

Provided for non-commercial research and education use.
Not for reproduction, distribution or commercial use.

ISSN 10175733

TAIPEI ZOO BULLETIN

VOLUME 22 DECEMBER 2011

第二十二期

中華民國一〇〇年十二月

動物園學報



This article was published in Taipei Zoo Bulletin. The attached copy is furnished to the author for non-commercial research and education use, including for instruction at the author's institution, sharing with colleagues and providing to institution administration.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article(e.g. in Word or Text form) to their personal website or institutional repository.

[http:// www.zoo.gov.tw](http://www.zoo.gov.tw)

利用聚合酶連鎖反應—變性梯度膠體電泳法 (PCR-DGGE) 及 16S rDNA 片段探討移居後大貓熊糞便中細菌相之變化

劉世芬*、陳澤維**、劉文御***、宋宏紅**

劉世芬、陳澤維、劉文御、宋宏紅 利用聚合酶連鎖反應---變性梯度膠體電泳法 (PCR-DGGE) 及 16S rDNA 片段探討移居後大貓熊糞便中細菌相之變化 動物園學報 22:45-60 (2011)

摘要：自中國大陸保護大熊貓研究中心雅安基地移居臺北市立動物園的兩隻大貓熊 (雌、雄各一)，經過食料轉換且其日糧供應之種類穩定後，開始定期採集受試動物之糞便樣本，萃取其中細菌的 DNA，並純化後，利用兩組廣泛使用的 16S rDNA 基因引子 P3-GC、P1、P2 (針對 V3 片段) 及 P63f-GC、P63f、P2 (針對 V1~V3 片段)，先以垂直電泳判斷 PCR-DGGE 技術最適切的變性膠體濃度，隨後進行水平電泳，將樣本中不同菌株的 DNA 自膠體中分開。之後將膠體上 DNA 條帶數據化後，以 SPSS 14.0 版本分析其上各樣本間之類別組成分析 (CATPCA)，據以繪出離散圖及確立本研究 PCR-DGGE 時使用的基因片段；再以 Phoretix 1D V2003.02 軟體進行 UPGMA 分析及 SPSS 14.0 版本進行階層集群分析法中的 Pearson Coefficient 計算核酸條帶分布之相似度，並繪出相似度樹狀圖。垂直電泳的結果顯示，以 V3 片段為基礎得到適當變性膠體的濃度為 45~55%，而 V1~V3 片段，則為 45~65%；兩者膠片上 DNA 條帶樣本的相似度分別為 65% 及 71.5%，顯示後者較前者更適合進一步分析樣本中可能出現的優勢菌種。此外，雌、雄大貓熊自身糞便樣本 V1~V3 區域片段的相似度分別為 72% 及 71%，表示在飼料種類固定後，個體大貓熊的腸道之常態菌相會呈現穩定狀態；而不同性別大貓熊糞便樣本間細菌相的相似度則低至 50%，此結果代表雌、雄大貓熊糞便中的菌相多少有差異性。再以分離到常態菌的 16S rDNA 片段定序後，發現雄大貓熊糞便中出現的主要菌種為 *Enterobacter spp.*、*Klebsiella spp.* 及 *Ralstonia spp.*；而雌大貓熊為 *Enterobacter spp.*、*Klebsiella spp.* 和 *Pseudomonas spp.*。本研究亦特別發現，*Ralstonia*、*Pseudomonas* 及 *Hafnia* 三屬的細菌未曾在相關的研究結果中出現。

關鍵字：大貓熊 (*Ailuropoda melanoleuca*)、聚合酶連鎖反應—變性梯度膠體電泳、16S rDNA、糞便細菌相

前言

本研究旨在探討自中國大陸保護大熊貓研究中心四川雅安基地移往臺北市立動物園後之兩隻大貓熊糞便中細菌相變化，藉以了解移居後之新環境及食糧轉換為在地之日糧種類後，是否將造成其體內腸道環境中的細菌相改變，以及對其攝食及正常生理產生影響？研究結果將提供園內

飼養管理者參考。以傳統的細菌分析及鑑定法僅有約 20% 的細菌能被分離及鑑定，因為選擇性培養基無法精確的模擬特定菌種在原始環境中增生所需的養分，故傳統的培養方法無法得到正確的環境細菌相 (Wayne *et al.*, 1987)。如今，分子生物技術已經發展得相當成熟，可以確實的分析

* 臺北市立動物園

** 東吳大學微生物學系

*** 國立政治大學通識中心及通訊作者

環境中存在之菌種組成 (Muyzer *et al.*, 1993)。

16S rDNA 為原核生物轉譯出核糖體的一段基因，可以當作細菌類緣演化關係的標記物質 (Fox *et al.*, 1980)，這段基因具高度的保留性，而且在菌種間有差異性 (Woese, 1987)，可用來鑑定不同的菌種。比起傳統鑑定細菌的方法，建立 16S rDNA 基因庫更能真實反應樣本中的原始微生物相 (Giovannoi *et al.*, 1990; Ward *et al.*, 1990)。不過由於建立與分析 16S rDNA 基因庫的工作量大且費時，而以 16S rDNA 的基因片段在菌種間的差異現象為基礎，發展出聚合酶連鎖反應暨變性梯度電泳分析 (polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis, PCR-DGGE) 的方法，並結合統計分析的模式，更能快速的分析樣本中的細菌相 (Muyzer and Smalla, 1998)。

早期有關圈養大貓熊糞便中細菌相之研究對象，包括在其原棲地附近的臥龍保育中心 (張等, 1995; 熊等, 2000)、遷居日本上野動物園 (Hirayama *et al.*, 1989)，及圈養在上海動物園的大貓熊 (Wei *et al.*, 2007) 等。前兩者的研究方式多以傳統的方式為之，研究結果有其侷限性；後者雖然部分利用 PCR-DGGE 的方法分析 16S rDNA 基因片段，但所分析的對象係針對 V3 片段研究的結果。因為 V3 片段的分子量較小，所以本研究決定採用基因較長的後者，用以篩選糞便中的優勢菌種。

材料及方法

1、糞便樣本採集與保存

臺北市立動物園於 2008 年 12 月接受中國大陸 (雅安大貓熊基地) 以動物交換方式取得之雌、雄大貓熊各一隻時，其皆為 4 歲齡，檢疫一個月後安置在該園特展館中。自 2009 年 5 月開始至同年 12 月止，每週定期採樣一次；採樣時，儘量蒐集清晨時排出之整顆新鮮糞便，置入無菌夾鏈袋中，並以手提冰箱運送至實驗室，隨後立即採集糞便內部之樣本，進行菌液之分離及萃取其中細菌染色體 DNA 的步驟。同年 5 月至 8 月，該園供給受試動物的日糧主要有輔助性飼料及竹產品，前者含高纖餅乾、紅蘿

蔔、蘋果及特製窩窩頭，後者有烏殼綠竹、箭竹葉、麻竹葉、桂竹葉及桂竹筍等。此段期間所採集的糞便樣本，包括 5 月 3 次、6 月 1 次、7 月 3 次、8 月 1 次，即為本研究分析的樣本來源。

取約 20 g 之糞便樣本封存於無菌 6 號夾鏈袋，以 0.1 M 磷酸鹽緩衝生理食鹽水溶液 (Phosphate Buffered Saline, PBS) 浸泡並拍打 10 分鐘，以確保將樣本中之細菌盡數沖洗於 PBS 中，再將此混合菌液倒入 50 mL 離心管中，以 2,000 rpm、25°C 下離心 10 分鐘。離心結束後可清楚觀察到沉澱物堆積，此時取上清液移入另一 50 mL 離心管中，再以 10,000 rpm、25°C 下離心 10 分鐘。此時上清液為植物色素及小分子有機物溶液，管底之沉積物則為樣本中之細菌。去除上清液後，加入 10 mL 之 0.1 M PBS 回溶，並分裝至 1.5 mL 之尖底小錐形試管中，置於 -80°C 下保存，以便進行後續細菌 DNA 的萃取工作。

2、萃取樣本中細菌染色體 DNA

將製備好的糞便混和菌液以 14,000 rpm、室溫下離心 10 分鐘，去除上清液後，再加入 567 μ L Tris-EDTA 緩衝液 (pH 8.0) 懸浮菌體後，加入粒徑 0.2 mm 玻璃珠 1 g，以冷熱交替法打破細胞壁。隨後加入 lysozyme (40 mg/mL) 混合均勻後，置於 37°C 水浴槽中作用 2 小時打破細胞，隨後加入 pronase K solution (Sigma-Aldrich Co.) 去除胞外蛋白；後加入 80 μ L CTAB-NaCl (10% hexadecyltrimethyl ammonium bromide in 0.7M NaCl) 溶液，將菌體打破後，以 14,000 rpm、室溫下離心 10 分鐘。取上清液 600 μ L，加入 RNase (Roche Diagnostics Ltd., Sandhofer Strasse 116, D-68305 Mannheim, Germany) 3 μ L，置於 37°C 水浴槽中作用 30 分鐘 (最終濃度為 10 μ g/mL)，以去除 RNA 干擾。

之後加入等體積的 phenol-chloroform-isoamylalcohol (體積比 25 : 24 : 1) 溶液充分混合，置於微量離心機以 14,000 rpm 離心 15 分鐘，再取出上層液置於新的微量離心管中，並避免吸入介面物質，此步驟須重複兩次。加入等體積的 chloroform-isoamylalcohol (體積比為 24 : 1) 溶液，

並充分混合，以去除可能殘留的 phenol 溶液，後置於微量離心機中以 14,000 rpm 離心 15 分鐘，取出上層含核酸的溶液置於新的微量離心管內，亦須避免吸入介面物質，後加入 0.7 倍上層液體積的 2-propanol 充分混合，置於室溫下 30 分鐘，再置於微量離心機內，以 14,000 rpm 離心 10 分鐘。倒掉上清液，並充分晾乾後，加入事先於 -20°C 預冷之 70% 絕對酒精，使核酸沉澱後置於微量離心機內，以 14,000 rpm 離心 10 分鐘，去除上清液後充分風乾，加入適量的去離子水回溶 DNA 後，保存於 -20°C 下。DNA 產物再經數度純化及離心後，以 2% 瓊脂膠體 (agarose gel) 電泳確認，並以核酸計算儀 (GeneQuant II, Phamacia Biotech, UK) 定量，當 A260 與 A280 的比值為 1.8 以上時，才能進行後續試驗。以上實驗方法均參考 Ausubel (1987) 的研究報告。

3、聚合酶連鎖反應—變性梯度膠體電泳 PCR-DGGE) 分析

3.1 廣用性引子 (Universal primer)

本研究所使用的引子包括 P2、P3-GC、P63f-GC、P63f、P3 及 P1 等 (Table 1)。對於放大 16s rDNA 中 V3 片段所使用的引子有：P3-GC、P1 及 P3 (forward)、P2 (reverse)，作用範圍 341~534 bp；而使用在 V1~V3 區域的則有：P63f-GC、P63f (forward) 及 P2 (reverse)，作用範圍 63~534 bp。這些引子用於定序及進行 DGGE 前，必須放大 V3 及 V1~V3 區域的 DNA 片段；而 GC-clamp 之作用係在 5' 端增加 40 個 G 或 C 後，作為製備 V3 及 V1~V3 區域 DNA 片段放大所需之 forward 引子，大小約 530 bp (含 GC-rich)。以上實驗方法均採自 Fantroussi *et al.* (1999)。

3.2 聚合酶連鎖反應

取 2 μ L 大貓熊腸道菌的染色體 DNA，加入 PCR buffer、dNTP、P63f-GC (GC-rich forward primer)、P2 或 P3-GC (reverse primer) 及 Taq DNA polymerase (5 Unit/ μ L) 後，放入溫度控制器 (T1 Thermocycle, Whatman, Biometra) 內進行放大反應。反應步驟、溫度及時間如下：(1) 94°C、5 分鐘；(2) 94°C、1 分鐘；(3) 58.5°C、1 分鐘 30

秒；(4) 72°C、1 分鐘；(5) 72°C、10 分鐘；(6) 4°C、終止反應，其中放大反應之步驟第 (3) 至第 (5) 必須來回重複執行 30 次。以上實驗方法係參考自 Sambrook and Russell (2001)。

3.3 以瓊脂膠體電泳分析確認 DNA 分子量的大小

製作 2.0% 的瓊脂膠體，進行電泳分析，待所製作的膠體凝固後置入電泳槽 (RunOne, EmbiTec) 中，以 1:5 的比例將 6X DNA loading dye 與 DNA 樣本混合均勻後，在電壓 100 伏特下進行電泳約 30 分鐘。結束電泳後取出膠體，使用濃度為 0.02 mg/L 的溴化二錠 (Ethyl Bromide) 染色 10 秒後，以清水退染 25 分鐘，置於紫外線光源下觀察結果，以便確定增幅後 16S rDNA 的片段大小。

3.4 純化 PCR 產物

本研究使用 Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit (Geneaid)，藉以去除 PCR 產物中多餘的 dNTP，避免干擾核酸濃度測定的準確度，影響後續電泳條件的設定。經過上述工具所設定的步驟處理，最後所得即為純化 DNA 後的 PCR 產物。

3.5 DGGE 條件的建立

3.5.1 垂直膠體電泳 (perpendicular denaturing gradient gel)

先使用垂直梯度膠體分析大貓熊腸道菌菌叢樣本的最適變性膠體梯度，本研究均使用 40% Acrylamide/Bis-Acrylamide (37.5:1) 加入 8% 濃度的膠體中 (Bio-Rad Laboratories, Inc., 1000 Alfred Nobel Drive, Hercules, California 94547, USA) 使膠體能夠固化，並於溶液中加入不同濃度的變性劑 Formamide (Merck Co. Inc., P.O. Box 100, Whitehouse Station, New Jersey 08889-0100, USA) 及 Urea，使膠體中含 100% 至 0% 比例的變性膠體溶液。各管膠體體積為 20 mL，在高濃度變性膠體溶液中添加 160 μ L 10% APS (Ammonium Persulfate, Sigma) 及 16 μ L 的 TEMED (N,N,N',N'-Tetramethyl-1,2-diaminomethane, Sigma)，低濃度管中則加入 110 μ L 之 10% APS 與 11 μ L 的 TEMED。

上述藥劑分別均勻混合後，將膠體吸入注射筒中，並將針筒架於 Gradient Former (Bio-Rad Laboratories, Inc.)

上，接上三向接頭後，以穩定、均勻的速度推動 Gradient Former，使膠體緩緩混合從灌膠孔旋鈕 (injection port fitting) 注入事先架好的玻璃座內，以形成 0% 到 100% 變性梯度膠體，且將電泳方向與變性梯度成垂直，待鑄膠動作完成後拔掉齒模 (comb)，以利注入 DNA 樣本。將 PCR 產物和 100 μ L 6X DNA loading dye 混合均勻後，平均注入垂直膠體的容器中，變性梯度膠體電泳槽 (Bio-Rad Laboratories, Inc.) 須注入約 7 公升之 1 X TAE-buffer，作為電泳的緩衝溶液，並以 60°C、電壓 70V 進行電泳 13 小時 (V3 樣本) 及 15 小時 (V1~V3 樣本)。結束後，取下膠體後進行銀染，並決定 V3 垂直電泳的變性梯度為 45~55%，而 V1~V3 為 45~65%，及後續試驗之水平膠體之變性濃度。

3.5.2 水平梯度電泳

水平梯度膠體參考上述垂直電泳的結果，配出低濃度 45% 與高濃度 65% 之變性膠體溶液後，進行大貓熊菌相差異分析。將大貓熊腸道菌的 chromosomal DNA 分別以前述之引子放大樣本細菌中的 V3 及 V1~V3 區域，PCR 產物經去除干擾物後，測定核酸濃度，調整 DNA loading 量為 200 ng/well，電泳溫度設為 60°C，電壓為 70V，分別進行 13 小時 (V3 樣本) 及 15 小時 (V1~V3 樣本) 後，取出膠體銀染，隨後觀察膠體上的條帶分布情形。

3.6 DGGE 圖譜分析

將已封片保存的 DGGE 膠體，使用 UVP GelDoc-it imaging System 照相儲存為 Tif 檔，再使用 ImageQuant TL 7.0 (GE Healthcare) 中的 1D 分析軟體將圖檔中的條帶數據化。將上述所得數據以 SPSS 14.0 版本軟體進行類別組成分析 (Categorical principal components analysis, CATPCA)，觀察各別時間點大貓熊糞便樣本間的差異；再使用 Phoretix 1D V2003.02 軟體進行 UPGMA 分析，並以 SPSS 14.0 版本進行階層集群分析法中的 Pearson Coefficient 計算及製作在不同階段採集大貓熊糞便時的菌相相似度樹狀圖。

3.7 條帶定序

以將 DGGE 膠體浸泡於 SYBERGOLD (MDBio Inc.)

染劑中，進行 DNA 染色，判定欲洗提 (elute) 的條帶後，以刀片切下，並洗提出 DNA。選擇 P63f (不含 GC-rich) 及 P2 引子，以 nested-PCR 的方式，將樣本中的 V1~V3 區域增幅，並使用 Proof reading Taq polymerase kit (Invitrogen) 進行 PCR，產物大小約 183 及 490 bp。

3.8 TA 轉殖 (TA cloning)

本階段的實驗方法及步驟均採自 Sambrook and Russell (2001)。DNA 片段進行定序分析時，於片段前後各 50 bp 會出現訊號微弱的現象而導致部分序列無法判讀，然而 DGGE 所使用之片段大小侷限於 700 bp 以下，故直接以 DNA 片段定序將減少在比對時所提供的序列資訊。因此，本研究必須將 DNA 片段送入 pGEM-T Vector 中進行 TA cloning。

洗提 DNA 後，將 DNA 片段送入 pGEM-T Vector 中進行 TA cloning，隨後以載體上之 M13 結合位置進行定序分析。將所增幅的 PCR 產物純化後以 pGEM-T Vector System Kit (Promega #TM042) 進行接合 (ligation) 作用，接合位置在載體的 lacZ 基因上，可得具有插入序列的質體。

之後，選用基因型 lacZ⁻ 的 *E. coli* JM109，製作勝任細胞 (competent cell)，經過特定條件連續培養後，所得菌液在冰上分裝 100 μ L 至小離心管中，最後加入液態氮急速冷凍，冰存於 -80°C 中，隔夜即可使用。

取出保存於 -80°C 的勝任細胞，混合上述經過結合作用後之產物，並將上述產物平推於含有 Ampicillin (50 μ g/mL)、IPTG (50 μ g/mL) 及 X-gal (50 μ g/mL) 的 LB 瓊脂培養基上，於 37°C 中培養 16~24 小時後，挑選白色菌落，即是轉型成功而含有 PCR 產物的菌體。將此菌培養在含有 Ampicillin 的 LB 培養液中培養 16 小時後即可抽取質體。

因為在 pGEM-T vector map 161~177 和 2,941~2,957 的位置上分別具有 M13 的 forward 及 reverse 的結合位置，經由 PCR 之後，以電泳分析可確認含有 insert DNA 的 PCR 產物，而其樣本的產物大小為 726 bp。

使用引子 M13 的 PCR 條件如下：Step 1：94°C、5 分鐘，Step 2：94°C、1 分鐘 (denaturation)，Step 3：55

°C、1 分鐘 30 秒 (annealing)，Step 4：72°C、1 分鐘 (extension)，Step 5：72°C、10 分鐘，Step 6：4°C、終止反應；Step 2~Step 4 須重覆進行 30 次。

在確認 DNA 片段大小後，委託陽明基因體定序中心進行序列定序，得到的序列片段，與美國國家衛生院生物資訊中心 (NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 的資料庫進行核酸序列相似度的比對 (Blast)，取得分最高的候選菌種作為該片段最可能的菌種，並於資料庫中取得相關資料。

結果與討論

1、決定分析之 16S rDNA 片段

16S rDNA 為細菌存活所必須之基因序列，以此段基因序列作為研究對象，比較能偵測出樣本中大部分的菌種；此外，此段序列具有高度保留性，有利試驗設計時使用常見型引子，而其放大後的變異區也會因不同之菌種出現不同的序列。16S rDNA 全長為 1.5kb，若將完整的 16S rDNA 進行 PCR-DGGE，則可能會因序列過長，分析結果容易造成誤差；加以試驗過程冗長，所以必須選取長度適中之變異區做為研究的對象。

本試驗結果發現，V3 變異區中 DNA 片段的濃度以垂直電泳可以測出變性藥劑濃度的範圍在 45~55% 之間 (Fig. 1)；而以同樣的濃度經水平電泳後所得到的結果，如 Fig. 2。另一方面以 PCR 放大後的 V1~V3 片段在 45~65% 的變性藥劑濃度條件下進行垂直電泳，能夠得到最佳狀況下的 16S rDNA 濃度 (Fig. 3)；再以上述變性濃度區間進行水平膠體電泳，所得結果如 Fig. 4。

兩者之水平電泳膠片以 SPSS 軟體分析後，可得 V3 與 V1~V3 片段各樣本間之離散圖 (Fig. 5A 及 5B)。由圖中可以發現，不同時間採得之樣本組成分析可區分為同一群，以紅色橢圓形框內的數字表示 (Fig. 5B)；再以 Phoretix 1D V2003.02 軟體進行 UPGMA 分析 V3 和 V1~V3 區域所分離出來的 DNA 條帶，發現兩者樣本的相似度分別為 65% 及 71.5% (數據未顯示)，由此顯示後者較前者更適

合進一步分析樣本中可能出現的優勢菌種。

本研究使用的目標序列為 16S rDNA 之 V1~V3 片段，而非沿用較常使用之 V3 片段，主要的原因為 V3 序列過短，進行序列比對時容易出現誤差；因此使用較長的 V1~V3 序列進行 DGGE 後，再經軟體分析之結果發現，V1~V3 序列在膠體上之 DNA 條帶數量出現較少，降低了樣本間的歧異度，所得結果相對的較易分析，而能找出另類的優勢菌種。Wei *et al.* (2007) 曾利用 V3 片段分析過大貓熊糞便中細菌相的變化，由其 PCR-DGGE 所得之水平電泳膠片上可看出，與本研究的結果相似。

2、DGGE 條件的建立

經 0~100%變性梯度的垂直膠體電泳分析，放大後的大貓熊腸道細菌之 16S rDNA V1~V3 變異區域的 DNA 片段，結果如 Fig. 3 所示，其變性範圍在 45~65% 間，故本研究後續進行水平電泳變性膠體梯度亦為 45~65%。

為了消除不同電泳試驗或不同膠體因製備所造成的誤差，進行 DGGE 前必須選取一些標準菌種，製備個別的 V1~V3 變異區域的 DNA 片段，作為分析時參考之用的標記物 (Marker)，而本研究測試後發現以 *Escherichia coli* 作為 Marker 可得到 7 道 DNA 條帶，故作為比對位置的功能較 *Streptococcus pyogenes* 佳 (數據未顯示)。

3、以 PCR-DGGE 分析的糞便菌相

參考本園之大貓熊餵養紀錄，得知在 6 至 8 月份之食料組成已穩定，因此本研究決定以大貓熊之 7、8 月糞便樣本作為分析恆定菌相之樣本。樣本 DNA 經純化，並進行 PCR-DGGE 後，其膠體圖以 SPSS 軟體進行 CTA-PCA 分析其上之 DNA 條帶分布狀態，結果顯示所有的條帶分布可區分成主要的一群 (Fig. 5B)，亦表示 7、8 月各樣本間之菌相組成很相近；再以 Phoretix 1D V2003.02 軟體進行 UPGMA 分析，可得相似度之樹狀圖 (Fig. 6 & 7)。由樹狀圖中可以看出，相同個體間大貓熊糞便細菌相 7、8 月樣本之總相似度分別為 72% (雄) 及 71% (雌)，而雌、雄不同性別間，7、8 月採集的樣本間相似度則僅為 50% (Fig. 8)。前述結果顯示，在日糧成分穩定後，相同個體間糞便菌相

變化不大；後者則顯示，不同性別的大貓熊，彼此的糞便菌相會有所不同。

此外，從膠圖上可發現在箭頭指出之 DNA 條帶為相同個體、不同時間點所採集之樣本 (Fig. 4)，即為分析大貓熊腸道菌中之常態存在的菌群樣本；經 DGGE 分析和定序比對，發現雄性大貓熊之腸道常態菌主要為 *Enterobacter* spp.、*Klebsiella* spp. 和 *Ralstonia* spp.，雌性者則為 *Enterobacter* spp.、*Klebsiella* spp.、*Pseudomonas* spp. 及 *Hafnia alvei* (Table 2)。由表中可以看出，不同性別大貓熊糞便中相同的菌叢有 *Enterobacter* spp. 及 *Klebsiella* spp.，而雄性者特有的常態菌叢為 *Ralstonia* spp.，雌性者則為 *Pseudomonas* spp. 及 *Hafnia* spp.。

早期以傳統方式研究大貓熊腸道細菌相的報告中，主要的優勢菌種有：*Streptococcus* sp.、*Enterobacteriaceae* (Hirayama *et al.*, 1989)；*Escherichia coli*、*S. faecalis*、*Lactobacillus* sp. (張等, 1995)；*E. coli*、*Enterococcus* sp.、*Enterobacteria* sp.、*Lactobacillus* sp.、*Klebsiella* sp. 及 *Proteus* sp. (熊等, 2000)。而 Wei *et al.* (2007) 亦指出，以 16S rDNA 之 V3 片段分析上海動物園圈養之大貓熊糞便中的優勢菌種單位 (OUT) 亦為 *E. coli*；而本研究則未發現任何 *E. coli* 出現，是否係因為使用 PCR-DGGE 的技術：(1) 無法於膠體上將樣本中所有的 DNA 樣本分離 (Vallaey *et al.*, 1997)；(2) 相同的樣本，以增幅不同 16S rDNA 片段進行 DGGE 分離，可能出現不同的結果 (Lerman and Silverstein, 1987)；(3) 引子對不同樣本 DNA 的吸附力有差異，造成 PCR 的不對等增幅，導致 DGGE 的結果可能會漏檢 (Ahn *et al.*, 2009) 等。

除榮等 (2006) 及 Wei *et al.* (2007) 曾經發現大貓熊糞便中出現數量不多，而對纖維素有分解作用的厭氧梭狀芽孢桿菌有 *Clostridium lentocellum*、*C. tertium* 及 *C. disporicum* 外，前述早期傳統式的菌相分析結果與本次研究相同，並未檢出 *Clostridium* 屬的細菌。

由雌、雄大貓熊糞便中分離出相同的菌株中，尤其以 *Klebsiella* 要特別注意，因為此菌中的 *Klebsiella oxytoca* 及 *K. pneumonia*，有感染大貓熊後導致腹瀉、血便與血尿的紀錄 (王等, 2007a 及 2007b)，本次研究中在雄性大貓熊

糞便中已經檢出了 *K. oxytoca*。熊等 (2000) 則指出，亞成年大貓熊在冬季最易感染條件性致病菌，其中就以 *K. pneumonia* 最為嚴重。

此外，本次研究發現 *Ralstonia* spp.、*Hafnia* sp. 及 *Pseudomonas* spp. 等均未在上述的研究結果中出現，是否因為使用的 16S rDNA 基因片段為 V1~V3，或是由於移居新環境後提供的日糧品種與原圈養地不同所造成，則有待進一步研究。

謝誌

本研究得以順利進行，承蒙東吳大學微生物系研究室團隊、本園特展館館長陳玉燕和全體大貓熊管理人員等之鼎力協助，以及生殖生理實驗室施玲玲研究人員提供資料參考，謹此一併致謝。

參考文獻

- 王成東、蘭景超、羅婭、喻述蓉、黃祥明、張志和、余建秋。2007a。大熊貓致病性催產克雷伯菌的分離鑑定。圈養大熊貓研究進展，張志和主編，第 344-346 頁。四川科學技術出版社。
- 王成東、蘭景超、羅婭、楊智、張再蓉。2007b。大熊貓感染性泌尿生殖道血尿病症原---肺炎克雷伯氏桿菌。圈養大熊貓研究進展，張志和主編，第 350-352 頁。四川科學技術出版社。
- 張志和、何光昕、王行亮、鍾順隆、張安居、李光權。1995。大熊貓腸道正常菌群的研究。獸類學報 15(3): 170-175。
- 熊焰、李德生、王印、彭廣能、張和民、張貴權。2000。臥龍自然保護區大熊貓糞樣菌群的分離鑑定與分布研究。畜牧獸醫學報 31(2): 165-170。
- 榮華、邱成書、胡國全、劉曉風、張輝、費立松、徐恒、鄧宇。2006。一株大熊貓腸道厭氧纖維素菌的分離鑑定、系統發育分析及生物學特性的研究。應用與環境

微生物學報 12(2): 239-242。

- Ahn, J. H., Y. J. Kim, T. Kim, H. G. Song, C. Kang and J. O. Ka. 2009. Quantitative improvement of 16S rDNA DGGE analysis for soil bacteria community using real-time PCR. *J. Microbiol. Method* 78:216-222.
- Ausubel F. M. 1987. *Current Protocols in Molecular Biology*--- Preparation of Genomic DNA from Bacteria (Unit 2.4). Publisher: Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience Ltd, New York, USA.
- Fantroussi S., L. Verschuere, W. Verstraete, and E. M. Top. 1999. Effect of phenylurea herbicides on soil microbial communities estimated by analysis of 16S rRNA gene fingerprints and community-level physiological profiles. *Appl. Environ. Microbiol.* 65(3):982-988.
- Fox, G. E., E. Stackebrandt, R. B. Hespell, J. Gibson, J. Maniloff, T. A. Dyer, R. S. Wolfe, W. E. Balch, R. S. Tanner, L. J. Magrum, L. B. Zablen, R. Blakemore, R. Gupta, L. Bonen, B. J. Lewis, D. A. Stahl, K. R. Luehrsen, K. N. Chen and C. R., Woese. 1980. The phylogeny of prokaryotes. *Science* 209:457-463.
- Giovannoni, S. J., T. B. Britschgi, C. L. Moyer and K. G. Field. 1990. Genetic diversity in Sargasso Sea bacterioplankton. *Nature* 345: 60-63.
- Hirayama K., S. Kawamura, T. Mitsuoka and K. Tashiro. 1989. The fecal flora of the giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*) . *Journal of Applied Bacteriology* 67:411-415.
- Lerman L. S. and V. Silverstein. 1987. Computational simulation of DNA melting and its application to denaturing gradient gel electrophoresis. *Methods Enzymol.*: 155:482-501.
- Muyzer, G., E. C. De Waal, and A. G. Uitterlinden. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:695-700.
- Muyzer, G. and K. Smalla, 1998. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Int. J. Gen. Mol. Microbiol.* 73:127-141.
- Naoki T., M. A. B. Catalan-Sakairi, Y. Sakaguchi, I. Kato, Z. Zhou, and H. Shoun. 2003. Aerobic denitrifying bacteria that produce low levels of nitrous oxide. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:3152-3157.
- Ramón S. V., A. L. González, and L. J. Torres-Bauzá, 2008. Four different integrative recombination events involved in the mobilization of the gonococcal 5.2 kb beta-lactamase plasmid pSJ5.2 in *Escherichia coli*. *Plasmid.* 60: 200–211.
- Sambrook J. and D. W. Russell. 2001. *Molecular Cloning*. Published by Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA, 2344pp.
- Vallaeyts, T., E. Topp, G. Muyzer, V. Macheret, G. Laguerre, A. Rigaud, and G. Soulas. 1997. Evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis in the detection of 16S rDNA sequence variation in rhizobia and methanotrophs. *Microb. Ecol.* 24: 279-285.
- Ward, D. M., R. Weller and M. M. Bateson. 1990. 16S rRNA sequence reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community. *Nature* 345:63-65.
- Wayne, L. G., D. J. Brenner, R. R. Colwell, Grimont, P. A. D. Kandler, O. Krichevsky, M. I. Moore, L. H. Moore, W. E. C. Murray, R. G. E. Stackebrandt, M. P. Starr and H. G. Truper. 1987. Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 37:463-464.
- Wei G., H. Lu, Z. Zhou, H. Xie, A. Wang, N. Karen and L. Zhao. 2007. The microbial community in the feces of the Giant Panda (*Ailuropoda melanoleuca*) as determined by PCR-TGGE profiling and clone library analysis. *Microb. Ecol.* 54(1):194-202.
- Woese, C. R. 1987. Bacterial evolution. *Microbiological Reviews*, 51: 221-271.

Analysis of fecal bacterial flora from the two removed Giant Pandas (*Ailuropoda melanoleuca*) with PCR-DGGE profiling and various 16S rDNA fragments

Shyh-Fen Liu^{*}, Ze-Wei Chen^{**}, Wen-Yu Liu^{***} and Hung-Hung Sung^{**}

Abstract : This study prefers to develop a method of molecular biology by PCR-DGGE and to evaluate the possibility of utilizing the strategy to explore the changes in fecal bacteria flora as the two pandas, four years old, a male and a female, moved into Taipei Zoo from Yaan, Sichuan panda's base in December, 2008. During July to August in 2009, the feeding condition maintained with the same ingredients of daily diets when the standard feeding procedures have been constructed constantly.

In this period, the feces sampled weekly from both male and female pandas. Then, the total bacteria DNA in the feces were extracted and amplified with two sets of 16S rDNA primers (for V3 and V1-V3 regions) combining with PCR-DGGE procedures to separate the whole flora's DNA fragments in polyacrylamide gel. Not only had the methods of perpendicular and parallel electrophoresis been used and the final results acquired from the separation of nucleic acid fragments of bacterial 16S rDNA of V3 and V1-V3 regions but the two statistical measures, SPSS Analysis System and UPGMA of Phoretix ID V2003.02, were used for discrete degree and similarity assessments as well. Based on the reasons of lower discrete tendency, 45~65% denatured gel's concentration and higher similarity (71.5%) than V3 regions (65%), we consider that the V1~V3 regions may possess the candidate approaches to be able to find out widely fecal bacteria flora owing to fewer bands and lower diversities emerged on the gel.

Furthermore, it was 72% and 71% similarity individually occurred in female and male panda, respectively. That means the fecal bacteria flora will tend to be stable if the formula of daily diets condition upon constantly. On the other hand, the similarity was lowered at 50% between the two pandas that may cause by sexual variations.

These 16S rDNA fragments were particularly selected from the 16S rDNA library via PCR-DGGE procedures of sequencing, blasting and comparing in order to identify their conclusive species. The results revealed that some of the primary fecal bacteria were *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp., and *Ralstonia* spp. appeared in male but the others like *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp. and *Pseudomonas* spp. came out inside feces from female panda. Especially, *Ralstonia*, *Pseudomonas* and *Hafnia* were the unique members that stemmed from fecal samples of both pandas, but they have never been found in previous studies.

Key words: Gaint panda (*Ailuropoda melanoleuca*), PCR-DGGE, 16S rDNA, fecal bacterial flora

* Taipei Zoo

** Department of Microbiology, Soochow University, Taiwan, R.O.C.

*** Center of General Education, National Chen-Chi University and corresponding author

Table 1. All of used primers in this study

Primers	Nucleus sequences (5'→3')	References
P2	5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3'	Muyzer <i>et al.</i> (1993)
P3	5'-CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGGCACGGG GGGCCTACGGGAGGCAGCAG-3'	Muyzer <i>et al.</i> (1993)
P63f	5'-CAGGCCTAACACATGCAAGTC-3'	Fantroussi <i>et al.</i> (1999)
P63f-GC	5'-CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGGCACGG GGCAGGCCTAACACATGCAAGTC-3'	Fantroussi <i>et al.</i> (1999)
M13f	5'-GTTTTCCAGTCACGAC-3'	Ramón <i>et al.</i> (2008)
M13r	5'-ACAGGAAACAGCTATGA-3'	Ramón <i>et al.</i> (2008)
8f	5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'	Naoki <i>et al.</i> (2003)
1510r	5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'	Naoki <i>et al.</i> (2003)

Table 2. Main fecal bacterial species with PCR-DGGE profiling from the removed female and male panda

Sources	Bacteria species	Identity (%)
Male		
	<i>Enterobacter aerogenes</i>	100
	<i>Klebsiella oxytoca</i>	99
	<i>Klebsiella ornithinolytica</i>	99
	<i>Klebsiella trevisanii</i>	99
	<i>Ralstonia thomasi</i>	99
	<i>Ralstonia pickettii</i>	99
	<i>Ralstonia mannitolilytica</i>	99
Female		
	<i>Enterobacter aerogenes</i>	99
	<i>Hafnia alvei</i>	99
	<i>Klebsiella ornithinolytica</i>	100
	<i>Pseudomonas fragi</i>	99
	<i>Pseudomonas syringae</i>	99
	<i>Pseudomonas kilonensis</i>	99
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	99

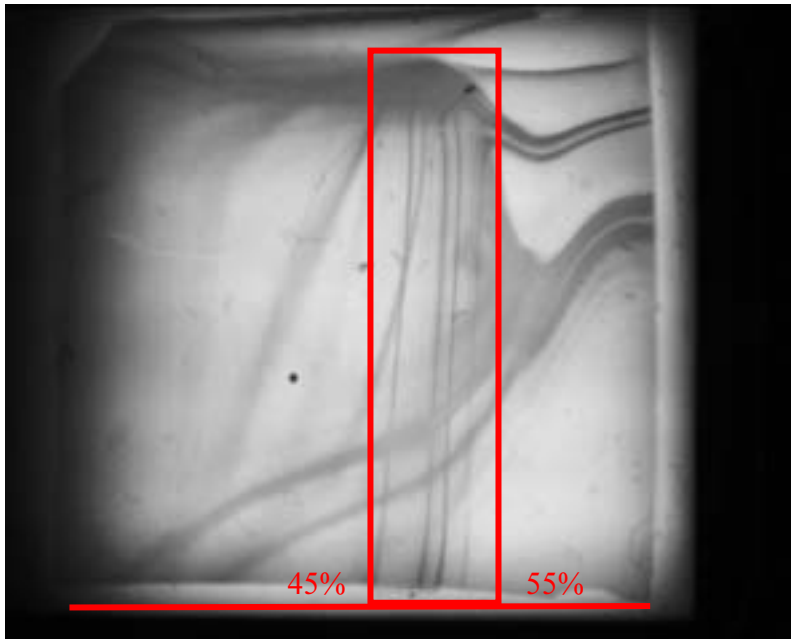


Fig1. Denatured agents concentration ranged from 45 to 55% acquired optimally for DNA capacities of V3 regions via perpendicular PCR-DGGE's performances.

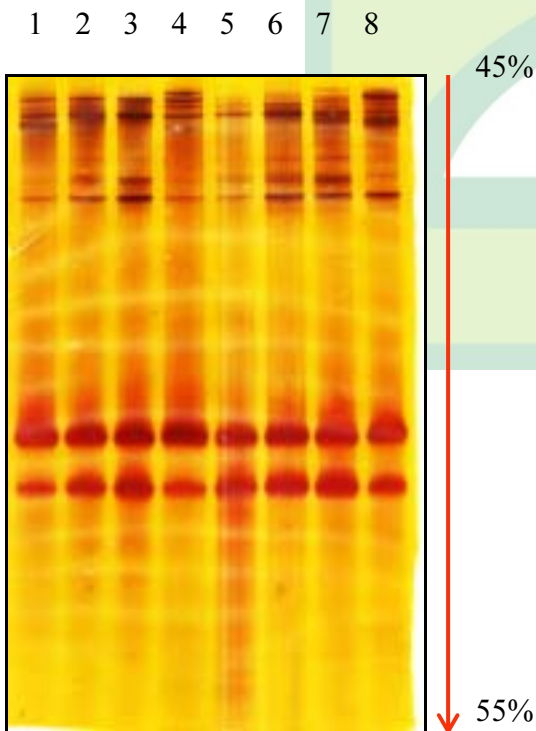


Fig2. Parallel DGGE map produced by 16S rDNA's sequences of V3 regions.

Note: Lane 1-4 labeled 050709, 051409, 052109 and 060609 from the male and Lane 5-8 labeled 050709, 051409, 052109 and 060609 from the female panda, respectively.

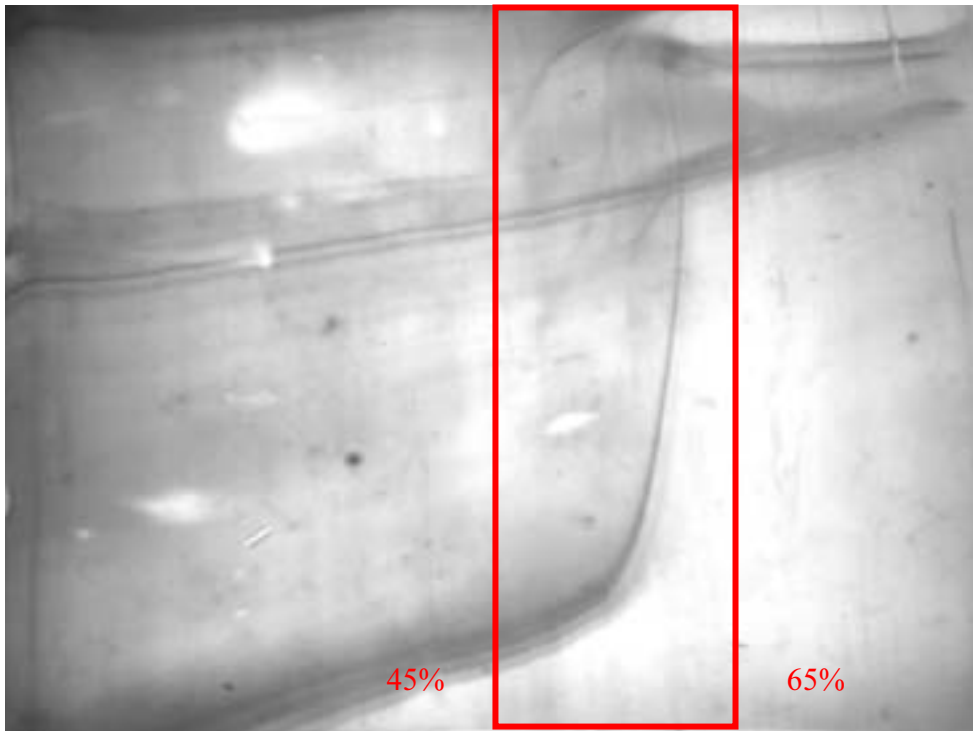


Fig3. Denatured agents concentration ranged from 45 to 65% acquired optimally for DNA capacities of V1~V3 regions via perpendicular PCR-DGGE's measures

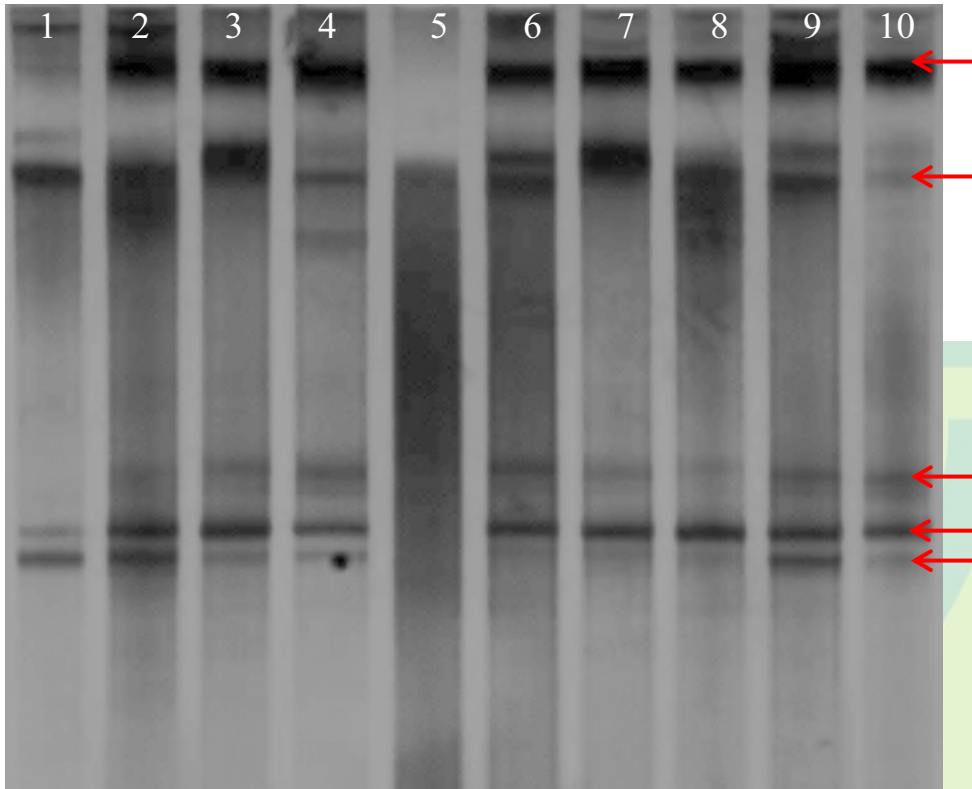


Fig4. Parallel DGGE map stemmed from 16S rDNA ' s bands of V1~V3 regions. (Lane 1-5 labeled 070809, 072109, 072909, 080609 and 081309 from the male and Lane 6-10 labeled 070809, 072109, 072909, 080609 and 081309 from the female panda. →: DNA bands selected for analyzing the conclusive fecal bacteria species)

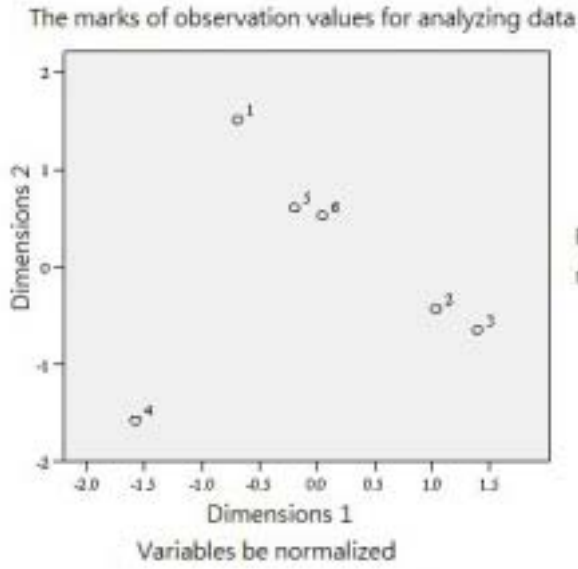


Fig. 5 A The discrete map of 16S rDNA bands of V3 region



The marks of observation values for analyzing data

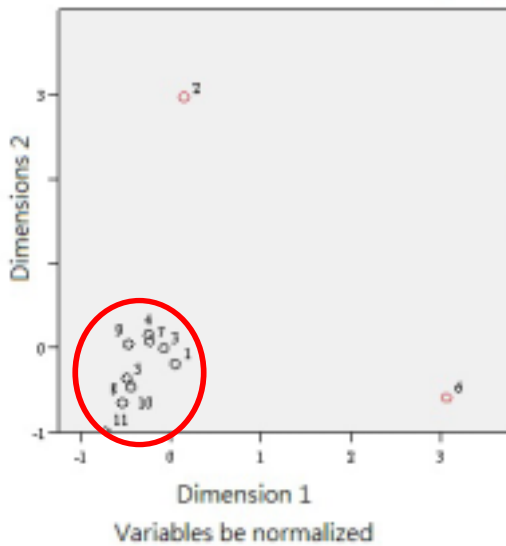


Fig. 5 B The discrete map of 16S rDNA bands of V1-V3 region

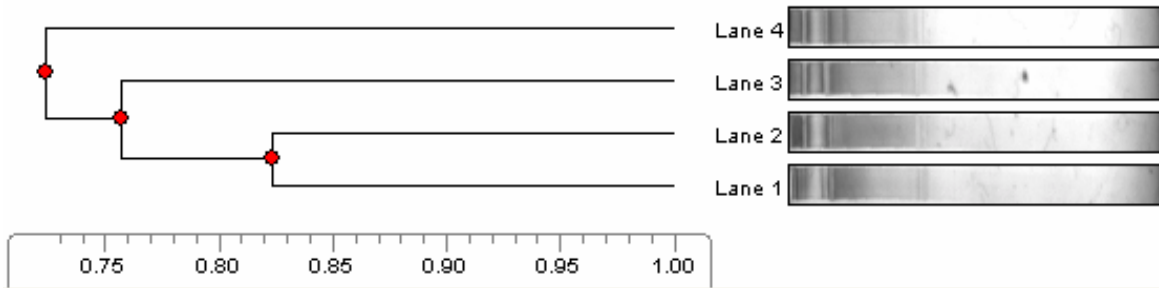


Fig6. Similarities (%) of fecal bacterial flora came out in July and August clustered from the DNA bands of male panda (Lane 1 to Lane 4). The data on scale represent the percentage of similarities.

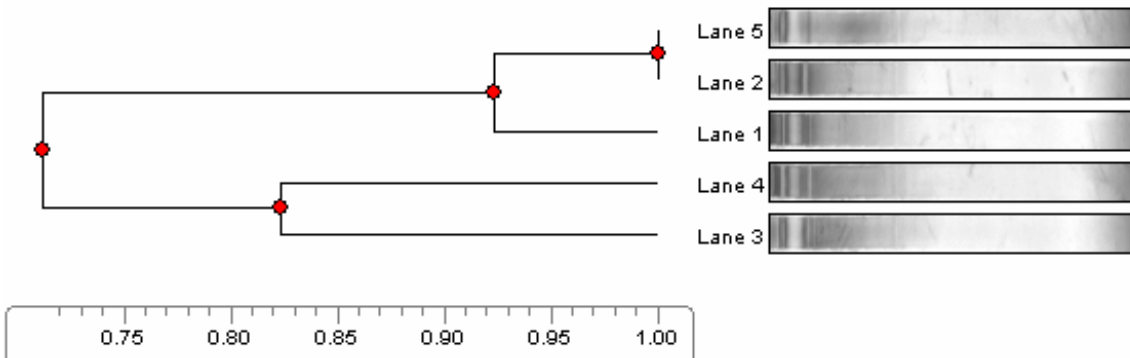


Fig7. Similarities (%) of fecal bacterial flora turned up with in July and August clustered from the DNA bands of female panda (Lane 1 to Lane 5). The data on scale represent the percentage of similarities.

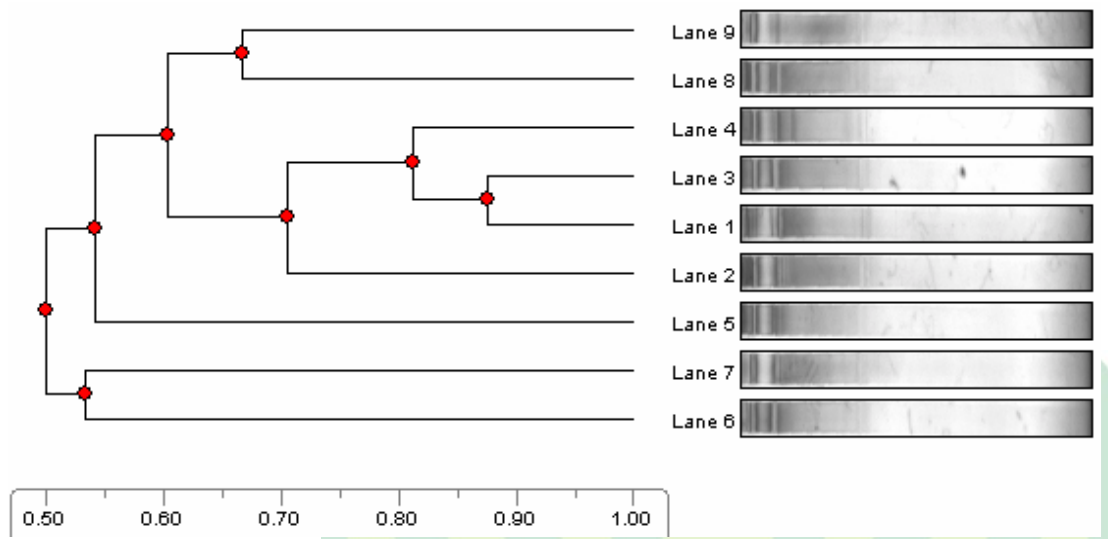


Fig 8. Similarities (%) of fecal bacterial flora being found in July and August clustered between the female (Lane 5 to Lane 9) and the male panda (Lane 1 to Lane 4); the data on scale stand for the percentage of similarities.

