

Studies on DNA Authentication of Cordyceps spp. and Their Physicochemical Properties Studies

張鴻泰、李世傑

E-mail: 9511704@mail.dyu.edu.tw

ABSTRACT

Cordyceps, one of the well-known expensive and tradition Chinese medicine, consists of dried fungus *Cordyceps sinensis* (Berk) Sacc. growing on the larva of the caterpillar. The parasitic complex of the fungus and the caterpillar which has anti-tumor active and significant effects on the immune system. Recently, due to an increased demand for these medical fungi, the isolation of the fungi from the environment has been insufficient, and so other species of Cordyceps or artificially cultured mycelia have been used to substitute for wild type. There are more than ten related species that carry the same name on the commercial market. Since the value of each may differ by more than 100-fold, the authentication of these fungal drugs is essential to secure their efficacy. However, the identification of the origin of a particular species, especially of its bioproducts on the marker, is difficult. Fungal rDNA has high conserved, and because of the relation that is evolved, there will be little differences on its rDNA, will utilize these differences to phylogenetic analyses that classify the fungi. Pairs of primer were used in this experiment to amplified the 18S ribosomal DNA and Internal Transcribed Spacer (ITS) regions for four Cordyceps spp. The comparison studies of 18S rDNA and ITS ' s DNA sequences from these four ordyceps spp. and the sequences obtained from NCBI gene bank were performed the test the identifies and the origin of these four Cordycpes spp. The results showed CS4 is *Cordyceps sinensis*, BCRC32219 and CM1117 are *Cordyceps militaris*. The CM1, originally claimed to be *Cordycpes militaris*, is possible the contamination from *Saccharomycete*. The antioxidant activity profiles for these four Cordyceps spp. provided an additional method to distinguish the different form Cordyceps spp. of different origin.

Keywords : Cordyceps spp. ; DNA authentication ; ribosomal internal transcribed spacer ; antioxidant

Table of Contents

目錄	封面	內頁	簽名頁	授權書	iii	中文摘要	iv	英文摘要	v	誌謝	vi	目錄	vii	圖目錄	xi	表目錄	xiii	第一章	緒論	1	第二章	文獻回顧	2	2.1	蟲草屬的研究簡史	2	2.2	蟲草屬的分類地位	2	2.3	蟲草屬的型態特徵	2	2.4	蟲草屬的寄主	3	2.5	蟲草的形成	4	2.6	蟲草屬的活性成	5	2.6.1	蟲草素 (Cordycepin)	5	2.6.2	腺 [adenosine]	5	2.6.3	多醣 (polysaccharides)	6	2.6.4	麥角甾醇 (Ergosterol)	7	2.6.5	超氧化物歧化 [SOD]	7	2.7	蟲草屬的藥理特性	8	2.7.1	抗腫瘤作用	8	2.7.2	增強免疫系統	8	2.7.3	抗氧化與清除自由基	9	2.7.4	對心血管系統的影響	9	2.7.5	保肝作用	9	2.8	蟲草的應用	10	2.9	蟲草屬分子生物鑑定系統的重要性	11	2.10	研究動機	13	第三章	材料與分法	17	3.1	藥品與材料	17	3.2	儀器設備	18	3.3	利用18S核糖體DNA與ITS核糖體DNA基因序列鑑別蟲草屬	19	3.3.1	實驗菌株	19	3.3.2	菌種培養基	20	3.3.3	菌種保存	20	3.3.4	菌種活化	20	3.3.5	DNA萃取	20	3.3.6	蟲草屬核糖體基因之選殖與定序	21	3.4	蟲草屬菌株之發酵培養與分析檢定	22	3.4.1	樣品的處理	22	3.4.2	樣品萃取方式	23	3.4.3	高效率液相層析分析	23	3.5	蟲草屬菌絲體抗氧化活性之測定	23	3.5.1	樣品的處理	24	3.5.2	樣品萃取方式	24	3.5.3	DPPH 自由基清除能力測定	24	3.5.4	亞鐵離子螯合能力之測定	25	第四章	結果與討論	26	4.1	四種蟲草屬菌株培養生長情形	26	4.2	真菌分子鑑定分類方式	26	4.2.1	以NS1/FS2引子組對蟲草屬DNA進行PCR反應，擴增核糖體18S rDNA 基因的結果	27	4.2.2	以ITS1/ITS4 引子組對蟲草屬DNA進行 PCR反應，擴增核糖體ITS1、5.8S、ITS2 rDNA基因結果	27	4.2.3	蟲草屬的18S核糖體 DNA 基因定序結果	28	4.2.4	蟲草屬的ITS核糖體 DNA 基因定序結果	28	4.3	蟲草屬菌株之發酵培養與分析檢定結果與討論	29	4.4	蟲草屬菌絲體抗氧化活性之結果與討論	31	4.4.1	清除DPPH 自由基之能力	31	4.4.2	亞鐵離子螯合效果	31	第五章	結論	33	第六章	參考文獻	61	附錄	69	附錄一	腺 [adenosine] 之標準曲線	69	附錄二	蟲草素標準品之標準曲線	70	圖目錄	頁次	圖1	蟲草素結構	34	圖2	腺 [adenosine] 之化學式	35	圖3	草屬菌株在 24 下以相同條件培養，分別在5天、10天、15天、20天所測得重量	36	圖4	Cordyceps spp. 之 Gemonic DNA	37	圖5	引子位置及其延伸方向示意圖	38	圖6	Cordyceps spp. 之 18S 核糖體基因	39	圖7	Cordyceps spp. 之 ITS1、5.8S、ITS2核糖體基因	40	圖8	蟲草屬菌株在引子組NS1/FS2間部分18S核糖體RNA 基因序列的排列結果	41	圖9	CS4、CM1117、BCRC32219、CM1以引子組NS1/FS間之18S核糖體RNA 基因並以NCBI所登錄蟲草屬分類 指標進行UPGMA 統計分析所得之系統演化關係圖	45	圖10	蟲草屬菌株在引子組ITS1/ITS4間部分ITS1、5.8S、ITS2核糖體RNA基因序列的排列結果	46	圖11	CS4、CM1117、BCRC32219、CM1以引子組ITS1/ITS4 間之核糖體RNA 基因並以NCBI所登錄蟲草屬分類指 標進行UPGMA 統計分析所得之系統演化關係圖	47	圖12	HPLC分析圖，為腺 [adenosine]	48	圖13	HPLC分析圖，為蟲草素標準品	49	圖14	HPLC分析圖，為CM1117萃取液	50	圖15	HPLC分析圖，為CM1萃取液	51	圖16	比較不同蟲草萃取物及BHT對DPPH自由基之清除 能力	52	圖17	比較不同蟲草萃取物及EDTA對亞鐵離子螯合效應	53
----	----	----	-----	-----	-----	------	----	------	---	----	----	----	-----	-----	----	-----	------	-----	----	---	-----	------	---	-----	----------	---	-----	----------	---	-----	----------	---	-----	--------	---	-----	-------	---	-----	---------	---	-------	--------------------	---	-------	---------------	---	-------	------------------------	---	-------	---------------------	---	-------	--------------	---	-----	----------	---	-------	-------	---	-------	--------	---	-------	-----------	---	-------	-----------	---	-------	------	---	-----	-------	----	-----	-----------------	----	------	------	----	-----	-------	----	-----	-------	----	-----	------	----	-----	--------------------------------	----	-------	------	----	-------	-------	----	-------	------	----	-------	------	----	-------	-------	----	-------	----------------	----	-----	-----------------	----	-------	-------	----	-------	--------	----	-------	-----------	----	-----	----------------	----	-------	-------	----	-------	--------	----	-------	----------------	----	-------	-------------	----	-----	-------	----	-----	---------------	----	-----	------------	----	-------	---	----	-------	--	----	-------	-----------------------	----	-------	-----------------------	----	-----	----------------------	----	-----	-------------------	----	-------	---------------	----	-------	----------	----	-----	----	----	-----	------	----	----	----	-----	---------------------	----	-----	-------------	----	-----	----	----	-------	----	----	--------------------	----	----	--	----	----	------------------------------	----	----	---------------	----	----	----------------------------	----	----	--------------------------------------	----	----	--	----	----	---	----	-----	--	----	-----	--	----	-----	------------------------	----	-----	-----------------	----	-----	--------------------	----	-----	-----------------	----	-----	-----------------------------	----	-----	-------------------------	----

表目錄 頁次 表1 核醣體不同序列分類等級表 54 表2 實驗所使用之引子 55 表3 CM1118菌株之18S片段DNA序列的比較以程式 BLAST與基因庫GenBank所收錄的核酸序列比對之結果 56 表4 NCBI網站之登錄號 57 表5 CS4 菌株之ITS1-5.8S-ITS2片段DNA序列的比較以程式 BLAST與基因庫GenBank所收錄的核酸序列比對之結果 58 表6 CM1之ITS1-5.8S-ITS2片段DNA序列以程式BLAST 與基因庫GenBank所收錄的核酸序列比對之結果 59 表7 經HPLC分析，積分其四株菌面積，測得其蟲草素及腺? @度 60

REFERENCES

- 1、王國棟 (1995) 冬蟲夏草類生態、培植、應用。科學技術文獻出版社，北京。
- 2、宋振玉 (1995) 中草藥現代研究 第一卷。北京中國協和醫科大學聯合出版社。北京。
- 3、江曉路、葛蓓蕾和胡曉珂 (2002) 蛹蟲草 (*Cordyceps militaris*) 對藥物引起免疫抑制的拮抗作用。青島海洋大學學報 32 (1):46-50。
- 4、朱宏圖 (1987) 人工培養蛹蟲草研究。中藥通報12 (12):21。
- 5、匡彥德和王美英 (1989) 冬蟲夏草免疫增強作用機理的研究。上海免疫學雜誌9 (1):6-8。
- 6、沈均、陶蓉芬 (1999) 蛹蟲草治療老年性痴呆療效觀察。現代中西醫結合雜誌。8:1958-1959。
- 7、周佳賢、曾耀銘、和劉炳嵐 (2004) 蛹蟲草固態培養及探討。第九屆生化工程研討會論文集。大葉大學。彰化。
- 8、周廣麟 (2000) 蛹蟲草的液態培養 (發酵) 技術。中國食物與營養 (2):26-27。
- 9、周良楨、楊倚竹、續月明、朱慶義、馬紫亮、朱延瑞、葛孝炎 (1990) 冬蟲夏草菌絲體治療慢性乙型病毒肝炎的近期療效觀察。中國中藥雜誌, 15 (1):53-55。
- 10、李紹平、季暉、李萍、董婷霞、詹華強及李文琪 (2001) 冬蟲夏草抗腫瘤作用研究進展。中草藥雜誌32 (4):373-375。
- 11、李水清及楊豔芳 (2001) 冬蟲夏草菌發酵粉提取工藝的研究。中醫藥學刊19:406。
- 12、貢成良、吳衛東、徐承智、楊昆和陳國剛 (2002) 家蠶蛹蟲草的化學成分分析。蠶業科學 28 (2):168-172。
- 13、柴建萍、白興和謝道燕。2003。不同蛹蟲草菌株比較試驗與篩選。雲南農業科技 4:22-23。
- 14、徐文豪、薛智和馬建民 (1988) 冬蟲夏草的水溶性成分 - 核?類化合物的研究。中藥通報13 (4):34-36。
- 15、高懷安、陳世中、王麗榮、張林節及李建榮 (1987)。秦巴蛹蟲草與冬蟲夏草某些化學成分的對比研究。中藥通報12 (2):44-45。
- 16、許瑞祥 (1984) 人工培養冬蟲夏草屬之性質極其代謝物的探討。國立台灣大學農業化學研究所碩士論文，台北。
- 17、孫悅迎及張旭東 (2002) 冬蟲夏草與蛹蟲草特性分析。中國藥學報30 (2):43-44。
- 18、孫艷、官杰及王琪 (2002) 人工蛹蟲草子實驗對荷肝炎小鼠的抑癌作用及NK, IL-2提高活性的實驗研究。中國藥師雜誌11 (7):39-40。
- 19、張德玉 (2003) 培養條件對靈芝菌絲體超氧化歧化? (SOD) 生成之影響。第7-15頁。東海大學化工所碩士論文。台中。
- 20、張紅兵及趙英 (1994)。上海中醫藥雜誌冬蟲夏草研究的新進展。中草藥雜誌25 (9):488-492。
- 21、陳桂寶、羅梅初和劉寶晶 (1997) 蛹蟲草的藥理作用。中草藥28 (7):415。
- 22、陳志昇 (1998)。冬蟲夏草*Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc. 分子生物鑑定系統之研究。國立台灣大學農業化學研究所碩士論文。台北，台灣。
- 23、陳蕙英、顏國欽 (1999) 自由基、抗氧化防禦與人體健康。Nutritional Sciences Journal, 23:105-121。
- 24、曹暉、劉玉萍 (1999) DNA 分子標記技術:一種新的中藥分析方法。藥物分析雜誌, 19 (5):355-360。
- 25、管代義、陳春華、孫璐西、孫蓮玉、張秀琴、張援平、陳順志、吳佩杰、劉毅和王永 (1993)。北冬蟲夏草抗氧化作用的實驗研究。中國醫學雜誌28:473-475。
- 26、蘇慶華 (1985)。新屬植生蟲草 (*Phytocordyceps*) 型態遺傳及生化之研究。國立台灣大學農業化學研究所博士論文。台北，台灣。
- 27、鍾裕容、崔淑蓮、楊智、劉岱、楊立新及劉靜明。(1990) 蛹蟲草菌絲與冬蟲夏草鐘胺基酸、甘露醇的含量。中國中藥雜誌15 (4):39。
- 28、顧曉哲 (2003)。蟲草屬真菌核酸資料庫之建立與應用。國立成功大學生物科技研究所碩士論文。台北，台灣。
- 29、Alexopoulos, C. J., Mims, C. W. and Blackwell, M. (1996) Introductory Mycology, Wiley, New York.
- 30、Chang H.L., Chao,G.R., Chen,C.C and Mau,J.L. (2001) NonVolatile taste components of *Agaricus blazei*, *Antrodia camphorate* and *Cordyceps militaris* mycelia. Food Chemistry.74:203-207.
- 31、Dams, E., Hendriks, L., Van de Peer, Y., Neefs, J-M., Smits, G., Vandenbempt, I., and Wachter, R. D. (1988) Complication of small ribosomal subunit RNA sequences. Nucleic Acids Res. 16 (Sup.):r87-173.
- 32、Decker, E. A. and Welch, B. (1990) Role of ferritin as a lipid oxidation catalyst in muscle food. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 38:674.
- 33、Godron, M. H. (1990) . The mechanism of antioxidant action in vitro. In B. J. F. Hudson (ed), Food antioxidants (Chaper 1. pp. 1-18) . London and New York: Elsevier Applied Science.
- 34、Gutteridge, J. M.C. (1993) .Free radicals in disease process. A complication of cause and consequence. Free Radical Research Communication , 19: 141-158.
- 35、Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C., and Corss, C. E. (1992) . Free radicals, Antioxidants, and human disease:Where are we now? The Journal of Laboratory and Clinical Medicine, 119:598-620.
- 36、Hseu, R. S., Wang, H. H., Wang, H. F. and Moncalvo. J. M. (1996) . Application of PCR-amplified DNA to differentiate the *Ganoderma* isolates. J. Chinese Agric. Chem. Soc. 34:129-143.
- 37、Hubbell, H. R.,Pequignot, E. C., Willis, D. H.M Lee, C. and Suhadolink, R.J. (1985) Differentinal antiproliferative actions of 2',5' oilgotrimver core and its cordypin analogue on human tumor cells. Int. J. Cancer, 36:389-394.
- 38、Ito, Y. and Hirano. T (1997) The determination of the partial 18S ribosomal DNA sequences of *Cordyceps* species. Lett. Appl. Microbiol., 25:239-242.
- 39、Jagger, D. V., Kredich, N. M and Gorin, A.J.1961. Inhibition of Ehrlich mouse ascites tumor growth by cordycepin. Cancer Res. 21:216-220.
- 40、Kehrer, J. P. (1993) . Free radicals as mediators of tissue injury and disease . Critical Reviews in Toxicology. 23:21-48.
- 41、Kelly, J.M and Cox, R. A. (1982) The nucleotide sequence at the 3' -end of *Neurospora crassa* 18S-Rrna and studies on the interaction with 5S rRNA . Nucleic Acid Res., 10 :6733-6749.
- 42、Kiho, T., Yamane, A., Hui, Usui, S. and Ukai, S. (1996) Polysaccharide in fungi. XXXVI. Hypoglycemic activity of *Cordyceps sinensis* and its effect on glucose metabolism in mouse liver. Biol. Pharm. Bull., 19 (2) :294-296.
- 43、Kredich, N. M. 1980. Inhibition of Nucleic Acid Methylation by Cordycepin. The Journal of Biological chemisthy. 255 (15) :7380-7385.
- 44、Kuo, Y. C., Lin , C.Y., Tsai, W. J., Wu , C. L., Chen, C. F. and Shiao, M.S. 1994. Growth inhibitors against tumor cell in *Cordyceps sinensis* other than cordycepin and polysaccharides. Caner Investigation. 12:611-615.
- 45、Mark, D. B., Keller, B. J and Guarino< A. J. 1969. The Composition of the cell wall fraction of the fungus.

Cordyceps militaris. *Biophys Acta*. 183:58-64. 46、 Medlin, L., Elwood, H. J., Stickel, S. and Sogin, M. L. (1988) The characterization of enzymatically amplified eukaryotic 16S-like rRNA coding regions. *Gene*, 71 :491-499. 47、 Muller, E. and Von Arx, J A. (1973) *Pyrenomyces: Meliolales, Coronophorales, Sphaeriales*. In: *The Fungi* (Ainsworth, G. C., Sparrow, F. K. and Sussman, A. S. ed.). Academic Press, Inc., New York. 48、 Nan, J.X., Park, E.J., Yang, B. K., Song, C. H., Ko, G and Sohn, D. H. 2001. Antifibrotic effect of dextracellular biopolymer from submerged mycelial cultures of *Cordyceps militaris* on liver fibrosis induced by bile duct ligation and scission in rat. *Arch. Pharm. Res.* 24 (4) :327-332. 49、 Nikoh, N. and Fukatsu, T. (2000) . Interkingdom host jumping underground: phylogenetic analysis of entomoparasitic fungi of the genus *Cordyceps*. *Mol. Biol. Evol.* 17:629-638. 50、 Non-Volatile taste components of *Agaricus blazei*, *Antrodia camphorata* and *Cordyceps militaris* mycelia. *Food Chemistry*. 74:203-207. 51、 Shimada, K., Fujikawa, K., Yahara, K. and Nakamura, T. (1992) Antioxidative properties of xanthan on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. *J. Agric. Food Chem.* 40:945-948. 52、 Shimizu, D. (1994) *Color Inconography of Vegetable Wasps and Plant Worms*. Seibundo Shinkosha, Tokyo. 53、 Rodman, E., Farmell, D.R., Coyne, J.M., Allan, P.W., Hill, D.L., Duncan, K. L.K., Tomaszewski, J. E., Smith, A. C and Page, J. G. 1977. Toxicity of Cordycepin in Combination with the Adenosine Deaminase inhibitor 2-Deoxycoformycin in Beagle Dogs. *Toxicology and applied pharmacology*. 147:39-45. 54、 Wang, Z., He, Z., Li, S and Yuan, Q. 2005. Purification and partial characterization of Cu,Zn containing superoxide dismutase from entomogenous fungal species *Cordyceps militaris*. *Enzyme and Microbial Technology*. 5:1-8. 55、 Wang, Y.H., Ye, J., Li, C. L., Cai, S.Q., Ishizaki, M and Katada, M. 2004. An experimental study on anti-aging action of *Cordyceps* extract. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*. 29 (8) :773-6. 56、 Williamson, J. 1966. Cordycepin, an antitumor antibiotic with trypanocidal properties. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 60:8-9. 57、 White, T. J., Buuns, T., Lee, S., and Taylor, J. (1990) . Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In *PCR Protocols : A Guide to Methods and Applications*, Edited by Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J., and White, T. J. San Diego: Academic Press. 315-322. 58、 Yamaguchi, Y., Kagota, S., Nakamura, K., Shinozuka, K and Kunitomo, M. 2000. Antioxidant activity of the extracts from fruiting bodies of cultured *Cordyceps sinensis*. *Phytotherapy Research*. 14:647-649.