

行政院原子能委員會核能研究所

委託研究計畫期末研究報告

功能性奈米材料於細胞酵素活性偵測技術之開發研究

Synthesis of functional nanomaterials for the detection of
cellular enzyme activity

計畫編號：1002001INER082

受委託機關(構)：國立臺灣大學化學系暨研究所

計畫主持人：張煥宗 教授

聯絡電話：02-33665393

E-mail address：changht@ntu.edu.tw

核研所聯絡人員：陳威希 博士、趙建華 博士

報告日期：100 年 12 月 13 日

目 錄.....	I
作者及所屬單位.....	II
中文摘要.....	1
Abstract.....	2
壹、計畫緣起與目的.....	3
一、計畫緣起.....	3
二、計畫目的.....	6
貳、研究方法與過程.....	7
一、藥品.....	7
二、儀器.....	7
三、合成 13 nm 金奈米粒子(Au NPs)	8
四、TBA-Au NPs 製備.....	8
五、凝血酶凝固時間偵測.....	9
參、結果與結論.....	10
一、長度對 TBA-Tn-Au NPs 的影響.....	10
二、TBA-h _m T ₁₅ -Au NPs 髮夾區的互補數.....	13
三、TBA ₁₅ /TBA ₂₉ -h ₈ T ₁₅ -Au NPs 多價性質作用	16
四、與常用的抗凝血藥比較.....	20
五、利用光照射回復凝血酶活性	21
六、結論與建議.....	23
肆、參考文獻.....	24
附件	

作者及所屬單位

- 張煥宗 教授 (國立臺灣大學 化學系暨研究所)
黃志清 教授 (國立臺灣海洋大學 生物科技研究所)
李季霖 博士生 (國立臺灣大學 化學研究所)
林子恩 碩士生 (國立臺灣大學 化學研究所)
許家綸 碩士生 (國立臺灣海洋大學 生物科技研究所)

中文摘要

我們證實調控金奈米粒子(gold nanoparticles, Au NPs)表面上胸腺嘧啶適合體的長度(thymine-linker number, T_n ; $n = 0-60$) 和凝血酶適合體(thrombin binding aptamers, TBA)髮夾區互補數目(hairpin number, h_m ; $m = 0-16$), 能有效地調控凝血酶之活性。TBA- T_n -Au NPs 和 TBA- h_m -Au NPs 抑制效果的順序分別為: TBA- T_{30} -Au NPs > TBA- T_{45} -Au NPs \approx TBA- T_{60} -Au NPs > TBA- T_{15} -Au NPs > TBA- T_0 -Au NPs 和 TBA- h_8 -Au NPs > TBA- h_{16} -Au NPs > TBA- h_4 -Au NPs > TBA- h_0 -Au NPs。我們發現多價性質的 TBA₁₅/TBA₂₉- h_8 T₁₅-Au NPs 於血漿中有良好抑制凝血酶的活性; 此抑制劑與和凝血酶有很高的結合力($K_d = 8.86 \times 10^{-12}$ M), 與單價的 TBA₂₉ 相比為其 100 倍高, 是 TBA₁₅ 的 10,000 倍, 而與融合適合體(fusion aptamers)、樹突狀適合體(dendritic aptamers)相比至少有 10 倍之高。此外, TBA₁₅/TBA₂₉- h_8 T₁₅-Au NPs 與未加入抑制劑(對照組)於凝血酶凝固時間(Thrombin Clotting Time, TCT)測試得知, 其延長時間約為 296 倍。我們相信此技術能利用其他抗凝之 DNA 或 RNA 適合體修飾於奈米材料上, 同時亦能與不同凝血蛋白作用, 例如: 第九凝血因子(factor IX)、活化蛋白 C (activated protein C) 或第七凝血因子 (factor VIIa) 等。

關鍵字: 金奈米粒子、凝血酶、胸腺嘧啶、適合體。

Abstract

In this study, we have demonstrated that thymine linker length number (T_n , $n = 0-60$) and hairpin pair number ($h_m = 0-16$) in the terminal of thrombin binding aptamers (TBA) have strong impacts on the flexibility and stability of gold nanoparticles (Au NPs) and thus the binding strength and inhibitory potency toward thrombin. The decreased order of inhibitory potencies of the functional Au NPs is TBA- T_{30} -Au NPs > TBA- T_{45} -Au NPs \approx TBA- T_{60} -Au NPs > TBA- T_{15} -Au NPs > TBA- T_0 -Au NPs and TBA- h_8 -Au NPs > TBA- h_{16} -Au NPs > TBA- h_4 -Au NPs > TBA- h_0 -Au NPs. The multivalent TBA₁₅/TBA₂₉- h_8T_{15} -Au NPs provided ultrahigh thrombin enzymatic inhibition in plasma samples. The TBA₁₅/TBA₂₉- h_8T_{15} -Au NPs exhibit a high binding affinity ($K_d = 8.86 \times 10^{-12}$ M) toward thrombin—over 100 times higher than that of monovalent TBA₂₉, 10,000 times higher than that of TBA₁₅, and at least 10 times higher than those of fusion aptamers, dendritic aptamers, and TBA₂₉-Au NPs. They exhibit TCT 296 times longer than that without containing an inhibitor. We believe that our described techniques can be applied to modify NPs with other anticoagulant DNA or RNA aptamers toward different proteins such as factor IX, activated protein C, and factor VIIa.

Keywords : gold nanoparticles (Au NPs) 、 thrombin 、 thymine 、 aptamers

壹、計畫緣起與目的

一、計畫緣起

奈米材料隨尺寸降低，其表面積與體積比(surface to volume ratio)相對增加，表面原子數的比例也會大增，因此具備許多特殊光譜、磁性和電化學特性，適用於生醫領域材料的開發¹。奈米材料應用於蛋白質和 DNA 等生物分子的研究工作擁有許多優點²，如金屬奈米粒子(metallic NPs)的表面電漿共振(surface plasmon resonance, SPR)吸收可藉由粒子的大小、形狀和表面修飾等方式來調控³，如此可提供多重偵測的優點，進而開發出微陣列(microarrays)式的分析工作。另外 NPs 比一般染料提供更高感度的訊號偵測，如金奈米粒子(Au nanoparticles; Au NPs)之 SPR 吸收係數為 $10^8-10^{10} \text{ M}^{-1}\text{cm}$ 是一般傳統染料一百倍以上，這種光學特性所開發出的奈米感測器，提供了高靈敏的生物分子偵測與分析⁴。由於 Au NPs 的性質穩定、不具細胞毒性，如欲在其上進行功能性修飾，可輕易地利用金-硫鍵結的特性，即可在 Au NPs 上修飾功能性分子，如：抗體、適合體(aptamer)等，所以相當適合應用於生物分子檢測、藥物傳遞、功能性奈米粒子等生醫領域方面的研究。另外，Au NPs 具有如粒子大小調控性、粒子表面多樣性和複合式功能性奈米材料等其它優點⁵，故經由調控生物大分子和奈米粒子的結合比例，可控制奈米感測器偵測選擇性和靈敏度，如單股 DNA 修飾的 Au NPs，粒子大小會影響互補 DNA 偵測的選擇性與靈敏度，相同地調控粒子表面單股 DNA 的密度也會影響對 DNA 偵測靈敏度與辨識度⁶。

適合體是對特定分子有專一性結合力的寡核苷酸(oligonucleotide)，無論是有機小分子或蛋白質到病毒與細胞等，皆

可利用 SELEX (systematic evolution of ligands by exponential enrichment)技術篩選出與目標分子有高親和力及高特異性的寡核苷酸片段⁷。和傳統利用抗體(antibody)相比較，兩者都有好的作用力及專一性，但抗體的活性會受環境中溫度和 pH 值影響，當反應在高溫或極酸條件下進行時，抗體會變性(denature)造成結構瓦解，與抗原(antigen)作用力也隨之減弱。寡核苷酸片段可在高溫或 pH 變化較大的環境存在，對高濃度鹽類的容忍度也較蛋白質高。而核酸適合體最大的發展潛力是可在奈米粒子表面修飾多條適合體 (aptamer-conjugated nanoparticles, Apt-NPs)來加強適合體對目標分子的親和力。

蛋白酵素活性偵測一直以來在生物醫學上扮演著重要的角色，快速且簡易的酵素活性偵測是臨床醫學開發的趨勢，目前最簡易的酵素活性偵測是利用探針(probe)分子光學性質的改變，如吸收、螢光和散色光等的改變來達偵測目的。酵素活性的調控一直以來也是重要的研究主題，精準地控制酵素活性讓酵素成為良好的工具，在工業、分子生物技術或生醫檢測上有很大的潛力⁸⁻¹⁰。酵素活性的調控可以藉由小分子、多胜肽或適合體的作用來達成^{11,12}，其中適合體因為容易合成、專一性高、性質穩定加上 DNA 本身特有互補特性，使 DNA 適合體成為酵素抑制技術開發的良好平台，目前已有許多酵素如 lysozyme, thrombin, HIV-RNase, secretory phospholipase A2, neutrophil elastase, 與 HCV NS3 protease 等的分子適合體已被篩選出，雖然 Apt-NPs 已證明可用於這些酵素偵測，但應用於複雜生物樣品或細胞內偵測和酵素活性控制並不多。

在生物體的機制中，當皮膚表面受傷或血管壁因高壓而受損都會

啟動體內的凝血機制，而凝血機制便是由一連串酵素活化的連鎖反應所啟動的梯瀑效應(casade)構成，因而得以快速修補受損的血管。在整個凝血過程中，最重要步驟是凝血酶與纖維蛋白原的作用，藉由活化纖維蛋白原產生網狀結構的纖維蛋白，並固定血小板，形成血栓(thrombi)覆蓋在傷口，使血液不再流出血管，能維持血液順暢的在血管中流動。凝血酶是維持正常生理狀態不可或缺的重要因子，但是當凝固後，身體中分解血塊的溶血機制沒有及時清除這些血栓，反而使得血栓阻塞血管，阻止血液於體內的流動，而導致細胞或組織壞死，甚至造成動脈栓塞或腦血栓等致命的疾病。此外，在多項研究指出凝血酶與組織修復、發炎反應、血管新生或是腫瘤生成有關，它不僅只在凝血機制中扮演重要角色，對於人體影響的層面也相當廣闊，因此能夠調控凝血酶活性或是提高適合體與其結合能力是相當重要的。

近年來，本實驗室已陸續開發出許多在水溶液中製備不同組成及形狀的奈米材料的方法，由於合成是在水溶液及室溫中進行，不需使用有機溶劑及外加的能量，故極具綠色化學的需求。我們已成功應用金奈米粒子結合適合體應用於 DNA、腫瘤蛋白以及重金屬離子之偵測。本計畫期望能將這些技術結合，以適合體修飾的金奈米粒子為基礎，期望能有效調控凝血酶(thrombin)的活性。

二、計畫目的

蛋白酵素活性偵測與調控是藥物開發的重要方向之一，快速且高靈敏的酵素偵測與可逆的酵素調控便相當重要，很多藥物設計是結合酵素的活性區域來調控酵素活性，但此調控方式，往往是不可逆的，且要找到於酵素的活性區域結合的抗體有時並不容易。另外，結合力(binding affinity)不足或太強的抗體，會造成活性調控不易。多價結合(multivalent binding)調控與調控結合方式來控制蛋白酵素活性是目前努力方向之一。因為奈米粒子表面可同時修飾多種辨識適合體分子及穩定分子，故可提供多價結合與調控結合等優點。

凝血酶(thrombin)是凝血系統中最重要蛋白質，主要功能是催化纖維蛋白原形成纖維蛋白，引發凝血作用¹³，同時也是肺癌轉移的重要指標¹⁴。目前最常見能與 thrombin 作用的 DNA 適合體有兩種，分別是 15 個鹼基組成的 TBA₁₅ 與 29 個鹼基的 TBA₂₉。TBA₁₅ 與 thrombin 的結合位置為 exosite I，exosite I 同時也是凝血酶辨識其受質的位置，TBA₂₉ 與 thrombin 雖然擁有較強之結合能力($K_d \sim 0.7$ nM)，但 TBA₂₉ 與 thrombin 結合位置為 exosite II，TBA₂₉ 結合上 exosite II 後無法直接影響 thrombin 活性。因凝血酶具有多個分子適合體結合於蛋白質上不同束縛位置(exosite)，故利用奈米粒子表面自排列/組裝(self-assembled arranged monolayer; SAAM)的技術將可應用於其酵素偵測與活性控制¹⁵。在本研究中，我們試圖利用不同長度的胸腺嘧啶(thymine)和改變髮夾區的互補數目(hairpin pair numbers)，來調控凝血酶活性的能力。此外，我們也將 TBA₁₅ 和 TBA₂₉ 同時修飾在金奈米粒子表面，形成多價性質的抑制劑，期望能提高與凝血酶的結合能力，亦能增加抑制凝血的效果。

貳、研究方法與過程

一、藥品

凝血酶(human α -thrombin, $\geq 1,000$ NIH units/mg protein)、人類纖維蛋白原(human fibrinogen)、牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)、四氯金酸(Hydrogen tetrachloroaurate(III) trihydrate, $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$)、氫氧化鈉(NaOH)、氯化鈉(sodium chloride, NaCl)、氯化鉀(potassium chloride, KCl)、氯化鈣(Calcium chloride, CaCl_2)、氯化鎂(magnesium chloride, MgCl_2)、三羥甲基氨基甲烷(tris(hydroxymethyl)aminomethane)、鹽酸(Hydrochloric acid, HCl)、肝素(heparin ammonium salt from porcine intestinal mucosa, 1134.928 g/mol, 140 USP units/mg)、阿加曲班(argatroban)、水蛭素(hirudin)購於美國 Sigma-Aldrich 公司, 華法林(warfarin)購買於美國 Fluka 公司, 三鈉檸檬酸鹽(trisodium citrate dehydrate)購買自美國 J. T. Baker 公司。凝血酶時間測定試劑(thrombin clotting time reagent, TCT)買於澳洲(Helena Laboratories)。寡核苷酸和修飾硫醇基之寡核苷酸(thiol-modified oligonucleotides)買自美國 DNA 技術合成公司(Coralville, IA, USA)。二次水則由 Millipore 公司機器製造超純水(Milli-Q)。

二、儀器

1. 盤式吸收儀 SynergyTM 4 Multi-Mode Microplate Reader (Biotek Instruments, USA)
2. 加熱攪拌器 PC-420 (Corning, USA)
3. 超音波洗淨器 D9NX-DC200H (Delta, Taiwan)

4. 震盪混合器 G-560 (Scientific-Industries, USA)
5. 純水機 Milli-Q system QGARD00R1 (MA,USA)
6. 電子分析天平 HR-200 (Adapter, Japan)
7. 高速離心機 3K-30 (Sigma, Germany)
8. pH酸鹼度計 SP-701 (Switzerland, UK)
9. 螢光光譜儀 FP-6300 (Jasco, Japan)
10. 水平式電泳槽 MUPID-2plus (MUPID, Japan)

三、合成 13 nm 金奈米粒子(Au NPs)

本研究以 50 mL (4 mM)檸檬酸鈉($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$)為還原劑將 0.5 mL (0.1 M)四氯金酸(HAuCl_4)還原成金奈米粒子。此反應於沸騰的溶液中進行，反應 8 分鐘後立即冰浴，即可合成 13 nm 金奈米粒子，濃度約為 15 nM。最後經穿透式電子顯微鏡量測得知，Au NPs 粒徑約為 13.3 ± 0.6 nm。

四、TBA - Au NPs 製備

我們分別將 5' 端修飾硫醇(thiol)分子之凝血酶適合體(thrombin binding aptamers)：TBA₁₅ (150 μM , 5 μL)與 TBA₂₉ (150 μM , 5 μL)互混，再加入 13 nm 的金奈米粒子(15 nM, 990 μL)，利用金硫鍵(Au-S)的方式鍵結。經兩個小時後，再加入 200 mM NaCl 進行 salt aging。放置一天後，再利用高速離心機離心(相對離心力為 3,0000 g，20 分鐘，共三次)最後以 5 mM Tris-HCl (pH 7.4)回溶。為了定出每個金奈米粒子所接上之凝血酶適合體數目，我們將離心之上清液，以常用之 OliGreen (OG)試劑來染¹⁶，再以螢光儀進行定量。

五、凝血酶凝固時間偵測

偵測凝血酶凝固時間，配製體積為 500 μ L 溶液，含 1 X 仿生理緩衝液(pH 7.4)、牛血清白蛋白(100 μ M)、抑制劑(TBA - Au NP, 2.5 nM)，分別將凝血酶(5.0 nM)及血漿(0.5 X)於 37 度加熱器中(加熱 3 分鐘)，最後再將兩者混合於 1-cm 石英管，用螢光儀測定凝血酶凝固時間。

參、主要發現與討論

一、長度對 TBA-Tn - Au NPs 的影響

我們利用金硫(Au - S)鍵結合方式分別將 2.0 μ M 凝血酶適合體(thrombin binding aptamers, TBA₁₅ 與 TBA₂₉)和隨機序列(random DNA, rDNA)修飾於金奈米粒子表面，並利用不同長度的胸腺嘧啶(T₀, T₁₅, T₃₀, T₄₅ 和 T₆₀)和不同髮夾區互補數目(h_m-hairpin)的適合體修飾於金奈米粒子(Apt - Au NPs)上(表示為 TBA-h_mT_n - Au NPs)，如: TBA₂₉-h₄T₁₅ - Au NPs 表示為 TBA₂₉有 4 對髮夾區互補和尾端有 15 個胸腺嘧啶的鹼基作為不同長度連接適合體與金奈米粒子表面時所調控的距離。為了探討長度及髮夾區互補數目對抑制凝血酶效果的影响，我們測試了不同適合體的凝血酶凝固時間，樣品包含凝血酶(5.0 nM)、稀釋兩倍的血漿，再加入不同的抑制劑如下: TBA₁₅-h₀T_n (100 nM), TBA₂₉-h₄T_n (100 nM), TBA₁₅-h₀T₀-Au NPs (0.83 nM), TBA₁₅-h₀T₁₅-Au NPs (0.91 nM), TBA₁₅-h₀T₃₀-Au NPs (1.30 nM), TBA₁₅-h₀T₄₅-Au NPs (1.52 nM), TBA₁₅-h₀T₆₀-Au NPs (1.89 nM), TBA₂₉-h₄T₀-Au NPs (1.00 nM), TBA₂₉-h₄T₁₅-Au NPs (1.14 nM), TBA₂₉-h₄T₃₀-Au NPs (1.43 nM), TBA₂₉-h₄T₄₅-Au NPs (1.54 nM)和 TBA₂₉-h₄T₆₀-Au NPs (1.92 nM)，我們發現凝血酶適合體密度會隨著 T₀ 至 T₆₀ 長度之增加而降低。

圖 1 顯示延長凝血酶凝固時間的差異。我們比較抑制劑的強度，是利用 TBA 和 TBA-Au NPs 延長凝血酶凝固時間 $[(t - t_0)/t_0]$ 來判斷， t_0 和 t 分別表示沒加入抑制劑和加入抑制劑所延長的時間，凝血酶凝固時間較長表示為較強的抗凝血劑。當兩種 TBA₁₅ 與 TBA₂₉ 適合體都在自由的狀態下(未修飾於金奈米粒子表面)，只有 TBA₁₅ 在凝血酶

誘導凝血的過程中有明顯的抑制效果。可能是因為 TBA₁₅ 作用於凝血酶主要位置在 exosite 1，直接影響 thrombin 活性。

此外，我們發現 TBA-Au NPs 抑制效果會隨著 T₀ 至 T₃₀ 長度的增加而使得適合體活動性提高，以穩定的 G-quadruplex 構型，進而提升抑制的效果；但大於 30 個胸腺嘧啶(>T₃₀)後，其抑制凝血效果便有下降的趨勢。我們推測增加 T_n 長度能使修飾在 Au NPs 上的 TBA 活動性提高，且易摺疊成 G-quadruplex 之構型而增加抗凝血效果。由圖 2A 得知 TBA-Au NPs 隨著 T_n 長度增加至 n = 60 水合直徑 (Hydrodynamic diameters) 也隨之增加，當 TBA 修飾在 Au NPs 上 T_n 長度大於 n = 30，TBA 修飾於每個 Au NPs 上的比例也相對降低(表 1)，導致抑制凝血效果下降。圖 2C 中電泳遷移率也說明 TBA 修飾於 Au NPs 上隨著 T_n 長度增加，遷移速率也相對變慢。

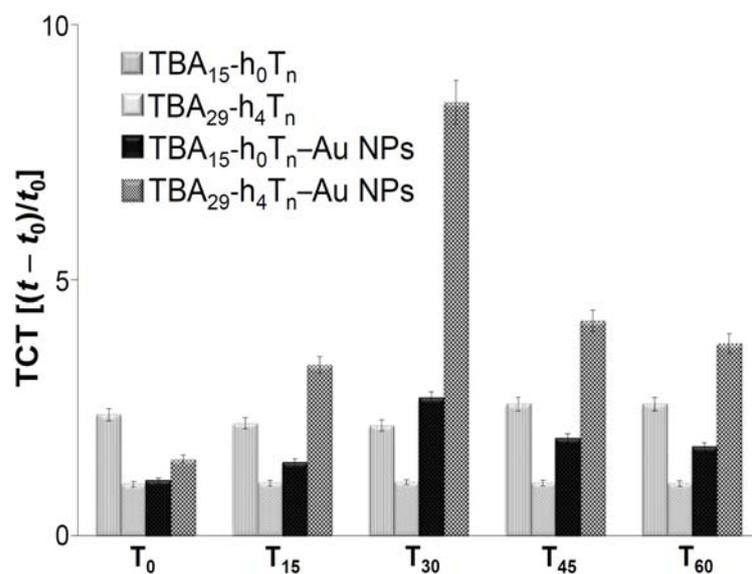


圖 1：於血漿樣品中，四種不同抑制劑相對於凝血酶凝固時間 (relative thrombin clotting time) $[(t - t_0)/t_0]$ 之比較。

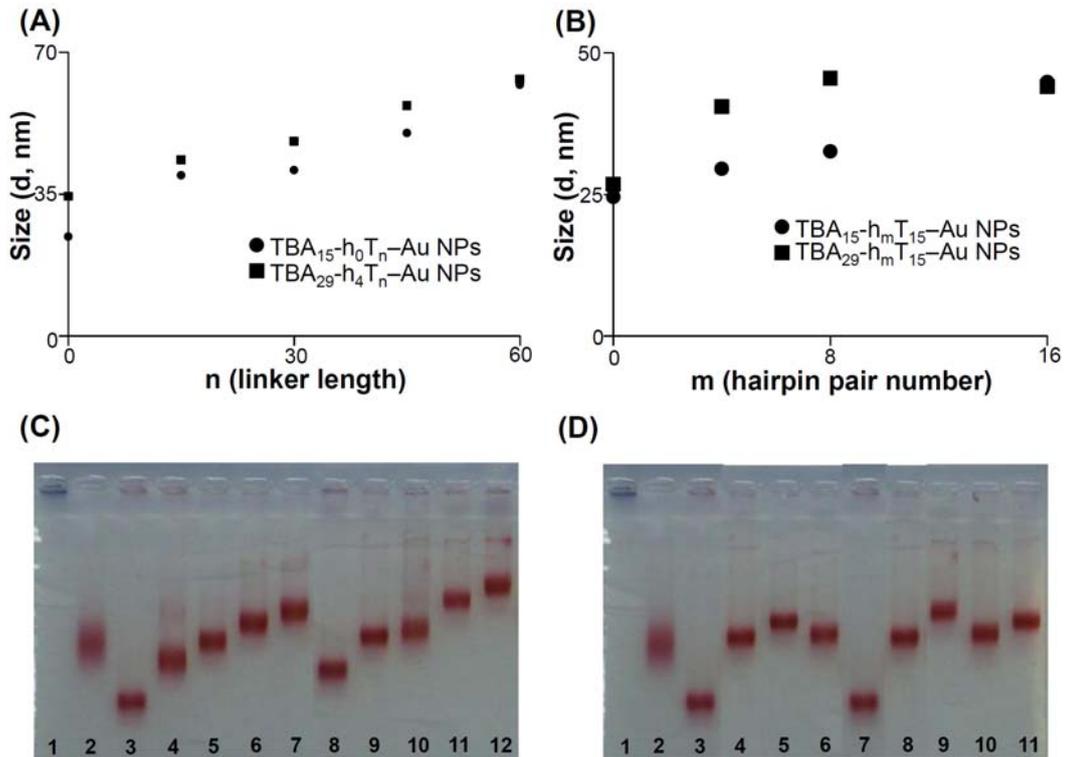


圖 2: (A, B)水合直徑與(C, D)不同長度之 TBA-h_mT_n-Au NPs (50 nM) 於 20 V/cm 電場下經電泳後之結果。Lanes 於(C): (1) bare Au NPs, (2) BSA capping Au NPs, (3) TBA₁₅-h₀T₀-Au NPs, (4) TBA₁₅-h₀T₁₅-Au NPs, (5) TBA₁₅-h₀T₃₀-Au NPs, (6) TBA₁₅-h₀T₄₅-Au NPs, (7) TBA₁₅-h₀T₆₀-Au NPs, (8) TBA₂₉-h₄T₀-Au NPs, (9) TBA₂₉-h₄T₁₅-Au NPs, (10) TBA₂₉-h₄T₃₀-Au NPs, (11) TBA₂₉-h₄T₄₅-Au NPs, (12) TBA₂₉-h₄T₆₀-Au NPs ; Lanes in (D): (1) bare Au NPs, (2) BSA capping Au NPs, (3) TBA₁₅-h₀T₁₅-Au NPs, (4) TBA₁₅-h₄T₁₅-Au NPs, (5) TBA₁₅-h₈T₁₅-Au NPs, (6) TBA₁₅-h₁₆T₁₅-Au NPs, (7) TBA₂₉-h₀T₁₅-Au NPs, (8) TBA₂₉-h₄T₁₅-Au NPs, (9) TBA₂₉-h₈T₁₅-Au NPs, (10) TBA₂₉-h₁₆T₁₅-Au NPs 和(11) TBA₁₅/TBA₂₉-h₈T₁₅-Au NPs。

二、TBA-h_mT₁₅ - Au NPs 髮夾區的互補數

圖 3 為 TBA₁₅-h_mT₁₅ (100 nM) , TBA₂₉-h_mT₁₅ (100 nM) , TBA₁₅-h₀T₁₅-Au NPs (0.91 nM) , TBA₁₅-h₄T₁₅-Au NPs (1.11 nM) , TBA₁₅-h₈T₁₅-Au NPs (1.43 nM) , TBA₁₅-h₁₆T₁₅-Au NPs (1.82 nM) , TBA₂₉-h₀T₁₅-Au NPs (0.85 nM) , TBA₂₉-h₄T₁₅-Au NPs (1.14 nM) , TBA₂₉-h₈T₁₅-Au NPs (1.43 nM)或 TBA₂₉-h₁₆T₁₅-Au NPs (1.82 nM)凝血酶凝固時間偵測的結果。在實驗中，我們發現 TBA₁₅-h_mT₁₅ 延長髮夾區互補數能穩定 G-quadruplexs 構型，使其在血漿樣品中可減少被核酸酶消化而增加抑制凝血效果。此外，我們亦發現 TBA₁₅-h_mT₁₅-Au NPs 和 TBA₂₉-h_mT₁₅-Au NPs 會隨著互補數從 h₀ 增加到 h₈ 時，使得抑制凝血效果提升；反之，互補數過高時使得抑制凝血效果變差。我們推測，增加互補數能提高修飾於金奈米粒子上的適合體 G-quadruplexs 結構之穩定度，使得抑制凝血效果提升。另外，增加 h_m 也能提升適合體 G-quadruplexs 結構的水合直徑(如圖 2B 所示)。若以凝血酶凝固時間來比較，TBA₁₅-h₁₆T₁₅-Au NPs/TBA₂₉-h₁₆T₁₅-Au NPs (延長凝血酶凝固時間分別為 2.6/12.3 倍) 延長凝固時間較 TBA₁₅-h₈T₁₅-Au NPs/TBA₂₉-h₈T₁₅-Au NPs (延長凝血酶凝固時間分別是 4.2/18.2 倍)短，推測可能是因為前者在每個金奈米粒子上的凝血酶適合體比例較低(表 1 和圖 2D)及不可預期的分子間雜合或 G-quadruplexs 結構形成所導致。

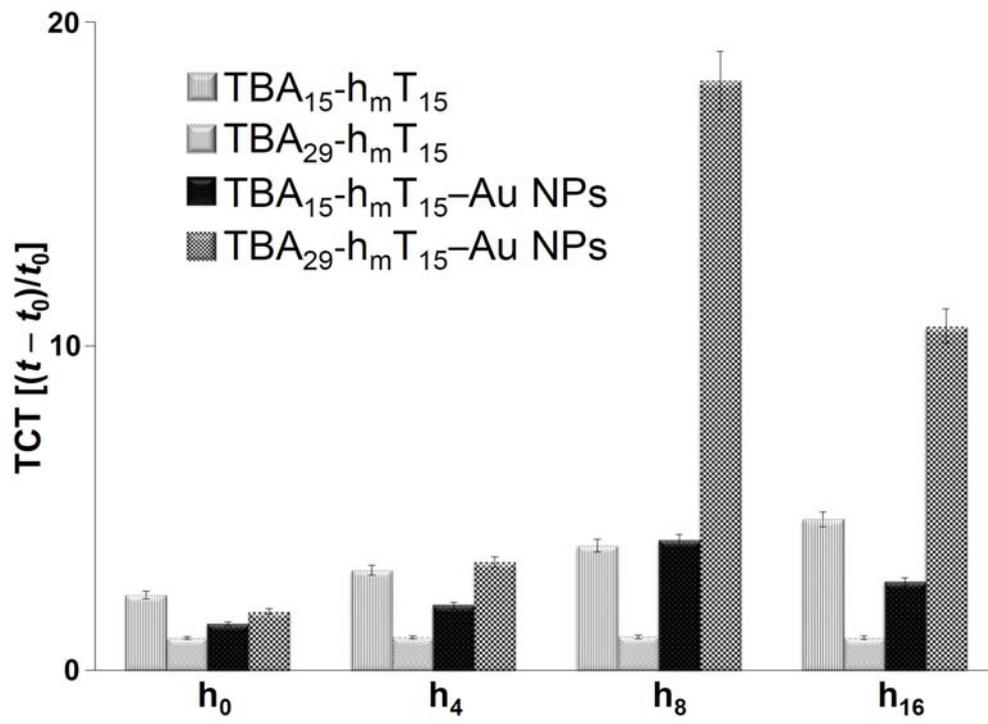


圖 3: 於血漿樣品中加入 TBA-h_mT₁₅ 或 TBA-h_mT₁₅-Au NPs 的相對凝血酶凝固時間 $[(t - t_0)/t_0]$ 。

表 1. TBA (凝血酶適合體)及 rDNA(隨機 DNA 序列)於金奈米粒子表面上之數目。

Name	Sequence ^a	TBA/Au NP ^b
T _n h ₀ -TBA ₁₅	5'-T _n GGTTGGTGTGGTTGG-3'	-
T _n h ₄ -TBA ₂₉	5'-T _n AGTCCGTGGTAGGGCAGGTTGGGGTGACT-3'	-
T _n -rDNA	5'-T _n GCTGACTACACGCTGTCATTA-3'	
SH-T ₀ h ₀ -TBA ₁₅	5'-SH-GGTTGGTGTGGTTGG-3'	120
SH-T ₁₅ h ₀ -TBA ₁₅	5'-SH-T ₁₅ GGTTGGTGTGGTTGG-3'	110
SH-T ₃₀ h ₀ -TBA ₁₅	5'-SH-T ₃₀ GGTTGGTGTGGTTGG-3'	75
SH-T ₄₅ h ₀ -TBA ₁₅	5'-SH-T ₄₅ GGTTGGTGTGGTTGG-3'	66
SH-T ₆₀ h ₀ -TBA ₁₅	5'-SH-T ₆₀ GGTTGGTGTGGTTGG-3'	53
SH-T ₀ h ₄ -TBA ₂₉	5'-SH-AGTCCGTGGTAGGGCAGGTTGGGGTGACT-3'	99
SH-T ₁₅ h ₄ -TBA ₂₉	5'-SH-T ₁₅ AGTCCGTGGTAGGGCAGGTTGGGGTGACT-3'	88
SH-T ₃₀ h ₄ -TBA ₂₉	5'-SH-T ₃₀ AGTCCGTGGTAGGGCAGGTTGGGGTGACT-3'	70
SH-T ₄₅ h ₄ -TBA ₂₉	5'-SH-T ₄₅ AGTCCGTGGTAGGGCAGGTTGGGGTGACT-3'	65
SH-T ₆₀ h ₄ -TBA ₂₉	5'-SH-T ₆₀ AGTCCGTGGTAGGGCAGGTTGGGGTGACT-3'	52
SH-T ₁₅ h ₄ -TBA ₁₅	5'-SH-T ₁₅ <u>AGTCCGTGGTTGGTGTGGTTGGGGTGACT</u> -3'	90
SH-T ₁₅ h ₈ -TBA ₁₅	5'-SH-T ₁₅ <u>ATCTAGTCCGTGGTTGGTGTGGTTGGGGTGACTAGAT</u> -3'	70
SH-T ₁₅ h ₁₆ -TBA ₁₅	5'-SH-T ₁₅ <u>ATTCTACTGGATAGTCCGTGGTTGGTGTGGTTGGGGTGACTATCCA</u> <u>GTAGAAT</u> -3'	55
SH-T ₁₅ h ₀ -TBA ₂₉	5'-SH-T ₁₅ GGTAGGGCAGGTTGG -3'	118
SH-T ₁₅ h ₈ -TBA ₂₉	5'-SH-T ₁₅ <u>ATCTAGTCCGTGGTAGGGCAGGTTGGGGTGACTAGAT</u> -3'	70
SH-T ₁₅ h ₁₆ -TBA ₂₉	5'-SH-T ₁₅ <u>ATTCTACTGGATAGTCCGTGGTAGGGCAGGTTGGGGTGACTATCCA</u> <u>GTAGAAT</u> -3'	55
SH-T ₁₅ -rDNA	5'-SH-T ₁₅ GCTGACTACACGCTGTCATTA-3'	105

^a 底線部分表示為髮夾區之互補序列 ^b 每個金奈米粒子所含之適合體數目

三、TBA₁₅/TBA₂₉-h₈T₁₅-Au NPs 多價性質作用

在找出最佳化的長度及互補數之TBA-h_mT_n-Au NPs的條件後，我們利用多價性質之金奈米粒子(TBA₁₅/TBA₂₉-h₈T₁₅-Au NPs)提高抑制劑對凝血酶的酵素活性。經測試後得知抑制劑TBA₁₅-h₈T₁₅ (100 nM), TBA₁₅-h₈T₁₅-Au NPs (1.43 nM), TBA₂₉-h₈T₁₅-Au NPs (1.43 nM)和TBA₁₅/TBA₂₉-h₈T₁₅-Au NPs (1.42 nM)延長凝血酶凝固時間分別是未加入抑制劑的3.9、4.2、18.2和296倍(圖4)，結果顯示，TBA₁₅/TBA₂₉-h₈T₁₅-Au NPs具有高效能抑制凝血酶的活性。而未經過互補數改變的TBA₁₅-h₀/TBA₂₉-h₄-Au NPs延長凝血酶凝固時間為19.3倍¹⁷⁻¹⁹。利用多價性質的TBA₁₅/TBA₂₉-h₈T₁₅-Au NPs和凝血酶反應會使粒子間形成交聯作用，隨著凝血酶濃度的增加(10到100 nM)，TBA₁₅/TBA₂₉-h₈T₁₅-Au NPs (1.0 nM)之聚集程度使得吸收峰有明顯的變化(圖5)。由圖6可知TBA₁₅/TBA₂₉-h₈T₁₅-Au NPs和凝血酶之間有很強的結合力，其解離常數為： $K_d = 8.86 \times 10^{-12} \text{ M}$ ，是free TBA₂₉兩個冪次高，為樹突狀的TBA₁₅及TBA₂₉一個冪次高¹⁷⁻²⁶。此外，會形成高效能抑制效果，推測可能因為TBA₁₅/TBA₂₉-h₈T₁₅-Au NPs本身與凝血酶間產生的靜電作用力以及奈米粒子本身有立體障礙所致。另外，在治療與診斷的應用，核酸與酵素的反應之穩定性及避免被核酸酶降解是很重要的。我們證明TBA₁₅/TBA₂₉-h₈T₁₅-Au NPs可穩定存在於血漿環境中高達48小時(圖7)，我們推測TBA₁₅/TBA₂₉-h₈T₁₅-Au NPs因表面屬於高負電性，使高濃度鹽類大多分布於表面，故在血漿樣品中能抵抗核酸酶的降解²⁷。

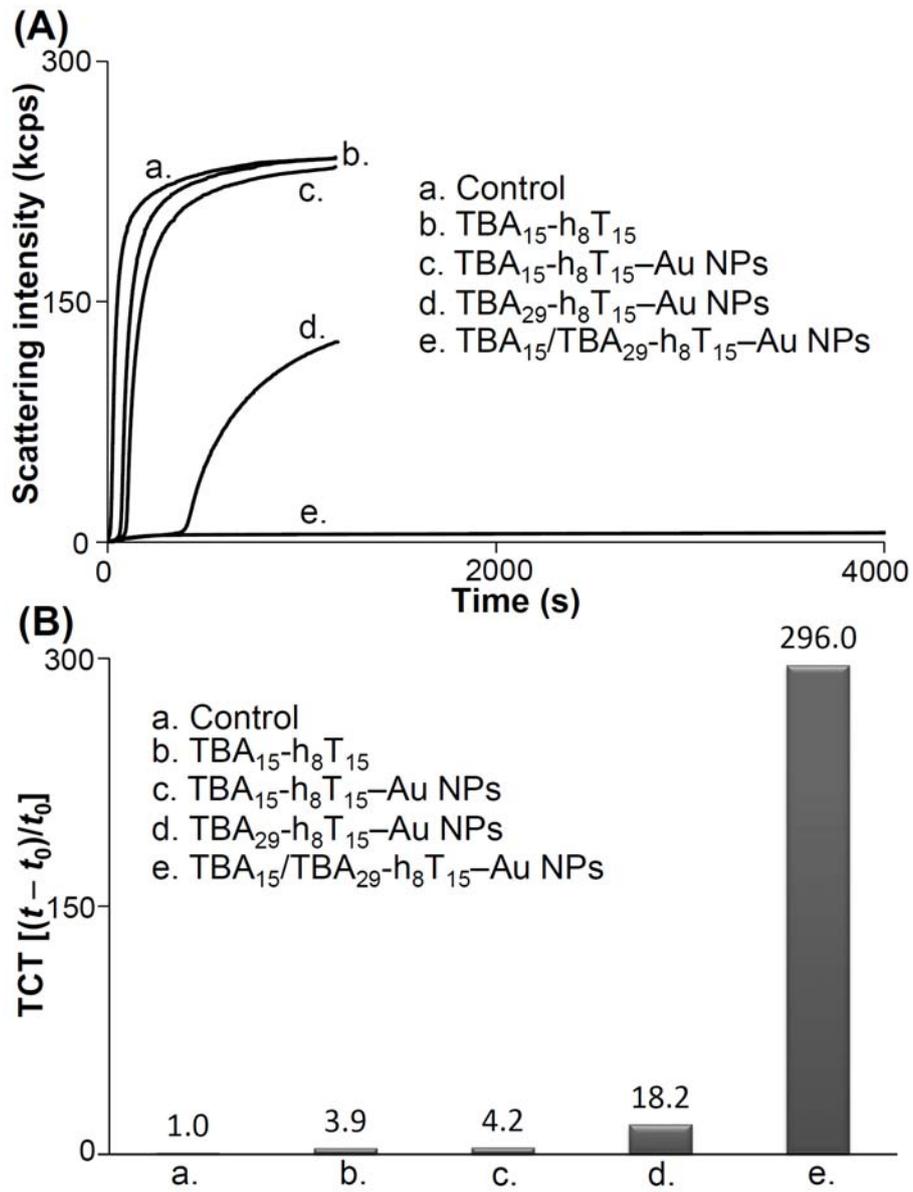


圖4：(A)對照組(a)及抑制劑(b-e)於血漿中進行線上偵測；(B)對照組(a)及抑制劑(b-e)於血漿中相對凝血酶凝固時間 $[(t - t_0)/t_0]$ 之倍率。

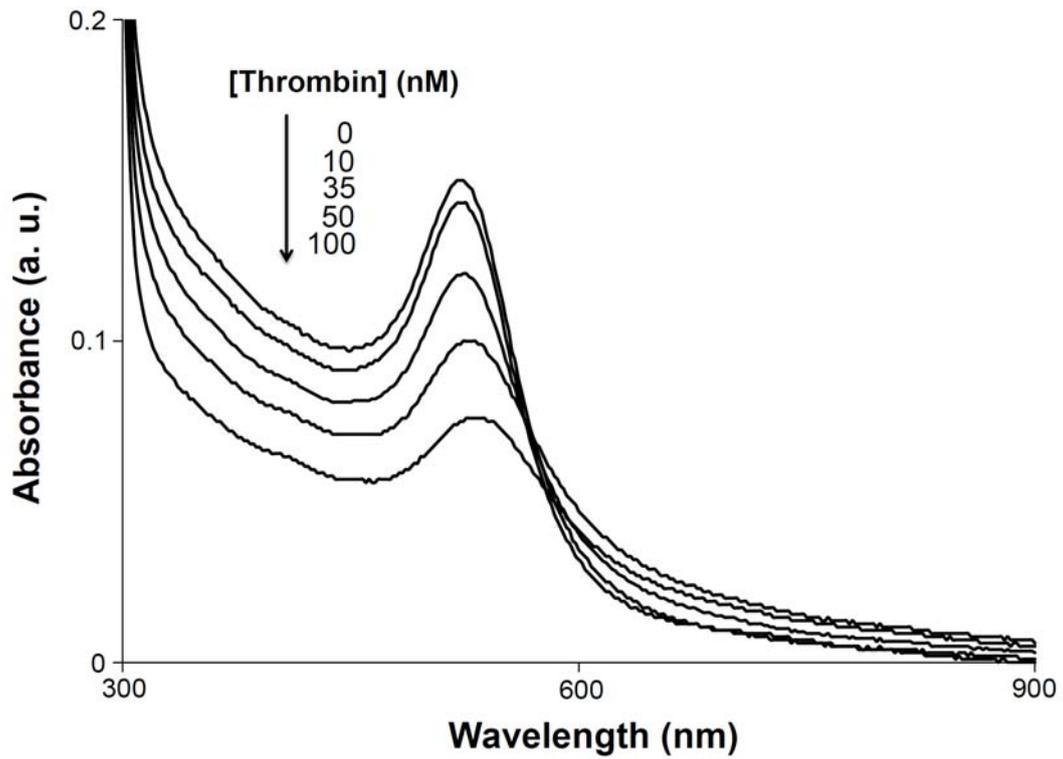


圖 5 : TBA₁₅/TBA₂₉-h₈T₁₅-Au NPs (1.0 nM) 的紫外光-可見光光譜(於生理條件下含有 0-100 nM 凝血酶及 100 μM BSA)。

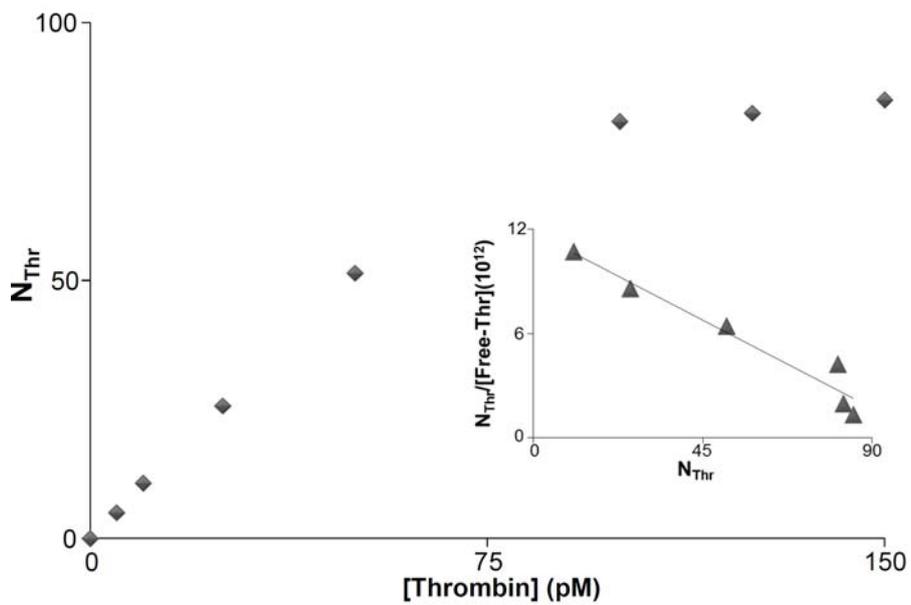


圖 6 : Thrombin-TBA₁₅/TBA₂₉-h₈T₁₅-Au NPs 複合體之解離常數 (Dissociation constant K_d) 以 $N_{Thr}/[Free-Thr]$ 對 N_{Thr} 作圖求得。

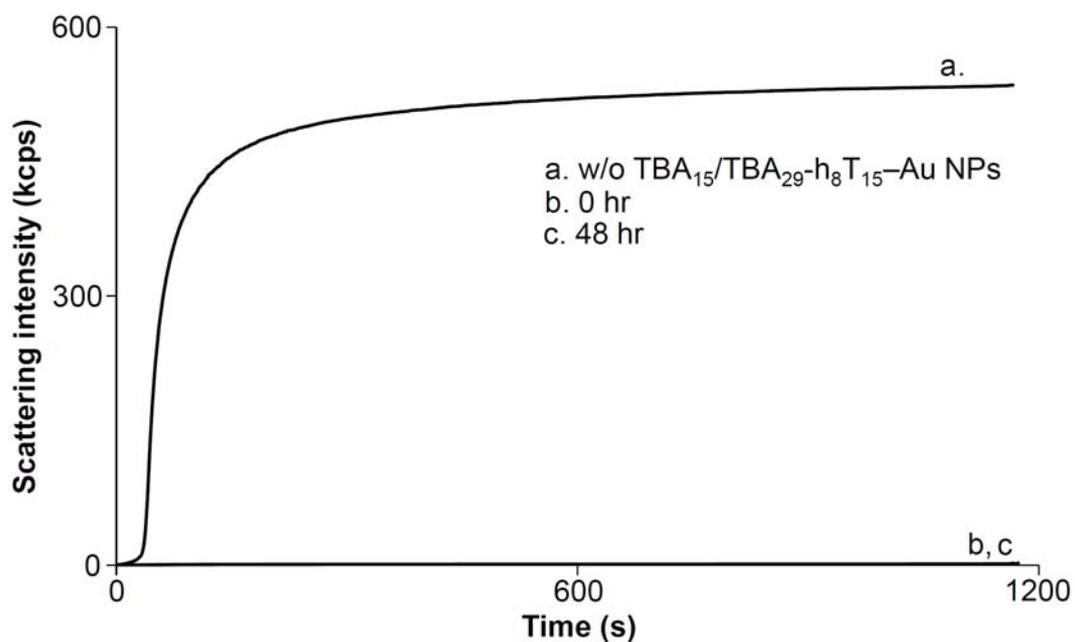


圖 7：以 $TBA_{15}/TBA_{29}\text{-}h_8T_{15}\text{-Au}$ NPs (1 nM, 990 μL) 為穩定的抗凝固劑於人類血漿樣品中(兩倍稀釋)反應 0 和 48 小時，之後再加入凝血酶(500 nM, 10 μL) 進行功能測試。

四、與常用的抗凝血藥比較

如圖8所示，我們將TBA₁₅/TBA₂₉-h₈T₁₅-Au NPs、TBA₂₉-h₄T₁₅-Au NPs以及常見之抗凝血藥物(肝素、阿加曲班、水蛭素和華法林)於人類血漿樣品中進行凝血酶凝固時間(Thrombin Clotting Time, TCT) 測試。隨著不同劑量的增加，測定TBA₁₅/TBA₂₉-h₈T₁₅-Au NP和TBA₂₉-h₄T₁₅-Au NPs，以及常見的四種抗凝血藥物後，發現TBA₁₅/TBA₂₉-h₈T₁₅-Au NP抗凝血能力較其他五種都好。舉例來說，我們在凝血酶凝固時間測定時，固定抗凝血劑或TBA的濃度都為10 nM來做比較；TBA₁₅/TBA₂₉-h₈T₁₅-Au NPs 400 ± 6秒(0.14 nM; 在未加入任何抑制劑的時間為20 ± 3秒)，其他藥物如：肝素65 ± 5秒、阿加曲班58 ± 4秒、水蛭素22 ± 3秒、華法林23 ± 3秒，以及TBA₂₉-h₄T₁₅-Au NPs (0.11 nM; [TBA] = 10 nM)為69 ± 4秒。

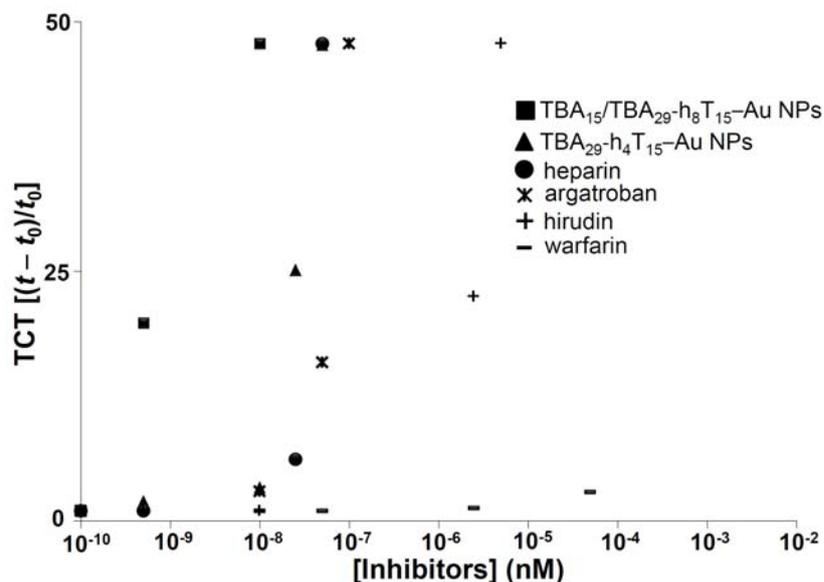


圖 8：將 TBA₁₅/TBA₂₉-h₈T₁₅-Au NPs、TBA₂₉-h₄T₁₅-Au NPs 以及常見之抗凝血藥物(肝素、阿加曲班、水蛭素和華法林)於人類血漿樣品中進行凝血酶凝固時間(Thrombin Clotting Time, TCT)測試。

五、利用光照射回復凝血酶活性

在體外循環中，抑制劑和凝血因子能做可逆的反應是很重要的²⁸⁻³⁰。凝血酶除了是止血的重要酵素外，很多癌症發生也和它有關³¹。因此，很多探針利用光子的能量，使其可以更準確和目標物作用；也能促進抗凝血效用而得以治療其他疾病。我們也在TBA前端修飾具有光照官能基(TBA_{pc})，利用光調控凝血酶活性。圖9顯示在血漿環境中，TBA₁₅/TBA₂₉-h₈T₁₅-Au NPs和TBA_{15pc}/TBA_{29pc}-h₈T₁₅-Au NPs (濃度都為2.5 nM)抑制凝血的效果。一旦TBA_{15pc}/TBA_{29pc}-h₈T₁₅-Au NPs/凝血酶混合物經過365 nm UV光(365 nm, 20 mW/cm², 30分鐘)照射後，凝血酶可迅速回復其活性。TBA_{15pc}/TBA_{29pc}-h₈T₁₅-Au NPs經過近UV光照後，讓構形猶如籠子(caged)一般的TBA_{15pc}/TBA_{29pc}適合體單體從Au NPs上脫落。再經由近UV光照30分鐘抑制劑，離心取上層定量TBA_{pc}，約有80%從Au NPs上釋放出來。為了減少光照射對動物組織的傷害，在未來的發展上希望可以用雙光子(two-photon)來做為光源。

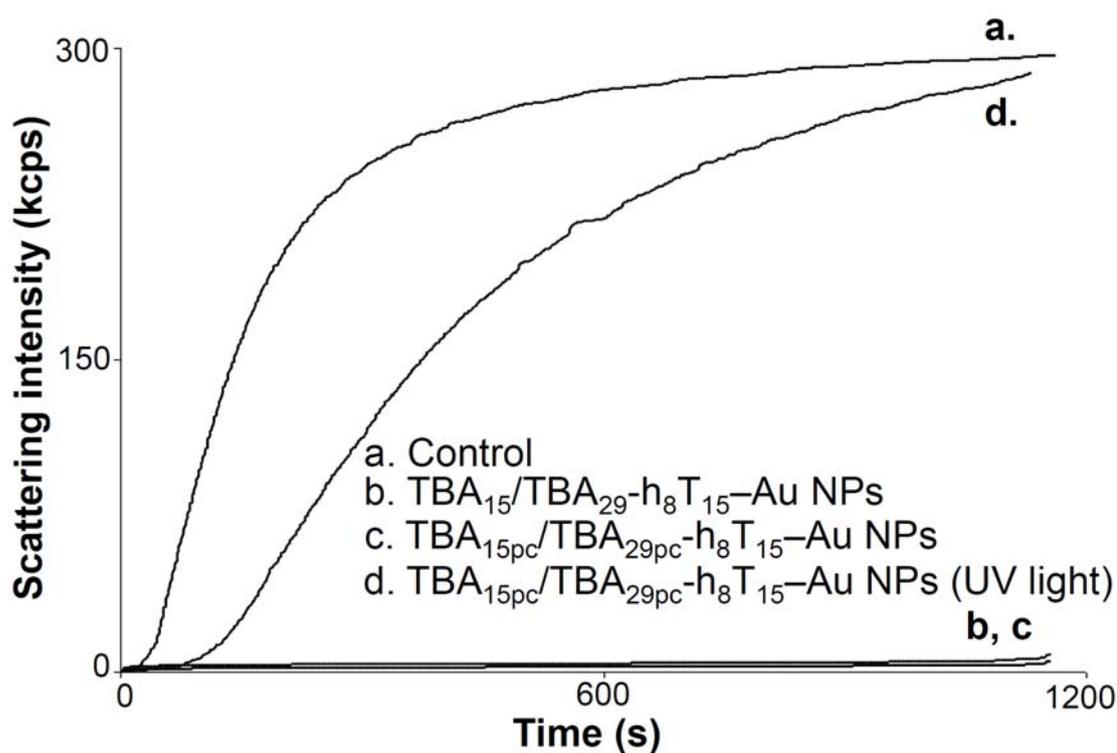


圖9：可逆性的TBA_{15pc}/TBA_{29pc}-h₈T₁₅-Au NPs (2.5 nM)於血漿中進行近紫外光(365 nm)之照射：(a)凝血酶(5 nM)加入兩倍稀釋的血漿中不添加任何之抑制劑；(b) 2.5 nM TBA₁₅/TBA₂₉-h₈T₁₅-Au NPs或(c) 2.5 nM TBA_{15pc}/TBA_{29pc}-h₈T₁₅-Au NPs於凝血酶和血漿中反應；(d) 2.5 nM TBA_{15pc}/TBA_{29pc}-h₈T₁₅-Au NPs於凝血酶和血漿中反應並進行近紫外光(365 nm)照射30分鐘。

六、結論及建議

我們發展出的TBA₁₅/TBA₂₉-h₈T₁₅-Au NPs抑制劑可做為高效能之抗凝血劑；主要原因可能是具有高度活動性、穩定及多價性質。TBA₁₅/TBA₂₉-h₈T₁₅-Au NPs和凝血酶之間的作用力很強，具有很高的結合力($K_d = 8.86 \times 10^{-12}$ M)；其結合力和單價TBA₂₉有100倍之多，亦為TBA₁₅的10,000倍；和其他利用樹突狀鍵結的TBA或TBA₂₉-Au NPs至少相差10倍³²。而單純加入TBA₁₅和未加入抑制劑相比，凝血酶凝固時間只延長3.9倍；但TBA₁₅/TBA₂₉-h₈T₁₅-Au NPs卻可延長高達296倍。另外，TBA_{15pc}/TBA_{29pc}-h₈T₁₅-Au NPs可藉由近UV光照回復凝血酶活性；因此，新開發光調控的抗凝血劑，在生物藥物上的應用也更具潛力。我們相信利用這樣的技術，可以將其他的DNA或RNA修飾在奈米粒子上，也可與其他蛋白質或癌細胞作用，進而使得這技術能被廣泛地利用。

肆、参考文献

1. Nath, N.; Chilkoti, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 8197–8202.
2. De, M.; Ghosh, P. S.; Rotello, V. M. *Adv. Mater.* **2008**, *20*, 4225–4241.
3. Mazumder, S.; Dey, R.; Mitra, M. K.; Mukherjee, S.; Das, G. C. *J. Nanomater* **2009**, Article ID 815734, 17 pages.
4. Stewart, M. E.; Anderton, C. R.; Thompson, L. B.; Maria, J. Gray, S. K.; Rogers, J. A.; Nuzzo, R. G. *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 494–521.
5. Myroshnychenko, V.; Rodriguez-Fernandez, J.; Pastoriza-Santos, I.; Funston, A. M.; Novo, C.; Mulvaney, P.; Liz-Marzan, L. M.; de Abajo, F. J. G. *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37*, 1792–1805.
6. Storhoff, J. J.; Lazarides, A. A.; Mucic, R. C.; Mirkin, C. A.; Letsinger, R. L.; Schatz, G. C. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 4640–4650.
7. Stoltenburg, R.; Reinemann, C.; Strehlitz, B. *Biomol. Eng.* **2007**, *24*, 381–403.
8. Sheldon, R. A. *Adv. Synth. Catal.* **2007**, *349*, 1289–1307.
9. Palomo, J. M. *Curr. Org. Synth.* **2009**, *6*, 1–14.
10. Marvin, J. S.; Corcoran, E. E.; Hattangadi, N. A.; Zhang, J. V.; Gere, S. A.; Hellinga, H. W. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **1997**, *94*,

- 4366–4371.
11. Vegas, A. J.; Fuller, J. H.; Koehler, A. N.; *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37*, 1385–1394.
 12. Schreiber, S. L.; *Chem. Eng. News* **2003**, *81*, 51–61.
 13. Wolberg, A. S. *Blood Rev.* **2007**, *21*, 131–142.
 14. Nierodzik, M. L.; Karpatkin, S. *Cancer Cell* **2006**, *10*, 355–362.
 15. Muller, J.; Wulffen, B.; Potzsch, B.; Mayer, G. *ChemBioChem* **2007**, *8*, 2223–2226.
 16. The Handbook—A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies, <http://www.probes.com/handbook/sections/0803.html>.
 17. Bock, L. C.; Griffin, L. C.; Latham, J. A.; Vermaas, E. H.; Toole, J. *J. Nature* **1992**, *355*, 564–566.
 18. Padmanabhan, K.; Padmanabhan, K. P.; Ferrara, J. D.; Sadler, J. E.; Tulinsky, A. *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 17651–17654.
 19. Tasset, D. M.; Kubik, M. F.; Steiner, W. *J. Mol. Biol.* **1997**, *272*, 688–698.
 20. Kim, Y.; Dennis, D. M.; Morey, T.; Yang, L.; Tan, W. *Asian. J. Chem.* **2010**, *5*, 56–59.
 21. Kim, Y.; Cao, Z.; Tan, W. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2008**, *105*, 5664–5669.

22. Müller, J.; Freitag, D.; Mayer, G.; Pötzsch, B. *J. Thromb. Haemost.* **2008**, *6*, 2105–2112.
23. Müller, J.; Wulffen, B.; Pötzsch, B.; Mayer, G. *ChemBioChem* **2007**, *8*, 2223–2226.
24. Hasegawa, H.; Taira, K.; Sode, K.; Ikebukuro, K. *Sensors* **2008**, *8*, 1090–1098.
25. Mayer, G.; Müller, J.; Mack, T.; Freitag, D. F.; Höver, T.; Pötzsch, B.; Heckel, A. *ChemBioChem* **2009**, *10*, 654–657.
26. Henry, B. L.; Monien, B. H.; Bock, P. E.; Desai, U. R. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 31891–31899.
27. Seferos, D. S.; Prigodich, A. E.; Giljohann, D. A.; Patel, P. C.; Mirkin, C. A. *Nano Lett.* **2009**, *9*, 308–311.
28. Nimjee, S. M.; Keys, J. R.; Pitoc, G. A.; Quick, G.; Rusconi, C. P.; Sullenger, B. A. *Mol. Ther.* **2006**, *14*, 408–415.
29. Kim, Y.; Phillips, J. A.; Liu, H.; Kang, H.; Tan, W. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2009**, *106*, 6489–6494.
30. Heckel, A.; Buff, M. C. R.; Raddatz, M.-S. L.; Müller, J.; Pötzsch, B.; Mayer, G. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 6748–6750.
31. Zacharski, L. R. *Cancer Lett.* **2002**, *186*, 1–9.
32. Lee, J. H.; Yigit, M. V.; Mazumdar, D.; Lu, Y. *Adv. Drug Delivery*

Rev. **2010**, 62, 592–605.

附件：

(A)

投稿期刊: RSC Advances

抬頭：Highly flexible and stable aptamer-caged nanoparticles for control of thrombin activity.

作者：Chia-Lun Hsu, Shih-Chun Wei, Jyun-Wei Jian, Huan-Tsung Chang, Wei-Hsi Chen, and Chih-Ching Huang

摘要：

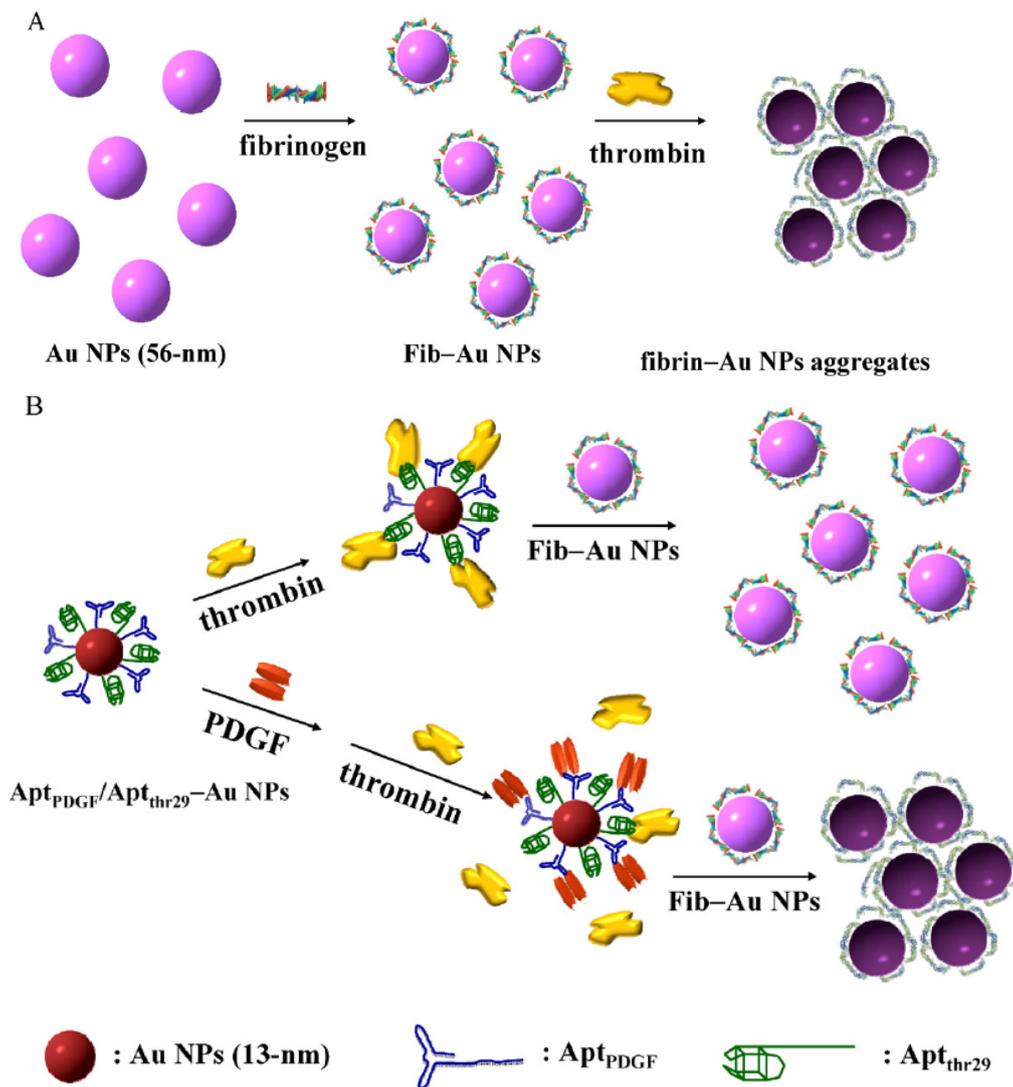
In this paper, we have demonstrated thymine linker length number (T_n , $n = 0-60$) and stem pair number (P_m , $m = 0-16$) in the terminal of thrombin binding aptamers (TBAs) having strong impact on the flexibility and stability of TBA-modified gold nanoparticles (TBA-Au NPs) and thus the binding strength and inhibitory potency toward thrombin. The anticoagulation of TBA-Au NPs increased with an increase in the linker length from T_0 to T_{30} due to an increase in the flexibility of G-quadruplexes of TBAs on the Au NP surfaces (TBA- T_n -Au NPs). The inhibition of TBA- P_mT_{15} -Au NPs increased with increase in the P_m from P_0 to P_8 as a result of increase in the rigidity and the stability of G-quadruplexes of TBAs on the Au NP surfaces. The best results were observed for multivalent TBA-Au NPs conjugates-TBA₁₅/TBA₂₉-P₈T₁₅-Au NPs- exhibited ultrahigh binding affinity toward thrombin ($K_d = 8.86 \times 10^{-12}$ M) and thus extremely high anticoagulant (inhibitory) potency because of their particularly flexible and stable conformation and multivalency. Compared to the case without inhibitors, their measured thrombin clotting time (TCT) was 296 times longer, whereas for TBA₁₅ alone it was only 3.9 times longer. From the dosage dependence of TCT delay, we further demonstrated the anticoagulation ability of our TBA₁₅/TBA₂₉-P₈T₁₅-Au NPs was much better than the commercial drugs (argatroban and hirudin). Moreover, the Au NPs modified with TBA with photocleavable (PC) unit allow a reversal in the activity of TBA_{PC}-Au NPs via near-UV light-inducement of TBA released from Au NPs. We believe that our described techniques can be used widely to modify NPs with other anticoagulant DNA or RNA aptamers towards different proteins such as factor IX, activated protein C, and factor VIIa.

狀態：已接受

(B)

發表期刊：Biosensors and Bioelectronics 29 (2011) 204–209.

作者：Tzu-En Lin, Wei-His Chen, Yen-Chun Shiang, Chih-Ching Huang,
Huan-Tsung Chang



中文摘要：

我們利用金奈米粒子和凝血酶來偵測血小板生長因子，此系統具有良好的靈敏度以及選擇性。在本系統中，我們用核酸適體修飾的金奈米粒子(13 nm)作分子辨認，上面的核酸適體有兩種，一種是可以專一性地和血小板生長因子結合；另一種是由 29 個核苷酸所組成，和凝血酶具有專一性。凝血酶會催化血纖維素原的聚合反應，形成網狀的纖維蛋白。因此我們將纖維蛋白素原修飾在 56 nm 的金奈米粒子上面，經過凝血酶的作用之後，金奈米粒子就會聚集，如此一來纖維蛋白素原修飾的金奈米粒子即可作為訊號放大的工具。凝血酶若結合在奈米材料上，那麼活性就會被抑制；如果血小板生長因子先行結合在奈米材料上，那麼凝血酶就會因立體阻障而無法接在材料上。也就是說，血小板生長因子越多，溶液中游離的凝血酶就會越多，也越容易催化纖維蛋白素原修飾的金奈米粒子而產生聚集，因此藉由金奈米粒子的聚集便可得知血小板生長因子的含量多寡。於最佳化的條件下，系統可偵測地血小板生長因子的線性範圍在 0.5-20 nM，偵測極限為 0.3 nM。用核酸適體修飾的金奈米粒子濃縮分析物後，可將偵測極限往下降至 35 pM，並可測得在細胞培養基中血小板生長因子濃度約為 230 (\pm 20) pM。這樣的結果顯示出這套系統具有良好的靈敏度，可以有選擇性的對分析物進行快速又準確的偵測。

狀態：已公開發表

(C)

投稿期刊：Analytical Chemistry

抬頭：Peroxidase Mimicking DNA–Gold Nanoparticles for the Fluorescence Detection of Lead Ions in Blood.

作者：Chi-Lin Li, Wei-His Chen, Cheng-Kang Chiang, and Huan-Tsung Chang

摘要：

We have developed a fluorescence approach for the highly selective and sensitive detection of lead ions (Pb^{2+}) ions using G-quadruplex DNA (T30695)-modified gold nanoparticles (T30695-Au NPs) and Amplex UltraRed (AUR). Surface-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (SALDI-TOF MS) and inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) revealed the formation of Pb-Au alloys on the surfaces of the 40T30695-Au NPs (i.e., the system featuring 40 molecules of T30695 per Au NP) in the presence of Pb^{2+} ions, leading to increased catalytic activity for the H_2O_2 -mediated oxidation of AUR. The fluorescence intensity (excitation/emission maxima: ca. 540/584 nm) of the AUR product was proportional to the concentration of Pb^{2+} ions over a range 0.1–100 nM ($R^2 = 0.99$), with a limit of detection (LOD, at a signal-to-noise ratio 3) of 0.05 nM. The 40T30695-Au NP/AUR probe was highly selective (by at least 200-fold over other metal ions) toward Pb^{2+} ions; it allowed the detection of Pb^{2+} ions in standard solutions containing 100 mM NaCl and 10 μM cysteine, with LODs of 0.1 and 0.3 nM, respectively. We validated the practicality of using the 40T30695-Au NPs/AUR probe by determining the concentrations of Pb^{2+} ions in blood samples in a simple, selective, and sensitive manner.

狀態：投稿中 (2011/11/09)