

TILLING 技术研究进展及其在植物空间诱变上的应用前景

任卫波¹, 郭慧琴², 徐柱¹, 赵亮², 王蜜²

(1. 中国农业科学院草原研究所, 内蒙古呼和浩特 010010; 2. 内蒙古农业大学, 内蒙古呼和浩特 010018)

摘要 在回顾 TILLING/ecoTILLING 技术的发展及其应用的基础上, 阐述了其在植物空间诱变研究领域的应用前景。

关键词 空间诱变; TILLING 技术; 研究进展; 植物

中图分类号 S188 **文献标识码** A **文章编号** 0517 - 6611 (2009) 21 - 09827 - 03

Research Progress on TILLING Technology and Its Application Foreground in the Space Mutations of Plants

REN Wei-bo et al (Grassland Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Huhhot, Inner Mongolia 010010)

Abstract Based on reviewing the development and application of TILLING/ecoTILLING technology, its application foreground in the research field of space mutations of plants were expounded.

Key words Space mutations; TILLING technology; Research progress; Plants

近地空间环境具有微重力、高真空、强烈的空间辐射及弱地球磁场等特点。这些特殊条件对进入其中的生物材料具有特殊的复合诱变作用^[1]。研究和实践证明, 空间诱变在有效创造罕见突变基因资源和培育作物新品种方面已发挥出越来越重要的作用, 成为空间生命科学的重要组成部分, 并凸显良好的产业发展优势^[2]。然而, 目前的空间诱变还存在很多亟待解决的关键问题, 尤其是在突变体的筛选工作中^[3]。常规的空间诱变变异体筛选是通过田间种植、单株筛选, 连续世代遗传稳定性观察 3 个步骤完成, 这一过程存在成本高、周期长、不可预见性等缺点。TILLING (Target induced local lesions in genomes) 是一种低成本、高通量的反向遗传学变异体筛选方法。它将化学随机诱变 (EMS) 和基于 PCR 特定基因位点突变筛选有机结合起来^[4]。目前已成功运用于拟南芥^[5]、小麦^[6]、斑马鱼^[7]等生物。而且, 已有的研究表明, 该技术在作物品种改良方面有着巨大的潜力^[6]。该方法用于化学诱变 (EMS) 诱变体筛选, 不仅提高 EMS 诱变效率, 同时也间接推动了以点突变变异材料为基础的植物功能基因组研究。另外也有报道该方法能显著提高 γ 射线诱变材料筛选效率。因空间诱变变异与 γ 射线诱变有一定的相似性, 将 TILLING 技术应用于空间诱变变异研究不仅是可行的, 而且还具有重要意义。

1 TILLING 技术及其技术要点

1.1 TILLING 技术

TILLING 是一种基于反向遗传学的突变体筛选方法。通过该技术可以从诱变群体或野生群体的数千个个体中筛选出稀有的单核苷酸多态性 (SNP)^[4], 它有 2 个技术特点: ① DNA pooling, 通过构建基因池可大大减少需要检测的个体数; ② 通过精心设计的特异性引物, PCR 扩增靶基因的目标区域, 确保检测区域的特异性。其标准程序及要求如下: ① EMS 诱变处理种子, 单株种植获得 M1 代; ② M1 代植株自交, 获得 M2 代; ③ M2 代植株单株提取 DNA 及质量检测, 同时保存 M2 代种子, 形成种子库; ④ 基因池的

构建。构建基因池时, 要确保各个单株的 DNA 等量混合; ⑤ 目标基因选择和 PCR 扩增。根据目标基因序列设计一对特异引物进行 PCR 扩增。引物分别用 700 和 800 nm 荧光染料标记。另外扩增区域不易太长, 一般为 1.0 ~ 1.5 kb 为宜; ⑥ 杂合双链形成。PCR 完成后, PCR 产物通过多次变性和复性, 以形成突变型/野生型的杂合双链; ⑦ 酶切。用特异性核酸内切酶酶切同源双链。一般使用 CELI 酶, 该酶能有效识别并切开杂合双链中的不匹配位点, 但是 CELI 的酶切环境对酶切效果影响很大, 因此有必要进行条件优化。⑧ 酶切产物电泳分析。通过变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 然后用双色红外荧光系统分析电泳结果, 获得突变池; ⑨ 利用相同方法从突变池中筛选突变个体; ⑩ 突变个体 PCR 片段测序。通过全片段测序, 确认核酸多态的类型、位置和数量; ⑪ 突变表型鉴定。虽然, TILLING 大幅减少了发现突变的工作量, 但后期的突变表型的确定仍需要作很多工作。通常的做法是通过异型杂交, 产生多样性后代来确定突变表型^[12]。研究表明, TILLING 能够识别多种类型的多态: 单核苷酸多态、小片段插入和缺失、微卫星重复数变化等, 发现的位点多态可通过测序得到确认。应用毛细管电泳技术对 Ecotilling 技术进行优化, 可用于多倍体分析^[8]。

1.2 TILLING 技术要点

1.2.1 材料的遗传背景。

高度纯合、自交亲和的材料为首选, 其遗传结构简单。当然杂合体 and 异花授粉材料也可用于 TILLING 分析, 只是要复杂一些^[6]。为了最低限度的降低群体内的遗传变异, 应选择单一亲本产生的后代。另外, 最好选择已有核酸序列信息的群体。

1.2.2 DNA pooling 技术。

为了提高选择效率, 采用 DNA pooling 技术。在 TILLING 中, 一般 8 个单株的 DNA 等量混合构建基因池, 也有用 5 个单株的^[13]。具体单株数因变异出现频率而异。一般而言变异频率高, 构成基因池的个体数就少; 变异频率低, 构成基因池的个体数就多。而在 Ecotilling 中, 一般是 2 个单株 DNA 混合构建基因池, 其中一个为参照 DNA (一般为该物种已测序的材料); 这种区别的原因在于: SNP 在诱变群体中的出现频率远低于不同生态型群体^[9]。通过精确控制模板 DNA 浓度、优化 PCR 反应和 CELI 酶切环境, 进一步提高 pooling 样本数是完全可行的^[9]。

基金项目 “十一五” 国家科技支撑计划重点项目 (2008BADB3B04); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金 (中国农业科学院草原研究所) 资助项目。

作者简介 任卫波 (1979 -), 男, 山西晋城人, 博士, 助理研究员, 从事牧草种质资源与育种。

收稿日期 2009-04-07

1.2.3 当 SNP 位于扩增子 (amplicons) 5' 或 3' 端时, 一般不容易被 LI-Cor 或琼脂糖电泳检测出来。因此, 在扩增时, 需要设计多对引物, 来覆盖目标区域, 使得每个扩增子的重叠区域大于 100 bp^[9]。

1.2.4 酶的来源一般是香芹 (*Apium graveolens*) 提取物, 其通过纯化, 有非常高的酶切效果, 甚至可以和商品酶类相媲美。但现在也有使用芜菁 (*Brassica rapa*) 小叶柄提取物酶切水稻 DNA 杂合双链的报道^[13]。相对芹菜, 芜菁的成本更低, 而且一年四季都可以获得。

1.2.5 CELI 酶切产物检测。一般检测方法为 DPAGE 电泳和荧光检测。这种方法需要荧光标记引物 (IRDye700 和 IRDye800) 和双色红外荧光扫描系统^[10]; 最近也有报道使用毛细电泳系统 (HAD-GT12)^[11] 和琼脂糖凝胶电泳^[9] 来检测 CELI 酶切产物。

1.2.6 目前, 已开发出多个软件用于简化 TILLING 技术。Nick 和 Greene 研究开发了 TILLING 引物设计软件 CODDLE (<http://www.proweb.org/coddle/>), 包含了所有共享数据库中的基因组和蛋白质编码信息, 能根据用户输入的序列信息, 产生基因模型和蛋白质保守区域模型。然后根据最有可能突变为高频率终止密码子的区域或进化保守区域设计引物。引物设计完成后可用 Primer3 程序对 CODDLE 候选引物进行选择^[12]。突变体评价软件 PARSESNP (<http://www.proweb.org/parsesnp/>) 能提供图谱信息, 预测点突变对基因编码蛋白功能、酶切位点及其他方面的影响, 从而用于分析突变对表型的影响。

2 TILLING 技术的应用

TILLING 使在大量个体中快速检测基因变异成为可能, 而且相对成本较低, 因为每个单倍型只需要一个个体测序就可以了, 大大减少了需要测序的个体数目, 降低了检测成本。这种方法适用范围广, 不仅适用于纯合体与二倍体, 也可适用于杂合体和多倍体。TILLING 技术尤其适用于在大群体中, 筛选突变体和同时检测多个基因的 SNP。

2.1 突变体筛选 Slade 等首次利用 TILLING 技术对异源六倍体和四倍体小麦 EMS 诱变植株进行筛选, 在 1 920 个诱变植株中识别出 246 个 waxy 等位基因位点^[6]。Sato 等利用 TILLING 技术对 γ 射线诱变水稻种子进行突变体筛选, 获得 6 株变异体, 其中 4 株的变异类型为单核苷酸变异, 2 株的变异类型为小片段 DNA 缺失 (2~4 bp)^[13]。

2.2 功能基因组研究 随着主要模式植物全基因组测序的完成, 如何高效利用序列信息, 开展基因功能研究成为人们关注的新热点。因此, 利用已有的序列信息, 通过加工、修饰和改造靶基因来达到研究基因功能目的的反向遗传学方法应运而生。目前植物常用的反向遗传学方法包括反义 RNA 技术 (antisense RNA)、DNA 插入诱变 (包括 T-DNA 和转座子插入)、RNAi (RNA interference) 等, 但这些方法都在技术上存在一定缺陷。反义 RNA 技术需要花费大量精力来预先确定目标基因是否表达; DNA 插入诱变则在对靶基因过小时或存在多拷贝的基因功能研究中受到限制。RNAi 技术抑制基因表达应用非常广泛^[14], 但其作用机理尚不清楚。其后代表型存在多样性和不可预知性。同时上述方法均需耗

时的转基因和组织培养。与上述方法相比, 结合了传统化学诱变和高效筛选技术特点的 TILLING 具有三方面的优势: ①可获得点突变的系列等位基因, 产生一系列从弱到强的表型效应, 尤其对可能涉及亚致死基因、长度较小的基因、复等位基因等基因的功能分析具有优势^[21]; ②可诱导产生高频率点突变, 筛选目的基因只需较小的突变群体^[20]; ③不依赖转基因技术和组织培养, 省时、省力。因此, 该体系自 2000 年创立以来, 先后应用于拟南芥^[5]、小麦^[6]、斑马鱼^[7] 等生物的功能基因组研究中。

2.3 SNP 检测 Comai 等利用改进的 TILLING 技术 (即 Ecotilling) 首次对拟南芥不同生态型间的 SNP 进行研究^[10]。随后 Ecotilling 作为一种有效的 SNP 检测手段, 用于野生棉白杨 (western black cottonwood) 群体多态性研究^[15]。Ecotilling 主要适用于在大规模群体 (数百乃至上千个个体) 中寻找稀有 SNP, 检测的片段大小 < 1.5 kb 为宜^[16]。

2.4 标记辅助选择 Ecotilling 作为一种有效的 SNP 检测手段, 不仅能揭示特定基因的位点多态性, 还可作为遗传标记用于辅助选择。在用 Ecotilling 技术对燕麦抗白粉病基因 *mlo* 和 *m1a* 研究中, 多个 SNP 被发现, 这些 SNP 作为遗传标记, 可用于在育种中整合多个抗病等位基因, 提高抗病能力^[17]。

3 TILLING 技术应用于空间诱变研究

3.1 技术可行性 理论上讲, TILLING 检测的突变群体与传统诱变群体没有本质区别^[18]。在对空间搭载材料进行常规遗传学方法筛选突变体时, 可以同时结合采用 TILLING 技术进行反向遗传学筛选。从技术上讲, 该体系已经在 γ 射线诱变变异体筛选中获得突破。已有的研究表明, 空间诱变与 γ 射线诱变诱变性质有相似之处, 因此该技术用于空间诱变研究从技术上是可行的。从另一个角度来讲, 目前认为空间诱变的主要因素是空间重粒子辐射。粒子辐射诱变的特点是诱变点突变的频率相对较低, 小片段插入与缺失和大片段插入缺失的频率较高。已有的研究表明, 物理诱变变异可产生 DNA 大片段缺失, 有时这种缺失能达到 6 M 或更多, 然而这种变异一般都是不能遗传给后代的^[19]。因此, 空间诱变产生的可遗传变异主要是由小片段缺失与插入以及少量点突变引起的。而且目前的研究报道表明, TILLING 技术能够在含有大量个体的群体中有效识别变异单核苷酸多态、小片段插入与缺失和微卫星重复数变化等变异类型。因此该技术用于空间诱变研究从技术上是适合的。

3.2 应用的意义 研究表明, 经过空间搭载后, 植物会出现形态学、生理生化、细胞显微结构、细胞分裂、染色体等多方面的变化^[22]。总体上讲这些变化分为可遗传变异和生理损伤 2 种, 其中只有可遗传变异才可用于作物品种改良。如何有效区分两者是目前空间诱变研究面临的重要问题。常规遗传学方法就是通过多年田间种植, 连续世代观察, 从而判断某性状变化是否可遗传。这种筛选方法不仅成本高、耗时长、易受环境条件影响, 而且由于不能事先对变异类型和频率进行有效预测, 还具有盲目性和不确定性。TILLING 技术可以很好地解决上述 2 个问题。其一, TILLING 技术筛选是直接从基因变异的水平进行筛选, 因此可以有效地降低生

理损伤变异的人选频率。其二,由于是按靶基因序列设计特异性引物,因此 TILLING 提供了从分子水平定向规模筛选突变体的技术平台,提高了选择结果的目的性和可预测性。尤其对品质和营养成分等无法从植物表型加以选择或耐逆、恢复性、不育性等难以快速评价的性状筛选尤为有利^[20]。因此,将 TILLING 技术与空间诱变技术结合起来,它不但可继承空间诱变频率高、优异变异多、可获得稀有变异等优点,还融合 TILLING 技术的高效筛选性和结果可预见性等优点,最终将空间诱变及航天育种技术转变为一种高效、定向诱变育种新技术。

3.3 TILLING 技术用于空间诱变 参照 EMS-TILLING 和辐射诱变 TILLING 流程,考虑到空间诱变的特点,检测成本和可操作性,特提出以下流程仅供参考:①卫星搭载干种子,进行空间诱变;②按单株种植空间诱变一代 SP1 植株;③SP1 代植株自交,获得 SP2 代;SP2 代植株单株提取 DNA 及质量检测,同时保存 SP3 代种子,形成种子库;④基因池的构建。构建基因池时,要确保各个单株的 DNA 等量混合;每个基因池单株数因物种和诱变频率而异,诱变频率高的材料可选用 4 或 6 个,诱变频率低的可选用 8 或 10 个单株;⑤目标基因选择和 PCR 扩增引物设计结合软件 CODDLE 和 Primer 3.0,选择要最大限度的保证 PCR 扩增产物的专一性。另外扩增区域不易太长,一般以 1.0 ~ 1.5 kb 为宜;可同时选择多个基因或一个基因可设计多对引物分区扩增,筛选变异;⑥杂合双链形成 PCR 完成后,PCR 产物通过多次变性和复性,以形成突变链/自然链的杂合双链;⑦杂合位点酶切。选择合适的酶类,既要保证酶切检测效率,也要考虑到检测成本。建议适用香芹 (*Apium graveolens*) 提取物或芜菁 (*Brassica rapa*) 小叶柄提取物。因 CELI 的酶切环境对酶切效果影响很大,因此有必要进行酶的用量及酶切条件优化。⑧酶切产物电泳分析。通过电泳条带分析突变池;如果条件较好的实验室可以适用变性 PAGE 胶和双色红外荧光系统检测;如果条件一般的或对检测精度要求不是太高,可以考虑使用琼脂糖凝胶系统进行突变体检测。琼脂糖检测具有相对成本低,可检测片段大(目标产物则介于 2 ~ 3 kb)的优点,但是受分辨率限制,琼脂糖电泳只能检测出变异位点的存在,变异位点的位置、数量和类型需要通过全片段测序来确认,而且琼脂糖电泳无法有效区分单倍型;⑨利用相同方法从突变池中筛选突变个体;⑩突变个体 PCR 片段测序。通过全片段测序,确认核酸多态的类型、位置和数量;⑪突变表型鉴定。可结合常规变异体筛选方法进行。

3.4 应用的前景

3.4.1 突变特性研究。尽管植物空间诱变研究已有几十年的历史,但主要是从通过表型→蛋白→基因的正向遗传学的方法进行,真正利用反向遗传学的方法从分子水平阐明其诱变特性的研究并不多。而 TILLING 技术正是在研究突变特性方面具有很大潜力。Greene 等利用该技术对 EMS 诱发拟南芥突变特性进行研究,结果发现 EMS 诱变特性是随机点突变,而且 99% 以上的是 G/C→A/T 的转换突变^[5]。同时利用该技术对诱变频率进行研究发现,不同植物的诱变频率显著不同,其中六倍体小麦最高,突变密度达到 1/25 kb^[6];拟

南芥为 1/170 kb^[5],水稻 1/500 kb 等。这说明对于 EMS 诱变,染色体倍性是影响突变发生频率的主要因素^[21]。利用 TILLING 技术对空间诱变的诱变特性和频率进行研究,对搭载材料选择,突变群体构建和筛选都有着重要的指导意义。

3.4.2 突变资源筛选与作物品种改良。目前空间诱变的材料主要是生产推广面积大、经济价值相对较高的品种或品系,这些材料多为异源多倍体,遗传构成复杂,应用常规的分子标记进行辅助选择,难度高,效果差。然而,作为一种基于反向遗传学的突变体筛选方法,TILLING 技术不仅适用于遗传背景简单的二倍体植物如拟南芥等^[5],还可适用于遗传背景复杂,却又具有重要经济意义的异源多倍体如六倍体小麦^[6],在重要经济作物突变体筛选和品种改良中具有巨大潜力^[6]。利用 TILLING 技术对空间诱变群体进行筛选,可有效剔除非遗传变异,显著提高选择效率,缩短性状稳定时间,对加快航天育种进程有着重要意义。

3.4.3 功能基因组研究。突变体是基因功能研究的基础,通过特定基因变异位点表型分析,可以获得关于基因功能的信息。空间诱变具有突变频率高、变异幅度大、诱变效率高等特点,而且通过空间诱变还可以获得一些地面无法获得的罕见变异材料^[22],这些材料对基因功能研究是非常重要的。TILLING 技术不仅能高效的将这些变异材料筛选出来,还可能获得该突变的系列等位基因,这些等位基因可能会产生一系列从强到弱的表型效应,有利于基因结构与功能的研究。

参考文献

- [1] MEI M, QIU Y, SUN Y, et al. Morphological and molecular changes of maize plants after seeds been flown on recoverable satellite[J]. Advances in Space Research, 1998, 22(12): 1697 - 1671.
- [2] 刘录祥, 郭会君, 赵林妹. 我国作物航天育种 20 年来的基本成就与展望[J]. 核农学报, 2007, 21(6): 589 - 592.
- [3] 蒲志刚, 张志勇, 向跃武, 等. 航天诱变创制带标记水稻新材料及新品种选育上的应用[J]. 核农学报, 2008, 22(1): 49 - 51.
- [4] COLBERT T, TILL B J, TOMPA R, et al. High-throughput screening for induced point mutations[J]. Plant Physiol, 2001, 126: 480 - 484.
- [5] GREENE E A, CODOMO C A, TAYLOR N E, et al. Spectrum of chemically induced mutations from a large-scale reverse-genetic screen in *Arabidopsis* [J]. Genetics, 2003, 164: 731 - 740.
- [6] SLADE A J, FUERSTENBERG S I, LOEFFLER D, et al. A reverse genetic, nontransgenic approach to wheat crop improvement by TILLING [J]. Nature Biotechnol, 2005, 23: 75 - 81.
- [7] WIENHOLDS E, EEDEN F V, KOSTERS M, et al. Efficient target-selected mutagenesis in zebrafish [J]. Genome Res, 2003, 13: 2700 - 2707.
- [8] CORDEIRO G, ELIOTT F G, HENRY R J. An optimized ecoTILLING protocol for polyploids or pooled samples using a capillary electrophoresis system [J]. Analytical Biochemistry, 2006, 355(1): 145 - 147.
- [9] RAGHAVAN C, NAREDO M E B, WANG H, et al. Rapid method for detecting SNP on agarose gels and its application in candidate gene mapping [J]. Molecular Breeding, 2007, 19: 87 - 101.
- [10] COMAI L, YOUNG K, TILL B J, et al. Efficient discovery of DNA polymorphisms in natural populations by EcoTILLING [J]. Plant J, 2004, 37: 778 - 786.
- [11] SUZUKI T, EIGUCHI M, SATOH H, et al. A modified TILLING system for rice mutant screening [J]. Rice Genet Newsl, 2005, 22: 85 - 87.
- [12] 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.
- [13] 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]. Breeding Science, 2006, 56: 179 - 183.
- [14] WATERHOUSE P M, GRAHAM H W, WANG M B. Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA [J]. Proc Nat Acad Sci USA, 1998, 95(23): 13959 - 13964.

本稳定;对于Pb的测定,硼氢化钾的浓度在5~40 g/L时,荧光强度较稳定,综合以上考虑,试验选择20 g/L的硼氢化钾作为还原剂。

2.2 反应介质及酸度的影响 对于氢化物的形成,酸及酸度是原子荧光测定一个重要条件。在较低的酸度下,酸的影响一般很小。但是,酸度太低的溶液中某些共存的金属离子可能产生干扰,而且在低酸度下,容易产生固态氢化物或泡沫状氧的衍生物干扰测定;而酸度太高时又会产生抑制信号干扰,还会产生荧光猝灭而影响灵敏度。该试验对盐酸、硝酸、硫酸、高氯酸等常用酸作为反应介质对测定Hg、As、Pb荧光强度的影响进行了比较,试验结果表明,盐酸为介质效果最佳,而且测定Hg的盐酸浓度在0.5%~5.0%;测定As的盐酸浓度1.5%~15.0%;测定Pb的盐酸介质浓度在1.5%~2.2%时荧光强度最大且稳定,因此试验选用2%的盐酸为测定介质。

2.3 共存离子的影响 试验了常见元素对Hg、Pb、AS测定的影响,在选定的仪器工作条件下 Al^{3+} 、 Fe^{3+} 、 Cu^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Cr^{3+} 、 Bi^{3+} 、 Ag^{+} 、Hg、 Pt^{2+} 、Se(IV)、Te(IV)、Ge(IV)、Sn(II);常见元素允许量均较大,方法选择性好。

2.4 样品前处理 卷烟烟气冷凝物中的重金属元素只是吸附在石英剑桥滤片的表面,一般用1%硝酸在室温下用超声波浸取或振荡浸取可让剑桥滤片上吸附的重金属元素溶出;由于硝酸介质对荧光强度有负影响,因此试验中用盐酸浸取样品,结果表明:用浓度为1%~5%的盐酸,超声浸取20 min以上可让样品中的Hg、As、Pb完全溶出;因此选择用2%的盐酸超声浸取30 min。

2.5 工作曲线及检出限 在选定的试验条件下,氢化物发生—原子荧光光谱法测定Hg、As、Pb的工作曲线,其线性范围、回归方程、相关系数及检出限见表2。

表2 工作曲线、相关系数、回归方程和检出限

Table 2 The working curve, correlation coefficient, regression equation and detection limit

元素 Element	线性范围 // $\mu\text{g/L}$ Linear range	回归方程 Regression equation	相关系数(r) Correlation coefficient	检出限// $\mu\text{g/L}$ Detection limit
Hg	0.1~150	$A=22.43C+2.35$	0.999 5	0.035
As	0.1~200	$A=26.15C+2.84$	0.999 3	0.035
Pb	0.2~120	$A=16.82C-1.86$	0.999 6	0.050

(上接第9829页)

- [15] GILCHRIST E J, HAUGHN G W, YING C C, et al. Use of ecoTILLING as an efficient SNP discovery tool to survey genetic variation in wild populations of *populus trichocarpa* [J]. *Molecular ecology*, 2006, 15 (5): 1367-1378.
- [16] COMAI L, HENIKOFF S. TILLING: practical single-nucleotide mutation discovery [J]. *The Plant Journal*, 2006, 45: 684-694.
- [17] MEJLHEDE N, KYJOVSKA Z, BACKES G, et al. EcoTILLING for the identification of allelic variation in the powdery mildew resistance genes *mlo* and *m1a* of barley [J]. *Plant Breeding*, 2006, 125 (5): 461-467.
- [18] HENIKOFF S, TILL B J, COMAI L. Single-nucleotide mutations for plant

2.6 回收率试验及精密度 取收集相同卷烟烟气的剑桥滤片2份,其中1份加入已知量Hg、As、Pb标样,另1份不加,在相同条件下测定5次,通过加入标准的测出量除以标准加入量计算回收率,并根据5次平行测定的结果计算相对标准偏差,结果见表3。

表3 方法精密度及回收率

Table 3 The precision and recovery of the method

元素 Element	加入量// μg Addition	测出量// μg Measured amount	回收率//% Recovery	RSD//% ($n=5$)
Hg	0.2	0.185	93	3.2
As	0.2	0.181	91	3.0
Pb	0.2	0.190	95	2.8

2.7 样品分析结果 卷烟样品按“2.4”样品前处理的方法处理,按许多仪器条件测定,结果见表4。

表4 样品分析及结果

Table 4 The sample analysis and results

组分 Component	样品//ng/支 Samples			
	卷烟 A1 Cigarette A1	卷烟 S1 Cigarette S1	卷烟 B3 Cigarette B3	卷烟 H5 Cigarette H5
Pb	81.40	77.80	67.80	58.50
As	18.60	11.50	16.40	10.80
Hg	2.86	3.47	5.61	1.87

3 结论

卷烟主流烟气用剑桥滤片捕集,用2%盐酸超声波浸取滤片上捕集的Hg、As、Pb,然后用原子荧光法测定,方法相对标准偏差为2.8%~3.2%,标准回收率为91%~95%,结果令人满意。

参考文献

- [1] 索卫国,胡清源,王芳,等. 卷烟烟气中微量和痕量元素研究综述[J]. *中国烟草学报*, 2007, 13 (5): 61-64.
- [2] 孙楠,薛健. 中药中重金属测定的研究进展[J]. *中草药*, 2005, 36 (12): 1907-1909.
- [3] 张艳玲,周汉平. 烟草重金属研究概述[J]. *烟草科技*, 2004, 12 (12): 22-27.
- [4] 祁春健,王瑞,王宏义. 原子吸收光谱法测定香烟烟气中重金属的含量[J]. *分析测试学报*, 2004, 23 (4): 107-109.
- [5] 谢涛,黄泳彤,徐扬. 用ICP-MS法测定卷烟烟气中的重金属元素[J]. *烟草科技*, 2003, 11 (1): 27-29.

functional genomics [J]. *Plant Physiol*, 2003, 135: 630-636.

- [19] NAITO K, KUSABA M, SHIKAZONO N, et al. Transmissible and non-transmissible mutations induced by irradiating *Arabidopsis thaliana* pollen with γ -rays and carbon ions [J]. *Genetics*, 2005, 169: 881-889.
- [20] 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.
- [21] 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.
- [22] 任卫波,韩建国,张蕴薇,等. 航天育种研究进展及其在草上的应用前景[J]. *中国草地学报*, 2006, 28 (5): 91-97.