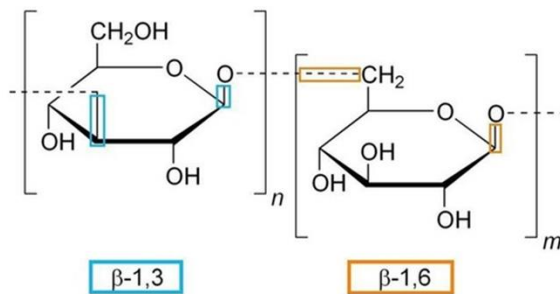


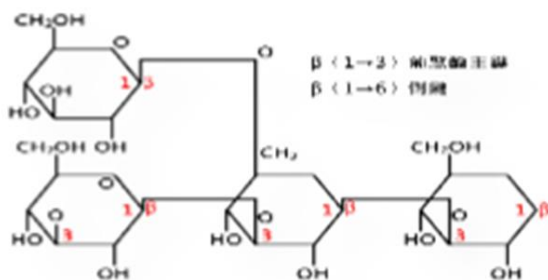
1. 摘要

靈芝的主要活性成分為靈芝多醣 (GLP)，靈芝多醣有三種，靈芝子實體多醣，菌絲體多醣(胞內多醣)，發酵液=多醣(胞外多醣)，它是一個多醣組成的混合物。

由於多醣結構複雜，不易得到確切的化學結構式。多醣鍵由三股單醣鍵組成，主要以氫鍵固定定位。目前分離到的 200 多種靈芝多醣中，大多為 β -葡聚糖， α -葡聚糖。

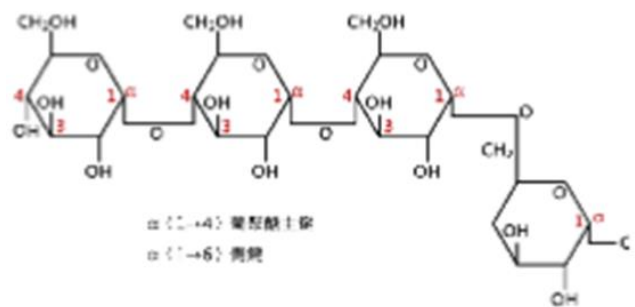


圖一、醣苷鍵連接方式： $\beta(1\rightarrow3)(1\rightarrow6)$ 、 $\beta(1\rightarrow4)(1\rightarrow6)$ 含有肽鍵



圖二、靈芝子實體的多醣體是由葡萄糖單位以 $\beta(1\rightarrow3)$ 為主鍵相接而成的聚合物；靈芝高分子量的多醣體進

入人體後，無法被人體酵素分解，所以才能有效誘發干擾素，啟動免疫系統功能的機制，進而達到抑制腫瘤的作用。



圖三、菌絲體的多醣體是由葡萄糖單位以 $\beta(1\rightarrow4)$ 為主鍵相接而成的聚合物；靈芝菌絲體的多醣體是可被人體的酵素分解成葡萄糖，這種多醣體無法啟動免疫系統功能。

2. 簡介

靈芝又稱(赤芝)靈芝草、神芝、芝草、仙草、瑞草，是多孔菌科植物赤芝或紫芝的全株。

《神農本草經》將靈芝分在上品類藥，皆為無毒而沒有副作用者；《神農本草經》對靈芝的評價很高，是一種滋補強壯、扶正固本、延年益壽及鬆弛身心的珍貴藥材，該書將靈芝分六類並強調『久食輕身不老、延年神仙』。[5]

靈芝多醣是靈芝的主要有效成分之一，具有抗腫瘤、免疫調節、降血糖、抗氧化、降血脂與抗衰老作用。

靈芝多醣有六種作用：

1. 免疫調節及抗腫瘤
2. 抗輻射
3. 抗衰老、抗氧化作用
4. 調節血糖
5. 改善循環系統功能
6. 保肝作用

目前 GLP 被廣泛使用，例如：食品、藥物及化妝品，也有開發有預防血管疾病、腫瘤、糖尿病的藥物及保健品。由於現在技術還不夠成熟，加上成本的問題，必須通過現在生物工程，引進技術，完善提取工藝，濃縮 GLP 精華，開發延緩衰老的化妝品等。

3. 專題進行方式

(一) 實驗流程 (CTAB 萃取法)

[CTAB(cetyltrimethylammonium bromide, 十六烷基三甲基溴化銨)]

準備藥劑：

- (a) 液態氮 (打破細胞壁)
- (b) CTAB (溶解細胞膜)
- (c) 7.5M 醋酸胺 (使 DNA 纏繞)
- (d) 99% 藥用酒精 (脫水兼隔絕外來物)
- (e) 70% 酒精 (再次脫水)
- (f) TE buffer (維持 DNA 環境，不易降解)
- (g) Phenol chloroform (清洗劑)
- (h) RNase A (除去多餘 DNA)
- (i) Proteinase K (除去多餘蛋白質)

抽取靈芝 DNA 步驟：

- 1) 靈芝菌絲加入液態氮，磨成粉狀後取出 5~7g 放入 tube。
- 2) 加入 CTAB 將 tube 補滿，置入 55°C 水浴槽內 15 分鐘，取出後離心

8000rpm 10 分鐘，並取上清液至新管。

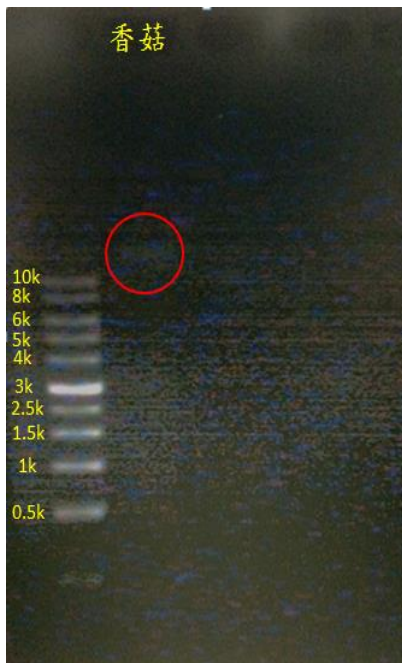
- 3) 加入 1/20 上清液體積 7.5M 醋酸胺及兩倍上清液體之 99% 藥用酒精置入 -20°C 冰箱，沉澱 1 小時。取出後離心 8000rpm 15 分鐘，並除去上清液體。
- 4) 加入 70% 酒精，離心 13000rpm 1 分鐘 (8000rpm 5 分鐘) 後將酒精抽乾 (此步驟重複 2 次)，並將沉澱物置於不易被汙染的環境自然風乾 20 分鐘。
- 5) 分別加入 400 μ TE buffer 回溶，並將分裝的兩管 tube 合併成 1 管。
- 6) 加入 2 μ RNase A，置入 55°C 水浴槽 20 分鐘。
- 7) 取出後加入 2 μ Proteinase K，再度置入 55°C 水浴槽內 20 分鐘。
- 8) 加入等體積 Phenol Chloroform，均勻混合至乳白色，離心 13000rpm 5 分鐘，取上清液體至新管，重複此步驟至中間層乾淨。
- 9) 加入 1/20 上清液體積 7.5M 醋酸胺及兩倍上清液體之 99% 藥用酒精置入 -20°C 冰箱沉澱 1 小時，取出後離心 8000rpm 15 分鐘，並除去上清液體。
- 10) 加入 70% 酒精，離心 13000rpm 一分鐘將酒精抽乾 (此步驟重複 2 次)，並將沉澱物置於不易被汙染的環境自然風乾 20 分鐘。
- 11) 加入 200 μ TE buffer 回溶，待跑膠 (0.8%) 確認結果。



圖四、gDNA 電泳膠圖(靈芝)



圖六、gDNA 電泳膠圖(木耳)



圖五、gDNA 電泳膠圖(香菇)

(二) 聚合酶連鎖反應 (Polymerase chain reaction (PCR)[4]

利用成對的引子來擴增特定 DNA 序列，溶液中加 $1\mu\text{l}$ 靈芝 DNA ($1\mu\text{g}/\mu\text{l}$)、 $6\mu\text{l}$ 5X PCR Master Mix 與各基因專屬引子 F 端 ($10\mu\text{M}$) 與 R 端 ($10\mu\text{M}$) 各取 $1\mu\text{l}$ ，最後加入 UVddH₂O 至總體積 $30\mu\text{l}$ 。

先一大管的量為 $150\mu\text{l}$ 調配，再分裝 5 個小管的量各為 $30\mu\text{l}$ 。

注意：在調配的時候，DNA 的體積不可以大於總體積的 10%。

材料	一管的量	五管的量	調配順序
F 端引子	$1\mu\text{l}$ (10M)	$5\mu\text{l}$	2

R 端引子	1 μ l (10 M)	5 μ l	3
DNA	1 μ l	5 μ l	4
Fast-Rum TM Taq Master Mix with Dye (5X)	6 μ l	30 μ l	5
UVddH ₂ O	21 μ l	105 μ l	1
總量	30 μ l	150 μ l	

表一、primer 配置順序



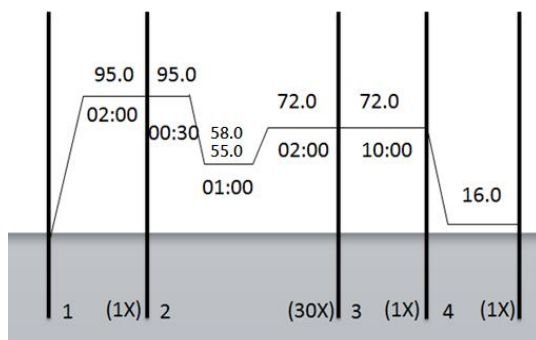
圖八、PCR 電泳膠圖(靈芝)

引子名稱	適合溫度
GL18900	58 度
GL22204	55 度
GL30088	57 度
GL25613	56 度
GL30799	57 度
GL29877	56 度

表二、引子對應有效的反應溫度

GL18900大小約為225bp,
GL22204大小約為195bp,
GL30088大小約為390bp,
GL25613大小約為210bp,
GL30799大小約為225bp,
GL29877大小約為210bp

GL18900與GL30799大小相似
GL25613與GL29877大小相似



圖七、PCR 反應溫度數據

圖九、band 帶大小

4. 主要成果

利用抽取 gDNA 及聚合酶連鎖反應的測試來探討靈芝 DNA 在有效的反應溫度下對應到的引子，所得到的實驗結果與我們所預設的結果大致相同。

5. 評估與展望

最初我們所期望的結果是將靈芝多醣轉殖到酵母菌，再由酵母菌的複製功能培養出更多的靈芝多醣。由於我們在操作的過程中，還有嘗試抽取香菇以及木耳的 DNA 且與靈芝做比對，但我們在抽取香菇及木耳的 DNA

這部分花費了我們不少時間，最終我們只利用靈芝、香菇進行聚合酶連鎖反應。

6. 結語

經過將近一年的專題磨練，在實驗室嘗試了很多次實驗，從實驗失敗到成功甚至是穩定輸出實驗的成果。而在實驗操作方面也得到很多收穫，並更加了解操作流程及其中的涵意，因此收穫良多。最重要的是在這次的實驗中培養出無比的耐性和毅力，造就了現在的我們，而這樣的能力可以增強我們的抗壓性，幫助我們進入社會後不容易被擊倒。

7. 銘謝

首先感謝指導老師劉志俊老師，在製作專題的這段時間，給我們許多靈芝這項領域的專業知識，使我們更加了解靈芝；也謝謝張慧玫老師指導我們在實驗方面的技術指導，使我們可以清楚知道如何解決在實驗上遇到的問題。最後也感謝實驗室的學長們教導及提醒我們在實驗的過程中，所需要注意的細節以及如何改善實驗結果。

8. 參考文獻

[1] 華創生命工學

http://hcym-life.com/tech_02.aspx

[2] 華創生命工學

http://hcym-life.com/tech_02.aspx

[3] 余彥國, 張瑾, 張進隆. 靈芝多醣結構及藥理學作用研究發展 2012 年第 4 期

[4] 基龍米克斯生物科技股份有限公司

司

<http://www.genedragon.com.tw/article02.htm>

[5] 醫學百科

<http://cht.a-hospital.com/w/%E7%81%B5%E8%8A%9D>