

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

人體腸道微生物基因庫之建立:16S rRNA 基因序列之分析及 功能多樣性評估

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC91-2314-B-039-011-

執行期間：91年08月01日至92年07月31日

執行單位：中國醫藥大學醫事技術學系

計畫主持人：梅惠卿

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 93 年 1 月 13 日

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫

成果報告
期中進度報告

人體腸道微生物基因庫之建立：16S rRNA 基因序列之分析及
功能多樣性評估

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC 91 - 2314 - B - 039 - 011 -

執行期間： 91 年 8 月 1 日至 92 年 7 月 31 日

計畫主持人：梅惠卿

共同主持人：蔡英傑

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)： 精簡報告 完整報告

執行單位：中國醫藥學院醫事技術學系

中 華 民 國 93 年 1 月 12 日

摘要

關鍵詞：腸道微生物生態系、雙列桿菌、16S rRNA、定量 PCR

由於目前腸道內的微生物資源利用有限，以及鑑於以往對腸道菌之菌落分佈以傳統培養方式獲得的結果，很難完全反映腸道內菌群分佈情形，因此希望利用分生技術建立一個腸道內微生物 DNA 之基因庫來幫助了解及加以利用。

雙列桿菌 *Bifidobacterium* 是人體腸道中重要的益菌 Probiotics，在嬰兒腸道微生物中此菌更佔有 75% 以上的比例。近來發展出的人體 16S rRNA 基因之 *Bifidobacterium* 菌屬 (genus-) 及菌種 (species-) 特異性 PCR 引子 (primers) 已可成功的偵測腸道 *Bifidobacteria* 的分佈情形。由於新生兒體內 *Bifidobacterium* 來源仍不清楚，且腸道細菌生態變化快速，有別於成人的微生物組成，因此本計劃結合 Genus- 及 Species-specific primers 與定量 PCR 方法，分別針對自然產、剖腹產、餵哺母乳及奶粉等四種組合的新生兒進行腸道菌種組成 (composition) 及生態變化 (dynamics) 的分析。首先利用厭氧培養，培養出一套標準菌株群，並以此套菌株群當作基準做為初步定量，以便做出 real-time PCR (Lightcycler of Roche) 之 standard curve，之後再分別採集不同時間點之嬰幼兒糞便檢體，一方面做厭氧培養，作為總腸道菌數之對照；另一方面，萃取出其 chromosome DNA，利用 16S rDNA-targeted genus 以及 species-specific PCR primers，進行定量 PCR，與標準菌株之 standard curve 比較，進而求出腸道菌數之絕對定量。

英文摘要

Key word : Intestinal microbial ecology , *Bifidobacterium* , 16S rRNA , Quantitative PCR

The utilization of intestinal microorganism is still limited. The conventional culture-based methods hardly reveal the actual distribution of intestinal microbiota. This project aims at construct the enteric metagenomic library to indicate the entero-environment and make use of these genetic materials.

Bifidobacteria are part of the important probiotics of the human intestines that comprise more than 75% of the total microorganisms in infant intestine. The newly developed human 16S rRNA-targeted genus- and species-specific PCR primers cover all of the species that inhabit the human gut and have been successfully used for the identification and detection of *Bifidobacteria*. The origin of *Bifidobacteria* of the infant guts is still unclear and the *Bifidobacterial* population changes in time, which is different from that of adult guts. Firstly, a series of *Bifidobacterium* standard bacteria were cultured anaerobically and the bacteria numbers were calculated. The different amounts of extracted DNA were then subjected to real-time PCR and the standard curves were prepared. The feces samples with time intervals from newborn infants were also cultured anaerobically to obtain total numbers of anaerobic bacteria. The identification and enumeration of *Bifidobacteria* by quantitative PCR using 16S rRNA gene-targeted genus- and species-specific primers were determined by comparing with the standard curves.

研究目的

複雜的腸道微生物群落(microbial community)除了幫助腸道的消化及代謝作用外，同時具有維護腸道細菌生態平衡(well-balanced intestinal microbiota)，增強免疫機能及避免病菌叢生的能力⁽¹⁾⁽²⁾。腸道益菌(Probiotics)⁽³⁾⁽⁴⁾對人體健康的觀念早在百年前即已提出，這些益菌包括 *Lactobacillus*、*Bifidobacterium* 及 *Enterobacterium* 等⁽⁵⁾，其中 *Bifidobacterium* 在成人腸道中約佔微生物含量的 3%，而在餵哺母乳及奶粉的嬰兒腸道中更分別佔有高達 91% 及 75% 的比例⁽⁶⁾，因此一般深信它對於保護人體腸道應具有相當程度的重要性。

一般來說，人腸道中 *Bifidobacterium* 菌種組成在數月，或一年內的變動並不大，相反地，嬰兒腸道中的 *Bifidobacterium* 菌種則會隨時改變，近來許多研究利用人體腸道中的 *Bifidobacterium* 菌設計出 genus-specific 及 species-specific PCR primers⁽⁷⁾⁽⁸⁾，測得成人與嬰兒腸道中的 *Bifidobacterium* 菌種種類確實不同，可是進一步針對初生嬰兒快速發展中的腸道微生物組成(composition)及變動(dynamics)的追蹤，甚至嬰兒飲食對腸道生態的影響則並無具體的文獻報告。以往對腸道微生物菌落的了解係根據傳統培養方法所獲得之結果，菌種之分類(classification)及鑑定(identification)由菌落的表現性狀(phenotypic trait)來判別，可信度不高⁽⁹⁾，且往往忽略了腸道中 85% 的難培養菌群(nonculturable bacteria)⁽¹⁰⁾⁽¹¹⁾，因此由培養方法分離出的菌種並不能代表完整的腸道微生物生態。有鑑於此，本計劃於是利用更進一步的分生技術，對腸道菌屬做一系列的分析與研究。

首先，必須先對其腸道菌分佈狀況有確切的了解，本計畫針對新生兒腸道微生物進行研究，先將自然生產，剖腹生產及餵哺母乳與人工配方奶粉等不同條件的新生兒加以分組，採集其糞便進行腸道 *Bifidobacterium* 菌種組成、定量分析及生理活性菌的偵測；在研究策略上參考 Matsuki 等人⁽⁸⁾所發表的八組 *Bifidobacterium* species-specific primers 及二組 *Bifidobacterium* 及 *Bacteroides* group-specific primers 以定量 PCR 方法建立腸道 *Bifidobacterium* 菌種的鑑定及生態動向觀察標準，之後再逐步建立起腸道菌基因庫，以利於日後利用 cloning 技術找尋新的菌株。

當我們更加了解人體腸道內微生物的生態時，則可適時的添加物質幫助特定的微生物生長，以維持腸道生態平衡及身體健康。另外，基因庫的建立亦可提供未來微生物的快速鑑別、開發新功能的酵素及新治療藥劑。

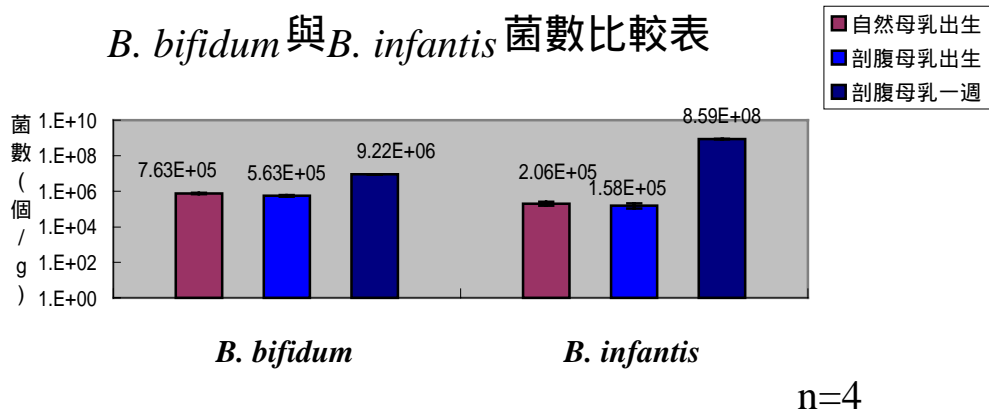
材料及方法

1. **檢體收集及處理**：檢體為糞便，分成母乳自然產、母乳剖腹、奶粉自然產三部分，又細分為出生後的初便、一週、兩週、一個月共四期。將檢體與 PBS 以 1:9 做 1/10 稀釋清洗，離心 6000rpm，15 分鐘，重複三次。儲存於 -20 。
2. **萃取 chromosome DNA**：利用 100mM Tris-HCl，40mM EDTA，pH9.0、10 % SDS、0.1mm glass beads、phenol 以及 phenol/chloroform/isoamylalcohol(25:24:1)於 Mini-BeadBeater™ 中進行研磨溶解懸浮菌液。再以 3M sodiumacetate 和 isopropanol 沉澱出 chromosome DNA，最後以 ethanol 清洗掉鹽類。回溶於 ddH₂O，儲存於 -20 。

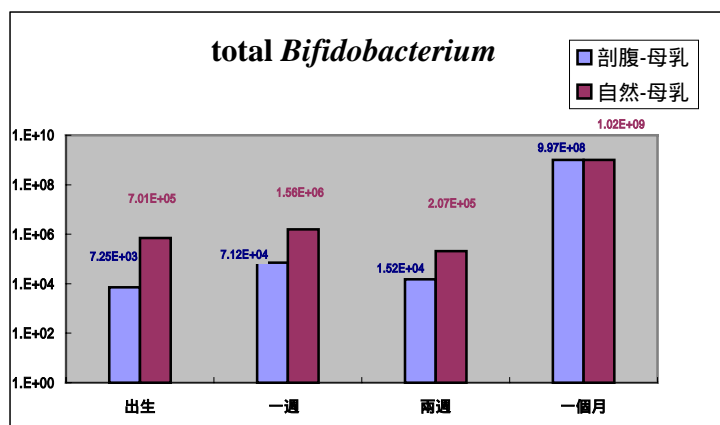
- 厭氧培養**：分為標準菌株及檢體兩方面培養。標準菌株則分別有 *Bacteroides fragilis*、*Bifidobacterium adolescentis*、*B. angulatum*、*B. bifidum*...等 9 隻標準菌株。標準菌株以 $10^4 \sim 10^7$ 序列稀釋，分別接種於 MRS 培養基中（含 cystein），三天後計數菌落。檢體則以 $1 \sim 10^3$ 序列稀釋濃度進行培養，三天後計數菌落。
- PCR**：以 10x Buffer、0.2mM dNTP、0.25mM primers、5U Taq polymerase、template DNA 以及 ddH₂O 之混合物，於 denature 94 °C ; 20s、anneal 55 °C , 20s ; extension 72 °C , 30s、35 個 cycle 條件下進行增幅反應。
- Real-Time Quantitative PCR**：利用 Roche 之 LightCycler 進行反應。將 Hot-start Taq、PCR buffer、dNTPs、SYBR Green I、10mM MgCl₂ 及 ddH₂O 之混合物，於下列條件下進行反應。pre-incubation：hot-start，94 °C denaturation 10mins；amplification：95 °C 10s；anneal 5s、72 °C 25s，45 個 cycles；melting curve：從 anneal Tm-5 °C 開始以 0.1 °C/s 上升至 95 °C 為止。

結果與討論

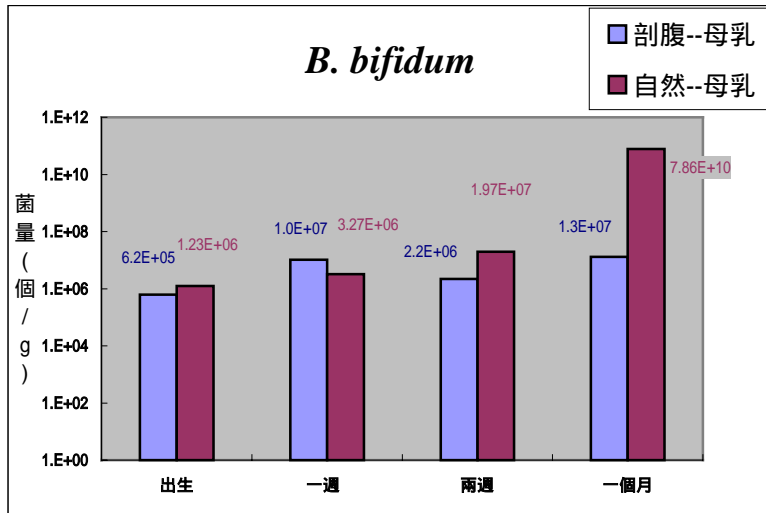
以厭氧培養方式計算 *Bifidobacteria* 各標準菌種菌數，並以定量 PCR 法製成標準曲線，以 genus-specific primers 測得檢體中 *Bifidobacteria* 為 total *Bifidobacteria* 數，再以絕對定量方式以 species-specific primers 所得定量 PCR 結果比對嬰兒腸道檢體各 *Bifidobacteria* species 數量。其結果如下圖所示：



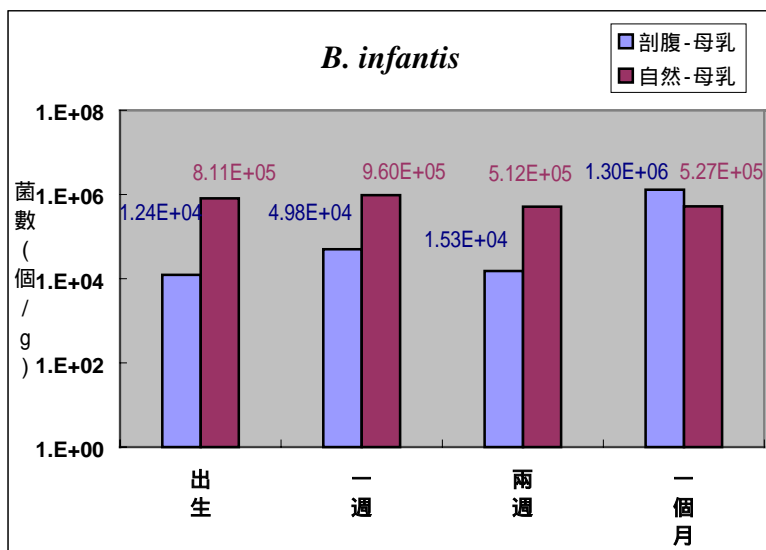
一週後，不論是每克糞便之菌量或是增加量，*B. infantis* 皆較 *B. bifidum* 高。



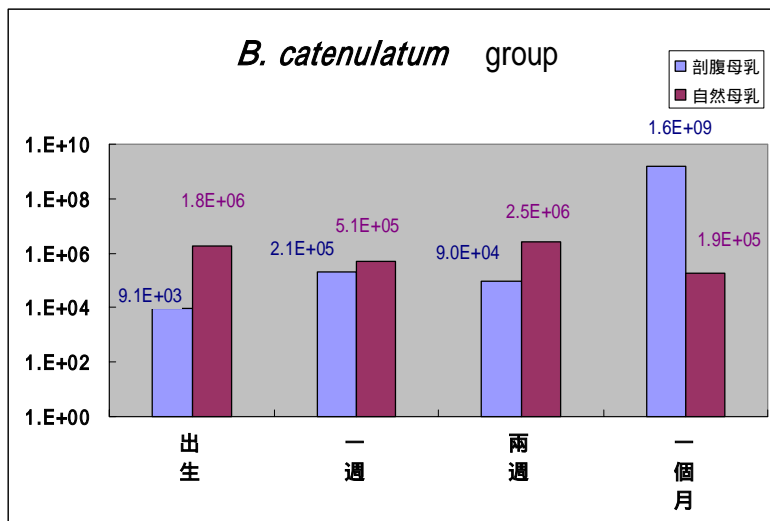
出生時的 total *Bifidobacterium* 自然生產組比剖腹生產組高，而在一個月後則無明顯差距



B. bifidum 的自然-母乳於一個月後較剖腹-母乳為高。

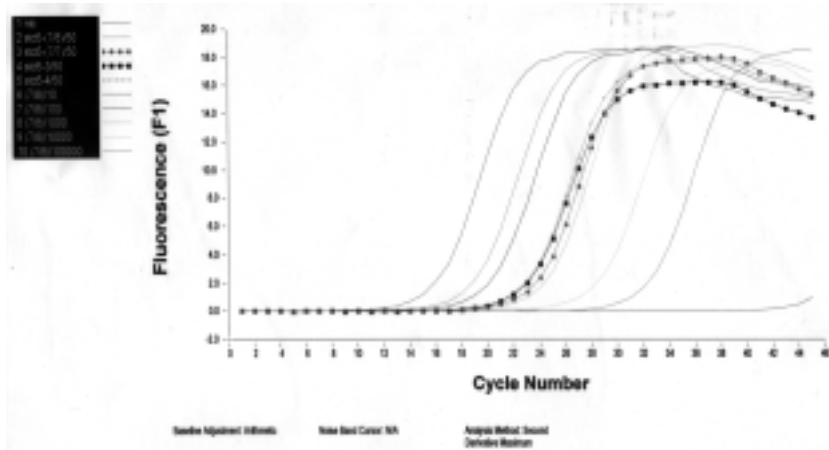


B. infantis 在剖腹-母乳的生長趨勢於一個月後優於自然-母乳。

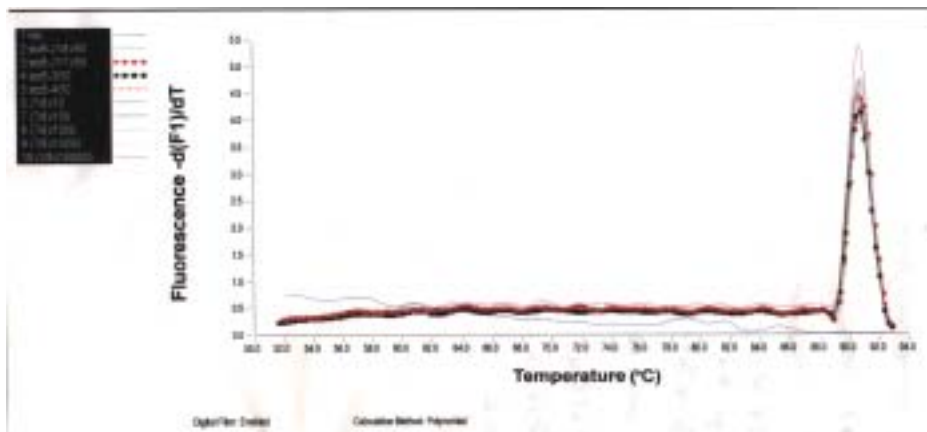


B. catenulatum group 於剖腹-母乳一個月後的生長趨勢較自然-母乳高於許多。

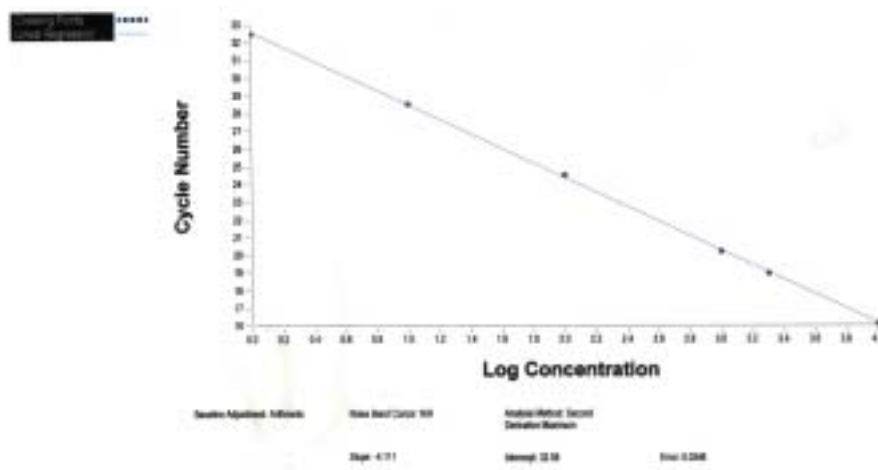
Standard curve 的製備



Melting peaks



Standard curve



由於本計畫仍在進行中，所得到的數據及判讀有限，目前資料顯示出初步菌種間之比較及部分菌株之定量，未來則希望利用 cloning 技術找尋新的菌株，並完成腸內菌基因庫之建立，以利於各方面研究之發展。

參考資料

1. Maidak, B.L., J.R.Cole, C.T.Parker,Jr.,G.M.Garrity,N.Larsen,B.Li,T.G.Liburn, M.J.McCaughey, G. J. Olaen,R. Overbeek, S. Pramanik, T.M.Schmidt,J.M.Tiedje,and C.R.Woese.1999.A new version of the RDP (Ribosomal Database Project) .Nucleic Acids Res.27: 171-173.
2. Tannock,G.W.1995.Normal microflora: an introduction to microbes inhabiting the human body.Chapman & Hall, London. United Kingdom.
3. Holzapfel, W.H., Haberer, P., Geisen, R., Björkroth,J.,& Schillinger,U.2001.Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. American Journal of Clinical Nutrition,73,365S-373S.
4. Holzapfel, W. H., Haberer, P.,Snel, Snel,J.,Schillinger, U., & Huis in't Veld, J.H.J.1998.Overview of gut flora and probiotics. International Journal of Food Microbiology,41,85-101.
5. Wilhelm H. Holzapfel, Ulrich Schillinger.2002.Introduction to pre- and probiotics. Food Research International 35,109-116
6. Harmsen,H. J. M., A. C. M. Wildeboer,G. C. Raangs, A. A. Wagendorp, N. Klijn, J. G. Bindels, and G. W. Welling.2000.Analysis of intestinal flora tification and detection methods. J.Pediatr. Gastroenterol. Nutr. 30: 61-67.
7. Matsuki T., Watanabe K.,Fujimoto J., Miyamoto Y., Takada T., Matsumoto K., Oyaizu H., Tanaka R.,2002,Development of 16S rRNA-Gene-Targeted Group-Specific Primers for the Detection and Identification of Predominant Bacteria in Human Feaces. In press.
8. Matsuki T., Watanabe K., Tanaka R., Fukuda M., Oyaizu H.,1999,Distribution of Bifidobacterial Specoes in Human Intestinal Microflora Examined with 16S rRNA-Gene-Targeted Species-Specific Primers, Applied and Environmental Microbiology, Oct, 4506-4512.
9. Matsuki T., Watanabe K., Tanaka R, 2002, Genus-and Species-specific PCR Primers for the Detection and Identification of Bifidobacteria, Prebiotics and Probiotics: Where are we going, 85-104.
10. Langendijk, P. S., F. Schut, G. J. Jansen, G. C. Raangs, G. R. Kamphuis, M. H. Wilkinson,and G. W. Welling.1995. Quantitative fluorescence in situ hybridization of bifidobacterium spp. With genus-specific 16S rRNA-targeted probes and its application in fecal samples. Appl. Environ. Microbiol. 61: 3069-3075.
11. Suau, A., R. Bonnet, M. Sutren, J. J. Godon, G. R. Gibson, M. D. Collins, and J. Dore. 1999. Direct analysis of genes encoding 16S rRNA from complex communities reveals many novel molecular species within the human gut. Appl. Environ. Microbiol. 65: 4799-4807.