

基因改造作物及食品之檢測方法 - 抗嘉磷塞大豆之基因特性及 PCR 檢測

袁秋英、蔣慕琰

前 言

1999 年全球基因改造生物體 (Genetically Modified Organism, GMO) 之栽種面積已達四千萬公頃，大豆、玉米、棉花及油菜為基因改造之主要作物。此等栽種中之基因產品以抗殺草劑者佔 71%，其餘者為殖入 Bt 基因之抗蟲作物^(8,9)。目前主要上市之抗殺草劑轉基因大豆為抗嘉磷塞大豆 (Roundup Ready™ soybean)。嘉磷塞 glyphosate ((N-phosphomethyl) glycine) 為臺灣最重要之非選擇性萌後殺草劑，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^(7,11)，造成苯丙胺酸 (phenylalanine)、酪胺酸 (tyrosine) 及色胺酸 (tryptophan) 3 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^(7,22)，達成防除雜草之目的。

抗嘉磷塞轉基因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 基因轉殖於大豆，由於此 CP4 EPSPS 酵素對嘉磷塞之親和性低，且可與其受質 phosphoenolpyruvate (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⁽²⁷⁾。

臺灣市售之大豆多為進口，2000 年進口之大豆為 230 萬公噸，其中 88% 來自美國⁽¹⁾，有多少進口大豆為基因改造產品，尚無資料可查。此等基因改造產品對於人類及整個生態環境所造成之利益及可能帶來不良影響之風險，是目前備受關切的問題。基因改造作物之栽種對於傳統農業栽培體系具直接性之衝擊，於單一作物之測定及預估較易執行，此等作物及其產品對於農業生態系及人類之影響屬間接性之衝擊。例如生態環境方面，可能由於基因外流，近親種雜交，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問題；食品、飼料用基因改造產品之安全問題方面，可能存在表現蛋白質、抗生素抗性基因之

毒性及過敏性等問題，均不易於短期內測定及預估^(20,28)。因此，基因改造作物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。

目前世界各國已進行基因改造產品以 DNA 及蛋白質為基礎之篩選及鑑定方法的建立，由於目前之轉基因大豆及玉米等作物大部份利用 35S 啟動子、NOS 終結子及標的基因構築者，因此於歐盟各國建立之 DNA 定性分析，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^(19, 24, 25)，行政院衛生署藥檢局已由 Fluka Chemical 公司購得 0~5% (W/W) GM 大豆，並以文獻之 35S、NOS 及 EPSPS DNA 片段為引子，進行 PCR 測定之研究^(2,23)。本研究針對抗草膦塞轉基因大豆進行抗藥特性、CP4 EPSPS 基因定序、PCR DNA 產物鑑定及大豆轉基因植株之南方氏雜合反應等 DNA 之定性分析，進而專一性檢測及鑑定大豆及其相關之加工產品⁽³⁾。

基因改造生物及食品之檢測方法

目前應用於基因改造生物及食品之檢測方法主要分為兩類^(4, 6)，第一類以基因為檢測對象之方法，最常用者為聚合酵素鏈鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR)；第二類以蛋白質為檢測對象之方法，包括酵素連結免疫吸附分析法 (enzyme linked immunoabsorbant assay, ELISA) 及西方墨點分析法 (Western blot analysis)。此二類檢測方法各具優缺點，PCR 方法之優點為靈敏度 (0.01%~0.1%)，可同時檢測單一樣品中所含之不同轉基因，缺點為易因樣品污染、檢測試劑及儀器不同而影響分析結果，對於高度加工樣品，DNA 斷裂，以 PCR 檢測易產生偽陰性結果。免疫分析法之優點為檢測過程中之干擾較少，以條帶(strip)方式分析可縮短檢測時間，缺點為靈敏度較低 (0.5%~1%)，蛋白質變性者亦不易檢出。對於基因改造食品檢出之正確性、專一性及靈敏度，各具優缺點，且此二方法檢測之轉殖基因或蛋白質為已知者。而仍在研發中之晶片檢測方法，預估可檢測未知之轉殖基因，亦可同步檢出多種轉殖基因，且利於大量樣品之檢測，大幅縮短檢測時間。下列針對各重要檢測方法詳述之。

一、聚合酵素鏈鎖反應 (PCR) 檢測方法^(4, 14, 25, 26)

聚合酵素鏈鎖反應為利用酵素之作用，將特定的 DNA 片段快速放大及增殖，再將此增殖之基因於洋菜膠 (agarose) 進行電泳分析。PCR 方法可應用於基因改造生物體或食品之定性或定量分析^(14,16)，一般以定性分

析之利用較簡易而普遍。理想之 PCR 檢測條件決定於檢體 DNA 抽取的純度、回收率以及引子 (primer) 的設計，皆會影響檢出結果之專一性及靈敏度。基因改造生物體及食品以 PCR 方法檢測轉殖之基因，需先了解轉殖基因構築之成份，做為設計引子之依據，例如針對啟動子 (promoter)、終止子 (terminator)、轉殖標的基因 (target gene) 及抗生素抗性基因 (antibiotic gene) 等 DNA 序列設計引子。

而依據所選定設計引子之特性，可區分為二用途：一為篩選式檢測：大部份引子設計為啟動子或終止子之 DNA 片段，此檢出結果只可證明檢體是否為基因改造者，無法得知轉殖之基因為何？由於目前市售之基因改造生物大部份使用之啟動子為花椰菜嵌紋病毒啟動子 (CaMV 35S promoter)⁽²¹⁾、終止子為胭脂仙人掌藍伊紅合成酵素終止子 (nopaline synthase gene terminator, NOS) 者，因此世界各國以 35S 啟動子及 NOS 終止子 DNA 序列設計引子之 PCR 檢測方法最為普遍⁽²⁴⁾。歐洲 13 國亦利用 35S 啟動子為引子，以 PCR 方法聯合評估基因改造大豆及玉米之檢測結果，但是由於各國抽取檢體 DNA 之方法及試劑皆不相同，影響 DNA 的回收率及純度，而引子選用 35S 或 NOS DNA 片段之不同、PCR 使用之試劑、酵素以及 PCR 儀器之廠牌、機型等，皆會造成檢測靈敏度的差異⁽²⁴⁾。

PCR 分析方法之另一用途為針對轉殖基因特異性之檢測：大部份引子設計為轉殖標的基因之序列，由此方法可得知檢出基因改造檢體之標的基因為何？瑞士等歐洲國家於 PCR 方法已建立之流程步驟：先以篩選式 PCR 檢測檢體是否為基因改造食品，正反應者再進階以標的基因進行特異性之檢測⁽¹⁷⁾。巢式 PCR 為利用二組引子對，先以於 DNA 序列較近兩端之引子對，進行第一次 PCR 增殖，再以此 PCR 產物為 DNA 模板，以於 DNA 序列較內層之引子對，進行第二次 PCR 增殖⁽⁴⁾。此分析方法不但可以改進傳統 PCR 法造成之偽陽性，亦可提高檢測之專一性及靈敏度。

定量 PCR (Quantitative PCR) 之原理和定性分析者相似，可區分為兩種⁽¹⁶⁾，第一種為定量競爭性 PCR (Quantitative competitive PCR, QC PCR)，將標準品 DNA 與檢測樣品 DNA 於同一處理中進行增殖放大，共同競爭已知數量的引子，進而估算檢測樣品之含量。第二種為即時定量 PCR (Light Cycler PCR)⁽¹⁶⁾，以 DNA 探針連接螢光試劑，待此 DNA 探針與 PCR 產物結合，檢測螢光光量，並以電腦軟體分析，進行量化之計算，靈敏度為 0.1%。德國、瑞士等歐洲各國已發展即時定量 PCR 方法於基因改造食品之檢測，以期更精準量化檢測之 DNA 含量^(17, 25)。

二、免疫分析法^(4, 10, 29)

免疫分析法之原理係利用單株或多株抗體與目標蛋白質進行反應，再經由酵素與受質的結合進行檢測，其中酵素連結免疫吸附分析法

(ELISA)是利用酵素與受質結合後呈色之差異來判讀結果。西方墨點分析法亦經由抗體結合目標蛋白質，但以發光化學物質之光電比色判讀結果。此兩類免疫分析法於呈色或光量度之測定皆可與標準品比對，而應用於基因改造生物體及食品之定性或定量分析。因此免疫分析法中抗體之製備為重要步驟，抗體對目標蛋白質的親和性及專一性影響分析之正確性及靈敏度。目前美國、歐洲及亞洲多國皆有 ELISA 及檢測條片(strip)套組上市用於基因改造大豆及玉米之檢測⁽²⁹⁾，所需檢測時間短，靈敏度高，此方法操作方便，適於定性篩選進口檢疫測試用。然而上述之檢出效率是以標準品為檢樣之結果，免疫法若實際應用於經加熱、發酵或酵素水解的加工食品，其中之蛋白質可能已變性或食品內基質對抗體與目標蛋白質辨識、結合的干擾，皆可能影響到檢測之正確性及靈敏度，此方面之檢測技術仍在研究改進中。

三、晶片檢測⁽⁴⁾

DNA 晶片之原理為利用一種在固態表面上進行 DNA 分子間之雜化反應，再配合螢光訊號之檢測技術，得以快速且大量檢測樣品。目前國內中研院正研發微型生物晶片(cDNA microarray)於基因改造食品之檢測方法，此方法為將標的基因、報導基因、啟動子及終止子的 DNA 做成模板(template)，增殖其基因片段，並利用微型生物晶片機器將之點在尼龍膜上，做為篩選之探針膜，欲檢測之 DNA 需先以隨機引子法標定螢光物質，再將檢體之 DNA 與探針進行雜化反應，經半信實機讀取資料。此方法之優點為同時可檢測多種轉殖之基因、檢測之樣品數多、準確性高、敏感度強之快速檢定方法。尤其對於未標明轉殖基因為何之加工食品，可降低偽陽性之現象。

抗嘉磷塞大豆之轉基因 (CP4 EPSPS) 特性及 PCR 檢測

一、嘉磷塞抗性之藥劑測定

市售之大豆樣品，經播種育苗，二本葉之植株噴施嘉磷塞 (41% 溶液，億豐) 1.8 kg/ha，施藥後 7 日，可明顯區分為正常生長植株及受傷害植株，受傷害植株之特徵為葉片黃化褐化、新生葉狹小、葉數少、植株低矮 (圖 1.)，此傷害現象為嘉磷塞作用之典型徵狀⁽⁷⁾，顯示正常生長之植株為具抗嘉磷塞之轉基因大豆，受傷害植株則為無抗藥性傳統培育之大豆品系。由正常生長植株之株數，得知萌芽之大豆植株中抗嘉磷塞之轉基因大豆佔 35~47%。

二、抗嘉磷塞基因之聚合酵素連鎖反應

抽取大豆植株幼葉 DNA，依據抗嘉磷塞大豆之基因訊息^(21, 27)，由 35S promoter 及 NOS DNA 序列設計之引子分別為 35S promoter：5'-GACGCACAATCCCACTATCCTTCGCA-3' 及 NOS：5'-CATCGCAAGACCGGCAACAGGATTC-3' (表 1.)，經聚合酵素連鎖反應測定，起始變性溫度為 94 4 分鐘；變性溫度 94 1 分鐘，測試之煉合溫度分別為 56、58、60、62、64、66、68 及 70 1 分鐘，延展溫度 72 1 分鐘，循環 30 週期；最後延展溫度 72 7 分鐘。結果顯示煉合反應之溫度於 58~70，皆可於轉殖株產生約 1.8 kb 之單一 DNA 片段，非轉殖株則無此 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 (圖 2.)。經由 genomic DNA 不同含量之 PCR 測試，煉合溫度為 68 條件下，0.1 ng genomic DNA 仍可產生 1.8 kb DNA 產物。歐洲數國之 15 個研究室以 35S 及 NOS 分別為引子之檢測極限為 0.1~2 ng 及 0.5~10 ng⁽²⁴⁾，顯示本試驗 PCR 之結果敏感度極高。

三、PCR DNA 產物之鑑定

(一) 抗藥基因 (CP4 EPSPS) 之定序

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 為 1.8 kb 者，再抽取此菌株之 plasmid DNA 定序⁽¹²⁾。由 DNA 序列及與 NCBI 基因庫比對 CP4 EPSPS 胺基酸序列之結果顯示，1.8 kb PCR 產物由 35S promoter 之 DNA 片段 (106 bp)、矮牽牛葉綠體 transit peptide DNA 片段 (220 bp)、全長 CP4 EPSPS cDNA (1368 bp) 及 NOS 3' DNA 片段 (102 bp) 組成，與大豆 40-3-2 品系⁽²⁷⁾ 呈現 insert DNA 之構築相同。將 CP4 EPSPS DNA 序列轉換成胺基酸序列與 NCBI 基因庫內農桿菌 *Agrobacterium* sp. strain CP4 之 CP4 EPSPS 胺基酸序列比對之結果，大腸桿菌單一菌株之 plasmid DNA 經重複檢測 4 次，於胺基酸 serine² 處皆為 leucine (鹼基為 CTT)。將 CP4 EPSPS 胺基酸序列與 NCBI 基因庫之番茄、玉米、矮牽牛、大腸桿菌比對，相似度為 25.0、24.1、23.3、26.0%，CP4 EPSPS 與一般植物及微生物之 EPSPS 功能有關之重要胺基酸部位經鑑定位於 Lys²⁸、Arg³³ 及 Arg¹²⁸ 處，相當於大腸桿菌之 Lys²²、Arg²⁷ 及 Arg¹²⁴ (13, 15)，而 CP4 EPSP synthase 胺基酸 Ala¹⁰⁰ 相當於矮牽牛之 Gly¹⁰⁰ 及大腸桿菌之 Gly⁹⁶ (13, 15)，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⁽¹²⁾ (圖 3.)。

(二) Nested PCR 檢測

此 Nested PCR 引子為針對 insert DNA 構築中所添加之矮牽牛 CTP DNA 片段及目標基因 CP4 EPSPS DNA 片段所設計者，除了可確證以 35S

及 NOS 為引子之 PCR 產物以外，亦可應用於篩選性 PCR 流程之後，專一性標的基因之檢測。轉殖株大豆以 35S 及 NOS 為引子之 1.8 kb PCR 產物者經四組引子：CTP-F/EPSPS-1、CTP-F/EPSPS-2、35S/CTP-R 及 NOS/EPSPS-3 (表 1.) 之 nested PCR 測試及電泳分析，分別測得約 680、822、144 及 129 bp DNA 片段 (圖 4.)。

(三) 限制酶消化反應

由 1.8 kb PCR 產物經 BamHI、PstI 及 NcoI 3 種限制酶消化反應及電泳分析，可將 PCR 之 DNA 產物分割為二 (0.6、1.2 kb)、三 (0.3、0.7、0.9 kb) 及二 (0.6、1.2 kb) 個 DNA 片段 (圖 5.)。此等限制酶於 CP4 EPSPS 基因之切點皆與抗嘉磷塞大豆 40-3-2 品系 insert DNA 序列者相似⁽²⁷⁾，可鑑定由 35S 起動子及 NOS 終結子為引子之 PCR 產物其目標基因為 CP4 EPSPS。

四、大豆植株、種子及市售相關加工產品之測定

(一) 轉殖株與非轉殖株大豆葉片之南方氏雜合反應 (Southern hybridization)

轉殖株與非轉殖株大豆之 genomic DNA，以 BamHI、RcoRI、HindIII、NcoI 4 種限制酶消化反應，再以 ³²P-CP4 EPSPS 為探針之南方氏雜合反應，結果顯示轉殖株之 genomic DNA，於 BamHI、RcoRI、HindIII、NcoI 限制酶處理者分別可辨識四 (1.6、3.3、6.5、16 kb)、三 (2.2、3.0、6.4 kb)、二 (1.8、5.5 kb)、二 (8.0、18.0 kb) 個 DNA 片段，非轉殖株則無可辨識之 DNA 片段 (圖 6.)，此結果不僅可證明自備之 ³²P-CP4 EPSPS 的確存在於抗嘉磷塞之大豆植株中，且至少於植體中具 2 組以上 CP4 EPSPS DNA，以基因槍方式轉基因之植株可能具多組 CP4 EPSPS 基因。

(二) 大豆植株、種子及市售相關加工產品之 PCR 測定

轉殖株大豆之葉片、種子 (0.1%、W/W、轉殖株/非轉殖株) 及市售之豆漿及豆腐，經以 35S/CTP-R 及 NOS/EPSPS-3 引子之 PCR 測試、電泳分析分別測得約 144 及 129 bp DNA 片段 (圖 7.)，衛生署藥檢局以 35S、EPSPS 或 NOS 為引子之檢測極限亦為 GM 大豆之 0.1% (w/w)⁽²³⁾。因此以 35S/NOS、CTP-F/EPSPS-1 及 CTP-F/EPSPS-二引子之 PCR 分析，可利用於抗嘉磷塞轉基因大豆活體原料之檢測，以 35S/CTP-R 及 NOS/EPSPS-三引子之 PCR 分析，可利用於抗嘉磷塞轉基因大豆活體原料及加工食品 DNA 之檢測。

結 語

針對抗嘉磷塞大豆之檢測，除了由 35S 或 NOS DNA 片段設計引子，進行篩選式 PCR 檢測檢體是否為基因改造食品以外，亦經由內切限制酵素反應之圖譜、巢式 PCR (nested PCR)、標的基因探針之雜化以及 PCR 產物定序等四種方法進一步確認 PCR 之結果，進階以標的基因進行特異性 PCR 之檢測，證明轉基因為 CP4 EPSPS，此抗嘉磷塞大豆為 Roundup Ready 大豆(圖 8.)。使用 PCR 分析方法，對於基因改造大豆作物或種子原料之檢測，較容易檢出且正確性亦高，因為轉殖之標的基因及其蛋白質的結構較完整。然而對基因改造食品之檢測困難度較大，因為檢體於加工過程中經過高溫、發酵或酵素水解，使得 DNA 斷裂成小片段等問題。本研究由 35S/CTP-R 及 NOS/EPSPS 兩組引子，進行 PCR 檢測，亦可專一性檢出大豆活體原料及加工食品中小片段 DNA。一般而言，PCR 檢測方法之優點為可進行大量檢體偵測、具較高之特異性、靈敏度及操作簡易等。但亦有檢出錯誤之可能性，例如檢體或試劑被 CaMV 或農桿菌感染，使檢測結果呈偽陽性，因此進行 PCR 方法檢測時須配合對照組試驗，降低檢出結果之誤判。

參考文獻

1. 中華民國農產貿易統計要覽。2001。行政院農委會，台北。203 頁。
2. 林即易、闕麗眼、施養志。2000。以 PCR 方法檢測基因改造大豆及玉米。基因改造食品之貿易管理與標示問題研討會論文集。台北。87-101。
3. 袁秋英、蔣慕琰。2002。進口大豆抗嘉磷塞除草劑之測定及其基因特性之探討。臺灣農業化學暨食品科學(編印中)。
4. 潘子明。2000。基因改造食品檢驗方法總論。基因改造食品之貿易管理與標示問題研討會論文集。台北。27-85。
5. <http://www.oecd.org/>
6. <http://www.bats.ch/>
7. Amrhein, N., Deus, B., Gehrke, P. and Steinrücken, H. C. 1980. The site of the inhibition of the shikimate pathway by glyphosate. *Plant Physiol.*, 65 : 830-834.
8. Behrens, S., Case, D., Dickinson, D., Kies, C. and Miller, L. 2000. Biotechnology-The next green revolution?. (<http://www.public.iastate.edu/~rjsalvad/reports/s00/GMOhungry/hung^ergmo.html>).
9. Bell, J. Matthiesen, C., Matthiesen, D. and Handschke, C. 2000. Issues surrounding the GMO controversy. (<http://www.ublic.iastate.edu/~rjsalvad/reports/s00/GMOcontroversy/GMOcontroversy.html>)

10. Brett, G. M., Chambers, S. J., Huang, L. and Morgan, M. R. A. 1999. Design and development of immunoassays for detection of proteins. *Food Control*, 10: 401 -406.
11. Della-Cioppa, G., Bauer, S. C., Klein, B. K., Shah, D. M., Fraley, R. T. and Kishore, G. 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.
12. Duke, S. O. 1996. Herbicide-resistant crops: Agricultural, environmental, economic, regulatory, and technical aspects. pp. 53 -84. CRC Press, Inc., USA.
13. Duncan, K., Lewendon, A. and Coggins, J. R. 1984. The complete amino acid sequence of *Escherichia coli* 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase. *FEBS Lett.*, 170 : 59-63.
- Mitten, D. H., MacDonald, R. and Klonus, D. 1999. Regulation of foods derived from genetically engineered crops. *Curr. Opin. Biotechnol.* 10:298-302.
14. Gachet, E., Martin, G. G., Vigneau, F. and Meyer, G. 1999. Detection of genetically modified organisms (GMOs) by PCR: a brief review of methodologies available. *Trends in Food Sciences & Technology*. 9:380 -388.
15. Gasser, C. S., Winter, J. A., Hironaka, C. M. and Shah, D. M. 1988. Structure, expression and evolution of the 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase genes of petunia and tomato. *J. Biol. Chem.* 263 : 4280-4289.
16. Huebner, P., Studer, E. and Luethy, L. 1999. Quantitation of genetically modified organisms in food. *Nature Biotechnol.* 17:1137 -1138.
17. Kuiper, H. A. 1999. Summary report of the ILSI Europe workshop on detection methods for novel foods derived from genetically modified organisms. *Food Control*, 10 : 339-349.
18. Hupfer, C., Hotzel, H., Sachse, K. and Engel, K. H. 1998. Detection of the genetic modification in heat-treated products of Bt maize by polymerase chain reaction. *Z. Lebensm. Unters. Forsch A.* 206:203 -207.
19. Hübner, P., Studer, E., Häfliger, D., Stadler, M., Stadler, M., Wolf, C. and Looser, M. 1999. Detection of genetically modified organisms in food: critical points for quality assurance. *Accred. Qual. Assur.* 4: 292-298.
20. Issues of Genetically Modified Crops as reported in the press. 2000. (http://www.urel.berkeley.edu/berkeleyan/1999/0915/crop_report.html)
21. Kay, R. A., Daly, C. M. and McPherson, J. 1987. Duplication of the *CaMV*/35S promoter sequences creates a strong enhance for plant genes. *Science*, 236 : 1299-1302.
22. Kishore, G. M. and Shah, D. M. 1988. Amino acid biosynthesis inhibitors as herbicides. *Annu. Rev. Biochem.*, 57 : 627-663.
23. Lin, H. Y., Chiueh, L. C. and Shih, D. Y. C. 2000. Detection of genetically modified soybeans and maize by the polymerase chain reaction method. *J. Food and Drug Analysis*, 8: 200 -207.
24. Lipp, M., Anklam, E., Brodmann, P., Pietsch, K. and Pauwels, J. 1999. Results of an interlaboratory assessment of a screening method of genetically modified organisms in soy beans and maize. *Food Control*, 10: 379-383.
25. Meyer, R. 1999. Development and application of DNA analytical methods for the detection of GMOs in food. *Food Control*, 10: 391-399.
26. Mullis, G. T. and Erlich, H. A. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239: 487-491.

27. Padgett, S. R., Kolacz, K. H., Delannay, X. D., LaVallee, Tinius, B. J., Tinius, C. N., Rhodes, W. K., Otero, Y. I., Barry, G. F., Eichholtz, D. A., Peschke, V. M., Nida, D. L., Taylor, N. B. and Kishore, G. M. 1995. Development, identification, and characterization of a glyphosate-tolerant soybean line. *Crop Sci.* 35: 1451-1461.
28. Peterson, G., Cunningham, S., Deutsch, L., Erickson, J., Quinlan, A., Racz-Luna, E., Tinch, R., Troell, M., Woodbury, P. and Zens, S. 2000. The risks and benefits of genetically modified crops: A multidisciplinary perspective. (<http://life.csu.edu.au/consecol/vol14/iss1/art13/>).
29. Rogan, G. J., Dulin, Y. A., Lee, T. C., Magin, K. M., Astwood, N. S., Bhakta, L. N., Leach, P. R., Sanders and R. L. Fuchs, 1999. Immunodiagnostic methods for detection of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase in Roundup Ready soybeans. *Food Control*, 10: 407-414.

表1. 測試中使用之引子

No. primer	DNA sequence (5' 3')	Gene	Amplified DNA
(1) 35 S	GACGCACAATCCCCTATCCTTCGCA	35 S promoter	1800 bp
NOS	CATCGCAAGACCGGCAACAGGATTC	NOS terminator	
(2) CTP-F	CAACATGGCTCAAGGGATACAAACCC	CTP of petunia	680 bp
EPSPS -1	GTCACCGTCTTCCGATTTTAC	CP4 EPSPS	
(3) CTP-F	CAACATGGCTCAAGGGATACAAACCC	CTP of petunia	822 bp
EPSPS -2	GATCGGCTCGATGACCGTCGTG	CP4 EPSPS	
(4) 35 S	GACGCACAATCCCCTATCCTTCGCA	35S promoter	144 bp
CTP -R	GGGTTTGTATCCCTTGAGCCATGTTG	CTP of petunia	
(5) NOS	CATCGCAAGACCGGCAACAGGATTC	NOS terminator	129 bp
EPSPS -3	GAACTCTCCGATACGAAGGCTGCC	CP4 EPSPS	

CTP : chloroplast transit peptide.

未施藥大豆

施藥大豆



圖1. 市售大豆噴施嘉磷塞(41% 溶液)1.8 kg/ha，施藥後7日，抗嘉磷塞轉殖株正常生長，非抗嘉磷塞轉殖株褐化死亡。

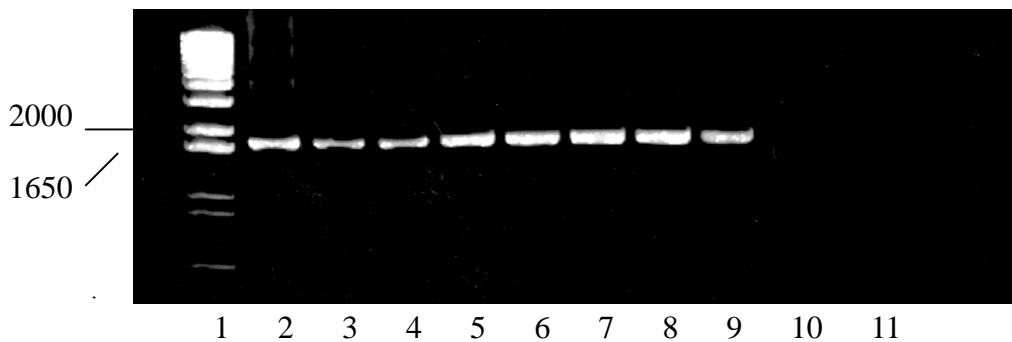


圖2. 抗嘉磷塞轉基因大豆以35S 及NOS為引子之PCR反應煉合溫度測定。

第1欄為DNA marker，第2欄至第9欄為分別為轉殖株之PCR煉合溫度56、58、60、62、64、66、68、70，第10欄為非轉殖株之PCR煉合溫度56，第11欄為去離子水。

CP4	1	mlhgassrpatarkss-----glsgtvripgdksishrsfmfgglasgetritgl	50
Petunia	1	-----p.eivlqpikei....kl..k.l.nrill.aa.se...vvdn.	45
Tomato	17	-----i....kl..k.l.nrill.aa.se.r.vvdn.	49
Zea mays	14	-----i....kl..k.l.nrill.aa.se.t.vvdn.	46
E.coli	6	-----lqpiarvd..inl..sk.v.nrall.aa..h.k.vl.n.	44
CP4	51	legedvintgkamqangarir--kegdtwiidgvgn---ggll-----apeapld--fgnaa [*]	100
Petunia	46	.ssd.ih-mlg.lktl.lhve--edsanqravve.c---...fpvgkesk.iq.f--l...g [*]	100
Tomato	50	.ssd.ihymlg.lktl.lhveddn.nqra.ve.c.gfpv.kks-----ep.iq.f--l...g [*]	105
Zea mays	47	.ns...hymlg.lrtl.lsv--adkaakravv..c---...kfpvedake.vq.f--l...g [*]	102
E.coli	45	.dsd..rhln.lt.l.vsy--lsa-rtrceii.....p.-----ha-ga-elfl...g [*]	96
CP4	101	tgcrltmglvgydfdstfigda--sltkrpmgrvlnplremgvqvksedgd	150
Petunia	101	.am.pltaa.t.aggn.ryvl.gvprmrierisdldvg.kql.ae.dcl.t	142
Tomato	106	.am.pltaa.t.aggh.ryvl.gvprmrierigdlvg.kql.ae.dcl.t	147
Zea mays	103	.am.pltaa.taaggnatyvl.gvprmrierigdlvg.kql.ad.dcl.t	154
E.coli	97	.am.plaaalclgsn.ivlt.ep--rmkerl.hlvda..lg.akityleqe	146

圖3. 抗嘉磷塞轉基因大豆之CP4 EPSPS 胺基酸部份序列與矮牽牛、番茄、玉米、及大腸桿菌之EPSPS之比較。粗體字者為與EPSPS 功能相關之胺基酸，右上角具* 標示者為與嘉磷塞結合相關之胺基酸，”.”為相同之胺基酸，”-“為無胺基酸之空格。

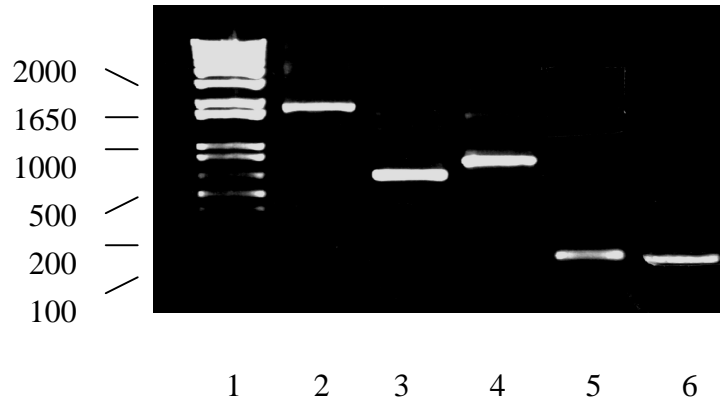


圖4. 抗嘉磷塞轉基因大豆以35S、NOS、矮牽牛之CTP DNA 片段及CP4 EPSPS DNA 片段為引子之Nested PCR測定。35S 及NOS引子之PCR產物為DNA 模板，第1欄為DNA marker，第2欄至第6欄之引子分別為35S/NOS、CTP-F/EPSPS -1、CTP-F/EPSPS-2、35S/CTP-R、NOS/EPSPS-3。

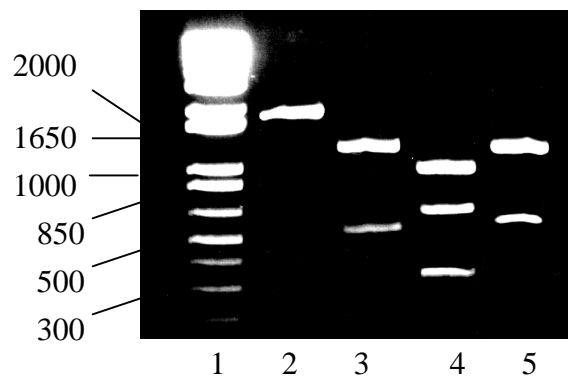


圖5. 抗嘉磷塞轉基因大豆PCR產物之限制酵素消化反應。第1欄為DNA marker，第2欄為1.8 kb之PCR DNA 產物，未經限制酵素反應者，第3至第5欄分別經限制酵素BamHI，Pst I 及NcoI 反應者，以1.2% agarose gel 電泳分析。

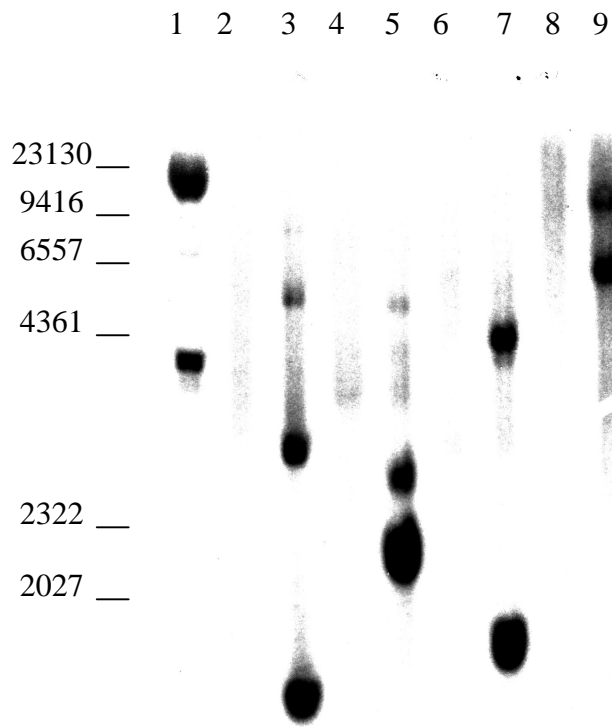
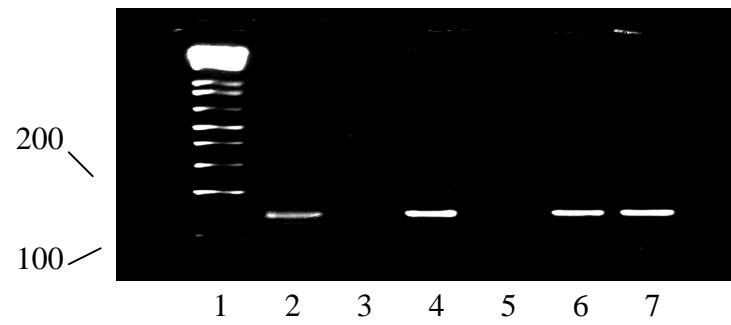


圖6. 抗嘉磷塞轉基因大豆植株及非轉殖株之南方氏雜合反應，大豆 genomic DNA 20 μ g，經限制酵素行消化反應及電泳分離後將DNA 轉移至轉漬膜，以 32 P- CP4 EPSPS 為探針行雜合反應及自動放射顯影。第1欄為DNA marker，第2、3欄之限制酵素為BamHI，第4、5欄為EcoRI，第6、7欄為HindIII，第8及9欄為NcoI；第3、5、7、9欄為轉殖株葉片DNA，第2、4、6、8欄為非轉殖株葉片DNA。

(A) primers: 35S / CTP-R



(B) primers: NOS / EPSPS-3

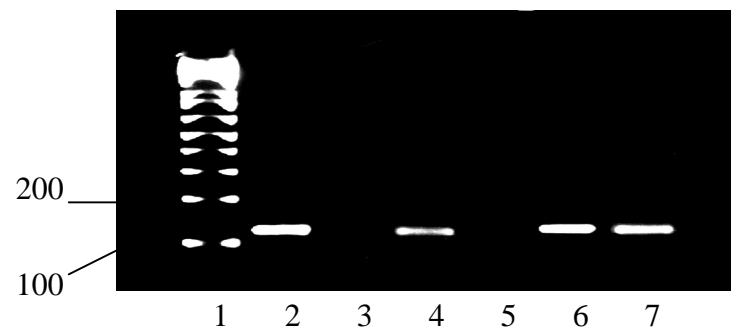


圖7. 大豆及農產加工品抗嘉磷塞基因之PCR測定。純化之DNA 以(A) 35S/CTP-R及(B)NOS/EPSPS-3為引子之增殖。第1欄為DNA marker，第2欄為大豆葉片(轉殖株)，第3欄為大豆葉片(非轉殖株)，第4欄為大豆種子(0.1%、轉殖株/非轉殖株)，第5欄為大豆種子(非轉殖株)，第6欄為豆漿，第7欄為豆腐。

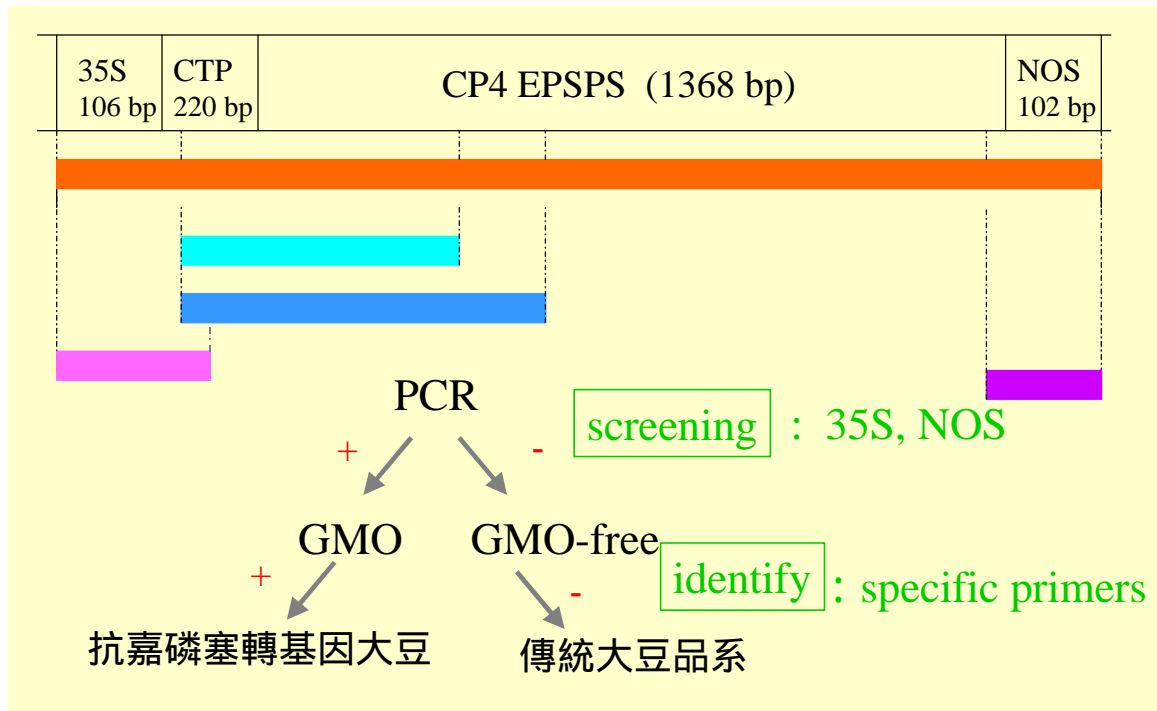


圖8. 抗嘉磷塞轉基因大豆以PCR檢測之流程圖。利用篩選性引子(35S, NOS)可檢出是否為基因改造作物或食品，再利用專一性引子(35S/CTP, CTP/EPSPS或EPSPS/NOS)可檢出是否為抗嘉磷塞作物或食品。