

轉殖抗輪點病毒病鞘蛋白基因木瓜 檢測能力之建立

沈翰祖¹ 孫永偉² 陳駿季³

基因轉殖作物之栽培在近年來急遽增加，2006之 ISAAA (International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications) 之統計資料顯示，全世界栽培基因轉殖作物之耕地面積已達1億零2百萬公頃。轉基因生物及其產品對生態環境與人體健康所可能產生的衝擊，廣泛的受到世界各國關切並重視。APEC各經濟體均各自訂有基因轉殖生物與其產製品之相關管理法規，並針對基因轉殖之植物種苗及相關農產品建構檢測及監測平台。根據新修訂之種苗法及相關管理法規，有關基因轉殖作物在上市前除須進行生物安全評估外，上市後，產品除須標示外，亦須接受主管機關監控，以維護國內生態環境之安全。但是在執行上，目前僅及於轉殖作物風險評估作業，有關基因轉殖作物種苗檢測技術自2003年起才開始由種苗場及農試所等單位針對重要可能進口作物開發檢測技術。

現階段國內完成基因轉殖作物田間試驗階段者為「抗輪點病毒」木瓜，正在田間試驗階段者有七項，包括稻米（生產

豬乳鐵蛋白及高效能植酸素二項）、馬鈴薯（生產高效能植酸素）、青花菜（抗老化）、番茄（抗胡瓜嵌紋病毒）、赤松（木質素生合成基因）、木瓜（雙重抗木瓜輪點病毒及木瓜畸葉嵌紋病毒）。此外，基因改造玉米及大豆已為衛生署公告許可上市品項，產品原料雖以大宗穀物途徑進口，但也可能流入田間種植。為國內基因轉殖植物之生物安全管理，並了解其或因運輸過程之不當散出或被以非核准目的用途使用之可能情形，有必要儘早建立國內基因轉殖植物檢測流程及田間監測體系。

本研究針對「轉殖抗輪點病毒病鞘蛋白基因 (Papaya ring spot virus coat protein gene, PRSV CP gene) 木瓜」之定性檢測進行相關研究。研究材料之基因轉殖木瓜是由國立中興大學葉錫東教授所提供。此等木瓜株系含有之主要外源基因：「轉殖抗輪點病毒病鞘蛋白基因木瓜」為木瓜輪點病毒之鞘蛋白基因 (PRSV CP)。由於上述外源基因係構築於Ti二位元載體 (pBI121; Clontech公

¹ 種苗改良繁殖場 助理研究員

² 種苗改良繁殖場 助理研究員

³ 種苗改良繁殖場 研究員兼副場長

司)上,因此經基因轉殖後,完整之轉殖系除含有外源基因外,前端序列有35S啟動子(promoter)、gus基因前導序列(來自pBI121載體)及轉譯起始碼(AUG),後有nos終結子。此外,亦含有nptII基因(抗neomycin系列抗生素之基因)(圖1)。本檢測方法係將特定核酸片段利用聚合鏈鎖反應(Polymerase chain reaction, PCR)方法擴增後,以電泳分析核酸擴增產物所呈現之條帶位置。

PCR檢測「抗輪點病毒病基因轉殖木瓜」(簡稱「單抗木瓜」),檢測方法

依據包景俊博士「木瓜輪點病毒鞘蛋白轉基因木瓜抗病性狀之研究」博士論文。先檢測作為內部對照之Papain gene, PCR增幅產物大小為211bp(圖2)。其次檢測nptII gene,以鑑定是否為基因轉殖木瓜,其PCR增幅產物大小為1039 bp(圖2)。檢測PRSV-CP gene具有預期之PCR增幅產物為840bp(圖2)。PCR檢測電泳分析必須同時測試正反應(基因轉殖木瓜)及負反應對照組(非基因轉殖木瓜)樣品。檢體DNA之電泳結果,須與正反應對照組及DNA片段分子

抗木瓜輪點病毒 (PRSV) 基因轉殖木瓜

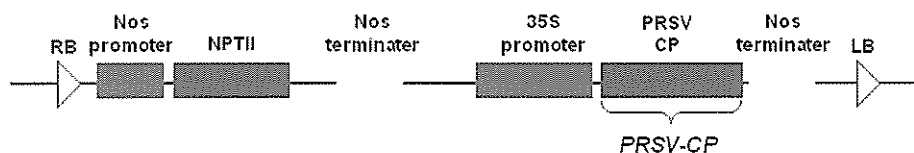


圖1「轉殖抗輪點病毒病鞘蛋白基因木瓜」之轉殖載體圖譜。

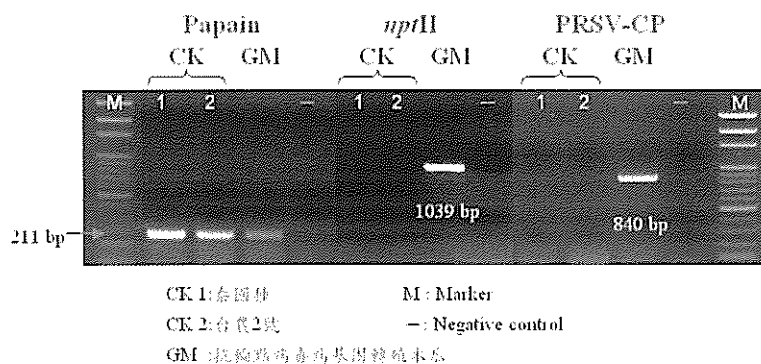


圖2「抗輪點病毒病基因轉殖木瓜」檢測Papain gene、nptII gene、PRSV-CP gene。

量標誌之電泳結果進行相互比對，當檢體DNA 與正反應對照組DNA 二者之PCR 增幅產物大小相同，且經由DNA 分子量標記物質估算PCR 增幅產物大小無誤，即判定該檢體含有基因轉殖的木瓜。為避免因為樣品或轉殖植物中的轉殖序列發生

斷裂而無法正確檢測，故針對轉殖序列設計短片段引子進行PCR檢測。進行抗輪點病毒病基因轉殖木瓜轉殖序列短片段檢測（圖3），結果如(圖4)

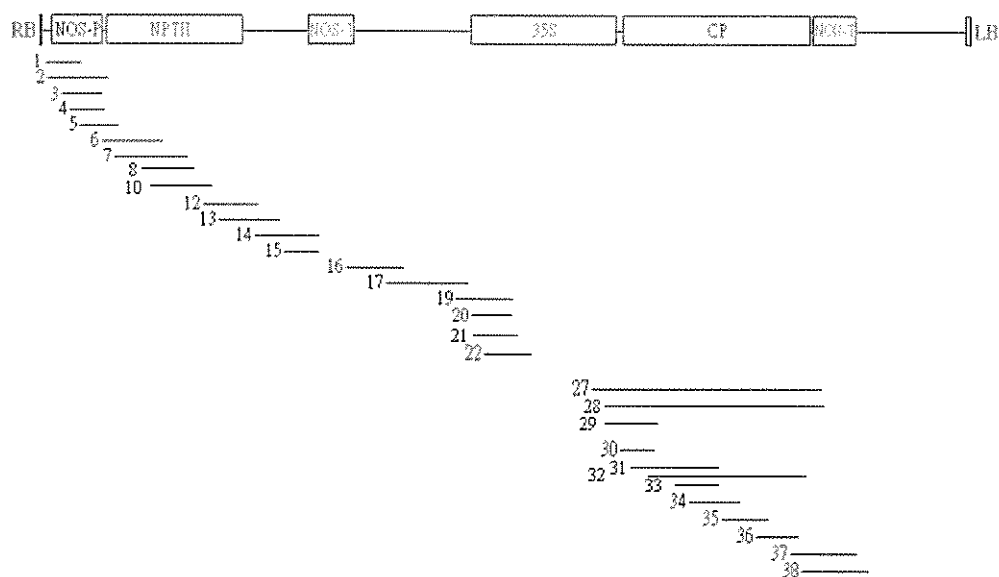


圖3 抗輪點病毒病基因轉殖木瓜轉殖序列短片段檢測位置示意圖。

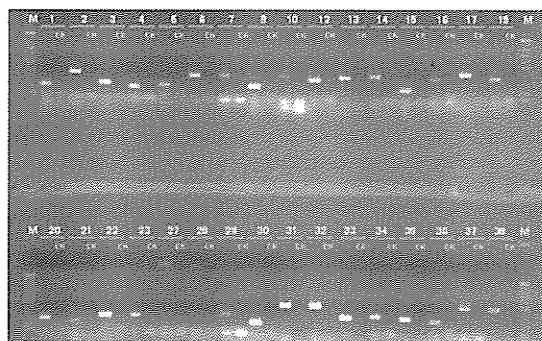


圖4 抗輪點病毒病基因轉殖木瓜轉殖序列短片段PCR檢測結果。GM：「抗輪點病毒病基因轉殖木瓜」；CK：台農2號非基因轉殖木瓜；M：Marker。

為確認PCR檢測之敏感度，故設計敏感度試驗，是將基因轉殖與非基因轉殖樣品木瓜葉片分別乾燥磨粉後，依重量比將二種樣品混合成1%、3%、5%、10%、25%、50%、75%、100%等9種混合樣品（表1）。以PCR檢測Papain gene、nptII gene、PRSV-CP gene，

表1「轉殖抗輪點病毒病鞘蛋白基因木瓜」（GM papaya）與非基因轉殖木瓜（Non-GM papaya）不同混合比例樣品對照表。

No.	GM papaya %	Non-GM papaya %
1	100	0
2	75	25
3	50	50
4	25	75
5	10	90
6	5	95
7	3	97
8	1	99
9	0	100
10	—	—

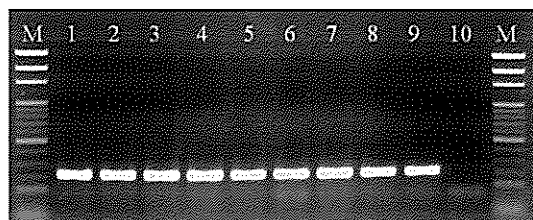


圖5「轉殖抗輪點病毒病鞘蛋白基因木瓜」不同混合比例樣品檢測Papain gene的PCR產物的電泳分析結果。M：Marker；1-10如表1。

以探討檢測的敏感度。結果顯示檢測Papain gene的PCR產物之電泳條帶亮度不受轉殖樣品比例改變的影響（圖5）；而nptII gene、PRSV-CP的PCR產物利用電泳分析後的條帶亮度依轉殖樣品比例的降低而遞減（圖6、7）。



圖6「轉殖抗輪點病毒病鞘蛋白基因木瓜」不同混合比例樣品檢測nptII gene的PCR產物的電泳分析結果。M：Marker；1-10如表1。

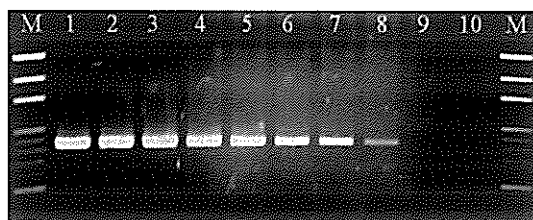
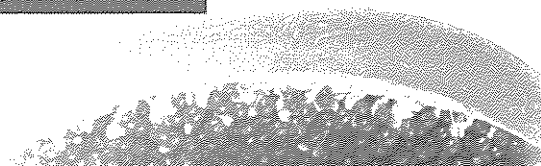


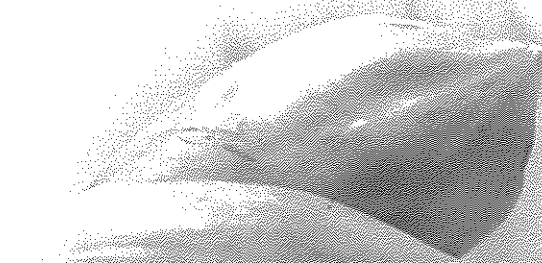
圖7「轉殖抗輪點病毒病鞘蛋白基因木瓜」不同混合比例樣品檢測PRSV-CP gene的PCR產物的電泳分析結果。M：Marker；1-10如表1。



為縮短檢測所花費的時間，故建立多重聚合酶鏈鎖反應（multiplex PCR）之技術，Multiple PCR技術可同時檢出「轉殖抗輪點病毒病鞘蛋白基因木瓜」可同時檢出CP gene預期之840bp、CP gene與部分載體間之短片段405bp，與papain gene預期之211bp片段（圖8）。

利用分子標誌建立檢測流程時必須必須要有充分的目標基因序列資訊以提供引子之設計。本研究所建立之基因轉殖木瓜是由國立中興大學葉錫東教授所研發建構之。此等木瓜株系含有之主要外源基因為木瓜輪點病毒之鞘蛋白基因(PRSV CP)，大小為1kbp。由於此外源基因系構築於Ti二位元載體（pBI121；Clontech公司）上，因此經基因轉殖後，完整之轉殖系除含有PRSV CP基因外，前端序列有35S啟動子(promoter)、gus基因前導序列（來自pBI121載體）及轉譯起始碼（AUG），後有nos終結子。此外，亦含有 nptII 基因(抗neomycin系列抗生素之基因)。

由於35S啟動子、nos終結子及npt II 基因經常被發現在其他基因轉殖作物上，利用此區域所設計之分子標誌通常僅能證明可能為基因轉殖作物而無法確認轉殖何種外源基因。此外，利用35S 啟動子核酸序列所設計之分子標誌有可能因植株感染病毒而呈現誤判為基因轉殖作物。本檢



測試驗所使用之分子標誌主要來自PRSV鞘蛋白完整基因的片段，檢測結果可以明確判斷是否為抗木瓜輪點病毒之基因轉殖植株。由於分子檢測的結果常因所抽取之DNA品質及反應試劑及儀器失誤而無法完整呈現出正確結果。為避免上述現象產生，本檢測流程除了針對CP外源基因外，另針對papain基因設計專一性引子作為internal control以確保所有相關PCR反應的正確性。

基因轉殖木瓜的檢測先針對Papain gene進行檢測，此為供作內部對照之基因，PCR 增幅產物大小為211bp（圖2），以確保檢體DNA品質合乎要求；其次檢測nptII gene，以鑑定是否為基因轉殖木瓜，其PCR 增幅產物大小為1039 bp（圖2）；若判定為基因轉殖木瓜，則進一步檢測是否為「抗輪點病毒病基因轉殖木瓜」。檢測PRSV-CP gene具有預期之840bp之PCR 增幅產物（圖2）。

我國第一個通過隔離田間試驗之抗輪點病毒病之基因轉殖木瓜原本為母株，但是栽培田之田間所檢測出具有基因轉殖特性的木瓜卻常是兩性株，顯示此一基因轉殖品系已被當為育種材料而繁衍後代。由於基因的重組缺失等特性，基因轉殖植物雜交後代有可能出現僅含部分外源基因的植株。值得重視的是，目前已證實當植株含有PRSV-CP外源基因部分片段時也

可能表現出抗病特性，而此等特性之植株並無法被傳統之PCR檢測技術所檢測出來而誤判為非基因轉殖植物。若此等植株被進一步利用於育種或經由組織培養大量繁殖而自由釋出於田間時，將嚴重危害現有木瓜外銷產業。因此針對「抗輪點病毒病之基因轉殖木瓜」之轉殖序列（圖3）中設計短片段引子進行PCR檢測，以判別植株是否帶有部分轉殖序列。結果顯示可明確區別抗輪點病毒病之基因轉殖木瓜與非基因轉殖木瓜（圖4）。

將基因轉殖與非基因轉殖樣品木瓜葉片樣品混合成1%、3%、5%、10%、25%、50%、75%、100% 等混合樣品，以PCR檢測Papain gene、nptII與PRSV-CP gene，以探討檢測的敏感度。結果顯示檢測Papain gene的PCR產物之電泳條帶亮度不受轉殖樣品比例改變的影響（圖5），可確認所萃取的DNA品質符合試驗要求，並且亦證實木瓜葉片混合樣品之配製品質均能達到需求；而nptII與PRSV-CP gene的PCR產物利用電泳分析後的條帶亮度依轉殖樣品比例的降低而遞減（圖6、7），顯示混合樣品中基因轉殖樣品所佔比例之多寡，可明顯影響PCR產物的多寡，未來將可嘗試利用此一特性建立除了即時PCR（Real-time PCR）以外的定量檢測方法。

根據原本所建立的檢測方式，

PRSV-CP、短片段與papain基因的檢測需個別進行，在人力、物力上增加不少檢測成本。為改善此一缺點，利用多重聚合?鏈鎖反應技術（multiplex PCR）開發可同時檢出CP gene預期之840bp、CP gene與部分載體間之短片段405bp，與papain gene（圖8）。

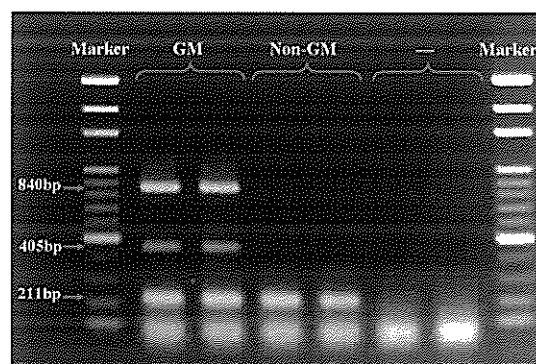


圖8 抗「木瓜輪點毒素病」基因轉殖與非基因轉殖木瓜針對目標基因（木瓜輪點病毒外鞘蛋白基因, CP gene）與papain gene，利用專一性引子進行多重聚合酶鏈鎖反應（multiple PCR），可同時檢出CP gene預期之840bp、CP gene與部分載體間之短片段405bp，與papain gene預期之211bp片段。GM為基因轉殖木瓜，Non-GM為非基因轉殖木瓜，-為空白試驗。