



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I576432 B

(45)公告日：中華民國 106 (2017) 年 04 月 01 日

(21)申請案號：099110728

(22)申請日：中華民國 99 (2010) 年 04 月 07 日

(51)Int. Cl. : C12N15/87 (2006.01)

C12N15/82 (2006.01)

(30)優先權：2009/04/07 美國

61/167,389

(71)申請人：陶氏農業科學公司(美國) DOW AGROSCIENCES LLC (US)

美國

(72)發明人：山繆 傑亞庫瑪 P SAMUEL, JAYAKUMAR PON (US)；帕托里諾 約瑟夫 F PETOLINO, JOSEPH F. (US)；森保洙 納拉辛哈 C SAMBOJU, NARASIMHA CHARY (IN)；韋伯 史蒂芬 R WEBB, STEVEN R. (CA)；姚 克姆 Y YAU, KERRM Y. (CA)

(74)代理人：惲軼群；陳文郎

(56)參考文獻：

WO 2007050715A2

WO 2009046384A1

Moeller Lorena et al. "Engineering with Precision: Tools for the New Generation of Transgenic Crops" BioScience 2008, 58 (5): 391-401.

Navarro G, Tros de Ilarduya C. "Activated and non-activated PAMAM dendrimers for gene delivery in vitro and in vivo." Nanomedicine. 2009 5(3):287-97. Epub 2009 Jan 19.

審查人員：顏逸瑜

申請專利範圍項數：18 項 圖式數：7 共 54 頁

(54)名稱

序列特異性核酸酶之奈米粒子媒介式遞送技術

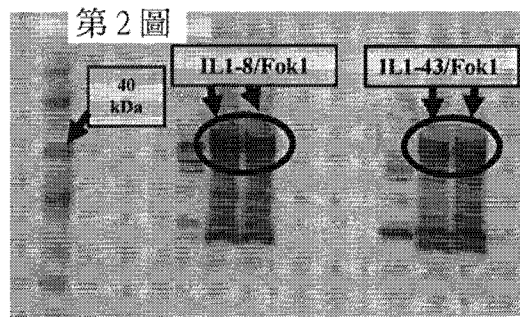
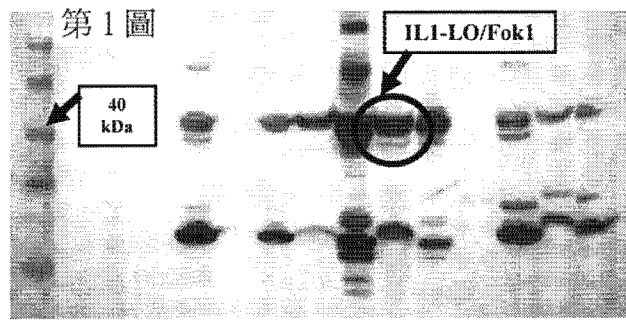
NANOPARTICLE MEDIATED DELIVERY OF SEQUENCE SPECIFIC NUCLEASES

(57)摘要

提供將序列特異性核酸酶引入包括細胞壁之植物細胞的方法。該方法為遺傳或修飾的植物提供，並且用於治療或預防包括細胞壁之植物細胞中的疾病。

Provided are methods for introducing a sequence specific nuclease into a plant cell comprising a cell wall. Methods are provided for genetically or otherwise modifying plants and for treating or preventing disease in plant cells comprising a cell wall.

指定代表圖：



公告本

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號： 99110128

※申請日：

99. 4. 7

※IPC 分類：

C12N 15/87 (2006.01)

C12N 15/82 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

序列特異性核酸酶之奈米粒子媒介式遞送技術 / NANOPARTICLE
MEDIATED DELIVERY OF SEQUENCE SPECIFIC NUCLEASES

二、中文發明摘要：

提供將序列特異性核酸酶引入包括細胞壁之植物細胞的方法。該方法為遺傳或修飾的植物提供，並且用於治療或預防包括細胞壁之植物細胞中的疾病。

三、英文發明摘要：

Provided are methods for introducing a sequence specific nuclease into a plant cell comprising a cell wall. Methods are provided for genetically or otherwise modifying plants and for treating or preventing disease in plant cells comprising a cell wall.

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第 (1 及 2) 圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：(無)

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

相關申請案的交互參考

本申請案主張 2009 年 4 月 7 日申請之美國臨時申請案第 61/167,389 號的利益。

發明領域

本發明關於一種使用奈米粒子以非侵入性遞送序列特异性核酸酶進入含細胞壁之植物細胞的方法。

【先前技術】

發明背景

奈米粒子的獨特性質可被用來將 DNA 遞送進入細胞中。於所研究的奈米粒子(例如鎢、鋁、鎳等等)之中，金奈米粒子(GNP)似乎是用於 DNA 遞送的優良候選者。低細胞毒性及容易以各種具生物重要性的配位體官能化使得金奈米粒子成為用於轉形的優先選擇。金奈米粒子的大小範圍為 1.2nm-600nm。通常使用的 GNP 合成方式對於 20-400nm 的粒子產生帶負電(例如檸檬酸鹽塗覆)的表面，然而對於 1-10nm 較小範圍的 GNPs 係產生帶正電的表面。具有充分彈性以部分展開其鹼基的質體 DNA 可被暴露於金奈米粒子。在檸檬酸鹽官能化之 GNP 的案例中，質體 DNA 可部分地展開。DNA 骨架上的負電荷夠遠，如此鹼基與金奈米粒子之間的吸引凡得瓦爾(van der Waals)力引起質體 DNA 貼附並塗覆於金粒子表面。然而，在帶正電 GNP 的案例中，靜電及凡得瓦爾力可貢獻於 DNA 的塗覆或貼附。

除金屬奈米粒子以外，3-5nm 大小範圍內的半導體奈米粒子(例如量子點)(“QD”)也已經被用作遞送分子進入細

胞的載體。DNA 及蛋白質可被塗覆或連接至以配位體多官能化的 QD 表面(參見, 例如 Patolsky, F., 等人, J. Am. Chem. Soc. 125, 13918(2003))。藉著使用標準生物結合操作技術(參見, 例如 Pinaud, F., D. King, H.-P. Moore, S. Weiss, J. Am. Chem. Soc. 126, 6115(2004); Bruchez, M., M. Moronne, P. Gin, S. Weiss, A. P. Alivisatos, Science 281, 2013(1998)), 羧酸或胺類多官能化的 QDs 可被交互連接至含硫醇基(參見, 例如 Dubertret B, 等人, Science 298, 1759(2002); Akerman, M. E., W. C. W. Chan, P. Laakkonen, S. N. Bhatia, E. Ruoslahti, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99, 12617(2002); Mitchell, G. P., C. A. Mirkin, R. L. Letsinger, J. Am. Chem. Soc. 121, 8122(1999))或是含 N-羥基琥珀醯亞胺(NHS)酯基的分子。多官能化 QDs 的另一方法係經由與鏈黴素蛋白結合。鏈黴素蛋白與生物素化的蛋白質、寡體或抗體結合(參見, 例如 Dahan M. 等人, Science 302, 442(2003); Pinaud, F., D. King, H.-P. Moore, S. Weiss, J. Am. Chem. Soc. 126, 6115(2004); Dahan M. 等人, Science 302, 442(2003); Wu, X. Y., 等人, Nature Biotechnol. 21, 41(2003); Jaiswal, J. K., H. Mattoussi, J. M. Mauro, S. M. Simon, Nature Biotechnol. 21, 47(2003); 及 Mansson, A., 等人, Biochem. Biophys. Res. Commun. 314, 529(2004))。

奈米粒子已經被用於遞送質體 DNA 至各種動物細胞。已經發現當 DNA 塗覆的奈米粒子與不含細胞壁的細胞一起培養時, 細胞會攝取奈米粒子並開始表現編碼於 DNA 上的基因。當奈米粒子遞送至正常上具有細胞壁的細胞係所欲時, 於粒子添加至原生質體之前, 細胞壁被剝除(參

見，Torney, F.等人，Nature Nanotechnol. 2, (2007)。在植物細胞中，細胞壁作為外源施加之分子遞送的障礙。許多侵入性方法，如基因槍(biolistics)、微注射、電穿孔及農桿菌(*Agrobacterium*)已經被利用於達成基因及小分子遞送進入這些有壁的植物細胞中。遞送小分子及蛋白質橫過細胞壁並進入植物細胞中，對於完整植物之細胞、組織與器官的活體外與活體內操作技術的實現化發展係有利的。

雖然於細菌、酵母菌、動物細胞及苔類已經獲得確認，基因加入-將外來 DNA 引入基因組的預定位置-於高等植物中依然是個重要的挑戰。於植物細胞中，位置-特定的轉殖基因嵌合，與隨機嵌合相較，發生的機率非常地低，即使當引入的 DNA 含有大範圍之與宿主 DNA 同源的序列亦是如此(Halfter 等人 1992；Lee 等人 1990；Mia 及 Lam(1995))。例如，高效率之農桿菌為基礎的轉染系統及除草劑選擇於稻米中造成基因標的頻率高至 5×10^{-4} 。在植物中增強基因標的效率的努力包括負選擇標記的使用，與使用基因改造的植物基因以展現較高的標的頻率。儘管有這些努力，經由非同源過程的隨機 DNA 嵌合對於植物中之基因標的持續地成為主要的阻礙。鑑於標的基因加入未來在用於農業及工業生物技術之作物修飾中的通常利用性，對於這個問題的解決方案係迫切需要的。

在此方面，已經於廣泛範圍之植物及動物模型系統中觀察到，在宿主細胞之基因組的特別位置誘發 DNA 的雙股破裂(DSB)(其刺激同源-指引之 DSB 修補的自然細胞過程)之後，基因標的頻率實質上增加。天然發生之位置特定的內核酸酶(其辨識位置在植物基因組中係稀少的)已經以這

種方式被用於驅動轉殖基因嵌合進入標的序列，這早先係經由隨機嵌合轉送進入植物基因組中的。這些研究強調植物細胞中之標的 DSB 誘發以刺激基因標的的可能性，雖然將 DSB 引入天生位點的挑戰依然存在。

於動物細胞中，經由各種核苷酸序列特異性結合蛋白質(諸如白胺酸拉鍊、鋅指蛋白質等等)，可以解決標的基因組調變/操作的問題。這些蛋白質為與基因調控相關的轉錄因子及/或可用於在天生基因組的位置誘發 DSB。DSB 可由數種不同類型的序列特異性核酸酶(諸如巨核酸酶、白胺酸拉鍊、鋅指蛋白質等等)提供，而且最近可由所發展之這些蛋白質的新穎雜合變體提供。最佳描述之核苷酸特異性結合蛋白質之一為鋅指蛋白質(ZFP)。C2H2 鋅指發現於兩棲類轉錄因子 TFIIIA 中，自此以後，在所有後生動物物種中被發現為係最普通的 DNA 辨識片段。C2H2 ZFP 的 X 射線晶體構造，Zif268，顯示令人驚訝的如音節的蛋白質-DNA 辨識模式，其中各個鋅指在串聯排列內容中特定化 3 或 4 bp 的次位置，暗示著利用此胜肽片段作為具有新穎特異性之 DNA 結合區位之支架的可能性。自此以後，大量被基因改造以結合新穎序列的 ZFPs 已經在許多不同的實驗室中被成功地用於人工轉錄因子及其他官能性雜合蛋白質的內容中。C2H2 鋅指蛋白質區位已經用作序列特異性 DNA 結合的支架(Pavelitch 及 Pabo, 1991)，而且 ZFNs 由含來自第 IIS 型限制內核酸酶 FokI 之序列-獨立性核酸酶區位的融合鋅指蛋白質區位產生(Kim 等人, 1996)。基因改造的 ZFNs 已經在轉形與原始人類細胞中被用於驅動內源性基因組位點的高效率標的(Lombardo 等人, 2007)。

在植物中使用 ZFNs 的初步嘗試已經證明是有希望的 (Lloyd 等人, 2005; Wright 等人, 2005; Maeder 等人, 2008)。攜帶可誘發啟動子控制以及其對應辨識序列之 ZFN 基因的建構體穩定地嵌入阿拉伯芥中, 並且顯示於誘發之後代種子中, 以平均 7.9% 的頻率將來自在辨識位置之非同源端連接的標的突變引入 (Lloyd 等人, 2005)。類似地, 從由以 ZFN 轉形 (設計為切斷 SuRA 位點) 之原生質體再生的 66 株菸草植物中, 3 株顯示在標的位置有來自非同源端連接修補的單一鹼基對去除 (Maeder 等人, 2008)。含直接於鋅指辨識序列兩側漏失 600 bp 之預嵌入、非功能性信息基因的菸草細胞, 當與含對應 ZFN 基因的建構物及同源於包括漏失之 600 bp 之預嵌入序列的供給者 DNA 共轉形時, 顯示信息基因之同源-指引修補的證據 (Wright 等人, 2005)。最近, 酵母菌為基礎的分析被用於驗證能夠切斷植物內幾丁質酶基因的 ZFNs (Cai 等人, 2009)。帶有 ZFNs 與供給者 DNA 兩者的建構體 (包括以與內幾丁質酶位點同源之短段為兩側之 pat 抗除草劑基因匣體) 之 Ti 質體的農桿菌遞送技術產生高達 10% 之可以精確進入 ZFN 切斷位置之標的、同源-指引的轉殖基因嵌合。必須注意的是, 其他基於 C3H1 設計的鋅指設計已經顯示於植物中 (Shukla 等人, 2009, Cai 等人 2009)。

【發明內容】

發明概要

本發明關於一種使用奈米粒子以非侵入性遞送序列特异性核酸酶進入含細胞壁之植物細胞的方法。

以下實施例與系統、工具與方法一起描述, 其等係例

示及說明的，並不限制本發明範圍。

依據本發明，提供一種將序列特異性核酸酶引入植物細胞的方法，該方法包括：提供含細胞壁的植物細胞；以至少一序列特異性核酸酶塗覆奈米粒子；放置含細胞壁的植物細胞及序列特異性核酸酶塗覆的奈米粒子 使其等彼此接觸；讓序列特異性核酸酶塗覆的奈米粒子被攝取進入含細胞壁的植物細胞內。

除了描述於上的例示面向及實施例之外，進一步面向及實施例經由下述的說明將更為明顯。

圖式簡單說明

第 1 及 2 圖分別表示組胺酸-標籤的(1)及非組胺酸標籤的(2)ZFN-IL1 FokI 的 E.coli 表現。

第 3 圖表示 IL-1 鋅指-FokI 融合蛋白質刺激之染色體間的同源重組；其中 A 代表標的載體及 B 代表含重構 GFP 基因的重組體。

第 4 圖表示質體 pDAB1585 的簡圖。

第 5 圖表示 BY2-E 單一細胞株，顯示出細胞繁殖 2 小時後 GNP 媒介的 YFP 內化；小圖 A(FITC)、B(若丹明(Rhodamine))、C(DIC)、D(A+B)、E(A+B+C)、F(反向的反射影像)：YFP 內化係經由螢光顯微術觀察。黃色箭頭表示細胞質中含 YFP(擴散及集中於細胞核中)之活單一細胞中的內化。橘色箭頭顯示胞漿收縮細胞中的內化，其中細胞內收縮的原生質體質量顯示加強的螢光，表示細胞中的 YFP 內化。此細胞被發現於與活細胞相同的焦點平面，該活細胞被置於其他活細胞附近但位在其他活細胞下方，聚集多量顆粒及 YFP 螢光的細胞顯示，在長時間螢光顯微術

檢查下細胞的死亡。

第 6 圖表示巨核酸酶 I-SceI 蛋白質刺激之染色體間同源重組；其中 A 代表標的載體及 B 代表含重構 GFP 基因的重組體。

第 7 圖表示質體 pDAB100375 的簡圖。

【實施方式】

發明之詳細說明

在以下的說明及圖表中使用一些術語。為了提供對於說明書及申請專利範圍(包括將要給與此等術語的範圍)清楚及一致的了解，因而提供下述的定義：

回交。回交為其中育種者重複地使雜交後代回去交配親代之一者的過程，例如，第一世代雜交種 F1 與 F1 雜交種之親代基因型之一交配。

胚胎。胚胎為含在成熟種子內的小植物。

奈米粒子。一種具有至少一奈米等級尺度(通常少於 100nm)的顯微粒子。適用於本發明的奈米粒子可具有 1nm - 0.4 μ m 的大小。量子點可具有 1nm-10nm，較佳地 2-4nm 的中等直徑。用於本申請案的奈米粒子包括，但不限於，金奈米粒子、鎢奈米粒子、金塗覆奈米粒子、多孔奈米粒子、中多孔奈米粒子、矽石奈米粒子、聚合物奈米粒子、明膠奈米粒子、奈米殼、奈米核、奈米球、奈米柱、磁性奈米粒子、半導體奈米粒子、量子點、奈米基質、樹狀分子奈米基質與其等的組合。

量子點。量子點為一種半導體奈米粒子，其限制傳導帶電子、價電帶電洞或激子(傳導帶電子及價電帶電洞的結合對)朝所有的三個空間方向移動。此種限制可能係由於靜

電電位(外部電極、摻雜、應力、雜質所產生)，不同半導體材料之間介面存在(如在核-殼奈米晶體系統中)，半導體表面(如半導體奈米晶體)存在或這些組合的緣故。量子點可具有個別量子化的能量光譜。對應的波函數係空間地位於量子點內，但是延伸超過晶體晶格的許多節段。量子點含有小限定的數目(1-100 級)的傳導帶電子、價電帶電洞或激子(亦即限定數目的基本電荷)。

奈米-基質包括，但不限於，樹狀分子。樹狀分子為類球形或球形奈米粒子，其等被基因改造以攜帶包埋於其等內部空間中或貼附至其等表面上之分子。分子重複分支狀分子；分支讓表面及大量材料間可進行多價交互作用。樹狀分子的實例為球狀陽離子性聚胺基胺(PAMAM)串級聚合物。這些聚合物由表面的一級胺及內部的三級胺組成。此類的樹狀分子經熱處理而在溶劑分解的溶劑中部分地降解，藉此形成較少的立體限制與較大的彈性。樹狀分子的高度正電加速與 DNA 的靜電交互作用，而且彈性結構允許樹狀分子當結合至 DNA 時緊密存在，而當從 DNA 釋放時得以膨脹。由於樹狀分子的正電與彈性結構特性可以增加轉染或轉形的效率。樹狀分子可購自 Qiagen(Qiagen, Germantown, MD)，樹狀分子以 Superfect™轉染試劑(Cat # 301305)的型式於市場上向大眾供應。

多官能化的。除非另有特別指明，術語"多官能化的"將用於描述單官能化或多官能化的奈米粒子。單官能化的粒子指稱單一類型的官能基已經化學地結合於其上的官能化奈米粒子或奈米粒子凝聚體。多官能化的粒子指稱至少兩種(可能三種以上)不同類型之官能基已經化學地結合於

其上的奈米粒子或奈米粒子凝聚體。

抗除草劑。抗除草劑劑量指稱在會阻止生長及/或導致非抗性植物無法存活之活性成分的劑量下，植物依然存活(即植物不會被殺死)的能力。在一些案例中，耐受性植物可能會暫時黃化或呈現一些除草劑引起的傷害(例如，過度分蘗及/或生長抑制)，但是會恢復。

穩定化的。穩定化的指稱相同品種之自交植物從一世代至次一世代再現性地傳遞的植物特性。

攝取。攝取指稱粒子或基質，諸如奈米粒子(例如金、樹狀分子或量子點)橫過細胞壁或細胞膜而轉換位置，其中不會發生僅因為該粒子被攝取之細胞以外的其他東西施加動量至該粒子就發生轉換位置。僅因為施加動量至粒子就引起粒子橫過細胞壁或細胞膜而轉換位置之裝置或方法的非限制性實例為基因槍(biolistic)、基因槍(gene gun)、微注射及/或穿染(impalefection)技術。

核酸。術語"核酸"、"聚核苷酸"及"寡核苷酸"可交替使用並指稱去氧核糖核苷酸、核糖核苷酸聚合物或其他核苷酸或核苷聚合物，呈線狀或環狀構形，及成單股或雙股型式。為本發明之故，這些術語不該解釋為關於聚合物長度的限制。該術語可涵括已知的天然核苷酸的類似物，以及鹼基、糖基及/或磷酸部分(例如，硫代磷酸酯骨架)經修飾的核苷酸。通常，特別核苷酸的類似物具有相同鹼基對特性；亦即 A 的類似物將會與 T 結合為鹼基對。

染色體。染色體為染色質複合體，其包括所有或部分的細胞基因組。細胞基因組常常以其核型為特徵，核型係包括細胞基因組之所有染色體的集合。細胞基因組可包括

一或多個染色體。"離合染色小體"為複製的核酸、核蛋白複合體或其他包括非細胞之染色體核型一部分之核酸的構造。離合染色小體的實例包括質體與某些病毒基因組。"可趨近區域"為細胞染色質中的位置，其中存在於核酸中的標的位置可為辨認標的位置之外源分子所結合。不想被任何特別理論所束縛，據信可趨近區域並未被包進核小體構造中。可趨近區域的個別構造常常可藉由其對於化學及酵素性探針(例如，核酸酶)的敏感性而偵測。"標的位置"或"標的序列"係界定一部分核酸的核酸序列，如果用於結合的狀況充分存在的話，結合分子將會結合至該部分的核酸。例如，序列 5"-GAATTC-3'係 Eco RI 限制內核酸酶的標的位置。

基因。基因，為本發明之故，包括編碼基因產物的 DNA 區域，以及所有調節基因產物生成的 DNA 區域，不論此種調控序列是否鄰接著編碼及/或轉譯序列。據此，基因包括，但不必然限於，啟動子序列、終結子、轉譯調控序列(諸如核糖體結合位置及內核糖體進入位置)、加強子、抑制子、絕緣子、邊界元素、複製起始點、介質貼附位置及位點控制區域。

表現。術語表現或基因表現可交替使用，並指稱將包含於基因中的訊息轉換成為基因產物。基因產物可為基因(例如 mRNA、tRNA、rRNA、反義 RNA，核酶，結構 RNA 或其他任何形式的 RNA)的直接轉錄產物或 mRNA 轉譯所生的蛋白質。基因產物也包括經由諸如頂蓋化、聚腺苷化、甲基化及編輯過程修飾的 RNAs，及經由例如甲基化、乙醯化、磷酸化、泛素化、ADP-核糖基化、十四烷基化及醯化

改質的蛋白質。基因表現的"調變"指稱基因活性的改變。表現調變可包括，但不限於，基因活化及基因抑制。

蛋白質。術語"多肽"、"胜肽"及"蛋白質"可交替使用以指稱胺基酸殘基的聚合物。該術語也應用於胺基酸聚合物，其中一或多個胺基酸係對應於天然生成胺基酸的化學類似物或改質衍生物。

序列。術語"序列"指稱任何長度的核苷酸序列，其可為 DNA 或 RNA，可為線狀、環狀或分支狀且可為單股或雙股。術語"供給者序列"指稱插入基因組的核苷酸序列。供給者序列可為任何長度，例如介於 2 及 25,000 核苷酸長度之間(或介於其間或超過其上的任何整數)，較佳地介於約 100 及 5,000 核苷酸長度(或介於其間的任何整數)，更佳地介於約 200 及 2,500 核苷酸長度之間。

同源序列。同源序列指稱與第二序列分享一定程度序列相同性的第一序列，且其序列可以與第二序列完全相同。"同源，非同一序列"指稱與第二序列分享一定程度序列相同性的第一序列，但其序列其序列與第二序列不完全相同。例如，包括突變體基因之野生型序列的聚核苷酸與突變體基因序列係同源且非同一。在某些實施例中，兩序列之間同源的度足以讓其等之間使用正常細胞機制而發生同源重組。兩同源非同一序列可為任何長度 且其等的非同源程度可小至單一核苷酸(例如，藉由標的同源重組來校正基因組的點突變)或大至 10 以上的仟鹼基(例如，用以將基因插入於染色體的預定位置中)。包括同源非同一序列的兩聚核苷酸不需要為相同長度。例如，可以使用介於 20 及 10,000 核苷酸或核苷酸對之間的外源聚核苷酸(亦即供給

者聚核苷酸)。

重組。重組指稱兩聚核苷酸間的遺傳訊息交換過程。為本發明之故，"同源重組(HR.)"指稱例如發生於細胞中雙股破裂之修補期間的此種交換的特別化型式。此過程需要核苷酸序列同源，使用"供給者"分子以作為"標的"分子(亦即歷經雙股破裂者)修補的模板，並以各種方式稱作"非交換基因轉換"或"短序列基因轉換"，因為它使得遺傳訊息從供給者轉送至標的。不想被任何特別理論限制，此種轉送可牽涉形成於破裂標的與供給者之間之非互補雙螺旋 DNA 的不相符修正，及/或"合成依賴性的股結合"(SDSA)，其中供給者被用於再合成將成為標的一部分的遺傳訊息，及/或相關過程。此種特別化的 HR 常常導致標的分子序列的變異，使得供給者聚核苷酸的部分或所有序列被嵌合標的聚核苷酸中。

切斷。"切斷"、"誘發雙股破裂"及"剪斷"可互相交換使用並指稱 DNA 分子共價骨架的破裂。切斷可以各種方法開始，包括，但不限於，磷酸二酯鍵結的酵素或化學水解。單股切斷及雙股切斷都是可能的，雙股切斷可為兩個別單股切斷事件的結果。DNA 切斷會導致鈍端或是交錯端的產生。在某些實施例中，融合多肽用於標的雙股 DNA 的切斷。"切斷區位"包括具有 DNA 切斷之催化活性的一或多個多肽序列。切斷區位可包含於單一多肽鏈中或切斷活性可來自兩(或多個)多肽的結合。"切斷半區位"為與第二多肽(相同或不同的)結合而形成含切斷活性(較佳地，雙股切斷活性)複合體的多肽序列。雙股破裂及雙股切斷可交換使用。

染色質。染色質係包括細胞基因組的核蛋白構造。細胞染色質包括核酸(主要為 DNA)與蛋白質(包括組織蛋白及非組織蛋白的染色體蛋白質)。大部分真核細胞染色質以核小體型式存在，其中核小體核仁包括結合上八單元體的大約 150 鹼基對的 DNA，該八單元體包括兩組的組織蛋白 H2A，H2B，H3 及 H4；及連接者 DNA 於核小體核仁之間延伸(依據有機體不同而其長度不同)。組織蛋白 HZ 分子通常上與連接者 DNA 結合。為本發明之故，術語"染色質"意謂包含原核及真核兩者之所有類型的細胞核蛋白。細胞染色質包括染色體以及離合染色小體染色質。

結合。結合指稱巨分子(例如蛋白質及核酸)間的序列特異性、非共價交互作用。並非所有結合交互作用的組份都必須是序列特異性(例如，與 DNA 骨架上的磷酸殘基接觸)，只要該整體的交互作用係序列特異性即可。此種交互作用的特徵為通常上解離常數(Kd)係 10^{-6}M 以下。"親合性"指稱結合的強度：越高的結合親合性則 Kd 越低。

操作地連結。術語"操作地連結"及"操作連結的"(或"可操作連結的")可互換使用來指稱兩或多個組份(諸如序列元素)的交互並置，其中配置該組份使得兩組份具有正常功能並且讓至少一組份可以媒介作用在其他組份之至少一者上的功能。藉由說明，若轉錄調控序列對一或多個轉錄調控因子的存在或不存在起反應而控制編碼序列的轉錄程度的話，轉錄調控序列(諸如啟動子)操作性地連接至編碼序列。轉錄調控序列通常上與編碼序列操作地連接，但不需要直接靠近它。例如，加強子為操作地連接至編碼序列的轉錄調控序列，即使它們不是相鄰的。關於融合多肽，術語"操

作地連接"可指稱各個組份在與其他組份連接時，仍能實行與其未連接其他組份時相同的功能的事實。例如，關於 ZFP DNA-結合區位融合至切斷區位的融合多肽，若在融合多肽中，ZFP DNA-結合區位部分能結合其標的位置及/或其結合位置，同時切斷區位能夠切斷標的位置附近的 DNA，則 ZFP DNA-結合區位與切斷區位係操作地連結。

序列特異性核酸酶(SSN)-包括數類能夠辨識特異及獨特核苷酸序列(天生或改製的辨識位置)的雙功能性蛋白質，諸如，但不限於，巨核酸酶、白胺酸拉鍊及鋅指蛋白質。巨核酸酶代表在二價金屬離子(Ca、Mn、Mg)存在下能以高特異性切斷雙股 DNA 的酶家族。然而，其等與限制內核酸酶不同之處在於它們的辨識性質及構造(Belfort, M. Roberts RJ. 尋蹤內核酸酶：使房子保持整齊；Nucleic Acid Research, 1997, 25: 3379-3388)。特別地，限制酶辨認短核酸序列(3-8bp)，巨核酸酶辨認較長序列(12-40bp)-就 DSB 對準標的而言，其提供改善的特異性(Mueller, JE, Bryk, M. Loizos, N. Belfort M. 尋蹤內核酸酶。於 Nucleases 2nd 版。Linn, SM, Lloyd, RS, Roberts, RJ(Eds)冷泉港實驗室出版社：1993111-143)。白胺酸拉鍊-為牽涉許多真核調控蛋白質中之蛋白質-蛋白質交互作用的一類蛋白質，該真核調控蛋白質均為與基因表現相關之重要轉錄因子。白胺酸拉鍊指稱跨越包括動物、植物、酵母菌等界生物之這些轉錄因子所共享的共同結構片段。白胺酸拉鍊由結合至特定 DNA 序列的兩多肽(均二聚體或異二聚體)形成，其以白胺酸殘基均勻間隔排列的方式穿過 α -螺旋，使得兩多肽的白胺酸殘基終止於相同的螺旋面上。

鋅指 DNA 結合蛋白質。鋅指 DNA 結合蛋白質，ZFP，(或結合區位)係一種蛋白質，或較大蛋白質內的一區位，其經由一或多個鋅指以序列特異性的方式結合 DNA，鋅指為其構造係經由鋅離子配位穩定化之結合區位內的胺基酸序列區域。術語鋅指 DNA 結合蛋白質常簡稱為鋅指蛋白質或 ZFP。鋅指結合區位可被"基因改造"以結合至預定的核苷酸序列。基因改造鋅指蛋白質之方法的非限制性實例為設計與選擇。經設計的鋅指蛋白質係一種不存在於自然界的蛋白質，它的設計/組成主要來自合理的準則。用於設計的合理準則包括在現存 ZFP 設計及結合數據之資料庫儲存資訊中之處理資訊的取代規則及電腦化運算應用。參見，例如，美國專利 6,140,081；6,453,242；6,534,261；及 6,785,613；亦參見 WO 98153058；WO 98153059；WO 98153060；WO 021016536 及 WO 031016496；與美國專利 6,746,838；6,866,997；及 7,030,215。

基因組的序列。基因組的序列包括那些出現在染色體、離合染色小體、胞器基因組(例如粒腺體、葉綠體)、人工染色體及細胞中出現的任何其他類型核酸中的序列，細胞中出現的任何其他類型核酸，諸如，例如，大的序列雙微體染色體與內生性或感染性細菌及病毒的基因組。基因組的序列可為正常(亦即野生型)或突變體；突變體序列可包括，例如，插入、去除、轉換位置、25 重組及/或點突變。基因組的序列也可包括數個不同對偶基因之一。

植物細胞。植物細胞包括，但不限於，單子葉植物(單子葉)或雙子葉植物(雙子葉)或藻類或苔類細胞。單子葉的非限制性實例包括穀類植物 諸如玉米、稻米、大麥、燕麥、

小麥，高粱，黑麥、糖美椰(sugarmaye)、鳳梨、洋蔥、香蕉及椰子。双子葉的非限制性實例包括菸草、番茄、向日葵、棉花、甜菜、馬鈴薯、萵苣、瓜類、豆類、美藥拉(mayola)(油菜籽)、及苜蓿。植物細胞可來自植物的任何部分及/或來自植物發育的任何階段。

感興趣的區域。感興趣的區域為核酸聚合物的任何區域，諸如，例如，基因或者基因內或鄰近基因的非編碼序列，其中它被期待去結合外源分子。結合可能為了標的 DNA 切斷及/或標的重組之目的。感興趣的區域可出現於例如染色體、離合染色小體、胞器基因組(例如粒腺體、葉綠體)、質體、感染病毒基因組或任何其他核苷酸序列。感興趣的區域可在基因編碼區域內、轉錄的非編碼區域內(諸如，例如，引導序列、拖曳序列或內含子)或非轉錄的區域內(不論在編碼區域的上游或下游)。感興趣區域的長度可小至單一核苷酸對或高至 25,000 核苷酸對，或任何整數值的核苷酸對。

依據本發明實施例，提供一種將序列特異性核酸酶引入包含細胞壁之植物細胞的方法，該方法包括置放序列特異性核酸酶塗覆奈米粒子使其與植物細胞接觸並讓其橫過植物細胞壁而被攝取。在本發明的特別面向，奈米粒子可為任何奈米粒子而且可逆地或不可逆地含有、被塗覆有、或結合至及/或攜帶有鋅指核酸酶及/或巨核酸酶。在某些實施例中，與含細胞壁之植物細胞接觸之前或是與引入奈米粒子至含細胞壁的植物細胞同時，鋅指核酸酶可被引入奈米粒子。可用於本發明實施例之奈米粒子的實例包括，但不限於，金、量子點、金塗覆奈米粒子、多孔奈米粒子、

中多孔奈米粒子、矽石奈米粒子、聚合物奈米粒子、鎢奈米粒子、明膠奈米粒子、奈米殼、奈米核、奈米球、奈米柱、磁性奈米粒子、半導體奈米粒子、量子點、奈米基質、樹狀分子及/或其等的組合。

依據本發明實施例，含細胞壁的植物細胞可為任何包含完整或整個細胞壁的植物細胞。本發明實施例可包括含細胞壁的細胞，其等可來自任何組織或任何可以發現它們的地方，包括但不限於，胚胎、分生細胞、癒傷組織、花粉、葉、花藥、根、根尖、花、種子、莢果、莖、懸浮培養液與組織培養液。

於本發明特別實施例中，SSN 可為任何依據本發明被遞送至植物細胞的 ZFN。例如，ZFNs 可包括包括切斷區位(或切斷半區位)及鋅指結合區位的融合蛋白質，編碼這些蛋白質的聚核苷酸，與多肽及編碼多肽之聚核苷酸的組合。鋅指結合區位可包括一或多個鋅指(例如 2、3、4、5、6、7、8、9 或更多鋅指)，且可被基因改造以結合至任何感興趣的區域。因此，經由辨識想要切斷或重組之感興趣的標的區域，人們依據此處揭露的方法可建構一或多個包括切斷區位(或切斷半區位)及鋅指區位的融合蛋白質，其中鋅指區位被基因改造以辨認該感興趣區域的標的序列。此種融合蛋白質(或蛋白)於細胞中的存在將導致融合蛋白質結合至其等的結合位置並切斷該感興趣的區域或切斷感興趣區域的附近。更且，若與感興趣區域同源的外源聚核苷酸也出現在此種細胞中，雙股破裂之核苷酸序列及外源聚核苷酸之間將會發生高速率的同源重組。

於特別實施例中，提供至少一 SSN 至細胞將包括經由

奈米粒子直接提供一或多個複本的 SSN 蛋白質至細胞。在其他實施例中，提供至少一 SSN 至細胞包括將含有編碼 SSN 之核酸的奈米粒子提供與細胞，並且讓細胞從編碼 SSN 的核酸中產生 SSN。

在其他實施例中，提供給細胞的一或多個 SSNs 能夠切斷(個別地或與其他 SSNs 合作地)一或多個感興趣的區域或一或多個感興趣區域的附近。於特別實施例中，一或多個感興趣的區域將位在高度、更高度、非常高度或最高度表現之蛋白質的編碼序列內。於一些實施例中，一或多個感興趣的區域將靠近及/或位在一位點內，該位點包括編碼高度、更高度、非常高度或最高度表現之蛋白質的核苷酸序列。在其他實施例中，核苷酸序列可雙股破裂於單一感興趣的區域中。在又一實施例中，核苷酸序列可雙股破裂於兩或多個感興趣的區域。於特別實施例中，一或多個雙股破裂將位在高度、更高度、非常高度或最高度表現之蛋白質的編碼序列中。在其他實施例中，一或多個雙股破裂將靠近及/或位在一位點內，該位點包括編碼高度、更高度、非常高度或最高度表現之蛋白質的核苷酸序列。

於一至少兩雙股破裂的特別實施例中，修補雙股破裂將包括移除雙股破裂之間的材料並重接核苷酸序列的端點以切除雙股破裂間的序列。在一實施例中，切除的序列可，不受限地，包括編碼所有或部分編碼高度、更高度、非常高度或最高度表現之蛋白質之核苷酸序列的序列。在又一實施例中，切除的序列可，不受限地，包括影響高度、更高度、非常高度或最高度表現之蛋白質表現的調控序列。在此種實施例中，相對於切斷之前的表現程度，高度、更

高度、非常高度或最高度表現之蛋白質的表現降低。

於至少兩雙股破裂的另一實施例中，修補雙股破裂將包括移除雙股破裂間的材料，以供給者序列替換而用供給者序列取代雙股破裂間的序列。在其他實施例中，移除的序列可，不受限地，包括編碼全部或部分編碼高度、更高度、非常高度或最高度表現之蛋白質的核苷酸序列的序列。在又一實施例中，移除的序列可，不受限地，包括影響高度、更高度、非常高度或最高度表現之蛋白質表現的調控序列。於此種實施例中，相對於切斷之前的表現程度，高度、更高度、非常高度或最高度表現之蛋白質的表現降低。

在一個雙股破裂的實施例中，修補雙股破裂包括將供給者序列插入或橫過雙股破裂中。在某些實施例中，供給者序列可插入高度、更高度、非常高度或最高度表現之蛋白質的編碼序列中。在一實施例中，此種序列的插入會經由框架中(in-frame)停止密碼的出現(於一非限制性實例中)而打斷高度、更高度、非常高度或最高度表現之蛋白質之編碼序列的轉錄。在又一實施例中，供給者可，不受限地，打斷影響高度、更高度、非常高度或最高度表現之蛋白質表現之調控序列的功能。在實施例中，相對於切斷前的表現程度，高度、更高度、非常高度或最高度表現之蛋白質的表現降低。

在又一實施例中，供給者序列可編碼感興趣的蛋白質。在又一實施例中，來自供給者序列之感興趣蛋白質的表現可被調控序列控制、調控，或是操作地連接至調控序列，該調控序列存在於供給者序列中及/或該調控序列存在

於供給者序列插入的序列中。於另外實施例中，編碼感興趣蛋白質的核酸序列將與供給者序列分別地或共同地提供給細胞。於一些實施例中，供給者序列可與編碼感興趣蛋白質的序列均包含在相同核酸分子中。

在其他實施例中，編碼高度、更高度、非常高度或最高高度表現之蛋白質的核苷酸序列(於一非限制性實例中)將位於基因組、質體、黏接質體、人工染色體、離合染色小體或細胞內其他核苷酸構造中。

本方法的實施以及此處揭露組成物的製備及使用，除非另有指明，否則使用分子生物學、生化學、染色質結構及分析、計算化學、細胞培養、重組 DNA 與相關領域之習於此藝者所熟知的傳統技術。這些技術被充分解釋於文獻中。參見，例如，Sambrook 等人，分子選殖：實驗手冊，第二版，冷泉港實驗室出版社，1989，與第三版，2001；Ausubel 等人，分子生物學的現行操作技術，John Wiley & Sons，New York，1987 及定期更新；酵素學方法系列，Academic Press，San Diego；Wolffe，染色質結構與功能，第三版，Academic Press，San Diego，1998；酵素學方法，第 304 冊，"染色質"(P.M. Wassarman 與 A. P. Wolffe 編輯)，Academic Press，San Diego，1999；及分子生物學方法，第 119 冊，"染色質操作技術"(P.B. Becker 編輯)，Humana Press，Totowa，1999。

核酸遞送至植物細胞的技術

如上所述，DNA 建構體可以各種傳統技術被引入所要植物宿主的(例如基因組)中。瀏覽此等技術，參見，例如，Weissbach & Weissbach，植物分子生物學方法(1988，

Academic Press, N.Y.) 第 VIII 組, pp. 421-463; 及 Grierson & Corey, 植物分子生物學(1988, 第 2 版), Blackie, London, Ch. 7-9。

例如, 使用諸如植物細胞原生質體之電穿孔及微注射技術可將 DNA 建構體直接引入植物細胞的基因組 DNA 中, 或者使用基因槍方法(諸如 DNA 粒子轟炸)可將 DNA 建構體直接引入植物組織中(參見, 例如 Klein 等人(1987) *Nature* 327: 70-73)。或者, DNA 建構體可與合適的 T-DNA 側翼區域結合並且引入傳統的農桿菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 宿主載體中。農桿菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 媒介的轉染技術, 包括除害(disarming)及使用二元載體, 均充分描述於科學文獻中。參見, 例如 Horsch 等人(1984) *Science* 233: 496-498, 與 Fraley 等人(1983) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 80: 4803。

此外, 基因轉送可利用非農桿菌細菌或病毒, 諸如根瘤菌 (*Rhizobium sp.*) NGR234、青根瘤菌 (*Sinorhizobium meliloti*)、中根瘤菌 (*Mesorhizobium loti*)、馬鈴薯病毒 X、花椰菜鑲嵌病毒及木薯葉脈鑲嵌病毒及/或菸草鑲嵌病毒而完成, 參見, 例如 Chung 等人(2006) *Trends Plant Sci.* 11(1): 1-4。

再者, 融合至奈米粒子或序列特異性核酸酶的細胞穿透性胜肽可用於遞送核苷酸或蛋白質序列進入植物細胞。細胞穿透性胜肽可與奈米粒子、核苷酸序列或蛋白質一起表現、分離及官能化而用於植物細胞內部的遞送技術。能夠官能性地遞送分子進入植物細胞的細胞穿透性胜肽為習於此藝者所熟知並包括, 但不限於: TAT(Chugh 等人, (2008)

FEBS 275 : 2403-2414) ; R9(Chang 等人(2005) Plant Cell Physiol 46(3) : 482-488 及 Chen 等人(2007) FEBS Lett 581(9) : 1891-1897) ; MPG(Ziegler 等人(2008) Adv Drug Deliver Rev 6 : 580-597 及 Morris 等人(1997) Nucleic Acids Res. 25 : 2730-2736) ; PEP1(Henriques 等人 (2005) BioChemistry-US 44(3) : 10189 -10198) ; 及植物衍生的細胞穿透性胜肽。

當細胞被使用二元 T DNA 載體(Bevan (1984) Nuc. Acid Res.12 : 8711-8721)或共培養步驟(Horsch 等人(1985) Science 227 : 1229-1231)的細菌感染時，農桿菌 (*Agrobacterium tumefaciens*)宿主的毒性功能將引導建構體及相鄰標記插入植物細胞 DNA 中。通常上，農桿菌轉染系統係用於基因改造双子葉植物(Bevan 等人(1982) Ann. Rev. Genet.16 : 357-384 ; Rogers 等人(1986) Methods Enzymol.118 : 627-641)。農桿菌轉染系統也可用於轉形，以及轉送，DNA 至單子葉植物及植物細胞。參見美國專利第 5,591,616 號 ; Hemalsteen 等人(1984) EMBO J 3 : 3039-3041 ; Hooykass-Van Slogteren 等人(1984) Nature 311 : 763-764 ; Grimsley 等人(1987) Nature 325 : 1677-179 ; Boulton 等人(1989) Plant Mol. Biol.12 : 31-40. ; 與 Gould 等人(1991) Plant Physiol. 95 : 426-434。

另一基因轉送及轉染方法包括，但不限於，經由鈣-、聚乙二醇(PEG)-或電穿孔-媒介之裸 DNA 攝取的原生質體轉染(參見 Paszkowski 等人(1984) EMBO J 3 : 2717-2722 , Potrykus 等人(1985) Molec. Gen. Genet.199 : 169-177 ; From 等人(1985) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 82 : 5824-5828 ; 及

Shimamoto(1989) *Nature* 338 : 274-276)與植物組織的電穿孔(D'Halluin 等人(1992) *Plant Cell* 4 : 1495-1505)。其他植物細胞轉染方法包括微注射、碳化矽媒介的 DNA 攝取(Kaeppler 等人(1990) *Plant Cell Reporter* 9 : 415-418)，及微拋體轟炸(參見 Klein 等人(1988) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 85 : 4305-4309；及 Gordon-Kim 等人(1990) *Plant Cell* 2 : 603-618)。

揭露的方法及組成可被用以將外源序列插入植物細胞基因組的預定位置。對於該引入植物基因組之轉殖基因的表現嚴格地依賴其併合位置的事實這是相當有用的。據此，編碼例如養分、抗生素或治療分子的基因可藉標的重組被插入有利於其等表現的植物基因組區域中。

藉上述任一轉染技術產生的轉染植物細胞將被培養以再生整棵擁有轉染基因型的植物並因而獲得所要的表現型。此種再生技術組織依賴在培養成長液中操作某些植物生長激素，典型上依賴已經與所要核苷酸序列一起引入的殺生物劑及/或除草劑標記。來自培養之原生質體的植物再生描述於 Evans 等人，植物細胞培養手冊中的"原生質體分離及培養"，pp.124-176，Macmillian 出版公司，New York，1983；與植物及植物原生質體的結合與再生，pp. 21-73，CRC Press，Boca Raton，1985。再生也可得自植物癒傷組織、外植體、器官、花粉、胚胎或其等的部份。此種再生技術通常描述於 Klee 等人(1987) *Ann. Rev. of Plant Phys.* 38 : 467-486。

引入植物細胞的核酸可被用於對基本上任何植物供應所要的性狀。利用本發明的核酸建構體與各種上述的轉染

方法，各式各樣植物及植物細胞系統可被基因改造而獲得此處描述之所要的生理及農藝特性。在較佳實施例中，用於基因改造的標的植物及植物細胞包括，但不限於，單子葉植物及雙子葉植物，諸如作物，包括穀粒作物(例如小麥、玉米、稻米、小米、大麥)，水果作物(例如番茄、蘋果、梨子、草莓、橘子)，飼料作物(例如苜蓿)，根類蔬菜作物(例如胡蘿蔔、馬鈴薯、甜菜、山藥)，葉用蔬菜作物(例如萵苣、菠菜、甘藍)；開花植物(例如矮牽牛、玫瑰、菊花)，針葉樹及松樹(例如松木杉木、雲杉)；用於植物修復的植物(例如重金屬累積性植物)；油類作物(例如向日葵、油菜籽、大豆、棕櫚)與用於實驗目的的植物(例如阿拉伯芥)。因此，揭露的方法及組成得用於寬廣範圍的植物，包括，但不限於，來自蘆筍屬、燕麥屬、莖苔屬、柑橘屬、西瓜屬、辣椒屬、南瓜屬、胡蘿蔔屬、大豆屬、棉屬、大麥屬、萵苣屬、番茄屬、蘋果屬、樹薯屬、煙草屬、稻屬、酪梨屬、豌豆屬、梨屬、李屬、蘿蔔屬、黑麥屬、茄屬、高粱屬、小麥屬、葡萄屬、豇豆屬及玉蜀黍屬的種。

習於此藝者將可認知到，當表現匣體穩定地嵌合轉殖植物且確認可以運作之後，它可藉性狀雜交被引入其他植物。依據要被雜交的種類不同，可使用多種標準培育技術的任一種。

藉由選擇或篩選該經基因改造植物材料的性狀(其係由出現在轉染 DNA 上之標記基因所編碼)，轉染的植物細胞、癒傷組織、組織或植物可被確認與分離。譬如，經由將基因改造的植物材料成長於含抑制數量之抗生物劑或除草劑(轉染基因建構體得以對抗該等抗生物劑或除草劑)的

培養皿上而實行選擇。更且，也可藉由篩選任何出現於重組核酸建構體上的可見標記基因(例如 β -葡萄糖醛酸酶、螢光素酶，B 或 C1 基因)的活性而確認轉染植物及植物細胞。此種選擇及篩選方法習於此藝者均熟知。

物理及生化方法也可被用於確認含插入基因建構體的植物或植物細胞轉染體。這些方法包括，但不限於：1)用於偵測或決定重組體 DNA 插入物結構的南方分析或 PCR 放大；2)用於偵測及檢查基因建構體之 RNA 轉錄體的北方印漬法、引子-延伸或反轉錄酶-PCR 放大；3)偵測酶或核酶活性的酵素分析，其中此種基因產物為基因建構體所編碼；4)蛋白質膠體電泳、西方印漬技術、免疫沉澱或酶-連接免疫分析，其中基因建構產物為蛋白質；5)單一核苷酸多形性偵測技術、侵入分析、高溫定序、solexa 定序。其他技術，諸如原位雜交、酵素染色及免疫染色也可被用於偵測重組建構體在特定植物器官與組織中的存在及表現。進行這些分析的方法為習於此藝者所熟知。

使用此處揭露方法之基因操作的效果可經由例如分離自感興趣組織的 RNA(例如 mRNA)的北方印漬而觀察。典型上，若 mRNA 數量已經增加，則可假設對應的內源基因正在以比先前更快的速率表現。亦可使用測量基因活性的其他方法。依據所使用基質與反應產物或副產物增加或減少偵測方法的不同，可以使用不同類型的酵素分析。此外，蛋白質表現的程度可以免疫化學法分析，亦即習於此藝者熟知的 ELISA、RIA、EIA 及其他基於抗體的分析，諸如經由電泳偵測分析(以染色或者西方印漬法)。轉殖基因可選擇地表現於植物的一些組織中或一些發生階段中，或轉殖基

因可實質地隨著它的整個生命週期表現於實質上所有的植物組織中。然而，任何組合式的表現模式也是可以適用的。

本發明也涵括上述轉殖植物的種子，其中該種子具有轉殖基因或基因建構體。本發明更涵括上述轉殖植物的後代、選殖體、細胞株或細胞，其中該後代、選殖體、細胞株或細胞具有轉殖基因或基因建構體。

應用

揭露之標的切斷的方法及組成可被用以誘發基因組序列的突變。標的切斷將也用於產生基因剔除或基因敲掉產物(例如，功能性基因組或標的生效)並加速序列的標的插入基因組中(亦即，序列敲進)。插入可藉著同源重組所生之染色體序列的替換(於非限制性實例中)，或是藉由標的嵌合，其中新序列(亦即未出現於感興趣區域的序列)被插在預定的標的位置而完成。在某些實例中，此種新序列的兩側具有與染色體中感興趣區域同源的序列，相同方法將也用於以突變體序列取代野生型序列或將一對偶基因轉換為不同的對偶基因。

感染或嵌合植物病原菌的標的切斷可被用於治療植物宿主中的病原性感染，例如，藉由切斷病原菌的基因組使得其病原性降低或除去。此外，編碼植物病毒受體基因的標的切斷可被用於阻止此種受體的表現，因而防止病毒感染及/或病毒於植物中的散佈。

例示植物病原菌包括，但不限於，植物病毒諸如 *Alfarno* 病毒、*Alphacrypto* 病毒、*Badna* 病毒、*Betacypto* 病毒、*Bigemini* 病毒、*Bromo* 病毒、*Bymo* 病毒、*Capillo* 病毒、*Carla* 病毒、*Carrno* 病毒、*Caulimo* 病毒、*Closterio* 病毒、

Como 病毒、*Cucurno* 病毒、*Cytorhabdo* 病毒、*Diantho* 病毒、*Enamo* 病毒、*Faba* 病毒、*Fiji* 病毒、*Furo* 病毒、*Hordei* 病毒、*Hybrigemini* 病毒、*Idaeo* 病毒、*Ilawiruses*、*Ipomo* 病毒、*Luteo* 病毒、*Machlomo* 病毒、*Maclura* 病毒、*Marafi* 病毒、*Monogemini* 病毒、*Nana* 病毒、*Necro* 病毒、*Nepo* 病毒、*Nucleorhabdo* 病毒、*Oryza* 病毒、*Ourmia* 病毒、*Phytoreo* 病毒、*Potex* 病毒、*Poty* 病毒、*Rymo* 病毒、*satellite WAS*、*satelli* 病毒、*Sequi* 病毒、*Sobemo* 病毒、*Tenui* 病毒、*Tobamo* 病毒、*Tobra* 病毒、*Tornbus* 病毒、*Tospo* 病毒、*Tricho* 病毒、*Tymo* 病毒、*Umbra* 病毒、*Varicosa* 病毒及 *Waika* 病毒；真菌病原菌，諸如黑穗菌(例如 *Ustilaginales*)、銹病菌(*Uredinales*)、麥角菌(*Claviceps purpurea*)及白粉菌；黴菌(*Oomycetes*)，諸如馬鈴薯枯萎病菌(*Phytophthora infestam*)；細菌性病原菌，諸如伊文氏桿菌(例如 *E. herbicola*)、假單胞菌(例如 *P. aeruginosa*、*P. syringae*、*P. fluorescens* 及 *P. putida*)、青枯菌(例如 *R. solanacearum*)，農桿菌及黃單孢菌；線蟲(*Nematoda*)；與植潛蠅(*Polymyxa* 及 *Plasmodiophora*)。

用於感興趣蛋白質之標的重組生產的揭露方法可被用於以非同一序列取代任何基因組的序列。例如，突變體基因組的序列可被其野生型對應物取代，因而提供治療植物疾病；提供對抗植物病原菌；增加作物產量等等的方法。以類似方式，使用此處揭露的標的重組方法基因的一對偶基因可被不同對偶基因所取代。

在許多這些案例中，感興趣的區域包括突變，而且供給者聚核苷酸包括對應的野生型序列。類似地，野生型基

因組的序列可被突變體序列取代，如果想要的話。例如，致癌基因的過度表現可藉由使該基因突變或是以較低、非病原性表現程度的序列取代其控制序列而反轉。事實上，以任何方式利用此處揭露的方法及組成，任何依賴特別基因組序列的病原性均可被改正或減輕。

標的切斷、插入、剪除及/或重組也用於改變非編碼序列(例如調控序列，諸如啟動子、加強子、複構始原區、終結子、接合位置)以改變基因產物的表現程度。此種方法可被用於，例如治療目的、功能性基因組及/或標的有效性的研究。

染色質構造的標的修飾可用於加速融合蛋白質與細胞染色質的結合。於其他實施例中，除了或並非此處揭露的鋅指-切斷區位融合體之外，鋅指結合區位及重組酶(其等的功能片段)之間的一或多個融合體可被使用以加速標的重組。參見，例如，共有之美國專利第 6,534,261 號及 Akopian 等人(2003) Proc. Natl. Acad. Sci. USA100: 8688-8691。於另外的實施例中，揭露的方法及組成被用以提供 ZFP 結合區位與轉錄活化或抑制區位的融合體，該轉錄活化或抑制區位需要二聚體化(均二聚體或者異二聚體)以獲得活性。在這些案例中，融合多肽包括鋅指結合區位及功能區位單體(例如來自二聚體轉錄活化或抑制區位的單體)。兩此種融合多肽與適當定位之標的位置的結合允許二聚體化，如此重構功能性轉錄活化或抑制區位。

更且，如以上揭露的，此處記載的方法及組成可被用於將外源序列標的嵌合細胞基因組的感興趣區域中，例如其中切斷強化經由同源-依賴性機制的插入(例如供給者序

列的插入包括外源序列加上一或多個序列，該一或多個序列與預定基因組序列(亦即標的位置)是同一或是同源但非同一)。

供給者序列在外源序列兩側的區域可含有充足的同源性以支持基因組序列中雙股破裂的同源性引導修補，藉此在基因組標的位置插入外源序列。所以，供給者核酸可為任何足以支持外源序列藉同源-依賴性修補機制(例如同源重組)而嵌合的大小。不想被任何特別理論束縛，外源序列兩側的同源區域被認為可將含有雙股破裂位置之再合成遺傳訊息的模板提供給破裂的染色體端。在某些實施例中，兩同一序列或兩同源但非同一序列(或各自之一)出現於外源序列兩端。外源序列(或外源核酸或外源聚核苷酸)為一種含有非正常出現在感興趣區域的核苷酸序列。

例示外源序列包括，但不限於，cDNAs、啟動子序列、加強子序列、表位標示、標記基因、切斷酶辨識位置及各種類型的表現建構體。參見，例如，美國專利第 6,833,252 號。另外的例示尋的內核酸酶包括 I-CeuI、PI-PspI、PI-Sce、I-SceIV、I-CsmI、I-PanI、I-SceII、I-PpoI、I-SceIII、ICreI、I-TevI、I-TevII 及 I-TaiIII。它們的辨識序列已知。亦請參見美國專利第 5,420,032 號；Belfort 等人(1997) *Nucleic Acids Res.* 25: 3379-3388；Dujon 等人(1989) *Gene* 82: 115-118；Perler 等人(1994) *Nucleic Acids Res.* 22, 1125-1127；Jasin(1996) *Trends Genet.* 12: 224-228；Gimble 等人(1996) *J. Mol. Biol.* 263: 163-180；Argast 等人(1998) *J. Mol. Biol.* 280: 345-353 及 New England Biolabs 目錄。

標記基因包括，但不限於，編碼媒介抗抗生素之蛋白

質的序列 (例如抗安比西林、抗新黴素、抗 G418、抗嘌呤黴素), 編碼彩色或 螢光或冷光蛋白質的序列(例如綠螢光蛋白質、強化綠螢光蛋白質、紅螢光蛋白質、螢光素酶), 及媒介增強細胞生長及/或基因放大的蛋白質(例如二氫葉酸還原酶)。因此, 例示標記基因包括, 但不限於, β -葡萄糖醛酸酶(GUS)、草丁膦 N-乙醯轉送酶(PAT、BAR)、新黴素磷轉送酶、p-內醯胺酶、鄰苯二酚雙氧化酶、 α -澱粉酶、酪胺酸酶、P-半乳糖苷酶、螢光素酶、水母發光蛋白、EPSP 合成酶、腓水解酶、乙醯乳酸合成酶(ALS)、二氫葉酸還原酶 (DHFR)、茅草枯(dalapon)脫鹵酶及鄰氨基苯甲酸合成酶。在某些實施例中, 標的嵌合被用於插入 RNA 表現建構體, 例如負責調節微 RNA 或 siRNA 表現的序列。啟動子、加強子與其他轉錄調控序列, 如上所述, 也可嵌合 RNA 表現建構體中。

傳統轉形作用使用外來 DNA 的隨機嵌合以產生經修飾的轉殖作物植物, 這些轉殖作物植物具有在一些國外市場遭遇嚴格限制的選擇性狀。此外, 不想要的結果也來自 DNA 引入方法或是來自轉殖基因的隨機插入基因組的敏感地帶(常常每基因組好幾次)。特別地, 不精確插入的影響在早期世代不會自我顯明, 因為不同的 DNA 錯誤-檢查機制於生長、生殖、胚胎形成與發生期間才會活化。這些結果對於農業生技中之任一轉殖計畫的時間與金錢花費造成影響。然而, 在最近陶氏農業科學(Dow AgroSciences)的發明中(WO/2008/021207), 一種經由鋅指核酸酶(ZFN)媒介的同源重組而精確插入轉殖基因的方法被描述。相反地, 在 ZFN 蛋白質可以在標的有機體之外表現及純化, 然後遞送進入

標的植物細胞中的地方，如外科手術般的特定突變/基因剔除可經由非同源端接合(NHEJ)被誘發。因此，本發明可產生繞道避過轉殖作物限制的非轉殖基因修飾的植物，而且無須轉殖方法亦將可進行標的基因的編輯過程。

序列特異性核酸酶蛋白質(諸如 ZFN 蛋白質)的異源表現方法為習於此藝者所熟知。適用的表現系統包括，但不限於：使用活體外系統，諸如不含小麥胚芽細胞系統(參見美國專利第 7,235,382 號，嵌合此處作為參考)；螢光假單胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)表現系統(Madduri 等人，(2007) Protein Express Purif, 55(2): 352-360)；及畢赤酵母(*Pichia*)蛋白質表現系統(參見美國專利第 4,683,293；4,808,537；4,812,405；4,818,700；4,837,148；4,855,231；4,857,467；4,879,231；4,882,279；4,885,242；4,895,800；4,929,555；5,002,876；5,004,688；5,032,516；5,122,465；5,135,868；5,166,329 號，嵌合此處作為參考)。

本發明的特別實施例包括結合至奈米粒子(NP)之外源表現的功能性 ZFN，其經由 NP 媒介的聰明及隱密遞送技術方法被遞送進入完整的植物細胞中以誘發雙股破裂，並藉由 NHEJ 回復被打斷基因的功能性。在其他實施例中，結合至 NP 的功能性 ZFN 經由 NP 媒介之聰明及隱密遞送技術方法而與供給者片段 DNA 一起遞送。其中 ZFN 切斷基因組內的特定序列，而且供給者 DNA 經同源重組被嵌入這個位點。將蛋白質連接到 NP 的策略得採取四個主要方法(1)靜電吸附，(2)結合至 NP 表面上的配位體，(3)結合至蛋白質可辨認及結合的小輔因子分子，及(4)直接結合至 NP 表面(Aubin-Tam 及 Hamad-Schifferli, 2008)。其他策略描

述於 Medintz 等人的評論中。關涉這些標示策略的議題包括空間位阻，或蛋白質是否可‘越過’配位體至 NP 表面或相關的連接基團。選擇導致特定連接(亦即不會引起強烈交互連接)而且對於所要目的係穩定的化學也是必要的考量。ZFN 胜肽必須在高 DDT 濃度及鋅離子存在下官能化。為了保持結合體的穩定性，將依據 Oh 等人，2010 所述的結合步驟進行官能化。

藉由以下說明實例，本發明將進一步描述。

實例

實例 1:經由活體外轉譯或細菌表現而生產序列特異性核酸酶(SSNs)

SSNs(IL1-LO/Fok1、IL1-43/Fok1、IL1-8/Fok1 及 I-SceI)由含 SSNs、附加限制酶位置及 6x 組胺酸標籤的質體中被基因改造及 PCR 放大。PCR 產物插入 TOPO 載體 pCR2.1 以進行選殖及定序。含 SSN 編碼序列基因片段經限制消化從質體上移除並接合至表現載體 pET15b 的相容限制位置。這些樣品隨著 pDAB4883 轉形進入 BL21 表現勝任 *E.coli* 細胞中。為了有效表現，藉著由 pCOT4 表現質體組成的質體 pDAB4883 轉形 BL21，使得 SSN 蛋白質的損壞在 BL21 *E.coli* DNA 中降低，該 pCOT4 表現質體含有在也由 IPTG(異丙基-β-D-硫代半乳糖苷)誘發之啟動子基因下游的接合酶。此有助於修補在過度表現期間 SSNs 對於 BL21 細胞基因組所造成的任何損壞。

接合酶基因-pCOT4 建構體及 SSN-pET15b 建構體共轉形進入相同的 BL21 表現細胞中。轉殖 BL21 的培養物於含氯黴素、卡比西林及 ZnCl_2 的 50mL LB 培養液中成長並在

37°C 繁殖直到 OD_{600nm} 達到 0.5。以各種濃度的 IPTG(0.1-0.7mM)誘發表現，於各種溫度(16-28°C)下繁殖並經由 SDS-PAGE 及西方印漬法分析以偵測 SSN 蛋白質的存在。因此，IL1-LO/Fok1、IL1-43/Fok1、IL1-8/Fok1 及 I-SceI 表現於 *E. coli* 細胞中且經 Ni-NTA-純化。純化後，基於從表現質體中釋出特定片段的能力，顯示 SSN 的功能。

或者，序列特異性核酸酶經由活體外轉譯而表現。購自 Promega 的商業套組，TNT®，提供對於表現性蛋白質有效率及便利的檢測方法。選殖於 T7 或者 SP6 RNA 聚合酶啟動子下游之含序列特異性核酸酶基因的環狀質體，藉該套組所供應的蛋白質表現酶於活體外表現。依循製造者操作技術，合成的蛋白質於 60-90 分鐘內產生於 50 µL 的反應中。另外的商業套組亦可取得而用於活體外轉譯蛋白質，除了其他商業上可購得的套組之外，可使用的另外套組包括：Ambion 的 ActivePro™，Ambion 的蛋白質 cript™ II，New England Biolabs 的 PURExpress™。

第 1 及 2 圖顯示組胺酸-標籤的 SSN(ZFN-IL1Fok1)(1) 及非組胺酸標籤的 SSN(ZFN-IL1Fok1)(2)的 *E. coli* 表現。活體外-表現的 ZFN-IL1Fok1 從質體釋放界定良好之以 ZFN-結合位置-為兩側的片段。因此，*E. coli* 以及活體外-表現的 SSNs 兩者對於標的 DNA 分子的有效率及特定消化均是有用的，而且它們於本研究整個過程中被交替地使用。

選殖的 SSN 基因表現的蛋白質顯示為係具功能的(亦即在切斷供給者 DNA 方面係具功能的)。例如，質體 pDAB1585(顯示於第 4 圖)以 ZFN-IL1Fok1 處理。經消化的質體 DNA 被線狀化。來自 ZFN-IL1Fok1-消化之質體的

線狀化片段然後從膠質中純化並使用隔夜的活體外接合步驟而自我-接合。接合產物被轉送進入化學勝任的 DH5α *E. coli* 細胞中。數個重組菌落被回復並以限制圖案分析及 DNA 定序兩者分析，顯示該 pDAB1585 消化物係如預期的。

實例 2 - 含 SSN 結合位置(其兩側有 GFP 信息基因片段)之標的細胞培養物的生產

標的序列由兩綠螢光蛋白質(*gfp*)基因片段(Evrogen Joint Stock Company, Moscow, Russia)組成，其兩側有 β-葡萄糖醛酸酶(*uidA*)表現匣體。於一標的建構體中，含辨識序列的 ZFN 結合位置被嵌入標的建構體中，該辨識序列由鋅指-FokI 融合蛋白質可結合成為均二聚體的反向重複序列組成(第 3 圖)。結合位置包含 IL1-FokI 融合蛋白質之辨識序列的四個串聯重複序列，如此各結合位置的大小約 ~200 bp 以確保在複雜的染色質環境中鋅指-FokI 融合蛋白質可趨近辨識序列。於第二建構體中，I-SceI 結合位置嵌入標的建構體中(第 6 圖)。於各標的建構體中，結合位置在 N-端與 *uidA* 編碼序列融合。5' 及 3' *gfp* 基因片段重疊 540 bp。這些重疊的序列於標的序列內提供同源性，而且停止密碼被插入在 5' *gfp* 片段的 3' 端以確保不會有來自標的序列的功能性 *gfp* 轉錄。

標的序列使用農桿菌(*Agrobacterium*)轉形穩定地嵌入 BY2 菸草細胞懸浮培養物中。BY2 培養物(得自日本菸草的 Jun Ueki, Iwata, Shizuoka, Japan)維持於含 LS 基礎鹽類、170 mg/L KH₂PO₄、30 g/L 蔗糖、0.2 mg/L 2,4-D 及 0.6

mg/L 硫胺素-HCL 的 pH 6.0 的培養皿中(PhytoTechnology Labs, Shawnee Mission, KS, #L689)。藉由將 0.25mL PCV 添加至維持在旋轉搖晃器上之 250-mL 燒瓶(25°C 及 125 RPM)中的 50mL 之 LS-為基底的培養液中, BY2 細胞每 7 天進行次培養。為了產生含嵌入標的序列的轉殖 BY2 細胞培養液, 一燒瓶的四天後次培養懸浮液被分成 10-12 個之 4mL 分液, 其等共培養於含 100 μ l 農桿菌菌株 LBA4404 的 100x25mm 的 Petri dishes 培養皿中隔夜成長至 OD₆₀₀ ~1.5, 該農桿菌菌株帶有 pZFN-標的 pDAB1585(第 4 圖)或帶有 pI-SceI-標的 pDAB100375(第 7 圖)。培養皿以 Nescofilm[®](Azwel Inc., Osaka, Japan)包封並於 25°C 下無搖晃繁殖 3 天, 其後過多液體被移除且以含 500 mg/L 卡比西林的 11mL 的 LS 培養液取代。接著再次懸浮菸草細胞, 1mL 的懸浮液被分注於 100x25 mm 的 LS 培養盤上, LS 培養基含有 500mg/L 卡比西林及 200 mg/L 潮黴素並以 8 g/L 的 TC 瓊脂固化(PhytoTechnology, Shawnee Mission, KS)。培養盤未包封地於 28°C 黑暗中繁殖。此形成用於單一處理的 120-144 選擇盤。個別的抗潮黴素分離體在塗盤後第 10-14 天出現並被轉送至個別的 60x20 mm 盤中(一盤一分離體), 其中於 14 天的次培養計畫中, 它們在選擇的狀況下呈癒傷組織而維持, 直到被用於分析及後續的再轉形實驗。

藉由將~250-500mg 的癒傷組織放入 40-50mL 之含 100 mg/L 潮黴素的 LS 基礎培養液中, 並如上所述的, 每 7 天為次培養, 則含單一、全部長度嵌入複本之標的序列的抗

潮黴素、轉殖細胞培養液被選擇並用於重新起始懸浮液培養液。

細胞群聚及單一細胞兩者(如 DAS 單一細胞專利申請案，WO/2008/083233 所描述者生產)被用於實驗。實驗前 3 至 4 天，藉著將 2mL BY2 懸浮凝聚體轉送入 40mL 的 LSBY2 培養液(於 250-mL 燒瓶中，含有原液濃度之 4-氯-1,5-二苯基-1H-吡唑-3-基氧)-乙酸乙基酯(如專利 WO/2008/083233 所描述者)、1-3%甘油及 0.05-0.1%(v/v) DMSO)，而將一星期老的懸浮培養液次培養至新鮮培養液。於處理以誘發單一細胞之後 3.5 天或者 7 天，收集單一細胞。BY2 單一細胞經處理通過流動細胞儀以決定細胞的存活性，而且經由共焦點顯微術評估細胞的穩定性。藉由觀測背景螢光的程度(若存在的話)偵測穩定性。少百分比的細胞顯示符合死細胞的背景螢光，表示背景螢光係來自進行壞死作用的細胞。於測試背景螢光之後，單一細胞及規則懸浮凝聚兩者用於實驗中。

實例 3-用於遞送進入植物細胞之含 SSNs 的塗覆奈米粒子 (NP)

大小為 150nm 直徑的金膠體(BBI International，GC150)、5-((2-(及-3)-S(乙醯巰基)琥珀醯基)胺基)螢光素(SAMSA 螢光素：Invitrogen，A-685)、大小 80 及 90nm 之羧酸多官能化的金膠體奈米粒子 (TedPella，32019)、磺酸基-NHS(N-羥基磺酸基琥珀醯亞胺)，EDC(1-乙基-3-[3-二甲基胺基丙基]碳二亞胺鹽酸)(Pierce Biototechnology，24510，22980)、MES(2-[N-嗎啉基]乙烷磺酸)(Fisher Scientific，AC32776-1000)、磷酸鹽緩衝鹽水緩衝小包(Sigma，

P5368-10PAK)、組胺酸標籤的 GFP(Evrogen, 激發最大-482nm, 發射最大-502nm, FP611)、渦輪 (turbo) YFP(Evrogen, 激發最大-525nm, 發射最大-538nm, FP611)、碘化丙錠 (Sigma- P4864)、二乙酸螢光素酯(Sigma, F7378) 為各種經 SSNs 塗覆並用於遞送進入標的細胞培養液的多官能化 NP 類型。

(i) 奈米粒子結合體的製備

(a) 用於控制組處理之無 SSNs 之金-螢光素結合體的合成：以先前描述的方法製備金-螢光素結合體(Cannone 等人, 2006)以在 BY2 群聚或單一細胞中遞送及追蹤無 SSNs 的粒子。1mg 的 SAMSA 螢光素溶於 100 μ l 的 0.1 M NaOH 並劇烈震盪 15 分鐘以移除保護硫醇乙醯基團。活化的 SAMSA 然後與 100 μ l 的 150nm 金膠體($\sim 10^9$ 粒子/mL)混合。此溶液然後反應 1 小時以確定反應完全。其後 50 μ l 的 1M HCl 加入以中和溶液。溶液在 3000 RPM 離心 30 分鐘, 而且移除上清液。所得的黃色小粒再懸浮於 200 μ l 的 0.1 M PBS 中, 形成橘色溶液。重複此純化步驟兩次以確定移除自由的 SAMSA 螢光素。SAMSA 貼附至金的模式主要係經由硫醇結合。由於顯著的靜電相斥(SAMSA 在 pH>7 時為二負離子), SAMSA 被認為係保持與金膠體表面垂直(Cannone 等人, 2006)。此種 NP 被用於追蹤該等進入細胞之螢光素粒子的進入數目而作為給定狀況下細胞順從性表示的測量。

(b) 以 SSN 塗覆之金奈米粒子(GNP)的合成：使用稍加修改之 Grabarek 及 Gergely, 1990 所描述的操作技術合成 GNP-SSN 結合體。0.25mL 的 20-150nm 羧酸多官能化的金

膠體溶液($\sim 10^9$ 粒子/mL)於 3000 RPM 下離心 10 分鐘。傾倒上清液後，紅色小粒懸浮於 1mL 活化緩衝液中(0.1 M MES, 0.5 M NaCl, pH 6.0)。其後，0.4 mg EDC 及 1.1 mg 磺胺基-NHS 加入此溶液中並於室溫下劇烈震盪 15 分鐘。然後，添加 9 μ l 的 ZFN-IL1Fok1，所得的溶液於室溫下黑暗中反應達 2 小時以使得蛋白質及金完全反應。用於此反應之金膠體與蛋白質的比例由所發現之出現在金膠體上的羧酸數目決定。首先，出現於一金膠體上的羧基數目經由一金粒子(假設為球形)的表面面積除以一羧基所佔據的表面(0.20nm^2 (Kimura, 等人, 2002))計算而得。然後，此結果乘以出現之金膠體的全部數目以得到出現於整個金膠體溶液中的總羧基數目。此等於出現在給定數量之蛋白質中的胺基數目。經由出現於金膠體上的羧酸與出現於蛋白質上的胺基之間形成醯胺鍵結，金膠體貼附至蛋白質(Grabarek 及 Gergely, 1990)。粗估有 127,285 個蛋白質分子繫接至一金奈米粒子。

(ii)細胞處理：

a)金攝取及細胞存活性的時間路徑：以下樣品被製備於 24 孔無菌盤中：(i)500 μ L 的標的懸浮群聚或單一細胞(控制組)；(ii) 500 μ l 的 BY2 懸浮群聚或單一細胞+20 μ L 的 GNP+25 μ l 的二醋酸螢光素酯(FDA)+ 25 μ l 的碘化丙錠；及 (iii)其他處理包括 40、60、80 μ l 的 GNP 單獨及在 ZFN-IL1Fok1 與細胞及細胞存活性菌株結合中。經處理樣品於 5、20、120 分鐘及最後 24-48 小時後在螢光顯微鏡下檢查以確認細胞存活性。

b)金-SAMSA 螢光素處理：以下樣品於實驗前被製備

於 24 孔無菌盤中：(i)500 μ l 的標的懸浮群聚或單一細胞(控制組)；(ii)500 μ l 的標的懸浮群聚或單一細胞+20 μ l 的 SAMSA-螢光素(控制組)；及(iii)標的懸浮群聚或單一細胞+20 μ l 的 GNP-SAMSA-螢光素經處理，且懸浮液於室溫下黑暗中反應 20 分鐘以確認粒子的進入。

c)GNP 塗覆(例如標籤的)ZFN-IL1FokI 處理-以下樣品於細胞或懸浮群聚處理之前被製備於 24 孔無菌盤中：(i)500 μ l 的標的懸浮群聚或單一細胞(控制組)；(ii)500 μ l 的標的懸浮群聚或單一細胞+9-20 μ l 的 ZFN(控制組)；及(iii)500 μ l 的單一細胞+10-40 μ l 的 GNP-塗覆(例如標籤的)ZFN-IL1FokI。經處理的細胞及群聚於實驗前在室溫黑暗中反應達 2 小時。

使用 GFP/YFP 繫鏈之 GNPs 的控制處理被包括於所有實驗中以確保非侵入性穿透與在實驗中作為指引的最佳進入時點(參見第 5 圖)。此外，融合細胞穿透性胜肽(CPPs)被融合(例如多官能化)至 NP 以追蹤粒子的真正進入標的懸浮群聚及單一細胞的時間。

實例 4：量子點(QD)-標籤之 SSN 結合體的合成

冷光半導體奈米晶體 QDs 對於許多顯示的生物應用提供有力的原型實例 (Thermes V 等人，2002；Windbichler 等人，2007；Fajardo-Sanchez 等人，2008；Arnould S，等人，2006)。它們的效用來自可與大蛋白質相提並論之獨特光物理特性及大小的組合。親水性 CdSe-ZnS QDs 的流體動力學半徑從~5nm(就與分子配位體交換的奈米晶體頂蓋而言)變化至~20nm(就包封於嵌段共聚物內的奈米晶體而言)(Smith J 等人，2006)。單一 QD 與數生物分子(諸如抗

體、胜肽，DNA)結合以提供強化的親合力與塗覆的 QD 生物結合體。

利用 ZFN-IL1FokI 結合(例如塗覆)至親水性 QDs 以作為加速其等細胞內攝取及遞送至合適標的 DNA 位置的另一策略被描述於此實例中。該方法通常依照用於使 QD-蛋白質貨物內化進入活細胞中的步驟，如描述於 DAS 專利申請案 65502 者。

(i) QD 合成：具有發射最大集中於 510 及 540nm 的 CdSe-ZnS 核-殼 QDs 依詢所描述的步驟，利用熱配位溶劑混合物中有機金屬前驅體的逐步反應而合成(Lu 等人，2007；Doyon 等人 2006；Collins 等人，2003；Lanio 等人，2000)。藉由將天然頂蓋殼(主要由三辛基磷及氧化三辛基磷(TOP/TOPO)組成)與雙官能配位體如前所述地交換，奈米晶體被多官能化且變得親水性 (Lie 等人，2002；Mani 等人，2005；Desjarlais 及 Berg，1993)。使用兩套親水性 QDs：(1)僅以二氫硫辛酸為頂蓋的奈米晶體；及(2)以聚(乙二醇)-附加的二氫硫辛酸(PEG Mw $\approx$ 600，DHLA-PEG)與生物素-終結的 DHLA-聚(乙二醇)(PEG Mw $\approx$ 400，DHLA-PEG-生物素)混合物(配位體莫耳比例 9：1)為頂蓋的奈米晶體。它們分別稱作 DHLA-QDs 及 DHLA-PEG-生物素-QDs。

(ii)量子點生物結合體的自我組合：為了自我組合所要價數的 QD-ZFN-IL1FokI 結合體，適當莫耳比例的 His-ZFN 被加入在 10 mM Tris-Cl pH 8 緩衝液中之 0.3 μ M 之 510-nm 發射的 DHLA-加蓋的 QDs 中，並在室溫下反應 30 分鐘。類似地，b-PE-鏈黴素蛋白被加入磷酸鹽緩衝生理食鹽水(137 mM NaCl，10 mM 磷酸鹽，2.7 mM KCl，pH 7.4，PBS)

中之 0.3 μM 的 540-nm 發射的 QDs(以 9 : 1 比例之 DHLA-PEG : DHLA-PEG-生物素加蓋) 中，並在 4 °C 反應隔夜；此案例中的結合體形成經由鏈黴素蛋白-生物素交互作用所驅動。結合體的特性利用膠體電泳偵測，其中監測與 His-附加之 ZFN 或者鏈黴素蛋白-標記之 b-PE 結合之 QDs 的電泳移動性改變。樣品稀釋於 1×TBE 緩衝液(0.09 M Tris, 0.002 M Na₂-EDTA, 0.09 M 硼酸 pH 8.3)，並且為了探測 QD-b-PE 及 YFP 結合體而分別於 1%或 2% 瓊脂膠進行電泳。特別地，若它們為追蹤而被融合至螢光蛋白質的話，則可監測改變每 QD 生物結合體上 ZFN-IL1FokI 分子數目的效果。藉激化 QD 及/或蛋白質及捕捉膠體內分離帶狀物的螢光影像而收集膠體影像。藉由監測自我組合時，QDs 及螢光蛋白質之間能量轉送的改變確認結合體的形成。螢光光譜收集於利用 325nm 激發之 Tecan Safire 二重單色儀多功能微滴定盤讀取器(Tecan, Research Triangle Park, NC)。為了細胞內遞送及成影實驗，在標稱之 ZFN : QD 莫耳比例下，QDs 與 ZFN-IL1FokI 之混合物自我組合。

(iii)量子點-螢光蛋白質結合體之細胞內攝取：如前所述，於無菌狀況下實行細胞內化實驗。QD 生物結合體被稀釋成為完全培養液，加至細胞培養液，並以 40-150 $\mu\text{g/mL}$ 在 37 °C 下反應 1 小時。由具有組合價數 1 : 1 至 1 : 2.5 的 1 : 5 或是 1 : 10 QD/ZFN 及 QD/b-PE 組成的混合表面 QD 塗覆的結合體，與 CPP(每 QD 含 50 CPPs)一起，和不同 QD 結合濃度下的細胞培養液共同反應。過多的未結合 QD 結合體經由以 PBS 或細胞培養液清洗該培養液至少三次而移除。細胞然後於室溫下以 3.7%聚甲醛固定 10 分鐘，以

PBS 清洗兩次，並安置在含 DAPI 染劑(Invitrogen)的 ProLong Antifade 安置培養皿上以進行核染色。使用 Leica 顯微鏡表面收集螢光影像。側靠側之分開的螢光影像被收集且使用裝有 565nm 二向色濾光器的二重觀測系統定量。就 510nm QD-YFP/ZFN 的細胞攝影而言，樣品在 488nm 激發且收集的發射以 565nm 二色性及解褶積為收集/分離。QD 螢光於 $\lambda < 565\text{nm}$ 收集，及 YFP 螢光尾部於 $\lambda > 565\text{nm}$ 收集。YFP 滲漏進入 QD 窗中被減去作為部分的解褶積。540nm QDs 及 b-PE 於 488nm 激發，而且它們個別的發射以 565nm 二色性濾鏡分離並解褶積。使用 Xe 燈激發 DAPI 螢光且使用 DAPI 立方管(D350/50×用於激發，二色性 400DCLP，D460/50m 用於偵測)收集發射。使用 Xe 燈激發 AF647-TF 且使用 Cy5 立方管(激發 HQ620/60×，二色性 Q660LP，發射 HQ700/75m)進行螢光偵測。激發/偵測立方管由 Chroma Technology 供應。使用明亮光源收集差分干涉對比(DIC)影像。

(iv) ZFN-IL1FokI 塗覆的 QDs 確認：His 的交互作用直接發生在奈米晶體之富含 Zn 的無機表面。含兩(His)₆ 序列之 N-端的基因改造 ZFN-IL1FokI 以小間隔件分離，而且含 N-端(His)序列的 CPP 可以形成緊密的 QD-蛋白質/胜肽複合物。由於其很強的交互作用($KD \sim 10^{-15} \text{ M}$)，生物素-抗生素蛋白的結合作用係習於此藝者所熟知的通用生物結合策略。利用蓋有羥基及生物素-終結之 PEG 混合物的 QDs 表面(DHLA-PEG-生物素-QDs) 可以容易地與商業上可購得的 b-PE-鏈黴素蛋白結合(例如塗覆)。

(v) QD-ZFN-IL1FokI 結合體的細胞內遞送技術：為了

評估塗覆有 YFP/ZFN-IL1Fok1 貨物之多官能化的(例如表面官能化的)QDs 的攝取係經由出現於奈米晶體表面上之 CPP 的媒介，標的 BY2 細胞株分別與三類型結合體一起培養：QD-CPP 結合體(每 QD 含 10-100 CPP)，QD-ZFN-IL1Fok1/CPP，以及和 ZFN-IL1Fok1 與 CPP 之混合物組合的 QDs (QD-ZFN-IL1Fok1-CPP，每結合體具~10 ZFN-IL1Fok1 及~50 CPP)。細胞在 510-nm 發射的 QD 結合體溶液(在~75nm 濃度)下繁殖，濕潤以移除任何未結合材料，而且接著使用表面螢光顯微術照相。細胞也可分別以 DAPI 反染色而讓核及內囊胞被看到。當另外的 CPP 出現於 QD 表面(混合表面 QD-ZFN-IL1Fok1-CPP 結合體)上時，結合體實質上發生細胞內攝取，如同測量兩套細胞所得到之明顯的螢光強度所顯示者。更且，兩培養液所收集的影像顯示在 QD 及 ZFN-IL1Fok1/YFP 螢光圖案之間幾乎具有完全的重合。染色圖案及共定位圖案的評估表示細胞核周圍的分佈，而且大部分侷限於內囊胞隔間之內部。QD 結合體在 CPP 存在下被細胞株有效內化的現象顯示，CPP 有助於以 ZFN-IL1Fok1-螢光融合蛋白質貨物多官能化的(例如表面官能化的) QDs 的細胞內攝取。

單一細胞及凝集群聚以與奈米粒子部分描述之 NP 處理類似的方式處理，而且未經選擇地塗盤，並於實驗之後 2-4 星期監測 GFP 表現菌落的產生。

實例 5-接著 SSN 經由 GNPs 及 QDs 遞送進入菸草細胞之後的同源-指引修補

如上所述，具有嵌入 ZFN 或 I-SceI 結合位置(該結合位置係以繫鏈至粒子的 ZFN-IL1Fok1 或 I-SceI 處理)的標的細

胞株被塗盤於培養皿的培養液上。處理後，細胞被塗盤於未選擇的培養液上。綠色螢光焦點於 7 天後可以見到。為了確認所觀測到的螢光係來自功能性 *gfp* 基因的重新組構，一堆螢光素組織段被分離而且經由數個選擇性次培養過程手工地增殖。從這些螢光素組織分離基因組 DNA 並且以具有定錨在各 *gfp* 基因片段之探針進行 PCR 分析。自 SSN-處理之螢光素組織增量的樣品，當被放大時，產生所預期之 0.6 kb 的 PCR 產物，表示在這些組織中預期的重組現象已經重新建構功能性的 *gfp* 基因。在增量的樣品中也另外觀察到 4.1 kb 的 PCR 產物，表示細胞族群中存在有未重組的信息序列。鑑於用於達到 *gfp*-正值細胞增量之螢光素組織的視覺選擇方法，這並非是不可預期的。

雖然一些例示面向及實施例已經說明於上，但是習於此藝者將會認知某些修改、排列、添加及其等之次組合。所以，想要的是，以下附加的及其後引入的申請專利範圍被解釋為包括所有的此種修改、排列、添加及次組合，因為其等落入本發明申請專利範圍的真正精神及範疇之內。

【圖式簡單說明】

第 1 及 2 圖分別表示組胺酸-標籤的(1)及非組胺酸標籤的(2)ZFN-IL1 FokI 的 *E.coli* 表現。

第 3 圖表示 IL-1 鋅指-FokI 融合蛋白質刺激之染色體間的同源重組；其中 A 代表標的載體及 B 代表含重構 GFP 基因的重組體。

第 4 圖表示質體 pDAB1585 的簡圖。

第 5 圖表示 BY2-E 單一細胞株，顯示出細胞繁殖 2 小時後 GNP 媒介的 YFP 內化；小圖 A(FITC)、B(若丹明

(Rhodamine))、C(DIC)、D(A+B)、E(A+B+C)、F(反向的反射影像)：YFP 內化係經由螢光顯微術觀察。黃色箭頭表示細胞質中含 YFP(擴散及集中於細胞核中)之活單一細胞中的內化。橘色箭頭顯示胞漿收縮細胞中的內化，其中細胞內收縮的原生質體質量顯示加強的螢光，表示細胞中的 YFP 內化。此細胞被發現於與活細胞相同的焦點平面，該活細胞被置於其他活細胞附近但位在其他活細胞下方，聚集多量顆粒及 YFP 螢光的細胞顯示，在長時間螢光顯微術檢查下細胞的死亡。

第 6 圖表示巨核酸酶 I-SceI 蛋白質刺激之染色體間同源重組；其中 A 代表標的載體及 B 代表含重構 GFP 基因的重組體。

第 7 圖表示質體 pDAB100375 的簡圖。

【主要元件符號說明】

(無)

七、申請專利範圍：

1. 一種將序列特異性核酸酶(SSN)引入具有細胞壁之植物細胞的方法，該方法包括：

以 SSN 塗覆奈米粒子，其中該奈米粒子為一樹狀分子奈米基質(dendrimeric nanomatrix)或一塗覆有細胞穿透性胜肽之奈米粒子；

放置該具有細胞壁的細胞及該經塗覆的奈米粒子使其等彼此接觸；及

讓該奈米粒子及該 SSN 攝取進入該包括細胞壁的植物細胞中，其中該攝取不因施加動量至該奈米粒子而發生。

2. 如申請專利範圍第 1 項的方法，其中以 SSN 塗覆奈米粒子包括經由非共價吸收使該 SSN 固定在該奈米粒子的表面上。
3. 如申請專利範圍第 1 項的方法，更包括使吸收該 SSN 進入該奈米粒子中。
4. 如申請專利範圍第 1 項的方法，更包括以次細胞隔間標的性蛋白質(subcellular compartment targeting protein)塗覆該奈米粒子。
5. 如申請專利範圍第 4 項的方法，更包括讓該奈米粒子攝取進入該包括細胞壁之植物細胞的一隔間中。
6. 如申請專利範圍第 4 項的方法，其中該隔間選自由下列組成的群組：細胞質(cytosol)、細胞核、液泡膜(tonoplasts)、色素體(plastid)、黃化質體(etioplast)、雜色體(chromoplast)、白色體(leucoplast)、儲油體(elaioplast)、蛋白質體(proteinoplast)、澱粉體

(amyloplast)、葉綠體(chloroplast)與該雙層膜的內腔。

7. 如申請專利範圍第 1 項的方法，其中該包括細胞壁的植物細胞選自由下列組成的群組：菸草、胡蘿蔔、玉米、菜籽(canola)、油菜籽(rapeseed)、棉花、棕櫚、花生、大豆、稻種(*Oryza sp.*)、阿拉伯芥種(*Arabidopsis sp.*)、蓖麻種(*Ricinus sp.*)及甘蔗細胞。
8. 如申請專利範圍第 1 項的方法，其中該植物細胞來自一組織，該組織選自由下列組成的群組：胚胎、分生組織、癒傷組織、花粉、葉、花藥、根、根尖、花、種子、莢果及莖。
9. 如申請專利範圍第 1 項的方法，其中該奈米粒子選自由下列組成的群組：金奈米粒子、金塗覆奈米粒子、多孔(porous)奈米粒子、中多孔(mesoporous)奈米粒子、矽石奈米粒子、聚合物奈米粒子、鎢奈米粒子、明膠奈米粒子、奈米殼、奈米核(nanocores)、奈米球(nanospheres)、奈米柱(nanorods)、磁性奈米粒子、半導體奈米粒子、量子點、奈米基質、樹狀分子奈米基質與其等的組合。
10. 如申請專利範圍第 1 項的方法，更包括衍生化該奈米粒子的表面。
11. 如申請專利範圍第 1 項的方法，其中該 SSN 為一鋅指核酸酶，其包括具序列獨立性核酸酶區位(sequence-independent nuclease domain)的一鋅指蛋白質。
12. 如申請專利範圍第 11 項的方法，其中該序列獨立性核酸酶區位來自第 IIS 型限制內核酸酶 FokI。
13. 如申請專利範圍第 11 項的方法，更包括選擇含有穩定

嵌入(integrated)之鋅指核酸酶(ZFN)的細胞。

14. 如申請專利範圍第 13 項的方法，其中該選擇的細胞為可再生的細胞。
15. 如申請專利範圍第 14 項的方法，更包括從該可再生的細胞再生一植物。
16. 如申請專利範圍第 1 項的方法，其中該奈米粒子為一多官能化的奈米粒子。
17. 如申請專利範圍第 1 項的方法，其中該奈米粒子為一聚胺基胺(polyamidoamine, PAMAM)樹狀分子奈米基質。
18. 一種具有細胞壁且被一塗覆有 SSN 之奈米粒子轉染的植物細胞，其中該奈米粒子為一樹狀分子奈米基質或一塗覆有細胞穿透性胜肽之奈米粒子，且其中該轉染不因施加動量至該奈米粒子而發生。