

2021 年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

作品編號 080002

參展科別 生物化學

作品名稱 以新型 CRISPR-Cas9 技術優化粒線體基因剪輯

得獎獎項 大會獎 一等獎

就讀學校 臺北市私立復興實驗高級中學

指導教師 馬瑪宣、凌嘉鴻

作者姓名 孫若壹、林柏廷

關鍵詞 CRISPR-Cas9、粒線體 DNA (mtDNA)、
基因剪輯 (Gene editing)

作者簡介



我是台北市私立復興高中雙語部二年級的孫若壹，從小就對生物充滿熱忱，高一時幸運的因用一個個給教授寄信的方式意外獲得了在生化所做實驗的機會，不僅在實驗操作和讀 paper 的方面學習甚多，更漸漸發覺了對做實驗的熱情。感謝實驗室的教授、研究生和學校生物老師的耐心指導，希望未來能夠繼續往實驗這條路邁進！



大家好，我是林柏廷，是台北市私立復興中學雙語部高二的學生，自從國中接觸生物領域相關知識之後便對此產生了濃烈的興趣。我喜歡在閒暇時間閱覽不同生物學的課本與相關研究，也因此選擇踏上專研的路程。希望自己之後能秉持對研究的熱忱，並為科學界盡一份心力。

摘要

本研究開發一個新型的 CRISPR-Cas9 技術剪輯粒線體 DNA，提供粒線體基因所造成疾病的一個有潛能之治療方式。在本研究中，我們將嵌入粒線體標的訊號序列後的 Cas9 蛋白質和 sgRNA 分子送入粒線體內，將 CRISPR-Cas9 系統套用於粒線體中，並達成剪輯粒線體基因之目的。我們將 Cas9 蛋白質和 sgRNA 分子鑲嵌於同一質體上，有效導入 CRISPR-Cas9 系統於粒線體內，並觀察到剪輯之標的基因 ND4 含量下降了 32%，達到粒線體基因編輯之目標。雖然前人曾用 ZFN (Zinc-finger Nuclease)和 TALEN (Transcription Activator-like Effector Nucleases)成功編輯粒線體基因，但由於製作過程繁瑣和經費昂貴等種種原因，並未被廣泛使用。我們開發的新型 CRISPR-Cas9 粒線體基因剪輯系統將可以提供一個相對簡易且價格低廉的粒線體基因剪輯平台。

Abstract

Supportive treatment has long been the main treating method for mitochondrial diseases due to the lack of an effective and efficient remedy; however, recent progress on genetic engineering tools, such as CRISPR-Cas9, has shone light on a possible cure. In our research, we successfully implemented the CRISPR-Cas9 system on cell mitochondria and achieved mitochondrial genome editing by attaching mitochondria targeting sequences (MTS) to both the Cas9 protein and sgRNA. By constructing a plasmid that conjoins both Cas9 and our desired sgRNA, we effectively transferred the editing system into the mitochondria and observed a 32% decrease in the amount of our targeted gene - ND4. Previous practices were generally performed through other systems such as TALEN or ZFN, but the introduction of effective CRISPR-Cas9 editing shall no doubt become the major force that propels the conduct of mitochondrial genome editing.

壹、前言

1、 研究動機

(1)、 粒線體基因突變造成的疾病：

粒線體為一所有真核細胞皆具有的胞器，主要功能為利用氧化磷酸化 (oxidative phosphorylation, OXPHOS) 進行呼吸作用以製造細胞內過 90% 的能量。人體的粒線體的大小近似於細菌，會複製約 100-10,000 個環狀雙股的母系遺傳 DNA (mitochondrial DNA, mtDNA)，內含約 16569 個鹼基對，37 個基因，可製造 13 種蛋白質、22 種 tRNA 和兩種 rRNA，而其轉錄效率遠高於細胞核 DNA，93% 的序列都為編碼區，也無內含子 [1]。mtDNA 因數量龐大，基因修復的機制不像細胞核 DNA 完善，又為母系遺傳，因此含有突變基因的機率遠大於細胞核 DNA，而當粒線體中有足夠比例的 mtDNA 有突變現象時（通常為 70% 以上），即有機會導致疾病的產生。在常見的粒線體疾病中，許多皆由點突變所導致，例如賴博氏遺傳性視覺神經症 (Leber hereditary optic neuropath, LHON) 的主要突變點為 3460 G>A (ND1 基因上)、11778 G>A (ND4 基因上) 和 14484 T>C (ND6 基因上)，患者常有視網模神經節細胞和其軸突退化而造成的失明現象，嚴重者更會伴隨著肢體障礙的症狀；粒線體腦病變、乳酸血症及類中風症狀 (Mitochondrial Encephalomyopathy, Lactic Acidosis, and Stroke-like episodes, MELAS) 為一會導致肌肉病變、腦部病變、乳酸中毒和類中風症狀的疾病，主要突變的位置為 3243 A>G (位於 MT-TL1 基因上) [2]。在台灣，已知的粒線體基因缺陷相關疾病已逾五十多種，更被政府納入了罕見疾病之列，在國內有約 300-400 個家族有粒線體基因缺陷的問題，在全球統計下來的成人粒線體疾病盛行率更有約 1/5000 [3]。粒線體基因突變造成的疾病目前並無根治的方法，因此大多都只能採取支持性療法。之前已有實驗室利用鋅指核酸酶 (Zinc-finger nucleases, ZFNs) [4] 或轉錄激活樣效應因子核酸酶 (transcription activator-like effector nucleases, TALENs) [5] 標靶基因剔除工具等已相當成熟的基因編輯工具來嘗試修復或移除突變粒線體基因，雖有所成效，但是其技術方面有很大的缺陷，尤其是製造能夠鎖定標靶基因的限制酶

的繁瑣步驟造成時間和經費上的侷限更不容小覷。而 CRISPR/Cas9(常間回文重複序列叢集/常間回文重複序列叢集關聯蛋白系統, Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR-associated protein 9) 為近期較為興起的基因編輯技術, 因為其技術設計簡單而且操作容易的緣故, 科學界近十年內利用 CRISPR/Cas9 編輯細胞核基因已為逐漸成熟的技術, 不過在編輯粒線體基因的方面卻無具公信力的成果 [6]。因此我們希望能利用 CRISPR/Cas9 進行 mtDNA 編輯, 以達成修復或移除突變 mtDNA 的目標。

(2) 、 CRISPR-Cas9 技術

CRISPR/Cas9 系統是一個源自細菌免疫系統的機制, 此系統包含了負責辨認特定基因的嚮導 RNA (guide RNA, gRNA) 和負責剪輯基因的 Cas9 核酸內切酶 (CRISPR-associated protein 9, Cas9)。在細菌本身天然的機制中, 細菌會收集外來病毒的基因片段放入自身 DNA 中, 這段由不斷重複的基因序列和等長間隔構成的基因序列就稱為 CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) 或 CRISPR array, 此機制讓細胞在受到二次感染時, 能夠製造對應的嚮導 RNA 以辨識病毒的 DNA 序列並使用 Cas9 或類似蛋白對此外來的基因進行雙股斷裂 (double-strand break, DBS), 讓這些外來基因失去功效, 以達到防禦之效果。

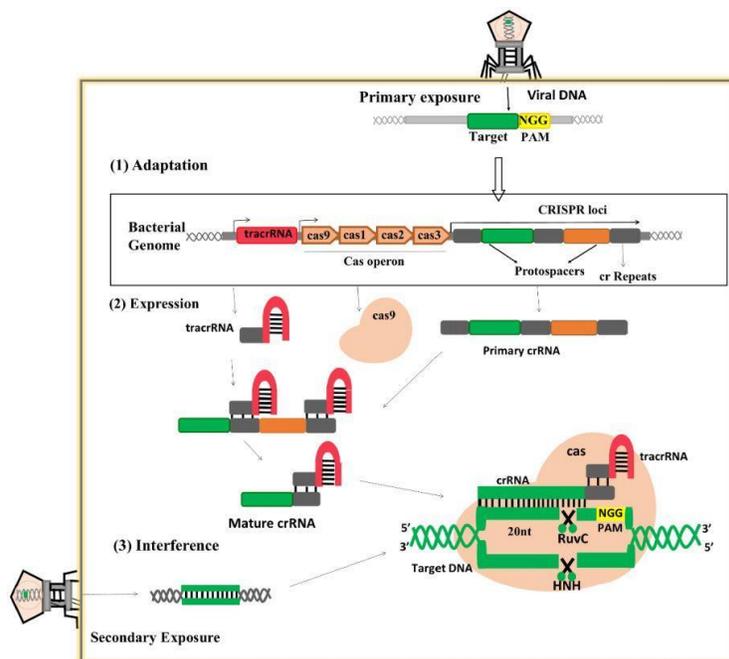


圖 1 : CRISPR-Cas9 於細菌免疫系統之防禦功用[7]

CRISPR/Cas9 技術在各實驗中運用的原理相似，會先設計一個和標靶基因相符的嚮導 RNA，再將嚮導 RNA 和 Cas9 蛋白利用轉染 (lipofection)、電穿孔 (electroporation) 或病毒感染 (viral infection) 等方式置入細胞核中 [8]。接著，嚮導 RNA 會和 Cas9 蛋白接合在一起，嚮導 RNA 負責辨識標靶 DNA，Cas9 蛋白再負責雙股斷裂的工作，切斷後再讓基因利用非同源性末端結合 (Non-homologous end joining, NHEJ) 或同源重組修復 (Homology directed repair, HDR) 進行修復程序。NHEJ 透過刪除或插入鹼基對後進行 DNA 連接，因此在修補後會有隨機、不同長度的基因組合。HDR 機制則會與擁有同源區域的 DNA 供體結合，將缺失片段精確移入基因中。因為 NHEJ 仰賴於添加或移除片段基因來達成恢復雙股螺旋的完整性，因此它並不是一個十分可靠的修復方式。不過如果目的只是想要透過移碼突變讓突變基因失去其具傷害性的功能，較容易執行的 NHEJ 修復機制便足以發揮此功效[9]。相對的，雖然 HDR 機制較為複雜，但它能夠使基因保留原始性能，或甚至是添加新的功能。

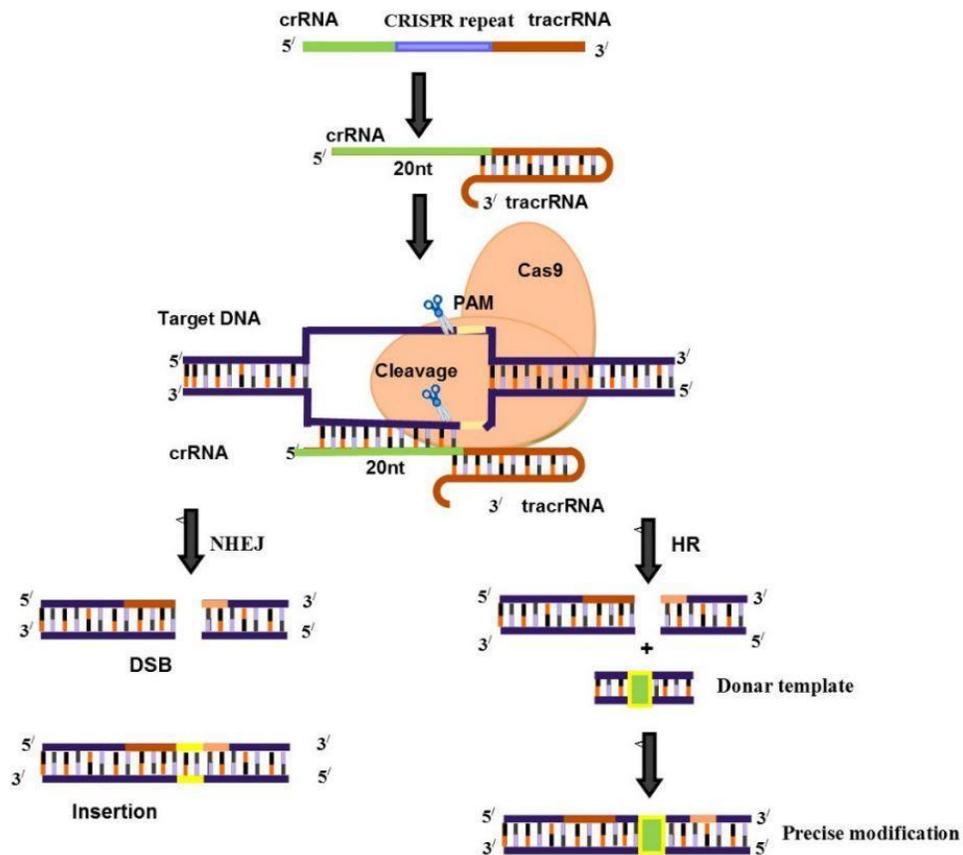


圖 2 : CRISPR-Cas9 剪輯機制[7]

而除了近十年較為興起的 CRISPR/Cas9 技術以外，之前已有其他相當成熟的基因編輯技術存在，其中以 ZFNs 和 TALENs 最廣泛使用（見圖 2）。這兩個技術都運用了融合 DNA 結合和剪輯區域的人工限制酶（restriction enzyme）的方式，讓其限制酶用 DBS 的方式剪輯標靶基因，不過這兩個技術在製造能夠鎖定標靶基因的限制酶的過程相當繁瑣，加上經費略高，因此無法被科學界廣泛地使用，而相對而言 CRISPR/Cas9 技術使用中在更換標靶基因時只需要重新設計嚮導 RNA 即可，和 ZFNs 和 TALENs 技術比較起來效率和便利性高出許多，所需的經費也較少，因此對於基因編輯技術的廣泛使用較有優勢。

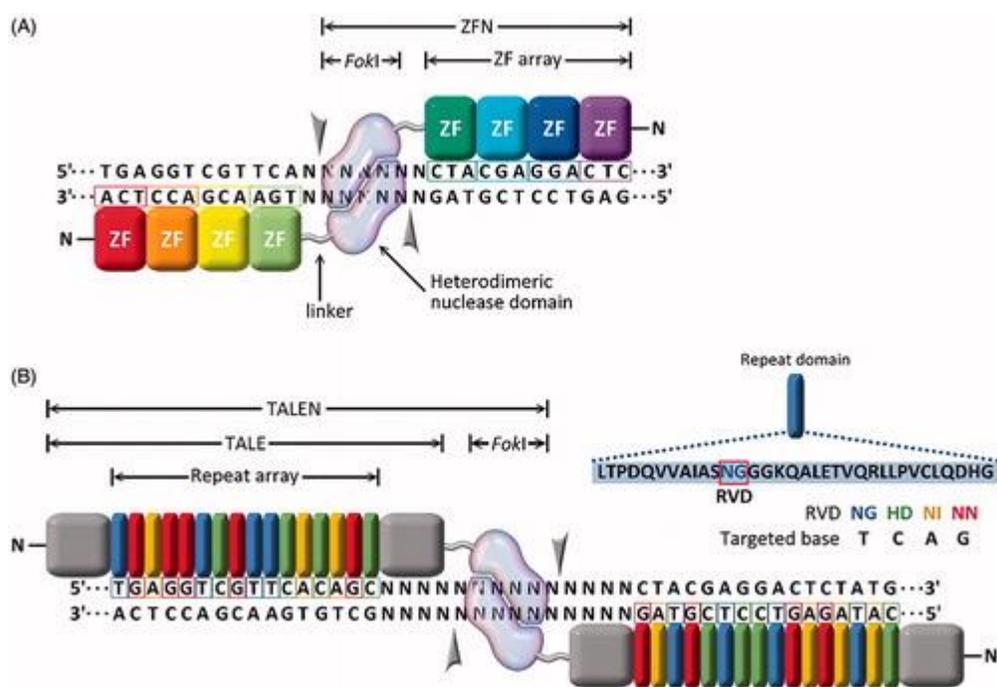


圖 3：其他基因剪輯技術比較[8]（A: ZFN; B: TALEN）

(3)、 How to target mutation sequences 如何指定剪輯突變基因位置

若想在實驗中達到利用 CRISPR-Cas9 指定剪輯特定基因的功能，我們需要先製作一個與目標基因互補並結合的嚮導 RNA 並將其引入 Cas9 工作的環境中。gRNA 與 Cas9 結合後便可以開始剪輯工作。Cas9 可以透過 PAM (Protospacer Adjacent Motif) 序列找出剪輯的位置，PAM 序列出現的位置都約莫出現在剪輯處下游 3~4 個鹼基對。而不同的 Cas9 蛋白會辨認不同的 PAM 序列，因此可以透過不同的 Cas9 變體擴張剪輯的範圍。在設計嚮導 RNA 時便可因應所使用的 Cas9 變體讓其剪接位置更靠近 PAM 序列，可以藉此提高剪輯的準確度。除此之外，如果突變基因位於 PAM 序列中，Cas9 對於 PAM 序列的高度辨認性更可以讓我們準確的剪輯該突變基因。

NHEJ 和 HDR 這兩種修復機制常見於細胞核基因體中，但粒線體中使用的方法是同源末端連接修復(Microhomology-Mediated End Joining, MMEJ)。相較於 NHEJ 和 HDR，MMEJ 在過程中利用了 MRE 核酸酶切除雙股 DNA 中的其中一股，形成頭尾兩個單鏈的突出端。這兩個單鏈突出端會透過微同源性序列(Microhomology sequence) -2 ~ 25 個互補的核苷酸序列- 進行辨認，微同源性序列 DNA 接合後，便會利用核酸酶將多餘的片段分解。然而，這種修復方法仍然會造成片段性的基因損失。

必須要提到的一點是，在粒線體中，線性(非環狀)的 DNA 會在短短幾小時內就被分解[10]。這是因為細胞中擁有許多份粒線體基因體，與其花費時間以及能量進行修復，細胞更傾向於直接分解錯誤的基因片段。在我們的研究當中，我們沿用此生物機制，透過剪輯突變粒線體基因的方式，將其突變基因由環狀剪成線性狀態而被分解。如第一段(粒線體基因突變造成的疾病)所提，我們希望將突變基因在人體內的表現量降到低於 70%的比例以下，即有望助於減緩病症症狀，甚至是治癒這些現在無任何根治方法的粒線體遺傳疾病。

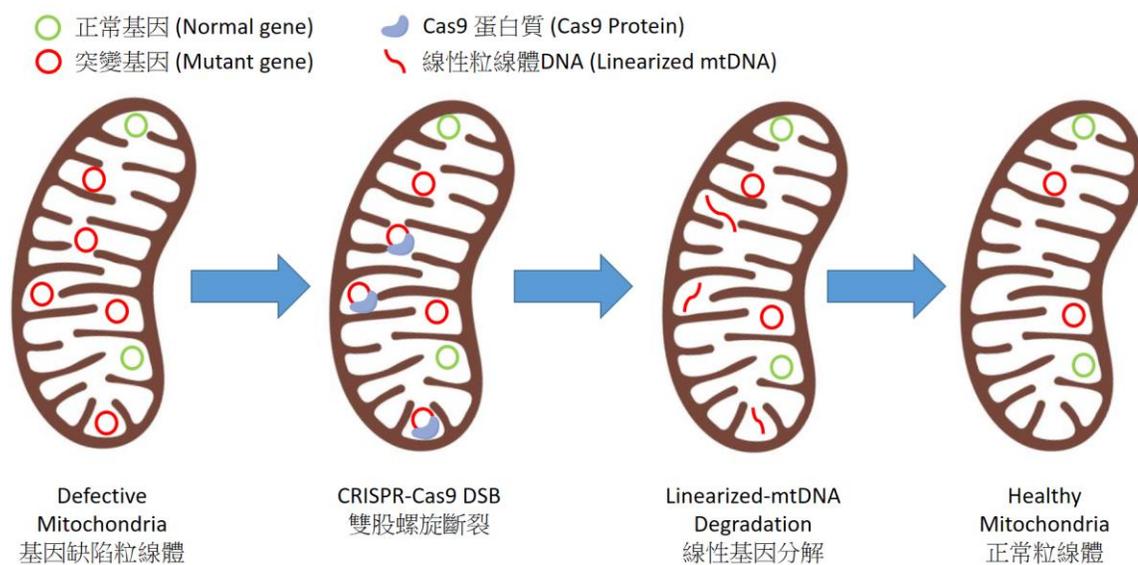


圖 4：實驗目標簡圖

實驗目標簡圖說明：

1. 本研究欲減少基因缺陷之粒線體 (突變基因 > 70%)在細胞中的數量
2. 導入 CRISPR-Cas9 系統於粒線體內，在突變的粒線體基因上進行雙股螺旋斷裂

3. 斷裂後呈線性狀態的基因將會被粒線體內的酵素分解
4. 分解後，粒線體內含有突變基因之數量減少，回歸正常粒線體之表現量

2、 研究目的：

- (1)、 利用接上 MTS 的方式將 Cas9 和 sgRNA 送入粒線體基質中
- (2)、 測試 CRISPR-Cas9 技術對細胞粒線體造成的影響
- (3)、 建立 CRISPR-Cas9 編輯粒線體 DNA 的技術平台

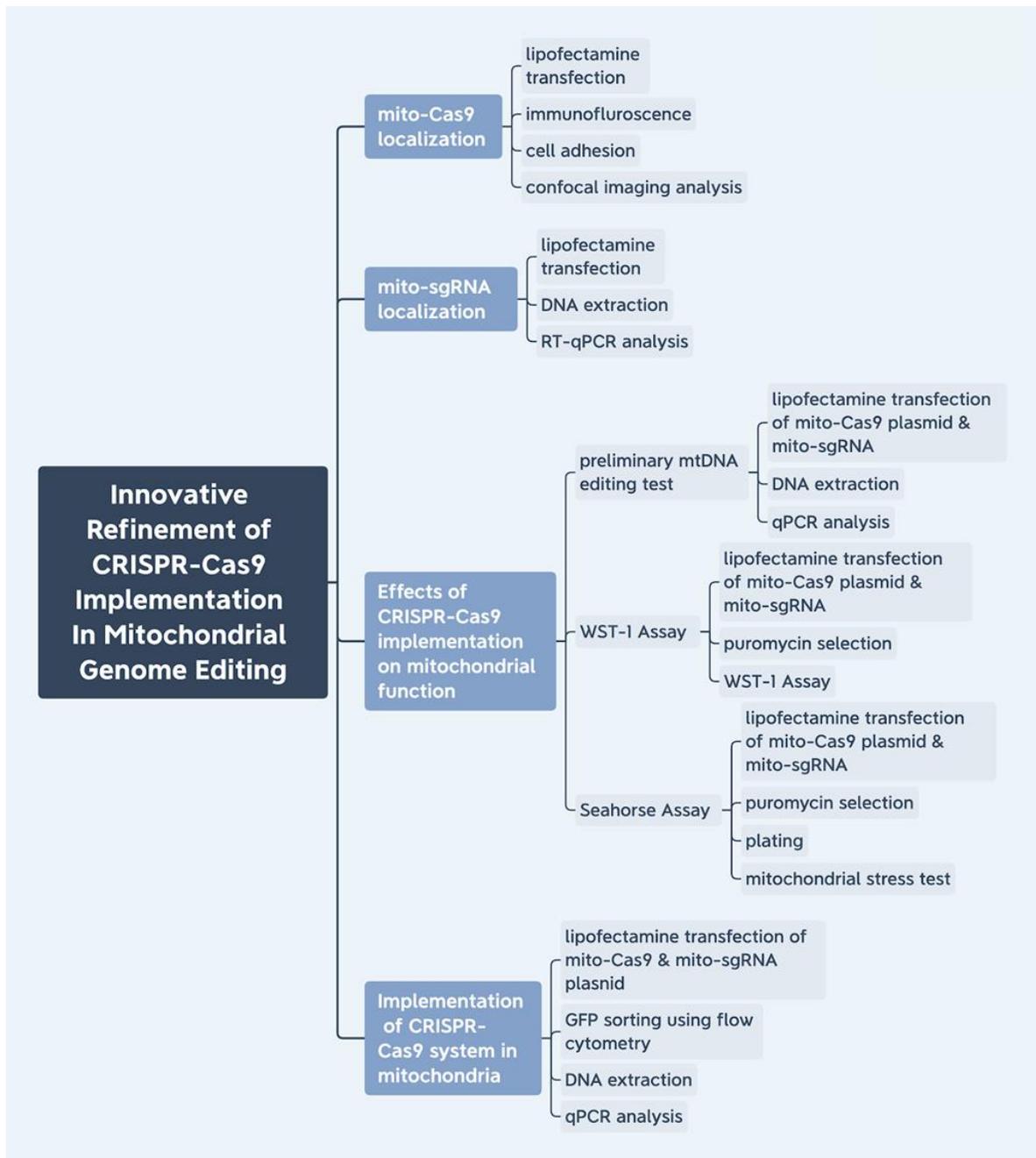


圖 5：實驗架構圖

貳、研究方法或過程

一、實驗設備及器材

- (1) 、 細胞培養：DMEM 培養基 (Dulbecco's Modified Eagle Medium) , FBS 胎牛血清 (Fetal bovine serum) , Antibiotic-Antimycotic, HEPES 緩衝劑 (N-2-hydroxyethylpiperazine-N-ethanesulfonic acid) , Trypsin 胰蛋白酶, DPBS 緩衝劑 (Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline) , trypan blue 台盼藍 (染劑) , 10-cm 培養皿, HeLa cells
- (2) 、 細胞轉染：Lipofectamine 3000 reagent
- (3) 、 流氏細胞技術：FACSJazz - 6 color cell sorter (圖 6)
- (4) 、 WST-1 assay：WST-1 reagent, Tecan Infinite M1000 Pro ELISA Reader (圖 7)
- (5) 、 海馬實驗：Seahorse XF96 Microplate, 96 微孔盤, oligomycin 寡黴素, FCCP 去偶合物 (carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy) phenylhydrazone) , Rotenone 魚藤酮, Antimycin A 抗黴素 A, Seahorse XFe96 Analyzer (圖 8)
- (6) 、 DNA extraction：Quick-DNA™ Miniprep Plus Kit (圖 9) , ZR Plasmid Miniprep™-Classic (圖 10) , QIAprep Spin Miniprep Kit (圖 11)
- (7) 、 qPCR (quantitative polymerase chain reaction)：Power SYBR Green Master Mix, StepOnePlus™ Real-Time PCR systems (圖 12)
- (8) 、 其他：細胞培養箱、離心機、電動吸管、微量吸管分注器、手動八爪分注器、nanodrop 分光光譜儀、恆溫水浴槽、顯微鏡、冰箱、gel imaging system、恆溫水槽、震盪培養箱、試管震盪混合器、真空乾燥器、電子秤、無菌操作台



圖 6 : FACSJazz - 6 color cell sorter



圖 7 : Tecan Infinite M1000 Pro ELISA Reader

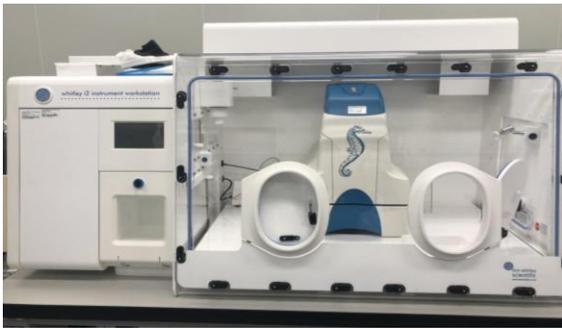


圖 8 : Seahorse XFe96 Analyzer



圖 9 : Quick-DNA™ Miniprep Plus Kit



圖 10 : ZR Plasmid Miniprep™-Classic



圖 11 : QIaprep Spin Miniprep Kit



圖 12 : StepOnePlus Real-Time PCR systems

二、實驗方法及步驟

(1)、 Cell culture 細胞培養：

將 HeLa 細胞培養在 DMEM 培養液中（含 10% FBS（56°C、30 分鐘），1X Antibiotic-Antimycotic 和 1% HEPES），設定培養箱條件為潮濕的 37°C，且含 5% 二氧化碳和 95% 其他氣體。當細胞長滿盤中的八成即需做細胞繼代，先把舊的 DMEM 培養液換成 5ml 的 DPBS 後移除以清洗細胞，接著加入 1ml 0.25% Trypsin，使藥劑和盤底的接觸均勻，以有效的讓細胞脫離細胞盤。把此盤放入 37°C 的培養箱作用三分鐘後，加入 3ml DMEM 培養液已停止作用，把含有細胞的混合液混合均勻後，再把 1ml 的液體（即為 1/4 的細胞）取出並在原盤加入 8ml DMEM 培養液即可等待細胞在培養箱內重新貼附及增長。

(2)、 Lipofection 細胞轉染：

在小規模的細胞轉染前一天，將 4×10^5 的 HeLa 細胞植入 12 孔的細胞培養盤中。質體 DNA（4ug）利用 Lipofectamine 3000（購自 Thermo Fisher Scientific）轉染送入細胞中，操作步驟參考此試劑的使用說明書：先在一 1.5ml 管中加入 4 μ l 的 Lipofectamine 3000 和 46 μ l 的 Opti-MEM（購自 Thermo Fisher Scientific），並在另一 1.5ml 管中加入 4ug 的質體 DNA 和 8 μ l 的 P3000™（購自 Thermo Fisher Scientific）且用 Opti-MEM 補滿至 50 μ l，接著再將兩液體混合在一起，並放在室溫 15 分鐘，最後再將此混合液加入細胞中即可。

(3)、 Immunofluorescence 免疫組織化學染色法和共軛焦顯微鏡拍攝：

將 4×10^5 的 HeLa 細胞植入含有 1ml 的 DMEM 的直徑 35mm 的玻璃底細胞培養盤（#81158, ibidi）中。48 小時後，用 1ml 的 DMEM 清洗細胞，再加入 200 μ l 的 200nM Mito Tracker Deep Red（購自 Invitrogen）至 DMEM 內，並放置在 37°C 30 分鐘。完成粒線體的染色後，再用 1ml 的 DMEM 清洗細胞，並將細胞浸泡在 1ml DMEM、37°C 6 小時。之後，用 1ml 的 DMEM 清洗細胞三次後，再進行細胞貼附。要讓細胞貼附於盤底，首先加入 1ml 含 4% 甲醛的 PBS，並靜置於室溫 15 分鐘，接著使用 1ml 的 DPBS 清洗細胞三次，再加入 1ml 含 0.1% (v/v) Triton X-100 的 PBS，並靜置於室溫 15 分鐘，接著在重複用 1ml DPBS 清洗細胞三次後，加入 200 μ l rabbit anti-

FLAG antibody (購自 Proteintech; 1:1000 稀釋在 PBS 中) 並在用鋁箔紙密封後將盤子放入 4°C 的環境中過夜。隔天, 用 1ml PBST 清洗細胞三次, 並用 1ml PBS 清洗細胞一次, 再加入 goat anti-rabbit antibody IgG antibody 和 Alex Fluor 546 (#A-11035, 購自 Thermo Fisher Scientific; 1:2000 稀釋於 PBS 中) 並靜置室溫三十分鐘, 接著, 將二級抗體移除並將 200 μ l 含有 300nM DAPI (#D1306, 購自 Invitrogen) 的 PBS 加入並靜置室溫 5 分鐘, 再用 1ml PBST 清洗細胞並將細胞泡在 1ml PBS 中。最後, 將此盤放置於共軛焦顯微鏡 (Leica SP5 X inverted) 下進行觀察及拍攝。

(4) 、 Flow cytometry 流氏細胞技術 :

加入 1 ml DPBS 清洗 35 毫米玻璃底盤 (ibidi # 81158) 中的 HeLa 細胞。加入 200 μ l 的 0.25% 胰蛋白酶(trypsin)後, 在 37°C 下放置 3 分鐘。將細胞轉移到 1.5 ml Eppendorf Tube 中並在 300 x g 狀態下離心 3 分鐘。除去上清液後, 將沉澱的細胞用 1 ml DPBS 洗滌一次, 並以 300 x g 離心 3 分鐘。再次除去上清液並加入 100 μ l Zombie Violet™ 染料 (BioLegend; 1 : 1000 稀釋於 PBS 中) 到細胞中。用鋁箔紙覆蓋後, 在室溫下靜置 15 分鐘。將 1 ml FACS 緩衝液添加到細胞中, 再以 300 x g 離心 3 分鐘, 完畢後除去上清液。加入 1 ml FACS 緩衝液重懸(再懸浮), 並將細胞轉移到帶有 Cell Strainer Snap Cap (#352235, Corning) 的 Falcon 5ml Round Bottom Polystyrene Test Tube 中。藉由流式細胞儀 (FACSJazz - 6 color cell sorter) 分析, 便可以得到細胞活性與 GFP 表現的資料。

(5) 、 RNA transfection :

在 mito-sgRNA 轉染前一天, 將 3×10^5 細胞接種在 6 孔細胞盤中。轉染前將 mito-sgRNA 在 65°C 環境下加熱 5 分鐘, 然後在室溫下冷卻 10 分鐘以重新折疊 RNA。RNA 重新折疊後, 按照製造商的說明進行操作。在 1.5 毫升試管中加入 3 μ l 的 Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific) 和 197 μ l 的 Opti-MEM (Thermo Fisher Scientific)。在另一個 1.5 毫升試管中加入 70 pmol RNA, 再加入 Opti-MEM 至 200 μ l。將兩種混和液合併, 在室溫下靜置 15 分鐘。15 分鐘後, 將此 DNA-脂質複合物添加到細胞盤中。

(6) 、 DNA 萃取 :

從 6 孔盤中取出 1×10^6 HeLa 細胞，再使用 Quick-DNA™ Miniprep Plus kit (購自 Zymo Research)萃取出 DNA，萃取流程參考使用說明。

(7)、 Quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR) :

透過 StepOnePlus™ Real-Time PCR system (Applied Biosystems)上的 Power SYBR Green Master Mix (# 4367659, Thermo Fisher Scientific) 進行 qPCR，便可定量 HeLa 細胞中的 DNA 數量。在進行 qPCR 時，所有試樣皆以一式三份同以下步驟進行配置。將兩倍體積(24 μ l) 的 SYBR Green 與一倍體積(12 μ l) 的 1 uM 引子 (primer)混合後平均分入 3 管，也將 15 ul 的混合物分配到控制組無模板的 PCR 管中進行對照。然後，將 12 μ l 的 10 ng 基因組 DNA 加至管中。最後再利用低殘留性移液尖頭(low retention tip) 取出 15 μ l 的最終混合物移至 optical tubes。蓋好管子並用 Kimwipe 清潔表面後，放入 StepOnePlus™ Real-Time PCR 系統進行 qPCR 分析。

(8)、 WST-1 assay :

要測試細胞在 96 孔盤裡的活性，首先先在每孔內加入 10 μ l 的 WST-1 試劑 (購自 Abcam)，靜置在 37°C、5% CO₂的環境下一個小時後，於每一個孔中取出 100 μ l 的細胞培養液，轉置於 ELISA 96 孔盤，偵測 440nm 的吸收波長，並且使用 660nm 的波長作為參照值，使用 ELISA Reader (Tecan Infinite M1000 Pro) 讀取。

(9)、 Mito Stress Test 海馬實驗 :

轉染前一天將 2×10^4 HeLa 細胞接種在帶有 80 μ l DMEM 的 Seahorse XF96 Microplate (Agilent) 中。海馬細胞盤周圍的盤中也加入了 80 μ l DMEM 以保持細胞盤的濕度。每個檢測探針都浸在 200 μ l 校準液中，並在 37°C，無 5% 二氧化碳的環境下靜置過夜。隔天，將細胞培養基替換為 180 μ l 分析培養基 (DMEM[pH 7.4], 2mM L-麩醯胺酸, 2%FBS)，檢測前 1 小時保持在 37°C、無 5% 的 CO₂ 濃度的環境當中。沒有細胞的孔也加入了 180 μ l 的培養基。利用海馬實驗組提供的覆蓋盤，分別在 A 口注入 20 μ l, 10 uM 寡黴素，在 B 口注入 22 μ l, 10 μ M 的 FCCP，在 C 口注入 25 μ L、5 μ M 的魚藤酮/抗黴素 A 到含有細胞的每個孔中。沒有細胞的孔中仍等量的加入了培養基至 A、B、C 口。配置完成後便可通過 Seahorse XFe96 分析儀 (Agilent) 進行校準和分析。

(10) 、 Statistical analysis :

全數的實驗數據皆使用 Prism 6 software (GraphPad Software, San Diego, CA)。數據顯示方式使用平均 ± 標準差, 需作對照的數據使用 t-tests 呈現, p 值 <0.05 代表此數據具有統計顯著性。

參、研究結果與討論

1、 研究結果

(1) 、 證明 mito-Cas9 能夠進入粒線體

目的：確定 MTS 和 Cas9 的組合能有效的將 Cas9 送入粒線體中，以利進行後續實驗。

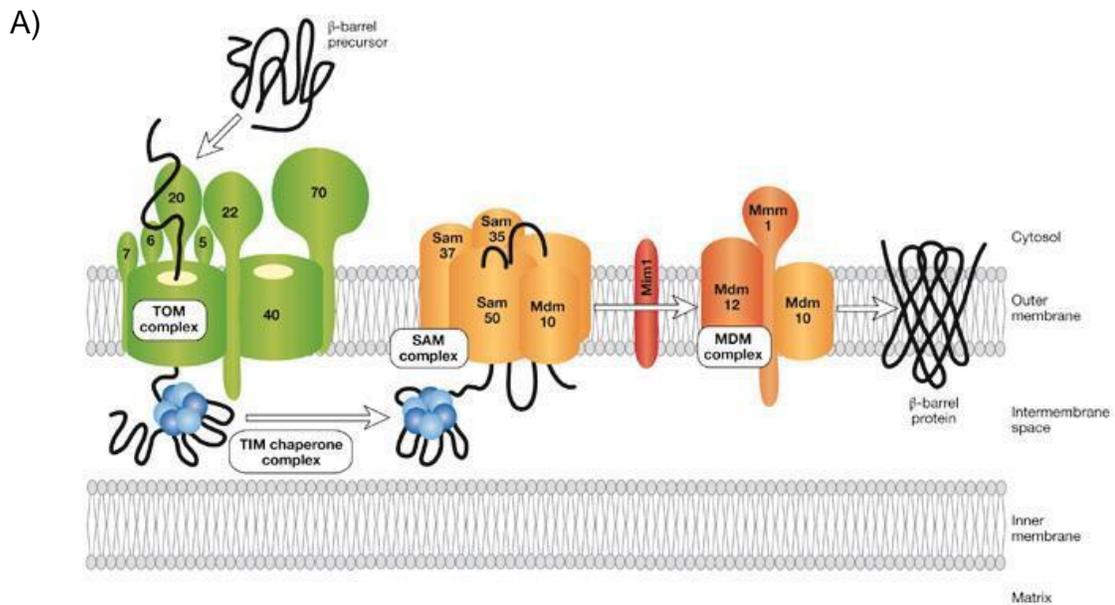


圖 13- A : SAM (Sorting and Assembly Machinery complex) 將蛋白嵌入外膜

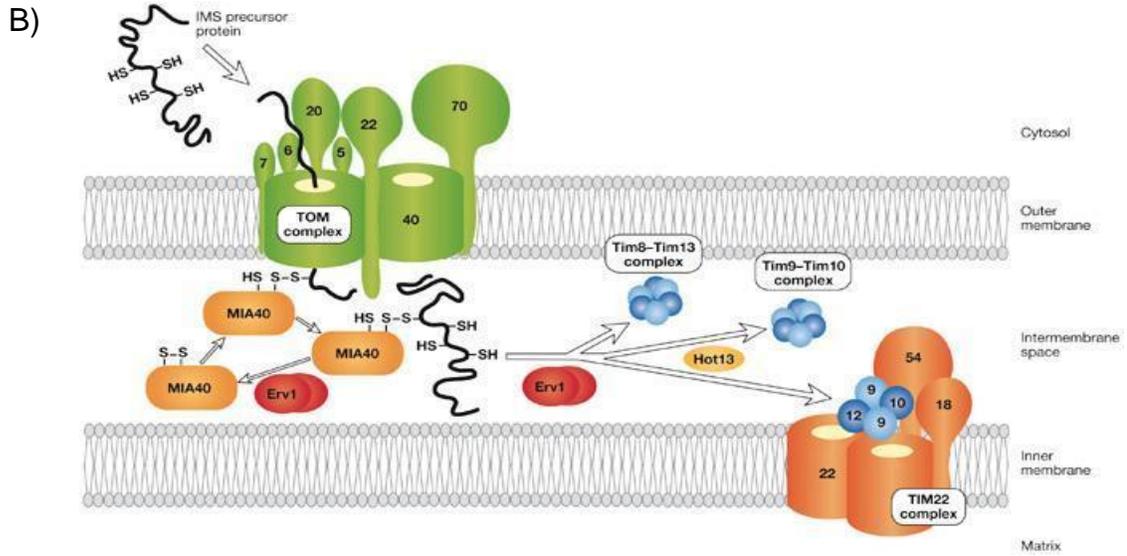


圖 13-B：使用共價修飾能夠將蛋白擋在外膜和內膜中間的膜間隙中

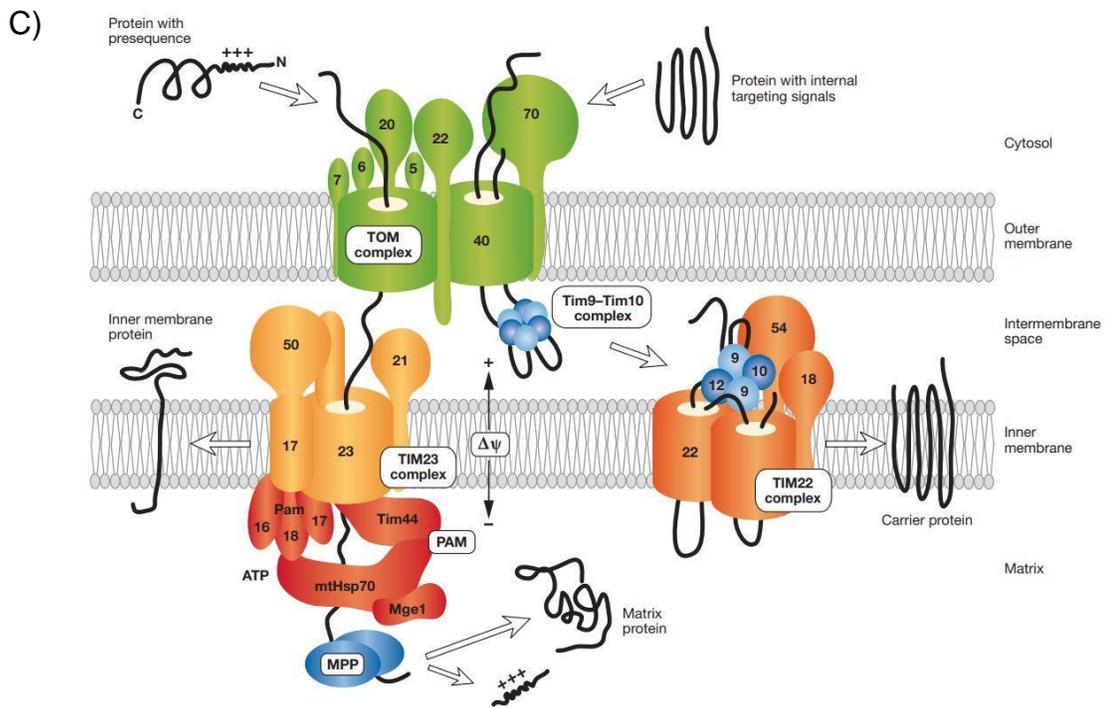


圖 13-C：粒線體內膜之轉位酶複合體（Translocase of the Inner Membrane complex, TIM）分為兩種：TIM22 能夠將蛋白嵌入內膜，TIM23 能夠將蛋白送入內膜內的基質中

圖 13：蛋白質送入粒線體之機制[11]

- 要將 CRISPR/Cas9 系統應用在粒線體基因上，首先需要將 Cas9 蛋白和嚮導 RNA 送入粒線體。因為粒線體大部分所需的蛋白質都是由細胞核裡的基因轉錄轉譯出來的，因此細胞本身就具有將蛋白質送入粒線體的機制。穿越粒線體外膜皆需要轉位酶複合體（Translocase of the Outer Membrane complex, TOM），而穿越外膜後，依照蛋白質輸送的目的地分為四種途徑：SAM（Sorting and Assembly Machinery complex）能夠將蛋白嵌入外膜（見圖 13-A）；使用共價修飾能夠將蛋白擋在外膜和內膜中間的膜間隙中（見圖 13-B）；粒線體內膜之轉位酶複合體（Translocase of the Inner Membrane complex, TIM）主要分兩種：TIM22 能夠將蛋白嵌入內膜，TIM23 能夠將蛋白送入內膜內的基質中（見圖 13-C）。
- 大部分送入粒線體基質的蛋白質以前驅蛋白（precursor protein）的形式運送，而其序列的前端常含有兩親（amphiphilic）的 α 螺旋狀粒線體標的訊號序列（Mitochondrial Targeting Sequence, MTS）（通常接在 N 端），以讓 TOM 上的受體辨認其序列。這時伴侶分子（chaperones）會結合在前驅蛋白上，以防此序列在還未進入粒線體之前就折成了具功能性的形狀，妨礙運輸。此含有 MTS 的前驅蛋白在有了 TOM 的辨認後，利用主動運輸的方式由 TOM 通道進入膜間隙中，而同時此序列前端（MTS 端）會再從 TIM 通入，這時伴侶分子會再次結合在前驅蛋白上，以幫助前驅蛋白進入基質中並防止進入基質的前驅蛋白再次滑回通道內，最後 MPP（mitochondrial processing peptidase）會把此序列的 MTS 切除，前驅蛋白最後在靠伴侶分子的幫助下形成具有功能性的蛋白，完成運輸蛋白的工作 [11]。

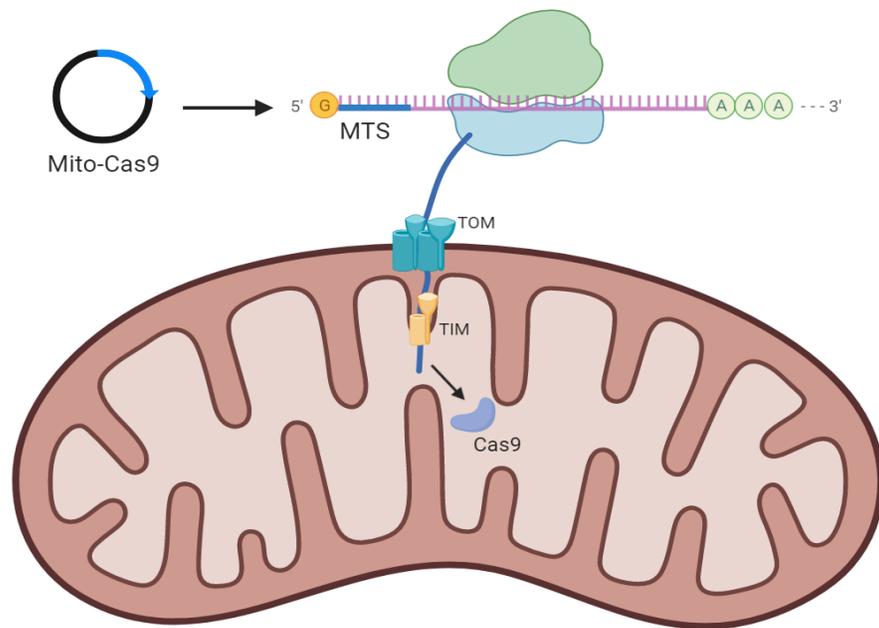


圖 14：此實驗 mito-Cas9 送入粒線體之機制

→ 因 CRISPR/Cas9 系統在此實驗中編輯的 DNA 位於粒線體基質中，需要將 Cas9 蛋白輸送至內膜內，因此使用的機制為前述提到的第四種蛋白質輸送方法：蛋白會先經由 TOM 穿越外膜，再經由 TIM23 穿越內膜。

→ 此實驗為了要讓 Cas9 蛋白送入粒線體中，會讓 Cas9 的前端有 MTS 的序列，以達到送入粒線體基質的目的（Cas9 和 MTS 之詳細序列見附錄 1）。

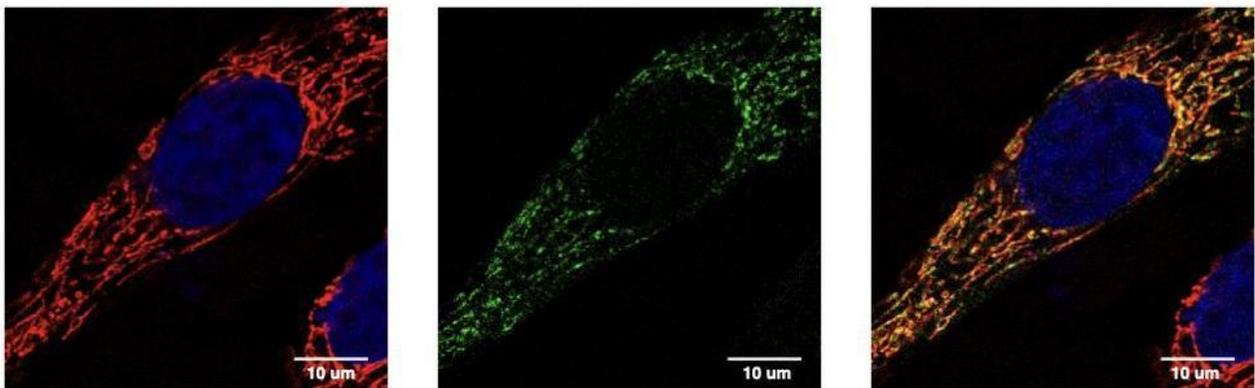


圖 15：mito-Cas9 localization 共軛焦顯微鏡拍攝結果

結果說明：

- 我們重複證實了接上 MTS 的 mito-Cas9 送入粒線體的效率
- 圖 15 是利用免疫組織化學染色法在共軛焦顯微鏡觀察拍攝的節果。我們利用了細胞轉染將帶有 MTS 的 Cas9 質體送進細胞並在一天後進行免疫組織化學染色法來觀察 Mito-Cas9 在細胞中的分布。我們利用 DAPI 進行細胞核染色（藍）、用 Mito-tracker 進行粒線體染色（紅）、並利用 Anti-flag 進行 Cas9 的染色（綠）。
- 由上圖可知，mito-Cas9 的染色（綠）與粒線體（紅）位置重疊，在右手邊的重疊照片中成橘色，驗證此 MTS 和 Cas9 的組合確實能被送入粒線體中。
- 後續的實驗皆會使用此 mito-Cas9 做測試。

(2) 、 證明 mito-sgRNA 能夠進入粒線體

目的：確定何種粒線體標的訊號序列(Mitochondrial Targeting Sequence, MTS)與 sgRNA 的組合能最有效的將 sgRNA 送入粒線體中，以利進行後續實驗。

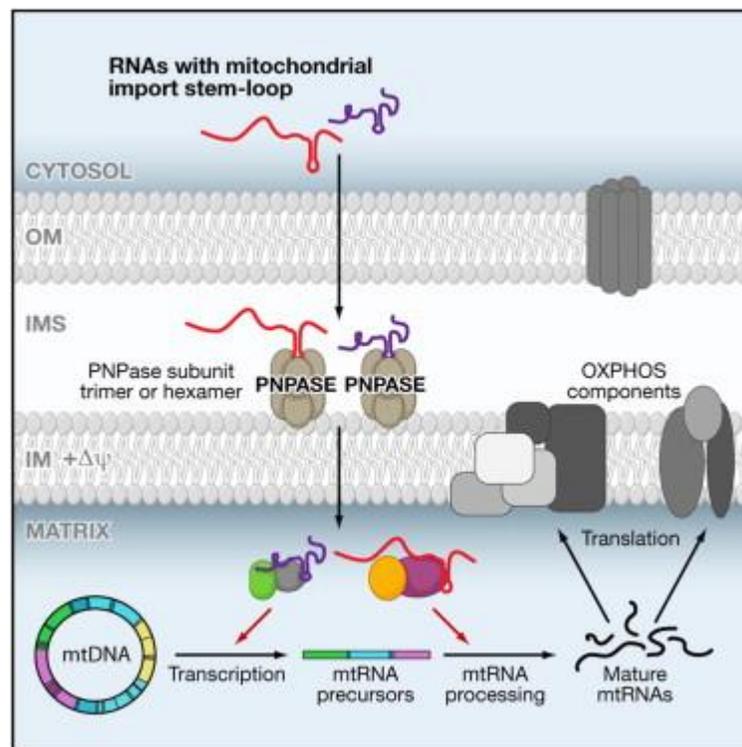


圖 16 RNA 送入粒線體之機制[12]

- 雖然把 RNA 送入粒線體的機制也是細胞本身具有的功能，但此機制的確切運作方式還尚未有確立的解釋。目前有學者猜想此輸送機制包含了一個叫做多核苷酸磷酸化酶（polynucleotide phosphorylase, PNPase）的蛋白。PNPase 為一個核糖

核酸外切酶，而人類的 PNPase 主要存在於粒線體中，除了參與 rRNA 的加工和 mRNA 的降解作用外，更有說法說 PNPase 還參與了引導一些 RNA 進入粒線體的機制，此設想也經由了多方面的實驗支持。如圖 16 所示，目前知道具有這樣功能的 PNPase 位於粒線體的膜間隙中，會辨認要進入粒線體的 RNA 的特殊莖環結構，但此機制還有許多尚未了解的部分，像是如何讓 RNA 通過外膜及內膜等等 [11]。

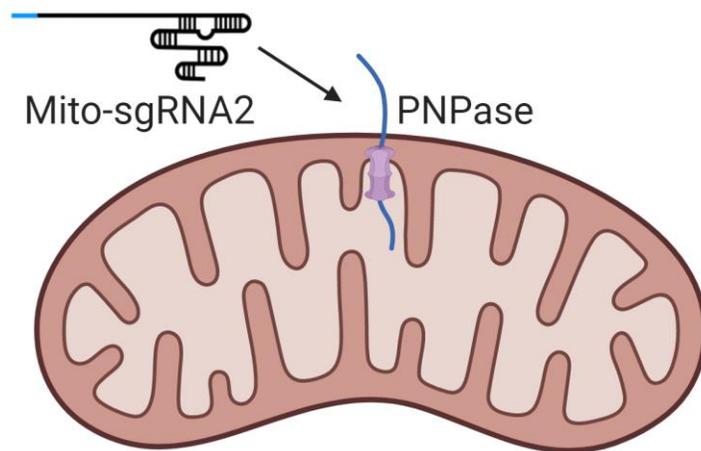


圖 17：此實驗 mito-sgRNA 送入粒線體之機制

→ 此實驗為了將 sgRNA 送入粒線體中，會讓 sgRNA 的前端接上 MTS 的序列，以達到送入粒線體基質的目的。

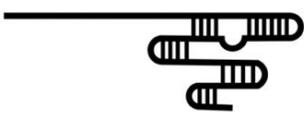
	未經修飾的sgRNA
	延長片段-1 (加在5'的 target gene 前) (序列 CACTCACAGTCG)
	延長片段-2: 3'-UTR (3' untranslated region, 3'非轉譯區) (序列: CAGAAGAAGTGACGGCTGGGGGCACAGTGGGCTGGGCG CCCCTGCAGAACATGAACCTTCCGCTCCTGGCTGCCACA GGTCCTCCGATGCTGGCCTTTGCGCCTCTAGAGGCAGC CACTCATGGATTCAAGTCCTGGCTCCGCCTCTTCCACT)
	Hair-pin shaped MTS (加在5' 或 internal)

圖 19 : 圖 20 之圖示



Type of MTS \ Location of modification	RP	F1D1	MRP	HD	55y
5'-MTS	mito-sgRNA3	mito-sgRNA4	mito-sgRNA5	mito-sgRNA6	mito-sgRNA7
Internal MTS	mito-sgRNA8	mito-sgRNA9	mito-sgRNA10	mito-sgRNA11	mito-sgRNA12
5'-MTS + 3'-UTR	mito-sgRNA13	mito-sgRNA14	mito-sgRNA15		

圖 20 : sgRNA 和 MTS 的測試組合 (共十五種) (詳細序列見附錄 2)

→ 把 haripin shaped motif 和延長片段兩種 MTS 分別嘗試接在 5'、中間和 3' 的位置, 加上原先未加任何 MTS 的 sgRNA (mito-sgRNA1) 做控制組, 排列組合出共 15 種 mito-sgRNA (見圖 20)。

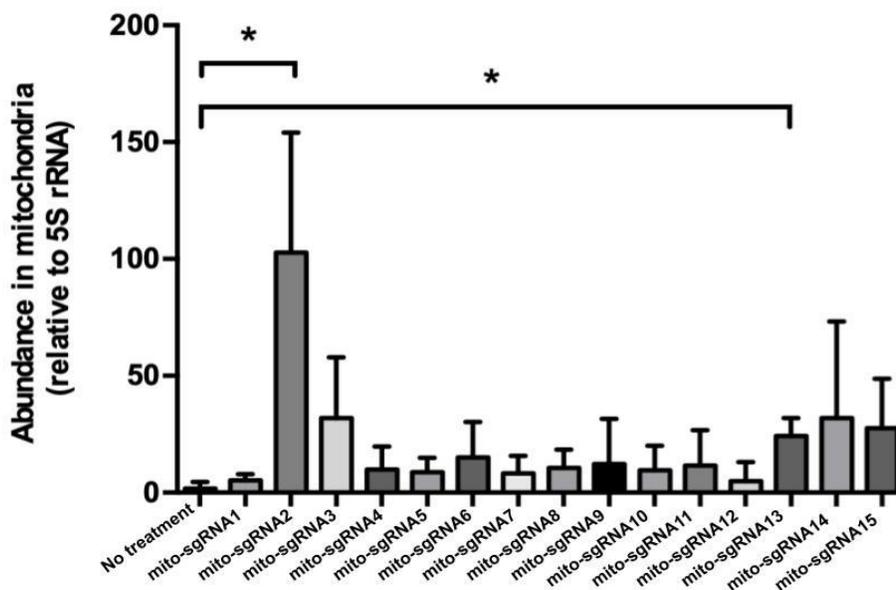


圖 21 : Mito-sgRNA localization RT-qPCR 實驗結果

結果說明：

- 我們首先使用 lipofectamine transfection 的方法進行細胞轉染，將帶有 sgRNA 的質體送入細胞內，並在九個小時後萃取出這些 sgRNA，進行 RT-qPCR，分析這些不同的 sgRNA 組合和 rRNA（控制組）比較起來的量，以推測哪一種 sgRNA 在粒線體中的含量最多，含量愈多，也就代表傳送效率愈高。

$$\text{Relative abundance} = \frac{[\text{guide RNA}]_{\text{Mito.}}}{[5S \text{ rRNA}]_{\text{Mito.}}}$$

圖 22 : mito-sgRNA relative abundance 計算方式

- 圖 21 的實驗結果的 y 軸代表相對於 5S rRNA（以每一個粒線體既有的 rRNA 量做控制變因）的 sgRNA 量比值（計算方法如圖 22），可得知，在所有組合中，mito-sgRNA2 成功送入粒線體的量最高，比 no treatment 的相對值高出約 100，比沒有接 MTS 的 sgRNA1 的相對值高出約 95，並達到統計數據的顯著差異，代表 sgRNA2 在此實驗中具有最高的傳送效率。

→ 由此實驗的數據得到驗證，只有接「藍色」延長片段的 mito-sgRNA2 送入粒線體的效能最高，因此之後皆以此組別的 sgRNA 做後續實驗。

(三)、 探討 CRISPR-Cas9 系統對粒線體功能的影響

1. 嘗試利用 CRISPR-Cas9 系統剪輯粒線體 DNA

目的：利用能夠成功送入粒線體的 mito-Cas9 和 mito-sgRNA2，測試此基因剪輯系統用於特定粒線體基因的剪輯效率。

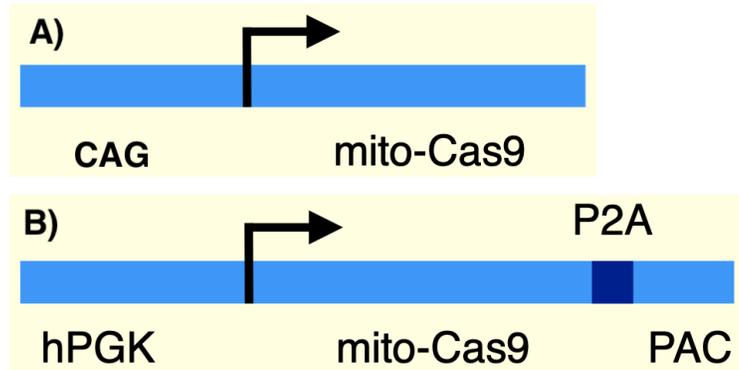


圖 23： mito-Cas9 質體設計

→ 在研究中，我們將 Cas9 以質體形式送入細胞的原因是因為 Cas9 蛋白無法輕易穿過粒線體雙層膜，但若以質體形式送入，則細胞在表現質體時，可以透過 TOM 和 TIM 將肽鏈送進粒線體基質後再進行蛋白質摺疊，進而達到將 Cas9 蛋白送入粒線體內的效果。前人曾測試過 CAG 啟動子與 mito-Cas9 基因鑲嵌而成的質體（見圖 23-A），結果因毒性的問題所擾。於是，我們決定利用一個較弱的啟動子 hPGK 取代原先使用的 CAG（見圖 23-B）。除此之外，我們也嵌入了 puromycin 抗性基因（PAC），而 P2A（一 2A 胜肽）位於 mito-Cas9 基因和 PAC 中間，可進行自我剪切，讓整個序列在轉錄過程中可以一並產生 mito-Cas9 與嘌呤霉素抗體。藉此，我們便可以透過 puromycin selection 選取轉染成功（存活於 puromycin 環境下）的細胞進行研究。

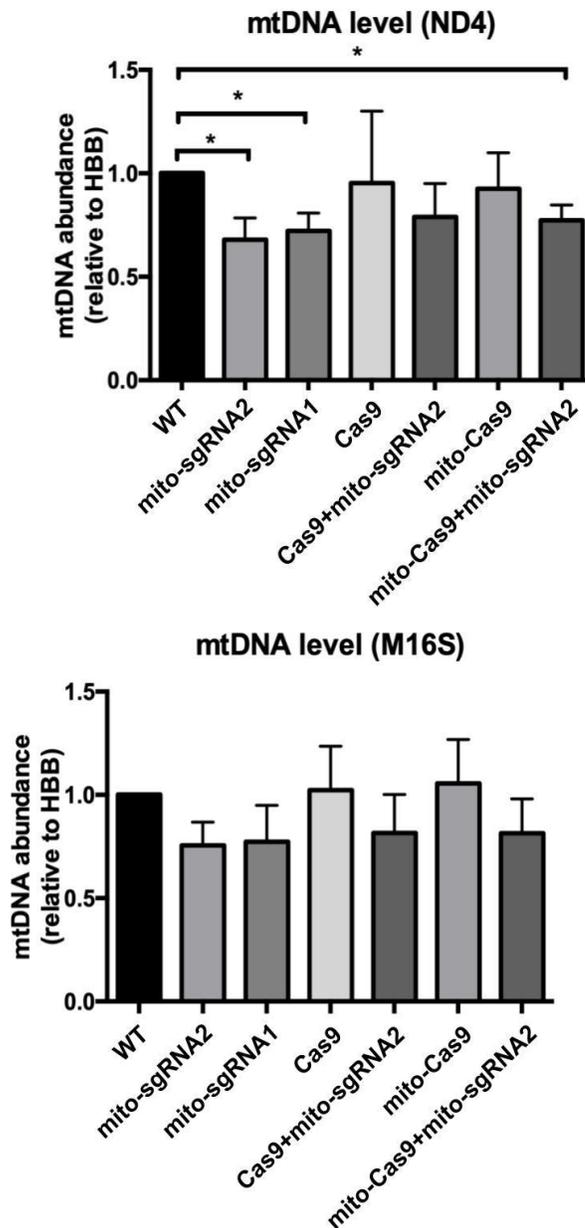


圖 24 : Mito-Cas9 system qPCR 實驗結果

結果說明：

→ 設計好質體之後，我們利用 Lipofectamine 轉染技術將質體送入細胞，再利用 Puromycin selection 篩選出轉染成功的細胞。隨後，我們送入前述擁有最高傳送效率的 mito-sgRNA2，並觀察一天後粒線體基因的變化量。我們將基因體萃取後，進行 qPCR 分析，並將粒線體中 ND4 數量(負責表現電子傳遞鏈上的氧化還原酶基因)除以 HBB 數量(細胞核中負責表現血紅蛋白的基因)(計算方法見圖 25)。這項動

作可以用來除去細胞數量多寡所帶來的差異並得到細胞群中粒線體與細胞核基因數量的相對豐富度。

$$\text{Relative abundance} = \frac{[\text{ND4}]_{\text{Mito}}}{[\text{HBB}]_{\text{Endo}}}$$

圖 25： mtDNA 特定基因 relative abundance 計算方式（以 ND4 基因為例）

- 由圖 24 實驗結果中，我們觀察到 mito-Cas9+sgRNA2 的組合確實有基因數量降低的現象
- 發現一個隱憂：只送入 mito-sgRNA1 或 mito-sgRNA2 的實驗組也都有了粒線體基因數量降低的現象。我們推測，能夠大幅降低粒線體基因的緣故，可能是因為 mito-sgRNA2 的影響導致細胞進行粒線體自噬，而導致大量粒線體基因缺失。

2. WST-1 Assay

目的：探討 CRISPR-Cas9 系統對細胞活性的影響

為了要證明 CRISPR-Cas9 系統確實對細胞活性有影響，我們進行了 WST-1 細胞活性檢測，特別觀察 mito-sgRNA 影響細胞活性的程度。雖然圖中 mito-Cas9 看似不會影響細胞活性，但我們仍不排除它具有的影響力，因此也對 Cas9 質體進行 WST-1 檢測。我們將 Cas9、mito-Cas9、Cas9+sgRNA2 與 mito-Cas9+sgRNA2 各自轉染進細胞一天後，利用 Puromycin selection 選出質體轉染成功的細胞進行 WST-1 檢測。

WST-1 細胞活性檢測法的原理，是觀察細胞分解甲臍(tetrazolium salt) 的情形來判定細胞的活性程度。這方法可以當作細胞活性判斷依據的主要原因是因為甲臍會被活細胞裡的脫氫酶(dehydrogenase)分解成橘黃色的 WST-8 formazan。因此，活細胞越多，甲臍被分解的速率越快、分解的數量也越多。而分解的數量可以透過 WST-8 formazan 橘黃色的深淺來判定，顏色越深，代表甲臍的分解量大，所以細胞活性高。

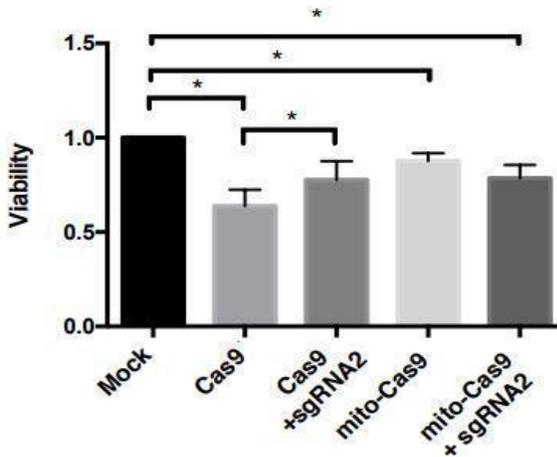


圖 26 : WST-1 實驗結果

結果說明：

- 我們觀察到 mito-Cas9+sgRNA2 的組合確實會顯著的影響細胞活性
- 而我們也發現在單一送入 Cas9 和 mito-Cas9 的實驗組中，細胞活性也受到了影響。
- 這代表著能影響細胞活性的並非只有 mito-sgRNA2，其實 Cas9 蛋白也是影響細胞活性的其中一個因子。
- 綜合實驗數據，我們可以看出 Cas9、Cas9+sgRNA2、mito-Cas9 與 mito-Cas9+sgRNA2 其實都會對細胞活性有所影響。

3. Seahorse Assay

目的：探討 CRISPR-Cas9 系統對粒線體功能的影響

我們進一步推論，Cas9 與 sgRNA 對細胞活性的影響可能是源自於粒線體的功能受礙。為了更加瞭解它們對粒線體的影響，我們進行了海馬實驗，希望可以從海馬實驗中得知更多關於 Cas9 和 mito-Cas9 對粒線體功能所造成的變化。

實驗說明：

- 同 WST-1 的前置處理，我們將 Cas9、mito-Cas9、Cas9+sgRNA2 與 mitoCas9+sgRNA2 各自轉染進細胞一天後，利用 Puromycin selection 選出質體轉染成功的細胞進行海馬檢測。

- 海馬檢測的原理是藉由持續性的測量細胞上清液中的氧氣濃度和質子通透量，得到該粒線體的耗氧率 (Oxygen Consumption Rate, OCR)。過程中，海馬偵測儀將陸續加入不同藥物，觀察 OCR 的變化。
- 如圖 27，未添加任何藥物之前所偵測到的 OCR 是粒線體正常情況下的基礎耗氧率 (圖 28-A)。
- 隨後添加 ATP 合成酶抑制劑 - 寡黴素(Oligomycin) - 之後，可以看到耗氧率大幅降低。因為透過 ATP 合成酶流入粒線體基質的管道被抑制(圖 28-B)，因此偵測到的只剩質子滲漏時的耗氧率(圖 28-C)。
- 接著加入羰基氰化物-4-(三氟甲氧基)苯腙(Carbonyl cyanide-p-trifluoromethoxyphenylhydrazone, FCCP)後，此藥物可以讓質子大量通過粒線體皺褶，因此可以用來偵測粒線體最大耗氧率的值為何(圖 28-D)。
- 最後加入的藥物為抗黴素 A(Antimycin A)和魚藤酮(Rotenone)，分別作用於電子傳遞鏈上的 Complex III 和 Complex I，目的是要完全抑制電子傳遞鏈的功能，觀察細胞的最低耗氧率為何(圖 28-F)。

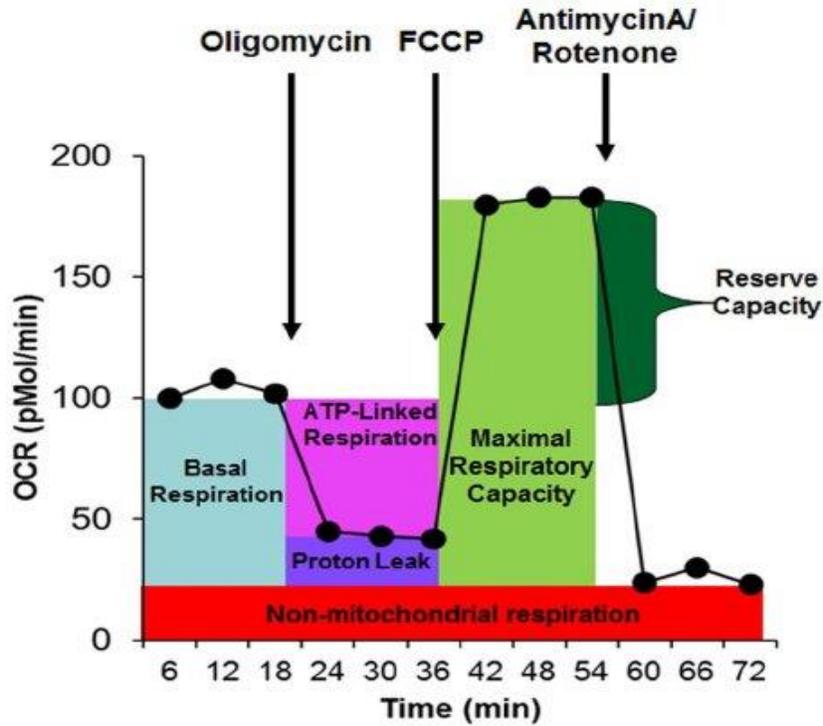


圖 27：海馬實驗藥物添加與耗氧率流程圖

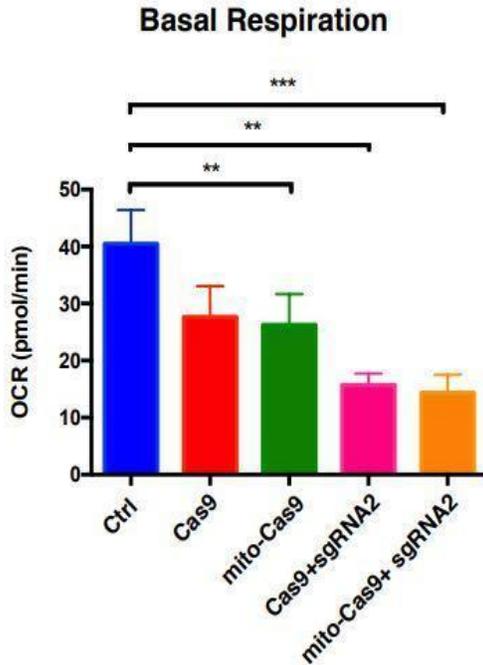


圖 28-A：基礎耗氧率

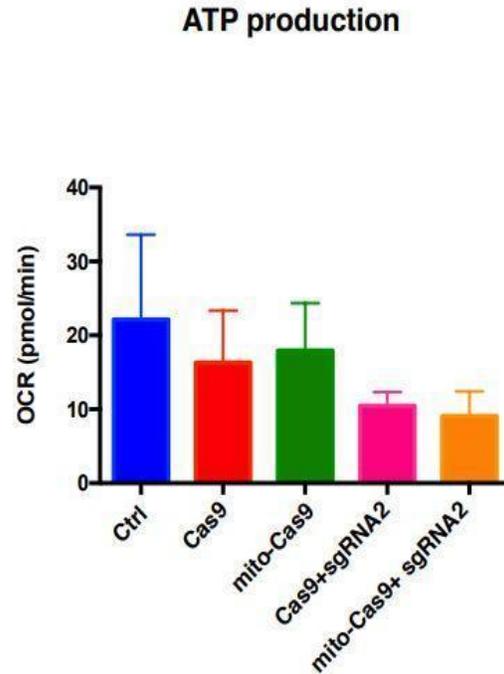


圖 28-B：ATP 生成相關耗氧率

Proton leak

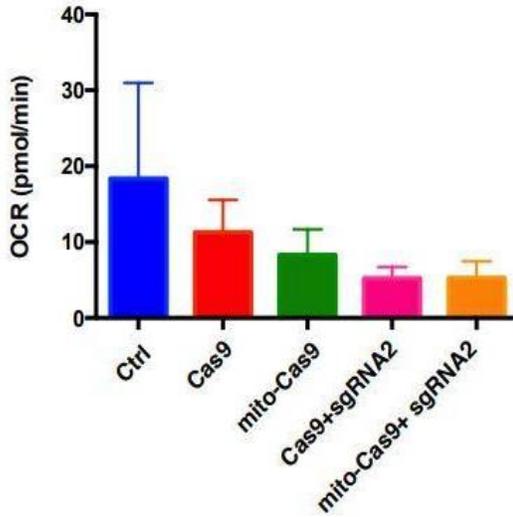


圖 28-C : 非 ATP 生成相關耗氧

Maximal Respiration

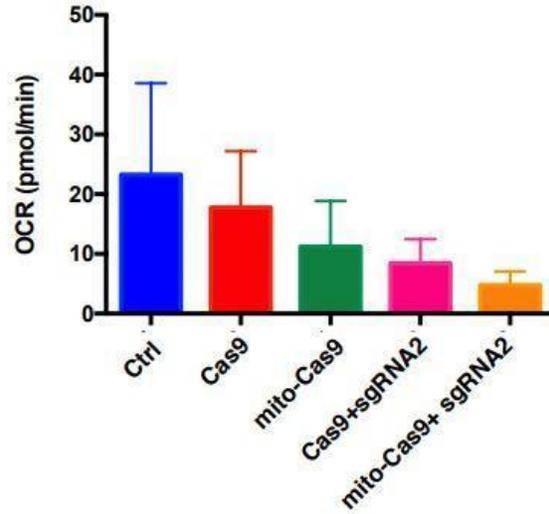


圖 28-D : 最大耗氧率

Coupling effect

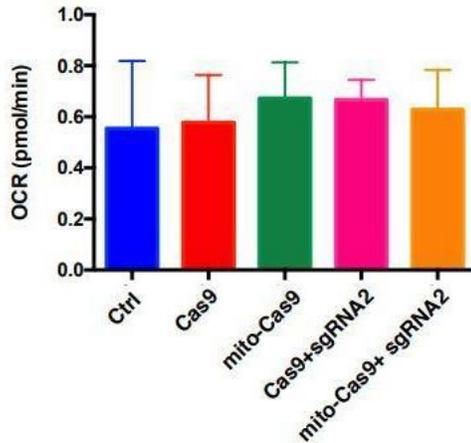


圖 28-E : ATP 相關膜電位差耗氧率

Non-Mito. respiration

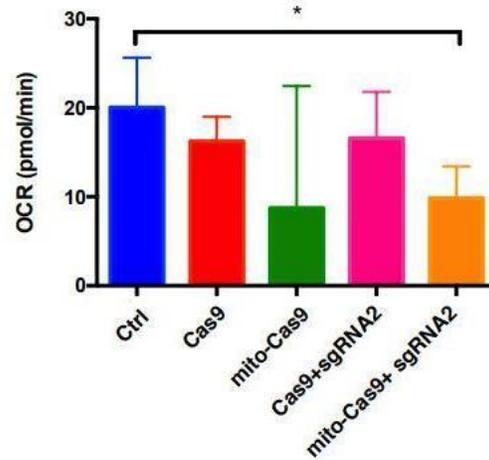


圖 28-F : 非粒線體耗氧率

圖 28 : Mito-Cas9 system toxicity Seahorse Assay 實驗結果

結果說明：

- 我們觀察到 mito-Cas9 和 sgRNA2 皆會對粒線體功能造成一定程度的影響，尤其是以 Basal Respiration 的結果更為顯著。
- 同時送入 mito-Cas9 和 sgRNA2 的實驗組，造成了粒線體 Basal Respiration 效率顯著降低的現象
- 其他的對照組，像只有送入 Cas9 或 mito-Cas9 或是同時送入 Cas9 和 sgRNA2 的對照組，同時也出現了粒線體 Basal Respiration 效率顯著降低的現象
- 由此看出其實 CRISPR-Cas9 系統裡的每一個元件都會對粒線體造成一定程度的影響，Cas9、mito-Cas9 和 sgRNA2 皆是。

(四)、嘗試將 CRISPR-Cas9 系統用於編輯粒線體 DNA

目的：嘗試利用同時送入 mito-Cas9 和 mito-sgRNA 的方式將 CRISPR-Cas9 系統用於編輯粒線體 DNA

最後，在知道把 CRISPR-Cas9 系統使用在粒線體具有一定的影響的情況下，我們還是想知道此系統在剪切 mtDNA 的效率為何。此實驗中，我們把 mito-Cas9 和 mito-sgRNA 使用 Gibson Assembly 鑲嵌在同一個質體中而非依序送入。藉此，我們可以減少細胞進行轉染的次數，而降低對細胞的傷害，提升對 mito-Cas9 的接受度。除此之外，我們希望透過同時轉錄與轉譯 mito-Cas9 和 mito-sgRNA 的機制降低 CRISPR-Cas9 系統在細胞中表現的時間，盡可能減少其對細胞的影響。

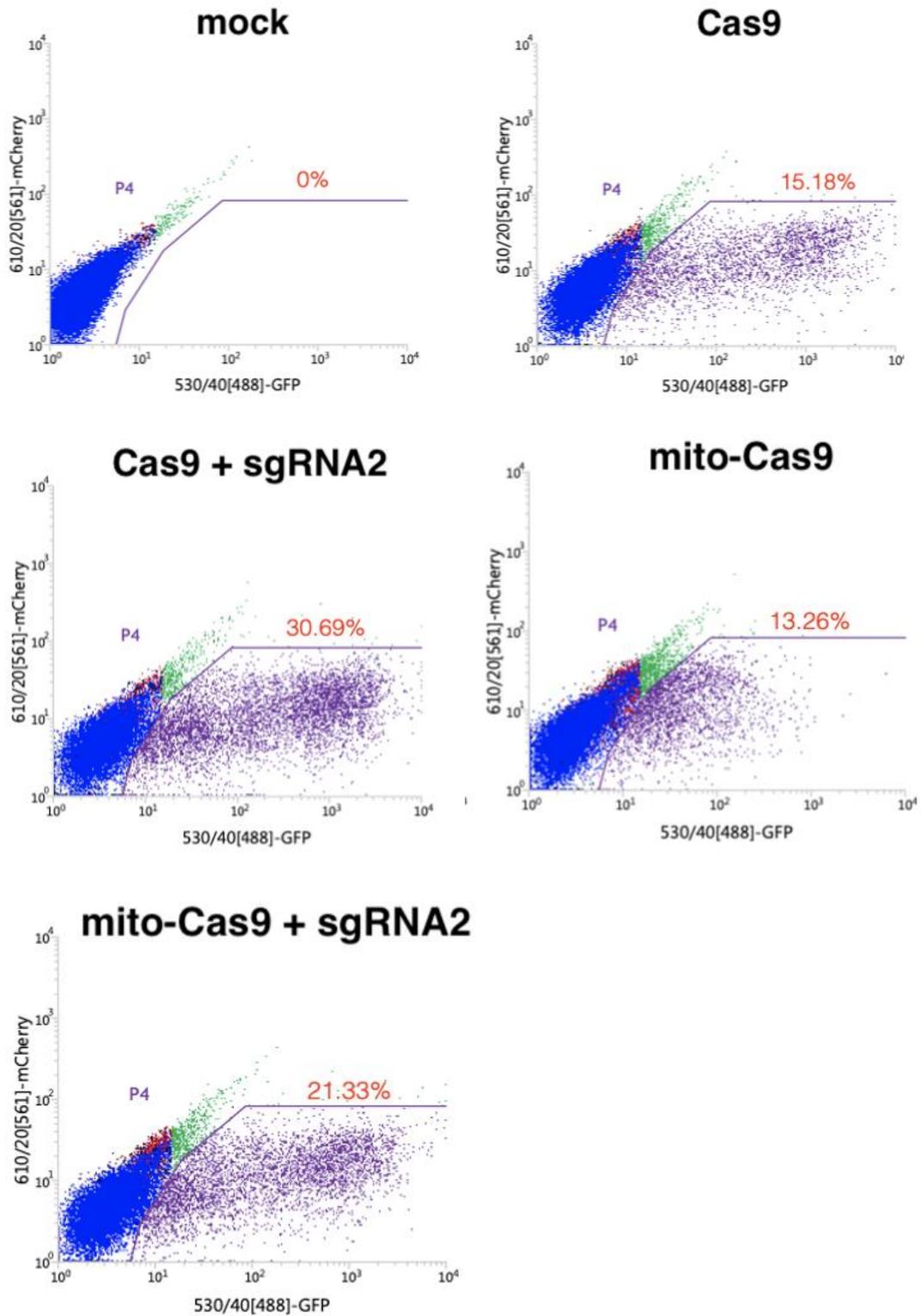


圖 29 : Mitochondrial genome targeting 實驗之 GFP 篩選結果

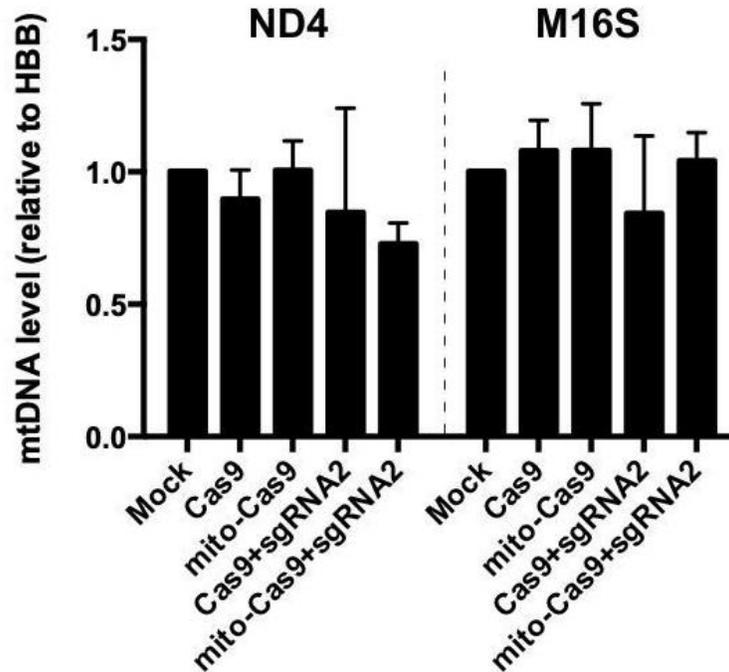


圖 30 : Mitochondrial genome targeting qPCR 實驗結果

結果說明：

- 我們首先使用 lipofectamine 的方式進行細胞轉染，將含有 mito-Cas9、mito-sgRNA 和 GFP 的質體送入細胞中，並在 66 小時後使用流式細胞儀取出帶有 GFP 訊號的細胞（如圖 29），並萃取出其 DNA 進行 qPCR 的分析，以 HBB 基因（細胞核 DNA 的基因）的含量作為控制變因（計算方式同圖 25），觀察 ND4 和 M16S 的量是否只有在同時送入 mito-Cas9 和 sgRNA2 時才有明顯變少的現象。
- 由圖 30 的 qPCR 結果可看出，在 ND4 基因的部分，同時送入 mito-Cas9 和 sgRNA2 的實驗組和其他的控制組比較起來的確有讓 ND4 的含量變少的現象
- 我們推測這些基因可能受到了 CRISPR-Cas9 系統的裁剪，造成基因量明顯減少。

2、 討論

(1)、 證明 mito-Cas9 能夠進入粒線體：

經由免疫組織化學染色法和共軛焦顯微鏡的結果可看出，粒線體染色（紅）和 Cas9 染色（綠）在重疊圖上呈現橘色，代表兩者的位置有重疊，證明接上了 MTS 的 Cas9 確實能夠被送入粒線體基質中。後續的實驗皆使用了此 mito-Cas9 做測試。

(2)、 證明 mito-sgRNA 能夠進入粒線體：

經由 RT-qPCR 的分析，發現在多種基因片段的測試中，sgRNA2 送入粒線體的效率最佳，但此 sgRNA 所擁有的 MTS 片段只是一個加長的基因序列，本身並沒有莖環的形狀，猜測能夠送入粒線體的原因可能是因為此片段接在原本設計好的 sgRNA 上後，整個 mito-sgRNA 的某些部分會產生類似莖環的形狀，導致此序列有和 MTS 相似的功能。後續的實驗皆使用了 mito-sgRNA2 做測試。

(三)、 探討 CRISPR-Cas9 系統對粒線體功能的影響：

在利用 lipofection 把 CRISPR-Cas9 系統(使用前述的 MTS6-Cas9 和 sgRNA2) 送入粒線體內，再使用 qPCR 分析此系統對目標基因的影響後，我們發現實驗結果並不如預期，不含 mito-Cas9 或 mito-sgRNA2 的對照組也有造成目標基因減少的現象，尤其是只含 sgRNA 或 sgRNA2 的組別。我們猜測原因是因為此系統對粒線體負面影響的緣故，導致粒線體內的基因減少，而為了確認此猜想，我們進行了細胞活性的實驗。我們由 WST-1 細胞活性檢測法發現不單是 sgRNA2，MTS6-Cas9 其實也會使細胞活性下降，代表這兩個應用於粒線體基因編輯的 CRISPR-Cas9 元件皆有對粒線體造成影響的疑慮。後續更精密的海馬實驗測試了粒線體的功能，也發現送入 Cas9 和 sgRNA 造成了粒線體功能下降的現象，代表 CRISPR-Cas9 系統造成粒線體功能受影響是一個未來仍需被關注的環節。

(四)、 嘗試將 CRISPR-Cas9 系統用於編輯粒線體 DNA：

在承認 Cas9 蛋白與 sgRNA 有負面影響的情況下，我們嘗試利用降低轉染次數以及減少表現時間等方法，盡可能地減低 CRISPR-Cas9 對細胞的影響。利用此方法，我們再次使用了 lipofection 和 qPCR 去探討 CRISPR-Cas9 運用在粒線體基因的可能性。我

們把 mito-Cas9 和 mito-sgRNA2 接成在同一個質體中一起送入細胞中。另外，我們也使用了 GFP 的方式篩選掉沒有送入 CRISPR-Cas9 系統的細胞，以更明顯的看出實驗結果數據的差別。而從目標基因為 ND4 基因的實驗結果中發現，只有同時送入 mito-Cas9 和 mito-sgRNA2 的實驗組有造成基因數量明顯下降的現象，代表 CRISPR-Cas9 的確有剪輯此粒線體基因的可能性。不過後續仍須使用其他實驗證實此猜想。

肆、結論與應用

自 1987 年 CRISPR 機制的發現，至 2012 年埃瑪紐埃勒·沙爾龐捷(Emmanuelle Charpentier)和詹妮弗·杜德納(Jennifer Doudna)的改良，到現在各領域的廣泛使用，CRISPR-Cas9 系統已向眾人展現其強大的剪輯功能。本研究希望能夠拓展此技術，使其進行粒線體基因之編輯。

本研究初期沿用了許多前人所發表的文獻及實驗結果，如 mito-Cas9 與 mito-sgRNA 於粒線體的 localization。在驗證前人結論效益後，本研究中的後續實驗皆沿用前人發現效率最好的 MTS6-Cas9 與 mito-sgRNA2 進行測試。

透過 lipofectamine transfection，我們依序將 MTS6-Cas9 與 mito-sgRNA2 送入細胞內，並利用 qPCR 技術定量粒線體基因的多寡，觀察 CRISPR-Cas9 系統是否有進行基因編輯。我們從 qPCR 實驗結果發現在某些陰性對照組中仍出現了基因量減少的狀況。我們推論這是因為 MTS6-Cas9 與 mito-sgRNA2 對粒線體負面影響所產生的現象，後續便進行了 WST-1 細胞活性測驗以及海馬實驗，驗證了此假說。

為了提升粒線體內 CRISPR-Cas9 系統的可行性，我們將 MTS6-Cas9 和 sgRNA2 鑲嵌在同一個質體上，減少了執行轉染的次數，並盡可能降低細胞暴露於 Cas9 蛋白之下的時長。再次進行 qPCR 定量粒線體基因後，觀察到送入 mito-Cas9 與 mito-sgRNA2 的實驗組基因數量有明顯的變化，其它對照組的實驗結果也較為合理，表示著 CRISPR-Cas9 技術於粒線體進行基因編輯的可行性。

在本研究中，我們並沒有直接解決 CRISPR-Cas9 系統對細胞活性的影響，而是選擇在操作時迴避或減少細胞與 Cas9 接觸的時間。雖然最後的實驗結果表示了該技術運用於粒線體的可能性，但是在未來裡，我們仍需要一個更加穩定的剪輯效果。若是能解決 mito-Cas9 對細胞活

性的影響，便能得到更穩定的實驗結果，而這對粒線體基因編輯的發展也將會是一大助長。後續實驗可以探討如何應對此問題，如利用藥物 (mdivi-1) 使粒線體機能優異化並抑制粒線體自噬，或替換為其它影響力較弱的 Cas9 變體 (variants) 等等。

隨著新科技的進步與新想法的滋生，CRISPR-Cas9 系統必將成為更成熟、更有影響力的實驗工具。我們盼此被譽為「上帝的剪刀手」的基因編輯系統能在不久的未來大放其彩。

伍、參考文獻

1. Chinnery, P. F., & Hudson, G. (2013). Mitochondrial genetics. *British Medical Bulletin*, 106(1), 135–159. <https://doi.org/10.1093/bmb/ldt017>
2. Schon, E. A., DiMauro, S., & Hirano, M. (2012). Human mitochondrial DNA: roles of inherited and somatic mutations. *Nature Reviews Genetics*, 13(12), 878–890. <https://doi.org/10.1038/nrg3275>
3. 蔣書.娟. (2005, April 6). *粒線體疾病 Mitochondrial Disorder*. 罕見疾病一點通-疾病資料庫. <http://web.tfrd.org.tw/genehelp/article.html?articleID=Mitochondrial%2520disorder&submenuIndex=0>
4. Rai, P. K., Craven, L., Hoogewijs, K., Russell, O. M., & Lightowlers, R. N. (2018). Advances in methods for reducing mitochondrial DNA disease by replacing or manipulating the mitochondrial genome. *Essays in Biochemistry*, 62(3), 455–465. <https://doi.org/10.1042/ebc20170113>
5. Chesnut, J. (2018, October 31). Analyzing TALEN vs CRISPR. *GEN - Genetic Engineering and Biotechnology News*. <https://www.genengnews.com/insights/analyzing-talen-vs-crispr/>
6. Gammage, P. A., Moraes, C. T., & Minczuk, M. (2018). Mitochondrial Genome Engineering: The Revolution May Not Be CRISPR-ized. *Trends in Genetics*, 34(2), 101–110. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2017.11.001>
7. Farooq, R., Hussain, K., Nazir, S., Javed, M. R., & Masood, N. (2018). CRISPR/Cas9; A robust technology for producing genetically engineered plants. *Cellular and Molecular Biology*, 64(14), 31. <https://doi.org/10.14715/cmb/2018.64.14.6>

8. Lino, C. A., Harper, J. C., Carney, J. P., & Timlin, J. A. (2018). Delivering CRISPR: a review of the challenges and approaches. *Drug Delivery*, 25(1), 1234–1257.
<https://doi.org/10.1080/10717544.2018.1474964>
9. Wang, G., Chen, H.-W., Oktay, Y., Zhang, J., Allen, E. L., Smith, G. M., Fan, K. C., Hong, J. S., French, S. W., McCaffery, J. M., Lightowers, R. N., Morse, H. C., Koehler, C. M., & Teitell, M. A. (2010). PNPASE Regulates RNA Import into Mitochondria. *Cell*, 142(3), 456–467. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.06.035>
10. Omar García-Lepe, U., & Ma Bermúdez-Cruz, R. (2019). Mitochondrial Genome Maintenance: Damage and Repair Pathways. *DNA Repair- An Update*, 1–21.
<https://doi.org/10.5772/intechopen.84627>
11. Bolender, N., Sickmann, A., Wagner, R., Meisinger, C., & Pfanner, N. (2008). Multiple pathways for sorting mitochondrial precursor proteins. *EMBO Reports*, 9(1), 42–49.
<https://doi.org/10.1038/sj.embor.7401126>
12. Fox, T. D. (2012). Mitochondrial Protein Synthesis, Import, and Assembly. *Genetics*, 192(4), 1203–1234. <https://doi.org/10.1534/genetics.112.141267>
13. Peeva, V., Blei, D., Trombly, G., Corsi, S., Szukszto, M. J., Rebelo-Guiomar, P., Gammage, P. A., Kudin, A. P., Becker, C., Altmüller, J., Minczuk, M., Zsurka, G., & Kunz, W. S. (2018). Linear mitochondrial DNA is rapidly degraded by components of the replication machinery. *Nature Communications*, 9(1), 1–10.
<https://doi.org/10.1038/s41467-018-04131-w>
14. Rose, S., Frye, R. E., Slattery, J., Wynne, R., Tippett, M., Pavliv, O., Melnyk, S., & James, S. J. (2014). Oxidative Stress Induces Mitochondrial Dysfunction in a Subset of Autism Lymphoblastoid Cell Lines in a Well-Matched Case Control Cohort. *PLoS ONE*, 9(1), e85436. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085436>

陸、附錄

1、 Humanized SpCas9 sequence and mitochondria-targeting sequences:

Human codon optimized S. pyogenes Cas9	GACAAGAAGTACAGCATCGGCCTGGACATCGGCACCAACTCTGTGGG CTGGGCCGTGATCACCGACGAGTACAAGGTGCCCAGCAAGAAATTCA AGGTGCTGGGCAACACCGACCGGCACAGCATCAAGAAGAACCTGATC GGAGCCCTGCTGTTTCGACAGCGGCGAAACAGCCGAGGCCACCCGGC TGAAGAGAACCGCCAGAAGAAGATACACCAGACGGAAGAACCGGATC TGCTATCTGCAAGAGATCTTCAGCAACGAGATGGCCAAGGTGGACGAC AGCTTCTTCCACAGACTGGAAGAGTCCTTCTGGTGGAAAGAGGATAAG AAGCACGAGCGGCACCCCATCTTCGGCAACATCGTGGACGAGGTGGC CTACCACGAGAAGTACCCACCATCTACCACCTGAGAAAGAACTGGT GGACAGCACCGACAAGGCCGACCTGCGGCTGATCTATCTGGCCCTGG CCCACATGATCAAGTTCGGGGCCACTTCTGATCGAGGGCGACCTG AACCCCGACAACAGCGACGTGGACAAGCTGTTCATCCAGCTGGTGCA GACCTACAACCAGCTGTTTCGAGGAAAACCCCATCAACGCCAGCGGCG TGGACGCCAAGGCCATCCTGTCTGCCAGACTGAGCAAGAGCAGACGG CTGGAAAATCTGATCGCCCAGCTGCCCGGCGAGAAGAAGAATGGCCT GTTTCGAAACCTGATTGCCCTGAGCCTGGGCCTGACCCCAACTTCAA GAGCAACTTCGACCTGGCCGAGGATGCCAACTGCAGCTGAGCAAGG ACACCTACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGCCAGATCGGCGAC CAGTACGCCGACCTGTTTCTGGCCGCCAAGAACCTGTCCGACGCCAT CCTGCTGAGCGACATCCTGAGAGTGAACACCGAGATCACCAAGGCC CCCTGAGCGCCTCTATGATCAAGAGATACGACGAGCACCACCAGGAC CTGACCCTGCTGAAAGCTCTCGTGCAGCAGCTGCCTGAGAAGTA CAAAGAGATTTTCTTCGACCAGAGCAAGAACGGCTACGCCGGCTACAT TGACGGCGGAGCCAGCCAGGAAGAGTTCTACAAGTTCATCAAGCCAT CCTGGAAAAGATGGACGGCACCGAGGAACTGCTCGTGAAGCTGAACA GAGAGGACCTGCTGCGGAAGCAGCGGACCTTCGACAACGGCAGCATC CCCACCAGATCCACCTGGGAGAGCTGCACGCCATTCTGCGGCGGCA GGAAGATTTTTACCCATTCTGAAGGACAACCGGGAAAAGATCGAGAA GATCCTGACCTTCGCATCCCCTACTACGTGGGCCCTCTGGCCAGGG GAAACAGCAGATTGCCTGGATGACCAGAAAGAGCGAGGAAACCATC ACCCCTGGA ACTTCGAGGAAGTGGTGGACAAGGGCGCTTCCGCCCA GAGCTTCATCGAGCGGATGACCAACTTCGATAAGAACCTGCCCAACGA GAAGGTGCTGCCAAGCACAGCCTGCTGTACGAGTACTTCACCGTGTA TAACGAGCTGACCAAAGTGAATAACGTGACCGAGGGAATGAGAAAGCC CGCCTTCTGAGCGGCGAGCAGAAAAGGCCATCGTGGACCTGCTGT TCAAGACCAACCGGAAAGTGACCGTGAAGCAGCTGAAAGAGGACTACT TCAAGAAAATCGAGTGCTTCGACTCCGTGGAAATCTCCGGCGTGGAAG ATCGGTTCAACGCCTCCCTGGGCACATACCACGATCTGCTGAAAATTA
---	---

TCAAGGACAAGGACTTCCTGGACAATGAGGAAAACGAGGACATTCTGG
AAGATATCGTGCTGACCCTGACACTGTTTTGAGGACAGAGAGATGATCG
AGGAACGGCTGAAAACCTATGCCACCTGTTTCGACGACAAAAGTGATGA
AGCAGCTGAAGCGGCGGAGATACACCGGCTGGGGCAGGCTGAGCCG
GAAGCTGATCAACGGCATCCGGGACAAGCAGTCCGGCAAGACAATCC
TGGATTTCTGAAGTCCGACGGCTTCGCCAACAGAACTTCATGCAGC
TGATCCACGACGACAGCCTGACCTTTAAAGAGGACATCCAGAAAAGCCC
AGGTGTCCGGCCAGGGCGATAGCCTGCACGAGCACATTGCCAATCTG
GCCGGCAGCCCCGCCATTAAGAAGGGCATCCTGCAGACAGTGAAGGT
GGTGGACGAGCTCGTGAAAGTGATGGGCCGGCACAAGCCCCGAGAACA
TCGTGATCGAAATGGCCAGAGAGAACCAGACCACCCAGAAGGGACAG
AAGAACAGCCGCGAGAGAATGAAGCGGATCGAAGAGGGCATCAAAGA
GCTGGGCAGCCAGATCCTGAAAGAACACCCCGTGGAAAACACCCAGC
TGCAGAACGAGAAGCTGTACCTGTACTACCTGCAGAATGGGCGGGATA
TGTACGTGGACCAGGAACTGGACATCAACCGGCTGTCCGACTACGAT
GTGGACCATATCGTGCCTCAGAGCTTTCTGAAGGACGACTCCATCGAC
AACAAAGGTGCTGACCAGAAGCGACAAGAACCGGGGCAAGAGCGACAA
CGTGCCCTCCGAAGAGGTCGTGAAGAAGATGAAGAACTACTGGCGGC
AGCTGCTGAACGCCAAGCTGATTACCAGAGAAAAGTTTCGACAATCTGA
CCAAGGCCGAGAGAGGGCGGCCTGAGCGAACTGGATAAGGCCGGCTT
CATCAAGAGACAGCTGGTGGAAACCCGGCAGATCACAAAGCACGTGG
CACAGATCCTGGACTCCCGGATGAACACTAAGTACGACGAGAATGACA
AGCTGATCCGGGAAGTGAAAGTGATCACCTGAAGTCCAAGCTGGTGT
CCGATTTCCGGAAGGATTTCCAGTTTTACAAGTGCGCGAGATCAACA
ACTACCACCACGCCACGACGCCTACCTGAACGCCGTCGTGGGAACC
GCCCTGATCAAAAAGTACCCTAAGCTGGAAAGCGAGTTCGTGTACGGC
GACTACAAGGTGTACGACGTGCGGAAGATGATCGCCAAGAGCGAGCA
GGAAATCGGCAAGGCTACCGCCAAGTACTTCTTCTACAGCAACATCAT
GAACTTTTTCAAGACCGAGATTACCCTGGCCAACGGCGAGATCCGGAA
GCGGCCTCTGATCGAGACAAACGGCGAAACCGGGGAGATCGTGTGGG
ATAAGGGCCGGGATTTTGCCACCGTGCGGAAAGTGCTGAGCATGCCC
CAAGTGAATATCGTGAAAAAGACCGAGGTGCAGACAGGCGGCTTCAG
CAAAGAGTCTATCCTGCCAAGAGGAACAGCGATAAGCTGATCGCCAG
AAAGAAGGACTGGGACCCTAAGAAGTACGGCGGCTTCGACAGCCCCA
CCGTGGCCTATTCTGTGCTGGTGGTGGCCAAAGTGGAAAAGGGCAAG
TCCAAGAACTGAAGAGTGTGAAAGAGCTGCTGGGGATCACCATCATG
GAAAGAAGCAGCTTCGAGAAGAATCCCATCGACTTTCTGGAAGCCAAG
GGCTACAAAGAAGTGAAAAAGGACCTGATCATCAAGCTGCCTAAGTAC
TCCCTGTTTCGAGCTGGAAAACGGCCGGAAGAGAATGCTGGCCTCTGC
CGGCGAACTGCAGAAGGGAAACGAACTGGCCCTGCCCTCAAATATG
TGAACCTCCTGTACCTGGCCAGCCACTATGAGAAGCTGAAGGGCTCCC
CCGAGGATAATGAGCAGAAACAGCTGTTTGTGGAACAGCACAAAGCACT

	<p>ACCTGGACGAGATCATCGAGCAGATCAGCGAGTTCTCCAAGAGAGTGA TCCTGGCCGACGCTAATCTGGACAAAGTGCTGTCCGCCTACAACAAGC ACCGGGATAAGCCCATCAGAGAGCAGGCCGAGAATATCATCCACCTGT TTACCCTGACCAATCTGGGAGCCCCTGCCGCCTTCAAGTACTTTGACA CCACCATCGACCGGAAGAGGTACACCAGCACCAAAGAGGTGCTGGAC GCCACCCTGATCCACCAGAGCATCACCGGCCTGTACGAGACACGGAT CGACCTGTCTCAGCTGGGAGGCGAC</p> <p>Translation: DKKYSIGLDIGTNSVGVAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLF DSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFHRL SFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYL ALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSVDKLFQILVQTYNQLFEENPINASGVDA KAILSARLSKSRLENLIAQLPGEKKNLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAE DAKLQLSKDYYDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEIT KAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYID GGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKNLREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHL GELHAILRRQEDFYFPLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTR KSEETITPWNFEVVDKASQAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPHKSHLLYEYF TVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYF KKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTL TLFEDREMIEERLKYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDK QSGKTILDFLKSDGFANRNFMLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHI ANLAGSPAIKKILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIAMARENQTTQKGQK NSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYLQNGRDMYVD QELDINRLSDYDHDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRKGSDNVPSEEVV KKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQI TKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSCLVSDFRKDFQFYKVIN NYHHAHDAYLNAVVGTAIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIKSEQEIG KATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFAT VRKVLSMPQVNIVKKTQVQGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKPYG GFDSPTVAYSVLVAKVEKSKKLSVKELLGITIMERSSEFKNPIDFLEA KGYKEVKKDLIKLPKYSLELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNF LYLASHYEKLGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVLADANL DKVLSAYNKHDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFYFDTTIDRKRYTST KEVLDTLIHQSIITGLYETRIDLSQLGGD</p>
MTHFD1L MTS	<p>ATGGGCACTCGCTTGCCTCTCGTGTGCGACAGT TGAGGCGGCCGCCGCAACCTCCCGGTCCCCCCC GAAGGTTGCGAGTTCATGCCGAGCA</p> <p>Translation: MGTRLPLVLRQLRRPPQPPGPPRRRLRVPCRA</p>

2 - In vitro transcribed RNA (IVT RNA):

IVT RNA	Sequence (5'-3')	Description
mito-sgRNA1	<u>GCATCATAATCCTCTCTCAGTTTTAGAGCTATGCTGG</u> AAACAGCATAGCAAGTTAAATAAGGCTAGTCCGTTA TCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGC	19nt ND4 target 6
mito-sgRNA2	<u>GCACTCACAGTCGCATCATAATCCTCTCTCAGTTTAA</u> GAGCTATGCTGGAAACAGCATAGCAAGTTTAAATAAG GCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAG TCG GTGC	30nt ND4 target 6
mito-sgRNA3	<u>GTCTCCCTGAGCTTCAGGGAGCACTCACAGTCGCAT</u> <u>CATAATCCTCTCTCAGTTTAAAGAGCTATGCTGGAAAC</u> AGCATAGCAAGTTTAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAA CTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGC	RP MTS - 30nt ND4 target 6
mito-sgRNA4	GCGCAATCGGTAGCGCTTCGAGCCCCCTACAGGGC <u>TCCCACTCACAGTCGCATCATAATCCTCTCTCAGTT</u> TAAGAGCTATGCTGGAAACAGCATAGCAAGTTTAAAT AAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACC GAGTCGGTGC	F1D1 MTS - 30nt ND4 target 6
mito-sgRNA5	<u>GAGAAGCGTATCCCGCTGAGCCACTCACAGTCGCA</u> <u>TCATAATCCTCTCTCAGTTTAAAGAGCTATGCTGGAAA</u> CAGCATAGCAAGTTTAAATAAGGCTAGTCCGTTATCA ACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGC	MRP MTS - 30nt ND4 target 6
mito-sgRNA6	GCGCAATCGGTAGCGCCACTCACAGTCGCATCATAA <u>TCCTCTCTCAGTTTAAAGAGCTATGCTGGAAACAGCAT</u> AGCAAGTTTAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGA AAAAGTGGCACCGAGTCGGTGC	HD MTS - 30nt ND4 target 6
mito-sgRNA7	GGCCTGGTTAGTACTTGGATGGGAGACCGCCAAGG AATACCGGGTGCACTCACAGTCGCATCATAATCCTC <u>TCTCAGTTTAAAGAGCTATGCTGGAAACAGCATAGCAA</u> GTTTAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAG TGGCACCGAGTCGGTGC	5S γ domain MTS - 30nt ND4 target 6
mito-sgRNA8	<u>GCACTCACAGTCGCATCATAATCCTCTCTCAGTTTAA</u> GAGCTATGCTGTCTCCCTGAGCTTCAGGGAGCAGCA TAGCAAGTTTAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTG AAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGC	30nt ND4 target 6 – internal RP MTS

mito-sgRNA9	<u>GCACTCACAGTCGCATCATAATCCTCTCTCAGTTTAA</u> GAGCTATGCTGGCGCAATCGGTAGCGCTTCGAGCC CCCTACAGGGCTCCACAGCATAGCAAGTTTAAATAA GGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGA GTCGGTGC	30nt ND4 target 6 – internal F1D1 MTS
mito-sgRNA10	<u>GCACTCACAGTCGCATCATAATCCTCTCTCAGTTTAA</u> GAGCTATGCTGAGAAGCGTATCCCGCTGAGCCAGC ATAGCAAGTTTAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTT GAA AAAGTGGCACCGAGTCGGTGC	30nt ND4 target 6 – internal MRP MTS
mito-sgRNA11	<u>GCACTCACAGTCGCATCATAATCCTCTCTCAGTTTAA</u> GAGCTATGCTGGCGCAATCGGTAGCGCCAGCATAG CAAGTTTAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAA AAG TGGCACCGAGTCGGTGC	30nt ND4 target 6 – internal HD MTS
mito-sgRNA12	<u>GCACTCACAGTCGCATCATAATCCTCTCTCAGTTTAA</u> GAGCTATGCTGGGCCTGGTTAGTACTTGGATGGGA GACCGCCAAGGAATACCGGGTGCAGCATAGCAAGT TTAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTG GCACCGAGTCGGTGC	30nt ND4 target 6 – internal 5S γ domain MTS
mito-sgRNA13	<u>GTCTCCCTGAGCTTCAGGGAGCACTCACAGTCGCAT</u> <u>CATAATCCTCTCTCAGTTTAAAGAGCTATGCTGGAAAC</u> AGCATAGCAAGTTTAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAA CTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCCAGAAGAA GTGACGGCTGGGGGCACAGTGGGCTGGGCGCCCC TGCAGAACATGAACCTCCGCTCCTGGCTGCCACA GGGTCTCCGATGCTGGCCTTTGCGCCTCTAGAGG CAGCCACTCATGGATTCAAGTCCTGGCTCCGCCTCT TCCACT	RP MTS - 30nt ND4 target 6 – MRPS12 3' UTR
mito-sgRNA14	GCGCAATCGGTAGCGCTTCGAGCCCCCTACAGGGC <u>TCCCACTCACAGTCGCATCATAATCCTCTCTCAGTT</u> <u>TAAGAGCTATGCTGGAAACAGCATAGCAAGTTTAAAT</u> AAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACC GAGTCGGTGCCAGAAGAAGTGACGGCTGGGGGCA CAGTGGGCTGGGCGCCCCCTGCAGAACATGAACCTT CCGCTCCTGGCTGCCACAGGGTCCTCCGATGCTGG CCTTTGCGCCTCTAGAGGCAGCCACTCATGGATTCA AGTCCTGGCTCCGCCTTTCCACT	F1D1 MTS - 30nt ND4 target 6 – MRPS12 3' UTR
mito-sgRNA15	<u>GAGAAGCGTATCCCGCTGAGCCACTCACAGTCGCA</u> <u>TCATAATCCTCTCTCAGTTTAAAGAGCTATGCTGGAAA</u> CAGCATAGCAAGTTTAAATAAGGCTAGTCCGTTATCA ACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCCAGAAGA	MRP MTS - 30nt ND4 target 6 – MRPS12 3' UTR

<p>AGTGACGGCTGGGGGCACAGTGGGCTGGGCGCCC CTGCAGAACATGAACCTTCCGCTCCTGGCTGCCAC AGGGTCCTCCGATGCTGGCCTTTGCGCCTCTAGAG GCAGCCACTCATGGATTCAAGTCCTGGCTCCGCCTC TTCCA</p>

*underlined letters: sgRNA targeting sequence, **bold letters**: mitochondrial targeting sequence (MTS)

3 · PCR condition of DNA template synthesis for IVT RNA

Target IVT RNA and PCR condition	Thermal cycler and setting
<p>mito-sgRNA1</p> <p>195 µL molecular ddH₂O 60 µL KAPA HiFi fidelity buffer (5X) 10 µL 10 µM T25G/SLKS2 20 µL 1 µM mito-sgRNA1 9 µL KAPA dNTP mix 6 µL KAPA HiFi DNA polymerase (300 µL in total, distributed 50 µL as aliquot into six PCR tubes)</p>	<p>Applied Biosystems SimpliAmp</p> <p>98°C, 30 seconds 98°C, 10 seconds \ 62°C, 10 seconds 40 cycles 72°C, 10 seconds / 72°C, 2 minutes 12°C, 5 minutes</p>
<p>mito-sgRNA2-15</p> <p>27.5 µL molecular ddH₂O 10 µL KAPA HiFi fidelity buffer (5X) 5 µL dimethyl sulfoxide 3 µL 1 µM SL613/SLKS2 2 µL 1 ng/µL mito-sgRNA 1.5 µL KAPA dNTP mix 1 µL KAPA HiFi DNA polymerase (50 µL in total in a PCR tube)</p>	<p>Eppendorf 6325 Mastercycler Pro S</p> <p>98°C, 2 minutes 98°C, 10 seconds \ 61°C, 10 seconds 40 cycles 72°C, 15 seconds / 72°C, 2 minutes 12°C, 5 minutes</p>

【評語】 080002

本研究開發一個新型的 CRISPR-Cas9 技術剪輯粒線體 DNA，提供粒線體基因所造成疾病的一個有潛能之治療方式。在他們的研究中，嵌入粒線體標的訊號序列(MTS)，以利 Cas9 蛋白質和 sgRNA 分子送入粒線體內，所以可套用 CRISPR-Cas9 系統於粒線體中，並達成剪輯粒線體基因之目的。他們且將 Cas9 蛋白質和 sgRNA 分子鑲嵌於同一質體上，有效導入 CRISPR-Cas9 系統於粒線體內，並確實觀察到剪輯之標的基因 ND4 含量下降了 32%，達到粒線體基因編輯之目標。比較前人曾用 ZFN (Zinc-finger Nuclease)和 TALEN(Transcription Activator-like Effector Nucleases)成功編輯粒線體基因，他們的方法已提供一個相對簡易且價格低廉的粒線體基因剪輯平台。

優點：CRISPR-Cas9 剪輯 DNA 的技術應用性很廣，他們的方法的可能有應用性。

缺點：送入 mito-Cas9 和 sgRNA2 的實驗組，會造成了粒線體 Basal Respiration 效率顯著降低的現象。去年七月在 Nature 期刊有報導使用 bacterial toxin 來做粒線體精確基因編輯的新方法，可能比用 CRISPR-Cas9 方法好。

問題及建議：

1. MTS 片段只是一個加長的基因序列，本身並沒有莖環的形狀，猜測能夠送入粒線體的原因可能是因為此片段接在原本設計好的 sgRNA 上後，整個 mito-sgRNA 的某些部分會產生類似莖環的形狀，導致此序列有和 MTS 相似的功能。可否用電腦模擬其結構？
2. CRISPR-Cas9 系統造成粒線體功能受影響，使細胞活性下降，如何解決？
3. 嘗試利用降低轉染次數以及減少表現時間等方法，想盡可能地減低 CRISPR-Cas9 對細胞的影響，確有造成基因數量明顯下降的現象，但有無對細胞有害？
4. 書面報告文中的英文摘要最後一句話: 「that propels the conduct of mitochondrial genome editing」，似乎應為「that propels the conduction of mitochondrial genome editing」較妥。第 23 頁「而 P2A（- 2A 胜肽）位於 mito-Cas9 基因和 PAC 中間，可進行自我檢切，讓整個序列在轉錄過程中可以一並產生」，應為「而 P2A（- 2A 胜肽）位於 mito-Cas9 基因和 PAC 中間，可進行自我剪切，讓整個序列在轉譯過程中可以一併產生」。

5. 在摘要中提及標的基因 ND4 含量下降了 32%，但在實驗結果中完全未呈現，應在圖 30 結果中陳述。mito-sgRNA 前後標示不一致，在圖 26 以後均是以 sgRNA2，這極易使讀者混淆以為是不同物。

6. 本研究與 2019 年台大生化所馮聖富的碩士論文「CRISPR-Cas9 技術應用於粒線體基因編輯之優化設計」有相關？