

# 中華大學生物資訊學系系統開發專題報告

## 藥用真菌三萜之合成路徑

### A Study on the Synthesis Pathway of Mushroom Triterpenes

專題組員: B10220024 陳姿伶、B10220027 張雁婷、B10220028 謝依汝

B10220034 張景媛、B10220050 劉芮萍

專題編號: PROJ2016-BIOINFO-102010

指導老師: 劉志俊老師

## 1. 摘要

靈芝在東亞是傳統的藥用真菌，有許多不同的種類，一般常見的藥用靈芝為『赤芝』。《神農本草經》根據中醫陰陽五行學說，按五色將靈芝分為赤芝（丹芝）、黑芝（玄芝）、青芝（龍芝）、白芝（玉芝）、黃芝（金芝）五類，稱為五芝，此外附紫芝（木芝），詳細的描述這六類靈芝的療效、味道和主治。

赤芝主治：胸中結、益心氣、補中、增智慧、不忘，久食輕身不老、延年神仙。

黃芝主治：心腹五邪、益脾氣、安神、忠信和樂、久食輕身不老、延年神仙。

青芝主治：明目、補肝氣、安精魂、仁恕，久食輕身不老、延年神仙、不忘強志。

紫芝主治：耳聾、利關節、保神、益精氣、堅筋骨、好顏色，久服輕身不老延年。療虛勞、治痔。

；根據現代研究發主要成分為靈芝多醣主要成分為靈芝多醣（*Ganoderma polysaccharides*）與靈芝三萜（*Ganoderma triterpenes*）。靈芝三萜具有抗腫瘤、保肝、高血壓、降膽固醇、抗 HIV 與抗組織胺等多重作用，其中以靈芝三萜為靈芝最珍貴的成份。

為了了解靈芝三萜的合成路徑，我

們透過 KEGG 反應路徑資料庫、靈芝基因體、GenBank 基因資料庫等，建立出靈芝三萜的合成路徑，最後我們用劉志俊主任設計的引子來進行基因存在性的驗證，並使用 GenBank 核酸資料庫來比對分析結果。

## 2. 簡介

### （一）真菌分類表

同界：真菌界

- 釀酒酵母菌：子囊菌門 半子囊菌綱 酵母目 酵母科 酵母屬

*Saccharomyces cerevisiae*

- 裂殖酵母菌：子囊菌門 裂殖酵母綱 裂殖酵母目 裂殖酵母目 裂殖酵母屬

*Schizosaccharomyces pombe*

- 米麴菌：子囊菌門 散囊菌綱 散囊菌目 髮菌科 麴菌屬

*Aspergillus oryzae*

- 紅麴菌：子囊菌門 散囊菌綱 散囊菌目 紅麴菌科 紅麴菌屬

*Monascus purpureus*

- 冬蟲夏草：子囊菌門 糞殼菌綱 肉座菌目 蛇形蟲草科 蛇形蟲草屬

*Ophiocordyceps sinensis*

同門：擔子菌門

- 銀耳：擔子菌門 銀耳綱 銀耳目 銀耳科 銀耳屬

*Tremella fuciformis*

- 菰黑粉菌：擔子菌門 黑粉菌綱  
黑粉菌目 黑粉菌科 黑粉菌屬

*Ustilago esculenta*

同綱：傘菌綱

- 草菇：擔子菌門 傘菌綱 傘菌目  
光柄菇科 小包腳菇屬

*Volvariella volvacea*

- 金針菇：擔子菌門 傘菌綱 傘菌目  
小皮傘科 小火焰菌屬

*Flammulina velutipes*

- 木耳：擔子菌門 傘菌綱 木耳目  
木耳科 木耳屬

*Auricularia auricula-judae*

同目：多孔菌目

- 香菇：擔子菌門 傘菌綱 多孔菌目  
香菇科 香菇屬
- 雲芝：擔子菌門 傘菌綱 多孔菌目  
多孔菌科 栓菌屬

*Trametes versicolor*

- 東方栓菌：擔子菌門 傘菌綱 多孔菌目  
多孔菌科 栓菌屬

*Trametes orientalis*

- 松生擬層孔菌：擔子菌門 傘菌綱  
多孔菌目 擬層孔菌科 擬層孔菌屬

*Fomitopsis pinicola*

- 灰樹花：擔子菌門 傘菌綱 多孔菌目  
薄孔菌科 樹花屬

*Grifola frondosa*

同科：靈芝科

- 假芝：擔子菌門 傘菌綱 多孔菌目  
靈芝科 假芝屬

*Amauroderma rugosum*

- 皺蓋假芝：擔子菌門 傘菌綱 多

孔菌目 靈芝科 假芝屬

*Amauroderma rude*

同屬：靈芝屬

- 靈芝：擔子菌門 傘菌綱 多孔菌目  
靈芝科 靈芝屬

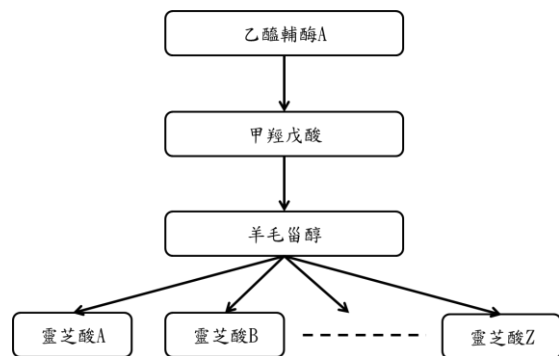
*Ganoderma lingzhi*

- 亮蓋靈芝：擔子菌門 傘菌綱 多孔菌目  
靈芝科 靈芝屬

*Ganoderma lucidum*

- 四川靈芝：擔子菌門 傘菌綱 多孔菌目  
靈芝科 靈芝屬

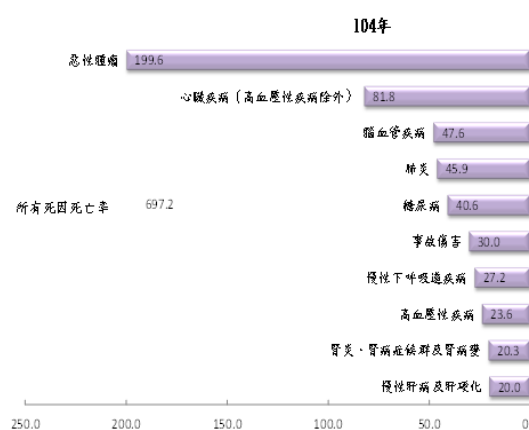
(二)靈芝三萜合成路徑



靈芝三萜為靈芝 (*Ganoderma lucidum*) 主要藥用的活性成分之一，而三萜 (*Triterpenes*) 是一種由六個異戊二烯所構成的環狀化合物，一般以三十個碳的碳氫原子所組成，而靈芝三萜是一種高度氧化的三萜類化合物，其核心結構為羊毛甾醇 (*Lanosterol*)，化學結構中有四個環，分子量通常在 400~600 之間。三萜類化合物是苦味的來源，且富含羧基、羥基、酮基、甲基、乙醯基和甲氧基等各種功能基。其化學結構皆包含四個環，碳原子個數大多為 30 個，少數為 27 個或 24 個。靈芝三萜的主要種類為靈芝酸 (*ganodericacids*)。

Kubota 等人在 1982 年分離出靈芝酸 A(*ganoderic acid A*)與靈芝酸 B(*ganoderic acid B*)等兩種靈芝三萜，新的靈芝三萜化合物由靈芝的子實體、孢子與菌絲體中分離出來，20 年後，靈芝三萜化合物的個數根據 2002 年林志彬等人從文獻中整理出來 122 種。而目前已知的靈芝三萜種類，根據 Xia 在 2014 年的整理，已高達 316 種。

### (三)研究動機



圖片來自:衛生福利部

十大死因中，以癌症位居最高，如何降低國人得癌症的風險？運動之餘再來就是從飲食方面著手，以保健食品為例，裡面的成份應該要有抗癌、調節免疫系統；而靈芝是最佳的免疫功能調節和激活劑，可顯著提高身體的免疫功能，增強患者自身的抗癌能力；主要藥用成分是靈芝三萜，但是對於靈芝三萜是怎麼合成的到目前為止我們仍然沒有答案，而靈芝是在這些多孔菌目藥用真菌裡唯一一個基因體最先被解開的，因此我們利用被解開的靈芝基因體探討怎麼合成這些靈芝三萜。然而靈芝是高單價食品不易取得，所以挑選了幾種食用菇類例如：

香菇、金針菇、木耳、草菇來做測驗以靈芝基因體為參考去比對這幾種食用菇類是否含有靈芝三萜其藥用成份。

## 3. 專題進行方式

### (一)實驗材料

鉢、Tube、CTAB、TE Buffer、70%酒精、99.5%藥用酒精、7.5M 醋酸胺、Phenol chloroform、RNase A、Proteinase K

### (二)CTAB 抽取 DNA 流程

本研究需要先利用 ITS1, 4 的片段進行序列比對，為了取得靈芝、香菇和金針菇的 ITS1, 4 片段序列，必須將其 3 種的 DNA 抽取出來，隨後利用聚合酶連鎖反應(pcr)大量複製其 ITS2 片段序列並其定序，最後將此 3 種 dna 產物與三萜 17 個引子進行分析，以下是 dna 抽取實驗的流程：

1. 靈芝菌絲和半朵香菇與金針菇加入液態氮磨成粉狀後取 5 克放入 tube 中。
2. 加入 CTAB 將 50ml 的 tube 補滿並用石臘膜封膜，置入 55°C 水浴槽 15 分鐘，取出後低溫離心 8000rpm 10 分鐘，並取出上清液分至 2 管新管。
3. 分別加入 1/20 上清液體積 7.5 醋酸胺和兩倍上清液體積之 99.5%藥用酒精後低溫(-20°C)沉澱 1 小時，取出後離心 8000rpm 20 分鐘，去除上清液。
4. 加入 70%酒精，離心 8000rpm 5 分鐘後將酒精抽乾(重複 1~2 次)並將沉澱物放入 50°C 烘乾箱風乾 15 分鐘(需全乾)。
5. 分別加入 500ul TE buffer 回溶，並將分裝的兩管 tube 合併成 1 管 2cc
6. 加入 2ul RNase A，石臘膜封膜置入 55°C 水浴槽 20 分鐘。

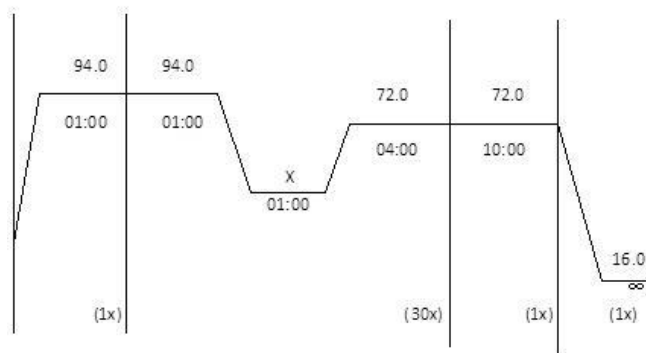
7. 取出後再加入 2ul Proteinase K, 在封膜置入 55°C 水浴槽 20 分鐘。
8. 加入等體積的 phenol chloroform, 均勻混合至乳白色, 離心 13000rpm 5 分鐘, 取上清液至新管, 重複此步驟直至中間曾乾淨。
9. 加入 1/20 上清液體積 7.5M 醋酸胺和兩倍上清液之 99.5% 藥用酒精後低溫(-20°C) 沉澱 1 小時, 取出後離心 13000rpm 10 分鐘並除去上清液。
10. 加入 70% 酒精, 離心 13000 rpm 1 分鐘後將酒精抽乾, 並將沉澱物至於烘乾箱風乾(需全乾)。
11. 加入 200ul TE buffer 回溶(量少 150 ul)。
12. 配置 0.8% 的洋菜膠進行電泳 (100V), 再去染膠 12 分鐘, 最後照膠, 得知實驗結果。

### (三) Primer 設計

我們使用以下引子是由劉志俊主任所設計的來進行 PCR

GL17879-R	GL17879-F
GL18675-R	GL18675-F
GL21690-R	GL21690-F
GL24992-R	GL24992-F
GL25499-R	GL25499-F
GL31761-R	GL31761-F
GL17808-R	GL17808-F
GL24085-R	GL24085-F
GL24088-R	GL24088-F
GL25304-R	GL25304-F
GL26574-R	GL26574-F
GL23174-R	GL23174-F

GL22911-R	GL22911-F
GL23338-R	GL23338-F
GL23376-R	GL23376-F
GL29704-R	GL29704-F
GL31771-R	GL31771-F

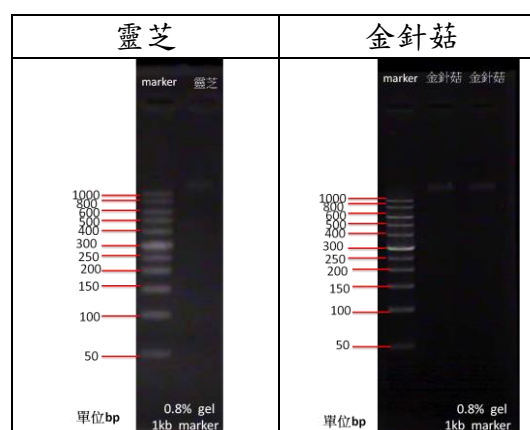


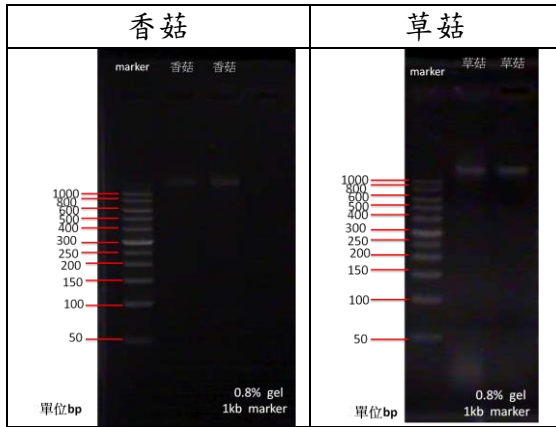
X 隨引子不同會有不同溫度變化

## 4. 主要成果

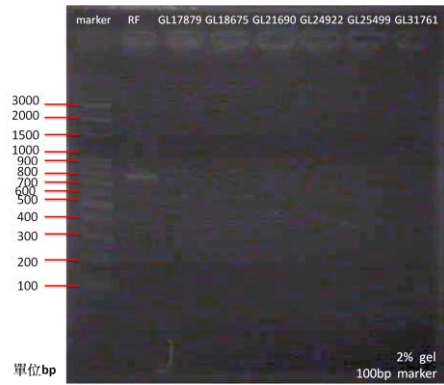
### (一) genomic DNA 結果

品種	靈芝	金針菇	香菇	木耳	草菇
成功 / 失敗	成功	成功	成功	失敗	成功



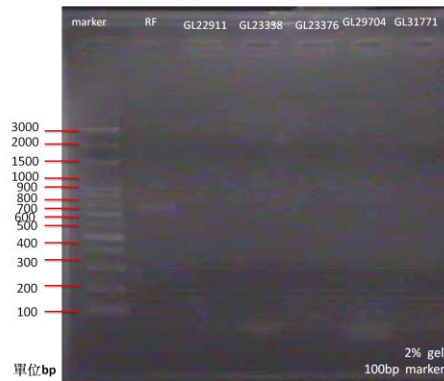
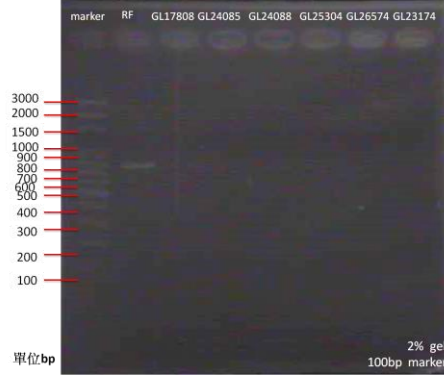
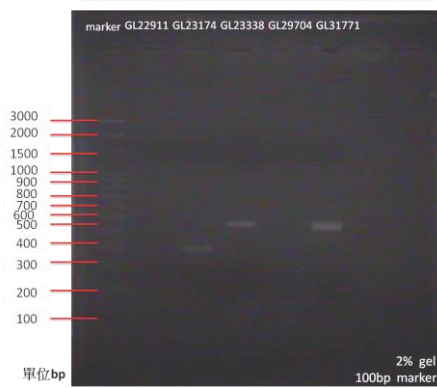
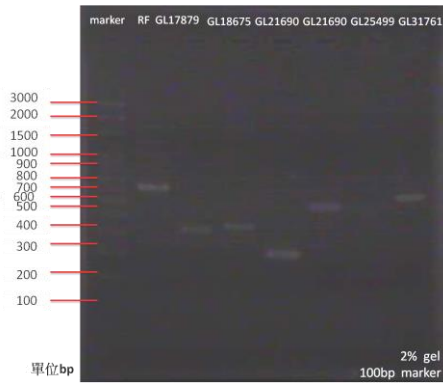


金針菇:

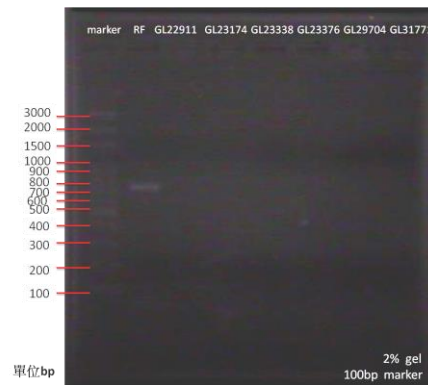


(二) PCR

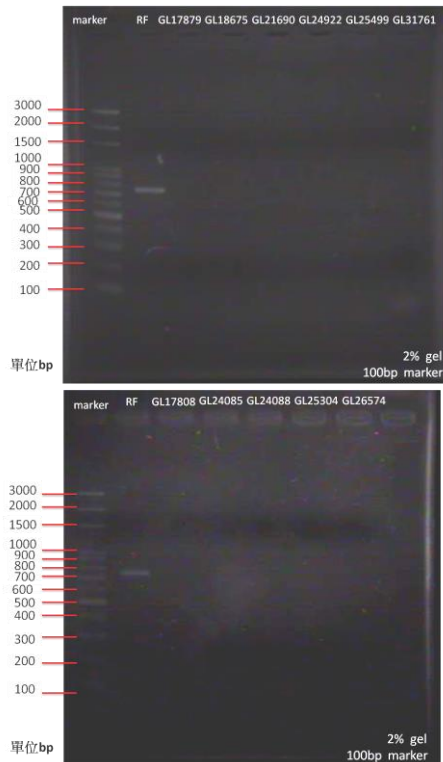
靈芝:



香菇:

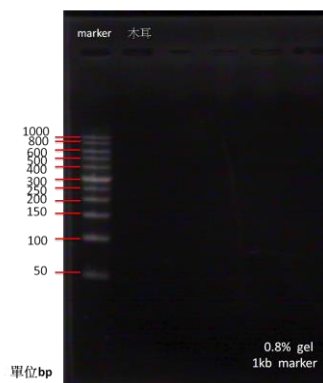






### (三)失敗的結果

木耳的 DNA 離心之後還是容易飄浮，不易抽取，所以失敗



### 5. 評估與展望

現在的人都注重養身，從飲食方面著手，如何吃的健康？吃的營養？很多人都會吃保健食品，像是靈芝，但往往都需要高額的花費，如果能從生活中取得較常見的菇類，一樣具有靈芝三萜的成分，既可以降低花費，也可以吃的健康。

如果做更深入的研究，未來有

機會將靈芝三萜的基因植入酵母菌中，大量生產，也許在未來市面上，靈芝三萜是很常見，也很容易取得的。

### 6. 結語

一開始我們使用馬鈴薯培養基進行靈芝培養，再將長出來的靈芝菌絲刮下，去抽取 DNA，再去跑 PCR 循環，但這樣有可能抽到馬鈴薯培養基上的基因，所以我們使用劉志俊主任栽種的靈芝，來抽取 DNA，所得到的 DNA 比較純。

用來做比對的食用菇類：金針菇、香菇、木耳、草菇，其中木耳的 DNA 抽取較為不易，所以失敗；而其他菇類 DNA 抽取順利，進而和靈芝引子進行配對；我們推測香菇會跟靈芝比較接近，但實驗結果不是如此，可能需要設計主要給香菇跑 PCR 的引子。

### 7. 銘謝

感謝劉志俊主任的指導，給予我們專題的題目與方向，也謝謝張慧玫老師提供我們的實驗方面協助，讓我們的專題可以順利進行，遇到問題也都能迎刃而解。

### 8. 參考文獻

- [1] “神農本草經”
- [2] “本草綱目”
- [3] “A Study on the Synthesis Pathway of Ganoderma Triterpenes”, 鄒季甫碩士論文.
- [4] “中國靈芝亞科的分類研究”，趙繼鼎、徐連旺、張小青.
- [5] 網址：  
<http://www.genome.jp/kegg/>(參考路徑)
- [6] 網址：  
<http://www.mohw.gov.tw/CHT/Ministry/Index.aspx>(衛生福利部)

[7]網址:

[http://www.07f.org/ganoderma\\_select0ne.php?ID=5](http://www.07f.org/ganoderma_select0ne.php?ID=5)(靈芝大學-靈芝三  
菇)