

有关 TILLING 技术介绍及相关的文献下载

TILLING 技术是于上个世纪 90 年代末期, 美国 Fred Hutchinson 癌症研究中心基础科学研究所的 Steven Henikoff 领导的研究小组发展起来的 (1)。目前, TILLING 技术作为种研究方法已经应用于多种生物中, 如拟南芥、玉米、水稻、百脉根、小鼠、斑马鱼、果蝇、线虫等。对于拟南芥, 这一技术已经非常成功并能够实现流水线操作, 大量的突变序列可以用 *in silico* 进行分析。TILLING 一词中文还没有统一的译名, 吴海滨等将其译为“定向诱导基因组局部突变技术 (2)”; 由于 TILLING 技术只是一种对基因组突变的靶向检测技术, 张宁等将其译为“基因组靶向定位诱导损伤技术 (3)”。

1 TILLING 技术的基本原来及技术路线

TILLING 技术的基本原理是: 通过化学诱变方法产生一系列的点突变, 经过 PCR 扩增放大, 经过变性复性过程产生异源双链 DNA 分子, 再利用特异性识别异源双链中错配碱基的核酸酶切开错配处的 DNA, 然后进行双色电泳分析。

其具体操作步骤是: 1: 甲基磺酸乙酯 (EMS) 诱变种子, 诱导产生一系列点突变; 2: 将种子培养, 获得第一代突变个体 (M1); 3: M1 植株自交, 产生第二代植株 (M2); 4: 按单株抽提 M2 植株的 DNA, 存放于 96 孔微量滴定板, 并保留 M2 代种子; 5: 将多个 96 孔板的 DNA 样本合并到一个 96 孔板内 (最多可合并 8 个, 每块板相当于 768 个 M2 单株) 构建 DNA 池; 6: 根据目标基因序列设计一对特异性引物进行 PCR 扩增, 两个引物分别用 700nm 和 800nm 荧光染料标记; 7: PCR 扩增片段变性、退火, 从而得到野生型和突变型所形成的异源双链核酸分子; 8: 用特异性识别并切割错配碱基的核酸内切酶 CELI 酶剪切异源双链核酸分子; 9: 酶切产物用变性的聚丙烯酰胺 (DPAGE) 凝胶电泳分离, 然后用标准的图象处理程序分析电泳图象, 获得突变池; 10: 利用相同方法从突变池中筛选突变个体; 11: 突变个体 PCR 片段测序验证; 12: 突变表型鉴定。

2 TILLING 技术的特点与优势

A、技术相对简单

由于 TILLING 技术是传统的化学诱变技术与双色红外荧光检测技术的有机相结合, 不需要复杂的技术和设备就可以对突变体库进行大规模筛选, 是一种高通量

并且相对廉价的技术，提高了筛选效率。

B、可以预测突变频率，获得满意的突变密度使用群体较小

TILLING 技术可以预先估计突变的概率，指导突变体库的构建。化学诱变技术的突变频率可以预先估算出来，如 EMS 主要诱导碱基从 C 到 T 的改变，有实验证实，发生 C/G 到 T/A 的转变有 99% 的概率（4）。对这一频率的计算对于确定目标基因的最佳扩增片段有重要的指导意义。于不同物种、不同受体的诱变频率有很大差异（5），对突变频率的合理估算将增加 TILLING 的效率。据现有的拟南芥 ATP 项目的粗略计算，每 1Mb 约含有 4 个突变，即每 250kb 左右含有 1 个突变，以这一突变密度估算，获得满意的突变密度所需的突变体群体大小小于 10000 个植株（6）。

C、高通量、自动化操作可以快速获得鉴定结果

TILLING 技术集成了自动加样设备、高通量的电泳检测设备，以及优秀的图象处理和分析系统，容易的实现了自动化操作。目前拟南芥中 TILLING 技术己能够完全自动化（7）。对于有着高突变频率的群体（如 ATP 项目中，每个基因组中含有约 1000 个突变，即突变频率约为每 1Mb 含有 7 个突变），一天就可以筛选出 20 个突变，至少可以获得一个被敲除的基因突变和超过 12 个以上的一系列错义突变。如果用标准的自动加样器结合自动化手臂的操作替代手工操作，有望把筛选量增加到每天 16 轮，这样每天就可以鉴定 3 到 4 个基因。由此可见，TILLING 技术适应了大规模高通量的筛选要求。

3 TILLING 技术的应用

A、在功能基因组中的应用

TILLING 首先在拟南芥中得到实际应用，2001 年，以美国为首的北美实验室启动了拟南芥的 TILLING 项目 (Arabidopsis TILLING Project, 简称 ATP)，该项目在立项的第一年就为拟南芥研究者们提供了超过 100 个基因的 1000 多个突变位点。ATP 项目的成功运作为 TILLING 技术提供了成功的应用范例，从而有力推动了该技术在其他物种中广泛应用。目前在植物中已建立包括拟南芥、白脉根、玉米（8）的 TILLING 技术平台。

B、在作物品种改良中的应用

转基因作物 (Genetic Modified Organism) 正受到广泛的争论，而且转基因作物无

一例外不是通过费时费力的载体构建和遗传转化步骤。分子标记辅助选择 (molecular marker assistant selection) 在现代育种中也体现了良好的应用前景, 但是不能对目标基因进行定向改造, 缺乏预见性。TILLING 技术 一经报道便很快被广泛应用于农业上进行基因型和表型的相关性研究, 并且 有望克服上述问题。

C、在生物进化和检测多态性中的应用

生物体物种间 DNA 存在广泛的多态性, 对于生物进化等具有主要意义。目前, 用于发现 DNA 多态性的常用方法有: 测序、单链构象异构多态性 (SSCP)、杂交和微阵列等, 但是, 这三种方法各有利弊, 测序的花费较高, 时间也较长 ;SSCP 的通量虽然较高, 但对于新发突变, 其检出率较低, 杂交和微阵列不但花费高, 而且检出率不足 50% (9)。在 TILLING 技术基础上发展起来的 EcoTILLING (ecotypic TILLING) 技术不需要进行让学诱变, 可直接用于检测生物的基因多态性 (10)。在检测自然突变的过程中, 不但可以检测到单核苷酸多态性 (SNP), 还可以检测小片断的插入、缺失和微卫星序列。

与以上三种方法相比, EcoTILLING 技术具有通量高、成本低、定位准确等优点。Comai 等利用 EcoTILLING 技术对拟南芥自然群体中不同生态型的 5 个基因进行多态性检测, 发现了包括单核苷酸多态性等一系列复杂的多态性 (11)。

4 展望

1995 年, 生物学家提出“后基因组”的概念, 即在基因组静态的作图、碱基序列分析基础上转入对基因组动态的生物学功能的研究—“功能基因组学”。随着人类基因组计划 (HGP) 的顺利进行, 果蝇、拟南芥、水稻等多种模式生物全基因组序列测定的相继完成, 基因组学的研究从结构基因组学开始过渡到功能基因组学。解所有基因如何协调发挥作用完成一系列的生长发育过程, 揭示基因组序列信息中所包含的生物学意义, 探索基因在植物生命活动中所起的作用, 是当前生命科学所面临的重大课题。

目前已经发展了多种分析鉴定基因功能的方法, 其中最直接最有效的方法是构建饱和的基因突变群体, 通过突变体分析鉴定基因功能。TILLING 技术作为一种高通量, 低成本的反向遗传学研究方法, 并不需要先进的生物学仪器设备, 基因组序列信息就是起工作的弹药。随着 TILLING 技术的不断发展与完善, 它

将成为生物功能基因组研究中的一种有效手段，同时在作物改良，医学检测，生物制药等方面 TILLING 技术 具有十分广阔的潜在的应用价值。

(1) Mclallum C.M.,Comai L .,Greene E.A.,and Henikoff S.Targeted screening for induced mutations.Nature Biotechnology,2000,18:455-457

(2) 吴海滨 , 朱汝财 , 赵德刚 . TILLING 技术的原理与方法述评 . 分子植物育种 ,2004, 2 (4):574 ~ 580

(3) 张宁, 杨泽 . Tilling 技术及其在遗传学中的应用 . 生物的化学 ,2004,24(6):516 ~ 517

(4) Greene EA, Codomo CA, Taylor NE, Henikoff JG, Till BJ, Reynolds SH,Enns LC, Burtner C, Johnson JE, Odden AR, et al . Spectrum of chemically induced mutations from a large-scale reverse-genetic screen in Arabidopsis. Genetics ,2003, 164: 731–740

(5) Henikoff S, Comai L . Single-nucleotide mutations for plant functional genomics. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol,2003, 54: 375–401

(6) Henikoff S, Till BJ, Comai L: TILLING. Traditional mutagenesis meets functional genomics. Plant Physiol 2004, 135 :630-636.

(7) Till B.J.,Reynolds S.H.,Greene E.A.,codomo C.A.,Enns L.C.,Johnson J.E.,Burtner C.,Odden A.R.,Young K.,Taylor N.E.,Henikoff J.G.,Comai L.,and HenikoffS.Large-scale discovery of induced point mutations with high-throughput TILLING ,51qikan.com.Genome Reasearch,2003,13(3):524-530

(8) 马光 , 李玉花. TILLING 技术功能基因组学中的应用 . 生物技术通讯. 2007 (01) ; 147-150

(9) Borevitz JO, Liang D, Plouffe D, Chang H-S, Zhu T, Weigel D,Berry CC, Winzeler E, Chory J: Large-scale identification of single-feature polymorphisms in complex genomes . Genome Res 2003, 13 :513-523.

(10) 袁谋志 , 刘忠松. TILLING 技术的发展与应用 . 作物研究 ; 2006 (05) ; 219-222+225

(11) Erin J Gilchrist and George W Haughn . . TILLING without a plough: a new method with applications for reverse genetics. Plant biotechnology,2005, 8 :1–5

