

张越,李湘茹,权金强,等. SNP检测方法在实验动物遗传质量检测中的研究进展和应用[J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(12): 1588-1593.

ZHANG Y, LI X R, QUAN J Q, et al. Research progress and application of single nucleotide polymorphism detection methods for genetic quality testing of laboratory animals [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2024, 32(12): 1588-1593.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2024.12.010

SNP检测方法在实验动物遗传质量检测中的研究进展和应用

张越¹,李湘茹¹,权金强^{1*},高彩霞^{2*},夏长友²,赵生国¹

(1. 甘肃农业大学动物科学技术学院,兰州 730070;2. 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所,动物疫病防控全国重点实验室,黑龙江省实验动物与比较医学重点实验室,国家禽类实验动物资源库,哈尔滨 150069)

【摘要】 实验动物作为生命科学研究的重要实验材料,其质量的均一性对实验结果的准确性和可靠性起到关键作用,而实验动物的遗传质量检测是评价实验动物遗传质量高低的重要环节。单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)作为分子标记已被广泛应用于实验动物遗传检测,随着现代生物技术的进步,实验动物的SNP遗传质量检测方法也一直在更新。本文主要梳理了目前SNP检测方法在实验动物遗传质量检测中的研究进展和应用,以及各种检测方法的优缺点,以期为实验动物的遗传质量检测提供参考依据。

【关键词】 实验动物;遗传质量;SNP;检测方法

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2024)12-1588-06

Research progress and application of single nucleotide polymorphism detection methods for genetic quality testing of laboratory animals

ZHANG Yue¹, LI Xiangru¹, QUAN Jinjiang^{1*}, GAO Caixia^{2*}, XIA Changyou², ZHAO Shengguo¹

(1. College of Animal Science and Technology, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China;

2. National Key Laboratory of Animal Disease Prevention and Control, Heilongjiang Provincial Key

Laboratory of Laboratory Animal and Comparative Medicine, National Poultry Laboratory Animal

Resource Center, Harbin Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural

Sciences(CAAS), Harbin 150069, China)

Corresponding author: QUAN Jinjiang. E-mail:quanjinjiang@163.com;GAO Caixia. E-mail:gaocaixia@caas.cn

【Abstract】 Laboratory animals provide an important experimental resource for life science research, and their uniformity plays a key role in the accuracy and reliability of the experimental result. Genetic quality testing of laboratory animals is thus essential to evaluate the genetic quality of laboratory animals. Progress in modern biotechnology has led to improvements in the method of genetic testing of experimental animals. Single nucleotide polymorphisms, as molecular markers, have been widely used in genetic testing of laboratory animals, and method for their detection in laboratory

【基金项目】 国家重点研发计划项目(2021YFF0703000),国家生猪技术创新中心先导科技项目(NCTIP-XD1C09),中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(1610302022018)。

Funded by National Key Research and Development Program of China(2021YFF0703000), Pilot Technology Project of National Pig Technology Innovation Center(NCTIP-XD1C09), Central Public Welfare Basic Scientific Research Institutes were Special(1610302022018).

【作者简介】 张越,女,在读硕士研究生,研究方向:动物遗传育种与繁殖。Email:1830299867@qq.com

【通信作者】 权金强,男,博士,讲师,研究方向:动物遗传育种与繁殖。Email:quanjinjiang@163.com;

高彩霞,女,博士,副研究员,研究方向:实验动物质量控制。Email:gaocaixia@caas.cn。

* 共同通信作者

animals have been updated, in line with biotechnology advances. In this paper, we review current research progress and the application of SNP detection method for genetic quality testing of laboratory animals, and discuss the advantages and disadvantages of various detection method, with a view to providing a reference basis for genetic quality testing of laboratory animals.

[Keywords] laboratory animal; genetic quality; SNP; detection method

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

实验动物作为生命科学研究的重要材料,其质量的均一性对实验结果的准确性和可靠性起着决定性作用,而遗传质量是影响实验动物质量高低的重要因素之一。早期研究中,动物遗传检测方法主要从形态学、细胞学、免疫学以及分子水平上进行遗传检测^[1]。免疫学标记是在动物所具有的免疫特性的基础上进行的,主要检测方法有血细胞凝集反应、细胞毒试验、同系异体组织移植法等^[2]。生化标记基因检测法也称同工酶法,这一方法检测主要根据不同位点的电泳速度来判定表型,再根据表型鉴别品系和分析封闭群体的遗传结构^[3]。虽然各种检测方法都能提供一些部分的有价值的遗传信息,但它们都具有各自的局限性,如下颌骨测定法用来遗传标记的位点非常有限,并且需要较长时间的饲养和观察,取下颌骨的操作也较为繁琐^[4]。

随着现代生物技术的发展,在分子水平对实验动物进行遗传检测的方法弥补了传统检测方法的许多不足,并且结果准确性高、检测所需时间短、费用低^[3]。尤其是单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)检测是目前实验动物遗传质量控制过程中最主要的研究方法,也是评价实验动物遗传质量的重要指标^[5]。SNP作为一种经典的遗传分子标记检测,在生物学、医学和遗传学等^[6-7]领域具有广泛的应用价值,其具有高准确性、高灵敏度和快速等优点,可以在DNA序列中识别和区分不同的等位基因,为实验动物的遗传质量评估提供有力支持。目前已知的SNP检测方法有DNA测序法、基因芯片、Snapshot法、质谱技术、KASP等技术。本文将主要探讨实验动物SNP检测方法的研究进展及其应用,并分析其局限性和未来发展趋势,以为实验动物遗传质量检测提供更加高效、便捷和精准的技术手段。

1 实验动物 SNP 检测方法

1.1 DNA 测序法

自1977年SANGER^[8]建立“双脱氧链终止测序法(又称Sanger测序法)”以来,DNA测序是20世

纪生物学研究中最重要发明之一,极大地推动了生物学和医学的发展,特别是在基因组学、遗传学和医学研究等领域。Sanger测序是DNA序列分析的经典方法,可直接获取核酸序列信息。该方法采用4种不同颜色的荧光染料来标记四种双脱氧核苷酸终止子,代替了之前的同位素标记引物方法,在一个反应管中可同时进行四个末端终止反应。利用聚丙烯酰胺凝胶分离终止反应的产物后,采用计算机荧光检测系统读取四种双脱氧核苷酸终止子,提高了测序的速度。

随着人类基因组计划的圆满完成,正式步入了后基因组时代,即功能基因组时代。在这一阶段,科研人员对基因功能的深入探索以及大规模基因组测序的需求日益增长,传统的测序方法因其在测序深度、速度及成本方面的局限性,已无法满足这一新时代的需求。因此,第二代测序技术以其高通量、高效率、低成本和准确性高等显著优势,迅速成为基因组学、转录组学、表观遗传学等领域研究的重要工具。主要包括罗氏454公司的GSFLX测序平台^[9]、Illumina公司的Solexa Genome Analyzer测序平台^[10]和ABI公司的SOLiD测序平台^[11]。DNA第三代测序技术,即单分子测序技术,彻底革新了DNA测序的方式。第三代测序技术主要以PacBio公司的单分子实时测序(SMRT)^[12]和Oxford Nanopore Technologies公司的纳米孔测序技术(nanopore sequencing)^[13]为代表。与传统的测序方法相比,第三代测序在测序过程中无需依赖PCR扩增,而是直接对每一条DNA分子进行单独测序。这种技术也被称为从头测序技术或单分子实时DNA测序,它提供了更高的测序速度和更低的测序成本^[14-16]。通过直接读取单分子的序列信息,第三代测序技术能够更准确地揭示基因组的复杂性和多样性。尽管近年来随着新技术的不断发展,第三代单分子测序技术已被逐渐应用于生命科学相关的研究中^[17],但作为第一代经典的Sanger测序因其高分辨率、高精度、结果直观、便于分析等优点仍然被广泛使用,这些优点使得它在许多领域中仍然保

持着不可替代的地位。可惜的是第三代测序技术的超长读长和直接测序的特点,使得在 SNP 检测过程中能够更准确地识别出变异位点,减少误判和漏判。同时,提高了 SNP 检测的效率。但该方法未见普遍的应用在实验动物遗传质量检测中。

1.2 基因芯片检测

基因芯片 (gene chip) 是利用核酸杂交原理建立的一种高通量 SNP 检测平台,属于生物芯片的一种。

它是一种基于微阵列技术的检测方法,其设计基础包括基因连锁、限制性长度的多态性及连锁不平衡等基因定位方法,工作原理主要依赖于同源 DNA 分子杂交。在测序过程中,基因芯片采用的是杂交测序方法。在芯片上,数以万计的特定序列的 DNA 片段(基因探针)被有规律地排列和固定。这些探针能与来自 DNA 样本的特定基因序列发生特异性杂交。当带有荧光标记的核酸序列与基因芯片上对应位置的核酸探针产生互补匹配时,通过确定荧光强度最强的探针位置,可以获得一组序列完全互补的探针序列。据此,可以重组出靶核酸的序列。目前,美国 Nanogene 公司研制的 Nanochip 电子微阵列^[18-19],可极大提高检测的灵敏度和反应速度,使花费数小时的杂交反应只需要 23 s 即可完成。

1.3 Snapshot 法

Snapshot 是一种由美国应用生物公司 (ABI) 开发的商业技术,它基于荧光标记的单碱基延伸原理,建立了一种称为小测序的分型方法^[18]。该技术的关键在于设计引物,其 3' 末端应紧挨着 SNP 位点,同时针对不同的 SNP 位点,可以设计不同长度的延伸引物。这样,通过引物的长度差异,就可以区分不同的 SNP 位点。在检测过程中,多重 PCR 扩增在一个含有测序酶和四种荧光标记的 ddNTP 体系中进行。由于加入的是双脱氧核糖核苷酸,因此引物延伸一个碱基就会终止。延伸产物通过测序仪检测,根据峰移动的位置可以确定延伸产物对应的 SNP 位点,而根据峰的颜色则可以确定 SNP 位点的碱基种类。

Snapshot 法具有操作简单、经济实惠的优点,可以在多种遗传分析仪上进行快速、准确的基因分型^[20],该技术实现了 SNP 分析的自动化,可以方便高效地用于高通量的 SNP 验证及中通量的 SNP 筛选,且每次反应可以检测多个 SNP 位点,具有更高的检测效率。

1.4 质谱法

质谱法是一种基于基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱技术 (matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, MALDI-TOF MS) 的检测方法^[21-22],发展于 20 世纪末期^[23],其检测过程中,需将样品与芯片基质共价结合形成结晶后,经过质谱仪的激光激发 DNA 分子片段。由于飞行时间与离子的质量成反比,于是可利用飞行时间判断 DNA 片段的分子量大小,从而确定 SNP 位点。其检测原理同样使用了单碱基延伸技术,在多重 PCR 扩增时,其扩增产物将在 SNP 位点上终止延伸,形成不同分子量的检测产物,再利用质谱分析获得图谱,而不同分子量的延伸产物,在其对应的分子量位置上可查看检测峰图,由此确定 SNP 位点。

质谱法广泛应用于高通量的 SNP 检测中,并已经取得了突破性进展,理论上准确率可高达 100%^[24-25]。此方法的特点是应用质谱法进行 SNP 分析,根据不同的分子量可以将等位基因排序:如产物中存在两个单核苷酸多态性位点,但由于质谱法是利用多重 PCR 反应的原理实现对多个 SNP 位点的同时检测,过多的引物在一个反应体系中容易形成引物二聚体,增加引物设计的难度。目前质谱检测技术是测定 SNP 最为准确的方法之一。

1.5 竞争性等位基因特异性 PCR

竞争性等位基因特异性 PCR (kompetitive allele specific PCR, KASP) 是 SNP 分析的第三代分子标记技术,是在已知 SNP 的终端荧光条件下,通过读取判断终端荧光的基因分型技术^[26-27]。传统的 Sanger 测序需要较长的 DNA 片段才能进行准确的分析,而 KASP 技术则可以在较短的 DNA 片段上进行检测,这使得分析过程更加快速,且 KASP 的结果更加精准。由于 KASP 采用的是通用探针,可以与各种不同的基因特异引物配合使用,而不需要针对每个特定的位点进行探针合成,这极大降低了试验成本^[28]。ZHANG 等^[29]采用 KASP 方法来鉴别野生型等位基因和相关缺陷等位基因在荷斯坦牛的 8 种常见遗传缺陷,这表明 KASP 检测对于检测多种遗传缺陷是简单、快速和可靠的。在 SHI 等^[30]的研究中,KASP 被用于对影响农药抗性的基因型进行高通量基因分型,首次被验证为表征农药抗性位点基因型的有效方法,其分型结果与 Sanger 测序结果一致。国外于 2012 年首次报道 KASP 适用于大样

本($N > 10\ 000$)的少量 SNP^[31]。但 KASP 也存在一些不足之处,荧光定量处理时存在分型错误,且不能直接测序发现未知 SNP 位点。相较于其他检测方法,KASP 技术在动物遗传育种方向的应用还是较少,相信随着技术的不断成熟,其应用会更加广泛。

2 SNP 检测方法在实验动物遗传质量检测中的应用

实验动物遗传检测的方法多种多样,这些方法各有优缺点,但都有其特定的应用场景和发展前景。SNP 是继限制性片段长度多态性(restriction fragment length polymorphism, RFLP)、简单重复序列标记(simple sequence repeats, SSR)之后的第三代分子标记^[32-33],与之前两代标记不同,SNP 标记的来源不受个体组织时间与空间的限制,它具有数量多、在全基因组分布广泛、遗传多样性丰富以及遗传稳定等特点^[34],被广泛应用于各种遗传学研究领域。同样,SNP 的检测方法也在不断创新,为了更好地发挥遗传检测在实验动物中的作用,需要不断优化和完善现有的检测方法,并探索新的检测技术。

利用高通量测序技术对实验动物的基因组进行深度测序,以发现更多的单核苷酸多态性和结构变异;还可以利用生物信息学方法对遗传数据进行深入分析,以发现更多的遗传标记和基因组特征。如 REUVENI 等^[35]开发了一个小鼠 SNP 数据库——Mouse SNP,采用 Ensembl 注释的基因组序列来编译小鼠 SNP 数据库,同时该数据库还提供来自 SymAtlas、Gene Ontology 和 OMIM 数据库的基因表达和功能注释,以进一步评估候选表型致突变。ZHANG 等^[34]从文献和公共数据库中收集了相关的 SNP 数据,以创建一个鱼类 SNP 数据库 Fish SNP,并使用统一的分析通路来处理文献作者未执行 SNP 的原始数据,以获得高可靠性的 SNP。此外,还需要将各种遗传检测方法联合起来,优势互补。可以将基因芯片和全基因组重测序结合起来^[36],以全面地了解实验动物的遗传背景和亲缘关系;还可将基因组测序和表型检测结合起来,以更准确地评估实验动物的育种潜力和适应能力。

小鼠通用基因分型芯片(mouse universal genotyping chip, MUGA)、MegaMUGA、GigaMUGA 和小鼠分集阵列(mouse diversity array, MDA)^[37-40],通过高通量测序或杂交技术,实现对基因组中大量

SNP 位点进行检测,旨在捕获小鼠群体中的常见遗传变异。该方法具备高通量、高灵敏度、高特异性等优势,特别适用于大规模的遗传检测。例如,ROMAN 等^[41]使用来自 291 只多样性远交小鼠的 MegaMUGA 阵列数据,成功揭示单个小鼠或单个 SNP 标记水平的问题。并采用 X 和 Y 染色体上 SNP 的微阵列探针强度来确认每只小鼠的性别,检查了 SNP 基因型频率,并根据其初始菌株的次要等位基因频率分组。这些基因芯片平台通过高通量测序或杂交技术,实现对基因组中大量 SNP 位点的并行检测,具备高通量、高灵敏度、高特异性等优势,特别适用于全基因组关联分析(genome-wide association study, GWAS)等大规模遗传学研究。不过,芯片制作成本较高,且操作需专业设备和人员。

除芯片检测外,WANG 等^[42]采用两个茎环引物和两个不同的通用荧光引物对基因组 DNA 进行等位基因特异性 PCR 扩增,在小鼠中验证了 4 个 SNP 位点,该方法中蓝色和绿色荧光信号可方便地在 DNA 测序仪上检测到,且仅需在一个管中进行一次反应,适用于多重基因分型,进行遗传检测,这一方法大大降低了为每个 SNP 设计不同荧光探针的成本,操作相对于芯片的制作而言方便,快捷。

为了促进基于 SNP 基因分型的广泛应用,研究者们开发了一种创新的方法,称为靶标 SNP-seq。靶标 SNP-seq 技术的核心优势在于其融合了固相芯片技术的高稳定性和可靠性与测序技术的高灵活性和低成本,为中等规模的 SNP 基因分型提供了一种既灵活又成本效益高且准确性高的解决方案^[43]。相较于传统的方法,靶标 SNP-seq 方法基于全基因组变异组分析(即不同种质的全基因组序列数据),利用精确的 SNP 进行基因分型。它不仅具备高通量和低成本的特性,而且对检测平台的要求相对较低,从而极大地拓宽了其应用范围。

这种通过靶向测序进行基因分型的方法常有不同的命名,如 SHS、GBTS、Target SNP-seq、MRASeq 等^[44],它们均体现了针对不同目标序列进行高效、精确测序的共同特点。ZHANG 等^[45]基于 GBTS 技术,在猪中开发了 50K 面板“GBTS50K”。还评估了 GBTS50K 在群体遗传结构分析、选择特征检测、全基因组关联研究(genome-wide association study, GWAS)、基因分型插补、遗传选择(genetic selection, GS)等应用中的效率。结果表明,GBTS50K 可以成为猪潜在遗传结构和分子育种的有力工具。目前,

靶标 SNP-seq 技术已在植物领域具有广泛应用,但在实验动物中使用较少,随着技术的不断进步,靶标 SNP-seq 有望在实验动物遗传检测领域得到更广泛的应用。这将提供更精准、高效的基因分型方法,有助于更深入地了解实验动物的遗传背景和遗传特征,为相关研究领域提供更为有力的支持。

3 实验动物遗传检测的展望

随着实验动物在医学和生物学领域的应用日益广泛,无论是在药物研发、药效测试、疾病模型建立,还是在基础生物学、生物医学研究等方面,都发挥着不可替代的作用。然而,实验动物的遗传变异可能会对实验结果产生影响,甚至导致实验结果的可靠性受到质疑。因此,实验动物遗传检测的重要性也就不言而喻了。遗传检测就像遗传质量控制的“眼睛”,它能够发现潜在的问题并提前预警。通过遗传检测,可以了解实验动物的基因型和遗传背景,评估其是否符合实验要求,从而确保实验结果的准确性和可靠性。此外,遗传检测还可以为实验动物的健康和福利提供保障,因为某些遗传变异可能会影响实验动物的生长、繁殖和疾病抵抗力等。

在实验动物研究中,遗传检测是保证实验结果真实性和可靠性的重要手段之一。为了更好地发挥遗传检测在实验动物中的作用,需要不断优化和完善现有的检测方法,并积极探索新的检测技术。只有这样,才能更好地利用实验动物进行科学研究,为人类的健康和发展做出更大的贡献。

参 考 文 献(References)

- [1] 宋国华, 陈朝阳, 刘田福, 等. 中国小鼠线粒体基因组与卫星遗传标记的研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2017, 27(5): 4-5, 15.
SONG G H, CHEN Z Y, LIU T F, et al. Study of mitochondrial genomes and molecular genetic marker of microsatellite in Chinese hamster [J]. Chin J Comp Med, 2017, 27(5): 4-5, 15.
- [2] 杜小燕, 霍学云, 陈振文. 实验动物遗传质量监测技术研究进展与应用 [J]. 实验动物科学, 2021, 38(4): 1-5.
DU X Y, HUO X Y, CHEN Z W. Research progress and application of genetic quality detection technology in laboratory animal [J]. Lab Anim Sci, 2021, 38(4): 1-5.
- [3] 张晓晴, 王妍, 谢飞, 等. 建立 6 种近交系大鼠遗传质量检测及品系鉴别的单核苷酸多态性组合 [J]. 实验动物科学, 2024, 41(3): 26-32.
ZHANG X Q, WANG Y, XIE F, et al. Establishment of genetic quality testing and strain identification SNP panel for six classes inbred rats [J]. Lab Anim Sci, 2024, 41(3): 26-32.
- [4] 段天林. DNA 指纹技术对近交系小鼠生产扩大群的遗传检测 [D]. 兰州: 甘肃农业大学; 2008.
- DUAN T L. DNA fingerprinting in genetic monitoring of production expansion colony of inbred strain mice [D]. Lanzhou: Gansu Agricultural University; 2008.
- [5] 董磊. 基于全基因组重测序技术发掘晋汾白猪特异 SNP 位点 [D]. 太谷: 山西农业大学; 2020.
DONG L. Discovery of specific SNP sites in jinfen white pig based on whole genome resequencing [D]. Taigu: Shanxi Agricultural University; 2020.
- [6] RYU S M, LEE Y, BANG S, et al. On-site SNP discrimination of Monkeypox viral DNA at room temperature using dCas9-enhanced extended-gate field-effect transistor [J]. Sens Actuators B Chem, 2024, 414: 135967.
- [7] PAIJMANS A J, BERTHELSSEN A L, NAGEL R, et al. Little evidence of inbreeding depression for birth mass, survival and growth in Antarctic fur seal pups [J]. Sci Rep, 2024, 14(1): 12610.
- [8] SANGER F, NICKLEN S, COULSON A R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1977, 74(12): 5463-5467.
- [9] MITRA R D, CHURCH G M. In situ localized amplification and contact replication of many individual DNA molecules [J]. Nucleic Acids Res, 1999, 27(24): e34.
- [10] SHENDURE J, PORRECA G J, REPPAS N B, et al. Accurate multiplex polony sequencing of an evolved bacterial genome [J]. Science, 2005, 309(5741): 1728-1732.
- [11] MITRA R D, SHENDURE J, OLEJNIK J, et al. Fluorescent in situ sequencing on polymerase colonies [J]. Anal Biochem, 2003, 320(1): 55-65.
- [12] ARDUI S, AMEUR A, VERMEESCH J R, et al. Single molecule real-time (SMRT) sequencing comes of age: applications and utilities for medical diagnostics [J]. Nucleic Acids Res, 2018, 46(5): 2159-2168.
- [13] MACKENZIE M, ARGYROPOULOS C. An introduction to nanopore sequencing: past, present, and future considerations [J]. Micromachines, 2023, 14(2): 459.
- [14] MIKHEYEV A S, TIN M M Y. A first look at the oxford nanopore minion sequencer [J]. Mol Ecol Resour, 2014, 14(6): 1097-1102.
- [15] FAN X, TANG D, LIAO Y, et al. Single-cell RNA-seq analysis of mouse preimplantation embryos by third-generation sequencing [J]. PLoS Biol, 2020, 18(12): e3001017.
- [16] YU S C Y, DENG J, QIAO R, et al. Comparison of single molecule, real-time sequencing and nanopore sequencing for analysis of the size, end-motif, and tissue-of-origin of long cell-free DNA in plasma [J]. Clin Chem, 2023, 69(2): 168-179.
- [17] ATHANASOPOULOU K, BOTI M A, ADAMOPOULOS P G, et al. Third-generation sequencing: the spearhead towards the radical transformation of modern genomics [J]. Life, 2021, 12(1): 30.
- [18] SOSNOWSKI R G, TU E, BUTLER W F, et al. Rapid determination of single base mismatch mutations in DNA hybrids by direct electric field control [J]. Proc Natl Acad Sci U S A,

- 1997, 94(4): 1119–1123.
- [19] EDMAN C F, RAYMOND D E, WU D J, et al. Electric field directed nucleic acid hybridization on microchips [J]. *Nucleic Acids Res*, 1997, 25(24): 4907–4914.
- [20] FONDEVILA M, BØRSTING C, PHILLIPS C, et al. Forensic SNP genotyping with SNaPshot: Technical considerations for the development and optimization of multiplexed SNP assays [J]. *Forensic Sci Rev*, 2017, 29(1): 57–76.
- [21] ROSS P, HALL L, SMIRNOV I, et al. High level multiplex genotyping by MALDI-TOF mass spectrometry [J]. *Nat Biotechnol*, 1998, 16(13): 1347–1351.
- [22] BRAY M S, BOERWINKLE E, DORIS P A. High-throughput multiplex SNP genotyping with MALDI-TOF mass spectrometry: practice, problems and promise [J]. *Hum Mutat*, 2001, 17(4): 296–304.
- [23] DEMIREV P A, HO Y P, RYZHOV V, et al. Microorganism identification by mass spectrometry and protein database searches [J]. *Anal Chem*, 1999, 71(14): 2732–2738.
- [24] GAYE P M, NDIAYE E H I, DOUCOURÉ S, et al. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry traces the geographical source of *Biomphalaria pfeifferi* and *Bulinus forskalii*, involved in schistosomiasis transmission [J]. *Infect Dis Poverty*, 2024, 13(1): 11.
- [25] WISE C A, PARIS M, MORAR B, et al. A standard protocol for single nucleotide primer extension in the human genome using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2003, 17(11): 1195–1202.
- [26] SIVA P, BUYARAPU R, IBROKHIM Y, et al. *Plant Breeding [M]*. Uzbekistan: IntechOpen Ltd; 2012.
- [27] 刘学峰, 张立春, 朱贵, 等. 绵羊 *FecB* 基因 KASP 检测方法的建立及其在肉羊育种中的应用 [J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2020(7): 58–61, 66, 159.
- LIU X F, ZHANG L C, ZHU G, et al. Establishment of KASP detection method for *fecB* gene in sheep and its application in mutton breeding [J]. *Heilongjiang Anim Sci Vet Med*, 2020(7): 58–61, 66, 159.
- [28] SEMAGN K, BABU R, HEARNE S, et al. Single nucleotide polymorphism genotyping using Kompetitive Allele Specific PCR (KASP): overview of the technology and its application in crop improvement [J]. *Mol Breed*, 2014, 33(1): 1–14.
- [29] ZHANG Y, LIANG D, HUANG H, et al. Technical note: Development and application of KASP assays for rapid screening of 8 genetic defects in Holstein cattle [J]. *J Dairy Sci*, 2020, 103(1): 619–624.
- [30] SHI P, SHEN X J, CHEN J C, et al. KASP genotyping and semi-quantitation of G275E mutation in the $\alpha 6$ subunit of Thrips palmi nAChR gene conferring spinetoram resistance [J]. *Pest Manag Sci*, 2023, 79(5): 1777–1782.
- [31] 马士龙, 谢书琼, 刘益丽, 等. KASP 技术及其在牛 SNP 分型中的应用研究进展 [J]. *江苏农业科学*, 2022, 50(11): 31–37.
- MA S L, XIE S Q, LIU Y L, et al. Research progress of KASP technology and its application in SNP typing of cattle [J]. *Jiangsu Agric Sci*, 2022, 50(11): 31–37.
- [32] RAFALSKI J A. Novel genetic mapping tools in plants: SNPs and LD-based approaches [J]. *Plant Sci*, 2002, 162(3): 329–333.
- [33] SCHLÖTTERER C. The evolution of molecular markers—just a matter of fashion? [J]. *Nat Rev Genet*, 2004, 5(1): 63–69.
- [34] ZHANG L, LI H, SHI M, et al. FishSNP: a high quality cross-species SNP database of fishes [J]. *Sci Data*, 2024, 11(1): 286.
- [35] REUVENI E, RAMENSKY V E, GROSS C. Mouse SNP Miner: an annotated database of mouse functional single nucleotide polymorphisms [J]. *BMC Genomics*, 2007, 8: 24.
- [36] LI X, YANG J, SHEN M, et al. Whole-genome resequencing of wild and domestic sheep identifies genes associated with morphological and agronomic traits [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 2815.
- [37] SIGMON J S, BLANCHARD M W, BARIC R S, et al. Content and performance of the MiniMUGA genotyping array: a new tool to improve rigor and reproducibility in mouse research [J]. *Genetics*, 2020, 216(4): 905–930.
- [38] GATTI D M, SVENSON K L, SHABALIN A, et al. Quantitative trait locus mapping methods for diversity outbred mice [J]. *G3*, 2014, 4(9): 1623–1633.
- [39] MORGAN A P, FU C P, KAO C Y, et al. The mouse universal genotyping array: from substrains to subspecies [J]. *G3*, 2015, 6(2): 263–279.
- [40] YANG H, DING Y, HUTCHINS L N, et al. A customized and versatile high-density genotyping array for the mouse [J]. *Nat Methods*, 2009, 6(9): 663–666.
- [41] BROMAN K W, GATTI D M, SVENSON K L, et al. Cleaning genotype data from diversity outbred mice [J]. *G3*, 2019, 9(5): 1571–1579.
- [42] WANG M, XU F, CHEN K, et al. A multiplex SNP genotyping by allele-specific PCR based on stem-loop and universal fluorescent primers of *Chr1daxin* mice [J]. *Electrophoresis*, 2019, 40(11): 1600–1605.
- [43] ZHANG J, YANG J, WEN C. A new SNP genotyping technology by target SNP-seq [J]. *Methods Mol Biol*, 2023, 2638: 365–371.
- [44] MENG Y, ZHANG W, CHENG Y, et al. Development and verification of a 10K liquid chip for Hainan black goat based on genotyping by pinpoint sequencing of liquid captured targets [J]. *BMC Genom Data*, 2024, 25(1): 44.
- [45] ZHANG Z P, XING S Y, QIU A, et al. The development of a porcine 50K SNP panel using genotyping by target sequencing and its application [EB/OL]. [2023–7–23]. <https://doi.org/10.1016/j.jia.2023.07.033>.