

# 第四章

---

## 非细胞微生物 —— 病毒

acellular organization — Viruses

# 第四章 病毒

---

- Ä 第一节 概述
- Ä 第二节 病毒的形态结构
- Ä 第三节 病毒的复制
- Ä 第四节 病毒的检出与定量
- Ä 第五节 病毒与实践

# 第一节 概述

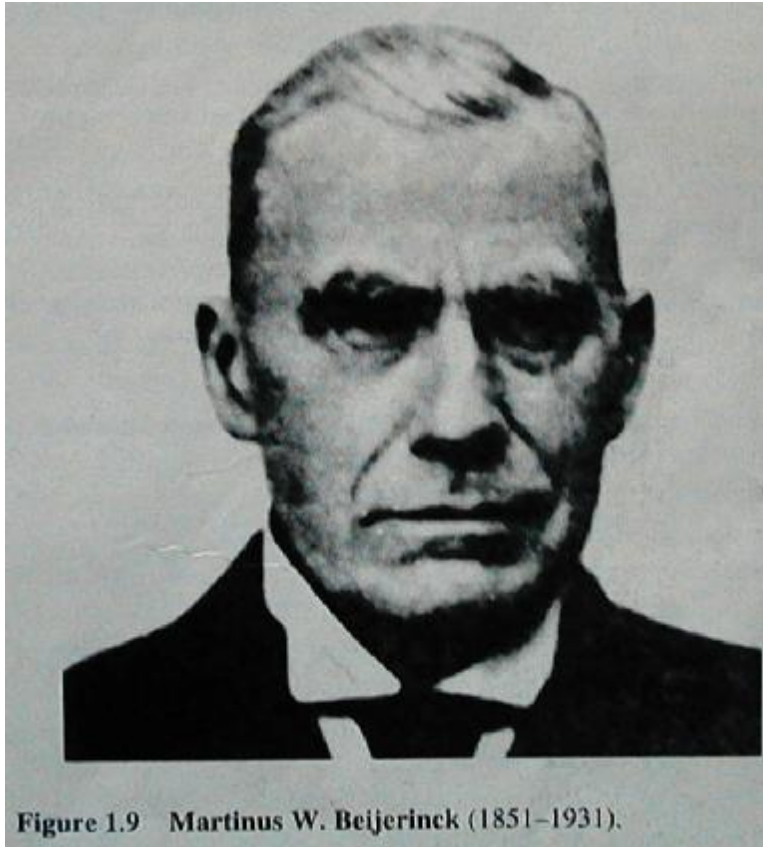
---

## 一、病毒的发现和研究历史

1886年，A. Mayer 发现具有传染性的烟草花叶病；

1892年，D. Ivanovsky烟草花叶病病原体能通过细菌滤器：  
一种能通过细菌滤器的“细菌毒素”或极小的细菌

# 一、病毒的发现和研究历史



1898年，M W Beijerinck对烟草花叶病病原体的研究结果：

- t 能通过细菌滤器；
- t 可被乙醇沉淀而不失去其感染性，
- t 能在琼脂凝胶中扩散；
- t 用培养细菌的方法不能被培养出来，推测只能在植物活细胞中生活；



比细菌小的具有传染性的活的流质（contagium vivum fluidum）

# 一、病毒的发现和研究历史

1900年前后，包括口蹄疫（foot and mouth disease）(Loeffler和Frosch发现，1989年)在内的多种动植物疾病病原体的滤过性特性被证明。



F W Twort（1915年）、F d' Herelle（1917年），分别发现细菌（*Shigella dysenteriae*）病毒



1935年，W M Stanley首次提纯并结晶了烟草花叶病毒  
(tobacco mosaic virus, TMV);

Bawden等证明烟草花叶病毒的本质为核蛋白;

1940年，Kausche首先用电镜观察到烟草花叶病毒颗粒;

# 一、病毒的发现和研究历史

---

病毒学（viruology）：研究病毒（virus）的本质及其与宿主的相互作用的科学，是微生物学的重要分支学科。

极大地丰富了现代生物学（微生物学、分子生物学、分子遗传学）的理论与技术；

有效地控制和消灭人及有益生物的病毒病害；  
利用病毒对有害生物、特别是害虫进行生物防治；  
发展以基因工程为中心的生物高新技术产业；

## 二、病毒的特点和定义

---

### 1、特点

- 1) 不具有细胞结构，具有一般化学大分子的特征。
- 2) 一种病毒的毒粒内只含有一种核酸，DNA或者RNA。
- 3) 大部分病毒没有酶或酶系极不完全，不含催化能量代谢的酶，不能进行独立的代谢作用。
- 4) 严格的活细胞内寄生，没有自身的核糖体，没有个体生长，也不进行二均分裂，必须依赖宿主细胞进行自身的核酸复制，形成子代。
- 5) 个体微小，在电子显微镜下才能看见。
- 6) 对大多数抗生素不敏感，对干扰素敏感。

## 一、病毒的特点和定义

### 1、特点

病毒是一类既具有化学大分子属性，又具有生物体基本特征；既具有细胞外的感染性颗粒形式，又具有细胞内的繁殖性基因形式的独特生物类群。



超显微的、没有细胞结构的、专性活细胞内寄生的实体



## 二、病毒的特点和定义

### 1、特点

#### 细菌与病毒性质的比较

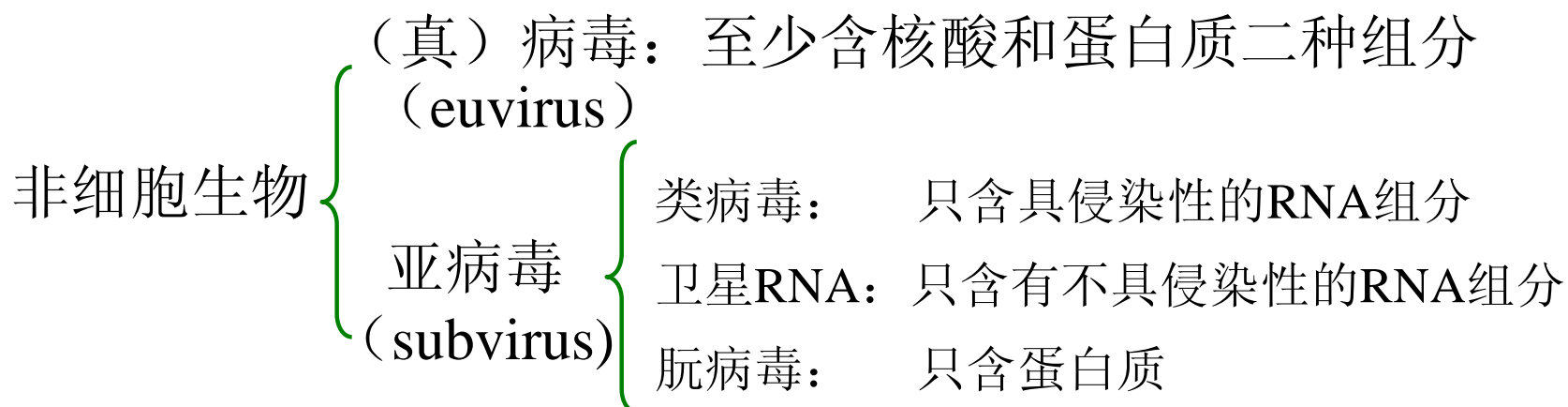
	BACTERIA			VIRUSES
	Typical Bacteria	Rickettsias	Chlamydias	
Intracellular parasite	-	+	+	+
Plasma membrane	+	+	+	-
Binary fission	+	+	+	-
Filterable through bacteriological filters	-	-	+	+
Possess both DNA and RNA	+	+	+	-
ATP-generating metabolism	+	+	-	-
Ribosomes	+	+	+	-
Sensitive to antibiotics	+	+	+	-
Sensitive to interferon	-	-	-	+

## 二、病毒的特点和定义

### 2、定义

病毒为具有独立于其宿主的进化史的绝对细胞内寄生物，它的DNA或RNA基因组被其所编码的蛋白质壳体化（encapsidation）。

-----（Fields等，1990年）



### 三、病毒的宿主范围

---

病毒几乎可以感染所有的细胞生物，并具有宿主特异性



噬菌体 (phage)、  
植物病毒 (plant viruses)  
动物病毒 (animal viruses)

## 第二节 病毒的形态结构

病毒是一类既具有化学大分子属性，又具有生物体基本特征；既具有细胞外的感染性颗粒形式，又具有细胞内的繁殖性基因形式的独特生物类群。

毒粒(virion)[病毒颗粒(virus particle)]:

病毒的细胞外颗粒形式，也是病毒的感染性形式。

一团能够自主复制的遗传物质  蛋白质外壳  包膜



保护遗传物质免遭环境破坏，并作为将遗传物质从一个宿主细胞传递给另一个宿主细胞的载体。

# 一、毒粒的形态结构

---

## 1、病毒的大小和形状

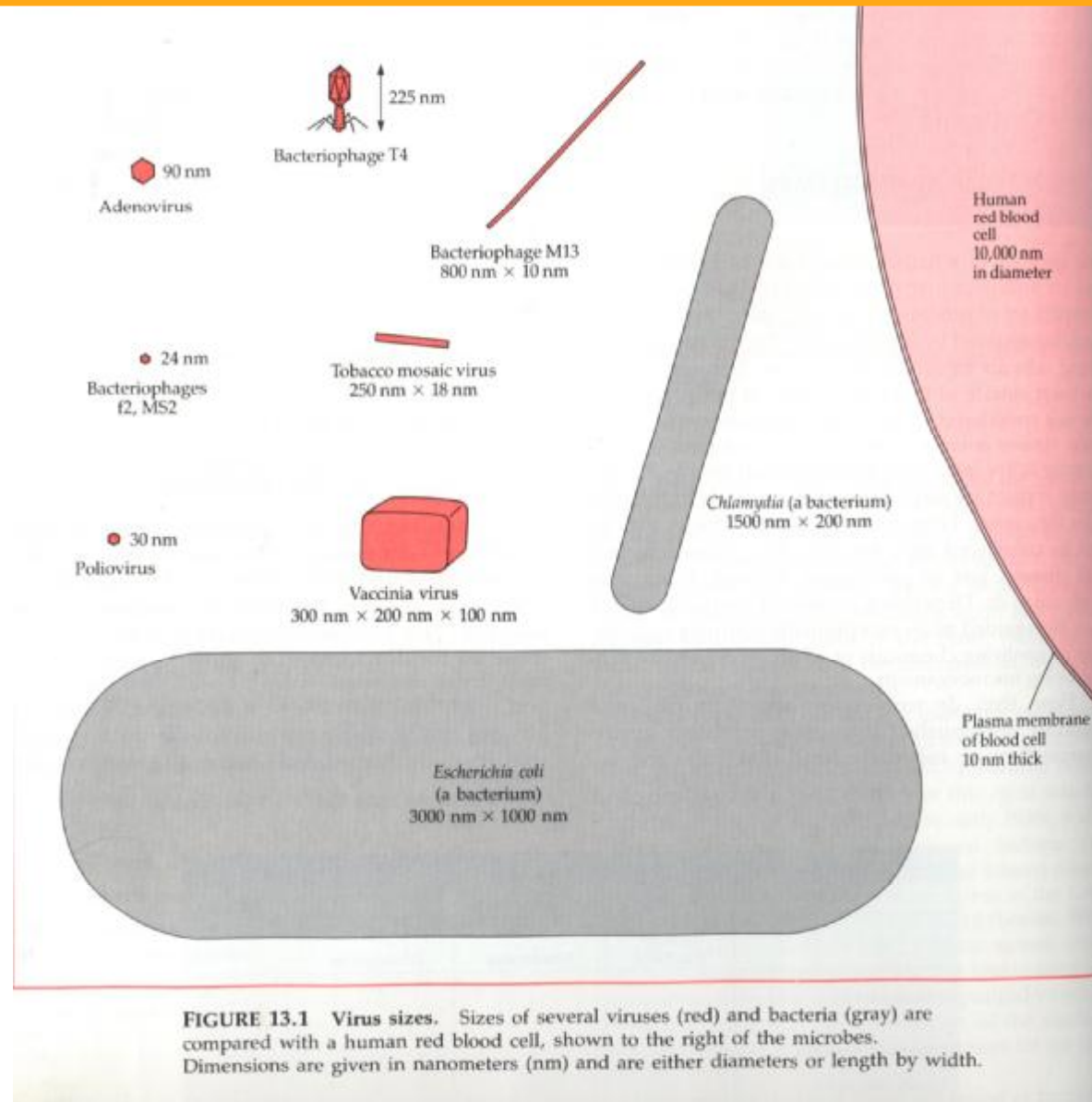
- ✦ 个体小，必需在电镜下观察；
- ✦ 不同病毒的毒粒大小差别很大；
- ✦ 毒粒的形状大致可分球形颗粒(或称拟球形颗粒)、杆状颗粒和复杂形状颗粒（如蝌蚪状，卵形）等少数几类。

# 病毒的形状



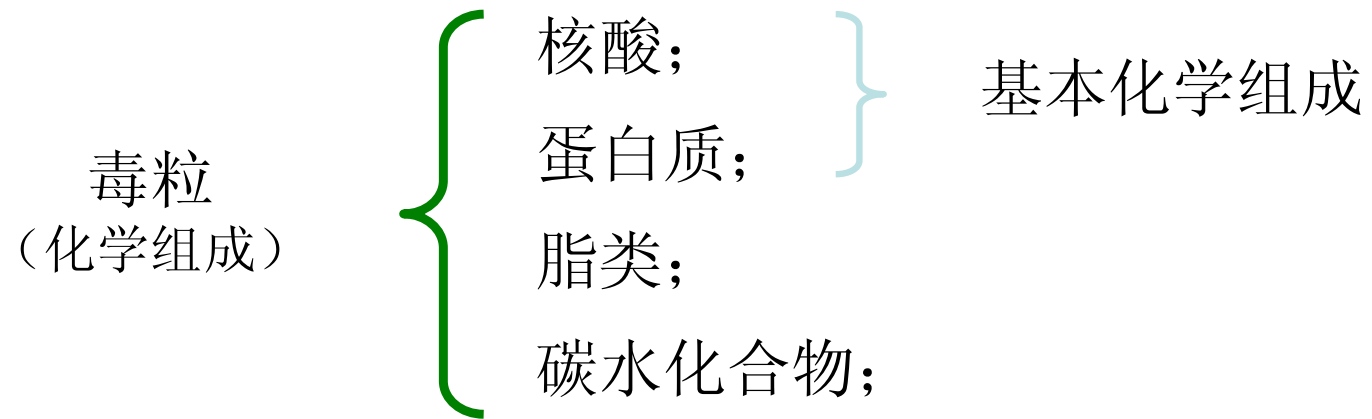
# 各种毒粒的大小、形态差异很大

病毒的形体微小，只能以nm计量，一般为10~300 nm。



## 二、毒粒的化学组成

---





## 二、毒粒的化学组成

---

### 1、病毒的核酸

t 核酸是病毒的遗传物质；

t 一种病毒的毒粒只含有一种核酸：DNA或是RNA；

病毒核酸 { 单链DNA (ss DNA) ;  
双链DNA (ds DNA) ;  
单链RNA (ss RNA) ;  
双链RNA (ds RNA) ;

# 病毒的核酸类型

动物病毒	含DNA	双链	牛痘病毒
		单链	小鼠细小病毒
	含RNA	双链	呼肠弧病毒
		单链	脊髓灰质炎病毒
植物病毒	含RNA	双链	水稻矮缩病毒
		单链	烟草花叶病毒
	含DNA	双链	花椰菜花叶病毒
细菌病毒	含DNA	双链	大肠杆菌T系噬菌体
		单链	大肠杆菌 $\phi$ X174, M13
	含RNA	单链	大肠杆菌 $f_2$ 噬菌体(5群)

## 核酸功能:

---

- 储存病毒的遗传信息
- 控制病毒的遗传变异
- 控制病毒的增殖
- 控制病毒对宿主的感染性

## 2、病毒的蛋白质

---

病毒蛋白质

非结构蛋白

病毒基因组编码的，在病毒复制过程中产生并具有一定功能，但并不结合于毒粒中的蛋白质。

结构蛋白

构成一个形态成熟的有感染性的病毒颗粒所必需的蛋白质

壳体蛋白；

基质蛋白；

囊膜蛋白；

酶蛋白

## 2、病毒的蛋白质

---

病毒结构蛋白的主要生理功能：

- 1) 构成蛋白质外壳，保护病毒核酸破坏；
- 2) 决定病毒感染的特异性；
- 3) 决定病毒的抗原性，能刺激机体产生相应的抗体；
- 4) 构成毒粒酶，或参与病毒对宿主细胞的入侵（如T4噬菌体的溶菌酶等），或参与病毒复制过程中所需要病毒大分子的合成（如逆转录酶等）；

### 3.其他成分：

---

较复杂病毒中还含有：

- 脂类：有些病毒包膜中含有来源于宿主细胞的脂类化合物，其中50-60%为磷脂，余为胆固醇。
- 多糖：以糖脂、糖蛋白的形式存在。
- 有的病毒还含胺类（丁二胺，亚精胺等）、金属离子等，它们是病毒装配时从环境中获得的不恒定成分。

### 三、毒粒的结构

---

衣壳粒(Capsomere) :

由一种或几种多肽链折叠而成的蛋白质亚单位。

衣壳(Capsid)

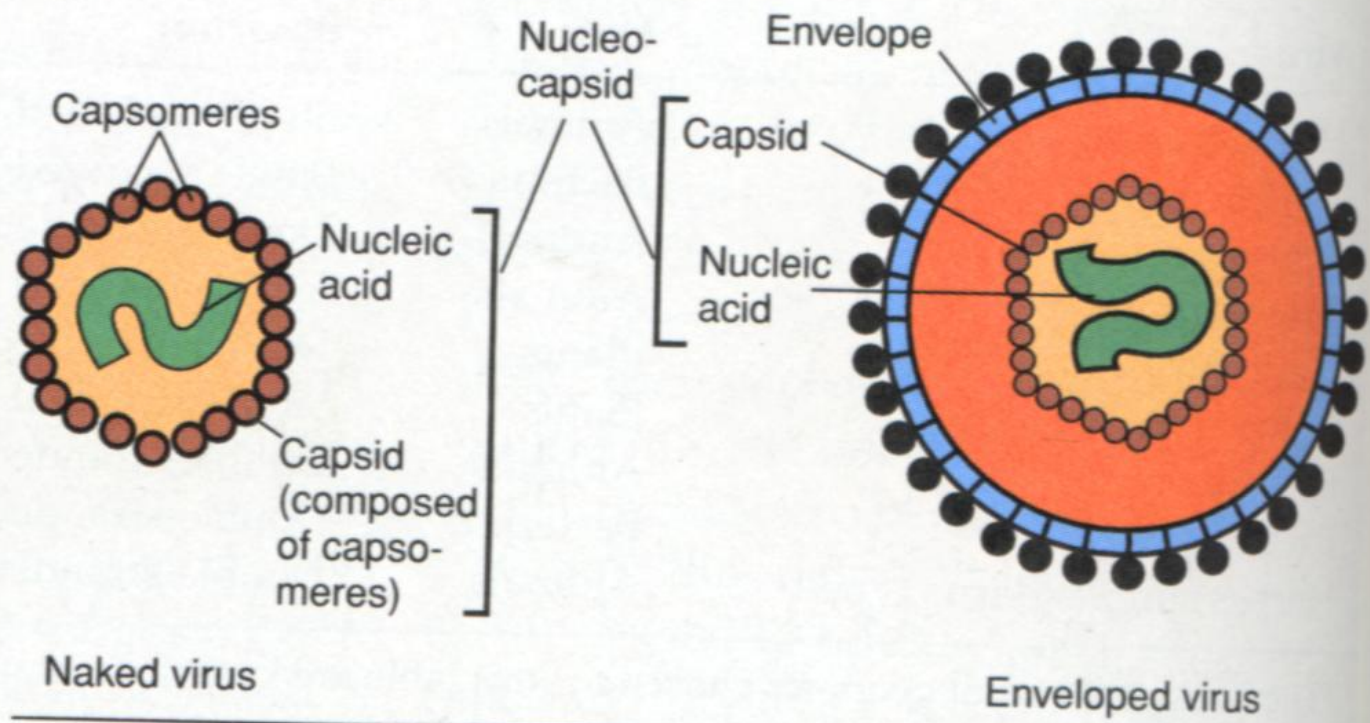
核酸

核壳 (nucleocapsid) :

病毒的蛋白质壳体和病毒核酸（核心）构成的复合物，又称核衣壳。

包膜(envelope)

刺突(spike): 包膜或核衣壳上的突起。



**Figure 8.3** Comparison of naked and enveloped virus, two basic types of virus particles.



### 三、毒粒的结构

---

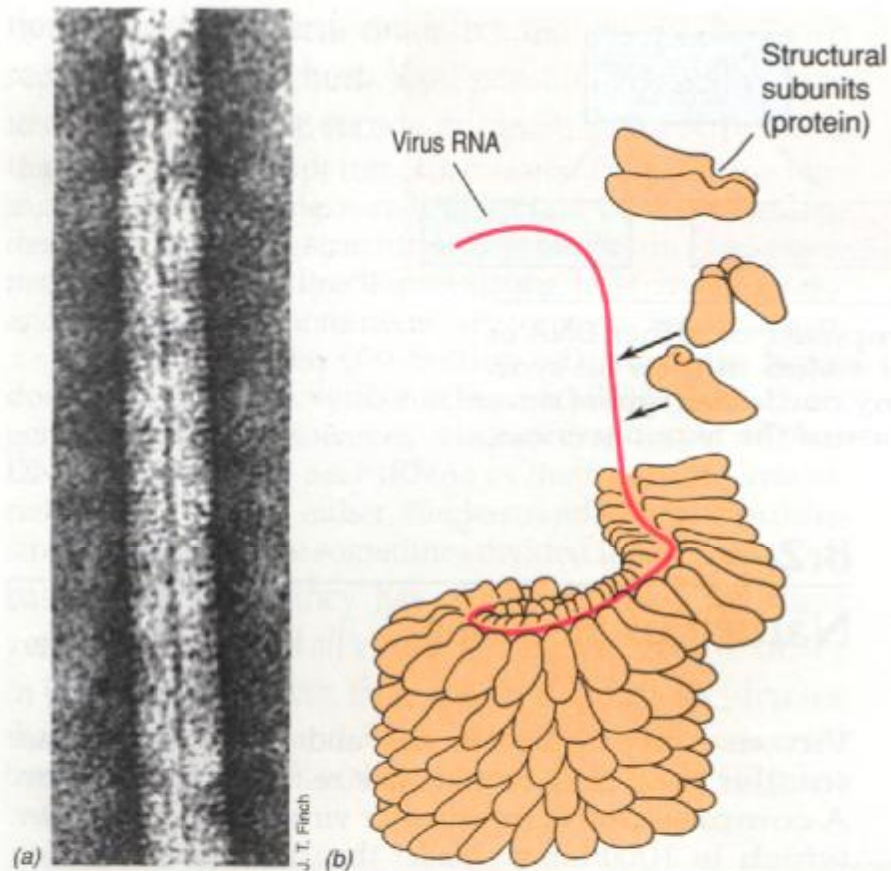
壳体结构类型

螺旋对称 (**helical symmetry**) 壳体

二十面体对称(**icosahedral symmetry**)壳体

复合对称(**complex symmetry**)结构

# 1. 螺旋对称（helical symmetry）壳体：



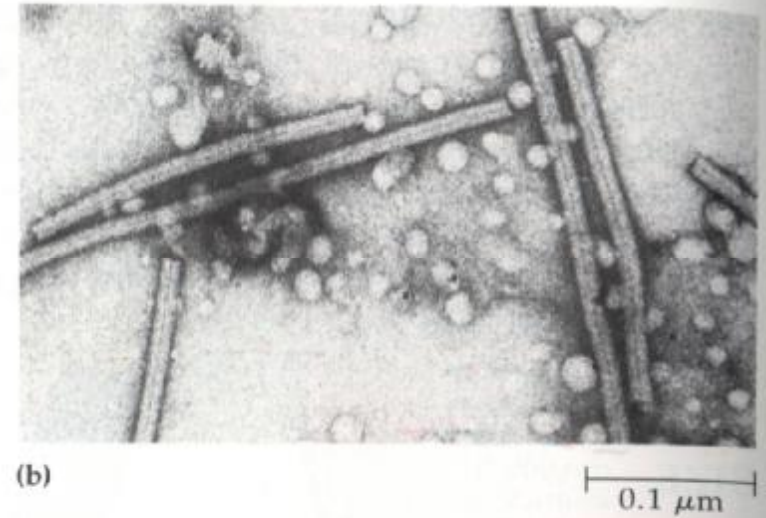
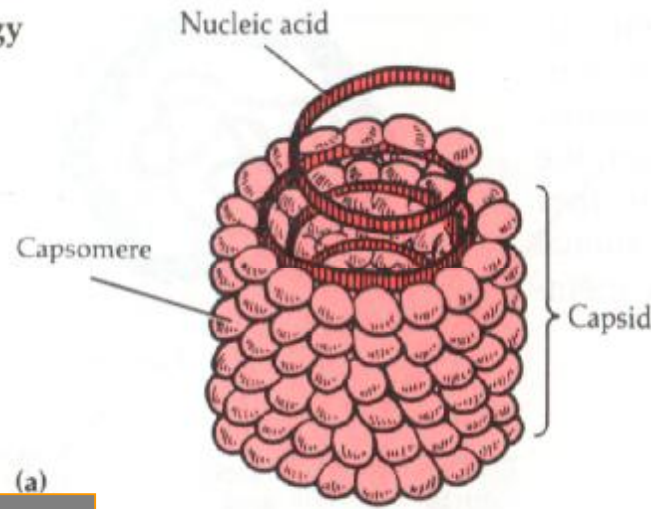
**Figure 8.2** An example of the arrangement of virus nucleic acid and protein coat in a simple virus, tobacco mosaic virus. (a) Electron micrograph at high resolution of a portion of the virus particle. (b) Assembly of the tobacco mosaic virion. The RNA assumes a helical configuration surrounded by the protein capsid. The center of the particle is hollow.

亚基有规律地沿着中心轴（核酸）呈螺旋排列，进而形成高度有序、对称的稳定结构。

此形状多为RNA病毒，具螺旋对称的动物病毒多有包膜。

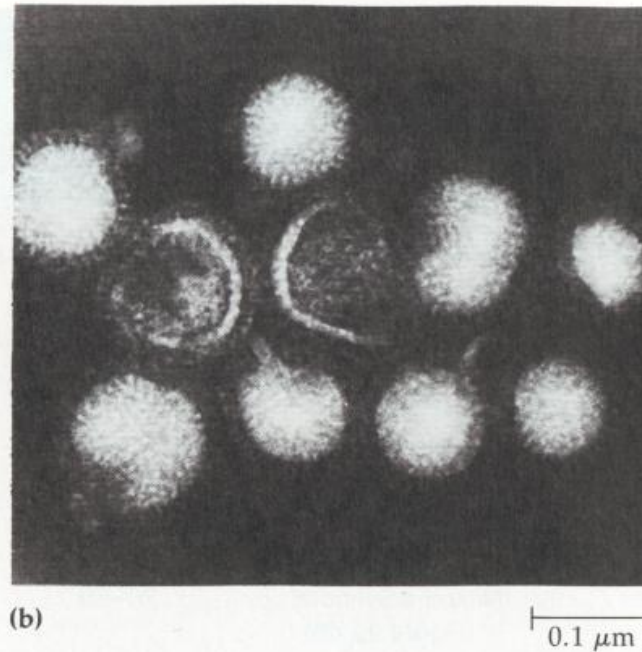
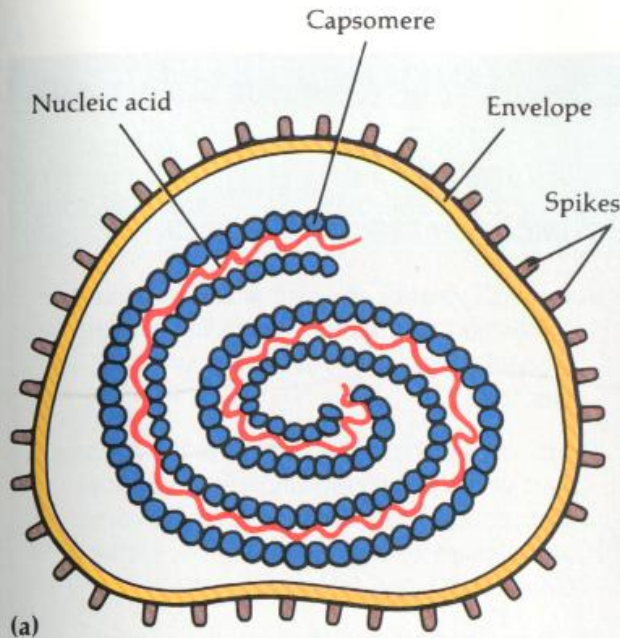
**FIGURE 13.3 Morphology of a helical virus.**

(a) Diagram of a portion of a tobacco mosaic virus. Several rows of capsomeres have been removed to reveal the nucleic acid.  
(b) Electron micrograph of a tobacco mosaic virus showing helical rods.



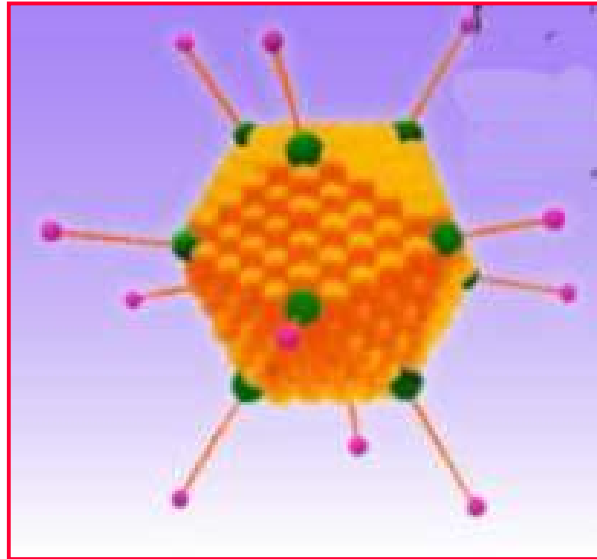
裸露的螺旋毒粒；

**FIGURE 13.5 Morphology of an enveloped helical virus.** (a) Diagram of an enveloped helical virus. (b) Electron micrograph of influenza viruses. Note the halo of spikes projecting from the outer surface of each envelope (see Chapter 24).



有包膜的螺旋毒粒

## 2.二十面体对称(icosahedral symmetry)壳体:

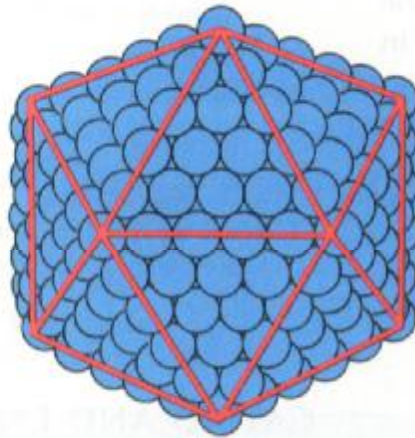


- 1)球或近球形，没有包膜，直径70-80nm。
- 2)高倍电镜下为多面体，它有12个角，20个面，30条棱。呈5（角）：3（面）：2（线）轴对称结构。
- 3)衣壳由252个衣壳粒组成，每个衣壳粒通常是由5个或6个蛋白质亚基聚集形成。有12个称做五邻体（penton）的衣壳粒（分子量各为70000Da），位于12个角上。每个五邻体上突出一根末端带有顶球的蛋白纤维，称为触须样纤维（也叫刺突）。有240个六邻体（hexon）（分子量各为120000Da）位于均匀分布在20个面上。

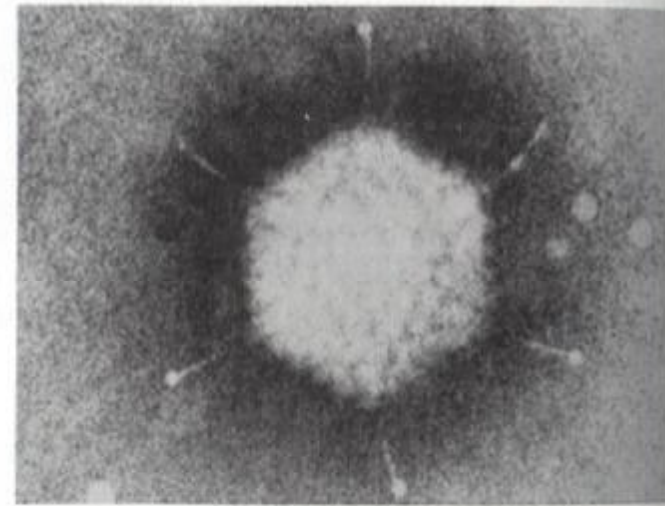
## 2.二十面体对称(icosahedral symmetry)壳体:

构成对称结构壳体的第二种方式是蛋白质亚基围绕具立方对称的正多面体的角或边排列，进而形成一个封闭的蛋白质的鞘。

FIGURE 13.4 Morphology of a naked polyhedral virus in the shape of an icosahedron.  
(a) Diagram of an icosahedron.  
(b) Electron micrograph of an adenovirus. Individual capsomeres in the protein coat are visible.



(a)

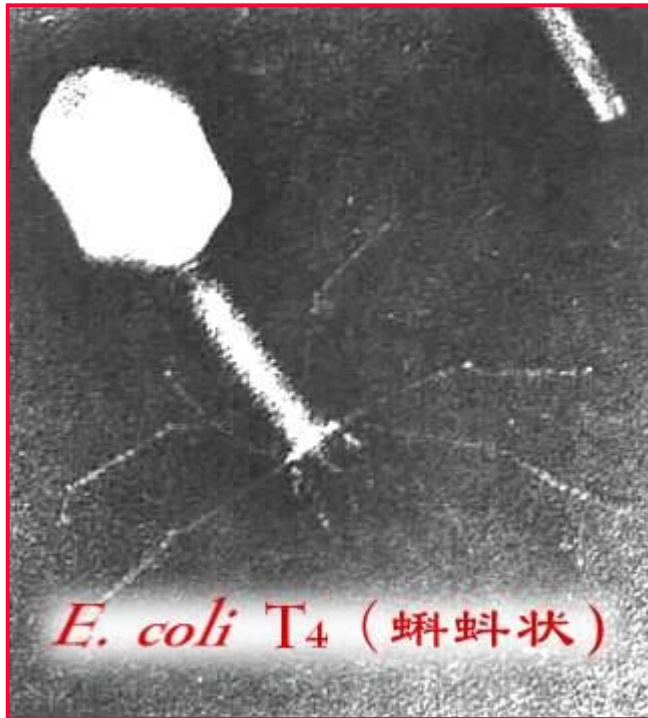


(b)

0.1 μm

### 3. 复合对称( **complex symmetry** )

---



大肠杆菌的T<sub>4</sub>噬菌体是由椭圆形的二十面体头部和螺旋对称的尾部组合而成，是病毒中复合对称的代表。

有尾噬菌体（tailed phage），其壳体由头部和尾部组成。  
包装有病毒核酸的头部通常呈二十面体对称，尾部呈螺旋对称。

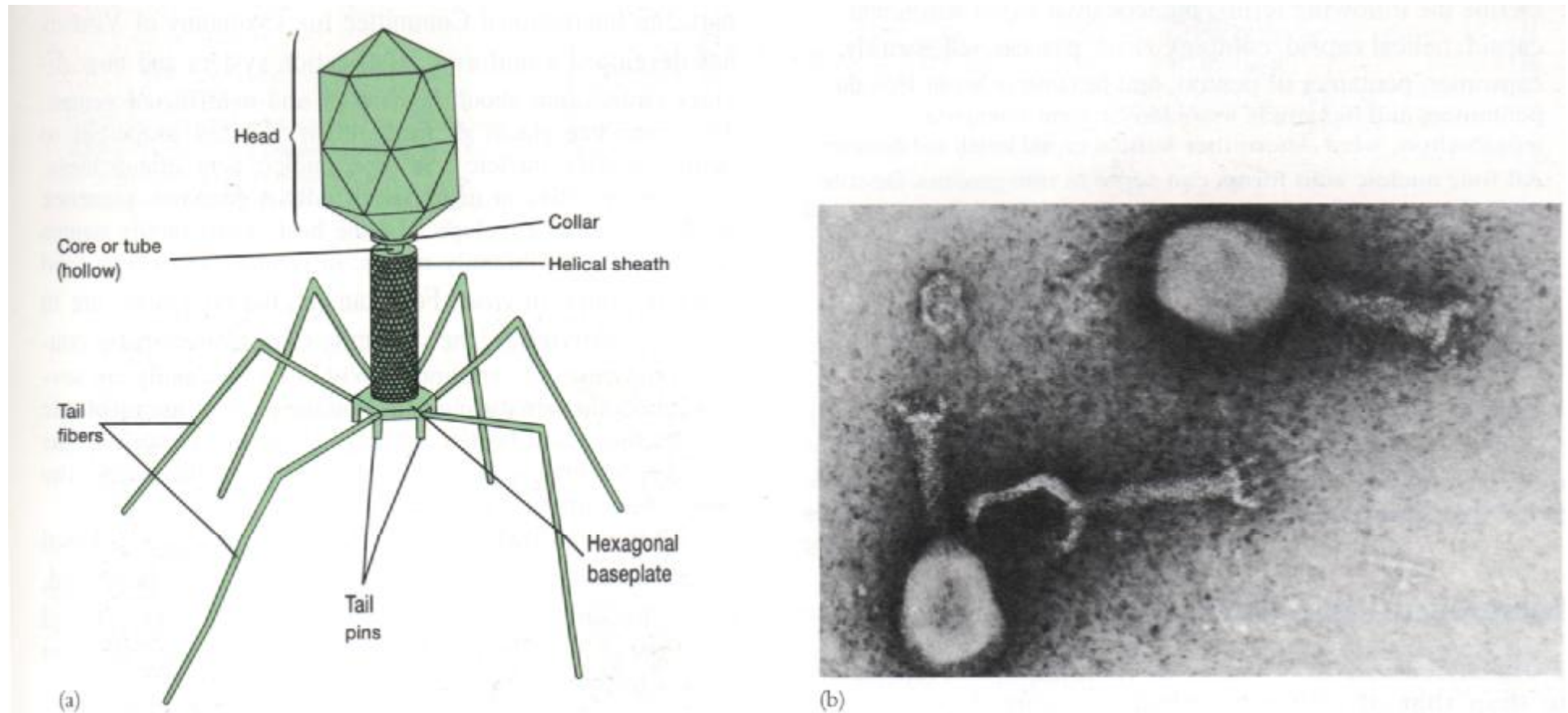


Figure 16.19 T-Even Coliphages. (a) The structure of the T4 bacteriophage. (b) The micrograph shows the phage before injection of its DNA.

# 第三节 病毒的复制

病毒的特点： 严格细胞内寄生物，只能在活细胞内繁殖。

病毒的复制：

病毒感染敏感宿主细胞后，病毒核酸进入细胞，通过其复制与表达产生子代病毒基因组和新的蛋白质，然后由这些新合成的病毒组分装配（assembly）成子代毒粒，并以一定方式释放到细胞外。病毒的这种特殊繁殖方式称做复制（replication）。



## 一、病毒的复制周期

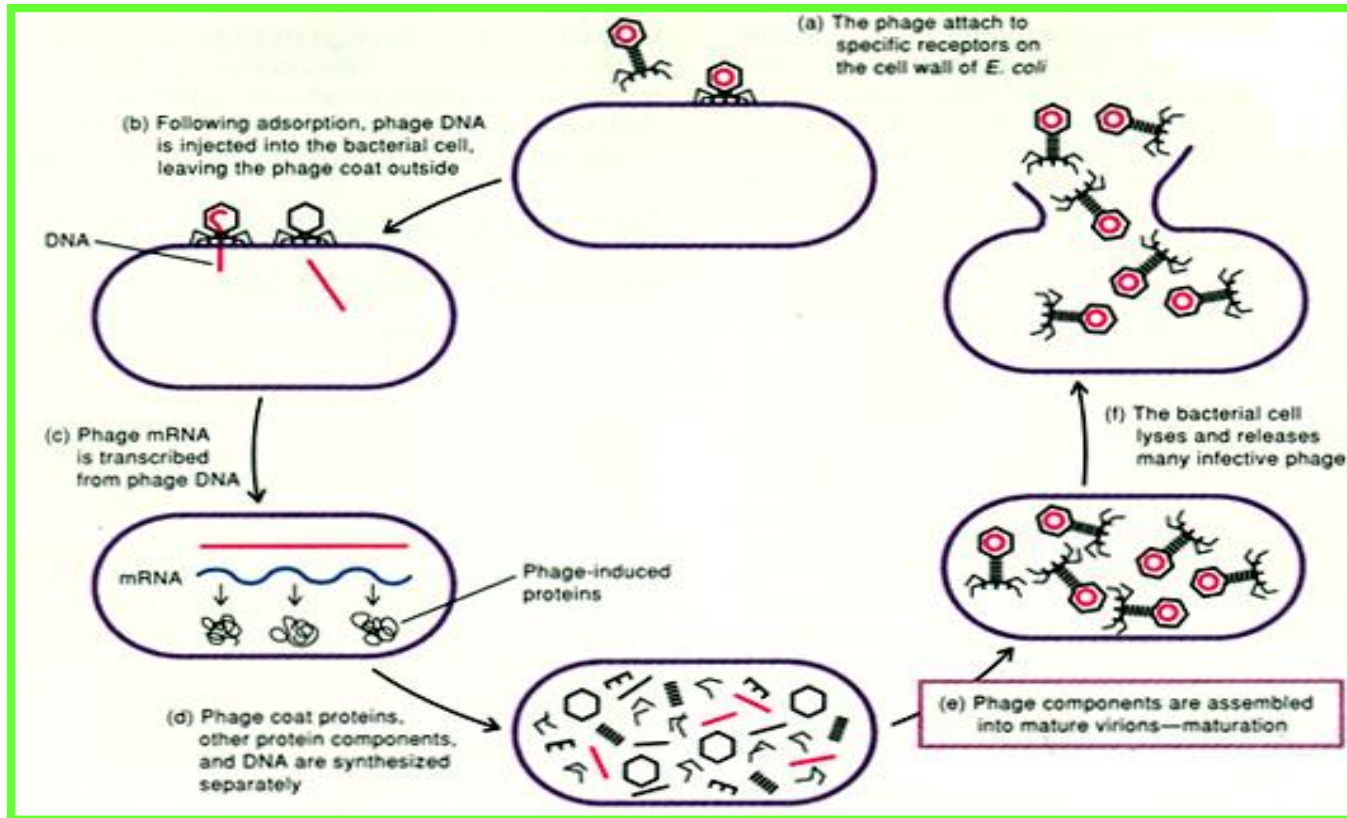
---

复制周期（replicative circle）或称复制循环：

自病毒吸附于细胞开始，到子代病毒从感染细胞释放到细胞外的病毒复制过程。

- ① 吸附(absorption);
- ② 侵入(penetration);
- ③ 复制(replication);
- ④ 装配(assembly)（成熟）；
- ⑤ 释放(release);

# 烈性噬菌体的繁殖过程

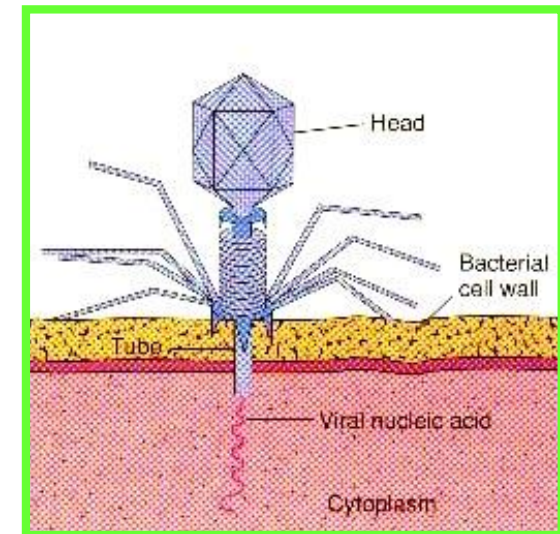
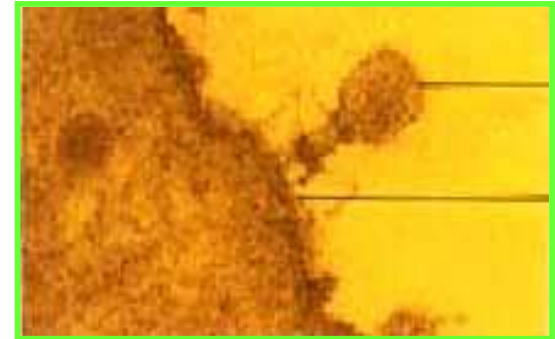


# 烈性噬菌体的繁殖过程

①**吸附**：噬菌体和宿主细胞上的特异性吸附部位进行特异性结合，噬菌体以尾丝牢固吸附在受体上后，靠刺突“钉”在细胞表面上。

②**侵入**：核酸注入细胞的过程。噬菌体尾部所含酶类物质可使细胞壁产生一些小孔，然后尾鞘收缩，尾髓刺入细胞壁，并将核酸注入细胞内，蛋白质外壳留在细胞外。

③**复制**：包括核酸的复制和蛋白质合成。噬菌体核酸进入宿主细胞后，会控制宿主细胞的合成系统，然后以噬菌体核酸中的指令合成噬菌体所需的核酸和蛋白质。

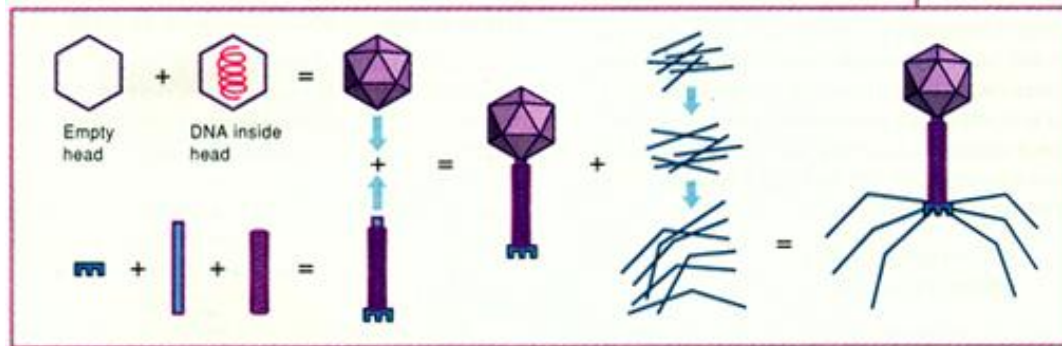


# 烈性噬菌体的繁殖过程

## ④ 装配:

主要步骤有:

DNA分子的缩合——通过衣壳包裹DNA而形成头部——尾丝及尾部的其它部件独立装配完成——头部与尾部相结合——最后装上尾丝，至此，一个个成熟的形状、大小相同的噬菌体装配完成。



## 烈性噬菌体的繁殖过程

### ⑤ 释放:

方式:

§裂解: 多以裂解细胞的方式释放。

§分泌: 噬菌体穿出细胞, 细胞并不裂解。

通常情况下, 一个噬菌体通过上述五个过程能合成100——300个噬菌体。烈性噬菌体的这种生长繁殖方式也称为一步生长,



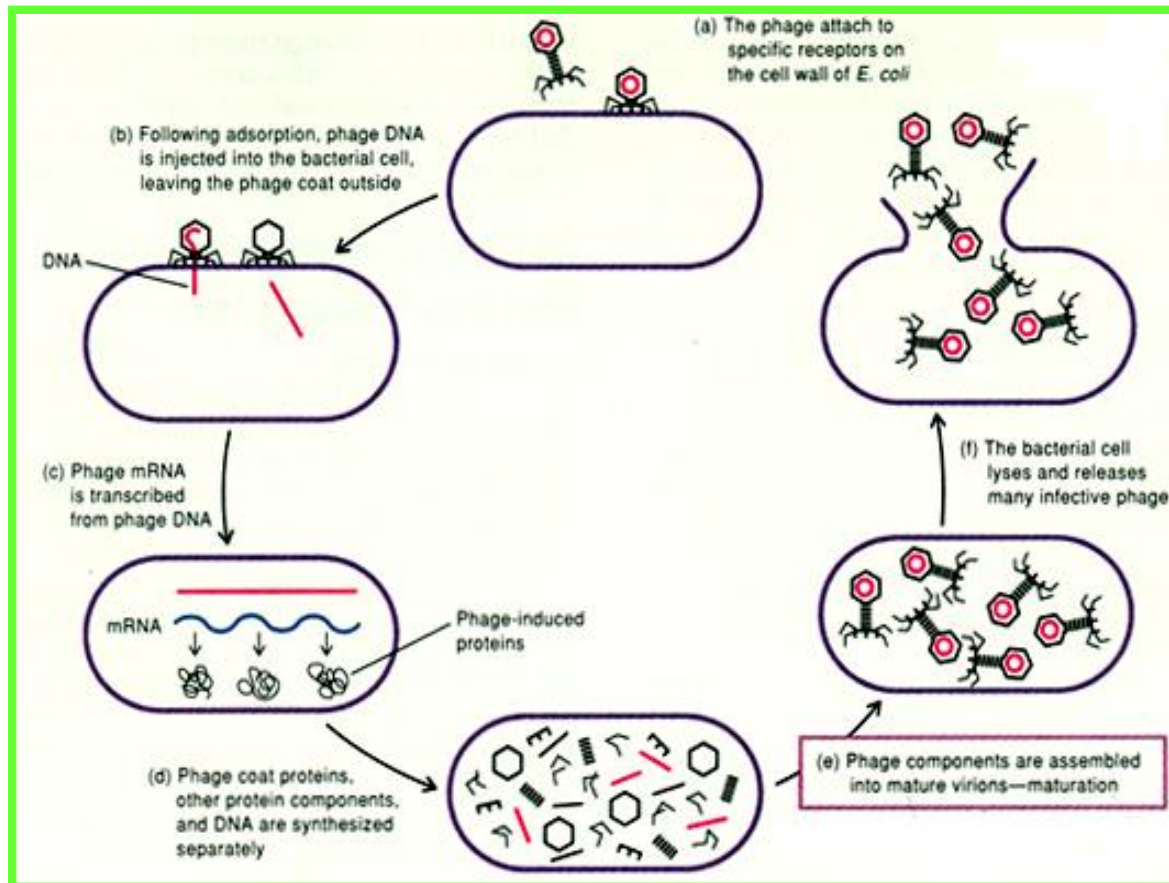
Figure 6.13



A weakened bacterial cell, crowded with viruses, has ruptured and released numerous virions that can then attack nearby susceptible host cells.

## 二、烈性噬菌体与一步生长曲线

烈性噬菌体(virulent phage):能在宿主细胞内增殖，产生大量子噬菌体并引起细菌裂解的噬菌体



烈性噬菌体的这种生长方式称一步生长。

## 一步生长曲线 (one step growth curve)

概念：经过一步生长实验后，得到以培养时间为横坐标，以噬菌斑数为纵坐标绘制成的有潜伏期、裂解期和稳定期的特征性曲线。

1939年，Max Delbruck & Emory Ellis:

*E. coli* / bacteriophage

- 1、用噬菌体的稀释液感染高浓度的宿主细胞；
- 2、数分钟后，加入抗噬菌体的抗血清；
- 3、将上述混合物大量稀释，终止抗血清的作用和防止新释放的噬菌体感染其它细胞；
- 4、保温培养并定期检测培养物中的噬菌体效价；
- 5、以感染时间为横坐标，病毒的感染效价为纵坐标，绘制出病毒特征性的繁殖曲线；

# 实验过程:

敏感菌10ml + Phage 1ml



混匀, 5min, 使之吸附

离心或用抗phage血清处理,  
去除过量phage



高倍稀释, 吸附phage的菌悬液  
(避免多次吸附)



37°C 培养, 定时取样



## 人为裂解处理 (每5min)

样品中加入氯仿裂解细胞



裂解液加入敏感菌液中



适当稀释混合液



涂布于琼脂培养基上

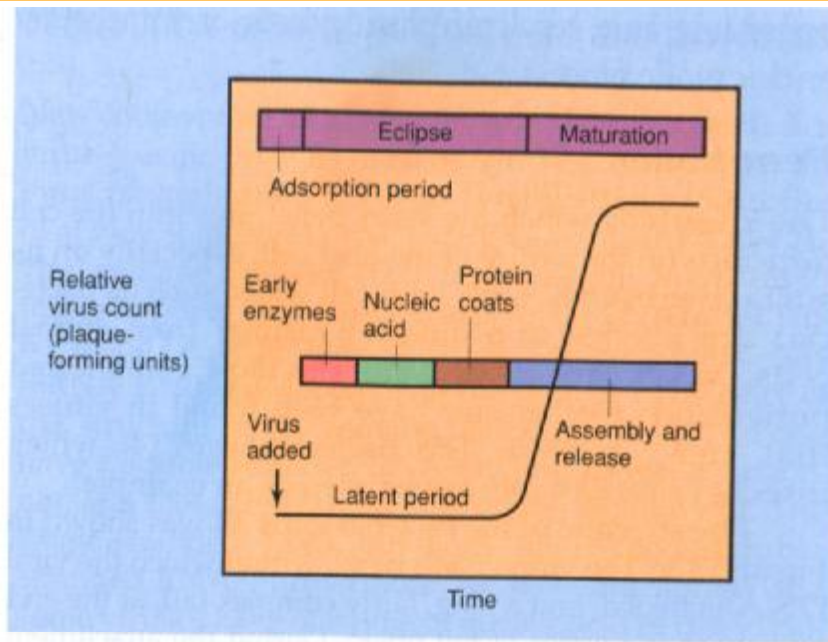


24-48h

计数噬菌斑



# 一步生长曲线 (one step growth curve)



**Figure 8.9** The one-step growth curve of virus replication. This graph displays the results of a single round of viral multiplication in a population of cells. Following adsorption, the infectivity of the virus particles disappears, a phenomenon called *eclipse*. This is due to the uncoating of the virus particles. During the *latent period*, replication of viral nucleic acid and protein occurs. The *maturation period* follows, when virus nucleic acid and protein are assembled into mature virus particles. At this time, if the cells are broken up, active virus can be detected. Finally, *release* occurs, either with or without cell lysis. The timing of the one-step growth cycle varies with the virus and host. With many bacterial viruses, the whole cycle may be complete in 30–60 min, whereas with animal viruses 12–24 hr is usually required for a complete cycle. Compare this general picture and color scheme with specific replication events shown for bacteriophage T4 in Figure 8.23.

噬菌体复制（繁殖）  
的三个阶段：

- 1、吸附期(adsorption period);  
游离的噬菌体吸附到宿主细胞
- 2、潜伏期(latent period);  
从噬菌体吸附到细胞到释放出  
新噬菌体的最短时期
- 3、裂解期(lysis period);  
随着菌体不断破裂，新噬菌体  
数目增加，直到最高值

平稳期 (plateau phase)

一步生长曲线的特征性数据：**潜伏期**和**裂解量**。

---

**潜伏期 (latent period)**：毒粒吸附于细胞到受染细胞释放出子代毒粒所需要的最短时间。噬菌体几分钟，动物病毒与植物病毒以小时或天计算。

**裂解量 (burst size)**：每个受染细胞所产生的子代病毒颗粒的平均数目。等于潜伏期受染细胞的数目除以稳定期受染细胞所释放的全部子代病毒的数目，噬菌体的裂解量一般为几十到几百，动植物病毒几百到上万个。

### 三、温和噬菌体和溶源性

---

#### (一) 温和噬菌体

温和噬菌体(temperate phage )或称溶源性噬菌体 (lysogenic phage)：侵染细菌后不产生子噬菌体和引起细菌裂解的噬菌体。

**溶源性(lysogeny)**：温和噬菌体侵染敏感细菌后不裂解它们，而与细菌共存的特性。

**前噬菌体(prophage)**：整合于细菌染色体或以质粒形式存在的温和噬菌体基因组称做原噬菌体。

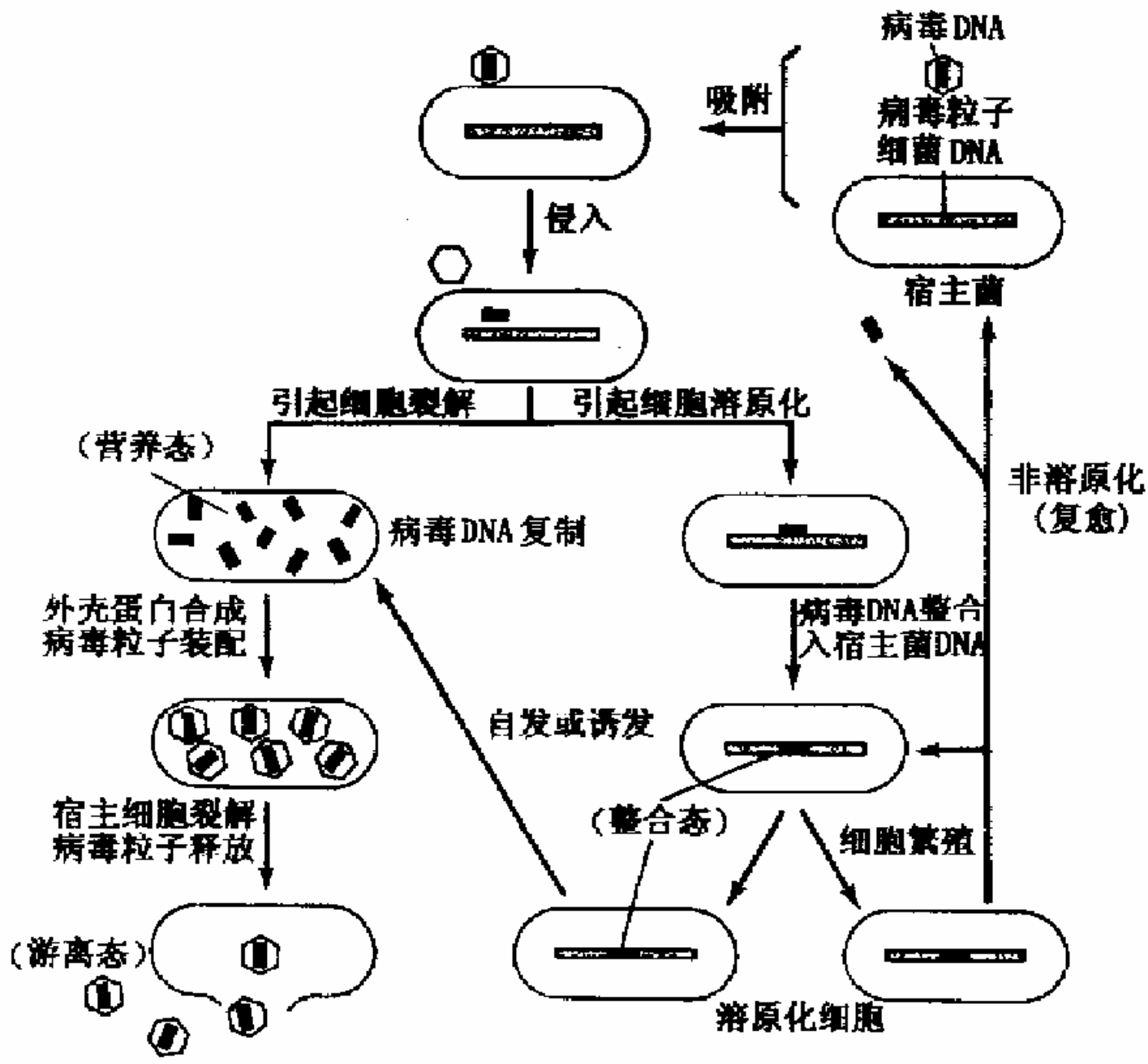
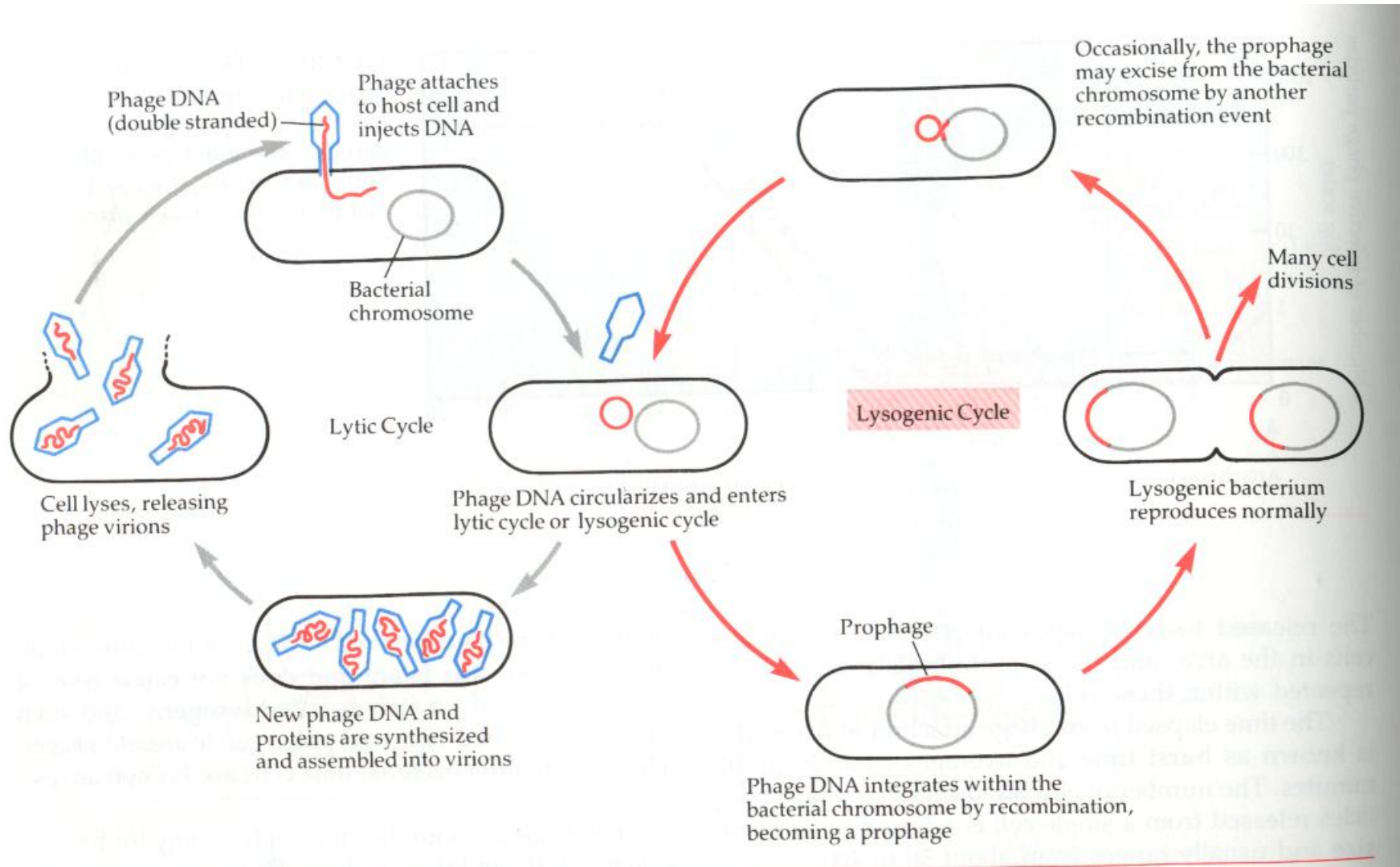


图 2.5.14 温和性噬菌体的生活史

# 温和噬菌体的溶源性反应:



在原噬菌体阶段，噬菌体的复制被抑制，宿主细胞正常地生长繁殖，而噬菌体基因组与宿主细菌染色体同步复制，并随细胞分裂而传递给子代细胞。

## （二）溶源性细菌及其检出溶源性感染对细胞的影响：

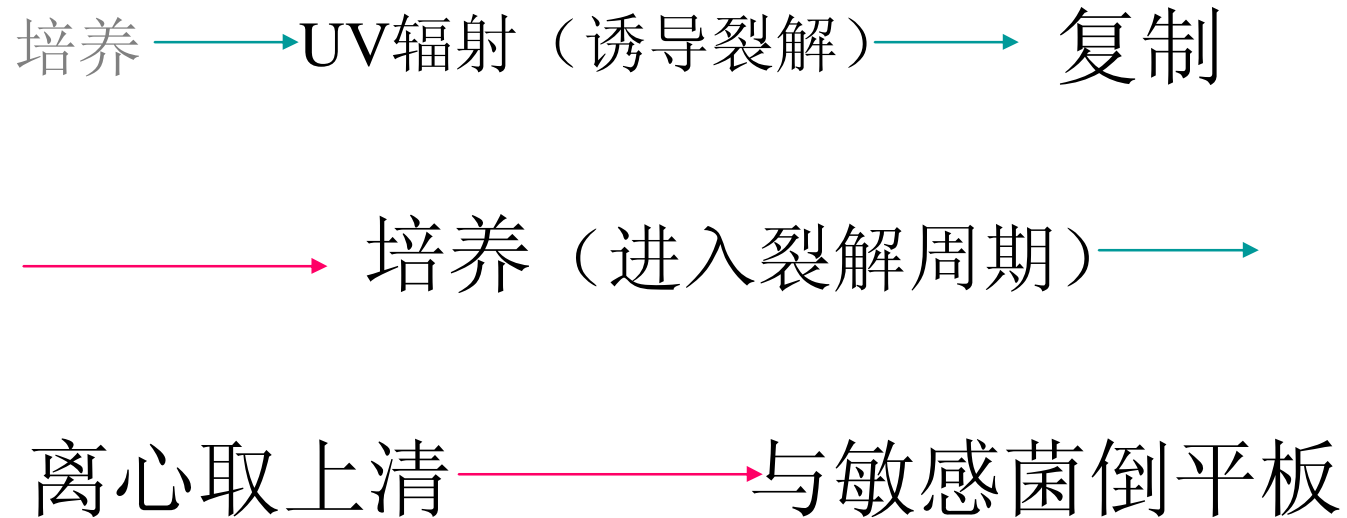
### 1. 溶源性细菌（lysogenic bacteria）

细胞中含有以原噬菌体状态存在的温和噬菌体基因组的细菌称做溶源性细菌。

#### 溶源菌的特性：

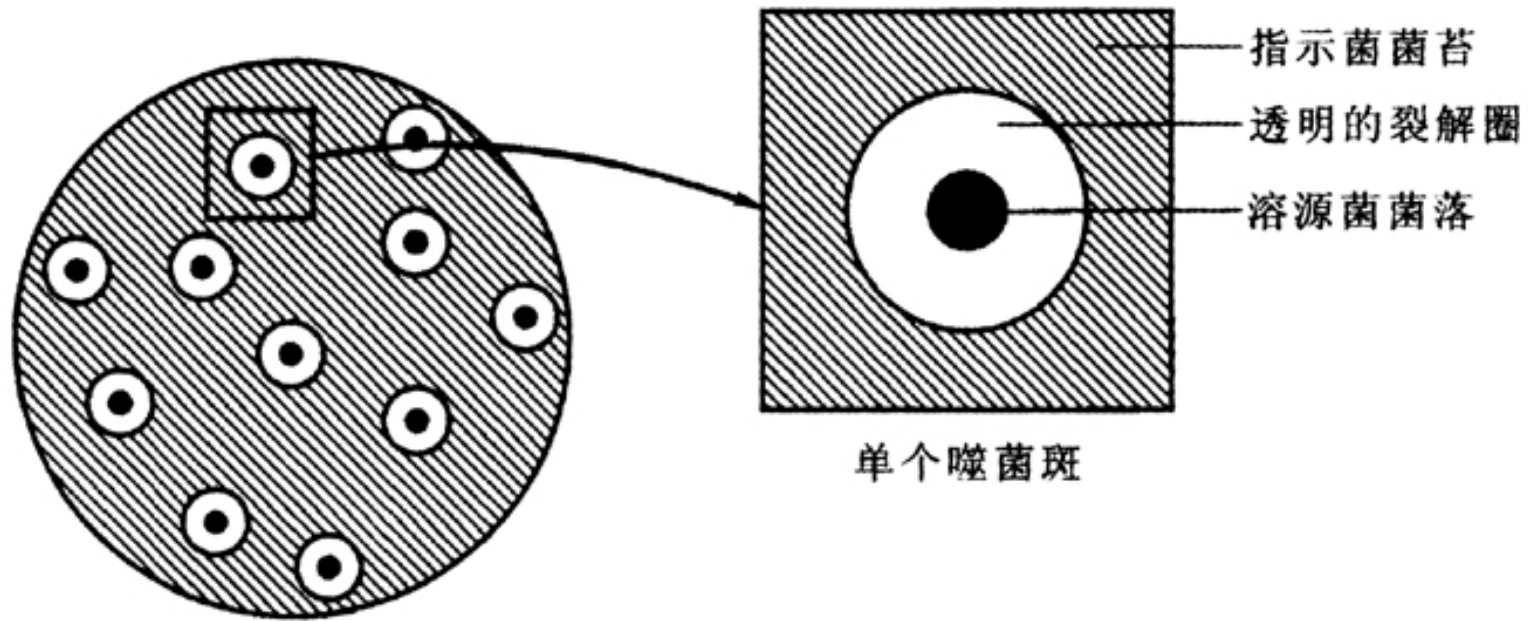
- (1) 具有遗传的、产生前噬菌体的能力；
- (2) 裂解：    自发裂解(spontaneous lysis)  
    诱发裂解(inductive lysis)；
- (3) 复愈；
- (4) 免疫性
- (5) 溶源转变
- (6) 局限性转导

## 2 溶源性细菌的检出:



菌落周围出现透明圈即为溶源性细菌

## 2. 溶源性细菌的检出



溶源菌及其独特噬菌斑的形态(模式图)



## 第四节 病毒的检出与定量

---

一、直接法 电子显微镜

二、间接法

间接法的基础：**细胞病变效应(cytopathic effect,CPE)**

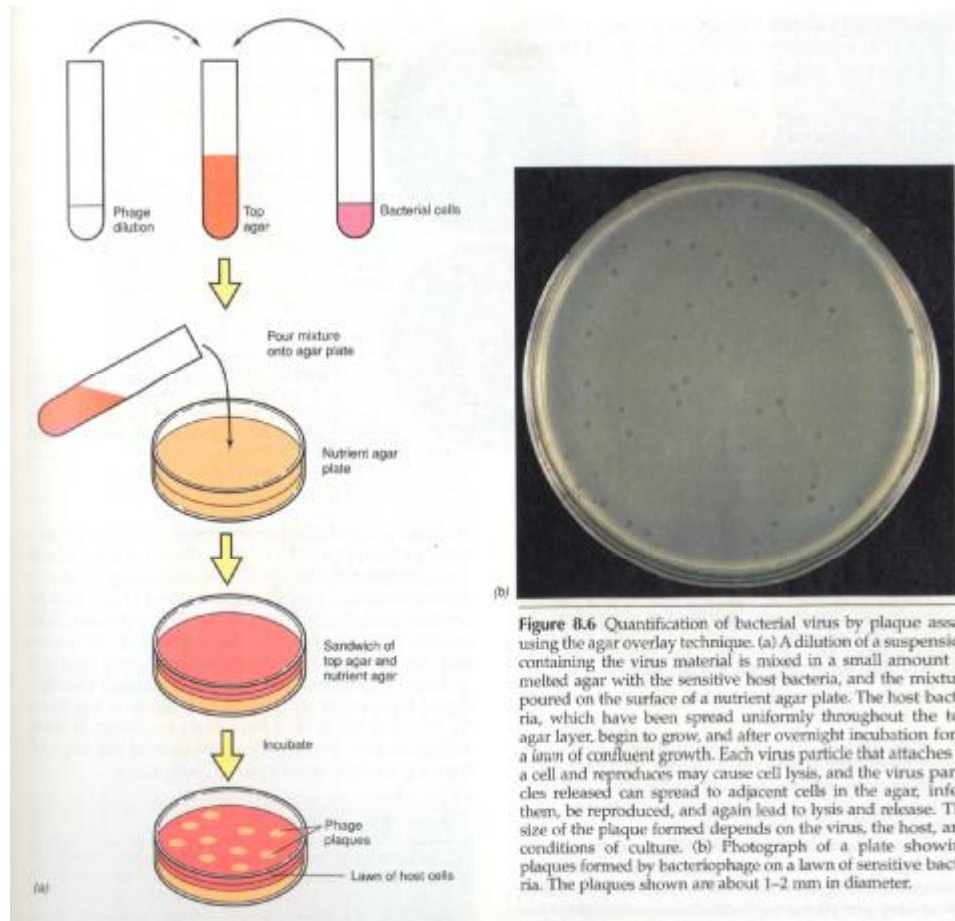
是指由于病毒感染出现的宏观、局部或普遍的退化性病变或异常。

**病毒感染单位(virus infection unit)**：是指当病毒和敏感宿主混合时能产生可检测的效应的最小单位。

## (一) 噬菌斑 (plaque)

# Quantification of bacterial virus by plaque assay

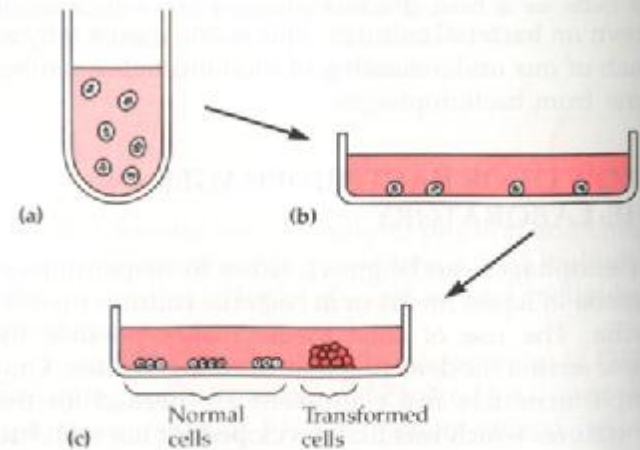
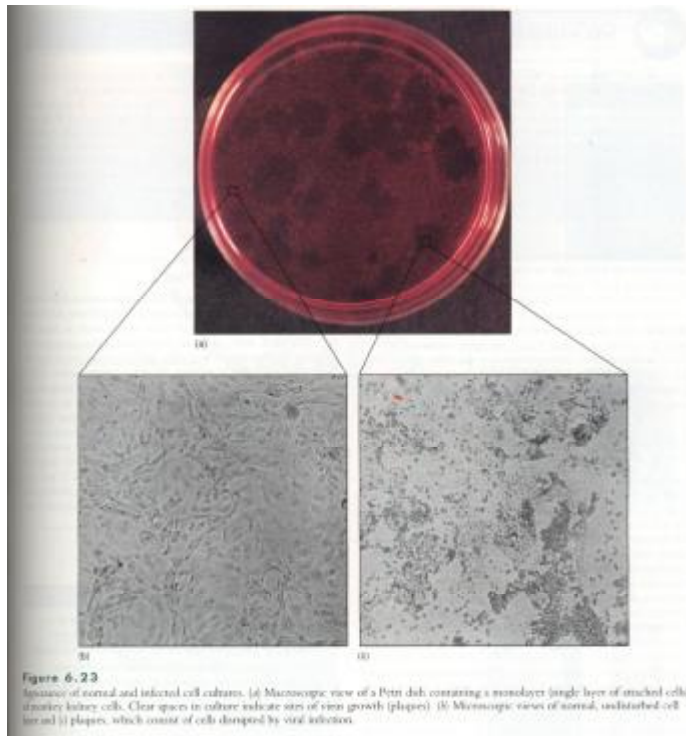
由于病毒感染引起的敏感细胞层上出现的裂解圈或细胞抑制圈。



**Figure 8.6** Quantification of bacterial virus by plaque assay using the agar overlay technique. (a) A dilution of a suspension containing the virus material is mixed in a small amount of melted agar with the sensitive host bacteria, and the mixture poured on the surface of a nutrient agar plate. The host bacteria, which have been spread uniformly throughout the top agar layer, begin to grow, and after overnight incubation form a lawn of confluent growth. Each virus particle that attaches to a cell and reproduces may cause cell lysis, and the virus particles released can spread to adjacent cells in the agar, infect them, be reproduced, and again lead to lysis and release. The size of the plaque formed depends on the virus, the host, and conditions of culture. (b) Photograph of a plate showing plaques formed by bacteriophage on a lawn of sensitive bacteria. The plaques shown are about 1–2 mm in diameter.

## (二) 蚀斑和感染病灶(focus Of infection)

若标本经过适当稀释进行接种并辅以染色处理，病毒可在培养的细胞单层上形成肉眼可见的局部病损区域，即蚀斑（plaque）或称空斑。



**FIGURE 13.12** Cell cultures. (a) A tissue is treated with enzymes to separate the cells. (b) Cells are suspended in culture medium. (c) Normal cells or primary cell lines grow in a monolayer across the glass or plastic container. Transformed cells or continuous cell cultures do not grow in a monolayer.

### (三)坏死斑(病斑) (lesion)

植物病毒

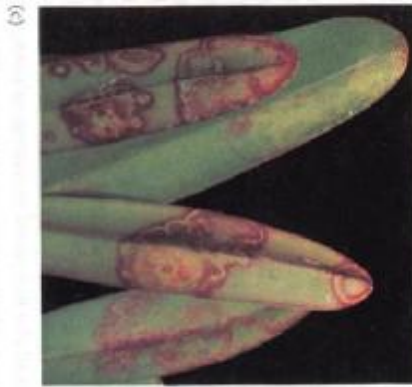


敏感植物叶片



产生坏死斑，或称枯斑

Figure 16.5 Necrotic Lesions on Plant Leaves. (a) Tobacco mosaic virus on *Nicotiana glauca*. (b) Bean common mosaic disease. Infected leaves show yellow mottling and distortion. (c) Tobacco mosaic virus infection of an orchid showing leaf color changes.



## (四) 病毒定量中的几个概念

### 1. 噬菌体效价 (titre, titer)

效价是指每ml试样中所含有的侵染性的噬菌体粒子数，或形成噬菌斑单位 (plaque forming unit, pfu) 数。

$$\text{公式: } n = Y / VX$$

式中：  
n 为噬菌体效价；  
Y 为噬菌斑数 / 平板；  
V 为噬菌体稀释液的体积；  
X 为噬菌体稀释液的稀释度。

### 2. 成斑率 (平板效率) (efficiency of plating, EoP)

# 第五节 病毒与实践

---

## 一、病毒的应用

(一) 鉴定病原菌，治疗疾病

(二) 防治害虫

(三) 作为分子生物学研究的工具

(四) 测定辐射剂量

## 二、细菌病毒和发酵工业（噬菌体的防治）

---

1. 污染现象

2. 污染原因

3. 防治措施

① 杜绝噬菌体的各种来源

② 控制活菌体的排放

③ 使用抗噬菌体菌株和定期轮换生产用菌

④ 噬菌体污染后的补救措施