

基因改造食品檢驗方法－玉米轉殖品項MON87427 (UI: MON-87427-7)
之轉殖品項特異性定性及定量檢驗

Method of Test for Genetically Modified Foods -
Event-specific Qualitatively and Quantitatively Test of Maize
Event MON87427 (UI: MON-87427-7)

1. 適用範圍：本檢驗方法適用於食品中基因改造玉米轉殖品項MON87427 (UI: MON-87427-7)之定性及定量檢驗。
2. 檢驗方法：檢體經DNA萃取後，以即時聚合酶鏈反應(real-time polymerase chain reaction, real-time PCR)之方法。
 - 2.1. 工作環境：工作平台需寬敞、潔淨、光線良好。檢體前處理、檢體DNA抽取、real-time PCR試劑配製及檢驗過程皆需有區隔空間，避免交叉污染。Real-time PCR試劑之配製應於無菌操作台內進行。
 - 2.2. 裝置^(註1)
 - 2.2.1. 即時聚合酶鏈反應器：ABI 7900HT Fast Real-Time PCR System (ABI7900)或Thermo Fisher Scientific QuantStudio 12K Flex Real-Time PCR System (QS12K)或Roche LightCycler，或同級品
 - 2.2.2. 冷凍乾燥裝置：溫度可達-40°C以下，真空度可達133 mBar以下，供檢體乾燥用。
 - 2.2.3. 振盪型粉碎機：Retsch MM200，或同級品。
 - 2.2.4. 真空乾燥裝置：供DNA乾燥用。
 - 2.2.5. 高壓滅菌釜：可達121°C以上者。
 - 2.2.6. 無菌操作台。
 - 2.2.7. 加熱振盪器：具55°C溫控及振盪功能。
 - 2.2.8. 微量冷凍離心機：可達20,000 ×g，並具4°C溫控功能。
 - 2.2.9. 離心機：供各式微量離心管離心用。
 - 2.2.10. 分光光度計：具波長260 nm、280 nm。
 - 2.2.11. 冷凍設備：具冷藏及凍結功能。
 - 2.2.12. 旋渦混合器。
 - 2.2.13. 酸鹼度測定儀。
 - 2.2.14. 水浴裝置：溫差±1°C以內者。
 - 2.2.15. 天平：最大稱重量為2000 g，靈敏度為0.1 g；最大稱重量為100 g，靈敏度為1 mg。

註1：本方法所使用或提及之產品品牌不代表為同類產品中最好者；反之，未使用或提及之產品品牌亦不代表為同類產品中較差者。

2.3. 試藥

2.3.1. DNA抽取用試藥：溴化十六烷三甲基銨(cetyltrimethylammonium bromide, CTAB)，乙二銨四乙酸二鈉(ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt, Na₂-EDTA)，異丙醇，氯化鈉，鹽酸，三羥甲基氨基甲烷(tris (hydroxymethyl) aminomethane (Tris-base))，乙醇(96-100%)等皆採分子生物分析級試藥；氯仿為試藥特級；適用於植物DNA抽取之市售套組。

2.3.2. Real-time PCR用^(註2)

2.3.2.1. 定性鑑別試驗用及定量試驗用引子及探針

2.3.2.1.1. HMG基因(供作內部對照基因)

引子F：HMGF，5'-TTGGCTACATAGGGAGCCTTGT-3'

引子R：HMGR，5'-GAGTCGGTAAGCTCCATCTTCTG-3'

探針P：HMGP，5'-(FAM)-AATCCACACAAACGCACGCGT
A-XT-PH-3', (X=TAMRA)

PCR增幅產物大小123 bp

2.3.2.2. 轉殖品項MON87427

引子F：87427 EF，5'-CCATATTGACCATCATACTCATTGC-3'

引子R：87427 ER，5'-GAAACGGTCGGGTCAAATGT-3'

探針P：87427 EP，5'-(FAM)-CATGTAGATTTCCTCGGTTTTCT
CCATATTGGT-XT-PH-3', (X=TAMRA)

PCR增幅產物大小121 bp

註2：合成之引子及探針，拆封後，以無菌去離子水稀釋成適當濃度，分裝後置於-20°C貯存備用，另探針需避光保存。探針5'端採用 6-carboxy-fluorescein (FAM) 標記，3'端採用 6-carboxytetramethyl-rhodamine (TAMRA)標記。

2.3.2.2. TaqMan Universal PCR Master Mix (適用於ABI7900或QS12K)

本試劑內含real-time PCR所需去氧核糖核苷三磷酸、聚合酶等，使用時添加引子、探針及待測檢體DNA。

2.3.2.3. LightCycler[®] FastStart DNA Master HybProbe (適用於Roche LightCycler)

本試劑內含real-time PCR所需去氧核糖核苷三磷酸、聚合酶等，且內附25 mM氯化鎂溶液，使用時添加引子、探針及待測檢體DNA。

2.3.3. 對照用參考物質：基因改造玉米轉殖品項MON87427，非基因改造玉米，或使用衛生福利部食品藥物管理署編號p87427之參考質體作為參考物質，或使用功能等同上述物質之同級品。

2.4. 器具及材料^(註3)

2.4.1. 吸管(Pipette)：10 μ L、20 μ L、100 μ L、200 μ L及1000 μ L。

2.4.2. 吸管尖頭(Pipette tips)：10 μ L、20 μ L、200 μ L及1000 μ L。

2.4.3. 離心管：200 μ L、600 μ L、1.5 mL及2 mL。

2.4.4. PCR 96孔反應盤：適用於ABI7900或QS12K使用。

2.4.5. PCR玻璃毛細管：Roche LightCycler專用。

2.4.6. 玻璃或塑膠瓶：50 mL、100 mL、250 mL、500 mL、1000 mL及2000 mL。

2.4.7. 塑膠離心管：50 mL。

2.4.8. 過濾：孔徑為0.45 μ m，nitrocellulose材質。

註3：使用之塑膠或玻璃器皿均為無DNase污染。

2.5. 試劑之配製

2.5.1. CTAB抽取緩衝溶液

稱取氯化鈉81.8 g、Tris-base 12.1 g及Na₂-EDTA 7.4 g，加水約700 mL，持續攪拌助溶，再加入CTAB 20.0 g，使其完全溶解，以1 N HCl調整pH值為8.0後定容至1000 mL，經121°C滅菌15分鐘後冷卻備用。

2.5.2. CTAB沉澱溶液

稱取CTAB 5.0 g與NaCl 2.3 g，加水持續攪拌使其完全溶解後，定容至1000 mL，經121°C滅菌15分鐘後冷卻備用。

2.5.3. 1.2 M NaCl溶液

稱取氯化鈉70.2 g，加水溶解後定容至1000 mL，經121°C滅菌15分鐘冷卻後備用。

2.5.4. Real-time PCR溶液之配製^(註4)

2.5.4.1. ABI7900或QS12K鑑別試驗用

5 μ M引子F..... 1.25 μ L

5 μ M引子R..... 1.25 μ L

3.3 μ M探針P..... 1.7 μ L

TaqMan Universal PCR Master Mix	12.5 μ L
檢體DNA溶液(總量100 ng)	5.0 μ L
無菌去離子水.....	3.3 μ L
總體積	25.0 μ L

2.5.4.2. Roche LightCycler鑑別試驗用

5 μ M引子F.....	1.5 μ L
5 μ M引子R	1.5 μ L
3.3 μ M探針P.....	1.5 μ L
LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe	2.0 μ L
25 mM氯化鎂溶液	2.4 μ L
檢體DNA溶液(總量100 ng)	5.0 μ L
無菌去離子水.....	6.1 μ L
總體積	20.0 μ L

註4：Real-time PCR溶液應置於冰浴中配製。

2.6. 標準曲線之製作^(註5)

取參考質體原液作為參考物質，參考質體包含轉殖品項標的基因(target gene)及內部對照基因(internal control gene)。以無菌去離子水稀釋成每5.0 μ L中各含20、80、1280、20480及1310720拷貝數等五種濃度。各濃度分別進行三重複試驗，偏離之數據應予捨棄，以各濃度一組以上之代表數據，製作標準曲線。

註5：20、80、1280、20480及1310720參考質體拷貝數之相對Ct值(threshold cycle value)分別為36、34、30、26及20 cycles。若使用其他參考物質，應自行探討適用濃度。

2.7. 檢體DNA之製備

2.7.1. 檢體之處理^(註6)

乾燥檢體直接以粉碎機研磨成細粉。溼狀檢體經冷凍乾燥處理後，再以粉碎機研磨成細粉。檢體需貯存於乾燥及冷凍環境中。

註6：1. 研磨檢體時應於區隔之空間進行，避免交叉污染。

2. 溼狀檢體之乾燥時間可視乾燥程度調整。

2.7.2. DNA之抽取^(註7)

2.7.2.1. 稱取檢體200 mg置入2 mL離心管。

2.7.2.2. 加入CTAB抽取緩衝液1 mL，並以旋渦混合器混合均勻。

2.7.2.3. 於65°C振盪反應90分鐘。

2.7.2.4. 以16,000 $\times$ g離心10分鐘。

- 2.7.2.5. 取上層液(約750 μ L)注入另一2 mL 離心管。
- 2.7.2.6. 加入氯仿400 μ L，並以旋渦混合器混合30秒鐘。
- 2.7.2.7. 以11,500 $\times$ g離心10分鐘。
- 2.7.2.8. 取上層液(約600 μ L)注入另一2 mL離心管。
- 2.7.2.9. 加入二倍體積(約1300 μ L)之CTAB沉澱溶液，並以反覆翻轉方式溫和混合。
- 2.7.2.10. 室溫靜置60分鐘。
- 2.7.2.11. 以14,250 $\times$ g離心10分鐘。
- 2.7.2.12. 去除上層液。
- 2.7.2.13. 加入1.2 M NaCl溶液350 μ L以溶解沉澱物質。
- 2.7.2.14. 加入氯仿350 μ L，並以旋渦混合器混合30 秒鐘。
- 2.7.2.15. 以12,000 $\times$ g離心10分鐘使分層。
- 2.7.2.16. 取上層液(約350 μ L)注入另一1.5 mL離心管。
- 2.7.2.17. 加入0.8倍體積(約280 μ L)之異丙醇，以反覆翻轉方式溫和混合，並於4°C靜置至少30分鐘以沉澱DNA，亦可靜置隔夜。
- 2.7.2.18. 於4°C以15,000 $\times$ g離心30分鐘。
- 2.7.2.19. 去除上層液。
- 2.7.2.20. 加入70%乙醇溶液(v/v) 500 μ L，清洗DNA沉澱物。
- 2.7.2.21. 於4°C以15,000 $\times$ g離心10分鐘。
- 2.7.2.22. 去除上清液，並以微量吸管吸除殘餘之乙醇溶液。
- 2.7.2.23. 置入真空乾燥裝置中，將DNA乾燥。
- 2.7.2.24. 乾燥之DNA以純水30 μ L溶解。
- 2.7.2.25. DNA溶液置於-20°C冷凍庫中貯存備用。

註7：1. DNA之抽取亦可採用市售套組，其操作步驟請參考套組中所附之使用手冊。

2. 抽取之DNA溶液收集至已滅菌1.5 mL離心管，作為檢體DNA原液。依2.7.3.節測定DNA濃度後，置於-20°C冷凍保存。

2.7.3. DNA濃度測定及純度判斷

取適量之檢體DNA原液，以無菌去離子水做適當倍數之稀釋，分別測定260 nm及280 nm之吸光值(O.D.)。以波長260 nm吸光值乘50 ng/ μ L及稀釋倍數，即為檢體DNA原液濃度。DNA溶液純度則以O.D.₂₆₀/O.D.₂₈₀ 比值作判斷，其比值應介於1.7~2.0。

2.8. Real-time PCR鑑別試驗

2.8.1. Real-time PCR操作步驟

2.8.1.1. Real-time PCR—ABI7900或QS12K

以無菌去離子水適當稀釋檢體DNA原液、引子及探針備用。取PCR反應管，依照2.5.4.1.節配製PCR溶液，依序加入TaqMan Universal PCR Master Mix、稀釋過之引子及探針，混合均勻後，分裝20 μ L入PCR反應管中，各別加入檢體DNA溶液5 μ L，再將PCR反應管置於離心機中，以200 $\times$ g瞬間離心，移入real-time PCR反應器，依下列條件進行反應。同時另製作正反應及負反應對照組。

步驟	溫度	時間
1. 熱活化	50°C	2 min
2. 最初變性	95°C	10 min
3. 變性	95°C	15 sec
4. 黏接、延展	60°C	1 min

步驟3至步驟4，共進行45個循環反應。

設定 PCR 模式：9600 Emulation

設定反應體積：25 μ L

2.8.1.2. Real-time PCR—Roche LightCycler

以無菌去離子水適當稀釋檢體DNA原液、引子及探針備用。取PCR反應管，依照2.5.4.2.節配製PCR溶液，依序加入LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe、25 mM氯化鎂溶液、稀釋過之引子及探針，混合均勻後，分裝15 μ L於玻璃毛細管中，各別加入檢體DNA溶液5 μ L，再將毛細管置於離心機中，以800 $\times$ g瞬間離心，移入real-time PCR反應器，依下列條件進行反應。同時另製作正反應及負反應對照組。

步驟	溫度	時間
1. 最初變性	95°C	10 min
2. 變性	95°C	5 sec
3. 黏接	60°C	25 sec
4. 延展	72°C	8 sec

步驟2至步驟4，共進行45個循環反應。

5. 冷卻	35°C	45 sec
-------	------	--------

2.8.2. Real-time PCR螢光分析

檢體DNA經real-time PCR反應後，直接從real-time PCR反應器上之螢幕觀察探針所產生之螢光增幅曲線，即可判讀反應結果。同時另測試正反應及負反應對照組

2.8.3. 確認

檢體DNA之real-time PCR增幅產物螢光分析圖與正反應對照組螢光分析圖進行相互比對，當檢體DNA與正反應對照組之real-time PCR螢光分析圖均出現經由探針所產生之螢光增幅曲線，即確認該real-time PCR增幅產物為轉殖品項MON87427基因改造玉米之基因片段，並確認該檢體中含有轉殖品項MON87427基因改造玉米。

2.9. 定量試驗^(註7)

2.9.1. Real-time PCR操作步驟及條件

ABI7900或QS12K

依2.8.1.1.節操作步驟及條件，另同時製作標準曲線、負反應及正反應對照組。

2.9.2. 計算

檢體定量後，依標的基因及玉米內部對照基因之標準曲線分別計算兩種基因之濃度，並求取各別平均值，再依下列公式計算檢體中轉殖品項MON87427基因改造玉米含量。檢測檢體中各種轉殖品項基因改造玉米含量，則必需各別測試每種轉殖品項含量，其總合即為轉殖品項總含量。

檢體中轉殖品項MON87427基因改造玉米含量(%)

$$= \frac{\text{標的基因}}{\text{玉米內部對照基因}} \times \frac{1}{\text{內標比}} \times 100$$

轉殖品項MON87427之內標比：0.63 (適用於ABI7900)或0.62 (適用於QS12K)

- 註7：1. 每件檢體建議測試二種稀釋濃度，如稀釋1：40及1：100，每種濃度各進行二重覆分析，最後結果則取其平均值，惟偏離之數據必須去除。
2. 未經稀釋或採用高濃度之檢體DNA可能抑制PCR。檢體DNA品質之測試可採用不同稀釋倍數測試，即將檢體DNA稀釋成1：40及1：100二種濃度，續進行PCR，二者之Ct值差距應為2-3，惟Ct值差距≤2時，表示所抽取之檢體DNA含有抑制

物質，檢體DNA應進一步稀釋或再去離子化，以得到最佳結果。

3. Ct值若介於36-45時，表示所抽取之檢體含極少量標的DNA；Ct值若介於15-20時，表示所抽取之檢體含大量標的DNA。
4. ABI7900或QS12K臨界值線【Threshold line (Th)】之設定建議：
PCR定量反應完成後，點選”Results”，進入”Amplification plot”視窗，將”Detector”選項設定為”All”，於”Analysis settings”選項之”Threshold”項目中輸入0.128，即完成Threshold line位置之設定，並依此估算各檢體之Ct值。
5. 本Real-time PCR定量試驗係採ABI7900或QS12K設定之，若使用其他機型，應自行檢討反應條件、標準曲線及內標比。

附註：1. 本檢驗方法之最低檢測濃度為0.1% (以乾重計)。

2. 本檢驗方法之適用範圍係指能夠抽取出DNA之食品，惟經過高度加工或不含DNA之食品並不適用。

參考文獻：

1. Chiueh, L. C., Lin, C. Y., Chen, Y. C., Wu, M. H. and Shih, D. Y. C. 2004. Establishment of quantitative method for five events of genetically modified maize (Bt11、Event176、GA21、MON810 and T25) by the real-time QPCR. J. Food Drug Anal. 12: 316-323.
2. Kuribara, H., Shindo, Y., Matsuoka, T., Takubo, K., Futo, S., Aoki, N., Hirao, T., Akiyama, H., Goda, Y., Toyoda, M. and Hino, A. 2002. Novel reference molecules for quantitation of genetically-modified maize and soybean. J. AOAC Int. 85: 1077-1089.
3. JRC-IHCP. 2016. Event-specific method for the quantification of maize MON87427 using real-time PCR -validated method.
[<http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/StatusOfDossiers.aspx>.]