

國立臺灣大學醫學院微生物學研究所

碩士論文

Graduate Institute of Microbiology

College of Medicine

National Taiwan University

Master Thesis



建立腸道菌叢培養體系統及分離一株低三甲胺產生者

相關菌種

Development of a culturomic system and isolation of a
bacterial strain associated with low trimethylamine
(TMA) producing phenotype

張芳齊

Fang-Chi Chang

指導教授：王錦堂 博士

Advisor: Jin-Town Wang , Ph.D.

中華民國 108 年 7 月

July, 2019



國立臺灣大學 (碩) 博士學位論文
口試委員會審定書

中文題目：建立腸道菌叢培養體系及分離一株低三甲胺產生者表型相關菌種

英文題目：Development of a culturomic system and isolation of a bacterial strain associated with low trimethylamine (TMA) producing phenotype

本論文係 張芳齊 君 (學號 R06445107) 在國立臺灣大學微生物學所完成之碩 (博) 士學位論文，於民國 108 年 07 月 16 日承下列考試委員審查通過及口試及格，特此證明

口試委員：

王錦堂

(簽名)

(指導教授)

莊依萍

吳怡廷
李香蓮

系主任、所長

蔡靜華

(簽名)

致謝



能夠進入台大微生物所並且在 R739 這個大家庭裡成長學習，真的幸運也幸福。大學時期雖然也是做關於細菌的實驗，但是腸道厭氧菌叢的實驗卻是完全沒有接觸過，覺得非常新奇也學到了更多知識。王錦堂老師帶領著我們一起去探索這個對我們來說全新的領域，雖然有困難和挫折卻也都能在每周的進度報告中一起討論檢視實驗過程，並適時提點我該如何改進，很感謝老師的耐心教導。

與實驗室的大家朝夕相處更是兩年碩士生活的一大部分，喜歡大家一起有說有笑的討論，即使遇到挫折也能互相傾聽和鼓勵，化阻力成動力。佩芳學姊和俐吟學姊則是實驗室裡的大家長，不僅從碩一就開始耐心地教我們實驗技術和計畫實驗，更是變成生活上無話不談的好朋友，在我們徬徨時伸出援手。我的同學上惠和淨妤更是從懵懂無知的碩一一起變成了可靠的學姊，在實驗上也幫助我很多，很難想像兩年過去了，王家三姊妹都要變成上班族了，希望久久一次的 R739 聚會不要忘記了。碩一的珈菱、惠恩、彥豪的到來更是讓實驗室充滿歡樂，我不會忘記大家一起出去玩的快樂小旅行，接下來要升碩二了，相信你們一定會做得很好，實驗也都如期順利進行！另外謝謝不論晴雨陪著我的阿忠和每個幫助我的人，碩士生活精采也開心，我會在未來繼續加油的！

中文摘要



近期的研究發現腸道微生物群可能在冠狀動脈疾病中扮演重要角色，傳統以糞便檢體為研究對象並以 16S rDNA 定序為普遍鑑別菌種的方法，但現在培養體系日趨重要，我們經實驗發現高登培養基 (Gordon's medium) 與五盤日本伊藤非選擇性培養基 (Itoh's non-selective medium) 對比於十一盤選擇性培養基 (Itoh's selective medium) 可能培養出最多菌種，因此我們將主要使用此進行後續實驗。關於糞便檢體收集後的儲存方式，實驗發現運輸培養液 (Puritan's transportation medium) 雖然維持了較多新鮮檢體的操作分類單元 (operational taxonomic unit, OTU) 但是不穩定，而冷凍檢體只比新鮮檢體少約 30%~50% 的 OTU。且經實驗證實基質輔助雷射脫附游離飛行時間質譜儀目前鑑定之圖譜訊號弱、資料庫少且鑑定效率約只有 16S rDNA 定序的 40%。而與我們合作的實驗室利用次世代定序 (next generation sequencing) 發現食用左旋肉鹼 (L-carnitine) 後血漿產生低量氧化三甲胺(trimethylamine-N-oxide, TMAO)的受試者糞便中出現頻率高且量顯著多的腸內菌為 *Flavonifractor plautii* (*F.plautii*)，推測其可能不利於氧化三甲胺的產生。並且我以相同的培養系統加以專一性的聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction) 分離出了 *F.plautii*。我們首先想探討是否其會分解三甲胺從而達到抑制氧化三甲胺的生成，實驗結果顯示並不會分解，其次我們也想知道是否其會與高量氧化三甲胺生成之菌反應，而抑制三甲胺的分泌，在膽鹼與肉鹼之代謝利用實驗中發現其並不會抑制。我們同樣也想知道是否其會抑制高量氧化三甲胺生成之菌生長，但在競爭實驗中並無發現抑制現象。

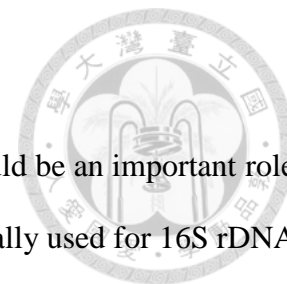
因此得出結論：高登培養基與日本伊藤非選擇性培養基為較適宜的腸內菌培養基，能培養出最多菌種；冷凍糞便檢體 OTU 數目只比新鮮檢體少約 30%~50% 的 OTU，因此篩選菌種時先使用冷凍檢體，而有特殊菌種培養困難時再採用新鮮糞便檢體；16S rDNA 定序為較好的鑑定菌種方式；*F.plautii* 並不會分解三甲

胺；也不會抑制高量氧化三甲胺生成之菌的三甲胺分泌；同樣並未發現能抑制高量氧化三甲胺生成之菌的生長。其功能有待進一步研究。

關鍵詞：動脈粥樣硬化，冠狀動脈疾病，腸道微生物群，L-肉鹼，培養



Abstract



Recent studies have also suggested that gut microbiota could be an important role in the development of CAD. Although stool sample is traditionally used for 16S rDNA sequencing to identify bacterial species and is considered as a common and convenient way to identify bacterial species, culturomic system is increasingly important nowadays. Based on our scientific experiments, Gordon's medium and five Itoh's non-selective medium can culture the most bacteria, so we chose them to continue on our studies. While Puritan's transportation medium can maintain a great amount of operational taxonomic unit (OTU) of fresh stool sample, it is not stable, and frozen sample is only 30%~50% less OTU than fresh sample. In our experiments, we found out that matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) detecting signals for our bacteria are weak and lacking of database, the identification efficiency is 60% less than 16S rDNA sequencing. And our collaborative laboratory found out that healthy subjects challenged with L-carnitine who produced low trimethylamine-N-oxide (TMAO) had a high frequency of *F.plautii*, suggesting that this species is disadvantageous to the production of TMAO. In my experiment, I use the same culturomic system with specific polymerase chain reaction and successfully isolate *F.plautii*. First we want to know if *F.plautii* can degrade TMA in order to inhibit the production of TMAO, experiment showed that it cannot degrade TMA, we also want to know if it will interact with high TMAO producing bacteria to inhibit the producing of TMAO. But in the L-carnitine/Choline assay, we found out that it does not have the property of inhibition. We also like to know if *F.plautii* can inhibit the growth of high TMAO producing bacteria, but did not find it in the competing assay.

My conclusions are Gordon's medium and five Itoh's non-selective medium are

better for gut microbiota, for they can culture the most bacteria; frozen sample is only 30%~50% less OTU than fresh sample, so we decide to use frozen sample for screening bacteria, and collect fresh sample only when having difficulty in culturing some bacterial species; 16S rDNA sequencing is a better way to identify bacterial species; *F.plautii* cannot degrade TMA nor inhibit the formation of TMAO of high TMAO producing bacteria or their growth. Its function needs further study.

Key words: Atherosclerosis, Coronary artery disease, Gut microbiota, L-carnitine, culturomics.

目 錄

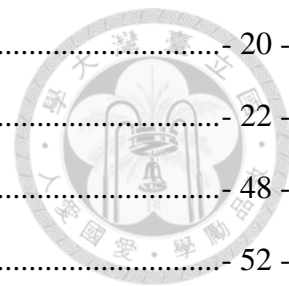


口試委員審定書.....	ii
致謝.....	iii
中文摘要.....	iv
Abstract.....	vi
目 錄.....	viii
圖目錄.....	xi
表目錄.....	xii
第一章、 緒論.....	- 1 -
1.1 腸道微生物群 (Gut microbiota)	- 1 -
1.2 腸道微生物群與宿主的免疫系統.....	- 1 -
1.3 冠狀動脈疾病與腸道微生物群的關聯.....	- 2 -
1.4 基質輔助雷射脫附游離飛行時間質譜儀 (matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, MALDI-TOF MS)	- 4 -
1.5 次世代定序(Next Generation Sequencing , NGS)之微生物體 16S 擴增子定序 (16S amplicon sequencing).....	- 5 -
1.6 高效液相層析儀 (high performance liquid chromatography, HPLC)	- 5 -
1.7 研究動機.....	- 6 -
第二章、 材料與方法.....	- 7 -
2.1 材料	- 7 -
2.1.1 培養基 (media).....	- 7 -
2.1.2 引子 (primers).....	- 8 -
2.2 方法	- 8 -
2.2.1 糞便之腸道微生物培養 (Culturing of fecal microbiota)	- 8 -



2.2.2 萃取細菌之 DNA (Genomic DNA extraction)	8 -
2.2.3 聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR)	9 -
2.2.4 基質輔助雷射脫附游離飛行時間質譜儀 (MALDI-TOF)樣品前處理	10 -
2.2.5 序列稀釋分離菌種.....	11 -
2.2.6 以特定序列分離菌種.....	11 -
2.2.7 三甲胺分解實驗 (Trimethylamine assay, Tma assay).....	12 -
2.2.8 膽鹼與肉鹼之代謝利用實驗 (L-carnitine/Choline assay).....	12 -
2.2.9 氘標記膽鹼與肉鹼之代謝利用實驗 (d ⁹ -L-carnitine / d ⁹ -Choline assay) ..	12 -
2.2.10 勝任細胞 (competent cell) 的製備	13 -
2.2.11 電穿孔 (electroporation).....	13 -
2.2.12 競爭實驗 (competing assay)	13 -
第三章、 結果.....	14 -
3.1 探討不同培養基對菌種數目的影響.....	14 -
3.2 以不同儲存方式與時間對糞便檢體菌種數目的影響.....	14 -
3.3 以基質輔助雷射脫附游離飛行時間質譜儀進行菌種鑑定.....	15 -
3.4 高登培養基 (Gordon's medium, GM) 培養之菌株以 16S rDNA 定序進行菌種 鑑定	15 -
3.5 日本伊藤選擇性培養基培養之菌株以 16S rDNA 定序進行菌種鑑定	16 -
3.6 以聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 分離菌種	16 -
3.7 以特定序列分離菌種.....	17 -
3.8 三甲胺分解實驗 (Trimethylamine assay, Tma assay).....	17 -
3.9 膽鹼與肉鹼之代謝利用實驗 (L-carnitine/Choline assay).....	17 -
3.10 氘標記膽鹼與肉鹼之代謝利用實驗 (d ⁹ -L-carnitine / d ⁹ -Choline assay)	18 -
3.11 競爭實驗 (competing assay).....	18 -
3.12 電穿孔 (electroporation).....	18 -

第四章、 討論.....	20 -
第五章、未來展望.....	22 -
第六章、參考文獻.....	48 -
附錄一、	52 -





圖目錄

圖 一、探討不同培養基對菌種數目之影響.....	42 -
圖 二、以不同儲存方式與時間對糞便檢體菌種數目的影響.....	43 -
圖 三、糞便檢體中特定菌種相對豐富度.....	44 -
圖 四、以聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 分離菌種.....	45 -
圖 五、以特定序列分離菌種.....	46 -
圖 六、三甲胺分解實驗 (Trimethylamine assay, Tma assay).....	47 -

表目錄



表 一、本研究使用之引子.....	23 -
表 二、以基質輔助雷射脫附游離飛行時間質譜儀進行高登培養基之菌種鑑定.....	24 -
表 三、以基質輔助雷射脫附游離飛行時間質譜儀進行 BL 伊藤非選擇性培養基之菌種鑑定.....	25 -
表 四、高登培養基 (GM) 培養之菌株以 16S rDNA 定序進行菌種鑑定.....	26 -
表 五、日本伊藤選擇性培養基培養之菌株以 16S rDNA 定序進行菌種鑑定.....	28 -
表 六、受試者糞便檢體中特定菌種相對豐富度.....	33 -
表 七、以聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 分離菌種挑選出之單一菌落.....	34 -
表 八、以聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 分離菌種.....	35 -
表 九、三甲胺分解實驗 (Trimethylamine assay, Tma assay).....	37 -
表 十、膽鹼與肉鹼之代謝利用實驗 (Carnitine/Choline assay).....	38 -
表 十一、氘標記膽鹼與肉鹼之代謝利用實驗 (d^9 -L-Carnitine / d^9 -Choline assay).....	39 -
表 十二、競爭實驗 (competing assay).....	40 -
表 十三、電穿孔 (electroporation).....	41 -

第一章、緒論



1.1 腸道微生物群 (Gut microbiota)

體腔動物 (coelomate animals) 的體腔內環繞著腸胃道和許多器官，而棲息於人類的多種多樣的腸道共生菌和其他微生物一起被稱為腸道微生物群 (gut microbiota)(1)，是人類健康的一部分，胃腸道微生物的定植 (colonization) 在出生後通過母親的產道和身體的接觸時就已經開始，而在幾週內會變得更加多樣化，於 2~3 年內的持續變化和逐漸的穩定後，與成年人的腸道微生物群已非常相似了(2)，並且會終其一生存在於體內，在我們的生命裡扮演重要角色。據估計大約有 100 萬億 (10^{14}) 個細菌細胞，包含 1000 種細菌存在於人體胃腸道中，人類腸道微生物群的基因含量可能超過宿主的基因含量至少 100 倍(3)，厚壁菌門 (*Firmicutes*)，類桿菌屬 (*Bacteroides*)，放線菌門 (*Actinobacteria*)，變形菌門 (*Proteobacteria*) 為 4 個主要門，佔人類的腸道微生物群 99% 以上。然而生活方式、飲食、衛生習慣和宿主基因及細菌生存的環境，都會影響腸道微生物群的在不同個體的組成(4)，而在短時間內因為飲食或藥物攝入也會有動態的改變(5)，不僅如此，宿主個體之間的腸道微生物群的多樣性和組成也同樣會受到微生物群落中生態位置和時間變化的影響，特定細菌佔據身體棲息地中的特定生態位置也會與特定生長或成熟階段相關(6)。腸道微生物群的組成非常多樣化，然而隨著時間推移，個體及其家庭成員的腸道微生物群組成似乎非常穩定(7)。

1.2 腸道微生物群與宿主的免疫系統


腸道微生物群與宿主免疫系統之間的相互作用在出生時就開始了。微生物群影響了免疫系統的發育，免疫系統反過來也可塑造微生物群的組成。宿主與其常駐微生物群之間的這種互利關係常導致微生物產生代謝產物，並延伸到免疫系統

之外，產生大量信號進行傳遞，這有助於宿主的演化適應性(8)。腸上皮細胞通過模式識別受體 (pattern recognition receptors) 如 TLRs 與 NOD-like receptors 以識別微生物細胞成分和代謝物來調整自身抗菌程序和代謝的穩定。

微生物和宿主之間可以通過這些免疫相關的信號傳導與直接的化學相互作用一起作用於多個器官，例如腸，肝，肌肉和腦，以執行多種生物化學和代謝活動，支持人體內的許多功能。許多細菌可以調節宿主的代謝反應，例如膽酸 (bile acids) 和短鏈脂肪酸 (short-chain fatty acids, SCFA) 的產生，這些都是維持宿主健康的必需產物(9)，也可促進宿主無法自行獲得的營養的吸收(10)，甚至是免疫系統的訓練和調節(11)，以及對抗病原微生物的保護(12)。此外微生物產生的代謝物也形成了宿主代謝表型，從而也可預估罹患疾病的風險。腸道微生物群對宿主免疫系統的深遠影響與未來長期健康密切相關。雖然核心腸道微生物群的組成在整個成年期基本上是穩定的，然而，有些組成部分具有動態靈活性，可通過改變物種組成來應對環境壓力或飲食變化等擾動，從而影響健康或疾病風險(13)。但若是這種和諧關係的破壞也同樣發現與成人的許多疾病有關，包括炎症性腸病 (inflammatory bowel disease, IBDs)(14)、第 2 型糖尿病 (type 2 diabetes)(15) 和冠狀動脈疾病 (coronary artery disease, CAD) (16)。

1.3 冠狀動脈疾病與腸道微生物群的關聯

心血管疾病 (cardiovascular disease)，包括冠狀動脈疾病和腦血管疾病 (cerebrovascular disease)，佔所有非傳染性疾病的近一半，是世界上主要的疾病負擔。它是導致全球死亡的主要原因，每年導致 1730 萬人死亡，預計到 2030 年將增加至 2360 萬(17)。冠狀動脈疾病是由於冠狀動脈壁內的動脈粥樣硬化形式的改變而阻礙正常的血流進入心臟肌肉，導致心肌缺血，動脈粥樣硬化和血栓的形成在某些嚴重的情況下會導致心肌梗塞(18)。



根據先前在冠狀動脈疾病的許多病例對照組和小鼠研究中，血漿氧化三甲胺 (plasma trimethylamine-N-oxide, TMAO) 被認為是與動脈粥樣硬化強烈相關的代謝物(19)。通過先前的研究表明，人類微生物群與氧化三甲胺的產生有相當大的關聯性(20)，其來源於飲食中的四級銨化物 (quaternary amines)[如膽鹼 (choline)、左旋肉鹼 (L-carnitine)、甘氨酸甜菜鹼 (glycine betaine, GBT) 和磷脂酰膽鹼 (phosphatidylcholine)]。其中左旋肉鹼對線粒體中的脂肪酸 β 氧化作用 (β -oxidation)(21)非常重要，是維持人類健康的重要營養物(22)，在紅肉中是一種非常豐富的營養素，含有類似於膽鹼的三甲胺 (trimethylamine, TMA) 結構(23)。雖然左旋肉鹼可以通過人體內源性合成，但我們的日常身體需求主要通過飲食攝取含左旋肉鹼的食物(24)。先前研究表明飲食中的左旋肉鹼有顯著比例可通過微生物群吸收(25)。然而這樣的代謝途徑不僅使宿主可利用的左旋肉鹼減少，甚至可能導致一些人產生肉鹼缺乏症 (carnitine deficiency)，且會促進氧化三甲胺形成使未來產生動脈粥樣硬化的風險增加(23)。而近期研究也鑑定了左旋肉鹼被腸道菌群代謝為三甲胺的酵素為加氧酶 (oxygenase component, CntA) 和還原酶 (reductase component, CntB)(26)。然後此氣體被吸收到體內循環中並進一步代謝為三甲胺-N-氧化物。而可能將三甲胺轉化為三甲胺-N-氧化物的物質為宿主肝臟的黃素單加氧酶 (flavin monooxygenase, FMO) 家族中的成員(27)。而先前的研究發現了黃素單加氧酶突變的個體存在三甲胺水平的積累，導致魚氣味綜合症 (fish malodor syndrome)，說明了黃素單加氧酶與三甲胺的氧化有關(28)。近期的研究更發現了黃素單加氧酶是將三甲胺代謝為氧化三甲胺中最活躍的，且通過核受體 FXR (NR1H4) 的作用，黃素單加氧酶會被膽酸顯著促進調控(27)。而三甲胺-N-氧化物目前認為與動脈狀硬化的發展有關，可能為通過誘導巨噬細胞清道夫受體 (scavenger receptors) 的表現如 CD36 和 SRA1，這兩者都參與了修飾攝取的脂蛋白，來促進巨噬細胞內的膽固醇積聚(29)，有助於增強膽固醇轉運 (forward cholesterol transport)” (30)，而三甲胺-N-氧化物及其飲食前驅物膽鹼和左旋肉鹼更可抑制膽

固醇逆轉運 (reverse cholesterol transport)，並誘導血小板過度反應。且在小鼠實驗中顯示與長期左旋肉鹼攝取會顯著增強體內氧化三甲胺合成能力(23)。



1.4 基質輔助雷射脫附游離飛行時間質譜儀 (matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, MALDI-TOF MS)

傳統微生物的鑑定是利用生化反應及形態觀察，然而此檢測方式費時費力，近年來，質譜儀已廣泛地應用於微生物醫學鑑定與研究(31)。其圖譜簡單，背景雜訊低且不會產生分析物離子的碎裂片段；機器的靈敏度高，只需要極少量的樣品即可偵測；耗時少、效率高、分析速度快。

主要原理為：將液體或固體的樣品與偵測試劑混合，經由溶劑揮發的乾燥過程，使分析物與基質形成晶體，以鐳射光激發樣品形成氣相之離子形式，質譜儀偵測氣相離子之質量與電子比，並轉換為圖譜內容呈現，利用相同物種圖譜內容一致的特性，將樣本圖譜與已知圖譜比對完成微生物菌株鑑定。

基質輔助雷射脫附-飛行時間質譜儀則是專為偵測氨基酸、多肽、多醣體、蛋白質及高分子化合物等大分子而開發的。其離子化器是以基質輔助雷射脫附法來產生離子，質量分析器則是根據離子飛行時間的長短來分辨離子質荷比的大小，特別適於極性大、難揮發、難氣化的生物大分子的離子化。由於主要產生單電荷的離子，質譜的判讀也相對簡單許多，同時也維持分析物原有的結構，因此使得質譜儀成為分析蛋白質與胜肽的最佳工具(32)。




1.5 次世代定序(Next Generation Sequencing , NGS)之微生物體 16S 擴增子定序 (16S amplicon sequencing)

16S 核糖體 RNA (16S ribosomal RNA, 16S rRNA) 為原核生物核糖體小亞基的重要組成，序列包含 10 個保守區域 (conserved regions) 和 9 個高變區域 (hypervariable regions)，長度約為 1,542 nt(33)。保守區在細菌間差異不大，由此可以反映生物物種間的親緣關係，其中高變區具有屬或種的特異性，隨親緣關係不同而有一定的差異，被認為是最適於細菌系統發育和分類鑑定的指標。因此對該區域中的序列進行定序已是研究環境微生物多樣性及群落組成差異的重要策略之一。相較於傳統生化試驗鑑定細菌，利用 16S rDNA 定序 (16S rDNA sequencing) 的方式能同時檢測大量且微量的環境樣品並且能快速且精準地提供環境微生物的菌種鑑定與菌種豐富度等資訊，更有效率及低成本，因此非常適用於總體基因體學 (Metagenomics) 的研究。

目前我們使用 Illumina HiSeq 定序平台，直接以聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 擴增所有細菌 V3-4 的區域，利用雙端定序 (Paired-End)，透過 Reads 拼接過濾以及操作分類單元 (operational taxonomic unit, OTU) 聚類，當有兩隻序列有 97% 相似的菌即設為一個 OTU，以進行物種注釋及豐度分析，不僅可以揭示樣品物種構成，還能進一步透過 α 多樣性分析 (Alpha Diversity) 及 β 多樣性分析 (Beta Diversity) 探討樣品之間的差異。

1.6 高效液相層析儀 (high performance liquid chromatography, HPLC)

高效液相層析儀是分析實驗室中最通用的儀器，本身具備分離與純化功能，在製藥、食品、化學品、原物料、環境、法醫、生物化學等領域中，提供有效定



量與定性分析數據。其分析是利用動相通過靜相時，混合物中的各成份在靜相和動相之間的分布係數不相同，使其在管柱中的滯留時間不相同而分離的方法，若化合物與靜相親和力較強，則滯留時間長，而化合物與動相的親和力較強，則滯留時間短，依此原理將樣品中的待測物與干擾物分離。

1.7 研究動機

冠狀動脈疾病是全世界的主要死亡原因之一。近期的研究也發現了腸道微生物群可以通過促進氧化三甲胺的產生而加劇冠狀動脈疾病，它是一種促動脈粥樣硬化的化合物(34)。而動脈粥樣硬化症的發病率越來越高，並在全球範圍內造成嚴重的健康和經濟負擔(35)，因此，降低風險的戰略至關重要。然而，我們還不知道究竟是哪些腸道微生物群中的細菌會參與疾病的機轉。基於相同的研究興趣，臺大醫院吳偉愷醫師團隊與我們實驗室合作(36)。特別地是，經過次世代定序食用左旋肉鹼後生成低量氧化三甲胺的受試者的糞便所發現的出現頻率顯著高且量比較多的腸內菌有 *g_Flavonifractor*、毛螺菌屬 (*g_Lachnospira*)、泛菌屬 (*g_Pantoea*)，詳見(附錄一)。因此本研究的目的是想通過培養的方式將有興趣的菌株分離出來，探討是否在動脈粥樣硬化保護起重要作用，為開發冠狀動脈疾病的治療方法提供了機會。另一方面我們希望以營養豐富的高登培養基 (Gordon's medium, GM) (37)，還有日本伊藤非選擇性培養基 (Itoh's non-selective medium) 與選擇性培養基 (Itoh's selective medium) (38)，建立腸道微生物培養系統，同時利用基質輔助雷射脫附游離飛行時間質譜儀幫助我們進行菌種鑑定。

第二章、 材料與方法



2.1 材料

2.1.1 培養基 (media)

培養基	說明 (每公升溶液之內容物)	來源
Gordon's medium (GM)	2 g Tryptone Peptone, 1 g Yeast Extract, 0.4 g D-glucose, 0.5 g L-cysteine, 1 g Cellobiose, 1 g Maltose, 1 g Fructose, 5 g Meat Extract, 100 mL KH ₂ PO ₄ , 0.002 g MgSO ₄ ·7H ₂ O, 0.4 g NaHCO ₃ , 0.08 g NaCl ₂ , 1 mL CaCl ₂ , 1 mL Vitamin K (menadione), 1 mL FeSO ₄ , 1 mL Histidine Hematin Solution, 2 mL Tween 80, 10 mL ATCC Vitamin Mix, 10 mL ATCC Trace Mineral Mix, 1.7 mL Acetic acid, 0.1 mL Isovaleric acid, 2 mL Propionic acid, 2 mL Butyric acid, 4 mL Resazurin, 12 g Noble Agar	參照(39)
Luria-Bertani (LB) broth	5 g NaCl, 10 g tryptone, 5 g yeast extract	Bio basic, Ontario, Canada
Tryptone Soy broth (TSB)	casein peptone 17 g, dipotassium hydrogen phosphate 2.5 g, glucose 2.5 g, sodium chloride 5 g, soya peptone 3 g	Bio basic, Ontario, Canada
Tryptone Soy Agar (TSA)	15 g tryptone, 5 g soytone, 5 g sodium chloride, 15 g agar	Dr.Platt Biotech Company



2.1.2 引子 (primers)

本研究所使用之引子列於 (表一)。

2.2 方法

2.2.1 糞便之腸道微生物培養 (Culturing of fecal microbiota)

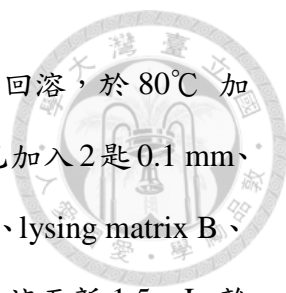
本實驗使用 Whitley DG 250 經濟型厭氧培養操作台操作與培養厭氧微生物實驗，使用混合氣體 (10 % CO₂, 10 % H₂, 80 % N₂)，專利 Anotox™ 及觸媒，可除去對細菌有害的硫化物及揮發性脂肪酸，並能有效維持厭氧環境。溫度設定為 35 °C。

操作前三天會將 LB broth 分裝於 20mL 玻璃試管後滅菌，瓶蓋仍保持轉鬆狀態，趁熱時放入冰水中使 broth 中氧氣釋出，約五分鐘後取出再放入厭氧操作箱，待 broth 涼後再將瓶蓋鎖緊；培養基放入厭氧操作箱。實驗當天取 1 g 糞便加 9 mL LB broth (或 0.3 g 糞便 + 3 mL LB broth 以此類推)，以滅菌過的研磨器仔細研磨，此為糞便稀釋 10⁻¹；取此溶液 10 μL 加 10 mL LB broth，倒轉三次，此為糞便稀釋 10⁻⁴；取此溶液 10 μL 加 10 mL LB broth，倒轉三次，此為糞便稀釋 10⁻⁷；此溶液 1 mL 加 10 mL LB broth，倒轉三次，此為糞便稀釋 10⁻⁸。依次取糞便稀釋 10⁻⁴、10⁻⁷、10⁻⁸ 塗開至各盤 (每次取一個稀釋倍數至全部培養基)。

2.2.2 萃取細菌之 DNA (Genomic DNA extraction)

由於欲檢測之細菌可能細胞壁厚，加熱也不易破壞，故本實驗使用 FastPrep-24 5G 快速均質機以玻璃珠 (glass beads) 震破菌以及傳統萃取法萃取 DNA，且使用 RNase A 來降低細菌 RNA 的污染。

首先將菌由培養基刮下後溶於 0.9 % NaCl，稀釋至 OD₆₀₀=1.0。接著取 1 mL 於 1.5 mL 離心管中，4°C 下 13,000 g 離心 20 分鐘後，去除上清液。加入 800 μL cell



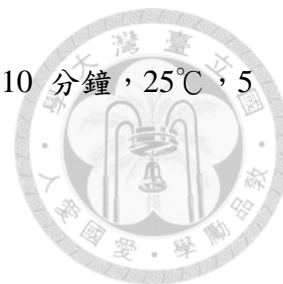
lysis solution (200 mM Tris-HCl, 100 mM EDTA, 75 mM SDS) 回溶，於 80°C 加熱 10 分鐘後靜置至室溫。將此溶液加入均質機專用 microtube (已加入 2 匙 0.1 mm、1 匙 0.5 mm 玻璃珠)，以 FastPrep-24 5G 快速均質機 (speed: 6、lysing matrix B、3 x 30 sec) 震盪破菌。室溫下 13,000 g 離心 10 分鐘後，取出上清液至新 1.5 mL 離心管中，各管加入 40 μ L lysozyme、4 μ L lysostaphin，37°C 水浴槽 60 分鐘 (於 30 分鐘時加入 RNase A 13 μ L)。再加入 200 μ L 乙酸銨，震盪，放置冰上 3 至 5 分鐘，4°C 下 13,000 g 離心 10 分鐘後，取出上清液至新 1.5 mL 離心管中。加入 600 μ L 酚-三氯甲烷，混合均勻後於室溫下 13,000 g 離心 5 分鐘後，取出上清液至新 1.5 mL 離心管中，再重複加入酚-三氯甲烷萃取一次，取出上清液至新 1.5 mL 離心管中。加入 500 μ L 異丙醇，上下倒轉至棉絮狀出現，室溫下 13,000 g 離心 5 分鐘後，去除上清液。加入 1 mL 70% 酒精潤洗沉澱物，室溫下 13,000 g 離心 5 分鐘後，去除上清液，至於 70°C 加熱器使沉澱乾燥。加入無菌水回溶 DNA 並置於室溫一晚後即可於 -20°C 保存。

2.2.3 聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR)

依據不同實驗目的所需之目標基因片段設計特異性的引子對 (primer pairs)，本實驗所使用的引子序列請參照(表一)，利用 DNA 聚合酶 (Taq polymerase) 進行專一性複製，即能放大目標基因片段，藉此能偵測該基因表現的強度或是經由切膠回收以利於 16S rDNA 定序。

首先，若是挑菌落進行聚合酶連鎖反應，則先加 3 μ L 無菌水於聚合酶連鎖反應管並於 95°C 加熱 15 分鐘；已萃取出之 DNA 則加 10 ng/ μ L DNA 1 μ L。依所選用之 DNA 聚合酶進行反應物配置。目前皆使用校正活性較優的 KOD Xtreme Taq Polymerase (如下列所示)。於儀器設定反應條件為 94°C，3 分鐘；94°C，30 秒 (denaturation)；55°C，30 秒 (annealing)；72°C，時間依基因長度調整

(extension)；重複上述步驟，次數由基因長度調整，接著 72°C，10 分鐘，25°C，5 分鐘。



Contents	KOD Xtreme
DNA template	3
20 mM primer (forward/reverse)	0.3
10X buffer	10 (2X buffer)
25 mM MgSO ₄	-
2.5 Mm dNTP	4 (2 mM dNTP)
Taq polymerase	0.4
ddH ₂ O	2
Total volume	20 μ L

2.2.4 基質輔助雷射脫附游離飛行時間質譜儀 (MALDI-TOF)

樣品前處理

本實驗所使用的飛行時間質譜儀為 Bruker 公司所生產，其型號為 autoflex speed。原理為將液體或固體的樣品與偵測試劑混合，經由溶劑揮發的乾燥過程，使分析物與基質形成晶體，以鐳射光激發樣品形成氣相之離子形式，質譜儀偵測氣相離子之質量與電子比，並轉換為圖譜內容呈現，利用相同物種圖譜內容一致

的特性，將樣本圖譜與已知圖譜比對完成微生物菌株鑑定。前處理為乙醇/甲酸法，使用的 1.5 mL 離心管以及吸管尖須為 Eppendorf 廠牌，否則塑化劑可能會溶出。


首先刮取約 10 顆菌落至裝好 300 μ L 無菌水的離心管中，震盪均勻。加入 900 μ L 酒精，混合均勻。室溫下 13,000 g 離心 2 分鐘後，去除上清液，打開離心管蓋並放置於抽風櫃中使酒精揮發。再加入 70% 甲酸 50 μ L，混合均勻。加入純乙腈 50 μ L，混合均勻。室溫下 13,000 g 離心 2 分鐘後，取 1 μ L 上清液點於反應盤並使其揮發。再點 1 μ L 基質溶液，進行 MALDI-TOF 上機。

2.2.5 序列稀釋分離菌種

前處理同方法 2.2.1，但於糞便稀釋至 10^{-4} 時即取 100 μ L 塗開於高登培養基，於厭氧箱培養三天後至菌種長滿培養基，將菌由培養基刮下溶於 5 mL LB broth，稀釋至 1 mL OD₆₀₀ = 1.0，此時菌量約為 10^8 cells/mL，將其稀釋 100 倍後約為 10^6 cells/mL，取 20 μ L 菌液至 24 wells 高登培養基盤，此時每一 well 內菌量約為 2×10^4 CFU，於厭氧箱培養三天後至菌種長滿培養基，將菌以 1 mL LB broth 沖下，以專一性引子通過聚合酶連鎖反應鑑定每一 well 是否含有有興之菌種；若有，將其稀釋至每一 well 含有 100 CFU，於厭氧箱培養三天後至菌種長滿培養基，將菌以 1 mL LB broth 沖下，以專一性引子通過聚合酶連鎖反應鑑定每一 well 是否含有有興之菌種；若有，再將其稀釋至每一 well 含有 50 CFU，於厭氧箱培養三天後至菌種長滿培養基，將菌以 1 mL LB broth 沖下，以專一性引子通過聚合酶連鎖反應鑑定每一 well 是否含有有興之菌種。若此時已有單一菌落，可以將其挑出培養，並以 16S rDNA 定序鑑別菌種。

2.2.6 以特定序列分離菌種

前處理同方法 2.2.1，但於糞便稀釋至 10^{-4} 時即取 100 μ L 塗開於高登培養基，



於厭氧箱培養三天後至菌種長滿培養基，將菌由培養基刮下溶於 5 mL LB broth，以專一性引子通過聚合酶連鎖反應鑑定每一盤是否含有有興之菌種；若有，將其稀釋至每一盤含有約 100 CFU，於厭氧箱培養三天後至菌種長滿培養基，將菌以專一性引子通過聚合酶連鎖反應鑑定該類是否為有興之菌種。

2.2.7 三甲胺分解實驗 (Trimethylamine assay, Tma assay)

將 *Flavonifractor plautii* 於 TSB 厭氧箱培養 72 小時，取 200 μ L 分別加入含 100 μ M、10 μ M、1 μ M 三甲胺的 15 mL TSB 中培養 72 小時，4 $^{\circ}$ C 下 13,000 g 離心 10 分鐘後收集上清液，以 0.22 μ m 過濾，再以高效液相色譜法分析。

2.2.8 膽鹼與肉鹼之代謝利用實驗 (L-carnitine/Choline assay)

預先準備好加有檸檬酸鐵銨(iron ammonium citrate) 之 TSB 培養液 200 mL，最後濃度為 0.069 mg/mL，其中的 100 mL 加入 0.4 M NaCl，另外的 100 mL 不添加作為對照組，再分別加入膽鹼和肉鹼，使最後濃度為 105 μ M。將 *Flavonifractor plautii* 和 *Bacteroides cellulosilyticus* 於 TSB 厭氧箱培養 72 小時，取 200 μ L OD600 約為 1.6~1.8 之菌液加入準備好之培養液，並於厭氧缸培養 72 小時，4 $^{\circ}$ C 下 13,000 g 離心 10 分鐘後收集上清液，以 0.22 μ m 過濾，再以高效液相色譜法分析。

2.2.9 氘標記膽鹼與肉鹼之代謝利用實驗 (d^9 -L-carnitine / d^9 -Choline assay)

預先準備好加有檸檬酸鐵銨(iron ammonium citrate) 之 TSB 培養液 80 mL，最後濃度為 0.069 mg/mL，各 40 mL 分別加入有氘標記的膽鹼和肉鹼 (d^9 - Carnitine,

d9-Choline) 使最後濃度為 105 μM 。將 *Flavonifractor plautii* 和 *Desulfovibrio desulfuricans* 於 TSB 厭氧箱培養 72 小時，取 200 μL OD600 約為 1.6~1.8 之菌液加入準備好之培養液，並於厭氧缸培養 72 小時，4 $^{\circ}\text{C}$ 下 13,000 g 離心 10 分鐘後收集上清液，以 0.22 μm 過濾，再以高效液相色譜法分析。

2.2.10 勝任細胞 (competent cell) 的製備

將 *Flavonifractor plautii* 養在 TSA 固態培養基，於 35 $^{\circ}\text{C}$ 厭氧箱培養三天，再以 TSB 將菌沖下，室溫下 5,000 g 離心 10 分鐘後，去除上清液，用 10 % glycerol 沖洗沉澱物，再重複該步驟一次。室溫下 5,000 g 離心 10 分鐘後，去除上清液，加 1 mL 10 % glycerol 回溶。分裝成 200 μL 每管。

2.2.11 電穿孔 (electroporation)

加入 1 μg DNA，厭氧箱 35 $^{\circ}\text{C}$ ，1 小時。2500 V，100 Ω ，25 μF 和 2500 V，600 Ω ，25 μF 進行電脈衝。電脈衝結束後 20 秒內送入厭氧箱，加入 800 μL TSB 液態培養基，厭氧箱 35 $^{\circ}\text{C}$ 培養 4 小時，離心 6000 rpm，5 分鐘，移去多餘上清液，依抗生素抗性選擇適合的培養基塗盤，厭氧箱 35 $^{\circ}\text{C}$ 培養三天。

2.2.12 競爭實驗 (competing assay)

將欲競爭之兩種厭氧菌養在 TSA 固態培養基，於 35 $^{\circ}\text{C}$ 厭氧箱培養三天，再以 TSB 將菌沖下，捕食者菌株 (predator strains) 與獵物菌株 (prey strains) 之菌液濃度調為 10:1，均勻混合後點 25 μL 於 TSA 固態培養基上，培養競爭五天後以 TSB 將菌沖下，稀釋塗於 TSA 固態培養基，培養三天後將菌挑至選擇性培養基與 TSA 固態培養基，使區分捕食者菌株與獵物菌株。

第三章、 結果



3.1 探討不同培養基對菌種數目的影響

為了選擇能夠囊括最多菌種的培養基，我們使用三位健康受試者的新鮮糞便檢體，培養於高登培養基、五盤伊藤非選擇性培養基與十一盤伊藤選擇性培養基，再經次世代定序分析，由得到的 OTU 結果顯示，與直接萃取 DNA 相比，受試者 A 和 B 均是高登培養基多於伊藤非選擇性培養基，而伊藤選擇性培養基最少，但是受試者 C 卻是伊藤非選擇性培養基多於伊藤選擇性培養基，而高登培養基最少。基於成本效益原則，我們決定選擇高登培養基以及伊藤非選擇性培養基繼續後續的實驗，詳見(圖一)。

3.2 以不同儲存方式與時間對糞便檢體菌種數目的影響

接著我們想知道不同的檢體儲存方式、檢體儲存時間長短是否會顯著影響之後培養出的菌種數目。測試的項目有裝於空罐的新鮮以及冷凍兩個月以上之糞便檢體、分別放於室溫運輸培養液 (Puritan's transportation medium) 4 小時和 48 小時以及 4°C 運輸培養液 72 小時的糞便檢體。經稀釋後培養於高登培養基，從次世代定序所分析的數據可以看到，受試者 A 糞便檢體放在運輸培養基 48 小時及 72 小時的操作分類單元數目相等，多於新鮮培養而冷凍糞便檢體操作分類單元數目最少；受試者 B 糞便檢體放在運輸培養基 48 小時操作分類單元數目最多，72 小時的次之，多於新鮮培養而運輸培養基 4 小時操作分類單元數目最少；受試者 C 糞便檢體則是新鮮培養操作分類單元數目最多，放在運輸培養基 48 小時的次之，多於冷凍糞便檢體和運輸培養基 4 小時，而 72 小時操作分類單元數目最少，詳見(圖二)。基於冷凍檢體大致只比新鮮檢體少 30%~50% 的 OTU，且為了方便受試者採樣與寄送檢體，我們決定在塞選菌種時一律使用冷凍檢體，而有需要時再採用新

鮮糞便檢體。



3.3 以基質輔助雷射脫附游離飛行時間質譜儀進行菌種鑑定

為了試驗基質輔助雷射脫附游離飛行時間質譜儀的菌種鑑定能力，我們隨機挑選十株於高登培養基以及四株於 BL 此一伊藤非選擇性培養基培養出並成功分離的菌株進行實驗。我們首先將此 14 株菌株抽取 DNA 並以 16S rDNA 定序後得知菌的種類，並將菌株分別培養於其相應培養基，以進行基質輔助雷射脫附游離飛行時間質譜儀的樣品前處理，並接著上機進行菌種鑑定。

基質輔助雷射脫附游離飛行時間質譜儀分析的結果在高登培養基的十個菌株中可以看出，只有四株菌株成功鑑定並與 16S rDNA 定序結果相符，但是分數皆位於 1.700-1.999，為可能的屬 (genus) 鑑定成功，而其他六株菌分數皆低於 1.699，為不可信的鑑定結果，詳見(表二)；於 BL 此一伊藤非選擇性培養基培養出之四株菌，只有一株成功鑑定並與 16S rDNA 定序結果相符，分數位於 2.000-2.299，為屬鑑定成功而可能種 (species) 也鑑定成功，而其他三株菌分數皆低於 1.699，為不可信的鑑定結果，詳見(表三)。由於基質輔助雷射脫附游離飛行時間質譜儀目前鑑定之圖譜訊號弱、資料庫少且鑑定效率較差，因此我們現規劃未來皆以 16S rDNA 定序進行菌種鑑定，並致力於建立台灣人腸胃道微生物菌叢之基質輔助雷射脫附游離飛行時間質譜儀圖譜，以便於未來之成功鑑定。

3.4 高登培養基 (Gordon's medium, GM) 培養之菌株以 16S rDNA 定序進行菌種鑑定

以新鮮糞便經標準稀釋步驟培養於高登培養基後，以肉眼隨機挑選 24 顆型態不同的菌落 (colonies) 進行 16S rDNA 定序之菌種鑑定，鑑定結果如(表四)所示，鑑定後之所比對序列與目標序列的覆蓋度 (Query coverage) 有 23 株皆大於 90%，

唯有 20 號菌株為 37%，而所比對序列與目標序列的相似度 (Identity) 皆大於 80%，為相當成功之菌種鑑定。然而 24 株菌株只有挑選到 8 種不同的菌株，挑選率為 33.33%，仍相當不足。



3.5 日本伊藤選擇性培養基培養之菌株以 16S rDNA 定序進行菌種鑑定

於是我們試以日本伊藤選擇性培養基 (mLBS、NBGT、BS、ES、NN、VS) 進行新鮮糞便之培養，並於每一種類的培養基隨機挑選 8-12 顆菌落，共 54 株菌進行 16S rDNA 定序之菌種鑑定，鑑定結果如(表五)所示。鑑定後之所比對序列與目標序列的覆蓋度 (Query coverage) 有 53 株皆大於 90%，唯有 9 號菌株為 12%，而所比對序列與目標序列的相似度 (Identity) 皆大於 85%，為相當成功之菌種鑑定。然而 54 株菌株只有挑選到 22 種不同的菌株，挑選率為 40.74%，雖然比肉眼挑選高登培養基高，但仍相當不足。

3.6 以聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 分離菌種

由受試者 A、B、C 糞便檢體經次世代定序所分析的數據可以看到三者皆含有毛螺菌屬 (*g_Lachnospira*) 和 *F. plautii* (圖三、表六)，希望能夠從中將兩者分離出，經稀釋糞便後培養並以聚合酶連鎖反應進行實驗。從膠圖可以看到稀釋至 2×10^4 CFU 後可以找到毛螺菌屬和 *F. plautii*，於是我們進一步稀釋至 100CFU、5CFU 後仍然可以找到毛螺菌屬，然而 *F. plautii* 稀釋至 100 CFU 後無法找到(圖四)。再將找到後的毛螺菌屬挑出十個單一菌落，經 16S 次世代定序後鑑定結果如(表七)，皆非毛螺菌屬，因此評估此設計之 primer 專一性弱。



3.7 以特定序列分離菌種


由於使用受試者 A、B、C 之檢體無法分離出 *F. plautii*，所以使用 *F. plautii* 豐富度最高的受試者 O06、O07 之糞便檢體(圖三)並以 *Flavonifractor plautii* strain YL31 的序列重新設計三個 primers(表一)，分別為 FLA NO.8、FLA NO.10、choline，為確定之 *F. plautii* 專一性序列。經稀釋糞便後以 GM 培養並以 primer FLA NO.8 進行聚合酶連鎖反應實驗。從膠圖可以看到 O06 檢體可能為 *F. plautii*，於是我們進一步使用更適合 *F. plautii* 生長之 TSA，將其稀釋成十一盤，每一盤約有 100 colonies，每顆菌沾取一些混合後於第四、七、十一盤發現可能為 *F. plautii*，於是將第四盤之每一菌落以 primer FLA NO.8 進行聚合酶連鎖反應實驗，於第五十七號菌發現可能為 *F. plautii*。為確定為 *F. plautii*，我們同時以三個專一性 primers 以及 16S primer 進行聚合酶連鎖反應實驗，發現皆為預期的產物(圖五)，經 16S 次世代定序後鑑定結果如(表八)，因此確定為 *F. plautii*。

3.8 三甲胺分解實驗 (Trimethylamine assay, Tma assay)

由於經過次世代定序食用左旋肉鹼後生成低量氧化三甲胺的受試者的糞便所發現的出現頻率顯著高且量比較多的腸內菌為 *F. plautii*，我們猜測其中一個原因可能是通過消耗三甲胺使得可以保護宿主免於冠狀動脈疾病。結果在含 100 μM 、10 μM 、1 μM 三甲胺的 15 mL TSB 中培養 72 小時候，以高效液相色譜法分析發現與無菌的控制組相比，有加 *F. plautii* 並沒有影響三甲胺的含量(表九)，因此推斷 *F. plautii* 並不會消耗三甲胺(圖六)。

3.9 膽鹼與肉鹼之代謝利用實驗 (L-carnitine/Choline assay)

由於經過總體基因體學 (Metagenomics) 食用左旋肉鹼後生成高量氧化三甲胺的受試者的糞便所發現的出現頻率顯著高且量比較多的腸內菌有 *Bacteroides*



cellulosilyticus，我們想探討是否 *F. plautii* 會與其反應，而抑制三甲胺的分泌。並且於先前的研究指出高鹽的環境會促使膽鹼運送至大腸桿菌，我們也同樣想驗證是否 *Bacteroides cellulosilyticus* 會利用。結果無論是在高鹽或正常培養液情況下，*F. plautii* 和 *Bacteroides cellulosilyticus* 都不會利用左旋肉鹼或是膽鹼生成三甲胺(表十)，而目前尚看不出 *F. plautii* 是否會抑制三甲胺的分泌。

3.10 氘標記膽鹼與肉鹼之代謝利用實驗 (d^9 -L-carnitine / d^9 -Choline assay)

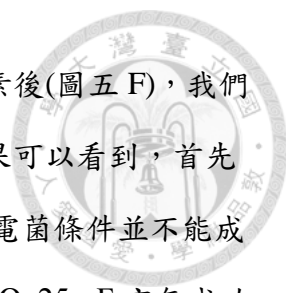
而 *F. plautii* 也有與 *Desulfovibrio desulfuricans* 這隻在羊腸胃中發現的菌做 d^9 -choline / d^9 -L-carnitine assay，因為 *Desulfovibrio desulfuricans* 是確定會生成三甲胺的菌，而這裡使用 d^9 標記是因為溶液中含有 choline 跟 carnitine，所以通過測定 d^9 -TMA，可以確定是否確實會利用外加的 choline 跟 carnitine，以及是否 *F. plautii* 會與其反應，而抑制三甲胺的分泌。結果顯示 *F. plautii* 並不會抑制 *Desulfovibrio desulfuricans* 分泌三甲胺(表十一)。

3.11 競爭實驗 (competing assay)

我們也想知道 *F. plautii* 是否可以抑制 *Bacteroides cellulosilyticus* 和 *Odoribacter splanchnicus* 這兩株高量氧化三甲胺生成菌的生長。從培養競爭五天後以 TSB 將菌沖下，稀釋塗於 TSA 固態培養基，培養三天後將菌挑至選擇性培養基與 TSA 固態培養基的結果可以看到 *F. plautii* 並無抑制這兩株菌的效果。

3.12 電穿孔 (electroporation)

我們接著想探討 *F. plautii* 會不會經由分解類黃酮後生成的短鏈脂肪酸而影響



三甲胺的生成，在確認了 *F. plautii* 有這一分解類黃酮所需的酵素後(圖五 F)，我們想試作此基因之剔除實驗，先確認能否進行電穿孔。由實驗結果可以看到，首先使用質體 pJV62 以及 625V, 600Ω, 25 μF 和 2500 V, 200Ω, 25 μF 電菌條件並不能成功電菌(表十三 A,B)；改以條件 625V, 600Ω, 25 μF 和 2500 V, 200Ω, 25 μF 亦無成功(表十三 C)；更換成 pMN437 亦無法成功送入(表十三 D)；替換沖洗溶液為 SMP buffer 和適當的降低選擇性培養基的抗生素濃度為 80 μg/mL，也無法成功(表十三 E)。目前為止，不管是調整電菌之電壓或電流條件，或是替換沖洗溶液和適當的降低選擇性培養基的抗生素濃度，目前均無法成功將質體送進 *F.plautii* 之中。

第四章、 討論



由不同培養基對菌種數目的影響實驗中可以看出，高登培養基以及伊藤非選擇性培養基可以培養出的 OTU 數目最多，符合成本效益，可以以此為基礎大量培養腸道厭氧菌。而對於一般糞便檢體處理的方式，雖然冷凍檢體大致比新鮮檢體少 30%~50% 的 OTU，但是為了方便受試者採樣與寄送檢體，我們決定在塞選菌種時一律使用冷凍檢體，而當有重要菌種培養不出時再採用新鮮糞便檢體。

而由於塞選菌種是一項較繁瑣的工作，我們希望能藉由基質輔助雷射脫附游離飛行時間質譜儀輔助我們進行工作，但目前鑑定之圖譜訊號弱、資料庫少且鑑定效率較差，因此我們現皆以 16S rDNA 定序進行菌種鑑定，成功鑑定率相當高。而目前改用以肉眼隨機挑選高登培養基與日本伊藤選擇性培養基菌種後再以 16S rDNA 定序進行菌種鑑定的成功率高但效率不高，無法以此方法塞選出有興趣之菌株。然而目前設計之專一性毛螺菌屬引子在以聚合酶連鎖反應分離菌種實驗中可以看出此引子專一性低，無法分離出毛螺菌屬。

由於我們想要找出可能可以抑制高量三甲胺分泌菌的菌種，可能可以做為益生菌的功能。而目前以 *F.plautii* 特定序列作為引子，加以聚合酶連鎖反應已成功分離出此菌種，從三甲胺分解實驗推斷 *F. plautii* 並不會消耗分解三甲胺。在膽鹼與肉鹼之代謝利用實驗中發現其並不會抑制三甲胺的分泌。

而 *F.plautii* 目前也無法以電穿孔進行基因剔除，可能需要再了解究竟 *F.plautii* 要如何得到外來的 DNA，須試做其它除了電穿孔以外的實驗。

而由於與我們實驗室合作之團隊皆試針對偵測氧化三甲胺，為經過肝臟代謝後之產物，然而應該考慮到是否肝臟代謝之酵素與受試者之性別、年齡或本身之肝臟代謝情況不同而造成偵測到之氧化三甲胺之不同。可能須經由偵測糞便中之三甲胺的量來做區別。

雖然在競爭實驗中並無發現其會抑制高量氧化三甲胺生成之菌生長，有可能

為不同的菌有不同的生長時間，也有可能為培養之溶液過於營養，而不需要去競爭生長，未來可能需要模擬腸道生長環境或是進行動物實驗，也有可能可以收集稀釋糞便後的上清液，其中或許含有抑制的成分可以進行實驗。



第五章、未來展望



目前從實驗推斷 *F. plautii* 並不會消耗分解三甲胺、抑制高量氧化三甲胺生成之菌的三甲胺分泌或抑制其生長。因此我們希望能找出 *F. plautii* 與低量氧化三甲胺生成相關的基因，以及可能的其他機制。我們也希望以營養豐富的高登培養基，還有日本伊藤的選擇性與非選擇性培養基建立腸道微生物培養系統，並且以相同的培養系統培養出台灣人腸胃道微生物菌叢，同時建立基質輔助雷射脫附游離飛行時間質譜儀的菌種圖譜，提升基質輔助雷射脫附游離飛行時間質譜儀的鑑定能力，以及擴增資料庫，以便於未來之成功鑑定。



表一、本研究使用之引子

引子名稱	引子序列 (5'→3')	用途 (說明)
<i>Pantoea</i> F	GGCGTTGAGGTTAATAACCTCAG	PCR check
<i>Pantoea</i> R	GGAATTCTACCCTCCTCTACAAG	
<i>Flavonifractor</i> F	AGGGCGTG TAGGCGGGATT	
<i>Flavonifractor</i> R	GCGTCAGTTACTGTCCAGCAAT	
<i>Lachnospira</i> F	AAAGGGAGCGTAGGTGGCTG	
<i>Lachnospira</i> R	TCGAGCCTCAGTGTCAGTTACA	
FLA NO.8 F	TCGTTCTCGTACCAGACCTTGTA	
FLA NO.8 R	CCTACA ACTTAAATGTATATGCCTCAG	
FLA NO.10 F	ATGACTGAGCTGCGCAAGGC	
FLA NO.10 R	ACCGTGGCGCGCCAGTATTT	
choline F	CAGTCCCTTGGGCACCACAT	
choline R	GGTGGCCATCGGCTTTGTACT	
FLA-acetyl. F	ATGTCCGTGGAATTTTCGTCC	
FLA-acetyl R	ACGCATGGTGATGTAGCC	
16s-V3F	CCTACGGGNGGCWGCAG	
16s-V4R	GACTACHVGGGTATCTAATCC	
16SF	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	
16SR	AAGGAGGTGWTCCARCC	

表二、以基質輔助雷射脫附游離飛行時間質譜儀進行高登培養基之菌種鑑定

目前只有 G2、3、5、7 成功鑑定並與 16S rDNA 定序結果相符，但是分數皆位於 1.700-1.999，為可能的屬 (genus) 鑑定成功，而其他六株菌分數皆低於 1.699，為不可信的鑑定結果。

	MALDI-TOF	16S sequencing	Exist in database	Score
G1	not identified	<i>Blautia wexlerae</i>	No	1.629
G2	<i>Streptococcus equinus</i>	<i>Streptococcus equinus</i>	Yes	1.842
		<i>Streptococcus lutetiensis</i>	No	
G3	<i>Bifidobacterium longum</i>	<i>Bifidobacterium longum</i>	Yes	1.844
G4	not identified	<i>Paenibacillus polymyxa</i>	No	1.47
G5	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	Yes	1.988
		<i>Shigella flexneri</i>	Yes	
G6	not identified	<i>Ruminococcus</i> sp.	No	1.445
G7	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	<i>Bifidobacterium adolescent</i>	Yes	1.901
G8	not identified	<i>Blautia wexlerae</i>	No	1.461
G9	not identified	Uncultured bacterium	?	1.44
G10	not identified	<i>Clostridium</i> sp.	Yes	1.683
		<i>Anaerostipes hadrus</i>	Yes	

*2.300...3.000: highly probable species identification

2.000...2.299: secure genus identification, probable species identification

1.700...1.999: probable genus identification

0.000...1.699: not reliable identification

表 三、以基質輔助雷射脫附游離飛行時間質譜儀進行 BL 伊藤非選擇性培養基之菌種鑑定

目前只有 B4 成功鑑定並與 16S rDNA 定序結果相符，分數位於 2.000-2.299，為屬鑑定成功而可能種 (species) 也鑑定成功，而其他三株菌分數皆低於 1.699，為不可信的鑑定結果。

	MALDI-TOF	16S sequencing	Exist in database	Score
B1	not identified	<i>Bifidobacterium longum</i>	Yes	1.458
B2	not identified	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	Yes	1.571
B3	not identified	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	Yes	1.45
B4	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	Yes	2.01

* 2.300...3.000: highly probable species identification

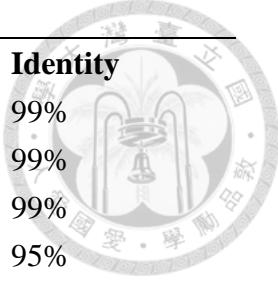
2.000...2.299: secure genus identification, probable species identification

1.700...1.999: probable genus identification

0.000...1.699: not reliable identification

表 四、高登培養基 (GM) 培養之菌株以 16S rDNA 定序進行菌種鑑定

Number	Species	Query coverage	Identity
1	<i>Pantoea</i> sp. <i>Flour</i>	96%	99%
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	96%	99%
	<i>Enterobacter</i> sp.	96%	99%
2	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	95%	99%
	<i>Pantoea</i> sp. <i>Flour</i>	95%	99%
	<i>Klebsiella</i> sp. <i>Jilu</i>	95%	99%
6	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	96%	99%
	<i>Pantoea</i> sp. <i>Flour</i>	96%	99%
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	96%	99%
11	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	94%	100%
	<i>Pantoea</i> sp. <i>flour</i>	96%	99%
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	96%	99%
19	<i>Pantoea</i> sp. <i>flour</i>	97%	99%
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	96%	99%
	<i>Enterobacter</i> sp.	96%	99%
3	<i>Escherichia coli</i>	96%	99%
	<i>Marine bacterium</i> HB-5	97%	99%
	<i>Enterobacteriaceae bacterium</i>	96%	99%
4	<i>Marine bacterium</i> HB-5	97%	99%
	<i>Escherichia coli</i>	97%	99%
	<i>Enterobacteriaceae bacterium</i>	96%	99%
5	<i>Escherichia coli</i>	96%	99%
	<i>Marine bacterium</i> HB-5	96%	99%
	<i>Bacterium strain</i>	96%	99%
7	<i>Uncultured Shigella</i>	96%	99%
	<i>Marine bacterium</i> HB-5	94%	100%
	<i>Bacterium strain</i>	96%	99%
9	<i>Escherichia coli</i>	96%	99%
	<i>Marine bacterium</i> HB-5	96%	99%
	<i>Enterobacteriaceae bacterium</i>	96%	99%
12	<i>Escherichia coli</i>	95%	99%
	<i>Marine bacterium</i> HB-5	95%	99%
	<i>Bacterium strain</i>	95%	99%

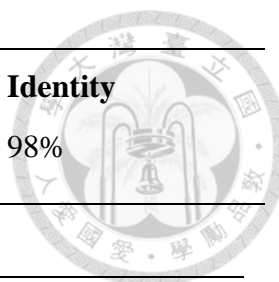


Number	Species	Query coverage	Identity
14	<i>Escherichia coli</i>	97%	99%
	<i>Marine bacterium</i> HB-5	97%	99%
	<i>Bacterium strain</i>	97%	99%
15	<i>Shigella boydii</i>	92%	95%
	<i>Escherichia coli</i>	92%	95%
	<i>Shigella dysenteriae</i>	92%	95%
21	<i>Escherichia coli</i>	96%	99%
	<i>Marine bacterium</i> HB-5	96%	99%
	<i>Bacterium strain</i>	96%	99%
22	<i>Marine bacterium</i> HB-5	97%	99%
	<i>Escherichia coli</i>	97%	99%
	<i>Enterobacteriaceae bacterium</i>	97%	99%
24	<i>Escherichia coli</i>	96%	99%
	<i>Marine bacterium</i> HB-5	96%	99%
	<i>Enterobacteriaceae bacterium</i>	96%	99%
8	<i>Bifidobacterium catenulatum</i>	96%	99%
	<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i>	96%	99%
	<i>Bifidobacterium catenulatum</i>	96%	99%
16	<i>Bifidobacterium catenulatum</i>	96%	99%
	<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i>	96%	99%
	<i>Bifidobacterium catenulatum</i>	96%	99%
10	<i>Bacterium strain</i>	96%	99%
	<i>Shigella flexneri</i>	96%	99%
	<i>Escherichia coli</i>	96%	99%
18	<i>Bacterium strain</i>	95%	99%
	<i>Shigella flexneri</i>	95%	99%
	<i>Enterobacteriaceae bacterium</i>	96%	99%
13	<i>Escherichia coli</i>	97%	99%
	<i>Enterobacteriaceae bacterium</i>	97%	99%
	<i>Escherichia coli</i>	97%	99%
17	<i>Streptococcus sanguinis</i>	97%	98%
20	Uncultured bacterium	37%	84%
	<i>Streptococcus sp. oral taxon</i>	37%	83%
23	<i>Streptococcus anginosus</i>	95%	99%

表 五、日本伊藤選擇性培養基培養之菌株以 16S rDNA 定序進行菌種鑑定

mLBs	species	Query coverage	Identity
1	<i>Lactobacillus salivarius</i>	96%	99%
2	<i>Lactobacillus salivarius</i>	95%	99%
3	<i>Lactobacillus salivarius</i>	95%	99%
4	<i>Lactobacillus salivarius</i>	92%	100%
	<i>Lactobacillus plantarum</i>	92%	100%
5	<i>Lactobacillus salivarius</i>	94%	99%
6	<i>Lactobacillus salivarius</i>	95%	99%
7	<i>Lactobacillus salivarius</i>	94%	99%
8	<i>Lactobacillus salivarius</i>	92%	100%
	<i>Lactobacillus plantarum</i>	92%	100%

NBGT	species	Query coverage	Identity
1	<i>Escherichia coli</i>	96%	98%
	<i>Marine bacterium</i> HB-5	96%	98%
	<i>Shigella</i> sp. kcps77	96%	98%
	<i>Klebsiella pneumonia</i>	96%	98%
2	<i>Escherichia coli</i>	96%	99%
	<i>Enterobacteriaceae</i>	96%	99%
	<i>bacterium</i>	96%	99%
	<i>Marine bacterium</i> HB-5		
3	<i>Bacteroides dorei</i>	96%	99%
4	<i>Bacterium</i> NLAE-zl-G515	96%	97%
	<i>Bacteroides xylanisolvens</i>	96%	97%
5	Uncultured bacterium	96%	99%
6	<i>Marine bacterium</i>	96%	99%
	<i>Escherichia coli</i>	96%	99%
	<i>Shigella dysenteriae</i>	96%	99%
	<i>Enterobacteriaceae</i>	96%	99%
	<i>bacterium</i>		
7	<i>Bacteroides ovatus</i>	96%	99%



NBGT	species	Query coverage	Identity
8	<i>Bacteroides xylanisolvens</i>	95%	98%

BS	species	Query coverage	Identity
1	<i>Bifidobacterium catenulatum</i>	97%	99%
	<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i>	97%	99%
	<i>Bifidobacterium catenulatum</i>	96%	99%
2	<i>Bifidobacterium catenulatum</i>	96%	99%
	<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i>	96%	99%
	<i>Bifidobacterium catenulatum</i>	95%	99%
3	<i>Bifidobacterium catenulatum</i>	95%	99%
	<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i>	95%	99%
	<i>Bifidobacterium catenulatum</i>	96%	99%
4	<i>Bifidobacterium catenulatum</i>	96%	99%
	<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i>	96%	99%
	<i>Bifidobacterium catenulatum</i>	94%	99%
5	<i>Bifidobacterium catenulatum</i>	94%	99%
	<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i>	94%	99%
	<i>Bifidobacterium catenulatum</i>	96%	99%
6	<i>Bifidobacterium catenulatum</i>	96%	99%
	<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i>	96%	99%
	<i>Bifidobacterium catenulatum</i>	94%	99%
7	<i>Bifidobacterium catenulatum</i>	94%	99%
	<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i>	94%	99%
	<i>Bifidobacterium catenulatum</i>	95%	95%
8	<i>Bifidobacterium catenulatum</i>	95%	95%
	<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i>	95%	95%
	<i>Bifidobacterium catenulatum</i>	95%	95%

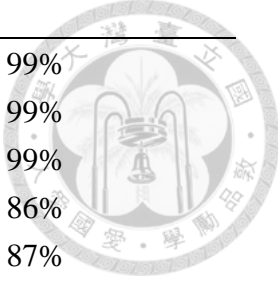
ES	species	Query coverage	Identity
1	<i>Eubacterium limosum</i>	95%	99%
	Uncultured bacterium	95%	99%
2	<i>[Clostridium] clostridioforme</i>	96%	99%
	strain DMF3 16S ribosomal	96%	99%
	RNA gene	96%	99%
	<i>[Clostridium] bolteae</i>		99%
	<i>Lachnoclostridium</i> sp. YL32		
3	<i>Eubacterium limosum</i>	96%	99%
	<i>Bacterium</i> P1B11 <i>Bacterium</i>	96%	99%
	NLAE-zl-P82	96%	99%
4	<i>Eubacterium limosum</i>	96%	99%
	<i>Bacterium</i> P1B11	96%	99%
	<i>Bacterium</i> NLAE-zl-P82	96%	99%
5	<i>Escherichia coli</i>	96%	97%
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	96%	97%
6	<i>Marine bacterium</i> HC-17	96%	96%
	<i>Shigella boydii</i>	97%	96%
	<i>Escherichia coli</i> strain EPEC	97%	96%
7	<i>Eubacterium limosum</i>	96%	99%
	<i>Eubacterium</i> sp. S100	96%	99%
	<i>Bacterium</i> P1B11	96%	99%
8	<i>Bacterium</i> NLAE-zl-G229	96%	90%
	<i>Eubacterium limosum</i>	96%	90%
	<i>Eubacterium</i> sp. S100	96%	90%

NN	species	Query coverage	Identity
1	Uncultured bacterium	95%	87%
2	<i>Enterococcus</i> sp. 15A	95%	99%
	<i>Enterococcus dispar</i>	95%	99%
	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	95%	99%
	<i>Enterococcus gallinarum</i>	95%	99%



3	<i>Enterococcus</i> sp. 15A	94%	99%
	<i>Enterococcus dispar</i>	94%	99%
	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	94%	99%
	<i>Enterococcus gallinarum</i>	94%	99%
4	<i>Peptoclostridium</i> sp.	96%	99%
5	<i>Escherichia coli</i>	97%	99%
6	<i>Blautia producta</i>	95%	99%
	<i>Blautia coccoides</i>	93%	100%
	<i>Bacterium</i> NLAE-zl-H470	93%	100%
	16S ribosomal RNA gene		
7	<i>Enterococcus</i> sp. 15A	95%	99%
	<i>Enterococcus dispar</i>	95%	99%
	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	95%	99%
	<i>Enterococcus gallinarum</i>	95%	99%
8	<i>Fusobacterium necrophorum</i>	91%	96%
9	Uncultured <i>Soehngenia</i>	12%	89%
10	<i>Blautia coccoides</i>	94%	99%
11	<i>Peptoclostridium</i> sp.	95%	99%
	<i>Clostridium sulfidigenes</i>	96%	99%
12	<i>Peptoclostridium</i> sp.	94%	99%

VS	species	Query cover	Ident
1	Uncultured bacterium	95%	99%
2	Uncultured organism	96%	99%
3	Uncultured bacterium	95%	99%
	<i>Veillonella parvula</i>	95%	99%
4	Uncultured bacterium	95%	99%
	Uncultured <i>Veillonella</i> sp.	95%	99%
5	<i>Escherichia coli</i>	96%	99%
	Uncultured bacterium	96%	99%
	<i>Marine bacterium</i> HB-5	96%	99%
	<i>Shigella flexneri</i>	96%	99%



6	<i>Escherichia coli</i>	95%	99%
	Uncultured bacterium	95%	99%
	<i>Marine bacterium</i> HB-5	95%	99%
7	Uncultured organism	93%	86%
	<i>Enterobacteriaceae</i>	87%	87%
	<i>bacterium</i>	89%	87%
	<i>Marine bacterium</i> HB-5	88%	87%
	<i>Escherichia coli</i>		
8	<i>Escherichia coli</i>	96%	99%
	Uncultured bacterium	96%	99%
	<i>Marine bacterium</i> HB-5	96%	99%
9	<i>Escherichia coli</i>	96%	99%
	Uncultured bacterium	96%	99%
	<i>Marine bacterium</i> HB-5	96%	99%
10	Uncultured bacterium	95%	99%

*mLBs、NBGT、BS、ES、NN 和 VS 為日本伊藤教授之選擇性培養基。

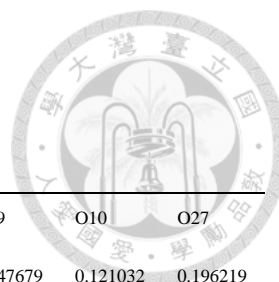


表 六、受試者糞便檢體中特定菌種相對豐富度

A. 十位受試者

Taxonomy	V06	V09	V15	O06	O07	V14	O08	O09	O10	O27
<i>Flavonifractor</i>	0.047679	0.064184	0.012837	0.557481	0.583155	0.034843	0.104528	0.047679	0.121032	0.196219
<i>Lachnospira</i>	0.001834	0.005501	0.031175	0	0	0	0.011003	0	0	0.005501
<i>pantoea</i>	0.029341	0	0.012837	0.005501	0.001834	0	0	0	0	0

B. 受試者 A、B、C (1：糞便直接萃取 DNA 2：高登培養基 3：伊藤非選擇性培養基 4：伊藤選擇性培養基)

Taxonomy	A1	B1	C1	A2	B2	C2	A3	B3	C3	A4	B4	C4
<i>Flavonifractor</i>	0.001712	0.002082	0.001134	0.002545	0.00118	0.000717	0.001481	0.001157	0.00074	0.001134	0.000925	0.001018
<i>Lachnospira</i>	0.00118	0.001041	0.001943	0.000301	0.000347	0.000393	0.001457	0.000347	0.000301	0.000231	0.000278	0.00044

表七、以聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 分離菌種挑選出之

單一菌落

Number	Species	Query coverage	Identity
A1	<i>Enterococcus faecium</i>	98%	96%
A2	<i>Fusobacterium varium</i>	99%	98%
	<i>Fusobacterium ulcerans</i>	99%	98%
A3	<i>Escherichia coli</i>	96%	96%
B1	Uncultured bacterium	98%	90%
	<i>Anaerostipes caccae</i>	99%	90%
	<i>Clostridium indolis</i>	99%	88%
B3	Uncultured bacterium	99%	96%
	<i>Acidaminococcus intestini</i>	99%	96%
C1	Uncultured bacterium	99%	96%
	<i>Acidaminococcus intestini</i>	99%	96%
	Butyrate-producing bacterium	96%	99%
C2	<i>Enterococcus lactis</i>	71%	95%
	<i>Enterococcus faecium</i>	70%	95%
C3	<i>Finegoldia magna</i>	98%	99%
	Uncultured bacterium	98%	99%
D2	Uncultured bacterium	98%	99%
	<i>Sutterellaceae bacterium</i>	98%	99%
D3	Uncultured bacterium	98%	99%
	<i>Phascolarctobacterium faecium</i>	98%	99%

表八、以聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 分離菌種

Number	Species	Query coverage	Identity
T1 F	<i>Flavonifractor plautii</i> strain aK2	98%	99%
	Uncultured bacterium	99%	99%
	<i>Clostridium</i> sp.	99%	99%
T1 R	<i>Clostridium orbiscindens</i>	99%	98%
	Uncultured bacterium	99%	98%
	<i>Flavonifractor plautii</i> strain 265	99%	98%
T2 F	Uncultured organism	97%	96%
	<i>Flavonifractor plautii</i> strain Ak2	97%	96%
	<i>Clostridium</i> sp.	97%	96%
T2 R	<i>Clostridium orbiscindens</i>	99%	98%
	Uncultured bacterium	99%	98%
	<i>Flavonifractor plautii</i> strain 265	99%	98%
T3 F	Uncultured organism	97%	97%
	<i>Flavonifractor plautii</i> strain aK2	97%	97%
	<i>Clostridium</i> sp.	98%	96%
T3 R	<i>Clostridium orbiscindens</i>	99%	98%
	Uncultured organism	99%	98%
	<i>Flavonifractor plautii</i> strain 265	99%	98%
T4 F	Uncultured bacterium	95%	97%
	<i>Clostridium</i> sp.	95%	97%
	<i>Flavonifractor plautii</i> strain aK2	95%	97%
T4 R	<i>Clostridium orbiscindens</i>	99%	97%
	Uncultured bacterium	99%	97%
	<i>Flavonifractor plautii</i> strain 265	99%	97%
C1 F	<i>Flavonifractor plautii</i> strain aK2	98%	96%
	Uncultured bacterium	99%	96%
C1R	<i>Clostridium orbiscindens</i>	97%	96%
	Uncultured bacterium	97%	96%
	<i>Flavonifractor plautii</i> strain 265	97%	96%
C2F	<i>Flavonifractor plautii</i> strain aK2	96%	95%
	Uncultured bacterium	96%	95%
	<i>Clostridium</i> sp.	96%	95%
C2R	<i>Clostridium orbiscindens</i>	99%	97%
	Uncultured bacterium	99%	97%

	<i>Flavonifractor plautii</i> strain 265	99%	97%
C3F	Uncultured organism	98%	95%
	<i>Flavonifractor plautii</i> strain ak2	98%	95%
	<i>Clostridium</i> sp.	98%	95%
C3R	<i>Clostridium orbiscindens</i>	99%	97%
	Uncultured bacterium	99%	97%
	<i>Flavonifractor plautii</i> strain 265	99%	97%
C4F	Uncultured organism	93%	97%
	<i>Flavonifractor plautii</i> strain aK2	93%	97%
	<i>Clostridium</i> sp.	93%	96%
C4R	Uncultured bacterium	95%	91%
	<i>Clostridium orbiscindens</i>	95%	91%
	<i>Flavonifractor plautii</i> strain 265	95%	91%
choline F	<i>Flavonifractor plautii</i> strain	98%	99%
	YL31	6%	97%
	<i>Bordetella petrii</i> strain DSM		
	12804		
choline R	<i>Flavonifractor plautii</i> strain	97%	99%
	YL31	6%	97%
	<i>Bordetella petrii</i> strain DSM		
	12804		

*T 為 TSA 培養基，C 為 CBA 培養基。



表 九、三甲胺分解實驗 (Trimethylamine assay, Tma assay)

Sample	TMA (μM)
TSB	0
Control-100	137.6189
Fla-100	138.7956
Control-10	14.6379
Fla-10	13.9196
Control-1	0.0000
Fla-1	0.0000

* Limit of quantification (LOQ): $0.17\mu\text{M}$ for TMA.

C-100 為 $100\mu\text{M}$ TMA 控制組，Fla-100 為加有 *F.plautii* $100\mu\text{M}$ TMA，C-10 為 $10\mu\text{M}$ TMA 控制組，Fla-10 為加有 *F.plautii* $10\mu\text{M}$ TMA，C-1 為 $1\mu\text{M}$ TMA 控制組，Fla-0 為加有 *F.plautii* $1\mu\text{M}$ TMA。

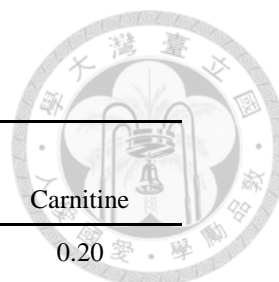


表 十、膽鹼與肉鹼之代謝利用實驗 (Carnitine/Choline assay)

Sample Name	Concentration (μM)			
	TMA	Choline	Carnitine	
BLANK	< LOQ	174.58	0.20	
Dd27774	409.77	0.46	0.28	
BLANK	< LOQ	173.02	0.25	
B. c. ($\text{OD}_{600}=1.85$)	< LOQ	180.11	0.19	
Choline Chloride	B. c. ($\text{OD}_{600}=0.2$)	< LOQ	160.50	0.21
F. p. ($\text{OD}_{600}=0.2$)	< LOQ	175.19	0.22	
B. c. + F. p.	< LOQ	177.31	0.20	
BLANK	< LOQ	66.17	90.27	
B. c. ($\text{OD}_{600}=1.85$)	< LOQ	69.47	82.52	
L-Carnitine	B. c. ($\text{OD}_{600}=0.2$)	< LOQ	68.05	85.53
F. p. ($\text{OD}_{600}=0.2$)	< LOQ	73.09	96.66	
B. c. + F. p.	< LOQ	81.90	97.30	
BLANK	< LOQ	182.04	0.16	
B. c. ($\text{OD}_{600}=1.85$)	< LOQ	172.60	0.26	
Choline Chloride	B. c. ($\text{OD}_{600}=0.2$)	< LOQ	178.29	0.22
(NaCl)	F. p. ($\text{OD}_{600}=0.2$)	< LOQ	174.35	0.22
B. c. + F. p.	< LOQ	171.88	0.07	
BLANK	< LOQ	68.80	92.61	
B. c. ($\text{OD}_{600}=1.85$)	< LOQ	69.52	81.78	
L-Carnitine	B. c. ($\text{OD}_{600}=0.2$)	< LOQ	68.77	86.40
(NaCl)	F. p. ($\text{OD}_{600}=0.2$)	< LOQ	71.12	89.63
B. c. + F. p.	< LOQ	66.71	81.58	

* Limit of quantification (LOQ): $0.17\mu\text{M}$ for TMA, $0.0006\mu\text{M}$ for carnitine.

B.c 為 *Bacteroides cellulosilyticus* , F.p 為 *Flavonifractor plautii* , Dd27774 為 *Desulfovibrio desulfuricans* 。

表 十一、氘標記膽鹼與肉鹼之代謝利用實驗 (d^9 -L-Carnitine / d^9 -Choline assay)

Substrate	Sample Name	Sample Concentration (μM)				
		d^9 -TMA	d^9 -L-carnitine	d^9 -Y-BB	d^9 -choline	Y-BB
d^9 -choline	BLANK	< LOQ	< LOQ	< LOQ	145.06	< LOQ
	F.p	< LOQ	< LOQ	< LOQ	147.48	< LOQ
	D.d	138.92	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
	F.p + D.d	120.98	< LOQ	< LOQ	0.27	< LOQ
d^9 -L-carnitine	BLANK	< LOQ	182.88	< LOQ	< LOQ	< LOQ
	F.p	< LOQ	182.41	< LOQ	< LOQ	< LOQ
	D.d	< LOQ	171.46	< LOQ	< LOQ	< LOQ
	F.p + D.d	< LOQ	203.65	< LOQ	< LOQ	< LOQ

* Limit of quantification (LOQ): $0.01\mu\text{M}$ for d^9 -TMA, $0.006\mu\text{M}$ for d^9 -L-carnitine, $0.006\mu\text{M}$ for d^9 -Y-BB, $0.009\mu\text{M}$ for d^9 -choline, $0.007\mu\text{M}$ for Y-BB.

F.p 為 *Flavonifractor plautii* , D.d 為 *Desulfovibrio desulfuricans* 。



表 十二、競爭實驗 (competing assay)

sample	OD600	dilution	<i>B.cellulosilyticus</i> (colonies)	<i>F.plautii</i> (colonies)	competitive index
1-1	0.9	10 ⁻⁵	50	4	0.08
1-2	0.9	10 ⁻⁵	62	5	0.08
2-1	0.9	10 ⁻⁶	40	4	0.1
2-2	0.9	10 ⁻⁶	51	3	0.06

sample	OD600	dilution	<i>O.splanchnicus</i> (colonies)	<i>F.plautii</i> (colonies)	competitive index
1-1	0.9	10 ⁻⁶	77	19	0.26
1-2	0.9	10 ⁻⁶	63	11	0.17
2-1	0.9	10 ⁻⁶	57	10	0.18
2-2	0.9	10 ⁻⁶	69	13	0.19

*competitive index 為獵人菌落數目除以獵物菌落數目，此項實驗獵人為 *F.plautii*

表 十三、電穿孔 (electroporation)

A.

Colonies (100 μ L)	Kana 100	No Ab
200 Ω	0	48
Fresh competent cell	0	46
600 Ω	0	54
Fresh competent cell	0	38

B.

Colonies (100 μ L)	Kana 100	No Ab
200 Ω	0	54
Fresh competent cell	0	70
600 Ω	0	72
Fresh competent cell	0	59
Frozen competent cell		125

C.

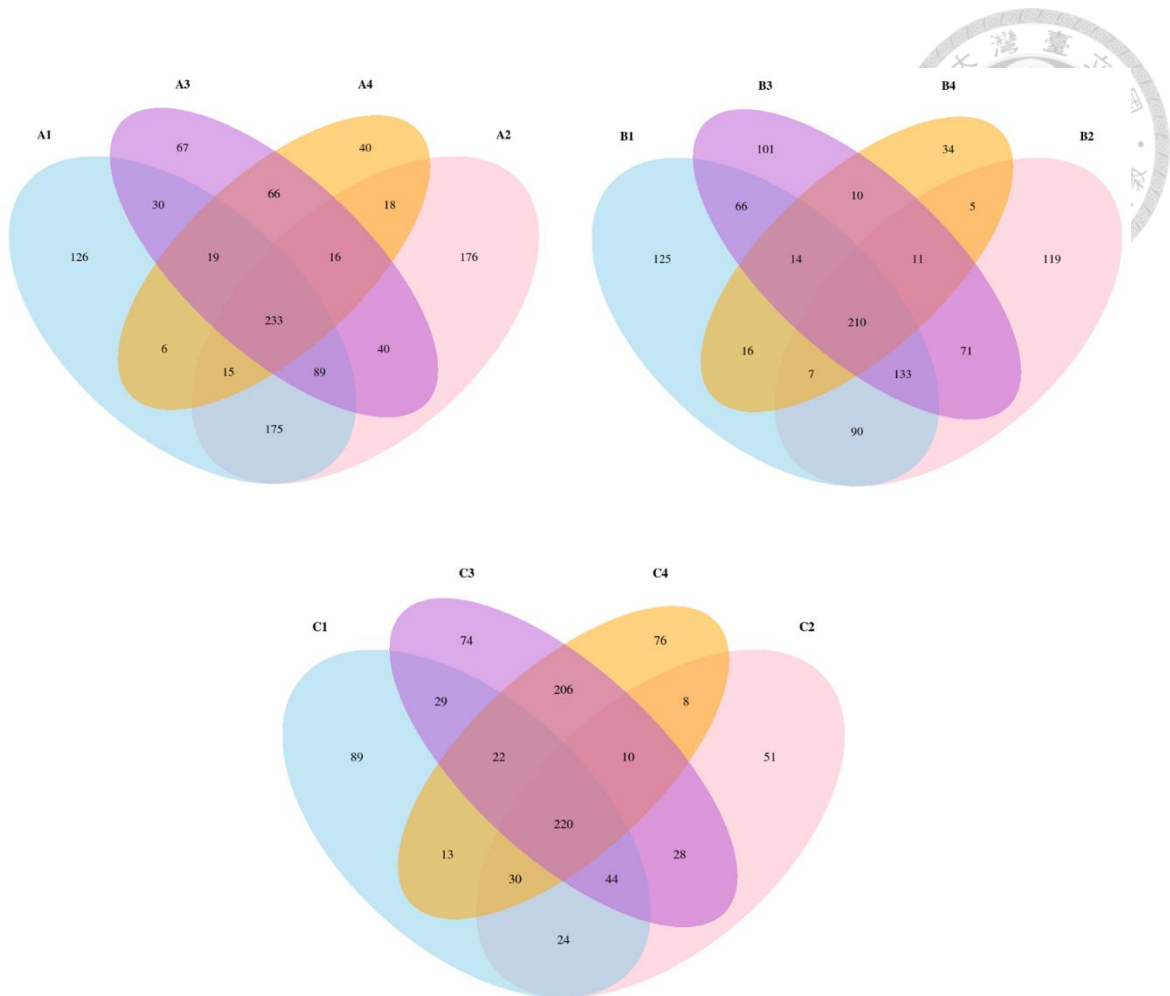
Colonies (100 μ L)	Kana 100	No Ab
720 Ω	0	18
Fresh competent cell	0	22
129 Ω	0	23
Fresh competent cell	0	22
Fresh competent cell		4000
Fresh competent cell exposure to air		2000

D.

Colonies (100 μ L)	Kana 100	No Ab
720 Ω	0	10
Fresh competent cell	0	13
129 Ω	0	9
Fresh competent cell	0	8
Fresh competent cell		250
Fresh competent cell exposure to air		190

E.

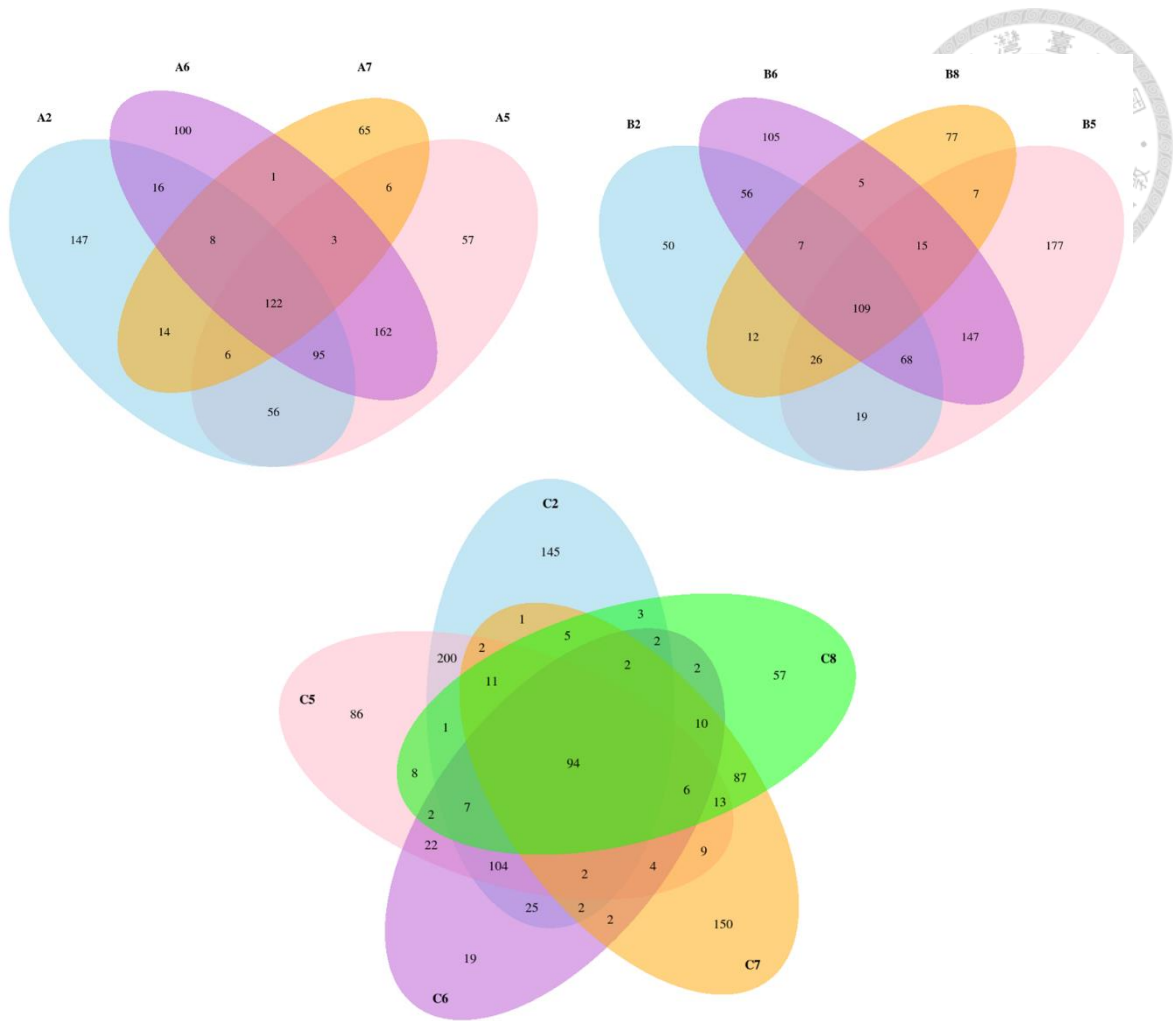
Colonies (100 μ L)	Kana 100	No Ab
A	0	440
B	0	864
C	0	656
D	0	1976
Fresh competent cell		87200
Fresh competent cell exposure to air		61600



- 1：糞便直接萃取 DNA 2：高登培養基
 3：伊藤非選擇性培養基 4：伊藤選擇性培養基

圖一、探討不同培養基對菌種數目之影響

受試者 A 糞便直接萃取 DNA 之操作分類單元數目為 693，高登培養基為 762，伊藤非選擇性培養基為 560，而伊藤選擇性培養基為 413，高登培養基>伊藤非選擇性培養基>伊藤選擇性培養基；受試者 B 糞便直接萃取 DNA 之操作分類單元數目為 661，高登培養基為 646，伊藤非選擇性培養基為 616，而伊藤選擇性培養基為 307，高登培養基>伊藤非選擇性培養基>伊藤選擇性培養基；受試者 C 糞便直接萃取 DNA 之操作分類單元數目為 471，高登培養基為 415，伊藤非選擇性培養基為 633，而伊藤選擇性培養基為 585，伊藤非選擇性培養基>伊藤選擇性培養基>高登培養基。圖為圖爾思公司所做。



- 2：新鮮糞便檢體
 6：4°C 運輸培養基 72 小時
 8：室溫運輸培養基 4 小時
 5：室溫運輸培養液 48 小時
 7：冷凍糞便檢體

圖二、以不同儲存方式與時間對糞便檢體菌種數目的影響

受試者 A 新鮮培養操作分類單元數目為 454，運輸培養液 48 小時及 72 小時數目均為 507，冷凍糞便檢體為 225，運輸培養液 48 小時=72 小時>新鮮培養>冷凍糞便；受試者 B 新鮮培養操作分類單元數目為 347，運輸培養液 48 小時為 568，72 小時的為 512，運輸培養液 4 小時為 258，運輸培養液 48 小時>72 小時>新鮮培養>4 小時；受試者 C 新鮮培養操作分類單元數目為 606，運輸培養液 48 小時為 571，72 小時的為 305，冷凍糞便檢體為 400，運輸培養液 4 小時為 310，新鮮培養>運輸培養液 48 小時>冷凍糞便>4 小時>72 小時。圖為圖爾思公司所做。

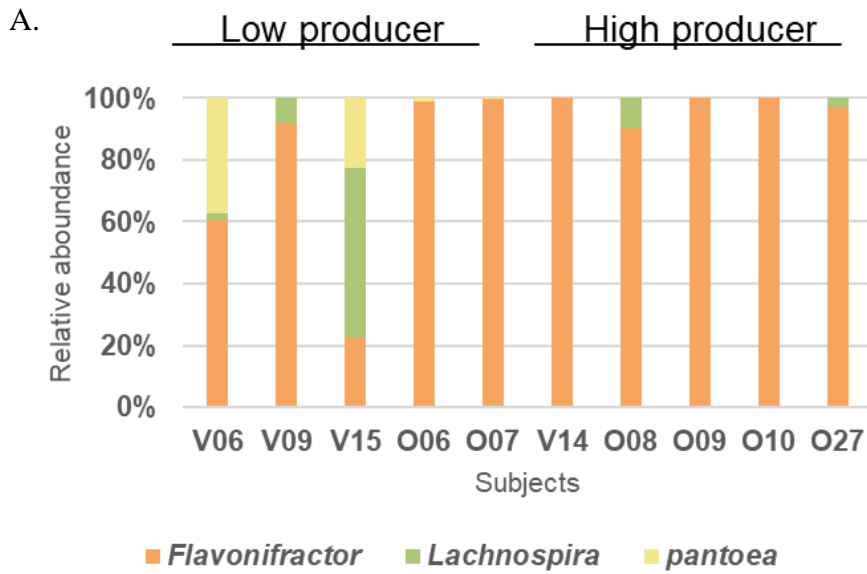
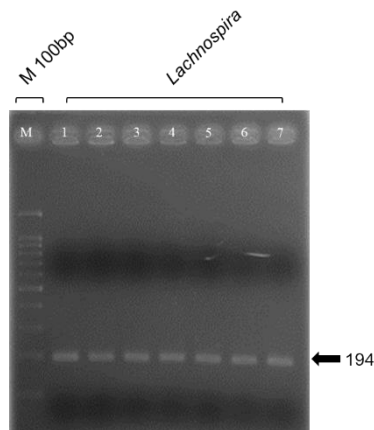


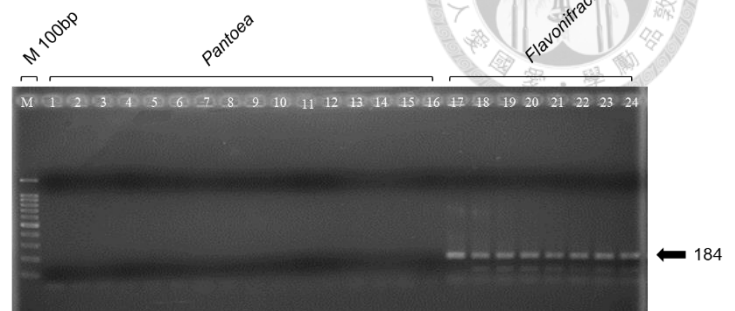
圖 三、糞便檢體中特定菌種相對豐富度

- A. 十位受試者糞便檢體中含有可能與低三甲胺產生相關之菌種相對豐富度。
- B. 受試者 A、B、C 糞便檢體中含有可能與低三甲胺產生相關之菌種相對豐富度。
(1：糞便直接萃取 DNA 2：高登培養基 3：伊藤非選擇性培養基 4：伊藤選擇性培養基)

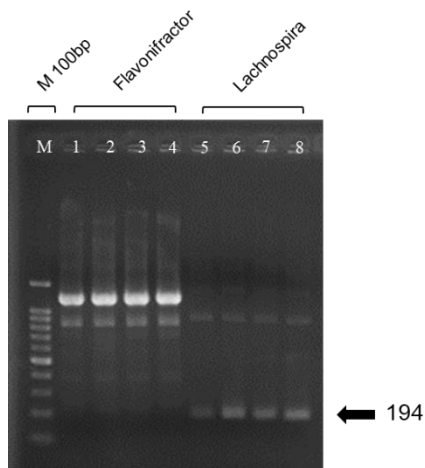
A.



B.



C.



D.

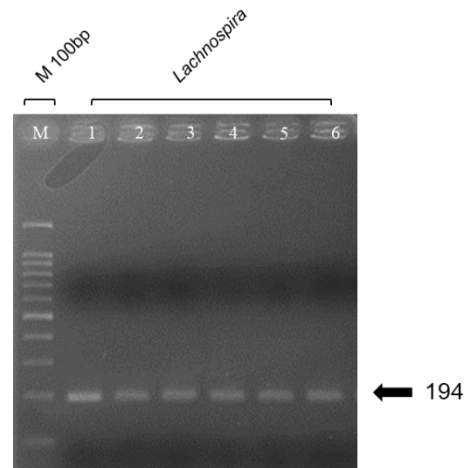


圖 四、以聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 分離菌種

- A. 1 至 7 為稀釋至 2×10^4 CFU 後可以找到毛螺菌屬 (*g_Lachnospira*)
- B. 1 至 16 為稀釋至 2×10^4 CFU 後無法找到泛菌屬 (*g_Pantoea*)，17 至 24 為稀釋至 2×10^4 CFU 後可以找到 *Flavonifractor*
- C. 1 至 4 為稀釋至 100 CFU 後無法找到 *Flavonifractor*，5 至 8 為稀釋至 100CFU 後可以找到毛螺菌屬 (*g_Lachnospira*)
- D. 1 至 6 為稀釋至 5CFU 後可以找到毛螺菌屬 (*g_Lachnospira*)

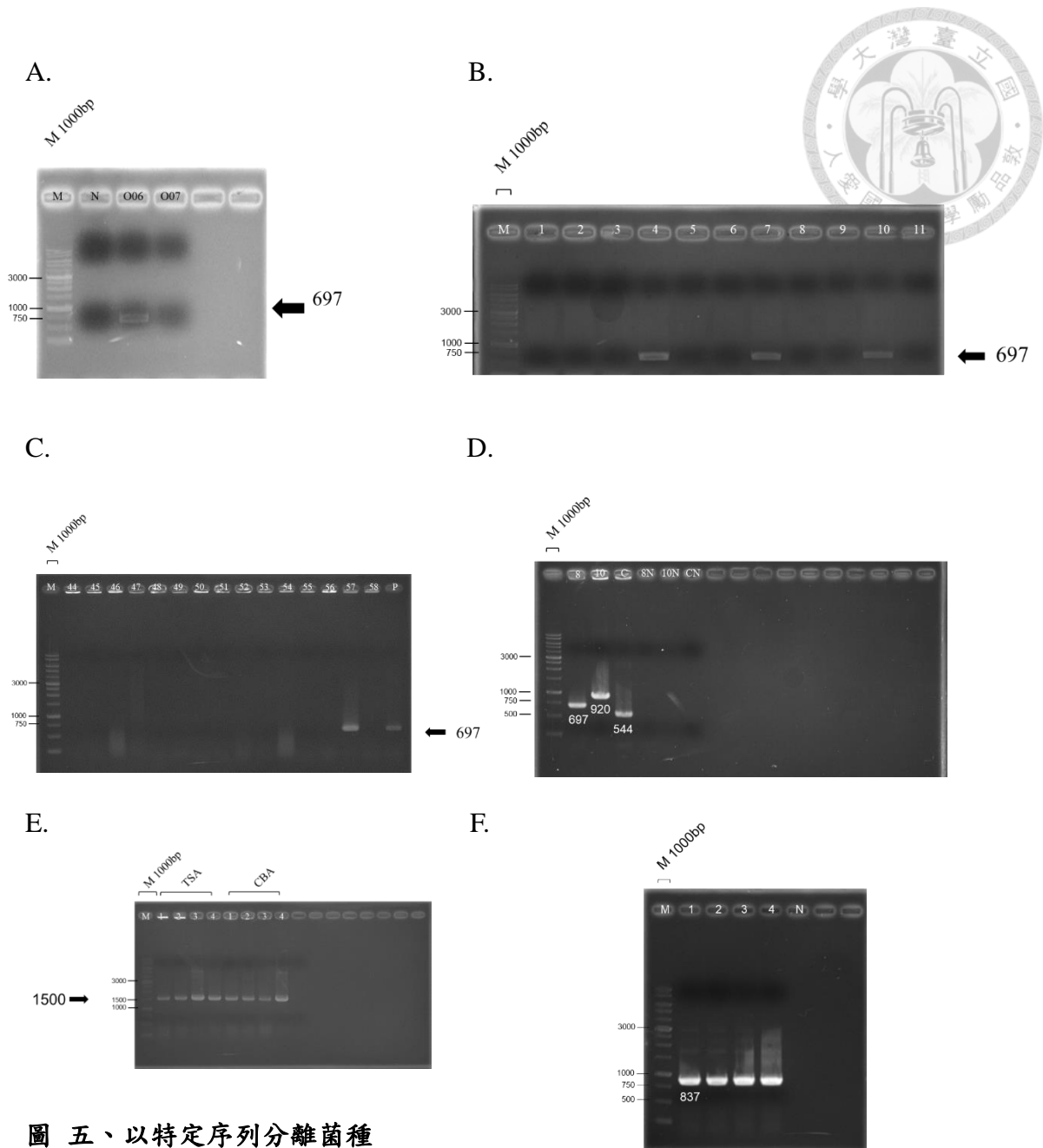
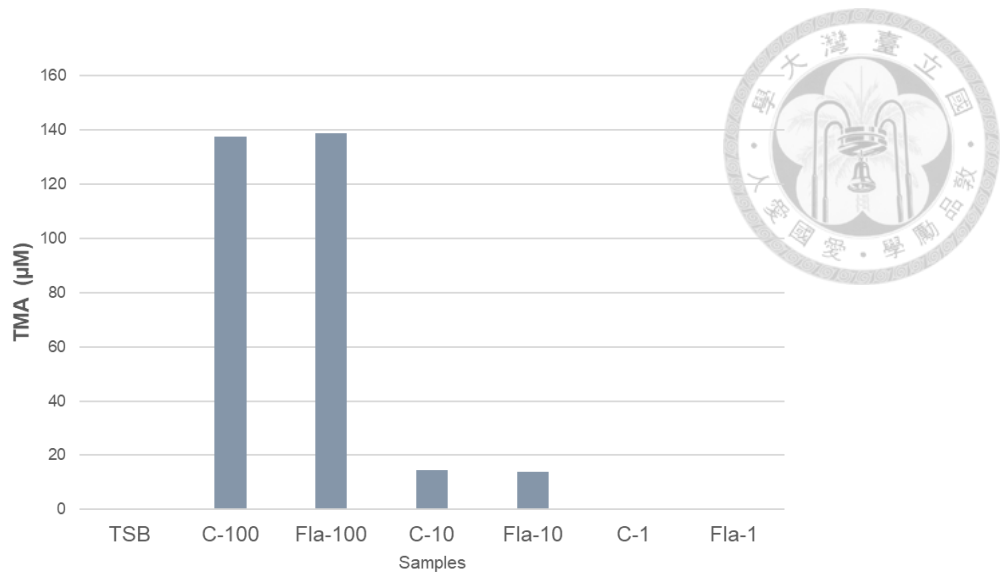


圖 五、以特定序列分離菌種

- A. 受試者 O06 糞便檢體稀釋後可以找到 *F.plautii*
- B. 1 至 11 為稀釋成 11 盤後可以找到 *F.plautii*。1 至 11 為盤數。
- C. 挑單一菌落後，第 57 顆菌為 *F.plautii*
- D. 以三種 *Flavonifractor* 特定序列鑑定確實為 *F.plautii*。8、10、C 分別為引子 FLA NO.8、FLA NO.10、choline
- E. 以 16s 定序鑑定 TSA、CBA 培養基上的各四顆單一菌落皆為 *F.plautii*
- F. 確認 *F.plautii* 含有 acetyl-CoA hydrolase，N 為陰性控制組，為不含菌之溶液。



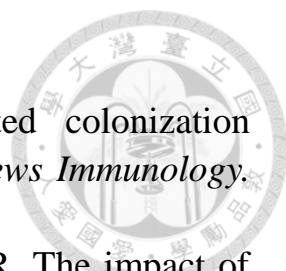
圖六、三甲胺分解實驗 (Trimethylamine assay, Tma assay)

在含 100 µM、10 µM、1 µM 三甲胺的 15 mL TSB 中培養 72 小時，以高效液相色譜法分析發現與無菌的控制組相比，有加 *F.plautii* 並沒有影響三甲胺的含量，因此推斷 *F.plautii* 並不會消耗三甲胺。C-100 為 100 µM TMA 控制組，Fla-100 為加有 *F.plautii* 100 µM TMA，C-10 為 10 µM TMA 控制組，Fla-10 為加有 *F.plautii* 10 µM TMA，C-1 為 1 µM TMA 控制組，Fla-0 為加有 *F.plautii* 1 µM TMA。

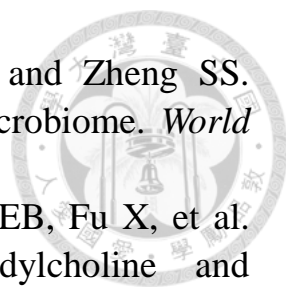
第六章、參考文獻

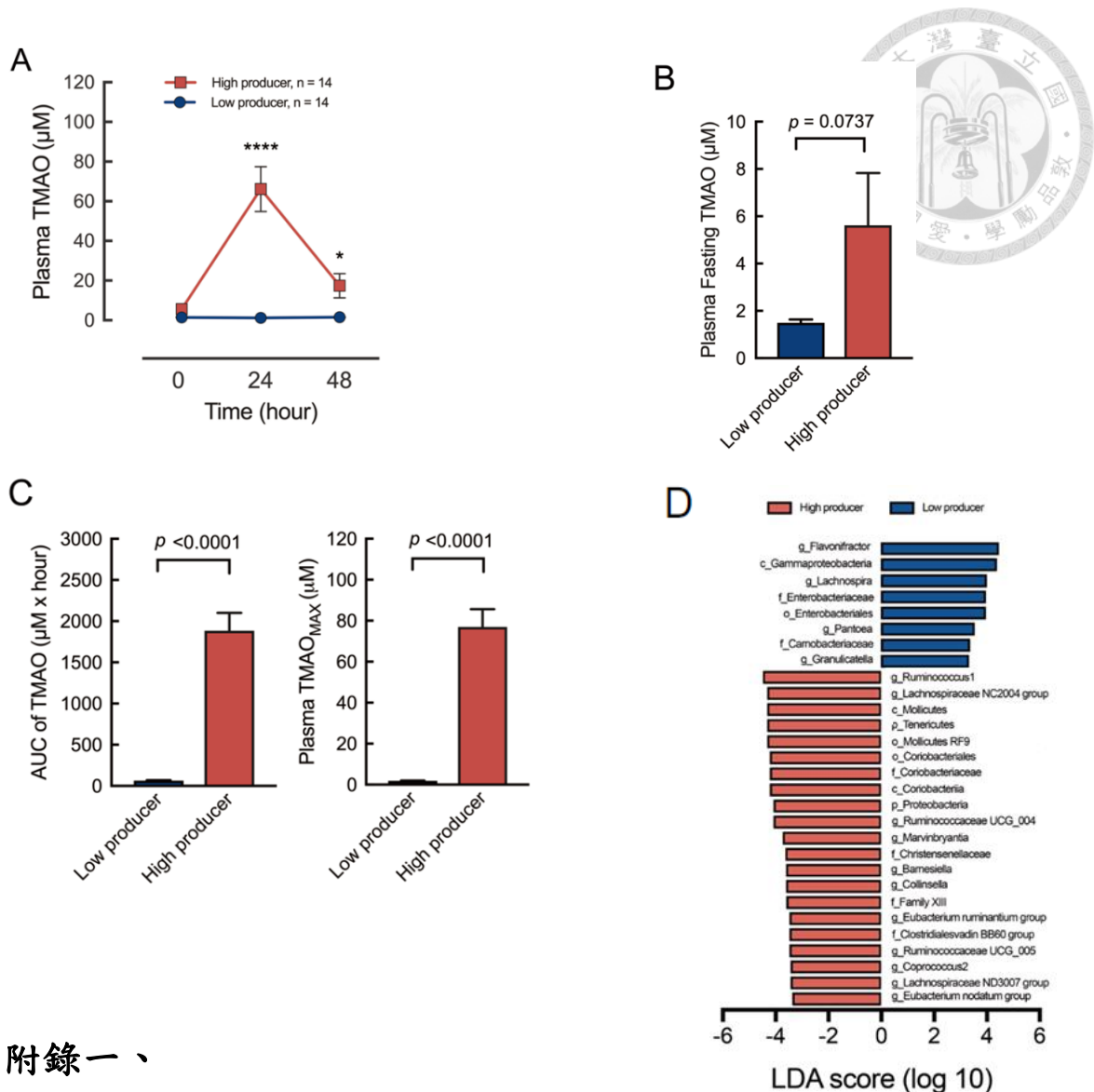


1. Gordon JJ. Honor thy gut symbionts redux. *Science (New York, NY)*. 2012;336(6086):1251-3.
2. Koenig JE, Spor A, Scalfone N, Fricker AD, Stombaugh J, Knight R, et al. Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011;108 Suppl 1:4578-85.
3. Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*. 2010;464:59.
4. Wu GD, Chen J, Hoffmann C, Bittinger K, Chen YY, Keilbaugh SA, et al. Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. *Science (New York, NY)*. 2011;334(6052):105-8.
5. Lozupone CA, Stombaugh JJ, Gordon JJ, Jansson JK, and Knight R. Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature*. 2012;489(7415):220-30.
6. Dominguez-Bello MG, Costello EK, Contreras M, Magris M, Hidalgo G, Fierer N, et al. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107(26):11971-5.
7. Faith JJ, Guruge JL, Charbonneau M, Subramanian S, Seedorf H, Goodman AL, et al. The long-term stability of the human gut microbiota. *Science (New York, NY)*. 2013;341(6141):1237439.
8. Hosokawa T, Kikuchi Y, Nikoh N, Shimada M, and Fukatsu T. Strict host-symbiont cospeciation and reductive genome evolution in insect gut bacteria. *PLoS biology*. 2006;4(10):e337.
9. Nicholson JK, and Wilson ID. Opinion: understanding 'global' systems biology: metabonomics and the continuum of metabolism. *Nature reviews Drug discovery*. 2003;2(8):668-76.
10. Wasielewski H, Alcock J, and Aktipis A. Resource conflict and cooperation between human host and gut microbiota: implications for nutrition and health. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2016;1372(1):20-8.
11. Thaiss CA, Zmora N, Levy M, and Elinav E. The microbiome and

- 
- innate immunity. *Nature*. 2016;535(7610):65-74.
12. Buffie CG, and Pamer EG. Microbiota-mediated colonization resistance against intestinal pathogens. *Nature reviews Immunology*. 2013;13(11):790-801.
 13. Clemente JC, Ursell LK, Parfrey LW, and Knight R. The impact of the gut microbiota on human health: an integrative view. *Cell*. 2012;148(6):1258-70.
 14. Morgan XC, Tickle TL, Sokol H, Gevers D, Devaney KL, Ward DV, et al. Dysfunction of the intestinal microbiome in inflammatory bowel disease and treatment. *Genome biology*. 2012;13(9):R79.
 15. Horie M, Miura T, Hirakata S, Hosoyama A, Sugino S, Umeno A, et al. Comparative analysis of the intestinal flora in type 2 diabetes and nondiabetic mice. *Experimental animals*. 2017;66(4):405-16.
 16. Sanchez-Alcoholado L, Castellano-Castillo D, Jordan-Martinez L, Moreno-Indias I, Cardila-Cruz P, Elena D, et al. Role of Gut Microbiota on Cardio-Metabolic Parameters and Immunity in Coronary Artery Disease Patients with and without Type-2 Diabetes Mellitus. *Frontiers in microbiology*. 2017;8:1936.
 17. Mathers CD, and Loncar D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLoS medicine*. 2006;3(11):e442.
 18. Fuster V, Badimon L, Badimon JJ, and Chesebro JH. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (2). *The New England journal of medicine*. 1992;326(5):310-8.
 19. Wang Z, Klipfell E, Bennett BJ, Koeth R, Levison BS, DuGar B, et al. Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease. *Nature*. 2011;472:57.
 20. Spence JD. Intestinal Microbiome and Atherosclerosis. *EBioMedicine*. 2016;13:17-8.
 21. Nakanishi T, Hatanaka T, Huang W, Prasad PD, Leibach FH, Ganapathy ME, et al. Na⁺- and Cl⁻-coupled active transport of carnitine by the amino acid transporter ATB(0,+)⁻ from mouse colon expressed in HRPE cells and *Xenopus* oocytes. *The Journal of physiology*. 2001;532(Pt 2):297-304.
 22. Fritz IB, and Mc EB. Effects of carnitine on fatty-acid oxidation by muscle. *Science (New York, NY)*. 1959;129(3345):334-5.

23. Koeth RA, Wang Z, Levison BS, Buffa JA, Org E, Sheehy BT, et al. Intestinal microbiota metabolism of L-carnitine, a nutrient in red meat, promotes atherosclerosis. *Nature medicine*. 2013;19(5):576-85.
24. Rebouche CJ. Carnitine function and requirements during the life cycle. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 1992;6(15):3379-86.
25. Rebouche CJ, and Chenard CA. Metabolic fate of dietary carnitine in human adults: identification and quantification of urinary and fecal metabolites. *The Journal of nutrition*. 1991;121(4):539-46.
26. Zhu Y, Jameson E, Crosatti M, Schafer H, Rajakumar K, Bugg TD, et al. Carnitine metabolism to trimethylamine by an unusual Rieske-type oxygenase from human microbiota. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2014;111(11):4268-73.
27. Bennett BJ, de Aguiar Vallim TQ, Wang Z, Shih DM, Meng Y, Gregory J, et al. Trimethylamine-N-oxide, a metabolite associated with atherosclerosis, exhibits complex genetic and dietary regulation. *Cell metabolism*. 2013;17(1):49-60.
28. Treacy EP, Akerman BR, Chow LM, Youil R, Bibeau C, Lin J, et al. Mutations of the flavin-containing monooxygenase gene (FMO3) cause trimethylaminuria, a defect in detoxication. *Human molecular genetics*. 1998;7(5):839-45.
29. Wang Z, Klipfell E, Bennett BJ, Koeth R, Levison BS, Dugar B, et al. Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease. *Nature*. 2011;472(7341):57-63.
30. Bremer J. Carnitine--metabolism and functions. *Physiological reviews*. 1983;63(4):1420-80.
31. Neville SA, Lecordier A, Ziochos H, Chater MJ, Gosbell IB, Maley MW, et al. Utility of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry following introduction for routine laboratory bacterial identification. *Journal of clinical microbiology*. 2011;49(8):2980-4.
32. van Veen SQ, Claas EC, and Kuijper EJ. High-throughput identification of bacteria and yeast by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in conventional medical microbiology laboratories. *Journal of clinical microbiology*. 2010;48(3):900-7.

- 
33. Wang WL, Xu SY, Ren ZG, Tao L, Jiang JW, and Zheng SS. Application of metagenomics in the human gut microbiome. *World journal of gastroenterology*. 2015;21(3):803-14.
34. Tang WH, Wang Z, Levison BS, Koeth RA, Britt EB, Fu X, et al. Intestinal microbial metabolism of phosphatidylcholine and cardiovascular risk. *The New England journal of medicine*. 2013;368(17):1575-84.
35. Mozaffarian D, Benjamin EJ, Go AS, Arnett DK, Blaha MJ, Cushman M, et al. Heart Disease and Stroke Statistics-2016 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*. 2016;133(4):e38-360.
36. Wu WK, Chen CC, Liu PY, Panyod S, Liao BY, Chen PC, et al. Identification of TMAO-producer phenotype and host-diet-gut dysbiosis by carnitine challenge test in human and germ-free mice. *Gut*. 2019;68(8):1439-49.
37. Goodman AL, Kallstrom G, Faith JJ, Reyes A, Moore A, Dantas G, et al. Extensive personal human gut microbiota culture collections characterized and manipulated in gnotobiotic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011;108(15):6252-7.
38. Henriques HN, de Carvalho AC, Soares Filho PJ, Pantaleao JA, and Guzman-Silva MA. Effect of prolonged use of high dose of tibolone on the vagina of ovariectomized rats. *International journal of experimental pathology*. 2011;92(4):266-71.
39. Goodman AL, Kallstrom G, Faith JJ, Reyes A, Moore A, Dantas G, et al. Extensive personal human gut microbiota culture collections characterized and manipulated in gnotobiotic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2011;108(15):6252-7.



附錄一、

- A. 受試者食用 1200mg 左旋肉鹼後選出各 14 位的血漿中氧化三甲胺數值高與低的人，並且測得在 48 小時內血漿氧化三甲胺隨時間變化之數值，於第 24 小時測得統計上最顯著差異。
- B. 受試者空腹時測得之血漿中氧化三甲胺數值並無統計上顯著差異。
- C. 受試者食用左旋肉鹼 48 小時後測得之血漿氧化三甲胺總量，以及血漿氧化三甲胺測得之最高數值。
- D. 將血漿中氧化三甲胺數值高與低者之糞便進行直接抽 DNA 次世代定序後發現，藍色的條狀圖是數值低者中與數值高者相比出現頻率高的菌，相反紅色的為數值高者出現頻率高的菌。