

# 人造標靶性光激發之奈米基因剪技術

## Artificial, Targeted, Light-Activated Nanoscissor for Sequence Selective Gene Scission

李映瑩、蔡宗霖、謝達斌

Ying-Ying Li, Tsung-Lin Tsai, Dar-Bin Shieh

基因工程造就了二十世紀生技醫藥發展的榮景，其中最重要的工具就是基因剪刀限制酶與基因糝糊連結酶。隨著人類與更多物種基因圖譜解碼，基因工程技術為人類疾病、能源與糧食問題提供了一個全新的契機。傳統上基因工程仍以限制酶為工具進行基因重組，但受限於辨識序列短且需使用特定的緩衝溶液，使技術在操作上較複雜，也有更多的限制。「人造標靶光激發之奈米剪 (artificial, targeted, light-activated nanoscissor, ATLANS)」是一種能在單一緩衝溶液環境下辨識選定的基因序列，且此序列可長達數十鹼基對以增加其辨識專一性，此外，更能針對細胞核中的雙股 DNA 進行辨識 (現有的基因沉默技術主要是針對 mRNA 之辨識)，並利用可見光波長調控雙股 DNA 之切割 (double strand cleavage)，由基因體上的層次達到更徹底抑制基因表現之目標。此技術使用奈米粒子作為載體並藉以穩定保護切割分子，提升細胞及次細胞層次標靶運送，以及光學活化切割之整體效能。此一技術已成功應用在細胞中抑制選定之螢光基因的表現，預期將能藉由切割特定抗藥基因的表現，達到降低化療投藥劑量及副作用、增強療效與降低癌細胞對處方用藥產生之抗藥性。

The discovery of restriction enzyme and ligase have brought about a revolution in biomedical technology industry in the 20th century. Through the completion of the Human Genome Project and whole genome decoding of more organism, a tremendous opportunity for advanced applications in food industry, biofuel and fighting human diseases has been opened. This technology developed an artificial targeted, light-activated nanoscissor (ATLANS) for advanced in-cell photonic manipulation of target gene scission and silencing through formation of targeted DNA triplex in the nucleus and double strand DNA scission at predesigned site through photonic activation in the visible wavelength photon energy. The technology has been successfully developed to remove green fluorescent gene in cancer cells. When target to cancer drug resistant gene, ATLANS may effectively decrease chemotherapeutic dosage and thus reduce systemic side effects while increase therapeutic efficacy. The technology could be applied to clinical disease management of cancer, infectious disease and genetic diseases in the future development.

### 一、前言

在生物的演化中，基因是控制生物個體中性狀表現的基本遺傳單位，其序列是由雙股去氧核糖核

酸 (DNA) 鏈所構成，如圖 1 所示<sup>(1,2)</sup>。基因序列可以決定蛋白質的表現並由其執行各式各樣的生物功能，以精密地調控各種複雜的生命現象，也是物種個體差異的根本<sup>(3)</sup>。隨著人類對基因結構的認識，

以及天然的基因切割與連結工具的發現，誕生了影響人類至鉅的基因工程技術<sup>(4)</sup>。基因工程技術是操控基因序列 (DNA) 重組的技術，藉由細菌體純化得到的限制酶酵素<sup>(5)</sup> 與 DNA 連結酶酵素<sup>(6)</sup>，科學家可以在試管內對各種生物個體中的 DNA 進行重組改造。限制酶酵素多半辨識 4 至 8 個具有迴文結構的序列並精確地進行切割，而 DNA 連結酶酵素則可以在催化斷裂後的兩個 DNA 之間形成磷酸二酯鍵而連接起來，於是靠著這「剪刀」(限制酶酵素) 與「糰糊」(DNA 連結酶酵素)，DNA 的密碼可以被重組、突變或交換等，再透過轉殖技術將人工重組後的 DNA 送入宿主細胞，經由細胞持續不斷的分裂與複製，製造出人類需要的基因產物或生物材料。

基因工程技術不僅帶來生技製藥與農畜業產業的革命性發展，也為一些疾病的治療帶來希望。當基因接觸到自由基、游離輻射、致癌物質或 DNA 複製的過程發生錯誤等因素，會導致 DNA 的序列發生取代、倒位、插入或缺失的結構改變，影響正常性狀的表現，進而產生基因突變<sup>(7)</sup>。許多癌化的過程與體內腫瘤細胞中的前致癌基因 (proto-oncogene) 經由基因突變而轉化為致癌基因 (oncogene) 有著密切的關連<sup>(8, 9)</sup>。這些突變往往導致細胞不正長分裂與增殖，造成局部血管新

生，促使細胞逆轉分化並進行遠隔轉移等，甚至能導致癌細胞對處方用藥產生抗藥性<sup>(10)</sup>。隨著現今醫學的進步，科學家可以透過基因沉默的基因工程技術 (例如：antisense oligodeoxynucleotides、ribozymes、RNAi 等策略) 去抑制特定致癌基因的表現<sup>(11)</sup>。而傳統基因沉默的策略只能攻擊在訊息核糖核酸 (mRNA) 的層次，其有效作用時間與基因表現抑制的效果較有限，且在有效地標靶投遞方面也有待突破性的發展<sup>(12)</sup>。除此之外，使用限制酶酵素進行 DNA 重組的基因治療，因限制酶酵素缺乏足夠的專一辨識序列長度而無法廣泛應用在切割致癌基因與抗藥基因上，且不同種類的限制酶酵素需要其特定的緩衝溶液才能有效地作用<sup>(13)</sup>。基於這些種種的限制，臨床上的基因沉默治療需要發展一個可以直接由 DNA 層次抑制該基因表達、有效地投遞至細胞、辨識序列長度不受限且無須使用特定的緩衝溶液的新治療平台。

一九五三年，Watson 與 Crick 證明 DNA 是由氫鍵形成雙股螺旋的結構，稱為華森-克立克鹼基配對 (Watson-Crick base pairing)<sup>(14)</sup> 的規則，並因此獲得諾貝爾獎。而一九五七年，Felsenfeld 與 Rich 則首先提出三股螺旋核酸 (triple-helical nucleic acids) 的存在，此一具有序列選擇性的第三股寡核苷酸 (triplex-forming oligonucleotide, TFO) 能在含

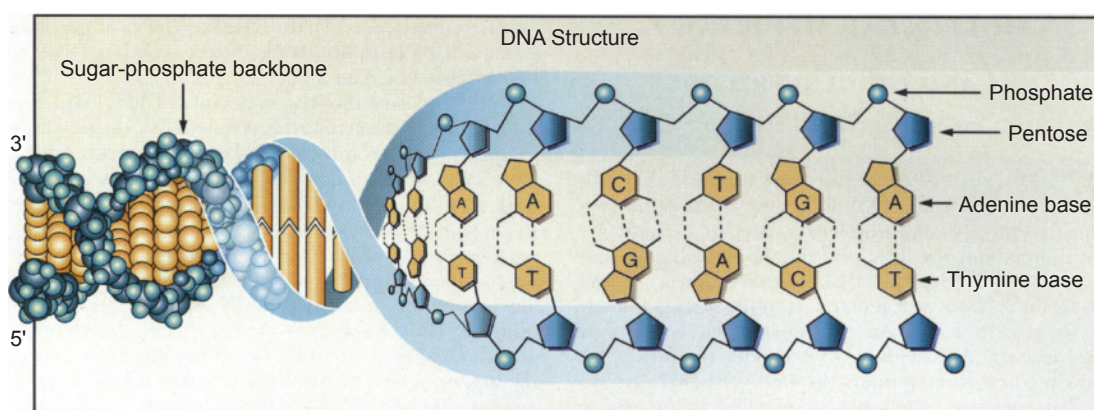


圖 1. 基因是由雙股去氧核糖核酸鏈結構 (DNA structure) 構成之示意圖。DNA 是兩條互相平行之核苷酸鏈以螺旋狀旋轉而成。單一核苷酸鏈是由核苷酸的單體聚合而成，每一種核苷酸由含氮鹼基 (nitrogenous bases)、五碳糖 (pentose) 及磷酸根 (phosphate) 組成。含氮鹼基可分腺嘌呤 (A)、胸腺嘧啶 (T)、胞嘧啶 (C)、鳥糞嘌呤 (G) 四類，以華森-克立克鹼基配對原則形成雙股 DNA，不同順序組成的含氮鹼基可決定 DNA 之差異<sup>(2)</sup>。

有 10 mM MgCl<sub>2</sub> 存在下，與雙股 DNA 形成穩定的三股結構 (triplex formation)<sup>(15)</sup>。一九五九年，Hoogsteen 發現 TFO 與雙股 DNA 是藉由非華森—克立克鹼基配對 (non-Watson-Crick base pairing) 之虎格斯汀鹼基配對 (Hoogsteen base pairing) 或逆轉虎格斯汀鹼基配對 (non-Hoogsteen base pairing) 於雙股 DNA 主凹槽 (major groove) 部位形成專一性

辨識而達成的，如圖 2 所示<sup>(16, 17)</sup>。一九六八年，這個概念首先被發現具有生理意義，Morgan 與 Wells 首次在大腸桿菌中發現，形成三股結構的 RNA 可以抑制 RNA polymerase 的轉錄作用<sup>(18)</sup>。爾後，許多致力於研究三股結構在基因調控與修飾的科學家則發現在哺乳細胞中，TFO 可以專一性地辨識目標基因並抑制該基因的複製與轉錄<sup>(19)</sup>。不

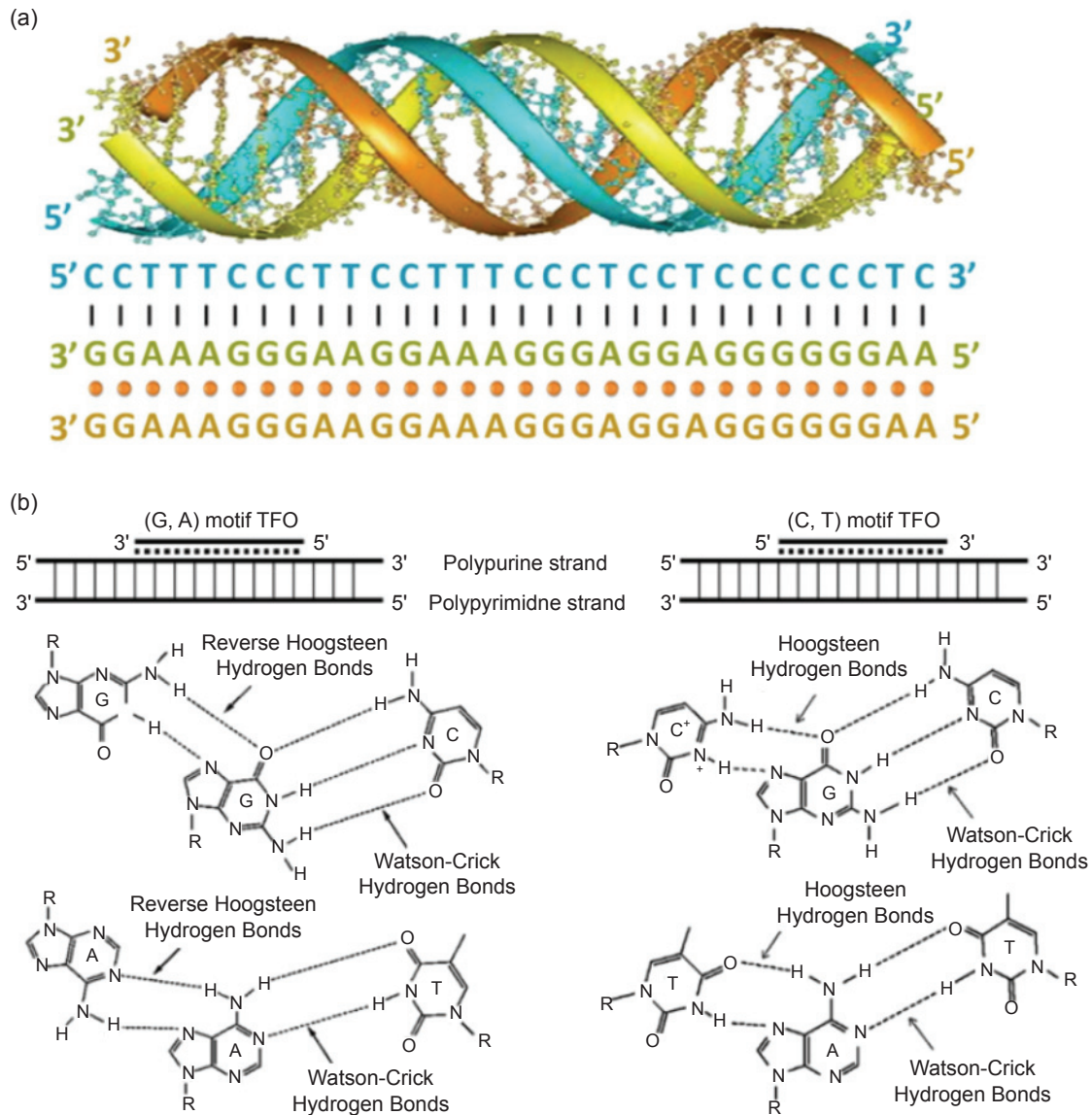


圖 2. TFO 形成三股結構之示意圖。(a) 藍色與綠色含氮鹼基是由華森—克立克鹼基配對 (黑色直線) 形成雙股 DNA。橘色含氮鹼基是由虎格斯汀鹼基配對或逆轉虎格斯汀鹼基配對 (紅色圓點) 於雙股 DNA 之主凹槽 (major groove) 部位形成三股結構。(b) TFO 以 G、A 含氮鹼基組成之型態 ((G, A) motif) 與 C、T 含氮鹼基組成之型態 ((C, T) motif) 與含有多嘌呤排列之雙股 DNA 鏈 (polypurine strand) 鍵結。其鍵結方向與雙股 DNA 鏈同方向即是虎格斯汀鹼基配對，而與雙股 DNA 鏈反方向則為逆轉虎格斯汀鹼基配對<sup>(17)</sup>。

同於限制酶酵素，TFO 可以辨識多達數十個鹼基對。雖然 TFO 應用於人類的基因沉默已有許多嘗試，例如抑制 Myc<sup>(20)</sup> 等致癌基因的表現，但基於 TFO 是一段單股寡核苷酸鏈，在活體應用上仍有許多限制，包含細胞投遞效率、穩定性、辨識與結合特定的基因專一性等<sup>(21)</sup>。有鑑於以上瓶頸，我們使用金奈米粒子作為載體攜帶 TFO 以克服上述困難。

金是具有高生物相容性的材料，金奈米粒子是一種優良的非生物性載體<sup>(22)</sup>。經由檸檬酸鈉還原反應可形成穩定的金奈米粒子，並具有高比表面積特性，利用硫金鍵可將生物分子鍵結於其表面<sup>(23)</sup>。美國西北大學 Mirkin 教授的研究小組於一九九五年，首先提出金奈米粒子與單股寡核苷酸鏈結合的策略，並證實結合上金奈米粒子的單股寡核苷酸鏈可以抵抗酵素或化學物質降解，並有效增加細胞投遞之效能<sup>(24)</sup>。金奈米粒子也具備特殊的光學活性，13 nm 金奈米粒子表面電漿帶 (surface plasmon band, SPB) 的吸收波峰位於 520 nm，而當粒子表面修飾不同長度 DNA 或蛋白質後，其表面電漿帶的吸收波峰會有偏移的現象<sup>(25)</sup>。因此，可藉此辨別生物分子的修飾。運用金奈米粒子之高比表面積特性，我們將金奈米粒子修飾多個具序列辨識功能之 TFO，使單一金奈米粒子能同步攜帶高達一百多段特定序列的單股 TFO，以增加 TFO 批次進入細胞的效率，並提高 TFO 在細胞中的穩定性。

文獻顯示要達到永久性基因沉默作用，TFO 需外接 DNA 切割試劑，使其鍵結於目標序列後，可藉由 DNA 切割試劑切斷此基因，達到更有效的基因抑制<sup>(26)</sup>。因此，我們在 TFO 的 3' 端修飾上可以被光激發的 DNA 切割試劑—脒 (hydrazone)<sup>(27)</sup>。此切割試劑已證實可以被 302 波長的紫外光激發，使結構內的 N-N 鍵轉為兩個帶有多餘電子的游離態胺基 (aminyl 與 iminyl 自由基) 並斷鍵，以剪切雙股 DNA<sup>(27)</sup>。在活體細胞中，被切割的基因可能會增加基因本身的不穩定性及突變的機率。即使細胞本身有修復的機制去移除受損的 DNA 片段，倘若細胞受到的損害太嚴重，細胞則會走向凋亡 (apoptosis) 路徑而死亡<sup>(28)</sup>。因此，選擇性地攻擊目

標基因且不傷害其他基因的表現與功能，是分子醫學發展的重要目標之一。為了達到這個目標，本實驗室嘗試發展人造標靶光激發奈米剪 (ATLANS) 技術，此技術利用金奈米粒子作為載體攜帶 TFO 之切割試劑以形成穩定之 ATLANS 複合物。此複合物可透過 TFO 選擇性的辨識更長之目標基因序列，並以光動能化學進行精確的雙股 DNA 切割，以達到光學控制基因切割的效果<sup>(29)</sup>。

## 二、結果

首先，我們以基因工程技術，將表現綠色螢光蛋白的質體 DNA 插入一段可被 TFO 專一辨識的序列，並用此一重組質體進行一系列之細胞外與細胞內實驗。我們將此 TFO 序列與金奈米粒子及 DNA 切割試劑依序組裝成 ATLANS 複合物。圖 3 為 ATLANS 複合物組裝之示意圖。經由檸檬酸鈉還原合成之金奈米粒子，藉由金硫醇鍵與 5' 端修飾硫醇基及 3' 端修飾胺基之 TFO 進行鍵結，如圖 3(a) 所示。在 10 mM 的磷酸緩衝溶液下，使用 0.1–0.3  $\mu$ M NaCl 的鹽梯度去增加 TFO 鍵結至金奈米粒子表面的效率，之後加入光激發 DNA 切割試劑 (圖 3(b)) 形成 ATLANS 複合物，如圖 3(c) 所示。此光激發 DNA 切割試劑藉由 BMPS 的官能基當連接橋樑接合 DNA 切割試劑 (hydrazone) 與 TFO。ATLANS 複合物由內至外之組成為：金奈米粒子、TFO、DNA 切割試劑。此單一複合物可以攜帶大於一百段的 TFO 辨識序列，而當 TFO 辨識到目標基因的序列後，則可以透過可見光局部激發 DNA 切割試劑，使 DNA 切割試劑結構內的 N-N 鍵斷裂而產生游離自由基，並對目標 DNA 序列進行雙股 DNA 切割作用，如圖 3(d) 及圖 3(e) 所示。

我們使用放射線標示之電泳運動位移測試 (EMSA) 評估試管內 TFO 與接上金奈米粒子的 TFO 對目標雙股 DNA 結合之專一性。此 TFO 以 [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] 同位素標定，在電泳後之膠體中，可以用同位素訊號位置來辨別分子量之差異。圖 4(a) 顯示未接上金奈米粒子之同位素 TFO (free TFO)，可專一性地辨識目標雙股 DNA 並形成三股結構，進而造成整體複合物的分子量上升，在電場之泳動速

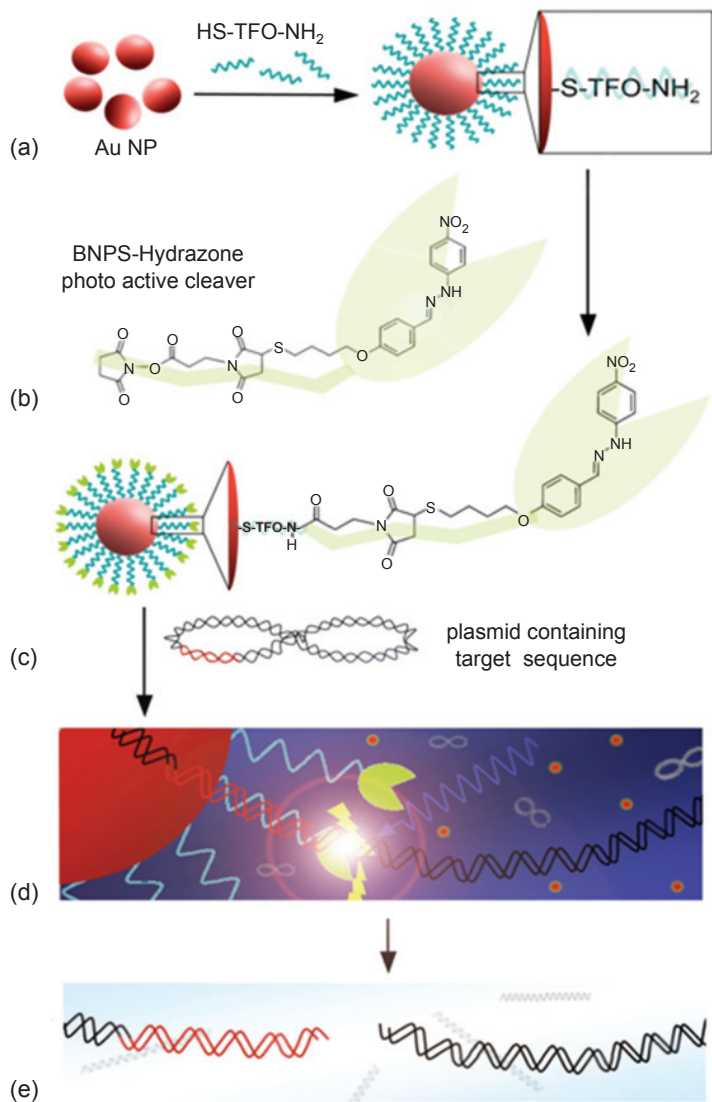


圖 3. 人造標靶光激發之奈米剪作用示意圖。(a/b) 五端硫醇及三端胺基修飾之TFO 在金奈米粒子表面是由金屬硫醇鍵形成單層 TFO 並外露胺基。(b/c)光激發之 DNA 切割試劑加入形成最終產物：金奈米粒子-TFO-光激發之 DNA 切割試劑 (ATLANS) 複合物。(c/d) 當含有 TFO 辨識序列的質體與 ATLANS 複合物混合後，奈米粒子表面上的 TFO 能認識該序列並捕捉質體。在 460 nm 可見光波長光源照射下，TFO 三端的光激發之 DNA 切割試劑可於局部被活化並攻擊 TFO 結合之目標基因序列下游的第 12 個鹼基對，產生雙股 DNA 切割的作用。(e) DNA 雙股螺旋被切割後，質體 DNA 由超螺旋結構的一型轉換為線性 DNA 的三型<sup>(29)</sup>。

度減緩。因此，隨著同位素 TFO 量的增加，形成三股結構的量 (超位移表現量) 也增加，並呈現與加入劑量相依性的關係 (dose-dependent manner)。且於  $1.0 \times 10^{-6}$  M 的濃度達到最多三股結構形成 (飽和狀態)。為了確認此結合是屬於專一性的辨識，我們給予相同核苷酸組成但排序不同之同位素 TFO (SC)，SC 組看不到任何三股結構形成之訊號。圖 4(b) 之第 16 行的結果顯示，接上金奈米粒子的同位素 TFO 也可以與目標雙股 DNA 形成專一性辨識，於  $1.0 \times 10^{-6}$  M 的濃度達到最多的三股結構形成。此結果顯示金奈米粒子的鍵結過程並不影響 TFO 辨識目標序列與形成三股結構之能力。為了更進一步確認此結合也是屬於專一性的辨識，我們使用無同位素之 TFO 來進行競爭性分析 (competition assay)。當給予大量未經同位素標定且與 TFO 是同序列之 cold probe，令其競爭原本同位素標定之 TFO，則可顯著降低同位素標示之三股結構。根據 SC 與 cold probe 的結果，證實我們設計的 TFO 是具有序列專一性之辨識能力。

我們進一步將接上金奈米粒子的 TFO 與 DNA 切割試劑鍵結形成 ATLANS 複合物，並進行試管內光調控切割測試，如圖 5 所示。為了進行 ATLANS 複合物的光調控切割測試，我們組裝了一台基因橡皮擦 (GeneEraser) 光學輔助系統，如圖 6 所示。此一系統是由十二顆功率為 3.0 W、波長為 460 nm 的高亮度藍光發光二極體 (H77FB1C0) 作為系統光源，並有恆溫與自動化曝光劑量控制。首先，我們測試 DNA 切割試劑本身對質體 DNA 是否有光控切割作用。我們將含有或不含有人造標靶序列的辨識區段之質體 DNA (pGEM-T Easy plasmid) 與未連結 TFO 之 DNA 切割試劑以 1:100 莫爾數比的量均勻混合，於 GeneEraser 內照射 15、30、60 與 120 分鐘後，可發現 DNA 切割試劑只有在藍光激發下會對質體 DNA 產生切割作用，而使攜帶人造標靶序列辨識區段的 pGEM-T Easy 質體 DNA 由第一型之超螺旋結構轉化為開放性環狀之第二型結構。

DNA 切割試劑於  $250 \mu\text{M}$  下達到最大切割效果，如圖 5(a) 所示。此結果顯示未接上 TFO 的 DNA 切割試劑，對 DNA 產生的光調控切割作用為

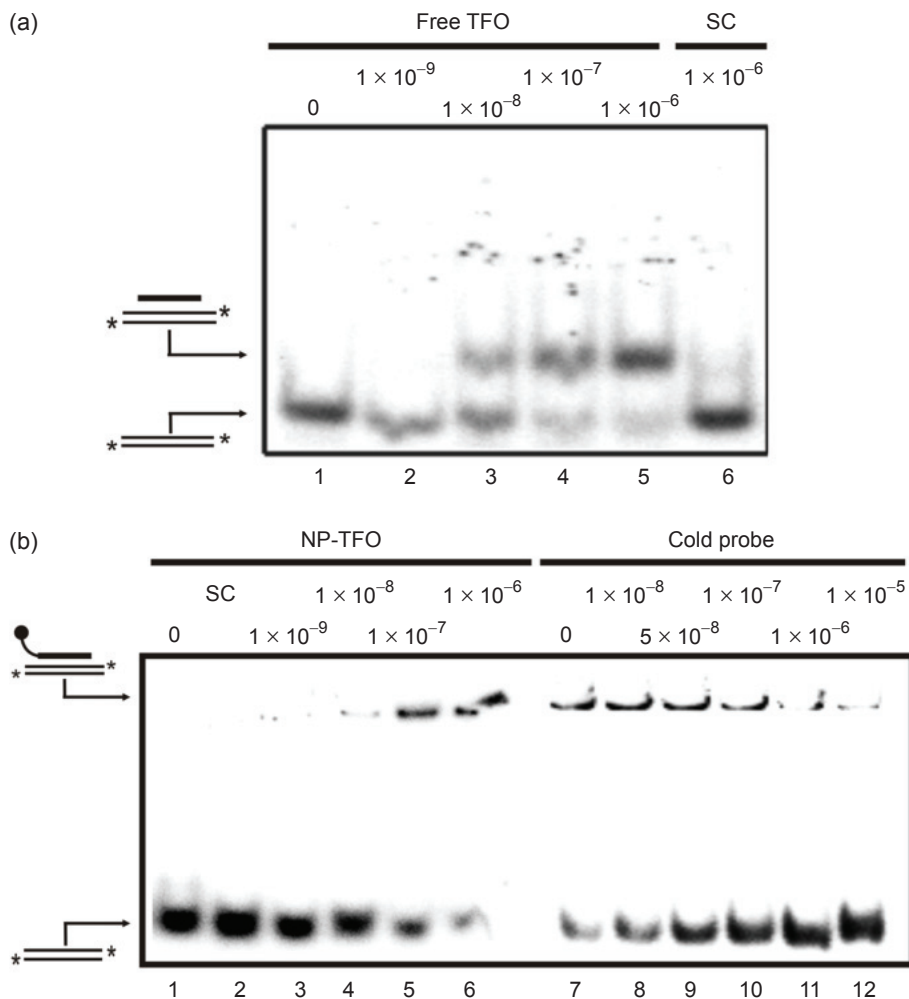


圖 4. 電泳運動位移測試 (EMSA) 結果顯示第三股形成寡核酸及與金奈米粒子結合之三股形成寡核酸皆能與標靶基因序列產生特異性結合。(a) 由與對照組 (第 1 行) 及相同核苷酸組成但排序不同之同位素 TFO (SC) (第 6 行) 相較下, 具有序列特異性之 TFO 形成之三股結構呈現加入劑量相依性的關係 (第 2-5 行), 可佐證其專一性結合。(b) 當接上金奈米粒子的 TFO 作為探針時 (第 1-6 行), 目標基因的序列會與之結合並產生劑量相依性之超位移表現。而加入未經同位素標定且與 TFO 是同序列之 cold probe 到反應中, 則是呈現劑量相依性的超位移區塊訊號衰減, 證實 TFO 序列具有辨識結合的專一性 (第 7-12 行)<sup>(29)</sup>。

非專一性的單股切割, 進而產生環狀之第二型結構, 其量化結果顯示其切割效率有 80%。然而, 若將此 DNA 切割試劑與接了金奈米粒子的 TFO 鍵結形成 ATLANS 複合物後, 光激發下會對含有 TFO 辨識序列的質體 (addressed plasmid) DNA 產生專一性之雙股 DNA 切割作用, 其切割效率高達 97%。此時的 addressed 質體 DNA 由第一型之超螺旋結構轉化為線性之第三型結構, 如圖 5(b) 所示。結果顯示 ATLANS 複合物上的 DNA 切割試劑經過光照後, 可分解成 aminyl 與 iminyl 自由基, 並於形成三股結構的 DNA 序列上進行兩股的切割, 而產生線性之第三型結構。相對地, ATLANS 複合物在沒有 TFO 辨識序列的質體 (unaddressed plasmid) DNA 序列並不會產生線性之第三型結構。

接下來我們驗證 ATLANS 複合物能作用在 TFO 辨識序列上產生專一性切割。圖 7 是 ATLANS 複合物在試管內經由 GeneEraser 儀器反應 (光照後) 切割後之片段, 並經由 DNA 定序所得之結果。結果顯示 ATLANS 複合物的切割位點是在 TFO 辨識序列下游第 12 對鹼基 (374) 處。接著, 我們進一步評估 ATLANS 複合物在細胞內對基因調節的能力。我們將圖 5 帶有 TFO 辨識序列之質體 DNA 轉染至 HeLa 癌細胞 (HeLa cells) 中, 此綠色螢光蛋白-N1 質體是由 CMV 啟動子、TFO 辨識序列及綠色螢光蛋白序列重組而成, 轉染後的 HeLa cells 會持續且穩定的表現強化綠螢光蛋白 (EGFP), 我們稱之 EGFP 模型細胞 2-B2。利用基因組之聚合酶鏈鎖反應 (genomic PCR) 分析 ATLANS 複合物是否具有光調控切割功能, 我們發現圖 8(a)

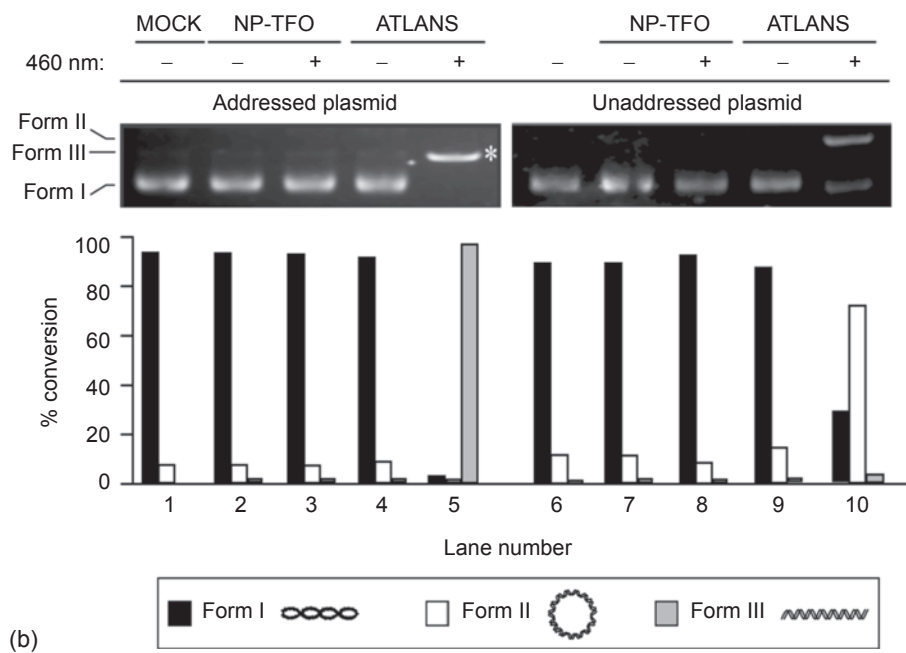
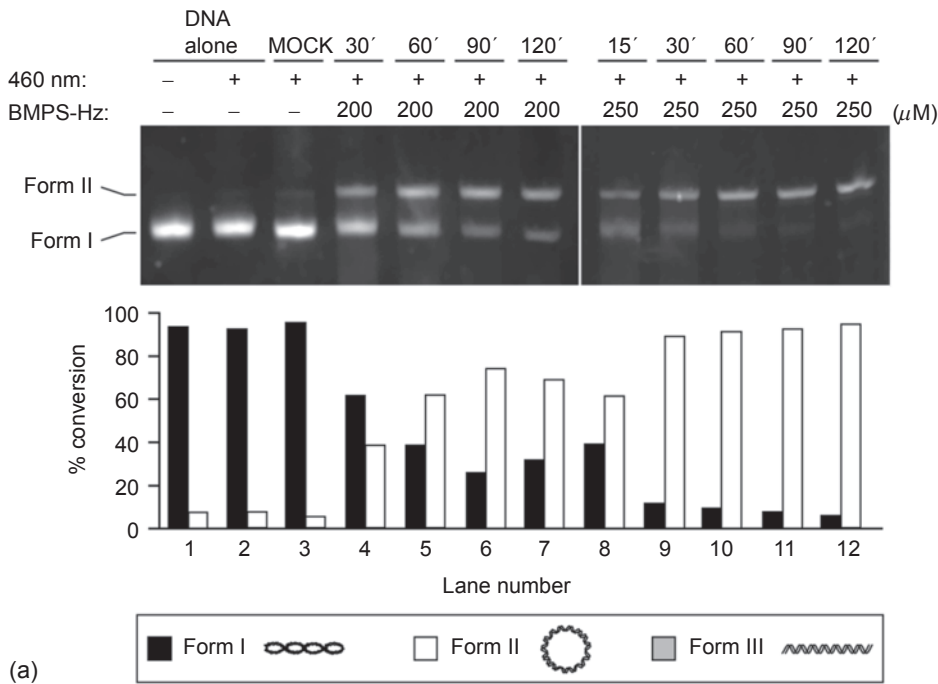


圖 5. 可見光可誘導修飾上 DNA 切割試劑修飾的 ATLANS 複合物進行 DNA 切割反應。(a) DNA 切割試劑 (BMPS-Hz) 與 pGEM-T Easy 質體 DNA 混合後，再以 GeneEraser 儀器 (460 nm, 0.27 W/cm<sup>2</sup>) 照射不等時間 (15、30、60、90 及 120 分鐘)。DNA 切割試劑呈現時間相依性之質體 DNA 結構轉換效率。其結構因單股核酸切割而由第一型之超螺旋結構轉化為開放性環狀之第二型結構，反應在三十分中左右達到飽和 (第 6 行)。(b) 有、無標靶序列之超螺旋 pGEM-T Easy 質體 DNA 模板與 ATLANS 複合物混合後並使用 GeneEraser 儀器照射 30 分鐘 (482.4 焦耳)，反應後的終產物於 1% 之藻膠內進行電泳分離。其結構因單股核酸切割而由第一型之超螺旋結構轉化為線性之第三型結構 (第 5 行:\*)。所有其他實驗條件僅得到極低的第二、三型 DNA 轉換效能 (29)。

的引子 E 可以放大出 EGFP 的 PCR 產物 (345 鹼基對)，而引子 T 則能放大出含有 TFO 辨識序列與 EGFP 的 PCR 產物 (623 鹼基對)。圖 8(b) 的結果顯示 ATLANS 複合物在細胞內只有在經過光照反應後，才會使 PCR 無法放大出引子 T 的產物。

由於引子 T 位於 ATLANS 複合物切割位置上

游，基因序列被 ATLANS 切割後導致 PCR 反應無法放大原有片斷，因此無法得到全長 (623 鹼基對) 之終產物。此外，ATLANS 複合物造成光照後標靶基因的受損，需要時間修復，因此在恢復上較不照光組長許多。而引子 E 位在 EGFP 基因 219-541 鹼基對的位置則作為實驗之控制組。進一步使

用流式細胞儀確認含有 ATLANS 複合物的細胞，在經過光照反應後的第 17 與 24 小時之 EGFP 蛋白質表現量呈現顯著下降的趨勢，數值量化後顯示 17 小時 EGFP 蛋白量被抑制高達 80%，而 24 小時 EGFP 蛋白量被抑制則回復到約 40%，如圖 8(c) 所示。以上的結果證實，ATLANS 複合物在細胞是可以作用在目標基因的 DNA 層次，進而影響到下游 mRNA 與蛋白質的表現。

### 三、結論

由於人造標靶光激發奈米剪 (ATLANS) 技術是利用 TFO 對基因序列專一性辨識之功能而加以改良的序列特异性光化學 DNA 切割材料。優於以往使用限制酶進行 DNA 切割之優勢在於：(1) 可標定不同基因序列於一個 ATLANS 複合物中，進行專一性的多基因同步切割；(2) 辨識大於傳統限制酶之鹼基對的基因序列，且較不易受序列對稱性之限制；(3) ATLANS 複合物在 TEM 的大小約為 26.33 nm，其具備小體積、易於組織穿透的優勢，容易進入細胞及細胞核並操控特定基因的表現；(4) 具有應用在基因沉默之基因工程治療的潛力；(5) 具有結合影像醫學追蹤及光調控切割的機制。因此，本技術未來可以針對影響癌細胞生長與抗藥性的基



圖 6. 基因橡皮擦之光學輔助系統。圖中紅色數字代表曝照於 460 nm 藍色可見光之時間(分鐘)，由面板可觀察到此系統確實可發出藍色可見光。

因，進行個別 TFO 之設計，以組裝成對抗癌細胞的人造標靶光激發奈米剪，抑制癌細胞之抗藥基因，進而達到更佳的癌症治療目標。此一人造標靶光激發之奈米剪技術結合了奈米材料與基因操控的特性，提供臨床基因沉默工程一個新的治療平台。

### 誌謝

感謝國科會 (NSC-98-3114-M-006-002、DOH99-TD-B-111-002、DOH99-TD-C-111-003) 對於此研究所提供的財務支援。

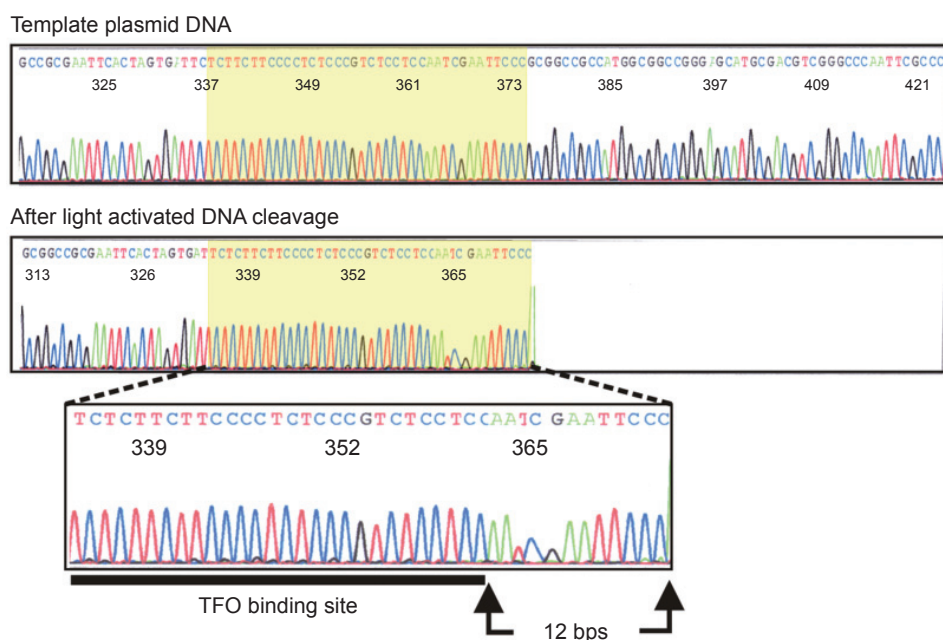


圖 7. 圖示是針對 ATLANS 複合物切割後的質體 DNA 進行 DNA 定序之結果 (僅顯示第三股形成寡核鹼結合區域附近序列 337-364 之序列)。由圖中可發現質體 DNA 在三端第 12 個鹼基對 (374) 的位置被切割<sup>(29)</sup>。

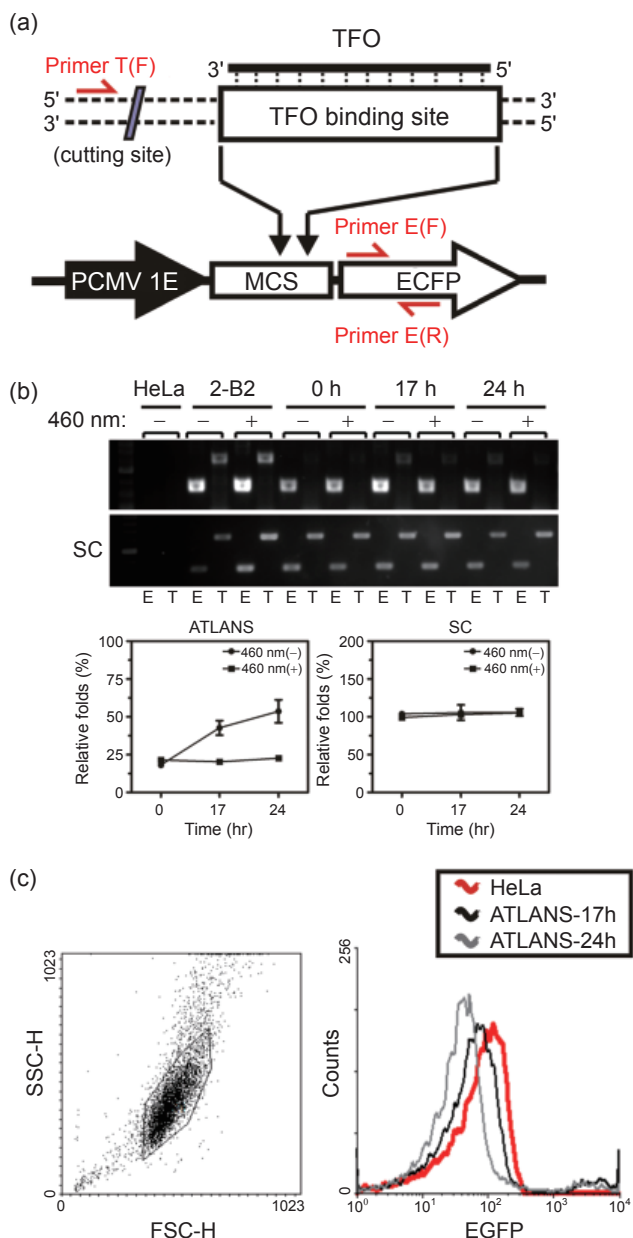


圖 8. ATLANS 複合物能有效地在 DNA 層次抑制強化綠螢光蛋白 (EGFP) 基因的表現。(a) 圖示是表示綠色螢光蛋白基因前端含有 TFO 辨識結合序列之綠色螢光蛋白-N1 質體之設計。作為 genomic PCR 反應之引子位置以紅色箭號表示 (引子 E 與 T)。ATLANS 複合物處理過之 EGFP model cells (2-B2)，接受 GeneEraser 儀器照射 15 分鐘後並培養不等時間 (0、17 及 24 小時)。綠色螢光蛋白基因在 DNA 及蛋白質層次的表現程度使用以下方法評估：(b) Genomic PCR 反應、(c) 流式細胞儀<sup>(29)</sup>。

## 參考文獻

1. M. B. Gerstein, C. Bruce, J. S. Rozowsky, D. Zheng, J. Du, J. O. Korbel, O. Emanuelsson, Z. D. Zhang, S. Weissman, and M. Snyder, *Genome research*, **17** (6), 669 (2007).
2. N. Rosenthal, *The New England Journal of Medicine*, **331** (1), 39 (1994).
3. D. Noble, *Philosophical Transactions. Series A, Mathematical, Physical, and Engineering Sciences*, **366** (1878), 3001 (2008).
4. D. A. Jackson, R. H. Symons, and P. Berg, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **69** (10), 2904 (1972).
5. R. J. Roberts, *CRC Critical Reviews in Biochemistry*, **4** (2), 123 (1976).
6. L. E. Mertz and R. W. Davis, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **69** (11), 3370 (1972).
7. A. Eyre-Walker and P. D. Keightley, *Nature Reviews: Genetics*, **8** (8), 610 (2007).
8. D. Stehelin, *Science*, **267** (5203), 1408 (1995).
9. C. M. Croce, *The New England Journal of Medicine*, **358** (5), 502 (2008).
10. P. Friedl and K. Wolf, *Nature Reviews: Cancer*, **3** (5), 362 (2003).
11. R. Kole, A. R. Krainer, and S. Altman, *Nature Reviews: Drug Discovery*, **11** (2), 125 (2012).
12. E. R. Rayburn and R. Zhang, *Drug Discovery Today*, **13** (11-12), 513 (2008).
13. M. Meselson and R. Yuan, *Nature*, **217** (5134), 1110 (1968).
14. J. D. Watson and F. H. Crick, *Nature*, **171** (4356), 737 (1953).
15. G. Felsenfeld, D. R. Davies, and A. Rich, *Journal of the American Chemical Society*, **79** (8), 2023 (1957).
16. K. Hooqsteen, *Acta Crystallographica*, **12** (10), 822 (1959).
17. N. Yang, S. Singh, and R. I. Mahato, *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society*, **155** (2), 326 (2011).
18. A. R. Morgan and R. D. Wells, *Journal of Molecular Biology*, **37** (1), 63 (1968).
19. P. P. Chan and P. M. Glazer, *Journal of Molecular Medicine*, **75** (4), 267 (1997).
20. B. P. Belotserkovskii, E. De Silva, S. Tornaletti, G. Wang, K. M. Vasquez, and P. C. Hanawalt, *Journal of Biological Chemistry*, **282** (44), 32433 (2007).
21. M. Duca, P. Vekhoff, K. Oussedik, L. Halby, and P. B. Arimondo, *Nucleic Acids Research*, **36** (16), 5123 (2008).
22. G. F. Paciotti, D. G. I. Kingston, and L. Tamarkin, *Drug Development Research*, **67** (1), 47 (2006).
23. G. Han, P. Ghosh, M. De, and V. M. Rotello, *NanoBioTechnology*, **3** (1), 40 (2007).
24. N. L. Rosi, D. A. Giljohann, C. S. Thaxton, A. K. Lytton-Jean, M. S. Han, and C. A. Mirkin, *Science*, **312** (5776), 1027 (2006).
25. P. Mulvaney, M. Giersig, and A. Henglein, *The Journal of Physical Chemistry*, **96** (25), 10419 (1992).

26. H. E. Moser and P. B. Dervan, *Science*, **238** (4827), 645 (1987).  
27. J. R. Hwu, S. C. Tsay, B. L. Chen, H. V. Patel, and C. T. Chou, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **12**, 1427 (1994).  
28. D. Trine, J. Maria, and N. Roni, *Journal of Biomedical Science*, **18** (1), 10 (2011).  
29. T. L. Tsai, D. B. Shieh, C. S. Yeh, Y. Tzeng, K. Htet, K. S. Chuang, J. R. Hwu, and W. C. Su, *Biomaterials*, **31** (25), 6545 (2010).
- 



李映瑩小姐為國立成功大學基礎醫學研究所博士班學生。

Ying-Ying Li is currently a Ph.D. student in the Institute of Basic Medical Sciences at National Cheng Kung

University.



蔡宗霖先生為國立成功大學基礎醫學博士，現任國立成功大學附屬醫院腫瘤中心藥物核心實驗室博士後研究員。

Sloan Tsung-Lin Tsai received his Ph.D. in basic medical sciences from National Cheng Kung University. He is currently a postdoctoral fellow at the Drug Development Core Lab of Cancer Center, National Cheng Kung University Hospital.



謝達斌先生為美國哈佛大學牙醫學院口腔病理博士，現任國立成功大學口腔醫學研究所教授兼所長。

Dar-Bin Shieh received his Ph.D. in dental medicine from Harvard University, USA. He is currently a professor in the Institute of Oral Medicine and Department of Stomatology at National Cheng Kung University.