

基因改造棉花PCR定性檢測技術之建立

張惠如¹、陳哲仁¹、周佳霖¹、周明燕²、孫永偉²、鍾文全³

一、前言

根據 2014 年 ISAAA (International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications) 統計資料，全世界種植基因改造作物 (Genetically Modified Crops, 簡稱 GM 作物) 之面積已達 1.81 億公頃，全球基改作物栽培面積，87%在美洲，亞澳地區 11%，而中東與非、歐洲僅佔 2%。主要栽培之作物依序為大豆(48.6%)、玉米(32.8%)、棉花(13.7%)、油菜(4.9%)。基因改造作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，並各自訂有基因改造作物與其產製品之相關管理法規及建構檢測及監測平台。根據我國植物品種及種苗法與相關管理法規，有關基因改造作物在上市前除須進行生物安全評估、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與消費者之安全。此外，我國飼料管理法第 11-1 條法規，要求以基因轉殖作物作為原料之飼料，其產品須進行標示並接受主管機關監控。

目前我國在 GM 作物之進出口管理方面，現階段採行境內及邊境管理措施，針對可能進口之 GM 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 GM 作物。目前國內之檢測單位

針對 GM 作物，包括：大豆、玉米、水稻、馬鈴薯、油菜及木瓜等作物之定性檢測技術已陸續建立，但對於目前上述栽培面積第三大的 GM 棉花，卻尚未建立檢測技術標準作業流程。為擴大我國於 GM 作物檢測之範圍，進而支援 GM 作物、農產品輸入以及後續管制事宜，乃進行相關試驗藉以建立基因改造棉花檢測技術。

二、基因改造棉花之介紹

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。根據國際棉花諮詢委員會 (International Cotton Advisory Committee, ICAC) 資料顯示，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。產量方面，FAO 資料顯示 2012 年全球棉花纖維或稱棉絨 (Cotton lint) 約為 2,600 萬公噸。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。

根據 ISAAA 之統計資料，目前 GM 棉花共有 56 個品項，其中未曾獲得核准栽培

¹ 種苗改良繁殖場生物技術課 助理研究員

² 種苗改良繁殖場生物技術課 副研究員

³ 種苗改良繁殖場生物技術課 研究員兼課長

表一、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	偵測之管家基因
T304-40	<i>bar</i> 、 <i>cry1Ab</i>	抗固殺草除草劑及抗鱗翅目害蟲	單一	<i>AdhC</i>
GHB119	<i>bar</i> 、 <i>ry2Ac</i>	抗固殺草除草劑及抗鱗翅目害蟲	單一	<i>AdhC</i>
281-24-236x3006-210-23	<i>pat(syn)</i> 、 <i>cry1F</i> 、 <i>cry1Ac</i>	抗固殺草除草劑及抗鱗翅目害蟲	混合	<i>SAH7</i>

者共有 8 個。而最早獲得栽培許可的是 BXN10211、BXN10215、BXN10222 與 BXN10224，皆為轉殖可抗溴苯腈類 (Bromoxynil) 除草劑基因(*bxn*)的 GM 棉花，美國於 1994 年給予許可。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 (sulfonylurea) 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。

三、GM 棉花三個不同品項 PCR 定性檢測

以通過歐盟參考物質和量測中心 (EU Institute of Reference Material and Measurements, IRMM) 認證的商業標準品為試驗材料，計有 T304-40 (0 %、1 %、10 %)、GHB119 (0 %、1 %、10 %) 及 281-24-236x3006-210-23 (0 %、1 %、10 %、100 %) 三個基改品項的標準品(表一)。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。結果顯示，目前所建立的 PCR 條件及配方，可分別於基

改品項 T304-40、GHB119 中增幅出棉花管家基因 (*AdhC*) 73 b.p. 大小的目標條帶；基改品項 281-24-236x3006-210-23 中增幅出棉花管家基因 (*SAH7*) 115 b.p. 大小的目標條帶(圖 1)。在偵測轉基因序列方面：基改品項 T304-40 可增幅出 78 b.p. 大小的目標條帶，而基改品項 GHB119 及 281-24-236x3006-210-23 中，除目標條帶被增幅外，尚有其他微弱的非專一性條帶，且在基改品項 281-24-236x3006-210-23 的 1% 含量樣品中無法增幅出目標條帶(圖 2)。

四、結論

在目前的試驗結果中，已建立具檢測效率及成本考量的棉花樣品核酸萃取流程，進一步以 GM 棉花商業標準品進行 PCR 定性檢測試驗，由結果顯示，所使用的 PCR 溫度時間條件，在基改品項 T304-40 可以獲得符合預期的穩定試驗結果，但在基改品項 GHB119 及 281-24-236x3006-210-23 中，尚有非專一性條帶以及 1% 含量樣品未檢出的問題需要解決。後續將調整 PCR 反應的條件與配方比例，以獲得更明確的試驗結果。另外，所有條件都確認後將建立基因改造棉花 (T304-40、GHB119 及 281-24-236x3006-210-23) 的 PCR 定性檢測標準作業流程，並進一步進行實驗室間能力試驗，以強化檢測方法的穩定性與標準化，且將持續收集其他基改品項之棉花標準樣品，逐步建立其檢測方法流程，以增強我國對 GM 棉花的檢監控能力。

研究成果

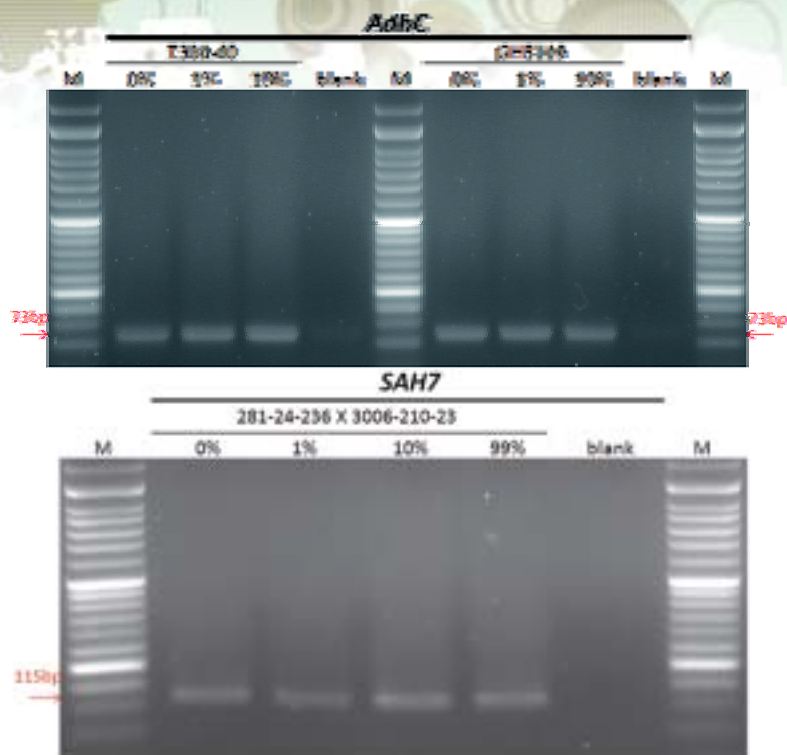


圖 1 | 三個 GM 棉花品項標準品之管家基因 PCR 定性檢測。M:Size Marker；0%、1%、10%、99% 為 T304-40、GHB119 及 281-24-236x3006-210-23 基因改造棉花標準樣品粉末；blank 為空白對照組。

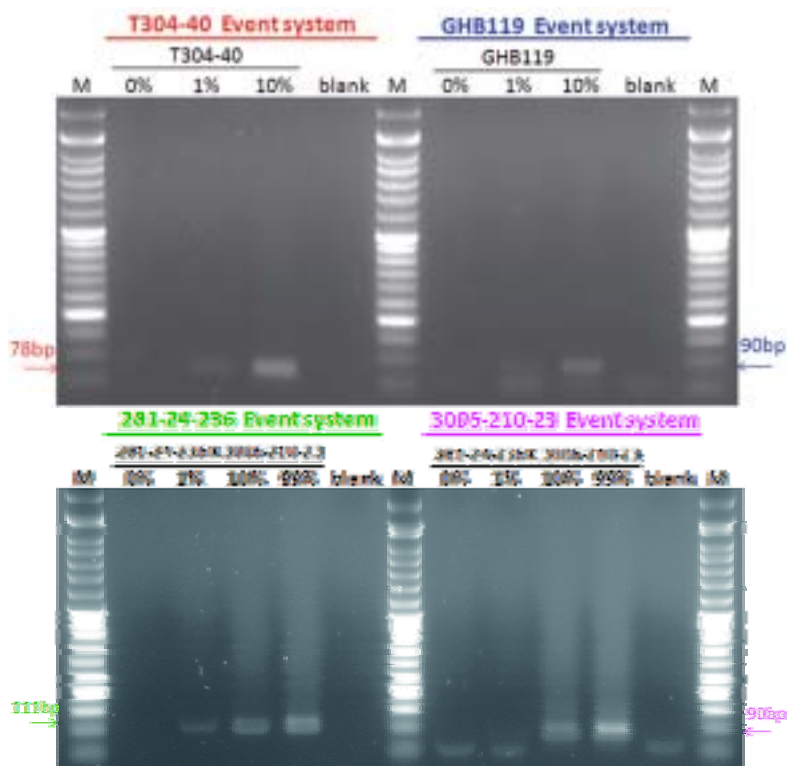


圖 2 | 三個 GM 棉花品項標準品之轉殖基因片段 PCR 定性檢測。M:Size Marker；0%、1%、10%、99% 為 T304-40、GHB119 及 281-24-236x3006-210-23 基因改造棉花標準樣品粉末；blank 為空白對照組。