

NAMR-S-112022（自行研究報告）

利用次世代轉錄體定序

研究深層海水促進牛樟芝菌生長與功效成分生成之機制

（正式報告）

中華民國112年12月

NAMR-S-1120（自行研究報告）

利用次世代轉錄體定序

研究深層海水促進牛樟芝菌生長與功效成分生成之機制

（正式報告）

主辦單位：本院海洋產業及工程研究中心

研究人員：余采倫、張景喻

研究期程：中華民國112年3月至112年12月

研究經費：新臺幣14萬2,800元

中華民國112年12月

「本研究報告絕無侵害他人智慧財產權之情事，如有違背願自負民、刑事責任。」

NAMR-S-112022

利用次世代轉錄體定序研究深層海水促進牛樟芝菌
生長與功效成分生成之機制
正式報告

國家海洋研究院

目 錄

目 錄.....	i
圖目錄.....	ii
表目錄.....	iii
摘要.....	1
第一章 前言.....	2
一、 前人研究.....	2
二、 研究目的.....	4
三、 研究架構.....	5
第二章 實驗材料與方法.....	6
一、 深層海水濃縮液.....	6
(一) 臺東深層海水濃縮液.....	6
(二) 花蓮深層海水濃縮液.....	6
二、 牛樟芝菌.....	6
(一) 牛樟芝菌種來源.....	6
(二) 菌體固態培養法.....	6
三、 檢驗分析.....	7
四、 DNA 萃取.....	7
五、 RNA 萃取.....	8
(一) 核酸沉澱.....	8
(二) RNA 分離.....	8
第三章 初步研究結果與討論.....	9
一、 牛樟芝生長狀態.....	9
二、 牛樟芝功效成分分析.....	11
三、 牛樟芝全基因體定序分析.....	12
(一) 牛樟芝全基因體基因註解報告.....	12
(二) 牛樟芝全基因體基因性狀預測.....	13
四、 牛樟芝轉錄體學分析.....	14
(一) 牛樟芝之基因表現定量差異比較.....	14
(二) 牛樟芝 mRNA 之 GO 基因功能分類.....	15
(三) 牛樟芝差異表現基因之 KEGG 生化路徑分析.....	17
第四章 結論.....	19
參考文獻.....	20

圖目錄

圖 1-1 牛樟芝相關保健功效	3
圖 1-2 牛樟芝相關生物功效成分	3
圖 1-3 牛樟芝轉錄體分析研究架構	5
圖 2-1 本研究牛樟芝菌株進行分子鑑定並於 NCBI 比對的結果.....	6
圖 3-1 牛樟芝皿培生長狀態紀錄.....	9
圖 3-2 牛樟芝皿培生長直徑.....	10
圖 3-3 牛樟芝 4AAQB 功效成分含量	11
圖 3-4 牛樟芝基因註解分析.....	12
圖 3-5 DSW 組別與 ROW 組別 RNA 表現差異比較	14
圖 3-6 DSW 組別與 ROW 組別相對 mRNA 上調基因 GO 基因功能分類柱狀圖	16
圖 3-7 DSW 組別與 ROW 組別相對 mRNA 下調基因 GO 基因功能分類柱狀圖	16
圖 3-8 DSW 組別與 ROW 組別相對 mRNA 上調基因 KEGG 散點圖.....	17
圖 3-9 DSW 組別與 ROW 組別相對 mRNA 下調基因 KEGG 散點圖.....	18

表目錄

表 3-1 牛樟芝基因體抗癌性狀預測	13
表 3-2 DSW 組別與 ROW 組別 RNA 表現差異比較	14

摘要

牛樟芝是臺灣特有藥用真菌，過去研究發現使用深層海水提升牛樟芝菌絲體保健成分，但其調控機制尚未釐清，因此本研究使用深層海水培養牛樟芝，並分析轉錄體進一步釐清深層海水對於牛樟芝基因調控影響、代謝路徑與基因功能分類。本研究結果顯示使用深層海水培養對牛樟芝基因表現和功能性次級代謝物合成產生影響。這將為進一步瞭解深層海水對牛樟芝生物活性成分的調控機制提供重要的基礎。基因體註解結果顯示，牛樟芝基因體中有 8926 個 CDS 基因和 180 個 Non-CDS 基因，其中 3367 個基因對應至 KEGG 生化代謝路徑，4164 個基因對應至 GO 基因功能分類。進一步的抗癌蛋白序列預測結果提供了 22 個潛在的抗癌蛋白序列，為未來進一步研究提供基礎。轉錄體分析揭示出使用深層海水與純水培養的 mRNA 和 lncRNA 表現量存在顯著差異，其中下調基因主要富集在生長相關的途徑，而金屬離子鍵結相關的基因功能也受到深層海水的影響。KEGG 生化代謝路徑分析顯示，深層海水培養影響了細胞週期、MAPK 信號通路、減數分裂和澱粉及蔗糖代謝等生物通路，與生長實驗結果相互印證。GO 基因功能分類進一步揭示了金屬離子結合相關的功能受到深層海水的影響，暗示微量元素在調控基因表現和代謝路徑中扮演著重要角色。綜合以上結果，本研究為深入瞭解深層海水對牛樟芝生物活性成分的調控機制提供了基礎。未來研究可以進一步探討深層海水中微量元素對基因表現的調控機制，以及深層海水培養牛樟芝對其他生物功能的影響。

第一章 前言

一、前人研究

牛樟芝學名為 *Antrodia cinnamomea*，生長於臺灣牛樟木上一種特有的藥用真菌。牛樟芝子實體因宿主稀缺且生長緩慢，以致供不應求且價格昂貴。牛樟芝富含多種保健功效成分，且具有可作為化學預防劑的應用成分，引起生物醫學界的關注，並運用於新藥研發。然而，目前已開發人工栽培技術，但野生牛樟芝子實體和人工培養菌絲體保健成分之成效有差異性，加上牛樟芝因其生長緩慢而需要耗費長時間的培養。因此，改善子實體和培養菌絲體間的生物活性代謝物是目前研究非常關切的問題。許多文獻指出牛樟芝具有多種生理和藥理之特性，例如保肝 (Kumar *et al.*, 2011)、抗癌 (Kuang *et al.*, 2021)、降血脂 (Peng *et al.*, 2017)、抗發炎 (Wang *et al.*, 2013)、抗氧化以及降血糖等功效 (圖 1-1)。

牛樟芝已鑑定超過 78 種化合物 (Ganesan *et al.*, 2019)，常見保健功效成分種類(圖 1-2)：

(1) 多醣 (Polysaccharides)

多醣是牛樟芝主要的活性成分，其具開發潛力和研究價值。多醣可用於免疫調節、抗發炎、抗血管生成和抗癌活性，且多醣是治療帕金森氏症的潛在天然藥物 (Xu *et al.*, 2022；Han *et al.*, 2019；Yen *et al.*, 2018；Cheng *et al.*, 2018)。

(2) 三萜化合物 (Triterpenoids)

牛樟芝中的三萜類化合物可用於減輕酒精引起的慢性肝損傷，其主要分為 Ergostane type 和 Landostane type，Ergostane type 具抗發炎特性，可作為改善抗血脂異常的潛在化學物質；而 Landostane type 具抗糖尿病活性 (Liu, *et al.*, 2021；Lin, *et al.*, 2019；Kuo, *et al.*, 2016；Qiao *et al.*, 2015)。

(3) 泛醌衍生物 (Ubiquinone Derivatives)

泛醌衍生物是牛樟芝中重要的生物活性化學物質，目前已開發出 13 種衍生物，具抗癌、免疫抑制和改善飲食肥胖等功效 (Guan *et al.*, 2017；Lin *et al.*, 2017)。

(4) 馬來酸和琥珀酸衍生物 (Maleic and Succinic Acid Derivatives)

Antrodins A-E 是牛樟芝重要的五種馬來酸和琥珀酸衍生物。其代謝物為最佳保肝活性的天然產物，且有多個研究表明其具抗肝纖維化作用與抗癌功效 (Geng *et al.*, 2016；Kumar *et al.*, 2015；Gokila *et al.*, 2013；Nakamura *et al.*, 2004)。

(5) 苯衍生物 (Benzene Derivatives)

牛樟芝中的 4,7-Dimethoxy-5-methyl-1,3-benzodioxole (DMB)與 Antrolone 等苯環化合物具良好的抗發炎特性，可用於開發新型抗發炎藥物 (You *et al.*, 2019；Shie *et al.*, 2016)。輔酶 Q0 亦是牛樟芝重要的苯類化合物，具抗腫瘤和抗發炎活性 (Chung *et al.*, 2014)。



圖 1-1 牛樟芝相關保健功效

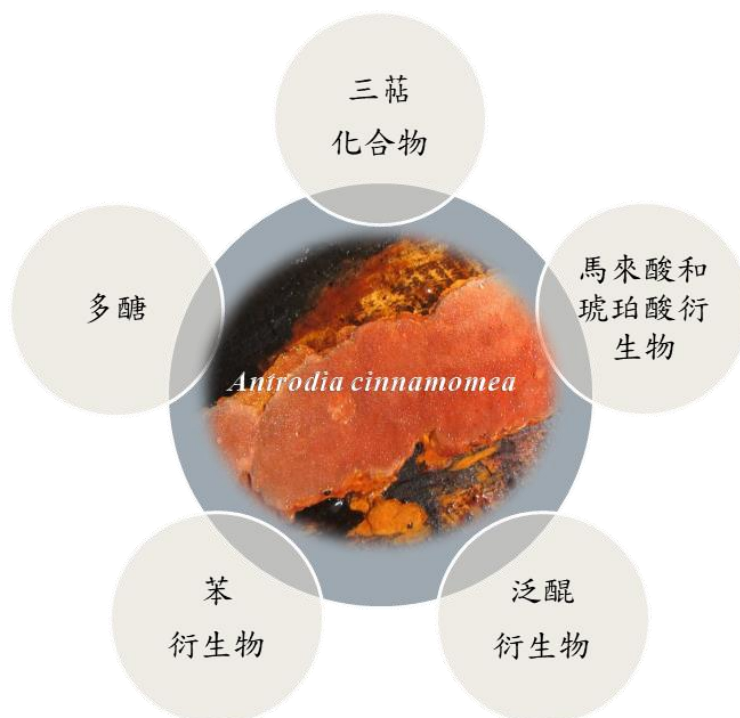


圖 1-2 牛樟芝相關生物功效成分

過去已有研究將深層海水應用於牛樟芝菌絲體的培養，並發現其中豐富的礦物質和微量元素有助於促進牛樟芝菌絲體的生長和代謝物的生產。這些研究顯示，在液態培養時，與使用純水相比，深層海水能夠顯著提高牛樟芝菌絲體的產量。

在牛樟芝成分方面，以深層海水培養的牛樟芝菌絲體相較於一般培養方式，其胞內三萜類含量較高。此外，深層海水還能有效提升牛樟芝液態胞外多醣的生成，同時增加液態菌絲體的總多酚含量。因此，深層海水對於牛樟芝菌絲體的培養生產有積極的影響，可產生富含保健成分的牛樟芝菌絲體產物 (Shi *et al.* 2016)。

在發酵過程中，牛樟芝菌絲體和醱酵液累積了深層海水中的礦物質元素，形成複合型態的有機礦物質，進一步提高深層海水牛樟芝對抗肝纖維化的效果。在硫代乙醯胺誘發的肝纖維化模型中，表明深層海水牛樟芝菌絲體相較於一般牛樟芝菌絲體具有更卓越的肝臟保護能力，能夠顯著降低肝功能指數 AST、活性氧分子和脂質過氧化作用。深層海水牛樟芝亦能明顯改善肝纖維化的病理發展，其主要作用是通過抑制纖維化因子 TNF- α 、 α -SMA 和肝膠原蛋白的表達 (Wang *et al.* 2013)。

二、 研究目的

牛樟芝具多項保健功效的成分，是臺灣特有的高經濟生技產物，且牛樟芝生長緩慢，菌絲體之功效成分含量相對子實體少。根據過去研究顯示，以微生物的發酵培養基中添加深層海水微生物生技研究水可有助於微生物的生長，並且提升主要指標成分的生成。在111年的研究中，由野生牛樟芝子實體中分離出牛樟芝菌株，並在皿培培養法中添加深層海水，可顯著提升牛樟芝菌絲體的生長速度，並同時提高抗癌成分。因此，過去研究已奠定應用深層海水強化牛樟芝菌絲體的培養技術。但深層海水是如何調控菌絲體基因表現以提升牛樟芝生長活性與及增加功能代謝物的生成，目前仍沒有研究證實。本研究延續過去之研究發現，深層海水可提升牛樟芝菌種生長與相關多項成分生成之效果，藉由全基因體定序分析，以探討本研究野生牛樟芝基因功能，特別是抗癌胜肽功能，並利用轉錄體學分析探討牛樟芝在基因層面調控生長與保健功效成分生成的影響，期望可透過基因層面的調控差異作為改良牛樟芝培育之基礎參考，以不同生物代謝路徑提升保健功效成分，提高生產效率。

三、 研究架構

將牛樟芝 (AC-NAMR)進行全基因體定序分析，以探討牛樟芝之功能成分；並將牛樟芝進行培養試驗，培養試驗是以添加深層海水培養之牛樟芝作為實驗組，及僅添加純水培養的無深層海水之牛樟芝作為控制組，觀察其生長狀態並進行轉錄體分析，最後與全基因體定序分析結果整合，探討牛樟芝生長與功能成分的生成機制，本研究之研究架構圖如圖 1-3。

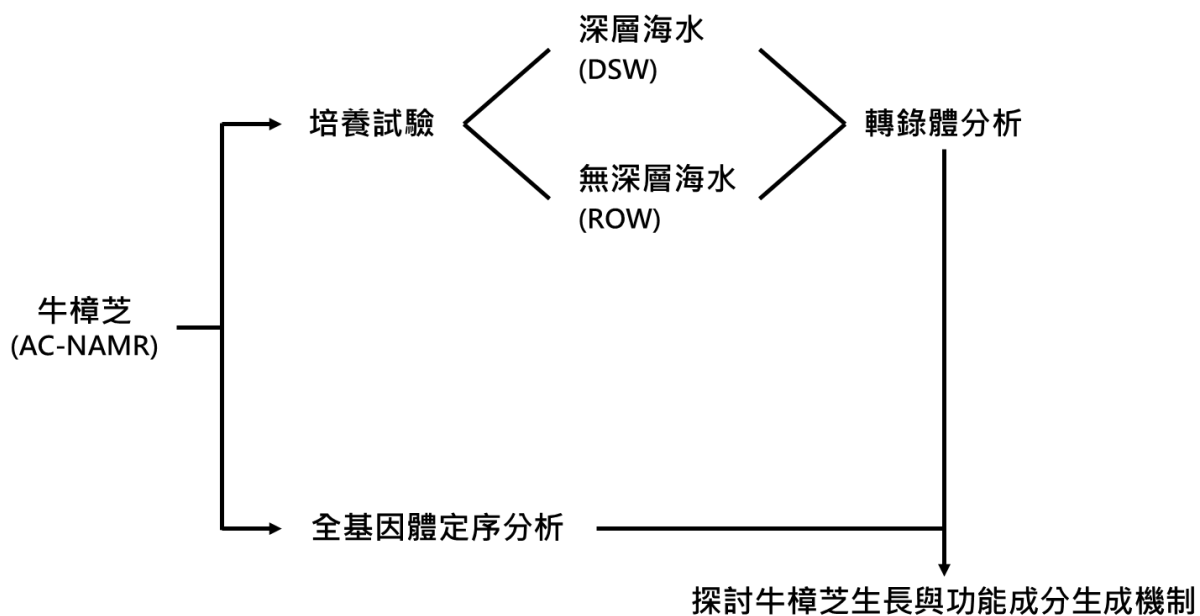


圖 1-3 牛樟芝轉錄體分析研究架構

第二章 實驗材料與方法

一、深層海水濃縮液

(一) 臺東深層海水濃縮液

取自臺東地區 300 公尺以下水深之深層海水。本項計畫命名為臺東 1 號深層海水 (TT)。

(二) 花蓮深層海水濃縮液

取自花蓮地區 600 公尺以下水深之深層海水。本項計畫命名為花蓮 1 號深層海水 (HL) 與花蓮 2 號深層海水 (TW)。

二、牛樟芝菌

(一) 牛樟芝菌種來源

本研究所實驗之牛樟芝子實體為國家海洋研究院與國立台東大學 2022 年共同於台東地區野外採集所得，其菌株經分離純化，經過型態鑑定外，也進行分子鑑定，與 NCBI 上牛樟芝序列比對，比對結果為 *Taiwanofungus camphoratus* (圖 2-1)。保存於國立臺東大學東部生物經濟中心。

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
Taiwanofungus camphoratus isolate WACD internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 1	303	303	100%	1e-78	95.29%	MN947417.1
Taiwanofungus camphoratus isolate RACTE internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 1	303	303	100%	1e-78	95.29%	MN947415.1
Taiwanofungus camphoratus isolate RACC internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 1	303	303	100%	1e-78	95.29%	MN947413.1
Taiwanofungus camphoratus strain AC001 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 1	303	303	100%	1e-78	95.29%	HQ397595.1
Taiwanofungus camphoratus isolate WACZ internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 1	300	300	98%	2e-77	95.24%	MN947419.1

圖 2-1 本研究牛樟芝菌株進行分子鑑定並於 NCBI 比對的結果

(二) 菌體固態培養法

探討不同來源與濃度之深層海水礦物質液對牛樟芝菌之菌數生長與成分變化之影響。分別應用三種來源之深層海水培養牛樟芝菌。將菌株進行活化後，以含有 10 倍 (10X)、20 倍 (20X) 濃縮深層海水礦物質液製備麥芽瓊脂 (Malt Extract Agar, MEA) 培養基作為固態平板培養基，取活化後之牛樟芝菌落分別培養於含有 10X、20X 之深層海水礦物質液之 MEA 培養基皿，於 30℃ 培養 28 天，期間紀錄菌絲體生長擴散之面積。

三、 檢驗分析

菌絲體乾物以甲醇進行萃取，並以 HPLC 分析 4-acetylanthroquinonol B (4AAQB)、Dehydroeburicoic Acid (DEA)及 Dehydrosulphurenic Acid (DSA)之含量。分析深層海水 10X 與 20X 醱酵前後之培養基中礦物質與營養鹽組成，以了解深層海水在培養過程中對於 4AAQB、DEA 與 DSA 的吸收情形。

四、 DNA 萃取 (萃取方法改良自 Luz 等人於 2021 年發表之文獻)

- 1、以預冷之研鉢和研杵，將牛樟芝菌樣品在液氮中研磨成粉末，存放於-80 °C 環境中。
- 2、每次提取前，將 0.3–1 % β -Mercaptoethanol 添加到 2X CTAB 提取緩衝液中，並在 65 °C 水浴中預熱 2X 提取緩衝液。
- 3、將 800 μ L 預熱的 2X CTAB 提取緩衝液添加到研磨的 0.05 g 真菌樣品中。
- 4、加入 4 unit agarase 與 5–10 μ L proteinaseK (20 mg/mL)，並在 55 °C 乾浴中孵育 2–3 hr。
- 5、加入 5 μ L RNase (10 mg/mL)，乾浴 30 min–1 hr，每 30 min 輕輕翻轉離心管 (不可使用 vortex)。
- 6、以 10,000 xg 離心 10 min。
- 7、添加約等體積的 Phenol : Chloroform : Isoamylalcohol (25:24:1, v/v)，並輕微顛倒混合。
- 8、在室溫下以 13,000 rpm 離心 15 min。
- 9、將含有 DNA 的上層液移至新的微量離心管中。
- 10、必要時重複氯仿萃取步驟，直至上層液澄清。
- 11、估計上層液的體積 (約 700 μ L)後，添加一半體積 (350 μ L)的 6 M 氯化鈉 (NaCl)，並充分混合。
- 12、依次添加 1/10 體積 (70 μ L) 3 M 乙酸鉀 ($\text{CH}_3\text{CO}_2\text{K}$)，同時與 500 μ L 冰冷的 100 % 異丙醇 (約上層液體積的三分之二)混合。
- 13、輕輕翻轉以沉澱 DNA，直至形成 pellet。
- 14、在-20 °C 下孵育 30 min。
- 15、以 13,000 rpm 離心 5 min，以去除上層液。
- 16、將含有 DNA 沉澱的試管倒置在薄紙上，以完全排出上層液。
- 17、用 500 μ L 70 % 乙醇洗滌 DNA 沉澱，並翻轉一次 (以溶解殘留鹽並提高 DNA 純度)。
- 18、以 13,000 rpm 離心 5 min。
- 19、丟棄管中的 70 %酒精，翻轉濾紙，讓含有顆粒的試管在室溫下風乾 15 min。
- 20、將 DNA 沉澱重懸於 50 μ L 1 $\times$ TE 緩衝液中。
- 21、將 DNA 在 50 °C 下孵育 1–2 hr，以確保完全重懸。
- 22、最後存放於-20 °C 環境中。

五、 RNA 萃取 (萃取方法改良自 Liyanage 等人於 2021 年發表之文獻)

(一) 核酸沉澱

- 1、 使用預冷之研鉢和研杵，將真菌樣品在液氮中研磨成粉末，並存放於儲存於-80 °C 環境中。
- 2、 每次提取前，將 β -Mercaptoethanol (最終濃度 1–2 %) 添加到 2X CTAB 提取緩衝液中，並在 65 °C 水浴中預熱 2X 提取緩衝液。
- 3、 將 4 mL 預熱的 2X CTAB 提取緩衝液添加到研磨的 0.2 g 真菌樣品中，加入 10 unit agarose (可有可無) 與 10–20 μ L ProteinaseK (20mg/mL)。
- 4、 於 55 °C 乾浴中孵育 2–3 hr，加入 20 μ L DNase (1500 U/mL) 乾浴 30 min–1 hr，每 10 min 輕輕翻轉離心管。
- 5、 以 6000 $\times$ g 離心 10 min，取上層液分裝置至離心管中。
- 6、 添加相等體積的 Phenol : Chloroform : Isoamylalcohol (25:24:1, v/v)，並輕微顛倒混合，靜置 5 min，13,000 rpm 離心 15 min。
- 7、 將含有 RNA 的上層液轉移至新的 1.5 ml 離心管中。
- 8、 重複萃取步驟 6、7，直至上層液澄清。
- 9、 加入 1/4 倍體積的 10 M LiCl (最終濃度為 2.5 M) 於上層液中，輕輕翻轉混合，並置於 -20 °C overnight。

(二) RNA 分離

- 1、 第二天將樣品以 15000 轉離心 30 min，以沉澱核酸。
- 2、 用 2 M LiCl 洗脫沉澱物，以 15000 轉離心 15 min，去除上層液。
- 3、 用 70 % EtOH 洗脫沉澱物，以 15000 轉離心 10 min，去除上層液。
- 4、 用 100 % EtOH 洗脫沉澱物，以 15000 轉離心 10 min，去除上層液。
- 5、 用滅菌水將 RNA 沉澱物重懸，並存放於 -80 °C 環境中。

第三章 初步研究結果與討論

一、牛樟芝生長狀態

依據研究結果圖 3-1 及圖 3-2 顯示，由添加純水 (ROW)及添加深層海水 (TT、TW 及 HL)之牛樟芝菌絲體的生長狀態來看，在培養第 14 天時，純水培養之菌絲體直徑約 3.8 cm 及面積約 11.2 cm²，而使用深層海水培養之牛樟芝菌絲體直徑約 4.6–6.2 cm 及面積約 17.2–30.3 cm²；而從培養第 21 天觀察，純水培養之菌絲體直徑約 5.8 cm 及面積約 24.3 cm²，深層海水培養之菌絲體直徑約 7.2–7.6 cm 及面積約 34.4–42.3 cm²，可看出深層海水培養之菌絲體直徑、面積與無深層海水之純水培養菌絲體相比，有添加深層海水之牛樟芝菌絲體都明顯較大；其中比較添加深層海水之牛樟芝菌絲體每組之 10X 及 20X，10X 深層海水培養之菌絲體面積約 42–42.3 cm²，以 20X 深層海水培養之菌絲體面積約 34.4–41.1 cm²。由此顯示，以深層海水培養牛樟芝菌絲體比使用純水培養之生長狀態明顯更佳，而相較於 20X 深層海水，使用 10X 深層海水進行培養牛樟芝菌絲體更有利於菌絲體生長。透由觀察圖 3-2，牛樟芝菌絲體直徑大小從第 21、26 天開始之生長緩慢且趨於平緩。

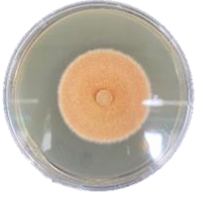
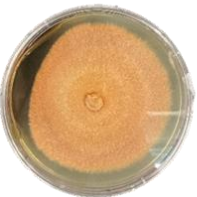
Days	ROW	TT-10X	TT-20X	
Day14				
Day21				
Days	TW-10X	TW-20X	HL-10X	HL-20X
Day14				
Day21				

圖 3-1 牛樟芝皿培生長狀態紀錄

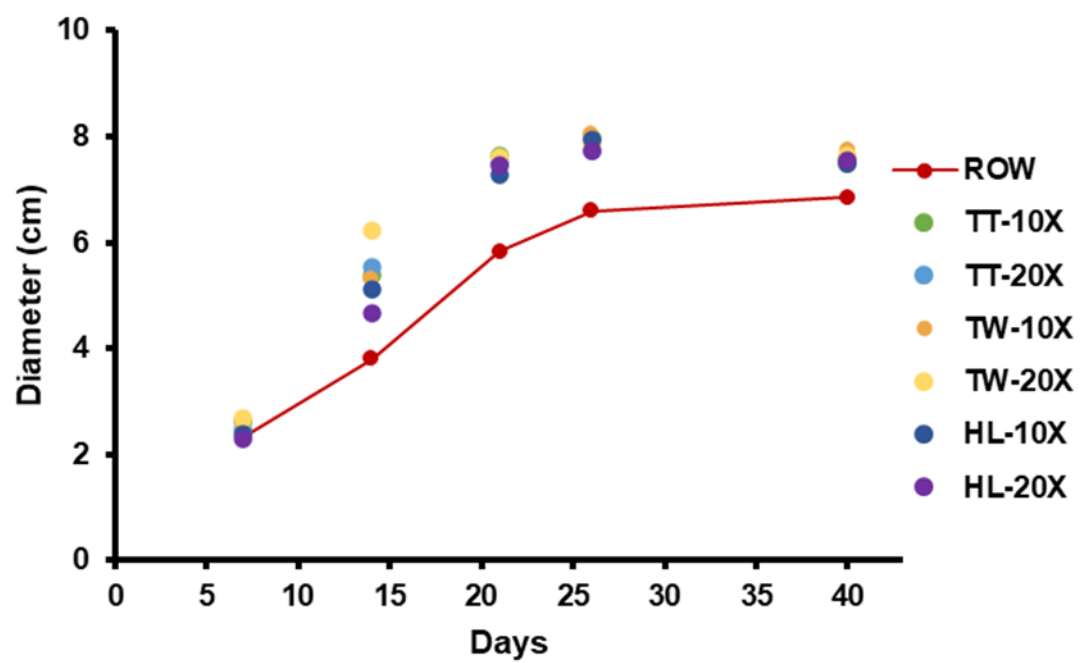


圖 3-2 牛樟芝皿培生長直徑

二、牛樟芝功效成分分析

前人研究證實牛樟芝具有抗癌活性，其中泛醌類衍生物之 4AAQB 對多種癌細胞具有抑制作用，本研究亦做 4AAQB 之分析，其研究結果如圖 3-3 所示。將培養第 21、26 及 40 天之牛樟芝菌絲體進行 4AAQB 分析，由圖 3-3(A)顯示，在第 26 天時牛樟芝菌絲體中之 4AAQB 都較第 21 天高，且亦幾乎較第 40 天高或相等，故後續以培養第 26 天之菌絲體進行探討。

圖 3-3(B)顯示，使用純水 (ROW) 培養牛樟芝之第 26 天時，其 4AAQB 濃度約 158 mg/kg，使用深層海水 (TT、TW 及 HL) 培養牛樟芝之 4AAQB 濃度約 326–1272 mg/kg；除 TW-20X 外，其餘 DSW 培養牛樟芝之 4AAQB 濃度皆高於純水培養之牛樟芝；而其中 TW-10X 及 TT-10X 組別 4AAQB 濃度最高，分別約為 1091 mg/kg 及 1272 mg/kg，濃度是純水培養之濃度的 6–8 倍。大致上，利用 10X 深層海水培養牛樟芝可顯著提升 4AAQB 含量 ($p < 0.05$) 相較於純水與 20X 深層海水培養之組別，後續將分析顯著 4AAQB 之 10X 深層海水所培養牛樟芝與 ROW 所培養牛樟芝進行轉錄體分析。由圖 3-3(C)和(D)顯示，使用純水培養牛樟芝之第 26 天時，其 DEA 及 DSA 濃度分別約為 685 mg/kg 和 585 mg/kg，使用深層海水培養牛樟芝之 DEA 和 DSA 濃度分別約 977–1335 mg/kg 及 1882–271762 mg/kg；除 TW-20X 外，其餘深層海水培養牛樟芝之 DEA 濃度皆高於純水培養之牛樟芝，且 10X 深層海水與 20X 深層海水培養之成分含量其統計結果無太大落差，表示深層海水 10X 與 20X 培養對於牛樟芝中 DEA 及 DSA 功效成分含量並無太顯著的影響。

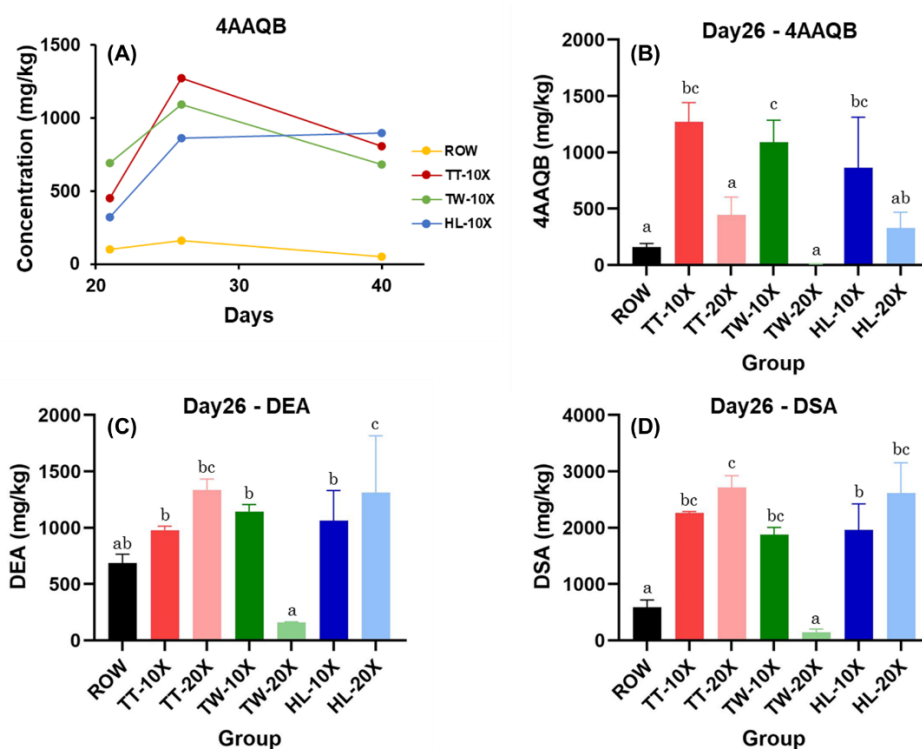


圖 3-3 牛樟芝 4AAQB 功效成分含量 (A)培養第 21、26 及 40 天之牛樟芝菌絲體 4AAQB 分析；培養第 26 天之牛樟芝菌絲體進行 (B)4AAQB 分析、(C)DEA 分析及 (D)DSA 分析

三、牛樟芝全基因體定序分析

因牛樟芝基因數據庫樣本參照少，本研究利用全基因體定序分析本實驗之牛樟芝菌株，建立其基因體數據，以利後續轉錄體學分析之基因序列比對，使牛樟芝基因調控機制的研究更具準確性。

(一) 牛樟芝全基因體基因註解報告

從基因體註解報告得知牛樟芝基因體中具有 8926 個 CDS 基因序列與 180 個 Non-CDS 基因序列，CDS (Coding region)是指基因序列中具蛋白質編碼序列的區域，簡易來說牛樟芝基因體具 8926 的蛋白質編碼片段，後續將這 8926 個 CDS 進行基因註解分析，發現有 3367 個基因可以對應至 KEGG 生化代謝路徑，以及 Gene ontology (GO)基因功能分類中牛樟芝編碼基因中有 4164 個基因對應上，而在基因蛋白預測的部分對應到牛樟芝基因的 6084 個蛋白 (圖 3-4)。

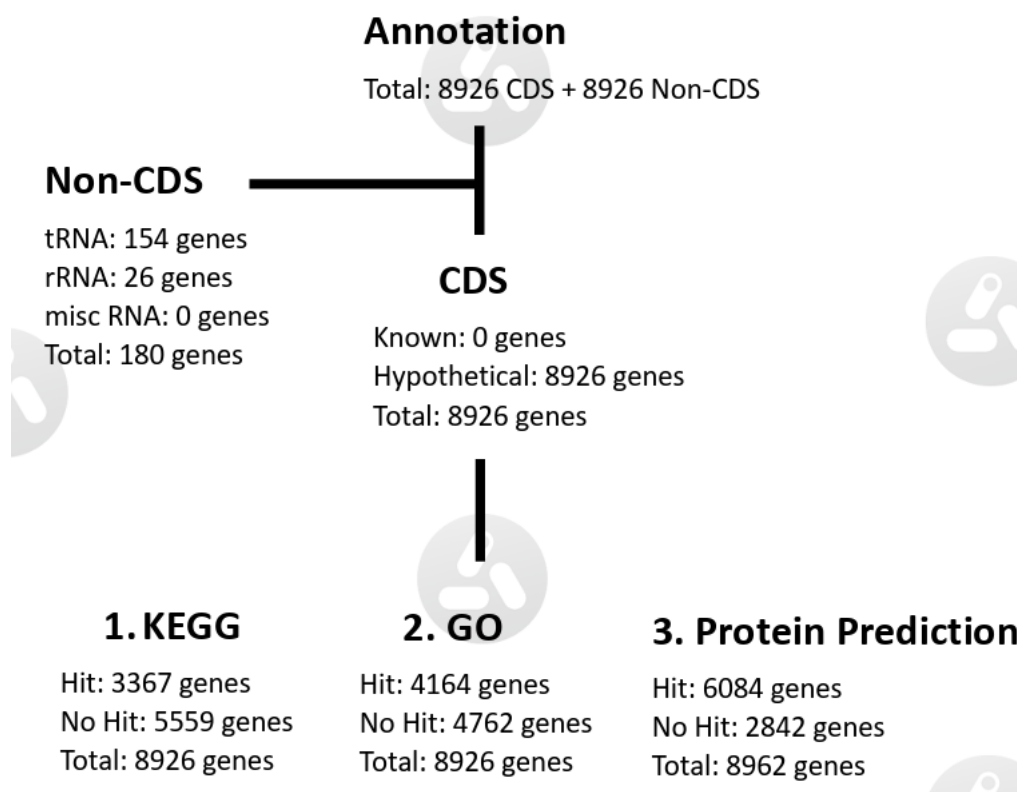


圖 3-4 牛樟芝基因註解分析

(二) 牛樟芝全基因體基因性狀預測

根據前人研究已知牛樟芝具有抗癌作用，並且會產生抗癌的二次代謝物，本研究將基因體定序結果與抗癌胜肽數據庫進行基因性狀預測，並於數據庫中比對出 22 個抗癌蛋白序列，後續可針對這 22 個抗癌胜肽進行蛋白成分含量研究，並結合轉錄體分析結果探討利用深層海水培養牛樟芝除了本研究檢測之 4AAQB 成分，是否調控了其他抗癌蛋白的基因表現 (表 3-1)。

表 3-1 牛樟芝基因體抗癌性狀預測

# Sequence_ID	Sequence	Prediction	Score
>g_00685	MGKAQKKTGKGRLDKYYKLAKEQGYRARSFAFKLIQLNKKYSFLESARCCI	AntiCP	0.55
>g_01177	MARTKQTARKSTGGKAPRKQLATKAARKTATAAATGGVKKPHRFRPGTVA	AntiCP	0.56
>g_00650	MPKSSKKRKDKAADFAKAKLKLKGKGQVASNAVDTSFKARSIALPAQSIA	AntiCP	0.57
>g_00587	MGFAHNNVLHQNHFRKDWQSRVRTWFDQPGRKLRRRQARKTKAAKLGVRP	AntiCP	0.54
>g_05096	MTTARGRKAPVIRSPAARVLQQPVPPAPPSAPVPAANGKKKKKKKGKGK	AntiCP	0.52
>g_03705	MPPKAAAAEKKVLLGRPSNNLKIGIVGLPNVGKSSFFNVLSKTDLGKAA	AntiCP	0.5
>g_03071	MAEKQATPGPSTLQRGKACLRCKRMRCGGKACQCVRAKKAEGCEY	AntiCP	0.56
>g_05359	MHLCSFCARRGSVLPAACLGRSMPDHGKNSCWRLTANDALPRRHFGWCSK	AntiCP	0.56
>g_04138	MSSAIATPSVCDFFCHQPKFGGYPYCGKTCAAQAAAALLCAQCHQPKYGN	AntiCP	0.58
>g_04108	MKALARVKARVKKRWGTLVDNPNYRGHALPLHGTTAKGTWVLKAAGKSNK	AntiCP	0.55
>g_04968	MPVAISELCPDALYSGGCVNTHCSLKHGAKLCEICGVICAPMSNYQAHTR	AntiCP	0.5
>g_05263	MWMKQVGEKCNRCWTRTQTIKCVWGEATACDQCIQAAQGCYFGGISIL	AntiCP	0.56
>g_05830	MWMCPCCTTARRITLVTFCTPIDALIVGCGLGLVAAHCLAQAGHKITL	AntiCP	0.5
>g_06158	MSQSNPSSSFTRYGPCYLCSSHHSHRTCPDYKCLRCRSPSPGHLTREC	AntiCP	0.53
>g_06166	MKQQAGEKCNRCCTRTQTVKCIWVEGATMCERCIAAQGCYFGGFLILGR	AntiCP	0.62
>g_06503	MARTKQTARKSTGGKAPRKQLASKAARKTAPTAATGGVKKPHRFRPGTVA	AntiCP	0.53
>g_07508	MGRPARCYRYCKNKPYPKSRYNRGVDPKIRIFDLGRKRASVDEFPFCC	AntiCP	0.51
>g_07865	MAATKTTKGKAAAKTSVSKLSKDSKAKAAKKAALAGTHAHASRKTRYSVS	AntiCP	0.56
>g_08047	MPTRFTKTRKHRGHVSAGHGRVGKHKHPGGRGLAGGQHHRHTNFDKYHP	AntiCP	0.55
>g_08398	MARTKQTARKSTGGKAPRKQLAAKSAVGRKTATGATGGVKKPHRFRPGTV	AntiCP	0.51
>g_08520	MARTKQTARKSTGGKAPRKQLAAKSAARKTATAAGGVKKPHRFRPGTVA	AntiCP	0.57
>g_08886	MLHSLAPLRSALLAVSLFWALVHLAHLALALVPVHRSSSSLLPSHARAH	AntiCP	0.59

四、牛樟芝轉錄體學分析

(一) 牛樟芝之基因表現定量差異比較

mRNA 與 lncRNA 的基因定量差異表現以表格與火山圖進行表示 (表 3-2 及圖 3-5)，由表 3-2 可以看出，mRNA 純水 (ROW)組別與深層海水 (DSW)組別相比有 4866 個基因有顯著的表現量差異，其中下調基因有 2644 個；lncRNA 具顯著差異的基因總共有 1514 個，其中下調的基因有 817 個。火山圖 (圖 3-5)部分，校正後的 p-value (padj)要求小於 0.05，中紅色點和綠色點均在 1.3 以上；紅色為上調基因，綠色為下調基因，可以看到 mRNA 之下調基因越接近左上角的基因點較多，代表 DSW-ROW 下調的基因較多，表示 DSW 組別基因表現量上的這些基因表現量是高於 ROW 組別；lncRNA 上調基因有 5 個具高度顯著調升，表示相對於 DSW 組別的這 5 個基因表現量低於 ROW 組別。因此，本研究後續可分別表列 mRNA 與 lncRNA 中表現量上升與表現量下降的前 10 名基因表現量的基因。將有利於後續分析深層海水對於此基因調控路徑的影響。

表 3-2 DSW 組別與 ROW 組別 RNA 表現差異比較

比較組別	全部 (All)	上升 (Up)	下降 (Down)	域值 (Threshold)
mRNA DSW-ROW	4866	2222	2644	edgeR pvalue <=0.05 log2FoldChange >=0
lncRNA DSW-ROW	1514	697	817	edgeR pvalue <=0.05 log2FoldChange >=0

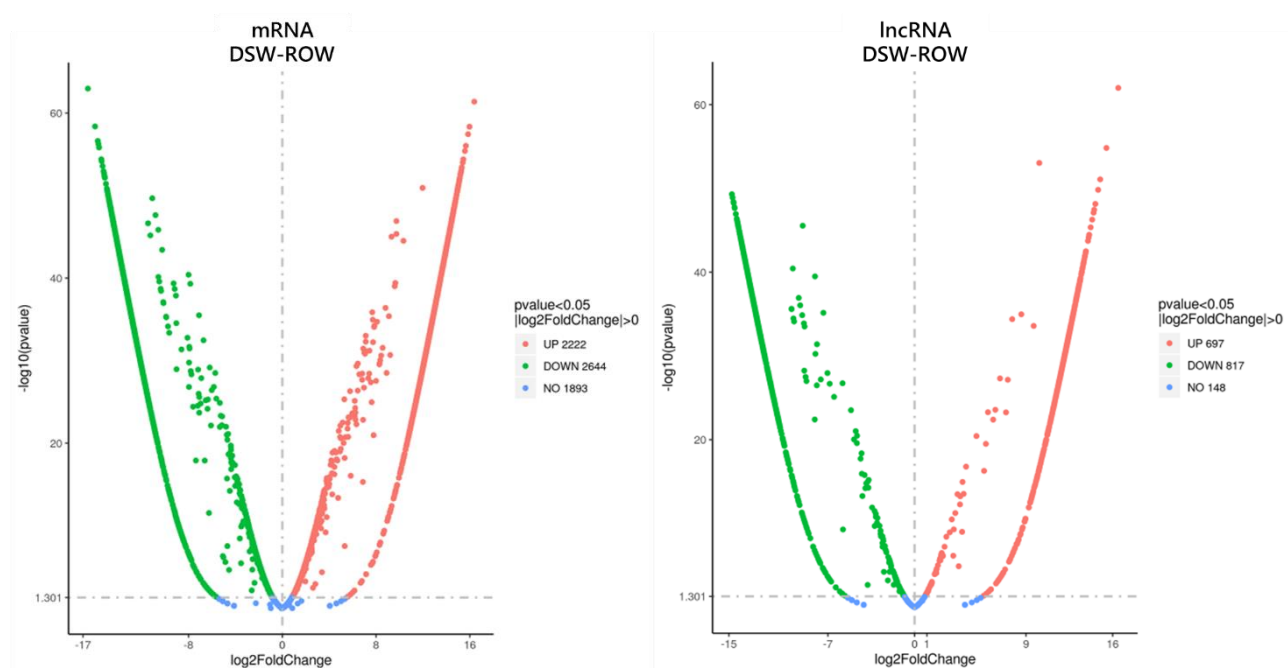


圖 3-5 DSW 組別與 ROW 組別 RNA 表現差異比較 (左圖 mRNA，右圖 lncRNA)

(二) 牛樟芝 mRNA 之 GO 基因功能分類

Gene ontology (GO)是將基因屬性分為三大類，其一是生物學過程 (Biological process, BP)，BP 主要描述基因和基因產物參與的生物學活動，如細胞代謝途徑等；其二，細胞組成 (Cellular component, CC)，CC 主要揭示細胞內基因產物具活性的位置，如細胞核及細胞質等；其三，分子功能 (Molecular function, MF)，MF 用以說明基因產物具有催化反應或結合其他分子等之具體生物學功能 (Ashburner *et al.*, 2000)。

根據圖 3-6 及圖 3-7 之 GO 基因功能分類柱狀圖所示，ROW 組相對 DSW 組之 mRNA 上調基因只高度富集一個分子功能為 translation factor activity (轉譯因子活性)，主要為分子參與蛋白質轉譯的生物學過程，而其他之生物學過程及細胞組成結果則不明顯。而 ROW 組相對 DSW 組之 mRNA 下調基因高度富集於兩個生物學過程分別為 DNA integration (DNA 整合)與 DNA metabolic process (DNA 代謝過程)。ROW 組相對 DSW 組之 mRNA 下調基因高度富集於三個細胞組成分別為 membrane-enclosed lumen (封閉的細胞膜內)、organelle lumen (胞器內)與 intracellular organelle lumen (細胞的胞器內)，可以看出細胞內基因產物具活性的位置主要有細胞膜或胞器內。ROW 組相對 DSW 組之 mRNA 下調基因高度富集於 10 個分子功能分別為 RNA-DNA hybrid ribonuclease activity (RNA-DNA 混合核糖核酸酶活性)、zinc ion binding (鋅離子結合)、endoribonuclease activity (內切核糖核酸酶活性)、endoribonuclease activity, producing 5'-phosphomonoesters (內切核糖核酸酶活性，產生 5'-磷酸單酯)、endonuclease activity, active with either ribo- or deoxyribonucleic acids and producing 5'-phosphomonoesters (內切核酸酶活性，對於核糖核酸或脫氧核糖核酸均具有，並產生 5'-磷酸單酯)、endonuclease activity (內切核酸酶活性)、ribonuclease activity (核糖核酸酶活性)、nuclease activity (核糖核酸酶活性)、transition metal ion binding (過渡金屬離子結合)、hydrolase activity, acting on ester bonds (水解酶活性，作用於酯鍵)和 metal ion binding cation binding (金屬離子結合陽離子結合)，在以上分子功能的富集結果，除一些主要參與生物學過程相關的分子功能外，可以發現有許多金屬離子結合相關的功能，表示 DSW 培養之牛樟芝確實會影響菌株對於金屬離子的運用，進而調控基因表現。

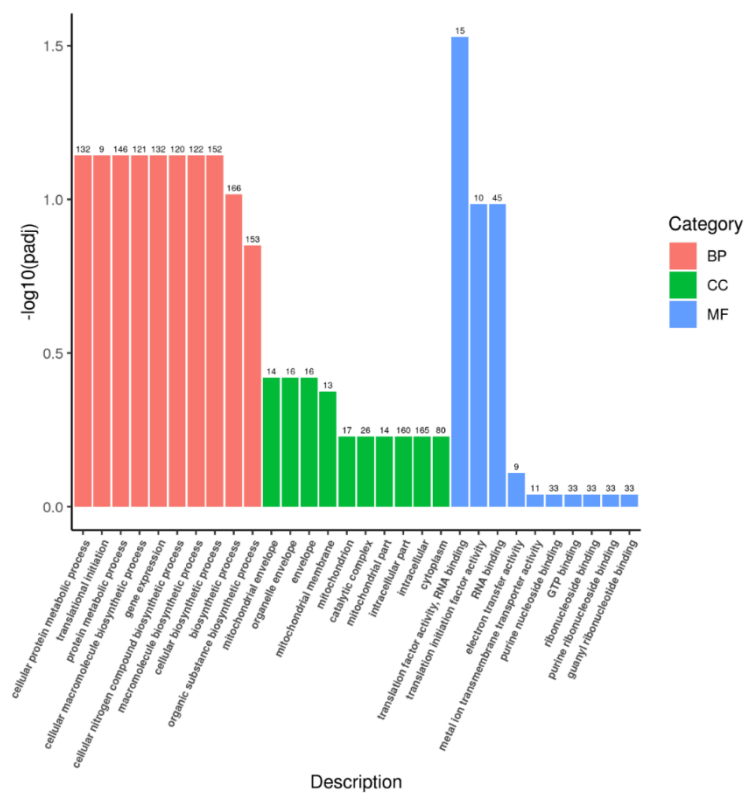


圖 3-6 DSW 組別與 ROW 組別相對 mRNA 上調基因 GO 基因功能分類柱狀圖

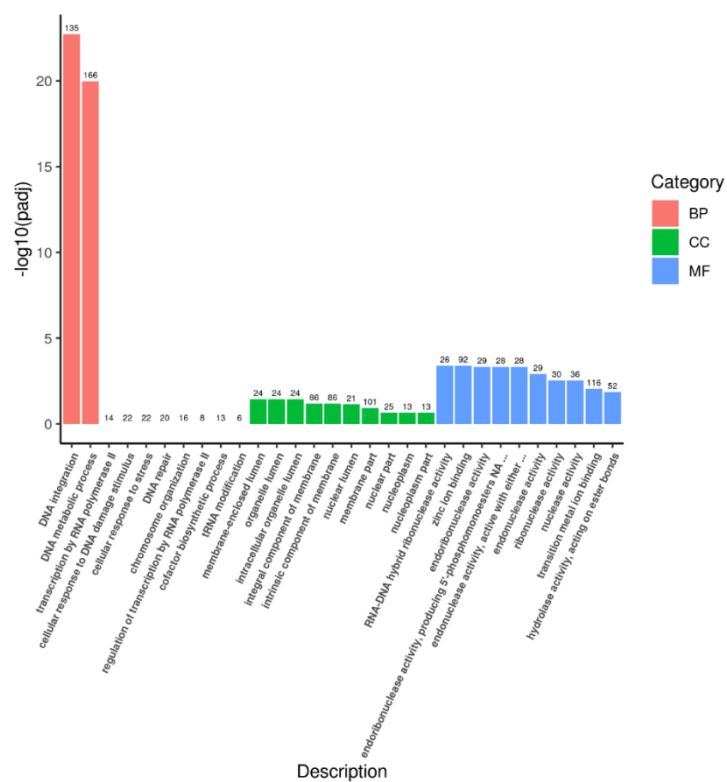


圖 3-7 DSW 組別與 ROW 組別相對 mRNA 下調基因 GO 基因功能分類柱狀圖

(三) 牛樟芝差異表現基因之 KEGG 生化路徑分析

KEGG 散點圖橫坐標是 Rich factor (富集因子), 數值越大表示富集程度越大。縱坐標是 20 條富集最顯著的 pathway term (生物通路)。padj 是經過多重校驗的 p-value, 取值範圍 [0, 1], 以顏色表示, 越紅表示 padj 越小, 說明富集越明顯。點的大小表示該 term 下差異基因的個數, 點越大表示基因數越多。由牛樟芝 mRNA 的 KEGG 散點圖 (圖 3-8 圖 3-9) 可以看出 ROW 組與 DSW 組相對的差異表現基因的下調基因富集因子較上調基因大, 且 padj 明顯較低, 表示其下調基因富集程度高於上調基因, 故下調基因的 pathway term 較為集中。而可以看到下調基因的 pathway term 富集 Cell cycle (細胞週期)、MAPK signaling pathway (MAPK 信號通路)、Meiosis (減數分裂) 及 Starch and sucrose metabolism (澱粉和蔗糖代謝), 除生存所需的 pathway term 外, 其富集細胞週期與減數分裂相關路徑, 代表 DSW 培養牛樟芝會影響菌種的細胞週期 (圖 3-9), 與本研究之 DSW 培養牛樟芝會影響其菌株的生長狀態結果相符 (圖 3-1 圖 3-2)。並且於上調及下調表現基因富集的 pathway term 與牛樟芝富含的功能性次級代謝物相關, 可知使用 DSW 培養牛樟芝確實會影響牛樟芝次級代謝物的生合成。

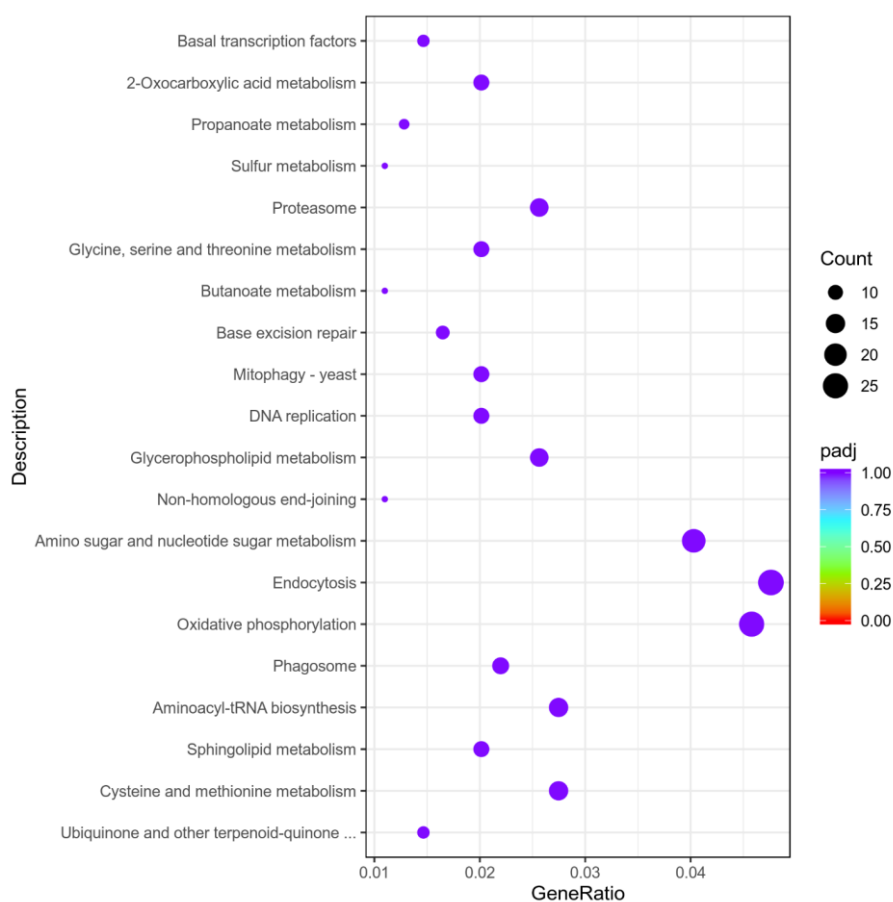


圖 3-8 DSW 組別與 ROW 組別相對 mRNA 上調基因 KEGG 散點圖

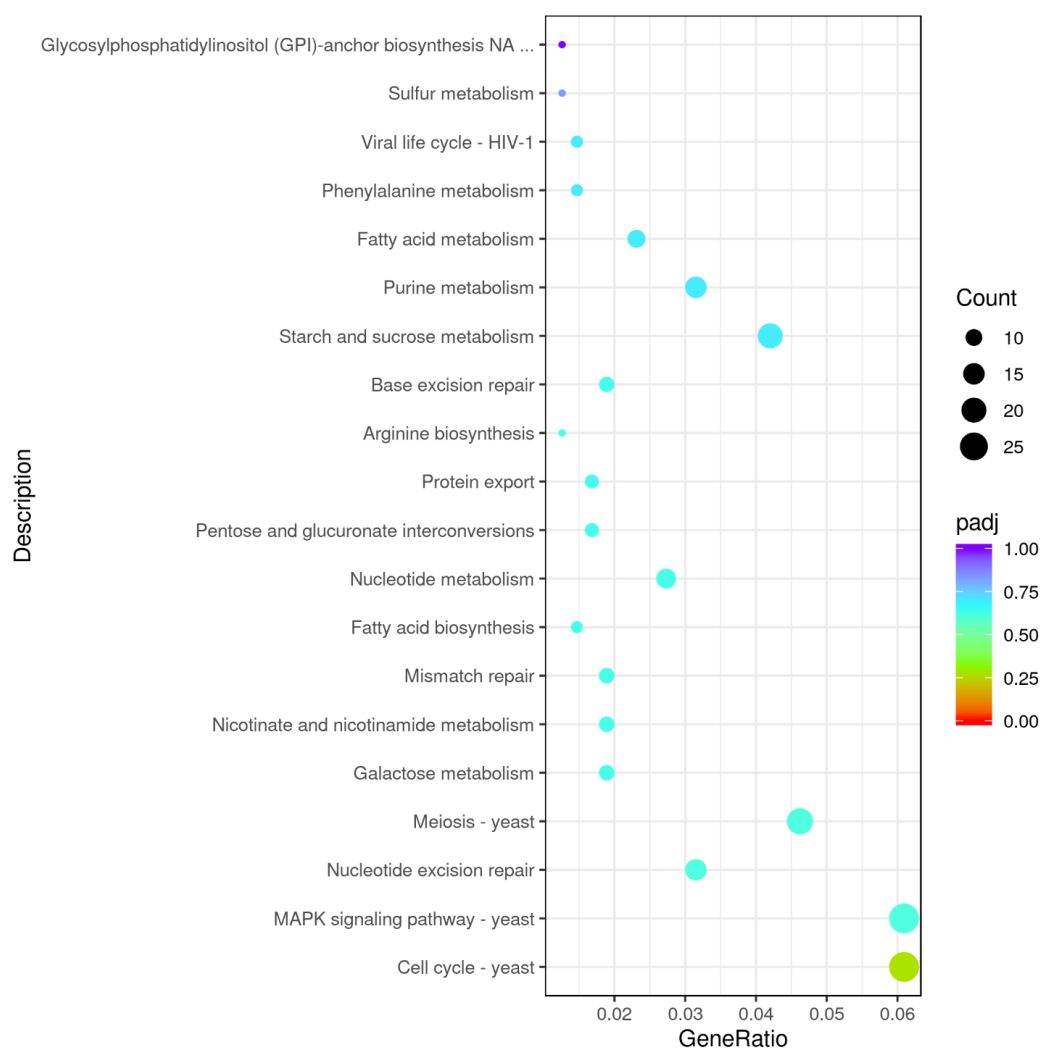


圖 3-9 DSW 組別與 ROW 組別相對 mRNA 下調基因 KEGG 散點圖

第四章 結論與未來研究方向

本研究牛樟芝生長狀態分析結果顯示，使用深層海水培養之牛樟芝可促進菌株生長，進一步比較 10 倍和 20 倍深層海水的效果，結果顯示 10 倍深層海水對於牛樟芝菌絲體的生長更為有利。此外，對於 4AAQB 醌類衍生物的分析結果顯示，使用 10 倍深層海水培養牛樟芝能夠顯著提升其含量，然而，對於 DEA 的功效成分，使用深層海水培養牛樟芝相對於純水培養效果較差，顯示純水培養對於 DEA 的功效成分較為合適。而對於 DSA 功效成分，10 倍和 20 倍深層海水培養之成分含量統計結果差異不大，顯示深層海水對於 DSA 功效成分含量影響不大。深層海水對於牛樟芝的生長和某些特定成分的含量有積極的影響，但對於不同成分可能存在差異，因此在具體應用中需根據需要進行調整。

基因體註解報告顯示，牛樟芝基因體中擁有 8926 個 CDS 基因序列和 180 個 Non-CDS 基因序列，其中 CDS 基因序列為蛋白質編碼區域。進一步的基因註解分析顯示，有 3367 個基因對應至 KEGG 生化代謝路徑，4164 個基因對應至 Gene Oncology (GO) 基因功能分類，以及 6084 個蛋白對應到牛樟芝基因。基於先前與本研究指出牛樟芝具有抗癌作用，本研究透過基因體定序結果與抗癌胜肽數據庫進行基因性狀預測，發現 22 個抗癌蛋白序列。隨後的研究將聚焦於這 22 個抗癌胜肽，進行蛋白成分含量研究，同時結合轉錄體分析結果，以了解深層海水培養對除 4AAQB 之外其他抗癌蛋白基因表現的影響。

轉錄體分析結果顯示，使用深層海水培養與純水培養的 mRNA 和 lncRNA 有顯著的表現量差異。火山圖結果顯示 DSW 組下調基因較多，而上調基因主要集中在 translation factor activity。KEGG 代謝路徑分析結果高度富集細胞週期之生長相關路徑，根據此結果後續研究可深入探討差異生長代謝路徑的調控機制，將有效釐清深層海水培養之牛樟芝最直接影響生長代謝路徑之基因。KEGG 生化代謝路徑結果顯示部分差異基因與功能性次級代謝物的生合成代謝相關，此結果與本研究之功能性代謝產物分析含量的提升相符。在 GO 的基因功能分類結果看到有多項金屬離子鍵結利用之差異表現基因富集，由此可推斷深層海水中的微量元素對於牛樟芝生物利用上具有生化代謝等功能影響，依據研究結果未來可表列相關金屬離子代謝應用之差異基因，並與 KEGG 生化代謝路徑進行交叉比對釐清該基因與金屬離子對於牛樟芝菌株生長以及功能性次級代謝產物之影響。根據以上結果分析，本研究使用深層海水培養牛樟芝與使用純水培養牛樟芝組別其基因表現差異中，主要富集生長代謝路徑、次級代謝物生合成以及金屬離子利用等相關基因功能與路徑，未來此研究可以更深入地進行系統性的數據分析，繪製深層海水培養牛樟芝之生物代謝路徑與相關調控基因機制圖。因研究期程關係，RNA 數據庫尚有許多生化調控路徑與基因功能未知，未來會根據本研究之初步結果接續統整分析 RNA 數據庫，並分析牛樟芝對於深層海水中微量元素吸收之狀態，依序檢視深層海水對於牛樟芝菌種生長與生物利用之調控。

參考文獻

- Ashburner, M., Ball, C. A., Blake, J. A., Botstein, D., Butler, H., Cherry, J. M., Davis, A. P., Dolinski, K., Dwight, S. S., Eppig, J. T., Harris, A. M., Hill, D. P., Tarver, L. L., Kasarskis, A., Lewis, S., Matese, J. C., Richardson, J. E., Ringwald, M., Rubin, G. M. & Sherlock, G. (2000). Gene ontology: tool for the unification of biology. *Nature genetics*, 25(1), 25-29.
- Cheng, J. J., Chao, C. H., & Lu, M. K. (2018). Large-scale preparation of sulfated polysaccharides with anti-angionenic and anti-inflammatory properties from *Antrodia cinnamomia*. *International journal of biological macromolecules*, 113, 1198-1205.
- Chung, C. H., Yeh, S. C., Chen, C. J., & Lee, K. T. (2014). Coenzyme Q0 from *Antrodia cinnamomea* in submerged cultures induces reactive oxygen species-mediated apoptosis in A549 human lung cancer cells. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2014.
- Ganesan, N., Baskaran, R., Velmurugan, B. K., & Thanh, N. C. (2019). *Antrodia cinnamomea*—An updated minireview of its bioactive components and biological activity. *Journal of food biochemistry*, 43(8), e12936.
- Guan, C., Li, Q., Song, X., Xu, W., Li, L., & Xu, A. (2017). Antroquinonol Exerts Immunosuppressive Effect on CD8⁺ T Cell Proliferation and Activation to Resist Depigmentation Induced by H₂O₂. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017.
- Geng, Y., Wang, J., Sun, Q., Xie, M., Lu, Z. M., Xu, H. Y., Shi, J. S. & Xu, Z. H. (2016). Identification of antrodin B from *Antrodia camphorata* as a new anti-hepatofibrotic compound using a rapid cell screening method and biological evaluation. *Hepatology Research*, 46(3), E15-E25.
- Gokila Vani, M., Kumar, K. J., Liao, J. W., Chien, S. C., Mau, J. L., Chiang, S. S., Lin, C. C., Kuo, Y. H. & Wang, S. Y. (2013). Antcin C from *Antrodia cinnamomea* protects liver cells against free radical-induced oxidative stress and apoptosis in vitro and in vivo through Nrf2-dependent mechanism. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013.
- Han, C., Guo, L., Yang, Y., Li, W., Sheng, Y., Wang, J., Guan, Q., & Zhang, X. (2019). Study on *Antrodia camphorata* polysaccharide in alleviating the neuroethology of PD mice by decreasing the expression of NLRP3 inflammasome. *Phytotherapy Research*, 33(9), 2288-2297.
- Kuang, Y., Li, B., Wang, Z., Qiao, X., & Ye, M. (2021). Terpenoids from the medicinal mushroom *Antrodia camphorata*: Chemistry and medicinal potential. *Natural Product Reports*, 38(1), 83-102.
- Kuo, Y. H., Lin, C. H., & Shih, C. C. (2016). Dehydroeburicoic acid from *Antrodia camphorata* prevents the diabetic and dyslipidemic state via modulation of glucose transporter 4, peroxisome

- proliferator-activated receptor α expression and AMP-activated protein kinase phosphorylation in high-fat-fed mice. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(6), 872.
- Kumar, K. S., Vani, M. G., Chueh, P. J., Mau, J. L., & Wang, S. Y. (2015). Antrodin C inhibits epithelial-to-mesenchymal transition and metastasis of breast cancer cells via suppression of Smad2/3 and β -catenin signaling pathways. *PLoS One*, 10(2), e0117111.
- Kumar, K. S., Chu, F. H., Hsieh, H. W., Liao, J. W., Li, W. H., Lin, J. C. C., Shaw, J. F. & Wang, S. Y. (2011). Antroquinonol from ethanolic extract of mycelium of *Antrodia cinnamomea* protects hepatic cells from ethanol-induced oxidative stress through Nrf-2 activation. *Journal of ethnopharmacology*, 136(1), 168-177.
- Liu, Y., Chen, R., Li, L., Dong, R., Yin, H., Wang, Y., Yang, A., Wang, J., Li, C. & Wang, D. (2021). The triterpenoids-enriched extracts from *Antrodia cinnamomea* mycelia attenuate alcohol-induced chronic liver injury via suppression lipid accumulation in C57BL/6 mice. *Food Science and Human Wellness*, 10(4), 497-507.
- Lin, C. H., Hsiao, L. W., Kuo, Y. H., & Shih, C. C. (2019). Antidiabetic and antihyperlipidemic effects of sulphurenic acid, a triterpenoid compound from *Antrodia camphorata*, in streptozotocin-induced diabetic mice. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(19), 4897.
- Lin, Y. L., Ma, L. T., Lee, Y. R., Shaw, J. F., Wang, S. Y., & Chu, F. H. (2017). Differential gene expression network in terpenoid synthesis of *Antrodia cinnamomea* in mycelia and fruiting bodies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(9), 1874-1886.
- Nakamura, N., Hirakawa, A., Gao, J. J., Kakuda, H., Shiro, M., Komatsu, Y., Sheu, C. C. & Hattori, M. (2004). Five New Maleic and Succinic Acid Derivatives from the Mycelium of *Antrodia camphorata* and Their Cytotoxic Effects on LLC Tumor Cell Line. *Journal of Natural Products*, 67(1), 46-48.
- Peng, C. H., Yang, M. Y., Yang, Y. S., Yu, C. C., & Wang, C. J. (2017). *Antrodia cinnamomea* prevents obesity, dyslipidemia, and the derived fatty liver via regulating AMPK and SREBP signaling. *The American Journal of Chinese Medicine*, 45(01), 67-83.
- Qiao, X., Wang, Q., Ji, S., Huang, Y., Zhang, Z. X., Bo, T., Tzeng, Y. M. & Ye, M. (2015). Metabolites identification and multi-component pharmacokinetics of ergostane and lanostane triterpenoids in the anticancer mushroom *Antrodia cinnamomea*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 111, 266-276.
- Shie, P. H., Wang, S. Y., Lay, H. L., & Huang, G. J. (2016). 4, 7-Dimethoxy-5-methyl-1, 3-benzodioxole from *Antrodia camphorata* inhibits LPS-induced inflammation via suppression of NF- κ B and induction HO-1 in RAW264. 7 cells. *International immunopharmacology*, 31, 186-

- Wang, H. C., Chu, F. H., Chien, S. C., Liao, J. W., Hsieh, H. W., Li, W. H., ... & Wang, S. Y. (2013). Establishment of the metabolite profile for an *Antrodia cinnamomea* health food product and investigation of its chemoprevention activity. *Journal of agricultural and food chemistry*, 61(36), 8556-8564.
- Xu, X. L., Li, S., Zhang, R., & Le, W. D. (2022). Neuroprotective effects of naturally sourced bioactive polysaccharides: An update. *Neural Regeneration Research*, 17(9), 1907.
- You, R. I., Lee, Y. P., Su, T. Y., Lin, C. C., Chen, C. S., & Chu, C. L. (2019). A Benzenoid 4, 7-Dimethoxy-5-Methyl-L, 3-Benzodioxole from *Antrodia cinnamomea* attenuates dendritic cell-mediated th2 allergic responses. *The American Journal of Chinese Medicine*, 47(06), 1271-1287.
- Yen, I. C., Shi, L. S., Chung, M. C., Ahmetaj-Shala, B., Chang, T. C., & Lee, S. Y. (2018). Antrolone, a novel benzoid derived from *Antrodia cinnamomea*, inhibits the LPS-induced inflammatory response in RAW264. 7 macrophage cells by balancing the NF- κ B and Nrf2 pathways. *The American Journal of Chinese Medicine*, 46(06), 1297-1313.