



中华人民共和国国家标准

GB/T 45137—2024

畜禽基因组编辑育种技术规程

Technical code of practice with genome editing and breeding for
livestock and poultry

2024-12-31 发布

2024-12-31 实施

国家市场监督管理总局
国家标准化管理委员会 发布

前 言

本文件按照 GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第 1 部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由中国标准化研究院提出并归口。

本文件起草单位：中国农业科学院北京畜牧兽医研究所、中国农业大学、西北农林科技大学、内蒙古大学、吉林大学、中国标准化研究院。

本文件主要起草人：敖红、李奎、牟玉莲、刘志国、连正兴、张涌、李光鹏、欧阳红生、王冰源、马爱进。



畜禽基因组编辑育种技术规程

1 范围

本文件确立了畜禽基因组编辑育种的技术流程,规定了相关要求和操作步骤。
本文件适用于畜禽基因组编辑育种的 CRISPR/Cas 技术操作。
注: CRISPR/Cas 指规律成簇间隔短回文重复序列/CRISPR 相关蛋白(Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR associated protein)。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中,注日期的引用文件,仅该日期对应的版本适用于本文件;不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。
GB 19489 实验室 生物安全通用要求

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

基因组编辑 genome editing

对生物体基因组中特定脱氧核糖核酸(DNA)片段进行靶向修饰,且不引入外源 DNA 的基因工程技术。

3.2

向导 RNA guide RNA;gRNA

在基因组编辑技术中起引导和模板作用的小分子核糖核酸(RNA),可介导基因组编辑过程。

4 要求

4.1 实验场所

实验室要求应符合 GB 19489 相应的生物安全等级要求。

4.2 人员

应通过必要的实验技术和生物安全管理规范的培训。

4.3 记录

应包括但不限于试验开始和结束的时间,受试材料名称、来源、编号、保存信息,目标基因序列信息,载体结构,测试图谱和结果判定等。
记录应保持规范、完整和一致,对记录的保存应作出相关规定。

4.4 动物福利

应符合相关动物福利法规的要求。

4.5 其他

基因组编辑育种的过程应符合相应法律法规的规定。

5 基因组编辑育种技术流程

技术流程图见图 1。

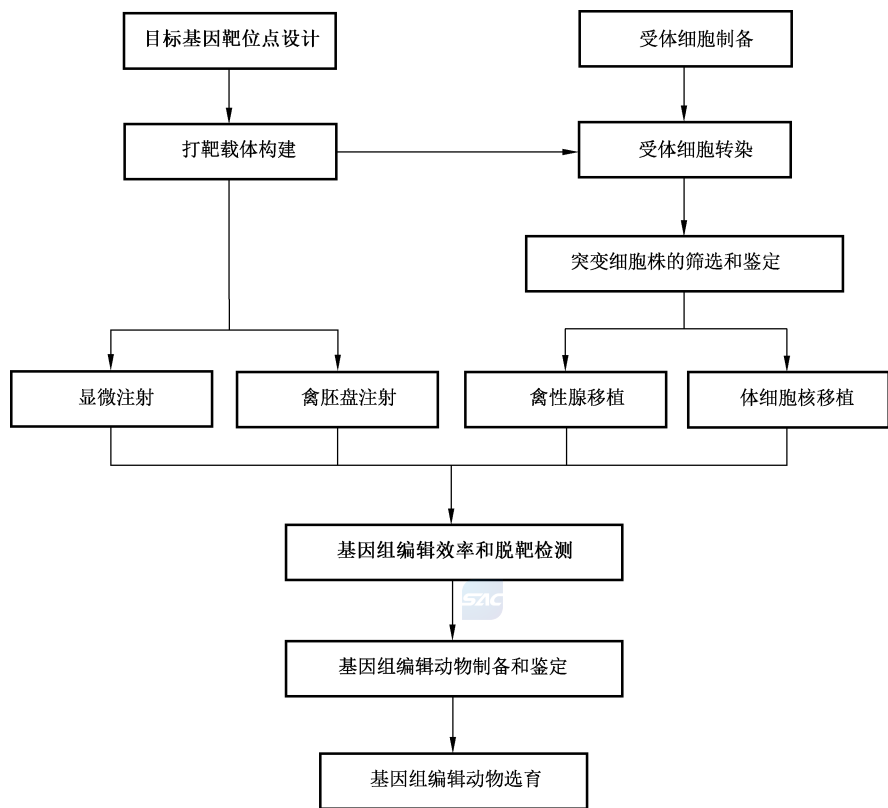


图 1 基因组编辑育种技术流程图

6 操作步骤

6.1 目标基因靶位点设计

明确目标基因的表达水平和表达特性,比对全基因组序列,根据宿主基因的来源、载体启动子的种类、转录本数量、蛋白功能域等选择适合的软件设计宿主基因上的靶位点。

6.2 打靶载体构建

根据靶位点预测的结果,设计相应引物。根据基因组编辑的方式和对象选择适宜的载体,进行退火、连接、转化和鉴定。应对 gRNA 的编辑活性和脱靶效应进行预测和验证。

6.3 受体细胞制备和转染

6.3.1 受体细胞制备

筛选合适的供体器官或组织,依据标准的细胞分离和纯化操作程序,获取生长良好的供体细胞。优化供体细胞的培养条件,并进行扩培或冻存备份。

6.3.2 受体细胞转染

根据细胞类型选择合适的转染方式。转染后的细胞放入培养箱中培养。转染后 72 h,按照动物细胞/组织提取试剂盒方法提取转染细胞基因组 DNA。

6.4 突变细胞株的筛选和鉴定

6.4.1 引物的设计及聚合酶链式反应(PCR)产物的扩增

根据目标基因序列以及确定的 gRNA 靶点位置,利用专业软件设计检测引物。以提取的细胞基因组 DNA 为模板,PCR 扩增出目的片段。

6.4.2 单克隆细胞制备



单克隆细胞可以通过有限稀释法铺板后进行制备。可参考以下标准:按每 10 mL 培养液中含有 400 个~500 个细胞进行稀释,分装至 15 个 100 mm 细胞培养皿中,在 37 ℃、5%(体积分数)CO₂、饱和湿度条件下的二氧化碳培养箱中培养,及时更换培养液并观察细胞克隆的大小及生长状态。

6.4.3 突变细胞株的鉴定和筛选

当细胞培养皿中细胞克隆直径生长至 2 mm 以上时,用记号笔标记单克隆细胞株,采用克隆环法消化细胞。消化后,取 1/2 的细胞克隆用于基因组 DNA 提取和 PCR 扩增。PCR 产物纯化后,将 PCR 产物与克隆载体连接,进行突变基因型的 DNA 测序鉴定。

检测基因组编辑突变体还可采用 T7E1 酶切、下一代测序(NGS)、高分辨率熔解分析(HRMA)和荧光 PCR 毛细管凝胶电泳等方法。

将鉴定正确的细胞克隆进行适当扩培,消化后进行克隆冻存,以用于后续研究。

6.5 基因组编辑效率和脱靶检测

选择 Sanger 测序、T7E1 酶切、NGS 等方法检测基因组编辑效率,通过测序验证编辑后的准确基因型。根据靶位点特性,采用软件脱靶预测联合 PCR 扩增测序、全基因组深度测序等技术等生物信息学等方法,分析预期脱靶位点,对脱靶以及脱靶位点的移码突变进行预测和分析。

家禽细胞的制备、转染以及突变细胞株的筛选和鉴定过程可选择适宜的方法参照 6.1~6.5 的步骤进行。

6.6 基因组编辑动物制备和鉴定

针对家畜,可通过体细胞核移植技术、线性化打靶载体或者 sgRNA 混合显微注射-胚胎移植等技术获得初代基因编辑动物。针对家禽,则可通过编辑原始生殖细胞-性腺移植、打靶载体混合 sgRNA 胚盘注射等方法获得初代编辑后代。提取初代动物的基因组 DNA,进行 PCR 扩增,PCR 产物初步酶切鉴定,然后通过 DNA 测序鉴定突变类型。鉴定引物用细胞鉴定引物,鉴定体系同细胞鉴定体系。应通过 PCR 扩增测序等试验验证突变位点的具体基因编辑情况,进一步通过实时定量 PCR 和 Western 杂交等试验分析突变基因表达情况。

6.7 基因组编辑动物选育

基因组编辑群体应按照生物安全评价管理法规的要求开展安全评价,形成育种核心群。核心群通过选配、出生选留、基因和表型测定等进行整体评估、选种和扩繁,最终获得基因组编辑新品种(系)。