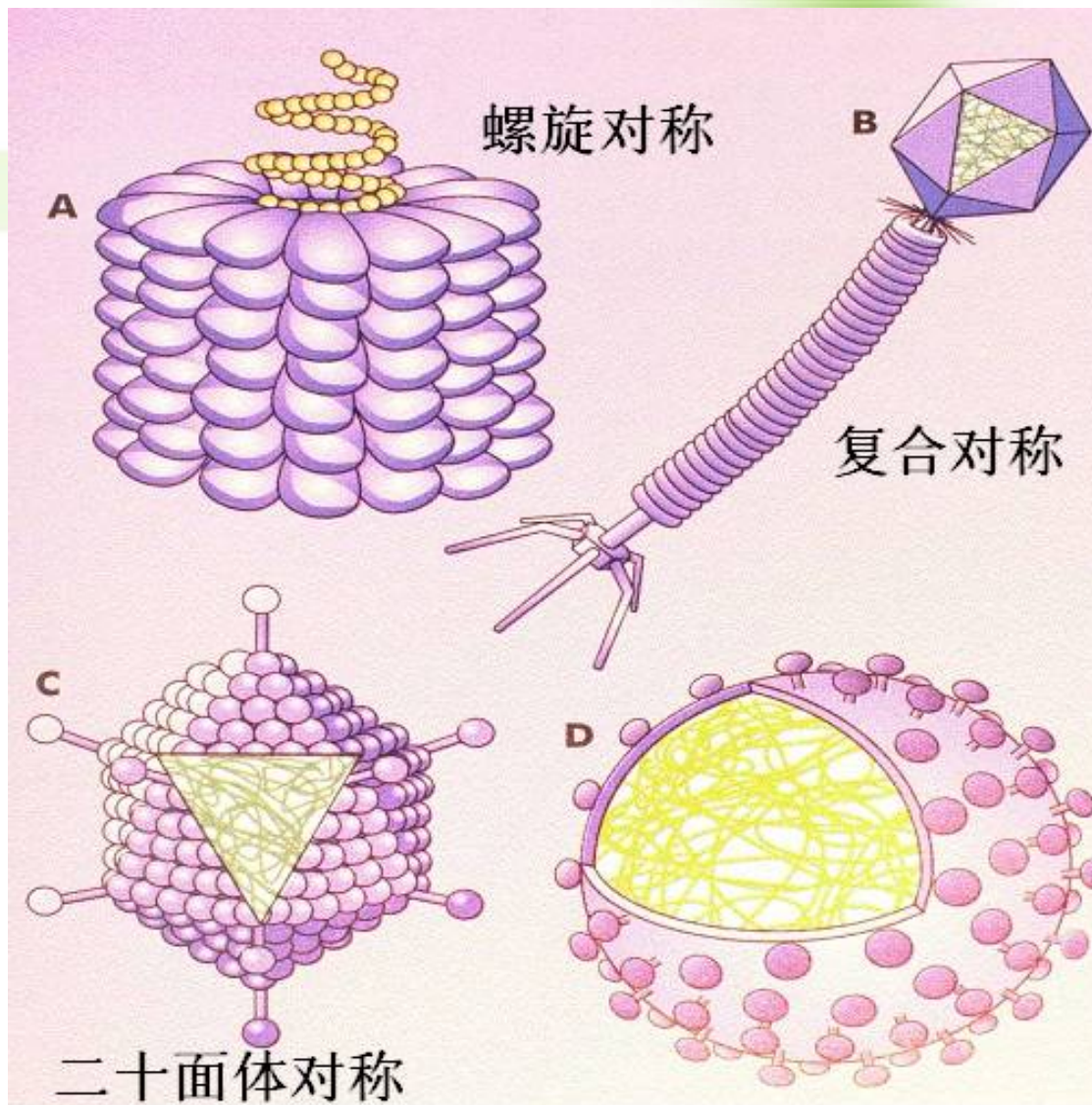




## 2. 病毒粒的对称体制

由相同的蛋白质亚基—衣壳粒装配而成的病毒粒子，通常只形成**螺旋对称**和**二十面体对称**（即等轴对称）两种体制，前者能使核酸与蛋白质亚基间的接触更为紧密，后者则特别有利于核酸分子以高度卷曲的形式包裹在小体积的衣壳中。

一些结构较复杂的病毒，其衣壳的特点无非是螺旋对称和二十面对称相结合而已，故称**复合对称**。







### 3. 病毒的群体形态

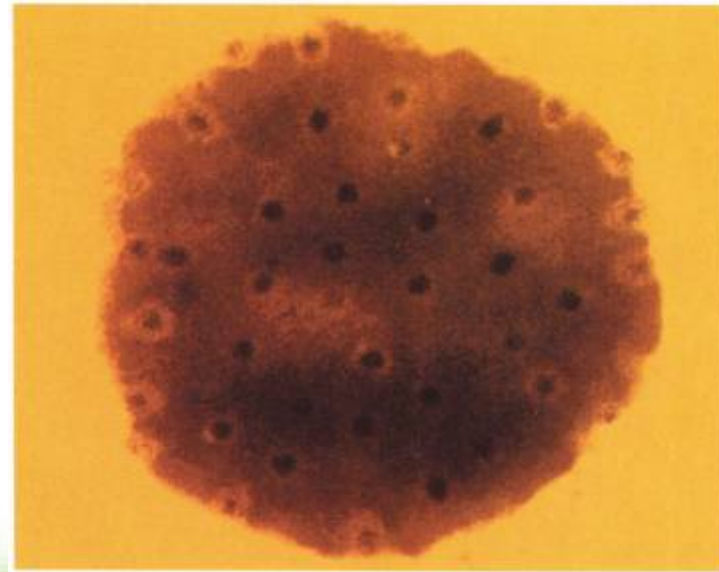
病毒粒子虽是无法用光学显微镜观察的亚显微颗粒，但当它们大量聚集在一起并使宿主细胞发生病变时，就可用光学显微镜加以观察。



## (1) 包涵体(inclusion body)

在某些感染病毒的宿主细胞内，出现光学显微镜可见的大小、形态和数量不等的小体，称为**包涵体**。它们多数位于细胞质内，具嗜酸性；少数位于细胞核内，具嗜碱性；也有在细胞质和细胞核内都存在的类型。在实践上，病毒的包涵体主要有两类应用：

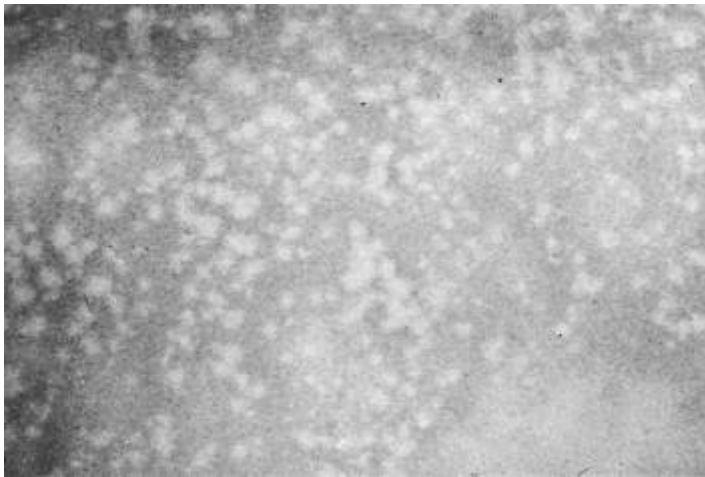
- ①用于病毒病的诊断
- ②用于生物防治

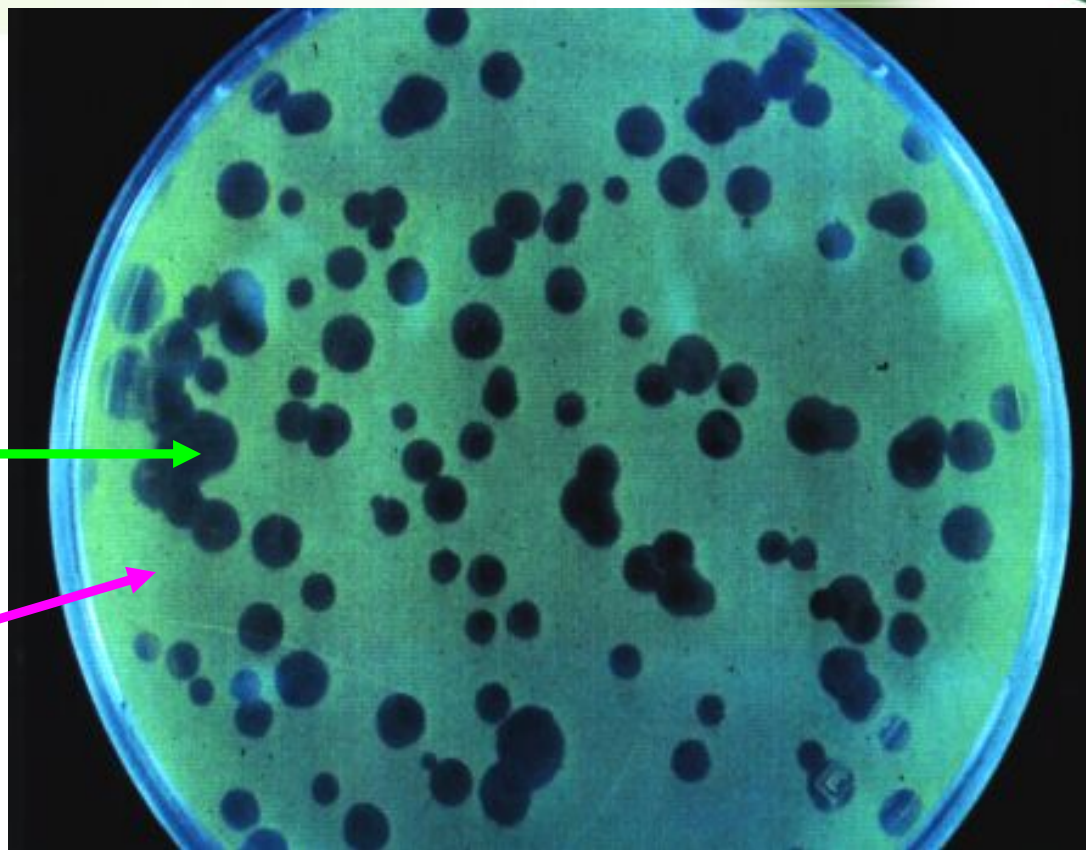




## (2) 噬菌斑 (plaque)

将少量噬菌体与大量宿主细胞混合后，将此混合液与45℃左右的琼脂培养基在培养皿中充分混匀，铺平后培养。经数小时至10余小时后，在平板表面布满宿主细胞的菌苔上，可以用肉眼看到一个一个透亮不长菌的小圆斑，这就是噬菌斑。





噬菌斑

荧光假单胞菌



### (3) 空斑

为进行有活性的动物病毒粒子的计数，在噬菌斑技术的启发下，出现了单层动物细胞上的病毒空斑计数法。在覆盖一薄层琼脂的一片单层细胞上，如某一细胞感染有病毒，则增殖后的病毒粒子只能扩散至邻近的细胞，最终形成一个与噬菌斑类似的空斑。如果用中性红等活性染料加以染色，不但可以区分活细胞和死细胞，而且可使空斑更为清晰。

### (4) 枯斑

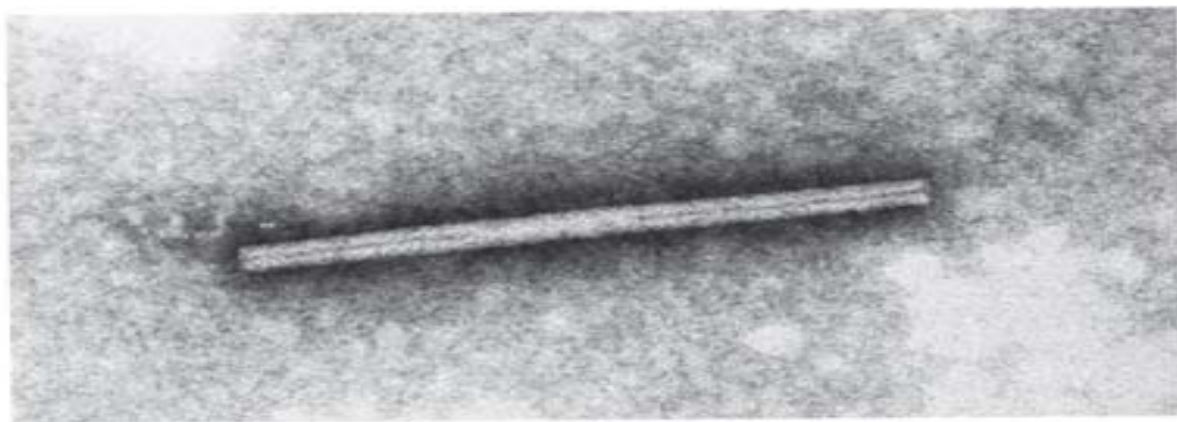
枯斑是植物叶片上的植物病毒群体。美国病毒学家 Holmes (1929年)最早发明用枯斑法测定烟草花叶病毒(TMV)的数目。方法是把试样与少许金刚砂相混，然后在烟叶子上轻轻摩擦，2~3天后，叶子上出现的局部坏死灶即枯斑。



### (三) 三类典型形态的病毒及其代表

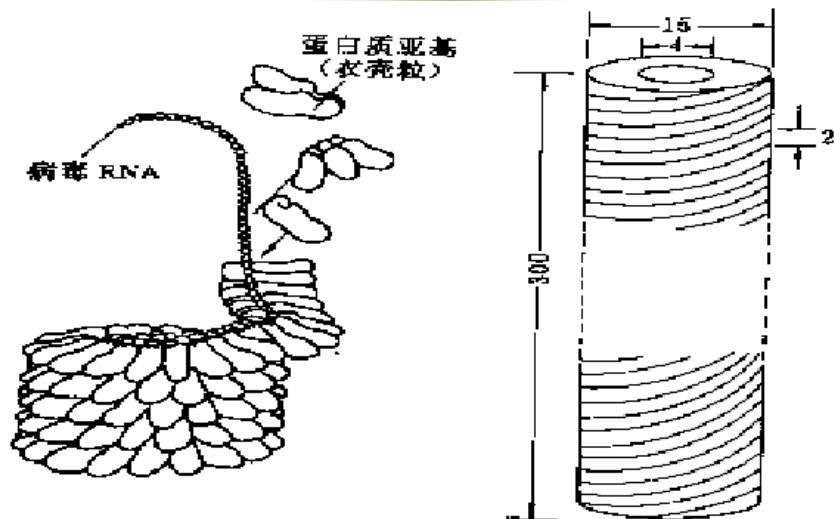
#### 1. 螺旋对称的代表——烟草花叶病毒(TMV)

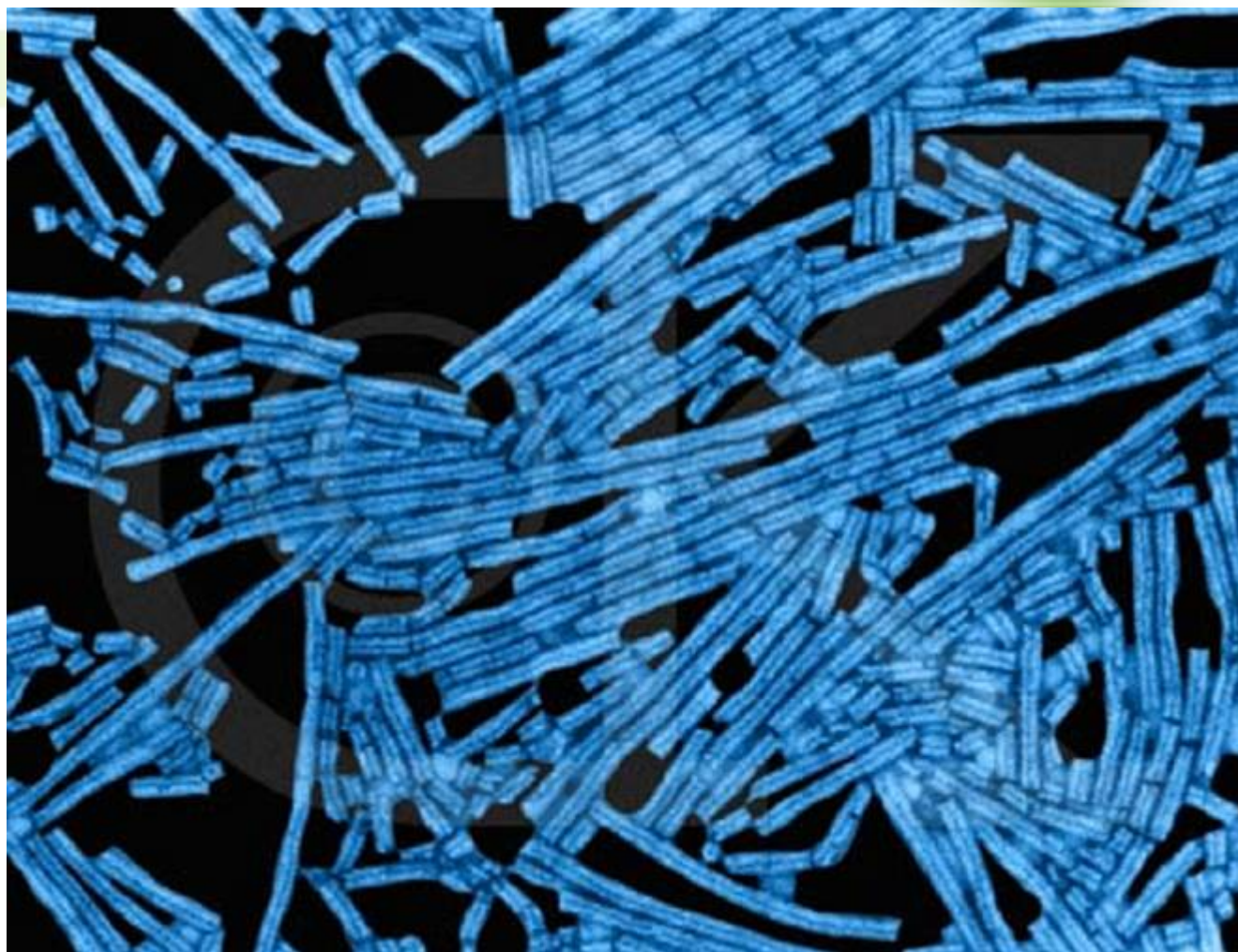
TMV在病毒学发展史上有其独特的地位。它是发现最早、研究最深入和了解最清楚的一种病毒。TMV呈直杆状，长300nm，宽15nm，中空（内径4nm）。含95%蛋白质和5%单链RNA（ssRNA）。其形态见图（400000倍）。



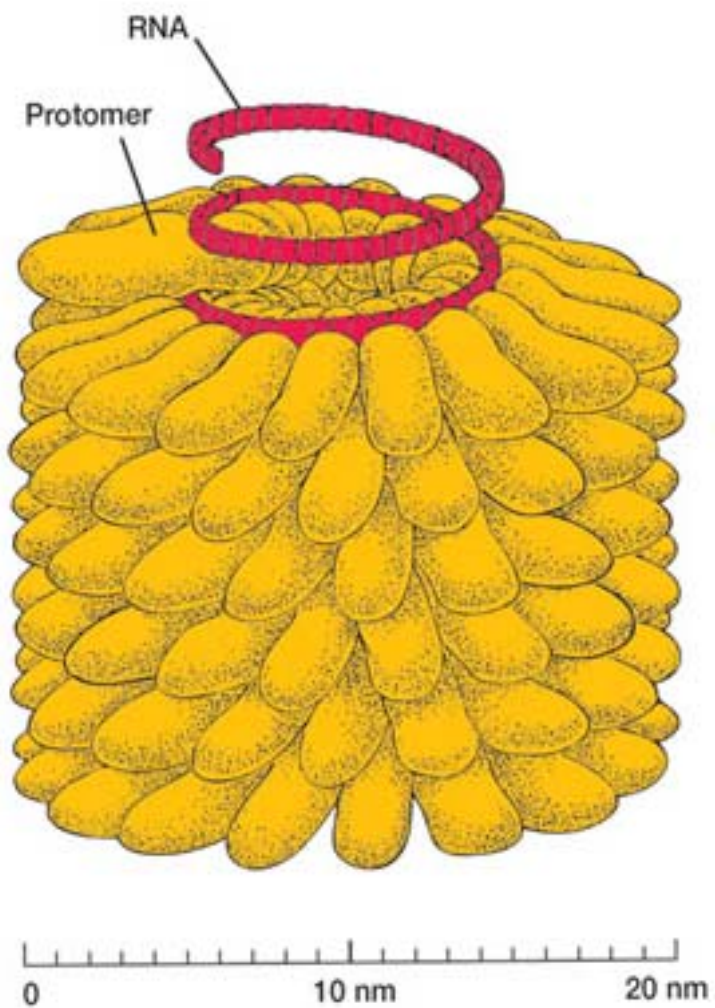


TMV共有2130个呈皮鞋状的蛋白质亚基(衣壳粒)组成。每个亚基由158个氨基酸组成，分子量为17500。亚基以逆时针方向螺旋排列，共130圈(螺距2.3nm，每圈有16.33个亚基)。ssRNA由6390个核苷酸单位组成，分子量为 $2 \times 10^6$ 。它位于距轴中心4nm处以相等的螺距绕于蛋白质外壳内，每3个核苷酸与一个蛋白亚基相结合，因此，每圈为49个核苷酸。









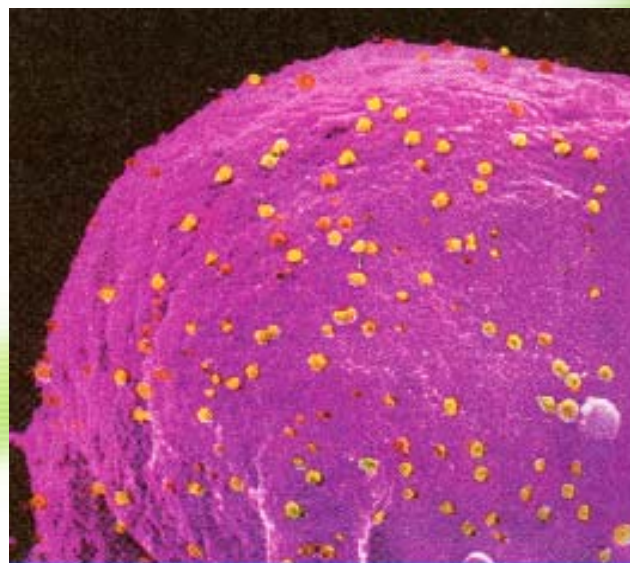


## 2. 二十面体对称的代表——腺病毒 (Adenovirus)

这是一种动物病毒，1953年首次从手术切除的小儿扁桃腺中分离到。它可侵染呼吸道、眼结膜和淋巴组织，是急性咽炎、咽结膜炎、流行性角膜炎和病毒性肺炎等的病原体。

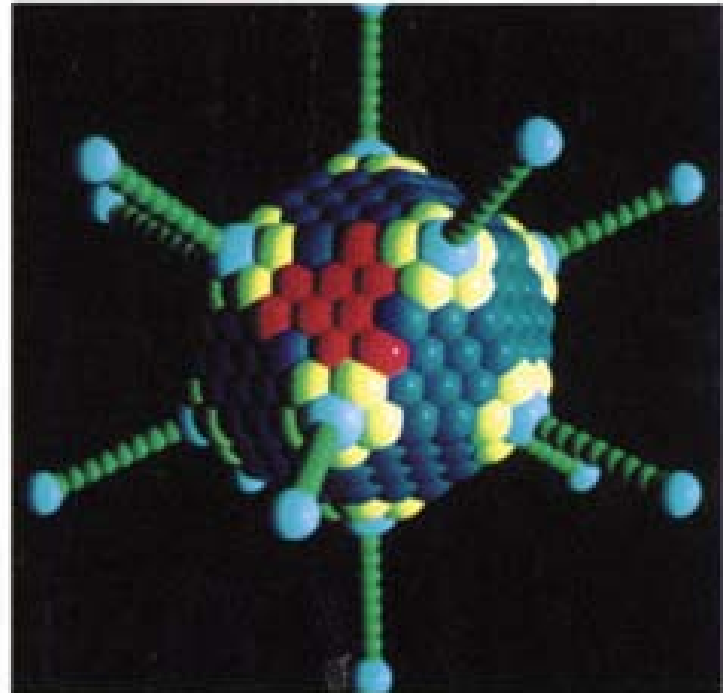
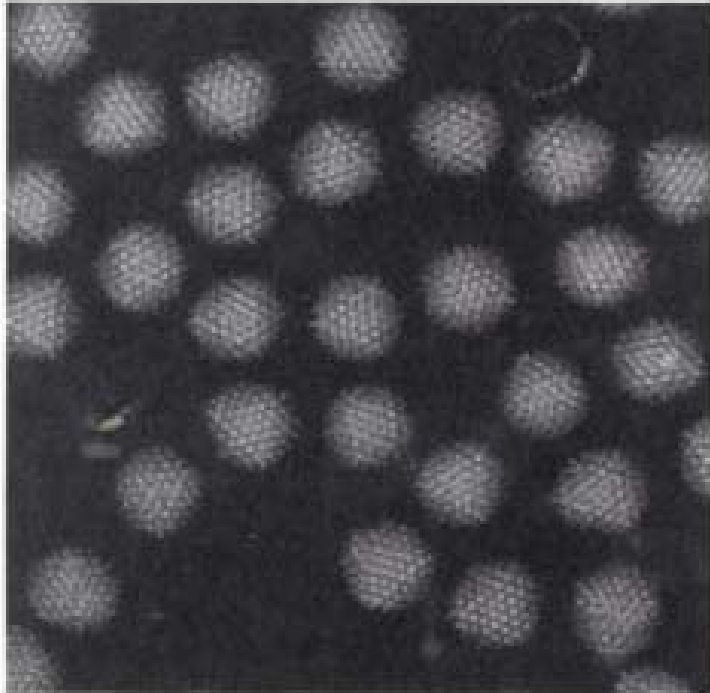
腺病毒的种类很多（80年代初已有80多种），它们的自然宿主有人、猴、牛、犬、鼠、鸟和蛙等。

腺病毒吸附在鸡红细胞上





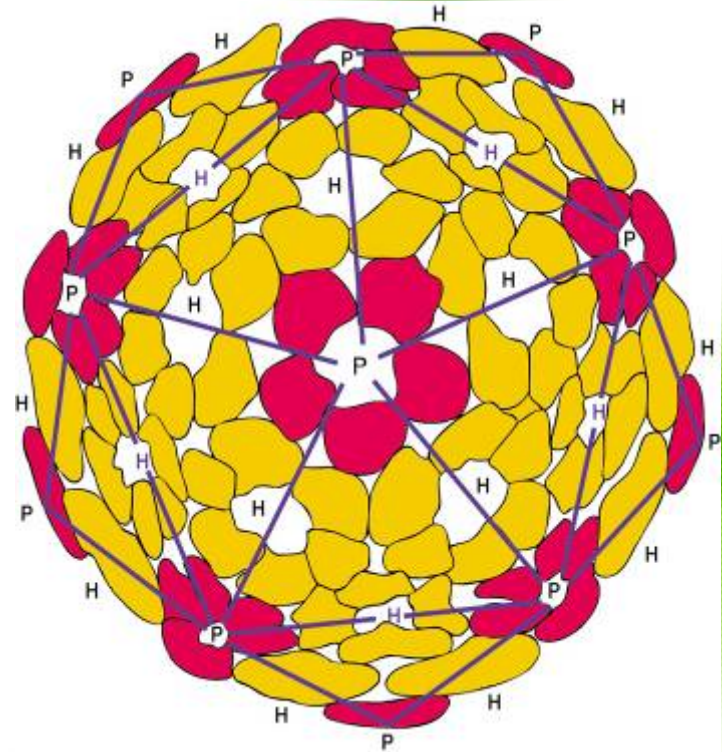
腺病毒的外形呈典型的二十面体，粗看像“球状”，没有包膜，直径为70~80nm。它有12个角、20个面和30条棱。





衣壳由252个衣壳粒组成，  
内有称作五邻体(pento)的衣壳  
粒12个(分子量各为70000Da)，  
分布在12个顶角上，还有称作六  
邻体(hexon)的衣壳粒240个(分  
子量各为120000Da)，均匀分布  
在20个面上。每个五邻体上突出  
一根末端带有顶球的蛋白纤维，  
称为**刺突**。

由42个壳粒构成的二十面体





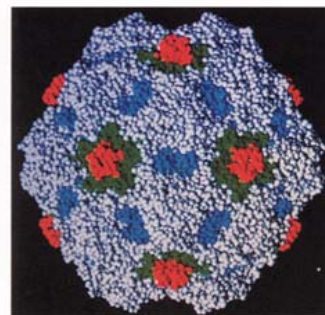
腺病毒的核心是由线状双链DNA (dsDNA)构成的。所

有的腺病毒，不管它们的天然宿主和血清型是什么，其基因组的大小都约为36500个碱基对。

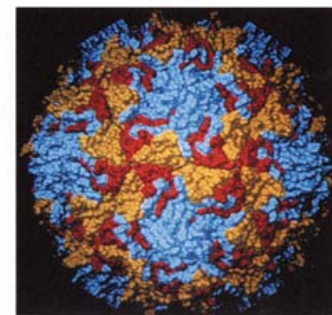
腺病毒只能培养在人的组织细胞(羊膜、HeLa或Hep-2细胞株等)

上，尤其适合长在人胎肾组织细胞上。不能在鸡胚上生长。

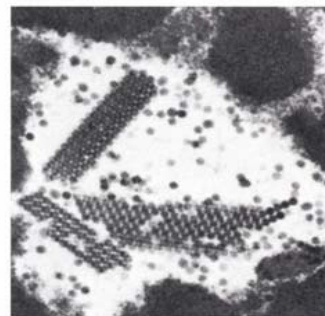
腺病毒在宿主的细胞核中进行增殖和装配，并能使宿主细胞形成包涵体。



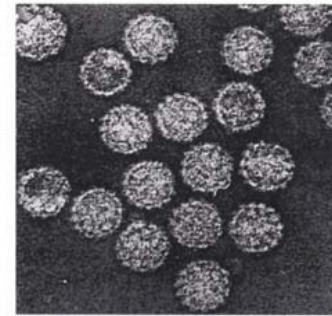
(a)



(b)



(d)

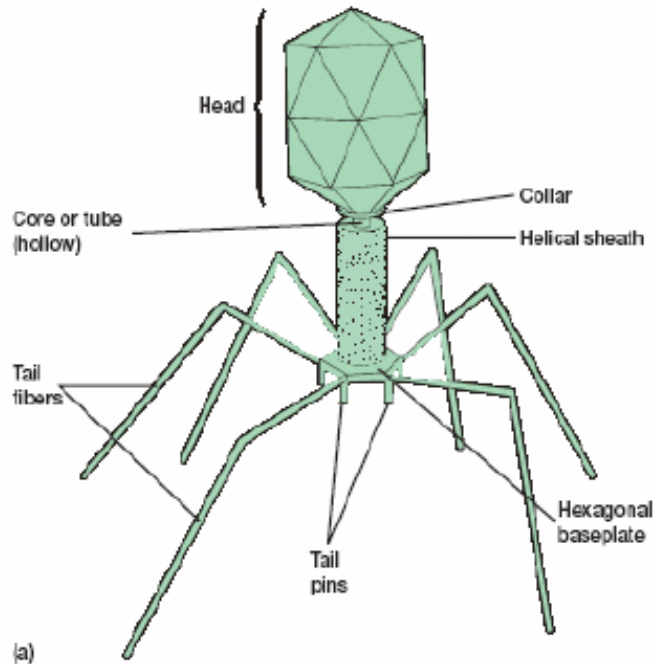


(e)



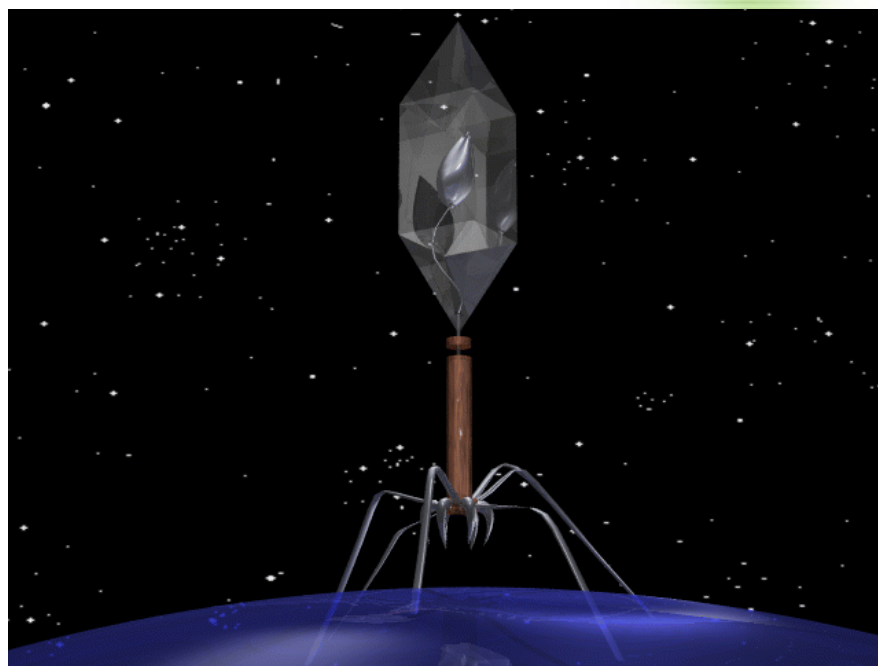
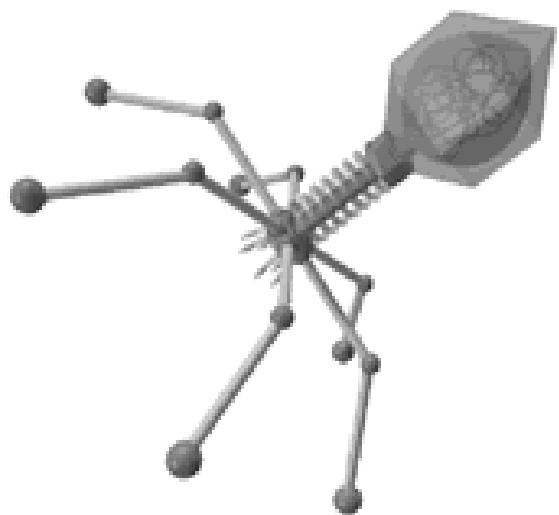
### 3. 复合对称的代表--T偶数噬菌体

大肠杆菌的T偶数(even type)噬菌体共有三种，即T<sub>2</sub>、T<sub>4</sub>和T<sub>6</sub>，在自然界分布极广，是病毒学和分子遗传学研究中的极好材料。





$T_4$ 由头部、颈部和尾部三个部分构成。由于头部呈二十面体对称而尾部呈螺旋对称，故是一种复合对称结构。



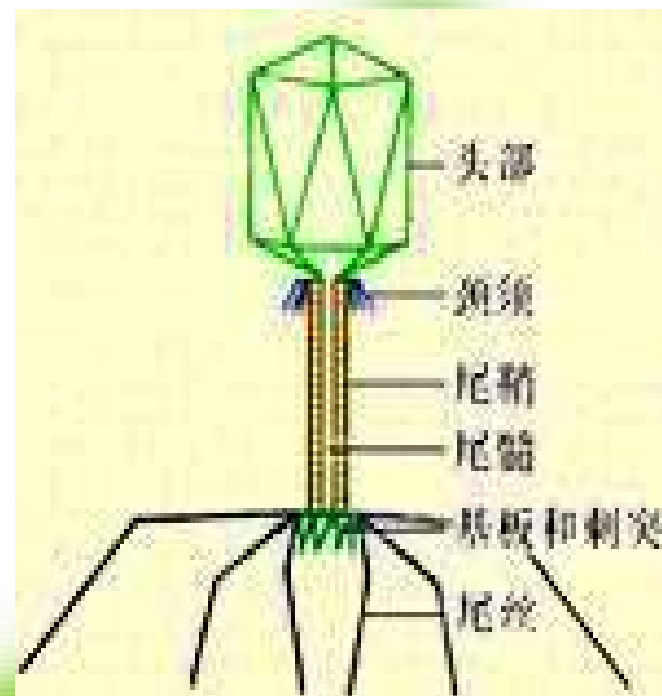


头部在电镜下呈椭圆形二十面体。

颈部由颈环和颈须构成。颈环为一六角形的盘状构造，有6根颈须自颈环上发出，其功能是裹住吸附前的尾丝。

尾部由尾鞘、尾管、基板、刺突和尾丝五部分组成。

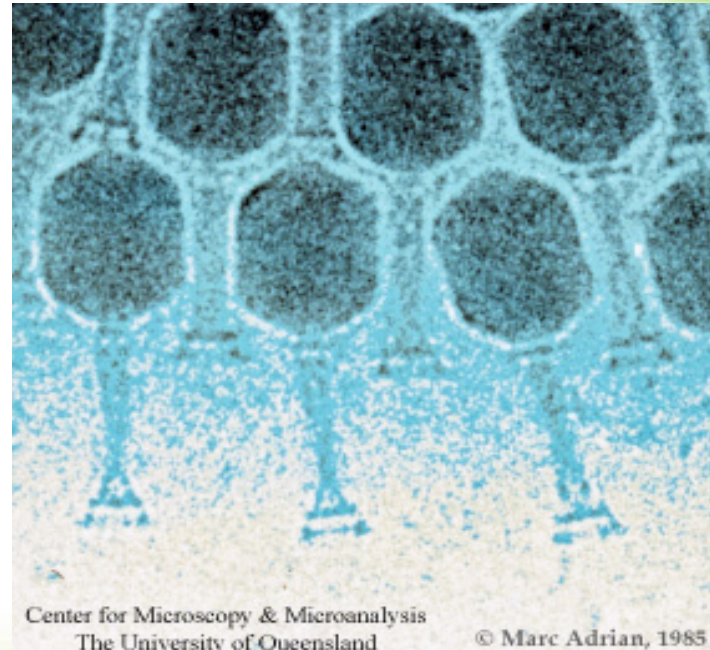
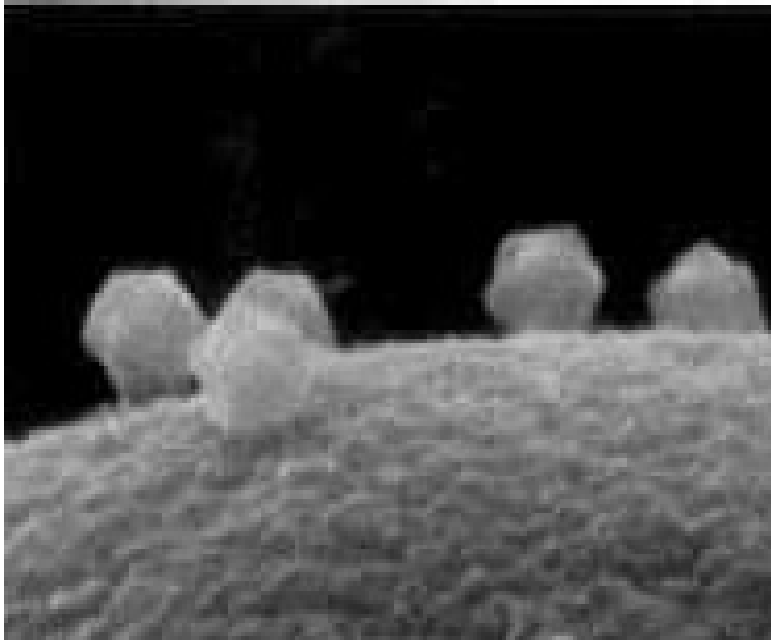
尾鞘可以伸展收缩。尾管在尾鞘内部，中空，感染时病毒DNA由头部通过尾管进入细胞。基板连接在尾部末端，为六角形、结构复杂的盘状物，中空；基板上长着6根尾丝和6个刺突。刺突有吸附功能。尾丝共有6根，具有专一地吸附在敏感宿主细胞表面的相应受体上的功能。







T偶数噬菌体吸附是通过尾部的尾丝。尾丝吸附后，会使基板受到构型的刺激，接着尾鞘蛋白发生收缩，使尾管插入宿主细胞。尾鞘收缩时，其144个蛋白亚基发生复杂的移位效应，使原有尾鞘的长度缩成一半，因此，与肌纤维蛋白的收缩十分相似。





## (四) 病毒的核酸

病毒核酸的类型可从以下几点来区分:

- ① 是**DNA**还是**RNA**,
- ② 是单链 (ss, single strand) 结构还是双链 (ds, double strand) 结构;
- ③ 呈线状还是环状;
- ④ 是闭环还是缺口环;
- ⑤ 基因组是单组分、双组分、三组分还是多组分;
- ⑥ 核酸的碱基 (b, base) 或碱基对 (bp, base pair) 数, 以及核苷酸序列等。





病毒核酸

单链DNA (ss DNA)  
双链DNA (ds DNA)  
单链RNA (ss RNA)  
双链RNA (ds RNA)

动物病毒以线状的dsDNA和ssRNA为多

植物病毒以ssRNA为主

噬菌体以线状的dsDNA居多

真菌病毒都是dsRNA

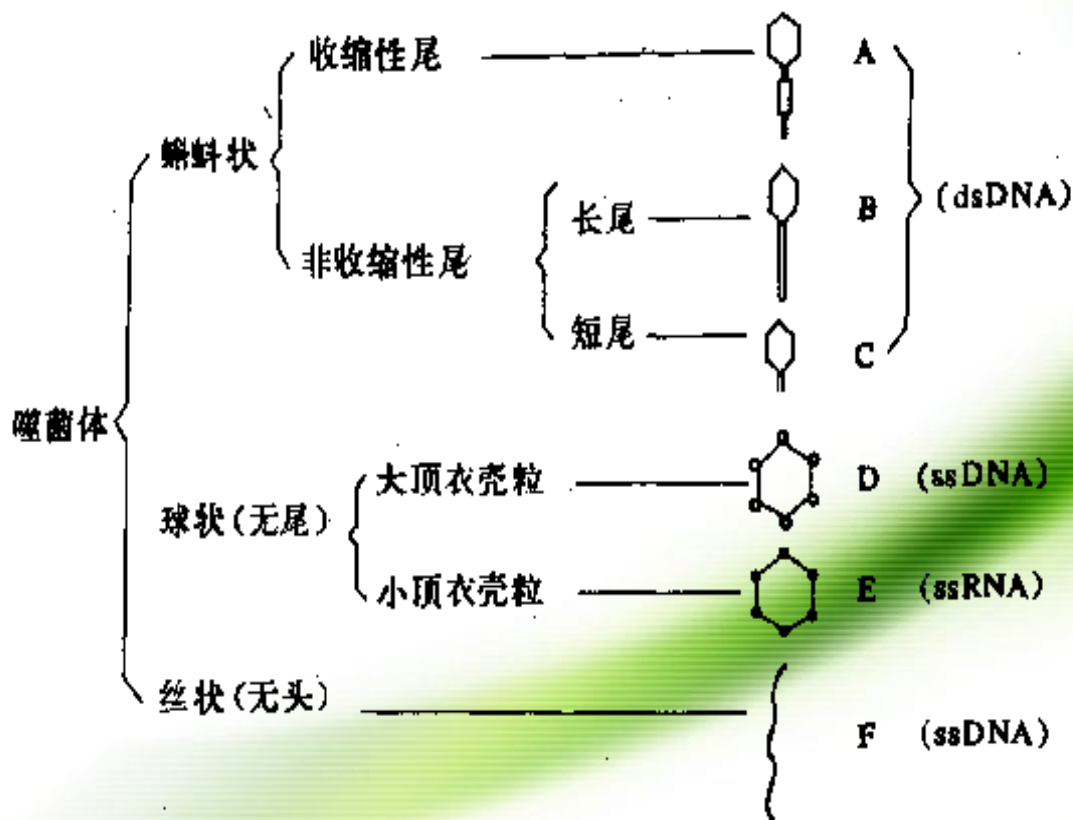
藻类病毒则都是 dsDNA



## 二、各类病毒及其繁殖方式

### (一) 原核生物的疾病——噬菌体

噬菌体包括噬细菌体、噬放线菌体和噬蓝细菌体。至今在绝大多数原核生物中都发现了相应的噬菌体。噬菌体有六类，即





# 1. 噬菌体的繁殖

病毒粒子并无个体的生长过程，而只有其两种基本成分的合成和装配，所以病毒粒之间没有年龄大小之分。

噬菌体的繁殖一般可分五个阶段，即吸附→侵入→增殖(复制与生物合成)→成熟(装配)→裂解(释放)。

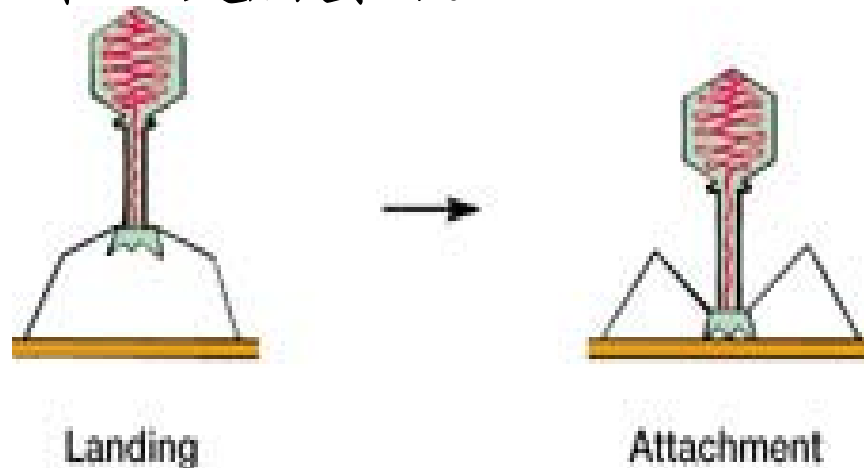
凡在短时间内能连续完成这五个阶段而实现其繁殖的噬菌体，称为**烈性噬菌体**(virulent phage)，反之则称为**温和噬菌体**(temperate phage)。烈性噬菌体所经历的繁殖过程，称为裂解性生活周期(lytic cycle)或增殖性生活周期(productive cycle)。

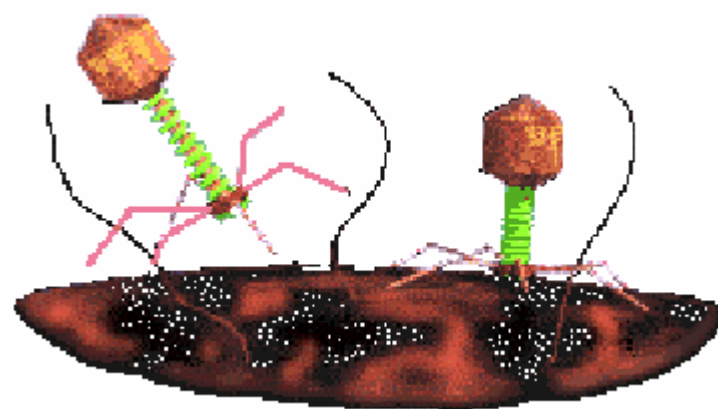
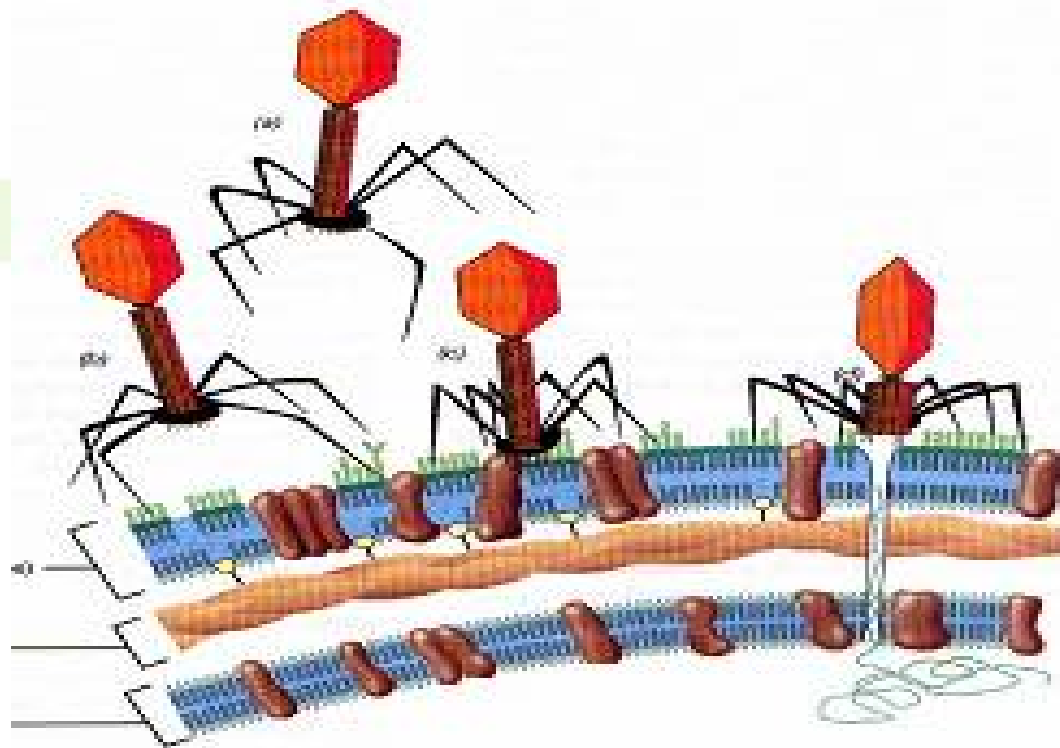


## (1) 吸附 (adsorption)

当噬菌体与宿主细胞在水溶液中发生偶然碰撞后，如果尾丝尖端与宿主细胞表面的特异受体接触，就可触发颈须把卷紧的尾丝散开。紧接着就附着在受体上，从而使刺突、尾板固着于细胞表面。

据研究，一个细菌表面约有300个吸附位点。不同的噬菌体有不同的吸附位点例如，*E.coli*T<sub>3</sub>、T<sub>4</sub>、T<sub>7</sub>的吸附位点是脂多糖，T<sub>2</sub>和T<sub>6</sub>是脂蛋白。







## 吸附作用受许多内外因素的影响

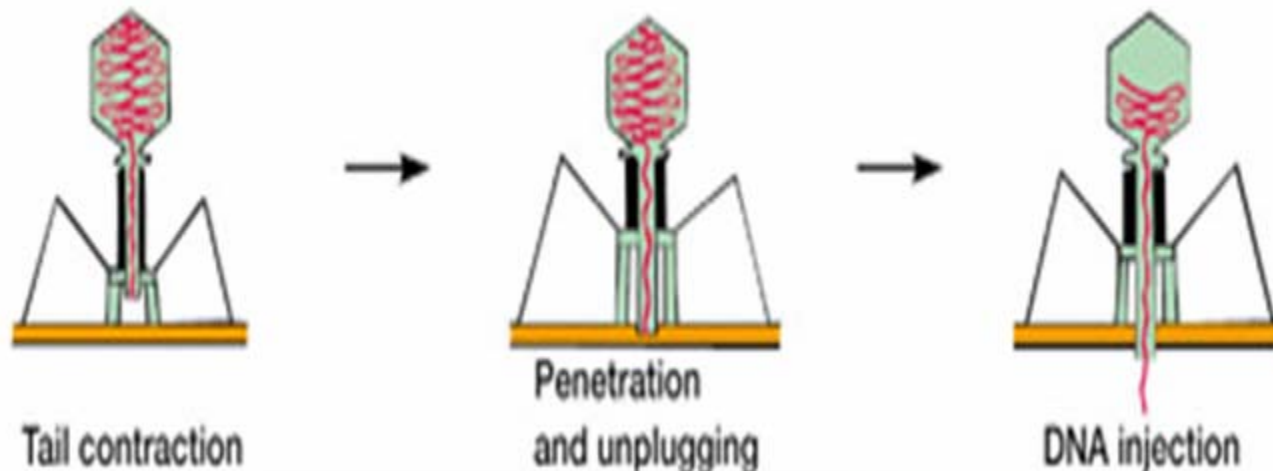
- ① 噬菌体的数量：每一敏感细胞所能吸附的相应噬菌体的数量很大，可达250~360。如大量噬菌体粒子同时吸附于一个敏感细胞，由于每个噬菌体粒子的尾管口都带有少量的溶菌酶，使宿主细胞表面顿时出现“千疮百孔”，从而发生**自外裂解**。
- ② 阳离子： $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 和 $\text{Ba}^{2+}$ 等阳离子对吸附有促进作用； $\text{Al}^{3+}$ 、 $\text{Fe}^{3+}$ 等阳离子则可引起失活。
- ③ 辅助因子：色氨酸可促进 $T_4$ 的尾丝摆脱颈须的束缚，有促吸附作用；生物素可促进产谷氨酸细菌噬菌体的吸附作用。
- ④ pH值：中性时有利于吸附，在 $\text{pH}<5$ 和 $\text{pH}>10$ 时不易吸附。
- ⑤ 温度：往往在生长最适温度范围内最有利于吸附。

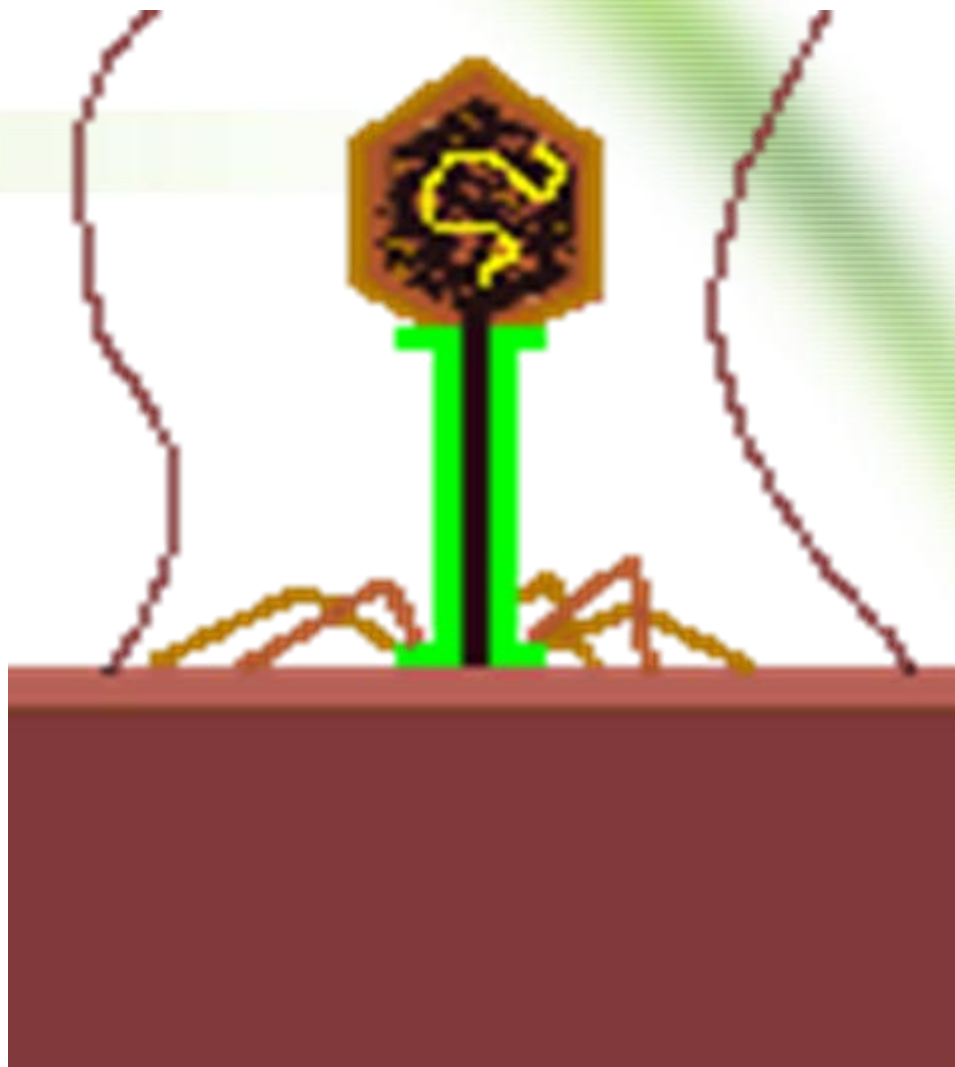




## (2) 侵入 (penetration)

吸附后，基板从尾丝中获得一个构型刺激，促使尾鞘中的亚基发生复杂的移位，并缩成原长的一半，由它把尾管推出并插入到细胞壁和膜中。在这一过程中，尾管端所携带的少量溶菌酶有助于局部细胞壁中肽聚糖的溶解。接着，头部的核酸即可通过尾管注入到宿主细胞中，而将蛋白质衣壳留在细胞壁外。从吸附到侵入的时间一般很短，在合适温度下， $T_4$ 只需要15秒。





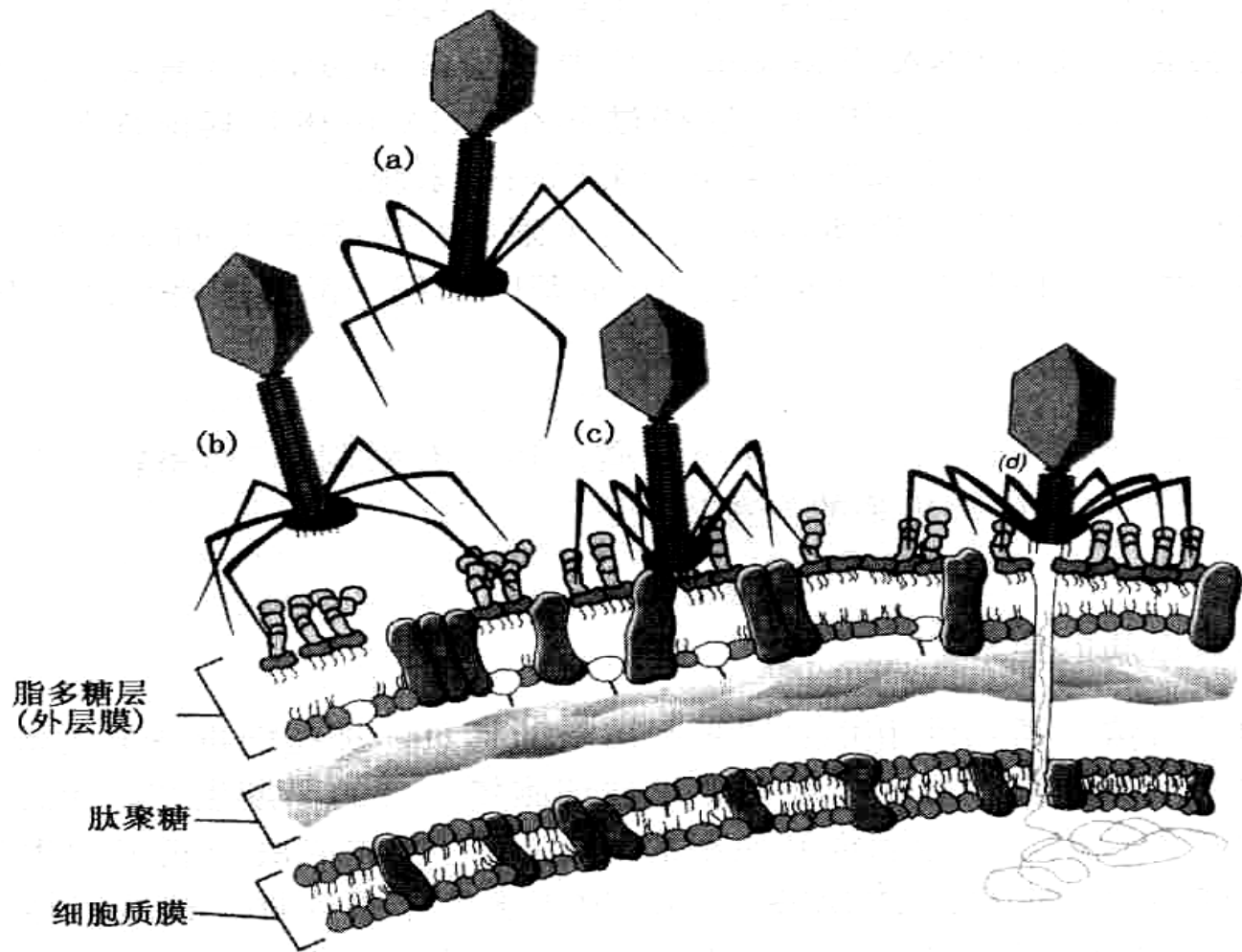


图 8.10 T4 噬菌体颗粒对大肠杆菌细胞壁的吸附和 DNA 的注入：(a) 未吸附的颗粒。(b) 长的尾丝与核心多糖相互作用吸附在细胞壁上。(c) 尾针接触细胞壁。(d) 尾鞘收缩和 DNA 注入。革兰氏阳性细胞壁的详细描述见第 3.6 节。



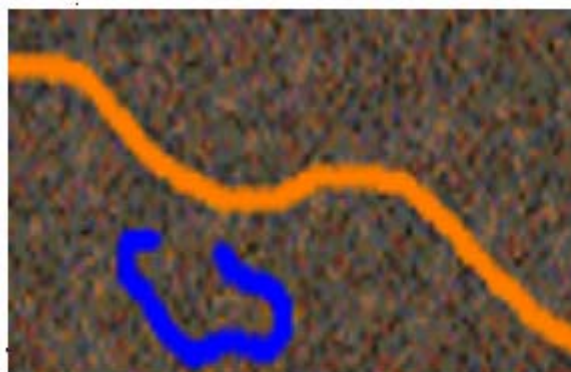
T4噬菌体感染大肠杆菌的电镜照片



### (3) 增殖 (replication)

增殖过程包括核酸的复制和蛋白质的生物合成。

首先，噬菌体以其核酸中的遗传信息向宿主细胞发出指令并提供“蓝图”，使宿主细胞的代谢系统按次序地逐一转向合成噬菌体的组分和“部件”，合成所需“原料”可通过宿主细胞原有核酸等的降解代谢库内的贮存物或从环境中取得。一旦大批成套的“部件”已合成，则在细胞“工厂”里就进行突击装配，于是就产生了一大群大小相等的、成熟的子代噬菌体粒子。



左图：病毒核酸链接入寄主核酸链  
右图：病毒核酸复制

## 病毒核酸的复制



## (4) 成熟(装配)

噬菌体的成熟(maturity)过程实际上是其已合成的各部件的装配(assembly)过程。在 $T_4$ 噬菌体的装配过程中，约有30个不同的蛋白和至少47个基因参与。



DNA分子的缩合→通过衣壳包裹DNA而形成头部→尾丝和尾部的其他部件独立装配完成→头部与尾部相结合→最后装上尾丝。至此，一个个成熟的、大小相等的噬菌体粒子就装配完成了。

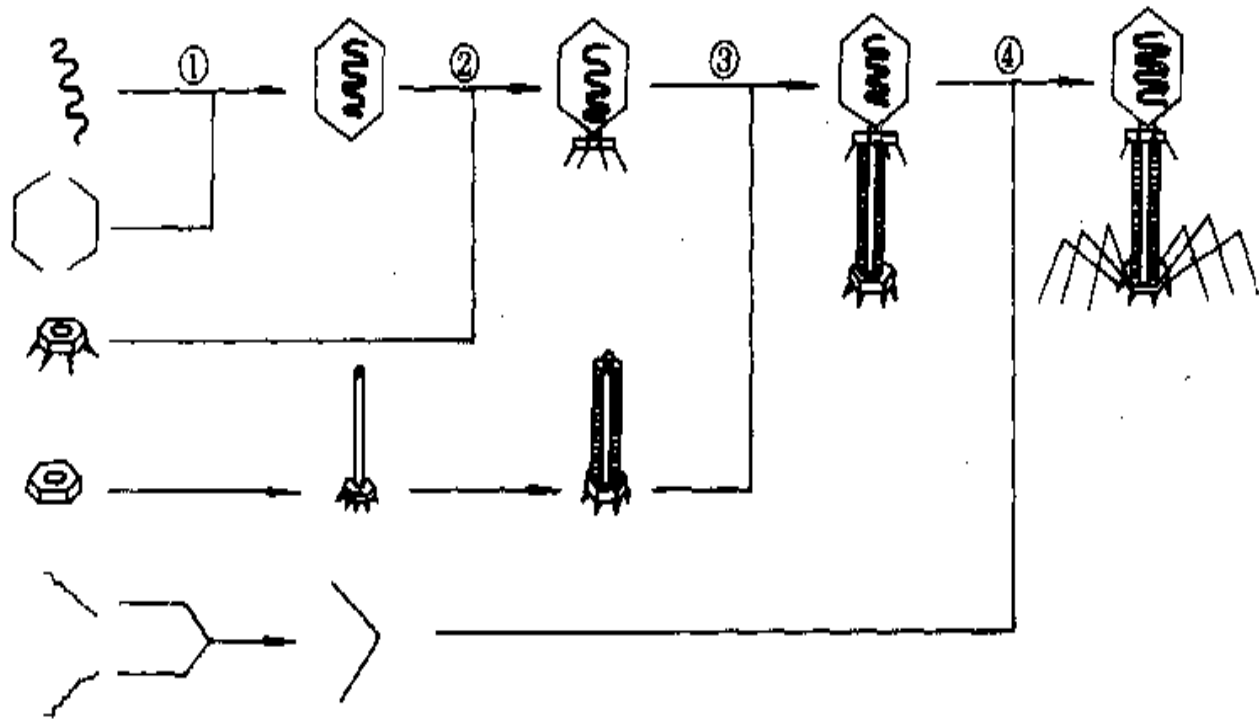


图 4-7 T 偶数噬菌体的装配过程

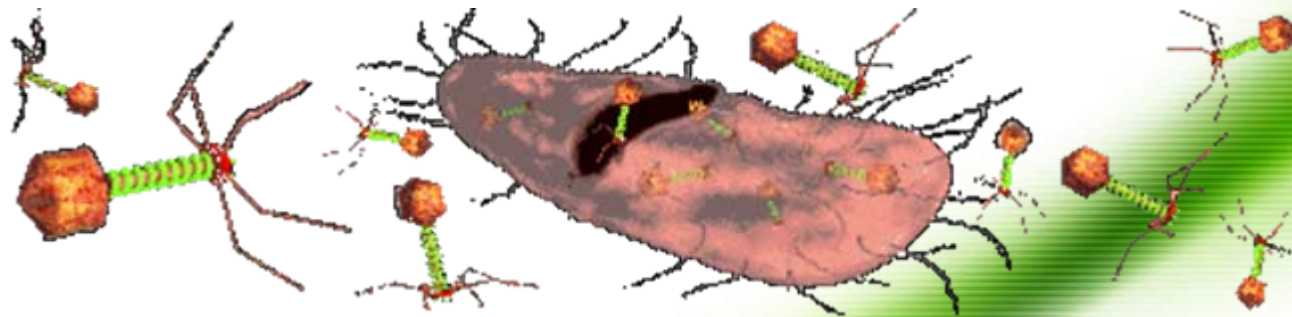




## (5) 裂解(释放)

当宿主细胞内的大量子代噬菌体已成熟后，由于水解细胞膜的脂肪酶和水解细胞壁的溶菌酶的作用，从细胞内部促进了细胞的裂解，从而实现了噬菌体的释放(release)。

每一个宿主细胞裂解后所产生的子代噬菌体量称裂解量(burst size)。不同的噬菌体有不同的裂解量，例如 $T_2$ 为150左右， $T_4$ 约100， $\phi X174$ 约1000，而f2则可高达10000左右。



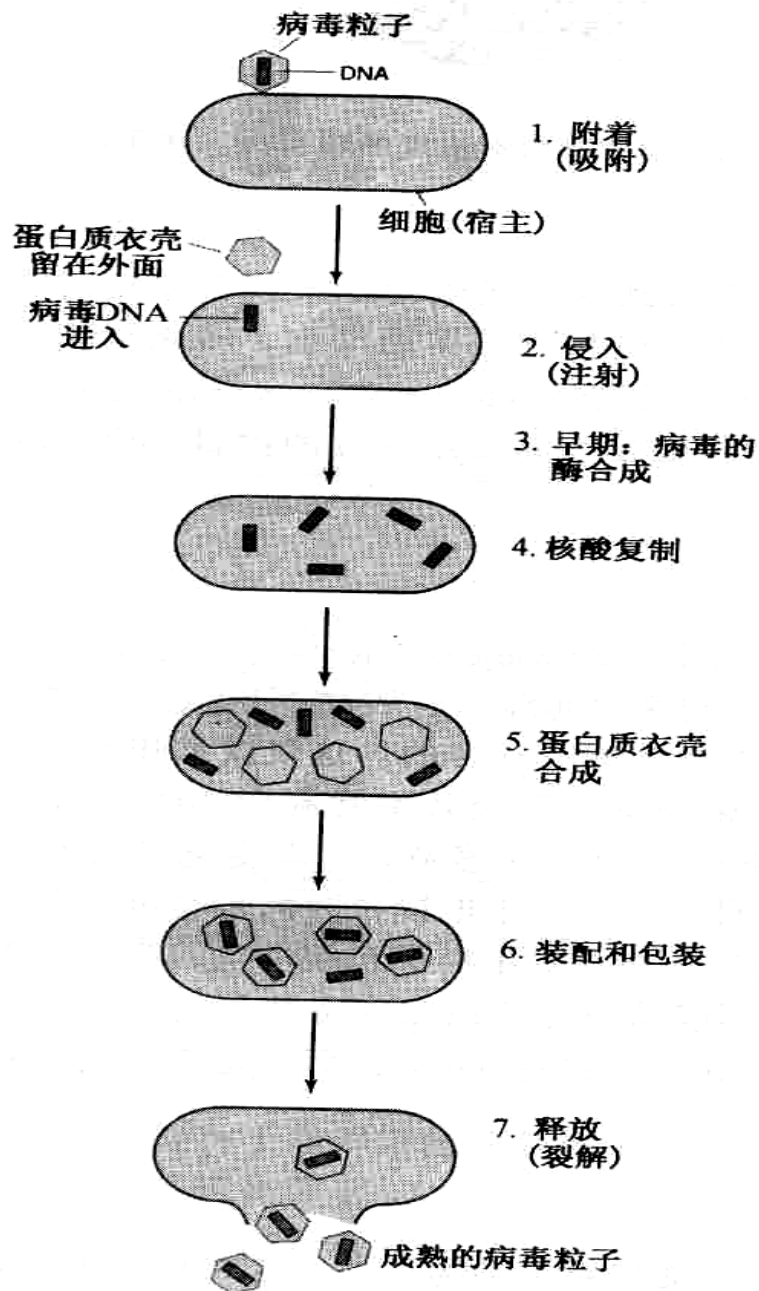
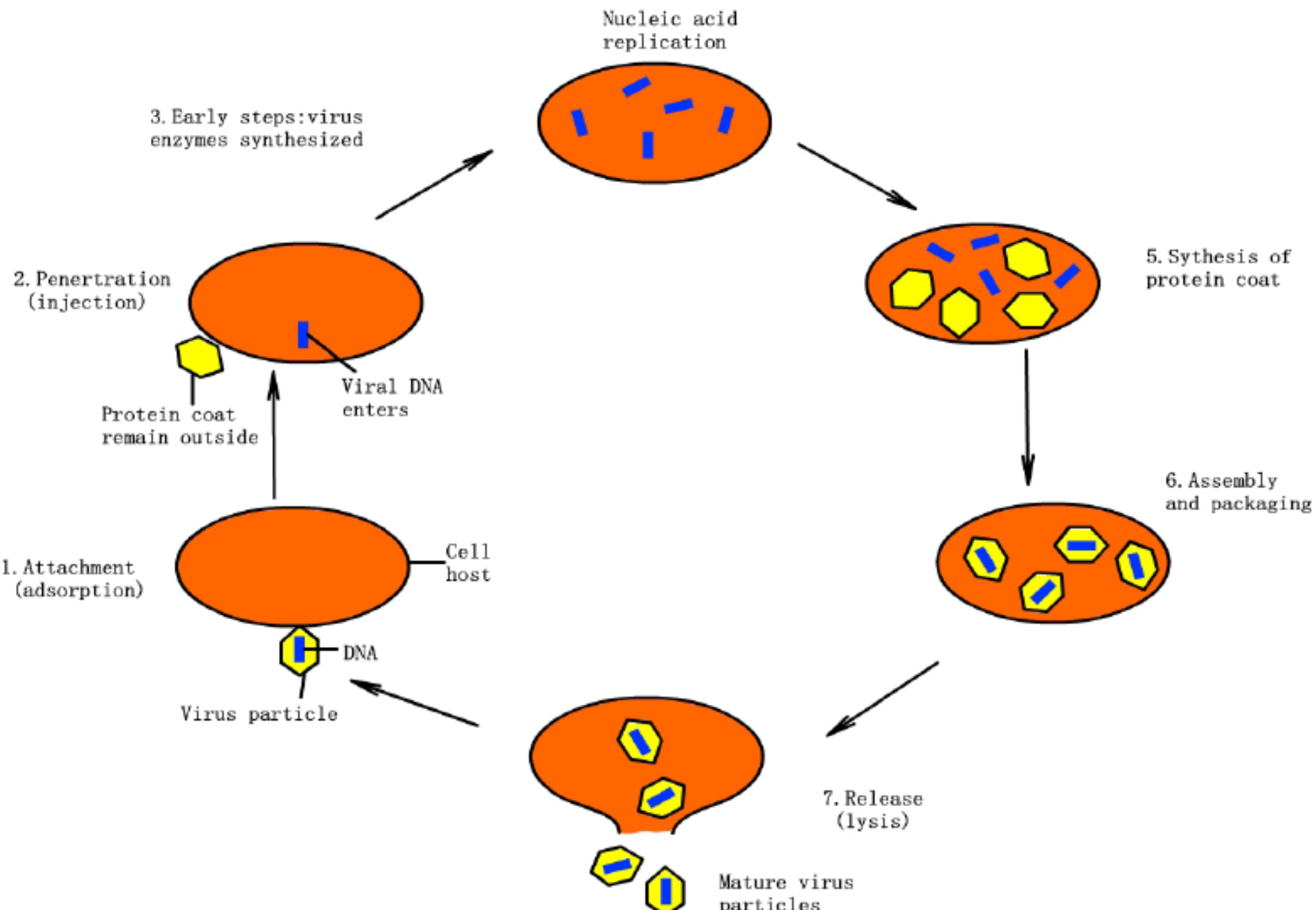
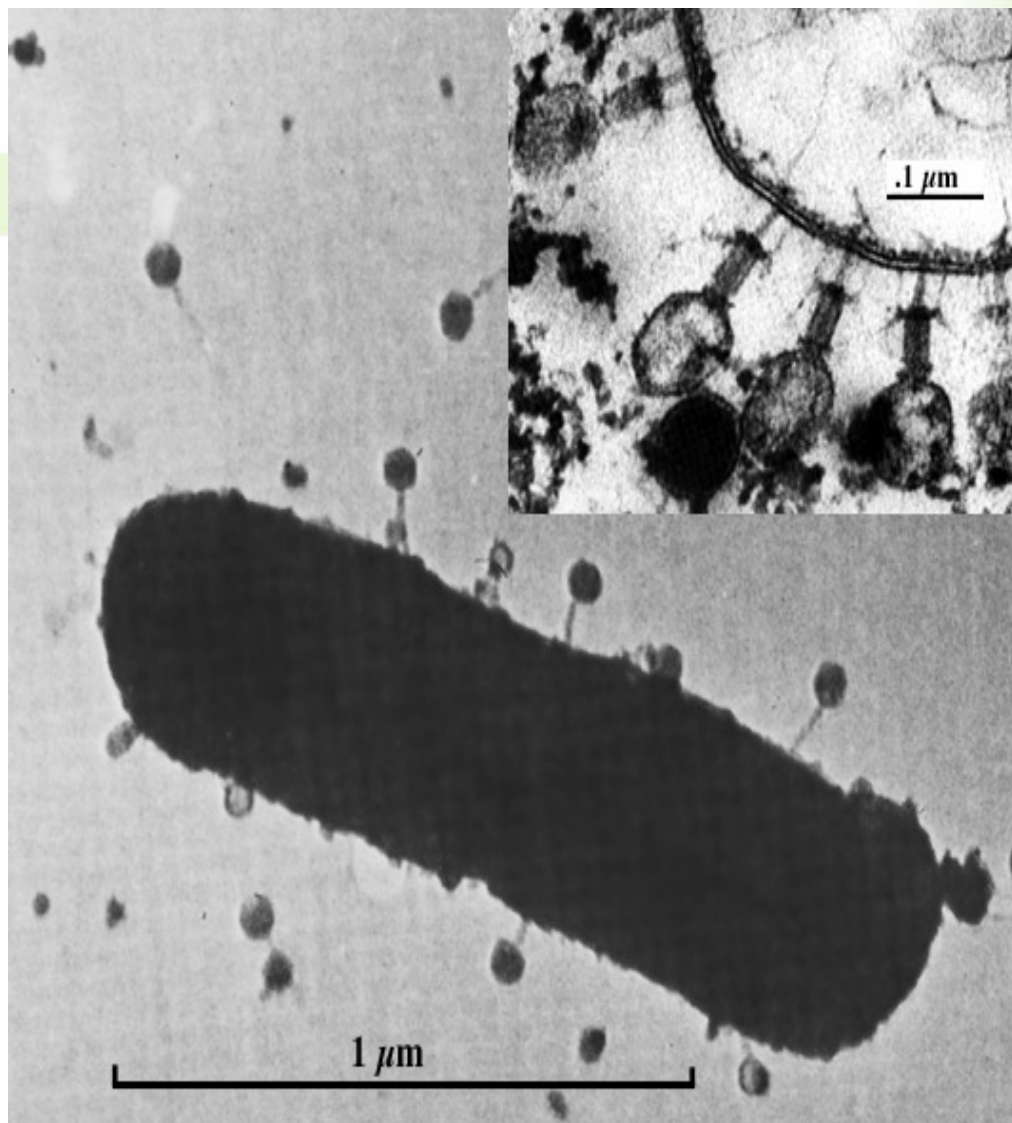


图 8.8 细菌病毒的复制循环。由此说明病毒复制的一般阶段。

# The Replication Cycle of a Bacterial Virus





一种噬菌体感染大肠杆菌



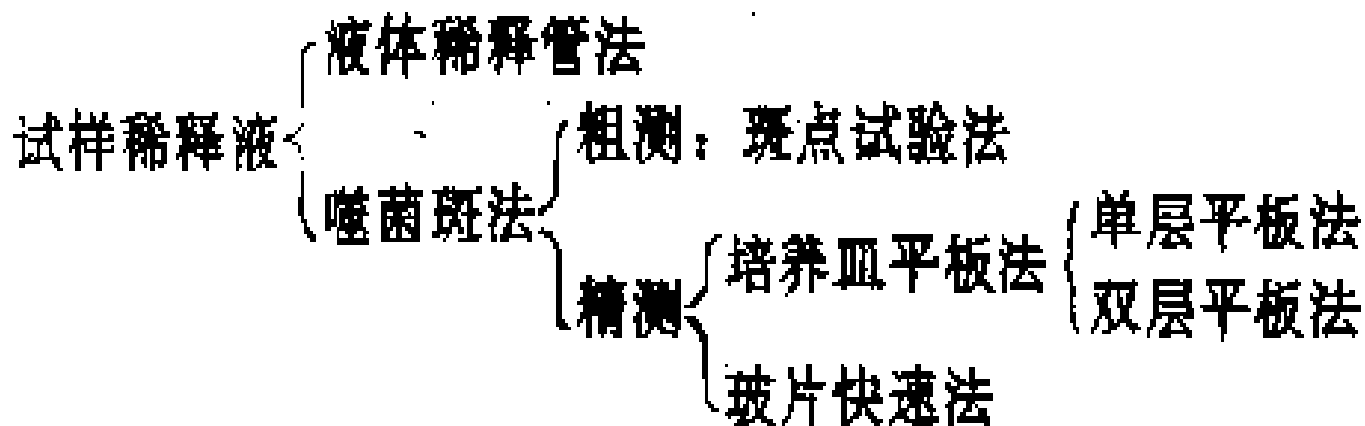
## 2. 噬菌体效价的测定

在菌苔上逐步形成的噬菌体群体，由于其侵蚀宿主细胞的结果，会使菌苔上出现一个个噬菌斑。因每种噬菌体的噬菌斑有一定的形状、大小、边缘和透明度，故可用作鉴定的指标，也可利用噬菌斑进行纯种分离和计数。噬菌体只形成“负菌落”。一个直径仅为2mm的噬菌斑，其中噬菌体粒子的数目即高达 $10^7 \sim 10^9$ 个。。

效价(titre, titer)这一名词在不同的场合有其不同的含义。在这里，效价表示每毫升试样中所含有的侵染性的噬菌体粒子数，也即噬菌斑形成单位(pfu, plaque-forming unit)数或感染中心(infective centre)数。



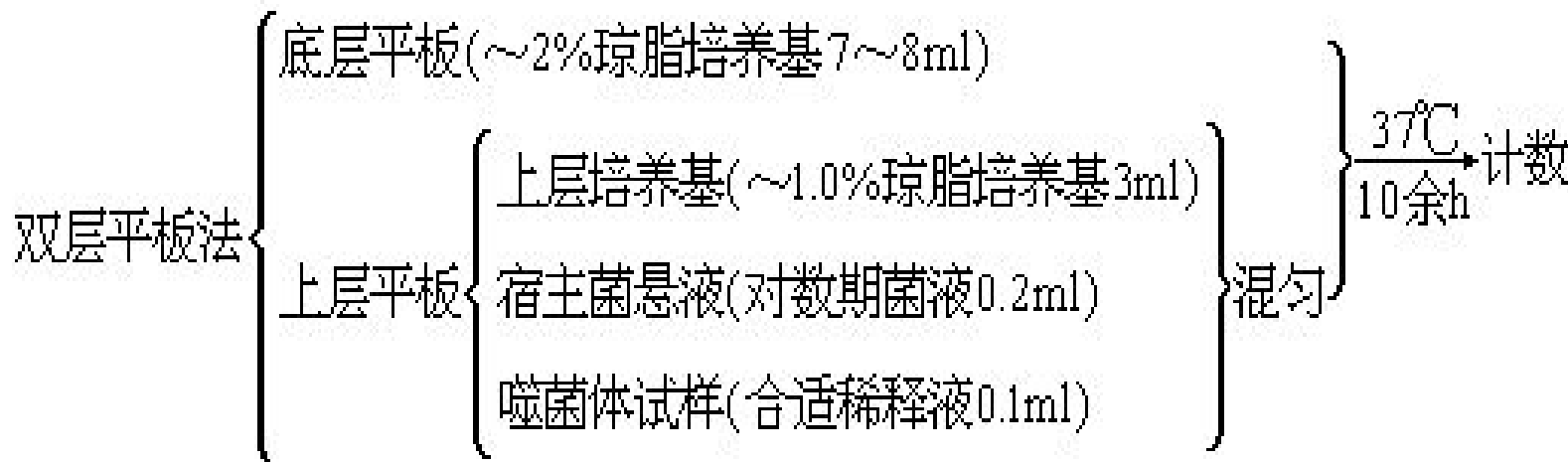
由于试样中一般噬菌体粒子含量较高，故应先对试样进行梯级稀释，然后再选用合适的方法（见以下表解）测定其效价。

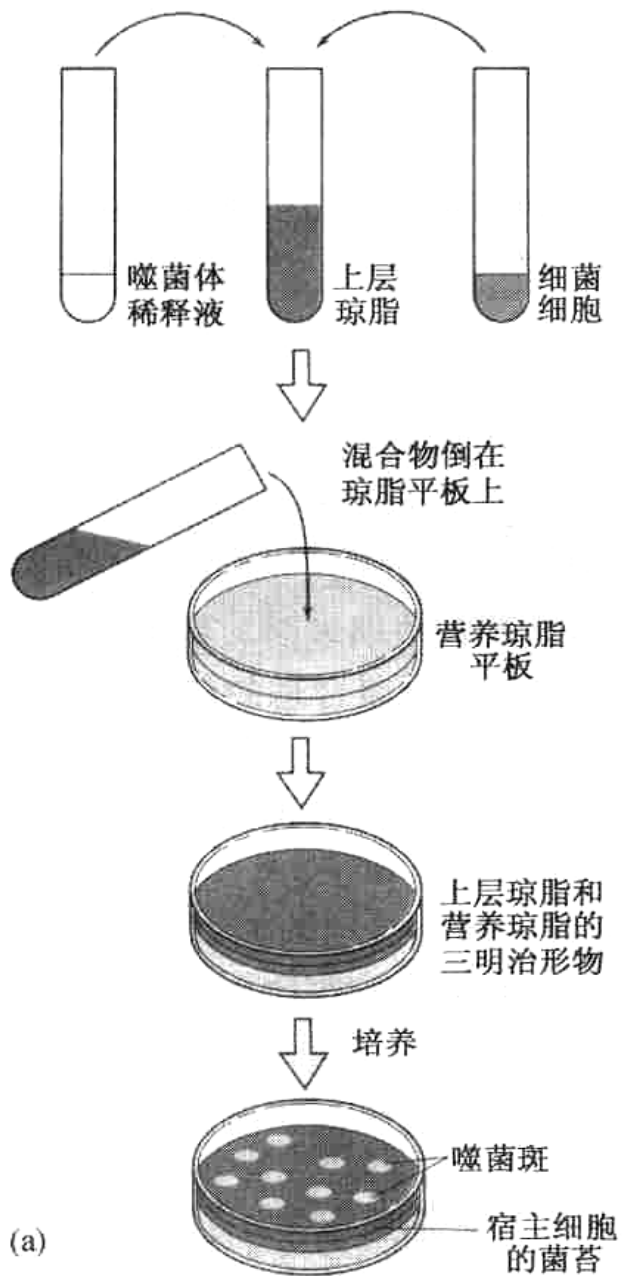




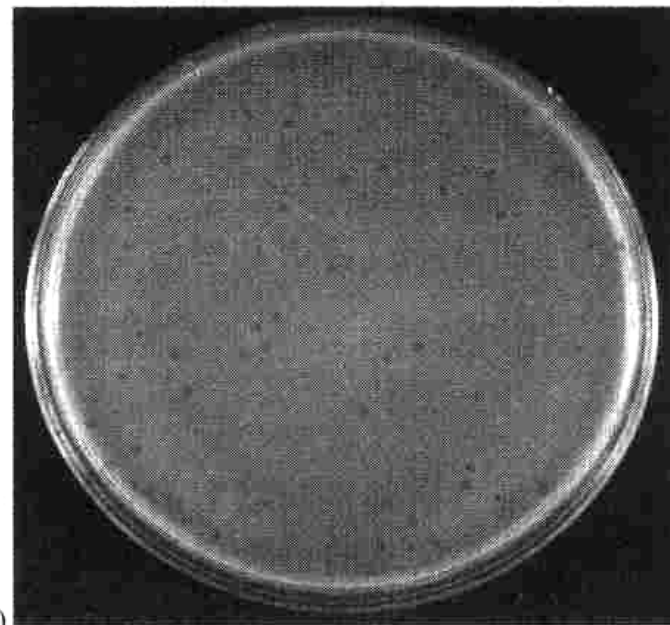
# 双层平板法

是一种被普遍采用并能精确测定效价的方法。预先分别配制含2%和1%琼脂的底层培养基和上层培养基。先用前者在培养皿上浇一层平板，再在后者(须先融化并冷却到45℃以下)中加入较浓的对数期敏感菌和一定体积的待测噬菌体样品，于试管中充分混匀后，立即倒在底层平板上铺平待凝，然后保温。一般经十余小时后即可进行噬菌斑计数。

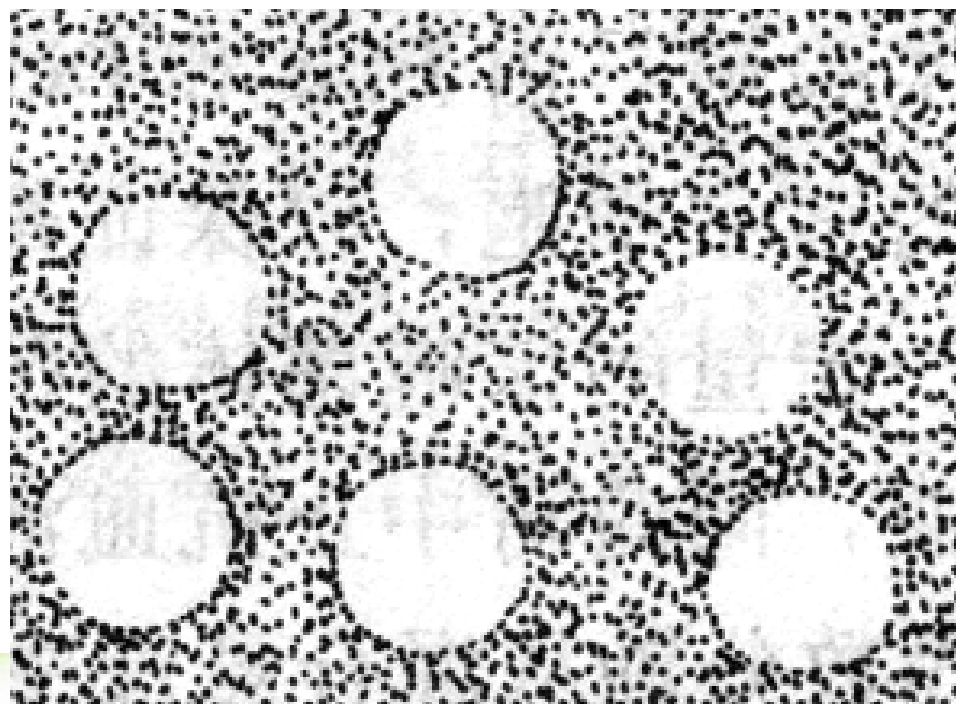




(a)



(b)

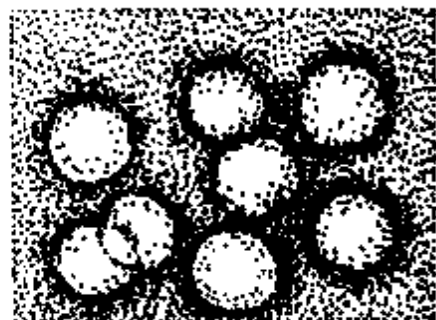
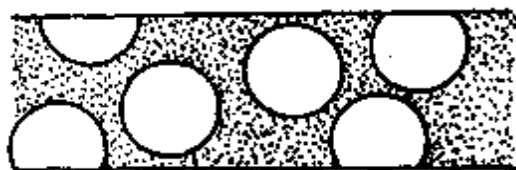




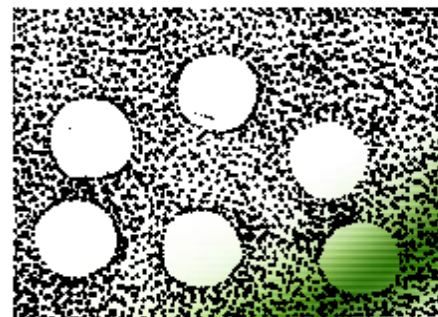


双层平板法主要有以下几个优点：

- ①底层培养基使原来底面不平的玻璃皿的缺陷得到了弥补，
- ②全部噬菌体斑都接近处于同一平面上，不仅每一噬菌斑的大小接近、边缘清晰，而且不致发生上下噬菌斑的重叠现象；
- ③上层培养基中琼脂较稀，形成的噬菌斑较大，有利于计数。



单层平板法  
(上：侧面观，下：顶面观)



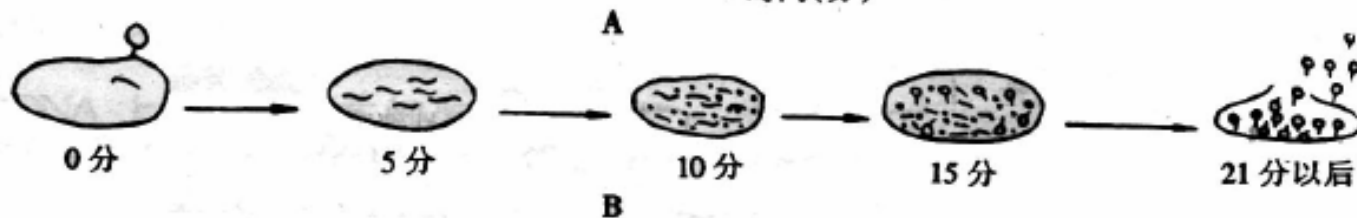
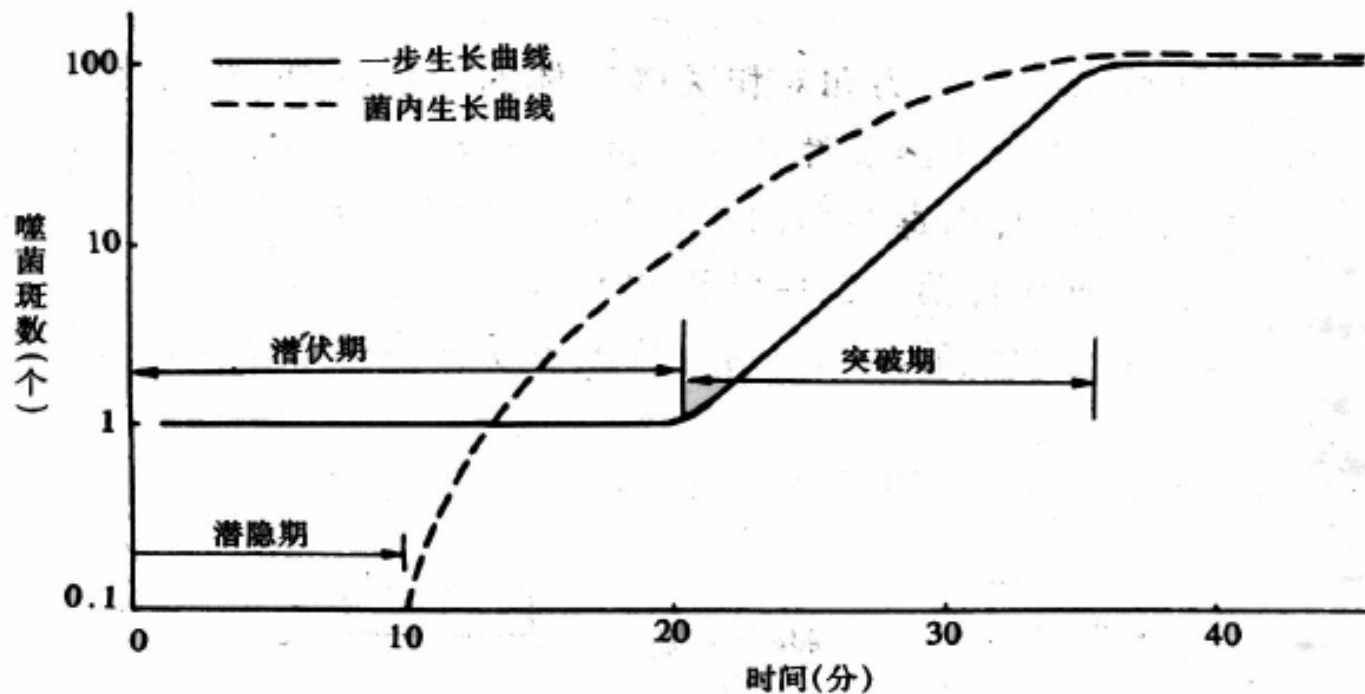
双层平板法  
(上：侧面观，下：顶面观)

图 4-8 双层平板法与单层平板法所形成的噬菌斑的比较



### 3. 一步生长曲线

一步生长曲线：定量描述烈性噬菌体生长规律的实验曲线称为一步生长曲线。分潜伏期，裂解期，平稳期。





## (1) 潜伏期

指噬菌体的核酸侵入宿主细胞后至第一个噬菌体粒子装配前的一段时间，整段潜伏期中没有一个成熟的噬菌体粒子从细胞中释放出来。

潜伏期又可分两段：

① 隐晦期(**eclipse phase**)，指在潜伏期前期人为地(用氯仿)裂解细胞，裂解液仍无侵染性的一段时间。

② 胞内累积期(**intracellular accumulation phase**)，又称潜伏后期。指在隐晦期后，如人为地裂解细胞，其裂解液已出现侵染性的一段时间。这是菌体开始装配的时期，电镜下可观察到已初步装配好的噬菌体粒子。



## (2) 裂解期

紧接在潜伏期后的一段宿主细胞迅速裂解、溶液中噬菌体粒子急剧增多的一段时间。噬菌体或其他病毒因没有个体生长，只有个体装配再加上其宿主细胞裂解的突发性，因此，从理论上来分析，裂解期应是瞬时的。但事实上因为细菌群体中各个细胞的裂解不可能是同步的，故实际上的裂解期还是较长的（见图）。



### (3) 平稳期 (plateau)

指感染后的宿主已全部裂解，溶液中噬菌体效价达到最高点后的时期。

平稳期中，每一宿主细胞释放的平均噬菌体粒子数称裂解量。



一步生长曲线实验最早由Ellis和Delbruck(1939)所设计。其基本步骤是：用噬菌体的稀悬液去感染高浓度的宿主细胞，以保证每个细胞至多不超过一个噬菌体吸附。经数分钟吸附后，混合液中加入一定量的该噬菌体的抗血清，借以中和尚未吸附的噬菌体。然后用保温的培养液稀释此混合液，同时可中止抗血清的作用。随即置于该细菌最适生长温度下培养。在一定的时间内，每隔数分钟从混合悬液中取出一份试样，并作效价测定。



## 4. 溶源性

### (1) 温和噬菌体

吸附并侵入宿主细胞后，噬菌体的DNA只整合在宿主的基因组上，并可长期随宿主DNA的复制而进行同步复制，因而在一般情况下不进行增殖和引起宿主细胞裂解的噬菌体，称温和噬菌体(temperate phage)或溶源噬菌体 (lysogenic phage)。这种温和噬菌体侵入宿主细胞而不引起宿主细胞裂解，即称溶源性或溶源现象。其宿主细胞称为溶原菌。



图 4-10 烈性噬菌体与温和噬菌体生活史的比较  
(上半部粗箭头指的为裂解性循环，下半圈为溶源性循环)





## 温和噬菌体的特点

- ① 具有整合能力，当温和噬菌体侵入其敏感宿主的细胞后，前者的核酸可整合到后者的核基因组上，这种处于整合态的噬菌体核酸，称作前噬菌体(prophage)；
- ② 具有同步复制能力，前噬菌体在一般情况下不进行复制和增殖，而是随宿主细胞的核基因组的复制而同步复制，并平均分布到两个子代细胞中去，如此代代相传。
- ③ 免疫性



温和噬菌体的存在形式有三种：

- ① 游离态：指已成熟释放并有侵染性的游离噬菌体粒子；
- ② 整合态：指整合在宿主核染色体上处于前噬菌体的状态（一种潜伏的形式）
- ③ 营养态：指前噬菌体经外界理化因子诱导后，脱离宿主核基因组而处于积极复制和装配的状态。

温和噬菌体的种类很多，常见的有*E.coli*的 $\lambda$  Mu-1、P-1和P-2噬菌体等。其中， $\lambda$ 噬菌体是研究最为透彻的一种温和噬菌体。



## (2) 溶源菌(lysogen或lysogenic bacteria)

在自然界中各种细菌、放线菌等都有溶源菌存在。溶源菌有以下几个特性:

①自发裂解, 在溶源菌的分裂过程中, 会有 $10^{-2}$ ~ $10^{-5}$ 个细胞发生自发裂解(spontaneous lysis), 其原因是由于少数细胞中原来处于整合态的前噬菌体转变成营养态的裂解性噬菌体(lytic phage)之故;

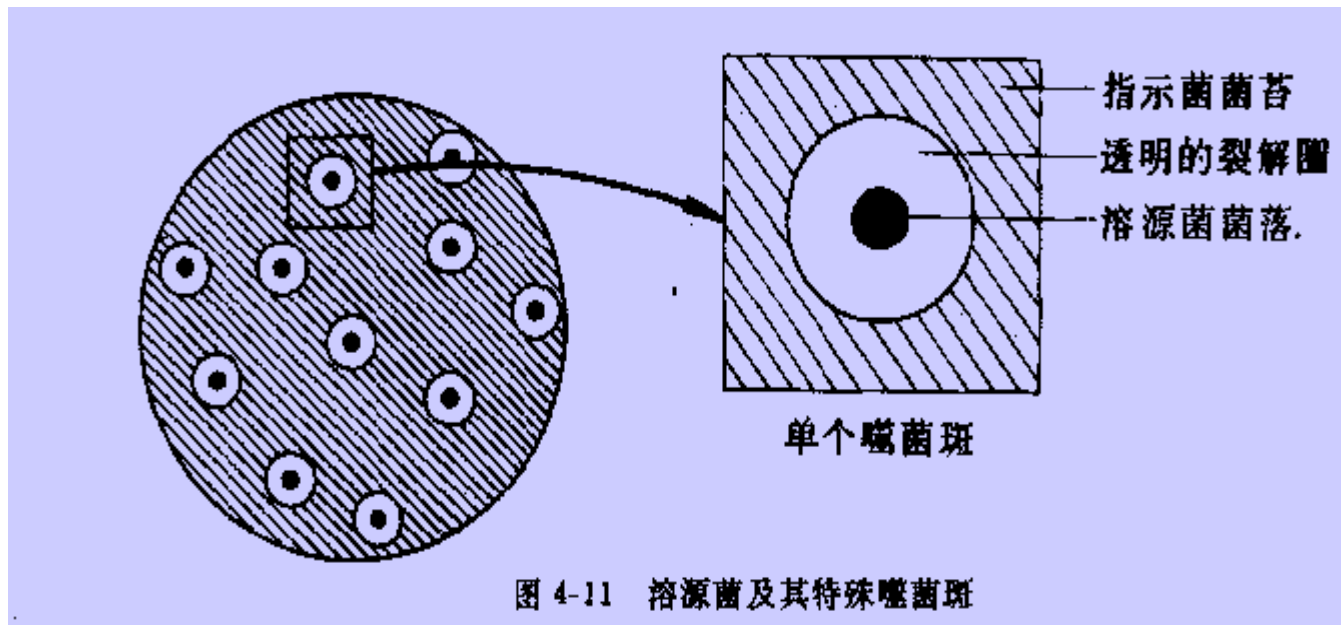
②复愈, 在溶源性细菌群体的增殖过程中, 一般有 $10^{-5}$ 的个体丧失其前噬菌体, 并成为非溶源性的细菌, 这一过程称为复愈或非溶源化, 复愈后的细胞其免疫性也随之丧失;

③免疫性



# 检验溶源菌的方法：

将少量溶源菌与大量的敏感性指示菌（遇溶源菌裂解后所释放的温和噬菌体会发生裂解性生活周期者）相混合，然后与琼脂培养基混匀后倒一平板。过一段时间后溶源菌就长成菌落。由于在溶源菌分裂过程中有极少数个体会发生自发裂解，其释放的噬菌体可不断侵染溶源菌菌落周围的指示菌菌苔，所以会产生一个个中央有溶源菌小菌落、四周有透明圈的**独特噬菌斑**。





# 第二节 亚病毒



亚病毒不具有真病毒的形态结构，能利用非自身编码的酶系统进行复制，有侵染性，并可在宿主中引起症状。

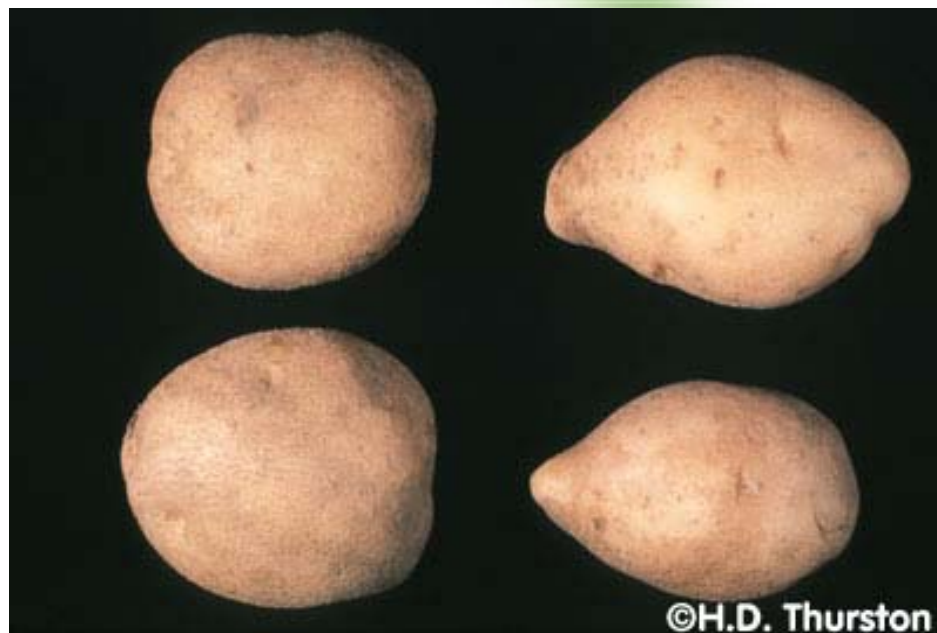
亚病毒主要有类病毒、拟病毒和朊病毒。



# 一、类病毒

## 1. 发现

马铃薯纺锤形块茎病 (potato spindle tuber disease, PSTD) 是1922年在美国发现的，它可使马铃薯减产20~70%。我国于1960年时在黑龙江省发现，减产极其严重。





1967~1971年，瑞士学者Diener发现，患PSTD的块茎抽提物经超离心和凝胶电泳后，出现一条比一般病毒分子更小的区带，而健康的块茎却没有。

经一系列试验后，证明它是一个没有衣壳包裹的RNA分子，经过电镜观察，发现它是一条长50nm的棒状dsRNA分子，他称它为马铃薯纺锤形块茎病类病毒 (potato spindle tuber viroid, PSTV)。从此，一类新的病原体——类病毒就被广泛承认并进行了深入的研究。





**类病毒：**只含有RNA一种化学组分，专性活细胞内寄生的分子病原体。

在1977~1988年间陆续发现的类病毒已有18种，例如番茄散顶病、柑橘裂皮病、菊花矮化病、菊花褪绿斑驳病、黄瓜白果病、椰子死亡病和酒花矮化病等的类病毒。



## 2. 特点

可以认为，类病毒是当今所知道的最小、只含RNA一种成分、专性活细胞内寄生的分子生物。

表 4-4 类病毒的特点及其与病毒的比较

比较项目	病 毒	类病毒
大小	大	小
成分	核酸和蛋白质等	裸露的 RNA 分子
核酸分子量	$10^6 \sim 10^8 \text{Da}$	$\sim 10^5 \text{Da}$
耐热性	50 ~ 60 °C 下失活	至 90 °C 下仍存活
传播特点	一般不能通过种子传播	可通过种子传播



### 3. 结构

大量实验证明，PSTV呈棒形结构，是一个裸露的闭合环状ssRNA分子。整个环由2个互补的半体所组成，其一含179个核苷酸，另一含180个核苷酸，两者间有70%的碱基以氢键方式结合，共形成122个碱基对。整个棒状结构中有27个内环。

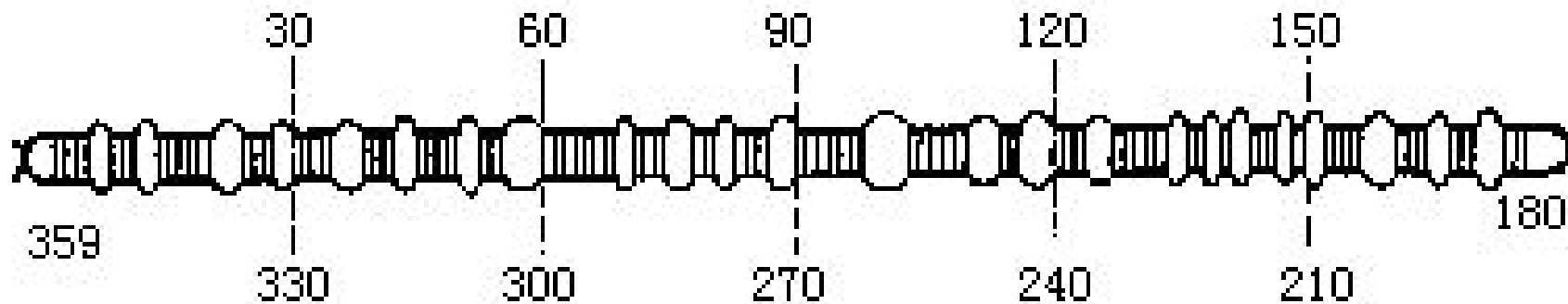


图4-16 马铃薯纺锤形块茎类病毒（PSTV）的结构模型



## 二、拟病毒

### 1. 发现

1981年Randles等在绒毛烟上分离到一种直径为30nm的二十面体病毒，称为绒毛烟斑驳病毒(VTMov, velvet tobacco mottle virus)。当他们在鉴定该病毒时，发现其基因组除含一种大分子线状ssRNA(称RNA-1)外，还含有一种类似于类病毒的环状ssRNA分子(称RNA-2)及它的线状形式(称RNA-3)。



进一步研究表明，对VTMoV的RNA-1和RNA-2进行单独接种时，都不能感染和复制，只有当RNA-1（辅助病毒）和RNA-2或RNA-3合在一起时才可以感染和复制。因此，这种环状ssRNA分子(RNA-2)是一种类似于类病毒的新型RNA分子，于是Haseloff等(1982)将这种包被于病毒衣壳内的**环状RNA分子**称为拟病毒。



拟病毒(virusoids) 又称类病毒(viroid-like) 或病毒卫星, 是指包裹在真病毒粒中的有缺陷的类病毒。拟病毒极其微小, 一般仅由裸露的RNA 或DNA 组成。被拟病毒“寄生”的真病毒又称辅助病毒, 拟病毒则成为它的“**卫星**”病毒。



拟病毒它是一些必须依赖辅助病毒才能复制的小分子核酸片段，它被包装在辅助病毒的壳体中，本身对于辅助病毒的复制不是必需的，而且它与辅助病毒的基因组无明显的同源性。拟病毒利用辅助病毒的复制酶进行复制，犹如病毒利用宿主细胞的能量、原料及酶进行复制一样。故可认为**拟病毒是寄生于辅助病毒粒子中的分子寄生物**。

据推测，拟病毒的复制是以自身侵染性RNA分子为模板，借助宿主细胞内依赖于RNA的RNA聚合酶进行复制。



## 2. 拟病毒研究的意义

- ① 有助于探索核酸的结构与功能;
- ② 有助于探索拟病毒与辅助病毒 (RNA-1) 间的相互关系;
- ③ 利用拟病毒这类低分子RNA来组建新的弱毒疫苗;
- ④ 对拟病毒的深入研究, 也有助于进一步探索病毒的本质和生命起源等重大生物学理论问题。





## 三、朊病毒

羊瘙痒病是绵羊和山羊的一种中枢神经系统退化性紊乱疾病，具有脱毛、皮肤瘙痒、失去平衡和后肢麻痹等症状。其病原是经过近两个世纪的研究仍未解决的一个谜。自从发现类病毒后，有人就联想起动物中亦有相应类病毒存在的可能。

1982年，美国的S. B. Prusiner 终于发现羊瘙痒病的病原是一种**蛋白质**，称为朊病毒。这一发现在生物学界引起震惊，因为它与目前公认的“中心法则”发生抵触。

**Prusiner** 因此获得1997年诺贝尔奖。



朊病毒又称蛋白质侵染因子（prion，是protein infection的缩写），是一类不含核酸的传染性蛋白质分子，因能引起宿主体内现成的蛋白质分子发生与其相似的**构象变化**，从而使宿主致病。

朊病毒与真病毒的主要区别：

- ① 呈淀粉样颗粒状；
- ② 无免疫原性；
- ③ 无核酸成分；
- ④ 由宿主细胞内的基因编码；
- ⑤ 抗逆性强，耐杀菌剂（甲醛）和高温（120～130℃处理4h后仍具感染性）。

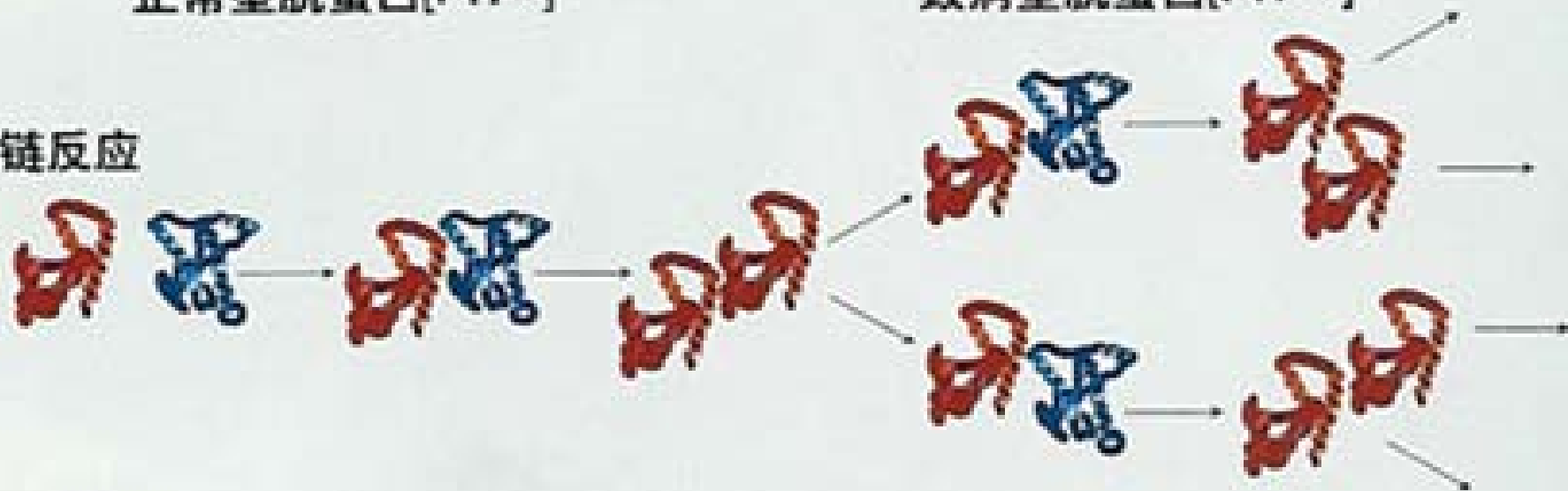


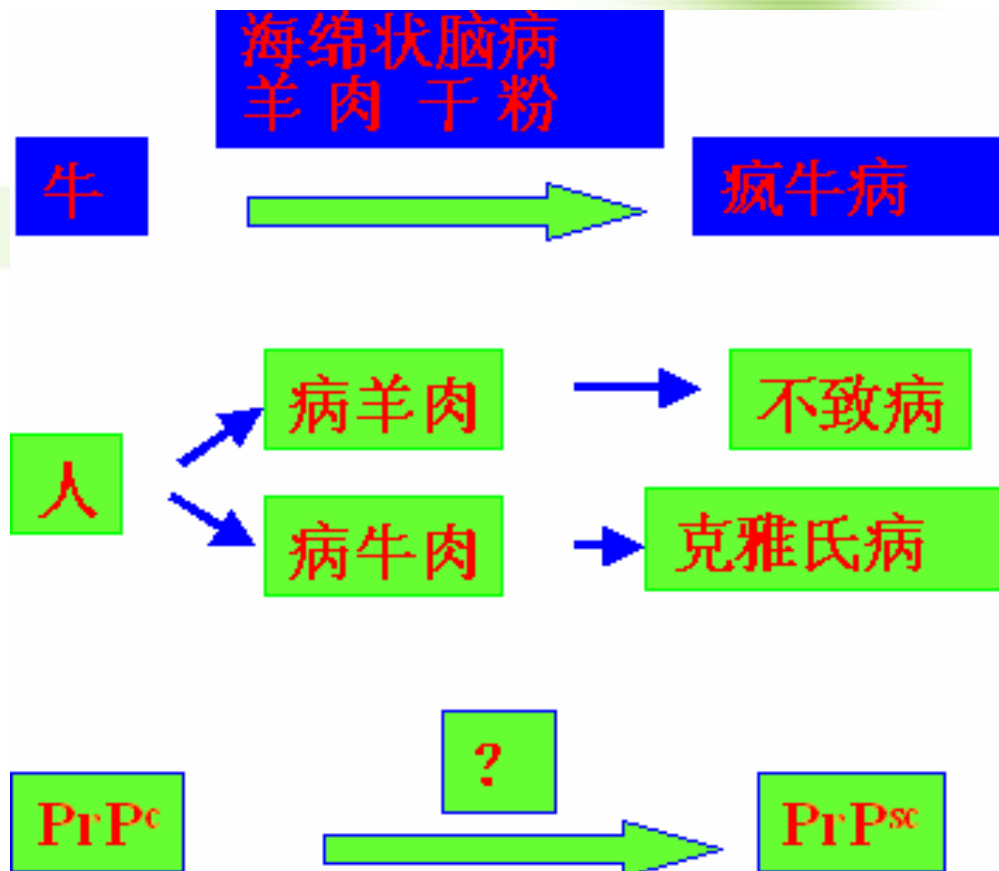
正常型朊蛋白[PrP<sup>C</sup>]



致病型朊蛋白[PrP<sup>Sc</sup>]

链反应





克病最初病例养殖场主  
克病潜伏期可达数十年  
克病可通过血液传染



# 第三节 病毒与实践



# 一、噬菌体与发酵工业

## 1. 当发酵液受噬菌体严重污染时出现的现象

- ①发酵周期明显延长;
- ②碳源消耗缓慢;
- ③发酵液变清, 镜检时, 有大量异常菌体出现;
- ④发酵产物的形成缓慢或根本不形成;
- ⑤用敏感菌作平板检查时, 出现大量噬菌斑;
- ⑥用电子显微镜观察时, 可见到有无数噬菌体粒子存在。



## 2. 预防噬菌体污染的措施

- ① 决不使用可疑菌种;
- ② 严格保持环境卫生;
- ③ 决不排放或随便丢弃活菌液;
- ④ 注意通气质量;
- ⑤ 加强管道及发酵罐的灭菌;
- ⑥ 不断筛选抗性菌种, 并经常轮换生产菌种;
- ⑦ 严格执行会客制度。



### 3. 一旦污染噬菌体，及时采取合理措施

- ①尽快提取产品，如发现污染时发酵液中的代谢产物含量已很高，应及时提取或补加营养并接种抗噬菌体菌种后再继续发酵，以挽回损失；
- ②使用药物抑制，目前防治噬菌体污染的药物还很有限，在谷氨酸发酵中，加入某些金属螯合剂可抑制噬菌体的吸附和侵入；加入 $1\sim 2\ \mu\text{g/ml}$ 金霉素、四环素或氯霉素等抗生素或 $0.1\%\sim 0.2\%$ 的“吐温60”“吐温20”或聚氧乙烯烷基醚等表面活性剂均可抑制噬菌体的增殖或吸附；
- ③及时改用抗噬菌体生产菌株。





## 二、昆虫病毒用于生物防治

昆虫病毒用于生物防治的优点：

- ① 致病力强，使用量少；
- ② 专一性强，安全可靠；
- ③ 抗逆性强，作用久长；
- ④ 生产简便，成本低廉。



### 三、病毒在基因工程中的应用

在基因工程中，把外源目的基因导入受体细胞并使之表达的中介体，称为载体。

#### 1. 噬菌体作为原核生物基因工程的载体

*E.coli* 的  $\lambda$  噬菌体，是目前研究得最为详尽的双链DNA噬菌体。其作为遗传工程载体有很多优点：

- ① 遗传背景十分清楚；
- ② 载有外源遗传因子的重组  $\lambda$  噬菌体；
- ③ 宿主范围狭窄，使用安全；
- ④  $\lambda$ -DNA 的两端具有由12核苷酸组成的粘性末端，用以构建科斯质粒（粘性质粒）；
- ⑤  $\lambda$  噬菌体及由它构建成的载体感染效率几乎达到100%



## 2. 动物DNA病毒作为动物基因工程的载体

可作为载体的动物病毒有SV40、人的腺病毒、牛乳头瘤病毒、痘苗病毒载体及RNA病毒等，以SV40研究最多。

## 3. 植物病毒作为基因遗传工程的载体

目前研究最多的是花椰菜花叶病毒



## 4. 昆虫DNA病毒作为真核生物基因工程的载体

优点:

- ① 具有在细胞核内复制的cccDNA;
- ② 对人畜安全;
- ③ 核型多角体蛋白基因带有很强的启动子, 表达产物达到宿主细胞总蛋白的20%或虫体干重的10%;
- ④ 又因为外源DNA的插入不会影响病毒的繁殖, 却丧失了形成多角体的能力, 因此可作为重组病毒的选择标记;
- ⑤ 对外源基因有很大容量, 可插入长达100kb的DNA片段;
- ⑥ 有强启动子作为病毒的晚期启动子, 故任何外源基因产物, 包括对病毒有毒性的产物也不影响病毒的繁殖与传代。



## 复习思考题

1. 什么是病毒？它有何特点？
2. 以大肠杆菌T4噬菌体为例，说明烈性噬菌体的侵染过程。
3. 什么是温和噬菌体？它与烈性噬菌体由何关系。
4. 病毒主要应用于哪些领域？
5. 解释下列名词：病毒粒子、衣壳、核衣壳、噬菌体、溶源细胞、溶源性、前噬菌体、包含体、多角体病毒、噬菌斑、空斑和枯斑、亚病毒



...been able to an...  
...you find rooms...  
...developed tubs, champagne...  
...other places you check into...  
...place quite like the famous...  
**PLAYFUL DAYS**  
Just about any of the resorts you choose...  
...you to you're although some are sea...  
...Here's an idea of what you can...  
...In summer there's swimming, sail...  
...and good old boating in the...  
...your trip. You'll also find golf...  
...and some resorts have secret...  
...Depending on where you stay...  
...like a... You'll also find...  
...and some resorts have secret...  
...Depending on where you stay...  
...like a... You'll also find...  
...and some resorts have secret...  
...Depending on where you stay...  
...like a... You'll also find...  
...and some resorts have secret...