

藥用大花紅景天微基因條碼分析方法之建立

謝詠笙 李蕙君 彭冠智 蔡麗瑤 高雅敏 林美智 曾素香

衛生福利部食品藥物管理署研究檢驗組

摘 要

大花紅景天*Rhodiola crenulata* (Hook.f. & Thomson) H. Ohba為臺灣中藥典記載紅景天藥材使用之基原。鑑於大花紅景天已被列為瀕危植物，在資源稀缺情況下，其同屬物種之根莖外觀形態近似不易分辨，可能會增加錯誤使用的風險，因此建立準確鑑定藥用品種之檢測方法對於藥效與安全性更顯重要。本研究運用微基因條碼(DNA mini-barcode)短片段易擴增之優點，以提高檢測之可行性，針對核糖體第二內轉錄間隔區(Internal Transcribed Spacer 2, ITS2)、粒線體基因組*nad2-ccmB*間隔區及葉綠體基因組*trnF-ndhJ*間隔區序列開發3組微基因條碼分析方法，並將其應用於市售26件紅景天藥材檢體之種屬鑑別。經測試各區段之聚合酶連鎖反應(Polymerase Chain Reaction)擴增率及定序成功率分別以ITS2最高(100%；100%)，*nad2-ccmB*次之(84.6%；84.6%)，而*trnF-ndhJ*最低(61.5%；46.2%)；ITS2區段展現最佳之適用性。本研究建立之ITS2微基因條碼方法可進行紅景天藥材真偽識別，以確保使用合格正確物種作為原料，防範假冒誤用。

關鍵詞：大花紅景天、微基因條碼、核糖體第二內轉錄間隔區(ITS2)

前 言

景天科(Crassulaceae)紅景天屬(*Rhodiola* L.)植物為多年生草本或亞灌木，該屬物種全世界超過200種，唯有大花紅景天(*Rhodiola crenulata*)是臺灣中藥典⁽¹⁾與中華人民共和國藥典⁽²⁾收錄記載為紅景天藥材之基原，其藥用部位為乾燥根及根莖。現代醫學研究指出大花紅景天萃取物或所含特定成分具有抗發炎⁽³⁾、降低血糖⁽⁴⁾、改善脂肪肝^(5,6)、抗疲勞⁽⁷⁾、抗缺氧⁽⁸⁾等多樣化藥理活性，顯現其對醫療保健用途發展具有高經濟應用價值。然而由於過度放牧造成自然生態環境的破壞以及無計畫性肆意採收，大花紅景天資源急遽減少，已被列為瀕

臨絕種植物^(9,10)。此外《瀕臨絕種野生動植物國際貿易公約》亦將紅景天屬所有物種列入附錄，納入貿易管制⁽¹¹⁾，造成市場需求面臨原料稀缺，可能會增加誤用品出現機率，對於用藥安全具有潛在危害風險，難以保證臨床治療效果。加上紅景天屬物種之根莖外觀具有相似的形態，容易造成識別與分類之混亂。依臺灣中藥典第四版規範「法定中藥材係源自於自然界，依中醫藥理論，載於本藥典、固有典籍或經中央衛生主管機關認定之其他各國藥典及其補充典籍，得供藥品使用之礦物或特定基原之植物與動物之原藥材、加工品及飲片。」，故準確鑑定藥材品種對於是否合乎法規規範及其安全性至關重要。

DNA 條碼(DNA barcoding)是一種快速準確的鑑定技術，近年來隨著定序成本降低與生物資訊學的進步，已普遍應用於驗證中草藥及其產品之物種真實性⁽¹²⁾。然而原料加工過程若經過高溫緩慢乾燥或是不當的儲存環境，可能造成其DNA含量減少或發生DNA降解(DNA degradation)，影響萃取之核酸品質並降低聚合酶連鎖反應(Polymerase Chain Reaction, PCR)之擴增效率⁽¹³⁻¹⁵⁾；由於微基因條碼(DNA mini-barcoding)是針對短片段序列，具有提升降解DNA擴增成功率之優點^(16,17)。故本研究運用微基因條碼技術開發大花紅景天DNA檢測方法並提供識別比對之參考資料，可加速檢驗時效，協助判定藥材基原是否合乎藥典規範。

材料及方法

一、材料

- (一)藥用品種對照材料：大花紅景天對照藥材粉末RCN01(購自中國食品藥品檢定研究院)與大花紅景天藥材RC1(購自中藥貿易商)，共2件。
- (二)非藥用品種對照材料：高山紅景天對照藥材粉末RSN01(購自中國食品藥品檢定研究院)與四裂紅景天藥材RQ1(購自中藥貿易商)，共2件。
- (三)紅景天藥材檢體：購自中藥貿易商及中藥行，檢體編號cRm01至cRm26，共26件。

二、試藥與試劑

- (一)一般化學藥品
1M Tris-HCl buffers, pH 8.0、0.5 M EDTA solution, pH 8.0、Proteinase K 及3 M Sodium acetate solution均購自 Thermo Fisher Scientific公司(Wilmington, DE, USA)、Phenol: Chloroform: Isoamyl alcohol (25:24:1, v/v/v)、Chloroform: Isoamyl alcohol (24:1, v/v)、

N-Lauroylsarcosine sodium salt及2-Propanol均購自Sigma-Aldrich公司(St. Louis, MO, USA)、Hexadecyl trimethyl ammonium bromide購自Allied Signal公司 (New York, NY, USA)、5 M Sodium chloride solution及Agarose均購自Amresco公司(Solon, OH, USA)。

(二)試劑

GFX PCR DNA and gel band purification kit購自Cytiva公司 (Marlborough, MA, USA)、Fast-Run Taq master mix及RTU Mass 100 DNA ladder均購自Protech Technology Enterprise公司(Taipei, Taiwan)、Primer 購自PURIGO Biotechnology公司(Taipei, Taiwan)、EZ-Vision two DNA dye as loading buffer購自VWR International公司 (Radnor, PA, USA)、TBE buffer購自Amresco公司(Solon, OH, USA)、Qubit dsDNA HS assay kit、ExoSAP-IT PCR product cleanup reagent、POP-7 polymer、BigDye Terminator v3.1 cycle sequencing kit、BigDye XTerminator purification kit及Running buffer 均購自Thermo Fisher Scientific公司(Wilmington, DE, USA)。

三、儀器設備

- (一)藥材粉碎機(Tube mill control, IKA, Germany)。
- (二)精密天平(PB153S, Mettler Toledo, Swiss)。
- (三)恆溫加熱槽(MC-01N, Major Science, Taiwan)。
- (四)離心機(Biofuge pico, Heraeus, Germany)。
- (五)核酸濃度螢光測定儀(Qubit 4 Fluorometer, Thermo Fisher Scientific, USA)。
- (六)聚合酶連鎖反應器(Astec PC320, Astec, Japan)。
- (七)電泳槽及鑄膠器(Mupid-exU, Advance,

Japan)。

(八)照膠影像系統(GelDoc Go Imaging System, Bio-Rad, USA)。

(九)定序儀(3130 Genetic Analyzer, Applied Biosystems, USA)。

四、DNA萃取與純化

檢體以藥材粉碎機研磨成細粉，稱取100 mg檢體粉末，參考Lu *et al.* (2005)萃取流程⁽¹⁸⁾，再利用GFX PCR DNA and gel band purification kit進行DNA純化，獲得檢體之總基因組DNA (total genomic DNA)，再利用核酸濃度螢光測定儀測定其核酸濃度。

五、聚合酶連鎖反應(Polymerase Chain Reaction, PCR)

反應溶液總體積為25 μ L，包含Fast-Run Taq master mix 5 μ L、25 μ M前置引子(Forward primer)溶液及25 μ M反置引子(Reverse primer)溶液各0.25 μ L、模板DNA 2 μ L和無菌蒸餾水17.5 μ L。PCR反應係於Astec PC320 聚合酶連鎖反應器進行，擴增條件設定先以94 $^{\circ}$ C反應3分鐘，接續溫度及時間如下，以94 $^{\circ}$ C反應1分鐘、引子黏合溫度(依據所設計引子組之不同而調整，如表一所示)反應1分鐘以及72 $^{\circ}$ C反應1分鐘等三步驟重複45循環，最後以72 $^{\circ}$ C反應5分鐘，反應結束後PCR產物儲存於4 $^{\circ}$ C。

六、膠片電泳試驗

取EZ-Vision two DNA dye as loading buffer 1 μ L與PCR擴增產物5 μ L混合均勻後注入2.0% Agarose膠片孔洞；另取 RTU Mass 100 DNA ladder同時進行電泳，作為DNA條帶大小判別依據，於TBE buffer中以100 伏特進行電泳35分鐘，再利用影像系統拍攝電泳結果。

七、DNA定序

將PCR擴增產物以ExoSAP-IT PCR product cleanup reagent進行純化，再以BigDye Terminator v3.1 cycle sequencing kit及BigDye XTerminator purification kit進行定序反應與純化後進行核酸序列分析。

結果與討論

一、微基因條碼分析方法開發與測試

為分辨大花紅景天與其同屬親緣關係相近之物種，下載並整理GenBank資料庫中紅景天屬物種序列資料，比對分析該屬物種間之序列高變異區段進行短片段(100-300鹼基對)之引子對設計，經篩選測試選擇ITS2、*nad2-ccmB*、*trnF-ndhJ*等3個目標區段開發微基因條碼分析方法。將藥用品種對照材料(RCN01和RC1)與非藥用品種對照材料(RSN01和RQ1)基因組DNA，個別以二重複進行3組微基因條碼引子對(表一)之PCR反應，將擴增產物進行膠片電

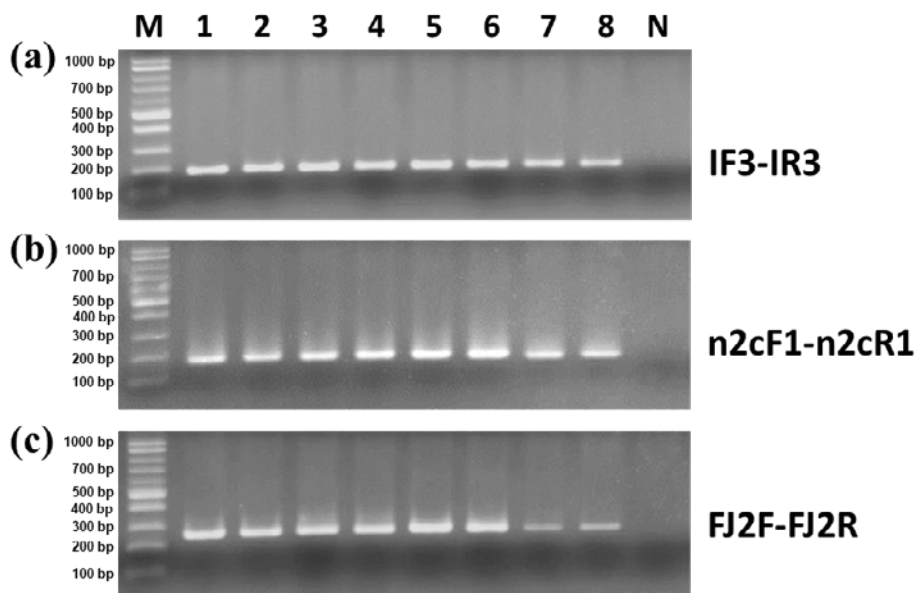
表一、微基因條碼分析用之引子資訊

基因組類別	基因區段	引子序列(5'→3')	引子黏合溫度($^{\circ}$ C)
細胞核基因組 (Nuclear DNA)	核糖體第二內轉錄間隔區 ITS2	IF3: GTGAAGCTTGGCCTCCCGT	56
		IR3: TCSCAATGCTGGAAACATCGAG	
粒線體基因組 (Mitochondrial DNA)	<i>nad2-ccmB</i> 基因間隔區	n2cF1: GAGACAACACCGATTTCGCT	50
		n2cR1: GGATAGCTTCCCTTAGTCAA	
葉綠體基因組 (Chloroplast DNA)	<i>trnF-ndhJ</i> 基因間隔區	FJ2F: TGGTTCCTGGCACATGAT	47
		FJ2R: CAACTAACCTTTCAAATACGT	

泳分析，觀察到4件樣品在3組引子對之擴增結果皆出現單一DNA條帶(如圖一)，將擴增產物進行定序，獲得3個目標區段之微基因條碼序列，如圖二、圖三及圖四所示。

將微基因條碼序列數據利用BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)搜尋工具與美國國家生物技術資訊中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)之GenBank資料庫進行序列相似性比對，分析結果如表二所列；2件藥用品種對照材料RCN01與RC1之3組微基因條碼序列皆與GenBank資料庫大花

紅景天(*R. crenulata*)參考序列相似度最高，驗證其物種皆為藥用大花紅景天；而2件非藥用品種對照材料RSN01與RQ1之3組微基因條碼序列相似度分析結果與GenBank資料庫中多個非藥用紅景天屬物種序列相似度最高，並無足夠證據支持分辨其種原，其鑑別結果僅能判別非屬藥用之大花紅景天。將上述序列資料利用MAFFT version 7軟體工具⁽¹⁹⁾進行多序列並列分析(Multiple Sequence Alignment)，比較各區段序列之變異位點；2件藥用品種對照材料之ITS2與*nad2-ccmB*序列與GenBank資料庫大花



圖一、藥用與非藥用品種對照材料之PCR擴增產物電泳圖

使用之引子對標示於右方：

(a) IF3-IR3為ITS2微基因條碼分析引子對

(b) n2cF1-n2cR1為*nad2-ccmB* 微基因條碼分析引子對

(c) FJ2F-FJ2R為*trnF-ndhJ* 微基因條碼分析引子對

M: 100 bp DNA ladder marker

Lane 1-2:大花紅景天對照藥材粉末RCN01

Lane 3-4:大花紅景天藥材RC1

Lane 5-6:高山紅景天對照藥材粉末RSN01

Lane 7-8:四裂紅景天藥材RQ1

N: Non-template control

```

>RCN01 ITS2 (188 bp)
GTGAAGCTTGGCCTCCCGTGAGCCCAAACCTCGCGGATGGCTTAAAAACGAGCCTCGAGACGGTT
AGACGTCGCGACAAGTGGTGGTTACGAGGCCTTGCGCCTTTGAGCTTTGCGCGTCGCTGCCGTC
GTCCCTCTCTCTCGAAATTATAACCCGAACGGAGCATCCTCGATGTTTCCAGCATTGCGA

>RC1 ITS2 (188 bp)
GTGAAGCTTGGCCTCCCGTGAGCCCAAACCTCGCGGATGGCTTAAAAACGAGCCTCGAGACGGTT
AGACGTCGCGACAAGTGGTGGTTACGAGGCCTTGCGCCTTTGAGCTTTGCGCGTCGCTGCCGTC
GTCCCTCTCTCTCGAAATTATAACCCGAACGGAGCATCCTCGATGTTTCCAGCATTGCGA

>RSN01 ITS2 (188 bp)
GTGAAGCTTGGCCTCCCGTGAGCCCAAACCTCGCGGATGGCTTAAAAACGAGCCTCGAGACTGTT
AGACGTCGCGATAAGTGGTGGTTACAAGGCCTTGTCCTTTGAGCGTTGCGTGTGCTGCCGTC
GTCCCTCTCTCTCGAAATTATAACCCGAAGGGAGCATCCTCGATGTTTCCAGCATTGCGA

>RQ1 ITS2 (190 bp)
GTGAAGCTTGGCCTCCCGTGAGCCCAAACCTCGCGGATGGCTTAAAAACGAGCCTCGAGACGGCT
AGACGTCGCGATAAGTGGTGGTTGCAAGGCCTTGTCCTTTGAGCGTTGCGCGTCGCTGCCGTC
GTCCCTCTCTCTCGAAATTATAACCCGAACGGAGCATCCTCGATGTTTCCAGCATTGCGA

```

圖二、藥用品種與非藥用品種對照材料之ITS2微基因條碼序列

(RCN01：大花紅景天對照藥材粉末；RC1：大花紅景天藥材；RSN01：高山紅景天對照藥材粉末；RQ1：四裂紅景天藥材)

```

>RCN01 nad2-ccmB (176 bp)
GAGACAACACCGATTTTCGCTAAGGTGAGGGTCTACTTTTTGAAAAACATTATATCTCCCTGTG
GAAAAACAGTAAACAAAATTTTTTAGGGAGAGGCACTCACTTTCATCTTTTTTTCATCGGA
AATAGGGAAAAATCCTAGCAAGTCGATTTTGACTAAGGGAAGCTATCC

>RC1 nad2-ccmB (176 bp)
GAGACAACACCGATTTTCGCTAAGGTGAGGGTCTACTTTTTGAAAAACATTATATCTCCCTGTG
GAAAAACAGTAAACAAAATTTTTTAGGGAGAGGCACTCACTTTCATCTTTTTTTCATCGGA
AATAGGGAAAAATCCTAGCAAGTCGATTTTGACTAAGGGAAGCTATCC

>RSN01 nad2-ccmB (176 bp)
GAGACAACACCGATTTTCGCTAAGGTGAGGGTCTACTTTTTGAAAAACATTATATCTCCCTGTG
GTAAAAACAGTAAACAAAATTTTTTAGGGAGAGGCACTCACTTTCATCTTTTTTTCATCGGA
AATAGGGAAAAATCCTAGCAAGTCGATTTTGACTAAGGGAAGCTATCC

>RQ1 nad2-ccmB (168 bp)
GAGACAACACCGATTTTCGCTAAGGTGAGGGTCTACTTTTTGAAAAACATTATATCTCCCTGTG
GTAAAAACAGTAAACAAAATTTTTTAGGGTCACTTTCATCTTTTTTTCATCGGAAATAGGGA
AAAATCCTAGCAAGTCGATTTTGACTAAGGGAAGCTATCC

```

圖三、藥用品種與非藥用品種對照材料之nad2-ccmB微基因條碼序列

(RCN01：大花紅景天對照藥材粉末；RC1：大花紅景天藥材；RSN01：高山紅景天對照藥材粉末；RQ1：四裂紅景天藥材)

>RCN01_ *trnF-ndhJ* (259 bp)
 TGGTTCCTGGCACATGATTTAGTTTTAGAATGGATGCTTTCTTTTATATATGAATAATAATTCA
 TAGGGATCAACAGACATATATTCTATAGCAGGATACCTACGTACCCATCTAGGCGTCTGAAAT
 ATACCCATACATTGTATAGATGAGAAAAGAATAAATTACAGTAGTTAAAAGAATCTTTTTTTGT
 TCGTACCCTTCTCGTTCAAAAAAAAAAATATATATTAATACTTCATACGTATTTGAAAGGTTAG
 TTG

>RC1_ *trnF-ndhJ* (260 bp)
 TGGTTCCTGGCACATGATTTAGTTTTAGAATGGATGCTTTCTTTTATATATGAATAATAATTCA
 TAGGGATCAACAGACATATATTCTATAGCAGGATACCTACGTACCCATCTAGGCGTCTGAAAT
 ATACCCATACATTGTATAGATGAGAAAAGAATAAATTACAGTAGTTAAAAGAATCTTTTTTTGT
 TCGTACCCTTCTCGTTCAAAAAAAAAAATATATATTAATACTTCATACGTATTTGAAAGGTTA
 GTTG

>RSN01_ *trnF-ndhJ* (261bp)
 TGGTTCCTGGCACATGATTTAGTTTTGGAATGGATGCTTTCTTTTATATATGAATAATAATTCA
 TAGGGATCAACAGACATATATTCTATAGCAGGATACCTACGTACCCATCTAGGCGTCTGAAAT
 ATACCCATACATTGTATAGATGAGAAAAGAATAAATTACAGTAGTTAAAAGAATCTTTTTTTGT
 TCGTACCCTGTCTGTTCTCGTTCAAAAAAAAAAATTTAATACTTCAAACGTATTTGAAAGGTT
 AGTTG

>RQ1_ *trnF-ndhJ* (262 bp)
 TGGTTCCTGGCACATGATTTAGTTTTAGAATGGATGCTTTCTTTTATATATGAATAATAATTCA
 TAGGGATCAACAGACATATATTCTATAGCAGGATACCTACGTACCCATCTAGGCGTCTGAAAT
 ATACCCATACATTGTATAGATGAGAAAAGAATAAATTACAATAGTTAAAAGAATCTTTTTTTGT
 TCGTACCCTGTCTGTTCTCGTTCAAAGAAAAAATATATTAATACTTCATACGTATTTGAAAGGT
 TAGTTG

圖四、藥用品種與非藥用品種對照材料之*trnF-ndhJ*微基因條碼序列

(RCN01：大花紅景天對照藥材粉末；RC1：大花紅景天藥材；RSN01：高山紅景天對照藥材粉末；
 RQ1：四裂紅景天藥材)

紅景天參考序列的變異位點鹼基皆相同(表三與表四)；而RCN01與RC1藥用品種對照材料*trnF-ndhJ*序列與GenBank資料庫大花紅景天參考序列(OP312064與NC_050881)有2個鹼基位置(225和226)有差異，推測可能為大花紅景天之種內變異；但仍可藉由該區段序列其他14個變異位點之鹼基相同與差異情形辨別是否為大花紅景天並區分其同屬非藥用品種，如表五所示。經由上述序列相似度分析及變異位點比對結果確認3組微基因條碼分析方法能夠有效識

別驗證藥用物種大花紅景天；並利用不同基因區段之鑑別結果進行多重確認，以提高種屬判定之準確性及可信度。

二、微基因條碼分析方法適用性評估

為測試微基因條碼分析方法之適用性，萃取純化26件紅景天藥材檢體之總基因組DNA，分別進行3組微基因條碼分析。其中ITS2引子對可擴增26件樣品DNA並成功獲得26條序列，*nad2-ccmB*引子對只擴增22件並獲

表二、微基因條碼序列BLAST序列相似度分析

對照材料名稱	ITS2微基因條碼序列 BLAST results		<i>nad2-ccmB</i> 微基因條碼序列 BLAST results		<i>trnF-ndhJ</i> 微基因條碼序列 BLAST results	
	GenBank accession number	Maximum identity (%)	GenBank accession number	Maximum identity (%)	GenBank accession number	Maximum identity (%)
大花紅景天對照藥 材粉末 RCN01	<i>R. crenulata</i> (EU239665)	100	<i>R. crenulata</i> (NC_070303)	100	<i>R. crenulata</i> (OP312064)	100
	<i>R. crenulata</i> (MH371167)	100			<i>R. crenulata</i> (PP262137)	100
大花紅景天藥材 RC1	<i>R. crenulata</i> (EU239665)	100	<i>R. crenulata</i> (NC_070303)	100	<i>R. crenulata</i> (OP312064)	99.62
	<i>R. crenulata</i> (MH371167)	100			<i>R. crenulata</i> (PP262137)	99.62
					<i>R. crenulata</i> (NC_050881)	99.62
高山紅景天對照藥 材粉末 RSN01	<i>R. amabilis</i> (AB088587)	99.47	<i>R. rosea</i> (PP024540)	100	<i>R. litwinowii</i> (PP262149)	98.85
	<i>R. macrocarpa</i> (AB088590)	99.47	<i>R. wallichiana</i> (OP312069)	100	<i>R. calliantha</i> (NC_060675)	98.85
	<i>R. macrocarpa</i> (KF113707)	99.47			<i>R. macrocarpa</i> (NC_060679)	98.85
	<i>R. atuntsuensis</i> (KJ569922)	99.47			<i>R. bupleuroides</i> (OL742461)	98.85
	<i>R. quadrifida</i> (KF113714)	99.47			<i>R. quadrifida</i> (PP262143)	98.85
	<i>R. nobilis</i> (KF113708)	99.47				
四裂紅景天藥材 RQ1	<i>R. himalensis</i> (KR269905)	99.47	<i>R. tangutica</i> (NC_072122)	100	<i>R. himalensis</i> (MZ242253)	100
			<i>R. juparensis</i> (NC_082108)	100	<i>R. kirilowii</i> (NC_052736)	100
					<i>R. sacra</i> (NC_052735)	100
					<i>R. juparensis</i> (NC_082109)	100

得22條序列，*trnF-ndhJ*子對僅擴增16件並取得12條序列。PCR擴增率及定序成功率以ITS2最高(100%；100%)，*nad2-ccmB*次之(84.6%；84.6%)，*trnF-ndhJ*最低(61.5%；46.2%)，如圖五。PCR擴增效率與定序成功率是評估DNA條碼進行物種識別效力之重要指標⁽²⁰⁻²³⁾，而ITS2

是3組微基因條碼檢測效率最高之區段，此試驗結果與Xin等人⁽²⁴⁾主張ITS2是最適合鑑定紅景天之分子標記一致。Zhang等人⁽²⁵⁾也提及細胞核基因組ITS區段具有演化速率較快、多拷貝數與高核苷酸變異性之特點，因而適合探討相近分類群的親緣關係。

表三、藥用與非藥用品種對照材料之ITS2微基因條碼序列變異位點

藥用品種對照材料/ 大花紅景天參考序列/ 非藥用品種對照材料	ITS2微基因條碼序列變異位點										
	61	63	76	88	90	99	110	116	133	134	160
大花紅景天對照藥材粉末 RCN01	G	T	C	A	G	C	T	C	—	—	C
大花紅景天藥材 RC1	G	T	C	A	G	C	T	C	—	—	C
大花紅景天參考序列 MH371167 (405-592)	G	T	C	A	G	C	T	C	—	—	C
大花紅景天參考序列 EU239665 (453-640)	G	T	C	A	G	C	T	C	—	—	C
高山紅景天對照藥材粉末 RSN01	T	T	T	A	A	T	G	T	—	—	G
四裂紅景天藥材 RQ1	G	C	T	G	A	T	G	C	C	T	C

表四、藥用與非藥用品種對照材料之nad2-ccmB微基因條碼序列變異位點

藥用品種對照材料/ 大花紅景天參考序列/ 非藥用品種對照材料	nad2-ccmB微基因條碼序列變異位點									
	66	83	95	96	97	98	99	100	101	102
大花紅景天對照藥材粉末 RCN01	A	A	A	G	A	G	G	C	A	C
大花紅景天藥材 RC1	A	A	A	G	A	G	G	C	A	C
大花紅景天參考序列 NC_070303 (155817-155992)	A	A	A	G	A	G	G	C	A	C
高山紅景天對照藥材粉末 RSN01	T	T	A	G	A	G	G	C	A	C
四裂紅景天藥材 RQ1	T	T	—	—	—	—	—	—	—	—

26件紅景天藥材檢體之物種鑑別結果，共檢出10件為大花紅景天(*R. crenulata*)，16件為非藥用紅景天物種。本研究所開發之方法可應用於原料之物種鑑別以確保產品符合法規規範。

三、結 論

試驗結果顯示本研究所開發ITS2微基因條碼方法具有良好鑑定效率，提供科學數據佐證

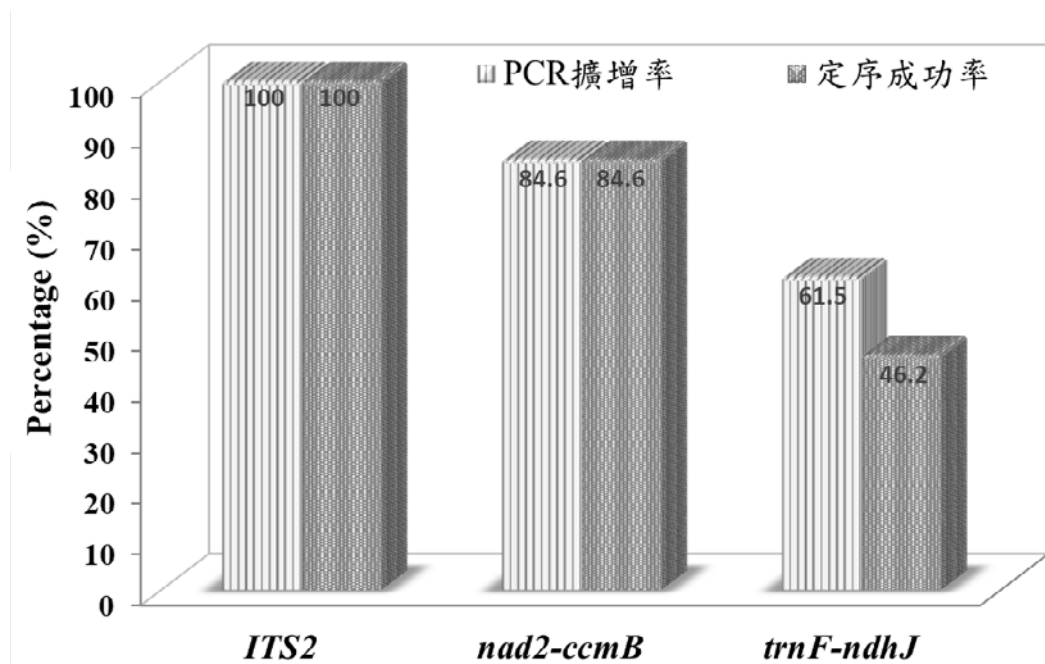
大花紅景天的種屬身分，準確鑑定藥用品種與區分非藥用品種，釐清藥材基原之正確性，從而維護用藥安全。

參考文獻

1. 衛生福利部臺灣中藥典第四版編修委員。2021。臺灣中藥典。第四版。216-217頁，衛生福利部。臺北市。

表五、藥用與非藥用品種對照材料之*trnF-ndhJ*微基因條碼序列變異位點

藥用品種對照材料/ 大花紅景天參考序列/ 非藥用品種對照材料	<i>trnF-ndhJ</i> 微基因條碼序列變異位點															
	27	169	201	202	203	204	205	206	220	225	226	227	228	229	233	245
大花紅景天對照藥材粉末 RCN01	A	G	—	—	—	—	—	—	A	A	—	A	T	A	A	T
大花紅景天藥材 RC1	A	G	—	—	—	—	—	—	A	A	T	A	T	A	A	T
大花紅景天參考序列 OP312064 (47897-48155)	A	G	—	—	—	—	—	—	A	A	—	A	T	A	A	T
大花紅景天參考序列 NC_050881 (47940-48198)	A	G	—	—	—	—	—	—	A	T	—	A	T	A	A	T
高山紅景天對照藥材粉末RSN01	G	G	T	G	T	C	T	G	A	A	—	—	—	—	—	A
四裂紅景天藥材 RQ1	A	A	T	G	T	C	T	G	G	A	—	—	—	—	A	T



圖五、微基因條碼分析紅景天藥材檢體之PCR擴增率及定序成功率

- 國家藥典委員會。中華人民共和國藥典。2020年版一部。161-162頁，中國醫藥科技出版社，北京。
- Lee, J.M., Kim, Y.S., Dong, X., Park, J.S. et

al. 2020. Anti-inflammatory effect of *Rhodiola crenulata* extracts through the down-regulation of MyD88 dependent pathway and induction of autophagy. J. Funct. Foods 64(6): 103703.

4. Yue, H., Wang, L., Jiang, S., Banma, C. *et al.* 2022. Hypoglycemic effects of *Rhodiola crenulata* (HK. f. et. Thoms) H. Ohba *in vitro* and *in vivo* and its ingredient identification by UPLC-triple-TOF/MS. *Food Funct.* 13(3): 1659-1667.
5. Yi, Q., Sun, P., Li, J., Kong, S. *et al.* 2018. Rho, a fraction from *Rhodiola crenulate*, ameliorates hepatic steatosis in mice models. *Front. Physiol.* 9: 222.
6. Yuan, C., Jin, Y., Yao, L., Liu, L. *et al.* 2020. *Rhodiola crenulata* root extract ameliorates fructose-induced hepatic steatosis in rats: association with activating autophagy. *Biomed. Pharmacother.* 125: 109836.
7. Hou, Y., Tang, Y., Wang, X., Ai, X. *et al.* 2020. *Rhodiola crenulata* ameliorates exhaustive exercise-induced fatigue in mice by suppressing mitophagy in skeletal muscle. *Exp. Ther. Med.* 20(4): 3161-3173.
8. Ma, Y., Wu, Y., Xia, Z., Li, J. *et al.* 2019. Anti-hypoxic molecular mechanisms of *Rhodiola crenulata* extract in zebrafish as revealed by metabolomics. *Front. Pharmacol.* 10: 1356.
9. 經濟部國際貿易署。2023。「瀕臨絕種動植物之物種」附表一、附表二及附表三。
[<https://law.moea.gov.tw/LawContent.aspx?id=GL001420>]
10. 王強、阮曉、李荷迪、王國軍等。2007。珍稀藥用資源植物紅景天研究現狀、問題與對策。自然資源學報，22(6): 880-889.
11. 澳門特別行政區政府新聞局。2023。進出口商須留意新納入貿易管制的物種。
[<https://www.gcs.gov.mo/news/detail/zh-hant/N23BIGa3G8>]
12. Zhu, S., Liu, Q., Qiu, S., Dai, J. *et al.* 2022. DNA barcoding: an efficient technology to authenticate plant species of traditional Chinese medicine and recent advances. *Chin. Med.* 17(1): 112.
13. Hrnčirova, Z., Bergerová, E. and Siekel, P. 2008. Effects of technological treatment on DNA degradation in selected food matrices of plant origin. *J. Food Nutr. Res.* 47(1): 23-28.
14. Alaeddini, R., Walsh, S.J. and Abbas, A. 2010. Forensic implications of genetic analyses from degraded DNA- a review. *Forensic Sci. Int. Genet.* 4(3): 148-157.
15. Staats, M., Cuenca, A., Richardson, J.E., Ginkel, R.V. *et al.* 2011. DNA damage in plant herbarium tissue. *PLoS One* 6(12): e28448.
16. Parveen, I., Gafner, S., Tehen, N., Murch, S.J. *et al.* 2016. DNA barcoding for the identification of botanicals in herbal medicine and dietary supplements: strengths and limitations. *Planta Med.* 82(14): 1225-1135.
17. Gao, Z., Liu, Y., Wang, X., Wei, X. *et al.* 2019. DNA mini-barcoding: a derived barcoding method for herbal molecular identification. *Front. Plant Sci.* 10: 987.
18. Lu, K.T., Lo, C.F., Chang, H.C. and Lin, J.H. 2005. Identification of Saposhnikovia Radix in concentrated Chinese medicine preparations by nested PCR and DNA sequencing methods. *J. Food Drug Anal.* 13(3): 219-224.
19. Katoh, K., Rozewicki, J. and Yamada, K.D. 2019. MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Brief. Bioinform.* 20(4): 1160-1166.
20. Ford, C.S., Ayres, K.L., Toomey, N., Haider, N. *et al.* 2009. Selection of candidate coding DNA barcoding regions for use on land plants. *Bot. J. Linn. Soc.* 159(1): 1-11.
21. 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(6): e508.
22. Poovitha, S., Stalin, N., Balaji, R. and Parani, M. 2016. Multi-locus DNA barcoding identifies *matK* as a suitable marker for species identification in *Hibiscus* L. Genome 59(12): 1150-1156.
 23. Xiong, C., Sun, W., Wu, L., Xu, R. *et al.* 2022. Evaluation of four commonly used DNA barcoding loci for *Ardisia* species identification. Front. Plant Sci. 13: 860778.
 24. Xin, T., Li, X., Yao, H., Lin, Y. *et al.* 2015. Survey of commercial *Rhodiola* products revealed species diversity and potential safety issues. Sci. Rep. 5: 8337.
 25. Zhang, D.J., Yuan, W.T., Li, M.T. and Zhang, Y.H. 2016. Analysis of the relationship between ribosomal DNA ITS sequences and active components in *Rhodiola* plants. Genet. Mol. Res. 15 (4): gmr15049337.

Development of DNA mini-barcode assay for authentication of the medicinal plant *Rhodiola crenulata*

YUNG-CHUAN HSIEH, HUI-CHUN LEE, GUAN-JHIH PENG, LI-YAO TSAI,
YA-MIN KAO, MEI-CHIH LIN AND SU-HSIANG TSENG

Division of Research and Analysis, TFDA, MOHW

ABSTRACT

In the Taiwan Herbal Pharmacopeia 4th edition, the dried root and rhizome of *Rhodiola crenulata* (Hook. F. & Thomson) H. Ohba are listed as medicinal species of the Hong Jing Tian material. Since *R. crenulata* has been listed as an endangered species, the scarcity of resources, and the rhizomes of other species in the same genus with similar appearances may increase the risk of adulteration and substitution. Therefore, accurate identification of medicinal varieties is important for efficacy and safety. This study used the advantage of DNA mini-barcode technology, with improves analytical feasibility by amplifying short DNA fragments. Three mini-barcodes were developed based on the ribosomal Internal Transcribed Spacer 2 (ITS2), the mitochondrial *nad2-ccmB* spacer, and the chloroplast *trnF-ndhJ* spacer sequences. Species identification of 26 Hong Jing Tian materials purchased from the market were tested. Among the three markers, the PCR amplification and sequencing success rates of ITS2 mini-barcode was the highest (100%; 100%), followed by the *nad2-ccmB* (84.6%; 84.6%), and the *trnF-ndhJ* was the lowest (61.5%; 46.2%). These results suggested the ITS2 mini-barcode offered the best applicability. This study established ITS2 as a reliable DNA mini-barcode for identifying the authenticity of the Hong Jing Tian material to ensure the correct species is used as raw material and to prevent counterfeiting and misuse.

Key words: *Rhodiola crenulata*, DNA mini-barcode, Internal Transcribed Spacer 2 (ITS2)