

## 應用rbcL基因序列鑑別桑寄生及其誤用藥材

呂康祖 謝詠荃 李蕙君 溫彩玉 劉宜祝 羅吉方

研究檢驗組

### 摘要

rbcL (ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit) 基因是植物葉綠體中與光合作用相關的重要基因之一，為植物分類上常用的DNA標記(DNA marker)，也應用於DNA barcode上。本研究利用rbcL基因序列鑑別中藥中經常發生誤用的桑寄生藥材。桑寄生為桑寄生科(Loranthaceae)植物桑寄生*Taxillus chinensis*的乾燥帶葉莖枝，常見誤用品有紅花寄生(*T. parasiticus*)、槲寄生(*Viscum coloratum*)、楓寄生(*V. liquidambaricum*)及桑科的桑枝(*Morus indica*)，研究中以確認基原的對照藥材序列及參考GenBank資料庫，建立標準序列，再收集市售及向藥廠價購之桑寄生藥材檢體27件，抽取DNA後，以rbcL基因的universal primers進行PCR及DNA定序分析，序列結果比對標準序列，得到鑑定結果，結果顯示27件檢體鑑定為桑寄生正品12件、紅花寄生11件、槲寄生2件及桑枝2件。

關鍵詞：桑寄生、rbcL、DNA定序

### 前言

rbcL (ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit) 基因是植物葉綠體中與光合作用相關的重要基因之一，為植物分類上常用的DNA標記(DNA marker)，應用在植物的分類研究有Olmstead *et al.*<sup>(1)</sup>及Palmer *et al.*<sup>(2)</sup>等的研究。目前國際上，正在建立一種新的分類依據，利用特定基因片段的DNA序列，作為生物鑑定的憑藉，如同條碼一般，賦予每一種生物1個條碼，此稱為“DNA barcode”，而rbcL基因的序列，常與其他基因序列搭配，作為高等植物的DNA barcode<sup>(3)</sup>。

依據中華中藥典記載，桑寄生為桑寄生科Loranthaceae桑寄生*Taxillus chinensis* (DC.) Danser之乾燥帶葉莖枝。又名桑上寄生、寄生草、寄生樹、蔦木，主產於廣東、廣西、福建等地。一般性狀為圓柱狀，直徑3-15 mm；表面灰色或紫棕色，具有分枝、枝痕或葉痕，有眾多細小皮孔，小枝有棕紅色細毛；質堅硬，易折

斷，折斷面木部呈裂片狀。有時帶葉，葉多捲縮，完整者卵圓形，全緣，棕色，革質，幼葉亦被棕紅色細毛。氣微，味澀。現代醫學的研究上，桑寄生萃取物已經發表於論文上的藥效有：抑制脂肪酸合成酵素與減少實驗動物體重之功效<sup>(4-6)</sup>、藉由活化巨噬細胞調控免疫反應<sup>(7)</sup>。

與桑寄生常發生混用的藥材有紅花寄生(*T. parasiticus*)、槲寄生(*Viscum coloratum*)、楓寄生(*V. liquidambaricum*)以及桑枝(*Morus indica*)，本研究利用分析特定DNA標記的DNA序列作為鑑別藥材的依據，用以區分桑寄生及其他相關混用、誤用藥材，期能應用於中藥檢驗及中藥品質提升，未來更可供我國中藥典修正時的參考依據。

### 材料與方法

#### 一、材料

(一)檢體藥材：包括製藥技術中心提供之藥材、

中藥廠提供之藥材、品質監測計畫購買藥材及查驗登記檢體共27件，另外收集已知外觀鑑別為偽品的藥材檢體共7件。

### (二)試藥

1. 一般化學藥品：十二烷基肌氨酸鈉(N-lauroyl sarcosine sodium salt)購自Sigma (St. Louis, MO, USA)，異丙醇(isopropanol)、醋酸鈉(CH<sub>3</sub>COONa·3H<sub>2</sub>O)、氯化鈉購自Merck (Darmstadt, Germany)，十六烷基三甲基溴化銨(hexadecyltrimethyl ammonium bromide, CTAB)購自BDH (England)，乙二胺四乙酸二鈉(ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt, EDTA)、三羥甲基氨基甲烷(tris (hydroxymethyl) aminomethane, Tris)、苯酚-氯仿-異戊醇混合液(phenol : chloroform : isoamyl alcohol (25 : 24 : 1; v/v/v))、氯仿-異戊醇混合液(chloroform : isoamyl alcohol (24 : 1; v/v))購自Amresco (OH, USA)
2. PCR純化套組：GFX PCR, DNA and Gel Band Purification Kit購自GE Healthcare (Buckinghamshire, UK)。
3. DNA聚合反應試劑：PCR Master Mix 5X (Taq polymerase 1.25U, dNTP 200 μM, reaction buffer)購自GENEMARK (Bio Basic, Canada)。
4. 引子：購自百力(臺灣)，1f(5'-ATGTCACCA CAAACAGAAAC -3')及724r (5'-TCGCATCATGTACCTGCAGTAGC -3')<sup>(3)</sup>。
5. 瓊脂膠體：Agarose B Low EEO購自GENEMARK (Bio Basic, Canada)
6. 100 bp ladder marker：GENEMARK (Bio Basic, Canada)
7. EZvision：購自Amresco (OH, USA)
8. Exo-SAP IT套組：購自USB (Cleveland, OH, USA)
9. BigDye Terminator v3.1 cycle sequencing Kit：購自Applied Biosystems (Foster, CA, USA)

10. BigDye Xterminator Kit：購自Applied Biosystems (Foster, CA, USA)
11. 限制酵素：購自New England BioLabs (MA, USA)

### (三)器材

1. 迷你電泳槽及鑄膠器(Mupid II, Cosmo Bio, Chuo-Ku, Tokyo, Japan)
2. 聚合酶連鎖反應器(Gradient Palm-cycler, Corbett Research Co., Australia and Astec PC320, Astec株式會社, Japan)
3. 影像系統(ImageQuant 300, GE Healthcare, UK)
4. 自動定序儀(3130 Genetic Analyzer, Applied Biosystems, USA)

## 二、方法

### (一)DNA萃取與純化

DNA萃取與純化方法是依照已發表的論文“Discriminating between *Achyranthis Bidentatae Radix* and *Cyathulae Radix* in Chinese medicine preparations by nested PCR and DNA sequencing methods.”<sup>(8)</sup>的方法進行，將藥材檢體磨粉，秤取100 mg置於2 mL微量離心管中，加入1 mL之lysis buffer (100 mM Tris-HCl, pH 8.0, 100 mM EDTA, 1% N-lauroyl sarcosine sodium salt, and 1 mg/mL proteinase K)，56℃水浴1小時。加入與溶液等體積之phenol : chloroform : isoamyl alcohol (25 : 24 : 1; v/v/v)，混合萃取，以12000 x g離心5分鐘。離心後取水層，加入150 μL 65℃預熱的CTAB-NaCl溶液(10% hexadecyltrimethylammonium bromide in 0.7 M NaCl)，加入200 μL 0.7 M NaCl，混合後置於65℃水浴15分鐘，加入等體積之chloroform : isoamyl alcohol (24 : 1; v/v)，混合萃取，以12000 x g離心5分鐘。離心後取水層，加入0.7倍體積之isopropanol及1/10倍體積之3 M sodium acetate<sub>(aq)</sub>，以12000 x g離心5分鐘。離心後倒去上清液，待沉澱物風乾。

後，加入50-100  $\mu\text{L}$ 之無菌水溶解。以PCR純化套組純化檢體DNA後，DNA溶液供PCR之用。

#### (二)電泳與定序分析

取PCR產物5  $\mu\text{L}$ ，與EZvision 1  $\mu\text{L}$ 混合，置入1.8%瓊脂膠體，進行電泳，電泳條件100V、30分鐘，以影像系統觀察，確認PCR結果，並拍攝影像。結果確認後，以Exo-SAP IT套組純化，純化後，以BigDye Terminator v3.1 cycle sequencing Kit做定序反應，再以BigDye Xterminator Kit作螢光物質除去之純化(以上套組操作步驟依套組說明)，之後置入96孔盤，以自動定序儀作DNA序列分析，所得定序結果與美國國家衛生院之GenBank資料庫進行序列比對，得到鑑定結果。

#### (三)RFLP

PCR產物取5  $\mu\text{L}$  (1)加入3 units限制酵素TspRI，並依酵素使用說明加入所附之buffer及BSA，補滅菌之二次水至總體積20  $\mu\text{L}$ ，65 $^{\circ}\text{C}$ 反應1小時，取出進行電泳。(2)加入3 units限制酵素AvaI，並依酵素使用說明加入所附之buffer，補滅菌之二次水至總體積20  $\mu\text{L}$ ，37 $^{\circ}\text{C}$ 反應1小時，取出進行電泳。

## 結果與討論

先進行對照藥材的序列分析，對照藥材是經過外觀、組織鏡檢等方法確認植物種類後的少量植物標本或藥材，包括桑寄生及其誤用藥材紅花寄生、槲寄生、楓寄生及桑科的桑枝共5種。在經過磨粉、抽出DNA後，分別利用不同的universal primers，對不同的DNA標記片段進行PCR，包括ITS、rbcL及trnH-psbA spacer region等，用以確認何種DNA標記可以順利被PCR擴增出來，以及擴增產生的DNA片段，經定序後，其序列差異程度，是否足以用來鑑別桑寄生及其誤用藥材。結果顯示，僅有rbcL可以適用於本研究，其所得桑寄生及其誤用藥材的DNA序列分析比對的結果，經過DNA序列排序後，可以清楚的區別桑寄生及其誤用藥材，序列排序分析得到結果如圖

一。

再進一步以序列相似性進行分析，可以發現桑寄生、紅花桑寄生的序列與桑枝較為接近，與槲寄生、楓寄生相差較遠，由於此次選擇的DNA marker為rbcL，係葉綠體上重要的基因，對於演化上有相對的穩定性，不容易變異，是否暗示桑寄生、紅花桑寄生與桑(*Morus indica*)的演化上親緣性，值得進一步探究。另外，桑寄生及紅花桑寄生序列相似性高達99%，僅有6個鹽基的差異，因缺乏同屬植物相關序列資料，無法再進一步探討兩種植物之親緣相關性。

將收集來的桑寄生檢體進行序列的分析，這些收集來的桑寄生檢體，都經過初步的外觀鑑別，經檢體DNA序列與對照藥材的序列比對，得到鑑定結果，如表一所示，27件檢體鑑定為桑寄生正品12件、紅花寄生11件、槲寄生2件及桑枝2件，桑寄生正品佔所有檢體數約44%，顯見誤用情形嚴重，較常發生的誤用是桑寄生以紅花寄生取代或混用，另外7件桑寄生的偽品，有1件DNA序列鑑別與原來外觀鑑別結果不同，可能由於藥材外觀特徵容易受到生長環境影響而改變，導致據以鑑別的特徵不明顯或模稜兩可，因而與DNA序列鑑別結果有差異。

在桑寄生藥材檢體常發現有桑寄生誤用藥材混雜其中，因為在抽取DNA時，是將藥材先磨粉，再進行DNA抽取，由於磨粉機一次磨粉需要相當數量的藥材，可能會有不同的寄生同時磨粉，而抽取的DNA就有摻混的情形，再用universal primers進行PCR及定序，含量較少的寄生，其DNA經PCR擴增後，與含量較多的寄生DNA量差異也隨之擴大，在定序時，儀器可能無法判讀，則會忽略此含量較少的寄生，而以含量較多的寄生為判讀結果。為了應付此一情形，可以應用簡單的PCR-RFLP方法來確認桑寄生檢體是否摻混，利用各種寄生的序列差異，選取適當的限制酶將寄生藥材PCR產物，不經過定序，直接剪切，從電泳圖上即可判定。研究中，經序列分析，選取TspRI及AvaI進行PCR-RFLP方法鑑別，以TspRI剪切，可以區分桑寄生、紅花寄生及

應用rbcL基因序列鑑別桑寄生及其誤用藥材

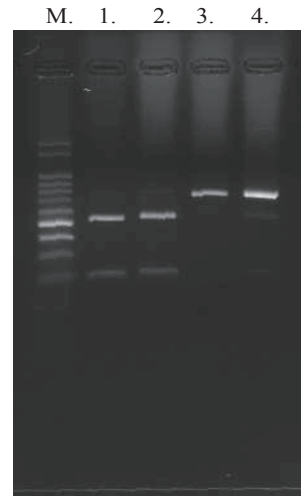
Viscum_coloratum	1	50	Morus_indica	TATTTGGGTTCAAAGCCCTGCGTCTACGCTGGAAGATTGGCAATC	
Viscum_liquidambaricum	TAAAGCAAGTGTGGATTCAAAGCGGGTAAAGATTACAATTGACTT		Taxillus_chinensis	TATTTGGGTTAAAGCCCTACGCTCTACGCTGGAAGATTGGCAATC	
Morus_indica	TAAAGCAAGTGTGGATTCAAAGCGGGTAAAGATTACAATTGACTT		Taxillus_parasiticus	TATTTGGGTTAAAGCCCTACGCTCTACGCTGGAAGATTGGCAATC	
Taxillus_chinensis	TAAAGCAAGTGTGGATTCAAAGCGGGTAAAGATTACAATTGACTT			***** ** * ***** ** ** * *****	
Taxillus_parasiticus	TAAAGCAAGTGTGGATTCAAAGCGGGTAAAGATTACAATTGACTT				
	***** ***** ** ** * ***** ** ** * *****				
Viscum_coloratum	51	100	Viscum_coloratum	401	450
Viscum_liquidambaricum	ATTATACTCCGATTATGAAACCAAGATACAGATCTTGGCAGCATTC		Viscum_liquidambaricum	CCTCCAGCTTATTCTAAAACCTTTCAAGGCCCGCTCATGGCATTCAAGT	
Morus_indica	ATTATACTCCGATTATGAAACCAAGATACAGATCTTGGCAGCATTC		Morus_indica	CCTCCAGCTTATTCTAAAACCTTTCAAGGCCCGCTCATGGCATTCAAGT	
Taxillus_chinensis	ATTATACTCCGATTATGAAACCAAGATACAGATCTTGGCAGCATTC		Taxillus_chinensis	CCTAACTGCTTATTAAAACCTTTCAAGGCCCGCTCATGGCATTCAAGT	
Taxillus_parasiticus	ATTATACTCCGATTATGAAACCAAGATACAGATCTTGGCAGCATTC		Taxillus_parasiticus	CCCCCGGCTTATTCTAAAACCTTTCAAGGCCCGCTCATGGCATTCAAGT	
	**** ** * ** * ** * ***** ** ** * *****			** ** * ** * ***** ** ** * ***** ** * *****	
Viscum_coloratum	101	150	Viscum_coloratum	451	500
Viscum_liquidambaricum	CGAGTCACTCCTCAGCCAGGAGTCCGCGTGAAGAACAGGGCCGCGGT		Viscum_liquidambaricum	GGAGAGAGATAAATTGAACAAGTATGGTCGTCCTCTATTGGGATGACAA	
Morus_indica	CGAGTCACTCCTCAGCCAGGAGTCCGCGTGAAGAACAGGGCCGCGGT		Morus_indica	GGAGAGAGATAAATTGAACAAGTATGGTCGTCCTCTATTGGGATGACAA	
Taxillus_chinensis	CGAGTCACTCCTCAGCCAGGAGTCCGCGTGAAGAACAGGGCCGCGGT		Taxillus_chinensis	TGAGAGAGATAAATTGAACAAGTATGGTCGTCCTCTATTGGGATGACAA	
Taxillus_parasiticus	CGAGTCACTCCTCAGCCAGGAGTCCGCGTGAAGAACAGGGCCGCGGT		Taxillus_parasiticus	TGAGAGAGATAAATTGAACAAGTATGGTCGTCCTCTATTGGGATGACAA	
	**** ***** ** * ***** ** * ***** ** * *****			***** ***** ** * ***** ** * ***** ** * *****	
Viscum_coloratum	151	200	Viscum_coloratum	501	550
Viscum_liquidambaricum	AGCTGCGGAATCTTCTACTGTACATGGACAACCTGTGTGGACCGATGGAC		Viscum_liquidambaricum	TAAACCTAAATAGGATTATCTGCTAAGAAGTACGGTAGAGCAGTTTAT	
Morus_indica	AGCTGCGGAATCTTCTACTGTACATGGACAACCTGTGTGGACCGATGGAC		Morus_indica	TAAACCTAAATAGGATTATCTGCTAAGAAGTACGGTAGAGCAGTTTAT	
Taxillus_chinensis	AGCTGCGGAATCTTCTACTGTACATGGACAACCTGTGTGGACCGATGGAC		Taxillus_chinensis	TAAACCTAAATAGGATTATCTGCTAAGAAGTACGGTAGAGCAGTTTAT	
Taxillus_parasiticus	AGCTGCGGAATCTTCTACTGTACATGGACAACCTGTGTGGACCGATGGAC		Taxillus_parasiticus	TAAACCTAAATAGGATTATCTGCTAAGAAGTACGGTAGAGCAGTTTAT	
	***** ***** ***** ***** ** * ***** ** * *****			***** ***** ** * ***** ***** ** * *****	
Viscum_coloratum	201	250	Viscum_coloratum	551	600
Viscum_liquidambaricum	TTACCAGCCTGGATCGTTACAAGGACGATGCTACCACATCGAGCCCGTT		Viscum_liquidambaricum	GAATGTCTCGCGGTGGACTGATTTTACAAGATGATGAGAAGCTAAA	
Morus_indica	TTACCAGCCTGGATCGTTACAAGGACGATGCTACCACATCGAGCCCGTT		Morus_indica	GAATGTCTCGCGGTGGACTGATTTTACAAGATGATGAGAAGCTAAA	
Taxillus_chinensis	TTACCAGCCTGGATCGTTACAAGGACGATGCTACCACATCGAGCCCGTT		Taxillus_chinensis	GAGTGTCTGCGCGGTGGACTGATTTTACAAGATGATGAGAAGCTAAA	
Taxillus_parasiticus	TTACCAGCCTGGATCGTTACAAGGACGATGCTACCACATCGAGCCCGTT		Taxillus_parasiticus	GAGTGTCTGCGCGGTGGACTGATTTTACAAGATGATGAGAAGCTAAA	
	***** ** * ***** ** * ***** ***** *****			** ***** ***** ***** ***** ***** ** *	
Viscum_coloratum	251	300	Viscum_coloratum	601	650
Viscum_liquidambaricum	GCTGGAGAAGAACTCAATATTGGCTATGTGCTTATCCCTTAGACCT		Viscum_liquidambaricum	TTCCCAACCATTATGCGTGGAGAGATCGTTTCTATTTTGTGCCGAAG	
Morus_indica	GCTGGAGAAGAACTCAATATTGGCTATGTGCTTATCCCTTAGACCT		Morus_indica	CTCCCAACCATTATGCGTGGAGAGACCGTTTCTATTTTGTGCCGAAG	
Taxillus_chinensis	GCTGGAGAAGAACTCAATATTGGCTATGTGCTTATCCCTTAGACCT		Taxillus_chinensis	TTCCCAACCATTATGCGTGGAGAGATCGTTTCTATTTTGTGCCGAAG	
Taxillus_parasiticus	GCTGGAGAAGAACTCAATATTGGCTATGTGCTTATCCCTTAGACCT		Taxillus_parasiticus	CTCCCAACCATTATGCGTGGAGAGACCGTTTCTATTTTGTGCCGAAG	
	***** ***** ** * ***** ** * ***** *****			***** ***** ***** ***** ***** ***** *****	
Viscum_coloratum	301	350	Viscum_coloratum	651	700
Viscum_liquidambaricum	TTTTGAAGAAGTCTGTACTAACCTGTTACTTCCATTGTGGGTAATG		Viscum_liquidambaricum	CCATTTATAAGCACAAGCTGAACAGGCGAAATCAAAGGACATTACTTTG	
Morus_indica	TTTTGAAGAAGTCTGTACTAACCTGTTACTTCCATTGTGGGTAATG		Morus_indica	CCATTTATAAGCACAAGCTGAACAGGCGAAATCAAAGGACATTACTTTG	
Taxillus_chinensis	TTTTGAAGAAGTCTGTACTAACCTGTTACTTCCATTGTGGGTAATG		Taxillus_chinensis	CAATTTATAAAGCACAAGCTGAACAGGCGAAATCAAAGGACATTACTTTG	
Taxillus_parasiticus	TTTTGAAGAAGTCTGTACTAACCTGTTACTTCCATTGTGGGTAATG		Taxillus_parasiticus	CTCTTTATAAGCACAAGCTGAACAGGCGAAATCAAAGGACATTACTTTG	
	***** ***** ***** ***** ***** ***** *****			* ***** ** * ***** ** * ***** ***** ***** *****	
Viscum_coloratum	351	400	Viscum_coloratum	701	
Viscum_liquidambaricum	TATTTGGCTCAAAGCCCTGCGTCTACGCGTGGAGGATCTGCGAATA		Viscum_liquidambaricum	AAT	
	TATTTGGCTCAAAGCCCTGCGTCTACGCGTGGAGGATCTGCGAATA		Morus_indica	AAT	
			Taxillus_chinensis	AAT	
			Taxillus_parasiticus	AAT	
				***	

圖一、桑寄生(Taxillus chinensis)與紅花寄生(T. parasiticus)、槲寄生(Viscum coloratum)、槲寄生(V.liquidambaricum)以及桑枝(Morus indica) rbcL序列比較

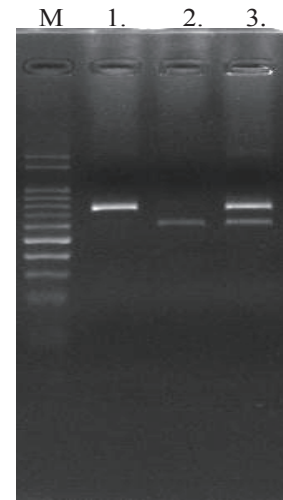
表一、桑寄生藥材DNA定序鑑別結果

藥材檢體	DNA 定序鑑別結果
TC01	<i>Taxillus chinensis</i>
TC02	<i>Taxillus chinensis</i>
TC03	<i>Taxillus chinensis</i>
TC04	<i>Taxillus chinensis</i>
TC05	<i>Taxillus chinensis</i>
TC06	<i>Taxillus chinensis</i>
TC07	<i>Taxillus chinensis</i>
TC08	<i>Taxillus parasiticus</i>
TC11	<i>Taxillus parasiticus</i>
TC12	<i>Taxillus parasiticus</i>
TC13	<i>Taxillus chinensis</i>
TC14	<i>Taxillus chinensis</i>
TC15	<i>Viscum coloratum</i>
TC16	<i>Morus indica</i>
TC17	<i>Taxillus chinensis</i>
TC18	<i>Taxillus parasiticus</i>
TC19	<i>Taxillus parasiticus</i>
TC20	<i>Taxillus chinensis</i>
TC21	<i>Taxillus parasiticus</i>
TC22	<i>Taxillus chinensis</i>
TC23	<i>Taxillus parasiticus</i>
TC24	<i>Viscum coloratum</i>
TC25	<i>Taxillus parasiticus</i>
TC26	<i>Taxillus parasiticus</i>
TC28	<i>Morus indica</i>
TC29	<i>Taxillus parasiticus</i>
TC31	<i>Taxillus parasiticus</i>
FTC01 桑寄生+紅花寄生	<i>Taxillus parasiticus</i>
FTC03 偽品	<i>Viscum liquidambaricum</i>
FTC04 槲寄生	<i>Viscum coloratum</i>
FTC05 槲寄生	<i>Viscum coloratum</i>
FTC09 楓寄生	<i>Viscum liquidambaricum</i>
FTC10 槲寄生	<i>Viscum liquidambaricum</i>
FTC11 桑枝	<i>Morus indica</i>

槲寄生、桑枝(如圖二),另外再進一步以AvaI剪切,可以區分桑寄生、紅花寄生及二者的混合物(如圖三),利用這兩種限制酶的組合,即可確認桑寄生檢體是否有摻混的情形發生。



圖二、以TspRI可以區分桑寄生、紅花寄生、槲寄生及桑枝 M: 100bp ladder marker, Lane 1: 桑寄生, Lane 2: 紅花寄生, Lane 3: 槲寄生, Lane 4: 桑枝



圖三、以AvaI可區分桑寄生、紅花寄生及二者的摻混藥材 M: 100bp ladder marker, Lane 1: 桑寄生, Lane 2: 紅花寄生, Lane 3: 桑寄生與紅花寄生的摻混藥材

## 結 論

傳統依據外觀性狀的生物分類方式與法則鑑別藥材,在近年來,逐步受到挑戰,因應著基因分析技術的進步,多種生物的全基因序列逐一被解開公布,隨著DNA Barcode的建立,以基因序列來鑑別分類生物的新法則勢必建立,而新的中



藥的鑑定方法應隨之逐步建立，以因應時代潮流所需，本研究之內容與所建立之鑑定方法，為未來中藥鑑定方法技術發展所趨，將可對中藥品質管理提升，有所助益。

### 參考文獻

1. Olmstead, R. G. and Palmer, J. D. 1994. Chloroplast DNA systematics: a review of methods and data analysis. *Am. J. Bot.* 81: 1205-1224.
2. Palmer, J. D., Jansen, R. K., Micheals, H. J., Chase, M. W. and Manhart, J. R. 1988. Chloroplast DNA variation and plant phylogeny. *Ann. Mo. Bot. Gard.* 75: 1180-1206.
3. Kress, W. J. and Erickson D. L. 2007. A two-locus global DNA barcode for land plants: the coding rbcL gene complements the non-coding trnH-psbA spacer region. *PLoS ONE* 2: e508.
4. Tian, W. X., Li, L. C., Wu, X. D. and Chen, C. C. 2004. Weight reduction by Chinese medicinal herbs may be related to inhibition of fatty acid synthase. *Life Sci.* 74: 2389-2399.
5. Wang, Y., Zhang, S. Y., Ma, X. F. and Tian, W. X. 2006. Potent inhibition of fatty acid synthase by parasitic loranthus [*Taxillus chinensis* (dc.) danser] and its constituent avicularin. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 21: 87-93.
6. Wang, Y., Deng, M., Zhang, S. Y., Zhou, Z. K. and Tian, W. X. 2008. Parasitic loranthus from Loranthaceae rather than Viscaceae potently inhibits fatty acid synthase and reduces body weight in mice. *J. Ethnopharmacol.* 118: 473-478.
7. Shin, H. Y., Chang, I. A., Zhang, W. J., Kim, Y. C., Yuun, Y. G. and Park, H. 2009. Immune stimulatory effects of *Loranthi ramulus* on macrophages through the increase of NO and TNF-alpha. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 31: 370-376.
8. Lu, K. T., Cheng, H. Y., Lo, C. F., Chang, H. C. and Lin, J. H. 2007. Discriminating between *Achyranthis Bidentatae Radix* and *Cyathulae Radix* in Chinese medicine preparations by nested PCR and DNA sequencing methods. *Planta Med.* 73: 1322-1326.

## Using the Sequence of *rbcL* Gene to Discriminate *Taxilli Ramulus* from Its Counterfeits

KANG-TSU LU, YUNG-CHUAN HSIEH, HUI-CHUN LEE, TSAI-YU WEN, YI-CHU LIU  
AND CHI-FANG LO

Division of Research and Analysis

### ABSTRACT

*rbcL* (ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit) is the important component of chloroplast for photosynthesis. The gene of *rbcL* is a useful DNA marker for taxonomy and DNA barcode. In this study, we discriminated *Taxilli Ramulus* from its counterfeits by the sequences of *rbcL* gene. *Taxilli Ramulus*, the dried stems with leaves of *Taxillus chinensis*, is widely used in Chinese medicine. *Taxilli Ramulus* is easy confused with the dried stems of *T. parasiticus*, *Viscum coloratum*, *V. liquidambaricolum* and *Morus indica* by appearance. We established a database of *rbcL* sequence of *Taxillus chinensis* and its counterfeits with the sequences of authentic raw materials and the data from GenBank. Our samples were purchased from local traditional Chinese (herbal) pharmacies and markets. The extracted DNA of samples was amplified by PCR with universal primers for *rbcL* gene, and then analyzed on an auto-sequencer. The revealed sequences were compared with the database. Twelve out of 27 samples were identified as *T. chinensis*, 11 *T. parasiticus*, 2 *V. coloratum* and 2 *M. indica*.

Key words: *rbcL*, *Taxilli Ramulus*, DNA sequencing