

## 第四章 案例報告

### 以葉綠體及核 DNA 分析進行大麻種子鑑定

#### 壹、前言

大麻（*Cannabis sativa*）產生毒害的主要成分是大麻酚（cannabinoids），在台灣屬於毒品危害防治條例的二級毒品，若持有或販賣毒品最重可處無期徒刑的處罰。本案例係基隆海關從 2001 年至 2004 年間查獲標示為火麻仁的可疑種子共 11 個貨櫃，雖然這些種子被懷疑是大麻（*Cannabis sativa*），但貨主堅稱這些是中醫植物中所謂的火麻仁，俗稱的火麻仁即為經過高溫烘焙、火烤等處理後不具萌發力之大麻種子，業者通常會進口火麻仁當作中藥或鳥類的飼料，因此，有些不肖業者或犯罪集團便以進口火麻仁的名義規避例行性的檢查，而成為國內栽植大麻的種子來源。大麻的鑑定可以型態鑑定為之，如葉表之剛毛觀察（Mitosinka *et al.*, 1972）、大麻酚之化學成分分析（Mikes *et al.*, 1971；Vree *et al.*, 1971；Vree *et al.*, 1972；Thornton and Nakamura, 1972；Smith, 1975）及近來所使用的 DNA 分析等（Linacre and Thorpe, 1998；Siniscalco Gigliano, 1997；Siniscalco Gigliano, 1998；Siniscalco Gigliano, 1999；Miller Coyle, 2003）。本案

於每一貨櫃隨機採樣進行種子之發芽力試驗及種屬鑑定。種子之發芽力試驗以 TTC (2,3,5-triphenyltetrazolium chloride) 方法進行分析，種屬試驗則以葉綠體基因組之 *trnL* -*trnF* IGS 及細胞核核糖體 DNA (nrDNA) 之 ITS1 等二基因位之 DNA 序列分析為之。

## 貳、材料與方法

### 一、樣品採集

從基隆海關 2001 年至 2004 年期間查獲標示為火麻仁的可疑種子共 11 個貨櫃中，每一貨櫃隨機採樣各約一公斤重的種子，以進行種子之發芽力試驗及種屬鑑定。

### 二、發芽力試驗

種子之發芽力試驗乃以 TTC 試驗法進行，其原理為具發芽能力的種子，即使在休眠期仍能不斷進行呼吸作用，放出  $2H^+$  及  $2e^-$ ，而使無色的氯化四唑 (Tetrazolium chloride) 還原成紅色的甲潛 (Formazane)，故可藉以檢定種子的活力。本案例於每一貨櫃之種子各取 100 顆以 TTC (Tetrazolium chloride，氯化四唑) 試驗法進行種子之發芽力試驗，其方法之操作如下 (Towill and Mazur, 1975; Ruf M and Brunner, 2003)：隨機取樣 100 顆種子於  $35^{\circ}C$  水中浸泡 3 小時後去其種皮，但切勿傷及種子的幼根、幼芽及子葉，因受傷的傷口也會跟氯化四唑溶液起反應。去種皮後將其置於錶玻璃內，並加入 1% 氯化四唑溶液，使所有種子完全浸入其內，蓋以蓋子，置於暗處，約 30 分鐘後開始每隔一段時間觀察一次呈色情形至隔夜，計數呈現紅色之種子數目。

### 三、DNA 萃取

每一貨櫃所採集之可疑種子各取十顆種子分別進行 DNA 萃取，本實驗以富聯生物科技公司之 Plant genomic DNA extraction miniprep system (Viogene, Cat. No. GPG1001) 進行植物基因組之 DNA 萃取。萃取後之 DNA 以 0.7 % 瓊脂電泳膠及分光光度計進行定量，並於 -20°C 冰箱中儲存。

### 四、PCR 複製

本研究以 *trnL-trnF* IGS (Taberlet *et al.*, 1991; Fangan *et al.*, 1994) 及核糖體 DNA (nrDNA) 之 ITS1 (White *et al.*, 1990) 等兩個基因位進行 PCR 複製，其所需之通用引子如表 4-1 所示，各基因位進行 PCR 複製所需的條件均相同，分述如下：反應溶液之總體積為 50  $\mu$ L，內含各引子 0.3  $\mu$ M、pH 8.3 的緩衝液(10 mM Tris-HCl, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl, 0.1 % (w/v) gelatin)、200  $\mu$ M dNTP、2.5 unit 的 VioTaq DNA polymerase (Viogene) 和 10 ng 模板 DNA。使用之熱循環儀為 2400 Perkin-Elmer thermal cycler (Applied Biosystems)，其熱循環條件設定為 94 °C 1 分鐘，50 °C 1 分鐘 及 72 °C 2 分鐘進行 35 個循環，接著 72 °C 7 分鐘，最後維持在 4 °C。

表 4-1 *trnL-trnF* IGS 及 ITS1 等二基因位複製所需之引子序列

基因位	引子序列
<i>trnL-trnF</i> IGS	5'-GGTTCAAGTCCCTCTATCCC-3'
	5'-ATTTGAACTGGTGACACGAG-3'
ITS1	5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3'
	5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3'

## 五、PCR 產物之序列分析

PCR 產物於 2 % 瓊脂膠進行電泳確認並以 PCR-M™ Clean Up System (Viogene) 進行純化，接著使用 ABI PRISM™ BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit 並分別以正向 (forward) 及反向 (reverse) 引子進行 PCR 產物之循環定序 (cycle sequencing) PCR 複製，此循環定序 PCR 產物以 POP-7™ performance optimized polymer (Applied Biosystems) 進行分析並以 ABI 3130 DNA Analyzer 進行 DNA 序列之偵測。各基因位之序列則以國家衛生研究院 (<http://bioinfo.nhri.org.tw>) 之 GCG computer package 之程式進行序列間之排比及序列之搜尋比對。

## 參、結果與討論

### 一、發芽力試驗

本實驗中 11 個貨櫃之種子以 TTC 方法進行發芽力試驗後，發現各貨櫃中其種子仍具有發芽力之種子比率為 10-97 %，表示此批樣品仍有部分種子具有發芽力。

### 二、*trnL-trnF* IGS 基因位之序列分析

每個貨櫃取 10 顆種子進行 *trnL-trnF* IGS 基因位之序列分析後，所有的樣品僅具有兩種序列型，分別為 267 bp (cs-type 1) 或 266 bp (cs-type 2)，此兩種序列型與 Kohjouma 等人 (Kohjouma *et al.*, 2000) 之研究結果相符。葎草 (accession no. AB033897) 及蛇麻 (accession no. AF501599) 於此基因位均為 266 bp，將此兩種序列型與葎草及蛇麻於此基因位之序列進行排比後發現此兩型間只具有一個鹼基對的插入/刪除 (indel) (圖 4-1)，cs-type 1 與葎草具有 8 個鹼基對的取代 (substitution) 及 1 個鹼基對的插入/刪除；與蛇麻則具有 9 個鹼基對的取代及 1 個鹼基對的插入/刪除。至於 cs-type 2 與葎草則具有 8 個鹼基對的取代；與蛇麻則具有 9 個鹼基對的取代。而本案於可疑種子出現之兩種序列型於 GenBank 及 EMBL 資料庫搜尋比對之結果也與大麻 (*Cannabis sativa*) 之序列完全相符 (accession no.

AB036243 及 AB036253)，相似度達 100 %。至於與大麻相近之種屬葎草 (*Humulus japonicus*, 與台灣植物誌所載之 *Humulus scandens* 為同種異名，本研究以台灣植物誌為命名依據) 及蛇麻 (*Humulus lupulus*) 間之相似度則分述如下：cs-type1 及 cs-type2 與葎草 (accession no. AB033897) 之相似度分別為 96.6 % 及 97.0 %；而與蛇麻 (accession no. AF501599) 之相似度則分別為 96.3 % 及 96.6 %。

### 三、核糖體 DNA 之 ITS1 基因位之序列分析

這些種子的樣品經序列分析後其 ITS1 基因位之長度均為 225 bp，且均具有相同的序列型，葎草及蛇麻 (accession no. Y18151) 於此基因位彼此具有 17 個鹼基對取代之變異，其序列長度均為 226 bp。而這些可疑種子的序列型與葎草及蛇麻於此基因位之序列進行排比後發現與葎草之間具有 27 個鹼基對的取代及 1 個鹼基對的插入/刪除；與蛇麻之間則具有 20 個鹼基對的取代及 1 個鹼基對的插入/刪除 (圖 4-2)。此序列型於 GenBank 及 EMBL 資料庫搜尋比對之結果也與大麻 (*Cannabis sativa*) 之序列完全相符 (accession no. Y18150)，相似度達 100 %；與蛇麻 (accession no. Y18151) 之相似度為 90.3 %；至於與台灣採集之葎草則只具有 87.6 % 之相似度。

```

1
HL .....a... ..c.a.....
HS .....a... ..c.....
CS-type1 .....t... ..t.....
CS-type2 .....t... ..t.....
Consensus GCCAAA.GAT TCCCTAATTA TTTATCCTCT CATTCCGTTA G.GGTTTCTA

```

```

51
HL .....c .....c.-.
HS .....c .....c.-.
CS-type1 .....t .....t..c
CS-type2 .....t .....t.-
Consensus ATTTGTTATG TTTCTCGTTC ATTCTAACT. TACAACCGGA CCTGAA.GAG

```

```

101
HL .....
HS .....
CS-type1 .....
CS-type2 .....
Consensus CCTTTTTTTT ATTATCACAA GCCTTGIGAT ATATATGAAA GACCTACAAA

```

```

151
HL .....t. ....
HS .....t. ....
CS-type1 .....g. ....
CS-type2 .....g. ....
Consensus TGAACATAAG GAATCCCAAT GTGCAATT.G AATAATTAAC AATGTAATCC

```

```

201
HL .....
HS .....
CS-type1 .....
CS-type2 .....
Consensus CCCTTTCGTC TTTTAAATTG ACATAGTCCA AGTCCTCTAG TAAAATGATG

```

圖 4-1 (續)



```

                251                      267
HL  .....c..t .....
HS  .....c..t .....
CS-type1 .....t..c .....
CS-type2 .....t..c .....
Consensus ATGATG.AT. ATGAATG

```

圖 4-1 大麻於 *trnL-trnF* IGS 基因位之兩個序列型與蛇麻 (*Humulus lupulus*) 及葎草 (*Humulus scandens*) 序列之排比結果。CS-type1, CS-type2 為大麻的兩種序列型、HL 及 HS 分別為蛇麻及葎草的序列型，此四種序列型以 PileUp 及 Pretty 程式進行排比及形成共通序列 (consensus sequences)，“.” 及 “-” 分別代表鹼基與共通序列相同及鹼基刪除。

```

1                                     50
HL  ....t.....
HS  .....c.
CS  .....-g...
Consensus TCGAAACCTG CAACAGCAGA ACGACCCGTG AACACGTTTT AAACAACCTT

51                                     100
HL  ...t.....
HS  .....c. ....c.... .tt..... .ct.c.....
CS  .....g... ....g....
Consensus GGGCGGGCGA GAGGAGCTTG CTCCTTGGAC CCGCCCTCAC CTGCTAGGAG

101                                    150
HL  .....c.....
HS  .....g...c.....
CS  .....c.....
Consensus AAATCTTGGC GGGCTAACGA ACCCCGGGCGC AATCTGCGCC AAGGAACAAT

151                                    200
HL  .....t... ..c.....
HS  .....c... ..c....
CS  .....t ..gg... ..t.g. ....c....aa
Consensus AAAAGATTAG CGCGTT.CTC GTGCGGAGAC CCGGAGACGG TGTTCCGCCG

201                                    226
HL  ..... t.....
HS  .....
CS  .....a.... ..ta.g. ....
Consensus TCGAGTTGCG TGTTCTTCAA AATGTC

```

圖 4-2 大麻於 ITS1 基因位之序列型與蛇麻 (*Humulus lupulus*) 及葎草 (*Humulus scandens*) 序列之排比結果。CS、HL 及 HS 分別為大麻、蛇麻及葎草的序列型，此三種序列型以 PileUp 及 Pretty 程式進行排比及形成共通序列 (consensus sequences)，“.” 及 “-” 分別代表鹼基與共通序列相同及鹼基刪除。

## 肆、結論

本案例於 11 個貨櫃中採樣之可疑種子，經 TTC 試驗後發現這些種子仍具有發芽力，而以葉綠體基因組之 *trnL -trnF* IGS 及細胞核核糖體 DNA 之 ITS1 等二基因位之 DNA 序列進行種屬鑑定之結果，發現所有分析之種子均與大麻具有相同的序列，且其序列也能有效的與葎草 (*Humulus scandens*) 及蛇麻 (*Humulus lupulus*) 等兩個大麻之相近種屬加以區別，顯示這批被標示為火麻仁的貨物確實為大麻種子，因此，本系統為大麻種子以 DNA 分析進行其種屬鑑定之有效方法。

## 伍、參考文獻

- Fangan BM, Stedje B, Stabbetorp OE, Jensen ES and Jakobsen KS. 1994. A general approach for PCR amplification and sequencing of chloroplast DNA from crude vascular plant and algal tissue. *Biotechniques* 16:484-494.
- Kohjyouma M, Lee IJ, Iida O, Kurihara K, Yamada K, Makino Y, Sekita S and Satake M. 2000. Intraspecific variation in *Cannabis sativa* L. based on intergenic spacer region of chloroplast DNA. *Biol. Pharm. Bull.* 23:727-730.
- Linacre A and Thorpe J. 1998. Detection and identification of cannabis by DNA. *Forensic Sci. Int.* 91:71-76.
- Mikes F, Hofmann A and Waser PG. 1971. Identification of (-)-delta 9-6a, 10a-trans-tetrahydrocannabinol and two of its metabolites in rats by use of combination gas chromatography-mass spectrometry and mass fragmentography. *Biochem. Pharmacol.* 20:2469-2476.
- Miller Coyle H, Palmbach T, Juliano N, Ladd C and Lee HC. 2003. An overview of DNA methods for the identification and individualization of marijuana. *Croat. Med. J.* 44:315-321.
- Mitosinka GT, Thornton JI and Hayes TL. 1972. The examination of cystolithic hairs of *Cannabis* and other plants by means of the scanning electron microscope. *J. Forensic Sci. Soc.* 12:521-529.
- Ruf M and Brunner I. 2003. Vitality of tree fine roots: reevaluation of the tetrazolium test. *Tree Physiol.* 23:257-263.
- Siniscalco Gigliano G, Caputo P and Cozzolino S. 1997. Ribosomal DNA analysis as a tool for the identification of *Cannabis sativa* L. specimens of forensic interest. *Sci. Justice* 37:171-174.

- Siniscalco Gigliano G. 1998. Identification of *Cannabis sativa* L. (Cannabaceae) using restriction profiles of the Internal Transcribed Spacer II (ITS2). *Sci. Justice* 38:225-230.
- Siniscalco Gigliano G. 1999. Preliminary data on the usefulness of internal transcribed spacer I (ITS1) sequence in *Cannabis sativa* L. identification. *J. Forensic Sci.* 44:475-477.
- Smith RN. 1975. High pressure liquid chromatography on cannabis, identification of separated constituents. *J. Chromatogr.* 115:101-106.
- Taberlet P, Gielly L, Pautou G and Bouvet J. 1991. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Mol. Biol.* 17:1105-1109.
- Thornton JI and Nakamura GR. 1972. The identification of marijuana. *J. Forensic Sci. Soc.* 12:461-519.
- Towill LE and Mazur P. 1975. Studies on the reduction of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride as a viability assay for plant tissue cultures. *Can. J. Bot.* 53:1097-1102.
- Vree TB, Breimer DD, van Ginneken CA, van Rossum JM, de Zeeuw RA and Witte AH. 1971. Identification of cannabivarin in hashish by a new method of combined gas chromatography-mass-spectrometry. *Clin Chim Acta* 34:365-372.
- Vree TB, Breimer DD, van Ginneken CA and van Rossum JM. 1972. Identification in hashish of tetrahydrocannabinol, cannabidiol and cannabinol analogues with a methyl side-chain. *J. Pharm. Pharmacol.* 24:7-12.
- White TJ, Bruns T, Lee S and Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, in PCR protocols: a guide to methods and applications, In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ (eds). Academic Press, California, USA. pp 315-322.