

嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

素食食品中含基因轉殖食品的檢測

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：90-FH-11

執行期間：90年1月1日至90年12月31日

計畫主持人：吳鴻程

共同主持人：

計畫參與人員：

執行單位：食品衛生系

中華民國九十一年二月八日

嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

素食食品中含基因轉殖食品的檢測

計畫編號：90-FH-11

執行期限：九十年一月一日至九十年十二月三十一日

主持人：吳鴻程 食品衛生系

一、中文摘要

本實驗以聚合酶鏈反應法(PCR)檢測含有 CAMV 促進子的基因改造(轉殖)大豆及其素食製品。大豆及其素食製品先以 proteinase K，在 68°C 作用 1 到 3 小時，再純化其 DNA。PCR 方法檢測基因改造大豆的引子，以鑑定大豆 DNA 品質的 SL(檢測大豆特有的 Lectin 基因)及鑑定基因改造大豆的 35S(源自 CaMV)。基因改造大豆，35S 引子之 PCR 反應產物為 195bp，而在 PCR 進行時，可同時加入 SL 及 35S 兩對引子，一方面可鑑定 DNA 品質，另一方面可同時檢測是否含有 CAMV 基因的基因改造大豆。市售的大豆、豆漿、豆腐、人造肉、素食肉、美國大豆蛋白皆含有基因改造大豆。台南農改場大豆，中國大陸大豆蛋白，則不含基因改造大豆。

關鍵詞：素食肉、基因改造食品、聚合酶鏈反應法

二、緣由與目的

大豆是國內大宗的輸入農產品，每年約有 200 公噸進口，其中約有 95% 來自美國。美國基因改造大豆，在 1995 年獲准上市，現在 53% 以上是種殖基因改造大豆，估計台灣市面上的黃豆可能一半是基因改造大豆。目前基因改造食品其食用安全性受到質疑，且以健康為訴求的素食者，希望能吃到天然的食物，忌諱吃到帶有外來基因的食品，故含基因改造食品需加以的標示，以讓消費者辨識。衛生署規定自九十二年強強制標示含基因改造食品。故偵測食品中基因改造食品含量，為目前重要

研究課題。現今有酵素連結免疫吸附法(ELISA)、聚合酶鏈反應法(PCR)及酵素活性測定法，可檢驗基因改造食品。此三大類方法中，仍以 PCR 方法應用最廣。PCR 偵測基因改造食品除了靈敏性高而且經加工後的產品亦可偵測。故目前歐盟、美國、日本兼採用 PCR 法。本實驗收集市面上常見的大豆及其素食製品，先用大豆特有 lectin gene 引子 (SL155U、SL256U、SL342D、SL520D) 確定是否抽取到大豆 DNA，再以 35S1、35S2 引子測定是否為基因改造食品。

三、材料與方法

材料：

1. 收集市面上的大豆、包裝豆漿、豆腐、素食肉、大豆蛋白、味噌。
2. 引子序列

SL155U	GCC GAA GCA ACC AAA CAT G
SL256U	CTC TAC TCC ACC CCC ATC
SL342D	CAT CTG CAA GCC TTT TTG TG
SL520D	GAT GGA TCT GAT AGA ATT GAC
35S1	GCT CCT ACA AAT GCC ATC A
35S2	GAT AGT GGG ATT GTG CGT CA

方法：

1. 大豆 DNA 抽取步驟：0.3g 大豆及其製品，加 860ul 抽取液、100ul guanidine-HCl (5M) 及 40ul Protein K (20mg/ml) 在 58°C 震盪 3 小時，經離心，取上層液，以樹脂 (wizard, progema) 吸附分離大豆 DNA。
2. PCR 條件：15mM MgCl₂，1Unit super DNA polymerase，1×PCR buffer，0.2mM

dNTP，整個反應體積 20ul，引子及大豆 DNA 因實驗目的，使用不同的濃度。

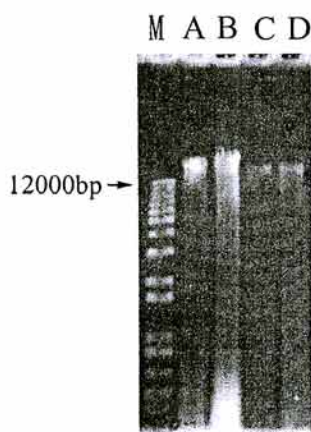
PCR 反應器設定的條件為：

1. 95°C，5 分鐘
2. 95°C，30 秒
58°C，45 秒 30 次循環
77°C，45 秒
3. 72°C，5 分鐘
4. 反應終止，保存在 15°C

PCR 產物以 2.5% agarose 膠體電泳分析。

四、結果與討論

基因改造大豆所轉殖的基因，為了讓轉殖基因能在大豆中表現，會在基因前加入轉錄啟動子，在基因後加入轉錄終止子，如圖一所示。大豆常用 CaMV 啟動子和 nos 終止子，基因改造大豆可能因各種目的，轉殖各種不同的基因，若以檢測基因為主，則 PCR 需要各種不同的引子，而且只能檢測特定的基因，無法用於篩選所有基因改造大豆，所以本研究以 35S1 及 35S2 引子對，檢測 CaMV 啟動子，若含有 CaMV 啟動子，則有 195 鹼基對的 PCR 產物。因食品為複雜的原料組合，在抽取 DNA 時，可能抽到別種原料的 DNA，故本研究亦以 SL155U 與 SL520D 及 SL256U 與 SL342D 兩組引子對，偵測大豆特有的 Lectin 基因，以確定抽取 DNA 時，是否抽取到大豆 DNA。如圖二所示，大豆磨粉及大豆磨泥，用本方法皆可抽取到 DNA，而且分子量皆可大於 12000 鹼基對，可見本方法可抽取到大分子的 DNA，有助於往後 PCR 的結果。



圖二：純化的大豆 DNA：0.1g 大豆粉或 0.3g 大豆泥抽取之 DNA 溶液，進行 0.7% agarose 膠體電泳。

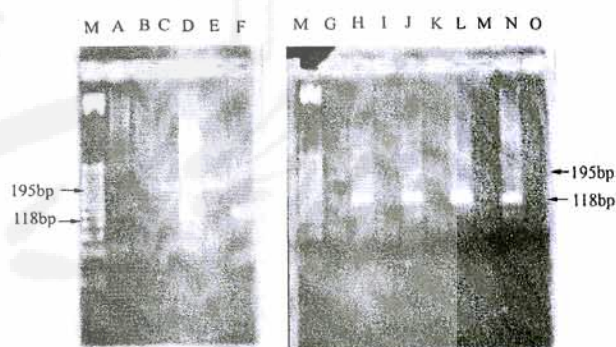
M: 1Kb plus ladder marker 最上面的 band 為 12000bp

A: 大豆粉抽取之 DNA 溶液 2ul

B: 大豆粉抽取之 DNA 溶液 5ul

C: 大豆泥抽取之 DNA 溶液 2ul

抽取市售大豆、豆漿、人造肉、味噌及中國大陸大豆蛋白之 DNA，以 SL256U、SL342D 引子對及 35S1、35S2 引子對進行 PCR，檢驗是否含有基因改造大豆。如圖三所示，以 SL256U、SL342D 引子對之 PCR 產物皆含有 118 鹼基對，可見皆有抽取到大豆 DNA。大豆、豆漿、人造肉含有基因改造大豆，因其可產生 195 鹼基對的 PCR 產物；味噌及中國大陸大豆蛋白則不含基因改造大豆。味噌因食品加工過程使 DNA 分解，故無法檢查。



圖三：大豆及其製品抽出之 DNA 的 PCR 產物:SL256U、SL342D 引子對的 PCR 產物為 118bp，可測出大豆 DNA 存在。35S1、35S2 引子對的 PCR 產物為 195bp，可測出基因改造大豆。

M: 25bp DNA step ladder marker 最下面的 band 為 25bp

A、B: 基因改造大豆 DNA，35S1、35S2 引子之 PCR 產物

C: 市售大豆 DNA，35S1、35S2 引子之 PCR 產物

D: 包裝豆漿 DNA，SL256U、SL342D 引子之 PCR 產物

E: 包裝豆漿 DNA，35S1、35S2 引子之 PCR 產物

F: A 廠牌人造肉 DNA，SL256U、SL342D 引子之 PCR 產物

G: A 廠牌人造肉 DNA，35S1、35S2 引子之 PCR 產物

H: 日本味噌 DNA，SL256U、SL342D 引子之 PCR 產物

I: 日本味噌 DNA，35S1、35S2 引子之 PCR 產物

J: B 廠牌人造肉 DNA，SL256U、SL342D 引子之 PCR 產物

K: B 廠牌人造肉 DNA，35S1、35S2 引子之 PCR 產物

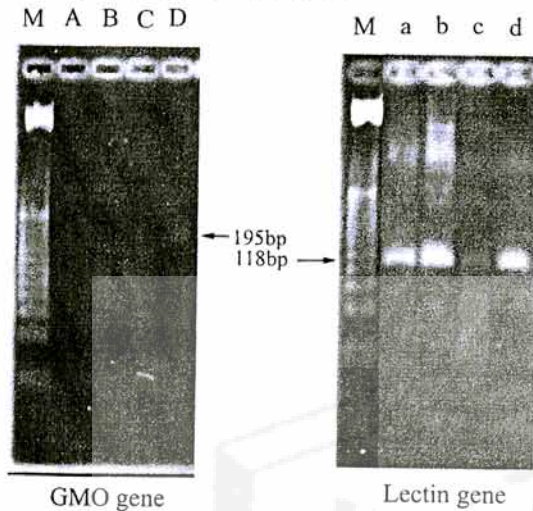
L: 台灣味噌 DNA，SL256U、SL342D 引子之 PCR 產物

M: 台灣味噌 DNA，35S1、35S2 引子之 PCR 產物

N: 大陸大豆蛋白 DNA，SL256U、SL342D 引子之 PCR 產物

O: 大陸大豆蛋白 DNA，35S1、35S2 引子之 PCR 產物

台南農改場大豆 DNA 以 35S1、35S2 引子對及 SL256U、SL342D 引子對進行 PCR。如圖四所示，台南農改場大豆 2、4 及 5 號皆非基因改造大豆。

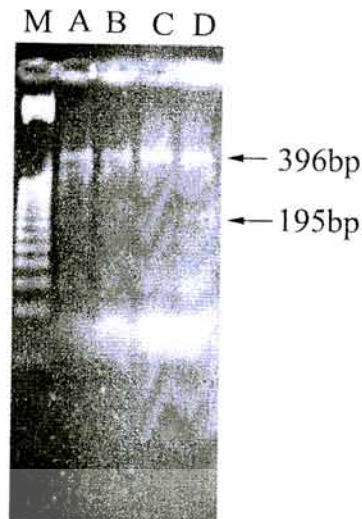


圖四：台南農改場大豆 DNA 之 PCR 產物

GMO gene：35S1、35S2 引子之 PCR 產物
Lectin gene：SL256U、SL342D 引子之 PCR 產物
M：25bp DNA step ladder marker 最下面的 band 為 25bp
A,a：台南 2 號大豆 DNA
B,b：台南 4 號大豆 DNA
C,c：台南 5 號大豆 DNA
D,d：市售大豆 DNA

市售素食火腿、素食雞肉、素食魚及豆乾 DNA 以 35S1、35S2 引子對及 SL155U、SL520D 引子對，同時加入 PCR 反應中，如圖五所示：皆可產生 396 鹼基對的大豆 Lectin 基因片段之 PCR 產物，及 195 鹼基對的基因改造大豆基因片段之 PCR 產物。故上述素食食品皆含基因改造大豆。在一個 PCR 反應中同時加入二對引子，可減少反應次數、材料，是值得參考的方法。

本研究以 PCR 方法檢測市售素食原料及食品，發現除了台南農改場大豆及中國大陸大豆蛋白不含基因改造大豆，其他皆含基因改造大豆。本研究只是定性檢驗基因改造大豆，可再進一步以 quantitative competitive PCR 或 Real time PCR，進行定量檢驗。

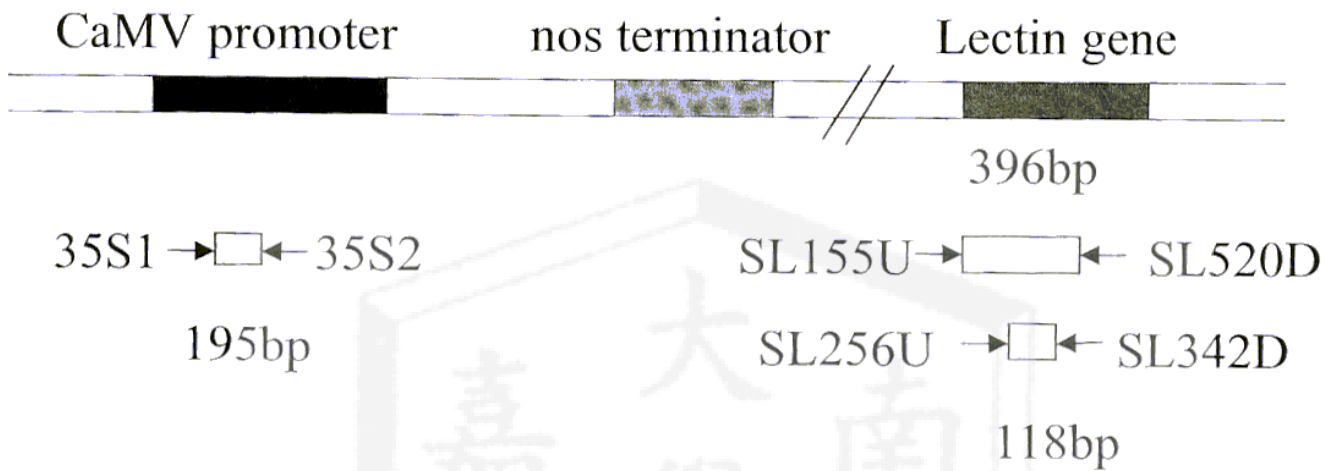


圖五：兩組引子對組合型 PCR 產物
SL155U、SL520D 及 35S1、35S2 兩組引子對，同時加入素食食品抽出之 DNA 內進行 PCR 反應。

M：25bp DNA step ladder marker 最下面的 band 為 25bp
A：素食火腿
B：素食雞肉
C：素食魚
D：豆乾

五、參考文獻

- [1] 林怡杏，基因轉殖食品之偵測，食品工業，32 期，42-50。
- [2] 許美芳，基因改造食品檢驗技術介紹，檢驗新知，31 期，55-76，民國九十年七月。
- [3] 公告以基因改造黃豆及基因改造玉米為原料之食品標示事宜，http://food.doh.gov.tw/life/genefood/pop_cornsign.htm
- [4] A. M. A. Van Hoef, E. J. Kok, E. Bouw, H. A. Kuiper and J. Keijer, Development and application of selective detection method for genetically soy and soy-derived products. Food additives and contaminants, vol. 15, 767-774, 1998.
- [5] A. Wurz, A. Bluth, P. Zeltz, C. Pfeifer and R. Willmund, Quantitative analysis of genetically modified organisms (GMO) in processed food by PCR-based methods, Food Control vol., 10, 385-389, 1999.
- [6] P. Huebner, E. Studer and J. Luethy, Quantitative competitive PCR for the detection of genetically modified organisms in food. Food Control, vol., 10, 353-358.
- [7] C. D. Hurst, A. Knight and I. J. Bruce, PCR detection of genetically modified soya and maize in foodstuffs. Molecular Breeding, vol., 5, 579-586, 1999.



圖一：GMO 大豆中內插的基因圖譜：

CAMV promoter : Cauliflower Mosaic Virus 35S promoter;

Nos terminator: nopaline synthase terminator;