

蒲公英基原真偽之快速鑑定方法－Allele-specific PCR 及 ISSR 標誌

袁秋英^{1*}、林李昌¹、林志鍵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

中草藥之研發與運用漸受矚目，然而藥材基原常出現偽品或代用品，易影響療效，甚至產生中毒問題。近年分子標誌已普遍應用於植物物種之親緣研究，其中比對基原植物基因組核酸之差異，也漸成為鑑定中草藥真偽的有利證據之一。本研究室已完成蒲公英(*Taraxacum mongolicum* Hand.-Mazz.)及其偽品基原 5.8S rRNA-ITS 序列，並發表 PCR-RFLP 檢測技術，此次研究再延伸發展為等位基因特異性之聚合酶鏈鎖反應(allele-specific polymerase chain reaction; AS-PCR)及簡單重複序列間標誌(inter-simple sequence repeat; ISSR)之快速檢測方法。經由比對臺灣蒲公英(*Taraxacum formosanum* Kitanlura)、西洋蒲公英(*T. officinale* Wiggers)及蒲公英(*T. mongolicum*)等 3 種蒲公英以及兔仔菜[*Ixeris chinensis* (Thunb.) Nakai]、鵝仔草(*Pterocypsela indica* L.)、苦蕒菜(*Sonchus oleraceus* L.)、黃鵪菜(*Youngia japonica* L.)、刀傷草[*I. laevigata* (Bl.) Sch.]等 5 種偽品基原 5.8S rRNA-ITS 序列之異同，設計 AS-PCR 的特異性引子，利用 multiplex PCR 可於臺灣蒲公英、西洋蒲公英、蒲公英及蒲公英屬基原分別增幅 194

bp、586 bp、402 bp 及 457 bp 核酸片段，5 種偽品基原則否。3 種蒲公英及 5 種偽品基原 genomic DNA 以 ISSR 編號 UBC-857 為引子，經一次 PCR 增幅，即可分別產生 2-6 條不同長度核酸的電泳圖譜，具有鑑別蒲公英及偽品基原之功效。本研究所建立之 AS-PCR 及 ISSR 標誌檢測方法，可快速、有效及正確區別蒲公英藥材基原之真偽，作為中草藥品質控管及基原鑑定之依據。

關鍵詞：蒲公英、中藥、分子標誌、核糖體核酸間隔區、等位基因特異性之聚合酶鏈鎖反應、簡單重複序列間標誌。

Allele-specific PCR and ISSR Marker Used in Rapid Detection of Adulteration Species of *Taraxacum mongolicum*

Chiou-Ing Yuan^{1*}, Li-Chang Lin¹, Chih-Chien 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

* 通信作者, yci@tactri.gov.tw

投稿日期：2009 年 9 月 18 日

接受日期：2009 年 9 月 23 日

作物、環境與生物資訊 6:183-191 (2009)

Crop, Environment & Bioinformatics 6:183-191 (2009)

189 Chung-Cheng Rd., Wufeng, Taichung Hsien 41362, Taiwan ROC

縮寫字：TCM, traditional Chinese medicine; ITS, internal transcribed spacer; AS-PCR, allele-specific polymerase chain reaction; ISSR, inter-simple sequence repeat; BC, University of British Columbia; NCBI, National Center for Biotechnology Information.

ABSTRACT

Substitutes and adulterants of traditional Chinese medicine (TCM) materials are often introduced intentionally or accidentally. It may seriously affect the regular therapeutic effects, even leading to life-threatening poisoning. DNA markers have been widely used for identification of plant species in recent decade. In this study, a previously published polymerase chain reaction – restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) assay for molecular authentication of *Taraxacum mongolicum* was modified to a rapid allelic specific PCR (AS-PCR) and inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. The specific primers of AS-PCR were designed from the 5.8 S rRNA-ITS nucleotide polymorphism to differentiate three *Taraxacum* species and five adulterant species, via multiplex PCR to produce unique 194 bp, 586 bp, 402 bp and 457 bp single bands for *T. formosanum*, *T. officinale*, *T. mongolicum* and *Taraxacum* spp., respectively. Among the selected ISSR primers, only UBC857 can significantly distinguish three *Taraxacum* species and five adulterant species by 2-6 different bands profiles. Those two novel AS-PCR and ISSR markers provide the effective and accurate identification of *Taraxacum* species.

Key words: *Taraxacum mongolicum*, Traditional Chinese medicine (TCM), Molecular marker, Internal transcribed spacer (ITS), Allele-specific polymerase chain reaction (AS-PCR), Inter-simple sequence repeat (ISSR).

前言

近年來西藥在研發過程中，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 Health 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)。

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大陸進口。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。又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(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)已普遍應用於鑑定物種，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。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，因此運用於中草藥之基原鑑定可更加完備(Wu *et al.* 1998, Chen and Wang 2003, Zhang *et al.* 2007)。

等位基因特異性 PCR (allele-specific polymerase chain reaction; AS-PCR)是中藥材品種鑑別的一種新方法，主要原理為針對真品基原某 DNA 序列的特異性位點設計引子，進行 PCR 反應，由增幅出的核酸片段長度即可鑑別出基原的真偽(Han and Zhu 2008)。簡單重複序列間標誌(inter-simple sequence repeat; ISSR)用於檢測簡單重複序列間 DNA 序列的差異(Zietkiewicz *et al.* 1994)，其基本原理為於 SSR 的 5'或 3'端加 1-4 個嘌呤或嘧啶鹼基，設計為引子用以分析不同樣品間基因組核酸的多型性，目前 ISSR 技術已於親緣關係、品種鑑定、遺傳特性等研究中應用(Avise 1994)。

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，已瀕臨絕滅(Natural Resources and Ecology GIS Database in Taiwan 2009)，有待關注及維護。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，形成部分地被的族落。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 (*Pterocypsela indica* L.)(Tong *et al.* 1999)、苦蕒菜 (*Sonchus oleraceus* L.)(Tong *et al.* 1999, Yuan 2001)、地膽草 (*Elephantopus mollis* Kunch) (Cao *et al.* 1997)、黃鵪菜 (*Youngia japonica* L.)(Yuan 2001)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，而其主成分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。

本研究室已針對臺灣蒲公英、西洋蒲公英及蒲公英等 3 種蒲公英與前述 7 種偽品基原，完成 5.8 S rRNA—ITS 序列之比較，登錄於 National Center for Biotechnology Information (NCBI)基因庫之接受號碼分別為 EU057986、AY862577、AY862576、AY862578、AY862582、AY862579、AY862581、AY862580、AY862584 及 EU057987，並建立 PCR—Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP)之檢測技術(Yuan *et al.* 2007)。由於不論經由核酸直接解序或是 PCR-RFLP 檢測，皆較耗時費工，因此本研究目的為建立快速簡易的鑑定及檢測方法。不僅利用蒲公英及偽品基原 ITS 序列之差異處設計專一性引子，完成 AS-PCR 檢測方法，亦發展 ISSR 標

誌，篩選可區別蒲公英基原真偽的引子，以提供作為蒲公英基原快速鑑定及品質控管的參考。

材料與方法

一、蒲公英屬植物及其偽品基原收集

蒲公英採集於山西省太原縣、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。5 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、黃鸝菜 3

株等，經比對臺灣植物誌(Flora of Taiwan) (Li 1998)之形態特徵及 5.8 S rRNA-ITS 序列無誤後進行試驗。

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，位點特異性鑑別引子(Table 1)及 ISSR 引子(參考 University of British Columbia, 編號 801-899 序列)由臺灣明欣公司合成，PCR 試劑(Fast-Run Taq Master Mix kit) 購自 Protech 公司，multiplex PCR 試劑購自 Qiagen 公司。PCR 儀器為 DNA Enginer (PTC-200)購自 MJ Research 公司。

Table 1. Primer sequences used in this study.

No. of primer	DNA sequence (5' → 3')	Amplified DNA (bp)
(1) Tara-ITS-F Tara-ITS-R	GCT TTCTCT TTTGGGCTATCATGC AGGGTCTTTACAACCACCACTAGC	457
(2) TF-ITS-F TF-ITS-R	CTCAGCACCTTCCAGCGTGCG TGCCGAGAGTCGTTTGTGATTA	194
(3) TM-ITS-F TM-ITS-R	CTCAGCACCTTCCAGCGTGCC TTCCGCTCCCAATCACCACA	403
(4) TO-ITS-F TO-ITS-R	GGATCTTGTTTCTGATCCTCAA GTCCTAGAACGATACATTGGGT	586
(5) IC-ITS-F IC-ITS-R	GATGGGCCTTGGTCCTGATCT GGAGAGTATGTTGGGGGACG	370
(6) PI-ITS-F PI-ITS-R	TGGGCTTTGGTCCTGATCCC TTTTCCGCCCCCAACAACATC	404
(7) SO-ITS-F SO-ITS-R	GCATAC AG TGG TAGCCTTC ATTTCCGCCCCCATGACCATT	252
(8) YJ-ITS-F YJ-ITS-R	TGATCCTCAATGCCTCCCGA CTAGAGGCTAACGACACACG	509
(9) IL-ITS-F IL-ITS-R	AATGGTCGTGTCCTCCTTGG ACCTACTAGGAGACCATGGTG	222

三、AS-PCR 於蒲公英基原真偽之檢測

各別稱取 0.1 g 臺灣蒲公英、西洋蒲公英、蒲公英等 3 種蒲公英，以及兔仔菜、鵝仔草、苦蕒菜、黃鵪菜、刀傷草之幼葉，以基因組 DNA 萃取試劑抽取 DNA。根據臺灣蒲公英、西洋蒲公英、蒲公英及兔仔菜、鵝仔草、苦蕒菜、黃鵪菜、刀傷草等 5 種常見偽品基原於 5.8 S RNA-ITS 序列之差異處，分別設計特異性引子(Table 1)，進行 2 階段 multiplex PCR 反應：

(一) 蒲公英屬基原與 5 種偽品基原之鑑別

選用 Tara-ITS-F/Tara-ITS-R(蒲公英屬)、IC-ITS-F/IC-ITS-R(兔仔菜)、PI-ITS-F/PI-ITS-R(鵝仔草)、SO-ITS-F/SO-ITS-R(苦蕒菜)、YJ-ITS-F/YJ-ITS-R(黃鵪菜)及 IL-ITS-F/IL-ITS-R(刀傷草)等 6 組引子，以 Qiagen multiplex PCR kit，添加 0.4 µg 各基原基因組 DNA、1 µL 10 µM 各引子、25 µL 2X PCR Master Mix 及滅菌去離子水，使總反應體積為 50 µL。PCR 反應條件：94°C 5 min，1 個循環；94°C 30 s、60°C 30 s、72°C 30 s，35 個循環；72°C 7 min，1 個循環。取出 10 µL PCR 產物加入 6 × bromophenol blue 染劑，注入於含 2.0% agarose/0.5 × TBE 膠體，以 100 伏特電壓進行電泳分析。

(二) 臺灣蒲公英、西洋蒲公英及蒲公英之鑑別

選用 TF-ITS-F/TF-ITS-R(臺灣蒲公英)、TM-ITS-F/TM-ITS-R(西洋蒲公英)及 TO-ITS-F/TO-ITS-R(蒲公英)，利用 Qiagen multiplex PCR kit，添加反應物之濃度如前述，PCR 反應條件：94°C 5 min，1 個循環；94°C 30 s、54°C 30 s、72°C 30 s，35 個循環；72°C 7 min，1 個循環。PCR 產物之電泳分析方法亦同前述。

四、ISSR 標誌於蒲公英真偽基原之檢測方法

取 0.3 µg 臺灣蒲公英、西洋蒲公英、蒲公英等 3 種蒲公英，以及兔仔菜、鵝仔草、

苦蕒菜、黃鵪菜及刀傷草之基因組核酸，利用 ISSR (University of British Columbia, UBC)編號 801-879 之 79 個引子進行 PCR 反應，以 Fast Run PCR Master Mix kit，添加 0.3 µg 各基原基因組 DNA、1 µL 10 µM ISSR 引子、25 µL 2X PCR Master Mix 及滅菌去離子水，使總反應體積為 50 µL。PCR 反應條件：94°C 5 min，1 個循環；94°C 30 s、55°C 30 s、72°C 30 s，35 個循環；72°C 7 min，1 個循環。經由增幅核酸條帶的多型性差異，篩選可區別蒲公英種間或偽品的引子。PCR 產物之電泳分析同方法三。

結果

一、AS-PCR 於蒲公英真偽基原之檢測

經由比對臺灣蒲公英、西洋蒲公英與蒲公英，以及兔仔菜、鵝仔菜、苦蕒菜、黃鵪菜、刀傷草 5 種常見偽品基原 ITS1 及 ITS2 序列之異同處，分別設計特異性引子(Table 1)。

(一) 蒲公英屬基原與 5 種偽品基原之鑑別

經以 Tara-ITS-F/Tara-ITS-R(蒲公英屬)、IC-ITS-F/IC-ITS-R(兔仔菜)、PI-ITS-F/PI-ITS-R(鵝仔草)、SO-ITS-F/SO-ITS-R(苦蕒菜)、YJ-ITS-F/YJ-ITS-R(黃鵪菜)及 IL-ITS-F/IL-ITS-R(刀傷草)等 6 組引子，利用 multiplex PCR 於 60°C 的煉合溫度，各基原皆可分別增幅出特定長度之核酸片段，3 種蒲公英屬基原增幅 457 bp；兔仔菜、鵝仔草、苦蕒菜、黃鵪菜及刀傷草則分別增幅 370、404、252、509 及 222 bp (Fig. 1A)。

(二) 臺灣蒲公英、西洋蒲公英及蒲公英之鑑別

選用 TF-ITS-F/TF-ITS-R(臺灣蒲公英)、TM-ITS-F/TM-ITS-R(西洋蒲公英)及 TO-ITS-F/TO-ITS-R(蒲公英)等 3 組引子，利用 multiplex PCR 可於臺灣蒲公英、西洋蒲公英及蒲公英分別增幅 194、586 及 402 bp 核酸片段(Fig. 1B)。

二、ISSR 標誌於蒲公英真偽基原之檢測

臺灣蒲公英、西洋蒲公英及蒲公英，以及兔仔菜、鵝仔菜、苦蕒菜、黃鶴菜、刀傷草 5 種常見偽品基原，以 UBS ISSR 引子進行 PCR 反應，結果大部分引子於各基原不易明確且同步增幅出顯著差異的核酸片段。其中僅 UBC-857 引子 (ACACACACACACACACYG) 經 PCR 反

應，可同時明顯區別 3 種蒲公英及 5 種偽品基原 (Fig. 2)，分別於 500-3,000 bp 之間增幅 2-6 條多型性核酸片段，臺灣蒲公英可增幅約 1,400 bp 片段，西洋蒲公英則缺少約 1,200 bp 片段，其他偽品皆各呈現不同長度之 2-3 條多型性核酸片段。

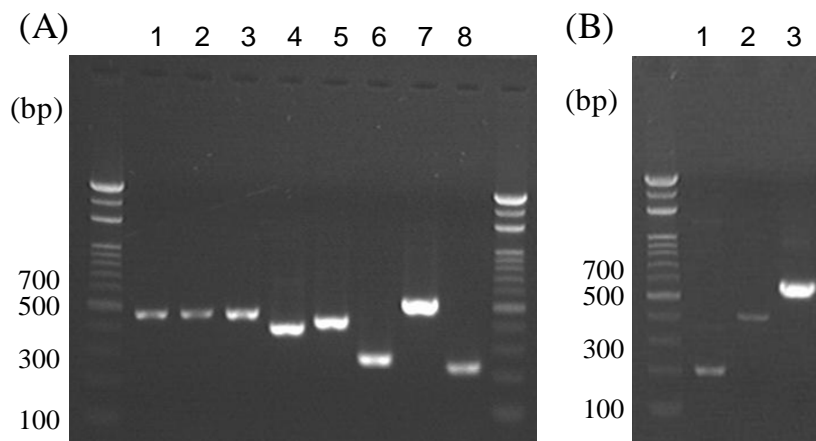


Fig. 1. AS-PCR assay (A) by using *Taraxacum* spp. primer to identify three *Taraxacum* species and five adulteration species; (B) by using *Taraxacum* species specific primers to identify three *Taraxacum* species. Lane 1, *Taraxacum formosanum*; lane 2, *T. mongolicum*; lane 3, *T. officinale*; lane 4, *Ixeris chinensis*; lane 5, *Pterocypsela indica*; lane 6, *Sonchus oleraceus*; lane 7, *Youngia japonica*; lane 8, *I. laevigata*.

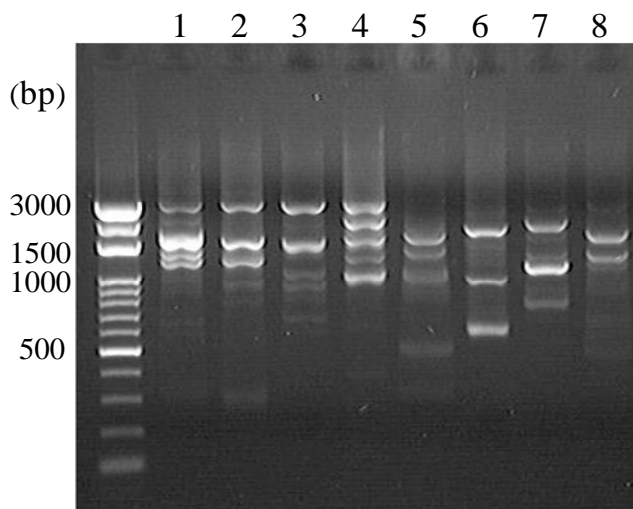


Fig. 2. ISSR-PCR electrophoretic profiles by using UBC-857 primer to identify three *Taraxacum* species (Lane 1, *Taraxacum mongolicum*; lane 2, *T. formosanum*; lane 3, *T. officinale*), and five adulteration species (lane 4, *Ixeris chinensis*; lane 5, *Pterocypsela indica*; lane 6, *Sonchus oleraceus*; lane 7, *Youngia japonica*; lane 8, *I. laevigata*).

討論

近年分子標誌技術已逐漸應用於中藥品種及真偽基原之鑑定，其中以 5.8 S rRNA-ITS 序列差異的比較為主(Chen and Wang 2003, Zhang *et al.* 2007)，包括半夏[*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)等之相關研究。而蒲公英藥材鑑別之研究主要包括 3 種蒲公英的核型與進化(Wang *et al.* 2007)、河南不同蒲公英藥材 HPLC 指紋圖譜分析(Li *et al.* 2008)、蒲公英藥材總 DNA 的提取(Li *et al.* 2009)等研究，目前有關蒲公英分子鑑別報導主要為隨機增幅多型性核酸(random amplified polymorphic DNA; 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 核酸多型性即發生改變，無法明確判斷真偽。

本研究針對大陸收集之蒲公英、臺灣之臺灣蒲公英、西洋蒲公英，以及兔仔菜、鵝仔草、苦滇菜、黃鵪菜、刀傷草，已完成 5.8S rRNA-ITS 之解序(Yuan *et al.* 2007)。3 種蒲公英 5.8S rRNA-ITS 序列長度皆為 643 bp，序列之間共有 6-29 個鹼基之差異，相似度介於 95.5-99.5%。兔仔菜、鵝仔草、苦滇菜、黃鵪菜、刀傷草等 5 種偽品基原 5.8 S rRNA-ITS 序列的長度介於 634-645 bp 之間。5 種偽品基原 5.8 S rRNA-ITS 序列與蒲公英者之比較，相似度介於 63.5-84.6%之間。

經由分析與比對 3 種蒲公英及 5 種偽品基原 5.8 S rRNA-ITS 序列的異同，設計特異性引子，發展為 AS-PCR 檢測方法。由於蒲公英藥用部位為蒲公英屬基原植物之全草(National Committee of Pharmacopoeia 2005)，顯示同為蒲公英屬基原，其遺傳質與

藥理具有共同特性，如果蒲公英之基原鑑定只欲區別蒲公英屬之基原與 5 種偽品基原，則可針對 3 種蒲公英屬基原的 ITS 高度保留區間，設計與 5 種偽品基原區隔的特異性引子(Tara-ITS-F/Tara-ITS-R)，利用 multiplex PCR 反應，3 種蒲公英基原皆可增幅出 457 bp 核酸片段，而 5 種偽品基原則無此片段(Fig. 1A)。

若欲進一步了解為何種蒲公英，可利用 3 種蒲公英鹼基差異處(例如 ITS₁ 的第 26、46、73、83、89、91、99、129 個鹼基、ITS₂ 的第 22、65、97、173、193、198、208 個鹼基)(Yuan *et al.* 2007)，分別設計臺灣蒲公英、西洋蒲公英及蒲公英特異性引子(TF-ITS-F/TF-ITS-R、TO-ITS-F/TO-ITS-R 及 TM-ITS-F/TM-ITS-R)，利用 multiplex PCR 反應，可於臺灣蒲公英、西洋蒲公英及蒲公英基原分別增幅 194、586 及 402 bp 核酸片段(Fig. 1B)。由於 AS-PCR 技術是針對中藥材已知核酸序列設計的專一性引子，不僅可經由升高煉合溫度，增加結果的正確性，且只需經過一次 PCR 反應及電泳分析，即可鑑別基原之真偽，尤其適用於偽品及混品之檢測。但此方法需先得知中藥材真品與偽品欲檢測核酸的差異序列，才可建立完備的檢測條件及結果。蛇床及蘭科部分藥材於不同分布區的分析亦採用此方法(Cai *et al.* 2000)。

ISSR 標誌技術之原理與操作與 RAPD 者相似，由於 ISSR 引子較長，因此檢測結果具有較佳的穩定性及再現性(Ziekiewicz *et al.* 1994)。本研究篩選 79 個 ISSR 引子，僅 UBC-857 引子經一次 PCR 反應後，使 3 種蒲公英及 5 種偽品基原同步增幅出不同長度及數量的核酸片段，可明確鑑別 3 種蒲公英及 5 種偽品基原。ISSR 亦已運用於石斛屬 9 種基原的鑑別，其中 2 種 ISSR 引子(UBC-807 及 UBC-864)即可區別所有被檢測樣品(Shen *et al.* 2005)。11 個青海省的冬蟲夏草樣品以 14 個 ISSR 引子分析，結果顯示不同產地的冬蟲夏草各有其特異性的 ISSR 核酸圖譜(Liang *et al.* 2005)。

AS-PCR 與 ISSR 檢測方法皆具有操作簡易及快速之特質，只需經過一次 PCR 反應，即可完成中藥材真偽的鑑別。然而此 2 方法亦各有優缺點，AS-PCR 需先得知中藥材真品與偽品欲檢測核酸的差異序列，自行設計特異性引子；而 ISSR 只需針對中藥材基原的真品與偽品，篩選出可鑑別的 ISSR 引子即可，無需預知真品的核酸序列。由於 AS-PCR 使用的引子具特異性，適用於混品之檢測；ISSR 則不適用於混品之檢測，PCR 結果易增幅出非專一性核酸片段，干擾多型性核酸結果的判讀。ISSR 方法較經濟，無核酸解序之費用。因此本研究針對蒲公英真品基原與偽品檢測方法的建立，分別選用 AS-PCR 技術及 ISSR 標誌，期望此 2 方法具有互補之功效，可運用於蒲公英藥材及半成品不同形態基原之鑑別與檢測。

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.
- Cai J, KY Zhou, LS Xu, ZT Wang, X Shen, YQ Wang, XB Li (2000) Ribosomal and ITS sequence analysis of *Cnidium monnieri* from different geographical origin in China. **Acta Pharm. Sin.** 35: 56-59.
- Cao H, PP But, P Shaw (1997) Identification of herba *Taraxaci* and its adulterants in Hong Kong market by DNA fringerprinting 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. Taipei. 111pp.
- Gao JP, YH Wang, CF Qiao, DF Chen (2003) Ribosomal DNA ITS sequences analysis of the Chinese crude drug fructus *Schisandrae sphenantherae* and fruts of *Schisandra viridis*. **China J. Chinese Mater. Med.** 28:706-710.
- GenBank of National Center for Biotechnology Information (2009) <http://www.ncbi.nih.gov> (visit on August 3, 2009)
- Han YL, JH Zhu (2008) Molecular markers used in identification of medicinal plants. **Res. Pract. Chinese Med.** 22:62-65.
- Li HL (1998) Compositae. p.10796-1081. In: **Flora of Taiwan**. Vol. 4. CT Huang (ed.) Editorial Committee of the Flora of Taiwan. Taipei.
- Li X, YF Du, HM Zhang, Z Hao, B Yan (2009) Extraction of genomic DNA from *Taraxacum officinal*. **Henan Sci.** 27:684-686.
- Li XF, HM S, XU M, M Lu (2008) HPLC fingerprint chromatogram analysis of some *Taraxacum* in Henan Province. **J. Chinese Med. Mater.** 31:1470-1473.
- Liang HH, Z Cheng, XL Yang, S Li (2005) Genetic variation and affinity of *Cordyceps sinensis* in Qinghai Province based on analysis of morphologic characters and inter-simple sequence repeat markers. **Chinese Tradit. Herbal Drugs** 36:1859-1864.
- Lin ZH, SJ Zu (2003) Quality control of Chinese medicinal herb. p.217-255. **Research and Development of Chinese Medicinal Herb Industry**. Consultant's Department of Education Board (ed.) Taipei.
- 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 (2009) Forestry Bureau, Council of Agriculture. Taipei.
- <http://ngis.zo.ntu.edu.tw/rareplant/species.asp?id=t00371> (visit on August 5, 2009)
- Shen Y, XU Cheng, XF Wan, M Zhang (2005) Application of ISSR-PCR to identification of different *Dendrobium* Sw. species. **Chinese Tradit. Herbal Drugs** 36: 423-427.
- 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. Coll. J.** 8:35-46.
- Wang SJ, XJ Yang, JR Ge, XP Fu (2007) Karyotypic and evolution variations of three species in *Taraxacum*. **J. Sci. Teacher's Coll. Univ.** 27: 49-52.
- 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.
- Yuan CC (2001) Textual research of material medica *Taraxacum mongolicum* and varietal identification. **Chinese Wild Plant Res.** 20:6-8, 17.
- Yuan CI, LC Lin, CL Kuo, MY Chiang (2007) PCR-RFLP marker of ribosomal DNA used in detection of adulteration species of *Taraxacum mongolicum*. **Crop Environ. Bioinform.** 4: 285-296.
- Zhang GC (2003) Internationalization of chinese medicinal herb. p.295-312. **Research and Development of Chinese Medicinal Herb Industry**. Consultant's Department of Education Board (ed.) Taipei.
- 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 Mater. 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 Agric. Sci.** 6:33-35.
- Zietkiewicz E, A Rafalski, D Labuda (1994) Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. **J Genomic** 20: 176-183.