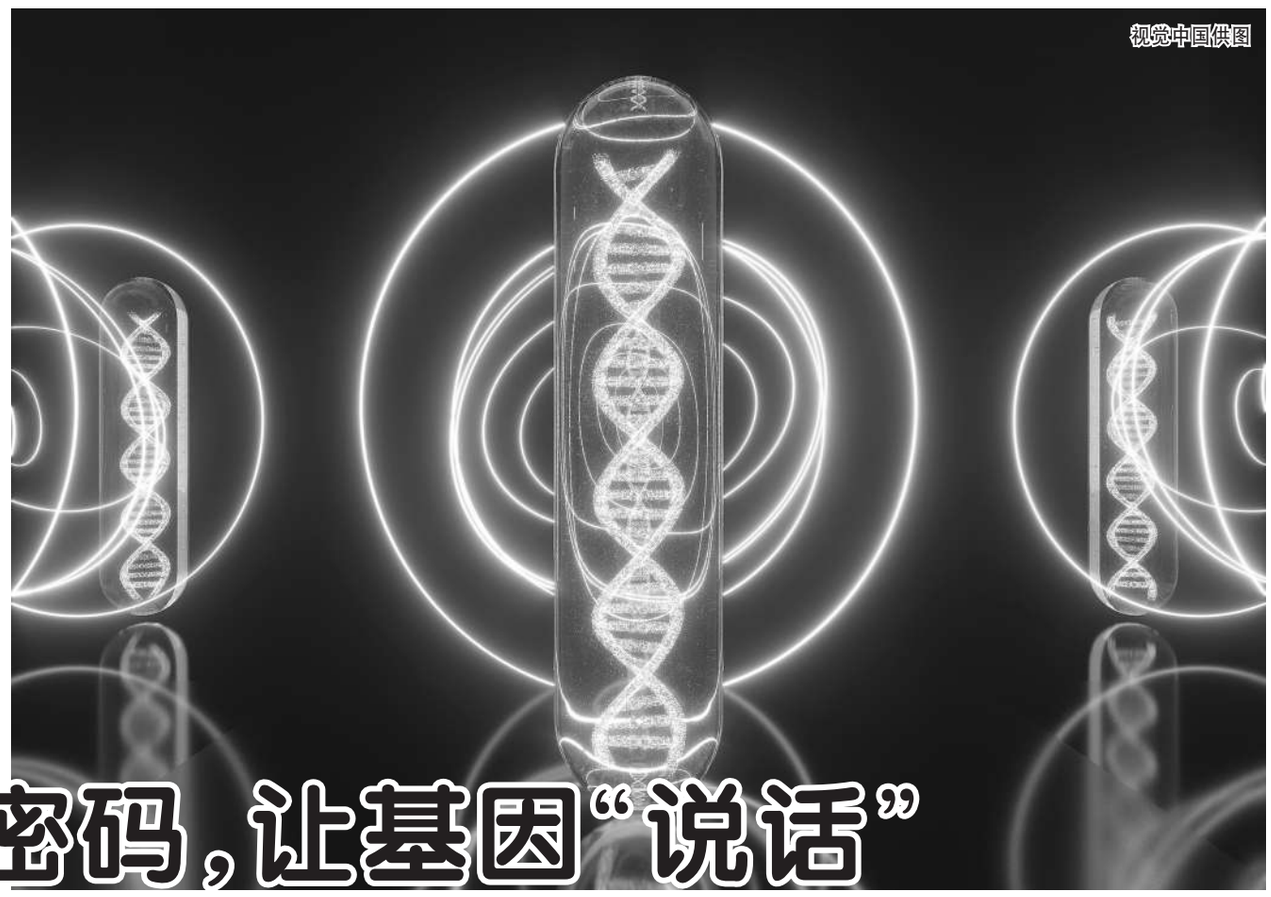
完成“人类基因组计划”所用的第一代基因测序技术，通量低、成本高、对人力需求大。而第二代基因测序技术可以一次性对几百万到几十亿条核酸分子进行序列测定，终结了漫长、浩大的测序时代，给生命科学研究和生物医学应用带来了全新突破。


视觉中国供图

# 破译生命密码，让基因“说话”

## 第二代测序技术仍为主流 第三、四代技术已露端倪

◎本报记者 唐 芳

在不久前公布的2022年度科学突破奖获奖名单中，开发二代DNA测序技术（NGS）的3位科学家荣获“生命科学突破奖”。归功于高效率的二代DNA测序技术，科学家们得以在第一时间测定新冠病毒基因序列，为人类对抗新冠病毒赢得了时间。

自1977年第一代DNA测序技术（Sanger法）问世以来，基因测序技术经历了第二代高通量测序技术和第三代单分子测序技术的变革，正在冲刺第四代纳米孔测序技术。目前，凭借高通量、大规模、并行测序以及速度快、成本低等显著优势，高通量测序技术已成为全球主流基因测序技术。

那么，以第二代测序技术为主导的我国基因测序产业现状如何？第三代、第四代基因测序技术距离商用化还有多远？对此，科技日报记者采访了著名基因组学专家、中国基因组学研究主要奠基人、中国科学院大学教授于军，以及我国主要基因测序仪生产商华大智造公司高级产品经理张陆琪。

### 高通量测序为全球主流基因测序技术

“生命密码”是一门语言，解读这门语言需要用到基因测序技术。“3位科学家在1998年发明的二代DNA测序技术，也被称作大规模并行测序技术，其更为人熟知的名字是高通量测序技术。”张陆琪对科技日报记者说。自DNA双螺旋结构于1953年被发现，生物学家便认识到，DNA中的A、T、C、G碱基排列信息包含了生物的全部遗传密码。

对于基因测序技术的代际关系，于军打比方说：“一代、二代、三代、四代测序仪并非相互取代的‘改朝换代’关系。就好比小客车、公交车、高铁、飞机都是交通工具，但它们会同时存在，以满足人们不同的出行需求。”

作为全球主流基因测序技术，高通量测序技术的主要应用领域包括无创产检（NIPT）、肿瘤、感染和胚胎植入前遗传学诊断和筛查等。据张陆琪介绍，高通量测序技术包含3种主流方式，分别为桥式PCR扩增与边合成边测序结合的测序技术、乳液PCR与半导体合成测序技术、以华大智造为代表的DNA纳米球与联合探针锚定聚合技术结合的测序技术。

“以华大智造高通量测序仪的测序过程为例，首先要建库，将待测的DNA碎片化，并将接头添加到DNA片段两端，环化后得到单链环状DNA；其次是扩增，通过单链环状DNA的滚环扩增，将DNA待测序列进行无损复制并形成DNA纳米球；然后是测序，将DNA纳米球固定在阵列化的测序芯片上，通过每轮与特定的酶和荧光探针反应，可发出不同的荧光信号并被高分辨率成像系统采集和识别，从而获得单个碱基序列。重复以上过程数百次，可获得大量DNA片段的碱基序列；最后，通过生物信息处理去重和拼接，获得待测DNA片段的序列。”张陆琪说。

### 成本下降促进了二代测序技术的普及

基因测序仪是生命科技领域重要的高端设备和底层工具。基因测序仪生产商作为基因测序行业的上游，为行业中下游机构提供核心工具，掌握着基因检测整个行业命脉。

根据《全球及中国生命科学综合解决方案行业报告》数据，全球基因测序仪及耗材市场在过去数年间保持了两位数的增长。预计到2030年，全球基因测序仪及耗材市场将达到245.8亿美元的规模，中国基因测序仪及耗材市场将达到43.4亿美元的规模。

“基因测序行业上游涉及复杂的多学科交叉及大量精密仪器制造和组装，源头性技术及完整的专利布局会构筑较高的技术壁垒。”张陆琪解释道，高通量测序仪是集光学、机械、电子、流体、软件、算法等多个交叉学科于一体的复杂系统，既对单项技术有很高的要求，也对架构设计和系统集成有很高的要求。因此在她看来，高技术壁垒和长期高资金投入，使部分外国企业曾垄断基因测序仪的研发和生产，国内测序仪研发领域一度存在空白。

实现基因测序相关设备及试剂耗材的国产自主可控，转机出现在2013年。于军介绍说，这一年，华大集团收购了美国基因测序仪制造商CG公司，通过大量的研发投入，华大集团将原本极为昂贵且形如“黑铁塔”的大型基因测序仪原型机，变成了多款经济可靠且拥有更高性能的桌面型设备，打破了国外垄断。“不过，基因测序行业上游集中度高，国外厂商抢先占领的市场份额较大，国产基因测序设备制造商存在较大竞争压力。”他直言。

目前行业上游的测序仪生产商主要被Illumina、ThermoFisher、罗氏等跨国巨头垄断，国内基因检测行业头部公司如华大基因、贝瑞基因也有设备和试剂生产。中游为面向终端用户的基因检测服务商，其购买上游公司生产的测序仪器、配套试剂等，为用户提供基因检测服务，从中收取服务费。下游则为基因检测服务使用者，包括医疗机构、科研机构、制药公司和个人用户等。

技术的进步促成了测序成本的下降。华大集团CEO尹烨曾指出，1990年开始的“人类基因组计划”，来自6个国家的约8000个科研工作者用时13年，才完成一个人的基因组测序，耗资38亿美元。而今天，在中国，一天就可以为几百人做基因组测序，每人只需要约500美金。“测序成本下降看似降低了产业市场规模，实则促进了高通量测序技术的普及，从而为基因测序行业快速增长带来机遇。”于军说。

张陆琪也认为，成本下降将催生更多的行业中下游应用场景，不断扩大市场规模。此外，精准医疗时代的到来以及肿瘤基因测序服务需求高速增长，将进一步推动行业中下游的发展。随着中游测序服务行业的快速发展，测序服务提供商对测序仪器及试剂耗材的需求也日益提升，有利于扩大行业上游的市场空间。

### 第三、四代基因测序技术聚焦单细胞

于军指出，完成“人类基因组计划”所用的第一代基因测序技术，通量低、成本高、对人力需求大。随着“人类基因组计划”的完成，测序向着更大样本量、更多数据量、更多物种的方向迅速发展。高通量测序技术可以一次性对几百万到几十亿条核酸分子进行序列测定，终结了漫长、浩大的测序“工程时代”，给生命科学相关研究领域和生物医学应用带来了全新突破。“英国、美国等发达国家已经启动百万人量级的全民基因组测序工程，而千万到亿量级的基因组序列检测也已具备可操作性。”他说。

尽管如此，为了完成单分子测序和RNA的直接测序，我们仍需要研发第三代测序仪和第四代测序仪。

关于第三代基因测序技术，尹烨曾撰文指出，要了解生命活动的本质，就需要将测序的“分辨率”提高到“单细胞”水平。他认为，现在大部分的基因测序，还是以某一块组织或者血液中成千上万细胞的平均表达状态为研究对象，分辨率较低。事实上，经过10余年的发展，基于单细胞的基因表达调控研究正逐渐成为主流，有些技术甚至已经开始探索真正的“时空单细胞测序”，即以单个细胞为单元，在时间（细胞周期）和空间（器官分布）两个维度进行基因测序研究，记录细胞在原组织中基因表达调控的机制细节。

于军解释说，第四代测序仪能够在单细胞水平和单分子分辨率下直接测定RNA分子的序列，同时识别序列中非直接转录生成的修饰核苷酸。因此，第四代RNA直测技术必须同时利用纳米孔技术和片上拉曼光谱技术，具有很大的挑战性。

于军补充道，如果把第四代基因测序仪与一种交通工具做比较的话，那它就是“上天的火箭”。“第四代测序仪的特点是单分子测序、测序速度快、测序数据能实时监控、方便携带等，这些优点让其成为各国竞相研发的热点，但在准确率方面，第四代基因测序仪还有待提高。”他说。

# 在体外为干细胞培养搭建新型“阳光房”

◎本报记者 陈 曦 通讯员 吴军辉

随着人类在生命科学领域探索的不断深入，干细胞研究和应用已经成为科学界和全球生物医药行业关注的热点之一。尽管具有广阔前景，但干细胞研究和应用仍面临许多亟待解决的难题，干细胞高质量体外培养就是其中之一。

南开大学生命科学学院杨军教授课题组，经过20余年的持续研究，开发出一套可以模拟体内微环境的干细胞仿生赋能系统，有效解决了目前干细胞体外培养效率低、费用高、安全性差、代际功能减损等问题，助力干细胞研究更好地走向应用。

### 干细胞培养难题：不够用、不好用、不敢用、用不起

干细胞，是人体发育过程中以及成体后体内存在的一类细胞，具有自我复制、多向分化等特点，常用于生长发育、疾病发生、药物筛选等科学研究。

除此之外，干细胞还可以用于疾病治疗，例如胚胎干细胞分化的眼角膜给患者带来了光明；脐带造血干细胞可用于治疗遗传性或获得性造血系统疾病；间充质干细胞可对自身免疫病患者进行免疫调节等。

然而，通常干细胞获取比较困难，数量也极其有限。为了获取足够数量的干细胞，必须进行体外扩增。但随着扩增代数的增加，干细胞的生物学功能会逐渐减弱，干细胞可用代次受限，导致干细胞资源稀缺、成本高昂，难以满足庞大的市场需求，极大限制了干细胞产业发展。因此急需一套解决干细胞数量严重短缺的方案。

杨军向记者介绍，目前的干细胞培养系统存在四大痛点：增殖能力不足，细胞产量低；功能丢失，治疗效果差；干细胞纯度低，安全风险大；细胞资源稀缺，生产成本高。简而言之，现有的培养系统极易造成培养的干细胞不够用、不好用、不敢用和用不起的问题。

### 模拟体内微环境，补齐干细胞最后一根“支柱”

“这是由于一般的干细胞扩增使用的培养表面不能很好地模拟体内微环境导致的。”团队负责人、南开大学生命科学学院博士生陈国强介绍，在多细胞生物中，没有一个细胞是孤立状态，细胞间的相互作用尤为重要。如果把干细胞培养环境比作“房子”，细胞间相互作用就是一根重要的“支柱”，没有这根“支柱”，“房子”就会摇摇欲坠。

> 通常干细胞获取比较困难，数量也极其有限。为了获取足够数量的干细胞，必须进行体外扩增。但随着扩增代数的增加，干细胞的生物学功能会逐渐减弱，干细胞可用代次受限，导致干细胞资源稀缺和成本高昂。

研究团队首先筛选出多种细胞间相互作用蛋白，分析其基因以及蛋白序列，随后利用基因工程技术构建融合蛋白基因，通过生物合成技术稳定批量地制备人工基质蛋白产品，最后利用纳米涂层技术在传统材料表面形成人工基质蛋白涂层实现表面功能改性。

团队制备的这一干细胞赋能系统，其基质成分明确稳定，量产纯度大于95%，且为人源蛋白，能够更好地调控人源干细胞，更为安全。同时，该系统能大规模构建细胞间相互作用的核心蛋白，模拟体内微环境，从而使细胞功能得以维持。

此外，通过模拟调控干细胞生长的微环境，新系统还缩短了干细胞增殖周期，使可用的干细胞数量大大增加，扩大了干细胞的生产规模，降低了干细胞的生产成本且减少了患者等待的时间。

“我们的培养技术补齐了干细胞培养的最后一根‘支柱’，仿生干细胞微环境，在体外构建了干细胞生存之家，而且还是一个温暖舒适的‘阳光房’，达到高效增殖、安全使用、功能提升和成本降低四大效果。”陈国强说。

干细胞扩增技术成熟后，研究团队又开启了针对干细胞不同用途赋能系统的开发。干细胞的行为受到其所处的微环境影响，要想让干细胞发挥指定的功能，需通过微环境对其进行精准调控。

为实现这一目的，团队不断优化，先后开发出心肌修复、血管再生、免疫调节以及关节修复等4种干细胞赋能系统。在相应疾病模型小鼠试验中，相较于传统基质表面培养的干细胞，新系统培养的干细胞具有更加显著的治疗效果。

视觉中国供图

## 研究进展

### 这项技术令致病微生物“无所遁形”

**科技日报讯（洪恒飞 宓卓慧** 记者**江耘**）记者10月11日从中国计量大学获悉，该校俞晓平教授牵头完成的“畜禽和水产品中高风险致病微生物精准识别和快速检测技术研究”获得2020年度市场监管科研成果一等奖。团队研发的全自动核酸提取仪和快速精准检测的试剂盒、试纸条等，已应用于农产品食品安全检测，为畜禽和水产品的质量安全加了一道“防护锁”。

“15年来，俞晓平教授团队一直致力于微生物检测技术和快速检测技术的创新和探索。我们研究创制的纳米磁珠包覆材料和创新改进的磁棒套自动装卸系统，可以高效地吸附大样本中的致病微生物核酸分子，快速得到高纯度的核酸。”团队成员、中国计量大学生命科学学院院长叶子弘教授说，与合作单位研制出的全自动核酸提取仪，能同时实现96个核酸样本的高效率富集，已获批第一类医疗器械备案和CE认证。

记者了解到，该装置的销售价格仅为国际同类产品的一半，近3年已销售7000多台，其中50%的产品销往英、德、法、美等国家。在新冠肺炎疫情期间，这一核酸提取仪被广泛应用于海关进口冷链畜禽和水产品的检测以及医院、疾控中心的大批量核酸检测，有效推动了安全检测技术和产品的升级，保障了我国农产品的正常贸易和安全。

叶子弘介绍，检测试剂盒利用特异性探针识别致病微生物的特定核酸序列，并将相应信号显示在试纸上，从而检测出是否存在致病菌。只要被检测出了致病菌，就意味着被检产品是不合格的。不同的探针就好比不同的钩子，各类致病微生物会被相对应的钩子捕获，然后在试纸条相对应的位置显示。

据悉，该团队研制的多目标快速检测方法构建了三重及以上的精准检测技术，能同时检测出多种致病微生物，并且检测时间较国内外同类产品缩短一半。目前，团队联合企业已实现了检测试剂盒和试纸条的产业化。

视觉中国供图

### 利用新发现的突变体基因 科学家可精准设计水稻籽粒大小

**科技日报讯**（记者**瞿剑**）记者10月10日从中国农业科学院获悉，该院作物科学研究所水稻分子设计技术与应用创新团队与国内其他科研机构合作，鉴定到一个细胞分裂素信号新组分PPKL1，发现其可通过引诱但不接纳细胞分裂素磷酸转移蛋白AHP2上的磷酸基团，干扰信号传递效率，从而抑制水稻籽粒大小。团队据此建立了一套水稻籽粒大小精准设计系统。相关研究成果在线发表于《分子植物》上。

团队成员、中国农科院作物科学研究所研究员童红宁介绍，植物中经典的细胞分裂素信号转导依赖于组氨酸受体激酶、组氨酸磷酸转移蛋白以及细胞分裂素响应因子RR之间磷酸基团的转移，然而对这一磷酸中继过程调控的分子机制，学界仍知之甚少。另一方面，在水稻中，细胞分裂素可以显著调控穗粒数，而对粒重或籽粒大小的调控功能学界也不清楚。

团队通过大规模诱变，筛选到一个大粒显性突变体并克隆了突变体基因PPKL1。与RR蛋白类似，PPKL1可与AHP2蛋白直接互作，并通过模仿RR蛋白功能区与其竞争AHP2的磷酸基团，导致磷酸中继效率大幅降低。当此功能区位点突变后则丧失了对信号传递的影响，籽粒显著增大。他们以优质水稻品种空育131为材料，针对其该功能区进行基因编辑，获得多个可不同程度增大籽粒的基因型，部分可显著增产。

团队还创制了千粒重从20克到38克渐次分布的水稻材料，从而建立了一套水稻籽粒大小精准设计系统。该研究发现，PPKL家族蛋白对细胞分裂素信号的抑制作用可能是一个古老的功能，其功能位点隐藏在甾醇类激素油菜素内酯信号组分中，发掘并利用这一基因，对作物进行分子设计改良具有重大应用价值。


视觉中国供图