

**基因改造食品檢驗方法—玉米轉殖品項 MIR604 (UI: SYN-IR6Ø4-5)
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 MIR604 (UI: SYN-IR6Ø4-5)**

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 MIR604 (UI: SYN-IR6Ø4-5)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 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 20,000 × 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：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)- CAATCCACACAAACGCACGCGTA -XT-PH-3',
(X=TAMRA)

PCR 增幅產物大小 123 bp

2.3.2.1.2. 轉殖品項 MIR604

引子 F：MIR604EF，

5'- GTTGCGGTTCTGTCAGTTCCA -3'

引子 R：MIR604ER，

5'- CGCACGCAATTCAACAGAAG -3'

探針 P：MIR604EP，

5'-(FAM)- CGTGACTCCCTTAATTCTCCGCTCATGA -XT -
PH-3', (X=TAMRA)

PCR 增幅產物大小 130 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 6-carboxytetramethyl-rhodamine (TAMRA)標記。

2.3.2.2. TaqMan Universal PCR Master Mix (適用於 ABI 7900HT Fast Real-Time PCR System)

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 MIR604，非基因改造玉米，或使用衛生福利部食品藥物管理署編號 pMIR604 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：ABI 7900HT Fast Real-Time PCR System 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(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 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 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 70.2 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.ABI 7900HT Fast Real-Time PCR System 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

2.5.4.2.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^(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 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 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 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 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 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 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/ μL 及稀釋倍數，即為檢體 DNA 原液濃度。DNA 溶液純度則以 $\text{O.D.}_{260}/\text{O.D.}_{280}$ 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 — ABI 7900HT Fast Real-Time PCR System

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 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 $200 \times g$ 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 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 2.5.4.2.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 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 $800 \times g$ 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 MIR604 基因改造玉米之基因片段，並確認該檢體中含有轉殖品項 MIR604 基因改造玉米。

2.9. 定量試驗^(註 8)

2.9.1. Real-time PCR 操作步驟及條件

ABI 7900HT Fast Real-Time PCR System

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 MIR604 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 MIR604 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 MIR604 之內標比：0.48 (適用於 ABI 7900)

- 註 8：
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 Real-time PCR 定量試驗係採 ABI 7900HT Fast Real-Time PCR System 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。