

基因轉殖作物品種檢測技術之開發—利用 35S 啟動子分子標誌檢測轉基因玉米及大豆¹

王昭月^{2,4} 范明仁² 林俊義³

摘 要

王昭月、范明仁、林俊義。2004。基因轉殖作物品種檢測技術之開發—利用 35S 啟動子分子標誌檢測轉基因玉米及大豆。中華農業研究 53:9-17。

本研究係分別以轉抗殺草劑基因之大豆以及轉抗蟲基因之玉米作為模式植物，建立基因轉殖植物在 DNA 層次之初步檢測分析。研究中基因轉殖與非基因轉殖之玉米及大豆共十七個樣品，經比較不同 DNA 萃取成本、DNA 純度以及聚合酵素連鎖反應結果，以 Wizard™ Genomic DNA Purification Kit 萃取結果較佳。另比較利用巢式聚合酵素連鎖反應(Nested Polymerase Chain Reaction)以及一般聚合酵素連鎖反應，進行基因轉殖大豆及玉米之鑑定，另以歐盟認可之基因轉殖產品偵測試劑組(Biosmart Allin 1.0 GMO Screening System)為對照，經依作物調整其聚合酵素連鎖反應條件，結果可正確測得基因轉殖玉米及大豆樣品中的 CAMV 35S 啟動子特有之 150bp DNA 片段；此外，依 CAMV 35S 啟動子序列，所合成之 35S 1/35S 2 引子以及 35S-F/ 35S-R 引子，亦可分別用以測得基因轉殖樣品中 CAMV 35S 啟動子特有之 195bp DNA 片段與 207bp 之 DNA 片段。

關鍵詞：基因轉殖作物、檢測。

前 言

二十世紀是分子生物科技邁向基因工程實際應用的時代，在農作物改良上，已利用分子生物技術開發出高產量、高品質、健康、環保以及具有抵抗不良環境衝擊之基因轉殖植物(Transgenic plant)或稱之為基因改造作物(Genetically modified crops; GM crops)(潘 2000)。首宗基因改造作物“Flavr Savr™ tomato”，於 1994 年獲准於美國及英國上市，統計至目前(2003 年)全球已通過 78 個基因改造作物之安全評估並上市，而依據 ISAAA(International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications)統計，2002 年全球商業性種植之基因改造作物已達五千八百萬公頃(James 2002)。唯基

1. 行政院農業委員會農業試驗所研究報告第 2180 號。接受日期：92 年 8 月 18 日。
2. 本所作物種原組助理研究員、研究員兼組長。臺灣省 臺中縣 霧峰鄉。
3. 本所所長。臺灣省 臺中縣 霧峰鄉。
4. 通訊作者，電子郵件：jywang@wufeng.tari.gov.tw；傳真機：(04)23331720。

因轉殖作物雖然為人類帶來高農業生產力、高品質以及高附加利用價值，但卻也可能產生一些潛在對人類及農業生態的負面影響。包括：基因轉殖作物可能加速全世界作物品種的單純化，以其強勢競爭力可能造成對其他作物生長之威脅，因而衝擊生態及物種(基因)的平衡與多樣性；以及，基因轉殖作物可能藉著花粉將所攜帶的新基因傳給其他地方種或野生種，因而造成基因汙染，並有衍生「超級野草」的危機，進而破壞地球生態之虞(Losey *et al.* 1999)。

在種原多樣性保育與永續利用前提下，國內的種原收集、保存與利用工作者，除繼續對傳統育種改良之種原材料詳實掌控其基因背景與利用外；對於新推出的基因轉殖作物，在進行生態及生物體影響安全評估同時，仍亟需建立快速且正確的基因轉殖植物之分子鑑定技術或篩檢方法，以提供與傳統非基因轉殖種原之區隔，另一方面亦可協助作為基因轉殖作物在生態環境中傳播監控之指標。

材料與方法

供試轉基因植物

自中華民國穀類研究所進口之大豆及玉米材料中，取得標誌為基因改造之大豆、玉米之種子樣品，包含 5 批轉抗殺草劑基因大豆(含 Roundup Ready soybean)種子及 7 批轉抗蟲基因玉米(含 BT-176)種子；另各取二個本省選育之玉米與大豆品種種子樣品，以及一個購自市場的大豆種子樣品，計 5 個對照樣品。綜合以上共計 17 個試驗用種子樣品(表 1)。

表 1. 基因轉殖作物檢測用之玉米及大豆種子樣品

Table 1. Samples of maize and soybean seeds prepared for transgenic crops detection

Sample no.	Crop	Import/ Local origin	Source	Remark
1	Soybean	Local origin #1	Supermarket	Non-GMO labeling
2	Soybean	Local origin #2	Supermarket	Non-GMO labeling
3	Soybean	Local origin #3	Supermarket	—
4	Soybean	Import #1	CGPRDI ^z	GMO ^z
5	Soybean	Import #2	CGPRDI	GMO
6	Maize	Import #3	CGPRDI	GMO
7	Maize	Import #4	CGPRDI	GMO
8	Maize	Import #5	CGPRDI	GMO
9	Maize	Tainung no.2	TARI ^z inbreed	Non-GMO
10	Maize	Tainung no.3	TARI inbreed	Non-GMO
11	Maize	Import #6	CGPRDI	GMO
12	Maize	Import #7	CGPRDI	GMO
13	Maize	Import #8	CGPRDI	GMO
14	Maize	Import #9	CGPRDI	GMO
15	Soybean	Import #10	CGPRDI	GMO
16	Soybean	Import #11	CGPRDI	GMO
17	Soybean	Import #12	CGPRDI	GMO

^z abbreviation, GMO:genetically modified organism ; CGPRDI:China Grain Products Research and Development Institute ; TARI:Taiwan Agricultural Research Institute.

轉基因植物之分析與檢測

以聚合酵素連鎖反應(Polymerase Chain Reaction, PCR)以及巢式聚合酵素連鎖反應(Nested Polymerase Chain Reaction, Nested PCR)分別建立偵測基因轉殖作物種子樣品中所含之 CAMV 35S 啟動子的 DNA 片段(Meyer 1999; Lipp *et al.* 1999)。Nested PCR 反應中，並以歐盟認可之基因轉殖產品 PCR 偵測用試劑組作為對照(Kuiper 1999)；而 PCR 分析則參考 CAMV 35S 啟動子的序列(Wolf *et al.* 2000)，合成專屬之引子進行反應，並比較其鑑別結果。

DNA 之萃取與純化：將待檢測之玉米與大豆種子磨粉，並分別取 50~80mg 之樣品，利用 Wizard™ Genomic DNA Purification System(Promega, Madison, WI)、Wizard® Magnetic DNA Purification System(Promega)，以及 Premier Excell Pure™ Plant/Fungi Genomic DNA Kit 等，三種不同的 DNA 的萃取試劑組，進行 DNA 萃取。萃取得之 DNA 再以 Spectrophotometer 以 OD₂₆₀ 測定萃取物濃度，最後並分別稀釋其濃度為 80ng/μl，提供作為 PCR 反應的模版，以進行 PCR 分析並比較其結果。

引子設計：35S 1/35S 2 以及 35S-F/35S-R 二組引子，係參考 Wolf 等人(2000)檢測 CAMV 35S 啟動子所設計之專屬引子。35S 1 序列為 5'GCT CCT ACA AAT GCC ATC A3'；35S 2 序列為 5'GAT AGT GGG ATT GTG GGT CA5'。另 35S-F 引子其序列為 5' CCT ACA AAT GCC ATC ATT GCG A3'；35S-R 序列為 5'GGG TCT TGC GAA GGA TAG TG 5'。

CAMV 35S 啟動子之 PCR 分析：PCR 反應總體積為 25 μl，內含 1 unit Taq polymerase (Roche-Fast Start)、1×PCR buffer (10 mM KCl；50 mM Tris-HCl, pH 8.3；5 mM (NH₄)₂SO₄)、1.5 mM MgCl₂、200 μM dNTP、0.5 μM primer 及 100 ng template DNA。PCR 反應儀器為 Perkin Elmer Cetus Thermal Cycler 9600，反應溫度條件依 CAMV 35S 啟動子合成的引子序列之 T_m 值分別設定如下：(一)35S 1/35S 2 引子【95°C 5 分鐘一次；95°C 20 秒，57°C 40 秒，72°C 1 分鐘，進行 40 次；接續 72°C 3 分鐘；反應完成後貯藏在 4°C。】(二)35S-F/35S-R 引子【94°C 10 分鐘一次；95°C 25 秒，62°C 30 秒，72°C 45 秒，進行 50 次；接續 72°C 7 分鐘；反應完成後貯藏在 4°C。】

CAMV 35S 啟動子之 Nested PCR 分析：Nested PCR 係用於增進反應的專一性，此方法包含兩個反應步驟，首先利用外側的引子組進行第一次增殖作用；隨後，以第一次 PCR 產物作為模板，設計一個內部的新引子組，再進行第二次 PCR 反應。由於以整體複雜性較低的模版 DNA 進行第二次 PCR 反應，可確保產生較多特定的同質終產物。

Nested PCR 分析係以基因轉殖產品檢測用之試劑組(Biosmart Allin 1.0 GMO Screening System)進行之，其中第一次反應總體積為 50 μl，內含 1 unit Taq polymerase (Roch- Fast Start、Promega Taq-buffer B)、40 μl Allin Mix 1 (內含 35S 啟動子 篩檢之引子、dNTP 與 PCR buffer)，及加入 400 ng template DNA；第二次反應係以第一次 PCR 產物，取 1 μl 當作反應模版，再加入 49 μl Allin Mix 2 再進行二次反應，反應混合液中特別帶有 internal control(Zein 基因)，可用以監測 PCR 反應，是否存在抑制產物生成之因子。兩次反應溫度條件分別設定如下：(一) Nested PCR 第一次反應【95°C 3 分鐘一次；95°C 30 秒，55°C 40 秒，進行 40 次；接續 72°C 3 分鐘；反應完成後貯藏在 4°C。】(二) Nested PCR 第二次反應【95°C 1 分鐘一次；95°C 45 秒，50°C 40 秒，72°C 30 秒，進行 45 次；接續 72°C 3 分鐘；反應完成後貯藏在 4°C。】

DNA 電泳：經不同聚合酵素連鎖反應而增殖之 DNA，取 12 μl 加入 6 倍的電泳緩衝液 (6×loading buffer：0.25% bromophenol blue 及 xylene cyanol，40% w/v sucrose)，以含 2.0% agarose 與 1.25 %Neu-Sev 3：1 agarose 之膠體，在 0.5X TBE buffer 中進行電泳，電泳槽均為 Cosmo, Mupid-2，電壓 100 伏特，電泳時間約 25~30 分鐘，結束後置於 0.5 mg/ml 的 ethidium bromide 中染色 20-30

分鐘，再於紫外燈光箱中，檢視膠體上 DNA 多型性片段，並照相及貯存影像於 IS 2000 Digital Imaging System (Alpha Innotech Corporation)，接續進行基因轉殖作物之 CAMV 35S 啟動子之 DNA 片段檢測。

結 果

DNA 快速萃取及比較

以包含基因轉殖之大豆及玉米等十七個樣品 50~80mg 進行 DNA 之萃取，並比較三種 DNA 萃取試劑(Promega / Wizard® Genomic DNA Purification Kit ; Promega / Wizard® Magnetic DNA Purification System for Food ; Premier Excel Pure™ Plant/Fungi Genomic DNA Kit)之 DNA 純度與產量，結果三種 DNA 萃取試劑組均可成功萃取得玉米與大豆種子樣品之 DNA。萃取得之 DNA 再以 Spectrophotometer 測定其 OD₂₆₀ 數值，推算其 DNA 量結果為 2μg ~4 μg。另由電泳檢測 DNA 品質結果，三種萃取試劑均可獲得品質良好之 DNA，但以 Wizard® Genomic DNA Purification Kit 之品質最好。就萃取所需之工作時間則分別為 1~4 小時，但以 Wizard® Magnetic DNA Purification System for Food 僅需 1 小時，為最省時(表 2)。萃取費用則為 25 元至 100 元之間，但其中則以 Wizard® Genomic DNA Purification Kit 僅需 25 元之費用最低(表 2)。

表 2. DNA 快速萃取試劑組及萃取 DNA 品質之比較

Table 2. Different DNA extraction kits and the comparisons of their quality

DNA Extraction Kit	Quality	Time (Hours)	Cost (NT dollars/sample)
Promega / Wizard® Genomic DNA Purification Kit	Good	2	25
Promega / Wizard® Magnetic DNA Purification System (food)	Fine	1	150
Premier ExcelPure™ Plant/Fungi Genomic DNA Kit	Fine	4	60

CAMV 35S 啟動子之 PCR 分析

依 CAMV 35S 啟動子基因的 5'與 3'兩端之序列，合成 35S 1/35S 2 引子組(35S 1 序列為 5'GCT CCT ACA AAT GCC ATC A3'；35S 2 序列為 5'GAT AGT GGG ATT GTG GGT CA5')；以及 35S-F/35S-R 引子組 (35S-F 引子其序列為 5' CCT ACA AAT GCC ATC ATT GCG A3'；35S-R 序列為 5' GGG TCT TGC GAA GGA TAG TG 5')。合成之 35S 1/35S 2 引子以及 35S-F/35S-R 引子經 PCR 反應結果，可分別測得基因轉殖大豆及玉米樣品中 CAMV 35S 啟動子基因之 195bp DNA 片段(圖 1)以及 207bp 之 DNA 片段(圖 2)，其中 P 樣品為 positive control 係以 Biosmart Allin 1.0 GMO Screening System 所附之對照組(含 80ng DNA /μl；0.5% each, Round up Ready® soybean and BT-176 maize)；編號 1,2 為非基因轉殖大豆，編號 3,4,14,15,16 是基因轉殖大豆樣品；編號 9,10 則為非基因轉殖玉米，編號 6,7,8,11,12,13 則是基因轉殖玉米樣品。據 35S 1/35S 2 引子之 PCR 電泳圖譜結果顯示，所有基因轉殖大豆及玉米種子樣品所抽得之 DNA(圖譜樣品編號：3,4,14,15,16,6,7,8,11,12,13)均可分別出現 195bp DNA 片段(圖 1)；而 35S-F/35S-R 引子之 PCR 電泳圖譜結果，所有基因轉殖樣品則具有 207bp 之 DNA 片段(圖 2)；另外屬於非基因轉殖之樣品(1,2, 9,10)則均不具此二個片段。

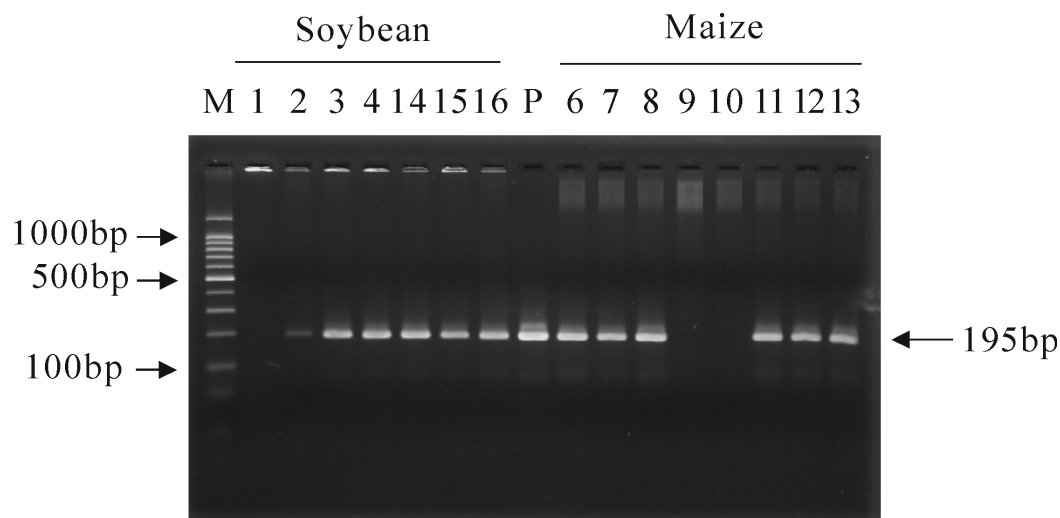


圖 1. 以 CAMV 35S 啟動子之特定序列 (35S 1/35S 2) 為引子，進行玉米及大豆基因轉殖樣品之檢測。

Fig. 1. Surveyed GMO samples by using PCR with CAMV 35S promoter specific sequence as primers (35S 1/35S 2).

Sample no. 1, 2 are non-GM soybean ; Sample no. 3, 4, 14, 15, 16 are GM soybean ; Sample no. 9, 10 are non-GM maize ; Sample no. 6, 7, 8, 11, 12, 13 are GM maize. Lanes M: size marker (100 ladder of promega). P: Positive control .

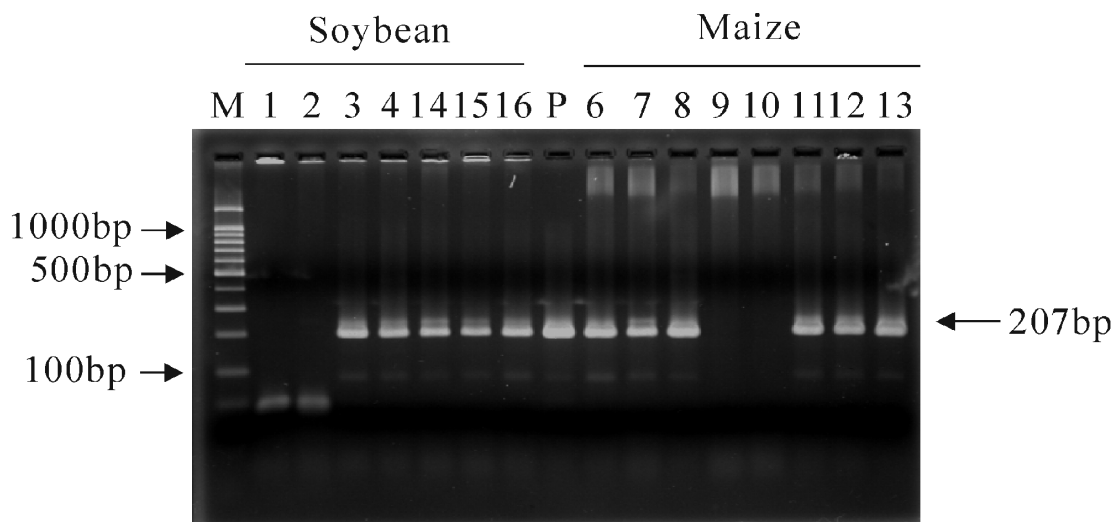


圖 2. 以 CAMV 35S 啟動子之特定序列 (35S-F / 35S-R) 為引子，進行玉米及大豆基因轉殖樣品之檢測。

Fig. 2. Surveyed GMO samples by using PCR with CAMV 35S promoter specific sequence as primers (35S-F/35S-R).

Sample no. 1,2 are non-GM soybean ; Sample no. 3, 4, 14, 15, 16 are GM soybean ; Sample no. 9, 10 are non-GM maize ; Sample no. 6, 7, 8, 11, 12, 13 are GM maize. Lanes M: size marker (100 ladder of promega). P: Positive control.

Nest-PCR 在基因改造大豆及玉米之鑑定

以歐盟認證之基因轉殖檢測用試劑組(Biosmart Allin 1.0 GMO Screening System)，配合利用 Nest-PCR 分析進行基因轉殖大豆及玉米之鑑定。初步經修正反應之模板 DNA 濃度為 400ng(PCR 反

應總體積 50 μ l)，或 200ng(PCR 反應總體積 25 μ l)，均可獲得穩定之鑑定結果，並正確的偵測得基因轉殖玉米及大豆樣品中之 CAMV 35S 啟動子基因專屬的 150bp DNA 片段(圖 3)。

Nest PCR 分析結果與基因轉殖樣品之判讀，按 Biosmart Allin 1.0 GMO Screening System 所採用之條件及結果說明書，判讀本試驗中所獲得之四個條帶，分別為 278bp (Zein 之基因，其來源為 Maize)，217bp (Zein 之基因， DNA 來源為 Internal Control)，150bp (CAMV35 啟動子基因)，118bp (Lectin 之基因)。Nest PCR 圖譜中編號 1,2，為非基因轉殖大豆，編號 10 則為非基因轉殖玉米樣品，均不具 150bp 之 DNA 片段；其餘編號 3,4,5 為基因轉殖大豆樣品，6,7,8,12 為基因轉殖玉米樣品，在 150bp 位置皆可得一清晰之條帶。

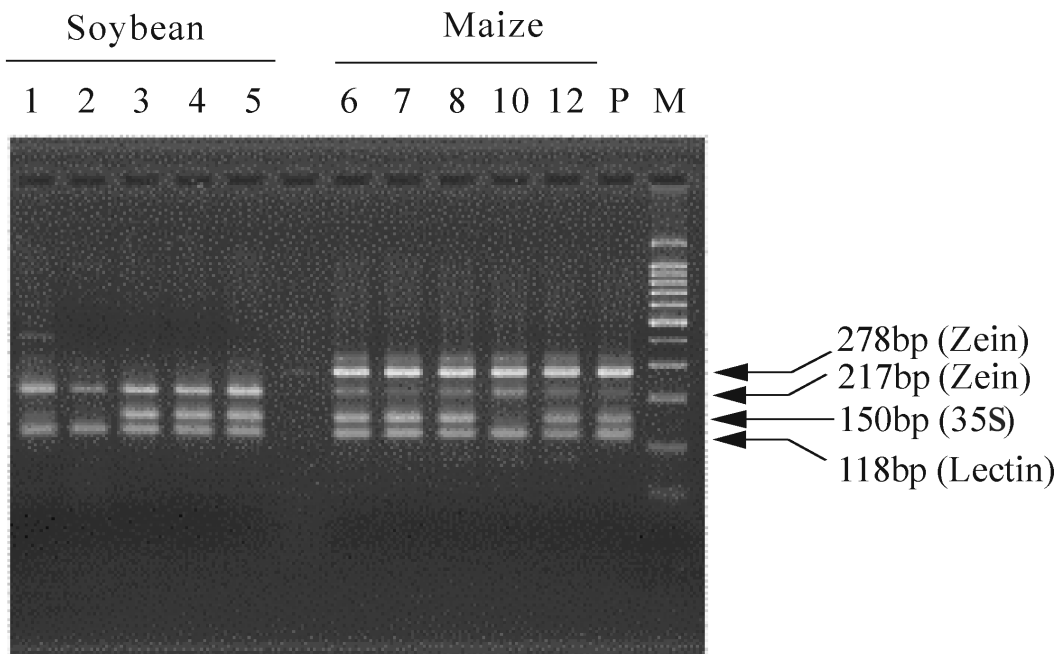


圖 3. 以 Biosmart Allin 1.0 試劑系統進行基因轉殖玉米及大豆樣品 CAMV 35S 啟動子之篩檢。

Fig. 3. Surveying maize and soybean GMO sample by Biosmart Allin 1.0 GMO Screen system for CAMV 35S promoter with nested PCR. Sample no. 1, 2 are non-GM soybean ; Samples no. 3, 4, 5 are GM soybean ; Sample no. 10 is non-GM maize ; Samples no. 6, 7, 8, 12 are GM Maize ; Lanes P: positive control ; M: size marker (100 ladder of promega).

討 論

基因轉殖作物的偵測，是生物科技與作物管理上重要之研究主題；完備之檢測方法也成為基因轉殖作物管制之基礎，唯基因轉殖作物偵測首要了解其轉殖方法及其基因構築，才能設計合適之方法以方便進行偵測。目前國際間鑑別基因轉殖生物的方法，主要分為兩大類，第一類以核酸為基礎之偵測方法：如聚合酵素連鎖反應(Polymerase Chain Reaction, PCR)，包括傳統 PCR(Gachet 1999)、Nested PCR (Meyer 1999)與 Real-Time PCR 等；第二類以蛋白質分析為基礎之方法(Rogan *et al.* 1999)：如酵素連結免疫吸附分析法(Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)，或西方墨點分析法(Western blot

analysis)等。唯目前歐洲官方研究機構所發表之基因轉殖作物檢測，多以第一類的核酸為主(Schreiber 1999)，可藉 CAMV 35S 啟動子設計之引子進行初步 PCR 之篩選；接續則作多基因鑑定之 PCR 分析(Multiplex PCR)，或根據基因轉殖構築中，插入之啟動子(promoter)、終結子(terminator)、篩選基因(selection gene)以及欲表現之目標基因(target gene)等，設計專屬之引子，以進行 Nested PCR 或特定基因轉殖作物之確認。此外，PCR 反應產物，將可再藉核酸定序、核酸內切酵素圖譜、探針雜交等分子技術，進行後續之確認。以上由特定單一基因的 PCR 分析乃至 Nested PCR 或多基因的 PCR 分析，將是本研究後續會開發以及建立的 GMO 鑑定系統。

唯不論是傳統 PCR、Nested PCR 與 Real-Time PCR，檢測基因轉殖作物之準確性以及再現性，皆與樣品 DNA 之品質息息相關，好的 DNA 品質為鑑定成功之基礎。由於本試驗使用之材料為種子，而糧食作物的種子尤其富含澱粉及其他二次代謝物等物質，DNA 含量普遍偏低，要獲得良好 DNA 品質是一種挑戰，故本試驗初步採用了三種 DNA 萃取試驗組，其所得之 DNA 經 PCR 結果可具穩定之再現性，且 PCR 產物清晰可判讀，唯兼顧 DNA 萃取時間與成品之考量，則以 Wizard® Genomic DNA 萃取試劑組表現較佳，可兼具快速萃取(二小時)及低萃取成本(25 元/樣品)等優點，以 50~80mg 之微量樣品，約可獲得 2 μ g 以上之 DNA，按一般 PCR 或 Nested PCR 反應條件，已可提供進行 20 次以上之 PCR 反應使用。

由於 Nest PCR 分析圖譜中，用以判讀 CAMV35 啟動子基因的 150bp 片段以及豆科種子必然存在的 Lectin 基因之 118bp 片段，兩者間分子大小相近且均為小於 150bp 之片段，以一般 DNA 電泳用的 2% Agrose 很難正確判讀及區隔，故本試驗採用了改良式 Agarose 膠體，以適當比率之 Agarose 及 Neu-Sev3:1 之膠體，電泳結果已可以將樣品中非基因轉殖大豆與玉米(樣品編號 1,2 與 10)，以及基因轉殖大豆與玉米(編號 3,4,5 與 6,7,8,12)，藉 150bp 之有無，明顯區隔出是否為基因轉殖產品。

Wolf 等研究人員(2000)曾針對基因轉殖產品中 CAMV 35S 啟動子之偵測，設計並提出一系列 PCR 反應之專屬引子，其中包含 35S 1/S 2、35S-F/35S-R，本試驗即參考其序列合成引子，以進行玉米大豆基因轉殖樣品之檢測，而試驗結果也與 Wolf 研究結果相符，分別可產生用以偵測 CAMV 35S 啟動子之 195bp 與 207bp 之片段。Wolf 研究結果，曾表示使用 35S 1/S 2 引子之 PCR 產物除 CAMV 35S 啟動子之專屬之 195bp 外，尚產生許多非專一性條帶，不若 35S-F/35S-R 僅產生唯一之 207bp 片段；而本試驗 PCR 反應之聚合酵素採用 Fast start polymerase，結果不論是 35S 1/S 2 或 35S-F/35S-R 引子組，均僅產生唯一條帶，具有較佳之專一性及判讀性；唯 35S 1/S 2 引子的 PCR 結果在 non-GM 的大豆(樣品 2)，呈現不確定的 35S 啟動子 之 195bp 條帶；而在 35S-F/35S-R 引子對 non-GM 樣品偵測則無此現象。另外，針對 35S 啟動子的 Nested PCR 分析，由於反應液內含的 internal control(Zein-217bp 之 DNA)，故全數樣品之 PCR 產物均有 Zein-217bp 條帶外；然所有樣品中之 Nested PCR 產物，均產生的 Lectin 基因之 118bp 片段，對玉米樣品而言值得進一步確認是否為人為之污染所致，唯對目前針對 35S 啟動子的偵測不致影響其判讀，故將於未來做為其他品系或作物進行 GMO 偵測時，詳加探討。

目前歐盟認可之 PCR 檢測鑑定方法可分成三個層級(Kuiper 1999)。一為檢測(Detection)：乃檢測樣品內是否含基因轉殖成分之材料，其方法一般以 PCR 為主，檢測對象為是否具有 CAMV35 啟動子或其 selector marker 為檢測基因；而層級二為鑑定(Identification)：鑑定係以基因轉殖“品種”為對象，瞭解基因轉殖之樣品是否為歐盟所認可之“品種”，此階段亦以 PCR 分析為主，但需設計特殊引子以檢測此基因轉殖之樣品內之 structure gene 為何，並與對照品種比對(此層級之分析，於本報告內雖尚未實施，但已列為將進行之工作)；第三層級為定量(Quantification)：為檢測樣品材料內基因轉殖成分之含量，一般係使用 Real-Time PCR。綜合以上歐盟對基因轉殖材料鑑定的方法，本研究在未來

在基因轉殖作物鑑定上，除考量開發快速有效率的鑑定方法外，為兼顧偵測的正確性，將配合以上多種篩檢方式，逐年作成綜合性之探討。

誌 謝

本研究部分分子生物技術承中興大學園藝研究所曾夢蛟教授指導，謹此謝意。

引用文獻

- 潘子明。2000。基因改造食品檢驗方法總論。p.27-85。基因改造食品之貿易管理檢驗與標示問題研討會論文集。
- Gachet, E.1999. Detection of genetically modified organisms (GMOs) by PCR: a brief review of methodologies available. *Trends Food Sci. Technol.* 9:380-388.
- James, C. 2002. *Global Review of Commercialized Transgenic Crops*. International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications, N.Y. 36 pp.
- Kuiper, H. A. 1999. Summary report of the ILSI Europe workshop on detection method for novel derived from genetically modified organisms. *Food Control* 10:339-349.
- Lipp, M., E. Anklam, P. Brodmann, K. Pietsch, and J. Pauwels. 1999. Results of an interlaboratory assessment of a screening method of genetically modified organisms in soybeans and maize. *Food Control* 10:379-383.
- Losey, J. E., L.S. Rayor, and M. E. Carter. 1999. Transgenic pollen harms monarch larvae. *Nature* 399:241.
- Meyer, R. 1999. Development and application of DNA analytical methods for the detection of GMOs in food. *Food Control* 10:391-399.
- Rogan, G. J., Y. A. Dudin, T. C. Lee, K. M. Magin, J. D. Astwood, N. S. Bhakta, J. N. Leach, P. R. Sanders, and R. L. Funchs. 1999. Immunodiagnostic methods for detection of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase in Roundup Ready® soybeans. *Food Control* 10: 407-414.
- Schreiber, G. A. 1999. Challenges for methods to detect genetically modified DNA in foods. *Food Control* 10:651-352.
- Wolf, C., M. Scheeferzinger, A. wurz, U. pauli, P. Hubner, and J. Luthy. 2000. Detection of cauliflower mosaic virus by the polymerase chain reaction: testing of food components for false-positive 35S-promoter screening results. *Eur. Food Res. Technol.* 210: 367-372.

Developing the Techniques for Transgenic Crops Detection -Detection of Genetically Modified Soybeans and Maize by 35S Promoter Molecular Marker¹

Jau-Yeuh Wang^{2,4}, Ming-Jen Fan² and Chien-Yih Lin³

Summary

Wang, J. Y., M. J. Fan, and C. Y. Lin. 2004. Developing the techniques for transgenic crops detection- detection of genetically modified soybeans and maize by 35S promoter molecular marker. J. Agric. Res. China 53:9-17.

Biotechnology has enabled the modification of crops in a very precise way thereby improving productivity and yield. Till 2003 about 78 transgenic crops were through safety evaluated and already approved. Since that, the problem for discriminating between transgenic crops and non- transgenic crops in the market was posed. In this study, we used herbicide resistance transgenic soybean and *Bacillus tumefaciens* (Bt) corn as model plants for setup the DNA level detection of transgenic crops. Three commercial DNA extraction kits were evaluated for DNA quality and PCR efficiency. The results showed that the Wizard® Genomic DNA Purification Kit can be manipulated easily to obtain DNA with good quality. The results of transgenic crops detection revealed that Nested PCR (Nest Polymerase Chain Reaction) analysis based on Biosmart Allin 1.0 GMO Screening System allowed the detection of transgenic soybean and transgenic corn by CaMV 35S promoter specific gene fragment of 150bp. Furthermore, the synthesized primers of 35S 1/35S 2 and 35S-F/35S-R also showed very efficient in detected the CaMV 35S promoter and produced the fragments of 195bp and 207bp respectively.

Key words: Transgenic crops, Detection.

-
1. Contribution No.2180 from Agricultural Research Institute, Council of Agriculture. Accepted: August 18, 2003.
 2. Assistant Horticulturist and Director and Senior Research Fellow, National Plant Genetic Resource Center, ARI, Wufeng, Taichung, Taiwan, ROC.
 3. Director-general of ARI, Wufeng, Taichung, Taiwan, ROC.
 4. Corresponding author, e-mail: jywang@wufeng.tari.gov.tw ; Fax: (04)23331720.