

**基因改造食品檢驗方法—玉米轉殖品項 EVENT176 (UI: SYN-EV176-9)
之構造特異性定性及定量檢驗**
**Method of Test for Genetically Modified Foods—Construct-specific
Qualitatively and Quantitatively Test of Maize Event EVENT176 (UI:
SYN-EV176-9)**

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 EVENT176 (UI: SYN-EV176-9) 之定性及定量檢驗。
2. 檢驗方法：檢體經 DNA 萃取後，以聚合酶鏈反應(Polymerase chain reaction, PCR)及即時聚合酶鏈反應(Real-time polymerase chain reaction, real-time PCR)檢測之方法。
 - 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、PCR 試劑配製及 PCR 等實驗過程皆需有區隔空間，避免交叉污染。PCR 試劑之配製應於無菌操作台內進行。
 - 2.2. 裝置^(註)
 - 2.2.1. 分光光度計：具波長 260 nm、280 nm。
 - 2.2.2. 旋渦混合器(Vortex mixer)。
 - 2.2.3. 真空乾燥裝置：供 DNA 乾燥用。
 - 2.2.4. 加熱振盪器：具溫控及振盪功能。
 - 2.2.5. 微量冷凍離心機(Micro refrigerated centrifuge)：可達 $20,000 \times g$ ，並具 4°C 溫控功能。
 - 2.2.6. 離心機：供各式微量離心管及 96 孔微量反應盤離心用。
 - 2.2.7. 聚合酶鏈反應器：ABI GeneAmp PCR System 9700，或同級品。
 - 2.2.8. 即時聚合酶鏈反應器：ABI 7900HT Fast Real-Time PCR System，或同級品。
 - 2.2.9. 振盪型粉碎機：Retsch MM 200，或同級品。
 - 2.2.10. 電泳槽：供 DNA 電泳用。
 - 2.2.11. 照相裝置：供拍攝電泳膠片用。
 - 2.2.12. 紫外燈箱：具波長 302 nm、365 nm 紫外燈。
 - 2.2.13. 冷凍設備：具冷藏及凍結功能。
 - 2.2.14. 高壓滅菌釜。
 - 2.2.15. pH 測定儀。
 - 2.2.16. 水浴裝置：溫差 $\pm 1^{\circ}\text{C}$ 以內者。
 - 2.2.17. 天平：最大秤重量為 2,000 g，靈敏度為 0.1 g；最大秤重量為 100

g，靈敏度為 1 mg。

2.2.18. 無菌操作台。

2.2.19. 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。

註：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. 去氧核糖核酸(deoxyribonucleic acid, DNA)抽取用^(註)：溴化十六烷三甲基銨(cetyltrimethylammonium bromide, CTAB)，氯仿，乙醇，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))。

註：氯仿為試藥特級，其餘皆為分子生物分析級試藥。

2.3.2. 聚合酶鏈反應(PCR)用

2.3.2.1. 定性鑑別試驗用引子^(註)

2.3.2.1.1. HMG (供作內部對照基因)

引子 F：HMGF，5'-TTGGCTACATAGGGAGCCTTGT-3'

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

PCR 增幅產物大小 123 bp

2.3.2.1.2. 轉殖品項 EVENT176

引子 F：Event176F，5'-gTg gAC AgC CTg gAC gAg AT -3'

引子 R：Event176R，5'- TgC TgA AgC CAC TgC ggA AC -3'

PCR 增幅產物大小 106 bp

2.3.2.2. 定性確認試驗用及定量試驗用引子及探針^(註)

2.3.2.2.1. HMG (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)-CAATCCACACAAACGCACGCGTA-XT-PH-3',
(X=TAMRA)

PCR 增幅產物大小 123 bp

2.3.2.2.2. 轉殖品項 EVENT176

引子 F：Event176F，5'-gTg gAC AgC CTg gAC gAg AT -3'

引子 R：Event176R，5'- TgC TgA AgC CAC TgC ggA AC -3'

探針 P：Event176P，
5'-(FAM)- AAC AAC AAC gTg CCA CCT CgA CAg gT-XT-
PH-3', (X=TAMRA)
PCR 增幅產物大小 106 bp

註：合成之引子及探針，拆封後，以無菌純水稀釋成適當濃度，分裝後置於-20℃貯存備用，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。

2.3.2.3. 去氧核苷三磷酸 (deoxyribonucleoside triphosphate, dNTP)

含去氧腺苷三磷酸(deoxyadenosine triphosphate, dATP)，去氧胞苷三磷酸(deoxycytidine triphosphate, dCTP)，去氧鳥糞嘌呤三磷酸(deoxyguanosine triphosphate, dGTP)及去氧胸苷三磷酸(deoxythymidine triphosphate, dTTP)各 2.5mM 之溶液。

2.3.2.4. 聚合酶

Taq DNA polymerase (2 U/μL)，或同級品。

2.3.2.5. TaqMan Universal PCR Master Mix (適用於 ABI 7900)

內含 PCR 所需去氧核苷三磷酸、聚合酶等試劑，使用者僅需自行添加引子、探針及待測檢體 DNA 即可。

2.3.3. 電泳用試藥：溴化乙錠(ethidium bromide)、瓊膠(agarose)、溴酚藍(bromophenol blue)、二甲苯藍(xylene cyanol FF)、甘油、硼酸，均採分子生物分析級試藥。DNA 分子量標記物質 (DNA molecular weight marker)：100-bp DNA Ladder Marker。

2.3.4. 基因改造玉米參考物質：轉殖品項 EVENT176 基因改造玉米，或使用行政院衛生署食品藥物管理局編號 pTFDAM2 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 1)

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

2.4.2. 電泳膠片製作盤。

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

2.4.4. 附隔離塞吸管尖頭(Aerosol barrier pipette tips)：10 μL、20 μL、40 μL、200 μL 及 1000 μL，或具同樣功能之同級品。

2.4.5. 離心管：200 μL、600 μL、1.5 mL 及 2 mL。

2.4.6. PCR 反應管：定性用，200 μL 及 500 μL。

2.4.7. PCR 反應管：定量用，200 μL。

2.4.8. 玻璃或塑膠瓶：50 mL、100 mL、250 mL、500 mL、1000 mL 及

2000 mL。

2.4.9. 塑膠離心管：50 mL。

2.4.10. 過濾膜：孔徑為 0.45 μm ，材質為 nitro-cellulose。

註 1：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(含 CTAB 20.0 g/L，1.4 M NaCl，0.1 M Tris/HCl，20.0 mM EDTA)

稱取氯化鈉 81.8 g、Tris 12.1 g 及 $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ 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 1N 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(含 CTAB 5.0 g/L，0.04 M NaCl)

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. 1.2M NaCl 溶液

稱取氯化鈉 70.1 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. 5 倍 TBE (Tris-borate-EDTA) 緩衝溶液

稱取三羥甲基氨基甲烷 54.0 g、硼酸 27.5 g 及 0.5 M pH 8.0 EDTA 溶液 20 mL，加水溶解後定容至 1000 mL，供作 5 倍 TBE 緩衝溶液。臨用前以水稀釋為 0.5 倍。

2.5.5. 2% 膠片

稱取瓊膠 2.0 g，加入 0.5 倍 TBE 緩衝溶液 100 mL，加熱攪拌至瓊膠完全溶解，適當冷卻後，倒入電泳膠片製作盤，並置入適當之尺梳，待膠片凝固後，即可使用。

2.5.6. 6 倍載入膠片緩衝溶液(6 $\times$ gel loading buffer)

稱取溴酚藍 25.0 g、二甲苯藍 0.25 g 及量取甘油 30 mL，加入無菌水使成 100 mL，並置於 4°C 冰箱貯存備用。

2.5.7. 膠片染液

稱取溴化乙錠 0.1 g，加水 10 mL 溶解，供作原液(含溴化乙錠 10 mg/mL)，使用前需以水稀釋成含溴化乙錠 1 $\mu\text{g/mL}$ 。溴化乙錠為致癌物質，配製時應注意安全。

2.5.8. PCR 溶液^(註)

2.5.8.1. 定性鑑別試驗用

10 倍 PCR 緩衝溶液(含 15 mM MgCl_2).....	2.5 μL
Taq DNA polymerase (2U/ μL).....	1.0 μL
2.5 mM dNTP.....	4.0 μL
10 μM 引子 F	1.0 μL

10 μ M 引子 R	1.0 μ L
模版 DNA 溶液 (總量 100 ng).....	5.0 μ L
無菌純水.....	10.5 μ L
總體積.....	25.0 μ L

2.5.8.2.ABI 7900HT Fast Real-Time PCR System 定性確認試驗用或定量試驗用

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	1.7 μ L
TaqMan Universal PCR Master Mix	12.5 μ L
模版 DNA 溶液 (總量 100 ng).....	5.0 μ L
無菌純水.....	3.3 μ L
總體積.....	25.0 μ L

註：以上溶液應置於冰浴中配製。估算一般 PCR 溶液之配製總量時，需超所需量的 10%。

2.6. 標準曲線之製作^(註)

2.6.1. 取參考質體原液，作為參考物質。以無菌純水進行系列稀釋成每 5.0 μ L 中各含 20 拷貝數、80 拷貝數、1,280 拷貝數、20,480 拷貝數及 1,310,720 拷貝數等五種濃度。

2.6.2. 採用轉殖品項標的基因(target gene)與玉米內部對照基因(internal control gene)各自獨立製作 2.6.1.節五種濃度，每種濃度需進行三重複試驗，並以儀器計算後之結果進行線性迴歸分析並製作標準曲線，惟每種濃度於三重複分析後，出現偏離現象時，應將該偏離之數據捨棄，但必須每個濃度皆有一組以上之代表數據存在，始可進行標準曲線之計算分析。

註：20 拷貝數之相對 Ct 值為 36 cycles、80 拷貝數之相對 Ct 值為 34 cycles、1,280 拷貝數之相對 Ct 值為 30 cycles、20,480 拷貝數之相對 Ct 值為 26 cycles、1,310,720 拷貝數之相對 Ct 值為 20 cycles。

2.7. 檢體 DNA 之製備

2.7.1. 檢體之處理^(註)

檢體為乾燥玉米粒或粉（碎）狀玉米者，可直接以粉碎機研磨成細粉。檢體為溼狀玉米或玉米加工品，經冷凍乾燥處理後，再以粉碎機研磨成細粉備用。檢體需貯存於乾燥及冷凍環境中。

註：1. 粉碎機建議採用振盪型粉碎機為宜。

2. 研磨檢體時應於區隔之空間進行，避免交叉污染。

3. 溼（液）狀檢體之乾燥時間可視乾燥程度調整。

2.7.2. DNA 之抽取^(註)

- 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 30 分鐘。
- 2.7.2.4. 以 14,000 g 離心 10 分鐘。
- 2.7.2.5. 取上層液注入另一 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 14,000 g 離心 10 分鐘。
- 2.7.2.8. 取上層液注入另一 2 mL 離心管。
- 2.7.2.9. 加入二倍體積之 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 14,000 g 離心 20 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 14,000 g 離心 10 分鐘使分層。
- 2.7.2.16. 取上層液注入另一 1.5 mL 離心管。
- 2.7.2.17. 加入 0.8 倍體積之異丙醇，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 14,000 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 14,000 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：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. 檢體需貯存於乾燥及冷藏環境中。

2.7.3. DNA 濃度測定及純度判斷

- 2.7.3.1. 檢體 DNA 溶液於使用前自冷凍庫中取出，於室溫下進行溶解。
- 2.7.3.2. 取適當量之 DNA 溶液以無菌純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 O.D.₂₆₀ 乘以 50 ng/ μ L 即為 DNA 溶液之濃度。計算 O.D.₂₆₀ / O.D.₂₈₀ 比值，其比值應介於 1.7~2.0 間。

2.8. 定性鑑別試驗^(註)

2.8.1. PCR 操作步驟

以無菌純水適當稀釋 DNA 溶液、引子備用。取 PCR 反應管，並依照 2.5.9.1. 節配製 PCR 溶液，依序加入無菌純水、10 倍 PCR 緩

衝液、dNTP、引子、DNA polymerase 及 DNA 溶液，混合均勻後，將反應管置於離心機瞬間離心，使混合液聚積於反應管之底部。移入 PCR 反應器，依據引子類別並參照 2.8.2.節設定反應條件，進行反應，結束後，取出 PCR 增幅產物，進行電泳分析。

2.8.2 PCR 條件

2.8.2.1 HMG 基因、轉殖品項 EVENT176

步驟	溫度	時間
1. 最初變性	95°C	3 min
2. 變性	95°C	1 min
3. 黏接	60°C	1 min
4. 延展	72°C	1 min
步驟 2 至步驟 4，共進行 45 個循環反應。		
5. 最終延展	72°C	7 min

2.8.3. 膠片電泳分析

取適量之 6 倍載入膠片緩衝溶液，分別與無菌純水(空白組)及 PCR 增幅產物混合均勻，注入 2%膠片孔中，以 50 或 100 伏特電壓進行電泳。同時，必須取 DNA 分子量標記物質進行電泳，作為 PCR 增幅產物大小之判別與計算依據。經電泳後之膠片置入膠片染液中進行染色約 15 分鐘，續置入水中漂洗及褪染，再置於紫外燈箱上，以波長 365 nm 之紫外光照射觀察是否有明顯之 DNA 螢光帶，並判讀結果。每次實驗必須同時測試正反應及負反應對照組。

2.8.4. 定性鑑別

檢體 DNA 之電泳結果，須與正反應對照組及 DNA 分子量標記物質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，即判定該檢體含有該測試轉殖品項 EVENT176 基因改造玉米。

- 註：1. PCR 定性鑑別試驗結果之判讀係以 PCR 增幅產物大小判定，當測試結果判讀困難時，建議進行確認試驗。
2. 檢體 DNA 之抽取與製備，其純度將直接影響後續 PCR 測試結果，建議抽取之檢體 DNA 可先進行玉米內部對照基因 PCR 測試，以確定是否含有 DNA 及其純度。

3. 本 PCR 定性鑑別反應條件係採 ABI GeneAmp PCR System 9700 設定之，若使用其他機型，應自行檢討反應條件。

2.9. 定性確認試驗：本實驗視需要而操作之。

2.9.1. 即時聚合酶鏈反應操作步驟及條件

2.9.1.1. ABI 7900HT Fast Real-Time PCR System

以無菌純水適當稀釋檢體 DNA 溶液、引子及探針備用。取適量無菌純水，並依照 2.5.8.2. 節配製 PCR 溶液，依序加入 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，再各別加入稀釋過之檢體 DNA 溶液 5 μ L，最後將 PCR 反應管置於離心機中，以 1200 rpm 瞬間離心，移入即時聚合酶鏈反應器，依下列條件進行反應。每次實驗皆須製作負反應及正反應對照組。

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 (Mode)：9600 Emulation

設定反應體積 (Sample Volume)：25 μ L

2.9.2. 定性確認

檢體 DNA 之螢光分析結果須與正反應對照組螢光分析結果進行相互比對，當檢體 DNA 與正反應對照組之 PCR 螢光分析結果，皆出現經由探針所產生之螢光增幅曲線，即確認該 PCR 增幅產物為該測試轉殖品項 EVENT176 基因改造玉米之基因片段，可確認該檢體中含有該測試轉殖品項 EVENT176 基因改造玉米。

2.10. 定量試驗^(註)

2.10.1. 即時聚合酶鏈反應操作步驟及條件

2.10.1.1. ABI 7900HT Fast Real-Time PCR System

同 2.9.1.1. 節操作步驟及條件，惟每次實驗皆須製作標準曲線、負反應及正反應對照組。

2.10.2. 計算

檢體經定量分析後，依據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，即所謂檢體中轉殖品項 EVENT176 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。

2.10.2.1. 計算公式

檢體中轉殖品項 EVENT176 基因改造玉米含量 %

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

2.10.2.2. 轉殖品項之內標比

EVENT176.....0.47 (適用於 ABI 7900)

- 註：1. 每件檢體建議測試二種稀釋濃度，如稀釋 1:40 及 1:100，每種濃度亦需進行二重覆分析，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 threshold cycle value (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 應進一步稀釋或再純化，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. ABI 7900 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. 本檢驗方法之最低檢測濃度為 0.1% (以乾重計)。
6. 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。