

編號：CCMP91-RD-011

# 保育類中藥材基因資料庫的建立及保育類 中藥材基因鑑定晶片之研發

黃國華

中國醫藥大學中國藥學研究所

## 摘 要

基因晶片具有快速診斷（4-12 小時）、特定性高、偵測範圍廣大（至少可同時偵測一萬個病原基因）及使用方便等優點，是其他方法望塵莫及的。本實驗室已建立其重要技術關鍵-cDNA microarray。cDNA microarray 是人類基因體計畫衍生出的革命性分析技術：將人類的 cDNA library（約一萬至三萬個），在 2cm × 3cm 的 nylon membrane 上固定之後再和細胞的 mRNA 作雜交，在極短時間即可得出數以萬計不同基因在細胞內表現的量。此技術應用於癌症及其他生物醫學之研究已經造成了革命性的影響，cDNA microarray 從根本改變了分子生物學研究的觀念，以近萬倍加速研究的步調，可謂生物醫學之另一波革命。

本計畫以 cDNA microarray 技術為基礎，以大戟科（EUPHORBIACEAE）大戟屬所有種 *Euphorbia* spp. 為研究重點，著重於基因庫建立、特異序列尋找、以及交互測試。我們已採集大戟科大戟屬所有種野生植物十四種及二十一種近緣植物，經過傳統鑑定之後，抽取植物染色體 DNA，建立植物基因庫。並以 RAPD，從十二種大戟屬及十三種近緣植物中分離出七十八個特定基因，經插入質體、定序之後再將特定基因以 PCR 放大，以微處理技術固定於晶片上。進行檢測時，再利用 PCR 的反應，標定染色體的 DNA，之後和晶片雜交，成功地鑑定植物的種屬。

本計畫成功的建立中草藥鑑定晶片的理論與實際標準作業，為中藥材防偽及國人用藥，提供一個快速而客觀的偵測工具。並且提供一個高經濟價值的生物科技領域。

關鍵詞：基因晶片、中草藥鑑定、聚合酵素連鎖反應、雜交、大戟科

Number : CCMP91-RD-011

# **Construction of DNA data bank and development of pharmacogrossfical chip for the endangered species in chinese herbal plants**

G. Steven Huang

Institute of Chinese Pharmacological Scences, China Medical College

## **ABSTRACT**

DNA chip inherits fast diagnosis and handles thousands of samples with high specificity in a parallel manor. The key-technology, cDNA microarray has been developed in this laboratory for years. We routinely manufacture microarray containing 30,000 human cDNA in 2cm by 3 cm nylon membrane or glass slide with colorimetric detection or laser-excited fluorescence detection.

This proposal is based on the hypothesis that using RAPD-PCR, it is possible to isolate DNA sequences specific to plants, and these isolated sequences are sufficient to represent the plants. Consequently, the specific DNA fragments are to be amplified and spotted on DNA chip and serve as a Euphobia chip, a chip that is capable of distinguishing plants between Euphobia and non-Euphobia. We have collected 35 various kinds of plants including 14 EUPHORBIAE and 21 closely related species. We extracted chromosomal DNA, isolated specific DNA fragments with RAPD-PCR, cloned the fragments, and sequence verified each isolated fragments. We have isolated 78 unique DNA fragments from 12 EUPHORBIAE and 13 closely related species. By searching through GenBank, we found the isolated fragments are unique and never published before. We also PCR-amplified these

DNA fragments and spotted onto nylon membrane. The hybridization of this chip indicated a major portion, except one, of the isolated DNA fragments contained sequences sufficient for distinguishing *Euphobia* from other species.

Keywords: DNA chip, microarray, RAPD, *Euphobia* chip

## 壹、前言

臺灣因為人口密度高，土地過度開發，環保觀念缺乏，偏頗的醫療觀念，以訛傳訛，導致保育類藥用植物瀕臨絕種。除了建立正確醫療觀念，保育類中藥材列管、培植之外，最重要的是以基因體研究方法，加速中藥材基因庫建立，以確保永續使用。並提供最直接的資訊，以開發有效的替代品。

RAPD (random amplified polymorphic DNA) 應用於動植物種原鑑定已有十幾年的歷史，利用隨機設計的引子，經由聚合酶連鎖反應 (PCR)，放大染色體上相耦合的 DNA 片段。以特定的引子，經由 RAPD，比較 DNA 片段的數目與長度，可以區別並鑑定種原。其操作方法便利，花費不大，再現性高，是一個廉價而快速的方法。缺點是因為缺乏基因序列分析，特定性遭受質疑。而且 RAPD-PCR 多條帶形態受到多種因素影響，例如 DNA 萃取的方法、純度，聚合酶品質，聚合反應的條件、儀器，甚至於電泳膠的解析度，都可以直接影響 RAPD 多條帶形態的判讀，所以標準化困難。

基因體研究一日千里，人類基因體計畫即將於 2003 年完成，2001 年已完成初稿，利用基因晶片針對人類重要疾病作快速診斷，預估在公元 2007 年，診斷及研究用基因晶片在全世界有十三億美元的市場。反觀基因晶片應用於植物的基原鑑定仍是一片處女地，還有很大的發展空間。

基因晶片具有快速診斷 (4-12 小時)、特定性高、偵測範圍廣大 (至少可同時偵測一萬個病原基因) 及使用方便等優點，是其他方法望塵莫及的。本實驗室已建立其重要技術關鍵-cDNA microarray。cDNA microarray 是人類基因體計畫衍生出的革命性分析技術：將人類的 cDNA library (約一萬至三萬個)，在 2cm x 3cm 的 nylon membrane 上固定之後再和細胞的 mRNA 作雜交，在極短時間即可得出數以萬計不同基因在細胞內表現的量。此技術應用於癌症及其他生物醫學之研究已經造成了革命性的影響，cDNA microarray 從根本改變了分子生物學研究的觀念，以近萬倍加速研究的步調，可謂生物醫學之另一波革命 (6)。

本實驗以 cDNA microarray 技術為基礎，以大戟科 (EUPHORBIACEAE) 大戟屬所有種 *Euphorbia* spp. 為研究重點，著重於基因庫建立、特異序列尋找、以及交互測試。逐一採集大戟科大戟屬所有種野生植物，經過傳統鑑定之後，抽取植物染色體 DNA，以 RAPD 分離出各種植物的特定基因，定序之後再將特定基因以微處理技術固定於晶片上。進行檢測時，再利用 PCR 的反應，標定染色體的 DNA，之後和晶片雜交，以鑑定植物的種屬。為中藥材防偽及國人用藥，提供一個快速而客觀的偵測工具。

## 貳、材料與方法

### 聚合酵素連鎖反應 (Polymerase Chain Reaction, PCR) 與電泳

將萃取得之 genomic DNA 先稀釋作為模板 DNA (template DNA)，利用 10 個核甘酸序列的隨意引子，進行聚合酵素連鎖反應。反應液參考 Oard 及 Dronavalli (1992)，反應總體積為 25ul，內含 1U Taq polymerase (Promega)、1 xPCR buffer (50mM KCl; 10 mM Tris-HCl, pH9.0; 0.1% Triton 100)、2.5mM MgCl<sub>2</sub>、200uM dNTP、0.2 uM primer 及 25ng template DNA。反應溫度條件設定如下：1 次 (cycle): 94°C, 3 分鐘→42°C, 1 分鐘→72°C, 1 分鐘；44 次 (cycles): 94°C, 1 分鐘→42°C, 1 分鐘→72°C, 2 分鐘。反應完成時自動保存在 4°C。經聚合酵素連鎖反應而增殖之 DNA，以 2% 的 agarose 在 TAE buffer (40mM Tris acetate, pH8.0; 1mM EDTA) 中進行 DNA 電泳。並以 Boehringer Mannheim 公司之 DNA molecular weight marker XVI) (250 bp ladder) 做為分子量的標誌，結束後置於 0.5 mg/ml 的 ethidium bromide 中染色，以 UV 光檢視 agarose 膠體上 DNA 多型性片段，照相、貯存影像、並進行分析。

### DNA 之抽取

主要依據 Doyle and Doyle (1990) 的 CTAB 抽取步驟進行部分修改以萃取植物體基因組 DNA。取約 10g 新鮮葉片至 1.5ml 小離心管中，以液態氮研磨後迅速加入 600ul 以預熱至 65°C 的 CTAB-PVP 溶液 (Lodhi et al., 1994)【2% CTAB (hexadecyltrimethyl ammonium bromide), 100mM Tris (pH 8.0), 1.4M NaCl, 20 mM EDTA (ethylenediaminetetra acetic acid, 1% PVP (polyvinylpolypyrrolidone) 及 0.2%  $\beta$ -ME (2-Mercaptoethanol) 後，利用震盪器劇烈搖盪至完全混合。置於 65°C 乾浴或水浴中 30 分鐘，並間歇搖動。取出離心管靜置冷卻至室溫後，以 14,000 rpm 離心 5 分鐘，將上清液倒至另一新的 1.5ml 小離心管中。並加入 500 ul chloroform/ isoamyl alcohol (24:1) 溶液以震盪器劇烈搖盪呈乳液狀態後，再以 14,000 rpm 離心 5 分鐘使兩液相分離，取 450ul 上層液至另一內裝 50ul 5M NaCl 的小離心管中，再加入 1ml - 20°C 的絕對酒精沈澱 DNA 過夜。以 14,000 rpm 離心 5 分鐘，倒掉上清液，加入 1ml wash buffer (0.2M sodium acetate, 75% ethanol) 後靜置 20 分鐘，以 14,000 rpm 離心 3 分鐘，倒出 wash buffer，倒立小離心管陰乾 5-10 分鐘。加入 50ul TE buffer (1mM EDTA, 10mM Tris, pH8.0) 以溶解 DNA，並以 65°C 乾浴或水浴處理 10 分鐘去除殘存的酒精 (1, 5)。

## DNA 定量與品質檢定

抽取少量樣品 DNA，加入適量 TE buffer 製作一系列不同稀釋倍數的原抽取液與稀釋液，以便進行電泳檢查 DNA 的品質及定量。所謂品質合格的 DNA 係指經 ethidium bromide 染色與 UV 顯像後的 DNA 形狀係呈“一圓團”者，表示該樣品 DNA 未被裂解；而定量的步驟係與已知濃度之 DNA 分子量標記（pGEM marker）的亮度相比較，以進行樣品 DNA 濃度的定量。

## DNA 序列分析

DNA fragments were PCR amplified from the cloned plasmid using T7 and SP6 primers. The unreacted reagents and small fragments were purified away using Qiagen PCR purification kit. Standard ABI BigDye sequencing reaction was performed using T7 or SP6 as sequencing primer. The reaction was purified, dried down, resuspended in 50% formamide followed by electrophoresis using NJ BaseStation automatic sequencing apparatus. The fluorescent signals were analyzed using manufacturer's software.

## 引子設計

PCR primer pairs were designed by using OMIGA. We specifically selected sequences that were unique by searching GenBank using BLAST searching tool. Typically, 18 to 20-mers were designed to a similar melting temperature in the range between 60 to 65 degrees. The primers were synthesized and firstly applied for PCR amplification using cloned plasmids as template. Primer pairs giving single bands were applied for PCR reaction using chromosomal DNA as template. Only primer pairs giving single bands proceeding to labeling and hybridization.

## 雜交及生物晶片的圖像的分析

Nylon 膜上含有 9600 點的 cDNA，作雜交之前要先用 5ml 的  $1 \times$  雜交緩衝液處理，此緩衝液含有  $5 \times$  SSC, 0.1% SDS, 1% BM blocking buffer (Boehringer Mannheim)，並且將鮭魚精子 DNA denature ( $60^\circ\text{C}$ , 1 小時)。探針與 2ul 的 10 ug/ml poly d (A)、2ul 的 10 ug/ml human Cot-1 DNA (Gibco BRL) 及 40ul 的雜交緩衝液混合最後體積為 80ul，接著以  $95^\circ\text{C}$  5 分鐘將探針混合液 denature，最後放置在冰上冷卻。將 Nylon 膜黏上探針混合液放置在雜交容器內，放置在  $95^\circ\text{C}$ , 5 分鐘，然後將其移至  $58^\circ\text{C}$  12-16 小時。然後，在室溫下，用 5ml 的  $2 \times$  SSC,

0.1% SDS 混合液清洗生物晶片膜 2 次，每次 5 分鐘。然後再以 5 ml 的  $0.1 \times$  SSC, 0.1% SDS 混合液，在  $58^{\circ}\text{C}$  下清洗 3 次，每次 15 分鐘。最後用 5ml 的 1% BM 阻絕試劑（含有 2% dextran sulfate）在室溫下 1 小時阻絕。接著，和 5ml 的  $700 \times$  diluted Streptavidin- $\beta$ -galactosidase (1.38U/ml，酵素活性)(Gibco BRL)，4% polyethylene glycol 8000(Sigma)，及 0.3% BSA 溶於 TBS 緩衝液(10mM Tris, pH7.4, 150mM NaCl) 的混合液靜置在室溫 1 小時。然後用 TBS 緩衝液清洗 3 次，每次 5 分鐘。接著將此膜以 5ml X-gal substrate（含有 1.2mM X-gal, 1mM  $\text{MgCl}_2$ , 3mM  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ , 3mM  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$  在 TBS 緩衝液中）處理，以  $37^{\circ}\text{C}$  搖盪 45 分鐘。最後以 MQ 水清洗並自然乾燥。呈色的圖像一般利用 UMAX PowerLook 3000 Flatbed 掃描器在解析度 3048 dpi 下，及 ScanAlyze (Michael Eisen, Stanford University) 處理。

## 參、結果

### 1. Collection of plants

已按計畫完成大戟屬所有種 *Euphorbia* spp. 基因庫，已經收集之植物，共三十五種，含大戟屬所有種十四種（表一），及近緣植物二十一種（表二）。

### 2. Establishing DNA bank

以萃取並純化所有已收集之植物染色體 DNA，如圖一，染色體 DNA 無分解現象，故可進行 RAPD 實驗。

### 3. RAPD analysis

我們利用四種不同隨機設計的 RAPD 引子，以植物染色體 DNA 為模版進行 RAPD 實驗，引子為 10 個核酸長度，其序列如表三。RAPD 的產物進行電泳膠分析，結果如圖二。我們發現所有植物之間，DNA 片段的長度分佈差異性極大。雖然在同一屬內的植物，以 RAPD 放大出的 DNA 片段仍然無法歸納出相似性。如 19（濱大戟）、3（台灣大戟）、27（白苞猩猩草細梗珠子）、7（大飛揚草）、2（岩大戟）、1（紫斑大戟）、32（小葉大戟（牧野樹））、9（麒麟花）等，同為大戟屬，但在四組 RAPD 的產物中，卻無法找出一段大小相似的 DNA 片段。不同屬植物之間，更不相同，如 16（台灣鐵莧）、18（印度人莧）、22（重

陽木)、21(多花葉底珠(白仔))、36(七日暈)、28(細梗珠子)、30(土蜜樹)、24(裏白巴豆)、34(細葉饅頭果)、23(水楊梅)、20(紅麻風樹)、12(野桐)等。所以，每一個放大出的 DNA 片段，極可能是特定的基因序列。

相同植物，不同採集次序之間，其 pattern 大至相同，但也有相異的情況。如 6 及 37 皆為紅乳草(小飛揚，EU2 的 RAPD 完全相同，但 EU1 的 pattern 中，6 多了一個約 3kb 的附屬條帶。7 及 26 皆為大飛揚草，比較 RAPD pattern 發現，EU1 相同，EU2 則有相異雜條帶出現。這可能是因為 PCR 反應的些微不同而造成的差異。RAPD 相異的令一可能性，是因為相同植物會因為產地或採集地不同，而有些微的基因差異。應此，單憑 RAPD 作鑑定常會有爭議性，顯示發展根據序列為結合的鑑定晶片的需要性。

#### 4. 基因 clone 及定序實驗

我們將 RAPD 放大的 DNA 片段接入 pGEMT (圖三)，再以 T7 及 SP6 的引子作自動定序(表四、五、六)，每一種植物定序 1-4 個不同的 PCR 產物，我們發現所有的 DNA 片段序列上並沒有相似性，間接證明 RAPD 放大出的片段是具有特定性的。將所有的序列上網 GenBank 查詢結果，發現並無類似序列。

#### 5. DNA chip manufacturing

我們以 PCR 放大分離出的 RAPD 片段，經過純化之後(圖四)，再以微陣列打點機，以每平方公分 256 點的密度，每一點 100 微米的直徑，固定在耐龍的薄膜上，再以 UV 燈固定。稱為大戟晶片(圖五 Euphorbia chip)。除了 RAPD 分離出來的 DNA 片段之外，再加上 16 個人類基因，作為 negative control(表七)。

#### 6. PCR 放大標定染色體 DNA 作晶片測試

晶片測試時，先以 PCR 技術，對於每一種植物的 chromosomal DNA 作放大(圖六)。在反應中，再加入 biotin-16-dUTP (or DIG-11-dUTP) 以標定放大後的 DNA 片段。將反應物純化後，經加熱分離雙股 DNA、和晶片雜交、加入顯色劑後，經過 Streptavidin- $\beta$ -galactosidase or anti-DIG-HRP 反應及顯色。以圖七為例，大戟晶片可以正確的鑑定白飯樹、白苞猩猩草細梗珠子、金剛纂、濱大戟、紅乳草及大飛揚草。唯一有雜訊的是聖誕紅(圖八)，除了本身聖誕紅的訊號之外，在訊號增強的模式之下，可以顯示微弱台灣大戟的訊號，顯示此兩種在序列上的相近。

## 肆、討論

我們利用 RAPD 及分子生物學技術，分離具有種屬特異性的 DNA 片段，並應用微陣列微處理技術，製作大戟晶片，從 DNA 片段定序及初步雜交的結果判定，大部分所分離出的片段是具有種屬特異性的，所以大戟晶片很可能具有判定真偽藥物的能力，但仍須進一步更大量的野外試驗來確定。

傳統植物分類學雖有特定的標準，但著重於形態學上的判定，較缺乏定量的準則。當樣本非新鮮採集時，不易確實分類，對於乾品，或是經加工研碎，更是無法判定。分子生物學的應用，尤其是 DNA 特定序列的應用，提供了植物分類學的未來希望。早期的分子生物學方法，著重於整體染色體的比較，如 RAPD、RFLP、及 AFLP(2, 3, 4)。但是此類方法必須以完整的 chromosomal DNA 為材料，所以能影響 chromosomal DNA 完整性的因素，都能造成實驗的極大誤差，如材料的新鮮度、萃取的條件、酵素反應的控制以及中間產物的控制。而且此類方法以產物的長短為判定依據，又無法以精確的分離方法進行，如定序膠電泳。因此，需要大量的重複試驗，以取得統計學上的意義。

以晶片作為鑑定工具，不需完整的 chromosomal DNA，而且最後以序列的內容來判斷。完全消除 RAPD 及 AFLP 的缺點，提高了方便性與實用性，並可在一次的實驗中鑑定種別 (6)。

藥用植物及中藥材經過炮製乾燥後，chromosomal DNA 的完整性完全遭到破壞。RAPD 及 AFLP 無法鑑定，但晶片只需短的 DNA 來判定，所以在理論上是極為可行的方法。

## 伍、結論與建議

我們成功的利用 RAPD 及分子生物學方法，分離大戟屬及近緣植物特異基因，並製成大戟晶片，成功地分辨所屬植物。以相同的方法，應可用於所有植物性的藥材。

由於經費限制，我們僅能針對部分大戟屬植物分離特定 DNA 序列、定序、製作品片及測試其鑑定效果。

我們很高興執行這項計畫做為鼓勵發展偉大的真正中草藥晶片，此晶片可以作為鑑定真的或偽的藥物。大戟晶片的製作只是我們求證對於鑑定晶片假設的第一部，然而卻是一個重要的步驟，並且指出此計畫是可行的。我們強烈的建議要完成中草藥鑑定晶片，必須組合一個包含傳統中草藥鑑定專家、分子生物學家、生物晶片專家及一個強力的領導中心的團隊。

## 誌謝

本研究計畫承蒙行政院衛生署中醫藥委員會，計畫編號 CCMP91-RD-011 提供經費贊助，使本計畫得以順利完成，特此誌謝。

## 陸、參考文獻

1. Doyle, J.J. and J.L. Doyle. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 12:13-15.
2. Dubreuil, P., C.Rebourg,M. Merlino,and A.Charcosset.1999.Evaluation of a DNA pooled-sampling strategy for estimating the RFLP diversity of maize populations.Plant Mol. Biol. Rep. 17:123-138.
3. Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, J.A. and Tingey, S.V.1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res. 18:6531-6535.
4. Welsh, J. and McClelland, M.1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. Nucleic Acids Res. 18:7213-7218.
5. Edwards K., Johnstone, C. and Thompson, C. 1991. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. Nucleic Acids Res. 19:1349.
6. Huang GS, Yang SM, Hong MY, Yang PC and Liu YC (2000) Differential gene expression of livers from apoE deficient mice. Life Sciences 68:19-28.

## 柒、圖、表

表一、大戟屬所有種 *Euphorbia* spp. 基因庫

採集順序	名稱 (中文)	名稱 (拉丁文)
19	濱大戟	<i>Euphorbia atoto</i> Forst.f.
3	台灣大戟	<i>Euphorbia formosana</i> HATATA
27	白苞猩猩草細梗珠子	<i>Euphorbia heterophylla</i> Linn.
7	大飛揚草	* <i>Euphorbia hirta</i> Linn.
26	大飛揚草	* <i>Euphorbia hirta</i> Linn.
2	岩大戟	<i>Euphorbia jolkini</i> BOISS
1	紫斑大戟	<i>Euphorbia maculatu</i> L.
32	小葉大戟 (牧野樹)	<i>Euphorbia makinoi</i> Hay.
9	麒麟花	<i>Euphorbia milli</i> CH. des MouLINS
10	大葉麒麟花	<i>Euphorbia milli</i> CH. des MouLINS var. <i>splendes.</i>
4	黃苞麒麟花	<i>Euphorbia milli</i> CH. des MouLINS var. <i>tanarivae</i> LEANDRI
11	金剛纂	<i>Euphorbia neriifolia</i> LINN
5	聖誕紅	<i>Euphorbia pulcherrima</i> WILDD ex KLOTZ
6	紅乳草	* <i>Euphorbia thymifolia</i> LINN.
37	紅乳草 (小飛揚)	* <i>Euphorbia thymifolia</i> Linn.
8	綠珊瑚	<i>Euphorbia truelli</i> L.

\* Flora of Taiwan 第二版將飛揚草及小飛揚草由 *Euphorbia* 屬移至 *Chamaesyce* 屬。

表二、大戟屬所有種近緣植物基因庫

採集順序	名稱 (中文)	名稱 (拉丁文)
16	台灣鐵莧	<i>Acalypha angatensis</i> BLANCO
18	印度人莧	<i>Acalypha indica</i> Linn.
22	重陽木	<i>Bischofia javanica</i> Blume
21	多花葉底珠 (白仔)	<i>Breynia formosana</i> (Hay) . Hay
36	七日暈	<i>Breynia officinalis</i> Hemsl.
28	細梗珠子	<i>Breynia vitis-idaea</i> (Bum.f.) C.E.Fischer
30	土蜜樹	<i>Bridelia tomentosa</i> Blume
24	裏白巴豆	<i>Croton cascarilloide</i> Raeush.
34	細葉饅頭果	<i>Glochidion rubrum</i> Bl.
23	水楊梅	<i>Homonia riparia</i> Lour.
20	紅麻風樹	<i>Jatropha gossypifolia</i> Linn var. <i>elegans</i> Mueller
12	野桐	<i>Mallotos japonicus</i> (THUNB.) MuELL.-ARG
15	穗花野桐 (白匏仔)	<i>Mallotos paniculatus</i> (LAM.) MuELL.-ARG
13	粗糠柴	<i>Mallotos philippensis</i> (LAM.) MuELL.-ARG
14	血桐	<i>Mallotos tanarius</i> (L.) MuELL.-ARG
25	扛箱藤	<i>Mallotos repandus</i> (Willd)
33	葉下珠	<i>Phyllanthus urinaria</i> Linn.
17	紅蓖麻	<i>Ricinus communis</i> Linn.
31	守官木	<i>Sauropus androgynus</i> Merr.
29	白飯樹	<i>Searinega virosa</i> (Roxb.) Pax et HOFFM.
35	烏	<i>Spium sebiferum</i> (L.) Roxb

表三、RAPD-PCR 使用的引子序列

名稱	序列 (從 5'到 3'端)
EU01	GAGCAGTTCG*
EU02	CCTGTCAGTG
EU03	CACGTGAGAC
EU04	GACATCTCCG

\* 引子序列為隨機設計，以 GC 起始、結束，GC content 限制於 60%。

表四、濱大戟 *Euphorbia atoto* Forst.f

---

CTTGGAATGAGTTATGCCTCCAAGGCGCTGAGAGCTCTCCATATGGTCGACCTGCAGGCGGCCGGAATTCCTAGTGAT  
TTCACGTCCACTACTCTTTATAATTTCTCCTAGCTCCTATATATCATAGAAGAGAAAACTCACAACCTATAAATTCATCT  
CGAGGAAATCTCTTAATTCAACCTTCCTTTTTTCATATTTCAAGTTCCTTCCTTTTTCTAGAAAATGCAACCTTGTTTCGAT  
CAAAACTTTAGAGGAGAATCCAATATATTTCTTTTACAACCTCTTCAAAGGCATATGTGAAAGGCTAAACCCGAGTCAGTGC  
GAAACTACCTCTCTACAGGTATTTCCATTGAAGATATTGCCTAAGTCTATGAATAAATTGGTAAAATCAAACCTTTCTGAA  
AACATGTGCTTGCTTACCACGATTTTTAATCGCTACATCACATGATATATCCAAATCAGTGAGATTCTCTTTATGGATG  
AGAAGATGGAACCTGGATTCATATCAGACCAGGTCTGATGAGAAGAGGTTGATGGAGGATATCTCAGCTGGAGAGAGGAAC  
AATCATGTGAAGCTTAAACATGAACAACCTCTGTTATTGTGGACGTGACATCTGAATGCCGCGATCGTCATGGAGGTCGGGA  
GCATGCGACGTGCTGGCCAAATTTTTCTATAATGGTGAGGTTG

---

表五、白飯樹 *Searinega virosa* (Roxb.) Pax et HOFFM

---

TGGCGGGCCGCGGGTAATTCGATTGGATGAGACCGGTTGTAGAGAGATTTTGGAAAGCCCTCCCATTAAGGGAGGACAATC  
GCAGAAAGGTAAAGGCAGGCGACCAAAGCGAGACTGTCAGAGTACTGAAAGGAGAGCGACAGTGGGCGTGGTTCAGGTTT  
TGAGTATAGGTAATGTACATCTTTGCAATGTACAATTGTAGGCGTTGACGTTGTCAAATGAATATGATTAATAAAGCTA  
TATCATTATCTGCGCATTAGGAAGAACTACATATGCCGGCGATGGATGAACTATTTGACCCGGTTCAGTACACAGATGA  
GAGGCATTTAACTCACATCTATCTGATCTCCACTCCTTGATTACTAGTGAATGGGGGATGGTGTACATATATTATTATAC  
CGATCGCATCACATTTGTGAATGACGAAACTATTATGCACATCAATAGCTCACATATGACACGTTAGTACTGGCGCCTTT  
AGTTGCTAGTGTCATGTTACTCATAAGATATGTACAAGGGCGACGACAACCATCGAACATCGTTCATGATGATTGTTGAG  
GTAGTGGTCAAACGTGAATCACGCCAAGAGTAAGGTCTGCTTCTAGGTGTGTTGCAGTCTCAATCAGTCTGCGCTGCGT  
TCACTGTCTGTGTTGTGTGAGTTATAGGGAGGTTGTTCTAATCTATCTACTAGCGAATTGATGCCATCCTACAGCTGC  
AGCACTATAGAGAGCTGCCAAGCGGTTGGAGGCATACCCTAGTTATTCTTTTAGGGAGGAGCATAAGTTGAGGGGGGTGG  
AGGGGAGAAGGGGA

---

表六、分離的特異 DNA 片段、所屬種別、及在晶片位置對照表

位置	DNA 名稱	中文名稱	學名
d01*	G08 M30-6**	土蜜樹	<i>Bridelia tomentosa</i> Blume
g03	G14 M30-4	土蜜樹	<i>Bridelia tomentosa</i> Blume
a05	G06 M07-2	大飛揚草	*** <i>Euphorbia hirta</i> L.
b09	G08 M07-2	大飛揚草	*** <i>Euphorbia hirta</i> L.
c10	G08 M26-6	大飛揚草	*** <i>Euphorbia hirta</i> Linn.
d09	G13 M07-2	大飛揚草	*** <i>Euphorbia hirta</i> L.
f01	G14 M07-2	大飛揚草	*** <i>Euphorbia hirta</i> L.
f12	G14 M26-3	大飛揚草	*** <i>Euphorbia hirta</i> Linn.
b12	G08 M10-3	大葉麒麟花	<i>Euphorbia milli</i> CH. des MouLINS var. splendens.
d12	G13 M10-3	大葉麒麟花	<i>Euphorbia milli</i> CH. des MouLINS var. splendens.
f04	G14 M10-5	大葉麒麟花	<i>Euphorbia milli</i> CH. des MouLINS var. splendens.
d02	G08 M32-4	小葉大戟 (牧野樹)	<i>Euphorbia makinoi</i> Hay.
e07	G13 M32-1	小葉大戟 (牧野樹)	<i>Euphorbia makinoi</i> Hay.
g05	G14 M32-6	小葉大戟 (牧野樹)	<i>Euphorbia makinoi</i> Hay.
b03	G06 M23-1	水楊梅	<i>Homonia riparia</i> Lour.
c07	G08 M23-5	水楊梅	<i>Homonia riparia</i> Lour.
f10	G14 M23-12	水楊梅	<i>Homonia riparia</i> Lour.
a01	G06 M03-1	台灣大戟	<i>Euphorbia formosana</i> HATATA
b05	G08 M03-4	台灣大戟	<i>Euphorbia formosana</i> HATATA
d05	G13 M03-4	台灣大戟	<i>Euphorbia formosana</i> HATATA
e09	G14 M03-1	台灣大戟	<i>Euphorbia formosana</i> HATATA
a11	G06 M16-1	台灣鐵莧	<i>Acalypha angatensis</i> BLANCO
c04	G08 M16-2	台灣鐵莧	<i>Acalypha angatensis</i> BLANCO
e04	G13 M16-1	台灣鐵莧	<i>Acalypha angatensis</i> BLANCO
f08	G14 M16-1	台灣鐵莧	<i>Acalypha angatensis</i> BLANCO
c11	G08 M27-3	白苞猩猩草細梗珠子	<i>Euphorbia heterophylla</i> Linn.
e06	G13 M27-7	白苞猩猩草細梗珠子	<i>Euphorbia heterophylla</i> Linn.
g01	G14 M27-1	白苞猩猩草細梗珠子	<i>Euphorbia heterophylla</i> Linn.
c12	G08 M29-1	白飯樹	<i>Searinega virosa</i> (Roxb.) Pax et HOFFM.
g02	G14 M29-8	白飯樹	<i>Searinega virosa</i> (Roxb.) Pax et HOFFM.
g04	G14 M31-4	守官木	<i>Sauropus androgynus</i> Merr.
b04	G06 M25-2	扛箱藤	<i>Mallotus repandus</i> (Willd)
c09	G08 M25-3	扛箱藤	<i>Mallotus repandus</i> (Willd)
f11	G14 M25-2	扛箱藤	<i>Mallotus repandus</i> (Willd)
a10	G06 M14-2	血桐	<i>Mallotos tanarius</i> (L.) MuELL.-ARG
c03	G08 M14-2	血桐	<i>Mallotos tanarius</i> (L.) MuELL.-ARG
e03	G13 M14-5	血桐	<i>Mallotos tanarius</i> (L.) MuELL.-ARG
f07	G14 M14-2	血桐	<i>Mallotos tanarius</i> (L.) MuELL.-ARG
a08	G06 M11-4	金剛纂	<i>Euphorbia neriifolia</i> LINN
c01	G08 M11-1	金剛纂	<i>Euphorbia neriifolia</i> LINN
e01	G13 M11-10	金剛纂	<i>Euphorbia neriifolia</i> LINN
f05	G14 M11-16	金剛纂	<i>Euphorbia neriifolia</i> LINN
a04	G06 M06-2	紅乳草	*** <i>Euphorbia thymifolia</i> LINN

b08	G08 M06-5	紅乳草	*** <i>Euphorbia thymifolia</i> LINN
d08	G13 M06-3	紅乳草	*** <i>Euphorbia thymifolia</i> LINN
e12	G14 M06-3	紅乳草	*** <i>Euphorbia thymifolia</i> LINN
b01	G06 M20-2	紅麻風樹	<i>Jatropha gossypifolia</i> Linn var. <i>elegans</i> Mueller
b02	G06 M22-1	重陽木	<i>Bischofia javanica</i> Blume
c06	G08 M22-6	重陽木	<i>Bischofia javanica</i> Blume
f09	G14 M22-5	重陽木	<i>Bischofia javanica</i> Blume
d04	G08 M34-2	細葉饅頭果	<i>Glochidion rubrum</i> Bl.
e08	G13 M34-4	細葉饅頭果	<i>Glochidion rubrum</i> Bl.
g07	G14 M34-2	細葉饅頭果	<i>Glochidion rubrum</i> Bl.
a09	G06 M12-3	野桐	<i>Mallotos japonicus</i> (THUNB.) MuELL.-ARG
c02	G08 M12-4	野桐	<i>Mallotos japonicus</i> (THUNB.) MuELL.-ARG
e02	G13 M12-2	野桐	<i>Mallotos japonicus</i> (THUNB.) MuELL.-ARG
f06	G14 M12-4	野桐	<i>Mallotos japonicus</i> (THUNB.) MuELL.-ARG
a02	G06 M04-9	黃苞麒麟花	<i>Euphorbia milli</i> CH. des MouLINS var. <i>tanarivae</i> LEANDRI
b06	G08 M04-8	黃苞麒麟花	<i>Euphorbia milli</i> CH. des MouLINS var. <i>tanarivae</i> LEANDRI
d06	G13 M04-1	黃苞麒麟花	<i>Euphorbia milli</i> CH. des MouLINS var. <i>tanarivae</i> LEANDRI
e10	G14 M04-2	黃苞麒麟花	<i>Euphorbia milli</i> CH. des MouLINS var. <i>tanarivae</i> LEANDRI
a03	G06 M05-7	聖誕紅	<i>Euphorbia pulcherrima</i> WILDD ex KLOT2
b07	G08 M05-6	聖誕紅	<i>Euphorbia pulcherrima</i> WILDD ex KLOT2
d07	G13 M05-8	聖誕紅	<i>Euphorbia pulcherrima</i> WILDD ex KLOT2
e11	G14 M05-1	聖誕紅	<i>Euphorbia pulcherrima</i> WILDD ex KLOT2
d03	G08 M33-1	葉下珠	<i>Phyllanthus urinaria</i> Linn.
g06	G14 M33-1	葉下珠	<i>Phyllanthus urinaria</i> Linn.
c08	G08 M24-4	裏白巴豆	<i>Croton cascarilloide</i> Raeush.
e05	G13 M24-7	裏白巴豆	<i>Croton cascarilloide</i> Raeush.
a06	G06 M08-5	綠珊瑚	<i>Euphorbia truclli</i> L.
b10	G08 M08-3	綠珊瑚	<i>Euphorbia truclli</i> L.
d10	G13 M08-2	綠珊瑚	<i>Euphorbia truclli</i> L.
f02	G14 M08-2	綠珊瑚	<i>Euphorbia truclli</i> L.
a12	G06 M19-3	濱大戟	<i>Euphorbia atoto</i> Forst.f.
c05	G08 M19-1	濱大戟	<i>Euphorbia atoto</i> Forst.f.
a07	G06 M09-2	麒麟花	<i>Euphorbia milli</i> CH. des MouLINS
b11	G08 M09-1	麒麟花	<i>Euphorbia milli</i> CH. des MouLINS
d11	G13 M09-1	麒麟花	<i>Euphorbia milli</i> CH. des MouLINS
f03	G14 M09-1	麒麟花	<i>Euphorbia milli</i> CH. des MouLINS

\* DNA 片段在晶片上的位置。以左上角為原點，由上至下為 a 至 h，由左至右為 1 至 12。所有點均作四重覆。

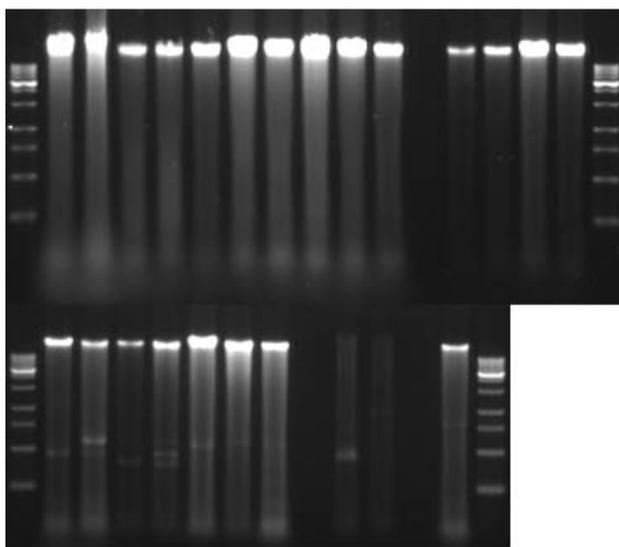
\*\*所有序列均經過自動定序，同一方向至少二重覆。所有序列存於中國醫藥學院基因晶片實驗室，學術機構如有需要，可和主持人聯繫。

E-mail:shuang@mail.cmc.edu.tw, <http://www2.cmc.edu.tw/genechip/index.html>.

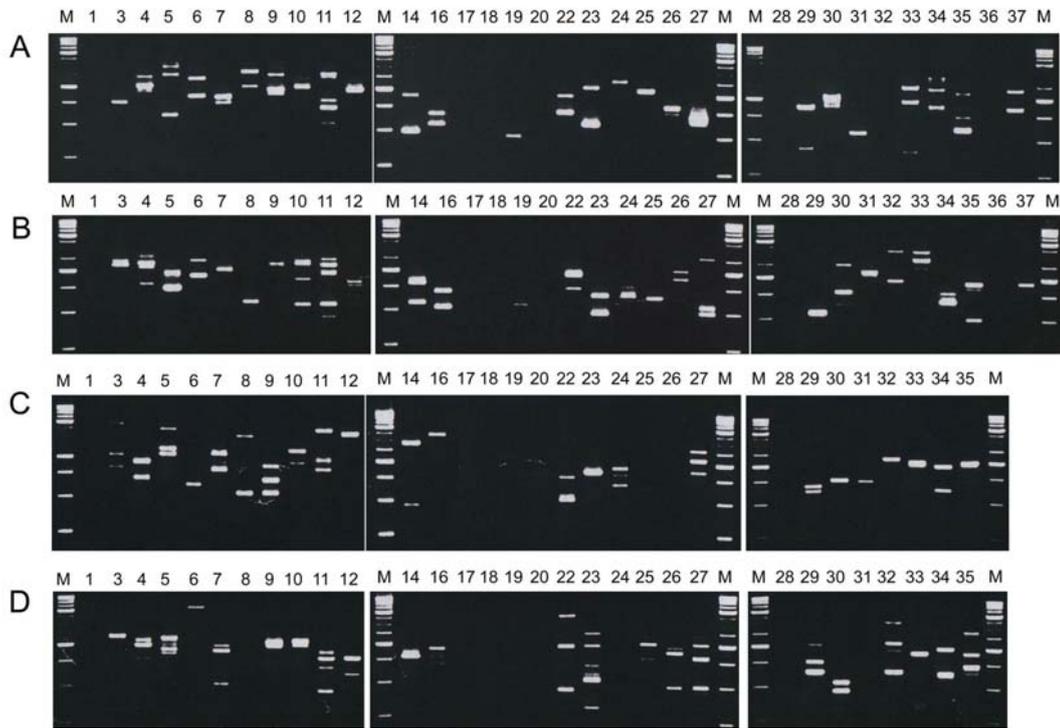
\*\*\* Flora of Taiwan 第二版將飛揚草及小飛揚草由 *Euphorbia* 屬移至 *Chamaesyce* 屬。

表七、控制基因及其在晶片上的位置

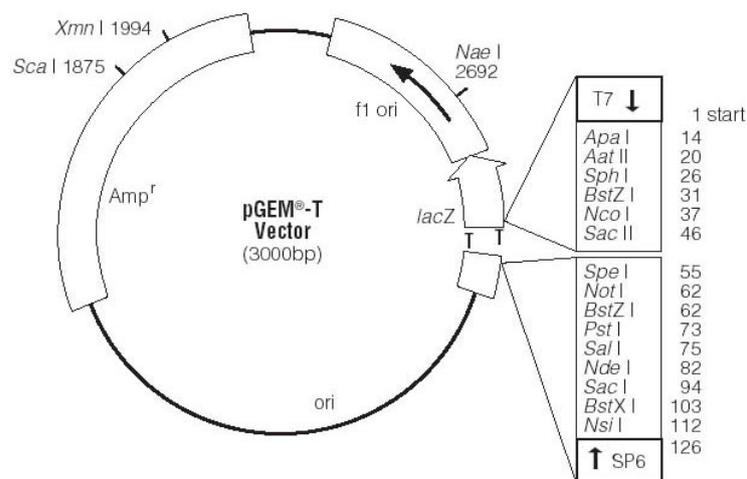
位置	基因名稱
g08	3-oxoacid CoA transferase
g09	serine/threonine kinase 4
g10	stanniocalcin 1
g11	splicing factor 3a, subunit 3
g12	solute carrier family 17
h01	sema domain, 3B
h02	sema domain, 4D
h03	syntenin
h04	ribosomal protein S6
h05	renal tumor antigen
h06	reelin
h07	JC265
h08	RAP2A
h09	actin associated protein
h10	GDP dissociation inhibitor 2
h11	quiescin Q6
h12	Hsp70-interacting protein



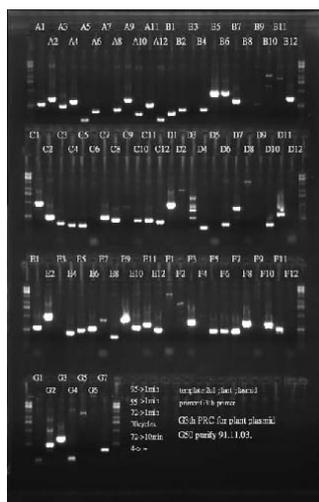
圖一、萃取並純化大戟科植物染色體 DNA，圖示典型的電泳膠，大部份 DNA 在高分子區域 (>20 kb)，顯示高純度的染色體 DNA。



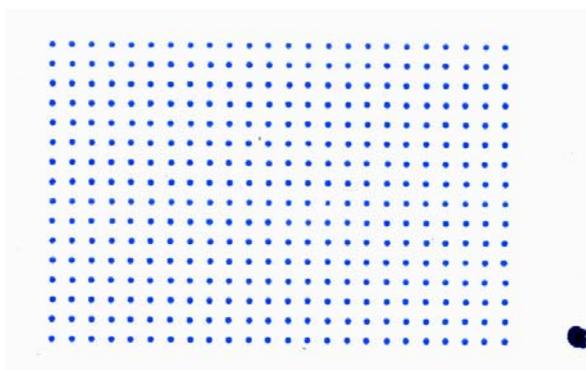
圖二、RAPD 電泳膠。利用四種不同的引子，以純化的植物染色體 DNA 為模板，進行 RAPD-PCR，反應物則以電泳膠分析。圖 A，以 EU1 為引子；圖 B，以 EU2 為引子；圖 C，以 EU3 為引子；圖 D，以 EU4 為引子。每個電泳膠上標示 M 為長度標準 (>5kb, 2kb, 1kb, 500bp, 250bp.)，阿拉伯數字相對於表一，指示不同的植物。



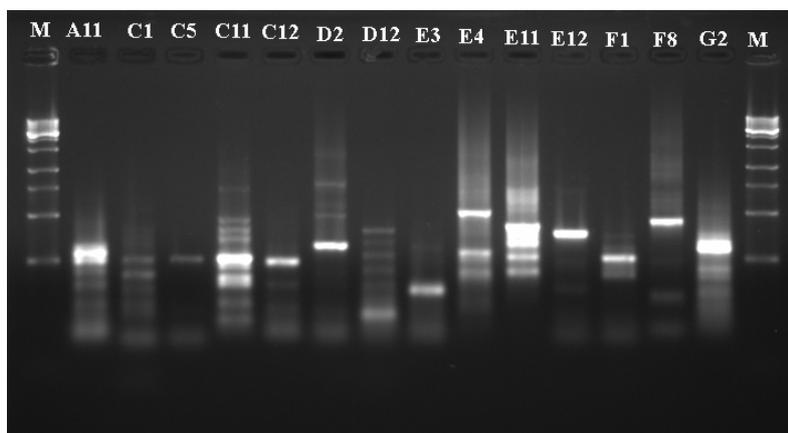
圖三、pGEM-T 質體，DNA 片段的插入點在 multiple cloning site，兩個突出的 T 之間。



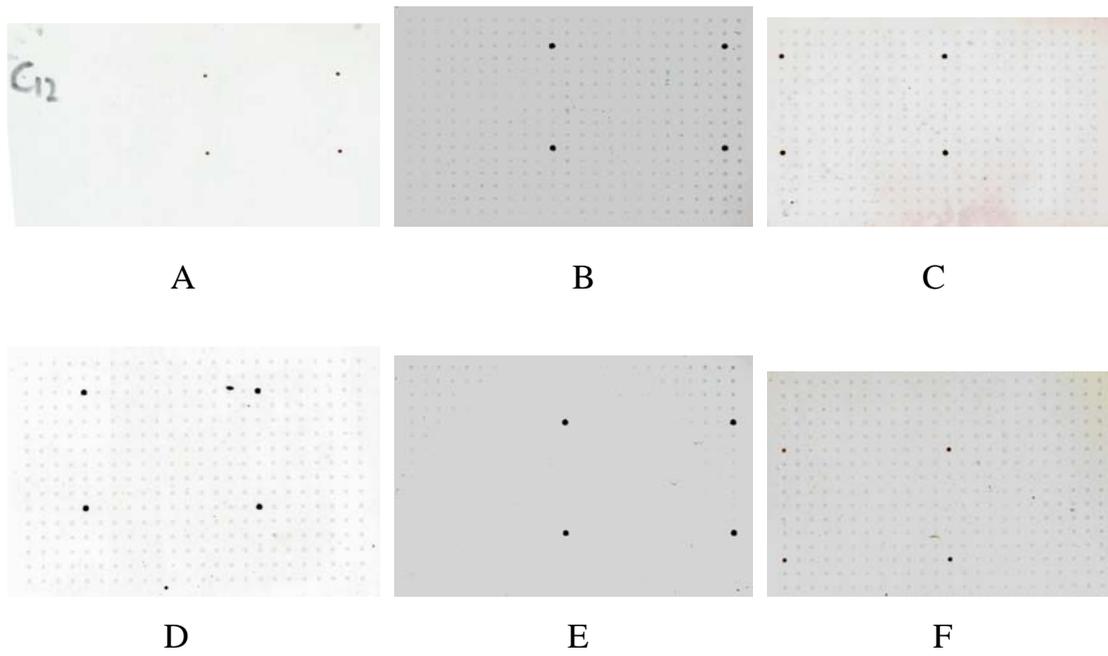
圖四、以 PCR 放大植物特異 DNA 片段。



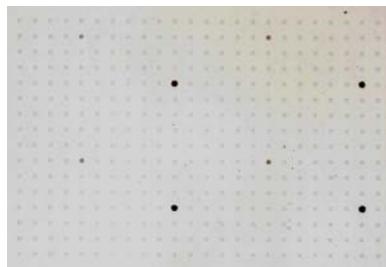
圖五、大戟晶片。在 2 公分x3 公分的耐龍膜上，以打點機，將 78 個基因，以四重複點上，總共 384 點。每點直徑為 100 微米（100 micron）。左上角為原點，DNA 片段的名稱詳列於表四。



圖六、以 DIG-11-dUTP 加入 PCR 反應，以 chromosomal DNA 為模板，放大特異 DNA 片段。自左至右為：marker，G06 M16-1（台灣鐵莧），G08 M11-1（金剛纂）。



圖七、利用大戟晶片鑑定大戟屬植物及近緣植物。(A) 白飯樹，(B) 白苞猩猩草細梗珠子，(C) 金剛纂，(D) 濱大戟，(E) 紅乳草，(F) 大飛揚草。



圖八、利用大戟晶片鑑定聖誕紅。