

「動物類藥材DNA條形碼檢測法」及  
「以DNA技術作為鑒別鹿茸的互補檢測方法」  
研究分享會

(CME- IP0006-0083)

1

政府中藥檢測中心

黃家樂

2021年12月3日



# 內容

- 中藥材鑒別
- 甚麼是DNA?
- 核酸檢測方法及應用
- DNA鑒別技術在中藥材的應用
- 動物類藥材DNA條形碼檢測法
- 以DNA技術作為鑒別鹿茸的互補檢測方法



# 中藥材鑒別體系

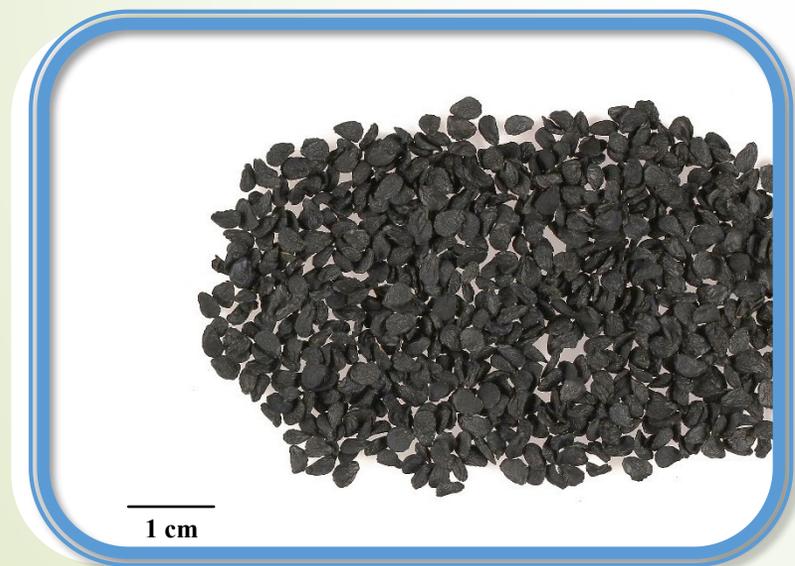
鑒定方法	依據
性狀鑒定	感官
基原鑒定	器官
顯微鑒定	細胞
理化鑒定	理化



# 性狀鑒別

➔ 經典方法，快速，簡便

韮菜子



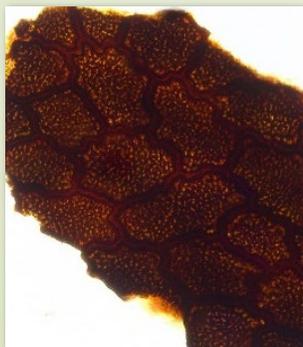
蔥子



# 顯微鑒別

- ▶ 通過顯微鏡觀察中藥材的顯微特徵，鑒別中藥材

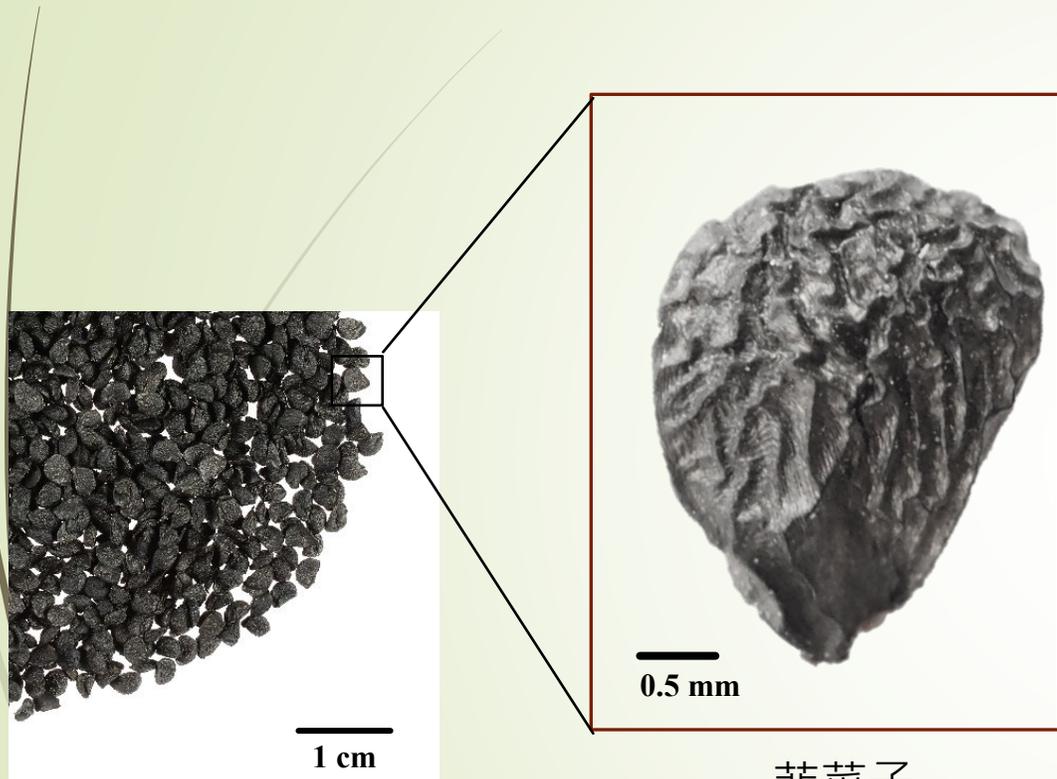
## 韮菜子



## 蔥子



# 微性狀鑒別

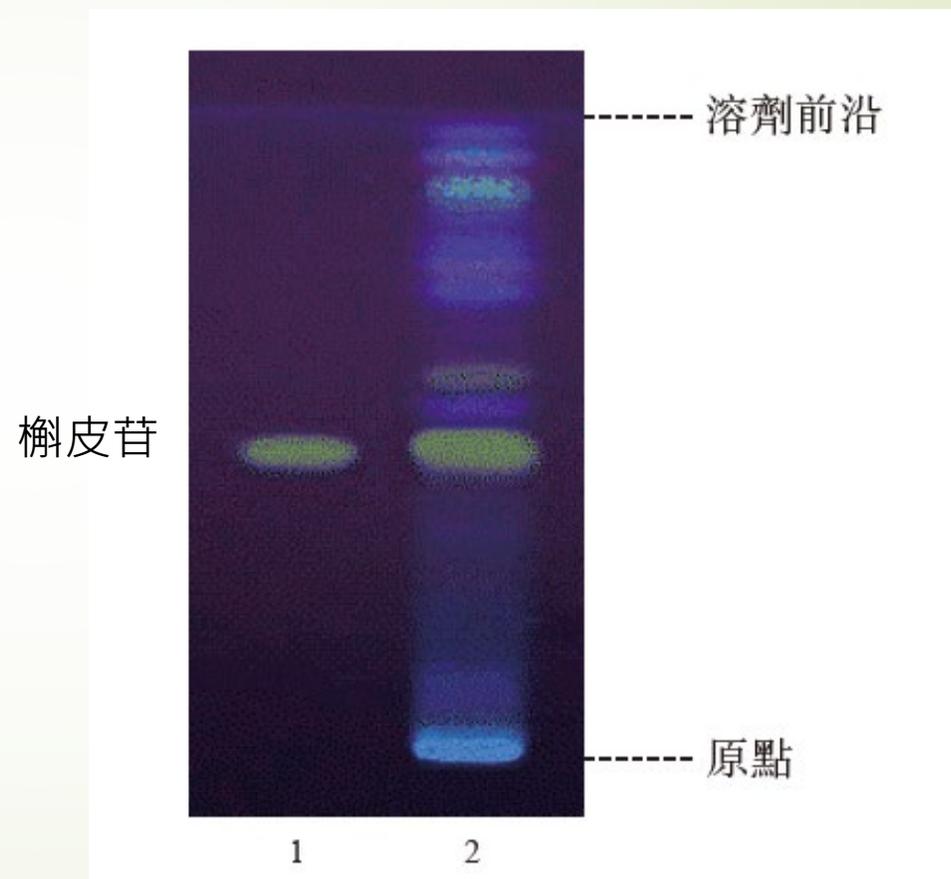


葎菜子



# 化學分析

- 化學成分
- 高效薄層色譜
- 高效液相色譜



# 容易混淆的藥材



蟬蛻



金蟬蛻



# 容易混淆的藥材



白花蛇舌草



水線草



# 容易混淆的藥材



南鶴虱

華南鶴虱



# 甚麼是DNA?



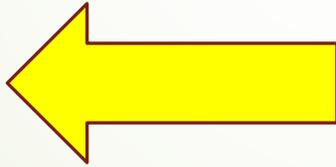
## 生物組成 - 特有類別

- 木質化組織 - 樹木
- 甲殼質 - 蝦，蟹，昆蟲



# 生物組成 – 普遍存在

- 碳水化合物
- 脂肪
- 蛋白質
- 核酸
  - DNA
  - RNA



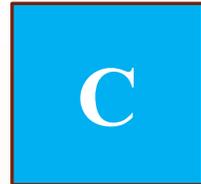
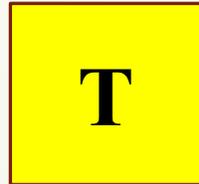
# DNA是甚麼？

- Deoxyribonucleic acid
- 脫氧核糖核酸
- 存在於生物的細胞內
- 生物設計的藍圖



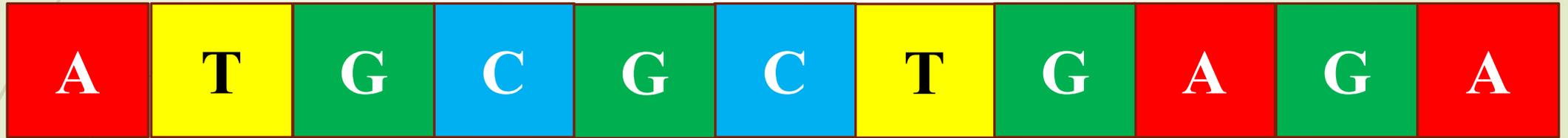
# DNA是甚麼？

- 由4種化合物組成
- 像字母積木



# 甚麼是DNA?

## 單鏈

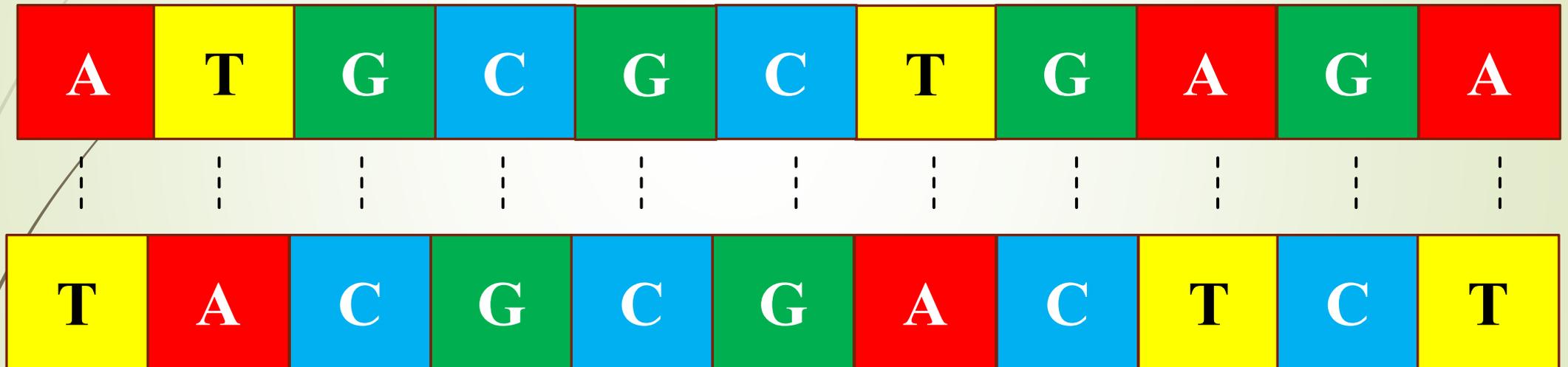


- ➔ 其排列次序，稱為DNA序列



# 甚麼是DNA?

## 雙鏈

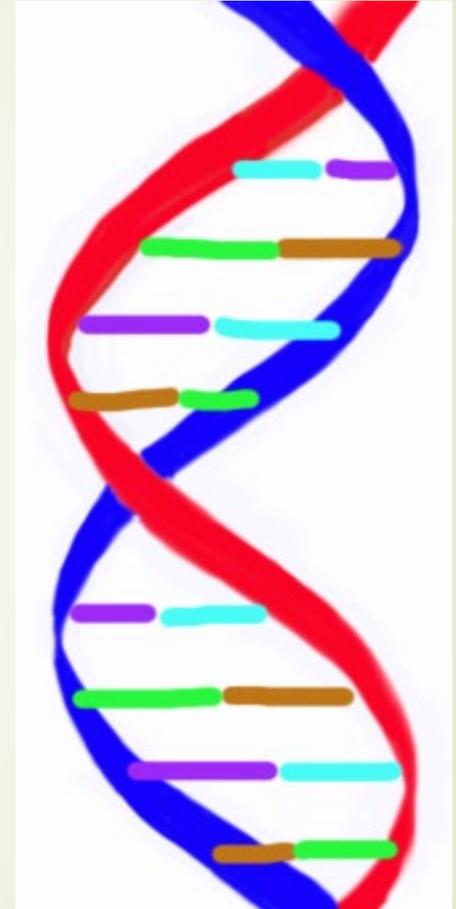


長度: 11 個鹼基對 (11 bp)



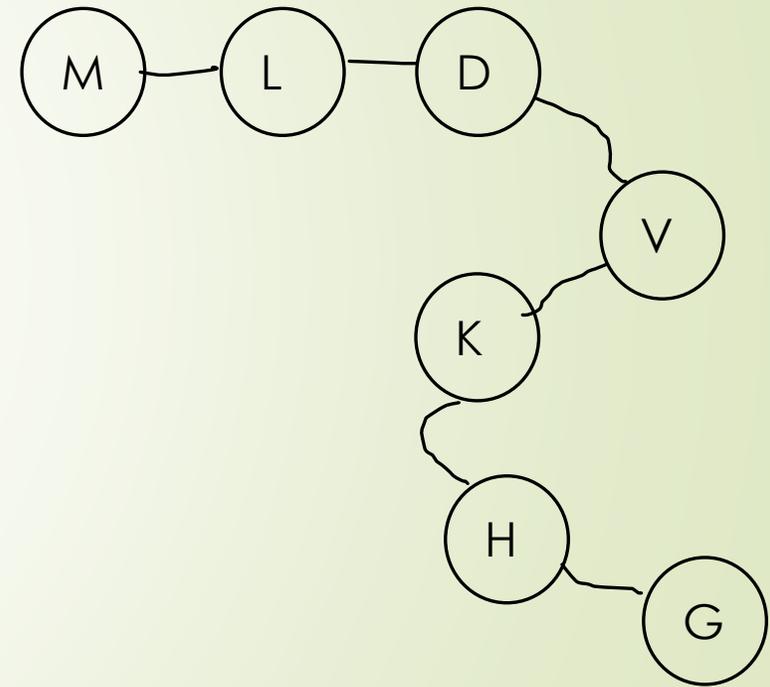
# 甚麼是DNA?

- 在生物裏，DNA以雙螺旋結構存在
- 1953年，沃森和克里克 (Watson and Crick) 在《自然》雜誌描述了DNA雙螺旋結構



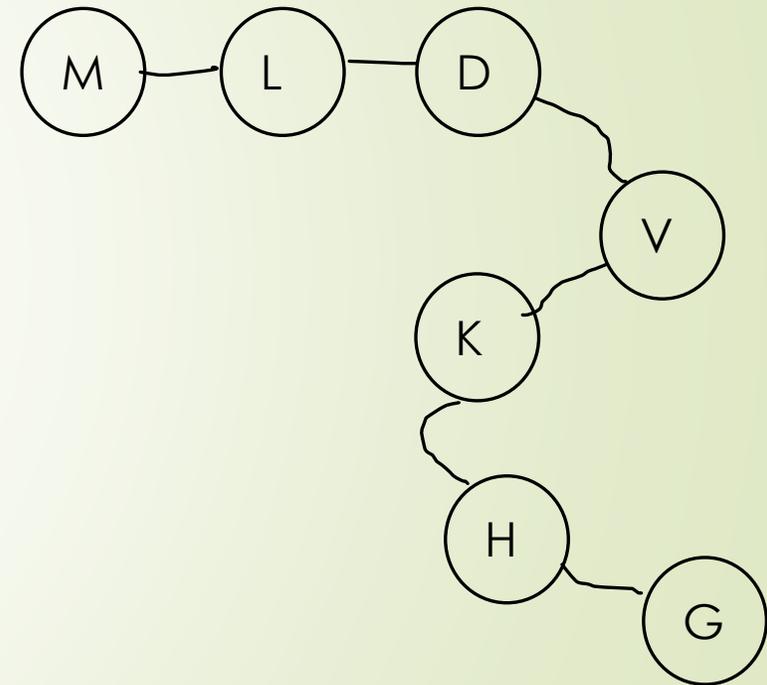
# 蛋白質

- 人體由20種氨基酸組成
- 20個英文字母
- 生物中必要組成成分
- 參與細胞的反應
  - 酶 (生物催化劑)
  - 肌肉
  - 免疫



# 蛋白質

- ➔ 每種蛋白都有獨特氨基酸排列
- ➔ 這些特定的排列，由甚麼決定？



# 密碼

## 摩斯密碼

訊號	代表英文字母
● —	A
— ● ● ●	B
— ● — ●	C

## DNA密碼

DNA序列	氨基酸
ATG	M
CGC	R
TGC	C



# DNA的角色

我是這個生物的一個細胞

我是這個生物的總設計圖

DNA

我是**蛋白質A**的設計圖

mRNA

我是最終產物，負責工作

蛋白質 A



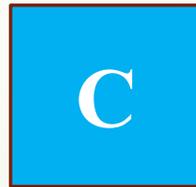
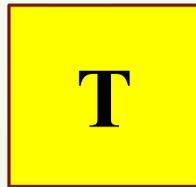
# 例子

- ➔ COVID-19 疫苗
- ➔ 病毒的刺突蛋白(S 蛋白)，令身體產生免疫反應



## 小結

- DNA由4種化合物組合而成
- 4種化合物排列次序，稱為DNA序列
- DNA是生命的藍圖



# 核酸技術



# 核酸技術里程

1868 年 - 從細胞提取出DNA

1937年 - 以電泳技術分離生物分子

1953年 - 發現DNA的雙螺旋結構

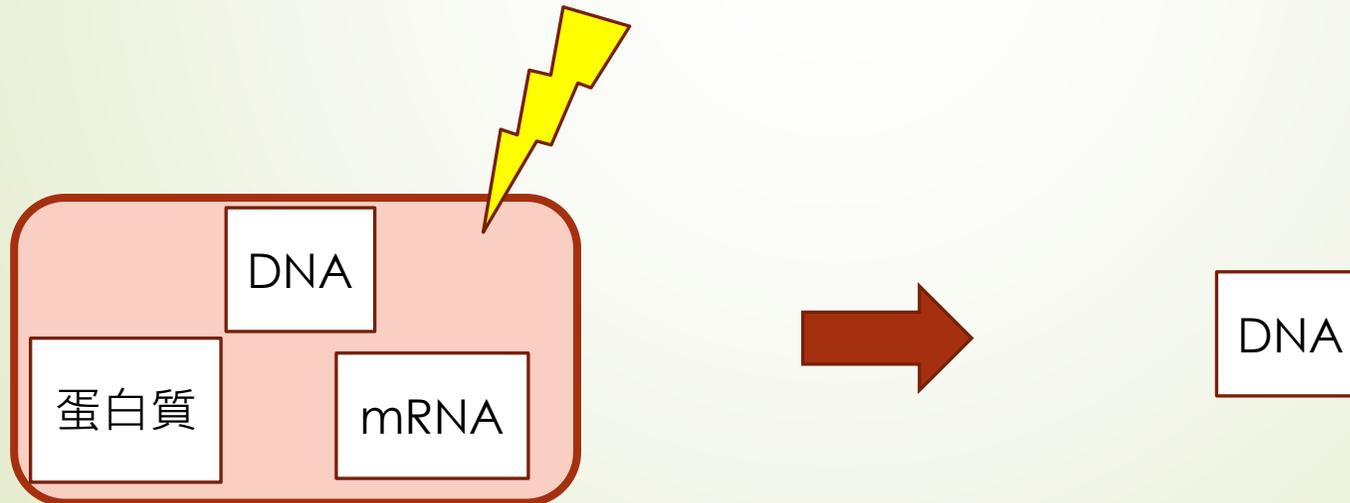
1977年 - 桑格DNA測序

1983年 - 聚合酶鏈式反應 (PCR)



# 從細胞中提取DNA

- 大多數情況下，不能直接檢測樣本
- 需將細胞膜或細胞壁打破
- 去除DNA以外的成份





# DNA測試的靈敏度



# PCR

- 聚合酶鏈式反應 (Polymerase chain reaction)
- 複製DNA
- 從少量的DNA樣本，反覆擴增，得到足夠分析的分量



# PCR的故事

- 發明人: 凱利.班克斯.穆利斯( Kary B. Mullis)
- 經常面對DNA樣本不夠使用
- 由汽車車輪發出規律聲音，啓發複製DNA
- 人工方法，在試管中進行



# PCR的故事

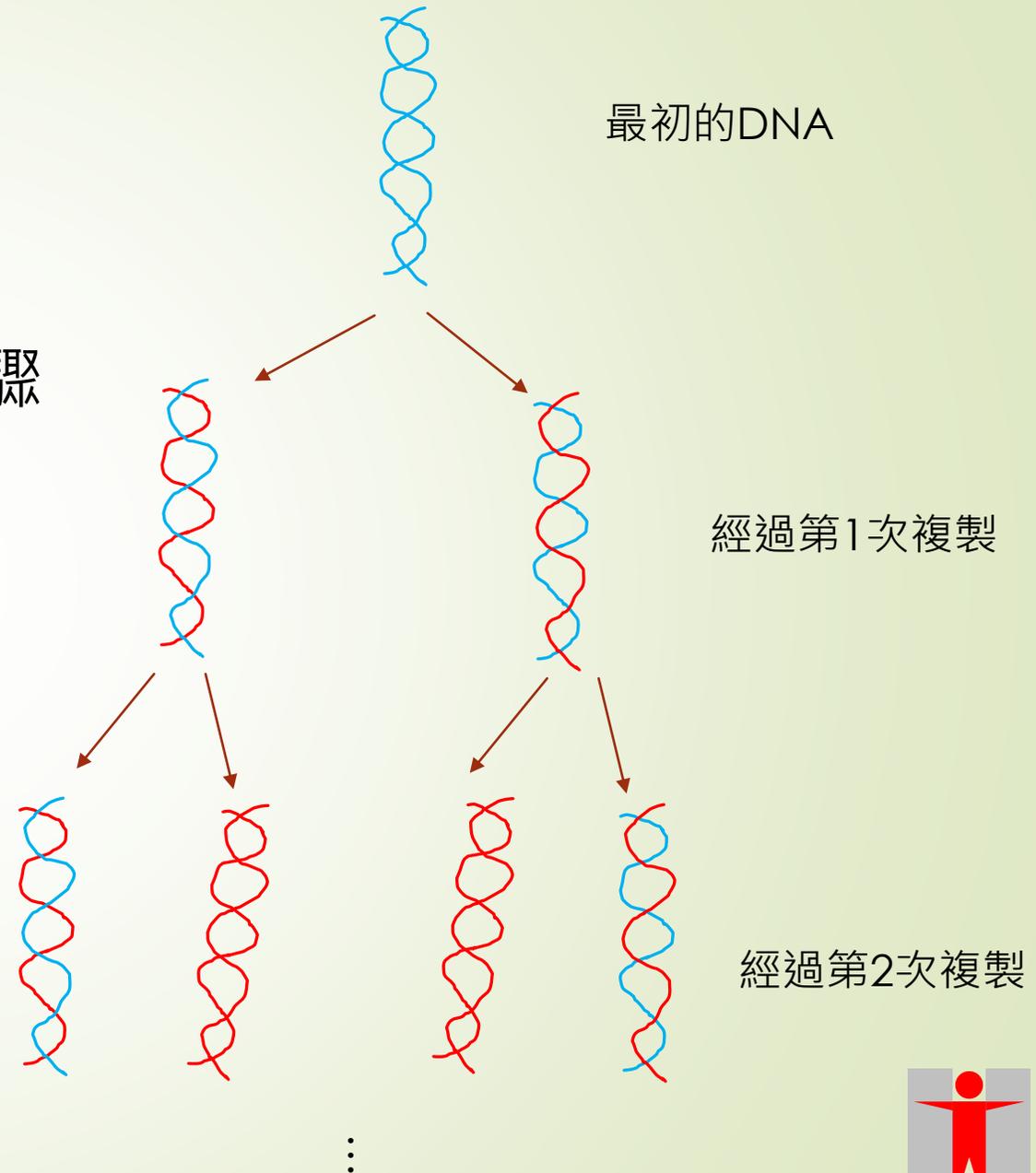
## 反覆進行相同的複製步驟

➤ 1次 -> 由1變2

➤ 2次 -> 由2變4

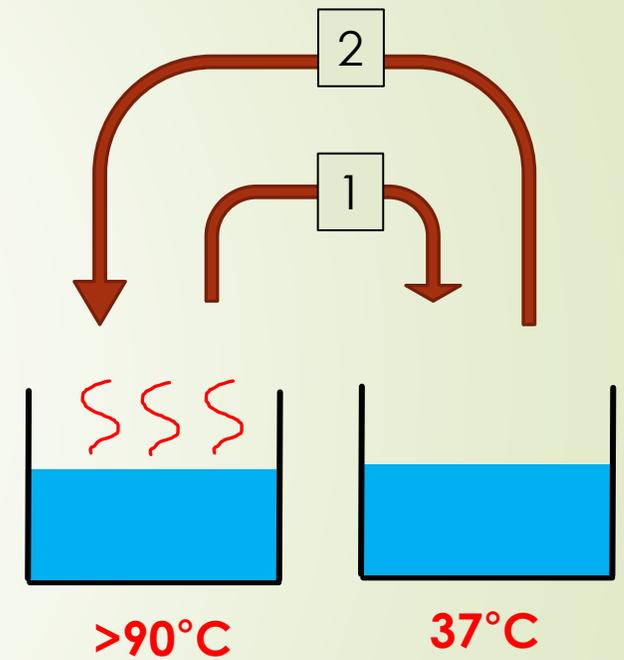
⋮

➤ 30次 -> 10億



## 初期的PCR

- ➔ PCR需進行約30次複製
- ➔ 每次複製前，都需要以  $>90^{\circ}\text{C}$  進行反應
- ➔ 每次加入新鮮的DNA聚合酶，去進行新一輪複製
- ➔ 十分耗費人力和物力



## 水生棲熱菌

- 1970年代
- 美國黃石國家公園的熱泉
- 發現生存在高溫環境的細菌
- 分離出耐高溫的DNA聚合酶
- 莫理斯改用這種DNA聚合酶，解決了每次複製需要加酶的缺點



# PCR的故事

- PCR變得更具實用性
- 小插曲
  - 投稿至《科學》遭駁回
  - 但隨後，《科學》選聚合酶為1989年度分子，讚揚對重要性
- 1993年，獲得諾貝爾化學獎
- 現時已有儀器，代替人手PCR

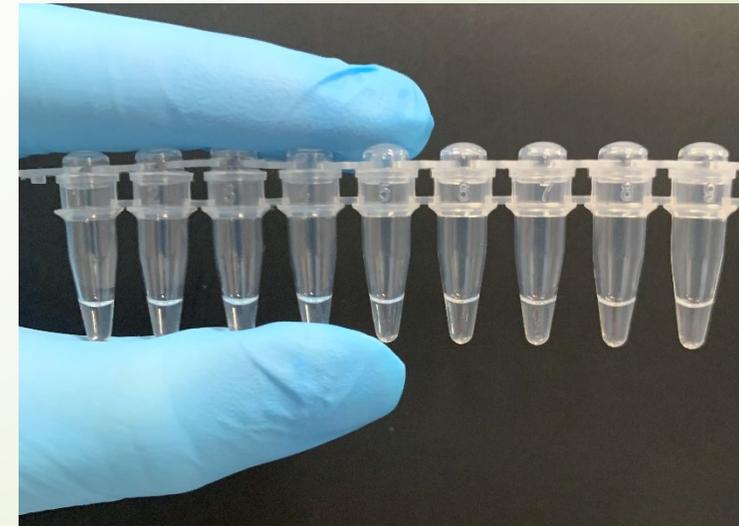
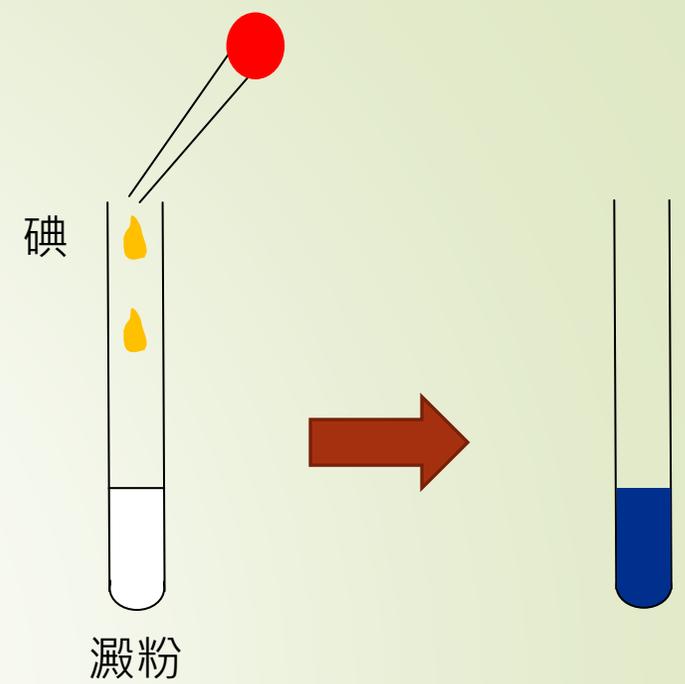


PCR儀



# 如何“看到”DNA?

- 樣本裏有沒有DNA?
- 經PCR後，有沒有PCR產物?
- 如果有，鹼基對長度是多少?

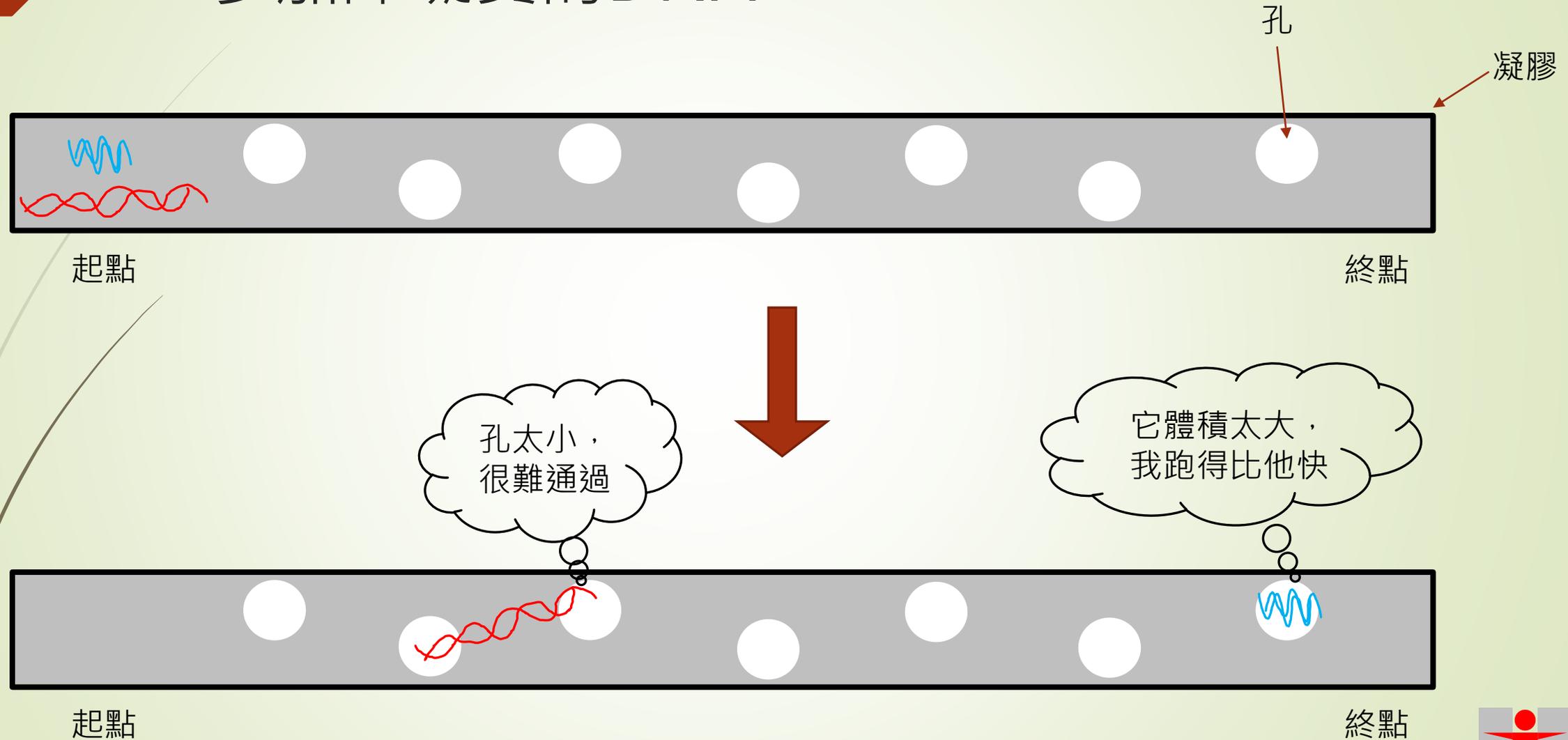


# 電泳

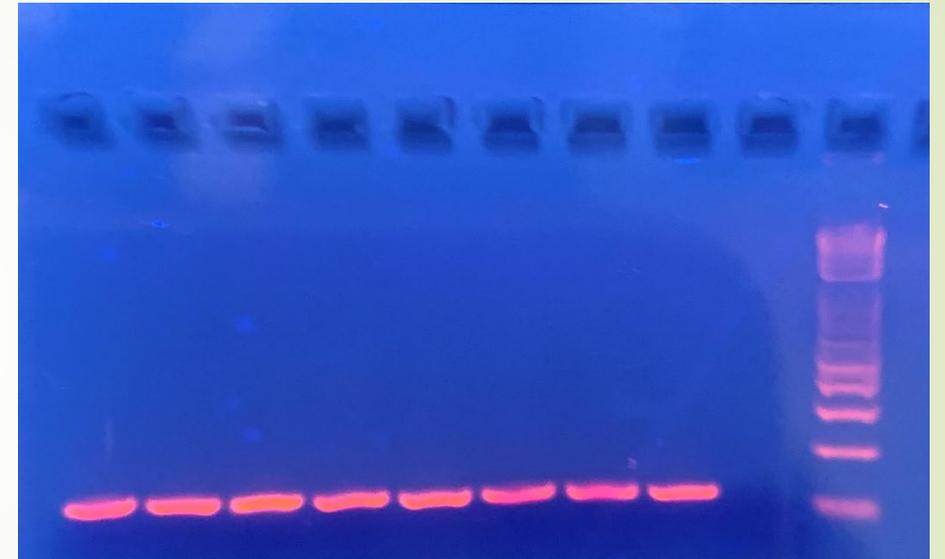
- 1937年
- 分離生物分子
- 瓊脂糖凝膠
  - 從海藻中分離
- DNA帶負電荷，被正極吸引



# 參加障礙賽的DNA



# 如何令DNA看得見？



在紫外光燈下觀察的DNA

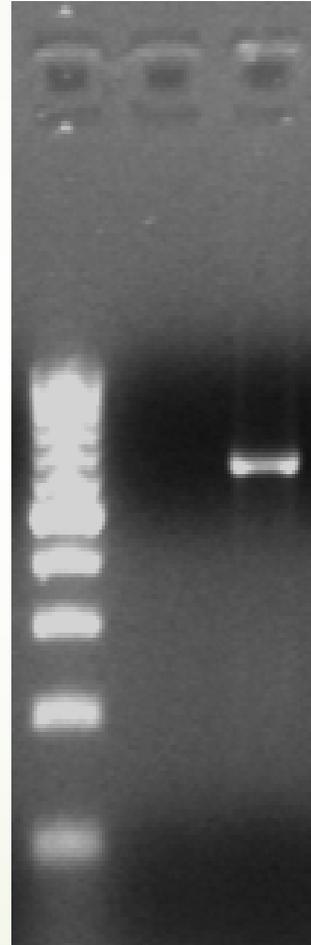


# 電泳圖

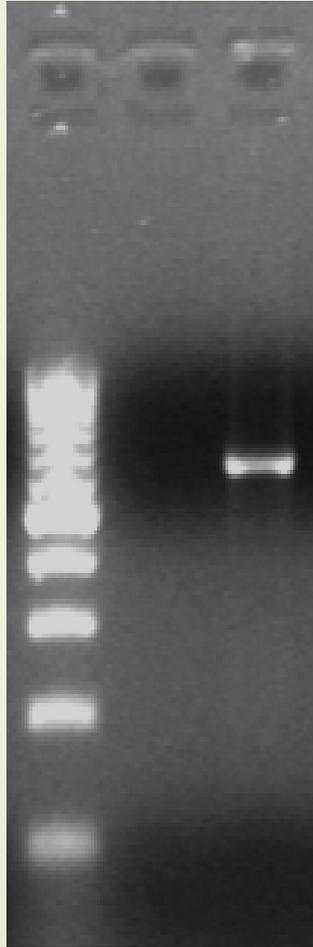
起點

長的DNA

短的DNA



# DNA測序



雖然看到DNA，但不知它的  
DNA序列



## 桑格法DNA測序

- 弗雷德里克.桑格 (Frederick Sanger)
- 唯一一位獲得2次諾貝爾化學獎
- 1955年，將胰島素的氨基酸序列定序
- 獲得了1958年諾貝爾化學獎

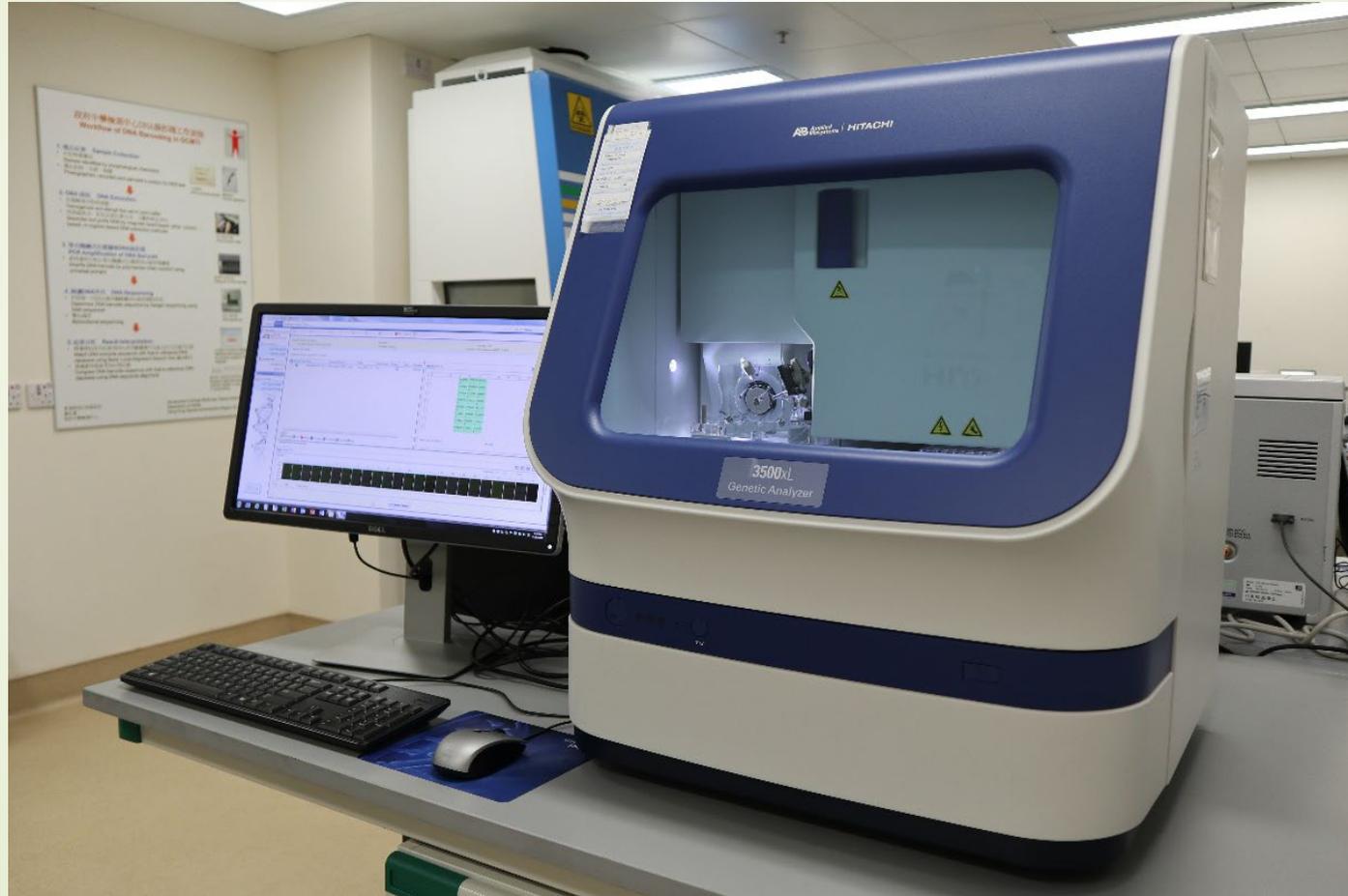


## 桑格法DNA測序

- 1975年，發展出一種叫「桑格法」的DNA測序技術
- 利用電泳讀出DNA序列
- 1980年，再度獲得諾貝爾化學獎
- 1990年代，DNA測序要使用放射性元素，手動操作

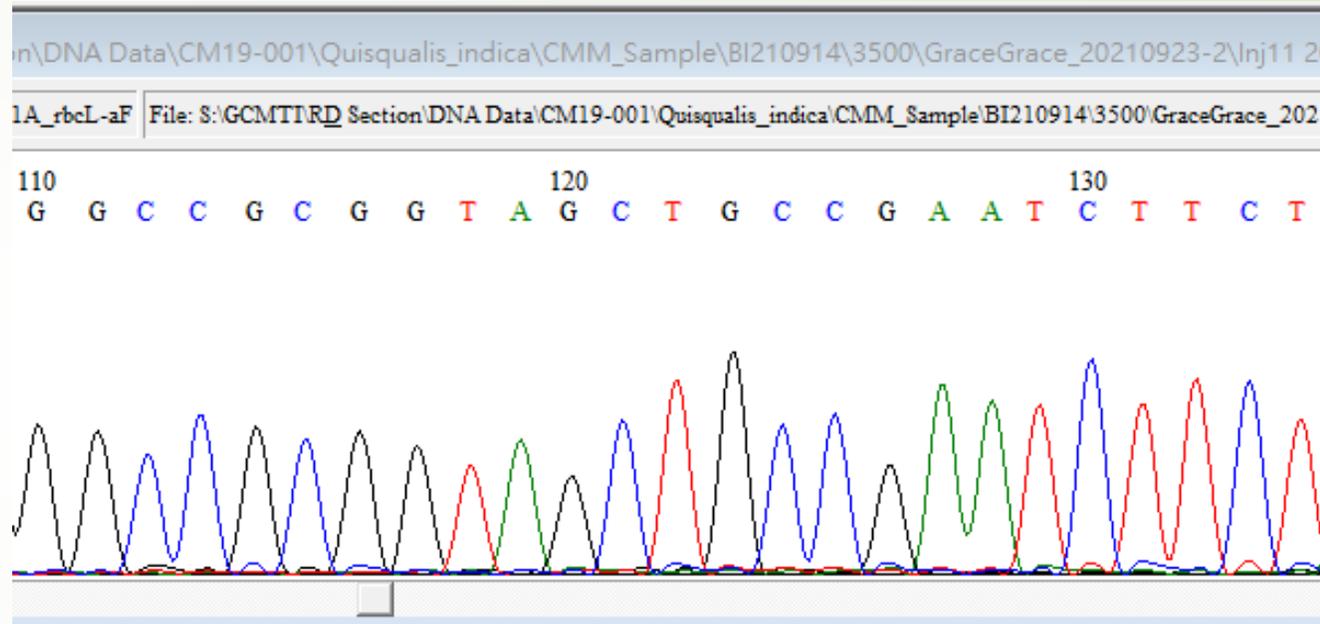


# DNA測序儀



# DNA序列

## 測序儀的數據



文字方式儲存

GGCCGCGGTA.....



## 小結

- 核酸技術用以測試生物的核酸特徵
- 常用的技術有PCR、電泳、DNA測序等

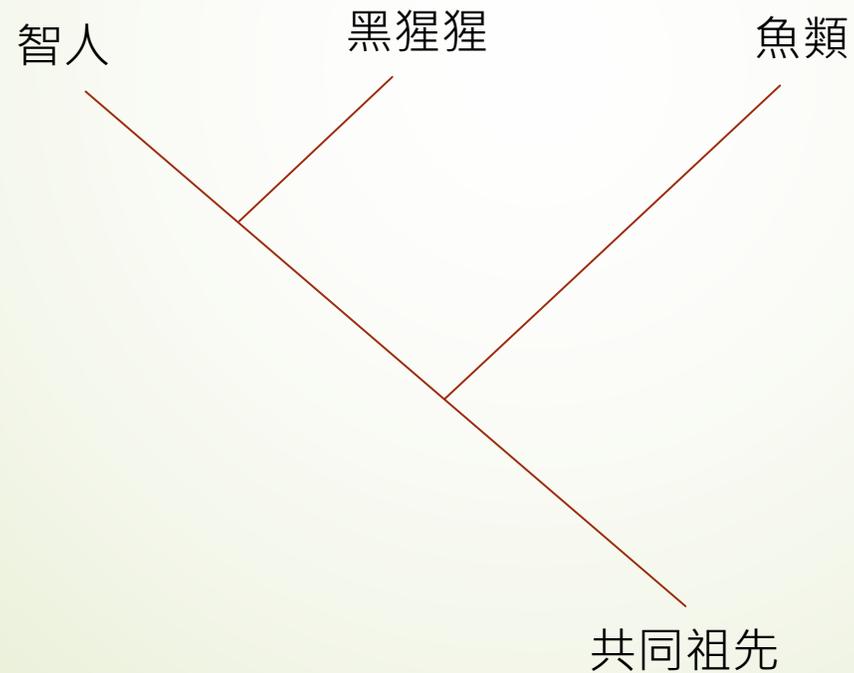


# 核酸檢測方法及應用



# 生物之間的DNA序列差異

- ▶ 外貌特徵差異大的生物，它們之間的DNA序列差異亦大



# 生物的身份

- 生物的DNA訊息量大
- 比對DNA序列，可以區分不同物種
  
- 但 ...



## 問題

- 以人類為例，有超過30億個鹼基對(bp)
- 桑格法每次能測1000 bp 以下
- 將所有鹼基對都進行測序？
  - 人力，時間，金錢
- 若否，應測試那一部份？



## 找尋合適的位置

- 科學家不斷尋找合適的DNA區域
- 區分不同生物品種，例如
  - ITS區域 (約600 bp)能夠有效區分人參和西洋參



人參



西洋參



實驗室A

DNA 區域 **A**  
對於柴胡十分有效!

我試了區域**B**，但對七葉一枝花無效，我打算試試區域**C**。

我們的結果顯示，DNA 區域 **B**可以區別鬼臼和龍膽。

剛接收了一個樣本，應該用區域**A**、**B**還是**C**?...

實驗室B

實驗室D



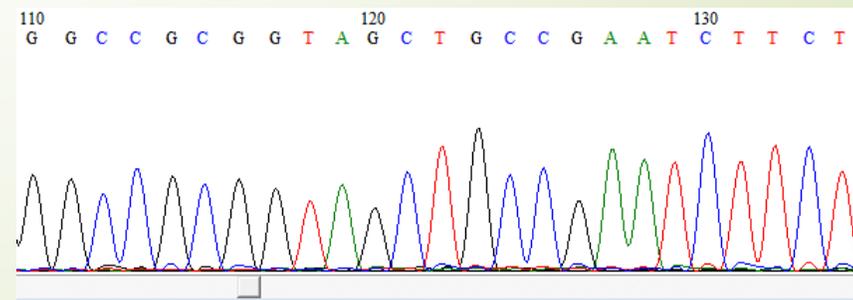
# 條形碼

- 按編碼規則排列的黑條和空白
- 代表商品名等信息
- 條形碼 = 商品



# DNA條形碼

- 2003年
- 加拿大動物學家Paul Hebert，提出以小段DNA片段，為全球生物編碼
- 像商品上的條形碼，生物的條形碼，便是其獨特的DNA序列
- 而這個以DNA序列作為條碼的方法，稱為DNA條形碼



# DNA條形碼

- 利用一段或幾段標準DNA區域
  - 集中資源
  - 資訊交換
- 實現動物、植物和真菌物種的快速鑒定
- 物種鑒定發展的大趨勢

大家都用區域A吧

實驗室A

實驗室C

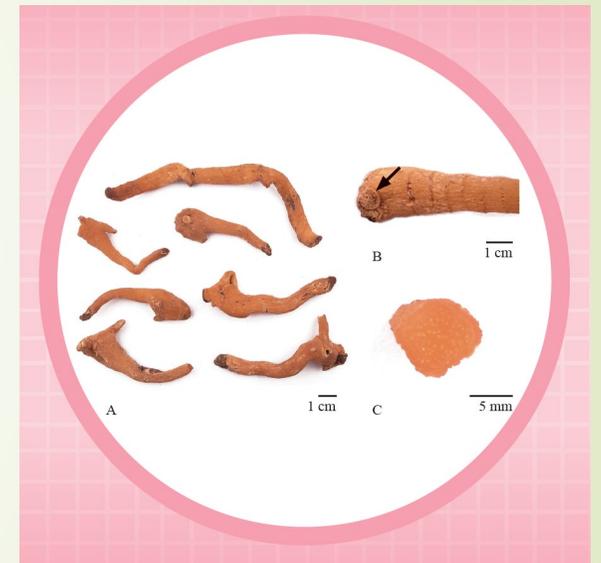
實驗室B

實驗室D



# DNA序列參考數據

- 等於藥材的圖鑑
- 由已確定來源的標本，所產生的DNA序列
- 所比對的是DNA序列
- 從而得知樣本身份



香港藥材標準第10冊 – 黃精外觀圖



# DNA指紋圖譜

- ➔ 無需進行DNA測序
- ➔ 找出生物之間的差異

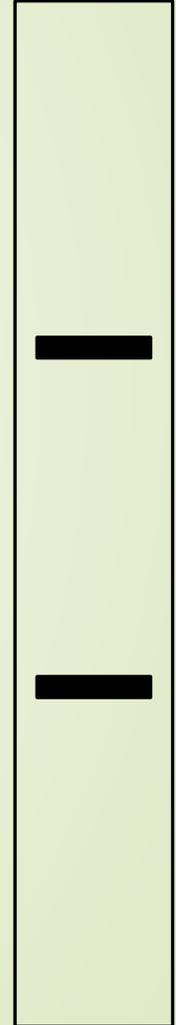
罪案現場



疑犯A



疑犯B



# 核酸檢測及應用

- 食品
- 環境鑒測
- 鑑證
- 醫療衛生



## 食品 – 基因改造食物

- 大豆、木瓜、香蕉
- 將其它生物的DNA，插入被改造生物之中
- 具有其它生物的功能
  - 抵抗病毒及虫害
  - 含豐富維他命A的香蕉



## 食品－食物致敏物

- 含致敏物的食物，例如
  - 麩質、奶類、蛋類、花生、甲殼動物、大豆、魚
- 無醫治方法
- 患者應避免進食含致敏物的食物



# 環境鑒測



# 醫療衛生

- 2019冠狀病毒檢測
- 反轉錄聚合酶連鎖反應(RT-PCR)
- PCR技術的其中一種
- 可以檢出病毒量



## 小結

- 隨著DNA技術的進步，亦發展出多種檢測方法，例子有DNA條形碼、DNA指紋圖譜
- DNA檢測技術應用於食品安全、環境監測、鑑證、醫療衛生等範疇，與大眾息息相關



# DNA鑒別技術在中藥材的應用



# DNA鑒別技術適用範圍

## ➤ 植物類

➤ 根、莖、花、果、葉、種子等

## ➤ 動物類

➤ 角、肉、血、皮、毛、鱗片等

## ➤ 真菌

➤ 菌絲體、子實體、孢子、複合體



# DNA鑒別技術特點

- 分辨能力強
- 生物各部位的DNA訊息一致
- 品種混雜、多來源品種的中藥材
- 沒有獨特化學成分標記的中藥材



## DNA鑒別技術的限制

- 無法作中藥材的品質評估
- 不適用於礦物類中藥材
- 不能分辨部位
- 相對其他鑒別方法，操作步驟較多



# 中藥基源品質管理

- 作為起始物料作的鑒別手段
  - 鑒別半加工原料 (失去外型特徵、藥材粉末)更顯優勢
  - 磨粉後製成的膠囊劑
- 鑒別多基源的中藥材，有助符合國外的註冊要求
  - 多基源中藥材含有多於一個植物品種，例如黃連(*Coptis chinensis*), 三角葉黃連(*Coptis deltoidea*)



# 中藥基源品質管理

- 容易混淆
  - 洋金花(*Datura metel*)
  - 鬧羊花 (*Rhododendron molle*)
- 無獨特化學成分標記的中藥材
  - 動物藥，例如鹿茸



# 全球DNA測試發展趨勢

- 英國藥典2017版補充章節
  - 聖羅勒
  - 黃柏、關黃柏
- 美國藥典2014
  - 指導原則作為補充方法



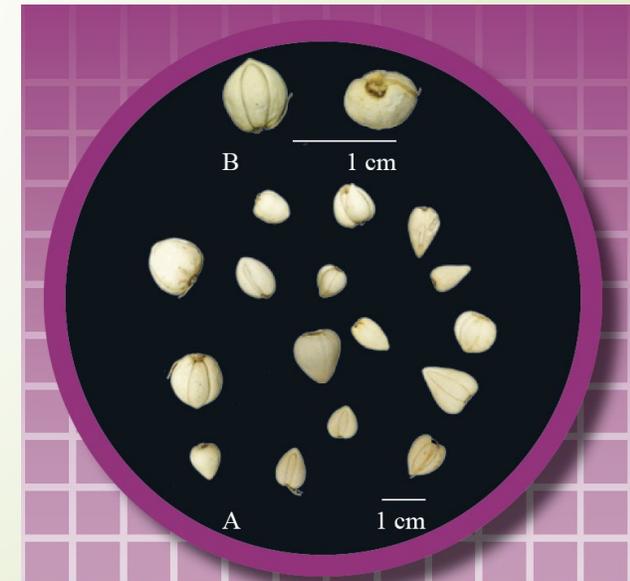
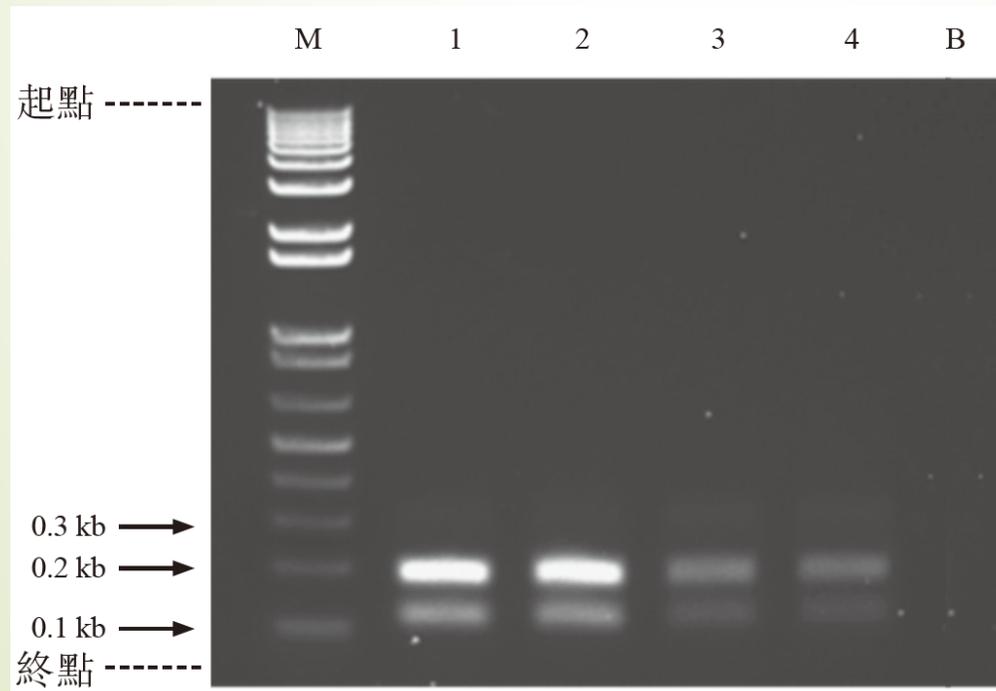
# 全球DNA測試發展趨勢

- 中華人民共和國藥典(中國藥典)2010版，首次發佈DNA指紋圖譜方法
  - 烏梢蛇
  - 蕪蛇
  - 川貝母
- 2015, 2020 版第四部
  - 9107 中藥材DNA條碼分子鑒定法指導原則



# DNA檢測中藥材例子 – 名貴藥材

- 香港中藥材標準第7冊
- 川貝母鑒別方法



## DNA檢測中藥材例子 – 有毒混淆品

- 川木通、木通、關木通
- 關木通為馬兜鈴科植物東北馬兜鈴
- 含有馬兜鈴酸
  - 腎毒性和致癌
- 關木通混淆木通出售
- 採用PCR-RFLP技術區分



# DNA檢測中藥材例子 – 動物類

- 蛇類
- 中國藥典
  - 金錢白花蛇(來源為銀環蛇)
  - 烏梢蛇 (來源為烏梢蛇)
  - 蕪蛇 (來源為五步蛇)
- 摻雜品十分多，包括
  - 赤鏈蛇、金環蛇、紅點錦蛇、王錦蛇、三索錦蛇、灰鼠蛇、山烙鐵頭等
- 利用CYTB測序，將正偽品區分



## DNA檢測中藥材例子 – 動物類

- 鱷魚肉、蛇、五爪金龍
- 大眾相信鱷魚肉對哮喘有幫助
- 2006年，香港中文大學對市面11份鱷魚肉乾進行DNA測序
  - 只有1份是鱷魚肉
  - 其餘是蜥蜴肉或蛇肉



# 其它藥材例子 (1)

## ➤ 根類

- 八角蓮與鬼臼、大戟、大黃、山藥、升麻、龍膽、百合、百部、紅景天、骨碎補、黨參、前胡、黃連 ...

## ➤ 果實種子類

- 八角茴香、五味子與南五味子、化橘紅與佛手、巴豆與毛巴豆、吳茱萸與山茱萸、梔子、蛇床子、砂仁、天花粉 ...

## ➤ 莖木皮花葉類

- 肉桂、杜仲、刺五加、鉤藤、紅花、西紅花、艾葉、桑葉與桑白皮、淫羊藿 ...



## 其它藥材例子 (2)

### ➤ 全草類

- 廣藿香與藿香、青蒿與茵陳、石斛與鐵皮石斛、魚腥草、細辛、穿心蓮、益母草、紫花地丁...

### ➤ 真菌類

- 冬蟲夏草、細曲、靈芝

### ➤ 動物類

- 阿膠、海馬、蛤蚧、蜈蚣、塞隆骨、麝香...



## 政府中藥檢測中心

- 政府在2015年的施政報告中宣佈決定籌劃一所由衛生署管理的中藥檢測中心。
- 中心現已命名為「政府中藥檢測中心」（「檢測中心」），專責中藥檢測科研，為中藥安全、品質及檢測方法建立國際認可的參考標準。
- 待永久的政府中藥檢測中心大樓興建之前，衛生署已在香港科學園設立臨時中心，並已於2017年3月起分階段運作。



## 政府中藥檢測中心

- 政府中藥檢測中心致力提倡以多學科鑒別手段來識別中藥材，因此政府中藥檢測中心內設有多個高科技及具國際水平的實驗室，可以開展中藥的高端科技研究及制訂檢測方法
- 檢測方法供大眾及相關業界免費參考使用



# 政府中藥檢測中心的DNA設施



# 政府中藥檢測中心的其他設施

## 性狀及顯微鑒別實驗室



## 中藥標本館



## 化學實驗室



## GCMTI 的DNA研究計劃

- 以DNA技術作為鑒別鹿茸的互補檢測方法
- 建立中藥材參考DNA序列庫
- 透過計劃，共開發了3個DNA檢測方法
- 詳情可參閱以下連結：

[https://www.cmro.gov.hk/html/b5/useful\\_information/gcmti/research/index.html](https://www.cmro.gov.hk/html/b5/useful_information/gcmti/research/index.html)



# 「動物類中藥材的DNA條形碼檢測方法」



## 特點

- 建立及確認動物類藥材的DNA條形碼檢測法及品質控制系統
- 已完成兩個鹿茸正品品種的參考DNA條形碼序列
- 為鑒別鹿茸提供更全面的參考依據

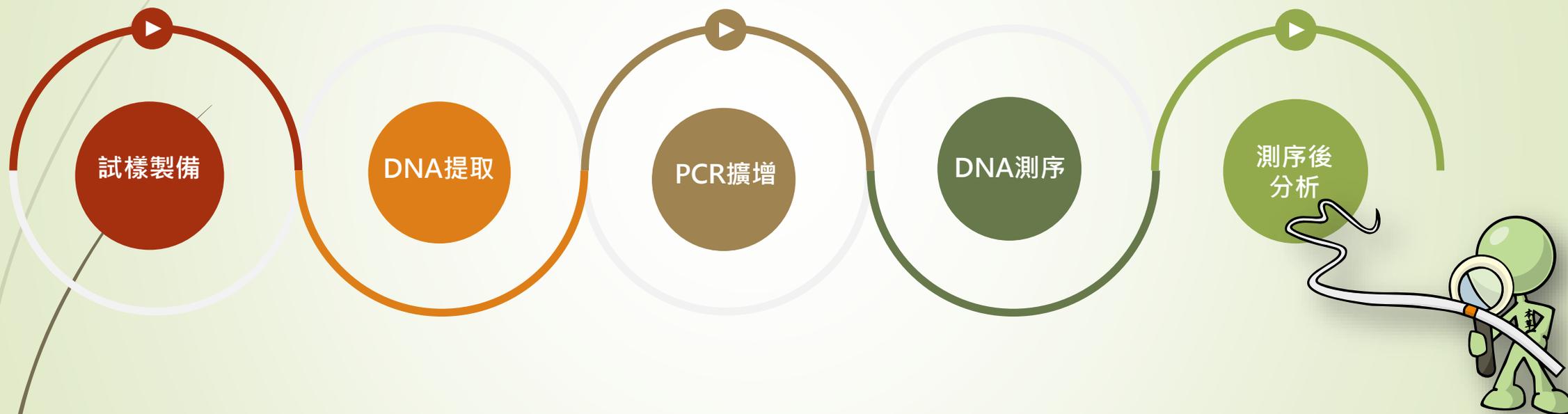


# DNA條形碼分子鑒定法

- DNA條形碼分子鑒定法是利用基因組中一段公認的、相對較短的DNA序列來進行物種鑒定的一種分子生物學技術
- 方法中提供的動物類DNA條形碼包括
  - COI
  - CYTB
  - 16S rRNA



# 方法步驟



# 操作流程 - DNA提取

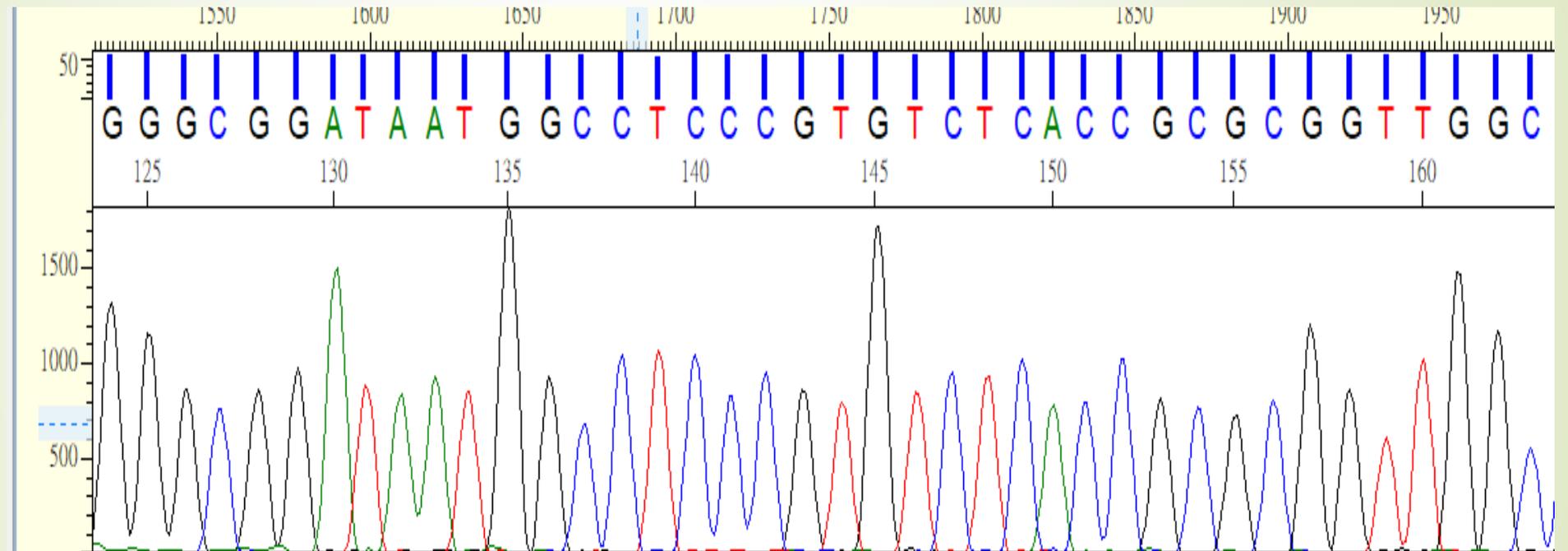
樣本前處理 → 樣本粉抹 → 樣品裂解液 → 恆溫混勻 → 分離溶液及組織

自動化DNA提取

珠子吸附 → 漂洗 → 磁力分離 → 純化DNA

# PCR擴增DNA條形碼









## Reference DNA Sequence

## Animal Part

## DNA Information

## Mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I (COI)

Batch ID. BI191203

```
>RD374-C_COI
TACTCTGTACTACTATTTGGTGCTGAGCAGGCATAGTAG
GAACAGCCTTAAGCCTACTGATTCGTGCCGAACCTGGCCA
ACCTGGTACTCTGCTTGGAGATGATCAAATTTATAAGTTA
TCGTAACCCGACATGCAATTCGTAATAATTTCTTTATAGTT
ATACCAATTATAATCGGAGGATTTGGTAATTGACTAGTTCC
CCTAATAATTTGGTGCCCGGACATAGCAATTCCTCGAATAA
ACAATAAAGCTTTTACTCCTCCCTCCTTCTTTCTTACTAC
TTTTAGCATCATATAGTTGAAGCTGGCGCAGGAACAGG
CTGAACCTGTATATCCCTCTAGCTGGCAACTTAGCTCAGC
CAGGGGCTTACAGTAGACCTGACCAATTTTCTTTACACTTG
GCAGGTGCTCCTCAATTCAGGGGCCATTAACCTTTATTAC
AACAAATTAATATAAAACCCCTGCCATATCACAAATATC
AAACCCCTCTATTCTGGTGATCCGTAATTAGTCACTGCTGTA
CTACTACTTCTACTCCTCGTACTAGCAGCCGGAATCAC
AATACTATTAACAGACCGAAACCTAAATAGAACCTTTTGG
ACCCAGCAGGAGGCCGAGATCCTATCTATATCAACACTT
GTT
```

## Mitochondrial cytochrome b (CYTB)

Batch ID. BI191203

```
>RD374-C_CYTB
AGGAGCAACAGTCATCACCAACCTCCTCTCAGCAATTCAT
ATATTGGCACAAACCTAGTCGAATGAATCTGAGGAGGCTT
TTCAGTAGATAAAGCAACCTTAACCCGATTTCTCGCTTTCC
ACTTTATCTTCCATTATCATCGCAGCACTGCTATAGTA
CACTTACTCTTCTCAGGAGCAGGATCCAAACACCCCAAC
AGGAATCCATCGGACCGGACAAAATCCCTTCCATCCTT
ACTACACTATTAAAGATATCCTGGGTATCTTACTTCTAATA
CTCTTCTAATATTACTAGTATTATTCGCCACGACCTGCTT
GGAGATCCAGACAACTATACCCGAGCAATCCACTCAACA
CACCCCTCACATCAAACCTGAATGATACTTCTATTGGCA
TACGCAATCCTA
```

## Mitochondrial 16S ribosomal RNA (16SrRNA)

Batch ID. BI191203

```
>RD374-C_16SrRNA
TGTTYTYTAAATAGGGACTTGTATGAATGGCCMCMCGAGG
GTTTACTGTCTCTTACTTCCAATCAGTGAAATGACCTTCC
CGTGAAGAGGCGGGAATATATTAATAGACGAGAAGACCC
TATGGAGCTTAACTACTAGCCAAAAGAAACAATTTTC
ATTAATAAGGAAACAACAACACTTTTATGGGCTAACAGC
TTTGGITGGGGTGACCTCGGGAACAAAGAAATCCTCCGAG
CGATTTAAAGACTAGACCTACAAGTCAATCACACAATC
GTTTATTGATCCAAAATAAATTTGATCAACGGAAACAAGT
TACCTTAGGGATAACAGCGCAATCCTATTCAAGAGTCCAT
ATCGACAAATAGGGTTTACGACCTCGATGTTGGATCAGGAC
ATCCCGATGGKGAACCCGCTATCAAAGGTTCTGTTGTTCAA
CGATTAAGT
```

Remarks: observations at nucleotide positions 5, 7, 33, 35 and 413

## Reference Detail

Description of reference material	Hair of <i>C. nippon</i>
Scientific name	<i>Cervus nippon</i> Temminck
Laboratory number	RD374
Sample mark	RD374-C
Locality	Xingcheng, Liaoning Province, China
Authenticated	Yes
Remarks	16S: 5Y, 7Y, 33M, 35M, 413K

## Image



「利用特異性聚合酶鏈式反應區分兩種真  
品鹿茸的物種」



## 特點

- 區分鹿茸飲片正品品種梅花鹿和馬鹿的篩選方法；
- 經驗證的篩選方法；
- 採用特異性-聚合酶鏈式反應技術；
- 操作較易無需進行DNA測序；
- 測試成本較低



梅花鹿 *C. nippon*



馬鹿 *C. elaphus*



# 鹿

- 全身是寶
- 根據《中華人民共和國藥典》，以鹿入藥的計有鹿角、鹿茸、鹿角膠，和鹿角霜四種藥材
- 市面上還有鹿尾羴、鹿鞭、和鹿筋等製品
- 當中以鹿茸最名貴



## 鹿茸

- 鹿科雄鹿未骨化密生茸毛的幼角
- 具壯腎陽、益精血、強筋骨等功效
- 根據《中醫藥條列》（第549章）及《中國藥典》2015年版，鹿茸的來源物種為梅花鹿和馬鹿
- 鹿茸屬名貴藥材，需求大而產量有限，因此偽品常見於市場
- 根據一些鹿茸的研究報告及文獻記載，部份鹿茸製品實際來源自馴鹿、水鹿



## 現時的鹿茸鑒別方法

- ▶ 性狀鑒別法可快速準確地鑒別鹿茸原藥材
  - ▶ 但亞洲地區出售的鹿茸大都會切成飲片，因失去了明顯性狀特徵所以較難作出判別



# 現時的鹿茸鑒別方法

- 化學手段
  - 受測藥材必需含有獨特的化學標識物
- 動物類藥材大多成份相近
- 根據中國藥典，甘氨酸是測定鹿茸的薄層色譜的標識物
- 甘氨酸普遍存在於各種生物
  - 未必能區分梅花鹿和馬鹿

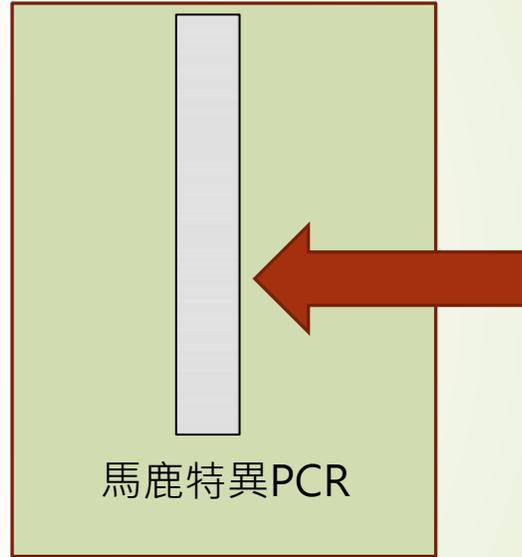
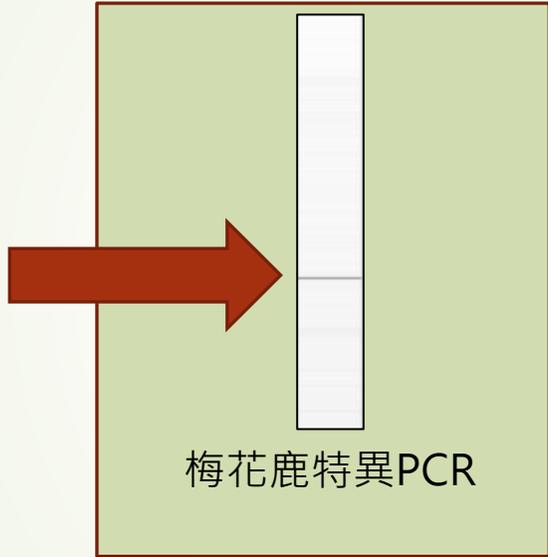


# 以DNA技術作為鑒別鹿茸的互補檢測方法

- 開發用於鑒別鹿茸飲片的脫氧核糖核酸(DNA)檢測方法
- 解決現時中藥業界未能有效鑒別鹿茸飲片的問題
- 讓業界識別及避免買賣貨源有問題的產品，保障業界聲譽和利益



# 原理



梅花鹿



# 方法步驟

樣本製備

提取DNA

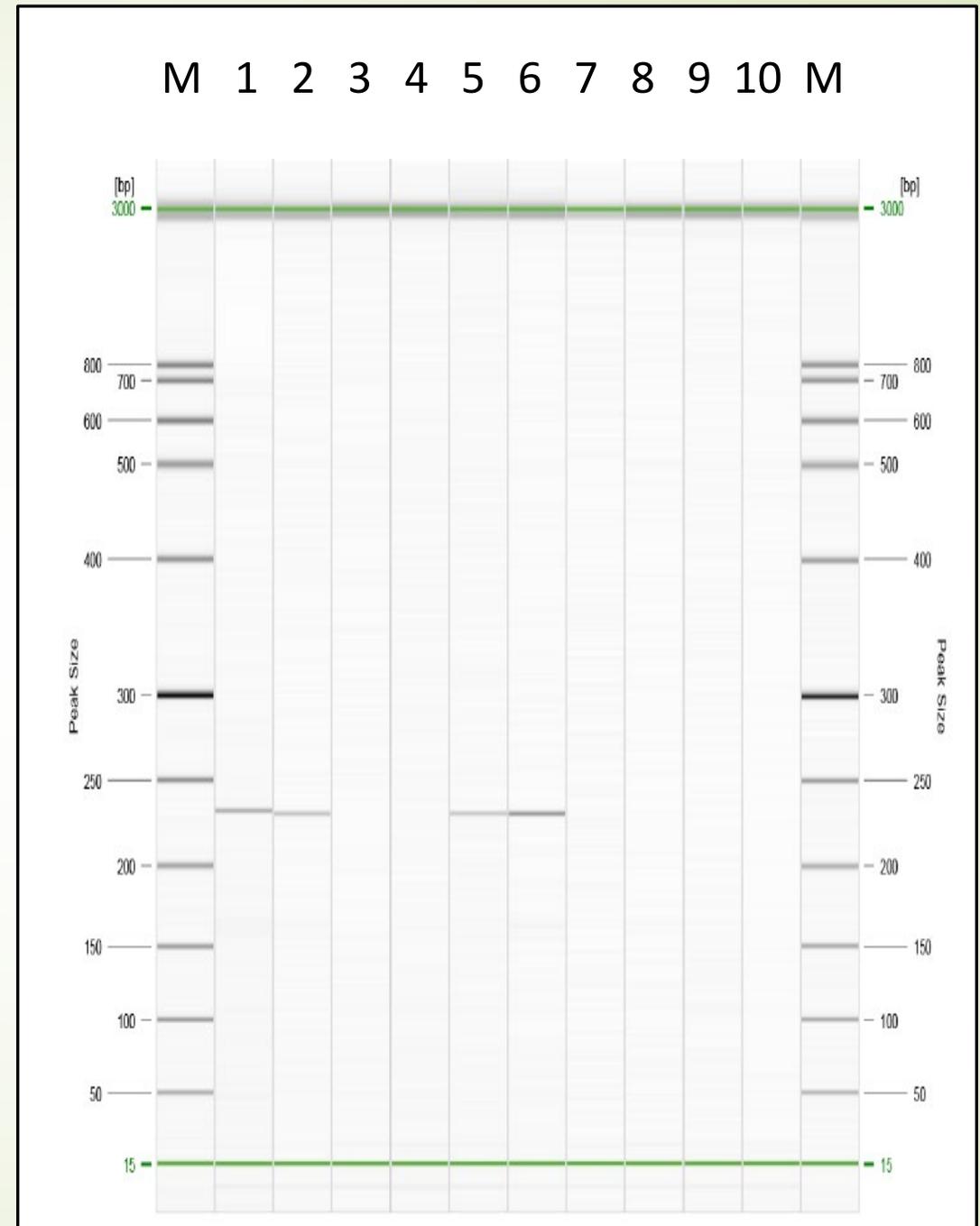
PCR擴增

電泳圖譜分析



# 電泳圖例子

- 1-2: 梅花鹿樣品
- 3-4: 馬鹿樣品
- 5-6: 梅花鹿提取陽性對照
- 7-8: 提取陰性對照
- 9-10: PCR陰性對照
- M: DNA ladder



# 可檢測其他鹿產品嗎？



鹿茸



鹿鞭



鹿筋



鹿角



鹿腿肉



鹿成份湯包  
(鹿筋)



# 會認錯其他動植物嗎？

類別	品種
其他鹿類	水鹿、馴鹿、麋鹿、白唇鹿
其他動物	水牛、家牛、綿羊、豬、雞、大頭鱈魚、歐洲無鬚鱈、綠青鱈、大西洋鱈、
植物	刺五加、馬鞭草、野葛
真菌	靈芝



# 怎樣選擇合適的檢測方法?

方法	優點	適用
特異性PCR	簡單、快速、不需要進行DNA測序	初步篩選樣本是否梅花鹿或馬鹿
動物類藥材的DNA條形碼檢測法	利用DNA條形碼數據，可得出更多鑒別信息	進一步確定來源物種 (梅花鹿或馬鹿)



## 總結

- DNA是生命的藍圖，透過測試生物的DNA特徵以識別來源品種
- 隨著DNA技術的進步，已發展出多種DNA檢測方法，例如DNA條形碼、DNA指紋圖譜等，與大眾生活息息相關
- 多國藥典亦已採納DNA檢測方法作為草藥/中藥材的補充方案
- 政府中藥檢測中心開發中藥材的DNA檢測方法，供大眾及相關業界免費參考使用



謝謝