**国家标准《畜禽基因组编辑育种技术规程》**

**编 制 说 明**

**（征求意见稿）**

# 一、任务来源

本国家标准的制定任务列入国家标准化管理委员会《国家标准委关于下达2018年第四批国家标准制修订计划的通知》（国标委综合〔2018〕83号》，项目编号“20184553-T-424”。本项任务由中国标准化研究院提出并归口，定于2020年完成。本标准起草工作组由中国农业科学院北京畜牧兽医研究所等单位共同组成。

# 二、目的和意义

本标准的目的是建立畜禽基因组编辑的技术规笵，建立标准化的技术流程。近十年来，随着基因编辑技术的不断突破，特别是CRISPR/Cas9技术以其操作简单、成本低廉、可多位点操作的优势迅速替代锌指酶和TALEN技术，在动物基因功能研究、家畜抗病、器官移植、肌肉生长性状改良等方面得到广泛应用。基因编辑技术与动物体细胞克隆技术结合后，能够快速获得具有特定表型的基因修饰畜禽群体，对培育新型畜牧品种具有重大意义。目前我国的猪、牛、羊、鸡等动物的基因组编辑技术研究处于国际先进水平，本标准的制定，将规范猪、牛、羊、鸡等畜禽的基因组编辑操作过程，为推动新型畜禽品种的培育进程，降低非预期效应的安全风险提供有力保障。

# 三、标准制定原则

本标准在制定中应遵循以下基本原则：依据目前最新的研究进展及应用情况，本着“实用性、普及性、可操作性、科学性、合理性”的原则，结合调研情况，提出了适用于猪、牛、羊、鸡等重要畜禽的基因组操作规范。

本标准编写格式应符合《标准化工作导则第1部分：标准的结构和编写规则》GB/T1.1-2009和 GB／T 20001.6-2017 《标准编写规则 第6部分 规程标准》的有关要求。

本标准编写的依据：本标准主要依据目前动物基因组编辑技术最新研究进展以及相关技术标准。并参考我国法规和标准，包括《GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法》等等。

# 四、标准主要内容

本标准系统性的对猪、牛、羊、鸡等主要畜禽的基因组编辑技术进行了规范，主要包括以下内容：

1. 术语与定义

本标准系统整理了畜禽的基因组编辑技术相关的术语，并规定了其具体含义。

2. 要求

基因组编辑是一项包括生物信息学、分子生物学和细胞学的综合性技术，因此在本标准对试验的设施环境、人员和材料、试剂、主要仪器等提出了规定。

3.操作规程

目前基因编辑技术主要包括锌指酶技术、TALEN技术和CRISPR/Cas9三种主流技术，其中CRISPR/Cas9以操作简便、成本低和不断改进的优势逐渐成为目前畜禽基因编辑育种的主流技术。基因编辑育种过程分为细胞突变株的制备和筛选，体细胞核移植克隆和后代鉴定与扩繁育种。本标准中基于CRISPR/Cas9编辑原理，主要对于第一个过程的关键环节操作要求进行规定。

# 五、标准工作过程

1. 组成标准起草小组

标准制定任务下达后，组成了标准起草工作组，明确了任务要求，安排了工作进度，通过会议研究讨论并确定了标准编制的原则和指导思想；制定了编制大纲和工作计划。

2. 开展相关材料收集情况

为了更好地完成本规范的编制工作，工作组广泛查阅关于基因组编辑技术的中外研究报道和技术方法的文献专著，具体如下：

标准类：包括国家标准《GB/T 1.1-2009 标准化工作导则 第1部分：标准的结构和编写》、《GB/T 20001.6-2017 标准编写规则 第6部分：规程标准》

技术资料类：包括专著、科研论文和测定数据，如2012年中国农业大学李宁院士主编的《动物克隆与基因组编辑》、2017年李奎教授主编的《动物基因组编辑》，以及研究文献100余篇。

3. 标准起草完善过程

依据GB/T 1.1—2000《标准化工作导则 第1部分：标准的结构和编写规则》等标准编制要求，对《畜禽基因组编辑育种技术规程》标准开展了研制工作，通过系统整理相关调研资料，于2018年7月完成了《畜禽基因组编辑育种技术规程》标准起草稿。在此基础上，2018年8月编制小组邀请中国农业大学、农业农村部科技发展中心、中国农业出版社、河北省畜牧局等单位的6位专家讨论了本标准文本的适用范围和主要技术内容的共性问题，根据专家意见，编制小组对标准起草稿进行了补充、修订。2019年2月25日，编制小组再次邀请华中农业大学、中国农业大学、农业农村部科技发展中心、中国农业出版社、北京畜牧兽医研究所等单位的10位专家进行讨论，对修改完成的标准起草稿进行了补充、修订，形成了本次的征求意见稿。形成了本次的征求意见稿。

# 六、国内外研究概况

1. 基因组编辑技术的发展

基因组编辑技术是指对基因组进行定点修饰和改变的技术。该技术主要利用序列特异性的DNA结合结构域和非特异性的 DNA 修饰结构域组合而成的序列特异性核酸内切酶(sequence specific nuclease, SSN)在基因组特定位置对双链DNA进行定向切割，进而激活细胞自身的修复机能来实现基因敲除、定点插入或替换等定向改造。这种技术的特点在于不改变目标生物基因组整体稳定性的基础上，在目标位点产生碱基缺失或插入，实现对单一或多个性状的消除或获得。

近年来，基因组编辑技术不断取得突破性进展，先后出现了锌指核酸酶(zinc finger nucleases, ZFN)、类转录激活因子效应物核酸酶(transcription activator like effector nucleases, TALEN)和成簇规律间隔短回文重复/Cas9(clustered regularly inter- spaced short palindromic repeats/Cas9, CRISPR/ Cas9) 以及结构引导内切酶(structure-guided endonu- cleases, SGN)等四种基因组编辑技术，尤其是第三代基因组编辑技术CRISPR/ Cas技术，因其设计简单、价格低廉、易于编程且高效，已迅速成为研发基因修饰动物的主流技术，在国内外转基因动物育种研究中广泛应用。随着基因编辑技术的突破，有关动物基因功能研究和基因修饰在家畜抗病、器官移植、肌肉生长性状改良等方面的应用得到迅猛发展。 2011年通过 ZFN 技术成功地在牛上实现了基因定点突变，得到了β-乳球蛋白基因敲除牛[1]。2012 年，中国农业科学院北京畜牧兽医研究所利用 ZFN 技术制备了肌肉生长抑制素(myostatin，MSTN)基因编辑梅山猪[2]，该猪具有显著的高瘦肉率表型，并进入转基因生物安全评价的环境释放阶段;在2013年和2014年又利用 TALEN 技术制备了MSTN 基因编辑梅山猪和大白猪，并进入转基因生物安全评价的中间阶段。2013年，LIU [3]等利用 ZFN 技术将 溶葡萄球菌素(lysostaphin)基因插入到β-酪蛋白 (beta-casein)基因座，制备的基因编辑牛的乳腺能够生成溶葡萄球菌素蛋白;2014年，LIU[4]等通过ZFN 技术将人溶菌酶(human lysozyme，hlyz)基因插入到牛的 β-酪蛋白基因座，获得的转基因牛的乳汁中可分 泌人溶菌酶，具有杀死金黄色葡萄球菌的能力。2015年，WU[5]等利用 TALENs 技术将胞内病原体抗性基因 1(intracellular pathogen resistance1，Ipr1)定点插入牛的基因组中，使转基因牛获得了抵抗结核病的能力，为中国抗结核病转基因牛新品种培育奠定了良好的基础。2016年，LUO [6]等利用 TALEN 技术将人血清白蛋白基因定点插入到牛β-乳球蛋白座位上，并制备了转基因牛。同时，中国学者利用基因组编辑技术， 发掘了 Rosa26、H11等“友好基因座”位点[6-8]，制备了一批具有重要医学价值的人类疾病模型及生产人药用蛋白的动物生物反应器。到目前为止，基因组编辑动物在农业、医学、生物材料和环保等领域得到了初步的应用，并显示出巨大的市场潜力和产业化前景[9]。

随着基因组编辑技术和应用的不断推进和扩大产业化的需求，对于相应的安全管理提出了日益紧迫的要求。美国、欧盟以及日本等国家，根据本国转基因动物的研发进展特别是基因组编辑技术大规模应用，都在积极进行相关法律法规的制修订和安全评估技术的研究。中国在转基因动物的研发水平居世界前列，2008年启动的转基因新品种培育重大专项为该领域的研究提供了重要平台，仅2015年统计数据表明，发表论文数量仅次于美国和德国，专利申请数位居世界第二。鉴于中国在基因组编辑技术研究和应用发展的事态，理应尽早思考和规划即将出现的基因组编辑技术产品和新品种的安全管理及其安全评价技术同步化，促进其产业化应用，切实为国家的生物安全作出重要贡献。

1. CRISPR/Cas9技术的关键环节和改进

Schaefer等2017在《Nature methods》[10]发表文章，证明体内CRISPR-Cas9编辑引起的脱靶效应会导致许多不可预测的基因突变。自从CRISPR应用到现在，脱靶效应一直是研究的热点。此外，目前CRISPR/Cas9具有碱基识别偏好性，局限了基因编辑的运用范围，而且会导致不同基因位点编辑效率不同，设计和筛选有效的gRNA仍然需要较大工作量。这些都是目前科研工作者亟待解决的问题。

2.1 CRISPR技术目前存在的问题

2.1.1 CRISPR/Cas9的脱靶效应

Cas9蛋白在sgRNA的介导下对靶基因进行特异性切割。sgRNA对靶基因序列、Cas9蛋白对PAM的错误识别都会导致脱靶效应的产生。靠近PAM基序的7nt碱基若发生突变，则会增加sgRNA错配的可能性。sgRNA与非靶基因序列发生不完全匹配(局部匹配)也可激活Cas9蛋白的核酸酶结构域，从而产生脱靶效应。除了sgRNA的错配外，PAM对Cas9蛋白发挥特异性切割功能也具有重要作用。如果PAM碱基发生错配，Cas9蛋白将不能发挥切割功能。

2.1.2 CRISPR/Cas9切割位点的偏移和低精确修复比例

sgRNA的长度和靶标的位置会对CRISPR/Cas9系统的精确性产生影响。研究表明sgRNA3'端10~12nt的“种子序列”和靶标基因的PAM序列决定着CRISPR/Cas9系统对靶基因识别与结合的特异性。CRISPR/Cas9系统不是哺乳动物酶系，人类的DNA修复系统与之缺乏配合，因此Cas9蛋白切割所产生的序列空缺变化差异很大。若产生较大的靶序列缺失，则会导致编辑位点产生明显的偏移，影响靶向切割的精确性。

CRISPR/Cas9系统进行精确编辑时，需要引入一段外源DNA同源修复。因为Cas9蛋白切割位点可能会产生偏移，并且外源DNA同源修复与人类的DNA修复系统缺乏配合，所以CRISPR/Cas9系统的精确修复比例较低。

2.1.3 PAM对于CRISPR/Cas9系统切割位点的限制

Cas9蛋白与PAM结合对靶标序列进行识别，PAM在一定程度上可限制CRISPR/Cas9系统对靶点的选择。生物基因组中虽然有较多的NGG，但并非所有基因都含有合适的PAM。有研究报道玉米基因组中只有30%的外显子具有适合CRISPR/Cas9系统行使特异性识别的PAM。Kleinstiver等针对酿脓链球菌Cas9(streptococcuspyogenesCas9，SpCas9)进行突变改造，诱导其对新的PAM产生识别，改造后的SpCas9扩大了对PAM的识别范围。PAM的有限性使CRISPR/Cas9系统不能在全基因组的任何位点进行特异性切割，尽可能打破PAM对切割位点的限制是CRISPR/Cas9系统发展的一个方向。

2.2 CRISPR系统编辑技术的改进

2.2.1 CRISPR-Cpf1

张锋及其同事在2015年发现了一种不同的CRISPR系统-CRIS-PR/Cpf1，研究小组证实此系统有潜力实现更简单、更精确的基因组编辑操作。来自氨基酸球菌属(AcidaminococcusRogosa)和毛螺菌属(LachnospiraBryantandSmall)的核酸内切酶Cpf1对比目前广泛使用的Cas9酶有一些显著的优势:第一，Cpf1系统更加简单，只需要一条RNA，而Cas9酶发挥DNA切割作用是要与至少两条小RNAs合成一种复合体，而且Cpf1蛋白酶比标准的Cas9蛋白要小一些，使得它更易于递送至细胞及组织内。第二，Cas9是在相同的位置同时剪切DNA分子的双链，最后形成的是平末端的双链断裂;而Cpf1酶剪切后形成的是两个不同长度的链，最终形成一个黏性末端的双链断裂，平末端相比于粘性末端更不容易处理，而粘性末端的产生让DNA的插入更容易控制。第三，相比于Cas9蛋白进行DNA双链剪切，Cpf1剪切时离识别位点很远，这就让研究人员在DNA的其不仅可以切割DNA，而且也切割RNA。与编辑位置上有了更多的选择[11]。CRISPR-Cas9系统不同的是，Cpf1能够独自地对此外，在一项新的研究中，研究人员更加具体地􏰁crRNA的前体(CRISPRDNA片段经转录而形成的述了Cpf1酶的特征:Cpf1表现出双重切割的活性，CRISPRRNA)进行加工，然后与加工后产生的crRNA结合，特异性地靶向和切割DNA，因而也就不需要来自宿主细胞的核糖核酸酶(RNase)和tracrRNA，这是人们迄今为止发现的最简单的一种CRISPR免疫系统，而且CRISPR/Cpf1系统可以同时对多个DNA靶位点进行编辑，达到多重编辑的目的[12]。张锋研究组在2016年年底设计了一个CRISPR/Cpf1阵列，用一个载体在哺乳动物细胞基因组中同时编辑了四个基因，初步证明了CRISPR/Cpf1多重基因组编辑的能力[13]。

2.2.2 CRISPR/dCas9-AID

大多数的人类(Homosapiens)遗传病都是由点突变所引起的。然而，利用当前的基因组编辑方法却无法高效地纠正细胞内的这些点突变，往往还会引起由随机核苷酸的插入或缺失引起的副作用。为了构建出更精确的基因编辑工具，日本神户大学科学家AkihikoKondo(--)将无核酸酶活性的dCas9(dead-Cas9)与来源于七鳃鳗的激活诱导胞苷脱氨酶融合在一起，AID酶通常会在免疫球蛋白和抗体基因中生成突变，造成免疫系统的多样性。AID酶对单链DNA起作用，可以将胞嘧啶(C)替换为尿嘧啶(U)，而在下一轮的DNA复制过程中(U)再转变为胸腺嘧啶(T)。这种改进的CRISPR新工具可以避免有害的双链断裂生成，减少CRISPR/Cas9技术可能引入的附加突变，且此过程不需要添加DNA模板，不会引起基因组的外源片段重组。这一基因编辑复合物也被证明在哺乳动物细胞系中很好地起作用，且脱靶率低[14]。

类似的研究报道了一种利用靶向性胞嘧啶脱氨酶在体内实现高效率的DNA碱基编辑的新方法。上海交通大学常兴研究组[15]发现，当把核酸酶缺陷的dCas9蛋白和胞嘧啶脱氨酶AID融合后，在gRNA靶向的基因组DNA上，胞嘧啶和鸟嘌呤可以随机地向其他三个碱基突变。这一新方法可以对细胞内的特定DNA序列进行单核苷酸突变的功能分析。该研究团队进一步证明，利用这一方法可以快速有效地模拟肿瘤细胞内耐药机制的异质性，预测可能出现的肿瘤耐药性突变，进而改良小分子抑制剂并且研究小分子物质与蛋白质靶点的相互作用。

2.2.3 CRISPR-STOP

对于高拷贝的基因组而言，如果一旦用CRIS-PR进行切割，极有可能引发复杂的基因组重组等副反应。来自弗吉尼亚医学院的科学家们2017年在NatureMethods发表文章[16]，使用Cas9蛋白偶联上碱基突变的BE3结构域，通过改变单个核苷酸来敲除基因以产生终止密码子，结果表明，这种被称为“CRISPR-STOP”方法是一种有效的、较为安全的替代野生型cas9的基因敲除研究。不仅如此，他们早期在约7000个人类基因中引入终止密码子。CRISPR-STOP介导的靶向筛选显示与WTCas9相当的功能，表明相应的方法对全基因组功能筛选的适用性。

Komor等人最近证实，APOBEC1酶和尿嘧啶糖基化酶抑制剂与切口酶Cas9(BE3)的融合有效地将胞嘧啶(C)转化成尿嘧啶(U或T)gRNA的非结合链不引起双链DNA断裂或需要外源DNA模板。科学家们利用这个CRISPR-BE来改变遗传密码并引入早期的密码子。将BE3靶向包含CGA(Arg)，CAG(Gln)和CAA(Gln)的基因的编码链，以分别产生TGA，TAG或TAA终止密码子[16]。

2.2.4CRISPRainbow

CRISPR系统不仅可用于基因组编辑，还能用于荧光标记基因组。CRISPRainbow的出现使研究人员能够更直观的观察基因组位点的结构。研究人员利用首先对Cas9基因进行突变，使Cas9蛋白失活，因而这种核酸酶只能结合到基因组DNA的特定位点，但无法表达切割活性。其次研究人员将失活的Cas9蛋白与红、绿、蓝等荧光蛋白的一种进行融合，使其不仅能够结合到基因组上，而且能够发出计算机可以识别的荧光信号。因此，Cas9与荧光蛋白复合体就可以在gRNA的引导下靶向基因组的特定区域，在活细胞中可根据不同位点表达的荧光颜色最多同时标记和追踪7个不同的基因组位点，从而可以评估活细胞基因组位点之间的距离以及空间结构。这一系统将成为实时研究基因组结构、运动的一个宝贵的工具。简单来说，生物学领域大多数人都在使用CRISPR来编辑基因组，而这种方法的诞生可以在活细胞中标记DNA和追踪DNA的活动[17]。

七、关键试验内容和技术指标说明

1．宿主基因靶位点预测和sgRNA设计

CRISPR/Cas9 编辑技术主要依据目标性状基因的信息，通过NCBI的Blast功能比对基因组序列，利用线上应用软件来筛选预测靶位点，设计不同sgRNA并对其编辑效率和脱靶进行分析和预测。

利用CRISPR/Cas9技术关键的两个问题是:如何提高CRISPR/Cas9技术基因组编辑效率?如何最大限度降低脱靶风险?影响基因组编辑效率和特异性的因素很多。目前业界对CRISPR/Cas9系统介导的基因组编辑效率和脱靶效应研究尚不够深入，观点还不统一。这反映在不同sgRNA设计与脱靶预测软件中，对sgRNA的活性和特异性评估标准不一致。

华中农业大学的谢胜松等[18]对16款sgRNA设计和脱靶效应评估在线和单机版软件的特点进行了阐述，通过制定38项评估指标对不同软件进行了比较分析，最后对11种用于检测基因组编辑效率和脱靶的实验方法，以及如何筛选高效且特异的sgRNA进行了归纳总结。

表-1 sgRNA设计软件汇总



sgRNA和PAM类型影响基因组编辑效率和特异性，而不同sgRNA活性和特异性有差异。因此，选择高效且特异的sgRNA的策略需要注意的因素有: (1)sgRNA的长度为17~20nt；(2)可选3'末端含GG的sgRNA，避免使用含“TTTT”转录终止序列的sgRNA，GC%含量为40%~60%； (3)如果构建U6或T7启动子驱动的sgRNA表达载体，为提高转录效率，可限定sgRNA的5'末端为G或GG； (4)如需造成基因移码突变，尽量选择在功能域或编码区内部设计sgRNA；(5)检查sgRNA靶标位点基因组序列是否存在SNPs；(6)针对Cas9单切口酶设计“paired-gRNA”，需限定两个sgRNA之间的距离，建议为–2~32nt；(7)分析脱靶位点可限定最大允许5个碱基错配，并同时评估种子序列的特异性。另外还可评估是否存在碱基插入或缺失。总之，应选择合适的软件设计sgRNA并进行脱靶分析。一个基因建议选择2~3个sgRNA进行实验验证，再选择活性高的sgRNA开展下一步的功能实验。

在对上述资料分类整理的基础上，该实验室建立了一个CRISPR-Cas9技术资源信息网(http://www.biootools.com/cn/)，以方便广大科研工作者使用。

PAM 位点前20bp左右为gRNA靶序列引Cas9蛋白作用于基因组。在全基因组范围内比对序列同源性，避开ＳＮＰ突变位点和保守性较差的区域，尽量选择那些在17-20bp匹配数量少的靶点以降低sgRNA靶向其他位置的几率。

2. 编辑效率和脱靶检测的生物学实验方法

目前，用于检测CRISPR/Cas9技术基因组编辑效率和脱靶的实验方法较多。下面阐述几种主要方法的特点:

(1)限制性核酸内切酶法。

该方法的特点是选择靶标位点含限制性内切酶识别位点的sgRNA。当靶标位点被切割后，相应的限制性内切酶识别序列会被破坏，由此可用对应的限制性内切酶，检测DNA靶标是否被切割[19]。或者在提供的同源供体DNA中，插入限制性核酸内切酶识别碱基序列，使其通过同源重组插入到靶标位点。再通过限制性内切酶进行酶切，以此方法来判断靶标位点是否发生同源重组。

(2)Surveyor酶切法(SurveyorendonucleaseIcleavageassays)。

Surveyor酶是一种S1核酸内切酶，能特异性识别并切割异源双链中错配的碱基，电泳分离酶切产物，可根据条带大小判断是否有基因组切割。该方法最初用于检测ZFN和TALEN技术介导的基因组编辑，可检测靶标结合位点是否有碱基替换或“Indels”，目前有用于CRISPR/Cas9技术介导的基因组编辑的报道[20]。

(3)T7E1酶切法(T7endonucleaseIcleavageassays)。

T7E1内切酶能识别并切割不完美匹配的DNA、十字形DNA结构、Holliday结构或DNA分叉点及异源二聚体DNA。T7E1酶切法是目前检测CRISPR/Cas9技术介导的基因组编辑效率的常用方法之一[21-23]。与Surveyor酶切法类似，该酶识别错配的杂合双链，能根据电泳条带亮度强弱计算“Indels”频率。

(4)高分辨率熔解曲线法(High-resolutionmelting,HRM)。

该方法的基本原理是依据DNA双链分子不同的溶解曲线来区分不同基因型的样品，且分辨率能达到单碱基水平。Bassett等[24]利用该方法，检测了利用CRISPR/Cas9技术基因敲除的果蝇。研究表明，该方法能较好区分嵌合体和杂合突变体果蝇，也适用于检测基因组编辑效率高低[24,25]。

(5)单分子实时(SMRT)测序法(Single moleculer ealtime DNA sequencing)。

此为第三代高通量测序技术，由Pacific Biosciences公司开发。Hendel等[26]利用该方法，分别检测了ZFNs、TALENs和CRISPR/Cas9系统介导的基因组编辑效率，发现该方法可同时评估NHEJ和HR介导的基因突变或修复效率。

(6)中性聚丙烯酰胺凝胶电泳法。

该技术的实验原理是，在中性聚丙烯酰胺凝胶中，不同构象等长的DNA单链电泳迁移率会发生变化，由此来判断基因是否发生突变。Zhu等[27]采用该方法，分析了利用CRISPR/Cas9技术制备的果蝇模型的基因型。研究发现，该技术能准确判定不同突变类型果蝇的基因型。

(7)SSA(Single-strandannealing)报告载体活性检测法。

该方法的核心是使用SSA报告基因载体，该载体中Luciferase报告基因被终止密码子提前终止，这种截短的Luciferase蛋白没有活性。如将sgRNA的靶标位点置于终止密码子之后。若靶标位点发生基因组编辑，可通过同源重组形成有活性的Luciferase，再通过检测Luciferase活性高低，即可评估CRISPR/Cas9技术的基因组编辑效率[28]。

(8)Sanger测序法。

该方法为检测CRISPR/Cas9技术基因组编辑效率常用方法之一[29]。可直接将PCR产物进行测序或连接到TA克隆载体中，再挑选单克隆菌落测序，该方法不仅能确定碱基缺失或插入类型，还可计算切割效率大小，但缺点是灵敏度较低。

对于基因组编辑效率和特异性评估，除了上述检测方法外，还有几种高通量和无偏评估方法:1整合酶缺陷型慢病毒载体(IDLVs)技术，其原理是细胞通过NHEJ机制对DNA修复的过程中，线性双链IDLV基因组能够优先整合到断裂的DNA双链处。该方法最初用于评估ZFN技术的基因组编辑效率[--]。2015年，Wang等[30]将此方法用于评估CRISPR/Cas9和TALENs技术的基因组编辑效率。研究表明，在靶标结合位点60bp范围内，可发现成簇的IDLV整合位点。该技术仅能检测到频率低至1%的脱靶突变，灵敏度较低，但却是从全基因组水平无偏检测脱靶效应。2GUIDE-seq(Genome-wide unbiased identifications of DSBs e valuated by sequencing)技术，该方法的原理是让细胞吸收特定的双链寡核苷酸(Double stranded oligo deoxynucleotides, dsODN)并整合进基因组断裂位点。然后抽提基因组DNA，随机打断后修复末端，连接用于高通量测序的接头。然后对dsODN的特异序列进行PCR扩增，富集包含dsODN的片段并进行高通量测序，最后利用软件分析Cas9核酸酶的切割位点，由此评估脱靶效应[--]。研究显示，该方法的灵敏度较高，能检测到频率低至0.1%的脱靶突变[31]。

3Digenome-seq(Cas9nuclease-digested whole genome sequencing)技术，其原理是利用全基因组测序法，寻找CRISPR/Cas9技术介导的基因组打靶和脱靶位点。大致流程是用Cas9核酸酶在试管中消化细胞的基因组DNA，然后通过高通量方法进行全基因组测序。这种体外消化可使得打靶和脱靶位点产生独特的序列模式，通过软件即可计算基因组编辑效率。研究表明，此方法灵敏度同样较高，可检测插入或缺失频率为0.1%的脱靶突变[32]。

表2-脱靶检测方法比较

3．打靶载体的构建

3.1 质粒的制备

菌种扩增、质粒DNA提取、酶切和回收按照常规方法和相应试剂盒说明进行

3.2 靶位点引物的设计及退火

根据上述方法策略预测靶位并设计相应引物。退火反应体系和条件组成根据实际情况优化后设定。

3.3 载体的连接、转化与测序鉴定

将退火反应液和gRNA、质粒单酶切回收产物进行连接反应，反应体系根据实际情况设定。反应产物在感受态细胞中转化按照常规方法进行，挑选菌落测序鉴定后扩增保存。

4. 细胞的准备和转染

细胞冻存和培养按照NYT1900-2010畜禽细胞和胚胎冷冻保存技术规范中的方法进行。

细胞转染采用电转染或适宜的细胞转染试剂盒。

5. 单细胞克隆的制备

在突变细胞株筛选过程中，可以采取表达报告基因或筛选标记基因的方法提高筛选效率。出于生物安全的考虑，本标准中推荐有限稀释法进行细胞的单克隆培养，通过测序鉴定正确的突变细胞株。

八、与有关的现行法律、法规和强制性国家标准的关系

本标准符合国家现行法律、法规、规章和强制性国家标准的要求，本标准的实施不涉及对现行标准的废止情况。

九、标准属性建议

建议将本标准属性定义为推荐性标准。本规程为首次制定和颁布，建议列为推荐性标准较为适宜，今后根据实际需要，进行不断的修订和完善。待本标准实施后，再根据需要做适当的修订和强制条款的增加。本标准所附录均为推荐性的标准，不排除更先进和更科学准确方法的采用。