

日本及大陸地區基因改造木瓜 PRSV-YK 品系定量檢測技術之分析

陳哲仁¹、周明燕²、張惠如¹、周佳霖¹、鍾文全³

隨著生物科技進展迅速，「基因改造作物」(genetically modified crop, GM crop，簡稱基改作物)是全球生物技術領域中重要農業產品，目前已知至少有 28 種作物 375 種基改作物品項已被成功開發。透過非自然的基因操作技術產生的增殖及(或)遺傳重組，使此類作物具備某一或某些原來未經改造之生物所沒有的特性，或擁有較原有生物特性表現更佳，如提升對惡劣環境與病蟲害的抵抗能力、增加或改變作物的營養成分、抵抗農藥如殺草劑的傷害等性質。基因改造作物僅針對特定基因改造，達到提高生產力及(或)品質之優點受到肯定，但基於生態安全、消費者採購與農民種植樣態的選擇權利，世界各國依據國情不同，紛紛訂定不同程度的管理規範。

一、基因改造作物國際發展現況

基因改造作物之栽培在近年來急速增加，根據ISAAA(International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications)組織 2014 年統計資料顯示，全世界栽培基改作物之耕地面積已達 1 億 8 千 1 百餘萬公頃，且種植面積仍持續增加中；全球

前三大基改作物種植國家分別為美國、巴西、阿根廷，大陸地區估計種植 420 萬公頃排名第 6 位；全球主要種植基改作物為玉米、大豆、油菜以及棉花。基改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民眾關切並重視。根據修訂中之植物品種及種苗法及相關管理法規，基改作物上市前須進行完整生物安全評估外，在田間試驗階段即受農業主管機關監控，以維護國內生態環境之安全。

我國基改作物之管制，現已完成境內管理措施並開始延伸至邊境管理，針對較可能有基改作物汙染風險之作物，包括玉米、大豆、木瓜、油菜、棉花、馬鈴薯等作物，由種苗改良繁殖場及相關改良試驗研究單位研發取樣檢測技術，並配合主管機關進行國內基改作物查驗，實際檢測種子(苗)是否為基改作物，並採取適當管理措施。

二、我國基因改造木瓜作物發展概述

番木瓜(*Carica papaya* L.)俗名木瓜，屬番木瓜科(Caricaceae)，番木瓜屬(*Carica*)植物，番木瓜屬共有 40 種，原產於墨西哥到阿根廷北部。根據農業統計資料顯示，國內栽培面積約在 3,000 公頃左右，以臺南及屏東為主要產區。在 1950 年代

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

由於全球各地木瓜產區先後受到木瓜輪點病毒(papaya ring sopt virus, PRSV)嚴重危害，使得染病果實畸形並出現同心圓狀斑點、果肉硬而不甜，商品價值全無。藉由現在已知的植物基因靜默防禦反應，透過人為導入一段無活性病毒核酸序列，使植株在遭受病毒侵染時即時引起防禦反應分解病毒核酸達到抗病保護效果，在美國、臺灣、大陸地區、泰國、印度等國家都有類似研究案例。目前國際上已核准商業生產之基改木瓜包括美國核准之 55-1 和 X17-2 品系，及大陸地區大陸核准之‘華農一號’品種；國內所研發之基改木瓜 PRSV-YK 品系，則是由中興大學葉錫東教授領導的研究團隊，分離本地的木瓜輪點病毒強病毒株 YK 株系，利用其鞘蛋白序列導入木瓜植株達到抗病保護效果所研發出的抗病品系，雖然已通過生物安全評估，但未獲核准生產種植。

基於我國並未開放種植基因改造作物，也為了確認我國輸出之木瓜相關產品未受基改作物汙染，因此木瓜仍列入監測管制項目。

國際上對於基因改造作物配和政策而有不同的開放程度及作為，以木瓜為例，大陸地區採局部開放政策，僅開放‘華農一號’基因改造木瓜種植；日本則有條件開放基因改造產品輸日，但須明確標示，並公布檢測方法，進行邊境抽驗監測管制。我國目前採用定性分析做為監控檢測標準，本文就日本及大陸地區針對基改木瓜 PRSV-YK 品系所公布之即時(real-time) PCR 檢測方法進行分析比較，藉由比較各國檢測分析方法，可做為我國後續建構定

量分析檢測技術參考。

三、日本 PRSV-YK 即時(Real-time)PCR 檢測技術

根據日本厚生勞動省公告，日本目前僅許可美國研究團隊研發之 55-1 抗木瓜輪點病毒基改品系，商品名‘Rainbow’及‘SunUP’，此外，並未許可基改木瓜 PRSV-YK 品系銷售。有關 YK 品系之檢查方法公布於「安全性未審査の組換え DNA 技術応用食品の検査方法」中，包括生鮮調味製品、乾燥製品、糖浸製品、果汁飲料、冰品等 7 種類樣品檢查方法。

另外在「Method of identifying genetically modified papaya (PRSV-YK-resistant strains) for seeds and leaves」，則記載種子及葉片即時 PCR 檢測方法。兩者分別以 Qiagen 公司出品 Genomic-tip 100/G/DNeasy Plant mini 或 Nippon Gene 公司出品 GM quicker2 試劑組進行 DNA 核酸萃取，先以偵測 DNA 核酸樣品中木瓜蛋白酶(papain)管家基因(housekeeping gene)確認核酸品質並做為內部控制，另以偵測 CaMV 35S 啟動子及 YK 品系專一性序列 YK-1 和 YK-2 兩個特定基因片段，據以判斷基改檢測結果，一旦同時檢出 CaMV 35S 啟動子及 YK 品系專一性序列，則判定為基改 YK 品系木瓜，如果同一 DNA 檢體的兩重複即時 PCR 檢測結果不一致，則自核酸萃取步驟開始再次分析，以重複試驗一致結果判定是否為基改樣品，如果未有一致結果則判定為非基改；若是僅檢出 CaMV 35S 啟動子未有 YK 品系專一性序列增幅訊號，則註記推測為非 YK 品系基改木瓜(圖 1)。

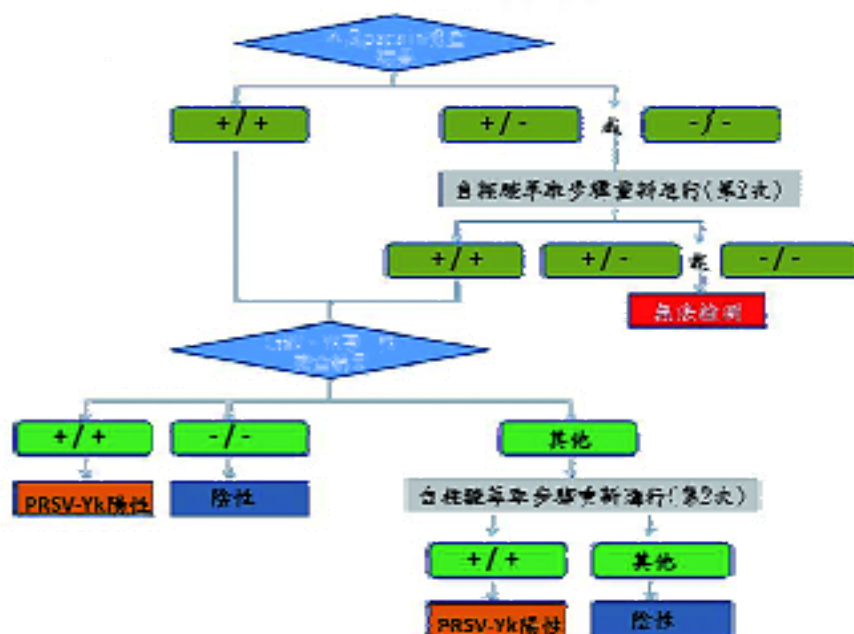


圖 1 | 日本基因改造木瓜檢測流程圖。

四、大陸地區 PRSV-YK 即時(Real-time) PCR 檢測技術

大陸地區中山大學根據從廣東和廣西兩省分離的木瓜輪點病毒優勢病毒株 YS 株系，利用其核酸複製酶基因導入木瓜植株，並以人工接種方式驗證其抗病性，開發出‘華農一號’基改木瓜，也是唯一獲得許可進行商業栽培品種並限制在廣東省生產，其餘基改木瓜品種(系)未獲得大陸地區農業部許可種植。

根據大陸地區「木瓜中轉基因成分定性PCR檢測方法」和「抗病毒轉基因番木瓜的實時PCR檢測」技術文件資料，因目前研發之基改木瓜品種(系)皆選用 CaMV 35S 啟動子、Nos 終結子以及 nptII 篩選基因三個基因零件與不同的木瓜輪點病毒序

列片段組成，因此，採兩階段檢測流程：首先種子與鮮果核酸萃取採用改良 CTAB 方法，就其中氯化鈉鹽類濃度略作調整，因應鮮果水分較多的影響，接續與日本方法相同偵測核酸樣品中木瓜蛋白酶管家基因確認核酸品質，第一階段鑑定 DNA 核酸樣品中有無 CaMV 35S 啟動子和 Nos 終結子存在，初步判定是否為基改木瓜，定性 PCR 檢測還加驗有無 nptII 篩選基因，如果皆無測出擴增產物則直接判定為非基改木瓜；第二階段則分別針對 55-1、‘華農一號’以及 YK 品種(系)特異序列，並根據陽性擴增產物訊號確定是何種基改木瓜品系(圖 2)。

五、結語

我國現行基改木瓜 PRSV-YK 品系檢查方法，係根據行政院農業委員會基因轉殖植物審議委員會通過之「抗輪點病毒病基因轉殖木瓜定性檢測與監測流程操作手冊」進行，基於我國並未核可任何基改作物商業栽培行為，因此，包括 PRSV-YK 品系基改木瓜與其他基改作物皆是不得檢出。種苗改良繁殖場依照現行操作方法在基改木瓜定性檢查靈敏度可達 0.1%，配合取樣標準作業流程可有效自混雜樣品中檢測是否存有基因改造成份存在；即時 PCR 檢測技術理論上雖具有更高的靈敏

度、減少分析時間以及可定量的優點，但是仍有成本高及過於靈敏產生的偽陽性等缺點，由於各國對基改木瓜管制強度不一，我國及日本皆不允許任何基改木瓜植株商業栽培，大陸地區則是有限制開放特定品種與區域種植，國內現行基改木瓜定性檢測方法足以達成管制需求，惟即時 PCR 定量檢測技術能提升分析效率，因此，種苗改良繁殖場也就日本及大陸地區大陸公告之方法進行瞭解，並著手開發核酸萃取方法及即時PCR檢測條件測試，據以建立符合科學證據之基改木瓜定量檢測方法。

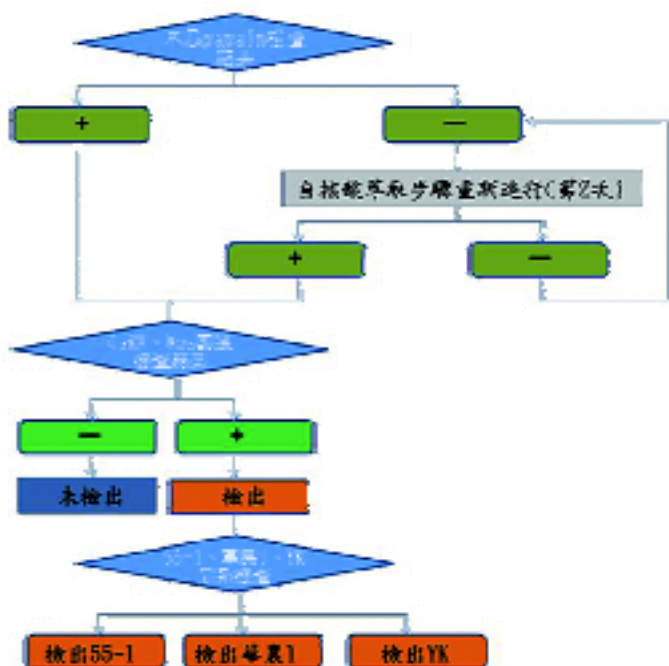


圖 2 | 大陸地區基因改造木瓜檢測流程圖。