

双定位信号增强工程化蛋白线粒体靶向性呈递

周冰倩¹, 李尚朴¹, 王旭¹, 孟祥宇¹, 邓竞荣¹, 邢金良², 王建刚¹,
徐坤¹

1. 西北农林科技大学动物科技学院, 杨凌 712100
2. 空军军医大学肿瘤生物学国家重点实验室, 西安 710000

摘要: 有效传递工程化改造的蛋白进入线粒体对开发高效的线粒体 DNA 编辑工具、实现线粒体疾病精准治疗具有重要意义。本研究选取 *eGFP* 和 *Cas9* 基因, 在其上游或/和下游引入不同的线粒体定位信号(mitochondrial localization signal, MLS)序列, 分别构建了相应的工程化蛋白表达载体。将不同表达载体转染 HEK293T 细胞后, 利用荧光共定位实验和免疫印迹实验分析不同工程化蛋白的线粒体靶向性呈递效果。结果显示, 相比单端添加 MLS 的 *eGFP* 和 *Cas9* 蛋白, 双端 MLS 改造均显著提高了工程化蛋白的线粒体靶向性呈递效率。推测双 MLS 策略可增强工程化蛋白的线粒体靶向性, 为以后开发高效的线粒体 DNA 编辑工具奠定了理论基础。

关键词: 线粒体疾病; 线粒体 DNA 编辑; 工程化蛋白; 线粒体定位信号; 线粒体靶向

Dual-localization signals enhance mitochondrial targeted presentation of engineered proteins

Bingqian Zhou¹, Shangpu Li¹, Xu Wang¹, Xiangyu Meng¹, Jingrong Deng¹, Jinliang Xing², Jiangang Wang¹, Kun Xu¹

1. College of Animal Science and Technology, Northwest A&F University, Yangling 71200, China
2. State Key Laboratory of Tumour Biology, Fourth Military Medical University, Xi'an 710000, China

Abstract: Effective delivery of engineered proteins into mitochondria is of great significance for developing efficient mitochondrial DNA editing tools and realizing accurate treatment of mitochondrial diseases. Here, the candidate genes, *eGFP* and *Cas9*, were engineered with different mitochondrial localization signal (MLS) sequences introduced at their up- or/and down-streams. The corresponding expression vectors for the engineered proteins were constructed respectively, and HEK293T cells were transfected with these vectors. The fluorescence colocalization and Western blotting assays were used to analyze the mitochondrial targeting presentation effect of different engineered proteins. The results demonstrated that the dual-MLS modification of the *eGFP* and *Cas9* proteins significantly improved the efficiency of mitochondrial targeted

收稿日期: 2024-06-12; 修回日期: 2024-09-01; 网络发布日期: 2024-09-04

基金项目: 农业生物育种重大专项 (编号: 2023ZD04074, 2023ZD04051)和肿瘤生物学国家重点实验室开放基金(编号: CBSKL2022ZDKF11) 资助 [Supported by the Biological Breeding-Major Projects (Nos. 2023ZD04074, 2023ZD04051) and the Open Fund Project from State Key Laboratory of Tumor Biology-China (No. CBSKL2022ZDKF11)]

作者简介: 周冰倩, 本科, 专业方向: 动物科学。E-mail: 2770998747@qq.com

通讯作者: 邢金良, 博士, 教授, 研究方向: 线粒体生物学与肿瘤防治。E-mail: xingjl@fmmu.edu.cn

徐坤, 博士, 副教授, 研究方向: 基因编辑工具的开发及研究应用。E-mail: xukun@nwfufu.edu.cn

DOI: 10.16288/j.ycz.24-171

presentation, compared with the engineered proteins with single MLS added. Hence, it is speculated that dual MLS strategy can enhance the mitochondrial targeting of engineered proteins, which lays a theoretical foundation for the future development of efficient mitochondrial DNA editing tools.

Keywords: mitochondrial diseases; mtDNA editing; protein engineering; mitochondrial localization signal; mitochondrial targeting

线粒体是真核生物细胞内不可或缺的细胞器,通过氧化磷酸化(oxidative phosphorylation, OXPHOS)为机体供能,并在细胞凋亡、代谢调节、钙信号传导、类固醇物质合成等多种细胞进程中发挥关键作用^[1]。线粒体 DNA (mtDNA)是一种裸露的双链环状结构,高度紧凑,仅包含 16,569 bp,内含 37 个基因,编码 22 个 tRNA,1 个 16S rRNA,1 个 12S rRNA 及 13 个氧化磷酸化所需的关键多肽^[2,3]。由于其独特的结构特征和活跃表达的需求,mtDNA 具有较高的突变率,导致机体内存在不同程度的突变,进而引发线粒体异质性^[4]。异质性超过一定限度时(即达到阈值,不同突变和突变发生的不同细胞、组织、器官,甚至个体,其阈值皆存在差异),可诱发原发性线粒体疾病(primary mitochondrial diseases, PMDs),这一现象被称为“阈值效应”^[5]。此外,PMDs 的临床表现与受损组织中的突变拷贝数成正比,低于阈值时通常无明显症状,高于阈值则出现严重表型^[6],发病的阈值水平通常在 70%~90%之间,但具体数值受 mtDNA 突变的性质或细胞中 mtDNA 的总量等多个因素影响,较为模糊^[7]。

尽管随着对线粒体疾病的分子遗传学机制、病理过程及临床表现的理解日益加深,研究者不断开发出线粒体替代疗法(mitochondrial replacement therapy, MRT)新型药剂、组织替代基因治疗、缺氧治疗、小分子疗法等一系列新型治疗方法^[8-10],但 these 方法均存在一定局限性。为根治线粒体疾病,一系列基因编辑工具被广泛应用于线粒体基因组的精准修复。早在 2001 年, Srivastava 等^[11]就发现限制性核酸内切酶 *Pst* I 对 mtDNA 的 T8399G 突变具有切割活性,从而实现了在小鼠细胞 mtDNA 异质性的消除。此后,锌指核酸酶(zinc-finger nuclease, ZFN)与转录激活因子样效应物核酸酶(transcription activator-like effector nuclease, TALEN)技术也相继应用于线粒体编辑领域^[12-14]。目前,已有大量研究

表明,经改造后的限制性核酸内切酶、ZFN 与 TALEN 技术可产生 mtDNA 双链断裂,并已在多种人源细胞系及小鼠肝脏、骨骼肌、心脏等器官组织中实现突变 mtDNA 的靶向清除^[11,13],且确认其效果可在生殖系中实现有效传递^[15]。然而应当指出,现有工具如限制性核酸内切酶、ZFN 及 TALEN 等,均存在靶向位点局限,设计繁琐和成本高昂等问题,使其不具备大规模应用的可能^[16,17]。

2020 年, Mok 等^[18]首次将双链 DNA 胞苷脱氨酶 DddA 与转录激活因子样效应物因子(transcription activator-like effector, TALE)融合,设计了 DdCBE 系统,在 mtDNA 上首次实现了特异性的 C·G 到 T·A 的转换,使单碱基编辑进入线粒体基因组编辑领域。2022 年, Cho 等^[19]将 DddA 与 TadA8e 相结合,实现了 mtDNA 从 A·T 到 G·C 的编辑,但进一步研究表明, DdCBE 不仅在线粒体中存在严重的脱靶效应,还可逃逸进入细胞核产生大量的单核苷酸变异(SNV)脱靶效应^[20,21]。在原始的 DdCBE 系统之后所开发出的 DdCBEs(V6)、DdCBEs(V11)^[22]、mito-TALENs^[19]、DdCBE_Ss^[23]等 DddA 衍生的线粒体编辑系统也存在同样问题。这表明,在 DdCBE 碱基编辑器的 N 端加入线粒体靶向信号(mitochondrial localization signal, MTS)不能阻止其进入细胞核。

基于上述现状,本研究在实验室前期研究基础上,设计并构建了不同单端及双端 MLS 修饰的工程化蛋白表达载体,以验证其对线粒体靶向性的提升效果。通过 PCR 扩增、酶切连接及 Sanger 测序验证,成功构建了包含不同 MLS 的 eGFP 和 Cas9 表达载体。采用 HEK293T 细胞进行转染实验,并通过荧光共定位及免疫印迹(Western blot)实验评估蛋白的线粒体靶向效率。结果表明,改造后的工程化蛋白载体能高效靶向线粒体,且双端 MLS 修饰显著提高了 eGFP 和 Cas9 蛋白的线粒体靶向效率,为构建高效线粒体基因编辑工具提供了理论依据。

1 材料与方法

1.1 载体构建

利用实验室前期构建的 pLL3.7-CMV-MLS 作为骨架载体。通过 PCR, 扩增 eGFP 序列, 与骨架载体进行双酶切连接, 构建 pLL3.7-CMV-MLS-eGFP 载体。此外, 为保证在 eGFP 翻译完成后能够及时终止, 在上一步构建好的 pLL3.7-CMV-MLS-eGFP 中, 将 3'UTR 插入 eGFP 序列后, 构建 pLL3.7-UMF-eGFP-3'U。另外, 选取靶向线粒体效率较高的 SOD2 和 COX8A, 通过 PCR 扩增, 插入前面构建好的 pLL3.7-UMF-eGFP-3'U 载体中(图 1)。

为了更好地检验双 MLS 对工程化蛋白靶向线粒体的影响, 将 eGFP 序列替换为 Cas9 序列。选用之前构建好的 pLL3.7-UMF-eGFP-3'U, pLL3.7-UMF-eGFP-S2MU 和 pLL3.7-UMF-eGFP-C8MU 作为骨架载体, 通过 PCR 扩增出 Cas9 片段, 经酶切连接构建出 pLL3.7-UMF-Cas9-3'U, pLL3.7-UMF-Cas9-S2MU 和 pLL3.7-UMF-Cas9-C8MU 载体, 将酶切鉴定正确的质粒送西安奥科生物公司进行测序。

1.2 细胞培养和转染

采用 HEK293T 细胞进行相关细胞实验检测。细胞培养条件均为: 90%DMEM 培养基(Gibco, 美国), 10%FBS (ScienceCell, 北京), 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的青霉素(Sigma, 美国), 95%空气, 5%CO₂(均为体积分数), 温度 37°C。用于提取细胞蛋白的细胞, 在消化时不使用胰酶, 以避免对线粒体蛋白造成损伤。采用 Hieff TransTM 脂质体核酸转染试剂(Invitrogen, 美国)根据说明书步骤进行转染实验: 转染前一天将细胞接种于 6 孔板中, 在细胞密度达到 70%~90%后进行转染, 每孔转染 3 μg 的质粒, 每组最少设置 3 个平行转染孔。

1.3 细胞线粒体纯度检测

将收集到的细胞的 1/2 用于提取线粒体蛋白, 1/2 用于提取浆蛋白和核蛋白。采用细胞线粒体提取试剂盒(Appligen, 北京)根据说明书步骤进行提取, 之后对提取物进行裂解, 获取线粒体蛋白。采用细胞核提取试剂盒(Solarbio, 北京)根据说明书步骤进

行细胞核和细胞质部分的提取分离, 之后对细胞质进行处理, 对细胞核进行裂解, 获得浆蛋白和细胞核蛋白。全程在低温下进行快速操作。

1.4 蛋白靶向效果鉴定

将转染 12 h 再正常培养 48 h 后的细胞进行细胞核 DAPI 染色和线粒体 Mitotracker 染色。加入 37°C 预热的 MitoTracker Red CMXRos 孵育 40 min 进行线粒体染色。在细胞透化后再加入 DAPI(5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)进行细胞核染色。全程在避光条件下进行操作, 以避免荧光淬灭, 影响染色效果。

将提取的线粒体蛋白、核蛋白和浆蛋白进行 SDS-PAGE 电泳, 在电泳前用 OD 仪测出其大概浓度以保证 SDS-PAGE 电泳时各蛋白的上样量基本一致。之后进行 Western blot, 以确定蛋白是否定位在线粒体中, 以及细胞核与细胞质中是否也存在目的蛋白。

1.5 数据统计与分析

所有实验均设置至少 3 个平行重复或独立重复, 通过 FIJI 软件进行数据处理, GraphPad Prism9.5.1 软件进行数据的统计分析, 正态性检验由 Normality and Lognormality Tests 分析完成, 选用 One-way ANOVA (and nonparametric or mixed)进行多重比较, $P < 0.05$, *和**均表示两组数据间有对照差异, 图表绘制由 GraphPad Prism 9.5.1 软件完成。

2 结果与分析

2.1 eGFP 蛋白工程化改造相关表达载体

本实验共构建了 5 组 eGFP 质粒分别作为对照组和实验组(图 1A), 将片段与骨架酶切连接后, 提取重组质粒 pLL3.7-UMF-eGFP-3'U (图 1B)、pLL3.7-UMF-eGFP-S2MU (图 1C)和 pLL3.7-UMF-eGFP-C8MU (图 1D), 3 组均用 *Xho* I 和 *Bam*H I 双酶切, 酶切后电泳产物约为 1930 bp 和 6375 bp 两条带, 经酶切鉴定载体大小无误。将阳性质粒送测序公司测序, 进行序列鉴定, 经比对, 载体构建正确, 进行下一步实验。

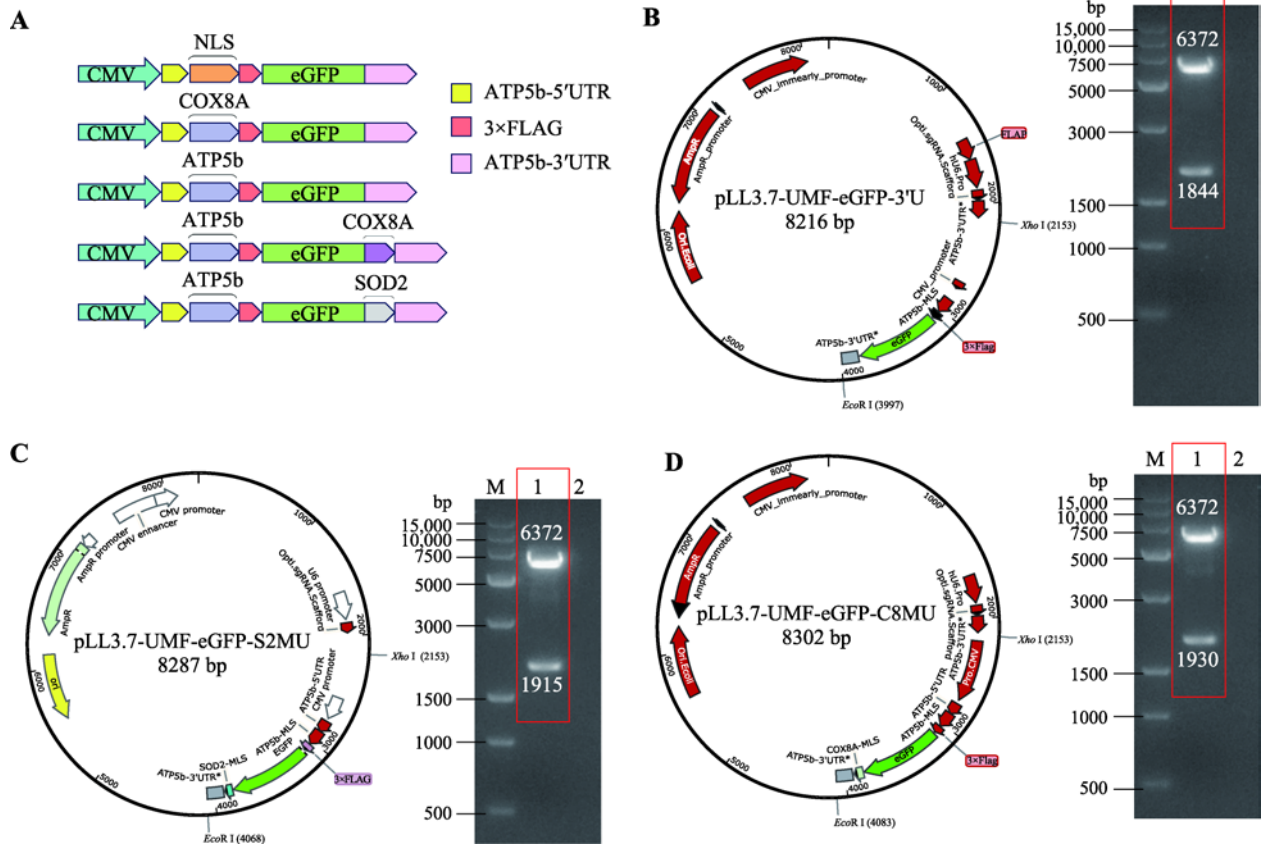


图 1 工程化的 eGFP 质粒图谱及其酶切鉴定结果

Fig. 1 Engineered eGFP plasmid mapping and enzymatic characterization

A: 工程化改造的 eGFP 表达载体; B: pLL3.7-UMF-eGFP-3'U 质粒图谱和酶切鉴定结果; C: pLL3.7-UMF-eGFP-S2MU 质粒图谱和酶切鉴定结果; D: pLL3.7-UMF-eGFP-C8MU 质粒图谱和酶切鉴定结果。M: Marker; 1: 酶切产物; 2: 空白。红色方框内的两条条带为酶切产物。

2.2 荧光共定位实验分析 eGFP 线粒体靶向性

为了验证本实验构建的 eGFP 载体能够高效靶向哺乳动物细胞线粒体, 并检验对工程化蛋白两端加上线粒体定位信号是否能有效提高其靶向效率, 首先将不同的 eGFP 载体转入 HEK293T 细胞中, 在转染 36 h 后对细胞进行细胞核 DAPI 染色和线粒体 mitotracker 染色, 转染 48 h 后进行荧光共定位分析, 通过荧光倒置显微镜观察质粒是否能够成功在细胞中表达(图 2A), 并通过细胞中的荧光共定位结果在 FIJI 软件中进行数据的统计与分析, 在 Prism 软件绘图(图 2B), 初步分析 eGFP 和 Mito Tracker 荧光峰线的重叠性, 进而直观判断不同 MLS 工程化改造对 eGFP 蛋白线粒体靶向性的影响。结果表明: eGFP 载体均成功转入 HEK293T 细胞中并表达(图 2A),

且荧光共定位分析结果表明, 相比于对照组, 引入 MLS 工程化改造的 eGFP 蛋白均具有明显的线粒体靶向性, 且双 MLS 改造的 eGFP 蛋白线粒体靶向性明显较好。综上所述, 双 MLS 工程化改造对 eGFP 蛋白线粒体靶向性可能具有较好的提升作用。

2.3 免疫印迹实验检测 eGFP 线粒体定位效果

为进一步确定双 MLS 对工程化蛋白 eGFP 靶向线粒体效率的影响, 在 eGFP 以及 Cas9 蛋白载体均成功转染 48 h 后, 将 HEK293T 细胞裂解, 进行线粒体蛋白、核蛋白和浆蛋白的提取。通过测量 OD 值及 SDS-PAGE 电泳, 确定各样品浓度后进行免疫印迹试验(图 3A), 通过对细胞线粒体蛋白、核蛋白和浆蛋白与抗体结合的条带进行分析, 确定提取蛋白的准确性以及蛋白在细胞中的定位, 并通过 FIJI

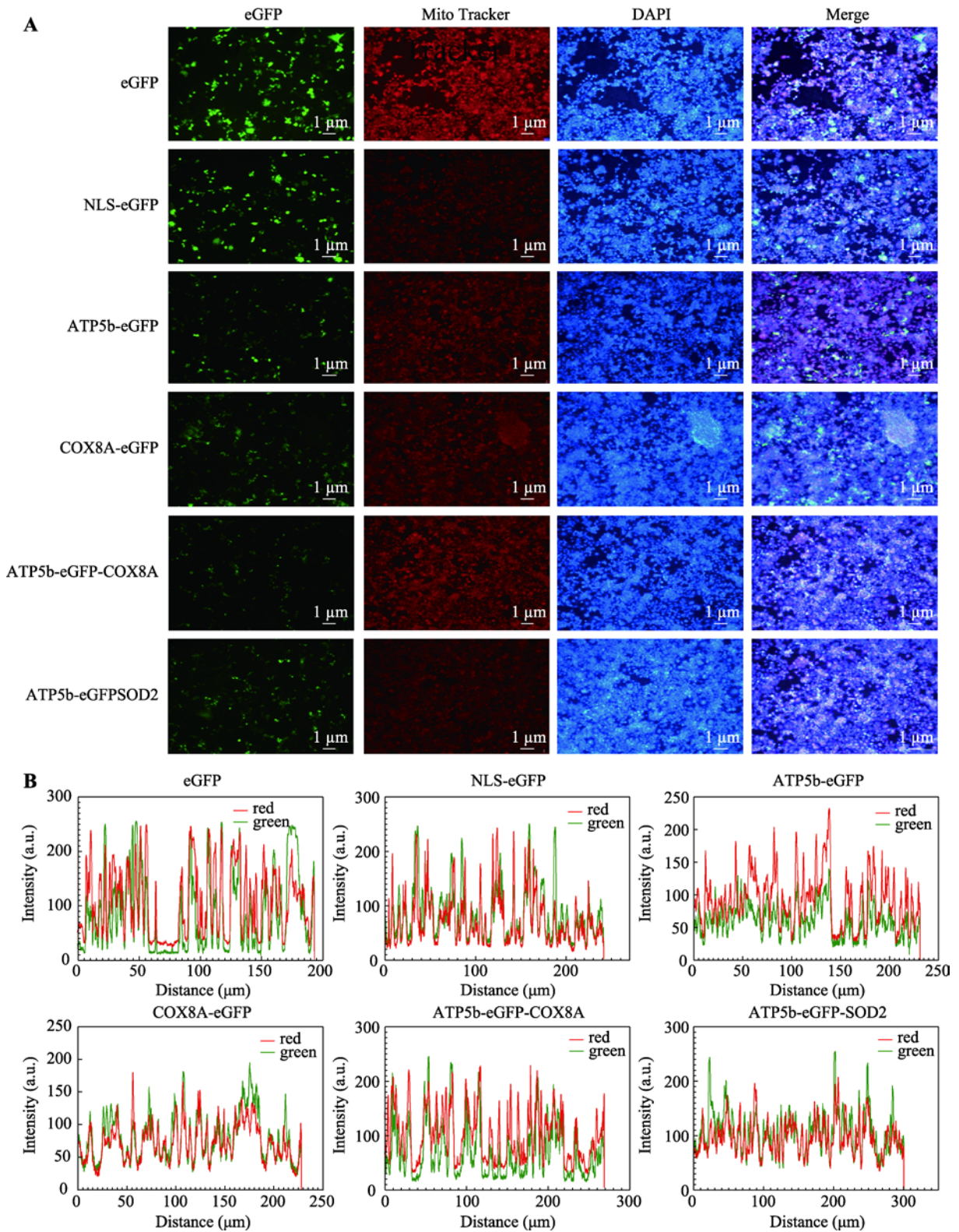


图 2 荧光染色结果及荧光共定位分析

Fig. 2 Results of fluorescence staining and analysis of fluorescence co-localisation

A: 5 组 eGFP 蛋白的 3 种荧光染色结果及 3 种荧光的 merge 结果; B: 5 组 eGFP 蛋白的荧光共定位分析结果。绿色代表 eGFP 荧光; 红色代表 Mito Tracker 荧光。在折线图中, 峰值处两条折线的重叠程度越高, 代表其线粒体定位效果越好。

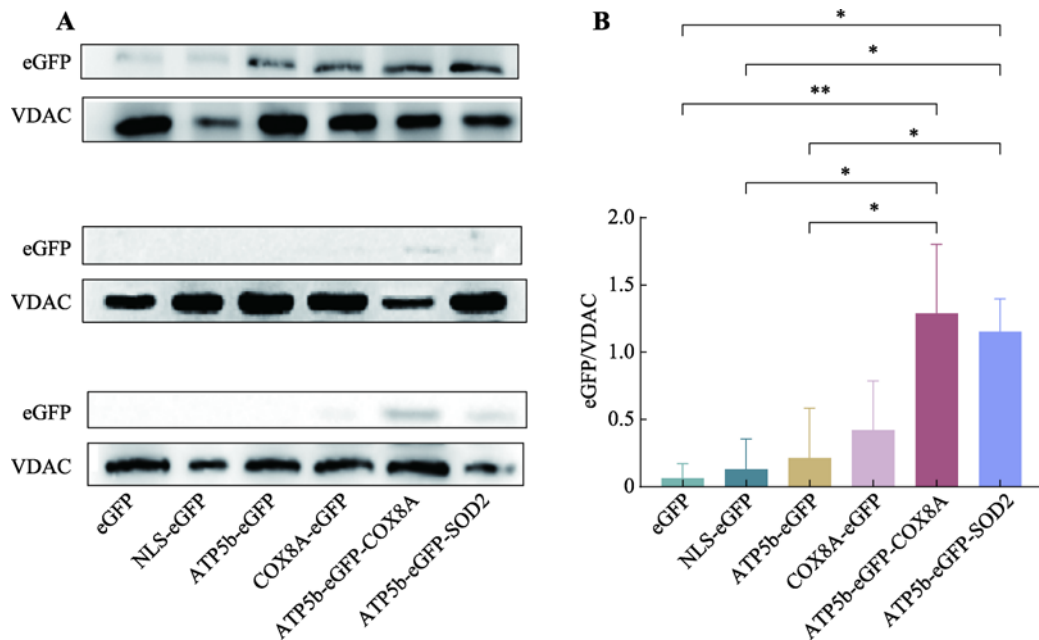


图 3 eGFP 蛋白的免疫印迹检测结果及灰度分析

Fig. 3 Western blot results and grayscale analysis of the eGFP protein

A: 使用 VDAC 作为线粒体内参检测 eGFP 蛋白在细胞内定位的 WB 检测结果; B: 对 WB 结果进行灰度分析后, eGFP 蛋白的表达水平。数据表示为 $SD \pm$ 平均值, $P < 0.05$, *: 两组数据差异显著; **: 两组数据差异极显著。

对免疫印迹结果进行灰度分析,在 Prism 中进行数据分析(图 3B)。经预试验鉴定,提取的蛋白纯度较高,基本无污染,免疫印迹结果可靠性较高。结果表明:对照组的 eGFP 表达载体蛋白在线粒体中的含量约等于无(图 3B),加入 MLS 的 eGFP 蛋白能够靶向到线粒体中,尤其是两端加入 MLS,即 pLL3.7-UMF-eGFP-C8MU 载体的线粒体靶向性更好(图 3B)。综上所述,本研究的实验结果表明,双 MLS 能够提高工程化蛋白 eGFP 的线粒体靶向性。

2.4 Cas9 蛋白工程化改造相关表达载体

基于前面工程化蛋白 eGFP 线粒体靶向载体的构建,选取另一个工程化蛋白 Cas9 进行线粒体靶向性研究。共构建了 5 组 Cas9 质粒分别作为对照组和实验组(图 4A),提取重组质粒 pLL3.7-UMF-SpCas9-3'U(图 4B),pLL3.7-UMF-SpCas9-S2MU(图 4C),pLL3.7-UMF-SpCas9-C8MU(图 4D),3 组均用 *Apa* I 进行单酶双切,酶切后电泳产物约为 8834 bp 和 2897bp 两条带,经酶切鉴定载体大小无误。将阳性质粒送测序公司测序,进行序列鉴定,经比对,

载体构建正确,进行下一步实验。

2.5 免疫印迹实验检测 Cas9 线粒体定位效果

为进一步确定双 MLS 对工程化蛋白 Cas9 靶向线粒体效率的影响,在 Cas9 蛋白载体均成功转染 48 h 后,将 HEK293T 细胞裂解,进行线粒体蛋白、核蛋白和浆蛋白的提取。通过测量 OD 值及 SDS-PAGE 电泳,确定各样品浓度后进行免疫印迹实验(图 5A),通过对细胞线粒体蛋白、核蛋白和浆蛋白与抗体结合的条带进行分析,确定提取蛋白的准确性以及蛋白在细胞中的定位,并通过 FIJI 对免疫印迹结果进行灰度分析,在 Prism 中进行数据分析及绘图。经预试验鉴定,提取的蛋白纯度较高,基本无污染,免疫印迹结果可靠性较高。结果表明:对照组的 Cas9 蛋白载体蛋白在线粒体中的含量约等于无(图 5B),加入 MLS 的工程化蛋白 Cas9 能够靶向到线粒体中,尤其是两端加入 MLS,即 pLL3.7-UMF-SpCas9-S2MU 载体和 pLL3.7-UMF-SpCas9-C8MU 载体的线粒体靶向性更好(图 5B)。综上所述,本研究的实验结果表明,双 MLS 能够提高工程化蛋白 Cas9 的线粒体靶向性。

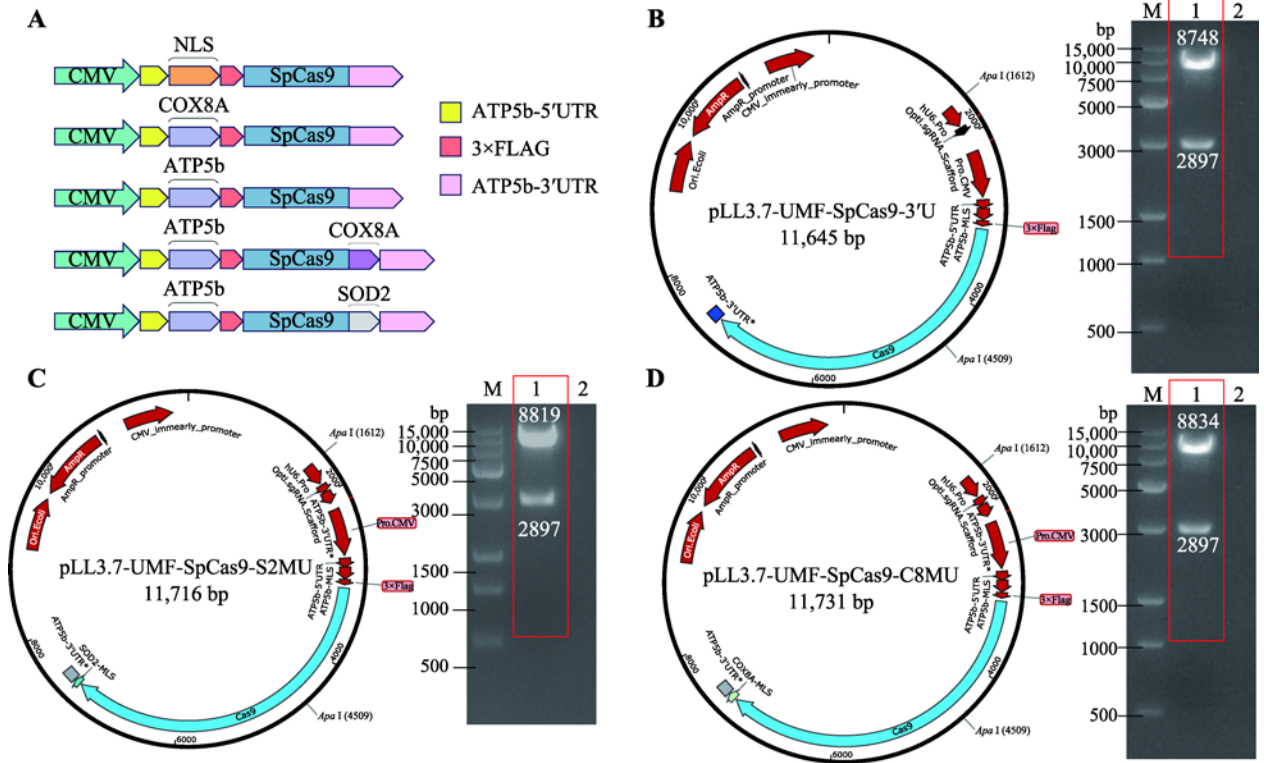


图 4 工程化的 Cas9 质粒图谱及其酶切鉴定结果

Fig. 4 Optimisation of Cas9 plasmid mapping and enzymatic characterisation

A: 工程化改造的 Cas9 表达载体; B: pLL3.7-UMF-SpCas9-3'U 质粒图谱和酶切鉴定结果; C: pLL3.7-UMF-SpCas9-S2MU 质粒图谱和酶切鉴定结果; D: pLL3.7-UMF-SpCas9-C8MU 质粒图谱和酶切鉴定结果。红色方框内的两条条带为酶切产物。

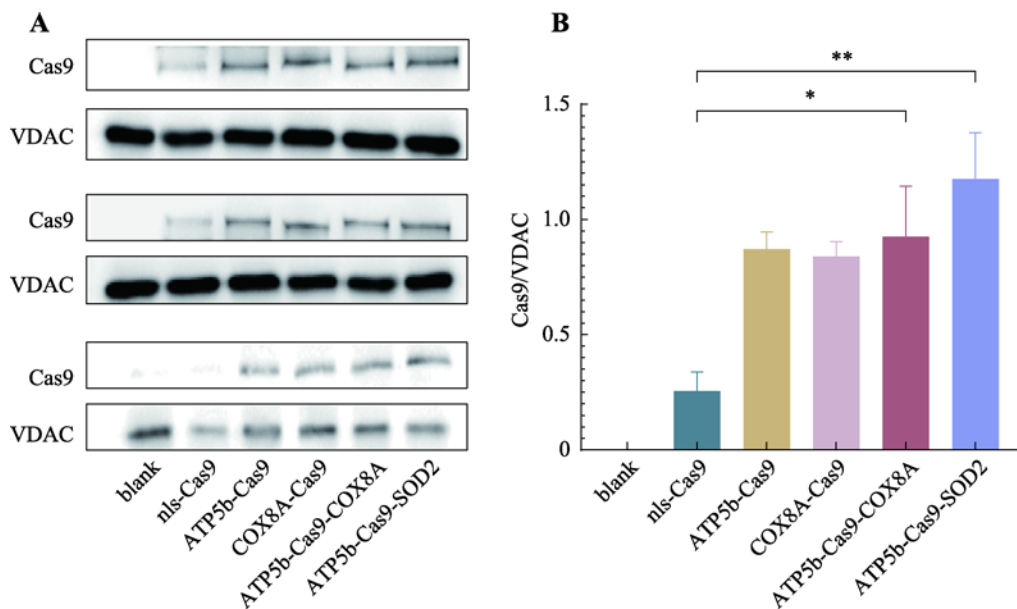


图 5 Cas9 蛋白的免疫印迹检测结果及灰度分析

Fig. 5 Western blot results and grayscale analysis of the Cas9 protein.

A: 使用 VDAC 作为线粒体内参检测 Cas9 蛋白在细胞内定位的 WB 检测结果; B: 对 WB 结果进行灰度分析后, Cas9 蛋白的表达水平。数据表示为 $SD \pm$ 平均值, $P < 0.05$, *: 两组数据差异显著; **: 两组数据差异极显著。

3 讨论

线粒体基因组编辑开启了线粒体疾病精准治疗的新纪元。近年来,以脱氨酶 DddA 为核心的线粒体碱基编辑器(如 DdCBE)使线粒体单碱基编辑取得了突破性进展。这些编辑器通过精确靶向线粒体,可将 mtDNA 中的 C·G 碱基对精准转换为 T·A 碱基对,从而实现 mtDNA 的定点碱基替换,为编辑线粒体病变基因提供可能^[18,19,22,23],尽管在人类早期胚胎中展示了高效的线粒体碱基编辑能力^[24,25]。然而后续研究揭示了 DddA 衍生的编辑器存在严重的脱靶效应,不仅在线粒体内引发了非预期的突变累积,还可进入细胞核并导致广泛的单核苷酸变异(SNV)^[20,21],这表明单一 N 末端线粒体定位信号未能有效隔绝其进入细胞核。鉴于此,本研究聚焦于提升工程化蛋白(以 eGFP 和 Cas9 为例)的线粒体靶向特异性与效率,通过设计并构建多种包含单一及双重线粒体定位信号(MLS)的载体系统,转染至 HEK293T 细胞后,综合运用多种试验技术,如荧光共定位分析和 Western blot,系统评估了不同 MLS 组合对线粒体靶向效率的影响。验证了双线粒体定位信号工程化蛋白对线粒体的靶向效率更高,特别是 ATP5b-eGFP-COX8A 和 ATP5b-Cas9-SOD2 构型载体的线粒体靶向效果最佳。结果显示,相较于单一 MLS 载体,采用双 MLS(如 ATP5b-eGFP-COX8A 与 ATP5b-Cas9-SOD2 组合)的工程化蛋白展现出更为卓越的线粒体靶向性能与保留能力,为线粒体基因编辑工具的优化提供了有力证据。

迄今为止,一系列基因编辑技术已被引入线粒

体基因组编辑领域,如限制性内切酶、ZFN 和 TALEN 均可产生双链断裂从而清除突变 mtDNA。尤其是 TALEN 技术,已被验证可在人源细胞系及小鼠体内多脏器组织实现对突变 mtDNA 的精准切除^[14,15]。但这些编辑器均存在靶向位点局限性,设计过程繁琐,成本高昂,难以推广应用^[17]。2020 年, DddA 脱氨酶被成功应用于 mtDNA 精准编辑,实现 C·G 到 T·A 的转换,代表了线粒体单碱基编辑的重要进展。后续多个 DddA 核酸编辑器相继被开发,如 DdCBE-V11、mito-TALENs 和 DdCBE-Ss 等,并被证实可在人类早期胚胎中可实现高效的线粒体基因替换编辑。但是,这些 DddA 衍生编辑器存在严重的脱靶效应,不仅线粒体内存在大量非特异编辑,还可逃逸进入细胞核引起单核苷酸变异,其安全性备受关注。

当前线粒体基因组编辑领域已报道了 CRISPR/Cas 系统、基于 DddA 的碱基编辑器及 Mito-BEs 系统等多类技术平台(表 1)。尽管 CRISPR/Cas9 系统因 gRNA 难以有效递送至线粒体而面临编辑效率瓶颈^[26,27]。而 Mito-BEs 系统则展现了针对 mtDNA 特定碱基转换的高精度与选择性,可实现对 mtDNA 的精准 C 到 T 或 A 到 G 碱基转换,而且具有选择性地编辑特定链的能力,且迄今未见显著脱靶报告。然而, DddA 衍生的 DdCBE 等线粒体编辑器虽然能够将 mtDNA 中的 C·G 变为 T·A,具有较高的编辑效率,并已通过实验验证其在人类早期胚胎中能够实现高效的线粒体碱基编辑。但其脱靶效应尤其是核内 SNVs 的生成,对临床应用的安全性构成了严峻挑战。

表 1 不同线粒体碱基编辑器的比较

Table 1 The comparison of different mitochondrial base editors

线粒体编辑器	组成元件	编辑类型	偏好性	编辑效率	脱靶	参考文献
CRISPR Cas9	Cas9, gRNA	Indel	碱基识别偏好	极小	严重的脱靶效应	[26,27]
DdCBEs	DddA, TALE	C·G-T·A	偏好 TC 序列	4.9%~49%	严重的脱靶效应	[18]
DdCBEs(V11)	DddA11, TALE	C·G-T·A	HC	15%~30%	严重的脱靶效应	[22]
DdCBE-Ss	Ddd-Ss, TALE	C·G-T·A	DC	6%~51%	严重的脱靶效应	[23]
Mito-TALEd	DddA, TadA8e, TALE	A·T-G·C	编辑位点偏好	大约 40%	严重的脱靶效应	[19]
Mito-BEs	TALE, Chymotrypsin, Deaminase	A·T-G·C 或 C·G-T·A	链选择偏好	大约 40%	暂未发现明确的脱靶效应	[28]

H=A, C, T; D=A, T, G。

本研究采用荧光共定位、免疫印迹等技术手段, 评估了不同单 MLS 和双 MLS 的工程化蛋白 eGFP 和 Cas9 对 HEK293T 细胞线粒体的靶向效率。通过对试验数据的进一步深入分析, 研究结果表明, 相较单 MLS 的工程化蛋白, 双 MLS 的工程化蛋白显著提高了进入线粒体的效率, 其中以 ATP5b-eGFP-COX8A 和 ATP5b-Cas9-SOD2 双信号组合的靶向效果最佳。综上所述, 本研究通过对目标蛋白的双 MLS 工程化改造, 提高了其靶向线粒体呈递的效率, 为改造优化上述 mtDNA 编辑系统、开发安全高效的 mtDNA 编辑新工具提供了新的思路。未来工作将完善双 MLS 设计、优化信号肽类型和位置, 为提高工程化蛋白线粒体靶向性提供更多的优化方案。

致谢:

感谢西北农林科技大学基因编辑科教平台(Northwest A&F University Gene Editing Scientific Teaching, NWAUFU-GEST)、西北农林科技大学羊遗传改良与生物育种创新团队和空军军医大学肿瘤生物学国家重点实验室对本研究提供的硬件和软件支持。

参考文献(References):

- [1] McBride HM, Neuspiel M, Wasiak S. Mitochondria: more than just a powerhouse. *Curr Biol*, 2006, 16(14): R551–R560. [DOI]
- [2] Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MH, Coulson AR, Drouin J, Eperon IC, Nierlich DP, Roe BA, Sanger F, Schreier PH, Smith AJ, Staden R, Young IG. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*, 1981, 290(5806): 457–465. [DOI]
- [3] Falkenberg M. Mitochondrial DNA replication in mammalian cells: overview of the pathway. *Essays Biochem*, 2018, 62(3): 287–296. [DOI]
- [4] Stewart JB, Chinnery PF. The dynamics of mitochondrial DNA heteroplasmy: implications for human health and disease. *Nat Rev Genet*, 2015, 16(9): 530–542. [DOI]
- [5] Chinnery PF, Thorburn DR, Samuels DC, White SL, Dahl HM, Turnbull DM, Lightowlers RN, Howell N. The inheritance of mitochondrial DNA heteroplasmy: random drift, selection or both? *Trends Genet*, 2000, 16(11): 500–505. [DOI]
- [6] Gorman GS, Schaefer AM, Ng Y, Gomez N, Blakely EL, Alston CL, Feeney C, Horvath R, Yu-Wai-Man P, Chinnery PF, Taylor RW, Turnbull DM, McFarland R. Prevalence of nuclear and mitochondrial DNA mutations related to adult mitochondrial disease. *Ann Neurol*, 2015, 77(5): 753–759. [DOI]
- [7] Gorman GS, Chinnery PF, Dimauro S, Hirano M, Koga Y, McFarland R, Suomalainen A, Thorburn DR, Zeviani M, Turnbull DM. Mitochondrial diseases. *Nat Rev Dis Primers*, 2016, 2: 16080. [DOI]
- [8] Nissanka N, Moraes CT. Mitochondrial DNA heteroplasmy in disease and targeted nuclease-based therapeutic approaches. *EMBO Rep*, 2020, 21(3): e49612. [DOI]
- [9] Hyslop LA, Blakeley P, Craven L, Richardson J, Fogarty NME, Fragouli E, Lamb M, Wamaitha SE, Prathalingam N, Zhang Q, O'Keefe H, Takeda Y, Arizzi L, Alfarawati S, Tuppen HA, Irving L, Kalleas D, Choudhary M, Wells D, Murdoch AP, Turnbull DM, Niakan KK, Herbert M. Towards clinical application of pronuclear transfer to prevent mitochondrial DNA disease. *Nature*, 2016, 534(7607): 383–386. [DOI]
- [10] Tachibana M, Sparman M, Sritanadomchai H, Ma H, Clepper L, Woodward J, Li Y, Ramsey C, Kolotushkina O, Mitalipov S. Mitochondrial gene replacement in primate offspring and embryonic stem cells. *Nature*, 2009, 461(7262): 367–372. [DOI]
- [11] Srivastava S, Moraes CT. Manipulating mitochondrial DNA heteroplasmy by a mitochondrially targeted restriction endonuclease. *Hum Mol Genet*, 2001, 10(26): 3093–3099. [DOI]
- [12] Minczuk M, Papworth MA, Miller JC, Murphy MP, Klug A. Development of a single-chain, quasi-dimeric zinc-finger nuclease for the selective degradation of mutated human mitochondrial DNA. *Nucleic Acids Res*, 2008, 36(12): 3926–3938. [DOI]
- [13] Bacman SR, Williams SL, Pinto M, Peralta S, Moraes CT. Specific elimination of mutant mitochondrial genomes in patient-derived cells by mitoTALENs. *Nat Med*, 2013, 19(9): 1111–1113. [DOI]
- [14] Reddy P, Ocampo A, Suzuki K, Luo JP, Bacman SR, Williams SL, Sugawara A, Okamura D, Tsunekawa Y, Wu J, Lam D, Xiong X, Montserrat N, Esteban CR, Liu GH, Sancho-Martinez I, Manau D, Civico S, Cardellach F, Del Mar O'Callaghan M, Campistol J, Zhao HM, Campistol JM, Moraes CT, Izpisua BJ. Selective elimination of mitochondrial mutations in the germline by genome editing. *Cell*, 2015, 161(3): 459–469. [DOI]

- [15] Gammage PA, Gaude E, Van Haute L, Rebelo-Guiomar P, Jackson CB, Rorbach J, Pekalski ML, Robinson AJ, Charpentier M, Concordet JP, Frezza C, Minczuk M. Near-complete elimination of mutant mtDNA by iterative or dynamic dose-controlled treatment with mtZFNs. *Nucleic Acids Res*, 2016, 44(16): 7804–7816. [DOI]
- [16] Owen RT, Flotte TR. Approaches and limitations to gene therapy for mitochondrial diseases. *Antioxid Redox Signal*, 2001, 3(3): 451–460. [DOI]
- [17] Zhang F, Cong L, Lodato S, Kosuri S, Church GM, Arlotta P. Efficient construction of sequence-specific TAL effectors for modulating mammalian transcription. *Nat Biotechnol*, 2011, 29(2): 149–153. [DOI]
- [18] Mok BY, de Moraes MH, Zeng J, Bosch DE, Kotrys AV, Raguram A, Hsu F, Radey MC, Peterson SB, Mootha VK, Mougous JD, Liu DR. A bacterial cytidine deaminase toxin enables CRISPR-free mitochondrial base editing. *Nature*, 2020, 583(7817): 631–637. [DOI]
- [19] Cho SI, Lee S, Mok YG, Lim K, Lee J, Lee JM, Chung E, Kim JS. Targeted A-to-G base editing in human mitochondrial DNA with programmable deaminases. *Cell*, 2022, 185(10): 1764–1776.e12. [DOI]
- [20] Wei YH, Li ZF, Xu K, Feng H, Xie L, Li D, Zuo ZR, Zhang ML, Xu CL, Yang H, Zuo EW. Mitochondrial base editor DdCBE causes substantial DNA off-target editing in nuclear genome of embryos. *Cell Discov*, 2022, 8(1): 27. [DOI]
- [21] Lei ZX, Meng HW, Liu LL, Zhao HN, Rao XC, Yan YC, Wu H, Liu M, He AB, Yi CQ. Mitochondrial base editor induces substantial nuclear off-target mutations. *Nature*, 2022, 606(7915): 804–811. [DOI]
- [22] Mok BY, Kotrys AV, Raguram A, Huang TP, Mootha VK, Liu DR. CRISPR-free base editors with enhanced activity and expanded targeting scope in mitochondrial and nuclear DNA. *Nat Biotechnol*, 2022, 40(9): 1378–1387. [DOI]
- [23] Mi L, Shi M, Li YX, Xie G, Rao XC, Wu DM, Cheng AM, Niu MX, Xu FL, Yu Y, Gao N, Wei WS, Wang XH, Wang YM. DddA homolog search and engineering expand sequence compatibility of mitochondrial base editing. *Nat Commun*, 2023, 14(1): 874. [DOI]
- [24] Wei YH, Xu CL, Feng H, Xu K, Li ZF, Hu J, Zhou L, Wei Y, Zuo ZR, Zuo EW, Li W, Yang H, Zhang ML. Human cleaving embryos enable efficient mitochondrial base-editing with DdCBE. *Cell Discov*, 2022, 8(1): 7. [DOI]
- [25] Chen XX, Liang D, Guo JY, Zhang JQ, Sun HF, Zhang XL, Jin JC, Dai YC, Bao QM, Qian XZ, Tan L, Hu P, Ling XF, Shen B, Xu ZF. DdCBE-mediated mitochondrial base editing in human 3PN embryos. *Cell Discov*, 2022, 8(1): 8. [DOI]
- [26] Wang B, Lv XJ, Wang YF, Wang ZB, Liu Q, Lu B, Liu Y, Gu F. CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis at microhomologous regions of human mitochondrial genome. *Sci China Life Sci*, 2021, 64(9): 1463–1472. [DOI]
- [27] Bi R, Li Y, Xu M, Zheng QZ, Zhang DF, Li X, Ma GL, Xiang BL, Zhu XJ, Zhao H, Huang XX, Zheng P, Yao YG. Direct evidence of CRISPR-Cas9-mediated mitochondrial genome editing. *Innovation (Camb)*, 2022, 3(6): 100329. [DOI]
- [28] Yi ZY, Zhang XX, Tang W, Yu Y, Wei XX, Zhang X, Wei WS. Strand-selective base editing of human mitochondrial DNA using mitoBEs. *Nat Biotechnol*, 2023, 42(3): 498–509. [DOI]

(责任编辑: 谷峰)