中藥材參考 DNA 序列庫
參考 DNA 序列的一般使用指引

目的

政府中藥檢測中心(“檢測中心”)建立中藥材參考 DNA 序列庫，載列各種中藥材的參考 DNA 序列。本指引旨在概述參考 DNA 序列的用法，介紹其三大用途，並說明如何通過兩種常見做法發揮上述三大用途。

背景

為控制中藥材的質量及確保其安全穩當，中藥材的鑒別工作必須準確無誤。眾所周知，DNA 技術是適用於鑒別物種的方法之一，原因是 DNA 一般不受生物的年齡、生理狀況和生境所影響。DNA 條形碼技術利用來自一個或多個特定 DNA 區域(又稱“DNA 條形碼”)的信息進行鑒別，是最為廣泛用於鑒別生物的 DNA 技術之一。就特定 DNA 區域內的 DNA 而言，不同生物之間存有顯著差異，但在同一物種的不同個體之間，這方面的差異則較小。因此，在區分近緣中藥材物種、形態上易於混淆的中藥材和沒有獨特化學指標的中藥材時，DNA 條形碼技術尤其有用。

中藥材參考 DNA 序列庫所載列的參考 DNA 序列，均源自分析已知分類位置的中藥材標本。建立此參考 DNA 序列庫的目的，是希望透過提供多樣化的檢測服務，提升本地檢測服務的水平。檢測中心會擬備資料表，記述所選用 DNA 條形碼的參考 DNA 序列及其相關資料。每種中藥材的資料表均有一個部分是按 DNA 條形碼劃分，分別以 FASTA 格式列出所有標本的參考 DNA 序列，這有助快速處理參考 DNA 序列，以便進行數據分析(有關詳情，請參閱中藥材參考 DNA 序列庫的“通用公告”)。

參考 DNA 序列的用法

中藥材參考 DNA 序列庫的參考 DNA 序列均來自憑證標本和經專家鑒

定的中藥材，並利用檢測中心內部驗證的方法產生，發揮以下三大用途，計有(1)鑒別物種、(2)顯示生物的親緣關係及(3)傳遞遺傳信息，以便制訂全新的檢測方法。所選用的 DNA 條形碼適用於鑒別物種，已獲多部藥典採用，並得到科學界廣泛認可。

(1) 鑒別物種

鑒別物種的方法是進行序列比對：比較樣本所產生的序列與參考序列來判斷兩者的相似度。兩者具有愈多共同的核苷酸，相似度愈高，在功能、結構及／或演化方面有關聯的機會愈大。

(2) 親緣關係分析

生物的演化史和關係對物種分類至關重要。科學家通過研究生物的可遺傳特徵(例如 DNA 序列、形態、行為特徵)推斷生物的親緣關係。我們只要根據生物的特徵為生物建立巢狀羣組，便可繪製出顯示上述假定關係的圖表，稱為親緣關係圖。使用一組或多組 DNA 條形碼繪製的親緣關係圖有助區分高遺傳相似度的近緣物種。

(3) 制訂檢測方法

序列比對亦可找出中藥材與相似物種的多型性位置。種特異性鑒別方法(例如特異性聚合酶鏈式反應(“特異性 PCR”)和聚合酶鏈式反應－限制性片段長度多態性)是根據物種的多型性核苷酸制訂，可用來鑒別目標中藥材物種或區分中藥材真品與常見的偽品，這正是制訂特異性 PCR 測試的要旨。與 DNA 條形碼技術比較，特異性 PCR 測試的處理速度較快，結果易於分析，因此成本較低。

要使參考 DNA 序列發揮上述用途(包括鑒別物種及制訂檢測方法)，兩種常見的做法是(1)進行序列排比及(2)利用公開資料庫進行序列比對。

(1) 序列排比

序列排比可透過比較兩個或以上 DNA 序列，找出其中相似之處。雙序列排比務求以最佳方式，對兩個查詢序列的字元進行排列和並列分析。多序列排比與雙序列排比類近，但在每次比對中同時分析兩個以上 DNA 序列。由於 DNA 條形碼的長度大多為 300 至 600 個鹼基對，因此以人手對 DNA 條形碼進行並列分析並不可行。下文將推介數個用作序列排比的電腦程式和軟件。

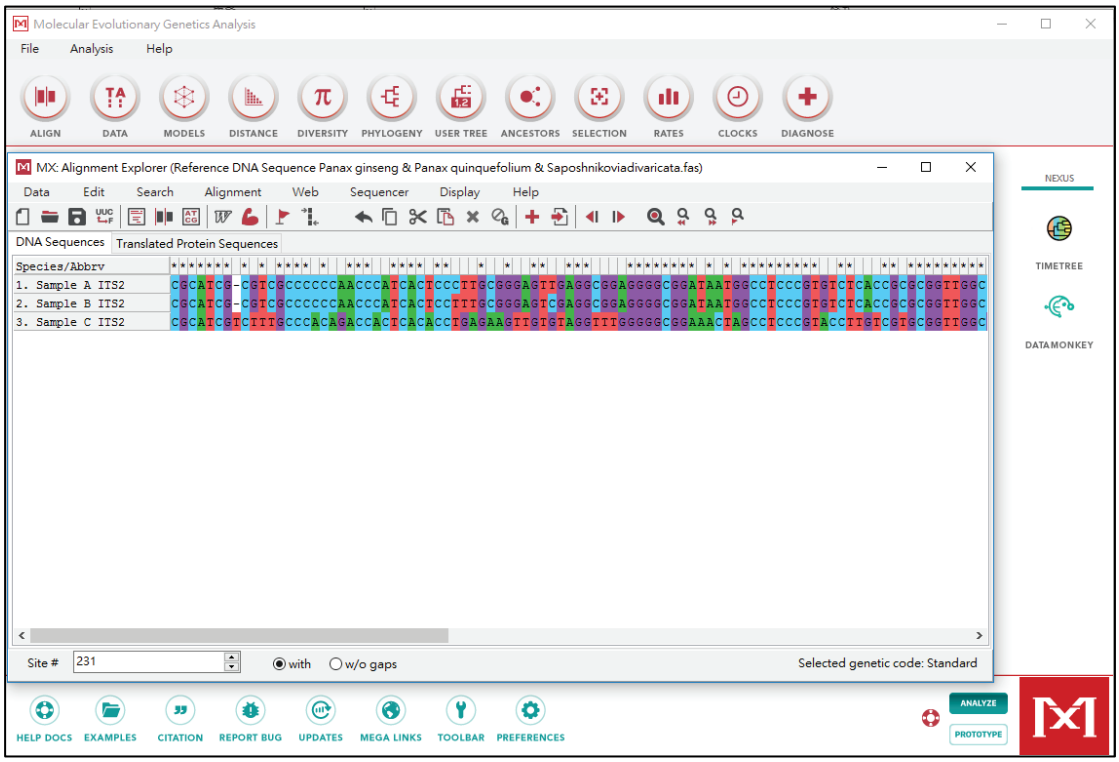
用作序列排比的電腦程式

雙序列排比和多序列排比可透過使用序列排比程式進行。擅於進行多序列排比的電腦程式包括 Clustal Omega、ClustalW、MUSCLE(MUltiple Sequence Comparison by Log-Expectation，即基於對數期望的多重序列比較)、MACSE (Multiple Alignment of Coding SEquences，即編碼序列的多重比對)、T-Coffee(Tree-based Consistency Objective Function for Alignment Evaluation，即以樹形基礎的一致性作多重序列比對)等。Clustal Omega 和 ClustalW(網址：http://www.clustal.org/)是通用的多序列排比程式，用於分析蛋白質和 DNA／RNA。Clustal Omega 是最新版本的 Clustal 系列電腦程式，與之前的版本相比，可進行較大規模的並列分析。MUSCLE(網址：https://www.drive5.com/muscle/)的優點則在於其速度和進行並列分析的準確度。上述程式大多適用於 Windows、Mac OS 和 Unix／Linux 電腦，並可以指令列命令模式運行。

用作序列排比的軟件套裝

分子進化遺傳學分析(Molecular Evolutionary Genetics Analysis, MEGA)是免費的序列排比軟件，可用作比較分析 DNA 序列。MEGA 配備了 ClustalW 和 MUSCLE 程式，以圖形使用者介面操作。使用者可將包含測試樣本的 DNA 序列和參考 DNA 序列的 FASTA 檔案匯入 MEGA 以進行序列排比。MEGA 以不同顏色標示四種核苷酸(分別以“A”、“G”、“C”和“T”代表)，因此使用者

可輕易從分析結果找出置頂序列(通常是參考序列，如圖一所示)與其餘序列之間在核苷酸排列上的差異。除了可用於進行序列排比，MEGA 更可用作繪製親緣關係圖和計算遺傳距離。



圖一：利用 MEGA 軟件進行序列排比的例子

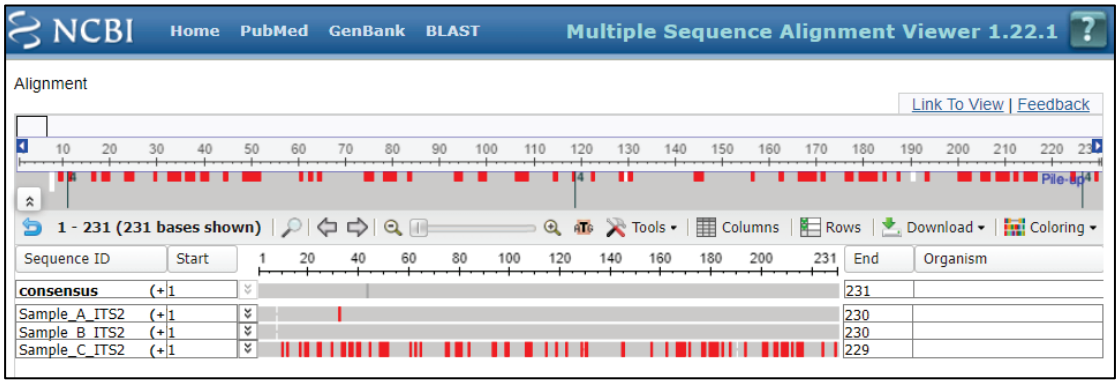
BioEdit 生物序列排列編輯器和 CodonCode Aligner 也是深受研究人員歡迎的序列排比軟件。BioEdit 生物序列排列編輯器是適合入門者使用的免費軟件，內置多種編輯功能，例如序列排序、計算序列一致性百分比和繪製親緣關係圖等。另外，此軟件的使用者介面簡單易用，可匯入、匯出、操控和檢視以 ClustalW 程式進行序列排比所得出的結果。CodonCode Aligner 則是商業軟件套裝，擅於編輯核苷酸的順序和監控原始序列數據的質量分數。使用者可以之修剪序列的兩端部分、組裝序列、編輯片段重疊羣和偵測突變，亦可利用內置程式 MUSCLE、MACSE 或 Clustal Omega 進行序列排比。

可進行序列排比的網上平台

網上也有多個平台提供可進行多序列排比的電腦程式。歐洲分子生物

學實驗室歐洲生物資訊研究所(EMBL-EBI)旨在協助研究人員互相分享和分析生物數據，其官方網站(網址：https://www.ebi.ac.uk/)提供了各種網上工具，例如 Clustal Omega、MAFFT(Multiple Alignment using Fast Fourier Transform，即是使用快速傅立葉變換之多重比對)、MUSCLE、T-coffee 等。在該網頁上的表格中，使用者可以“複製和貼上”的方式輸入多個 DNA 序列進行分析，更可按照需要和工作流程調節各項參數，例如匯出序列分析結果的排列順序和格式等。

NCBI Multiple Sequence Alignment Viewer 是由美國國家生物技術資訊中心(National Center for Biotechnology Information，簡稱 NCBI)管理的網上應用程式(網址：https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/msaviewer/)，以圖表方式展示多序列排比分析。如樣本 DNA 序列中的核苷酸與參考 DNA 序列(置頂序列)中的核苷酸有所不同，差異會以紅色標示(如圖二所示)，讓使用者直觀地從並列分析結果看出 DNA 序列之間的差異。



圖二：利用網上平台 NCBI Multiple Sequence Alignment Viewer 進行序列排比的例子

(2) 利用公開資料庫比對 DNA 序列

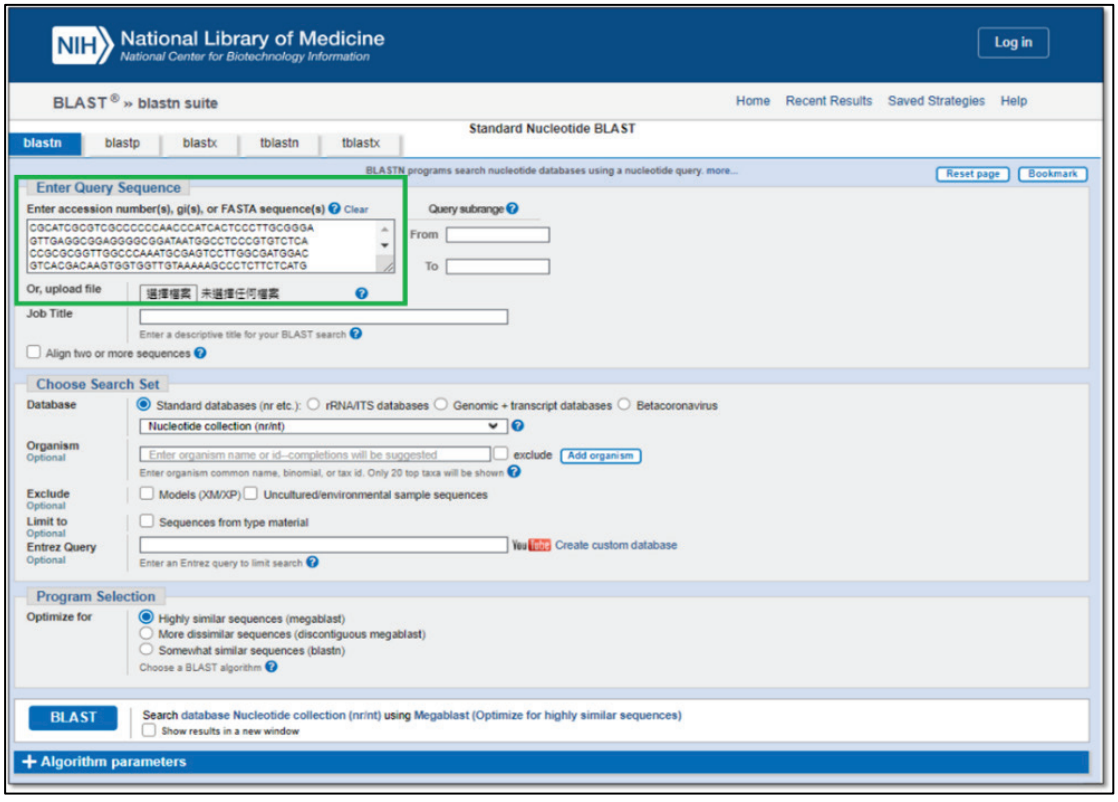
GenBank

NCBI GenBank 是由 NCBI 管理的綜合資料庫，收錄採自 50 多萬個物種的超過 25 億個序列，是最大型的序列資料庫之一。GenBank 會為收錄的每個序列記錄編配一個稱為登錄號(accession number)的專用識別號，而每

個序列記錄包括有關生物來源、基因座定性、作者、序列特徵等。NCBI 接納全球科學界提交的序列。須予留意的是，部分被提交的序列是來自未獲專家檢定的生物物料(例如中藥材商業製品)。總括而言，產自憑證標本或可追溯標本的核苷酸序列是比較可靠的參考來源。

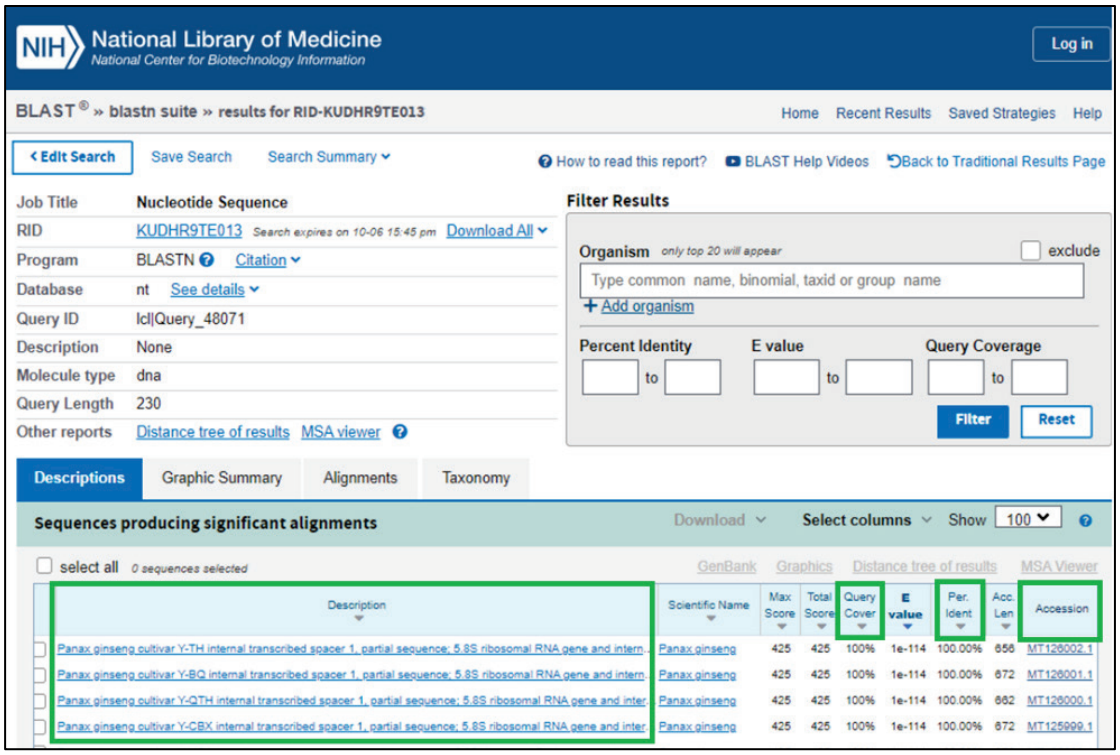
GenBank 的基本局部排比搜索工具(Basic Local Alignment Search Tool，簡稱 BLAST)

BLAST 是用於比照不同數據庫進行序列相似度搜索的程式。GenBank 有多個版本的 BLAST 程式，專為比照個別數據庫進行序列搜索而設。就中藥材的 DNA 條形碼技術而言，最常用的版本是比照核苷酸資料庫進行搜索的 BLASTn (網址：https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch)。使用者可於網上介面輸入查詢序列及調節參數，然後 BLAST 會找出查詢序列與 NCBI GenBank 收錄核苷酸序列在統計學上的相似度(圖三)。



圖三：上載序列到 BLAST 搜索平台的例子

BLAST 搜索結果會臚列 NCBI GenBank 中與查詢序列相符的核苷酸序列，並將最相符者置頂(圖四)。分析 BLAST 搜索結果時，使用者應着眼於兩個數字：“一致性百分比”(percent of identity)和“查詢覆蓋度”(query coverage)。“一致性百分比”代表查詢序列與 GenBank 內有關核苷酸序列的相似度百分比，而“查詢覆蓋度”則代表查詢序列與 GenBank 內核苷酸序列重疊的百分比。



圖四：參考 DNA 序列比對 NCBI GenBank 收錄核苷酸序列的 BLAST 搜索結果例子

其他公開資料庫

生命條形碼數據系統(Barcode of Life Data Systems，簡稱 BOLD；網址：https://www.boldsystems.org/index.php/IDS_OpenIdEngine)是用途廣泛的網上平台，提供核苷酸序列(特別是有關動物者)數據儲存和分析服務。

參考資料

1. C Notredame, DG Higgins, J Heringa. T-Coffee: A novel method for multiple sequence alignments. Journal of Molecular Biology, 2000, 302(1): 205-217.

2. CodonCode Corporation. CodonCode Aligner (Version 9.0). 2019. Available from: https://www.codoncode.com/index.htm

3. EW Sayers, EE Bolton, JR Brister, K Canese, J Chan, et al. Database resources of the national center for biotechnology information. Nucleic Acids Research, 2022, 50(D1): D20-D26.

4. K Katoh, K Misawa, K Kuma, T Miyata. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. Nucleic Acids Research, 2002, 30(14): 3059-3066.

5. K Tamura, G Stecher, S Kumar. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. Molecular Biology and Evolution, 2021, 38(7): 3022-3027.

6. MA Larkin, G Blackshields, NP Brown, R Chenna, PA McGettigan, et al. Clustal W and Clustal X version 2.0. Bioinformatics, 2007, 23(21): 2947-2948.

7. National Center for Biotechnology Information. Multiple Sequence Alignment Viewer (Version 1.22.0). 2022. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/msaviewer/

8. RC Edgar. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. Nucleic Acids Research, 2004, 32(5): 1792-1797.

9. S Ratnasingham, PDN Hebert. BOLD: The Barcode of Life Data System (www.barcodinglife.org). Molecular Ecology Notes, 2007, 7(3): 355-364.

10. SF Altschul, W Gish, W Miller, EW Myers, DJ Lipman. Basic local alignment search tool. Journal of Molecular Biology, 1990, 215(3): 403-410.

11. TA Hall. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic acids symposium series, 1999, 41: 95-98.

12. V Ranwez, S Harispe, F Delsuc, EJ Douzery. MACSE: Multiple Alignment of Coding SEquences accounting for frameshifts and stop codons. PLoS One, 2011, 6(9): e22594.