

動手「毒」理科 - STEM抗毒教育計劃

DNA物種鑑定



香港青年協會
the hongkong federation of youth groups

創意教育組
Creative Education Unit



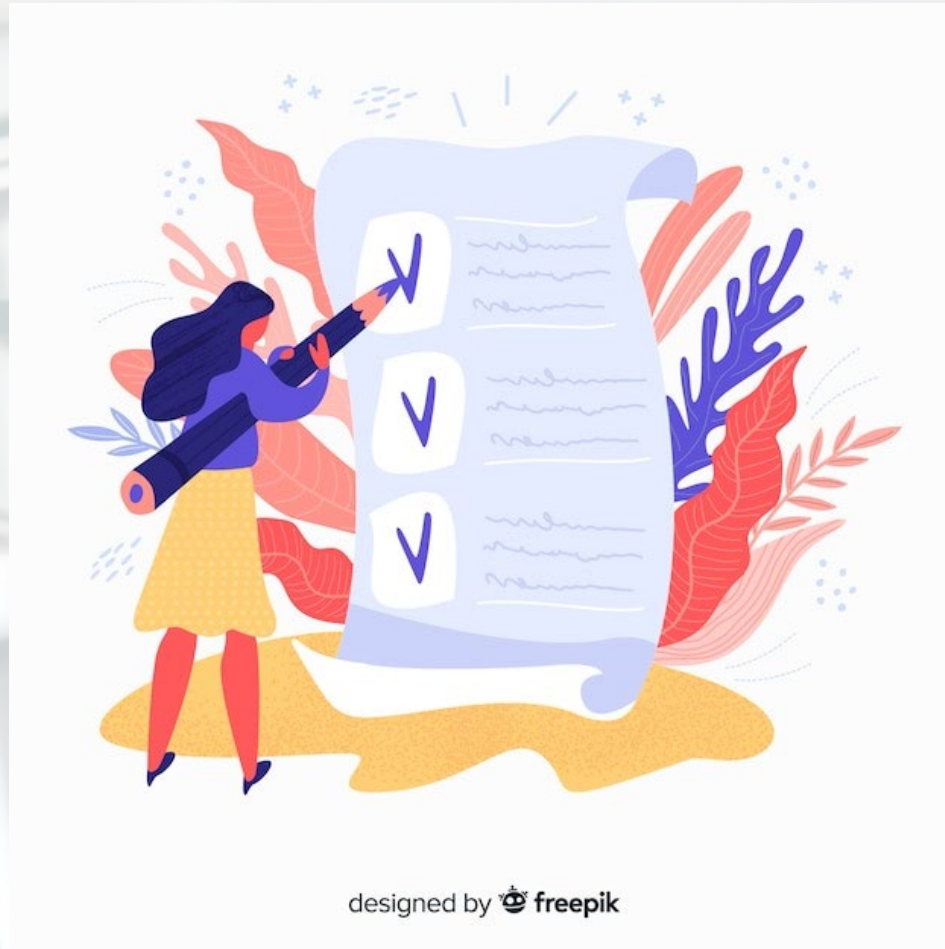
保安局禁毒處
求助/諮詢

186 186

98 186 186



PRE-TEST (前測)



物種鑑定



?

傳統生物分類法

- 二名法 (林奈氏分類法)
 - 例：智人 (*Homo sapiens*)
- 域 Domain、界 Kingdom、門 Phylum、綱 Class、目 Order、科 Family、屬 Genus、種 Species

不同的分類方法

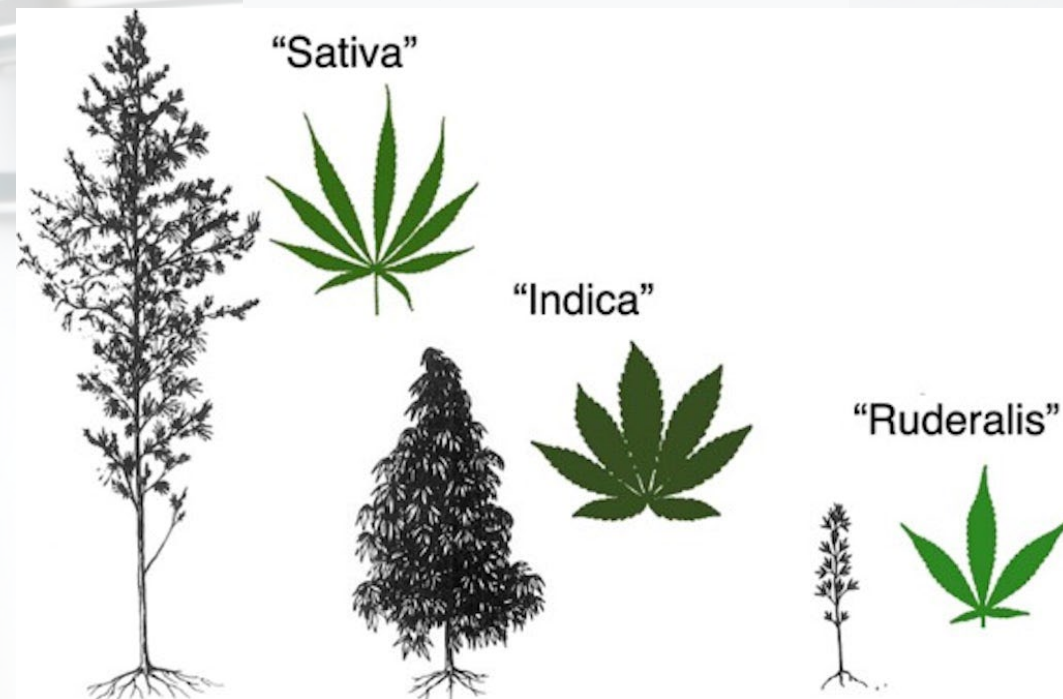
- 傳統：考古學、解剖學、顯微鏡學
 - 缺點：只能憑肉眼分辨，不夠準確
- 現代：DNA排序、氨基酸排序
 - 缺點：無法分析沒有DNA或氨基酸樣本的生物
- 例：普通非洲象 VS 非洲森林象 (圓耳象)



大麻有甚麼品種？



目： 薔薇目 Rosales
科： 大麻科 Cannabaceae
屬： 大麻屬 Cannabis



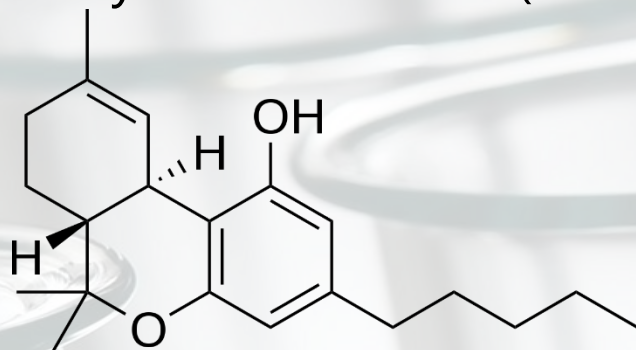
大麻是甚麼？

- 大麻是一種毒品屬於中樞神經迷幻劑，亦是一種鎮抑劑
- 吸食後會產生心跳加快、妄想、幻覺、口乾、眼睛發紅等
- 其中含有兩種大麻素：
 - 四氫大麻酚(THC) 及
 - 大麻二酚 (CBD)

同樣是大麻素...

四氫大麻酚

Tetrahydrocannabinol (THC)



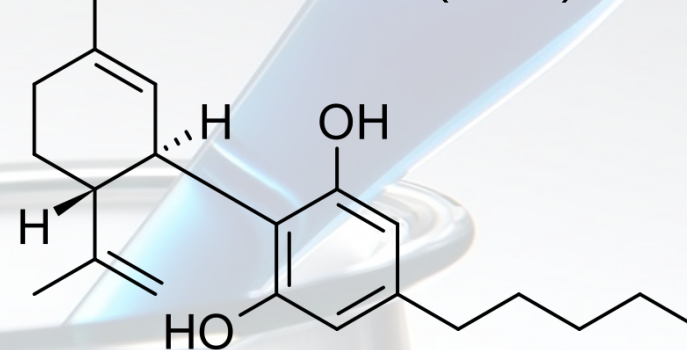
精神活性

濫用對身體的影響

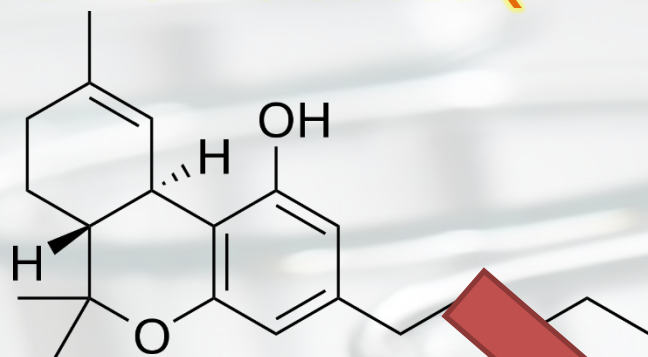
危險藥物 (香港)

大麻二酚

Cannabidiol (CBD)

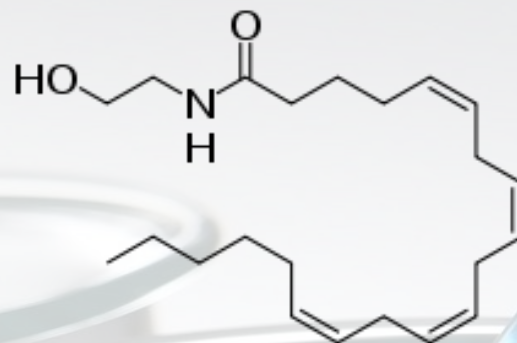
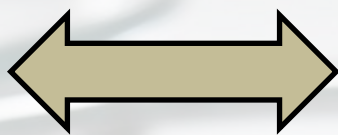


四氫大麻酚(THC) 的精神活性作用

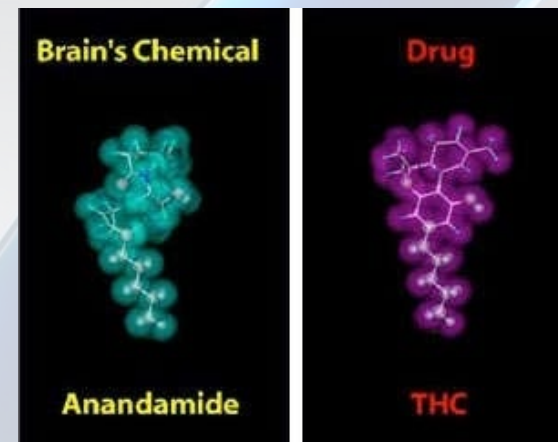


四氫大麻酚(THC)

結構相似



人體中製造的內源性大麻素：
Anandamide



影響一系列大腦功能：

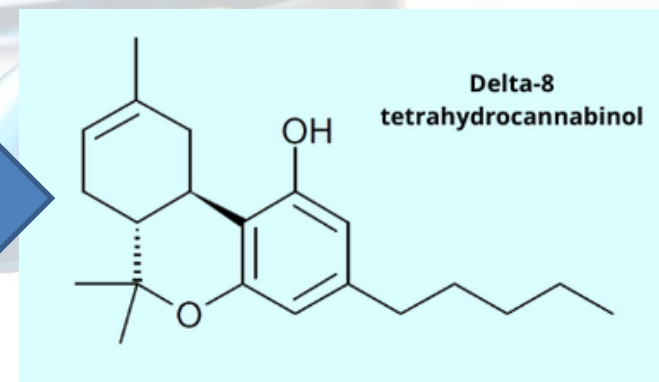
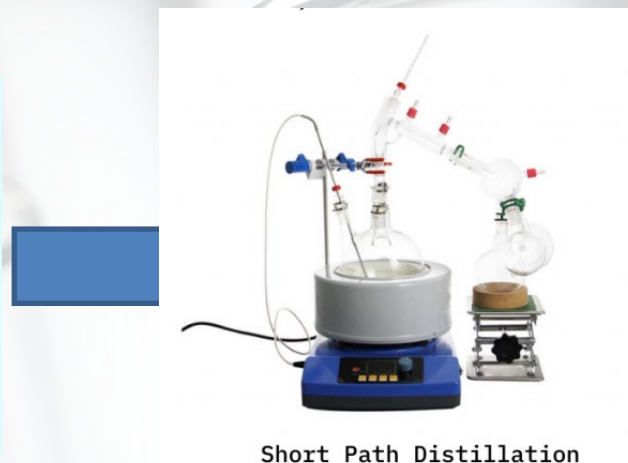
- 認知能力 (幻覺、專注力減少)
- 記憶力下降
- 情緒 (高漲、bad-trip: 焦慮)
- 食慾
- 疼痛感知

有關大麻二酚 (CBD)

- 無精神活性成份
- 只有一款FDA認可之藥物，用於治療癲癇症（沒有在香港上市）
- 舒緩痛症及情緒仍未有完整的科學實證



CBD



Delta-8 THC

CBD可透過化學方法轉化成有精神毒性成份的THC

大麻 = 藥物 = 安全？

- 藥物的治療功能視乎：
 - a) 治療之疾病（舒緩痛症、情緒、治療癌症等未被完全驗證）
 - b) 病人之個人狀況
 - c) 劑量、使用方法及頻率
- ➡ 誤用化學品十分危險



Epidiolex

建議劑量：5-25 mg/kg/day

CBD 服用超過 200 mg/kg/day，有機會引致：

- Cardiovascular damage
- Hepatocellular damage
- Inhibition of P450 systems
- Hormone changes
- Decreased fertility
- ...

危險藥物條例：管有及販運危險藥物

《危險藥物條例》(第134章)附表1第I部列出屬於危險藥物的藥物或物質

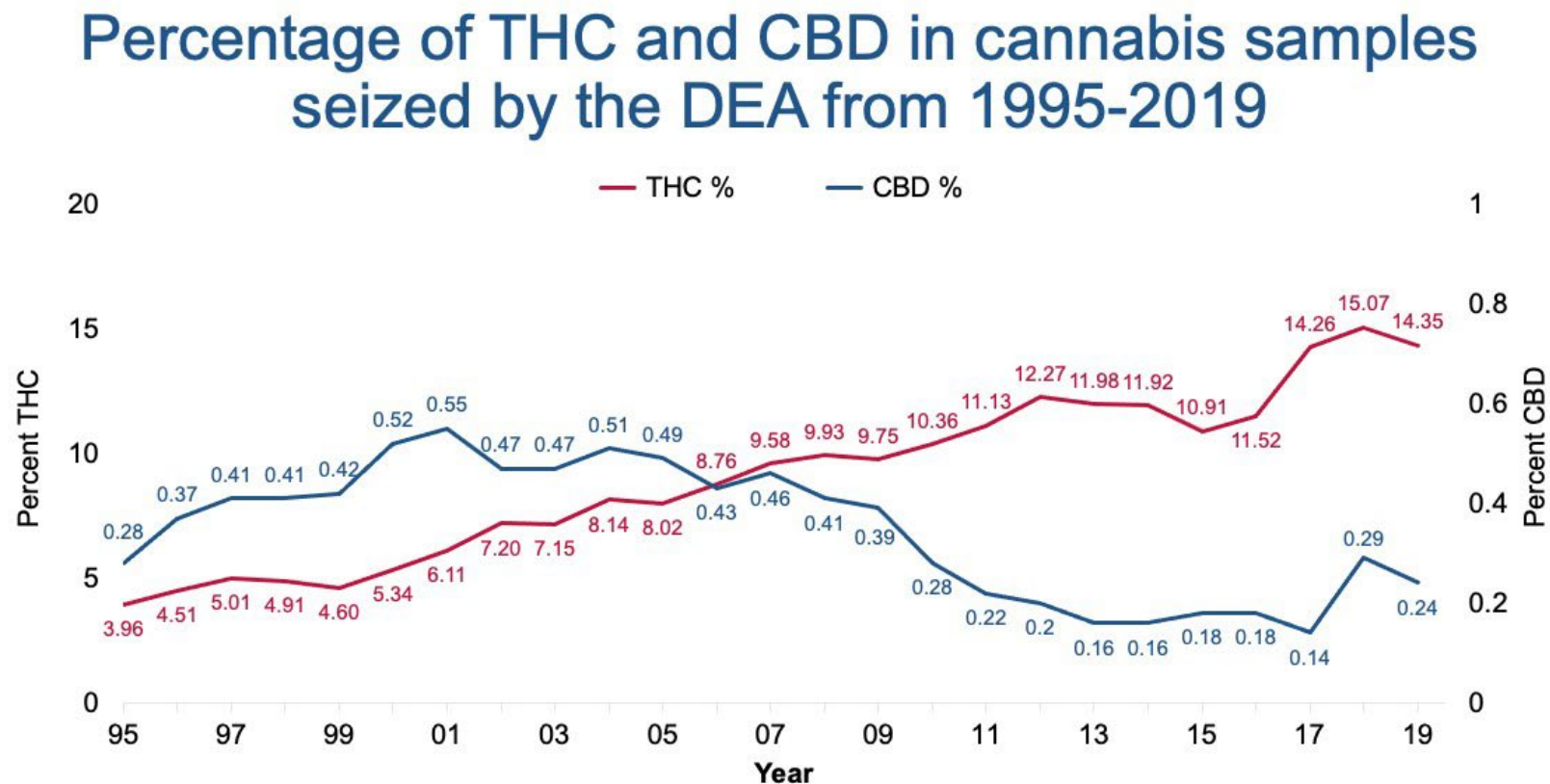
- 大麻(cannabis)指含有四氫大麻酚的任何大麻屬植物或其任何部分，及大麻屬植物的活種子
- 大麻樹脂(cannabis resin)指從任何大麻屬植物獲得的已分離樹脂，不論它是天然或是經過提純
- 大麻二酚(Cannabidiol) (由2022年第199號法律公告增補，2023年2月1日起生效)



常見的CBD產品包括：

- CBD護膚品 (如面霜、面膜)
- 身體清潔 / 護理品(如肌肉舒緩膏、牙膏)
- 口服油/精油
- 食品 (如軟糖、朱古力、啤酒)

大麻 = 天然 = 安全？



根據美國緝毒局(DEA) 按年分析非法大麻中的THC及CBD的含量
→ 人為因素令THC 含量顯著上升

不同品種的大麻有不同份量的大麻素



Cannabis sativa

THC : 較高
CBD : 較低



Cannabis indica

THC : 較低
CBD : 較高



Cannabis ruderalis

THC : 少量
CBD : 高

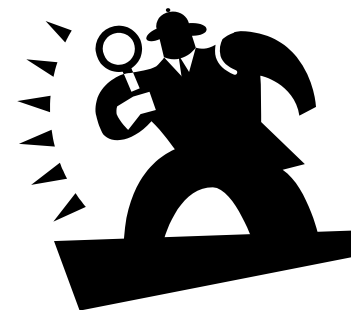
大麻的其他俗稱

- 俗稱：草、牛、花、hash、weed、、



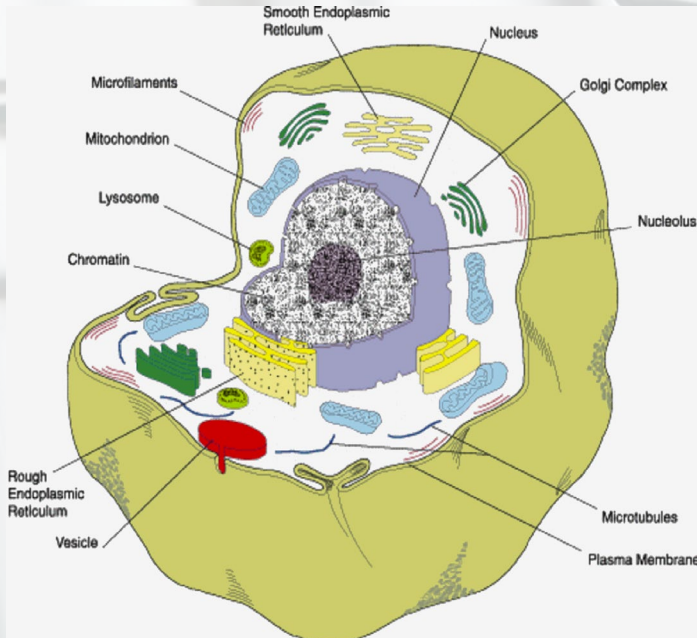
DNA物種鑑定

- 任務一：這是甚麼植物？
- 任務二：這大麻源自同一地區 / 批次？



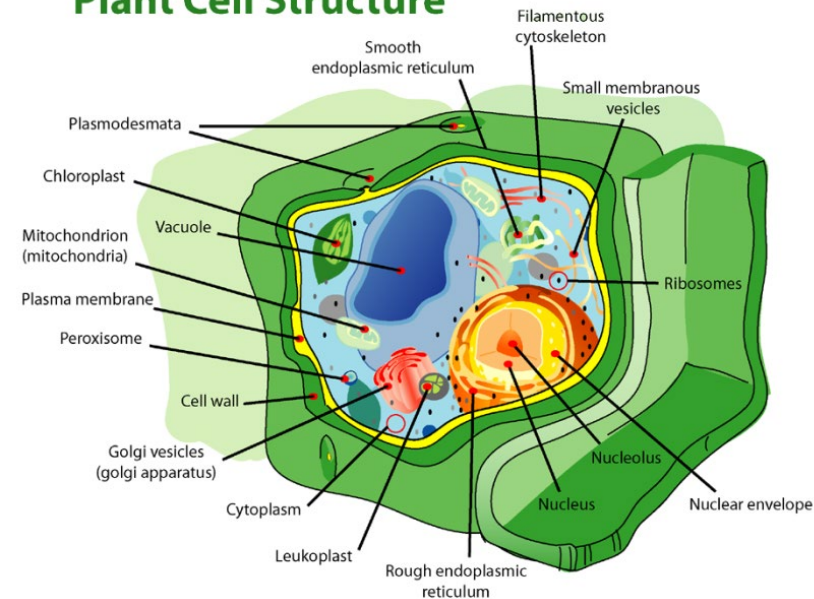
真核生物細胞 (EUKARYOTIC CELL)

- 細胞壁 (Cell wall) ✕
- 細胞膜 (Cell membrane) ✓
- 細胞核 (Nucleus) ✓
- 線粒體 (Mitochondrion) ✓
- 葉綠體 (Chloroplast) ✕



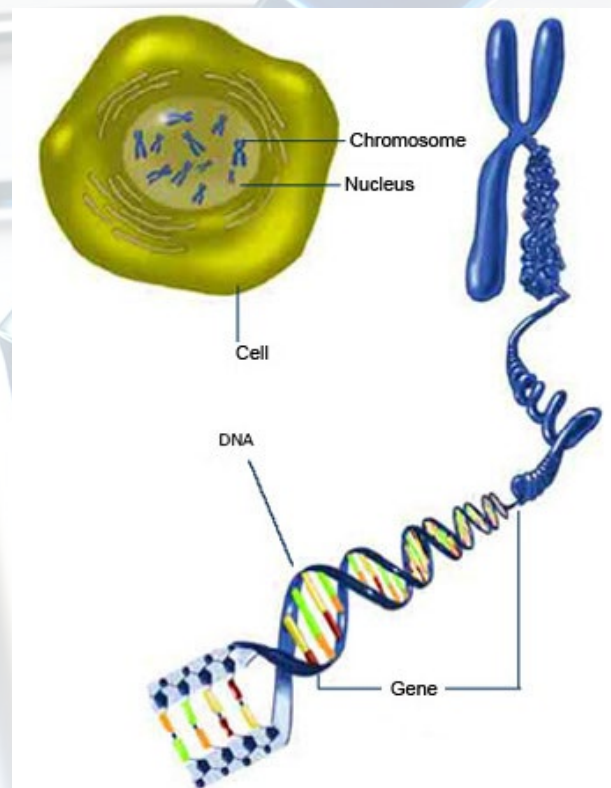
- 細胞壁 (Cell wall) ✓
- 細胞膜 (Cell membrane) ✓
- 細胞核 (Nucleus) ✓
- 線粒體 (Mitochondrion) ✓
- 葉綠體 (Chloroplast) ✓

Plant Cell Structure



DNA

- 細胞核內載有染色體(chromosomes)
- DNA 以染色體的形態存在



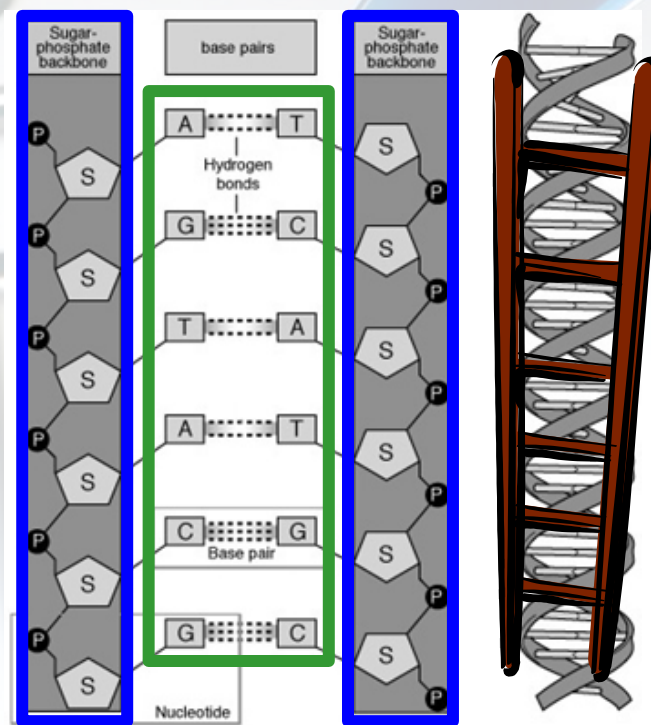
DNA

- 由兩條核苷酸鏈(nucleotides)組成
- 雙螺旋(double helix)



DNA 結構

- 核苷酸(nucleotides)由三種分子所構成
 - 核糖 (deoxyribose sugar)
 - 磷酸 (phosphate group)
 - 帶負電荷
 - 鹼基 (nitrogenous bases)
- 核苷酸的單位
 - basepair (bp)



核苷酸 (NUCLEOTIDES)

Deoxyribose sugar
脫氧核糖

Phosphate group
磷酸基

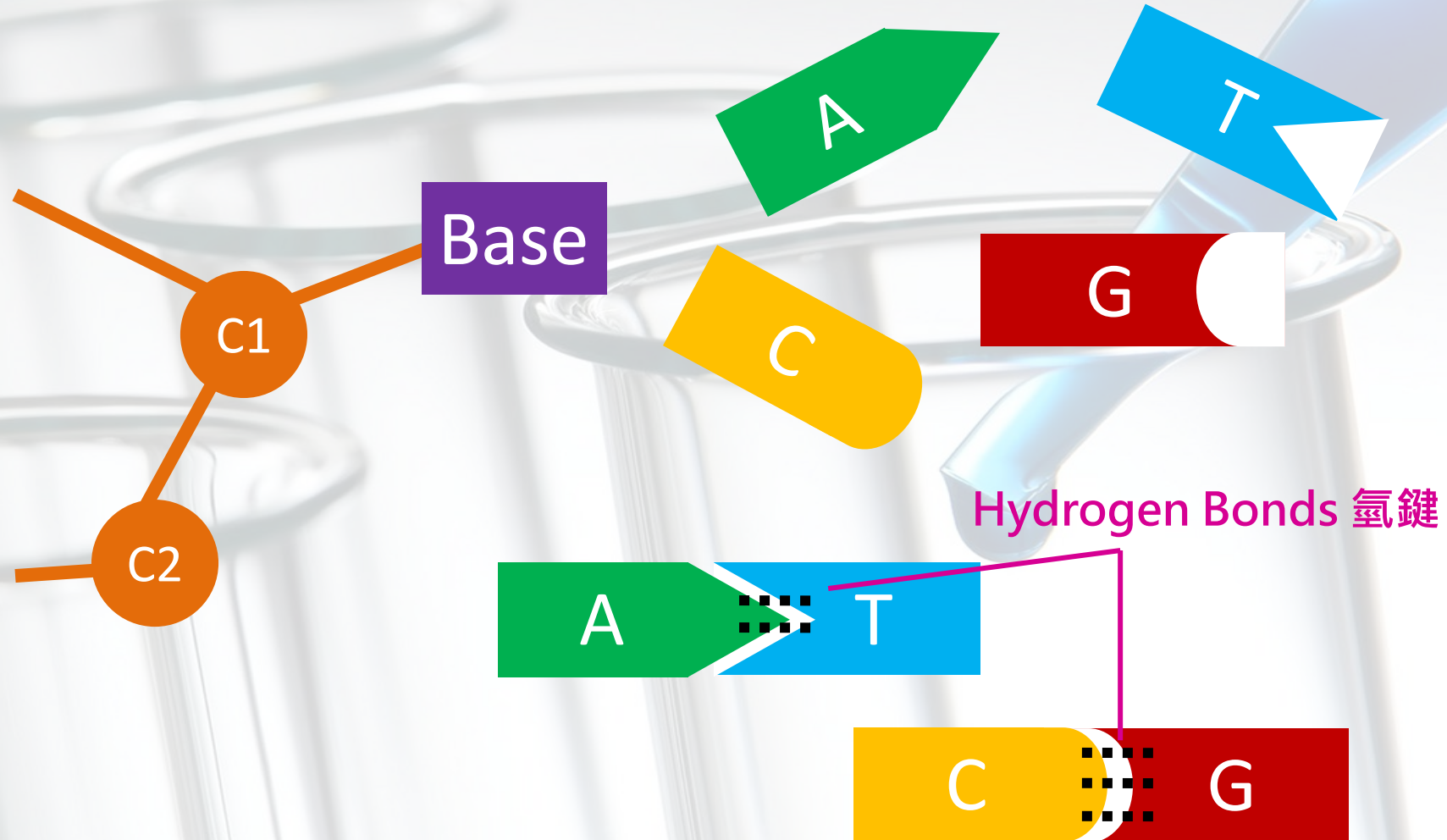
Nitrogenous base
鹼基

Hydroxyl group
羥基



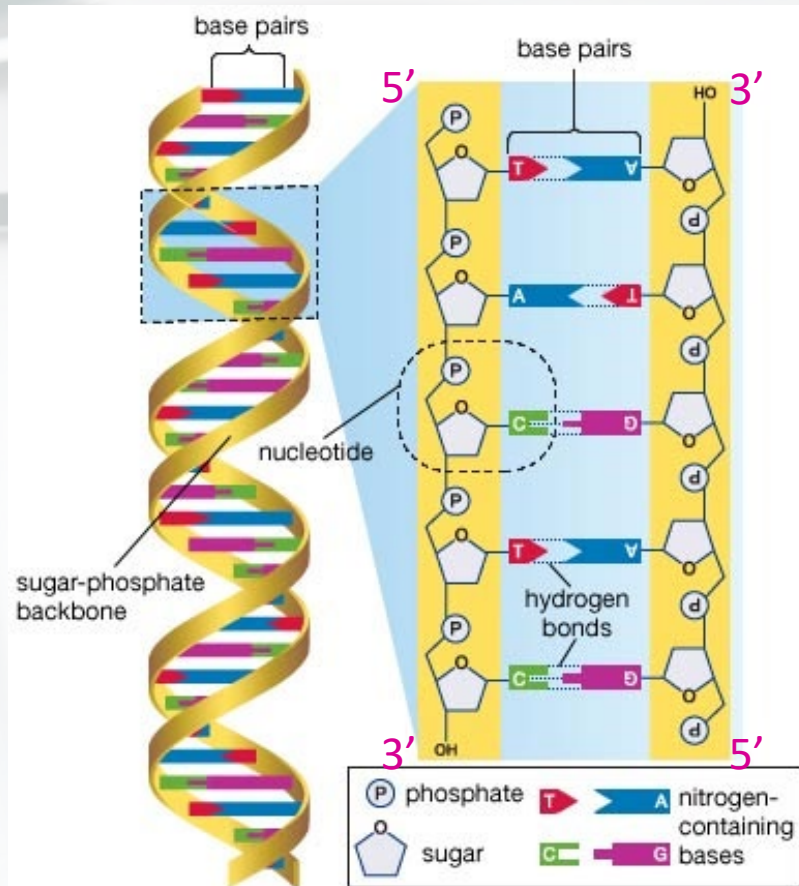
鹼基 (NITROGENOUS BASES)

Adenine(腺嘌呤), Thymine(胸腺嘧啶), Guanine(鳥嘌呤) and Cytosine(胞嘧啶)



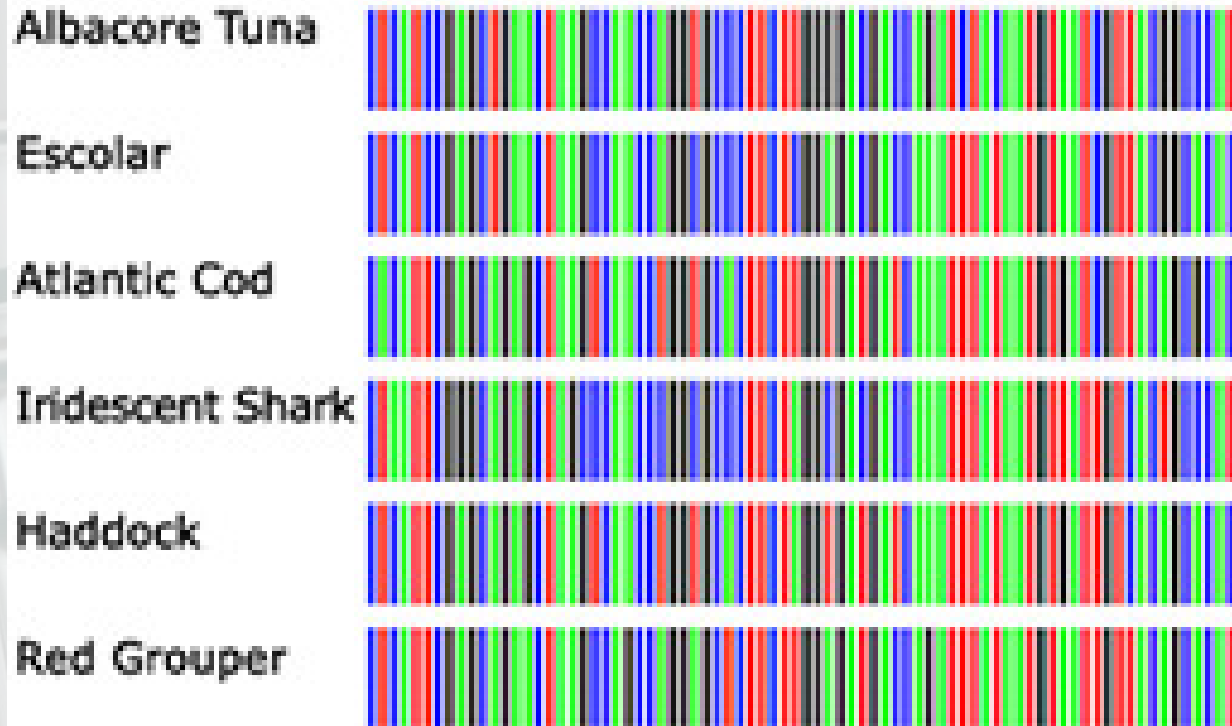
DNA

- DNA序列(DNA sequence)



DNA條碼 (DNA BARCODING)

- 比較不同物種的DNA排序



The screenshot shows the BLAST web interface from the National Library of Medicine. The header includes the NIH logo and the text "National Library of Medicine National Center for Biotechnology Information". A "Log in" button is visible in the top right corner. The main content area is titled "BLAST®" and includes a navigation bar with links for "Home", "Recent Results", "Saved Strategies", and "Help".

The central section is titled "Basic Local Alignment Search Tool" and contains a brief description: "BLAST finds regions of similarity between biological sequences. The program compares nucleotide or protein sequences to sequence databases and calculates the statistical significance." A "Learn more" link is provided.

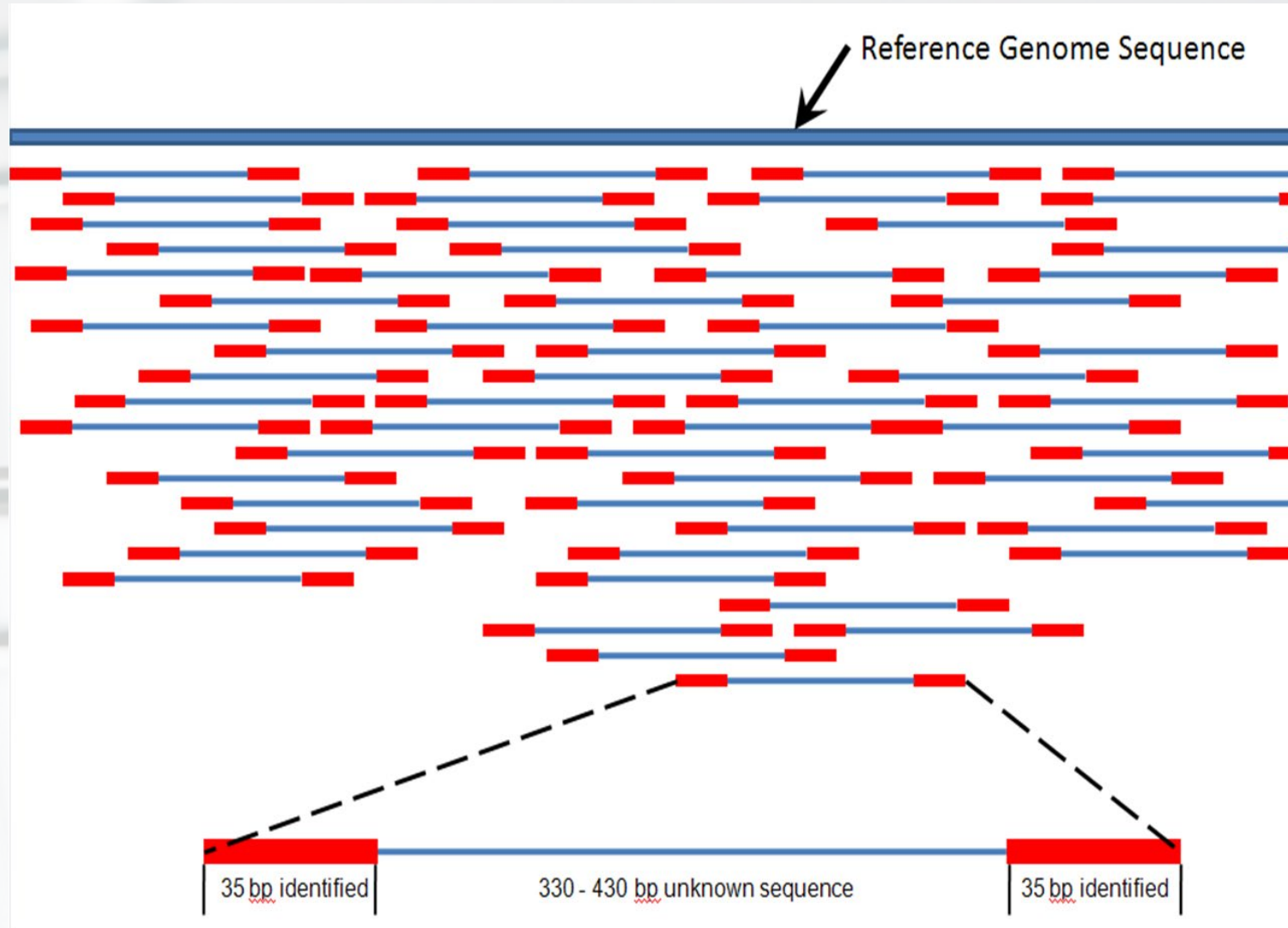
On the right side, there is a "NEWS" section with the headline "BLAST+ 2.15.0 is here!" and a sub-headline "We have included two exciting new features in the latest BLAST+ release". The date "Tue, 28 Nov 2023" and a link to "More BLAST news..." are also present.

The "Web BLAST" section features three main options:

- Nucleotide BLAST**: nucleotide → nucleotide
- blastx**: translated nucleotide → protein
- tblastn**: protein → translated nucleotide
- Protein BLAST**: protein → protein

At the bottom, there is a "BLAST Genomes" section with a search bar labeled "Enter organism common name, scientific name, or tax id" and a "Search" button. Below the search bar, there are links for "Human", "Mouse", "Rat", and "Microbes".

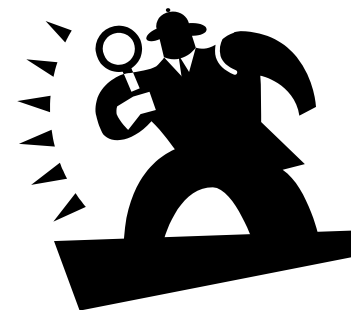
BLAST (BASIC LOCAL ALIGNMENT SEARCH TOOL)



The background of the slide features a close-up, shallow depth-of-field photograph of several clear microcentrifuge tubes. A blue pipette tip is positioned over one of the tubes, with a small droplet of liquid about to fall. The lighting is soft and clinical, typical of a laboratory setting.

DNA物種鑑定

- 任務一：這是甚麼植物？
 - DNA 條碼 (DNA Barcoding)
- 任務二：這大麻源自同一個地區 / 批次？



物種鑑定的方法

1. 提取 DNA
2. 聚合酶鏈式反應 (PCR)
3. DNA電泳
4. DNA測序 (DNA Sequencing)/ DNA條碼 (DNA Barcoding)

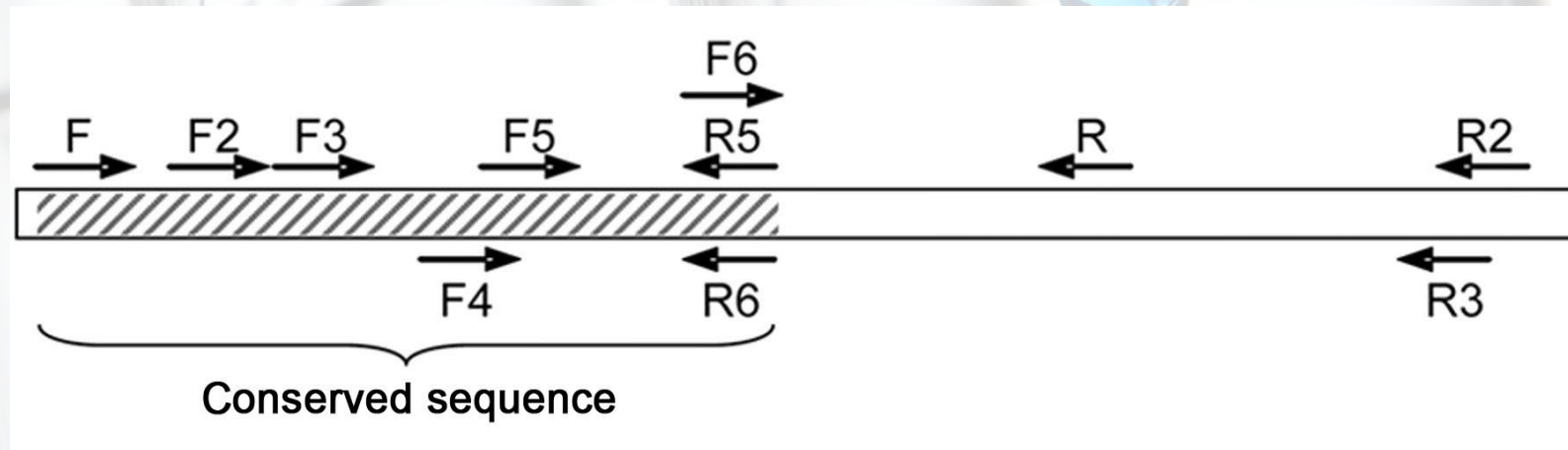
提取 DNA (DNA EXTRACTION)

- 將DNA從細胞核釋放
- 除去蛋白質



PCR (POLYMERASE CHAIN REACTION)

- 大量複製一段特定保守序列(Conserved Sequence)的DNA
 - 動物：Cytochrome c oxidase subunit 1 (*COX1*)
 - 植物：ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase (*rbcL*) / maturase K (*matK*)

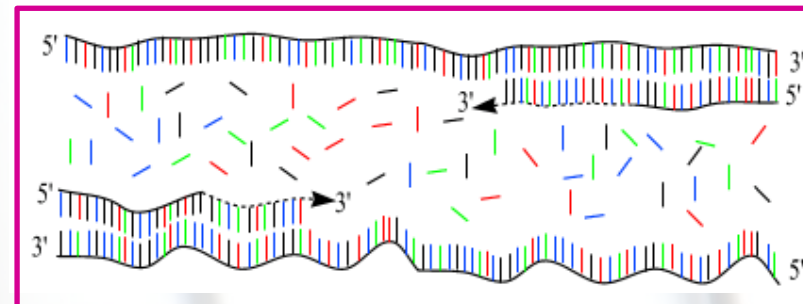
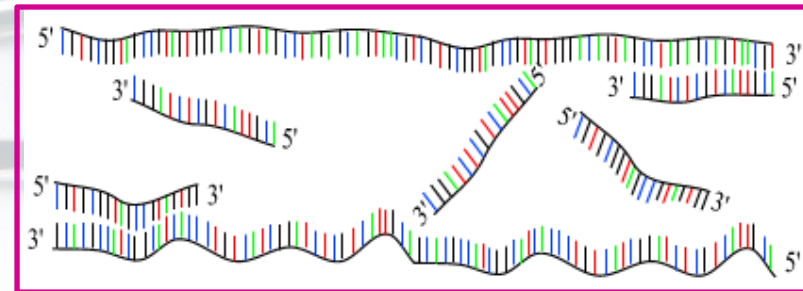
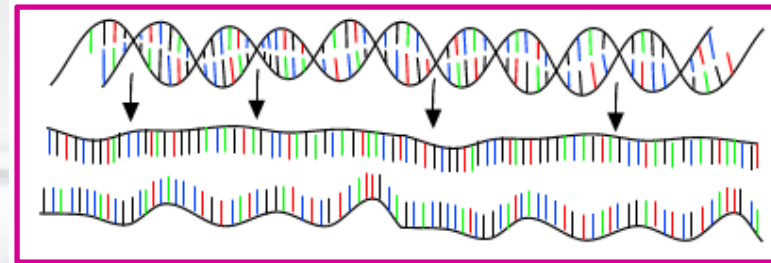


PCR (POLYMERASE CHAIN REACTION)

試管加入：

- 緩衝劑(buffer)
- $MgCl_2$
- DNA
- 引物(primer)
- 核苷酸(dNTP)
- DNA聚合酶(DNA polymerase)

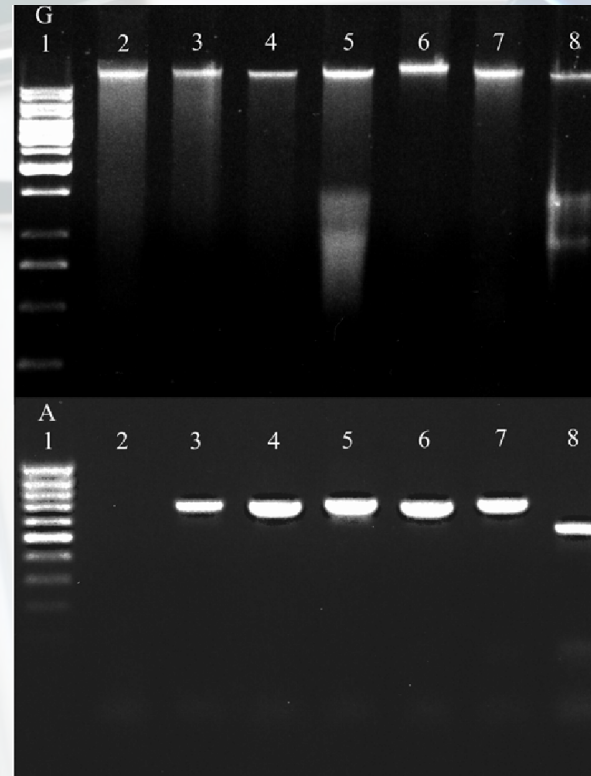
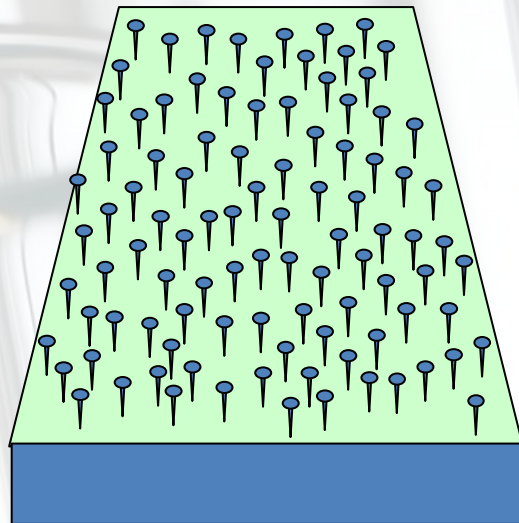
1. 95°C：打開DNA
2. 60°C：引物與DNA配對
3. 72°C：延長DNA
4. 重覆30-40次



DNA電泳 – 確保PCR成功

- 利用電場將不同大小的DNA分開
- 凝膠像大菜糕，有很多微小的孔

DNA fragments



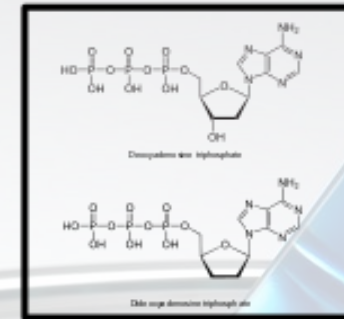
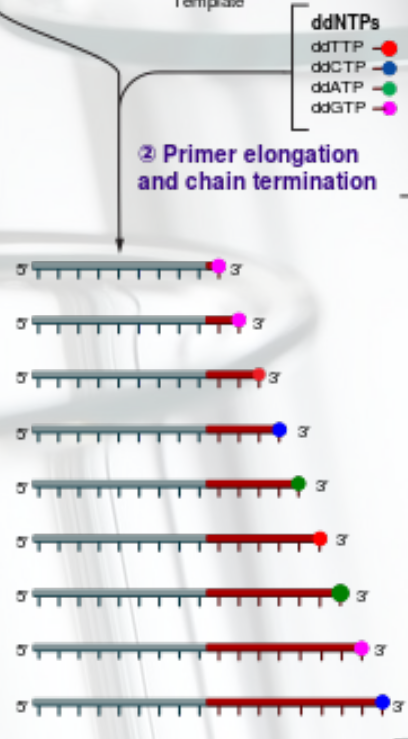
DNA測序 (DNA SEQUENCING)

① Reaction mixture

- ▶ Primer and DNA template
- ▶ DNA polymerase
- ▶ ddNTPs with flouochromes
- ▶ dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, and dTTP)



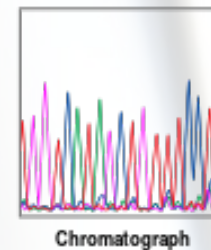
② Primer elongation and chain termination



③ Capillary gel electrophoresis separation of DNA fragments



④ Laser detection of flouochromes and computational sequence analysis



任務一：這是甚麼植物？



任務一：DNA條碼

1. Google search “BLAST” 或使用QR Code
2. 選擇 “Nucleotide BLAST”
3. 上載需要查詢的DNA Sample之Text File
4. 按 “BLAST”
5. 選擇100%或最吻合(Percentage identical) , 並最高分數的結果
6. 記錄6種(a-f)不明植物的品種



BLAST





Common Conserved Gene: Pentatricopeptide repeat (PPR)



考考你！

- 如果只是想知道這植物是否大麻，還有甚麼方法？

[Genome Res.](#) 2019 Jan; 29(1): 146–156.

doi: [10.1101/gr.242594.118](https://doi.org/10.1101/gr.242594.118)

PMCID: PMC6314170

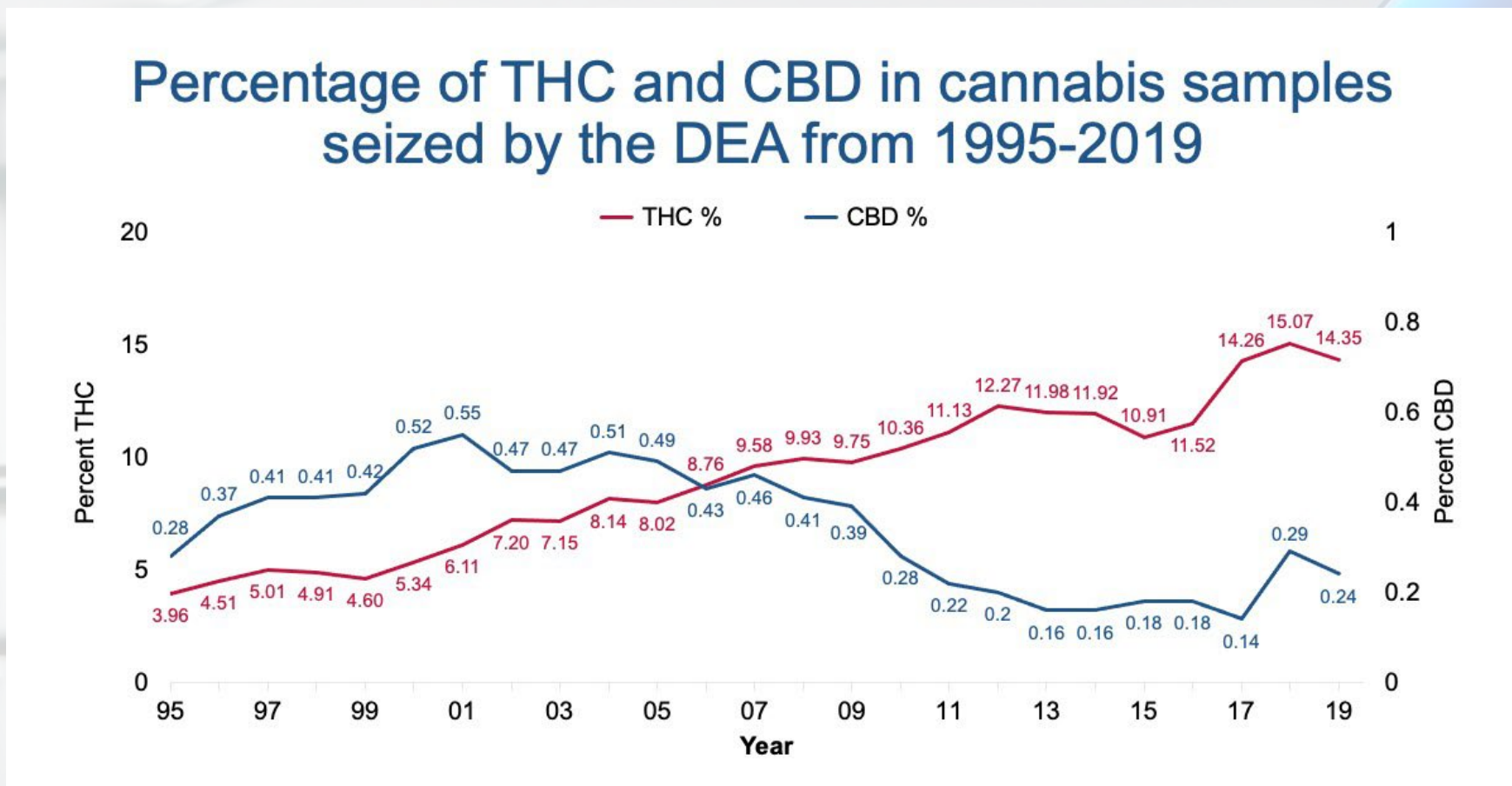
PMID: [30409771](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30409771/)

A physical and genetic map of *Cannabis sativa* identifies extensive rearrangements at the *THC/CBD acid synthase* loci

[Kaitlin U. Lavery](#),¹ [Jake M. Stout](#),² [Mitchell J. Sullivan](#),³ [Hardik Shah](#),^{3,4} [Navdeep Gill](#),⁵ [Larry Holbrook](#),⁶
[Gintaras Deikus](#),^{3,4} [Robert Sebra](#),^{3,4} [Timothy R. Hughes](#),^{1,7,8} [Jonathan E. Page](#),^{5,9} and [Harm van Bakel](#)^{1,3,4}

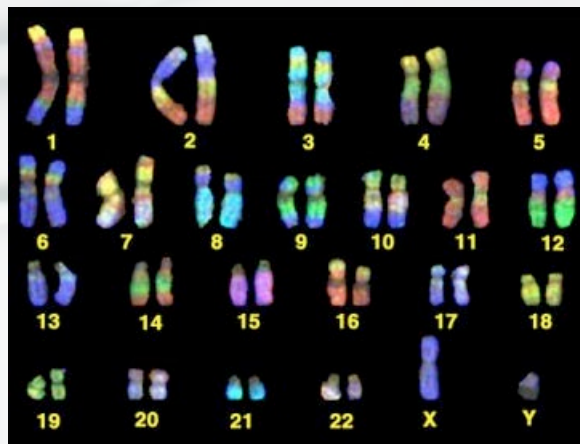
► [Author information](#) ► [Article notes](#) ► [Copyright and License information](#) [PMC Disclaimer](#)

了解大麻的源頭



根據美國緝毒局(DEA) 按年分析非法大麻中的THC及CBD的含量
→ 人為因素令THC 含量顯著上升

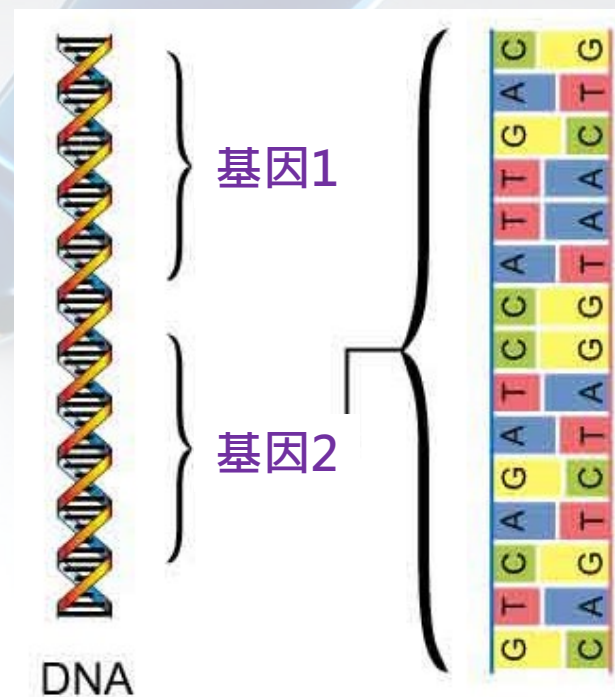
人類與大麻的基因組比較



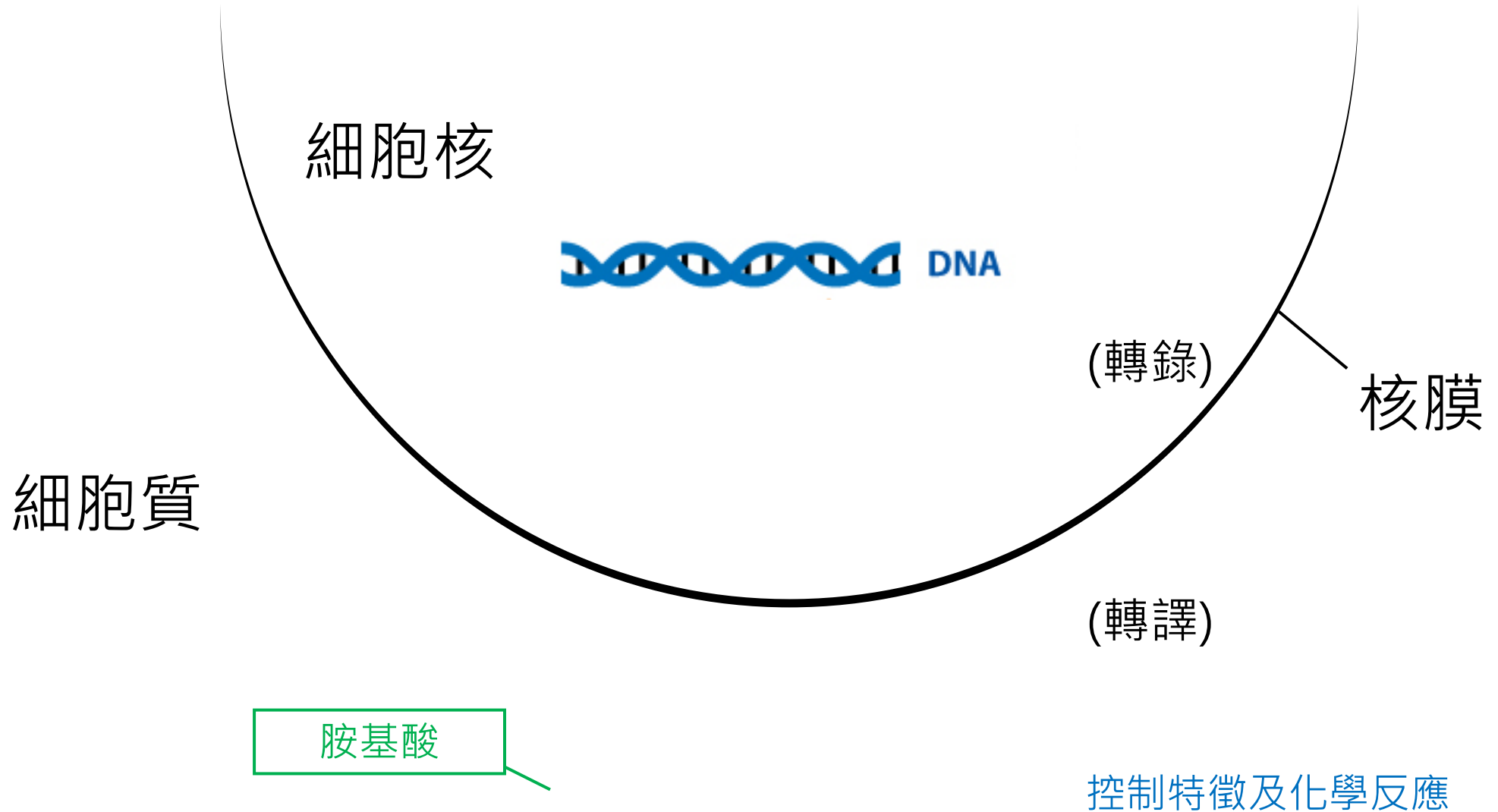
	人類 <i>Homo sapien</i>	大麻 <i>Cannabis sativa</i>
染色體倍性	二倍體 (Diploid, 2n)	大多是二倍體
染色體數量	23 對 (22對常染色體+1對性染色體)	10 對 (9對常染色體+1對性染色體)
DNA數量	大約30億bp	大約7億bp

基因(GENE)

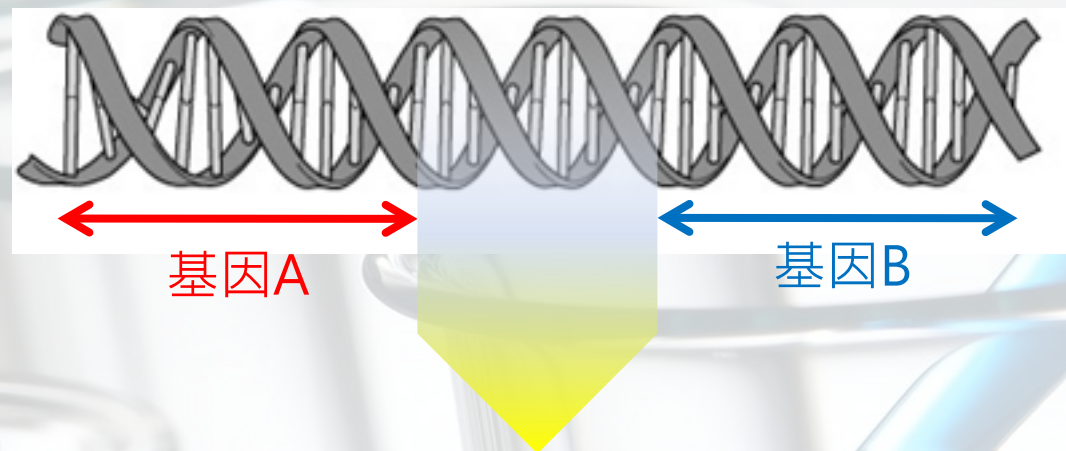
- 一段DNA
- 一個基因製造一個蛋白質
- 人類約有20,000-25,000個基因



中心法則 CENTRAL DOGMA



非編碼DNA (Non-coding DNA)

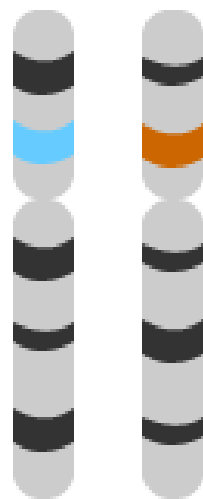


非編碼DNA

SHORT TANDEM REPEATS (STR) - 短縱列重複序列

包含多個重複序列

e.g. 染色體11的基因座 (locus) : TH01 , 包含 TCAT 的重複序列



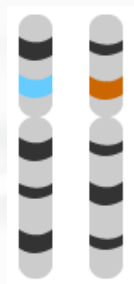
基因型 Genotype: 6-3

6個重複 : CCC TCAT TCAT TCAT TCAT TCAT TCAT

3個重複 : CCC TCAT TCAT TCAT

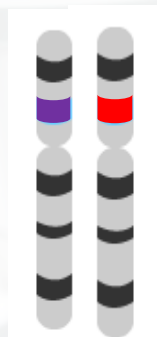
STR POLYMORPHISM (STRP) - STR 多型現象

個體1



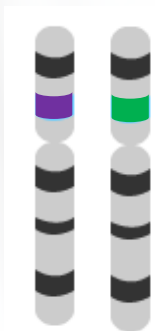
基因型：6-3

個體2



基因型：9-5

個體3

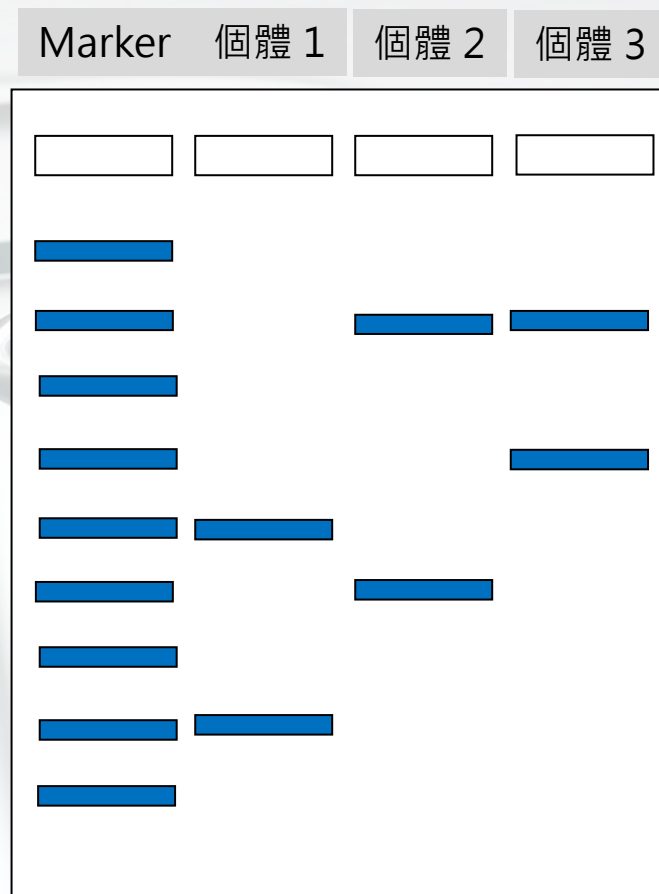


基因型：9-7

STRP – DNA PROFILING (DNA 指紋分析)

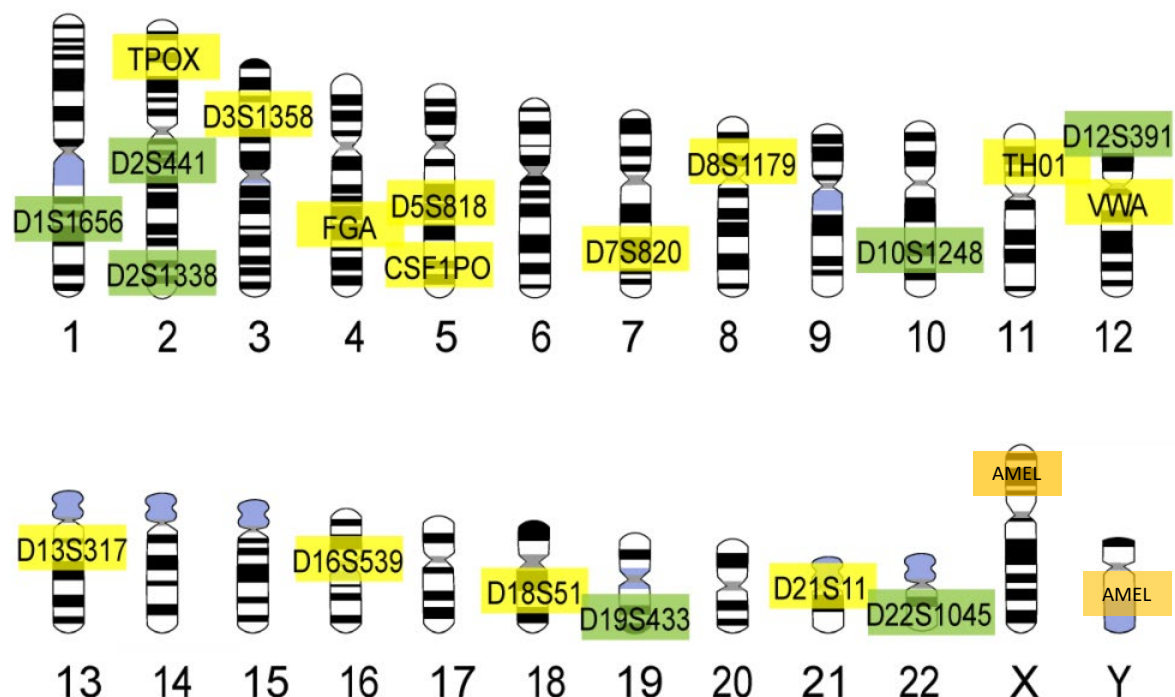
Locus TH01

DNA長度

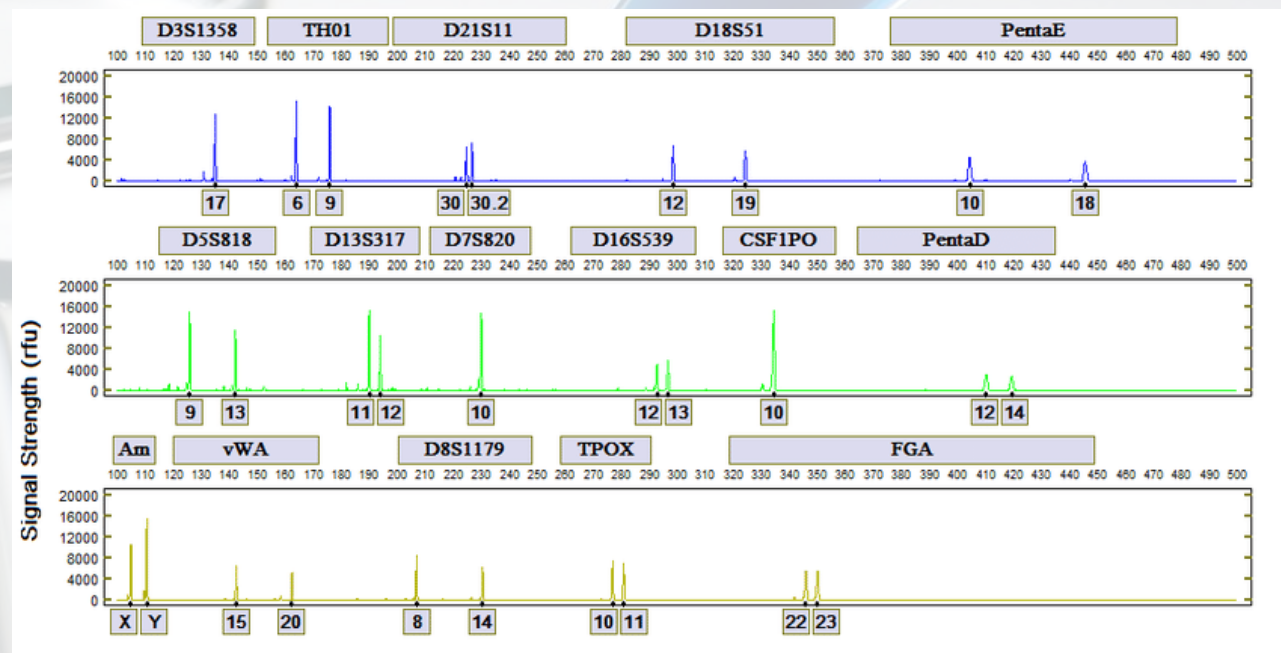


DNA鑑證分析 - STRP

STR loci used in U.S. Combined DNA Index System (CODIS)



- 13 original CODIS Core STR Loci
- Additional 7 CODIS Core STR Loci added Jan 2017



DNA鑑證分析 - 大麻的STRP

Genetic identification of Cannabis varieties based on marker STR analysis: Preliminary studies

Magdalena Marcińska^a  , Maria Wróbel^a, Andrzej Sekuła^a, Marek Kowalczyk^a,
Karolina Sekuła^a, Jakub Czarny^b, Jolanta Powierska-Czarny^b, Radosław Nawotka^c,
Robert Bachliński^d, Anna Duszyńska^d, Żanetta Makowska^d, Ewa Kadyjewska^d,
Agnieszka Choromańska^c

A Ge.F.I. – ISFG European collaborative study on DNA identification of *Cannabis sativa* samples using a 13-locus multiplex STR method

M. Di Nunzio^{a,c,*}, V. Agostini^d, F. Alessandrini^e, C. Barrot-Feixat^a, A. Berti^f, C. Bini^g,
M. Bottinelli^h, E. Carnevaliⁱ, B. Corradini^j, M. Fabbri^k, P. Fattorini^l, P. Garofano^m, S. Ginoⁿ,
A. Mameli^o, A. Marino^p, C. Previderè^q, C. Robino^r, C. Romano^s, P. Tozzo^t, A. Verzeletti^u,
L. Buscemi^e, D. Gangitano^a, C. Di Nunzio^{b,c}

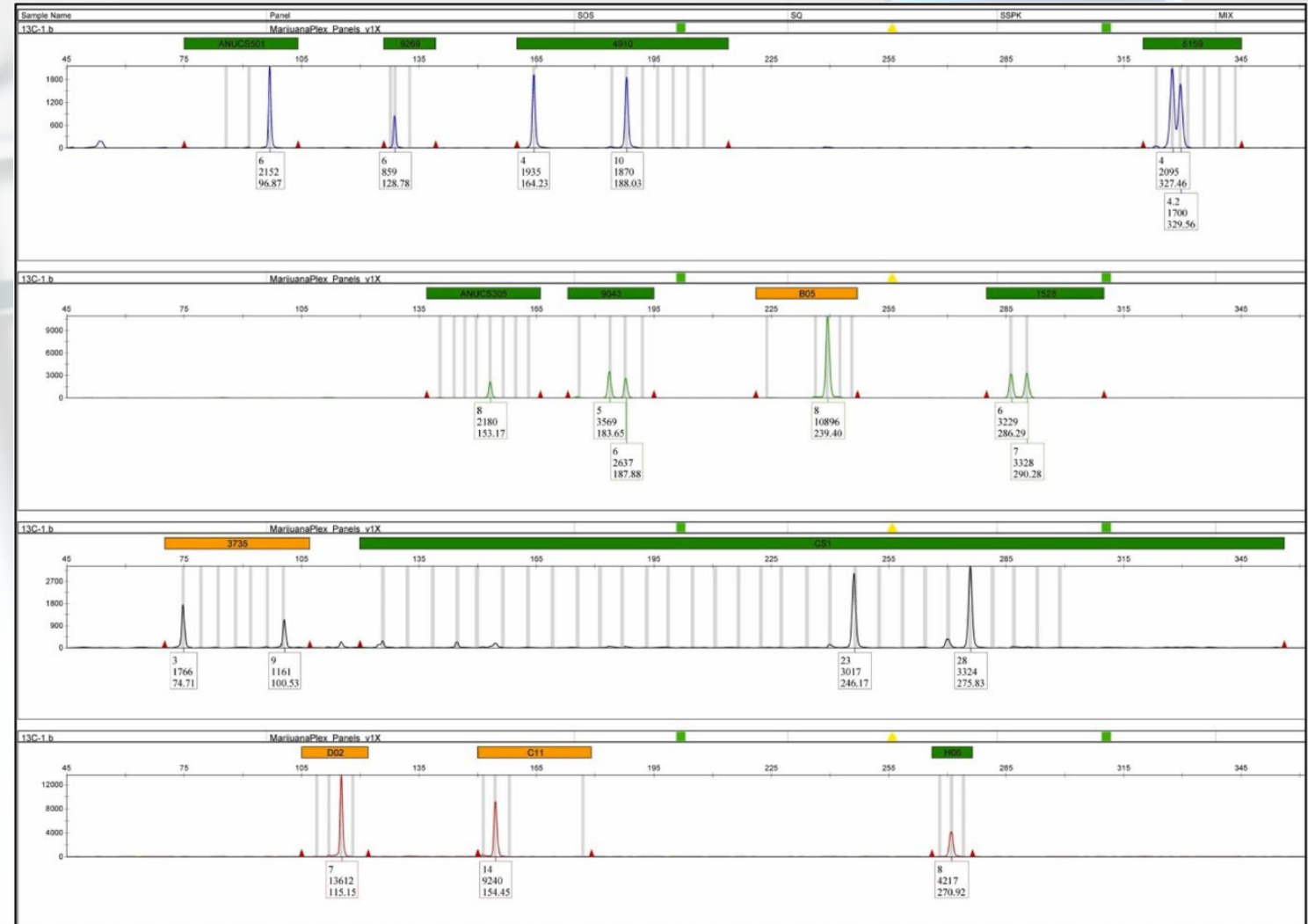
DNA鑑證分析 - 大麻的STRP

Genetic identification of Cannabis varieties based on marker STR analysis: Preliminary studies

Magdalena Marcińska^a, Maria Wróbel^a, Andrzej Sekuła^a, Marek Kowalczyk^a,
Karolina Sekuła^a, Jakub Czarny^b, Jolanta Powierska-Czarny^b, Radosław Nawotka^c,
Robert Bachliński^d, Anna Duszyńska^d, Żanetta Makowska^d, Ewa Kadyjewska^d,
Agnieszka Choromańska^c

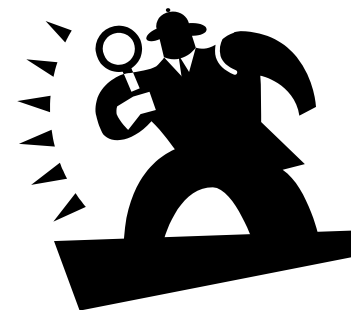
A Ge.F.I. – ISFG European collaborative study on DNA identification of *Cannabis sativa* samples using a 13-locus multiplex STR method

M. Di Nunzio^{a,c,*}, V. Agostini^d, F. Alessandrini^e, C. Barrot-Feixat^a, A. Berti^f, C. Bini^g,
M. Bottinelli^h, E. Carnevaliⁱ, B. Corradini^j, M. Fabbri^k, P. Fattorini^l, P. Garofano^m, S. Ginoⁿ,
A. Mameli^o, A. Marino^p, C. Previderè^q, C. Robino^r, C. Romano^s, P. Tozzo^t, A. Verzeletti^u,
L. Buscemi^e, D. Gangitano^a, C. Di Nunzio^{b,c}



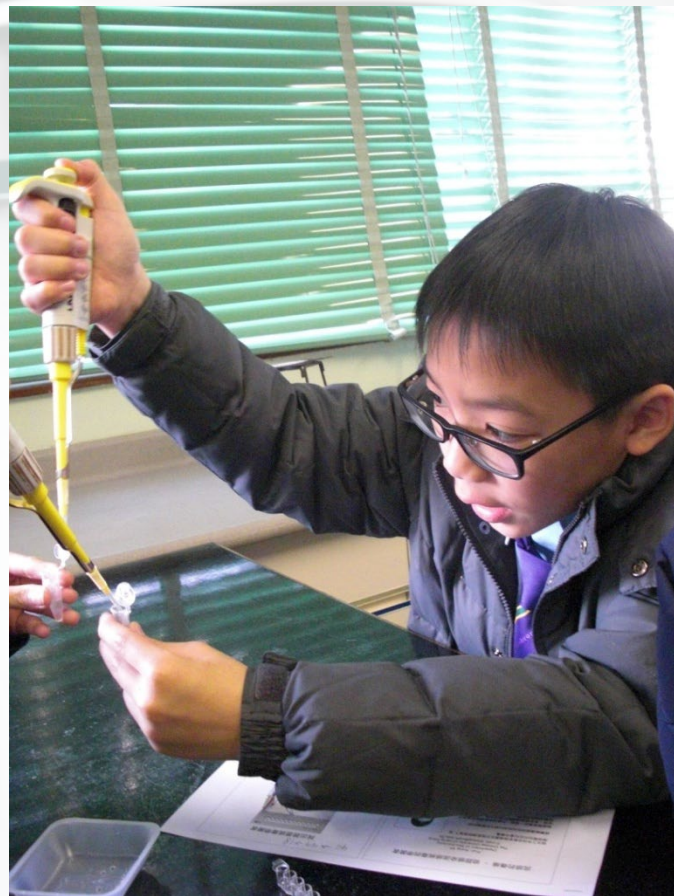
DNA物種鑑定

- 任務一：這是否大麻 / 有沒有大麻成份？
 - DNA 條碼 (DNA Barcoding)
- 任務二：這大麻源自同一個地區 / 批次？
 - 短縱列重複序列 - 電泳 (STR – Electrophoresis)



移液管 (PIPETTE)

- $1\mu\text{l} = 1 / 1000 \text{ ml}$



任務二 - 短縱列重複序列 - 電泳 (STR – ELECTROPHORESIS)

- 共有6個 *Cannabis sativa* 大麻的樣品
- 每組負責做 1個Locus之STR

Locus	A	B	C	D	E	F
I						
II						
III						
IV						
V						
VI						

M	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
H ₂ O	H ₂ O	Marker	A	B	C	D	E	F	H ₂ O	H ₂ O

e.g. Group 1 – Locus 1

有關電泳的提問

1. 為甚麼DNA樣本會向下走？
2. Marker的作用是甚麼？
3. 為甚麼DNA會發光？
4. 如何加快電泳的速度？
5. 電泳其實正在做甚麼化學反應？
6. 如果樣本只有一條band，可能是甚麼原因？

有關毒品的邀請

- 在哪裡？
- 有誰會邀請你？
- 他們會說甚麼說話去邀請？
- 你又會如何去拒絕？



拒絕的方法及技巧

1. 堅持拒絕法

2. 告知理由法

3. 友誼勸服法

6. 遠離現場法

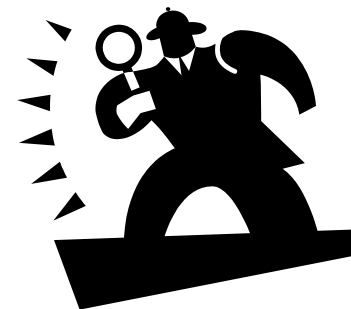
5. 轉移話題法

4. 自我解嘲法



DNA物種鑑定

- 任務一：這是否大麻 / 有沒有大麻成份？
 - DNA 條碼 (DNA Barcoding)
- 任務二：這大麻源自同一個地區 / 批次？
 - 短縱列重複序列 - 電泳 (STR – Electrophoresis)
 - 分支圖 Cladogram

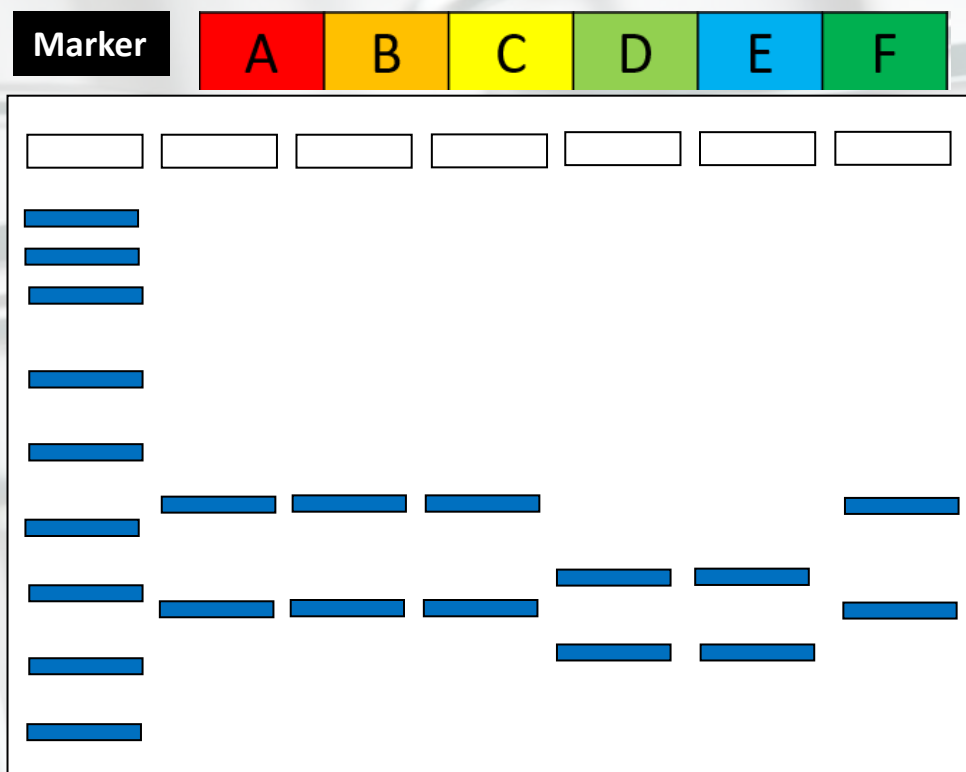


任務二：個體之間的關係 (BY CLADOGRAM)

- 在一個locus中，哪個樣品是一樣的？
- 分享成果

e.g. Group 1 – Locus 1

以同一個圖案表示相同款式的STR,
e.g. ○, ▲, □ ...



	A	B	C	D	E	F
I	○	○	○	▲	▲	○
II						
III						
IV						
V						
VI						

任務二：個體之間的關係 (BY CLADOGRAM)

- 在同一個locus中，哪個樣品是一樣呢？

		Individual (Sample)					
		A	B	C	D	E	F
Locus (Group)	I	○	○	○	▲	▲	○
	II	○	○	▲	□	□	★
	III	○	▲	□	★	★	□
	IV	○	○	○	▲	▲	○
	V	○	○	▲	□	□	★
	VI	○	○	○	○	○	○

任務二：個體之間的關係 (BY CLADOGRAM)

- 尋找兩個樣品相同STR的數目，
如：A及B之間有5個Locus是有相同的STR

	A	B	C	D	E	F
I	○	○	○	▲	▲	○
II	○	○	▲	□	□	★
III	○	▲	□	★	★	□
IV	○	○	○	▲	▲	○
V	○	○	▲	□	□	★
VI	○	○	○	○	○	○

	A	B	C	D	E	F
A		5				
B						
C						
D						
E						
F						

任務二：個體之間的關係 (BY CLADOGRAM)

- 尋找兩個樣品相同STR的數目，
又如：A及C之間有3個Locus是有相同的STR

	A	B	C	D	E	F
I	○	○	○	▲	▲	○
II	○	○	▲	□	□	★
III	○	▲	□	★	★	□
IV	○	○	○	▲	▲	○
V	○	○	▲	□	□	★
VI	○	○	○	○	○	○

	A	B	C	D	E	F
A		5	3			
B						
C						
D						
E						
F						

任務二：個體之間的關係 (BY CLADOGRAM)

- 尋找兩個樣品之間有多少個相同STR的Locus之數目

	A	B	C	D	E	F
I	○	○	○	▲	▲	○
II	○	○	▲	□	□	★
III	○	▲	□	★	★	□
IV	○	○	○	▲	▲	○
V	○	○	▲	□	□	★
VI	○	○	○	○	○	○

	A	B	C	D	E	F
A		5	3	1	1	3
B			3	1	1	3
C				1	1	4
D					6	1
E						1
F						

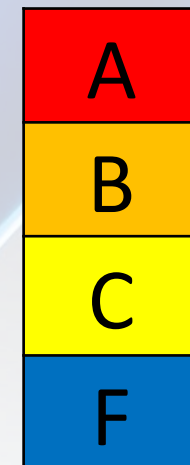
任務二：個體之間的關係 (BY CLADOGRAM)

	A	B	C	D	E	F
A		5	3	1	1	3
B			3	1	1	3
C				1	1	4
D					6	1
E						1
F						

	A	B	C	D	E	F
A		83.3%	50%	16.7%	16.7%	50%
B			50%	16.7%	16.7%	50%
C				16.7%	16.7%	66.7%
D					100%	16.7%
E						16.7%
F						

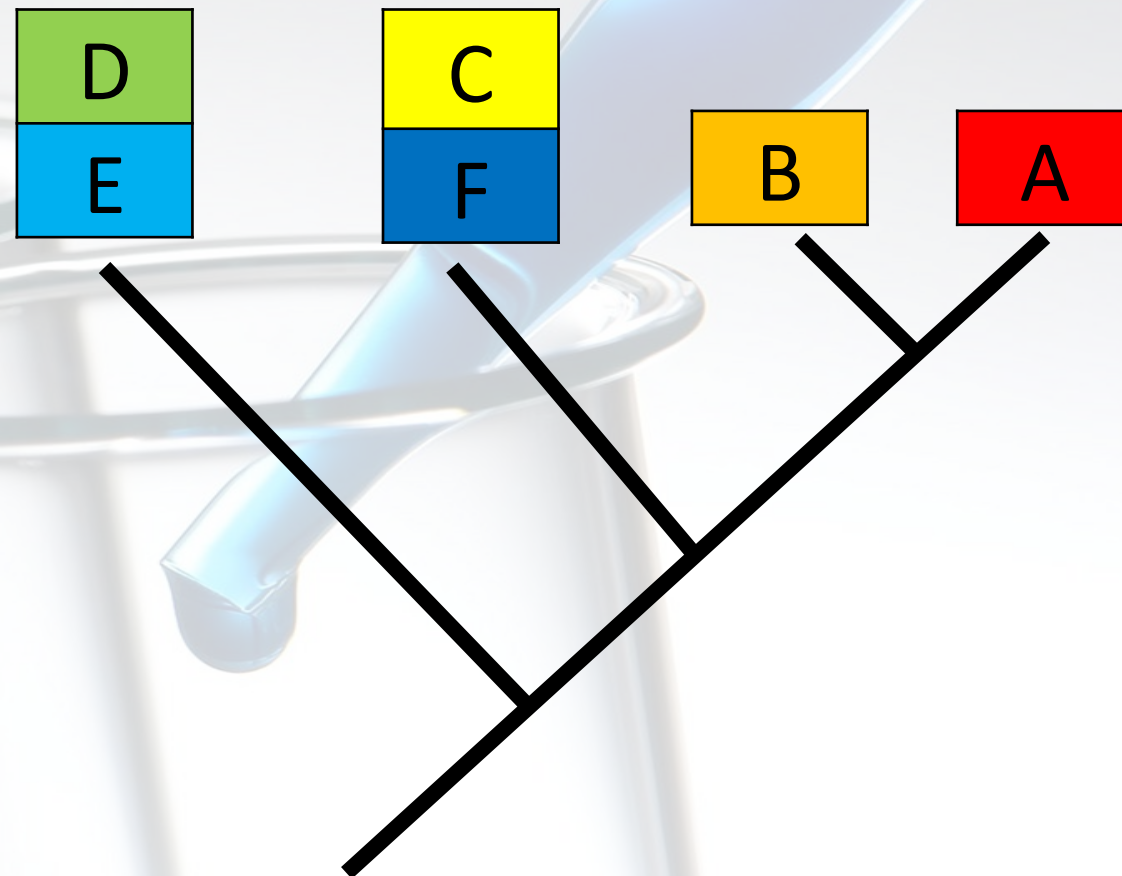
任務二：個體之間的關係 (BY CLADOGRAM)

	A	B	C	D	E	F
A		5	3	1	1	3
B			3	1	1	3
C				1	1	4
D					6	1
E						1
F						



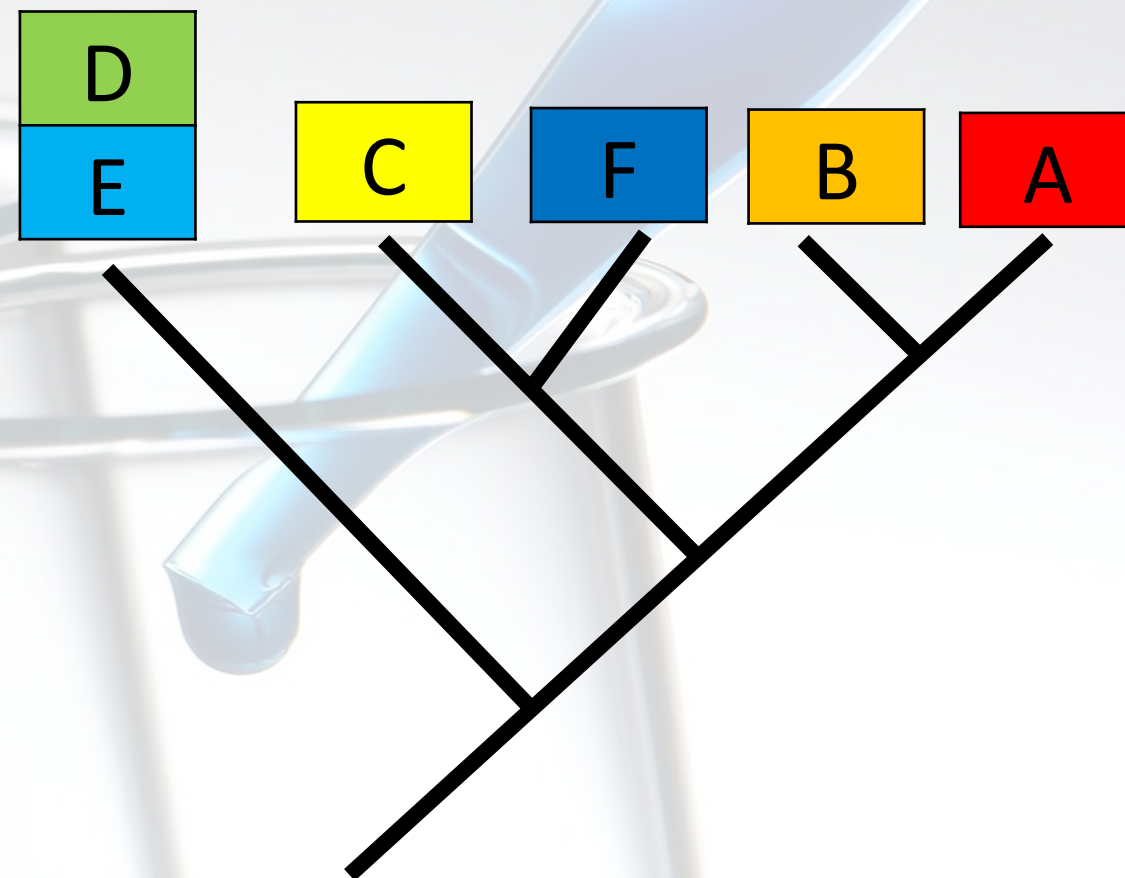
任務二：個體之間的關係 (BY CLADOGRAM)

	A	B	C	D	E	F
A		5	3	1	1	3
B			3	1	1	3
C				1	1	4
D					6	1
E						1
F						

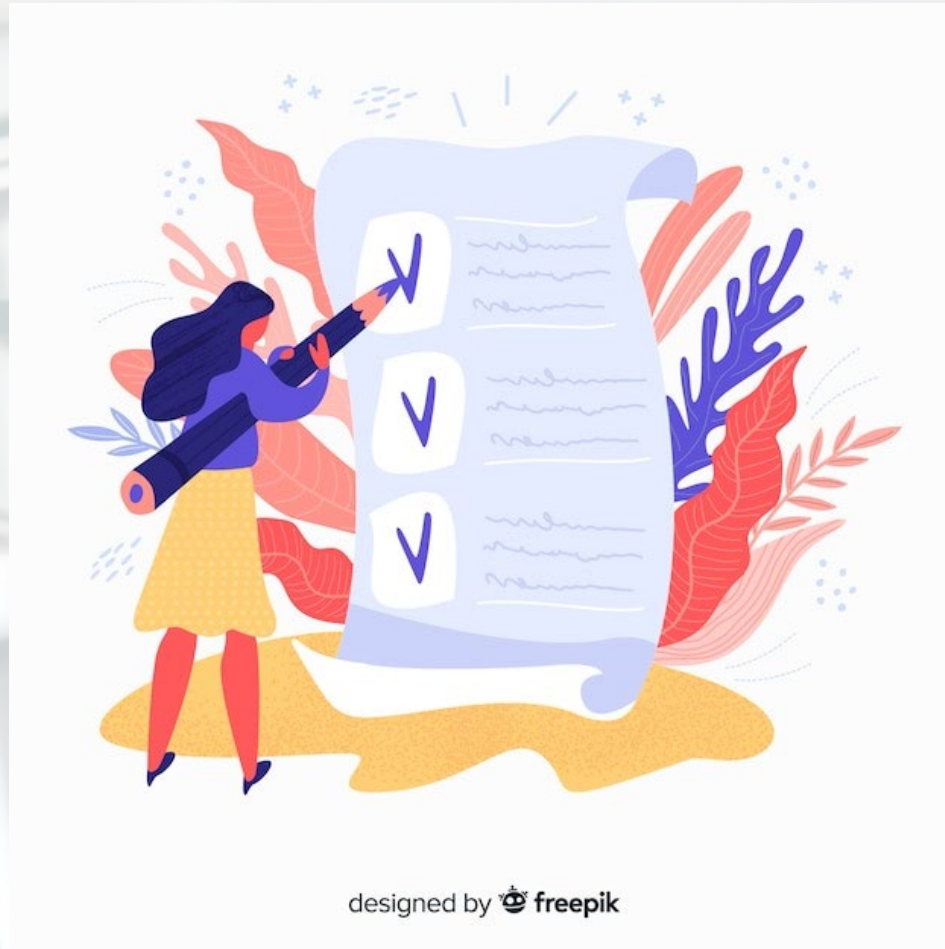


任務二：個體之間的關係 (BY CLADOGRAM)

	A	B	C	D	E	F
A		5	3	1	1	3
B			3	1	1	3
C				1	1	4
D					6	1
E						1
F						



POST-TEST (後測)



動手「毒」理科 - STEM抗毒教育計劃

DNA物種鑑定



香港青年協會
the hongkong federation of youth groups

創意教育組
Creative Education Unit



保安局禁毒處
求助/諮詢

186 186

98 186 186

