

基因改造小麥 PCR 定性檢測技術之建立

張惠如¹、陳哲仁²、周明燕¹、鍾文全³

1 種苗改良繁殖場 生物技術課 副研究員

2 種苗改良繁殖場 生物技術課 助理研究員

3 種苗改良繁殖場 生物技術課 研究員兼課長

一、前言

小麥為禾本科小麥屬植物，原產於溫帶地區，是世界上重要的糧食作物之一。根據 FAO 統計 2014 年全球小麥生產面積達 2 億 2,041 萬公頃，產量達 7 億 2,898 萬公噸，其中產量最大的國家是中國，其次為印度。農糧署 2015 年統計資料顯示臺灣種植小麥的面積為 3,116.31 公頃，產量約 7,334.73 公噸，金門縣種植面積最多達 2,615.3 公頃，本島主要集中於臺中市(147.3 公頃)、彰化縣(135.1 公頃)及台南市(135.1 公頃)。

國際農業生物技術應用服務組織 (International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications, ISAAA) 網頁資料中顯示小麥僅有一個基因轉殖品項，即為孟山都公司 MON71800，其轉殖來自農桿菌 CP4 菌株 (*Agrobacterium tumefaciens* strain CP4) 之 EPSPS 基因(抗嘉磷賽殺草劑)，該基因轉殖品項雖曾在美國進行田間試驗，並於 2005 年終止，但基改小麥 MON71800 仍未取得任何一個國家的生產許可，且孟山都公司也未將此基改小麥商品化上市。然而卻在 2013 年美國俄勒岡州農場田間發現 MON71800 基改小麥植株，引起基改小麥是否未完全銷毀而流出，以及小麥食/產品的安全性問題之疑慮，使得全球各國緊急建立檢測與邊境管制等方法。

目前我國在基改作物(Genetically modified organism, GMO)之進出口管理方面，現階段採行境內及邊境管理措施，針對可能進口之基改作物，由相關試驗研究單位研發取樣及檢測技術，建立一套標準化且具公信力之檢測技術與流程，實際檢測種子或種苗是否為基改作物。針對上述所提到的基因改造小麥事件，本場已建立檢測技術流程，以擴大我國於基因改造作物檢測之範圍，進而協助其相關農產品輸入與後續管制事宜。

二、基改小麥 PCR 定性檢測

由於無法取得基因改造小麥(MON71800)之標準參考物質或商業種子，因此先進行相關文獻及公告資料的蒐集，在歐盟聯合研究中心(Joint Research Centre, JRC)針對基改小麥 MON71800 開發檢測技術的策略報告中指出，基改玉米 NK603 的轉殖基因片段與基改小麥 MON71800 相同，故可使用基改玉米 NK603 認證級參考物質 (ERM-BF415, IRMM) 做為正對照替代樣品。除此之外，也進行 P-35 啟動子及 T-nos 終止子序列的檢測方法測試，做為檢測基改小麥 MON71800 的初篩方法。檢測技術是採用聚合酶鏈鎖反應 (Polymerase chain reaction, PCR)。

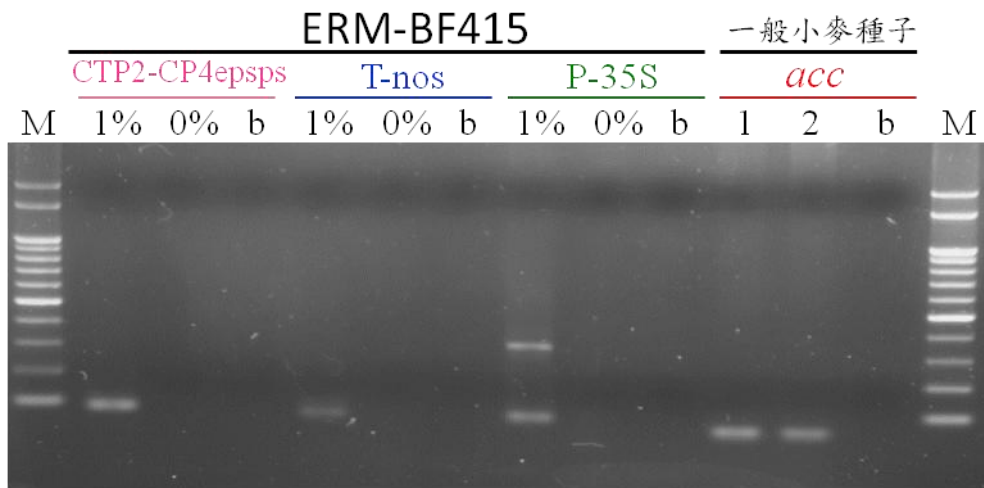
本文根據歐盟聯合研究中心的研究報告進行檢測引子序列合成，以基改玉米認證級參考物質(ERM-BF415)與一般小麥種子為試驗材料經均質機作用 30-45 秒後，將參考物質及種子粉末分別以核酸自動萃取機(Smart LabAsist-16)方法萃取核酸，進行 CTP2-CP4epsps、T-nos 與 P-35 序列片段 PCR 定性檢測試驗後，以電泳圖進行結果判定(圖一)。結果顯示，利用 JRC 公告之檢測方法，分別可在一般小麥種子中增幅出小麥管家基因(*acc*) 54 bp 大小的目標片段；及正對照樣品(ERM-BF415)增幅出轉殖序列 CTP2-CP4epsps、T-nos 與 P-35，得到符合預期 88 bp、84 bp 與 82 bp 大小的目標片段。

三、結論與展望

在目前的試驗結果顯示，參考相關文獻資料與JRC報告，以轉殖相同片段的轉殖品項之標準參考物質做為檢測方法的正對照，在特定的反應條件下可增幅出轉殖序列 CTP2-CP4epsps、T-nos與P-35的專一性條帶，進而建立基因改造小麥的初步檢測方法流程，可依據此流程檢測可疑的小麥樣品，若經過PCR定性檢測試驗後，增幅出符合目標大小的條帶，則可進一步檢測基改小麥MON71800的專一性片段，以確認可疑樣品的身分(圖二)。

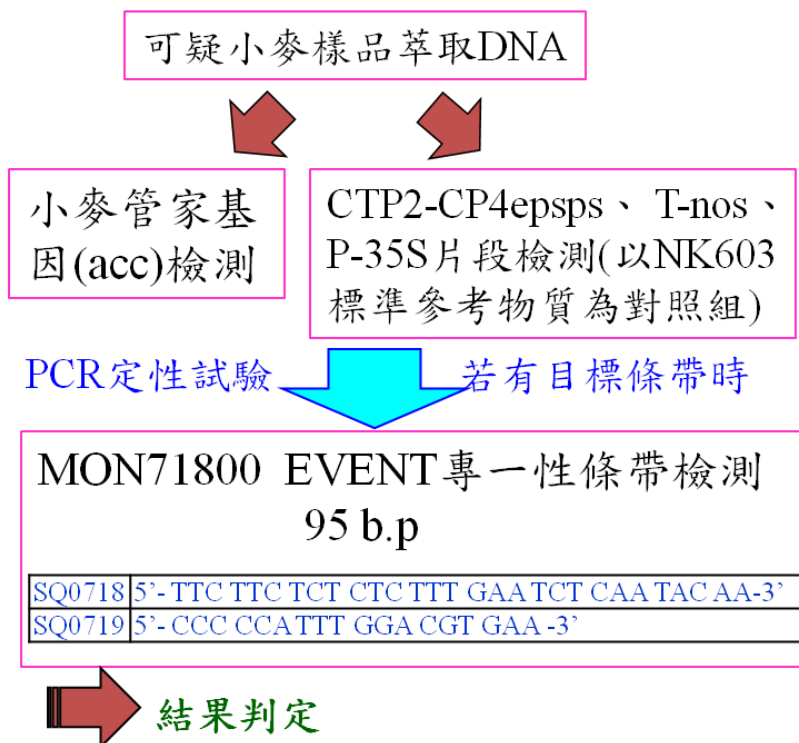
本場在建立基因改造作物的檢測方法上，發現試驗過程中標準參考物質(正對照)的取得最具挑戰，許多轉殖品項無法取得合適的標準參考物質，而增加檢測方法可信度的確認難度，因此將會是基因轉殖作物檢監測團隊所需面對的問題。此外，近幾年新興育種技術(new plant breeding techniques, NPBTs) 如 ZFN、RdDM、ODM 等，透過別於傳統基因改造轉殖特定片段之方式，而透過誘發突變、誘導其不表現特定基因片段或帶有相容

物種之特定基因序列等方法達成目的，因而產生的生物是否有別於傳統基因改造生物，以及法律上之定位為何，逐漸在國際上引起討論。新技術的發展至產品化還有一大段路及時間，但可想而知未來基改作物檢監控作業及檢測技術方法，勢必得面臨更大的挑戰。未來皆需進一步透過試驗計畫去建立具可信度的基因改造作物廣泛篩選檢測的方法，以解決所可能遭遇的問題。



圖一、基因轉殖小麥(MON71800)定性檢測方法

M：Gen100-Plus DNA Ladder； 0%、1%：ERM-BF415(NK603)標準參考物質 DNA； 1、2:不同品種小麥； b:空白對照組。



圖二、基改小麥 MON71800 定性檢測流程