

建立馬鈴薯多重聚合酶連鎖反應檢測技術

杜元凱¹ 馮昱維² 陳烈夫³ 陳述⁴ 林彥君⁵ 陳涵葳^{1,*}

摘要

杜元凱、馮昱維、陳烈夫、陳述、林彥君、陳涵葳。2019。建立馬鈴薯多重聚合酶連鎖反應檢測技術。台灣農業研究 68(1):16–27。

馬鈴薯 (*Solanum tuberosum* L.) 為我國常見的食用及加工作物，其塊莖在工業和飼料上具有很高的應用價值。本試驗以馬鈴薯物種專一性 (taxon-specific) 內生性基因尿苷二磷酸葡萄糖焦磷酸化酶 (UDP-glucose pyrophosphorylase; UGPase) 序列與基因轉殖馬鈴薯品項之專一性序列 (event-specific sequence) 建立多重聚合酶連鎖反應 (multiplex polymerase chain reaction; mPCR) 檢測技術。結果顯示，經多重聚合酶連鎖反應可正確增幅出目標片段，且混合 2 或 3 個不同轉殖品項之 DNA 樣本，亦能檢出專一性目標片段；單一基因轉殖品項之稀釋樣本檢測其最低檢測極限 (limit of detection; LOD)，本方法之檢測靈敏度可達 0.5%。將本方法送至 4 個不同的試驗單位進行能力試驗，結果亦顯示具備良好穩定性與再顯性。另外，本試驗以快速馬鈴薯核酸萃取方法並利用毛細管電泳分析目標片段，可大幅縮減檢測流程所耗時間、人力成本，期望能應用於馬鈴薯檢測技術開發與基因改造 (基改) 馬鈴薯轉殖品項檢驗方法之參考。

關鍵詞：馬鈴薯、多重聚合酶連鎖反應、檢驗方法。

前言

依據 2016 年國際農業生物技術應用推廣協會 (International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications; ISAAA) 統計資料顯示，全球共有 26 個國家種植基因改造作物，栽培面積總計 1.85 億公頃 (International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications 2016)。目前基因改造 (基改) 食品原料包括大豆、玉米、油菜與甜菜等品項已在台灣流通，並以種子、初級加工或高級加工食品的形態輸入，在製造、加工、調配、包裝、儲運及販賣過程中，可能發生有意或無意混雜風險。由於基改作物及其產品對於生態環境及人體健康的影響仍有疑慮，各國對於基因

改造食品標示資訊規範不盡相同。目前台灣採強制標示，根據「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」所訂，含基因改造食品原料之包裝食品、食品添加物及散裝食品皆需標示「基因改造」或「含基因改造」字樣。而非基因改造食品原料，其非故意摻雜率不得超過 3%，如超過則需標示「基因改造」等字樣。在醬油、大豆沙拉油等高層次加工品方面，亦須加註原料來源是否為基改作物。此外，其他國家非故意摻雜含量的標示界線，日本訂為 5%，歐盟為 0.9%，美國與加拿大則並未訂定強制標誌之管理法規 (Carter & Gruère 2006)。

投稿日期：2018 年 5 月 23 日；接受日期：2018 年 8 月 27 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 大武鄉公所農業觀光課技士。台灣 台東縣。

³ 農委會農業試驗所技術服務組副研究員。台灣 台中市。

⁴ 農委會農業試驗所作物種原組副研究員。台灣 台中市。

⁵ 農委會農業試驗所生物技術組研究助理。台灣 台中市。

為了有效管理基改作物及其產品，需建立快速、高專一性、高敏感性的基改檢測方式，以區分基改作物轉殖品項 (event)。目前常用的基改轉殖品項檢測技術以聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction; PCR) 為基礎，配合插入受體植物的外源基因與構築序列，或是涵蓋外來構築序列與作物基因體序列的邊界序列 (flanking sequence) 設計引子對，作為篩選基改轉殖品項之主要檢測依據 (Lipp *et al.* 2001)。目前發展出的基改檢測技術，如即時定量聚合酶連鎖反應 (real-time PCR) 屬於定量檢測技術，而一般 PCR 或多重聚合酶連鎖反應 (multiplex mPCR) 為定性檢測方法。近年來也發展了多種新興檢測技術，如環形恆溫核酸增幅反應 (Loop mediated isothermal amplification; LAMP)、數位 PCR (digital PCR; dPCR)、基因微陣列晶片 (DNA microarray) 等，縮短反應時間並提升檢測精確度 (Fraiture *et al.* 2015)。

馬鈴薯為全球重要糧食作物之一，僅次於小麥、玉米、稻米等，且年均產量均呈現上升趨勢。基改馬鈴薯在工業和飼料上具有很高的應用價值；如 BASF 公司推出商業種植基改馬鈴薯轉殖品項 BPS-25271-9 (EH92-527-1)、AM04-1020 及 AV43-6-G7 等，利用基因默化 (gene silencing) 技術，轉入馬鈴薯內生性基因顆粒結合澱粉酶 (granule bound starch synthase; GBSS) 的反義 RNA (antisense RNA) 片段來抑制基因表現，提高馬鈴薯轉殖系薯球支鏈澱粉含量，可供造紙及工業用澱粉生產，節省分離支鏈澱粉與直鏈澱粉的工序，降低製造成本 (European Commission 2010b)；中研院余淑美研究員以 sporamin (SPO) 啟動子、*Escherichia coli* 植酸酶 (phytase) 基因 acid phosphatase A (appA) 與 nopaline synthase (NOS) 終結子之融合基因，轉殖至馬鈴薯基因體中，並篩選出具有高效能植酸酶活性的基改轉殖系 2-1，作為動物飼料添加劑可提高磷的轉化率，減輕畜牧業的磷排放 (Hong *et al.* 2008)。隨著基改馬鈴薯在全球的重要性增加，雖然台灣尚未許可基改馬鈴薯的進口與栽培，但管理單位對基改馬鈴薯之檢監測預警工作不

可輕忽。

本試驗以 EH92-527-1、AM04-1020 及 2-1 等 3 種基改馬鈴薯轉殖品項作為試驗材料，依據其個別轉殖品項之邊界序列設計專一性引子對。另以馬鈴薯內生性基因尿苷二磷酸葡萄糖焦磷酸化酶 (UDP-glucose pyrophosphorylase; UGPase) 之保守性序列設計引子對，作為馬鈴薯物種專一性 (taxon-specific) 檢測目標，建立基改馬鈴薯 mPCR 檢測方法，達到縮短實驗時間與節省成本。此外，本試驗同時應用植物基因體 DNA 快速萃取法與毛細管電泳分析技術，可快速且正確地判斷上述 3 種基改馬鈴薯轉殖品項，由此建立一快速檢測基改馬鈴薯的檢測流程。

材料與方法

植物材料

本試驗之基因改造作物轉殖品項標準品皆購自 Institute for Reference Materials and Measurements (IRMM)，包括：(1) 馬鈴薯轉殖品項 EH92-527-1 塊莖粉末之非基改標準品 ERM[®]-BF421a (0%, blank) 與基改標準品 ERM[®]-BF421b (100%)；(2) 馬鈴薯轉殖品項 AM04-1020 塊莖粉末之非基改標準品 ERM[®]-BF430a (0%, blank) 與基改標準品 ERM[®]-BF430b (100%)；(3) 大豆轉殖品項 DP-305423-1 種子粉末之非基改標準品 ERM[®]-BF426a (0%, blank)；(4) 玉米轉殖品項 Bt176 種子粉末之基改標準品 ERM[®]-BF411f (5%)。基改馬鈴薯轉殖品項 2-1 為品種「克尼伯」(‘Kennebec’) 之轉植株，由中央試驗院分子生物試驗所余淑美院士提供 (台灣台北市) (Hong *et al.* 2008)；非基改馬鈴薯品種克尼伯則購買自種苗改良繁殖場，作為轉殖品項 2-1 的對照組。克尼伯與轉殖品項 2-1 植株材料，由本實驗室自行繁殖後，收取塊莖凍乾保存於 4°C 備用。

植物基因體 DNA 萃取

本試驗共使用兩種植物基因體 DNA 萃取方法：(1) 以 GeneMark Plant Genomic DNA Purification Kit (GMbiolab, 台灣台中市)，取 0.1 g 標準品粉末或磨碎的塊莖萃取植物基因

體 DNA，純化後的 DNA 樣本回溶於 40 μL 無菌水中保存於 -20°C 備用；(2) 修改自 Hosaka (2004) 之植物基因體 DNA 快速萃取方法，取 0.1 g 之塊莖與 500 μL extraction buffer (EB) 緩衝液 [100 mM Tris-HCl, pH 8.0; 50 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), pH 8.0; 500 mM NaCl; 1.25% sodium dodecyl sulfate (SDS); 0.2% 2-mercaptoethanol] 混合後壓碎，吸取 100 μL 混合液至滅菌離心管後，再加入 32 μL 5M potassium acetate。離心 10 s，取 10 μL 上清液與 240 μL 無菌水混合後，保存於 -20°C 備用。樣本基因體 DNA 萃取後，均經 NanoDrop 1000 (NanoDrop Technologies Inc., Wilmington, DE, USA) 測量濃度，再定量成 100 ng μL^{-1} 做後續 PCR 分析。

PCR 引子設計

本試驗使用之 PCR 引子可分為 2 種，其一是用於檢測馬鈴薯內生性基因 UGPase 之引子對，另一類則依照 3 種基改馬鈴薯轉殖品項之邊界序列做設計，偵測各別轉殖品項獨有的專一性序列片段。馬鈴薯 UGPase 基因序列根據 NCBI 網站資料庫 (GenBank: U20345.1)，挑選含 UGPase 基因序列，可由 UGP-mF (5'-CTCTGTGGTGGACAAGCTGAGGGAAGC-3') 與 UGP-mR (5'-GTCTAATCACCTCTCCCAATACTTCTTG-3') 引子對增幅得到 161 bp 片段。EH92 與 AM04 轉殖品項，分別依據其外源基因插入植物基因體 DNA 位置，挑選 3' 端與 5' 端邊界序列設計專一性引子對 (Hofvander 2005; Geiger *et al.* 2012)。序列為 EH-mF (5'-TTATTTGGATTGAGAGTGAATATGAGAC-3') 與 EH-mR (5'-ATTTACAATTGAAACAAGGAGTCATAAG-3')，可增幅得到 EH92 轉殖品項專一之 450 bp 片段；以及 AM-mF (5'-AAATACGTGTCTACAGCCATATAACAG-3') 與 AM-mR (5'-GTTAAGTATGAACAAAACGGAGTAAC-3')，可增幅得到 AM04 轉殖品項專一之 238 bp 片段。轉殖品項 2-1，根據本實驗室先前定序資料確認外源序列插入位置，於 5' 端邊界序列設計引子，序列為 2-1 flanking F1 (5'-TCAGACAACCTTTAAGATTTTTGGTT-3') 與 2-1 flanking R1

(5'-TAAAATCCAGATCCCCCGAATTA-3')，可增幅馬鈴薯 2-1 轉殖品項專一之 357 bp 片段。所有引子皆委託每得科技有限公司 (台灣桃園市) 合成，保存於 -20°C 備用。

mPCR 反應條件

mPCR 總反應體積為 20 μL ，包含 100 ng 基因體 DNA、0.4 μM EH92 引子對、0.4 μM AM04 引子對、0.2 μM 2-1 引子對、0.05 μM UGPase 引子對、Taq DNA Polymerase 2X Master Mix RED (1.5 mM MgCl_2) (AMPLIQON, Odense, Denmark)；反應液混合均勻後，進行 PCR (C1000 Touch™ Thermal Cycler, Bio-Rad, Hercules, CA, USA)，條件為 94°C 前處理 5 min。接續以 94°C 變性處理 30 s、 62°C 處理 30 s、 72°C 反應 27 s，共計 37 個循環，最後以 72°C 處理 7 min 後終止反應。PCR 增幅產物以 1.5% 瓊脂膠體分離增幅片段，並以 ethidium bromide (EtBr) 進行膠體染色，或利用毛細管電泳儀 (Qsep100 DNA Analyzer, Bioptic Inc., La Cañada Flintridge, CA, USA) 分析增幅片段。

mPCR 能力試驗

將 mPCR 反應溶液、預先混合之引子對與 6 個待測樣本 (包含轉殖品項 EH92-527-1、AM04-1020、2-1 之基因體 DNA 樣本)，以及無菌水做負對照組，隨機標示為 1-7 號，分別委託行政院農業委員會農業試驗所 (Taiwan Agricultural Research Institute; TARI) 種原組、種苗改良繁殖場 (Taiwan Seed Improvement and Propagation Station; TSS)、桃園區農業改良場 (Taoyuan District Agricultural Research and Extension Station; TYDARES)、台南區農業改良場 (Tainan District Agricultural Research and Extension Station; TND AIS) 共 4 個單位進行盲樣試驗，以同級品試劑與 PCR 儀器進行 PCR 反應，並回覆分析結果。

結果

mPCR 專一性 (specificity) 分析

為了檢測不同基改馬鈴薯轉殖品項，本試驗萃取基改馬鈴薯轉殖品項 EH92-527-1 與

AM04-1020 之 0% 與 100% 塊莖粉末標準品基因體 DNA，再將含 100% 標準品與 0% 標準品之基因體 DNA 樣本，配製成 10% (v/v) EH92 與 AM04 之 DNA 樣本；轉殖品項 2-1，則分別萃取 2-1、未轉殖克尼伯之塊莖基因體 DNA，配製 10% (v/v) 之 2-1 轉殖品項 DNA 樣本。本試驗另挑選兩種非馬鈴薯物種轉殖品項 (DP-305423-1、Bt176) 粉末標準品萃取其 DNA，作為對照樣本。經 mPCR 增幅後 EH92-527-1、AM04-1020、2-1 等 3 個轉殖品項之 10% 基改 DNA 樣本，可分別增幅 EH92 (450 bp)、AM04 (238 bp) 及 2-1 (357 bp) 之目標片段 (圖 1)，且所有馬鈴薯基因體 DNA 樣本皆可增幅馬鈴薯內生性基因 UGPase (161 bp) 片段。而大豆與玉米兩轉殖品項之基因體 DNA 樣本，則無任何片段產生，顯示 mPCR 檢測方法可鑑別不同物種及轉殖品項。另外，本試驗將 3 種基改馬鈴薯樣本進行混合，評估 mPCR 檢測方法是否能區分不同轉殖品項之混合樣本，混合樣本分別為 (1) 個別轉殖品項之 10% 與 0% 單一樣本；(2) 2 個基改馬鈴薯轉殖品項 10% 基改樣本之等比例混合樣本 (EH92

與 AM04、EH92 與 2-1、AM04 與 2-1)；(3) 3 個基改馬鈴薯轉殖品項 10% 基改樣本之等比例混合樣本 (EH92、AM04 與 2-1)，總共 10 個樣本作為檢測。試驗結果 (圖 2A) 得知，僅含單一轉殖品項之 DNA 樣本 (lane 1-6)，可分別準確辨認出個別基改轉殖品項 EH92 (450 bp)、AM04 (238 bp) 與 2-1 (357 bp) 之目標片段，而 2 個轉殖品項之等比例混合樣本 (lane 7-9) 與 3 個轉殖品項等比例混合樣本 (lane 10)，亦可同時增幅出所混合的轉殖品項目標片段，且所有馬鈴薯樣本皆可判別出內生性 UGPase (161 bp) 目標片段 (lane 1-10)。結果顯示，本試驗之 mPCR 檢測方法，可準確判斷轉殖品項並對混合樣本檢測具有高度專一性。

簡易快速萃取基因體 DNA 配合 mPCR 分析

為縮短檢測作業時間，本試驗參照 Hosaka (2004) 利用快速萃取法將轉殖品項 EH92-527-1 及 AM04-1020 之塊莖粉末標準品、轉殖品項 2-1 及對照組克尼伯植株塊莖各取約 0.1 g 萃取基因體 DNA，萃取結果經 Nanodrop 1000 測量濃度範圍在 25–200 ng μL^{-1} ，純度

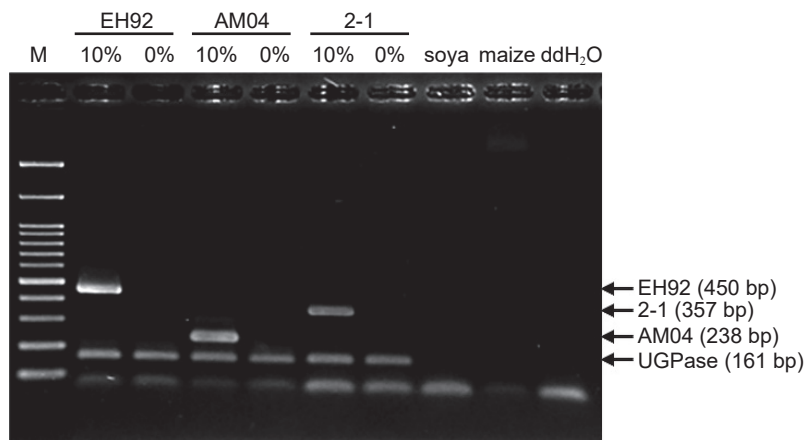


圖 1. 轉殖品項及作物專一性試驗電泳圖，各樣本分別為馬鈴薯 EH92、AM04 及 2-1 等 3 個轉殖品項之基因改造 (基改) (10%) DNA 樣本與非基改 (0%) DNA 樣本，與大豆、玉米之 DNA 樣本，利用 multiplex polymerase chain reaction (mPCR)，同時檢測 EH92 (450 bp)、AM04 (238 bp)、2-1 (357 bp) 及 UDP-glucose pyrophosphorylase (UGPase) (161 bp) 4 個目標片段。

Fig. 1. The results of specificity test of primers among events and species. The samples of 10% and 0% genetically modified (GM) potato (EH92-527-1, AM04-1020, 2-1), soybean, and maize were used and four target sequences including EH92 (450 bp), AM04 (238 bp), 2-1 (357 bp), and UDP-glucose pyrophosphorylase (UGPase) (161 bp) were detected by multiplex polymerase chain reaction (mPCR) simultaneously.

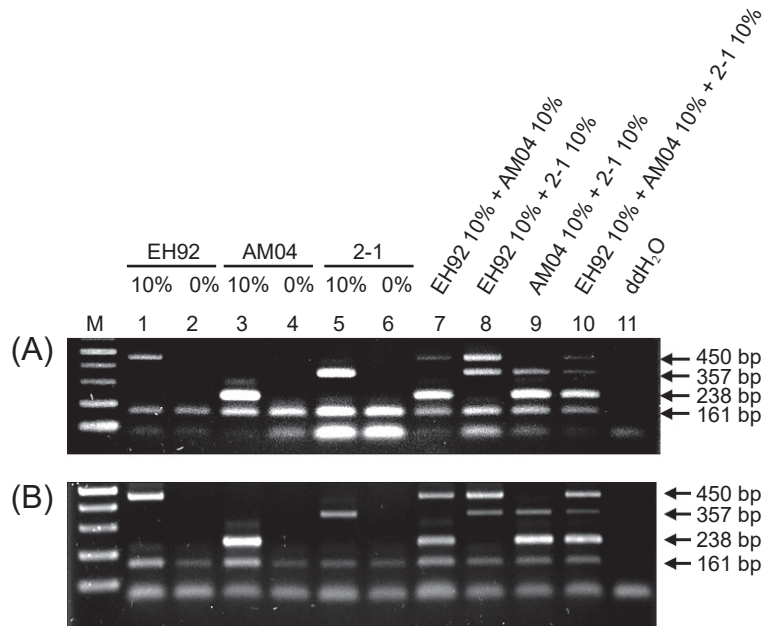


圖 2. 基因改造 (基改) 馬鈴薯混合樣本之 multiplex polymerase chain reaction (mPCR) 檢測結果。(A) 以商品化套組萃取 DNA 方法配合 mPCR 檢測電泳圖；(B) 快速萃取 DNA 方法配合 mPCR 檢測電泳圖。利用 mPCR，同時檢測 EH92 (450 bp)、AM04 (238 bp)、2-1 (357 bp) 及 UDP-glucose pyrophosphorylase (UGPase) (161 bp) 4 個目標片段，每個 Lane 總 DNA 量皆為 100 ng。

Fig. 2. The results of mixed samples among genetically modified (GM) potato events. (A) DNA samples extracted by commercial kit. (B) DNA samples using DNA rapid extraction method. Multiplex polymerase chain reaction (mPCR) was utilized to detect four target sequences simultaneously, including EH92 (450 bp), AM04 (238 bp), 2-1 (357 bp), and UDP-glucose pyrophosphorylase (UGPase) (161 bp). Each lane contained 100 ng DNA.

(A_{260}/A_{280}) 範圍在 1.6–2.1 之間，DNA 品質略遜於商品化套組之萃取結果。利用簡易快萃法萃取之 DNA 進行 mPCR 分析 (圖 2B)，結果 3 種 10% 單一標本皆可增幅出個別 EH92 (450 bp)、AM04 (238 bp) 及 2-1 (357 bp) 目標片段，10% 單一標本及非基改標本皆可辨識內生性基因 UGPase (161 bp) 目標片段 (lane 1–6)；而 2 種轉殖品項之等比例混合標本 (EH92 與 AM04、EH92 與 2-1、AM04 與 2-1) 與 3 種轉殖品項之等比例混合標本，均可辨識出個別轉殖品項專一性目標片段與內生性基因 UGPase 目標片段 (lane 7–10)，顯示本試驗之 mPCR 反應條件適用於大多數 DNA 品質，無需經過特別純化。

mPCR 靈敏度 (sensitivity) 評估

將 EH92-527-1、AM04-1020、2-1 三個轉殖品項基改 DNA 樣本與其對應之非基改 DNA

樣本，依不同比例混合配製為 100、10、4、1、0.9、0.5 及 0% 各 7 個樣本，所有樣本基因體 DNA 於 mPCR 反應均為 100 ng，以評估本試驗 mPCR 檢測法之最低偵測極限 (limit of detection; LOD)。電泳分析結果 (圖 3) 顯示，在 EH92-527-1、AM04-1020、2-1 三轉殖品項組別中，於 100、10、4、1、0.9 及 0.5% 皆可順利增幅個別轉殖品項之專一性目標片段 (lane 1–5)，且所有具馬鈴薯基因體 DNA 樣本皆可觀察到內生性 UGPase (161 bp) 目標片段，而各組別之正控制組 (lane 7–8) 也能清楚的觀察到其目標片段，故由此判斷其 LOD 皆為 0.5%。

毛細管電泳結果

本試驗以毛細管電泳分析 mPCR 之結果，其中 EH92 (450 bp)、AM04 (238 bp)、2-1 (357 bp) 及 UGPase (161 bp) 等 4 個目標片段移動時間 (migration time)，分別約為 3.9、3.7、3.1

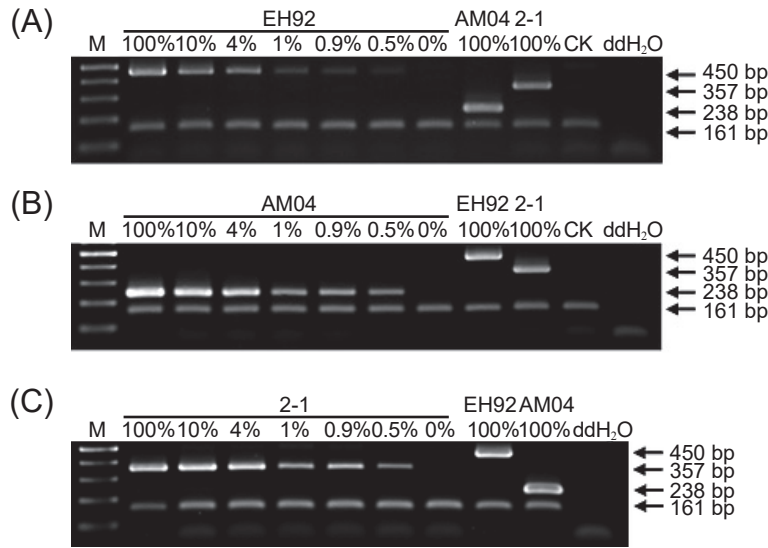


圖 3. 不同轉殖品項最低偵測極限。以 100% 及 0% 不同轉殖品項 DNA 配製 100、10、4、1、0.9、0.5 及 0% 樣本，利用基因改造 (基改) 馬鈴薯 multiplex polymerase chain reaction (mPCR)，同時檢測 EH92 (450 bp)、AM04 (238 bp)、2-1 (357 bp) 及 UDP-glucose pyrophosphorylase (UGPase) (161 bp) 四個目標片段。以轉殖品項 EH92 之基改 (100%) 及非基改 (0%) DNA 調配不同比例 DNA 樣本，轉殖品項 AM04、2-1 與 CK 之 DNA 樣本為 Positive control，ddH₂O 為 Negative control (A)。以轉殖品項 AM04 之基改 (100%) 及非基改 (0%) DNA 調配不同比例 DNA 樣本，轉殖品項 EH92、2-1 與 CK 之 DNA 樣本為 Positive control，ddH₂O 為 Negative control (B)。以轉殖品項 2-1 之基改 (100%) 及非基改 (0%) DNA 調配不同比例 DNA 樣本，轉殖品項 EH92、AM04 之 DNA 樣本為 positive control，ddH₂O 為 negative control (C)。

Fig. 3. The results of limitation of detection (LOD) among strains. Multiplex polymerase chain reaction (mPCR) was used to detect four target sequences simultaneously, including EH92 (450 bp), AM04 (238 bp), 2-1 (357 bp), and UDP-glucose pyrophosphorylase (UGPase) (161 bp) in 100, 10, 4, 1, 0.9, 0.5, and 0% genetically modified (GM), respectively, that contained samples made by 100% and 0% GM containing samples among strains. The results of 100, 10, 4, 1, 0.9, 0.5, and 0% GM containing samples of EH92. 100% AM04, 2-1 and CK were assigned as the positive control and ddH₂O was assigned as the negative control (A). The result of 100, 10, 4, 1, 0.9, 0.5, and 0% GM containing samples of AM04. 100% EH92, 2-1 and CK were assigned as the positive control and ddH₂O was assigned as the negative control (B). The results of 100, 10, 4, 1, 0.9, 0.5, and 0% GM containing samples of 2-1. 100% AM04, EH92 and CK were assigned as the positive control and ddH₂O was assigned as the negative control (C).

及 2.8 min。以 3 種轉殖品項等比例混合之混合樣本經 mPCR 反應後，分析結果可明顯觀察 EH92 (450 bp)、AM04 (238 bp)、2-1 (357 bp) 及 UGPase (161 bp) 檢測訊號 (圖 4A)；非基改馬鈴薯克尼伯經 mPCR 反應後分析，僅出現 UGPase (161 bp) 檢測訊號 (圖 4B)；使用去離子水 (負對照組) 之增幅結果，在 4 個相對應位置無任何檢測訊號出現 (圖 4C)。

mPCR 能力試驗

為增加試驗可信度，避免人為操作或實驗環境影響結果，本實驗室委託 4 個單位，將不同馬鈴薯轉殖品項之 10% 基改 DNA 樣本、

0% 非基改 DNA 樣本與負對照組共 7 個樣本，依照相同引子對與溫度條件作 mPCR 檢測，盲樣試驗回傳資料檢測結果均一致 (表 1)。各檢測單位結果，皆可正確增幅轉殖品項 EH92 (450bp)、AM04 (238 bp) 及 2-1 (357 bp) 之目標片段以及馬鈴薯內生性 UGPase (161 bp) 片段 (圖 5)，顯示 mPCR 具有良好的穩定性與再現性。

討論

隨著世界基改作物種植面積與轉殖品項的日益增加，對監控食品組成或飼料是否含有特

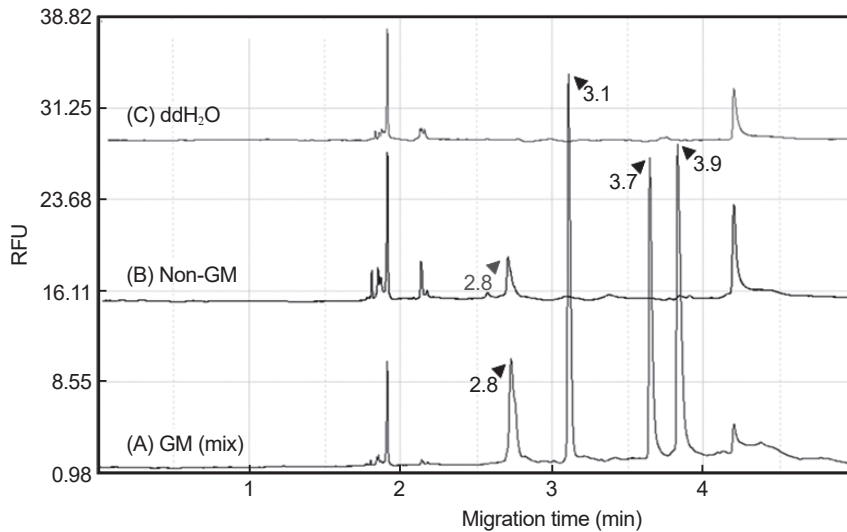


圖 4. 待測樣本經 multiplex polymerase chain reaction (mPCR) 後使用毛細管電泳分析結果。混合樣本為 EH92-527-1、AM04-1020、2-1 轉殖品項 (A)；非基因改造 (基改) 馬鈴薯 (「克尼伯」) (B)；水：負對照組 (C)。

Fig. 4. Examination of samples after multiplex polymerase chain reaction (mPCR) by using capillary electrophoresis. The concentration of each sample was 100 ng. The sample was mixed equally with EH92-527-1, AM04-1020 and 2-1 genomic DNA (A). The nongenetically modified (GM) potato (‘Kennebec’) (B). Negative control: deionized water (C).

表 1. 基因改造 (基改) 馬鈴薯 multiplex polymerase chain reaction (mPCR) 盲樣試驗結果表，重複數為 4。

Table 1. The blind test of genetically modified (GM) potato using multiplex polymerase chain reaction (mPCR). Each result contained 4 replications.

Item	EH92		AM04		2-1	
	10%	0%	10%	0%	10%	0%
EH92	+ ^z	-	-	-	-	-
AM04	- ^z	-	-	-	-	-
2-1	-	-	-	-	+	-
UGPase	+	+	+	+	+	+

^z +: positive results for the four replicates (TARI, TSS, TYDARES, TND AIS); -: negative results for the four replicates (TARI, TSS, TYDARES, TND AIS). UGPase: UDP-glucose pyrophosphorylase; TARI: Taiwan Agricultural Research Institute; TSS: Taiwan Seed Improvement and Propagation Station; TYDARES: Taoyuan District Agricultural Research and Extension Station; TND AIS: Tainan District Agricultural Research and Extension Station.

定基改作物，需要簡單、快速的檢測方法。現行基改作物檢測方式主要以 Real-time PCR 來進行，但 Real-time PCR 反應使用之試劑、探針及耗材成本花費較高，且實驗儀器取得與維護費用部分遠高於一般 PCR。相較之下 mPCR 與一般 PCR 皆須以電泳分析反應結果，然而 mPCR 因單一反應可偵測多個目標，可大幅減少配置與分析時間，且操作上較為簡便，應為較有效率的檢測方法。

mPCR 目前已成功運用在不同基改作物 (如棉花、玉米、大豆) 之分析及檢測 (Ahn *et al.* 2008; Kim *et al.* 2008; Kim *et al.* 2009)，本試驗嘗試建立馬鈴薯的 mPCR 檢測方法，結果顯示可在單一反應同時檢測 EH92 (450 bp)、AM04 (238 bp)、2-1 (357 bp) 共 3 個基改馬鈴薯轉殖品項之專一性序列片段。另以馬鈴薯內生性序列之 UGPase (161 bp) 片段作為對照基因，以避免 PCR 產生偽陰性結果

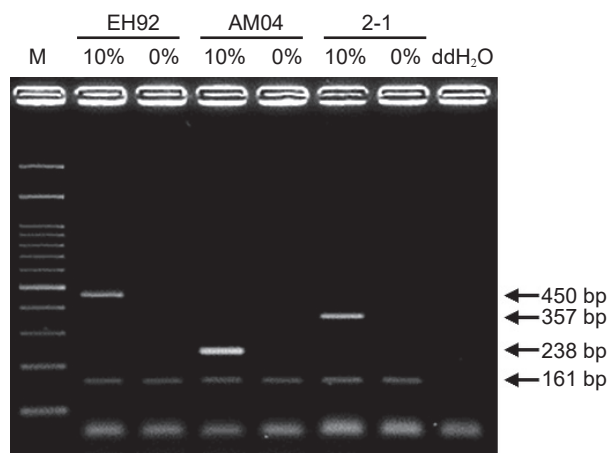


圖 5. 基因改造 (基改) 馬鈴薯 multiplex polymerase chain reaction (mPCR) 盲樣試驗電泳圖，同時檢測 EH92 (450 bp)、AM04 (238 bp)、2-1 (357 bp) 及 UDP-glucose pyrophosphorylase (UGPase) (161 bp) 四個目標片段。

Fig. 5. The electrophoresis results of the blind test of genetically modified (GM) potato. Multiplex polymerase chain reaction (mPCR) was used to detect four target sequences simultaneously, including EH92 (450 bp), AM04 (238 bp), 2-1 (357 bp) and UDP-glucose pyrophosphorylase (UGPase) (161 bp).

之誤判。專一性序列片段，是依據各轉殖品項在外源基因插入基因體序列後，取插入位置其外源基因部分序列與作物基因體序列，此區域稱邊界序列，對各轉殖品項而言為獨一無二。而 UGPase 片段為馬鈴薯內生性基因序列，主要表現於馬鈴薯塊莖，並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)；Watanabe *et al.* (2004) 試驗中依據 NCBI 資料庫 UGPase 基因設計引子對，針對馬鈴薯擴增出目標片段，且屬於茄科的番茄與茄子皆無偵測到 UGPase 基因片段，故可作為馬鈴薯物種專一性檢測對象。依據本試驗 mPCR 結果顯示，EH92 (450 bp)、AM04 (238 bp)、2-1 (357 bp) 僅在各馬鈴薯轉殖品項出現專一性片段，可作為確認檢體中是否具有基改馬鈴薯轉殖品項；而 UGPase (161 bp) 片段則僅於馬鈴薯作物樣本出現，於基改大豆、玉米則無觀察，說明本 mPCR 具備相當之專一性。能力試驗結果亦說明，本 mPCR 方法在個別 4 個實驗室不同操作人員與環境下，待測樣本均可準確觀察到對應的目標片段，顯示具有良好的穩定性與再現性。然而 mPCR 仍存在許多問題需要克服，首先多組引子於同一反應下會相互競爭或因相似性太高使彼此相互黏合 (annealing)，影響 PCR 效率與專一性。此外，若不同引子

間的鏈解溫度 (melting temperature; T_m) 差異過大，容易造成引子不易與 DNA 黏合使某些目標片段較為微弱，或是易與 DNA 發生非專一性黏合而產生非專一性條帶 (Henegariu *et al.* 1997)。因此設計目標序列時，需考慮引子對濃度與 T_m 值，並利用溫度梯度找出反應的最適合溫度。本試驗 mPCR 條件經多次修改優化後，於使用 3 個轉殖品項與兩兩轉殖品項混合進行 mPCR 分析，皆可順利觀察混合樣本產生對應的目標條帶，而負對照組並無出現非專一性產物，代表具良好再現性及高度特异性。

為節省檢測時間與成本，本試驗利用 mPCR 配合簡易快速萃取方法與毛細管電泳，建立馬鈴薯簡化檢測技術流程。由於馬鈴薯主要以塊莖作常態保存，本試驗除參照 Hosaka (2004) 的快速萃取法使用葉片萃取基因體 DNA 外，亦使用塊莖萃取基因體 DNA，在先前預備試驗測試結果顯示，經 mPCR 分析無論是葉片或塊莖萃取之基因體 DNA 皆能擴增目標片段。本試驗使用快速萃取法於 5 min 內可操作完畢，雖然品質與穩定性皆較市售套組略差，但經 mPCR 分析結果仍可清楚的顯示目標片段，證實此快速萃取法純化基因體 DNA 並用於檢測之可行性。另外，Rostamkhani *et*

al. (2011) 研究同時應用快速萃取法結合一般 PCR 及 LAMP 分析技術，用於開發基改棉花轉殖品項檢驗方法，可大幅縮短檢測時間與提高檢測靈敏度，代表快速萃取法可應用於不同檢測方法學之建立。本試驗另以毛細管電泳進行 mPCR 反應後之分析，可於 10 min 內獲取準確結果，除縮短電泳花費時間外，也可避免瓊脂膠體電泳使用 EtBr 或其他 DNA 染劑標示核酸，因而產生含染劑之實驗廢棄物。毛細管電泳法除可快速分析 PCR 產物外，因本身具備提供高解析度核酸片段分離能力，可克服 mPCR 增幅片段過於接近因而難以判斷的缺點。此外，毛細管電泳亦可自動化，已常見於基改作物檢測試驗 (Heide *et al.* 2008; Basak *et al.* 2014)。因此，透過快速萃取法配合毛細管電泳分析，可顯著減少檢測作業時間以加快檢測流程。

我國目前尚未核准基因改造馬鈴薯輸入，根據今年 6 月更新的「基因改造食品原料審議中案件清單」，目前美國 J. R. Simplot 公司所研發的 Innate 基改馬鈴薯 E12 與 Y9 轉殖品項已提出申請 (Taiwan Food and Drug Administration 2018)；而 EH92-527-1 基改馬鈴薯曾於 2010 年由歐盟核准作為工業和飼料上使用 (European Commission 2010a)，但由於審理程序上的疑慮與栽種面積一直無法提高，到了 2013 年歐盟法院以不合程序為由撤銷核准 (Dunmore 2013)。日後若我國開放基改馬鈴薯轉殖品項輸入，需依據馬鈴薯轉殖品項檢驗方法進行辨別與判斷。我國現行基因改造食品原料標示規定，含基改食品原料之包裝食品、食品添加物及散裝食品其非故意摻雜率不得超過 3%。本試驗利用 mPCR 檢測 3 個基改馬鈴薯轉殖品項 EH92-527-1、AM04-1020 及 2-1，符合法規所規定 3% 含量，最低偵測極限可達 0.5%，可有效檢測樣本是否具基改馬鈴薯成分。目前基改檢測管控以歐盟最為嚴格，其非故意摻雜率不得超過 0.9%，其聯合研究中心開發的檢測方法皆以 Real-time PCR 做為標準 (European Commission 2003)。雖然 Real-time PCR 有著高敏感性與快速的優點，但其分析及儀器成本較高為隱憂；而 mPCR 除可增加效

率或降低費用外，更可透過單一反應使用多對引子組，同時增幅轉殖品項專一之目標片段，能有效鑑別出混合不同基改轉殖品項之樣本。因此，如能先利用 mPCR 進行定性檢測，確認樣本有無轉殖品項專一之目標片段後，再依據檢測結果輔以 Real-time PCR 檢測基改馬鈴薯之含量，可簡化操作流程並降低操作錯誤之機會，有助於建立基改馬鈴薯產品之原料追蹤與標示管理。

隨著基改作物產量及需求的上升，檢測工作勢必更加繁重，成本也會更加增加，因此如何快速、有效地進行檢測作業，並減少人力、時間成本為一重要課題。本試驗利用 mPCR 並配合快速核酸萃取方法與毛細管電泳分析，可於短時間內完成馬鈴薯轉殖品項檢測流程並得到準確的結果，期望可應用於不同基改馬鈴薯轉殖品項檢驗方法開發，供其他基改轉殖作物檢測流程之參考。

誌謝

本試驗感謝中央研究院余淑美院士提供基改馬鈴薯 2-1 轉殖品項材料，並感謝台南區農業改良場楊藹華研究員、農業試驗所種原組陳述副研究員、種苗改良繁殖場陳哲仁助理研究員、桃園區農業改良場沈雅鈞助理研究員參加能力試驗。

引用文獻

- Ahn, J. H., J. H. Kim, S. Y. Kim, W. Y. Lee, S. H. Park, and H. Y. Kim. 2008. Multiplex PCR detection for 3 events of genetically modified maize, DAS-59122-7, TC6275, and MIR604. *Food Sci. Biotechnol.* 17:569–572.
- Basak, S., N. Z. Ehtesham, B. Sesikeran, and S. Ghosh. 2014. Detection and identification of transgenic elements by fluorescent-PCR-based capillary gel electrophoresis in genetically modified cotton and soybean. *J. AOAC Int.* 97:159–165.
- 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.

- 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.) Natural Resource Management and Policy. Vol. 30. Springer, Boston, MA. 577 pp.
- Dunmore, C. 2013. EU court annuls approval of BASF's Amflora GMO potato. Reuters, London, UK. <https://www.reuters.com/article/eu-gmo-potato/eu-court-annuls-approval-of-basfs-amflora-gmo-potato-idUSL6N0JS1TH20131213> (visit on 6/19/2017)
- European Commission. 2003. Regulation (EC) No 1830/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 concerning the traceability and labelling of genetically modified organisms and the traceability of food and feed products produced from genetically modified organisms and amending directive 2001/18/EC. EUR-Lex, Luxembourg, Germany. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/ALL/?uri=CELEX:32003R1830> (visit on 6/19/2017)
- European Commission. 2010a. Commission Decision of 2 March 2010: Authorising the placing on the market of feed produced from the genetically modified potato EH92-527-1 (BPS-25271-9) and the adventitious or technically unavoidable presence of the potato in food and other feed products under Regulation (EC) No 1829/2003 of the European Parliament and of the Council. EUR-Lex, Luxembourg, Germany. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?qid=1546478897240&uri=CELEX:32010D0136> (visit on 3/30/2017)
- European Commission. 2010b. Commission Decision of 2 March 2010: Concerning the placing on the market, in accordance with Directive 2001/18/EC of the European Parliament and of the Council, of a potato product (*Solanum tuberosum* L. line EH92-527-1) genetically modified for enhanced content of the amylopectin component of starch. EUR-Lex, Luxembourg, Germany. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX:32010D0135> (visit on 7/18/2017)
- Fraiture, M. A., P. Herman, I. Taverniers, M. De Loose, D. Deforce, and N. H. Roosens. 2015. Current and new approaches in GMO detection: Challenges and solutions. *Biomed Res. Intl.* 2015:392872.
- Geiger, M., C. Biesgen, and P. Hofvander. 2012. Amylopectin type starch with enhanced retrogradation stability. BASF Plant Science Company GmbH, Limburgerhof, Germany. <https://patents.google.com/patent/US20120216316> (visit on 8/3/2016)
- Heide B. R., E. Heir, and A. Holck. 2008. Detection of eight GMO maize events by qualitative, multiplex PCR and fluorescence capillary gel electrophoresis. *Eur. Food Res. Technol.* 227:527–535.
- Henegariu O., N. A. Heerema, S. R. Dlouhy, G. H. Vance, and P. H. Vogt. 1997. Multiplex PCR: Critical parameters and step-by-step protocol. *BioTechniques* 23:504–511.
- Hofvander, P. 2005. Structure and DNA sequence of insert and flanking genomic region of potato event EH92-527-1. BASF Plant Science Company GmbH, Limburgerhof, Germany. https://www.saveourseeds.org/fileadmin/files/SOS/Dossiers/Mon_863/Amended_Report_BPS-003A-05.pdf (visit on 3/23/2016)
- Hong, Y. F., C. Y. Liu, K. J. Cheng, A. L. Hour, M. T. Chan, T. H. Tseng, K. Y. Chen, J. F. Shaw, and S. M. Yu. 2008. The sweet potato sporamin promoter confers high-level phytase expression and improves organic phosphorus acquisition and tuber yield of transgenic potato. *Plant Mol. Biol.* 67:347–361.
- Hosaka, K. 2004. An easy, rapid, and inexpensive DNA extraction method, “one-minute DNA extraction,” for PCR in potato. *Amer. J. Potato Res.* 81:17–19.
- International Service for the Acquisition of Agri-Biotech Applications. 2016. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2016. The International Service for the Acquisition of Agri-Biotech Applications. Ithaca, NY. 125 pp.
- Kim, J. H., S. A. Kim, Y. J. Seo, W. Y. Lee, S. H. Park, and H. Y. Kim. 2008. Multiplex PCR detection of the MON1445, MON15985, MON88913, and LL-cotton25 varieties of GM cotton. *Food Sci. Biotechnol.* 17:829–832.
- Kim, J. H., Y. J. Seo, S. H. Sun, and H. Y. Kim. 2009. Multiplex PCR detection of 4 events of genetically modified soybeans (RRS, A2704-12, DP356043-5, and MON89788). *Food Sci. Biotechnol.* 18:694–699.
- Lipp, M., A. Bluth, F. Eyquem, L. Kruse, H. Schimmel, G. van den 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.
- Rostamkhani, N., A. Haghazari, M. Tohidfar, and A. Moradi. 2011. Rapid identification of transgenic cotton (*Gossypium hirsutum* L.) plants by loop-mediated isothermal amplification. *Czech J. Genet. Plant Breed.* 47:140–148.
- Taiwan Food and Drug Administration. 2018. The list of genetically modified food ingredients (in review). Taiwan Food and Drug Administration, Taipei, Tai-

- wan. <https://www.fda.gov.tw/TC/site.aspx?sid=1510>
(in Chinese) (visit on 8/13/2018)
- 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, T. Maitani, and M. Kubo. 2004. New qualitative detection methods of genetically modified potatoes. *Biol. Pharm. Bull.* 27:1333–1339.

Establishment and Application of Multiplex Polymerase Chain Reaction for Simultaneous Detection of Transgenic Potatoes

Yuan-Kai Tu¹, Yu-Wei Feng², Lit-Fu Chan³, Shu Chen⁴, Yen-Chun Lin⁵, and Han-Wei Chen^{1*}

Abstract

Tu, Y. K., Y. W. Feng, L. F. Chan, S. Chen, Y. C. Lin, and H. W. Chen. 2019. Establishment and application of multiplex polymerase chain reaction for simultaneous detection of transgenic potatoes. *J. Taiwan Agric. Res.* 68(1):16–27.

Potato (*Solanum tuberosum* L.) is known as one of the most important food crops in the world and has high application in industry and feed. In this study, we present a multiplex polymerase chain reaction (mPCR) method for simultaneous detection of genetically modified (GM) potatoes. Quadruplex PCR assay targeting three event-specific sequences and the taxon-specific endogenous reference gene (UDP-glucose pyrophosphorylase; UGPase) were established. All potato DNA samples generated the expected PCR products, and the detection method performed robustly and specifically with various combinations of mixed GM potato events. The limit of detection (LOD) of each single GM sample in our mPCR detection assay was 0.5%. Furthermore, a proficiency test returned from four research sectors also indicated that our detection method had good reproducibility and repeatability. We also developed a simple, rapid and cost-efficient nucleic acid extraction method coupled with multiplex PCR and followed capillary electrophoresis. These results suggest that our methods are suitable for detecting multiplex PCR targets and have the potential for screening unknown genetically modified potato samples through a simple procedure.

Key words: Potato, mPCR, Detecting method.

Received: May 23, 2018; Accepted: August 27, 2018.

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

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

² Technical Specialist, Dawu Township Office, Taitung Country, Taiwan, ROC.

³ Associate Research Fellow, Technical Service Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

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

⁵ Research Assistant, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.