

高通量基因分型系统 GeneMatrix 性能评价及应用

韦玉梅, 朱欣果, 田有辉

(成都瀚辰光翼科技有限责任公司, 四川 成都 610096)

摘要: 基于分子辅助选择和转基因的现代分子育种技术大幅提升了农作物育种的效率, 实现快速、定向、高效改良作物新品种。而分子辅助选择育种是一种借助分子标记对目标性状的基因型进行高效选择的分子育种方法。本文介绍一款用于检测单核苷酸多态性、插入缺失分子标记的全自动高通量基因分型系统 GeneMatrix, 该设备的特征决定了其适用于少量位点大量样本基因分型的应用场景, 本文借由两个分子育种的案例对其应用场景进行了详细阐释。

关键词: 育种; 分子辅助选择; 单核苷酸多态性; 高通量基因分型

Abstract: Crop improvement has been made possible by modern molecular breeding technology, which is based on molecular assisted selection and transgenic technology. Molecular assisted selection uses molecular markers to effectively select the genotype of target traits. Here, we introduce a fully automatic high-throughput genotyping system GeneMatrix, which is used to detect single nucleotide polymorphisms and insert deletion molecular markers. The characteristics of this equipment determine its application scenario for genotyping of a large number of samples with few locus. Finally, two molecular breeding cases were used to explain its application scenario in detail.

Keywords : Breeding; Marker-assisted selection; Single nucleotide polymorphism; High throughput genotyping

1 引言

粮食为人类提供了最根本的需求, 是决定社会发展的关键因素; 粮食供应安全不仅是中国, 也是世界所有国家极为关注的重大战略问题。种业是保障粮食安全的基础, 也是制约未来农业发展乃至社会发展的关键要素。作为农业的“芯片”, 良种对我国粮食增产的贡献率超过 40%^[1]。科学技术的进步是产业发展的有力保障, 20 世纪 50 年代至今, 矮化育种、杂交育种推动了作物育种革命, 作物产量大幅度提高。然而, 人口数量增加、中高等收入群体占比上升和膳食结构变化带来的全球食物安全问题依然严峻^[2]。

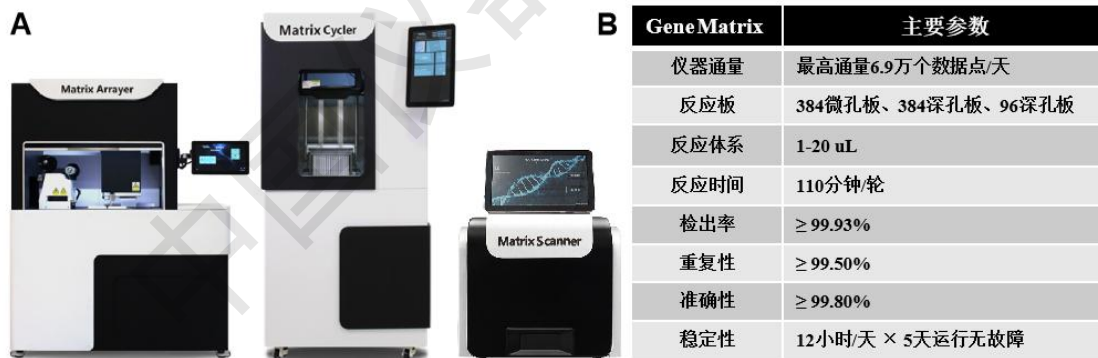
常规育种在过去近百年对农业的发展起到了巨大的推动作用, 但常规育种存在育种周期长、遗传改良实践效率偏低的缺陷, 整个育种周期一般需要 8~10 年^[3]。基于分子生物学理论的分子育种发源于 20 世纪 90 年代初, DNA 分子标记技术的开发和转基因生物育种技术的发展, 大大增加了育种的靶向性, 明显减少了育种周期, 品种培育效率得到大幅度提

升。农作物性状可分为单一基因控制的简单性状和多基因控制的复杂性状，前者可通过分子标记辅助育种模型（Marker-assisted selection, MAS）实现高效率育种选择。

MAS 是利用分子标记与决定目标性状基因紧密连锁的特点，通过检测分子标记，即可检测到目的基因的存在，达到选择目标性状的目的，具有快速、准确、不受环境条件干扰的优点。目前，最为常用的分子标记包括简单重复序列（Simple sequence repeat, SSR）和单核苷酸多态性（Single nucleotide polymorphism, SNP）。与 SSR 相比，SNP 具有遗传稳定、高密度、连锁性强以及二态性易于自动化等优势，已成为 MAS 的主流选择。SNP 的分型手段可分为 4 类：1）基于 PCR 的已知位点检测，如竞争性等位基因特异性 PCR

（Kompetitive Allele-Specific PCR, KASP）、Taqman 探针法及高分辨率熔解曲线（High-resolution melting, HRM）；2）基于靶向测序的已知位点检测，如液相芯片^[4]；3）基于固相芯片的已知位点检测；4）基于测序的已知/未知位点检测，如重测序、简化基因组测序等。不同的检测方法适用于不同的应用场景，根据样本量与检测位点数量，选择合适的检测方法是提高性价比的关键。

MAS 的特征之一是需要再短时间内进行少位点大样本的快速检测，在此背景下，自动化高通量 SNP 分型设备为 MAS 的生产应用提供了一种高效低成本的解决方案。高通量基因分型系统（GeneMatrix, GM）是一款自动化高通量体系构建及荧光 PCR 扩增的基因分型系统，该产品基于终点式荧光 PCR 反应原理，可对样本基因组中已知的 SNP、Indel 位点进行定性检测，适用于少量位点的大批量样本检测。本文对 GM 的设备进行性能参数进行



详尽解读，并结合两个应用案例对其使用场景进行阐释。

图 1 GM 硬件组成与主要参数

2 GM 性能参数

如图 1 所示，GM 由反应板制备仪（Matrix Arrayer）、高通量水浴热循环仪（Matrix Cycler）、高速荧光扫描仪（Matrix Scanner）以及配套的 Mater 分析软件组成（图 1 A）。整套检测系统可兼容 TaqMan、KASP 等多种基因分型试剂，日检测通量可达到 6.9 万数据点，支持 1~20 L 的 PCR 反应体系（图 1B）。Matrix Arrayer 反应板制备仪是一款集高通量加样、微量分液、超声清洗、自动化封板于一体的自动化移液工作站；其纳升级的移液

精度确保可将 DNA 样本和试剂精准分液至微孔板，在减少人为操作误差的同时，极大地降低了试剂消耗。高通量水浴热循环仪 Matrix Cyclor 配备有高温、常温与低温三个水浴箱，借助机械臂可同时对 20 张 384 微孔板进行热循环扩增；配套的 384 微孔板具有板壁轻薄，热质低等特点，可实现温度快速精准控制，从而确保扩增的均一性。高通量微孔板荧光扫描系统 Matrix Scanner，用于条形码读取、荧光检测。数据处理软件 Mater 为基因分型数据综合分析管理软件，具备灵活的版面设置和强大的数据管理分析功能，对原始检测数据进行快速获取和批量分析处理。

自 2018 年投入应用至今，GM 已在水稻、小麦、辣椒、绵羊等 13 个物种（图 2）的基因分型分析中进行大于 3000 万数据点的检测。为评估 GM 与分子育种实践需求的匹配度，本文对育种家或科研人员等终端用户在生产检测中最为关注的检出率、重复性、准确性及稳定性 4 个参数进行说明：1）检出率表示样本检出数量占总样本数量的比率，反映设备对批量样本的检测性能；使用 7 个不同品牌基因分型试剂，对 2880 例 DNA 样本（ $[c] \geq 10 \text{ ng/L}$ ， $1.7 \leq A_{260}/280 \leq 1.9$ ）的 12 个 SNP 位点进行检测，单位点检出率均大于 99.92%，整体检出率为 99.93%。2）重复性表征设备系统重复检测结果的一致性，即取同一批次样本分别进行 3 次生物学重复检测，并评估其检测结果的一致率；对 1840 例 DNA 样本的 12 个 SNP 位点进行 3 次重复检测，不同重复之间一致率为 99.63%。3）准确性是另一项衡量设备性能的关键指标，它关系到检测结果的真实有效性，如设备检测结果有误，将严重降低品种选育的工作效率；对 3810 例 DNA 样本的 12 个 SNP 位点进行检测，GM 分型结果与金标准之间的一致率为 99.82%。4）稳定性是对设备在高负荷运转情况下稳定运行能力的一项考核指标；根据育种群体筛选的实际应用场景，GM 进行满负荷运行（12 小时/天，连续运行 5 天），检测结果显示 GM 在无运行故障的前提下检出率依然大于 99.93%。

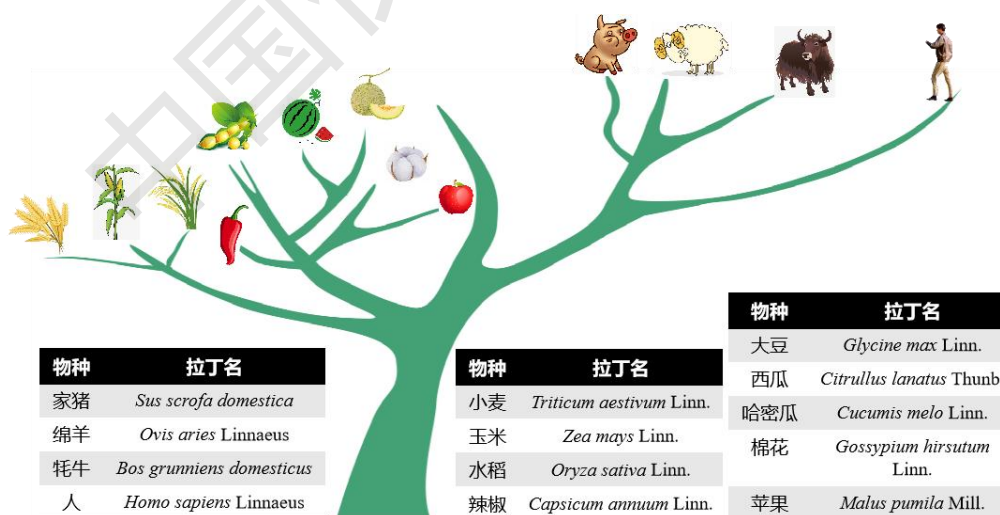


图 2 GM 基因分型物种

3 应用案例

3.1 哈密瓜分子标记辅助选择育种

栽培甜瓜 (*Cucumis melo* L.) 是葫芦科中重要的经济作物之一，包括蜜瓜、哈密瓜、芒果瓜、蛇瓜、脆瓜和酸瓜等多种一年生蔓生植物。品质评价指标主要包括甜度、香气、风味、质地以及维生素和矿物质的含量等。病原菌感染是影响其产量与品质的主要因素之一^[5]。蔓枯病 (Gummy stem blight, GSB) 是由禾谷镰刀菌 (*Didymella bryoniae* (Auersw.) Rehm) 引起的一种坏死疾病，是日光温室瓜类作物生产中主要病害之一，尤其是在我国东南沿海潮湿的设施栽培环境中多发^[6]。目前化学方法防治蔓枯病效果有限，实际生产中培育具有抗性的甜瓜品种是防治蔓枯病的最有效手段。通过对不同的甜瓜栽培品种的遗传分析，现已挖掘了 6 个独立的 GSB 抗性基因，其中 5 个为独立的显性抗性位点 (*Gsb-1*、*Gsb-2*、*Gsb-3*、*Gsb-4* 和 *Gsb-6*)，1 个为隐性抗性位点 (*gsb-5*)。目前，关于甜瓜抗蔓枯病的研究仍处于分子标记开发阶段，并没有明确的抗性基因被克隆^[7]。

新疆农业科学院哈密瓜研究中心利用 GM 系统对 380 个哈密瓜样本中蔓枯病抗性位点 *gsb-5* 候选基因上开发 SNP 位点进行分型，其检测结果可成功将不同的品种分为三种状态，且基因型与抗性表型之间具有较高的一致性 (图 3)。传统鉴定方法往往十分繁琐且耗时耗力，整个过程需要经历育苗、菌培养、接种及病情调查，且检出效率易受环境因素影响。此外，由于传统育种方法以表型选择为主，它依赖于育种家的实践经验，存在检测结果准确性较低、品种选育效率低下、选育周期长等缺点。而基于 MAS 的分子育种，以分子标记进行基因型精准选择，具有操作简单、选择效率高、准确性高且检测结果不受环境影响等优点。作为性价比首选的高通量基因分型技术具备检测通量高、检测成本低、重复性好、易于操作与实现自动化等特点，在 MAS 分子育种中具有极大的应用潜力。哈密瓜研究中心利用 GM 系统仅需 1 天时间即可快速完成 380 个样本的抗性鉴定，且使用 2 μ L PCR 微体系进行检测每个样本检测成本可大幅度降低，充分证实高效低成本的 MAS 技术在哈密瓜育种中的可行性。

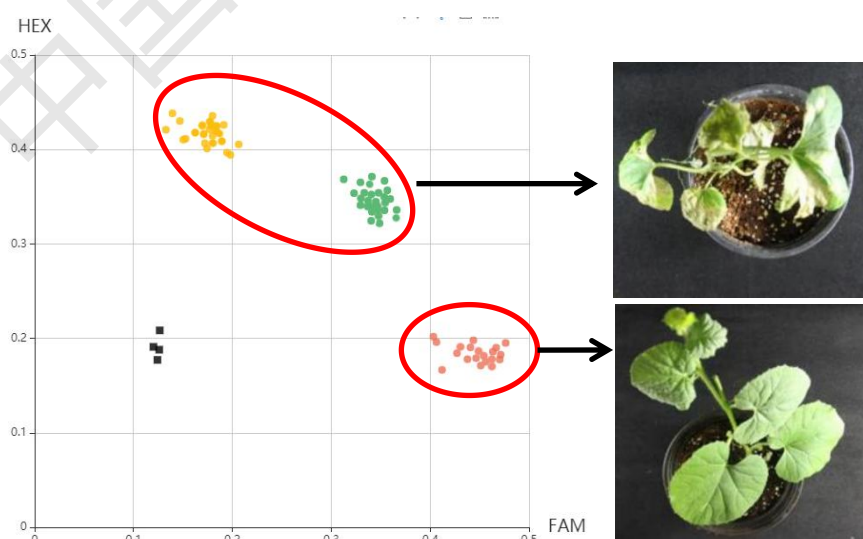


图 3 哈密瓜抗病育种

3.2 水稻分子聚合育种

栽培水稻 (*Oryza sativa* L.) 为全球约一半的人口提供主粮, 培养优质高抗的品种是目前水稻育种的方向之一。 *Bph14* 是水稻图位克隆分离的第一个褐飞虱抗性基因, 其编码一种卷曲螺旋、核苷酸结合位点、富含亮氨酸重复 (CC-NB-LRR) 的蛋白质, 其 CC 和 NB 结构域均可激活水杨酸信号通路及防御基因的表达; 此外, BPH14 蛋白形成同源复合体, 并与转录因子 WRKY46、WRKY72 相互作用, 增强了 WRKY46 与 WRKY72 依赖的反式激活活性, 而 WRKY46 和 WRKY72 可结合受体样细胞质激酶基因 *RLCK281* 和胼胝质合酶基因 *LOC_Os01g67364.1* 的启动子^[8]。 *Pi2* 则是水稻稻瘟病抗性基因之一, 其介导的抗性机制可能是同过负调节水杨酸的代谢, 从而导致水杨酸富集进而激活水稻基础免疫系统, 而产生的 *Pi2* 的非小种转化抗性。 香味是水稻的重要品质性状, 编码甜菜碱醛脱氢酶的 *Badh2* 基因抑制水稻香米主要成分 2-乙酰基-1-吡咯啉的生物合成, 携带 *Badh2* 功能丧失型突变的稻米具有香味^[9]。

安徽荃银高科种业股份有限公司借助 GM 系统, 采用 MAS 方法进行抗褐飞虱、稻瘟病、香味稻米的聚合育种。对于高回交世代的群体, 田间收集幼苗期水稻叶片, 经 SDS 法提取 DNA 后, 使用 GM 系统进行基因型鉴定, 三天时间便完成 10000 份材料 3 个基因位点的检测, 实现目标单株的精准快速筛选。

综上, 高通量基因分型系统 GM 在检出率、重复性、准确性、稳定性方面具有良好性能表现, 且能够满足分子育种过程中目标单株的快速高效鉴定。此外, 该系统也可应用于转基因检测、基因编辑检测、基因精细定位、基因关联分析、品种鉴定、纯度鉴定等方向, 具有广泛的应用场景。

参考文献:

- [1] Sun Q, Yan Y F, Shen H B. Analysis on the scientific and technological innovation of seed industry at home and abroad (in Chinese) [J]. China Seed Indust, 2013, 9: 4–6.
- [2] Hickey S, Lavers T, Niño-Zarazúa M, et al. The Politics of Social Protection in Eastern and Southern Africa[J]. Oxford: Oxford University Press, 2019.
- [3] Gao C. Genome engineering for crop improvement and future agriculture[J]. Cell, 2021, 184: 1621–1635.
- [4] Guo Z, Yang Q, Huang F, Zheng H, et al. Development of high-resolution multiple-SNP arrays for genetic analyses and molecular breeding through genotyping by target sequencing and liquid chip[J]. Plant Commun. 2021 Aug 9;2 (6) :100230.
- [5] 毕研飞, 徐兵划, 钱春桃, 等. 分子标记辅助甜瓜抗蔓枯病基因的聚合及品种改良[J]. 中国农业科学, 2015, 48 (3) : 523-533.
- [6] Hu Z, Deng G, Mou H, et al. A re-sequencing-based ultra-dense genetic map reveals a gummy stem blight resistance-associated gene in *Cucumis melo*[J]. DNA Research, 2018, 25 (1) : 1-10.

- [7] Hassan M Z, Rahim M A, Natarajan S, et al. Gummy stem blight resistance in melon: inheritance pattern and development of molecular markers[J]. International journal of molecular sciences, 2018, 19 (10) : 2914.
- [8] Hu L, Wu Y, Wu D, et al. The Coiled-coil and nucleotide binding domains of BROWN PLANTHOPPER RESISTANCE14 function in signaling and resistance against plant hopper in rice[J]. Plant Cell. 2017 Dec;29 (12) :3157-3185.
- [9] Chen S, Yang Y, Shi W, et al. *Badh2*, encoding betaine aldehyde dehydrogenase, inhibits the biosynthesis of 2-acetyl-1-pyrroline, a major component in rice fragrance[J]. Plant Cell. 2008 Jul;20 (7) :1850-61.

中国仪器仪表学会