



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 109727643 B

(45) 授权公告日 2022. 07. 19

(21) 申请号 201811482775.1

(22) 申请日 2018.12.05

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 109727643 A

(43) 申请公布日 2019.05.07

(73) 专利权人 云南中烟工业有限责任公司
地址 650231 云南省昆明市五华区红锦路
367号

(72) 发明人 高茜 向海英 曾婉俐 邓乐乐
蒋佳芮 许力 张建铎 杨光宇
李雪梅

(74) 专利代理机构 北京市领专知识产权代理有
限公司 11590
专利代理师 陈有业 任文娟

(51) Int. Cl.
G16B 30/00 (2019.01)
G01N 33/00 (2006.01)
G01N 35/00 (2006.01)
C12Q 1/6869 (2018.01)

(56) 对比文件

- CN 104657809 A, 2015.05.27
- CN 104732358 A, 2015.06.24
- CN 103164777 A, 2013.06.19
- CN 104651261 A, 2015.05.27
- CN 106779397 A, 2017.05.31
- CN 107206384 A, 2017.09.26
- CN 202748642 U, 2013.02.20
- ES 2274906 T3, 2007.06.01
- US 2015133523 A1, 2015.05.14
- US 2009299645 A1, 2009.12.03
- 管莹等.《电子烟烟液体外毒理学评价用细胞筛选研究》.《中国烟草学报》.2018,第24卷(第05期),第84-90页.
- 胡利伟等.《基于锁核苷酸(LNA)增敏的植烟土壤青枯雷尔氏菌定量PCR检测》.《烟草科技》.2017,第50卷(第12期),第14-21页.
- 熊贝贝等.《基于无线射频识别技术的食品安全检测实验室样品管理系统的设计与建立》.《食品安全质量检测学报》.2014,第5卷(第11期),第3514-3519页.

审查员 曾贞

权利要求书2页 说明书5页

(54) 发明名称

一种单靶点基因编辑T1代烟株筛选方法

(57) 摘要

本发明公开了一种单靶点基因编辑T1代烟株筛选方法,包括:(1)使用掌上电脑采集样品信息并与服务器终端进行无线连接;(2)根据掌上电脑与服务器终端无线连接的结果对烟叶样品进行管理,实时完成需进行烟叶样品采集的烟草烟株的筛选、烟叶样品的采集、签收、处理、存储、派样、检测、验余样品存储和验余样品处置的操作;并将检测结果反馈给烟株种植人员,从而完成单靶点基因编辑T1代烟株筛选。所述T1代烟株为T0代种子种出来的苗烟株,其中T0代种子为基因编辑再生苗烟株的种子。本发明的方法可以达到对相似的海量的单靶点基因编辑T1代烟株的

高效、精准的筛选。

1. 一种单靶点基因编辑T1代烟株筛选方法,其特征在于,包括:

(1) 使用掌上电脑采集样品信息并与服务器终端进行无线连接;

(2) 根据掌上电脑与服务器终端无线连接的结果对烟叶样品进行管理,实时完成需进行烟叶样品采集的烟草烟株的筛选、烟叶样品的采集、签收、处理、存储、派样、检测、验余样品存储和验余样品处置的操作;并将检测结果反馈给烟株种植人员,从而完成单靶点基因编辑T1代烟株筛选;

所述步骤(2)包括:

(21) 对单靶点基因编辑后的T0代种子进行点种和编码,并在T1代烟株苗期进行DNA测序,将烟株的DNA测序结果及对应的烟株编码上传至服务器终端;所述T0代种子为基因编辑再生苗烟株的种子,所述T1代烟株为T0代种子种出来的苗烟株;

(22) 观察哪些烟株已经达到现蕾期,使用掌上电脑对现蕾期烟株编码进行扫描,根据烟株编码对应的DNA测序结果和是否为首次采集对烟株进行筛选是否进行烟叶采集,从而完成烟株的筛选操作;

(23) 采集烟叶样品装入样品袋中并封口,通过蓝牙连接便携式打印机进行样品编码并打印,将打印后的样品编码贴在样品袋上并上传至服务器终端,从而完成烟叶样品采集的操作;

(24) 烟叶样品处理部门对采集的烟叶样品进行处理,然后存储在编码对应的固定位置,并采用掌上电脑扫描样品编码将存储位置上传至服务器终端,从而完成烟叶样品处理和存储操作;

(25) 烟叶样品派送部门将存储的烟叶样品派送给相应的检测人员并上传至服务器终端,从而完成烟叶样品派送操作;

(26) 检测完成后剩余样品退给样品存储部门,存储部门使用掌上电脑进行编码后存储,并上传至服务器终端;

(27) 样品检测人员将检测结果在电脑上记录并上传给服务器终端,烟株种植人员根据检测结果及烟株表型记录情况完成单靶点基因编辑T1代烟株筛选工作。

2. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述步骤(21),其包括:

(211) 对基因编辑后的分化苗烟株进行挂牌编码,每棵分化苗烟株均有其对应的独立编码;

(212) 在苗期进行分子采样并进行DNA测序,测序分两步进行:第一步测序烟株是否有sgRNA插入,第二步测序烟株是否有基因编辑;

(213) 将烟株的DNA测序结果及对应的烟株编码上传至服务器终端。

3. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述步骤(22),其包括:

(221) 使用掌上电脑对烟株编码进行扫描,根据服务器终端进行判定烟株是否为首次烟叶采集,若是则是需要采集烟叶样品的烟株;反之则不采集烟叶样品;

(222) 得到步骤(221)为需要采集的烟株,继续使用掌上电脑对烟株编码进行扫描,根据服务器终端对应的DNA测序结果判断是否采集烟叶样品。

4. 根据权利要求3所述的方法,其特征在于,所述步骤(222),其包括:

(2221) 根据服务器终端对应的DNA测序结果对烟株进行判定,将烟株分为四类,第一类:无需采样,DNA测序结果是无编辑;第二类:需采样,DNA测序结果是有编辑但是杂合体;

第三类:需采样且重点关注,因为DNA测序结果有编辑且是纯合体,第四类:需采样,其为未进行基因编辑处理的母本烟株;

(2222) 将第二类、第三类和第四类烟株进行扫描并上传至服务器终端,从而完成烟株的筛选操作。

5. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述步骤(23),其还包括:

(231) 同时在掌上电脑上记录烟株是否有特殊表型,所述特殊表型为叶色白化或黄化、叶面蜡质化革质化、叶缘内缩、主茎多分枝;

(232) 将特殊表型和具有特殊表型对应的烟株编码上传至服务器终端。

6. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述步骤(24),其包括:

(241) 烟叶样品处理部门对采集的烟叶样品进行冷冻干燥和粉碎处理后,放入样品存储管中,同时扫描烟叶样品袋上的样品编码,通过蓝牙连接便携式打印机打印样品编码贴在样品存储管上;

(242) 然后将样品存储管存储在其编码对应的样品架上的固定位置,并采用掌上电脑扫描样品编码将存储位置上传至服务器终端,从而完成烟叶样品处理和存储操作。

7. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述步骤(25),其包括:

(251) 烟叶样品派送部门将存储的烟叶样品派送给相应的检测人员,同时在掌上电脑上记录所派送人员、派送样品量及派送后剩余样品量并上传至服务器终端;

(252) 系统自动提醒检测人员优先检测需采样且重点关注的烟叶样品。

8. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述步骤(26),其包括:

(261) 样品存储部门判断存储的验余样品是否已经达到预设的存储期限,若是,则对验余样品进行销毁结束流程;反之,则使用掌上电脑进行编码后继续存储并上传至服务器终端。

9. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述步骤(27),其包括:

(271) 烟叶样品检验人员将检测的结果及对应的烟叶样品烟株编码在掌上电脑上记录并上传给服务器终端;所述检测为光谱分析检测、常规化学成分分析检测或基因编辑靶点预设代谢物检测;

(272) 烟株种植人员判断上传的检测结果及烟株表型情况与已有的未进行基因编辑处理的烟株进行统计学分析两者的区别;若全部无变化,则该烟叶样品对应的烟株进行收种保存,暂时不做进一步处理,记录并上传给服务器终端;反之,则该烟叶样品对应的烟株进行收种,并优先种植基因靶点预设代谢物检测与DNA检测结果一致的烟株,进行下一轮烟株筛选,记录并上传给服务器终端;从而完成单靶点基因编辑T1代烟株筛选工作。

一种单靶点基因编辑T1代烟株筛选方法

技术领域

[0001] 本发明涉及计算机软件领域,具体涉及一种用于基因编辑育种中的高效准确单靶点基因编辑T1代的海量烟株筛选方法。

背景技术

[0002] 基因编辑育种技术已被广泛用于各种植物的基因组修饰中,如拟南芥、水稻和烟草等。随着烟草基因编辑育种工厂的建成和素材创制的快速推进,海量基因编辑素材被创制出来,这些编辑素材在烟株表型筛选上成为关注重点,但相似烟株表型的烟叶化学成分及生理生化指标上具有差异。因此如何对海量的编辑素材进行烟株的高效精准筛选成为一个亟待解决的问题。

[0003] 由于烟株的筛选涉及烟株选择、烟叶样品采集及处理分析反馈等多个步骤,包括需要烟叶样品采集的烟株选择、烟株采样标记、特殊表型记录、烟叶采集装袋、烟叶冻存、烟叶冷冻干燥、烟叶磨碎、烟叶粉末存储、检测和验余样品的处理,最终根据烟株的检测结果的反馈对海量的烟草烟株重新筛选等,以上流程的大部分工作通常在远离电脑端进行,传统采用人工用记号笔将烟株编码抄写至样品袋或者样品管上,再逐步将编码录入电脑端,这些操作对人员素质要求高,极容易产生各类差错,严重影响样品管理过程进而影响烟叶编辑素材的高效精确筛选。同时采样及前处理过程存在较大的随意性,若不进行统一管理则会给后续的检测带来不稳定性。这些都严重影响烟草基因编辑育种工厂的建成和素材创制的快速推进。

[0004] 为解决上述问题,提出本发明。

发明内容

[0005] 本发明公开了一种单靶点基因编辑T1代烟株筛选方法,本发明的方法可以对烟株选择、烟叶样品的采集、签收、处理、存储、派送、验余样品处理进行高效准确便捷的管理,从而完成单靶点基因编辑T1代的海量烟株高效准确筛选。本发明的技术方案如下:

[0006] 本发明公开了一种单靶点基因编辑T1代烟株筛选方法,包括:

[0007] (1) 使用掌上电脑采集样品信息并与服务器终端进行无线连接;

[0008] (2) 根据掌上电脑与服务器终端无线连接的结果对烟叶样品进行管理,实时完成需进行烟叶样品采集的烟草烟株的筛选、烟叶样品的采集、签收、处理、存储、派样、检测、验余样品存储和验余样品处置的操作;并将检测结果反馈给烟株种植人员,从而完成单靶点基因编辑T1代烟株筛选。

[0009] 优选地,所述步骤(2),其包括:

[0010] (21) 对单靶点基因编辑后的T0代种子进行点种和编码,在并在T1代烟株苗期进行DNA测序,将烟株的DNA测序结果及对应的烟株编码上传至服务器终端;所述T0代种子为基因编辑再生苗烟株的种子,所述T1代烟株为T0代种子种出来的苗烟株;

[0011] (22) 观察哪些烟株已经达到现蕾期,使用掌上电脑对现蕾期烟株编码进行扫描,

根据烟株编码对应的DNA测序结果和是否为首次采集对烟株进行筛选是否进行烟叶采集，从而完成烟株的筛选操作；

[0012] (23) 采集烟叶样品装入样品袋中并封口，通过蓝牙连接便携式打印机进行样品编码并打印，将打印后的样品编码贴在样品袋上并上传至服务器终端，从而完成烟叶样品采集的操作；

[0013] (24) 烟叶样品处理部门对采集的烟叶样品进行处理，然后存储在编码对应的固定位置，并采用掌上电脑扫描样品编码将存储位置上传至服务器终端，从而完成烟叶样品处理和存储操作；

[0014] (25) 烟叶样品派送部门将存储的烟叶样品派送给相应的检测人员并上传至服务器终端，从而完成烟叶样品派送操作；

[0015] (26) 检测完成后剩余样品退给样品存储部门，存储部门使用掌上电脑进行编码后存储，并上传至服务器终端；

[0016] (27) 样品检测人员将检测结果在电脑上记录并将上传给服务器终端，烟株种植人员根据检测结果及烟株表型记录情况完成单靶点基因编辑T1代烟株筛选工作。

[0017] 再优选地，所述步骤(21)，其包括：

[0018] (211) 对基因编辑后的分化苗烟株进行挂牌编码，每棵分化苗烟株均有其对应的独立编码；

[0019] (212) 在苗期进行分子采样并进行DNA测序，测序分两步进行：第一步测序烟株是否有sgRNA插入，第二步测序烟株是否有基因编辑；

[0020] (213) 将烟株的DNA测序结果及对应的烟株编码上传至服务器终端。

[0021] 再优选地，所述步骤(22)，其包括：

[0022] (221) 使用掌上电脑对烟株编码进行扫描，根据服务器终端进行判定烟株是否为首次烟叶采集，若是则是需要采集烟叶样品的烟株；反之则不采集烟叶样品；

[0023] (222) 得到步骤(221)为需要采集的烟株，继续使用掌上电脑对烟株编码进行扫描，根据服务器终端对应的DNA测序结果判断是否采集烟叶样品。

[0024] 进一步优选地，所述步骤(222)，其包括：

[0025] (2221) 根据服务器终端对应的DNA测序结果对烟株进行判定，将烟株分为四类，第一类：无需采样，DNA测序结果是无编辑；第二类：需采样，DNA测序结果是有编辑但是杂合体；第三类：需采样且重点关注，因为DNA测序结果有编辑且是纯合体，第四类：需采样，其为未进行基因编辑处理的母本烟株；

[0026] (2222) 将第二类、第三类和第四类烟株进行扫描并上传至服务器终端，从而完成烟株的筛选操作。

[0027] 再优选地，所述步骤(23)，其还包括：

[0028] (231) 同时在掌上电脑上记录烟株是否有特殊表型，所述特殊表型为叶色白化或黄化、叶面蜡质化革质化、叶缘内缩、主茎多分枝等；

[0029] (232) 将特殊表型和具有特殊表型对应的烟株编码上传至服务器终端。

[0030] 再优选地，所述步骤(24)，其包括：

[0031] (241) 烟叶样品处理部门对采集的烟叶样品进行冷冻干燥和粉碎处理后，放入样品存储管中，同时扫描烟叶样品袋上的样品编码，通过蓝牙连接便携式打印机打印样品编

码贴在样品存储管上；

[0032] (242) 然后将样品存储管存储在其编码对应的样品架上的固定位置，并采用掌上电脑扫描样品编码将存储位置上传至服务器终端，从而完成烟叶样品处理和存储操作。

[0033] 再优选地，所述步骤(25)，其包括：

[0034] (251) 烟叶样品派送部门将存储的烟叶样品派送给相应的检测人员，同时在掌上电脑上记录所派送人员、派送样品量及派送后剩余样品量并上传至服务器终端；

[0035] (252) 系统自动提醒检测人员优先检测需采样且重点关注的烟叶样品。

[0036] 再优选地，所述步骤(26)，其包括：

[0037] (261) 样品存储部门判断存储的验余样品是否已经达到预设的存储期限，若是，则对验余样品进行销毁结束流程；反之，则使用掌上电脑进行编码后继续存储并上传至服务器终端。

[0038] 再优选地，所述步骤(27)，其包括：

[0039] (271) 烟叶样品检验人员将检测的结果及对应的烟叶样品烟株编码在掌上电脑上记录并上传给服务器终端；所述检测为光谱分析检测、常规化学成分分析检测或基因编辑靶点预设代谢物检测；

[0040] (272) 烟株种植人员判断上传的检测结果及烟株表型情况与已有的未进行基因编辑处理的烟株进行统计学分析两者的区别；若全部无变化，则该烟叶样品对应的烟株进行收种保存，暂时不做进一步处理，记录并上传给服务器终端；反之，则该烟叶样品对应的烟株进行收种，并优先种植基因靶点预设代谢物检测与DNA检测结果一致的烟株，进行下一轮烟株筛选，记录并上传给服务器终端；从而完成单靶点基因编辑T1代烟株筛选工作。

[0041] 本发明的有益效果：

[0042] 1、本发明的方法根据烟叶样品的检测指标对烟株的筛选进行反馈，以达到对相似的海量烟叶基因编辑素材(即烟株)的高效、精准的筛选。本发明的方法不仅适用于单靶点基因编辑T1代烟株筛选工作，也适用于后续的海量烟株继续筛选的管理。同时本发明的方法可以任意确定检测指标并反馈给烟株种植人员，从而筛选出烟叶样品对应的烟株是否进行收种再种植进行下一轮烟株筛选。

[0043] 2、本发明的方法在烟叶样品采集阶段，根据DNA检测结果对烟株进行判定，将烟叶分为四类，减少了样品采集工作量，且提出重点关注类别，提高了检测效率。

[0044] 3、本发明的方法在烟叶样品采集阶段采用掌上电脑扫描烟株编码并自动生成样品编码，现场采集数据与服务器终端中信息无线连接，避免了传统的手抄烟株编码并录入电脑的过程，有效提高了工作效率。

[0045] 4、本发明的方法的烟叶样品存储的位置与编码完全对应，烟叶样品的编码规则固定，因此烟叶样品存储的位置固定，且在在服务器终端及掌上电脑上都可以快速查询，这样可以对大量烟叶样品进行货架管理，保证了烟叶样品存贮位置的准确性以及后续取样的便捷性。

[0046] 5、本发明的方法每一步骤均将信息与服务器终端无线连接且信息互通，因此在服务器终端及掌上电脑上都可以快速查询到每个烟叶样品所处状态，并可对烟叶样品的采样、冷冻干燥、粉碎处理及存储过程进行系统跟踪，避免样品流转期间不可追溯性。

具体实施方式

[0047] 本发明的一种单靶点基因编辑T1代烟株筛选方法技术方案如下：

[0048] 实施例1

[0049] 本发明为了更好达到单靶点基因编辑T1代烟株筛选，提出了一套在现场管理时所使用的硬件装置，该装置包括掌上电脑、服务器终端、便携式条码打印机和不干胶标签纸。

[0050] 工作流程为：掌上电脑采集的样品信息通过无线网络接入到服务器终端的数据库，服务器终端的数据也会在第一时间通过原路径反馈给掌上电脑，以实现无线连接和反馈，从而将服务器终端数据库中样品信息延伸到每一个样品管理员的手中。在样品管理过程中，标签条码的打印过程为：掌上电脑通过蓝牙技术驱动便携式打印机，从而打印处所需的标签条码。

[0051] 具体的单靶点基因编辑T1代烟株筛选方法具体步骤为：

[0052] 1、掌上电脑信息并与服务器终端进行无线连接；

[0053] 2、用掌上电脑对已种植并生长出烟叶的基因编辑烟草烟株的DNA测序结果及对应的烟株编码上传至服务器终端；

[0054] 3、使用掌上电脑根据服务器终端进行判定烟株是首次烟叶采集且是第二类，然后进行烟叶采集；

[0055] 4、烟叶样品处理部门对采集的烟叶样品进行冷冻和粉碎处理，放入样品存储管中，同时扫描烟叶样品袋上的样品编码，通过蓝牙连接便携式打印机打印样品编码贴在样品存储管上，然后将样品管存储在编码对应的固定位置，并采用掌上电脑扫描样品编码将存储位置上传至服务器终端，从而完成烟叶样品处理和存储操作；

[0056] 5、烟叶样品派送部门将存储的烟叶样品派送给相应的检测人员并上传至服务器终端，从而完成烟叶样品派送操作；

[0057] 6、检测完成后剩余样品退给样品存储部门，存储部门判断存储的验余样品是达到预设的存储期限，则对验余样品进行销毁结束流程。

[0058] 7、烟叶样品检验人员将对应的烟叶样品烟株编码检测的化学成分在掌上电脑上记录并上传给服务器终端；

[0059] 8、烟株种植人员判断上传的检测的化学成分与已有的未进行基因编辑处理的烟株编码的化学成分是相同的，则该烟叶样品对应的烟株暂时留样不做进一步处理，在掌上电脑上记录并上传给服务器终端。

[0060] 实施例2

[0061] 硬件装置同实施例1，具体的单靶点基因编辑T1代烟株筛选方法具体步骤为：

[0062] a、掌上电脑信息并与服务器终端进行无线连接；

[0063] b、用掌上电脑对已种植并生长出烟叶的基因编辑烟草烟株的DNA测序结果及对应的烟株编码上传至服务器终端；

[0064] c、使用掌上电脑根据服务器终端进行判定烟株是首次烟叶采集且是第三类，然后进行烟叶采集；

[0065] d、烟叶样品处理部门对采集的烟叶样品进行冷冻和粉碎处理，放入样品存储管中，同时扫描烟叶样品袋上的样品编码，通过蓝牙连接便携式打印机打印样品编码贴在样品存储管上，然后将样品管存储在编码对应的固定位置，并采用掌上电脑扫描样品编码将

存储位置上传至服务器终端,从而完成烟叶样品处理和存储操作;

[0066] e、烟叶样品派送部门将存储的烟叶样品派送给相应的检测人员并上传至服务器终端,从而完成烟叶样品派送操作;

[0067] f、检测完成后剩余样品退给样品存储部门,存储部门判断存储的验余样品未达到预设的存储期限,使用掌上电脑进行编码后继续存储并上传至服务器终端。

[0068] g、烟叶样品检验人员将对应的烟叶样品烟株编码检测的生理生化指标在掌上电脑上记录并上传给服务器终端;

[0069] h、烟株种植人员判断上传的检测的生理生化指标与已有的未进行基因编辑处理的烟株编码的生理生化指标不相同,则该烟叶样品对应的烟株进行收种再种植进行下一轮烟株筛选,在掌上电脑上记录并上传给服务器终端;从而完成单靶点基因编辑T1代烟株筛选工作。