

國立臺灣大學生命科學院生化科技學系

碩士論文

Department of Biochemical Science and Technology

College of Life Science

National Taiwan University

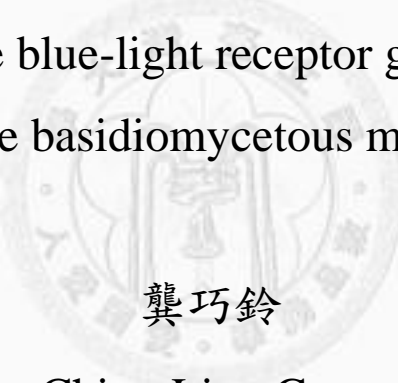
Master Thesis

擔子菌菇類藍光受器基因之選殖、序列分析與表現

Cloning, sequence analysis and expression of

the blue-light receptor gene

from the basidiomycetous mushrooms



龔巧鈴

Chiau-Ling Gung

指導教授：許瑞祥 博士

Advisor: Ruey-Shyang Hseu, Ph.D.

中華民國 100 年 7 月

July, 2011

謝誌

兩年的碩士生涯終於要劃下句點，過程中若沒有身邊許多人的幫助、支持與鼓勵，單靠自己一個人是絕對無法完成的，所以在此獻上我滿滿的感謝。

首先要謝謝我的指導教授許瑞祥老師，總是激發我的思考使我能看得更廣更遠，不被既有的觀念與想法所侷限，並在各方面都給予我完善的協助，幫助我一步步地完成論文。感謝黃慶臻老師在科學研究之觀念與邏輯的訓練，與每次 meeting 時不厭其煩的提醒與叮囑，使我時時反省自己並獲益良多。感謝楊啟伸老師提供許多寶貴且專業的建議，讓本論文能更完整的呈現。

感謝 106 實驗室的所有成員們，在這段日子裡，無論是學術知識上的討論、實驗方法的研究，或是吃喝玩樂與亂扯聊天，在大家的陪伴下點點滴滴既珍貴又溫暖。感謝王董、琬婷學姊與玉儒，像大家長般的帶領與照顧著整個實驗室。感謝畢業的明毅與映慈，時常奔波的林琤學姊、嗣民學長與明靜，要去國外念書的明玥學姊，你們的提點幫助我有所成長。謝謝我的兩個小精靈傲傲跟瑞芸，有妳們的陪伴讓我時常感到窩心又開心。感謝壯丁們信豪、佳麟和翊綸，常常被賦予搬重物的使命，辛苦你們啦。也謝謝小鬼頭們泡泡、致瑞、友邦與雅晴，你們讓實驗室充滿更多的歡笑。感謝我的同學朋友們，恰恰、芷玲、蔡毛、采馨、嫵伊等很多很多的人們，在我的生活與心靈上的慰藉與陪伴。

最後，要向我的老爸老媽還有家人們致上深深的感謝，你們是支持我的最大力量。

中文摘要

在許多食藥用擔子菌的栽培過程中，要使其形成子實體必須控制多項環境因子，其中光線是影響其子實體發育是否完全的一個重要因素，顯示擔子菌中應有接受光線刺激的受器存在。目前研究顯示灰蓋鬼傘(*Corprinus cinereus*)、隱球菌(*Cryptococcus neoformans*)、香菇(*Lentinula edodes*)與褐腐菌(*Postia placenta*)等四種擔子菌具有與子囊菌紅麵包黴(*Neurospora crassa*)藍光受器 White Collar-1 (WC-1)同源的蛋白質。本研究從常見食用真菌香菇、金針菇、鮑魚菇、美白菇與雞腿菇中選殖其 WC-1 同源藍光受器。目前使用專一性引子於香菇的互補 DNA (complementary DNA, cDNA)中選殖到兩條與已發表之香菇藍光受器基因 *LephrA* (accession no. AB279630)和 *LephrB* (accession no. AB446463)相似之基因，分別命名為 *photoreceptor A* 與 *photoreceptor B*。*photoreceptor A* 全長為 2,831 bp，其中包含了長 56 bp 的 intron，與 *LephrA* 核酸與胺基酸相同度分別為 99.5%和 99.2%。*photoreceptor B* 全長為 942 bp，與 *LephrB* 核酸與胺基酸相同度為 99.5%和 99.6%。在基因組中，*photoreceptor B* 被四個大小在 52~87 bp 之間 intron 分開。使用 pET-21a(+)載體於大腸桿菌 BL 21 (DE3)異源表現的 Photoreceptor B-His x6 為水溶性且大小約為 37.7 kDa。同時以特定之退化性引子於金針菇 cDNA 中擴增出一段長 420 bp 的核酸序列，轉譯的 140 個胺基酸序列分別與香菇、裂褶菌(*Schizophyllum commune*)、布拉克鬚鬚黴(*Phycomyces blakesleanus*)與灰蓋鬼傘中已發表的 WC-1 同源藍光受器分別具 28%、28%、24%與 31%相同度。

關鍵字：擔子菌菇類、感光系統、藍光受器、香菇、金針菇

Abstract

For the fruiting-body formation, there are different environmental factors that must be controlled on the edible and medical mushroom cultivation. Light is one of the most important elements influencing the fruiting-body development, which indicates that there exists photoreceptor for receiving the light stimulus in the basidiomycetes. The basidiomycete *Corpinus cinereus*, *Cryptococcus neoformans*, *Lentinula edodes* and *Postia placenta* have the blue-light receptors that are homologs of White Collar-1 (WC-1) in ascomycete *Neurospora crassa*. In this study, we attempted to clone the WC-1 homologs from the edible mushrooms: *L. edodes*, *Flammulina velutipes*, *Pleurotus ostreatus*, *Hypsizygus marmoreus* variant and *Coprinus comatus*. We cloned two blue-light receptor genes, *photoreceptor A* and *photoreceptor B*, from *L. edodes* by using specific primers and the complementary DNA template of *L. edodes* for PCR. The genes *photoreceptor A* and *photoreceptor B* are similar to the published blue-light receptor genes *LephrA* (accession no. AB279630) and *LephrB* (accession no. AB279630) in *L. edodes*. The sequence of *photoreceptor A* is 2,831 bp and contains intron in 56 bp. The identity of nucleotides and amino acids between *photoreceptor A* and *LephrA* are 99.5% and 99.6%. The sequence of *photoreceptor B* is 942 bp and the identity of nucleotides and amino acids compared to *LephrB* are 99.5% and 99.6%. The *photoreceptor B* gene is divided by four introns in the genome and the size of introns is between 52 bp and 87 bp. The *photoreceptor B* gene were subcloned to pET-21a(+) and expressed in *Escherichia coli* BL 21 (DE3). The protein product Photoreceptor B-His x6 is soluble and the molecular weight is about 37.7 kDa. In the same time, we cloned a 420 bp nucleotide from the complementary DNA of *F. velutipes* by using the degenerate primers. The deduced 140 amino acids of the cloned nucleotide has 28%, 28%, 24% and 31% identity to the WC-1 homologs of *L. edodes*, *Schizophyllum commune*, *Phycomyces blakesleeanus* and *C. cinereus*.

Keywords : Basidiomycetous mushroom, light-sensing system, blue-light receptor, *Lentinula edodes*, *Flammuliana velutipes*

目錄

中文摘要.....	I
Abstract.....	II
目錄.....	III
圖目錄.....	V
表目錄.....	VIII
第一章、前言.....	1
一、 食用菇類簡介.....	1
1. 菇類概述.....	1
2. 食用菇類人工栽培簡介.....	3
3. 常見食用菇類介紹.....	5
二、 真菌的光感知系統.....	7
1. 藍光感知系統.....	7
2. 紅光感知系統.....	8
3. 視紫質感知系統.....	8
三、 真菌藍光系統之研究情形.....	9
1. 紅麵包黴的藍光受器蛋白質.....	9
2. 保守性區域 PAS 與 LOV domain	10
3. 擔子菌門中藍光受器蛋白質之研究.....	10
四、 研究動機與目的.....	14
第二章 材料與方法.....	16
一、 實驗材料.....	16
1. 菌株及培養條件.....	16
2. 基因保存與表現系統.....	17

3. 使用質體.....	17
4. 實驗引子.....	18
二、 實驗方法.....	18
1. 菇類藍光受器基因鈎取.....	18
2. 使用大腸桿菌生產 photoreceptor B-His x6.....	32
第三章 實驗結果.....	37
一、 菇類藍光受器基因選殖.....	37
1. 嘗試由菇類基因體中以專一性引子擴增出藍光受器部分片段.....	37
2. 嘗試由菇類基因體中以退化性引子擴增出藍光受器部分片段.....	51
3. 嘗試由菇類 cDNA 中以退化性引子擴增出藍光受器部分片段.....	55
第四章、討論.....	67
一、 基因組中藍光受器的選殖.....	67
1. 專一性引子.....	67
2. 退化性引子.....	67
二、 香菇藍光受器基因的選殖.....	68
1. 本研究之 <i>LephrA :photoreceptpr A</i> 的選殖.....	68
2. Photoreceptor-B-His x6 處理菌絲結果.....	69
3. 金針菇中部分 WC-1 基因選殖.....	69
第五章、結論.....	72
第六章、未來工作.....	73
第七章、參考文獻.....	74
附錄.....	78

圖目錄

圖一、本研究架構.....	15
圖二 引子 <i>LephrA-F/R</i> 之序列與香菇藍光受器基因 <i>LephrA</i> 的對應位置。.....	22
圖三 引子 <i>LephrB-F/R</i> 之序列與香菇藍光受器基因 <i>LephrA</i> 的對應位置。.....	23
圖四 引子 <i>dst1.1-F/R</i> 與 <i>dst1.2-F/R</i> 之序列與灰蓋鬼傘藍光受器基因 <i>dst1</i> 的對應位置。.....	24
圖五 藍光受器序列比對與退化性引子 <i>dp-1-F</i> 、 <i>dp-1-R</i> 、 <i>dp-2-F</i> 、 <i>dp-2-R</i> 的序列與對應位置。.....	25
圖六 pET-21a(+)-photoreceptor B-His x6 質體.....	33
圖七 引子 <i>LephrA-F/R</i> 與 <i>LephrB-F/R</i> 確認結果.....	38
圖八 引子 <i>dst1.1-F/R</i> 與 <i>dst1.2-F/R</i> 確認結果.....	39
圖九 使用引子 <i>LephrB-full-F/LephrB-full-R</i> ，以香菇基因組為模板的 PCR 結果.....	40
圖十 <i>photoreceptor B</i> 在基因組中 exon 與 intron 的分布.....	41
圖十一 本研究選殖 <i>photoreceptor B</i> 之 exon 與 intron 分布的示意圖.....	42
圖十二 (A) 以 <i>LephrA-F/R</i> 為引子對金針菇 genomic DNA 進行 PCR 之結果(B) 以 <i>dst1.1-F/R</i> 為引子對金針菇 genomic DNA 進行 PCR 之結果(C) 以 <i>dst1.2-F/R</i> 為引子對金針菇 genomic DNA 進行 PCR 之結果.....	43
圖十三 (A) 以 <i>LephrA-F/R</i> 為引子對鮑魚菇基因體 DNA 進行 PCR 之結果(B) 以 <i>dst1.1-F/R</i> 為引子對鮑魚菇基因體 DNA 進行 PCR 之結果(C) 以 <i>dst1.2-F/R</i> 為引子對鮑魚菇基因體 DNA 進行 PCR 之結果.....	45
圖十四 (A) 以 <i>dst1.1-F/R</i> 為引子對鮑魚菇 genomic DNA 進行 PCR 之放大片段定序後轉譯成的氨基酸序列，以 Po-GD- <i>dst1.1-F</i> 稱之(B) 於 NCBI 網站上 Blast 之結果.....	46
圖十五 (A) 以 <i>LephrB-F/R</i> 為引子對美白菇基因體 DNA 進行 PCR 之結果(B) 以 <i>dst1.1-F/R</i> 為引子對美白菇基因體 DNA 進行 PCR 之結果.....	48
圖十六 (A) 以 <i>dst1.1-F/R</i> 為引子對美白菇 genomic DNA 進行 PCR 之放大片段定序後轉譯成的氨基酸序列，以 HmV-GD- <i>dst1.1-F</i> 稱之。(B) DNA 片段	

HmV-GD-dst1.1-F 於 NCBI 網站上 Blast 之結果。	49
圖十七 以引子 <i>LephrA</i> -F/R 對雞腿菇 genomic DNA 進行 PCR 之結果	50
圖十八 (A)以 <i>dp</i> -F/R 為引子與香菇基因體 DNA 為模板之擴增結果(B)以引子 M13_F/R 進行菌落 PCR 的結果	52
圖十九 <i>LephrA</i> 的 PAS domain 與選殖出的 <i>Le-dp</i> -Colony 1 和 21 之序列比對。	53
圖二十 (A)以 <i>dp</i> -F/R 為引子與金針菇基因體為模板之擴增結果(B) 以 <i>dp</i> -F/R 為 引子與鮑魚菇、美白菇、雞腿菇基因體為模板之擴增結果	54
圖二十一 由香菇的 cDNA 選殖 <i>LephrA</i> 與 <i>LephrB</i>	56
圖二十二 <i>LephrA</i> 與本研究選殖之 <i>photoreceptor A</i> 之序列比對	57
圖二十三 <i>LephrB</i> 與本研究選殖之 <i>photoreceptor B</i> 之序列比對	60
圖二十四 vector: pET-21a(+)與 insert: <i>Bam</i> HI- <i>photoreceptor B</i> - <i>Hind</i> III 限制酶截切 結果	61
圖二十五 (A)各純化分割的本研究選殖表現之 Photoreceptor B-His x6 蛋白質電 泳圖與(B)西方墨點圖	62
圖二十六 香菇、金針菇、鮑魚菇、美白菇與雞腿菇的菌絲液加入 Photoreceptor B-His x6 後黑暗與光照環境處理結果	63
圖二十七 使用引子(A) <i>dp</i> -F/R、(B) <i>dp</i> -1-F/R、(C) <i>dp</i> -1-F/ <i>dp</i> -2-R、(D) <i>dp</i> -2-F/ <i>dp</i> -1-R 對模板金針菇 cDNA 進行 PCR 的結果	65
圖二十八 使用引子 <i>dp</i> -2-F/ <i>dp</i> -1-R 對模板金針菇 cDNA 進行 PCR 所得 420 bp 序 列，以 FV-cDNA- <i>dp</i> 21-420 bp 稱之	65
圖二十九 FV-cDNA- <i>dp</i> 21-420 bp 轉譯之胺基酸與香菇、裂褶菌、布拉克鬚鬚徽 與灰蓋鬼傘中已發表的 WC-1 同源藍光受器之比對圖	66
圖三十 FV-cDNA- <i>dp</i> 21-420 bp 片段第一次基因組步移結果	70
圖三十一 由 3'GW 之編號 5 序列與 5'GW 之編號 7 序列串接而得的 FV-cDNA- <i>dp</i> 21-420 bp 第一次 GW 序列	71
附圖一 一般擔子菌的生活史	78
附圖二 市售的(A)香菇、(B)金針菇、(C)鮑魚菇、(D)美白菇、(E)雞腿菇	79

附圖三 WC 複合體影響光反應基因表現的作用機制示意圖(9, 13, 23)	80
附圖四 灰蓋鬼傘子實體的不同形態(27).....	81
附圖五 灰蓋鬼傘之生活史(30).....	82
附圖六 真菌中具 LOV domain 之藍光受器的比較(48).....	83
附圖七 真菌中 WC-2 同源之藍光受器的比較(47)	84
附圖八 黑色素形成機制.....	85



表目錄

表一 本研究使用之引子.....	19
表二 本實驗中菇類基因體 DNA 與第一股 cDNA 為模板時的聚合酶連鎖反應條件	26
表三 各物種基因組 DNA PCR 時使用之黏合溫度.....	27
表四 本實驗中大腸桿菌 DH5 菌落聚合酶連鎖反應(colony PCR)反應條件....	32
表五 限制酶反應之配方與反應條件.....	33
附表一 真菌感光系統(43).....	86
附表二 已發表之擔子菌 WC-1 同源藍光受器.....	87



第一章、前言

一、食用菇類簡介

1. 菇類概述

菇類屬於真菌界，一般是指其有性世代所發育成肉眼可見的子實體形態，此類真菌包含了部分的子囊菌與多數的擔子菌。食用菇類富含蛋白質、多醣體、膳食纖維、維生素與礦物質，並具有特殊風味，是極具營養的一種食物。菇類沒有肉類具高脂質與高膽固醇的缺點，加上其蛋白質含量高於蔬菜三至六倍，菇類的纖維質含量亦高，還具有能提升免疫力的多醣體與其它特殊分子，實為一優質的健康食物(36)。

在亞洲，自古以來就將菇類應用在醫藥上，近年來西方世界也開始研究其藥用功效，從各種菇類中找到許多具生理活性的物質(59)，顯示了菇類的藥用潛力，以下列舉菇類具有的藥理功效：

1.1. 抗細菌與抗真菌

菇類在自然環境中為了生存，其本身就能生成抗細菌與抗真菌的物質，研究人員便由菇類獲取這些物質來造福人類(21)。舉例來說，弗氏靈芝(*Ganoderma pfeifferi*)的靈芝酶素(ganomycin) (22)能抑制抗藥性金黃色葡萄球菌(methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)與其他細菌的生長(42)，而且弗氏靈芝的全萃取物可抑制會引起的皮膚疾病的皮屑芽孢菌(*Pityrosporum ovale*)、表皮葡萄球菌(*S. epidermidis*)與痤瘡桿菌(*Propionibacterium acnes*)等細菌生長(33)；香菇(*Lentinula edodes*)的草酸能抵抗金黃色葡萄球菌與其他細菌(3)；樹舌靈芝(*Ganoderma applanatum*)的固醇類能抑制細菌生長(49)。在抗真菌的作用上，長管靈芝(*Ganoderma annulare*)的樹舌環氧酸 A (Applanoxidic acid A)能抵抗鬚毛癬菌(*Trichophyton mentagrophytes*) (50)。

1.2. 抗病毒

菇類的全萃取與特定成分都有抗病毒的相關研究，其作用機制包含抑制病毒酵素、抑制病毒核酸生成及促使病毒被動物細胞吸收等(8)。靈芝(*Ganoderma lucidum*)的數種三萜類(triterpenes)能對抗人類後天免疫缺乏病毒(human immunodeficiency virus type 1, HIV-1)(18)，弗氏靈芝與其它靈芝屬的靈芝二醇(ganodermediol)、赤芝二醇(lucidadiol)與樹舌環氧酸 G (Applanoxidic acid G)能抵抗 A 型流感(influenza virus type A) (57)。毛柄庫恩菇(*Kuehneromyces mutabilis*)的菌絲全萃取(38)、粗毛針孔菌(*Inonotus hispidus*)的全萃取與酚類化合物，以及許多菇類的麥角固醇衍生物能抗 A 型與 B 型流感病毒(1)。除了前述的小分子具有抗病毒作用外，菇類成分中的大分子如：香菇與白樺茸(*Inonotus obliquus*)的水溶木質素、雲芝(*Trametes versicolor*)的多醣體 PSK 與 PSP 和金針菇(*Flammulina velutipes*)的核糖體失活蛋白質 velutin 等，也有研究指出能抑制 HIV 病毒。

1.3. 抗腫瘤

癌症是現今人類面臨最大的死亡威脅之一，菇類也被應用在腫瘤的預防與治療上。在十六與十七世紀的西歐，白樺茸的子實體被作為治療癌症與腸胃疾病的複合藥劑(40)；在台灣、日本、中國與韓國等亞洲地區，則是致力於研究菇類在調節免疫功能上對抗腫瘤細胞的作用，像是多醣體能刺激先天免疫以達到抗癌作用(11, 39, 45, 58)。在中國和日本，香菇的香菇多醣(lentinan)、裂褶菌(*S. commune*)的裂褶多醣(Schizophyllan)、雲芝的 PSK 與 PSP 和舞菇(*Grifola frondosa*)的活性物質 MD-fraction 都有被應用在癌症的臨床治療(22)。

1.4. 其他

除了上述藥用功效外，菇類還有抗過敏(28, 53)、抗氧化(34)、抗發炎(24)、抗動脈硬化(6, 29)與降血糖(20)等其它功用。以上資料顯示菇類在醫藥的用途十分廣泛，當我們持續增加對菇類的化學、生物科技與分子生物學上的知識，都能幫助我們將菇類的藥用潛力發揮至極致，以造福人類。

2. 食用菇類人工栽培簡介

人工栽培方式是根據不同菇類的自然生存條件而定，包括段木栽培、太空包栽培與覆土栽培等，栽培過程主要分成菌種製備、培養基質製作、接種、走菌、刺激出菇等步驟。

2.1. 人工栽培現況

隨著栽培技術的進步，可以人工大量栽培的菇類品種亦日漸增加，以下敘述目前已可人工栽培的菇類。在傘菌屬(*Agaricus spp.*)菇類中，包含世界栽培最大宗的洋菇(*A. bisporus*)，在臺灣、中國、日本與巴西皆有生產的巴西蘑菇(*A. balzei*)，還有臺灣研發出可於夏季栽培的高溫洋菇(*A. bitorquis*)。側耳屬(*Pleurotus spp.*)中的鮑魚菇(*P. ostreatus*)，目前約有 80 個國家栽培，另有夏季鮑魚菇(*P. cystidiosus*)、平菇(*P. floridaus*)、杏鮑菇(*P. eryngii*)、珊瑚菇(*P. citrinopileatus*)、桂肉色鮑魚菇(*P. flabellatus*)、粉紅色鮑魚菇(*P. incarnatus*)與鳳尾菇(*P. asjor-caju*)。此外，還有國人常見的香菇、草菇(*Volvariella volvacea*)、金針菇、鴻喜菇(*Hypsizygus marmoreus*)、銀耳(*Tremella fuciformis*)、木耳(*Auricularia auricula*)與毛木耳(*A. polytrica*)。另外，屬於藥用的靈芝屬(*Ganoderma spp.*)中，有靈芝(*G. lucidum*)、松杉靈芝(*G. tsugae*)與紫芝(*G. sinense*)。被視為高級食材的松露(*Tuber melanosporum*)屬於塊菌屬，此屬的菇類尚有夏塊菌(*T. aestivum*)、冬塊菌(*T. brumale*)與白松露(*T. magnatum*)等，只能在法國與義大利等地的特定林區生產。其它如繡球菌(*Sparassis crispa*)、鹿花菌(*Gyromitra*

esculenta)、滑菇(*Pholiota nameko*)、猴頭菇(*Hericiium erinaceus*)、舞菇(*Grifola frondos*)與竹筴(*Dictyophora indusiata*)等，也能人工栽培。

此外，有些無法人工培養其子實體的菇種，會使用菌絲體液態醱酵的方式來取代子實體的栽培，例如冬蟲夏草與牛樟芝(*Taiwanofungus camphoratus*)。

2.2. 栽培環境的控制

無論是何種栽培方式，都必須控制培養時的各種環境因子，才能成功獲得其子實體，環境因子如下所示：

- (1) 碳氮源比例：碳源與氮源是培養基質的主要成分，最佳碳氮源比例會使菇類生長得更好。
- (2) 酸鹼值：多數菇類喜歡偏酸性的培養基。
- (3) 溫度：不同菇類有其最適培養溫度，可分為高溫(20°C~30°C)、中溫(22°C~26°C)與低溫菇(8°C~18°C)，一般來說，菌絲體生長時期(俗稱走菌)要求的溫度會高於子實體發育時期(俗稱出菇)。
- (4) 濕度：菌絲體生長時期空氣濕度須控制在較低的60%左右，以防雜菌污染，待至出菇時其濕度須提高至85~95%，以利子實體形態發育完全。
- (5) 空氣：菌絲體生長時期能耐受較高濃度之二氧化碳，等到出菇時須增加通氣量以提高氧氣含量。
- (6) 光線：許多菇類的菌絲體生長時期不須光照，黑暗中菌絲生長較好，一旦走菌完全，會以適量散射光來誘發出菇，而且在適當光線下菇體才能生長良好。但洋菇是例外，其菌絲體與子實體生長時期皆不須光線。

3. 常見食用菇類介紹

3.1. 香菇

香菇又被稱為冬菇或椎茸，學名為 *Lentinula edodes*，分類地位上屬於真菌界(Fungi)，擔子菌門 (Basidiomycota)，傘菌綱(Agaricomycetes)，傘菌目(Agaricales)，小皮傘科 (Marasmiaceae)，香菇屬 (*Lentinula*)。

香菇屬於木腐型真菌，生活史與大部分菇類相似(附圖一)，其子實體如附圖二(A)所示，菌傘直徑在 5-20 公分左右，傘蓋成褐色具有鱗片，孢子印呈黑色，菌柄上具菌環。野生香菇主要生長在東亞、東南亞與南亞的溫帶地區，至今已有一百八十多年的栽培歷史，現有段木栽培與太空包等栽培方式。香菇是亞洲地區常見的食用與藥用真菌，曬乾後的香菇會有一種特殊香味，深受中國人與日本人的喜愛。其成分包含必需與非必需胺基酸、碳水化合物、可溶性纖維質、維他命、礦物質等等，富含維生素 D，能維護骨骼與牙齒的健康；香菇所含之多醣類被稱為香菇多醣，具有抗癌與增加免疫力的功效(5)。

3.2. 金針菇

金針菇又稱金絲菇或毛柄金錢菇，學名為 *Flammulina velutipes*，分類上隸屬真菌界(Fungi)，擔子菌門 (Basidiomycota)，擔子菌綱(Basidiomycetes)，傘菌目(Agaricales)，口蘑科(Tricholomataceae)，類火菇屬(*Flammulina*)。

金針菇屬於木腐型真菌，市售菇體如附圖二(B)所示，是低溫型食用菌，栽培歷史悠久，現以太空包與瓶裝栽培為主。金針菇富含各種胺基酸，其中離胺酸(lysine)與精胺酸的(arginine)含量很高；醣蛋白、多醣、維生素 B1、B2、C、E 以及礦物質，如硒、鋅、鈣、磷、鐵、鉀等營養成分豐富。此外亦含膳食纖維與胡蘿蔔素，具有特殊真菌免疫調節蛋白質(fungal immunomodulatory protein, FIP) FIP-*five*，能促使 interleukin-2、interferon- γ 與 tumor necrosis factor- α 的生成，

使免疫力提升與抑制腫瘤生成(16)。此外，還有預防和治療肝炎、胃腸潰瘍，以及降膽固醇等藥用功效。

3.3. 鮑魚菇

鮑魚菇又稱秀珍菇或蠔菇，學名為 *Pleurotus ostreatus*，子實體形態為菌柄側生於菌傘，如附圖二(C)所示，分類隸屬真菌界(Fungi)，擔子菌門(Basidiomycota)，擔子菌綱(Basidiomycetes)，傘菌目(Agaricales)，側耳科(Pleurotaceae)，側耳屬(*Pleurotus*)。

鮑魚菇屬於白腐型真菌(white rot fungi)，是世界上第二大宗的栽培食用菇，其商業化栽培方式包含麥桿或稻草推肥、裝袋與木屑太空包等。除了營養成分豐富外，還具有藥用功效，其多醣體有抗癌與抗氧化作用(7, 32)，由其菇體萃取之凝集素，能使小鼠增加抵抗腫瘤與抗肝癌的能力，提升存活率(56)。

3.4. 美白菇

由分子鑑定與交配測試證實美白菇與鴻喜菇(*Hypsizygus marmoreus*)為同一菇種(60)，以 *Hypsizygus marmoreus* variant 稱之，故分類地位與鴻喜菇相同，屬於真菌界(Fungi)，擔子菌門(Basidiomycota)，擔子菌綱(Basidiomycetes)，傘菌目(Agaricales)，口蘑科(Tricholomataceae)，玉蕈屬(*Hypsizygus*)。

鴻喜菇又稱真姬菇、玉蕈、榆菇與靈芝菇，屬於木腐型真菌，美白菇則是其白色變種的品系，子實體形態如附圖二(D)所示。鴻喜菇原生於日本與中國，南宋陳仁玉所著之《菌譜》中記載：「玉蕈，生山中初寒時，色潔皙可愛，故諡為玉，然做羹微韌，俗稱寒蒲蕈。」，其中提到的玉蕈極有可能為現今的鴻喜菇，而日本於十七世紀起即有多次採集與食用鴻喜菇的記錄。市售鴻喜菇與美白菇的味道鮮美，十分營養，氨基酸種類多達 18 種，所含礦物質中微量元素硒含量很高，有助於抗氧化與抗腫瘤(12, 52)。

3.5. 雞腿菇

雞腿菇又稱雞腿蘑菇或毛頭鬼傘，學名為 *Coprinus comatus*，子實體形態如附圖二(E)所示，分類隸屬真菌界(Fungi)，雙核亞(Dikarya)，擔子菌門(Basidiomycota)，傘菌綱(Agaricomycetes)，傘菌目(Agaricales)，鬼傘科(Psathyrellaceae)，鬼傘屬(*Coprinus*)。

雞腿菇與灰蓋鬼傘同屬，是在春末、夏秋時節的雨後長出之草腐型土生食用菌，分布於世界各國。可使用稻草、各種作物莖稈、木屑與米糠等基質進行人工栽培，菌絲最適生長溫度為 23-27°C，出菇溫度為 12-18°C。雞腿菇肉質細嫩，味道鮮美且營養豐富，但採摘後不能久放，過於成熟時會產生毒素而不能食用。此外，於動物實驗中發現其具降血糖與退熱(46)的功效。



二、真菌的光感知系統

1. 藍光感知系統

達爾文於西元 1881 年所敘述的植物向光性是文獻中最早被提出的生物藍光反應(15)。根據演化的同源性，在真菌中所發現的藍光感光蛋白質，與植物具有類似的保守性區域: light-oxygen-voltage (LOV) domain，而 LOV domain 是屬於 Per-Arnt-Sim (PAS) domain 的子群，是 flavin chromophore 中感光分子的結合區域。由於子囊菌紅麵包黴(*Neurospora crassa*)許多分化的過程都受到藍光調控，包括類胡蘿蔔素的生成、分生孢子的形成、子囊的向光性與生理時鐘的設定...等(43)，加上該生物具有容易培養、單倍體生活史與基因組解碼完成之優勢(9)，使該生物成為真菌中藍光訊息傳遞研究的模式生物，目前紅麵包黴已發表與藍光反應相關的蛋白質有 White Collar-1 (WC-1)、White Collar-2 (WC-2)與 Vivid (VVD)，其中 WC-1 被認為參與了紅麵包黴中所有的藍光反應，而且在許多其它真菌中皆具有 WC-1 的同源蛋白質(43)。

2. 紅光感知系統

真菌中紅光感知系統的主角是 phytochrome 此類型之光受器，chromophore 為 tetrapyrrole。Phytochrome 具有兩種吸光型態，分別是紅光吸收態(Pr)與遠紅光吸收態(Pfr)，與植物的 phytochrome 具同源性。在兩種型態 phytochrome 作用下對於真菌會有不同的影響(19)。舉例來說，小巢狀麴菌(*Aspergillus nidulans*)在光波長 680 nm 的紅光環境下行無性生殖產生分生孢子(conidiospores)，而在光波長 730 nm 的遠紅光環境下則是行有性生殖產生子囊孢子(ascospores)(41)；多頭絨泡菌(*Physarum polycephalum*)在遠紅光環境下會誘發原質團(plasmodium)的生成與產孢，而在紅光環境下則會抑制產孢(51)。

3. 視紫質感知系統

視紫質(rhodopsins)是由視紫蛋白(opsins)與輔因子視黃醛(retinal)組成的穿膜蛋白，具有七個的穿膜螺旋區，能吸收光線而產生訊息傳遞或驅動能量之產生。在真菌中，紅麵包黴的視紫質被命名為 NOP-1，吸收波長為 543 nm 的綠光(43)，影響無性分生孢子的產生和類胡蘿蔔素生成(4)。

三種系統的詳細資料如附表一所示。

三、真菌藍光系統之研究情形

1. 紅麵包黴的藍光受器蛋白質

紅麵包黴是藍光感知系統研究中的模式物種，已被發現的藍光受器為 WC-1、WC-2 與 VVD。WC-1 由鋅指結構、2 個 PAS domains、可能的轉錄活化區域、核定位訊號因子與 chromophore 結合區域組成(2)，其中 chromophore 結合區域又稱為 LOV domain，能與 flavin adenine dinucleotide (FAD) 此種 chromophore 結合，此結構最先是在植物光受器 phototropins 中被發現，當光化學變化發生，phototropins 的 LOV domain 上之半胱氨酸(cysteine)會與 flavin 結合形成 flavin-cysteinyl adduct，用以傳遞訊號；而在 WC-1 中，將其 LOV domain 半胱氨酸突變為絲氨酸(serine)後，則發現原本受光影響的基因活化反應消失，故推測 WC-1 活化模式可能與 phototropin 相同。

WC-2 由鋅指結構、1 個 PAS domain、可能的轉錄活化區域與核定位訊號因子組成，WC-2 能與 WC-1 藉由 PAS domain 而互相結合成為 WC 複合體(WC complex)，WC 複合體再進一步與光反應基因之啟動子(promoter)結合而影響其轉錄作用(10)。

VVD 具有 1 個 LOV domain，與紅麵包黴的光適應性(photoadaptation)有關，光適應性是敘述紅麵包黴在最初受光照射時，其光反應基因的轉錄表現量會增加，但光照持續一段時間後，此類基因之表現量則會下降至未受光照時的狀態。在紅麵包黴光適應性現象產生後，若要使光反應基因的轉錄表現量增加，則必須增強光照強度，或是將環境轉變成黑暗後一段時間之後，再次照光才能達成。當 VVD 基因被剔除，光適應性的現象則會消失，顯示 VVD 基因對紅麵包黴光適應性基因調控的重要性(9)。

WC-1、WC-2 與 VVD 三個藍光受器的相互作用調控了紅麵包黴的光反應基因之表現，進而影響其整體生理作用，作用機制模擬圖如附圖三所示。

2. 保守性區域 PAS 與 LOV domain

PAS domain 是能感受光線、還原電壓、氧氣、小分子配體 (ligands)與細胞能量變化等環境因子的重要蛋白質區域，廣泛存在於真核與原核生物之中。已知的許多的感知單元多位於細胞膜上，但是 PAS domain 則位在細胞質中。過去研究者在果蠅的週期時鐘蛋白質 (period clock protein, PER)、脊椎動物之芳香基碳氫化合物受體的核轉位蛋白 (aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator, ARNT)與果蠅的神經發育相關蛋白 (single-minded protein, SIM)中率先發現此具有重複且相似的蛋白質區域，而後各取三個蛋白質的字首而將其命名為 PAS domain(54)。

LOV domain 是 PAS domain 的子群，在植物的 phototropin 中被定義為接收藍光刺激的區域，LOV domains 經過藍光刺激後會以半胱胺酸與吸光分子 flavin mononucleotide (FMN)形成共價鍵結，使 photoreceptors 轉變為活化態而產生訊息傳遞(14)。

3. 擔子菌門中藍光受器蛋白質之研究

由於擔子菌會形成子實體，故在真菌中屬於特別的一群。部分擔子菌在由無性世代菌絲體轉變為有性世代子實體的過程中，需要光的參與來促進變化，這樣的現象使得研究人員試圖了解有哪些因子能接收光的刺激進而影響擔子菌的形態變化與生理轉變。擔子菌門中已發表的藍光受器基因如附表二所示，與子實體形成較為相關的研究物種為灰蓋鬼傘與香菇。

3.1. 灰蓋鬼傘

(1) 擔子菌門的模式物種

灰蓋鬼傘之分類為真菌界(Fungi)，擔子菌門 (Basidiomycota)，傘菌綱 (Agaricomycetes)，傘菌目 (Agaricales)，鬼傘科 (Psathyrellaceae)，鬼傘屬 (*Coprinus*)。

灰蓋鬼傘是子實體形成之研究的模式物種，因為其除了具有容易培養、菇體形成快速與同步減數分裂的特點之外，其全基因體已完全解碼，分子技術實驗與細胞學實驗法也相當成熟，例如基因轉形、插入突變、基因圖譜繪製、以 contour-clamped homogeneous electric field (CHEF) 電泳分離染色體與 chromosome-specific genomic libraries 的建構，還有減數分裂時期染色體之硝酸銀染色觀察與螢光染色體原位雜交技術(Fluorescence in situ hybridization, FISH) 等等(25)。

(2) 生活史與子實體形成過程

灰蓋鬼傘子實體的形成起始於約 0.2 mm 大小的菌絲結(hyphal knot)，接著會快速形成具有初期菌傘與菌柄結構的原基體(primordium)，在 12 小時光照與 12 小時黑暗交替的環境下便會轉變為成熟的子實體形態，其轉變包含了菌柄增長、菌傘形成與擔孢子的成熟散布；然而在持續的黑暗環境中，灰蓋鬼傘的原基體只會保持菌柄的增長，卻不會有菌傘與擔孢子的形成，此時的菌體被稱為”dark stipe”(26, 55)。灰蓋鬼傘子實體形態如附圖四所示。生活史如附圖五所示。

(3) 藍光受器: Dst1 與 Dst2

研究人員於西元 1982 年已得知主要刺激灰蓋鬼傘子實體形成的光波長為 445 nm，屬於藍光，也顯示灰蓋鬼傘中應存在接受藍光刺激的感光受器(17)。直至 2005 年才由 Kamada 等人發現 *dst1*(accession no. AB195817)此藍光受器基因，*dst1* 基因的突變株在光刺激後子實體發育仍然不完全，呈現”dark stipe”的形態，顯示 *dst1* 基因在光誘發形態變化中扮演一關鍵角色。加上轉譯蛋白質 Dst1 上具有 PAS domain 和 LOV domain，並與紅麵包黴 WC-1 具同源性，表示 Dst1 應為藍光受器(55)。

隨後於 2009 年，Kamada 等人發現了灰蓋鬼傘中第二個可能的藍光受器基因 *dst2* (accession no. AB449111)，*dst2* 基因突變株的形態與 *dst1* 基因突變株相同，皆為”dark stipe”，但 Dst2 並未具有 PAS domain，而是具有裂開之 FAD-binding-4 domain 和 berberin-like (BBE) domain，但是因為 FAD 是能與藍光受器 chromophore 結合之吸光物質，所以 Dst2 依然可能與藍光訊號傳遞相關。National Center for Biotechnology Information (NCBI)網站上有 18 個已發表蛋白質的序列與 Dst2 相近，其中屬於擔子菌門的有三個，物種分別為 *Laccaria bicolor* (accession No. XP-001889819)、*Postia placenta* (accession No. EED82635)與 *U. maydis* (accession No. UM04464.1)。目前於子囊菌門與接合菌門之中皆未發現此類具 FAD-binding-4 domain 的蛋白質，故研究人員推測此類蛋白質可能只存在於擔子菌門中(31)。

3.2. 香菇的藍光受器 *LephrA* 與 *LephrB*

香菇的出菇過程需要光線的刺激來誘發，因而引起了研究人員對其感光機制的興趣，研究人員 Sano 等人於 2007 年找到了香菇中第一個 WC-1 同源之光受器基因 *LephrA*，能轉譯出 924 個胺基酸，序列包含 serine-rich region、一個 LOV domain 與兩個 PAS domain，和灰蓋鬼傘的 *Dst1* (1,175 aa)、紅麵包黴的 WC-1 (1,167 aa)、隱球菌的 WC-1(1,141 aa)同屬具有 LOV domain 的藍光受器，上述藍光受器的保守性區域比對示意圖如附圖六所示。研究人員以半定量反轉錄聚合酶連鎖反應分析香菇菌絲體與子實體發育之各時期 *LephrA* 的表現量，發現其在各時期皆有表現，但在光照刺激後之子實體時期的表現量明顯較未照光菌絲體高，表示 *LephrA* 很可能是光誘發表現的基因(48)。

2009 年同樣由 Sano 等人發現了香菇第二個的藍光受器基因 *LephrB*，能轉譯出 313 胺基酸，具有一個 PAS domain 與鋅指結構，屬於 WC-2 同源蛋白質，其與其它 WC-2 同源蛋白質的保守性區域比對示意圖如附圖七所示。研究人員以 *Escherichia coli* 表現生產之 LePHRB 與 LePHRA，除了能以 PAS domain 相互結合外，LePHRB 還能專一性與香菇酪胺酸酶(tyrosinase)基因的啟動子結合，而且研究顯示 *LephrB in vivo* 的轉錄表現是受光所誘發，基於上述研究結果，研究人員推測光誘發表現之 LePHRB 可能與酪胺酸酶的啟動表現有關，進而可能影響菇體表面黑色素(melanin)的生成(47)。黑色素生成機制如附圖八所示。

四、研究動機與目的

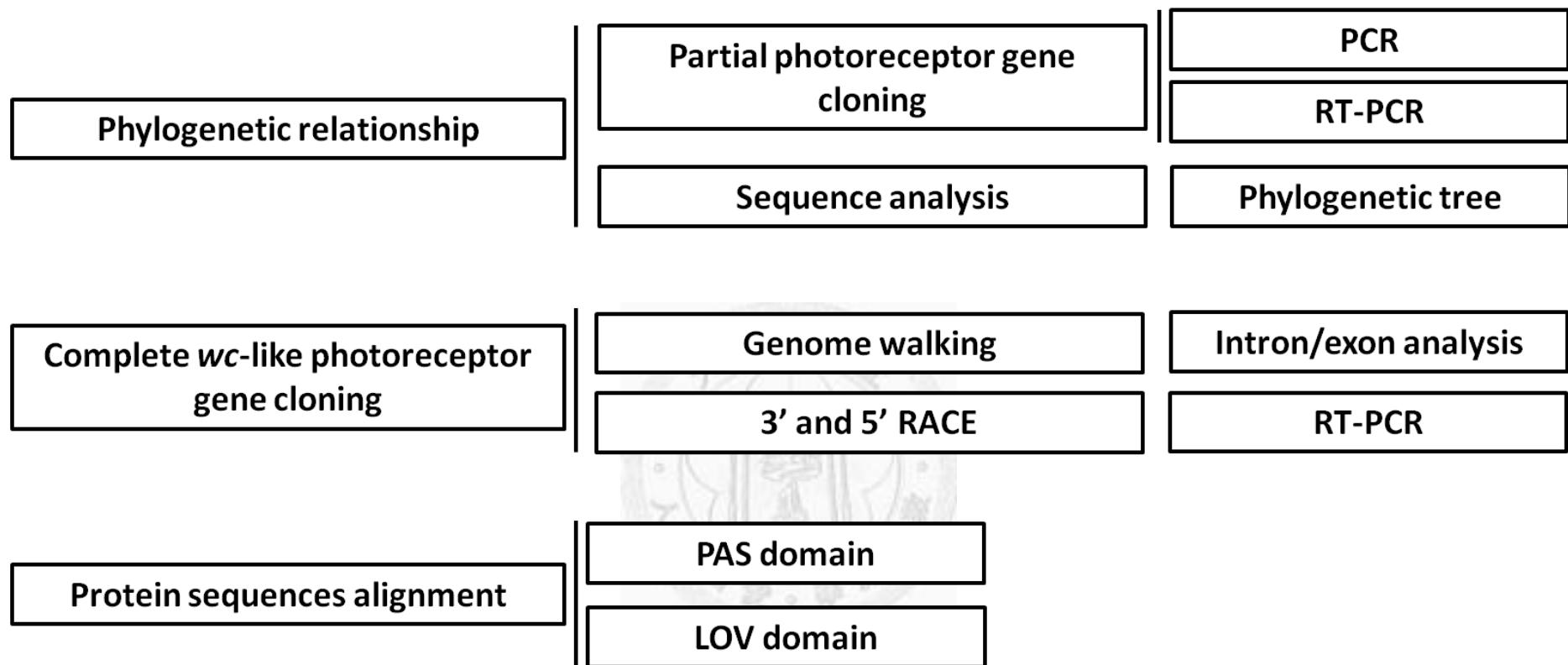
菇類是營養、美味與養生等多種益處兼具的食物，人類使用的歷史也十分悠久，仰賴現代科技的進步，陸續發現菇類許多具生理活性的成分與藥用功效，而透過栽培技術不斷的更新與改進，也使得我們能便宜且方便的購得食藥用菇類，增進飲食品質。

菇類人工栽培時須控制的因子包含培養基質、酸鹼值、溫度、濕度、通氣量與光線等，其中光線在菇類由無性世代的菌絲體轉變為有性世代子實體的過程中扮演刺激轉變的重要角色，由其是藍光的影響。過去的研究指出 WC 類的藍光受器能調控許多真菌的形態變化與生理作用，而擔子菌菇類中的相關研究雖少，卻顯示 WC 類藍光受器與其子實體誘發形成的相關性。

由於菇類的高經濟與營養價值，各國生技產業都積極的開發與改良菇類的人工栽培技術，若能藉由 WC 類藍光受器的研究而使我們更加了解光對菇類子實體的誘發調控過程，日後對於栽培技術的改良或有助益。

本研究選擇了常見的五種食用菇類香菇、金針菇、鮑魚菇、美白菇與雞腿菇作為材料，選殖其 WC 類藍光受器基因，並分析其序列的特性。本研究的架構如圖一所示；欲達成的目標為：

1. 已發表香菇藍光受器基因 *LephrA* 與 *LephrB* 的選殖與表現
2. 金針菇、鮑魚菇、美白菇與雞腿菇藍光受器基因的選殖與序列分析



圖一、本研究架構

Figure 1. Schematic framework of this study

第二章 材料與方法

一、實驗材料

1. 菌株及培養條件

使用菌株為本實驗室保存的分離株，包含香菇、鮑魚菇、金針菇、美白菇、灰蓋鬼傘與雞腿菇。各種菇類使用之固態平板培養基與液態培養基配方如下所示。

1.1. PDB 液態培養基與固體平板培養基

2.4% potato dextrose broth (PDB) (Becton Drive, Franklin Lakes, NJ USA)，為鮑魚菇液態培養時使用；香菇、鮑魚菇、灰蓋鬼傘與雞腿菇使用的平板培養基則是再外加 1.5% agar。

1.2. CYM 培養基

0.2% yeast extract、0.2% peptone、1% maltose、2% glucose、1x salt solution (30x salt solution stock: 1.5 g MgSO_4 、1.38 g KH_2PO_4 ，total 100 mL)，雞腿菇菌絲的液態培養、金針菇的液態與固態(再加上 1.5% agar)培養時所使用。

1.3. MYGpB 培養基

1% malt extract、1% yeast extract、0.5% glucose、0.3% peptone，美白菇液態與固態(加上 1.5% agar)培養使用。

1.4. 灰蓋鬼傘使用的液態培養基(44)

0.4% glucose、1% malt extract、0.4% yeast extract。

1.5. 香菇使用之液態培養基:

2% sucrose、0.5% yeast extract、0.5% malt extract、0.5% peptone、1× salt solution。

以上菌株皆靜置培養於 23°C 培養箱中。

2. 基因保存與表現系統

使用 *E. coli* DH5 α 為保存選殖之核酸序列用菌株, *E. coli* BL21 (DE3) 為生產蛋白質用的菌株, 37°C 下靜置培養於含 1.5% Agar 的 Luria-Bertani (LB, Acumedia Manufacturers, Inc. Lansing, Michigan, US) 固態平板培養基, 或是以 250 rpm 震盪培養於 LB 液態培養基中。長期保存則以含 25% 甘油之 LB 培養液冷凍保存於 -80°C 冰箱中。

3. 使用質體

3.1. yT&A vector (Yeastern, Taiwan)

使用 yT&A vector 為基因轉殖(TA cloning)之載體, 將選殖之核酸序列保存並定序確認之用, 其圖譜上具有抗 Ampicillin 之篩選標記(selection marker)。

3.2. pET 21a(+) vector

pET 21a(+) 為基因表達用載體, 將目標蛋白質基因建構與 pET 21a(+) vector 中, 宿主 *E. coli* 上的 *lac* operon 被乳糖類似物 Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) 啟動後產生之 T7 polymerase 能結合上 pET 21a(+) vector 之 T7lac promoter, 進而促進下游目標基因的轉錄與轉譯, 生產出目標蛋白質。其圖譜上具有抗 Ampicillin 與 kanamycin 之篩選標記。

4. 實驗引子

本研究中使用的引子如所示，分別由源資國際生物股份有限公司、基龍米克斯生物科技股份有限公司與禾鑫生技開發社合成。

二、實驗方法

1. 菇類藍光受器基因鈎取

1.1. 菌絲體培養

由斜面培養基保存的各菌種中切取適當大小之菌絲塊接種於固態平板培養基中，靜置培養 1~2 週以待菌絲約佈滿約 5 成面積的培養基後，於菌絲生長之邊緣處挖取菌絲塊接種至含 150 mL 液態培養基的 500 mL 錐形瓶中，靜置培養 4~5 週，收取菌絲，壓乾水分，於-80°C 冰箱中冰凍 2 天，接著使用冷凍抽乾機將菌絲所含水分抽乾，最後以液態氮研磨菌絲至細粉狀，取至 1.5 mL 微量離心管中，於-80°C 冰箱中保存備用。

表一 本研究使用之引子

Table 1. The primers used in this study.

Primer	Sequence(5'→3')	Remark
LephrA_F	GCACCCGATTTTCATCCACG	The specific primers of PAS domain in <i>LephrA</i>
LephrA_R	TCTCCCCTCAACATGATTGC	
phrB_F	ATCTTTGTATTGTCCTCTACGC	The specific primers of PAS domain in <i>LephrB</i>
phrB_R	GCATTTGAGACGAACATAAGC	
dst1.1_F	TTTGTGGTGGTTGATACCCGCC	The specific primers of PAS domain1 in <i>dst1</i>
dst1.1_R	CATATCAACCTGGAATCCAACATGG	
dst1.2_F	CCGGATTTTATTCACGTTGTC	The specific primers of PAS domain 2 in <i>dst1</i>
dst1.2_R	CCGTCCAGAAAGGATGATCG	
dp_F	GGNMGNAAYTGYMGNTTYTNCA	The degenerate primers for PAS domain and the conserved region of WC-1 homologs
dp_R	TCNCKNGTRAANACNNGNACRTCRTCNGGRTG	
dp_1_F	AAYYTNGTNACNGYNATHCC	
dp_2_F	GTNGARCCNNGNAARGGNMGNA	
dp_1_R	YTGTYGNARYTCRTAYTGCC	
dp_2_R	NARDATDATNGCYTTNCKNCCYTTNCC	
LephrA-full_F	ATGTTGGCACCAGGAGGCGGA	The specific primers for the full sequence of <i>LephrA</i>
LephrA-full+stop_R	TTAGGTACCATTCCCGTTGCGGTCA	

續表一、本研究使用之引子

Table 1. The primers used in this study.

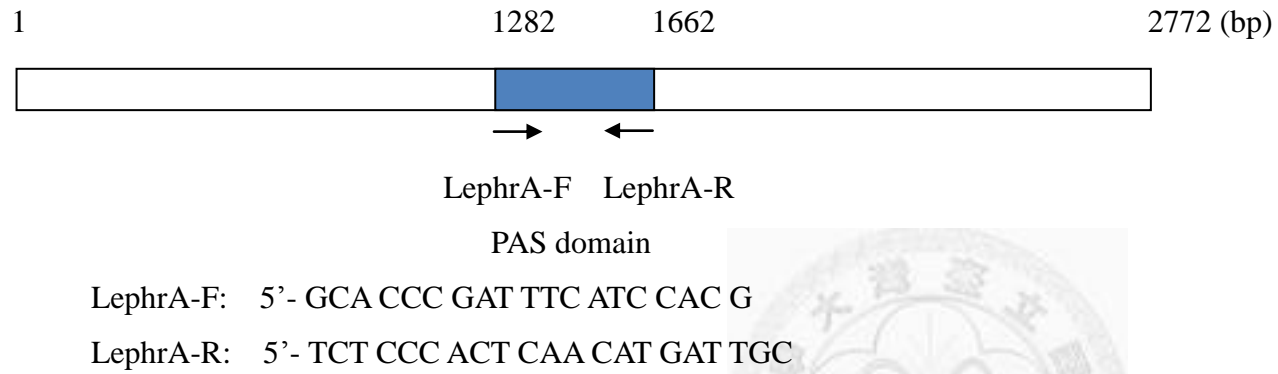
Primer	Sequence(5'→3')	Remark
LephrB-full_F	ATGTCGTCGTCTCTTCCGTCTCAA	The specific primers for the full sequence of <i>LephrB</i>
LephrB-full+stop_R	TCAGTTTGCTTCAACCAAACCGCCA	
phrA-PAS_F	TAAAAACTGCCGGTTCCTCCAA	
phrA-PAS_R	AAGTTCGCGCGTGAGAGGTT	
phrA_F	AGGAGGCGGAGCTGAAGTATTA	
phrA_R	TTGCGGTCAGTGGTATTCCA	
phrB-His-F-BamHI	CGGGATCCCGCT ₁ ATGTCGTCGTCTCTTCCGTCTCAAAGGC	
phrB-His-R-HindIII	CCCAAGCTTGGG ₃₁₃ GTTTGCTTCAACCAAACCGCCAGC	
M13_F	GTTTTCCCAGTCACGAC	
M13_R	CAGTATCGACAAAGGACACACT	
FV-cDNA-dp21-420 bp-1stGW-check-F	AAGGAAGTCCAAGCGAGTTT	
FV-cDNA-dp21-420 bp-1stGW-check-R	ATGATCAATTCAGCTTCCGC	

1.2. 引子設計與聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR)

PCR 是用以快速擴增特定 DNA 片段的方法。本研究之引子設計分為專一性引子與退化性引子(degenerate primer)兩部分，專一性引子分別能擴增出香菇與灰蓋鬼傘於 NCBI 網站上發表之藍光受器基因全長與其保守性區域 PAS domain，分別為 LephrA-F/R(圖二)、LephrB-F/R(圖三)、dst1.1-F/R 與 dst1.2-F/R(圖四)將已發表之藍光受器蛋白質 Le.PHRA、Cc.Dst1、Pp.WC-1、Cn.WC-1 與 Nc.WC-1 (附表二)以軟體 Bioedit 相互比對後，選取序列保守性較高的區域設計退化性引子 dp-1-F、dp-2-F、dp-1-R 與 dp-2-R (圖五)。

將純化之目標物種基因體 DNA 稀釋 10 倍後，取 35 μ L DNA template，加入 10 μ L 10 \times PCR buffer、3 μ L 10 mM dNTP、2 μ L 10 μ M 正向與反向引子、0.25 μ L GenTaq DNA polymerase 與 0.25 μ L pfu DNA polymerase (5U/ μ L；Hopegen Biotechnology Development Enterprise, Taipei)，最後加入無菌水使總體積為 100 μ L，PCR 反應條件如表二所示，其中各物種對應不同引子時所使用的 PCR 黏合溫度如表三所示。

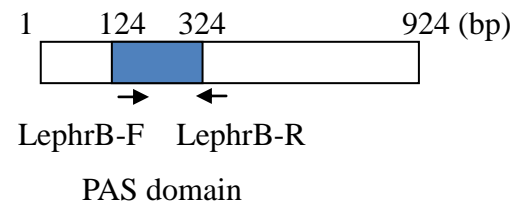
LephrA



圖二 引子 LephA-F/R 之序列與香菇藍光受器基因 *LephrA* 的對應位置。

Figure 2. The sequences of primers LephA-F/R and the relative positions in *LephrA*.

LephrB



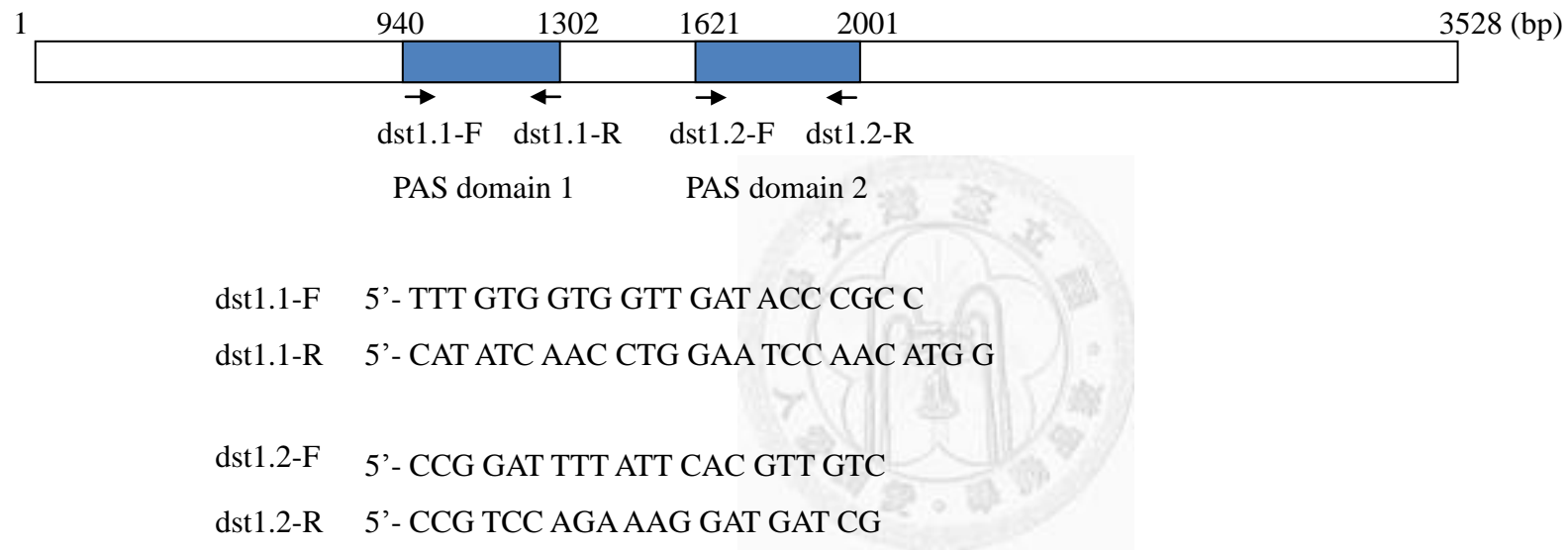
LephB-F: 5'- ATC TTT GTA TTG TCC TCT ACG C

LephB-R: 5'- GCA TTT GAG ACG AAC ATA AGC

圖三 引子 LephB-F/R 之序列與香菇藍光受器基因 *LephrA* 的對應位置。

Figure 3. The sequences of primers LephB-F/R and the relative positions in *LephrB*.

dst1



圖四 引子 dst1.1-F/R 與 dst1.2-F/R 之序列與灰蓋鬼傘藍光受器基因 *dst1* 的對應位置。

Figure 4. The sequences of primers dst1.1-F/R and dst1.2-F/R, and the relative positions in *dst1*.

Le. PHRA	248	KHCQTSLIINYKSGLAFINLVTVIPIKGGDISSPHEDDKVIYHVGFQVLTLEQP	301
Cc. Dst1	385	KHCQLVLTNYKDGTFETNIVTVIPIPGGLTGAAHEENEVVFHVGFQVMTQQP	438
Pp. WC-1	273	KHCQTSMINYKSGAAFINLVTVIPIV-----PDSHDSDVAYHVGFQVLAQQP	321
Cn. WC-1	638	KHCQTSLINYFRNGEPEFINLVTVVPIPI-----WDGPDIVYHVGFQILVEQP	684
Nc. WC-1	463	QHIQQLINYSKGGKPEINLIMIP-----WDTEEIRYFIFGFQILVECP	509

dp-1-F

Le. PHRA	512	KPRAVNLLFARTKSDQYVWVECRGRLHVEFGKGRKRESSWQYE	555
Cc. Dst1	489	QPRTVDLLFARTKNGCYVWVESRGRLHVEFGKGRKAILLSGRA	532
Pp. WC-1	625	GPRRVDLLFMPNKAGATVWVECRGRLHVEFGKGRKAILLSARA	668
Cn. WC-1	821	QPKPVHFTFIRTKNFGYVWVESMGRLVVEAGKGRKAVILSGRV	864
Nc. WC-1	685	QHTFVNIVEFIRRKNSGYTWFEHGTLENFQKGRKCIILVGRK	685

dp-2-F

Le. PHRA	739	NVFKILEISLSSWQYELQCMRYMNERL	766
Cc. Dst1	878	NMFEELVSLSSWQYELQQLKFANQRL	905
Cn. WC-1	1067	NIFEELVSLSSWQYELHCKMKTNRRL	1094
Nc. WC-1	880	NIFDELKTTCTSWQYELRQMEKVNRM	907

dp-1-R

Le. PHRA	512	KPRAVNLLFARTKSDQYVWVECRGRLHVEFGKGRKRESSWQYE	555
Cc. Dst1	489	QPRTVDLLFARTKNGCYVWVESRGRLHVEFGKGRKAILLSGRA	532
Pp. WC-1	625	GPRRVDLLFMPNKAGATVWVECRGRLHVEFGKGRKAILLSARA	668
Cn. WC-1	821	QPKPVHFTFIRTKNFGYVWVESMGRLVVEAGKGRKAVILSGRV	864
Nc. WC-1	685	QHTFVNIVEFIRRKNSGYTWFEHGTLENFQKGRKCIILVGRK	685

dp-2-R

dp_1_F AAY YTN GTN CAN GYN ATH CC

dp_2_F GTN GAR CCN GGN AAR GGN MGN AA

dp_1_R YTG YTG NAR YTC RTA YTG CC

dp_2_R NAR DAT DAT NGC YTT NCK NCC YTT NCC

圖五 藍光受器序列比對與退化性引子 dp-1-F、dp-1-R、dp-2-F、dp-2-R 的序列與對應位置。

Figure 5. Comparison of the amino acid sequences of the blue-light receptors, and the sequences and position of the degenerate primers dp-1-F, dp-1-R, dp-2-F and dp-2-R.

表二 本實驗中菇類基因體 DNA 與第一股 cDNA 為模板時的聚合酶連鎖反應條件

Table 2. The reaction condition of PCR when the templates are genomic DNA and first strand cDNA of mushrooms.

Primers	Cycle number	Denature	Annealing	Extension
Specific primers	1	94°C 10 min		
	30	94°C 45 sec	1 min 30 sec	72°C 2 min
	1			72°C 10 min
Degenerate primers	1	94°C 10 min		
	40	94°C 45 sec	1 min 30 sec	72°C 10 min
	1			72°C 2 min



表三 各物種基因組 DNA PCR 時使用之黏合溫度

Table 3. The annealing temperatures of the different DNA sources

Sources of the template	Primers	Annealing
<i>F. velutipes</i>	LephrA-F/R	50°C
	LephrB-F/R	
	dst1.1-F/R	54°C
	dst1.2-F/R	50°C
	dp-F/dp-R	50°C
<i>P. ostreatus</i>	LephrA-F/R	50°C
	LephrB-F/R	
	dst1.1-F/R	56°C
	dst1.2-F/R	54°C
	dp-F/dp-R	52°C
<i>H. marmoteus</i> variant	LephrA-F/R	
	LephrB-F/R	50°C
	dst1.1-F/R	54°C
	dst1.2-F/R	
	dp-F/dp-R	50°C
<i>C. comatus</i>	LephrA-F/R	50°C
	LephrB-F/R	
	dst1.1-F/R	
	dst1.2-F/R	
	dp-F/dp-R	50°C
<i>L. edodes</i>	LephrA-F/R	58°C
	LephrB-F/R	58°C
	dp-F/dp-R	55°C
<i>C. cinereus</i>	dst1.1-F/R	56°C
	dst1.2-F/R	58°C

註：斜線代表未有擴增產物。

1.3. 引子確認

使用引子 LephA-F/R 與 LephB-F/R 以香菇基因體 DNA 為模板，引子 dst1.1-F/R 與 dst1.2-F/R 以灰蓋鬼傘基因體 DNA 為模板分別進行 PCR 反應，反應條件與黏合溫度如表三所示。所得 DNA 片段選殖到 yT&A 質體後定序分析。

1.4. Total RNA 萃取

(1) Diethylpyrocarbonate (DEPC) treated ddH₂O 製備

每升蒸餾水加入 1 mL DEPC (Invitrogen, Life technologies, Carlsbad, CA, USA)，於攪拌器上隔夜攪拌後，使用滅菌釜以 121°C 滅菌 15 分鐘以去除 DEPC，室溫靜置保存。實驗過程所有的水皆使用 DEPC treated ddH₂O 以避免 RNase 作用。DEPC 為有毒藥品，配置時須全程於抽氣櫃中進行，並配戴口罩以免吸入揮發氣體。

(2) 使用器具前處理

研鉢、血清瓶與秤藥匙以鋁箔紙包裹後置於 180°C 烘箱中隔夜處理後，於室溫中使其緩緩降溫備用。另配置 3% H₂O₂ 用以浸泡 O-ring、瓶蓋、電泳槽、量筒與鑄膠器等塑膠用品。

(3) 500 mL 10x MOPS 電泳緩衝液配置

取 20.9 g 的 3- (N-morpholino) propanesulfonic acid (MOPS) 加入 350 mL DEPC 水中，攪拌均勻並將 pH 調至 7，再加入 10 mL 1 M NaOAc 與 10 mL 0.5 M EDTA (pH8)，將體積補至 500 mL 後以孔徑為 0.22 μm 之濾杯無菌抽氣過濾後室溫避光保存。正常狀態下呈透明，若顏色轉為深褐色則不可使用。

(4) 1.5% Formaldehyde agarose gel 配製(新鮮配製)

秤取 1.5 g agar 溶於 72 mL DEPC 水中，加熱至均勻。等冷卻至 55~60°C 時加入 10 mL 10x MOPS 電泳緩衝液及 18 mL deionized formaldehyde (具揮發毒性，需於抽氣櫃中操作)後即可使用。

(5) Total RNA 萃取流程

參考 Invitrogen 公司之 TRIzol[®] Reagent 實驗方法，首先，秤取約 100 mg 菌粉於研鉢中，加入 1~2 mL TRIzol reagent (Invitrogen, Life technologies, Carlsbad, CA, USA)後研磨均勻，再加入適量液態氮再次研磨破菌，之後置於室溫約 5 分鐘。將研磨液取至 eppendorf 中，每 1 mL 研磨液加入 200 μ L Chloroform 後用力搖晃 15 秒使液體成粉紅色，靜置 3 分鐘，以 12,000 g，4°C 離心 15 分鐘。小心吸取上層液體至另一 eppendorf 中，加入 500 μ L isopropanol 後小心混勻，室溫靜置 10 分鐘，以 12,000 g，4°C 離心 15 分鐘。去除上清液留沉澱 pellet，以 1 mL 冰 75% 酒精懸浮清洗 pellet，以 7,500 g，4°C 離心 5 分鐘。去除上清液後自然風乾 pellet 約 20 分鐘，以 50 μ L 1X RNAGuard 回溶，65°C 處理 5 分鐘後置於冰上備用，或保存於 -20°C 冰箱。

1.5. 反轉錄-聚合酶連鎖反應(reverse transcriptase – PCR, RT-PCR)

RT-PCR 是先以反轉錄酶將 RNA 反轉錄形成互補 DNA (complementary DNA, cDNA)後，在擴增出特定 DNA 片段的方法。將萃取出全 RNA 進行 RNA 電泳，使用核酸測定儀測定 RNA 純度與濃度。

以 HiScript I Reverse Transcriptase (BIONOVAS Biotechnology Co., Ltd., Ann Arbor, Michigan 48108 USA)合成第一股(first strand) cDNA。於 0.5 mL 微量離心管中加入 4 μ L RT buffer、2 μ L 0.1 M DTT (dithiothreitol)、1 μ L RNase OUT、1 μ L HiScript I Reverse Transcriptase 後混合均勻置冰上備用，再取另一 0.5 mL 微量離心管中加入適量的目標菌種全 RNA (5~10 μ g)、1 μ L 50 μ M oligo (dT)、1

μL 10 mM dNTP 後加 DEPC 水至 12 μL，最後將兩管反應液混合，先以 65°C 處理 5 分鐘，之後 42°C 反應 60 分鐘，取出微量離心管於冰上加入 1 μL RNase，37°C 反應 20 分鐘，即得第一股 cDNA 產物，置於冰上備用，或保存於 -20°C 冰箱。

使用 GenTag 與 pfu polymerase 進行 PCR 反應，取 34 μL 滅菌水、5 μL 10 × PCR buffer、1 μL 10 mM dNTP、各 2 μL 的正向與反向引子、各 0.5 μL GenTag 與 pfu polymerase，最後加入 5 μL 第一股 cDNA 產物進行加熱循環。

1.6. *LephrA* 與 *LephrB* 的選殖

為了擴增出香菇的藍光受器基因 *LephrA* 與 *LephrB*，使用引子 *LephrA*-full-F、*phrA_F*、*phrA_PAS_R*、*LephrA*-full+stop codon-R 與 *LephrB*-full-F/*LephrB*-full+stop codon-R，以由香菇子實體萃取之全 RNA 反轉錄的第一股 cDNA 為模板進行 PCR。選殖 *LephrA* 的 PCR 加熱循環條件為起始變性溫度 94°C，5 分鐘；變性溫度 94°C，45 秒，變性溫度 55°C，45 秒，延展溫度 72°C，2 分 30 秒，循環 40 週期；最後延展溫度 72°C，10 分鐘。選殖 *LephrB* 的反應條件為起始變性溫度 94°C，5 分鐘；變性溫度 94°C，45 秒，變性溫度 55°C，45 秒，延展溫度 72°C，1 分 30 秒，循環 40 週期；最後延展溫度 72°C，10 分鐘。PCR 產物進行電泳，將目標 DNA 片段切膠純化，選殖入 yT&A 載體中定序。

1.7. 香菇基因組中 *LephrB* 的選殖

使用引子 *LephrB*-full-F/*LephrB*-full+stop codon-R，以香菇基因組為模板以表二條件進行 PCR，黏合溫度為 53°C，定序分析所得產物。

1.8. 金針菇中部分藍光受器基因的選殖

PCR 進行條件如表三所示，反應中各引子使用的黏合溫度為：*dp*-F/R 48 °C、*dp*-1-F/R 50°C、*dp*-1-F/*dp*-2-R 47°C、*dp*-2-F/*dp*-1-R 53°C。

1.9. 洋菜膠電泳與 DNA 回收

產物以 1% 洋菜膠進行電泳，電泳緩衝液為 0.5x TAE buffer (40mM Tris-acetate, 1mM EDTA, pH8.0)，在 140 伏特電壓下進行電泳約 20 分鐘。膠片經 ethidium bromide (EtBr) 染色 5~10 分鐘後，於蒸餾水中適當退染 10~15 分鐘，於 UV box 上觀察結果並照相，將目標大小 DNA 產物由膠片上切下，使用 Micro-Elute DNA Clean/Extraction Kit (Hopegen Biotechnology Development Enterprise, Taipei) 純化擴增片段。

1.10. 質體接合與轉形

將純化之 DNA 片段再次以洋菜膠電泳分析，確認產量與片段大小後，以莫耳數比 vector : insert = 3 : 1 之比例，以 T&A™ Cloning Kit (Yeastern Biotech Company, Taipei) 將 DNA 片段黏合入 yT&A vector 中，反應時間為 25°C，2 小時或 16°C，隔夜處理，之後使用熱衝擊法將質體送至 *E. coli* DH5 α 中，先於含 1 μ g Ampicillin/ mL LB 的 LB 固態平板培養基上塗上 4 μ L IPTG 與 40 μ L X-gal 以進行藍白篩選，而後再塗上適量轉形後菌液(100~200 μ L)，37°C 培養 15~16 小時。

1.11. 大腸桿菌轉形株挑選

以滅菌牙籤挑取生長於 Ampicillin 篩選培養基中之白色菌落，加入引子 M13F/R 與 PCR 反應試劑後進行 Colony PCR，反應條件如表五。反應完成後以洋菜膠電泳分析確認目標產物，選取轉殖成功之菌落培養並抽取質體以進行定序分析。

表四 本實驗中大腸桿菌 DH5 α 菌落聚合酶連鎖反應(colony PCR)反應條件

Table 4. The reaction condition of colony PCR.

Primers	Cycle number	Denature	Annealing	Extension
	1	94°C 5 min		
M13F/R	30	94°C 45 sec	55°C 45 sec	72°C 2 min
	1			72°C 10 min

2. 使用大腸桿菌生產 photoreceptor B-His x6

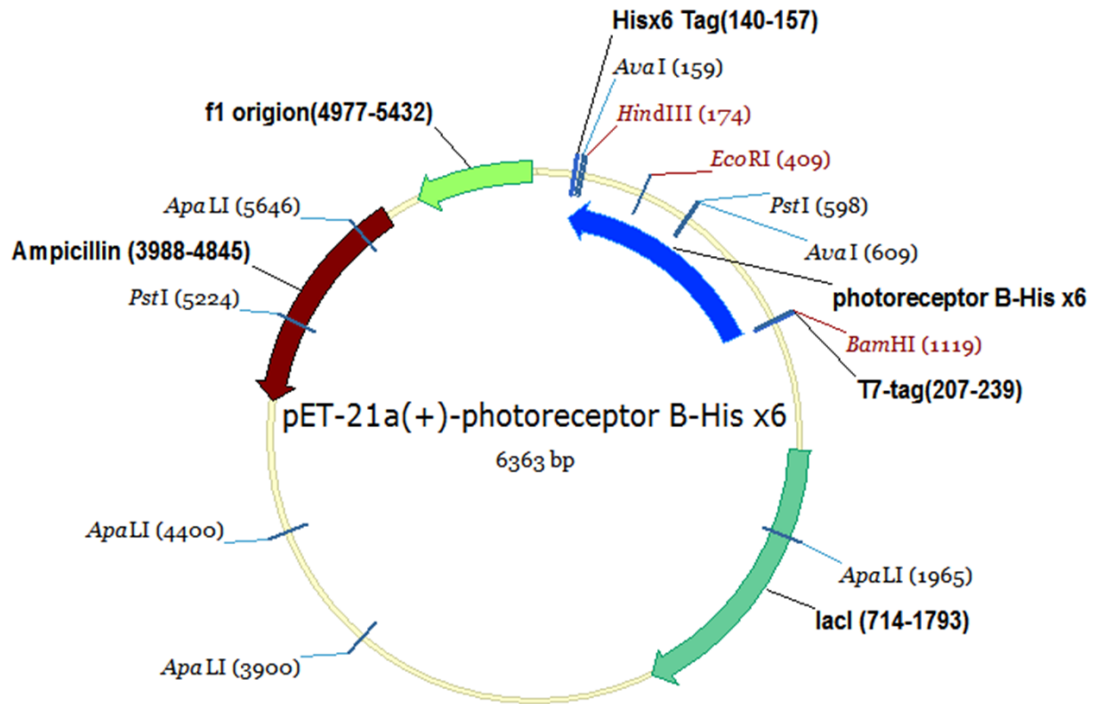
2.1. pET-21a(+)-photoreceptor B-His x6 的建構

將本研究建構在大腸桿菌 DH 5 α 的質體 yT&A-photoreceptor B 以引子 phrB-His-F-BamHI 與 phrB-His-R-HindIII 擴增出帶有 *Bam*HI 與 *Hind*III 限制酶 (New England Biolabs, 240 County Road Ipswich, MA 01938)切位序列的 *photoreceptor B* (*Bam*HI-*photoreceptor B*-*Hind*III)，將純化的 DNA 片段與表現載體 pET-21a(+)以 *Bam*HI 與 *Hind*III 限制酶以表五條件反應截切，之後依本章節 1.10 的方法進行質體接合與轉形，在大腸桿菌 DH 5 α 中建構 pET-21a(+)-photoreceptor B-His x6，確認序列無誤後再將 pET-21a(+)-photoreceptor B-His x6 轉形入表現用大腸桿菌 BL 21 (DE3)。pET-21a(+)-photoreceptor B-His x6 質體如圖六所示。

表五 限制酶反應之配方與反應條件

Table 5. The formula and reaction condition of the restriction enzyme digestion

Sample	10x Buffer	100x BSA	<i>Bam</i> HI	<i>Hind</i> III	H2O	Temp.	Time
vector : pET-21a(+) 3 μ L	NEB buffer 3 5 μ L	0.5 μ L	1 μ L	1 μ L	39.5 μ L	37°C	2 hours
insert : photoreceptor B 10 μ L					32 μ L.		



圖六 pET-21a(+)-photoreceptor B-His x6 質體

Figure 6. The construct of pET-21a(+)-photoreceptor B-His x6

2.2. 誘導 Photoreceptor B-His x6 的生產

將具載體 pET-21a(+)-photoreceptor B-His x6 的大腸桿菌 BL 21 (DE3) 單一菌落接種於 3 mL LB (含 1 μ g ampicillin /mL LB) 中，於 37°C 培養箱中震盪培養 12~14 小時做為種菌，取 1.5 mL 種菌菌液加入含 150 mL LB (1 μ g ampicillin /mL LB) 的 500 mL 凹底瓶，37°C 培養箱中震盪培養 2 小時，使吸光值(O.D.₆₀₀)達 0.5，再加入 150 μ L 1 M IPTG，於 30°C 培養箱中震盪培養 4 小時誘導目標蛋白質生產。菌液以 7000 g，4°C 離心 10 分鐘，去上清液，以 2 mL binding buffer (1 \times phosphate buffer，10 mM imidazole) 懸浮菌體後置於冰上，使用震盪儀以 15 秒間隔的頻率震盪破菌 30 分鐘，以 12,000 g，4°C 離心 10 分鐘後取上清蛋白質粗萃液，以 0.45 μ m 孔徑的濾膜過濾蛋白質粗萃液。

將體積最少 1 mL 的 ProBondTM Nickel-Chelating Resin 裝填於管柱中，以其 5 倍體積蒸餾水流洗，而後加入 0.5 倍體積 0.1 M NiSO₄ 將膠體 recharge，再以 5 倍體積蒸餾水流洗，最後以 10 倍體積 binding buffer 流洗，調整 pH 值至 7.4~8.0。

將過濾後的蛋白質粗萃液滴入管柱膠體中，以 10 倍體積 binding buffer 流洗，接著以 5 倍體積 50 mM imidazole 流洗，去除雜蛋白，再以 10 倍體積 200 mM imidazole 流洗出目標蛋白質，最後以 5 倍體積 500 mM imidazole 流洗出所有剩餘蛋白質，而以蛋白質電泳、西方雜合法與 BSA (Sigma, Germany) 蛋白質定量法去定性與定量分析各分劃的蛋白質。

2.3. 蛋白質電泳與西方墨點法

取各分劃蛋白質液 15 μ l 與 5 μ l 5x SDS 樣品緩衝液混合均勻，100°C 加熱 10 分鐘後，放置 -20°C 冰箱中冷卻 3 分鐘，離心備用。

配製 2 片 12% SDS-PAGE，架設於電泳槽中，於內外槽倒入 1x TGS buffer (0.1% SDS, 250 mM glycine, 25 mM Tris, pH 8.4) 後，以針筒吸取樣品緩衝液加入膠體的各槽中，先以 80 伏特電壓進行電泳，使其焦集 30 ~ 40 分鐘，待樣品到達分離膠體後再提高電壓至 140 伏特，約一小時後即可取出膠片，其一以 CBR 染劑 (0.1% coomassie brilliant blue R-250, 50% methanol, 9% acetic acid) 震盪浸泡 30 分鐘 (80 rpm)，再使用退染液退去背景，拍照並以玻璃紙封膠保存。

另一膠片浸泡於 TGSM buffer (1x TGS buffer, 10 % methanol) 中。將 PVDF (0.45 μ m) 浸泡於 100% 甲醇中，使用半乾式電泳轉漬槽 (Genmedika Biotechnology, 台北)，由下往上依序放置以轉印緩衝液浸濕的濾紙兩片、電泳膠片、PVDF 膜與轉印緩衝液浸濕的濾紙兩片，轉印條件為 150 伏特、10 瓦與 60 毫安培，轉印 40 分鐘。

轉印後的 PVDF 膜以 Gelatin-Net (0.25% Gelatin, 0.15 M NaCl, 50 mM Tris, 5 mM EDTA·2Na, 0.05% Tween-20, pH 8.0) 震盪浸泡 1 小時，再置換為 Gelatin-Net 稀釋 5000 倍之 6xHis 單株抗體 ((Becton Drive, Franklin Lakes, NJ USA)) 室溫震盪反應 1.5 小時，以 PBST (10 mM NaH₂PO₄, 130 mM NaCl, 0.05% Tween-20, pH 7.0) 震盪浸泡三次，每次十分鐘。加入以 Gelatin-Net 稀釋 5000 倍之 Goat anti-mouse IgG-AP conjugate 二次抗體 (PerkinElmer, Boston, MA, USA) 室溫震盪反應 1 小時，再以 PBST 震盪浸泡三次，每次十分鐘，倒去 PBST 後以 1x AP buffer 平衡 15 分鐘，最後加上基質 NBT/BCIP 避光靜置反應 15 ~ 20 分鐘，待色帶出現以蒸餾水漂洗終止反應，拍照並護貝封存。

2.4. 蛋白質 BCA 定量

配製 0.4, 0.3, 0.2, 0.15, 0.1, 0.05, 0 mg/ml 濃度之 BSA 製作標準曲線，將欲測樣品稀釋適當倍數(10 或 20 倍)後，各取 10 μ l 二重複加入 96 孔微量滴定盤，再加入 200 μ l 使用前均勻混合之 BCATM Protein Assay Kit (Pierce, Rockford, IL) BCA working reagent (reagent A : B = 50 : 1)，37°C 避光靜置反應半小時後，偵測 562 nm 的吸光值。將樣品偵測出的 O.D.₅₆₂ 代入 BSA 標準曲線計算蛋白質量，再乘回稀釋倍數即得目標純化蛋白質含量(Total soluble protein, TSP, 單位為 mg/ml)。

2.5. Photoreceptor B-His x6 功能測試: 蛋白殖液加入菌絲中並在光照與黑暗環境培養，觀察菌絲變化

配製 20 mL 各菌種培養液於 50 mL 錐形瓶，滅菌後各接種 3 個目標菌種菌絲塊於培養液中，每一菌種作為一個實驗組別，每組最少四瓶菌絲液，於 23°C 培養箱中培養約 7 天，每組中的兩瓶各加入 10 μ g 純化之 Photoreceptor B-His x6 蛋白質液作為實驗組，兩瓶加入同體積的溶劑 200 mM imidazole 緩衝液作為對照組，其中各一瓶實驗組與對照組的菌絲液於黑暗環境中處理 7 天，另兩瓶於 12 小時光照(TOA FL-10D-EX 10W-太陽神晝光色 6700K, 420 流明, 120 伏特, 0.15 安培)與 12 小時黑暗處理 7 天，拍照觀察菌絲變化。

第三章 實驗結果

一、菇類藍光受器基因選殖

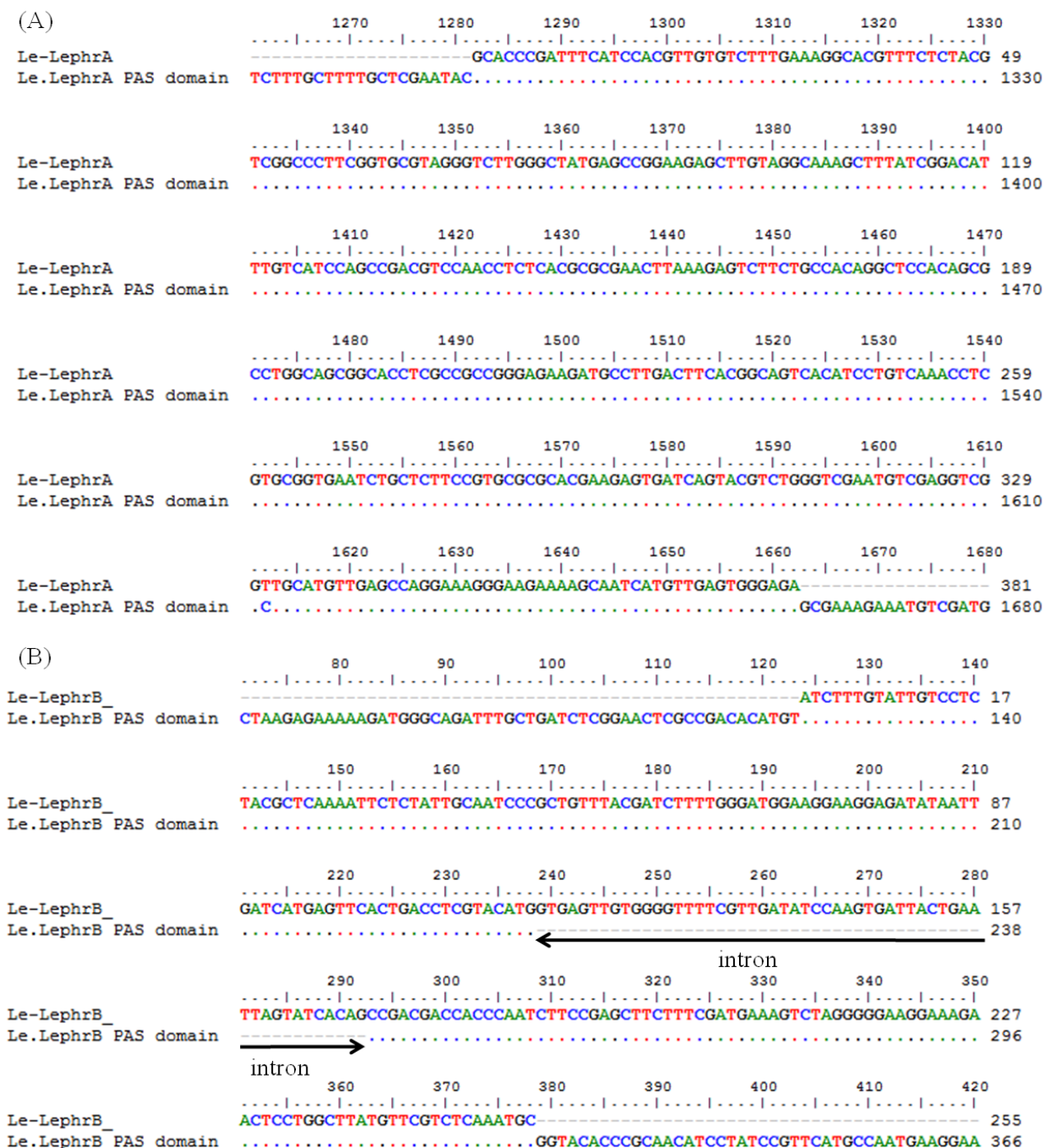
1. 嘗試由菇類基因體中以專一性引子擴增出藍光受器部分片段

參考 NCBI 網站中擔子菌香菇與灰蓋鬼傘的藍光受器 *LephrA*、*LephrB* 與 *dst1* 的基因序列，設計能擴增出其保守性區域 PAS domain 的專一性引子 *LephrA*-F/R、*LephrB*-F/R、*dst1.1*-F/R 與 *dst1.2*-F/R。為了確認引子的正確性，先以其原物種基因體 DNA 作為模板進行 PCR，將放大的 DNA 片段定序確認。之後以目標物種金針菇、鮑魚菇、美白菇與雞腿菇的基因體 DNA 做為模板進行 PCR 反應，以選殖其藍光受器保守性區域 PAS domain 的序列。

1.1. 引子確認

使用引子 *LephrA*-F/R 與 *LephrB*-F/R 以香菇基因體 DNA 為模版進行 PCR，引子 *LephrA*-F/R 放大的片段為 381 bp，分析後與已發表的香菇 *LephrA* (AB279630) 之 PAS domain 核酸序列相差 1 個核酸，如圖七(A)所示，可能是因為本實驗室使用的香菇菌株與選殖出 *LephrA* 的文章中使用的香菇並非同一品系，以致序列有些許差異，但轉譯之胺基酸完全相同；引子 *LephrB*-F/R 放大的片段為 255 bp，定序後與 *LephrB* 的 PAS domain 核酸序列比對結果如圖七(B)所示，顯示此區域具有 54 bp 的 intron。

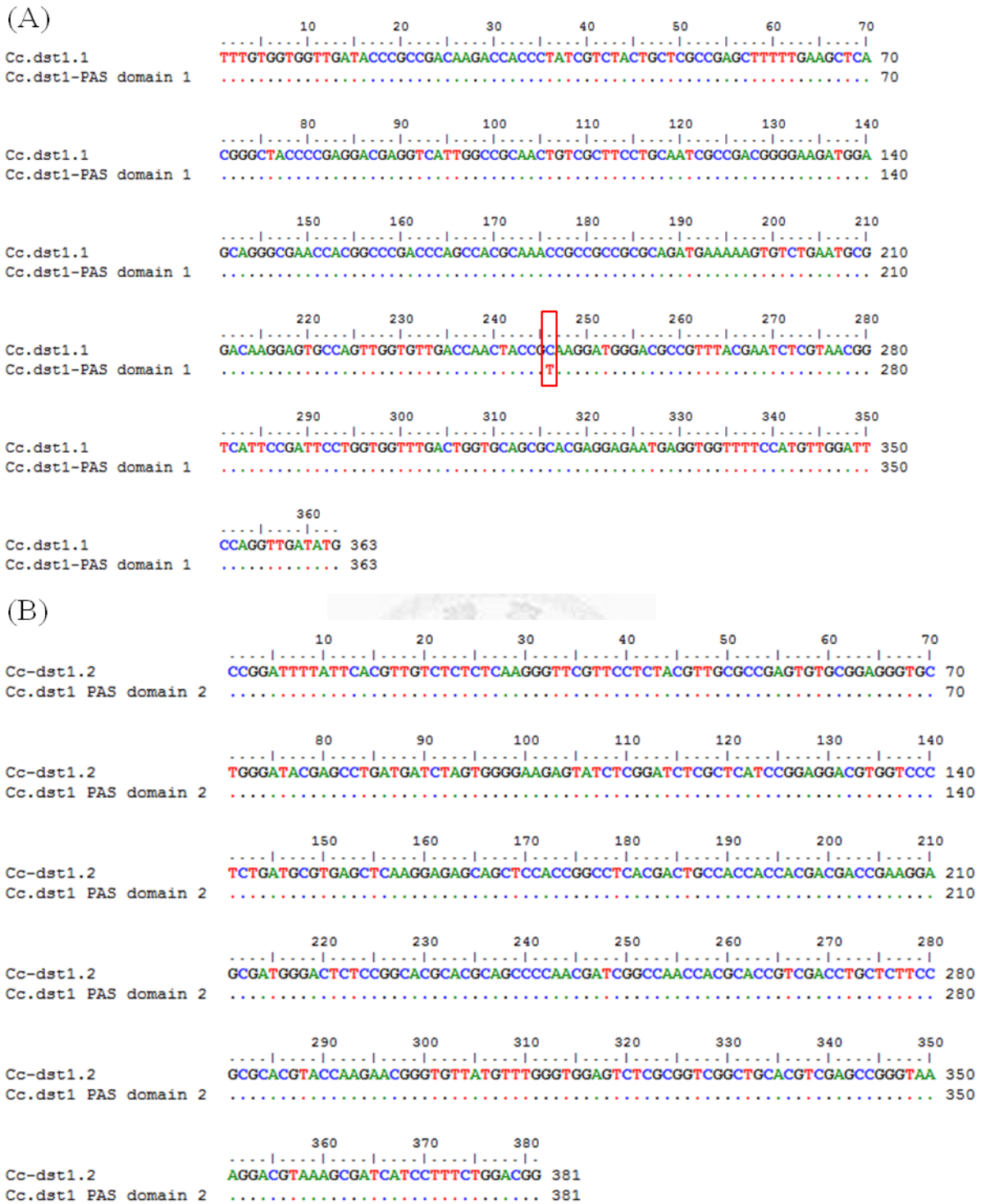
使用引子 *dst1.1*-F/R 與 *dst1.2*-F/R 以灰蓋鬼傘基因體 DNA 為模版進行 PCR，引子 *dst1.1*-F/R 放大出 363 bp 片段，與 *dst1* 靠近 5' 端之 PAS domain 1 相差 1 個核酸，如圖八(A)所示；引子 *dst1.2*-F/R 放大出 381 bp，與 *dst1* 靠近 3' 端之 PAS domain 核酸序列相同，如圖八(B)所示。



圖七 引子 Lephra-F/R 與 LephraB-F/R 確認結果

Figure 7. Confirmation of the primer Lephra-F/R (A) and LephraB-F/R (B).

Le-LephrA and Le-LephrB are represented the sequences which are amplified by using primers Lephra-F/R and LephraB-F/R. Le.LephrA and Le.LephrB PAS domain are represented the published nucleotide sequences of the PAS domains in *L. edodes*.

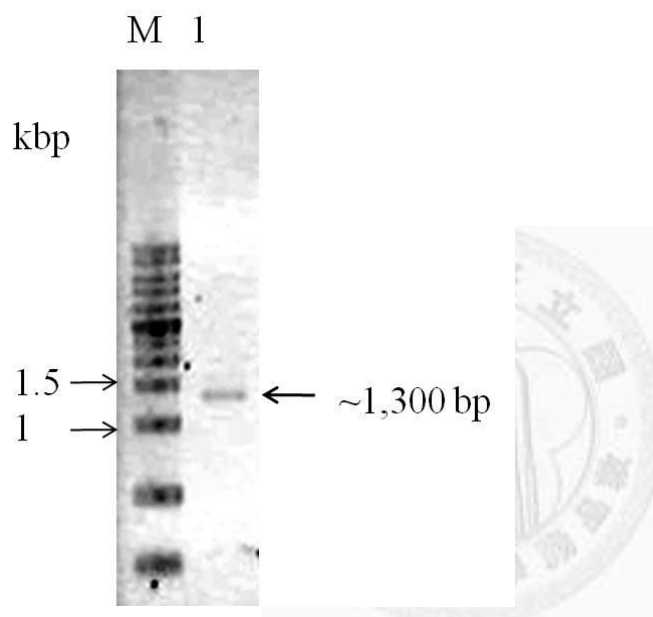


圖八 引子 dst1.1-F/R 與 dst1.2-F/R 確認結果

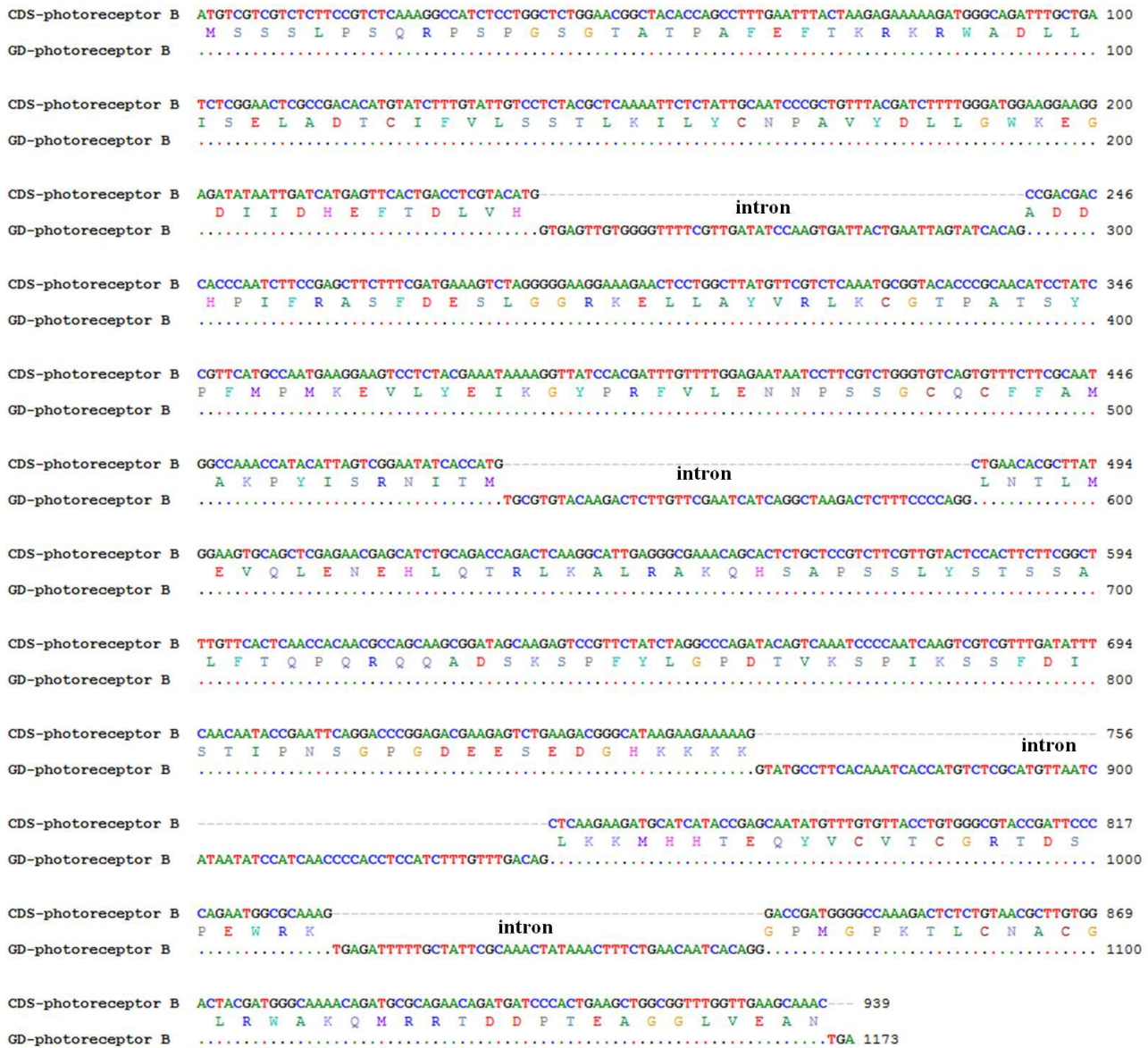
Figure 8. Confirmation of the primer dst1.1-F/R (A) and dst1.2-F/R (B). Cc-dst1.1 and Cc-dst1.2 are represented the sequences which are amplified by using primers dst1.1-F/R and dst1.2-F/R. Cc.dst1 PAS domain 1 and 2 are represented the published nucleotide sequences of the PAS domains in *C. cinerea*.

1.2.本研究選殖之 *LephrB*: *photoreceptor B* 在基因組中 exon 與 intron 的分布

使用引子 *LephrB*-full-F/R, 以香菇基因組為模板的 PCR 結果如圖九所示。PCR 所得序列以 *GD-photoreceptor B* 稱之, 表示由基因組 DNA 中 (genomic DNA, GD) 選殖, *CDS-photoreceptor B* 表示由 cDNA 中選殖的片段, CDS 表式轉譯區(coding region, CDS), 序列比對如圖十所示, 圖十一為卡通圖表示 exon 與 intron 的分布。



圖九 使用引子 *LephrB*-full-F/*LephrB*-full-R, 以香菇基因組為模板的 PCR 結果
Figure 9. The PCR result for genomic DNA of *L. edodes* using primers *LephrB*-full-F/R.

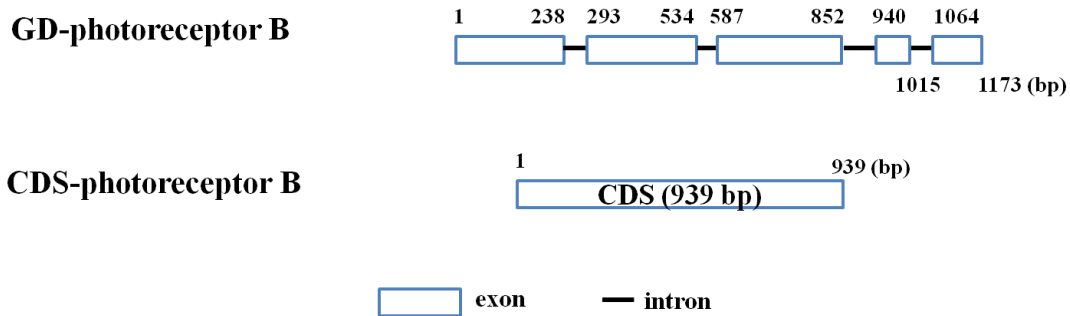


圖十 *photoreceptor B* 在基因組中 exon 與 intron 的分布

CDS-photoreceptor B 表示本研究選殖之 *photoreceptor B* 轉譯區，GD-photoreceptor

B 表示本研究中 *photoreceptor B* 在基因組中 exon 與 intron 的分布狀況

Figure 10. The distribution of exon and intron of *photoreceptor B* in the genome



圖十一 本研究選殖 *photoreceptor B* 之 exon 與 intron 分布的示意圖

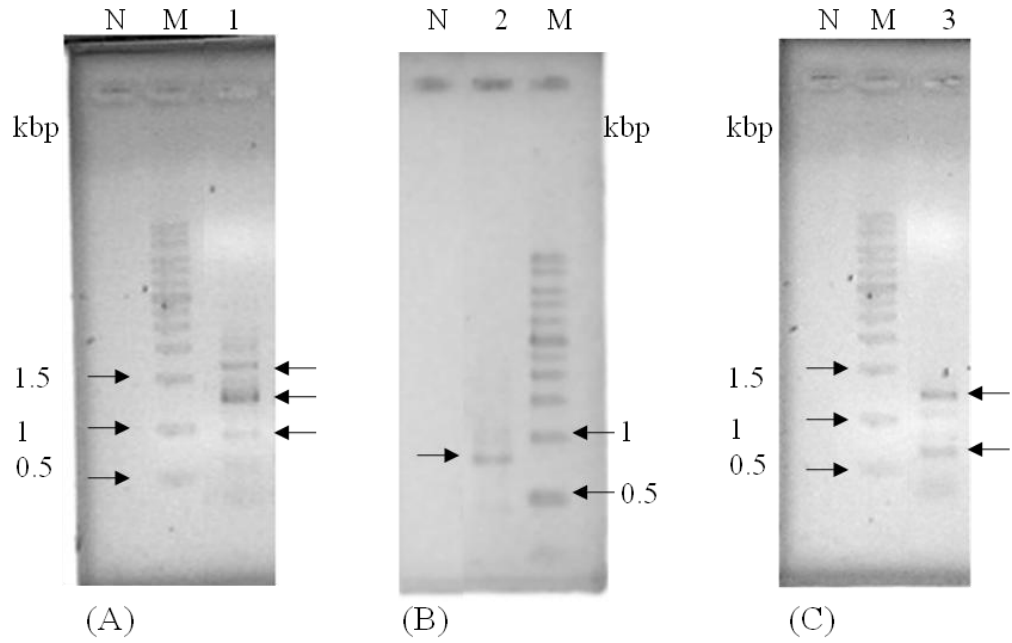
Figure 11. Schematic representation of the distribution of exon and intron of *photoreceptor B* in the genome

1.3. 金針菇的選殖結果

先以 gradient PCR 找出四組引子以金針菇 genomic DNA 為模板時，各組引子的最適 PCR 黏合溫度後(表三)，其中三組引子有放大產物，引子 LephA-F/R 在 PCR 後放大出三個主要 DNA 片段，大小分別在約 1.2 kbp、800 bp 與 400 bp 左右，如圖十二(A)所示，將這些片段純化後定序分析，得知 DNA 片段確實大小分別為 1,255 bp、837 bp 與 402 bp，這些片段以軟體 BioEdit 轉譯成胺基酸後於 NCBI 資料庫中進行 Blast，並未比對到目標序列。

引子 LephB-F/R 在黏合溫度降至 48°C 後，仍無明顯放大產物；引子 dst1.1-F/R 在黏合溫度為 54°C 時有明顯產物，如圖十二(B)所示，定序得知大小為 811 bp，以相同方法分析其轉譯胺基酸後，並無比對成功。

引子 dst1.2-F/R 則在在黏合溫度 50°C 能擴增出明顯 DNA 片段如圖十二(C)所示，定序得 718 bp 與 308 bp，但分析比對後依然未成功。



圖十二 (A) 以 LephA-F/R 為引子對金針菇 genomic DNA 進行 PCR 之結果(B) 以 dst1.1-F/R 為引子對金針菇 genomic DNA 進行 PCR 之結果(C) 以 dst1.2-F/R 為引子對金針菇 genomic DNA 進行 PCR 之結果

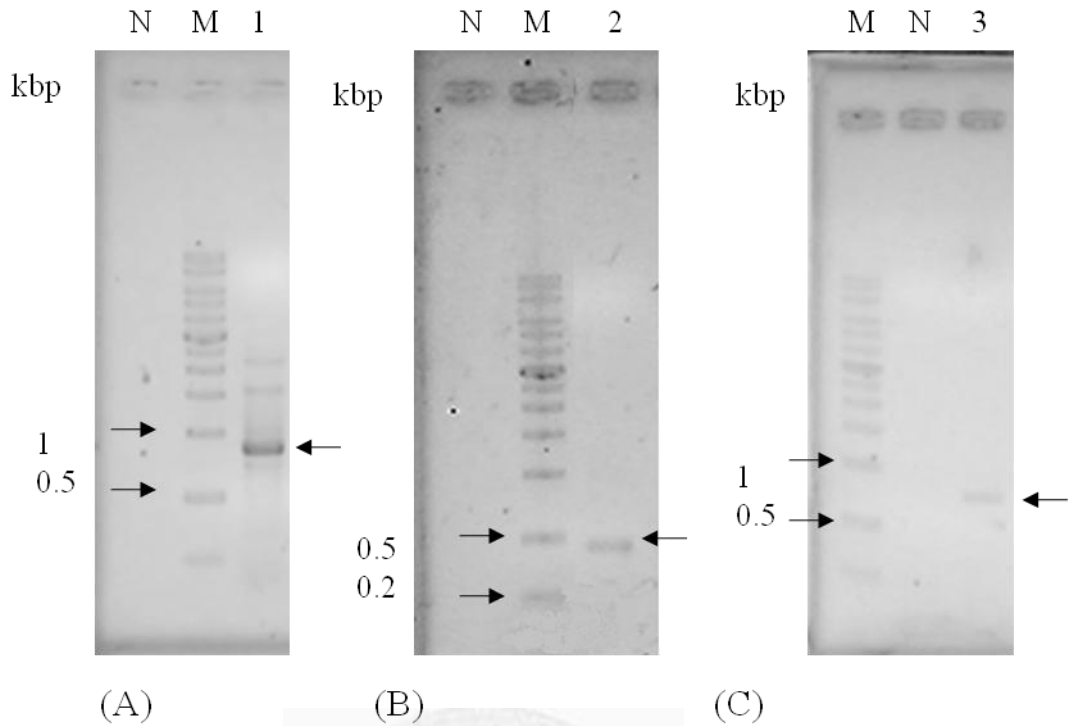
Figure 12. (A) Lane 1: PCR result for genomic DNA of *F. velutipes* using primers LephA-F/R. (B) Lane 2: PCR result for genomic DNA of *F. velutipes* using primers dst1.1-F/R. (C) Lane 3: PCR result for genomic DNA of *F. velutipes* using primers dst1.2-F/R.

1.4. 鮑魚菇的選殖結果

四組引子以鮑魚菇 genomic DNA 為模板的最適 PCR 反應黏合溫度如表二所示，其中三組引子能放大出產物，LephrA-F/R 引子在 PCR 反應後放大出三個主要片段，大小分別約在 2.5 kbp、1.6 kbp 與 800 bp 左右，如圖十三(A)所示，因已知真菌藍光受器中 PAS domain 的 DNA 片段大小範圍在 350 bp ~400 bp 間，所以具此推估大於 400 bp 太多的 PCR 擴增片段不會屬於 PAS domain，便只將約 800 bp DNA 片段純化後定序分析，確認 DNA 片段大小為 838 bp，Blast 此序列轉譯成的胺基酸序列後，並未比對到目標序列。

引子 LephrB-F/R 在黏合溫度降至 48°C 後，仍無明顯放大產物；引子 dst1.1-F/R 擴增出的產物如圖十三(B)所示，定序得知大小為 444 bp，是由 dst1.1-F 做為 3' 與 5' 端的引子而擴增出的產物，在 NCBI 網站上 Blast 其轉譯胺基酸(圖十四)後，發現與擔子菌 *S. commune* 的 XP_003028059 蛋白質的保守性區域 DSP_MapKP (N-terminal regulatory rhodanese domain of dual specificity phosphatases (DSP), such as Mapk Phosphatase.) 有相似性，比對結果如圖十四所示，有 41% 相似性，但是並非本實驗所要鈎取的藍光受器之部分序列。

引子 dst1.2-F/R 能擴增出明顯 DNA 片段如圖十三(C)所示，定序得 729 bp 片段，但仍未比對到目標序列。



圖十三 (A) 以 LephA-F/R 為引子對鮑魚菇基因體 DNA 進行 PCR 之結果(B) 以 dst1.1-F/R 為引子對鮑魚菇基因體 DNA 進行 PCR 之結果(C) 以 dst1.2-F/R 為引子對鮑魚菇基因體 DNA 進行 PCR 之結果

Figure 13. (A) Lane 1: PCR result for genomic DNA of *P. ostreatus* using primers LephA-F/R. (B) Lane 2: PCR result for genomic DNA of *P. ostreatus* using primers dst1.1-F/R. (C) Lane 3: PCR result for genomic DNA of *P. ostreatus* using primers dst1.2-F/R.

(A)

```

          10      20      30      40      50
Po-GD-dst1.1-F  FVVVDTRPPPVHAAHVVD SVNLAIP SLLLKRTRKQKRSVTSTTFPTLHS 50

          60      70      80      90      100
Po-GD-dst1.1-F  LRQYITTD ESLTVWDSLLVQGQPSPRWDGTLVVYDHMDASQKEDPNSAS 100

          110     120     130     140
Po-GD-dst1.1-F  WTLLEYILEPILRDVPTSRLCYLEGGFAAALS R KDFASGYVAGINHHK 148

```

(B)

GENE ID: 9591830 SCHCODRAFT 258388 | hypothetical protein
[Schizophyllum commune H4-8]

Score = 99.8 bits (247), Expect = 1e-19, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 53/128 (41%), Positives = 77/128 (60%), Gaps = 10/128 (8%)

```

Query 2  VVVDTRPPPVHAAHVVD SVNLAIP SLLLKRTRKQKRSVTSTTFPTLHS LRQYITTD E S L 61
      +++DTRP  HL  H+ DSVN++IPSL+LKR RK  S  F L SLRQ+ITTDE
Sbjct 201 LLIDTRPAAAHLQFHIRDSVNVSIPSLILKRCRKPGNS----GFHGLDSLRFITTD E G K 256

Query 62 TWWDSLLVQGQPSPRWDGTLVVYDHMDASQKEDPNSASWTLLEYILEPILRDVPTSRLCY 121
      +WD + G P WDG +++YD MDA + + +W L+ +L P++++ ++
Sbjct 257 ALWDKQMHPGGP---WDGDVILYDEEMDARDQSTSAAVAVALVSVLSPLVKE---GNVDW 310

Query 122 LEGGFAAA 129
      L E G A A
Sbjct 311 LEDGLARA 318

```

圖十四 (A) 以 dst1.1-F/R 為引子對鮑魚菇 genomic DNA 進行 PCR 之放大片段定序後轉譯成的氨基酸序列，以 Po-GD-dst1.1-F 稱之(B) 於 NCBI 網站上 Blast 之結果

Figure 14. (A) Deduced amino acids of PCR products for *P.ostreatus*, Po-GD-dst1.1-F, amplified by using primers dst1.1-F/R. (B) The blast results in NCBI website. Query: A part sequences of Po-GD-dst1.1-F ; Subject: A part sequences of XP_003028059

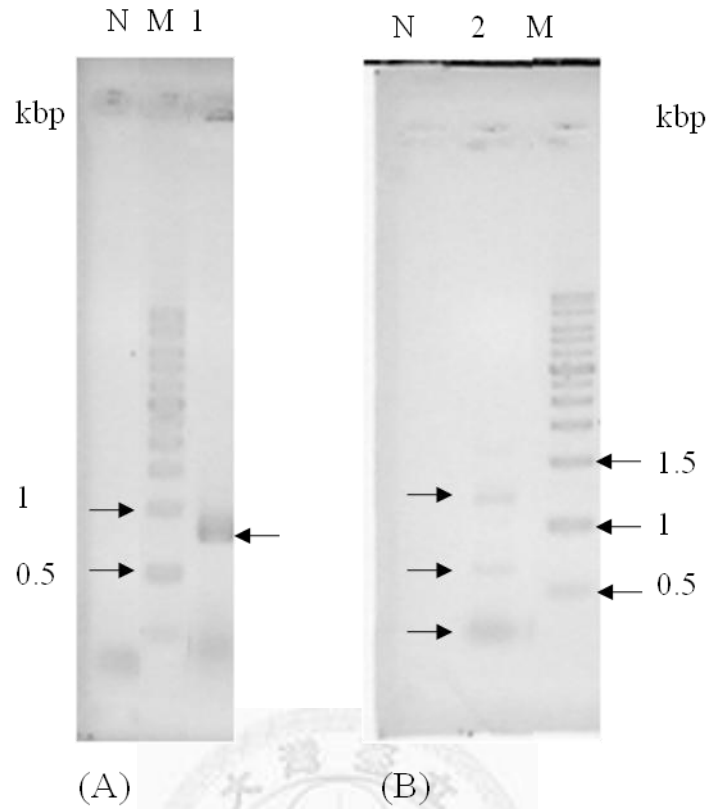
1.5. 美白菇的選殖結果

以美白菇基因體 DNA 為模板時只有 LephB-F/R 與 dst1.1-F/R 兩組引子能擴增出產物(圖十五)，定序後片段大小分別為 808 bp 與 857 bp、357 bp，引子 dst1.1-F/R 放大出的 857 bp 經分析後，發現此片段是由 dst1.1-F 做為 3'與 5'端的引子而擴增出的產物，以軟體 BioEdit 將序列轉譯為胺基酸後進行 Blast，其部分序列與灰蓋鬼傘之 XP_001837065 之保守性區域 RNRR2 (Ribonucleotide Reductase, R2/beta subunit, ferritin-like diiron-binding domain)具 88%相同度，比對結果如圖十六所示。而另外兩段序列未比對到目標序列。

1.6. 雞腿菇的選殖結果

以雞腿菇 genomic DNA 為模板時只有 LephA-F/R 此組引子能擴增出產物(圖十七)，定序後片段大小分別為 758 bp，以前述方法將序列分析比對，結果未比對到目標序列。





圖十五 (A) 以 LephrB-F/R 為引子對美白菇基因體 DNA 進行 PCR 之結果(B) 以 dst1.1-F/R 為引子對美白菇基因體 DNA 進行 PCR 之結果

Figure 15. (A) Lane 1: PCR result for genomic DNA of *H. marmoteus* variant using primers LephrB-F/R. (B) Lane 2: PCR result for genomic DNA of *H. marmoteus* variant using primers dst1.1-F/R.

(A)

```

      10      20      30      40      50
HmV-GD-dst1.1-F  XLWVDTRLNDNERHFISHVLAFFAASDGI V NENLVERFSNEVQVAEARC 50
      60      70      80      90     100
HmV-GD-dst1.1-F  FYGFQIMMENIHSE TY SLLIDTYIKDAAEREYLFDAVETIPC VKRKADWA 100
      110     120     130     140     150
HmV-GD-dst1.1-F  LNWISDRRSTFGERLVAF AAVEGIF FSGSFASIFW MKRGLMPGLTFSNE 150
      160     170     180     190     200
HmV-GD-dst1.1-F  LISRDEGMQTDFA CL LFSHLKRRRPH PNTVKAIITQAVTIEQEFLTGMFC* 200
      210     220     230     240     250
HmV-GD-dst1.1-F  LNFISFCTNIVFLRCTASEAHWHEC*LDVSIH*ICCRPSRCP RK*QVV* 250
      260     270     280
HmV-GD-dst1.1-F  LAKPIRLHGHDLTAGQDKLLREARLRLLEGGYQPPQ 286

```

(B)

```

GENE ID: 6013621 CC1G_00201 | ribonucleotide reductase small subunit
[Coprinopsis cinerea okayama7#130] (10 or fewer PubMed links)

Score = 361 bits (927), Expect = 6e-98, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 168/190 (88%), Positives = 181/190 (95%), Gaps = 0/190 (0%)

Query 6 DTRLNDNERHFISHVLAFFAASDGI V NENLVERFSNEVQVAEARC FYGFQIMMENIHSET 65
      + LNDNERHFISHVLAFFAASDGI V NENL+ERFSNEVQ AEARCFYGFQIMMENIHSET
Sbjct 130 NNKLNDNERHFISHVLAFFAASDGI V NENL LERFSNEVQAAAEARCFYGFQIMMENIHSET 189

Query 66 YSLLIDTYIKDAAEREYLFDAVETIPC VKRKADWALNWISDRRSTFGERLVAF AAVEGIF 125
      YSLLIDTYIKD A+R+YLFDAV+TIPC+K+KADWAL WISD++STF ERLVAF AAVEGIF
Sbjct 190 YSLLIDTYIKDPAQRDYLFDVDTIPC I K KADWAL TWISDQKSTFAERLVAF AAVEGIF 249

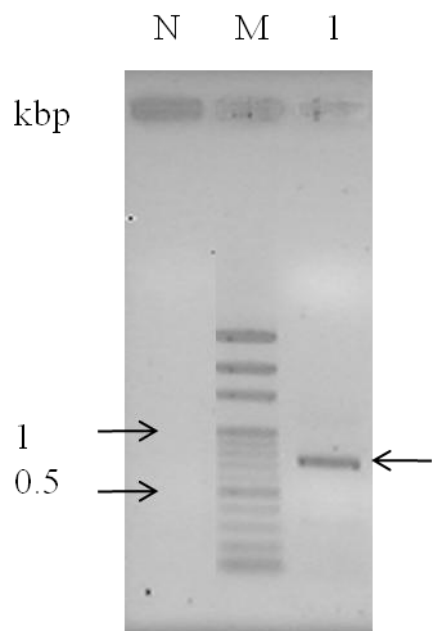
Query 126 FSGSFASIFW MKRGLMPGLTFSNELISRDEGMQTDFA CL LFSHLKRRRPH PNTVKAIITQ 185
      FSGSFASIFW+K K RGLMPGLTFSNELISRDEGM TDFACLLFSHLKRRRPH+ VK IIT+
Sbjct 250 FSGSFASIFWLK K RGLMPGLTFSNELISRDEGMHTDFACLLFSHLKRRRPHD VVKRIITE 309

Query 186 AVTIEQEFLT 195
      AV IEQEFLT
Sbjct 310 AVAIEQEFLT 319

```

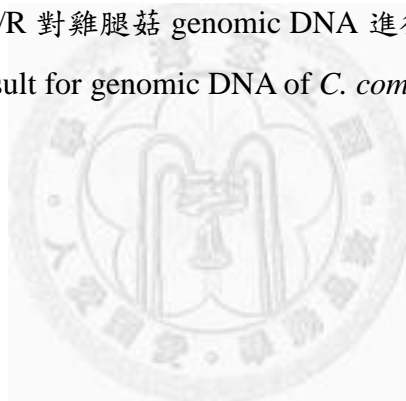
圖十六 (A) 以 dst1.1-F/R 為引子對美白菇 genomic DNA 進行 PCR 之放大片段定序後轉譯成的氨基酸序列，以 HmV-GD-dst1.1-F 稱之。(B) DNA 片段 HmV-GD-dst1.1-F 於 NCBI 網站上 Blast 之結果。

Figure 16. (A) Deduced amino acids of PCR products for *H. marmoteus* variant ,HmV-GD-dst1.1-F, amplified by using primers dst1.1-F/R. (B) The blast results in NCBI website. Query: A Part sequences of HmV-GD-dst1.1-F ; Subject: A Part sequences of XP_001837065.



圖十七 以引子 LephrA-F/R 對雞腿菇 genomic DNA 進行 PCR 之結果

Figure 17. Lane 1: PCR result for genomic DNA of *C. comatus* using primers LephrB-F/R.



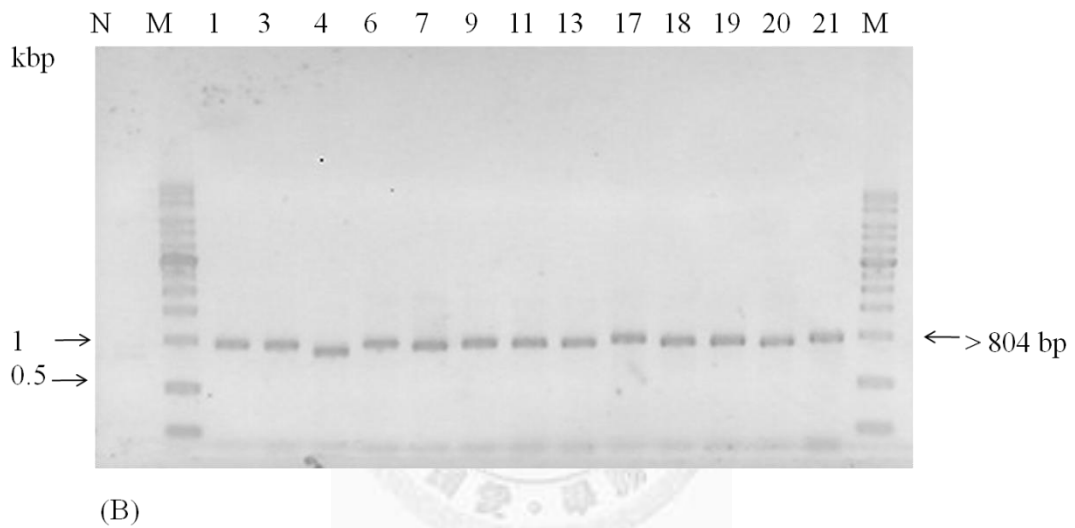
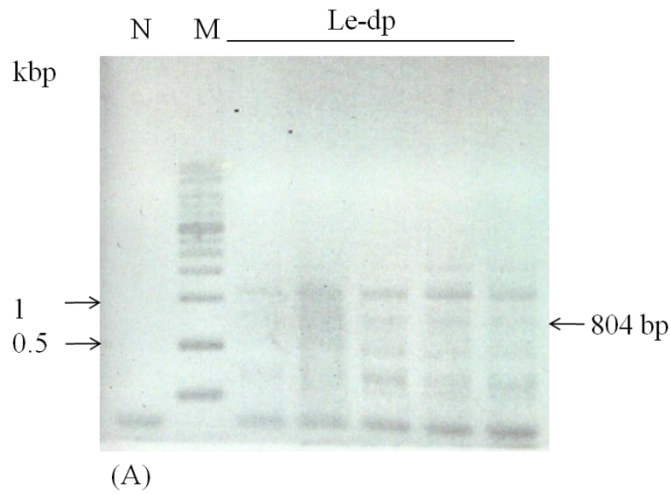
2. 嘗試由菇類基因體中以退化性引子擴增出藍光受器部分片段

使用引子 dp-F/R，分別以香菇、金針菇、鮑魚菇、美白菇與雞腿菇的基因體 DNA 做為模板進行 PCR，將放大的 DNA 片段定序確認，以選殖其藍光受器保守性區域 PAS domain 的序列。

2.1. 香菇的選殖結果

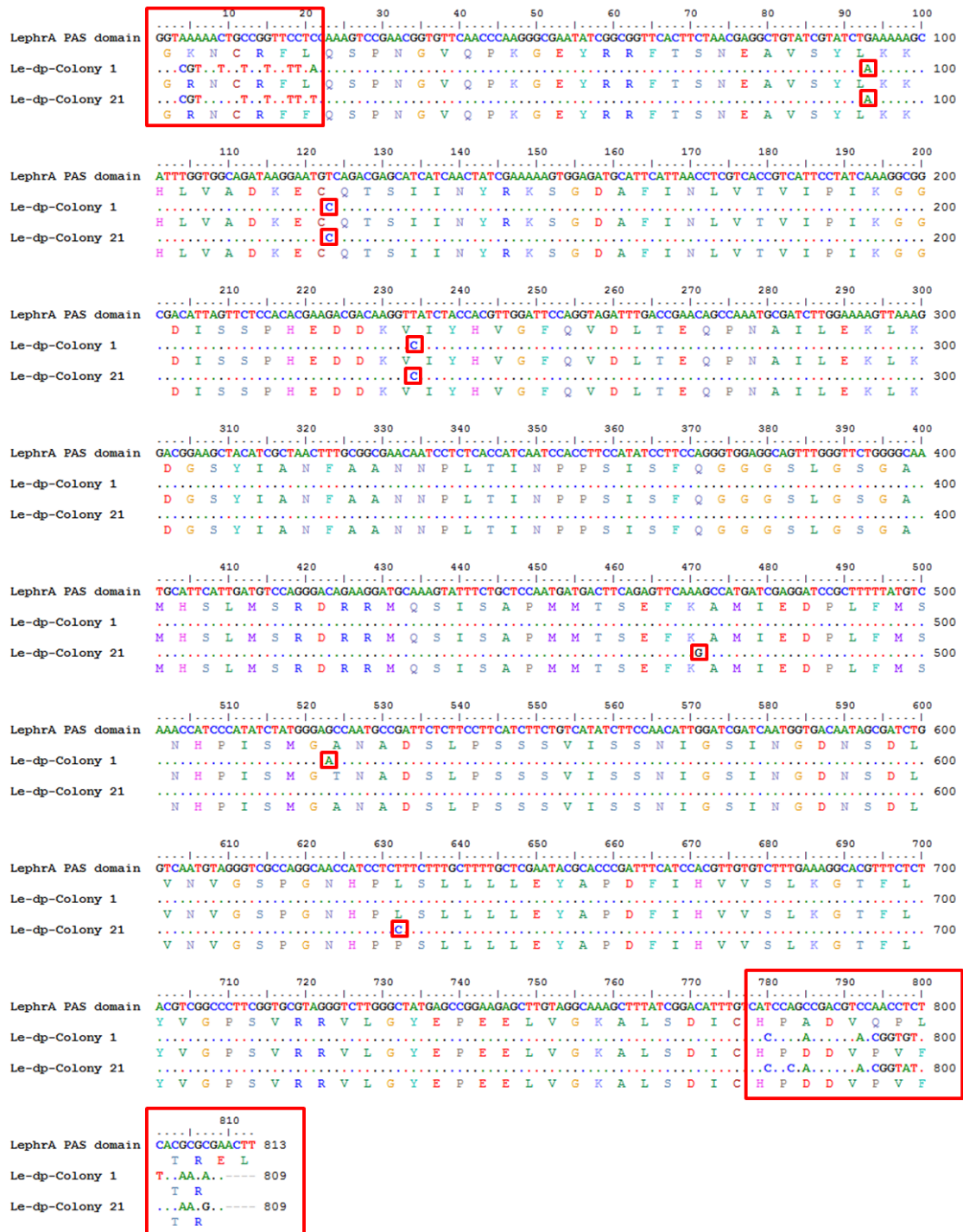
使用引子 dp-F/R 與香菇基因體 DNA 為模板進行 PCR，擴增的片段如圖十八(A)中 Le-dp，因已知 dp-F/R 所擴增出 *LephrA* 的 PAS domain 核酸序列長度為 804 bp(48)，所以切膠純化核酸大小在 700 bp~900 bp 間的片段，黏合入 yT&A vector 轉入大腸桿菌後，使用 M13_F/R 進行菌落 PCR，結果如圖十八(B)所示，將有正確擴增片段大小的菌落進行定序分析，圖十八(B)中編號 1 與 21 的片段序列(以 Le-dp-Colony 1 和 21 稱之)與 *LephrA* 的 PAS domain 之核酸序列相似，比對結果如圖十九所示。





圖十八 (A)以 dp-F/R 為引子與香菇基因體 DNA 為模板之擴增結果(B)以引子 M13_F/R 進行菌落 PCR 的結果

Figure 18. (A) The PCR results for genomic DNA of *L. edodes* by using primers dp-F/R. (B) The colony PCR results for the transforming colonies using primers M13_F/R.

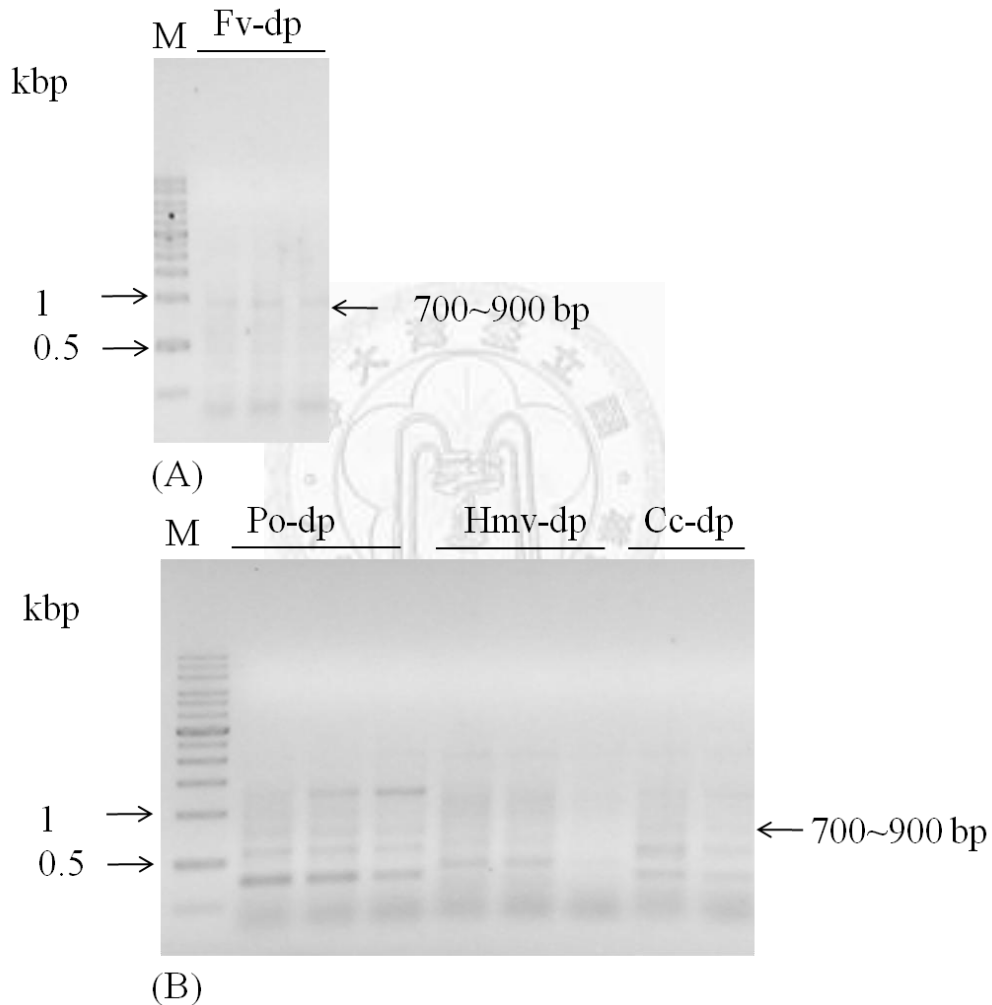


圖十九 *LephrA* 的 PAS domain 與選殖出的 Le-dp-Colony 1 和 21 之序列比對。

Figure 19. Sequence alignment of *LephrA* PAS domain, Le-dp-Colony1 and 21.

2.2. 金針菇、鮑魚菇、美白菇與雞腿菇的基因釣取結果

使用 dp-F/R 對金針菇、鮑魚菇、美白菇與雞腿菇基因組進行 PCR，結果如圖二十所示，將 700~900 bp 間的片段切膠純化後黏合入 yT&A vector，轉形到大腸桿菌後，使用 M13_F/R 進行菌落 PCR，將擴增片段大小在 600~900 bp 間的菌落萃取質體後定序，分析了多段序列卻都未與 PAS domain 相似。



圖二十 (A)以 dp-F/R 為引子與金針菇基因體為模板之擴增結果(B) 以 dp-F/R 為引子與鮑魚菇、美白菇、雞腿菇基因體為模板之擴增結果

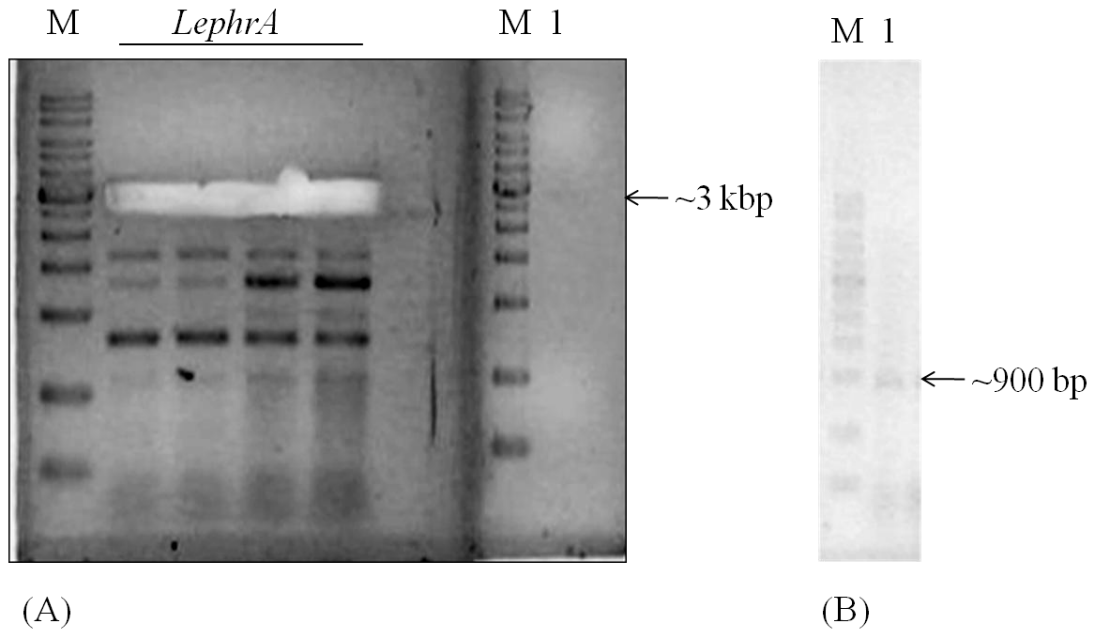
Figure 20. (A) The PCR results for genomic DNA of *F. velutipes* by using primers dp-F/R (B) The PCR results for genomic DNA of *P. ostreatatus*, *H. marmoteus* variant, *C. comatus* by using primers dp-F/R.

3. 嘗試由菇類 cDNA 中以退化性引子擴增出藍光受器部分片段

3.1. 選殖香菇的 *LephrA*

以香菇 cDNA 為模板，使用引子 *LephrA*-full-F 與 *LephrA*-full+stop codon-R 夾取 *LephrA* 全長，結果如圖二十一(A)所示，但因擴增產物的量少，加上全長為 2,775 bp，再將全長片段純化進行 TA 選殖時的效率很低，所以改以使用引子 *LephrA*-full-F 與 *phrA*-PAS-F 擴增 *LephrA* 近 5'端的前半段，大小為 1,440 bp，引子 *LephrA*-F 與 *LephrA*-full+stop codon-R 擴增 *LephrA* 近 3'端的前後半段，大小為 1,494 bp，前後兩段有 159 bp 的重疊區域，使用 Bioedit 將兩段串接後得到本研究使用的香菇之 *LephrA* 全長序列，以 *photoreceptor A* 稱之，與已發表之 *LephrA* 序列比對如圖二十二所示。



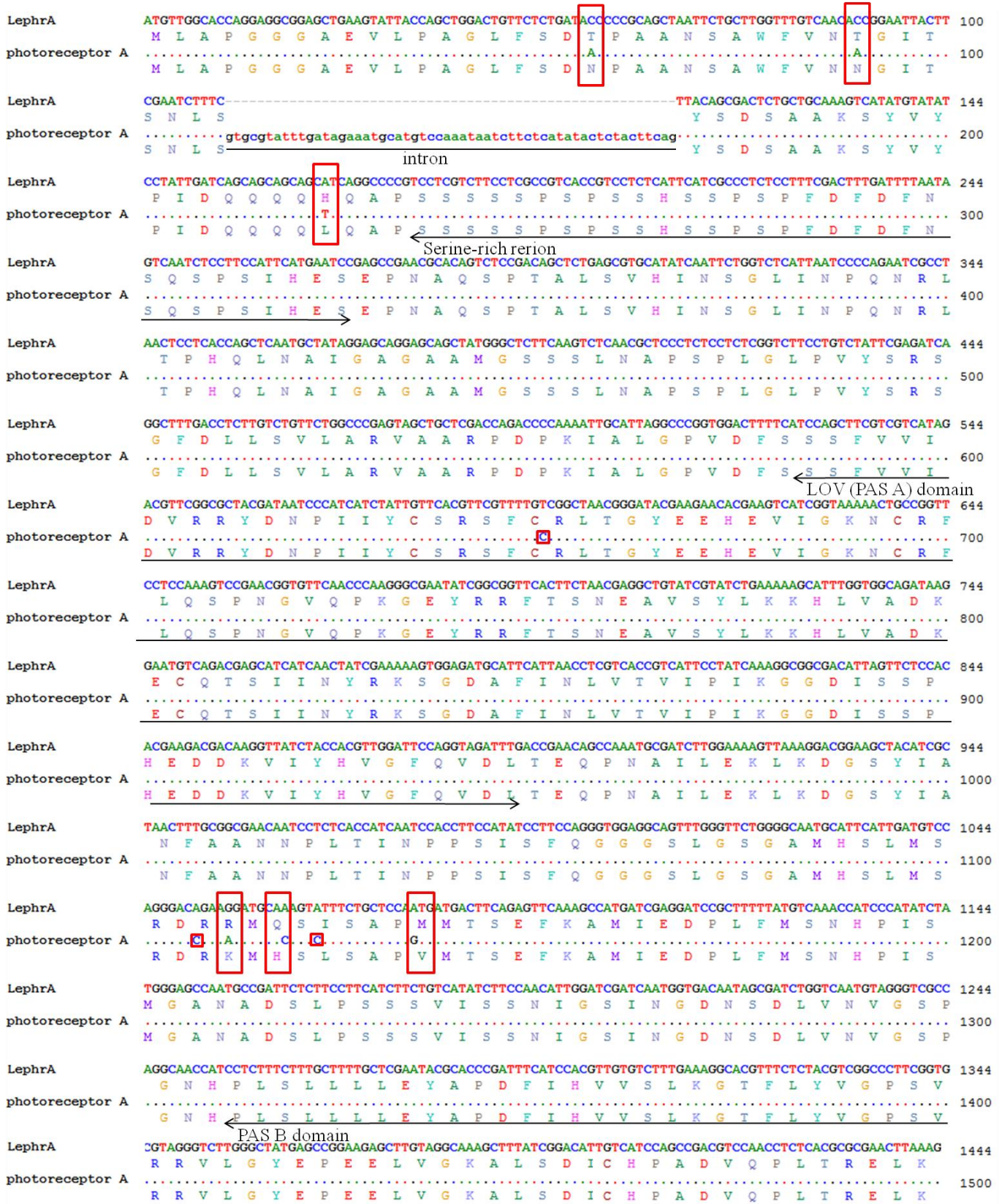


圖二十一 由香菇的 cDNA 選殖 *LephrA* 與 *LephrB*

(A) *LephrA*：模板為香菇的 cDNA 與引子為 *LephrA*-full-F、*LephrA*-full+stop codon-R 的 PCR 產物，將電泳膠片上約 3 kbp 的目標產物處切下純化。1：目標產物 *LephrA* 切膠純化所得產物。(B) 1：模板為香菇的 cDNA 與引子為 *LephrB*-full-F、*LephrB*-full+stop codon-R 的 PCR 產物。

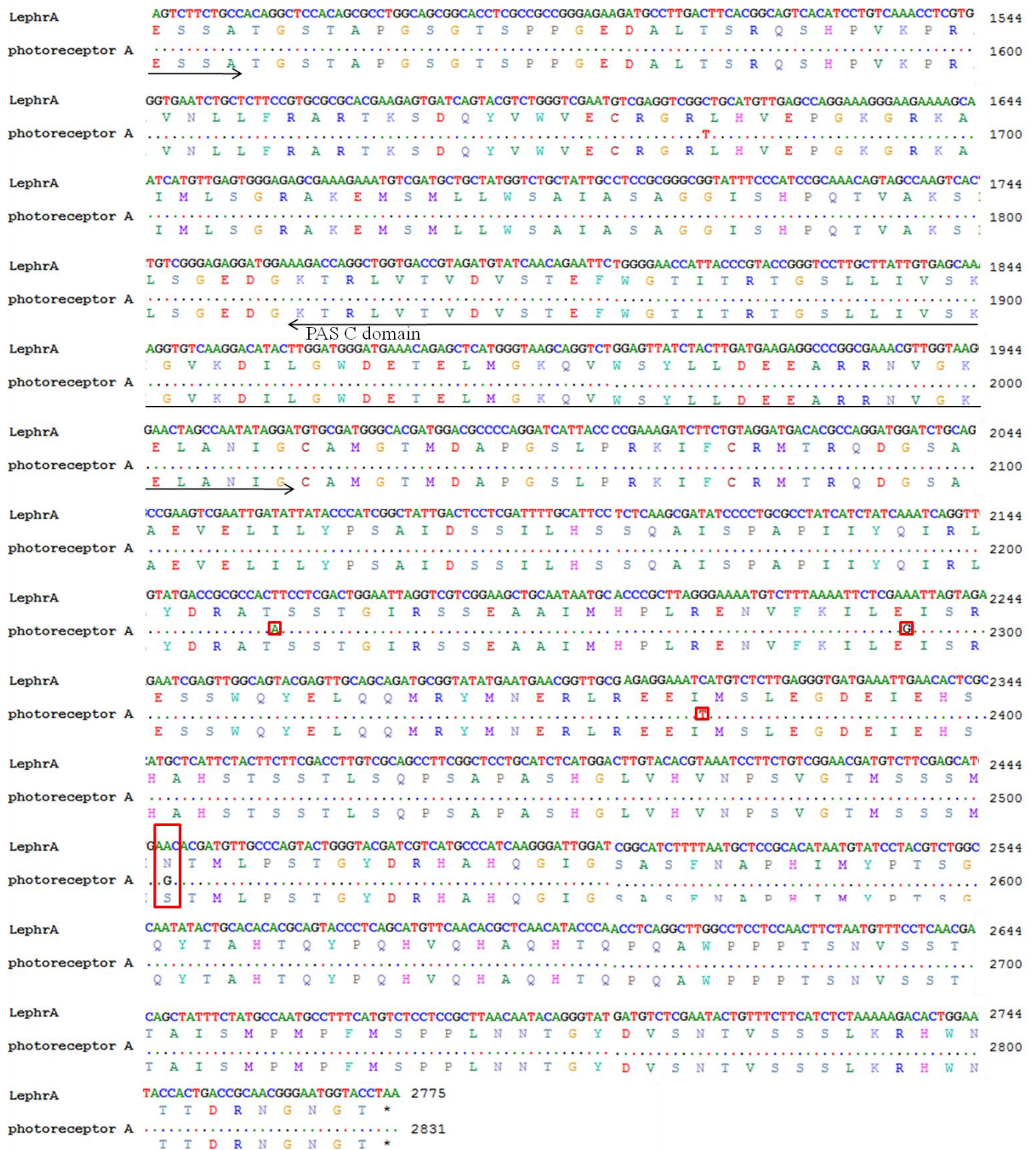
Figure 21. Cloning of *LephrA* and *LephrB* from *L. edodes*' cDNA.

(A) *LephrA*：PCR results and the target fragment cutting of *LephrA* from *L. edodes*' cDNA by using primers *LephrA*-full-F and *LephrA*-full+stop codon-R. Lane 1: Gel extracting product of *LephrA* (B) Lane 1: PCR results of *LephrB* from *L. edodes*' cDNA by using primers *LephrB*-full-F and *LephrB*-full+stop codon-R.



圖二十二 *LephrA* 與本研究選殖之 *photoreceptor A* 之序列比對

Figure 22. The sequence alignment of *LephrA* and *photoreceptor A*



圖二十二(續) *LephrA* 與本研究選殖之 *photoreceptor A* 之序列比對

Figure 22.(Continued) The sequence alignment of *LephrA* and *photoreceptor A*

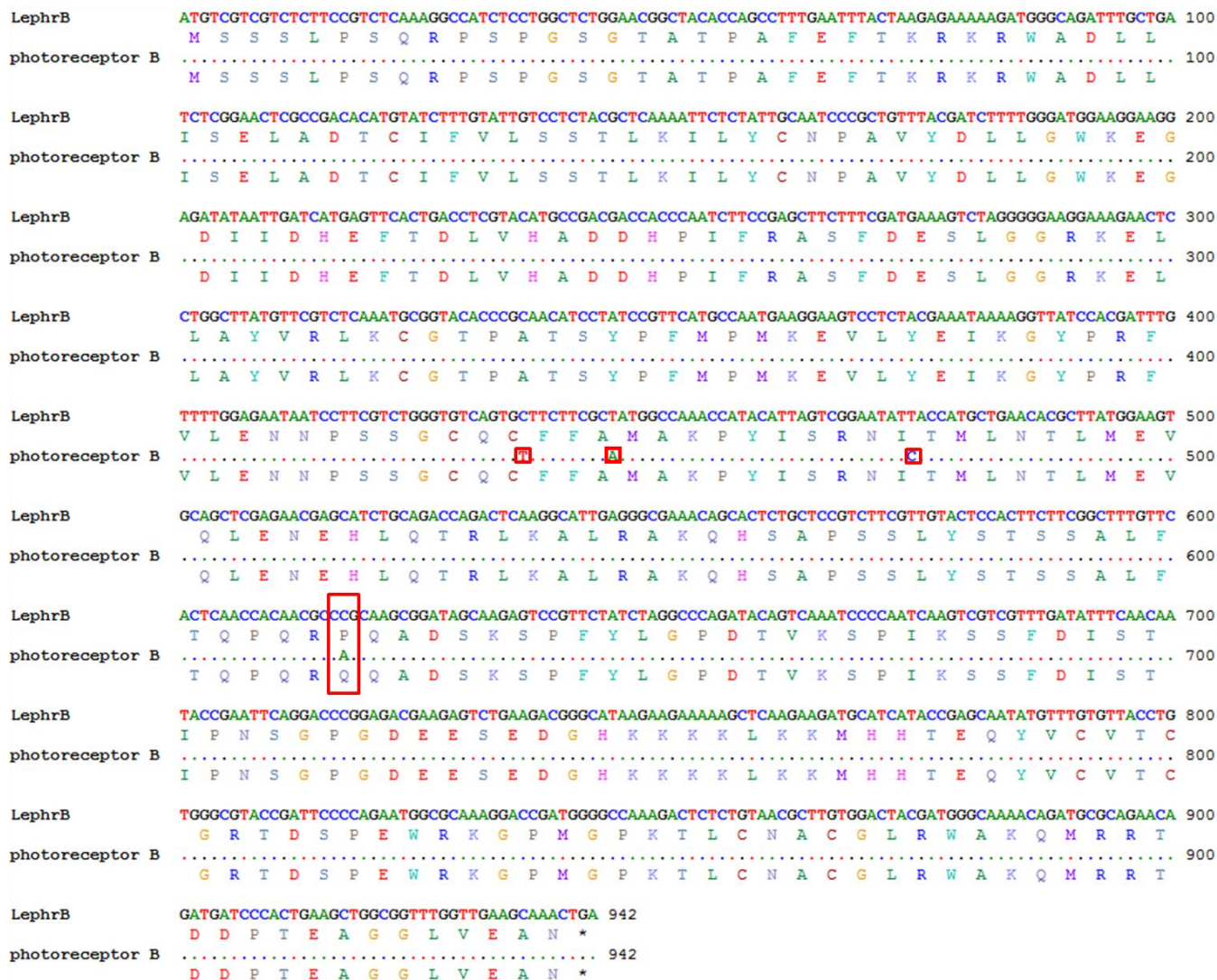
3.2. 選殖香菇的 *LephrB*

以香菇 cDNA 為模板，使用引子 *LephrB*-full-F 與 *LephrB*-full+stop codon-R 夾取 *LephrB* 全長，結果如圖二十一(B)所示，將約 900 bp 的產物純化後進行 TA 轉殖法，定序得到本研究使用的香菇之 *LephrB* 全長序列，以 *photoreceptor B* 稱之，其與已發表之 *LephrB* 比對如圖二十三所示。

限制酶截切後的 vector: pET-21a(+)與 insert: *Bam*HI-*photoreceptor B*-*Hind*III 如圖二十四所示，黏合建構質體使用大腸桿菌 BL21 (DE3)表現之 Photoreceptor B -His×6，在 150 mL 培養液中以 IPTG 誘導生產，並使用 ProBond™ Nickel-Chelating Resin 純化後，所得蛋白質濃度約在 0.2 mg/mL，其蛋白質電泳圖與以 6His 單株抗體進行的西方墨點法結果如圖二十五所示。

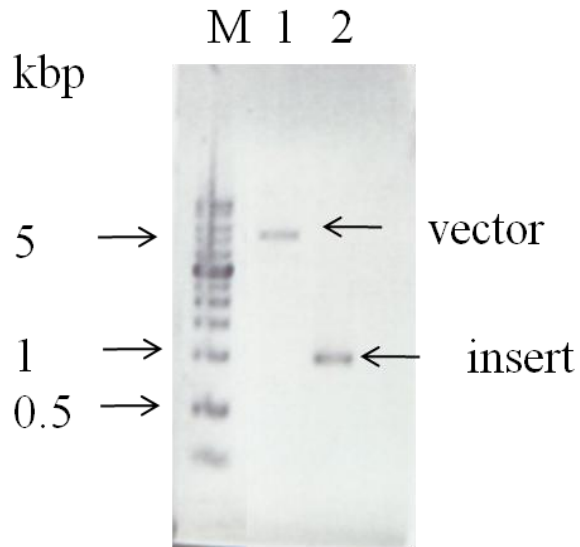
3.3. Photoreceptor B-His x6 功能測試

香菇、金針菇、鮑魚菇、美白菇與雞腿菇的菌絲液加入 Photoreceptor B-His x6 後以黑暗與光照環境培養 7 天，圖二十六顯示菌絲狀況，黑暗與光照環境的菌絲狀況沒有差異，沒有預期的色素產生。



圖二十三 *LephrB* 與本研究選殖之 *photoreceptor B* 之序列比對

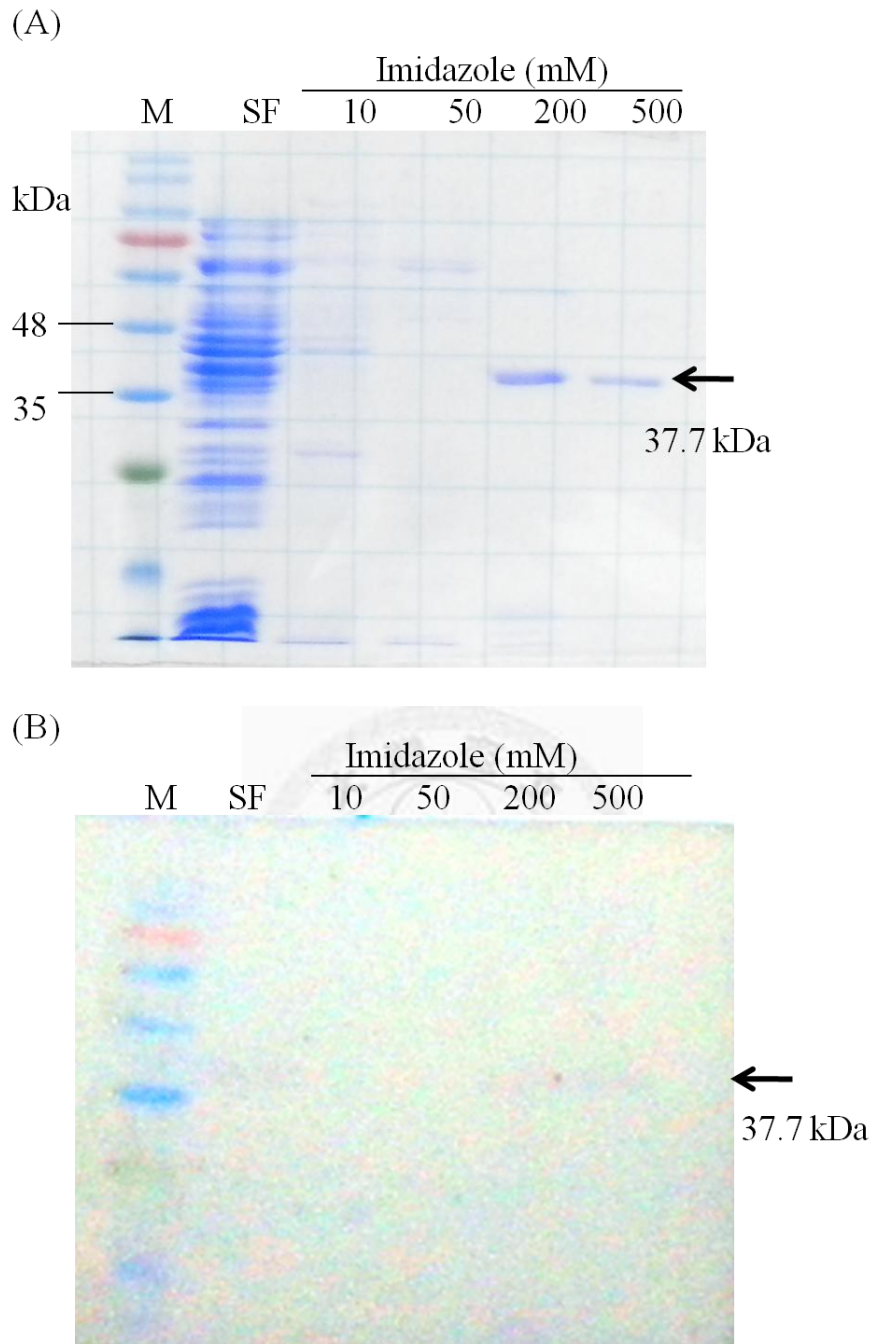
Figure 23. The sequence alignment of *LephrB* and *photoreceptor B*



圖二十四 vector: pET-21a(+)與 insert: *Bam*HI-*photoreceptor B-Hind*III 限制酶截切結果

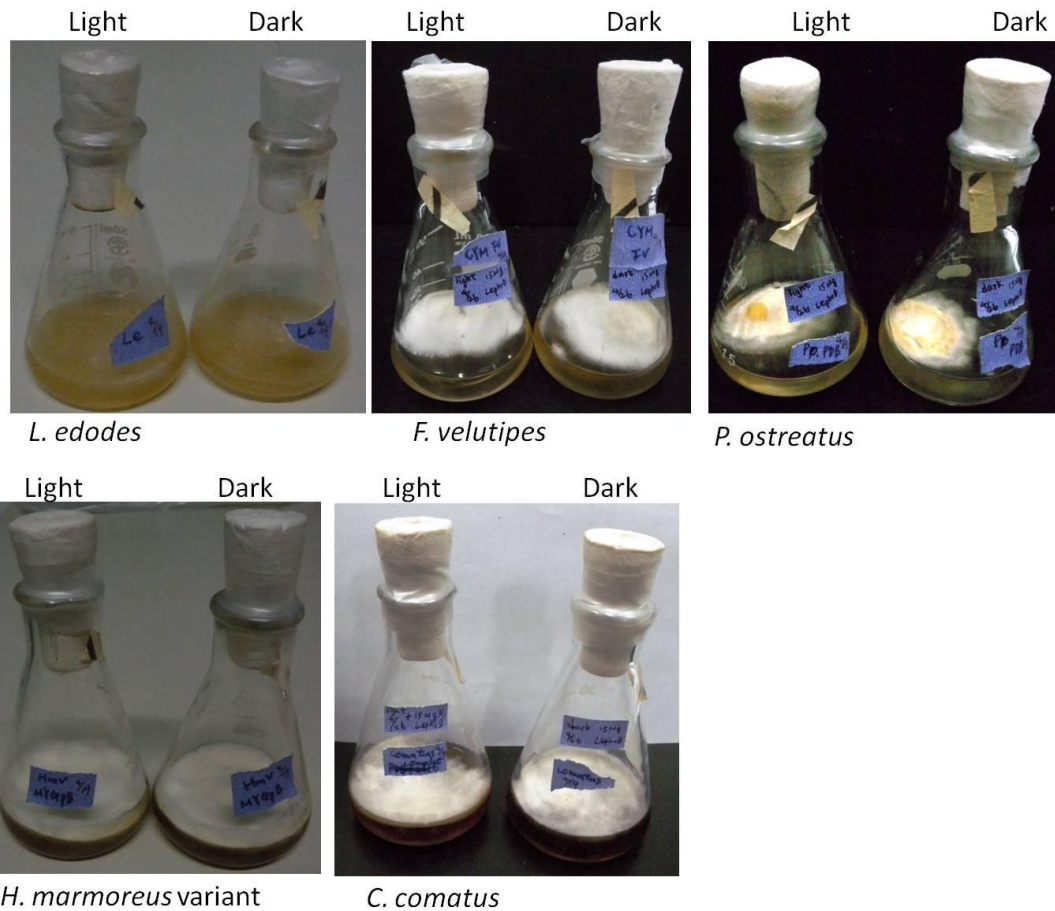
Figure 24. The results of vector: pET-21a(+) and insert: *Bam*HI-*photoreceptor B-Hind*III digested by *Bam*HI and *Hind*III





圖二十五 (A)各純化分割的本研究選殖表現之 Photoreceptor B-His x6 蛋白質電泳圖與(B)西方墨點圖

Figure 25. (A) The SDS-PAGE of Photoreceptor B-His x6 from different elution fraction (B) The western-blot of Photoreceptor B-His x6 from different elution fraction by anti-His x6 monoclonal primary antibody and goat anti-mouse IgG-AP conjugate secondary antibody



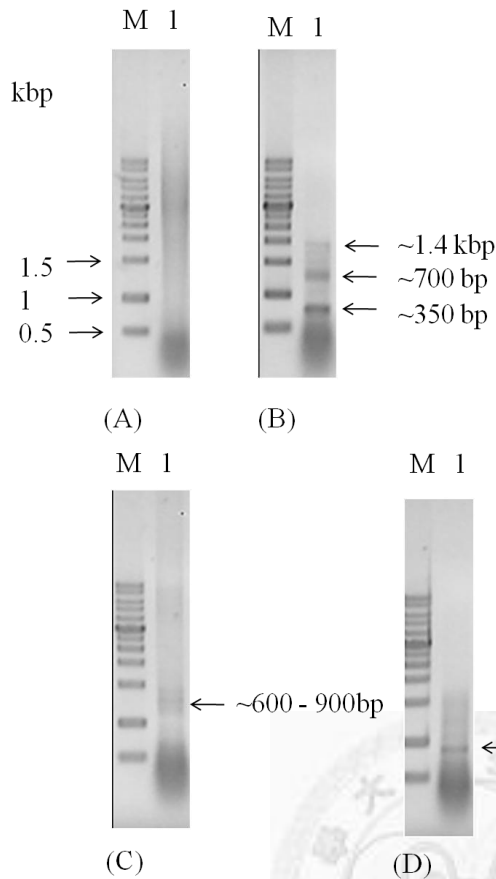
圖二十六 香菇、金針菇、鮑魚菇、美白菇與雞腿菇的菌絲液加入 Photoreceptor B-His x6 後黑暗與光照環境處理結果

Figure 26. The mycelia condition of *L. edodes*, *F. velutipes*, *P. ostreatus*, *H. marmoreus* variant and *C. comatus* after adding Photoreceptor B-His x6 and incubating in dark and light environment.

3.4. 金針菇中選殖結果

使用引子 dp-F/R、dp-1-F/R、dp-1-F/dp-2-R、dp-2-F/dp-1-R 對模板金針菇 cDNA 進行 PCR，結果如圖二十七所示。引子 dp-F/R 進行 PCR 結果未有專一的擴增產物；引子 dp-1-F/R 的擴增產物為約 1.4 kbp、700 bp 與 350 bp，三個片段分別切膠純化進行定序分析後，皆非屬於 PAS domain 之序列；引子 dp-1-F/dp-2-R 的擴增產物在 600 bp~900 bp 之間，將此範圍擴增產物切膠純化進行定序分析，所得 661、747、765、779、812 與 932 bp 皆不屬於 PAS domain；引子 dp-1-F/R 的擴增產物為約 400 bp，定序後得知為 420 bp，序列如圖二十八所示，轉譯成 140 個胺基酸後，與香菇、裂褶菌(*S. commune*)、布拉克鬍鬚黴(*P. blakesleeanus*)與灰蓋鬼傘中已發表的 WC-1 同源藍光受器分別具 28%、28%、24%與 31%相同度，胺基酸序列比對如圖二十九所示，使用網站為 NCBI 的 Constraint-based Multiple Alignment Tool http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/cobalt/cobalt.cgi?link_loc=BlastHomeLink。





圖二十七 使用引子(A)dp-F/R、(B)dp-1-F/R、(C)dp-1-F/dp-2-R、(D)dp-2-F/dp-1-R 對模板金針菇 cDNA 進行 PCR 的結果

Figure 27. The PCR results for first strand cDNA of *F. velutipes* by using primers (A)dp-F/R、(B)dp-1-F/R、(C)dp-1-F/dp-2-R、(D)dp-2-F/dp-1-R

```

FV-cDNA-dp21-420 bp  GTTGAACCGGGGAAAGGGAGTAAAGCGATTGTGCTCAGTGCAGGGGTCAAGGAGGTCGGGTTCGCTGCGCGCACCGTTGGT 80
                      V E P G K G S K A I V L S A R V K E V G S L R A P L V
FV-cDNA-dp21-420 bp  TTCTGGCGGGTTAGTGGGACTGTTACGCCTGACGGGACTATCCCTCGTCGCTACGCGGGATGTAGCGGGGTGGACAGTAG 160
                      S G G V S G T V T P D G T I L V A T R D V A G W T V
FV-cDNA-dp21-420 bp  GCGAGCTCGTTGGGAAGTCGTTCTACGCGCTCTTCGATACCCTGACGGTACTCCGGACGCGAAGAGAGCTCTCATGCGG 240
                      G E L V G K S F Y A L F D T L T V L P D A K R A L M R
FV-cDNA-dp21-420 bp  AGGAAAGAGGGAGGCAAGTTGAGGTTGAAGTTCGGGTGTGGAAGCAGCTGGGGAGCGATAGTCTCCGCGGGTGTACCA 320
                      R K E G G K V E V E V R V W K Q L G S D S L P R V Y Q
FV-cDNA-dp21-420 bp  AATCACGGATGCGCCATCGCAGCAAGCGGTTCCGAGCTTTGACGCTTTCGAGGAGCTGGGAACGGAGAGGGAGAGCAGCT 400
                      I T D A P S Q Q A V P S F D V F E E L G T E R E S S
FV-cDNA-dp21-420 bp  GGCAGTATGAACTCCAGCAG 420
                      W Q Y E L Q Q

```

圖二十八 使用引子 dp-2-F/dp-1-R 對模板金針菇 cDNA 進行 PCR 所得 420 bp 序列，以 FV-cDNA-dp21-420 bp 稱之

Figure 28. The sequence of FV-cDNA-dp21-420 bp

```

FV-cDNA-dp21-420 bp 1 -----VEPGKGSKAIVLSARVKEVGSRLRAPLV--SGGVS-- 32
BAF56991 498 PGEDALTSRQSHPV--KPRAVNLLFRARTKSDQYVWVECRGRHLHVEPGKGRKAIMLSGRAKEMSMLLWSAIASAGGISHP 575
|XP_003028974 511 -----PS--MPRTVDLLFRAQMKTGRYVWMECRGRHLHVEPGKGRKAIMLSGRAREMMECRWGRLRAGGGLA-P 575
ABB77844 351 -----KVVDLLFRVRRKYSGYMMECRGRHLHMDQSKSRKCLVLSGRQRPVYKHLWRDICST----- 406
XP_001832659 608 EGAMGLSGTHAAPTIGQPRTVDLLFRARTKNGCYVWVESRGRHLHVEPGKGRKAIILSGRAREIPKMSWGLVIKTGGLAKM 687

FV-cDNA-dp21-420 bp 33 -----GTVTPDG-----TILVATRDVAGWTVVGELVGKSFYALFDTLTVLPDAKR--- 76
BAF56991 576 QTVAKSLSGEDGKTRLVTVDVSTEFWGTITR---TGSLLIIVSKGVKDIILGWDETELMGKQWWSYLLDEEARRNVGK-EL 650
|XP_003028974 576 SAVSPS-----GAQVPREFWGTLAAGAGGRAAFATVGGVADVLGWDAADVLGRAVGLVCGGAGATIIDA-EV 643
ABB77844 407 -----SLEG-----TEFWAKTSLA---GLYLHVAAKQCETIGFSAESLEGASIQYIPNHEIPDMSRAFDL 464
XP_001832659 688 VKAQRVVVGSGGVEQVEEVDQFQEWWTMSP---QMVMLMIGKGFDPVMGYSQSEFHGRNFKLLDSSSSSSVSLSDV 762

FV-cDNA-dp21-420 bp 77 -----ALMRKEGGKVEVEVRVWVKQ-----LGSDS-----LPRVYQIT-----DA 111
BAF56991 651 ANIGCAMGTMDAPGS-LPRKIFCRMTRQDGSAAEVELILYPSAIDSSILHSSQ---AISPAPIIYQIR----- 714
|XP_003028974 644 ARM---LTAHQAQGDDAPRSLSLRMRARDGAEDVRLVLYRPFARAVKHT-----VAPAPVIFQCA----- 702
ABB77844 465 VRQGQRVNLQHS-----ILNEKGNYSTVTSTFYFG--DWSSFQSE-----PAFALVQTR-LGREEMFRITD 522
XP_001832659 763 VQQLGTLSSKSKEDCVEKVESVKCRVHRDGHLLDVVVWVYRPERDVRVLEATRNLGGVLPAPHLIQVRKIGAETYPLTDT 842

FV-cDNA-dp21-420 bp 112 PSQQAV-----PSF-----DVFEELGTERESSWQYELQQ----- 140
BAF56991 715 -LYDRATSSSTGIRSSSEAAIMHPL-----RENVFKILEISRESSWQYELQQMRYMNERLREEIMSLEGD-EI-EH-- 780
|XP_003028974 703 -SADAVASAGEMR-----HSA-----NANVFEEFELARGTSWQYELQQVRYANQRLLDEIAVVEAQLGV-QP-- 762
ABB77844 523 -----NLQENVFSEIEPTRGTSWQYELHQLQLANKRLHEQIESLSPGPKRKKQRKR 572
XP_001832659 843 SSSSALSSPSSSTSSSLSSSHPSLSKRFTIDPGANMFEELVSRGSSWQYELQLKFNQRLLRDDIKMLEAAVRA-HKGR 921

```

圖二十九 FV-cDNA-dp21-420 bp 轉譯之胺基酸與香菇、裂褶菌、布拉克鬚鬚黴與灰蓋鬼傘中已發表的 WC-1 同源藍光受器之比對圖

Figure 29. The multiple alignment for the translation of FV-cDNA-dp21-420 bp and the WC-1 homologs of *L.edodes* (BAF56991)、*S. commune* (XP_993928974)、*P. blakesleanus* (ABB77844)、*C. coprinus* (XP_001832659)

(Constraint-based Multiple Alignment Tool on NCBI

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/cobalt/cobalt.cgi?link_loc=BlastHomeLink)

第四章、討論

一、基因組中藍光受器的選殖

1. 專一性引子

一開始選擇以專一性引子由目標菇類基因組 DNA 中選殖藍光受器保守性區域的原因，其一為考慮到專一性引子的擴增產物會較少而利於分析，其二為擔子菌中已發表的藍光受器之 PAS domain 核酸序列大部分沒有 intron，而且 *LephrA* 的 PAS domain 序列亦是 Sano 等研究人員由基因組 DNA 中選殖而得，故本研究亦選擇以基因組 DNA 為模板。但是實驗結果中選殖出的核酸序列轉譯成胺基酸後皆不屬於 PAS domain，而且 PCR 產物表示 PAS domain 胺基酸序列雖具保守性，但其核酸序列可能因為物種間的親源遠近與不同物種的密碼子使用偏移(codon usage bias)而有很大的差異。因此，本研究實驗方法改以使用退化性引子為主。

2. 退化性引子

2.1. 香菇基因組中 dp-F/R 引子的確認

成功以引子 dp-R 獲取 *LephrA* 部分 PAS domain 序列，與 *LephrA* 比對結果中發現此部分序列在靠近 5' 與 3' 端的差異很大，應是 dp-F/R 為退化性引子所致，而中間的序列有些微不同，可能因為不同地區香菇菌株的品系差異，或者是 PCR 中聚合酶作用的誤差。Sano 等人以南方雜合法(southern blot)分析 *LephrA* 在香菇菌株 FMC2 (48)基因組 DNA 的拷貝數與分布情形，發現以探針偵測分別被限制酶 *Ava*I、*Sma*I 與 *Xho*I 截切之 DNA 片段中，三組都只各有一個片段有訊號，顯示在香菇菌株 FMC2 中 *LephrA* 應該只有一個拷貝數，所以不會是因為在基因組中有多個拷貝數而造成序列有所差異。

2.2. 本研究材料中選殖結果

使用退化性引子 dp-F/R 所得 PCR 產物大小由 300 bp 至 1.5 kbp 皆有，參考擔子菌已發表之 WC-1 同源蛋白質，計算它們在此組引子間的 PAS domain 核酸序列大小在 600 bp~900 bp 之間，所以本研究中亦選擇 PCR 產物大小在 600 bp~900 bp 間的片段進行定序分析，但是分析了數十個不同 PCR 產物後卻皆未找到與 PAS domain 相似的片段，可能的原因有：

- (1) dp-F/R 引子雖然在擔子菌已發表之 WC-1 同源蛋白質中具高相同度，卻不表示在其它擔子菌中亦相同，特別是本研究中選擇的食用菇，所以擴增產物可能都不屬於 PAS domain。
- (2) dp-F/R 引子在本研究使用菇類基因組中所能擴增的目標 PAS domain 核序列大小可能在 600 bp~900 bp 之外，以致未能獲取目標片段。
- (3) 因為退化性引子是許多專一性引子的混合，加上模板基因組中包含了轉譯區與非轉譯區等許多核酸序列，所以 PCR 產物中或許具有目標片段，但因非目標片段產物過多而未能挑選到目標序列。

二、香菇藍光受器基因的選殖

1. 本研究之 *LephrA*:*photorecetpr A* 的選殖

本研究選殖之 *photorecetpr A* 基因序列中包含已發表之 *LephrA* 的 intron，理論上由 oligo (dT) 作為引物反轉錄所得之第一股 cDNA 應不具有 intron，因而懷疑萃取之全 RNA 中有基因組 DNA 的汙染，但是直接以香菇全 RNA 作為模板，以相同引子 *LephrA*-full-F/*LephrA*-full+stop codon-R 進行 PCR 的結果未有目標片段產生，加上 *photorecetpr B* 的選殖片段亦未包含 intron，顯示全 RNA 應該沒有基因組 DNA 的汙染。

推測原因可能為 *photoreceptpr A* 在 pre-mRNA 接上 3' poly(A) tail 階段時尚未將 intron 切除，以致 RT-PCR 結果呈現 pre-mRNA 反轉錄的序列。

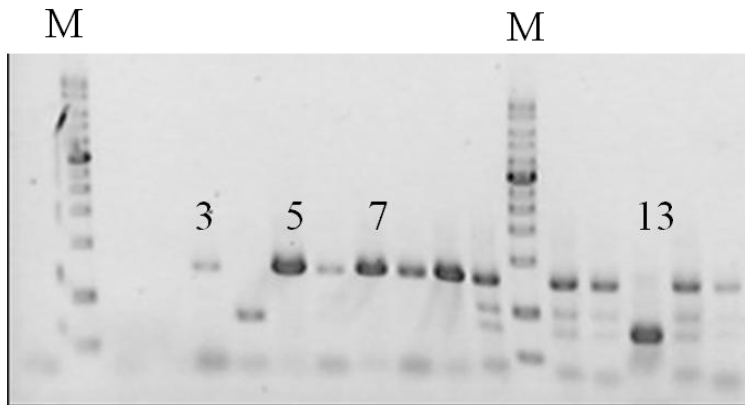
2. Photoreceptor-B-His x6 處理菌絲結果

因為香菇中藍光受器 LePHRA 與 LePHRB 被推測能刺激其黑色素形成相關酵素酪胺酸酶的生成，本研究推測是由於光照後 LePHRB 產生而引發黑色素生成，於是設計此實驗將本研究純化之 Photoreceptor-B-His x6 加入菌絲中觀察變化，但結果顯示光照與黑暗處理的菌絲皆未有變化，原因可能為 1) 菌絲細胞壁使蛋白質無法進入細胞中產生作用 2) 蛋白質構形不正確使其未能行使功能 3) 只有 Photoreceptor-B-His x6 並不能誘發黑色素的生成，還需要其他環境因子的調整。

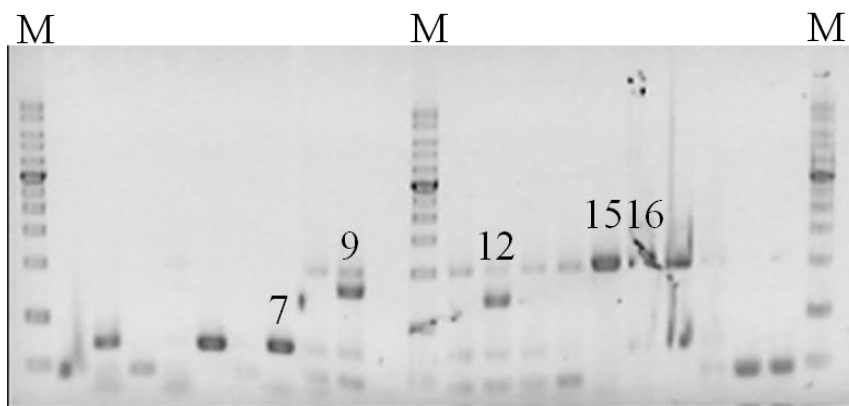
3. 金針菇中部分 WC-1 基因選殖

3.1. 第一次基因組步移結果

以 FV-cDNA-dp21-420 bp 序列進行 5'與 3' 基因組步移(genome walking, GW)，第一次 GW 結果如圖三十所示，5'GW 中編號 7 的序列與 3'GW 中編號 5 的序列皆包含 FV-cDNA-dp21-420 bp，將兩段序列使用 Bioedit 組合後得到第一次 GW 結果，如圖三十一所示。然而，在使用引子 FV-cDNA-dp21-420 bp-1stGW-check-F/R 與以金針菇基因組為模板，作為確認第一次 GW 之模擬結果是否在基因組中位於同一序列之上，結果未有產物，顯示 FV-cDNA-dp21-420 bp 序列在基因組中之分布並非如圖三十一所呈現。



(A) 3' Genome Walking



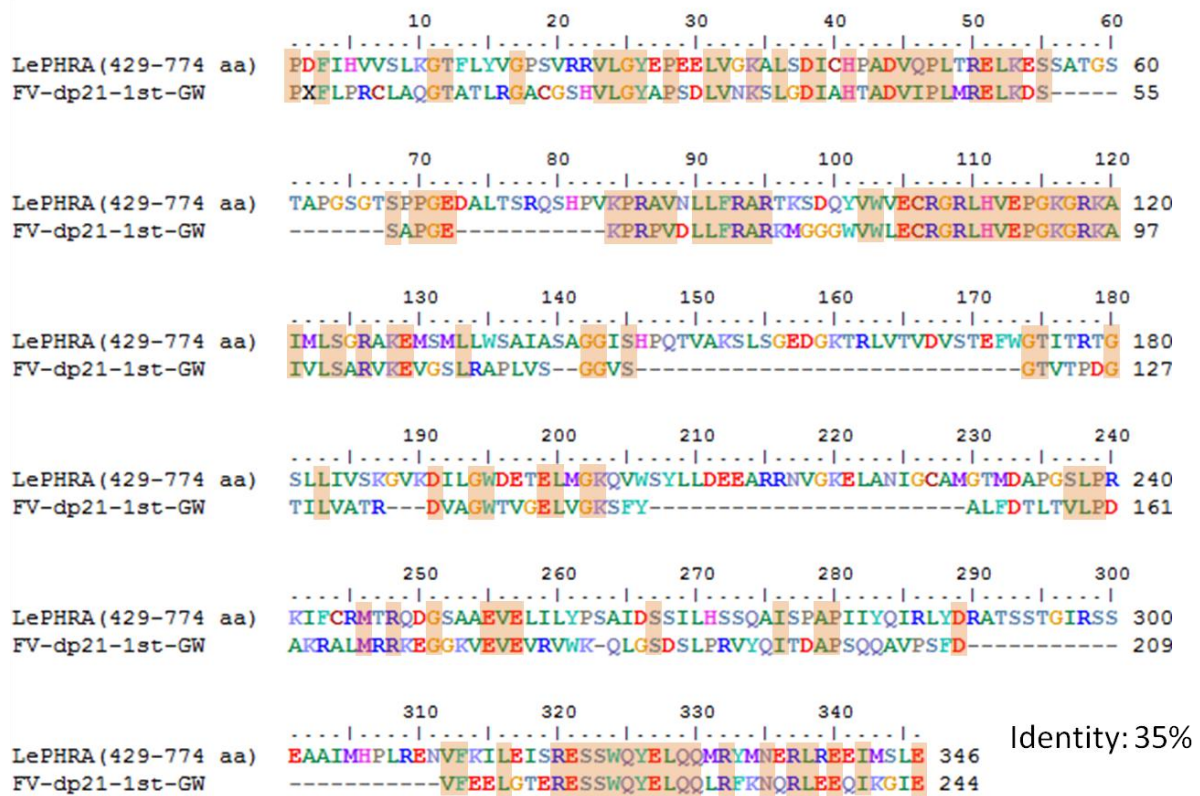
(B) 5' Genome Walking

圖三十 FV-cDNA-dp21-420 bp 片段第一次基因組步移結果

(A) 3' 第一次基因組步移結果，選擇編號 3、5、7、13 片段進行定序 (B) 5' 第一次基因組步移結果，選擇編號 7、9、12、15、16 片段進行定序

Figure 30. The first genome walking results for FV-cDNA-dp21-420 bp

(A) The first 3'GW results (B) The first 5'GW results



圖三十一 由 3'GW 之編號 5 序列與 5'GW 之編號 7 序列串接而得的 FV-cDNA-dp21-420 bp 第一次 GW 序列
Figure 31. The sequences of the first GW results by contig of 3' GW-no.5 and 5' GW-no. 7 sequences

第五章、結論

1. 使用專一性與退化性引子，以香菇、金針菇、鮑魚菇、美白菇與雞腿菇的基因組為模板之 PCR 選殖方法，成功使用 dp-F/R 引子由香菇中獲取藍光受器 PAS domain 部分序列，大小為 813 bp。
2. 由本實驗室的香菇菌株成功選殖出其藍光受器基因 *photoreceptor A* 與 *photoreceptor B*，其中 *photoreceptor A* 包含 intron，序列大小為 2,831 bp；*photoreceptor B* 的基因全長為 942 bp，在基因組中被四段 intron (239~292; 535~586; 853~939; 1,016~1063) 分開。
3. 本研究成功於大腸桿菌 BL 21 (DE3) 中以載體 pET-21a(+) 成功表現 Photoreceptor B-Hisx 6，在 150 mL 培養液中誘導生產與純化後可得濃度約 0.2 mg/mL，總量 10 mL 的目標蛋白質，SDS-PAGE 結果呈現產物大小為約 37.7 kDa，西方墨點法結果顯示 Photoreceptor B-Hisx 6 能被 anti-Hisx 6 單株抗體偵測，表示成功表達目標蛋白質。
4. 使用退化性引子 dp-2-F/dp-1-R 成功於金針菇 mRNA 反轉錄之第一股 cDNA 中擴增出 420 bp 的 PCR 產物，與已發表之 WC-1 藍光受器 BAF56991、XP_003028974、ABB77844 與 XP_001832659 分別具 28%、28%、24% 與 31% 相同度。

第六章、未來工作

1. 本論文設計之引子可繼續使用於其它菇類或真菌的藍光受器基因選殖。選殖策略上，雖然以基因組為模板時，準備模板與 PCR 的方法較為簡易，但卻有獲取產物過多而不易選殖到目標片段的缺點。本研究建議使用 mRNA 反轉錄之第一股 cDNA 作為模板，獲取目標片段的機率較高，但在萃取 RNA 的步驟須注意保持全 RNA 的完整。
2. 為了獲取未含 intron 之 *photoreceptor A* 全長，可以使用重疊 PCR (overlap PCR) 去掉 intron 以將 exon 序列串接而得，或是由本論文採取的傳統 RNA 萃取法改為使用 mRNA extraction kit 以保持 RNA 的完整，加上高效率反轉錄酶，可能較能獲取完整無 intron 的全長。
3. 進行 FV-cDNA-dp21-420 bp 的 3' 與 5' rapid amplification of cDNA ends (RACE)，以獲取金針菇的 WC-1 藍光受器基因全長。
4. 進行 FV-cDNA-dp21-420 bp 的 3' 與 5' 基因組步移，以獲取金針菇的 WC-1 藍光受器基因於基因組中 intron 與 exon 的分布，並分析 3' 啟動子、3' untranslated region (UTR) 及 5' UTR。
5. 若能成功選殖金針菇中 WC-1 藍光受器基因全長，為了分析其基因表現與光照之關聯性，可參考 Sano 等研究人員以半定量 RT-PCR 偵測光照與黑暗環境下此基因表現量的方法。

第七章、參考文獻

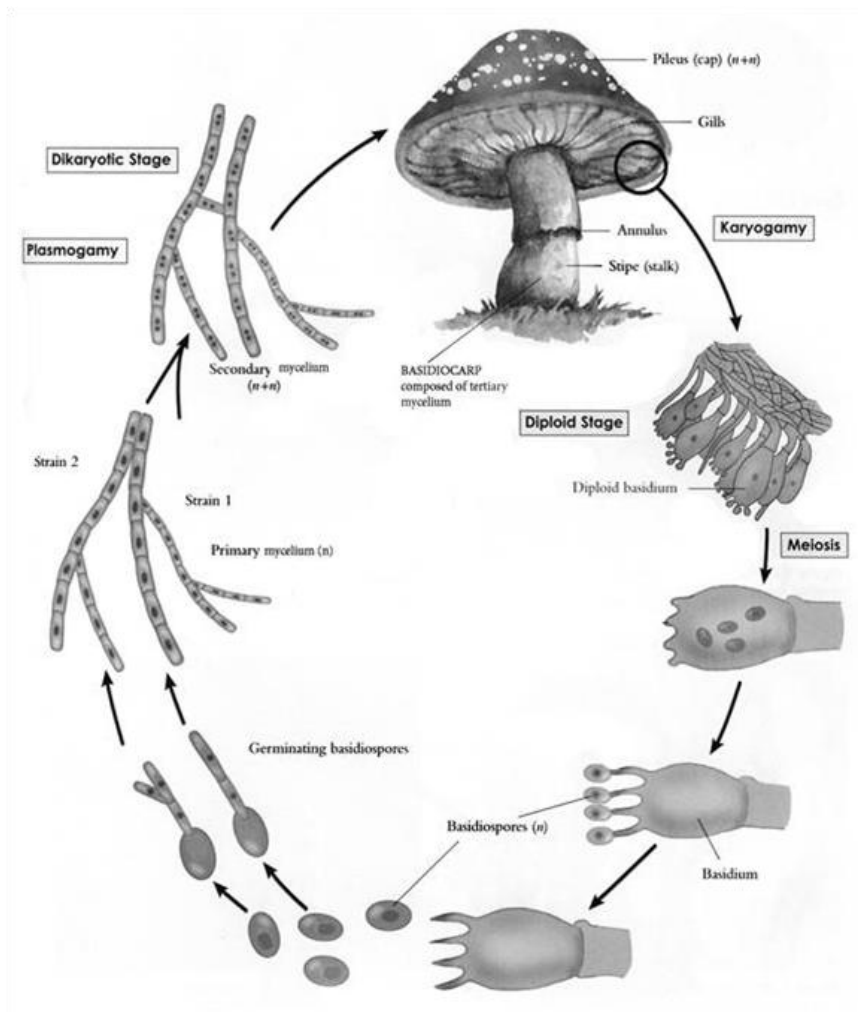
1. **Awadh, A., R. Mothana, A. Lesnau, H. Pilgrim, and U. Lindequist.** 2003. Antiviral activity of extracts and compounds from *Inonotus hispidus*. *Fitotherapia* **74**: 483-5.
2. **Ballario, P., P. Vittorioso, A. Magrelli, C. Talora, A. Cabibbo, and G. Macino.** 1996. White collar-1, a central regulator of blue light responses in *Neurospora*, is a zinc finger protein. *The EMBO Journal* **15**: 1650-1657.
3. **Bender, S., C.N. Dumitrache-Anghel, J. Backhaus, G. Christie, R.F. Cross, G.T. Lonergan, and W.L. Baker.** 2003. A Case for Caution in Assessing the Antibiotic Activity of Extracts of Culinary-Medicinal Shiitake Mushroom [*Lentinus edodes* (Berk.) Singer] (Agaricomycetidae). *Int. J. Med. Mushrooms* **5**: 31-5.
4. **Bieszke, J.A., L. Li, and K.A. Borkovich.** 2007. The fungal opsin gene nop-1 is negatively-regulated by a component of the blue light sensing pathway and influences conidiation-specific gene expression in *Neurospora crassa*. *Curr. Genet.* **52**: 149-57.
5. **Bisen, P., R. Baghel, B. Sanodiya, G. Thakur, and G. Prasad.** 2010. *Lentinus edodes*: a macrofungus with pharmacological activities. *Curr. Med. Chem.* **17**: 2419-2430.
6. **Bobek, P. and Galbavy.** 1999. Hypocholesterolemic and antiatherogenic effect of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) in rabbits. *Nahrung* **43**: 339-342.
7. **Bobek, P. and S. Galbavy.** 2001. Effect of pleuran (beta-glucan from *Pleurotus ostreatus*) on the antioxidant status of the organism and on dimethylhydrazine-induced precancerous lesions in rat colon. *Br. J. Biomed. Sci.* **58**: 164-8.
8. **Brandt, C.R. and F. Piraino.** 2000. Mushroom antivirals. *Recent Res. Dev. Antimicrob. Agents Chemother.* **4**: 11-26.
9. **Chen, C.H., B.S. Demay, A.S. Gladfelter, J.C. Dunlap, and J.J. Loros.** 2010. Physical interaction between VIVID and white collar complex regulates photoadaptation in *Neurospora*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 16715-16720.
10. **Cheng, P., Y. Yang, K.H. Gardner, and Y. Liu.** 2002. PAS domain-mediated WC-1/WC-2 interaction is essential for maintaining the steady-state level of WC-1 and the function of both proteins in circadian clock and light responses of *Neurospora*. *Mol. Cell. Biol.* **22**: 517-24.
11. **Chihara, G., Y. Maeda, J. Hamuro, T. Sasaki, and F. Fukuoka.** 1969. Inhibition of mouse sarcoma 180 by polysaccharides from *Lentinus edodes* (Berk.) sing. *Nature* **222**: 687-8.
12. **Combs, G.F. and W.P. Gray.** 1998. Chemopreventive agents selenium. *Pharmacol. Ther.* **79**: 179-192.
13. **Corrochano, L.M.** 2007. Fungal photoreceptors: sensory molecules for fungal development and behaviour. *Photochem. Photobiol. Sci.* **6**: 725-736.
14. **Crosson, S., S. Rajagopal, and K. Moffat.** 2003. The LOV domain family: photoresponsive signaling modules coupled to diverse output domains. *Biochemistry (Mosc).* **42**: 2-10.
15. Darwin, C., ed. *The power of movement in plants.* 1881.
16. **Ding, Y., S.V. Seow, C.H. Huang, L.M. Liew, Y.C. Lim, I.C. Kuo, and K.Y.**

- Chua.** 2009. Coadministration of the fungal immunomodulatory protein FIP-Fve and a tumour-associated antigen enhanced antitumour immunity. *Immunology* **128**: e881-e894.
17. **Durand, R. and R. Jacques.** 1982. Action spectra for fruiting of the mushroom *Coprinus congregatus*. *Arch. Microbiol.* **132**: 131-134.
 18. **El-Mekrawy, S., M.R. Meselhy, N. Nakamura, Y. Tezuka, M. Hattori, N. Kakiuchi, K. Shimotohno, T. Kawahata, and T. Otake.** 1998. Anti-HIV-1 and anti-HIV-1-protease substances from *Ganoderma lucidum*. *Phytochemistry* **49**: 1651-7.
 19. **Froehlich, A.C., B. Noh, R.D. Vierstra, J. Loros, and J.C. Dunlap.** 2005. Genetic and molecular analysis of phytochromes from the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Eukaryot. Cell* **4**: 2140-52.
 20. **Gao, Y., J. Lan, X. Dai, J. Ye, and S. Zhou.** 2004. A Phase I/II Study of Ling Zhi Mushroom *Ganoderma lucidum* (W. Curt.: Fr.) Lloyd (Aphyllphoromycetidae) Extract in Patients with Type II Diabetes Mellitus. *Int. J. Med. Mushrooms* **6**: 207-14.
 21. **Hawksworth, D.L.** 2001. Mushrooms: the extent of the unexplored potential. *Int. J. Med. Mushrooms* **3**: 333-7.
 22. Hobbs, C., ed. *Medicinal Mushrooms.* . 1995, Santa Cruz: Botanica Press.
 23. **Hunt, S.M., S. Thompson, M. Elvin, and C. Heintzen.** 2010. VIVID interacts with the WHITE COLLAR complex and FREQUENCY-interacting RNA helicase to alter light and clock responses in *Neurospora*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**: 16709-16714.
 24. **Jose, N., T. Ajith, and K.K. Janardhanan.** 2002. Antioxidant, Anti-inflammatory, and Antitumor Activities of Culinary-Medicinal Mushroom *Pleurotus pufmonanus* (Fr.) Quel. (Agaricomycetidae). *Int. J. Med. Mushrooms* **4**: 329-35.
 25. **Kamada, T.** 2002. Molecular genetics of sexual development in the mushroom *Coprinus cinereus*. *Bioessays* **24**: 449-459.
 26. **Kamada, T., R. Kurita, and T. Takemaru.** 1978. Effects of light on basidiocarp maturation in *Coprinus macrorhizus*. *Plant Cell Physiol.* **19**: 263-275.
 27. **Kamada, T., H. Sano, T. Nakazawa, and K. Nakahori.** 2010. Regulation of fruiting body photomorphogenesis in *Coprinopsis cinerea*. *Fungal Genet. Biol.* **47**: 917-921.
 28. **Kohda, H., W. Tokumoto, K. Sakamoto, M. Fujii, Y. Hirai, K. Yamasaki, Y. Komoda, H. Nakamura, S. Ishihara, and M. Uchida.** 1985. The biologically active constituents of *Ganoderma lucidum* (Fr.) Karst. Histamine release-inhibitory triterpenes. *Chem. Pharm. Bull.* **33**: 1367-1374.
 29. **Komoda, Y., M. Shimizu, Y. Sonoda, and Y. Sato.** 1989. Ganoderic acid and its derivatives as cholesterol synthesis inhibitors. *Chem. Pharm. Bull.* **37**: 531-3.
 30. **Kues, U.** 2000. Life history and developmental processes in the basidiomycete *Coprinus cinereus*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**: 316-53.
 31. **Kuratani, M., K. Tanaka, K. Terashima, H. Muraguchi, T. Nakazawa, K. Nakahori, and T. Kamada.** 2010. The *dst2* gene essential for photomorphogenesis of *Coprinopsis cinerea* encodes a protein with a putative FAD-binding-4 domain. *Fungal Genet. Biol.* **47**: 152-8.
 32. **Lavi, I., D. Friesem, S. Geresh, Y. Hadar, and B. Schwartz.** 2006. An

- aqueous polysaccharide extract from the edible mushroom *Pleurotus ostreatus* induces anti-proliferative and pro-apoptotic effects on HT-29 colon cancer cells. *Cancer Lett.* **244**: 61-70.
33. **Lindequist, U., T.H.J. Niedermeyer, and W.D. Julich.** 2005. The pharmacological potential of mushrooms. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* **2**: 285-300.
 34. **Liu, F., V. Ooi, and S. Chang.** 1997. Free radical scavenging activities of mushroom polysaccharide extracts. *Life Sci.* **60**: 763-771.
 35. **Lu, Y.K., K.H. Sun, and W.C. Shen.** 2005. Blue light negatively regulates the sexual filamentation via the Cwc1 and Cwc2 proteins in *Cryptococcus neoformans*. *Mol. Microbiol.* **56**: 480-91.
 36. **Manzi, P., L. Gambelli, S. Marconi, V. Vivanti, and L. Pizzoferrato.** 1999. Nutrients in edible mushrooms: an inter-species comparative study. *Food Chem.* **65**: 477-482.
 37. **Martinez, D., J. Challacombe, I. Morgenstern, D. Hibbett, M. Schmoll, C.P. Kubicek, P. Ferreira, E.J. Ruiz-Duenas, A.T. Martinez, P. Kersten, K.E. Hammel, A. Vanden Wymelenberg, J. Gaskell, E. Lindquist, G. Sabat, S.S. Bondurant, L.F. Larrondo, P. Canessa, R. Vicuna, J. Yadav, H. Doddapaneni, V. Subramanian, A.G. Pisabarro, J.L. Lavin, J.A. Oguiza, E. Master, B. Henrissat, P.M. Coutinho, P. Harris, J.K. Magnuson, S.E. Baker, K. Bruno, W. Kenealy, P.J. Hoegger, U. Kues, P. Ramaiya, S. Lucas, A. Salamov, H. Shapiro, H. Tu, C.L. Chee, M. Misra, G. Xie, S. Teter, D. Yaver, T. James, M. Mokrejs, M. Pospisek, I.V. Grigoriev, T. Brettin, D. Rokhsar, R. Berka, and D. Cullen.** 2009. Genome, transcriptome, and secretome analysis of wood decay fungus *Postia placenta* supports unique mechanisms of lignocellulose conversion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**: 1954-9.
 38. **Mentel, R., D. Meinsen, H. Pilgrim, B. Herrmann, and U. Lindequist.** 1994. In vitro antiviral effect of extracts of *Kuehneromyces mutabilis* on influenza virus. *Pharmazie* **49**: 859-860.
 39. **Mizuno, T.** 1999. The extraction and development of antitumor-active polysaccharides from medicinal mushrooms in Japan. *Int. J. Med. Mushrooms* **1**: 9-29.
 40. **Molitoris, H.P.** 1994. Mushrooms in medicine. *Folia Microbiol. (Praha).* **39**: 91-98.
 41. **Mooney, J. and L. Yager.** 1990. Light is required for conidiation in *Aspergillus nidulans*. *Genes Dev.* **4**: 1473-1482.
 42. **Mothana, R.A.A., R. Jansen, W.D. Julich, and U. Lindequist.** 2000. Ganomycins A and B, new antimicrobial farnesyl hydroquinones from the basidiomycete *Ganoderma pfeifferi*. *J. Nat. Prod.* **63**: 416-418.
 43. **Purschwitz, J., S. Muller, C. Kastner, and R. Fischer.** 2006. Seeing the rainbow: light sensing in fungi. *Curr. Opin. Microbiol.* **9**: 566-71.
 44. **Rao, P. and D. Niederpruem.** 1969. Carbohydrate metabolism during morphogenesis of *Coprinus lagopus* (sensu Buller). *J. Bacteriol.* **100**: 1222-1228.
 45. **Reshetnikov, S.V. and K.K. Tan.** 2001. Higher Basidiomycota as a Source of Antitumor and Immunostimulating Polysaccharides (Review). *Int. J. Med. Mushrooms* **3**: 361-94.
 46. **Sabo, A., N. Stilinovic, S. Vukmirovic, Z. Bukumiric, I. Capo, and V.**

- Jakovljevic.** 2010. Pharmacodynamic action of a commercial preparation of the mushroom *Coprinus comatus* in rats. *Abdom. Imaging* **24**: 1532-7.
47. **Sano, H., S. Kaneko, Y. Sakamoto, T. Sato, and K. Shishido.** 2009. The basidiomycetous mushroom *Lentinula edodes* white collar-2 homolog PHRB, a partner of putative blue-light photoreceptor PHRA, binds to a specific site in the promoter region of the *L. edodes* tyrosinase gene. *Fungal Genet. Biol.* **46**: 333-41.
48. **Sano, H., T. Narikiyo, S. Kaneko, T. Yamazaki, and K. Shishido.** 2007. Sequence analysis and expression of a blue-light photoreceptor gene, *Le.phrA* from the basidiomycetous mushroom *Lentinula edodes*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **71**: 2206-13.
49. **Smania, A., F. Monache, E. Smania, and R. Cuneo.** 1999. Antibacterial activity of steroidal compounds isolated from *Ganoderma applanatum* (Pers.) Pat.(Aphyllophoromycetideae) fruit body. *Int. J. Med. Mushrooms* **1**: 325-330.
50. **Smania, E., F. Delle Monache, and A. Smania.** 2003. Antifungal activity of sterols and triterpenes isolated from *Ganoderma annulare*. *Fitoterapia* **74**: 375-377.
51. **Starostzik, C. and W. Marwan.** 1995. A photoreceptor with characteristics of phytochrome triggers sporulation in the true slime mould *Physarum polycephalum*. *FEBS Lett.* **370**: 146-8.
52. **Steinbrenner, H., E. Bilgic, L. Alili, H. Sies, and P. Brenneisen.** 2006. Selenoprotein P protects endothelial cells from oxidative damage by stimulation of glutathione peroxidase expression and activity. *Free Radic. Res.* **40**: 936-43.
53. **Tasaka, K., M. Mio, K. Izushi, M. Akagi, and T. Makino.** 1988. Anti-allergic constituents in the culture medium of *Ganoderma lucidum*.(II) The inhibitory effect of cyclooctasulfur on histamine release. *Inflamm. Res.* **23**: 157-160.
54. **Taylor, B. and I. Zhulin.** 1999. PAS domains: internal sensors of oxygen, redox potential, and light. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63**: 479-506.
55. **Terashima, K., K. Yuki, H. Muraguchi, M. Akiyama, and T. Kamada.** 2005. The *dst1* gene involved in mushroom photomorphogenesis of *Coprinus cinereus* encodes a putative photoreceptor for blue light. *Genetics* **171**: 101-8.
56. **Wang, H., J. Gao, and T.B. Ng.** 2000. A new lectin with highly potent antihepatoma and antisarcoma activities from the oyster mushroom *Pleurotus ostreatus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **275**: 810-6.
57. **Wasser, S.P., E. Nevo, D. Sokolov, S. Reshetnikov, and M. Timor-Tismenetsky.** 2000. Dietary supplements from medicinal mushrooms: diversity of types and variety of regulations. *Int. J. Med. Mushrooms* **2**: 1-19.
58. **Wasser, S.P. and A.L. Weis.** 1999. Medicinal properties of substances occurring in higher Basidiomycetes mushrooms: current perspectives. *Int. J. Med. Mushrooms* **1**: 31-62.
59. **Zjawiony, J.K.** 2004. Biologically Active Compounds from Aphyllophorales (Polypore) Fungi. *J. Nat. Prod.* **67**: 300-310.
60. **范嫻蕪.** 2007. 以甘油醛-3-磷酸脫氫酶基因啟動子研究美白菇轉形系統。國立台灣大學微生物與生化學研究所碩士論文。

附錄



附圖一 一般擔子菌的生活史

Figure S1. Life cycle of typical basidiomycetes.

圖片來源: <http://kentsimmons.uwinnipeg.ca/16cm05/16labman05/lb2pg24.htm>



(A)



(B)



(C)



(D)

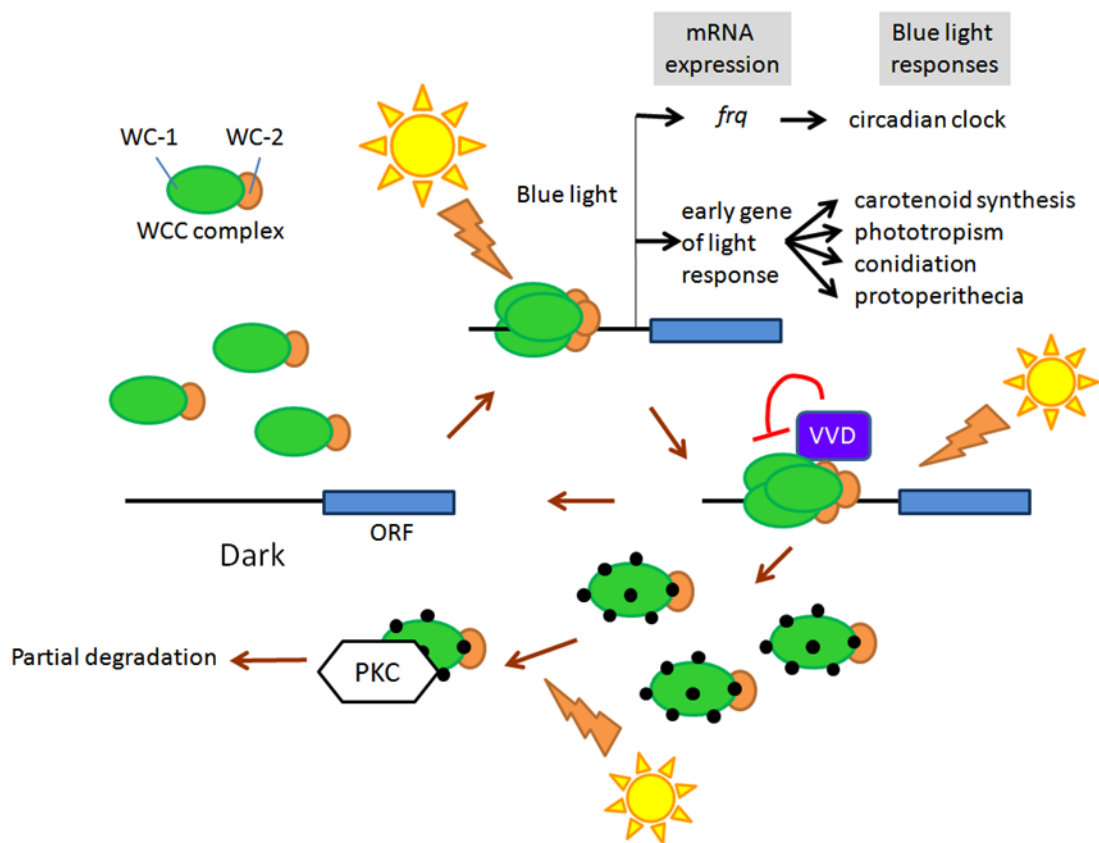


(E)

附圖二 市售的(A)香菇、(B)金針菇、(C)鮑魚菇、(D)美白菇、(E)雞腿菇

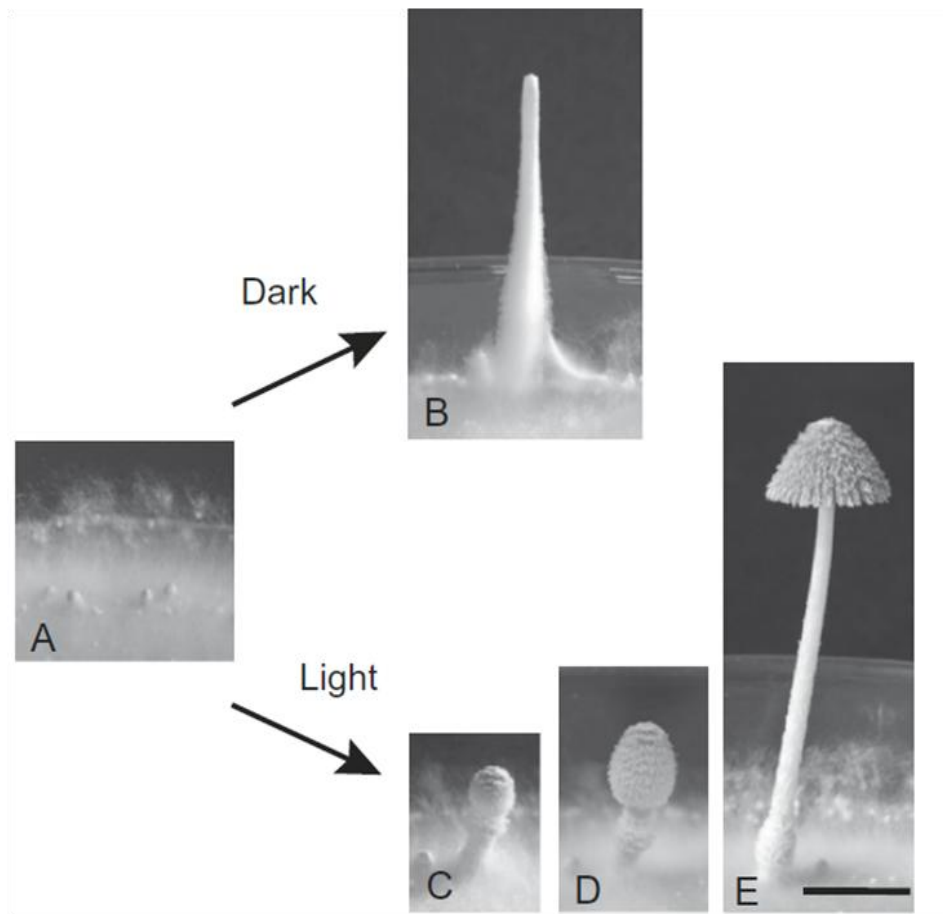
Figure S2. The fruiting body of *L. edodes*, *F. velutipes*, *P. ostreatus*, *H. marmoreus* variant, *C. comatus*.

圖片來源：(E) <http://dafeng55.blog.163.com/blog/static/1890377200811065926711/>



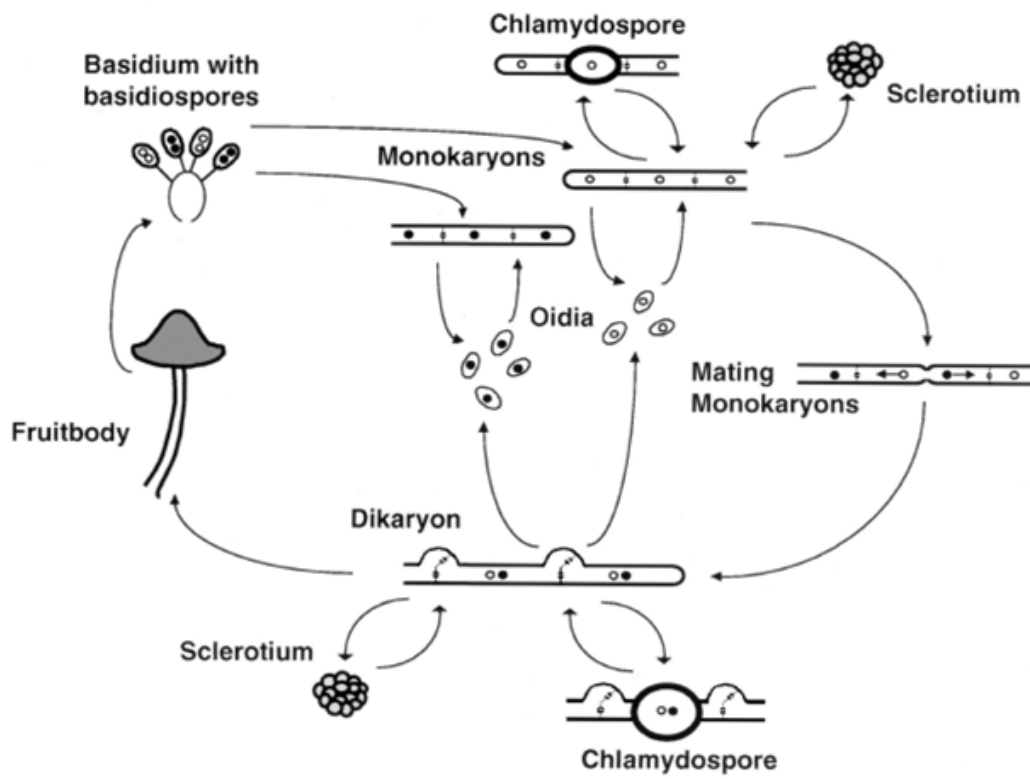
附圖三 WC 複合體影響光反應基因表現的作用機制示意圖(9, 13, 23)

Figure S3. This model shows the mechanism of the WC complex and VVD regulating the expressions of light-response genes. The WC complex does not bind to the upstream of the light-response genes in the dark. After the light exposure, the interaction of the FAD chromophore and WC-1 causes the formation of a flavin-cysteinyl adduct and causes the conformational change of WC-1. This change leads to the aggregation of WC complex, and the aggregated WC complex binds to the promoter of light-response genes and activates these genes expression. After the extended illumination, VVD binding to the WC complex and the phosphorylated WC-1 lead to the exclusion of the WC complex from the promoter and stop the gene expression. The excluded WC complex may interact with the protein kinase C (PKC) and is partially degraded. After a period in the dark, the remained and the new produced WC complex is waiting for photoactivation again. However, there are still many unknown regulations that need to be explored.



附圖四 灰蓋鬼傘子實體的不同形態(27)

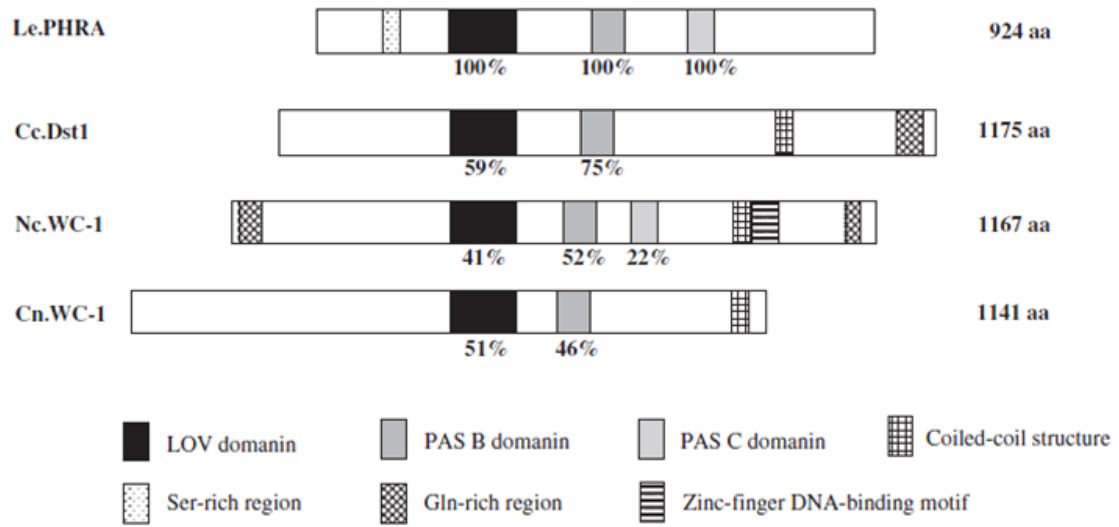
Figure S4. Morphology of *C. cinereus* . A: The mycelia and primordia. B: The dark stipe . C-E: The Mature fruiting bodies.



附圖五 灰蓋鬼傘之生活史(30)

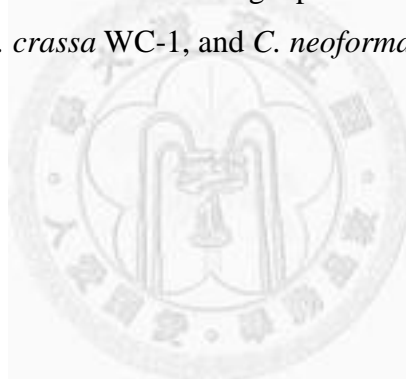
Figure S5. Life cycles of *C. cinerea*

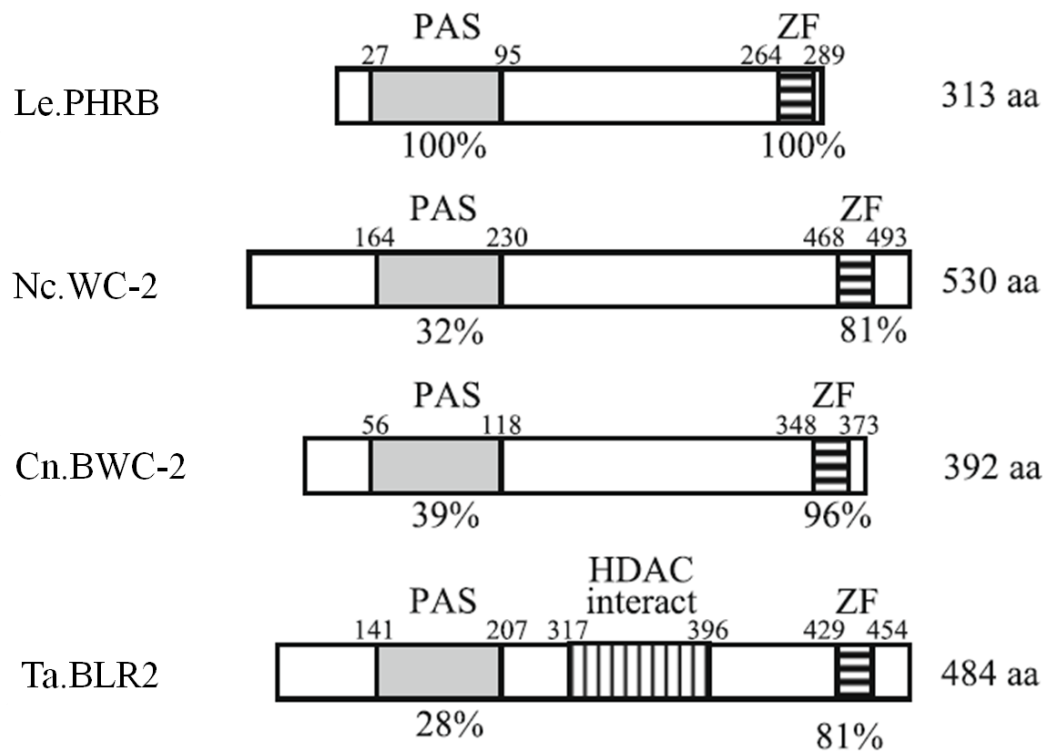




附圖六 真菌中具 LOV domain 之藍光受器的比較(48)

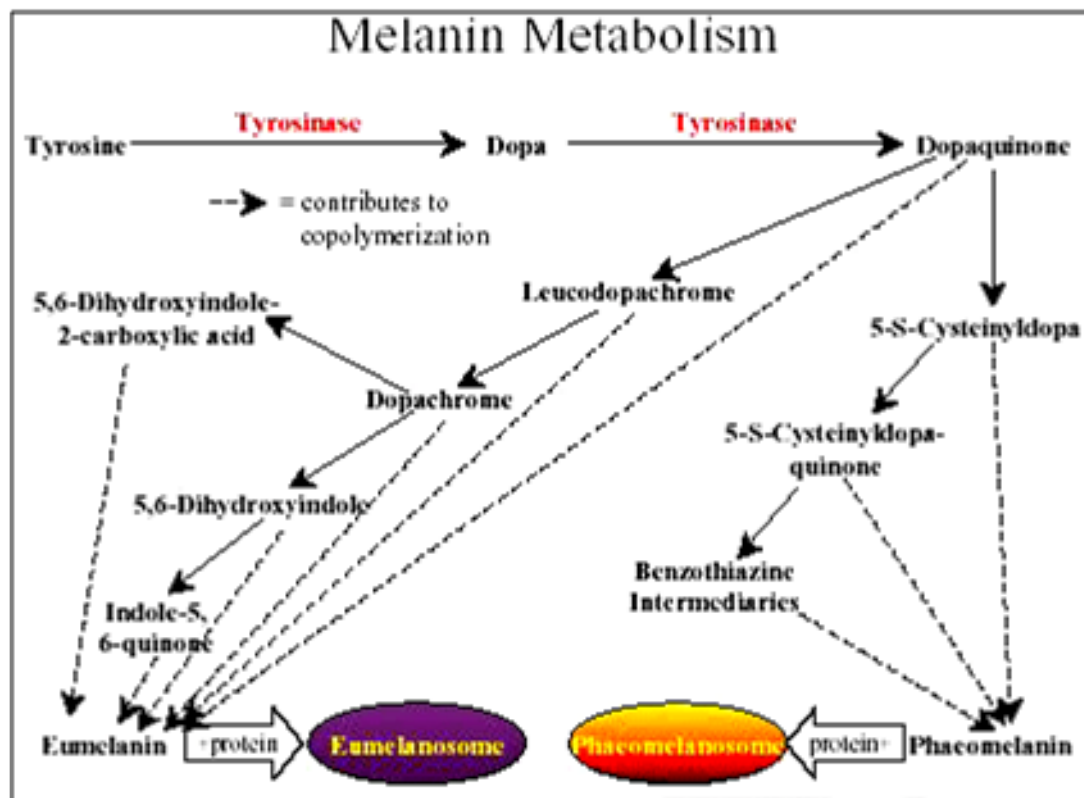
Figure S6. Schematic representation of the fungal photoreceptors families of *L. edode* PHRA, *C.cinereus* Dst1, *N. crassa* WC-1, and *C. neoformans* WC-1.





附圖七 真菌中 WC-2 同源之藍光受器的比較(47)

Figure S7. Schematic representation of *L. edodes* PHRB, *N. crassa* WC-2, *C. neoformans* BWC-2, and *T. atroviride* BLR2.



附圖八 黑色素形成機制

Figure S8. Melanin metabolism.

圖片來源: <http://www.consultdrminas.com/index.php?cnt=3&sub=23>

附表一 真菌感光系統(43)

Table S1. The fungal light-sensing systems

System	Kinds of photoreceptor	Chromophore	Species
Blue-light sensing system	Phototropin	Flavin	<u>Ascomycetes</u> <i>A. nidulans</i> , <i>N. crassa</i> , <i>Trichoderma atroviride</i> , <i>Tuber borchii</i> <u>Zygomycetes</u> <i>Mucor circinelloides</i> , <i>P. blakesleeanus</i> <u>Basidiomycetes</u> <i>Coprinopsis cinerea</i> , <i>Cryptococcus neoformans</i> , <i>L. edodes</i>
	Cryptochrome	Flavin or pterin	<u>Ascomycetes</u> <i>Gibberella zeae</i> , <i>N. crassa</i> , <i>Sordaria macrospora</i>
Red-light sensing system	Phytochrome	Tetrapyrrole (bilin)	<u>Ascomycetes</u> <i>A. nidulans</i> , <i>A. fumigates</i> , <i>Botryotinia fuckeliana</i> , <i>Cochliobolus heterotrophus</i> , <i>Fusarium graminearum</i> , <i>Fusarium verticillioides</i> , <i>N. crassa</i> , <i>P. blakesleeanus</i> <u>Basidiomycetes</u> <i>C. neoformans</i> , <i>Ustilago maydis</i>
Opsin-system	Opsin	Retinal	<i>N. crassa</i> <i>C. neoformans</i>

附表二 已發表之擔子菌 WC-1 同源藍光受器

Table S2. The basidiomycetous WC-1 homolog blue-light photoreceptors.

Species	Gene name	Accession no.	Protein name	Accession no.	Reference
<i>L. edodes</i>	<i>LephrA</i>	AB279630	LePHRA	BAF56991	(48)
	<i>LephrB</i>	AB445463	LePHRB	BAH57971	(47)
<i>C. cinereus</i>	<i>dst1</i>	AB195817	Dst1	BAD99145	(55)
	<i>dst2</i>	AB449111	Dst2	BAI67190	(31)
<i>P. placenta</i>	<i>Pp.wc-1</i>	XM_002469772	Pp.WC-1	XP_002469817	(37)
<i>C. neoformans</i>	<i>CWC1</i>	AY660969	Cn.WC-1	AAT73612	(35)
	<i>CWC2</i>	-	CWC2	-	(35)