

利用質體參考物質以及多重聚合酶連鎖反應建構 基改馬鈴薯之檢測與定量方法

杜元凱¹ 馮昱維² 吳明哲³ 王熙宇² 陳述⁴ 陳涵葳^{1,*}

摘要

杜元凱、馮昱維、吳明哲、王熙宇、陳述、陳涵葳。2016。利用質體參考物質以及多重聚合酶連鎖反應建構基改馬鈴薯之檢測與定量方法。台灣農業研究 65(1):18–30。

基改作物一般無法以外觀型態加以區分，而透過以聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction; PCR) 所發展的各项檢測技術，則可明確進行篩選與區別。本研究針對基因改造馬鈴薯 EH92-527-1 品系，利用該品系邊界序列 (flanking sequence) 與馬鈴薯 *UGPase* 序列將其構築於質體參考物質 pGEM-EH92，利用即時聚合酶連鎖反應 (real-time PCR) 建立檢量線：決定係數 $R^2 = 0.99$ ，檢量範圍最低為 20 個拷貝數，3% (w/w) 偏誤值 (bias) 為 16.3%，相對標準誤差 (relative standard error) 介於 6–12.9%。顯示其確實可實質應用於檢測基改馬鈴薯 EH92-527-1 品系，此質體參考物質兼具容易保存、便宜與穩定佳等優點。另外，以 EH92-527-1 品系之 *RNApol* (RNA polymerase) 與 *nptII* (Neomycin phosphotransferase II)、反義 *GBSS* (granule bound starch synthase) 基因為目標，建構多重聚合酶連鎖反應 (multiplex PCR) 反應，可得最低檢測極限為 3%，由此可大幅縮短檢測時間、檢測成本，並提升檢測準確度。

關鍵詞：基因改造、馬鈴薯、即時聚合酶連鎖反應、質體參考物質。

前言

依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) 2013 年統計資料顯示，全球目前共有 27 個國家種植基因改造 (以下稱基改) 作物，總耕作面積已達 175,200,000 ha。其中，基改大豆占全球大豆生產量 79%，基改玉米則占全球玉米生產量 32%。目前台灣黃豆、玉米供給主要仰賴進口，可以種子形式、初級加工或高層次加工食品等型態輸入，在製造、加工、調配、包裝、運送、貯存及販賣的過程中，可能發生有意或無意的混雜風險。因此，衍生基改作物的環境

安全性以及產品標識等需探討之疑慮，迄今仍為社會大眾所關切 (Conner *et al.* 2003; Crespi & Marette 2003)。我國衛生福利部於 2015 年 5 月 29 日公告「包裝食品含基因改造食品原料標示應遵行事項」、「食品添加物含基因改造食品原料標示應遵行事項」及「散裝食品含基因改造食品原料標示應遵行事項」，非基因改造食品原料非有意攙入基因改造食品原料超過 3%，即視為基因改造食品原料，須標示「基因改造」等字樣；日本標示界限為 5%，歐盟為 0.9%，美國是基改作物生產的主要國家，並無強制標示之規範 (Carter & Gruère 2006)。

基改作物一般無法以外觀型態加以區分，開發有效的檢測方式實為必需。以聚合酶連鎖

投稿日期：2014 年 12 月 16 日；接受日期：2015 年 6 月 8 日。

* 通訊作者：swaychen@tari.gov.tw

¹ 農委會農業試驗所生物技術組助理研究員。台灣 台中市。

² 農委會農業試驗所生物技術組研究助理。台灣 台中市。

³ 農業科技研究院植物科技研究所研究員兼所長。台灣 新竹市。

⁴ 農委會農業試驗所作物種原組副研究員。台灣 台中市。

反應 (polymerase chain reaction; PCR) 為基礎所發展之各項檢測技術，具高敏感性、高專一性，適合大量篩選工作，配合外源基因與插入受體植物之邊界序列 (flanking sequence) 設計引子 (primer)，便可區分基改作物之品系 (event)，是目前基改作物最主要的檢測方法 (Lipp *et al.* 2001)。一般 PCR 或多重 PCR (multiplex PCR; mPCR)，屬於定性的檢測方式。而在定量檢測方面，早期多以競爭型 PCR 進行相對定量 (Hupfer *et al.* 2000)，目前則以即時定量聚合酶連鎖反應 (real-time PCR) 為主要定量方法，其他定量檢測技術還包括數位 PCR (digital PCR) 與微陣列晶片 (microarray) 等。

基改作物檢測之認證標準品 (certified reference materials; CRM)，為經過日本基因公司 (Nippon Gene Co., Ltd) 之參考物質暨量測研究中心 (Institute for Reference Materials and Measurements; IRMM) 或美國油品化學協會 (American Oil Chemists' Society; AOCS) 等機構認證，確保標準品之品質與檢測能力後，始得做為標準品使用。然而，CRM 是由植物組織經冷凍乾燥後製成，具有不易保存、價格昂貴等缺點，且並非所有基改作物皆能取得而製備 CRM。為克服 CRM 之缺點，可利用同時帶有特定基改作物系物種專一性序列以及品系專一性序列的質體，此質體參考物質 (plasmidic reference materials; PRM) 便可作為定性或定量檢測之標準品。由於 PRM 製備簡單、操作便捷，可望發展成為 CRM 的替代使用物質 (Kuribara *et al.* 2002; Shindo *et al.* 2002)。

基改馬鈴薯 EH92-527-1 品系利用基因默化 (gene silencing) 技術，降低內生顆粒結合澱粉酶 (granule bound starch synthase; GBSS) 之表現，以增加馬鈴薯球支鏈澱粉含量。本研究利用基因重組技術構築基改馬鈴薯 EH92-527-1 之質體參考物質 pGEM-EH92，內含馬鈴薯尿苷二磷酸葡萄糖焦磷酸化酶 (UDP-glucose pyrophosphorylase; UGPase) 基因序列與 EH92-527-1 品系邊界序列，於 pGEM-EH92 質體即可同時檢測上述兩種序列，並

應用 Real-time PCR 建立基改馬鈴薯 EH92-527-1 品系 (BASF Plant Science[®]) 檢量線，由此取代 CRM 之購買與使用，開發穩定、低價且可依賴的 EH92-527-1 品系定量檢測方法。此外，本試驗針對基改馬鈴薯 EH92-527-1 品系開發 mPCR 檢測技術，可同時檢測 EH92-527-1 品系 RNA 聚合酶基因 (RNA polymerase; *RNApol*)、抗抗生素篩選基因 (Neomycin phosphotransferase II; *nptII*)，以及 *GBSS* 基因反譯股序列。以上兩種定量與定性檢測方法之建立，期可做為未來開發基改作物檢測技術之參考。

材料與方法

試驗材料

本試驗之 CRM 皆購自 Institute for Reference Materials and Measurements (IRMM)，包括：(1) 基改馬鈴薯 EH92-527-1 品系之塊莖粉末標準品 [ERM[®]-BF421a (0%, blank) 與 ERM[®]-BF421b (100%, level 1)]；(2) 基改馬鈴薯 AM04-1020 品系之塊莖粉末標準品 [ERM[®]-BF430a (0%, blank)、ERM[®]-BF430b (100%, level 1)]；(3) 基改大豆 Roundup Ready Soya 種子粉末標準品 [ERM[®]-BF410ak (0%, blank)、ERM[®]-BF410gk (10%)]。作為非基改馬鈴薯對照組之克尼伯 (Kennebec) 品系，購買自行政院農業委員會種苗改良繁殖場。植物基因體之 DNA 的萃取使用 Plant Genomic DNA Purification Kit (PROTECH, Taiwan)。

質體參考物質 pGEM-EH92 之構築與製備

本試驗所用之基改馬鈴薯 EH92-527-1 品系之引子與探針，參考自 IRMM 提供之 EH92-527-1 品系專一序列及馬鈴薯內源性基因 (*UGPase*) 序列資訊。以基改馬鈴薯 EH92-527-1 品系 CRM [ERM[®]-BF421b (100%)] 之基因體 DNA 為模板，分別以 UGP-F/UGP-R 及 EH92-RC F/EH92-RC R 引子對 (表 1)，進行第 1 次 PCR，增幅出 213 bp 之 *UGPase* 片段與 288 bp 之 EH92-527-1 品系專一性片段。由於 UGP-R 與 EH92-RC F 的 5' 端具有 24 個

表 1. 單一、多重與即時聚合酶鏈鎖反應中各別使用的引子對與探針名稱與序列。

Table 1. Primers and probes used in PCR, mPCR, recombinant PCR, and real-time PCR (RT-qPCR) in this research.

Target	Primer/Probe	Sequence (5' → 3')	Amplification length (bp)	Application	
Event-specific	Event527-bf1	GTGTCAAAAACAATTACAG	134	PCR, RT-qPCR	
	St527-R1	TCCCTTAATTCTCCGCTCATGA		PCR, RT-qPCR	
	St527-S2	AGATTGTCGTTTCCCGCCTTCAGTT		RT-qPCR	
	EH92-RC F	EH92-RC F	ACTTGGCTATGCTTCACATCACC-GAGAGGTGGCAAAAATTTTCAGAAGG	288	Recombinant PCR
		EH92-RC R	AACGTAAAACGGCTTGTC		Recombinant PCR
		as-gbss-F1	TGCCACATAAAAATCAAGAGTAACTA		189
UGPase	as-gb-R	TGAGGGATACGCAGAACAGGTCAT		mPCR	
	UGP-qr	GGACATGTGAAGAGACGGAG	86	PCR, RT-qPCR	
	UGP-qF	CTACCTCTACCCCTCCGC		PCR, RT-qPCR	
	Mhmg probe	CTACCACCATTACCTCGCACCTCCTCA		RT-qPCR	
	UGP-F	TTATCCGGGAGAAGGTGGGAGT	213	Recombinant PCR	
	UGP-R	CGGTGATGTGAAGCATAGCCAAGT		Recombinant PCR	
	PhyRC-F	ACTTGGCTATGCTTCACATCACC-GGGAAGATCTCACATTTTTGTATTCA		Recombinant PCR	
nptII	sNPT-F	CGCATGATTGAACAAGATGGATTGC	420	mPCR	
	sNPT-R	ATGTTTCGCTTGGTGGTCAATGG		mPCR	
RNA polymerase	RP-F	TCGTGGATTTTTCCGATCTC	862	mPCR	
	RP-R	ATCTCGCTCCATCTCTCCAA		mPCR	

互補的鹼基對，PCR 產物以 UGP-F/EH92-RRCR 引子對進行第二次 PCR 時，可得 472 bp 之重組片段，將該片段次選殖至 pGEMT-Easy Vector (Promega) 後，即完成基改馬鈴薯 EH92-527-1 質體參考物質 pGEM-EH92 之構築 (圖 1)。質體 DNA 製備係接種單一菌落至含抗生素的液態培養基，以 100 rpm 轉速培養 8 h，再以 Mini Plus™ Plasmid DNA Extraction System (VIOGENE) 進行質體 DNA 的萃取，經分光光度計 (NanoDrop P1000, Thermo) 定量後保存，並送源資國際生物科技股份有限公司進行定序。

引子專一性確認

PCR 反應係針對馬鈴薯 *UGPase* 基因與基改馬鈴薯 EH92-527-1 轉殖系品系專一性序列，使用引子對 UGP-qF/UGP-qr 與 E527-1bf/S527-R (表 1) 進行專一性檢測，增幅產物為 86 bp 與 134 bp。反應溶液含基因體 DNA 100 ng、0.2 mM dNTPs (Promega)、1× PCR 緩

衝液 [20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM KCl, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 0.1% Triton X-100]、2 μM 引子對、1 unit ExcelTaq™ DNA polymerase (PREMIER)，總反應體積為 20 μL；以 94°C 前處理 2 min，接續以 94°C 變性處理 30 s、56°C 處理 30 s、72°C 反應 30 s，共計 35 個循環，最後以 72°C 處理 7 min 後終止反應 (Veriti, ABI)，PCR 產物以 2% 之瓊脂膠體進行電泳分離。

Multiplex PCR

mPCR 反應係針對馬鈴薯 *RNA pol* 基因 (862 bp)、抗抗生素篩選 *nptII* 基因 (420 bp) 及 EH92-527-1 品系 anti-*GBSS* 序列 (189 bp) 進行同時檢測，使用 3 對引子 RP-F/RP-R、sNPT-F/sNPT-R 與 as-gbss-F1/as-gb-R 進行目標片段增幅 (表 1)。mPCR 反應液含基因體 DNA 100 ng、0.1 mM dNTPs (Promega)、1× PCR 緩衝液 [20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM KCl, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 0.1% Triton

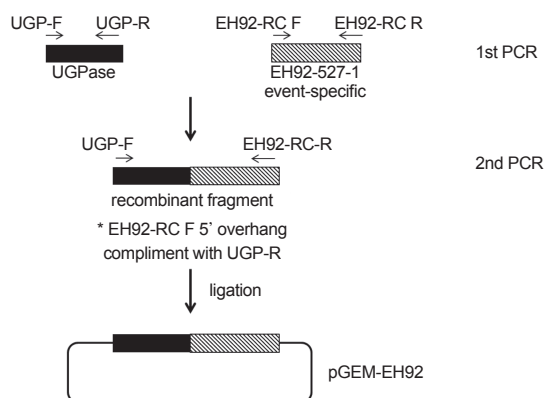


圖 1. 質體參考物質 pGEM-EH92 之構築策略。1st PCR 分別利用 UGP-F/R 以及 EH92-RC-F/R 將內生性基因 (*UGPase*) 及品系專一性序列 (event-specific) 以 PCR 的方式增幅。2nd PCR 利用 UGP-F 與 EH92-RC-R 進行 recombinant PCR, 將兩個片段連接, 最後再將此構築序列接合於 pGEM-T 載體。

Fig. 1. The strategy of plasmidic reference material pGEM-EH92 construction. UGP-F/R and EH92-RC-F/R primers were used to amplify potato endogenous gene *UGPase* and EH92-527-1 sequences in 1st PCR, respectively. Two amplicons from 1st PCR were joined together in 2nd PCR using UGP-F and EH92-RC-R primers. Finally, the recombinant fragment was put into pGEM-T vector.

X-100]、0.1 μM 引子對、2.5 units ExcelTaq™ DNA polymerase (PREMIER), 總反應體積為 20 μL ; 以 94°C 前處理 2 min, 接續以 94°C 變性處理 30 s、56°C 處理 30 s、72°C 反應 30 s, 共計 30 個循環, 最後以 72°C 處理 7 min 後終止反應 (Veriti, ABI), PCR 產物以 2.5% 之瓊脂膠體進行電泳分離。

質體參考物質 pGEM-EH92 Real-time PCR

pGEM-EH92 為本試驗中基改馬鈴薯 EH92-527-1 品系之 PRM, pGEM-EH92 質體 DNA 先以 *SacI* 酵素酶切成線性形式 (linear form) 後, 以分光光度計定量 (NanoDrop P1000, Thermo, USA), 測定 3 次至標準誤差 (standard deviation; SD) 小於 0.05, 則視其平均值為 PRM 之起始濃度 (Kuribara *et al.* 2002)。依據公式 1 與 2 換算 PRM 的拷貝數 (copy numbers), 並稀釋成下列濃度: 20、6.25 \times

10^2 、 1.25×10^4 、 2.5×10^5 及 5×10^6 (copies/5 μL)。

$$\begin{aligned} \text{Copies number of PRM} \\ = \frac{\text{Total PRM weight (g)}}{\text{PRM weight per molecule (g)}} \end{aligned} \quad (1)$$

$$\begin{aligned} \text{PRM weight per molecule} \\ = \text{Size (bp)} \times 660 \times 1.66 \times 10^{-24} \text{ (g)} \end{aligned} \quad (2)$$

PRM Real-time PCR 反應液含 20、6.25 \times 10^2 、 1.25×10^4 、 2.5×10^5 及 5×10^6 copies (5 μL^{-1}) 不同拷貝數之 pGEM-EH92 質體 DNA、1 \times Gene expression master mix (ABI), 900 nM 引子對 (Event527-bf1/St527-R1 或 UGP-qf/UGP-qr)、250 nM 之螢光探針 (St527-S1 或 Mhmg probe), 偵測不同 PRM 拷貝數下品系專一性序列與 *UGPase* 含量 (表 1), 總反應體積為 25 μL 。反應條件為 50°C 下 2 min, 95°C 反應 10 min, 接著 95°C 下 15 s、60°C 下 1 min, 共 40 個循環 (ABI 7500, ABI)。每次試驗皆放置空白試驗組 (no template control; NTC), 每次試驗各樣品重複 3 次, 將 3 次試驗之 Ct 值 (cycle threshold) 代入公式 3 估算拷貝數, 並計算 3 次試驗之平均拷貝數與相對標準誤差 (relative standard deviation; RSD), RSD 計算公式如公式 4。根據 20、6.25 \times 10^2 、 1.25×10^4 、 2.5×10^5 及 5×10^6 個拷貝數之 PRM 所量測之 Ct 值, 分別建立 EH92-527-1 品系專一性序列和內生基因 (*UGPase*) 含量檢量線。

$$\text{Log}_{10}(\text{DNA}) = \frac{\text{Ct} - \text{Y Intercept}}{\text{Slop}} \quad (3)$$

$$\text{RSD} = \frac{\text{Standard deviation of copy number}}{\text{Mean of copy number}} \quad (4)$$

質體參考物質 pGEM-EH92 定量方法準確度 (accuracy) 與精準度 (precision) 分析

為測試利用質體參考物質 pGEM-EH92 進行基改馬鈴薯 EH92-527-1 定量檢測之準確度

與精準度，分別以 1、3 及 5% (w/w) 不同濃度之 EH92-527-1 馬鈴薯 CRM 做為待測樣品分別上機進行 Real-time PCR，反應液含 1、3 及 5% (w/w) 之基因體 DNA 180 ng、1× Gene expression master mix (ABI)，900 nM 引子對 (Event527-bf1/St527-R1 或 UGP-qF/UGP-qr)、250 nM 之螢光探針 (St527-S1 或 Mhmg probe)，分別檢測不同濃度組合 CRM 中品系專一性序列或 *UGPase* (表 1)，總反應體積為 25 μ L，並以質體參考物質所建構之檢量線求得個不同濃度之量測值。最後計算偏誤值 (公式 4) 與相對標準誤差 (公式 5)，評估質體參考物質 pGEM-EH92 進行基改馬鈴薯 EH92-527-1 定量檢測之準確度與精準度。

$$\text{Bias} = \frac{\text{Mean value} - \text{True value}}{\text{True value}} \times 100\% \quad (4)$$

$$\text{RSD} = \frac{\text{Standard deviation of values}}{\text{Mean value}} \times 100\% \quad (5)$$

結果

質體參考物質 pGEM-EH92 之構築與製備

質體參考物質 pGEM-EH92 定序結果如圖 2，基改馬鈴薯 EH92-527-1 品系專一性序列與 *UGPase* 之序列經比對後證實無誤，針對品系專一序列與 *UGPase* 設計之 Real-time PCR 引子與探針位置個別以箭頭與波浪線標示。

引子專一性確認

為確認本試驗中所使用之引子對序列之專一性，分別以 Kennebec 馬鈴薯、EH92-527-1、AM04-1020 轉殖馬鈴薯與 Roundup Ready 轉殖大豆基因體 DNA 為材料，利用 PCR 的方式進行檢測。結果指出，馬鈴薯內部對照基因之 *UGPase* 引子對只能對馬鈴薯的基因體 DNA 檢測出目標大小之片段 (86 bp) (圖 3A)；而 EH92-527-1 之品系專一性引子對只能對 100% EH92-527-1 之馬鈴薯基因體 DNA 檢測出目標片段 (134 bp)，對其他馬鈴薯基因體 DNA 及大豆的基因體 DNA 無法增幅出相



圖 2. 質體參考物質 pGEM-EH92 之序列。UGPase 引子為 UGP-qF 與 UGP-qr (箭號)，探針粘附位置為 Mhmg (波浪線)。基改馬鈴薯 EH92-527-1 品系專一序列 (flanking sequence) 引子為 Event527-bf1 與 St527-R1 (箭號)，探針粘附位置為 St527-R2 (波浪線)。

Fig. 2. Result of sequencing for pGEM-EH92. UGP-qF and UGP-qr (arrow head) were used as primers, and Mhmg (wave line) was used as probe for *UGPase* sequence. Event527-bf1 and St527-R1 (arrow head) and St527-R2 (wave line) were used as primers and probe, respectively, for EH92-527-1 event-specific sequence.

應的片段 (圖 3B)，顯示本試驗所使用之內部對照基因之專一性引子對 (*UGPase*) 及 EH92-527-1 品系專一性引子皆具有高度專一性。

Multiplex PCR

利用 EH92-527-1 品系專一性、馬鈴薯內生性基因 (*RNA pol*) 和載體上特定序列 (*nptII*) 的引子對 as-gbss-F1/as-gb-R、RP-F/RP-R、sNPT-F/sNPT-R 進行 Multiplex PCR 檢驗，目標產物大小分別為 189 bp、862 bp 和 420 bp (圖 4)。並利用馬鈴薯標準品 100、75、50、25、10、5、3、1 及 0% (w/w) 進行最低檢測極限測試，結果顯示最低可偵測 3% (w/w) 馬鈴薯樣品 (圖 5)。

質體參考物質 pGEM-EH92 Real-time PCR

採用 EH92-527-1 品系專一性序列與馬鈴薯內部對照基因 (*UGPase*) 各自獨立進行 20 、 6×10^2 、 1.25×10^4 、 2.5×10^5 及 5×10^6 拷貝數 5 種濃度之 Real-time PCR，每種濃度 3 重複。結果如圖 6、7 所示，檢量線之決定係數 (R^2 value) 平均皆達到 0.99 以上，取得之標準

曲線之斜率以及截距用來進行未知樣品之拷貝數的計算。本試驗結果所得如下：

UGPase:

$$\log_{10}(\text{DNA}) = \text{Ct} - 40.34675 / -3.54073$$

品系專一性序列：

$$\log_{10}(\text{DNA}) = \text{Ct} - 42.56533 / -3.63083$$

將所測得之平均 Ct 值利用帶入所建立之檢量線公式，並進行換算為拷貝數，計算所得之拷貝數的平均值及其 3 重複次實驗結果之 RSD 值如表 2 所示。結果顯示，不論是內部對照基因 (*UGPase*) 及 EH92-527-1 品系專一性序列的部分，預期之參考質體之濃度與實際拷貝數差異不大，3 次試驗結果之再現性表現亦佳。

質體參考物質 pGEM-EH92 定量方法之準確度與精準度分析

準確度與精準度分析結果如表 3 所示，1、3 及 5% (w/w) 偏誤值分別為 62、16.3 及 2.2%，相對標準誤差分別為 13.0、11.2 及 6.1%，除 1% 偏誤值大於 25% 外，其餘不同百分比之偏誤值與相對標準誤差均落於可接受範圍 25% 內，顯示本試驗所開發出之定量方法及質體參考物質 pGEM-EH92 之適用性及可信度俱佳。

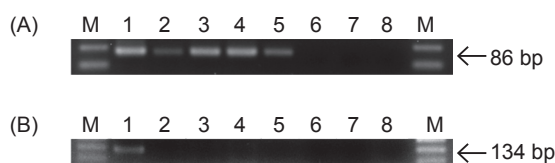


圖 3. 基改馬鈴薯 EH92-527-1 品系專一引子與內生性基因引子 PCR 專一性確認。(A) 馬鈴薯內生性基因 (*UGPase*) 引子，預期增幅的 DNA 大小為 86 bp；(B) 基改馬鈴薯 EH92-527-1 專一性引子增幅 DNA 大小為 134 bp PCR 產物。

Fig. 3. Specificity validation of the taxon-specific and event-specific primers for transgenic potato EH92-527-1. (A) Taxon-specific primers for potato, expected PCR product is 86 bp; (B) EH92-527-1 event-specific primers for potato, expected PCR product is 134 bp. Lane M: 50bp DNA ladder; Lane 1: 100% EH92-527-1 potato CRM; Lane 2: 0% EH92-527-1 potato CRM; Lane 3: 100% AM04-1020 potato CRM; Lane 4: 0% AM04-1020 potato CRM; Lane 5: *Solanum tuberosum* (Kennebec); Lane 6: 10% Roundup ReadyTM Soya; Lane 7: 0% Roundup ReadyTM Soya; and Lane 8: ddH₂O.

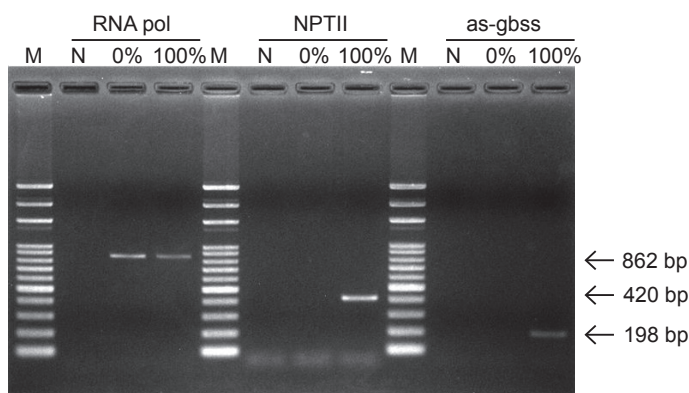


圖 4. *RNA pol*、*nptII* 及 anti-*GBSS* 基因之聚合酶鏈鎖反應之檢測結果電泳圖。M 行：100 bp DNA ladder；N 行：Negative control；0% 行：0% EH92-527-1 CRM；100% 行：100% EH92-527-1 CRM。

Fig. 4. Electrophoresis results of PCR amplification for *RNA pol*, *nptII*, and anti-*GBSS* gene. Lane M: 100 bp DNA ladder; Lane N: Negative control; Lane 0%: 0% EH92-527-1 CRM; and Lane 100%: 100% EH92-527-1 CRM.

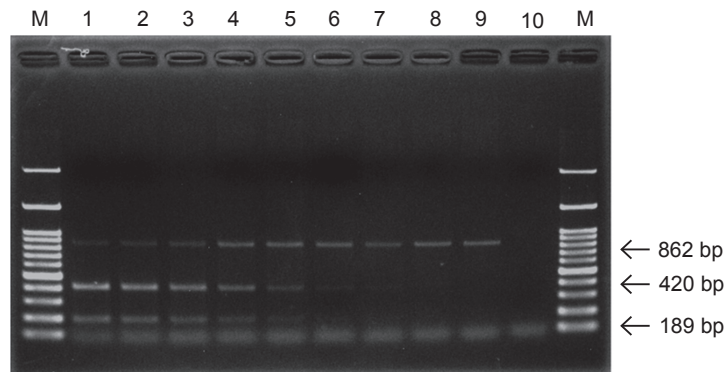


圖 5. 利用多重聚合酶鏈鎖反應同時檢測 *RNA pol* (862 bp)、*nptII* (420 bp)、*anti-GBSS* (189 bp)。以 100% 和 0% EH92-527-1 CRM 配製出不同比例的樣品進行最低可偵測濃度 (LOD) 檢測。

Fig. 5. Simultaneously detection for *RNA pol* (862 bp), *nptII* (420 bp), and *anti-GBSS* (189 bp) by means of multiplex PCR. Samples for the lowest of detection (LOD) were mixed with 100% and 0% EH92-527-1 CRM, respectively. Lane M: 100 bp DNA ladder; Lane 1: 100%; Lane 2: 75%; Lane 3: 50%; Lane 4: 25%; Lane 5: 10%; Lane 6: 5%; Lane 7: 3%; Lane 8: 1%; Lane 9: 0%; and Lane 10: Negative control.

討論

當外源基因插入受體作物基因體，插入位置部分涵蓋外源基因序列部分涵蓋受體作物基因體序列，此區域為邊界序列 (flanking sequence)。由於不同品系之轉殖作物外源基因插入位置皆不相同，故可作為特定作物品系檢測標的 (Holst-Jensen *et al.* 2006)。*UGPase* 已證實為在馬鈴薯基因體中為單一插入序列拷貝 (Borovkov *et al.* 1997)，可作為馬鈴薯之物種專一性 (taxon-specific) 檢測對象外 (Watanabe *et al.* 2004)，也為良好定量對照基因。針對上述二序列於本試驗所設計之 PCR 條件以及反應下均可增幅目標片段 (*UGPase* 為 86 bp，品系專一性序列為 134 bp)，並經定序後證實為目標序列，顯示具有良好的專一性 (圖 2)。

作物基因體內可能存在與外源 T-DNA 相似基因序列，結果將導致轉殖作物檢測可能產生誤判與偽陽性的可能 (Rønning *et al.* 2003)。為增進定性檢測的準確性與節省花費、時間成本，本研究利用多重 PCR 方式以單一反應同時檢測多個目標序列，包含品系專一性序列、物種專一性等序列。然而實務上此方式之建立具有一些需克服的缺失。首先，多個目標序列在同一反應下會互相競爭；其次是每個目標序列所需要的反應條件 (例如 PCR 溫度

設定與 PCR 反應化學組成，如 dNTP、MgCl₂ 濃度，聚合酶使用量) 均不相同。因此，試驗結果經常是有某個目標序列特別明顯，其餘顯示微弱訊號或者出現非特異性條帶。為避免上述情形發生，本試驗於設計個別目標序列時，除考慮大小需可達肉眼可分辨外，尚須考慮個別引子 T_m 值、濃度以及是否可能互相干擾。因此，我們利用不同引子濃度以及溫度梯度 PCR，找尋最佳的引子濃度與反應溫度組合，並以不同物種與品系的基因體核酸驗證本試驗方法的專一性，測試最低偵測可達 3% (w/w) (圖 5)。

一般而言，以多重 PCR 方式進行基改作物檢測，可同時得知多個目標序列，然而多重 PCR 主要進行定性試驗，無法精準定量，因此需要絕對定量試驗時，必須利用 Real-time PCR 來進行，且歐盟現行基改作物檢測方式皆以 Real-time PCR 來進行。而進行基改作物的絕對定量試驗時，常使用認證標準品 CRM 建立檢量線，但其具有許多缺點。CRM 來自於特定基改作物品系組織冷凍乾燥後研磨而得的粉末，植物體組織即存在先天上之遺傳背景異質性 (Zhang *et al.* 2011)；可購得之標準品相對重量百分比不定，對於建立定量檢量線時，無法涵蓋更寬的檢量範圍；製作與保存認證標準物質相當勞費人力與花費，又 CRM 的製備

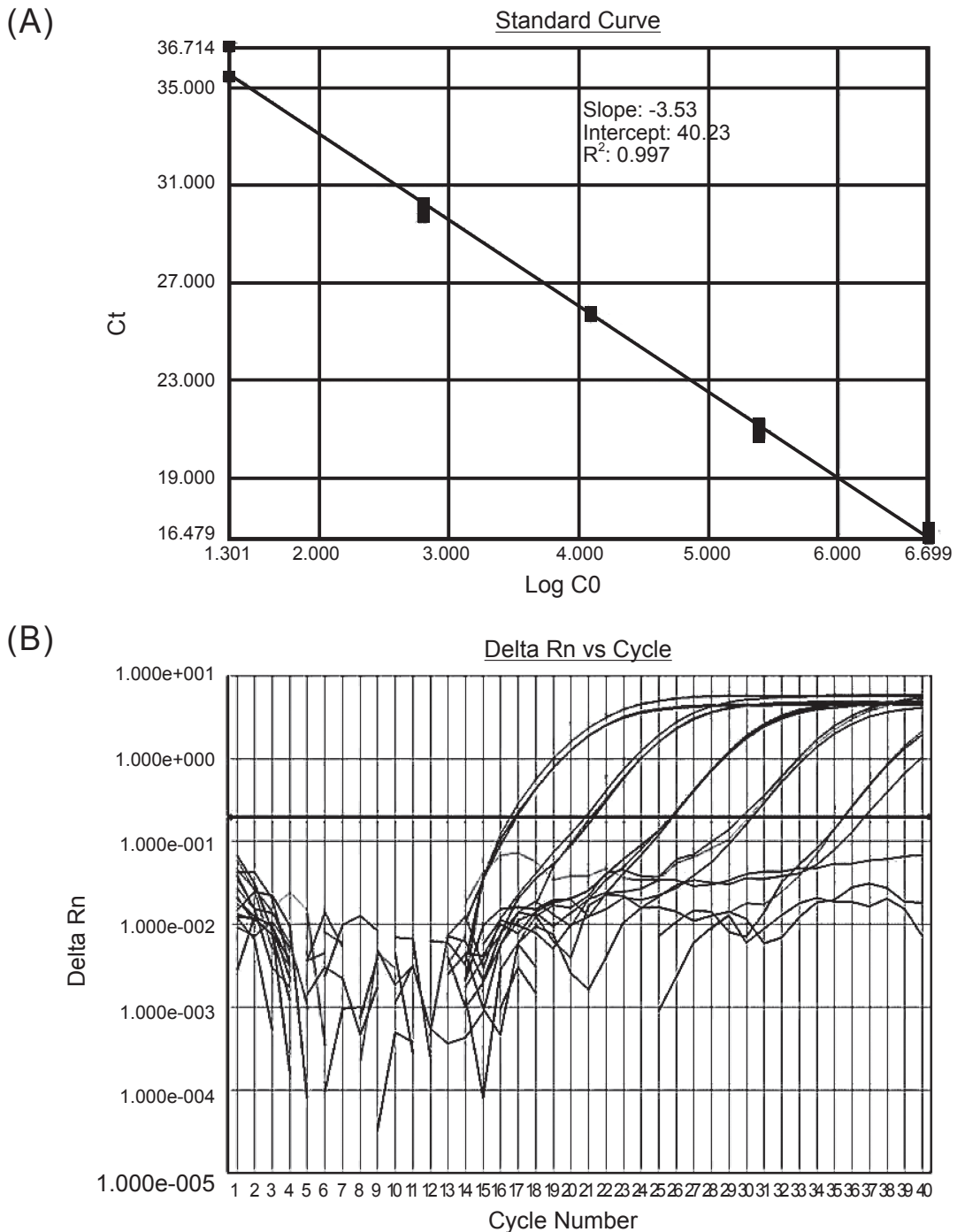


圖 6. 利用即時聚合酶鏈鎖反應偵測序列稀釋馬鈴薯內生性基因 (*UGPase*)。 (A) 由質體標準物質 (pGEM-EH92) 所建構之檢量線。 (B) 含 5×10^6 copies、 2.5×10^5 copies、 1.25×10^4 copies、 6.25×10^2 copies、20 copies 質體標準物質之增幅曲線。

Fig. 6. Detection for serial dilution of taxon-specific detection for EH92-527-1 by real-time PCR. (A) Quantification curve for plasmidic reference material (pGEM-EH92); (B) Amplification curve was constructed by 5×10^6 copies, 2.5×10^5 copies, 1.25×10^4 copies, 6.25×10^2 copies, and 20 copies of plasmidic reference material (pGEM-EH92).

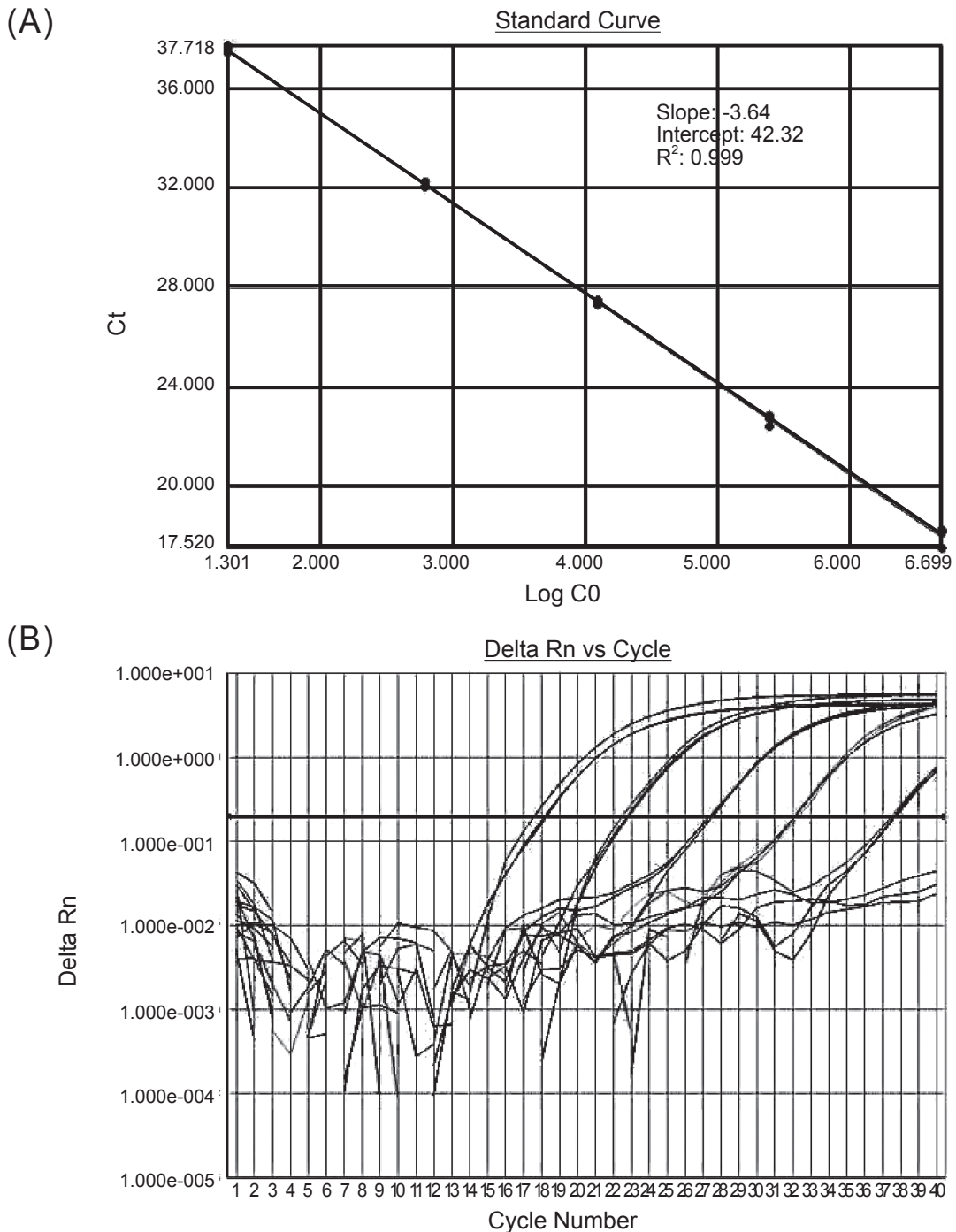


圖 7. 利用即時聚合酶鏈鎖反應偵測序列稀釋基改馬鈴薯 EH92-527-1 品系專一序列。(A) 由質體標準物質 (pGEM-EH92) 所建構之檢量線。(B) 含 5×10^6 copies、 2.5×10^5 copies、 1.25×10^4 copies、 6.25×10^2 copies、20 copies 質體標準物質之增幅曲線。

Fig. 7. Detection for serial dilution of event-specific detection for EH92-527-1 by real-time PCR. (A) Quantification curve for plasmidic reference material (pGEM-EH92); (B) Amplification curve was constructed by 5×10^6 copies, 2.5×10^5 copies, 1.25×10^4 copies, 6.25×10^2 copies, and 20 copies of plasmidic reference material (pGEM-EH92).

表 2. pGEM-EH92 參考質體利用 Real-time PCR 推估之拷貝數之重複性。

Table 2. Repeatability of numbers of pGEM-EH92 from 20 to 5×10^6 copies per reaction for each real-time PCR.

Target	Copy No.		
	True value	Mean	RSD ^z
UGPase	20	19.13	0.10
	625	680.98	0.20
	12,500	11,829.24	0.16
	250,000	279,472.20	0.01
	5,000,000	4,659,142.00	0.04
Event-specific	20	23.02	0.25
	625	588.49	0.24
	12,500	11,239.84	0.23
	250,000	254,614.40	0.18
	5,000,000	5,473,020.00	0.12

^z RSD: Relative standard deviation of the triplicate reaction in single experiment for each PCR system.

表 3. 質體參考物質 pGEM-EH92 定量方法之準確度與精準度分析。

Table 3. The accuracy and precision of results with quantitative methods using pGEM-EH92 as calibrants.

True value (%)	Accuracy		Precision	
	Mean GMO (%)	Bias True value (%)	SD ^z	RSD ^y
5	4.89	2.20	0.30	6.12
3	3.49	16.33	0.39	11.25
1	1.62	62.00	0.21	12.95

^z SD: Standard deviation.

^y RSD: Relative standard deviation.

是以重量百分比為單位，而利用 PCR 方式為基礎定量基改作物是以基因體套數為單位，二單位間之數學轉換仍未確定，故利用 CRM 進行基改作物定量之可靠性仍為人所質疑 (Trapmann *et al.* 2002; Taverniers *et al.* 2004)。再者，以基改大豆與玉米為例，存在於基因體中非目標序列的干擾所造成 PCR 反應效率差異，由此也影響定量結果 (Kuribara *et al.* 2002)。以上皆說明 CRM 確實仍存在使用上的疑慮，而以質體標準物質 PRM 作為取代 CRM 的使用，除製備過程簡單、花費低廉、容易保存，是同樣以基因體套數為單位。另外，只要基改作物系序列資料可得，即可構築標準建立之檢量線，因此標準質體已認為可成為取代認證標準物質的使用 (Taverniers *et al.* 2001; Pardigol *et al.* 2003)。

本研究結果顯示，利用質體參考物質 pGEM-EH92，針對其上內源性基因 *UGPase* 以及基改馬鈴薯 EH92-527-1 品系專一性序列，以 Real-time PCR 方式分別建立檢量線與增幅曲線如圖 6、7，內源性基因 *UGPase* Ct 平均值介於 16.7 (相當於 4,659,142 拷貝數) 與 35.8 (相當於 19 拷貝數)，EH92-527-1 馬鈴薯品系專一性序列 Ct 平均值介於 18.1 (相當於 5,473,020 拷貝數) 與 37.6 (相當於 23 拷貝數)，決定係數 R^2 平均皆達到 0.99 (圖 6、7)，斜率分別為 -3.53 與 -3.64。良好的檢量線決定係數不可低於 0.98，斜率範圍需介於 -3.1 至 -3.6，由斜率換算 PCR 效率則應介於 90–110%。本研究利用 PRM 所建立之 EH92-527-1 檢量線各項數值均落於可接受範圍內，並顯示良好之 PCR 效率與線性關係，故以 pGEM-EH92 作

為檢量標準物質相當適用於基改馬鈴薯 EH92-527-1 之定量檢測 (Fraga *et al.* 2014)。

利用 PRM 建立檢量線進行基改作物的定量準確度與精準度分析部分，可以偏誤值與相對標準誤差計算結果進行評估，偏誤值越大代表定量方式準確度不佳，相對標準誤差則表示定量結果之離散程度。前人曾以基改大豆 1% Roundup Ready soybean 分析所得之偏誤值約為 4% (Zhang *et al.* 2008)，Wang *et al.* (2011) 以基改大豆 0.25–2% Roundup Ready soybean 分析所之偏誤值則介於 0.5–40%，相對標準誤差介於 3.09–18.53%。顯示利用 PRM 進行基改作物定量結果的準確度與精準度，依據個別實驗室人員操作、儀器、作物種類、使用方法等差異，而影響偏誤值與相對標準誤差數值。本研究利用 1、3 及 5% (w/w) EH-92-527-1 CRM 作為未知樣本進行測試，並計算偏誤值，如表 3，定量平均值分別為 1.6、3.5 及 4.9%，偏誤值介於 2.2–62%。本研究結果在 1% 之偏誤值過大 (達 62%)，表示本檢量方法於真值為 1% 時，檢量結果與實際值的差距甚大，結果將無法採信。依據 European Network of GMO Laboratories (ENGL) 針對基改作物定量方法所設置的標準，偏誤值應介於 $\pm 25\%$ 之間，合理的相對標準誤差亦應介於 $\pm 25\%$ 間，本研究結果相對標準誤差均落於 $\pm 25\%$ 。綜上，本研究以質體標準物質 pGEM-EH92 建立之定量系統各重要參數均落於可接受範圍，針對 EH92-527-1 馬鈴薯品系專一性序列以及內源性基因 *UGPase* 進行定量結果皆顯示良好之應用性與再現性。

結論

台灣農業生物技術的蓬勃發展，自 1990 年代即有基改作物的相關研究，如今轉殖作物之使用更已普遍可見於人民日常生活當中，隨著近年國人對於環境、食品安全要求日漸升高，政府扮演把關與監督的角色更甚重要。以質體標準物質作為檢量標準品已應用於基改大豆、玉米與水稻 (Burns *et al.* 2006; Caprioara-Buda *et al.* 2012; Li *et al.* 2013)，本研究所建立之基改 EH-92-527-1 馬鈴薯品系之定量方式

與多重聚合酶連鎖反應，除可作為實際應用於定量與定性檢測 EH-92-527-1 馬鈴薯外，亦提供未來開發其它基改作物檢測方式的參考。

引用文獻

- Borovkov, A. Y., P. E. McClean, and G. A. Secor. 1997. Organization and transcription of the gene encoding potato UDP-glucose pyrophosphorylase. *Gene* 186:293–297.
- Burns, M., P. Corbisier, G. Wiseman, H. Valdivia, P. McDonald, P. Bowler, K. Ohara, H. Schimmel, D. Charles, A. Damant, and N. Harris. 2006. Comparison of plasmid and genomic DNA calibrants for the quantification of genetically modified ingredients. *Eur. Food Res. Technol.* 224:249–258.
- Caprioara-Buda, M., W. Meyer, B. Jeynov, P. Corbisier, S. Trapmann, and H. Emons. 2012. Evaluation of plasmid and genomic DNA calibrants used for the quantification of genetically modified organisms. *Anal. Bioanal. Chem.* 404:29–42.
- Carter, C. A. and G. P. Gruère. 2006. International approval and labeling regulations of genetically modified food in major trading countries. p.459–480. *in: Regulating Agricultural Biotechnology: Economics and Policy.* (Just, R. E., J. M. Alston, and D. Zilberman, eds.) Springer. New York. 732 pp.
- Conner, A. J., T. R. Glare, and J. P. Nap. 2003. The release of genetically modified crops into the environment. *Plant J.* 33:19–46.
- Crespi, J. M. and S. Marette. 2003. “Does Contain” vs. “Does Not Contain”: Does it matter which GMO label is used? *Eur. J. Law Econ.* 16:327–344.
- Fraga, D., T. Meulia, and S. Fenster. 2014. Real-time PCR. *Curr. Protoc. Essential Lab. Tech.* 10:10.3.1–10.3.40.
- Holst-Jensen, A., M. D. Loose, and G. V. d. Eede. 2006. Coherence between legal requirements and approaches for detection of genetically modified organisms (GMOs) and their derived products. *J. Agric. Food Chem.* 54:2799–2809.
- Hupfer, C., H. Hotzel, K. Sachse, F. Moreano, and K. H. Engel. 2000. PCR-based quantification of genetically modified Bt maize: Single-competitive versus dual-competitive approach. *Eur. Food Res. Technol.* 212:95–99.

- Kuribara, H., S. Yoichiro, M. Takeshi, T. Ken, F. Satoshi, A. Nobutaro, H. Takashi, A. Hiroshi, G. Yukihiko, T. Masatake, and H. Akihiro. 2002. Novel reference molecules for quantitation of genetically modified maize and soybean. *J. AOAC Intl.* 85:1077–1089.
- Li, L., X. Zhang, Y. Wan, and W. Jin. 2013. Development of a novel reference plasmid for accurate quantification of genetically modified kefeng6 rice DNA in food and feed samples. *Biomed. Res. Intl.* 2013:1–7.
- Lipp, M., A. Bluth, F. Eyquem, L. Kruse, H. Schimmel, G. V. d. Eede, and E. Anklam. 2001. Validation of a method based on polymerase chain reaction for the detection of genetically modified organisms in various processed foodstuffs. *Eur. Food Res. Technol.* 212:497–504.
- Pardigol, A., S. Guillet, and B. Pöpping. 2003. A simple procedure for quantification of genetically modified organisms using hybrid amplicon standards. *Eur. Food Res. Technol.* 216:412–420.
- Rønning, S. B., M. Väitilingom, K. G. Berdal, and A. Holst-Jensen. 2003. Event specific real-time quantitative PCR for genetically modified Bt11 maize (*Zea mays*). *Eur. Food Res. Technol.* 216:347–354.
- Shindo, Y., H. Kuribara, T. Matsuoka, S. Futo, C. Sawada, J. Shono, H. Akiyama, Y. Goda, M. Toyoda, and A. Hino. 2002. Validation of real-time PCR analyses for line-specific quantitation of genetically modified maize and soybean using new reference molecules. *J. AOAC Intl.* 85:1119–1126.
- Taverniers, I., E. V. Bockstaele, and M. D. Loose. 2004. Cloned plasmid DNA fragments as calibrators for controlling GMOs: Different real-time duplex quantitative PCR methods. *Anal. Bioanal. Chem.* 378:1198–1207.
- Taverniers, I., P. Windels, E. V. Bockstaele, and M. D. Loose. 2001. Use of cloned DNA fragments for event-specific quantification of genetically modified organisms in pure and mixed food products. *Eur. Food Res. Technol.* 213:417–424.
- Trapmann, S., H. Schimmel, G. N. Kramer, G. V. d. Eede, and J. Pauwels. 2002. Production of certified reference materials for the detection of genetically modified organisms. *J. AOAC Intl.* 85:775–779.
- Wang, X., D. Teng, Y. Yang, F. Tain, Q. Guan, and J. Wang. 2011. Construction of a reference plasmid molecule containing eight targets for the detection of genetically modified crops. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 90:721–731.
- Watanabe, T., H. Kuribara, T. Mishima, H. Kikuchi, T. Kodama, S. Futo, K. Kasama, A. Toyota, M. Nouno, A. Saita, K. Takahashi, A. Hino, H. Akiyama, and T. Maitani. 2004. New qualitative detection methods of genetically modified potatoes. *Biol. Pharm. Bull.* 27:1333–1339.
- Zhang, H., L. Yang, J. Guo, X. Li, L. Jiang, and D. Zhang. 2008. Development of one novel multiple-target plasmid for duplex quantitative PCR analysis of roundup ready soybean. *J. Agric. Food Chem.* 56: 5514–5520.
- Zhang, N., W. Xu, W. Bai, Z. Zhai, Y. Luo, X. Yan, J. He, and K. Huang. 2011. Event-specific qualitative and quantitative PCR detection of LY038 maize in mixed samples. *Food Control* 22:1287–1295.

Development of Detection and Quantification Methods for Transgenic Potato Using Multiplex PCR and Plasmidic Reference Material

Yuan-Kai Tu¹, Yu-Wei Feng², Min-Tze Wu³, Shi-Yu Wang², Shu Chen⁴, and Han-Wei Chen^{1,*}

Abstract

Tu, Y. K., Y. W. Feng, M. T. Wu, S. Y. Wang, S. Chen, and H. W. Chen. 2016. Development of detection and quantification methods for transgenic potato using multiplex PCR and plasmidic reference material. *J. Taiwan Agric. Res.* 65(1):18–30.

The objectives of this research were to establish a new quantification method and a fast multi-target PCR method for genetically modified potato event, EH92-527-1. A plasmidic reference material (PRM), pGEM-EH92, was constructed and used as a calibrant to quantify content of EH92-527-1. Results showed the lowest of quantification was 0.1% (w/w), bias and relative standard error were 16.3% and 6–12.9%, respectively, at 3% (w/w) true value. It indicated that the quantification method by means of PRM was able to practically determine the EH92-527-1 event content of mixed sample above 3%. When *RNApol* (RNA polymerase), *nptII* (Neomycin phosphotransferase II) and antisense *GBSS* (Granule bound starch synthase) sequences of EH92-527-1 event were used as multiplex PCR target, the lowest of qualification of multiplex PCR method was 3%.

Key words: Genetically modified, Potato, Real-time PCR, Plasmidic reference material.

Received: December 16, 2014; Accepted: June 8, 2015.

* Corresponding author, e-mail: swaychen@tari.gov.tw

¹ Assistant Research Fellows, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

² Research Assistants, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

³ Research Fellow and Director, Plant Technology Laboratories, Agricultural Technology Research Institute, Hsinchu, Taiwan, ROC.

⁴ Associate Research Fellow, Plant Germplasm Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.