基因轉殖植物檢測技術開發體系之建立

范明仁[1]　陳述[2*]　林俊義[2]　蔡奇助[3]
楊藹華[4]　王仕賢[4]　林學詩[5]

摘　要

基因轉殖植物之檢測有兩種方式，第一種是藉由基因表現的層次進行觀察檢測，如：基因表現蛋白質或植物之外在表徵等；第二種方式係就 DNA 層次直接檢測轉殖之外來基因的 DNA 序列。就基因表現層次方面而言，目前台南區農業改良場利用除草劑進行耐藥性篩檢，供試的 21 個玉米品種均對嘉磷塞(Glyphosate)（年年春 41%S、80 倍稀釋液噴施）及固殺草(Glufosinate)（百試達 18.02%S、100 倍稀釋液噴施）無耐藥性。僅進口飼料玉米具有耐藥性之個體。花蓮區農業改良場則已發展以 x-gluc 溶液染色法檢測具 GUS 基因之基因轉殖植物之技術。再就 DNA 層次之檢測方式而言，其可區分為四個檢測層次，第一層次為初步篩檢是否為基因轉殖作物，就木瓜而言，農業試驗所針對 CaMV35S 啟動子(Cauliflower mosaic virus 35S promoter；CaMV35S)、*nos*(nitric oxide synthase；*nos*）終結子，以及抗 Kanamycin 之篩選基因 *npt*II（neomycin phosphotransferase II；*npt*II)；高雄區農業改良場針對 CaMV35S 啟動子及 *nos* 終結子進行檢測，皆可獲得專一性條帶，而非基因轉殖木瓜無此條帶；台南區農業改良場則是針對玉米及番茄進行 CaMV35S 啟動子及 *nos* 終結子檢測是否有基因轉殖作物混雜，結果顯示 21 個玉米品種(主要為甜玉米)及 42 個番茄品種均未檢測出有基因轉殖植物滲入，僅進口飼料玉米檢測出。第二層次為標第基因特異性檢測，農業試驗所針對 PRSV（papaya ringspot virus）鞘蛋白結構基因序列所設計之引子，可使 16-0-1、17-0-5、18-2-4 等基因轉殖木瓜株系產生約 820bp 之專一性條帶，非基因轉殖木瓜無此條帶。第三層次為檢測外源基因之結構特異性，引子所擴增區域係跨越在二個以上的外源基因，藉此方式可順利判別基因轉殖之外源基因間相對位置，農業試驗所以此方式，已順利獲得

* 通訊作者(電子郵件：cshu@wufeng.tari.gov.tw；聯絡電話：886-4-23302301 轉 807；傳真：886-4-23338162)
1.亞洲大學生活應用科學系。
2.行政院農業委員會農業試驗所。
3.高雄區農改場。
4.台南區農改場。
5.花蓮區農改場。

轉殖木瓜外源基因之完整序列，可明確區分特定轉殖與非轉基因轉殖木瓜。第四層次為事件特異性檢測，藉由各轉殖株系間，外源基因插入點之差異，區別不同之轉植株系。農業試驗所已成功設計不同引子，對不同木瓜轉殖株系有專一性的判別條帶。另外於水稻方面，目前農業試驗所已建立水稻基因轉殖鑑定技術結果顯示，第一層次以 PCR 方式可偵測出轉殖水稻含有 CaMV35S 啟動子、*nos* 終結子，以及篩選基因 *hpt*II（hygromycin resistance；*hpt*II）之專一性條帶，非基因轉殖水稻無此條帶；第二層偵測出基因轉殖水稻分別含有 APU（amylopullulanase）、Lactoferrin、Phytase 等基因；第三層次針對基因轉殖APU，以及轉殖Phytase水稻進行外源基因跨區檢測，亦可獲得專一的條帶，經定序後與原始已知序列相同。

關鍵字：基因轉殖（Gene transformation）、木瓜輪點病毒（Papaya ringspot virus）、普魯南醣酶（amylopullulanase, APU）、乳鐵蛋白（Lactoferrin）、植酸酵素（Phytase）

前 言

木瓜輪點病毒(papaya ringspot virus；簡稱 PRSV)是木瓜生長栽培期間最大的殺手，於西元1945年首先在夏威夷的歐胡(Oahu) 島被發現以來(Jensen, 1949)，目前幾乎已侵害世界上所有的木瓜產區。台灣係於1975年在高雄縣的燕巢、大樹、阿蓮等高屏溪兩岸的木瓜栽培區首先發現木瓜輪點病毒的存在，之後在短短的三年間即已摧毀全省各地的木瓜果園，損失極為嚴重(Wang *et al*., 1978)。

目前市面上所販售的木瓜以台農二號兩性株為大宗，多係以網室栽培方式為主。網室栽培技術是由農業試驗所鳳山分所發展出，其對於阻隔蚜蟲的傳毒成效極佳，為目前可以栽培出消費市場較喜愛的木瓜風味(台農二號)，又可以不受木瓜輪點病毒為害的方式。然而網室成本高，且颱風季節時風險又大，使得果農生產成本高，因此要獲取利潤日漸困難。

基於上述，隨著生物技術之發展，研究學者們期望藉由植物基因轉殖技術，能對於木瓜輪點病害的防治有一完整的解決途徑。基因轉殖木瓜最早發展於美國，由康乃爾大學與夏威夷大學合作，以基因槍方式將木瓜輪點病毒 PRSV HA5-1 輕症系統的鞘蛋白基因(coat protein gene)轉殖入木瓜，使轉殖後之植株對木瓜輪點病毒產生抗性，此稱之為鞘蛋白調控保護(coat protein-mediated protection)(Lius *et al*., 1997)。其所依據的學理為病原誘導抗病性(parasite-derived resistance)的理論(Sanford and Johnston, 1985)，也就是將病毒基因體的一部份轉殖至寄主植物的染色體組內，以達到抗病毒感染的目的。

所得之基因轉殖木瓜品種 Sunup 及 Rainbow 已於 1998 年 5 月起在夏威夷及美國販售。但夏威夷所研發之鞘蛋白轉基因抗 PRSV 之木瓜僅能對夏威夷之病毒株系有很好的抗性，對台灣及其他地區之病毒則不具抗性(Tenant *et al,* 1994)。

國內基因轉殖木瓜之研究始於 1988 年，所利用的學理與上述相同，其係針對分離自台灣的強症病毒素系統(YK 系統)，先經過核甘酸序列解序(Wang *et al.,* 1994; Wang and Yeh, 1997)，利用定點突變方式將其構築送入 Ti 質體，使其可以在植物細胞內進行轉錄，並轉譯出 PRSV 鞘蛋白的完整基因(Cheng *et al.,* 1996)，再轉型入農桿菌(Agrobacterium tumefaciens)中，之後採獨創的液相傷口處理木瓜未成熟胚法(鄭, 1994)，克服了木瓜轉型與組培再生等困難，成功地將 PRSV YK 病毒的鞘蛋白基因，轉殖進入目前栽培品種台農二號木瓜中，於 1996 年產生了本土的基因轉殖木瓜(包, 2000)。

基因轉殖作物之興起，也引起了人們對於生態安全、種原多樣性，乃至人體安全影響的疑慮，因此紛紛制定相關法規予以管理(林等, 2001)。葉錫東教授所自行研發的木土基因轉殖木瓜已於 2001 年 3 月通過了農委會之隔離田間試驗所規範的生態環境安全評估。但依據最新公告的「植物品種及種苗法」的規定，凡為基因轉殖作物之種苗應予以標示，為了配合相關法規的實施，基因轉殖木瓜種苗檢測技術之研發為目前急待辦理的重點工作之一，以使新的「植物品種及種苗法」可落實執行，且有先進科學之檢測結果來作為法令施行之依據。

全球的 GM 作物正如火如荼的研究，合法通過有 88 種，尤其是 2005 年人類人口增加達 80 億，因此以生物技術來改良作物，增加生產力為人類未來生存的趨勢。2004 年全球獲批准種植的「生物技術作物（即基因轉殖作物,GMO）」為 8100 萬公頃，種植國家多為開發中國家。1995 年 GMO 種苗銷售金額為 7500 萬美金，1998 年達到 12-15 億美元，2000 年達到 30 億美元，2005 年預計將達 80 億美元。2004 年全球基因轉殖作物種植面積在五萬公頃以上的國家有 14 個，包括印度、中國、巴西、南非、阿根廷、菲律賓、澳大利亞、巴拉圭、烏拉圭、墨西哥、美國、加拿大、西班牙、羅馬尼亞，其中 9 個為開發中國家，而 5 個為已開發國家，生物技術作物（GMO）持續快速的被接受，反應全人類認識到基因轉殖作物在生產率、環境、經濟、健康和社會福利等方面的發展進步，而且南方國家已超過北方國家，顯示生物技術作物（GMO）將被全球廣泛採用及接受，基因轉殖作物以棉花、大豆、玉米及油菜為大宗，種植面積占全球總耕地 15 億公頃的 5% ，以轉入抗殺草劑基因的大豆為主，抗蟲玉米次之，目前研發之趨勢為導入多價基因。全球種子市場目前約 300 億美金，其中基因轉殖種子佔 16% ，即 47 億美金，2005 年預計可超過 50 億美金，隨著基因轉殖作物種類與數量日益增加，可想而知，未來基因

轉殖作物將衝擊全球人類之生活及經濟活動，所以在未知基因轉殖作物對人類健康是否有疑慮之情況下，有必要發展基因轉殖作物檢測技術，告知消費者何者為基因轉殖商品，使其有自主選擇性。

目前檢測基因轉殖作物，可由蛋白質層次與 DNA 層次兩方面來檢視，蛋白質層次之鑑定常用的方法有酵素連結免疫吸附分析法(Enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA)，西方墨點分析法(Western blot analysis)等；而 DNA 層次之鑑定最常用的方法為聚合酵素連鎖反應(Polymerase Chain Reaction; PCR)，這也是目前檢測基因轉殖作物最常被利用的作法(Miraglia *et al.,* 2004)。所應用主要原理為針對所轉入的外來序列設計引子，藉由 PCR 擴增反應來偵測這些特殊的 DNA 序列是否存在。

因此，設計合適的引子以產生具專一性的產物，是發展基因轉殖作物鑑定技術的關鍵技術。就 PCR 引子的設計而言，依據所欲偵測的目標，可區分為四個層次：第一層次為基因轉殖可能樣品之篩檢(screening)，其係就啟動子、終結子，以及抗藥篩選基因序列區域設計引子以進行 PCR 反應，主要目的為針對受測樣品進行初步篩檢，把具有啟動子或終結子等序列的樣品挑出來。第二層次為基因特異性(gene specific)之檢測，係就所轉殖進入的外來基因序列設計引子，以偵測樣品中是否確有該外來基因之存在。第三層次為結構特異性(construct specific)的檢測，所設計的引子其擴增的區域是跨越在啟動子與外來基因兩區，或是跨越在外來基因與終結子兩區，主要是藉由已知的基因結構排列，以進行基因轉殖作物檢測結果之再確認。第四層次為事件特異性(event specific)，所設計的引子擴增區域是跨越於外來基因與被轉殖的受體品系基因組之間，因此可同時偵得受體品系與外來基因，這個層次之檢測主要係用於轉基因作物之品種(系)鑑別。

本研究主要目的為應用上述第一、二、三、四層次的 PCR 鑑定技術，進行傳統木瓜與基因轉殖木瓜植株與種苗，以及基因轉殖水稻檢測鑑定方法之研究。

材料與方法

(一)試驗材料

1. 基因轉殖木瓜，由中興大學葉錫東教授處所取得之 16-0-1、17-0-5、18-2-4 三個基因轉殖木瓜株系。非基因轉殖木瓜則由鳳試所提供，台農一、二、五、六號，日陞、紅妃、穗中紅、馬大瓜、泰國種等種原（農試所辦理）。
2. 基因轉殖水稻包括(1)甜甜米，為轉殖 APU 基因之水稻（中研院余淑美研究員所提供）。(2)轉 phytase 基因之水稻分別是由中研院余淑美研究員及國際

基因公司提供。(3)轉 lactoferrin 基因之水稻，是由中興大學陳良築教授所提供。非基因轉殖水稻為台農 67 號（*Oryza Sativa* L cv. TN67），作為對照組之用（農試所辦理）。

3. 進口飼料玉米與甜玉米包括 H5、H10、Honey 236、MADONA、Shimmer、台南 22 號、金美 2 號、金蜜、夏蜜、華珍、黑美珍、蜜珍二號、蜜珍三號、興農 506、興農好滋味、雙色金華、雙色金蜜、阪田、阪田 610、夏強、PopCorn，其詳細來源見表一（台南場辦理）。
4. 番茄包括 Bolzano、Campari、Chapeau、CHT1312、Clarance、Daydream、DRK909、Elstar、FA189、Lemance、Lovett、Nectar、Salomee、Sensacion、Sensei、Sunstream、Tarantino、Temptation、Tomato1306、Y73-RedStone、四季紅、玉豐、朱蜜、朱鳳、朱麗、秀珠、明珠、金光、金剛二號、金珠、金龍、春光、紅瑞、紅慧、夏津、貴女、黃水晶、農友 301、翠紅、嬌女、聯珠、麗君 (表二)（台南場辦理）。

(二)研究方法

基因轉殖植物之檢測方式有兩種方式，第一種是藉由基因表現的層次進行觀察檢測，如基因表現蛋白質或植物之外在表徵等；第二種方式係就 DNA 層次直接檢測是否具有轉殖之外來基因的 DNA 序列，方法如下：

1. 植物體基因組 DNA 之萃取

主要參考 Doyle and Doyle（1990）所提之方法進行部份修改以萃取植物體基因組 DNA。取約 0.5g 植株嫩葉，以液態氮研磨後迅速加入 500µl 已預熱至 60℃的 1% CTAB DNA 萃取緩衝液，置於 60℃水浴 30 分鐘，並間歇搖動。取出離心管靜置冷卻至室溫後，以 14,000 rpm 離心 5 分鐘，取上清液倒至另一新的 1.5ml 小離心管中，並加入 500µl chloroform / isoamylalcohol (24∶1) 溶液混勻，再以 14,000 rpm 離心 5 分鐘使兩液相分離，取上清液加入 300ul -20℃的 isopropanol 以沈澱 DNA。以 14,000 rpm 離心 10 分鐘，倒掉上清液，加入 1ml wash buffer（75% ethanol,10mM ammonium acetate）混勻，於 14,000rpm 離心 10 分鐘後倒掉上清液，將 DNA 沈澱進行乾燥後加入 50ul 無菌水溶解，並加入 RNase（10ug/ml）於 37℃下反應 30 分鐘。所抽得的 DNA 均經 O.D. 值測定與電泳，以檢測所萃取之 DNA 濃度與品質。

2. PCR 引子之設計

本研究中所使用之引子全為自行設計，由於本研究涉及日後檢測制度之實施，因此文中將不提及引子代號及其詳細序列，悉請讀者見諒。

3. 聚合酵素連鎖反應 (Polymerase Chain Reaction, PCR)

反應總體積為 30 μl，內含 1.2unit polymerase、1X PCR buffer(50mM KCl；

10mM Tris-HCl, pH9.0；0.1% Triton 100)、2.5mM $MgCl_2$、200 μM dNTP、0.2 μM primer 及 32ng template DNA。聚合酵素連鎖反應係於 Perkin Elmer Cetus Thermal Cycler 9600 進行，反應溫度條件之設定係依據所設計引子特性之不同而調整。經聚合酵素連鎖反應所增殖之產物，以 2%的 agarose 在 TAE buffer (40mM Tris acetate, pH8.0；1mM EDTA) 中進行 DNA 電泳，並以 UV 光檢視、照相及貯存影像於 IS 2000 Digital Imaging System (Alpha Innotech Corporation)。

4. PCR 反應產物之確認

將所得之 PCR 產物直接進行定序(ABI 3730 XL DNA Analyzer)，定序所得結果，以已知的序列為標準進行比對，所使用之比對軟體為 DNASTAR (DNASTAR, 2001)。

結 果

就基因表現層次方面而言，就台南區農業改良場利用除草劑進行耐藥性篩檢之結果，供試的 21 個玉米品種均對嘉磷塞(Glyphosate)（年年春 41%、80 倍稀釋液噴施）及固殺草(Glufosinate)（百試達 18.02%、100 倍稀釋液噴施）無耐藥性，僅進口飼料玉米具有耐藥性之個體，其中 60%對嘉磷塞有耐藥性，5%對固殺草有耐藥性(圖一)；大豆對嘉磷塞有 89 %之耐藥性，對固殺草無耐藥性(表三)。花蓮區農業改良場則發展以 x-gluc 溶液染色法檢測基因轉殖植物之技術（資料未附）。

就 DNA 層次直接檢測轉殖之外來基因的 DNA 序列，針對基因轉殖作物第一層次的 PCR 鑑定，台南場在進口飼料玉米中，檢測出 CaMV35S 啟動子及 *nos* 終結子，比例均為 25%；21 個甜玉米品種均未檢出預期之 DNA 增幅片段，42 個番茄品種也均未檢測出轉基因標的物。在木瓜方面農業試驗所、高雄區農業改良場（資料未附）、利用葉錫東教授所轉殖進入的基因序列為藍本，針對 CaMV35S 啟動子區域設計引子進行 PCR，由農業試驗所所得之結果顯示，三個基因轉殖木瓜株系於 870bp 處皆可產生具專一性的產物，而未經轉殖的品種系全無此產物之出現(圖二)；另針對 kanamycin 抗藥篩選基因 *npt*Ⅱ序列設計引子進行 PCR 之結果，三個基因轉殖木瓜株系於 810bp 處具專一性產物，其他栽培與商業品種則無此產物(圖三)；最後針對 *nos* 終結子區域設計引子進行 PCR 結果顯示，三個基因轉殖木瓜株系於 126bp 處皆可產生具專一性的產物，而未經轉殖的品種系全無此產物之出現(圖四)。

基因轉殖水稻檢測方法之研發由農業試驗所執行，所得結果如下：第一層次的定性檢測顯示，轉殖 APU 基因（amylopullulanase）之甜甜米、轉殖 phytase

基因之轉植酸水稻與轉乳鐵蛋白水稻等基因轉殖水稻於 560bp 處皆可偵得 hygromycine 基因片段，非基因轉殖的水稻台農 67 號無此產物(圖五)；針對 CaMV35S 基因片段所設計之引子，甜甜米、轉植酸水稻及轉乳鐵蛋白水稻於 93bp 產生專一性條帶，而轉乳鐵蛋白水稻可同時於 420bp 及 93bp 處各產生一專一性之條帶，非基因轉殖的台農 67 號水稻無此產物(圖六)；偵測 *nos* 基因之專一性引子可使甜甜米、轉植酸水稻與轉乳鐵蛋白水稻產生 130bp 專一性條帶，非基因轉殖的台農 67 水稻無此產物(圖七)。

農業試驗所針對基因轉殖木瓜所轉殖進入的 PRSV 鞘蛋白結構基因設計引子，以進行第二層次基因特異性(gene specific)的 PCR 鑑定，結果三個基因轉殖株系均可於 820bp 處產生一具專一性的產物(圖八)，而未經轉殖的品種系全無此產物之出現。

在水稻方面，針對水稻所轉殖進入的 APU、phytase、lactoferrin 基因分別設計引子，以進行第二層次基因特異性(gene specific)的 PCR 鑑定，結果基因轉殖 APU 水稻可以獲得 750bp 專一性的產物，而非轉殖 APU 的轉殖水稻及非基因轉殖水稻全無此產物之出現(圖九)；轉殖植酸水稻可以利用 phytase 的引子增幅獲得 1250bp 專一性的產物，而非轉殖植酸基因的轉殖水稻及非基因轉殖水稻全無此產物之出現(圖十)；轉乳鐵蛋白水稻可以 Lactoferrin 的引子增幅獲得 700bp 專一性的產物，而非轉乳鐵蛋白水稻的轉殖水稻及非基因轉殖水稻全無此產物之出現(圖十一)。

第三層次之檢測為結構特異性(construct specific)的檢測，所以設計引子之擴增區域是跨越於 CaMV35S 啟動子與 PRSV 鞘蛋白基因兩區，偵測結果可獲得 700bp 之專一性條帶，非基因轉殖水稻全無此產物之出現(圖十二)。為鑑定轉殖 APU 水稻結構特異性的檢測，所設計引子之擴增區域是跨越於 APU 與 *nos* 終結子兩區，偵測結果可獲得 700bp 之專一性條帶，非基因轉殖水稻全無此產物之出現(圖十三)。轉植酸水稻結構特異性的檢測，所設計引子之擴增區域是跨越於 phytase 與 *nos* 終結子兩區，偵測結果可獲得 300bp 之專一性條帶，非基因轉殖水稻全無此產物之出現(圖十四)。

第四層次為事件特異性(event specific)檢測，引子擴增跨越外來基因與被轉殖的受體基因組之間，可同時測得受體與外來基因，故可做為品種鑑定之用，三種基因轉殖木瓜皆可分別以專一性引子分別鑑定出各轉殖株系，左端 PCR 結果顯示三種基因轉殖木瓜 16-0-1 與 17-0-5 為同一株轉殖木瓜之分株，此兩株木瓜可以相同的引子增幅獲得專一性條帶(圖十五)，且兩者 PCR 產物之解序結果相同，18-2-4 無此條帶形成；而另一組引子則可使 18-2-4 獲得專一性之條帶，而 16-0-1 與 17-0-5 以此組引子行 PCR 反應時則無產物(圖十六)。

有關 PCR 產物之確認，上述無論針對 CaMV35S 啟動子、*npt*Ⅱ抗藥篩選

基因、*nos* 終結子，以及 PRSV 鞘蛋白結構基因等所得的 PCR 增殖產物，均已經過定序分析，經序列比對結果發現所得的 PCR 擴增產物與原始序列間皆具有 98%以上的相符性，顯示所設計的引子組皆具有極高的專一性，並確認已建立了基因轉殖木瓜植株與種苗檢測之第一層次、第二層次、第三層次與第四層次的 PCR 鑑定作業流程。也就是說對於木瓜種苗是否為基因轉殖之作物以及為哪一株系，經由本研究結果已初步建立了檢測及鑑定技術。

而且，在上述所有試驗中，為進行樣品 DNA 與作物特性之確認，我們針對木瓜特有基因（木瓜酵素基因 papain）設計了專一引子予以驗證(圖六)，結果顯示所有的參試樣品均具有木瓜酵素基因 papain。

另由於受檢的樣品很多，為了加速樣品檢測的效率，我們嘗試將萃取所得的 DNA 予以混合，再以專一性引子進行 PCR 反應，結果在 9(傳統木瓜)：1(基因轉殖木瓜樣品)的混合 DNA 樣品中，仍可偵得 CaMV35S 啟動子與 PRSV 鞘蛋白結構基因專一性條帶之出現(圖七、八)。因此日後倘進行特定區域採樣時，初步可逢機取樣 10 株予以混合後進行 PCR 之鑑定偵測，以減少檢測的樣品數，並加速檢測效率。

討　論

經由本研究，我們認為進行基因轉殖作物之檢測必須依著第一、二、三、四層次的順序進行是相當重要的。在初步篩選時應先針對轉錄啟動子、終結子、篩選基因這三種 DNA 序列進行 PCR 反應，初篩結果若為陽性，再針對所轉入的不同轉殖基因設計引子進行複檢確認，將可減少後續進行 PCR 反應的數目。本研究中基因轉殖木瓜、水稻所使用的是 CaMV35S 啟動子、*nos* 終結子與 *npt*Ⅱ基因，雖然這是根據統計現今基因轉殖作物最常被使用的序列之一，但就目前發展中的基因轉殖作物而言，其所使用的啟動子已日趨多樣化(林等, 2001)，因此，如何與我國基因轉殖作物研究人員充份溝通，使其願意提供啟動子、終結子、篩選基因與所轉入之特殊基因序列的正確詳細資訊，將是研發檢測技術與落實未來法規推動的重要基礎。

另日後若有基因轉殖種子種苗申請進口時，則應要求提出轉殖基因之詳細資料及檢測方法，以為檢測之依據，否則若要全面篩檢，將增加困難度。

就本研究而言，所採用的 CaMV35S 轉錄啟動子及 *nos* 轉錄終結子分別取自於植物病毒 CaMV 及植物病源菌農桿菌，所以若作物受到 CaMV 或農桿菌感染，雖初篩結果可能會呈偽陽性，但再進一步的針對轉殖基因本身設計引子進行複檢時，將會呈陰性結果，因此不致造成檢測的誤判(Farid, 2002)。另就本研究中的木瓜輪點病毒而言，其屬於馬鈴薯 Y 屬病毒(Potyvirus genus)，可

經由機械接種或蚜蟲傳播，寄主範圍相當狹窄，僅限於番木瓜科(Caricaceae)，藜科(Chenopodiaceae)及葫蘆科(Cucurbitaceae)等雙子葉植物。此病毒在番木瓜科和葫蘆科植物上會引起系統性感染，在藜科上則造成局部病斑。該病毒為長絲狀顆粒，大小約 780×12mm，在 PRSV 病毒顆粒內包含一條單鏈核醣核酸(ssRNA)(包,2000)，由於其為 RNA 病毒，因此將不影響 DNA 層次之鑑定。

此外，在進行 PCR 檢測時，必須同時進行對照組試驗，以確立檢驗結果的可信度。陰性對照組係不含任何轉殖作物來源的 DNA。而陽性對照組須依據植物種類之不同而定，以確定 DNA 品質、PCR 反應條件無誤，如：大豆係針對 lectin 基因、玉米係針對 invertase 基因設計引子(Meyer, 1999; Lin *et al.,* 2000)。本研究中係以木瓜特有之木瓜酵素(papain)基因為標的，依據 papain 基因序列(Cohen *et al.,* 1986)設計引子，以作為木瓜物種陽性對照組之檢測。而水稻亦同樣進行陽性對照組之檢測（結果未附）。

藉由本研究，雖然對於檢測是否為基因轉殖或傳統木瓜、水稻種苗之技術研發已經成熟，但對於所檢出之基因轉殖木瓜的來源則尚須更進一步的研究，由於第四層次的鑑定可偵測解析出植物受體轉殖品系基因組被外來基因插入區域的序列，因此可作為轉殖作物之品種(系)鑑定之用，藉由此方式，就本試驗所設計之引子，我們已可進一步確認所檢測出之基因轉殖木瓜樣品的來源品系是由哪一株木瓜轉殖株系而來，可提供更確鑿的證據。

依據報告(包, 2000; Ling *et al.,* 1991)，以美國與台灣所發展之 GM 木瓜為例，其殖入之基因結構相類似，美國所發展的基因轉殖木瓜與本土的基因轉殖木瓜相比較，其皆具有 CaMV35S 啟動子、*npt*Ⅱ抗藥篩選基因與 *nos* 終結子，即使在所轉入的外來基因部份，由於病毒親緣的關係，二者鞘蛋白基因的序列亦具有頗高的相似度。解決途徑除了針對美國基因轉殖木瓜與本土基因轉殖木瓜之基因構築找到可以區隔的序列設計引子以進行 PCR 鑑定之外，研發第四層次的鑑定技術亦可解決上述問題。

結　論

本研究主要目的為研發應用 PCR 技術，進行基因轉殖木瓜、水稻植株與種苗檢測方法之研究，目前已建立了基因轉殖木瓜植株與種苗檢測之第一層次、第二層次、第三層次與第四層次的 PCR 鑑定作業流程，也已建立了基因轉殖水稻植株檢測之第一層次、第二層次、第三層次的 PCR 鑑定作業流程，對於用於種苗是否為 GMO 或為傳統種（子）苗之檢測鑑定已經足夠，所以不論苗木或田間篩檢，本試驗已研發出合宜之檢測鑑定技術。

為了健全種子與種苗法之落實，建立周延完善之基因轉殖作物檢測體系仍為本研究最終之目標，根據研究結果，以及考慮到檢測實際之實用性，宜以農委會農糧署為主體，成立標準作業審查委員會，並由防檢局提供防檢疫技術指導，在農委會農試所成立木瓜與水稻的基因轉殖作物檢測核心實驗室；在種苗繁殖場成立馬鈴薯與油菜的基因轉殖作物檢測核心實驗室，而各農業改良場負責進行樣品採樣與初步篩檢，其中台中區農業改良場、花蓮區農業改良場、高雄區農業改良場負責木瓜篩檢；台南區農業改良場負責玉米與番茄篩檢如圖十七，再將各農業改良場檢出之疑似基因轉殖樣品進行二次檢測，如有篩出疑似基因轉殖樣品，則送到核心實驗室作再確認及進一步之分析檢測，如此基因轉殖植物之檢測體系即可完整妥善建置成立。

參考文獻

包慧俊。2000。木瓜輪點病毒鞘蛋白轉基因木瓜抗病性狀之研究。 國立中興大學植物病理學研究所博士論文。台中市。

林俊義、范明仁、陳述。2001。面對基因改造作物之因應。農業世界雜誌。212:12-21。

鄭櫻慧。1994。木瓜輪點病毒台灣分離株系鞘蛋白轉基因木瓜之構築及其抗性。國立中興大學植物病理系博士論文。台中市。

Cheng, Y.H., J.S. Yang, and S.D. Yeh. 1996. Efficient transformation of papaya by coat protein gene of papaya ringspot virus mediated by *Agrobacterium* following liquid-phase wounding of embryogenic tissues with carborundum. Plant Cell Rep. 16:127-132.

Cohen, L.W., V.M. Coghlan, and L.C. Dihel. 1986. Cloning and sequencing of papain-encoding cDNA. Gene 48:219-227.

DNASTAR, Inc. 2001. Lasergene User's Manual. Madison, Wisconsin, USA.

Doyle, J.J. and J.L. Doyle. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 12:13-15.

Farid, E.A. 2002. Detection of genetically modified organisms in foods. Trends in Biotechnology 20:215-223.

Jensen, D.D. 1949. Papaya ringspot virus and its insect vector relationships. Phytopathology 39:212-220.

Ling, K., S. Namba, C. Gonsalves, J.L. Slightom, and D. Gonsalves. 1991. Protection against detrimental effects of potyvirus infection in transgenic tobacco plants expressing the papaya ringspot virus coat protein gene.

Bio/Technology 9:752-758.

Lius, S., R.M. Manshardt, M.M.M. Fitch, J.L. Slightom, J.C. Sanford, and D. Gosalves. 1997. Pathogen-derived resistance provides papaya with effective protection against papaya ringspot virus. Molecular Breeding 3:161-168.

Lin, H.Y., L.C. Chiueh, and Y.C. Shih. 2000. Detection of genetically modified soybeans and maize by the polymerase chain reaction method. Journal of Food and Drug Analysis 8:200-207.

Meyer, R. 1999. Development and application of DNA analytical methods for the detection of GMOs in food. Food Control 10:391-399.

Miraglia, M., K.G. Berdal, C. Brera, P. Corbisier, A. Holst-Jensen, E.J. Kok, H.J.P. Marvin, H. Schimmel, J. Rentsch, J.P.P.F. van Rie and J. Zagon. 2004.Detection and traceability of genetically modified organisms in the food production chain. Food and Chemical Toxicology 42:1157-1180.

Sanford, J.C., and S.A. Johnston. 1985. The concept of parasite-derived resistance. J. Theor. Biol. 113:395-405.

Tennant, P.F., C. Gonsalves, K.S. Ling, M. Fitch, R. Manshardt, J.L. Slight, and D. Gonsalves. 1994. Differential protection against papaya ringspot virus isolates in coat protein gene transgenic papaya and classically cross-protected papaya. Phytopathology 84: 1359-1366.

Wang, H.L., C.C. Wang, R.J. Chiu, and M.H. Sun. 1978. Preliminary study on papaya ringspot virus in Taiwan. Plant Prot. Bull. 20:133-140.

Wang, C.H., H.J. Bau, and S.D. Yeh. 1994. Comparison of the nuclear inclusion B protein and coat protein genes of five papaya ringspot virus strains distinct in geographic origin and pathogenicity. Phytopathology 84:1205-1210.

Wang, C.H., and S.D. Yeh. 1997. Divergence and conservation of the genomic RNAs of Taiwan and Hawaii strains of papaya ringspot virus. Arch. Virol. 142:271-285.

表一、供試之玉米品種與取得來源

代號	玉米品種	取得來源
1	H5	台灣農產公司
2	H10	台灣農產公司
3	Honey 236	台灣農產公司
4	MADONA	台灣農產公司
5	Shimmer	台灣農產公司
6	台南 22 號	台南場朴子分場
7	金美 2 號	和生種子
8	金蜜	台南場朴子分場
9	夏蜜	和生種子
10	華珍	台南場朴子分場
11	黑美珍	農友種苗
12	蜜珍二號	農友種苗
13	蜜珍三號	農友種苗
14	興農 506	台南場朴子分場
15	興農好滋味	台灣農產公司
16	雙色金華	和生種子
17	雙色金蜜	和生種子
18	阪田	台灣農產公司
19	阪田 610	台灣農產公司
20	夏強	台南場
21	PopCorn	超市

＊台南場提供

表二、供試之番茄品種與取得來源

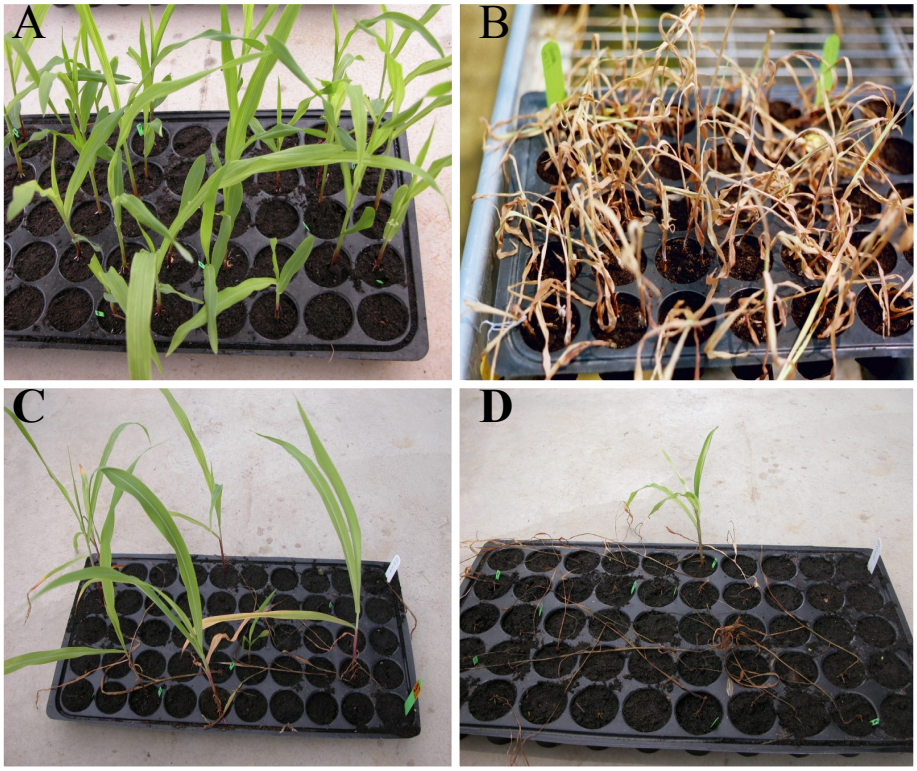
番茄品種	取得來源	番茄品種	取得來源
Bolzano	DeRuiter Seeds, Netherland	玉豐	和生種苗公司
Campari	Enza Zaden, Netherland	朱蜜	農友種苗公司
Chapeau	DeRuiter Seeds, Netherland	朱鳳	農友種苗公司
CHT1312	AVRDC	朱麗	農友種苗公司
Clarance	DeRuiter Seeds, Netherland	秀珠	農友種苗公司
Daydream	Enza Zaden, Netherland	明珠	農友種苗公司
DRK909	DeRuiter Seeds, Netherland	金光	農友種苗公司
Elstar	Enza Zaden, Netherland	金剛二號	農友種苗公司
FA189	福埠實業公司	金珠	農友種苗公司
Lemance	DeRuiter Seeds, Netherland	金龍	和生種苗公司
Lovett	Enza Zaden, Netherland	春光	農友種苗公司
Nectar	Enza Zaden, Netherland	紅瑞	和生種苗公司
Salomee	Enza Zaden, Netherland	紅慧	和生種苗公司
Sensacion	Enza Zaden, Netherland	夏津	農友種苗公司
Sensei	Enza Zaden, Netherland	貴女	農友種苗公司
Sunstream	Enza Zaden, Netherland	黃水晶	和生種苗公司
Tarantino	Enza Zaden, Netherland	農友 301	農友種苗公司
Temptation	Enza Zaden, Netherland	翠紅	農友種苗公司
Tomato1306	福埠實業公司	嬌女	農友種苗公司
Y73-RedStone	台南區農改場	聯珠	農友種苗公司
四季紅	農友種苗公司	麗君	農友種苗公司

＊台南場提供

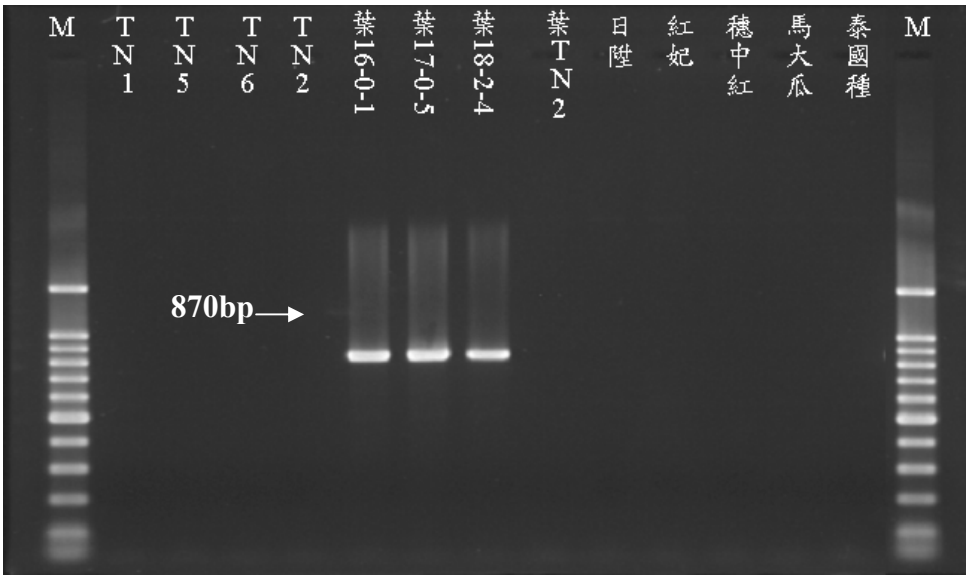
表三、甜玉米 21 種、飼料玉米、黃豆分別以 41%嘉磷塞(Glyphosate，年年春)稀釋 80 倍及 18.02%固殺草(Glufosinate，百試達)稀釋 100 倍噴施檢測其耐藥性比例

受檢樣品	殺草劑	
	嘉磷塞	固殺草
甜玉米（計 21 種）	0 %	0 %
飼料玉米	60 %	5 %
大豆	89 %	0 %

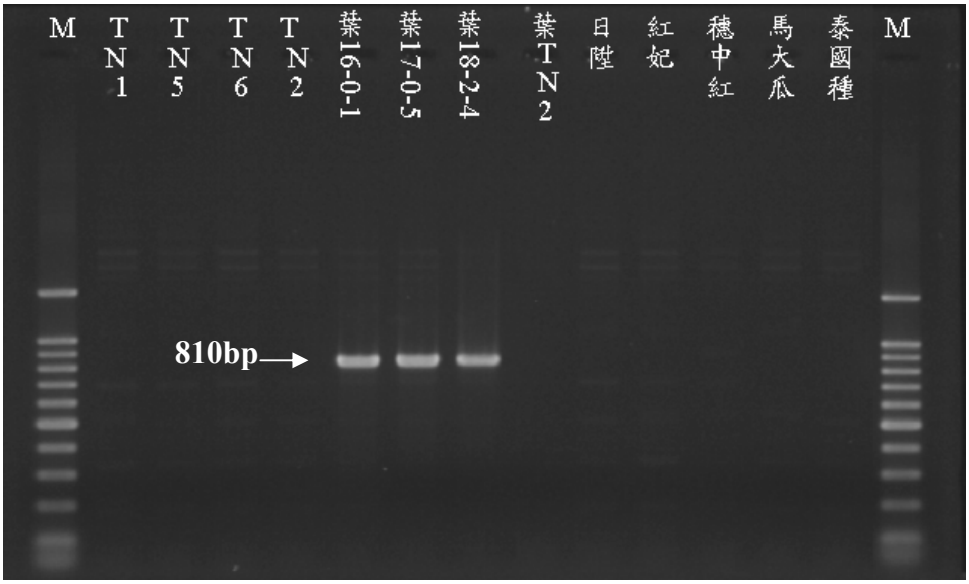
＊台南場提供



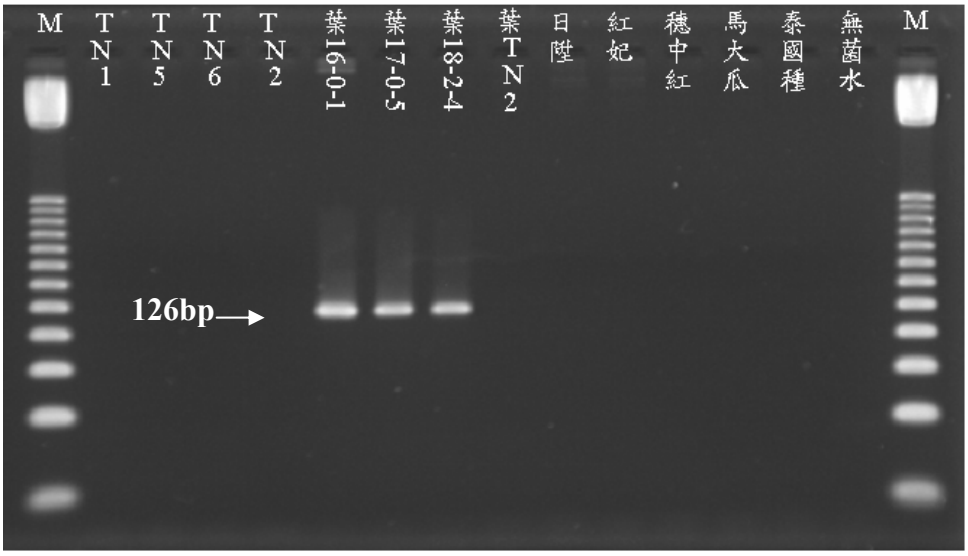
圖一、進口飼料玉米除草劑耐受性篩檢(A)播種萌芽之進口飼料玉米。(B)非基因轉殖玉米不耐除草劑全部死亡。(C)進口飼料玉米對嘉磷塞具有 60%抗性。(D)進口飼料玉米對固殺草具有 5%抗性。（台南場提供）



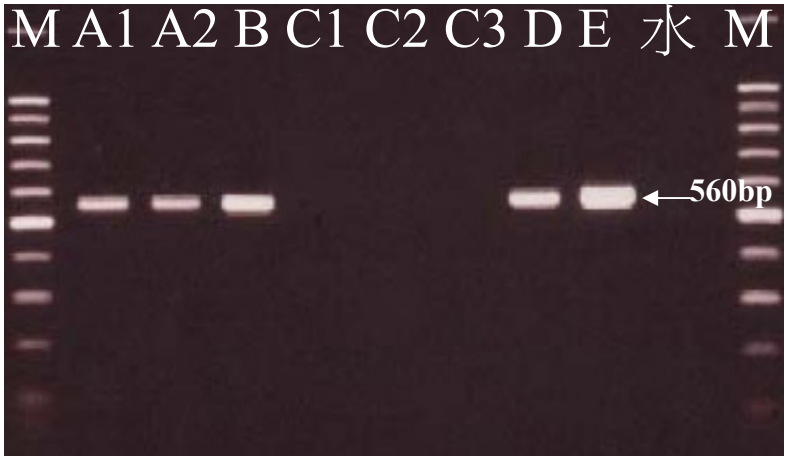
圖二、針對基因轉殖木瓜株系與傳統木瓜品種偵測 CaMV35S 啟動子之 PCR 擴增產物。M:100bp DNA ladder。品種代號：TN1：台農 1 號。TN2：台農 2 號。TN5：台農 5 號。TN6：台農 6 號。葉 TN2：葉錫東教授提供之台農 2 號。葉 16-0-1、葉 17-0-5、葉 18-2-4：葉錫東教授提供之基因轉殖木瓜。日陞、紅妃、穗中紅、馬大瓜、泰國種：商業品種。（農試所提供）



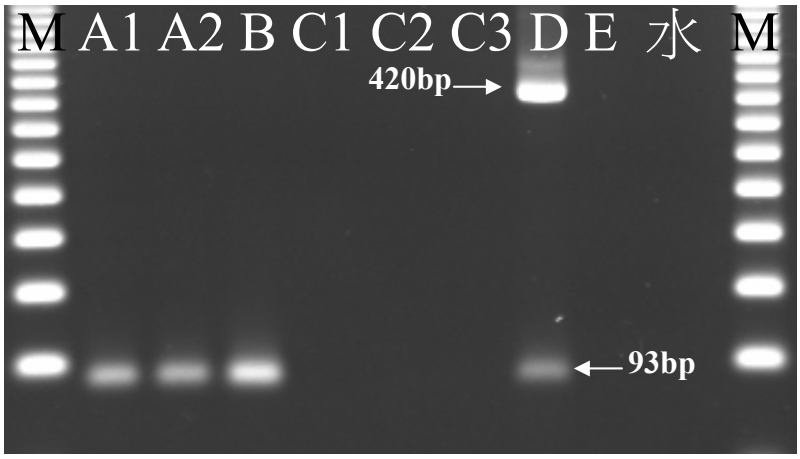
圖三、針對基因轉殖木瓜株系與傳統木瓜品種偵測 kanamycin 抗藥篩選基因 *npt*Ⅱ之 PCR 擴增產物。M:100bp DNA ladder。品種代號：TN1：台農 1 號。TN2：台農 2 號。TN5：台農 5 號。TN6：台農 6 號。葉 TN2：葉錫東教授提供之台農 2 號。葉 16-0-1、葉 17-0-5、葉 18-2-4：葉錫東教授提供之基因轉殖木瓜。日陞、紅妃、穗中紅、馬大瓜、泰國種：商業品種。（農試所提供）



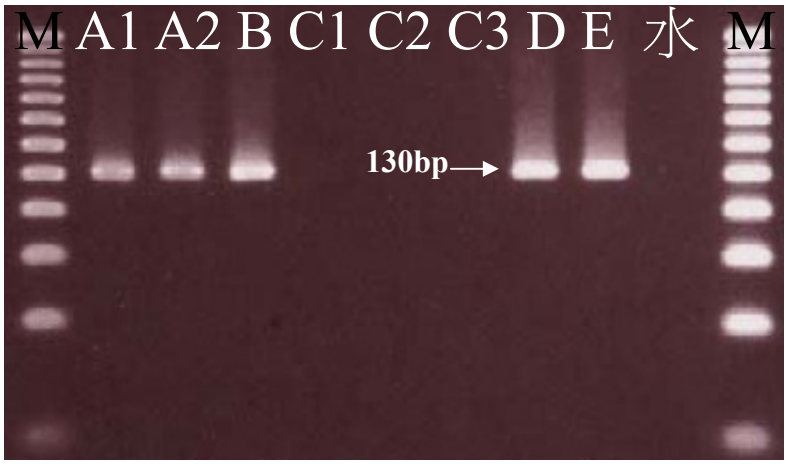
圖四、針對基因轉殖木瓜株系與傳統木瓜品種偵測 *nos* 終結子之 PCR 擴增產物。M:25bp DNA ladder。品種代號：TN1：台農 1 號。TN2：台農 2 號。TN5：台農 5 號。TN6：台農 6 號。葉 TN2：葉錫東教授提供之台農 2 號。葉 16-0-1、葉 17-0-5、葉 18-2-4：葉錫東教授提供之基因轉殖木瓜。日陞、紅妃、穗中紅、馬大瓜、泰國種：商業品種。（農試所提供）



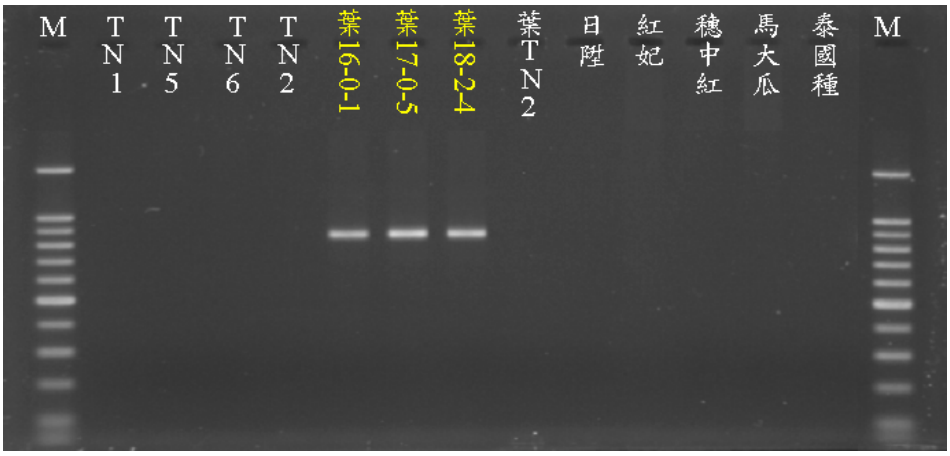
圖五、針對基因轉殖水稻株系與傳統水稻品種偵測 hygromycin 抗藥篩選基因 hptⅡ之 PCR 擴增產物。M:100bp DNA ladder。品種代號: A1:APU, 92 年第 1 期水稻(余淑美)；A2:APU, 92 年第 2 期水稻(余淑美)；B: Phytase 基因轉殖水稻(余淑美)；C1、C2、C3:台農 67；D:Act LF 陳良築教授；E: Phytase 基因轉殖水稻(國際)。（農試所提供）



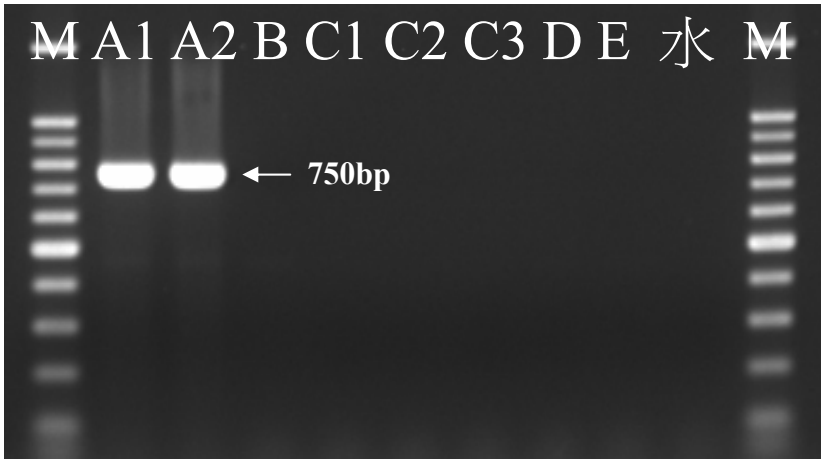
圖六、針對基因轉殖水稻株系與傳統水稻品種偵測 CaMV35S 啟動子基因之 PCR 擴增產物。M:100bp DNA ladder。品種代號: A1:APU, 92 年第 1 期水稻(余淑美)；A2:APU, 92 年第 2 期水稻(余淑美)；B: Phytase 基因轉殖水稻(余淑美)；C1、C2、C3:台農 67；D:Act LF 陳良築教授；E: Phytase 基因轉殖水稻(國際)。（農試所提供）



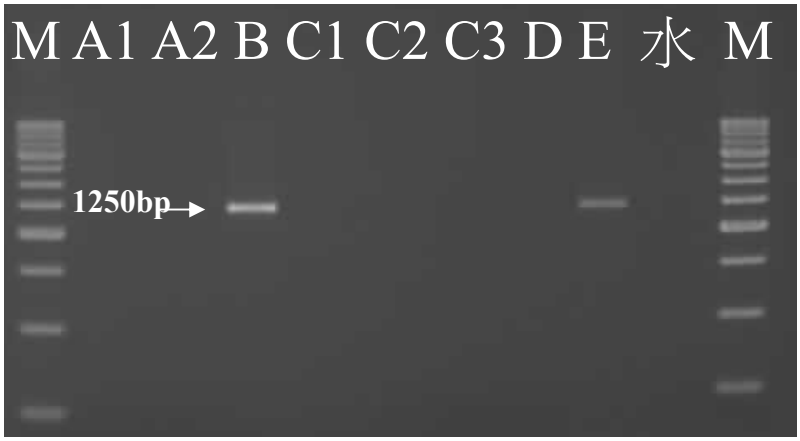
圖七、針對基因轉殖水稻株系與傳統水稻品種偵測 *nos* 終結子基因之 PCR 擴增產物。M:100bp DNA ladder。品種代號: A1:APU, 92 年第 1 期水稻(余淑美)；A2:APU, 92 年第 2 期水稻(余淑美)；B: Phytase 基因轉殖水稻(余淑美)；C1、C2、C3:台農 67；D:Act LF 陳良築教授；E: Phytase 基因轉殖水稻(國際)。（農試所提供）



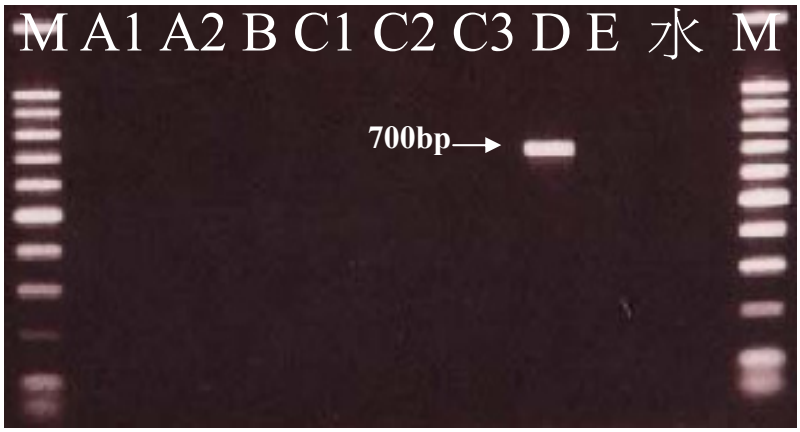
圖八、針對基因轉殖木瓜株系與傳統木瓜品種偵測 PRSV 鞘蛋白基因之 PCR 擴增產物結果。M:100bp DNA ladder。品種代號：TN1：台農 1 號。TN2：台農 2 號。TN5：台農 5 號。TN6：台農 6 號。葉 TN2：葉錫東教授提供之台農 2 號。葉 16-0-1、葉 17-0-5、葉 18-2-4：葉錫東教授提供之基因轉殖木瓜。日陞、紅妃、穗中紅、馬大瓜、泰國種：商業品種。（農試所提供）



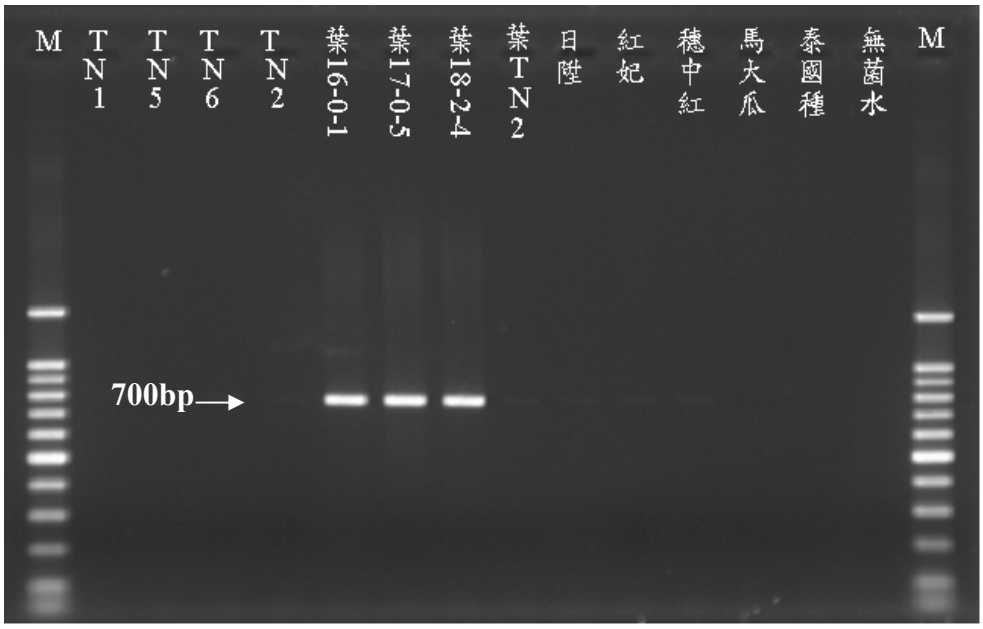
圖九、針對基因轉殖水稻株系與傳統水稻品種偵測 APU 基因之 PCR 擴增產物。M:100bp DNA ladder。品種代號: A1:APU, 92 年第 1 期水稻(余淑美)；A2:APU, 92 年第 2 期水稻(余淑美)；B: Phytase 基因轉殖水稻(余淑美)；C1、C2、C3:台農 67；D:Act LF 陳良築教授；E: Phytase 基因轉殖水稻(國際)。（農試所提供）



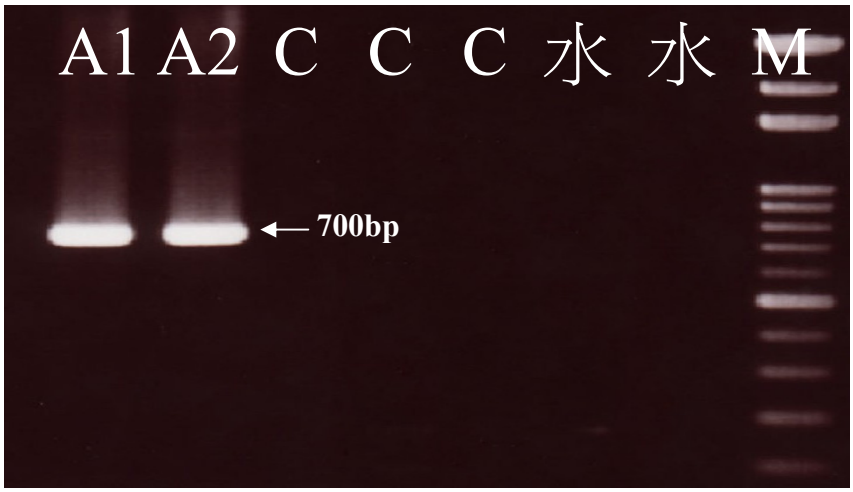
圖十、針對基因轉殖水稻株系與傳統水稻品種偵測 phytase 基因之 PCR 擴增產物。M:100bp DNA ladder。品種代號: A1:APU, 92 年第 1 期水稻(余淑美)；A2:APU, 92 年第 2 期水稻(余淑美)；B: Phytase 基因轉殖水稻(余淑美)；C1、C2、C3:台農 67；D:Act LF 陳良築教授；E: Phytase 基因轉殖水稻(國際)。(農試所提供)



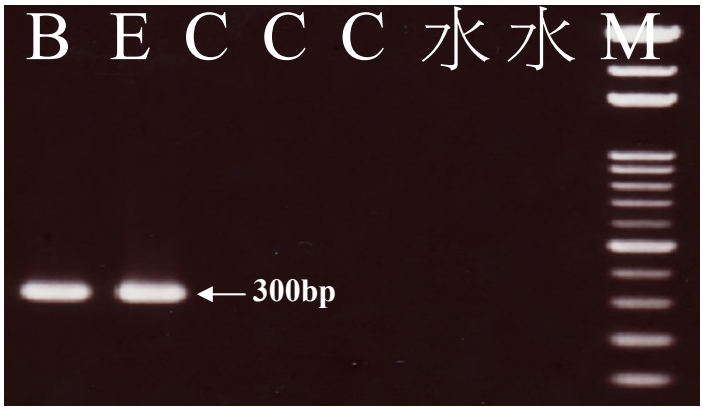
圖十一、針對基因轉殖水稻株系與傳統水稻品種偵測 lactoferrin 基因之 PCR 擴增產物。M:100bp DNA ladder。品種代號: A1:APU, 92 年第 1 期水稻(余淑美)；A2:APU, 92 年第 2 期水稻(余淑美)；B: Phytase 基因轉殖水稻(余淑美)；C1、C2、C3:台農 67；D:Act LF 陳良築教授；E: Phytase 基因轉殖水稻(國際)。(農試所提供)



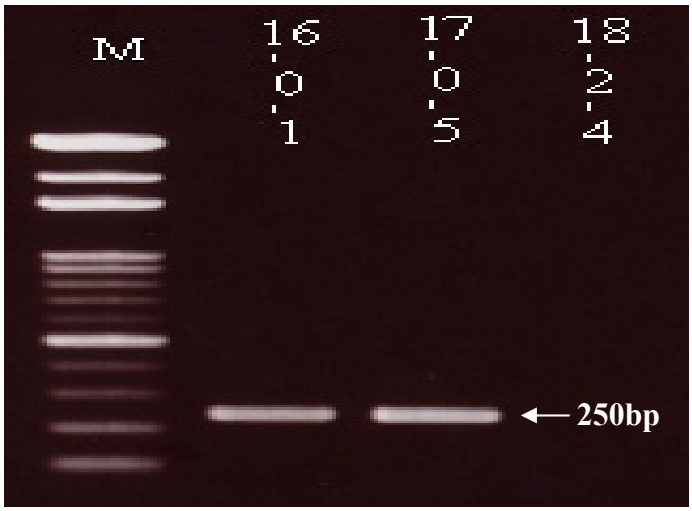
圖十二、針對基因轉殖木瓜株系與傳統木瓜品種偵測(CaMV35S+PRSV)區域之 PCR 擴增產物。M:100bp DNA ladder。品種代號：TN1：台農 1 號。TN2：台農 2 號。TN5：台農 5 號。TN6：台農 6 號。葉 TN2：葉錫東教授提供之台農 2 號。葉 16-0-1、葉 17-0-5、葉 18-2-4：葉錫東教授提供之基因轉殖木瓜。日陞、紅妃、穗中紅、馬大瓜、泰國種：商業品種。（農試所提供）



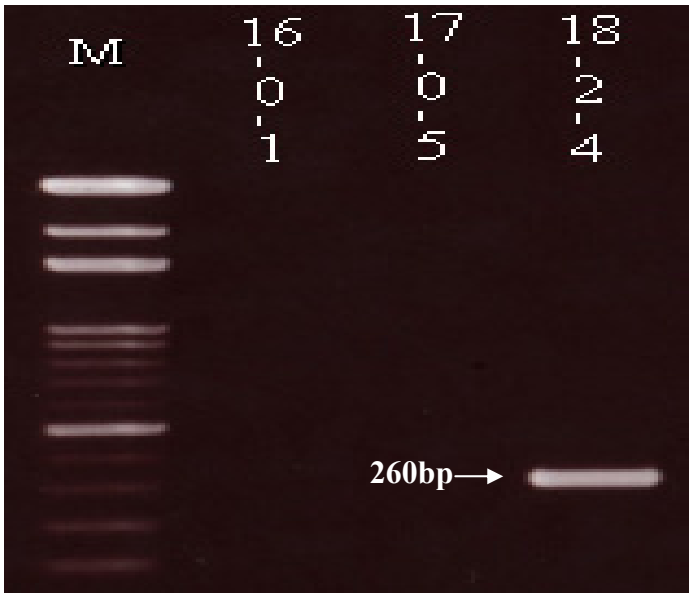
圖十三、針對基因轉殖水稻甜甜米與非基因轉殖水稻偵測(APU+*nos* 終結子)區域之 PCR 擴增產物。M:100bp DNA ladder。針對基因轉殖水稻株系與傳統水稻品種偵測 hygromycin 抗藥篩選基因 hptⅡ之 PCR 擴增產物。M:100bp DNA ladder。品種代號: A1:APU, 92 年第 1 期水稻(余淑美)；A2:APU, 92 年第 2 期水稻(余淑美)；C:台農 67。（農試所提供）



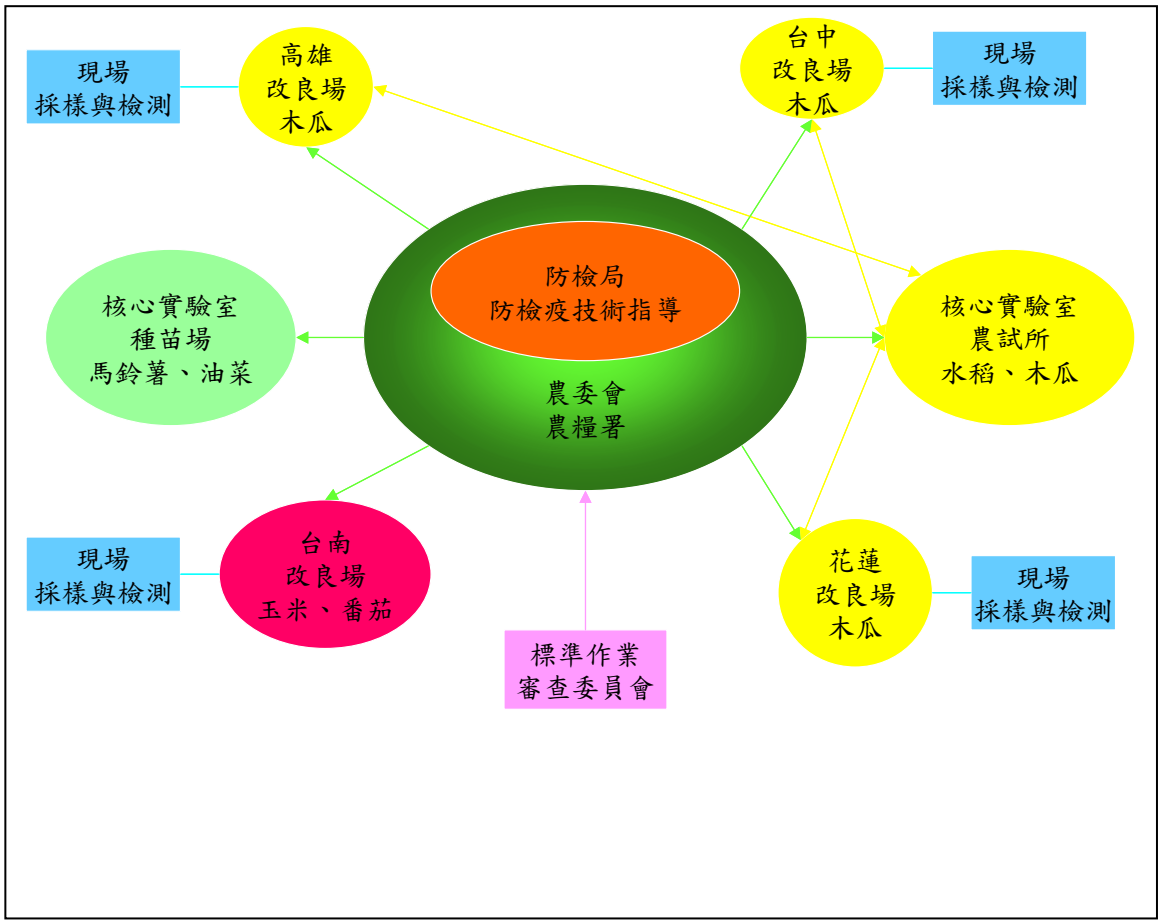
圖十四、針對基因轉殖植酸水稻與非基因轉殖水稻偵測(phytase+*nos* 終結子)區域之 PCR 擴增產物。M:100bp DNA ladder。品種代號: B: Phytase 基因轉殖水稻(余淑美)；E: Phytase 基因轉殖水稻(國際)；C:台農 67。（農試所提供）



圖十五、以 16-0-1 之 flanking 序列所設計之引子進行 PCR 反應，可使 16-0-1 及 17-0-5 產生專一性條帶，18-2-4 無此條帶。M:100bp DNA ladder。（農試所提供）



圖十六、以 18-2-4 之 flanking 序列所設計之引子進行 PCR 反應，可使 18-2-4 產生專一性條帶，16-0-1 及 17-0-5 無此條帶。M:100bp DNA ladder。（農試所提供）



圖十七、基因轉殖作物檢測體系

The proposed protocol for the detection system of transgenic plants in Taiwan

Ming-Jen Fan[1], Shu Chen[2*], Chien-Yih Lin[2], Chi-Chu Tsai[3], Ai-Hua Yang[3], Shyh-Shyan Wang[4] and Hsueh-Shih Lin[5]

Abstract

Generally there are two kind methods to detect transgenic plants. The first method is the detection of the character protein produced by gene translation from transgenic plant. Secondary method is DNA sequence detection of foreign gene transfer from other organisms. Tainan District Agriculture Research and Extension station (Tainan-DARE) had been survey some corn varieties for herbicide resistance. From their report, twenty-one traditional corns are not anti-herbicide by glyphosate (80X, 41%S glyphosate) and glufosinate (100X, 18.02%S glyphosate). Only imported feed corn has herbicide resistance of glyphosate and glufosinate. The detection method of transgenic plants in Hualien DAIS is to use x-gluc staining for those plants with GUS gene.

For the secondary detection method, which use DNA sequence as detection methods, can be classified into four categories. The first category is to assort transgenic plant and non-transgenic plants. For category 1 of identification, the primer sets of Taiwan Agriculture Research Institute (TARI) are designed to detect the CaMV35S promoter gene, *nos* terminator gene and the kanamycin selection marker gene *npt*II for papaya. Kaonsiung DARE use primers to detect the CaMV35S promoter gene and *nos* terminator gene, too. The results showed the transgenic papaya have specific bands; all of the traditional varieties don't have those bands. The primer sets of Tainan DARE are designed to detect the CaMV35S promoter gene and *nos* terminator gene for corn and tomato. The results showed both twenty-one traditional corn varieties and forty-two tomato varieties don't have

*Corresponding author（E-mail: cshu@wufeng.tari.gov.tw ; Tel: 886-4-23302301-807; Fax: 886-4-23338162）

1.Department of Applied Life Sciences, Asia University.

2.Division of Plant Germplasm, Agriculture Research Institute.

3.Kaonsiung District Agriculture Research and Extension station.

4.Tainan District Agriculture Research and Extension station.

5.Hualien District Agriculture Research and Extension station.

specific bands, but imported feed corn has some specific bands. The category 2 was called as gene specific detection, TARI use the coat protein gene sequence of papaya ring spot virus (PRSV) from professor Yeh to design a primer set which could detect PRSV transgenic papaya by the specific product in 820bp, all of the traditional varieties don't have those bands. A primer set of category 3 was designed for construct specific detection to amplify the region across between gene and gene. The results show accurate complete sequence from T-DNA of transgenic papaya by TARI. The category 4 was called as event specific. The T-DNA random inserts genomic DNA of every one transgenic plant line in different site. The primer sets of TARI are designed to detect the DNA flanking in papaya. The results showed papaya had specific bands in different transgenic lines. TARI also has accomplished the detection methods for detection transgenic rice. The PCR (Polymerase Chin Reaction) analysis is applied in this research. In category 1, the results showed transgenic rice have specific bands of CaMV35S promoter gene, *nos* terminator gene and the hygromycin selection marker gene *hpt*II. All of the traditional varieties don't have those bands. In category 2, the results showed transgenic rice have specific bands of amylopullulanans (APU) gene, lactoferrin gene and phytase gene. A primer set of category 3 was designed for construct specific detection to amplify the region across between gene and gene. The results showed accurate complete sequence from T-DNA of transgenic rice of APU and phytase.

Key words: Gene transformation, Papaya ringspot virus (PRSV), amylopullulanase (APU)、Lactoferrin、Phytase