

基因编辑技术在农业种质资源上的应用

韩红兵¹, 谢卡斌², 曹罡², 田见晖¹, 王栋³

(1. 中国农业大学, 北京 100193; 2. 华中农业大学, 武汉 430070; 3. 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所, 北京 100193)

摘要: 基因编辑是对生物基因组的特定位点进行精准操作, 以实现 DNA 片段定点删除、插入或者单碱基突变的技术。该技术突破了传统农业育种性状改良的瓶颈, 能够创制出多种动植物全新种质。尤其是其中的 CRISPR/Cas9 技术, 以其操作简便、高效率、多靶标、通用性等优势成为当前主流的应用技术, 将给农业种业带来革命。为抢占未来种业种质创新和育种制高点, 我国应采取积极应对措施, 努力提高此技术的效率与精准性, 积极制定相应的法律、法规。

关键词: 基因编辑; 农业育种; 种业种质创新

中图分类号: S-1 文献标识码: A

Application of Gene Editing Technology on Germplasm Resources

Han Hongbing¹, Xie Kabin², Cao Gang², Tian Jianhui¹, Wang Dong³

(1. China Agricultural University, Beijing 100193, China; 2. Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China; 3. Institute of Animal Science, China Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

Abstract: Gene editing technology can precisely manipulate specific sites of the biological genome to achieve DNA fragment deletion, DNA insertion, or single base mutations. This technology has broken the bottleneck of traditional agricultural breeding and has been widely used in animal and plant improvement and creating a variety of new animal and plant breeding germplasms. The CRISPR/Cas9 technology has become the mainstream technology in current applications owing to its unique advantages such as easy handling, high efficiency, multi-target, and versatility, and it will bring revolutionary changes to agriculture. To improve China's agricultural breeding in the future seed industry, we should improve the efficiency and accuracy of this technology, and draw up related laws and rules.

Keywords: gene editing technology; agricultural breeding; agricultural germplasm innovation

一、基因编辑技术简介

(一) 技术概念

基因编辑是对生物基因组的特定位点精准操作, 实现脱氧核糖核酸 (DNA) 片段定点删除、插

入或者单个碱基突变等的一项技术。技术包括两个过程: 一是精准定位, 在基因组上准确找到特定 DNA 片段; 二是利用工具酶执行 DNA 编辑功能。当工具酶使生物体细胞基因组 DNA 双链断裂后, 可通过非同源末端连接 (NHEJ) 修复, 产生碱基

收稿日期: 2018-10-25; 修回日期: 2018-10-31

通讯作者: 王栋, 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所, 研究员, 主要研究方向为动物繁殖; E-mail: dwangcn2002@vip.sina.com

资助项目: 中国工程院咨询项目“工程科技颠覆性技术战略研究”(2017-ZD-10)

本刊网址: www.enginsci.cn

插入或缺失, 导致功能基因的失活; 还可通过同源重组修复 (HDR), 达到 DNA 片段插入或碱基突变。以锌指核酸内切酶 (ZFN) 和类转录激活因子效应物核酸酶 (TALEN) 为代表的第二代基因编辑技术, 提高了基因编辑效率。2013 年, 以 CRISPR/Cas9 (clustered regulatory interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated protein 9) 系统为标志的第三代基因编辑技术取得了决定性突破, 并因其操作简便、成本低、效率高、多靶标等特有优势, 成功获得抗蓝耳病猪、无角奶牛, 突破了常规育种瓶颈, 成为基因编辑主流技术。伴随着基因编辑技术的不断改进及其在动植物上的广泛应用, 未来农业领域将发生颠覆性变革。

(二) 技术特性

CRISPR/Cas9 基因编辑技术特性主要体现在: ①操作简单、成本低。利用 Cas9 蛋白的切割酶活性、sgRNA 引导 Cas9 蛋白定位目标位点的特性, 仅构建 Cas9 基因和 sgRNA 表达质粒, 即可完成基因编辑系统构建。②编辑效率高。靶向切割 DNA 双链效率达 50% 以上, 最高达 90% 以上, 介导的同源重组效率也达到 40% 以上, 远高于先前的技术体系。③靶点覆盖广, 靶向性高。以 PAM (protospacer adjacent motifs) 序列 (即 NGG) 为识别序列, 该技术能够实现目标基因组全部基因的编辑 (人类基因组每 8bp 就存在一个 PAM 序列)。同时, sgRNA 种子序列 (距 PAM 序列 8~12 碱基) 应与靶 DNA 完全配对的切割限制, 进一步增强了靶向性。④同时编辑的多个基因。Cas9 蛋白能同时与多个不同 sgRNA 形成剪切复合物, 实现对多个基因同时编辑。⑤通用性广。无基因、细胞类型及物种限制, 特别适用于对农业领域的动物、植物或微生物 (病毒、细菌) 的基因组改造。

二、基因编辑技术发展与应用现状

(一) 技术发展历程

20 世纪 80 年代末期, 马里奥·卡佩奇研发了基因打靶技术 [1], 实现了动物细胞基因组的精准编辑, 具有里程碑意义。随着研究的逐渐深入, 推动该技术不断取得突破, 并建立了多种技术体系。其中, ZFNs 技术是最早的人工内切核酸酶介导的基

因组编辑技术 [2], 在玉米、小鼠、人、果蝇、斑马鱼、牛和猪等多种动植物中成功应用。该技术编辑效率较高, 但系统构建难度大、费用高, 限制其推广和应用。而同期的 TALEN 技术作为另一项基因编辑技术, 操作相对简单, 也可使特定靶 DNA 序列双链断裂, 实现精确基因编辑 [3], 平均编辑效率达 40% 以上, 在酵母、果蝇、斑马鱼、爪蟾、小鼠、大鼠、水稻、猪、牛、羊等多种生物上都有应用。由第一代基因打靶到第二代 ZFN 和 TALEN 基因编辑技术, 编辑效率实现了质的飞跃。2012 年, 美国科学家首次证实, CRISPR/Cas9 系统能够靶向精确切割 DNA 片段, 并实现了动物细胞基因组精准编辑 [4~6], 标志着基因组定点修饰技术的新突破。此后, CRISPR/Cas9 基因编辑技术逐渐应用于动植物、微生物等领域, 成为高效、简便、通用的主流基因编辑技术。并通过突变型 Cas9 与胞嘧啶脱氨酶、尿嘧啶糖苷酶抑制蛋白及腺苷脱氨酶结合, 发展了单碱基基因编辑技术, 实现了单个碱基转换 [7,8]。

(二) 基因编辑技术应用领域

1. 突破了动物遗传改良与新品种培育瓶颈

传统动物育种周期长, 优良性状聚合难度大, 改良目标性状不确定性大。基因编辑技术不仅突破了传统育种难以解决的遗传障碍, 而且能实现特定性状的精准改变, 颠覆了已有动物遗传改良技术路径和选育效率。世界各发达国家和新兴经济体已将基因编辑技术作为优先发展方向超前部署, 以期抢占未来动物育种制高点。

(1) 生产性能改良

育种专家们发现, 肌肉生成抑制素 (MSTN) 是一种肌肉生长负调控因子, 该基因自然突变的比利时蓝牛和皮埃蒙特牛肌肉量丰富, 比其他肉牛肉量多 18%~20%。因此, 针对动物育种中产肉性状改良进展缓慢问题, 通过基因编辑技术, 创制了 MSTN 基因功能缺失的猪、牛、羊, 显著提高了肌肉生长速度和瘦肉率 [9~11], 并使其表现出了经典的“双肌臀”特征。另外, 有角表型不利于饲养管理, 而常规育种培育无角牛至少需要 20 年以上, 并可能导致产奶量下降。为此, 美国科学家基于对角型控制基因的研究成果, 对荷斯坦奶牛基因组的角型等位基因进行编辑, 将其替换成无角基因 P_c ,

培育了无角奶牛 [12], 减少了动物争斗, 提高了产奶性能。此外, 对 FGF5 基因编辑, 同样也提高了羊毛产量, 增加了羊毛细度。

(2) 产品品质改善

β -乳球蛋白是牛奶、羊奶中的固有蛋白成分, 是引起婴儿过敏的重要过敏原之一 (婴儿的消化系统尚未发育完全, β -乳球蛋白较容易“整颗”被吸收, 而被免疫系统判断为病原), 传统选育无法去掉该过敏原成分。2011 年, 我国首次通过基因编辑技术, 敲除了奶牛 β -乳球蛋白基因, 创制了奶中不含 β -乳球蛋白的奶牛, 可以生产适合婴儿食用的奶制品 [13], 进一步改善了乳品质。该研究为奶山羊育种新材料创制指明了方向, 通过对羊乳过敏原 β -乳球蛋白基因进行编辑, 使对奶制品过敏的人群也可以尽情享受奶制品。

(3) 抗病性能提升

动物重大传染性疾病不仅威胁人类健康, 也给畜牧业造成了巨大的经济损失, 这一直是育种专家和疫病专家无法解决、无法逾越的产业难题, 基因编辑技术为该难题的解决提供了重要思路。以动物传染性海绵状脑病为例, 该病是一种由朊病毒蛋白 (PRNP) 基因引起的牛、羊和人共患中枢神经系统疾病。我国学者利用基因编辑技术敲除了 PRNP 基因, 获得了抗疯牛病牛和抗羊瘙痒病绵羊与山羊等育种新材料 [14~16]。同样, 通过基因编辑将抗结核病的鼠基因 *Ipr1* 导入奶牛基因组, 培育了抗结核病奶牛 [17]。采用基因编辑技术, 美国科学家使猪蓝耳病 (PRRS) 病毒结合受体 CD163 基因功能缺失, 获得 CD163 基因编辑猪, 该猪对 PRRS 具有完全抗性, 化解了头号烈性传染病对猪养殖业的威胁 [18,19]。

2. 突破提高农作物产量、品质改良及抗病抗逆性选育瓶颈

(1) 增产和品质改善

产量性状是微效多基因性状, 传统遗传选育遗传进展已趋缓慢, 然而, 利用基因编辑技术分别敲除水稻产量负调控基因 *Gn1a*、*DEP1*、*GS3* 和 *IPA1*, 水稻每穗实粒数或粒密度、粒长都明显增加, 稻米产量大幅提高 [20~22]。同样, 利用 CRISPR/Cas9 技术定点编辑小麦粒长和粒重负调控基因 *TaGASR7*, 也使小麦粒重显著增加。直链淀粉含量影响水稻品质, 采用 CRISPR/Cas9 技术靶向修饰直

链淀粉合成酶基因 *OsWaxy*, 突变水稻直链淀粉含量由 14.6% 下降至 2.6% [23], 改善了稻米糯性品质。利用 CRISPR/Cas9 技术敲除影响玉米赖氨酸含量的基因 *O2*, 显著增加了 *O2* 突变玉米赖氨酸含量, 对 *fl2*、*opaque7*、*opaque6*、*De-30* 等进行基因编辑, 不同程度地改变了胚乳的氨基酸组成, 增加了赖氨酸含量 [24]。基因编辑技术已成为快速、定向改良作物产量与品质的重要工具。

(2) 抗逆与抗病性能提升

稻瘟病是危害水稻最严重的病害之一。靶向敲除负调控水稻的稻瘟病抗性基因 *OsERF922*, 获得的 T2 纯合突变系在苗期和分蘖期对稻瘟病菌的抗性显著提高 [25]。美国对 *Sweet14* 基因进行编辑, 获得了抗白叶枯病的水稻 [26]。我国首次对小麦 *MLO* 进行基因编辑, 获得了对白粉病具有广谱抗性的小麦材料。ARGOS8 是一个乙烯响应负调控因子, 干旱胁迫过表达 ARGOS8 的玉米比野生型显著增产。利用基因编辑技术使 ARGOS8 表达量显著增加, 这些突变体在干旱环境下的产量比野生型玉米产量有显著提升 [27]。

3. 突破了动物疫苗研发与致病机制研究瓶颈

我国利用 CRISPR/Cas9 系统和 Cre/Lox 系统对伪狂犬病毒进行基因编辑, 构建了第一个基因编辑候选疫苗。但是, 该系统不适用于所有物种, 尤其是结核分枝杆菌等病原微生物。而基于三型 CRISPR/Cas10 系统的新型 CRISPR/Cas 基因编辑系统, 则可用于不同病原微生物基因组编辑, 制备新的基因编辑疫苗 (如伪狂犬病毒、非洲猪瘟病毒、结核分枝杆菌等)。此外, 聚焦型或全基因组文库 CRISPRi 筛选技术也被用于筛选人或小鼠病毒受体, 以及动物病毒受体基因, 寻找与病毒复制相关的关键因子。如利用全基因组文库 CRISPRi 筛选技术鉴定出了宿主识别细菌 ADP-heptose 的受体。

三、基因编辑技术产业化前景

(一) 基因编辑技术产业化需求旺盛

CRISPR/Cas9 基因编辑作为一种革命性技术, 不但轰动了学术界、产业界, 也对资本产生了巨大吸引力。伴随其向农业育种等领域的逐渐渗透, 先后取得了抗蓝耳病猪、无角牛、磷高效玉米培育等一系列突破性进展, 并逐渐走向产业化。2014 年,

美国密苏里大学通过基因编辑成功获得完全抵抗蓝耳病的 CD163 敲除猪。国际著名猪育种公司英国 Genus PLC 公司与美国密苏里大学合作, 共同开展抗蓝耳病新品种猪的系统培育工作, 并于 2015 年宣布, 5 年后将抗蓝耳病新品种猪提供给猪肉生产商。目前, 该公司已相继拿到 CD163 基因、分子剪刀等知识产权许可, 并培育出祖代抗蓝耳病猪群体 [28]。与动物研究相比, 植物基因组编辑产品的开发和应用相对成熟, 已经开始商业化生产和应用, 早在 2012 年, 美国政府就批准了首个基因组定向修饰的磷高效玉米, 可以作为常规品种直接进行田间评价。基因编辑技术在植物抗病、抗除草剂、提升品质与产量方面的巨大经济价值, 驱动了拜耳公司、先正达公司、孟山都公司、杜邦-先锋公司的产业化研发步伐, 新型基因组编辑技术, 创建新型基因编辑农作物品种。

(二) 基因编辑技术产业化市场规模预测

随着技术研发的深入, 基因编辑的技术优势不断凸显, 并逐渐转化为产业优势, 已经在动植物育种方面显示了广阔的前景。据美国 Kalorama Information 公司估计, 2025 年基因编辑及其相关供应市场规模有望突破 50 亿美元。以我国为例, 2017 年生猪存栏 40 350 万头, 肉牛存栏 10 008.5 万头, 奶牛存栏 1 376.6 万头, 肉羊存栏 30 314 万头, 我国已成为名副其实的畜牧业大国。然而, 随着人口增加, 对畜产品产量和品质的需求不断增加, 家畜存栏还将大幅增加, 如以 10%~20% 的动物个体由基因编辑动物替代计算, 我国的市场规模也相当可观。同样, 农作物市场规模也很大, 经济效益更为明显。美国杜邦公司 (DuPont) 是最大的转基因作物销售公司之一, 据其测算, 首批基因编辑食物将会在 5 年内被端上餐桌。

四、基因编辑技术产业化发展建议

尽管基因编辑技术产业化与市场需求结合紧密, 产业化前景诱人, 但其产业化仍然受到一些瓶颈问题的制约: ① CRISPR/Cas9 系统自身技术问题。目前该技术基因编辑效率相对较低, 且靶点特异性有待提高。② CRISPR/Cas9 技术产业化中的技术壁垒问题。CRISPR/Cas9 技术原始创新来源于美

国科学家, 知识产权归属美国, 该技术在农业育种中的应用, 必将涉及知识产权问题。需要深入开展相关基础研究, 研发新的基因编辑技术, 绕开专利侵权问题。③ 基因编辑技术产业化法律、法规问题。基因编辑技术产业化进程, 很大程度上取决于其对应的法律、法规政策的完善与否。欧美在相关法律、法规立法方面走在世界前列, 基因编辑技术与转基因技术有本质区别, 我国应针对基因编辑技术制定相关法规, 为基因编辑的产业化应用提供法律保障。因此, 在基因编辑技术产业化进程中, 有必要协调好以下几方面的工作。

(一) 谋划布局科技项目

加强科技计划顶层设计和整体布局, 面向基因编辑技术在农业领域的应用推广问题, 开展前沿性、原创性基础应用研究, 面向未来 20 年我国经济社会发展的重大战略需求, 规划启动并实施一批农业领域基因编辑科技项目。

(二) 着力推动“产学研”一体化

基因编辑属于知识密集型技术, 产业化发展需要“产学研”一体化模式。以农业科技创新项目为载体, 培养和凝聚一批能支撑产业发展创新的领军人才、优秀团队, 为基因编辑技术产业化提供智力支撑。鼓励高校、科研机构开展多种形式的农业科技合作与科技成果转化活动, 加大企业、社会资本共同参与的风险投资, 解决“产学研”联合中的资金不足问题, 切实推动基因编辑技术在农业领域的产业化应用。

(三) 引导社会资金投入

基因编辑作为高新技术必将推动农业领域的革命性改变, 带来的经济效益不可估量。政府在增加对农业基因编辑技术研发投入的同时, 应制定各种优惠政策, 鼓励引导社会资金投入, 加快基因编辑技术在农业领域应用的产业化步伐。

(四) 建立与完善法律、法规

基因编辑是一种新型的动植物遗传改良技术, 与转基因育种有本质区别, 发达国家已经建立了相应配套的法律、法规。而我国尚未制定基因编辑的相关法规, 政府部门应紧跟技术发展潮流, 出台关

于农业基因编辑产品的相关法规及实施细则，为农业领域基因编辑技术的产业化发展铺平道路。

参考文献

- [1] Capecchi M R. Altering the genome by homologous recombination [J]. *Science*, 1989, 244: 1288–1292.
- [2] Geurts A M, Cost G J, Freyvert Y, et al. Knockout rats via embryo microinjection of zinc-finger nucleases [J]. *Science*, 2009, 325(5939): 433–443.
- [3] Christian M, Cermak T, Doyle E L, et al. Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases [J]. *Genetics*, 2010, 186(2): 757–761.
- [4] Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity [J]. *Science*, 2012, 33(9096): 816–821.
- [5] Cong L, Ran F A, Cox D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems [J]. *Science*, 2013, 339(6121): 819–823.
- [6] Mali P, Yang L H, Esvelt K M, et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9 [J]. *Science*, 2013, 339(6121): 823–826.
- [7] Komor A C, Kim Y B, Packer M S, et al. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage [J]. *Nature*, 2016, 533(7603): 420–424.
- [8] Gaudelli N M, Komor A C, Rees H A, et al. Programmable base editing of A•T to G•C in genomic DNA without DNA cleavage [J]. *Nature*, 2017, 551(7681): 464–471.
- [9] Bi Y Z, Hua Z, Liu X M, et al. Isozygous and selectable marker-free MSTN knockout cloned pigs generated by the combined use of CRISPR/Cas9 and Cre/LoxP [J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 31729.
- [10] Wang X L, Yue H H, Lei A M. Generation of gene-modified goats targeting MSTN and FGF5 via zygote injection of CRISPR/Cas9 system [J]. *Scientific Reports*, 2015, 5: 13878.
- [11] Han H B, Ma Y H, Wang T, et al. One-step generation of myostatin gene knockout sheep via the CRISPR/Cas9 system [J]. *Frontiers of Agricultural Science and Engineering*, 2014, 1(1): 2–5.
- [12] Tan W, Carlson D F, Lancto C A, et al. Efficient nonmeiotic allele introgression in livestock using custom endonucleases [J]. *Proceeding of the National Academy of Sciences*, 2013, 110: 16526–16531.
- [13] 李永涛, 张兰威, 孔保华. 消除乳清蛋白中 β -乳球蛋白致敏性的研究进展 [J]. *东北农业大学学报*, 2009, 40(7): 136–139.
Li Y T, Zhang L W, Kong B H. Research progress on eliminating sensitization of β -lactoglobulin in whey [J]. *Journal of Northeast Agricultural University*, 2009, 40(7): 136–139.
- [14] kuroiwa Y, kasinathan P, matsushita H, et al. Sequential targeting of the genes encoding immunoglobulin-mu and prion protein in cattle [J]. *Nature Genetics*, 2004, 36(7): 775–780.
- [15] Denning C, Burl S, Ainslie A, et al. Deletion of the alpha(1,3) galactosyl transferase (GGTA1) gene and the prion protein (PrP) gene in sheep [J]. *Nature Biotechnology*, 2001, 19(6): 559–562.
- [16] Yu G, Chen J, Yu H, et al. Functional disruption of the prion protein gene in cloned goats [J]. *Journal of General Virology*, 2006, 87(4): 1019–1027.
- [17] Wu H B, Wang Y S, Zhang Y, et al. TALE nickase-mediated SP110 knockin endows cattle with increased resistance to tuberculosis [J]. *Proceeding of the National Academy of Sciences*, 2015, 112(13): 1530–1539.
- [18] Prather R S, Whitworth K M, Schommer S K, et al. Genetic engineering alveolar macrophages for host resistance to PRRSV [J]. *Veterinary Microbiology*, 2017, 209: 124–129.
- [19] Whitworth K M, Rowland R R R, Ewen C L, et al. Gene-edited pigs are protected from porcine reproductive and respiratory syndrome virus [J]. *Nature Biotechnology*, 2016, 34(1): 20–22.
- [20] Li M, Li X, Zhou Z, et al. Reassessment of the four yield-related genes Gn1a, DEP1, GS3, and IPA1 in rice using a CRISPR/Cas9 system [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2016, 7: 377–385.
- [21] Wang Y, Geng L, Yuan M, et al. Deletion of a target gene in Indica rice via CRISPR/Cas9 [J]. *Plant Cell Reports*, 2017, 36(8): 1333–1343.
- [22] Shen L, Wang C, Fu Y, et al. QTL editing confers opposing yield performance in different rice varieties [J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2018, 60(2): 89–93.
- [23] Ma X, Zhang Q, Zhu Q, et al. A robust CRISPR/Cas9 system for convenient, high-efficiency multiplex genome editing in monocot and dicot plants [J]. *Molecular Plant*, 2015, 8(8): 1274–1284.
- [24] 张东民, 张晓星, 朱慧, 等. 基因编辑技术的研究及在玉米中的应用 [J]. *玉米科学*, 2018, 26(1): 45–49.
Zhang D M, Zhang X X, Zhu H, et al. Research and application of gene editing technology in maize [J]. *Journal of Maize Sciences*, 2018, 26(1): 45–49.
- [25] Wang F, Wang C, Liu P, et al. Enhanced rice blast resistance by CRISPR/Cas9-targeted mutagenesis of the ERF transcription factor gene OsERF922 [J]. *PLoS One*, 2016, 11(4): e0154027.
- [26] Li T, Liu B, Spalding M H, et al. High-efficiency TALEN-based gene editing produces disease-resistant rice [J]. *Nature Biotechnology*, 2012, 30(5): 390–392.
- [27] Shi J, Gao H, Wang H, et al. ARGOS8 variants generated by CRISPR-Cas9 improve maize grain yield under field drought stress conditions [J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2017, 15(2): 207–216.
- [28] 刘志国, 王冰源, 牟玉莲, 等. 分子编写育种——动物育种的发展方向 [J]. *中国农业科学*, 2018, 51(12): 2398–2409.
Liu Z G, Wang B Y, Mou Y L, et al. Breeding by molecular writing (BMW): The future development of animal breeding [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2018, 51(12): 2398–2409.