

蒲公英與其偽品物種 5.8S rDNA 序列及 PCR-RFLP 之分子鑑定

袁秋英^{1*}、林李昌¹、郭昭麟²、蔣慕琰¹

¹行政院農委會農業藥物毒物試驗所公害防治組

²中國醫藥大學中藥資源學系

摘要

近年中草藥之研發與運用倍受矚目，然而藥材基原常出現代用品及偽品，使用不當易影響療效，甚至發生中毒現象。由於分子標誌普遍應用於植物物種之鑑定，其中針對基原植物 18S-26S rDNA 序列之比對，已漸成為鑑定中草藥真偽的有利證據之一。本研究利用 ITS₁-5.8S rRNA-ITS₂ 序列之差異及 PCR-RFLP 技術，建立蒲公英 (*Taraxacum mongolicum* Hand.-Mazz.) 及其偽品或替代品之檢測方法。試驗結果顯示蒲公英、臺灣蒲公英 (*T. formosanum* Kitanlura) 及西洋蒲公英 (*T. officinale* Wiggers) 等 3 種蒲公英，ITS₁-5.8S rRNA-ITS₂ 序列長度皆為 643 bp；而兔仔菜 (*Ixeris chinensis* (Thunb.) Nakai)、刀傷草 (*I. laevigata* (Bl.) Sch.)、鵝仔草 (*Pterocypsela indica* L.)、苦蕒菜 (*Sonchus oleraceus* L.)、黃鸚菜 (*Youngia japonica* L.)、地膽草 (*Elephantopus mollis* Kunch) 及紫背草 (*Emilia sonchifolia* (L.) DC. var. *javanica* (Burm. F.) Mattfeld) 等 7 種偽品基原植物 ITS₁-5.8S rRNA-ITS₂ 序列長度界於 634-645 bp 之間。蒲公英屬植物之相似度為 95-99%；蒲公英屬植物與 7 種偽品之相似度則介於 80-88% 之間。經由比對 3 種蒲公英及 7 種偽

品基原植物 5.8S rRNA-ITS 核酸片段之異同，分別利用 *Sph* I、*Mse* I 及 *Bmr* I 限制酶反應，可將蒲公英屬植物 5.8S rRNA-ITS 核酸片段，切割為 2-4 條不同長度之多型性條帶。本研究所建立之 PCR-RFLP 檢測技術，可有效及正確區別蒲公英藥材基原之真偽，可提供為中草藥品質控管及基原鑑定之依據。

關鍵詞：蒲公英、中藥、分子鑑定、核糖體核酸、間隔區、聚合酶鏈鎖反應-限制酶片段長度多型性

PCR-RFLP marker of ribosomal DNA used in detection of adulteration species of *Taraxacum mongolicum*

Chiou-Ing Yuan^{1*}, Li-Chang Lin¹, Chao-Lin Kuo² and Mou-Yen Chiang¹

¹ Taiwan Agricultural Chemicals and Toxic Substances Research Institute, Wufeng, Taichung Hsien 41358, Taiwan ROC

² China Medical University, Taichung 40402, Taiwan ROC

ABSTRACT

Substitutes and adulterants of traditional Chinese medicine (TCM) materials are often introduced intentionally or accidentally, thus

縮寫字：TCM, traditional Chinese medicine; rDNA, ribosomal DNA; rRNA, ribosomal RNA; ITS, internal transcribed spacer; PCR-RFLP, Polymerase chain reaction -Restriction Fragment Length Polymorphism; RAPD, Randomly amplified polymorphic DNA.

* 通信作者, yci@tactri.gov.tw

投稿日期：2007 年 8 月 1 日

接受日期：2007 年 10 月 25 日

作物、環境與生物資訊 4:285-296 (2007)

Crop, Environment & Bioinformatics 4:285-296 (2007)

189 Chung-Cheng Rd., Wufeng, Taichung Hsien

41301, Taiwan ROC

serious interfering with their therapeutic effects, even leading to life-threatening poisoning. DNA markers have been widely used for identification of plant species in recent decade. Novel methods for molecular authentication of *Taraxacum mongolicum* have established in this study, based on direct sequencing of the internal transcribed spacer (ITS) region of 18S-26S ribosomal DNA (rDNA) and PCR-restriction fragment length polymorphism (RFLP). The whole length of ITS1-5.8S rRNA-ITS2 region was 643 bp in *T. mongolicum*, *T. formosanum* and *T. officinale*, and was 634-645 bp in the seven adulterant species. The similarity of ITS1-5.8S rRNA-ITS2 regions among *Taraxacum* species and between *Taraxacum* species and their adulterant species were 95-99% and 80-88%, respectively. The PCR product of three *Taraxacum* species and seven adulterants on the 5.8S rRNA-ITS were digested with the restriction endonuclease *Sph* I, *Mse* I and *Bmr* I. Each fragment gave unique electrophoretic profiles for three *Taraxacum* species. This method provides an effective and accurate identification of *Taraxacum* species.

Key words: *Taraxacum mongolicum*, Traditional Chinese medicine (TCM), Molecular marker, Ribosomal DNA, Internal transcribed spacer (ITS), Polymerase chain reaction -Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP).

前言

近年西藥在研發過程中，已面臨重大瓶頸，替代療法(Alternative medicine)的風潮，使得中草藥成為備受注目的研究重點。世界衛生組織(World Organization, WHO)分別於 1996 及 1998 年訂定及公布「草藥評估準則 (Guidelines for the Assessment of Herbal Medicines)」及「藥用植物原料品質管控方法(Quality Control Methods for Medicinal Plant Materials)」，其主要目的為建立中草藥的適當法規標準、藥品品質、安全性及藥效的評估步驟，進而協助會員國將草藥的發展列入國家政策與執行相關計畫之考量(Zhang 2003)。為因應全球醫藥產業大力投注於草藥療效研發的趨勢，我國行政院經

濟部於 2000 年提出「中草藥產業技術發展五年計畫」，積極推動中草藥產業技術發展(Promotion Office of Biomedical Technology Department of Industrial Technology Ministry of Economic Affairs 2007)。衛生署中醫藥委員會同時為了提升臺灣中草藥國際化之競爭力，規畫籌設「中藥品質管制中心」，訂定藥品 CMC (Chemistry, Manufacture and Control)規範並推動中藥廠全面實施 cGMP 系統，欲使得中草藥產品品質符合安全有效、均一性及再現性的目標(Lin *et al.* 2006)。

臺灣發展中草藥的最大優勢為具備優良的中草藥製造技術，然而由於受限於栽種面積及昂貴工資等因素，大約 90%中藥材皆需仰賴中國進口。由於人工種植的藥材追求量產，致使品種退化及品系混雜，造成藥材的藥用成分含量大幅降低，過量採集使得某些物種瀕於滅絕，而採用替代的偽劣植材，品質難以掌控成為重要的瓶頸(Lin and Zn 2003)。目前臺灣市售草藥也由於藥材來源混淆、同名異物及同物異名的情形，容易發生誤用、混用以及偽劣藥材等問題(Tong *et al.* 1999, Committee of Chinese Medicine and Pharmacy 2002, Zhang 2006)，嚴重影響療效及用藥之安全性。因此如何有效鑑定及管控進口藥材，以提升臺灣中草藥品質及確保國人健康，為當前刻不容緩的重要課題。

中草藥性狀和顯微鑑定的傳統方法可分為四類：性狀鑑定法、顯微鑑定法、理化鑑定法及生物鑑定法(Lin and Zn 2003)。由於傳統顯微鑑定之操作技術及判讀組織異同之難度較高，且全草用藥植材必須採取多處不同部位檢驗，以及藥粉樣品組織形態被破壞，鏡檢結果判讀不易等問題。近年生物技術限制酶(Restriction enzyme)及聚合酶鏈鎖反應(Polymerase Chain Reaction, PCR)技術研發以來，分子標誌(molecular marker)被普遍使用於核酸序列的差異比對，由於 DNA 分子標誌法具有專一性、穩定性、微

量、準確、易操作及快速等優點，進而應用於鑑定物種，以及探討生物之遺傳變異、親源關係及群落演化等研究(Avise 1994, Weising *et al.* 2005)，例如利用核糖體基因(ribosomal DNA, rDNA)，包括 18S、5.8S 及 26S 基因密碼區及 internal transcribed spacer (ITS)、external transcription spacer (ETS)及 internal genetic spacer (IGS)等間隔區之基因標誌。一般而言，18S、5.8S 及 26S rDNA 由於變異性低，適用於科別之標誌，而 ITS 及 ETS 由於具有協同演化之特性(concerted evolution)，而且序列長度約為 500-700 bp，適用於屬及種間之標誌(Zhao *et al.* 2000, Weising *et al.* 2005)。因此發展以分子鑑定及檢驗方法，可使中草藥之基原鑑定更加完備(Wu *et al.* 1998, Chen and Wang 2003, Zhang *et al.* 2007)。

蒲公英(*Taraxacum mongolicum* Hand.-Mazz.) 為菊科(Compositae)蒲公英屬(*Taraxacum*)多年生草本植物，原產於中國，俗名婆婆丁或黃花地丁。於「中國藥典」記載蒲公英藥材之基原為蒲公英(*T. mongolicum*)、鹹地蒲公英(*T. sinicum* Kitag.)或多種同屬植物的帶根全草，其主要功能為化熱毒、消惡腫結核、解食毒、散滯氣(National Committee of Pharmacopoeia 2005)，近年之研究顯示蒲公英富含類黃酮素(flavonoid)、抗氧化物質和酵素(例如 Superoxide Dismutase, SOD)、三萜類(terpenoid)、香豆素類(coumarin)及酚酸類(phenolic acid)化合物，具有抑菌、抗腫瘤、抗內毒、利膽、保肝及增強免疫力之作用(Zhao *et al.* 2006)。臺灣田野也可發現臺灣蒲公英(*T. formosanum* Kitanlura)及西洋蒲公英(*T. officinale* Wiggers)兩種同屬植物的族群。臺灣蒲公英為原生植物，主要分佈於大甲溪以北的濱海沙地，包括淡水、金山、新竹及大甲等地，近年由於被大量採集，根據國際自然及自然資源保育聯盟(The World Conservation Union, IUCN)受威脅等級之

評估，臺灣蒲公英在 10 年內，族群數量將減少 50%，已瀕臨絕滅(Natural resources and ecology GIS database in Taiwan 2007)，為有待關注及維護的原生植物。西洋蒲公英原產於歐亞大陸，目前分佈於臺灣中、北部，主要族群集中於新竹縣地區，形成部份地被的族落。蒲公英、臺灣蒲公英及西洋蒲公英外觀形態極為相似，最主要之性狀差異在於總苞部位，西洋蒲公英最外層總苞向下反轉，蒲公英及臺灣蒲公英者無此現象(Li 1998)。

根據文獻報導目前臺灣市售的蒲公英基原，常被以形態相似的其他菊科植物替代，包括兔仔菜 [*Ixeris chinensis* (Thunb.) Nakai](Tong *et al.* 1999, Yuan 2001, Committee of Chinese Medicine and Pharmacy 2002)、刀傷草(*I. laevigata* (Bl.)Sch.)(Zhang 2006)、鵝仔草(*Pterocypselia indica* L.)(Tong *et al.* 1999)、苦蕒菜(*Sonchus oleraceus* L.)(Tong *et al.* 1999, Yuan 2001)、黃鶴菜(*Youngia japonica* L.)(Yuan 2001)、地膽草(*Elephantopus mollis* Kunch)(Cao *et al.* 1997)或紫背草(*Emilia sonchifolia* (L.) DC. var. *javanica* (Burm. F.) Mattfeld)(Cao *et al.* 1997, Yuan 2001)等。經由調查 38 件蒲公英商品中，其中僅 2 件為蒲公英屬植物，其餘 36 件為臺灣產菊科萵苣屬(*Lactuca*)植物之兔仔菜或鵝仔草(Tong *et al.* 1999)。由於此等混用或誤用的基原乾品，不易由外觀區別，而其主成份與藥理特性與蒲公英的差異，可能直接影響療效及用藥的安全性。因此本研究利用分子標誌之原理，針對蒲公英與其偽品基原 5.8S rRNA 及 ITS 序列之比較，建立 Polymerase chain reaction -Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP)之檢測技術，提供為蒲公英基原鑑定及品質控制的參考。

材料與方法

一、蒲公英屬植物及其偽品植材收集

蒲公英採集於山西省太原縣(TM-1)、大

同縣(TM-2)；甘肅省文縣(TM-3)、渭源縣(TM-4)及河南省洛陽縣(TM-5)等地之蒲公英，為中藥專業學者鑑別之基原植物(中國醫藥大學提供)，共 8 株。臺灣蒲公英(TF)採集於苗栗縣後龍、新竹縣關西鎮、桃園縣大園鄉；中國醫藥大學提供，及採購於臺中縣藥草栽培業者，共 9 株。西洋蒲公英(TO-1)採集於新竹縣關西鎮、桃園縣大園鄉，及採購於臺中縣藥草栽培業者，共 8 株。7 種偽品基原植物採集於臺中縣農地，分別有兔仔菜 6 株、刀傷草 5 株、鵝仔草 5 株、苦滇菜 3 株、黃鶴菜 3 株、地膽草 3 株、紫背草 4 株等，經比對臺灣植物誌(Flora of Taiwan)(Li 1998)之形態特徵無誤後進行試驗。

二、藥品及儀器

基因組 DNA 萃取試劑(DNeasy Plant Maxi kit)購自 Qiagen 公司，plasmid DNA 純化試劑(miniprep system kit)、DNA 純化回收套組(gel extraction kit)及 DNA marker (1 kb plus DNA Ladder) 購自 GenMark 公司，引子由臺灣明欣公司合成，DNA 載體 (pGEM-T Easy Vector kit) 購自 Promega 公司，PCR 試劑(Fast-Run Taq Master Mix kit) 購自 Protech 公司。*EcoR* I、*Sph* I、*Mse* I 及 *Bmr* I 限制酶購自 Biolabs 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。PCR 儀器 Gene Amp PCR system 2400 及 DNA 定序儀 ABI PRISM 377-96 DNA Sequencer 為美國 Perkin-Elmer 公司產品。

三、5.8S rRNA-ITS 序列之增幅與解序

各別稱取 0.1 克蒲公英、臺灣蒲公英、西洋蒲公英、兔仔菜、鵝仔草、刀傷草、苦滇菜、黃鶴菜、地膽草及紫背草之幼葉，以基因組 DNA 萃取試劑抽取 DNA。根據 GenBank 菊科植物於 18S 與 26S rRNA 序列，設計 ITS-F 引子(5'-AGGTGAACCTGC GGAAGGATCATTG-3')及 ITS-R 引子(5'-

CTTCTCCTCCGCTTATTGATATGCT-3')，進行 PCR 反應。反應添加物為 50 ng 模板 DNA、1 μ l ITS-F 引子、1 μ l ITS-R 引子、10 μ l Taq mix buffer，添加無菌蒸餾水使總體積為 50 μ l。PCR 反應條件為起始變性溫度 94 $^{\circ}$ C 5 min，變性溫度 94 $^{\circ}$ C 30 s，煉合溫度 50 $^{\circ}$ C 30 s，延展溫度 72 $^{\circ}$ C 30 min，循環 35 週期，最後延展溫度 72 $^{\circ}$ C 7 min。取 5 μ l PCR 產物，加入樣品 0.1 倍體積之 bromophenol blue 染劑，注入於含 1.2% (w v⁻¹) agarose gel 之 0.5 X TBE 膠體，以 100 伏特電壓進行電泳分析。

PCR 增幅之核酸片段經溶洗後，進行接合反應(ligation)，取 3 μ l PCR 產物，添加於 pGEM-T Easy Vector 試劑 (5 μ l 2 X Rapid Ligation buffer, 1 μ l 50 ng pGEM-T Easy vector, 1 μ l T4 DNA ligase)，於 16 $^{\circ}$ C 反應 14-16 h。將單一菌落之大腸桿菌 TG1 strain，加 3 ml LB 培養液，於 37 $^{\circ}$ C 振盪培養 14 h，取 200 μ l 菌液加入接合反應之 10 μ l DNA，放置於冰上 30 min，再加入 200 μ l LB 培養液，於 37 $^{\circ}$ C 振盪培養 1 h，將菌液塗抹於 LB plate (含 IPTG、X-gal 及 ampicillin)，培養 14-16 h，選取含有 DNA insert 之白色菌落，移入 3 ml LB 培養液中，再於 37 $^{\circ}$ C 培養 14-16 h，抽取 plasmid DNA，取 20 μ l plasmid DNA 加 1 μ l *Eco*RI 限制酵素，於 37 $^{\circ}$ C 反應 2 h，取出 6 μ l 加入樣品 0.1 倍體積之 EtBr 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。確證轉殖之 plasmid DNA 並進行解序，利用 NCBI GenBank 的 Blast 功能比對基因庫之核酸序列，以 BioEdit (5.0.9 版)及 Clustalx 軟體(Hall 1999)排序、相似度之估算。

四、PCR-RFLP 之檢測方法

利用蒲公英、臺灣蒲公英、西洋蒲公英之 3 種蒲公英，及兔仔菜、鵝仔草、刀傷草、苦滇菜、黃鶴菜、地膽草及紫背草等 7 種偽品基原植物，於 ITS 序列之差異處，以 *Sph* I、

Mse I 及 *Bmr* I 之 3 種限制酶，進行 PCR-RFLP 檢測方法之建立。取 5 μ l 5.8S rRNA-ITS 之 PCR 產物，添加 2 μ l 限制酶及 2 μ l 緩衝液，加無菌水使總體積為 20 μ l，於 37°C 反應 90 min。以 2.0% Agarose gel 進行電泳分析，步驟同方法三。

結果

一、3 種蒲公英及 7 種偽品基原植物 5.8S rRNA-ITS 序列長度比較

蒲公英、臺灣蒲公英、西洋蒲公英之 3 種蒲公英，以及兔仔菜、刀傷草、鵝仔草、苦蕒菜、黃鹼菜、地膽草及紫背草等 7 種偽品基原植物以 ITS-F 及 ITS-R 為引子，經 PCR 反應增幅之核酸片段約為 730 bp (Fig.1)。經解序後之核酸序列於 NCBI GenBank 比對，皆為 5.8S rRNA-ITS 序列，此 10 種基原植物 ITS₁-5.8S rRNA-ITS₂ 序列登錄於基因庫之接受號碼分別為 EU057986、AY862577、

AY862576、AY862578、AY862582、AY862579、AY862581、AY862580、AY862584 及 EU057987。其中蒲公英、臺灣蒲公英及西洋蒲公英的 ITS₁-5.8S rRNA-ITS₂ 序列長度皆為 643 bp，其 ITS₁、5.8S rRNA 及 ITS₂ 各片段分別為 255、162 及 226 bp (Table 1)。7 種偽品基原植物的 ITS₁-5.8S rRNA-ITS₂ 序列長度介於 634-645 bp 之間，以地膽草者最短，黃鹼草者最長，5.8S rRNA 片段與 3 種蒲公英相同皆為 162 bp，ITS₁ 及 ITS₂ 片段長度則依基原植物種類而異，分別介於 249-260 bp 及 219-228 bp 之間 (Table 1)。

二、3 種蒲公英 5.8S rRNA-ITS 序列相似度比較

將本研究之山西省太原縣(TM-1)、大同縣(TM-2)、甘肅省文縣(TM-3)、渭源縣(TM-4)及河南省洛陽縣(TM-5)等 5 處採集之蒲公英、臺灣收集之臺灣蒲公英(TF)及西洋蒲公英

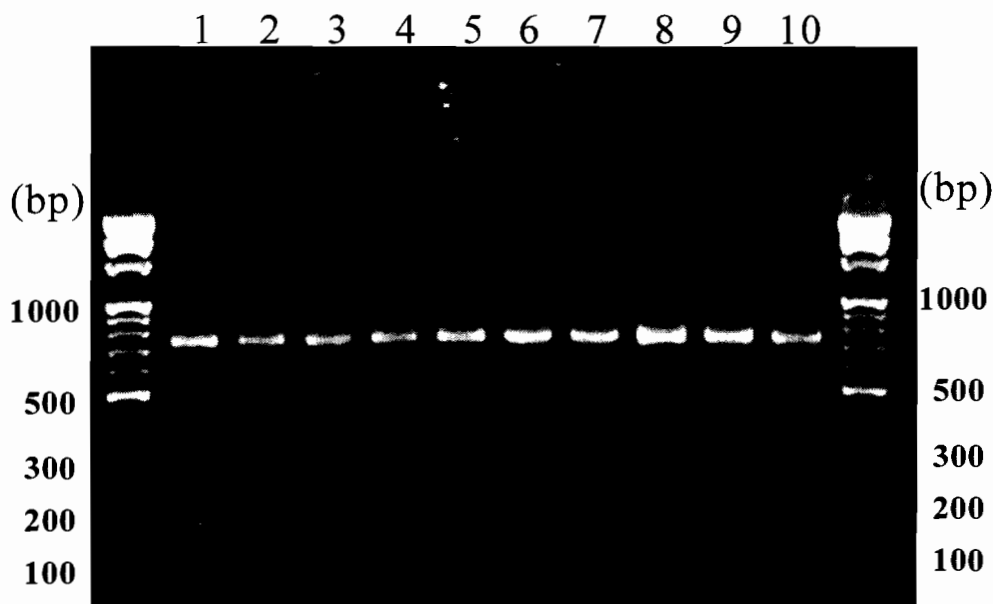


Fig. 1. PCR products in 5.8S rRNA-ITS regions of three *Taraxacum* species and seven adulteration species. Lane 1, *Taraxacum. mongolicum*; lane 2, *T. formosanum*; lane 3, *T. officinale*; lane 4, *Ixeris chinensis*; lane 5, *I. laevigata*; lane 6, *Pterocypsela indica*; lane 7, *Sonchus oleraceus*; lane 8, *Youngia japonica*; lane 9, *Elephantopus mollis*; lane 10, *Emilia sonchifolia* var. *javanica*.

英(TO-1), 與已登錄於 NCBI GenBank 之蒲公英(*T. mongolicum*)(TM-6, accession No. EF114672; TM-7, accession No. AY548210)、西洋蒲公英(*T. officinale*)(TO-2, accession No. AY548211)比較 5.8S rRNA-ITS 序列之相似度, 不同省縣採集的蒲公英(TM-1~TM-5), 其 5.8S rRNA-ITS 序列有 6-29 個鹼基之差異, 相似度界於 95.5-99.1%, 此 5 處蒲公英與已登錄之蒲公英(TM-6, TM-7)序列相似度亦界於 95.7-99.4%之間, 然而比較已登錄之

蒲公英(TM-6)與蒲公英(TM-7)序列, 亦只有 96.4%之相似度(Table 2)。臺灣蒲公英(TF)與河南省洛陽縣的蒲公英(TM-5)及已登錄之蒲公英(TM-6)相似度最高(99%), 與甘肅省文縣的蒲公英(TM-3)的相似度最低(95.8%), 與西洋蒲公英之相似度為 96.4%。而西洋蒲公英與甘肅省文縣的蒲公英(TM-3)、已登錄之蒲公英(TM-7)及西洋蒲公英(TO-2)相似度皆高於 99%, 其餘者皆僅約 96%(Table 2)。

Table 1. Nucleotide sequence length in ITS₁, 5.8S rRNA and ITS₂ fragments of 3 *Taraxacum* species and 7 adulteration species.

Species	ITS regions (bp)				Accession code *
	ITS ₁	5.8S	ITS ₂	Total	
TM _y	255	162	226	643	EU057986
TF	255	162	226	643	AY862577
TO	255	162	226	643	AY862576
IC	249	162	228	639	AY862578
IL	255	162	224	641	AY862582
PI	254	162	225	641	AY862579
SO	256	162	225	643	AY862581
YJ	258	162	225	645	AY862580
EM	253	162	219	634	AY862584
ESJ	260	162	219	641	EU057987

* Accession code of NCBI GenBank.

^y TM: *Taraxacum mongolicum*, TF: *T. formosanum*, TO: *T. officinale*, IC: *Ixeris chinensis*, IL: *I. laevigata*, PI: *Pterocypsela indica*, SO: *Sonchus oleraceus*, YJ: *Youngia japonica*, EM: *Elephantopus mollis*, ESJ: *Emilia sonchifolia* var. *javanica*.

Table 2. Matrix of ITS₁-5.8S rRNA-ITS₂ similarities of *Taraxacum mongolicum*, *T. formosanum* and *T. officinale*.

Species	TM-1	TM-2	TM-3	TM-4	TM-5	TM-6	TM-7	TF	TO-1
TM-1	-								
TM-2	98.8	-							
TM-3	95.5	95.5	-						
TM-4	95.5	96.6	96.0	-					
TM-5	99.1	98.0	95.8	97.4	-				
TM-6	99.1	98.4	95.7	97.2	99.4	-			
TM-7	96.1	96.1	99.1	95.8	96.6	96.4	-		
TF	96.1	98.3	95.8	97.5	99.5	99.4	96.0	-	
TO-1	96.1	96.4	99.4	99.4	96.4	96.0	99.2	96.4	-
TO-2	95.7	95.7	99.2	95.5	96.1	96.0	99.5	96.0	99.5

TM: *Taraxacum mongolicum*, TF: *T. formosanum*, TO: *T. officinale*, TM-1~TM-5 are from Mainland China and TF and TO-1 are from Republic of China in this study; TM-6, TM-7, TO-2 are from NCBI GenBank (accession No. EF114672, AY548210, AY548211).

三、7 種偽品基原植物與 3 種蒲公英 5.8S rRNA-ITS 序列之比較

兔仔菜、刀傷草、鵝仔草、苦滇菜、黃鵪菜、地膽草及紫背草等 7 種偽品基原植物之 5.8S rRNA-ITS 序列，與蒲公英者之比較，鹼基之差異數目界於 98-232 個鹼基，相似度

界於 63.5-84.6%，以免仔菜及刀傷草與蒲公英之相似度較高，紫背草之相似度最低。其中 5.8S rRNA 序列的鹼基差異較少，僅有 1-13 個鹼基(資料未呈現)，ITS₁ 及 ITS₂ 的差異數分別界於 55-141 及 34-98 個鹼基之間 (Fig. 2, 3)。

TM	1	TCGAACCCCTGCAAGGCAGAACGACCCGTGAACACGTAAA--TACAACCGGGTGTATGGGG-AGATGGATCTTGG-....TT	72
TF	1	72
TO	1T..... T	72
IC	1A.....T.....T.....T.....TT.....T.A.....GC.....C	72
IL	1A.....T.....T.....CT.....TT.....A.....G.....GC.....T.....CC	73
PI	1T.....T.....C.....T.....CA.....A.....GCT.....C	72
SO	1A.....T.....T.....GTT.....C.....TT.....T.....GCT.....ATG.....	73
YJ	1T.....T.....T.....AA.....T.....T.....C.....TC.....T.....C	73
EM	1G.CT.A.....A.....C.CC--G.A.TATC.A.T.A.TG.A.C.TCA.GT.C....C	70
ESJ	1T.....ATGTAC.....T.....TT.....G.GT.....C--A.....TTTT.....TCCTT.GTATCA.TCA.GTCATTTG..	77
TM	73	TTGATCCTCAGCACC--TTCCAGCGTG--CCT GCATGC TTTCTCTTTTGGGCTATCATGCTTGTATTGTTGGACT TT-AA	147
TF	73G.....G.....	147
TO	73	C.....A.....C.T.....C.....A.....A.....	147
IC	73	C.....T.T.A.T.--C.TG.....T.....G.-G.....T.GC.A.T.TGA..C.C..CA..TC....	143
IL	74	CA....T..GA..T.--C.TGA....GTTT.....G.-G...A.G.T.TG..A....TA.T.C....CA..-C....	148
PI	73	.GATC..CT.A.C.T--..ATGAT....AA.TTG..G.GC..TC...T..GGGCATCATGGA.CCC..CAT..CA..-C	146
SO	74	A....AG..A.G.--A...GGT....TT.T.A.G.A.....T.G..C...GA...CCCA.C....A...-	147
YJ	74ATG....C..GA.T...-TG.....G.G...TG.ACA...C.C...TA...C.C.....CAA-T	148
EM	71	..CCAATCT.TGC...-CG...A..GA--AT.AT.C.A.G..CT.GAC...GCC.TG.AGAA..C.C.C...CGACA-T	145
ESJ	78	..AT..T.TGGATG.AA.GTTGAT....-TA.CTT..G.AAAC.CG.....GCCA...-A.T.TACA...ACAAAA-C	153
TM	148	CCAAACCCCGGCACGGTATGTGCCAAGGAAAACAATAAAC-GAGAGGGACTCGACCTGTTA-TGCCCGTTT-GTGGTGT	224
TF	148A.....	224
TO	148	A.....C.....A.....	224
IC	144	A.....A.....A.....T.....A.....T.....C..C.....	218
IL	149	A.....A.....A.....TT.....A.....T.T..GT...-C..C.....	224
PI	147	A.....A.....T.....A.....A.T.AC..AT.....C.....	223
SO	148	A.....C.....TT.A.T.A.A..T.CTA.TT..T.A.T.....TAC.....	225
YJ	149	A.....A.....TG..A..TA...A.....T.T...A.....A..-C.....	227
EM	146	A.....AAA.C.....TGA..A.CT.-A...A.AGTGT.G.G..GC.-CATTT..GCATTC.AAT	223
ESJ	154	A...C.AT..A.....C.C...T.....ATGA.C.T--AGA.CG..T.TA.CA.GCT.T.AT....C..C...TA	230
TM	225	GCAATCTGAGCGTGTCTCTTGAATCACA	255
TF	225 T	255
TO	225	255
IC	219	.T..ATA.GITT..G.....G.....	249
IL	225	.T..AA..GT.....G.....	255
PI	224	.G.A.G.GCT...G.....G.....	254
SO	226	...A.A.GTG..AG...T...A..A...T	256
YJ	228	.T.A.A.GT...G.....G.....T	258
EM	224	.TGCTG.TCTA.TG..T..CGA.....	253
ESJ	231	TTGCCAGG.TATC.TG.A..T..AT..A..T	260

Fig. 2. Alignment of ITS₁ sequences in three *Taraxacum* species and seven adulteration species. TM: *T. mongolicum*, TF: *T. formosanum*, TO: *T. officinale*, IC: *Ixeris chinensis*, IL: *I. laevigata*, PI: *Pterocypsela indica*, SO: *Sonchus oleraceus*, YJ: *Youngia japonica*, EM: *Elephantopus mollis*, ESJ: *Emilia sonchifolia* var. *javanica*. Boxes denote nucleotide sequences that are *Sph* I (GCATGC), *Mse* I (TTAA) and *Bmr* I (ACTGGG) restriction site of ITS₁ sequences in *Taraxacum* species. The same sequences are indicated by dot(.). Gaps(-) are introduced for the best alignment.

TM	1	ATCGCGTGGCCCCATC-ATAGTTCCC- TTAA GGGTAGTTG-TGGTGATTGGGAGCGGAAATGGCCCTCCCGTCT-TG	76
TF	1C.....C.....	76
TO	1C.....C.....G.....T.....	76
IC	1T.....A.....C.CT..CT.ATT...T..CA-..T.....GA...G.....A...-C	78
IL	1C...G...CT...AGTA...TA.CA-..T..T...G...G.....A.....	74
PI	1T..T..A...CC.....-C..C..GTTG...-AT..TG...G.....A.....-AT	75
SO	1	..T.....TGC..-C.CA...T--A...TGTA..AA...C...G.....T...-	75
YJ	1T...C...C...-T.A.CC...CA.C...-C...G...A.....A...C...-	76
EM	1	..A...T...C...CGTCATGT----TC..C.GCA-..TC-..C...G...A..T..T..A...CA.C	72
ESJ	1	G..AT...A..T..T.A.-.C.CC...T----GAT.G..A...-CA.TG...T.G-T...G.....T.C-A.	72
TM	77	TTGTGCGGTTGGTCAAATAACGAGTCCCTTCGGT-GGACACACGGCTAGTGGTGGTTGTAAGACCCCTTTTCTCTGCTG	156
TF	77	156
TO	77G.....	156
IC	79	.G..T.....C.T...CG...G.....T.....TC.....CG.A..G.....	158
IL	75	.G...T...C.T...G...A...T.....T.....CG...G...C.	154
PI	76	.GT.T...C.T...A.G...T...C...G...A.....A.C...CG..A.G..T..	155
SO	76	..TT...C.T...G.T...A.GC..TG...AA.....A.T...CG...G..T..	155
YJ	77	.G...T..C...C.T...G.GTT.C...A..T.....T.....CG...G.C.C.	156
EM	73	GC...T...C.C...TGAT.G..G.G.T.A.-T.G...A..T.....A..A..T.CGGTC.AGAG.-	151
ESJ	73	AG.C...A.CT...G...T...TTA.-T.....AT.....A.....C...CGA.T..	151
TM	157	TGTGTGCTGAGCTGCTAGGGAAGCCCTCAAAAAAGACCC-ATTGTATCGTCTTAGGATGATGCTTCGACC	226
TF	157	226
TO	157	...T.....A.....A...A.....TC...C.....	226
IC	159	...T.....T.....A.....CC.....T.....G.T.C.....T	228
IL	155	...AT.....C...A...CC.....C.....	224
PI	156	...TG.....TC.....C...TTC...C.G.....	225
SO	156	...TG.....ATT...TTT.....TAA.AA.C...ATA.....	225
YJ	157	...T...CT...CATAT.G...-CTA...A...T	225
EM	152	C...T.C...TCA.CG.TA..AAG.CTCGTTT...TGAC.C...A.GA.TC...C-...G.A.	219
ESJ	152	...TCAA.-T.AT.TAA..G.AA...TTG.T...T..A...C...G-T.C.A..G.T..TT	219

Fig. 3. Alignment of ITS₂ sequences in three *Taraxacum* species and seven adulteration species. TM: *T. mongolicum*, TF: *T. formosanum*, TO: *T. officinale*, IC: *Ixeris chinensis*, IL: *I. laevigata*, PI: *Pterocypsela indica*, SO: *Sonchus oleraceus*, YJ: *Youngia japonica*, EM: *Elephantopus mollis*, ESJ: *Emilia sonchifolia* var. *javanica*. Boxes denote nucleotide sequences that are *Mse* I (TTAA) restriction site of ITS₂ sequences in *Taraxacum* species. The same sequences are indicated by dot (·). Gaps(-) are introduced for the best alignment.

四、3 種蒲公英及 7 種偽品基原植物之 PCR-RFLP 檢測方法

經由比對蒲公英、臺灣蒲公英、西洋蒲公英等 3 種蒲公英，以及兔仔菜、刀傷草、鵝仔草、苦蕒菜、黃鵪菜、地膽草及紫背草等 7 種偽品基原植物於 ITS₁ 及 ITS₂ 序列之異同，利用 *Sph* I 限制酶，可於蒲公英、臺灣蒲公英及西洋蒲公英 5.8S rRNA-ITS 序列之 PCR 產物，分割為 130 及 597 bp 之 2 片段，而 7 種偽品基原植物 5.8S rRNA-ITS 序列之 PCR 產物仍為約 730 bp 單一片段(Fig.4A)。利用 *Mse* I 限制酶，可於臺灣蒲公英 5.8S rRNA-ITS 序列之 PCR 產物，分割為 103、

169、197 及 257 bp 之 4 片段；而蒲公英及西洋蒲公英 5.8S rRNA-ITS 序列之 PCR 產物，分割為 169、258 及 300 bp 之 3 片段(Fig.4B)。利用 *Bmr* I 限制酶，可於及西洋蒲公英 5.8S rRNA-ITS 序列之 PCR 產物，分割為 74 及 653 bp 之 2 片段，蒲公英及臺灣蒲公英 5.8S rRNA-ITS 序列之 PCR 產物為 727 bp(Fig.4C)。

討論

近年分析 rDNA 序列中 ITS 之差異，已逐漸應用於中藥品種及真偽基原之鑑定(Chen and Wang 2003, Zhang *et al.* 2007)。例如：半夏 [*Pinellia ternate* (Thunb.)

Breit.](Zhang *et al.* 2006)、杜仲(*Eucommia ulmoides* Oliv)(Ma *et al.* 2004)、益母草(*Leonurus japonicus* Houtt.)(Yang *et al.* 2006)、五味子(*Schisandra sphenanthera* Rehd. et Wils)(Gao *et al.* 2003)及柴胡(*Bupleurum chinense* DC.)(Xie *et al.* 2006)等。

本研究首先針對於大陸收集之蒲公英，以及臺灣之臺灣蒲公英、西洋蒲公英進行 5.8S rRNA-ITS 序列的選殖與比較，3 種蒲公英及登錄於 NCBI GenBank 的蒲公英 (AY548210)及西洋蒲公英(AY548211)的 5.8S rRNA-ITS 序列長度皆為 643 bp，此基因庫

登錄之另一蒲公英(EF114672)的長度為 642 bp，其缺失位置在 ITS₂ 第 14 個鹼基。兔仔菜、刀傷草、鵝仔草、苦蕒菜、黃鵪菜、地膽草及紫背草等 7 種偽品基原植物 5.8S rRNA-ITS 序列的長度，僅苦蕒菜與蒲公英屬基原植物同為 643 bp，其餘者分別界於 634-645 bp 之間，以地膽草者最短，黃鵪菜者最長(Table 1)。10 種測試之基原植物 5.8S rRNA 長度皆為 162 bp，且 ITS₁ 序列較 ITS₂ 長，與一般菊科及十字花科植物者相同(Baldwin 1995)，其中 3 種蒲公英屬基原植物的 ITS₁ 及 ITS₂ 序列長度皆相同，分別為 255

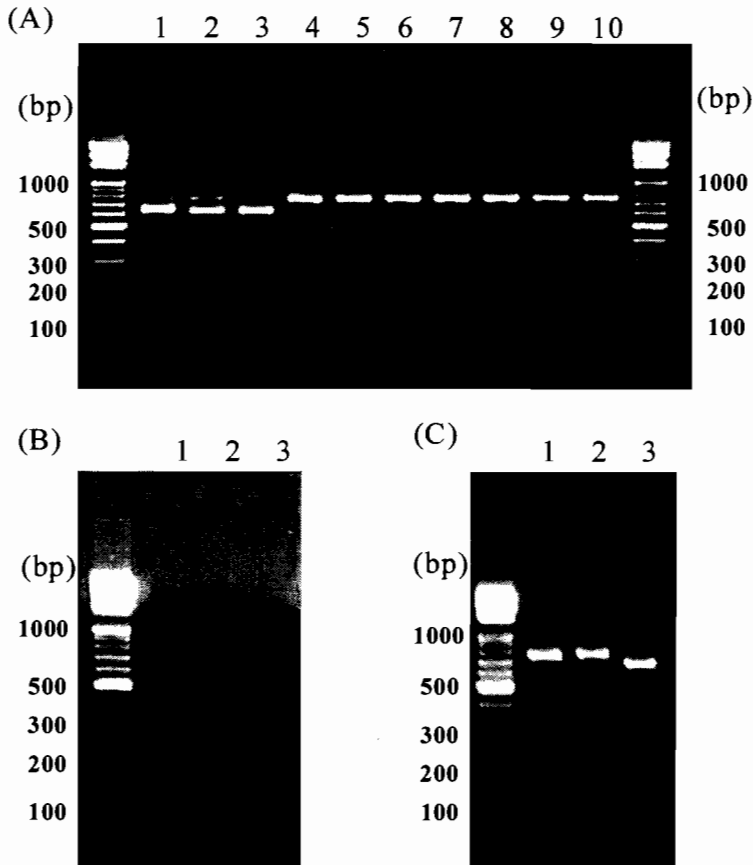


Fig. 4. PCR-RFLP analysis using restriction enzyme (A) *Sph* I. (B) *Mse* I. (C) *Bmr* I on partial 5.8S rRNA-ITS regions of three *Taraxacum* species and seven adulteration species. Lane 1, *Taraxacum mongolicum*; lane 2, *T. formosanum*; lane 3, *T. officinale*; lane 4, *Ixeris chinensis*; lane 5, *I. laevigata*; lane 6, *Pterocypsela indica*; lane 7, *Sonchus oleraceus*; lane 8, *Youngia japonica*; lane 9, *Elephantopus mollis*; lane 10, *Emilia sonchifolia* var. *javanica*.

及 226 bp；7 種偽品基原植物中僅刀傷草的 ITS₁ 長度與蒲公英屬者相同，其餘者 ITS₁ 及 ITS₂ 長度則分別界於 249-260 bp 及 219-228 bp 之間。華中五味子 (*S. sphenanthera*) 及綠葉五味子 (*S. viridis* A. C. Smith) (Gao *et al.* 2003)、益母草及其 3 種偽品基原植物亦有 ITS 長度不同之現象 (Yang *et al.* 2006)。

比較山西省太原縣、大同縣、甘肅省文縣、渭源縣及河南省洛陽縣等 5 處採集之蒲公英；臺灣之臺灣蒲公英及西洋蒲公英，與登錄於 NCBI GenBank 之蒲公英 (EF114672、AY548210)、西洋蒲公英 (AY548211) 之 5.8S rRNA-ITS 序列的相似度，結果顯示 3 種蒲公英屬基原植物，其 5.8S rRNA-ITS 序列共有 6-29 個鹼基之差異，相似度界於 95.5-99.5% (Table 2)，經由 3 種蒲公英屬基原植物 5.8S rRNA-ITS 序列的交叉比對，顯示同為生長於甘肅省的蒲公英，來自於文縣及渭源縣者，其 5.8S rRNA-ITS 序列相似度僅 96.0%；而山西省太原縣及大同縣的蒲公英與河南省者相似度較高，序列相似度為 98.0-99.1%，顯示不同地區蒲公英 5.8S rRNA-ITS 序列存在約 1-5% 之種內 (inter-species) 差異，或是大陸採集的植株中，有外觀相似的蒲公英屬不同物種 (species) 存在。中國四川、陝西、貴州及湖南等地的杜仲，亦有相似之現象，不同地區的杜仲 5.8S rRNA-ITS 序列相似度界於 96.9-100% 之間 (Ma *et al.* 2004)。此外，臺灣蒲公英與河南省的蒲公英及登錄之蒲公英 (EF114672) 5.8S rRNA-ITS 序列相似度皆高於 99%，同時由花朵總苞的外觀比較，臺灣蒲公英與蒲公英皆無向下反轉的現象，與西洋蒲公英的特徵不同，也顯示臺灣蒲公英與蒲公英的親源較西洋蒲公英近。西洋蒲公英與甘肅省文縣、渭源縣的蒲公英及登錄之蒲公英 (AY548210) 相似度亦高於 99%，顯示蒲公英屬內之蒲公英、臺灣蒲公英及西洋蒲公英 3 種植物 5.8S rRNA-ITS 序列具有種間 (inter-species) 的高相似度之機率。或是甘肅省文縣、渭源縣的

蒲公英藥用部位為蒲公英屬植物之全草 (National Committee of Pharmacopoeia 2005)，顯示同為蒲公英屬的植物，遺傳質與藥理皆具共同特性之故。同屬內柴胡的 ITS 序列相似度則較低，界於 88-98% 之間，人工栽培與野生種 ITS 序列相似度亦較低 (Xie *et al.* 2006)。

比較蒲公英、臺灣蒲公英及西洋蒲公英之 3 種蒲公英，以及兔仔菜、刀傷草、鵝仔草、苦蕒菜、黃鵪菜、地膽草及紫背草等 7 種偽品基原植物 5.8S rRNA-ITS 序列之差異，其中 5.8S rRNA 序列雖為具高度保留的特性，但於 3 種蒲公英第 135 個鹼基處，普遍發生個體間有 Thymine(T)、Guanine(G) 或 Cytosine(C) 的差異 (資料未呈現)，且 3 種蒲公英 ITS 鹼基的差異數目於 ITS₁ 及 ITS₂ 相近似，主要發生於 ITS₁ 的第 26、46、73、83、89、91、99、129、142、151、166 及 249 個鹼基，以及 ITS₂ 的第 22、58、65、97、162、173、193、198、207、208 及 214 個鹼基 (Fig. 2、3)。而於 3 種蒲公英屬基原植物的 ITS 序列中，仍有共同的高度保留區間，包括 ITS₁ 的第 100-128 bp、193-247 bp 及 ITS₂ 的第 75-96 bp、98-150 bp 等。7 種偽品基原植物 5.8S rRNA-ITS 序列與蒲公英者之比較，相似度界於 63.5-84.6% 之間，以兔仔菜及刀傷草與蒲公英之相似度較高，紫背草之相似度最低。7 種偽品基原植物於 3 種蒲公英屬基原植物 ITS 高度保留區間，仍有 8-33 個及 5-19 個鹼基之差異。

經由 3 種蒲公英及 7 種偽品基原植物 ITS₁ 及 ITS₂ 的鹼基比對，衍生為以 PCR 增幅 rRNA-ITS 序列，再利用限制酶切位之差異，發展為 PCR-RFLP 檢測技術。以 *Sph* I 限制酶可於蒲公英、臺灣蒲公英及西洋蒲公英 5.8S rRNA-ITS 序列之 PCR 產物，分割為 130 及 597 bp 之 2 片段，而 7 種偽品基原植物 5.8S rRNA-ITS 序列之 PCR 產物仍為約 730 bp 單一片段，因此以 *Sph* I 限制酶建立之 PCR-RFLP 技術，可明確區別 3 種蒲公英及 7

種偽品基原植物；亦可進而以 *Mse* I 限制酶鑑定臺灣蒲公英，或是以 *Bmr* I 限制酶鑑定西洋蒲公英(Fig. 4)。有關蒲公英之分子標誌研究，另有以 2 組隨機引子的 AP-PCR 及 RAPD 方法，區別蒲公英及 6 種偽品基原植物(Cao *et al.* 1997)，然而 RAPD 方法之再現性低，且混雜 2 種以上基原時，RAPD 多型性條帶圖譜即發生改變，無法明確判斷真偽。其他中藥材亦有利用 PCR-RFLP 技術進行真偽基原之研究，例如黨參(*Codonopsis pilosula* (Franch.) Nannf.) 4 種同屬基原與 2 種偽品、人參屬(*Panax*) 基原，可經由 ITS 序列之差異，以 PCR-RFLP 明顯區別(Fu *et al.* 1999, Um *et al.* 2001)。

利用蒲公英及偽品基原植物的 5.8S rRNA-ITS 序列的異同，另可發展為專一性引子之 multiplex PCR 或是專一性探針之晶片檢測技術，此等檢驗技術有待進一步之研發。

誌謝

本研究承蒙行政院衛生署中醫藥委員會計畫(CCMP94-RD-009)之經費支持，謹致謝意。

引用文獻

- Avisé JC (1994) *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. Chapman and Hall. New York/London. 511pp.
- Baldwin BG, MJ Sanderson, JM Porter (1995) The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. *Annu. Missouri Bot. Gard.* 82:247-277.
- Cao H, PP But, P Shaw (1997) Identification of herba *Taraxaci* and its adulterants in Hong Kong market by DNA fingerprinting with random primed PCR. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* 22:197-200.
- Chen SQ, L Wang (2003) Application and development of rRNA sequencing in origin identification of chinese material medica. *J. Henan Univ. Chinese Med.* 18:86-88.
- Committee of Chinese Medicine and Pharmacy (2002) *Adulteration and substitution species of Chinese crude drugs in Taiwan*. Committee on Chinese Medicine and Pharmacy, Department of Health, Executive Yuan (ed.) Taipei. 111pp.
- Elder JR, BJ Turner (1995) Concerted evolution of repetitive DNA sequence in eukaryotes. *Quart. Rev. Biol.* 70:297-319.
- Fu RZ, J Wang, YB Zhang, ZT Wang, PP But, N Li, PC Shaw (1999) Differentiation of medicinal *Codonopsis* species from adulterants by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. *Planta Med.* 65:648-550.
- Gao JP, YH Wang, CF Qiao, DF Chen (2003) Ribosomal DNA ITS sequences analysis of the Chinese crude drug fructus *Schisandrae sphenantherae* and fruits of *Schisandra viridis*. *China J. Chinese Material Med.* 28:706-710.
- GenBank of National Center for Biotechnology Information (2007) <http://www.ncbi.nih.gov>
- Hall TA (1999) BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids Symp. Ser.* 41:95-98.
- Li HL (1998) Compositae. p.10796-1081. *In: Flora of Taiwan*. Vol. 4. Huang CT (ed.-in chief), Editorial Committee of the Flora of Taiwan. Taipei.
- Lin YZ, WZ Lee, CZ Chen (2006) *Laws and Regulations on Managements of Chinese Medicine products in Taiwan*. Committee on Chinese Medicine and Pharmacy, Department of Health, Executive Yuan (ed.) Taipei. 637pp.
- Lin ZH, SJ Zu (2003) *Quality control of Chinese medicinal herb. Research and Development of Chinese medicinal herb Industry*. Consultant's Department of Education Board (ed.) Taipei. p. 217-255.
- Ma YH, J Yang, WZ Jia, GS Ye (2004) Sequence analysis of ITS of nuclear ribosomal DNA of *Eucommia ulmoides* from different geographical origin in China. *J. Northwest For. Univ.* 19:16-19.
- National Committee of Pharmacopoeia (2005) *Chinese Pharmacopoeia*. Pharmacopoeia of People's Republic of China, Beijing. 289pp.

- Natural Resources and Ecology GIS Database in Taiwan (2007) Forestry Bureau, Council of Agriculture. <http://ngis.zo.ntu.edu.tw/index1.htm>
- Promotion Office of Biomedical Technology Department of Industrial Technology Ministry of Economic Affairs (2007) http://www.herbal-med.org.tw/About/office_4.asp
- Schaal BA, GH Learn (1988) Ribosomal DNA variation within and among plant populations. *Annu. Missouri Bot. Gard.* 75: 1207-1216.
- Tong CF, YL He, XZ Zhang, HY Cai, YX Zhang (1999) Investigation of adulteration and substitution species of Chinese crude drugs in Taiwan. *Chinese Med. College J.* 8:35-46.
- Um Jy, HS Chung, MS Kim, HJ Na, HJ Kwon, KM Lee, SJ Lee, JP Lim, KR Do, WJ Hwang, YS Lyu, NH An, HM Kim (2001) Molecular authentication of *Panax ginseng* species by RAPD analysis and PCR-RFLP. *Biol. Pharm. Bull.* 24:872-875.
- Weising K, H Nybom, K Wolff, G Kahl (2005) DNA Fingerprinting in Plants: Principles, Methods and Applications. 2nd ed., Taylor & Francis Group, New York. 444pp.
- Wu P, KY Zhou, ZH Zhang, LS Xu. (1998) Molecular identification of traditional Chinese drug *Hippocampus*. *Acta Pharm. Sinica* 33:226-233.
- Xie H, Z Chao, KK Huo, BY Wu, SI Pan (2006) ITS sequence of 9 *Bupleurum* species and its application in identification of *Chaihu* (*Radix bupleuri*). *J. South Med. Univ.* 26:1460-1463.
- Yang ZY, Z Chao, KK Huo, BY Bu, SI Pan (2006) Nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer 1 sequence of 4 *Leonurus* species. *J. South Med. Univ.* 19:16-19.
- Yuan CC (2001) Textual research of material medica *Taraxacum mongolicum* and varietal identification. *Chinese Wild Plant Res.* 20:6-8,17.
- Zhang GC (2003) Internationalization of chinese medicinal herb. Research and Development of Chinese medicinal herb Industry. Consultant's Department of Education Board (ed.) Taipei. p295-312.
- Zhang JY, QS Guo, LW Wu, YY Hang (2006) Ribosomal DNA ITS sequence analyses of *Pinellia ternate* from different geographical origin in China. *China J. Chinese Material Med.* 31:1768-1772.
- Zhang XC (2006) Identification of easily confused and misused raw Materials of chinese medicine. Bureau of Food and Drug analysis (ed.) Taipei. 783pp.
- Zhang YB, PC Shaw, CW Sze, ZT Wang, Y Tong (2007) Molecular authentication of Chinese herbal materials. *J. Food Drug Anal.* 15: 1-9.
- Zhao L, YJ Yang, D Lin (2006) Economic values of Dandelion. *Liaoning Agri. Sci.* 6:33-35.
- Zhao ZL, LS XU, H Dong, ZT Wang (2000) Evaluation of ITS sequence of nrDNA in plant molecular systematics. *J. Plant Resour. and Environ.* 9:50-54.