

轉基因食品檢測

Genetically Modified Food Detection

一. 課前思考

有機黃豆營養高+豆渣更健康

- 來源: http://mag.udn.com/mag/life/storypage.jsp?f_ART_ID=469956
- 日期: 2013/08/06

日前主婦聯盟公布，台灣黃豆幾乎仰賴進口，每年從美國、巴西進口，九成都是基因改造黃豆。然而基改黃豆在國外很少人吃，主要用來餵牛豬，提煉生質柴油，在台灣卻當成特選黃豆，直接吃下肚，安全堪憂。

國內學者指出，基改黃豆抗農藥、抗除草劑，農民為了增加收成大量噴洒，所以基改黃豆的除草劑含量都特別高，在基改黃豆田裡，連一隻蜜蜂都看不到。基改黃豆不是為了增加營養價值，而是為了提高產量。基改黃豆的 DNA 被破壞之後，40 種以上的蛋白質也跟著改變，恐怕會引發過敏反應。

雖然在科學上尚未能對基因改造食品的安全性給予明確答案，但已有奧地利、義大利科學家在 2008 年分別發表研究指出，基改黃豆所飼養的豬不能生育，顯示長期食用基因改造作物，動物的生育能力和免疫能力會受影響。儘管衛生單位認為，基改黃豆安全無虞，但其他的國家卻不敢輕忽風險。歐盟就規定，食品只要添加基改黃豆超過 0.9%就要標示，韓國 3%、澳紐 1%，台灣最寬鬆，規定 5%，而且絕大多數的產品根本都沒標，以致國內市售各種黃豆食品包括豆漿，大多使用成本較便宜的基改黃豆，實在難安心。

至於歐美最多人吃的有機黃豆，當然是非基因改造豆，而且是完全天然種植，它的營養價值優於一般豆類，就是因為栽種條件受到嚴格規範，不可使用化肥及農藥。有機黃豆不論在生產與加工販售過程，都必須通過層層驗證與審查，才能獲得合格認證。

有機黃豆很難用肉眼辨識，無法經由色澤、顆粒大小等外觀來辨別，色斑是正常現象。真正有機作物只能透過認證來認明，最簡單有效的辨識方法就是看它是否有合格的有機認證標章。民眾選購時應注意是否顆粒飽滿、大小顏色相近、無雜色、無黴斑、無蟲蛀、無破皮。有機黃豆為非基因改造，蛋白質含量超過 40%，營養價高於基因改造黃豆。但是國人吃黃豆攝取多來自過度加工的黃豆食品，不僅不是有機，而且經過繁複加工，大部分的膳食纖維、機能性成分都跟著流失，營養價值所剩無幾。

思考題:

1. 你知道什麼是基因改造食品嗎?

2. 試舉例日常生活中常見的基因改造食品。

基改食品安全嗎？學者警告有風險

來源: <http://e-info.org.tw/node/75203> (公共電視台北報導)

日期: 2012 年 3 月 15 日

瘦肉精風暴持續延燒，也讓許多民眾開始關心食品安全問題，15 日有學者提出警告，很多西方食品都是基因改造的食品，這些食品吃多了，除了會過敏，也有致癌的風險，呼籲政府，應加強「基改食品」的標示，讓消費者有所選擇，這樣才能讓消費者吃得安心。

學者說，所謂基因改造，是指用人為方式改變物種的基因排序，雖然可以讓農作物不再受飛蛾幼蟲的危害，增加農作物生產量，但也可能因此改變土壤的微生物，甚至有些基改作物為了抗蟲，還植入具有抗藥性的抗生素，對環境和人類都是一種傷害。

由於生活中有越來越多、可能含有基因改造的食品，像是黃豆、玉米、植物油、起司、洋芋片等，因此學者呼籲政府、應加強「基改食品」的標示，同時也呼籲大賣場及連鎖速食業者，應主動告知消費者，店內使用的黃豆、玉米是否為基因改造，這樣才能讓消費者吃得安心。

思考題：

1. 基因改造食品有什麼好處及壞處？

2. 你贊同加入食品標籤標示基因改造食品嗎？為什麼？

3. 基因改造技術除了運用在食品上？還有什麼方面會運用到此技術？

他從白蟻腸道 育出二代環保豬

來源: <http://e-info.org.tw/node/87441> (聯合晚報台北報導)

日期: 2013 年 7 月 19 日

東海講座教授鄭登貴從白蟻身上找到神奇的微生物基因，未來可望培育出吃木屑長大的豬。他還利用白蟻腸道的微生物，開發有機肥料，種出沒有蟲害、更鮮美的蔬菜，並開發保健食品。

鄭登貴幾年前在牛胃中找出微生物基因，利用基因轉殖技術，從牛胃的微生物分離出基因，注入豬的受精卵，培育出跟牛一樣吃草的環保豬，讓豬的隻胰臟可以分泌大量植酸分解纖維素，讓豬也可以吃草取得能量，且排泄物不髒不臭，降低環境污染。

他從白蟻腸道內的微生物篩出五種基因酶，比牛胃微生物的消化力量更徹底，目前已先用老鼠做實驗，6 月基改鼠已出生，接下來要培育第二代環保豬，讓豬吃木屑取得能量，減少對進口飼料玉米的依賴，也減少豬糞的碳排放量。

鄭登貴說，白蟻腸道內的微生物有很多寶藏，除了計畫培育吃木屑的環保豬，也已成功開發出微生物發酵有機質肥料，能促進植物氮、磷、鉀肥吸收，提高農作物的收成及甜度，還可增加花色的鮮豔度及開花數量。

思考題：

1. 根據以上報導，怎麼能夠培育出環保豬？

2. 培育環保豬的好處有什麼？會有什麼的不良後果嗎？

3. 從以上三篇報導，試綜合分析何謂基因改造，及其好處及壞處？

4. 若你是一名生物科學家，現在要利用基因改造技術去製造一種新品種(生物/食品)，你會怎麼做？

二．轉基因背景

2.1 什麼是轉基因食品？

轉基因食品，又稱為基因改造食品，是指利用基因工程手段，人為的將某些生物的基因轉移到其他生物中去，改造生物的遺傳物質，使其在營養品質、消費品質等方面轉變成人類所需要的模樣，這些加入了非原有基因的生物稱為轉基因生物，以轉基因生物為直接食品，或以此作原料加工生產的食品就是轉基因食品。如玉米、大豆、黃金米(其介紹見以下報章)等就是常見的轉基因食品。

菲農毀基改米 數千科學家連署痛斥

來源: <http://udn.com/NEWS/WORLD/WOR4/8120481.shtml>

日期: 2013/08/26

四百名反對基因改造作物的示威者八日闖入菲律賓比科爾地區基改「黃金米」的試驗田，將黃金米連根拔除。此舉挑動了學界的敏感神經，全球數千名科學家罕見的連署力挺黃金米，認為人們不應該出於恐懼全面排斥基改作物。

紐約時報報導，黃金米由非營利組織「國際水稻研究所」的科學家研發，他們在水稻裡植入來自玉米和細菌的基因，讓水稻胚乳累積β胡蘿蔔素，由於胚乳呈金黃色，因此將這種水稻稱為黃金米。菲律賓政府將決定是否容許黃金米在一般農田種植。

目前市面上的基改作物若不是耐除草劑，就是抗蟲害，主要是對農民有利，消費者並未直接受惠。黃金米則不同。食物中的β胡蘿蔔素可以被人體分解成維生素A吸收利用。每年全球有廿五萬到五十萬名兒童因缺乏維生素A而失明，每年有兩百萬亞洲與非洲人因缺乏維生素A、免疫功能低落而染病死亡。科學家希望藉由黃金米，讓世界各地以米飯為主食者有充足的維生素A。

帶頭拔除黃金米的菲律賓農夫說：「我們不希望菲律賓人被基改實驗利用，尤其是我們的小孩。」

連署的科學家則指出，基改技術既能改善開發中國家人民營養不良的問題，也能讓不知道自己營養不均的已開發國家人民攝取足夠的營養，不能一味反對。他們還點名「綠色和平」等團體以製造恐懼的手法將基改作物汙名化。

紐約大學生物學教授普魯格南說：「人們對基改作物有太多錯誤觀念。科學家植入黃金米的基因並不是什麼奇怪的東西，這種基因在南瓜、甜瓜和胡蘿蔔裡都找得到。西方國家對基改作物的批評，很多都是因為不了解開發中國家的饑荒和營養不良有多悲慘。」

帶頭連署的沙烏地阿拉伯阿布杜拉國王科技大學教授尼娜·費多羅夫說：「科學家早該出面疾呼『別再扯謊了，別再製造無謂的恐慌』，基改技術可拯救數百萬人的性命。」

黃金米二〇〇〇年曾登上時代雜誌封面，微軟董事長蓋茲的慈善基金會也支持讓黃金米進行測試，以幫助非洲解決營養不良問題。反對者則指控黃金米是推廣基改作物的「特洛伊木馬」，他們強調基改作物的風險仍未被充分了解，「綠色和平」發言人歐坎波說，該組織仍寧願站在「審慎的那一方」，反對任何基改作物。



一名科學家在馬尼拉郊區的黃金米實驗田說明基改作物的特性。菲律賓一處黃金米實驗田遭反對者破壞，引發全球數千名科學家連署聲明。小圖左為一般米，右為黃金米。（路透）

2.2 轉基因食品的好處有什麼？

通過轉基因的手段，人們可以按照自己的意願得到所需要的食品。例如，將抗病蟲害、抗除草劑等基因轉入農作物，就可以獲得具有相應基因的品種，還可以縮短獲得新品種的時間，提高農作物的產量、增加作物的營養價值，生產一些高附加值的物質，如有藥用價值的物質、維生素、工業上用的生物高分子聚合物等。

2.3 轉基因食品有對身體有負面影響嗎？

世界上第一例轉基因植物誕生於 1983 年，到今還沒有證據表明轉基因食品會對人體健康造成危害。但是，在基因操作過程中，可能發生意想不到的變化。對於健康和環境的長期影響，科學研究還不深入。因此，很多國際組織、國家和地區，如歐盟、英國、澳大利亞、新西蘭、香港等，都制定了相應的法律、法規，對轉基因產品進行管理和標注，以便進行監控。

三．實驗介紹

2.1 PCR—聚合酶鏈反應

聚合酶鏈反應(Polymerase Chain Reaction, PCR)是一種體外核酸擴增技術，是用於擴增一小段已知的 DNA 片斷或單個基因，甚至是某個基因的一部分，使所要研究的目標基因或 DNA 片段能於數小時內擴增至十萬至百萬倍，使肉眼能直接觀察和判斷（如圖 2 所示，紅色和藍色是目標的雙鏈 DNA 片段，使用 PCR 可以不斷複製出相同的 DNA 片段，用作擴增之用），因此在分析 DNA 和檢測鑒定中，PCR 是十分重要的生物技術，使我們可從一根毛發、一滴血、甚至一個細胞中擴增出足量的 DNA 用來分析研究。在過去，要擴增 DNA 片段需要幾天幾星期才能完成，現在用 PCR 技術幾小時便可完成，且具有特異、敏感、產率高、快速、簡便、重複性好、易自動化等突出優點，大大增加了生物科學研究的效率。

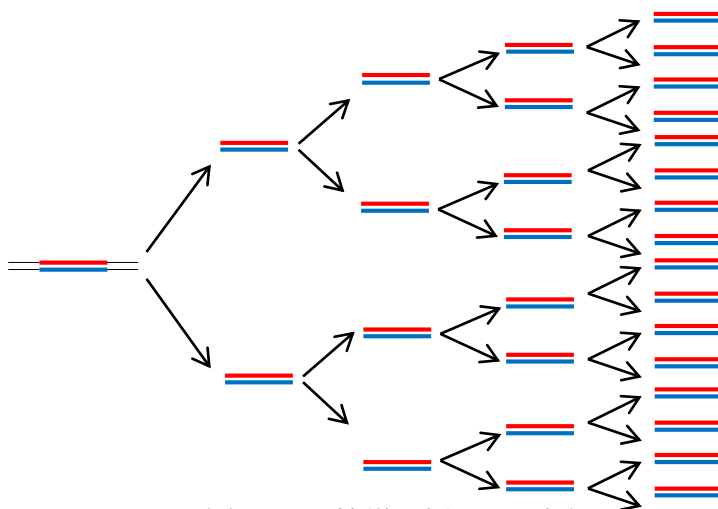


圖 2. PCR 擴增目標 DNA 片段

3.2 DNA 複製

PCR 技術的原理是利用 DNA 複製來完成擴增的目的， 所以說 PCR 就是重覆多次的 DNA 複製過程， 在了解 PCR 之前， 就必先了解什麼是 DNA 複製。在 PCR 技術中的複製過程中有幾個基本組成 1 元件：

元件	說明
DNA 模板 (template)	含有需要擴增的 DNA 片斷， 即要複製的目標 DNA 片段
2 個引子 (primer)	決定了需要 PCR 擴增的起始和終止位置
DNA 聚合酶 (polymerase)	聚合酶用作催化 DNA 複製過程， 使互補的核苷酸碱基能夠配對在模版上。
脫氧單核苷酸(dNTP)	與模板互補的核苷酸能用於構造新的互補鏈
緩衝體系	提供適合聚合酶行使功能的化學環境

開始時，一種稱為 DNA 聚合酶的蛋白質（上表第三列）會找到 DNA 長鏈中某個特殊位置，把雙股螺旋 DNA 如拉鏈般地分開成為單股，這樣的單股 DNA 就是表中第一列所說的 DNA 模版，接下來引子（上表第二列）實質是一 DNA 片段，它帶有與模版某一位點互補的碱基對，兩個引子分別會黏合兩個模版上，因此引子能夠決定起始和結束的位置。在複製過程中，DNA 聚合酶在外找到與模版互補的核苷酸（上表第四列），核苷酸會黏合在模版上，形成的一對新 DNA 與原本的 DNA 一模一樣。

3.3 PCR 反應步驟

一般的 PCR 反應由 20 到 30 個循環組成，每個循環包括以下 3 個步驟：

變性(denaturation)

利用高溫(93-97℃)使雙鏈 DNA 分離，高溫能將雙股 DNA 鏈中用作相連的氫鍵打斷。在第一個循環之前，通常加熱長一些時間(1-2 分鐘)以確保模板和引子完全分離，僅以單鏈形式存在。

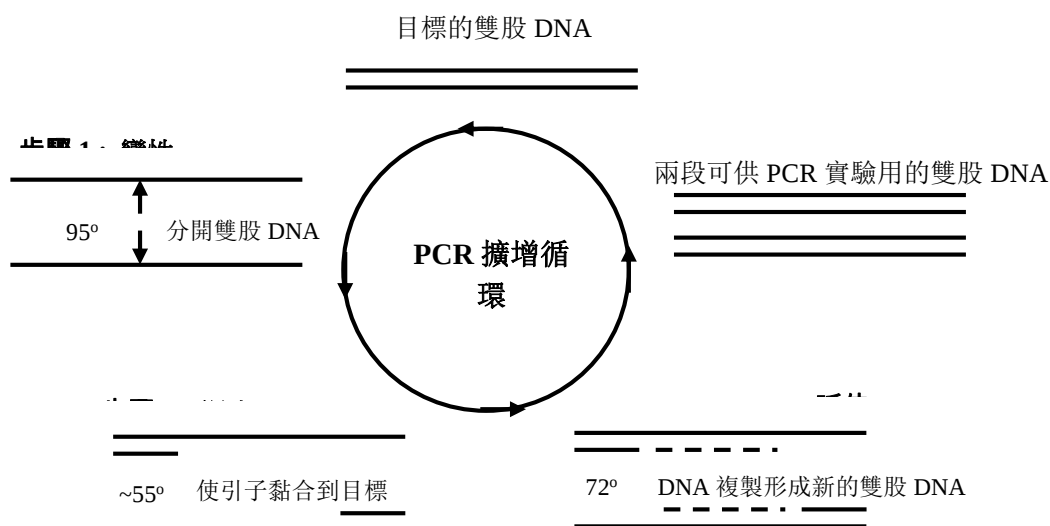
退火(Annealing)

在 DNA 雙鏈分離後，降低溫度使得引子可以結合於單鏈 DNA 上。此階段的溫度通常低於引子熔點 5℃。錯誤的黏合溫度可能導致引子不與模板結合或者錯誤地結合。該步驟時間 1-2 分鐘。

★注意：Annealing 本意為黏合，在 PCR 反應步驟中可理解為退火的意思。

延伸(Extension)

引子結合後，DNA 聚合酶會開始沿著 DNA 鏈合成互補鏈，而達到複製擴增之意。此階段的溫度決定於 DNA 聚合酶的最適溫度，而時間則決定於聚合酶的作用，以及需要合成的 DNA 片斷長度。估計合成 1000bp 大概需要 1 分鐘。

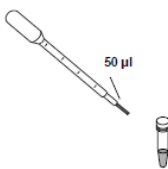
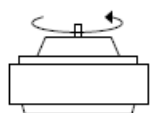


三. 實驗試劑

名稱	份量	數量
InstaGene Matrix,	---	500ul 3 支
ddH ₂ O(),	水	40ml 1 支
GMO control DNA	GMO 陽性對照 DNA	45ul 1 支
GMO Primer	GMO 引物	100ul 1 支
Plant Primer	植物引物	100ul 1 支
Agarose	瓊脂糖	1.2g 1 支
1x TAE buffer	1x TAE 電泳緩衝液	50ml 1 支
Loading Dye	上樣染色液	100ul 1 支
100x Fast Blast DNA Stain	DNA 染色劑	50ul 1 支

四. 實驗步驟

4.1 提取 DNA

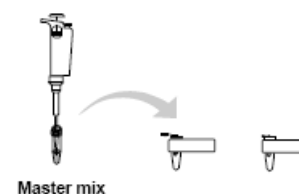
1  在 3 支擰蓋離心管上分別標記 non-GMO, Test A, Test B”	2  稱量大約 1g 的非基因改做綠豆，然後放進研磨中	3 加入 2 次 5ml 水  加入 5ml 的水，然後研磨 2 分鐘，令綠豆變成糊狀。 再加入 5ml 的水，然後繼續研磨，令糊狀物更滑。
4  吸取 50ul 的綠豆糊狀物，放進 “non-GMO” 的小管 ★注意小管中已有 500ul 的 InstaGene Matrix。	5  對被檢測食物(A 和 B)重複進行步驟 2 – 5	6  手指分別輕彈兩管管尖，然後放入 95 度水浴鍋中 5min。水浴後離心 5 分鐘，備用。

4.2 PCR 反應

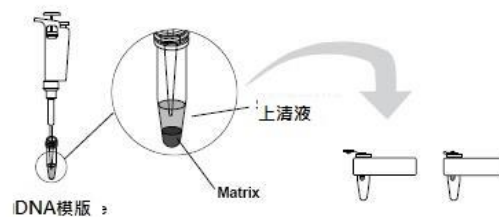
1. 標記 8 支 PCR 小管
2. 標記 8 管 PCR 蓋離心管中，再放於發泡膠支架(foam holder)，放於冰浴中。



3. 按照上表中放入用移液槍吸取 20µl 對應的 Master Mix(見表 1) 於每一支 PCR 管中，注意取每次吸取不同種類的 Master Mix 時，要用新的 tip 頭



4. 用移液槍吸取 20 μ l 對應的 DNA(見表 1)於每一支 PCR 管中，蓋上管蓋；注意加不同種類的 DNA 時要使用不同 tip 頭，在吸取時只吸取上清液，不要吸到下層 Matrix



5. 將 6 支 PCR 管放入 PCR 儀，進行擴增。

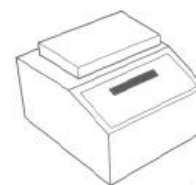
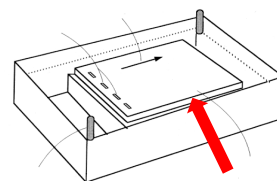


表 1. PCR 小管

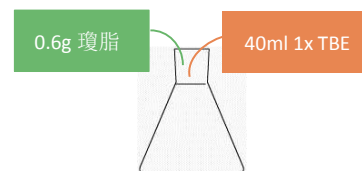
Tube	Master Mix	DNA	備註
1	20 μ l Plant MM (green)	20 μ l Non-GMO food control DNA	非基因改做植物 + 植物引物
2	20 μ l GMO MM (red)	20 μ l Non-GMO food control DNA	非基因改做植物 + 引物
3	20 μ l Plant MM (green)	20 μ l Test food(A) DNA	檢測食物(A) + 植物引物
4	20 μ l GMO MM (red)	20 μ l Test food(A) DNA	檢測食物(A) + GMO 引物
5	20 μ l Plant MM (green)	20 μ l Test food(B) DNA	檢測食物(B) + 植物引物
6	20 μ l GMO MM (red)	20 μ l Test food(B) DNA	檢測食物(B) + GMO 引物
7	20 μ l Plant MM (green)	20 μ l GMO control DNA	GMO 陽性植物 DNA 對照 + 植物引物
8	20 μ l GMO MM (red)	20 μ l GMO control DNA	GMO 陽性植物 DNA 對照 + GMO 引物

4.3 製備瓊脂糖凝膠

1. 拿出電泳槽中的凝膠槽，用膠紙把兩邊封好。

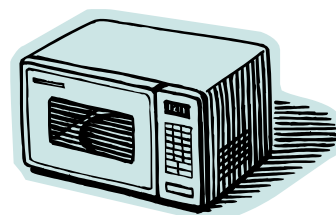


2. 在三角锥形瓶加入 0.6g 的瓊脂糖和 40ml 的 1x TBE



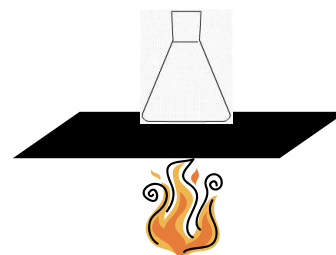
3A. 微波爐加熱法

一開始時用中火加熱 3 分鐘，取出後小心轉動，使試劑混合，然後每次加熱 30 秒，取出後轉動使之混合，直至所有粉末溶解，溶液呈透明才停止加熱，然後放涼至 60°C，並加入 SYBR Green。

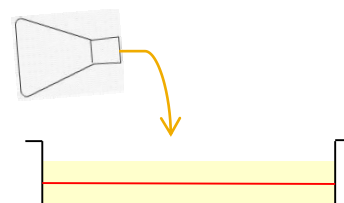


3B. 加熱版法

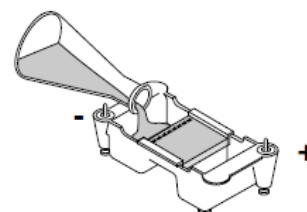
把三角锥形瓶放上加熱版，不時小心轉動，使試劑混合，直至所有粉末溶解和溶液呈透明，然後放涼至 60°C，並加入 SYBR Green。



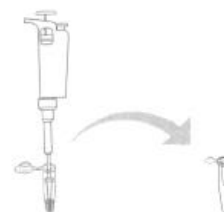
4. 涼卻後把把溶液慢慢倒入凝膠槽中，大約 0.5 - 0.75cm 厚（注意不要產生太多氣泡），圖中所示為凝膠槽側面，注意倒溶液約到紅線位置。溶液倒完後把梳垂直插進尚未凝固的溶液中，靜待 10 - 15 分鐘。



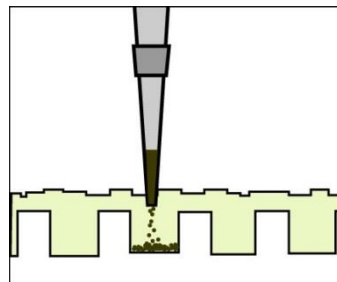
5. 凝膠凝固後，慢慢將梳取出，撕下膠紙，把凝膠槽放回電泳槽，有孔的一邊放在黑色(負極)那一邊，加入緩衝液 1xTBE，份量為覆蓋凝膠，並高出 3mm 左右。(注意：電泳槽中和凝膠所用的電泳緩衝液必須是同一批製備的)。再加入 Sybr Green。



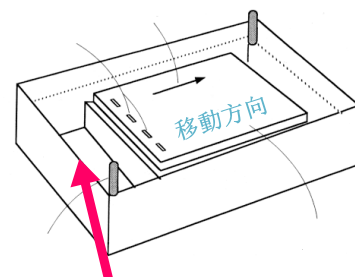
6. 安裝好電泳裝置後，將 PCR 小管放於無蓋離心管中，加入 10μl 的 Loading dye 於每一個樣品中，用移液槍吸噴 3 次，注意每次需用新的 tip 頭



7. 按表 2 順序加入樣品到電泳槽



8. 蓋上凝膠槽的蓋子，接通電源，以100V 電壓, 30分鐘時間進行電泳，DNA會由負極向正極移動(黑色移向紅色方向)。如果金屬片貼附得很好，那麼通電的時候，電極附近就會產生氣泡(紅色箭頭位置)。30分鐘後觀察移動情況，切斷電流，並將凝膠小心地從凝膠槽中取出。

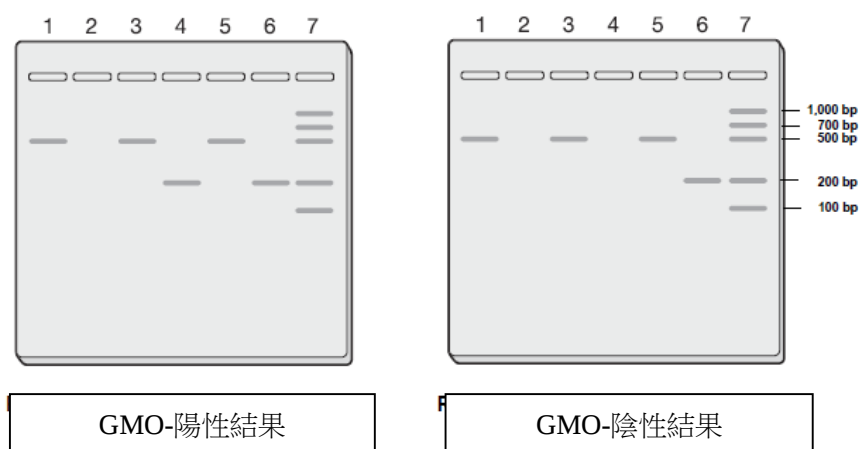


9. 拿出凝膠後，把凝膠放在Blue Light Box上，在sybr Green的染色下，DNA能夠在藍光下顯現

表 2. 於 PCR 小管內加入的樣品

Lane	Sample	樣本	體積
1	Non-GMO food control with plant primer	非基因改做植物 +植物引物[陰性對照]	20uL
2	Non-GMO food control with GMO primer	非基因改做植物 +引物[陰性對照]	20uL
3	Test food with plant primers	檢測食物 +植物引物	20uL
4	Test food with GMO primers	檢測食物 +GMO 引物	20uL
5	GMO positive DNA with plant primers	GMO 陽性植物 DNA 對照 +植物引物[陽性對照]	20uL
6	GMO positive DNA with GMO primer	GMO 陽性植物 DNA 對照 +GMO 引物[陽性對照]	20uL
7	PCR molecular weight ruler	PCR 分子尺	20uL

五. 實驗結果



思考題

- 除了用研磨外，有沒有其它提取食物 DNA 的方法？

- 如何解讀上圖結果？陽性和陰性對照物有什麼作用？
