



# 耐盐转基因大豆事件 *AtARA6*-A001 外源插入片段侧翼序列及其应用

孙星邈<sup>1</sup>, 侯云龙<sup>1</sup>, 王英哲<sup>2</sup>, 关诗宇<sup>2</sup>, 邱红梅<sup>1</sup>, 张 玲<sup>2</sup>

(1. 吉林省农业科学院(中国农业科技东北创新中心) 大豆研究所, 吉林 长春 130033; 2. 吉林省农业科学院(中国农业科技东北创新中心) 农业生物技术研究所, 吉林 长春 130033)

**摘 要:**转基因大豆 *AtARA6*-A001 事件采用农杆菌介导大豆遗传转化法获得,其受体为沈农9号,具有耐盐特性,目前已经进入环境释放阶段。为明确该转基因大豆材料的分子特征及其转基因检测方法,推进该转基因事件生物安全评价工作。本研究以转基因大豆 *AtARA6*-A001 为研究对象,利用 Southern 杂交方法及基因组重测序技术鉴定了外源基因的拷贝数及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 *AtARA6* 基因耐盐大豆 A001 事件的特异性定性 PCR 检测方法。此方法能特异性检测转基因大豆植株 *AtARA6*-A001 根、茎、叶、花和种子样品,并且能够特异性识别转基因大豆事件的身份,这为后续转基因大豆及其产品的检测和监管提供技术支持。

**关键词:**大豆;转基因;侧翼序列;重测序;定性 PCR 检测

## Flanking Sequence of Exogenous Insertion in Salt-tolerant Transgenic Soybean Event *AtARA6*-A001 and Its Application

SUN Xingmiao<sup>1</sup>, HOU Yunlong<sup>1</sup>, WANG Yingzhe<sup>2</sup>, GUAN Shiyu<sup>2</sup>, QIU Hongmei<sup>1</sup>, ZHANG Ling<sup>2</sup>

(1. Soybean Research Institute, Jilin Academy of Agricultural Sciences (Northeast Agricultural Research Center of China), Changchun 130033, China; 2. Agro-Biotechnology Research Institute, Jilin Academy of Agricultural Sciences (Northeast Agricultural Research Center of China), Changchun 130033, China)

**Abstract:** *AtARA6* gene from *Arabidopsis thaliana* was introduced into soybean receptor Shennong 9 by *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean cotyledon nodes, obtaining the salt-tolerant transgenic soybean event *AtARA6*-A001. To identify the molecular characteristics and setting up a detection method of this transgenic soybean material, we could further accelerate the biosafety evaluation of this transgenic event in the future. In this study, the copy number of exogenous gene of the homozygous transgenic soybean *AtARA6*-A001 was identified by Southern hybridization as well as the position and direction of the insertion site. Meanwhile, the left and right flanking sequences of exogenous T-DNA were obtained by PCR amplification. Based on these data, a specific qualitative PCR method for detecting *AtARA6* gene salt-tolerant soybean A001 event was established. This method has high specificity, and can quickly identify transgenic soybean events, including *AtARA6*-A001 parents, derivatives, or varieties, as well as plants, tissues, seeds and products for specific detection, achieving effective supervision and management of transgenic soybeans by technical support.

**Keywords:** soybean; transgene; flanking sequence; resequencing; qualitative PCR detection

自然界中,由于各种生物和非生物胁迫的因素,农作物的产量品质受到不同程度的影响,而盐害最为常见,主要通过抑制种子萌发和植物的生长发育,造成作物产量的重大损失<sup>[1-2]</sup>。但植物有多种方式来应对非生物胁迫,如囊泡运输等。大量证据表明,液泡运输确保了与压力相关的离子高效运输到液泡<sup>[3]</sup>。拟南芥中 RAB5 的一个同源基因 *AtARA6* (RABF1) 在内体小泡运输过程中发挥作用,并可能在分子的再循环及降解过程中发挥关键作用,进而参与了植物的应激反应<sup>[4-5]</sup>。*AtARA6* 由于含有独特的 N 端的肉豆蔻酰化序列而不同于

RAB5 其他成员,但是它们有共同的激活因子<sup>[6]</sup>。*AtARA6* 由于参与内体运输而体现出多种生物学功能,如信号转导、逆境胁迫、生长调节等<sup>[7-8]</sup>。已有研究表明过表达 *AtARA6* 拟南芥比野生型具有更高的耐盐性,*AtARA6* 互补过表达系 RABF1E 显示出比野生型 *AtARA6* 敲除更长的根系长度,因此,N-豆蔻酰化可能是 *AtARA6* 发挥耐盐作用必要的部分<sup>[9]</sup>。

大豆是一种富含蛋白质、不饱和脂肪酸及多种生物活性成分的优质油料作物。大豆油不但能作为食物,还可以用作生物燃料<sup>[10]</sup>。大豆的需求量因其用途的多样化而日益增长。然而当下耕地面积

收稿日期:2023-04-12

基金项目:吉林省农业科技创新工程项目定向委托(CXGC2022DX009);大豆产业技术体系种子生产岗位专家项目(CARS04-P13)。

第一作者:孙星邈(1968—),硕士,副研究员,主要从事大豆分子育种研究。E-mail:xingmiaosun@163.com。

通讯作者:张玲(1981—),博士,副研究员,主要从事大豆基因编辑育种研究。E-mail:zly\_jaas@126.com;

邱红梅(1982—),硕士,副研究员,主要从事大豆种质资源研究。E-mail:qhm2001-2005@163.com。

有限,且土壤面临着严重的盐渍化,通过培育耐盐品种应对盐胁迫是提高大豆产量的有效途径。异源表达 *AtARA6* 基因的发现促进了转基因耐盐大豆品种的选育。转 *AtARA6* 基因耐盐大豆事件是吉林省农业科学院张玲副研究员通过大豆子叶节介导的农杆菌转化技术,将拟南芥来源的 *AtARA6* 基因 (GenBank:NM\_115341.3) 导入大豆受体品种沈农 9 号 (国审豆 2007015) 而获得的,并且在 2020 年获得农业部批准的环境释放。该份材料较受体品种在盐胁迫处理条件下,分别在芽期、苗期和全生育期具有较强的萌发能力和适应性,并能够稳定遗传<sup>[11]</sup>。

转基因技术培育耐盐大豆,不受传统育种方法周期长的限制,可以快速获得农艺性状和遗传稳定性良好的大豆种质。但现阶段消费者对转基因大豆的安全性还存在质疑,需要加强对转基因大豆的生物安全问题进行科学的研究与评估,这是保证转基因大豆健康发展的重要技术依据,而转基因检测技术则是生物安全评估中的关键技术之一<sup>[12]</sup>。外

源基因的整合位点,不但对该基因的转录、表达以及调控有影响,还对该作物的遗传稳定性和安全性有着重要意义<sup>[13]</sup>。

本研究通过 Southern 和基因组重测序技术检测出 *AtARA6* 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 *AtARA6* 转基因事件及其衍生品的特异性 PCR 定性检测方法,旨在为后续转基因大豆及其产品的检测和监管提供技术支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

供试转基因大豆 *AtARA6*-A001 事件已经获得农业部转基因生物安全—环境释放阶段批件 (2020) 第 148 号。转基因受体对照品种为沈农 9 号。对照大豆品种吉育 3733 和中吉 602 及水稻、玉米等由吉林省农业科学院大豆研究所邱红梅老师提供。转基因外源基因的载体图谱详见图 1。

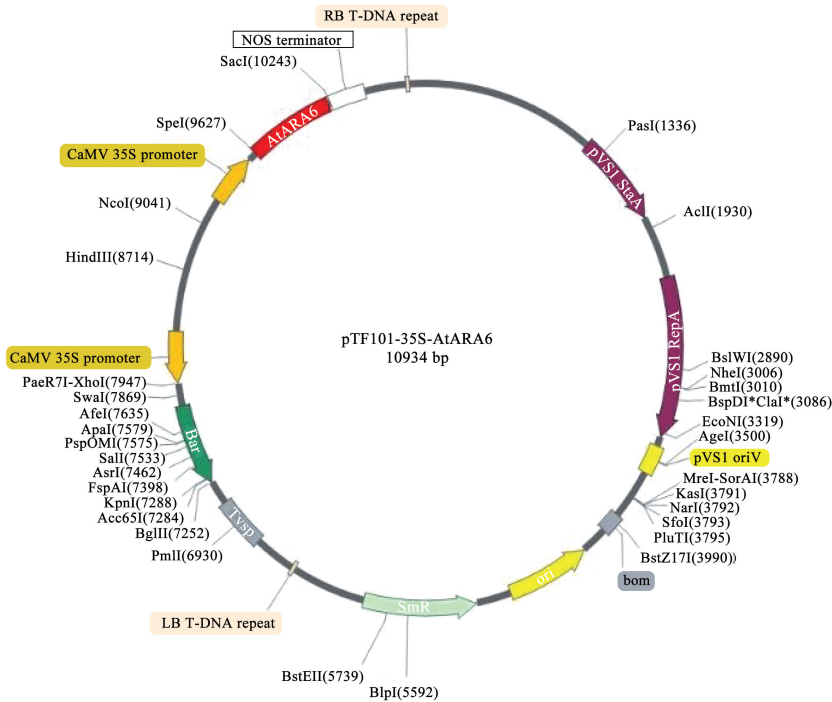


图 1 pTF101-35S-*AtARA6* 载体质粒图谱

Fig. 1 Map of pTF101-35S-*AtARA6* plasmid vector

### 1.2 方法

1.2.1 外源基因拷贝数的鉴定 采用 CTAB 法<sup>[10]</sup> 提取待测样品 DNA,通过紫外分光光度计和电泳检测 DNA 的浓度和质量。采用地高辛标记方法、利用 Roche 公司的试剂盒 (DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II) 进行 Southern 分析。以

插入的外源目的基因 *AtARA6* 片段设计探针引物 (正向:5'-ATGGGATGTGCTTCTTCTCTCCAG-3';反向:5'-TGACGAAGGAGCAGGACGAGGTAGC-3'), 探针大小为 606 bp。并根据插入序列内部的特异性酶切位点的特性,采用限制性内切酶 *Hind* III 和 *Bam* H I 对转基因事件中的基因组进行单酶切分析 (图 2)。

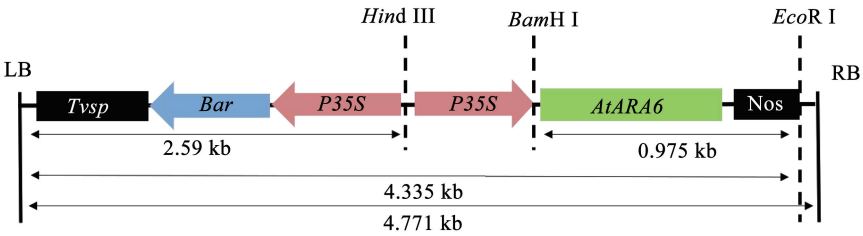


图 2 pTF101-35S-*AtARA6* 载体的 T-DNA 插入序列物理图谱

Fig. 2 Map of T-DNA insertion sequence in pTF101-35S-*AtARA6* vector

1.2.2 基因组重测序确定外源基因插入位置 通过 Southern 技术可以确定外源基因是否插入到大豆基因组中,但是不能明确具体的位点。本研究选用基因组重测序技术分析和确定转基因大豆 *AtARA6*-A001 事件中,外源基因的插入位置。测序试验委托北京百迈客生物科技有限公司对样品进行外源基因插入位置分析。选取在大豆营养生长阶段(V3 阶段:第三叶期,第四节复叶完全展开)取新鲜幼嫩的叶片送测序公司。测序采用二代高通量测序 Xten 平台进行测序,测序倍数为 30 ×。

1.2.3 侧翼序列的分析 根据转基因大豆事件 *AtARA6*-A001 外源插入序列及插入位点在大豆参考

基因组中上、下游(左、右)序列,分别设计左、右侧边界侧翼序列的 PCR 检测引物(表 1)。以 *AtARA6*-A001 基因组 DNA 为模板,利用上述引物分别进行 PCR 扩增,PCR 反应体系选用北京康为世纪的高保真、长片段、快速扩增 DNA 聚合酶 Mix 试剂盒(CW2965M),PCR 反应条件及方法参照说明书。胶回收及纯化单一特异性 PCR 条带,连接至 pMT-18 克隆载体,委托北京六合华大基因科技有限公司测序验证。将测序结果与外源插入序列和参考基因组序列进行比对,获得转基因大豆事件 *AtARA6*-A001 外源插入片段左、右边界侧翼序列。

表 1 引物列表  
Table 1 List of primers

引物名称 Primer name	引物序列 (5'-3') Primer sequence (5'-3')	目的片段长度 Target fragment length/bp	用途 Usage
A001-LB-F	GCCGAAATGCATAGCCAAGG	2125	左侧翼序列扩增
A001-LB-R	GGTCAACTTCCGTACCGAGC		
A001-LB-SF	GAAGCCCCGGAACCATTTT	330	左边界特异检测
A001-LB-SR	CTGCCTCTGATCAATTCGGG		
A001-RB-F	CAGCCAAGACAGCCGATAACATA	929	右侧翼序列扩增
A001-RB-R	CGGAAAAAGAATCAGCAAAGAAGG		
A001-RB-SF	CCGCTCACAAATTCACACAA	433	右边界特异检测
A001-RB-SR	TAAGGAGGAAGCAACTGGGC		

1.2.4 特异性 PCR 检测 根据旁侧序列结果设计转基因大豆 *AtARA6*-A001 特异性检测引物,左边界特异检测引物 A001-LB-SF/SR 扩增片段为 330 bp,右边界特异检测引物 A001-RB-SF/SR 扩增片段为 433 bp(表 1)。PCR 产物融合一部分大豆基因组序列和一部分 T-DNA 序列。采用 CTAB 法<sup>[10]</sup>分别提取转基因大豆植株 *AtARA6*-A001 根、茎、叶、花和种

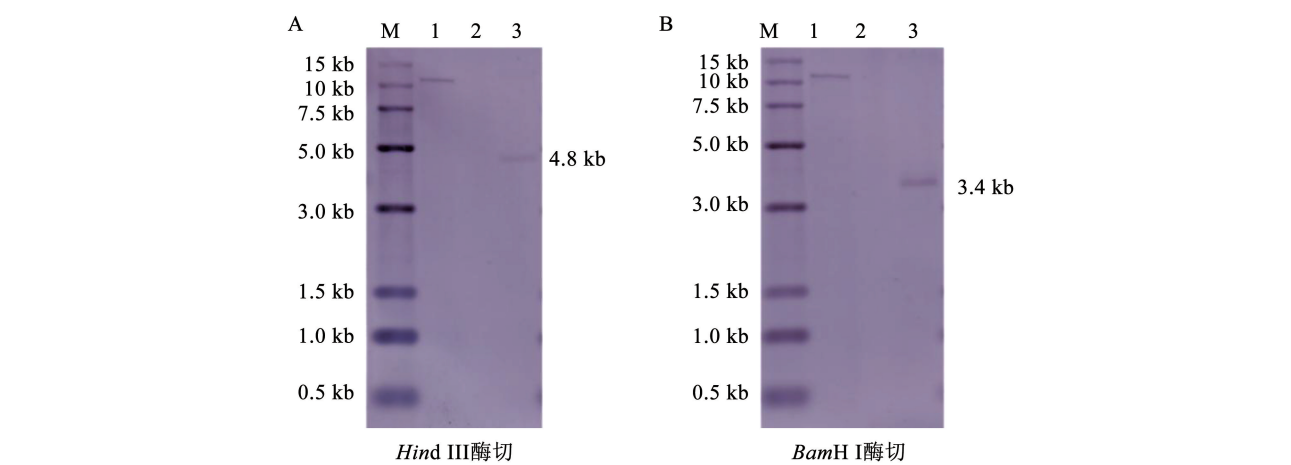
子样品的 DNA。以受体非转基因大豆品种沈农 9 号、常规大豆品种吉育 363、中吉 602、水稻、玉米作为对照,进行 PCR 扩增。使用康为世纪的 2 × GoldStar Best MasterMix (Dye) 试剂盒 CW0655M 进行 PCR 反应,PCR 反应条件及方法参照说明书。利用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增产物。

## 2 结果与分析

### 2.1 拷贝数鉴定

为明确转基因大豆事件 *AtARA6-A001* 的外源 T-DNA 序列是否整合到受体大豆基因组中及外源目的基因的在受体基因组中插入的拷贝数,采用 Southern 杂交技术对转基因大豆 *AtARA6-A001* 事件进行了检测和分析。其中 *Hind* III 酶切在载体上距离 T-DNA 区中的 RB 端大约 1.2 kb,预测在转基因

事件中,获得的杂交片段应该是大于 1.2 kb。而 *Bam*H I 酶切位点在载体上距离 RB 端为 0.975 kb,预测在转基因事件中,获得的杂交片段应该是大于 1 kb(图 2)。结果表明:用限制性内切酶 *Hind* III 对基因组 DNA 进行酶切,获得杂交片段大小分别约为 4.8 kb(图 3A);用限制性内切酶 *Bam*H I 单酶切,获得杂交片段大小分别约为 3.4 kb(图 3B),均大于预期的条带 0.975 kb。由此可见,*AtARA6-A001* 中外源 T-DNA 以单拷贝方式整合到大豆基因组中。



注: M. 15 kb Marker; 1. 阳性质粒; 2. 对照受体沈农 9 号; 3. 转基因事件 *AtARA6-A001*。  
Note: M. 15 kb Marker; 1. Positive plasmid; 2. CK Shennong 9; 3. Transgenic event *AtARA6-A001*.

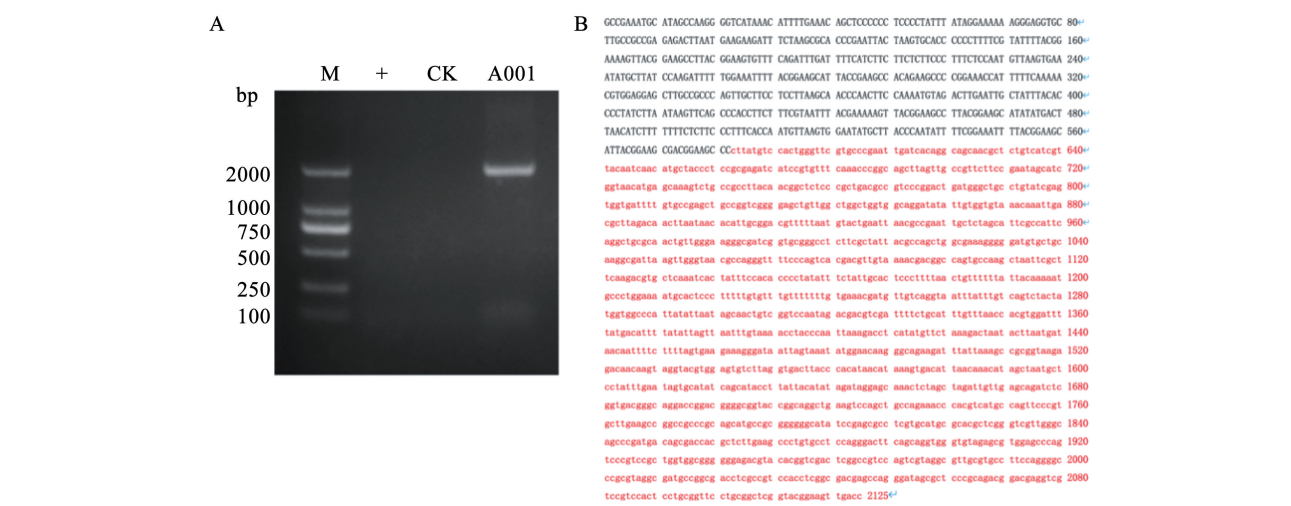
图 3 转基因大豆 *AtARA6-A001* 事件 Southern 杂交检测

Fig. 3 Southern blot analysis of the transgenic *AtARA6-A001* soybean

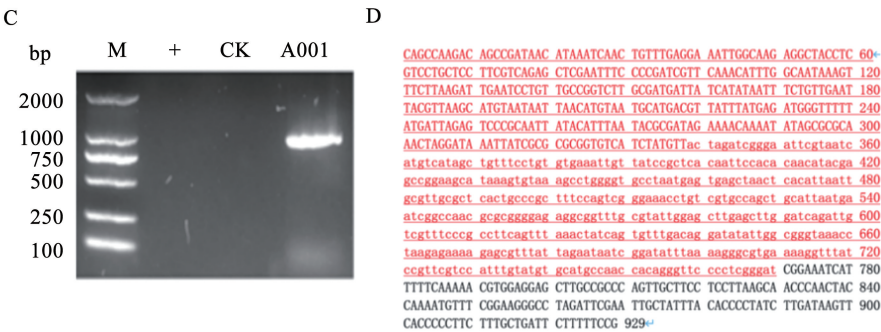
### 2.2 外源插入片段侧翼序列分析

根据测序分析获得的转基因大豆 *AtARA6-A001* 左边界侧翼序列信息,设计特异性引物进行 PCR 扩增,扩增产物融合一段大豆基因组序列和外源插入序列片段,结果显示:扩增产物只在转基因大豆 *AtARA6-A001* 中出现,而阳性质粒 pTF101-35S-*AtARA6* 和受体沈农 9 号中没有条带(图 4A 和 C)。

将所得片段进行测序,*AtARA6-A001* 左边界侧翼序列共 2 125 bp,其中,1 ~ 582 bp 位点序列来源于沈农 9 号基因组序列,583 ~ 2 125 bp 位点序列来源于外源插入片段序列(图 4B)。对于右边界侧翼序列,设计引物获得片段长度为 929 bp,其中,1 ~ 770 bp 位点序列来源于外源插入片段序列,771 ~ 929 bp 位点序列来源于沈农 9 号基因组序列(图 4D)。







注:A. 左边界侧翼序列 PCR 扩增电泳结果图;B. 左边界侧翼序列分析;C. 右边界侧翼序列 PCR 扩增电泳结果图;D. 右边界侧翼序列分析;M. 2 kb DNA Marker;+. 阳性质粒为 pTF101-35S-*AtARA6*;CK. 受体沈农 9 号;A001. 转基因大豆 *AtARA6*-A001;黑色部分是栽培大豆品种沈农 9 号基因组序列;红色部分转基因大豆材料大豆 *AtARA6*-A001。

Note:A. PCR amplification of left flanking sequence. B. Left boundary flank sequence analysis; C. PCR amplification of right flanking sequence; D. Right boundary flank sequence analysis; M. 2 kb DNA Marker; P. Positive plasmid pTF101-35S-*AtARA6*; CK. Receptor variety Shennong 9; Transgenic soybean *AtARA6*-A001. The black sequence was from Shennong 9, and the red sequence was from transgenic soybean *AtARA6*-A001.

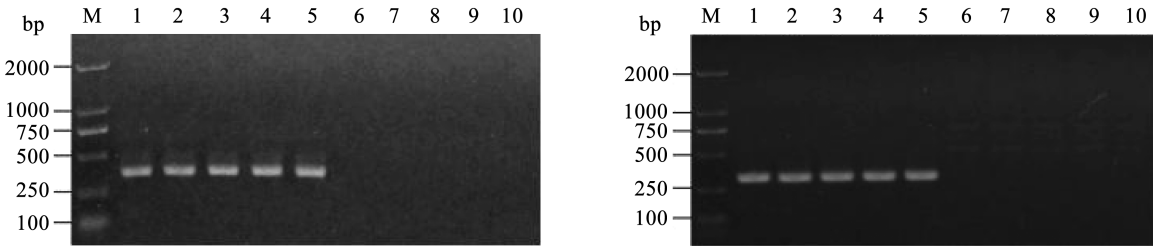
图 4 转基因事件 *AtARA6*-A001 左、右边界侧翼序列 PCR 验证

Fig. 4 PCR verification of left and right flanking sequences of *AtARA6*-A001 transgenic event

2.3 特异性 PCR 检测

根据转基因大豆事件 *AtARA6*-A001 外源插入片段确定的整合位点和侧翼序列设计了特异性 PCR 检测引物,其中左边界引物 A001-LB-SF/SR 扩增引物为 330 bp,右边界引物 A001-RB-SF/SR 扩增引物为 433 bp。当以受体非转基因大豆品种沈农 9 号、

常规大豆品种中吉 603、吉育 3733 及玉米和水稻作为模板时,都没有扩增产物出现;以 *AtARA6*-A001 根、茎、叶、花和种子 DNA 为模板时,能够扩增出清晰的条带,证明这两对引物都可以特异性识别转基因大豆事件 *AtARA6*-A001(图 5)。



注:LB. 左边界特异性引物 A001-LB-SF/SR 检测;RB. 右边界特异性引物 A001-RB-SF/SR 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. 大豆品种中吉 602;8. 大豆品种吉育 3733;9. 玉米;10. 水稻。

Note:LB. Left boundary specific primer A001-LB-SF1/SR1 detection; RB. Right border specific primer A001-RB-SF1/SR1 detection; M. 2 kb DNA Marker; 1. Root; 2. Stem; 3. Leaves; 4. Flowers; 5. Seeds; 6. Soybean variety Shennong 9; 7. Soybean variety Zhongji 602; 8. Soybean variety Jiyu 3733; 9. Corn; 10. Rice.

图 5 转基因大豆事件 *AtARA6*-A001 特异性引物 PCR 检测

Fig. 5 Transgenic soybean event *AtARA6*-A001 specific primer PCR detection

3 讨论

在转基因作物中,外源 T-DNA 插入序列在受体植物基因组中的整合位置是随机的。但在每个转基因事件中的 T-DNA 左右端序列与受体基因组序列拼接而成 T-DNA 插入位点的侧翼序列是唯一的<sup>[11]</sup>。且根据这个侧翼序列建立的特异性检测方法,是准确识别此次转基因事件身份的特异性标

识,也是在不同转基因作物检测,实现转基因作物及其产品产权保护、检测和有效监督管理的一个重要依据<sup>[12]</sup>。以往分离外源 T-DNA 侧翼序列主要借助基因组步移(genomic walking)结合 PCR 技术进行分析,虽然 PCR 技术具有快速、准确、操作简便易行等优点,在转基因农作物种子和产品检测方面可以起到较大作用<sup>[13-16]</sup>,但对于大豆这种基因组复杂的作物,只通过预测的基因组序列设计引物做 T-DNA

左右端序列的扩增,很难一次找到准确的侧翼序列以及特异性扩增引物。本研究首先通过结合 Southern 杂交和基因组重测序技术精准地确定了转基因大豆事件 *AtARA6-A001* 在大豆基因组中的位置及外源 T-DNA 插入序列上下游 2 kb 的序列,并根据得到的序列进行侧翼序列 PCR 扩增和特异性引物设计等,此方法得到的结果更为精准有效。依据侧翼序列建立的转化事件 *AtARA6-A001* 特异性检测方法也能对转基因大豆事件 *AtARA6-A001* 包括亲本、衍生品系或品种,及其制品包括植株、组织、种子等进行特异性检测,从而实现了转基因大豆及其产品更为准确且快速的鉴定。

### 4 结论

本研究以转基因大豆 *AtARA6-A001* 为研究对象,利用 Southern 杂交方法及基因组重测序技术鉴定了外源基因的拷贝数及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,并基于左右旁侧序列,建立了转 *AtARA6* 基因耐盐大豆 A001 事件的特异性定性 PCR 检测方法。此方法能特异性检测转基因大豆植株 *AtARA6-A001* 根、茎、叶、花和种子样品,并且能够特异性识别转基因大豆事件,可为后续转基因大豆及其产品的检测和监管提供技术支持。

### 参考文献

[1] QUAN R, LIN H, MENDOZA I, et al. SCABP8/CBL10, a putative calcium sensor, interacts with the protein kinase SOS2 to protect *Arabidopsis* shoots from salt stress[J]. *The Plant Cell*, 2007, 19(4): 1415-1431.

[2] PHANG T H, SHAO G, LAM H M. Salt tolerance in soybean[J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2008, 50(10): 1196-1212.

[3] MARTÍN-DAVISON A S, PÉREZ-DÍAZ R, SOTO F, et al. Involvement of *SchRabGDII* from *Solanum chilense* in endocytic trafficking and tolerance to salt stress[J]. *Plant Science*, 2017, 263: 1-11.

[4] UEDA T, YAMAGUCHI M, UCHIMIYA H, et al. Ara6, a plant-unique novel type Rab GTPase, functions in the endocytic pathway of *Arabidopsis thaliana*[J]. *The EMBO Journal*, 2001, 20(17): 4730-4741.

[5] HOEPFLINGER M C, GERETSCHLAEGER A, SOMMER A, et al. Molecular and biochemical analysis of the first ARA6

homologue, a RAB5 GTPase, from green algae[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2013, 64(18): 5553-5568.

[6] EBINE K, FUJIMOTO M, OKATANI Y, et al. A membrane trafficking pathway regulated by the plant-specific RAB GTPase ARA6[J]. *Nature Cell Biology*, 2011, 13: 853-859.

[7] GROSSHANS B L, ORTIZ D, NOVICK P. Rabs and their effectors: Achieving specificity in membrane traffic[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103(32): 11821-11827.

[8] ISHITANI M, LIU J, HALFTER U, et al. SOS3 function in plant salt tolerance requires N-myristoylation and calcium binding[J]. *The Plant Cell*, 2000, 12(9): 1667-1677.

[9] YIN C, KARIM S, ZHANG H, et al. *Arabidopsis RabF1 (ARA6)* is involved in salt stress and dark-induced senescence (DIS)[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2017, 18(2): 309.

[10] QI D H, LEE C F. Influence of soybean biodiesel content on basic properties of biodiesel-diesel blends[J]. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 2014, 45(2): 504-507.

[11] HONG Z, LI Y, ZHAO Y, et al. Heterologous expression of *Arabidopsis AtARA6* in soybean enhances salt tolerance[J]. *Frontiers in Genetics*, 2022, 13: 849357.

[12] 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. The advances of transgenic plants detection techniques[J]. *China Biotechnology*, 2010, 30(2): 120-126.)

[13] 崔帅, 王作平, 于江辉, 等. 转基因水稻 BPL9K-2 事件特异性检测方法的建立[J]. *中国生物工程杂志*, 2018, 38(11): 32-41. (CUI S, WANG Z P, YU J H, et al. Event-specific detection methods of genetically modified rice BPL9K-2[J]. *China Biotechnology*, 2018, 38(11): 32-41.)

[14] 冯翠莲, 万玥, 冯小艳, 等. 转基因甘蔗 *BtG-2* 的 T-DNA 侧翼序列分析及其转化事件特异性检测[J]. *热带作物学报*, 2021, 42(9): 2468-2477. (FENG C L, WAN Y, FENG X Y, et al. Analysis of the T-DNA flanking sequence and event-specific detection for insect-resistant transgenic sugarcane *BtG-2*[J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2021, 42(9): 2468-2477.)

[15] 王叶, 谢家建, 黄春蒙, 等. 转 *cryIaA* 基因抗虫棉整合结构解析及转化体特异性检测方法的建立[J]. *棉花学报*, 2017, 29(4): 307-315. (WANG Y, XIE J J, HUANG C M, et al. Integrated structure of the modified *cryIaA* gene in cotton and its event-specific detection[J]. *Cotton Science*, 2017, 29(4): 307-315.)

[16] 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): 14-20. (SHEN A J, CHEN S, ZHOU X Y, et al. Analysis of the flanking sequence and event-specific detection of transgenic line W-4 of *Brassica napus*[J]. *Jiangsu Journal of Agricultural Sciences*, 2014, 30(1): 14-20.)