

抗嘉磷塞基改大豆之 CP4 EPSPS 西方墨點法免疫分析

袁秋英*、林李昌、謝玉貞、蔣慕琰

Western Blot Immunoassay of Glyphosate Tolerant Genetic Modified Soybean Based on CP4 EPSPS

Chiou-Ing Yuan*, Li-Chang Lin, Yu-Chen Hsieh and Mou-Yen Chiang

摘自「作物、環境與生物資訊」期刊，2006，3(3):239-248

Reprinted from *Crop, Environment & Bioinformatics*, 3(3):239-248, 2006

抗嘉磷塞基改大豆之 CP4 EPSPS 西方墨點法免疫分析

袁秋英*、林李昌、謝玉貞、蔣慕琰
行政院農業委員會農業藥物毒物試驗所公害防治組

摘要

本研究以自備之抗嘉磷塞 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (Agrobacterium sp. strain CP4, CP4 EPSPS) 抗體，利用西方墨點法(Western blot)探討 CP4 EPSPS 抗體之靈敏度及專一性，以及大豆相關加工品之檢測。由抗嘉磷塞大豆 (Roundup Ready® Soybean, RRS)葉片抽取 genomic DNA，設計 CP4 EPSPS 基因含 *Hind* III 及 *Xho* I 切位之引子，進行 PCR 反應，於抗嘉磷塞大豆植材的基因組 DNA 中可增幅約 380 bp 的核酸片段，非抗嘉磷塞者則無此核酸片段。經由轉殖於大腸桿菌，選殖含約 380 bp inserted DNA 的單一菌株，確證此增幅之核酸片段為 CP4 EPSPS 第²⁰⁶Met 至³²⁵Ile 胺基酸，長度為 375 bp。將此 PCR 產物接合於 pET-28a (+)載體，再轉殖於大腸桿菌 BL21 strain，以 IPTG 誘導 CP4 EPSPS 融合蛋白質表現，經純化回收單一蛋白質(約 16 KDa)製備為 CP4 EPSPS 多株抗體。以 Roundup Ready®大豆標準品(0、0.1、0.5、1、2、5 及 100%)、抗嘉磷塞及非基改之大豆葉片與種子、傳統市場及超市之豆漿、豆腐、豆花以及豆干樣品，進行西方墨點免疫分析。結果顯示總蛋白質含量約 20 µg 之大豆標準品(0.5%以上)皆可於約 47 KDa 處

呈現一明顯條帶。抗嘉磷塞大豆葉片的 CP4 EPSPS 蛋白質含量為種子的 3 倍以上。傳統市場及超市未標示為非基改之豆漿、豆腐及豆花樣品，皆可檢出 CP4 EPSPS 蛋白質。本研究自製之 CP4 EPSPS 抗體，具有發展為酵素連結免疫吸附法 (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA) 及免疫條帶法(strip)之潛力，可應用於快速及大量篩檢含 CP4 EPSPS 轉基因作物。

關鍵詞：基因改造生物體、大豆、嘉磷塞抗藥性、CP4 EPSPS、免疫分析、西方墨點法。

Western Blot Immunoassay of Glyphosate Tolerant Genetic Modified Soybean Based on CP4 EPSPS

Chiou-Ing Yuan*, Li-Chang Lin, Yu-Chen Hsieh and Mou-Yen Chiang

Taiwan Agricultural Chemicals and Toxic Substances Research Institute, Wufeng, Taichung Hsien 41358, Taiwan ROC

ABSTRACT

In this study, lab-made antibody and western blot were used to investigate the sensitivity and specificity of immunoassay for glyphosate tolerant soybean and related food

縮寫字：GMO, Genetically Modified Organism; RRS, Roundup Ready® Soybean; EPSPS, 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase; PEP, phosphoenolpyruvate; PCR, polymerase chain reaction; NCBI, National Center for Biotechnology Information; Met, Methionine; Ile, Isoleucine; ELISA, Enzyme-linked Immunosorbent Assay.

* 通信作者, yci@tactri.gov.tw

投稿日期：2006 年 4 月 18 日

接受日期：2006 年 5 月 19 日

作物、環境與生物資訊 3:239-248 (2006)

Crop, Environment & Bioinformatics 3:239-248 (2006)

189 Chung-Cheng Rd., Wufeng, Taichung Hsien 41301, Taiwan ROC

products. Genomic DNA was extracted from glyphosate tolerant GM soybean and PCR was run using primers with *Hind* III and *Xho* I sites for CP4 EPSPS. The ca. 380 bp fragment was transformed to *E. coli* DH5 α . Subsequent selection of transformed cell and sequencing of DNA showed that amplified fragment was 375 bp and was translated to ²⁰⁶Met to ³²⁵Ile of CP4 EPSPS. The 375 bp fragment was constructed on Pet-28a (+) vector and transformed to *E. coli* BL21 for further multiplication of CP4 EPSPS. The ca. 16 KDa protein was purified and used as antigen for production of polyclonal antibody. Western immunoblot assay using anti-CP4 EPSPS polyclonal antibody demonstrated that standard Roundup Ready Soybeans[®] at 20 μ g total protein level could be detected. This lab-made polyclonal antibody was also effective for detection of seeds and living plants of Roundup Ready Soybeans[®] as well as processed products such as seeds, soymilk and Tufu.

Key words: Genetically Modified Organism (GMO), Soybean, Glyphosate-resistance, CP4 EPSPS, Immunoassay, Western blot.

前言

2005 年全球基因改造生物體 (Genetically Modified Organism, GMO) 之栽種面積已達九千萬公頃，其中主要之基改作物為大豆、玉米、棉花及油菜，改良的性狀以抗除草劑作物佔 71%，抗蟲作物佔 18%，兼具抗蟲及抗除草劑作物佔 11% (Global Knowledge Center on Crop Biotechnology 2006)。目前主要上市之抗除草劑轉基因大豆為抗嘉磷塞大豆 (Roundup Ready[®] Soybean, RRS)。嘉磷塞 glyphosate ((N-phosphomethyl) glycine) 為臺灣最重要之非選擇性萌後除草劑，於 1970 年代早期登記使用，其主要作用位置為 shikimic acid 代謝路徑中 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS)，嘉磷塞與受質 phosphoenolpyruvate (PEP) 產生競爭性之抑制且阻止 EPSPS preprotein 運移至葉綠

體 (Amrhein *et al.* 1980, Della-Cioppa *et al.* 1986)，造成苯丙胺酸 (phenylalanine)、酪胺酸 (tyrosine) 及色胺酸 (tryptophan) 三種芳香族胺基酸含量降低，影響蛋白質之合成，進而抑制植物生長 (Amrhein *et al.* 1980, Kishore and Shah 1988)，達成防除雜草之目的。抗嘉磷塞基改大豆為孟山都公司研發之基因工程產品，其利用基因槍技術，將農桿菌 *Agrobacterium* sp. strain CP4 之 EPSPS 基因 (簡稱 CP4 EPSPS) 轉殖於大豆，由於此 CP4 EPSPS 酶對嘉磷塞之親和性低，且可與其受質 PEP 緊密結合，使 shikimic acid 路徑正常運作，此轉基因大豆植株，噴施嘉磷塞可正常生長，無任何傷害徵狀 (Padgett *et al.* 1995)。

臺灣市售之大豆多為進口，2004 年進口之大豆為 203 萬公噸，其中 80% 以上來自美國及巴西 (Agricultural Trade Statistics of the Republic of China 2004)。由於基因改造作物可能有基因污染、野草化、非目標生物之毒害及食物鏈破壞等生態環境問題；食品、飼料用基因改造產品亦可能存在毒性及過敏性等安全性問題 (Ammann *et al.* 2001, Perderson *et al.* 2001)。因此，基因改造作物轉基因特性之研究，及其相關產品標準鑑定方法及標示制度之建立，為當前進口農產品檢測之重要課題。

由於目前之轉基因大豆及玉米等作物大部份利用花椰菜嵌紋病毒之啟動子 (35S promoter)、nopaline synthase 基因之 3' nontranslated region (NOS terminator) 及標的基因所構築，文獻所見之 DNA 定性分析，大都以 35S 啟動子及 NOS 終結子設計引子，先進行篩選式 PCR 檢測，再以標的基因設計專一性引子，進一步再以 PCR 技術確認之 (Hübner *et al.* 1999, Kuiper 1999, Lipp *et al.* 1999)。近年臺灣亦針對玉米、大豆等主要基改作物發展 PCR 檢測方法及技術，包括行政院衛生署、臺灣大學及本所 (Chiueh *et al.* 2001, Jeng *et al.* 2003, Lin *et al.* 2001, Yuan

and Chiang 2002, Yuan *et al.* 2003, Yuan *et al.* 2006)。

現階段以免疫法分析植物蛋白質表現的應用已相當普遍(Dumbroff *et al.* 1993)，同時也延伸於食品中蛋白質的免疫分析(Brett *et al.* 1999)，例如基改菸草及大豆之研究(Bindler *et al.* 1999, Lipp *et al.* 2000)。本研究針對抗嘉磷塞基改大豆，進行 CP4 EPSPS 抗體製備，利用西方墨點法，評估抗體之專一性及靈敏度，進而檢測基改大豆及其相關加工品，建立免疫分析之初步檢測系統。

材料與方法

一、藥品、儀器及大豆植材

一般試劑藥品購自 Merck (Whitehouse Station, USA)及 Sigma (Louis, USA)公司，基因組 DNA 抽取套組 DNeasy Plant Maxi kit 購自 Qiagen (Hilden, Germany)公司，plasmid DNA 抽取套組 miniprep system kit、DNA 純化回收套組 gel extraction kit 及 DNA marker (1 kb plus DNA Ladder) 購自吉恩馬克公司(臺中縣，臺灣)，PCR 試劑 (Fast Run)購自波仕特公司(臺北市，臺灣)，引子由明欣公司(臺北市，臺灣)合成，DNA 載體 (pGEM-T Easy Vector kit) 購自 Promega 公司 (Madison, USA)，pET-28a 載體購自 Novagen 公司(Madison, USA)。CP4 EPSPS 抗體由伯森生物科技公司(臺北市，臺灣)代理製備，具備 USDA licensed (number 93-R-283)及 NIH Animal Welfare Assured (number A4182-01) 動物房之認證。PCR 儀器 (Peltier Thermal Cycler PTC-200)為 MJ 公司(Waltham, USA)產品。DNA 定序儀 ABI PRISM 377-96 DNA Sequencer 為美國 Perkin-Elmer 公司產品。蛋白質電泳槽及轉漬器(semi-dry transfer cell)為 Bio-Rad 公司(Waltham, USA)產品。抗嘉磷塞大豆標準品為 Fluka 公司 (Ronkonkoma, USA)產品(包括 0、0.1、0.5、

1、2、5 及 100%)。RRS 大豆 RRS 種子、葉片及非基改大豆種子、葉片由前研究篩選所得者(Yuan and Chiang 2002)。豆漿、豆花、豆腐及豆干由中部傳統市場與超市購得。

二、基改大豆 CP4 EPSPS 特定片段之增幅

經由 National Center for Biotechnology Information (NCBI) GenBank (<http://www.ncbi.nih.gov/>)比對番茄、阿拉伯芥、牛筋草及華九頭獅子草之 EPSPS 與 CP4 EPSPS 胺基酸序列之差異，選取 CP4 EPSPS 胺基酸²⁰⁶Methionine (Met)至³²⁵Isoleucine (Ile)間的片段(Fig.1)，再依據抗嘉磷塞基改大豆 CP4 EPSPS 核酸序列(Yuan and Chiang 2002)，設計含 *Hind* III 及 *Xho* I 限制酶切位之引子，分別為 CP4-F (5'-CAAGCTTGCATGCTGCAGGGCTTTGGC-3') 及 CP4-R (5'-ATCCTCGAGAATCGGATATTCGTCGAT-3')。取 50 ng μl^{-1} 基改大豆之 DNA，加 1 μl 10 μM primer，利用 10 μl Fast-Run™ Taq Master Mix kit，加 37 μl 去離子水，總體積為 50 μl ，進行 PCR 反應 (Mullis and Erlich 1988)。起始變性溫度為 94°C 5 分鐘；變性溫度 94°C 30 秒，煉合溫度 52°C 30 秒，延展溫度 72°C 30 秒，循環 35 週期；最後延展溫度 72°C 7 分鐘。取 5 μl PCR 產物，加入樣品 0.1 倍體積之 bromophenol blue 染劑，注入於含 1.2% (w/v) agarose gel 之 0.5 X TBE 膠體，以 100 伏特電壓進行電泳分析，時間約 25 分鐘，取出膠體於紫外燈下觀察結果，所得 DNA 片段與 DNA Marker 比較，利用內差法估計長度。

三、PCR DNA 產物之確定

由 PCR 產物之電泳分析結果，割取約 380 bp 之 DNA，利用 gel extraction kit 將 DNA 從膠體中溶洗出，進行 ligation 及 transformation 步驟。取 3 μl 此 DNA，加於 pGEM-T Easy Vector kit (5 μl 2 X Rapid

MLHGASSRPATARKSSGLSGTVRIPGDKSISHRSFMFGGLASGETRITGL
 LEGEDVINTGKDMQAMGARIRKEGDTWIIDGVGNGLLAPEAPLDFGNAA
 TGCRLTMGLVGVYDFDSTFIGDASLTKRPMGRVNLNPLREMGVQVKSSEDGD
 RLPVTLRGPKTPTPI TYRVPMA SAQVKS AVLLAGL NTPG I TTVIEPI MTR
 *

DHTEKMLQGFGANLTVETDADGVRTIRLEGRGKLTGOVIDVPGDPSSTAF
PLVAALLVPGSDVTILNVLNPNTRTGLILTLQEMGADIEVINPRLAGGED
VADLRVRSSTLKGVTVPEDRAPSMIDEYPI LAVAAAFAEGATVMNGLEEL
 *

RVKESDRLSAVANGLKLNVDCEGETSLVVRGRPDGKGLGNASGAAVAT
 HLDHRIAMSFLVMGLVSENPTVDDATMIATSFPEFMDLMAGLGAKIELS
 DTKAA

Fig. 1. Amino acid sequence of CP4 EPSPS from *Agrobacterium* spp. Strain CP4 (Accession No. AF464188). The PCR amplified region was between ²⁰⁶Met and ³²⁵Ile position as indicated with asterisk (*) and underline mark.

Ligation buffer, 1 µl 50 ng pGEM-T Easy vector, 1 µl T4 DNA ligase), 於 16°C 反應 14~16 小時。取 200 µl 大腸桿菌(*Escherichia coli* DH5α strain) 加入接合反應之 10 µl DNA, 於 42°C 反應 2 分鐘, 放置於冰上 3 分鐘, 於 37°C 振盪培養 1 小時, 將菌液塗抹於 LB plate(含 isopropyl b-D-thiogalactoside (IPTG)、X-gal 及 ampicillin), 於 37°C 培養 14~16 小時, 選取白色單一菌株及具有 380 bp insert DNA 之 plasmid DNA 定序。利用 ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit, 以 DNA 定序儀定序。將 DNA 序列以 DNASTAR 軟體轉換成胺基酸序列, 以 NCBI 基因庫中 Blast 功能比對基因序列。

四、CP4 EPSPS 融合蛋白之大量表現、純化及多株抗體製備

PCR 產物經以 T4 DNA ligase 於 16°C 反應 14~16 小時, 接合於 pET-28a (+) 載體(Fig. 3 (A)), 再轉殖於大腸桿菌 BL21 (DE3) strain, 經由 1 mM IPTG 之誘導, 於 20°C 培養 16 小時, 以 6,500 xg 離心 10 分鐘, 添加

蛋白萃取液, 利用超音波(75 Watt, 10%)破菌, 以 1,5000 xg 離心 10 分鐘, 取上層液。經 Ni-NTA superflow 樹脂之純化, 回收約 2.4 mg CP4 EPSPS, 將 CP4 EPSPS 蛋白質注入 2.5 kg 紐西蘭兔之皮下組織, 進行多株抗體之製備, 二週後再行第二次注射, 再經 10 日後進行採血, 分離血清, 並測試抗體效價(titer), 以稀釋 1000-2000 倍抗體進行西方墨點分析。

五、西方墨點分析(Western blot)

取約 0.2 g 檢測樣品, 包括 RRS 標準品(0、0.1、0.5、1、2、5 及 100%)、抗嘉磷塞大豆葉片及種子、非基改大豆葉片及種子、傳統市場之豆漿、豆腐及豆花樣品各 3 件; 超市之豆漿、豆腐及豆干樣品各 4 件。以緩衝液(100 mM Tris pH 7.0, 1 mM glutathione, 10 mM EDTA, 5 mM DTT, 1 mM benzamidine, 20% glycerol) 1:5 (W:V) 萃取總蛋白質。經由於 13,000 xg 離心(4°C), 上清液以 Bradford 方法(Bradford 1976) 定量, 取約 20 µg 蛋白質, 以 35 mA 電流進行 12% SDS-PAGE 膠體電泳分析。利用 semi-dry transfer cell 以 200 mA 反應 1 小時, 將

SDS-PAGE 膠體上之蛋白質轉漬於 PVDF 膜。以 20 ml phosphate buffer (PBS, pH 7.4) 加 0.1% Tween-20 及 1g 脫脂奶粉為 blocking buffer (Sambrook and Russell 2001), 加於轉漬膜反應 14-16 小時, 以 PBS-T 清洗 3 次, 各 5 分鐘, 再以 40 ml PBS-T 加 40 μ l CP4 EPSPS 抗體, 於室溫下反應 1 小時, 以 PBS-T 清洗 2 次, 各 10 分鐘, 添加 30 ml PBS-T 及 3 μ l alkaline phosphatase 二次抗體, 於室溫下反應 1 小時, 以 PBS-T 清洗 3 次, 各 10 分鐘。添加 4 ml bCIP/NBI reagent 呈色, 再以 PBS-T 停止呈色反應。

結果

一、RRS 基改大豆 CP4 EPSPS 特定片段之增幅

基改大豆基因組 DNA 經由以 CP4-F 及 CP4-R 為引子之 PCR 反應, 可增幅約 380 bp 的核酸片段, 非基改大豆經 PCR 反應則無此

片段(Fig. 2), 以無菌之去離子水取代 DNA 樣品之負對照組亦無此核酸片段。

二、PCR 產物—抗藥基因(CP4 EPSPS)解序

將 PCR 產物由膠體溶洗出, 經接合、轉殖、抽取 plasmic DNA 及確認單一菌株之 insert DNA 為約 380 bp 者, 以此菌株的 plasmid DNA 解序, 由 insert DNA 解序結果, 經轉換為胺基酸序列, 與 NCBI 基因庫比對 CP4 EPSPS 之胺基酸序列(accession No. AB209952), 顯示約 380 bp 的 PCR 產物的確為 CP4 EPSPS 基因的部份片段, 確實之長度為 375 bp, 經轉譯後為 CP4 EPSPS 胺基酸²⁰⁶Met 至³²⁵Ile 間的片段(Fig.1)。

三、CP4 EPSPS 融合蛋白之表現及純化

PCR 產物經由限制酵素 *Hind* III 及 *Xho* I 反應, 接合於 pET-28a (+)載體(Fig. 3 (A)), 轉殖於大腸桿菌, 再以 IPTG 誘導表現, 結果可於 16 KDa 處呈現蛋白質含量明顯增加

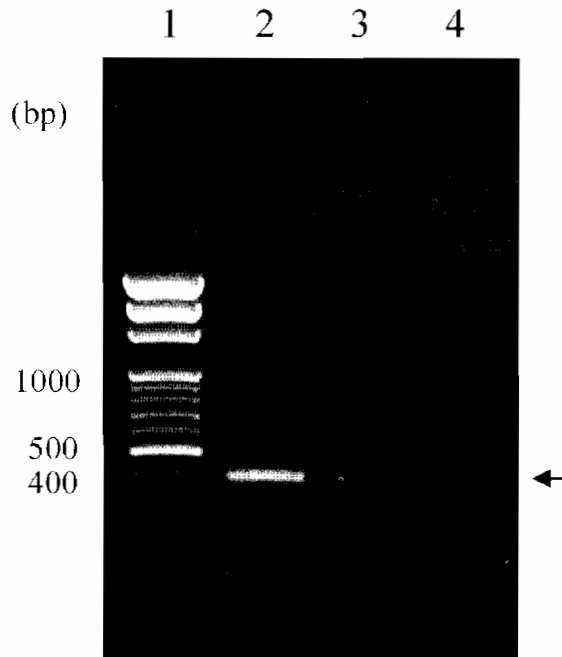


Fig. 2. Genomic DNA of glyphosate-resistant soybean (Roundup Ready® Soybean, RRS) was amplified by PCR using CP4-F/CP4-R primer pair. Lane 1 to 4 were DNA marker, RRS, non-GM soybean and distilled water, respectively.

現象(Fig. 3 (B), lane 3), 僅大腸桿菌之蛋白 (lane 1)或僅轉殖 pET-28a (+)載體者(lane 2), 於 16 KDa 處皆無此現象。大量製備 CP4 EPSPS 蛋白, 再經由 Ni-NTA superflow 樹

脂之反應, 即可獲得純化之 CP4 EPSPS(Fig. 3 (B), lane 4)。割取此純化的蛋白質, 回收約 2.4 mg CP4 EPSPS 蛋白質, 進行多株抗體之製備。

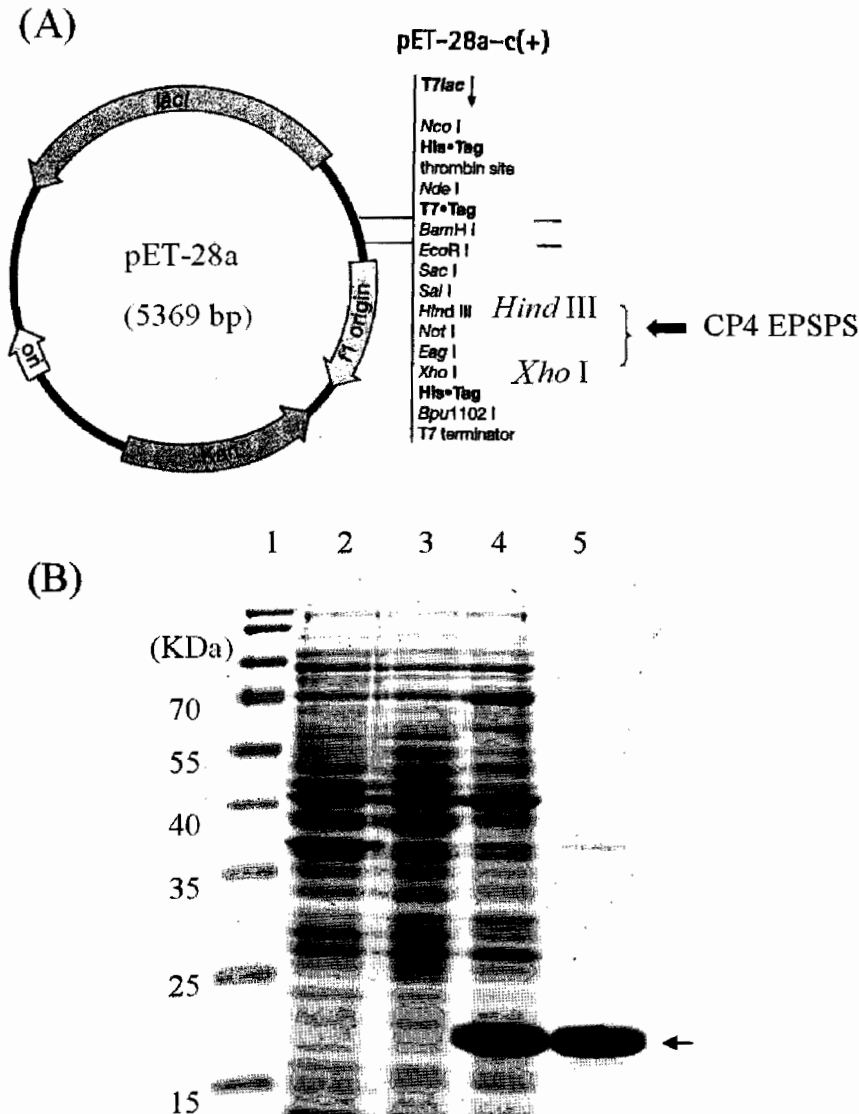


Fig. 3. Induction and purification of CP4 EPSPS fusion protein from Roundup Ready® Soybean by IPTG in pET-28a transformed cell. (A) Construction of His-CP4 EPSPS fusion gene. A 375 bp cDNA fragment encoding the 16.0 KDa CP4 EPSPS was inserted into the pET-28a expression vector at *Hind* III and *Xho* I site. (B) Induction and purification of CP4 EPSPS fusion protein. Lane 1, protein marker; lane 2, total protein of *Escherichia coli* BL21 cell; lane 3, total protein of pET-28a vector-transformed *E. coli*; lane 4, total protein of CP4 EPSPS-transformed *E. coli* induced with 0.1 mM IPTG; and lane 5, purified CP4 EPSPS from transformed *E. coli*.

四、西方墨點分析

20 μ g 總蛋白質之 RRS 大豆標準品(0、0.1、0.5、1、2、5 及 100%)，經電泳分析及轉漬反應，結果 0.1%大豆標準品即可於約 47 KDa 呈現弱條帶，0.5%以上大豆標準品條帶較明顯(Fig. 4A)，且大豆標準品 CP4 EPSPS 含量越高，條帶呈色越強。以 20 μ g 總蛋白質之 RRS 大豆葉片及種子、非基改大豆葉片及種子進行檢測，結果僅 RRS 大豆葉片及種子可呈現約 47 KDa 的條帶(Fig. 4B)，非基改大豆葉片及種子樣品則無此條帶。其中 RRS 大豆葉片的 CP4 EPSPS 蛋白質表現量，比種子的 CP4 EPSPS 含量多 3 倍以上(Fig. 4 (B), lane 7)。

經由以 CP4 EPSPS 抗體檢測傳統市場之豆漿、豆腐及豆花樣品，皆可於約 47 KDa 處呈現明顯條帶(Fig. 4C)。超市購得之豆漿及豆腐樣品，若於包裝盒上註明非基改者皆無 CP4 EPSPS 條帶，未註明者部份仍可檢出

含 CP4 EPSPS 蛋白質。豆干為高度加工之大豆產品，皆無檢出條帶。

討論

由 RRS 基改大豆 CP4 EPSPS 特定片段之 PCR 增幅結果，僅 RRS 大豆可增幅 380 bp 片段，非基改大豆及去離子水之增幅結果皆無此片段，初步結果顯示增幅的核酸片段應為轉基因 CP4 EPSPS。PCR 產物經大腸桿菌繁殖後解序，長度為 375 bp，轉譯後胺基酸序列與 NCBI GenBank 中 CP4 EPSPS (Accession No. AF464188) 比對，確證為 CP4 EPSPS 胺基酸²⁰⁶Met 至³²⁵Ile 間的片段。

此 CP4 EPSPS PCR 產物經由接合於 pET-28a (+)載體，轉殖於大腸桿菌，以 IPTG 誘導 CP4 EPSPS 融合蛋白的表現，結果可於 16 KDa 處呈現蛋白質含量明顯增加現象(Fig. 3 (B), lane 3)，表示 380 bp 的 CP4 EPSPS 核

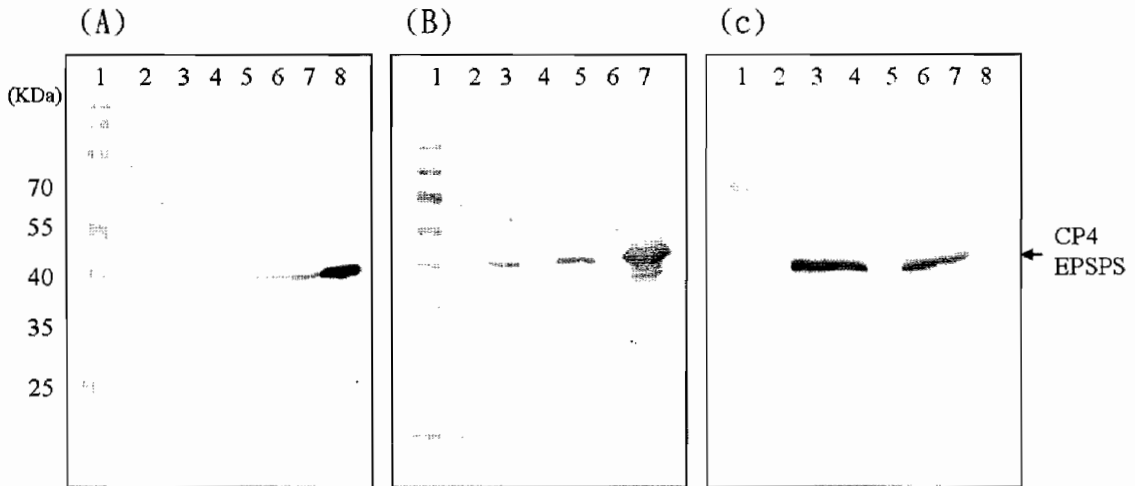


Fig. 4. Western blot of CP4 EPSPS gene in soybean and processed farm products. (A) Standard Roundup Ready Soybean from Fluka: lane 1 to 8 were 0, 0.1, 0.5, 1, 2, 5 and 100% (W/W), respectively. (B) Marketed soybean seed and green house raised soybean. Lane 1, protein marker; lane 2, 0% standard materials; lane 3, 5% standard materials; lane 4, non-GM soybean seed; lane 5, RRS seed; lane 6, non-GM soybean leaf; and lane 7, RRS leaf. (C) Samples of processed soybean products from local market. Lane 1, protein marker; lane 2, 0% standard materials; lane 3, 100% standard materials; lane 4, soybean milk from traditional marker; lane 5, soybean milk from supermarket; lane 6, tofu pudding from traditional market; lane 7, bean curd from traditional market; and lane 8, Dried tofu from supermarket.

酸片段，可於轉殖的大腸桿菌中大量生產 CP4 EPSPS 融合蛋白，經由純化後製備為 CP4 EPSPS 多株抗體。

本研究自製之 CP4 EPSPS 抗體，以 RRS 的種子、葉片或加工品進行西方墨點分析，皆只呈現約 47 KDa 處的單一條帶，非基改大豆的種子及葉片無 47 KDa 的條帶，顯示此 CP4 EPSPS 抗體之專一性良好，同時未與大豆原有之 EPSPS 雜合而呈色。一般而言，易造成抗體及抗原發生非專一性結合的原因包括：蛋白質構型相似度、酚酸類化合物干擾、酵素抑制劑或脂肪酸造成抗體變性等 (Anklam *et al.* 2002)，此等干擾因素並未出現於本研究中。根據 AGBIOS GM database (<http://64.26.159.139/dbase.php>) 資料顯示，RRS 只有一組轉基因 CP4 EPSPS DNA，但 Padgett *et al.* (1995) 的研究報導，其 35S promoter 經修飾後，可於 RRS 轉植株內大量表現 CP4 EPSPS，由免疫分析，可明顯發現 RRS 葉片的 CP4 EPSPS 蛋白質含量相當豐富，比種子的 CP4 EPSPS 含量多 3 倍以上 (Fig. 4 (B), lane 7)。

以 RRS 標準品測試 CP4 EPSPS 抗體的靈敏度，結果顯示 0.1% RRS 以 20 μ g 總蛋白質，即可於約 47 KDa 處呈現弱條帶，0.5% RRS 條帶更明顯。孟山都公司亦曾製備 CP4 EPSPS 的多株抗體 (Rogan *et al.* 1999)，文獻中未呈現製備為 CP4 EPSPS 抗體之胺基酸片段位置及長度，經由西方墨點分析結果之檢測極限為 0.25%。

影響免疫方法檢測基改作物效率的可能原因為：檢體中轉基因含量過低，或是加工品經加熱處理，造成蛋白質變性，降低與抗體辨識的親和性之故 (Anklam *et al.* 2002)。本研究中檢測傳統市場之豆漿、豆腐及豆花樣品，以及超市中未註明非基改之豆漿、豆腐及豆花樣品，皆可於約 47 KDa 處呈現明顯條帶。然而，豆干為大豆高度加工品，CP4 EPSPS 蛋白質可能於加工過程斷裂或變性，因此無檢出條帶。

將西方墨點分析大豆標準品之結果與 PCR 方式檢測結果 (Kuiper 1999, Lin *et al.* 2001, Yuan and Chiang 2002) 比較，1 ng 0.1% 大豆標準品以 PCR 反應，即可明顯檢出，顯示 PCR 反應之靈敏度普遍高於以西方墨點法的免疫分析。然而 CP4 EPSPS 抗體之利用，可延伸發展為酵素鏈結免疫吸附法 (ELISA) 或條帶法 (strip)，此二方法具有可同步篩檢大量樣品、縮短檢測時間、無電泳分析之致癌廢棄物及降低檢測成本等優點，尤其條帶法具有可攜帶及 5-20 分鐘以內即可判讀測試結果的特性。歐洲 13 個聯盟國的 38 個實驗室，曾共同以市售之 ELISA 試劑組，進行 RRS 大豆粉的免疫分析，結果顯示 0.5% 及 1.0% RRS 定量檢出的正確度分別為 88.1% 及 95.2%，仍有 11.9% 及 4.8% 之錯誤結果 (Lipp and Anklam 2000)。行政院衛生署亦曾以市售之 ELISA 及 strip 試劑組，測試對 RRS 之靈敏度分別為 0.1% 及 0.3% (Lin *et al.* 2001)。Brunnert *et al.* (2001) 曾發表以 35S promoter 抗體研發的 PCR-ELISA 技術，做為初步篩檢 RRS 之用，雖然測試的靈敏度可介於 0.1-2.0% 之間，但僅分析 35S promoter，不易排除嵌紋病毒污染之誤判。因此，本研究自備的 CP4 EPSPS 抗體，具有發展為 ELISA 或 strip 免疫試劑之潛力。

誌謝

本研究承蒙行政院農業委員會經費補助『94 農科-13.2.3-藥-P2』計畫，謹致謝意。

引用文獻

- Agricultural Trade Statistics of the Republic of China (2004) p.203. (in Chinese) Council of Agriculture, Executive Yuan, Taipei.
- Ammann K, YP Jacot, RA Mazyad (2001) Safety of Genetically Engineered Plants: An Ecological Risk Assessment of Vertical Gene Flow. p.60-87. In: Safety of Genetically Engineered Crops. R Custers (ed.) Flanders Interuniversity Institute for Biotechnology, Zwijnaarde, Belgium.

- Amrhein N, B Deus, P Gehrke, HC Steinrücken (1980) The site of the inhibition of the shikimate pathway by glyphosate. **Plant Physiol.** 65:830-834.
- Anklam E, F Gadani, P Heinze (2002) Analytical methods for detection and determination of genetically modified organisms in agricultural crops and plant-derived food products. **Eur. Food Res. Technol.** 214:3-26.
- Bindler G, DBF Dorlhac, F Borne, E Gregg, Z Guo, H Klus, M Maunders, L Mueller, H Negishi, H Pijnenburg, M Ward, J Zuber (1999) Report of the task force genetically modified tobacco: detection methods CORESTA. p.77-148. Bulletin 1999-4, Cooperation Centre for Scientific Research relative to Tobacco, Paris, France.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochem.** 72: 248-254.
- Brett GM, SJ Chambers, L Huang, MRA Morgan (1999) Design and development of immunoassays for detection of proteins. **Food Control** 10: 401-406.
- Brunnert HJ, F Spener, T Börchers (2001) PCR-ELISA for CaMV-35S promoter as a screening method for genetically modified Roundup Ready Soybeans. **Eur. Food Res. Technol.** 213:366-371.
- Chiueh LC, YL Chen, DYC Shih (2001) Study on the detection method of six lines of genetically modified maize and processed foods. (in Chinese) p.117-133. Conference on the Detection and Regulation of Genetically Modified Food. Sep 20, 2001. Taipei.
- Della-Cioppa G, SC Bauer, BK Klein, DM Shah, RT Fraley, G Kishore (1986) Translocation of the precursor of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase into chloroplasts of higher plants in vitro. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 83:6873-6877.
- Dumbroff EB, S Gepstein (1993) Immunological methods for assessing protein expression in plants. p.207-223. *In: Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology.* BR Glick, JE Thompson (eds.) CRC, Washington New York London.
- GenBank of National Center for Biotechnology Information (2006) (<http://www.ncbi.nih.gov/>)
- Global Knowledge Center on Crop Biotechnology (2006) (<http://www.isaaa.org/kc/>)
- GM Database from AGRIS (2005) (<http://64.26.159.139/dbase.php>).
- Hübner P, E Studer, D Häfliger, M Stadler, M Stadler, C Wolf, M Looser (1999) Detection of genetically modified organisms in food: critical points for quality assurance. **Accred. Qual. Assur.** 4:292-298.
- Jeng ST, YT Shyu, TM Pan (2003) Detection of the genetically modified soybeans in processed foods. Food and Fertilizer Technology Center. p.1-10. (<http://www.ffc.agnet.org/library/article/tb161.html>)
- Kishore GM, DM Shah (1988) Amino acid biosynthesis inhibitors as herbicides. **Annu. Rev. Biochem.** 57: 627-663.
- Kuiper HA (1999) Summary report of the ILSI Europe workshop on detection methods for novel foods derived from genetically modified organisms. **Food Control** 10:339-349.
- Lin HY, JW Chiang, DYC Shih (2001) Detection of genetically modified soybeans by PCR method and immunoassay kits. **J. Food Drug Anal.** 9:160-166.
- Lipp M, E Anklam, JW Stave (2000) Validation of an immunoassay for detection and quantitation of a genetically modified soybean in food and food fractions using reference materials: interlaboratory study. **J. AOAC** 83:919-927.
- Lipp M, E Anklam, P Brodmann, K Pietsch, J Pauwels (1999) Results of an interlaboratory assessment of a screening method of genetically modified organisms in soy beans and corn. **Food Control** 10:379-383
- Mullis GT, HA Erlich (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science** 239:487-491.
- Padgett SR, KH Kolacz, X Delannay, DB Re, BJ LaVallee, CN Tinius, WK Rhodes, YI Otero, GF Barry, DA Eichholtz, VM Peschke, DL Nida,

- NB Taylor, GM Kishore (1995) Development, identification, and characterization of a glyphosate-tolerant soybean line. **Crop Sci.** 35:1451-1461.
- Perdersen J, FD Eriksen, I Knudsen (2001) Toxicity and Food Safety of Genetically Engineered Crops. p.27-59. *In: Safety of Genetically Engineered Crops.* R Custer (ed.) Flanders Interuniversity Institute for Biotechnology. Zwijnaarde, Belgium.
- Rogan GJ, YA Dudin, TC Lee, KM Magin, JD Astwood, NS Bhakta, JN Leach, PR Sanders, RL Fuchs (1999) Immunodiagnostic methods for detection of 5-Enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase in Roundup Ready® Soybeans. **Food Control** 10:407-414.
- Sambrook J, DW Russell (2001) Molecular Cloning: A laboratory manual. Third edition. Vol. 3-2. A8.52-A9.49 Cold Spring Harbor Lab. Press, New York. USA.
- Yuan CI, MY Chiang (2002) Detection and Genomic Characterization of Imported Soybean Resistant to Glyphosate. (in Chinese) **Taiwanese J. Agricul. Chem. Food Sci.** 40:119-128.
- Yuan CI, YC Hsieh, MY Chiang (2003) Characterization and detection of glufosinate resistant gene in corn products in Taiwan. (in Chinese) **Plant Prot. Bull.** 45:329-342.
- Yuan CI, YC Hsieh, LC Lin, MY Chiang (2006) Characterization and Detection of the Glyphosate-resistant Gene in Corn Products in Taiwan. (in Chinese) **Crop Environ. Bioinform.** 3:20-32.