

基因组编辑植物的监管与检测技术

潘志文¹, 张旭冬², 高洁儿¹, 刘鹏程², 姚涓¹, 张秀杰^{2*}, 姜大刚^{1*}

1. 华南农业大学生命科学学院, 农业农村部植物及植物用微生物生态环境安全监督检验测试中心 (广州), 广州 510642

2. 农业农村部科技发展中心, 北京 100176

摘要 基因组编辑技术是利用人工核酸酶对生物体目标基因序列进行修饰的技术。近年来, 以 CRISPR/Cas 系统为代表的基因组编辑技术由于高效、简单的操作发展迅速, 为研究动植物基因功能、疾病治疗、植物分子育种等方面提供重要的方法。同时, 由于基因编辑产品的不断出现, 为政府监管提出了更高的要求。通过介绍植物基因组编辑技术及其产品的种类, 重点说明了主要国家、经济体在植物基因组编辑产品的安全监管的异同, 概述了科学界对基因编辑作物的基本原则, 并介绍了几种植物基因组编辑产品的检测方法。

关键词 基因组编辑; CRISPR; 监管; 检测方法; 转基因

自 1996 年转基因作物商业化以来, 全球种植转基因作物面积持续增加, 在 2018 年达到 1.917 亿 hm^2 , 种植的主要作物包括玉米、大豆、棉花、油菜等^[1]。然而, 转基因作物为全球带来巨大经济效益和生态效益的同时, 公众对转基因的关注和争论也不断。随着基因组编辑等新技术的出现, 了解不同国家基因组编辑转基因作物监管政策, 总结相应的检测技术非常必要。

基因组编辑 (genome editing) 是指利用人工构

建的核酸酶对生物体的基因组序列进行改造, 对目标基因序列进行精确的碱基插入、替换和敲除等修饰的技术^[2]。由于基因组编辑技术具有方便和效率高等特点, 已经成功应用到多种生物, 在植物基因功能研究、农作物育种等方面更是取得了重要的研究进展^[3-4]。随着越来越多不同类型基因组编辑植物的面世, 尤其是基因组编辑农作物的成功商业化, 对基因组编辑产品的监管提出了更高的要求, 对基因组编辑产品的检测也迫在眉睫。对基因组

收稿日期: 2020-07-13; 修回日期: 2020-12-29

基金项目: 农业农村部农业政策研究课题

作者简介: 潘志文, 硕士研究生, 研究方向为转基因植物检测技术, 电子信箱: panzhiwen@scau.edu.cn; 张秀杰 (通信作者), 副研究员, 研究方向为转基因生物安全评价与检测, 电子信箱: zhxj7410@sina.com; 姜大刚 (共同通信作者), 副研究员, 研究方向为转基因生物安全评价与检测, 电子信箱: dagangj@scau.edu.cn

引用格式: 潘志文, 张旭冬, 高洁儿, 等. 基因组编辑植物的监管与检测技术[J]. 科技导报, 2021, 39(9): 87-92; doi: 10.3981/j.issn.1000-7857.2021.09.010

编辑作物的发展和安全管理等已有报道^[5-6],但对基因组编辑技术、产品和相应的检测技术的总结还较薄弱。本研究介绍基因组编辑技术的类型及其植物产品分类,比较不同国家对基因组编辑产品的监管政策,探讨植物基因组编辑产品的检测方法。

1 基因组编辑的类型

基因组编辑技术利用人工构建的序列特异性核酸酶通过在生物体基因组(基因)特定位置(靶位点)制造DNA双链断裂,然后利用生物体自身的同源重组(homologous recombination, HR)功能,删除或替换相应的DNA序列,或利用非同源末端连接(non-homologous end joining, NHEJ)功能产生随机的DNA小片段插入或缺失,精确对基因序列的进行特异性改造^[2]。已知的序列特异性核酸酶主要包括:锌指核酸酶(zinc finger nucleases, ZFNs)^[7]、类转录激活因子效应物核酸酶(transcription activator-like effector nucleases, TALENs)^[8]以及成簇规律间隔短回文重复与关联蛋白(cluster regularly interspaced short palindromic repeat-associated proteins, CRISPR/Cas)系统^[9]。ZFNs是最早被广泛应用的基因组定点修饰技术,但用于识别靶DNA的蛋白模块构建烦琐,难度大,时间长,脱靶率高,应用受到限制;TALENs是目前商业化比较成功的基因组编辑技术,它的DNA结合域可以设计成不同长度,识别任意DNA序列的模块化蛋白,与ZFNs相比具有更好的灵活性,但是TALENs模块的设计组装和筛选过程比较复杂,工作量庞大,可操作性不高^[2]。ZFNs和TALENs技术都是依赖于DNA结合蛋白模块,操作较复杂烦琐,而CRISPR/Cas技术克服了以上不足,仅靠人工合成的sgRNA就可以完成对靶位点的识别,且sgRNA设计和合成非常方便,效率更高、切割位点更精确、细胞毒性更小,逐步发展成基因组编辑方面的主流技术^[4]。目前,CRISPR/Cas技术已经成功应用于水稻、玉米、小麦、大豆、番茄及蘑菇等的育种改良以及植物基因功能研究中。

2 植物基因组编辑产品分类

利用基因组编辑技术,定向敲除植物体内的某个基因,或向植物体内定向插入某个基因,可以获得具有新的遗传性状或遗传性状得到改良的材料。国际上对于这些使用位点特异性核酸酶(site-directed nucleases, SDN)获得的基因组编辑产品主要分3类:第1类(SDN-1)为基因组编辑过程中,不涉及同源重组修复,没有引入外源DNA片段,仅在特定位点处产生双链断裂后,利用NHEJ方式进行修复,最终在靶位点造成点突变或少量几个碱基的插入或缺失;第2类(SDN-2)为基因组编辑过程中,利用同源修复模板(与靶位点序列仅有1到几个碱基差异),使用HR方式进行双链断裂后的修复,最终在靶位点造成少量碱基(一般少于20个碱基)突变;第3类(SDN-3)为基因组编辑过程中,使用HR方式在双链断裂处插入外源基因(DNA)片段(可多达几千个碱基),最终在靶位点造成外源基因DNA片段插入^[6,10-11]。

3 基因组编辑植物的监管

由于基因组编辑技术的准入门槛不高、存在脱靶效应,以及基因组编辑的类型不同、产生的基因组编辑植物多样,各国对基因组编辑植物监管措施也不尽相同。

3.1 国际上对基因组编辑植物的监管

目前,美国、加拿大、阿根廷、智利、巴西、哥伦比亚、欧盟、日本等国家/组织对基因组编辑农产品的监管制定了较明确可用的监管流程或法规。

美国政府对基因组编辑作物产品监管采取以最终产品为监管对象,遵循“个案分析原则”,由美国农业部(United States Department of Agriculture, USDA)、环境保护署(Environmental Protection Agency, EPA)和食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)共同管理^[11]。研发者可以向相应的管理机构提出监管咨询:由USDA对具体个案产品是否存在潜在植物有害化风险进行审

查,确定是否监管;由EPA对具体个案产品是否存在杀虫性、抗病性等进行审查,确定是否监管;由FDA对具体个案产品是否存在预期/非预期效应、潜在的过敏性毒性以及营养差异进行审查,确定是否监管,并由FDA对上市的产品进行后市场化监管^[12-13]。目前,USDA已经对多种应用ZFNs、TALENs、CRISPR/Cas技术培育的SDN-1和SDN-2类玉米、油菜、蘑菇和亚麻荠等产品豁免转基因生物监管^[14-15]。

加拿大、阿根廷、智利、巴西、哥伦比亚等国家采取比较相似的监管方式,以最终产品为监管对象,按照“个案分析原则”进行评价,由开发者确定其产品是否具有新属性,若产品涉及DNA重组和新性状则自动触发监管^[11]。目前加拿大也已批准了多种农产品,如Cibus公司开发的耐磺酰脲类除草剂的SU Canola™油菜商业化应用^[16]。

欧盟历来对转基因产品持保守态度,对待基因组编辑作物产品的态度同样谨慎。欧盟主张以过程为监管对象,2012年欧洲食品安全局(European Food Safety Authority, EFSA)发布调查报告指出ZFNs技术研发的SDN-3类基因组编辑植物受转基因植物相关法律监管;2018年欧盟法院裁决,基因组编辑作物与转基因作物等同视之;2001年后出现的新突变技术产生的生物体同样受转基因生物法律法规监管。也有部分欧盟机构认为部分无外源DNA插入的育种产品(如使用ZFNs技术获得的SDN-1和SDN-2类基因组编辑产品)不应属于转基因生物范畴^[12]。

日本厚生劳动省专家调查会2018年12月发布报告认为:通过基因组编辑技术插入外源基因的产品,应作为转基因产品接受安全监管;通过基因组编辑技术敲除某些基因的产品与传统品种改良技术获得的产品难以区分,目前大部分研发中的基因组编辑产品都属于此类,政府为掌握研发信息以及在出现非预期的情况时能有效消除不利影响,要求销售者向政府提供包括基因组变化以及过敏物质与毒素等信息,但不会通过法律强制实施。2019年9月19日,日本厚生劳动省发布了最新版本的基因组编辑技术食品和食品添加剂处理指南:所有包含

基因编辑技术产品的杂交后代都需要向厚生劳动省通报,在通过磋商后才能销售。

澳大利亚由基因技术监管专员办公室(Office of the Gene Technology Regulator, OGTR)主要负责产品研发过程的监管,并于2016年启动了《基因技术法案》的第三次修订,明确是否对基因工程方面新技术产生的生物产品实行与传统转基因生物同等的管理要求;SDN-1类产品与自然突变相似,无需监管;SDN-2和SDN-3类产品由于涉及同源重组,较多改变基因组序列,引进新的遗传物质,需要政府相关部门进行监管^[17-19]。

3.2 中国对基因组编辑植物的监管

中国对基因组编辑植物的监管主要依据是国务院颁布的《农业转基因生物安全管理条例》,按照其中第三条规定:“本条例所称的农业转基因生物,是指利用基因工程技术改变基因组构成,用于农业生产或者农产品加工的动植物、微生物及其产品”。因此,通过基因组编辑技术获得的农作物及其产品,无论是与传统育种植物类似、不含有外来基因序列的SDN-1类和SDN-2类基因组编辑植物,还是与传统转基因植物类似存在外源基因插入的SDN-3类基因组编辑植物,均属于农业转基因生物,依法纳入农业转基因生物安全管理范畴。

目前,对基因组编辑植物产品的安全评价与管理亦有报道和讨论,沈平等^[9]认为,存在外源基因插入、获得新性状的SDN-3类基因组编辑植物应该按照传统转基因植物全面进行安全评价与管理;而对于不含有外源基因序列的SDN-1类和SDN-2类基因组编辑植物,建议简化安全评价与管理的内容,针对最终产品可能引入的食用和环境安全风险,有重点地开展安全评价。

针对基因组编辑作物,Huang等^[20]提出了监管的5个关键原则:(1)必须严格控制处于研发和试验阶段的基因组编辑作物,严防非法流出;(2)必须确保基因组编辑作物在研发过程中引入的外源DNA(包括参与基因组编辑的载体元件等)被完全去除;(3)必须详尽汇报靶位点处的DNA序列变化,若插入外源DNA序列,必须说明外源DNA供体和受体的亲缘关系、遗传背景以及互作的可能性;

(4) 必须评价该作物发生脱靶的可能性及其风险, 确保不发生非预期的编辑事件; (5) 必须把以上 4 个管理过程和相关信息如实登记备案。在满足以上 5 点的基础上, 基因组编辑植物产品才能和常规育种植物产品接受同等监管。

4 基因组编辑植物产品检测技术

按照中国目前的监管体系, 为了更科学地对基因组编辑植物进行监管, 更有针对性的检测技术必不可少。与传统转基因植物被插入大片段外源基因序列的情况不同, 基因组编辑技术在改造的受体生物体内留下的痕迹较少, 特别是 SDN-1 和 SDN-2 类基因组编辑产品。已有的转基因产品检测方法, 如聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 等对此类基因组编辑产品的检测不能完全适用, 给基因组编辑植物及其产品的检测带来新的挑战。因此, 需要加强检测新技术的研究, 建立针对基因组编辑植物产品检测的新方法。

传统转基因产品检测方法中, PCR 方法由于特异性强、灵敏度高、重现性好、操作较简单、检测成本较低, 应用最为广泛, 并且已有大量相关检测标准。SDN-3 类基因组编辑类似于传统转基因方法, 获得的产品仍然适用普通 PCR 检测方法。但是, 对于 SDN-1 和 SDN-2 类型只涉及少量碱基改变的基因组编辑产品, 需要研发新的不同的检测方法。目前能应用于检测单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 位点的方法, 很多都适合用于检测 SDN-1 和 SDN-2 类基因组编辑产品。已有文献报道的基因组编辑产品检测方法包括基于测序的检测方法、错配切割法 (mismatch cleavage assay)、等位基因特异性 PCR (allele-specific PCR, AS-PCR) 法、实时荧光 PCR 法、微液滴数字 PCR (droplet digital PCR, ddPCR) 法等^[21]。

基于测序的检测方法是对基因组编辑产品进行鉴别的最准确方法, 特别是 SDN-1 和 SDN-2 这类只有少数碱基改变的类型。第一代测序方法包括 Sanger 测序 (链终止法) 和化学降解法 (链降解法), 但这代测序方法操作繁琐、自动化程度较低、

读取片段长度有限、且测序成本较高。第二代测序方法 (next generation sequencing, NGS 测序), 是以边合成边测序的方式实现了高通量、低成本的大规模并行测序, 其中, 焦磷酸测序在检测 SNP 位点方面应用广泛, 由于 SDN-1 和 SDN-2 类型的基因组编辑产品的突变位点与 SNP 位点的情况类似, 因此, 焦磷酸测序技术可以发挥重要作用。测序方法发展至今已经进入第三代: 以单分子测序为特点, 无需进行 PCR 扩增, 通过现代光学、高分子纳米技术等手段进行碱基信号读取, 具有更高通量、更高读长、更低成本的特点。目前, 已有研究人员把测序结果结合靶点分析技术, 开发出简并序列解码方法 (degenerate sequence decoding, DSD) 及其网页版解码工具, 能简便、高效对大量测序文件进行同步解码, 对靶点突变情况进行分析^[22-23]。

错配切割法是通过错配切割酶 (如 T7E1、Surveyor、Cruiser) 识别异源双链核酸分子的错配位点并切割, 从而进行分析的一种方法。先通过 PCR 扩增含有预期基因组编辑位点的野生型与待测样品基因组 DNA, 将野生型与待测样品的 PCR 扩增产物进行变性退火杂交, 再用错配切割酶进行酶切, 通过琼脂糖电泳分析, 确定待测样品是否经过基因组编辑。若待测样品经过基因组编辑, 则其 PCR 产物与野生型的 PCR 产物变性退火杂交, 形成可被错配切割酶识别并切割的异源双链核酸分子, 而野生型同源双链分子不能被切割, 电泳条带不同^[24]。

等位基因特异性 PCR 方法是根据基因组编辑位点分别设计 2 条上游引物, 并使编辑位点位于其中一条上游引物的 3' 末端, 2 条上游引物分别与同一下游引物进行 PCR 扩增。由于 Taq DNA 聚合酶缺乏 3'→5' 外切酶活性, 只有上游引物 3' 末端与模板严格互补时才能顺利进行 PCR 扩增, 反之, 则无 PCR 产物。扩增产物通过电泳分离后, 即可判定样本是否经过基因组编辑。AS-PCR 分析方法具有简便、快速以及费用低等优点, 适用于已知基因组编辑位点的样品检测^[25]。

Taqman 探针实时荧光 PCR 方法是在 PCR 扩增体系中加入 1 个与靶位点序列互补的 Taqman 荧光

探针,以实时检测PCR扩增信号。Taqman探针的5'端与3'端分别标记荧光报告基因及其对应的淬灭基团,探针完整时荧光被淬灭。若PCR扩增时,待测样品存在与探针匹配的序列,聚合酶会将结合靶序列的探针荧光报告基因切除,随着反应进行,体系发出不断增强的荧光信号。如果靶序列发生变化,待测样品与探针匹配出错,则荧光信号将出现不同,从而可以推算出待测样品基因组编辑的情况。实时荧光PCR常以96/384孔板的形式操作,灵敏度高,操作相对简单,可用于大规模筛查已知的基因组编辑产品,此方法也同样有其局限性,不能区分突变位点类型(SNP位点与基因组编辑位点)。

对于编辑位点和序列未知的基因组编辑植物,可以针对目前基因组编辑应用领域的热门编辑位点、常见的脱靶位点及载体骨架等进行筛查,对筛查得到的疑似样品或阳性样品再使用测序的方法进行确认。同时,可结合对基因组的修饰情况、表达产物等的检测,实现对未知基因组编辑产品的有效识别。使用AS-PCR分析方法、Taqman探针实时荧光PCR方法对已知的基因组编辑植物产品进行检测,主要依赖前期针对已知的基因组编辑靶位点设计特异性引物(探针),方法建立后操作相对简单,仪器设备也比较容易满足需求,应用成本相对较低,可用于大规模筛查已知的基因组编辑产品。

5 结论

以CRISPR/Cas9为代表的基因组编辑技术发展日新月异,在植物基因功能研究、遗传改造以及育种中具有巨大的应用前景。由于基因组编辑植物存在脱靶效应等可能引发安全风险,因此,基因组编辑植物的监管非常重要,加强对检测技术的研究,进行有效的安全评价与监管,使基因组编辑植物及其产品更健康地发展和应用。

不同种类植物基因组编辑技术产品应该根据其特点有重点地开展不同类型的安全监管,同时,不同种类的植物基因组编辑产品应该根据其特点针对性地开发相应的检测方法。由于基因组编辑技术在改造的受体体内留下的痕迹较少,特别是对

编辑位点和序列未知的基因组编辑植物,现有的转基因产品检测方法很难对其进行准确地识别和检测。通过与已知基因组编辑产品的全基因组测序数据、靶位点序列、脱靶位点序列、常见的载体序列等相关的数据资料进行比对,可帮助实现对未知的基因组编辑产品的识别,也可对基因组编辑产品的知识产权保护,但这需要依托于信息准确、数据全面详实的基因组编辑产品信息数据库。因此,由研发者提供基因组编辑产品详细的遗传背景、基因组编辑操作方法、分子特征与性状等数据,由管理部门对相关数据进行收集、验证、汇总及维护,加快建立基因组编辑产品数据库非常必要。此外,通过测序结合大数据分析对未知基因组编辑产品进行鉴别也是未来检测技术发展的趋势之一。

参考文献(References)

- [1] 国际农业生物技术应用服务组织. 2018年全球生物技术/转基因作物商业化发展态势[J]. 中国生物工程杂志, 2019, 39(8): 1-6.
- [2] Papaioannou I, Simons J P, Owen J S. Oligonucleotide-directed gene-editing technology: Mechanisms and future prospects[J]. Expert Opinion on Biological Therapy, 2012, 12(3): 329-342.
- [3] 沈平, 章秋艳, 杨立桃, 等. 基因组编辑技术及其安全管理[J]. 中国农业科学, 2017, 50(8): 1361-1369.
- [4] 刘耀光, 李构思, 张雅玲, 等. CRISPR/Cas植物基因组编辑技术研究进展[J]. 华南农业大学学报, 2019, 40(5): 1-12.
- [5] 付伟, 魏霜, 王晨光, 等. 基因编辑作物的发展及检测监管现状[J]. 植物检疫, 2016, 30(3): 1-8.
- [6] 焦悦, 吴刚, 黄耀辉, 等. 基因组编辑技术及其安全评价管理[J]. 中国农业科技导报, 2018, 20(4): 12-19.
- [7] Pabo C O, Peisach E, Grant R A. Design and selection of novel Cys₂His₂ zinc finger proteins[J]. Annual Review of Biochemistry, 2001, 70(70): 313-340.
- [8] Li T, Huang S, Zhao X, et al. Modularly assembled designer TAL effector nucleases for targeted gene knockout and gene replacement in eukaryotes[J]. Nucleic Acids Research, 2011, 39(14): 6315-6325.
- [9] Cong L, Ran F A, Cox D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems[J]. Science, 2013, 339(6121): 819-823.

- [10] Sprink T, Eriksson D, Schiemann J, et al. Regulatory hurdles for genome editing: process- vs. product-based approaches in different regulatory contexts[J]. *Plant Cell Reports*, 2016, 35(7):1493-1506.
- [11] Jeffrey D W, Wang K, Yang B. The regulatory status of genome-edited crops[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2015, 14(2):510-518.
- [12] 何晓丹, 陈琦琦, 展进涛. 欧美等国基因组编辑生物安全管理政策及对中国的启示[J]. *中国科技论坛*, 2018(8): 183-188.
- [13] 薛满德, 龙艳, 裴新梧. 基因编辑技术及其在作物育种中的应用与安全管理[J]. *中国农业科技导报*, 2018, 20(9): 12-22.
- [14] Waltz E. Tiptoeing around transgenics[J]. *Nature Biotechnology*, 2012, 30(3): 215-217.
- [15] Waltz E. Gene-edited CRISPR mushroom escapes US regulation[J]. *Nature*, 2016, 532(7599): 293-293.
- [16] Jones H D. Regulatory uncertainty over genome editing [J]. *Nature Plants*, 2015, 1(1): 14011.
- [17] Araki M, Nojima K, Ishii T. Caution required for handling genome editing technology[J]. *Trends in Biotechnology*, 2014, 32(5): 234-237.
- [18] Shew A M, Danforth D M, Nalley L L, et al. New innovations in agricultural biotech: Consumer acceptance of topical RNAi in rice production[J]. *Food Control*, 2017, 81: 189-195.
- [19] 吴刚, 李文龙, 石建新, 等. 澳大利亚转基因生物安全监管概况及启示[J]. *生物技术通报*, 2019, 35(3): 138-143.
- [20] Huang S, Weigel D, Beachy R N, et al. A proposed regulatory framework for genome-edited crops[J]. *Nature Genetics*, 2016, 48(2): 109-111.
- [21] 刘春霞, 耿立召, 许建平. 植物基因组编辑检测方法[J]. *遗传*, 2018, 40(12): 25-41.
- [22] Ma X, Chen L, Zhu Q, et al. Rapid decoding of sequence-specific nuclease-induced heterozygous and bi-allelic mutations by direct sequencing of PCR products [J]. *Molecular Plant*, 2015, 8(8): 1285-1287.
- [23] Liu W, Xie X, Ma X, et al. DSDecode: A web-based tool for decoding of sequencing chromatograms for genotyping of targeted mutations[J]. *Molecular Plant*, 2015, 8(9): 1431-1433.
- [24] Guschin D Y, Waite A J, Katibah G E, et al. A rapid and general assay for monitoring endogenous gene modification[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2010, 649: 247-256.
- [25] Gualberto R, Kidd K K. Direct haplotyping of chromosomal segments from multiple heterozygotes via allele-specific PCR amplification[J]. *Nucleic Acids Research*, 1989, 17(20): 8392.

Supervision and detection technology of genome-edited plants

PAN Zhiwen¹, ZHANG Xudong², GAO Jieer¹, LIU Pengcheng², YAO Juan¹, ZHANG Xiujie^{2*}, JIANG Dagang^{1*}

1. College of Life Sciences, South China Agricultural University; Inspection and Testing Center for Ecological and Environmental Risk Assessment of Plant and Plant-Related Microorganism (Guangzhou), Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Guangzhou 510642, China

2. Development Center of Science and Technology, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Beijing 100176, China

Abstract Genome editing is the technology using sequence specific nucleases to modify the target genes of organisms. In recent years, genome editing technology represented by the CRISPR/Cas system has been rapidly developed due to its accurate, efficient and easy handling. Genome editing provides important tools for research of gene function, disease treatment and plant molecular breeding. At the same time, genome-edited products appeared in large numbers would have higher demands for the supervision of government departments. In this review, we summarize three types of genome editing technology and products. We also introduce regulations of some countries and economies in genome-edited plants and corresponding products. Several detection technologies for genome-edited plants and products are also introduced. This review can provide suggestions for supervision department of GM plant products and technical reserve for testing organizations.

Keywords genome editing; CRISPR; supervision; detection method; transgene ●



(责任编辑 徐丽娇)