

# 基因轉殖番茄檢測技術之研究<sup>1</sup>

楊祐俊<sup>2</sup>、陳盈君<sup>2</sup>、張隆仁<sup>2</sup>

## 摘 要

本研究的主要目的在於建立一個可信賴的基因轉殖番茄檢測技術。透過NCBI資料庫的論文檢索及序列比對，我們找到了一段番茄特有的基因序列“LAT52”，針對該序列設計一組正對照檢測引子，測試出適合的反應條件，檢測的敏感度可達到0.5 ng至0.1 ng之間；並且分別對於4種不同的番茄品種以及9種不同的作物進行定性測試，結果發現所有的番茄DNA皆能增幅出預期的片段，證實該引子確實可以做為一個良好的陽性對照組，用來確定DNA品質以及PCR反應條件無誤。除此之外，配合相關研究單位，針對所取得的轉殖番茄材料，我們也成功地建立有效率的複合引子聚合酶連鎖反應檢測技術，節省檢測所需的時間與金錢。

**關鍵字：**番茄、基因轉殖作物、檢測技術。

## 前 言

西元1994年，全世界第一個延緩果實軟化的基因改造番茄「莎弗」(Flavr Savr™)在美國核准上市之後<sup>(4)</sup>，開啓了農業生技時代的新紀元。隨著生物技術的日益發達，有關於轉殖植物的研究也愈來愈多，更有不少基因改良後的作物已在市場上流通。目前市面上已出現的基因轉殖作物包括大豆、玉米、油菜、棉花、木瓜、馬鈴薯、稻、南瓜、甜菜及番茄等10種，另開發中的有蘋果、香蕉、大麥、椰子、芒果、鳳梨及甘薯等7種。並且根據統計，自1996年基轉作物首次商業種植以來的十年間，其種植的面積每年都以兩位數字的速度增長，種植的國家也從6個增至21個<sup>(3)</sup>，在2005年時，據估算，生物技術作物的全球市場價值為52.5億美元，相當於2005年全球作物保護市場(340.2億美元)的15%，以及全球商業種子市場(300億美元)的18%，並且預估2006年將超過55億美元<sup>(1,2)</sup>。

然而在遺傳工程帶來便利的同時，目前也愈來愈多的研究發現，這項技術亦帶來一些非預期的問題，主要是對於基因轉殖食品安全的憂慮，以及基因轉殖作物所造成的生態影響<sup>(5,6)</sup>。但無論基因轉殖爭議再大，越來越多的生物技術公司及政府研究團隊投入大量研發經費生產此類基因改良產品，這也是個不爭的事實，更是一個不得不面對的世界趨勢。因此，如何建立一套可信賴且有效率的檢測方法，透過具有公信力的實驗，在未標示的食品中檢測出

<sup>1</sup> 行政院農業委員會臺中區農業改良場研究報告第 0659 號。

<sup>2</sup> 行政院農業委員會臺中區農業改良場國防訓儲研究助理、助理研究員、副研究員。

哪些是基因改良食品，提供給消費群眾們自己做選擇，才能符合目前全世界的科技潮流，保障消費者的權利。

目前已發展之基因轉殖檢測技術，大多以聚合酶連鎖反應(Polymerase Chain Reaction, PCR)和酵素結合免疫吸附反應(Enzyme-linked immunoassay, ELISA)做為評估依據，兩者分別是針對核酸以及蛋白質做為檢測標的，皆有其學理性與應用性。但因為轉殖基因的種類眾多，不太可能針對每一種蛋白質製備抗體，且這些待檢測的蛋白質可能會因為加工過程而失去活性或分解，使得抗體檢測結果偽陰性的機率增加。因此目前基因轉殖檢測技術多採用PCR法，因為該方法有操作方法簡單、敏感度高且較能系統化及做多種轉殖基因之大量偵測等優點<sup>(7)</sup>。然而在進行PCR法檢測時，除了待檢測的轉殖序列外，還必須同時進行正對照組試驗以確立檢驗結果的可信度，因此如何設計一組正對照試驗是相當重要的。目前大部份檢測技術多以針對該植物種類設計一組專一的PCR引子為陽性對照組，這樣的優點除了可以確定DNA品質、PCR反應條件無誤外，還能判斷是否為預期的檢測作物，例如檢測大豆可以針對lectin基因、玉米係針對invertase基因<sup>(8,9)</sup>以及木瓜可以針對papain基因設計該物種的特異引子<sup>(10)</sup>，做為陽性的對照反應。

至目前為止，在國內還無相關的研究報告提出適合番茄作物的專一引子，因此本研究配合相關研究單位，針對所取得的轉殖番茄材料，設計了一組陽性對照反應引子，以及一組針對該轉殖基因之檢測引子，成功地建立一套有效率且可信賴的基因轉殖番茄植株檢測技術。

## 材料與方法

### 一、試驗材料

本研究所採用之試驗材料，採集自台中區農業改良場，或由種苗改良繁殖場提供，包括4種不同的番茄品種(姑娘、紅美玲、黃壽、R8-1)、4種常見的轉殖作物(向日葵、油菜、稻米、玉米)，以及5種茄科作物材料(茄子、辣椒、青椒、煙草、馬鈴薯)。

### 二、研究方法

- (一)植物體基因組DNA之萃取：採用Plant Genomic DNA Purification Kit (GENEMARK Technology, Taiwan)萃取，操作程序如下：秤取鮮重約0.1 g番茄葉片置於1.5 ml之離心管，加入液態氮，快速研磨成細粉後加入400  $\mu$ l的萃取液以及4  $\mu$ l的proteinase K，混合均勻後於65°C下反應20分鐘，每隔2~3分鐘拿出震盪。加入130  $\mu$ l的precipitation solution，均勻混合後置於冰上5分鐘，於室溫下利用離心機 (Microguge 18 Centrifuge, BECKMAN, Germany)以14,000 rpm轉速下離心5分鐘，接著取上清液至另一新分離管 (spin column)，放置於收集管(collection tube)中，以14,000 rpm轉速下離心3分鐘，讓DNA吸附於膜上。再用binding buffer將DNA溶出，然後轉換至另一新的分離管 (spin column) 中，以14,000 rpm轉速下離心5分鐘，再用700  $\mu$ l的Wash buffer清洗兩次，離心1分鐘將雜質洗淨，最後加入150  $\mu$ l的ddH<sub>2</sub>O溶出DNA並於-20°C中保存。

- (二)DNA總量分析：使用Quant-iT dsDNA BR assay kit (Invitrogen, USA)搭配Qubit Fluorometer分光光度儀定量之，主要可以測量的範圍在2~1,000 ng之間，操作程序如下：以1:200比例將Quant-iT reagent與Quant-iT buffer稀釋成Working Solution，取190 ul Working Solution加入10 ul的標準品(分別為0 ng與100 ng)，在測量待測樣品前先建立標準曲線，之後的測量只需加入1 ul的樣品，劇烈搖晃2-3秒後靜置2分鐘，以Qubit Fluorometer分光光度儀讀值測量。
- (三)PCR引子之設計<sup>(11)</sup>：利用Vector NTI Suite 6.0 (Invitrogen, USA)軟體設計出長約20~25 bp的引子，其GC百分比約在40%~60%之間，黏合溫度約在50°C~55°C之間，並注意引子本身不會形成二次結構或引子對間不會形成互補結構，3'端的序列最好為C或G。
- (四)聚合酶連鎖反應(Polymerase Chain Reaction, PCR)<sup>(12)</sup>：反應總體積為25 ul，內含10 mM Tris-HCl (pH 8.3)、50 mM KCl、1.5 mM MgCl<sub>2</sub>、0.2 mM dNTP、10 mM primer pair、1.2 unit Tag polymerase (GENEMARK Technology, Taiwan)以及不同植物的DNA模版。聚合酶連鎖反應係於GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystem, USA)進行，反應溫度條件設定依標準流程進行之，先以94°C反應10分鐘，接著以94°C反應1分鐘、50~55°C反應1分鐘(此溫度依據所設計引子之不同而調整)以及72°C反應1分鐘，包含上述三步驟重覆35循環，最後以72°C反應10分鐘。經聚合酶連鎖反應所增幅之產物，以2%的agarose在TBE buffer中進行DNA電泳，並以UV光檢視、照相及貯存影像於電泳影像分析系統 (IS 2000 Digital Imaging System, Alpha Innotech Corporation)。
- (五)DNA序列選殖定序：
1. DNA膠體回收：該實驗以Gel Extraction Kit (Viogene, USA)來萃取瓊脂凝膠中的DNA片段。操作流程如下：將包含所需DNA片段之瓊脂凝膠切下，置入離心試管中，以100 mg對應300 ul Buffer的比例將Buffer NT1加入離心試管中，置入50°C水浴槽中10分鐘。待凝膠完全溶解後，把該溶解液移入純化組件所附的離心管柱中(spin column)中，在室溫下以14,000 rpm離心1分鐘後，丟棄下層液。加入700 ul的Buffer NT3，以同樣條件進行離心，並重複Buffer清洗動作及離心步驟，最後以離心14,000 rpm離心3分鐘去除殘存的酒精。之後將上層套管移入乾淨的離心試管中，加入30 ul的ddH<sub>2</sub>O靜置於室溫下2分鐘後，以14,000 rpm離心2分鐘，將溶下的DNA置於-20°C保存備用。
  2. 接合反應(Ligation)：使用pOSI-T cloning Kit (GENEMARK Technology, Taiwan)進行選殖試驗。取100 ng膠體回收後的DNA加入1 ul的載體，以及1ul 10X的接合緩衝溶液(0.66 M Tris-HCl pH 7.5、5.50 mM MgCl<sub>2</sub>、50 mM DTT)相混合後，加入1ul T4 DNA接合酵素(Ligase)，最後補足水至10 ul於4 °C下進行反應12小時。
  3. 轉型作用(Transformation)：取100 ul的大腸桿菌(*E. coli*, DH5 $\alpha$ )勝任細胞加入10 ul接合反應處理過的DNA，靜置於冰上30分鐘後，移入42°C的水浴槽內進行熱休克反應2分鐘，立刻移入冰上，加入500 ul LB培養液於37°C下培養1小時，取適量塗抹在含Kanamycin之篩選用培養基中，於37°C下培養12~16小時。

4. 轉型成功確認：利用選殖試劑組所提供的選殖確定引子對進行菌落PCR反應，反應溫度條件設定係依據依照標準流程進行之，先以94℃反應10分鐘，接著以94℃ 1分鐘、60℃ 1分鐘(此溫度所設計引子之不同而調整)、72℃ 1分鐘等三步驟重覆35循環，最後以72℃反應10分鐘。經聚合酶連鎖反應所增幅之產物，以2%的agarose在TBE buffer中進行DNA電泳，並以UV光檢視確認所增加的片段大小無誤後，交由明欣生技公司抽取質體進行定序 (ABI 310 XL DNA Analyzer)。

(六)序列比對分析：將定序後的結果利用NCBI資料庫，藉由基因序列的比對(Blastn)，在目前所發表的序列中搜尋其相似度較高的序列，最後以Mega3軟體進行ClustalW Alignment分析。

## 結 果

### 番茄作物正對照引子設計

藉由NCBI資料庫的論文檢索，我們找到了一個番茄特有的基因序列LAT52<sup>(13)</sup> (Genbank No. 19263)，該基因在資料庫上公佈的全長共有1,810個鹼基對，包含兩個exon，分別位於667-820與1279-1610鹼基對之間，合計為486個鹼基對，共轉譯出161個胺基酸，目前的研究資料認為該蛋白質與番茄的花粉管發育相關<sup>(14)</sup>。進一步，我們利用該基因序列進行比對，結果發現除了該番茄LAT52基因之外，並沒有相似的序列發表在其它作物之資料庫上，因此利用該序列做為一個番茄的專一對照組有其相當高的可行性。

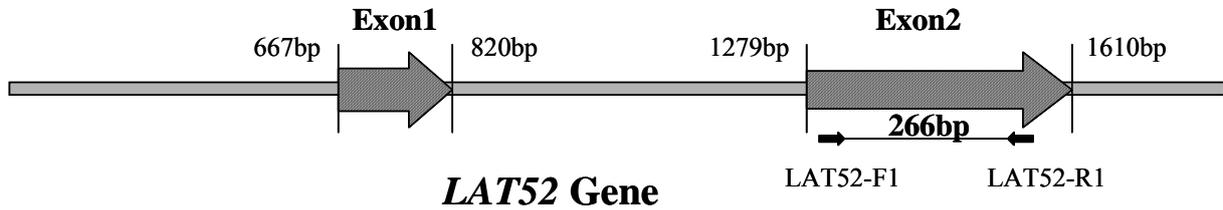
本研究選擇該基因的exon2序列作為引子設計模版，因為exon區域相較於intron區域有較高的遺傳保留性，做為一個檢測番茄的正對照組，有較佳的再現性，又exon2的片段長度較大於exon1，在引子設計上有更靈活的選擇性。利用Vector NTI軟體輔助，設計出兩條正對照引子：

LAT52-F1：5'-CAGGAACATCAGCACAGAGGC-3'、

LAT52-R1：5'-TGCATCCTTGAACAGACTCAGC-3'、

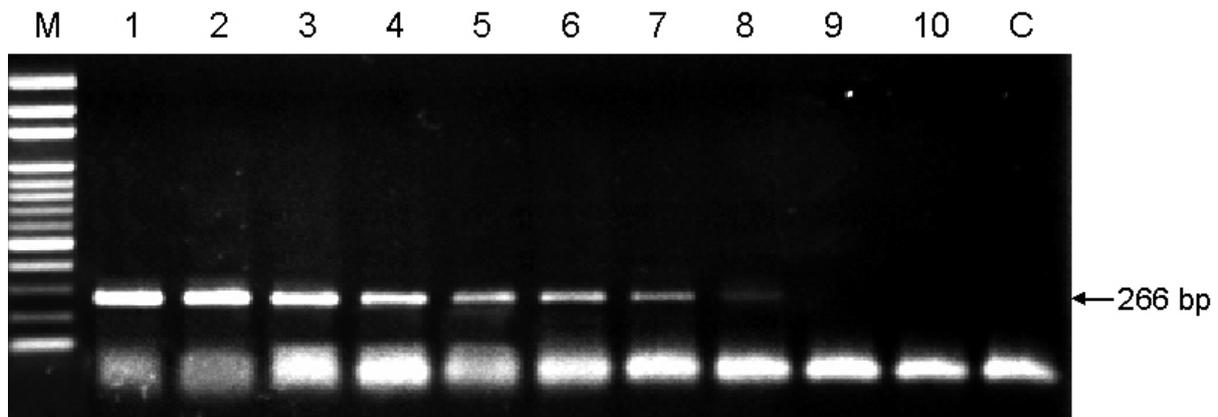
GC百分比分別約為57%與50%，黏合溫度控制約在50℃~55℃之間，這樣相近的好處能夠讓引子對在同一反應條件下進行，有利於設計複合引子的聚合酶連鎖反應。除此之外，避免引子本身形成二次結構，或引子對間形成互補結構，3'端的序列最好為C或G等。設計的引子位置與基因的簡圖如圖一所示，預估增幅出266個鹼基對片段。

PCR的反應條件主要依照標準流程進行之，除了調整引子的黏合溫度外，還調整鎂離子與dNTP的濃度比例，最後選擇的最適黏合溫度在52℃，接著進行引子對靈敏度測試，約取濃度320 ng的染色體DNA，進行不同濃度的序列稀釋，結果如圖二所示，最終可以看到明顯條帶的DNA濃度介於0.5至0.1 ng之間，證實該引子具有良好的靈敏度，可以做為一個好的正對照組。



圖一、*LAT52*基因之結構簡圖與聚合酶連鎖反應引子之位置標示圖。

Fig. 1. The schematic diagram of the *LAT52* gene structure and the positions of PCR primer pairs (LAT52-F1/LAT52-R1). A 266 bp DNA fragment were amplified with primer pairs LAT52-F1/LAT52-R1.

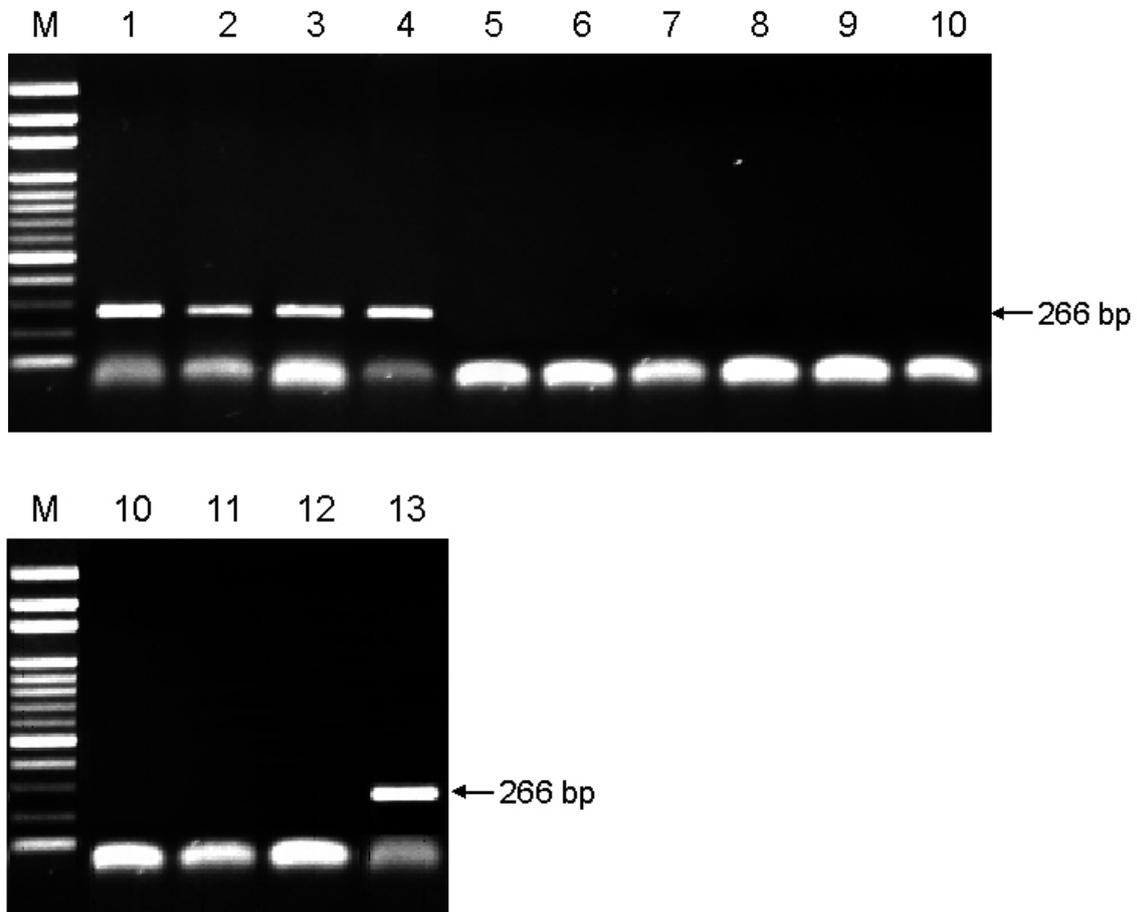


圖二、PCR 引子檢測靈敏度測試。

Fig. 2. The detection sensitivity assay of the PCR primer pairs. PCR analyses were performed with serial dilutions of tomato genomic DNA. (Lanes 1-10: 320, 160, 80, 40, 20, 10, 2.5, 0.5, 0.1 and 0.02 ng; lane C: negative control; lane M: maker).

### 引子對專一性測試

針對引子專一性試驗，本實驗收集了4種不同的番茄品種(姑娘、紅美玲、黃壽、R8-1)、4種常見的轉殖作物(向日葵、油菜、稻米、玉米)，以及5種茄科作物材料(茄子、辣椒、青椒、煙草、馬鈴薯)，在萃取完植物染色體DNA後，將濃度控制在約100 ng進行PCR反應。結果如圖三所示，在本實驗所收集到的4種番茄材料中，皆能明顯的增幅出預期的片段大小，表示在針對番茄檢測時，該引子對當成一個正對照組引子是可行的，而且在大部份的相近物種與常見的轉殖作物皆未能放大出該片段，僅在馬鈴薯材料上增幅出相同大小的片段，因此我們也進一步的將該片段選殖，進行定序分析。



圖三、LAT52 引子檢測專一性測試。M. Marker；1. 番茄(小姑娘)；2. 番茄(紅美玲)；3. 番茄(黃壽)；4. 番茄(R8-1)；5. 向日葵；6. 油菜；7. 稻米；8. 玉米；9. 茄子；10. 辣椒；11. 青椒；12. 煙草；13. 馬鈴薯。

Fig. 3. The detection specificity assay of the PCR primer pairs. M. Marker；Lane 1-4. tomato variety；5. sunflower；6. canola；7. rice；8. maize；9. eggplant；10. pepper；11. sweet pepper；12. tobacco；13. potato。

### 馬鈴薯 *LAT52* 序列分析

將定序後的結果當成模版，藉由NCBI資料庫在目前所發表過的序列中進行比對 (Blastn)，結果發現只有番茄的 *LAT52* 與其相似，且序列的相似度高達94% (圖四)，顯示在馬鈴薯的基因體中也有一個與 *LAT52* 很類似的基因，至於該基因是否也與發表在番茄的 *LAT52* 基因結構相同，則需要更進一步將全長定序才能證實。

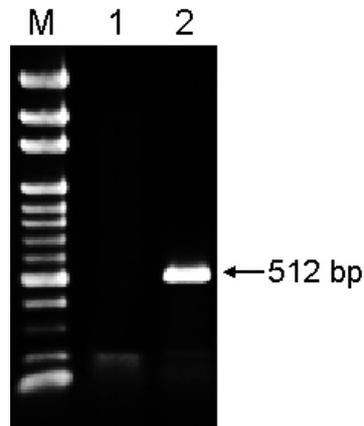
		Section 1					
	(1)	1	10	20	30	40	51
Potato	(1)	CAGGAACATCAGCACAGAGGCCGAGACGTTCTCAGTGGAGGGTGTGACAGA					
Tamato	(1)	CAGGAACATCAGCACAGAGGCTGAGACGTTTTCAGTGGAAAGGTGTGACTGA					
Consensus	(1)	CAGGAACATCAGCACAGAGGC	GAGACGTT	TCAGTGGAA	GGTGTGAC	GA	
		Section 2					
	(52)	52	60	70	80	90	102
Potato	(52)	CAAGGATGGAAGGTACAAATTAACCGTTGATGGGGACCACGAGAACGATAT					
Tamato	(52)	TAAAGATGGCAAGGTACAAATTAACCGTTAATGGAGACCACGAGAACGATAT					
Consensus	(52)	AA GATGG	AAGTACAAATTAACCGTT	ATGG	GACCACGAGAACGATAT		
		Section 3					
	(103)	103	110	120	130	140	153
Potato	(103)	TTGTGAGGTGACAGTTGTCAAAAGCCCAAGGGAGGACTGCAAAGAGAGTGT					
Tamato	(103)	TTGCAGGTGACAGTTGTGAAAAGCCCAAGGGAGGACTGCAAAGAGAGTGT					
Consensus	(103)	TTG GAGGTGACAGTTGT	AAAAGCCCAAGGGAGGACTGCAAAGAGAGTGT				
		Section 4					
	(154)	154	160	170	180	190	204
Potato	(154)	GTCAGGATATGAAAAGGCAAGAATTGAGTGTAGTACAATGTTGGTATCCA					
Tamato	(154)	GTCTGGATATGAAAAGGCAAGAATTGAGTGTAGTGACAATGTTGGTATCCA					
Consensus	(154)	GTC GGATATGAAAAGGCAAGAATTGAGTGTAGT	ACAATGTTGGTATCCA				
		Section 5					
	(205)	205	210	220	230	240	255
Potato	(205)	CAATGCTGTGAGATATGCCAATCCACTTTTCTTCATGAAGGCTGAGTCTGT					
Tamato	(205)	CAATGCTGTGAGATTTGCCAATCCACTTTTCTTCATGAAGGCTGAGTCTGT					
Consensus	(205)	CAATGCTGTGAGAT	TGCCAATCCACTTTTCTTCATGAAGGCTGAGTCTGT				
		Section 6					
	(256)	256	267				
Potato	(256)	TCAAGGATGCAA					
Tamato	(256)	TCAAGGATGCAA					
Consensus	(256)	TCAAGGATGCAA					

圖四、番茄與馬鈴薯之 *LAT52* 部份基因序列比對。

Fig. 4. Alignment of *LAT52* partial gene sequences obtained from tomato and potato.

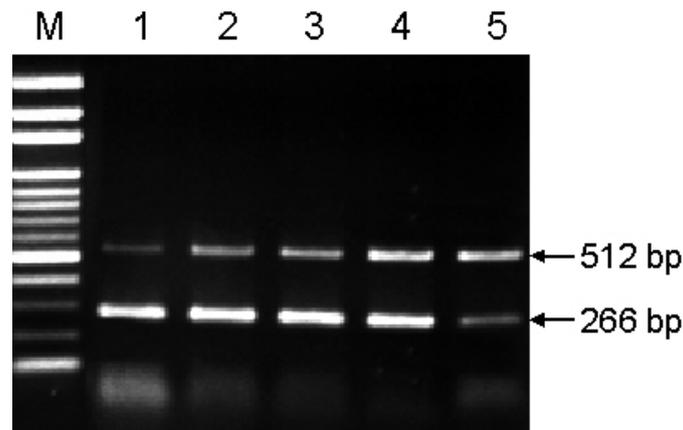
### 多重複引子PCR反應

此外，配合相關研究單位進行轉殖番茄檢測技術開發之研究，本試驗也針對該轉殖基因設計了一組專一的引子對（該引子全為自行設計，由於本研究涉及日後檢測制度之實施，因此文中將不提及引子代號及其詳細序列），除了能夠單獨使用增幅出預期的片段(圖五)，更能搭配本研究所設計的正對照引子，調整不同的引子濃度以10:10、10:8、10:6、10:4以及10:2 uM等混合比例，設計出多重複引子聚合酶連鎖反應。結果顯示在正對照與目標基因引子對比例10:4 uM的條件下，能夠得到最明顯的條帶(圖六)，建立有效率的多重複聚合酶連鎖之基因轉殖檢測技術，節省檢測所需的時間與金錢。



圖五、基因轉殖番茄之外源基因檢測。

Fig. 5. The foreign gene detection with the transgenic tomato. (Lane 1: negative control, Lane 2: transgenic tomato. lane M: maker).



圖六、基因轉殖番茄之複合引子聚合酶連鎖反應。

Fig. 6. Multiplex PCR reaction with the transgenic tomato. (Lane 1-5: transgenic tomato. lane M: maker). PCR analyses were performed with the transgenic tomato by different mixed ratio of pooled primer pairs from CP primer to LAT52 primer. (Lane1-5: 10:10, 10:8, 10:6, 10:4 and 10:2 uM).

## 討 論

本研究中，我們認為要建立一個可信賴的基因轉殖番茄檢測技術，除了要針對轉殖的外來基因設計一組專一的引子對外，事先設計一組適合的正對照引子也是相當重要的目標，因為儘管抽取植物染色體DNA的技術已經相當成熟，但畢竟經過人為的操作，就有可能產生誤差，而且檢測樣品的取樣、保存方式以及新鮮程度上也不盡相同，因此為了避免檢測結果呈現偽陰性，並確立檢驗結果的可信度，本論文內容多以正對照組試驗之建立做為討論。

目前為止，國內針對番茄作物並無公開的資料可提供一好的對照引子，本研究藉由生物資訊資料庫的論文檢索及序列比對，找到了一段番茄特有基因序列 $LAT52$ ，針對該序列的 $exon2$ 設計了一組正對照引子，測試該對引子的偵測靈敏度可達到 $0.5\text{ ng}\sim 0.1\text{ ng}$ 之間，如果換算成轉基因與非轉基因樣品的混合比例約為 $1:100$ ，這對於將來在面對大量檢測樣品時，所必須採用的混合抽樣檢測方式已經足以應付。此外，針對專一性試驗，相較於前人的研究<sup>(15)</sup>，我們也證實了該基因確實廣泛地存在番茄作物的染色體中，這個結果也代表，就做為一個基因檢測的正對照組特性而言，已經足以提供檢測者所必需的資訊，例如抽取的DNA品質以及PCR反應條件無誤...等，換言之，只要該組試驗未出現預期的條帶，就代表DNA的品質或反應的條件出現問題，檢驗人員必須重新再操作一次，找出問題所在。然而，對於所檢測的材料是否必定是番茄作物，本論文的結果卻與先前研究所報導的並不一致，我們發現在馬鈴薯的染色體中也能放大出大小相似的片段，因此我們進一步將該片段選殖並且定序，進行比對的結果顯示該序列確實與目前所發表的序列不同，但卻有高達94%的相似程度，至於該基因跟發表在番茄的 $LAT52$ 基因是否為同源或同功基因，則需要更進一步的研究才能證實。

本研究已針對轉殖番茄作物，成功地建立有效率的複合引子聚合酶連鎖反應檢測技術，並且對於 $LAT52$ 基因序列，提供了詳細的檢測分析結果，目前也已經利用本研究在馬鈴薯所選殖的序列，比較與番茄 $LAT52$ 基因序列的些許差異，設計出更專一的番茄特有序列引子，進一步驗證所檢測的樣品是否確定為番茄作物，針對未知的取樣材料進行檢測，增加應用在檢測加工食品上的可行性，建立更完善的基因轉殖番茄檢測技術。

## 參考文獻

1. 潘子明 2006 科技發展政策報導 SR9504。
2. 牛惠之、郭華仁、滕沛倫、彭英泰、陳詩欣 2005 基因改造產品-發展、爭議、管理與規範 p.33-35 農委會動植物防疫檢疫局。
3. James, C. 2006. Global status of commercialized Biotech/GM crops:2006. ISAAA.
4. Food and Drug Administration (FDA). 1994. Fed. Regist. 26700-26711.
5. Losey, J. E., L. S. Rayor and M. E. Carter. 1999. Transgenic pollen harms monarch larvae. Nature. 399(6733): 214.
6. Hilbeck, A., M. Baumgartner, P. Fried and F. Bigler. 1998. Effects of transgenic *Bacillus thuringiensis* corn-fed prey on mortality and development time of immature *Chrysoperla carnea* (Neuroptera: Chrysopidae). Environmental Entomology. 27: 480-487.
7. Miraglia, M., K. G. Berdal, C. Brera, P. Corbisier, A. Holst-Jensen, E. J. Kok, H. J. Marvin, H. Schimmel, J. Rentsch, J. P. van Rie and J. Zagon. 2004. Detection and traceability of genetically modified organisms in the food production chain. Food and Chemical Toxicology. 42(7): 1157-1180.

8. Meyer, R. 1999. Development and application of DNA analytical methods for the detection of GMOs in food. *Food Control*. 10: 391-399.
9. Lin, H. Y., L. C. Chiueh and D. Y. C. Shih. 2000. Detection of genetically modified soybeans and maize by the polymerase chain reaction method. *Journal of Food and Drug Analysis* 8: 200-207.
10. Cohen, L. W., V. M. Coghlan and L. C. Dihel. 1986. Cloning and sequencing of papain-encoding cDNA. *Gene*. 48(2-3): 219-227.
11. Lowe, T., J. Sharefkin, S. Q. Yang and C. W. Dieffenbach. 1990. A computer program for selection of oligonucleotide primers for polymerase chain reactions. *Nucleic Acids Research*. 18(7): 1757-1761.
12. Arnheim, N. and H. Erlich. 1992. Polymerase chain reaction strategy. *Annual Review of Biochemistry*. 61: 131-156.
13. Twell, D., R. Wing, J. Yamaguchi and S. McCormick. 1989. Isolation and expression of an anther-specific gene from tomato. *Molecular and general genetics*. 217(2-3): 240-245.
14. Muschietti, J., L. Dircks, G. Vancanneyt and S. McCormick. 1994. LAT52 protein is essential for tomato pollen development: pollen expressing antisense LAT52 RNA hydrates and germinates abnormally and cannot achieve fertilization. *Plant Journal*. 6: 21-338.
15. Yang, L., A. Pan, J. Jia, J. Ding, J. Chen, H. Cheng, C. Zhang and D. Zhang. 2005 Validation of a tomato-specific gene, *LAT52*, used as an endogenous reference gene in qualitative and real-time quantitative PCR detection of transgenic tomatoes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53(2): 183-190.

# The Study of the Detection Technique for Genetically Modified Tomato<sup>1</sup>

Yu-Chun Yang<sup>2</sup>, Ying-Chun Chen<sup>2</sup> and Long-Zen Chang<sup>2</sup>

## ABSTRACT

The purpose of this study was to establish a reliable detection method for transgenic tomato identification. We found a tomato (*Lycopersicon esculentum*) species-specific gene sequence, *LAT52*, by means of the paper search and sequence blast at NCBI database. The primer sets were designed as a positive control against this sequence. The suitable condition of PCR reaction was tested and the detection sensitivities were between 0.5 and 0.1 ng of tomato genomic DNA. Qualitative PCR analyses were assayed with 4 different tomato varieties and 9 different plants and those expected amplified products were obtained with all of tomato materials. These results demonstrated the primer set could be utilized to confirm the genomic DNA quality and the PCR condition without mistake. In addition, we have successfully established a multiplex PCR assay technique to detect transgenic tomato material accompany with the related research organization to save the time and money of detection.

**Key words:** tomato, genetically modified crops, detection technique.

---

<sup>1</sup>Contribution No. 0659 from Taichung DARES, COA.

<sup>2</sup>DIRDS Research Assistant, Assistant Agronomist and Associate Agronomist of Taichung DARES, COA.