

转基因生物技术安全农产品舆情分析

专题周报

(2023 年 7 月 11 日—2023 年 7 月 17 日)

【本期重点关注】

1. 欧盟评估转基因酿酒酵母菌株 LALL-LI 生产的三酰甘油脂肪酶的安全性
2. 欧盟评估转基因枯草芽孢杆菌菌株 XAN 生产的内切-1, 4- β -木聚糖酶的安全性
3. 欧盟评估非转基因黑曲霉菌株 294 生产的纤维素酶的安全性
4. 欧盟评估非转基因塔宾曲霉菌株 LYX 生产的内切-1, 4- β -木聚糖酶的安全性
5. 芬兰是否很快会食用到转基因蔬菜?
6. 美国人要吃转基因, 基改紫色番茄清除最终监管障碍
7. 我市积极开展农作物苗期转基因检测工作
8. 推广中心开展玉米制种田转基因监管检测工作
9. 【SCI HORTIC】过表达芒果 MiGF6A 和 MiGF6B 基因可促进转基因拟南芥

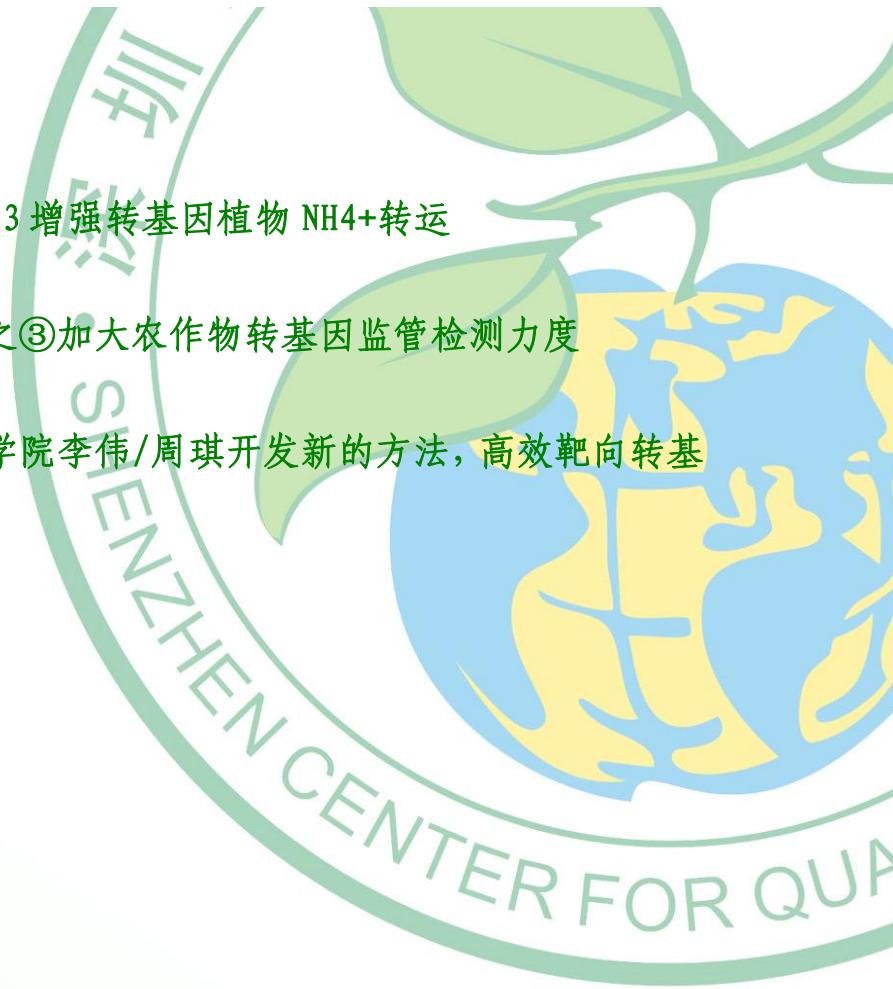
开花

10. Plant Science | NtAMT1.3 增强转基因植物 NH_4^+ 转运

11. 筑牢农业生物安全防线之③加大农作物转基因监管检测力度

12. Cell Discov | 中国科学院李伟/周琪开发新的方法, 高效靶向转基因整合

因整合



一、本期热点事件摘要

1、欧盟评估转基因酿酒酵母菌株 LALL-LI 生产的三酰甘油脂肪酶的安全性

【食品伙伴网】

链接: <http://news.foodmate.net/2023/07/665219.html>

内容:

核心提示: 2023 年 7 月 6 日, 欧盟食品安全局就一种食品酶三酰甘油脂肪酶 (triacylglycerol lipase) 的安全性评价发布意见。

食品伙伴网讯 2023 年 7 月 6 日, 欧盟食品安全局就一种食品酶三酰甘油脂肪酶 (triacylglycerol lipase) 的安全性评价发布意见。

据了解, 这种食品酶是由转基因酿酒酵母菌株 LALL-LI 生产的, 旨在用于烘焙过程中。

经过评估, 专家小组认为, 在预期的使用条件下, 不能排除通过饮食接触引起过敏反应的风险, 但这种情况发生的可能性很低。根据所提供的数据, 小组得出结论, 该食品酶在预期的使用条件下不会引起安全问题。

部分原文报道如下:

The food enzyme triacylglycerol lipase (triacylglycerol acyl hydrolase, EC 3.1.1.3) is produced with the genetically modified *Saccharomyces cerevisiae* strain LALL-LI by Lallemand Inc. The genetic modifications do not give rise to safety concerns. The food enzyme is free from viable cells of the production organism, but not from recombinant DNA. It is intended to be used in baking processes. Dietary exposure to the food enzyme - total organic solids (TOS) was estimated to be up to 0.42 mg TOS/kg body weight

t per day in European populations. The production strain of the food enzyme fulfils the requirements for the qualified presumption of safety (QPS) approach to safety assessment. Therefore, the Panel considered that toxicological tests are not needed for the assessment of this food enzyme. A search for the similarity of the amino acid sequence of the food enzyme to known allergens was made and no match was found. The Panel considered that, under the intended conditions of use, the risk of allergic reactions by dietary exposure cannot be excluded, but the likelihood is low. based on the data provided, the Panel concluded that this food enzyme does not give rise to safety concerns under the intended conditions of use.

2、欧盟评估转基因枯草芽孢杆菌菌株 XAN 生产的内切-1, 4- β -木聚糖酶的安全性【食品伙伴网】

链接: <http://news.foodmate.net/2023/07/665220.html>

内容:

核心提示: 2023 年 7 月 10 日, 欧盟食品安全局就一种食品酶内切-1, 4- β -木聚糖酶 (endo-1, 4- β -xylanase) 的安全性评价发布意见。

食品伙伴网讯 2023 年 7 月 10 日, 欧盟食品安全局就一种食品酶内切-1, 4- β -木聚糖酶 (endo-1, 4- β -xylanase) 的安全性评价发布意见。

据了解, 这种食品酶是由转基因枯草芽孢杆菌菌株 XAN 生产的, 旨在用于烘焙过程和基于谷物的过程。

经过评估，专家小组认为，在预期的使用条件下，不能排除通过饮食接触引起过敏反应的风险，但这种情况发生的可能性很低。根据所提供的数据，小组得出结论，该食品酶在预期的使用条件下不会引起安全问题。部分原文报道如下：

The food enzyme endo-1,4- β -xy lanase (4- β -d-xy lan xy lanohydrolase, EC 3.2.1.8) is produced with the genetically modified microorganism *Bacillus subtilis* strain XAN by DSM Food Specialties B.V. The genetic modifications do not give rise to safety concerns. The food enzyme is free from viable cells of the production organism and its DNA. The production strain of the food enzyme contains antimicrobial resistance genes. However, based on the absence of viable cells and DNA from the production organism in the food enzyme, this is not considered to be a risk. The food enzyme is intended to be used in baking processes and cereal-based processes. Dietary exposure to the food enzyme total organic solids (TOS) was estimated to be up to 0.02 mg TOS/kg body weight (bw) per day in European populations. As no other concerns arising from the microbial source and its subsequent genetic modification or from the manufacturing process have been identified, the Panel considered that toxicological tests are not needed for the assessment of this food enzyme. A search for similarity of the amino acid sequence of the food enzyme to known allergens was made and no match was found. The Panel considered that, under the

intended conditions of use, the risk of allergic reactions by dietary exposure cannot be excluded, but the likelihood is low. based on the data provided, the Panel concluded that this food enzyme does not give rise to safety concerns, under the intended conditions of use.

3、欧盟评估非转基因黑曲霉菌株 294 生产的纤维素酶的安全性【食品伙伴网】

链接: <http://news.foodmate.net/2023/07/665310.html>

内容:

核心提示: 2023 年 7 月 12 日, 欧盟食品安全局就一种食品酶纤维素酶 (cellulase) 的安全性评价发布意见。

食品伙伴网讯 2023 年 7 月 12 日, 欧盟食品安全局就一种食品酶纤维素酶 (cellulase) 的安全性评价发布意见。

据了解, 这种食品酶是由非转基因黑曲霉菌株 294 生产的, 旨在用于八种食品制造过程: 烘焙工艺、谷物加工、酿造工艺、生产淀粉和谷蛋白的谷物处理、果汁生产中的水果和蔬菜加工、果汁以外产品的水果和蔬菜加工、蒸馏酒精生产和葡萄酒及葡萄酒醋的生产。

经过评估, 专家小组认为, 在预期的使用条件下 (蒸馏酒精生产除外), 不能排除饮食暴露引起过敏反应的风险, 但这种情况发生的可能性很低。根据所提供的数据, 小组得出结论, 该食品酶在预期的使用条件下不会引起安全隐患。部分原文报道如下:

The food enzyme cellulase (4-(1, 3; 1, 4)- β -D-glucan-4-glucanohydrolase; EC 3.1.2.4) is produced with the non-genetically modified

ied *Aspergillus niger* strain 294 by Kerry Ingredients & Flavours Ltd. The food enzyme is considered free from viable cells of the production organism. The enzyme is intended to be used in eight food manufacturing processes: baking processes, cereal-based processes, brewing processes, grain treatment for the production of starch and gluten fractions, fruit and vegetable processing for juice production, fruit and vegetable processing for products other than juices, distilled alcohol production and wine and wine vinegar production. Since residual amounts of total organic solids (TOS) are removed during distilled alcohol production and grain treatment for the production of starch and gluten fractions, dietary exposure was only calculated for the remaining six food manufacturing processes. It was estimated to be up to 5.706 mg TOS/kg body weight (bw) per day in European populations. Genotoxicity tests did not indicate a safety concern. The systemic toxicity was assessed by means of a repeated dose 90-day oral toxicity study in rats. The Panel identified a no observed adverse effect level of 794 mg TOS/kg bw per day, the highest dose tested.

The calculated margin of exposure for each age group was 184 (infants), 146 (toddlers), 139 (children), 219 (adolescents), 305 (adults) and 441 (the elderly). A search for the similarity of the amino acid sequence of the food enzyme to known allergens was made and four matches were found. The Panel considered that, un

der the intended conditions of use (other than distilled alcohol production), the risk of allergic reactions by dietary exposure cannot be excluded, but the likelihood is low. based on the data provided, the Panel concluded that this food enzyme does not give rise to safety concerns under the intended conditions of use for adolescents, adults and the elderly.

4、欧盟评估非转基因塔宾曲霉菌株 LYX 生产的内切-1, 4- β -木聚糖酶的安全性【食品伙伴网】

链接: <http://news.foodmate.net/2023/07/665312.html>

内容:

核心提示: 2023 年 7 月 12 日, 欧盟食品安全局就一种食品酶内切-1, 4- β -木聚糖酶 (endo-1, 4- β -xylanase) 的安全性评价发布意见。

食品伙伴网讯 2023 年 7 月 12 日, 欧盟食品安全局就一种食品酶内切-1, 4- β -木聚糖酶 (endo-1, 4- β -xylanase) 的安全性评价发布意见。

据了解, 这种食品酶是由非转基因塔宾曲霉菌株 LYX 生产的, 旨在用于烘焙过程和基于谷物的过程。

经过评估, 专家小组认为, 在预期的使用条件下, 不能排除通过饮食接触引起过敏反应的风险, 但这种情况发生的可能性很低。根据所提供的数据, 小组得出结论, 该食品酶在预期的使用条件下不会引起安全问题。

部分原文报道如下:

The food enzyme endo-1, 4- β -xylanase (4- β -D-xylan xylohydrolase, EC 3.2.1.8) is produced with the non-genetically modified microorganism *Aspergillus tubingensis* strain LYX by DSM Food S

pecialties B.V. The food enzyme was considered free from viable cells of the production organism. It is intended to be used in baking processes and cereal-based processes. Dietary exposure to the food enzyme - total organic solids (TOS) was estimated to be up to 0.106 mg TOS/kg body weight (bw) per day in European populations. Genotoxicity tests did not indicate a safety concern. The systemic toxicity was assessed by means of a repeated dose 90-day oral toxicity study in rats. The Panel identified a no observed adverse effect level of 227 mg TOS/kg bw per day, the highest dose tested, which when compared with the estimated dietary exposure, resulted in a margin of exposure of at least 2,142. A search for the similarity of the amino acid sequence of the food enzyme to known allergens was made and no match was found. The Panel considered that, under the intended conditions of use, the risk of allergic reactions by dietary exposure cannot be excluded, but the likelihood is low. based on the data provided, the Panel concluded that this food enzyme does not give rise to safety concerns, under the intended conditions of use.

5、芬兰是否很快会食用到转基因蔬菜？【微信公众号】

链接：<https://mp.weixin.qq.com/s/30f68f1xDb4gpw4kWX0Rfw>

内容：

欧洲委员会希望放宽其严格的转基因生物（GMO）法规。放宽的目标是帮助农业适应气候变化。

转基因食品

几十年来，转基因食品一直在欧洲被视为咒骂词。在芬兰，大约十年前，基因改造生物（GMO）引发了一场引人注目的公民运动，反对转基因生物。

即使到现在，这个话题仍然引发强烈的情绪和恐惧，但现在人们希望改善转基因食品的声誉。

欧洲委员会和许多专家认为，当前迫切需要植物的基因编辑，或更准确地说是基因组编辑。通过这种方法，可以使植物品种更适应变化的气候条件，并同时改善欧洲人的食品安全。

上周，欧洲委员会提出了关于使用新基因组技术进行植物育种的立法提案。

这个提案已经被期待已久。尽管技术已经取得了巨大进步，但在欧洲迄今为止，使用这些技术一直非常困难，几乎是不可能的。现在人们希望放宽某些新技术的转基因监管。

新品种需要更好地抵御极端天气现象

卡恩塔-哈梅地区的约基奥伊斯（Jokioisilla）密切关注新育种技术的发展。

在这里，有芬兰唯一一家从事广泛植物育种活动的公司 Boreal 的设施，他们在这里培育适合芬兰环境的品种，例如大麦、燕麦和豌豆。约基奥伊斯通过交配制造新的植物品系。

Boreal 的一个温室目前正在种植秋小麦，希望培育出比以前更高产且更耐旱的品种。另一个温室里则开着豌豆花，他们也试图提高豌豆的产量，因为豌豆的使用在最近几年有所增加。

植物育种已经在积极应对气候变化方面做了很多工作，Boreal 的育种主管 Merja Veteläinen 说道。

在未来，我们必须能够引进比现有品种更耐旱的品种，并且在收获时能够抵御暴雨。

关于转基因生物（GMO）法规的放宽，将会导致什么后果？芬兰会很快食用到基因编辑的超级蔬菜吗？

根据芬兰社会与卫生部的谈判官员 Kirsi Törmäkangas 的说法，人们不必担心这个问题。Törmäkangas 也是与部门有关的基因技术委员会的秘书长。

放宽只适用于那些通过与传统方法相似的技术对植物进行类似突变的情况。经过基因改良的植物中不会残留来自其他物种的 DNA。

其中一种这样的技术是所谓的基因剪刀。这项技术是在大约十年前开发的，被认为是基因编辑的突破。基因剪刀可以精确地修改动物、植物和微生物的基因组。

Törmäkangas 还提醒人们，所有食品，包括通过新的基因组编辑技术改良的食用植物，都需要遵守相同的安全要求。

因此，对于这些食品，人们不必比其他任何消费者购买到的食品更加担心。

该提议引发了反对意见，将面临漫长的争议

实际上，通过放宽法规，商店的货架上可以销售更富营养的蔬菜，例如含有更多营养成分的蔬菜，或者使用更少农药栽培的番茄，或者经过基因编辑以更好地抵抗病害的马铃薯。

目标还包括确保品种的高产。如果供应充足，这可能会使蔬菜价格更

具竞争力，更便宜。

然而，这只是委员会的提案。预计将进行一系列繁忙的谈判：首先，成员国和欧洲议会必须形成各自的立场，然后将其协调一致。

芬兰新一届政府尚未对该提案表态，但根据芬兰社会与卫生部的 Törmäkangas 的说法，初步态度是积极的。

我们已经达成一致意见，认为当前的欧盟基因技术法规已不再符合目的，需要进行更新。

然而，她警告说，成员国之间的谈判将会非常困难。这个问题在欧盟成员国之间和国内已经政治化。

许多组织已经表达了对委员会提案的反对意见。

例如，绿色和平组织就此发表了声明，称放宽 GMO 法规会损害产品的安全性和消费者的权益。

环保组织的一项关注也涉及到，随着法规放宽，欧洲农业生产可能越来越集中在大型经营者手中。这个担忧与 GMO 植物有关。

博恩大学的研究员 Matin Qaim 在 7 月初向德国之声表示，这些担忧源于类似孟山都（Monsanto）这样的农业巨头。孟山都是全球最大的植物育种和农药生产公司之一。Qaim 表示，该公司以高昂的价格向农民销售种子。

Qaim 认为农业部门不应仅由少数几家公司掌控，但他认为这种集中并不与基因技术本身有关。他认为监管应确保该行业存在竞争。

6、美国人要吃转基因，基改紫色番茄清除最终监管障碍【微信公众号】

链接：<https://mp.weixin.qq.com/s/o8FXJ0RdZyZ7WZanPFHTPw>

内容：

转基因食品仍然存在形象问题，但公众态度正在发生变化。英国

Norfolk Plant Sciences 公司 (NPS) 已完成与 FDA 就紫番茄的安全性进行的上市前咨询。该款紫番茄经过转基因, 可产生高水平的促进健康的花青素, 准备在美国上市。

经过三年审查后, FDA 表示“目前对源自 Del/Ros1-N 番茄的人类食品没有进一步的疑问”。NPS 表示, 在该公司向美国农业部证明保证转基因紫番茄与传统番茄相比不会带来额外安全风险的九个月后, FDA 发出这封“无疑问”信函。

凭借这一重要进展, NPS 公司准备推出一系列紫番茄产品, 包括新鲜番茄和家庭园艺用种子。

这不是转基因番茄的“首秀”

稍稍了解农业科技历史, 就知道这并不是转基因番茄的“首秀”。早在 80 年代, 生物技术公司 Calgene 就开发了转基因的 FLAVR SAVR 番茄, 以延长保质期并增强抗真菌能力, 并于 1994 年进入美国市场, 但在 Calgene 公司被“臭名昭著”的孟山都收购后于 1997 年消失。

与其把 FLAVR SAVR 番茄的迅速消亡归咎于反转基因情绪, 倒不如说供应链挑战在很大程度上是其罪魁祸首。Calgene 当时试图非常快速地推出产品, 并在一年内从头开始建立一条供应链, 其中的番茄品种对于要进入的种植地点或产品类别来说并非最佳选择。

到了 90 年代中后期, 虽然 FLAVR SAVR 番茄生产的罐装番茄酱在主要超市表现良好; 然而, 1998 年风向发生了逆转, 媒体对“转基因食品争议”的狂热报道让零售商对转基因失去了兴趣。到 1999 年, FLAVR SAVR 番茄被放弃。

自那以后发生了什么变化，让 NPS 相信消费者今天会接受转基因番茄呢？根据该公司的首席执行官 Nathan Pumplin 博士的说法，越来越多的人开始看到基因工程在影响可持续性、食品营养质量和食品安全方面的巨大潜力。这些食品可以为消费者带来明显的利益。

与此同时，Z 世代和千禧一代的消费者对转基因生物的看法比他们的父母辈要积极得多，而且现在的媒体反应也要比 90 年代积极的多得多。还有，农产品的包装商和托运商也对紫番茄潜力感到兴奋，因为他们都在寻找下一个会引起轰动的食品，而 NPS 的紫番茄具有明显的差异化。

转基因新产品重获公众信任的重要过程

NPS 认为通过 FDA 无疑问认可是公众对其新产品产生信任的一个重要过程，也是所有在美国销售的转基因作物的障碍。FDA 信函对种植者和渠道合作伙伴都非常重要，这样就可以向客户传达产品经过审核的信息。

据悉，NPS 的转基因紫番茄产品用于非商业样品用途已经有几个月的时间了。获到 FDA 的认可消息后，该公司的种植合作伙伴已慢慢开始在选择的餐厅和农贸市场出售新鲜番茄；在 2023 年测试推广，然后在 2024 年在更广泛的零售市场推出。

为了建立一个以消费者为中心的品牌，NPS 网站向希望收到种子的消费者开放注册。随着 FDA 的流程结束，NPS 就可以向家庭园艺用户分发种子。在未来，NPS 还会与优秀的种植者和经销商合作，努力扩大新鲜紫番茄的生产和分销，并扩大其他创新作物品种的组合。

紫色的果肉和外皮

虽然许多番茄有紫色外皮，但 NPS 这款紫番茄的果肉也是紫色。该公司通过从金鱼草花中获取的两个基因，激活了番茄在成熟过程中产生花青素的途径。这些基因就像打开西红柿天然紫色色素的开关，可得到更高水平的抗氧化剂。

最棒的是，NPS 可以将任何种类的番茄品种都变成紫色，从大番茄到甜甜的樱桃番茄，使它们营养更丰富。

花青素作为抗氧化剂还能减缓果实的软化速度，保持新鲜度更久。目前，大多数商业化种植的番茄都没有等到完全成熟，就采摘它们并进入供应链。

所以，令真正饕客沮丧的事，莫过于买到一个看起来很棒，但食而无味的番茄。转基因紫番茄可让果实完全成熟、拥有完整的风味，同时仍然能够满足供应链要求。

7、我市积极开展农作物苗期转基因检测工作【吴忠农业】

链接：<https://mp.weixin.qq.com/s/-xHPKAXBEftHwGmvjdRvhg>

内容：

农业转基因生物安全监管工作事关粮食安全、食品安全和生态安全，根据《2023年吴忠市农业转基因生物监管工作方案》精神，近日，吴忠市农业农村局会同青铜峡市、利通区农业执法大队全面开展玉米制种基地、大豆等农作物苗期转基因检测工作，通过该项活动，进一步规范了种子生产秩序，确保我市农业生产用种安全。

此次重点对宁夏钧凯种业有限公司、宁夏登海种业有限公司、宁夏康农种业有限公司、宁夏福裕农业科技有限公司、宁夏稼禾盛种业

有限公司、襄阳正大农业开发有限公司等 15 家基地的主要农作物田间植株进行抽样检测，共抽取玉米、大豆、马铃薯样本 855 份，现场采用试纸条快速检测方法，经检测均呈阴性，未发现含有转基因成分。

下一步，我市将继续加大农业转基因生物安全监管工作力度，强化宣传引导，持续做好农作物转基因检测工作，确保农业生产安全。一是夯实工作责任，将转基因检测工作常抓不懈，在农作物种子转基因安全监测环节中，应检尽检，查早查小；二是做好农作物试验示范，进一步筛选适合我市种植的优良品种；三是加强种子质量安全检测，确保全市农作物用种安全；四是开展专项检查活动，严防非法转基因种子进入市场，有效确保我市粮食作物生产安全。

8、推广中心开展玉米制种田转基因监管检测工作【乌前旗农科局】

链接：<https://mp.weixin.qq.com/s/-00HmIjH3IWqtHwTGuXXoQ>

内容：

为切实抓好农业转基因生物安全监管工作，进一步强化源头治理，确保农业生产生态安全。近期，乌拉特前旗农牧业技术推广中心种子站工作人员对全旗范围内的玉米制种田开展转基因成分抽样检测。

2023 年，五家制种企业（四家为外省企业）到乌拉特前旗委托玉米生产，共落实玉米制种田 2921.5 亩，种子站工作人员共采集 108 个叶片样本，采用蛋白试纸条快速检测方法进行检测。经检测均呈阴性，未发现含转基因成分。

今后，我旗将进一步加大对农作物转基因的监管检测力度，强化宣传引导，把打击非法转基因作物当作一项长期工作开展下去，确保全旗农业生产生态安全。

9、【SCI HORTIC】过表达芒果 MiGF6A 和 MiGF6B 基因可促进转基因拟南芥开花【塞斯基因】

链接: <https://mp.weixin.qq.com/s/jxsvba80D7mIIcXKDbw8Ng>

内容:

01 摘要

14-3-3 基因是调控花朵发育和胁迫反应的通用基因。本研究从 SiJiMi 芒果基因组中获得了两个同源 14-3-3 基因 MiGF6A 和 MiGF6B。序列分析显示 MiGF6A 和 MiGF6B 均具有完全保守的 14-3-3 超家族结构域。MiGF6A 和 MiGF6B 在各发育阶段的组织中均有表达,尤其是在花和芽中。在低温、NaCl 和聚乙二醇 (PEG) 处理下, MiGF6A 和 MiGF6B 均有表达。亚细胞定位分析显示 MiGF6A 和 MiGF6B 定位于细胞核。在拟南芥中过表达 MiGF6A 和 MiGF6B 导致提早开花表型,并显著上调开花相关基因开花位点 T (AtFT), AtFD1 和 leaf (AtLFY)。酵母双杂交和双分子荧光互补 (BiFC) 分析表明 MiGF6A 和 MiGF6B 与 MiFD1、MiFD2 和 MiSVP3 蛋白相互作用。这些结果表明 MiGF6A 和 MiGF6B 可能在芒果开花过程中发挥积极作用。

02 技术路线

Sequence analysis of the MiGF6A and MiGF6B genes in mango

Expression analysis of the MiGF6A and MiGF6B genes in mango

Subcellular localization of MiGF6A and MiGF6B

MiGF6A and MiGF6B vector construction and transformation

of

Arabidopsis

Yeast two-hybrid assays

Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) assays

MiGF6A and MiGF6B vector construction and transformation
of Arabidopsis

Isolation and sequence analysis of the MiGF6A and MiGF6B
genes in mango

03 主要结果

3.1 芒果 MiGF6A 和 MiGF6B 基因序列分析

通过转录组和基因组测序，从芒果中分离出两个 MiGF6s，即 MiGF6A (GenBank 登录号为 00K203791) 和 MiGF6B (GenBank 登录号为 OK203792)。应用 IBS 1.0 软件分析 MiGF6A 和 MiGF6B 基因结构特征。Si JiMi 芒果 MiGF6A 和 MiGF6B 的开放阅读框(open reading frames, ORFs)长度分别为 783 bp, DNA 序列分别为 2443 bp 和 2193 bp。从图 1A 的数据可以看出，MiGF6A 和 MiGF6B 基因的结构与拟南芥同源基因 AtGRF1 相似，共有 4 个外显子和 3 个内含子。虽然两种基因的 CDS 长度相同，但各外显子存在碱基差异，内含子长度存在显著差异。MiGF6A 和 MiGF6B 分别位于 8 号染色体和 2 号染色体上，均编码 261 个氨基酸(AA)。核苷酸和氨基酸序列同源性分析显示，MiGF6A 和 MiGF6B 的同源性分别为 87.23%和 86.44%。这些结果表明，这两个基因具有高度同源性，但不是同一基因。

将 MiGF6A 和 MiGF6B 的氨基酸序列与拟南芥和其他物种的 MiGF6

同源蛋白的氨基酸序列进行比较。从图 1B 的数据可以看出，与其他 MiGF6 同源蛋白一样，MiGF6A 和 MiGF6B 基因编码的氨基酸序列具有完全保守的 14-3-3 超家族结构域。从 NCBI 数据库下载不同物种的 MiGF6s 氨基酸序列，利用 MEGA 11.0 软件构建 MiGF6 蛋白系统发生树。结果显示 MiGF6A 和 MiGF6B 聚类在同一枝上，芒果 MiGF6A 和 MiGF6B 与 PvGF6 (*Pistacia vera*) 亲缘关系近，属于漆树的同一家族(附录图 1C)。

3.2 MiGF6A 和 MiGF6B 启动子序列分析

利用 PLACE 和 PlantCARE 在线软件分别预测 SiJiMi 中 MiGF6A 和 MiGF6B 基因启动子区域 ATG 密码子上游-2.0 kb 区域的顺式调控元件。结果表明，这 4 条序列含有丰富的核心启动子元件。如图 2 所示，MiGF6A 和 MiGF6B 基因启动子内调控元件的类型和数量存在明显差异。MiGF6A 和 MiGF6B 基因启动子均含有光响应元件和茉莉酸甲酯响应元件，MiGF6A 基因含有另外两个元件。还有赤霉素反应元件、生长素反应元件、细胞分裂素反应元件和其他应激反应元件。综上所述，这些结果表明 MiGF6A 和 MiGF6B 基因的表达可能受到光、植物激素和胁迫的调控。

3.3 分析 MiGF6A 和 MiGF6B 基因在芒果组织和开花发育阶段的特异性表达模式

2019 年 3 月 6 日，从 sijimi 树开花枝和非开花枝的成熟叶、成熟茎、花和芽中采集了 6 个组织样本。通过 RT-qPCR 获得 MiGF6A 和 MiGF6B 基因的组织表达模式。结果表明，MiGF6A 和 MiGF6B 基因在芒果不同组织器官中均有表达，且表达模式不同。MiGF6A 基因在开花枝中的表达量高于非开花枝，且在花中表达量最高。此外，MiGF6B 基因在

开花枝条中的表达水平低于未开花枝条，MiGF6B 基因在芽中的表达水平最高(图 3A, B)。

为了确定 MiGF6A 和 MiGF6B 基因在不同发育阶段芒果树中的表达模式，我们从 SiJiMi 树上收集了茎、叶和芽样本(2018 年 11 月至 2019 年 3 月)，通过 RT-qPCR 检测 MiGF6A 和 MiGF6B 基因在不同发育阶段的茎、叶和芽中的表达模式。结果表明，MiGF6A 和 MiGF6B 基因在芒果整个花期均有表达，但其表达模式存在差异。MiGF6A 在营养生长期、花诱导期和花器官发育期的茎、叶和芽中的表达水平相对恒定，但在开花期的花中表达水平最高。MiGF6B 基因在营养生长期和成花诱导期的表达量变化不大，但在茎和叶中的表达量大幅增加，并在成花诱导期达到最高水平；而 MiGF6B 基因在诱导开花结束时高表达(图 3C, D)。

3.4 MiGF6A 和 MiGF6B 基因在应激反应中的表达分析

RT-qPCR 检测不同胁迫条件下 MiGF6A 和 MiGF6B 的表达模式。结果示于图 4 中。在 NaCl 2°C 和 PEG 处理后，MiGF6A 和 MiGF6B 的表达水平都显示出不同程度的增加。以治疗时间 0 作为表达基线。在 PEG 处理下，MiGF6A 和 MiGF6B 呈阶段性诱导，呈现先上升后下降的趋势；两者都是快速诱导的，在 6 h 达到最大表达量，之后表达量继续下降(图 4A)。在 NaCl 处理下，MiGF6A 和 MiGF6B 的表达量也呈现先升高后降低的趋势，但 MiGF6B 的总体表达量较低，说明 MiGF6B 的表达对盐胁迫不敏感。MiGF6A 的表达在 12 h 开始明显升高，48 h 达到高峰，之后逐渐下降至接近零(图 4B)。在 2°C 处理下，MiGF6A 和 MiGF6B 的表达水平也呈现先升高后降低的趋势；两种基因的水平从 0 h 开始随

时间逐渐升高, 在 24 h 达到最大值(图 4C), 然后缓慢下降。综上所述, 这些结果提示 MiGF6A 和 MiGF6B 基因可能参与了对不同应激条件的反应, 共同为进一步的研究奠定了基础。

3.5 MiGF6A 和 MiGF6B 蛋白的亚细胞定位

为了确定 MiGF6A 和 MiGF6B 的亚细胞定位, 在 CaMV35S 启动子调控下, 将两种蛋白融合到绿色荧光蛋白(GFP)上。定位结果如图 5 所示。细胞膜内可见 35S::GFP 荧光。4', 6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)染色显示, MiGF6A-GFP 和 MiGF6B-GFP 融合体仅在细胞核内显示绿色荧光, 仅在细胞核内检测到蓝色荧光信号。综上所述, 这些结果表明 MiGF6A 和 MiGF6B 定位于细胞核。

3.6 转基因拟南芥过表达的表型分析

MiGF6A 和 MiGF6B 在转基因拟南芥植株中表达, 而在对照植株中没有表达(图 6C, D)。在 LD 条件下, MiGF6A 和 MiGF6B 转基因株系的开花时间明显早于对照株系(图 6A, B)。MiGF6A 和 MiGF6B 转基因株系的开花时间约为 27 天, 而对照株系的开花时间约为 30 天(图 6G, H)。

为了进一步研究 MiGF6A 和 MiGF6B 在开花过程中的潜在机制, 在开花前收集 MiGF6A 和 MiGF6B 转基因植物的叶片, 通过 RT-qPCR 检测 3 个开花相关基因(AtFT、AtFD 和 AtLFY)的表达水平。内源性基因 AtFT、AtFD 和 AtLFY 在转基因细胞系中的转录水平显著高于野生型细胞系。这些结果表明, 过表达 MiGF6A 和 MiGF6B 可以促进 AtFT、AtFD 和 AtLFY 下游基因的表达水平(图 7A、B)。

3.7 MiGF6A 和 migf6b 相互作用蛋白的鉴定和验证

为了进一步研究 MiGF6A 和 MiGF6B 基因的功能，我们通过酵母双杂交的方法筛选了与它们相互作用的蛋白。将 MiGF6A 和 MiGF6B 的全长编码区克隆至 pGBKT7 诱饵载体，转化 Y2H Gold 酵母。对 pGBKT7-MiGF6A 和 pGBKT7-MiGF6B 质粒进行自活化和毒性评估，并将非自活化的酵母载体 PGADT7-MiSVP 与本实验室构建的芒果 cDNA 文库进行结合。在选择性培养基 (SD0/-Trp/-Leu/-His/-Ade) 上筛选出 10 个蓝色单克隆菌落。由于从文库筛选获得的相互作用蛋白不是由全长基因编码的，可能会出现假阳性，因此我们还需要确定蛋白质的全长序列，并通过一对一检验确定相互作用的真实性。这些蛋白质中只有三种与花的形成有关。选择 3 个与开花相关的蛋白，MiFD1, MiFD2 和 MiSVP3 来验证它们之间的蛋白相互作用。结果示于图 8A 中。MiGF6A, MiFD1/FD2 和 MiSVP3 之间以及 MiGF6B 和 MiFD1/FD2 之间的相互作用在洋葱的 BiFC 实验中得到验证。构建双分子荧光互补载体 pSPYNEMiGF6A、pSPYNE-MiGF6B、pSPYNE-MiSVP3、pSPYCE-MiFD1、pSPYCEMiFD2 和 pSPYCE-MiGF6A。以 pSPYNE-empty 和 pSPYCE-empty 作为对照。如图 8B 所示，MiGF6A 与 MiFD1、MiFD2、MiSVP3 共转化后，洋葱细胞核内检测到强烈的 YFP 荧光信号，MiGF6B 与 MiFD1、MiFD2 共转化后，洋葱细胞核内也检测到强烈的 YFP 荧光信号；在 pSPYNE-empty + pSPYCE-empty 对照组中未观察到 YFP 荧光。综上所述，这些结果表明 MiGF6A 在细胞核中与 MiFD1/MiFD2 和 MiSVP3 相互作用，MiGF6B 与 MiFD1/MiFD2 相互作用。

04 结论

在这项研究中，两个芒果 14-3-3 基因 (MiGF6A 和 MiGF6B) 被从芒

果基因组和转录组中挖掘出来。MiGF6A 和 MiGF6B 在芒果花发育的所有阶段的茎、叶和花中表达，以应对低温、干旱和盐胁迫。

此外，功能分析显示 MiGF6A 和 MiGF6B 定位于细胞核内。酵母双杂交和 BiFC 分析表明 MiGF6A 和 MiGF6B 在细胞核内与花蛋白 FD1, FD 2 和 SVP3 相互作用。这些结果进一步表明 MiGF6A 和 MiGF6B 可能参与了芒果开花的调控。(图 9)

原文链接:

<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2023.112074>

PDF 获取:

<https://www.sciensgene.com/h-nd-223.html>

10、Plant Science|NtAMT1.3 增强转基因植物 NH₄⁺转运【林木科学评论】

链接: <https://mp.weixin.qq.com/s/Tqj7bodpn-t7sLhmAgKcHw>

内容:

中国农业大学资源与环境学院 2017 年在 Plant Science 杂志上发表了题为“Molecular identification of tobacco NtAMT1.3 that mediated ammonium root-influx with high affinity and improved plant growth on ammonium when overexpressed in Arabidopsis and tobacco”的研究论文。该研究鉴定了烟草铵转运蛋白 NtAMT1.3 并阐明其功能特性。

研究背景

氮是植物生长发育的重要常量元素之一。然而，在大多数自然土壤中，植物的氮素可用性通常是有限的和非均匀分散的，这导致植物可能已经进化出各种策略/系统来调节其根系吸收能力，以补偿土壤氮

素可用性的时空变化。铵 (NH_4^+) 是土壤中主要无机氮形态之一，特别缺氮时， NH_4^+ 成为许多植物的主要氮源。 NH_4^+ 从土壤中的获取和在植物内的移动主要由植物细胞中位于质膜 (PM) 的铵转运蛋白 (AMTs) 介导。阐明这些转运蛋白的功能有助于我们理解 NH_4^+ 从土壤中吸收和在整个植物中分布的机制。这可能是改善植物生长和生产力以及防止氮肥对环境负面影响的重要一步。

研究结果

烟草 AMT1.3 同源基因开放阅读框的分子鉴定

为了探索烟草 NH_4^+ 转运的分子组成，以拟南芥 AMT1.1 序列为参照，在烟草基因组数据库中搜索同源序列，并通过基于 Web 服务器的基因预测，从 *Nicotiana tabacum* 或 *Nicotiana tabacum* L. cv. K326 中获得了 3 个与 AMT1.1 同源的不同编码序列或开放阅读框。基于蛋白质序列相似性分析，我们将这些直系同源物之一命名为 NtAMT1.3 (图 1A)，其 ORF 可能仅来源于一个外显子 (参见 K326 基因组数据库，登录号 AWOJ-SS 1877，位置 53449-54843)。来自其他植物物种的 AMT1 和 AMT2 亚家族成员的系统发育分析显示 NtAMT1.3 属于 AMT1 簇，并且与番茄 LeAMT1.3 高度同源 (序列相似度 92.4%) (图 1A)。NtAMT1.3 编码蛋白由 464 个氨基酸组成，被预测为一个整体膜蛋白，表现出 10 个跨膜结构域 (TMs)，N 端和 C 端都在细胞质外 (图 1B)。在转录上，NtAMT1.3 的至少三个表达序列标签 (ESTs) (例如 CK293460.1, CK288135.1 和 BP747124.1) 可以在数据库中找到，这些 ESTs 与 NtAMT1.3 的“起始密码子”或“终止密码子”的 5'-或 3'-末端序列完全匹配，CK288135.1 甚至还显示了一个 poly-A 尾，表明预测的 NtAMT

1.3 的 ORF 实际上是表达的。

NtAMT1.3 的异源表达补充了酵母突变体在低 NH_4^+ 上的生长, 并且 NtAMT1.3 定位于质膜

为了快速检测 NtAMT1.3 在 NH_4^+ 转运中的分子功能, 将 NtAMT1.3 的 ORF 克隆到酵母表达载体 pHXT426 中, 然后转化到酵母菌株 31019b ($\Delta\text{mep1-3}$, ura3), 中, 该菌株在 3 个内源性铵转运蛋白基因 (mep1 、 mep2 和 mep3) 的表达中存在缺陷, 且在小于 5 mM NH_4^+ 作为唯一 N 源时不能生长。与携带空载体 p426 的转化体相比, 携带 NtAMT1.3 的 31019b 酵母细胞在高达 1-2 mM NH_4^+ 上恢复了生长, 与用 pHXT 426 转化的野生型阳性对照菌株 23346c 相当 (图 2), 表明 NtAMT1.3 介导了 NH_4^+ 跨酵母细胞的 PM 输入。

此外, 为了检验 NtAMT1.3 通过细胞膜渗透 NH_4^+ 的可能性, 使用蛋白质融合方法研究 NtAMT1.3 的亚细胞定位, 将绿色荧光蛋白基因 (GFP) 与 NtAMT1.3 的 C-末端融合以产生构建在 CaMV 35 S 启动子下游的 NtAMT1.3: GFP。将 NtAMT1.3: GFP 转化拟南芥 (Col-0) 后, 通过共聚焦显微镜观察到一些独立的转基因品系根伸长区细胞中的 GFP 信号。来自 NtAMT1.3: GFP 的绿色信号 (图 3A) 与 PM 的红色荧光 (图 3B) 很好地重叠, 这是细胞与 FM4-64 孵育 10 分钟后产生的信号。这种重叠在叠加图像的黄色中可以清楚地观察到, 这是绿色和红色信号合并的结果 (图 3C)。此外, 某些液泡的边界由于没有可视化的绿色或红色信号从而可以明显区分 (图 3D), 所以 NtAMT1.3 的亚细胞定位最有可能在根细胞的 PM 上。此外, NtAMT1.3: GFP 在烟草叶表皮细胞中的瞬时表达让我们再次检测到 NtAMT1.3 的 PM 定位模式 (图 3E-G),

与拟南芥高亲和力尿素转运蛋白 AtDUR 3 非常相似 (图 3 I-K), 其已被记录定位在 PM 上。

氮对 NtAMT1.3 基因转录的调控

为了鉴定 NtAMT1.3 对植物 N 营养状态的分子响应, 将烟草放在不同 N 浓度水培预处理 18-21 天后提取总 RNA (图 4), 通过定量 RT-PCR (qPCR) 监测基因表达。在叶和根中, NtAMT1.3 的表达在缺氮情况下 (1 天或 3 天; 转录物丰度比正常供氮情况下的对照高 3 倍以上) 明显上调 (图 4)。恢复 NH_4^+ (在最初的 1-4 小时内) 与 3 天缺氮的对照组相比, 明显抑制了 NtAMT1.3 的转录 (图 4), 但在恢复 NH_4^+ 12 小时后, 刺激了 2 倍以上的叶表达 (图 4)。有趣的是, 缺氮 3 天后, 恢复 NO_3^- (在前 1 小时或 4 小时) 后, NtAMT1.3 在叶片中的 mRNA 水平强烈增加 (图 4), 但在 12 小时后显著下降 (图 4)。当以另一个基因 L25 作为参考时, 也观察到类似的表达模式。总之, 这些数据表明, NtAMT1.3 的转录丰度不仅受到植物 N 状态的调控, 而且还受到局部 NH_4^+ 或 NO_3^- 供应的调控。

NtAMT1.3 的表达恢复了拟南芥 qko 突变体在低 NH_4^+ 条件下的生长, 并介导了高亲和力的 NH_4^+ 流入拟南芥根部

为了深入了解 NtAMT1.3 在植物 NH_4^+ 摄取和利用中可能的生理相关性, 将 NtAMT1.3 在拟南芥四重突变体系 qko (atamt1.1-1.3, atamt2.1) 中过量表达, 该系在 $<0.5 \text{ mM}$ NH_4^+ 作为唯一 N 源时生长不良。创建了几个独立的含有 NtAMT1.3 的纯合子系, 并通过 qPCR 在植物中证实了 NtAMT1.3 的表达 (图 5A), 这些植物在 1 mM 硝酸铵上预培养 5 天后, 在含有 0.5 mM NH_4^+ 的植物培养基上生长 9 天 (图 5B)。生长表

型分析表明, NtAMT1.3 的过表达可以明显改善 qko 突变体在低 NH_4^+ 上的生长(图 5B), 与突变体相比, 其特征是芽和根的生物量明显增加, 主根长度延长, 总氮和 NH_4^+ 含量增加(图 5C-F)。

此外, 为了确定 NtAMT1.3 介导的 NH_4^+ 运输特性, 将根部暴露于含 $^{15}\text{N}-\text{NH}_4^+$ 的营养液 5 分钟后, 检测了 32 天和 4 天的 N 饥饿的 qko 突变体和 NtAMT1.3 转化系 (qko + NtAMT1.3-2, L2) 的根部短期 NH_4^+ 内流。浓度依赖性 NH_4^+ 内流显示 NtAMT1.3 确实以 Michaelis-Menten 动力学促进外部 NH_4^+ 输入到根中(图 6)。NtAMT1.3 的根吸收在 250 μM NH_4^+ 时达到饱和, 并表现出最大的转运活性。($V_{\text{max}}=285.8\pm 8.27\mu\text{mol g}^{-1}\text{root DW h}^{-1}$; $K_{\text{m}}=51.87\pm 5.79\mu\text{M}$) (图 6)。在另一个独立的转基因品系(如 L2)中也测量了非常相似的运输动力学参数。

NtAMT1.3 过表达对烟草生长和 NH_4^+ 吸收的影响

为了进一步了解 NtAMT1.3 在本体中的生理意义, 我们构建了 NtAMT1.3-转基因烟草。两个独立的纯合 NtAMT1.3 过表达系 (L1 和 L5) 与其野生型在不同的 NH_4^+ 浓度 (0.1-5 mM) 下水培生长 14 天, 随后进行生长和生理测试。与野生型相比, 明显具有更多 NtAMT1.3-mRNA 丰度的转基因植物确实在 NH_4^+ 上显示出更好的生长表型(图 7A 和 B)。如图 7C 所示, 在 0.1mM、1mM 或 5mM 的 NH_4^+ 上, NtAMT1.3 过表达植株的芽和根的新鲜生物量分别比对照高 1.5-1.8 倍、1.7-1.9 倍或 1.3-1.5 倍(图 7C1); 转基因株系和野生型在芽或根中的 NH_4^+ 含量没有明显差异(图 7C2), 而在 0.1-5mM NH_4^+ 上生长时, NtAMT1.3 过表达烟草芽中的 N 含量比野生型的多 15%左右(图 7C3)。此外, 植物细胞内 NH_4^+ 同化的第一步所需的酶——谷氨酰胺合成酶 (GS) 的活性分析

显示，在给予 1mM 或 5mM 的 NH_4^+ 时，NtAMT1.3 转基因植物的芽中的 GS 活性明显高于对照（2.2 或 1.5 倍）（图 7C4）。这种升高的 GS 作用可能在生理上对植物有效地同化/利用从根部吸收的 NH_4^+ 至关重要，也许是通过 NtAMT1.3 的过表达而增强的，从而使植物细胞能够在在一个相对稳定和低水平上保留 NH_4^+ （图 7C2）。

为了测试转基因烟草的生长改善和芽中更高的 N 含量是否与 NtAMT1.3 过表达所加强的 NH_4^+ 获取直接相关，我们进行了根部吸收研究。在正常营养液中预培养 14 天的植株 3 天缺氮处理后，向根供应 $250\mu\text{M}$ 或 $1000\mu\text{M}$ 的 $^{15}\text{NH}_4^+$ 20 分钟。 ^{15}N 的测量结果显示，与对照组相比，这两个品系在根中的 NH_4^+ 积累量都增加了 35-40%（图 8）；在 20 分钟的 NH_4^+ 吸收过程中，所有植物芽中的 ^{15}N 沉积量被确定为非常低的水平（小于根部的 1%，数据未显示），确认 NtAMT1.3 的过表达明显促进了烟草根细胞 PM 中 NH_4^+ 的输入。

该研究从烟草中分离出了一个功能性的铵转运体 NtAMT1.3，并提供了分子和生理证据，表明其可能是一个有效的遗传成分并负责植物细胞中 NH_4^+ 的吸收和转运。将 NtAMT1.3 在烟草中过表达明显促进了烟草在 NH_4^+ 上的生长，且 NH_4^+ 的浓度范围为 0.1-5 mM，这在大多数土壤中是可获得的。表明 NtAMT1.3 可以被认为是一个潜在的和有前途的分子目标，用于改善作物（至少包括烟草）的氮利用效率。

11、筑牢农业生物安全防线之③加大农作物转基因监管检测力度【鄂尔多斯农牧局】

链接：https://mp.weixin.qq.com/s/VBdEuqsSCi9uHi1JAG_NEQ

内容：

农业转基因生物安全监管工作事关粮食安全、食品安全和生态安全，鄂尔多斯市农牧局高度重视农业转基因监管工作，进一步加大农作物转基因监管检测力度，强化转基因科普宣传，全力净化种业市场，保障我市粮食生产安全。

开展部署安排，强化监管责任。市农牧局于今年 5 月 25 日印发了《2023 年鄂尔多斯市农牧业转基因生物监管工作方案》，指导旗区和相关部门开展转基因监管工作。市农牧技术推广中心种业发展站统一采购并发放转基因试纸条，督促企业落实主体责任。在企业南繁育种、制种田备案和品种试验开展等关键环节，提前安排部署做好宣传工作，发放明白纸和宣传材料，引导企业加强转基因生物安全管理工作，杜绝非法转基因材料种植，确保全市农牧业转基因生物监管工作顺利推进。

开展监督检查，净化种业市场。一是抓好冬季企业库检工作，开展春季市场抽检。对我市农作物种子企业 2 个玉米种子样品，种子市场 55 个种子样品开展检测，三种转基因成分（BT、CP4 和 BAR）试纸条快速检测结果均为阴性。二是加强作物品种试验示范管理。我市四家承试单位共承担自治区玉米、小麦、水稻品种统一试验 24 组。五家承试单位开展绿色通道、联合体和其他自主试验参试品系 2333 个，面积 559 亩。为承试单位发放转基因检测试纸条并开展筛查工作。三是加强对制种田转基因筛查工作。今年全市备案 11 家市外种业企业和 4 家本市企业，玉米制种田共 35031 亩，制定工作方案，在规定时间内完成转基因检测工作。四是加强对转基因动物试验的属地监管。内蒙古亿维白绒山羊有限责任公司种羊场承担内蒙古大学开展的绒山羊转

基因中间试验。现有转基因相关试验羊 322 只，其中受体母羊 158 只，转基因成年公羊 13 只。开展基因分离等实验，产转基因羔羊 103 只，全部隔离圈养，闭环管理。

下一步，市农牧局将着重加强全市制种田转基因管理和畜禽转基因试验管理工作，强化转基因执法检查力度，做好转基因科普宣传工作力度，确保全市农牧业转基因生物监管工作取得实效。

12、Cell Discov | 中国科学院李伟/周琪开发新的方法，高效靶向转基因整合【微信公众号】

链接：<https://mp.weixin.qq.com/s/c60tYDCqaoyPgIdZeiqgaw>

内容：

由于精确操纵 DNA 修复途径的困难，由双链断裂触发的大型转基因的高保真靶向整合本质上是低效的。

2023 年 7 月 4 日，中科院动物所李伟及周琪共同通讯在 Cell Discovery 在线发表了题为“High-efficiency targeted transgene integration via primed micro-homologues”的研究论文，该研究揭示通过始发态微同源物实现高效靶向转基因整合。始发态同源物辅助整合 (PAINT) 的改进版本，命名为 PAINT 3.0，最大限度地提高了编辑效率，并最大限度地减少了偏离目标的集成，尤其是在处理无疤痕的帧内敲除 (KI) 时。使用 PAINT 3.0，研究者将报告基因转基因靶向家政基因，其编辑效率高达 80%，比传统的同源定向修复方法高出 10 倍以上。

使用 PAINT 3.0 插入 2.5kb 转基因在几个治疗相关的基因组基因座上实现了高达 85% 的 KI 频率，这表明其具有临床应用的潜力。最后，

PAINT 3.0 能够在原代 T 细胞中实现高效的非病毒基因组靶向，并产生具有特异性肿瘤杀伤能力的功能性 CAR-T 细胞。因此，研究者确定 PAINT 方法是一种用于大规模转基因整合的强大基因编辑工具，并可能为细胞和基因治疗以及基因组写入技术开辟新的途径。总之，该研究利用先导编辑器设计了一种称为 PAINT 的稳健 KI 策略，该策略利用逆转录单链微同源物来增强不同类型细胞中的靶向 KI。

基于 CRISPR/Cas9 的基因编辑工具主要通过利用内源性 DNA 修复途径，如同源定向修复（HDR）、非同源末端连接（NHEJ）和一种称为微同源介导末端连接（MMEJ）的替代性 NHEJ 修复途径，实现大的外源 DNA 片段的靶向整合。

HDR 是一种忠实的修复途径，通过利用同源姐妹染色单体或外源同源供体作为模板介导 DSB 修复。CRISPR/Cas9 在预选位点诱导的 DSBs 促进附近区域 HDR 介导的敲除（KI），质粒供体携带长同源臂（HAs，500 - 3000 bp），其位于外源 DNA 的侧翼。然而，质粒供体模板化 HDR 的活性本质上是低效的，这阻碍了基于 HDR 的方法在多种细胞类型中，特别是在人类细胞中介导大转基因的靶向 KI 的性能。几项研究报告称，单链寡脱氧核糖核苷酸（ssODNs）可以用作供体模板，以实现高 KI 效率，但它们只能传递短编辑（<50 个碱基）。

NHEJ 是一种同源性无关、易出错的修复途径。与 HDR 不同，NHEJ 修复途径可以发生在整个细胞周期，是许多类型哺乳动物细胞中修复 DSB 的主要机制，包括神经元和肌肉细胞等非分裂体细胞。NHEJ 途径也可以通过同时切割基因组 DNA 和 NHEJ 供体来驱动位点特异性转基因 KI。通过 NHEJ 途径，切除的双链转基因片段在 DSB 位点以随机方向重

新连接基因组 DNA，并可能在连接处留下 indels。利用 NHEJ 途径，同源性非依赖性靶向整合 (HITI) 已被证明通过在供体载体中重排 CRISPR/Cas9 靶向间隔区序列的方向来增强转基因在预期方向上的整合。然而，连接位点上不可预测的 indels 阻碍了基于 NHEJ 的策略在介导框架内开放阅读框架融合中的应用。

除了 HDR 和 NHEJ，MMEJ 还被用于介导大的外源 DNA 的靶向整合。基于 MMEJ 的方法独立于长程 HA 在靶基因座实现了外源 DNA 的精确掺入。然而，最近的报道表明，基于 MMEJ 的方法在哺乳动物细胞中通常效率低下。

先导编辑是一种新的基因编辑工具，用于处理小的缺失、突变和插入。逆转录酶 (RT) 与 spCas9 内切酶 (H840A) 偶联，形成 PE - Cas9，该内切酶切割基因组靶位点，并在切割链的 3' 端延伸微同源瓣 (MHF) 和预期编辑。然后，通过独立于 DSB 的链交换和错配修复，将短编辑整合到目标部位。基于先导编辑的搜索和替换工作方式，以及用单链同源臂修饰的转基因可能促进靶向 KI 的假设，研究者推导了先导编辑 (PE) 在供体载体处理中的应用，并设计了一种基于 PE 的 KI 策略：PAINT。

PAINT 方法，最初以 PAINT 1.0 为例，通过转基因盒每侧的逆转录单链微同源外伸 (MHO) 介导高效靶向 KI。先导编辑引导 RNA (pegRNA) 的优化进一步增强了其 KI 的功效。操纵控制细胞周期和 DNA 修复的机制表明，始发态微同源物介导的末端连接 (PMEJ) 途径以“复制和粘贴”的方式指示 PAINT 介导的靶向 KI。这一发现启发研究者用 MHF 取代 MHO，以避免基于 NHEJ 的线性化双链 DNA (ldsDNA) 的不精

确整合。PAINT 的最终版本 PAINT 3.0 进一步结合了单 MHF 和双链 HA，以处理无疤痕的帧内转基因整合，并实现了高保真 KI，同时最大限度地减少了目标上和目标外的整合误差。

最后，PAINT 3.0 被用于治疗相关基因组基因座中的靶向 KI。PAINT 3.0 介导的靶向原代 T 细胞中 TRAC 基因座的非病毒基因组产生了高达 50%-60% 的功能性嵌合抗原受体 (CAR)-T 细胞，当与肿瘤细胞共培养时，这些细胞表现出特异性杀伤活性。研究者确定，PAINT 策略是一种很有前途的基因编辑工具，为克服阻碍基因组工程技术发展的障碍提供了新的机会。

原文链接:

<https://www.nature.com/articles/s41421-023-00552-0>

深圳市农业科技促进中心
深圳市标准技术研究院

2023 年 7 月 17 日发