

学校编码: 10384  
学号: B200326024

分类号 \_\_\_\_\_ 密级 \_\_\_\_\_  
UDC \_\_\_\_\_

厦 门 大 学

博 士 学 位 论 文

基因治疗药物中基因传递载体的应用基础研究

Basic Study on Application of  
Gene Carrier in Gene Therapeutic Drugs

学 生 姓 名: 杨天赐

指导教师姓名: 彭宣宪 教授

李祺福 教授

专 业 名 称: 生化与分子生物学

论文提交日期: 2008 年 06 月

论文答辩时间: 2008 年 07 月

学位授予日期: 年 月

答辩委员会主席: 唐崇惕 院士

评 阅 人: \_\_\_\_\_

2008 年 07 月

## 厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为( )课题(组)的研究成果,获得( )课题(组)经费或实验室的资助,在( )实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

## 厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

# 目 录

摘 要 .....	1
Abstract.....	3
第一章 前 言 .....	5
1 基因治疗 .....	5
1.1 基因治疗机理 .....	5
1.2 基因治疗途径及步骤 .....	5
1.3 基因治疗的原则 .....	6
1.4 基因治疗中有待解决的关键问题 .....	8
2 基因载体 .....	9
2.1 病毒载体 .....	11
2.2 非病毒载体 .....	15
3 阳离子聚合物基因载体 .....	18
3.1 阳离子聚合物主要类型 .....	19
3.2 阳离子聚合物的基因传递机制 .....	21
3.3 阳离子聚合物载体的毒性 .....	23
4 RNAi 技术.....	23
4.1 RNAi 的发现.....	23
4.2 RNAi 机制.....	24
4.3 RNAi 技术的优越性.....	25
4.4 RNAi 在基因治疗领域的应用.....	26
5 抗体制备技术 .....	27
5.1 抗体的发展 .....	28
5.2 单克隆抗体在医学中的应用 .....	32
5.3 单克隆抗体与多克隆抗体的比较 .....	34
6 本论文的研究内容 .....	35
第二章 环氧合酶 COX-2 抗体制备 .....	37

一、材料 .....	37
1 常用试剂和耗材 .....	37
2 主要设备 .....	41
3 生物材料 .....	42
二、试验方法 .....	43
1 环氧合酶 COX-2 多克隆抗体制备 .....	43
1.1 兔抗血清的制备 <sup>[124-126]</sup> .....	43
1.2 DOT-ELISA 测效价试验 .....	43
1.3 抗体特异性的鉴定 .....	44
1.4 多克隆抗体的纯化 .....	44
1.5 辣根过氧化物酶 (HRP) 标记多克隆抗体 (过碘酸钠法) .....	46
2 环氧合酶 COX-2 单克隆抗体制备 .....	47
2.1 免疫方案 .....	47
2.2 免疫脾淋巴细胞制备 .....	47
2.3 髓瘤细胞的准备 .....	47
2.4 饲养细胞 (Feeder cells) 的制备 .....	48
2.5 细胞融合 .....	49
2.6 HAT 选择杂交瘤 .....	50
2.7 ELISA 方法筛选杂交瘤细胞分泌抗体 .....	50
2.8 杂交瘤的克隆化 (有限稀释法) .....	50
2.9 杂交瘤细胞的冻存 .....	51
2.10 杂交瘤细胞复苏 .....	52
2.11 单克隆抗体的大量生产 .....	52
2.12 单抗的纯化 .....	52
2.13 单克隆抗体的鉴定 .....	53
三、结果 .....	54
1 环氧合酶 COX-2 多克隆抗体制备 .....	54
1.1 多克隆抗体的效价鉴定 .....	54
1.2 抗体的特异性鉴定 .....	55

2 环氧合酶 COX-2 单克隆抗体制备 .....	56
2.1 抗体特异性的鉴定 .....	56
2.2 McAb 的 Ig 类的鉴定 .....	57
2.3 McAb 效价的确定 .....	58
2.4 单抗纯度的鉴定 .....	58
四、讨论 .....	58
1 COX 多克隆抗体制备 .....	58
2 COX 单克隆抗体制备 .....	59
第三章 阳离子聚合物基因传递载体的应用基础研究 .....	62
一、材料 .....	62
1 常用试剂 .....	62
2 主要设备 .....	62
3 生物材料 .....	64
二、试验方法 .....	65
1 阳离子聚合物基因传递载体构建 .....	65
1.1 阳离子聚合物合成 .....	65
1.2 基因载体工作液的制备 .....	65
1.3 制备阳离子聚合物基因传递载体 .....	65
2 sofast 基因载体体外试验研究 .....	66
2.1 sofast/DNA 复合物形成、粒径及 zeta 电位分析 .....	66
2.2 sofast/DNA 复合物抗核酸酶能力 .....	66
2.3 sofast 基因载体缓冲能力 .....	66
2.4 sofast 基因载体结合核酸能力 (DNA 延滞试验) .....	67
2.5 sofast 基因载体所介导的基因转染效果研究 (体外应用) .....	67
2.6 sofast 基因载体细胞毒性分析 .....	69
2.7 sofast 基因载体的抗血清特性 .....	69
2.8 不同细胞株类型的转染操作及优化 .....	70
2.9 转染分析时间 .....	71
2.10 基因融合肽对 sofast 基因载体转染的促进作用 .....	71

2.11 sofast 基因载体稳定性试验 .....	73
2.12 基因载体工作液盐浓度对转染效率的影响（体外） .....	73
3 sofast 基因载体体内试验 .....	73
3.1 sofast 基因载体体内毒性试验 .....	73
3.2 绿色荧光蛋白基因在大鼠肺肝肾细胞中的表达（体内应用） .....	75
3.3 体内使用时候 sofast 基因载体与 DNA 比例的优化 .....	76
3.4 基因载体工作液盐浓度对转染效率的影响（体内） .....	76
4 sofast 基因载体转染 siRNA 效果研究 .....	76
三、结果 .....	77
1 sofast 阳离子聚合物基因传递载体构建 .....	77
2 sofast 基因载体体外试验研究 .....	78
2.1 sofast/DNA 复合物形成、粒径及 zeta 电位分析 .....	78
2.2 sofast/DNA 复合物抗核酸酶能力 .....	80
2.3 sofast 基因载体的缓冲能力 .....	81
2.4 sofast 基因载体结合核酸能力的研究（DNA 延滞试验） .....	82
2.5 sofast 基因载体所介导的基因转染效果研究（体外试验） .....	83
2.6 sofast 基因载体细胞毒性分析 .....	87
2.7 sofast 基因载体的抗血清特性分析 .....	88
2.8 不同细胞株类型的转染操作及优化 .....	89
2.9 转染分析的时间 .....	92
2.10 diINF-7 对 sofast 基因载体转染效果的影响 .....	94
2.11 sofast 基因载体稳定性试验 .....	96
2.12 基因载体工作液盐浓度对转染效率的影响（体外应用） .....	96
3 sofast 基因载体体内试验 .....	97
3.1 sofast 基因载体体内毒性试验 .....	97
3.2 绿色荧光蛋白基因在大鼠肝肾细胞中的表达（体内） .....	98
3.3 体内使用时候 sofast 基因载体与 DNA 比例的优化 .....	101
3.4 基因载体工作液盐浓度对转染效率的影响（体内应用） .....	102
4 sofast 基因载体转染 siRNA 的效果研究 .....	102

四、讨论 .....	103
1 sofast 基因载体介导的转染机制 .....	103
2 sofast/DNA 物理特性 .....	106
3 sofast 基因载体抗核酸酶作用 .....	107
4 sofast 基因载体转染效果 .....	107
5 sofast 基因载体毒性 .....	108
6 sofast 抗血清特性 .....	109
7 影响转染效率的因素、优化 .....	110
8 转染分析时间 .....	113
9 diINF-7 对 sofast 基因载体转染效果的促进作用 .....	114
10 sofast 基因载体体内毒性试验 .....	116
11 sofast 基因载体体内应用 .....	116
12 sofast 介导的 siRNA 转染 .....	121
五、小结 .....	122
第四章 脂质—阳离子聚合物 siRNA 基因载体的应用基础研究 .....	126
一、材料 .....	126
1 常用试剂 .....	126
2 主要设备 .....	127
3 生物材料 .....	129
二、试验方法 .....	130
1 脂质—阳离子聚合物 siRNA 基因载体构建 .....	130
1.1 脂质—阳离子聚合物合成 .....	130
1.2 基因载体工作液的制备 .....	130
1.3 制备脂质—阳离子聚合物基因传递载体 .....	131
2 lipid-cationic polymer 基因载体体外试验 .....	131
2.1 lipid-cationic polymer/siRNA 复合物形成、粒径及 zeta 电位分析 .....	131
2.2 lipid-cationic polymer 基因载体结合核酸能力的研究 (DNA 延滞试验) .....	131
2.3 lipid-cationic polymer 基因载体缓冲能力 .....	132
2.4 lipid-cationic polymer 基因载体所介导的基因转染效果研究 (体外应用) .....	132



2.5 lipid-cationic polymer/siRNA 复合物抗核酸酶能力 .....	133
2.6 lipid-cationic polymer 基因载体细胞毒性分析验证.....	133
2.7 siRNA 作用特异性的研究 .....	134
2.8 降解试验 .....	134
2.9 稳定性试验 .....	134
2.10 lipid-cationic polymer 基因载体的抗血清特性.....	134
2.11 基因融合肽 diINF-7 对 lipid-cationic polymer 转染效果的影响.....	135
2.12 质子泵抑制剂对 lipid-cationic polymer 转染效果的影响.....	136
3 lipid-cationic polymer 基因载体体内试验.....	137
3.1 lipid-cationic polymer 基因载体体内毒性试验.....	137
3.2 lipid-cationic polymer 基因载体体内转染效果.....	138
三、结果 .....	141
1 脂质-阳离子聚合物 siRNA 基因传递载体构建.....	141
2 lipid-cationic polymer 基因载体体外试验.....	142
2.1 lipid-cationic polymer /DNA 复合物形成、粒径及 zeta 电位分析 .....	142
2.2 lipid-cationic polymer 基因载体结合核酸能力的研究 (DNA 延滞试验) .....	144
2.3 lipid-cationic polymer 基因载体缓冲能力.....	145
2.4 lipid-cationic polymer 基因载体所介导的基因转染效果研究 (体外应用) .....	146
2.5 lipid-cationic polymer/siRNA 复合物抗核酸酶能力 .....	148
2.6 lipid-cationic polymer siRNA 基因载体细胞毒性分析验证.....	148
2.7 siRNA 作用特异性的研究 .....	149
2.8 降解试验 .....	150
2.9 稳定性试验 .....	151
2.10 lipid-cationic polymer 基因载体的抗血清特性.....	151
2.11 diINF-7 对转染效果的影响.....	152
2.12 质子泵抑制剂对 lipid-cationic polymer 转染效果的影响.....	154
3 lipid-cationic polymer 基因载体体内试验.....	155
3.1 lipid-cationic polymer 基因载体体内毒性试验.....	155
3.2 lipid-cationic polymer 基因载体体内转染效果.....	156

四、讨论 .....	160
1 脂质-阳离子聚合物转染 siRNA 机制的探讨 .....	160
2 pH 缓冲能力、抗核酸酶作用 .....	162
3 lipid-cationic polymer /siRNA 复合物物理特性 .....	163
4 转染特性 .....	163
5 lipid-cationic polymer 体内转染 .....	165
五、小结 .....	167
第五章 肿瘤患者 IgM/IgG 类免疫复合物的免疫调节作用 .....	170
一、引言 .....	170
二、材料和方法 .....	173
1. 实验材料 .....	173
2 研究对象 .....	173
3. 主要仪器 .....	175
二、方法 .....	175
1 Ig/Ig-TCIC 测定 .....	175
2 血清总、游离和复合 Ig 的测定 .....	176
3 统计学检验 .....	177
三、结果 .....	177
1 肿瘤患者总 IgM 和 IgG 水平 .....	177
2 肿瘤患者复合 IgM 和 IgG 水平 .....	180
3 肿瘤患者 IgM/IgG-TCIC 水平 .....	183
4 肿瘤患者 IgG/IgM-TCIC 水平 .....	186
四、讨论 .....	189
参考文献 .....	191
致 谢 .....	212
攻读博士期间发表的论文 .....	213
攻读博士期间申报的国家发明专利 .....	214

## Table of content

Abstract in Chinese.....	1
Abstract in English .....	3
Chapter 1 Introduction.....	5
1 Gene therapy.....	5
2 Gene carrier .....	9
3 Cationic polymer gene carrier .....	18
4 RNAi.....	23
5 Preparation of antibody.....	27
6 Research in this thesis.....	35
Chapter 2 Preparation of COX-2 antibody .....	37
Section 1 Materials .....	37
1 Reagents and consumables .....	37
2 Main instruments .....	41
3 Biological materials.....	42
Section 2 Methods .....	43
1 Preparation of COX PcAb .....	43
1.1 Preparation of rabbit anti-serum .....	43
1.2 DOT-ELISA.....	43
1.3 Identification of antibody specificity.....	44
1.4 Purification of polyclonal antibody .....	44
1.5 HRP labeled polyclonal antibody .....	46
2 Preparation of COX monoclonal antibody .....	47
2.1 Protocol.....	47
2.2 Preparation of immune spleen lymphocytes.....	47
2.3 Preparation of myeloma cells .....	47
2.4 Preparation of feeder cells .....	48
2.5 Cell fusion.....	49

2.6 Selection of hybridoma cells by HAT.....	50
2.7 Hybridoma cells screening by ELISA.....	50
2.8 Clone of Hybridoma cells.....	50
2.9 Storage of hybridoma cells.....	51
2.10 Resuscitation of hybridoma cells.....	52
2.11 Mass production of monoclonal antibody.....	52
2.12 Purification of monoclonal antibody.....	52
2.13 Identification of monoclonal antibody.....	53
Section 3 Results.....	54
1 Preparation of COX polyclonal antibody.....	54
1.1 Titer measurement of polyclonal antibody.....	54
1.2 Identification of antibody specificity.....	55
2 Preparation of COX-2 monoclonal antibody.....	56
2.1 Identification of antibody specificity.....	56
2.2 Ig class identification of McAb.....	57
2.3 Measurement of McAb titer.....	58
2.4 Measurement of purity of monoclonal antibody.....	58
Section 4 Discussion.....	58
1 Preparation of COX-2 PcAb.....	58
2 Preparation of COX-2 McAb.....	59
Chapter 3 Basic Study on Application of cationic polymer Gene Carrier.....	62
Section 1 Materials.....	62
1 Reagents.....	62
2 Instruments.....	62
3 Biological Materials.....	64
Section 2 Methods.....	65
1 Construction of cationic Polymer gene carrier.....	65
2 In vitro analysis of sofast gene carrier.....	66
2.1 Analysis of sofast/DNA complex formation, partical size and zeta potential.....	66
2.2 Analysis of anti-nuclease capacity of sofast/DNA complex.....	66

2.3 Analysis of buffering capacity of sofast gene carrier .....	66
2.4 Analysis of combination ability of sofast gene carrier (DNA retarding analysis).....	67
2.5 Analysis of efficiency of sofast gene carrier mediated gene transfection (in vitro application) .....	67
2.6 Cytotoxic assays of sofast gene carrier .....	69
2.7 Analysis of sofast gene carrier's anti-serum property .....	69
2.8 Operation and optimization of transfection procedure of different cell lines.....	70
2.9 Analysis of transfection time .....	71
2.10 Promotion effect of gene fusion peptide on sofast gene carrier transfection .....	71
2.11 Stability test of sofast gene carrier.....	73
2.12 Effect of salt concentration of gene carrier working solution on transfection efficiency (in vitro).....	73
3 In vivo assays of sofast gene carrier .....	73
3.1 In vivo toxicity test of sofast gene carrier .....	73
3.2 Expression of GFP in pulmonary, liver and kidney cells .....	75
3.3 Optimizaiotn of ratio of sofast gene carrier and DNA in in vivo application.....	76
3.4 Effect of salt concentration of gene carrier workin solution on transfection (in vivo)	76
4 Effect of sofast gene carrier mediated siRNA transfection .....	76
Section 3 Resultls .....	77
1 Construction of sofast cationic polymer gene carrier .....	77
2 In vitro assays of sofast gene carrier.....	78
2.1 Analysis of sofast/DNA complex formation, partical size and zeta potential .....	78
2.2 Analysis of anti-nuclease capacity of sofast/DNA complex.....	80
2.3 Analysis of buffering capacity of sofast gene carrier .....	81
2.4 Analysis of combination ability of sofast gene carrier (DNA retarding assays).....	82
2.5 Analysis of efficiency of sofast gene carrier mediated gene transfection (in vitro application) .....	83
2.6 Cytotoxic assays of sofast gene carrier .....	87
2.7 Analysis of sofast gene carrier's anti-serum property .....	88
2.8 Operation and optimization of transfection procedure of different cell lines.....	89

2.9 Analysis of transfection time .....	92
2.10 Effect of gene fusion peptide on sofast gene carrier transfection.....	94
2.11 Stability test of sofast gene carrier.....	96
2.12 Effect of salt concentration of gene carrier working solution on transfection efficiency (in vitro).....	96
3 In vivo assays of sofast gene carrier .....	97
3.1 In vivo toxicity test of sofast gene carrier .....	97
3.2 Expression of GFP in pulmonary, liver and kidney cells (in vivo).....	98
3.3 Optimizaiont of ratio of sofast gene carrier and DNA in in vivo application.....	101
3.4 Effect of salt concentration of gene carrier workin solution on transfection (in vivo) .....	102
4 Effect of sofast gene carrier mediated siRNA transfection .....	102
Section 4 Discussion.....	103
1 Mechanisms of sofast mediated transfection.....	103
2 Physical properties of sofast/DNA .....	106
3 Anti-nuclease capacity of sofast gene carrier .....	107
4 Transfection efficiency of sofast gene carrier.....	107
5 Toxicity of sofast gene carrier .....	108
6 Anti-serum property of sofast .....	109
7 Elements that affect transfection efficiency and their optimization .....	110
8 Analysis of transfection time .....	113
9 Promotion effect of diINF-7 on tranfection efficiency of sofast gene carrier .....	114
10 In vivo toxicity test of sofast gene carrier .....	116
11 In vivo application of sofast gene carrier.....	116
12 Sofast mediated siRNA transfection.....	121
Section 5 Summary.....	122
Chapter 4 Basic Study on Application of lipid-cationic polymer Gene Carrier .....	126
Section 1 Materials .....	126
1 Reagents.....	126
2 Instruments .....	127

3 Biological Materials.....	129
Section 2 Methods .....	130
1 Construction of lipid-cationic polymer siRNA gene carrier.....	130
1.1 Synthesis of lipid-cationic polymer .....	130
1.2 Preparation of gene carrier working solution .....	130
1.3 Preparation of lipid-cationic polymer gene carrier .....	131
2 In vitro assays of lipid-cationic polymer gene carrier .....	131
2.1 Analysis of lipid-cationic polymer/siRNA complex formation, partical size and zeta potential .....	131
2.2 Analysis of combination ability of lipid-cationic polymer gene carrier (DNA retarding analysis).....	131
2.3 Analysis of buffering capacity of lipid-cationic polymer gene carrier .....	132
2.4 Analysis of efficiency of lipid-cationic polymer gene carrier mediated gene transfection (in vitro application) .....	132
2.5 Analysis of anti-nuclease capacity of lipid-cationic polymer/siRNA complex .....	133
2.6 Cytotoxic assays of lipid-cationic polymer gene carrier .....	133
2.7 Specificity assays of siRNA .....	134
2.8 Degradation test.....	134
2.9 Stability test .....	134
2.10 Analysis of lipid-cationic polymer gene carrier's anti-serum property .....	134
2.11 Effect of gene fusion peptide on lipid-cationic polymer gene carrier transfection..	135
2.12 Effect of proton pump inhibitor on lipid-cationic polymer transfection efficiency	136
3 In vivo assays of lipid-cationic polymer gene carrier.....	137
3.1 In vivo toxicity test of lipid-cationic polymer gene carrier .....	137
3.2 In vivo transfection effect of lipid-cationic polymer gene carrier .....	138
Section 3 Results .....	141
1 Construction of lipid-cationic polymer siRNA gene carrier.....	141
2 In vitro assays of lipid-cationic polymer gene carrier .....	142
2.1 Analysis of lipid-cationic polymer/siRNA complex formation, partical size and zeta potential .....	142

2.2 Analysis of combination ability of lipid-cationic polymer gene carrier (DNA retarding assays).....	144
2.3 Analysis of buffering capacity of lipid-cationic polymer gene carrier .....	145
2.4 Analysis of efficiency of lipid-cationic polymer gene carrier mediated gene transfection (in vitro application) .....	146
2.5 Analysis of anti-nuclease capacity of lipid-cationic polymer/siRNA complex .....	148
2.6 Cytotoxic assays of lipid-cationic polymer siRNA gene carrier .....	148
2.7 Specificity assays of siRNA .....	149
2.8 Degradation test.....	150
2.9 Stability test .....	151
2.10 Analysis of lipid-cationic polymer gene carrier's anti-serum property .....	151
2.11 Effect of gene fusion peptide on lipid-cationic polymer gene carrier transfection..	152
2.12 Effect of proton pump inhibitor on lipid-cationic polymer transfection efficiency	154
3 In vivo assays of lipid-cationic polymer gene carrier.....	155
3.1 In vivo toxicity test of lipid-cationic polymer gene carrier .....	155
3.2 In vivo transfection effect of lipid-cationic polymer gene carrier.....	156
Section 4 Discussion.....	160
1 Mechanism of lipid-cationic polymer in siRNA transfection.....	160
2 pH buffering and anti-nuclease capacity of lipid-cationic polymer gene carrier .....	162
3 Physical properties of lipid-cationic polymer /siRNA complex.....	163
4 Properties of lipid-cationic polymer mediated transfection.....	163
5 In vivo transfection of lipid-cationic polymer .....	165
Section 5 Summary.....	167
Chapter 5 Immune Regulation of patients with malignancies of Ig/ Ig two-component-Determined Circulating Immune Complexes.....	170
Section 1 Introduction.....	170
Section 2 Materials .....	173
Section 3 Methods .....	175
Section 4 Results .....	177
Section 5 Discussion.....	189



Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库