

35-1

高雄區農技報導

【第三十五期之1】

中華民國九十年三月 發行單位

行政院農業委員會
高雄區農業改良場

基因改造食品檢測方法之簡介

生物技術室：黃文理



利用基因槍轉殖方法獲得基因改造水稻(資料引自洪, 1997)

基因改造食品檢測方法之簡介

生物技術室：黃文理

一、緒言

七〇年代植物育種學家利用雜交方法，將半矮性基因導入水稻中，大幅提高水稻產量，史稱第一次綠色革命。近年來利用基因工程技術，將各種有利基因轉殖入作物中，藉以提高產量，解決日益嚴重糧食不足問題，在邁入廿一世紀的此刻，已被期許為第二次綠色革命。

所謂基因改造生物體(Genetically Modified Organisms, GMO)係指利用遺傳工程或分子生物技術，對生物基因層次上進行修改或重組，並使之增殖，以達到某種特定目標，如增加抗病、抗蟲、抗逆境能力、改良營養價值、促進生長、延長保存期限.....等等，均可稱之為基因改造生物體。其中包括微生物、植物、及動物。而利用GMO為原料，加工製成的食品或食品添加物即稱為基因改造食品(Genetically Modified Food, GMF)。到目前為止，估計有超過五十種以上基因改造作物已正式商業化生產，主要栽培的有超過廿種以上，包括大豆、玉米、馬鈴薯、蕃茄、棉花，及油菜等作物(表一)。至一九九九年為止，全世界GMO作物種植面積已超過四千萬公頃，且每年仍持續增加中，主要分佈在美洲地區，據統計，在美國約有65%大豆、48%棉花、

37%玉米、及35%油菜均是基因轉殖作物。

一般而言，經由基因改造技術，可讓生產者獲得更高產量、提昇產品品質、減少農藥及肥料施用，以減少對生態環境造成之污染。雖然GMO具有極高發展潛力，惟近年來有關基因改造食品的問題，在國內外均引起相當多爭議，其中包括對環境生態可能的衝擊、對人體健康可能的影響、GMO是否必須明白標示、是否違反自然演化、及相關農產品可能引發的國際貿易問題等等。國內環境品質文教基金會於八十九年委託香港DNA晶片實驗室進行國內市售食品GMO偵測，第一批報告指出，在十六件市售豆類及玉米製品中，有高達十一件檢驗出含基因改造成分；第二批報告中也指出，在幾個大型連鎖速食店販售之漢堡麵包及雞塊中，乃至速食麵中，均檢出含有基因改造成分，這兩份報告馬上引起政府機關及國人高度重視與討論。此外，去年度國內外銷日本的毛豆，外銷前日方也首度要求我方提供毛豆樣品進行GMO檢測，確定未含基因改造成分後，才准予進口。綜合上述，姑且不論GMO食品是否對人體健康造成影響(仍有待更多更詳細評估)，基於消費者知的權利及可能衍生的貿易問題，建立一套正確、穩定、且有效率GMO食品檢測方法，的確是政府當務之急；而一般民衆也應對

表一、已上市基因轉殖作物之現況(資料引自潘子明,2000)

作物種類*	研發國家(研發企業)	主要銷售國家
不易腐爛蕃茄	美國(Calgene)	美國、加拿大、英國、日本
含高亮果膠蕃茄	美國(Zeneca)	美國、英國
抗殺草劑大豆	美國(Monsanto)	美國、歐盟、日本
含高量油酸大豆	美國(Du pont)	美國
抗殺草劑玉米	美國(Dekalb)	美國
抗殺草劑玉米	美國(Agr Evo)	美國、日本
抗害蟲(蛾類)玉米	美國(Northrup King)	美國、日本
抗害蟲(蛾類)玉米	美國(Ciba Seeds)	美國、加拿大、歐盟、日本
抗害蟲(蛾類)玉米	美國(Monsanto)	美國、日本
抗害蟲(蛾類)及殺草劑玉米	美國(Monsanto)	美國
耐甲蟲類馬鈴薯(2種)	美國(Monsanto)	美國、日本
抗病毒美國絲瓜(2種)	美國(Asgrow)	美國
抗殺草劑油菜	加拿大(Monsanto)	美國、加拿大、日本
抗殺草劑油菜(3種)	加拿大(Agr Evo)	美國、加拿大、日本
抗殺草劑油菜(5種)	加拿大(PGS)	美國、加拿大、日本
含高量月桂酸油菜	美國(Calgene)	美國、加拿大
抗殺草劑棉花	美國(Calgene)	美國、澳洲、日本
抗殺草劑棉花	美國(Monsanto)	美國、澳洲、日本
耐害蟲(蛾類)棉花	美國(Monsanto)	美國、澳洲、日本
可變色康乃馨	澳洲(Florigene)	澳洲、日本
具雄不孕性菊苣	比利時(PGS)	美國、歐盟

*以種苗及植物體出售之農作物

GMO食品有較正確認知。完備的檢測方法是GMO食品進行標示管制之基礎，本報告即針對數種目前最廣泛使用之GMO食品檢測方法作一介紹。

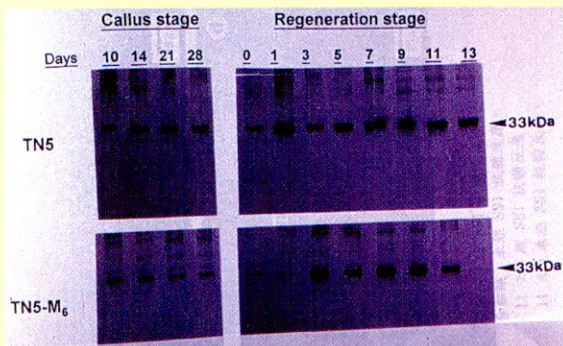
二、基因改造食品之檢驗方法

目前基因改造食品之檢驗方法主要分為三大類，第一類以核酸分析為基礎，如聚合酵素鏈反應法(polymerase chain reaction, PCR)分析；第二類是以蛋白質為基礎之方法，如酵素連結免疫吸附分析法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)及西方墨點分析法(Western blot analysis)；第三類是以酵素活性測定為基礎之方法。各種分析方法各有其優劣點及特異性，若是一般新鮮材料之檢測，各分析方法均可適用；而加工後之產品蛋白質可能已變性，不適合以酵素活性方法檢測。某些高度加工食品，DNA片段可能已斷裂成小片段，亦不宜以PCR方法偵測之。此三類方法，以PCR分析法應用最普遍，ELISA與西方墨點法次之，各分析方法之比較如表二。

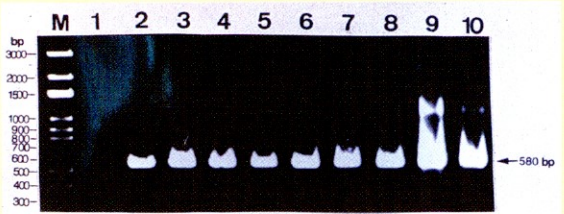
表二、GMO食品各檢驗方法之比較
(資料引自蘇遠志,2000;潘子明,2000)

	PCR	ELISA	Western blot
檢測對象	DNA	蛋白質	蛋白質
檢測工具	DNA引子	抗體	抗體
樣品之干擾	較高	較低	較低
靈敏度	0.01%-0.1%	0.5%-1%	0.25%-1%
檢測項目之多樣化	適合	不適合	不適合
大量篩選	適合	適合	不適合
定量	適合	適合	不適合
限制	高度加工不適合	蛋白質變性	蛋白質變性

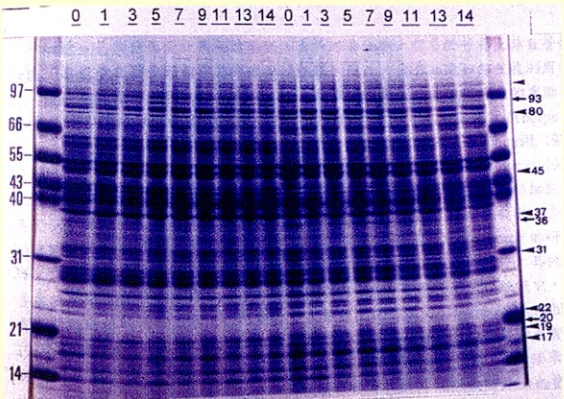
由於進行微量分析時，因取樣造成的誤差有時可能比樣品間實際差異顯著，因此，要得到具代表性的樣品，是非常重要且困難的。取樣工作的優劣，可能直接影響分析數據的再現性，因此取樣分析前，一定要先瞭解整批材料的特性及同質度，再依循檢測方法本身之靈敏度，以科學性、統計性的取樣方法(如樣品大小、取樣程序)進行取樣，以確保檢驗結果的可靠性。



利用西方墨點法檢視特定蛋白質。圖中33KDa條帶為蔗糖轉化酵素。



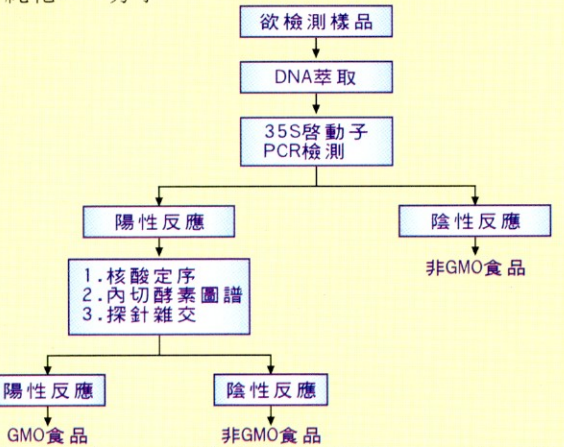
利用PCR方法檢測基因改造植物。圖中580bp條帶位置為npt11基因片段。



利用SDS-PAGE蛋白質電泳方法檢視細胞中可溶性蛋白質圖譜。

(一)聚合酵素鏈反應法(PCR)分析

PCR是一種以酵素方法增殖特定核酸序列的技術，主要步驟是利用90°C以上高溫，讓DNA雙股螺旋變性分開(denaturation)，隨著溫度逐漸下降，事先加入反應液特定序列引子(primer)會和樣品中相同或相似核酸序列結合(oligonucleotide annealing)，藉由DNA聚合酵素作用，使此一特定DNA片段增殖、延伸(DNA polymerase extension)，重複此一程序，一般約進行30-40次循環。利用PCR技術可將特定DNA片段快速增殖、放大，再以洋菜膠(agarose)電泳分析，觀察序列長短特異性。由此可知，PCR檢測方法成功與否，有兩個重要因子，首先是要能瞭解插入GMO中外來基因之構造及序列，以作為引子設計的依據，其次是欲檢測之樣品，必須能有效萃取純化DNA分子。



圖一、GMO食品PCR檢測法操作流程(改寫自Huebner等人,1999)

PCR分析法檢測GMO之操作流程如圖一所示。

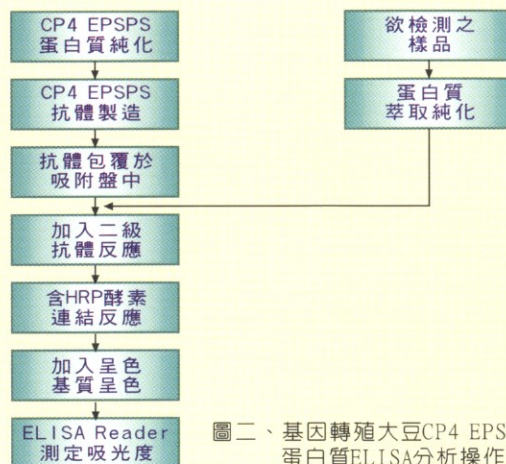
分析者可依據改造基因之調控基因(如啟動子、促進子)、結構基因(structural genes)、或終止子(terminator)序列設計引子，用以鑑別產品，雖然目前轉殖基因種類非常多，但花椰菜嵌紋病毒(CaMV)35S啟動子及胭脂仙人掌藍伊紅合成酵素終止子(nopaline synthase gene, NOS terminator)是最普遍被構築的序列，約有近半數已上市轉殖作物中含有這兩段序列，因此也是最適合用來作為初步PCR檢測引子之設計。經初步PCR檢測後呈現陽性反應(positive response)者，應再進一步利用核酸定序、限制性核酸內切酵素圖譜分析、或特定序列探針雜交分析，若依然呈現陽性反應者，才可確定為GMO食品；反之，應歸類為非GMO食品。

(二)特定蛋白質之偵測

某些種類GMO食品，由於成分中DNA含量過少或斷裂成太小片段，無法以檢驗基因的方式(PCR方法)進行偵測，食品中的蛋白質便可成為檢驗的目標物，常用的有酵素連結免疫吸附分析(ELISA)與西方墨點分析(Western blot)兩種方法。此方法成功與否取決於抗體的生產及分析的方式兩部分，抗體的優劣取決於對目標蛋白質(抗原)親和性及專一性高低及有效價(titer)；分析的方式部分，若是利用蛋白質電泳法將蛋白質分子先行分離，將其轉印(blotting)至PVDF膜上，加入抗體與目標蛋白質結合後，利用特殊酵素和上述結合體形成錯合物，再加入呈色基質使之顯色，此方式稱為西方墨點法。若是在吸附盤(plate)中，利用蛋白質與帶有特殊酵素的二級抗體結合，再加入呈色基質，使之呈色，即是所謂的ELISA。前者靈敏度高且準確性高，ELISA則是操作簡易且反應快速，可依材料選擇最適當分析方法。

這兩種分析方法，目前普遍應用在基因轉殖大豆抗殺草劑之CP4 EPSPS蛋白質之檢測上，尤其是ELISA分析法，其操作流程如圖二所示。

藉由以上檢測方式之介紹可知，不同檢測方法各有其優劣點與特異性(如表二)，當實際進行檢測時，可依據檢測目的及材料本身選擇最適當且最可靠的檢驗方法。目前為了提高檢測信賴度，許多專家建議ELISA與PCR可配合使用，一個用以篩選，一個用以確認，頗值得操作時參考。



圖二、基因轉殖大豆CP4 EPSPS蛋白質ELISA分析操作流程

三、結論

基因改造技術不是萬能的，但卻是一條可大幅增加作物生產量、降低生產成本、縮短作物育種年限、及減少化學物質對生態環境衝擊，非常有效的途徑，更遑論其對治療遺傳疾病及醫藥上的貢獻。或許不是每個人都同意廿一世紀是生物技術的時代，但不可諱言的，在你我生活周遭，生物科技正一步步與我們發生密切相關。你或許可以選擇拒絕基因改造食品，但身為廿一世紀的你，卻不能不知道基因改造生物體(GMO)及GMO食品的重要性，因為這已是世界潮流，它絕不會因為你我的漠視而減緩發展步伐；相反地，不僅基因改造植物的普遍化，基因改造動物體之實用化，很快的也即將在可預見的數年內發生。

隨著基因工程技術的逐漸成熟與實際應用，接踵而來的是更多的挑戰與考驗，可能包括基因改造食品對人體健康的評估、對生態影響、法律及道德層面的問題、乃至更多相關分析技術突破……等等，一般人對不熟悉的事物總是抱持較負面的想法，甚至加以批評，只是或許你我能做的應不只是批評與反對，如何瞭解此項新科技，並進而思考如何改良以避開它可能引發的負面效應，使之幫助全人類迎接未來的挑戰，增進人類生活福祉，才是較正面且積極的作法。

不論GMO產品是否對人體健康造成影響、GMO食品是否必須加以標示、或是如何標示，第一步工作都是必須區分究竟哪些產品是經過基因改造過的，哪些沒有，因此建立一套鑑定GMO食品的標準方法，絕對是必須且重要的，透過具公信力實驗，將可減低大眾對GMO食品的疑慮與恐慌。國內相關檢測方法及法規，均已逐漸發展中，相信很快也可建立我國GMO食品檢測依據。本報告針對目前世界上各研究室與生技公司最廣泛使用GMO食品檢測方法作一介紹，主要是希望讀者對GMO作物栽培現況與GMO食品檢測有初步認識，也對GMO食品的未來，提供一思考方向。