

Professor Stefan Jansson
Umeå Plant Science Centre
Fysiologisk botanik
Umeå Universitet
901 87 Umeå
Tel: 070-677 23 31
Email stefan.jansson@umu.se

Jordbruksverket
Regelenheten

Komplettering Dnr 4.6 1-6714/14

Jag ställde i fjol en fråga om en CRISPR-muterad backtrav skulle omfattas av lagstiftningen för genetiskt modifierade växter. Ni begärde 2014-06-26 kompletterande uppgifter som jag först nu besvarar, vi beslöt att inte genomföra dessa experiment 2014 så det var inte bråttom. Jag tänkte dock nu återkomma till frågan och lämnar härmed in denna komplettering. Jag kommer att ge två alternativ. För att förklara varför kan jag berätta om tanken bakom detta.

Vi startade våra fältförsök med backtrav år 2000 med mutanter som saknade PsbS-proteinet, som är viktigt för växters förmåga att hantera överskottsljus i fotosyntesapparaten. Vi har sedan dess tillgång till två olika sorts mutanter som saknar PsbS, dels en mutant (*npq4-1*) som framställt genom "fast neutron bombardment", och som därför saknar hela PsbS-genen och även omgivande DNA, hur stor bit som deleterats har inte analyserats. Dessutom har vi ett antal EMS-mutanter som alltså är punktmutationer, dessa beskrivs i bifogad uppsats från 2000 (Li et al). Ätminstone EMS-mutanterna har säkerligen ett stort antal "off-target mutationer", eller vad man nu skall kalla dem, vi kallar de ofta "unlinked mutations", mutationer som inte sitter i PsbS-genes. Det är mindre sannolikt att *npq4-1* har det, men vi vet inte, ingen bryr sig om att analysera detta eftersom det inte är relevant för de biologiska egenskaperna, vi hanterar eventuella "off-target" mutationer som man gör inom forskningen, genom att studera flera oberoende mutanter och endast när dessa visar upp samma fenotyp kan vi dra slutsatsen att fenotypen beror på mutationen. EMS- och "fast neutron bombardment" omfattas inte av gentekniklagstiftningen, alltså kan vi utan att fråga Jordbruksverket odla dessa (som vi publicerade redan år 2002 (Külheim et al, bifogad).

Vi har dessutom tillgång till T-DNA KO linjer för PsbS-genen. Dessa betraktas som genetiskt modifierade fast egenskaperna är ur ett forskningsperspektiv givetvis densamma som för EMS- och fast neuron-mutanterna; en backtrav som saknar PsbS och som vi därför kan använda för att konfirmera slutsatserna från de andra mutanterna utan att behöva bekymra oss för andra mutationer som kan störa våra slutsatser. Vi har ett tillstånd för fältförsök som täcker dessa, alltså får vi odla dem i fält trots att de räknas som genetiskt modifierade (fast ingen annan skulle kunna göra det).

Nu har vi utökat vår repertoar av "PsbS-lösa backtravar" med sådana där mutationer i PsbS-genes introducerats med hjälp av CRISPR/CAS9. Vi har gjort ett T-DNA konstrukt som innehåller dels CAS, dels sgRNA som introducerar en mutation i PsbS. Vi kan med hjälp av klorofyll-fluorescence lätt och icke-destruktivt mäta om vi lyckats slå ut expressionen av PsbS, tekniken finns beskriven i Li et al (2000). Vi är bara intresserade av växter som saknar PsbS och bryr oss inte nämnvärt om "off-target-mutationer", i alla fall inte mer än vad vi gör vad gäller EMS-mutanter, dvs vi

jämför några oberoende linjer. Dels har vi då linjen med T-DNA kvar i sig (variant A), dels har vi linjer där T-DNA korsats bort (variant B). Dessa två "varianter" av PsbS-lösa växter kan vi nu lägga till de tre kategorier vi har sedan tidigare, och undrar om vi får odla dessa i fält utan att tillfråga er. Svaren på frågorna kommer nedan

1. Vilken transformationsmetod använde du för dina linjer? Alternativt, använde du tillfälligt uttryck i protoplastsystem eller agro-infiltrationssystem?

Svar: Traditionell Agrobacterium-infektion, d v s "floral dip"

2. Om du transformerade in DNA, har du undersökt växtlinjerna med avseende på ytterligare, ofullständiga insertioner?

Svar: Nej"

3. Uttrycks singel guide RNA (sgRNA) (Alternativt CRISPR RNA och trans-activating crRNA) från en införd gen/gener i växterna?

Svar: Ja (fast i variant B är den bortkorsad i de som skall sättas ut)

4. Är både insert med Cas och med sgRNA bortkorsade i linjerna som du vill sätta ut?

Svar: I variant A; Nej, I variant B; Ja.

5. Hur är det analyserat? Med andra ord hur har bortkorsningen bekräftats?

Svar: PCR

6. Har du använt en oligonukleotid i samband med muteringen, för att åstadkomma basutbyte, genutbyte eller insertering?

Svar: Nej

7. Hur syntetiserades i så fall oligonukleotiden?

Svar: Oväsentligt

8. Hur valdes sekvenserna i oligonukleotiden?

Svar: Oväsentligt

9. Har DNA inserterats i muteringsstället?

Svar: Oväsentligt antar jag (detta gäller om en oligo använts?)

10. Har off-target-mutationer analyserats i växterna?

Svar: Nej"

Jag ser fram emot era svar som blir viktiga för oss för att planera våra experiment. Om ni skulle anse att analys av "off-target-mutationer" är viktigt skulle jag vilja ha en motivering till varför det är viktigt i fallet med CRISPR, men oväsentligt i fallen med EMS och fast neutrons

Med vänlig hälsning
Stefan Jansson