转 *HAL1* 基因大豆侧翼序列分析及特异性检测方法研究

蔡勤安,尚丽霞,姜志磊,于志晶,马 瑞

(吉林省农业科学院 农业生物技术研究所,吉林 长春 130033)

摘 要:为方便 *HAL1* 转基因大豆的研究和检测,以转 *HAL1* 基因大豆 T_3 代基因组 DNA 为模板,使用热不对称交错 PCR(TAIL-PCR)方法分离其外源基因插入位点的侧翼序列,获得了插入片段 DNA 序列(T-DNA)的左翼序列和右翼序列。通过比对大豆基因组序列确定其整合位点,确定了 *HAL1* 基因的 T-DNA 在大豆基因组 1 号染色体非编码区 49468395 位点以单拷贝插入,转基因事件不影响大豆基因组功能基因的正常表达,而且在 200 $mmol \cdot L^{-1}$ NaCl 盐胁迫下转基因植株生长力明显强于对照材料。蛋白定量检测结果表明,在叶片中蛋白含量最高可达 0.03 $mg \cdot g^{-1}$,在根茎花中也有表达,但是含量较低。根据整合位点处的左右侧翼序列设计两对特异性 PCR 检测引物,PCR 检测结果显示只有转 *HAL1* 基因大豆阳性材料才能扩增出 926 和 816 bp DNA 片段。本研究建立的转 *HAL1* 基因大豆特异性定性检测方法,对转基因大豆的研究具有重要的意义,也为大豆转基因受体材料的管理与检测提供参考。

关键词:大豆;转基因;侧翼序列分析

中图分类号:S565.1 **文献标识码**:A **DOI**:10.11861/j.issn.1000-9841.2018.01.0032

The T-DNA Flanking Sequence Analysis and Specific Detection Method of Transgenic Soybean with Gene *HAL1*

CAI Qin-an, SHANG Li-xia, JIANG Zhi-lei, YU Zhi-jing, MA Rui

(Agro-Biotechnology Research Institute, Jilin Academy of Agricultural Sciences, Changchun 130033, China)

Abstract: For the convenience of research and testing of *HAL1* trasformed soybeans, thermal asymmetric interlaced PCR (TAIL-PCR) method were used to separate the T-DNA flanking sequence, with the T_3 genomic DNA of *HAL1* transgentic soybean as the template, by comparing the soybean genomic data, the T-DNA was inserted in soybean genome chromosome 1 non-coding region 49468395 loci as single copy. In order to ensure that the transgenic events do not affect the normal expression of the functional genes of the soybean genome. Under the threaten of 200 $mmol \cdot L^{-1}$ NaCl, the growth force of transgenic plant was significantly stronger than that of the control materials, protein quantitative test results showed protein in leaf reached to 0.03 $mg \cdot g^{-1}$, protein content in root, stem and flower was lower. Two pairs of specific detection primers were designed based on the two flanking sequences and the insertion of the transgenic plant, and two DNA fragments of 926 and 816 bp were acquired by PCR. In this study, the established T-DNA flanking sequences analysis will provide effective method in transgenic soybean detection and management.

Keywords: Soybean; Transgenic plant; Flanking sequence analysis

大豆是世界上主要的油料作物。2015 年全球转基因作物的种植面积高达 1.797 亿 hm^2,其中大豆种植面积为 0.916 亿 hm^2,占总面积的 51%[1]。中国不仅是农业生产大国,更是农业消费大国。自 1996 年以来,中国已成为大豆净进口国。随着国内需求不断地增加,转基因大豆进口量也在逐年增大。仅在 2015 年,中国转基因大豆进口量高达 8 169万 t,同比增长 14.4%[2]。

对转基因大豆生物安全问题进行科学研究和评价是对转基因大豆进行监督管理,保障其健康发展的重要技术基础,而转基因检测技术是生物安全评价的关键技术之一[3]。整合进入大豆染色体的外源基因插入位点的侧翼序列,对目的基因的正常转录、表达及调控有重要影响,且对研究转基因大豆的稳定遗传性以及转基因大豆的安全生产具有重要意义。所以侧翼序列信息的获得对于转基因植株的身份验证具有重大意义,并有助于对外源基因的表达机制和外源基因在受体基因组中产生的影响进行研究[4]。

由于每个转基因事件是随机整合在转基因大豆基因组中的,而在外源基因插入位点旁侧序列已知的情况下,能够根据旁侧序列设计引物。刘慧[5]使用 T-DNA 激活标签插入技术结合侧翼序列分析,认为 T-DNA 插入不是完全随机的,而是偏好于插入

收稿日期:2017-06-30
基金项目:农业部转基因生物新品种培育科技重大专项(2014zx08004-002-001)。
第一作者简介:蔡勤安(1975-),男,硕士,助理研究员,主要从事作物基因工程研究。E-mail:qinancai@126.com。
通讯作者:马瑞(1966-),男,博士,研究员,主要从事作物基因工程研究。E-mail:ruimaai@126.com。
于志晶(1977-),女,硕士,副研究员,主要从事作物遗传转化。E-mail:yuzhijing0001@163.com。

到基因区。如果插入到受体基因区域中,会引起基因内部序列的重排,这可能造成基因失活。因此转基因事件的侧翼序列分析对于检测转入基因以及分析其插入特点,确保转基因事件不影响大豆基因组功能基因的正常表达具有重要意义。

Gaxiola 等[6]于 1992 年首先从酵母细胞中克隆到了 *HAL1* 基因。该基因的编码产物是一个与酵母耐盐性相关的蛋白质。虽然 *HAL1* 的具体作用机制尚未清楚,但是它可赋予酵母细胞超强的耐盐表型,所以这是用以在植物中转基因表达的首选酵母耐盐调节因子。前期研究中,我们利用农杆菌介导大豆子叶节遗传转化法,已将耐盐基因 *HAL1* 导入到大豆 Willimas82 中,获得了耐盐转基因大豆材料。且在 200 mmol·L^{-1} NaCl 盐胁迫下转基因植株生长力明显强于对照材料。目前已经建立了许多关于旁侧序列的分析方法,其中 TAIL-PCR 以其简单、快速、高效等特点被广泛应用[7]。本研究旨在通过 TAIL-PCR 方法获得耐盐转基因大豆的左、右旁侧序列,依据旁侧序列确定 T-DNA 在基因组中的整合位点,并建立事件特异性 PCR 检测方法,根据侧翼序列和 T-DNA 设计转基因大豆特异性检测引物,建立了转 *HAL1* 基因大豆定性检测方法,为 *HAL1* 转基因大豆的研究和检测提供参考。

1　材料与方法

1.1　植物表达载体图谱

植物表达载体含有 *Bar* 基因和 *HAL1* 基因,其 T- DNA 结构如图 1 所示。

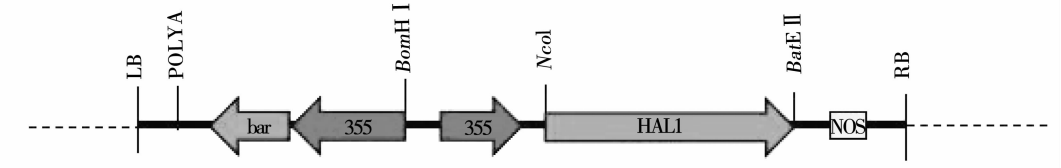


图 1　pCHAL1 质粒图谱

Fig. 1　T- DNA of vector pCHAL1

1.2　大豆材料

转基因大豆(受体材料为 Willimas82)含有 *Bar* 基因和 *HAL1* 基因,外源基因为单拷贝整合,由本课题组培育;非转基因大豆 Willimas82 由吉林省农业科学院生物所大豆课题组提供。

1.3　DNA 的提取

于 6 月中旬取大田种植的 T_3 代转 *HAL1* 基因大豆叶片于 -80℃保存。采用 CTAB 方法提取大豆叶片 DNA[8]。DNA 样品的纯度和浓度用 Nano Drop 检测。

1.4　左边界侧翼序列的获取

本试验采用 TaKaRa 公司 Genome Walking Kit 试剂盒获取转 *HAL1* 基因大豆中外源 T-DNA 整合位点处的侧翼序列,首先根据已知 *Bar* 序列设计 3 条左边界特异引物(表 1)。

表 1　左边界特异引物

Table 1　The left boundary specific primers

名称 Name	序列(5′-3′) Sequence(5′-3′)	引物长度 Primer length/mers
5’ SP1	GTCAACTTCCGTACCGAGCCGCAG	24
5’ SP2	TGGACGGCCGAGTCGACCGTGTAC	24
5’ SP3	CGCATGCACGAGGCGCTCGGATAT	24

以 1 μL,500 ng 的转基因大豆基因组 DNA 为模板,使用 5’ SP1、5’ SP2、5’ SP3 和 TaKaRa Genome Walking Kit(Code No. 6108)试剂盒中的 AP1、AP2 和 AP3、AP4,以及 CK 引物,按 TaKaRa Genome Walking Kit(Code No. 6108)试剂盒说明书重复 5 次试验,每次 3 轮 TAIL-PCR 反应。再使用 Takara MiniBEST Agarose Gel DNA Extraction Kit V 4.0 (Code No. 9762)切胶回收特异性扩增产物条带。胶回收产物与 pMDTM19-T Vector(Code No. 6013)连接,热转化至 *E. coli* Competent Cells JM109(Code No. 9052)中,挑取阳性单菌落,送宝生物生物有限公司进行测序,最终获得 5’端未知侧翼序列。

1.5　右边界侧翼序列的获取

右边界侧翼序列的获取同左边界侧翼序列的获取方法,根据已知 *HAL1* 序列设计的 3 条特异引物(表 2)。

表 2　右边界特异引物

Table 2　The left boundary specific primers

名称 Name	序列(5′-3′) Sequence(5′-3′)	引物长度 Primer length/mers
3’ SP1	ACCTCAAAGAAAAGTGCAGTTATC	24
3’ SP2	CGAAACAAAGCATACGCCAGGATT	24
3’ SP3	TAAAACGCCTATCCCTAAGAGTGG	24

1.6 外源 T-DNA 在大豆基因组中整合位点的确定

根据获得的 5’ 和 3’ 端旁侧序列测序结果在 soybase. org 网站（https://www.soybase.org/gb2/gbrowse/gmax2.0/）比对大豆基因组，获得 T-DNA 在大豆基因组中的整合位点。

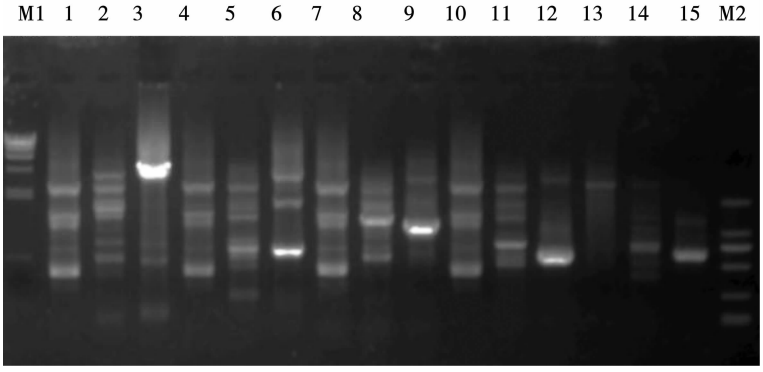
1.7 转基因大豆特异性 PCR 检测

根据获得的 5’ 和 3’ 端侧翼序列测序结果以及已知的 T-DNA 序列设计 PCR 引物，进行 PCR 检测。5’ 反应条件为：94℃ 2 min；94℃ 30 s，52℃ 30 s，72℃ 1 min，35 个循环；72℃ 5 m，16℃ 1 h。3’ 反应条件为：94℃ 2 min；94℃ 30 s，49℃ 30 s，72℃ 1 min，35 个循环；72℃ 5 m，16℃ 1 h。扩增产物利用 2% 琼脂糖凝胶检测。

2 结果与分析

2.1 左边界侧翼序列的获取

左边界侧翼序列电泳结果如图 2 所示，4 个简并引物 AP1、AP2、AP3、AP4 的第 3 轮 PCR 反应（3、6、9、12 泳道）均得到比试剂盒所提供阳性对照（15 泳道）清晰的特异性条带，本研究选取大小适中的 5’ AP3-3rd 约 1.0 kb 的扩增产物条带（9 泳道）切胶回收进行测序。测序结果如图 3。



M1 为 λ-*Hind* Ⅲ酶切产物；1-3 分别为 AP1 引物扩增 1 轮、2 轮和 3 轮的产物；4-6 分别为 AP2 引物扩增 1 轮、2 轮和 3 轮的产物；7-9 分别为 AP3 引物扩增 1 轮、2 轮和 3 轮的产物；10-12 分别为 AP4 引物扩增 1 轮、2 轮和 3 轮的产物；13-15 为正对照引物扩增 1 轮、2 轮和 3 轮的产物；M2：DL2000。

M1：λ-*Hind* Ⅲ digest；1-3：Amplificated with AP1 for 1st，2nd and 3rd；4-6：Amplificated with AP2 for 1st，2nd and 3rd；7-9：Amplificated with AP3 for 1st，2nd and 3rd；10-12：Amplificated with AP4 for 1st，2nd and 3rd；13-15：Amplificated with positive control for 1st，2nd and 3rd；M2：DL2000。

图 2 左边界 TAIL-PCR 电泳结果

Fig. 2 The TAIL-PCR of left boundary

```
CGACGGATAG TGGGGGAGAA AGAGAAACCG AAGATGATTA TGTACTATGG TTATTATATA TGTACAATTG TAACTTCACT CTATTGTTAA ACGAATTACA 100
GTTTACCCTT TGTACCACTT CCAGAGAACG TCCTCTTTCA GTGATTTTGC CATTTCATTA GCTTTGTTAA ATGATGTTTA CTTTGCTGGA ACTTTTAAAT 200
GGGAAGAAAT CGAAAATTAT GGAAGGACTA ATAGTAACAA TGAAAAAGAG GTAAGTAAAA TCATTAACCA TTATCATCAT CTTCTTCTGT TAGTTAATCA 300
CGTAGCAGCC ATCTTGGTTC ATTTAATCAC ATGGGCAGCT GGAGACTGCC TATACATGTT TCGTAAATAG CCTTTAAAAG TGATAACTTA ATGAGGTGAA 400
AAAGTCAGAG AATCAAGTCA ATAATAATAA AGAATGAGAT GAGATGGGCA AAGTTTTAGA TCTTTAGCCA GTTGTAGTAG CCTAGAGCTA ACTAGACTTT 500
TGTTCTGGAA TGTATTATTT TGGCTGGATT CCTTAGACAG TAGATAGCAT GACACCTCCA CTTCTATAGA CATTGCTGAA TGGAAAAAAA TTATAAGCAG 600
AGTACCGAAT AAAAGAATTG GTCCCACTGA GTACCAGAAT ATATTGTGGT GTAAACAAAT TGACGCTTAG ACAACTTAAT AACACATTGC GGACGTTTTT 700
AATGTACTGA ATTAACGCCG AATTAATTCG GGGGATCTGG ATTTTAGTAC TGGATTTTGG TTTTAGGAAT TAGAAATTTT ATTGATAGAA GTATTTTACA 800
AATACAAATA CATACTAAGG GTTTCTTATA TGCTCAACAC ATGAGCGAAA CCCTATAGGA ACCCTAATTC CCTTATCTGG GAACTACTCA CACATTATTA 900
TGGAGAAACT CGAGTCAAAT CTCGGTGACG GGCAGGACCG GACGGGGCGG TACCGGCAGG CTGAAGTCCA GCTGCCAGAA ACCCACGTCA TGCCAGTTCC 1000
CGTGCTTGAA GCCGGCCGCC CGCAGCATGC CGCGGGGGGC ATATCCGAGC GCCTCGTGCA TGCGCACGCT CGGGTCGTTG GGCAGCCCGA TGACAGCGAC 1100
CACGCTCTTG AAGCCCTGTG CCTCCAGGGA CTTCAGCAGG TGGGTGTAGA GCGTGGAGCC CAGTCCCGTC CGCTGGTGGC GGGGGGAGAC GTACACGGTC 1200
GACTCGGCCG TCCAGTCGTA GGCGTTGCGT GCCTTCCAGG GGCCCGCGTA GGCGATGCCG GCGACCTCGC CGTCCACCTC GGCGACGAGC CAGGGATAGC 1300
GCTCCCGCAG ACGGACGAGG TCGTCCGTCC ACTCCTGCGG TTCCTGCGGC TCGGTACGGA AGTTGACCGT GCTTGTCTCG ATGTAGTGGT TGACGATGGT 1400
GCAGACCGCC GGCATGTCCG CCTCGGTGGC ACGGCGGATG TCGGCCGGGC GTCGTTCTGG GCTCAT 1466
```

红色部分为大豆基因组序列；黑色为已知序列；绿色部分为未匹配序列。

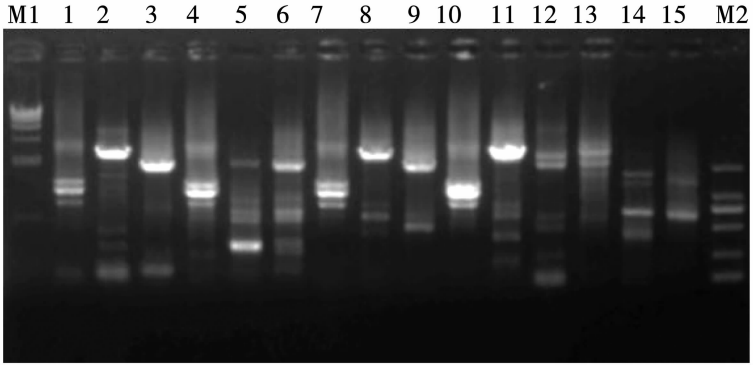
The red part indicate the soybean genome sequence；The black part indicate the known sequence；The green part indicate the unmatched sequence.

图 3 左边界 TAIL-PCR 的测序结果

Fig. 3 Sequencing of the left-boundary by TAIL-PCR

2.2　右边界侧翼序列的获取

右边界 Tail PCR 电泳结果如图 4 所示,引物 AP1、AP2、AP3 的第 3 轮 PCR 反应(3、6、9 泳道)均得到比试剂盒所提供正对照清晰的特异性条带,并且 3、6、9 泳道分子量大小相似。为方便测序选取与 5'相同引物的 3' AP3-3rd 的扩增产物条带(9 泳道)切胶回收进行测序。测序结果如图 5。



M1 为 λ-*Hin*d Ⅲ酶切产物;1-3 分别为 AP1 引物扩增 1 轮、2 轮和 3 轮的产物;4-6 分别为 AP2 引物扩增 1 轮、2 轮和 3 轮的产物;7-9 分别为 AP3 引物扩增 1 轮、2 轮和 3 轮的产物;10-12 分别为 AP4 引物扩增 1 轮、2 轮和 3 轮的产物;13-15 为正对照引物扩增 1 轮、2 轮和 3 轮的产物;M2:DL2000。

M1:λ-*Hin*d Ⅲ digest;1-3:Amplificated with AP1 for 1st,2nd and 3rd;4-6:Amplificated with AP2 for 1st,2nd and 3rd;7-9:Amplificated with AP3 for 1st,2nd and 3rd;10-12:Amplificated with AP4 for 1st,2nd and 3rd;13-15:Amplificated with positive control for 1st,2nd and 3rd;M2:DL2000.

图 4　右边界 TAIL-PCR 电泳结果

Fig. 4　The TAIL-PCR of right boundary

红色部分为大豆基因组序列;蓝色部分为已知序列;绿色部分为未匹配序列。

The red part indicate the soybean genome sequence;The blue part indicate the known sequence;The green part indicate the unmatched sequence.

图 5　右边界 TAIL- PCR 的 测序结果

Fig. 5　Sequencing of the right-boundary by TAIL-PCR

2.3 外源 T-DNA 在大豆基因组中整合位点的定位

根据获得的侧翼序列测序结果在 soybase 网站(https://www.soybase.org/GlycineBlastPages/)比对大豆基因组。T-DNA 插入大豆基因组 1 号染色体非编码区 49468395 碱基处。如图 6 大豆基因组 Gm01_49468395..49469837 序列所示,红色所显示的前半部分与左边界测序结果红色部分序列匹配(图 3),蓝色所显示的后半部分与右边界测序结果蓝色部分序列匹配(图 5),这些结果说明左右边侧翼侧序列定位的 T-DNA 在大豆基因组中的整合区域完全一致,此转基因事件为单拷贝转基因事件。T-DNA 在整合到大豆基因组的过程中,载体左右边界序列均被删除,左边界填充了 8 bp 的一段未知来源的核苷酸序列,右边界填充了 4 bp 的一段未知来源的核苷酸序列。

图 6 大豆基因组 Chr01:49468395..49469837 序列

Fig. 6 Chr01:49468395..49469837 sequence of soybean genome

2.4 转基因大豆特异性 PCR 检测

根据侧翼序列测序结果设计 PCR 引物(表 3),PCR 检测结果如图 7 所示。由于我们设计的引物,一端在 T-DNA 序列,另一端在大豆基因组中:如 5'F 上游引物在左边界基因组上,5'R 下游引物在 T-DNA 上;3'F 上游引物在 T-DNA 上,3'R 下游引物在右边界基因组上(图 7)。在质粒和阴性材料均不能扩增到条带,只有转基因阳性材料获得了预期大小的片段(图 8)。

表 3 5′和 3′端特异引物

Table 3 5′ and 3′ specific PCR detection primers

名称 Name	序列(5′-3′) Sequence(5′-3′)	引物长度 Primer length /mers	扩增产物长度 PCR product length/bp
5' F	GTAGCAGCCATCTTGGTTCA	20	926
5' R	GCAACGCCTACGACTGGAC	19	
3' F	GAAGGCACTACATATCCG	18	816
3' R	CCGTGATTCAATTAAACAC	19	

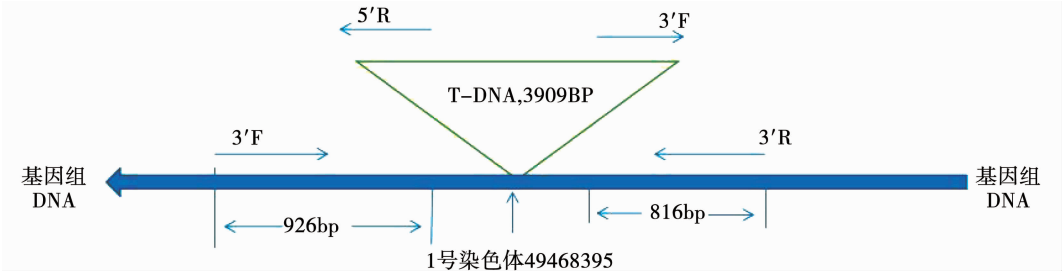
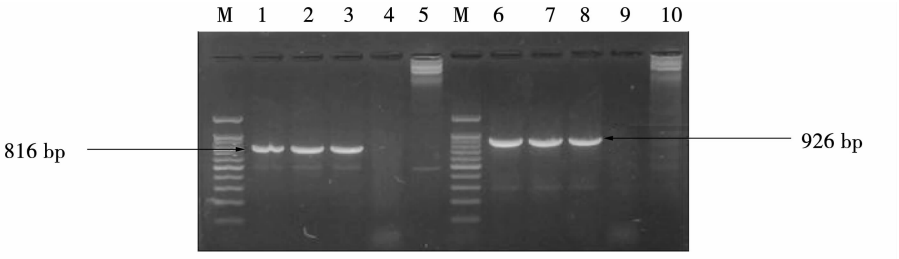


图 7 转基因大豆 F1H6018 左右边界引物位置图

Fig. 7 Transgentic soybean F1H6018 flanking sequence specific PCR detection primers location



1 ~5 为右边界引物 3' F 和 3' R 的扩增结果,其中 1、2 和 3 为阳性材料,4 为阴性对照,5 为质粒;6 ~10 为左边界引物 5' F 和 5' R 的扩增结果,其中 6、7、8 为阳性材料,9 为阴性对照,10 为质粒;M 为 100BP marker。

1-5 are the amplification of the right boundary by primer 3′ F and 3′ R(1, 2, 3 is the positive, 4 is the negative control, 5 is the plasmid);6-10 are the amplification of the left boundary by primer 5′ F and 5′ R (6, 7, 8 line is the positive, 9 line is the negative control, 10 line is the plasmid);M: 100BP marker.

图 8　转 *HAL1* 基因大豆特异性 PCR 检测

Fig. 8　Specific PCR assay for transgenic soybean *HAL1*

3　结论与讨论

大豆是世界上的重要粮食作物,转基因大豆的应用极大的提高了大豆的产量和质量。转基因大豆新品种在世界范围内种植面积在不断地扩大,转基因性状也由最初的抗除草剂、抗虫性状过渡到优质、抗病、抗逆等性状,并进一步向高产、营养高效、生物反应器等方向发展[9]。目前主要有两类转基因产品检测技术:(1)基于核酸技术,如 PCR、Southern-blot、基因芯片等;(2)基于蛋白质技术,如 Western-blot、ELISA、试纸条等。其中以 PCR 方法应用最为广泛,目前已有许多转基因植物转化体特异性检测方法的报道,如转基因大豆 RRS、MON89788,转基因玉米 Bt11、MON863、NK603、Bt176 等,转基因油菜 GT73、Oxy235,转基因棉花 MON531、MON1445 等[10]。由于每一个转化事件都是特异性的,根据 PCR 扩增结果可以快速精准判断特异的转化事件。

整合进入大豆染色体的外源目的基因插入位点的侧翼序列,对目的基因的正常转录、表达及调控有重要影响,且对研究转基因大豆的稳定遗传性以及转基因作物的安全生产具有重要意义,因此,侧翼序列的分析成为植物转基因育种安全评估的重要研究手段,受到广大科学研究者的重视[11-12]。

王晓波等[13]利用染色体步移法获得了转基因大豆插入位点的侧翼序列,不仅明确了外源 EPSPs 基因在大豆基因组中的整合、定位及其侧翼序列,而且发现外源基因不是以点插入方式整合,而是导致大豆基因组约 135 kb 片段的移位;NOS 下游大豆基因组序列发生重排,导致一个编码 HEC1 和 HEAT repeat 两个功能域的基因(Glyma02g09790)结构受到影响,发现该基因在 ABA 和 PEG 处理时下调表达,推测该基因通过 ABA 信号通路参与胁迫应答。

本研究分别在转 *HAL1* 基因大豆 T-DNA 序列两端以及其侧翼序设计两对 PCR 引物。由于我们设计的引物,一端在 T-DNA 序列中,另一端在大豆基因组中,质粒和阴性材料均不能扩增到条带,只有转基因事件的阳性材料才能获得预期大小的片段。并且两对 PCR 引物中的任何一对都可对其进行身份验证。

分离转基因插入位点旁侧序列是建立转化体特异性 PCR 检测方法的必要前提,本研究通过热不对称交错 PCR 法,获得了插入片段 DNA 序列的左翼序列和右翼序列。通过同源性比对分析,定位了外源基因在转基因大豆基因组中的整合位点,并确认此区域为非编码区,但有一些未知序列的插入。外源 T-DNA 的整合区域与外源基因的稳定表达及基因沉默的发生具有非常密切的关系,此 T-DNA 插入到基因非编码区,避免了外源基因的插入对内源基因表达造成的影响[14-15]。同时,外源基因也可以正常表达,Elisa 检测表明,HAL1 蛋白在叶子中表达量最高可以达到 0.03 $mg \cdot g^{-1}$,在根茎叶中也有一定的表达,但是表达量偏低。后续的耐盐试验中,在 200 $mmol \cdot L^{-1}$ NaCl 盐胁迫下转基因植株生长力明显强于对照材料,可以说明酵母 *HAL1* 基因对提高大豆耐盐性具有一定的促进作用。我们利用侧翼序列检测技术,明确了外源基因的导入没有影响到内源基因的正常表达,同时其蛋白可以正常表达。探究其蛋白表达量和代谢途径,*HAL1* 基因提高大豆耐盐性的分子机理是我们下一步研究需要做的工作。本研究所建立的转 *HAL1* 基因大豆特异性定性检测方法,对提高转基因材料的鉴定效率具有一定的意义。

参考文献

[1] Clive J. 2015 年全球生物技术/转基因作物商业化发展态势[J]. 中国生物工程杂志, 2016, 36(4): 1-11. (James C. Global biotechnology/GM crops commercialization development trend in 2015[J]. China Biotechnology,2016, 36(4): 1-11.)

[2] 崔宁波, 张正岩. 转基因大豆研究及应用进展[J]. 西北农业学报, 2016, 25(8): 1111-1124. (Cui N B, Zhang Z Y. Research and application of transgenic soybean[J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2016, 25(8): 1111-1124.)

[3] 郭斌, 祁 洋, 尉亚辉. 转基因植物检测技术的研究进展[J]. 中国生物工程杂志, 2010, 30(2): 120-126. (Guo B, Qi Y, Wei Y H. Progress in the research of transgenic plant testing[J]. China Biotechnology, 2010, 30(2): 120-126.)

[4] 刘蓓. 外源基因插入位点旁侧序列的研究方法及进展[J]. 农业与技术, 2012(4): 97. (Liu B. Research methods and progress of the exogenous gene insertion site flanking sequence[J]. Agriculture & Technology, 2012(4): 97.

[5] 刘慧. 烟草 T-DNA 激活标签插入突变体侧翼序列的扩增与分析[D]. 北京: 中国农业科学院, 2013: 28. (The amplification and analysis for flanking sequences of T-DNA activation tagging in *Nicotiana tabacum*[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2013: 28.)

[6] Gaxiola R, De Larrinoa I F, Villalba J M, et al. A novel and conserved salt-induced protein is an important determinant of salt tolerance in yeast [J]. The EMBO Journal, 1992, 11 (9): 3157-3164.

[7] 蒲远波, 郭翠, 平淑珍. 基因侧翼序列扩增技术的应用进展[J]. 生物技术通报, 2016, 32(11): 72-79. (Pu Y B, Guo C, Ping S Z. Application progress on amplified methods to clone flanking sequence[J]. Biotechnology Bulletin, 2016, 32(11): 72-79.)

[8] Fulton T M, Chunwongse J, Tanksley S D. Microprep protocol for extraction of DNA from tomato and other herbaceous plants[J]. Plant Molecular Biology Reporter, 1995, 13(3): 207-209.

[9] 杨向东, 隋丽, 李启云, 等. 大豆遗传转化技术研究进展[J]. 大豆科学, 2012, 31(2): 302-315. (Yang X D, Sui L, Li Q Y, et al. Recent advances in soybean transformation[J]. Soybean Science, 2012, 31(2): 302-315.)

[10] 李飞武, 李葱葱, 董立明, 等. 转基因大豆 MON89788 转化体特异性定性 PCR 检测[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(13): 6679 -6682. (Li F W, Li C C, Dong L M, et al. Establishment of event-specific qualitative PCR method for transgenic soybean MON89788[J]. Journal of Anhui Agricultural Science, 2010, 38(13): 6679-6682.)

[11] 祁洋, 李燕, 王永智, 等. 扩增 T-DNA 插入位点侧翼序列的方法及其应用进展[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(17): 7907-7908. (Qi Y, Li Y, Wang Y Z, et al. Advances in the amplification methods and application of T-DNA insertion site flanking sequence[J]. Journal of Anhui Agricultural Science, 2009, 37(17): 7907-7908.)

[12] 颜静宛, 林琳, 王锋. 获得基因侧翼序列位点信息的几种扩增方法[J]. 福建农业学报, 2005, 20(增刊): 125-129. (Yan J W, Li L, Wang F. Amplified methods for acquiring gene flanking sequence's information[J]. Fujian Journal of Agricultural Sciences, 2005, 20(Suppl): 125-129.)

[13] 王晓波, 蒋凌雪, 魏利, 等. 外源抗草甘膦 EPSPs 基因在大豆基因组中的整合与定位[J]. 作物学报, 2010, 36(3): 365-375. (Integration and insertion site of EPSPs gene on the soybean genome in genetically modified glyphosate-resistant soybean[J]. ACTA Agronomica Sinica, 2010, 36(3): 365-375.)

[14] 杨瑞芳, 白建江, 朴钟泽, 等. 转 *cry1Ac1* 基因抗虫水稻的培育[J]. 分子植物育种, 2014, 12(6): 1103-1111. (Yang R F, B J J, Piao Z Z, et al. Development of insect-resistant transgenic rice with *cry1Ac1* gene[J]. Molecular Plant Breeding, 2014, 12(6): 1103-1111.)

[15] 郭娜娜, 吴辉, 于晓惠, 等. 转基因大豆插入位点分析及特异性 PCR 检测方法的建立[J]. 热带作物学报, 2011, 32(8): 1527-1531. (Guo N N, Wu H, Yu X H, et al. Flanking sequence analysis and qualitative PCR detection of transgenic soybean[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2011, 32(8): 1527-1531.)