

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2025 年 1 月 2 日 (02.01.2025)



(10) 国际公布号
WO 2025/001891 A1

- (51) 国际专利分类号:
C12Q 1/6895 (2018.01) *C12N 15/11* (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2024/099474
- (22) 国际申请日: 2024 年 6 月 17 日 (17.06.2024)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
202310765880.0 2023年6月27日 (27.06.2023) CN
- (71) 申请人: 浙江大学 (ZHEJIANG UNIVERSITY) [CN/
CN]; 中国浙江省杭州市西湖区余杭塘路
866号, Zhejiang 310058 (CN)。
- (72) 发明人: 司占峰 (SI, Zhanfeng); 中国浙江省杭州市
西湖区余杭塘路 866 号, Zhejiang 310058 (CN)。

胡艳 (HU, Yan); 中国浙江省杭州市西湖区余
杭塘路 866 号, Zhejiang 310058 (CN)。张天真
(ZHANG, Tianzhen); 中国浙江省杭州市西湖区
余杭塘路 866 号, Zhejiang 310058 (CN)。方磊
(FANG, Lei); 中国浙江省杭州市西湖区余杭塘
路 866 号, Zhejiang 310058 (CN)。韩泽刚 (HAN,
Zegang); 中国浙江省杭州市西湖区余杭塘
路 866 号, Zhejiang 310058 (CN)。

- (74) 代理人: 杭州求是专利事务所有限公司
(HANGZHOU QIUSHI PATENT OFFICE CO.,LTD.);
中国浙江省杭州市西湖区古墩路 701 号绿城紫
金广场 B 座 1103 室, Zhejiang 310014 (CN)。
- (81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家
保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG,
BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU,

(54) **Title:** GOSSYPIMUM HIRSUTUM LOW-DENSITY LIQUID PHASE CHIP BASED ON TARGETED CAPTURE SE-
QUENCING AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 一种基于靶向捕获测序的陆地棉低密度液相芯片及其应用

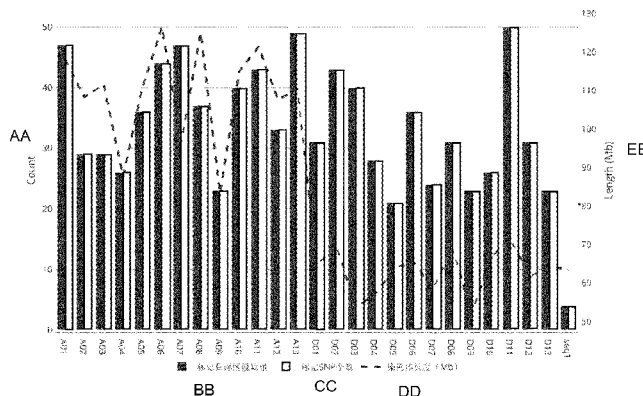


图 1

AA Count
BB Number of labeled target segments
CC Number of labeled SNPs
DD Chromosome length (Mb)
EE Length (Mb)

(57) **Abstract:** Disclosed are a *Gossypium hirsutum* low-density liquid phase chip based on targeted capture sequencing and the use thereof. The low-density chip comprises 908 SNP sites, including 329 sites significantly associated with important agronomic traits such as fiber quality, yield, and disease resistance of *Gossypium hirsutum*, 14 common sites for plant transgene detection, and 565 other sites. The chip is suitable for the use in transgenic ingredient detection, resource evaluation, genetic identification, and seed purity identification in *Gossypium hirsutum* varieties, and genetic improvement of major agronomic traits in *Gossypium hirsutum* varieties.

CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

- (84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第21条(3))。
 - 包括说明书序列表部分(细则5.2(a))。
-

(57) 摘要: 公开了一种基于靶向捕获测序的陆地棉低密度液相芯片及其应用。低密度芯片包括908个SNP位点, 其中与陆地棉纤维品质、产量、抗病性等重要农艺性状显著关联的位点329个, 常见植物转基因检测位点14个, 其他位点565个。此芯片适合于陆地棉品种中转基因成分检测、资源评价和亲缘鉴定、种子纯度鉴定以及陆地棉品种主要农艺性状遗传改良中的应用。

一种基于靶向捕获测序的陆地棉低密度液相芯片及其应用

技术领域

本发明涉及遗传学、分子生物学、生物信息学和棉花分子育种领域，尤其涉及一种基于靶向捕获测序的陆地棉低密度液相芯片及其应用。

背景技术

单核苷酸多态性(Single Nucleotide Polymorphism, SNP)指基因组单个核苷酸的变异，是由单个核苷酸对置换、颠换、插入或缺失所形成的变异形式。单核苷酸多态性作为第三代遗传标记，SNP 数量众多、分布密集、易于检测，是较理想的基因分型目标。纵观分子标记技术的革新，以 DNA 序列变异为基础的单核苷酸多态性 (SNP)，已经接近在分子水平进行变异检测的终极标准。预期今后若干年分子检测技术和平台的发展大致是在此基础上进行提升和改进。因此，高效、低成本的 SNP 基因型检测技术成为发展共享技术和平台的最佳选择。

基于 SNP 的靶向测序基因型检测 (genotyping by target sequencing, GBTS) 技术就是要从基因组 DNA 中挑选特定的靶向位点，进行测序和基因型检测。这种靶向或固定的简化基因组测序大大减少了 DNA 测序量，简化了生物信息分析和数据处理，提高了对各种基因型检测平台的适应性。且该技术适合所有标记位点的检测，包括功能已知位点 (如已克隆的基因)、功能未知位点 (候选基因) 以及中性位点。其系统标记数量的可塑性为各种应用提供了巨大弹性空间，基本上适合需要不同标记数量的全部场景，如标记辅助的主基因选择、回交育种及其背景选择、多基因聚合育种、种子纯度检测、转基因成份鉴定等。因此 GBTS 将成为未来很长一段时间基因型检测的首选。

已开发的棉花 SNP 芯片如 Illumina 80K, ZJU40K 等已经被育种企业和科研单位广泛采用，应用于基因分型、基因组选择、种质资源遗传多样性分析等。这些芯片 SNP 密度普遍较高，其中 Illumina 80K 固相芯片还存在无法定制的缺点；芯片位点设计普遍以全基因组均匀分布的位点为基础，没有考虑与性状的关联，因而分型成本较高且选择的的目的性不强。传统育种周期较长，表型变异不可预见，主要靠育种家的经验筛选。在对育种目标性状进行改良时容易造成其他优异性状的丢失。分子标记辅助育种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，检测目的基因和位点，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，其关键的限制因素是与性状关联的位点的准确鉴定。

综上，基于陆地棉基因组测序和全基因组关联分析挖掘的陆地棉纤维品质、产量、抗病性等重要农艺性状显著关联的位点，以及常见植物转基因检测位点，部分背景位点，开发一

款用于陆地棉基因分型、转基因检测、种质资源评价和分子标记辅助选择等的低密度液相 SNP 芯片迫在眉睫。

发明内容

本发明的目的在于针对现有技术的不足,发现及筛选出 894 个 SNP 位点,利用陆地棉 894 个 SNP 位点与 14 种主要转基因开发液相基因芯片,用于陆地棉转基因成分检测及基因分型。

本发明采用的技术方案具体如下:

一种基于靶向捕获测序的陆地棉低密度液相芯片,所述陆地棉全基因组低密度 SNP 芯片由检测 894 个 SNP 位点以及 14 种主要转基因的探针组成;所述 14 种主要转基因具体为: A1Bt、A2CPTI、A3CP4-epsps、A4CP4-epsps、A5bar、A6pat、A7CdP450、A8cp4-epsps、B.1CaMV35S、B.2FMV35S、B.3NOS、B.4NOS、B.5CaMV35S 和 NPTII; 所述 894 个 SNP 位点如表 1 所示。

进一步地,所述检测 14 种主要转基因的探针如 SEQ ID NO.1~SEQ ID NO.14 所示。

本发明所述基因芯片采用液相芯片,基于液相探针捕获技术,设计探针并合成一套包含 908 位点信息,可用于检测陆地棉中是否含有常见的 14 种转基因成分以及陆地棉资源评价和亲缘鉴定、种子纯度鉴定以及陆地棉品种主要农艺性状遗传改良。

进一步地,主要农艺性状包括纤维品质性状、产量性状、抗病性。

本发明所用的液相芯片技术体系为 GenoBaits 技术体系。工作原理是基于目标 SNP 标记设计的探针与检测样本的 DNA 进行靶向序列互补结合以及测序,从而达到对检测样本的目标 SNP 标记基因型检测的目的。本发明中,凡是能准确检测 894 个 SNP 位点以及 14 种主要转基因的探针均可达到相同的技术效果。本发明芯片的应用可以极大提高基因型检测准确度、提高检测水平,降低检测成本,并为棉花分子育种提供重要的技术支撑。

附图说明

图 1 为 SNP 标记染色体分布统计图; SNP 标记在不同染色体上的个数统计结果: a.横坐标为染色体编号; b.左纵坐标表示位点数和区段数; c.右纵坐标表示染色体长度(单位 Mb);

图 2 为 SNP 位点在染色体上的分布图。

具体实施方式

下面结合具体实施方式对本发明进行进一步的详细描述。

实施例 1、基于靶向捕获测序的陆地棉低密度液相芯片的设计和制备。

具体方法为:

1. 基于三个群体重测序获得的 VCF 文件 (Fang 等. Genomic analyses in cotton identify signatures of selection and loci associated with fiber quality and yield traits. Nature genetics, 2017, 49(7): 1089; Liu 等. Association mapping of seed oil and protein contents in upland cotton.

Euphytica, 2015, 205(2): 637-645;) , 以棉花基因组 TM-1_V2.1 (Hu 等. *Gossypium barbadense* and *Gossypium hirsutum* genomes provide insights into the origin and evolution of allotetraploid cotton. *Nature genetics*, 2019, 51(4): 739-748.) 为参考, 根据 SNP 位点在群体中的 MAF>0.35, 杂合率<15%, NA 比例<10%, 染色体均匀分布为原则, 筛选出 601 个 SNP 位点(背景位点)。

2. 根据主要农艺性状 GWAS 关联结果 (Fang 等. *Genomic analyses in cotton identify signatures of selection and loci associated with fiber quality and yield traits. Nature genetics*, 2017, 49(7): 1089; Liu 等. *Association mapping of seed oil and protein contents in upland cotton. Euphytica*, 2015, 205(2): 637-645; Li 等, *Genomic Insights into the Genetic Basis of Cotton Breeding in China, Molecular Plant* 16, 662–677) , 选择与农艺性状及抗病性显著关联的 634 个 SNP 位点 (前景位点) 。

3. 以上共获得陆地棉基因组目标区段共 1235 个, 通过检测备选 SNP 位置和位点基因型是否与陆地棉参考基因组 TM-1 V2.1 (cotton.zju.edu.cn) 一致, 筛选后获得 1148 个候选目标区段。

4. 根据 1148 个候选目标区段, 进行探针设计, 设计原则具体为: 挑选出可覆盖区域的所有长度为 100-120bp 的探针; 计算可覆盖目标区域探针的 GC 含量; 计算探针的同源性区域个数。其中, a. 40 bp 以上完全相同; b.相似度 85%, 长度 80 bp; c.相似度 95%, 长度 70bp 三种情况均视为一个同源性区域。探针挑选原则: 选取探针 GC 含量在 30% ~70%之间的; 选取同源性区域个数≤5 的; 选取探针区域不包含 SSR、N 区域的。根据以上这些设计及挑选原则, 共设计挑选出 1795 个探针, 能检测 894 个目标区段, 894 个目标区段对应的核心 SNP 位点信息如表 1 所示, SNP 标记染色体分布统计如图 1 所示, 分布如图 2 所示。

5. 根据农业部公布的棉花转基因检测 14 个常见检测序列, 设计出 14 条检测探针, 本实施例中提供的 14 条检测探针如 SEQ ID NO.1~ SEQ ID NO.14 所示, 按顺序分别检测 A1Bt、A2CPTI、A3CP4-epsps、A4CP4-epsps、A5bar、A6pat、A7CdP450、A8cp4-epsps、B.1CaMV35S、B.2FMV35S、B.3NOS、B.4NOS、B.5CaMV35S 和 NPTII 基因; 该引物对组合的扩增产物可以进行一次高通量测序和分析即可完成样本中转基因成分的检测。其中, 检测 A3CP4-epsps 基因和 B.4NOS 基因的探针 (SEQ ID NO.3、SEQ ID NO.12) 如表所示; 其中, I 是次黄嘌呤。

	序列长度	序列信息	基因名称
SEQ ID NO.3	333	ACGGTGACCG TCTTCCCGTT ACCITGCGCG GGCCGAAGAC GCCGACGCCG ATCACCTACC GCGTGCCGAT GGCCTCCGCA CAGGTGAAGT CCGCCGTGCT GCTCGCCGGC CTCAACACGC CCGGCATCAC GACGGTCATC GAGCCGATCA TGACGCGCGA TCATACGGAAGATGCTGC AGGGCTTTGG CGCCAACCTT ACCGTCGAGA CGGATGCGGA CGGCGTGCGC ACCATCCGCC TGAAGGCCG CGGCAAGCTC ACCGGCCAAG TCATCGACGT GCCGGGCGAC CCGTCTCTGA CGGCCTTCCC GCTGGTTGCG GCCCTGCTTG TTC	A3CP4-e psps

SEQ ID NO.12	217	ATCGTTCAAA CATTTGGCAA TAAAGTTTCT TAAGATTGAA TCCTGTTGCC GGTCTTGCGA TGATTATCAT ATTAATTICTG TTGAATTACG TTAAGCATGT AATAATTAAC ATIGTAATCCA TGACGTTATT TATGAGATGG GTTTTTATGA TTAGAGTCCC GCAATTATAC ATTTAATACG CGATAGAAAA CAATATAG CGCGCAAAC AGGATAA	B.4NOS
-----------------	-----	---	--------

6. 将检测 894 个 SNP 位点以及 14 种主要转基因的探针组成基于靶向捕获测序的陆地棉低密度液相芯片；其中与陆地棉纤维品质、产量、抗病性等重要农艺性状显著关联的位点 329 个，常见植物转基因检测位点 14 个，其他位点 565 个。

本实施例中通过博瑞迪生物技术有限公司合成捕获探针构建芯片，该芯片基于液相探针杂交的靶向基因型检测（GBTS） 技术：GenoBaits。GenoBaits 工作原理是基于目标探针与靶向序列互补结合进行定点捕获。首先对要测试的材料进行 gDNA 文库构建。同时根据 DNA 互补原理，在每个待测位点设计覆盖目标 SNP 的探针，采用生物素（Biotin）标记对目标探针进行标记。然后，在液态中利用生物素标记的目标探针与基因组目标区域杂交形成双链。随后利用链霉亲和素包衣的磁珠对携有生物素标记的目标探针进行分子吸附，从而捕获与探针杂交的靶点。最后，对捕获的靶点序列进行洗脱、靶点扩增、建库和测序，最终获得目标 SNP 的基因型。

表 1 894 个核心 SNP 位点信息

SNP 号	染色体	基因组位置	Ref	Alt	是否功能位点	SNP 号	染色体	基因组位置	Ref	Alt	是否功能位点
001	A01	110747518	C	T	是	448	A05	97278925	G	T	否
002	A03	11727109	T	C	是	449	A05	98875724	G	T	否
003	A03	20665441	A	G	是	450	A06	100673641	T	C	否
004	A03	2166240	A	G	是	451	A06	119009915	A	G	否
005	A03	22543857	C	T	是	452	A06	120558212	G	A	否
006	A03	8450966	A	T	是	453	A06	12521911	A	G	否
007	A05	766233	C	A	是	454	A06	1289926	T	C	否
008	A10	111125064	A	G	是	455	A06	14409659	T	C	否
009	A10	111437317	G	A	是	456	A06	19263878	T	C	否
010	A10	112338179	A	T	是	457	A06	19510906	A	G	否
011	A10	112651380	T	G	是	458	A06	24921227	T	G	否
012	A10	112940238	G	A	是	459	A06	25685023	C	T	否
013	A10	113053553	G	A	是	460	A06	30796846	T	C	否
014	A11	30523772	A	G	是	461	A06	32683074	T	C	否
015	A12	87529643	A	G	是	462	A06	32798852	G	A	否
016	A13	103027858	C	A	是	463	A06	34369034	T	C	否
017	D02	4110390	T	G	是	464	A06	36798412	T	C	否
018	D03	15331946	G	A	是	465	A06	46083287	G	A	否
019	D03	31088497	C	T	是	466	A06	46958830	A	C	否
020	D03	34610610	A	G	是	467	A06	47635932	A	G	否
021	D03	39193206	C	T	是	468	A06	47877963	A	G	否
022	D03	39600506	A	T	是	469	A06	5322494	A	C	否
023	D03	40070059	G	A	是	470	A06	72157456	T	C	否

024	D03	43229382	A	G	是	471	A06	73439358	G	A	否
025	D03	43511381	A	G	是	472	A06	75814615	C	T	否
026	D03	43821808	A	G	是	473	A06	78918757	A	G	否
027	D03	44126802	T	C	是	474	A06	80502017	G	C	否
028	D03	45101555	G	A	是	475	A06	80669852	T	C	否
029	D03	45114135	A	G	是	476	A06	80914576	T	C	否
030	D03	45162922	A	T	是	477	A06	83069476	A	G	否
031	D03	45219545	C	T	是	478	A06	83420195	A	G	否
032	D03	45904637	A	C	是	479	A06	83713547	A	G	否
033	D03	46030279	A	C	是	480	A06	89002323	T	C	否
034	D04	53296491	T	A	是	481	A06	89566493	T	C	否
035	D04	53338317	A	G	是	482	A06	90969355	A	G	否
036	D04	55873730	G	T	是	483	A06	93187658	T	C	否
037	D04	55895101	A	T	是	484	A06	95478943	T	C	否
038	D06	11366732	G	T	是	485	A06	973530	C	T	否
039	D09	7626032	T	C	是	486	A07	11906060	T	C	否
040	D10	5613642	C	T	是	487	A07	11915754	C	T	否
041	D10	65188256	T	C	是	488	A07	12320575	T	C	否
042	D11	171062	T	C	是	489	A07	18648297	G	A	否
043	D11	23848335	T	C	是	490	A07	21310224	T	C	否
044	D11	23889334	T	C	是	491	A07	21785923	A	G	否
045	D11	23957256	A	T	是	492	A07	25884125	G	A	否
046	D11	24042912	C	T	是	493	A07	29041927	C	T	否
047	D11	9255660	C	T	是	494	A07	36875269	C	G	否
048	D13	4503413	G	A	是	495	A07	38342570	T	C	否
049	A02	103887986	G	A	是	496	A07	40698615	G	A	否
050	A02	103969684	T	C	是	497	A07	42581937	T	C	否
051	A02	103980780	A	G	是	498	A07	43180984	A	G	否
052	A03	7639601	A	G	是	499	A07	43810960	A	G	否
053	A04	4584038	G	A	是	500	A07	43986311	T	C	否
054	A04	4584101	C	T	是	501	A07	47819857	A	G	否
055	A05	69623179	C	T	是	502	A07	54517045	G	A	否
056	A06	28180129	G	G	是	503	A07	64238084	C	T	否
057	A06	28338559	T	G	是	504	A07	80217572	C	T	否
058	A06	28760155	A	G	是	505	A07	80388490	A	T	否
059	A06	37577336	T	C	是	506	A07	82916184	T	C	否
060	A07	10774519	G	A	是	507	A07	83105438	G	A	否
061	A07	89225727	T	C	是	508	A07	8422752	G	C	否
062	A07	90178382	T	C	是	509	A07	89161736	A	G	否
063	A07	90300535	G	T	是	510	A07	9478030	A	C	否
064	A07	90432981	T	C	是	511	A08	10429943	C	G	否
065	A07	90438470	G	A	是	512	A08	106893339	C	T	否
066	A07	90497386	C	T	是	513	A08	109696323	G	A	否
067	A09	4830640	G	A	是	514	A08	112025642	C	T	否
068	A09	77528103	G	T	是	515	A08	113464785	A	G	否
069	A10	109602998	G	A	是	516	A08	116730869	A	G	否

070	A10	112187864	C	A	是	517	A08	1713011	T	C	否
071	A10	112213784	T	C	是	518	A08	19121855	C	A	否
072	A10	75431311	A	G	是	519	A08	20388949	G	A	否
073	A10	75517245	C	G	是	520	A08	25642734	C	T	否
074	A10	7883291	T	C	是	521	A08	29214900	C	T	否
075	A11	114890178	C	T	是	522	A08	29234582	A	C	否
076	A11	15811782	G	A	是	523	A08	29239926	T	C	否
077	A11	23909944	C		是	524	A08	29243822	A	G	否
078	A11	360614	A	C	是	525	A08	4039263	C	T	否
079	A11	90244406	C	A	是	526	A08	48463216	T	C	否
080	A12	57229716	A	G	是	527	A08	55388879	C	T	否
081	A12	88694205	C	T	是	528	A08	56754026	A	G	否
082	A12	90492050	C	T	是	529	A08	63452446	G	A	否
083	A12	98576530	C	T	是	530	A08	64485512	G	A	否
084	A13	105476632	G	T	是	531	A08	78341697	C	T	否
085	A13	105477213	G	A	是	532	A08	89152238	A	G	否
086	A13	105486165	G	A	是	533	A08	89152667	T	C	否
087	A13	105603690	T	C	是	534	A08	93471156	A	T	否
088	D01	64087028	G	C	是	535	A08	99343910	A	G	否
089	D02	1013903	T	C	是	536	A09	12673218	T	C	否
090	D02	1396386	T	C	是	537	A09	12998204	C	T	否
091	D03	43272859	G	C	是	538	A09	14103382	C	T	否
092	D03	43289074	A	T	是	539	A09	20823587	T	A	否
093	D05	23684485	C	A	是	540	A09	20844042	G	A	否
094	D05	5720265	G	T	是	541	A09	23502455	A	C	否
095	D05	57485276	C	A	是	542	A09	25275518	T	G	否
096	D05	58079007	G	A	是	543	A09	31554465	C	T	否
097	D05	58177617	C	T	是	544	A09	40968413	A	G	否
098	D06	12003138	G	A	是	545	A09	42870985	A	G	否
099	D06	17773574	A	G	是	546	A09	45777	C	A	否
100	D06	60207647	G	C	是	547	A09	47518943	G	A	否
101	D06	8776619	G		是	548	A09	51396443	G	A	否
102	D07	19075384	A	G	是	549	A09	55493894	C	G	否
103	D07	51856497	T	C	是	550	A09	61184216	A	G	否
104	D07	6729179	A	C	是	551	A09	61363297	G	T	否
105	D08	2896926	A	C	是	552	A09	65591384	T	C	否
106	D08	2901847	A	G	是	553	A09	67674689	G	T	否
107	D08	2904400	A	G	是	554	A09	76025039	G	A	否
108	D08	5505113	G	T	是	555	A10	10543466	A	G	否
109	D08	63065133	G	C	是	556	A10	106581756	T	C	否
110	D09	6549285	G	A	是	557	A10	107143359	T	G	否
111	D10	2524436	C	A	是	558	A10	107787459	G	A	否
112	D11	57041068	C	T	是	559	A10	10945265	A	C	否
113	D11	58261390	A	C	是	560	A10	112338443	T	A	否
114	D11	64752270	C	A	是	561	A10	15068940	G	A	否
115	D11	64756382	T	C	是	562	A10	18866303	A	C	否

116	D11	64904998	G	C	是	563	A10	27447943	A	G	否
117	D11	64926164	C	T	是	564	A10	3130405	C	T	否
118	D11	64930470	T	C	是	565	A10	3310056	T	C	否
119	D11	64937064	G	C	是	566	A10	45696050	C	A	否
120	D11	65065455	C	A	是	567	A10	48324687	G	A	否
121	D12	53158662	G	A	是	568	A10	48366731	A	G	否
122	D12	60059695	T	C	是	569	A10	56444175	C	T	否
123	D13	1774748	C	T	是	570	A10	6404617	T	C	否
124	D13	229536	C	G	是	571	A10	6555180	A	G	否
125	D13	45090184	T	G	是	572	A10	6738311	A	C	否
126	D13	53340754	A	C	是	573	A10	68078336	A	G	否
127	D13	8371110	A	C	是	574	A10	76202810	T	C	否
128	seq1	39098148	T	A	是	575	A10	85468645	A	G	否
129	seq1	39098165	A	C	是	576	A11	11016688	T	C	否
130	seq1	39098173	G	C	是	577	A11	11441789	A	G	否
131	seq1	9660644	C	G	是	578	A11	1394259	C	G	否
132	A01	2102346	T	C	是	579	A11	16077265	G	A	否
133	A01	8820452	A	C	是	580	A11	18005388	A	G	否
134	A02	1689682	C	T	是	581	A11	23540980	C	T	否
135	A03	51260473	T	A	是	582	A11	25232174	C	A	否
136	A04	6518897	C	T	是	583	A11	25233949	T	C	否
137	A05	11730945	G	A	是	584	A11	30735652	A	G	否
138	A05	75751203	T	C	是	585	A11	31753695	A	G	否
139	A06	8750649	T	C	是	586	A11	35871174	A	C	否
140	A07	1032070	A	C	是	587	A11	37921426	C	A	否
141	A07	1032071	G	T	是	588	A11	52514719	T	C	否
142	A07	12032478	C	T	是	589	A11	55123151	A	G	否
143	A07	95507309	C	G	是	590	A11	56784796	T	C	否
144	A07	989813	T	A	是	591	A11	62701332	T	C	否
145	A08	117118370	A	G	是	592	A11	63434388	A	G	否
146	A08	119190686	T	C	是	593	A11	66244941	A	G	否
147	A08	124176460	A	G	是	594	A11	67626090	T	C	否
148	A08	6187342	T	C	是	595	A11	67630369	G	C	否
149	A08	97074019	C	T	是	596	A11	68182818	A	G	否
150	A09	13706113	T	C	是	597	A11	68183232	C	T	否
151	A10	109236405	A	G	是	598	A11	70719189	A	G	否
152	A10	114220963	C	T	是	599	A11	77534048	C	T	否
153	A12	94150095	C	T	是	600	A11	82139694	G	A	否
154	A13	106412709	C	T	是	601	A11	85424243	T	C	否
155	A13	109879969	C	T	是	602	A11	89746643	A	T	否
156	A13	6433021	T	C	是	603	A11	90149203	C	T	否
157	D01	1150200	T	A	是	604	A11	92066056	T	C	否
158	D01	18933398	C	T	是	605	A11	92429725	C	T	否
159	D01	600285	C	T	是	606	A11	95752317	A	T	否
160	D02	12661527	T	C	是	607	A11	98573925	A	G	否
161	D02	1920733	C	G	是	608	A12	10226218	G	A	否

162	D02	1946913	A	G	是	609	A12	11396410	G	A	否
163	D02	44762375	T	C	是	610	A12	11429480	G	A	否
164	D02	6392666	G	A	是	611	A12	12115755	C	T	否
165	D02	68951786	C	A	是	612	A12	16073340	A	G	否
166	D03	2487227	A	G	是	613	A12	17820382	G	T	否
167	D04	1347244	A	G	是	614	A12	22544556	T	G	否
168	D04	52647897	A	G	是	615	A12	24422845	T	C	否
169	D05	26764654	C	T	是	616	A12	3233765	A	G	否
170	D05	45810951	A	G	是	617	A12	36619695	G	A	否
171	D06	1497967	G	A	是	618	A12	40703533	G	A	否
172	D06	1624645	A	C	是	619	A12	4152128	A	G	否
173	D06	54504155	A	T	是	620	A12	44104522	G	T	否
174	D06	59180787	G	A	是	621	A12	44388198	A	G	否
175	D06	61085437	T	A	是	622	A12	44629878	T	A	否
176	D07	46303166	A	G	是	623	A12	5091648	T	A	否
177	D08	61439658	G	A	是	624	A12	52831490	G	C	否
178	D08	68631323	C	T	是	625	A12	60989615	A	C	否
179	D08	9335830	C	T	是	626	A12	6396346	A	G	否
180	D09	2749569	A	C	是	627	A12	68296841	G	A	否
181	D09	38068242	T	C	是	628	A12	7194840	G	A	否
182	D11	1280801	G	A	是	629	A12	77899237	C	T	否
183	D12	15727440	T	C	是	630	A12	7810671	C	G	否
184	D12	58551591	C	T	是	631	A12	7969574	A	G	否
185	D12	7113678	G	A	是	632	A12	80173437	G	A	否
186	D13	59655465	T	G	是	633	A13	100127785	G	A	否
187	D13	60649746	G	A	是	634	A13	101918312	G	A	否
188	A01	110967771	A	C	是	635	A13	17036027	A	C	否
189	A02	107361717	T	A	是	636	A13	17036590	C	T	否
190	A02	1707434	G	A	是	637	A13	21731709	A	G	否
191	A02	26551420	G	A	是	638	A13	23198397	T	C	否
192	A05	14504864	C	T	是	639	A13	27322121	A	G	否
193	A05	14504889	A	G	是	640	A13	278763	T	G	否
194	A05	15429410	C	G	是	641	A13	35844566	G	A	否
195	A07	42902490	C	G	是	642	A13	45195746	A	G	否
196	A07	90603512	T	G	是	643	A13	45220863	T	C	否
197	A07	90783146	G	A	是	644	A13	45223069	A	G	否
198	A08	112071927	C	T	是	645	A13	45229632	C	G	否
199	A10	110613300	T	C	是	646	A13	45230181	G	A	否
200	A11	104539963	T	C	是	647	A13	45238518	T	A	否
201	D02	1913626	A	G	是	648	A13	45240195	A	G	否
202	D02	1915388	T	C	是	649	A13	50036635	C	G	否
203	D02	6362048	C	T	是	650	A13	59746791	T	C	否
204	D04	1546736	T	A	是	651	A13	7768028	C	T	否
205	D05	14240130	T	G	是	652	A13	77893733	G	A	否
206	D06	45390691	C	T	是	653	A13	78230319	G	A	否
207	D06	46672551	C	T	是	654	A13	79597429	A	G	否

208	D08	18841330	A	C	是	655	A13	80392586	T	C	否
209	D11	20428933	A	T	是	656	A13	80452058	A	G	否
210	A01	114857126	G	A	是	657	A13	80730886	C	A	否
211	A01	115721972	A	G	是	658	A13	81306936	C	T	否
212	A01	117760175	T	C	是	659	A13	83761879	T	C	否
213	A01	117760658	T	A	是	660	A13	89445949	A	G	否
214	A02	106224475	A	G	是	661	A13	9366668	A	T	否
215	A02	3111851	A	G	是	662	A13	94821021	C	T	否
216	A03	110233891	A	G	是	663	A13	94837745	C	T	否
217	A04	67550448	A	T	是	664	A13	94898464	G	T	否
218	A04	86560855	C	T	是	665	A13	96661617	A	G	否
219	A04	86568861	C	T	是	666	A13	97785453	C	T	否
220	A05	105715349	A	G	是	667	D01	24764505	A	T	否
221	A05	15876258	T	C	是	668	D01	24767839	T	C	否
222	A05	15876308	C	G	是	669	D01	31464245	G	T	否
223	A05	1874595	A	G	是	670	D01	32265626	A	G	否
224	A05	2124121	C	T	是	671	D01	32543583	T	C	否
225	A05	22775565	G	A	是	672	D01	33576723	A	G	否
226	A05	22924264	T	A	是	673	D01	37246475	G	A	否
227	A05	22938538	A	T	是	674	D01	38589185	C	A	否
228	A05	31423050	T	C	是	675	D01	40297859	T	C	否
229	A06	119255407	C	T	是	676	D01	42570072	C	A	否
230	A06	124093748	C	T	是	677	D01	46056348	C	A	否
231	A06	1503775	C	G	是	678	D01	54437017	G	T	否
232	A07	21563371	C	T	是	679	D01	54531974	A	G	否
233	A07	23460168	C	T	是	680	D01	54532596	A	C	否
234	A07	83188617	G	C	是	681	D01	54841313	C	T	否
235	A07	88838111	C	T	是	682	D01	56204975	T	C	否
236	A07	90625054	C	T	是	683	D01	56387888	T	A	否
237	A07	90633925	C	T	是	684	D01	59941820	C	T	否
238	A07	90639206	T	C	是	685	D01	63516128	A	G	否
239	A08	104027372	A	G	是	686	D01	9090589	A	T	否
240	A08	107661059	T	G	是	687	D02	17045564	T	A	否
241	A08	123086263	C	G	是	688	D02	18307420	C	A	否
242	A08	123101111	T	C	是	689	D02	18765233	A	G	否
243	A08	31131479	C	T	是	690	D02	19924810	G	A	否
244	A08	6469161	T	A	是	691	D02	23266296	G	A	否
245	A09	73717101	C	A	是	692	D02	29523923	T	A	否
246	A10	108187386	C	T	是	693	D02	30504620	G	T	否
247	A10	114006682	G	A	是	694	D02	38335405	A	G	否
248	A10	2516523	C	T	是	695	D02	45180077	T	A	否
249	A10	4309496	C	A	是	696	D02	4665984	G	A	否
250	A11	118950829	A	T	是	697	D02	50316439	A	C	否
251	A11	24222	G	A	是	698	D02	50316584	A	G	否
252	A11	9073286	G	A	是	699	D02	54044417	A	G	否
253	A11	99926974	A	G	是	700	D02	57420904	G	A	否

254	A12	104493499	T	A	是	701	D02	57735413	T	C	否
255	A12	95983460	C	G	是	702	D02	59149744	A	C	否
256	A13	100671788	C	T	是	703	D02	60903663	A	G	否
257	A13	104864916	T	G	是	704	D02	64071331	A	G	否
258	A13	107008682	A	G	是	705	D02	64105609	T	C	否
259	A13	5759232	A	G	是	706	D02	652122	G	A	否
260	A13	68442801	C	A	是	707	D02	69573139	T	C	否
261	A13	89442130	G	A	是	708	D03	10851700	G	C	否
262	A13	98283310	T	C	是	709	D03	12601043	T	C	否
263	D01	19034036	T	A	是	710	D03	19246208	T	C	否
264	D01	54855218	T	C	是	711	D03	25627391	C	T	否
265	D01	54866986	C	T	是	712	D03	25646216	C	T	否
266	D01	54890106	T	C	是	713	D03	27701555	C	T	否
267	D01	54896281	G	A	是	714	D03	31735979	T	C	否
268	D01	57261588	A	G	是	715	D03	34571433	G	T	否
269	D01	58881229	C	T	是	716	D03	36559975	C	T	否
270	D02	51851185	A	G	是	717	D03	4447807	G	A	否
271	D02	52987299	A	G	是	718	D03	46722299	T	C	否
272	D02	53034743	G	T	是	719	D03	47897510	G	A	否
273	D02	53253589	A	C	是	720	D03	48891235	A	G	否
274	D02	54901956	C	T	是	721	D03	50598904	G	T	否
275	D02	63310106	T	C	是	722	D03	5253112	T	G	否
276	D02	6401616	T	A	是	723	D03	5254940	A	C	否
277	D02	68030533	A	T	是	724	D03	6554186	A	G	否
278	D02	7489387	T	G	是	725	D03	6884462	G	T	否
279	D02	7531127	A	G	是	726	D03	7213302	T	C	否
280	D03	2503186	G	T	是	727	D03	8405927	A	G	否
281	D04	52350838	T	G	是	728	D04	19963729	C	G	否
282	D04	6848742	A	C	是	729	D04	25993830	C	T	否
283	D04	6861687	C	T	是	730	D04	28820458	C	T	否
284	D04	851577	G	A	是	731	D04	34164246	A	G	否
285	D05	14718765	A	G	是	732	D04	34164765	T	C	否
286	D05	55154526	T	C	是	733	D04	34168061	T	C	否
287	D05	56805649	A	G	是	734	D04	34170181	T	G	否
288	D06	18372518	T	A	是	735	D04	34186357	A	G	否
289	D06	47311286	G	T	是	736	D04	34188285	T	C	否
290	D06	64318600	T	C	是	737	D04	34209861	G	T	否
291	D07	10130687	G	C	是	738	D04	34212452	T	C	否
292	D07	54754308	T	C	是	739	D04	4477447	G	A	否
293	D07	54818140	G	A	是	740	D04	50668212	C	T	否
294	D07	54821539	T	A	是	741	D04	54749560	G	T	否
295	D08	2748641	C	T	是	742	D04	55088982	T	G	否
296	D08	430878	C	A	是	743	D04	6405687	C	T	否
297	D08	4868113	C	T	是	744	D04	9885360	G	C	否
298	D08	608978	C	T	是	745	D05	10111963	A	G	否
299	D09	49092148	A	G	是	746	D05	22301632	T	C	否

300	D09	6069425	C	T	是	747	D05	22581979	C	A	否
301	D10	63443095	G	C	是	748	D05	44163822	C	G	否
302	D10	63918764	C	T	是	749	D05	4754359	G	A	否
303	D10	64184291	A	T	是	750	D05	50425541	G	A	否
304	D10	826050	A	G	是	751	D05	54319989	C	T	否
305	D11	10658879	T	C	是	752	D05	54328389	G	A	否
306	D11	13890576	T	C	是	753	D05	60809038	C	G	否
307	D11	21988164	G	A	是	754	D05	63575099	G	A	否
308	D11	23924389	T	A	是	755	D06	120461	T	C	否
309	D11	23924409	C	T	是	756	D06	15573192	C	A	否
310	D11	23944152	C	T	是	757	D06	24091586	T	G	否
311	D11	24002127	A	G	是	758	D06	32611737	T	C	否
312	D11	24004889	C	T	是	759	D06	37123528	A	G	否
313	D11	24034422	G	C	是	760	D06	39543027	T	C	否
314	D11	24036519	A	G	是	761	D06	40371530	A	C	否
315	D11	3229941	A	G	是	762	D06	40976675	T	G	否
316	D11	3230659	C	T	是	763	D06	4587872	A	G	否
317	D11	62899476	G	A	是	764	D06	459987	A	G	否
318	D12	1201966	C	A	是	765	D06	46781842	A	G	否
319	D12	2093018	T	G	是	766	D06	51896336	G	A	否
320	D12	2108978	A	G	是	767	D06	52879640	A	G	否
321	D12	2237848	G	A	是	768	D06	8300282	C	A	否
322	D12	49521512	A	G	是	769	D06	8301102	A	G	否
323	D12	49927212	G	A	是	770	D06	8302085	A	T	否
324	D12	53455112	T	A	是	771	D06	8316146	C	G	否
325	D12	55839588	C	T	是	772	D06	8316953	A	G	否
326	D12	61139512	A	C	是	773	D06	8317874	T	G	否
327	D12	61140550	C	T	是	774	D06	9134552	G	A	否
328	D13	44115715	T	G	是	775	D06	984077	G	C	否
329	D13	45131566	A	G	是	776	D07	12186527	T	A	否
330	A01	102077466	C	T	否	777	D07	18817779	C	T	否
331	A01	103023924	G	A	否	778	D07	19736648	A	T	否
332	A01	109299115	A	G	否	779	D07	21947521	T	C	否
333	A01	110128160	A	G	否	780	D07	23120977	A	G	否
334	A01	110687776	A	T	否	781	D07	28055711	G	A	否
335	A01	113567604	C	T	否	782	D07	29109329	C	A	否
336	A01	114087981	G	A	否	783	D07	29307287	C	A	否
337	A01	11692652	C	T	否	784	D07	31304191	T	A	否
338	A01	17937689	T	C	否	785	D07	33903373	A	G	否
339	A01	19586649	T	C	否	786	D07	35288441	A	C	否
340	A01	20011715	C	T	否	787	D07	35472043	G	A	否
341	A01	23552093	C	T	否	788	D07	42317367	A	G	否
342	A01	25130938	T	C	否	789	D07	48374078	C	T	否
343	A01	29630645	A	G	否	790	D07	4924881	T	A	否
344	A01	30304909	A	G	否	791	D07	53499692	T	C	否
345	A01	30655283	T	C	否	792	D08	10680089	C	G	否

346	A01	31298172	T	A	否	793	D08	13077583	T	C	否
347	A01	37097863	G	A	否	794	D08	149324	C	T	否
348	A01	39816020	G	C	否	795	D08	16413758	T	A	否
349	A01	44008051	G	A	否	796	D08	1767573	C	T	否
350	A01	45886993	C	T	否	797	D08	18913124	T	C	否
351	A01	48030807	G	A	否	798	D08	21560032	C	T	否
352	A01	50753667	C	A	否	799	D08	22149204	C	A	否
353	A01	52461718	G	C	否	800	D08	23067189	T	C	否
354	A01	53550328	A	G	否	801	D08	23093384	C	A	否
355	A01	55361298	T	C	否	802	D08	31945553	A	G	否
356	A01	5665093	A	G	否	803	D08	4830232	G	T	否
357	A01	59440674	A	G	否	804	D08	53958299	A	G	否
358	A01	60660225	T	C	否	805	D08	54171228	C	T	否
359	A01	62406568	T	C	否	806	D08	60184589	T	A	否
360	A01	69399954	A	G	否	807	D08	60980269	T	G	否
361	A01	72356977	A	G	否	808	D08	64419820	T	C	否
362	A01	73066978	C	T	否	809	D08	69065625	C	T	否
363	A01	83056539	G	C	否	810	D09	11775224	T	C	否
364	A01	9307886	T	C	否	811	D09	13077530	G	A	否
365	A01	94433050	C	G	否	812	D09	13092466	G	A	否
366	A01	97114671	G	A	否	813	D09	14556836	A	G	否
367	A01	9928461	A	G	否	814	D09	14980165	T	C	否
368	A01	9992909	T	C	否	815	D09	16586783	G	A	否
369	A02	104702522	C	G	否	816	D09	16915286	T	G	否
370	A02	106564817	G	A	否	817	D09	29378213	T	C	否
371	A02	126465	A	G	否	818	D09	30116231	T	C	否
372	A02	18537125	A	G	否	819	D09	32511822	A	G	否
373	A02	19418124	T	C	否	820	D09	35843751	T	A	否
374	A02	3608260	T	A	否	821	D09	39952298	A	G	否
375	A02	3753565	C	G	否	822	D09	40931477	T	G	否
376	A02	39122586	T	C	否	823	D09	5153702	A	G	否
377	A02	44761669	C	A	否	824	D09	5327090	A	T	否
378	A02	44836527	T	C	否	825	D09	7625892	A	G	否
379	A02	52198772	A	G	否	826	D09	8984707	T	C	否
380	A02	63519897	A	G	否	827	D10	11881833	G	A	否
381	A02	64573030	C	T	否	828	D10	12641518	T	C	否
382	A02	64810766	A	G	否	829	D10	13203079	T	C	否
383	A02	71898039	G	C	否	830	D10	13218360	A	G	否
384	A02	76764218	C	A	否	831	D10	17236139	A	C	否
385	A02	79665360	C	T	否	832	D10	21015217	A	T	否
386	A02	82773518	A	G	否	833	D10	22279984	T	C	否
387	A02	8356092	C	T	否	834	D10	23857566	T	C	否
388	A02	95037408	T	G	否	835	D10	27931417	A	C	否
389	A03	10432099	T	C	否	836	D10	29136434	A	G	否
390	A03	104900576	A	C	否	837	D10	36608001	A	G	否
391	A03	106410955	G	A	否	838	D10	5768028	T	A	否

392	A03	16588547	T	C	否	839	D10	58648569	T	C	否
393	A03	35348610	T	C	否	840	D10	59110528	C	T	否
394	A03	36068818	T	C	否	841	D10	59338863	A	G	否
395	A03	41629111	T	C	否	842	D10	63020858	A	G	否
396	A03	62010341	C	T	否	843	D10	65084524	C	T	否
397	A03	72339471	A	G	否	844	D10	7921537	G	C	否
398	A03	81970703	T	C	否	845	D10	9584269	C	T	否
399	A03	91791344	T	C	否	846	D11	18266384	A	G	否
400	A03	93575802	T	C	否	847	D11	19526253	A	G	否
401	A03	93642770	G	T	否	848	D11	21313603	T	C	否
402	A03	95039694	T	C	否	849	D11	22813334	G	C	否
403	A03	95047213	A	G	否	850	D11	22866559	G	A	否
404	A03	95068176	A	C	否	851	D11	22965595	T	C	否
405	A03	95073577	T	A	否	852	D11	25045105	A	G	否
406	A03	95086199	C	T	否	853	D11	26242153	A	G	否
407	A03	95090581	A	G	否	854	D11	29069201	A	G	否
408	A03	95091209	G	A	否	855	D11	30858636	A	G	否
409	A03	97554243	A	T	否	856	D11	31530446	T	C	否
410	A04	11004835	T	G	否	857	D11	33562213	G	T	否
411	A04	11910166	C	T	否	858	D11	36259888	G	C	否
412	A04	12158377	C	T	否	859	D11	4001453	C	A	否
413	A04	12243883	A	G	否	860	D11	42064410	C	G	否
414	A04	13827618	T	C	否	861	D11	46502666	T	C	否
415	A04	16789748	A	G	否	862	D11	49025870	T	G	否
416	A04	1886870	C	T	否	863	D11	53984557	A	G	否
417	A04	1958101	A	G	否	864	D11	62552126	C	T	否
418	A04	1969979	T	C	否	865	D11	63105221	T	A	否
419	A04	22382054	C	G	否	866	D12	13234020	C	A	否
420	A04	36328459	G	A	否	867	D12	20303021	T	G	否
421	A04	37588019	A	G	否	868	D12	20676817	C	T	否
422	A04	55428635	G	A	否	869	D12	20679556	G	C	否
423	A04	61481730	C	T	否	870	D12	24086625	G	A	否
424	A04	69596220	G	A	否	871	D12	31095105	A	G	否
425	A04	7163673	C	G	否	872	D12	31344122	G	A	否
426	A04	7164063	C	T	否	873	D12	34101393	A	G	否
427	A04	81630879	T	C	否	874	D12	36771208	C	T	否
428	A04	83437396	A	G	否	875	D12	39681819	T	G	否
429	A04	84817926	T	A	否	876	D12	39682436	C	T	否
430	A05	101965827	A	G	否	877	D12	40027143	A	G	否
431	A05	102937436	T	C	否	878	D12	41909287	A	G	否
432	A05	106162489	C	T	否	879	D12	4257295	A	G	否
433	A05	1273243	T	G	否	880	D12	4544167	A	C	否
434	A05	24223452	C	T	否	881	D12	50612739	T	C	否
435	A05	28843012	G	A	否	882	D13	19377974	A	G	否
436	A05	36231152	A	G	否	883	D13	2694968	A	C	否
437	A05	36585565	T	G	否	884	D13	3134551	A	T	否

438	A05	39529362	C	T	否	885	D13	39085839	G	A	否
439	A05	40529916	T	C	否	886	D13	42257012	A	G	否
440	A05	54824863	C	T	否	887	D13	49441679	A	G	否
441	A05	59499071	G	A	否	888	D13	49745988	A	G	否
442	A05	75568141	A	G	否	889	D13	55874078	A	G	否
443	A05	75568470	A	G	否	890	D13	57525048	T	G	否
444	A05	78899507	G	A	否	891	D13	58479149	A	G	否
445	A05	94441223	C	G	否	892	D13	63605335	A	G	否
446	A05	94467545	G	T	否	893	D13	64125386	T	C	否
447	A05	96112268	T	C	否	894	D13	9724970	T	A	否

其中，Ref 表示 SNP 位点在参考基因组中的碱基类型，Alt 表示 SNP 位点在群体中的碱基类型。

实施例 2、基于靶向捕获测序的陆地棉低密度液相芯片在陆地棉基因分型以及转基因成分检测中的应用。

使用 200 个陆地棉品种对芯片进行测试。测试结果显示，棉花功能标记芯片的平均位点检出率为 94.17%，满足陆地棉基因分型检测。

整个实验流程是基于GenoBaits技术体系完成的。具体实验流程如下：

1. 提取待测样本的基因组 DNA，并构建样品文库；

1.1 样品 DNA 提取

采用 CTAB 法对样本 DNA 进行提取。

1.2 样品 DNA 质检

将测试样品 DNA，用 Qubit Fluorometric Quantitation(Thermo Fisher)对 DNA 浓度进行测定，用 1wt%琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的完整性。检测合格的样品放入 4℃冰箱，保存、备用。

1.3 样品 DNA 片段化

取 12μL 质检合格的 DNA 放置于 0.2μL PCR 管中，将管置于超声波破碎仪中对 DNA 进行随机物理破碎，片段破碎至 200-400bp。

1.4 样品末端修复

向管中加入 4μL GenoBaits End Repair Buffer(GenoBaits，即石家庄博瑞迪生物科技有限公司)和 2.7μL GenoBaits End Repair Enzyme，补水至 20μL，放入 ABI 9700 PCR 仪中 37℃温育 20 分钟，完成破碎片段的末端修复和加 A 过程。

1.5 样品测序接头连接

从 PCR 仪中取出小管加入 2μL GenoBaits Ultra DNA ligase、8μL GenoBaits Ultra DNA Ligase Buffer 和 2μL GenoBaits Adapter，补水至 40μL，然后放置于 ABI9700 PCR 仪上 22℃反应 30 分钟，完成测序接头的连接。

1.6 样品 DNA 纯化

向连接产物中加入 48 μ L 的 Beackman AMPure XP Beads(Beackman 公司)对连接产物进行纯化,纯化后采用磁珠进行片段筛选,保留插入片段在 200~300bp 的连接产物。

1.7 样品文库扩增

向上一步的 PCR 管中加入 5 μ L 带有 Barcode 序列的测序接头、1 μ LP5 接头、10 μ L GenoBaits PCR Master Mix,并用纯水补至 20 μ L;用 ABI 9700 PCR 仪进行扩增,扩增程序为:95 $^{\circ}$ C 预变性 5min,95 $^{\circ}$ C 变性 30s,60 $^{\circ}$ C 退火 30s,72 $^{\circ}$ C 延伸 30s;重复变性、退火、延伸,共 8 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 5min。不同的 Barcode 用于区分不同的样品。

1.8 样品文库纯化

向第二轮 PCR 产物中加入 24 μ L Beckmen AMPure XP Beads (Beackman 公司),用移液器上下吸打均匀后,将 0.2 μ L 的 PCR 管置于磁力架上至溶液澄清,弃去上清并用 75vol%乙醇洗涤磁珠一次,用 pH 值为 8.0 的 Tris-HCl 将文库 DNA 洗脱下来。

2. 利用基于靶向捕获测序的陆地棉低密度液相芯片测定目标样品在 894 个 SNP 位点和 14 个基因的基因型

2.1 DNA 杂交

取 500ng 已完成构建的基因组 DNA 测序文库,加入 5 μ L GenoBaits Block I 和 2 μ L GenoBaits Block II,置于 Eppendorf Concentrator plus(Eppendorf 公司)真空浓缩仪上,在 $\leq 70^{\circ}$ C 的温度下蒸干至干粉。向干粉管中加入 8.5 μ L GenoBaits 2 $\times$ Hyb Buffer、2.7 μ L GenoBaits Hyb Buffer Enhancer、2.8 μ L Nuclease-Free Water,用移液器吸打混匀后放置于 ABI 9700 PCR 仪上 95 $^{\circ}$ C 温育 10 分钟,然后取出 PCR 管加入 3 μ L 已经合成的探针(探针的浓度为 60ng/ μ L),漩涡震荡混匀后放置于 ABI 9700 PCR 仪上 65 $^{\circ}$ C 温育 2 小时,完成探针杂交反应。

2.2 DNA 捕获

向上一步杂交完成的反应体系中加入 100 μ L GenoBaits DNA Probe Beads,上下吸打 10 次,放入 ABI 9700 PCR 仪上 65 $^{\circ}$ C 温育 45 分钟,使磁珠与探针结合。用 100 μ L GenoBaits Wash Buffer I、150 μ L GenoBaits Wash BufferII 分别对结合探针后的磁珠进行 65 $^{\circ}$ C 热洗,然后再用 100 μ L GenoBaits Wash Buffer I、150 μ L GenoBaits Wash Buffer II (和 150 μ L GenoBaits Wash Buffer III 分别对磁珠进行常温洗涤。洗涤完成的磁珠用 20 μ L Nuclease-Free Water 进行重悬。

取 13 μ L 重悬后的 DNA(带磁珠)加入到新的 0.2mL PCR 管中,然后加入 15 μ L GenoBaits PCR Master Mix、2 μ L GenoBaits Primer Mix 配置 post-PCR 体系,用 ABI 9700 PCR 仪进行文库扩增,扩增程序为:95 $^{\circ}$ C 预变性 5min,95 $^{\circ}$ C 变性 30s,60 $^{\circ}$ C 退火 30s,72 $^{\circ}$ C 延伸 30s;重复变性、退火、延伸,共 15 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 5min。

向 post-PCR 产物中加入 45μL Beckmen AMPure XP Beads（Beackman 公司）并用移液器上下吸打均匀，然后将 0.2mL PCR 管置于磁力架上至溶液澄清，弃去上清并用 75vol%乙醇洗涤磁珠两次，用 pH 为 8.0 的 Tris-HCl 将文库 DNA 洗脱下来。完成探针的杂交捕获工作。

2.3 DNA 杂交捕获文库质检

用 Qubit Fluorometric Quantitation（Thermo Fisher）对文库的 DNA 浓度进行测定，然后用琼脂糖凝胶电泳检测文库 DNA 的片段大小是否在 300-400bp 之间。

2.4 DNA 杂交捕获文库测序

将构建好的 DNA 文库用华大 MGISEQ2000 测序仪进行测序。

2.5 基因型数据分析

测序数据经过 FastQC（www.bioinformatics.babraham.ac.uk/project）质控后，用 BWA（bio-bwa.sourceforge.net）的默认参数将测序数据比对到参考基因组上，用 GATK（software.broadinstitute.org/gatk）软件对测序数据进行 SNP 鉴定，用自编的 Perl 脚本对探针捕获测序的基因型分型信息进行提取，形成最终的基因型分型结果，如表 2 和表 3 所示。

表 2 低密度液相基因芯片在 200 个棉花品种材料中检出率

编号	位点类型	缺失位点数	检出位点数	位点检出率	总位点数	序列数目	样品名称
W4_23	SNP	31	863	0.965324	894	100249200	豫棉 20
W5_53	SNP	31	863	0.965324	894	99342600	Y13
W6_12	SNP	33	861	0.963087	894	99011100	石选 87*SGK321
W6_20	SNP	33	861	0.963087	894	99988800	53--12
W4_12	SNP	34	860	0.961969	894	99629100	新陆早 25 号
W6_2	SNP	35	859	0.96085	894	100976700	垦 62*HT23
W7_41	SNP	35	859	0.96085	894	99422400	12-12-29
W4_24	SNP	38	856	0.957494	894	100787400	徐棉 18
W7_51	SNP	38	856	0.957494	894	100119900	12-5-66
W8_55	SNP	39	855	0.956376	894	99564300	DP201
W7_22	SNP	40	854	0.955257	894	100554900	25-27
W4_26	SNP	41	853	0.954139	894	100237200	新陆早 18 号
W7_34	SNP	41	853	0.954139	894	100266000	敦棉 1 号
W7_52	SNP	41	853	0.954139	894	99038400	12-5-62
W5_50	SNP	42	852	0.95302	894	100182300	111-43-50
W5_56	SNP	42	852	0.95302	894	99903900	石 K14
W6_45	SNP	42	852	0.95302	894	99362700	富全 10 号
W6_57	SNP	42	852	0.95302	894	100907100	石抗 126
W7_32	SNP	42	852	0.95302	894	100285200	晋 3
W4_19	SNP	43	851	0.951902	894	100998300	豫棉 112
W6_47	SNP	43	851	0.951902	894	100189200	河南抗黄
W7_43	SNP	43	851	0.951902	894	100931100	12-10-91

W5_41	SNP	44	850	0.950783	894	99323400	南通 5 号
W6_14	SNP	44	850	0.950783	894	100806000	26-5*603
W6_29	SNP	44	850	0.950783	894	99386400	N78
W6_38	SNP	44	850	0.950783	894	100534200	ND012
W7_55	SNP	44	850	0.950783	894	100782300	12-5-47
W8_40	SNP	44	850	0.950783	894	99412800	15-23-52
W8_53	SNP	44	850	0.950783	894	99927600	602
W6_31	SNP	45	849	0.949664	894	99343500	SW1
W6_46	SNP	45	849	0.949664	894	100151700	海甘棉
W8_21	SNP	45	849	0.949664	894	100318500	15-32-66
W4_21	SNP	46	848	0.948546	894	100013100	新陆早 35 号
W5_57	SNP	46	848	0.948546	894	99984300	148-39
W6_32	SNP	46	848	0.948546	894	100779900	TH25
W7_26	SNP	46	848	0.948546	894	100933800	邯棉 885
W7_54	SNP	46	848	0.948546	894	99124200	12-5-50
W8_29	SNP	46	848	0.948546	894	99807000	15-30-87
W8_41	SNP	46	848	0.948546	894	100498500	15-23-2
W4_10	SNP	47	847	0.947427	894	100618800	豫 79-10
W4_11	SNP	47	847	0.947427	894	99957600	新陆早 38 号
W6_1	SNP	47	847	0.947427	894	99529800	19-34
W6_33	SNP	47	847	0.947427	894	100663500	Y17
W6_52	SNP	47	847	0.947427	894	99811200	冀棉 169
W6_9	SNP	47	847	0.947427	894	99948900	GK26*系 9
W8_14	SNP	47	847	0.947427	894	99806400	15-49-128
W8_3	SNP	47	847	0.947427	894	99324300	12-3-91
W8_4	SNP	47	847	0.947427	894	100275300	12-3-79
W4_15	SNP	48	846	0.946309	894	100711200	盐棉 1 号
W7_12	SNP	48	846	0.946309	894	99058800	惠远 14
W7_35	SNP	48	846	0.946309	894	100970100	德字棉 531
W7_49	SNP	48	846	0.946309	894	99326700	12-7-60
W7_50	SNP	48	846	0.946309	894	99306900	12-7-59
W7_7	SNP	48	846	0.946309	894	99368400	新陆早 62 号
W8_46	SNP	48	846	0.946309	894	100236300	15-22-119
W4_20	SNP	49	845	0.94519	894	100209900	徐州 514
W4_22	SNP	49	845	0.94519	894	100844100	黔农 465
W4_27	SNP	49	845	0.94519	894	100599600	徐州 58
W5_49	SNP	49	845	0.94519	894	100093800	562*GK15
W6_26	SNP	49	845	0.94519	894	100599900	H65
W6_56	SNP	49	845	0.94519	894	99428400	石 K10
W7_17	SNP	49	845	0.94519	894	100983000	K2725
W7_18	SNP	49	845	0.94519	894	99957300	邯 2301
W7_25	SNP	49	845	0.94519	894	99270000	克克 1543
W7_27	SNP	49	845	0.94519	894	99344400	珂字棉 100
W8_1	SNP	49	845	0.94519	894	99020100	12-4-4
W8_9	SNP	49	845	0.94519	894	99031500	12-2-1

W4_13	SNP	50	844	0.944072	894	99059400	鲁棉研 32
W4_18	SNP	50	844	0.944072	894	100920900	蜀棉 1 号
W5_40	SNP	50	844	0.944072	894	99094200	中棉所 2
W5_43	SNP	50	844	0.944072	894	99566100	苏棉 9 号
W6_19	SNP	50	844	0.944072	894	99018000	9456D
W6_25	SNP	50	844	0.944072	894	99556800	GK19
W6_4	SNP	50	844	0.944072	894	99815400	9-8*41-79
W6_5	SNP	50	844	0.944072	894	100613700	29-24
W6_8	SNP	50	844	0.944072	894	99734700	2040048
W7_13	SNP	50	844	0.944072	894	99374700	新陆中 42 号
W7_2	SNP	50	844	0.944072	894	99099900	新石选 12-2
W7_31	SNP	50	844	0.944072	894	100951200	赣棉 47
W7_44	SNP	50	844	0.944072	894	100114500	12-10-55
W8_28	SNP	50	844	0.944072	894	100653600	15-30-114
W8_45	SNP	50	844	0.944072	894	100893600	15-22-122
W5_51	SNP	51	843	0.942953	894	100363500	芽黄
W6_16	SNP	51	843	0.942953	894	99083400	86-27
W6_23	SNP	51	843	0.942953	894	100297200	FY408
W7_59	SNP	51	843	0.942953	894	99893700	12-4-17
W7_8	SNP	51	843	0.942953	894	100942800	红叶棉
W8_15	SNP	51	843	0.942953	894	100924800	15-49-81
W5_42	SNP	52	842	0.941834	894	100995300	荆 1246
W6_21	SNP	52	842	0.941834	894	100983000	惠远 706
W6_34	SNP	52	842	0.941834	894	99177600	新石 H8
W6_53	SNP	52	842	0.941834	894	99472200	金惠 2 号
W6_59	SNP	52	842	0.941834	894	99576000	系 9
W7_19	SNP	52	842	0.941834	894	99485100	中创 83
W7_28	SNP	52	842	0.941834	894	99802500	光叶岱字棉
W7_29	SNP	52	842	0.941834	894	100461300	关农 1 号
W7_33	SNP	52	842	0.941834	894	100824600	冀棉 25
W7_37	SNP	52	842	0.941834	894	100739700	辽棉 6 号
W7_5	SNP	52	842	0.941834	894	100159500	FY11
W8_20	SNP	52	842	0.941834	894	100125300	15-34-37
W8_27	SNP	52	842	0.941834	894	100520100	15-31-37
W4_16	SNP	53	841	0.940716	894	99840300	新陆早 37 号
W4_25	SNP	53	841	0.940716	894	99889800	新陆早 34 号
W5_46	SNP	53	841	0.940716	894	99389100	10-75(GK26)
W6_17	SNP	53	841	0.940716	894	99564000	44-32*0317
W6_18	SNP	53	841	0.940716	894	100725000	907
W6_30	SNP	53	841	0.940716	894	99855300	Sic74
W6_37	SNP	53	841	0.940716	894	99430800	TH1246
W7_16	SNP	53	841	0.940716	894	99008700	新石 K25
W7_21	SNP	53	841	0.940716	894	100089600	科林 113
W7_38	SNP	53	841	0.940716	894	99726900	9D208
W8_23	SNP	53	841	0.940716	894	100993800	15-32-56

W8_44	SNP	53	841	0.940716	894	100825200	15-22-123
W5_44	SNP	54	840	0.939597	894	100837200	604
W5_45	SNP	54	840	0.939597	894	100416000	石 K9*69-2
W6_15	SNP	54	840	0.939597	894	100869000	78-12*27-67
W7_58	SNP	54	840	0.939597	894	99997500	12-4-18
W4_14	SNP	55	839	0.938479	894	100904400	豫无 19
W6_36	SNP	55	839	0.938479	894	100311900	Z1112
W7_20	SNP	55	839	0.938479	894	99243300	合信 3-15
W7_3	SNP	55	839	0.938479	894	100638300	益早棉 1 号
W7_46	SNP	55	839	0.938479	894	99991800	12-7-63
W8_16	SNP	55	839	0.938479	894	99406200	15-49-52
W8_22	SNP	55	839	0.938479	894	99472200	15-32-58
W8_35	SNP	55	839	0.938479	894	100480200	15-24-43
W8_43	SNP	55	839	0.938479	894	99589500	15-22-138
W8_51	SNP	55	839	0.938479	894	100058700	15-20-77
W4_28	SNP	56	838	0.93736	894	99112500	鑫秋 4 号
W6_11	SNP	56	838	0.93736	894	100515300	69--2
W6_54	SNP	56	838	0.93736	894	100317000	辽棉 18
W7_14	SNP	56	838	0.93736	894	99093900	B4-23
W7_48	SNP	56	838	0.93736	894	99941700	12-7-61
W8_8	SNP	56	838	0.93736	894	99772200	12-2-3
W5_52	SNP	57	837	0.936242	894	100220400	116-39 李
W5_55	SNP	57	837	0.936242	894	100485300	丰凯 2002
W6_13	SNP	57	837	0.936242	894	99657600	69-2*68-38*44-5
W6_55	SNP	57	837	0.936242	894	100733100	农大 06-2
W6_60	SNP	57	837	0.936242	894	99150900	新垦 09
W8_12	SNP	57	837	0.936242	894	99462000	15-50-26
W6_42	SNP	58	836	0.935123	894	100928700	ZJ6
W8_11	SNP	58	836	0.935123	894	100039800	12-1-41
W8_32	SNP	58	836	0.935123	894	99022500	15-26-117
W8_33	SNP	58	836	0.935123	894	99439800	15-26-115
W5_47	SNP	59	835	0.934004	894	100508700	垦 4432*42-53
W7_15	SNP	59	835	0.934004	894	99036900	德夏棉 1 号
W7_6	SNP	59	835	0.934004	894	100377900	ZB0848
W8_13	SNP	59	835	0.934004	894	100167300	15-50-24
W8_6	SNP	59	835	0.934004	894	100583400	12-2-62
W8_7	SNP	59	835	0.934004	894	99838800	12-2-43
W5_54	SNP	60	834	0.932886	894	100389900	148-39*06X2
W6_24	SNP	60	834	0.932886	894	100596600	G2-2-5
W6_3	SNP	60	834	0.932886	894	100425600	(ZJ6*112-17)BC3
W6_48	SNP	60	834	0.932886	894	99048000	惠和 28 号
W6_7	SNP	60	834	0.932886	894	99922800	52-64*42-53K
W7_36	SNP	60	834	0.932886	894	100682400	冀棉 1 号
W7_42	SNP	60	834	0.932886	894	100202400	12-12-25
W8_19	SNP	60	834	0.932886	894	100493400	15-34-38

W6_28	SNP	61	833	0.931767	894	99491100	JF-2
W7_53	SNP	61	833	0.931767	894	99729900	12-5-61
W5_58	SNP	62	832	0.930649	894	100466100	15-10
W7_11	SNP	62	832	0.930649	894	100858500	惠远 12
W7_47	SNP	62	832	0.930649	894	99605700	12-7-62
W8_2	SNP	62	832	0.930649	894	99890100	12-3-100
W8_34	SNP	62	832	0.930649	894	100190700	15-24-74
W5_48	SNP	63	831	0.92953	894	99879600	41-79*抗 10
W6_40	SNP	63	831	0.92953	894	100251300	C6-5-3-3
W6_44	SNP	63	831	0.92953	894	100044000	博 6
W7_57	SNP	63	831	0.92953	894	100730100	12-4-65
W8_10	SNP	63	831	0.92953	894	99693300	12-1-99
W8_25	SNP	63	831	0.92953	894	99323700	15-31-127
W8_5	SNP	63	831	0.92953	894	99361500	12-3-6
W6_6	SNP	64	830	0.928412	894	99247500	HY3(闫)
W8_17	SNP	64	830	0.928412	894	99436200	15-48-27
W8_26	SNP	64	830	0.928412	894	100524900	15-31-60
W6_51	SNP	65	829	0.927293	894	100836000	惠远 720
W7_10	SNP	65	829	0.927293	894	99849300	农大棉 8 号
W7_60	SNP	65	829	0.927293	894	99119100	12-4-13
W6_49	SNP	66	828	0.926174	894	100147800	新陆早 61 号
W8_24	SNP	66	828	0.926174	894	99160800	15-31-131
W8_38	SNP	66	828	0.926174	894	99833100	15-23-71
W8_54	SNP	66	828	0.926174	894	100014300	217
W5_59	SNP	67	827	0.925056	894	100699200	淮棉 2 号
W6_10	SNP	67	827	0.925056	894	100195500	C2
W6_27	SNP	67	827	0.925056	894	99646800	IF1-1K
W7_30	SNP	67	827	0.925056	894	99294000	晋棉 29
W6_22	SNP	68	826	0.923937	894	99210600	闫棉 216
W7_56	SNP	68	826	0.923937	894	99101400	12-4-94
W8_52	SNP	68	826	0.923937	894	100813800	新石 H 12
W6_35	SNP	69	825	0.922819	894	100593900	天云 07195
W6_43	SNP	69	825	0.922819	894	99564000	标杂 A 父本
W8_30	SNP	70	824	0.9217	894	99070500	15-30-10
W8_36	SNP	70	824	0.9217	894	99015300	15-24-42
W7_4	SNP	71	823	0.920582	894	100414200	中 705
W8_42	SNP	74	820	0.917226	894	99028800	15-23-1
W7_9	SNP	75	819	0.916107	894	100838100	112-27
W6_39	SNP	76	818	0.914989	894	99708300	金垦 1242
W8_37	SNP	78	816	0.912752	894	99621900	15-24-19
W8_18	SNP	79	815	0.911633	894	99877200	15-37-106
W8_50	SNP	80	814	0.910515	894	99403800	15-21-16
W8_39	SNP	83	811	0.907159	894	99165900	15-23-68

表 3 低密度液相基因芯片在 200 个棉花品种材料中转基因成分检出情况

基因名 称	A1Bt	A2C PTI	A3CP4 -epsps	A4CP4-e psps	A5b ar	A6p at	A7CdP 450	A8cp 4-eps ps	B.1CaM V35S	B.2FM V35S	B.3 NO S	B.4NO S	B.5C aMV 35S	NPTII
检出的 个体数	64	0	0	3	0	0	0	0	68	3	0	54	0	64
W4_10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
W4_11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
W4_12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
W4_13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
W4_14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
W4_15	96.03%	0	0	0	0	0	0	0	100.00%	0	0	99.08%	0	100.00%
W4_16	96.03%	0	0	0	0	0	0	0	100.00%	0	0	99.54%	0	100.00%
W4_18	96.03%	0	0	0	0	0	0	0	100.00%	0	0	98.16%	0	100.00%
W4_19	96.36%	0	0	0	0	0	0	0	100.00%	0	0	99.08%	0	100.00%
W4_20	96.03%	0	0	0	0	0	0	0	100.00%	0	0	92.17%	0	100.00%
W4_21	96.03%	0	0	0	0	0	0	0	100.00%	0	0	99.08%	0	100.00%
W4_22	96.03%	0	0	0	0	0	0	0	100.00%	0	0	99.08%	0	100.00%
W4_23	96.03%	0	0	0	0	0	0	0	100.00%	0	0	99.08%	0	100.00%
W4_24	96.03%	0	0	0	0	0	0	0	100.00%	0	0	99.08%	0	100.00%
W4_25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
W4_26	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
W4_27	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
W4_28	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
W5_40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
W5_41	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
W5_42	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
W5_43	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
W5_44	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
W5_45	96.03%	0	0	0	0	0	0	0	100.00%	0	0	99.08%	0	100.00%
W5_46	96.03%	0	0	0	0	0	0	0	100.00%	0	0	99.08%	0	100.00%
W5_47	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
W5_48	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
W5_49	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
W5_50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
W5_51	96.03%	0	0	100.00%	0	0	0	0	100.00%	100.00%	0	99.08%	0	100.00%
W5_52	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
W5_53	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
W5_54	96.03%	0	0	0	0	0	0	0	100.00%	0	0	99.08%	0	100.00%
W5_55	96.03%	0	0	0	0	0	0	0	100.00%	0	0	62.21%	0	95.47%
W5_56	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
W5_57	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
W5_58	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
W5_59	96.03%	0	0	0	0	0	0	0	100.00%	0	0	99.08%	0	100.00%
W6_10	41.06%	0	0	0	0	0	0	0	34.36%	0	0	0	0	34.59%
W6_11	96.03%	0	0	0	0	0	0	0	100.00%	0	0	76.96%	0	100.00%

[illegible]

W8_36	96.03%	0	0	0	0	0	0	0	100.00%	0	0	0	0	89.18%
W8_37	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
W8_38	96.03%	0	0	0	0	0	0	0	100.00%	0	0	99.08%	0	100.00%
W8_39	96.03%	0	0	0	0	0	0	0	100.00%	0	0	79.26%	0	100.00%
W8_3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
W8_40	96.36%	0	0	0	0	0	0	0	100.00%	0	0	99.08%	0	100.00%
W8_41	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
W8_42	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
W8_43	96.03%	0	0	0	0	0	0	0	100.00%	0	0	0	0	89.81%
W8_44	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
W8_45	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
W8_46	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
W8_4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
W8_50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7.30%
W8_51	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
W8_52	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
W8_53	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
W8_54	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
W8_55	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
W8_5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
W8_6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
W8_7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
W8_8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
W8_9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

以上结果证实低密度SNP液相芯片在200份陆地棉材料中的检出率为90.7%-96.5%，平均位点检出率为94%。在陆地棉品种中具有较高多态性，十分适合陆地棉种质资源评价、遗传改良以及转基因成分检测，检测准确性高。相比于已有的固相芯片和已开发的高密度液相芯片，可以以更低的成本开展棉花育种研究。

显然，上述实施例仅仅是为清楚地说明所作的举例，而并非对实施方式的限定。对于所属领域的普通技术人员来说，在上述说明的基础上还可以做出其他不同形式的变化或变动。这里无需也无法把所有的实施方式予以穷举。而由此所引申出的显而易见的变化或变动仍处于本发明的保护范围。

权利要求书

- 1.一种基于靶向捕获测序的陆地棉低密度液相芯片，其特征在于，所述陆地棉全基因组低密度 SNP 芯片由检测 894 个 SNP 位点以及 14 种主要转基因的探针组成；所述 14 种主要转基因具体为：A1Bt、A2CPTI、A3CP4-epsps、A4CP4-epsps、A5bar、A6pat、A7CdP450、A8cp4-epsps、B.1CaMV35S、B.2FMV35S、B.3NOS、B.4NOS、B.5CaMV35S 和 NPTII；所述 894 个 SNP 位点如表 1 所示。
- 2.根据权利要求 1 所述的基于靶向捕获测序的陆地棉低密度液相芯片，其特征在于，所述检测 14 种主要转基因的探针如 SEQ ID NO.1~SEQ ID NO.14 所示。
- 3.权利要求 1 或所述的基于靶向捕获测序的陆地棉低密度液相芯片的应用，其特征在于，包括：陆地棉转基因成分检测及基因分型、陆地棉资源评价和亲缘鉴定、种子纯度鉴定以及陆地棉品种主要农艺性状遗传改良。
- 4.根据权利要求 3 所述的应用，其特征在于，主要农艺性状包括纤维品质性状、产量性状、抗病性。

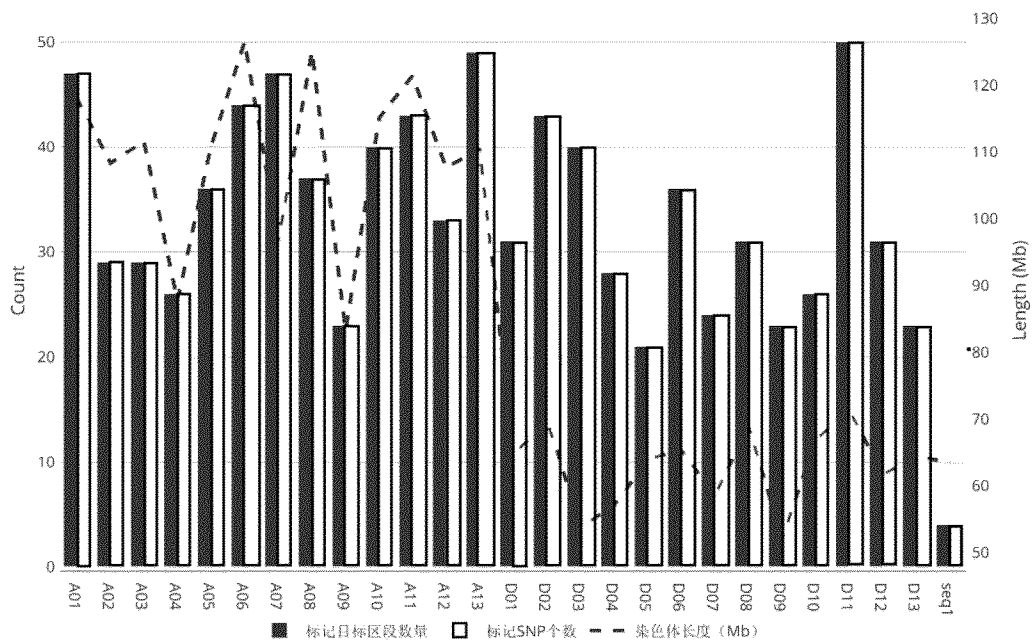


图 1

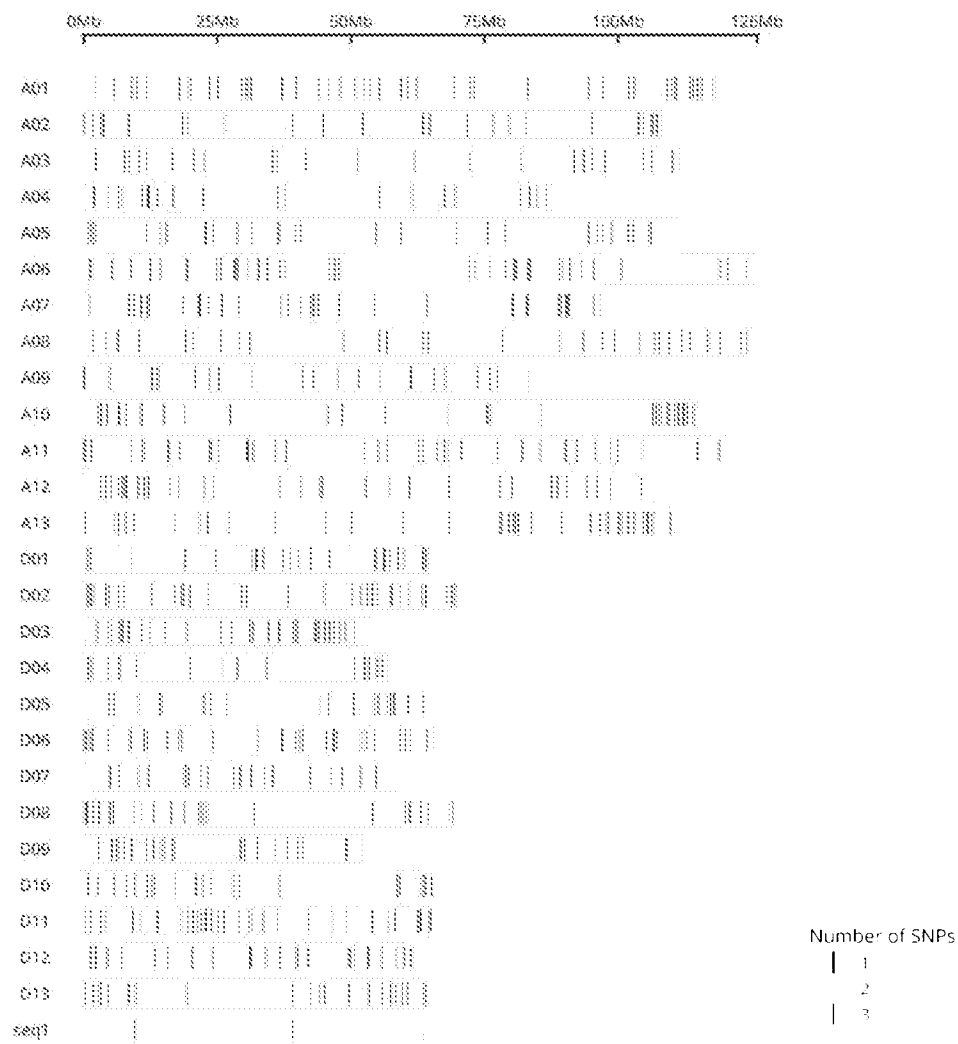


图 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2024/099474

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q1/6895(2018.01)i; C12N15/11(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC: C12Q, C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNXTX, WPABSC, WPABS, ENTXTC, ENTXT, DPWI, VEN, CNKI, 万方数据, WANFANG DATABASE, Web of Science, 百度学术, BAIDU SCHOLAR, HimmPat, incoPat, 读秀, DUXIU, 中国生物序列检索系统, China Patents Biological Sequence Search System, NCBI, EBI, STNext: 申请人, 发明人, Applicants, Inventors, 棉, 液相, 液体, 芯片, SNP, A1Bt, A2CPTI, A3CP4-epsps, A4CP4-epsps, A5bar, A6pat, A7CdP450, A8cp4-epsps, B.1CaMV35S, B.2FMV35S, B.3NOS, B.4NOS, B.5CaMV35S, NPtII, hirsutum, cotton, liquid, chip?, 序列1-14

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 116751886 A (ZHEJIANG UNIVERSITY) 15 September 2023 (2023-09-15) claims 1-4, description, paragraphs 8-12, table 1, and sequences 1-14	1-4
A	SI, Zhangfeng et al. "The design, validation, and utility of the "ZJU CottonSNP40K" liquid chip through genotyping by target sequencing" <i>INDUSTRIAL CROPS & PRODUCTS</i> , Vol. 188, 12 December 2022 (2022-12-12), article no. 115629 abstract, and sections 2.1, 2.2, 2.5, 3.1, 3.4 and 3.5	1-4
A	CN 113308562 A (ZHEJIANG UNIVERSITY) 27 August 2021 (2021-08-27) claim 1, and description, paragraphs 9-11, 19 and 40	1-4
A	WO 2018085971 A1 (NANJING AGRICULTURAL UNIVERSITY) 17 May 2018 (2018-05-17) description, page 3, paragraphs 2-4, 6 and 8 and page 4, paragraphs 1, 6 and 7	1-4



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"D" document cited by the applicant in the international application
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

06 September 2024

Date of mailing of the international search report

11 September 2024

Name and mailing address of the ISA/CN

China National Intellectual Property Administration (ISA/
CN)
China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District,
Beijing 100088

Authorized officer

Telephone No.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	FANG, Lei et al. "Genomic analyses in cotton identify signatures of selection and loci associated with fiber quality and yield traits" <i>NATURE GENETICS</i> , Vol. 49, No. (7), 05 June 2017 (2017-06-05), 1089-1098 abstract, page 2, right-hand column, last paragraph-page 3, right-hand column, last paragraph and page 4, left-hand column, paragraph 3, and figure 2	1-4
A	HU, Yan et al. "Gossypium barbadense and Gossypium hirsutum genomes provide insights into the origin and evolution of allotetraploid cotton" <i>NATURE GENETICS</i> , Vol. 54, No. (4), 30 April 2019 (2019-04-30), 739-748 abstract, page 740, left-hand column, paragraph 1, and figure 2	1-4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2024/099474

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. ☒ forming part of the international application as filed.
 - b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),
☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2024/099474

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
CN	116751886	A	15 September 2023	None	
CN	113308562	A	27 August 2021	None	
WO	2018085971	A1	17 May 2018	None	

A. 主题的分类

C12Q1/6895(2018.01)i; C12N15/11(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

IPC: C12Q, C12N

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

CNTEXT, WPABSC, WPABS, ENTXTC, ENTXT, DPWI, VEN, CNKI, 万方数据, Web of Science, 百度学术, HimmPat, incoPat, 读秀, 中国生物序列检索系统, NCBI, EBI, STNext: 申请人, 发明人, Applicants, Inventors, 棉, 液相, 液体, 芯片, SNP, A1Bt, A2CPTI, A3CP4-epsps, A4CP4-epsps, A5bar, A6pat, A7CdP450, A8cp4-epsps, B.1CaMV35S, B.2FMV35S, B.3NOS, B.4NOS, B.5CaMV35S, NPTII, hirsutum, cotton, liquid, chip? , 序列1-14

C. 相关文件

类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
PX	CN 116751886 A (浙江大学) 2023年9月15日 (2023 - 09 - 15) 权利要求1-4, 说明书第8-12段, 表1, 序列1-14	1-4
A	SI, Z.F.等. "The design, validation, and utility of the "ZJU CottonSNP40K" liquid chip thorough genotyping by target sequencing" INDUSTRIAL CROPS & PRODUCTS, 第188卷, 2022年12月12日 (2022 - 12 - 12), 第115629篇 摘要, 第2.1, 2.2, 2.5, 3.1, 3.4, 3.5节	1-4
A	CN 113308562 A (浙江大学) 2021年8月27日 (2021 - 08 - 27) 权利要求1, 说明书第9-11, 19, 40段	1-4
A	WO 2018085971 A1 (NANJING AGRICULTURAL UNIVERSITY) 2018年5月17日 (2018 - 05 - 17) 说明书第3页第2-4, 6, 8段, 第4页第1, 6, 7段	1-4

☒ 其余文件在C栏的续页中列出。

☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

"A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

"D" 申请人在国际申请中引证的文件

"E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

"L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)

"O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

"p" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

"T" 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

"X" 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

"Y" 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

"&" 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

2024年9月6日

国际检索报告邮寄日期

2024年9月11日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中国国家知识产权局
中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088

授权官员

刘春杰

电话号码 (+86) 010-53961934

PCT/ISA/210 表(第2页) (2022年7月)

C. 相关文件		
类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
A	FANG,L.等. "Genomic analyses in cotton identify signatures of selection and loci associated with fiber quality and yield traits" NATURE GENETICS, 第49卷, 第7期, 2017年6月5日 (2017 - 06 - 05), 1089-1098 摘要, 第2页右栏最后1段-第3页右栏最后1段, 第4页左栏第3段, 图2	1-4
A	HU,Y.等. "Gossypium barbadense and Gossypium hirsutum genomes provide insights into the origin and evolution of allotetraploid cotton" NATURE GENETICS, 第54卷, 第4期, 2019年4月30日 (2019 - 04 - 30), 739-748 摘要, 第740页左栏第1段, 图2	1-4

第I栏 核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列,国际检索是基于下列序列表进行的:
- a. ☒ 作为国际申请的一部分提交的:
 - b. ☐ 为国际检索的目的在国际申请日之后提交 (细则13之三.1(a)) ,
☐ 附有说明序列表不超出所提交国际申请公开范围的声明。
2. ☐ 本报告是在没有收到符合WIPO ST.26标准的序列表的情况下, 考虑了国际申请中披露的任何核苷酸和/或氨基酸序列, 在可进行有意义检索的范围内做出的。
3. 补充意见:

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2024/099474

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)
CN	116751886	A	2023年9月15日	无	
CN	113308562	A	2021年8月27日	无	
WO	2018085971	A1	2018年5月17日	无	