
DOI: 10.13718/j. cnki. xdzk. 2025.04.010

周昂,蒋晶晶,左伟东,等.利用基因组测序技术鉴定家蚕转基因位点方法的建立 [J].西南大学学报(自然科学版),2025,47(4):113-122.

利用基因组测序技术鉴定家蚕转基因位点方法的建立

周昂, 蒋晶晶, 左伟东, 陈欣, 童晓玲, 代方银, 李春林

西南大学 资源昆虫高效养殖与利用全国重点实验室/ 西南大学 农业农村部蚕桑生物学与遗传育种重点实验室,重庆 400715

摘要:建立一种基于基因组测序技术高效鉴定家蚕转基因插入位点的方法,并分析测序深度对位点鉴定准确性的 影响,从而为家蚕及其他物种利用基因组测序技术开展低成本、高通量的转基因位点鉴定提供参考。首先,采集两 份家蚕转基因材料的蛹,进行全基因组测序,并经过质量控制筛选出高质量的测序后读段(reads)。以载体序列和 家蚕基因组为参考,经两轮比对分析,得到覆盖基因组和载体的目标 reads。利用目标 reads 上的基因组序列在家蚕 泛基因组数据库中进行比对分析,进而获得插入位点的具体位置。随后,运用 Seqtk 软件对数据进行抽样,分析不 同测序深度对位点鉴定准确性的影响。两份材料的基因组测序数据分别为 9.76 G 和 11.18 G,质控后读段(clean reads)数量分别为 32 639 026 和 37 394 695,测序深度约为 20×。序列比对分析和聚合酶链式反应(PCR)实验验证 结果显示:TransGene_1 的插入位点位于 1 号染色体 1 899 494 bp 与 1 899 495 bp 之间;TransGene_2 的插入位点 位于 21 号染色体 959 510 bp 与 959 515 bp 之间,且插入位点均处于基因间区。利用两份转基因材料的基因组测序 数据进行不同测序深度的模拟分析,发现转基因材料 TransGene_1 在测序深度为 6×时就能够得到覆盖两侧断点 的 reads,实现精确定位,而 TransGene_2 则需要测序深度达到 10×及以上才能实现精确定位。

关键词:家蚕;转基因插入位点;基因组测序;测序深度; 转基因鉴定

中图分类号: **S882** 文献标志码: A 文 章 编 号: 1673-9868(2025)04-0113-10

开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Establishment of A Genome Sequencing Method for Identification of Transgenic Sites in Silkworm

ZHOU Ang, JIANG Jingjing, ZUO Weidong, CHEN Xin, TONG Xiaoling, DAI Fangyin, LI Chunlin

收稿日期: 2024-01-03

基金项目:国家自然科学基金项目(U20A2058,31830094);中央高校基本科研业务费自然科学项目(SWU-KQ22005)。

作者简介:周昂,硕士研究生,主要从事家蚕经济性状的研究。

通信作者:李春林,副教授。

State Key Laboratory of Resource Insects, Southwest University/Key Laboratory of Sericultural Biology and Genetic Breeding, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Southwest University, Chongging 400715, China

Abstract: This study aims to establish a method for efficiently identifying transgenic insertion sites in silkworms through genome sequencing. It also analyzes how sequencing depth affects the accuracy of site identification, and provides a reference for low-cost, high-throughput transgenic site identification in silkworms and other species. Two silkworm transgenic materials were collected for whole genome resequencing. High-quality reads were selected through quality control. Target reads covering the genome and vector were obtained through two rounds of comparison analysis using the vector sequence and silkworm genome as references. The specific location of the insertion site was obtained by comparing the genome sequence in the target reads with the silkworm pan-genome database. Subsequently, we used the seqtk software to sample the data, and analyzed how different sequencing depths affected the accuracy of site identification. The genome sequencing data of the two materials were 9.76 G and 11.18 G, and the number of clean reads were 32 639 026 and 37 394 695, respectively, and the sequencing depth was about $20 \times$. Sequence alignment analysis and PCR experimental verification results indicate that the insertion site of TransGene_1 is located between 1 899 494 bp and 1 899 495 bp on chromosome 1, while the insertion site of TransGene_2 is between 959 510 bp and 959 515 bp on chromosome 21. Both insertion sites were located in the intergenic region. Using the genome sequencing data of the two transgenic materials for simulation analysis under different sequencing depths, we found that the transgenic material TransGene_1 can obtain reads covering both breakpoints at a sequencing depth of $6 \times$, achieving precise positioning, while TransGene_2 needs a sequencing depth of $10 \times$ or above to achieve precise positioning.

Key words: silkworm; transgenic insertion site; genomic sequencing; sequencing depth; transgenic identification

栽桑养蚕是我国先民的伟大创举,有着超5000年的历史。蚕桑产业作为我国特色优势产业,在脱贫 攻坚进程中发挥了关键作用,是当前乡村振兴的优势特色产业之一。培育高产且优质的蚕品种是推动养蚕 业健康发展以及增加蚕农收入的重要根基。基因编辑技术在农业育种方面的应用越发广泛,不仅为作物抗 病性的改良给予了关键支撑,还极大地推动了作物品质的提升^[1-2]。在家蚕育种领域,转基因技术也被广泛 用于创制优质育种素材^[3-7]。就转基因素材来讲,明确其插入位点对其育种用途和推广极为关键。此外,家 蚕亦是重要的实验动物,基于家蚕展开的功能基因研究对理解昆虫发育^[8]、遗传^[9]以及进化^[10]有着重要的 参考价值。转基因技术同样是功能基因研究的重要方式,确定转基因材料中目的片段的插入位点对明确目 的基因的功能是不可或缺的。所以,构建高效、精准的鉴定家蚕转基因位点的方法对家蚕育种和功能基因 的研究有着重大意义。

传统上,常用 DNA 印迹杂交^[11]确定转基因材料中目的片段的拷贝数,再通过以聚合酶链式反应 (PCR)为基础的方法确定插入位点,后者包括反向 PCR、交错式热不对称 PCR、质粒拯救法、外源接头 PCR 以及 Sanger 测序等。例如文献[12]利用反向 PCR 方法成功找到 Bt11 转基因玉米的侧翼序列;文献 [13]利用交错式热不对称 PCR 方法成功分离了山药 Pal 和 Pgi 基因的 5'-侧翼区域;文献[14]利用质粒拯 救法成功在水稻中获取到插入 T-DNA 序列。然而,这些基于 PCR 的鉴定方法往往过程繁琐。例如,反向 PCR 方法需要将转基因系基因组酶切处理并环化,再经数轮巢式 PCR 扩增,才可能鉴定到插入位点^[15]; 交错式热不对称 PCR 方法需采用温度梯度和不对称的引物设计,以增加扩增特异性^[16];质粒拯救法需使 用限制酶对 DNA 进行处理,并将其导入大肠杆菌内,使用 PCR 筛选阳性菌落并测序^[17]。其他方法也涉及 较多关键中间环节,使得传统基于 PCR 的鉴定方法不仅检测效率低、对实验人员技术要求较高,且其成功 率不高,部分情况下需重复多次才能完成插入位点鉴定。综合来看,传统转基因位点鉴定方法操作复杂、 特异性低,且受连接效率、退火温度、引物设计因素等限制^[18]。随着以转基因技术为代表的分子育种技术 的广泛应用,有必要在各物种中建立更高效、更精准的转基因位点鉴定方法。

近年来,随着高通量测序技术的普及,个体基因组测序成本迅速降低,使得利用基因组测序技术高效 鉴定转基因插入位点成为可能。目前,在拟南芥^[19-20]、玉米^[21-22]、大豆^[23-24]、水稻^[25-26]、小鼠^[27-28]、 猪^[29-30]、花椒树^[31]、月季^[32-33]等的研究中皆有利用基因组测序技术进行转基因位点鉴定的报道,但在家蚕 的研究中尚未有过相关研究和报道。

本研究利用全基因组测序技术,对两个转基因家蚕品系的插入位点进行鉴定,建立一套快速确定家蚕转基因插入位点的方法。此外,还分析了测序深度如何影响插入位点检测的准确性。

1 材料与方法

1.1 样本与基因组测序

转基因材料 TransGene_1 和 TransGene_2 是本实验室前期构建的 2 个过表达家蚕品系。TransGene_1:利用同源重组的办法,将目的基因表达核连接到 piggyBac-{3×P3-EGFP}载体上,通过胚胎显微注射技术注射至新产非滞育蚕卵(G0代);随后,饲养 G0代至化蛾(G1代),并在 G1代蚁蚕刚孵化时筛选复眼发出绿光的个体;再饲养自交产生 G2代,逐代筛选,最终获得纯合的转基因过表达品系。TransGene_2:将目标基因与家蚕 A4 启动子、SV40 终止子通过中间载体 pSL1180 构建表达核[A4-Gene-SV40],酶切回收表达核后与 piggyBac-[3×P3-EGFP]载体连接;再通过显微注射技术将重组载体转入家蚕非滞育卵(低温催青卵);最后利用荧光显微镜筛选复眼有绿色荧光的 G1代个体逐代自交饲育,逐代筛选,最终得到转基因过表达品系。

使用 TransGene_1 和 TransGene_2 的蛹提取基因组 DNA,使用血液/细胞/组织基因组 DNA 提取试剂盒建立 DNA 文库(百迈客生物科技有限公司),利用 HiSeq X 平台进行双端测序,每条 reads 长 150 bp。 1.2 数据处理

为了获得高质量的基因组测序数据用于后续研究,采取了以下步骤:① 剔除 N 碱基含量超过 5%的 reads;② 剔除质量值低于 20 且比例超过 30%的 reads。第一轮比对选用插入序列为参考,首先利用 软件 BWA(Burrows-Wheeler-Alignment Tool) v0.7.17 将 clean reads 比对至参考序列;随后,使用软件 samtools v1.6^[34]对结果进行排序与筛选。第二轮比对选用家蚕基因组 Bomo_genome^[35]为参考基 因组,以第一轮比对结果为输入进行比对,同样对结果进行排序与筛选。使用结果中的部分 reads 提 交至网站 http://silkmeta.org.cn/^[36]进行 BLAST 分析,以获得具体的插入位置。

1.3 准确性验证

根据 reads 对比结果确定转基因载体的插入方向,拼接转基因材料序列,并设计引物加以确认(表 1)。 引物设计原则如下:设计 3 对引物,其中 2 对为断点检测引物(即一条引物设计于基因组上,另一条设计于 载体(左臂或右臂)),剩下一对为基因组检测引物,上下游均位于基因组上。借助凝胶电泳情况以及 PCR 产物测序结果,验证插入位点鉴定的准确性。

检测位置	引物名称	序列(5'3')	产物大小/bp
左臂断点	T1-L-F	CTAAATGCACAGCGACGGAT	304
	T1-L-R	ATAGAAGACGCTCAGTTGGC	
	T2-L-F	ATGGCCTTGGAATCGTCAGA	200
	T2-L-R	TCATTTTGACTCACGCGGTC	
右臂断点	T1-R-F	ATTACTGGGCCAACAACTGC	537
	T1-R-R	TGTGCCAAAGTTGTTTCTGACT	
	T2-R-F	ACCGATAAAACACATGCGTCA	402
	T2-R-R	CAAAAGCGGATAGGGCACAA	
基因组序列	T1-G-F	CGTTGAACATAATGTGCTTGACG	590
	T1-G-R	ACGGTTAACTTATCTGCCTTCG	
	T2-G-F	GGCCTCCCAGACAGAATAGT	364
	T2-G-R	CCAGCAAAAGTGATCCGAGG	

表 1 TransGene 插入位点鉴定引物信息

注: bp 指碱基对数。

1.4 测序深度依赖性检测

利用软件 seqtk 对双端测序文件予以随机抽取,从而模拟不同深度的测序状况,随机种子随机生成,每个深度设置 11 个重复。本研究总共设置 9 个梯度,模拟测序深度从 2×至 16×的情形。

2 结果与分析

2.1 插入位点鉴定策略与测序结果

本研究运用全基因组测序技术对家蚕转基因的插入位点予以鉴定,具体分为以下 4 个步骤(图 1):其一,针对测序结果开展质量控制与过滤操作,去除低质量以及不适于分析的测序结果,留存 clean reads 以作后续分析之用。其二,于第一轮比对期间,挑选带有载体序列的 reads,将插入序列当作参考,运用 clean reads 与之进行比对并对结果加以筛选。经筛选后的结果可分为两类,一类是完全比对成功的 reads;另一类是仅有部分序列能够比对上的 reads,此类 reads 又可细分为比对上左臂和比对上右臂两种情况,这两种情况中的 reads 均为需要保留的 reads。其三,在第二轮比对时,筛选出与参考基因组存在 部分相同序列的 reads。其四,在实验验证步骤里,利用与参考基因组比对上的最长部分进行序列对比操 作,确定插入位点,并设计引物开展实验验证。

分析表明, TransGene_1 的基因组测序总共获取了约 9.76 GB 的数据, 其中包含 32 639 026 条 clean reads, Q30 达到 98.02%。TransGene_2 的基因组测序共得到了约 11.18 GB 的数据, 涵盖 37 394 695 条 clean reads, Q30 为 97.95%。这两份材料的测序深度均约为 20×(表 2), 测序质量均符合后续分析要求。

表 2 基因组测序结果

样本名称	clean reads 数	高质量碱基数	Q 30/%	GC/ %	测序深度/×
TransGene_1	32 639 026	9 759 018 256	98.02	37.40	20
TransGene_2	37 394 695	11 180 626 164	97.95	37.40	20

注:Q30:质量值大于等于 30 的碱基数占总碱基数的百分比;GC:样品 GC 含量,即G 和C 类型的碱基数占总碱基数的 百分比。



绿色短线代表基因组序列,黑色短线为插入序列;红色箭头为总长检测引物,对应下方第1、2 泳道结果;蓝色箭头为断点检测引物,对应 后续泳道结果;PCR 验证结果中黑色部分代表阳性结果,白色部分代表阴性结果。

图 1 应用基因组测序技术鉴定家蚕转基因插入位点的方法流程

2.2 插入位点定位及序列比对分析

依据本研究的插入位点定位策略,初步判定转基因品系 TransGene_1 的插入位点处于 1 号染色体的 1 899 494 bp 之处,其插入方向为从同源右臂至同源左臂(图 2b);而转基因品系 TransGene_2 的插入位点 位于 21 号染色体的 959 510 bp 之处,插入方向为从同源左臂至同源右臂(图 2c)。

为深入分析,对转基因材料的序列予以拼接和比对,且统计了可与家蚕参考基因组比对的 reads 的长度。在转基因品系 TransGene_1 中,最短碱基数为 34 bp,最长碱基数为 105 bp,平均碱基数为 55.4 bp。而在 TransGene_2 中,最短碱基数为 32 bp,最长碱基数为 118 bp,平均碱基数为 65.7 bp。 获取具有可比对到家蚕参考基因组上的长碱基数的测序后读段(reads),有助于保证此分析方法比对 结果的准确性(表 3)。

样本名 左臂 reads 数 右臂 reads 数 最短碱基数/bp 最长碱基数/bp 平均碱基数/bp TransGene 1 10 6 34 105 55.4 TransGene 2 65.7 6 11 32 118

表 3 TransGene 插入位点比对结果统计

注:以上结果均为比对到基因组的情况。reads 指测序仪单次测序所得到的碱基序列, bp 指碱基对数。

2.3 插入位点鉴定准确性验证

为了验证本实验方法的准确性,于转基因品系 TransGene_1 中设计了 3 对引物加以验证:左臂断点的 扩增产物长度为 304 bp,右臂断点的扩增产物长度为 537 bp,野生型家蚕预计仅扩增 590 bp 的基因组序 列。电泳结果表明:TransGene_1 左、右臂断点产物的扩增长度和预期相符,并且未扩增基因组序列,这显 示该品系为转基因纯合型;野生型家蚕仅扩增基因组序列,未扩增左、右臂断点,与预期一致(图 3a)。

在转基因品系 TransGene_2 中,同样设计了 3 对引物来进行验证,结果与预期相符(图 3b)。随后, 对以上两个转基因品系的左、右臂断点扩增产物开展 Sanger 测序(图 3c、图 3d),结果和之前拼接的序 列一致,验证了本研究方案的准确性。



红色箭头为插入位点,红色虚线内为既有基因组序列也有插入序列的 reads,粉色线段代表转基因载体右臂,蓝色线段代表转基因载体左臂。

图 2 TransGene_1 插入位点鉴定比对结果

2.4 插入位点鉴定的深度依赖性分析

为深入探究测序深度对插入位点鉴定准确性的影响,本研究按一定比例对 clean reads 进行随机抽样, 梯度设为 2×、4×、6×直至 16×,对抽取的 reads 开展两轮比对,每个梯度重复 11 次,以此模拟并比较不 同测序深度下转基因插入位点的鉴定效率(图 4)。

利用两份转基因材料(TransGene_1 与 TransGene_2)的全基因组测序数据,对不同测序深度下转基因 材料插入位点的鉴定情况进行了模拟(表 4)。结果表明,测序深度对插入位点的鉴定效果存在显著影响。 测序深度为 2×时,两份材料的未检测率分别为 40.4% 与 18.2%,检测率分别为 36.4% 和 18.2%,这表明 此时鉴定效率较低。测序深度为 5×时,两种载体的未检测率均降为 0%,检测率分别提升至 90.9%和 72.7%,这意味着在此测序深度下鉴定效率有较大提高。测序深度为 6×时,TransGene_1 的鉴定率达到 100%;测序深度为 10×时,TransGene_2 的鉴定率也达到 100%,显示在这两个深度下鉴定效率分别达到 最优。所以,本研究认为,针对两份转基因材料插入位点的鉴定,测序深度处于 6×到 10×之间,即可确保 鉴定的有效性。





1、3、5为野生型家蚕,2、4、6为转基因个体,M为DNA分子量标准2000+。蓝色阴影为载体序列,米色线段代表载体右臂,蓝 色线段代表表达核,紫色线段代表载体左臂。





图 4 不同深度测序文件模拟测试方案

		未检测	未检测率/%		单侧检测率/%		检测率/%	
Trans	Trans	Trans	Trans	Trans	Trans	Trans	Trans	
Gene_1	Gene_2	Gene_1	Gene_2	Gene_1	Gene_2	Gene_1	Gene_2	
2	2	40.4	18.2	36.4	63.6	36.4	18.2	
4	4	0	0	36.4	45.5	63.6	54.5	
5	5	0	0	9.1	27.3	90.9	72.7	
6	6	0	0	0	27.3	100	72.7	
8	8	0	0	0	18.2	100	81.8	
10	10	0	0	0	0	100	100	
12	12	0	0	0	0	100	100	
14	14	0	0	0	0	100	100	
16	16	0	0	0	0	100	100	

表 4 不同深度样本的鉴定情况

3 讨论与结论

3.1 转基因位点鉴定

转基因生物的安全性一直是备受关注的焦点,涉及转基因操作技术安全问题与转基因产品安全性评估。在这方面,文献[37]已对转基因水稻可能给土壤质量和土壤生物带来的影响进行了深入研究。准确掌握转基因插入位点,对评估转基因生物安全性极为关键。本研究运用全基因组测序技术,针对两个前期构建的家蚕转基因品系开展了插入位点定位及后续验证工作。序列分析结果表明:TransGene_1的插入位点位于1号染色体1899494 bp与1899495 bp之间;TransGene_2的插入位点位于21号染色体959510 bp与959515 bp之间,这两个插入位点均属于基因间区。具体来说,TransGene_1插入位点距离上游基因KWMTBOMO000591173 bp,距离下游基因KWMTBOMO00603194 bp;TransGene_2插入位点距离上游基因上游基因KWMTBOMO1235430067 bp。

本研究借助全基因组测序技术精确鉴定了两个转基因品系的插入位点,并设计了检测引物,用于对转 基因品系插入位点进行准确分型。这些检测引物不但可用于转基因品系的追踪与鉴别,而且可作为分子标 记在其育种、选育中发挥作用。

3.2 鉴定准确性对测序深度的依赖性分析

本研究在测序深度为 20×时,成功借助全基因组测序数据对插入位点予以鉴定,这表明在此测序深度 下能够获取同时包含载体与基因组序列的 reads。通常而言,较高的测序深度可提升捕获特定 reads 的概 率^[38],但相应地会使测序费用与分析成本增加。本研究探究了测序深度对位点鉴定准确性的影响。利用现 有数据开展不同深度的模拟测试,结果显示,最低测序深度为 6×时即可实现对插入位点的准确鉴定。有 趣的是,本研究采用两份数据进行相同的模拟测试,然而另一份具有较多 clean bases 的材料却需在测序深 度为 10×的条件下方能完成鉴定任务,这或许是不同测序文库及插入位点的保守性存在差异所致。

在将全基因组测序与生物信息学手段相结合进行分析时,充足的高质量数据至关重要。文献[39]利用 测序深度达 182×的全基因组测序数据,针对快速循环育种中的转基因苹果 T1109 开展转基因插入验证, 并与测序深度为 167×的野生型苹果进行比较,结果表明在转基因苹果 T1109 中未检测到意外的转基因插 入事件;文献[40]于测序深度为 8×的转基因小鼠中成功鉴定出 Pmel-1 TCR α 和β转基因的基因组插入位 点,这与本研究得出的最低测序深度(6×)相近。更高的测序深度能够获取更多的高质量数据,在运用生物 信息学手段进行分析时能得到更精确的结果,但同时也可能致使假阳性结果增多。文献[41]对 G2-6 转基 因水稻进行了 T-DNA 插入位点鉴定,在测序深度为 70×时发现 3 条非水稻同源序列的 reads,并通过实验 证实这是由污染导致的假阳性。所以,在运用全基因组测序技术进行转基因位点鉴定时,应当结合物种特 性以及插入基因的特点,选取适宜的测序深度。 参考文献:

- [1] 龚晓平, 王楠, 况晓明, 等. 利用 RNA 干涉研究水稻 OsROSES1 基因的功能 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2020, 42(6): 1-10.
- [2] 雷建军,朱张生,陈长明,等.辣椒分子育种研究进展 [J].西南大学学报(自然科学版),2023,45(7):1-20.
- [3] JIANG L, WANG G H, CHENG T C, et al. Resistance to Bombyx Mori Nucleopolyhedrovirus via Overexpression of an Endogenous Antiviral Gene in Transgenic Silkworms [J]. Archives of Virology, 2012, 157(7): 1323-1328.
- [4] MATSUMOTO Y, ISHII M, ISHII K, et al. Transgenic Silkworms Expressing Human Insulin Receptors for Evaluation of Therapeutically Active Insulin Receptor Agonists [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2014, 455(3-4): 159-164.
- [5] MA L, XU H F, ZHU J Q, et al. Ras1(CA) Overexpression in the Posterior Silk Gland Improves Silk Yield [J]. Cell Research, 2011, 21(6): 934-943.
- [6] KUWANA Y, SEZUTSU H, NAKAJIMA K I, et al. High-Toughness Silk Produced by a Transgenic Silkworm Expressing Spider (Araneus Ventricosus) Dragline Silk Protein [J]. PLoS One, 2014, 9(8): e105325.
- [7] KIM S W, YUN E Y, CHOI K, et al. Expression of the Blue Fluorescent Protein in Fibroin H-Chain of Transgenic Silkworm [J]. International Journal of Industrial Entomology, 2014, 52: 25-32.
- [8] ZHANG Y, ZHOU X, GE X, et al. Insect-Specific MicroRNA Involved in the Development of the Silkworm Bombyx-Mori [J]. PLoS One, 2009, 4(3): e4677.
- [9] XU X, WANG Y H, LIU Z L, et al. Disruption of Egg-Specific Protein Causes Female Sterility in Bombyx Mori [J]. Insect Science, 2022, 29(1): 128-138.
- [10] HAMILTON C A, STLAURENT R A, DEXTER K, et al. Phylogenomics Resolves Major Relationships and Reveals Significant Diversification Rate Shifts in the Evolution of Silk Moths and Relatives [J]. BMC Evolutionary Biology, 2019, 19(1): 182.
- [11] GREEN M R, SAMBROOK J. Southern Blotting [J]. Cold Spring Harbor Protocols, 2021, 2021(7): 269-280.
- [12] ZIMMERMANN A, LÜTHY J, PAULI U. Event Specific Transgene Detection in Bt11 Corn by Quantitative PCR at the Integration Site [J]. LWT-Food Science and Technology, 2000, 33(3): 210-216.
- [13] TERAUCHI R, KAHL G. RapidIsolation of Promoter Sequences by TAIL-PCR: The 5'-Flanking Regions of Pal and Pgi Genes from Yams (Dioscorea) [J]. Molecular & General Genetics, 2000, 263(3): 554-560.
- [14] LI A H, ZHANG Y F, WU C Y, et al. Screening for and Genetic Analysis on T-DNA-Inserted Mutant Pool in Rice [J]. Acta Genetica Sinica, 2006, 33(4): 319-329.
- [15] TAMURA T, THIBERT C, ROYER C, et al. Germline Transformation of the Silkworm Bombyx Mori L. Using a piggyBac Transposon-Derived Vector [J]. Nature Biotechnology, 2000, 18(1): 81-84.
- [16] MAZARS G R, THEILLET C. Direct Sequencing by Thermal Asymmetric PCR [J]. Methods in Molecular Biology, 2003, 226: 355-360.
- [17] NAN G L, WALBOT V. Plasmid Rescue: Recovery of Flanking Genomic Sequences from Transgenic Transposon Insertion Sites [J]. Methods in Molecular Biology, 2009, 526: 101-109.
- [18] 徐纪明,朱建树,李梦真,等. 侧翼序列获取技术研究进展 [J]. 遗传, 2022, 44(4): 313-321.
- [19] POLKO J K, TEMANNI M R, VAN ZANTEN M, et al. Illumina Sequencing Technology as a Method of Identifying T-DNA Insertion Loci in Activation-Tagged Arabidopsis Thaliana Plants [J]. Molecular Plant, 2012, 5(4): 948-950.
- [20] SCHOUTEN H J, VANDEGEEST H, PAPADIMITRIOU S, et al. Re-Sequencing Transgenic Plants Revealed Rearrangements at T-DNA Inserts, and Integration of a Short T-DNA Fragment, But No Increase of Small Mutations Elsewhere [J]. Plant Cell Reports, 2017, 36(3): 493-504.
- [21] PENG C, MEI Y T, DING L, et al. Using Combined Methods of Genetic Mapping and Nanopore-Based Sequencing Technology to Analyze the Insertion Positions of G10evo-EPSPS and Cry1Ab/Cry2Aj Transgenes in Maize [J]. Frontiers in Plant Science, 2021, 12: 690951.
- [22] SIDDIQUE K, WEI J J, LI R, et al. Identification of T-DNA Insertion Site and Flanking Sequence of a Genetically Modified Maize Event IE09S034 Using Next-Generation Sequencing Technology [J]. Molecular Biotechnology, 2019, 61(9):

694-702.

- [23] NIU L, HE H L, ZHANG Y Y, et al. Efficient Identification of Genomic Insertions and Flanking Regions Through Whole-Genome Sequencing in Three Transgenic Soybean Events [J]. Transgenic Research, 2021, 30(1): 1-9.
- [24] GUO B F, GUO Y, HONG H L, et al. Identification of Genomic Insertion and Flanking Sequence of G2-EPSPS and GAT Transgenes in Soybean Using Whole Genome Sequencing Method [J]. Frontiers in Plant Science, 2016(7): 1009.
- [25] PARK D, KIM D, JANG G, et al. Efficiency to Discovery Transgenic Loci in GM Rice Using Next Generation Sequencing Whole Genomere-Sequencing [J]. Genomics & Informatics, 2015, 13(3): 81-85.
- [26] XU W T, ZHANG H W, ZHANG Y C, et al. A Paired-End Whole-Genome Sequencing Approach Enables Comprehensive Characterization of Transgene Integration in Rice [J]. Communications Biology, 2022, 5(1): 667.
- [27] JACOBSEN J C, ERDIN S, CHIANG C, et al. Potential Molecular Consequences of Transgene Integration: The R6/2 Mouse Example [J]. Scientific Reports, 2017(7): 41120.
- [28] AKTARY Z, CORVELO A, ESTRIN C, et al. Sequencing Two Tyr: CreERT2 Transgenic Mouse Lines [J]. Pigment Cell & Melanoma Research, 2020, 33(3): 426-434.
- [29] WANG Q, SHI N N, SHANG Y, et al. Comprehensive Molecular Characterization of a Transgenic Pig Expressing hCD46 Gene [J]. Gene, 2017, 626: 376-385.
- [30] 魏强,奥岩,杨漫漫,等.利用全基因组重测序技术鉴定五指山猪 GHR 突变体转基因插入位点 [J].遗传,2021, 43(12):1149-1158.
- [31] 田凤鸣, 陈强, 何九军, 等. 花椒根腐病拮抗菌株 W-1 基因组测序及抑菌机理研究 [J]. 南方农业学报, 2024, 55(6): 1639-1652.
- [32] 方慧仪,梁雨薇,李昕苑,等. 月月粉月季 NUDIX 基因家族的鉴定与表达分析 [J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版),2024,50(6): 852-866.
- [33] 王君妍, 王峰, 龚瑶, 等. 月季 P450 基因家族及其参与月季花香形成基因的鉴定 [J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2025, 51(1): 54-66.
- [34] DANECEK P, BONFIELD J K, LIDDLE J, et al. Twelve Years of SAMtools and BCFtools [J]. GigaScience, 2021, 10(2): giab008.
- [35] KAWAMOTO M, JOURAKU A, TOYODA A, et al. High-Quality Genome Assembly of the Silkworm, Bombyx Mori[J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2019, 107: 53-62.
- [36] LU K P, PAN Y F, SHEN J H, et al. SilkMeta: a Comprehensive Platform for Sharing and Exploiting Pan-Genomic and Multi-Omic Silkworm Data [J]. Nucleic Acids Research, 2024, 52(D1): D1024-D1032.
- [37] 谷荣辉,成功,李建钦,等.转基因水稻对土壤性质及土壤生物的影响[J].云南农业大学学报(自然科学),2014, 29(3):448-457.
- [38] AJAY S S, PARKER S C J, ABAAN H O, et al. Accurate and Comprehensive Sequencing of Personal Genomes [J]. Genome Research, 2011, 21(9): 1498-1505.
- [39] PATOCCHI A, KEILWAGEN J, BERNER T, et al. No Evidence of Unexpected Transgenic Insertions in T1190-A Transgenic Apple Used in Rapid Cycle Breeding-Following Whole Genome Sequencing [J]. Frontiers in Plant Science, 2021, 12: 715737.
- [40] JI Y, ABRAMS N, ZHU W, et al. Identification of the Genomic Insertion Site of Pmel-1 TCR α and β Transgenes by Next-Generation Sequencing [J]. PLoS One, 2014, 9(5): e96650.
- [41] WANG X J, JIAO Y, MA S, et al. Whole-Genome Sequencing: an Effective Strategy for Insertion Information Analysis of Foreign Genes in Transgenic Plants [J]. Frontiers in Plant Science, 2020, 11: 573871.

责任编辑 廖坤