

嘉南藥理科技大學 97 年度教師專題研究計畫成果報告

一、基本資料

計畫類型	<input type="checkbox"/> 重點研究 <input checked="" type="checkbox"/> 一般個人型研究				
計畫主持人	劉坤湘	單位	生物科技系	職級	助理教授
計畫名稱	樟芝漆氧化酶基因之分離與光誘導表現之研究				
執行期限	民國 97 年 1 月 1 日起至民國 97 年 12 月 31 日止				
※計畫編號：	CN9720				

中華民國 98 年 2 月 26 日

研究計畫內容

(一) 摘要

以褐腐菌類、屬於台灣特有種真菌的樟芝 (*Taiwanofungus camphoratus*) 為實驗材料，由於在先前實驗中無意間發現其中具有漆氧化酶 (laccase) 的活性，並可經由適當之光照誘導而增加漆氧化酶的活性，因而針對此一已知可用於分解木質素 (lignin) 等多項生理功能的酵素—漆氧化酶，計畫以反轉錄聚合酶鏈鎖反應 (reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)，放大出樟芝漆氧化酶基因 cDNA(s)，以進行漆氧化酶基因的分離與光誘導表現之研究。

由於樟芝在先前的研究中，所含多項成分已為醫療上或抗老化等功能所肯定，針對真菌漆氧化酶的存在與相關研究，相信亦是一個值得探討的領域。因此計畫以樟芝為實驗材料，進行漆氧化酶基因的分離，並且能夠進一步研究其基因表現，對於樟芝價值的再提升、以及漆氧化酶的研究與利用，都將是具有挑戰性與應用性的研究。

(二) 結果與討論

1. 光誘導固態培養之樟芝菌絲產生漆氧化酶活性

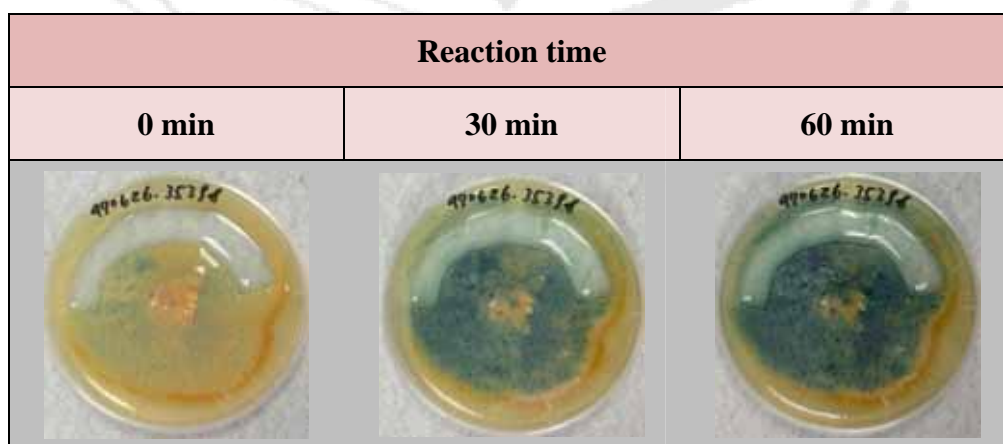


圖 1. 樟芝菌株 BCRC35398 經光照後，以 ABTS 初步進行酵素活性測試之檢測結果。

如圖 1 所示，於加入 ABTS 後 30 分鐘至 60 分鐘，藍色呈色顯示菌絲具有漆氧化酶活性。證明樟芝漆氧化酶活性可經光照誘導。

2. 聚合酶鏈鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 引子設計



圖 2. 經比對相近物種漆氧化酶基因序列，所設計引子在基因上的相對位置。其中 I、II、III、IV 表示為銅離子結合位置

3. 樟芝漆氧化酶基因 cDNA 之分離

經由比對多條已發表之真菌漆氧化酶基因，參考保守區域設計引子，於 PCR 放大後，得到樟芝漆氧化酶基因 cDNA 的部分序列。圖 3 為 RT-PCR 反應後之膠體電泳圖，箭頭所示為預期長度約 999 bp 之漆氧化酶基因 cDNA。

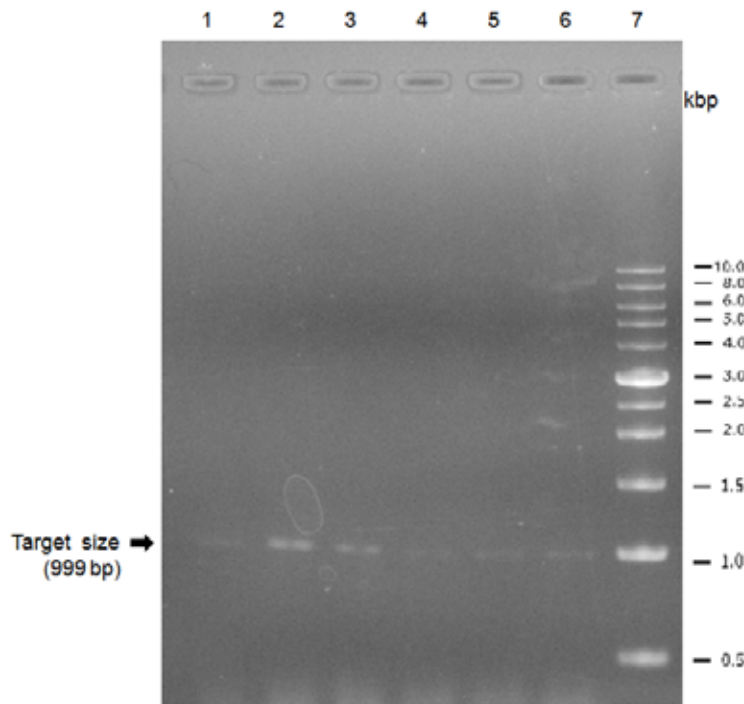


圖 3. 樟芝菌株 BCRC35398 經光照後萃取 RNA，經由 RT-PCR 反應後進行膠體電泳的結果。Lane 2 為 PCR 反應時所使用的 annealing temperature 為 52.7°C，可得較佳的實驗結果，預期長度約為 999 bp。

4. 漆氧化酶基因序列比對

經過 RT-PCR 產物接合至 pGEM-T Easy Vector、轉殖大腸桿菌、少量繁殖後進行質體純化，將此重組質體進行定序分析後，利用生物資訊網站 National Center for Biotechnology Information (NCBI) 中的 BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 功能，與資料庫現有之漆氧化酶基因序

列進行比對，結果如圖 4。紅色區塊顯示與資料庫內現有之漆氧化酶基因序列具有及高相似度，確認所分離出之 cDNA 序列為漆氧化酶基因。

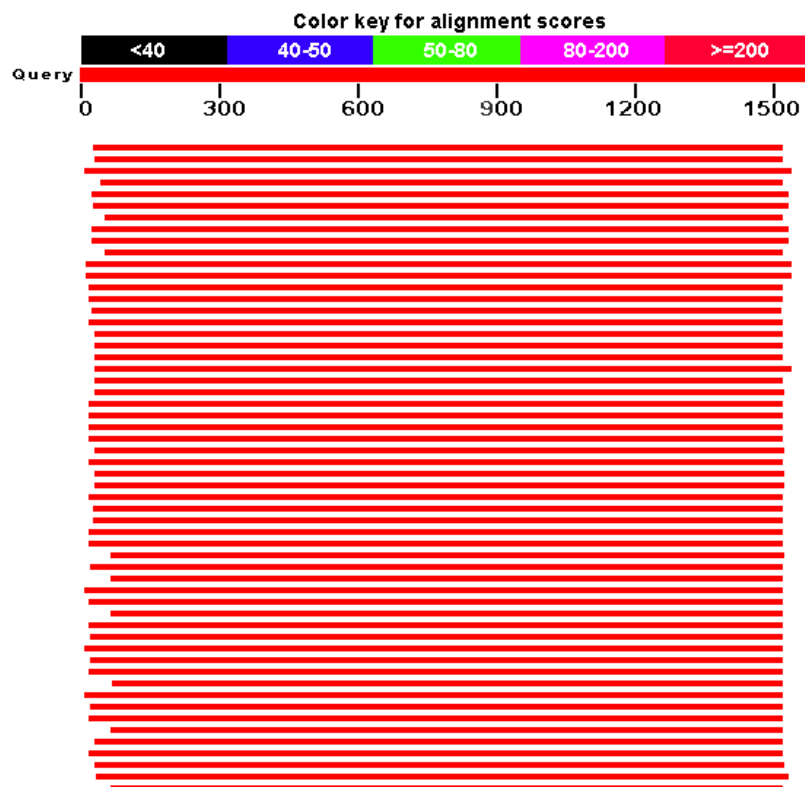


圖 4. 將所分離出之 cDNA 片段經與 NCBI 資料庫比對後的結果。由紅色區塊顯示與資料庫內現存基因序列有極高相似度。

5. 未來展望

目前初步結果顯示，樟芝固態培養下經光照可誘導漆氧化酶基因表現；此計畫未來可朝以下方向進行：繼續延長光照時程/照光後避光/避光後照光等處理，以了解在不同光照處理下，漆氧化酶基因表現情形，期能對該基因有更多了解。

(三) 參考文獻

Chang, T.T. and Chou, W.N. (1995) *Antrodia cinnamomea* sp. nov. on *Cinnamomum kanehirai* in Taiwan. *Mycol. Res.* 99: 756-758.

Chang, T.T and Chou, W.N. (2004) *Antrodia cinnamomea* reconsidered and *A. salmonea* sp. nov. on *Cunninghamia konishii* in Taiwan. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 45: 347-352.

Galhaup, C., Goller, S., Peterbauer, C.K., Strauss, J., and Haltrich, D. (2002) Characterization of the

- major laccase isoenzyme from *Trametes pubescens* and regulation of its synthesis by metal ions. *Microbiology* 148: 2159-2169.
- Kumar, S.V., Phale, P.S., Durani, S., and Wangikar, P.P. (2003) Combined sequence and structure analysis of the fungal laccase family. *Biotechnol. Bioeng.* 83: 386-94
- Leonowicz, A., Cho, N.S., Luterek, J., Wilkolazka, A., Wojtas-Wasilewska, M., Matuszewska, A., Hofrichter, M., Wesenberg, D., and Rogalski, J. (2001) Fungal laccases: properties and activity on lignin. *J. Basic Microbiol.* 41: 185-227.
- Palmieri G., Bianco, C., Cennamo, G., Giardina, P., Marino, G., Monti, M., and Sannia, G. (2001) Purification, characterization, and functional role of a novel extracellular protease from *Pleurotus ostreatus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 2754-2759.
- Wu, S.H., Ryvarden, L., and Chang, T.T. (1997) *Antordia camphorate* ("niu-chang-chih"), a new combination of a medicinal fungus in Taiwan. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 38: 273-275.
- Wu, S.H., Yu, Z.H., Dai, Y.C., Chen, C.T., Su, C.H., Chen, L.C., Hsu, W.C., and Hwang, G.Y. (2004) *Taiwanofungus*, a polypore new genus. *Fungal Sci.* 19: 109-116.
- Yaver, D.S, Xu, F., Golightly, E.J., Brown, K.M., Brown, S.H., Rey, M.W., Schneider, P., Halkier, T., Mondorf, K., and Dalboge, H. (1996) Purification, characterization, molecular cloning, and expression of two laccase genes from the white rot basidiomycete *Trametes villosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 834-841.
- Zang, M. and Su, C.H. (1990) *Ganoderma comphoratum*, a new taxon in genus *Ganoderma* from Taiwan, China. *Acta. Bot. Yunnanica* 12: 395-396.