

抗病转基因大豆事件 B4J8049 外源 T-DNA 整合位点分析及特异性检测

包婉莹^{1,2}, 仲晓芳², 杜 茜², 赵倩倩², 杨向东^{2*}

(1. 吉林师范大学生命科学学院, 吉林 四平 136000; 2. 吉林省农业科学院农业生物技术研究所/吉林省农业生物技术重点实验室, 长春 130033)

摘 要:大豆疫霉根腐病是由卵菌纲病原菌—疫霉菌(*Phytophthora sojae*)引起的大豆毁灭性病害之一。本研究前期利用农杆菌介导转化技术, 将广谱抗病基因 *hrpZm* 导入栽培大豆 Williams 82, 获得高抗疫霉根腐病转基因大豆新品系 B4J8049, 并已进入环境释放试验阶段。为进一步推进该转化事件的生物安全评价及应用, 本研究采用热不对称交错 PCR (thermal asymmetric interlaced PCR, TAIL-PCR) 方法分析外源 T-DNA 整合位点右边界序列, 并依据其序列特征, 建立该转化事件特异性检测方法。Southern 杂交检测结果表明, 转基因大豆事件 B4J8049 外源 T-DNA 插入拷贝数为 1 个。根据外源 T-DNA 插入片段序列设计 3 条嵌套特异性检测引物, 与简并引物组合进行 TAIL-PCR 扩增反应, 获得外源 T-DNA 插入位点右边界序列。BLAST 分析 (<https://soybase.org/>) 表明, 外源 T-DNA 片段以单拷贝形式反向插入的方式整合到大豆基因组中第 8 号染色体的 187 824 位点。在此基础上, 依据插入位点右边界序列设计检测引物, 建立转基因大豆事件 B4J8049 特异性检测方法。本研究为该抗病转基因事件 B4J8049 及其衍生产品特异性检测提供依据。

关键词: *hrpZm*; 转基因大豆; 整合位点; 侧翼序列; 事件特异性检测

中图分类号: S565.1

文献标识码: A

文章编号: 1003-8701(2018)05-0021-06

Analysis of the Foreign T-DNA Insertion Site and Event-Specific Detection of the Disease-Resistant Transgenic Soybean B4J8049

BAO Wanying^{1,2}, ZHONG Xiaofang², DU Qian², ZHAO Qianqian², YANG Xiangdong^{2*}

(1. School of Life Science, Jilin Normal University, Siping 136000; 2. Agricultural Biotechnology Institute, Jilin Academy of Agricultural Sciences /Jilin Provincial Key Laboratory of Agricultural Biotechnology, Changchun 130033, China)

Abstract: *Phytophthora* root and stem rot, caused by an oomycete pathogen *Phytophthora sojae*, is one of the most devastating diseases in soybean production. In our previous study, we introduced a broad-spectrum disease resistant gene *hrpZm* into the soybean cultivar ‘Williams 82’ by the *Agrobacterium*-mediated transformation to generate the transgenic event B4J8049, which exhibited high resistance to *P. sojae* and approved for environmental release. To advance safety assessment and application of the transgenic soybean event, we analyzed the insertion site of the foreign T-DNA in the genome of the event B4J8049 using the thermal asymmetric interlaced PCR (TAIL-PCR), and established the event-specific detection method based on the flanking sequence at the right border of the T-DNA insertion. Southern blot analysis confirmed the single-copy insertion of the foreign T-DNA in the soybean genome. Three nested specific primers based on the T-DNA sequence and the arbitrary degenerate primers were designed to amplify the right border flanking sequence by TAIL-PCR. BLAST analysis (<https://soybase.org/>) revealed that the foreign T-DNA was inserted into the position 187 824 on the soybean chromosome 8 in the reverse way. Based on the flanking sequence of the right border, an event-specific detection method was established for the transgenic soybean B4J8049 and its derivative products.

Key words: *hrpZm*; Transgenic soybean; Insertion site; Flanking sequence; Event-specific detection

收稿日期: 2018-06-24

基金项目: 国家转基因生物新品种培育科技重大专项(2016ZX08004-004); 吉林省农业科学院创新工程项目(C6215000220、C7208000307)

作者简介: 包婉莹(1992-), 女, 在读硕士, 主要从事大豆生物技术育种研究。

通讯作者: 杨向东, 男, 博士, 研究员, E-mail: xdyang020918@126.com

大豆疫霉根腐病是由卵菌纲病原菌—疫霉菌 (*Phytophthora sojae*)引起的大豆毁灭性病害之一。该病害近年来在我国大豆主产区的发生和为害程度逐步加重,一般发病率在5%~10%,严重地块甚至绝产,且该病害一旦发生,很难根除^[1-4]。目前生产上对大豆疫霉根腐病的防治主要采用种植抗、耐性品种,改良栽培措施以及化学防治等方法。由于大豆疫霉菌生理小种分化明显,新的病原小种不断出现,田间毒性小种演替频率较高,如何进一步拓宽大豆疫霉根腐病抗源基础,提高大豆疫霉根腐病抗性及其持久性,对于有效防治病害的发生具有重要的意义。本研究前期利用农杆菌介导转化技术^[5],将广谱抗病基因 *hrpZm* 导入栽培大豆 Williams 82,经多年抗性鉴定,获得对疫霉根腐病抗性水平显著提高的转基因大豆事件 B4J8049。*hrpZm* 基因来源于丁香假单胞杆菌 (*Pseudomonas syringae*),并按照大豆偏爱性密码子进行人工优化合成。该基因编码 14.7 kDa 富含甘氨酸的蛋白质^[6-7],能够触发普通烟草中的超敏反应 (*hypersensitive response*, HR)^[6]。本研究获得的高抗疫霉根腐病转基因大豆事件 B4J8049 对疫霉菌 1 号生理小种具有较强的抗性,室内接种死亡率为 6.67%~17.24%,且农艺性状与非转基因对照没有明显差异^[8]。该转基因事件已于 2015 年批准进入环境释放阶段[农基安审字(2015)第 037 号]。

由于外源 T-DNA 在植物基因组中的整合具有随机性和不可复制性,不同转基因事件中外源 T-DNA 插入位点侧翼序列均存在差异,因此,分析外源 T-DNA 在植物基因组中的整合位点,并依据插入位点侧翼序列建立的特异性检测方法,是准确识别不同转基因事件,实现转基因事件及其产品有效监督管理的一个重要依据。目前侧翼序列的分离方法主要包括以 PCR 技术为基础的染色体步移法(反向 PCR 法、连接 PCR 法、特异引物 PCR 法、热不对称交错 PCR 等)^[9]及基因组重测序法。其中,热不对称交错 PCR 因其简便、高效、高特异性、高灵敏度等特点在分子生物学研究的各领域得到广泛应用^[10-12]。本研究旨在利用 TAIL-PCR 技术分析外源 T-DNA 在转基因事件 B4J8049 基因组中的整合位点侧翼序列,并依据侧翼序列特征,建立该转基因事件特异性 PCR 检测方法,为转基因大豆事件 B4J8049 及其衍生品系检测提供参考,推进该转基因事件的生物安全评价及应用。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

抗病转基因大豆事件 B4J8049 由吉林省农业科学院农业生物技术研究所以创制并保存^[8]。该转化事件是利用携带 pTF101-*Gmubi3-hrpZm* 的质粒,采用农杆菌介导转化法获得的。该转基因事件已于 2015 年批准进入环境释放阶段。栽培大豆品种 Williams 82、沈农 9 号及高油酸转基因大豆 L72 由本课题组保存。

1.2 Southern 杂交检测

利用高盐 CTAB 法 (Hexadecyltrimethyl Ammonium Bromide) 提取大豆植株叶片基因组 DNA^[13]。约 30 μ g 的基因组 DNA 经 *Xba* I (New England Biolabs Inc., Beverly, Massachusetts) 酶切后,转移至 HybondTM-N⁺ 尼龙膜 (GE Amersham, RPN303B, 美国)。利用地高辛 (DIG) 11-dUTP 标记 *hrpZm* 片段 (423 bp) 作为探针进行 Southern 杂交检测,具体检测方法参照试剂盒说明书 (DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II, Roche 公司,德国)。探针扩增引物为 HRP-F2: 5'-ATG-CAAAGCCTTAGTTTGAAGCTCTTC-3', HRP-R2: 5'-TCACCATTGAAAGCTGCTGTTGCTG-3')。PCR 反应条件: 95℃ 5 min, 94℃ 30 s, 58℃ 30 s, 72℃ 1 min, 共 35 个循环; 72℃ 10 min。杂交温度 42℃, 室温下用 BCIP / NBT 进行化学染色,直到出现清晰的杂交信号^[8, 13]。

1.3 T-DNA 右边界序列扩增

根据表达载体 pTF101-*Gmubi3-hrpZm* T-DNA 区右边界 (right border, RB) 序列特征设计 3 条高退火温度嵌套特异性引物,分别命名为 101RB-0a、101RB-1a、101RB-2a (表 1)。按照 Liu 等^[14]报道,设计高简并性引物 LAD-1、LAD-2 及锚定引物 Ac1 (表 1)。利用 TAIL-PCR 反应原理^[14-16],依次利用 101RB-0a/LAD-1/LAD-2、101RB-1a/Ac1 和 101RB-2a/Ac1 引物组合,对转基因大豆事件 B4J8049 外源 T-DNA 右边界侧翼序列进行 3 轮 PCR 扩增。第一轮反应体系中,简并性引物 LAD-1 或 LAD-2 与特异性引物 101RB-0a 浓度比为 3:1,扩增模板为基因组 DNA。在第二和第三轮反应体系中,特异性引物 101RB-1a 或 101RB-2a 与锚定引物 Ac1 浓度比为 1:1,扩增模板为稀释 1 000 倍后的上一级 PCR 反应产物。经过三轮 PCR,获得 T-DNA 插入位点的旁侧序列,扩增程序见表 2。

表 1 引物序列表

引物名称	引物序列
101RB-0a	5'-ACGTGGTTAAACAAATGCAGAAAATCGACGTCGTC-3'
101RB-1a	5'-AGTAGACTGACAAATAAATTACCTGACAACATCGTTTCAC-3'
101RB-2a	5'-CACAAAAAGGGAGTGCATTTTCCAGGGC-3'
LAD-1	5'-ACGATGGACTCCAGAGCGGCCGC(G/C/A)N(G/C/A)NNNGGAA-3'
LAD-2	5'-ACGATGGACTCCAGAGCGGCCGC(T/A/C)N(A/G/C)NNNCCAC-3'
Ac1	5'-ACGATGGACTCCAGAG-3'
SEQ-1	5'-TCCTTAAGTTGCAGCATTTAACACATCTCCTC-3'
SEQ-2	5'-GAATTCCTGATCTAGTAACATAGATGACAC-3'
SEQ-3	5'-AATTTTTTTCTCTAATGAGGAGATGTGTTAAATGC-3'
SEQ-4	5'-TATGCACTCCCTTTTAACTGTTTTTTATTACAAAATG-3'
SEQ-5	5'-TTTCCCGCCTTCAGTTTAAACTATCAG-3'
SEQ-6	5'-GACGCCGTCAACAATGGTGAAC-3'

表 2 TAIL-PCR 扩增程序

扩增反应	循环数	程序
第 1 轮	1	93℃ 2 min
	1	95℃ 1 min
	10	94℃ 30 s, 60℃ 1 min, 72℃ 3 min
	1	94℃ 30 s, 25℃ 2 min, 72℃ 3 min
	25	94℃ 20 s, 60℃ 1 min, 72℃ 3 min
	1	72℃ 5 min
第 2 轮	12	94℃ 20 s, 68℃ 1 min, 72℃ 3 min, 94℃ 20 s, 68℃ 1 min, 72℃ 3 min, 94℃ 20 s, 50℃ 1 min, 72℃ 3 min
	1	72℃ 5 min
第 3 轮	7	94℃ 20 s, 68℃ 1 min, 72℃ 3 min, 94℃ 20 s, 68℃ 1 min, 72℃ 3 min, 94℃ 20 s, 50℃ 1 min, 72℃ 3 min
	1	72℃ 5 min

1.4 扩增产物测序及分析

上述第三轮扩增产物用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳分离后,利用 DNA 回收试剂盒(北京天根)回收特异性扩增条带,并连接到 GENSTAR 公司的 EZ-T 克隆载体中。挑选阳性克隆送上海生工测序。根据测序结果,利用 DNAMAN 软件(version 5.2),并检索大豆基因组数据库(<https://soybase.org/>),分析扩增片段序列与载体序列和大豆基因组序列的同源性,序列比对参数为默认。

1.5 转基因大豆事件 B4J8049 特异性 PCR 检测

根据表达载体 pTF101-*Gmubi3*-*hrpZm* 中目的基因 *hrpZm* 和筛选标记 *bar* 的表达框设计引物(SEQ-1/2 和 SEQ-3/4,表 1),分别对 *hrpZm* 和 *bar* 基因表达框进行 PCR 扩增。同时,根据外源 T-DNA(右边界序列一侧)及紧邻整合位点的大豆基因组序列设计 PCR 检测引物(SEQ-5/6,表 1),建立事件特异性的 PCR 检测方法。PCR 扩增体系(25μL)为 10×PCR 缓冲液 2.5μL, 10 mmol/L dNTPs 0.5μL, 5U/μL Taq 酶 0.5μL,大豆样品 DNA

1.0μL, 10μmol/L 上游和下游引物各 0.5μL, ddH₂O 19.5μL。PCR 扩增程序为:95℃ 5 min, 94℃ 30 s, 59℃ 30 s, 72℃ 3 min, 35 个循环;72℃ 10 min。扩增产物于 1% 琼脂糖凝胶检测。

2 结果与分析

2.1 转基因事件 B4J8049 外源 T-DNA 插入拷贝数检测

植物表达载体 pTF101-*Gmubi3*-*hrpZm* 中目的基因为 *hrpZm*(序列见图 1A),由大豆组成型强启动子 *Gmubi3* 驱动,终止子为 *nos*; *bar* 基因作为筛选标记,由 CaMV 35S 启动子驱动(图 1B)。利用地高辛标记 *hrpZm* 片段作为探针对转基因大豆事件 B4J8049 进行 Southern 杂交检测。结果表明,在转基因大豆中检测到一条明显的杂交条带,而对照非转基因植株中无杂交信号,表明外源基因已整合至大豆基因组中,且为单拷贝(图 1C),与 Du 等^[8]报道一致。

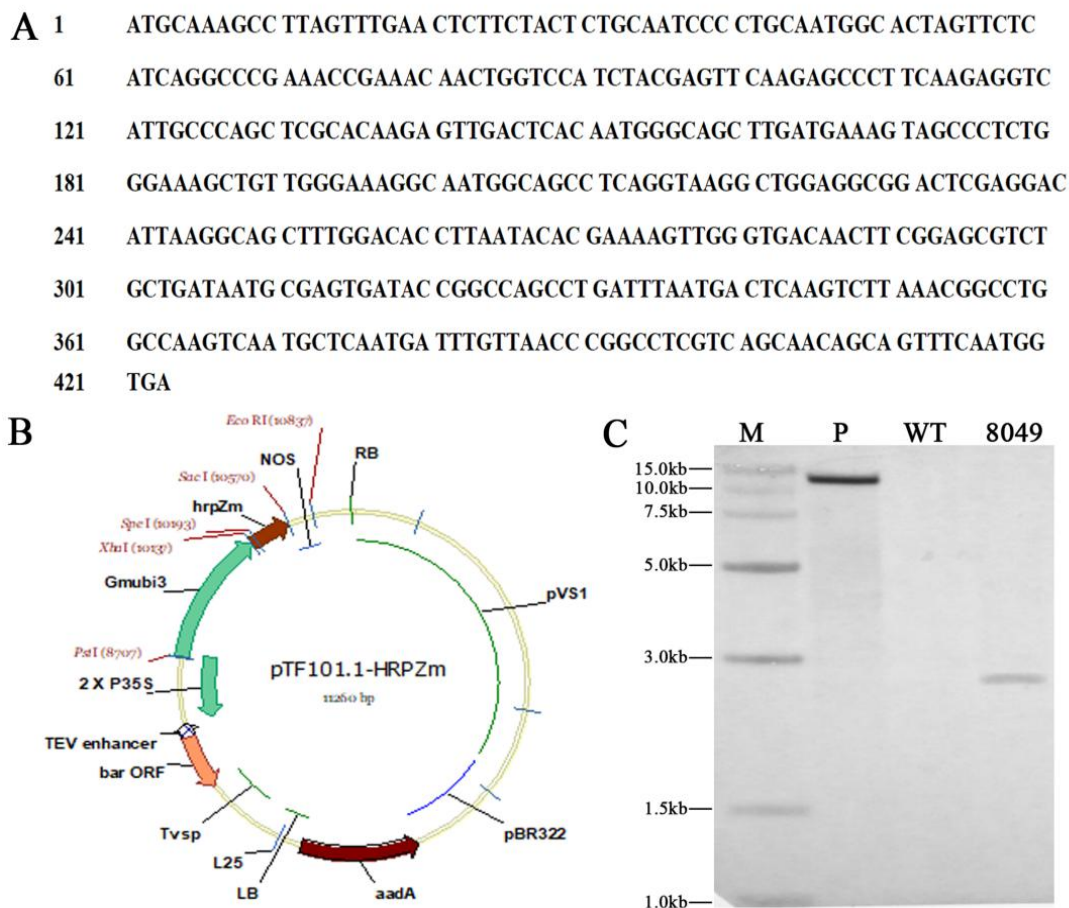


图1 *hrpZm* 基因序列、植物表达载体图谱以及 Southern 杂交检测

(A) *hrpZm* 基因序列; (B) 以 pTF101.1 为骨架的植物表达载体; (C) T_4 代转基因株系 B4J8049 Southern 杂交检测

M: 15K DNA marker; P: 阳性质粒; WT: 野生型 Williams 82; 8049: 转基因事件 B4J8049

2.2 外源 T-DNA 右边界侧翼序列分析

依次利用 101RB-0a/LAD-1/LAD-2、101RB-1a/Ac1 和 101RB-2a/Ac1 引物组合, 对转基因大豆事件 B4J8049 外源 T-DNA 右边界侧翼序列进行 PCR 扩增。检测结果表明, 第三轮扩增获得预期

大小的特异片段(引物 101RB-2a/Ac1), 大小约为 1 kb 左右, 而在阳性质粒和野生型 Williams 82 中均没有扩增(图 2)。将扩增片段进行测序, 并检索大豆基因组数据库 (<http://soybase.org/>)。结果表明, 转基因事件 B4J8049 的 T-DNA 右边界旁侧序列共 1 027 bp, 其中第 13 ~ 993 bp 为大豆基因组序列 (Chr08 186 844~187 824), 第 994 ~ 1 027 bp 为 T-DNA 片段, 如图 3 所示。以上结果证明抗病转基因大豆事件 B4J8049 外源 T-DNA 片段以单拷贝形式反向插入的方式整合到大豆基因组中第 8 号染色体的 187 824 位点。

2.3 外源表达框检测以及事件特异性 PCR 的建立

根据 *hrpZm* (*ubi3-hrpZm-nos*) 和 *bar* 表达框 (35S-*bar-Tvsp*) 设计引物, 扩增结果见图 4A, 该结果表明, 引物 SEQ1/2 和引物 SEQ3/4 可分别从转化事件 B4J8049 中获得与阳性质粒中大小一致的条带, 而野生型 Williams 82 中则无扩增, 表明转基因事件 B4J8049 中外源 T-DNA 表达框完整地插入到大豆基因组中。

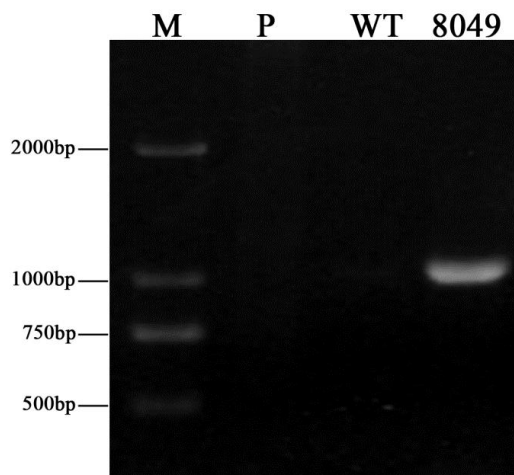


图2 转基因大豆 B4J8049 外源 T-DNA 右边界旁侧序列分离

M: 2K DNA marker; P: pTF101-*Gmubi3-hrpZm* 质粒; WT: 野生型 Williams 82; 8049: 转基因大豆 B4J8049

1 CGGCCGCCGA AAACCACGAC GCCGTCAACA ATGGTGAACA ACACCACCAC CACTTCGCCA
 61 GAAGAAACAA CACCCAGTGG TCGCAAAAGC AGCAAAGCGC AAGAGAAGAC GAGAGGAACG
 121 CGGAAGAAGA TGAAGTGAAG TCGCGGAACA GAAGAACAGG AACACGGAAA AGAAGAGGAA
 181 TAGGCGTTGG GTGCACAAAT TTTTAAAAAA AACCACAGGG GTATTTACGT ATTTTCACAT
 241 AAAGTGTGG GTGCACCTAG CAACAGCCTA GGGAAAAGTG TCATCTTGTA TGTTTCTGAA
 301 AAAATAACGG GGTGAGAATA GCAACTCCCT CGTGGTTTTC AGCATAATAT GGGCCAACTC
 361 AATCTTCAAT AGGTGCTAGC CCGTTAACTA AGATGAGTCC TAGCCTAGTT GAAGCTTTGT
 421 CTATTATATA TTTGTCTTT AGTGACAAAG GCAGTGGGAA GGATGAAGAA GCTTCCCAGA
 481 CGGTGCCAAA CATACTACTA GACGACAAAA GGTCATATC CTTTGGACC TCTTGCCCTC
 541 TTCTACATCC AACTAGGTTT ACCATTGACA AAGATGTTTC TTAAGTATGC TCATTTTTTA
 601 TACATATATT TAAAAATTGA GTACGATATC AACTCATTTA TAATACTCAA TCAATTAATT
 661 ATGTTTATTA AACTAGTATA TCTTTATTTA ATTTAAACAA ATAATTTATT AGATTCGGAC
 721 CACTAAATAG ACGGCGGCGA GCATGTATCA TGATTATGTA TGGAGCAAAA GGAGCTAGAA
 781 AACTTGGTGA TCAAGTATAG ACGTAAGTAG ATTCCATTTC ATAATATTGT GACCAAAGGA
 841 AAATTTCAAG GACCAAAAGA TGGAGAAAAT CTTTTTCAAA TCATATCCAT AAGCAGACAA
 901 ACTAGCACGA GGGCTTGATT CTTAACAAAA ATCATTATTA TTTTAAGTCA ACAGTTAGTA
 961 GAAATTCTAA CGCAAATCAA GTGTTTACAC TGATCAAAACA CTGATAGTTT AACTGAAGG
 1021 CGGGAAA

图3 转基因事件B4J8049 T-DNA右边界旁侧序列

单横线:大豆基因组序列;双横线:T-DNA序列

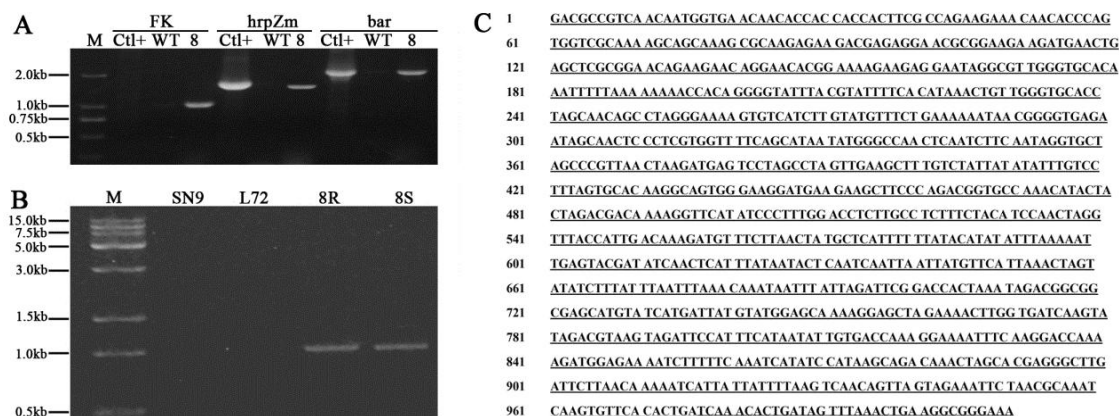


图4 转基因大豆B4J8049特异性PCR检测结果及序列分析

(A)表达框检测;M:2K DNA Marker;Ctl+:阳性质粒;WT:野生型 Williams 82;8:转基因事件B4J8049;
 FK:事件特异性引物SEQ5/6检测;hrpZm:hrpZm基因表达框检测;bar:bar基因表达框检测;(B)M:15K DNA Marker;
 SN9:非转基因大豆沈农9号(常规品种)叶片基因组DNA;L72:高油酸转基因大豆L72叶片基因组DNA;
 8R和8S:分别为B4J8049根和种子基因组DNA;(C)B4J8049 T-DNA右边界旁侧序列

单横线:大豆基因组序列;双横线:T-DNA序列

利用特异性引物SEQ-5/SEQ-6进行TAIL-PCR扩增时,非转基因植株均无扩增条带,只有转基因大豆B4J8049植株叶片和种子DNA产生1 010 bp特异性扩增条带(图4A,FK),包括第1~976 bp的大豆基因组序列和第977~1 010 bp的外源T-DNA片段,其核苷酸序列如图4C所示。利用该对引物,以沈农9号、高油酸转基因大豆^[13]以及B4J8049的根和种子DNA为模板,可以有效地识别转基因大豆事件B4J8049,而其它转基因大豆和非转基因大豆均无条带(图4B)。由此可见,上述引物可以用于转基因大

豆事件B4J8049的特异性检测。

3 结论与讨论

目前PCR方法是检测转基因农产品的常规手段,它具有快速、准确、灵敏度高、操作简便易行等优点,适用于开展转基因农作物种子及其相关产品的检测工作。但是在转基因植物中,由于外源T-DNA插入的随机性使得转基因作物的安全性遭到质疑,而且转基因产品的专利保护、标识问题也同样已引起政府与民众的高度关注^[17]。因此,

有必要开发适合转基因大豆或者其他作物的检测方法。由于外源基因在受体基因组中的整合位点具有品系特异性,而且不可重复,因此,根据外源基因及其整合位点旁侧序列设计引物,通过PCR扩增建立的检测方法,具有较高的特异性。侧翼序列的分离,不仅利于研究外源基因的表达机理和外源基因的表达对受体基因组产生的影响,而且对于转基因品系的鉴定和安全性评估具有重要意义^[18]。

TAIL-PCR技术是基于PCR扩增为主要手段的染色体步移技术(Genome-walking)^[14-16],虽然步移距离比基于构建基因组文库的染色体步移要短,但是由于其具有简单、快速、高效等特点,在已知序列的旁侧序列分离中得到了广泛应用,如应用于转基因水稻^[19]、棉花^[20]、大豆^[21-22]、油菜^[23-25]、玉米^[26]、小麦^[27]等旁侧序列的分离。本研究利用Genome-walking的原理,通过TAIL-PCR方法,获得抗病转基因大豆事件B4J8049外源T-DNA旁侧序列,标定了转基因大豆外源T-DNA整合位点为大豆Chr08染色体的187 824位点,整合方式为单拷贝反向插入。将测序所得的序列信息在数据库中进行BLAST检索,未找到与插入位点处基因组序列同源的mRNA或cDNA克隆,只发现与大豆基因组信息同源的未知序列。本研究依据旁侧序列信息,建立的特异性PCR检测方法,可快速准确地识别该转基因事件及其衍生品,为转基因大豆及其产品检测提供依据。

参考文献:

- [1] Tyler M B. *Phytophthora sojae*: root rot pathogen of soybean and model oomycete[J]. Mol Plant Pathol, 2007, 8: 1-8.
- [2] Lin F, Zhao M, Ping J, et al. Molecular mapping of two genes conferring resistance to *Phytophthora sojae* in a soybean landrace PI567139b[J]. Theor Appl Genet, 2013, 126: 2177-2185.
- [3] Shen C Y, Su Y C. Discovery and preliminary studies of *Phytophthora megasperma* on soybean in China (in Chinese)[J]. Acta Phytopathologica Sin, 1991, 21: 298.
- [4] Zuo Y, Xue C, Han W, et al. The infections characteristics of *Phytophthora sojae* to soybean seedlings (in chinese)[J]. Acta Phytophylacica Sin, 2002, 12: 377-378.
- [5] 王冬娟. 根癌农杆菌介导大豆节遗传转化的初步研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2012.
- [6] Miao W, Wang X, Li M, et al. Genetic transformation of cotton with a harpin-encoding gene *hpa_{soo}* confers an enhanced defense response against different pathogens through a priming mechanism[J]. BMC Plant Biol, 2010, 10(1): 1-14.
- [7] 姜兆远, 邹晓威, 高洁. 烟草野火病菌 *hrpZ* 基因的克隆及蛋白的原核表达[J]. 吉林农业大学学报, 2009, 31(6): 700-704.
- [8] Du Q, Yang X, Zhang J, et al. Over-expression of the *Pseudomonas syringae* harpin-encoding gene *hrpZm* confers enhanced tolerance to *Phytophthora* root and stem rot in transgenic soybean [J]. Transgenic Research, 2018, 27(3): 277-288.
- [9] 李付鹏, 伍宝朵, 马朝芝, 等. 基于PCR的染色体步移技术研究进展[J]. 中国生物工程杂志, 2010, 30(12): 87-94.
- [10] Liu Y G, Chen Y L. High-efficiency thermal asymmetric interlaced PCR for amplification of unknown flanking sequences[J]. Bio Techniques, 2007, 5: 649-656.
- [11] Terauchi R, Kahl G. Rapid isolation of promoter sequences by Tail-PCR: the 5-flanking regions of Pal and Pgi genes from Yams (*Dioscorea*)[J]. Mol Gen Genet, 2000, 263: 554-560.
- [12] 方进, 翟文学, 王文明, 等. 转基因水稻T-DNA侧翼序列的扩增与分析[J]. 遗传学报, 2001, 28(4): 345-351.
- [13] 杨静, 邢国杰, 牛陆, 等. 反义RNA介导GmFAD2-1B基因沉默增强大豆种子中油酸的高效累积[J]. 作物学报, 2017, 43(11): 1588-1595.
- [14] Liu Y G, Huang N. Efficient amplification of insert end sequences from bacterial artificial chromosome clones by thermal asymmetric interlaced PCR[J]. Plant Mol Biol Rep, 1998, 16: 175-181.
- [15] Liu Y G, Mitsukawa N, Oosumi T, et al. Efficient isolation and mapping of *Arabidopsis thaliana* T-DNA insert junctions by thermal asymmetric interlaced PCR[J]. The Plant Journal, 1995, 8(3): 457-463.
- [16] Liu Y G, Whittier R F. Thermal asymmetric interlaced PCR: automatable amplification and sequencing of insert and fragments from P1 and YAC clones for chromosome walking[J]. Genomics, 1995, 25(3): 674-681.
- [17] 柯纳德, J. 海勒. 基因工程食品-生产方法与检测技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 259.
- [18] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程[M]. 北京: 科学出版社, 2002: 742-744.
- [19] 郭超, 何行健, 邓力华, 等. 转基因水稻BarKasalath-01事件特异性检测[J]. 分子植物育种, 2017, 15(11): 4466-4475.
- [20] 汪巧, 谢家建, 苏长青, 等. 转 *cryIac* 基因抗虫棉鄂杂棉1号的旁侧序列和品系特异性检测[J]. 农业生物技术学报, 2011, 19(3): 427-433.
- [21] 仇有文, 高学军, 张明辉, 等. 抗除草剂转基因大豆插入拷贝数及其旁侧序列分析[J]. 生物技术, 2011, 21(6): 31-35.
- [22] 蔡勤安, 尚丽霞, 姜志磊, 等. 转 *HAL1* 基因大豆侧翼序列分析及特异性检测方法研究[J]. 大豆科学, 2018, 37(1): 32-38.
- [23] 聂淑晶, 武玉花, 吴刚, 等. 转基因油菜RF1的外源基因插入位点分析与事件特异性检测方法研究[J]. 中国油料作物学报, 2008, 30(3): 265-267.
- [24] 申爱娟, 陈松, 周晓婴, 等. 转基因油菜W-4 T-DNA旁侧序列分析与事件特异性检测[J]. 江苏农业学报, 2014, 30(1): 10-20.
- [25] Chen S, Shen A J, Zhou X Y, et al. Analysis of the flanking sequence and event-specific detection of transgenic line W-4 of *Brassica napus*[J]. Agricultural Science & Technology, 2014, 15(7): 1089-1094.
- [26] 袁磊, 孙红炜, 杨崇良, 等. 转基因玉米MON88017旁侧序列分析及定性PCR检测[J]. 作物学报, 2010, 36(2): 361-364.
- [27] 段晓亮, 许兰杰, 刘志勇, 等. 转基因小麦外源基因插入位点初步分析及检测方法的建立[J]. 粮油食品科技, 2014, 22(4): 76-81.

(责任编辑:王昱)