



上海伯豪生物技术有限公司
SHANGHAI BIOTECHNOLOGY CORPORATION

农林研究分册

服务科技创新，护航人类健康！



2019版

目录

基因组层面研究

技术平台

全基因组重测序	01
SNP基因分型芯片	01
其它基因分型平台	03

研究方向

全基因组关联分析	04
遗传图谱构建与QTL定位	05
BSA测序定位	06
群体进化与选择	08
性状相关变异筛选	09

转录组层面研究

植物mRNA测序	10
植物全转录组测序/lnsRNA测序	12
circRNA测序	13
miRNA测序	14

表观基因组层面研究

全基因组甲基化测序 (WGBS)	16
甲基化DNA免疫共沉淀测序 (MeDIP-seq)	17

微生物层面研究

16S rDNA/18S rDNA/ITS扩增子测序	19
宏基因组测序 (元基因组测序)	20

伯豪客户农林研究高分文献

附：样品准备与运送	22
-----------------	----

公司介绍

服务科技创新，护航人类健康！

上海伯豪生物技术有限公司(以下简称“伯豪生物”)2008年12月成立，是一家以技术服务、疾病与健康检测、分子检测产品的开发和生产为主营业务的高新技术企业。公司形成了面向科研和临床的系统技术服务平合，提供全基因组测序、生物信息分析、标志物筛选和分子检测验证、基因功能验证科研一站式服务，同时提供试剂盒开发、生产以及检测应用的转化医学的临床一站式服务。伯豪生物携手各参控股子公司重庆伯豪医学检验所(临床医学检测专业子公司)、伯豪医药(医疗器械经营专业子公司)和迅伯生物(产品研发和GMP生产专业子公司)共同开启“专业服务成就科学发现，产业布局构筑精准医学”的新篇章。



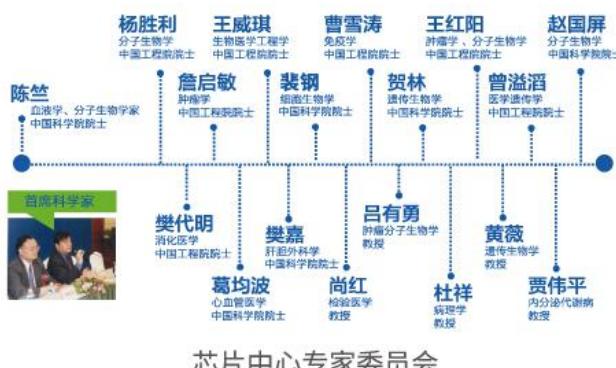
高新技术企业



国家基因检测技术应用示范中心



浦东新区企业研发机构



芯片中心专家委员会

国际一流质量标准

伯豪生物建立了规范化的质量控制体系，通过了ISO9001:2015质量管理体系的认证，并参照GLP-L的标准，通过156个SOP文件对项目、样品、实验过程、生物信息分析过程、数据信息管理、保密等进行严格质控。



多样化的服务平台

伯豪生物多样灵活的服务平台，系统的生物学研究解决方案，全力加速您组学研究的进程！



丰富的项目经验

伯豪生物从事技术服务15年，承接项目数超过15000个，用户单位5000家以上，协助客户发表SCI论文1500余篇（影响因子共计7000多分），全面推动中国基因组学服务产业的发展。



客户分布网络图



伯豪生物协助客户发表相关文章

基因组层面研究

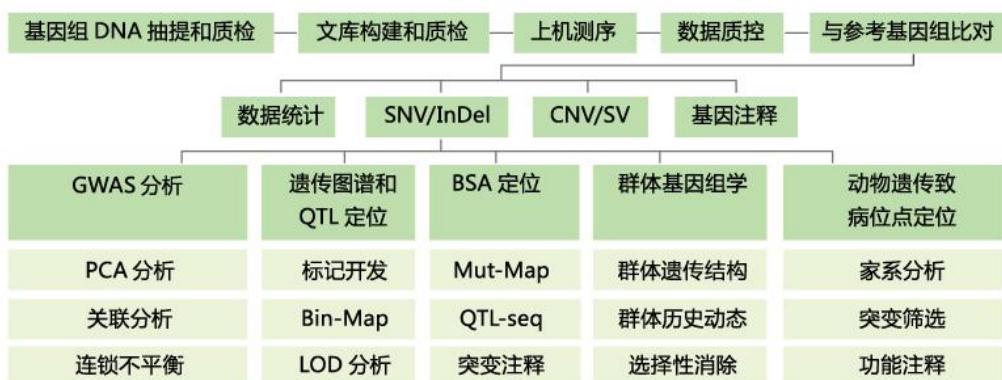
随着高通量技术的迅猛发展，目前已有大量动植物物种的基因组被测序完成。这使得对这些物种进行全基因组重测序成为可能，甚至可以根据 SNP 信息设计基因芯片，以便做大量样本 SNP 分型。在通过高通量手段得到全基因组范围的变异信息后，主要有两方面用途：变异筛查和分子标记。(1) 性状相关变异筛选：通过比较野生型和突变型，得到基因组差异信息，用以解释变异和性状的关系。这需要使用全基因组重测序的方法，得知每一个位点的遗传信息以便做比较；(2) 分子标记：使用低深度重测序或 SNP 芯片，得到均匀覆盖在整个基因组上的变异位点。通过分子标记与性状位点之间的关联，将目标性状定位在某个分子标记附近。基于分子标记的研究方向主要有：遗传图谱构建与 QTL 定位、BSA 测序定位、全基因组关联分析、群体进化和选择。实验平台包括高通量测序平台 (Illumina Hiseq 平台) 和 SNP 芯片平台 (Affymetrix GeneTitan® 芯片平台和 Illumina 光纤微珠芯片平台)。

技术平台

全基因组重测序

全基因组重测序是对已有参考基因组序列的个体或群体进行测序，通过与原有基因组进行比较，得出丰富的全基因组变异信息。随着测序成本的降低和分析技术的成熟，目前全基因组重测序在不同物种、不同研究领域均有广泛应用。

技术路线



样本要求

- 样品纯度：OD 260/280 值应在 1.7 ~ 2.0 之间，A260/A230 > 1.5；RNA 应该去除干净；不含有其它个体或其它物种的 DNA 污染；
- 样品浓度：浓度不低于 55ng/μl；
- 样品总量：每个样品总量不少于 2μg；
- 样品溶剂：溶解在 TE 或水中；
- 样品运输：DNA 低温运输，在运输过程中请用 parafilm 将管口密封好，以防出现污染。

SNP 基因分型芯片

伯豪生物拥有全面的高通量基因分型平台——Affymetrix GeneTitan® 芯片平台和 Illumina 光纤微珠芯片平台，以及专业的分析团队和高效的生物信息服务器，为科研工作者提供全面的基因分型和生物信息分析服务。

Affymetrix SNP 基因分型芯片

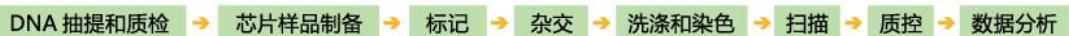
美国 Affymetrix 公司开发的寡核苷酸原位光刻合成专利技术 (light-controlled in situ synthesis of DNA microarrays)，是目前最高密度的芯片制备技术。GeneTitan® 仪器以及业界公认的 Affymetrix® 高通量 (HT) 芯片板为芯片处理带来了第一个无需手动的自动化方案。Affymetrix GeneTitan® 将杂交、洗涤和成像无缝整合到一台仪器中，具有以下优点：

- (1) 扩展性 GeneTitan® 平台可选择多样的芯片板形式，从而达到通量的扩展；
- (2) 高效 手动操作时间仅 30 分钟，可无人值守；
- (3) 灵活 通过多种芯片板完成不同的实验目的；
- (4) 准确 实验条件的稳定可产生具有高度可重复性的数据。

Axiom® 基因分型解决方案为您提供多种芯片。您可以选择要研究物种的自定义内容，也可以选择来自 Axiom® 基因组数据库的基因型经过验证的内容。

强大	对任何物种、任何基因组规模和任何倍性水平进行基因分型 Axiom® 分析可检测插入或缺失 (InDel) 并保证包含所有候选 SNP , 与相邻 SNP 最近可达 20 bp , 实现了更高效的 QTL 分析
可靠	低至 100 ng DNA , 即可获得基因分型结果 , 适用于各种样本类型 基因型检出率 ≥ 99%
扩展	完全自动化的流程 , 每周可处理最多 8 张芯片板 , 而无需增加人工或仪器 一张芯片板上有 96 个或 384 个样本 , 检测每个样品多达 260 万个变异

实验流程



产品目录

芯片名称	物种	位点数	最少样本数
动物物种			
Axiom® Equine Genotyping Array	马	671K	192
Axiom® Porcine Genotyping Array	猪	659K	192
Axiom® Trout Genotyping Array	鳟鱼	58K	192
Axiom® Trout Genotyping Array 384-format	鳟鱼	58K	768
Axiom® Genome-Wide BOS 1 Array Plate Genotyping Bundle 1	牛	640K	192
Axiom® Genome-Wide Chicken Genotyping Array	鸡	580K	192
Axiom® Buffalo Genotyping Array	水牛	90K	192
Axiom® Salmon Genotyping Array	三文鱼	130K	192
植物物种			
Axiom® Soybean Genotyping Array	大豆	181K	192
Axiom® Cotton Genotyping Array	棉花	36K	192
Axiom® Wheat 820k Genotyping Array Plate A	小麦	820K	96
Axiom® Wheat 820k Genotyping Array Plate B	小麦	820K	96
Axiom® Wheat Breeder's Genotyping Array	小麦	35K	768
Axiom® Strawberry Genotyping Array	草莓	90K	192
Axiom® Maize Genotyping Array	玉米	600K	192
Axiom® Rose Genotyping Array	玫瑰	69K	192
Axiom® Rice Genotyping Array	水稻	43K	192
个性化定制			
Axiom® myDesign TG Array	定制	1K-2.6M	>480

注 : 更多物种相关芯片产品详询伯豪生物。

Illumina SNP 基因分型芯片

Illumina 公司以测序业务闻名 , 而其在生物芯片方面的业务也具有不可忽视的优势和竞争力。 Illumina SNP Genotyping 采用激光共聚焦微珠芯片技术 (BeadArray™) , 可对全基因组或特定 SNP 位点进行分型 , 其检测质量可靠 , 得到业界所广泛认可。

实验流程

	第一天	第二天	第三天
Infinium技术	gDNA NaOH变性	扩增后DNA片段化	芯片上进行单碱基延伸	
	全基因组扩增过夜	DNA片段沉淀和重悬	芯片扫描	数据分析
		准备BeadChip	原始数据	
		DNA片段上芯片杂交		

产品目录

芯片名称	物种	位点数	最少起订量
动植物 *			
Bovine HD BeadChip	牛	~770K	48
Bovine LD Genotyping BeadChip	牛	~8K	48
BovineSNP50 DNA Analysis BeadChip	牛	~50K	48
Canine HD BeadChip	犬	~170K	48
Ovine SNP50 BeadChip	羊	~50K	48
Porcine SNP60 BeadChip	猪	~60K	48
Maize LD BeadChip	玉米	~3K	48
Maize SNP50	玉米	~50K	48
个性化定制			
iSelect HD Custom Genotyping BeadChips	定制	3k-90k	24
iSelect HTS Custom Genotyping BeadChips	定制	90k-700k	24

注 * : 更多动植物物种芯片产品请参见 Illumina 官方产品目录。

其它基因分型平台

基于多重PCR的目标区段/ SNP的高通量重测序

设计和优化多重PCR引物，扩增目标区域，不同样本加上不同index区分，利用高通量测序平台进行深度测序，鉴定目标区域中的多态或突变位点。
优点：自主引物设计及优化平台，保证测序结果特异性及均一性；针对研究目标，灵活定制研究方案测序有效覆盖度95%以上，准确率>98%。

KASP基因分型技术

KASP (Kompetitive Allele-Specific PCR)，即竞争性等位基因特异性PCR。KASP反应包括Primer Mix和Master Mix两种主要成分。Primer Mix由两条末端碱基不同的等位基因正向引物与一条反向引物构成，两条正向引物5' 端分别连有不同序列的检测引物序列。Master Mix包含两条带有不同荧光的检测引物。优点：优异的准确性（独立评价的准确性>99.8%）；超强的灵活性；前所未有的低成本（无需昂贵的双色标记探针）；高效的成熟技术。

Fluidigm技术对SNP位点的验证

Fluidigm的核心技术是微流控阀门技术，Biomark HD系统是目前唯一一种可进行基因分型、基因表达profiling、实时数字定量PCR (qdPCR)和单细胞分析的多用途实时PCR系统。Fluidigm BioMark 有三种芯片：96*96, 48*48和192*24。优点：高通量，成本低；灵敏度高，位点特异性探针，荧光标记的延伸引物，与Taqman金标准吻合度高；时间短，从样本处理到拿到数据3-4个小时；灵活性，任意物种，只要知道目的序列，探针可以定制。

MassARRAY质谱分析的SNP分型平台

通过PCR将覆盖SNP位点的DNA序列扩增出来，然后应用单一延伸引物(extension primer)扩增PCR产物，然后用飞行质谱进行分析，根据差别进行分型。优点：高性价比，在所有的SNP分型方法中，价格最低；高准确性，采用尖端的飞行质谱的分型技术，比RT-PCR技术更精准；高通量，一张芯片可对384个样本进行多重检测，每个体系最多实现36重反应；广泛性：可测试各种类型的样本；高效性，全自动分析数据，最快一天内可以完成基因分型报告。

样本要求

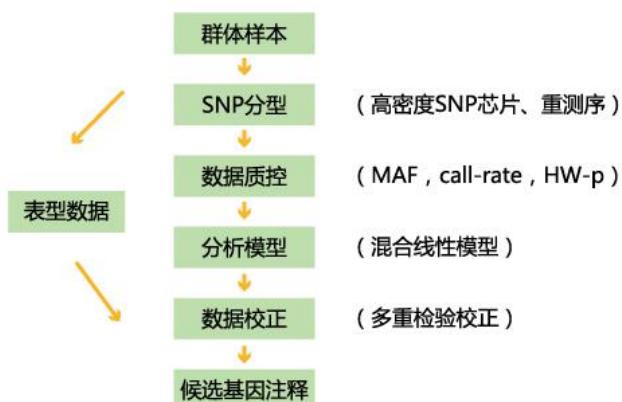
1. 样品纯度：OD 260/280 值应在 1.7 ~ 2.0 之间，A260/A230 > 1.5；RNA 应该去除干净；不含有其它个体或其它物种的 DNA 污染；
2. 样品浓度：浓度不低于 55ng/ μ l；
3. 样品总量：每个样品总量不少于 2 μ g；
4. 样品溶剂：溶解在 TE 或水中；
5. 样品运输：DNA 低温运输，在运输过程中请用 parafilm 将管口密封好，以防出现污染。

研究方向

全基因组关联分析

全基因组关联分析 (genome-wide association studies , GWAS) 是一种在全基因组水平上将大量样本的表型和基因型进行对照分析或相关性分析，从而对复杂性状进行基因定位的方法。数量性状 (Quantitative characters) 是指在一个群体内的各个体间表现为连续变异的性状，在一个群体内各个个体的差异一般呈连续的正态分布，难以在个体间明确地分组。目前，GWAS已经成为动植物数量性状位点 (quantitative trait locus , QTL) 精细定位的重要手段。随着越来越多的物种全基因组测序完成，GWAS将更广泛地应用于育种和进化领域。

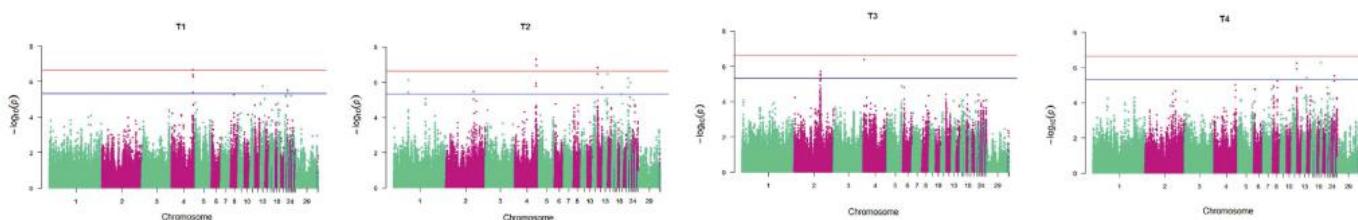
技术路线



案例解析

案例一 使用GWAS研究鸡攻击行为相关基因

攻击行为是很多物种共有的进化属性，它可以帮助雄性物种快速建立生存空间或社会主导地位。本文使用GWAS方法来探究攻击行为背后的遗传因素。研究共使用了265只雄性家鸡，在出生第60天时开始测量攻击性状，共4个，分别为T1：在记录期间（16天）内打斗的次数；T2：每天打斗的次数（超过4次则被记录）；T3：打斗的天数；T4：超过4次打斗的天数。基因分型工作由上海伯豪完成，使用了Affymetrix Axiom平台的高密度芯片，型号为600K Affymetrix Axiom HD chicken genotyping array，共生成了599,898个SNP位点。经过质控后，保留468,020个SNP用于GWAS分析。结果共得到33个显著位点，涉及26个基因。随后，作者对26个相关基因进行代谢通路分析，根据基因互作网络进一步得到9个基因，其中SORCS2基因与多个基因互作，可能具有重要功能。最后，研究在鸡成纤维细胞系DF-1中敲降了SORCS2基因的表达量，观察到上下游基因表达量也随之降低。此结果显示SORCS2基因可能会影响多巴胺通路的表达，从而影响到鸡的攻击行为程度。



T1-T4四个攻击行性状的Manhattan图；蓝和红色线分别表示 $P=4.6E-6$ 和 $P=2.3E-7$

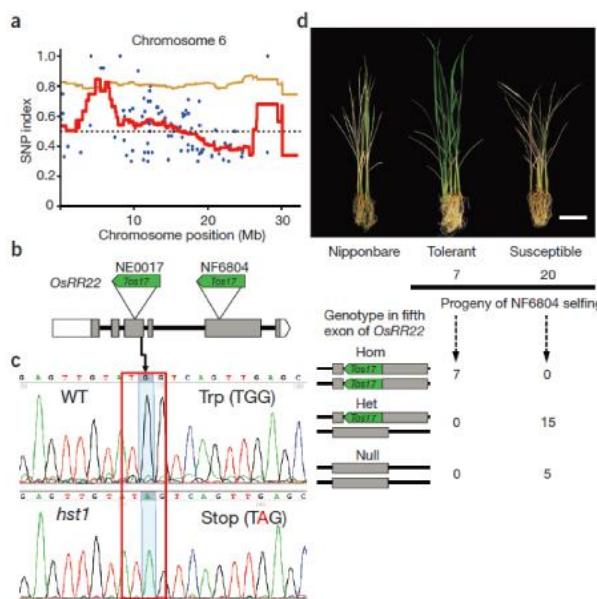
原文出处：

Li ZH, Zheng M, Abdalla A, et al. Genome-wide association study of aggressive behavior in chicken. Sci Rep. 2016.

案例解析

案例一 MutMap方法快速培育耐盐水稻品系Kaijin

在日本的Ryohei Terauchi团队提出MutMap方法两年后，他们成功使用该方法在两年之内快速培育出了一个耐盐水稻品系Kaijin并成功推广。



利用MutMap鉴定hst1的突变；a.SNP-index图，蓝色点为SNP-index数值，红色线为窗口（Sliding windows= 4Mb，步移10kb）SNP-index均值，橙色线为99%置信区间；b.OsRR22/HST1基因结构，绿色框为Tos17插入突变位置；c.Sanger测序验证突变位点导致提前终止；d.Tos17插入突变验证OsRR22的功能，不耐和耐盐分离比为3:1。

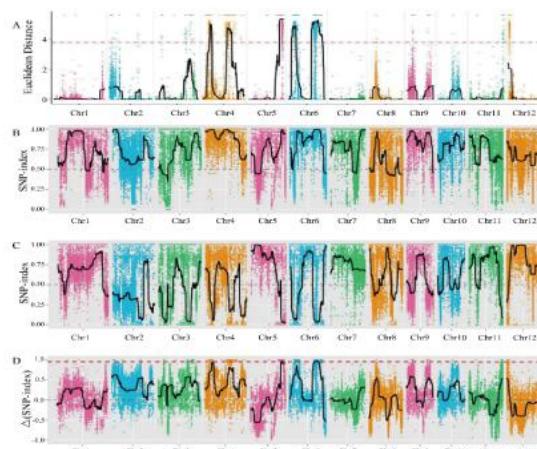
研究使用了6,000株EMS诱变过的水稻品系Hitomebore，经过7天的1.5%NaCl条件培养，选择出耐盐突变品系hst1。经过与已有耐盐品系比较，发现hst1具有更强的耐盐性，适合作为优良品系育种的亲本。接下来，hst1与野生型Hitomebore进行杂交并构建F2群体，经过0.75%NaCl处理，发现不耐盐和耐盐分离比符合3:1的关系。将耐盐F2子代20株进行混池测序，并与野生型亲本进行比较，得到1,005个突变位点。对这些突变位点进行SNP-index的计算，统计出显著偏离0.5的点，发现2个SNP-index=1的位点，其中一个导致OsRR22基因的第三外显子发生提前终止，另一个位于非编码区。最后，作者使用了水稻Tos17突变体库的OsRR22突变株验证了该突变结果确实将导致水稻耐盐，并通过回交亲本和Sanger测序验证培育出耐盐品系Kaijin。此项工作证明了MutMap方法在育种领域的高效性。

原文出处：

Takagi H, Tamiru M, Abe A, et al. MutMap accelerates breeding of a salt-tolerant rice cultivar. Nat Biotechnol. 2015, 33(5):445-9.

案例二 使用QTL-seq解析水稻耐冷遗传基础

研究者使用了水稻不耐冷（DN422）和耐冷（KY131）亲本杂交构建了RILs群体，依据冷水处理下种子可育率（PSST）为耐冷指标，挑选了具有极端表型的个体分别混为两个DNA池，进行建库，并进行全基因组重测序。通过群体间SNP频率的差异（SNP-index和欧式距离）来进行分析，获得6号染色体上3.68M的候选区域；结合QTL连锁定位结果，将候选区域缩小到1.81Mb，并进一步得到候选基因LOC_Os06g39750。表明QTL-seq结合传统QTL连锁定位方法可用于快速定位水稻数量性状。



在水稻RILs群体中用QTL-seq寻找耐冷位点。a.欧式距离分析法鉴定PSST的关联区域；b.不耐冷池的SNP-index图；c.耐冷池的SNP-index图；d. Δ (SNP-index)图。黑线表示拟合值，红色虚线表示关联阈值

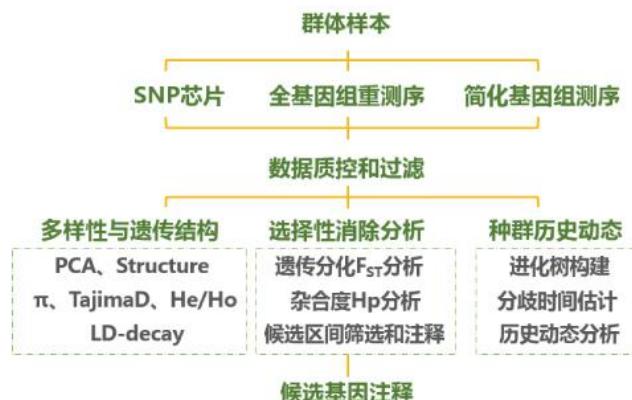
原文出处：

Sun J , Yang L , Wang J , et al. Identification of a cold-tolerant locus in rice (*Oryza sativa* L.) using bulked segregant analysis with a next-generation sequencing strategy[J]. Rice, 2018, 11(1):24.

群体进化与选择

群体进化是基于群体遗传学方法研究不同群体之间的结构、多样性和演化规律的一门学科。随着高通量分型技术的发展，群体遗传学研究已从使用单一或少数分子标记 转为使用基于全基因组的分子标记，如使用 SNP 芯片、全基因组重测序和简化基因组测序等技术得到的 SNP 标记。群体进化主要讨论以下几方面问题：(1) 群体间的进化关系、群体结构和遗传多样性；(2) 群体间的选择信号，通过遗传分化和选择性清除分析，筛选受到选择的基因，用以解释品种的驯化机制或种群的环境适应性进化；(3) 群体的历史动态变化，例如有效种群大小，基因流，群体分化时间等。

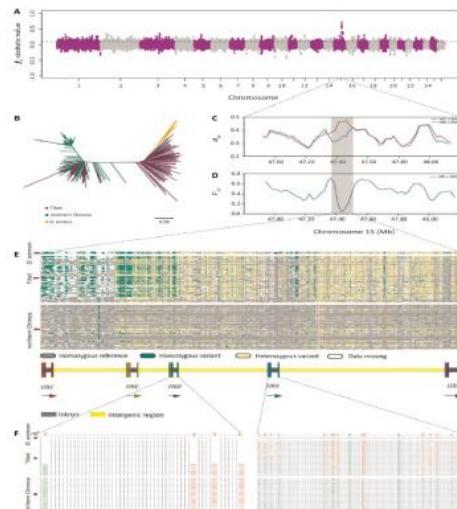
技术路线



案例解析

案例一 绵羊基因组学揭示了人类定居青藏高原的历史及西藏绵羊的适应性进化

研究组通过收集遍布青藏高原的986只西藏绵羊 (*Ovis aries*) 和4只野生盘羊 (*Ovis ammon*) 样本，利用绵羊全基因组基因芯片 (SNP50K Bead Chip, 620个样本) 分型、全基因组重测序 (186个样本, Illumina HiSeq X Ten 平台, 测序深度约 $6.5\times$)、线粒体和Y染色体遗传变异，并结合动植物考古遗迹进行综合分析。从西藏绵羊的父系、母系起源和分化以及基因组的群体遗传结构、群体历史动态变化和遗传选择效应等方面对西藏绵羊的进化历史进行了全面的解析。基于近似贝叶斯计算的群体历史动态模拟结果和考古遗迹统计分析发现在~3,100年前，绵羊同耐寒的麦类作物一起被史前人类带上青藏高原，形成西藏绵羊青海亚群；随后在~1,300年前，随着史前人类通过“唐蕃古道”持续稳定的迁徙并定居在青藏高原的腹地西藏地区，西藏绵羊青海亚群也扩散到西藏并分化形成西藏亚群。全基因组水平检测结果表明，野生盘羊的基因组成分渗入到西藏绵羊中，覆盖了其基因组的5.23%~5.79%。进一步对渗入区域分析发现西藏绵羊继承了盘羊的优势基因HBB，并且该基因在西藏绵羊中受到了强烈的正向选择；渗入的HBB基因在红细胞中O2/CO2交换通路中发挥重要调节作用，从而帮助西藏绵羊快速适应青藏高原的高海拔低氧环境。这与早期尼安德特人基因流渗入到藏人中并且帮助藏人快速适应高原环境的结果相一致。在渗入区域，还发现盘羊与西藏绵羊在RXFP2基因片段内具有相似的基因型模式，该基因与绵羊角形态相关。这可能与藏族人由于宗教（祭祀）对野生盘羊的螺旋型大角的偏好相关，也可能与西藏绵羊的长期野外开放式放牧方式，螺旋型大角有利于其生存竞争相关，从而该基因片段逐代在西藏绵羊中被固定下来。此外，本研究还检测到由于区域适应性和人工选择产生的不同生态类型的西藏绵羊，在基因组上留下的强烈选择信号和显著遗传印记。本项研究以西藏绵羊的基因组数据和考古遗迹统计为基础，阐述了全新世晚期史前人类分为两个阶段从平原地区通过黄土高原走向青藏高原腹地的过程，为早期人类定居青藏高原的历史和早期畜牧业的发展提供了新的见解。本研究还有助于我们深入理解西藏绵羊的进化历史和高原适应性机制。



野生盘羊向西藏绵羊导入HBB基因的鉴定；A. fd值在西藏绵羊基因组上的分布；B. 基于基因渗入区域SNP的165只绵羊（中国北方和西藏）和4只野生盘羊的Neighbor-Joining聚类；C和D.分别是序列分化系数(d_{xy})和群体分化系数(F_{ST})在15号染色体上基因渗入区域内的分布；HUS，低海拔的绵羊；GMA，西藏绵羊；E.基因渗入区域165只绵羊和4只野生盘羊的HBB基因的基因型；F. 165只绵羊和4只野生盘羊HBB基因的蛋白序列；绵羊参考基因组Oar v.4.0中21个非同义氨基酸标记为红色；与参考基因组相同或不同的氨基酸分别用绿色和粉色表示。

原文出处：

Hu X J, Yang J, Xie X L, et al. The Genome Landscape of Tibetan Sheep Reveals Adaptive Introgression from Argali and the History of Early Human Settlements on the Qinghai-Tibetan Plateau[J]. Molecular biology and evolution, 2018, 36(2): 283-303.

性状相关变异筛选

当研究基因组差异较小的多个个体时（例如动物家系中的患病和正常个体，动植物群体中的突变型和野生型等），可直接对这些个体进行全基因组重测序，直接比较 SNV、InDel、CNV 或 SV 信息，得到个体之间的基因组差异。通过对这些差异进行筛选（例如致病位点的共分离，突变型比野生型多出的变异等），最终可以获得少量的性状相关变异位点进入后续验证，来确定性状相关的变异。

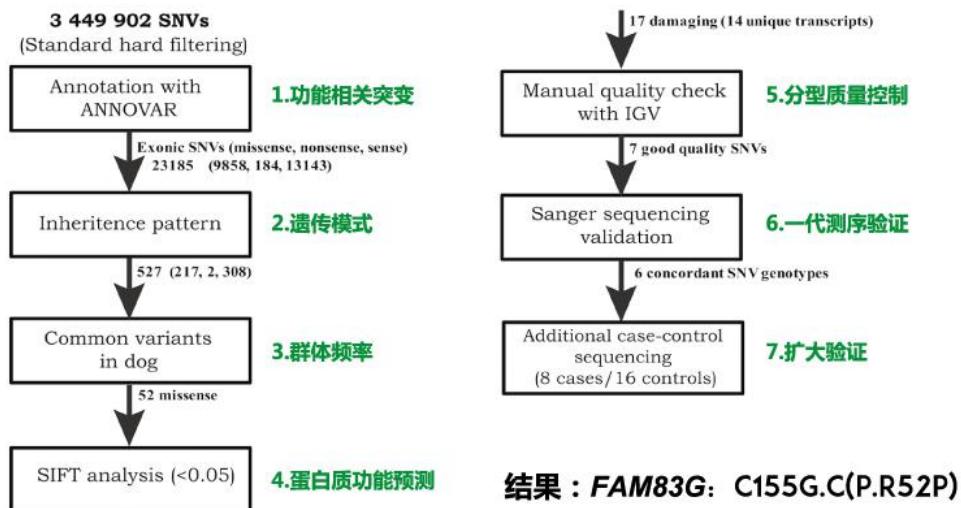
案例解析

案例一 全基因组测序定位狗足垫角质化隐性病遗传位点

此案例研究了一种称为足垫角质化的狗隐性遗传病，使用了患病狗和其亲本的核心家系（Trios）进行全基因组重测序，与狗的参考基因组进行比对，得到了大量的 SNVs 和 InDels 突变。接下来，通过 ANNOVAR 注释，进行致病位点筛选：

- (1) 筛选出可能导致蛋白功能变化的突变；
- (2) 符合携带者父母本为杂合，患病子代为纯合的突变；
- (3) 去除在狗的群体中为多态性的位点；
- (4) 选出蛋白功能预测为有害的突变；
- (5) 选出分型质量好的突变；
- (6) 经过一代测序验证的突变；
- (7) 在散发病例中扩大验证。

最终，将致病位点相关变异锁定在 *FAM83G* 基因上的一个突变上。



原文出处：

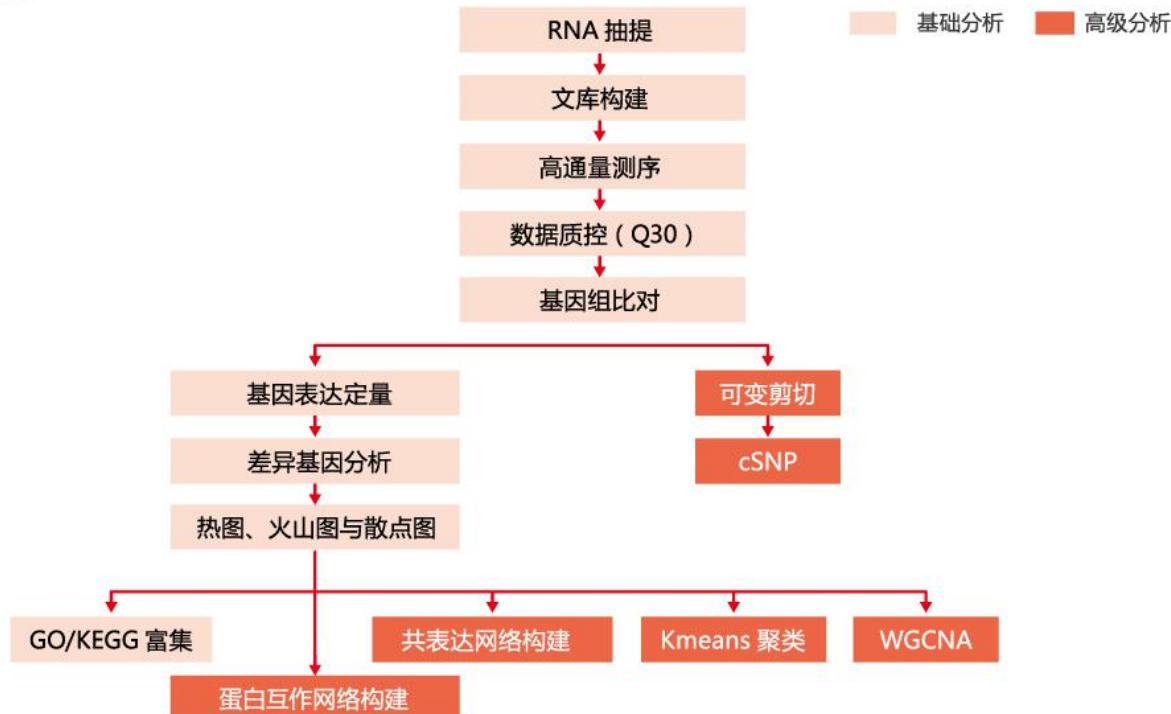
Sayyab S, Viluma A, Bergvall K, et al. Whole-Genome Sequencing of a Canine Family Trio Reveals a *FAM83G* Variant Associated with Hereditary Footpad Hyperkeratosis. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 2016, 6(3): 521-527.

转录组层面研究

植物 mRNA 测序

如果要对当今生物学研究技术做一个统计，那么 mRNA 测序绝对可以算是应用频率最高的几个技术之一。基于 Illumina HiSeq 平台的 mRNA 测序能够快速获得基因表达谱；基于测定的序列可以同时对 cSNP，可变剪接等转录本的序列及结构信息进行精确的分析；另外对于检测低丰度转录本和发现新转录本具有独特的优势。

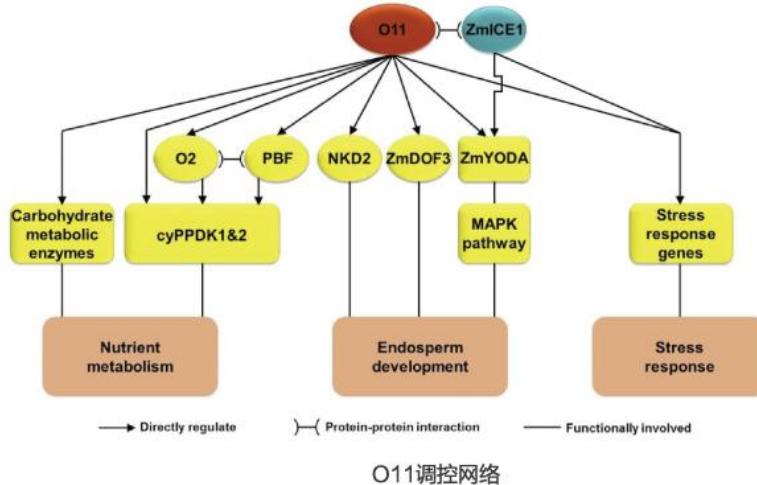
技术路线



案例解析

案例一 玉米胚乳发育和代谢的基因调控网络的研究

上海大学生科院宋任涛团队以玉米经典籽粒突变体 opaque11为研究对象，证实该突变同时影响了籽粒的发育和储藏物的积累。通过图位克隆，发现O11编码了胚乳特异的bHLH转录因子。通过转录组 (RNA-Seq) 与染色质免疫共沉淀 (ChIP-Seq) 分析，全面解析了O11的下游调控网络。发现O11不仅调控胚乳发育的关键转录因子（如NKD2和ZmDof3）；还直接调控了多个关键的储藏物代谢关键转录因子（如O2和PBF）。该研究还筛选和鉴定到多个与O11直接互作的蛋白，其中包括与冷胁迫应答相关的关键转录因子ZmICE1。研究发现，O11和ZmICE1协同调控冷胁迫应答相关的基因以及植物发育中重要信号开关ZmYODA。本研究发现，O11作为关键调控因子，协调了胚乳细胞发育、储藏物代谢和逆境响应等生物学过程，是胚乳整体基因调控网络的核心调控节点。相关研究成果发表在国际知名期刊The Plant Cell上。

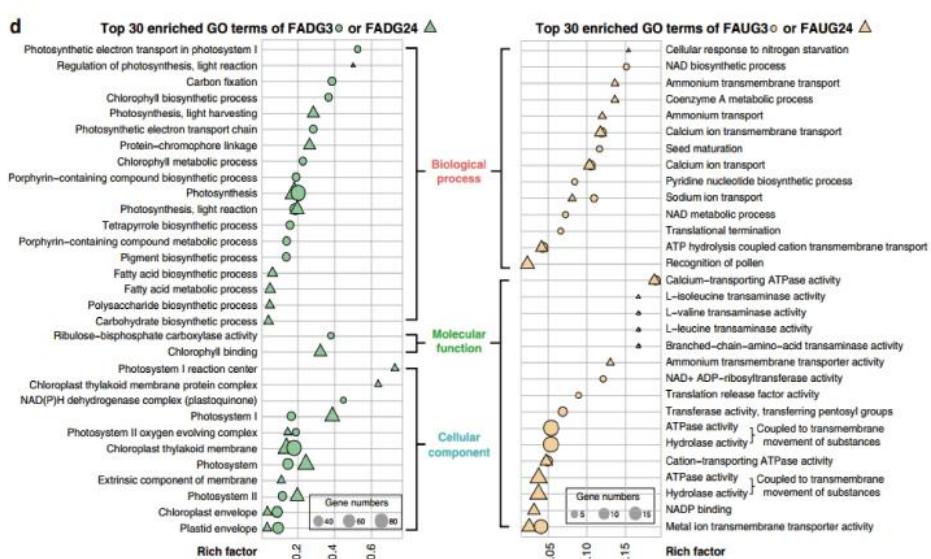


原文出处：

Fan Feng, Weiwei Qi, Yuanda Lv, et al. OPAQUE11 Is a Central Hub of the Regulatory Network for Maize Endosperm Development and Nutrient Metabolism. The Plant Cell. 2018, 30(2): 375–396.

案例二 小麦-禾谷镰刀菌以短肽介导的互作机制

中科院植生所唐威华教授团队与有机所刘文教授团队，近日在国际知名杂志《Nature Communication》上发表了禾谷镰刀菌侵染小麦的相关机制研究成果。文章指出禾谷镰刀菌的一个次级代谢产物合成基因簇fg3_54，可能编码了其毒力因子，fusaoctaxin A。对fg3_54进行敲除，禾谷镰刀菌的侵染能力大大减弱，外源添加fusaoctaxin A后，禾谷镰刀菌侵染能力得到恢复。为了确定小麦在病原菌入侵过程细胞水平的相关防御反应，作者进行了小麦转录组测序研究。实验设置了真菌产生fusaoctaxin A以及外源添加fusaoctaxin A的两种处理条件，确定了处理3h和24h后，小麦基因组中表达均受到抑制的基因，868和862个下调基因。通过GO富集分析发现，处理3h后，下调基因主要与叶绿体活性相关以及防御免疫反应相关通路相关。24h后，与微管活动相关、细胞壁生成活动受到抑制。其中，小麦转录组测序服务由伯豪生物提供。



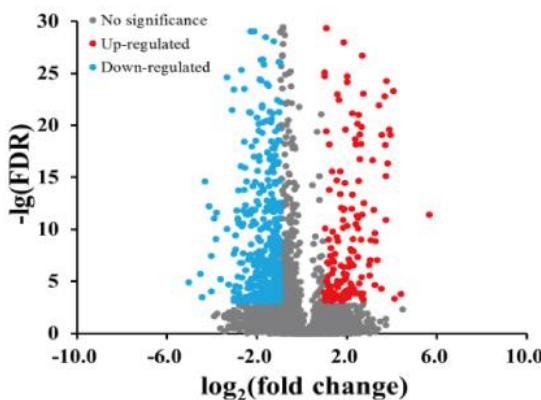
Fusaoctaxin A暴露后小麦转录组变化

原文出处：

Jia LJ, Tang HY, Wang WQ, et al. A linear nonribosomal octapeptide from *Fusarium graminearum* facilitates cell-to-cell invasion of wheat. *Nat Commun.* 2019;10(1):922.

案例三 吸水链霉菌5008 (*Streptomyces hygroscopicus* 5008) 高产量生产井岗霉素的研究

上海交通大学对吸水链霉菌5008 (*Streptomyces hygroscopicus* 5008) 高产量生产井岗霉素 (Validamycin) 的研究做出重要贡献。研究人员对吸水链霉菌的 γ -丁内酯 (GBL) 合成基因afsA与丁内酯受体基因arpA分别进行敲除和过表达改造。通过上海伯豪的Illumina Hiseq2500 mRNA测序服务对吸水链霉菌基因变化进行分析，从而开发得到了井岗霉素高产量的吸水链霉菌 (产量比改造前增加55%)，为吸水链霉菌生产井岗霉素的基因工程改造做出了重要贡献。



野生型5008 与 shbR1/R3 敲除株的转录组差异

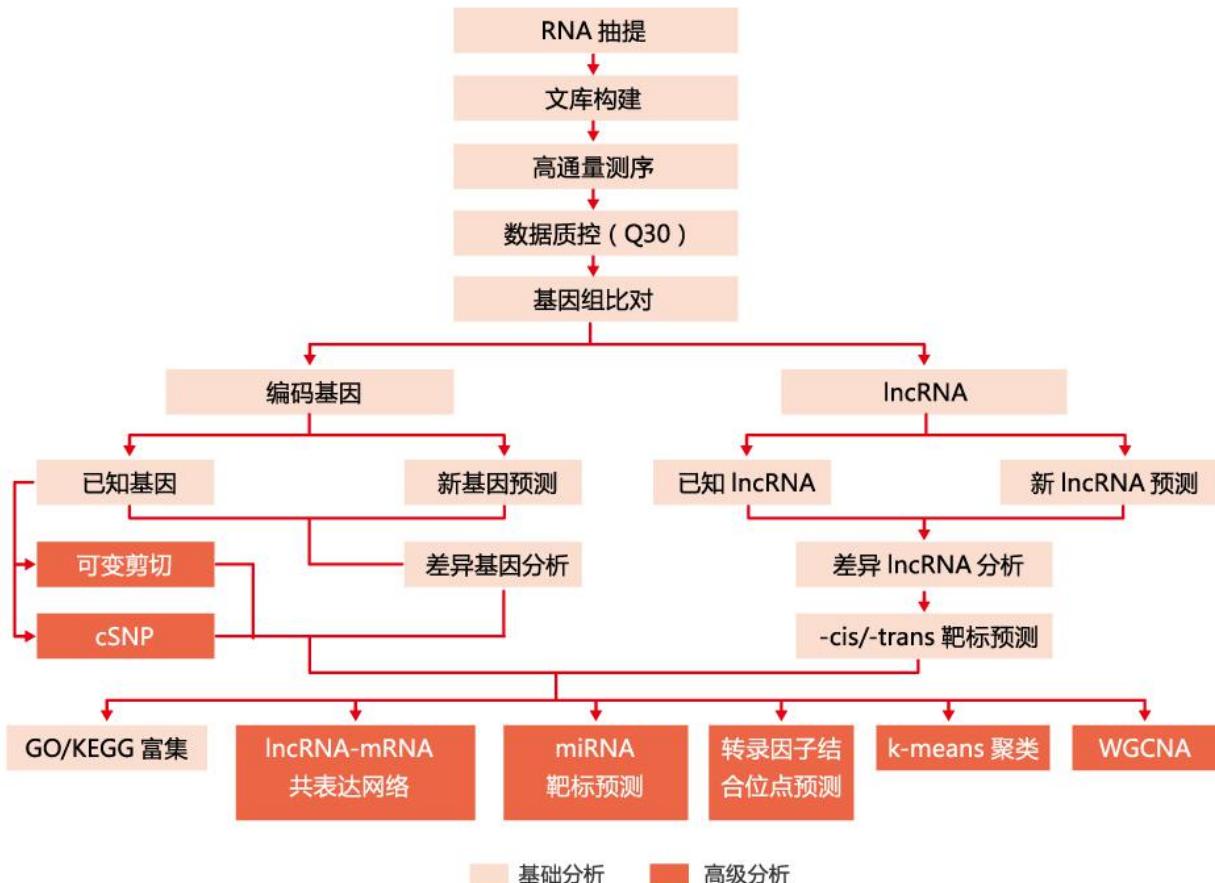
原文出处：

Tan GY, Peng Y, Lu C, et al. Engineering validamycin production by tandem deletion of γ -butyrolactone receptor genes in *Streptomyces hygroscopicus* 5008. *Metab Eng.* 2015, 28:74-81.

植物全转录组测序 /lncRNA 测序

转录组是特定物种、组织或细胞在特定生理状态下转录的所有 RNA 的集合，包括 mRNA 和 ncRNA，其中 lncRNA (long non-coding RNA , lncRNA) 是一类长度超过 200nt 的 ncRNA，通过多种方式在表观遗传、转录以及转录后水平发挥调控作用。全转录组测序在研究 mRNA 的同时，能够发现大量的 lncRNA，并对其表达水平和转录本结构进行分析。当进一步开展 lncRNA 与 mRNA 的关联分析时，就可以深入研究 lncRNA 的调控网络。

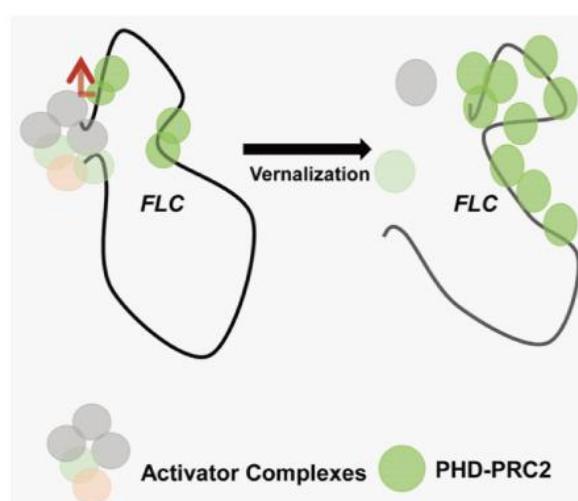
技术路线



案例解析

案例一 植物 lncRNA 分子机制研究扛鼎之作——PRC2 复合物在拟南芥发育中的作用

春化抑制因子 *FLOWERING LOCUS C* (*FLC*) 的沉默是春化发育过程中主要的影响因素之一。*FLC* 的沉默受到了在进化上保守的 *Polycomb Repression Complex 2* (*PRC2*) 复合物调控的。长链非编码 RNA (lncRNA) 在哺乳动物研究中广泛参与了 *PRC2* 复合物的生物学过程。拟南芥 (*Arabidopsis*) 中，一个名为 *COLDAIR* 的 lncRNA 通过结合 *PRC2* 的方式帮助 *PRC2* 维持在 *FLC* 染色体上的覆盖。*COLDAIR* 来源于 *FLC* 第一个内含子，在冷胁迫后大约第 20 天的表达达到高峰，在 *FLC* 基因座沉默后表达量下降到冷胁迫前的水平。包括启动子来源在内，已经在哺乳动物中鉴定到了多个 lncRNA 与 *PRC2* 相关。冷胁迫早期，*COLDWRAP* 招募 *PRC2* 到 *FLC* 第一个内含子附近。随后，*COLDWRAP* 帮助 *PRC2* 在 *FLC* 全基因座区域内广泛覆盖，导致 H3K27me3 在全基因座区域内出现。这个过程直到 *COLDAIR* 转录区域以及 *FLC* 启动子区域完整的染色体环形为止。



原文出处：

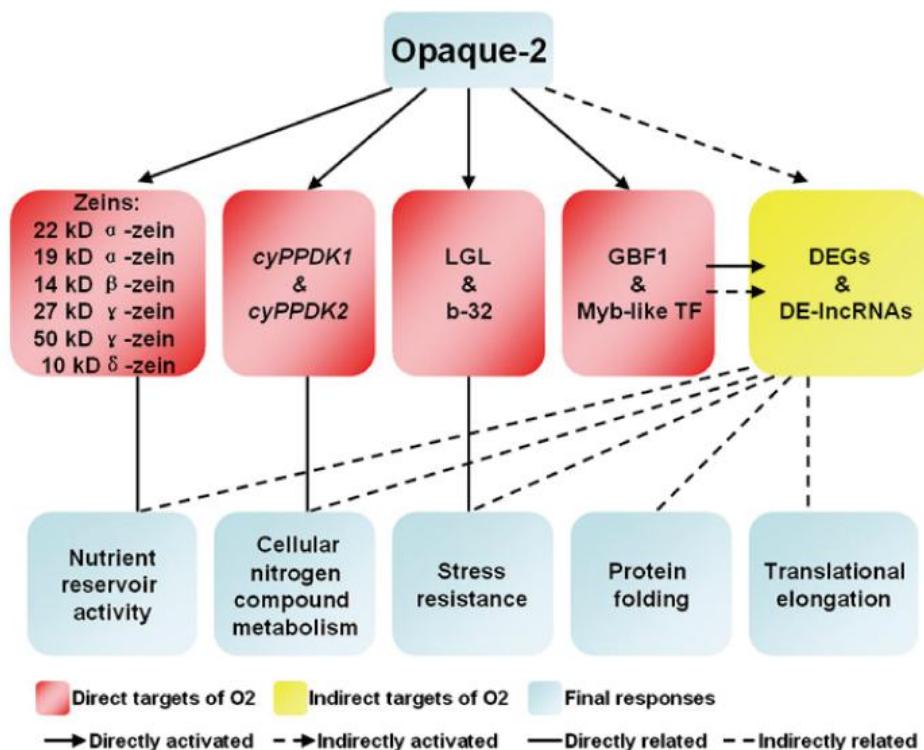
Kim DH, Sung S. Vernalization-triggered intragenic chromatin loop formation by long noncoding RNAs. Dev Cell.2017.

案例二 CHIP-Seq+全转录组测序——玉米籽粒重要转录因子下游靶标的筛选与功能分析

我们需要从植物种子中获得什么？这不是一个类似遗失很久的苏斯博士的书，而是一个严肃的农林方向的问题。确实，人工选择使得谷物的表型产生了大量的变化，以至于种子更多的存在于茎上，而不是埋藏在地下。考虑到种子在我们的日常饮食过程中的重要作用，农艺学家以及生物学家最近更多的开始关注于如何提高种子的营养价值。举例来说，玉米 (*Zea mays*) 种子主要包含了淀粉以及醇溶蛋白。醇溶蛋白是一类单子叶谷物类植物特有的营养储藏蛋白，分别由 α -， β -， γ -和 δ -类组成。根据生化分析，此类蛋白只含有微量的赖氨酸和色氨酸。

opaque2 (*o2*)突变体首先在1964年被人们在美国的一处农场中发现。*o2*突变体中玉米籽粒胚乳发生剧烈的变化，其胚乳相较于野生型而言呈现粉质状，且不透明，并且醇溶蛋白（尤其是 α 类醇溶蛋白）含量显著下降，与此同时，非醇溶蛋白含量显著上升，导致突变体籽粒中赖氨酸含量比野生型高约70%。然而，*O2*作为一个籽粒发育过程中重要的转录因子其下游的靶标，却还不为人所知。在此，研究人员通过玉米籽粒全转录组测序实验以及ChIP-seq对*O2*下游靶标进行筛选。

研究人员通过RNA-Seq一共鉴定到了大约1000个差异基因以及lncRNA。对这些基因以及lncRNA的靶标进行功能归类后发现，差异基因与lncRNA主要富集在抗逆以及营养代谢途径。通过自制的*O2*抗体对*O2*进行ChIP-seq实验结合全转录组测序结果发现，*O2*下游的调控因子包括醇溶蛋白，代谢酶以及转录因子等。



O2 调控网络示意图

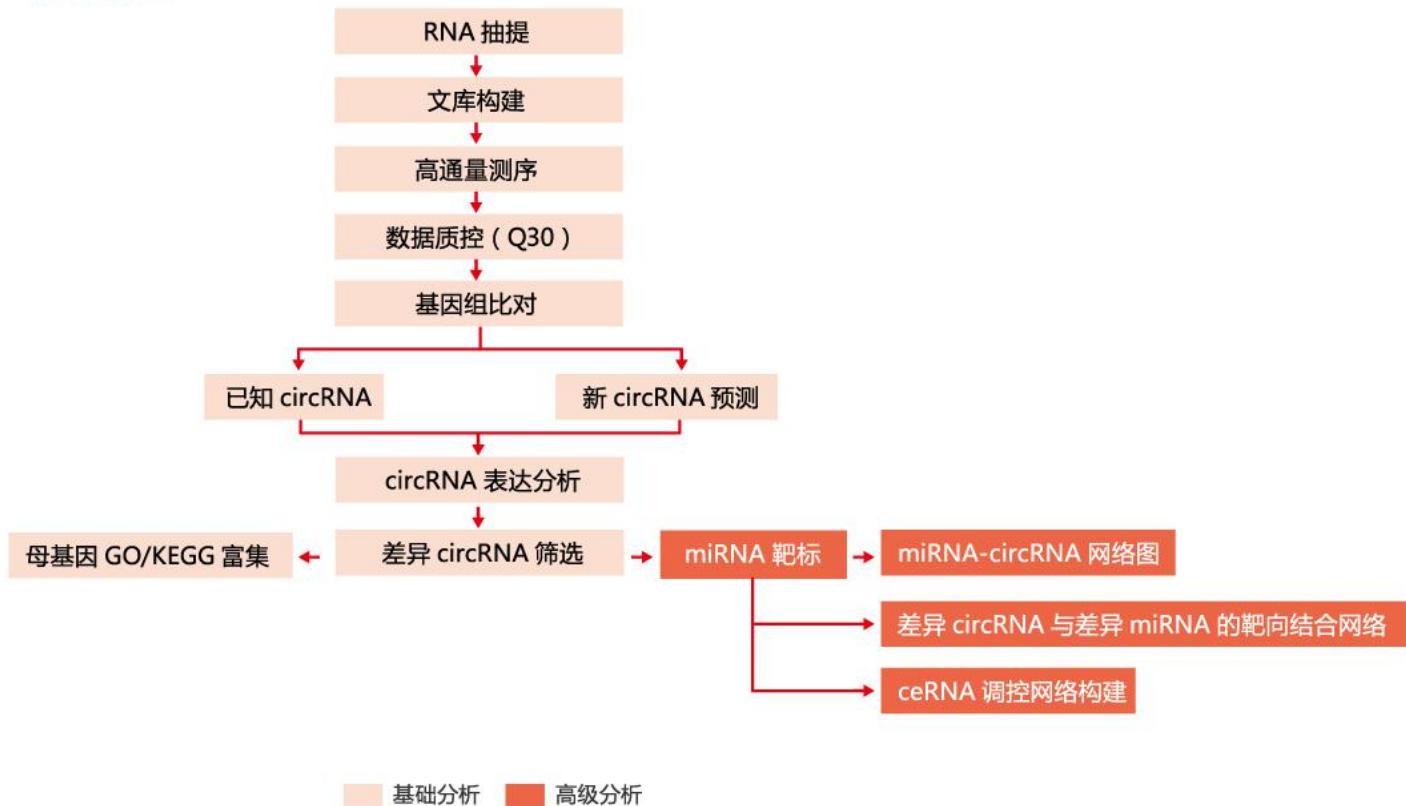
原文出处：

Li, C., Qiao, Z., Qi, W., et al. Genome-wide characterization of cis-acting dna targets reveals the transcriptional regulatory framework of *opaque2* in maize. *Plant Cell*, 2017, 27(3), 532-45.

circRNA 测序

环状 RNA (Circular RNA, circRNA) 是在转录过程中，通过可变剪接形成的一类首尾相连的环状 RNA 分子。高等生物中，circRNA 的种类和含量远远超过预期。最近的研究发现 circRNA 可以作为 miRNA 的海绵体，结合胞内 miRNA，阻断 miRNA 对其靶标基因的抑制作用。circRNA 也可与蛋白形成复合体调节下游的靶基因。另外，circRNA 的表达呈现出很强的组织特异性，也暗示了 circRNA 也具有重要的生物学功能。基于 Illumina HiSeq 平台的 circRNA 测序能够快速检测样本 circRNA 的种类并进行表达定量，结合生物信息学挖掘手段，研究 circRNA 的功能和调控机制。

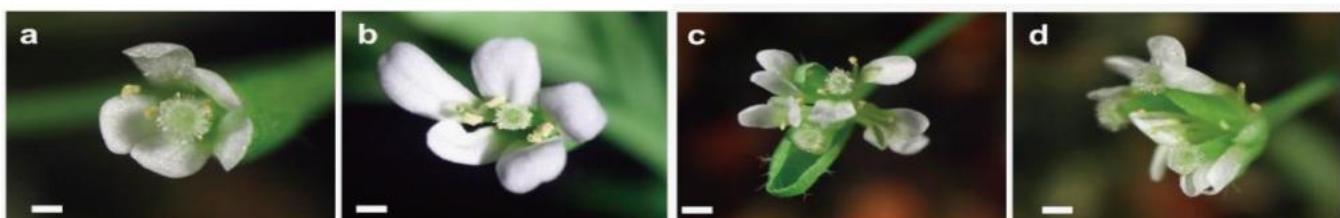
技术路线



案例解析

案例一 植物 circRNA 研究扛鼎之作：circRNA 与其母基因 mRNA 形成 R-loop 调控母基因剪切

2017年4月17日，Nature出版集团的 *Nature Plants* 杂志在线以 letters 的形式在线发表了法国格勒诺布尔阿尔卑斯大学的最新研究成果，详细论证了来源于植物特有的 MADS-box 转录因子 *SEPALLATA3* (*SEP3*) 的 circRNA 对母基因 mRNA 的调控分子机制。研究人员发现，*SEP3* 的第6个外显子形成的 circRNA 可以显著增加母基因跨越外显子的可变剪切 (cognate exon-skipped AS variant, *SEP3.3* 缺乏 exon 6) 程度，导致植物开花表型变化。并且研究人员发现，这个 circRNA 可以强烈结合其母基因的 DNA 基因座，形成一个 RNA:DNA 杂合体 (R-loop)。R-loop 的形成可以导致转录的中止，同时招募剪切因子引发对 *SEP3* 的可变剪切。这不仅是植物学研究中少数的 circRNA 分子机制研究的论文，同时也为人们对 circRNA 的认识提供了新的理解，首次将 circRNA 与个体器官的表型相结合。在植物学领域与医学领域都具有显著的生物学意义。



circRNA 被敲降后表型观察

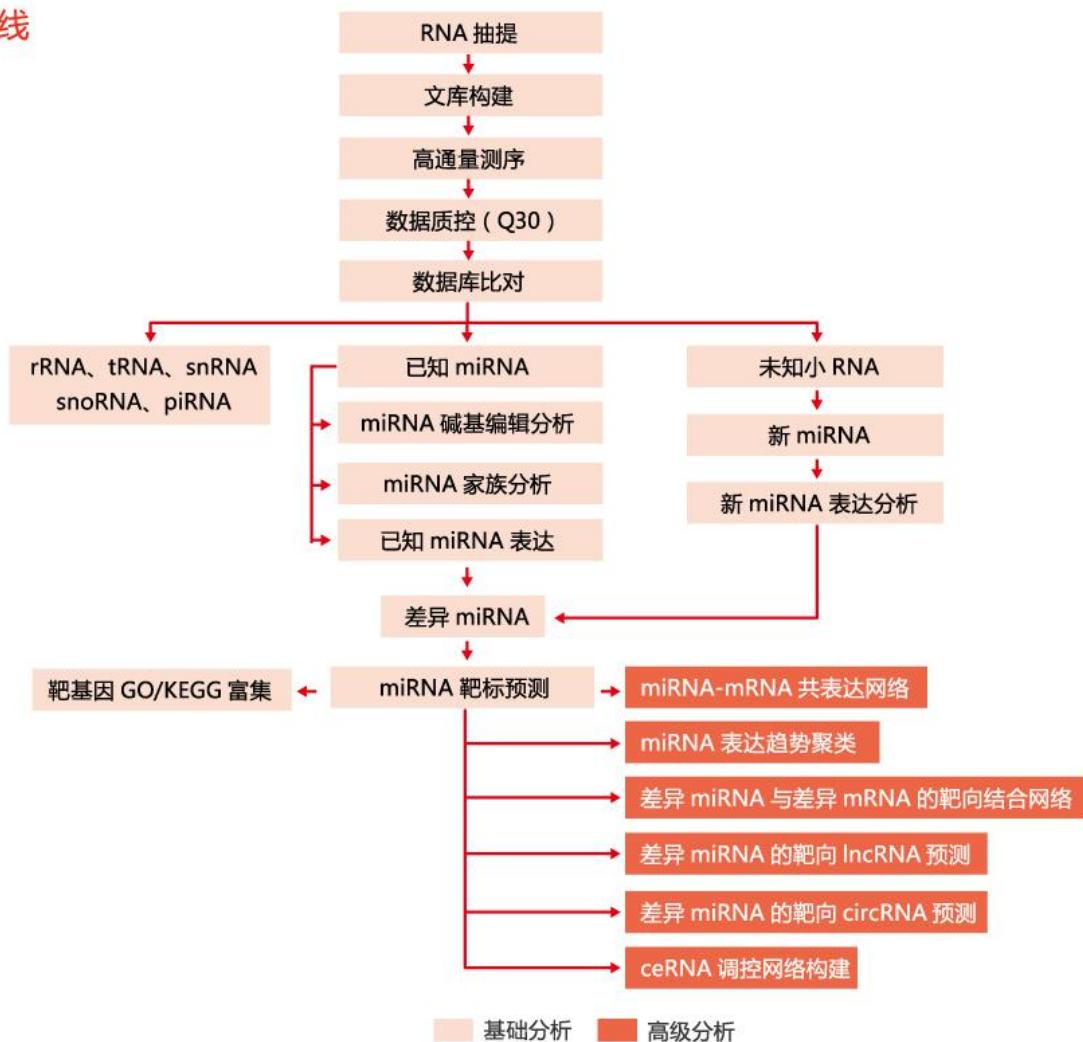
原文出处：

Conn VM, Hugouvieux V, Nayak A, et al. A circRNA from *SEPALLATA3* regulates splicing of its cognate mRNA through R-loop formation. *Nat Plants*. 2017, 3, 17053.

miRNA 测序

small RNA是指长度在18~30nt的内源性RNA，包括miRNA, siRNA和piRNA等。它们在mRNA的转录及转录后水平的调控中发挥重要作用，参与细胞生长、分化、代谢等各个生物学过程，对生物体的正常发育和疾病过程起着关键作用。small RNA测序是指基于高通量测序平台对目标样本的small RNA进行大规模检测，同时发现新的小RNA，结合生物信息学挖掘手段，研究small RNA的功能、结构和调控机制。

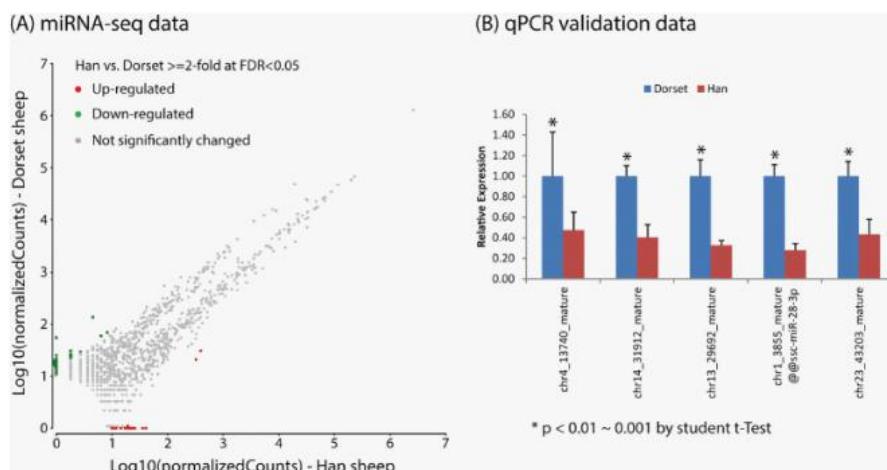
技术路线



案例解析

案例一 小尾寒羊和陶赛特羊脂肪组织 RNA 测序研究其形态差异

全基因组甲基化测序 (WGBS, Whole-genome bisulfite sequencing) 结合了亚硫酸氢盐转化方法与新一代高通量测序技术，可在单碱基分辨率水平上高效地检测全基因组DNA甲基化状态。亚硫酸氢盐处理可以使DNA中未发生甲基化的胞嘧啶脱氨基转变成尿嘧啶，而甲基化的胞嘧啶保持不变，PCR扩增所需片段，则尿嘧啶全部转化成胸腺嘧啶。对PCR产物进行高通量测序，与参考序列比对，即可判断CpG/CHG/CHH位点是否发生甲基化。



差异 miRNA 散点图及 qPCR 验证结果

原文出处：

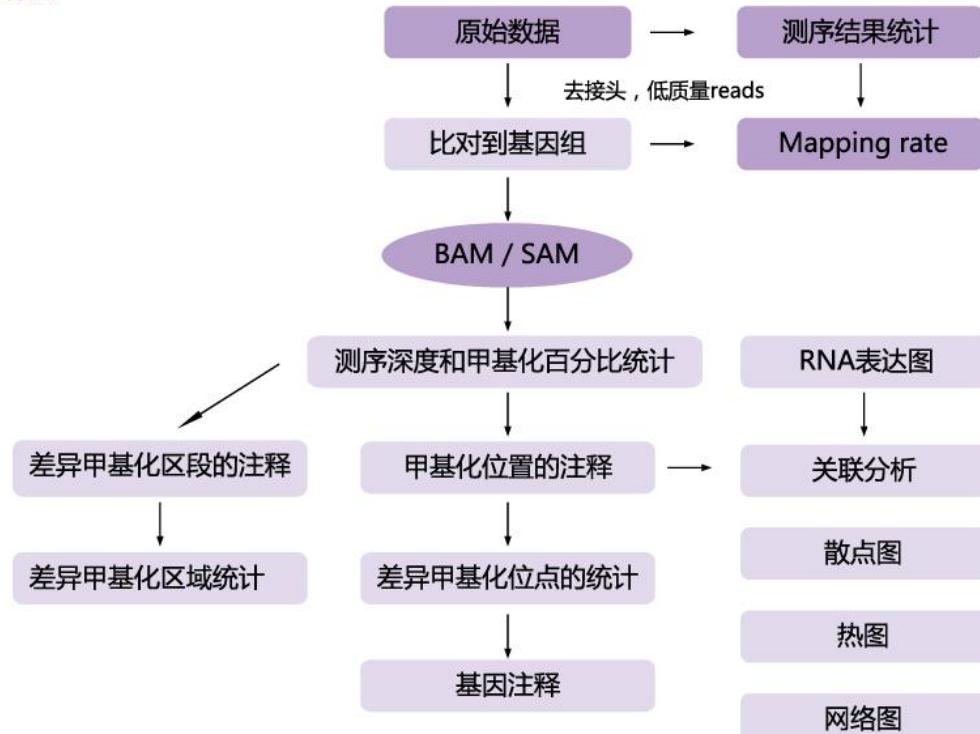
Miao X, Luo Q, Qin X, et al. Genome-wide analysis of microRNAs identifies the lipid metabolism pathway to be a defining factor in adipose tissue from different sheep. *Sci Rep*. 2015, 5:18470.

表观基因组层面研究

全基因组甲基化测序 (WGBS)

全基因组甲基化测序 (WGBS, Whole-genome bisulfite sequencing) 结合了亚硫酸氢盐转化方法与新一代高通量测序技术，可在单碱基分辨率水平上高效地检测全基因组DNA甲基化状态。亚硫酸氢盐处理可以使DNA中未发生甲基化的胞嘧啶脱氨基转变成尿嘧啶，而甲基化的胞嘧啶保持不变，PCR扩增所需片段，则尿嘧啶全部转化成胸腺嘧啶。对PCR产物进行高通量测序，与参考序列比对，即可判断CpG/CHG/CHH位点是否发生甲基化。

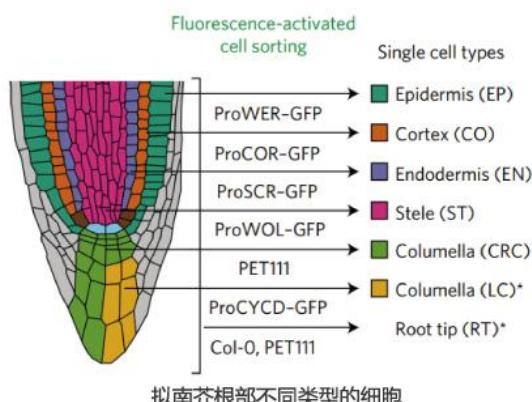
技术路线

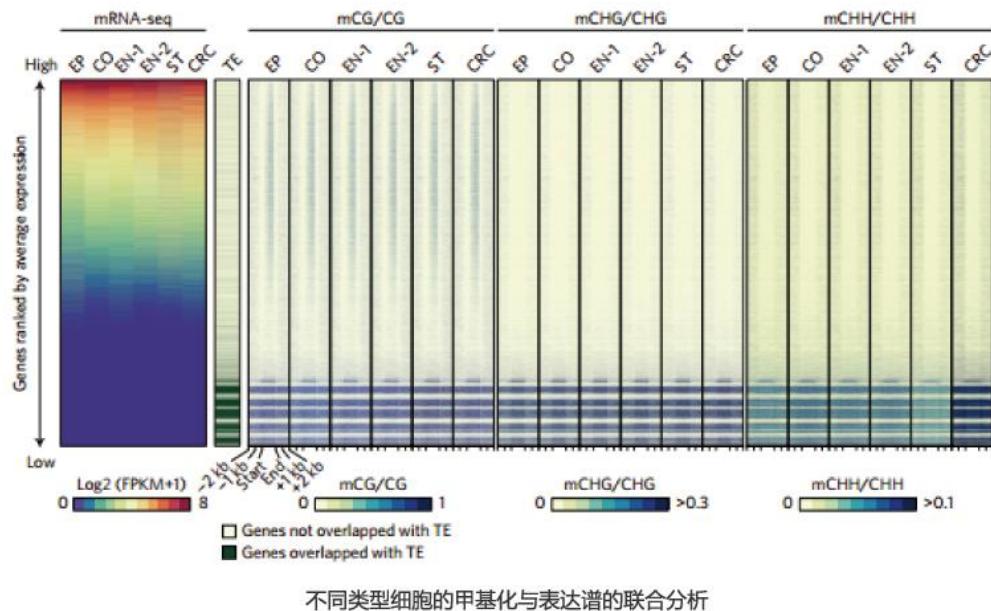


案例解析

案例一拟南芥根部组织的甲基化特征

DNA甲基化是植物器官和组织之间不同的表观遗传修饰，但细胞类型之间的变异程度尚不清楚。在这里，作者报告了覆盖拟南芥根分生组织的六个主要细胞群类型在单碱基分辨率全基因组DNA甲基化组，mRNA转录组和小RNA转录组。鉴定了细胞类型特异性的DNA甲基化模式，特别是在CHH背景下，其中H是A，C或T。小柱根冠的基因组是拟南芥细胞中迄今为止甲基化程度最高的细胞。它在转座子 (TEs) 中被高度甲基化，伴随着编码RNA指导的DNA甲基化 (RdDM) 途径组分和24-nt smRNA的转录物的丰度增加。缺乏核小体重塑器降低DDM1的水平，DDM1是维持DNA甲基化所需的，以及参与异染色质形成的组蛋白转录物丰度低表明中可能出现异染色质缺失，从而允许获得RdDM因子整个基因组，并在该组织中产生过量的24-nt smRNA。这些图提供了对不同植物体细胞类型之间存在的表观基因组多样性的新见解。





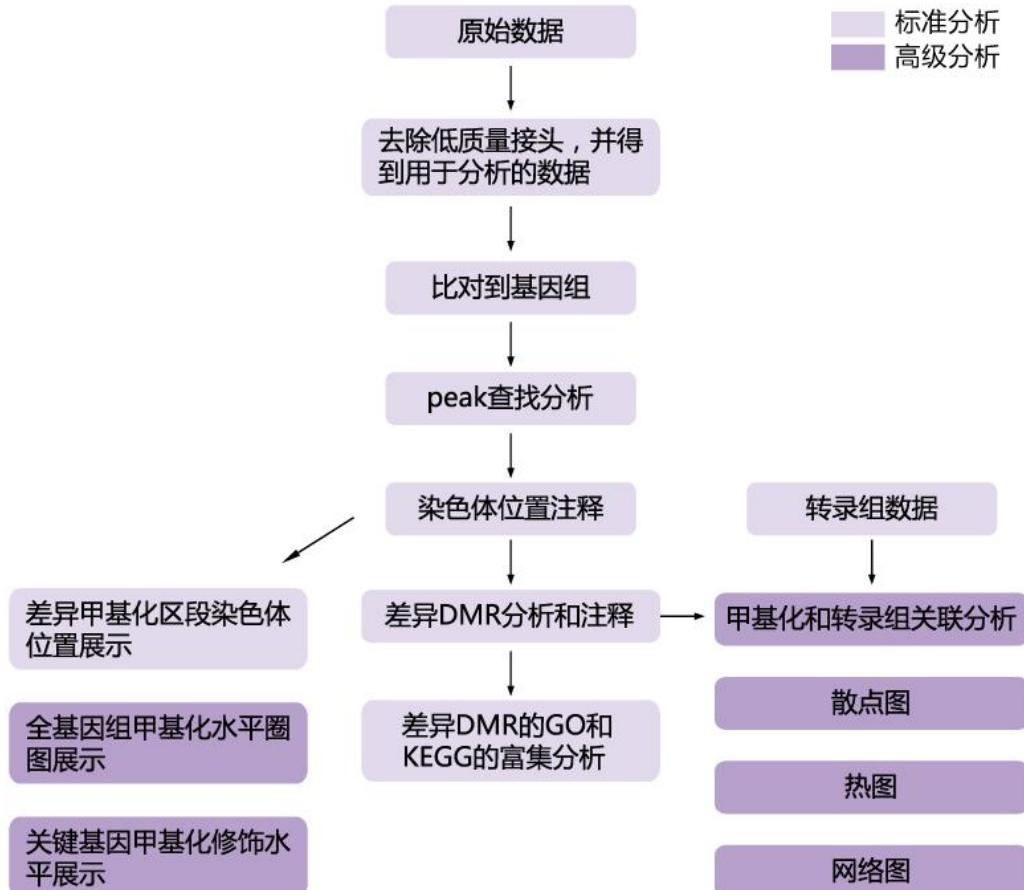
原文出处：

Kawakatsu T, Stuart T, Valdes M, et al. Unique cell-type-specific patterns of DNA methylation in the root meristem[J]. Nature plants, 2016, 2(5): 16058.

甲基化DNA免疫共沉淀测序 (MeDIP-seq)

MeDIP-Seq (Methylated DNA Immunoprecipitation Sequencing)，即甲基化DNA免疫共沉淀测序。先用5'-甲基胞嘧啶抗体富集胞嘧啶甲基化的基因组片段，然后对富集的片段进行高通量测序。该方法检测范围覆盖全基因组，所需测序数据量较少，但不能在单碱基分辨率水平上检测DNA胞嘧啶甲基化状态。

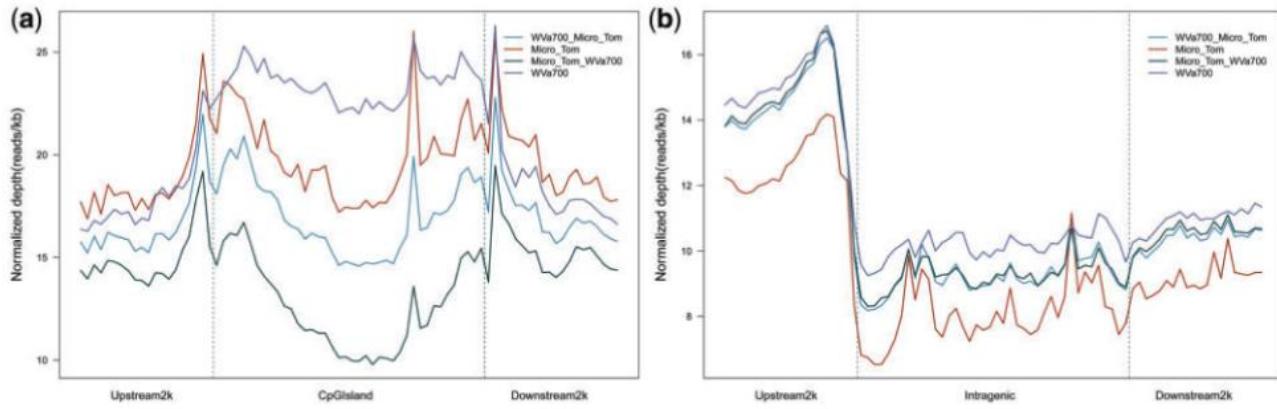
技术路线



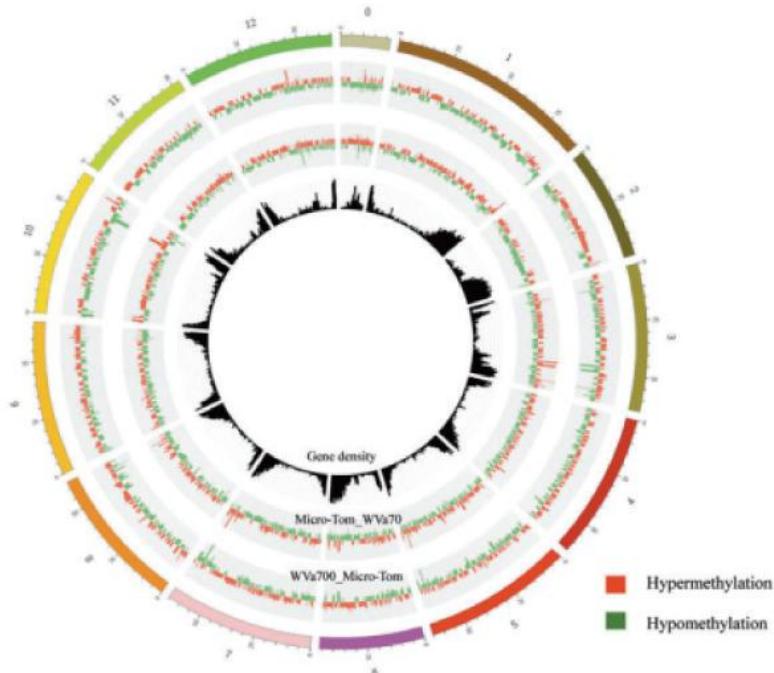
案例解析

案例一使用MeDIP-seq技术研究番茄、醋栗番茄和两者杂交后的番茄的甲基化差异模式

广泛杂交是提高作物产量和品质的一种常见而有效的育种策略。一个有趣的现象是，互交杂交种通常表现出不同的表型，其潜在机制还不清楚。在此，我们报告了通过甲基化DNA免疫沉淀测序，比较分析了番茄、粗粒番茄及其互交杂种的番茄的DNA甲基化模式。与亲本相比，相互杂交的CpG岛和LTR逆转录因子的DNA甲基化水平较低。重要的是，DNA甲基化模式的显著差异，主要在内含子和CDS区域之间。这些不同的甲基化区域被定位到79个基因，其中14个被选择用于分析基因表达水平。进一步的关联分析发现，与siRNAs相关的差异甲基化基因有15个，这些基因的甲基化水平与各自的siRNAs呈负相关。



在不同功能区域reads的分布统计



杂交样本的高低甲基化以圈图展示

原文出处：

Raza M A, Yu N, Wang D, et al. Differential DNA methylation and gene expression in reciprocal hybrids between Solanum lycopersicum and S. pimpinellifolium[J]. DNA Research, 2017, 24(6): 597-607.

微生物层面研究

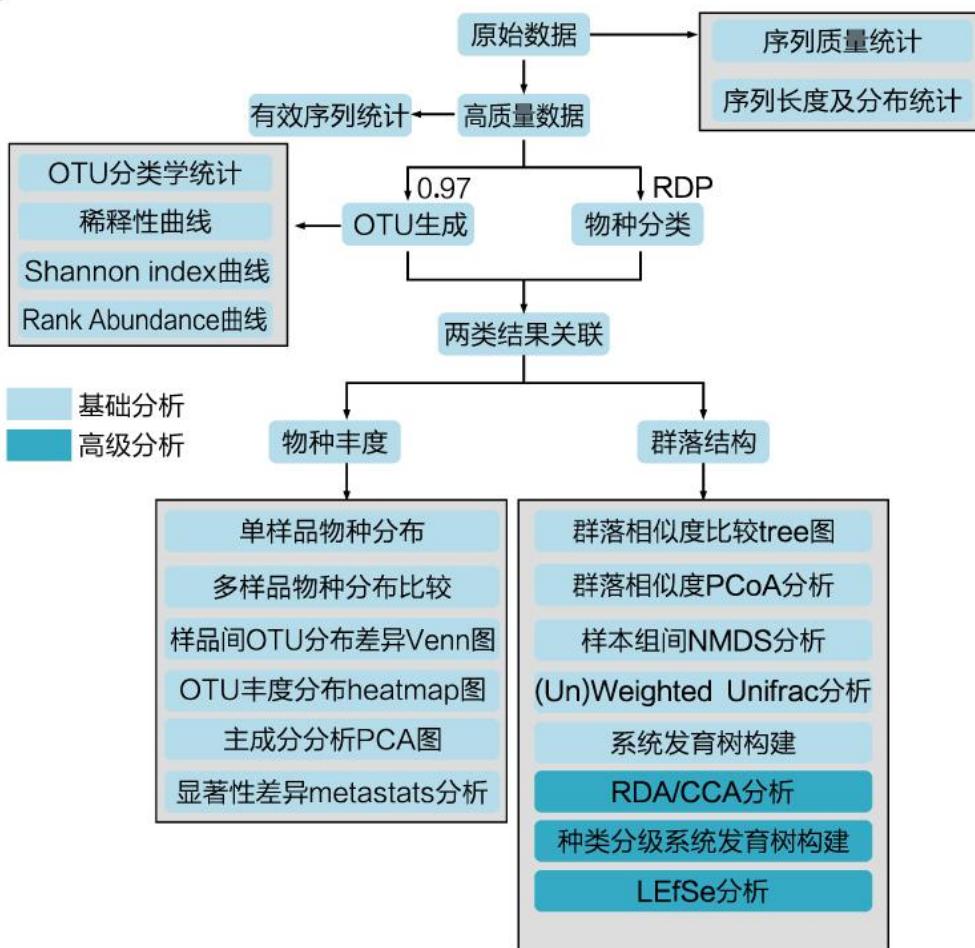
16S rDNA/18S rDNA/ITS 扩增子测序

16S rDNA 扩增子测序：16S rDNA 为原核生物中编码核糖体小亚基 rRNA 的 DNA 序列，具有 9 个高变区域 (V1-V9) 和 10 个保守区域，其中保守区反映细菌种属间亲缘关系，高变区反映了物种间的特异性，选择通用引物进行 PCR 扩增，进而通过新一代测序技术对 16S rDNA 的单个或多个高变区进行测序，来分析环境或者临床样本中古菌或细菌的群落结构多样性。

18S rDNA 扩增子测序：18S rDNA 真核生物中编码核糖体小亚基 rRNA 的 DNA 序列，具有可变区 (V1-V9，没有 V6 区) 和保守区。保守区反映生物物种间的亲缘关系，高变区反映物种间的差异。选择通用引物进行 PCR 扩增，进而通过新一代测序技术对 18S rDNA 的高变区（一般选择 V4 区）进行测序，来分析环境或者临床样本中真核生物群落结构多样性。

ITS 扩增子测序：ITS 分为两个区域：ITS1/ITS2，其中 ITS1 位于真核生物核糖体 rDNA 序列 18S 和 5.8S 之间，ITS2 位于真核生物核糖体 rDNA 序列 5.8S 和 28S 之间。通过新一代测序技术对 ITS1 或者 ITS2 进行测序，进一步做环境微生物中真菌多样性分析。

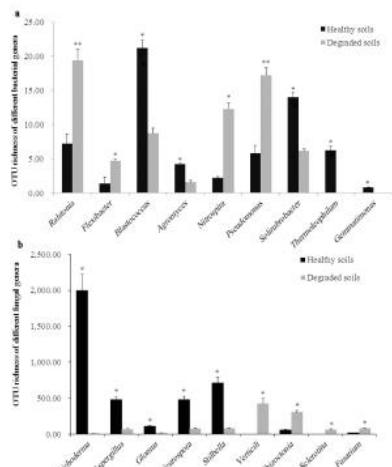
技术路线



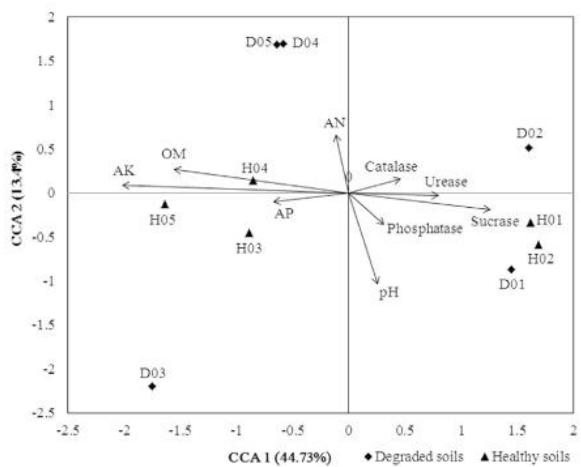
案例解析

案例一 退化土壤中微生物群落结构及功能的变化

土壤退化是一个极其严重的全球问题，长期连作和滥用化肥会造成土质变差。全球范围内，每年约有 40% 的农业土壤发生严重退化，24% 的土壤仍在持续恶化。在中国，农业化肥的滥用导致土壤退化，造成土壤养分失衡、土壤酸化、污染物积累和生物多样性下降等现象。但是关于土壤微生物群落对土壤退化及生态系统功能的反馈机制仍知之甚少。本文通过 16S/18S rDNA 多样性测序和基因芯片的方法研究退化土壤中微生物类群和功能基因的转变。研究发现了退化土壤微生物群落组成和结构发生改变，同时土壤 pH 值和酶活性发生降低。此外，为了应对土壤酸化及其他不利环境因素，退化土壤的应激反应、毒力、硫代谢相关基因显著增多，不利于有益微生物的生存。这些结果为我们更好地了解土壤微生物群落对土壤退化及生态系统功能的反馈机制提供了新的方向。



正常和退化土壤中微生物丰度的比较。(a)
细菌的比较结果 (b) 真菌的比较结果



正常和退化土壤中微生物组成与土壤化指标的关系

原文出处：

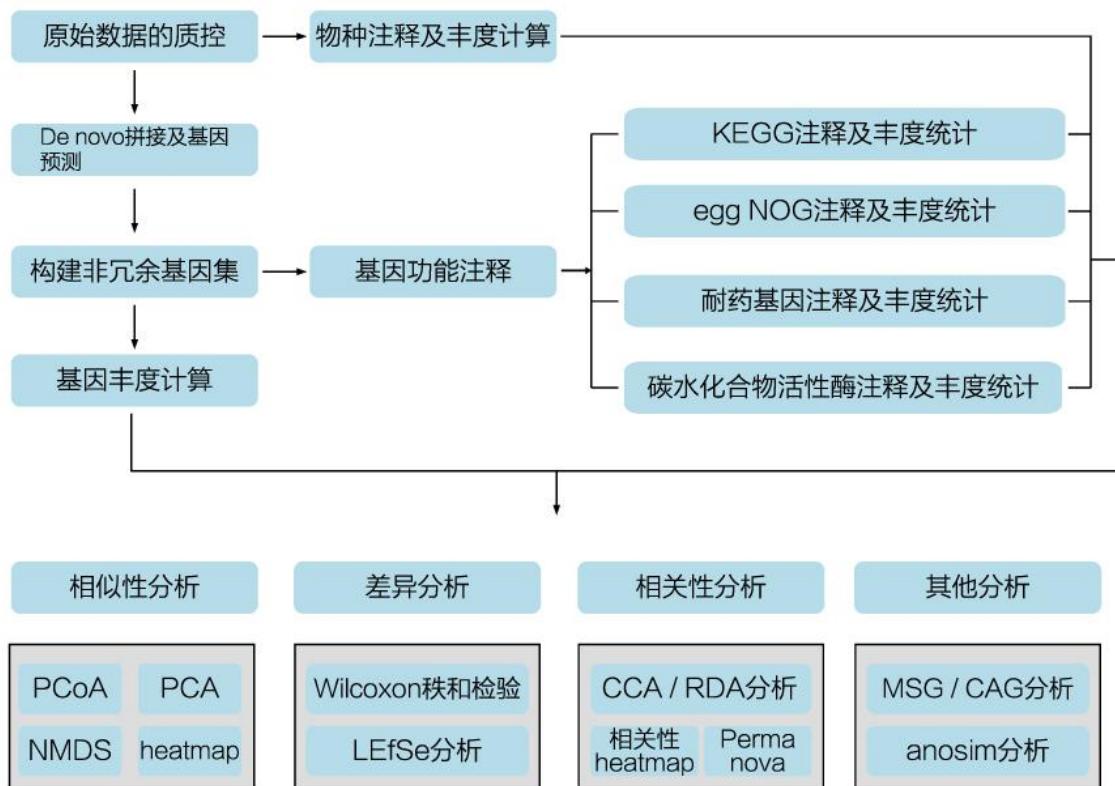
Zhang H, Wang R, Chen S, et al. Microbial taxa and functional genes shift in degraded soil with bacterial wilt. Sci Rep. 2017, 7.

宏基因组测序(元基因组测序)

宏基因组测序是对特定环境中的整个微生物群落的基因组信息进行检测，进而研究生境中微生物的群落结构、物种分类、进化关系、基因功能及微生物与生境之间的相互作用关系的一项测序技术。

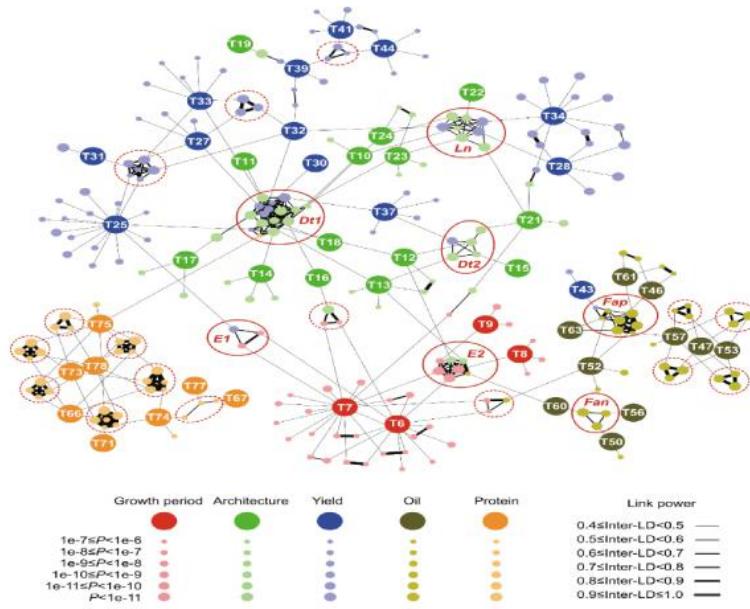
宏基因组测序不依赖传统的微生物分离纯化技术，直接提取生境样本中的总 DNA 进行测序，为鉴定低丰度的微生物群落和获得更多新基因等提供了新的途径。

技术路线



案例二 GWAS揭示大豆农艺性状的遗传网络

作物的产量、品质等大都是多基因控制的复杂性状，由于受到一因多效和遗传连锁累赘的影响，使某些性状在不同材料和育种后代中协同变化，呈现耦合性相关。解析复杂性状间耦合的遗传调控网络，明确关键调控单元，对分子设计育种具有重要意义。本研究对来自世界各地的809份材料利用HiSeq 2000和HiSeq 2500 平台进行重测序（平均深度约为8.3×），共得到10,415,168个SNP和1,033,071个 Indels (≤ 6 bp)。利用GWAS并结合新开发的上位性效应检测方法，对84个性状（多年多点表型）的调控位点进行了系统的全基因组扫描，共鉴定出245个显著性关联位点，并发现其中95个关联位点和其他位点存在上位性效应。一方面，这些关联位点很好地解析单个性状的遗传调控。例如，对于油含量相关性状，共鉴定到24个脂肪酸代谢相关和21个脂代谢相关的基因，它们分别参与了不同的重要酶促反应。深入分析发现这些基因是通过加性效应共同调控多个大豆油脂性状的形成。另一方面，这些关联位点揭示了不同性状间相互耦合的遗传基础。根据连锁不平衡分析，发现115个关联位点可相互连锁，并将所观测的51个性状联系起来，形成复杂的多性状多位点调控网络，该遗传调控网络很好地解释了不同性状间的耦合关系。研究还发现其中23个关联位点起到了重要作用，对不同性状的形成起到关键调控作用，并对其中部分位点在不同性状耦合中的作用进行了验证。



大豆不同性状间的遗传调控网络；节点表示性状及其对应的关联位点；不同性状关联位点之间的边由LD决定；涉及Dt1, Dt2, E1, E2, Ln, Fan和Fap的位点用实线圈表示，未知的位点用虚线圈表示

遗传图谱构建与 QTL 定位

遗传连锁图谱（Genetic linkage map）是以基因重组交换值为基础构建的遗传图谱，可表示分子标记之间的相对位置和距离。QTL连锁定位以遗传图谱的构建为基础，将QTL定位在遗传图谱的一个区间内。

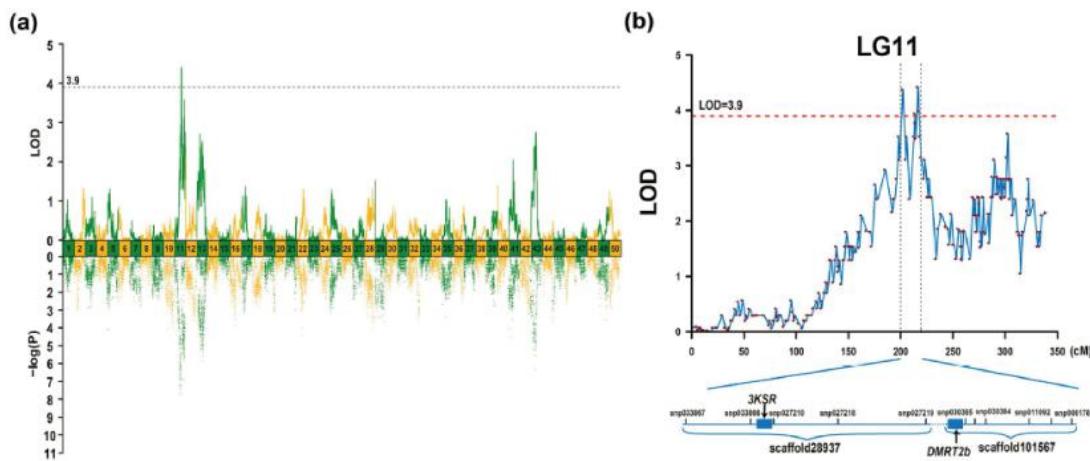
技术路线



案例解析

案例一 鲤鱼高密度遗传谱图构建和性别与生长相关性状的QTL定位

鲤鱼是重要的水产物种，其全基因组已于14年被测序完成，并开发出了高密度SNP芯片。本研究所用材料为黄河鲤全同胞F1家系的119条个体和2个亲本，使用了Affymetrix Axiom Carp 250K SNP芯片进行基因分型，得到了平均标记密度为0.38cM的高密度连锁图谱。利用这张图谱，作者对这个家系的生长相关性状（体重、体长、胴体重）和性别二态性进行了QTL定位，鉴定出了22个和7个性状相关的QTL，平均（中值）定位精度在1cM以内。研究还进行了基于家系的关联分析作为连锁分析的参考。根据定位结果，研究鉴定出了生长相关调控因子KISS2, IGF1, SMTLB, NPFFR1和CPE，以及性别二态性相关基因3KSR和DMRT2b。本研究显示黄河鲤高密度遗传连锁图谱为QTL精细定位和原位克隆提供了有力的帮助。



黄河鲤的QTL定位和关联分析；a. 横坐标为位点在50条染色体的位置，上图为连锁分析得到的LOD值，下图为关联分析得到的 $-\log(P)$ 值；b. 2个QTL区域分别包含3KSR和DMRT2B基因

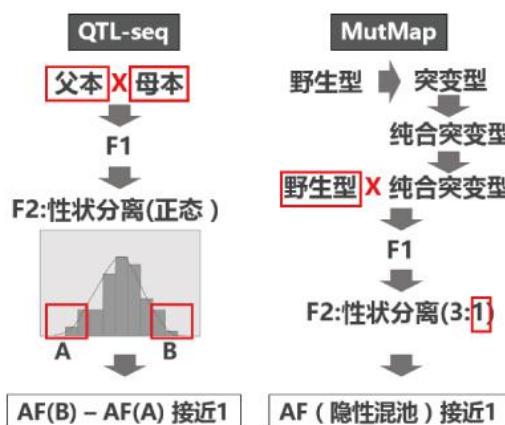
原文出处：

Peng W, Xu J, Zhang Y, et al. An ultra-high density linkage map and QTL mapping for sex and growth-related traits of common carp (*Cyprinus carpio*). *Sci Rep.* 2016, 6.

BSA 测序定位

在动植物性状定位研究中，将家系后代中具有极端相反性状的个体分为两组，以此寻找与性状呈现共分离的分子标记，实现性状定位的方法，称为混合分组分析法（Bulked Segregant Analysis, BSA）。在高通量测序普及的近十年内，BSA方法再次成为了性状定位研究的有力工具。在众多方法中，以 QTL-seq 和 MutMap 最为常用。QTL-seq 可用于应对自然发生的数量性状和质量性状；MutMap 是一种特定的应用，分析寻找的是 EMS 诱变导致的突变性状，而非自然产生的突变。

技术路线

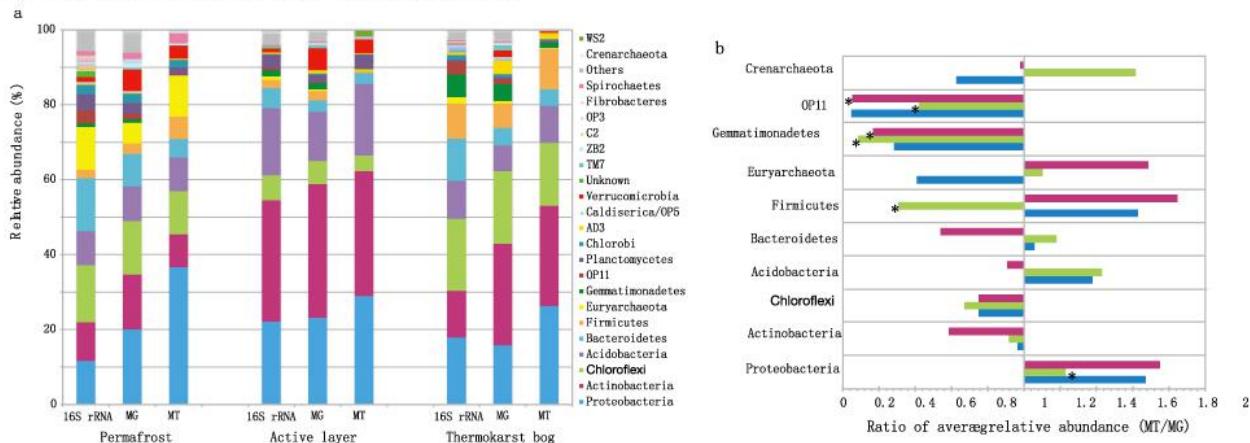


注：红色框内为测序样本

案例解析

案例一宏组学技术研究完整冻土，季节性解冻活跃层土壤和热岩溶沼泽中微生物的组成与功能

地球大约有 20% 的面积是永久冻土，其中蕴含了大量的碳，一旦融化，这些蕴含在土壤中的碳就会被微生物所转化，最终释放到大气层中。但是对土壤中活跃的微生物的了解却很少。美国科学家通过宏基因组测序和宏转录组测序的方法研究完整冻土，季节性解冻活跃层和热岩溶沼泽中微生物的组成，活跃程度以及潜在和活跃的功能。



物种组成及活性物种分析 (a) 16S rDNA 宏基因组 (MG) 和宏转录组 (MT) 分析物种组成 (b) 宏转录组和宏基因组的比值 (MT/MG) 分析 , MT/MG>1 , 说明该物种在特定的样本中比较活跃。

原文出处 :

Hultman J, Waldrop M P, Mackelprang R, et al. Multi-omics of permafrost, active layer and thermokarst bog soil microbiomes. Nature, 2015, 521(7551): 208-212.

伯豪客户农林研究高分文献

- Jia LJ, Tang HY, Wang WQ, et al. A linear nonribosomal octapeptide from *Fusarium graminearum* facilitates cell-to-cell invasion of wheat. *Nat Commun.* 2019;10(1):922. (IF=11.878) 使用服务种类 : RNA测序
- Wang G, Zhang J, Wang G, et al. Proline responding1 Plays a Critical Role in Regulating General Protein Synthesis and the Cell Cycle in Maize. *Plant Cell*, 2014, 26(6): 2582.(IF: 9.251) 使用服务种类 : RNA测序
- Qiao Z, Qi W, Wang Q, et al. ZmMADS47 Regulates Zein Gene Transcription through Interaction with Opaque2. *PLoS Genet*, 2016, 12(4): e1005991.(IF: 7.528) 使用服务种类 : RNA测序
- Chen J, Xie J, Chen B, et al. Genetic variations and miRNA–target interactions contribute to natural phenotypic variations in *Populus*. *New Phytol*, 2016, 212(1): 150.(IF: 7.21) 使用服务种类 : RNA测序
- Chen X, Feng F, Qi W, et al. Dek35 encodes a PPR protein that affects cis-splicing of mitochondrial nad4 intron 1 and seed development in maize. *Mol Plant*, 2016, 10(3).(IF: 7.142) 使用服务种类 : RNA测序
- Qi W, Zhu J, Wu Q, et al. Maize rea1 mutant stimulates ribosome use efficiency and triggers distinct transcriptional and translational responses. *Plant Physiol*, 2016, 170(2): 971.(IF: 6.841) 使用服务种类 : RNA测序
- Cui L G, Shan J X, Shi M, et al. The miR156-SPL9-DFR pathway coordinates the relationship between development and abiotic stress tolerance in plants. *Plant J*, 2014, 80(6): 1108-1117.(IF: 6.815) 使用服务种类 : Others
- Du J, Wang S, He C, et al. Identification of regulatory networks and hub genes controlling soybean seed set and size using RNA sequencing analysis. *J Exp Bot*, 2017, 68(8): 1955.(IF: 5.677) 使用服务种类 : RNA测序
- Wu L, Luo P, Di D W, et al. Forward genetic screen for auxin-deficient mutants by cytokinin. *Sci Rep*, 2015, 5: 11923.(IF: 5.578) 使用服务种类 : DNA重测序
- Xia Z, Zhao Z, Chen L, et al. Synergistic infection of two viruses MCMV and SCMV increases the accumulations of both MCMV and MCMV-derived siRNAs in maize. *Sci Rep*, 2016, 6: 20520.(IF: 5.578) 使用服务种类 : miRNA 测序
- Tian J, Song Y, Du Q, et al. Population genomic analysis of gibberellin-responsive long non-coding RNAs in *Populus*. *J Exp Bot*, 2016, 67(8): 2467.(IF: 5.526) 使用服务种类 : RNA测序
- Di D W, Wu L, Zhang L, et al. Functional roles of *Arabidopsis CKRC2/YUCCA8* gene and the involvement of PIF4 in the regulation of auxin biosynthesis by cytokinin. *Sci Rep*, 2016, 6(6): 36866.(IF: 5.228) 使用服务种类 : DNA 测序
- Zhang H, Miao H, Li C, et al. Ultra-dense SNP genetic map construction and identification of SiDt gene controlling the determinate growth habit in *Sesamum indicum* L. *Sci Rep*, 2016, 6: 31556.(IF: 5.228) 使用服务种类 : DNA测序

14. Zhao Q, Kang Y, Wang H Y, et al. Expression profiling and functional characterization of miR-192 throughout sheep skeletal muscle development. *Sci Rep*, 2016, 6: 30281.(IF: 5.228) 使用服务种类 : miRNA测序
15. Zhang H, Wang R, Chen S, et al. Microbial taxa and functional genes shift in degraded soil with bacterial wilt. *Sci Rep*. 2017, 7. (IF: 5.228) 使用服务种类 : 16S/18S rDNA测序
16. Sun X, Li M, Sun Y, et al. The developmental transcriptome sequencing of bovine skeletal muscle reveals a long noncoding RNA, IncMD, promotes muscle differentiation by sponging miR-125b. *Biochim Biophys Acta*, 2016, 1863(11): 2835.(IF: 5.128) 使用服务种类 : RNA测序
17. Liu J, Li Z, Xu L, et al. Analysis of copy number variations in the sheep genome using 50K SNP BeadChip array. *BMC Genomics*, 2013, 14(1): 229.(IF: 4.397) 使用服务种类 : Illumina OvineSNP50 Genotyping BeadChip服务

附：样品准备与运送

由于植物材料较为复杂，不同组织内代谢产物差异巨大，样本准备不可一概而论。在此，我们按照经验，将样本准备分为普通组织（如叶片等）以及多糖多酚类组织（如马铃薯块茎以及单子叶植物籽粒等）。

普通组织

取材新鲜组织，剪切成小块，立即用准备好的铝箔包裹组织，并在铝板上标记样本名称，在液氮中速冻之后转移至 -80°C 冰箱冻存或长期放置于液氮中，干冰运输。不建议使用 RNAlater® 组织 RNA 保护试剂保存植物组织样品。不建议将植物组织样品溶于 TRIzol® 试剂中保存运输。

普通组织 RNA 提取较为简单，在此不作详细介绍。RNA 抽提过程中使用的离心管与枪头必须彻底去除 RNA 酶。RNA 酶可以通过 0.1% DEPC 水浸泡 24 小时以上，并且 180°C 处理 8 小时以上完全去除，也可以通过氯仿浸泡 30 分钟以上部分去除（原则上不推荐使用该方法）。值得注意的是，乙醇只能起到杀菌以及除污垢的作用，对去除 RNA 酶基本没有任何显著作用。实验过程中，需要佩戴一次性口罩以及手套避免污染 RNA 酶（离心机无需去除 RNA 酶）。RNA 抽提完毕后，需要立即分装小管并且 -80°C 冻存。

多糖多酚类组织

取材新鲜组织，剪切成小块，立即用准备好的铝箔包裹组织，并在铝板上标记样本名称，在液氮中速冻之后转移至 -80°C 冰箱冻存或长期放置于液氮中，干冰运输。不建议使用 RNAlater® 组织 RNA 保护试剂保存植物组织样品。不建议将植物组织样品溶于 TRIzol® 试剂中保存运输。

RNA 抽提推荐使用多糖多酚样本的试剂盒。具体操作流程参照试剂盒使用说明书。针对那些不使用试剂盒的抽提而言，为了充分去除次级代谢产物，可以通过在裂解细胞前加入 1mL 石油醚以及离心来达到该目的（石油醚去油脂，离心去淀粉与蛋白质）。其他注意事项与普通组织抽提一致。

土壤样品

取样和保存：取土壤表层样品（0-20 cm），每个样品由 3 个采样点采集并混合，风干后，过 1 mm 孔径筛除去石块和植物残根等杂物，放入无菌封口袋中，4°C，并马上进行 DNA 抽提。如短期保存，DNA 可置于 -20°C 保存，如长期保存建议置于 -80°C 存放。如无法进行 DNA 抽提，请尽快将样本置于液氮中冷冻 4 h 以上，再转移至 -80°C 保存。注意样本在保存期间避免反复冻融。

如采集根际土壤，拔取根部的大块松散土壤，用已消毒的软毛刷刷下附着在植物根际的土壤，放入无菌封口袋中。

取样量：≥3 g/ 样本，污染土壤的取样量：≥ 5 g/ 样本

建议：每个样本进行分装，每个管子 1 g。

抽提试剂盒推荐：FastDNA Spin Kit for Soil

水体样品

取样和保存：使用采水器采集水样（建议 1-2 L），置于 4°C，并立即用无菌的 0.22 μm 醋酸纤维滤膜抽滤水样（若水体浑浊，可使用无菌的大孔膜过滤后再使用 0.22 μm 滤膜）取出滤膜后马上进行样品 DNA 抽提。如短期保存，DNA 可置于 -20°C 保存，如长期保存建议置于 -80°C 存放。如无法进行 DNA 抽提，请尽快将样本置于液氮中冷冻 4 h 以上，再转移至 -80°C 保存。注意样本在保存期间避免反复冻融。

建议：每个样本要额外备份一份。

抽提试剂盒推荐：PowerWater® DNA Isolation Kit



服务科技创新，护航人类健康！

咨询热线:800-820-5086/400-880-5086

电话:021-58955370

网址:www.shbio.com

邮箱:market@shbio.com

地址:上海张江高科技园李冰路151号