

## 進口大豆抗嘉磷塞除草劑之測定及其基因特性之探討

袁秋英\* 蔣慕琰

行政院農業委員會 農業藥物毒物試驗所

(接受刊載日期: 中華民國九十年十一月十五日)

台灣消費之大豆主要依賴每年自國外輸入約 200 萬噸之大豆種子, 由零售市場購得之種子大部份具生物活性, 本試驗於溫室播種採購之大豆, 豆株幼苗期噴施嘉磷塞 1.8 kg/ha, 非轉殖株於施藥後三至四日呈現傷害徵狀, 二週內即死亡, 豆株中 35~47% 不受嘉磷塞影響者, 應為抗藥性之轉基因大豆, 本研究以此大豆葉片及種子, 進行 PCR 及 CP4 EPSPS 基因特性之研究。抽取大豆幼葉之 genomic DNA, 由 CaMV 35S promoter 及 NOS terminator DNA 序列設計二個 primers, 行聚合酶鏈鎖反應測定, 煉合反應溫度於 56 至 70 °C 之間, 轉殖株大豆均可產生約 1.8 kb 之單一 DNA 片段, 非轉殖株則無此 DNA 片段, 煉合溫度為 68 °C 條件, template DNA 可偵測極限為 0.1 ng。PCR 產物經接合、轉型反應及定序, 此 1.8 kb PCR 產物係由 35S promoter 之 DNA 片段 (106 bp)、綠體 transit peptide DNA 片段 (220 bp)、全長 CP4 EPSPS DNA (1368 bp) 及 NOS 3' DNA 片段 (102 bp) 組成, 由 Nested PCR 結果, 轉殖株大豆者經四組專一性引子之反應及電泳分析, 分別測得約 680、822、144 及 129 bp DNA 片段, 轉殖株與非轉殖株大豆葉片之 genomic DNA, 以 <sup>32</sup>P-CP4 EPSPS 為探針之南方氏雜合反應, 顯示轉殖株之 genomic DNA, 可辨識二至四個 DNA 片段, 非轉殖株則無此可辨識之 DNA 片段, 轉殖株大豆之葉片、種子、市售之豆漿、豆腐經 35S/CTP-R 及 NOS/EPSPS-3 專一性引子之 PCR 檢測, 分別測得約 144 及 129 bp DNA 片段。

**關鍵字:** 基因改造生物體, 大豆, 嘉磷塞抗藥性, 聚合酶鏈鎖反應, EPSPS。

## Detection and Genomic Characterization of Imported Soybean Resistant to Glyphosate

Chiou-Ing Yuan\* and Mou-Yen Chiang

Taiwan Agricultural Chemicals and Toxic Substances Research Institute, Wufeng, Taichung, Taiwan

(Accepted for publication: November 15, 2001)

Two million tons of soybean are imported annually into Taiwan. Seeds sampled from local shops were found to be mostly viable. We established seedlings in a greenhouse and applied 1.8 kg/ha of glyphosate on the foliage of these plants. Sensitive seedlings showed symptoms of injury in 3~4 days and were killed within two weeks. Glyphosate-resistant seedlings accounted for 35~47% of the original seed samples. We used plants that survived glyphosate treatment for PCR detection and genomic characterization. PCR assay of genomic DNA extracted from soybean leaves, using the CaMV 35S promoter and NOS terminator as primers, produced a 1.8 kb fragment under an annealing temperature between 56 to 70 °C. DNA from soybean leaf at the 0.1 ng level could be detected. DNA sequencing using PCR products showed that the 1.8 kb fragment consisted of 35S promoter (106 bp), chloroplast transit peptide (220 bp), CP4 EPSPS (1368 bp) and NOS (102 bp). The sequence CP4 EPSPS (1368 bp) is comparable to the amino acid sequence listed in the gene bank of NCBI. We designed four specific primer sets for the DNA sequence of glyphosate-resistant soybean; PCR products of 680, 822, 144, and 129 bp were produced using these specific primers. Primer producing a 144 or 129 bp fragment was suitable for the detection of implanted genes from processed products, such as soymilk and Tofu.

**Key words:** GMO, Soybean, Glyphosate-resistant, PCR, EPSPS.

\* Corresponding author.

## 前 言

1999 年全球基因改造生物體 (Genetically Modified Organism, GMO) 之栽種面積已達四千萬公頃，大豆、玉米、棉花及油菜為基因改造之主要作物。此等栽種中之基因產品以抗殺草劑者佔 71%，其餘者為殖入 Bt 基因之抗蟲作物<sup>(1,2)</sup>。目前主要上市之抗殺草劑轉基因大豆為抗嘉磷塞大豆 (Roundup Ready<sup>TM</sup> soybean)。嘉磷塞 glyphosate (N-phosphomethyl glycine) 為臺灣最重要之非選擇性萌後殺草劑，於 1970 年代早期登記使用，其主要作用位置為 shikimic acid 代謝路徑中 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS)，嘉磷塞與受質 phosphoenolpyruvate (PEP) 產生競爭性之抑制且阻止 EPSPS preprotein 運移至葉綠體<sup>(3,4)</sup>，造成苯丙胺酸 (phenylalanine)、酪胺酸 (tyrosine) 及色胺酸 (tryptophan) 三種芳香族胺基酸含量降低，影響蛋白質之生合成，進而抑制植物生長<sup>(4,5)</sup>，達成防除雜草之目的。抗嘉磷塞轉基因大豆為孟山都公司研發之基因工程產品，其利用基因槍技術，將農桿菌 *Agrobacterium* sp. strain CP4 之 EPSPS 基因轉殖於大豆，由於此 CP4 EPSPS 酵素對嘉磷塞之親和性低，且可與其受質 phosphoenolpyruvate (PEP) 緊密結合，使 shikimic acid 路徑正常運作，此轉基因大豆植株，噴施嘉磷塞可正常生長，無任何傷害徵狀<sup>(6)</sup>。

臺灣市售之大豆多為進口，2000 年進口之大豆為 230 萬公噸，其中 88% 來自美國<sup>(7)</sup>，有多少進口大豆為基因改造產品，尚無資料可查。此等基因改造產品對於人類及整個生態環境所造成之利益及可能帶來不良影響之風險，是目前備受關切的問題。基因改造作物之栽種對於傳統農業栽培體系具直接性之衝擊，於單一作物之測定及預估較易執行，此等作物及其產品對於農業生態系及人類之影響屬間接性之衝擊。例如生態環境方面，可能由於基因外流，近親種雜交，造成優勢品系野草化、生物物種單一化、非目標生物之毒害及食物鏈破壞等問題；食品、飼料用基因改造產品之安全問題方面，可能存在表現蛋白質、抗生素抗性基因之毒性及過敏性等問題，不易於短期內測定及預估<sup>(8,9)</sup>。因此，基因改造作物及其相關產品標準鑑定方法及標示制度之建立，為當前進口農產品檢測之重要課題。目前世界各國已進行基因改造產品以 DNA 及蛋白質為基礎之篩選及鑑定方法的建立，由於目前之轉基因大豆及玉

米等作物大部份利用 35S 啟動子、NOS 終結子及標的基因構築者，因此於歐盟各國建立之 DNA 定性分析，以 35S 啟動子及 NOS 終結子設計引子，先進行篩選式 PCR 檢測，再以標的基因設計引子，進一步以 PCR 技術確認之<sup>(10-13)</sup>，行政院衛生署藥檢局已由 Fluka Chemical 公司購得 0~5% (w/w) GM 大豆，並以文獻之 35S、NOS 及 EPSPS DNA 片段為引子，進行 PCR 測定之研究<sup>(14)</sup>。本研究針對抗嘉磷塞轉基因大豆進行抗藥特性、CP4 EPSPS 基因定序、PCR DNA 產物鑑定及大豆轉基因植株之南方氏雜合反應等 DNA 之定性分析，進而專一性檢測及鑑定大豆及其相關之加工產品。

## 材 料 與 方 法

### 一、臺灣市售大豆嘉磷塞抗性之藥劑測定

2000 年 4 月間於臺灣中部地區 12 處雜糧零售店及超市，收集市售大豆種子，各樣品取 200 粒種子，播種於含培養土之育苗盤，放置於溫室培養，澆水保持濕潤，待植株發育至二本葉，噴施嘉磷塞 (41% 溶液，億豐) 1.8 kg/ha，水量為 600 L/ha。施藥後三至七日，記錄植株萌芽率、外觀傷害徵狀及正常生長植株之株數。

### 二、抗嘉磷塞大豆材料之製備

取用收集之大豆種子，如方法一。培育至二本葉，噴施嘉磷塞，施藥後三至七日，分別種植幼葉外觀傷害及正常生長植株，於溫室照光 14 小時，培育至開花結實，並分別收集非抗藥及抗藥植株之種子。本研究中測定所使用之大豆葉片及種子，皆為此自行繁殖及採種之植材。

### 三、藥品及儀器

一般試劑藥品購自德國 Merck 公司及美國 Sigma 公司，嘉磷塞異丙胺鹽 (glyphosate, 41% 溶液) 購自台灣億豐公司。RNA 抽取緩衝液 (Trizol) 購自美國 Life 公司，genomic DNA 抽取套組 (DNeasy Plant Maxi kit) 購自德國 Qiagen 公司，plasmid DNA 抽取套組 (miniprep system kit) 及 DNA 純化回收套組 (gel extraction kit) 購自台灣 Viogene 公司，DNA marker (1 kb plus DNA Ladder) 購自美國 Life 公司，PCR 試劑

(Advantage 2 PCR kit)購自美國 Clontech 公司，引子由臺灣明欣公司合成，限制酵素購自美國 MBI 公司，接合酶及 DNA 載體 (pGEM-T Easy Vector kit)購自美國 Promega 公司。DNA 定序試藥 (ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit)購自美國 PE Applied Biosystems 公司。 $^{32}\text{P}$ -CP4 EPSPS DNA 為自備之 1.8 kb PCR DNA 產物 (已定序確認者)，利用 rediprime<sup>TM</sup> II kit 及  $^{32}\text{P}$ -dCTP (購自美國 Amersham Pharmacia 公司) 反應合成者。轉漬膜 (Hybond-N) 購自美國 Amersham 公司，X 光片 (BioMax) 購自 Kodak 公司。PCR 儀器 (Gene Amp PCR system 2400) 及 DNA 定序儀 (ABI PRISM 377-96 DNA Sequencer) 購自美國 Perkin-Elmer 公司。

#### 四、聚合酵素鏈鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR)：溫度及敏感度測試

播種大豆種子，育苗步驟同方法二，於六葉齡植株之下位成熟葉，滴施嘉磷塞 (41% 溶液) 5  $\mu\text{L}$ ，施藥三日後，分別剪下具傷害徵狀 (非轉殖者) 及無傷害徵狀 (轉殖者) 植株之幼葉 1 g，抽取 genomic DNA。依據抗嘉磷塞大豆之基因訊息<sup>(8,14,15)</sup>，設計二個引子，分別為花椰菜嵌紋病毒之起動子 (35S promoter)：5'-GACGCACAATCCCACTATCCTTCGCA-3' 及 nopaline synthase gene 之 3' nontranslated region (NOS 3')：5'-CATCGCAA-GACCGCAACAGGATTC-3'。取轉殖株及非轉殖株大豆之 genomic DNA 50 ng/ $\mu\text{L}$ ，加 10  $\mu\text{M}$  primer 1  $\mu\text{L}$ ，利用 Advantage 2 PCR kit (50 X Advantage 2 Polymerase Mix 1  $\mu\text{L}$ ，10 X Advantage 2 PCR Buffer 5  $\mu\text{L}$ ，50 X dNTP Mix 10 mM 1  $\mu\text{L}$ ，PCR grade H<sub>2</sub>O 40  $\mu\text{L}$ )，進行 PCR 測試<sup>(16)</sup>，正對照者為 Advantage 2 PCR kit 之 control，負對照者以 PCR 等級去離子水取代 DNA。反應步驟為：起始變性溫度為 94  $^{\circ}\text{C}$  四分鐘；變性溫度 94  $^{\circ}\text{C}$  一分鐘，測試之煉合溫度分別為 56、58、60、62、64、66、68 及 70  $^{\circ}\text{C}$  一分鐘，延展溫度 72  $^{\circ}\text{C}$  一分鐘，循環 30 週期；最後延展溫度 72  $^{\circ}\text{C}$  七分鐘。取 PCR 產物 5  $\mu\text{L}$ ，加入樣品 0.1 倍體積之 bromophenol blue 染劑，注入於含 1.2% (w/v) agarose gel 之 0.5 X TBE 膠體，以 100 伏特電壓進行電泳分析，時間約 25 分鐘，取出膠體於紫外燈下觀察結果，所得 DNA 片段與 DNA Marker 比較，利用內差法估計長度。

取轉殖株 genomic DNA 0.05、0.1、0.5、1、2、5、10、20、50 ng，分別加 10  $\mu\text{M}$  primer 1  $\mu\text{L}$ ，利用 Advantage 2 PCR kit，進行 PCR 測試，

反應步驟為：起始變性溫度為 94  $^{\circ}\text{C}$  四分鐘；變性溫度為 94  $^{\circ}\text{C}$  一分鐘，煉合溫度為 68  $^{\circ}\text{C}$  一分鐘，延展溫度為 72  $^{\circ}\text{C}$  一分鐘，循環 30 週期；最後延展溫度為 72  $^{\circ}\text{C}$  七分鐘，膠體電泳分析步驟同煉合溫度處理者。

#### 五、PCR DNA 產物之鑑定

##### 1. 抗藥基因 (CP4 EPSPS) 之定序

由 PCR 產物之電泳分析結果，割取約 1.8 kb 之 DNA，利用 gel extraction kit 將 DNA 從膠體中溶洗出，進行 ligation 及 transformation 步驟。取此 DNA 3  $\mu\text{L}$ ，添加於 pGEM-T Easy Vector kit (2 X Rapid Ligation buffer 5  $\mu\text{L}$ ，50 ng pGEM-T Easy vector 1  $\mu\text{L}$ ，T4 DNA ligase 1  $\mu\text{L}$ )，於 16  $^{\circ}\text{C}$  反應 14~16 小時。將單一菌落之大腸桿菌 JM109 strain，加 LB 培養液 3 mL，於 37  $^{\circ}\text{C}$  振盪培養 14 小時，取菌液 200  $\mu\text{L}$  加入接合反應之 DNA 10  $\mu\text{L}$ ，放置於冰中 30 分鐘，加入 LB 培養液 200  $\mu\text{L}$ ，於 37  $^{\circ}\text{C}$  振盪培養一小時，塗抹於 LB plate (含 IPTG、X-gal 及 ampicillin)，培養 14-16 小時，選取含有 DNA insert 之白色菌落，移入 LB 培養液 3 mL 中，再於 37  $^{\circ}\text{C}$  培養 14-16 小時，取出 300  $\mu\text{L}$ ，保存於 4  $^{\circ}\text{C}$ ，其餘之菌液於室溫下 3000 g 離心五分鐘，倒出上層液，抽取 plasmid DNA，用去離子水 50  $\mu\text{L}$  洗出 plasmid DNA，取 plasmid DNA 20  $\mu\text{L}$  加 *EcoRI* 限制酵素 1  $\mu\text{L}$ ，於 37  $^{\circ}\text{C}$  反應二至三小時，取出 6  $\mu\text{L}$  加入樣品 0.1 倍體積之 bromophenol blue 染劑，注入於含 1.2% agarose 之 0.5 X TBE 膠體，以 100 伏特電壓進行電泳分析。選取具 1.8 kb insert DNA 之菌株，塗抹於含 ampicillin 之 LB 固體培養基上，於 37  $^{\circ}\text{C}$  培養 14-16 小時，抽取菌體之 plasmid DNA 定序。

抽取大腸桿菌菌體之 plasmid DNA，利用 ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit，以 DNA 定序儀定序。將 DNA 序列以 GENSTAR 軟體轉換成胺基酸序列，比對 National Center for Biotechnology Information (NCBI) 基因庫中 CP4 EPSPS 之胺基酸序列。

##### 2. Nested-PCR 檢測

設計專一性之引子，分別為矮牽牛 chloroplast transit peptide 片段 (CTP-F、CTP-R) 及 CP4 EPSPS DNA 片段 (EPSPS-1、EPSPS-2 及 EPSPS-3) (表一)，取轉殖株之 PCR 產物 1  $\mu\text{L}$

表一 測試中使用之引子  
Table 1. Primers used in this study

No. primer	DNA sequence (5' → 3')	Gene	Amplified DNA
(1) 35 S NOS	GACGCACAATCCCCTATCCTTCGCA CATCGCAAGACCGGCAACAGGATTC	35 S promoter NOS terminator	1800 bp
(2) CTP-F EPSPS-1	CAACATGGCTCAAGGGATACAAACCC GTCACCGTCTTCCGATTTTAC	CTP of petunia CP4 EPSPS	680 bp
(3) CTP-F EPSPS-2	CAACATGGCTCAAGGGATACAAACCC GATCGGCTCGATGACCGTCGTG	CTP of petunia CP4 EPSPS	822 bp
(4) 35 S CTP-R	GACGCACAATCCCCTATCCTTCGCA GGGTTTGTATCCCTTGAGCCATGTTG	35S promoter CTP of petunia	144 bp
(5) NOS EPSPS-3	CATCGCAAGACCGGCAACAGGATTC GAACTCTCCGATACGAAGGCTGCC	NOS terminator CP4 EPSPS	129 bp

CTP: chloroplast transit peptide.

L, 利用 Advantage 2 PCR kit 進行如方法四之 PCR 及電泳分析。

### 3. 限制酵素消化反應

取轉殖株之 PCR 產物 10  $\mu$ L, 加去離子水 10  $\mu$ L, 並分別加 *Bam*HI、*Pst*I 及 *Nco*I 三種限制酵素 1  $\mu$ L 及緩衝液, 於 37 $^{\circ}$ C 進行二小時消化反應, 再行電泳分析。

## 六、大豆植株、種子及市售相關加工產品之檢測

### 1. 轉殖株與非轉殖株大豆葉片之南方氏雜合反應 (Southern hybridization)<sup>(17)</sup>

取轉殖株與非轉殖株之 genomic DNA 20  $\mu$ g, 加入 *Bam*HI、*Rco*RI、*Hind*III、*Nco*I 限制酵素各 5  $\mu$ L, 於 37 $^{\circ}$ C 反應 10-12 小時, 注入於含 0.8% agarose 之 0.5 X TBE 膠體, 進行電泳分析。再將轉漬膜放置於膠體上方, 以 20 X SSC 緩衝液進行轉漬。放射性探針 <sup>32</sup>P-CP4 EPSPS 之製備: 取自備之 CP4 EPSPS DNA (已定序之 1.8 kb PCR 產物) 約 50 ng, 使用 rediprime<sup>TM</sup> kit, 再加入 <sup>32</sup>P dCTP 50  $\mu$ Ci, 於 37 $^{\circ}$ C 反應 10-15 分鐘, 將標定完成之探針純化後進行雜合反應。轉漬膜於 42 $^{\circ}$ C 預雜合一至二小時, 再加入含 <sup>32</sup>P-CP4 EPSPS 之雜合液, 於 42 $^{\circ}$ C 反應 16-18 小時。於 0.1 X SSC、0.1% SDS 溶液中, 60 $^{\circ}$ C 水浴中浸搖、風乾, 將轉漬膜與 X 光片置於片夾中, 於 -70 $^{\circ}$ C 進行自動放射顯影 (autoradiography)。

### 2. 大豆植株、種子及市售相關加工產品之 PCR 檢測

利用專一性引子 (4) 及 (5), 分別為 35S/

CTP-R 及 NOS/EPSPS-3, 抽取大豆轉殖株及非轉殖株幼葉、種子 (0、0.1%, W/W, 轉殖株/非轉殖株)、豆漿及豆腐之 DNA 各 0.5 g, 利用 Advantage 2 PCR kit 進行如方法四之 PCR 及電泳分析。煉合溫度分別為 50 及 57 $^{\circ}$ C。

## 結果與討論

### 一、進口大豆嘉磷塞抗性之藥劑反應測定

十二組不同來源之大豆樣品, 經播種育苗, 其中九組大豆樣品之發芽率為 78-92%, 三組大豆樣品不萌芽 (表二)。九組大豆幼苗於施藥後三至四日, 部份植株開始呈現藥害徵狀, 施藥後七日, 可明顯區分為正常生長植株及受傷害植株, 受傷害植株之徵為葉片黃化褐化、新生葉狹小、葉數少、植株低矮 (圖一), 施藥後 14 日全株乾枯死亡, 此傷害現象為嘉磷塞作用之典型徵狀<sup>(4)</sup>, 顯示正常生長之植株為具抗嘉磷塞之轉基因大豆, 受傷害植株則為無抗藥性傳統培育之大豆品系。由正常生長植株之株數, 得知萌芽之大豆植株中抗嘉磷塞之轉基因大豆佔 35-47%。

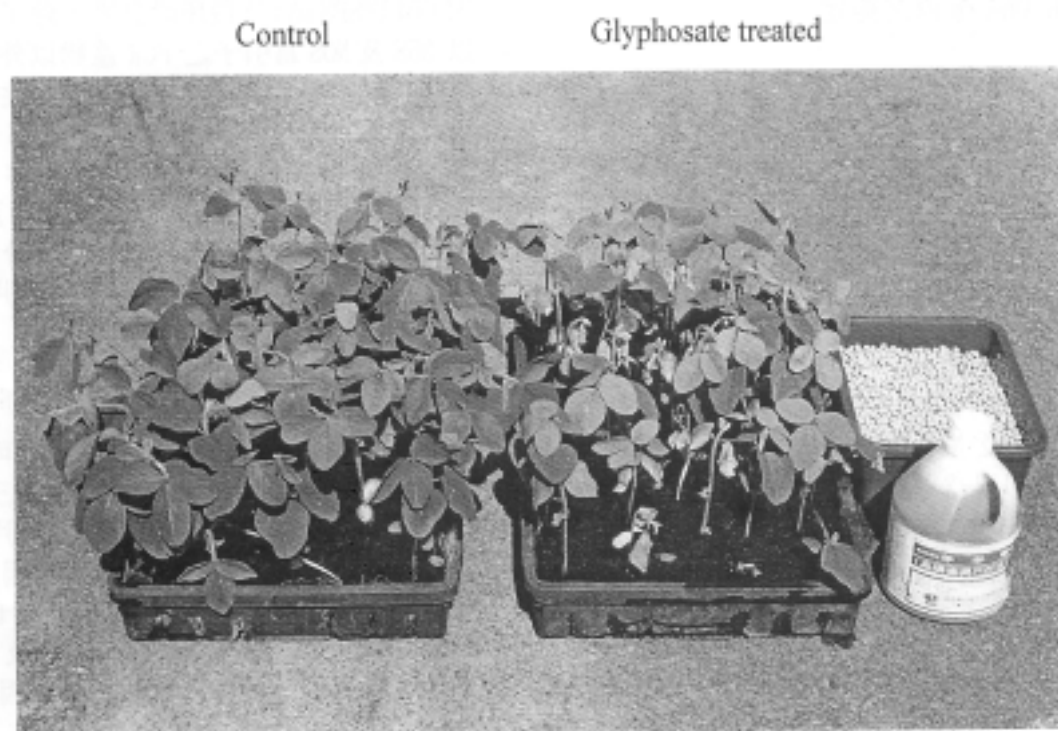
### 二、大豆抗嘉磷塞基因之聚合酵素鏈鎖反應

植株幼葉以 DNeasy Plant Maxi kit 抽取 genomic DNA, 此 kit 利用 DNA-binding resin 及 'CTAB' 方法<sup>(13)</sup>之原理, 可由 1g 植體抽取約 150  $\mu$ g 之 DNA, 以 DNeasy<sup>TM</sup> kit 抽取之 DNA 純度高<sup>(13)</sup>, 且加入 RNase 可去除 RNA 造成之干擾。

表二 市售大豆對嘉磷塞之反應  
Table 2. Responses of imported soybean to glyphosate

Sample No.	Percentage of Germination (%)	Injured plant		Normal plant	
		No. of plant	(%)	No. of plant	(%)
1	78	100	64	56	36
2	83	90	54	76	46
3	88	94	53	82	47
4	90	117	65	63	35
5	88	94	53	82	47
6	82	104	63	60	37
7	90	104	58	76	42
8	88	94	53	82	47
9	92	116	63	68	37

\* Soybean seeds were collected from local retail shops. Seedlings, 2-3 leaf stage, raised from 200-seeds were evaluated for injury after foliar application of glyphosate at 1.8 kg/ha.

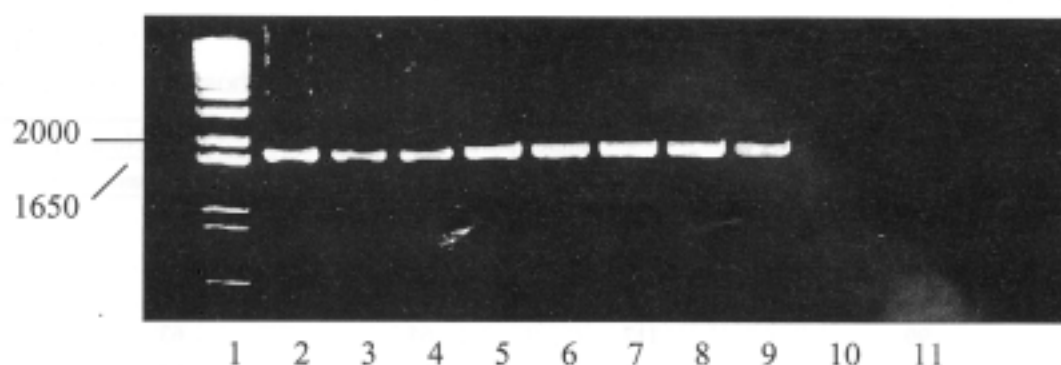


圖一 市售大豆噴施嘉磷塞 (41%溶液) 1.8 kg/ha，施藥後七日，抗嘉磷塞轉殖株正常生長，非抗嘉磷塞轉殖株褐化死亡

Fig. 1. Glyphosate resistant soybean survived, foliar application of glyphosate at 1.8 kg/ha. Susceptible soybean was killed at seven days after spray of glyphosate.

由 35S promoter 及 NOS DNA 序列設計之 primer (1) (表一)，經聚合酶連鎖反應測定之結果顯示，煉合反應之溫度於 58 至 70℃，皆可於轉殖株產生約 1.8 kb 之單一 DNA 片段，非轉殖株則無此 DNA 片段，以無菌之去離子水取代 DNA 樣品之負對照組亦無此 DNA 片段，表示 PCR 測

試中無污染現象發生(圖二)。經由 genomic DNA 不同含量之 PCR 測試，煉合溫度為 68℃條件下，0.1 ng genomic DNA 仍可產生 1.8 kb DNA 產物。歐洲數國之 15 個研究室以 35S 及 NOS 分別為引子之檢測極限為 0.1-2 ng 及 0.5-10 ng<sup>(12)</sup>，顯示本試驗 PCR 之結果敏感度極高。



圖二 抗嘉磷塞轉基因大豆以 35S 及 NOS 為引子之 PCR 反應煉合溫度測定。第 1 欄為 DNA marker，第 2 欄至第 9 欄為分別為轉殖株之 PCR 煉合溫度 56、58、60、62、64、66、68、70 °C，第 10 欄為非轉殖株之 PCR 煉合溫度 56 °C，第 11 欄為去離子水

Fig. 2. PCR products of genomic DNA of normal and glyphosate resistant soybean (GRS) under different annealing temperature CP4 EPSPS gene (1.8 kb) was amplified by polymerase chain reaction using primer pair 35S and NOS. Lane 1, 10, and 11 were DNA marker, normal soybean DNA and deionized water, respectively. Lane 2 to 9 were DNA of glyphosate resistant soybean with different annealing temperature between 56 to 70 °C.

### 三、PCR DNA 產物之鑑定

#### 1. 抗藥基因(CP4 EPSPS)之定序

將 PCR 之 DNA 產物由膠體溶洗出，經接合、轉型反應、抽取 plasmic DNA 及確認單一菌株之 insert DNA 為 1.8 kb 者，再抽取此菌株之 plasmid DNA 定序<sup>(18)</sup>。由 DNA 序列及與 NCBI 基因庫比對 CP4 EPSPS 胺基酸序列之結果顯示，1.8 kb PCR 產物由 35S promoter 之 DNA 片段 (106 bp)、矮牽牛葉綠體 transit peptide DNA 片段 (220 bp)、全長 CP4 EPSPS cDNA (1368 bp) 及 NOS 3' DNA 片段 (102 bp) 組成，與大豆 40-3-2 品系<sup>(9)</sup>呈現 insert DNA 之構築相同。將 CP4 EPSPS DNA 序列轉換成胺基酸序列與 NCBI 基因庫之 CP4 EPSPS 胺基酸序列比對之結果，大腸桿菌單一菌株之 plasmid DNA 經重複檢測四次，於胺基酸 serine<sup>2</sup> 處皆為 leucine (鹼基為 CTT)。將 CP4 EPSPS 胺基酸序列與 NCBI 基因庫之番茄、玉米、矮牽牛、大腸桿菌比對，相似度為 25.0、24.1、23.3、26.0%，CP4 EPSPS 與一般植物及微生物之 EPSPS 功能有關之重要胺基酸部位經鑑定位於 Lys<sup>28</sup>、Arg<sup>30</sup> 及 Arg<sup>128</sup> 處，相當於大腸桿菌之 Lys<sup>22</sup>、Arg<sup>27</sup> 及 Arg<sup>124</sup> (19, 20)，而 CP4 EPSP synthase 胺基酸 Ala<sup>100</sup> 相當於矮牽牛之 Gly<sup>100</sup> 及大腸桿菌之 Gly<sup>88</sup> (20, 21)，此處 Alanine 之差異，被認為是造成 CP4 EPSPS 與嘉磷塞親和性降低之重要因素<sup>(22)</sup> (圖三)。

#### 2. Nested PCR 檢測

此 Nested PCR 引子為針對 insert DNA 構築中所添加之矮牽牛 CTP DNA 片段及目標基

因 CP4 EPSPS DNA 片段所設計者，除了可確證以 35S 及 NOS 為引子之 PCR 產物以外，亦可應用於篩選性 PCR 流程之後，專一性標的基因之檢測。轉殖株大豆以 35S 及 NOS 為引子之 1.8 kb PCR 產物者經四組引子：CTP-F/EPSPS-1、CTP-F/EPSPS-2、35S/CTP-R 及 NOS/EPSPS-3 之 nested PCR 測試及電泳分析，分別測得約 680、822、144 及 129 bp DNA 片段 (圖四)。

#### 3. 限制酵素消化反應

由 1.8 kb PCR 產物經 *Bam*HI、*Pst*I 及 *Nco*I 三種限制酵素消化反應及電泳分析，可將 PCR 之 DNA 產物分割為二 (0.6、1.2 kb)、三 (0.3、0.7、0.9 kb) 及二 (0.6、1.2 kb) 個 DNA 片段 (圖五)。此等限制酵素於 CP4 EPSPS 基因之切點皆與抗嘉磷塞大豆 40-3-2 品系 insert DNA 序列者相似<sup>(9)</sup>，可鑑定由 35S 起動子及 NOS 終結子為引子之 PCR 產物其目標基因為 CP4 EPSPS。

### 四、大豆植株、種子及市售相關加工產品之測定

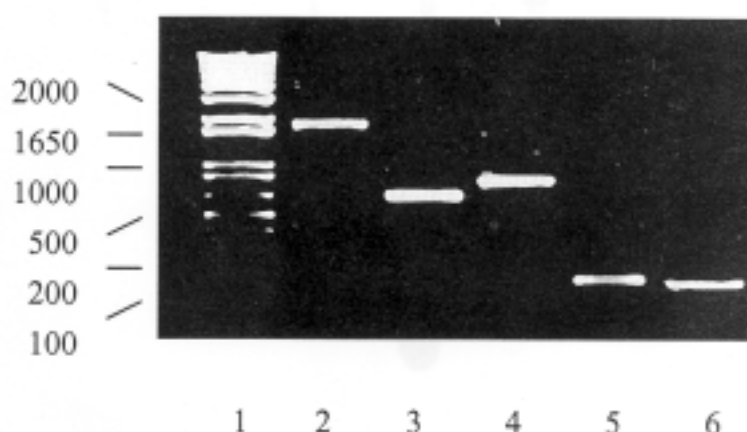
#### 1. 轉殖株與非轉殖株大豆葉片之南方氏雜合反應

轉殖株與非轉殖株大豆之 genomic DNA，以 *Bam*HI、*Rco*RI、*Hind*III、*Nco*I 四種限制酵素消化反應，再以 <sup>32</sup>P-CP4 EPSPS 為探針之南方氏雜合反應，結果顯示轉殖株之 genomic DNA 於 *Bam*HI、*Rco*RI、*Hind*III、*Nco*I 限制酵素處理者分別可辨識四 (1.6、

CP4 1	mlhgassrpatarkss	glsgtvripgdksishrsfmfgglasgetritgl	50
Petunia 1		-p-eivlqpikei----kl-sk-l-nrill-aa-se---vvdn-	45
Tomato 17		i----kl-sk-l-nrillllaa-se-r-vvdn-	49
<i>Zea mays</i> 14		i----kl-sk-l-nrillllaa-se-t-vvdn-	46
<i>E. coli</i> 6		lqpiarvd--inl-sk-v-nrallllaa-h-k-vl-n-	44
CP4 51	legedvintgkamqangarir	kegdtwiidgvgn ggl1 apeapld fgnaa*	100
Petunia 46	-ssd-ih mlg-lktl-lhve	edsanqravve-c ---fpvgkesk-iq-f l---g*	100
Tomato 50	-ssd-ihymlg-lktl-lhveddn-nqra-ve-c-gfpv-kks	ep-iq-f l---g*	105
<i>Zea mays</i> 47	-ns---hymlg-lrtl-lsve	adkaakravv-c --kfpvedake-vq-f l---g*	102
<i>E. coli</i> 45	-dsd--rhmln-lt-l-vsyt	lsa-rtrceii-- --p- ha-ga-elfl---g*	96
CP4 101	tgcr1tmglvgvydfdstfigda	sltkrpmgrvlnplremgvqvksedgd	150
Petunia 101	-am-pltaa-t-aggn-ryvl-gvprmrerisdldvg-kql-ae-dcfl-t		142
Tomato 106	-am-pltaa-t-aggh-ryvl-gvprmrerigdlvg-kql-ae-dcsl-t		147
<i>Zea mays</i> 103	-am-pltaa-taaggnatyvl-gvprmrerigdlvvg-kql-ad-dcfl-t		154
<i>E. coli</i> 97	-am-plaaalclgsn-ivlt-ep	rmkerl-hlvda--lg-akityleqe	146

圖三 抗嘉磷塞轉基因大豆之 CP4 EPSPS 胺基酸部份序列與矮牽牛、番茄、玉米、及大腸桿菌之 EPSPS 之比較粗體字者為與 EPSPS 功能相關之胺基酸，右上角具 \* 標示者為與嘉磷塞結合相關之胺基酸，"--" 為相同之胺基酸

Fig. 3. Comparison of the partial amino acid sequences of the CP4 EPSPS of glyphosate-resistant soybean, petunia, tomato, corn, and *E. coli* EPSPS proteins.

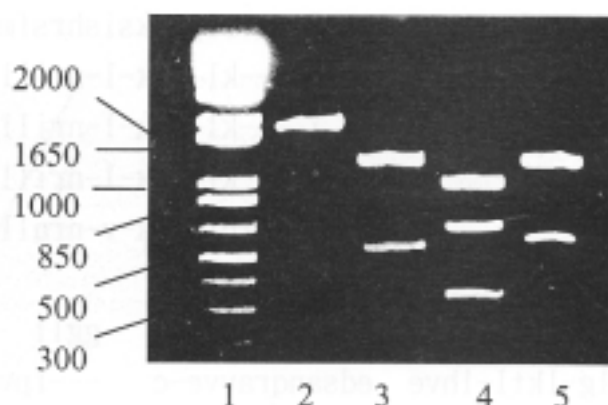


圖四 抗嘉磷塞轉基因大豆以 35S、NOS、矮牽牛之 CTP DNA 片段及 CP4 EPSPS DNA 片段為引子之 Nested PCR 測定。35S 及 NOS 引子之 PCR 產物為 DNA 模板，第 1 欄為 DNA marker，第 2 欄至第 6 欄之引子分別為 35S/NOS、CTP-F/EPSPS-1、CTP-F/EPSPS-2、35S/CTP-R、NOS/EPSPS-3

Fig. 4. Nested PCR analysis of 35S/NOS-PCR products of glyphosate-resistant soybean. The DNA products were amplified by using primer pair. Lane 1 was DNA marker, lane 2 was 35S/NOS, lane 3 was CTP-F/EPSPS-1, lane 4 was CTP-F/EPSPS-2, lane 5 was 35S/CTP-R, lane 6 was NOS/EPSPS-3.

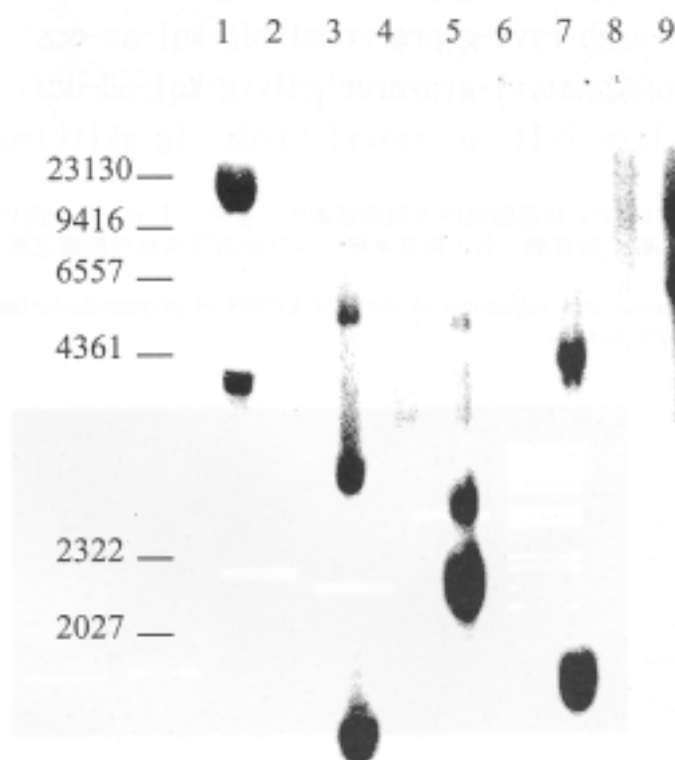
3.3、6.5、16 kb)、三(2.2、3.0、6.4 kb)、二(1.8、5.5 kb)、二(8.0、18.0 kb)個 DNA 片段，非轉殖株則無可辨識之 DNA 片段(圖

六)，此結果不僅可證明自備之  $^{32}\text{P}$ -CP4 EPSPS 的確存在於抗嘉磷塞之大豆植株中，且至少於植體中具兩組以上 CP4 EPSPS DNA，以基因



圖五 抗嘉磷塞轉基因大豆 PCR 產物之限制酵素消化反應。第 1 欄為 DNA marker，第 2 欄為 1.8 kb 之 PCR DNA 產物，未經限制酵素反應者，第 3 至第 5 欄分別經限制酵素 *Bam*HI, *Pst*I 及 *Nco*I 反應者，以 1.2% agarose gel 電泳分析

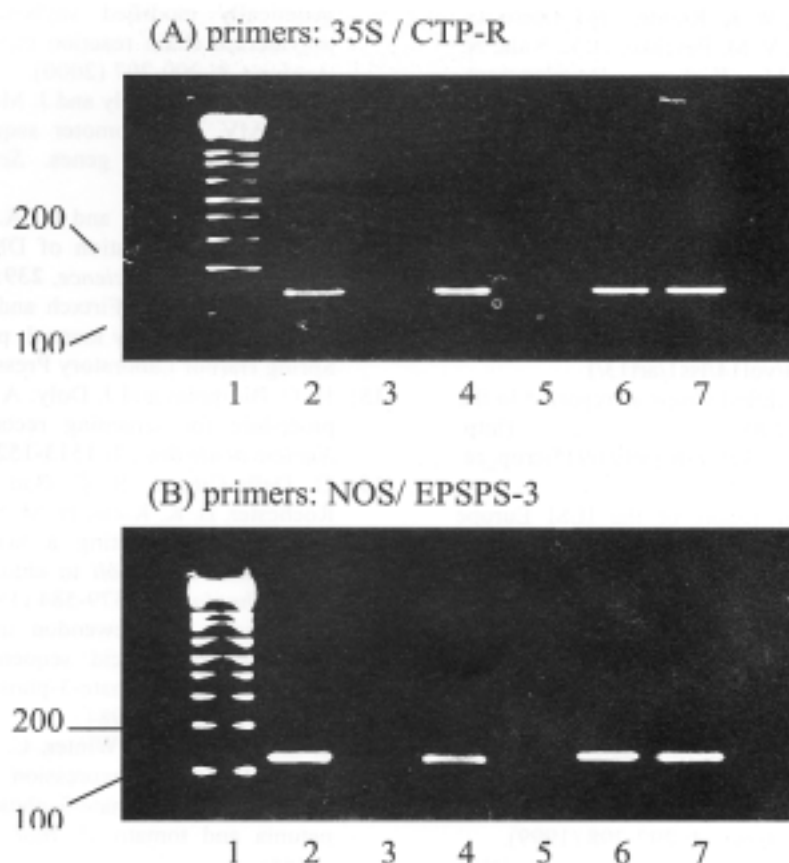
Fig. 5. Results from the restriction enzyme digestion of PCR products of glyphosate-resistant soybean. Lane 1 was DNA marker, lane 2 was non-digested 1.8 kb PCR product, 10  $\mu$ L of PCR product were digested with *Bam*HI (lane 3), *Pst*I (lane 4), and *Nco*I (lane 5).



圖六 抗嘉磷塞轉基因大豆植株及非轉殖株之南方氏雜合反應。大豆 genomic DNA 20  $\mu$ g，經限制酵素行消化反應及電泳分離後將 DNA 轉移至轉漬膜，以  $^{32}$ P-CP4 EPSPS 為探針行雜合反應及自動放射顯影。第 1 欄為 DNA marker，第 2、3 欄之限制酵素為 *Bam*HI，第 4、5 欄為 *Eco*RI，第 6、7 欄為 *Hind*III，第 8 及 9 欄為 *Nco*I；第 3、5、7、9 欄為轉殖株葉片 DNA，第 2、4、6、8 欄為非轉殖株葉片 DNA

Fig. 6. Southern hybridization of genomic DNA of normal and glyphosate-resistant soybean (GRS). Soybean genomic DNA, 20  $\mu$ g were digested with *Bam*HI (lane 2, 3), *Eco*RI (lane 4, 5), *Hind*III (lane 6, 7) and *Nco*I (lane 8, 9); digested DNA was separated by electrophoresis and transferred onto a nylon membrane. The filter was hybridized with the  $^{32}$ P-labeled DNA of EPSPS, the mature protein coding regions of CP4 EPSPS full length DNA. Lane 1 was DNA marker, hybridization appeared only for DNA from GRS (lane 3, 5, 7, 9) and not for DNA from normal soybean (lane 2, 4, 6, 8).





圖七 大豆及農產加工品抗嘉磷塞基因之 PCR 測定。純化之 DNA 以(A) 35S/CTP-R 及(B) NOS/EPSPS-3 為引子之增殖。第 1 欄為 DNA marker，第 2 欄為大豆葉片(轉殖株)，第 3 欄為大豆葉片(非轉殖株)，第 4 欄為大豆種子(0.1%、轉殖株/非轉殖株)，第 5 欄為大豆種子(非轉殖株)，第 6 欄為豆漿，第 7 欄為豆腐

Fig. 7. PCR analysis of glyphosate-resistant gene in soybean and processed farm products. Purified sample DNA was amplified with primer pairs (A) 35S/CTP-R and (B) NOS/EPSPS-3. Column description: lane 1: DNA marker, lane 2: soybean leaf (resistant), lane 3: soybean leaf (normal), lane 4: soybean seeds (0.1%, resistant/normal), lane 5: soybean seeds (normal), lane 6: soybean milk, lane 7: bean curd.

槍方式轉基因之植株可能具多組 CP4 EPSPS 基因。

## 2. 大豆植株、種子及市售相關加工產品之 PCR 測定

轉殖株大豆之葉片、種子(0.1%、w/w、轉殖株/非轉殖株)及市售之豆漿及豆腐，經以 35S/CTP-R 及 NOS/EPSPS-3 引子之 PCR 測試、電泳分析分別測得約 144 及 129 bp DNA 片段(圖七)，衛生署藥檢局以 35S、EPSPS 或 NOS 為引子之檢測極限亦為 GM 大豆之 0.1% (w/w)<sup>(14)</sup>。因此以 35S/NOS、CTP-F/EPSPS-1 及 CTP-F/EPSPS-2 引子之 PCR 分析，可利用於抗嘉磷塞轉基因大豆活體原料之檢測，以 35S/CTP-R 及 NOS/EPSPS-3 引子之 PCR 分析，可利用於抗嘉磷塞轉基因大豆活體原料及加工食品 DNA 之檢測。

## 參 考 文 獻

- (1) J. Bell, C. Matthiesen, D. Matthiesen and C. Handschke: Issues surrounding the GMO controversy. (2000). (<http://www.ublic.astate.Du-rjsalvad reports s00 GMO controversy / GMOcontroversy.html>)
- (2) S. Behrens, D. Case, D. Dickinson, C. Kies and L. Miller: Biotechnology-The next green revolution? (2000). (<http://www.public.iastate.edu/~rjsalvad /reports /s00/ GMOhunger /hung^ergmo.html>).
- (3) G. Della-Cioppa, S. C. Bauer, B. K. Klein, D. M. Shah, R. T. Fraley and G. Kishore: Translocation of the precursor of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase into chloroplasts of higher plants in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**: 6873-6877 (1986).
- (4) N. Amrhein, B. Deus, P. Gehrke and H. C. Steinrücken: The site of the inhibition of the shikimate pathway by glyphosate. *Plant Physiol.*, **65**: 830-834 (1980).
- (5) G. M. Kishore and D. M. Shah: Amino acid biosynthesis inhibitors as herbicides. *Annu. Rev. Biochem.*, **57**: 627-663 (1988).
- (6) S. R. Padgett, K. H. Kolacz, X. Delannay, D. B. Re, B.

- J. LaVallee, C. N. Tinius, W. K. Rhodes, Y. I. Otero, G. F. Barry, D. A. Eichholtz, V. M. Peschke, D. L. Nida, N. B. Taylor and G. M. Kishore: Development, identification, and characterization of a glyphosate-tolerant soybean line. *Crop Sci.*, **35**: 1451-1461 (1995).
- (7) 中華民國農產貿易統計要覽·p 203·行政院農委會·台北 (2001)·
- (8) G. Peterson, S. Cunningham, L. Deutsch, J. Erickson, A. Quinlan, E. Racz-Luna, R. Tinch, M. Troell, P. Woodbury and S. Zens: The risks and benefits of genetically modified crops: A multidisciplinary perspective. (2000). (<http://life.csu.edu.au/consecol/vol14/iss1/art13/>)
- (9) Issues of Genetically Modified Crops as reported in the press (2000). ([http://www.urel.berkeley.edu/berkeleyan/1999/0915/crop\\_report.html](http://www.urel.berkeley.edu/berkeleyan/1999/0915/crop_report.html))
- (10) H. A. Kuiper: Summary report of the ILSI Europe workshop on detection methods for novel foods derived from genetically modified organisms. *Food Control*, **10**: 339-349 (1999).
- (11) M. Lipp, E. Anklam, P. Brodmann, K. Pietsch and J. Pauwels: Results of an interlaboratory assessment of a screening method of genetically modified organisms in soy beans and maize. *Food Control*, **10**: 379-383 (1999).
- (12) P. Hübner, E. Studer, D. Häfliger, M. Stadler, M. Stadler, C. Wolf and M. Looser: Detection of genetically modified organisms in food: critical points for quality assurance. *Accred. Qual. Assur.*, **4**: 292-298 (1999).
- (13) R. Meyer: Development and application of DNA analytical methods for the detection of GMOs in food. *Food Control*, **10**: 391-399 (1999).
- (14) H. Y. Lin, L. C. Chiueh and D. Y. C. Shih: Detection of genetically modified soybeans and maize by the polymerase chain reaction method. *J. Food and Drug Analysis*, **8**: 200-207 (2000).
- (15) R. A. Kay, C. M. Daly and J. McPherson: Duplication of the CaMV 35S promoter sequences creates a strong enhance for plant genes. *Science*, **236**: 1299-1302 (1987).
- (16) G. T. Mullis, K. B. and H. A. Erlich: Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, **239**: 487-491 (1988).
- (17) J. Sambrook, E. F. Firtxch and T. Maniatis: Molecular cloning: a laboratory manual. pp. A9.28 3 th. Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y. (2001).
- (18) H. C. Birnboim and J. Doly: A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic acids Res.*, **7**: 1513-1523 (1979).
- (19) G. Della-Cioppa, S. C. Bauer, M. T. Taylor, D. E. Rochester, B. K. Klein, D. M. Shah, R. T. Fraley and G. M. Kishore: Targeting a herbicide-resistant enzyme from *Escherichia coli* to chloroplast of higher plants. *Bio/Technology*, **5**: 579-584 (1987).
- (20) K. Duncan, A. Lewendon and J. R. Coggins: The complete amino acid sequence of *Escherichia coli* 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase. *FEBS Lett.*, **170**: 59-63 (1984).
- (21) C. S. Gasser, J. A. Winter, C. M. Hironaka and D. M. Shah: Structure, expression and evolution of the 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase genes of petunia and tomato. *J. Biol. Chem.*, **263**: 4280-4289 (1988).
- (22) S. O. Duke : Herbicide-resistant crops: Agricultural, environmental, economic, regulatory, and technical aspects. pp. 53-84. CRC Press, Inc., USA (1996).