

基因编辑如何摆脱“脱靶”困扰

■本报记者 韩天琪

基因组编辑技术是当前生命科学研究的前沿领域。在多种不同的基因组编辑方法中,以 CRISPR/Cas9 系统最为便捷、高效,应用也最广泛。

但 CRISPR 技术存在的脱靶效应依旧是影响其能否广泛应用的主要限制因素,如何正确评估、检测脱靶效应,并提出相应的策略降低脱靶效应,是当前基因组编辑研究领域的重要研究方向。

近日,华中农业大学棉花遗传改良团队一篇相关综述,系统总结了当前的基因编辑工具、基因编辑产生的脱靶效应及类型、脱靶效应的机理、动植物的脱靶效应存在的问题;并总结了如何进行 sgRNA 设计、脱靶效应的评估和预测、避免和减轻脱靶效应的策略,及对预期基因组编辑结果的影响。该论文在线发表于国际综合性期刊 *Advanced Science*。

基因编辑虽好 脱靶是个问题

相对于以往研究基因功能的工具,以 CRISPR/Cas9 为代表的基因编辑技术效率和准确性都较高,但也会带来一个可能“致命”的问题——脱靶效应。

“基因编辑可以‘指哪打哪’。一般只要 20 个核苷酸序列就能对一个基因进行定位并定点敲除。但同时,在基因组序列中,与特定 20 个核苷酸序列相近的碱基片段非常多。基因编辑过程中,与导向 RNA 靶向目标很接近的片段,也会结合上去并被敲除掉,这就是所谓的‘脱靶’。”华中农业大学植物科学技术学院教授、论文共同通讯作者金双侠在接受《中国科学报》采访时解释道。

金双侠强调,由于可以结合的潜在脱靶位点基因片段较短,所以在理论上脱靶概率还是比较高的,脱靶位点也比较多。如果脱靶现象普遍发生,对动植物来说都会是一个严峻挑战,其后果是比较严重的。

在电子科技大学生命科学与技术学院教授张勇看来,基因编辑技术在动植物育种和基础研究工作中都很重要。但其中的脱靶效应和非特异性剪切对应用结果和研究成果的可靠性、有用性有重要影响。“目前,对于基因编辑技术的应用和发展的综述较多,但全面综述脱靶效应的比较少。”

进展

褐藻寡糖可缓解家畜肠道炎症

本报讯 近日,国际期刊*(黏膜免疫学)*在线发表中国农业科学院北京畜牧兽医研究所最新研究成果。该项研究揭示,褐藻寡糖具有缓解小肠黏膜炎症、促进肠道健康的作用机制。

该所家畜营养与调控科技创新团队研究员张宏福介绍,天然植物提取物,如寡聚糖、多糖、多酚和黄酮等,具有增强机体免疫功能、维护健康的作用,以及无残留、不产生抗药性的天然优势,在畜禽绿色健康养殖领域具有重要的开发应用前景。

而褐藻寡糖是一种通过降解褐藻胶得到的聚合度 20 以下的线型低聚物,含有聚甘露糖醛酸、聚古罗糖醛酸和杂合褐藻寡糖 3 种成分,被认为有抗氧化、抗炎症、抗细胞凋亡及增殖的作用。

该研究使用白消安构建肠道黏膜炎症模型,使用单细胞 RNA 测序手段和功能富集分析发现,褐藻寡糖可调节白消安干扰的基因表达,缓解对小鼠肠道细胞内质网、线粒体、细胞膜、细胞间连接和微绒毛的破坏作用,维持细胞正常功能,进而减轻小肠黏膜炎症损伤。IPEC-J2 细胞试验进一步揭示,褐藻寡糖是通过甘露糖受体信号通路对肠道细胞发挥作用。血液代谢组及肠道微生物群落分析也进一步证实,褐藻寡糖具有改善小肠簇状细胞、杯状细胞和潘氏细胞,促进肠上皮细胞恢复,进而提升小肠健康功能的作用。

该成果可为靶向性调控禽肠道健康、促进绿色健康养殖提供重要理论依据,也是该团队面向畜禽产业饲料全面禁抗重大需求,校企合作开发新型绿色替代产品,构建绿色健康养殖饲料营养体系,推动养殖业高质量发展的实践。

(张晴丹)

相关论文信息: <https://doi.org/10.1038/s41385-019-0248-z>



金双侠在华中农大作物遗传改良国家重点实验室查看基因编辑的棉花材料。

“长期以来,学术界对植物基因编辑器和基因编辑工具的脱靶效应缺乏相关重视。”安徽省作物基因编辑中心主任、安徽省农科院水稻研究所研究员魏鹏程评价称,该综述很好地结合了动物基因编辑技术中的前沿进展和植物基因编辑所面临的问题,指出了未来在脱靶效应方面到底应该做哪些工作。

四种降低脱靶效应的策略

根据该论文,基因编辑领域目前可以采用以下策略降低脱靶效应:开发并合理利用预测脱靶效应的有效工具;开发新的基因编辑系统;利用高质量参考基因组设计靶标;好的基因编辑工具递送系统。“上面几种技术策略的利用,可以有效减少或避免脱靶。”金双侠表示。

脱靶检测最简单有效的方法之一是全基因组测序法。通过软件预测潜在的脱靶位点,然后将基因组测出来进行比对。如果与受体材料相比,潜在脱靶位点没有变化则证明没有脱靶,有变化则可能存在脱靶,进一步可以通过经典 Sanger 测序法进行验证。“这是目前非常简单高效且全面的一种方法。”金双侠称。

开发新的基因编辑系统,则是从技术源头的角度避免脱靶。目前出现了一些新的 CRISPR/Cas 系统,相比于最常用的 CRISPR/Cas 9 系统,有更高的精准性可以显著地降低脱靶效应。

基因编辑中的基因组是通过基因组测序获得的成千上万的小片段拼接而成,受早期测序技术和拼接策略的局限,很多物种的基因组早期版本有错误。如果对这样的基因组进行编辑,就好比去解读一本错误百出的书,自然会产生误解。所以,如果没有很好的参考基因组,很容易产生脱靶。

“最理想的状态是,做每一个品种的基因组编辑时,以该品种的参考基因组去做靶标设计。”金双侠表示,即使是同一个物种,不同的品种、品系间都存在相当大的遗传差异,这会对脱靶、基因编辑精准性产生很大影响。

好的基因编辑工具的传递系统应当尽量避免或者降低组织培养产生的体细胞无性系变异,也是减少脱靶或者提高基因编辑精准性的一个重要策略。

基因编辑工具未来前景

张勇认为,该综述对基本概念讲得

春耕保供急 专家线上忙

■本报记者 李晨 通讯员 许天颖



猪视网云课堂在线观看超过 14 万人次。

新冠肺炎疫情当前,春耕却要开始了。如何保证“米袋子”“菜篮子”“果园子”的充足,直接关系到农户和百姓的民心安稳。

南京农业大学社会合作处处长陈巍介绍,疫情发生以来,南京农业大学农业重大技术协同推广计划项目的各个专家团队,运用多种信息化手段为农户持续开展线上技术指导与咨询服务,组织针对新型农业经营主体、基层农技人员的“线上调研”。

农户和专家虽然未“见面”,但也从未“断线”,防控、保供两不误。

疫情对产业既有冲击,也有推动

疫情发生后,国家梨产业技术体系首席科学家、南京农业大学园艺学院教授张绍铃组织梨体系全体人员密切关注疫情对我国梨产业的影响。

2 月初,他联合梨产业体系经济岗位专家,分别面向梨生产者、经营者、消费者等开展了广泛的网络问卷调查,形成《新冠肺炎对梨产业影响调查报告》,目前已报送农业农村部科教司、种植业管理司等主管部门。

据了解,调查涉及全国 20 个省 73 个地市,涵盖了主要梨产业从业者。

张绍铃告诉《中国科学报》,通过调查分析,新冠肺炎疫情对梨产业既有冲击,也有一些积极效应。冲击主要体现在疫情及防控措施造成部分生产资料价格上升和供应短缺。同时,由于疫情影响劳动力流动,导致梨园短期

内出现用工短缺、相关工作推进困难。此外,物流受阻或成本增加直接影响了贮藏梨出库。春节本是市场消费的旺季,但 92% 的从业者表示,受疫情影响,贮藏梨出库量明显下降,51% 的受访者表示出库价格降低。

不过,疫情对拉动梨的消费也有一定的正面影响。多数受访者表示,会因为其润肺功能而选择多吃梨。梨是一种相对耐存储的水果,大多数受访者表示,会选择多存储一些,以供全家持续消费。绝大部分受访者表示梨供应正常,供应量和价格均比较平稳。

针对调查中发现的问题,张绍铃会同梨体系的专家们给出了几点建议:地方政府对于生产物资供应给予一定协助,保障关键时节的梨园作业需求;组织本地梨果经销大户与梨主产区对接,签订购销协议,稳定供应关系;更多地借助电商平台帮助果农和贮藏户销售梨果。

针对当前梨园生产遇到的管理问题,张绍铃建议专家团队及时发布技术指导方案,并通过在线视频、电话、QQ、微信等多种方式对农户进行指导。

保障畜禽生产不能放松

1 月 27 日,南京农业大学动物科学学院教授、江苏省现代农业(生猪)产业体系首席专家黄瑞华早早地回到工作岗位,通过多种信息手段向养殖户提供远程服务。

黄瑞华还组织体系岗位专家与基地主任、国家重大农业技术协同推广江苏试点(生猪)项目组,以及江苏省规模畜禽产业技术创新战略联盟成员单位,面向江苏、福建、广东、四川等省开展“新冠肺炎疫情防控对生猪产业影响”的远程调研。短短两天时间收到反馈 20 多个县域、近百个企业的信息反馈。

1 月 31 日,项目组针对调研中普遍存在的养殖物资运输、市场销售、工作人员返场受阻等问题,提出了相关建议,第一时间呈送相关主管部门。

非常清楚,对方法的综述非常全面。同时也非常贴近研究工作的实际。“不是从理论到理论的、读完别人工作后做的文献综述,而是结合了第一线的工作。”

“该综述通过总结现有研究工作,梳理了脱靶效应这一概念的历史,对脱靶效应的概念进行了比较系统和全面的分类。在方法层面比较全面系统阐述了怎样从实验角度,用不同基因编辑技术检测脱靶效应的效率及可行性;用生物信息学、AI 数据分析等预测评估脱靶效应;怎样降低脱靶效应、提高基因编辑的准确性等问题。”张勇表示。

目前,基因编辑最主流的三种工具分别是锌指核酸酶(ZFN)技术、转录激活样效应因子核酸酶(TALEN)技术和串联间隔短回文重复序列(CRISPR/Cas)系统。其中以 CRISPR/Cas 最高效、应用最多,但其脱靶率相对来说也最高。在准确性方面,TALEN 的表现最好。

上世纪 90 年代开始,生物界已经开始运用 ZFN 技术。2000 年之后出现 TALEN 技术。“早期的基因编辑技术都是蛋白质递层,也就是说要把蛋白质递到细胞里来,释放蛋白质的过程消耗的能量是非常大的。”魏鹏程表示,虽然 TALEN 技术目前来看在保真性和精确程度上比 CRISPR/Cas 强,但从所消耗的能量和构建药品的成本上看,CRISPR/Cas 应是基因编辑技术以后发展的一个重点。

“CRISPR/Cas 基因编辑工具目前所面临的保真性和精确程度不足的问题,在后续发展中应该可以得到克服。”魏鹏程据此判断的理由是,早期的 CRISPR 蛋白主要从自然生物中去筛选,并没有根据需要进行人工选择,因此能承受一部分的脱靶效应。一旦把人工选择加进去之后,保真性很容易进化出来。“将来随着 CRISPR/Cas 技术的日臻完善,会把现有的一些问题,比如保真性方面的缺陷给弥补上。”

金双侠也认为,虽然三种主流工具的应用目前处于优势互补状态,有的科研机构会同时使用这三种工具,但未来还是 CRISPR/Cas 更有发展潜力。

相关论文信息:
<https://doi.org/10.1002/adv.201902312>

“日常消毒方面可以借鉴猪场防非洲猪瘟的消毒策略”“尽快恢复民生企业,特别是饲料企业的‘绿色通道’”“针对性制定员工回场规程,应有符合防控新冠肺炎要求的隔离观察期、观察期间行为与健康登记制度”……

面对新冠肺炎疫情,生猪体系采取岗位+基地模式,针对基地与示范点开展远程指导,并率先启动工作一日一报模式;通过多个网络平台,就养殖户普遍关心的疫情防控、病死畜禽处理、育种保障等问题,提供及时有效的一对一线上指导。

“当前疫情防控是第一位的,但是保障畜禽生产同样不能放松,因为这是民生工程。既要想办法尽快补充饲料供应,防止畜禽饿死,可考虑地挖掘非常规饲料资源,以解燃眉之急;又要科学有效地处理好病死畜禽,防止可能带来的次生灾害。”黄瑞华说。

直播支招小麦生产关键期

2 月 14 日上午,一场主题为《小麦中后期病虫害防治技术要点》的培训直播在“江苏布谷鸟种植联盟”平台上线。该联盟由南京农业大学农学院教授、江苏布谷鸟种植产业发展联盟理事长姜东于 2018 年发起,目前集结了 21 家高校、科研院所、企业,主要针对全国小麦的种植大户和农资商进行培训和指导。

姜东告诉《中国科学报》,今年受暖冬气候影响,春小麦的平均生育期比平时提前了一个月,因此,目前正值小麦生产管理的关键时期。受疫情影响,当前农资、物流一定程度受阻,农田用工劳力跟不上。根据天气预报,2 月中旬还会迎来大幅降温,化学除草过程中小麦本身的抗冻能力下降,因此,冻害风险较高。

针对当前生产中遇到的棘手问题,平台第一时间邀请联盟专家,自 2 月 9 日开始,分别围绕施肥、除草、防病虫害等主题对农户进行直观实用的线上指导。此外还开通微信群,通过视频、语音、图片等方式,对农户遇到的问题进行一对一的“会诊”。

截至 2 月 14 日,3 期直播已顺利结束,有来自全国 13 个省份、超过 33 万用户关注该平台,收看在线直播。

绿色视野

食糖是关系国计民生的战略物资和重要基础产业,其主要原料之一就是甘蔗。但由于甘蔗品种退化严重、种植效率低、成本高等问题,全国食糖产量连年下降,国内食糖自给率仅为 60%,食糖价格屡遭国际市场冲击。

面对“内外交困”的现状,中国热带农业科学院热带生物技术研究所(以下简称热科院生物所)研究员杨本鹏带领团队开展科研攻关,历经 20 年深耕甘蔗领域,研发出甘蔗脱毒种苗技术。在保障种苗安全的情况下,新技术为突破甘蔗种植瓶颈,实现甘蔗机械化生产、提高效率,促进甘蔗产业走出“寒冬”奠定了基础。

种苗脱毒 快速扩繁

甘蔗是我国最为重要的食糖原料作物,占食糖总产量的 90%以上,是我国热带、亚热带地区第一大经济作物,主要分布于广西、云南、广东、海南等省区,也是这些地区农民脱贫致富的支柱产业。

不过,由于甘蔗是无性繁殖作物,在其宿根栽培过程中易受花叶病和宿根矮化病等病原物的反复侵染而造成品种退化,导致单产和蔗糖分降低。

品种就是农业的“芯片”,甘蔗的种苗起到至关重要的作用。“品种退化严重和良种繁育效率低是制约我国甘蔗产业健康发展的主要问题。”杨本鹏在接受《中国科学报》采访时表示,我国甘蔗由产长期徘徊在 4.2 吨左右,其种植效益较低。在自育新品种还难以取代现有主栽品种之际,退化品种的提纯复壮是当务之急。

为此,杨本鹏一直在思索,怎样使甘蔗体内的病菌病毒脱出,恢复到母本性状。经过反复的试验和摸索,他们研发出甘蔗茎段综合脱毒及脱毒种苗工厂化培育的关键技术,实现了脱毒种苗的工厂化繁育,这就解决了品种退化及繁育速度慢的问题,不但可以延长优良品种的使用年限,还可以提高育种的经济性。

“通过综合脱毒,可以彻底脱除花叶病和宿根矮化病等病原,使原原种的获取率达到 70%以上,原原种的带病带毒率为零。”杨本鹏说。

此外,通过多年的不断选择和优化,团队还攻克了甘蔗脱毒种苗规模化移栽假植、田间扩繁的关键技术,令原种苗移栽假植成活率达到了 95%以上,田间种植成活率达到



脱毒原种苗移栽在穴盘

杨本鹏供图

新型施肥施药机为农民减“负”

本报讯 “目前,国内施肥施药的技术研究多集中于精准施药和精量施肥,但现有的植保机械主要存在施肥幅宽小、肥料利用率低等问题。”扬州大学机械工程学院教授张瑞宏说。近日,他带领的科研团队,集成液压系统、风送喷雾系统和基于 PLC 的施肥施药控制系统等多项先进工艺技术,成功研发出大宽幅对行施肥施药机,有效解决了作业难题。

“我国是农业大国,以水稻、小麦、玉米为主的粮食作物播种面积超过 1.12 亿公顷。但在施用化肥时,一直存在施用粗放、养分不均衡等问题。在防治病虫害时,大量使用手动和机动迷雾器等小型施药机械。其作业精度差,成雾药滴直径大,易从叶片表面滚落,导致近 70%农药流失,造成环境污染,严重制约了我国农业可持续发展。”张瑞宏说。

据了解,实现施肥施药喷头与作业间距离调整的关键在于对调节机构。团队成员奚小波告诉《中国科学报》,通过将机组集成化设计,他们将施肥施药作业执行终端分为三组,互相铰接。作业时,左右两侧机构能够在拓展液压缸的驱动下完全展开,实现对行距离的调整,破解了施肥施药幅宽小的难题。

95%以上,甘蔗脱毒种苗田间繁育效率低的问题得到解决。

配套技术 降本增效

实际上,我国甘蔗生产成本非常高,在国际上没有竞争力。“这是因为我国种甘蔗的自然气候条件相对较差,土地生产规模小,地形地貌也限制机械化的推广应用,加上近年来人工成本上升,导致甘蔗生产成本居高不下。”团队成员、热科院生物所副研究员蔡文伟在接受《中国科学报》采访时说。

有了脱毒良种,可以保证甘蔗种植无病无毒、健康生长,不过良种要想发挥更大作用,实现降本增效,还需要配套的生产栽培技术。

“我们创新了甘蔗脱毒种苗宽行稀植的种植模式,推出良种脱毒种苗配套生产栽培技术,既发挥了脱毒种苗的优良特性,又推动了耕作与收获机械的应用,采用良种、良法‘两条腿’走路,真正实现降本增效。”杨本鹏介绍,应用该技术体系种植甘蔗脱毒种苗,可使甘蔗产量提高 20%以上,蔗糖分提高 0.5~1 个百分点,节约用种 60%。

“良种加良法,通过示范带动,农民真正看到了现代化甘蔗种植带来的效益,他们不再心存怀疑。我们的成果得到了很好的推广应用。”蔡文伟说。

他们通过在云南、广西、广东和海南等甘蔗主产区进行良种脱毒种苗培育、共建良种繁育基地、多层次开展技术培训等方式,加强与种业企业、地方农技部门合作,实现了成果的“育、繁、推”产业化应用。

十年来,该项技术累计推广 556.93 万亩,近 3 年累计应用 426.02 万亩,新增农业产值 17.77 亿元,新增农民纯收入 12.98 亿元。“该成果为蔗糖产业发展和贫困地区脱贫攻坚提供了重要技术支持。”杨本鹏说。



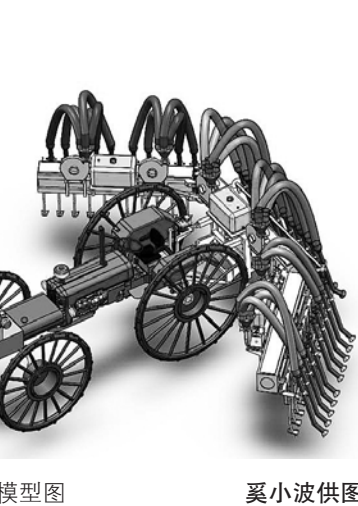
杨本鹏供图

团队成员张翼夫介绍,该机械可以实现“因地制宜,因材施教”。为适应不同作物在不同生长阶段的不同作业高度需要,他们自主设计了一种喷雾作业高度可调节的机构,通过三组高度调节方式的结合,可满足不同施药高度需要。

据悉,该项目已申请 8 项专利,并在扬州市江都区进行示范应用。

“30 年来,很多农机设备纷纷上市。为了更优化,我常常往田里跑,通过观察不同作物的播种、发芽和生长过程中的形态来研究设计新装置。我希望农民的辛劳能减少,丰收的喜悦能增加,这才是为农业添福。”张瑞宏说。

(李晨 刘雨晗)



机具模型图

奚小波供图