

**基因改造食品檢驗方法—玉米轉殖品項 Event3272 (UI: SYN-E3272-5) 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 Event3272 (UI: SYN-E3272-5)**

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 Event3272 (UI: SYN-E3272-5)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)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 65°C 溫控及振盪功能。
 - 2.2.5. 微量冷凍離心機(Micro refrigerated centrifuge)：可達 20000 × 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 PRISM[®] 9700 Sequence Detector，或同級品。
 - 2.2.8. 即時聚合酶鏈反應器：ABI 7900 HT 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. 酸鹼度測定儀(pH meter)。
 - 2.2.16. 水浴裝置：溫差±1°C 以內者。
 - 2.2.17. 天平：最大秤重量為 2000 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：溴化十六烷三甲基銨(cetyltrimethylammonium bromide, CTAB)、氯仿、乙二銨四乙酸二鈉(ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt, Na₂-EDTA)、異丙醇、氯化鈉、鹽酸及三羥甲基氨基甲烷(tris(hydroxymethyl)aminomethane, Tris-base)均採試藥級，乙醇(99.9%)採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 Event3272

引子 F：Event3272F,

5'-AAAAGAACCCGATCGACAGGAT-3'

引子 R：Event3272R,

5'-CCAGTAGAACGCCTGCATGAT-3'

PCR 增幅產物大小 137 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 Event3272

引子 F：Event3272F,
5'-AAAAGAACCCGATCGACAGGA T-3'
引子 R：Event3272R,
5'-CCAGTAGAACGCCTGCATGAT-3'
探針 P：Event3272P,
5'-(FAM)-TGCGAGCGCCACCAGCGCTTAGTACCT-XT-PH-
3', (X=TAMRA)
PCR 增幅產物大小 137 bp

註：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。

2.3.2.3. 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 2.5 mM 之溶液。

2.3.2.4. 聚合酶

Taq DNA polymerase (2 U/μL)，內附 10 倍含 15 mM 氯化鎂之 PCR 緩衝溶液，或同級品。

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

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

2.3.3. 電泳用：溴化乙錠(ethidium bromide)、溴酚藍(bromophenol blue)、二甲苯藍(xylene cyanol FF)、乙二胺四乙酸二鈉(ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt, Na₂-EDTA)、三羥甲基氨基甲烷(tris(hydroxymethyl)aminomethane, Tris)、氫氧化鈉及硼酸採試藥級。瓊膠(agarose)及甘油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 Event3272 基因改造玉米，或使用行政院衛生署食品藥物管理局編號 pE3272 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 μ L、20 μ L、100 μ L、200 μ L 及 1000 μ L。
- 2.4.2. 電泳膠片製作盤。
- 2.4.3. 吸管尖頭(Pipette tips)：10 μ L、20 μ L、200 μ L 及 1000 μ L。
- 2.4.4. 附隔離塞吸管尖頭(Aerosol barrier pipette tips)：10 μ L、20 μ L、40 μ L、200 μ L 及 1000 μ L。
- 2.4.5. 離心管：200 μ L、600 μ L、1.5 mL 及 2 mL。
- 2.4.6. PCR 反應管：定性用，200 μ L 及 500 μ L。
- 2.4.7. PCR 反應管：定量用，200 μ L。
- 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. 濾膜：孔徑 0.45 μ m，nitro-cellulose 材質。

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：

稱取氯化鈉 81.8 g、三羥甲基氨基甲烷 12.1 g 及乙二胺四乙酸二鈉 7.4 g，加去離子水約 700 mL，持續攪拌助溶，再加入溴化十六烷三甲基銨 20.0 g，使其完全溶解，以 1N 鹽酸溶液調整 pH 值為 8.0，再加去離子水使成 1000 mL，經 121°C 滅菌 15 分鐘後冷卻備用。

2.5.2. CTAB 沉澱溶液：

稱取溴化十六烷三甲基銨 5.0 g 及氯化鈉 2.3 g，加去離子水溶解使成 1000 mL，經 121°C 滅菌 15 分鐘後冷卻備用。

2.5.3. 1.2M 氯化鈉溶液：

稱取氯化鈉 70.1 g，加去離子水溶解使成 1000 mL，經 121°C 滅菌 15 分鐘冷卻後備用。

2.5.4. 1N 鹽酸溶液：

量取鹽酸 8.33 mL，緩緩加入去離子水 50 mL 中，再加去離子水使成 100 mL。

2.5.5. 0.5M 乙二胺四乙酸(EDTA)溶液

稱取乙二胺四乙酸二鈉 186.1 g，加去離子水 800 mL 溶解，再加入

氫氧化鈉 20 g 以調整 pH 值至 8.0，並加去離子水使成 1000 mL。

2.5.6. 70%(v/v)乙醇溶液：

量取乙醇 35 mL，加入無菌去離子水使成 50 mL。

2.5.7. 0.5 倍 TBE (Tris-borate-EDTA) 緩衝溶液

稱取三羥甲基氨基甲烷 54 g 及硼酸 27.5 g，加入 0.5M EDTA 溶液 20 mL，再加水溶解使成 1000 mL，供作 5 倍 TBE 緩衝溶液，或使用市售 5 倍 TBE 緩衝溶液。臨用時以去離子水將 5 倍 TBE 緩衝溶液稀釋為 0.5 倍，作為 0.5 倍 TBE 緩衝溶液。

2.5.8. 2%膠片

稱取瓊膠 2 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。

2.5.9. 6 倍載入膠片緩衝溶液(6 × gel loading buffer)

稱取溴酚藍 25 g 及二甲苯藍 0.25 g，加甘油 30 mL，再加無菌去離子水使成 100 mL，置於 4℃ 冰箱貯存備用。

2.5.10. 膠片染液

稱取溴化乙錠 0.1 g，加水 10 mL 溶解，供作原液(10 mg/mL)，使用前以水稀釋成 1 µg/mL。溴化乙錠為致癌物質，配製時應注意安全。

2.5.11. PCR 溶液：^(註)

2.5.11.1. 定性鑑別試驗用：

10 倍含 15 mM 氯化鎂之 PCR 緩衝溶液.....	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 µM 引子 R	1.0 µL
模版 DNA 溶液(20 ng/µL)	5.0 µL
無菌去離子水.....	10.5 µL
總體積.....	25.0 µL

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

5 µM 引子 F.....	1.25 µL
----------------	---------

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
模版 DNA 溶液(20 ng/ μ L)	5.0 μ L
無菌去離子水	3.3 μ L
總體積	25.0 μ L

註：以上溶液應置於冰浴中配製。

2.6. 標準曲線之製作^(註)

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)及玉米內部對照基因(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：20、80、1280、20480 及 1310720 拷貝數之相對 Ct 值(threshold cycle value)分別為 36、34、30、26 及 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，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：1. 研磨檢體時應於區隔之空間進行，避免交叉污染。

2. 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)

稱取檢體 200 mg 置於 2 mL 離心管。加入 CTAB 抽取緩衝液 1 mL，以旋渦混合器混合均勻後，於 65°C 振盪反應 30 分鐘，再以 14000 g 離心 10 分鐘。取上層液，移入另一 2 mL 離心管，加入氯仿 400 μ L，以旋渦混合器混合 30 秒鐘，再以 14000 g 離心 10 分鐘。取上層液，移入另一 2 mL 離心管，加入二倍體積之 CTAB 沉澱溶液，以反覆翻轉方式溫和混合，室溫靜置 60 分鐘。以 14000 g 離心 20 分鐘，去除上層液，加入 1.2 M 氯化鈉溶液 350 μ L 溶解沉澱物，再加入氯仿 350 μ L，以旋渦混合器混合 30 秒鐘。以 14000 g 離心 10 分鐘，取上層液，移入另一 1.5 mL 離心管，加入 0.8 倍體積之異丙醇，以反覆翻轉方式溫和混合，於 4°C 靜置至少 30 分鐘以沉澱 DNA，或靜置隔夜。於 4°C 以 14000 g 離心 30 分鐘。去除上層液，加入 70%乙醇溶液 500 μ L 清洗 DNA 沉澱物，再於 4°C 以 14000 g 離心 10 分鐘。去除上清液，以微量吸管吸除殘餘之乙醇溶液。置於真空乾燥裝置中，將 DNA

乾燥。乾燥之 DNA 以無菌去離子水 30 μ L 溶解，於-20 $^{\circ}$ C 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 濃度測定及去離子度判斷

檢體 DNA 溶液於使用前自冷凍庫中取出，於室溫下解凍。取適量 DNA 溶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 乘以 50 ng/ μ L 及稀釋倍數，即為 DNA 溶液之濃度。DNA 溶液純度則以 O.D.₂₆₀ / O.D.₂₈₀ 比值，其比值應介於 1.7~2.0。

2.8. 定性鑑別試驗^(註)

2.8.1. PCR 操作步驟

以無菌去離子水適當稀釋 DNA 溶液、引子備用。取 PCR 反應管，依 2.5.11.1. 節配製 PCR 溶液，依序加入無菌去離子水、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

HMG 基因、轉殖品項 Event3272

步驟	溫度	時間
1. 最初變性	95 $^{\circ}$ C	3 min
2. 變性	95 $^{\circ}$ C	1 min
3. 黏接	60 $^{\circ}$ C	1 min
4. 延展	72 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ 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，分別與無菌去離子水(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。同時另取 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。電泳後之膠片置於膠片染液 15 分鐘後，於水中漂洗及褪染，再以紫外燈照射觀察是否有明顯之 DNA 螢光帶，並判讀結果。另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 PCR 增幅產物電泳結果，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，即判定該檢體含有轉殖品項 Event3272 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，應進行確認試驗。
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 PRISM® 9700 Sequence Detector 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

ABI 7900 HT Fast Real-Time PCR System

以無菌去離子水適當稀釋檢體 DNA 溶液、引子及探針備用。取適量無菌去離子水，依 2.5.11.2.節配製 PCR 溶液，依序加入 Master Mix、稀釋之引子及探針，混合均勻後，分裝 20 μ L 於 PCR 反應管中，各別加入稀釋之檢體 DNA 溶液 5 μ L，將 PCR 反應管置於離心機中，以 1200 rpm 離心 2 分鐘，再移入即時聚合酶鏈反應器，依下列條件進行反應。另同時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：9600 Emulation

設定反應體積：25 µL

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 增幅產物為轉殖品項 Event3272 基因改造玉米之基因片段，並確認檢體中含有轉殖品項 Event3272 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

ABI 7900 HT Fast Real-Time PCR System

依 2.9.1.1. 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。

2.10.2. 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 Event3272 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 Event3272 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 Event3272 之內標比：0.42 (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。