

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

銀耳(*Tremella fuciformis*)多醣體量產關鍵技術及機能性 產品開發--銀耳機能性保健功效之研究及產品開發 研究成果報告(精簡版)

計畫類別：整合型
計畫編號：NSC 99-2321-B-468-002-
執行期間：99年08月01日至100年07月31日
執行單位：亞洲大學生物科技學系

計畫主持人：范宗宸
共同主持人：施養佳、彭慶添

處理方式：本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2年後可公開查詢

中華民國 100年10月14日

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫 成果報告
 期中進度報告

(計畫名稱) 銀耳(*Tremella fuciformis*) 多醣體量產關鍵技術及
機能性產品之開發--銀耳機能性保健功效之研究及產品開發

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC 99-2321-B-468-002-

執行期間：2010年08月01日至2011年07月31日

執行機構及系所：亞洲大學 生物科技學系

計畫主持人：范宗宸

共同主持人：施養佳、彭慶添

計畫參與人員：陳金詩、許素連

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)： 精簡報告 完整報告

本計畫除繳交成果報告外，另須繳交以下出國心得報告：

赴國外出差或研習心得報告

赴大陸地區出差或研習心得報告

出席國際學術會議心得報告

國際合作研究計畫國外研究報告

處理方式：除列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權， 一年 二年後可公開查詢

中華民國 100 年 08 月 23 日

一、摘要：

本計畫分成(一)銀耳菌株分子標幟鑑定分成兩個層次，分別為：種間及種內之鑑定。

(1)種間鑑定：我們利用引子 BM36/BM37 做 Internal transcript spacer(ITS) - PCR，發現在黑木耳、白木耳、香灰菌種間的鑑定確實有明顯不同，經 PCR 及電泳後得到黑木耳條帶位置在 600bp，白木耳條帶位置在 500bp，香灰菌條帶位置在 900bp；另外，我們也將巴西蘑菇及舞菇進行種間鑑定，發現巴西蘑菇條帶位置在 750bp，舞菇條帶位置在 650bp，可由此兩個結果顯示 ITS 確實可以運用在種間的鑑定，但在種內的鑑定時，發現銀耳同種內不同菌株其 ITS 序列相似度高達 99% 以上，且大多數為單核苷酸多型性(SNP)，較難找出可做為種內鑑定的序列位置。

(2)種內鑑定：在菇類方面有關SSR的資料很少，因此本實驗室設計一套鈎取Simple sequence repeat(SSR)引子的技術，結合adaptor-ligation PCR 和suppression PCR技術發展出dual-suppression PCR method，利用此種方法在銀耳的SSR兩翼序列設計專一性引子進行銀耳種內的分子鑑定；目前我們已經得到三組引子對：BM66/93及BM67/92及BM99/102，從BM66/93這組引子，我們得到LT1, LT2, LT4, LT6的SSR序列是 $(AG)_{14}$ ，但LT7, LT12的SSR 序列是 $(AG)_{13}$ ，此結果顯示若是單由一組SSR引子是無法完整鑑別出銀耳種內的差異，因此，而BM67/BM92這組引子，得到LT2的SSR序列是 $(C)_{15}(T)_{16}$ ，LT1, LT4的SSR序列是 $(C)_{14}(T)_{18}$ ，LT6的SSR序列是 $(C)_{13}(T)_{19}$ ，LT7的SSR序列是 $(C)_{14}(T)_{16}$ ，LT12的SSR序列是 $(C)_{12}(T)_{19}$ ，最後是BM99/102這組引子，得到LT1, LT2, LT7的SSR序列是TGT，LT4, LT6, LT12的SSR序列是GTCTCCATTTGT，此結果顯示在銀耳種內的差異極為微小，雖然並未達到預定的六組引子，但藉由上述結果相互比較，已可得到正確的答案。因此，未來我們將此技術也可以廣泛應用在菇類的鑑定，做為銀耳品種間或菇類之分子指紋分析及鑑定，並做為產品指紋分析的鑑定前導平台。本計畫的研究成果：投稿一篇關於銀耳分子鑑定在IEEE期刊 (2011 11th IEEE International Conference on Bioinformatics and Bioengineering)，目前已被接受，題目為The application of molecular markers to identify edible fungi - A case study of *Tremella fuciformis*。

(二)本計畫其中一項目的為探討銀耳萃取液對過氧化氫誘發視網膜色素上皮細胞氧化傷害之保護與修復作用，其成果如下：銀耳LT1品系經由萃取後所得分子量 $>8 \times 10^5$ Da之多醣體粗萃物，經細胞毒性試驗結果證實0.1-1mg/ml銀耳萃取物對於視網膜色素上皮細胞(ARPE-19)不具毒殺性，

且48-72小時對於細胞本身還具有促進生長作用。接著將銀耳萃取物作用於被H₂O₂氧化傷害之ARPE-19細胞，結果顯示在濃度0.1-1mg/ml之銀耳萃取物對細胞都有保護的效果，且濃度0.5-1mg/ml之銀耳萃取物對細胞也具有修復之作用。最後，進行流式細胞儀分析銀耳萃取物濃度為0.05-1mg/ml可減緩過氧化氫造成細胞產生ROS的量。以500uM過氧化氫單獨作用於細胞所產生的ROS量為77.5%，當加入銀耳萃取物後細胞所產生的ROS量明顯減少至50.5-62.8%。此結果證實LT1銀耳萃取物對於過氧化氫誘發視網膜色素上皮細胞氧化傷害具有保護作用，且銀耳萃取物在低濃度(0.05mg/ml)時即有減少ROS產生之作用。

關鍵詞：銀耳，分子鑑定，銀耳萃取物、視網膜色素上皮細胞、過氧化氫誘發氧化傷害

二、計畫緣由與目的

菇蕈類很早即被國人當成食品或藥物使用，例如香菇、木耳、洋菇可以入菜，而靈芝、茯苓、銀耳等菇蕈類亦可作為醫療用途。這些食用菇蕈對中國人而言，不僅能增添食物的美味，更是日常身體保健與養生食療的重要食材。依據研究，多數的食用菇蕈類多醣具有抗腫瘤活性、增強免疫、抗癌症、降血糖、降血壓作用與降低膽固醇等生理活性 (Misaki *et al.*, 1986; Jong *et al.*, 1991; Yang *et al.*, 1989)。有文獻表示銀耳具有包括:抗憂鬱(Cheng *et al.*, 1996; Cheng *et al.*, 2002)、抗氧化(Liu *et al.*, 2005)、抗發炎(Wu *et al.*, 2007)、抗心肌細胞凋亡 (Qu *et al.*, 2009)、抗癌、抗突變性、降血壓、降血糖等(Ukai *et al.*, 1972; Wang *et al.*, 1983; Nie *et al.*, 2000)作用。在中國銀耳有用於治療肝癌病患的報告(Qu *et al.*, 2007)。對肝癌細胞 Hep G-2 有直接抑制作用(Li *et al.*, 2008)。科學研究也證實，銀耳多醣具有降低小鼠低密度膽固醇含量(Cheung *et al.*, 1996)、促進淋巴球增生與血小板細胞活性及增加脾臟巨噬細胞的活性(Ma *et al.*, 1992)、誘導人體產生致腫瘤壞死因子(tumor necrosis factor, TNF) (Gao *et al.*, 1997, 1996; Ukai *et al.*, 1992)。而銀耳酸性多醣可促進嗜乳酸桿菌之生長(Wu *et al.*, 2008)。β-葡聚醣 (β-gulcans) 能提升人體免疫力等(Xia *et al.*, 1989)。根據調查指出台灣有原生“銀耳”；分布於台北陽明山、惠蓀林場、阿里山等地，國內對銀耳的研究大多集中在分類生活史和栽培條件上(陳, 1999)，亦曾有小面積的栽培，但後來因大陸白木耳的傾銷，因而已很少量產。在台灣建立銀耳子實體量產及銀耳多醣體萃取等技術，可建立銀耳子實體生產及銀耳多醣體量產產業，將為台灣農業創造新興之產業。

過去銀耳的鑑定皆依靠其外表形態的調查，依據子實體生長的狀態及顏色來做分類，但因為其非傘菌類，所以子實體產生的變異相當的少，僅能用顏色做區隔，但依顏色區別常會受到環境的影響，而使顏色有所變化且顏色的差異僅在白黃間的比率而已，所以以子實體顏色做區隔在銀耳菌種的鑑定上稍兼薄弱。因此，進行銀耳菌株的分子標幟鑑定，對銀耳產能、遺傳育種工作，菌種保種、產品指紋分析及智慧財產之保護皆具有實用價值。另外，菌種純度亦將影響到子實體的產量及多醣體之萃取比率，所以保持菌種的純度及研發鑑定的方法為本計畫之關鍵技術之一。

本計畫主要研究目的是運用銀耳菌株的分子標誌鑑定技術，開創高產量之多醣體萃取（本計畫之關鍵技術之二），並建立天然銀耳機能性保健食品功效分析平台，開發具經濟效益之生產方式，以提取國內食品生技產業進行銀耳相關產品研發之重要依據(圖1)。

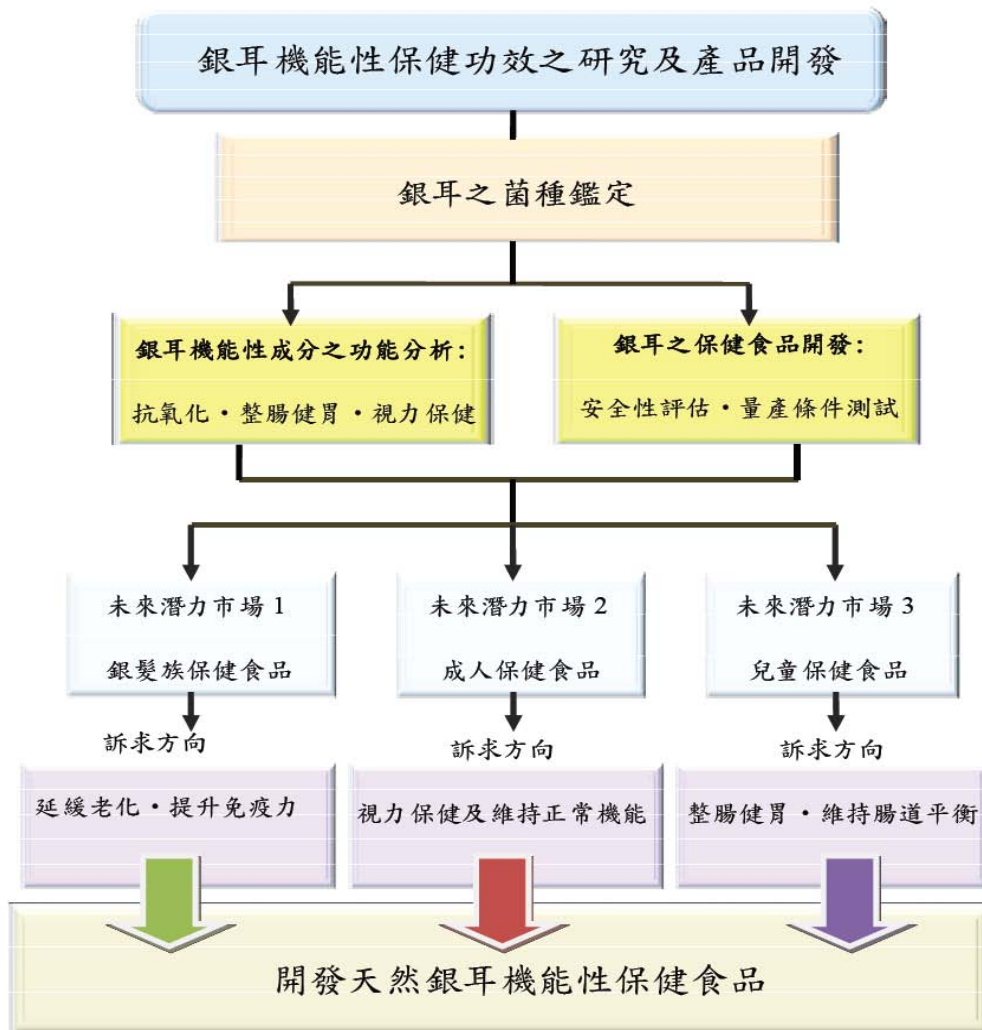


圖 1. 銀耳機能性保健功效研究及產品開發之規劃

三、材料與方法

3-1. 建立銀耳及香灰菌菌絲與銀耳子實體 DNA 萃取及分子鑑定之技術

3-1-1. CTAB 萃取 DNA 技術

材料來源為銀耳及香灰菌液態培養菌絲及太空包栽培之子實體，以 CTAB (Cetyltrimethylammonium bromide)法萃取 DNA，根據 Murray 及 Thompson (Murray and Thompson, 1980)的方法加以修改成適合本研究 DNA 萃取之方法，主要針對 NaCl 濃度修改為 2.8 M 高鹽濃度並且加入 PVP 幫助多醣沉澱防止植物酚類物質氧化影響 DNA 品質。

3-1-2. 建立 ITS、SSR 分子鑑定

a. ITS 分子鑑定

利用 IT1 及 IT2 兩個 ITS 引子去夾出 ITS1、5.8S 和 ITS2，如圖 2:

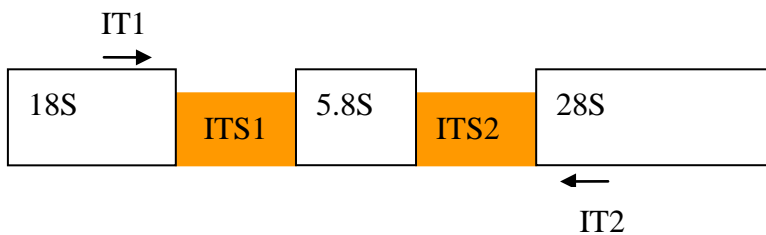
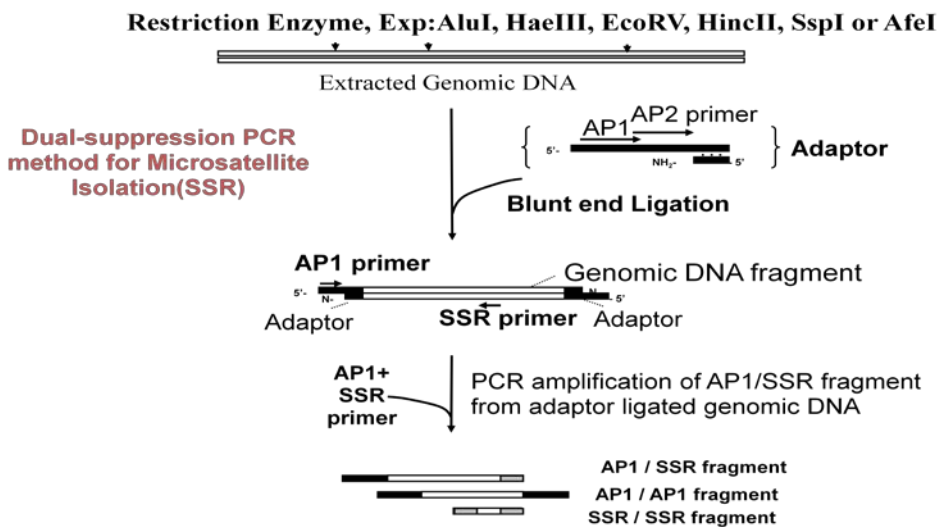


圖 2. ITS 模式圖

IT1 為 BM36，引子序列為 TCCGTAGGTGAACCTGCGG。IT2 為 BM37，引子序列為 TCCTCCGCTTATTAATATGC。

b. 建立 SSR 引子



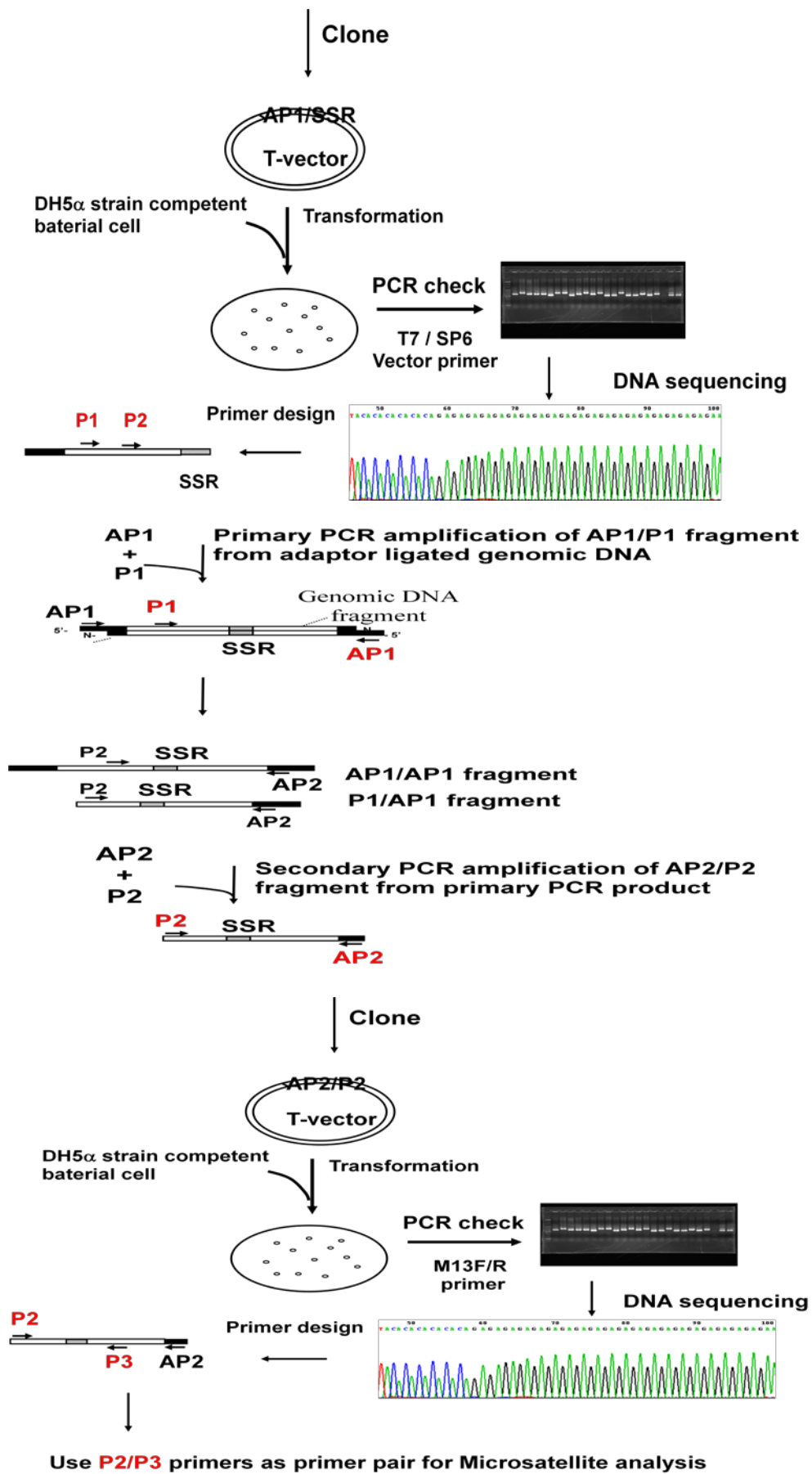


圖 3. Dual-suppression PCR method for Microsatellite Isolation (SSR)

3-2. 銀耳萃取液對過氧化氫誘發視網膜色素上皮細胞氧化傷害之保護與修復作用

材料:

A. 銀耳子實體

LT1 銀耳由子計畫一提供。

B. 藥品及培養基:

Trypsin-EDTA、0.04% Crystal violet solution、extraction buffer、PBS、DMEM-F12medium、DCFHDA

方法:

3-2-1. 銀耳前處理

利用第一年之多醣體萃取比例 1:60 由熱水浸提 5 小時方式以萃取出銀耳粗多醣，將粗萃之多醣體以濃縮分離膜(0.04 μ m 80K) 進行分離作用，可得到分子量 $>8 \times 10^5$ Da 之銀耳多醣粗萃物，再分別將分離後的多醣體加入 4 倍體積之 95% 乙醇，進行酒精沉澱，一天後離心取得多醣體，再將多醣體冰在 -80°C 待凍乾，凍乾後備用。

3-2-2. 探討銀耳萃取液對過氧化氫誘發視網膜色素上皮細胞氧化傷害之保護作用

3-2-2-1. 細胞毒性試驗 (MTT assay):

Adult Retinal Pigment Epithelium-19 (ARPE-19)，為一種人類視網膜色素上皮細胞株，培養在 DMEM-F12 培養基中，置於 37°C 、5% CO_2 的 T25 培養盒於培養箱中培養。當細胞約長九分滿則進行分盤，首先將舊培養基吸乾淨，再以 5 ml 1xPBS 緩衝液洗清，利用 Disposable pipette 吸去舊培養液，一至兩次後，捨去。加入 1ml Trypsin-EDTA 均勻潤濕細胞後，置入 37°C incubator 3-5 分鐘。自 incubator 取出細胞，輕拍 25T 使細胞由培養瓶底部剝離，於倒立顯微鏡下觀察，當細胞將要分離而呈現圓粒狀時，加入 3-5ml 細胞培養液(DMEM) 緩慢沖洗培養瓶底部數次後，取出細胞懸浮液置入 15ml 離心管中，再均勻混合數次，取出 200ul 細胞於 1.5ml eppendorf，取部分以血球計數盤計數，將 RPE-19 細胞以 $100 \mu\text{l}$ 之 5×10^4 cell/well 細胞量，接種於 96 well 微量培養盤 (microplates) 中，並置於培養箱 (incubator) 培養 24 小時後，移除舊培養液，再以 $100 \mu\text{l}/\text{well}$ PBS 緩衝液清洗細胞表面後並移除，而後再加入 $100 \mu\text{l}/\text{well}$ 細胞培養液及預測試濃度之樣品，並培養 24、48、72 小時後移除溶液，再分別加入 $100 \mu\text{l}/\text{well}$ 之 0.5 mg/ml MTT 溶液，於 37°C 細胞培養箱 (含 5% CO_2) 培養 4 小時後移除溶液，再加入 $100 \mu\text{l}/\text{well}$ DMSO 溶解 formazan 結晶，並於

空白well中加入同體積DMSO做為blank，使用ELISA reader於波長540 nm。偵測吸光值。

3-2-2-2.探討銀耳多醣對過氧化氫誘發視網膜色素上皮細胞氧化傷害之保護作用

將 RPE-19 細胞以 1000 μ l 之 6 x 10⁴ cell/well 細胞量，接種於 12 well 微量培養盤(microplates)中，並置於培養箱(incubator)培養 24 小時後，移除舊培養液，再以 500 μ l/well PBS 緩衝液清洗細胞表面後並移除舊培養液，而後再加入 1000 μ l/well 細胞培養液（配方組成參見表 3）及預測試濃度之樣品，並培養 12 小時後移除溶液，再以 500 μ l/well PBS 緩衝液清洗細胞表面後並移除，再加入 1000 μ l/well 細胞培養液和 100 μ l/well 500 μ M H₂O₂ 並培養 2 小時，移除溶液，以 500 μ l/well PBS 緩衝液清洗細胞表面後並移除，再加入 1000 μ l/well 細胞培養液，培養 4 小時後移除溶液，再以 500 μ l/well PBS 緩衝液清洗細胞表面後並移除，加入 3%福馬林 15 分鐘後移除，以 500 μ l/well PBS 緩衝液清洗細胞表面後並移除，加入 1%結晶紫 15 分鐘後移除，以 500 μ l/well PBS 緩衝液清洗細胞表面後並移除，加入 Extraction buffer 300 μ l/well 20 分鐘後測 O.D.590 nm。

3-2-2-3.探討銀耳多醣對過氧化氫誘發視網膜色素上皮細胞氧化傷害之修護作用

將 RPE-19 細胞以 1000 μ l 之 6 x 10⁴ cell/well 細胞量，接種於 12 well 微量培養盤(microplates)中，並置於培養箱(incubator)培養 24 小時後，移除舊培養液，再以 500 μ l/well PBS 緩衝液清洗細胞表面後並移除舊培養液，再加入 1000 μ l/well 細胞培養液和 100 μ l/well 500 μ M H₂O₂ 並培養 2 小時，移除溶液，以 500 μ l/well PBS 緩衝液清洗細胞表面後並移除，而後加入 1000 μ l/well 細胞培養液及預測試濃度之樣品，並培養 24 小時後移除溶液，再以 500 μ l/well PBS 緩衝液清洗細胞表面後並移除，再以 500 μ l/well PBS 緩衝液清洗細胞表面後並移除，加入 3%福馬林 15 分鐘後移除，以 500 μ l/well PBS 緩衝液清洗細胞表面後並移除，加入 1%結晶紫 15 分鐘後移除，以 500 μ l/well PBS 緩衝液清洗細胞表面後並移除，加入 Extraction buffer 300 μ l/well 20 分鐘後測 O.D. 590 nm。

3-2-2-4.利用流式細胞儀觀察過氧化氫誘發視網膜色素上皮細胞氧化傷害之保護作用

將 RPE-19 細胞以 12000 細胞量，接種於 6well 培養盤(microplates)中，並置於培養箱(incubator)培養 24 小時後，移除舊培養液，再以 500 μ l/well PBS 緩衝液清洗細胞表面後並移除舊培養液，而後再加入 1000 μ l/well 細胞培養液及預測試濃度之樣品，並培養 12 小時後移除溶液，再以

500 μ l/well PBS 緩衝液清洗細胞表面後並移除，再加入 1000 μ l/well 細胞培養液和 100 μ l/well 500 μ M H₂O₂ 並培養 2 小時，移除溶液，以 500 μ l/well PBS 緩衝液清洗細胞表面後並移除，再加入 1000 μ l/well 細胞培養液，培養 4 小時後移除溶液，再以 500 μ l/well PBS 緩衝液清洗細胞表面後，加入 1ml Trypsin-EDTA 均勻潤濕細胞後，置入 37°C incubator 3-5 分鐘。自 incubator 取出細胞，輕拍使細胞由培養瓶底部剝離，取出細胞懸浮液置入離心管，接著 PBS 緩衝液清洗細胞 1-2 次，最後，將細胞溶於 800ul PBS 再加入 10uM DCFHDA 染劑，37°C 反應 30 分鐘後上流式細胞儀進行分析。

四、執行進度及成果

4-1. 建立銀耳及香灰菌菌絲與銀耳子實體 DNA 萃取及分子鑑定之技術

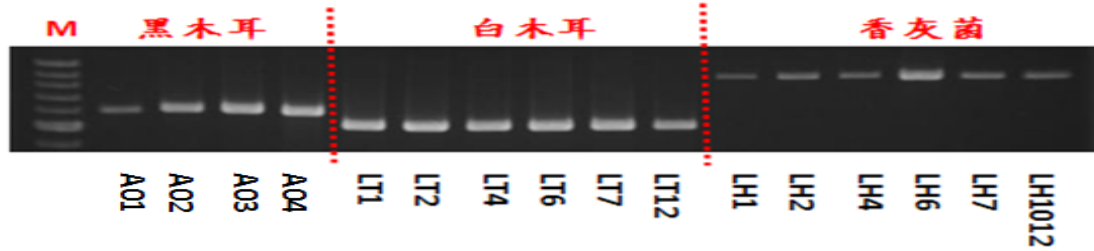
4-1-1. ITS 鑑定

在 ITS 的電泳圖 (圖一) 中，可以看到在黑木耳、白木耳、香灰菌種間的條帶位置確實有明顯不同，黑木耳條帶位置在 600bp，白木耳條帶位置在 500bp，香灰菌條帶位置在 900bp；而在黑木耳、白木耳、香灰菌種內條帶位置則無明顯差異。

在 ITS 的電泳圖(圖二)中，可以看到在發現在白木耳、黑木耳、舞菇、巴西蘑菇種間的鑑定確實有明顯不同，白木耳條帶位置在 500bp，黑木耳條帶位置在 600bp，舞菇條帶位置在 650bp，巴西蘑菇條帶位置在 750bp；而此四種真菌(白木耳、黑木耳、舞菇、巴西蘑菇)其種內之差異亦不明顯。

而為了探討是否能用 ITS 鑑定種間的差異，因此，將五種真菌(香灰菌、舞菇、巴西蘑菇、白木耳和黑木耳)的序列利用 NCBI BLAST 比對，得到親緣關係樹狀圖(圖三)。從樹狀圖可以看到分成三個族群：(1)香灰菌(2)舞菇和巴西蘑菇(3)白木耳和黑木耳，其中以舞菇和巴西蘑菇親緣關係較接近，白木耳和黑木耳親緣關係較接近，但香灰菌和另外兩個族群之間的親緣關係較疏遠。

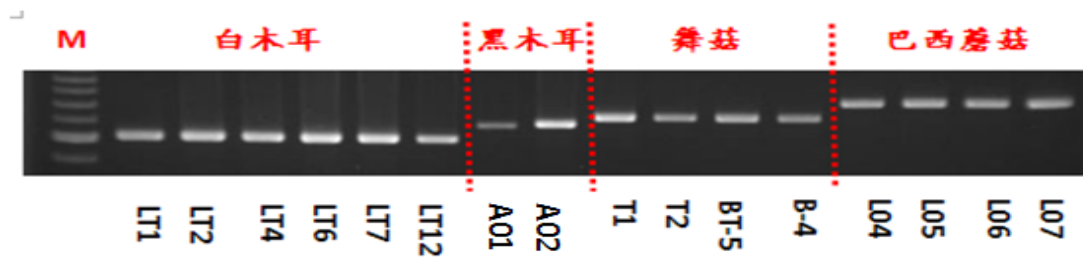
從上述結果來看，可以發現相同物種間(種內)的序列相似度很高，而在不同物種間除了條帶位置不同之外，其序列種間差異度也極高，因此可以證明利用 ITS 能鑑定出物種之間的不同，目前已可以用在菇類的種間鑑定，成功建立一套標準流程。



圖一、利用 BM36/BM37 引子鑑別黑木耳、白木耳、香灰菌之 ITS 差異。

註 1：A01、A02、A03、A04 為黑木耳，LT1、LT2、LT4、LT6、LT7、LT12 為白木耳，LH1、LH2、LH4、LH6、LH7、LH1012 為香灰菌，M 為 100~3000 bp marker。

註 2：A01:林院長提供的菌絲 BJ，A02:傳統市場子實體，A03:興農超市子實體，A04:林院長提供子實體。



圖二、利用 BM36/BM37 引子鑑別白木耳、黑木耳、舞菇、巴西蘑菇之 ITS 差異。

註 1：A01、A02 為黑木耳，LT1、LT2、LT4、LT6、LT7、LT12 為白木耳，T1、T2、BT-5、B-4 為舞菇，L04、L05、L06、L07 為巴西蘑菇，M 為 100~3000 bp marker。

註 2：A01:林院長提供的菌絲 BJ，A02:傳統市場子實體。



圖三、將五種真菌(香灰菌、舞菇、巴西蘑菇、白木耳和黑木耳)序列利用 NCBI BLAST 比對，得到親緣關係樹狀圖。

4-1-2. SSR 鑑定

從 ITS 鑑定的結果可以發現在種內的序列相似度極高，因此希望藉由發展 SSR 引子當作分子標誌去鑑別銀耳，目前本實驗室已經發展出兩組 SSR 引子對，(1)BM66/BM93 可以得到 LT1, LT2, LT4, LT6 是(AG)₁₄，LT7, LT12 是(AG)₁₃；(2)BM67/BM92 可以得到 LT1 和 LT4 均為(C)₁₄(T)₁₈，和 LT2, LT6, LT7, LT12 並不相同；(3) BM99/102 可以得到 LT1, LT2, LT7 是 TGT，LT4, LT6, LT12 是 GTCTCCATTTGT。從表一中可以發現，利用 dual-suppression PCR method 在銀耳的 SSR 兩翼序列設計專一性引子進行銀耳種內的分子鑑定，得到 BM66+93 及 BM67+92 及 BM99+102，發現在銀耳種內的差異極為微小，因此，我們認為繼續發展新的引子對將有助於種內鑑定，未來此技術也可以廣泛應用在菇類的鑑定。

表一、由 BM66/BM93 和 BM67/BM92 和 BM99/BM102 三組引子對，得到在不同銀耳菌株的 SSR 序列。

	BM66/BM93	BM67/BM92	BM99/BM102
LT1	(AG) ₁₄	(C) ₁₄ (T) ₁₈	TGT
LT2	(AG) ₁₄	(C) ₁₅ (T) ₁₆	TGT
LT4	(AG) ₁₄	(C) ₁₄ (T) ₁₈	GTCTCCATTTGT
LT6	(AG) ₁₄	(C) ₁₃ (T) ₁₉	GTCTCCATTTGT
LT7	(AG) ₁₃	(C) ₁₄ (T) ₁₆	TGT
LT12	(AG) ₁₃	(C) ₁₂ (T) ₁₉	GTCTCCATTTGT

LT1, LT2, LT7

CGTTAAACCGTCTCATTTCGCCCCTTGTTTAGTCTAGGTCTGG
TGGGGACAGGCCTGTGATAT

LT4, LT6, LT12

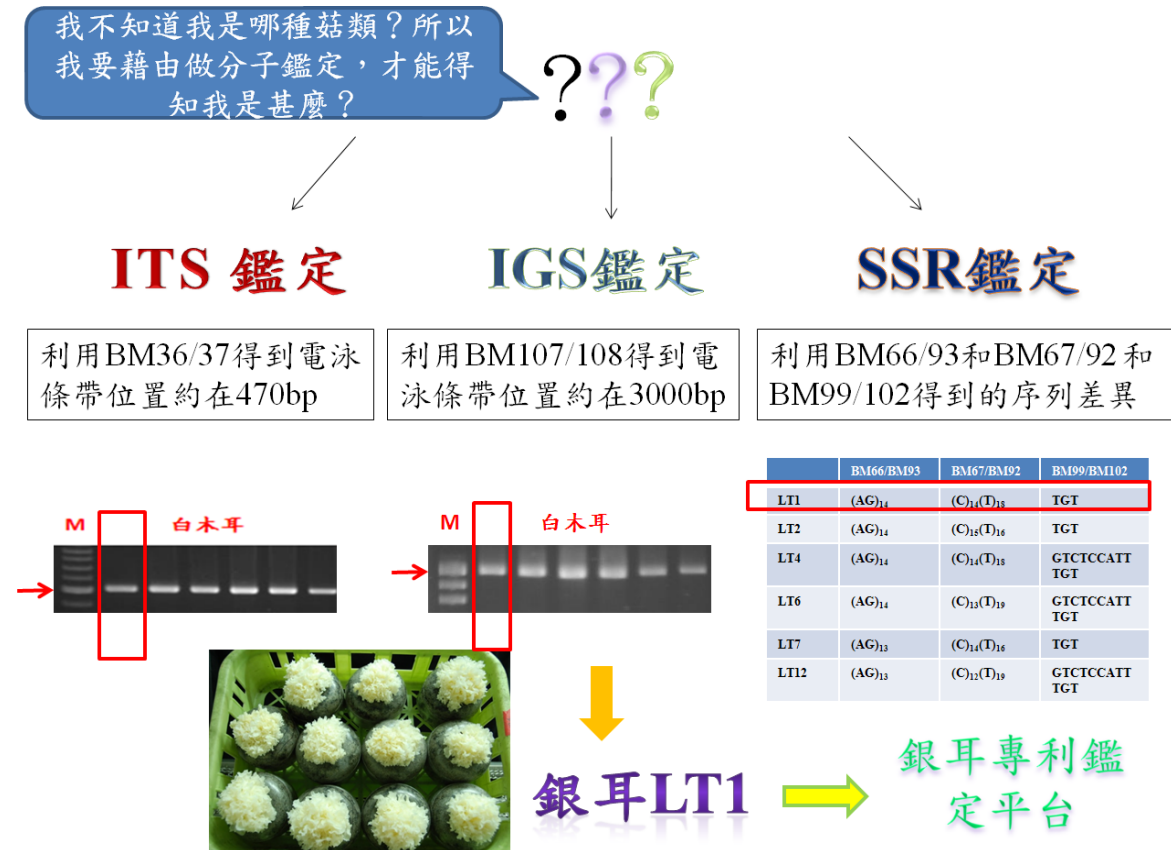
CGTTAAACCGTCTCATTTCGCCCCTGTCTCCATTTGTTTAGT
CTAGGTCTGGTGGGGACAGGCCTGTGATAT

圖四、利用此引子對(BM99+102)得到 LT1, LT2, LT4, LT6, LT7, LT12 的序列。

從紅色粗體字往上開始上游 231bp 均相同，從紅色粗體字往下計算下游 282bp 均相同，此實驗

總共做了四重覆，證明在銀耳菌株內仍存在些許的差異，而這些差異是否是造成銀耳顏色白黃比例不同的關鍵，仍在持續探討中。

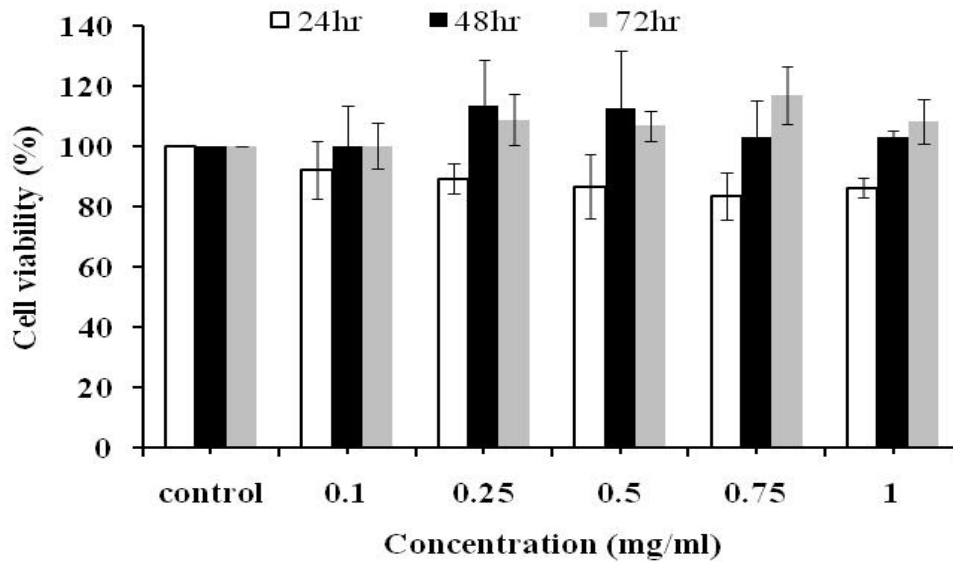
菇類分子鑑定的摘要：



4-2. 銀耳萃取液對過氧化氫誘發視網膜色素上皮細胞氧化傷害之保護與修復作用

4-2-1. 細胞毒性試驗 (MTT assay):

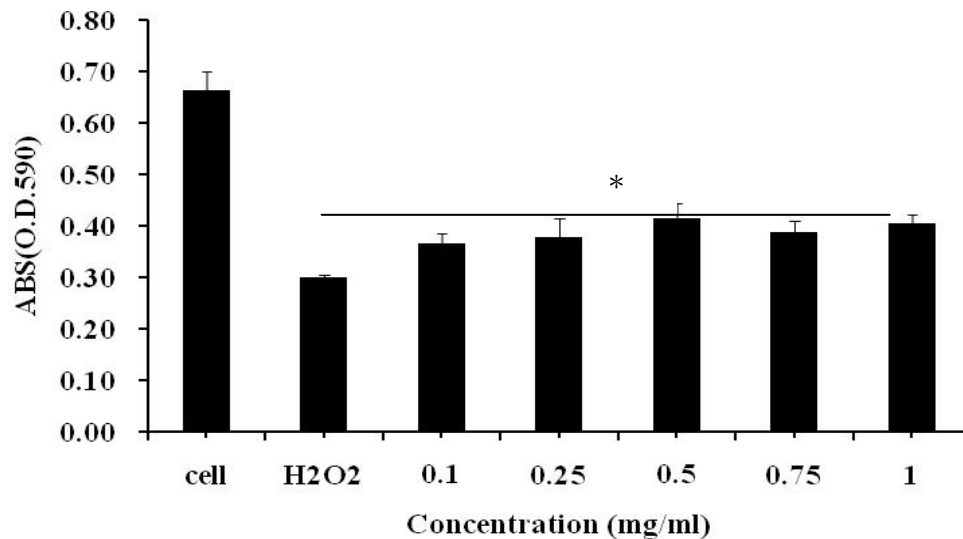
利用 LT1 銀耳多醣濃度 0.1、0.25、0.5、0.75、1mg/ml 作用於 ARPE-19 細胞，其研究結果顯示對 ARPE-19 不具有毒殺性，24 小時細胞存活率大於 80%，48-72 小時細胞存活率大於 100%，顯示 LT1 銀耳多醣對於 ARPE-19 具有增生的效果(圖五)。



圖五. LT1 銀耳多醣之細胞毒細試驗

4-2-2. 銀耳多醣對過氧化氫誘發視網膜色素上皮細胞氧化傷害之保護作用

銀耳萃取物作用於視網膜色素上皮細胞 (ARPE-19) 對 H₂O₂ 氧化傷害結果顯示，在濃度 0.1-1mg/ml 對細胞都有保護的效果 (圖六)。



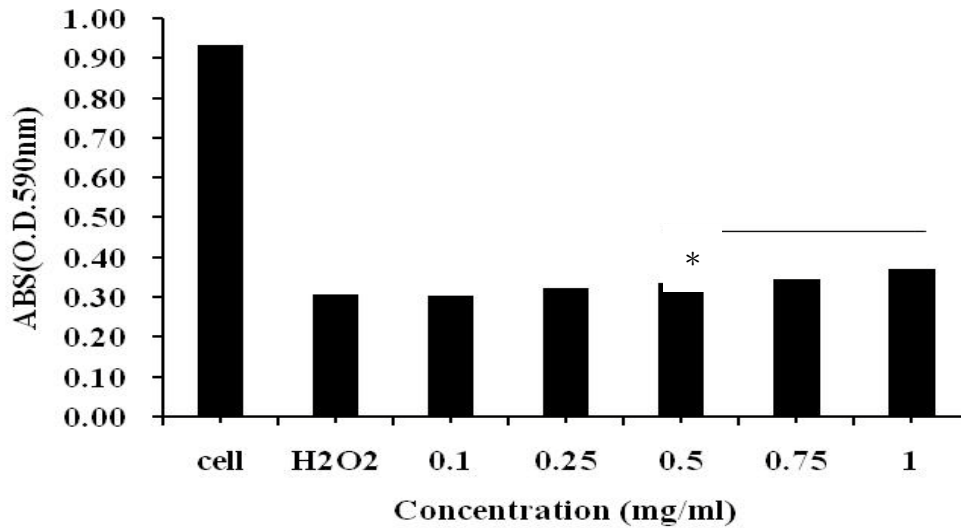
Values are expressed as mean \pm SD of triplicate samples

*P<0.05 ; **P<0.01 significantly different of normal mic group

圖六. 銀耳萃取物保護 ARPE-19 之 H₂O₂ 氧化傷害

4-2-3. 銀耳多醣對過氧化氫誘發視網膜色素上皮細胞氧化傷害之修復作用

銀耳萃取物作用於視網膜色素上皮細胞 (ARPE-19) 對 H₂O₂ 氧化傷害結果顯示，在濃度 0.5-1mg/ml 對細胞有修復的作用 (圖七)。



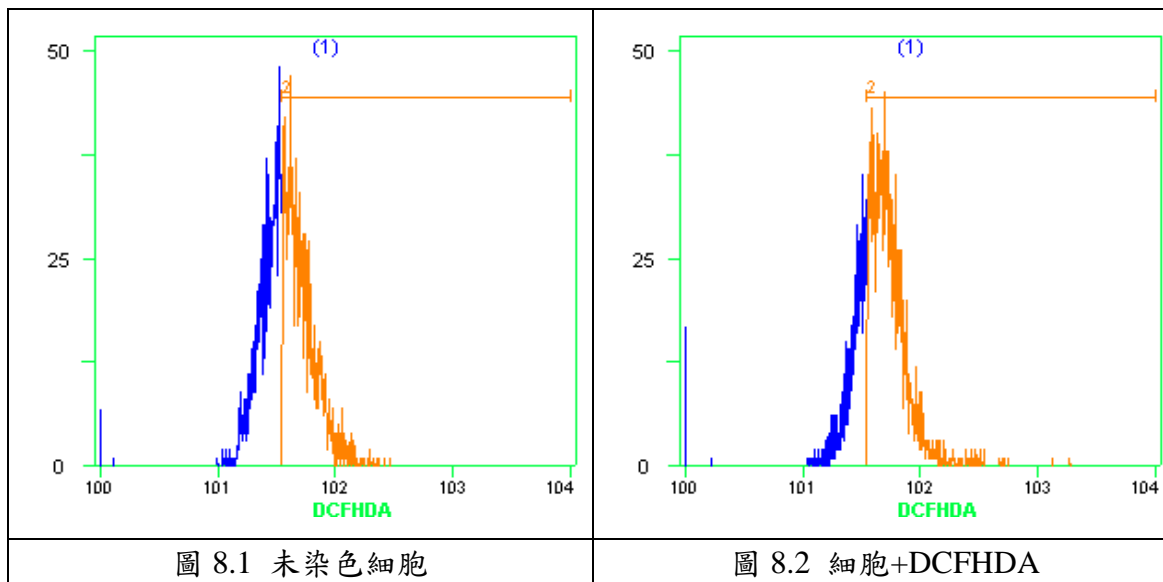
Values are expressed as mean \pm SD of triplicate samples

*P<0.05 ; **P<0.01 significantly different of normal mic group

圖七. 銀耳萃取物修復 ARPE-19 之 H2O2 氧化傷害

4-2-4. 利用流式細胞儀觀察過氧化氫誘發視網膜色素上皮細胞氧化傷害之保護作用

利用銀耳萃取物 0.05-1mg/ml 作用於視網膜色素上皮細胞 (ARPE-19) 對 H₂O₂ 氧化傷害之保護作用結果顯示: LT1 銀耳萃取物濃度 0.05、0.1、0.25、0.75mg/ml 有降低由 H₂O₂ 所誘發視網膜色素上皮細胞所產生的 ROS 量, 其 0.5 與 1mg/ml 則表現與對照組相同的 ROS 量, 綜合結果少量銀耳萃取物就可減少 ROS 產生(圖 8.1-8.9、圖八)。



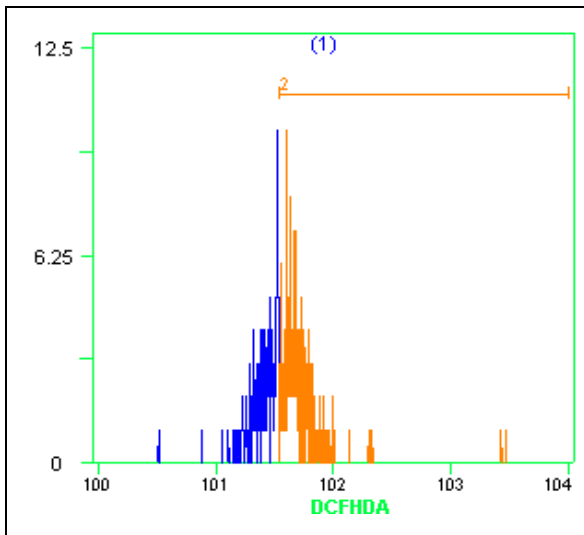


圖 8.3 H₂O₂+DCFHDA

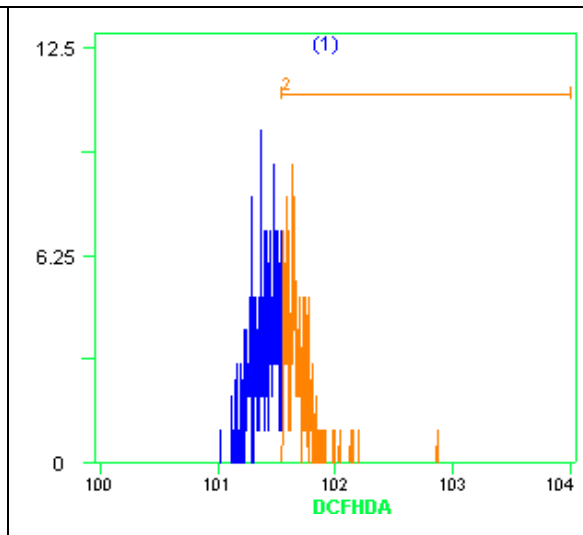


圖 8.4 H₂O₂+ 0.05mg/ml T.F

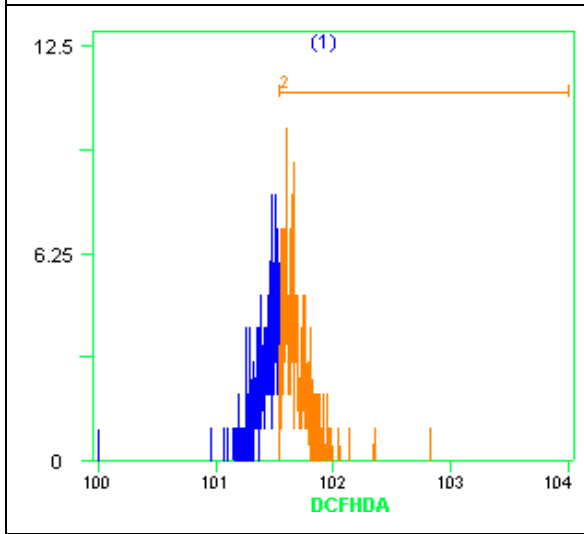


圖 8.5 H₂O₂+ 0.1mg/ml T.F

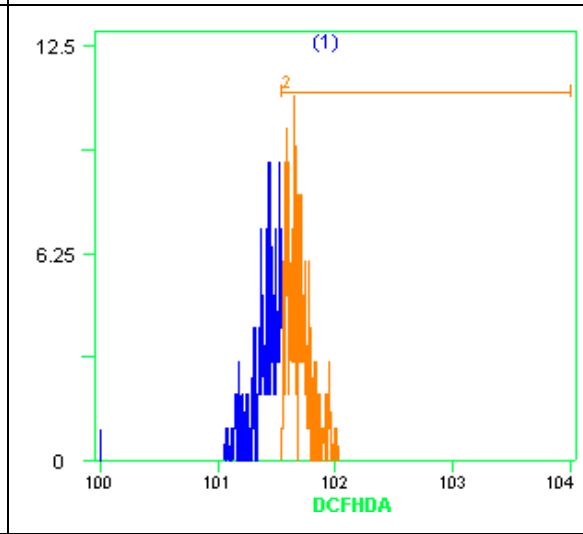


圖 8.6 H₂O₂+ 0.25mg/ml T.F

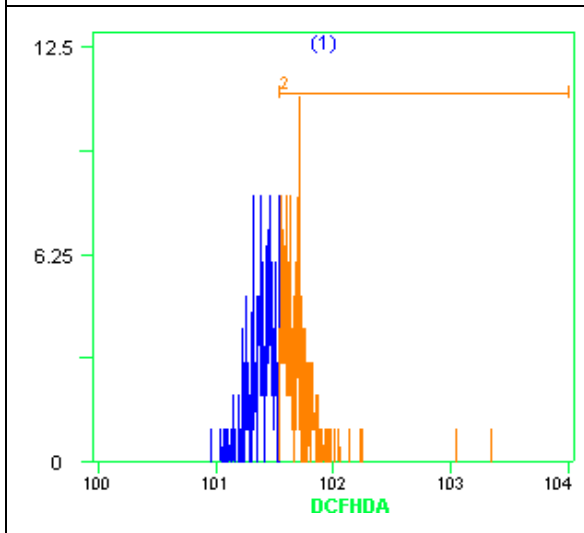


圖 8.7 H₂O₂+ 0.5mg/ml T.F

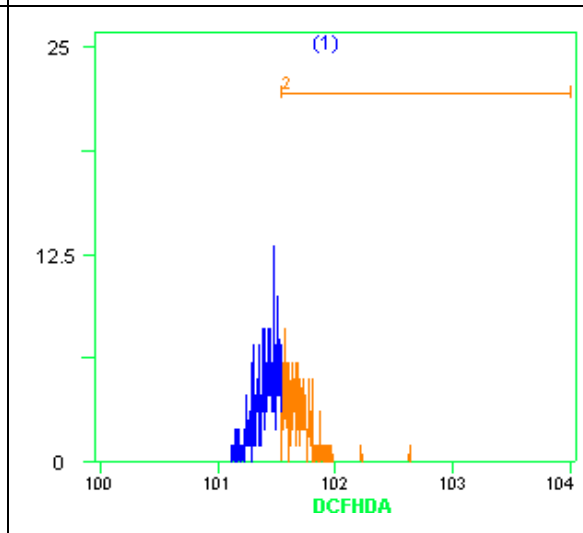
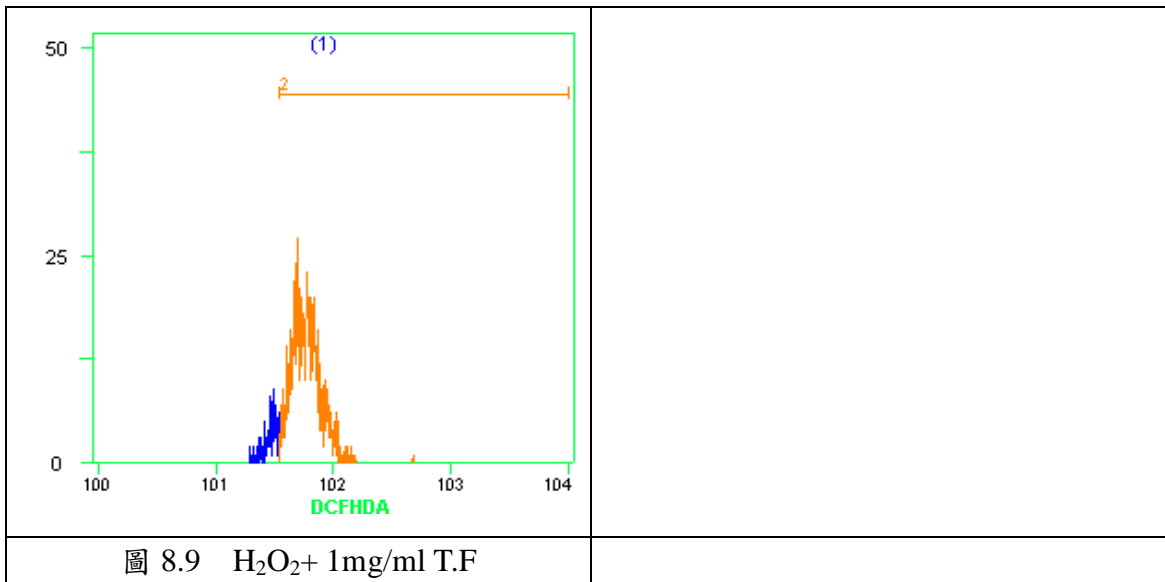
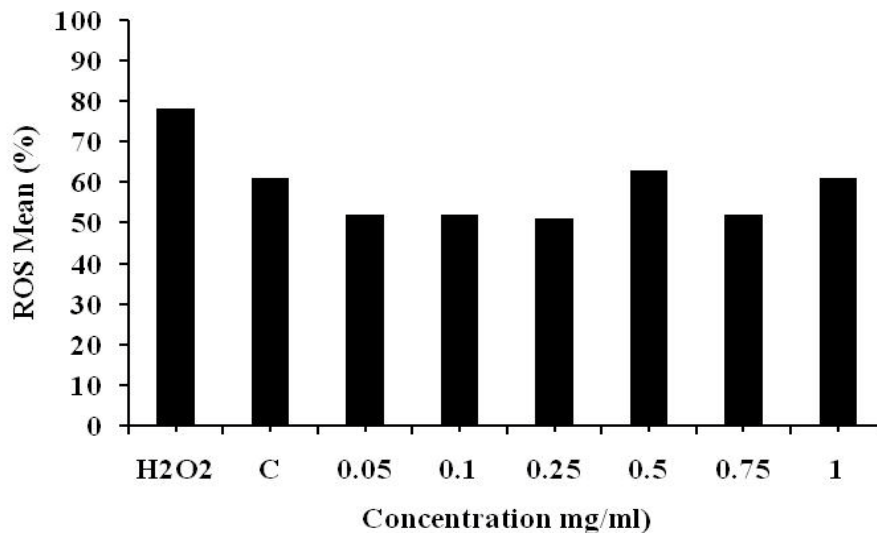


圖 8.8 H₂O₂+ 0.75mg/ml T.F



圖八. 流式細胞儀分析銀耳萃取物作用於過氧化氫傷害 ARPE-19 細胞之 ROS 量



圖八. 分析流式細胞儀之銀耳萃取物減少 ARPE-19 細胞所產生 ROS 量

五、計畫成果自評：(是否達成預定成效，如進度落後請說明原因)

(1) 以ISSR 反推SSR 以設計出可做為鑑定用的六組SSR 引子。

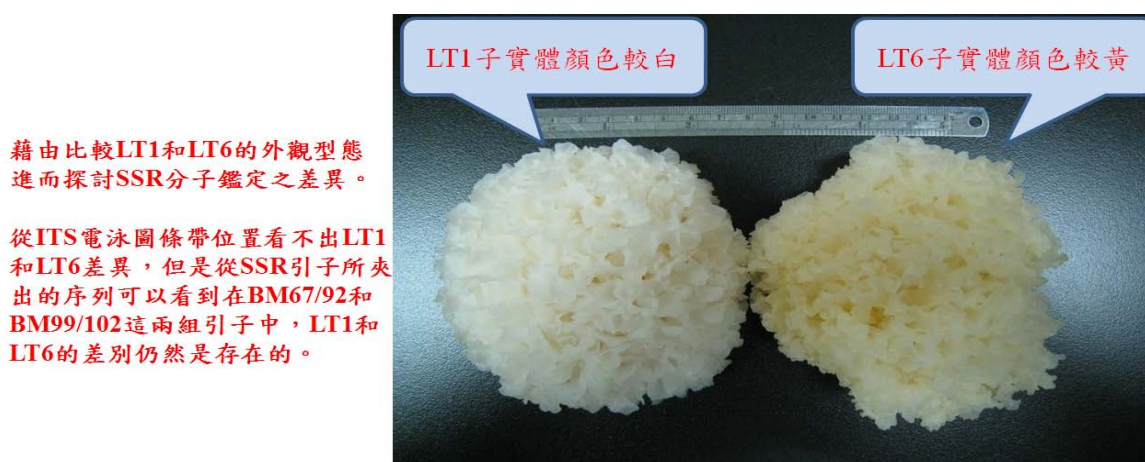
目前已做出三組SSR引子，要達到預定目標六組引子要比預期來的多一點時間，因為真菌SSR marker較其他生物(被子植物、昆蟲、魚、鳥和哺乳類)來的困難，原因如下：[1]多為無性繁殖，故遺傳歧異度低；[2]真菌基因組可能存有罕見性；[3]從已發表完整或部份的基因組序列內檢視SSR，發現真菌的SSR比其他生物體確實較少；[4]在14種真菌90%的SSR都是重複數很少，少於8；[5]94%已發表的SSR marker為單一核苷酸，於遺傳上學上很難應用。

(2) 以ITS、SSR 引子進行銀耳及香灰菌種間及種內之分子鑑定平台。

ITS已完成五種真菌(香灰菌、舞菇、巴西蘑菇、白木耳和黑木耳)的序列解序，且利用NCBI BLAST進行比對，可以證明利用ITS能鑑定出物種之間的不同，目前已可以用在菇類的種間鑑定，成功建立一套標準流程。SSR已完成BM66/BM93和BM67/BM92和BM99/BM102三組引子對，得到在不同銀耳菌株的SSR序列。

(3) 比較分子鑑定及子實體、菌絲生長外觀之關聯性。

目前得到LT1和LT6的子實體，LT1外觀較白，LT6外觀較黃，而我們從SSR分子鑑定得到在BM67/92，LT1是(C)₁₄(T)₁₈，LT6是(C)₁₃(T)₁₉；而在BM99/102，LT1是TGT，LT6是GTCTCCATTTGT，可發現從子實體的外觀和分子鑑定結果相同，證明其關聯性。



表二、由BM66/BM93和BM67/BM92BM99/102三組引子對，得到在銀耳菌株(LT1和LT6)的SSR序列。

	BM66/93	BM67/92	BM99/102
LT1	(AG) ₁₄	(C) ₁₄ (T) ₁₈	TGT
LT6	(AG) ₁₄	(C) ₁₃ (T) ₁₉	GTCTCCATTTGT

(4) 本計畫已達到預定成果，投稿一篇關於銀耳分子鑑定在IEEE期刊(2011 11th IEEE International Conference on Bioinformatics and Bioengineering)，目前已被接受，題目為The application of molecular markers to identify edible fungi - A case study of *Tremella fuciformis*。

(5) 已完成 LT1 銀耳萃取物對細胞之毒性試驗，結果顯示不具毒性，且有增生的作用。

(6) 已完成 LT1 銀耳多醣對過氧化氫誘發視網膜色素上皮細胞氧化傷害之保護作用。

國科會補助計畫衍生研發成果推廣資料表

日期:2011/09/01

國科會補助計畫	計畫名稱: 銀耳機能性保健功效之研究及產品開發
	計畫主持人: 范宗宸
	計畫編號: 99-2321-B-468-002- 學門領域: 保健食品研究開發
無研發成果推廣資料	

99 年度專題研究計畫研究成果彙整表

計畫主持人：范宗宸		計畫編號：99-2321-B-468-002-					
計畫名稱：銀耳(Tremella fuciformis)多醣體量產關鍵技術及機能性產品開發--銀耳機能性保健功效之研究及產品開發							
成果項目		量化			單位	備註（質化說明：如數個計畫共同成果、成果列為該期刊之封面故事...等）	
		實際已達成數（被接受或已發表）	預期總達成數(含實際已達成數)	本計畫實際貢獻百分比			
國內	論文著作	期刊論文	0	0	100%	篇	
		研究報告/技術報告	0	0	100%		
		研討會論文	0	0	100%		
		專書	0	0	100%		
	專利	申請中件數	0	0	100%	件	
		已獲得件數	0	0	100%		
	技術移轉	件數	0	0	100%	件	
		權利金	0	0	100%	千元	
	參與計畫人力 (本國籍)	碩士生	0	0	100%	人次	
		博士生	0	0	100%		
		博士後研究員	0	0	100%		
		專任助理	0	0	100%		
國外	論文著作	期刊論文	0	0	100%	篇	
		研究報告/技術報告	0	0	100%		
		研討會論文	0	0	100%		
		專書	0	0	100%		章/本
	專利	申請中件數	0	0	100%	件	
		已獲得件數	0	0	100%		
	技術移轉	件數	0	0	100%	件	
		權利金	0	0	100%	千元	
	參與計畫人力 (外國籍)	碩士生	0	0	100%	人次	
		博士生	0	0	100%		
		博士後研究員	0	0	100%		
		專任助理	0	0	100%		

<p>其他成果 (無法以量化表達之成果如辦理學術活動、獲得獎項、重要國際合作、研究成果國際影響力及其他協助產業技術發展之具體效益事項等，請以文字敘述填列。)</p>	<p>本計畫的研究成果：投稿一篇關於銀耳分子鑑定在 IEEE 期刊 (2011 11th IEEE International Conference on Bioinformatics and Bioengineering)，目前已被接受，接受函如附件，題目為 The application of molecular markers to identify edible fungi - A case study of Tremella fuciformis。</p>
--	---

	成果項目	量化	名稱或內容性質簡述
科 教 處 計 畫 加 填 項 目	測驗工具(含質性與量性)	0	
	課程/模組	0	
	電腦及網路系統或工具	0	
	教材	0	
	舉辦之活動/競賽	0	
	研討會/工作坊	0	
	電子報、網站	0	
	計畫成果推廣之參與(閱聽)人數	0	

國科會補助專題研究計畫成果報告自評表

請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況、研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）、是否適合在學術期刊發表或申請專利、主要發現或其他有關價值等，作一綜合評估。

1. 請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況作一綜合評估

達成目標

未達成目標（請說明，以 100 字為限）

實驗失敗

因故實驗中斷

其他原因

說明：

2. 研究成果在學術期刊發表或申請專利等情形：

論文： 已發表 未發表之文稿 撰寫中 無

專利： 已獲得 申請中 無

技轉： 已技轉 洽談中 無

其他：（以 100 字為限）

3. 請依學術成就、技術創新、社會影響等方面，評估研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）（以 500 字為限）

(1) 建立專屬之分子鑑定引子試驗之預期貢獻：

以分子鑑定於菇類栽培種為菇類栽培業者極待輔導之項目，可使其栽培之菌種有科學化之證據，本研究成果可移轉給業者使用。

(2) 本計畫之成果將可應用分子鑑定結合外觀形態分類於銀耳及香灰菌之鑑定，除具學術上之價值外；在產業面上，銀耳種原之保存鑑定對產量及品質影響極大，然而原種及接種用菌種易受到污染而使產量及銀耳子實體之顏色變差，或多醣體之產量下降。因此菌種之保存及鑑定為銀耳產量品質之關鍵技術，必需立即建立，且相關資料亦可用於智慧財產權登記時使用。

(3) 銀耳萃取物改善視網膜功能之預期貢獻：

提供銀耳萃取物之視網膜保護作用及試驗於細胞體外之分析結果，以作為未來視力保健產品開發之依據。