

TILLING 技术及其应用

孙洁 崔海瑞*

(浙江大学原子核农业科学研究所, 杭州 310029)

摘要 定向诱导基因组局部突变 (targeting induced local lesions in genomes, TILLING) 可快速、有效地鉴定和定向筛选突变, 是一种全新的反向遗传学技术。现对 TILLING 的技术流程、核心与特点, 及其在突变研究、反向遗传学及功能基因组学、SNP 检测、资源创新与分析以及作物遗传改良等方面的应用进行了综述。

关键词 TILLING; 反向遗传学; SNP; 资源评价; 遗传改良

在现今基因组时代, 揭示基因及蛋白质的功能越来越需要反向遗传学的帮助。为克服常用反向遗传学手段的不足和某些限制, 科学家们发展了定向诱导基因组局部突变(targeting induced local lesion in genomes, TILLING)技术^[1,2]。它将诱发生点突变的化学诱变方法与 PCR 筛选技术和高通量检测方法有效结合, 是一种全新的高通量的反向遗传学和功能基因组学研究方法^[3-6]。自从 2000 年有关拟南芥 TILLING 研究的文章发表以来, TILLING 技术已被应用于多种生物的研究中。本文系统介绍了 TILLING 技术的原理、核心与特点, 并对其应用取得的成果和前景进行了评述。

1 TILLING 技术的基本原理与操作流程

TILLING 技术的基本原理是: 首先是运用化学诱变剂诱发产生一系列的点突变而获得突变群体, 提取 DNA 并把多个待测样品 DNA 混合建立突变群体及其 DNA 池, 然后利用特异性引物对特定 DNA 区段进行 PCR 扩增, 通过变性和复性过程得到异质双链。如果有突变发生, 那么形成的异质双链中将含有错配碱基。利用特异性的核酸内切酶识别错配碱基的异质双链并在错配处切开双链, 最后进行变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测。如果发现阳性结果, 则再在混合的样品中逐一检测, 最后确定阳性样本。

其具体操作流程如下^[6]: (1) 甲基磺酸乙酯(EMS) 诱变处理干种子, 诱导产生一系列的点突变; (2) 按单株种植诱变一代 M_1 植株; (3) M_1 代植株自交, 产生 M_2 ; (4) 按单株种植提取 M_2 植株的 DNA, 存放于 96 孔微滴定板, 收获并保存 M_3 种子, 形成种子库; (5) 按 8 个样本一组将 DNA 样本混合, 构建 DNA 池; (6) 根据目

标基因设计特异性引物, 分别进行荧光染料标记和 PCR 扩增; (7) 扩增产物变性、退火, 获得野生型和突变型的异源双链核酸分子; (8) 用特异性识别并切割碱基错配的核酸内切酶酶切异源双链核酸分子; (9) 采用变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(DPAGE)分离和双色检测, 以标准图像处理程序分析电泳图像获得突变; (10) 采取相同的方法从突变池中筛选突变个体; (11) 突变个体 PCR 产物的测序验证; (12) 突变体的表型鉴定。

2 TILLING 的技术核心与特点

2.1 TILLING 技术的核心

由上可见, 如何有效识别异源双链中错配碱基是 TILLING 技术的核心。最初的 TILLING 是利用变性高效液相色谱(DHPLC) 检测 DNA 池中的突变^[1,7], 但这种检测手段不利于规模化操作, 也不利于提高筛选突变的效率。为此, Colbert 等^[6]对 TILLING 作了一些改进, 即先用特异性识别碱基错配的核酸酶酶切异源双链核酸分子, 再用变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测酶切产物, 通过图像处理程序分析点突变的存在与否。S1 核酸酶^[8]、T4 内切酶^[9]和绿豆核酸酶^[10]等可用于碱基错配的特异性识别和切割, 但效果不尽人意, 例如, 绿豆核酸酶在 pH 值近中性时需要较高的浓度才能对超螺旋 DNA 进行切割, 而且切割处也多局限于富含 TA 区域^[11], 在酸性 pH 值(5.5)条件下才能保持较高的切割效率^[12]; S1 不能对单个错配碱基进行有效地切割^[13]; 此外, 它们所需要的最适 pH 值呈

收稿日期: 2006-07-12 接受日期: 2006-10-18

浙江省科技厅(No.2005E10008)和国际原子能机构资助项目(No.13631)

* 通讯作者。Tel: 0571-86971405, Fax: 0571-86971202, E-mail:

hrcui@zju.edu.cn

酸性,也容易导致DNA在富含AT的区域解螺旋和非特异性降解。

从芹菜里提取的核酸酶CEL I是被认为具有高度特异性识别错配碱基的真核剪切酶,它可以识别双链DNA中错配的碱基,但对各种错配碱基切割偏爱程度并不完全一样,表现为 $C/C \geq C/A \sim C/T \geq G/G > A/C \sim A/A \sim T/C > T/G \sim G/T \sim G/A \sim A/G > T/T$ ^[14]。CEL I的最佳pH值为中性,具有274个氨基酸残基,分子量约31.44 kDa,切割时需要 Zn^{2+} 参与,同时 Mg^{2+} 对其有效的切割3'端错配核苷酸也具有帮助^[15]。CEL I不仅能识别错配碱基并能在错配碱基的3'端进行切割,再用变性的序列胶(PAGE)分离酶切产物,能够将超过1 kb的PCR扩增产物内的点突变定位在几个碱基对内^[14,15]。CEL I的引入是TILLING广泛应用的基础,大大地提高了TILLING的工作效率^[16]。

在TILLING中,引物设计的好坏直接影响着对突变筛选的结果,所以在确立所要筛选的目标区段后,如何根据目标序列设计引物就成为TILLING的一个重要方面。幸运的是在拟南芥TILLING项目(*Arabidopsis* TILLING project, ATP)研究开发了CODDLE (codons optimized to discover deleterious)程序(<http://www.proweb.org/coddle>),该程序能够识别各种形式的序列信息,并能根据输入的碱基序列产生基因模型和蛋白质保守区域模型,能够列出EMS诱导植株产生有害突变的可能范围,当1 000 bp左右的区段被选中后,系统就会根据最有可能突变成高频率终止密码子的区域或进化保守区域设计引物,结合其他引物设计程序(如Primer3或Primer5)可对CODDLE列出的候选引物进行选择^[17]。

点突变的检测和突变体的鉴定是TILLING的另一个核心内容。通常点突变很难被检测,要求检测仪器不仅要灵敏度高,还要能够准确识别假阳性位点。Colbert等^[6]将双色红外荧光扫描系统(LI-COR DNA分析系统)引入TILLING中,大大提高了突变筛选效率。用一对不同荧光标记的特异性引物扩增DNA,扩增产物经加热变性和缓慢降温随机复性后,在DNA池里只要有一个突变就会形成异源双链核酸分子,这些双链产物将被核酸内切酶剪切,再经变性聚丙烯酰胺凝胶双通道电泳分离即可筛选出突变。由于两个剪切片断采用的是不同的荧光染料标记,在两个图像中上下方都会出现一个条带,可以通过估计载有3'和5'端标记的这两个条带的大小来推测点突变所在位置。一旦在某个DNA池中检测到突变,可

对这个DNA池中每一DNA样品按相同的方法进行二次筛选而检出突变个体。虽然TILLING技术大幅度减少了突变筛选的工作量,但是后期突变表型的确认仍需很多工作。通过杂交、测交等,可对产生后代的表型进行确认,明确突变对表型的影响和突变之间的等位关系^[11,18]。

2.2 TILLING技术的特点

TILLING具有高通量和可自动化操作的特点。由于高度特异性识别和切割错配碱基的CEL I的应用和双色红外荧光扫描系统检测的引入,使得对突变体的筛选可规模化。筛选每块96孔微量滴定板相当于筛选了768个 M_2 单株(8×96),假如每个目标筛选区段大约为1 kb,那么每块胶大约可以检测750 kb的基因组序列。在ATP中,仅需1个技术员1天就能完成4轮筛选,可检测3 000个突变株,相当于检测了300万个碱基对。对于突变频率高的群体,1天可筛选20个突变,至少鉴定1个基因^[6]。由于集成了高通量的电泳检测设备、优秀的图像处理系统和分析软件及一种能够给96孔微量滴定板自动加样的设备等多种技术,TILLING可自动化操作,目前,在拟南芥研究中TILLING已完全实现了自动化^[19]。

在适用于高通量筛选的同时,TILLING也适合少量筛选,因为高频率的点突变只需相对较小的突变群体。在拟南芥研究中,TILLING筛选基因一般只需原来一半大小的突变群体。Till等^[9]采用1对引物就从拟南芥6 912个突变单株筛选出预期的突变基因。如果使用多对引物筛选1个基因,所需的突变群体将更小,例如,McCallum等^[1]报道1 000个突变单株即可满足实际所需。

TILLING采用的双色红外荧光检测CEL I酶切产物,可以有效的排除假阳性条带^[6]。由于杂质、干扰分子在红外光区几乎不发光,用红外荧光检测不仅背景非常低,灵敏度也很高,此外,结合红外荧光染料后,该检测方法还具有另一个优点——宽广的线性范围。这一特点使得强信号和弱信号能够同时被分辨,当野生型条带的信号强,突变型条带信号弱时,也能够轻松识别突变。假阳性通常有两种情况,一种是在一个通道的电泳图中多个泳道出现阳性条带;另一种情况是在两个电泳图的相同泳道的相同位置出现阳性条带。因为在两个不同植株中出现相同的点突变的可能性很低,推测发生第一种情况可能是由于某种同源双链对CEL I特别敏感,能够被其酶切,从而使得同样条带出现在一张电泳图的不同泳道

上。而发生第二种情况可能是由于错误的引发导致产生大量的相同大小的双末端标记产物,在扩增循环中,小的产物比大的产物有一定的选择优势。当一对引物分别用不同荧光染料标记时,PCR产物的产量会比较低并且不稳定;但是当把有标记的引物和没用标记的引物混和后进行扩增,PCR产物就会相当稳定。

3 TILLING技术的应用

3.1 在突变特性研究中的应用

EMS是常用的一种高效化学诱变剂,它诱发点突变包括三种类型,一是密码子变为终止子,使翻译的蛋白质失去功能,即形成无义突变;二是突变发生在编码区以外或以内,但不改变氨基酸编码顺序,形成沉默突变;三是突变引起氨基酸编码顺序的改变,形成错义突变。尽管EMS用于植物诱发突变和正向遗传学的研究已经有几十年的历史,但真正从分子水平上阐明其诱发突变特性的研究报道并不多。而TILLING技术在突变的研究和筛选中具有很大的应用潜力^[20]。

Greene等^[21]利用TILLING技术对EMS诱发拟南芥基因突变进行了系统的研究,在192个基因中发现了约1900个突变位点,对这些突变位点的进一步分析表明,EMS诱发的突变是随机的,99%以上是G/C→A/T碱基转换突变,3类点突变的频率与预期相符,但突变碱基所在处的碱基组成具有位置偏差,例如,突变G的两侧为嘌呤的频率要高于预期值,而为嘧啶的频率则低于期望值。这些结果真正从分子水平上明确了EMS诱发突变的特性。

利用TILLING技术可对诱发突变的频率进行估算。从目前报道的结果来看,烷化剂诱发不同植物发生突变的频率明显不同,相差约40倍。六倍体小麦中发生突变的密度最高,达到1/25 kb^[22],其次是四倍体小麦1/40 kb^[22],其他依次是果蝇1/150 kb^[23]、拟南芥1/170 kb^[21]、斑马鱼1/(230~500) kb^[24, 25]、玉米1/500 kb^[26]、水稻1/500 kb^[27]和大麦1/1 000 kb^[28]。这些结果表明染色倍性是影响突变发生频率的主要因素,而与基因组大小并没有关联。利用TILLING技术对3类不同的点突变频率也可以估算,例如,McCallum等^[1]对EMS诱发拟南芥产生的点突变进行了研究,其分析结果显示,大约5%的突变是无义突变,30%是沉默突变,65%是错义突变。突变频率的估算对突变体的选择、构建突变群体都具有重要的指导意义。

3.2 在 SNP 检测和发掘中的应用

SNP是指基因组内单个核苷酸变异引起的DNA序列多态性,包括单个碱基的转换和颠换,而且其中最少一种等位基因在群体中的频率不小于1%。单核苷酸多态性是基因组中最丰富的遗传变异,对于功能基因组研究和建立分子标记都具有重要的利用价值^[18, 29]。

发现和检测SNP的方法有多种。原则上任何用于测定单个碱基突变或多态性的技术都可用来发现和识别SNP。尽管有许多方法可用于检测基因型和目前已知的SNP,但适用于发现新的SNP的方法并不多^[30]。适用的方法首先应该是高通量并且对存在于大量样品中的少数SNP的检测具有敏感性;其次,分析费用要低,这也是实际工作中需要考虑的因素;另外一个应该考虑的指标就是在不同品种检测中能否在共同背景下检测稀有变异的能力。

对所要研究的目标片段进行测序固然是一种有效而可靠的方法,但测序的费用很贵,而且费时;其他以凝胶电泳为基础的检测方法,如单链构象多态性(SSCP)、变性梯度凝胶电泳(DGGE)等,不能确定所分析DNA片段中突变的类型和位置^[31];依赖于变性动力学的定量PCR技术也能用于SNP的检测,但只适合于对小片段的分析^[32];质谱也能够用于检测SNP,但是它需要PCR片段转录为RNA,在分析之前还需要用四种酶进行预处理,同时在费用上也不具有竞争优势^[33];利用芯片杂交技术^[34]和变性高效液相色谱技术(DHPLC)^[35]检测SNP可以实现高通量,但芯片杂交技术只能检出约50%的SNP^[36],而DHPLC中对每个DNA片段的分析则都需要优化相应的运行温度^[37]。

TILLING可以作为一个很好的SNP检测方法^[38-40],因为它具有高通量、高敏感度和经济的特点;CEL I剪切的DNA片段明确地揭示SNP的所在位置,大大地简化了后续分析;最重要的是它可以不考虑遗传背景的变化,当SNP频繁发生时,TILLING也仍然能够检测。这使其在检测人类基因多态性和筛选致病基因中也具有重要的利用价值^[41]。

3.3 在反向遗传学和功能基因组学中的应用

反向遗传学的目的在于通过表型分析来阐明已知序列基因的功能,常用的研究手段有DNA插入突变^[42](包括T-DNA和转座子插入诱变)和基于RNA的基因沉默技术^[43]。但这些手段都存在某些缺陷,从而使这些技术在反向遗传学的应用中受到很大的限制^[4, 5]。

采用 DNA 插入诱变和基于 RNA 的基因沉默等技术时都依赖于转基因方法来引入外来 DNA。对拟南芥这种模式植物来说,基因的导入已不是限制因素,而对于其他大多数植物来说,转基因的效率不能满足需要,而且再生过程往往会碰到许多困难。所以采用转座子和 T-DNA 进行基因剔除,只能应用于那些遗传转化体系和再生体系比较成熟的物种。当目标植物在转基因和再生方面存在困难时,采用这些方法则会受到一定的限制,而 TILLING 技术恰恰可以避免此类问题的发生。TILLING 技术有效结合了化学诱变方法的高频率点突变和现代分析技术,与其他反向遗传学手段相比,具体表现在以下三个方面的优势:(1)可获得点突变的系列等位基因,对可能涉及到亚致死基因的表型分析具有独特的优势;(2)可诱导产生高频率的点突变,筛选目的基因只需要较小的突变群体;(3)不依赖于农杆菌介导转化或转座子标签系统,不需要较为耗时的转基因操作和经过烦琐的组织培养过程。

TILLING 的显著优势在于它可以对基因组特定目标区域内多个突变位点进行鉴定^[22]。这些突变有可能构成一个等位系列,产生一系列由弱到强的表型效应,有利于进行结构与功能的研究。这些突变也可能涉及某些特定代谢机制的变化,而不是改变特定基因产物的有效水平。比如说,编码区突变的基因翻译出的代谢酶与底物的亲和力减弱,改变酶的调控区域,或涉及与某些亚基或蛋白质互作的变化,这些改变在代谢途径中都会有很大的影响。有些突变能使酶的结构域发生改变,因而改变酶与底物的亲和力,或者影响对底物的结合或是其他蛋白质与蛋白质的互相作用。在代谢途径中,上述的某一改变则会导致极大的影响。因此,在一些重要作物中,当缺乏对有益目标基因产物的了解时,TILLING 为对这些基因的研究提供了一条潜在的途径,对功能基因组学研究来说也是一个有用的工具。

TILLING 技术作为一种全新的反向遗传学研究方法^[3-6],自从 2000 年在模式植物拟南芥中创立以来,已被用于水稻^[27]、玉米^[26]、小麦^[22,37]、大麦^[28]、百脉根^[44]、大豆^[22]、番茄^[22]、甘蓝^[5]、莴苣^[22]、花生^[22]、蓖麻^[22]等植物和果蝇^[23]、斑马鱼^[24,25]、老鼠^[45]等动物的功能基因组学研究中。

3.4 在资源分析中的应用 —— Ecotilling

TILLING 技术在检测自然变异中也具有很大的潜力。随着测序工作的开展,有许多的物种基因组序

列已知,但有些物种并不适合于传统的突变及遗传学分析方法。对于这些物种,研究它们的野生型多态性可以提供更多的基因功能信息,并且有助于把图谱与连锁不平衡分析联系起来。即使在那些已知遗传信息较多的物种中,例如拟南芥,对那些利用突变尚未鉴定的特性,也可以通过分析自然资源来阐明^[46]。同时,对自然资源的 SNP 的研究可以提供物种适应策略和群体历史变迁的线索,而适应策略和群体历史变迁对研究物种进化具有重要作用。在近亲交配物种中,例如拟南芥,大多数位点是纯合的,在对来自不同材料的 DNA 建池时,需要设置一基因型做参照标准,因为特异性剪切酶只能剪切错配基因位点。而对远亲交配的物种来说,如杨树,它们具有高度的杂合性,所以 Ecotilling 不仅可以用于检测变异程度,还可以评判特定基因的杂合水平。为确定来自同一群体的不同个体中特定基因的核苷酸序列变异情况,通常需要测序,而 Ecotilling 的一个强大之处就是可以减少测序的工作量,通过 Ecotilling,只要对一到两个具有代表性的样品的测序分析,就能够显示任一特定位点的 DNA 多态性情况^[5]。另外,通过对相对不保守非编码区中保守区的鉴别,TILLING 可以帮助鉴定调控域^[7]。Comai 等^[47]最先运用 TILLING 技术分析了 96 份拟南芥材料的 5 个特定基因的自然变异,并将其称之为 Ecotilling,他们的研究表明,Ecotilling 不仅可以检出 DNA 序列中单碱基的变化,而且还可以揭示小片段的缺失、插入及微卫星多态性。Wu 等^[48]利用绿豆核酸酶代替 CEL I 对甘蓝进行了多态性分析,进一步证明 Ecotilling 可有效地用于自然资源的评价。最近,Gilchrist 等^[49]利用 Ecotilling 对棉白杨的 9 个特定基因位点进行了分析,发现了 63 个新 SNP,认为这些 SNP 可以作为标记应用,其研究结果从一个侧面对来自不同地域棉白杨的核苷酸序列多样性勾画了较为精确的图谱。

3.5 在创造突变资源和作物品种改良中的应用

利用 TILLING 技术可以诱发和高效筛选突变,这对作物品种改良将具有重要意义。起初 TILLING 是在已经测序的模式二倍体植物拟南芥中建立起来的。而对于那些遗传背景更为复杂、具有重要意义的多倍体农作物效果如何并不知晓。Slade 等^[22]的研究结果给予了肯定的回答,他们利用 TILLING 技术定向诱发突变和对蜡质基因突变进行筛选,在六倍体普通小麦及四倍体硬粒小麦中鉴定出了约 250 个新的等位基因,有 94 种被认为与改变编码蜡质基因

产物有关,还发现了两个显著突变的蜡质基因座,并检测出一个相近的蜡质表现型,而传统的育种方法无法发现这一结果,因为表型筛选根本不能从野生型中辨识出这两个点突变。其结果表明了 TILLING 技术可以迅速产生并检测出许多新的等位基因,并且已证实其中一些等位基因与性状有关,这些等位基因展现了丰富的遗传多样性,在提高淀粉品质和特性方面具有很大的应用潜力。

利用 TILLING 技术,在水稻^[27]、大麦^[28]、玉米^[26]、百脉根^[44]等植物中也进行了诱发突变和突变体筛选的研究,获得了多种不同类型的突变体,突变性状涉及到植株结构、器官形态、生长发育、产量构成因素以及病虫害抗性等,这些突变体的创造,不仅为开展基因功能研究提供了良好的材料,也为品种改良提供了丰富的遗传资源。

Caldwell等^[28]认为, TILLING 对于有较大基因组的作物具有如下优势: (1)对于大多数植物而言, EMS 诱发突变的频率较高,而且不受基因组大小的影响; (2)耗时较短,一般来说,通过加代繁殖,具有较大基因组的农作物一年可繁殖 2 代,所以在实际工作中一年半就可以产生所需要的突变群体; (3)由于 EMS 诱发突变不涉及转基因操作,其后代可直接种植于田间而不受任何限制,产生一系列的等位突变有利于表型分析,而且对突变的筛选是从 DNA 水平上直接鉴定和选择的,这样被鉴定出的突变就可以作为选择标记,加快其渗入分子育种的步伐。因此, TILLING 技术可有机结合诱变技术和生物技术,作为分子育种的特例用于农作物突变分子育种^[20]。

4 小结

在反向遗传学领域里 TILLING 是个具有重大意义的研究手段,它集有效、经济于一身,能运用于诱变群体,也能使用于野生物种的遗传评价。TILLING 能直接检测出目标突变,这一点很好的补充了其他技术在这方面的运用。另外,它是极少数的能够在植物 DNA 中高通量检测错义突变基因的技术之一,而错义突变在阐明基因功能及基因间相互作用中具有重要作用。TILLING 技术能够在目的基因中快速测定出点突变,这一点是具有很强竞争力的,而使用转座子或 T-DNA 剔除特定基因,虽然可以准确测定表型,但需要进行耗时的转基因和经过烦琐的组织培养过程,而且这些方法是将整个基因剔除,无法观察到活性基因功能部分丧失的结果。但 TILLING 也不是十

全十美的,也有其缺陷,例如检测的大部分 DNA 池中不含错配,单从 DNA 水平上检测的突变也可能是不表达的,而且要做到高通量也需要特殊设备。虽然说随着反向遗传学和功能基因组学研究技术的不断创新和发展,更新颖的技术总有一天会取代 TILLING 技术,但在目前及今后相当长的一段时间内, TILLING 技术仍是一种较好的选择。

参考文献(References)

- [1] McCallum CM *et al.* *Plant Physiol*, 2000, **123**: 439
- [2] 吴海滨等. *分子植物育种*, 2004, **2**: 574
- [3] Till BJ *et al.* *Methods Mol Biol*, 2003, **236**: 205
- [4] Henikoff S *et al.* *Plant Physiol*, 2004, **135**: 630
- [5] Gilchrist EJ *et al.* *Curr Opin Plant Biol*, 2005, **8**: 211
- [6] Colbert T *et al.* *Plant Physiol*, 2001, **126**: 480
- [7] McCallum CM *et al.* *Nat Biotechnol*, 2000, **18**: 455
- [8] Howard JT *et al.* *Biotechniques*, 1999, **27**: 18
- [9] Babon JJ *et al.* *Mol Biotechnol*, 2003, **23**: 73
- [10] Kowalski D *et al.* *Biochemistry*, 1976, **15**: 4457
- [11] Sheflin L G *et al.* *Nucl Acids Res*, 1984, **12**: 7087
- [12] Kowalski D *et al.* *J Biol Chem*, 1982, **257**: 7820
- [13] Loeb LA *et al.* *Biochim Biophys Acta*, 1981, **656**: 256
- [14] Oleykowski CA *et al.* *Nucleic Acids Res*, 1998, **26**: 4597
- [15] Yang B *et al.* *Biochemistry*, 2000, **39**: 3533
- [16] Till B J *et al.* *Nucleic Acids Res*, 2004, **32**: 2632
- [17] Taylor NE *et al.* *Nucleic Acids Res*, 2003, **31**: 3808
- [18] Henikoff S *et al.* *Annu Rev Plant Biol*, 2003, **54**: 375
- [19] Till B J *et al.* *Genome Res*, 2003, **13**: 524
- [20] 李春寿等. *核农学报*, 2005, **19**: 317
- [21] Greene EA *et al.* *Genetics*, 2003, **164**: 731
- [22] Slade A *et al.* *Nat Biotechnol*, 2005, **23**: 75
- [23] Winkler S *et al.* *Genome Res*, 2005, **15**: 718
- [24] Draper BW *et al.* *Methods Cell Biol*, 2004, **77**: 91
- [25] Wienholds E *et al.* *Genome Res*, 2003, **13**: 2700
- [26] Till BJ *et al.* *BMC Plant Biol (electronic resource)*, 2004, **4**: 12
- [27] Wu JL *et al.* *Plant Mol Biol*, 2005, **59**: 85
- [28] Caldwell DG *et al.* *Plant J*, 2004, **40**: 143
- [29] 杜春芳等. *遗传*, 2003, **25**: 735
- [30] Kwork PY. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 2001, **2**: 235
- [31] DeFrancesco L *et al.* *Scientist*, 2001, **15**: 24
- [32] Gundry CN *et al.* *Clin Chem*, 2003, **49**: 396
- [33] Stanssens P *et al.* *Genome Res*, 2004, **14**: 126
- [34] Cutler DJ *et al.* *Genome Res*, 2001, **11**: 1913
- [35] Underhill PA *et al.* *Genome Res*, 1997, **7**: 996
- [36] Borevitz JO *et al.* *Genome Res*, 2003, **13**: 513
- [37] Slade AJ *et al.* *Transgenic Res*, 2005, **14**: 109
- [38] Comai L *et al.* *Plant J*, 2006, **45**: 684
- [39] Qiu P *et al.* *Biotechniques*, 2004, **36**: 702
- [40] Yeung AT *et al.* *Biotechniques*, 2005, **38**: 749
- [41] 张 宁等. *生命的化学*, 2004, **24**: 516
- [42] Alonso J M *et al.* *Science*, 2003, **301**: 653
- [43] Chuang CF *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97**: 4985
- [44] Perry JA *et al.* *Plant Physiol*, 2003, **131**: 866
- [45] Smits BM *et al.* *Genomics*, 2004, **83**: 332

- [46] Gazzani S *et al. Plant Physiol*, 2003, **132**: 1107
[47] Comai L *et al. Plant J*, 2004, **37**: 778

- [48] Wu J *et al. Agric Sci China*, 2005, **4**: 654
[49] Gilchrist EJ *et al. Mol Eco*, 2006, **15**: 1367

TILLING Technology and Its Application

Jie Sun, Hai-Rui Cui*

(*Institute of Nuclear Agricultural Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China*)

Abstract Targeting induced local lesions in genomes (TILLING) is a novel reverse genetics technology that provides rapid and effective characterization and targeting screen for mutations. The methodology, technical core and advantages of TILLING were introduced and its applications in mutation research, reverse genetics and functional genomics, detection of single nucleotide polymorphism (SNP), germplasm enhancement and evaluation, and crop genetic improvement were reviewed in this paper.

Key words TILLING; reverse genetics; SNP; germplasm evaluation; genetic improvement

Received: July 12, 2006 Accepted: October 18, 2006

This work was supported by the Science and Technology Department of Zhejiang Province (No.2005E10008) and the International Atomic Energy Agency (No.13631)

*Corresponding author: Tel: 86-571-86971405, Fax: 86-571-86971202, E-mail: hrcui@zju.edu.cn