生物技术通报
· 技术与方法 · BIOTECHNOLOGY BULLETIN 2026, 42(10):47-54

基于酿酒酵母克隆与错位热循环连接的环状全长人类线粒体DNA制备

彭文慧[1, 2, 3] 李冠初[2, 3] 刘永敏[2, 3] 马文建[1*] 郭晓贤[3*]

（1.天津科技大学生物工程学院,天津 300457; 2.合成生物学海河实验室,天津 300308; 3.中国科学院天津工业生物技术研究所,天津 300308）

摘 要： 【目的】人类线粒体DNA突变与多种疾病相关，但其全长序列在原核宿主中不稳定，体外制备大片段环状DNA也较困难，亟需一套新策略来高效制备环状全长线粒体DNA，以突破线粒体遗传操作的关键技术瓶颈。【方法】首先，为有效克服传统原核克隆系统的宿主毒性问题，利用酿酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）高效的同源重组系统将全长人线粒体基因组稳定克隆至酵母载体中；同时，通过定点编辑去除了内源的*Eco*R I限制性酶切位点，为克隆的mtDNA提供遗传筛选标记。随后，开发一种基于错位线性化片段的体外热循环连接新策略，以解决线性PCR产物的环化难题。该方法利用耐热连接酶在变性-复性循环中驱动异源双链黏性末端的形成，从而实现长片段DNA的高效环化。【结果】利用该策略成功制备了大小为16.6 kb的全长人线粒体基因组。限制性内切酶图谱分析及外切酶抗性实验证实，合成产物为序列正确、无缺口的共价闭合环状DNA。【结论】建立的“酵母辅助编辑-体外循环组装”技术体系，不仅解决了高质量环状全长mtDNA制备的难题，也为线粒体疾病模型的构建、人工线粒体合成以及线粒体基因治疗载体的开发提供了通用的遗传操作平台。

关键词： 线粒体基因组；同源重组；交叉复性；循环连接；DNA环化；体外合成

DOI: 10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2025-1470

Synthesis of Circular Full-length Human Mitochondrial DNA Based on Yeast Cloning and Staggered Thermal Cycling Ligation

PENG Wen-hui[1, 2, 3] LI Guan-chu[2, 3] LIU Yong-min[2, 3] MA Wen-jian[1*] GUO Xiao-xian[3*]

（1. *College of Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin* 300457; 2. *Haihe Laboratory of Synthetic Biology, Tianjin* 300308; 3. *Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin* 300308）

Abstract: 【Objective】 Mutations in human mitochondrial DNA (mtDNA) are associated with various diseases. However, the full-length sequence is unstable in prokaryotic hosts, and the *in vitro* preparation of large circular DNA fragments also remains challenging. Therefore, there is an urgent need for a new strategy to efficiently produce circularized full-length mtDNA, in order to overcome the critical technical bottleneck in mitochondrial genetic manipulation. 【Method】 First, to effectively overcome the host toxicity issues inherent in traditional prokaryotic cloning systems, we successfully cloned the full-length human mitochondrial genome into a yeast vector by leveraging the highly efficient homologous recombination system of *Saccharomyces cerevisiae*. Concurrently, site-directed editing was performed to eliminate the endogenous *Eco*R I restriction sites, thereby providing genetic screening markers for the artificially synthesized mtDNA. Subsequently, to address the challenge of circularizing linear PCR products, we developed a novel *in vitro* thermal cycling ligation strategy based on staggered linearized fragments. This method utilizes a thermostable ligase to drive the formation of heteroduplexe cohesive ends during denaturation-renaturation cycles, thereby achieving efficient circularization of long DNA fragments. 【Result】 Experimental results demonstrated the successful synthesis of the 16.6 kb full-length human mitochondrial genome. Restriction mapping and exonuclease resistance assays confirmed

收稿日期：2026-01-02
基金项目：合成生物学海河实验室颠覆性创新类项目（22HHSWSS00027），国家自然科学基金面上项目（32471320）
*通信作者：马文建 ma_wj@tust.edu.cn，郭晓贤 guoxx@tib.cas.cn

that the synthesized product consists of sequence-correct, nick-free, covalently closed circular DNA.【Conclusion】The yeast-assisted editing and *in vitro* cyclic assembly technological system established in this study not only overcomes the difficulty of preparing high-quality circular full-length mtDNA, but also provides a versatile genetic manipulation platform for constructing mitochondrial disease models, synthesizing artificial mitochondria, and developing mitochondrial gene therapy vectors.

Keywords: mitochondrial genome; homologous recombination; cross-annealing; thermal cycling ligation; DNA circularization; *in vitro* synthesis

线粒体在演化过程中，其基因组发生了剧烈的缩减，绝大多数基因转移到了细胞核中，仅保留了极度精简的环状DNA分子，即线粒体DNA（mitochondrial DNA, mtDNA）。人类mtDNA是一个全长约为16.6 kb的双链环状分子[1]。与核基因组不同，mtDNA缺乏内含子且基因间隙极短，这种高度压缩的组织形式意味着其序列中任何位点的突变都可能引发严重的功能缺陷[2]。该基因组编码了线粒体功能不可或缺的37个基因，包括13个氧化磷酸化复合物的核心疏水亚基、22个线粒体特异性tRNA以及2个rRNA（12S和16S）。这些基因产物共同构成了线粒体独立的翻译机器及能量代谢核心。除编码区外，mtDNA仅含有一个主要的非编码控制区（D-loop），它是调控mtDNA复制与转录的枢纽。

与遵循孟德尔遗传的核基因不同，mtDNA表现出独特的遗传特征。一个体细胞内通常含有数千个拷贝的mtDNA，这种多拷贝特性允许野生型与突变型mtDNA在同一细胞中共存，即异质性（heteroplasmy）。线粒体疾病的表型表达遵循阈值效应（threshold effect）：只有当突变型mtDNA的比例累积超过特定临界值（通常>50%–70%）时，才会导致呼吸链功能障碍并诱发临床症状[3]。这种复杂的遗传机制使得线粒体疾病的临床表现呈现出高度的异质性和不可预测性[4]。

基因组工程的常规流程通常依赖于大肠杆菌（*Escherichia coli*）进行克隆、扩增和修饰。然而，对于人类线粒体基因组而言，这一基础步骤却成为了一个长达数十年的技术瓶颈。早在20世纪80年代，研究人员就尝试将完整的人类mtDNA克隆到细菌质粒中，但屡遭失败。含有完整mtDNA序列的质粒转化*E. coli*后，往往导致宿主菌死亡，或迫使质粒发生快速的缺失突变以维持生存[5]。随后的系统性筛选最终确认，编码苏氨酸转运RNA（tRNA-Thr）的区域是导致这种序列特异性毒性的根本原因[6]。鉴于原核宿主的不兼容性，研究人员转向了具有真核同源重组修复机制的酿酒酵母[7]，利用酵母独特的生物学特性，完整的全长人类mtDNA已成功在酵母中实现克隆与稳定维持[8]，这为mtDNA的体外遗传操作提供了潜在的替代平台。

尽管获取mtDNA模板是第一步，但对其进行精准编辑同样面临挑战。由于线粒体缺乏像细胞核那样完善的DNA同源重组修复（HDR）机制，现有的编辑工具在应用上存在显著局限。早期的工具如线粒体靶向锌指核酸酶（MitoZFN）[9]和转录激活样效应因子核酸酶（MitoTALEN）[10]，主要通过切割DNA产生双链断裂（DSB）来诱导突变型mtDNA的降解，仅适用于清除有害突变而非修复。尽管CRISPR/Cas9技术彻底改变了核基因组编辑，但其在线粒体中的应用一直饱受争议。目前尚无公认有效的机制能将外源gRNA高效导入线粒体基质[11]，且Cas9切割产生的DSB同样会导致mtDNA的降解而非修复。近期，研究人员开发的DdCBE（DddA-derived cytosine base editor）[12]和随后的TALED（TALE-linked deaminase）[13]虽然实现了不依赖DSB的碱基编辑，打破了长期僵局，但这些工具仍面临旁观者效应、脱靶风险以及无法纠正插入/缺失突变等固有限制[11]。面对活体编辑的局限性，“体外合成–体内递送”的全基因组替换策略成为新的研究热点。目前已开发出多种突破双层膜阻隔的递送策略，包括MITO-Porter[14]、利用线粒体蛋白输入机制的肽–核酸偶联物[15]，以及MitoPunch压力脉冲技术[16]等。此外，利用靶向线粒体的*Eco*RI限制性内切酶，可有效清除内源性mtDNA，制备出缺乏mtDNA的ρ0细胞[17]，为外源mtDNA的回补创造了理想受体环境。然而，这一策略所需的高质量外源mtDNA的制备，仍存在关键技术缺失。

虽然利用酵母系统可以克隆全长mtDNA，但从酵母中提取的克隆往往混杂大量核基因组DNA，且

难以彻底去除载体骨架。另一方面，通过PCR扩增虽然能获得大量高纯度mtDNA，但产物呈线性构象。天然mtDNA为超螺旋闭合环状结构，直接转染线性DNA极易被胞内酶降解，且无法启动正常的复制与转录。尝试利用常规连接酶对线性产物进行体外环化，通常效率极低，且倾向于形成多聚体或串联产物，难以获得单体环状DNA。

针对上述挑战，本研究提出了体内生物学编辑与体外酶学扩增与环化的整合策略。利用酿酒酵母同源重组系统，规避了大肠杆菌的宿主毒性，实现了全长人类mtDNA的稳定克隆与无痕修饰；针对线性DNA环化效率低的问题，建立基于错位线性化片段的热循环连接方法，可将线性PCR产物高效转化为具有生物活性的共价闭合环状DNA，从而打通从序列编辑到高质量全长线粒体基因组制备的关键路径。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　菌株、细胞系与质粒　人胚胎肾细胞293T（HEK293T）购自中乔新舟，在含有10%胎牛血清（FBS）和1%青霉素-链霉素的双抗DMEM培养基中，于37 ℃、5% CO_2条件下培养。DH5α大肠杆菌用于常规质粒扩增。酿酒酵母（*S. cerevisiae*）菌株BY4741作为宿主进行同源重组克隆。穿梭质粒pRS415及pUC19质粒为本实验室保存。

1.1.2　酶与试剂　*Eco*RI、*Bam*HI、*Cla*I、*Hin*dIII、*Hinc*II、*Sma*I，以及T4 DNA Ligase、Exonuclease V（RecBCD）、T5 Exonuclease均购自NEB。Phusion高保真DNA聚合酶购自赛默飞。耐热连接酶Ampligase购自Lucigen。质粒提取试剂盒及胶回收试剂盒购自天根生化科技。引物由金唯智合成，详细序列见表1。

表1　本研究所使用的引物

Table 1　Primers used in this study

引物名称 Primer	引物序列 Primer sequence（5′-3′）	说明 Notes
A_F1	tgagttacctcactcattagTATGTGTTGTCGTGCAGGTAGAGG	小写字母为pRS415同源序列（Lowercase letters indicate homologous sequences to the pRS415 vector） 加粗字母为*Eco*R I位点内所引入的突变碱基（Bold characters represent the mutated bases introduced within the *Eco*R I recognition site）
D_R4	acaaggaagtacaggacaattgATGACCCACCAATCACATGCCTATCATATAGT	
A_R1	GGCCATTATCGAAGAATT**T**ACAAAAAACAATAGC	
B_F2	GCTATTGTTTTTTGT**A**AATTCTTCGATAATGGCC	
B_R2	CCCTGTTCTTATGAAT**C**CGAACAGCATAC	
C_F3	GTATGCTGTTCG**G**ATTCATAAGAACAGGG	
C_R3	GGTCCATCATAGAATT**T**TCACTGTGATAT	
D_F4	ATATCACAGTGA**A**AATTCTATGATGGACC	
59F	/5Phos/GGCCCTCTCAGCCCTCCTAATGAC	/5Phos/为5′端磷酸化修饰（/5Phos/ indicates a 5′ phosphorylation modification）
59R	/5Phos/CCTGTTAGGGGTCATGGGCTGGGTTTTACTATATGATAGGCATGTGATT GGTGGGTCATTATGTGTTGTCGTGCAGGTAGAGGC	
F40	/5Phos/AAAACCCAGCCCATGACCCCTAACAGGGGCCCTCTCAGCCCTCCTAATG ACCTCCGGCCTAGCCATGTGAT	
R41	/5Phos/ACTATATGATAGGCATGTGATTGGTGGGTCATTATGTGTTGTCGTGCAG GTAGAGGCTTACTAGAAGTGTG	

1.2　方法

1.2.1　全长线粒体基因组的酵母同源重组克隆　提取HEK293T细胞总DNA作为模板。根据GenBank中的人线粒体基因组序列（NC_012920.1）及pRS415载体序列，设计4对含有重叠区域的引物（A_F1/R1，B_F2/R2，C_F3/R3，D_F4/R4）。在引物设计中引入同义突变以破坏*ND1*、*ND2*和*ND5*基因中的*Eco*R I位点（详见表1）。使用高保真聚合酶扩增出4个重叠片段，回收纯化后与扩增的pRS415载体按摩尔比2∶1混合。利用乙酸锂转化法将混合物共转化至酿

酒酵母感受态细胞中，涂布于SC-Leu缺陷培养基，于30 ℃培养3–4 d。挑选单克隆进行菌落PCR验证，阳性克隆提取质粒后通过测序确认突变位点及连接处的序列正确性。

1.2.2 错位线性化片段的制备 pUC19模型：提取pUC19质粒，分别使用*Hinc* Ⅱ和*Sma* Ⅰ进行单酶切消化，产物经1%琼脂糖凝胶电泳分离并回收，获得两组末端位置相差17 bp的平末端线性片段。线粒体基因组：以构建正确的酵母重组质粒为模板，使用5′端磷酸化的引物对（59F/R和F40/R41）进行高保真PCR扩增。扩增产物经凝胶回收纯化，测定浓度备用。

1.2.3 体外变性–复性热循环连接 配制20 μL反应体系：包含等摩尔量的两组错位线性DNA片段（各约100 ng）、1 × Ampligase Reaction Buffer，以及5 U Ampligase。反应在热循环仪中进行，程序如下：预变性：95 ℃处理2 min。循环连接：95 ℃变性30 s，随后降低至退火/连接温度（60 ℃或70 ℃）保持15 min。共进行4个循环。对照组反应体系中不加入Ampligase，其余条件相同。

1.2.4 外切酶处理与环化验证 循环反应产物分别进行以下处理以验证拓扑结构：Exonuclease V处理：向反应产物中加入Exonuclease V及ATP，于37 ℃孵育30 min，以消化残留的线性DNA。T5 Exonuclease处理：产物与T5 Exonuclease混合，于37 ℃孵育30 min，以消化线性和开环DNA，富集共价闭合环状DNA。酶切图谱分析：纯化后的mtDNA环化产物使用*Hind* Ⅲ进行酶切，pUC19环化产物使用*Bam*HI进行酶切，产物经1%琼脂糖凝胶电泳检测。

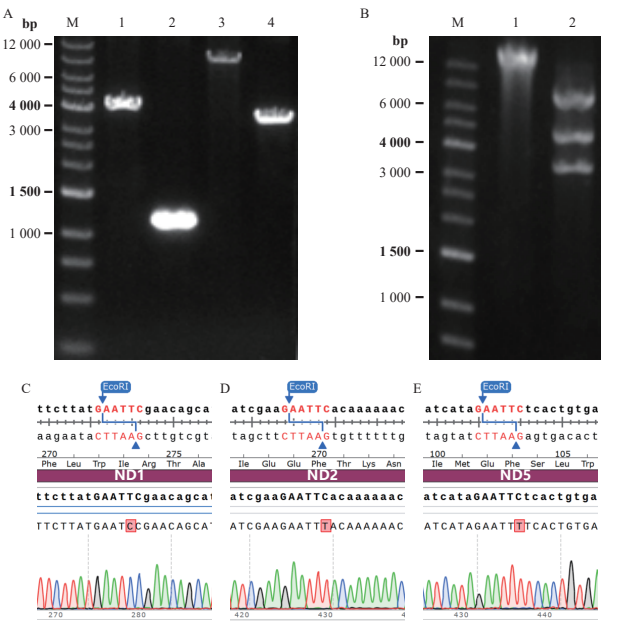
1.2.5 测序分析 T5 Exonuclease处理后的抗性产物经纯化后，使用对应连接位点附近的引物进行Sanger测序，验证连接处的序列完整性。

2 结果

2.1 完整线粒体基因组的重组克隆

序列分析表明，293T细胞线粒体基因组含有3个*Eco*R Ⅰ限制性内切酶识别位点，分别位于*ND1*、*ND2*及*ND5*基因编码区内。为了将完整的293T细胞mtDNA克隆至酿酒酵母，本研究采用了酵母体内同源重组策略，并通过引入同义突变消除内源性的*Eco*R Ⅰ位点，从而提供一个有效的遗传标记，用以区分和筛选人工合成的mtDNA。首先，分别在3个*Eco*R Ⅰ位点及ATP6与COX3交界处设计扩增引物，并在引物中引入突变。接下来以293T细胞总DNA为模板进行PCR扩增，获得4个长度分别为4、12、8、3.5 kb的片段（图1-A）。这些片段覆盖全长mtDNA且末端具有相互重叠DNA序列；随后，将这些片段与携带末端同源片段的低拷贝穿梭载体pRS415共转化酿酒酵母。经SC-Leu缺陷培养基筛选后，通过菌落PCR验证了各重组连接位点的正确性。

随后，利用引物对F40/R41从验证正确的克隆



A：用于酵母同源重组的4个重叠PCR片段电泳图。M：DNA marker。B：组装后全长mtDNA的验证。泳道1：引物F40/R41扩增的全长PCR产物。泳道2：*Cla* Ⅰ和*Bam*H Ⅰ双酶切验证，显示预期大小的条带（~8 kb，5 kb，3.5 kb）。C–E：测序峰图确认消除了*Eco*R Ⅰ位点的同义突变（红框所示）。分别为ND1（m.4125T>C）（C），ND2（m.5280C>T）（D）和ND5（m.12645C>T）（E）。上图：野生型序列；下图：突变序列

A: Gel electrophoresis of the four overlapping PCR fragments used for yeast homologous recombination. M: DNA marker. B: Validation of the assembled mtDNA. Lane 1: Full-length PCR product amplified by primers F40/R41. Lane 2: Restriction digest with *Cla*I and *Bam*HI showing expected fragments (~8 kb, 5 kb, and 3.5 kb). C–E: Sequencing chromatograms confirming synonymous mutations (red boxes) that eliminate *Eco*RI sites. C: ND1 (m.4125T>C); D:ND2 (m.5280C>T); E: ND5 (m.12645C>T). Top: Wild-type sequence; bottom: mutated sequence

图1 无*Eco*R Ⅰ位点的全长人线粒体基因组重组克隆的构建与验证

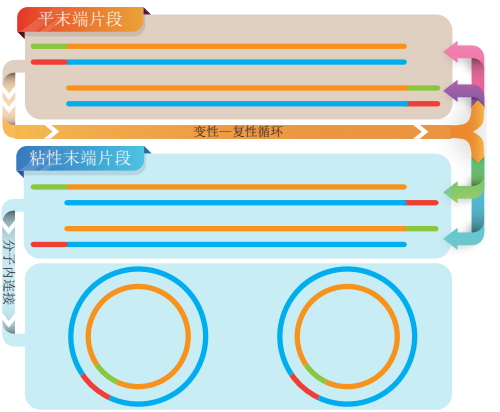
Fig. 1 Construction and verification of recombinant clone of *Eco*R I-free full-length human mitochondrial genome

中扩增出预期的全长mtDNA（图1-B，泳道1）。对该PCR产物进行*Cla* I和*Bam*H I双酶切鉴定，电泳结果显示获得了约8、5和3.5 kb的3条特异性片段，与理论预测一致（图1B，泳道2）。进一步的Sanger测序分析证实，在靶向的m.4125T、m.5280C及m.12645C位点均成功引入了同义突变：*ND1*基因第273位异亮氨酸（Ile）密码子由ATT变为ATC，*ND2*基因第270位及*ND5*基因第103位苯丙氨酸（Phe）密码子均由TTC变为TTT（图1-C–E）。综上所述，利用酿酒酵母高效的同源重组机制，成功构建了去除*Eco*R I位点的全长线粒体基因组穿梭质粒。

2.2　线性DNA体外环化新方法的建立与验证

由于PCR扩增获得的mtDNA为线性平末端DNA，为实现其高效环化，设计了一种基于错位线性化DNA片段（staggered linearized DNA）的循环连接环化方法（图2）。作为概念验证，首先利用pUC19质粒评估了该方法的有效性。分别使用*Hinc*II和*Sma*I对环状质粒pUC19进行单酶切，将其线化，获得两组平末端线性DNA片段。由于这两种酶的识别位点在质粒序列上相隔17个碱基对，因此所产生的两组片段的末端位置相互错开。将这两组片段等量混合，在含有耐热连接酶（Ampligase）的体系中进行连续的变性–退火–连接循环。在退火过程中，来源于不同酶切产物的单链DNA发生交叉配对，形成具有互补黏性末端的异源双链DNA（图2，中间浅蓝色框所示），进而被Ampligase特异性识别并连接环化。尽管同源配对会重新形成无法被连接的平末端双链（图2，棕色框所示），但它们可在随后的循环中解离并再次参与异源配对，从而驱动反应累积环化产物。循环反应结束后，利用Exonuclease V消化去除残留的线性DNA，即可获得环化的DNA。

琼脂糖凝胶电泳结果显示（图3），天然pUC19质粒呈现典型的超螺旋环状构象，且不被Exonuclease V消化（泳道1），而单纯混合的错位线性片段呈现单一线性条带（泳道2），且对Exonuclease V敏感（泳道3）。经过变性–复性循环（无连接酶对照）处理后，出现了一条迁移率较线性片段更慢的新条带（泳道4），推测为退火形成的带有缺口（nick）的开环DNA（open circular DNA）。而在添加Ampligase的实验组中，出现了一条迁移率较快、位置接近天然



错位平末端片段进行变性–复性循环。互补链间的交叉杂交产生具黏性末端的异源双链（中图），作为分子内连接形成环状DNA（下图）的底物。平末端同源双链（上图）重新进入热循环，从而驱动平衡向环状产物积累方向移动

Blunt-ended fragments with staggered termini undergo denaturation-renaturation cycles. Cross-hybridization between complementary strands generates cohesive-ended heteroduplexes (middle panel) that serve as substrates for intramolecular ligation into circular DNA (bottom panel). Blunt-ended homoduplexes (top panel) are recycled through further thermal cycles, shifting the equilibrium toward circular product accumulation

图2　错位线性化DNA片段的变复性循环连接环化策略示意图

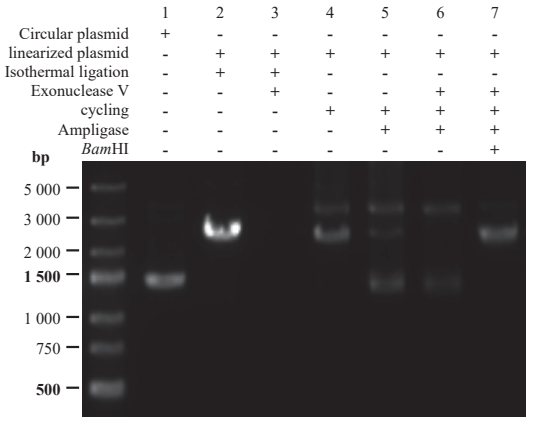
Fig. 2　Schematic illustration of the staggered linear DNA circularization strategy

超螺旋质粒的条带。Exonuclease V处理结果表明，线性DNA条带完全消失，而主要产物条带保留（泳道6），证实其具有核酸外切酶抗性，为环状结构。随后使用*Bam*H I对该抗性产物进行单酶切，重新释放出与线性对照长度一致的单一条带（泳道7）。上述结果证实，该反应体系成功生成了共价闭合环状DNA，验证了本文开发的错位线性化循环连接环化方法的有效性。

2.3　线粒体DNA的体外环化与制备

尽管酵母克隆系统能获得完整的线粒体基因组，但受限于低拷贝载体的特性，其mtDNA提取效率较低且难以彻底去除载体骨架。相比之下，PCR技术虽能大量制备高纯度mtDNA，但其线性构象限制了下游应用。为获得高产量的全长环状mtDNA，将上述开发的体外环化策略应用于全长mtDNA扩增产物。

本研究设计了两组5′端磷酸化的引物对（59F/R和F40/R41），通过PCR扩增获得末端相互错开的全长mtDNA线性片段。随后，将这两组片段混合，分



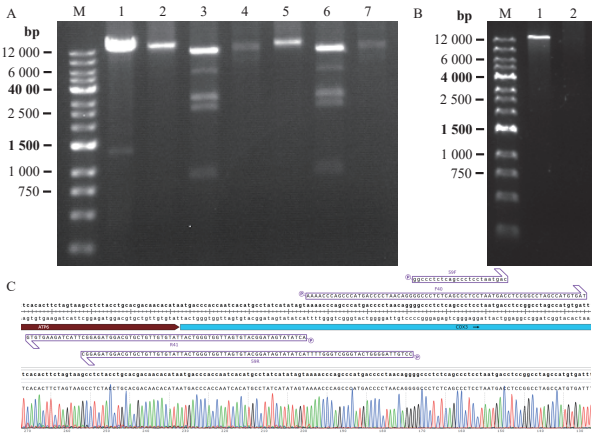
反应产物的琼脂糖凝胶电泳分析。泳道 1–3（对照组）：天然环状 pUC19 表现出对 Exonuclease V 的抗性（泳道 1），而错位线性底物混合物则被完全降解（泳道 3），验证了外切酶的选择性。泳道 4：在无 Ampligase 参与的热循环中，底物发生复性形成开环 DNA，但未形成共价闭合环状 DNA。泳道 5–6：完整的连接反应体系生成了多种构象产物（泳道 5），经 Exonuclease V 处理后仍保留特异性条带（泳道 6），证实成功连接成了闭合环状 DNA。泳道 7：对外切酶抗性产物进行 *Bam*HI 单酶切，获得与初始线性底物大小一致的单一线性条带（对比泳道 2），确认组装产物为正确的单体质粒

Agarose gel electrophoresis analysis of the reaction products. Lanes 1–3 (Controls): Native circular pUC19 exhibits resistance to Exonuclease V digestion (Lane 1), whereas the staggered linear substrate is completely degraded (Lane 3), confirming the selectivity of the exonuclease. Lane 4: Thermal cycling without Ampligase yields re-annealed complexes (likely nicked or concatenated). Lanes 5–6: The full ligation reaction generates products (Lane 5) that remain detectable after Exonuclease V treatment (Lane 6), confirming the formation of covalently closed circular DNA. Lane 7: Linearization of the Exonuclease V-resistant product with *Bam*HI restores a single band identical in size to the input linear substrate (Lane 2), verifying the correct assembly of the monomeric plasmid

图 3 pUC19 错位线性化后使用变性–复性–连接循环重新环化检测与验证

Fig. 3 Detection and validation of pUC19 recircularization via misprimed linearization followed by denaturation-renaturation-ligation cycling

别在 60 ℃和 70 ℃的退火/连接温度下进行热循环反应。琼脂糖凝胶电泳结果如图 4-A 所示。为验证产物的环化状态，利用 *Hin*d III 对产物进行了酶切分析。293T 细胞 mtDNA 序列中含有 3 个 *Hin*d III 位点，若为线性 PCR 产物，完全酶切将产生 10 202、3 003、2 474 和 890 bp 四个片段；而一旦成功环化，线性分子的首尾片段将重新连接，从而在酶切后产生一条特征性的 5 477 bp 片段（由 3 003 bp 与 2 474 bp 片段融合而成）。电泳结果显示，所有环化组（泳道 3 和 6）均清晰地出现了该 5 477 bp 特征条带，有力证明了错位线性 mtDNA 已成功发生分子内连接。此外，环化产物经 Exonuclease V 处理后仍能检测到 DNA 条带，基于 Exonuclease V 降解线性 DNA 的特性，进一步证实了环状结构的形成。



A：环化产物的琼脂糖凝胶电泳分析。泳道 1：错位线性 mtDNA 片段混合物。泳道 2 和 5：分别在 60 ℃和 70 ℃条件下进行热循环连接的产物。泳道 3 和 6：对应产物的 *Hin*d III 酶切图谱。约 5.5 kb 特征条带（由 3 003 bp 和 2 474 bp 的末端片段融合形成）的出现证实了线性的首尾连接与环化。泳道 4 和 7：经 Exonuclease V 处理后的产物，显示出外切酶抗性条带，表明环状结构的存在。M：DNA Marker。B：利用 T5 Exonuclease 验证共价闭合环状 DNA。泳道 1：环化产物保留了抗性条带，表明形成了无缺口的 cccDNA。泳道 2：线性 mtDNA 对照被完全降解。M：DNA Marker。C：连接位点的序列验证。上图：位于 *ATP6* 和 *COX3* 基因交界处的引物对（59F/R 和 F40/R41）结合位点示意图。下图：T5 Exonuclease 抗性产物的 Sanger 测序峰图，证实了连接位点处序列的准确还原

A: Electrophoretic analysis of the circularization products. Lane 1: Mixture of overlapping linear mtDNA fragments. Lanes 2 and 5: Products obtained after thermal cycling ligation at 60 ℃ and 70 ℃, respectively. Lanes 3 and 6: *Hind* III restriction digests of the circularization products. The appearance of a characteristic ~5.5 kb band (fusion of the 3 003 bp and 2 474 bp terminal fragments) confirms successful circularization, distinct from the linear restriction pattern. Lanes 4 and 7: Products treated with Exonuclease V, showing resistant high-molecular-weight bands indicative of circular structure. M: DNA Marker. B: Validation of covalently closed circular (ccc) DNA using T5 Exonuclease. Lane 1: The cyclized product retains a resistant band, confirming the formation of nick-free cccDNA. Lane 2: Linear mtDNA control is completely degraded. M: DNA Marker. C: Sequence verification of the ligation junction. Top: Schematic illustrating the binding sites of the primer pairs (59F/R and F40/R41) at the boundary of the *ATP6* and *COX3* genes. Bottom: Sanger sequencing chromatogram of the T5 Exonuclease-resistant product, confirming the precise sequence restoration across the ligation site without mutations or deletions

图 4 全长人线粒体基因组的体外环化与验证

Fig. 4 *In vitro* circularization and validation of the full-length human mitochondrial genome

鉴于T5 Exonuclease能特异性降解线性及带有缺口的开环DNA，进一步使用T5 Exonuclease处理产物以富集共价闭合环状DNA。如图4-B所示，对照组线性mtDNA被完全消化，而环化产物中保留了显著的抗性条带，表明成功制备了无缺口的闭合环状mtDNA。由于PCR扩增的断点位于*ATP6*与*COX3*基因交界处，对T5 Exonuclease抗性产物进行了测序分析。结果证实，包括连接位点在内的序列完全正确（图4-C）。综上所述，利用该体外循环环化新方法，本研究成功将线性扩增的全长mtDNA转化为序列精确的闭合环状DNA。

3　讨论

本研究建立了一套整合酿酒酵母同源重组与变复性循环连接的全新技术体系，有效解决了线粒体基因组难以在原核系统中克隆以及体外难以制备全长闭合环状DNA的两大难题。长期以来，大肠杆菌对某些真核线粒体序列的不稳定性或毒性耐受低，限制了mtDNA的完整克隆。本研究利用酿酒酵母高效的同源重组能力，不仅实现了全长mtDNA的稳定克隆，更提供了一个灵活的遗传操作平台。通过该平台，研究人员可以根据需求对mtDNA进行改造，例如编辑酶切位点作为筛选标记，或定点引入致病性突变。这种“先在酵母中编辑，再体外扩增环化”的策略，为反向遗传学研究提供了高质量的模板来源。

在克隆保真性方面，酿酒酵母高效的同源重组机制为大片段mtDNA的准确组装提供了生物学基础。除PCR扩增阶段的保真度外，mtDNA中$tRNA^{Thr}$基因在宿主中的表达毒性往往是导致片段重排或点突变的主要诱因。此前已有研究尝试利用高拷贝的2 μ质粒克隆全长人类mtDNA，但在筛选大量克隆后未获成功，说明高剂量暴露下的序列毒性会产生剧烈的宿主选择压力。采用低拷贝载体实现全长序列的准确克隆，表明降低拷贝数可有效将毒性抑制在细胞耐受阈值内。尽管本研究尚未对该系统的长期遗传稳定性进行评估，但理论上可进一步尝试将mtDNA定点整合至酵母基因组，利用单拷贝维持策略进一步削弱潜在毒性并提升序列稳定性。

针对PCR产物无法直接模拟天然mtDNA超螺旋结构的局限，本研究开发的基于错位线性化片段的体外变性–复性循环连接方法拥有独特的技术优势。与传统的T4连接酶体系相比，该方法利用耐热连接酶（Ampligase）在高温循环中通过DNA变复性，促使无法连接环化的平末端同源双链解离，并重新配对形成具有互补黏性末端的可连接环化异源双链，从而驱动产物向环状DNA累积。这一策略能够有效处理长度和序列构成多样的DNA分子。此外，该方法为制备具有复杂结构的DNA分子提供了新思路，例如通过设计特定的错配引物，该体系可用于制备带有定点错配或包含特定化学修饰的杂合双链环状DNA，这对于研究DNA修复机制或核酸–蛋白相互作用具有重要价值。

尽管错位片段环化方法有效，但在实际应用中仍需考虑其动力学特征与局限性。环化效率可能受多种因素共同制约，包括片段长度、序列组成、错位黏性末端的长度以及DNA浓度。理想情况下的单轮环化效率为50 %。本研究在使用错位pUC19片段进行环化的实际操作中，实现了平均31%的单轮环化效率。由于环化效率主要取决于DNA复性的动力学与分子内连接效率，其中DNA复性效率将随循环反应中线性片段的减少而降低，较难调控，而分子内连接的动力学则主要受黏性末端控制且在循环反应中相对稳定。因此，改变错位距离以调控黏性末端长度，应作为优化特定序列片段环化效率的优选参数。

此外，必须正视的是，长时间的高温变性–复性循环可能会对DNA链造成潜在的热损伤，如碱基脱氨或脱嘌呤，这可能会影响后续的转染效率或生物学功能。同时，与细胞内天然提取的mtDNA相比，体外合成的产物缺乏天然的表观遗传修饰。另一个不可忽视的问题是副产物的形成：尽管电泳检测主要显示单体环状条带，但理论上反应过程中不可避免会通过分子间连接形成二聚体或多聚体。对于纯度要求高的下游应用，建议在环化后引入额外的凝胶回收或层析纯化步骤。

4　结论

本研究通过整合酿酒酵母同源重组与错位热循环连接技术，成功建立了全长人类线粒体基因组体外制备的新策略。该策略在利用酿酒酵母宿主规避了mtDNA在原核系统中的序列毒性与不稳定性，实

现了全长序列的克隆与精准编辑的基础上，通过创新性的变复性循环连接解决了长片段PCR产物的环化难题，获得了序列准确的共价闭合环状DNA。这一技术路径为线粒体反向遗传学研究、疾病模型构建及基因治疗载体的开发提供了简便、通用的遗传操作手段。

参考文献

[1] Schon EA, DiMauro S, Hirano M. Human mitochondrial DNA: roles of inherited and somatic mutations [J]. Nat Rev Genet, 2012, 13(12): 878-890.

[2] Park J, Baruch-Torres N, Yin YW. Structural and molecular basis for mitochondrial DNA replication and transcription in health and antiviral drug toxicity [J]. Molecules, 2023, 28(4): 1796.

[3] Belousova V, Ignatko I, Bogomazova I, et al. Causes of and solutions to mitochondrial disorders: a literature review [J]. Int J Mol Sci, 2025, 26(14): 6645.

[4] Mei JL, Ding P, Gao C, et al. Mitochondrial diseases: molecular pathogenesis and therapeutic advances [J]. MedComm, 2025, 6(9): e70385.

[5] Tapper DP, Van Etten RA, Clayton DA. Isolation of mammalian mitochondrial DNA and RNA and cloning of the mitochondrial genome [M]//Biomembranes Part K: Membrane Biogenesis: Assembly and Targeting (Prokaryotes, Mitochondria, and Chloroplasts). Amsterdam: Elsevier1983: 426-434.

[6] Mita S, Monnat RJ, Loeb LA. Direct selection of mutations in the human mitochondrial $tRNA^{Thr}$ gene: reversion of an 'uncloneable' phenotype [J]. Mutat Res Mutagen Relat Subj, 1988, 199(1): 183-190.

[7] Ruiz E, Talenton V, Dubrana MP, et al. CReasPy-cloning: a method for simultaneous cloning and engineering of megabase-sized genomes in yeast using the CRISPR-Cas9 system [J]. ACS Synth Biol, 2019, 8(11): 2547-2557.

[8] Bigger BW, Liao AY, Sergijenko A, et al. Trial and error: how the unclonable human mitochondrial genome was cloned in yeast [J]. Pharm Res, 2011, 28(11): 2863-2870.

[9] Gammage PA, Rorbach J, Vincent AI, et al. Mitochondrially targeted ZFNs for selective degradation of pathogenic mitochondrial genomes bearing large-scale deletions or point mutations [J]. EMBO Mol Med, 2014, 6(4): 458-466.

[10] Reddy P, Ocampo A, Suzuki K, et al. Selective elimination of mitochondrial mutations in the germline by genome editing [J]. Cell, 2015, 161(3): 459-469.

[11] Lim K. Mitochondrial genome editing: strategies, challenges, and applications [J]. BMB Rep, 2024, 57(1): 19-29.

[12] Guo JY, Chen XX, Liu ZW, et al. DdCBE mediates efficient and inheritable modifications in mouse mitochondrial genome [J]. Mol Ther Nucleic Acids, 2022, 27: 73-80.

[13] Cho SI, Lim K, Hong S, et al. Engineering TALE-linked deaminases to facilitate precision adenine base editing in mitochondrial DNA [J]. Cell, 2024, 187(1): 95-109, e26.

[14] Yamada Y, Fukuda Y, Harashima H. An analysis of membrane fusion between mitochondrial double membranes and MITO-Porter, mitochondrial fusogenic vesicles [J]. Mitochondrion, 2015, 24: 50-55.

[15] Rai PK, Craven L, Hoogewijs K, et al. Advances in methods for reducing mitochondrial DNA disease by replacing or manipulating the mitochondrial genome [J]. Essays Biochem, 2018, 62(3): 455-465.

[16] Sercel AJ, Patananan AN, Man TX, et al. Stable transplantation of human mitochondrial DNA by high-throughput, pressurized isolated mitochondrial delivery [J]. eLife, 2021, 10: e63102.

[17] Kukat A, Kukat C, Brocher J, et al. Generation of rho0 cells utilizing a mitochondrially targeted restriction endonuclease and comparative analyses [J]. Nucleic Acids Res, 2008, 36(7): e44.

（责任编辑　朱琳峰）