

# 小麦 TILLING 分析中 CEL I 酶切及 PCR 反应体系的优化

潘娜<sup>1</sup>, 郭会君<sup>1</sup>, 赵世荣<sup>1</sup>, 赵林姝<sup>1</sup>, 古佳玉<sup>1</sup>, 李军辉<sup>1</sup>, 王广金<sup>2</sup>, 徐荣旗<sup>3</sup>, 刘录祥<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> 中国农业科学院作物科学研究所/国家农作物基因资源与基因改良重大科学工程/国家农作物航天诱变技术改良中心, 北京 100081;

<sup>2</sup> 黑龙江省农业科学院生物技术研究所, 哈尔滨 150086; <sup>3</sup> 中国农业科学院生物技术研究所, 北京 100081)

**摘要:** 在小麦中建立稳定的基于 CEL I 酶切的目的基因突变位点检测技术, 有助于高通量鉴定目的基因片段的点突变及提高突变检测效率。本研究以冬小麦品种新麦 18 空间诱变 SP<sub>2</sub> 群体为材料, 以小麦糯质基因 *Waxy* 为目标片段, 通过优化基因组 DNA 提取方法、调整 PCR 反应体系中 dNTP、Mg<sup>2+</sup> 及引物浓度、改变目标片段 CEL I 酶切缓冲液成分, 以及调整纯化过程中的空气相对湿度等方式, 优化了小麦 TILLING 技术体系。在利用 PVP-40 法提取 DNA 过程中, 研磨器振动频率提高到 30/s, KAc 溶液的反应时间延伸为 20min 时, 基因组 DNA 质量和纯度最佳; 在设定的浓度范围内 dNTP 和 Mg<sup>2+</sup> 浓度对产物影响差异不明显, 均能高效扩增出目的条带。引物浓度对产物影响差异显著, 最佳引物浓度为 0.4 μmol/L。20 μl 酶切体系中, 最佳 CEL I 酶浓度为 0.1 U 且利用超纯水代替 CEL I 缓冲液。最终在小麦中建立起了基于 CEL I 酶切的高通量 TILLING 筛选技术体系。

**关键词:** 小麦; TILLING; CEL I; 优化; 糯质基因 *Waxy*

## Establishment and Optimization of CEL I-based TILLING for Wheat

PAN Na<sup>1</sup>, GUO Hui-jun<sup>1</sup>, ZHAO Shi-rong<sup>1</sup>, ZHAO Lin-shu<sup>1</sup>, GU Jia-yu<sup>1</sup>,

LI Jun-hui<sup>1</sup>, WANG Guang-jin<sup>2</sup>, XU Rong-qi<sup>3</sup>, LIU Lu-xiang<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences/National Key Facility for Crop Gene Resources and Genetic Improvement/ National Center of Space Mutagenesis for Crop Improvement, Beijing 100081;

<sup>2</sup> Biotechnology Research Institute, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086;

<sup>3</sup> Biotechnology Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081)

**Abstract:** CEL I-based TILLING (Targeting Induced Local Lesions In Genomes) platform is very useful for high throughput identification of point mutations within targeted genes and improvement of mutation-detected efficiency in wheat. The space-mutated Xinmai 18 (*Triticum aestivum* L.) SP<sub>2</sub> population was used with one SNP of *Waxy* gene in the population as a positive control. The TILLING protocol for wheat was optimized through improving the method of genomic DNA extraction, the concentration of dNTP, Mg<sup>2+</sup>, primers and CEL I buffer as well as experimental environment air humidity. It was found that through raising the grinding frequency to 30/s and prolonging the reaction time of KAc to 20min in genomic DNA extraction, the quality and purification of DNA were the best. The concentration of both dNTP and Mg<sup>2+</sup> did not have any influence on PCR products within the set ranges, while primer played an important role in PCR products and the best concentration was 0.4 μmol/L. Optimum amount of CEL I enzyme was 0.1 U in a 20 μl of digestion reaction system and ultrapure water substituting for CEL I buffer was the best reaction condition. A CEL I-based TILLING technique for wheat was established and optimized.

**Key words:** Wheat; TILLING; CEL I; Optimization; *Waxy* gene

收稿日期: 2011-10-19 修回日期: 2011-11-25

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863 计划)项目(2012AA100402); 农业部农业公益性行业科研专项(201103007); 国家自然科学基金项目(31100610); 国际原子能机构项目(CPR5017); 哈尔滨市学科带头人项目(2007RFXYN054)

作者简介: 潘娜, 硕士研究生

通讯作者: 刘录祥, 研究员。研究方向: 作物诱发突变与生物技术育种。E-mail: luxiang@263.net.cn

定向诱导基因组局部突变 (Targeting Induced Local Lesions In Genomes, TILLING) 技术<sup>[1]</sup>是基于反向遗传学策略,将诱变技术、PCR 技术和高通量突变检测技术相结合,可高通量、准确地鉴定出由化学诱变剂或物理诱变剂诱变产生的单碱基差异。TILLING 提供了从分子水平上定向规模化筛选突变体的技术平台,尤其对品质、耐逆性、恢复性、不育性等无法从植株表型上加以选择或难以快速评价的性状筛选尤为有利,提高了突变体筛选效率<sup>[2]</sup>。

TILLING 技术结合了诱变突变与高效筛选技术,具备高通量、高灵敏度的特点,是一种很好的点突变检测方法<sup>[3-5]</sup>。该技术对于绝大多数物种都适用,没有严格的物种局限性。因此 TILLING 技术自 2000 年发明以来,已经广泛应用于农作物突变筛选中。TILLING 技术首次在小麦中的应用是 Slade 等<sup>[6]</sup>将其用于小麦淀粉品质改良,在 1920 个 EMS 诱变的 M<sub>2</sub> 单株中,通过检测 3 个 *Waxy* 同源片段,共获得 246 个独立的等位变异位点,突变频率为 1/24 ~ 1/40kb。有 94 种被认为与改变编码蜡质基因产物有关,*Waxy* 的酶活性表现为从近似野生型到几乎完全丧失等一系列变化。表型分析后,将 1 个 *Waxy* 基因在 D 基因组中发生的缺失突变体与 1 个在 A 基因组中产生的错义突变体杂交,获得了 *Waxy* 完全丧失的糯质突变体。Dong 等<sup>[7]</sup>利用 TILLING 技术,在 2348 株 EMS 诱变的 M<sub>2</sub> 单株中对糯质基因 *Wx-A1* 及 *Wx-D1* 进行检测,共获得 121 个突变体,包括有沉默突变、错义突变及缺失突变。通过杂交两个基因缺失突变体 (*Wx-A1* 缺失突变与 *Wx-D1* 缺失突变;这两个突变体中 *Wx-B1* 自然缺失) 成功地培育出一个完全糯性的小麦品系。由于没有物种局限性,TILLING 技术在水稻<sup>[8-11]</sup>、玉米<sup>[12-13]</sup>、大豆<sup>[14]</sup>、大麦<sup>[15]</sup>、燕麦<sup>[16]</sup> 等作物中也得到了广泛的应用,鉴定出大量的目的基因突变位点并培育出具有优良目标性状的突变体。

高质量的基因组 DNA、稳定的 PCR 扩增体系以及酶切条件等,是建立稳定的 TILLING 检测平台的前提。在不同的物种甚至同一物种但不同的实验室环境下,TILLING 流程中的各个步骤都存在一定的差异,没有一个固定不变、适用于任何物种的 TILLING 技术体系<sup>[17]</sup>。本研究利用 2006 年通过实践八号育种卫星搭载、空间综合环境处理的小麦品种新麦 18 所产生的 SP<sub>2</sub> 群体为试验材料,

在小麦中建立 TILLING 检测技术,并优化相关试验步骤,为在小麦诱变群体中快速检测目标基因等位变异奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

CEL I 酶切及 PCR 反应体系的优化以实践八号育种卫星空间综合环境处理冬小麦 (*Triticum aestivum* L.) 品种新麦 18 所产生的 SP<sub>2</sub> 群体的 192 个单株为试验材料,以未进行搭载处理的原始亲本作为对照。在总计 2304 个单株的新麦 18 SP<sub>2</sub> 群体中,田间观察到多种表型变异,如株高、穗长、粒色、千粒重等都出现了不同程度的变化,而且还出现了叶片白化突变<sup>[18]</sup>。TILLING 检测以新麦 18 和济南 17 为材料。

### 1.2 基因组 DNA 提取及 DNA 池的构建

**1.2.1 基因组 DNA 提取** 采用 PVP-40 法提取小麦叶片基因组 DNA,具体操作流程如下。

(1) 取小麦新鲜叶片约 0.5g,加液氮后利用组织研磨器 (Vibration Mill Type MM301, Retsch GmbH Co, Germany) 研磨,振动频率为 30/s,研磨 2min。

(2) 加入 65℃ 预热的 DNA 提取液 600μl,利用组织研磨器充分混匀。样品放入摇床内,振动频率为 450 rpm,60℃ 反应 1 h。

DNA 提取液 (pH 9.5): Tris 0.1mol/L, KCl 1mol/L, EDTA (pH 8.0) 10mmol/L, PVP-40 0.19mmol/L (用前加), NaHSO<sub>3</sub> 0.03mol/L (用前加)。

(3) 加入 200μl 5mol/L KAc (pH 5.8) 溶液,混匀后室温静置 15min。13000r/min 离心 10min。取约 300μl 上清液加入到预冷的 165μl 异丙醇溶液中,静置 10min,离心后弃上清。

(4) 70% 无水乙醇洗 DNA 两次,干燥,加 200μl TER 溶解。

TER 溶液: Tris 10mmol/L, EDTA 1mmol/L, RNA 酶 0.05mg/ml。

**1.2.2 DNA 池的构建** 采用紫外分光光度计法测定每个 DNA 样品的浓度,将浓度稀释到 40 ng/μl 后,随机选取 2 个 DNA 样品,等量混合后构建 DNA 池,用于后续 TILLING 筛选。

### 1.3 目标序列

以小麦糯质基因 *Waxy* (Genbank: AB019622) 为目的序列,引物序列为 Wx7A2<sup>[6]</sup> (Wx7A2L: 5'-ACC CGC ATG CTG TTT GAT AAT TTC AGT G-3', Wx7A2R: 5'-AGA ATG CCA CCT AGC CAT GAA

ATG GAG T-3'), 片段扩增长度为 479bp。非荧光标记引物序列由上海生物工程有限公司合成, IRDye 标记引物序列由美国 IDT 公司合成。

引物混合比例为, 非荧光标记 Wx7A2L: IRDye 700 标记 Wx7A2L: 非荧光标记 Wx7A2R: IRDye 800 标记 Wx7A2R = 2: 3: 1: 4。

#### 1.4 目的基因片段 PCR 扩增

参考 Till 等<sup>[17]</sup>中的 PCR 扩增体系与程序(表1, 表2), PCR 扩增采用 10 $\mu$ l 的反应体系, 对 dNTP、Mg<sup>2+</sup> 及引物设定浓度梯度(表1), 调整最佳扩增条件。

表1 PCR 扩增体系

Table 1 PCR amplification system

PCR 成分	PCR Components	浓度 Concentration
Ex-Taq 缓冲液	Ex-Taq buffer	0.5 $\times$
dNTP 浓度 ( $\mu$ mol/L)	Concentration of dNTP	160, 180, 200, 220
Mg <sup>2+</sup> 浓度 ( $\mu$ mol/L)	Concentration of Mg <sup>2+</sup>	150, 180, 200, 220
引物浓度 ( $\mu$ mol/L)	Concentration of primer	0.3, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0
Ex Taq HS DNA 聚合酶(U)	Ex Taq HS DNA polymerase	0.25
DNA 模板用量 (ng)	Concentration of DNA template	200

表2 PCR 扩增条件

Table 2 PCR amplification conditions

程序	Programme	温度及时间	Temperature and Time
第1次变性	First denaturing	95 $^{\circ}$ C, 2min	
变性	Denaturing	94 $^{\circ}$ C, 20s	
退火	Annealing	73 $^{\circ}$ C, 30s	Increment - 1 $^{\circ}$ C/cycle
延伸	Extension	72 $^{\circ}$ C, 1min	Ramp to 72 $^{\circ}$ C at 0.5 $^{\circ}$ C/s
变性	Denaturing	94 $^{\circ}$ C, 20s	
退火	Annealing	65 $^{\circ}$ C, 30s	
延伸	Extension	72 $^{\circ}$ C, 1min	Ramp to 72 $^{\circ}$ C at 0.5 $^{\circ}$ C/s

扩增完后其产物直接进行变性与复性。具体程序为, 99 $^{\circ}$ C 变性 10min, 70 $^{\circ}$ C 退火 20s, 70 个循环, 每个循环退火温度降低 0.3 $^{\circ}$ C。

#### 1.5 酶切反应

采用两个酶切反应体系 I 和 II (表3), 体积均为 20 $\mu$ l。PCR 扩增产物经 45 $^{\circ}$ C 酶切 15min 后, 立即加入 5 $\mu$ l 0.225mol/L EDTA (pH 8.0) 以终止反应。

表3 CEL I 酶切反应体系

Table 3 CEL I-cleaved reaction system

	I	II
超纯水 ( $\mu$ l)	17.9	19.94 ~ 19.88
CEL I 缓冲液浓度	1 $\times$	0
Concentration of CEL I buffer		
CEL I 酶浓度 (U)	0.1	0.06, 0.08, 0.10, 0.12
Concentration of CEL I Enzyme		

CEL I 缓冲液: MgSO<sub>4</sub> 100mmol/L, Hepes (pH 7.4) 100mmol/L, KCl 100mmol/L, Triton X-100 0.2%, BSA 0.002mg/ml

#### 1.6 样品纯化及浓缩

利用 Sephadex G50 对酶切产物纯化, 纯化产物置于 PCR 仪中于 90 $^{\circ}$ C 进行体积浓缩, 约 35 ~ 45min, 至终体积 1.5 $\mu$ l。

#### 1.7 突变位点检测及分析

利用 6% 变性聚丙烯酰胺凝胶, 在 LI-COR 4300 仪器中电泳检测酶切产物。采用 Gelbuddy 软件对电泳图像分析处理, 标记突变位点。

#### 1.8 TILLING 检测验证

根据我国小麦子粒硬度 *Pinb* 基因的分布情况<sup>[19]</sup>, 以及新麦 18 和济南 17 *Pinb* 基因的测序结果, 发现二者序列间存在 1 个碱基的差异。将新麦 18 和济南 17 DNA 等量混合用于验证 TILLING 技术。*Pinb* 基因引物序列为, Pb (PbF: 5'-CCA ACG AAA CTA ATG AGA AAT AAA AAG GTG-3', PbR: 5'-AAG TTG TTG GAT GGA CGA ATA AGG TT-3')<sup>[19]</sup>, 片段扩增长度为 1334bp。

## 2 结果与分析

### 2.1 基因组 DNA 提取方法的改进

为了提高 DNA 得率, 降低蛋白含量, 在提取过程中对多个环节作出改进。当研磨器的振动频率为 25/s 时, 部分样品不能充分研磨成粉末状, 降低了 DNA 得率。当振动频率提高到 30/s 时, 样品研磨充分且为干粉状。

加入 KAc 溶液后的反应时间为 10min 时, 琼脂糖凝胶结果表明提取的 DNA 条带上方点样孔处有亮带, 而且利用分光光度计测定 DNA 浓度, A260/A280 比值小于 1.8, 这说明 DNA 溶液中蛋白没有完全除干净(图 1a)。当把反应时间延长到 15 ~ 20min 时, 蛋白完全被去除, 点样孔干净, DNA 条带单一且纯度高(图 1b)。

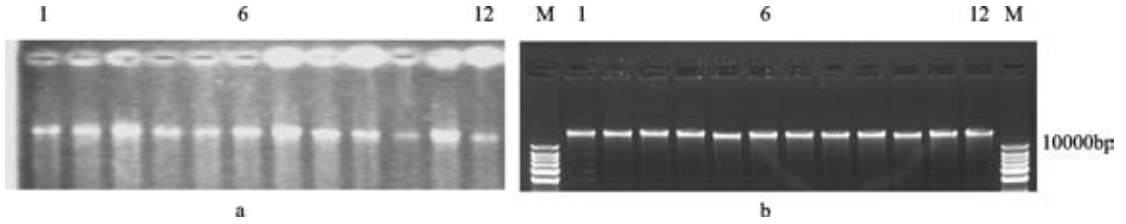


图 1 不同 KAc 溶液反应时间对 DNA 质量的影响

Fig. 1 Influence of KAc reaction time on DNA quality

a: KAc 溶液反应 10min; b: KAc 溶液反应 20min; M: 分子量标记; 1~12: SP<sub>2</sub> 群体中随机选取样本基因组

a: KAc for 10min b: KAc for 20min M: Marker 1~12: DNA Genome DNA bands of Xinmai 18

## 2.2 目的基因片段 PCR 扩增体系的优化

### 2.2.1 dNTP 及 Mg<sup>2+</sup> 浓度的优化

试验过程中对 dNTP 和 Mg<sup>2+</sup> 设定了浓度梯度, 结果表明, 在设定的浓度范围内 dNTP 和 Mg<sup>2+</sup> 浓度对产物影响差异不明显, 均能高效扩增出目的条带。在保证扩增效果的基础上本着最低量原则, dNTP 的最佳浓度为 200 μmol/L, Mg<sup>2+</sup> 的最佳浓度为 150 μmol/L。

### 2.2.2 引物浓度对 PCR 扩增产物的影响

由图 2 可以看出, 当引物浓度为 0.3 μmol/L 时, 产物信号偏弱。当浓度提高到 0.4 μmol/L 时, 产物信号增强且条带清晰。浓度为 0.6 μmol/L 和 0.8 μmol/L 时, 产物信号稍微过强, 不利于条带的辨别。当浓度提高到 1.0 μmol/L 时, 信号开始减弱。为达到最佳扩增效果, 同时节约消耗, 因此引物选用 0.4 μmol/L 为最佳浓度。

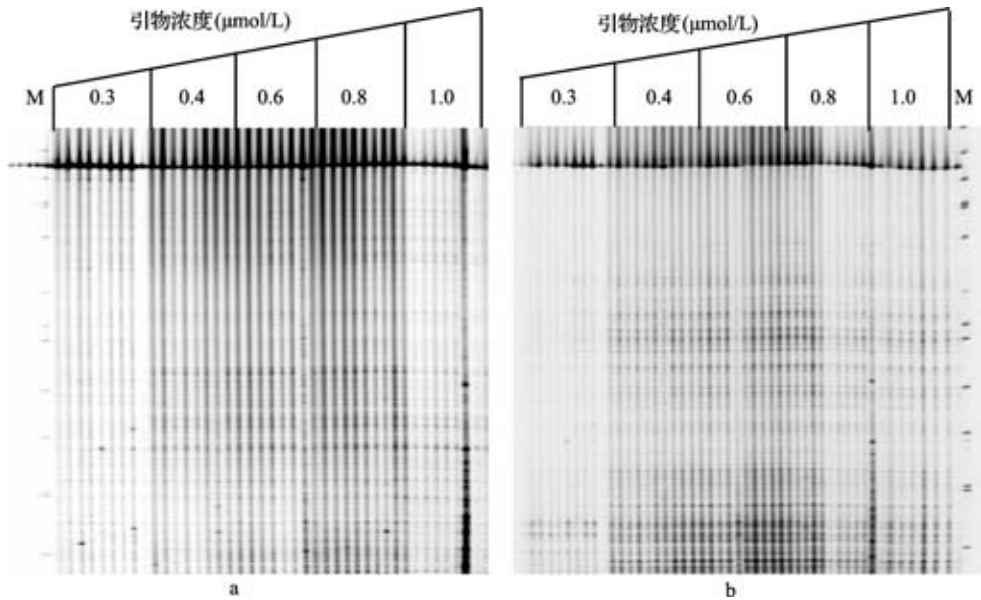


图 2 不同引物浓度对 PCR 产物的影响

Fig. 2 The influence of different primers concentrations on PCR product

引物浓度设定 5 个梯度 0.3、0.4、0.6、0.8、1.0 μmol/L, 每个浓度 8 个重复, DNA 模板为 SP<sub>2</sub> 群体中随机选取的样本, M: 分子量标记

The concentration ladder of primer is 0.3, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 μmol/L, 8 repeats for each concentration,

DNA templates are sampled at random from the SP<sub>2</sub> population; M: Marker;

a: IRDye 700; b: IRDye 800

## 2.3 酶切反应体系及产物纯化的改进

### 2.3.1 CEL I 缓冲液及 CEL I 酶浓度的调整

利用酶切体系 I 切割 PCR 扩增产物时, 结果表明, 电泳图像质量差, 条带不清晰, 各条带信号较弱尤其是大片段酶切产物部分几乎没有信号(图 3a); 换用酶切体系 II 后, 图像质量明显改善, 条带清晰且

信号增强(图 3b)。这一结果表明, CEL I 缓冲液对酶切效果产生了较大的影响, 最终表现为图像质量的降低。

随着 CEL I 酶用量的增加, 产物信号逐渐减弱。当酶用量为 0.1U 时, 阳性突变位点的酶切条带信号强且清晰, 完全可以满足试验需求。

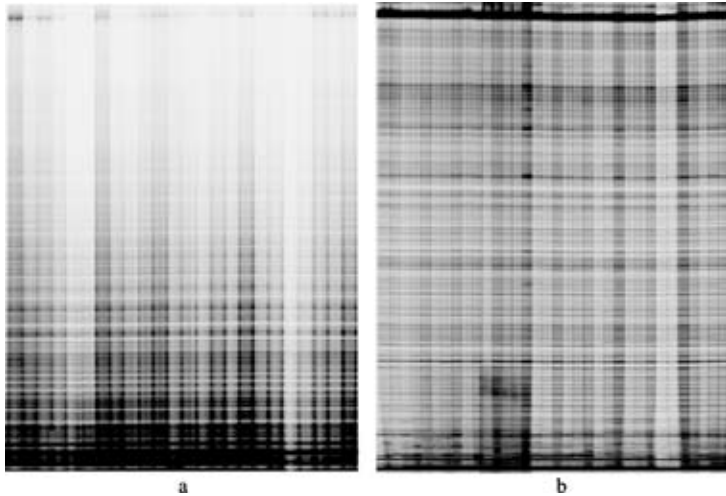


图3 酶切体系 I 和 II 下的酶切产物电泳图

Fig. 3 CEL I-cleaved gel image of two system I and II

a: 酶切体系 I 下的酶切产物 IRDye 700 通道电泳图; b: 酶切体系 II 下的酶切产物 IRDye 700 通道电泳图

a: IRDye 700 image of system I b: IRDye 700 image of system II

**2.3.2 不同实验环境对电泳图像的影响** 本研究将奥地利国际原子能机构 Seibersdorf 实验室、英国洛桑实验站及本实验室(北京)3 个不同环境条件下的电泳图像进行比较。结果表明,相同试剂浓度、相同试验步骤、同一试验人员的条件下,电泳结果明显不同(图 4)。Seibersdorf 实验室环境下背景信号较

强,洛桑实验站出现严重的引物二聚体现象,本实验室条件下,800nm 产物信号减弱而且 700nm 通道下较大片段酶切产物条带信号没有其他 2 个环境下清晰。这一结果说明,在具体实验条件都相同的情况下,不同实验室环境会对产物的扩增效果存在一定的影响,但对结果判读影响不大。

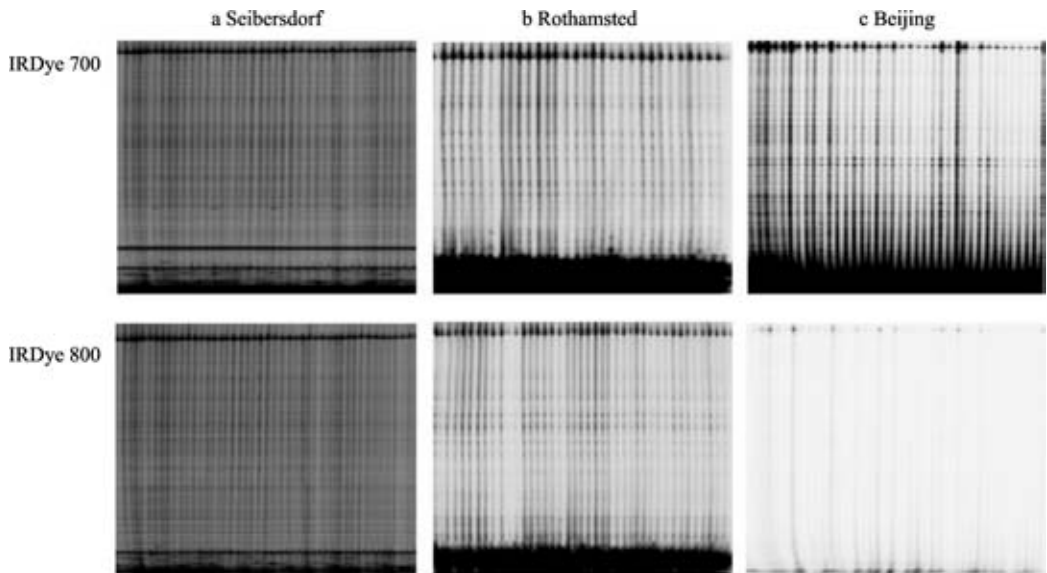


图4 相同条件下不同实验室环境实验结果差异

Fig. 4 PCR difference in different labs

PCR 扩增体系为  $10 \times$  Ex-Taq buffer 0.5  $\mu$ l, dNTP(2.5 mmol/L) 0.8  $\mu$ l,  $Mg^{2+}$  (25 mmol/L) 0.6  $\mu$ l, 荧光引物混合液 (5  $\mu$ mol/L) 0.04  $\mu$ l, Ex Taq HS (5U/ $\mu$ l) 用量为 0.05  $\mu$ l, DNA 模板用量为 200ng, 最后加水至 10  $\mu$ l

PCR amplification system is that  $10 \times$  Ex-Taq buffer 0.5  $\mu$ l, dNTP(2.5 mmol/L) 0.8  $\mu$ l,

$Mg^{2+}$  (25 mmol/L) 0.6  $\mu$ l, primer(5  $\mu$ mol/L) 0.04  $\mu$ l, Ex Taq HS (5U/ $\mu$ l) 0.05  $\mu$ l,

DNA template 200ng, adding  $H_2O$  to 10  $\mu$ l

**2.3.3 酶切产物纯化过程的改进** 当实验室内空气湿度约为 18% 时,PCR 扩增产物经酶切、Sephadex G50 纯化后的电泳结果表明,电泳图像模糊而且信号偏弱(图 5a)。在其他实验条件完全一致的情况下,当室内空气湿度提高到 40% 时,电泳图像变清晰,产物信号增强(图 5b),表明空气湿度对最终的实验结果具有很大的影响。

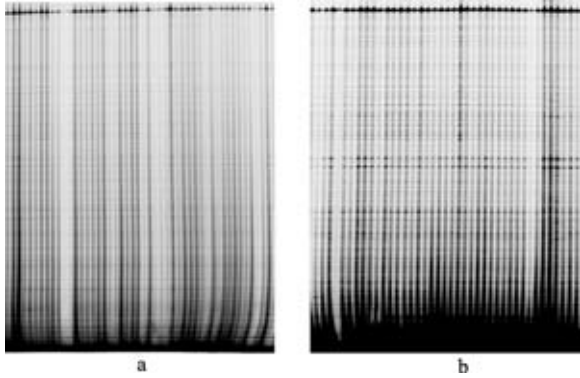


图 5 室内加湿前后酶切电泳图

Fig. 5 CEL I-cleaved gel image of *Waxy* gene in different dampness

- a:室内未加湿条件下 IRDye 700 荧光通道电泳图;
- b:室内加湿条件下 IRDye 700 荧光通道电泳图
- a:The IRDye 700 image under unhumidified environment
- b:The IRDye 700 image under humidified environment

**2.4 利用优化的 TILLING 体系进行基因检测**

用上述优化的 TILLING 体系检测 *Waxy* 基因,可以高效地检测到 *Waxy* 基因的阳性突变位点,清晰地看到在突变位点处被 CEL I 酶切割的条带(图 6)。将检测出的突变体的 *Waxy* 基因重新扩增后,送去测序,结果表明,该突变体 *Waxy* 基因序列与新麦 18 野生型序列相比,插入 5 个碱基(图 7)。

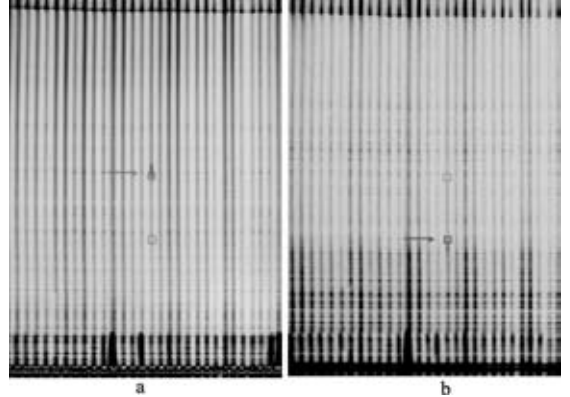


图 6 *Waxy* 基因阳性突变位点电泳检测

Fig. 6 The positive mutation of *Waxy* gene identified by TILLING

- a:IRDye 700 酶切片段;b:IRDye 800 酶切片段
- a:The dark band circled in red is IRDye 700 band cleaved by CEL I b:The dark bands circled in blue is IRDye 800 band cleaved by CEL I

```

W 1  GCGTCTGCTGGTTACAATTTCCAGGTCSSGGGCAAGACCAAGGAGAAGATCTATGGACC
M 1  GCGTCTGCTGGTTACAATTTCCAGGTCSSGGGCAAGACCAAGGAGAAGATCTATGGACC

W 61  GACGGCCGGCACCAGCTACGAGGACAAACAGCAGCGGCTTCAGCCTTCTCTGCCAGGAGCGA
M 61  GACGGCCGGCACCAGCTACGAGGACAAACAGCAGCGGCTTCAGCCTTCTCTGCCAGGAGCGA

W 121 CTTGAGGTGCCACCGATCCTCGACCTCAACAAACACCCACACTTTTCTGACCCCTACGGT
M 121 CTTGAGGTGCCACCGATCCTCGACCTCAACAAACACCCACACTTTTCTGACCCCTACGGT

W 181 AAGATCAAGAACAACTAGAGTGTATCTCAAGAACTTGATTTCTACTTGACAGCACTCGAT
M 181 AAGATCAAGAACAACTAGAGTGTATCTCAAGAACTTGATTTCTACTTGACAGCACTCGAT

W 241 GATTATCATCTTCCCTTGTATCTTGGTGCTGCCATGCTA...TGCCGTCGCCGTGCCGG
M 241 GATTATCATCTTCCCTTGTATCTTGGTGCTGCCATGCTATGCCGTCGCCGTGCCGG

W 296 CCGCCAGGGGCAAGACGCGGTGTTTGTGTGCAACGACTGGCACACGGGCTTCTGGCCCTG
M 301 CCGCCAGGGGCAAGACGCGGTGTTTGTGTGCAACGACTGGCACACGGGCTTCTGGCCCTG

W 356 CTACCTCAAGAGCAACTACCAETCCAATGGCATCTATAGCACGGCCAAAGTTTGCATCT
M 361 CTACCTCAAGAGCAACTACCAETCCAATGGCATCTATAGCACGGCCAAAGTTTGCATCT

W 416 TCTGAAACTTTATATTCGCTCTGCATATCAATTTGCGGTTCACTCTGCCAGCCTGAATT
M 421 TCTGAAACTTTATATTCGCTCTGCATATCAATTTGCGGTTCACTCTGCCAGCCTGAATT

W 476 TTAC
M 481 TTAC
  
```

图 7 *Waxy* 基因野生型序列与突变序列比对结果

Fig. 7 Blast of *Waxy* sequence between wild type and mutations

W:新麦 18 野生型 DNA 序列;M:突变体 DNA 序列

W:DNA sequence of Xinmai 18 wild type;M:DNA sequence of mutations

利用优化的 TILLING 体系可以清晰的检测到新麦 18 与济南 17 的小麦子粒硬度基因 *Pinb* 存在

的一个自然突变(图 8)。结果表明,建立的 TILLING 体系可以灵敏地检测到此 SNP 位点。

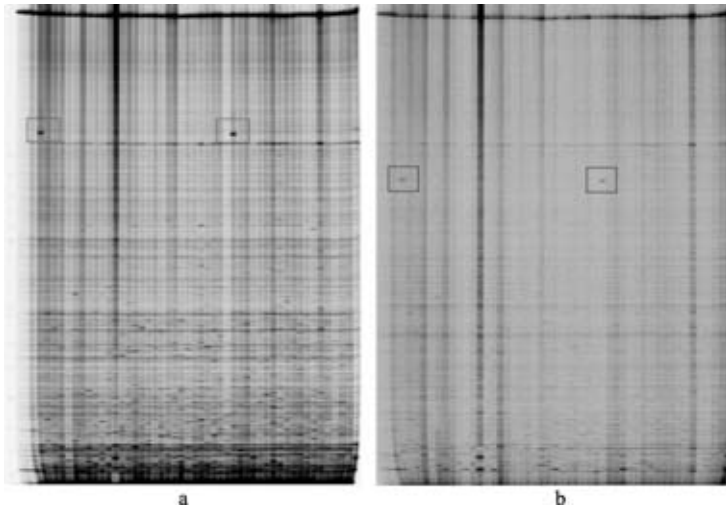


图 8 *Pinb* 基因自然变异位点检测结果

Fig. 8 The natural variation of *Pinb* identified by TILLING

a: IRDye 700 通道电泳图; b: IRDye 800 通道电泳图

a: IRDye 700; b: IRDye 800

### 3 讨论

#### 3.1 DNA 提取过程中多糖、蛋白等杂质的去除

目前,常用改良的 CTAB 法、SDS 法和各种方法的改良法制备植物基因组 DNA<sup>[20-26]</sup>,但这些方法步骤较多,耗时长<sup>[27]</sup>。本研究所采用的 PVP-40 法总共仅需 2 次离心可得到高浓度 DNA,操作步骤少,程序简单,更适于高通量 DNA 提取。植物组织中所含多糖、蛋白和酚类等次生物质是影响 DNA 纯度和质量的主要因素<sup>[28]</sup>。而 PVP 能有效地去除多糖<sup>[29]</sup>,通过在 DNA 提取液中加入 PVP-40,一方面有效地防止了多酚等物质的氧化,另一方面有效地除去了多糖等杂质,提高了 DNA 质量,从而更好的满足了酶切、扩增过程中对模板的要求。

本研究中 KAc 在 DNA 提取过程中的作用是在低 pH 值高盐环境下沉淀蛋白,因此首先要调整 KAc 溶液的 pH 值,使其提供一个较低的酸性环境,其次使 KAc 溶液有足够的反应时间以沉淀蛋白。当 KAc 反应时间是 10min 时,点样孔中有蛋白残留;当把反应时间延长到 15~20min 时,KAc 可以充分地结合蛋白,点样孔中没有杂质,DNA 纯度得到提高,因此低 pH 值高浓度的 KAc 可以有效地除去蛋白。王传堂等<sup>[30]</sup>利用高盐低 pH 值法提取花生 DNA,同样取得了很好的结果。与苯酚-氯仿-异戊醇反复抽提蛋白相比,利用低 pH 值高浓度的 KAc 去除蛋白操作更

方便省时,适合于高通量 DNA 提取。

#### 3.2 引物、Mg<sup>2+</sup> 及 PCR 操作对产物扩增的影响

研究发现,在 PCR 反应中 Mg<sup>2+</sup>、dNTP、引物和 TaqDNA 聚合酶 4 个因素对扩增量的影响从大到小依次为:引物、Mg<sup>2+</sup>、dNTP、Taq DNA 聚合酶<sup>[31]</sup>。本研究中引物浓度同样是影响扩增结果的重要因素。在一定范围内,随着引物浓度的提高,产物的荧光信号不断增强。而当引物浓度增加到 0.6 μmol/L 和 0.8 μmol/L 时,易形成引物二聚体且产物荧光信号偏强,难以识别条带。引物浓度为 1.0 μmol/L 时,产物信号开始减弱。因此在保证扩增效果的前提下,同时节约消耗,引物浓度选用 0.4 μmol/L,此时产物信号增强且条带清晰。

#### 3.3 CEL I 缓冲液及空气湿度对凝胶图像的影响

利用 CEL I 酶对变异位点的切割是 TILLING 技术流程中关键的步骤,核心在于 CEL I 酶特异性地识别并切割变异位点<sup>[32]</sup>。本研究酶切反应中使用 CEL I 缓冲液时,LI-COR 4300 电泳图像质量差,条带不清晰而且条带信号弱;但当直接用超纯水代替 CEL I 缓冲液后,图像质量明显改善,条带信号增强。推测可能是由于 CEL I 缓冲液中含有 Triton X-100 去污剂及其他离子,而纯化时不能完全去除这些离子,从而影响了最终的电泳结果,降低了检测的灵敏度。

从 PCR 扩增到产物酶切的一系列试验步骤,在试验样品中存留了大量的各种离子及蛋白等,因此

需要对酶切产物进行纯化以除去多余的离子等,样品纯化的完全与否直接影响到突变位点的检测效率与图像质量。北京地区环境干燥,空气湿度偏低,由于静电作用,在制作 Sephadex 纯化板时,容易造成 Sephadex G50 填充不均匀,从而使离子及蛋白等物质随产物一起过滤出来,影响试验结果。当将室内空气相对湿度提高到 40% 时,静电效应减弱, Sephadex G50 填充更均匀,提高了离子等大分子量物质的去除效率,使电泳图像变清晰,产物信号增强。

空间环境是由宇宙射线、微重力、弱地磁等多种因素组成的复杂诱变因素,根据本试验所用的基因和样品的突变频率初步分析,其点突变频率低于已经报道的小麦 EMS 结果<sup>[6]</sup>,这是否暗示空间诱变环境如同一般物理诱变因素一样主要诱导缺失突变而非点突变,仍有待基于同一品种的不同诱变因素诱变群体的系统比较分析。

本研究以小麦空间诱变群体为材料,在小麦中成功建立起了基于 CEL I 酶切的 TILLING 检测技术,为高通量检测目的基因突变位点奠定基础。

致谢:感谢英国洛桑实验站 Andy Phillips 博士为本研究提供了 DNA 提取方法,感谢奥地利国际原子能机构 Seibersdorf 实验室 Bradley Till 博士提供了 CEL I 酶及对试验提出了宝贵建议。

## 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] 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
- [3] Comai L, Henifoff S. TILLING: practical single-nucleotide mutation discovery [J]. Plant [J], 2006, 45: 684-694
- [4] Qiu P, Shandilya H, Durocher J, et al. Mutation detection using Surveyor™ nuclease [J]. Biotechniques, 2004, 36: 702-707
- [5] Yeung A T, Hattangadi D, Blakesley L, et al. Enzymatic mutation detection technologies [J]. Biotechniques, 2005, 38: 749-758
- [6] Slade A J, Fuerstenberg S I, Loeffler D, et al. A reverse genetic nontransgenic approach to wheat crop improvement by TILLING [J]. Nat Biotechnol, 2005, 23: 75-81
- [7] Dong C M, Morgan J D, Sharp P, et al. A modified TILLING method for wheat breeding [J]. The Plant Genome, 2009, 2: 39-47
- [8] Wu J L, Wu C, Leung H, et al. Chemical and irradiation-induced mutants of indica rice IR64 for forward and reverse genetics [J]. Plant Mol Biol, 2005, 59: 85-97
- [9] Till B J, Cooper J, Tai T H, et al. Discovery of chemically induced mutations in rice by TILLING [J]. BMC Plant Biol, 2007, 7: 19-30
- [10] Suzuki T, Eiguchi M, Kurata N, et al. MNU-induced mutant pools and high performance TILLING enable finding of any gene mutation in rice [J]. Mol Genet Genomic, 2008, 279: 213-223

- [11] Sato Y, Shirasawa K, Takahashi Y, et al. Mutant selection from progeny of gamma-ray irradiated rice by DNA heteroduplex cleavage using *Brassica Petiole* extract [J]. Breed Sci, 2006, 56: 179-183
- [12] Till B J, Reynolds S H, Weil C, et al. Discovery of induced point mutations in maize genes by TILLING [J]. BMC Plant Biol, 2004, 4: 12-19
- [13] Weil C F, Monde R A. Getting to the point mutations in maize [J]. Crop Sci, 2007, 47: 60-67
- [14] Cooper J L, Till B J, Laport R G, et al. TILLING to detect induced mutations in soybean [J]. BMC Plant Biol, 2008, 8: 9-18
- [15] Gottwald S, Bauer P, Komatsuda T, et al. TILLING in the two-rowed barley cultivar Barke reveals preferred sites of functional diversity in the gene HvHox1 [J]. BMC Res Notes, 2009, 2: 258-272
- [16] Chawade A, Sikora P, Brautigam M, et al. Development and characterization of an oat TILLING-population and identification of mutations in lignin and  $\beta$ -glucan biosynthesis genes [J]. BMC Plant Biol, 2010, 10: 86-98
- [17] Till B J, Zerr T, Comai L, et al. A protocol for TILLING and Eco-tilling in plants and animals [J]. Nat Protocol, 2006, 1 (5): 2466-2477
- [18] 郭会君, 靳文奎, 赵林妹, 等. 实践八号卫星飞行环境中不同因素对小麦的诱变效应[J]. 作物学报, 2010, 36 (5): 764-770
- [19] Wang J, Sun J Z, Liu D C, et al. Analysis of Pina and Pinb alleles in the micro-core collections of Chinese wheat germplasm by Eco-tilling and identification of a novel Pinb allele [J]. J Cereal Sci, 2008, 48 (3): 836-842
- [20] Doyle J J, Doyle J L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue [J]. Phytochem Bull, 1987, 19: 112-115
- [21] Dellaporta S L, Wood J, Hicks J B. A plant DNA miniprep: Version II [J]. Plant Biol Rep, 1983, 1 (4): 19-21
- [22] Aras S, Duran A, Yenilmez G. Isolation of DNA for RAPD analysis from dry leaf material of some *Hesperis* L. Specimens [J]. Plant Mol Biol Rep, 2003, 21: 461-462
- [23] Bhattacharjee R, Kolesnikova Allen M, Aikpodion P, et al. An improved semiautomated rapid method of extracting genomic DNA for molecular marker analysis in *Cocoa*, *Theobroma cacao* L [J]. Plant Mol Biol Rep, 2004, 22: 435-436
- [24] Sui Z M, Chen X, Wang L Y, et al. An improved approach for synthesis of positively charged silver [J]. Nanoparticles, 2005, 34 (1): 100-101
- [25] 陈大明, 张上隆, 金勇丰. 一种木本果树基因组 DNA 提取方法研究[J]. 浙江农业大学学报, 1997, 23(6): 621-624
- [26] 李晓波, 冯波, 张朝晖, 等. 植物药材总 DNA 提取[J]. 中草药, 2002, 33 (7): 652-654
- [27] 曹文波, 郑璐璐, 谢文海. 一种提取植物基因组 DNA 的方法 - 改良尿素法 [J]. 华中师范大学学报, 2008, 42 (3): 448-451
- [28] 周延清. DNA 分子标记技术在植物研究中的应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005
- [29] 王卓伟, 余茂德, 鲁成. PVP 在桑叶总 DNA 提取中的应用[J]. 西南农业大学学报, 2001, 23 (1): 61-62
- [30] 王传堂, 黄粤, 杨新道. 改良 CTAB 法和高盐低 pH 值法提取花生 DNA 的效果[J]. 花生学报, 2002, 31 (3): 21-23
- [31] 彭秉玉, 胡延萍, 巩爱岐, 等. 杂交油菜 ISSR-PCR 反应体系的建立和优化[J]. 植物研究, 2010, 30 (5): 576-581
- [32] 潘娜, 郭会君, 赵世荣, 等. TILLING 技术在作物突变研究中的应用现状与前景[J]. 植物遗传资源学报, 2011, 12 (4): 581-587