CRISPR/Cas9 基因编辑高 GABA 番茄快速检测方法研究

袁小雅[1] 甄 珍[2]

（[1]长沙海关技术中心，410000，湖南长沙；[2]哈尔滨海关技术中心齐齐哈尔综合实验室，161000，黑龙江齐齐哈尔）

摘 要 针对 CRISPR/Cas9 基因编辑的高γ-氨基丁酸（GABA）番茄建立了荧光 PCR 和数字 PCR 检测方法，通过高 GABA 番茄与野生型番茄基因序列对比，设计多组特异性引物探针序列，利用荧光 PCR 法检测得出 1 组符合要求的引物探针序列，检测灵敏度可达 0.01%，稳定性良好，且在数字 PCR 检测体系中同样具有特异性。荧光 PCR 检测耗时短，适合常规定性检测，成本较低，但灵敏度和精准度有限；数字 PCR 操作复杂、成本高且检测耗时较长，但无需标准曲线，绝对定量更精准，尤其适合低丰度样本或复杂背景下的微量检测。该方法的建立为基因编辑植物的检测提供了方法依据，并为制订相关检测标准打下基础，为生物安全监管提供技术支撑。

关键词 番茄；基因编辑；γ-氨基丁酸；荧光 PCR；数字 PCR

基因编辑技术自 2012 年问世以来引起了广泛的关注，并在多领域得到创新和应用。Jinek 等[1]于 2012 年利用 CRISPR 系统实现了基因编辑；Cong 等[2]于 2013 年通过 CRISPR 系统成功地对真核细胞基因组进行编辑；法国科学家 Emmanuelle Charpentier 与美国科学家 Jennifer A. Doudna 于 2020 年因开发出一种基因编辑方法而获得了诺贝尔化学奖[3]。自此之后，基因编辑技术被广泛应用到微生物、植物、动物及人类疾病等各个领域[4-7]。

基因编辑技术不同于转基因技术，该技术可实现基因的定向编辑和改造，即对特定的 DNA 片段进行删除或添加，对特定的碱基进行删除或替换等，从而达到对目的基因以及产物的编辑，改变目标基因或调控元件的结构、序列和功能。该技术的特点是操作简单、通用性强，近年来，利用该技术的相关研究增长迅速，出现许多种技术方法，如锌指核酸酶（zinc finger nucleases，ZFNs）、转录激活因子样效应物核酸酶（transcription activator-like eff- ector nucleases，TALENs）、常间回文重复序列丛集/常间回文重复序列丛集关联蛋白（clustered regularly interspaced short palin-dromic repeats/CRISPR-associated protein，CRISPR/Cas）[8-10]、环化重组酶系统（cyclization recombination enzyme-locus of X，Cre-lox）和光控 CRISPR[11-15]等。有多种利用基因编辑技术改造的植物品种实现商业化，部分品种已开始种植和出售。如日本利用 CRISPR/Cas9 技术培育出了高γ-氨基丁酸（gamma-aminobutyric acid，GABA）番茄品种，并已被批准种植和出售[15]；2021 年初，韩国 Toolgen 公司利用 CRISPR-Cas9 改造的高油酸大豆在中亚地区进行了田间试验，并预计未来 3 年由田间试种逐步实现商业化[7,16]；美国宾夕法尼亚大学的杨亦农利用 CRISPR/Cas9 技术培育了基因编辑的双孢菇（*Agaricus bisporus*），法国生物公司 Calyxt 用 TALEN 技术培育出的高油酸/低亚麻酸大豆、高油酸大豆、品质改良苜蓿、耐碰损马铃薯和耐寒贮马铃薯[7,17]均已获得豁免权。

到目前为止，各国对基因组编辑植物的监管还没有明确的规定。日本的政府专家组决定不对某些类型的基因编辑进行监管；美国农业部曾发表声明，只要它们不是植物害虫，或是利用植物害虫开发的，便不会对利用基因组编辑技术改造过的植物进行监管；哥伦比亚、加拿大、阿根廷、巴西、以色列、智利、澳大利亚等国家的监管政策与美国相同；英国最高法院裁定，基因编辑植物应与转基因生物同等受到严格监管，只要不是通过交配或自然重组而发生的，导致生物体的遗传物质发生了改变，就应定义为转基因生物；尼日利亚、挪威、巴拉圭、肯尼亚、乌拉圭等国与英国相同；我国对于未引入外源基因的基因编辑植物，可以根据要求完成试验并提供相关的安全数据资料，可申请生产应用的安全证书[15]。

作者简介：袁小雅，研究方向为食品微生物及转基因检验，E-mail：libbyyxy@qq.com
甄珍为通信作者，研究方向为食品农产品微生物及转基因检验，E-mail：zhen-zhen@coustoms.gov.cn
基金项目：海关总署科研项目（2022HK031）
收稿日期：2025-04-29；修回日期：2025-07-17；网络出版日期：2025-07-22

尽管各国的监管政策存在差异，但随着商业化进程和全球贸易的发展，转基因检测方法已不适用于基因编辑检测，开发基因编辑植物的特异性检测方法是必然的[15]。Zhang 等[18]利用 PCR 及微滴数字 PCR 方法对基因编辑的水稻进行检测，并对基因编辑成分进行了定量分析，结果发现相对标准偏差（*RSD*）＜25%，偏差在±17%范围内，说明该方法符合检测方法的要求，并为基因编辑植物提供了一种可靠的定性和定量检测方法。Chhalliyil 等[16]开发了首个商业化基因组编辑作物油菜的定量 PCR 检测方法，该方法灵敏度高、特异性强，定量限达到 0.05%。本文针对 CRISPR/Cas9 基因编辑的高 GABA 番茄建立了荧光 PCR 和数字 PCR 检测方法，该方法可以从野生型番茄和基因编辑番茄中识别出 CRISPR/Cas9 基因编辑的高 GABA 番茄，具有很高的灵敏性和特异性，满足检测要求，为基因编辑植物的检测提供了理论依据，为制定相关检测标准打下基础，并为生物安全监管提供参考。

1　材料与方法

1.1　试验材料

CRISPR/Cas9 基因编辑的高 GABA 番茄由中国农业大学提供，GABA 含量比野生型高 19 倍。13 个不同野生型番茄品种样品由国家植物种质资源库提供，来源于中国、日本、德国、荷兰、俄罗斯、韩国、美国和法国。

1.2　试验方法

试验于 2024 年在黑龙江哈尔滨海关技术中心齐齐哈尔综合实验室转基因室进行。

1.2.1　DNA 提取　使用 TaKaRa MiniBEST Universal Genomic DNA Extraction Kit Ver.5.0 提取试剂盒（TAKALA 公司）从番茄植物组织中提取 DNA。利用核酸蛋白测定仪测定 DNA 的浓度和 A_{260}/A_{280}、A_{260}/A_{230}，以评估提取 DNA 的质量和杂质情况。调整 DNA 的浓度至 300 ng/μL，并储存在−20 ℃备用。

1.2.2　荧光定量 PCR　使用荧光定量 PCR 系统（耶拿，qTOWER2.2，德国）进行实时定量 PCR 检测。实时荧光 PCR 的扩增程序为：95 ℃预变性 10 s，95 ℃变性 15 s、60 ℃退火及延伸 1 min，共 40 个循环，在 60 ℃下采集荧光信号[19]。反应体系包括：实时荧光 PCR 反应混合液 12.5 μL、上游引物 GABA-F 1.0 μL、下游引物 GABA-R 1.0 μL、探针 GABA-P 0.5 μL、样品 DNA 2.0 μL、补超纯水至 25.0 μL。

1.2.3　数字 PCR　使用微滴式数字 PCR 仪进行数字 PCR 检测。数字 PCR 的扩增程序为：热启动 95 ℃预变性 5 min，热循环扩增 94 ℃变性 30 s、60 ℃退火 60 s，共 49 个循环，扩增结束后进行 98 ℃ 10 min 的热失活。数字 PCR 每 20 μL 扩增的反应体系包含：样品 DNA 20~30 ng、上游引物 GABA-F 及下游引物 GABA-R 各 8~15 nmol、探针 GABA-P 2~10 nmol、数字 PCR 扩增酶 Mix 预混液 10~15 μL、余量为水。

1.2.4　扩增体系检测限试验　以 CRISPR/Cas9 编辑的高 GABA 番茄 DNA 为模板进行梯度稀释，稀释后的基因编辑植物的相对含量分别为 5.0%、1.0%、0.5%、0.1%、0.05%、0.01%和 0.005%，每个梯度稀释液进行 3 次重复扩增反应。通过 1.2.2 的荧光定量 PCR 检测方法验证扩增体系灵敏度。根据检测结果分别计算 DNA 拷贝数浓度 3 个平行之间的 *RSD* 值，当 *RSD*＜25%时为扩增体系检测限[20]。

1.2.5　引物探针稳定性验证试验　在反应体系中加入 13 个不同野生型的番茄和 CRISPR/Cas9 编辑的高 GABA 番茄，通过 1.2.2 的实时荧光 PCR 检测方法对不同模板的筛选元件进行扩增，验证引物探针稳定性。

2　结果与分析

2.1　引物探针的特异性

引物和探针的特异性对荧光 PCR 和数字 PCR 检测的敏感性至关重要。pYLCRISPR/Cas9 系统介导的番茄基因组编辑情况如图 1 所示。本试验通过高 GABA 番茄与野生型番茄基因序列对比，使用

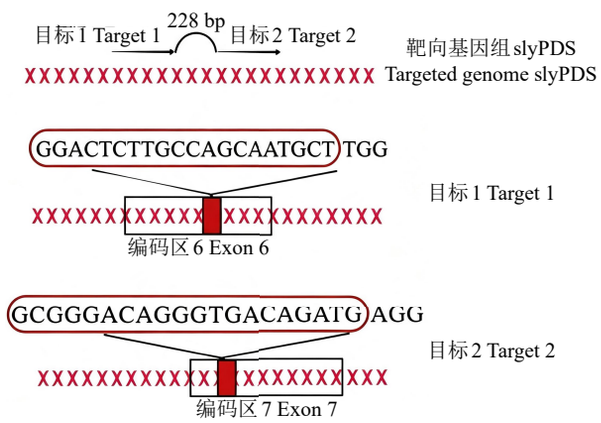


图 1　pYLCRISPR/Cas9 系统介导的番茄基因组编辑情况

Fig.1　Gene editing in tomato via the pYLCRISPR/Cas9 system

Primer Premier 6.0 软件正向设计引物序列，采用 Beacon Designer 8.0 软件设计特异性探针序列，设计了 4 组特异性引物探针，分别命名为 G1~G4，具体引物探针序列如表 1 所示，利用荧光 PCR 方法验证引物探针的特异性，结果如图 2 所示，G2 的特异性较好，循环阈值（cycle threshold，C_t）为 27.09，符合检测要求。

表 1 高 GABA 番茄引物和探针信息

Table 1 Primer and probe information of high GABA tomato

名称 Name		序列 Sequence (5′→3′)	扩增大小 Amplification size (bp)
G1	G1-F	GGAGCACATGTACAATGCTTTACC	99
	G1-R	CGGCAATGTGTTTAATTGCTTAG	
	G1-P	GAAACAACCCGCCTGGTTGAT	
G2	G2-F	GCACATGTACAATGCTTTACC	98
	G2-R	GTGTTTAATTGCTTAGTGGCAGC	
	G2-P	GAACGAGACTGCCTGGTTGATGC	
G3	G3-F	GCACATGTACAATGCTTTACCAAC	99
	G3-R	GCAATGTGTTTAATTGCTTAGTGGC	
	G3-P	GGAAACAACCCGCCTGGTT	
G4	G4-F	GCACATGTACAATGCTTTACC	97
	G4-R	GTGTTTAATTGCTTAGTGGCAGC	
	G4-P	GAACGAGACTGCCTGGTTGATGC	

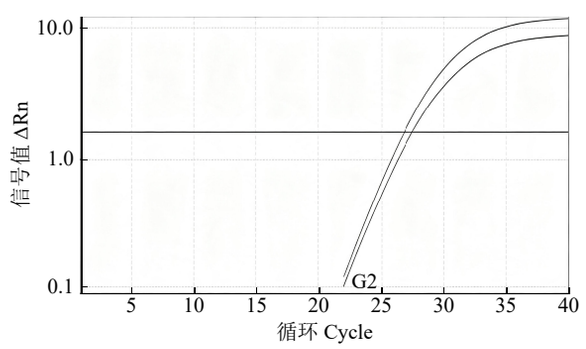


图 2 G1~G4 引物探针的扩增曲线

Fig.2 Amplification curve of the G1-G4 primer probes

2.2 扩增体系的检测限

由表 2 可知，≥0.01% DNA 浓度的 *RSD* 均＜25%，但 DNA 浓度为 0.005%时，*RSD* 为 ND，即没有扩增到，所以可以得出结论，扩增体系的检测限是 0.01%。

2.3 引物探针稳定性

为了确定引物探针的稳定性，选择了来自中国、日本、德国、荷兰、俄罗斯、韩国、美国、法国的 13 个不同野生型番茄与 CRISPR/Cas9 编辑的高 GABA 番茄进行引物探针的扩增效果测试。13 个不同野生型番茄的产地和名称见表 3，扩增结果

表 2 DNA 梯度浓度检测结果的统计分析

Table 2 Statistical analysis of results from the DNA gradient concentration assay

浓度 Concentration (%)	C_t 1	C_t 2	C_t 3	平均 C_t Average C_t	相对标准偏差 *RSD* (%)
5.00	30.89	32.12	31.13	31.38	2.08
1.00	31.96	32.78	31.86	32.20	1.57
0.50	32.86	33.68	32.82	33.12	1.46
0.10	34.12	35.08	35.44	34.88	1.97
0.05	35.90	36.76	36.27	36.31	1.19
0.01	38.11	38.88	38.60	38.53	1.01
0.005	ND	39.62	ND	ND	ND

ND 表示没有检测到扩增。

ND indicates that no amplification was detected.

表 3 野生型番茄品种列表

Table 3 List of wild tomato varieties

序号 Number	国家 Country	品种名称 Variety name
1	中国	诺盾 314
2	中国	荷兰德奥特 302
3	中国	德澳特 7845
4	日本	心形番茄
5	日本	阳光大道
6	德国	鲁比阿姨的德国绿番茄
7	德国	巴斯夫蜜思提拉小番茄
8	荷兰	德奥特 302
9	俄罗斯	黑柿子番茄
10	韩国	釜山金粉
11	法国	樱桃番茄
12	美国	传统牛排番茄
13	美国	紫色番茄

如图 3 所示，引物探针体系表现出良好的稳定性，只对 CRISPR/Cas9 编辑的高 GABA 番茄有扩增背景，且扩增效果明显，表明该引物探针对 CRISPR/Cas9 编辑的高 GABA 番茄具有高度选择性。

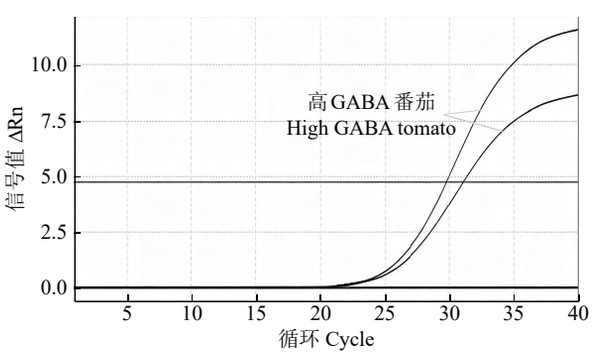


图 3 荧光 PCR 扩增曲线的结果

Fig.3 Results of fluorescence PCR amplification curve

2.4 通过数字 PCR 进行检测分析

荧光 PCR 检测体系中具有特异性的引物探针在数字 PCR 检测体系中也应同样具有特异性，所

以通过数字 PCR 的检测，对引物探针进行验证[18]，试验方法见 1.2.3 和 1.2.4，扩增结果如图 4 所示，引物探针在数字 PCR 检测体系的特异性表现良好，只对 CRISPR/Cas9 编辑的高 GABA 番茄有扩增背景，呈阳性反应，且扩增效果明显，表明该引物探针适用于数字 PCR 检测体系。

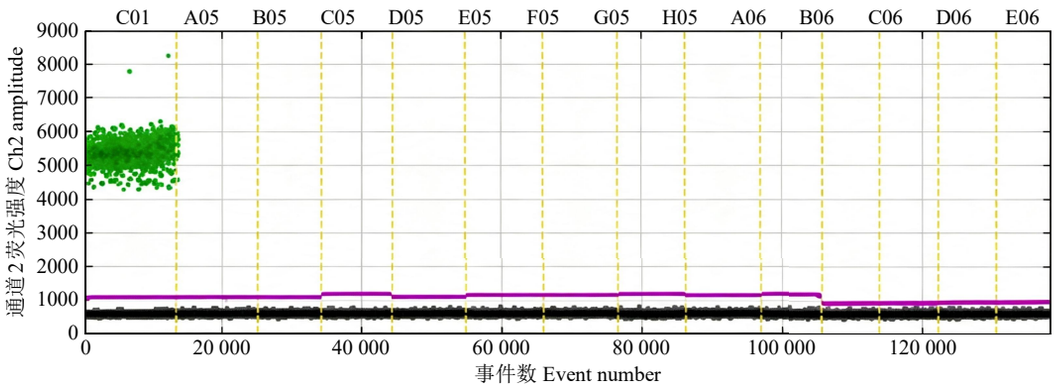


图 4　数字 PCR 扩增曲线的结果

Fig.4　Results of digital PCR amplification curve

3　讨论

基因编辑技术自从问世以来发展迅速，新方法、新技术、新成果不断涌出。未来，该技术将得到进一步开发并应用于多个领域，有望成为植物改造的重要工具，推动更多基因编辑植物商业化[7]。基因编辑技术改造的是植物本身的基因，没有引入外来基因，这与转基因方法截然不同，因此，应当加快推进基因编辑植物检测方法及检测标准的研究与制定，建立一套灵敏、精准、完善、高通量的基因编辑植物的检测方法体系[7]，这有利于生物安全监管、环境监测和品种溯源。Li 等[21]采用 CRISPR/Cas9 方法，针对番茄 slyPDS 基因组进行靶向编辑，得到高 GABA 番茄品种。在此，本试验以 CRISPR/Cas9 基因编辑的高 GABA 番茄为材料，提出并验证了一种针对编辑位点特异性的荧光 PCR 和数字 PCR 检测方法，此方法可用于检测基因编辑的植物。本试验中，设计的引物探针序列中包含了变化的碱基，设计了 4 组特异性引物探针，利用荧光 PCR 方法验证引物探针对 CRISPR/Cas9 基因编辑的高 GABA 番茄的特异性，从结果中得到 1 组扩增效果明显的引物探针序列，通过梯度稀释法检测得到验证，扩增体系的检测限是 0.01%。引物探针的稳定性尤为关键，为此，选择了来自中国、日本、德国、荷兰、俄罗斯、韩国、美国和法国的 13 个不同野生型番茄，进一步测试引物探针的稳定性，结果显示该组引物探针序列只对 CRISPR/Cas9 基因编辑的高 GABA 番茄有特异性，稳定性良好。最后试验验证该组引物探针序列同样适用于数字 PCR 检测体系。本文建立的方案为基因编辑植物的检测提供了方法依据，为生物安全监管、环境监测和品种溯源提供技术支撑，并为制订相关检测标准打下基础。

参考文献

[1] Jinek M，Chylinski K，Fonfara I，et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. Science，2012，337：816-821.

[2] Cong L，Ran F A，Cox D，et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. Science，2013，339(6121)：819-823.

[3] 牛煦然，周卓，魏文胜. 浅谈 2020 年诺贝尔化学奖：通向未来的基因编辑. 大学化学，2020，35(12)：118-126.

[4] Gupta D，Bhattacharjee O，Mandal D，et al. CRISPR-Cas9 system: a new-fangled dawn in gene editing. Life Sciences，2019，232：116636.

[5] Barman A，Deb B，Chakraborty S. A glance at genome editing with CRISPR-Cas9 technology. Current Genetics，2020，66(3)：447-462.

[6] Swarts D C，Jinek M. Cas9 versus Cas12a/Cpf1: Structure-function comparisons and implications for genome editing. Wiley Interdisciplinary Reviews：RNA，2018，9(6)：e1481.

[7] 窦迎港，甄珍. 基因编辑作物技术原理、商业化及检测研究进展. 作物杂志，2023(2)：16-23.

[8] Wang Z，Cui W G. CRISPR-Cas system for biomedical diagnostic platforms. View，2020，1(3)：20200008.

[9] Ling X Y，Chang L Y，Chen H Q，et al. Improving the efficiency of CRISPR-Cas12a-based genome editing with site-specific covalent Cas12a-crRNA conjugates. Molecular Cell，2021，81(22)：4747-4756.

[10] 李树磊，郑红艳，王磊. 基因编辑技术在作物育种中的应用与展望. 生物技术通报，2020，36(11)：209-221.

[11] Carroll D，Yale J B. Genome editing: past, present, and future. Yale Journal of Biology and Medicine，2017，90(4)，653-659.

[12] Pan Y，Yang J，Luan X，et al. Near-infrared upconversion-activated CRISPR-Cas9 system: a remote-controlled gene editing

platform. Science Advances，2019，5(4)：eaav7199.
[13] Moroz-Omori E V， Satyapertiwi D， Ramel M C， et al. Photoswitchable gRNAs for spatiotemporally controlled CRISPR-Cas-based genomic regulation. ACS Central Science，2020，6(5)：695-703.
[14] Zhang Y，Ling X，Su X，et al. A DNA origami nanorobot for targeted CRISPR-Cas9 delivery. Angewandte Chemie International Edition，2020，59(47)：20895-20899.
[15] Aksoy Y A，Yang B，Chen W，et al. Spatial and temporal control of CRISPR-Cas9-mediated gene editing delivered via a light-triggered liposome system. ACS Applied Materials & Interfaces，2020，12(47)：52433-52444.
[16] Chhalliyil P，Ilves H，Kazakov S A，et al. Real-time quantitative PCR method specific for detection and quantification of the first commercialized genome-edited plant. Foods，2020，9(9)：1245.
[17] Roseville M N. Calyxt's high oleic low linolenic soybean deemed non-regulated by USDA. (2020-06-03)[2025-04-20]. https://calyxt.com/calyxts-high-oleic-low-linolenic-soybean-deemed-non-regulated-by-usda/.
[18] Zhang H W，Li J，Zhao S B，et al. An Editing-site-specific PCR method for detection and quantification of *CAO1*-edited rice. Foods，2021，10(6)：1209.
[19] 陈絮蒙，田星，郭亦杰，等. 不同比例酸枣仁-茯苓水提物对大鼠焦虑样行为的影响. 食品工业科技，2023，44(2)：408-416.
[20] European Network of GMO Laboratories. Definition of minimum performance requirements for analyticalmethods of gmo testing. (2020-05-16)[2025-04-20]. https://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/doc/MPR%20Report%20Application%2020_10_2015.
[21] Li R，Li R，Li X D，et al. Multiplexed CRISPR/Cas9-mediated metabolic engineering of γ-aminobutyric acid levels in *Solanum lycopersicum*. Plant Biotechnology Journal，2018，16(2)：415-427.

Rapid Detection Method for High-GABA Tomato Edited by CRISPR/Cas9

Yuan Xiaoya[1], Zhen Zhen[2]

([1]Changsha Customs Technology Center, Changsha 410000, Hunan, China;
[2]Qiqihar Integrated Laboratory, Harbin Customs Technology Center, Qiqihar 161000, Heilongjiang, China)

Abstract Our laboratory established fluorescence PCR and digital PCR detection methods for the high gamma-aminobutyric acid (GABA) tomato edited by CRISPR/Cas9. By comparing the gene sequences of high-GABA tomato and wild-type tomato, we designed multiple groups of specific primer-probe sequences, and detected a set of primer probe sequences that met the detection requirements by fluorescent PCR. The detection sensitivity can reach 0.01%, the stability was good, and it was also specific in the digital PCR detection system. Fluorescent PCR detection took a short time and was suitable for routine qualitative detection, with low cost, but its sensitivity and accuracy are limited. Digital PCR was complex in operation, high in cost and long in detection time, but it did not need a standard curve, and its absolute quantification was more accurate, especially suitable for trace detection in low abundance samples or complex background. The establishment of this method provides a methodological basis for the detection of genetically edited plants, lays a foundation for formulating relevant detection standards, and provides technical support for biosafety supervision.

Key words Tomato; Gene editing; Gamma-aminobutyric acid; Fluorescent PCR; Digital PCR