基因改造食品檢驗方法－黃豆轉殖品項MON87751 (UI: MON-87751-7)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 Soybean Event MON87751 (UI: MON-87751-7)

1. 適用範圍：本檢驗方法適用於食品中基因改造黃豆轉殖品項MON87751 (UI: MON-87751-7)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℃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。
2.2.6. 無菌操作台。
2.2.7. 加熱振盪器：具55℃溫控及振盪功能。
2.2.8. 微量冷凍離心機(Micro refrigerated centrifuge)：可達20000 ×g，並具4℃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(Vortex mixer)。
2.2.13. 酸鹼度測定儀(pH meter)。
2.2.14. 水浴裝置：溫差±1℃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：乙醇(96-100%)採分子生物分析級試藥；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. Lectin基因(供作內部對照基因)

引子F：LEBF，
5′-CATTTGGGACAAAGAAACCGGTA-3′
引子R：LEBR，
5′-AGCCCATCTGCAAGCCTTTT-3′
探針P：LEBP，
5′-(FAM)-CCAGCTTCGCCGCTTCCTTCAACTT-(BBQ)-3′,
PCR增幅產物大小96 bp

2.3.2.1.2. 轉殖品項MON87751

引子F：87751EF，
5′-TGCTCTTTGGAGTTTATTTTGTAG-3′
引子R：87751ER，
5′-CCTCAATTGCGAGCTTTCT-3′
探針P：87751EP，
5′-(FAM)-CCAGTCAGCATCATCACACCAAAAGTTAGGC-(BHQ)-3′
PCR增幅產物大小116 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℃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BlackBerry® Quencher (BBQ)標記或Black Hole Quencher® (BHQ®)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：基因改造黃豆轉殖品項MON87751，非基因改造黃豆，或使用衛生福利部食品藥物管理署編號p87751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 µL、20 µL、100 µL、200 µL及1000 µL。

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

2.4.3. 離心管：200 µL 、600 µL、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. 濾膜：孔徑為0.45 µm，nitrocellulose材質。

註3： 使用之塑膠或玻璃器皿均為無DNase污染。

2.5. Real-time PCR溶液之配製(註4)

2.5.1. ABI7900或QS12K鑑別試驗用

5 µM引子F.. 1.25 µL
5 µM引子R.. 1.25 µL
3.3 µM探針P.. 1.7 µL
TaqMan® Universal PCR Master Mix .... 12.5 µL
檢體DNA溶液(總量100 ng) .... 5.0 µL
無菌去離子水.. 3.3 µL
總體積…………………………………………………. 25.0 µL

2.5.2. Roche LightCycler鑑別試驗用

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

總體積……………………………………………...…….. 20.0 µL

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 µL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

採用適用於植物DNA抽取之市售套組，依套組操作說明步驟抽取DNA。抽取之DNA溶液收集至已滅菌之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/µL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2.5.1.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 µL入PCR反應管中，各別加入檢體DNA溶液5 µL，再將PCR反應管置於離心機中，以200 ×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℃	2 min
2. 最初變性	95℃	10 min
3. 變性	95℃	15 sec
4. 黏接、延展	60℃	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 µL

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2.5.2.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 µL於玻璃毛細管中，各別加入檢體DNA溶液5 µL ，再將毛細管置於離心機中，以800 ×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℃	10 min
2. 變性	95℃	5 sec
3. 黏接	60℃	25 sec
4. 延展	72℃	8 sec
步驟2至步驟4，共進行45個循環反應。		
5. 冷卻	35℃	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MON87751基因改造黃豆之基因片段，並確認該檢體中含有轉殖品項MON87751基因改造黃豆。

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，依標的基因及黃豆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MON87751基因改造黃豆含量。檢測檢體中各種轉殖品項基因改造黃豆含量，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MON87751基因改造黃豆含量(%)

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

轉殖品項MON87751 之內標比：0.97 (適用於ABI7900)

轉殖品項MON87751 之內標比：1.11 (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複分析，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值若界於36-45時，表示所抽取之檢體含極少量標的DNA；Ct值若界於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. 本檢驗方法之測試範圍係指能夠抽取出DNA 者之食品，經過高度加工或不含DNA 之食品不適用於本檢驗方法。

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 Soybean MON87751 Using Real-time PCR -Validated Method. http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/StatusOfDossiers.aspx.