

參考質體 (plasmidic reference material) 於基因轉殖植物檢測之應用

農試所生技組 杜元凱 陳涵葳 丁肇彤 吳明哲

一、前言

隨著生物技術的發展，遺傳工程可選殖出一物種的特定基因，再將其導入另一物種中表現，進而改變或創造新的性狀。基因轉殖植物的發展堪稱為近代生物技術應用於農業研究的代表，科學家可以將來自於動物、植物或微生物的基因轉殖進入植物當中，使其獲得高產量、抗病、抗蟲等特性，或作為分子農場生產疫苗與工業用原料。由於基因轉殖植物與一般植物難以由外觀區分，常需依賴聚合酶鏈鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 等分子生物檢測技術進行判別。正規試驗之正對照組 (標準品, certified reference material, CRM) 為取自轉植株組織所研磨而成之粉末，再經由驗證機構所認證後，始得作為正式判斷基因轉殖植物之依據，但常有昂貴、不易取得與保存之情況，若目標序列已知，可將其構築為參考質體 (plasmidic reference

material, PRM)，以取代標準品之使用，具有易取得、易保存，低成本等優點，為進行基因轉殖植物檢測之良好標準品來源。

二、基因轉殖作物檢測方式

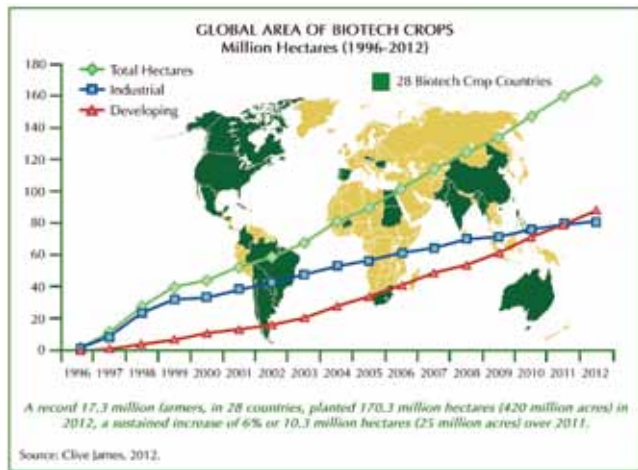
自1980年代基因轉殖煙草問世開始，育種者可藉基因轉殖的方式突破物種間的隔閡，縮短傳統育種時程，1995年上市的Flaver Savr™番茄，是第一項商品化的基改作物，根據國際農業生物技術應用推廣協會(International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications, ISAAA)統計，至2012為止共有美國、巴西、阿根廷等28個國家種植基因轉殖作物，商業總耕作面積已達170,300,000公頃(圖一)，因此如何分辨是否為基因轉殖作物為重要的研究課題。基因轉殖作物之檢測標的可分為核酸與蛋白質兩個大類，核酸標的之檢測除一般PCR外，還包括了多重PCR (multiplex PCR)、環形恆溫核酸增幅反應 (loop-mediated isothermal amplification, LAMP) 以及數位PCR (digital PCR) 等；蛋白質標的之檢測則以酵素聯結免疫吸附反應 (enzyme-

作者：杜元凱助理研究員
連絡電話：04-23317321

linked immunoassay, ELISA)以及側向流體檢測條帶 (lateral flow strip)為主，但蛋白質標的檢測方法僅適用於初步篩檢或定量用途，不如核酸標的檢測法精準，可定量、定性，或進行轉殖品系專一性(event-specific)的鑑別。基因轉殖作物的檢測可分三個層次(表一)：第一層為篩檢 (Screening)，初步篩選確認樣本中是否含有已登錄之轉殖作物篩選用基因如GUS (β -glucuronidase)或NptII (Neomycin phosphotransferase II)，常用方式為PCR；第二層為識別 (Identification)，進一步確定樣品中含有何種轉殖系，由於各項基因轉殖作物在向政府申請同意進行商業栽培前，需提供品系專一性的檢測引子對，可利用品系專一性PCR的方式辨識樣品內的轉殖系種類；第三層次則為定量(Quantification)分析，測定未知樣本中轉殖系的含量，常以real-time PCR或digital PCR的方式來進行檢測。

三、Plasmidic reference material 參考質體

檢測機構進行基因轉殖作物之定性與定量檢測時，必需取得該轉殖作物之標準品作為對照，目前常以轉殖作物之植物組織，經冷凍乾燥與研磨所得之粉末，再經Institute for Reference Materials and Measurements (IRMM)、American Oil Chemists' Society (AOCS)、Nippon Genes等驗證機構確認其品質後，始得作為標準樣本而公開販賣。參考質體則是將目標轉殖系之品系專一性序列(event-specific



圖一、歷年各國之基因轉殖作物耕作面積統計圖。(來源:ISAAA,2012)

表一、基因轉殖作物之檢測方式

檢測方式	目的	方式
篩檢 (Screening)	初步判定未知樣本是否含有基因轉殖作物。	PCR ^x Multiplex PCR ^x LAMP ^x ELISA ^y Lateral flow strip ^y
辨識 (Identification)	辨別未知樣本內所含基因轉殖作物品系。	品系專一性PCR
定量 ^z (Quantification)	測定未知樣本中所含基因轉殖系含量。	Real-time PCR Digital PCR

^x：以核酸為檢測標的之方式 ^y：以蛋白質為檢測標的之方式

^z：依各國規範不同，我國與日本為超過5%含量之產品即需標示具有基因轉殖植物成分，歐盟為0.9%，美國則無強制標示規範。

sequence)及物種特異性序列(taxon-specific sequence)構築至載體，經實驗驗證其定性與定量之能力等同於標準品時，始得取代標準品之使用(如圖二)。標準品除較為昂貴以外(1g售價約新台幣2,000~4,500元)，又因為其為由植物實體衍生之粉末狀態，在保存上需注意否則易受潮而無法使用，最重要的是，並非所有基因轉殖作物系皆具有標準品供販賣；相較下參考質體製作花費較為便宜，易於保存，只要取得轉殖作物之遺傳背景資料，即可進行特定轉殖系參考檢測質體的製作，並作為特定基因轉殖作物系之定性或定量用對照樣本。

四、結論與建議

人類對生活水準的要求驅動科技的快速發展，起於1980年代的基因轉殖植

物研究，目的在於減少農藥與化學肥料的施用、提升作物產量與營養價值、增加對抗氣候變遷等逆境摧殘，有助農業永續經營，然而基因轉殖作物對於環境生態乃至於食品安全的影響，仍然存在著支持與反對兩派說法。因應台灣目前核准多種基因轉殖作物進口的現況，國人確實需要一套監督預警系統，避免轉殖作物有意或無意間流入生態環境，如何有效判定未知樣本是否為轉殖作物，為檢監測技術上最重要的一項工作，利用參考質體作為正對照組，可有效提升檢測速率並降低成本花費，為實際作業可行之方法。

五、參考文獻

- James, C. 2012. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2012. ISAAA Brief No. 44. ISAAA: Ithaca, NY.
- Fraley R. T., S. G. Rogers, R. B. Horsch, P. R. Sanders, J. S. Flick, S. P. Adams, M. L. Bittner, L. A. Brand, C. L. Fink, J. S. Fry, G. R. Galluppi, S. B. Goldberg, N. L. Hoffmann, and S. C. Woo. 1983. Expression of bacterial genes in plant cells. PNAS. 1983 80(15) 4803-4807.
- Shindo, Y., H. Kuribara, T. Matsuoka, S. Futo, C. Sawada, J. Shono, H. Akiyama, Y. Goda, M. Toyoda, and A. Hino. Validation of real-time PCR analyses for line-specific quantitation of genetically modified maize and soybean using new reference molecules. JAOAC Int. 85(5):1119-26.



圖二、標準品與參考質體之差異。