

转基因耐逆大豆 *FvC5SD-L05* 事件的 T-DNA 侧翼序列分析及其特异性检测

张维东¹, 袁翊新^{1,2}, 李明月^{1,2}, 孟凡立², 张 玲¹

(¹ 吉林省农业科学院农业生物技术研究, 长春 130033; ² 东北农业大学农学院, 哈尔滨 150030)

摘要: 转 *FvC5SD-L05* 基因大豆事件是利用农杆菌介导的大豆子叶节遗传转化法将从金针菇克隆到的 *FvC5SD* 基因导入大豆栽培品种沈农 9 号中获得的纯合耐旱转基因大豆事件, 该材料具有良好的耐旱特性和农艺性状。为了明确该转基因大豆材料的分子特征及其检测方法, 从而推进其生物安全性评价工作, 本研究以转基因大豆 *FvC5SD-L05* 的 T₄ 代纯合株系为研究对象, 利用 Southern 杂交方法鉴定了外源基因的拷贝数; 及基因组重测序技术分析外源基因 *FvC5SD* 在大豆基因组中插入位点的位置和方向。同时利用 PCR 扩增技术获得了外源 T-DNA 的左右侧翼序列, 并基于左右侧翼序列, 建立了转 *FvC5SD* 基因耐逆大豆 L05 事件的特异性定性 PCR 检测方法。该方法特异性强、灵敏度高, 能够在 *FvC5SD-L05* 基因组 DNA 含量为 100 ng 的模板中检测出转基因成分, 实现了对转 *FvC5SD* 基因耐逆大豆 L05 事件的特异性检测, 进一步为该转基因大豆及其衍生产品的检测和身份识别提供技术依据。

关键词: 转基因大豆; T-DNA 侧翼序列; 特异性检测; *FvC5SD* 基因

T-DNA Flanking Sequence Analysis and Specific Detection of Transgenic Soybean *FvC5SD-L05*

ZHANG Wei-dong¹, YUAN Yi-xin^{1,2}, LI Ming-yue^{1,2}, MENG Fan-li², ZHANG Ling¹

(¹ Institute of Agricultural Biotechnology, Jilin Academy of Agricultural Sciences, Changchun 130033;

² College of Agriculture, Northeastern Agricultural University, Harbin 150030)

Abstract: The *FvC5SD* gene from *Flammulina velutipes* was transformed into soybean cultivar Shennong 9 by Agrobacterium mediated genetic transformation of soybean cotyledon nodes. The transgenic soybean line *FvC5SD-L05* showed good drought tolerance and agronomic performance. To clarify the characteristics of the transgenic soybean *FvC5SD-L05* material meeting its biosafety evaluation, we analyzed the copy number of *FvC5SD* gene in T₄ generation plant by Southern hybridization and identified the position and direction of the insert in soybean genome. Meanwhile, we established a specific qualitative PCR detection method for *FvC5SD-L05* by PCR amplification of the flanking sequences of exogenous T-DNA. This method represents specificity with high sensitivity for being able to detect transgenic fragment in the template of 100 ng genomic DNA content of *FvC5SD-L05*. The specific detection of *FvC5SD-L05* provided technical basis to identify the transgenic soybeans with the target gene.

Key words: transgenic soybean; T-DNA flanking sequence; specific detection; genotype identification

收稿日期: 2022-04-03 修回日期: 2022-04-18 网络出版日期: 2022-05-13

URL: <https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20220403001>

第一作者研究方向为作物分子育种研究, E-mail: 1286837665@qq.com; 袁翊新为共同第一作者

通信作者: 张玲, 研究方向大豆基因编辑育种, E-mail: zly_jaas@126.com

孟凡立, 研究方向大豆遗传育种, E-mail: mengfanli@neau.edu.cn

基金项目: 吉林省农业科学院基本科研经费定向委托和杰出青年项目 (KYJF2021JQ001)

Fundation project: Jilin Academy of Agricultural Sciences Outstanding Youth Program for Basic Scientific Research Funds (KYJF2021JQ001)

干旱一直是影响大豆产量和品质的主要原因,也是制约大豆生产的一个非生物逆境胁迫因子^[1]。近年来,挖掘抗旱相关基因,利用基因工程技术培育耐旱大豆新品种是有效缓解干旱胁迫对大豆影响的手段之一^[2]。转基因大豆是世界首批成功引进并商业化栽培的转基因作物之一,同时也是世界上栽培面积最高的转基因作物^[3]。其中抗草甘膦转基因大豆是转基因大豆的最成功例子,自 1996 年起,抗草甘膦转基因大豆在美国和南美洲部分国家得到迅速发展,到 2008 年,抗草甘膦转基因大豆已经占普通大豆种植面积一半以上^[4]。随着大规模种植转基因作物,转基因作物和其衍生物也逐渐走进了人们的生活^[5]。为保障公众的信息权利,欧盟于 1997 年第一次在全球设立转基因产品标识制度,并于 2003 年颁布了一项新的法规,要求任何包含 0.9% 以上转基因生物成分的食品和饲料都应当采取强制性标志^[6]。此后,在不少发达国家和地区也陆续建立了转基因成分的标识制度,要求对食物和饲料中含哪些转基因成分进行标识及设定阈值^[7]。按照国际通行准则,依据转基因生物对人类、动植物、微生物和生态环境所构成的影响程度,将其安全性分为 4 个级别。同时,还对受体生物、基因操作、转基因生物、转基因产品等方面进行了严格的安全技术评价,对已上市的产品制定和实行安全评价、品种审定、种子生产、生产加工等严格的管理与审批制度^[8]。

本研究中的转 *FvC5SD* 基因耐逆大豆 L05 事件是通过农杆菌介导法将真菌金针菇 (*Flammulina velutiper* (Fr.) Sing) 的 *FvC5SD* 基因 (GenBank: JN696291.1) 导入大豆受体品种沈农 9 号中获得的。该份材料较受体品种在干旱处理条件下具有较强芽期、苗期和全生育期抗旱性,并能够稳定遗传。此外,通过表型和综合农艺性状评价表明, *FvC5SD*-L05 在熟期、株高、叶形、花色、百粒重、总脂肪和总蛋白含量等与对照品种无差异,该份材料具有很大的潜在应用价值。在本研究中,通过 Southern 和基因组重测序技术检测 *FvC5SD*-L05 中 T-DNA 拷贝数及染色体插入位点,并进一步结合 PCR 方法分离出 T-DNA 整合位点的两侧序列,最终建立了针对 *FvC5SD*-L05 转基因事件及其衍生品的检测和身份识别的特异性检测方法。

1 材料与方法

1.1 试验材料

吉林省农业科学院培育的转 *FvC5SD* 基因耐逆

大豆 L05 事件已经获得农业部转基因生物安全 (环境释放阶段) 的批件 (2020 第 162 号)。受体对照品种为沈农 9 号。植物表达载体为 pTF101-35S, 该载体的骨架 pTF101 来源于大肠杆菌, T-DNA 插入区包含外源目的基因 *FvC5SD* 和标记基因 *bar*, 均由启动子 CaMV35S 驱动, 载体图谱见图 1。外源目的基因 *FvC5SD* 从食用菌金针菇中克隆, 由吉林省农业科学院农村能源与生态研究所张维东老师保存和提供。

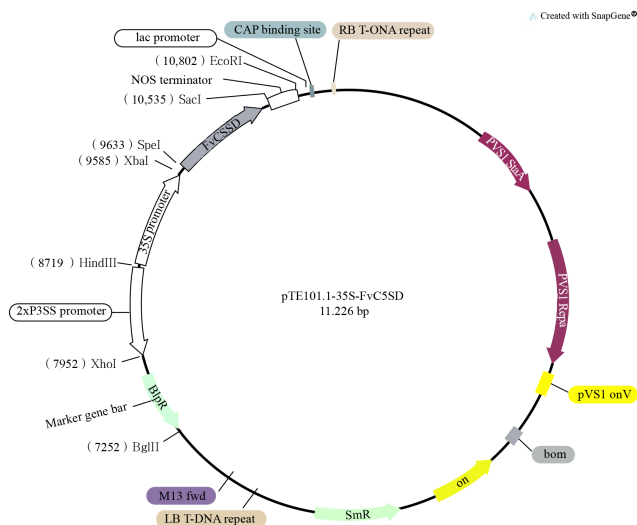


图 1 pTF101-35S-*FvC5SD* 载体质粒图谱

Fig.1 The map of pTF101-35S-*FvC5SD* plasmid vector

1.2 Southern 杂交

取 0.5~1.0 g (新鲜的叶片 5~6 片) 冷冻组织在预冷的研钵中研成粉末状, 装入预冷的 50 mL 圆底离心管, 以高盐 CTAB 方法对总 DNA 进行提取, 用紫外分光光度计测量 DNA 的浓度, -20 °C 保存备用。使用 Southern 试剂盒 (Roche Diagnostics, 美国) 对转基因大豆 L05 材料进行 Southern 杂交检测, 具体方法参照试剂盒说明书。根据 T-DNA 区域内的特异性酶切位点, 结合 *FvC5SD* 的探针在 T-DNA 上的位置 (图 2), 选择了两种限制性内切酶 (*Hind* III 和 *Bam*HI) 用于对基因组总 DNA (约 30 μg) 的分别酶切, 其中 *Hind* III 酶切位点在载体上距离 RB 端为 2.446 kb, 则杂交条带大小应大于 2.446 kb; 而 *Bam*HI 酶切位点在载体上距离 RB 端为 1.26 kb, 杂交条带大小应大于 1.26 kb。用 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳分离酶切产物, 在高盐 (20 × SSC) 的条件下, 将其转移至带有正电荷的尼龙薄膜上。按照目的基因 *FvC5SD* 保守区序列设计所需的探针, 方法采用地高辛随机引物标记法来标记 DNA 探针, 其中目的基因 *FvC5SD* 的探针为 891

bp。在 42 ℃ 的条件下进行杂交;用 2 × SSC (含 0.1% SDS) 在 25 ℃ 下洗膜 2 次,每次 5 min;在 65 ℃ 下,

用 0.5 × SSC (含 0.1% SDS) 洗膜 2 次,每次 15 min。最后使用 BCIP/NBT 在膜上直接显色成图。

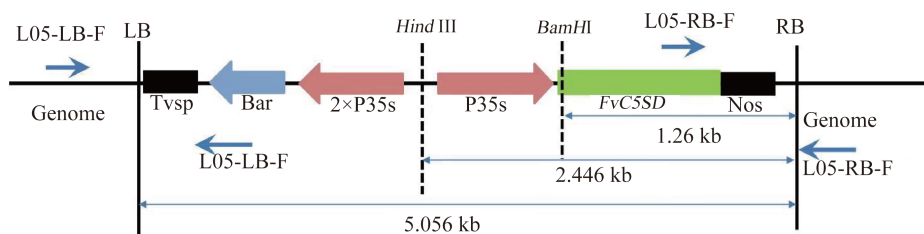


图 2 pTF101-35S-*FvC5SD* 载体的 T-DNA 插入序列物理图谱及特异性引物位置

Fig.2 T-DNA structure of pTF101-35S-*FvC5SD* expression vector and location of specific primers

1.3 基因组重测序

采用高盐 CTAB 法提取 T₄ 代纯合转基因大豆事件 L05 以及受体对照沈农 9 号营养生长阶段 (V3 阶段: 第三叶期, 第四节复叶完全展开) 的叶片。委托北京百迈客公司对转基因单株 L05 基因组 DNA 的混样进行测序。选用二代高通量测序 Xten 平台进行测序, 测序倍数 30 ×。将转基因大豆事件 *FvC5SD*-L05 重测序数据与参考基因组和外源插入序列进行比对, 在比对结果数据中, 找到以下两类 Paired end reads: 第一类为一端 reads 比对上参考基因组序列, 另一端 reads 比对上插入序列; 第二类为两端中任何一端 reads 一部分序列比对上参考基因组序列, 另一部分比对上插入序列。使用 Burrows-Wheeler Aligner 序列比对软件 bwa 对所有参考基因组进行对比, 并选取所有可与外源插入序列比对上的 reads, 进行局部组装。使用 blastn 组装, 将组装的 contig 分别与外源插入序列信息和参考基因组结果进行比对, 首先筛选出 contig 序列比对到染色体的区域内, 并对这些区域的 bwa 比对结果进行 IGV 截图检验, 最后获得外源插入片段插入位点信息。

1.4 T-DNA 旁侧序列 PCR 验证

依据基因组重测序结果, 获得了 *FvC5SD*-L05 的外源 T-DNA 插入序列和左、右旁侧序列, 并对 PCR 检测的引物进行了设计, 如表 1 所示。利用上述引物, 将 *FvC5SD*-L05 基因组 DNA 作为模板, 分别进行 PCR 扩增。PCR 反应体系 (50 μL): 20 × PCR 缓冲液 5 μL, 10 mmol/L dNTPs 1 μL, 5 U/μL Taq 酶 1 μL, DNA 样品 2.0 μL, 10 μmol/L 正向引物 1 μL, 10 μmol/L 反向引物 1 μL, ddH₂O 39 μL。PCR 反应条件为: 95 ℃ 5 min; 94 ℃ 30 s, 60 ℃ 30 s, 72 ℃ 45 s, 共 30 个循环; 72 ℃ 5 min。用 1% 的琼脂糖凝

胶电泳检测 PCR 产物, 以确定有无特异性条带。然后用胶回收试剂盒对 PCR 产物进行纯化, 克隆到 pMT-18 克隆载体 (宝生物, 大连, 中国) 上测序。委托北京六合华大基因科技有限公司测序验证, 并将测序结果与外源插入序列及参考基因组序列进行比对。

1.5 特异性 PCR 检测方法的建立

为了筛选到特异性的 PCR 引物, 首先根据旁侧序列 (即外源插入序列和大豆基因组相连区域) 分别设计 3 对上、下游引物, 如表 1 所示, 以转基因大豆事件 *FvC5SD*-L05 的 DNA 为模板, 分别测试上述引物的特异性和稳定性。最终从上述引物中挑选出特异性最强, 扩增效率最高的用作该转基因事件及衍生产物的特异性检测的专用引物。为了检验特异性引物的有效性, 分别提取了转基因大豆植株 *FvC5SD*-L05 的根、茎、叶、花和种子的 DNA, 以受体非转基因大豆品种沈农 9 号、常规大豆品种吉育 35、东农 50 及玉米和棉花作为对照, 进行 PCR 扩增检测。PCR 反应体系 (50 μL) 为: 20 × PCR 缓冲液 5 μL, 10 mmol/L dNTPs 1 μL, 5 U/μL Taq 酶 1 μL, DNA 样品 2.0 μL, 10 μmol/L 正向引物 1 μL, 10 μmol/L 反向引物 1 μL, ddH₂O 39 μL。PCR 反应条件为: 95 ℃ 5 min; 94 ℃ 30 s, 60 ℃ 30 s, 72 ℃ 45 s, 共 30 个循环; 72 ℃ 5 min。PCR 扩增后, 用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测其产物, 观测结果。

2 结果与分析

2.1 Southern 杂交检测

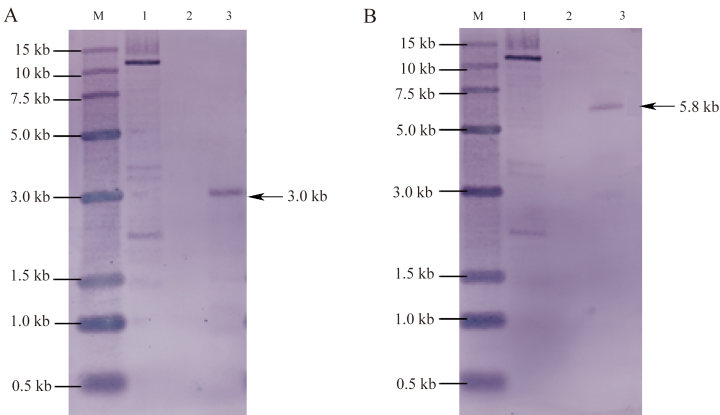
为了明确 *FvC5SD*-L05 事件中 *FvC5SD* 基因是否整合到受体沈农 9 号的基因组上及整合的拷贝数, 利用地高辛标记的 *FvC5SD* 基因作为探针, 利用 Southern 杂交技术对转基因大豆事件 L05 的 T₄

表 1 PCR 引物
Table 1 PCR primer

引物种类 Species of primers	引物名称 Primer name	引物序列 (5'-3') Primer sequence	PCR 产物长度 (bp) Length of PCR product
<i>FvC5SD</i> 的探针引物 Probe primer of <i>FvC5SD</i>	<i>FvC5SD</i> -F	ATGGACGTCGTTCTCAACATCGCC	891
	<i>FvC5SD</i> -R	CTACTCGACCTTCTCCTCTTTCCC	
左旁侧序列扩增引物 Additive of left side sequence	L05-LB-F1	TGACCGATAAGCCATCATG	1749
	L05-LB-R1	GGTCAACTTCCGTACCGAGC	
右旁侧序列扩增引物 Right-side sequence extension	L05-RB-F1	ACGGCTACACTTACCTTGTCCTGA	1548
	L05-RB-R1	TTGTCTGGTCTGAAGACCTTTCTA	
左边界扩增引物 The left boundary augmented attractor	L05-LB-SF1	GTCATAGCAGGACACCCCTA	524
	L05-LB-SR1	GTAATAGCGAAGAGGCCCGC	
	L05-LB-SF2	ATCAGGCCCCCTACTAATCG	
	L05-LB-SR2	ATACAGGCAGCCCATCAGTC	626
	L05-LB-SF3	CAGGCCCCCTACTAATCGAG	
	L05-LB-SR3	ATACAGGCAGCCCATCAGTC	
右边界扩增引物 Right border augmentation	L05-RB-SF1	GGAGCTTGAGCTTGGATCAG	466
	L05-RB-SR1	TTGCTCGCTCTCTTTTGTCT	
	L05-RB-SF2	GCATTAATGAATCGGCCAAC	
	L05-RB-SR2	GCTCGCTCTCTTTTGTCTCT	512
	L05-RB-SF3	TAAAGCCTGGGGTGCCTAAT	
	L05-RB-SR3	CTTGCTCGCTCTCTTTTGTG	

代材料进行了研究。结果显示,利用限制性内切酶 *Hind* III 对基因组 DNA 酶切 *FvC5SD* 基因片段为探针,获得杂交片段为单条带,大小约为 3.0 kb,与预期的杂交条带大小一致 (>2.446 kb)。对基因组 DNA 用限制性内切酶 *Bam*H I 单酶切 *FvC5SD* 基

因片段为探针,也是单一条带,获得杂交片段大小约为 5.8 kb,均符合预测杂交条带大小 (>1.26 kb)。从上述结果可以得出,外源基因已整合到转基因 *FvC5SD*-L05 大豆基因组中,同时是以单拷贝的方式整合。



A: *Hind* III 酶切的 Southern 杂交检测; B: *Bam*H I 酶切的 Southern 杂交检测; M: 15 kb DNA Marker;
1: 对照质粒; 2: 受体材料对照 DNA; 3: 转基因材料 L05 的 DNA
A: Southern blot analysis of *Hind* III digestion; B: Southern blot analysis of *Bam*H I digestion; M: 15 kb DNA Marker;
1: Control plasmid; 2: Receptor material control DNA; 3: DNA of transgenic material L05

图 3 转 *FvC5SD* 基因大豆目的基因 *FvC5SD* 的 Southern 杂交检测
Fig.3 Southern blot analysis of the target gene *FvC5SD* of *FvC5SD* transgenic soybean

2.2 基因组 DNA 重测序

利用生物信息学方法对转基因事件 *FvC5SD-L05* 的重测序分析得到的 61241558 个原始 reads (双端序列) 进行质量评估, 筛选过滤得到 34155660 个 Clean Reads, 然后再将其与大豆参考基因组序列进行比对, 确定 Clean Reads 在参考基因组上的位置, 并统计了一系列的数据, 如测序深度、基因组覆盖度等。此次分析数据量为 15.07 Gbp 的 Clean Data, Q30 达 91.07%。样品与参考基因组的平均比对率为 98.56%, 平均覆盖深度分别为 $15\times$, 基因

组覆盖度为 98.13% (至少 1 个碱基覆盖)。将转基因大豆 *FvC5SD-L05* 重测序数据分别与参考基因组和外源插入序列进行比对, 利用 blastn 将组装的 contig 分别与外源插入序列和参考基因组结果进行比对, 选取 contig 序列比对到染色体的区域, 并对这些区域的 bwa 比对结果进行 IGV 截图验证, 得到外源插入片段插入位置 (图 4)。结果显示, 转基因大豆 *FvC5SD-L05* 外源 T-DNA 片段插入位置为 Chr.16 染色体 16651913 bp 位点处, 整合方式为正向插入。

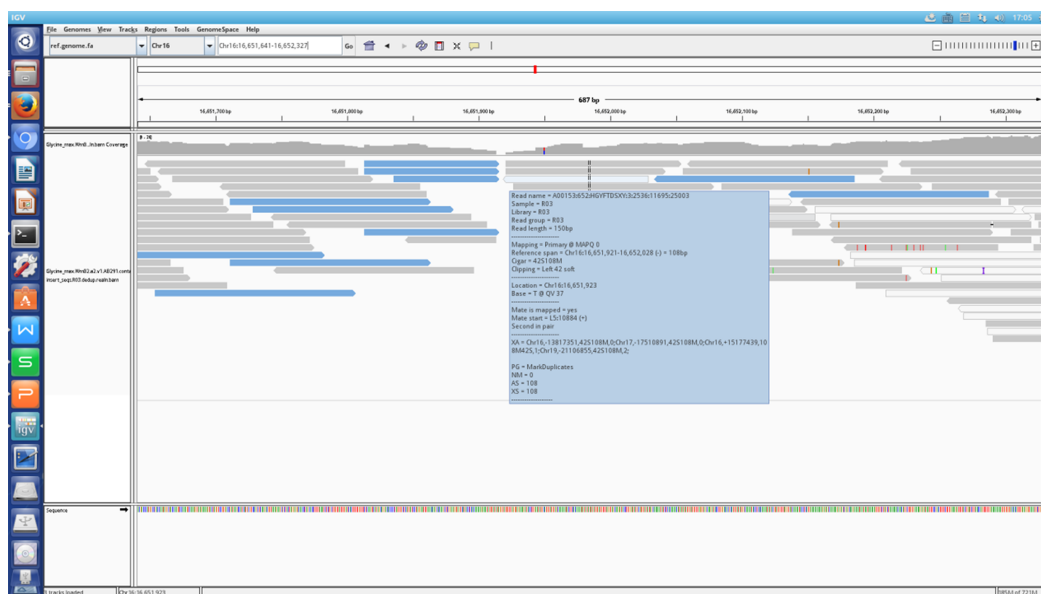


图 4 T-DNA 序列整合位点的 IGV 的验证截图

Fig.4 Verification screenshot of IGV at T-DNA sequence integration site

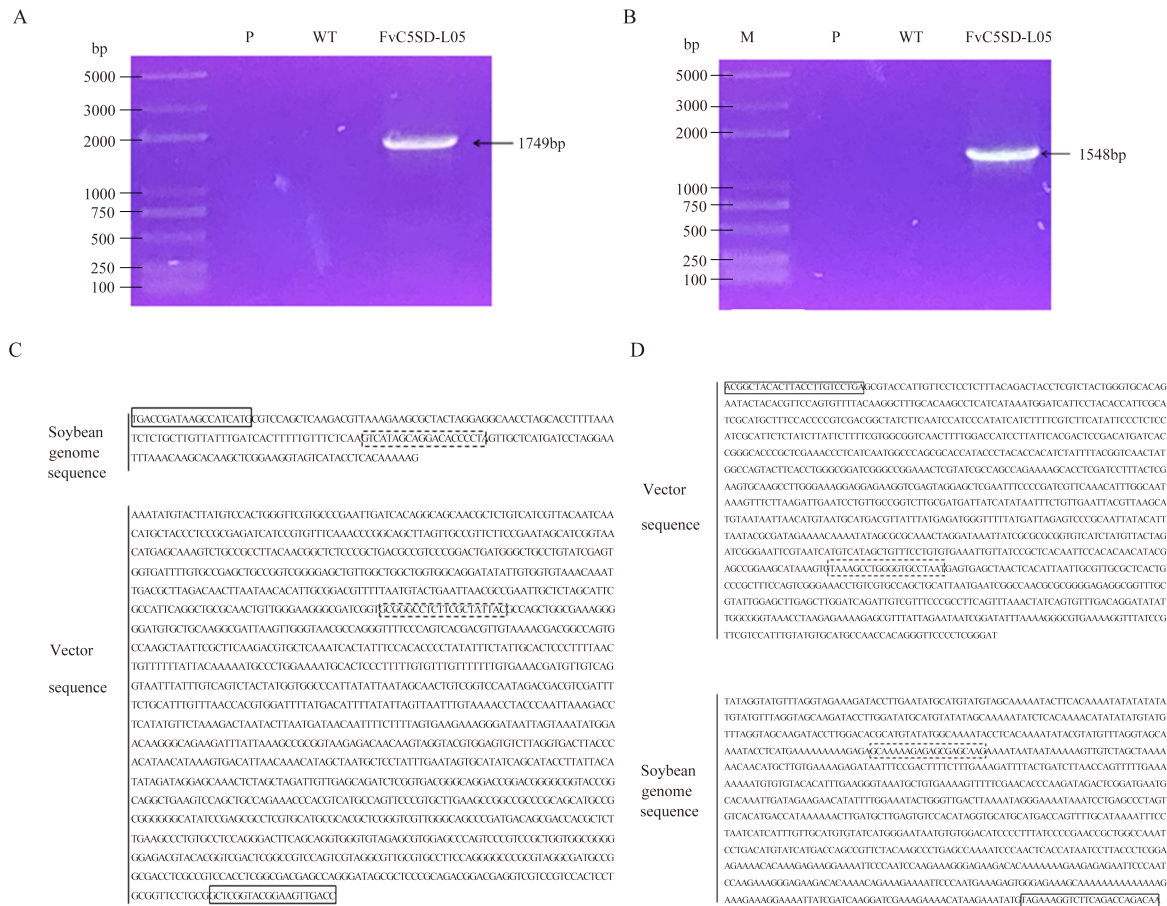
2.3 旁侧序列 PCR 验证

根据转基因大豆事件 *FvC5SD-L05* 的全基因组重测序结果, 在 *FvC5SD* 基因 T-DNA 序列和整合位点左边界序列分别设计特异性引物, 进行旁侧序列 PCR 扩增。PCR 扩增产物应该是一段含有部分 T-DNA 序列和大豆基因组序列的融合序列。在本研究中, 旁侧序列 PCR 扩增结果表明, 对于左边界序列验证, 转基因大豆 *FvC5SD-L05* 事件中扩增出了特异、单一的 1749 bp 的预期大小的目标条带, 对目标条带进行测序分析, 其中第 1~197 位点序列来自于栽培大豆品种沈农 9 号基因组序列, 则第 198~1749 位点序列来自于外源插入片段序列 (图 5A、5C)。而在针对右边界序列设计的特异性引物中, 扩增出了特异 1548 bp 的预期大小的目标条带, 而在对照材料中没被扩增出条带。进一步对目标条带进行测序分析发现, 在 1548 bp 的右边界侧翼序列中, 第 1~1187 位点序列来源于外源插入片段的

T-DNA 序列, 第 1188~2174 位点序列来自于栽培大豆品种沈农 9 号基因组序列 (图 5B、5D)。

2.4 转基因事件 *FvC5SD-L05* 特异性及灵敏度 PCR 检测

利用转基因大豆事件 *FvC5SD-L05* 外源插入片段左边界侧翼序列和右边界侧翼序列, 分别设计 3 对特异性检测引物, 最终分别筛选出 1 对有特异性扩增条带; 其中左边界侧翼序列特异性检测引物 L05-LB-SF1/SR1, 扩增获得 524 bp 的特异性单一条带, 而右边界侧翼序列特异性检测引物 L05-RB-SF3/SR3 的扩增产物为 606 bp。结果如图 6 所示, 以非转基因大豆品种沈农 9 号、常规大豆品种吉育 47、吉育 72 及玉米和棉花为模板时, 均无扩增条带, 当模板为转基因大豆 *FvC5SD-L05* 的根、茎、叶、花和种子时, 出现特异性扩增的单一条带, 表明转基因大豆事件 *FvC5SD-L05* 能够被这两对引物特异性识别。



A: 左边界侧翼序列 PCR 扩增; B: 右边界侧翼序列 PCR 扩增, M: 2 kb DNA Marker, P: 阳性质粒, WT: 野生型 Williams82, *FvC5SD-L05*: 转基因大豆 *FvC5SD-L05*; C: 左边界侧翼序列分析, 实线方框: 引物 L05-LB-F1/R1 结合位点, 虚线方框: 引物 L05-LB-SF1/SR1 结合位点;

D: 右边界侧翼序列分析, 实线方框: 引物 L05-RB-F1/R1 结合位点, 虚线方框: 引物 L05-RB-SF3/SR3 结合位点

A: PCR amplification of left flanking sequence; B: PCR amplification of right flanking sequence, M: 2 kb DNA Marker, P: Positive plasmid, WT: Williams82, *FvC5SD-L05*: Transgenic soybean *FvC5SD-L05*; C: Left boundary flank sequence analysis, solid line box: Primer L05-LB-F1/R1 binding site, virtual box: Primer L05-LB-SF1/SR1 binding site; D: Right boundary flank sequence analysis, solid line box: Primer L05-RB-F1/R1 binding site, Virtual box: primer L05-RB-SF3/SR3 binding site

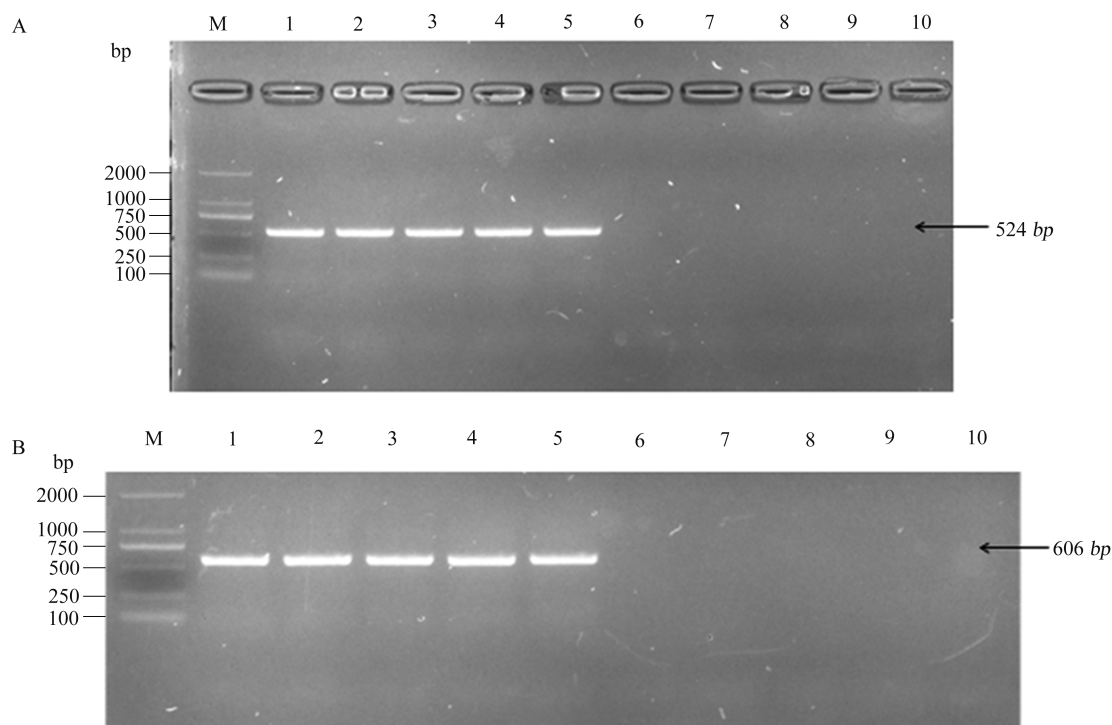
图 5 转基因事件 *FvC5SD-L05* 左、右边界侧翼序列 PCR 验证

Fig.5 PCR verification of left and right flanking sequences of transgenic event *FvC5SD-L05*

3 讨论

在如今这个科技快速发展、时代不断进步的背景下,转基因育种技术在世界农业生产中发挥重要作用,发展转基因育种技术已然成为世界各国攻克科技制高点和提升农业国际竞争力的战略重点^[9]。与此同时,如何有效地对转基因作物进行评估与监管,也是我国对转基因作物生物安全管理的必要问题之一^[10]。在常规的转基因技术获得的转化事件中,T-DNA 在受体植物的插入均为随机的,因此对 T-DNA 的侧翼序列的克隆及定位对于有效识别转基因植株起着至关重要的作用^[11]。近年来,通过全基因组重测序和 PCR 技术相结合筛选鉴定 T-DNA

插入片段和植物受体基因组的连接区域的特异性检测法,已然成为目前检测转基因作物及其产品中转基因成分的最普遍和最有效的方法之一^[12]。本研究所用的耐旱转基因大豆事件 *FvC5SD-L05*,即为利用转基因方法在大豆中异源超表达来源于金针菇的外源基因 *FvC5SD* 获得的转基因大豆材料^[13],利用 Southern 和重测序技术检测外源 T-DNA 的整合位点及旁侧序列等相关信息,并根据上述信息分别在转 *FvC5SD-L05* 基因大豆 T-DNA 序列两端以及其侧翼序列设计 PCR 引物,引物的设计原则为:保证一端位于 T-DNA 序列中,另一端在大豆基因组中。因此只能在转基因 *FvC5SD-L05* 中扩增出条带,而在质粒和野生型及对照材料中均不能扩增



A: 左边界特异性引物 L05-LB-SF1/SR1 检测; B: 右边界特异性引物 L05-RB-SF3/SR3 检测; M: 2 kb DNA Marker;
1: 根; 2: 茎; 3: 叶; 4: 花; 5: 种子; 6: 大豆品种沈农 9 号; 7: 大豆品种吉育 47; 8: 大豆品种吉育 72; 9: 玉米; 10: 棉花
A: left boundary specific primer L05-LB-SF1/SR1 detection; B: Right border specific primer L05-RB-SF3/SR3 detection;
M: 2 kb DNA Marker; 1: Root; 2: Stem; 3: Leaves; 4: Flowers; 5: Seeds; 6: Soybean variety Shennong 9;
7: Soybean variety Jiyu 47; 8: Soybean variety Jiyu 72; 9: Corn; 10: Cotton

图 6 事件特异性引物 PCR 检测
Fig.6 Event-specific primer PCR detection

到条带,利用这种方法分别分离到 *FvC5SD-L05* 的 T-DNA 左侧 1749 bp 和右侧 1548 bp 的旁侧序列。该方法简单、价格低廉,是获得外源 T-DNA 旁侧序列的有效手段之一。

同时为了进一步有效、快速、精准地对转基因 *FvC5SD-L05* 大豆事件及其衍生产品检测和身份识别鉴定,基于已经获得左右旁侧序列信息,分别在左侧 1749 bp 和右侧 1548 bp 的区域内设计和筛选到特异性、专一性及扩增能力较好的引物,最终筛选到 524 bp 左侧引物 L05-LB-SF1/SR1 和 606 bp 的右侧引物 L05-RB-SF3/SR3 作为后续相关转基因材料身份验证的标准引物。在选取的转基因事件的不同组织中,利用上述引物扩增均能获得条带清晰、单一的目标条带。该方法采用常规定性 PCR 方法就可以检测出结果,且操作简便、价格低廉、灵敏度高,已经成为转基因作物及其产品中转基因成分检测和身份识别的有效依据^[14-15]。

参考文献

[1] 王博华,任毅,时晓磊,王继庆,谢磊,加娜尔·拜合提,耿洪

伟.干旱胁迫下小麦苗期根系性状的全基因组关联分析.植物遗传资源学报,2022,23(4):1111-1123

Wang B H, Ren Y, Shi X L, Wang J Q, Xie L, Ghanal B H T, Geng H W. Genome-wide association analysis of wheat seedling root traits under drought stress. Journal of Plant Genetic Resources, 2022, 23(4): 1111-1123

[2] Kamthan A, Chaudhuri A, Kamthan M, Datta A. Genetically modified (GM) crops: Milestones and new advances in crop improvement. Theoretical and Applied Genetics, 2016, 129(9): 1639-1655

[3] 余永亮,梁慧珍,王树峰,练云,位艳丽,王庭峰.中国转基因大豆的研究进展及其产业化.大豆科学,2010,29(1):143-150

Yu Y L, Liang H Z, Wang S F, Lian Y, Wei Y L, Wang T F. Research progress and commercialization on transgenic soybean in China. Soybean Science, 2010, 29(1): 143-15

[4] Tetsuya Y, Kyoko T, Masao I. Recent advances in soybean transformation and their application to molecular breeding and genomic analysis. Breeding Science, 2012, 61(5): 480-494

[5] 袁磊,孙红炜,杨崇良,尚佑芬,路兴波,赵蕾.转基因玉米 MON88017 旁侧序列分析及定性 PCR 检测.作物学报,2010,36(2):361-364

Yuan L, Sun H W, Yang C L, Shang Y F, Lu X B, Zhao L. Analysis of junction sequence in the transgenic maize MON88017 and the methods of qualitative PCR detection. Acta Agronomica sinica, 2010, 36(2): 361-364

- [6] 金芫军,贾士荣,彭于发.不同国家和地区转基因产品标识管理政策的比较.农业生物技术学报,2004(1):1-7
Jin W J, Jia S R, Peng Y F. Comparison of labeling policy of genetically modified products in different countries and territories. Journal of Agricultural Biotechnology, 2004(1): 1-7
- [7] 肖国樱,周浩,孟秋成,陈芬.中国转基因作物的主要争论问题与解读.农业现代化研究,2011,32(6):666-669
Xiao G Y, Zhou H, Meng Q C, Chen F. Debate of transgenic crops in China and its unscrambling. Research of Agricultural Modernization, 2011, 32(6): 666-669
- [8] 马宇浩,蔡甘先,邓晓恬,李瑞,高爽,董向会,孙光泽,邵钰溶,夏添兰,贺旗,邓学梅.我国转基因生物安全评价现状及展望.中国畜牧杂志,2021,57(10):1-7
Ma Y H, Cai G X, Deng X T, Li R, Gao S, Dong X H, Sun G Z, Tai Y R, Xia T L, He Q, Deng X M. Current status and prospects of safety evaluation of genetically modified organisms in China. Chinese Journal of Animal Science, 2021, 57(10): 1-7
- [9] 徐九文,李天富,韩正姝,童继平.作物转基因育种技术的应用及安全性探讨.安徽农业科学,2016,44(30):97-100, 117
Xu J W, Li T F, Han Z S, Tong J P. Security discussion and applicatim of genetically modified crops technology. Journal of Anhui Agricultural Science, 2016, 44(30): 97-100, 117
- [10] 焦悦,梁晋刚,翟勇.转基因作物安全评价研究进展.作物杂志,2016(5):1-7
Jiao Y, Liang J G, Zhai Y. Progress in safety assessment of genetically modified crops. Crops, 2016(5): 1-7
- [11] 蔡勤安,尚丽霞,姜志磊,于志晶,马瑞.转 HAL1 基因大豆侧翼序列分析及特异性检测方法研究.大豆科学,2018,37(1):32-38
Cai Q A, Shang L X, Jiang Z L, Yu Z J, Ma R. The T-DNA flanking sequence analysis and specific detection method of transgenic soybean with gene HAL1. Soybean Science, 2018, 37(1): 32-38
- [12] 仲晓芳,杨静,贺红利,牛陆,邢国杰,杨向东.基于基因组重测序的高含量油酸转基因大豆 T-DNA 旁侧序列分析及事件特异性 PCR 检测.农业生物技术学报,2018,26(12):2017-2026
Zhong X F, Yang J, He H L, Niu L, Xing G J, Yang X D. Analysis of the T-DNA flanking sequences and event-specific PCR detection of high-content oleic acid transgenic soybean (*Glycine max*) bases on genome re-sequencing. Journal of Agricultural Biotechnology, 2018, 26(12): 2017-2026
- [13] Zhang L, Li T, Wang Y, Zhang Y Y, Dong Y S. FvC5SD overexpression enhances drought tolerance in soybean by reactive oxygen species scavenging and modulating stress-responsive gene expression. Plant Cell Reports, 2019, 38(9): 1039-1051
- [14] 仇有文,高学军,张明辉,敖金霞,袁肖寒,刘营.抗除草剂转基因大豆插入拷贝数及其旁侧序列分析.生物技术,2011,21(6):31-35
Chou Y W, Gao X J, Zhang M H, Ao J X, Yuan X H, Liu Y. The copy number of transgenic soybean with the EPSPS gene and flanking sequence analysis. Biotechnology, 2011, 21(6): 31-35
- [15] 张亮,杨剑波,宋丰顺,陈圣,郭霞,李莉,汪秀峰.实时荧光 PCR 技术定量检测转 Bt 基因水稻的研究.生物学杂志,2008,25(6):63-65, 71
Zhang L, Yang J B, Song F S, Chen S, Guo X, Li L, Wang X F. Detecting of Bt transgenic rice by real-time quantitative PCR technique. Journal of Biology, 2008, 25(6): 63-65, 71