

東吳大學微生物學系碩士論文
Master Thesis Department of Microbiology
Soochow University

指導教授：趙維良 博士
Advisor: Dr. Wei-Liang Chao

台灣黑熊成長時期腸道菌相多樣性與熊科
動物腸道菌相相關性分析

研究生：劉正康（Chen-Kang Liu） 撰
中華民國一百零三年一月

致謝

首先真的非常感謝趙維良老師對我實驗和論文的指導，不僅僅是教會我做實驗的道理，同時也讓我學習到了許多處事的精神，在大學及研究所生涯很高興能加入 M204 實驗室這個大家庭，很感謝當實驗上有困難熊學姊總是不厭其煩地幫助我，平常無聊時也能一起分享許多有趣的事物，動物園方的劉教授和劉副園長，謝謝你們在採樣時大力的幫忙，讓我順利做出實驗還有完成論文，也很高興在超傭館有一群能一起吃飯聊天的好同學們，哈哈、至正、牧蘇、凌雲，讓我在研究所生涯不孤單，還要謝謝動物園的熊們，尤其是台灣黑熊黑糖，沒有你們的大便就沒有我的論文，最後也感謝所有幫助過我的學長姐、學弟妹，不論是實驗上還是生活上，都很高興有大家的參與。

摘要

本實驗研究中，使用聚合酶連鎖反應-變性梯度膠體電泳 (PCR-DGGE) 分析台灣黑熊生長過程以及不同熊科動物之間腸道菌相差異，實驗主要以 Phortix 1D 軟體對 PCR-DGGE 膠體做 V3 變異區核酸條帶分布相似度分析，了解不同樣本之間的相似性以及差異，並進一步以分子複殖方式獲得樣本中菌相的組成。

台灣黑熊生長過程中斷奶前時期 *Streptococcus* sp. 42% 為最主要之菌群，而斷奶後則變成是 *Clostridium* sp. 為最主要之菌群，由原本 13% 增加為 38%，*Streptococcus* sp. 則降至 8%。相似性分析顯示斷奶前後明顯分成兩群，而斷奶後樣本之間相似度並無太大差異，相隔一年及半年後的樣本與原先樣本比較相似度也都達到 70% 以上，顯示台灣黑熊在發育成熟後腸道菌相就不易改變。

不同熊科動物腸道菌相組成分析中發現，台灣黑熊、阿拉斯加棕熊、馬來熊之間，菌相組成非常相似，都是以 *Streptococcus* sp.、*Enterococcus* sp.、*Escherichia* sp. 為主，但是大貓熊則是 *Pseudomonas* sp.、*Enterobacter* sp. 為主。

實驗結果顯示，不論是台灣黑熊生長過程中或是不同熊科動物之間菌相變化，最主要都是與食物有較大關聯，而年齡或是物種所造成的影響則需要更進一步實驗去驗證。

Abstract

This experiment utilizes polymerase chain reaction denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE) to analyze the composition of the Taiwan Black Bear's (*Ursus thibetanus formosanus*) intestinal tract bacterial compositions during growth which was then compared the intestinal bacteria of other species of bears. Our efforts primarily focused on using Phortix 1D to find similarities in the V3 mutated nucleotide region on the PCR-DGGE gel. Molecular cloning was then utilized to obtain the exact composition of bacteria in the sample collected.

Pre-weaning, *Streptococcus* sp. is the primary bacterium species present in the Taiwan Black Bear's intestines at 44% of total bacterium composition. But after weaning, *Clostridium* sp. becomes the primary bacterium present at 38% rising from 17%. *Streptococcus* sp. levels however drop from the original 44% to 17%. Similarity analyses indicate that the pre-weaning and post-weaning bacterial fauna are split drastically into two groups, whereas post-weaning bacterial compositions seem to stabilize. Similarity studies done six months and a year after weaning are 70% alike, suggesting that Taiwan Black Bear intestinal bacterial composition does not change easily after the fauna matures.

Comparisons between the Taiwan Black Bear and other members of the Ursidae family reveal that both Alaskan Brown Bears and Malaysian Bears share the same intestinal bacterial fauna as the Taiwan Black Bear which primarily consists of *Streptococcus* sp., *Enterococcus* sp., and *Escherichia* sp. On the other hand, the Panda's intestinal bacteria are composed primarily of *Pseudomonas* sp.

and *Enterobacter* sp.

The study done suggests that changes in intestinal bacterial compositions are primarily linked to the bear's diets. Further research is required to determine whether the species of bear or phase of development affects the intestinal bacterial composition.



目錄

摘要	I
Abstract	II
目錄	IV
表目錄	VII
圖目錄	IX
前言	1
熊科動物簡介	1
台灣黑熊	1
腸道微生物	2
腸道微生物影響宿主	3
宿主對腸道微生物的影響	3
食物對腸道微生物之影響	4
年齡對腸道微生物之影響	4
糞便微生物代表腸道微生物	5

糞便菌相分析	6
實驗目的	8
材料方法	9
熊糞便採集	9
糞便樣本前處理及樣本中菌體 DNA 萃取	9
核酸膠體電泳分析	10
以 PCR 方式增幅糞便樣本中菌體 DNA.....	11
以變性膠體梯度電泳 (PCR-DGGE) 分析以 PCR 方式增幅糞便樣本中 菌體 DNA	12
銀染 (Silver stain)	13
PCR-DGGE 圖譜分析	14
條帶定序	14
基因選殖 (Cloning)	14
接合作用 (Ligation)	14
勝任細胞 (competent cell) 的製備.....	15
進行轉型作用 (Transformation)	15
定序結果分析	16

結果	17
糞便處理及菌體 DNA 抽取	17
變性梯度膠體電泳 (PCR-DGGE) 分析以 PCR 方式增幅之黑熊糞便樣 本中菌體 DNA	18
PCR-DGGE 圖譜分析	18
黑熊樣本 DGGE 條帶定序	19
黑熊樣本年間比較	20
不同熊類間腸道菌相差異分析	20
討論	22
熊類糞便樣本菌體 DNA 抽取模式建立	22
台灣黑熊生長發育過程中腸道菌相分析	22
黑熊成年後腸道菌相	24
動物園飼養之不同熊類間腸道菌相比較	25
參考文獻	27
圖表	32

表目錄

表一、黑熊成長過程樣本 DGGE 圖譜編號條帶定序結果..... 32

表二、四種熊類糞便樣本 DGGE 圖譜編號條帶定序結果..... 34



圖目錄

圖一、黑熊生長及採樣歷程。箭頭範圍為採樣時期.....	37
圖二、使用前人方法抽取之糞便菌體 DNA 洋菜瓊脂糖膠體電泳.....	38
圖三、更改方法後抽取之糞便菌體 DNA 洋菜瓊脂糖膠體電泳.....	39
圖四、黑熊糞便菌體 PCR-DGGE 垂直膠體電泳圖譜.....	40
圖五、黑熊糞便菌體 PCR-DGGE 圖譜.....	41
圖六、黑熊糞便菌體 PCR-DGGE 圖譜.....	42
圖七、黑熊糞便菌體 PCR-DGGE 圖譜.....	43
圖八、五月黑熊糞便樣本 DGGE 圖譜以軟體分析相似度.....	44
圖九、六月黑熊糞便樣本 DGGE 圖譜以軟體分析相似度.....	45
圖十、七月黑熊糞便樣本 DGGE 圖譜以軟體分析相似度.....	46
圖十一、八月黑熊糞便樣本 DGGE 圖譜以軟體分析相似度.....	47
圖十二、九月黑熊糞便樣本 DGGE 圖譜以軟體分析相似度.....	48
圖十三、十月黑熊糞便樣本 DGGE 圖譜以軟體分析相似度.....	49
圖十四、十一月黑熊糞便樣本 DGGE 圖譜以軟體分析相似度.....	50
圖十五、十二月黑熊糞便樣本 DGGE 圖譜以軟體分析相似度.....	51

圖十六、糞便樣本選取後 DGGE 圖譜之一	52
圖十七、糞便樣本選取後 DGGE 圖譜之二	53
圖十八、選取後樣本 DGGE 圖譜之一軟體分析	54
圖十九、選取後樣本 DGGE 圖譜之二軟體分析	55
圖二十、黑熊成長過程樣本 DGGE 圖譜條帶定序結果	56
圖二十一、黑熊成長過程樣本 DGGE 圖譜條帶定序結果延伸	57
圖二十二、黑熊成長過程樣本中菌屬總比例分析圖	58
圖二十三、黑熊成長過程樣本中不同階段菌屬比例分析圖	59
圖二十四、黑熊樣本年間比較 DGGE 圖譜軟體分析	60
圖二十五、四種熊類糞便樣本 DGGE 圖譜	61
圖二十六、四種熊類糞便樣本不同菌屬含量比例分析圖	62

前言

熊科動物簡介

熊是一種雜食性大型哺乳類，分類上屬於動物界、脊索動物門、哺乳綱、食肉目犬形亞目熊科，現存進化關係最近的物種是鰭足類（海獅、海豹、海象）和犬科。現在地球上有八種熊，廣泛分布北半球和南半球的一部分，如亞洲、歐洲、美洲和北極。常見的特徵有短尾、極佳的嗅覺和聽覺、五個無法收縮的爪，以及長、密、粗的毛。剛出生時，它的大小與天竺鼠差不多，至少要與母親生活一年。雖然熊屬於食肉目，但牠們是雜食性的，食物包括小動物、水果、堅果、蜂蜜等。部份品種甚至以植物為主食，北極熊基本是食肉動物，而大貓熊以竹子為主要食物，其他的熊都是雜食動物。熊的平均壽命是 25 到 40 年。北極熊是最大型的熊，是現存陸地上最大的食肉動物。馬來熊（太陽熊）是最小型的，比人的平均體重還小一點。

台灣黑熊

台灣黑熊是台灣產大型的陸生動物。體長 120-150 公分，尾長 20 -30 公分，肩高 60-70 公分，最重可逾 200 公斤。頭闊而圓，頸短，外耳殼圓而聳立，全身披黑色粗毛，體壯碩，四肢粗壯有力，前後肢均具五趾，掌全部裸出，爪彎曲而銳利。胸前有白色短毛構成 V 字形之白斑。台灣黑熊雖然為食肉目動物，但卻是屬於以植物之葉子、嫩芽，果實及蟲蛹為主食雜食性動物。除了交配期或撫育小熊期間外，通常獨居，白天在所築巢位或樹洞或岩洞內休息，夜晚也會外出覓食。冬季時並不冬眠，可能會移至較低海拔區域覓食。台灣黑熊為台灣特有亞種，棲息地以海拔 1,000-3,000 公尺之森林地帶為主。族群量稀少，由於棲息地受干擾與些許捕捉，現有的野生族群有隔離的現象。也使得台灣黑熊成為瀕臨絕種的物種（Hwang et al., 2002）。

腸道微生物

微生物普遍存在於環境之中，生物體的表面以及腔道中也不例外，微生物存在於生物體的皮膚、口鼻腔以及消化道（gastrointestinal tract）其中以消化道當中的微生物密度最高（Willey et al., 2009）。人類消化道中的微

生物，大部分都存在於大腸中，每公克大腸內容物約含有超過 10^{11} 的微生物，包括 300~400 種不同的菌種（Finegold, 1974）。腸道微生物數量龐大且大多屬於厭氧菌，糞便成分中即有 60% 都是由微生物所構成（Guarner and Malagelada, 2003）。因此構成了一個複雜的生態系統，彼此之間或與宿主之間密切交互作用的生物多樣性環境（Scanlan and Marchesi, 2008）。



腸道微生物影響宿主

對於所有動物來說腸道微生物都是不可或缺的存在，腸道微生物與宿主是一種互利共生的關係，在消化道中微生物彼此間或是與宿主之間都會互相影響生理代謝，這些腸道的微生物在宿主當中就如同是器官一般的存在，功能範圍廣泛，不論是在養份提供（Flint et al., 2007）、能量代謝轉換（Turnbaugh et al., 2006）、腸道內膜生長或是免疫系統的建立（Kruse et al., 1999）等等，都顯示出腸道微生物在宿主體內的重要性（Flint et al., 2008）。

宿主對腸道微生物的影響

不只是腸道微生物會對宿主造成影響，宿主本身的生理狀態也會對腸道微生物造成影響，生物體腸道當中的環境是一個變化頻繁而且有許多干擾的，在這樣的環境下細菌要能在腸道中長期停留並不容易，而為了要能長期停留在腸道中發展出了兩種方式，其中一種是與宿主的腸道上皮細胞交互作用而附著，另一種則是藉由增加繁殖速率，使繁殖速率大於腸道排除微生物的速率而可以停留在腸道中（Ewing and Cole, 1996），不論是哪

一種停留方式都會受到宿主的生理狀態所影響，而宿主本身的生理反應與免疫反應也都會去影響這些微生物的組成與種類。目前研究主要認為對於腸道微生物組成影響最主要的原因是宿主的種間親源關係（phylogeny）、食性（diet）以及年齡（age）（Ley et al., 2008）而日常飲食、健康狀況及環境等因素則會使得菌相產生變動（Penders et al., 2006）。

食物對腸道微生物之影響

食物對於動物來說是必要的營養來源，而對於寄宿於動物腸道內的微生物也是如此，腸道內微生物會去發酵並利用宿主所消化的食物，進而轉變成微生物自己的營養來源，不同類型或成分的食物微生物能發酵與利用的程度也會不同，例如：乳糖或蔗糖分子較小的營養來源較澱粉這類大分子的更容易讓微生物發酵利用，而不同的微生物也有不同的營養利用傾向，如果以不同營養組成之飼料餵食馬匹，會改變其消化道內菌相組成，如果餵食高澱粉類型的飼料，馬匹腸道內能利用乳酸的細菌量會明顯增

加，而餵食高纖維類型的飼料，則馬匹腸道內纖維分解菌的數量明顯增加（de Fombelle et al. 2003）

年齡對腸道微生物之影響

腸道微生物菌相也會因宿主年齡不同而有差異，因為宿主的生理狀況會影響體內微生物族群的變化，動物在發育過程中消化道環境改變而會菌相變動，在動物剛出生的階段，需要經過一段時間消化道中的菌相才會趨於穩定，因此年齡層相近的個體會具有較相似的菌種組成，而年老的個體則因為體內環境的不穩定，使得消化道菌相會受其健康狀況而有所差異

（Wang et al. 2003），前人研究以肉雞做為實驗對象，以不同年齡分成不同的實驗組，實驗過程都以相同的飼料餵食，分析雞隻迴腸中的菌相，發現到不管是 PCR-DGGE 圖譜或是菌相總菌數的變化，都是與年齡相關的，像是在 PCR-DGGE 分析中 streptococci 在年輕的雞隻樣本中並沒有出現，但是在年老的雞隻樣本中卻有出現（Knarreborg et al. 2002）。

糞便微生物代表腸道微生物

哺乳動物的消化道通常泛指食道 (esophagus)、胃 (stomach)、小腸、盲腸 (cecum) 及大腸。各部位因環境的不同，受到許多物理及化學環境因子所影響，如 pH 值、含氧量及養分受質等，其腸道微生物菌相也有所差異 (Evans et al., 1998)。糞便中微生物是整個消化道菌相的集合，食物從口進入經過整個消化道最後由肛門排出，其中微生物有些是在未入口中時就在食物中生長，有些則是棲息在不同部位的消化道上皮細胞表面 (Savage, 1977)，雖然腸道微生物菌相與糞便微生物有些許差異，但還是具有一定代表性，而且由於宿主消化道中之腸道微生物樣本取材不易且需維持厭氧狀態，因此腸道微生物相關研究文獻大部分仍取材自宿主糞便 (Marteau et al., 2001)。

糞便菌相分析

在傳統研究菌相的組成方法是將樣本連續稀釋，或直接在培養基培養，並選擇菌落純化後，再分離鑑定，但是由於培養基的環境並不如菌相

原始環境，所以導致只有不到 20%的細菌能被成功的培養、分離並鑑定，因此欲使用傳統培養方法得到正確的環境菌相一直都有其侷限性 (Fry,2000; Wayne,1987)。近十年來分子生物技術的進步發展，提供了許多不同於傳統方法的新分析方法 (Muyzer et al.,1993)，如利用原核生物轉譯出核糖體 RNA 的一段基因 (即 16S rDNA) 利用其高度保留性及種間差異性 (Woese, 1987)，用以分析環境樣本中菌種的組成，其中包含無法被培養的菌株，相較於傳統培養方法，分析 16S rDNA 基因庫的方法更能真實反應樣本中的完整細菌相 (Giovannoni et al., 1990; Ward et al., 1990)。而在本實驗中所使用的 PCR-DGGE 技術是將 16S rDNA 目標區段 (V3 region) 以 PCR 放大後結合 DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) 方式去分析樣本菌相組成，雖然序列長度相同，但是在含有變性試劑的連續濃度梯度膠體進行電泳因為不同菌種放大序列中 GC 含量的不同或是 GC 分布的位置不同的特異性，而能夠在電泳中被進一步分離，而每一個條帶都可能代表某菌種，因此在定序及比對後，可用來比較不同環境樣本的差異性 (Muyzer et al.,1993)，也可以進而利用統計軟體加以分析菌種差異。

實驗目的

- 本實驗研究目的為以 PCR-DGGE 去分析了解台灣黑熊生長發育過程中腸道菌相組成以及變化
- 分析動物園內飼養之熊類（台灣黑熊、阿拉斯加棕熊、馬來熊、大貓熊）之間腸道菌相，並探討腸道菌相與物種的關聯



材料方法

熊糞便採集

黑熊於民國 97 年 12 月 31 日出生，並於民國 98 年 4 月 16 日送入台北市立動物園，逐周採集糞便樣本，自民國 98 年 4 月 30 日至 12 月 30 日，共 25 次，民國 99 年 11 月每週採集 1 次共 4 次，民國 100 年 6 月每週採集 1 次共 3 次，民國 101 年 6 月每週採集台灣黑熊 (*Ursus thibetanus formosanus*)、馬來熊 (*Helarctos malayanus*)、阿拉斯加棕熊 (*Ursus arctos alascensis*) 糞便樣本共 4 次。每次採樣後分裝至 50 ml 尖底離心管中，儲藏於-80°C

糞便樣本前處理及樣本中菌體 DNA 萃取

取 5 g 糞便樣本置於無菌夾鍊袋中，並加入 45 mL Phosphate-buffer Saline(PBS) 並以手拍打夾鍊袋 1 分鐘後，移入 50 mL 離心管以 1000 rpm 10 分鐘 離心，取上清液 6 mL 置入 15 mL 離心管中，並離心 10000 rpm 去除上清液後再加入 570 μ L Tris-EDTA buffer 回溶 pellet 並移入 eppendorf 中，再加入 bead，置於-80°C 冷凍 20 分鐘，65°C 水浴 5 分鐘 再以震盪器

震盪 1 分鐘，重複以上步驟兩次後，以 mini shaker (IKA MS1 minishaker, USA) 連續震盪 10 分鐘以打破菌體細胞，將前處理後的菌液加入 20 μ L lysozyme 置 37°C 水浴 2 小時，加入 5 μ L protease E 及 30 μ L 10% (w/v) SDS 混合均勻後置 45°C 水浴 16 小時，使菌體細胞膜鬆散，並分解蛋白質，加入 100 μ L 5M NaCl 及 80 μ L CTAB-NaCl 溶液(10% hexadecyltrimethyl ammonium bromide in 0.7 M NaCl) 混勻後會出現乳白色混合物，置於 65°C 水浴 15 分鐘，加入 700 μ L chloroform-isoamylalcohol (體積比為 24:1) 混勻後，離心 14000 rpm 15 分鐘，此時溶液介面會有一層物質，為以變性之蛋白質，若分層不完全或有吸取到中間物質，則須重新離心，取上清液至新的 eppendorf 中，並避免吸到介面物質，加入 0.5 μ L RNase 37°C 水浴 30 分鐘，加入等體積的 phenol- chloroform-isoamylalcohol (體積比 25:24:1) 充分混勻並以 14000 rpm 離心 15 分鐘，加入 700 μ L chloroform-isoamylalcohol (體積比 24:1) 混勻後以 14000 rpm 離心 15 分鐘 重複兩次 去除可能殘留的 phenol，離心後取上層含核酸的溶液置於新的 eppendorf 中，並加入 0.7 倍體積的 iso-propanol 充分混合，置室溫 30 分鐘以 14000 rpm 離心 10 分鐘，去除上清液後，風乾，加入 -20°C 預冷的絕對酒精，溫和的混勻，使核

酸沉澱，以 14000 rpm 離心後去除上清液並風乾，風乾後以 30 μ L 無菌 TE buffer 回溶，進行核酸膠體電泳分析，並保存於 -20°C ，

核酸膠體電泳分析

取 1.2 g 瓊脂膠體固體顆粒 (Invitrogen, USA)，加入 100 mL 的 0.5X TAE buffer 後，以微波爐將膠體溶解。攪拌冷卻至 55°C 後，加入 2 μ L 溴化二錠 (ethyl bromide)，混合均勻後注入鑄膠器中，待膠體凝固後置入電泳槽 (RunOne, EmbiTec) 中備用，接著以 1:5 的比例將 6X DNA loading dye 與 DNA 樣本混合均勻後，將 6 μ L 的混合液注入膠體孔洞中。以 0.5X TAE buffer 作為電泳緩衝液，在電壓 50 伏特下進行電泳約 10 分鐘，再於電壓 100 伏特下進行電泳約 15 分鐘。結束電泳後取出膠體，置於紫外光源下觀察結果。

以 PCR 方式增幅糞便樣本中菌體 DNA

以 PCR 方式增幅利於糞便中菌體 DNA 分析，方式如下：取 2 μ L 10x PCR buffer、0.8 μ L 5 mM dNTPs、0.6 μ L 25 mM MgCl_2 、0.2 μ L 10 μ M P1 引子、0.2 μ L 10 μ M P2 引子、0.2 μ L Taq polymerase (5 unit/mL) 2 μ L DNA

template，並補水至總體積為 20 μ L，置於 0.2 mL eppendorf 中，混合均勻後，稍為離心將蓋子上的溶液離下來，並將 eppendorf 置於循環加溫器中，進行 PCR 反應，反應條件為 94 $^{\circ}$ C 5 分鐘 1 個循環，94 $^{\circ}$ C 50 秒、53 $^{\circ}$ C 1 分鐘 60 個循環、72 $^{\circ}$ C 3 分鐘 1 個循環，此反應的控制組是以無菌三次水代替 template DNA，以檢測藥品是否有外來 DNA 污染。PCR 產物以洋菜膠體電泳分析，此對引子增幅片段大小應為 193 bp。若要進行 PCR-DGGE 則 PCR 反應需改以 P3-GC Clamp、P2 引子增幅，方式如下：取 5 μ L 10x PCR buffer、2 μ L 5 mM dNTPs、1.5 μ L 25 mM $MgCl_2$ 、0.5 μ L 10 μ M P3-GC Clamp 引子、0.5 μ L 10 μ M P2 引子、0.5 μ L Taq polymerase (5 unit/mL) 5 μ L DNA template，並補水至總體積為 50 μ L，置於 0.2 mL eppendorf 中，混合均勻後，稍為離心將溶液離至底部，並將 eppendorf 置於循環加溫器中，進行 PCR 反應，反應條件為 94 $^{\circ}$ C 5 分鐘 1 個循環，94 $^{\circ}$ C 50 秒、53 $^{\circ}$ C 1 分鐘 60 個循環、72 $^{\circ}$ C 3 分鐘 1 個循環，此反應的控制組是以無菌三次水代替 template DNA，以檢測藥品是否有外來 DNA 污染。PCR 產物以洋菜瓊脂膠體電泳分析，此對引子增幅片段大小應為 233 bp。

以變性梯度膠體電泳(PCR-DGGE)方式分析以 PCR 方式增幅之糞便樣本中菌體 DNA

變性梯度膠體電泳分析，分為垂直梯度膠體 (perpendicular denaturing gradient gel)與水平梯度膠體 (parallel denaturing gradient gel)，先使用垂直梯度膠體電泳分析樣本的最適變性梯度，選取變性膠體梯度區域後再以水平梯度膠體分析，本實驗均以 12% Acrylamide 做為膠體固化劑，並以 Urea 以及 Formanid 做為變性劑，加入膠體溶液中使膠體成為 100%以及 0% denature acrylamide agent。待鑄的各管膠體溶液體積為 20 mL，分為 100% 以及 0%兩管，100% denature acrylamide agent 需加入 160 μ L APS (ammonium persulfate) 及 16 μ L TEMED (N, N, N', N'-tetramethyl-1,2-diaminomethane)，0%則是加入 110 μ L APS 及 11 μ L TEMED 用以將膠體溶液固化，加入後混勻，個別將兩管膠體吸入注射針筒內，並將針筒架設於 Gradient Former (Bio-Rad, USA) 上，將三向街頭接上後以穩定並均勻的速度推動 Gradient Former 使膠體緩緩混合並從灌膠孔旋鈕 (injection port fitting) 注入事先架設好的垂直玻璃鑄膠座，以形成 0%到 100%與電泳方向垂直之變性梯度膠體。水平膠體依照比例混合配出變性劑

濃度 40%與 60%之 denaturing acrylamide agent 進行分析，架設好水平膠體玻璃鑄膠座及 Gradient Former 後，由上部注入膠體溶液，凝固後就成為水平變性梯度膠體。鑄膠完成的膠體可進行電泳，電泳溫度為 60℃，電流為 70V，電泳槽中需加入 7 L 1x TAE-buffer 做為緩衝液，電泳時間為 15 小時，電泳反應完成後，取出膠體染色以觀察條帶分布情形或切取條帶。

銀染(Silver Stain)

將膠體取下後置於注有 0.1% 300 mL 硝酸銀溶液的專用染色槽中，並以水平震盪儀 100 rpm 震盪浸泡 20 分鐘，移除硝酸銀溶液，以去離子水潤洗膠體 2 次，再將膠體浸入每 300 mL 含有 3.6 g 氫氧化鈉、30 mg 硼酸及 1.2 mL 甲醛的顯色溶液中，待可清楚看見條帶後，將膠體移至含有 0.75% 碳酸鈉溶液中浸泡 20 分鐘強化條帶色澤，染色完成的膠片浸泡在 10%甘油溶液中一小時以後，拍照並進行封片。

PCR-DGGE 圖譜分析

將銀染(Silver Stain)後的膠體以 UVP GelDoc-it imaging System 照相儲存為.TIF 格式，再利用 ImageQuant TL 7.0 (GE Healthcare, USA) 中的 1D

分析軟體將圖檔數據化，並分析菌相組成，以及 Phoretix 1D v2003.02 (TotalLab, UK) 軟體進行 UPGMA 分析。

條帶定序

若要進行切取條帶的膠體，在進行完 PCR-DGGE 電泳後，取出膠體，浸泡在以無菌三次水稀釋 1 萬倍的 Syber Gold 溶液中，水平震盪 100rpm 2 小時，至於 UV 燈箱上以波長 302 nm 觀察，並切取目標條帶，置於 eppendorf 中加入 30 μ L 無菌三次水，放置 4°C 隔夜，使 DNA 溶出，並將此溶液取適當量以 P1-P2 引子進行 PCR 增幅，增幅後產物送至明欣生物科技公司進行定序。

基因選殖 (Cloning)

將條帶 PCR 產物以 P1-P2 引子進行 PCR 增幅後，使用 DNA clean Kit (GeneMark, TW) 按照廠商步驟將 PCR 產物純化，其後進行 ligation

接合作用 (Ligation)

使用 pGEM-T Easy vector (promega, AU)，依廠商建議步驟進行，反應

置於 4°C，作用 24 小時，得到具有插入序列的質體。

勝任細胞（competent cell）的製備

選用基因型 $LacZ^-$ 、tetracycline^r 的 *E. coli* XL1-blue 作為勝任細胞。將 *E. coli* XL1-blue 劃於含 tetracycline（20 µg/ml）（Sigma-Aldrich Corporation, PO Box 14508, Saint Louis, MO 63178 USA）的 LB 瓊脂培養基中，挑選出具 tetracycline 抗性的菌落後，接菌於 5 ml 含 tetracycline 的 LB 培養液，37°C 培養過夜，加入 30 ml LB 培養液，37°C 繼續培養 2 小時，直到 OD 值達到約 0.48。將培養好的菌液裝於離心管中，以離心機室溫 2500×g 離心 10 分鐘，去除上清液。沉澱物以 2 ml 4°C 預冷 $CaCl_2$ （100mM）懸浮後，再加入 12.5ml $CaCl_2$ 置於冰上 30 分鐘後，於 4°C 預冷離心機 2500×g 離心 5 分鐘後，去除上清液。沉澱物以 500 µl 4°C 預冷 $CaCl_2$ 懸浮後，分裝於 0.5 ml 微量離心管每管 50 µl。

進行轉型作用（Transformation）

勝任細胞在 0.5 ml 微量離心管內加入接合作用完的質體，質體與勝任細胞混合體積比約為 1：10，以 pippeting 方式混合。混合均勻後置於冰上

30 分鐘。再將微量離心管置於已預熱於 42°C~45°C 的水浴槽中，進行 heat shock，反應 45~60 秒後，放回冰上，接著將混合物推於含有 ampicillin (50 µg/ml) (Roche, Germany)、IPTG (200 µg/ml) (Roche, Germany) 及 X-gal (40 µg/ml) (Roche, Germany) 的 LB 瓊脂平板培養基上，於 37°C 培養 16~24 小時，挑選出白色菌落，即為可能含有 PCR 產物的菌體，取得純菌後，直接將平板培養基送至明欣生物科技公司分析，並取得序列。

定序結果分析

將定序後所得到的序列片段結果，與美國國家衛生院生物資訊中心 (NCBI) 的資料庫進行核酸序列相似度比對 (Blast)，以得到具有相似序列微生物的核酸序列以及其他相關資料。

結果

糞便處理及菌體 DNA 抽取

本實驗過程中，黑熊生長歷程以及各階段餵食方式標示在（圖一），本實驗對象的台灣黑熊於民國 97 年 12 月 31 日出生，在民國 98 年 4 月 16 日送入北市立動物園，4 月 21 日開始吃副食品，7 月 21 日斷奶，10 月 31 日開始每日會餵食 500 g 左右的生肉，採樣的時間點為民國 98 年 4 月至 12 月、民國 99 年 11 月、民國 100 年 6 月，每週採樣一次。黑熊為雜食性動物，在採樣過程中可以明顯發現，每次糞便樣本組成差異很大，而糞便中有大量未消化完全的食物殘渣，一開始是使用前人（邱, 2009）抽取豬隻糞便樣本菌體 DNA 流程，無法獲得可繼續後續實驗之菌體 DNA，而後改變方法，在抽取 DNA 時所取的糞便樣本由原本 1g 增加到 5g，原本以樣本混合 PBS 加入試管，再以試管震盪的方式改成將樣本混合 PBS 並加入無菌夾鍊袋中以手拍打，其餘步驟不改變，以前人方式抽取糞便菌體 DNA 洋菜瓊脂糖膠體電泳圖結果為（圖二），得到的只有少量且無法使用的 DNA，更改方式後抽取的糞便菌體 DNA 洋菜瓊脂糖膠體電泳圖結果為（圖三），變

更步驟後，可得到更大量且可用於後續實驗之菌體 DNA。



變性梯度膠體電泳(PCR-DGGE)方式分析以 PCR 方式增幅之黑熊糞便樣本中菌體 DNA

每週取得之糞便樣本 DNA 以 PCR 引子放大後，先利用 PCR-DGGE 垂直變性梯度膠體分析，了解變性範圍大約為 40%至 70%（圖四），再以此範圍進行水平變性梯度電泳分析，電泳結果圖為（圖五）、（圖六）、（圖七）。

PCR-DGGE 圖譜分析

將 PCR-DGGE 結果電泳圖以 Phoretix 1D v2003.02 軟體進行 UPGMA 逐月分析（圖八）至（圖十五），由軟體分析結果具有 70%以上相似度的樣本，則選取其中一個樣本，縮減樣本數，並使所有選取樣本可以使用在同一次的 PCR-DGGE 實驗中（圖十六）、（圖十七），選取日期為 4/30、5/7、5/14、5/28、6/4、6/11、6/18、7/2、7/15、7/22、7/29、8/6、8/13、9/3、9/10、9/17、10/1、10/7、10/28、11/4、11/11、11/18、12/2、12/23、12/30，第一張膠體（圖十六）最後一個樣本與（圖十七）第一個樣本相同，是做為兩張圖比對條帶位置的依據，此次實驗結果膠體再以軟體進行相似性分析（圖十八）、（圖十九）。軟體分析條帶相似性結果發現到，第一張圖譜主要分為

兩群（圖十八），分別為採樣日期 5/7 至 6/11 以及 6/18 至 8/6，第二張圖譜則沒有明顯分群（圖十九），大部分都有達到相似性 60%以上（圖十九、lane 3 至 lane 12）。



黑熊樣本 DGGE 條帶定序

DGGE 圖譜上條帶取得序列後，與 NCBI 資料庫比對，得知所屬菌屬，條帶所得到定序有 *Streptococcus* sp.、*Echerichia* sp.、*Clostridium* sp.、*Klebsiella* sp.、*Citrobacter* sp.、*Enterobacter* sp. 菌屬（圖二十）。所有定序成功條帶有 42 個，其中 *Streptococcus* sp. 有 12 個，*Echerichia* sp. 有 18 個，*Clostridium* sp. 有 7 個，*Klebsiella* sp. 有 3 個，*Citrobacter* sp. 有 1 個，*Enterobacter* sp. 有 2 個（表一）。因為並未完全得到所有條帶定序，在圖譜也發現到圖譜上同一個橫向位置上的條帶定序到的菌種都是同一種（圖二十一），並以 ImageQuanTL 軟體分析條帶強度，進一步了解不同菌屬在所有樣本中所佔的真實比例（圖二十二），其中 *Klebsiella* sp. 佔 31%、*Clostridium* sp. 佔 25%、*Escherichia* sp. 佔 20%、*Streptococcus* sp. 佔 19%、*Enterobacter* sp.、*Citrobacter* sp. 佔 1%，未鑑定出的菌屬佔 3%（總共 180 條帶中有 42 條未鑑定出菌屬），以及依照黑熊生長過程中不同時期所出現菌屬的比例（圖二十三），斷奶前 *Streptococcus* sp. 佔 42%、*Klebsiella* sp. 佔 30%、*Clostridium* sp. 佔 13%、*Escherichia* sp. 佔 10%、未鑑定出的菌屬佔 5%

(10/180)，*Enterobacter* sp.、*Citrobacter* sp. 未在此時期發現到，斷奶後 *Clostridium* sp. 佔 35%、*Klebsiella* sp. 佔 24%、*Escherichia* sp. 佔 20%、*Streptococcus* sp. 佔 11%、*Citrobacter* sp.、*Enterobacter* sp. 各佔 1%、未鑑定出的菌屬佔 8% (25/180)，斷奶後並且開始吃生肉時期 *Clostridium* sp. 佔 38%、*Klebsiella* sp. 佔 29%、*Escherichia* sp. 佔 22%、*Streptococcus* sp. 佔 8%、未鑑定出的菌屬佔 3% (7/180)、*Citrobacter* sp.、*Enterobacter* sp. 未在此時期發現到。

黑熊樣本年間比較

將民國 98 年 11 月、99 年 11 月、100 年 6 月黑熊樣本做 PCR-DGGE 實驗，並將 PCR-DGGE 圖譜以軟體分析 (圖二十四)，用以了解同一隻黑熊在不同年間腸道菌相之變化，除了 lane 6 以外，明顯分成兩群，98 年 11 月與 99 年 11 月 (圖二十四、lane 4、lane 5、lane 8、lane 9、lane 10、lane 11)，99 年 11 月 (lane 7) 與 100 年 6 月 (圖二十四、lane 1、lane 2、lane 3、lane 7)，此兩個分群各自相似度都有達到 70% 以上。

不同熊類間腸道菌相差異分析

民國 101 年 6 月至動物園採取黑熊、棕熊、馬來熊，三種熊類糞便樣本，以及取得前人研究大貓熊糞便菌體 DNA，以 PCR-DGGE 方式分析（圖二十五），並以軟體分析相似性，進一步將條帶切下後，溶出 DNA，以引子放大並送至明欣生物科技公司定序。部分定序結果有雜訊，則接著以分子複殖的方式取得序列。定序結果得到 *Streptococcus* sp.、*Enterococcus* sp.、*Escherichia* sp.、*Bacillus* sp.、*Weissella* sp.、*Pseudomonas* sp.、*Lactococcus* sp.、*Clostridium* sp.、*Comamonas* sp.這幾屬菌種，台灣黑熊、馬來熊、棕熊主要發現到的菌屬為 *Streptococcus* sp.、*Enterococcus* sp.、*Escherichia* sp.、*Bacillus* sp.、*Weissella* sp.、*Streptococcus* sp.。大貓熊團團及圓圓發現到的菌屬則是 *Pseudomonas* sp.、*Enterobacter* sp.、*Enterococcus* sp.、*Comamonas* sp.、*Streptococcus* sp.（圖二十五），進一步將所有取得定序序列以熊種區分做菌屬百分比分析（圖二十六），棕熊分析到的序列 *Streptococcus* sp. 佔 59%、*Enterococcus* sp. 佔 11%、*Escherichia* sp. 佔 17%、*Weissella* sp. 佔 13%，台灣黑熊分析到的序列 *Streptococcus* sp. 佔 51%、*Enterococcus* sp. 佔 31%、*Bacillus* sp. 佔 10%、*Escherichia* sp. 佔 8%，馬來熊分析到的序列 *Streptococcus* sp. 佔 34%、*Enterococcus* sp. 佔 17%、*Escherichia* sp. 佔 30%、

Bacillus sp. 佔 11%、*Lactococcus* sp.、*Weissella* sp. 各佔 4%，大貓熊分析到的序列 *Pseudomonas* sp. 佔 55%、*Enterobacter* sp. 佔 25%、*Enterococcus* sp.、*Comamonas* sp. 各佔 6%、*Streptococcus* sp. 佔 7%。



討論

熊類糞便樣本菌體 DNA 模式建立

本實驗所採取糞便樣本目標皆為食肉目熊科動物，此類大型哺乳動物雖為食肉目但卻是雜食，而且偏向草食性，多以蔬菜水果為主食，糞便樣本中有大量食物殘渣殘留。一開始是以前人研究的抽取豬隻糞便細菌 DNA 的方法（邱，2009）處理熊類糞便樣本，結果發現並不能有效的取得糞便內菌體 DNA，雖然豬隻也是雜食性動物，但是對於食物的消化是比較完全的，熊類糞便樣本約 70% 都是未消化完全的食物殘渣，所以前人以糞便樣本混合 phospho buffer saline (PBS) 加入試管中震盪的方式並不能有效的將食物殘渣上的菌體沖洗下來，或是沖洗下來的量太少。經過不斷測試改進方式之後，發現將原本糞便取的量由 1 g 增加至 5 g，並且改用把糞便樣本與 PBS 裝入無菌夾鏈袋中，手隔著夾鏈袋拍打的方式，能有效取得大量糞便樣本中的菌體，進一步去萃取 DNA 以利後續實驗進行。

台灣黑熊生長發育過程中腸道菌相分析

本實驗主要研究對象的這隻台灣黑熊，於民國 97 年 12 月 31 日出生，

在 98 年 4 月 16 日送入台北市立動物園，剛好能有機會隨著他成長，並取得糞便樣本，分析其腸道菌相的改變，有文獻指出日常飲食、年齡、健康狀況及環境因素等物理化學因子，如溫度、酸鹼值及受質等皆會影響腸道菌相（Penders et al., 2006），野生的北極熊也會因為生長的區域環境不同而使腸道菌相有所不同（Trine et al., 2010），而在本實驗中也發現到台灣黑熊生長過程中不同時期菌相差異，台灣黑熊生長過程中最主要所發現到的菌屬為 *Clostridium* sp.（25%）、*Escherichia* sp.（20%）、*Streptococcus* sp.（19%）、*Klebsiella* sp.（31%）而 *Enterobacter* sp. 及 *Citrobacter* sp.（1%）則被認為是偶發或是非常態出現的菌屬（圖二十二），在斷奶前的時期菌群主要組成是以 *Streptococcus* sp. 最多（42%）其次是 *Klebsiella* sp.（30%）而其他菌屬則各佔 10% 左右（圖二十三），由軟體分析結果也發現，黑熊食物以奶及副食品為主的時期（圖十八、lane 7 至 13）與食物為蔬菜水果的時期（圖十八、lane 1 至 6）明顯分成兩群。台灣黑熊斷奶之後菌屬組成明顯變動 *Streptococcus* sp. 由原本 42% 降至 11%，而 *Clostridium* sp. 由原本 13% 升高至 35%，*Escherichia* sp. 也從 10% 升高至 20%，在台灣黑熊開始吃生肉之後（10 月 30 日）*Clostridium* sp. 更升高至 38%，而 *Streptococcus* sp. 只

剩 8% (圖二十三)，影響腸道微生物菌相的因素有很多，其中飲食也是最主要的原因之一，以人類為例子，就算是相同物種純素食者菌相是以 *Clostridium coccooides* 以及 *Clostridium ramosum* 為主，而飲食包含大量魚及肉類者主要菌群則是 *Faecalibacterium prausnitzii*，因飲食習慣的不同腸道菌相也是會有明顯差異 (Mueller et al.,2006)，斷奶前後最明顯的是飲食的變化，表示我們在本實驗所發現到的菌相變化主要是與台灣黑熊在不同階段食物不同所致。

黑熊成年後腸道菌相

黑熊生長過程菌相分析之後，為了瞭解在黑熊成長成熟之後菌相上與以前是否會有變化，而再過了一年以及半年分別又再次採樣一個月，與先前的採樣樣本做比較，經過軟體分析圖譜之後發現到隔了一年以及再隔半年的圖譜相似度幾乎都有達到接近 70%以上，表示台灣黑熊發育成熟之後腸道菌相就不容易改變，前人研究指出嬰兒腸道菌相，要到兩歲才會像成人一般穩定，革蘭氏陰性厭氧菌的數目也是在兩歲後才會增加到成人的狀態 (Bjorksten et. al. 2001)，兔子盲腸內的微生物族群會隨著年齡而有所變

化，纖維素分解菌會在兔子出生後兩週開始出現，而在其斷奶並開始進食草料後，80% 的盲腸菌相則會建立完成，之後便維持穩定的平衡狀態 (Piattoni et al., 1995)，在本實驗中也有觀察到類似情形，台灣黑熊菌群組成在斷奶前是以 *Streptococcus* sp. 佔最多(42%)，斷奶後則變成 *Clostridium* sp. 佔為最多 (35%) *Echerichia* sp. 其次 (20%)，而 *Streptococcus* sp. 則減少至 11%，之後開始吃生肉的時期組成也是與斷奶後類似也是以 *Clostridium* sp. 所佔比例最多 (38%) *Streptococcus* sp. 再組成中佔的比例更低，由實驗結果看來台灣黑熊也是要達到一定的年齡腸道菌相才會趨於穩定。

動物園飼養之不同熊類間腸道菌相比較

目前台北市立動物園中飼養的熊科動物有馬來熊、台灣黑熊、阿拉斯加棕熊、大貓熊，以實驗方式希望去了解同樣都是人為飼養的熊科動物，腸道菌相是否會因為物種間的差異而有不同，實驗結果發現到，馬來熊，台灣黑熊，阿拉斯加棕熊的菌相中發現到雖然菌屬的比例上有差異，但是菌屬組成非常相似，發現到主要的菌屬是 *Streptococcus* sp.、*Enterococcus* sp.、*Escherichia* sp.，其中佔最多的也是 *Streptococcus* sp.（棕熊 59%、黑熊 51%、馬來熊 34%），在大貓熊樣本所觀察到的菌屬組成卻是以 *Pseudomonas* sp.、*Enterobacter* sp.為主，跟其他熊類發現到的菌屬是完全不同（圖二十六），在前人研究中所鑑定出的貓熊主要菌群為 *Enterococcus* sp.、*Lactobacillus* sp.、*Bifidobacterium* sp.、*Enterobacter* sp.（Wei et al. 2007）部分在本次實驗中也有發現，但最主要的 *Pseudomonas* sp. 前人研究中卻沒有出現，可能由於前人研究為上海動物園之貓熊，而由於環境與地域的關係導致此差異。大貓熊與其他熊類最明顯的差異就在於食性上的不同，大貓熊是以竹葉為主食，食性偏向全素，其他熊類則是以蔬菜水果為主食，

但還是有攝取肉類，食性偏向雜食。在本次實驗中，結果所看到的差異認為是由於食性的不同所導致，腸道微生物菌相非常複雜，不同環境因子或是不同的食物甚至是年齡都會導致不同個體腸道主要菌叢的差異（DeLong and Pace, 2001），許多研究闡明，食性是最主要去影響腸道微生物菌相的因素（Mueller et al., 2006; Penders et al., 2006），在前人研究中有發現有些生物（如反芻動物、白蟻、蚯蚓）消化道內有發展出特殊的古細菌，具有物種專一性（Egert et al. 2003），若要探討不同熊種與菌相之間的關係，可能需要更進一步深入去研究，找到特殊菌屬與物種之間的關連。

參考文獻

Bjorksten, B., Sepp, E. and Julge, K. 2001. Allergy development and the intestinal microflora during the first year of life. *J Allergy Clin Immunol.*;108:516-20.

de Fombelle, A., M. Varloud, A. G. Goachet, E. Jacotot, C. Philippeau, C. Drogoul, and V. Julliand. 2003. Characterization of the microbial and biochemical profile of the different segments of the digestive tract in horses given two distinct diets. *Animal Science* 77:293-304.

DeLong, E. E. and Pace, N. R. 2001. Environmental diversity of Bacteria and Archaea. *Systematic Biology* 50:470-478.

Egert, M., B. Wagner, T. Lemke, A. Brune, and M. W. Friedrich. 2003. Microbial community structure in midgut and hindgut of the humus-feeding larva of *Pachnoda ephippiata* (Coleoptera : Scarabaeidae). *Applied and Environmental Microbiology* 69:6659-6668.

Evans, D. F. 1998. Physicochemical environment of the colon. *European Journal of Cancer Prevention* 7: S79-S80.

Finegold, S. M., Attebery, H. R., and Sutter, V. L. 1974. Effect of diet on human fecal flora - comparison of japanese and american diets. *American Journal of Clinical Nutrition* 27: 1456-1469.

Flint, H. J., Bayer, E. A., Rincon, M. T., Lamed, R., and White, B. A. 2008. Polysaccharide utilization by gut bacteria: potential for new insights from genomic analysis. *Nature Reviews Microbiology* 6: 121-131.

Fry J. 2000. Bacterial diversity and unculturables. *Microbiol. Today.* 27: 186-188

Glad T., Pål B., Kaare M. N., Lorenzo B., Magnus A., Jon A. and Monica A. S. 2010. Bacterial diversity in faeces from polar bear (*Ursus maritimus*) in Arctic Svalbard. *BMC Microbiology.* 10: 1-10

Giovannoni S. J., Britschgi T. B., Moyer C. L., Field K. G. 1990. Genetic diversity in Sargasso Sea bacterioplankton. *Nature* 345: 60-63

Guarner, F., and Malagelada, J. R. 2003. Gut flora in health and disease. *Lancet* 361: 512-519.

Hwang, M. H., D. L. Garshelis, and Y. Wang. 2002. Diets of Asiatic black bears in Taiwan, with methodological and geographical comparisons. *Ursus*. 13:111-125.

Knarreborg A., M. A. Simon, R. M. Engberg, B. B. Jensen and G. W. Tannock. 2002. Effects of Dietary Fat Source and Subtherapeutic Levels of Antibiotic on the Bacterial Community in the Ileum of Broiler Chickens at Various Ages. *Applied and Environmental Microbiology*. 68: 5918-5924

Ley, R. E., Lozupone, C. A., Hamady, M., Knight, R., and Gordon, J. I. 2008. Worlds within worlds: evolution of the vertebrate gut microbiota. *Nature Reviews Microbiology* 6: 776-788.

Marteau, P., Pochart, P., Dore, J., Bera-Maillet, C., Bernalier, A., and Corthier, G. 2001. Comparative study of bacterial groups within the human cecal and fecal microbiota. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 4939-4942.

Mueller S, Saunier K, Hanisch C, Norin E, Alm L, Midtvedt T, Cresci A, Silvi S, Orpianesi C, Verdenelli MC, Clavel T, Koebnick C, Zunft HJ, Dore J, Blaut M. 2006. Differences in fecal microbiota in different European study

populations in relation to age, gender, and country: a cross-sectional study. *Appl Environ Microbiol* 72: 1027-1033

Muyzer G, de Waal E. C., Uitterlinden A. G. 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

Neefs, J. M., Y. V. De Peer., L. Hendriks, and R. DeWachter. 1990. Compilation of small ribosomal subunit RNA sequences. *Nucleic Acids Research*. 18:2237–2317.

Penders J., Thijs C., Vink C., Stelma F. F., Snijders B., Kummeling I., van den Brandt P. A., Stobberingh E. E. 2006. Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. *Pediatrics* 118: 511-521

Piattoni, F., L. Maertens, and D. Demeyer. 1995. Age-dependent variation of cecal contents composition of young-rabbits. *Archives of Animal Nutrition-Archiv Fur Tierernahrung* 48:347-355.

Prescott's principles of microbiology. Edited by **Joanne M. Willey, Linda**

M. Sherwood, and Chris J. Woolverton. 2009

Savage, D.C. 1977. Microbial ecology of gastrointestinal tract. *Annual Review of Microbiology* 31: 107-133.

Scanlan, P. D., and Marchesi, J. R. 2008. Micro eukaryotic diversity of the human distal gut microbiota: qualitative assessment using culture dependent and independent analysis of faeces. *Isme Journal* 2: 1183-1193.

Ward D. M., Weller R., Bateson M. M. 1990. 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community. *Nature* 345: 63-65

Wayne L. G., Brenner, D. J., Colwell, R. R., Grimont, P. A. D., Kandler, O., Krichevsky, M. I., Moore, L. H., Moore, W. E. C., Murray, R. G. E., Stackebrandt, E., Starr, M. P., and Truper, H. G. 1987. Report of the Ad-Hoc-Committee on Reconciliation of Approaches to Bacterial Systematics. *International Journal of Systematic Bacteriology* 37: 463-464

Wei G., Lu H., Zhou Z., Xie H., Wang A., Nelson K., Zhao L. 2007. The microbial community in feces of the giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*) as

determined byPCR-TGGE profiling and clone library analysis. Microbial Ecology 54:194-202

Woese C. R. 1987. Bacterial evolution. Microbiol Rev 51: 221-271



表一、黑熊成長過程樣本 DGGE 圖譜編號條帶定序結果

編號	菌屬	序列相似度(Bases/Bases)
1	<i>Streptococcus</i> sp.	160/162 (99%)
2	<i>Streptococcus</i> sp.	160/160 (100%)
3	<i>Streptococcus</i> sp.	196/197 (99%)
4	<i>Streptococcus</i> sp.	159/160 (99%)
5	<i>Streptococcus</i> sp.	157/161 (98%)
6	<i>Streptococcus</i> sp.	159/160 (99%)
7	<i>Escherichia</i> sp.	157/160 (98%)
8	<i>Streptococcus</i> sp.	197/197 (100%)
9	<i>Escherichia</i> sp.	157/160 (98%)
10	<i>Streptococcus</i> sp.	150/152 (99%)
11	<i>Klebsiella</i> sp.	156/159 (99%)
12	<i>Clostridium</i> sp.	126/130 (97%)
13	<i>Escherichia</i> sp.	152/153 (99%)
14	<i>Enterobacter</i> sp.	157/160 (98%)
15	<i>Clostridium</i> sp.	126/127 (99%)
16	<i>Escherichia</i> sp.	196/197 (99%)
17	<i>Streptococcus</i> sp.	156/158 (99%)
18	<i>Clostridium</i> sp.	157/159 (99%)
19	<i>Streptococcus</i> sp.	159/160 (99%)
20	<i>Enterobacter</i> sp.	155/157 (99%)
21	<i>Citrobacter</i> sp.	170/174 (98%)
22	<i>Klebsiella</i> sp.	156/159 (99%)
23	<i>Klebsiella</i> sp.	159/161 (99%)
24	<i>Streptococcus</i> sp.	160/160 (100%)
25	<i>Escherichia</i> sp.	158/159 (99%)
26	<i>Escherichia</i> sp.	157/158 (99%)
27	<i>Escherichia</i> sp.	159/161 (99%)
28	<i>Escherichia</i> sp.	159/161 (99%)
29	<i>Escherichia</i> sp.	158/161 (98%)
30	<i>Escherichia</i> sp.	159/161 (99%)
31	<i>Escherichia</i> sp.	157/160 (98%)
32	<i>Escherichia</i> sp.	159/161 (99%)
33	<i>Klebsiella</i> sp.	155/159(97%)
34	<i>Klebsiella</i> sp.	161/161 (100%)
35	<i>Klebsiella</i> sp.	158/159(99%)
36	<i>Klebsiella</i> sp.	170/174 (98%)
37	<i>Escherichia</i> sp.	147/147 (100%)
38	<i>Escherichia</i> sp.	156/159 (99%)

編號	菌屬	序列相似度 (Bases/Bases)
39	<i>Escherichia</i> sp.	157/160 (98%)
40	<i>Escherichia</i> sp.	197/198 (99%)
41	<i>Escherichia</i> sp.	157/160 (98%)
42	<i>Escherichia</i> sp.	157/160 (98%)



表二、四種熊類糞便樣本 DGGE 圖譜編號條帶定序結果

編號	菌屬	序列相似度 Bases/Bases (%)
1	<i>Weissella</i> sp.	196/196 (100%)
*2	<i>Enterococcus</i> sp.	197/197 (100%)
	<i>Weissella</i> sp.	195/196 (99%)
*3	<i>Enterococcus</i> sp.	196/196 (100%)
	<i>Streptococcus</i> sp.	196/197 (99%)
4	<i>Streptococcus</i> sp.	159/160 (99%)
5	<i>Streptococcus</i> sp.	159/160 (99%)
6	<i>Streptococcus</i> sp.	161/162 (99%)
7	<i>Escherichia</i> sp.	196/196 (100%)
8	<i>Streptococcus</i> sp.	197/197 (100%)
9	<i>Weissella</i> sp.	196/196 (100%)
*10	<i>Enterococcus</i> sp.	195/196 (99%)
	<i>Streptococcus</i> sp.	197/197 (100%)
11	<i>Streptococcus</i> sp.	161/162 (99%)
*12	<i>Streptococcus</i> sp.	159/160 (99%)
	<i>Escherichia</i> sp.	196/196 (100%)
13	<i>Streptococcus</i> sp.	197/197 (100%)
14	<i>Enterococcus</i> sp.	197/197 (100%)
15	<i>Enterococcus</i> sp.	196/197(99%)
16	<i>Streptococcus</i> sp.	159/160 (99%)
17	<i>Escherichia</i> sp.	156/160 (98%)
18	<i>Enterococcus</i> sp.	196/196 (100%)
19	<i>Enterococcus</i> sp.	197/197 (100%)
*20	<i>Enterococcus</i> sp.	193/197(98%)
	<i>Clostridium</i> sp.	167/171(98%)
21	<i>Enterococcus</i> sp.	158/159 (99%)
22	<i>Bacillus</i> sp.	158/159(99%)
23	<i>Streptococcus</i> sp.	160/160 (100%)
24	<i>Escherichia</i> sp.	157/160 (98%)
25	<i>Streptococcus</i> sp.	159/161 (99%)
26	<i>Streptococcus</i> sp.	159/160 (99%)
27	<i>Streptococcus</i> sp.	161/162(99%)
28	<i>Streptococcus</i> sp.	159/160(99%)
29	<i>Streptococcus</i> sp.	159/160(99%)

*同一條帶中包含有兩屬菌的序列

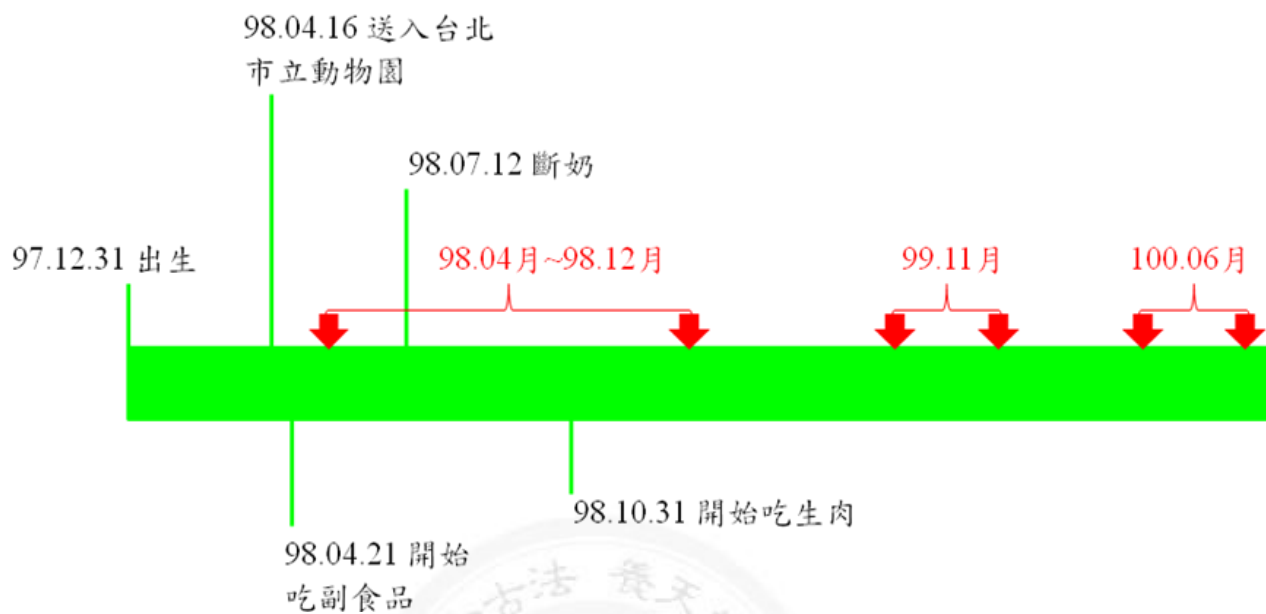
編號	菌屬	序列相似度(Bases/Bases)
30	<i>Streptococcus</i> sp.	160/160 (100%)
31	<i>Enterococcus</i> sp.	196/197 (99%)
32	<i>Streptococcus</i> sp.	196/197 (99%)
33	<i>Streptococcus</i> sp.	159/160 (99%)
*34	<i>Streptococcus</i> sp.	196/197 (99%)
	<i>Lactococcus</i> sp.	196/197(99%)
35	<i>Escherichia</i> sp.	195/196 (99%)
*36	<i>Escherichia</i> sp.	194/196 (99%)
	<i>Streptococcus</i> sp.	197/197 (100%)
37	<i>Enterococcus</i> sp.	157/159 (99%)
38	<i>Bacillus</i> sp.	155/159 (97%)
39	<i>Bacillus</i> sp.	155/160 (97%)
*40	<i>Enterococcus</i> sp.	196/197 (99%)
	<i>Clostridium</i> sp.	168/171 (98%)
41	<i>Streptococcus</i> sp.	197/197 (100%)
42	<i>Escherichia</i> sp.	157/160 (98%)
*43	<i>Escherichia</i> sp.	196/196 (100%)
	<i>Enterococcus</i> sp.	194/196 (99%)
44	<i>Weissella</i> sp.	157/158 (99%)
*45	<i>Enterococcus</i> sp.	197/197 (100%)
	<i>Streptococcus</i> sp.	197/197 (100%)
46	<i>Enterococcus</i> sp.	196/196 (100%)
47	<i>Streptococcus</i> sp.	196/197 (99%)
48	<i>Streptococcus</i> sp.	159/160 (99%)
*49	<i>Streptococcus</i> sp.	197/197 (100%)
	<i>Escherichia</i> sp.	195/196 (99%)
*50	<i>Enterococcus</i> sp.	196/197 (99%)
	<i>Pseudomonas</i> sp.	187/197 (95%)
51	<i>Pseudomonas</i> sp.	153/156 (98%)
52	<i>Pseudomonas</i> sp.	158/159 (99%)
53	<i>Pseudomonas</i> sp.	152/159 (96%)
54	<i>Pseudomonas</i> sp.	153/158 (97%)
55	<i>Enterobacter</i> sp.	195/196 (99%)
56	<i>Comamonas</i> sp.	155/156 (99%)

*同一條帶中包含有兩屬菌的序列

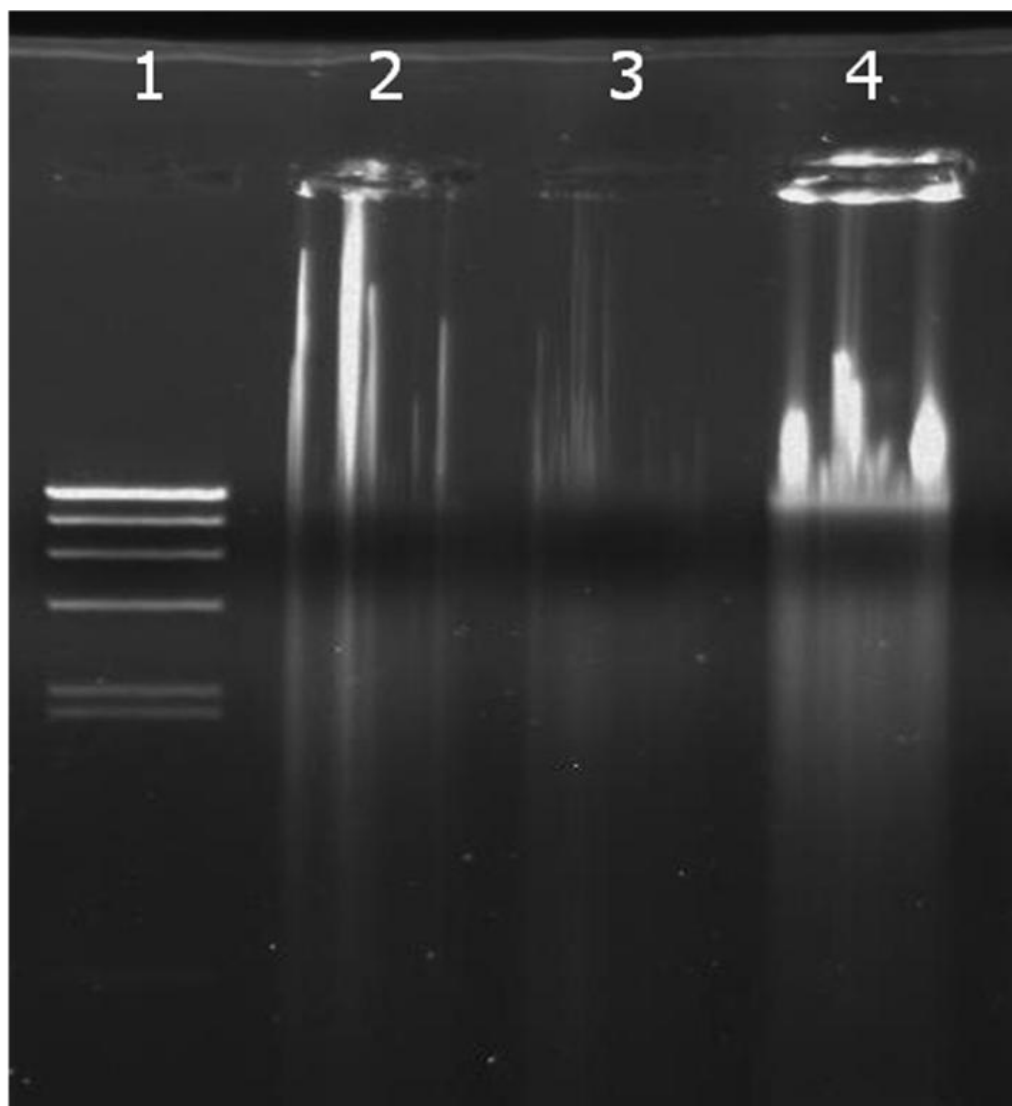
編號	菌屬	序列相似度 (Bases/Bases)
*57	<i>Streptococcus</i> sp.	195/197 (99%)
	<i>Pseudomonas</i> sp.	194/196 (99%)
*58	<i>Enterobacter</i> sp.	195/196 (99%)
	<i>Pseudomonas</i> sp.	194/196 (99%)
59	<i>Pseudomonas</i> sp.	193/196 (98%)
60	<i>Pseudomonas</i> sp.	153/156 (98%)
61	<i>Enterobacter</i> sp.	157/160 (98%)
62	<i>Enterobacter</i> sp.	160/160 (100%)

*同一條帶中包含有兩屬菌的序列



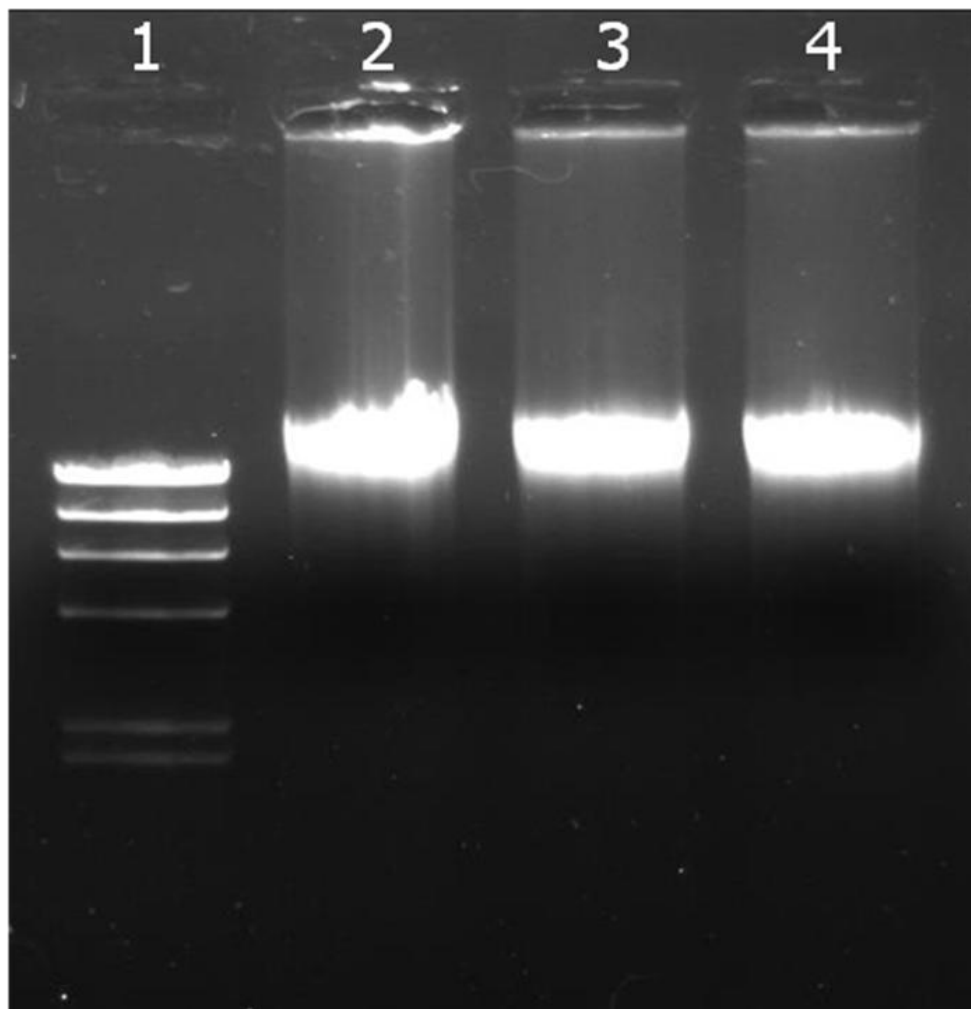


圖一、黑熊生長及採樣歷程。箭頭範圍為採樣時期。



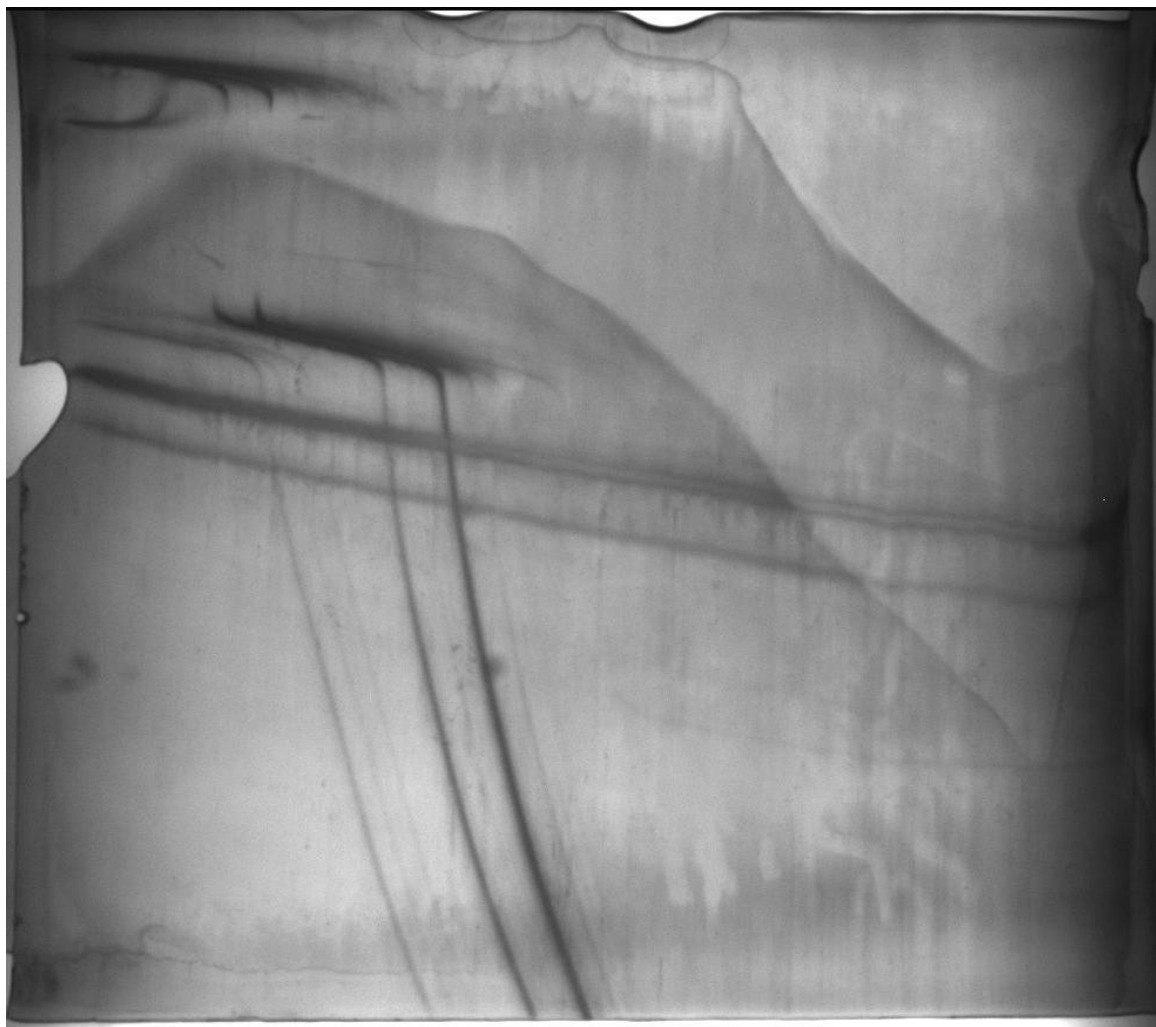
圖二、使用前人方法抽取之糞便菌體 DNA 洋菜瓊脂糖膠體電泳。

Lane 1：Marker， Lane 2~4：6/25 黑熊糞便樣本。



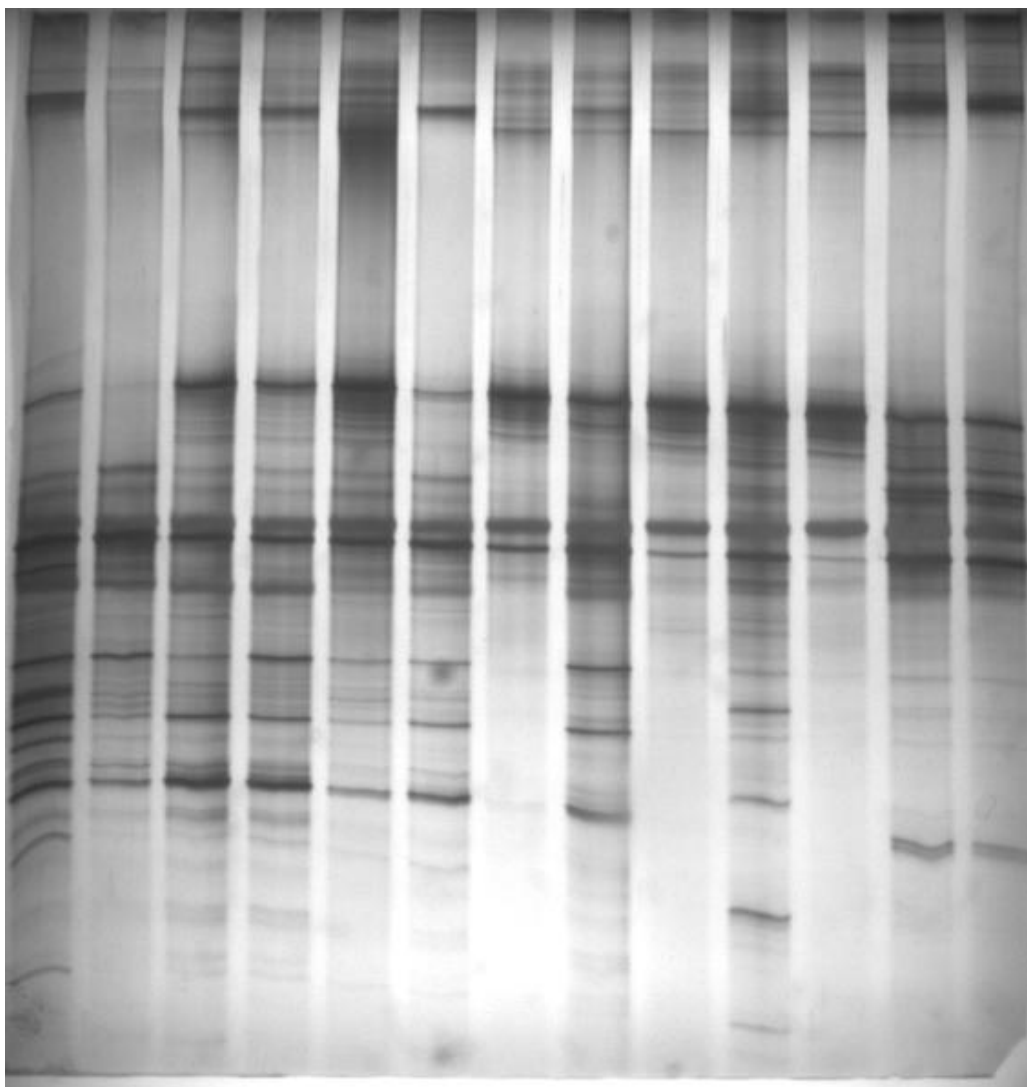
圖三、更改方法後抽取之糞便菌體 DNA 洋菜瓊脂糖膠體電泳。

Lane 1：Marker， Lane 2~4：6/25 黑熊糞便樣本。

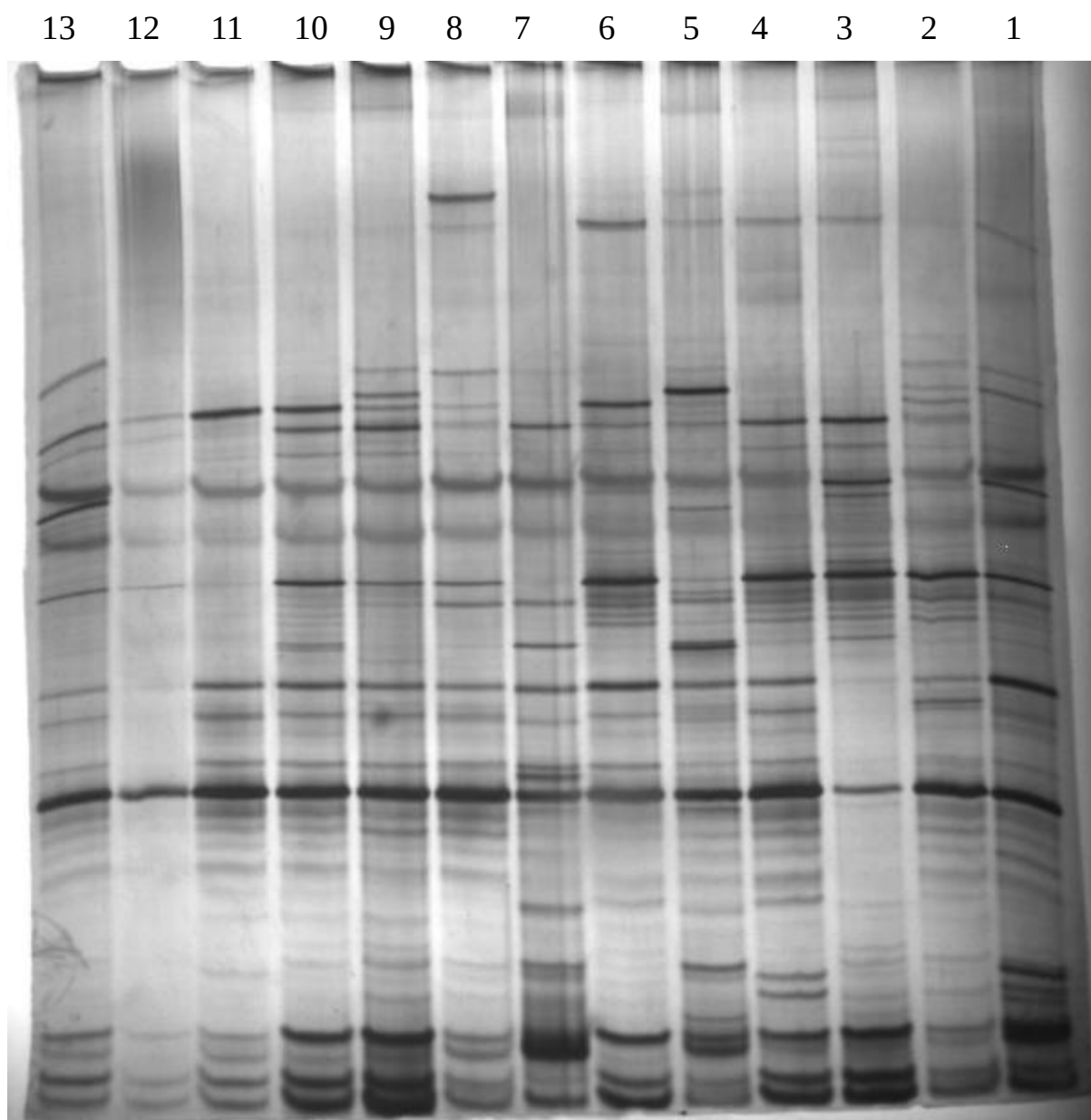


圖四、黑熊糞便菌體 PCR-DGGE 垂直膠體電泳圖譜。

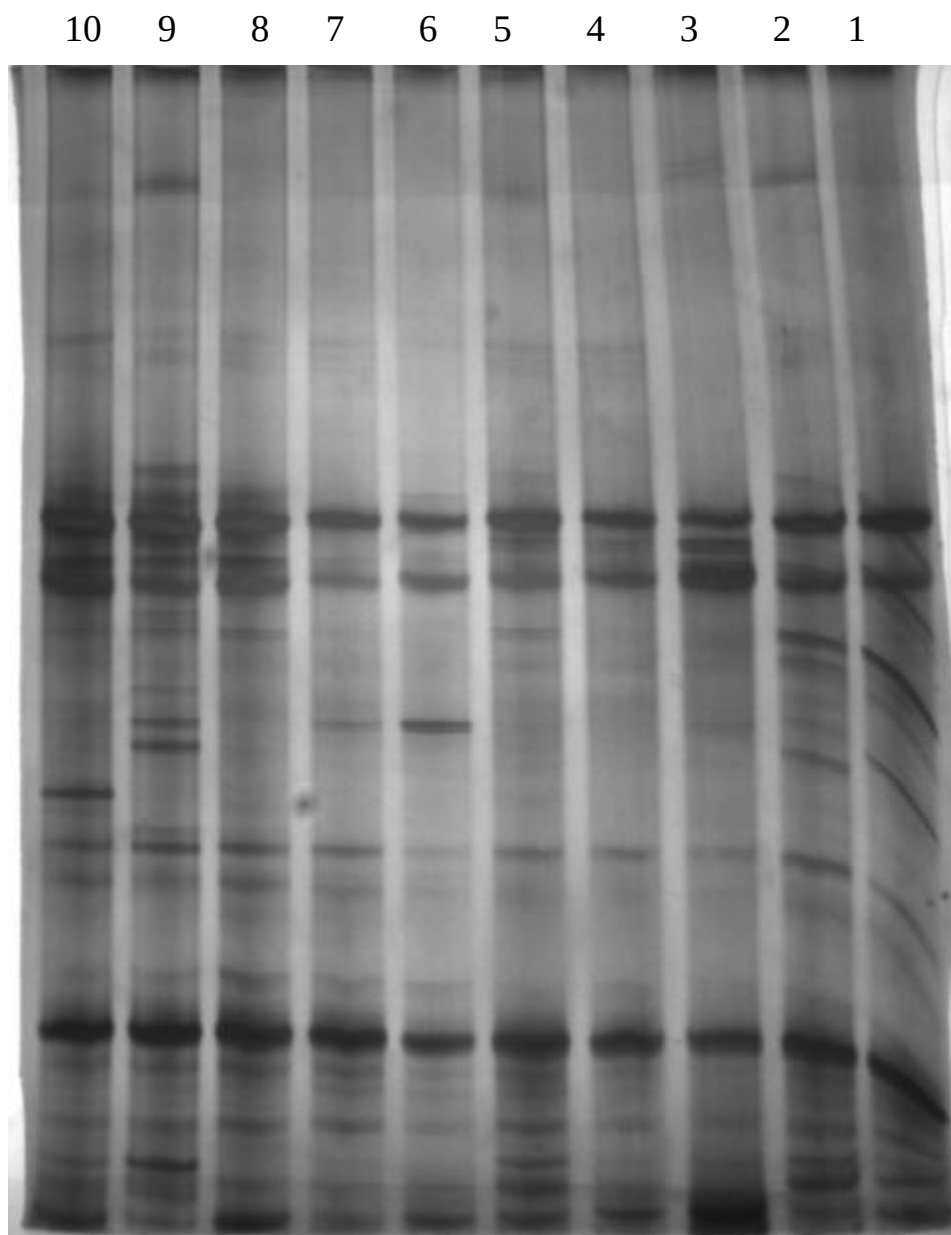
13 12 11 10 9 8 7 6 5 4 3 2 1



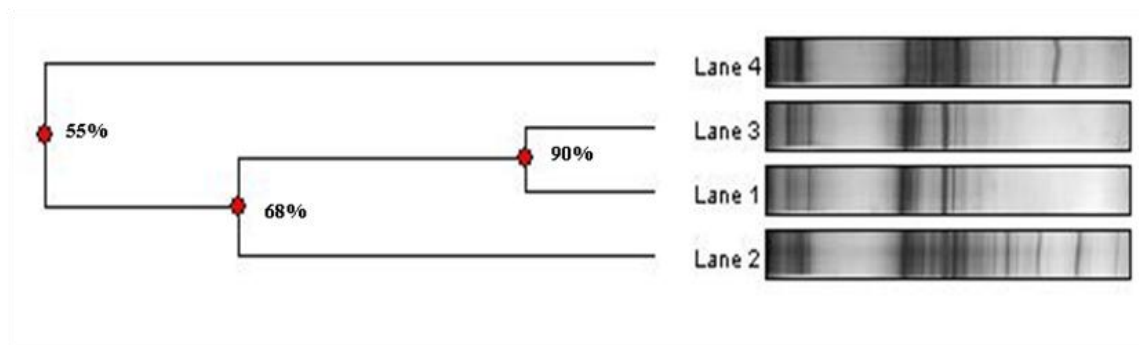
圖五、黑熊糞便菌體 PCR-DGGE 圖譜。Lane 1：採樣日期 4/30，Lane 2：採樣日期 5/7，Lane 3：採樣日期 5/14，Lane 4：採樣日期 5/21，Lane 5：採樣日期 5/28，Lane 6：採樣日期 6/4，Lane 7：採樣日期 6/11，Lane 8：採樣日期 6/18，Lane 9：採樣日期 6/25，Lane 10：採樣日期 7/2，Lane 11：採樣日期 7/8，Lane 12：採樣日期 7/15，Lane 13：採樣日期 7/22。



圖六、黑熊糞便菌體 PCR-DGGE 圖譜。Lane 1：採樣日期 7/29，Lane 2：採樣日期 8/6，Lane 3：採樣日期 8/13，Lane 4：採樣日期 8/20，Lane 5：採樣日期 8/27，Lane 6：採樣日期 9/3，Lane 7：採樣日期 9/10，Lane 8：採樣日期 9/17，Lane 9：採樣日期 9/24，Lane 10：採樣日期 10/1，Lane 11：採樣日期 10/7，Lane 12：採樣日期 10/14，Lane 13：採樣日期 10/21。

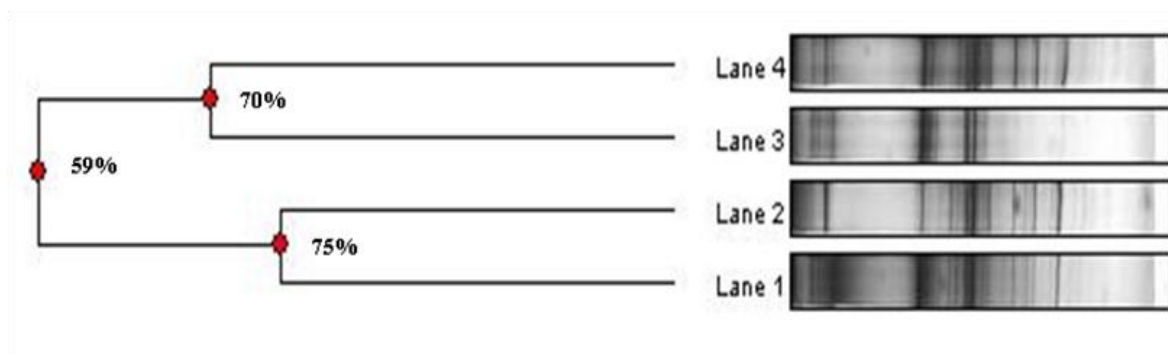


圖七、黑熊糞便菌體 PCR-DGGE 圖譜。Lane 1：採樣日期 10/28，Lane 2：採樣日期 11/4，Lane 3：採樣日期 11/11，Lane 4：採樣日期 11/18，Lane 5：採樣日期 11/25，Lane 6：採樣日期 12/2，Lane 7：採樣日期 12/9，Lane 8：採樣日期 12/16，Lane 9：採樣日期 12/23，Lane 10：採樣日期 12/30。



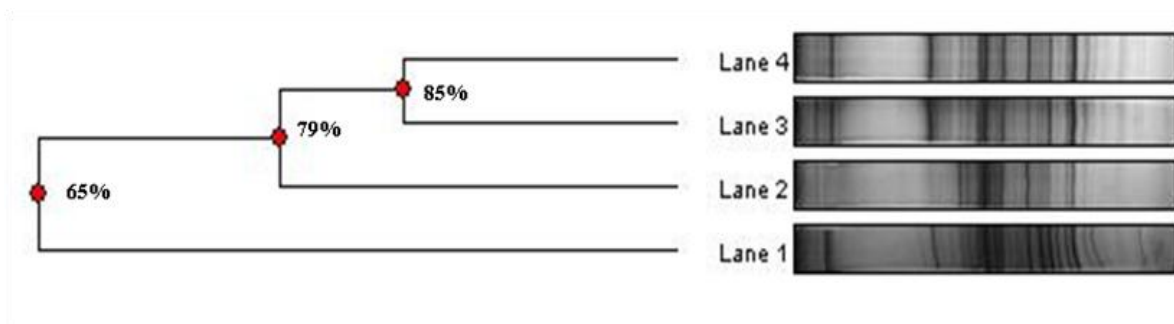
圖八、五月黑熊糞便樣本 DGGE 圖譜以軟體分析相似度。Lane 1：採樣日期 5/28，Lane 2：採樣日期 5/21，Lane 3：採樣日期 5/14，Lane 4：採樣日期 5/7。





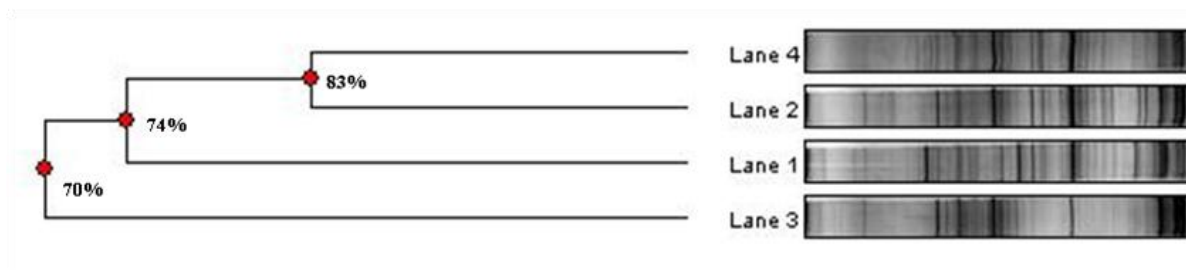
圖九、六月黑熊糞便樣本 DGGE 圖譜以軟體分析相似度。Lane 1：採樣日期 6/25，Lane 2：採樣日期 6/18，Lane 3：採樣日期 6/11，Lane 4：採樣日期 6/4。





圖十、七月黑熊糞便樣本 DGGE 圖譜以軟體分析相似度。Lane 1：採樣日期 7/22，Lane 2：採樣日期 7/15，Lane 3：採樣日期 7/8，Lane 4：採樣日期 7/2。





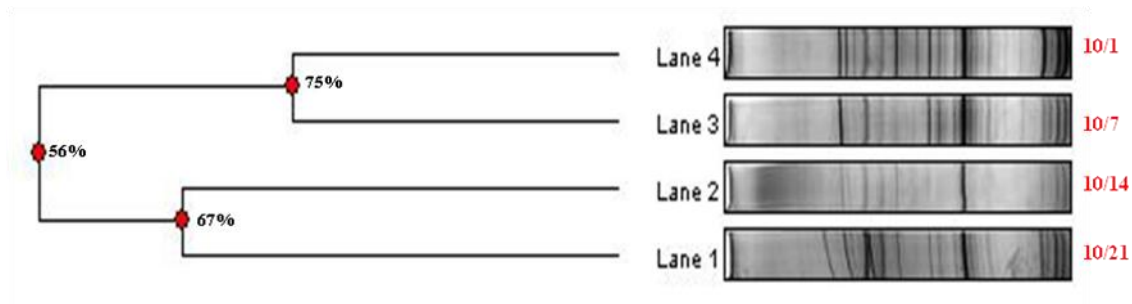
圖十一、八月黑熊糞便樣本 DGGE 圖譜以軟體分析相似度。Lane 1：採樣日期 8/27，Lane 2：採樣日期 8/20，Lane 3：採樣日期 8/13，Lane 4：採樣日期 8/6。





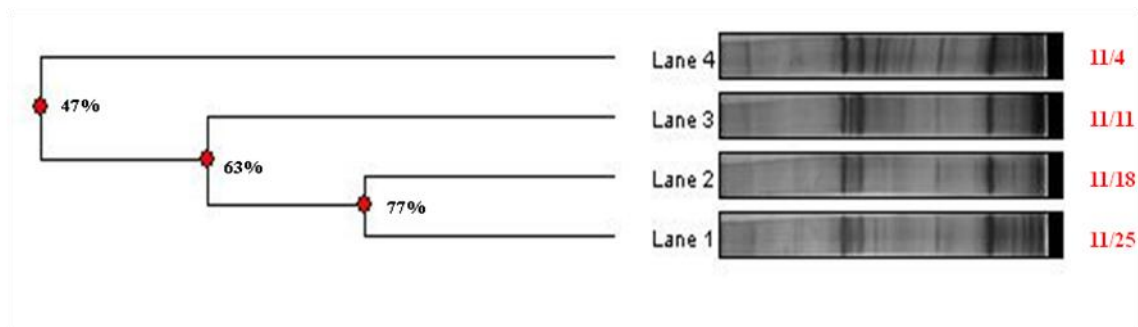
圖十二、九月黑熊糞便樣本 DGGE 圖譜以軟體分析相似度。Lane 1：採樣日期 9/24，Lane 2：採樣日期 9/17，Lane 3：採樣日期 9/10，Lane 4：採樣日期 9/3。





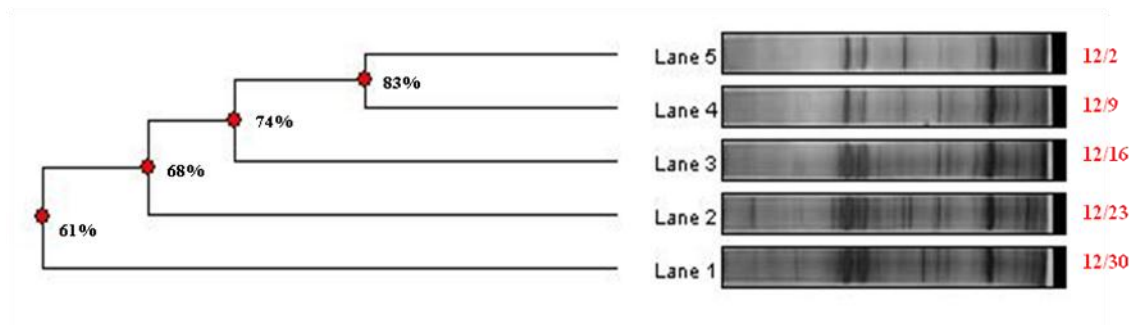
圖十三、十月黑熊糞便樣本 DGGE 圖譜以軟體分析相似度。Lane 1：採樣日期 10/21，Lane 2：採樣日期 10/14，Lane 3：採樣日期 10/7，Lane 4：採樣日期 10/1。



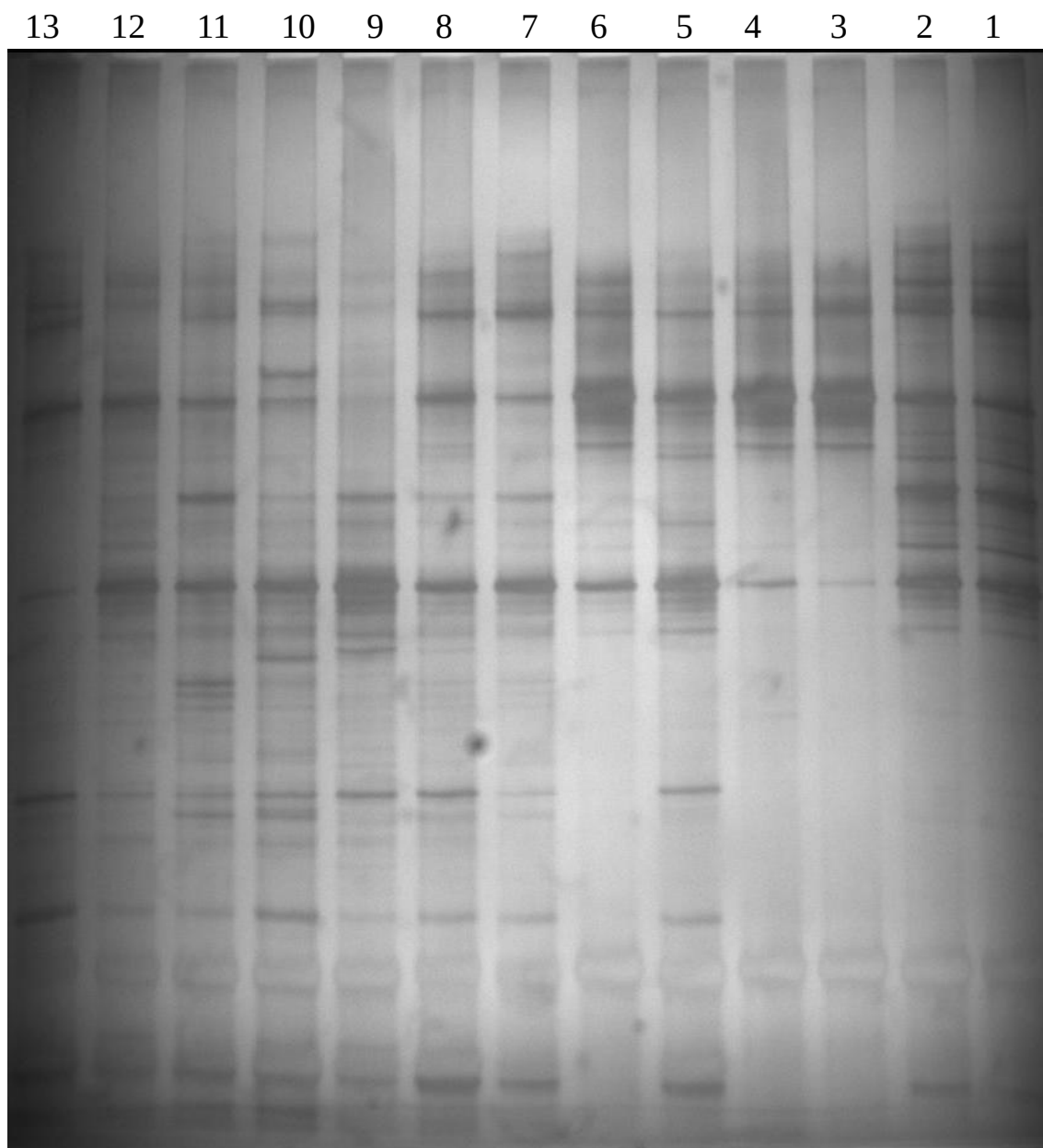


圖十四、十一月黑熊糞便樣本 DGGE 圖譜以軟體分析相似度。Lane 1：採樣日期 11/25，Lane 2：採樣日期 11/18，Lane 3：採樣日期 11/11，Lane 4：採樣日期 11/4。

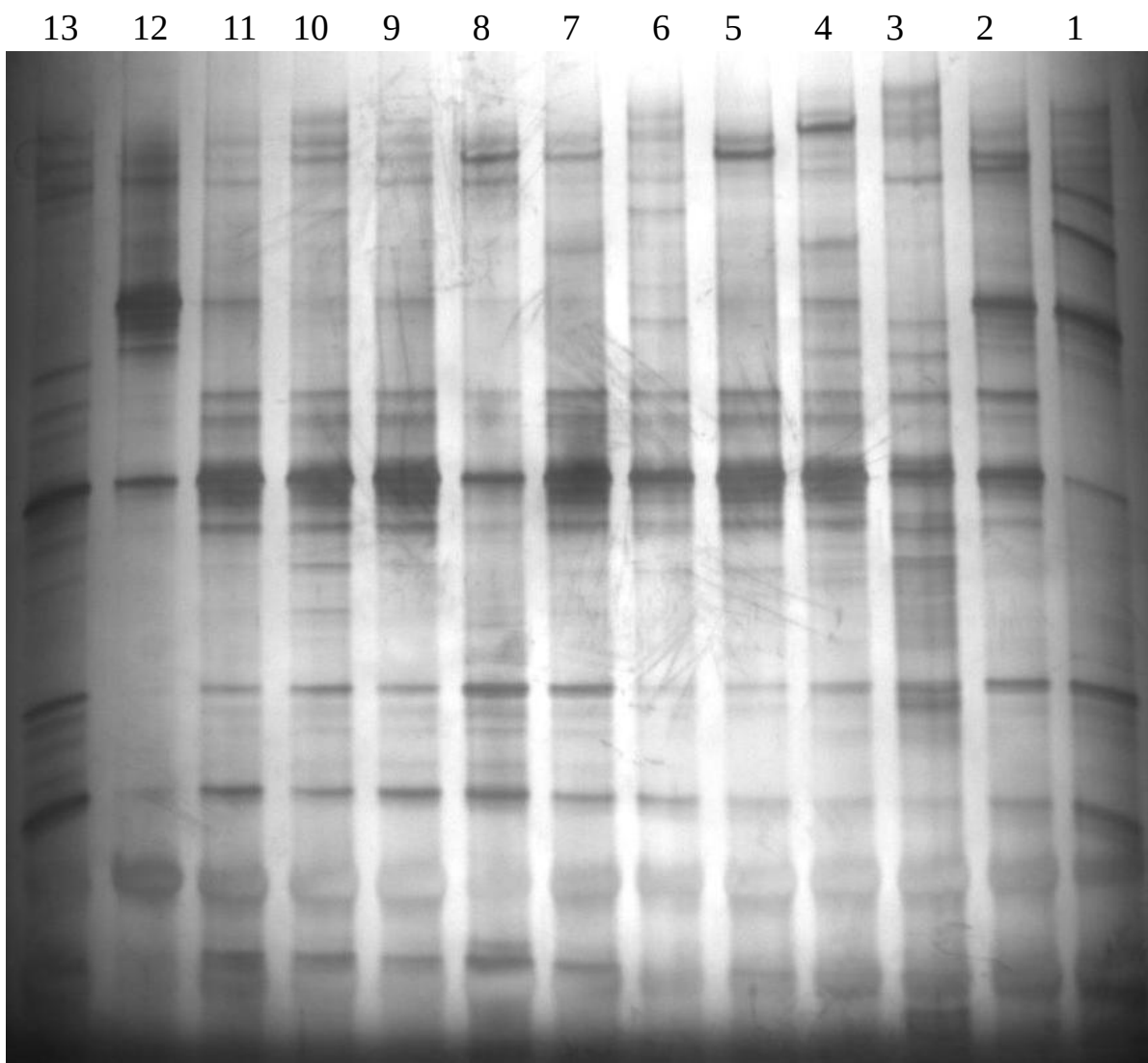




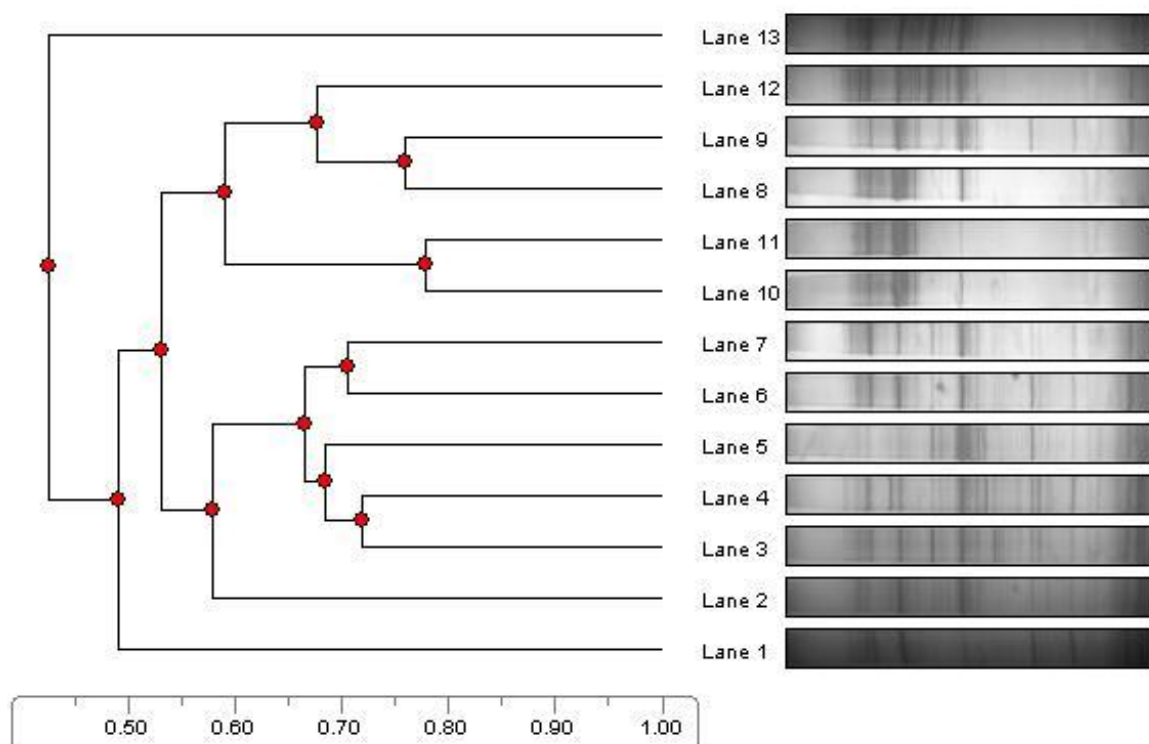
圖十五、十二月黑熊糞便樣本 DGGE 圖譜以軟體分析相似度。Lane 1：採樣日期 12/30，Lane 2：採樣日期 12/23，Lane 3：採樣日期 12/16，Lane 4：採樣日期 12/9，Lane 5：採樣日期 12/2。



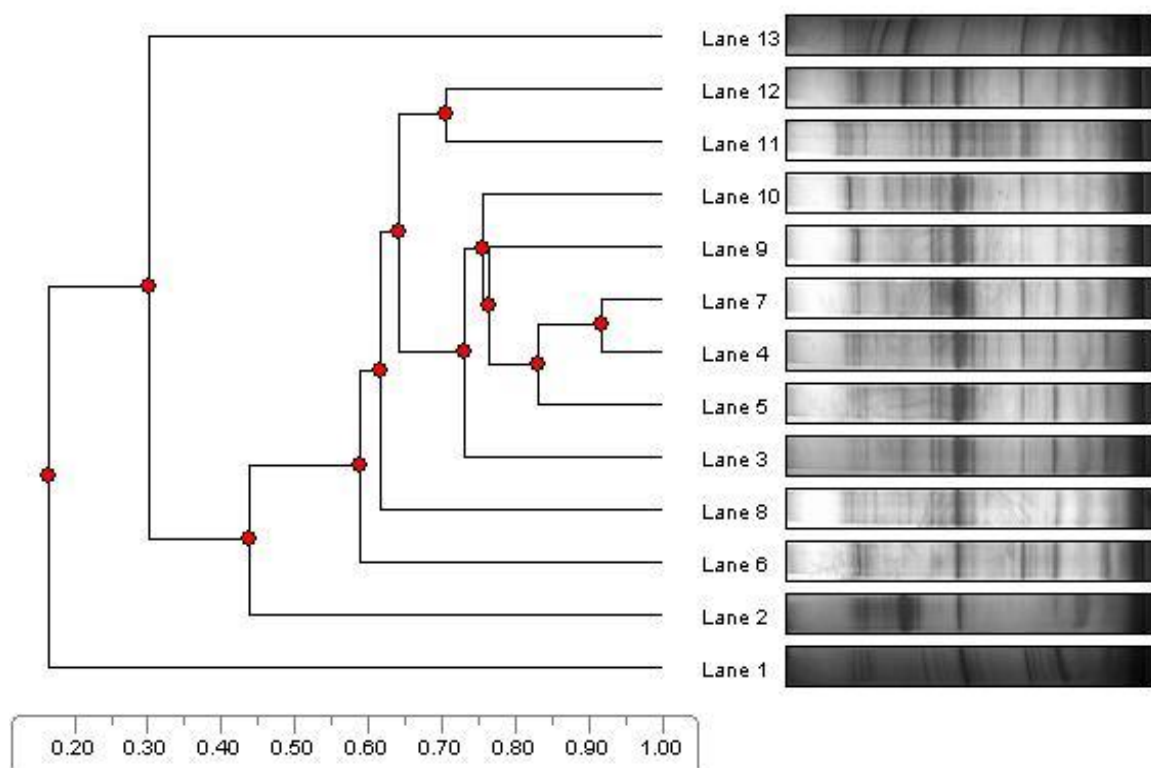
圖十六、糞便樣本選取後 DGGE 圖譜之一。Lane 1：採樣日期 4/30，Lane 2：採樣日期 5/7，Lane 3：採樣日期 5/14，Lane 4：採樣日期 5/28，Lane 5：採樣日期 6/4，Lane 6：採樣日期 6/11，Lane 7：採樣日期 6/18，Lane 8：採樣日期 7/2，Lane 9：採樣日期 7/15，Lane 10：採樣日期 7/22，Lane 11：採樣日期 7/29，Lane 12：採樣日期 8/6，Lane 13：採樣日期 8/13。



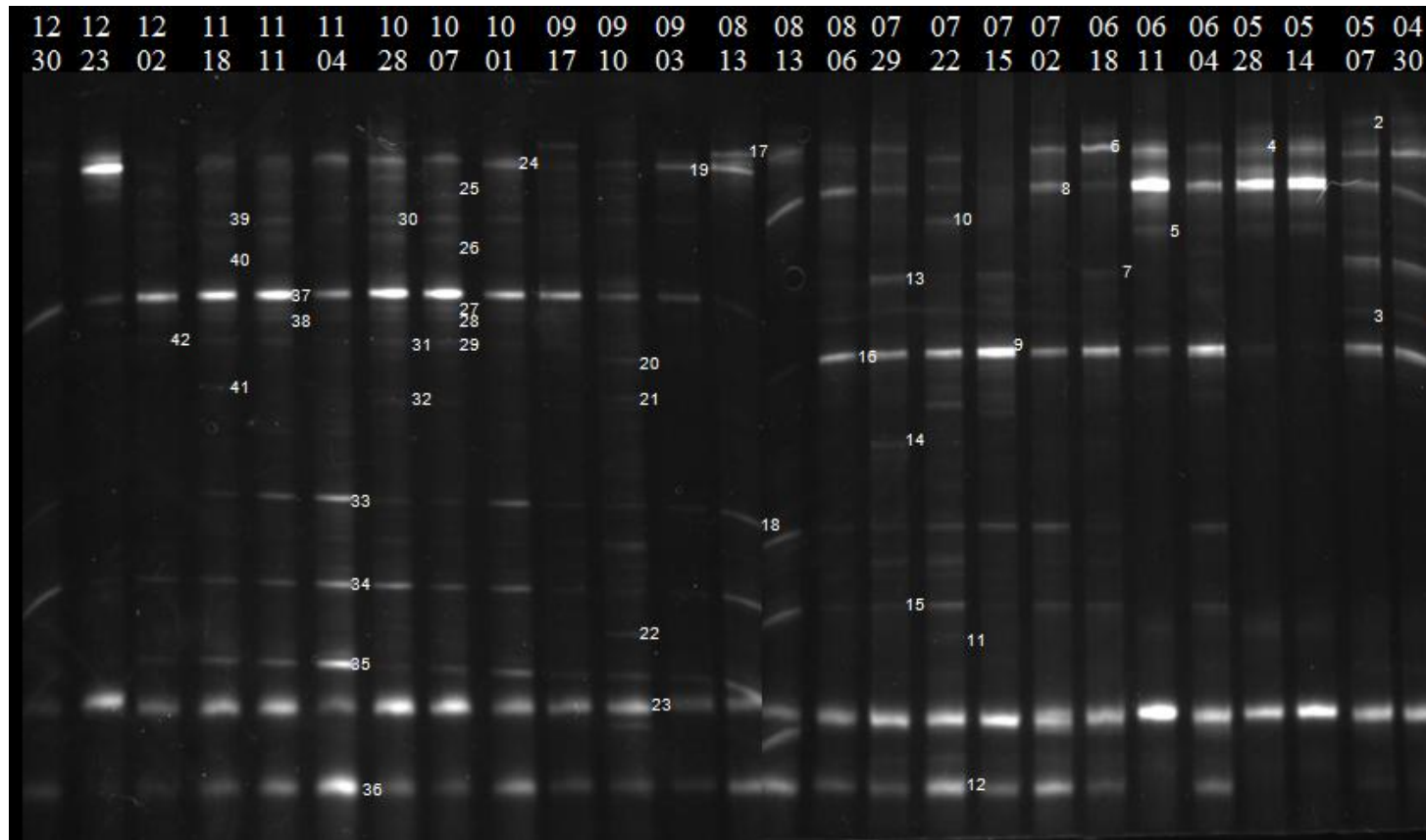
圖十七、糞便樣本選取後 DGGE 圖譜之二。Lane 1：採樣日期 8/13，Lane 2：採樣日期 9/3，Lane 3：採樣日期 9/10，Lane 4：採樣日期 9/17，Lane 5：採樣日期 10/1，Lane 6：採樣日期 10/7，Lane 7：採樣日期 10/28，Lane 8：採樣日期 11/4，Lane 9：採樣日期 11/11，Lane 10：採樣日期 11/18，Lane 11：採樣日期 12/2，Lane 12：採樣日期 12/23，Lane 13：採樣日期 12/30。



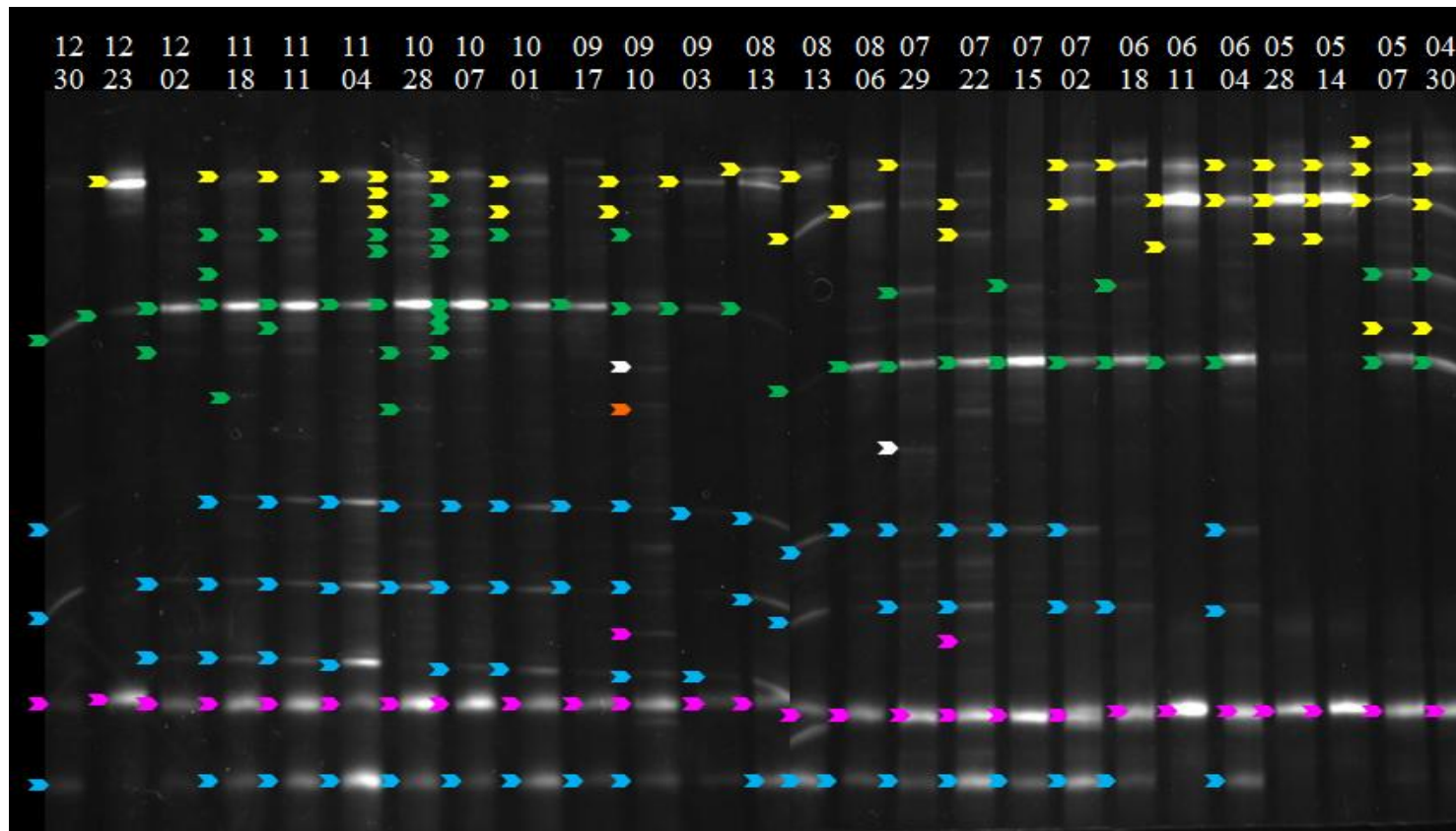
圖十八、選取後樣本 DGGE 圖譜之一軟體分析。Lane 1：採樣日期 8/13，Lane 2：採樣日期 8/6，Lane 3：採樣日期 7/29，Lane 4：採樣日期 7/22，Lane 5：採樣日期 7/15，Lane 6：採樣日期 7/2，Lane 7：採樣日期 6/18，Lane 8：採樣日期 6/11，Lane 9：採樣日期 6/4，Lane 10：採樣日期 5/28，Lane 11：採樣日期 5/14，Lane 12：採樣日期 5/7，Lane 13：採樣日期 4/30。



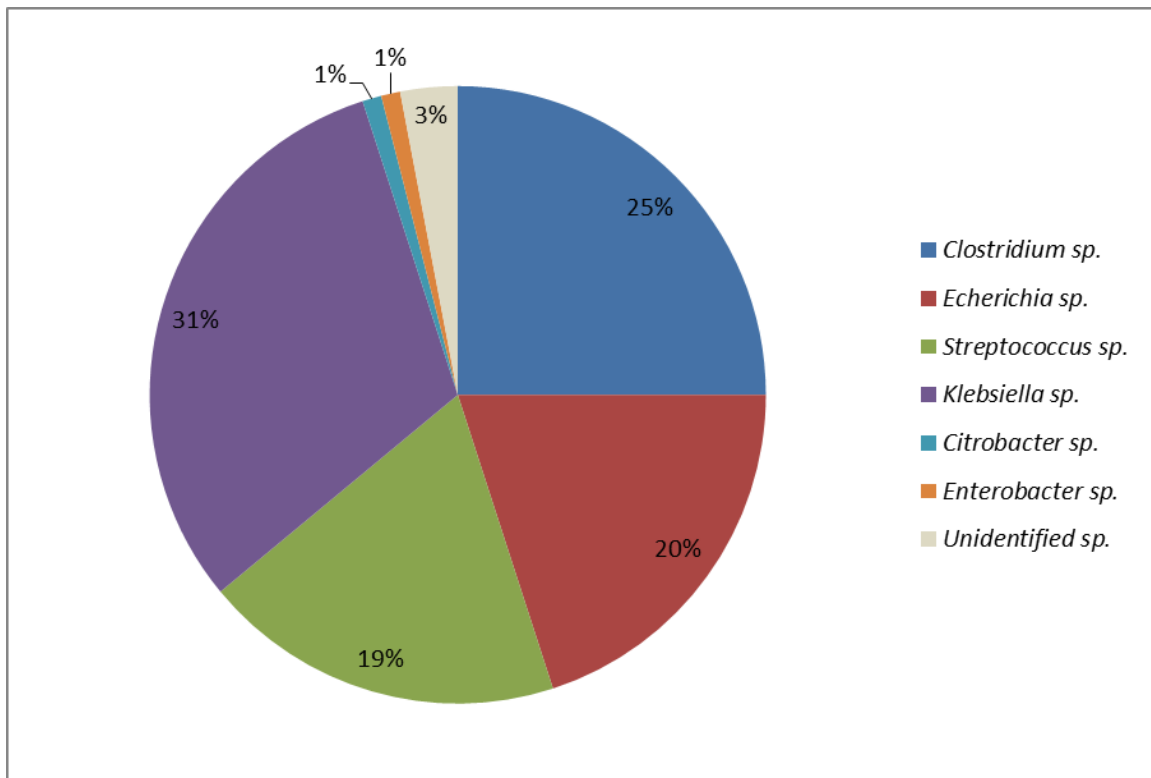
圖十九、選取後樣本 DGGE 圖譜之二軟體分析。Lane 1：採樣日期 12/30，Lane 2：採樣日期 12/23，Lane 3：採樣日期 12/2，Lane 4：採樣日期 11/18，Lane 5：採樣日期 11/11，Lane 6：採樣日期 11/4，Lane 7：採樣日期 10/28，Lane 8：採樣日期 10/7，Lane 9：採樣日期 10/1，Lane 10：採樣日期 9/17，Lane 11：採樣日期 9/10，Lane 12：採樣日期 9/3，Lane 13：採樣日期 8/13。



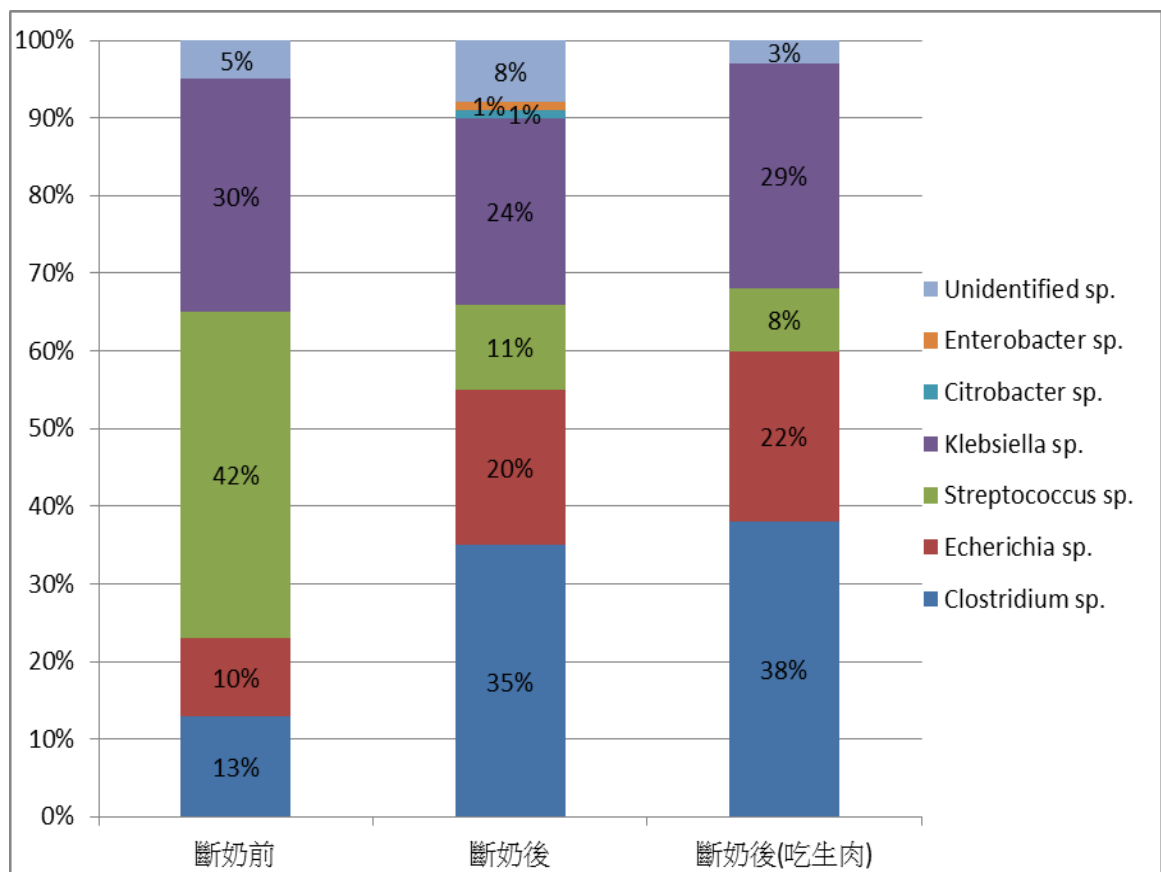
圖二十、黑熊成長過程樣本 DGGE 圖譜條帶定序結果。圖上方數字為採樣月分與日期、圖上編號為採取並定序成功之條帶，條帶編號詳細內容請見表一。



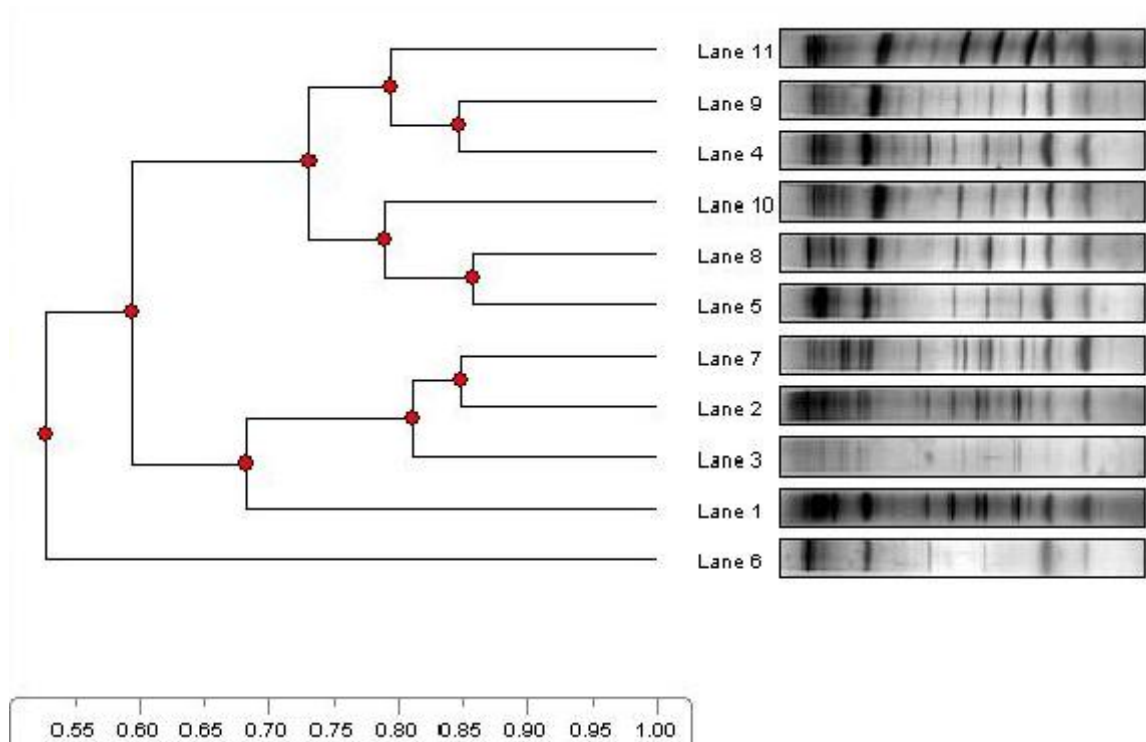
圖二十一、黑熊成長過程樣本 DGGE 圖譜條帶定序結果延伸。圖上方數字為採樣月分與日期。綠色：*Echerichia* sp.、黃色：*Streptococcus* sp.、藍色：*Clostridium* sp.、桃紅色：*Klebsiella* sp.、橘色：*Citrobacter* sp.、白色：*Enterobacter* sp.。



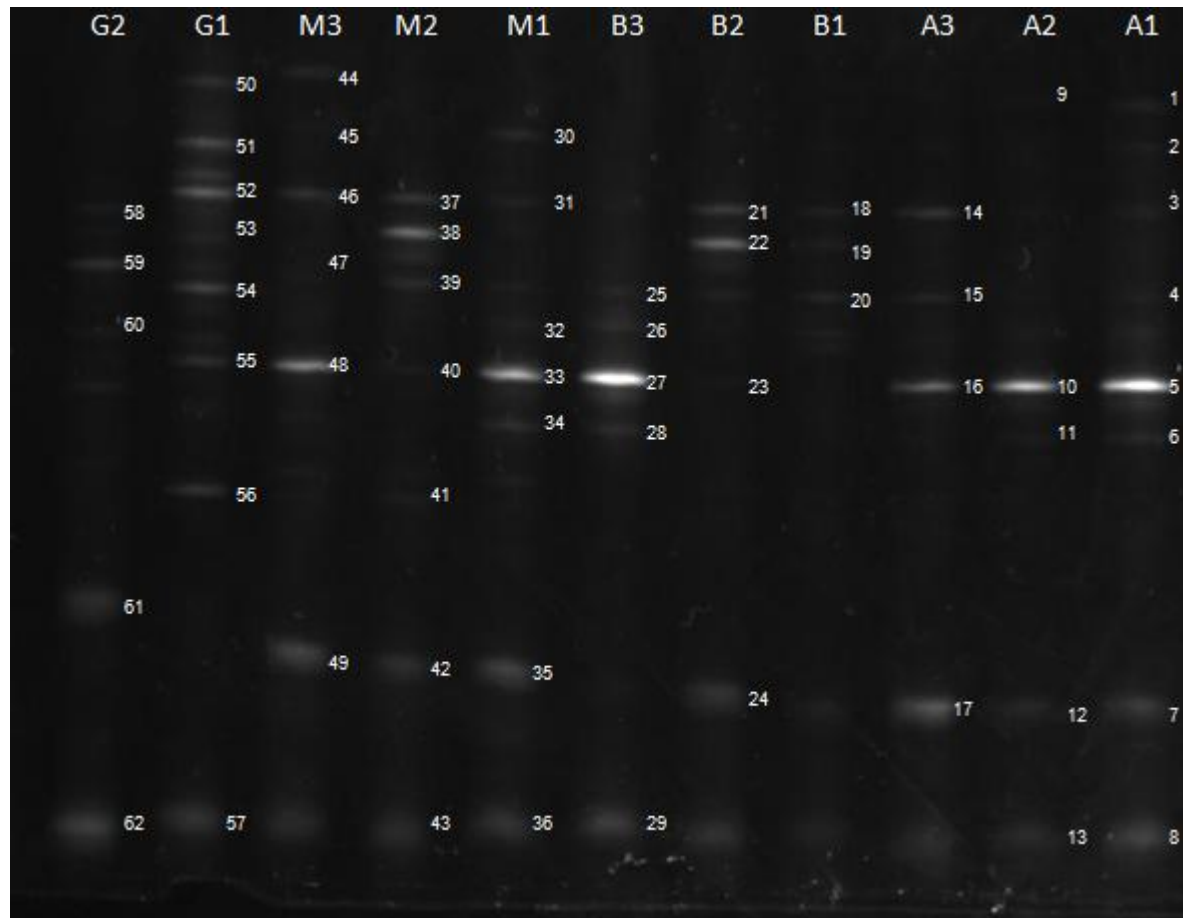
圖二十二、黑熊成長過程樣本中菌屬總比例分析圖。



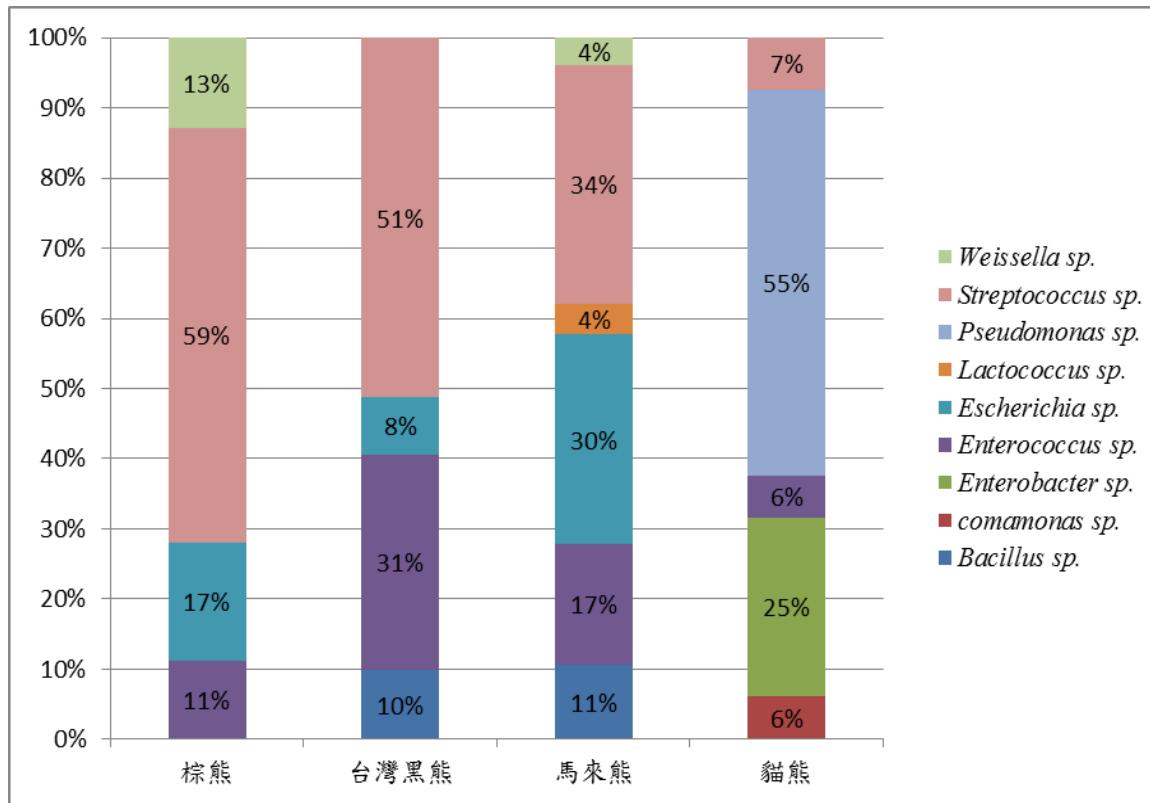
圖二十三、黑熊成長過程樣本中不同階段菌屬比例分析圖。



圖二十四、黑熊樣本年間比較 DGGE 圖譜軟體分析。Lane 1 至 Lane 3：
100 年 6 月，Lane 4 至 Lane 7：99 年 11 月，Lane 8 至 Lane 11：98 年
11 月



圖二十五、四種熊類糞便樣本 DGGE 圖譜。Lane A1、A2、A3：阿拉斯加棕熊 6/6、6/13、6/20 糞便樣本，Lane B1、B2、B3：台灣黑熊 6/6、6/13、6/20 糞便樣本，Lane M1、M2、M3：馬來熊 6/6、6/13、6/20 糞便樣本，Lane G1：大貓熊 6/11 糞便樣本，Lane G2：大貓熊 6/21 糞便樣本。圖上編號為採取並定序成功之條帶，條帶編號詳細內容請見表二。



圖二十六、四種熊類糞便樣本不同菌屬含量比例分析圖。