

学校编码: 10384  
学号: 31420111150123

分类号\_\_\_\_\_密级\_\_\_\_  
UDC

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

乙肝病毒核心蛋白病毒样颗粒作为基因载体的初步研究

The primary study of Hepatitis B virus core protein  
virus-like particle used as gene transfer

周军

指导教师姓名: 任 磊 教授

专 业 名 称: 生物医学工程

论文提交日期: 2015 年 月

论文答辩时间: 2015 年 月

学位授予日期: 2015 年 月

答辩委员会主席: \_\_\_\_\_

评 阅 人: \_\_\_\_\_

2015 年 月

厦门大学博硕士学位论文摘要库

## 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

## 摘要

基因治疗越来越成为一种治疗人类遗传病和癌症的一种手段,乙肝病毒核心蛋白病毒样颗粒具有规则的正二十面体结构,为基因治疗提供了新的载体选择。

本论文工作主要分为三个方面:

1、在构建好的乙肝病毒核心蛋白的大肠杆菌表达载体基础上,优化纯化步骤,探讨乙肝病毒核心蛋白病毒样颗粒(HBc VLPs)在体外条件下的解聚和重组条件,选定重组液的最佳配方,并考察解聚重组对 HBc VLPs 的形貌、抗原性等影响。

2、通过琼脂糖电泳等方法考察两种 HBc-183 和 HBc-144 这两种 HBc VLPs 对坍塌的质粒和未坍塌的质粒保护情况并通过荧光定量法测量 VLPs 对质粒的封装率。

3、通过转染报告基因 pGL3,用化学发光仪测量,来考察两种 HBc VLPs 作为基因载体其转染情况,通过 MTT 法来检验其生物相容性等问题。

关键词: 基因治疗 乙肝病毒核心蛋白 病毒样颗粒 基因转染

厦门大学博硕士学位论文摘要库

## Abstract

Gene therapy has become more and more access into a cure of human inherited diseases and cancer. Hepatitis B Virus core protein virus-like particles (HBc VLPs) with its icosahedra structure give Gene therapy one more promising choice as gene vector. In the following of this essay , three aspects were discussed:

1. With established Hepatitis B Virus core protein expressing system,we optimized the procedure and the condition of purification.Through the disassembly and reassembly of the HBc VLPs in vitro, the best condition for the reassembly was discovered.The composition of the reassembly buffer solution was tested for its influence of the morphology and the antigenicity.
2. Through the agarose Electrophoresis,two kinds HBc--VLPs:HBc-183 and HBc-144—was tested for its protection of plasmid DNA.With the help of fluorescence staining, the encapsulation efficiency of these two kinds HBc VLPs encapsulating the collapsed and unconllapsed plasmid was compared in quantitative.
3. With the report gene pGL3,the efficiency of the transfection of these two kinds HBc VLPs encapsulating the collapsed and unconllapsed plasmid was measured. MTT was used to evaluate the biocompatibility of VLPs.

Key words: Gene therapy ; Hepatitis B Virus Core protein ; virus-like particles ;  
Gene transfer;

厦门大学博硕士学位论文摘要库



## 目录

摘要.....	I
Abstract .....	III
<b>第一章 绪论 .....</b>	<b>1</b>
1.1 引言 .....	1
1.2 病毒载体.....	2
1.3 非病毒载体.....	3
1.3.1 脂质体.....	4
1.3.2 阳离子多聚物.....	5
1.3.3 多肽导向载体系统.....	6
1.3.4 纳米载体.....	8
1.3.5 病毒样颗粒.....	11
1.3.6 嵌合载体.....	12
1.4 乙肝病毒核心蛋白的研究.....	13
1.4.1 HBV 核心颗粒的结构特征.....	13
1.4.2 外源片段在 HBc N 端的插入及颗粒的形成情况 .....	14
1.4.3 外源片段在 HBc 刺突部位的插入以及颗粒形成的情况.....	14
1.4.4 外源片段在 HBc C 端的插入及颗粒形成的情况.....	15
1.5 本研究的意义和内容.....	15
参考文献: .....	16
<b>第二章 乙肝核心蛋白表达纯化及理化性质研究.....</b>	<b>25</b>
2.1 引言: .....	25
2.2 实验试剂和仪器: .....	25
2.2.1 试剂与仪器 .....	25
2.2.2 实验主要试剂配制.....	27
2.3 实验方法: .....	28

2.3.1 表达纯化.....	28
2.3.2 HBc 蛋白的解聚与重组.....	31
2.3.3 表征技术.....	32
2.3.4 酶联免疫吸附反应 (ELISA) .....	34
<b>2.4 结果与讨论.....</b>	<b>35</b>
2.4.1 纯化结果的表征 .....	35
2.4.2 BCA 法测定蛋白浓度 .....	39
2.4.3 解聚液对蛋白形貌、粒径、抗原性的影响 .....	40
2.4.4 不同的离子强度对重组的影响 .....	42
2.4.5 不同的微量离子对重组的影响 .....	44
<b>2.5 本章小结.....</b>	<b>46</b>
<b>第三章 乙肝核心蛋白病毒样颗粒作为基因载体初步应用 .....</b>	<b>48</b>
<b>3.1 引言: .....</b>	<b>48</b>
<b>3.2 实验试剂和仪器 .....</b>	<b>48</b>
3.2.1 试剂与仪器 .....	48
<b>3.3 实验方法: .....</b>	<b>50</b>
3.3.1 质粒的制备.....	50
3.3.2 VLPs 与质粒的复合物的制备 .....	51
3.3.3 琼脂糖电泳检测 PEI 与质粒的最佳及 VLPs 对质粒的包裹与保护 .....	52
3.3.4 VLPs 与质粒复合物的粒径检测 .....	52
3.3.5 荧光染料 Picogreen 法定量检测 VLPs 对质粒 DNA 的包封率....	53
3.3.6 MTT 测定 VLPs 与质粒复合物对细胞的毒性 .....	54
3.3.7 化学发光法检测 VLPs 对荧光素酶报告基因转染的影响 .....	54
<b>3.4 结果与讨论.....</b>	<b>55</b>
3.4.1 低分子量的 PEI 促使质粒的坍塌.....	55
3.4.2 VLPs 对质粒的保护 .....	56
3.4.3 VLPs 包裹坍塌质粒的粒径分析 .....	58
3.4.4 VLPs 对坍塌质粒 DNA 的包封率.....	60
3.4.5 MTT 测定 VLPs 与质粒复合物对细胞的毒性 .....	64

3.4.6 VLPs 介导荧光素酶基因转染 .....	65
3.5 本章小结 .....	66
<b>全文总结及展望 .....</b>	<b>68</b>
全文总结 .....	68
展望 .....	68
硕士期间发表的论文 .....	69
致谢 .....	70

厦门大学博硕士学位论文摘要库

## Contents

摘要.....	I
Abstract.....	III
<b>CHAPTER 1 REVIEWS .....</b>	<b>1</b>
1.1 Introduction .....	1
1.2 Viral vector.....	2
1.3 Non-viral vector .....	3
1.4 Research of Hepatitis B virus core protein .....	13
1.5 Proposal and content of this study .....	15
Reference: .....	16
<b>Chapter 2 The expression, purification and physical and chemical properties research of Hepatitis B virus core protein .....</b>	<b>25</b>
2.1 Introduction: .....	25
2.2 Materials and Instruments: .....	25
2.3 Experimental: .....	28
2.4 Results and discussion.....	35
2.5 Conclusions .....	46
<b>Chapter 3 Hepatitis B Virus core protein virus-like particles applied as gene vector .....</b>	<b>48</b>
3.1 Introduction: .....	48
3.2 Materials and Instruments .....	48
3.3 Experimental: .....	50
3.4 Results and discussions .....	55
3.5 Conclusion.....	66
<b>Summary and future works .....</b>	<b>68</b>

**Publications** ..... 69

**Acknowledgement** ..... 70

厦门大学博硕士学位论文摘要库

# 第一章 绪论

## 1.1 引言

基因治疗 (gene therapy) 是上世纪七十年代首次被提出的, 它是随着 DNA 重组技术而发展起来的。通常来讲, 基因治疗是指将一些具有治疗或者正确的 DNA 或者其他核酸物质导入细胞来纠正由于基因缺失或者基因错乱而病变导致的病变, 从而达到治疗效果。起初, 基因治疗的提出主要是针对人类的一些由于基因水平的遗传病。标志着基因治疗时代开始的是 1990 美国的 Anderson 等人进行的首例基因治疗临床实验并取得了成功, 而我国首例基因治疗临床实验是在 1991 年复旦大学薛京伦教授组进行的。随着基因治疗技术的发展, 它越来越成为一种新的治疗发展方向, 是被期待做一种治疗癌症的途径[1]。

根据将基因导入人体的方式来划分, 基因治疗可以分为直接治疗和间接治疗。直接治疗就是指将完整的基因或者基因对的片段作为基因药物导入人体进行治疗。而间接治疗则导入的不是基因药物而是能够起到治疗效果的在体外经过基因修饰的细胞。从导入的基因或者基因片段发挥作用的方式来分, 基因治疗可以分为以下几种:

(1) 抑制性治疗: 抑制 DNA 转录水平或者 mRNA 翻译水平;

(2) 替代性治疗: 将正确的基因导入来替代缺失或者功能紊乱的基因, 这是最常见的基因治疗方式;

(3) 修复性治疗: 通过选择性的回复突变使某些基因回复正常功能;

近几十年来, 基因治疗已经取得了很大的进展, 并多次成功治疗了人类的遗传疾病。Cavazzana-Calvo 等在 2000 年首次成功地实现了对多种免疫缺陷综合症-X1 (SCID-X1) 病人进行基因治疗[2]。Aiuti 等人在 2002 年成功实现了对腺苷脱氨酶-多重免疫综合症 (ADA-SCID) 患者的治疗[3]。随着基因治疗技术的发展, 基因治疗已经从早期对单基因遗传病的治疗扩展到对人类多基因疾病, 甚至包括心血管疾病、代谢性疾病、恶性肿瘤、以及感染性疾病(如 AIDS、乙型肝炎)等。

基因治疗需要将外源的基因导入到特定靶细胞的细胞核中,这个过程需要克服重重屏障:细胞膜、溶酶体、核膜或者线粒体膜[4, 5]。选取具体方法的策略,通常将外源基因的导入需要通过一定的技术方法和载体,技术方法主要是物理方法,常见的方法包括:显微注射、电穿孔和激光等热懂等,但物理方法与载体法相比基因转染的效率相对较低,技术限制比较明显[6]。载体法中用于基因转染的载体的可以分为病毒载体和非病毒载体,接下来我们就对两种载体转染细胞的机制、转染效率方面进行总结,并基于此总结提出本文的研究内容和研究意义。

## 1.2 病毒载体

病毒载体将外源基因转染的原理是通过将目的 DNA 片段整合到病毒的基因组中,当病毒感染目的细胞时,外源的目的 DNA 得以在细胞中表达。病毒载体有着显著的转染优势其表现在:有非常广的不同的病毒类型可供选择;有着非常强的组织特异性和组织取向性(如类腺病毒);目的基因的表达速度快,如塞姆利及森林病毒;长时间持续的表达尤其是慢病毒;基因组的整合(如腺病毒和慢病毒)。当然病毒载体的缺点也是十分明显的:由于其需要将目的 DNA 整合到病毒的基因组中,因此 DNA 片段的大小是有限制的;由于使用的是具有活性的病毒,因此可能会由病毒感染引起细胞病变的效应。目前常用的病毒载体系统主要有塞姆利基森林病毒[7],慢病毒[8]和腺病毒[9]。

塞姆利及森林病毒介导的转染能够在几小时内转染,而慢病毒转染则需要在一周的时间才能达到检测水平,但其表达能够持续几个月,因此 Dull 等相信通过一个限制的系统的第三代慢病毒载体将会有更好的表现[10]。如果使用腺病毒作为载体,大约在 24 小时内可以检测到转染的目的基因表达的蛋白。腺病毒介导的表达能够持续稳定一周而不没有引起有害的反应[11, 12]。因此腺病毒介导的转染可能是最适用与在初代细胞培养中表达目的蛋白的方法。另一方面,疱疹病毒介导的转染也成功在初代细胞培养中表达出了蛋白[13]。在基因治疗中,基因转导和表达不再是在隔离的细胞中而是在特定的器官,到达器官组织可以通过局部注射或者血液循环,但对于载体需要更多的组织特异性。但同时需要面临更多的障碍:抗体的中和、血浆蛋白的黏附、肝清除和血管壁的阻碍[14]。最终还涉及表达产物是否会引起免疫反应。已有一些报道腺病毒会引起较大的免疫反应导

致了表达的静默[15-17]。因此很多研究者关注于腺相关病毒（AAV，Adeno-associated virus）载体，它作为一种替代不会引起病变反应，较低的免疫反应以及持续稳定的基因转染[18]。

病毒类载体能够高效的转染靶细胞，递呈目的基因，表达目的基因[19]可能是由于其有效的将目的基因包封在其衣壳内部，保护了DNA进入靶细胞，有效的逃逸溶酶体，通过一些微观通道将目的基因传递至细胞核[20-22]。Cotton、Wagner等人成功的使用腺病毒为载体转染Hela细胞，转染效率高达100%[23]。

病毒类载体其安全性一直受人怀疑，有研究表明，在经过AAV载体的基因治疗后，患者精子中发现了AAV病毒[24]。2003年对于免疫缺陷疾病的患者进行基因治疗后出现由于病毒出插入性诱变引起了急性T细胞淋巴瘤白血病[25]。因此距离临床使用病毒类载体还需进一步的研究和改进。

### 1.3 非病毒载体

由于病毒载体具有免疫原性，制备复杂，不具有导向性，以及其生物安全性存在隐患，研究者们又发展了非病毒载体作为病毒载体的补充，使得基因治疗适用面更广。非病毒载体主要机制通常是利用亲水或者疏水的多聚阳离子聚合物来将重组质粒或者人工合成的翻译寡核苷酸进行凝聚浓缩，形成复合物微粒，通过细胞内吞作用进入细胞内，通过逃逸溶酶体等方式进入细胞核从而达到基因转染的效果。虽然非病毒载体有着转染效率相对于病毒载体较低、基因的表达持续时间短等不足，但其优点也是研究者寄予厚望的[26]：

- 1.不需要重新转染在一个细胞中，制备相对简单，省时；
- 2.对于包载的基因片段大小或者核苷酸的类型限制较小，极大的扩大了目的基因的范围和基因治疗的应用范围；
- 3.免疫原性低，急性毒性小，不含有病毒核酸不具有感染性，生物安全性上相对安全；
- 4.可以通过修饰一些具有靶向功能的分子使得载体具有特异性和靶向性，并且可以转移至非分裂期的细胞进行有效表达；
- 5.制备方便重复性好，适合大规模生产，成本相对较低。

在接下来的篇幅中我们将简单的对几种非病毒载体进行介绍。



Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”.

Fulltexts 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.