

臺灣市售飼料玉米抗嘉磷塞基因特性及檢測利用之探討

袁秋英*、謝玉貞、林李昌、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

於 2005 年 1 月至 2 月期間收集一般雜糧店販售之飼料玉米，測定其種子發芽及幼株對嘉磷塞之反應，並由抗性植株葉片中分離核酸，探討抗藥基因之特性。將市售玉米於溫室內播種，於 4 葉齡幼苗期噴施嘉磷塞 (41% 溶液) 1.8 kg ha⁻¹，施藥後 5~7 日，多數玉米植株呈現傷害徵狀，並於 2 週內枯死，14 組測定樣品中均有抗藥性之植株，其所佔比率介於 0.9~3.7% 之間，應為抗嘉磷塞之轉基因玉米。再以嘉磷塞次致死劑量 0.5 kg ha⁻¹ 處理植株，區別感抗植株後，進一步抽取玉米幼葉之 genomic DNA，由花椰菜嵌紋病毒啟動子 (CaMV 35S promoter)、水稻 actin 基因啟動子及 nopaline synthase 基因之終結子 (NOS terminator) 核酸序列設計兩組引子，進行聚合酶鏈鎖反應，結果具抗藥之疑似轉基因玉米可分別擴增約 2.0 及 2.6 kb 片段或 2.1 kb 之單一片段，非抗藥植株則無此等 DNA 片段。PCR 產物經接合、轉型反應及定序，比對核酸及胺基酸序列，顯示 2.0 PCR 產物含水稻 actin promoter、阿拉伯芥 ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase small subunit (RuBisCo SSU) 之 chloroplast transit peptide (CTP)、CP4 EPSPS 及 NOS terminator 片段。2.6 kb 之基

因構築為 35S promoter、玉米熱休克蛋白 (SHP70) 基因、CP4 EPSPS 及 NOS terminator 片段。2.1 kb 片段則由水稻 actin promoter、向日葵 RuBisCo SSU 之 CTP、玉米 RuBisCo small subunit 之 CTP、修飾之玉米抗嘉磷塞 EPSPS 及 NOS terminator 等片段組成。顯示此 2 種玉米為似抗嘉磷塞之 NK603 及 GA21 品系。經由專一性引子之設計及 multiplex PCR 分析結果，可分別檢出 4 及 11 株抗嘉磷塞玉米為似 NK603 及 GA21 品系。市售之玉米粉、玉米仁、爆米花及玉米罐頭等食品以 multiplex PCR 分析，可檢出含抗嘉磷塞基因之玉米物料。

關鍵詞：基因改造生物體、玉米、嘉磷塞抗藥性、CP4 EPSPS 基因、修飾之玉米抗嘉磷塞 EPSPS 基因、複合-聚合酶鏈鎖反應。

Characterization and Detection of the Glyphosate-resistant Gene in Corn Products in Taiwan

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

Taiwan Agricultural Chemicals and Toxic Substances Research Institute, Council of Agriculture, Taichung Hsien 41358, Taiwan ROC

* 通信作者, yci@tactri.gov.tw

投稿日期：2005 年 10 月 12 日

接受日期：2006 年 1 月 12 日

作物、環境與生物資訊 3:20-32 (2006)

Crop, Environment & Bioinformatics 3:20-32 (2006)

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

縮寫字：GMO, Genetically Modified Organism; EPSPS, 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase; PEP, phosphoenolpyruvate; PCR, polymerase chain reaction; NCBI, National Center for Biotechnology Information; RuBisCo SSU, ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase small subunit; CTP, chloroplast transit peptide; SHP70, heat shock protein 70.

ABSTRACT

We germinated corn seeds collected from retail shops in central Taiwan and tested seedling tolerance against glyphosate. Of all 14 samples tested, seedlings survived herbicide treatment (1.8 kg ha⁻¹ foliar spray) ranged from 0.9-3.7%. These indicated that a small portion of marked feed corn was genetically modified for glyphosate tolerance. We extracted genomic DNA from leaves of seedlings survived low rate of glyphosate spray (0.5 kg ha⁻¹), and conducted PCR with two sets of primers (CaMV 35S promoter/NOS terminator, rice actin promoter/NOS terminator). PCR amplified fragments were 2.0 and 2.1 kb for promoter using rice actin and 2.6 kb using 35S. Nucleic acid sequences of these fragments were analyzed after conjugation and transformation. Comparison on nucleic and amino acid (NCBI, blast analysis) suggested that components of PCR fragments were: 1) actin promoter, chloroplast transit peptide (CTP) of RuBisCo small subunit from *Arabidopsis thaliana*, CP4 EPSPS and NOS terminator for 2.0 kb fragment; 2) 35S promoter, heat shock protein from maize (SHP70), CP4 EPSPS and NOS terminator for 2.6 kb fragment; 3) Rice actin promoter, CTP of RuBisCo small subunit from *Helianthus annuus*, CTP of RuBisCo small subunit from corn, modified EPSPS from corn and NOS terminator for 2.1 kb product. These results also suggested that genetically modified corn lines NK603 and GA21 were in our samples. Multiplex PCR using sequence based primers were conducted on seedlings and corn products. Analysis of 15 glyphosate tolerant seedlings showed that 4 and 11 were NK603 and GA21, respectively. Gene fragments, glyphosate-resistant related, were detected in 11 of 17 corn products that sampled in local market. Positive identified products included flour, kernel (fresh, canned), popcorn and corn flake.

Key words: GMO, Corn, Glyphosate resistance, CP4 EPSPS gene, Modified EPSPS of maize, Multiplex-PCR.

前言

2004 年全球基因改造生物體 (Genetically Modified Organism, GMO)之

栽種面積已達八千一百萬公頃，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 72%，抗蟲作物佔 19%，兼具抗蟲及抗除草劑作物佔 9% (Global Knowledge Center on Crop Biotechnology 2004, GM Database from AGBIOS 2005)。目前主要上市之抗嘉磷塞玉米有 NK603 及 GA21 兩種品系 (GM Database from AGBIOS 2005)，皆已於臺灣衛生署申請食品安全審查 (Genetically Modified Food 2003)。嘉磷塞 [glyphosate, (N-phosphomethyl) glycine] 為全球最常用之除草劑，近年之年產值達 30 億美元，佔全球農藥總額之 10% (Pesticide Action Network 2004)。臺灣於 1970 年代開始登記於水田畦畔、果園、新墾田、休閒田、非耕地及水生雜草之使用 (Fei and Wang 2004)，嘉磷塞之主要作用位置為 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 (Devine *et al.* 1993)，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，影響蛋白質之生合成，進而抑制植物生長 (Kishore and Shah 1988)，達成防除雜草之目的。抗嘉磷塞轉基因玉米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 基因或經修飾之玉米 EPSPS 基因轉殖於玉米 (AW x CW 自交系) (GM Database from AGBIOS 2005)，由於此 CP4 EPSPS 酶對嘉磷塞之親和性低，且可與受質 PEP 緊密結合，使 shikimic acid 路徑正常運作，此轉基因玉米植株，噴施嘉磷塞可正常生長，無任何傷害徵狀 (Hess 1996)。

臺灣市售飼料及雜糧用玉米多為進口，2002 年進口之玉米約為 500 萬公噸，其中 94% 來自美國 (Agricultural Trade Statistics

of the Republic of China 2003), 2004 年全球玉米 14% 為基因改造玉米, 美國之基改玉米約佔 45%, 含抗除草劑者佔 18% (Agricultural Statistics Board, U.S. Department of Agriculture 2004), 由於基因改造作物及產品可能經由基因外流或近親種雜交方式, 造成優勢品系野草化、生物物種單一化、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表現蛋白質、抗生素抗性基因之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與標示制度之建立, 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, 均以 35S 啟動子及 NOS 終結子設計引子, 先進行篩選式 PCR 檢測, 再以標的基因設計引子, 進一步以 PCR 技術確認之 (Hübner *et al.* 1999, Kuiper 1999, Lipp *et al.* 1999, Matsuoka 2000)。近年國內已針對玉米、大豆等主要栽培基改作物發展檢測方法及技術, 包括行政院衛生署、臺灣大學及農委會藥毒所 (Chiueh *et al.* 2001, Jeng *et al.* 2003, Lin *et al.* 2000, Yuan and Chiang 2002, Yuan *et al.* 2003)。由於抗嘉磷塞玉米品系構築之轉基因組成不同, 因此本研究針對抗嘉磷塞轉基因玉米進行抗藥特性、CP4 EPSPS 與經修飾之玉米 EPSPS 等轉基因解序、multiplex PCR 鑑定方法之建立, 並進而檢測玉米相關之加工產品。

材料與方法

一、藥品及儀器

一般試劑藥品購自德國 Merck 公司及美國 Sigma 公司, 嘉磷塞異丙胺鹽

(glyphosate, 41% 溶液) 購自臺灣億豐公司。基因組 DNA 抽取套組 DNeasy Plant Maxi kit 及 multiplex PCR kit 購自德國 Qiagen 公司, plasmid DNA 抽取套組 miniprep system kit、DNA 純化回收套組 gel extraction kit 及 PCR 試劑購自臺灣 Viogene 公司, DNA marker (1 kb plus DNA Ladder) 購自臺灣吉恩馬克公司, 引子由臺灣明欣公司合成, DNA 載體 (pGEM-T Easy Vector kit) 購自美國 Promega 公司。DNA 定序試藥 (ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit) 購自美國 PE Applied Biosystems 公司。PCR 儀器 Gene Amp PCR system 2400 及 DNA 定序儀 ABI PRISM 377-96 DNA Sequencer 為美國 Perkin-Elmer 公司產品。

二、臺灣市售玉米嘉磷塞抗性之藥劑測定

2005 年 1 月至 2 月期間於臺灣中部地區雜糧零售店及超市, 收集玉米種子 14 組樣品, 以甜玉米 (農友種苗, 華珍品系) 為對照植株, 各樣品取 150 粒種子, 播種於含培養土 (Bio-mix potting substratum, Tref 公司) 之育苗盤, 放置於溫室培養, 澆水保持濕潤, 待植株發育至 3~4 葉, 噴施嘉磷塞 (41% 溶液) 1.8 kg ha^{-1} , 水量為 600 L ha^{-1} 。施藥後 7~10 日, 記錄植株萌芽率、外觀傷害徵狀及正常生長植株之株數。活體幼株在溫室測定後即銷毀。

三、抗嘉磷塞玉米材料之製備與篩選

取用前述收集之玉米種子。培育至 3~4 葉, 噴施低劑量嘉磷塞 (0.5 kg ha^{-1}), 施藥後 5 日, 分別種植幼葉外觀傷害及正常生長植株, 收集非抗藥性及抗藥性植株之葉片, 進行轉基因特性之研究。

四、聚合酶鏈鎖反應 (Polymerase chain reaction, PCR)

播種玉米種子, 育苗步驟同前述方法,

於 4 葉齡植株之下位成熟葉，滴施 5 μl 嘉磷塞 (0.5 kg ha⁻¹) 藥液，施藥後 5 日，分別剪下具傷害徵狀(非抗藥性者)及無傷害徵狀(具抗藥性者)植株之 0.1 g 幼葉，抽取基因組 DNA。依據抗嘉磷塞玉米之轉基因序列之構築組成 (GM Database from AGBIOS 2005)，由花椰菜嵌紋病毒啟動子(CaMV 35S promoter)、水稻 actin 基因啟動子及 nopaline synthase 基因之終結子(NOS terminator)核酸序列設計 35S-F/NOS-R 及 actin-F/NOS-R 二組引子(Table 1)。取 50 ng μl^{-1} 抗性植株及非抗性植株玉米之 DNA，分別加 1 μl 10 μM primer，利用 Viogen PCR kit (1 μl 50 X Polymerase, 5 μl 10 X PCR Buffer, 1 μl 50 X dNTP Mix 10 mM, 40 μl PCR grade H₂O)，總體積為 50 μl ，進行 PCR 測試(Mullis and Erlich 1988)，負對照者以 PCR 等級去離子水取代 DNA。反應步驟為：起始變性溫度為 94°C 5 分鐘；變性溫度 94°C 45 秒，煉合溫度 54°C 45 秒，延展溫度 72°C 45 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。

五、PCR DNA 產物之鑑定

由 PCR 產物之電泳分析結果，割取約 2.6、2.1 及 2.0 kb 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，添加於 pGEM-T Easy Vector kit (5 μl 2 X Rapid Ligation buffer, 1 μl 50 ng pGEM-T Easy vector, 1 μl T4 DNA ligase)，於 16°C 反應 14~16 小時。將單一菌落之大腸桿菌 (*Escherichia coli* DH5 α strain)，加 3 ml LB 培養液，於 37°C 振盪培養 14 小時，取 200 μl 菌液加入接合反應之 10 μl DNA，放置於冰上 30 分鐘，再加入 200 μl LB 培養液，於 37°C 振盪培養 1 小時，將菌液塗抹於 LB plate (含 IPTG、X-gal 及 ampicillin)，培養 14~16

Table 1. Primers used in this study.

No. primer	DNA sequence (5' → 3')	Gene	Amplified DNA
(1) 35S-F	GACGCACAATCCCCTATCCTTCGCA	35 S promoter	2595 bp
NOS-R	CATCGCAAGACCGGCAACAGGATTC	NOS terminator	
(2) Actin-F	GAATGGGGCTCTCGGATGTAGATC	actin promoter of rice	1967 bp
NOS-R	CATCGCAAGACCGGCAACAGGATTC	NOS terminator	(NK603) 2130 bp (GA21)
(3) Actin-F	GAATGGGGCTCTCGGATGTAGATC	actin promoter of rice	873 bp
CP4-R	TGCTGTCGAAATCGTAGACC	CP4 EPSPS	
(4) CP4-F	GACAAGTCGATCTCCACC	CP4 EPSPS	273 bp
CP4-R	TGCTGTCGAAATCGTAGACC		
(5) M-EPSPS-F	GGACAACAGTGGTTGATA ACCTGC	modified EPSPS of maize	201 bp
M-EPSPS-R	AGCAGTAACAGCTGCTGTCAAGGA		
(6) CPT1-F	TGGGCTGCAGGAATCCGAAAGAC	CTP1 of RuBisCo SSB in sunflower	384 bp
CPT2-R	ACGTTGCCGAGGCTTCTGAAGAAG	CTP2 of RuBisCo SSB in maize	

小時，選取含有 DNA insert 之白色菌落，移入 3 ml LB 培養液中，再於 37°C 培養 14~16 小時，取出 300 μ l，保存於 4°C。其餘之菌液於室溫下以 3000 g 離心 5 分鐘，倒出上層液，抽取 plasmid DNA，用 50 μ l 去離子水洗出 plasmid DNA，取 20 μ l plasmid DNA 加 1 μ l *Eco*RI 限制酵素，於 37°C 反應 2 小時，取出 6 μ l 加入樣品 0.1 倍體積之 bromophenol blue 染劑，注入於含 1.2% agarose 之 0.5 X TBE 膠體，以 100 伏特電壓進行電泳分析(Birnboim and Doly 1979)。選取具 2.6、2.1 及 2.0 kb insert DNA 之菌株，塗抹於含 ampicillin 之 LB 固體培養基上，於 37°C 培養 14~16 小時，抽取菌體之 plasmid DNA 定序。抽取大腸桿菌菌體之 plasmid DNA，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 National Center for Biotechnology Information (NCBI) 基因庫中 Blast 功能比對基因序列。

六、Multiplex PCR 檢測抗嘉磷塞玉米

經由 2.6、2.1 及 2.0 kb PCR 產物之序列，設計 2 組專一性引子，分別為 actin-F/CP4-R 及 M-EPSPS-F/M-EPSPS-R (Table 1)，取抗嘉磷塞玉米之基因組 DNA 50 ng，利用 PCR kit 進行如前述方法之 PCR (煉合溫度為 54°C 45 秒)及電泳分析(1.2% agarose)。

七、市售玉米相關加工產品之檢測

設計專一性引子，分別為 CP4- F/CP4-R 及 CTP1-F/CTP2-R (Table 1)，利用 multiplex PCR 方法，檢測玉米粉、玉米仁、爆米花、玉米罐頭、玉米片、冷凍混合蔬菜之玉米粒及玉米濃湯之玉米粒等檢體共 17 件樣品。分別取 0.1 g 檢體抽取 DNA，進行 multiplex PCR 檢測，步驟如前述 multiplex

PCR 方法及電泳分析(1.2% agarose)。

結果

一、玉米植株施用嘉磷塞之藥劑反應

十四組不同來源之玉米樣品，經播種育苗，發芽率為 59~93% (Table 2)。玉米幼苗於施藥後 5~7 日，部份植株開始呈現藥害徵狀，施藥後 14 日，可明顯區分為正常生長植株及受傷害植株。受傷害植株之徵狀為葉片黃化及褐化(Fig. 1)，施藥後 14 日全株乾枯死亡。正常生長之植株可能為具抗嘉磷塞之轉基因玉米，受傷害植株則為無抗藥性傳統培育之玉米品系，臺灣之甜玉米華珍品系為對照植株，施藥後 7 日皆死亡。萌芽玉米植株中疑似轉植株之抗嘉磷塞玉米佔 0.9~3.1% (Table 2)。

二、抗嘉磷塞玉米之基因片段

玉米植株幼葉以 DNeasy Plant Maxi kit 抽取 genomic DNA，可由 0.1 g 植體抽取約 15 μ g 之 DNA，以 DNeasy™ kit 抽取之 DNA 純度高，且加入 RNase 可去除 RNA 造成之干擾。由 35S promoter、actin promoter 及 NOS terminator DNA 序列設計之引子 (Table 1)，經 PCR 之結果顯示，煉合反應之溫度於 54°C，可於抗嘉磷塞植株樣品，分別擴增約 2.6、2.0 (35S-F/NOS-R 及 actin-F/NOS-R 引子)或 2.1 kb (actin-F/NOS-R 引子)之單一 DNA 片段，非抗嘉磷塞植株則無此等擴增之 DNA 片段，以無菌之去離子水取代 DNA 樣品之負對照組亦無此 DNA 片段，表示 PCR 測試中無污染現象發生(Fig. 2)。

三、聚合酶鏈鎖反應產物定序及基因組成

將 PCR 之 DNA 產物由膠體溶洗出，經接合、轉型反應、抽取 plasmic DNA 及確認單一菌株之 insert DNA 約為 2.6、2.0 及 2.1 kb 者，再抽取此菌株之 plasmid DNA 定序。

將 PCR 之 DNA 產物序列以 NCBI 之 Blast 分析比對基因庫序列，結果長度約 2.0 kb PCR 產物由水稻 actin promoter (282 bp)、阿拉伯芥 ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase small subunit

(RuBisCo SSU) 之 chloroplast transit peptide (CTP) (225 bp)、CP4 EPSPS (1374 bp)及 NOS terminator (74 bp)片段組成(Fig. 3); 長度約 2.6 kb PCR 產物由 35S promoter DNA 片段(99 bp)、玉米 heat shock protein

Table 2. Seed germination and seedling response of feed corn^x to glyphosate application.

Sample No.	Established seedlings	Injured plant		Normal plant	
		No. of plant	(%)	No. of plant	(%)
1	135	130	96.3	5	3.7
2	132	130	98.5	2	1.5
3	129	127	98.4	2	1.6
4	139	137	98.6	2	1.4
5	116	115	99.1	1	0.9
6	118	117	99.2	1	0.8
7	126	125	99.2	1	0.8
8	107	106	99.1	1	0.9
9	89	89	100.0	0	0.0
10	126	126	100.0	0	0.0
11	93	93	100.0	0	0.0
12	132	132	100.0	0	0.0
13	115	115	100.0	0	0.0
14	112	112	100.0	0	0.0
Control	136	136	100.0	0	0.0

^x Corn seeds were collected from local retail shops. Seedlings, 3-4 leaf stage, raised from 150-seeds were evaluated for injury after foliar application of glyphosate at 1.8 kg ha⁻¹.

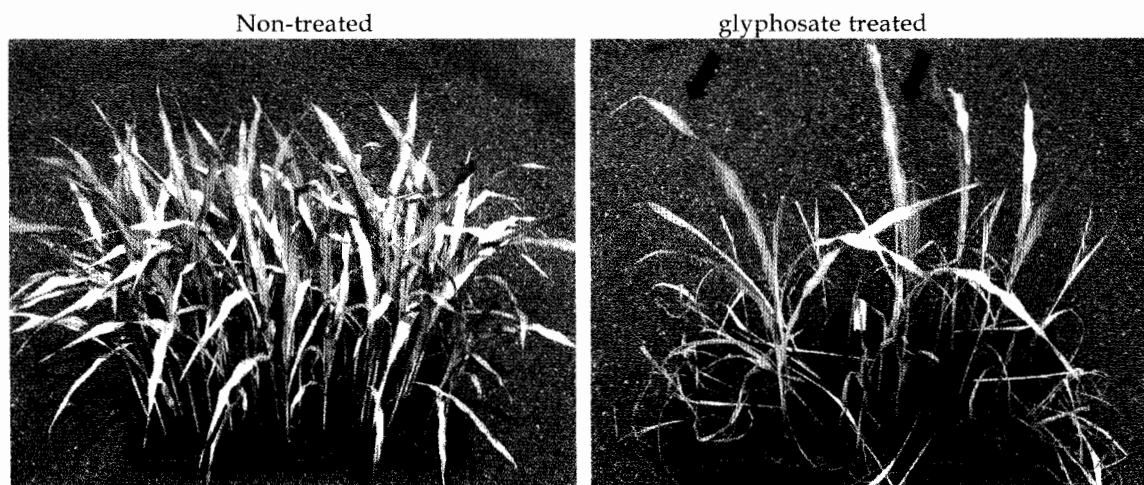


Fig. 1. Glyphosate resistant corn survived after foliar application of glyphosate (41% SL) at 1.8 kg ha⁻¹. Susceptible corn plants were killed at seven days after spray of glyphosate.

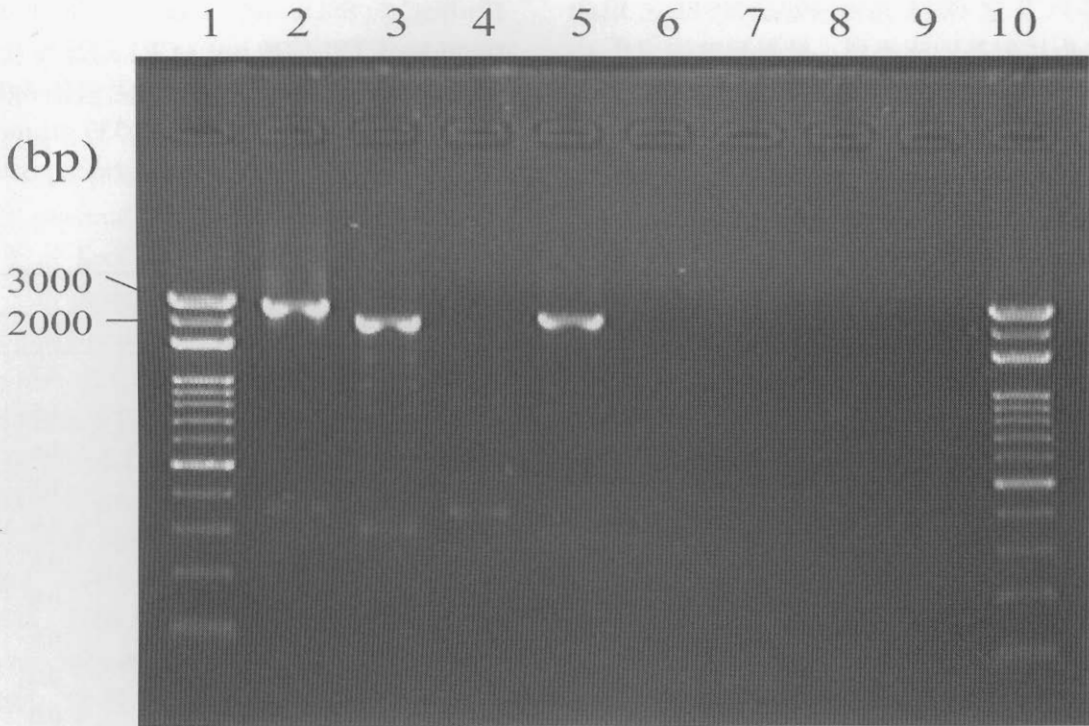


Fig. 2. Genomic DNA of glyphosate resistant corn was amplified by PCR using different primer pair. Lanes 1 and 10 were DNA marker; lanes 2, 4, 6 and 8 were 35S-F/NOS-R primers; lanes 3, 5, 7 and 9 were actin-F/NOS-R primers; lanes 2 and 3 were #2 sample; lanes 4 and 5 were #1 sample; lanes 6 and 7 were non-glyphosate resistant corn; and lanes 8 and 9 were deionized water.

(SHP70) (1053 bp)、CP4 EPSPS (1368 bp)及 NOS terminator (75 bp)片段組成，同時含此 2 組構築組成者，擬似 NK603 抗嘉磷塞玉米品系(GM Database from AGBIOS 2005)；長度約 2.1 kb PCR 產物包括水稻 actin promoter (282 bp)、向日葵 RuBisCo SSU 之 CTP (205 bp)、玉米 RuBisCo SSU 之 CTP(210 bp)、修飾之玉米抗嘉磷塞 EPSPS (modified EPSPS, M-EPSPS, 1335 bp)及 NOS terminator (74 bp)等片段，此構築組成擬似 GA21 抗嘉磷塞玉米品系(GM Database from AGBIOS 2005)。由此三序列訊息設計檢測 GA21 品系之引子位於向日葵 RuBisCo SSU 之 CTP1、玉米 RuBisCo SSU 之 CTP2 及玉米 M-EPSPS 基因(Fig. 3，逆向箭頭區間

顯示處)，檢測 NK603 品系之引子位於水稻 actin promoter 及 CP4 EPSPS 基因(Fig. 3)。

經由抗嘉磷塞 EPSPS 胺基酸序列比對之結果顯示，非基改玉米(NCBI GenBank, accession No. X63374)與似 GA21 品系之抗嘉磷塞玉米(M-EPSPS)之差異，僅於第 106 胺基酸分別為 Proline (Pro)與 Serine (Ser) (Fig. 4，* 星號表示處)。馬來西亞及臺灣抗嘉磷塞牛筋草之 EPSPS 胺基酸序列，主要的差異亦是於敏感植株相對位置之 107 Pro，改變為 107 Ser (馬來西亞)或 107 Alanine (Ala) (臺灣) (Baerson *et al.* 2002, Yuan *et al.* 2005)。似 NK603 品系玉米之轉基因 CP4 EPSPS 與非基改玉米之 EPSPS 胺基酸相似度則低於 30% (Fig. 4)。

四、抗嘉磷塞玉米植株之 multiplex PCR 檢測

利用 2 組專一性引子，分別為 actin-F/CP4-R 及 M-EPSPS-F/M-EPSPS-R (Table 1, Fig. 3)，以 multiplex PCR 方法檢測抗嘉磷塞玉米葉片 DNA，結果可分別檢出 4 株樣品，呈現 actin-F/CP4-R 引子對擴增之 873 bp 條帶，應為 NK603 品系玉米。11 株樣品呈現 M-EPSPS-F/M-EPSPS-R 引子對擴增之 201 bp 條帶，應為 GA21 品系玉米(Fig.

3 及 Fig. 5)。

五、市售玉米相關加工產品之測定

利用 4 組專一性引子：actin-F/CP4-R、M-EPSPS-F/ M-EPSPS-R、CP4- F/CP4-R 及 CTP1-F/ CTP2-R (Table 1)，檢測 17 件玉米加工產品，其中 11 件可檢出抗嘉磷塞之轉基因。由於玉米片及玉米濃湯樣品為高度加工之產品，非玉米之添加物較多，因此進行 PCR 的 temple DNA 增為 200~500 ng。結果可檢

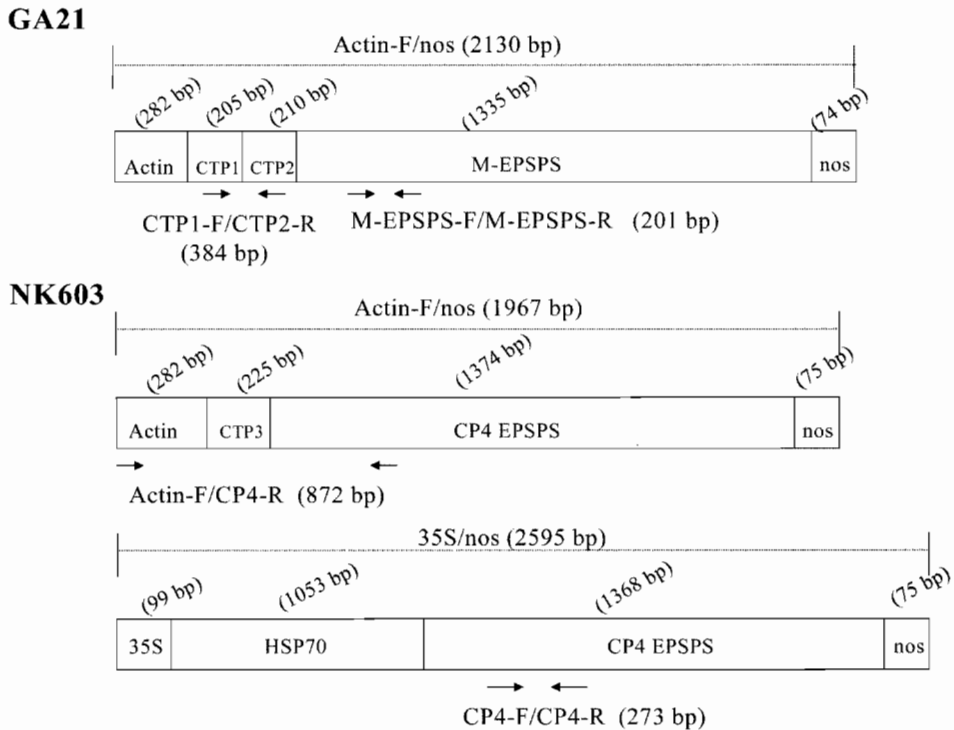


Fig. 3. Elements of PCR products and positions of primers in the different glyphosate resistant corn constructs. Approximate positions of primers are shown as arrows. 35S, cauliflower mosaic virus promoter; actin, actin I promoter and intron sequences from rice; NOS, nopaline synthase terminator; CP4 EPSPS, 5-enolpyruvyl shikimate -3-phosphate synthase (EPSPS) gene from *Agrobacterium* sp. strain CP4; M-EPSPS, modified EPSPS gene from corn; CTP1, chloroplast transit peptide of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase oxygenase small subunit (RuBisCo SSU) gene from sunflower; CTP2, chloroplast transit peptide of RuBisCo SSU gene from corn; CTP3, chloroplast transit peptide of RuBisCo SSU gene from *Arabidopsis*; and HSP70, heat shock protein 70 from maize.

出 3 件玉米粉、2 件玉米仁及 2 件玉米罐頭樣品可擴增 201、273、384 及 873 bp 4 個 DNA 片段(Fig. 6)，顯示含有 35S promoter、actin promoter、CP4 EPSPS 及抗嘉磷塞玉米 M-EPSPS 基因;2 件爆米花可擴增 273 及 873

bp 2 個 DNA 片段，顯示含有 actin promoter 及 CP4 EPSPS 基因;2 件玉米片可擴增 201 bp DNA 片段，顯示含有抗嘉磷塞玉米 M-EPSPS 基因;冷凍混合蔬菜及玉米濃湯之玉米粒則無轉基因之檢出。

	▼▼▼	▼* * *
<i>Z. may</i> (X63374)	AGAEIIVLQPIKEISCTVKLPGSKLSNRILLALLSEGGTTVVDNLLNSDEVHYMLGALRTLGLSVEADKAAKRAVWVGGCGKFPVE-DAKEEVQLFLGNACTAMRPLTAAVTAAGGN	117
<i>Z. may</i> (M-EPSPS)	S..... 117
<i>E. indica-S</i> (MA)	...V.....V.....S.A.....D.....K.....A.K.....	118
<i>E. indica-R</i> (MA)	...V.....V.....S.A.....D.....K.....A.K.....	S..... 118
<i>E. indica-S</i> (TW)	...V.....V.....S.A.....K.....K.....	118
<i>E. indica-R</i> (TW)	...V.....V.....S.A.....K.....K.....	A..... 118
<i>E. coli</i>	--MESLT...ARVD...IN.....A.....AH.K.L...D.D.R...N.TA...V.YTLSADRT.CEII.N.PH.G---A.E.....A.LCLGSND	112
<i>A. sp.</i> CP4	SSRPATARKSSGLSGL...RI...D...I.H.SFMFGG.ASGE.RITG...EG...INTGK.MQAM.ARIKKEGDTWII-DGVGN.GLL.PEAP----.DF...A.GC...MGL...VY	113
	▼	▼▼▼
<i>Z. may</i> (X63374)	-ATYVLIGVPRMRERP1GDLVVLKQLGADVDCFLGTDYPPVRVKIGLPGGKVKLSGSISSQVLSALLMAAPLALGDVBEI1DKLISIPYVEMTLRLMERFGVKA--EHSNDWDRF	233
<i>Z. may</i> (M-EPSPS)	233
<i>E. indica-S</i> (MA)	C..... 234
<i>E. indica-R</i> (MA)	C..... 234
<i>E. indica-S</i> (TW)	L..... 234
<i>E. indica-R</i> (TW)	C..... 234
<i>E. coli</i>	---I...T.E...K...H...DA.RLG...KITYLEQE...L.LQ--...FT...N.DVD...F...T...PE.TV.R.KGD.V.K...IDI...N.KT...E--I...-QHYQQ.	223
<i>A. sp.</i> CP4	DFDSTFIIGDASLTK...M.RVLPN.REM.VQ.KSED.DRL...TLR...PKTPTPIYRVVMA.A.VKS.V.LAGLNTP.IT--TV.EPIMTR----.DH.E.MLQG...ANLT...ADGVR	221
	▼	
<i>Z. may</i> (X63374)	YIKGGQKYKSPKNAYVEGDASSASYFLAGAAI-TGGIVTVBCCGTTSLQGDVKFAEVLMMGA---KVTWTETSVITVTPPREPFGKHLKAI DVNMNMPDVAMTLAVVALFADGPT	348
<i>Z. may</i> (M-EPSPS)	348
<i>E. indica-S</i> (MA)	Q..... 349
<i>E. indica-R</i> (MA)	Q..... 349
<i>E. indica-S</i> (TW)	T..... 349
<i>E. indica-R</i> (TW)	T..... 349
<i>E. coli</i>	VV...S.Q...TY.....A...IK...K.T.I.RN.M...IR...D.....TIC.GDDYISC.....RGE.N...MD.HI...I.T...K...339	
<i>A. sp.</i> CP4	T...LEGRG.LT.QVIDVPGDP.STA.PLV...LLVP.SDVTHLNVLMNPTRTGLIL.T.QE...DIEVINPRLAGGEDVADLRVRSSTL.GVTVPEDRAP.S.I.EYPI...AAA...E.A.	350
	▼▼▼	▼
<i>Z. may</i> (X63374)	AIRDVASWRVKETERMVAIRTELTKLGSVEEGPD---YCIITPPEKLNVT---AIDTYDDHRMAMAFSLAACAEV-PVTIRDPCGTRKTFPDYFDVLSHFVKN	445
<i>Z. may</i> (M-EPSPS)	445
<i>E. indica-S</i> (MA)	D..... 446
<i>E. indica-R</i> (MA)	L.....D..... 446
<i>E. indica-S</i> (TW)	D..... 446
<i>E. indica-R</i> (TW)	D..... 446
<i>E. coli</i>	TL.NIYN...D.LF.MA...KV...E...H...IR...FA--E.A.N...C...V.LSDT...L...K.A...EQ.ARI.QAA	427
<i>A. sp.</i> CP4	VNGLLEEL...SD.LS.VANG.KLN.VDCD...ETSLVVRGRPDGK.GNASGA.VA.HL...I...S.LVMGLVSEN...VD.ATMIATS...E...MDLMAGLGAHLSDTKAA	450

Fig. 4. Sequence comparison of EPSPS from plants and microorganisms. EPSPS sequences of glyphosate-resistant *Zea maize* were elucidated from this study. *Eleusine indica* from Taiwan based on Yuan *et al.* (2005). Sequences on other EPSPS were from NCBI GenBank. Major difference among non-GM and GM maize were at 106 and 100 position indicated with asterisk (*) mark. Glyphosate resistant type of GA21-like and NK603-like GM maize were associated with serine (S) and alanine(A), respectively. The reverse triangles (▼) marks are residues suggested for glyphosate binding by Schönbrunn *et al.* (2001).

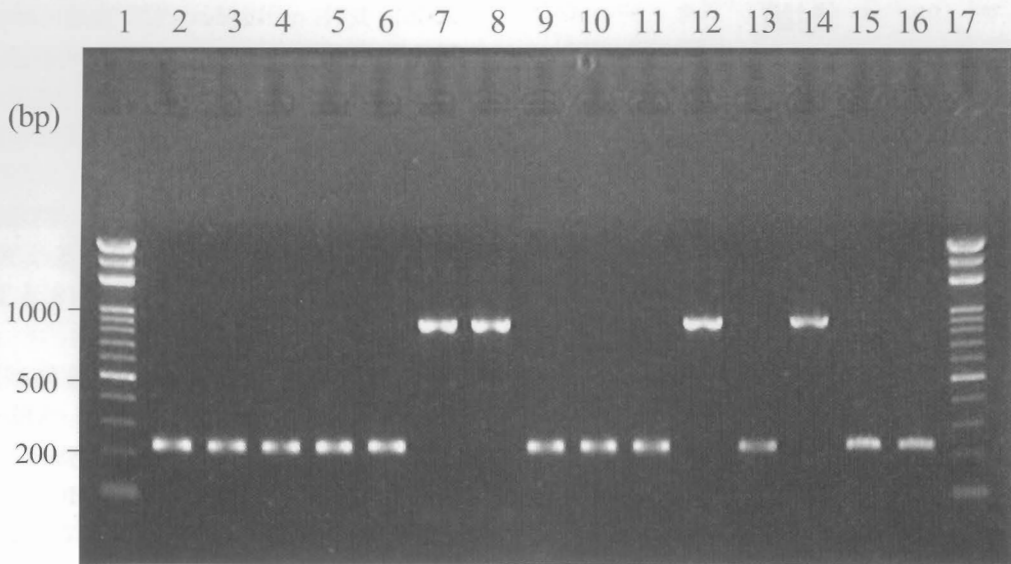


Fig. 5. PCR products of genomic DNA of glyphosate resistant corn were amplified by multiplex PCR. Primers were actin-F/CP4-R and M-EPSPS-F/M-EPSPS-R, respectively (Table 1). Lanes 1 and 17 were DNA marker; lanes 2-6, 9-11, 13, 15 and 16 were GA21-like plant; and lanes 7, 8, 12 and 14 were NK603-like plant.

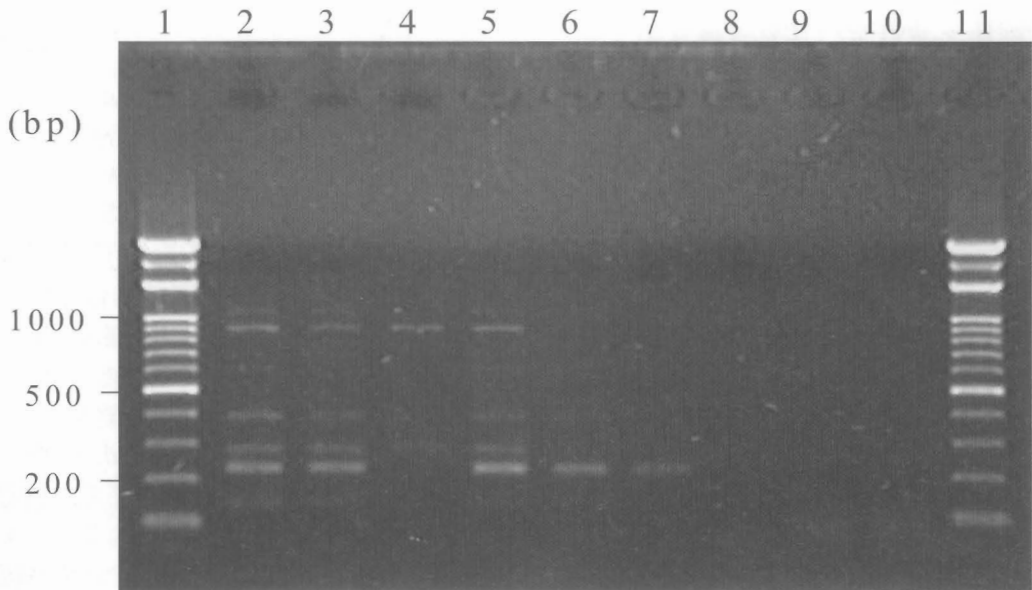


Fig. 6. Multiplex PCR analysis of glyphosate-resistant gene in corn and processed products. Purified sample DNA was amplified with primer pairs, M-EPSPS-F/M-EPSPS-R, CTP1/CTP2, CP4-F/CP4-R, and/or actin-F/CP4-R were used for. Lanes 1 and 11 were DNA marker; lane 2 was corn flour; lane 3 was corn kernel; lane 4 was popcorn; lanes 5 and 6 were canned corn; lane 7 was corn flakes; lane 8 was mixed vegetables; lane 9 was corn soup; and lane 10 was non- GM corn .

討論

經由玉米植株噴施嘉磷塞之藥劑反應，測定 14 組不同來源之樣品，植株幼苗於施藥後 7 日，可明顯區分為正常生長植株及受傷害植株，此傷害現象為嘉磷塞作用之典型徵狀(Devine 1993, Kishore and Shah 1988)，受傷害植株為無抗藥性傳統培育之玉米品系，正常生長之植株則可能為抗嘉磷塞之轉基因玉米。此反應結果顯示進口玉米種子中，抗嘉磷塞轉基因玉米約佔 0.9~3.7%，較抗固殺草轉基因玉米(1~14.7%)含量低(Yuan *et al.* 2003)。按美國轉基因玉米之栽種面積約佔 45% (Agricultural Statistics Board, U.S. Department of Agriculture 2004)，主要包括應用抗蟲 *cry* 基因、抗嘉磷塞 CP4 EPSPS 基因或經修飾之玉米抗嘉磷塞 EPSPS 基因以及抗固殺草 *pat* 或 *bar* 基因之玉米。玉米之生產國於採收穀物至貯藏運送過程中，可能未分別處理傳統品系玉米及基改玉米，因此各批次外銷種子混有不同品系之轉基因玉米。Yuan and Chiang (2002) 之檢測顯示 2000~2002 年間市售大豆種子中，抗嘉磷塞轉基因大豆之比例(35~47%)遠較抗除草劑玉米者(Yuan *et al.* 2003)為高。

經由 PCR 產物之解序結果顯示，同時含有 2.0 及 2.6 kb PCR 產物之抗嘉磷塞玉米，與含有 2 組不同構築之 NK603 轉基因品系(GM Database from AGBIOS 2005)轉基因者相同，其中之 2.0 kb PCR 產物包括水稻 *actin promoter*、阿拉伯芥 *RuBisCo SSU* 之 CTP、CP4 EPSPS 及 NOS terminator 核酸片段；2.6 kb PCR 產物包括 35S 啟動子、玉米 HSP70、CP4 EPSPS 及 NOS terminator 核酸片段。另一含有 2.1 kb PCR 產物之抗嘉磷塞玉米品系，構築組成與 GA21 轉基因品系者相同，包括水稻 *actin promoter*、向日葵 *RuBisCo SSU* 之 CTP、玉米 *RuBisCo SSU* 之 CTP、抗嘉磷塞玉米 M-EPSPS 及 NOS terminator (GM Database from AGBIOS

2005)。經由 multiplex PCR 檢測，15 個抗嘉磷塞玉米樣品中有 4 株為 NK603 品系，11 株為 GA21 品系，顯示臺灣進口之玉米種子中除了含有抗固殺草之 T25、Event176 及 Bt11 三種轉基因品系(Yuan *et al.* 2003)，亦帶有抗嘉磷塞之 NK603 及 GA21 轉基因品系(Fig. 3)。衛生署已核准之 10 種基改玉米中，抗除草劑者另有 DLL25、DBT418 及 TC1507 則未見於檢測樣品。

孟山都公司研發之抗嘉磷塞轉基因玉米包括 GA21、NK603、MON801、MON802、MON809、MON832 及 MON88017 品系，其中 MON801、MON802 及 MON88017 品系兼具抗蟲特性，但目前僅有 GA21 及 NK603 上市(GM Database from AGBIOS 2005)，由於此 2 品系構築組成不同，依據核酸序列設計專一性引子，可用於檢測不同品系之轉基因產物。本研究 PCR 產物基因序列與基因庫資料比對，其中似 GA21 品系之玉米樣品，構築的經修飾之玉米抗嘉磷塞 M-EPSPS 基因，與非基改玉米之 EPSPS 基因(NCBI GenBank, accession No. X63374)有 6 個鹼基之差異(資料未呈現)，而經修飾之部位主要在於 ³¹⁶C (cytosine) 及 ³¹⁸A (adenine) 分別置換為 ³¹⁶T (thymine) 及 ³¹⁸C，經轉譯後則由 ¹⁰⁶Pro 改變為 ¹⁰⁶Ser (Fig. 4)，此差異處為影響 EPSPS 與嘉磷塞藥劑結合之重要位置(Baerson *et al.* 2002)。抗嘉磷塞牛筋草 (*Eleusine indica*) EPSPS 胺基酸，則由 ¹⁰⁷Pro 改變為 ¹⁰⁷Ser 或 ¹⁰⁷Ala 的變異位置相同(Baerson *et al.* 2002, Yuan *et al.* 2005)，顯示此相似序列的改變與 GA21 品系之抗嘉磷塞特性具相關性。NK603 品系內 2 組構築的轉基因皆含抗嘉磷塞之 CP4 EPSPS 基因，其 ¹⁰⁰Ala 胺基酸相當於玉米之 ¹⁰¹Gly (glycine) 及牛筋草之 ¹⁰²Gly (Fig. 4)，此處 Alanine 之差異，被認為是造成 CP4 EPSPS 與嘉磷塞親和性降低之重要因素(Hess 1996)。大腸桿菌 EPSPS 與嘉磷塞鍵結有關之胺基酸，不同於前述者，則標示於 Fig. 4 (倒三角 ▼

處)(Schönbrunn *et al.* 2001)。

利用專一性引子，檢測 17 件玉米產品，其中玉米粉、玉米仁及玉米罐頭樣品，含 GA21 及 NK603 品系成份、爆米花含 NK603 品系成份、玉米片含 GA21 品系成份。衛生署藥檢局利用 Matsuoka *et al.* (2001) 發表之引子，於玉米餅檢出含 GA21 品系(Chiueh *et al.* 2001, Lin *et al.* 2000)。美國種植之基因改造玉米，採收後即與傳統品系玉米混合，再以飼料或食品外銷。本研究之檢測結果顯示，臺灣由美國進口之玉米種子除了含有 Bt11、T25 及 Event 176 三種抗固殺草品系(Yuan *et al.* 2003)，另有 GA21 與 NK603 二種抗嘉磷塞品系。

引用文獻

- Agricultural Trade Statistics of the Republic of China (2003) p.194-215. (in Chinese) Council of Agriculture, Executive Yuan, Taipei.
- Agricultural Statistics Board, U.S. Department of Agriculture (2004) The National Agricultural Statistics Service (NASS). (<http://usda.mannlib.cornell.edu/reports/nassr/field/pcp-bba/acrg0604.txt>)
- 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.
- Baerson SR, DJ Rodriguez, M Tran, Y. Feng, NA Biest, GM Dill (2002) Glyphosate-resistant goosegrass. Identification of a mutation in the target enzyme 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase. **Plant Physiol.** 129:1265-75.
- Birnboim HC, J Doly (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. **Nucleic Acids Res.** 7:1513-1523.
- 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.
- Devine M, SO Duke, C. Fedtke (1993) *Physiology of Herbicide Action*. p.251-294. PTR PrenticeHall, New York, USA.
- Fei WC, YM Wang (2004) *Plant Protection Manual*. (in Chinese) p.701-799. Taiwan Agricultural Chemicals and Toxic Substances Research Institute, Council of Agriculture Press, Taichung.
- Genetically Modified Food (2003) (<http://gmo.doh.gov.tw/life/main.shtml>)
- Global Knowledge Center on Crop Biotechnology (2004) Global area of biotech crops in 2004. (<http://www.isaaa.org/kc/Global%20Status/gmreview/area.htm>)
- GM Database from AGBIOS (2005) (<http://64.26.159.139/dbase.php>)
- Hess FD (1996) Herbicide-resistant crops: perspectives from a herbicide manufacturer. p.53-84. *In: Herbicide-Resistant Crops: Agricultural, Environmental, Economic, Regulatory, and Technical Aspects*. SO Duke (ed.) Lewis Publishers, Boca Raton.
- 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.fftc.agnet.org/library/article/tb161.html>)
- Kay RA, CM Daly, J McPherson (1987) Duplication of the CaMV 35S promoter sequences creates a strong enhance for plant genes. **Science** 236:1299-1302.
- 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, LC Chiueh, DYC Shih (2000) Detection of genetically modified corns and corn by the polymerase chain reaction method. **J. Food Drug Anal.** 8:200-207.
- 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.
- Matsuoka T, Y Kawashima, H Akiyama, H Miura, Y Goda, Y Kusakabe, K Isshiki, M Toyoda, A Hino (2000) A method of detecting recombinant DNAs from four lines of genetically modified corn. **J. Food Hyg. Soc. Japan** 41:137-143.
- Mullis GT, HA Erlich (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science** 239:487-491.
- 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.
- Pesticide Action Network (PAN) UK (2004) Glyphosate (fact sheet). **Pesticides News** 64:20-21.
(<http://www.pan-uk.org/pestnews/Actives/glyphosate2.htm>)
- Schönbrunn E, S Eschenburg, WA Shuttleworth, JV Schloss, N Amrhein, NS Evans, W Kabsch (2001) Interaction of the herbicide glyphosate with its target enzyme 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase in atomic detail. **PNAS** 98:1376-1380.
- Yuan CI, MY Chiang (2002) Detection and Genomic Characterization of Imported Soybean Resistant to Glyphosate. (in Chinese) **Taiwanese J. Agric. 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, MY Chiang (2005) Glyphosate-resistant goosegrass in Taiwan: cloning of target enzyme (EPSPS) and molecular assay of field populations. (in Chinese) **Plant Prot. Bull.** 47: 251-262.