

GM作物及其檢測技術介紹

張惠如

2017/10/12

前言

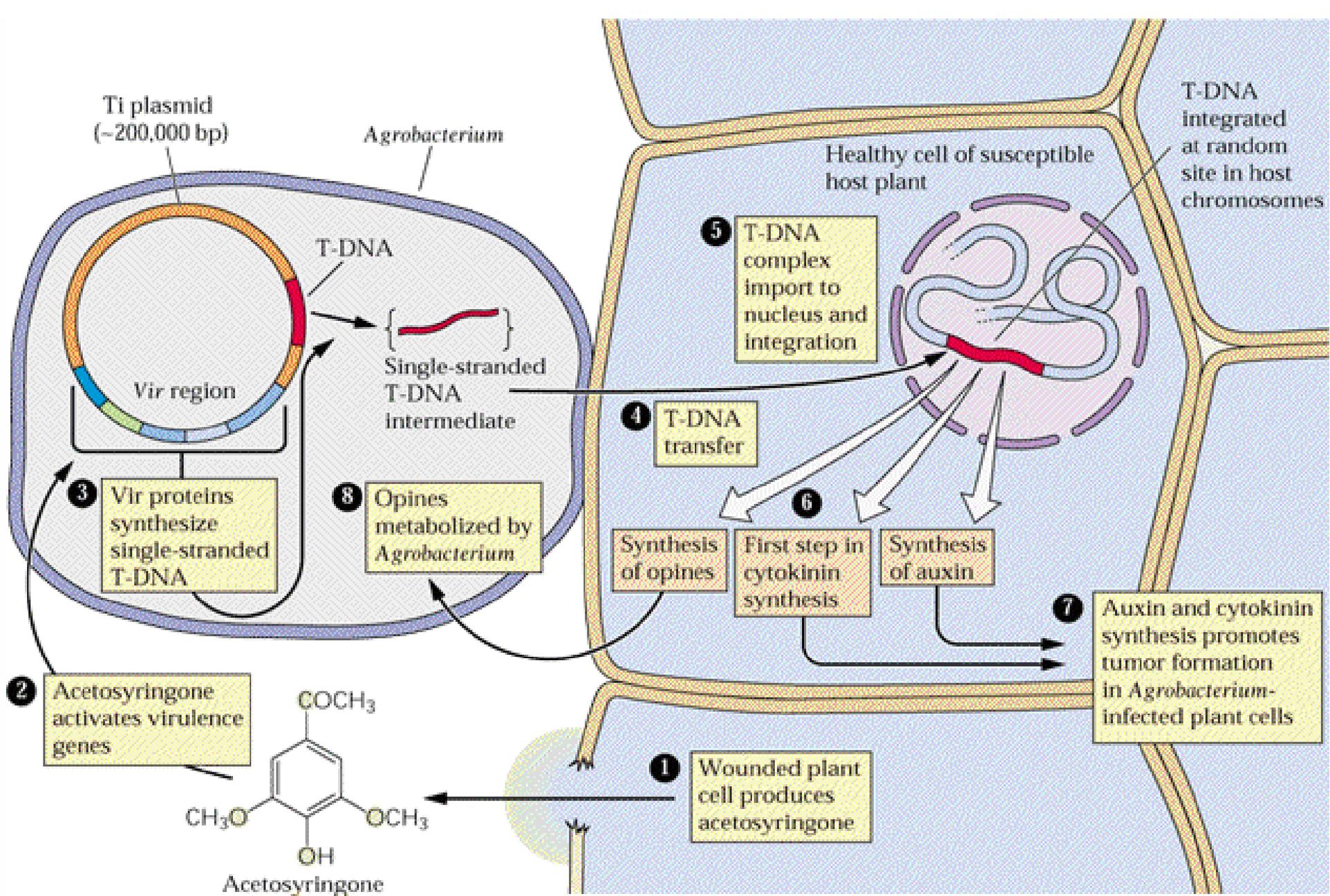
植物的基因轉殖是把外來的基因送入植物細胞並嵌入植物細胞的染色體或胞器的基因組內，此外來的基因可正常的表現並穩定的遺傳至後代

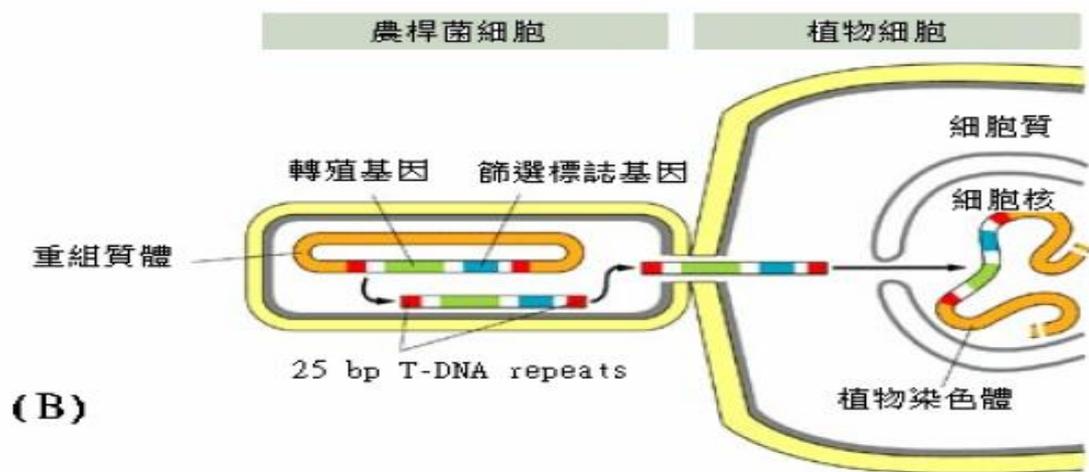
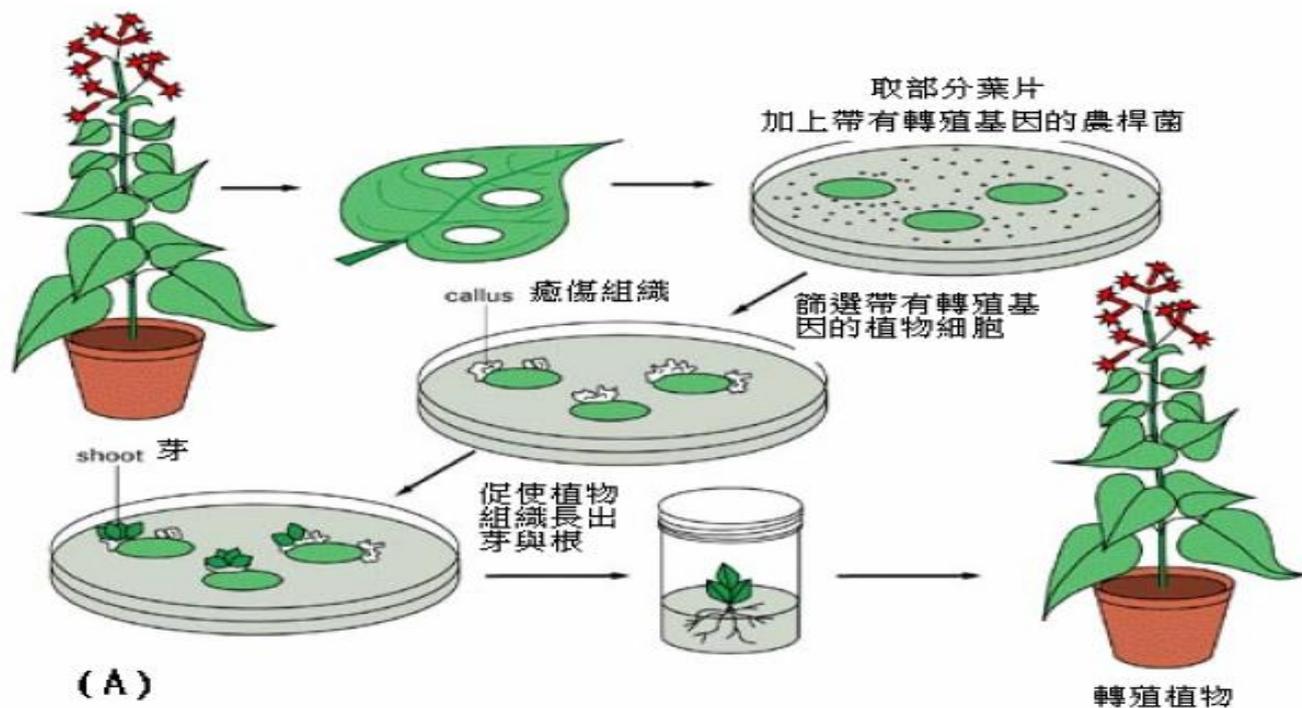
直接轉殖是指將DNA片段直接導入目標細胞中

電孔法(Electroporation)、微注射法(Microinjection)、基因槍法(又稱微粒子撞擊法; Particle bombardment)等

間接轉殖方法是利用質體(Plasmid)當作攜帶外來基因的載體(Vector)

農桿菌轉殖法(Agrobacterium-mediated transformation)





圖一、製造基因轉殖作物的步驟

(A)以帶有轉殖基因及篩選標誌基因重組質體的農桿菌感染植物葉片細胞，並以組織培養技術，製造帶有轉殖基因的改造植物。

(B)帶有轉殖基因及篩選標誌基因的T-DNA進入植物細胞並嵌入染色體。

(圖片來源：Alberts et al 1994. Molecular Biology of the Cell)

材料與方法

★植物材料：圓葉菸草

★構築載體

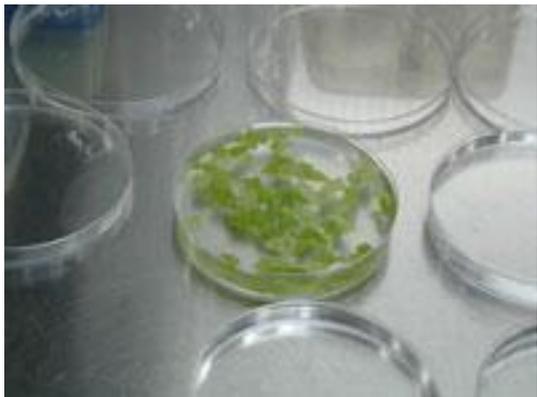
採用LBA4404菌系內含PBI121的質體

共同構築成一種GUS表現載體，並將之轉形到農桿菌

➤ 葡萄糖醛酸甘醇素---GUS報導基因

➤ NPTII gene報導基因(抗kanamycin篩選neomycin phospho-transferase II)

★ 組織培養



滅菌完成的葉片於無菌水浸濕的濾紙上切成約1~1.5cm見方，且四周皆為切口傷處，在用鑷子在葉片上戳洞。之後浸泡於農桿菌的菌液裡10-60秒

用滅菌的濾紙吸去多餘的菌液

受農桿菌感染的培植體放在不加任何抗生素的Incubation medium放在暗處培養2天

兩天後，把受感染的培植體移到 selection medium





三天後培養皿轉至正常照光



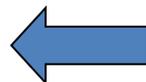
長出癒傷組織



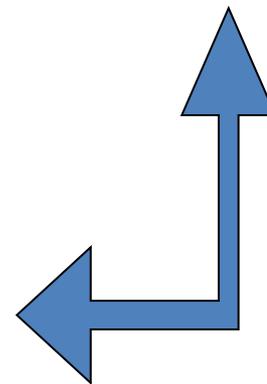
分離出shoot 移至發根的培養基中



移到溫室馴化



長根



常用轉基因作物分析方法

- 核酸層次

- ◎針對DNA

1. 南方轉漬分析 (Southern blotting)
2. 聚合酵素鏈反應法 (polymerase chain reaction, PCR) 分析
3. 實時PCR (real-time PCR).
4. 生物晶片 (Microarrays)

- ◎針對RNA transcripts

1. RT-PCR;
2. Real-time PCR
3. Northern blotting;
4. Microarrays

- 蛋白層次:

1. 酵素連結免疫吸附分析法 (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)
2. 檢驗試劑條 (Strip)
3. 西方墨點分析法 (Western blotting)
4. 生物晶片 (Microarrays)
5. 測定酵素活性 (使用不廣)

基因轉殖木瓜之定性檢測方法

1.轉殖抗輪點病毒病鞘蛋白基因木瓜

(Papaya ring spot virus coat protein gene, PRSV CP gene)

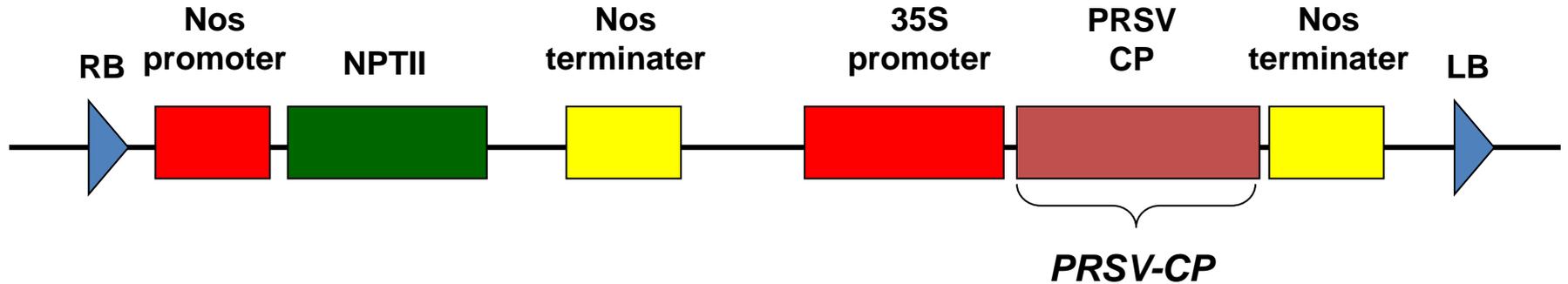
2.雙重抗木瓜輪點病毒及木瓜畸葉嵌紋病毒性狀基因轉殖木瓜

(Papaya ring spot virus coat protein gene, PRSV CP gene ;
papaya leaf distortion mosaic virus, PLDMV
~ *PY16-CP* gene)

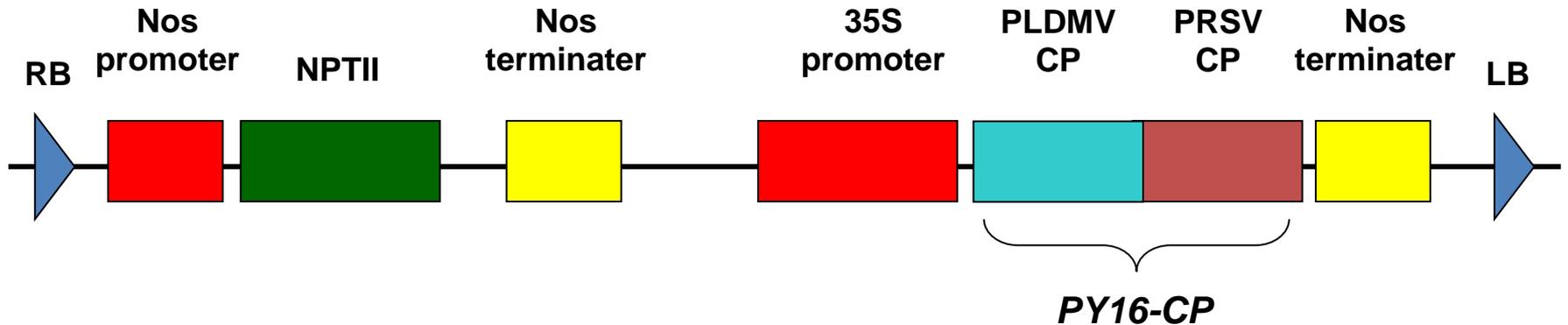
TPY10-4、TPY12-4、TPY14-1品系

註-----基因轉殖：即為基因改造（基改）、GMO

抗木瓜輪點病毒 (PRSV) 基因轉殖木瓜



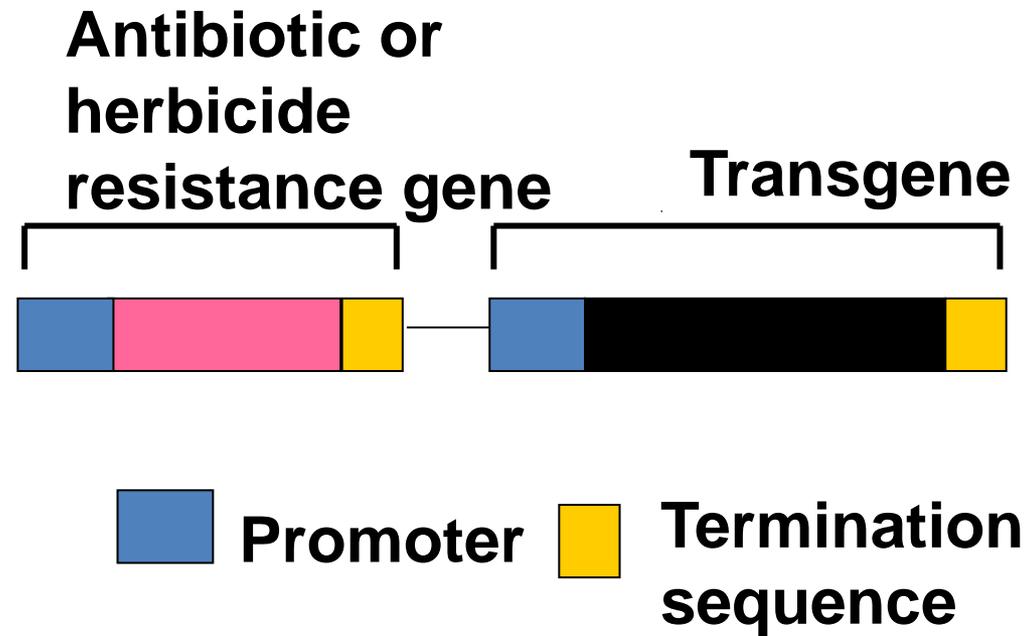
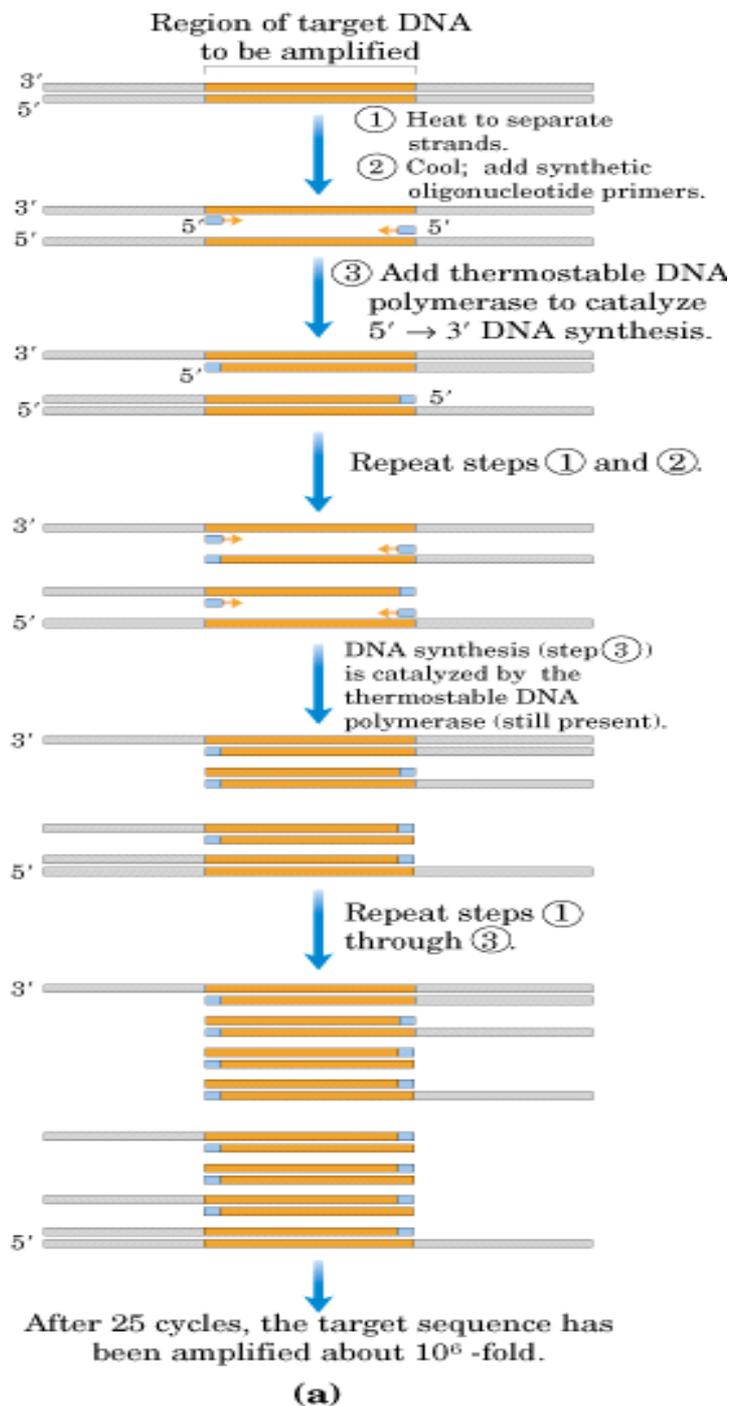
雙重抗木瓜輪點病毒 (PRSV) 及木瓜畸葉嵌紋病毒 (PLDMV) 性狀基因轉殖木瓜



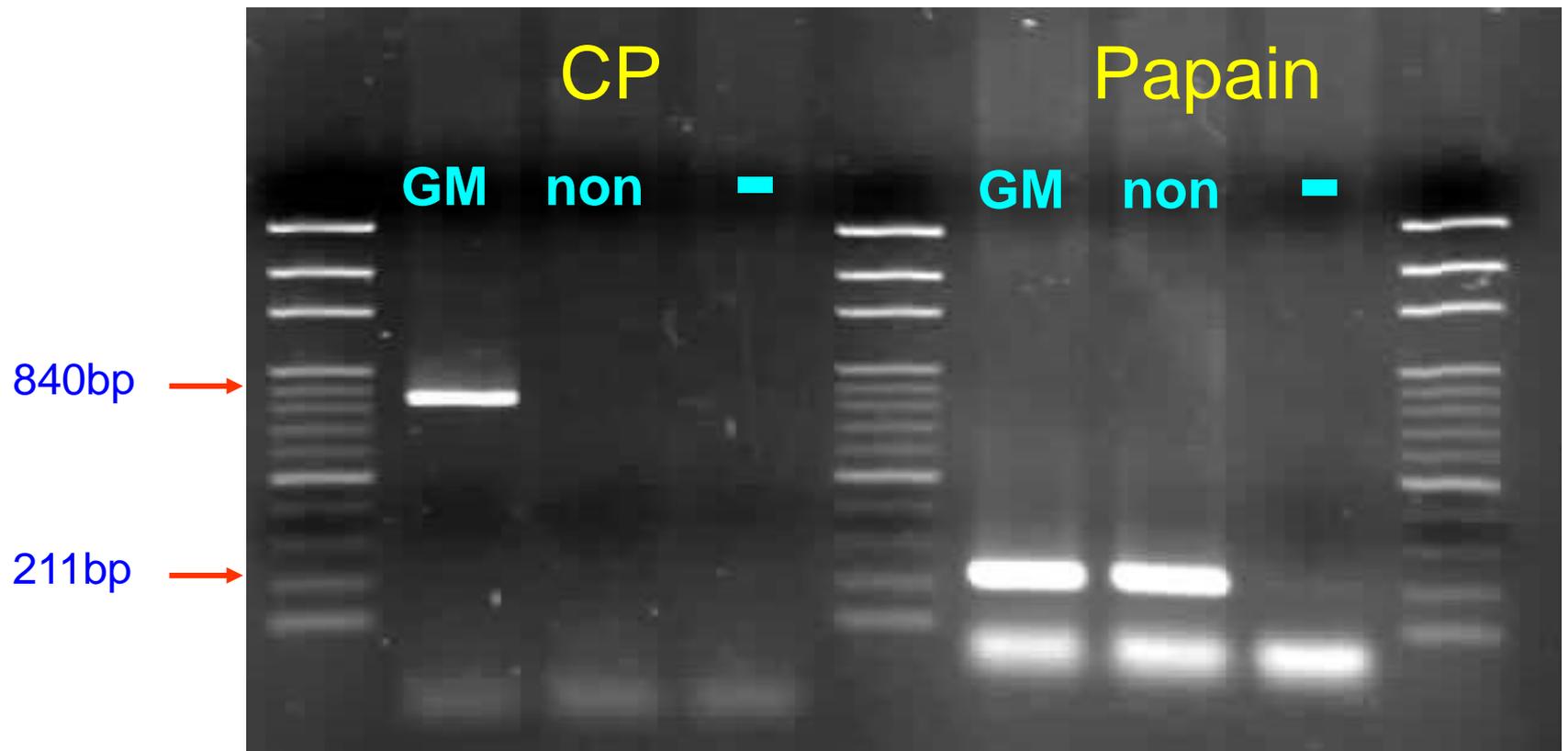
PCR技術原理

- PCR 技術是利用針對轉殖基因設計好的專一性引子對 (specific primers)，增幅染色體內的目標轉殖基因
- 經過模板雙股 DNA 分離 (denature)、引子對黏合 (annealing)、DNA 合成 (synthesis) 的步驟，並重複30~40個循環的反應，利用瓊脂膠體電泳 (agarose gel electrophoresis) 觀察所增幅的 DNA 片段。

PCR原理



基因轉殖木瓜定性檢測



PCR技術優點

- 可進行大量偵測
- 較高之特異性及靈敏度
- 多種轉殖基因之偵測為可行
- 可檢驗之產品形式較多
- DNA純化方法不因檢測項目不同而有所差異，因此在樣品的前處理上較為一致
- 操作簡易較能系統化

PCR之限制

- 純化DNA程序較為複雜 (相較於ELISA)
- 產品成分不含DNA者不適之，如沙拉油、純化之大豆卵磷脂、澱粉抽出物等產品，另外加工程序可能破壞DNA，如高溫、酵素水解使結果呈偽陽性如醬油、麵包
- 根據歐盟實驗室經驗，純化DNA長度若短於400 bp，結果呈偽陽性
- CaMV 35S promoter、NOS、nptII序列會自然存在於食品中，所以其檢驗不能斷定有重組DNA的存在
- 樣品與試劑的污染，包括樣品的交互污染或之前PCR分析的殘留，會有偽陽性的結果

轉殖基因植物的其他檢測方法

◆ 轉基因植物蛋白的偵測與分析-----ELISA

- 主要原理是將酵素以化學鍵結至抗原或抗體後，再被用來測定免疫複合物(immune complexes)，而此複合物是在一固相(solid phase)中形成
- 酵素免疫分析法既簡單又靈敏，在一個簡單的實驗環境中，可被用來測定大量的微量樣本

◆ 南方轉漬法(Southern blotting)

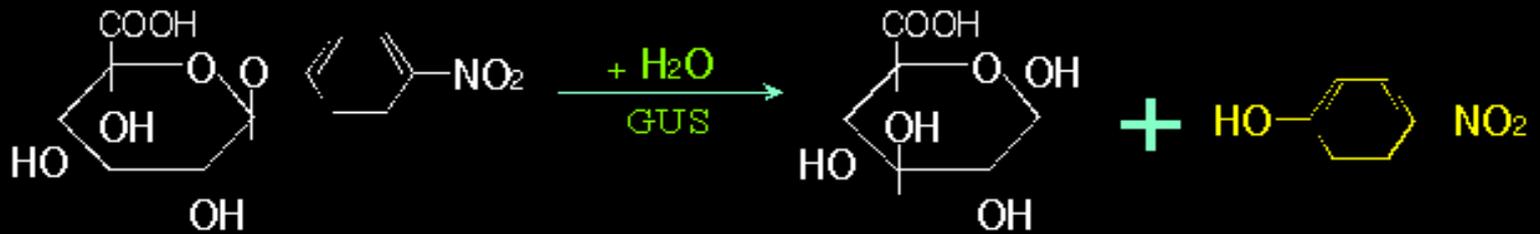
- 將植物DNA以轉殖基因表現卡夾上的限制酵素切位酶切，在經膠體電泳分離後，把膠上的DNA片段轉印到NC paper上，再以經過標定的DNA片段作為探針，作雜和反應。
- 可以判斷得轉殖基因在植物染色體的插入數，其正確性可以再以轉基因植物子代的分離比加以確認。

GUS 酵素活性的分析

GUS 酵素活性的測定：

反應物

生成物

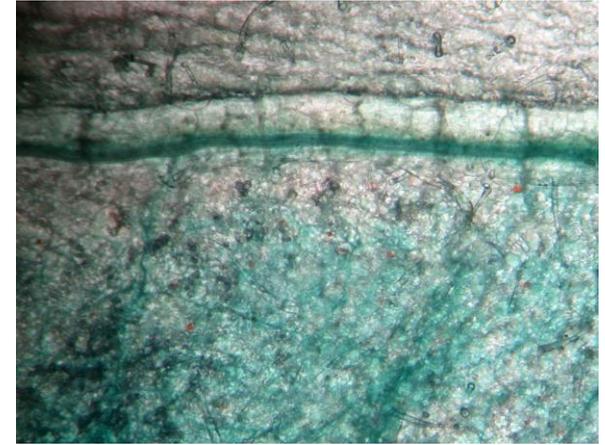
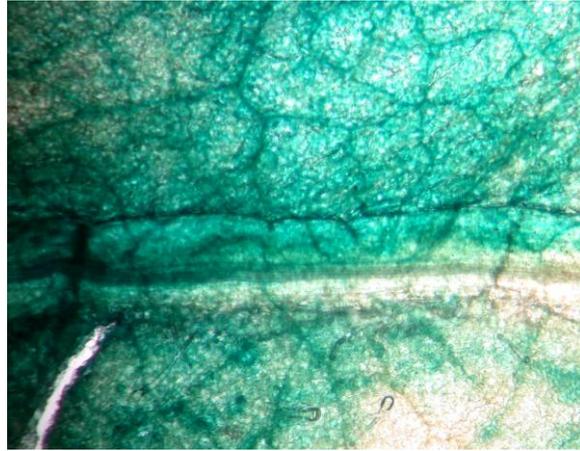
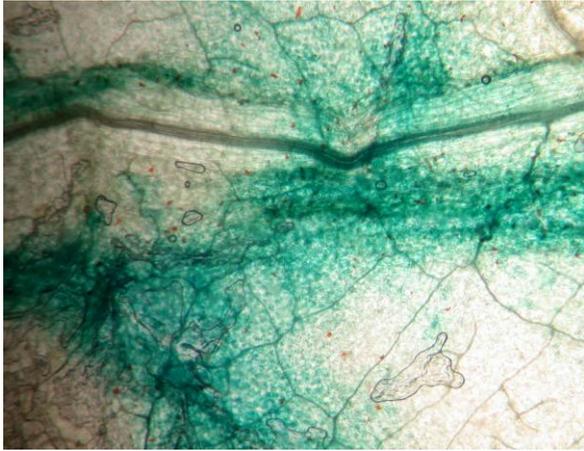


p-Nitrophenyl β-D-glucuronide
(pNPG)

β-D-Glucuronic acid

p-Nitrophenol
(yellow color)

415 nm



A

B

C

為三棵轉基因菸草植株的葉片經由GUS活性測定後，以95%酒精退去葉綠素，在顯微鏡下放大觀察的圖片

基因轉殖棉花檢測技術

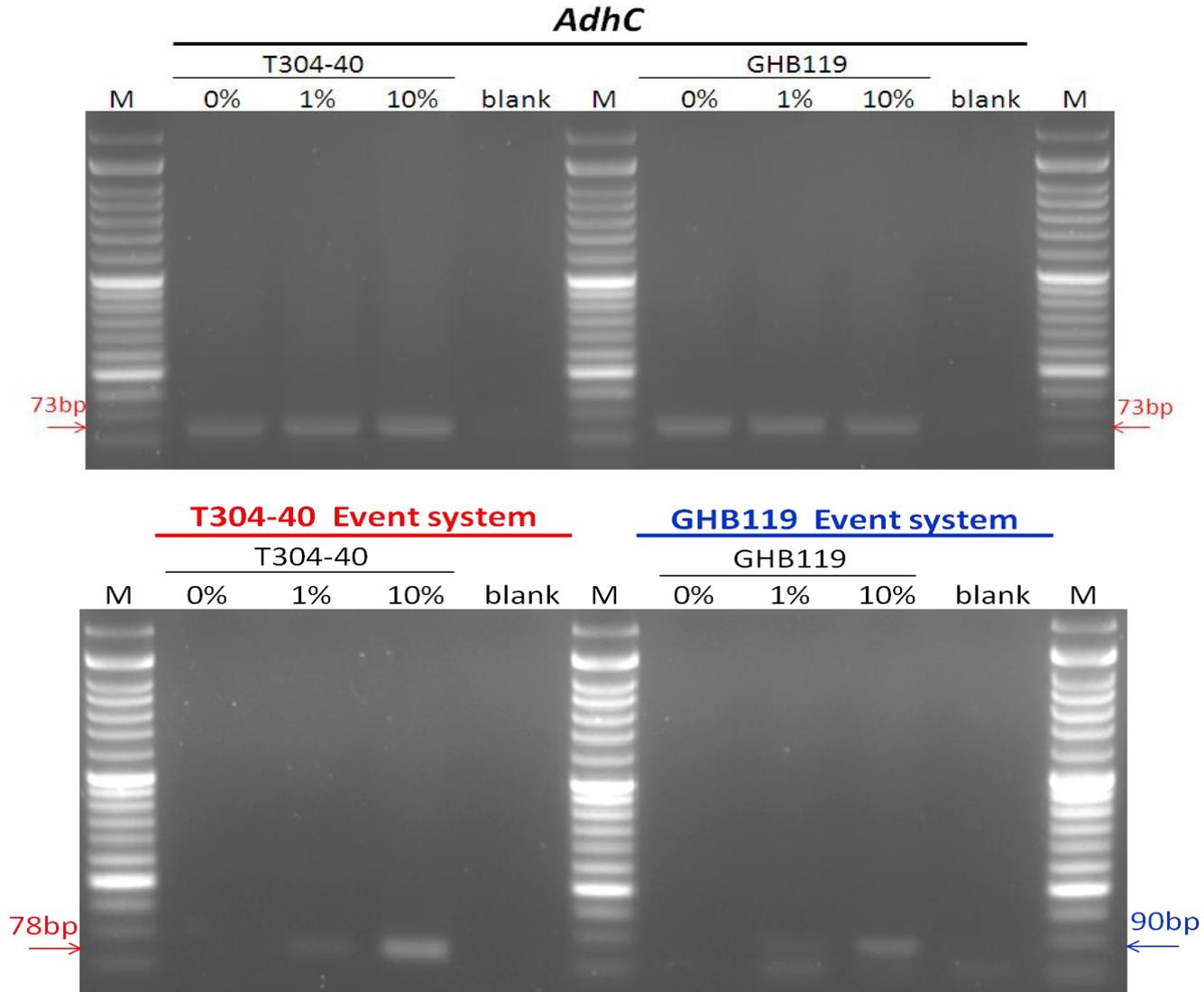
- ✓ 棉花是**錦葵科棉花屬**植物，原產於亞熱帶。其花朵為乳白色，開花後不久轉成深紅色後凋謝，留下綠色小型的蒴果，稱為棉鈴。**棉鈴**內有棉籽，**棉籽**上的茸毛從棉籽表皮長出，充滿棉鈴內部。棉鈴成熟時裂開，露出柔軟的纖維即俗稱的「**棉花**」，主要應用於紡織業。
- ✓ 2012-2015年全球棉花種植面積在3,414-3,439萬公頃之間，分別以**印度、中國、美國及巴基斯坦**位列前四名，其中印度棉花種植面積在1,200公頃左右，農糧署2013年統計臺灣棉花種植面積約1.58公頃。
- ✓ 由相關數據可知全球棉花種植面積中，**種植GM棉花約占七成**。
- ✓ 棉花作物的產物除棉絨外，**脫殼棉仁**所製成的**棉籽粕**中蛋白質含量可達41%-44%，代謝能可達10.04兆焦/千克，可做為**肉用仔雞飼料**。

基因轉殖棉花檢測技術

- GM棉花可分為兩大類，第一類為**抗除草劑**如嘉磷塞 (glyphosate)、固殺草 (glufosinate)、硫醯尿素類 (sulfonyleurea) 及 Bromoxynil 等類的GM棉花；另一類為**抗害蟲**如抗鱗翅目害蟲及歐洲玉米螟 (*Ostrinia nubilalis*) 的GM棉花。
- 購入3種ERM認證的GM棉花標準參考物質：**T304-40**(0%、1%、10%)、**GHB119**(0%、1%、10%)及**281-24-236x3006-210-23**(0%、1%、10%、98%)
- 以核酸自動萃取機 (Smart LabAsist-16) 萃取DNA，配合**歐盟公告**之GM棉花即時聚合酶鏈鎖反應 (Real-time polymerase chain reaction, 簡稱Real-time PCR) 檢測方法及Baeumler等人(2014)所發表的方法，合成可增幅棉花管家基因 (house-keeping gene) 及轉基因序列的引子，進行GM棉花T304-40、GHB119及281-24-236x3006-210-23的PCR定性檢測方法試驗。

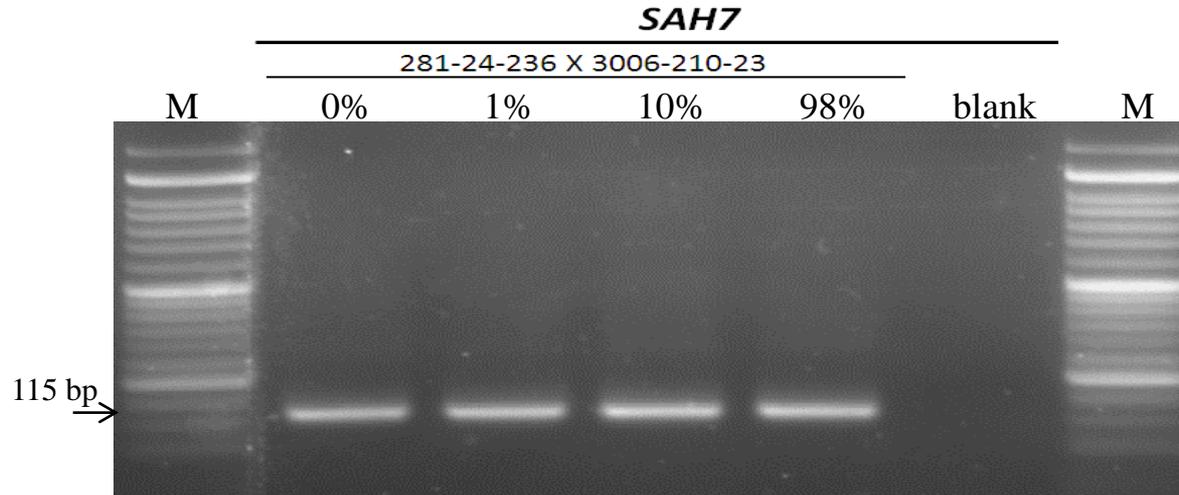
基因改造棉花PCR定性檢測技術之建立

- 基改棉花之商業標準品T304-40(0%、1%、10%)、GHB119(0%、1%、10%)



基因改造棉花PCR定性檢測技術之建立

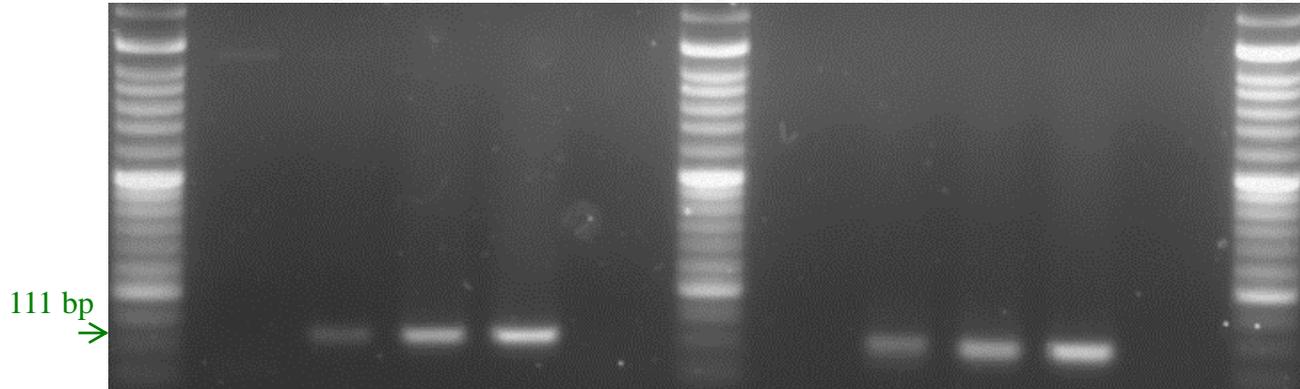
➤ 基改棉花之商業標準品281-24-236 x 3006-210-23(0%、1%、10%、98%)



281-24-236 Event system

281-24-236 X 3006-210-23

M 0% 1% 10% 98% blank M



3006-210-23 Event system

281-24-236 X 3006-210-23

M 0% 1% 10% 98% blank M

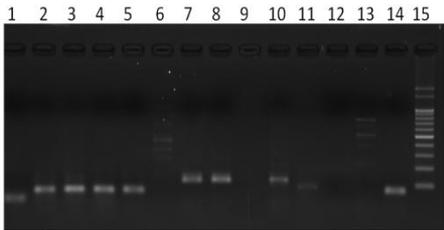
← 90 bp

以GM棉花標準參考物質進行實驗室間能力試驗

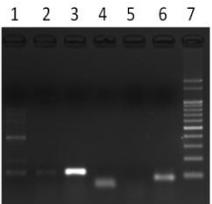
參與實驗室：種苗場、桃改場、農試所、鳳試所及台南場

第一次：於9/23寄送已知樣品進行檢測技術之實驗室間儀器與檢測穩定度試驗(5個實驗室皆能在各品項檢測出目標條帶)

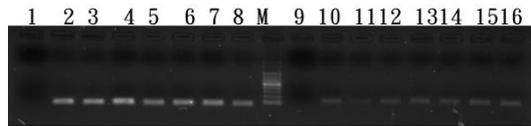
第二次：於11/4寄送5個盲樣樣品進行實驗室間能力試驗(3個實驗室結果完全正確；另2個實驗室正確率80%)



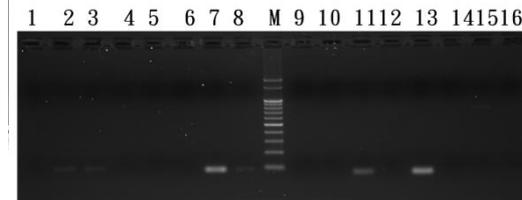
1-5 AdHC, 6-8SAH, 9-11 GHB, 12-14 T304



1-3 281, 4-6 3006



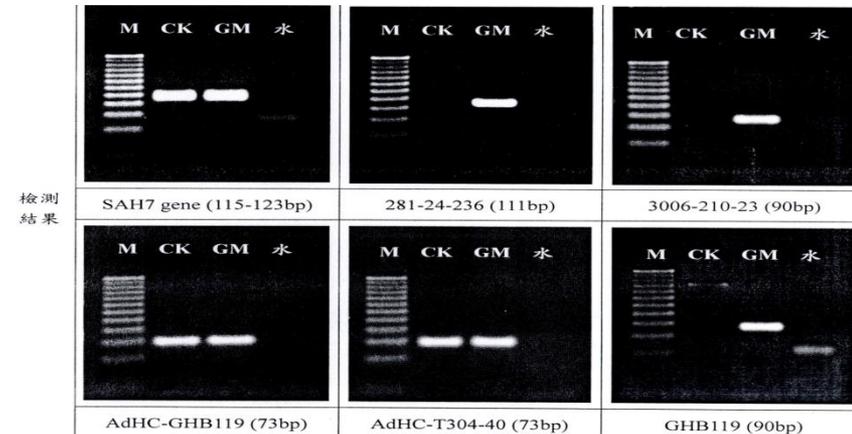
Lane1-8 AdHC+ CK, GM-, GM+, 盲樣1-5,
Lane9-16 SAH



Lane1-8 GHB+ CK, GM-, GM+, 盲樣1-5,
Lane9-16 T304



Lane1-8 281+ CK, GM-, GM+, 盲樣1-5,
Lane9-16 3006



檢測
結果

檢測項目	CK	GM	1	2	3	4	5
SAH7 gene	+	+	+	+	+	+	+
轉殖品項(281-24-236)	-	+	+	-	-	-	+
轉殖品項(3006-210-23)	-	+	+	-	-	-	+
AdHC gene	+	+	+	+	+	+	+
轉殖品項(GHB119)	-	+	-	-	-	+	-
轉殖品項(T304-40)	-	+	-	+	-	-	-

檢測
結果

結論：

- (1)盲樣樣品 1 號檢出基因轉殖棉花 DNA，轉殖品項為 281-24-236 及 3006-210-23。
- (2)盲樣樣品 2 號檢出基因轉殖棉花 DNA，轉殖品項為 T304-40。
- (3)盲樣樣品 3 號未檢出基因轉殖棉花 DNA。
- (4)盲樣樣品 4 號檢出基因轉殖棉花 DNA，轉殖品項為 GHB119。
- (5)盲樣樣品 5 號檢出基因轉殖棉花 DNA，轉殖品項為 281-24-236 及 3006-210-23。

三個不同基改品項商業標準品

品項(Event)	轉殖基因	轉基因功能	單一/混合品系	偵測之家基因
T304-40	bar、 cry1Ab	抗固殺草除草劑及抗鱗翅目害蟲	單一	AdhC
GHB119	bar、 cry2Ae	抗固殺草除草劑及抗鱗翅目害蟲	單一	AdhC
281-24-236 x 3006-210-23	pat(syn)、 cry1F、 cry1Ac	抗固殺草除草劑及抗鱗翅目害蟲	混合	SAH7

Thank you

https://www.youtube.com/watch?v=-UqR__NESSM

https://www.youtube.com/watch?v=L7qnY_GqytM

<https://www.youtube.com/watch?v=4m6yrrcK8VA>

http://open.163.com/movie/2016/5/4/1/MBNDHL0NL_MBNHP7C41.html

實驗室安全宣導

<https://www.youtube.com/watch?v=zEbpvB-l7q4>

<https://www.youtube.com/watch?v=LVqVgnyTg4I>

聚合酶鏈鎖反應 (PCR)

利用針對轉殖基因所設計好的專一性引子，增幅染色體內的目標轉殖基因；經由模板雙股DNA分離、引子對黏合、DNA合成的步驟，並重複至個循環的反應

優點：操作容易、反應迅速及靈敏度高

缺點：引子對本身的專一性不夠高，或是反應條件造成專一性不足，導致偽陽性的結果發生