

魚類腸道菌相分析利器— 聚合酶連鎖反應－變性梯度膠體電泳

蔡明珂、郭錦朱、陳紫熒

水產試驗所東港生技研究中心

腸道菌相的組成及其優勢菌群對動物的健康及成長影響至鉅。傳統上分析魚類之腸道菌相，是以基礎培養基 (basic medium) 及選擇性培養基 (selective media) 初培後，由細菌形態進行單顆純化培養，繼之以顯微鏡觀察或鑑別培養基 (differential media) 進行簡單分類或直接送定序。然而這種觀測微生物多樣性的方法有許多重大的缺陷；其一，魚類腸道微生物環境相當複雜，不但受到免疫系統與攝入食物等之影響，微生物間彼此也會產生交互作用，另外還有許多未查明的影響因子。這些因素會因時地而異，難以用人工培養方法重現。根據文獻報導，高達 90% 以上的細菌無法以人工培養 (徐，2006)，再加上海洋是個廣袤多樣的生態系，科學家迄今所探究的海洋細菌種類甚至不到總數的 5% (孫，2013)，因此合理推測魚類腸道內可能存在無法以傳統方法培養及鑑定的菌種。其二，顯微鏡下所觀察到的腸道菌，只能判斷其表現型 (phenotype)，但是許多表現型在不同環境下亦有所差異，這樣的不穩定性或許會增加誤判的可能性，相對之下，基因型 (genotype) 顯得較為可靠，尤其目前分子生物技術進展快速，以基因型作為菌種的判斷

依據將是更好的方式。

聚合酶連鎖反應－變性梯度膠體電泳 (polymerase chain reaction-denatured gradient gel electrophoresis, PCR-DGGE) 是目前常見的腸道菌相分析方法之一。DGGE 是利用尿素和甲醯胺等變性劑作為濃度梯度，使不同組成的去氧核糖核酸 (DNA) 有不同的變性程度，在膠體電泳中移動的速度有別，來區分即使長度相同，但組成有差異的 DNA 片段。DGGE 具有高度的靈敏度。最早是用來檢測 DNA 片段上的點突變，近來被應用到微生物菌相相關研究中。

DNA 為雙股螺旋結構，由腺嘌呤 (adenine, A)、胸腺嘧啶 (thymine, T)、胞嘧啶 (cytosine, C) 和鳥糞嘌呤 (guanine, G) 四種去氧核糖核苷酸組成。A 和 T 互相配對，其間存在 2 個氫鍵；C 和 G 互相配對，其間存在 3 個氫鍵。氫鍵屬於較強的分子間作用力，要打開雙股的 DNA，根據其氫鍵數量不同，有不同的難易度。在某個溫度下，使 50% 的 DNA 分子變性為單股，另外 50% DNA 維持雙股，這個溫度稱為 T_m 值，是判斷 DNA 變性難度的數值。在 DNA 中，具有 3 個氫鍵的 G、C 鹼基對比例愈高，則 T_m 值愈大。

因此，我們可以藉由 T_m 值的不同，來區分各種 DNA 組成 (Strathdee and Free, 2013)。除了溫度以外，DNA 也會因 pH 值和化學藥劑變性，DGGE 就是利用尿素和甲醯胺變性劑讓 DNA 進行變性。變性劑濃度從負極往正極遞增，開始電泳時，雙股 DNA 如同一般膠體電泳朝正極前進。當到達最低變性濃度區域時，雙股 DNA 開始變性，結構變化導致 DNA 前進速度也開始大幅下降。因此序列組成不同的 DNA 會在不同的變性濃度區域開始減速，而得以藉此區分出不同的 DNA 片段 (圖 1)。

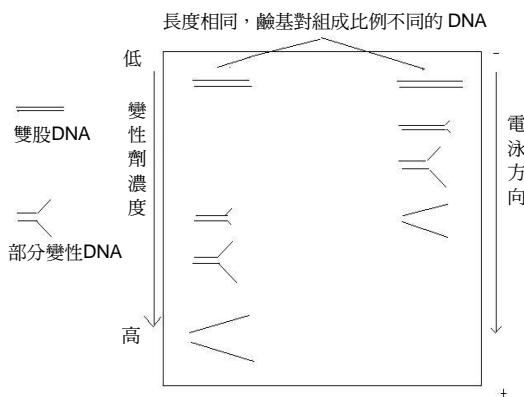


圖 1 DGGE 電泳原理簡圖

根據長久以來的研究，核糖體核糖核酸 (rRNA) 是核糖體構成的一部分，廣泛存在於各種生物之中，常作為生物親緣關係與種類鑑定的依據。其中 16S rRNA 的基因 (rDNA) 在細菌及古菌中普遍存在，而且大小適中 (約 1.5 kb) (曹, 2011)。而且 16S rDNA 具有高度保守的保留區及高度變異區 (圖 2)。在各菌種間都高度保守的片段，很適合作為 PCR 引子的結合點；因菌種而異的變

異區，則很適合作為菌種分類的依據 (Coenye and Vandamme, 2003)。因此 DGGE 就是利用 rDNA 的這種特性，使用適當的 DNA 引子，將目標 rDNA 用 PCR 的方式增量，然後進行變性劑濃度梯度的電泳，來判斷腸道的菌相。

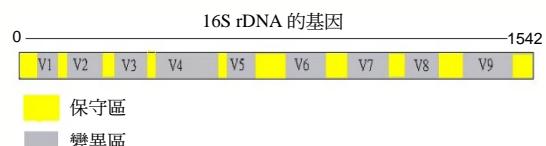


圖 2 16S rRNA 之基因 (rDNA) 序列

當 PCR-DGGE 完成之後，藉由螢光染色可以看到膠體上的電泳成果，初步了解整體菌相。但要判斷菌種，仍需將 16S rDNA 從洋菜膠上切下，並送至相關單位進行基因定序。定序出來的結果可以使用如 NCBI 的基因資料庫進行比對，就能夠判斷出這些 rDNA 是屬於那個菌種 (黃等, 2011)。

PCR-DGGE 相較於一般人工培養和顯微鏡觀察的分析方式，不但操作簡單，又能夠在很短的時間內大規模分析目標環境的整體菌相，更包含許多無法培養的菌種。此外，DGGE 具有非常優異的靈敏度；例如在 500 個核苷酸序列中，即使只有一個點突變，DGGE 仍可以判斷出來 (陳, 2003)。準確又快速的優點，使其成為相當有效益的菌種判斷方式，可以應用在環境病原調查、海洋菌相分析以及魚類腸道菌優勢菌種的判斷等，此外，魚腸道菌相的變化趨勢與疾病發生之關聯性研究，PCR-DGGE 更是不可多得的一大利器。