

高通量测序技术的相关应用

郑依依

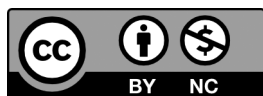
东北林业大学，哈尔滨

摘 要 | 高通量测序是 DNA 测序技术发展中的重大突破，它的出现为现代农业科学的研究提供了前所未有的机遇。本文总结了以 454、Solexa 和 SOLiD 为代表的第二代高通量测序技术的原理以及 HeliScope 和 Pacific Biosciences SMRT 为代表的单分子测序技术的最新进展。在此基础上，归纳了高通量测序技术在基因组测序、转录组测序、小分子 RNA 及数字化基因表达谱等研究领域在农业研究中的应用。最后，指出了当前高通量测序技术的特点并对其在今后研究中的发展方向进行了展望。

关键词 | 高通量测序技术；转录组；农业科学；应用

Copyright © 2021 by author (s) and SciScan Publishing Limited

This article is licensed under a [Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/). <https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>



1 引言

自从 1977 年以 Sanger 法（双脱氧核苷酸末端终止法）为代表的第一代测序技术帮助人们完成了第一个完整基因组图谱的绘制以来，测序技术不断发展进步。进入 21 世纪后，以 Roche 454、IlluminaGA 和 ABI SOLiD 测序系统为代表的第二代测序技术诞生了，第二代测序技术具有测序通量高、速度快及测序成本低等优点。随着高通量测序技术在科学研究中的广泛应用，它们逐渐成为了新

作者简介：郑依依，东北林业大学，硕士。

文章引用：郑依依. 高通量测序技术的相关应用 [J]. 农业科学进展, 2021, 3 (2): 68-73.

<https://doi.org/10.35534/aas.0302008c>

一代高通量测序技术的代表者并为广大科研工作者所接受。

测序技术的快速发展为现代农业科学的研究进步起到了巨大的推动作用。测序技术逐渐应用到农业科学研究的多个领域，如作物分子育种、动植物抗病基因、抗逆基因的筛选、作物经济性状的发育机理等研究，并取得了重大的进展。本研究综述了高通量测序技术在现代农业研究中的主要应用并展望了今后的研究发展方向，希望为今后的科学研究打下基础。

2 高通量测序技术原理

第二代测序技术以高通量及低成本为其主要特征，并在此基础上保持了第一代测序技术的高准确性。利用高通量测序技术只需要1周即可完成第一代Sanger测序技术花费3年完成的人基因组测序任务。

由于第二代测序技术能够对1个物种的基因组和转录组进行深入细致的研究，因此又被称为深度测序技术（deep sequencing）。

2.1 454 测序技术原理

Roche公司的454测序系统是第二代测序技术中第1个商业化运营的测序平台。454测序仪利用焦磷酸法测序，其技术原理是：454测序仪首先利用微乳滴PCR技术（emulsion PCR，emPCR）来生成扩增产物。

将固化引物的微球与单链DNA文库模板以及必要的PCR反应化合物一起混合，微球与文库片段的比例适当，以确保大多数微球结合的单链DNA分子不超过1个。水溶液与油混合形成油包水结构乳滴，每个乳滴都是一个进行后续PCR反应的微型化学反应器，经过多轮热循环，每个微球表面都结合了数千个相同的DNA拷贝，然后富集微球，转移并放置到刻有规则微孔阵列的微孔板上，每个微孔只能容纳一个微球，微孔板被安装成为流通池的一部分，其中一面可以通过测序反应的化合物，另一面则与CCD光学检测系统的光纤部件相接触。碱基测定采用边合成边测序，利用焦磷酸法产生的光学信号来进行检测，通常所说的焦磷酸测序法是利用ATP硫酰化酶和荧光素酶在三磷酸核苷结合到DNA链上的时候释放焦磷酸，通过ATP硫酰化酶和荧光素酶产生一系列级联反应，

导致生物化学发光放出光信号。测序是顺次向流通池中加入4种dNTP中的一种，每个微孔之中有或是没有光信号释放出来分别表明dNTP连接到片段上或者不是互补的核苷酸，这样也就确定了DNA模板上的互补碱基。对每个小孔中的DNA片段分子进行准确快速的碱基序列的测定。454技术平台平均读取长度达到400 bp，使得后继的序列拼接工作更加高效、准确。

2.2 Solexa 测序技术原理

Illumina公司的Genome Analyzer于2006年问世，它是基于Solexa技术的测序系统。Illumina/Solexa测序技术的基本原理是边合成边测序（sequencing by synthesis SBS），把待测序列打断成200~500 bp的小片段，并在小片段两端加上不同的接头，连接载体，构建ssDNA文库。DNA与流动槽（flow cell）的附着力将这些ssDNA随机地附着在流动槽表面的channel上。

流动槽是一种含有8个channel的微纤维板，它的表面固定有很多接头，能支持ssDNA在其表面进行桥式扩增。向反应体系中添加未标记的核苷酸和酶，进行桥式PCR（Bridge PCR）扩增反应。Bridge PCR以流动槽表面固定的接头为模板，经扩增将桥型ssDNA扩增成桥型dsDNA。将桥型dsDNA变性成ssDNA，继续扩增。经过不断的扩增变性循环，每种ssDNA都在各自的位置集中成束（cluster），每束含有单个模板分子的500~1000个克隆拷贝，从而达到能支持下一步测序反应所需信号强度的模板量。“DNA cluster” Genome Analyzer综合分析仪上进行序列分析。向反应体系中同时添加DNA聚合酶、接头引物和带有碱基特异荧光标记的4种dNTP。由于这些dNTP的3'羟基被化学方法保护，因而每轮合成反应都只能添加1个dNTP。在dNTP被添加到合成链上后，所有未使用的游离dNTP和DNA聚合酶会被洗脱。加入激发荧光所需的缓冲液，用激光激发荧光信号，用光学设备完成荧光信号的记录，再通过计算机分析转化为测序结果。当荧光信号的记录完成后，加入化学试剂淬灭荧光信号并去除dNTP的3'羟基保护基团，以便进行下一轮测序反应。如此反复，得出片段的精确序列。Solexa技术的读取长度可以达到2×75 bp，相比454技术，其后续的序列拼接工作的计算量和难度均大大增加，该平台的测序通量是传统平台（第一代测序仪）的数千倍。

2.3 单分子测序技术

新近研发的 Helicos 公司的 Heliscope 单分子测序仪、PacificBiosciences 公司的 SMRT 技术和 Oxford Nanopore Technologies 公司正在研究的纳米孔单分子技术,被认为是第三代测序技术。Heliscope 技术和 SMRT 技术是利用荧光信号进行测序,纳米孔单分子技术是利用不同碱基产生的电信号进行测序。第三代测序技术已逐渐被科学家关注,将会逐渐应用于科学研究,解决众多的农业科学问题。

第三代测序技术是通过增加荧光的信号强度及提高仪器的灵敏度等方法解决错误率的问题,使测序不再需要 PCR 扩增这个环节,实现了单分子测序并继承了高通量测序的优点。第三代测序技术里的纳米孔单分子技术则更是在原理上做出本质变革,不再基于目前所用测序技术广泛使用的边合成边测序的思想,而是使用外切酶从 ssDNA 的末端逐个切割形成单碱基,并采用新技术对切落下来的单碱基进行检测,这样可以更好地提高读取长度,减少测序后的拼接工作量,实现对未知基因组进行重新测序。

3 高通量测序技术在农业科学研究中的应用

获得一个物种的全基因组序列是加快对此物种了解的重要捷径。对于一些基因组未被测序过的生物,其基因组测序需要从头测序。从头测序也称 de novo 测序,其不需要任何现有的序列资料就可以对某个物种进行测序,利用生物信息学分析手段对序列进行拼接、组装,从而获得该物种的基因组图谱。科研工作中,常结合 Solexa/SOLiD 技术的高通量和 454 技术或传统的 Sanger 测序技术的较长读长的优势来共同完成从头测序工作,利用多测序平台可以大大降低测序成本,提高测序速度,保证测序结果准确性。例如 Huang 等完成的黄瓜全基因组测序,结合了传统的 Sanger 测序技术和第二代 Illumina GA 测序技术,得到了 26.5×10^9 个高质量碱基,平均 72.2 倍覆盖度的黄瓜基因组序列,其中 Sanger 测序技术得到 3.9 倍, Illumina GA 得到 68.3 倍覆盖度, Illumina GA 读取长度为 42~53 bp。Dalloul 等利用 Roche 454 和 Illumina GA 技术完成了火鸡基因组的从头测序。其中,454 技术完成 5 倍测序深度,GA 技术完成 20 倍测序深度。测序结果覆盖了覆盖火鸡基因组 90% (0.92/1.1 Gb),发现 6 mol/L SNP,预测 1.6×10^4 个基因。

高通量测序已广泛应用于以转录组测序等为代表的功能基因组学研究中。对有参考基因组序列的物种，转录组测序数据可以大大丰富和验证对基因组数据的注释，而该技术本身可用于不同样本间基因表达差异、可变剪接等的比较。在无参考基因组序列的物种中，转录组测序可以大量且快速地充实该物种的遗传数据库，这些数据资源可有助于在该物种中进一步开展分子生物学研究。随高通量测序技术而出现的数字基因表达谱（DGE）测序、小 RNAs 测序、降解组测序、DNA 甲基化测序、染色质免疫共沉淀 DNA 测序等新方法为科学家们进行农业科学相关研究提供了更多的选择。

近几年高通量测序技术的应用拓展并深化了科学研究领域的视野。（1）通过基因的核酸序列，已经鉴定出了大量基因，为相应的蛋白序列及功能研究提供了一个捷径。（2）基因多态性等信息的获得对遗传图谱的绘制，基因克隆，进化关系的理解更为透彻，从而促进了对生物多样性的研究。（3）高通量测序技术提高了实验技术的准确性，尤其是对低丰度表达的转录本，对整个转录组的测序是基因研究领域中的一个进步的标志。（4）高通量测序技术在灵敏性，可操作性方面的优势将会拓宽表达谱研究领域的发展，高通量测序技术对数据处理的轻便性也会大大促进基础研究和比较基因组学领域的研究。

高通量各种测序技术均有其特点，在测序过程中常根据测序样本特点使用某种技术或多种测序技术结合使用。如对已知序列的基因组进行重新测序，可利用 Solexa 和 SOLiD 技术，而在对全新的基因组进行测序时，则需要 Solexa 或 SOLiD 技术结合 454 技术或第一代测序技术共同完成，以保证测序的高通量及准确性。高通量测序技术建立的时间还很短，技术不是很成熟，其信息储备量也很有限，现在所能解释的生物学现象和机制还很有限，即使获得了基因组信息，如何去解释和应用它，仍是一个长远的问题，需要今后去逐渐解决。

参考文献

- [1] 周晓光, 任鲁风, 李运涛, 等. 下一代测序技术: 技术回顾与展望 [J]. 中国科学, 2010, 40 (1): 23-37.
- [2] Seo T S, Bai X, Kim D H, et al. Four-color DNA sequencing by synthesis on

- a chip using photocleavable fluorescent nucleotides [J] . Proc Natl Acad Sci USA, 2005, 102 (17) : 5926–5931.
- [3] 秦贞奎. 栉孔扇贝 (*Chlamys farreri*) 性别分化相关基因的筛选以及两个相关基因的表达分析 [D] . 中国海洋大学, 2011.
- [4] 周峻沛. 云斑天牛胃肠道内共生细菌来源的纤维素酶和半纤维素酶的初步研究 [D] . 中国农业科学院, 2010.

High-fluxed DNA Sequencing Technology and Its Application in Agricultural Science Research

Zheng Yiyi

NorthEast Forestry University, Harbin

Abstract: High-throughput sequencing is a major breakthrough in DNA sequencing technology development, the emergence of high-throughput sequencing technology provided an unprecedented opportunity to modern agricultural scientific research. This paper summarized the principle of the 454, Solexa and SOLiD second-generation high-throughput sequencing technology and the latest progress of the HeliScope and Pacific Biosciences SMRT, as represented by the single-molecule sequencing technology. On this basis, the high-throughput sequencing technology was summed up in genome sequencing, transcriptome sequencing, small RNA molecules and digital gene expression profiles and other research areas in agricultural research. Finally, the characteristics and development prospect of high-throughput sequencing technology was noticed.

Key words: High-throughput sequencing technology; Genome transcriptome; Agricultural science; Application