

利用多目標 PCR 檢測基因改造木瓜

陳富永、蔡奇助¹、陳國憲、王雲平、楊藹華²

摘 要

木瓜產業受到木瓜輪點病毒(papaya ringspot virus, PRSV)的嚴重威脅，產量大減，中興大學植物病理系教授葉錫東博士培育的抗輪點病毒基因改造木瓜，可有效降低此病毒的威脅。但因基因改造作物是否影響生態及食用安全性之疑慮，政府單位及消費大眾均極關切基因改造木瓜的檢測。本研究利用 PCR 反應，進行核酸層次的檢測，以針對 PRSV 外鞘蛋白基因(coat protein, CP)設計專一性之引子，可以增幅一 820 bp 之 DNA 片段，正確檢測出基因改造木瓜。為提高檢測之精準性及效率，同時開發出多目標 PCR(multiplex PCR)技術，針對殖入木瓜之多個基因及 DNA 序列做為檢測對象，包括 PRSV CP 基因、NPT-II(neomycin phosphotransferase)基因、NOS(nopaline synthase) terminator 序列、及 CaMV(cauliflower mosaic virus) 35S promoter 序列等設計專一性引子，利用多組核酸引子，同時進行 PCR 反應，在基因改造木瓜中可分別增幅 359 bp、295 bp、180 bp、及 134 bp 四個片段；再加上木瓜本身的木瓜酵素(papain)基因之專一性引子(增幅 211 bp)，做為內部對照(internal control)達到多重確認基因改造木瓜檢測精準性之效果。

關鍵語：基因改造木瓜、DNA 檢測、多目標 PCR

前 言

「基因改造作物」(Genetically Modified Crops, GM crops，簡稱「基改作物」，或稱「基因轉殖作物」)就是將某一個作物品種，以人工的方法，轉殖接入其他物種的基因，或者是將該物種的基因做修飾改造後，所產生的新的作物品種。有別於傳統育種，基因改造突破物種間不親合的限制，可將不同物種間的基因交互利用，同時可預期殖入基因會在子代中表現；例如藉由此技術使得農作物可以抵抗病原菌的侵害、可以殺死取食的昆蟲、可以產生對除草劑的耐藥性...等等⁽⁸⁾。基改作物發展十年來，至少有 120 種植物被轉殖成功⁽⁹⁾，但目前已商品化的基改作物則僅有黃豆、玉米、油菜、棉花、番

¹高雄區農業改良場助理研究員及副研究員

²台南區農業改良場助理研究員、助理研究員及副研究員

茄、稻米、馬鈴薯、木瓜、甜菜、小麥等，然而在工業大國及生產廠商的強力主導下，基改作物在全球的栽培面積已從 1996 年的一百餘萬公頃，增加到 2005 年的 9 千餘萬公頃⁽⁸⁾，這些基改作物中以黃豆為最大宗，其次為玉米、棉花及油菜；其中又以除草劑耐藥性的基改作物佔最大部分、其次為昆蟲抗性、第三為兩者兼具的基改作物。國內最常見的基改作物是黃豆與玉米，均是藉由穀物的貿易而進入，主要來自美國；另外一部分是國內學術研究機構自行研究發展的基改作物，包括木瓜、水稻、番茄...等作物^(2,4)；其中又以國立中興大學葉錫東教授所研發之抗木瓜輪點病毒(papaya ringspot virus, PRSV)的病毒鞘蛋白(coat protein, CP)基因改造木瓜進展最快，已完成田間試驗，目前正進行食品安全之評估，尚未命名上市^(1,5)。但由於國內對於基因改造作物的相關管理法規未能及時立法實施，使得基因改造木瓜在田間試驗階段即因控管不周延，導致植物材料外流，基因改造木瓜出現在市面上的消息多有所聞。木瓜是國產的重要水果之一，近五年平均種植面積約 3,460 公頃(93 年農業統計年報)、主要栽培區為高屏地區則有近 1,400 公頃；木瓜果實肉質甜美、營養價值高，富含木瓜酵素、多種礦物質及維生素，廣受民眾喜愛；但由於對基因改造作物食用安全性的疑慮，消費大眾莫不希望能正確地分辨「基因改造」或「非基因改造」木瓜。為了準確、快速而有效率及經濟層面考量下檢測出基因改造木瓜，本研究以針對殖入之基因及 DNA 序列做為檢測對象，設計包括 CaMV(cauliflower mosaic virus)35S promoter、NOS(nopaline synthase)terminator 序列、PRSV CP 基因、及 NPT-II(neomycin phosphotransferase)基因等之專一性引子，利用多組核酸引子，同時進行 PCR 反應，針對基因改造及非基因改造木瓜進行檢測，建立檢測技術，準確地區隔兩種不同的木瓜，將是基因改造木瓜實務檢測時的一項利器。

材料與方法

一、植物材料

基因改造(GM)木瓜植物材料為中興大學葉錫東教授所提供之台農二號基因改造木瓜葉片材料，此為轉殖台灣地區分離之木瓜輪點病毒(PRSV YK strain)鞘蛋白基因之基因轉殖木瓜，對多個品系之木瓜輪點病毒具有抗性⁽⁵⁾；對照之非基因改造木瓜為種植於溫室之台農二號木瓜。

二、木瓜 DNA 製備

以植物 DNA 萃取試劑組(DNeasy Plant Mini Kit, Qiagen 公司生產)進行植物 DNA 製備。秤取木瓜葉片 0.1 克，以液態氮研磨成粉狀，移入微量離心

管，加入 AP1 溶液 400 μ l、RNase A 溶液(100 mg/ml) 4 μ l，振盪混合均勻，置於 65°C 水浴 10 分鐘。之後加入 130 μ l 之 AP2 溶液，混合均勻，置於冰上 5 分鐘，以 12,500 rpm 轉速，離心 5 分鐘。將上層液體移至新的分離管中，再以 12,500 rpm 轉速，離心 2 分鐘，將流出液移至新的微量離心管，加入 1.5 倍體積之 AP3/E 溶液，以手搖晃混合均勻。混合均勻後將溶液移至收集管上的收集管柱(mini spin column)中，轉速 8,000 rpm、離心 1 分鐘，倒掉過濾下之液體，收集管柱中加入 500 μ l 之 AW 溶液，轉速 8,000 rpm、離心 1 分鐘，倒掉過濾下之液體；重複 1 次，丟棄過濾液，再以轉速 12,000 rpm、離心 2 分鐘，使清洗液及酒精去除乾淨，最後將收集管柱置於新的微量離心管中，加入 200 μ l 之預熱的 AE 溶液，靜置 5 分鐘後，轉速 8,000 rpm、離心 1 分鐘，以洗出 DNA，保存於-20°C 備用。

三、不同比例 GM 木瓜混合 DNA 製備

將 GM 木瓜及非 GM 木瓜葉片分別經冷凍乾燥後，磨成粉末，再依重量比例分別秤取 GM 及非 GM 木瓜葉片粉末置於微量離心管中，混合成含有 100%、75%、50%、25%、10%、5%、3%、1%及 0% GM 木瓜之材料，混合後再各自取出 0.03 克粉末進行 DNA 製備，製備方法同前所述。

四、引子合成

針對轉殖於基因改造木瓜之 PRSV-CP 基因合成專一性引子組(表 1)，CP-5 及 CP-R 分別位於 CP 基因之上游及下游序列⁽⁵⁾，聯合增幅之 DNA 片段為 820 bp；針對木瓜本身基因木瓜酵素(papain)之專一性引子組 PAPAN-F 及 PAPAN-R，聯合增幅之 DNA 片段為 211 bp^(1,3)。為進行 Multiplex-PCR，調整各 PCR 產物大小，另外合成 CP-F，位於 CP 基因之中游序列，與 CP-R 引子聯合增幅之 DNA 片段為 359 bp；針對 kanamycin 抗性基因 NPT II 之專一性引子 NPT-F 及 NPT-R 聯合增幅之 DNA 片段為 295 bp、針對 NOS terminator 之專一性引子 NOS-F 及 NOS-R 聯合增幅之 DNA 片段為 180 bp、及針對 35S promoter 之專一性引子 35S-F 及 35S-R 聯合增幅之 DNA 片段為 134 bp^(6,7,10,11)。

五、單一目標 PCR 試驗

聚合酶連鎖反應(polymerase chain reaction, PCR)以 Applied Biosystems 公司製造之 GeneAmp PCR System 9700 儀器進行。以基因改造及非基因改造木瓜 DNA 每個樣品各 200 ng 為模版(template)DNA，利用針對 PRSV CP 基因之專一性引子 CP-5、CP-R 或針對木瓜酵素基因之專一性引子 PAPAN-F、PAPAN-R 進行 PCR 試驗，分別檢測 PRSV CP 基因或木瓜酵素基因。以 Taq DNA 聚合酶(購自 Invitrogen 公司)為反應酵素，每個反應

表 1. 試驗中使用之引子組及增幅片段大小

Table 1. Primers used in this study

Primer	Primer sequence 5'-3'	Target	Amplified fragment
CP-5 CP-R	TCTAAAAATGAAGCTGTGGA GTGCATGTCTCTGTTGACAT	PRSV-CP	820 bp
CP-F CP-R	CAAGTCGATTATCCGATTAACC GTGCATGTCTCTGTTGACAT	PRSV-CP	359 bp
NPT-F NPT-R	TTTCTCGGCAGGAGCAAGG ACTGGGCACAACAGACAATC	NPT-II	295 bp
PAPN-F PAPN-R	GGGCATTCTCAGCTGTTGTA CGACAATAACGTTGCACTCC	Papain	211 bp
NOS-F NOS-R	GAATCCTGTTGCCGGTCTTG TTATCCTAGTTTGCGCGCTA	Nos terminator	180 bp
35S-F 35S-R	AAAGGCTATCGTTCAAGATGC AGTGGAGATATCACATCAATCCACTT	35S promoter	134 bp

使用 0.75 Unit，最終反應液之各成分濃度為：各種 primer 0.2 μ M、20 mM Tris-HCl pH8.4、50 mM KCl、1.6 mM MgCl₂ 以及 0.16 mM dATP、0.16 mM dTTP、0.16 mM dCTP、0.16 mM dGTP；反應體積為 25 μ l，置於 0.2 ml 之微量離心管。PCR 之反應條件為 95°C / 5 分鐘，接著為進行 40 個循環的 95°C / 20 秒鐘、57°C / 40 秒鐘、72°C / 1 分鐘，循環後為 72°C / 3 分鐘，最後維持在 4°C。空白對照組(CK)使用去離子水取代木瓜 DNA，其餘添加之反應溶液均相同。

不同比例 GM 混合材料之檢測，以混合後萃取之 DNA 為材料，同樣各取 200 ng 為模版，以 PRSV CP 基因之專一性引子 CP-5、CP-R 為引子對進行檢測，使用之反應溫度與循環條件與前述單一目標 PCR 試驗相同。

六、Multiplex-PCR 試驗

Multiplex-PCR(多目標 PCR)為利用多組引子，同時檢測多個標的基因或序列的 PCR 反應，使用儀器同樣以 Applied Biosystems 公司製造之 GeneAmp PCR System 9700 儀器進行。以基因改造及非基因改造木瓜 DNA 每個樣品各 200 ng 為模版，利用 5 組專一性引子同時針對 5 個目標進行反應：分別為針對 PRSV CP 基因之專一性引子 CP-F、CP-R(各 0.3 μ M)、針

對 kanamycin 抗性基因 NPT II 之專一性引子 NPT-F、NPT-R(各 0.2 μM)、針對木瓜酵素(papain)基因之專一性引子 PAPN-F、PAPN-R(各 0.2 μM)、針對 NOS terminator 之專一性引子 NOS-F、NOS-R(各 0.3 μM)、及針對 35S promoter 之專一性引子 35S-F、35S-R(各 0.3 μM)，進行 PCR 試驗。以 Taq DNA 聚合酶(購自 Invitrogen 公司)為反應酵素，每個反應使用 0.75 Unit，最終反應液之各成分濃度為：20 mM Tris-HCl pH8.4、50 mM KCl、3 mM MgCl₂ 以及 0.16 mM dATP、0.16 mM dTTP、0.16 mM dCTP、0.16 mM dGTP；反應體積為 25 μl ，置於 0.2 ml 之微量離心管。PCR 之反應條件為 95°C / 5 分鐘，接著為進行 40 個循環的 95°C / 20 秒鐘、63°C / 40 秒鐘、72°C / 1 分鐘，循環後為 72°C / 3 分鐘，最後維持在 4°C。空白對照組(CK)使用去離子水取代木瓜 DNA，其餘添加之反應溶液均相同。

不同比例 GM 混合材料之檢測，以混合後萃取之 DNA 為材料，同樣各取 200 ng 為模版，以針對 PRSV CP 基因之專一性引子 CP-F、CP-R(各 0.3 μM)、針對 kanamycin 抗性基因 NPT II 之專一性引子 NPT-F、NPT-R(各 0.2 μM)、針對木瓜酵素(papain)基因之專一性引子 PAPN-F、PAPN-R(各 0.2 μM)、針對 NOS terminator 之專一性引子 NOS-F、NOS-R(各 0.3 μM)、及針對 35S promoter 之專一性引子 35S-F、35S-R(各 0.3 μM)進行檢測，使用之反應溫度與循環條件與上述多目標 PCR 相同。

七、電泳分析

經 PCR 後之反應液取 8 μl 進行電泳分析，以 1.6%之瓊脂膠(agarose)膠片(溶於 0.5 \times TBE 緩衝液中，1 \times TBE：0.089M Tris-base, 0.089M Borate, 0.002M EDTA)，多目標 PCR 使用 2%之瓊脂膠膠片，在 100V 之電壓下進行；電泳結束後以影像軟體(Bio-Rad 公司)，擷取電泳核酸條帶成影像檔，判讀檢測結果。

結果與討論

一、PCR 試驗

木瓜酵素基因是木瓜本身特有之基因，利用專一性引子組 PAPN-F 及 PAPN-R 進行 PCR 試驗，可增幅一 211 bp 大小之 DNA 片段，因為是木瓜本身之基因，所以只要是木瓜的 DNA，不論是基因改造木瓜或非基因改造木瓜均應出現此片段產物(圖 1. A-I)。進行木瓜酵素基因之檢測，目的為檢驗 DNA 材料之品質，能檢測出此基因，表示此 DNA 進行 PCR 沒有問題，方可確認 PRSV CP 基因檢出與否之正確性。

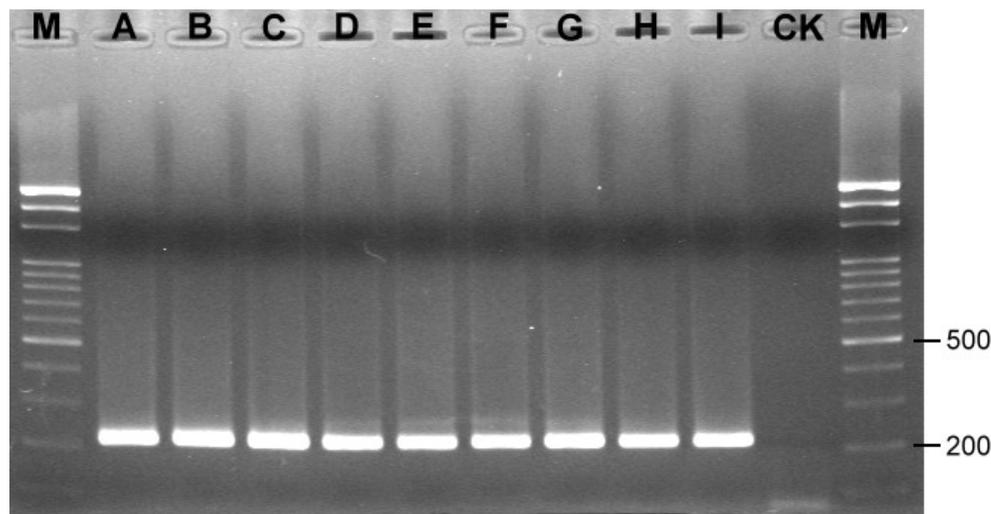


圖 1. 以針對木瓜酵素基因之專一性引子組 PAPN-F 及 PAPN-R 進行 PCR 檢測試驗(A~G 為基因改造木瓜、H~I 為非基因改造木瓜、CK 為以水取代木瓜 DNA 之對照組)

Fig 1. PCR products amplified from papaya using papain gene specific primer pair PAPN-F and PAPN-R (Lane A-G: GM-papaya; lane H-I: non-GM papaya; lane CK: water control)

專一性引子 CP-5 及 CP-R 之對應位置分別在 PRSV CP 基因之 5'端及 3'端，利用此引子組進行 PCR 檢測，可在基因改造木瓜之材料中增幅一 820 bp 大小之 DNA 片段(圖 2. A-G)，在非基因改造木瓜中則沒有這個片段的出現(圖 2. H-I)，二者間之區隔極為明確。

以不同比例 GM 木瓜混合材料進行 PRSV CP 基因檢測，探討在混合材料中的檢測能力、訂定偵測極限。而檢測結果(圖 3)顯示，不同比例 GM 木瓜之材料 PCR 反應後，在約 820 bp 之位置均產生一增幅條帶，而且依 GM 比例之降低而呈現遞減現象，在 100%、75%、及 50%三種含量比例時，增幅條帶亮度似無顯著差異，顯示當 GM 木瓜含量在一半以上時，檢測的效率與全 GM 材料是沒有差別的，而含量在 25%以下時，增幅的量隨之遞減；含量降至 1%，PRSV CP 基因 DNA 之增幅量較少，但仍可明顯地判讀其為基因改造產品，而含量 0%之材料則完全沒有增幅條帶，因此在本實驗之條件下，PRSV CP 基因之檢測極限達 1%。

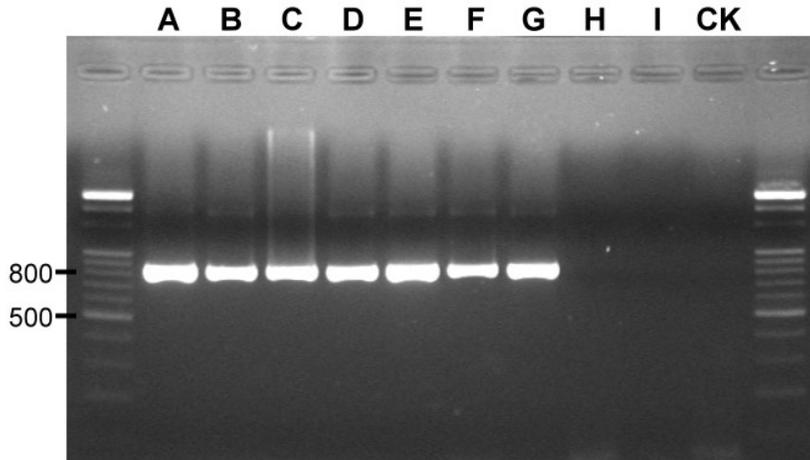


圖 2. 以針對 PRSV CP 基因之專一性引子組 CP-5 及 CP-R 進行 PCR 檢測試驗(A~G 為基因改造木瓜、H~I 為非基因改造木瓜、CK 為以水取代木瓜 DNA 之對照組)

Fig 2. PCR products amplified from papaya using PRSV CP gene specific primer pair CP-5 and CP-R (Lane A-G: GM-papaya; lane H-I: non-GM papaya; lane CK: water control)

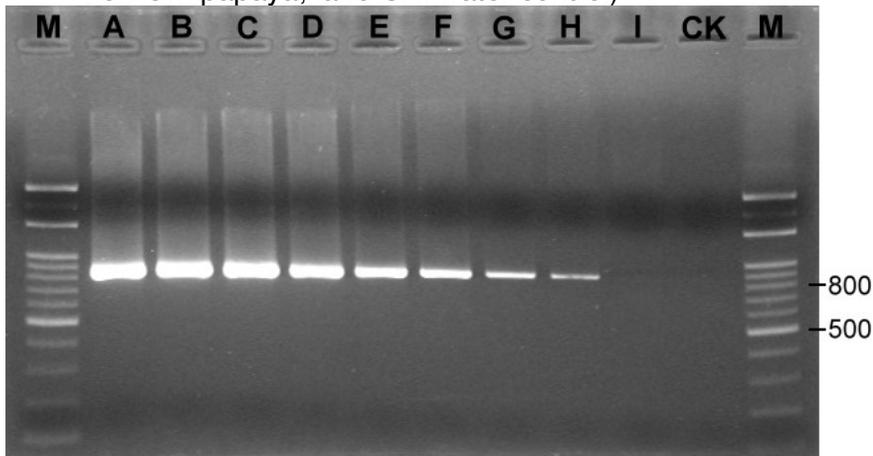


圖 3. 以針對 PRSV CP 基因之專一性引子組 CP-5 及 CP-R，對含不同比例基因改造木瓜之材料進行 PCR 檢測試驗(A~I 為分別含有 100%、75%、50%、25%、10%、5%、3%、1%及 0%基因改造木瓜之材料，CK 為以水取代木瓜 DNA 之對照組)

Fig 3. PCR products amplified from papaya material containing ratios of GM-papaya using PRSV CP gene specific primer pair CP-5 and CP-R (Lane A-I: Materials containing 100%, 75%, 50%, 25%, 10%, 5%, 3%, 1%, and 0% GM-papaya, respectively; lane CK: water control)

二、Multiplex-PCR 試驗

多目標 PCR 試驗的目的在於進行一次的 PCR 試驗中可同時檢測多個目標，節省試驗材料的耗費，同時也節省時間、金錢，常用於未知樣品中，以數個可能的目標同時進行檢測，例如在國際間基因改造玉米的品項 (transgenic event) 相當多，針對一個玉米材料或其加工食品進行檢測時，可同時將幾個常見的基因改造玉米品項的專一性引子進行 PCR 試驗，經由出現的品項專一性 DNA 片段，判斷未知材料中含有何種基因改造玉米品項⁽¹²⁾。在基因改造木瓜的檢測中，若以一個 PRSV CP 基因 PCR 增幅片段之有無，來判定是否為基因改造木瓜，恐有過於武斷之顧慮，因此若能藉由多目標 PCR 試驗多方面確認，同時達到節省材料、檢測時間的目的。基因改造木瓜乃是將 PRSV CP 基因藉由農桿菌 (*Agrobacterium*) 導入木瓜細胞中，而在轉殖此基因進入木瓜細胞的構築過程中，也同時將 CaMV 35S promoter、NOS terminator、NPT II 基因一併送入木瓜細胞中，因此若能同時將這四個外來基因都進行檢測，由檢測結果的有無更能確認是否為基因改造木瓜；在同一次試驗中，也同時檢測木瓜本身特有之木瓜酵素基因，則以木瓜酵素基因檢測結果之有無確認為木瓜材料，同時 DNA 材料品質的良莠也獲得確認。在單一目標 PCR 中，PRSV CP 基因檢測標的所增幅的片段為 820 bp，在進行多目標 PCR 時，由於與其他目標的 PCR 反應競爭反應材料，此 DNA 片段太長，不易在結果中呈現出來，因此必須縮小增幅片段，另外在 PRSV CP 基因中段設計引子(CP-F)，使增幅片段縮小為 359 bp；另外，一般針對 35S promoter 檢測所增幅之片段約為 190-200 bp，此與針對 NOS terminator 檢測所增幅之片段 180 bp、針對木瓜酵素檢測所增幅之片段 211 bp 太過接近、容易發生混淆，因此另外設計引子，使針對 35S promoter 檢測之標的增幅片段減為 134 bp，如此五個檢測片段的結果將得以區隔，在電泳膠片上呈現 359 bp、295 bp、211 bp、180 bp、及 134 bp 之階梯式分佈。同時在 PCR 的條件中，因應各引子之反應效率不同，其個別濃度必須進行調整，分別調整為 0.2-0.3 μM 不等，而反應液中， Mg^{++} 離子濃度也必須調高至 3 mM，PCR 反應黏合溫度定為 63 $^{\circ}\text{C}$ ，使各個別 PCR 反應都能有效率地進行。

試驗結果(圖 4)顯示，在基因改造木瓜材料的檢測結果中(A-E)，預期的五個片段均可清楚呈現，個別片段明顯區隔，並無混淆不易判讀現象，而非基因改造木瓜的材料(F-I)，則僅出現木瓜酵素 211 bp 的片段，其餘轉殖送入之基因均未檢測出；與單一目標 PCR 反應相較，單一目標 PCR 反應需分別進行 PRSV CP 基因及木瓜酵素基因之檢測兩次 PCR 反應方可判定是否為基

改木瓜，而多目標 PCR 反應則在一次的 PCR 反應中即可包含這兩種基因的檢測。而且多目標 PCR 反應所檢測的五個目標，除木瓜酵素基因外，其餘四個均非木瓜本身自有的基因，均是由人為導入的外源基因或 DNA 片段，因此這四個增幅片段只要有其中之一出現，即可做為基因改造產品的判定；由此顯示，多目標 PCR 反應之檢測效率較佳、準確度較高，在一次的 PCR 試驗即可達到檢測效果，是未來應用於實務檢測時的一項利器。

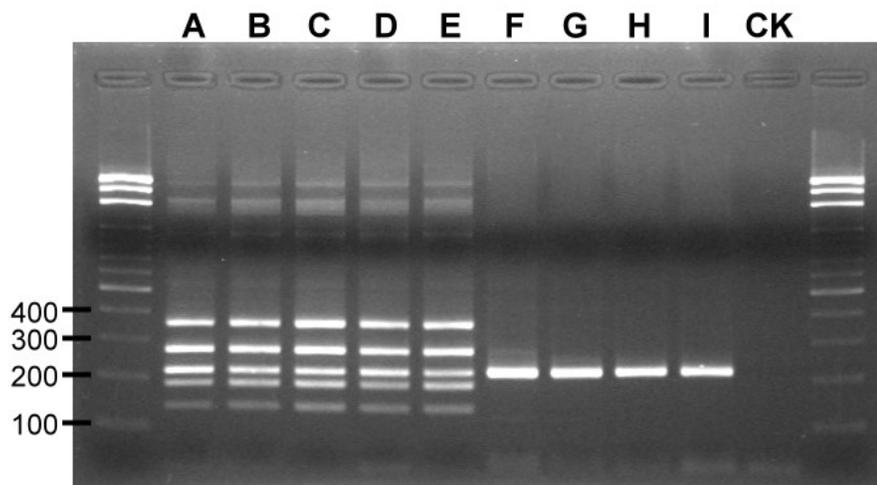


圖 4. 以針對 PRSV CP 基因、kanamycin 抗性基因、木瓜酵素基因、NOS terminator 序列、及 CaMV 35S promoter 序列之五組專一性引子組進行多目標 PCR 檢測結果(A~E 為基因改造木瓜、F~I 為非基因改造木瓜、CK 為以水取代木瓜 DNA 之對照組)

Fig 4. Multiplex-PCR products amplified from papaya using 5 pairs of primers specific to PRSV-CP gene, NPT II gene, papain gene, NOS terminator sequence, and CaMV 35S promoter sequence (Lane A-E: GM-papaya; lane F-I: non-GM papaya; lane CK: water control)

同樣以不同比例 GM 混合材料之木瓜 DNA 進行多目標 PCR 反應檢測，以探討多目標 PCR 反應在混合材料中之檢測能力。結果(圖 5)顯示，在 GM 比例較高時(A-E 行)，預期的五個增幅片段均可清楚辨識；GM 比例較低時，部分片段增幅的量較低，例如在 GM 含量為 1%時(H 行)，木瓜酵素基因及 NPT II 基因的增幅片段仍清晰可見，而 PRSV CP 基因、35S promoter、NOS terminator 的增幅片段則隱約可見，但與全無 GM 的材料(0%，I 行)比較，則可明確地區別二者分別為 GM 材料及非 GM 材料，此亦為多目標 PCR 反應檢測之特點，在一次的 PCR 反應結果中，可檢視 DNA 材料之良莠、並同時鑑別 GM 與非 GM 產品。

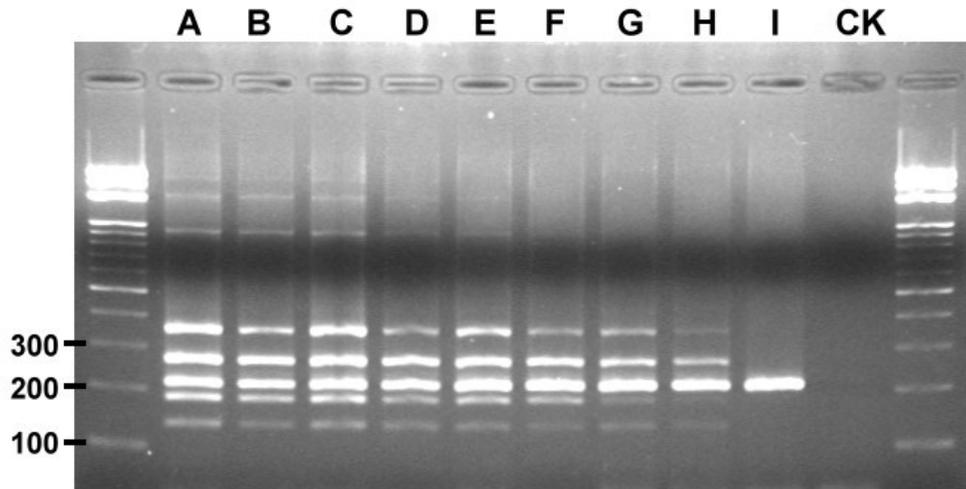


圖 5. 以針對 PRSV CP 基因、kanamycin 抗性基因、木瓜酵素基因、NOS terminator 序列、及 CaMV 35S promoter 序列之五組專一性引子組，對含不同比例基因改造木瓜之材料進行多目標 PCR 檢測結果(A~I 為分別含有 100%、75%、50%、25%、10%、5%、3%、1%及 0%基因改造木瓜之材料，CK 為以水取代木瓜 DNA 之對照組)

Fig 5. Multiplex-PCR products amplified from papaya material containing ratios of GM-papaya using 5 pairs of primers specific to PRSV-CP gene, NPT II gene, papain gene, NOS terminator sequence, and CaMV 35S promoter sequence (Lane A-I: Materials containing 100%, 75%, 50%, 25%, 10%, 5%, 3%, 1%, and 0% GM-papaya, respectively; lane CK: water control)

木瓜產業受到木瓜輪點病毒的嚴重威脅，產量大減，抗輪點病毒基因改造木瓜，已通過行政院農委會的生物安全評估，可以由隔離田間試驗，向下一階段推進。這是國內第一個完成隔離田間試驗的基因改造植物，由於它對數個木瓜輪點病毒分離株均具抗病力⁽⁵⁾，不僅能嘉惠木瓜農和消費者，也具有往國際市場發展的商機。然而在這個基改木瓜尚未完成所有評估程序及命名之前，卻已有種子流落農民手中，自行栽培生產，並進入市場銷售，此舉已嚴重衝擊我國傳統木瓜產業，並引起我國木瓜外銷國家之注意，有可能要求我出具「非基改木瓜」之證明，因此基改木瓜檢測技術之開發有其迫切之需要。未來應用於出口木瓜檢測、國內基因改造作物監測、木瓜育種材料確認...等，多目標 PCR 反應將是一項極有潛力之工具。而此技術之建立，對於未來進行其他基因改造產品檢測，也將是可供參考之依據。

參考文獻

1. 尤宗富、林世敏、鄧宇翔、溫銘嘉、葉錫東、包慧俊. 2004. 木瓜輪點病毒鞘蛋白基因改造木瓜果實內鞘蛋白基因表現之探討. 台灣農業化學與食品科學 42 : 466-473.
2. 行政院衛生署藥物食品檢驗局基因改造食品專欄. 2006. <http://gmo.doh.gov.tw/Web/>
3. 林澤揚、蔡淑貞、葉錫東、王叔菴、施養志. 2001. GM-木瓜鑑別檢驗方法之探討與研究. 基因改造食品之檢測與管理研討會專刊 98-113 頁. 行政院衛生署藥物食品檢驗局印. 台灣台北。
4. 袁秋英、謝玉貞、蔣慕琰. 2003. 台灣市售飼料玉米抗固殺草基因特性及檢測利用之探討. 植保會刊 45 : 329-342.
5. Bau, H. J., Y. H. Cheng, T. A. Yu, J. S. Yang, and S. D. Yeh. 2003. Broad-spectrum resistance to different geographic strains of papaya ringspot virus in coat protein gene transgenic papaya. *Phytopathology* 93:112-120.
6. Chiueh, L. C., Y. L. Chen, and D. Y. C. Shih. 2002. Study on the detection method of six varieties of genetically modified maize and processed foods. *J. Food Drug Anal.* 10:25-33.
7. Chiueh, L. C., Y. L. Chen, J. H. Yu, and D. Y. C. Shih. 2001. Detection of four types of genetically modified maize by polymerase chain reaction and immuno-kit methods. *J. Food Drug Anal.* 9:50-57.
8. Global Knowledge Center on Crop Biotechnology. 2006. <http://www.isaaa.org/kc/>
9. GM database from AGBIOS. 2006. <http://64.26.159.139/dbase.php>
10. Lin, H. Y., J. W. Chiang, and D. Y. C. Shih. 2001. Detection of genetically modified soybeans by PCR method and immunoassay kits. *J. Food Drug Anal.* 9:160-166.
11. Lin, H. Y., L. C. Chiueh, and D. Y. C. Shih. 2000. Detection of genetically modified soybeans and maize by the polymerase chain reaction method. *J. Food Drug Anal.* 8:200-207.
12. Tao, Z., X. F. Cai, S. L. Yang, and Y. Gong, 2001. Detection of exogenous genes in genetically modified plants with multiplex polymerase chain reaction. *Plant Molecular Biology Reporter* 19:289-298.

Detection of Genetically Modified Papaya With Multiplex-PCR

F. Y. Chen, C. C. Tsai¹, K. H. Chen, Y. P. Wang, and A. H. Yang²

Abstract

Papaya (*Carica papaya*) is rich in vitamins and nutrition, and also an important fruit in Taiwan. Papaya ringspot virus (PRSV) is a destructive virus in papaya, and became a limit factor in papaya production. Genetically modified (GM) papaya, which has been developed by Dr. Yeh, NCHU, is a possible strategy resistant to PRSV. Exactly detection of GM papaya is an important task in papaya production. Primers specific to PRSV CP gene have been designed, which reflected 820bp fragment, exhibited good detection result in GM papaya. In order to reduce detection time and cost, and also promote the accuracy of detection, multiplex-PCR technique has been developed. Five primer pairs, which specific to PRSV CP gene, NPT II gene, papain gene, NOS terminator sequence, and CaMV 35S promoter sequence, were designed for PCR detection in one reaction. Multi-fragments patterns of 359 bp, 295 bp, 211 bp, 180 bp, and 134 bp were obtained in GM-papaya sample, but non-GM sample shown one 211 bp fragment only.

Key words: genetically modified papaya, GMO detection, multiplex PCR)

¹ Assistant and associate researchers, Kaohsiung District Agricultural Research and Extension Station

² Assistant, assistant and associate researchers, Tainan District Agricultural Research and Extension Station