

TILLING 技术及其在农作物中的应用现状

王伟威

(黑龙江省农业科学院 农产品质量安全研究所, 黑龙江 哈尔滨 150086)

摘要: TILLING 技术是一种全新的反向遗传学研究方法。文章简要介绍了 TILLING 技术的原理、操作流程、技术要点及其特点, 并总结了 TILLING 技术在麦类、玉米及水稻研究中的应用现状。

关键词: TILLING 技术; 反向遗传学研究方法; 应用现状

中图分类号: S188

文献标识码: A

文章编号: 1002-2767(2011)04-0013-04

TILLING (Targeting Induced Local Lesions IN Genomes), 直译为定向诱导基因组局部突变技术, 也被译为基因组靶向定位诱导损伤技术, 是由美国 Fred Hutchinson 癌症研究中心在 20 世纪 90 年代末期研究成功并开发应用^[1]。TILLING 技术是一种全新的反向遗传学研究方法。它是一种高通量、低成本, 可高效筛选由化学诱变剂 EMS 诱发产生的点突变个体的技术。近年来, TILLING 技术已经应用于植物功能基因组学的研究、点突变体的筛选、SNP 的检测和开发以及标记辅助育种等方面。早在 20 世纪 30 年代, 人工可诱发产生突变成为遗传学发展史上一项最重大的突破以来, 打破了智能研究自发突变体的局限, 推动了之后的遗传学研究^[2]。对于高等生物的各种遗传特性研究便可以通过对诱导突变体进行的基因功能研究来实现。由诱导突变体推动的反向遗传学研究方法正逐步成为基因组学研究的主要方法, 即在已知基因序列的基础上研究特定基因的编码功能。经常被使用的反义 RNA 干扰沉默和插入外源 DNA 片段这两种反向遗传学研究方法, 通常伴随着转基因技术以及组织培养技术, 仅应用于少数物种^[3]。TILLING 技术则将化学诱变方法、PCR 技术以及高通量检测相结合, 应用于反向遗传学和功能基因组学研究^[4]。

1 TILLING 技术的原理和操作流程及特点

1.1 TILLING 技术的基本原理

TILLING 技术的使用对象是由一系列点突变组成的突变群体, 通常使用化学诱变的方法来获得点突变, 提取群体的 DNA, 并将其混合构建

成 DNA 池。通过特异性引物对 DNA 池中的 DNA 进行 PCR 扩增, 从而得到特定区域的扩增片段。如果这一突变群体中确实有突变产生, 那么所扩增出的片段中会存在有错配的碱基。最初的 TILLING 技术运用 DHPLC 对 DNA 池中的突变进行检测, 后为了提高效率减少成本, 限制性内切酶便被用来识别和切开错配处的 DNA 双链, 然后利用变性电泳的方法对片段进行分析。当确定这一突变群体中确实含有阳性片段, 则对混合样品中的 DNA 进行检测, 最终获得阳性样品^[1,5]。TILLING 技术的核心可以归纳为“异源双链、错配碱基”^[6]。

1.2 TILLING 技术的操作流程

TILLING 操作流程见图 1, ①将干种子利用甲基磺酸乙酯(EMS)进行处理, 使其受到诱导, 从而产生一系列的点突变, 采用单株种植的方式产生 M_1 植株; ② M_1 植株自交, 获得 M_2 种子, 种植后得到 M_2 植株群体; ③单株提取 M_2 植株 DNA, 建库; ④同时收获 M_3 植株种子并保存, 建立种子库; ⑤以多个个体为一组(最多为 8 个植株个体)等量混合其 DNA, 得到混合 DNA 池, 增加工作通量; ⑥设计特异性引物, PCR 扩增得到野生型和突变型 2 种扩增片段; ⑦使用限制性内切酶切开异源双链, 通常使用的酶为 CELI 酶, 它能够有效识别出错配的碱基, 即突变的位点, 并切开这一杂合双链; ⑧利用电泳的方法分析酶切后得到的产物, 从而得到突变池; ⑨当发现有突变体时, 利用相同的酶切电泳方法对突变池中的个体进行筛选, 获得突变个体, 并对其进行测序, 从而得知其突变类型、位置和数量, 同时进行表型鉴定和比对^[4,7]。

1.3 TILLING 技术的要点

1.3.1 TILLING 群体的构建 构建 TILLING

收稿日期: 2011-01-17

作者简介: 王伟威(1981-), 男, 黑龙江省哈尔滨市人, 硕士, 研究实习生, 从事生物技术研究。E-mail: davidwww@126.com。

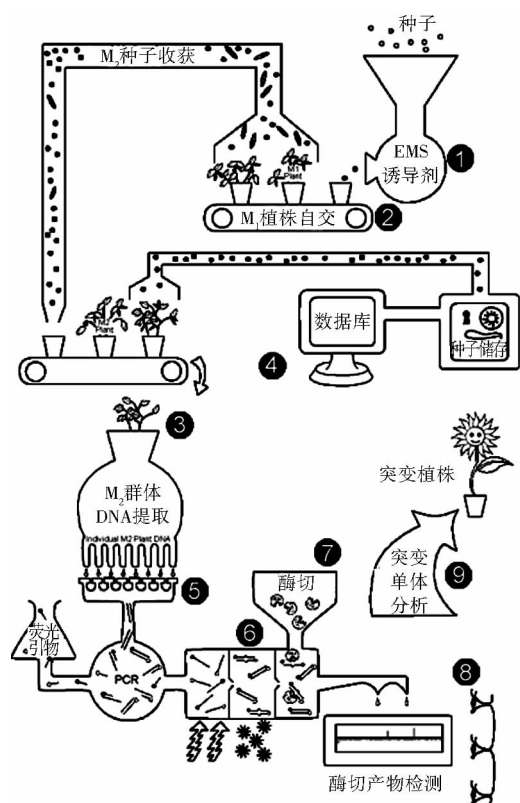


图1 TILLING技术的操作流程(RevGenUK)

突变群体的首选突变剂为EMS,一般会将种子在 $30\sim 100\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ (0.3%~1.0%)浓度的EMS溶液中浸泡14~18 h,但针对不同物种的条件需要进行试验优化。在产生 M_1 群体后,需要植物自交获得 M_2 。为了达到最佳遗传分离效果, M_2 植株应不少于1万株,即 M_1 群体的种子数应达到1万个^[8]。遗传结构简单的材料更适宜进行 M_1 群体的建立,如使用高度纯合的材料以及自交亲和的材料。对于以杂合体材料、异花授粉材料为基础建立 M_1 群体,相对的要求会更复杂些。为了降低体内的遗传变异,应选择单一亲本产生的后代。另外,当群体的核酸序列信息已知会给后续工作提供方便^[7]。

1.3.2 DNA池的构建 TILLING技术具有高通量的特点,构建DNA池是为了提高筛选突变体的效率。构建DNA池一般会采用8个单株为一组,将其DNA等量混合,得到目的DNA池,也有以5个单株为一组的方法。具体的单株数量取决于突变出现的频率,如果突变频率较高,则构成DNA池所需的单株数就少,反之突变频率较低,则构成DNA池所需的数就多^[7]。在构建多倍体植物DNA池时,会因有过多的DNA序列片段、

过多的拷贝数而使目标序列的扩增率降低,可以利用减少池中个体个数或重新设计扩增目的性更强的引物来解决这一问题^[8]。

1.3.3 目标片段的选择 TILLING技术中,最佳目标片段大小为1 500 bp,但大部分真核生物基因都大于2 000 bp,所以基因的哪一部分为目标片段是应该考虑的。发生在内含子和非翻译区内的点突变不会对基因功能的表达有影响,所以应该选择发生在保守序列区的突变体^[8]。一款名为CODDLE的引物设计软件可以用于在TILLING技术中设计特定引物,这款软件中包含了所有的蛋白质编码信息以及基因组信息,在软件中输入目的序列,它会根据序列信息自动生成一保守区域模型。然后分析出最有可能发生突变的区域,并在此区域中设计特异性引物。然后可应用常用引物设计软件Primer3对CODDLE设计出的引物进行优化选择^[9]。

1.3.4 酶切产物的检测 酶切产物的检测方法有多种,一般的方法为DPAGE凝胶电泳、琼脂糖凝胶电泳以及LI-COR DNA遗传分析系统的双色红外荧光检测技术。近年来,随着毛细管电泳系统的发展,CELI酶的酶切产物也会使用毛细管电泳系统这一更高端的方法来进行检测^[7]。

1.4 TILLING技术的特点

与反义RNA干扰沉默和插入外源DNA片段这两种反向遗传学研究方法相比,TILLING技术将高频率点突变技术与PCR扩增筛选技术相结合,可以有效地发现各突变类型。其优点在于只需对数量较少的突变群体进行筛选便可获得大量的目的基因。同时TILLING技术不通过农杆菌介导转化等方式获得突变体,所以技术中不需要花费大量时间进行转基因操作和培养组织^[10]。TILLING技术整合了具有高通量特点的凝胶电泳及毛细管电泳检测设备、快捷的图像显像处理系统、规模化自动分析的配套软件以及自动化的上样设备等,使得此技术具备了高通量、低成本以及可自动化操作的特点^[11]。同时,运用双色红外荧光检测CELI酶切产物,可以有效地排除假阳性条带,使筛选结果准确^[3-4,11]。

2 TILLING技术的应用

自2000年以来,作为一种新型的反向遗传学研究方法,TILLING技术已被成熟地应用于小麦、大麦、水稻、玉米、大豆、番茄等植物以及果

蝇^[12]、老鼠等动物的功能基因组学研究中。同时 TILLING 技术在突变体的筛选, SNP 的检测和开发以及标记辅助选择育种等方面都有很好的应用^[13]。

2.1 TILLING 技术在麦类研究中的应用

目前小麦的育种方法有多种, 由于小麦基因组及其遗传特性比较复杂, 在小麦中获得的基因改变往往由于等位基因的覆盖作用而很难通过表型来进行检测和鉴定。Caldwell 等发现分别经过 20、30 mmol·L⁻¹ EMS 处理的大麦种子不育率小于 10%, 比较适合 TILLING 技术的应用^[14-15]。苏格兰大麦研究所在 22 000 份经 EMS 诱导的大麦突变体品系中发现群体中每隔 10 万个核苷酸序列会出现 1~5 个碱基的变异^[14]。Slade 等^[16]利用 TILLING 技术对控制糯性性状基因的突变进行了筛选和研究, 最终在四倍体硬粒小麦以及六倍体普通小麦中发现了 250 个左右的新等位基因, 其中有 94 个等位基因能够改变 RNA 编码产物, 与此同时 Slade 等^[16]还发现了 2 个具有显著突变的基因座以及一个相近的糯性表现型。Feiz 等创建了 EMS 诱导的普通软质小麦突变体库, 并推算发现每隔 12 kb 就会有一个突变体产生, 而且有些突变体品系的硬度值有很大的提高, 此突变体库是目前报道中突变频率最高的突变体库^[14,17]。陈锋等以琼脂糖凝胶电泳为检测工具应用 TILLING 技术筛选发生在小麦高分子量麦谷蛋白亚基 1B×14 的启动子区的突变体, 筛选出 7 个不同的点突变体, 3 个突变体的蛋白表达量明显弱于野生型植株^[14]。这些通过 TILLING 技术发现的突变体为小麦的遗传研究提供了丰富的资源和多样的育种材料。另外, 对于一些难以作出快速评价的性状, 如小麦抗逆性、小麦不育性等, TILLING 技术也对分子水平上高通量性状突变体筛选给予了强大的技术支持^[12,18]。

2.2 TILLING 技术在玉米研究中的应用

TILLING 技术为在玉米反向遗传学的研究方面提供了一种全新的方法和视角, 用以解决玉米转基因技术获得成功较少的问题。Till 等将 750 株玉米进行花粉诱变, 以诱变所得的 M2 代植株为材料, 运用 TILLING 技术对长度为 1 kb 的 11 个玉米基因片段进行了研究。在这些片段中发现了 17 个点突变, 其中包括了在 DMT102 基因上出现的 3 个错意突变。所获得的突变体会被用为日后玉米育种的基础材料, 从而促进了玉

米育种研究的发展^[18]。

2.3 TILLING 技术在水稻研究中的应用

由于对连锁分子标记的基础性实验不够完善, 在水稻分子育种的研究中经常会筛选到假阳性材料, 这是由于所应用的连锁分子标记与重要农艺性状基因或 QTL 遗传距离较大, 导致了在杂交的过程中连锁标记与目标性状基因分离的状况。TILLING 技术能高效鉴定出发生在诱变群体中特定基因上的一系列点突变, 从而省略了对连锁标记细致研究的环节, 避免了假阳性材料的发生。Wu 等通过对籼稻品种 IR64 诱变后得到 2 000 个诱变个体, 并利用 TILLING 技术对个体中的 10 个基因进行了分析, 从而鉴定了在其中 2 个基因上发生的突变。这些研究成果表明 TILLING 技术可以被成功地应用在水稻的研究中^[19]。

3 结论

在反向遗传学研究及 SNP 检测方面, TILLING 技术的出现具有重大意义, 作为一种新型的研究手段, 它具有高效、经济等特点, 不仅可以应用于诱导突变的群体, 也可以应用于野生突变体。TILLING 技术能够在目的基因中快速测定出点突变, 具有很强的竞争力, 同时它也是极少数能够在植物 DNA 中高通量检测错义突变基因的技术之一。在植物分子辅助育种方面, TILLING 技术能够直接从大量遗传群体中发现新的变异, 并用于新品种的选育。对于那些反向遗传研究信息不是很多的物种和那些需要在大群体中筛选 SNP 的研究, TILLING 技术目前可能是唯一的解决途径。

参考文献:

- [1] 吴海滨, 朱汝财, 赵德刚. TILLING 技术的原理与方法述评[J]. 分子植物育种, 2004, 2(4): 574-580.
- [2] McCallum C, Comai L, Greene E A, et al. Targeting induced local lesions in genomes (TILLING) for plant functional genomics[J]. Plant Physiology, 2000, 123(7): 439-442.
- [3] 李春寿, 阮关海, 张琳琳, 等. TILLING 技术的原理、特点及其在点突变筛选中的应用[J]. 核农学报, 2005, 19(4): 317-321.
- [4] 孙浩, 刘继业, 崔海瑞. TILLING 技术及其在植物遗传与改良中的应用[J]. 科技通报, 2007(6): 805-811.
- [5] 侯彩玲, 陈龙, 刘晓萌, 等. TILLING 技术在作物品质改良中的应用[J]. 种子, 2008(11): 77-80.
- [6] 张宁, 杨泽. TILLING 技术及其在遗传学中的应用[J]. 生命的化学, 2004, 24(6): 516-517.
- [7] 任卫波, 郭慧琴, 徐柱, 等. TILLING 技术研究进展及其在植物空间诱变上的应用前景[J]. 安徽农业科学, 2009,

- 37(21):9827-9829,9838.
- [8] Haughn G W, Gilchrist E J. TILLING in the botanical garden: A reverse genetic technique feasible for all plant species[M]. UK: Global Science Books, 2006.
- [9] Weil C. TILLING in Grass Species[J]. Plant Physiology, 2009, 1(149): 158-164.
- [10] 袁谋志, 刘忠松. TILLING 技术的发展与应用[J]. 作物研究, 2006(5): 582-585, 588.
- [11] 孙浩, 崔海瑞. TILLING 技术及其应用[J]. 细胞生物学杂志, 2007, 29(1): 41-46.
- [12] Winkler S, Schwabedissen A, Backasch D, et al. Target-selected mutant screen by TILLING in drosophila[J]. Genome Research, 2009, 12: 527-560.
- [13] Wang D K, Sun Z X, Tao Y Z, et al. Application of TILLING in plant improvement[J]. Acta Genetica Sinica, 2006, 33(11): 957-964.
- [14] 陈锋, 徐艳花, 董中东, 等. TILLING 技术的形成和发展及其在麦类作物中的应用[J]. 麦类作物学报, 2010, 30(1): 178-182.
- [15] Caldwell D G, Nicloa Mc, Shaw Paul, et al. A structured mutant population for forward and reverse genetics in barley(*Hordeum vulgare* L.) [J]. The Plant Journal, 2004, 40: 143-150.
- [16] Slade A J, Vic C, Knauf, et al. TILLING moves beyond functional genomics into crop improvement[J]. Transgenic Research, 2005, 14: 109-115.
- [17] Feiz L, Martin J M, Giroux M J, et al. Creation and functional analysis of new *Puroindoline* alleles in *Triticum aestivum*[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2009, 118: 247-257.
- [18] 陈波, 张燕. TILLING 技术及其在作物遗传育种学中的应用[J]. 西昌学院学报, 2006(6): 13-15.
- [19] 闫双勇, 刘学军, 苏京平, 等. TILLING 在水稻育种中的应用前景[J]. 中国生物工程杂志, 2006, 26(11): 76-80.

TILLING Technology and Its Application Status on Crops

WANG Wei-wei

(Agricultural Products Quality and Safety Research Institute of Heilongjiang Agricultural Academy of Sciences, Harbin, Heilongjiang 150086)

Abstract: TILLING technology is a new reverse genetics strategy. The article introduced the principle, process and characteristics of TILLING technology, as well as its applications on wheat, maize and rice research.

Key words: TILLING technology; reverse genetics strategy; application status

草莓采后贮藏保鲜技术

1 贮藏前的准备工作

1.1 果实成熟度的确定 成熟度首先影响到果实的品质,按果实的着色面积,成熟度可分为1/4、2/4、3/4和全部着色4个进程。3/4着色的果实在经过24 h贮藏后有很浓的香味,采果成熟度以3/4着色(即七八成熟)为宜。

1.2 采收 草莓果实成熟期先后不一,应分期采收。采收宜在早晨或傍晚进行,连同花萼自果柄处摘下,避免手指触及果实。果实边摘边分级,以减少翻动而造成机械损伤。

1.3 选果 采收后的草莓应及时去除病果和机械损伤果实。健康果贮藏期腐烂主要是从相邻病果受感染,通过选果,减少病源,利于果实的贮藏。此外,采果前减少浇水和叶面喷施 CaCl_2 都有利于草莓果实的贮藏保鲜。

2 贮藏保鲜技术

2.1 冷藏 草莓果实适宜贮藏温度为 0°C ,相对湿度为 90%~95%。果实采后应及时预冷至果温为 1°C ,再进行冷藏。据报道,草莓(宝交早生

品种)采用近冰点温度贮藏,可获得更好的保鲜效果[冷藏温度为 $(0.5 \pm 0.2)^{\circ}\text{C}$,相对湿度 85%~95%]。

2.2 气调贮藏 将草莓果实置于 0.3%过氧乙酸加 $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 赤霉素的冷却混合液中浸渍 1 min,置于 $0 \sim 1^{\circ}\text{C}$ 冷风下吹干药液后,将果实放入包装盒内,并装入聚乙烯塑料袋(厚度为 0.06 mm)中,在袋中放入适量亚硫酸钠及乙烯吸收剂,扎紧袋口,进行气调贮藏(CO_2 15%~20%, O_2 3%~5%,贮藏温度 0°C)。但须注意,贮藏环境中 CO_2 浓度不宜超过 25%, O_2 浓度不宜太低。以免损伤果实。

2.3 塑料薄膜包装 一般做法是先将果实盛在小容器(塑料盒、纤维板盘或小篓等)内,外罩聚乙烯料薄膜。其作用是降低失重,未罩袋的处理失重 2.65%,罩袋的仅有 0.1%。其次可明显延长贮藏期。

2.4 植酸浸果保鲜 用 0.1%植酸+0.5%山梨酸浸果处理,室温下可保鲜 7 d。