

# 2021 年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

作品編號 070005

參展科別 微生物學

作品名稱 利用次世代基因定序技術探討我國急性腹瀉患者之腸道菌叢表現

就讀學校 臺北市立麗山高級中學

指導教師 林智暉、蕭國偉

作者姓名 林炫宇

關鍵詞 急性腹瀉、次世代基因定序、腸道菌叢

## 作者簡介



我是林炫宇，目前就讀臺北市立麗山高級中學。從高中開始進實驗室了解微生物。小學從雜誌廣告中，看見的科普書籍介紹，裡面無菌小鼠的實驗與生活密切相關又新穎，令我忍不住一口氣看完密密麻麻的介紹。後來發現科學研究的嚴謹，包括量化、統計、實驗設計，實驗室避免污染的觀念，比大眾的科普書籍提及的內容多出許多，也很開心了解科學。

## 摘要

依據世界衛生組織 2013 年調查研究顯示，全球每年約有 29% 的孩童 (超過兩百萬名) 因腹瀉及肺炎而死亡，而在我國腹瀉群聚亦佔傳染病防治之大宗，尤其 2020 年受新冠肺炎 (COVI-19) 疫情影響，台灣民眾均留在國內旅遊，腹瀉案件急速增加，且因適逢旅遊熱門旺季加上中小學開學之際，經常出現規模上百人的腹瀉群聚，危害民眾健康。現階段急性腹瀉病人的治療多以支持性療法為主，然而目前應用糞便移植重建腸道菌叢已是包括癌症在內的重症醫療方向之一。本研究應用次世代基因定序技術偵測微生物 16S rRNA 的高變異區域進行急性腹瀉患者腸道微生物菌相組成、菌種豐富度分析及菌種鑑定，希望透過偵測急性腹瀉患者的腸道微生物相分析有助於理解腹瀉患者與健康人體腸道菌叢的差異，可提供未來臨床治療參考，亦可藉此推動從家庭到社區的全民健康促進，打造健康優質的生活品質。

## Abstract

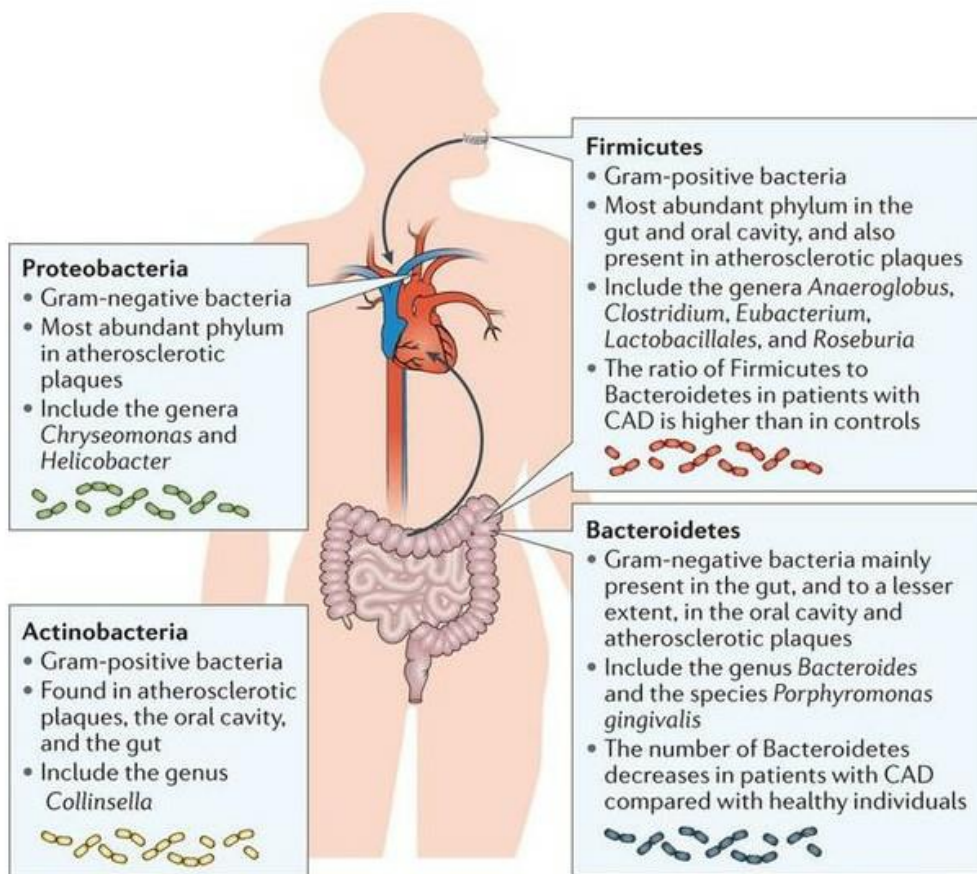
According to research from WHO in 2013, there is roughly 29% of children die of diarrhea and pneumonia. Cluster infection of diarrhea is the main in Epidemic Disease Prevention and Control, especially due to COVID-19, Taiwan people travel in own country, the cases of diarrhea rising rapidly. The tourist peak season coincide with a new semester has started, cluster infection of diarrhea often happened. Nowadays, acute diarrhea was treated in supportive therapy, however, faecal microbiota transplant is one of the treatments to cure cancer. This study adopted Next Generation Sequencing to detect the hypervariable region of 16s rRNA, in order to identify bacterial flora and observed species richness of acute diarrhea patients. Expecting to offer reference for clinical treatment, also promote the health of family to community.

# 壹、前言

## 一、研究動機

依據世界衛生組織 2013 年調查研究顯示，全球每年約有 29% 的孩童 (超過兩百萬名) 因腹瀉及肺炎疾病而死亡 (WHO, 2013)，依疾病管制署委託國家衛生研究院以及健保資料庫分析我國急性腸胃炎發生狀況之研究報告，結果顯示於 2001-2014 年研究期間，我國因急性腸胃炎就醫之每年發生率約 15~20% (15,000~20,000/ 100,000 人)，就醫人口以小於 5 歲以下孩童較高，且在近年人數有微幅上升的趨勢 (疾病管制署，2018)，而近 2 年因腹瀉急診平均每萬人口每周就診比率均在 3.5% 以上，嚴重危害民眾健康。

腸道菌叢 (Gut Microbiota) 是指棲息在人體腸道內的細菌族群。在正常情形下，預估超過  $10^{14}$  的菌群居住於人類的腸胃道，對於人體的各種生理及病理現象影響相當明顯且重要 (Barko et al., 2018)。腸道是人體最大的免疫器官，健康的腸道可抵禦包括細菌、病毒、黴菌及寄生蟲等致病微生物的攻擊，若腸道發炎受到損害，細菌、病毒等病原體就會入侵身體，導致發炎，人體的免疫力就降低。依據腸道細菌與人類的交互作用關係，可分為中間菌 (約占 60~70%)、好菌 (約占 10~20%) 以及壞菌 (約占 10%)。中間菌平時對人體沒有顯著影響，但會因腸道的平衡狀態改變，而對人體產生有益或有害的效果；好菌的發酵作用會對人體有益，而壞菌的腐敗作用則會使人生病 (陳邦基，2016)。人體內細菌在分類上主要可分為四個門，包括厚壁菌門 (Firmicutes)、擬桿菌門 (Bacteroidetes)、放線菌門 (Actinobacteria) 以及變形菌門 (Proteobacteria) (圖一)，其中厚壁菌門及擬桿菌門佔腸道微生物相的 9 成以上。



圖一、人體腸道菌叢種類及分布圖 (資料來源 <https://www.nature.com/articles/nrcardio.2016.183>, 2017)。人類體內四大菌門介紹，分別為厚壁菌門 (Firmicutes)、擬桿菌門 (Bacteroidetes)、放線菌門 (Actinobacteria) 以及變形菌門 (Proteobacteria)

近年來應用糞便移植重建腸道菌叢已是癌症、糖尿病、帕金森氏症等重症醫療方向之一 (Durack & Lynch, 2019; Zheng, 2018; Qian, 2018)，然而目前對於急性腹瀉疾病仍以支持性療法為主，若透過偵測急性腹瀉患者的腸道微生物菌相組成、菌種豐富度分析及菌種鑑定，則有助於理解腹瀉患者與健康人體腸道菌叢的差異，不但可提供未來醫學治療方向，也可提供民眾穩定體內腸道菌叢的建議，以降低國內腹瀉疾病的發生率。

## 二、問題及研究目的

腸道菌叢的穩定平衡對於人體健康維持極為重要 (Mowat, A. M et al., 2014)。當病人發生急性腹瀉時，所表現的病徵包括大便頻密並且呈稀爛或水狀的情況，同時可能出現嘔吐及發燒，嚴重者甚至會出現脫水等併發症，而這些症狀均有可能破壞腸胃道內菌叢的動態平衡狀態。目前急性腹瀉疾病的治療仍以補充水分或電解質等支持性療法為主，然而重建腸道菌叢療法已應用於許多重要疾病的治療。因此綜合以上因素，本研究探討以下兩點目的：

- (一)、探討急性腹瀉患者腸道菌叢組成及菌種豐富度。
- (二)、分析急性腹瀉患者間腸道菌叢的差異。

## 貳、研究方法或過程

### 一、實驗材料

#### (一) 藥品試劑

PBS 緩衝液、冰塊、70%酒精 Nuclease-free 純水、Tris-HCl pH8.0

1. 核酸萃取: Buffer PBS、QiAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany)、Buffer ASL、InhibitEX Tablet、proteinase K、Buffer AL、Buffer AW1、Buffer AW2、Nuclease-free Water
2. 檢體 DNA 定量以及 16s rRNA PCR 增幅反應: Qubit 測定儀專用的核酸稀釋液、Qubit DNA Assay kit、LongAmp Taq 2X Master Mix(New England BioLabs Inc)、GoTaq Green Master Mix (Promega Corporation, US)
3. DNA 修復以及尾端整平 NEBNext FFPE Repair Mix、NEBNext Ultra II End repair/dA-tailing Module
4. 磁珠純化:Agencourt AMPure XP、DNase-Free water、Qubit 測定儀專用的核酸稀釋液、Qubit DNA Assay kit
5. 條碼標記:Native Barcode、Blunt/TA Ligase Master Mix、DNase-Free water、Qubit 測定儀專用的核酸稀釋液、Qubit DNA Assay kit

6. 牽引蛋白黏接:Adaptor Mix II、NEBNext Quick Ligation Reaction Buffer、Quick T4 DNA Ligase、Short Fragment Buffer (SFB)、Elution Buffer
7. Nanopore 定序裝填及啟動 Flow Cell Priming Kit、Flow cell、NEB Blunt/TA Ligase Master Mix、NEB Quick Ligation Reaction Buffer、NEBNext Quick Ligation Module

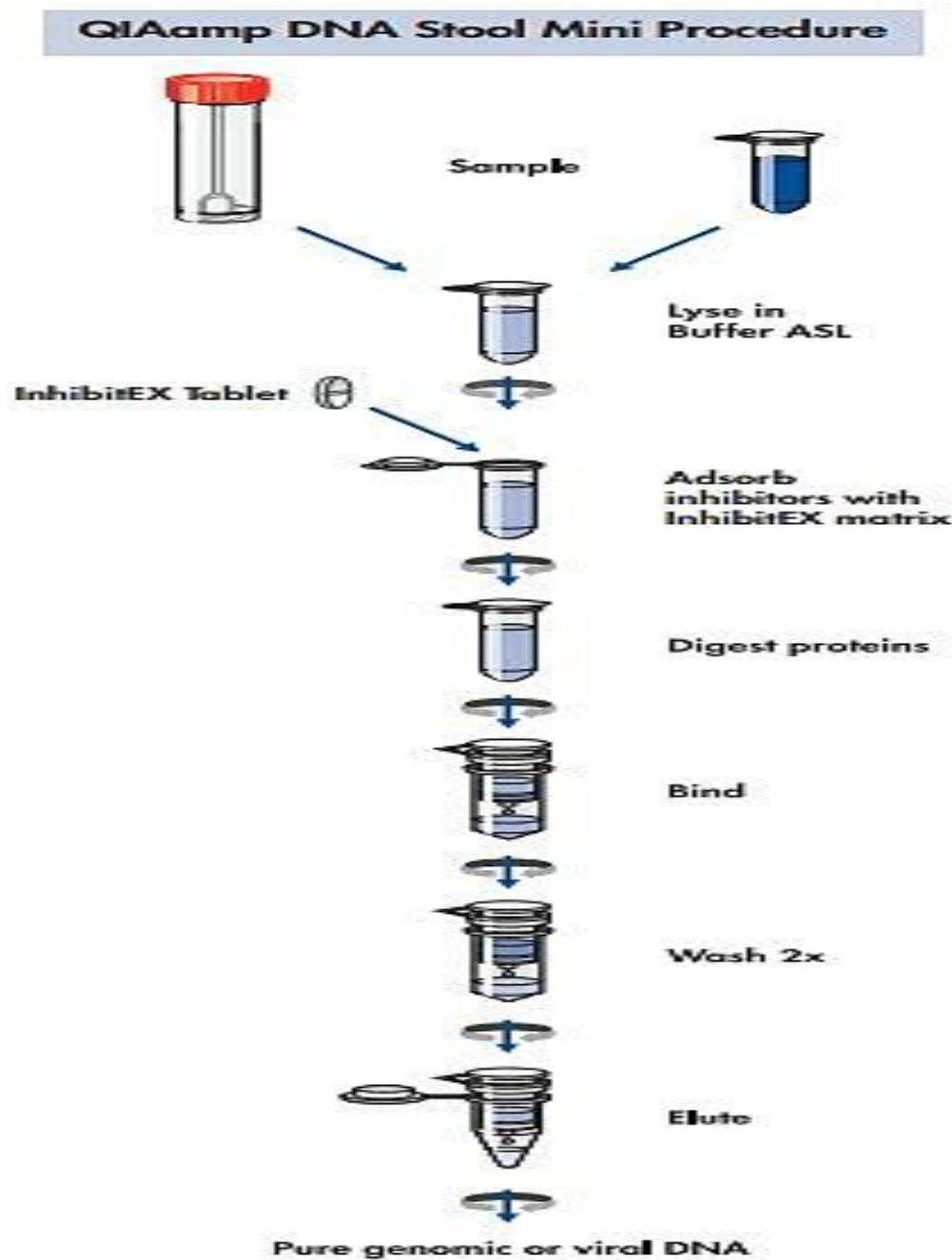
## (二) 器材及分析軟體

3mm 玻璃珠、抗凍筆、振盪器、電動吸管(pipette aid)、微量吸管分注器 (Pipette)、離心管、1.5 ml 低殘留微量離心管、0.5 ml 薄壁離心管、0.2 ml 薄壁離心管、離心機、Class II 生物安全操作櫃、恆溫加熱槽、Qubit 核酸定量偵測儀、聚合酶鏈鎖反應儀、電腦、-80°C 冰箱、4°C 冰箱、MinION 次世代基因定序儀、MinKNOW 序列解讀軟體、EPI2ME 序列分析軟體。

## 二、實驗方法 (傳染病 標準檢驗方法手冊標準作業流程) (衛生福利部疾病管制署，2019)

### (一) 急性腹瀉患者糞便前處理及核酸萃取

急性腹瀉患者糞便檢體取自行政院衛生福利部疾病管制署，係透過我國法定傳染病通報系統項下腹瀉症候群通報送驗之患者糞便驗餘檢體。將約 1 顆花生米粒大小的糞便以 1 : 10 之比例加入 PBS 強力震盪成懸浮液，之後以 4°C，3000 rpm 離心 15 分鐘，收集上清液進行後續核酸萃取。DNA 萃取依照 QiaAmp 糞便 DNA 萃取套組的說明書進行 (QiaAmp stool DNA extraction protocol, Qiagen, Valencia, CA)，取 200ml 糞便上清液加 1.4 ml Buffer ASL，混合震盪 1 分鐘後，置於 70°C 15 分鐘，之後以 Vortex 混合 15 秒以 14000 rpm 離心 1 分鐘，取上清液 1.2ml 加入一錠 InhibitEX Tablet，靜置 1 分鐘待錠劑全數溶解。之後離心 3 分鐘取上清液 200ml，加入 15ml proteinase K 均勻混合後加入 200ml Buffer AL，均勻混合 15 秒後置於 70°C 10 分鐘，之後加入 200ml 100% 酒精均勻混合，將混合後的檢體液以同一管 QIAamp spin column 進行 14000 rpm 離心，移除廢液後加 500 ml Buffer AW1 清洗液，以 14000 rpm 離心 1 分鐘後再移除廢液，檢體再加入 500 ml Buffer AW2 清洗液，以 14000 rpm 離心 3 分鐘後再移除廢液，再以 14000 rpm 離心 1 分鐘以移除殘餘的酒精清洗液。最後加入 50 ml Nuclease-free Water 靜置 1 分鐘以溶出純化完成的 DNA。整個 DNA 萃取的流程如圖二。



圖二、急性腹瀉患者糞便檢體 DNA 純化流程圖。(資料來源 <https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=c8fe97e7-78cc-4275-bbac72c9b7c3de38&lang=en>,

2010)。萃取核酸的標準作業流程。



## (二) 檢體 DNA 定量以及 16s rRNA PCR 增幅反應

為進行次世代基因定序，檢體 DNA 須先以 Qubit 核酸測定儀進行定量。以儀器專有的 0.5 ml 薄壁離心管取 1 ml DNA 加 199 ml Qubit 測定儀專用的核酸稀釋液，混合均勻後置入測定儀測定 DNA 的量 (ng/ml)。每個檢體取 30ng DNA 進行 16s rRNA 全長 PCR (片段長度~1540 bp)，PCR 反應使用的試劑為 LongAmp Taq 2X Master Mix (New England BioLabs Inc)，反應總體積 50 ml，primer 為複製 16s RNA 全長的引子對：27F 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'以及 1492R 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'。PCR 反應條件如下: 1.Denature 95°C 5 分鐘; 2.Amplification 95°C 30 秒、50°C 30 秒、72°C 30 秒進行 30 cycles 3. Final extension 72°C 10 分鐘。

## (三) 次世代基因定序法進行腸道菌叢偵測

### 1. DNA 修復以及尾端整平 (DNA repair and end-prep)

將複製完的 PCR 產物進行尾端整平，以試劑 NEBNext FFPE Repair Mix、NEBNext Ultra II End repair/dA-tailing Module 進行，取 1.5 ml 低殘留微量離心管，分別加入 48 ml PCR 產物、3.5 ml NEBNext FFPE DNA Repair Buffer、2ml NEBNext FFPE DNA Repair Mix、3.5 ml Ultra II End-prep reaction buffer 以及 3ml Ultra II End-prep enzyme mix，總反應體積 60ml 以指尖輕彈管壁混合均勻後放入恆溫反應槽，先以 20°C 反應 5 分鐘後再以 65°C 反應 5 分鐘。

### 2. 磁珠純化 (AMPure XP purification)

以 Agencourt AMPure XP 磁珠進行 DNA 純化。磁珠使用前須先手搖使其混合均勻，取 60 ml 磁珠加入前一個步驟的反應液，以指尖輕彈管壁混合均勻後放在混合儀 (Mixer)，翻轉混合 5 分鐘。之後將離心管放在磁台上 10 分鐘使磁珠吸附於磁台，磁珠完全吸附後取出管內反應液，並以 200 ml 70%酒精清洗磁珠 2 次。之後以 25 ml DNase-Free water 打散磁珠，使 DNA 溶於水中，利用磁台再次吸附移除磁珠以獲得純化之 DNA。再取 1 ml DNA 加 199 ml Qubit 測定儀專用的核酸稀釋液，混合均勻後置入 Qubit 測定儀測定剩餘 DNA 的量。

### 3. 條碼標記 (barcode ligation)

取 22.5 ml 磁珠純化後的 DNA 加入 2.5 ml Native Barcode 以及 25 ml Blunt/TA Ligase Master Mix，混合後靜置於室溫 10 分鐘使條碼黏附於待測 DNA 片段，之後再重複前述步驟 2 以磁珠進行純化洗去未黏附的條碼，最後將 DNA 溶於 26 ml DNase-Free water 並取 1 ml DNA 加 199 ml Qubit 測定儀專用的核酸稀釋液，混合均勻後置入 Qubit 測定儀測定剩餘 DNA 的量。

### 4. 牽引蛋白黏接 (Adaptor ligation and clean-up)

取 1.5 ml 低殘留微量離心管，將前一步驟完成標記不同條碼的 DNA 以等量比例混合成最終體積 65 ml 的 DNA 片段庫 (DNA library)，分別加入 5 ml Adaptor Mix II、20ml NEBNext Quick Ligation Reaction Buffer、10 ml Quick T4 DNA Ligase，總反應體積 100ml 以指尖輕彈管壁混合均勻後靜置於室溫 10 分鐘，之後再重複步驟 2 以磁珠進行純化，但清洗磁珠時改以 Short Fragment Buffer (SFB)進行清洗，之後將 DNA 溶於 15 ml 的 Elution Buffer 並保存於 4°C 等待上機。

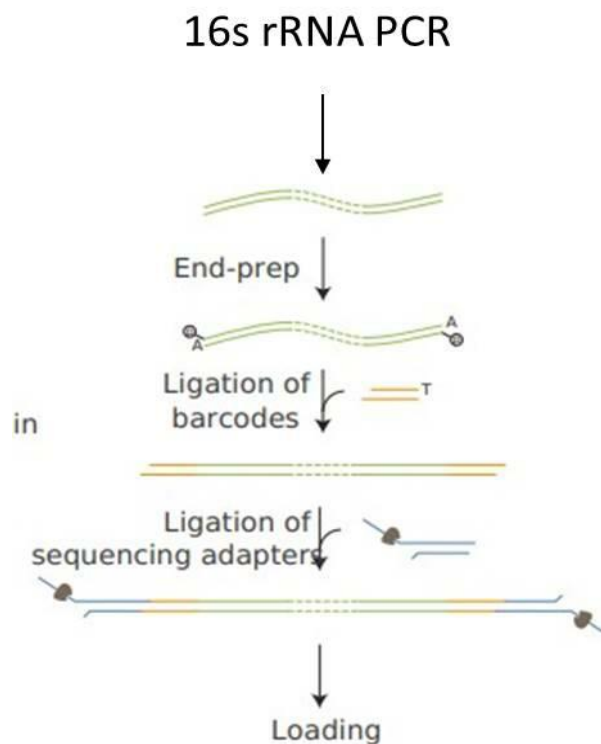
### 5. Nanopore 定序裝填及啟動 (Priming and loading the Spot flow cell)

將 Nanopore 定序芯片從 4°C 取出至室溫回溫後放進 MinION 定序儀(圖三)，以 Flow Cell Priming Kit 進行上機定序。將一管 FB buffer 以及 FLT 試劑從 -20°C 取出回溫震盪混合後，取 FLT 30 ml 加入 FB buffer 配置成定序啟動混合液 (Priming Mix)。取 800 ml 加入芯片上的啟動孔(priming port)，加入過程中需避免氣泡進入孔洞以免阻塞奈米定序孔。靜置 5 分鐘。將前一步驟 4 準備好的 DNA library 取 12ml 加入 37.5 ml 的 SQB Buffer 以及 25.5 ml LB 小圓珠，使成總體積 75 ml 的定序混合液，以微量吸管分注器混合並避免氣泡產生。在上機前再取 200ml Priming Mix 加入啟動孔後，將製備好的定序混合液緩慢滴入樣品孔(Sample Port)後，關閉試劑孔及樣品孔及定序儀上蓋進行上機。Nanopore 上機定序樣品置備流程圖如圖四。



圖三、Nanopore 定序儀及定序芯片(資料來源：<https://nanoporetech.com/>, 2020)。

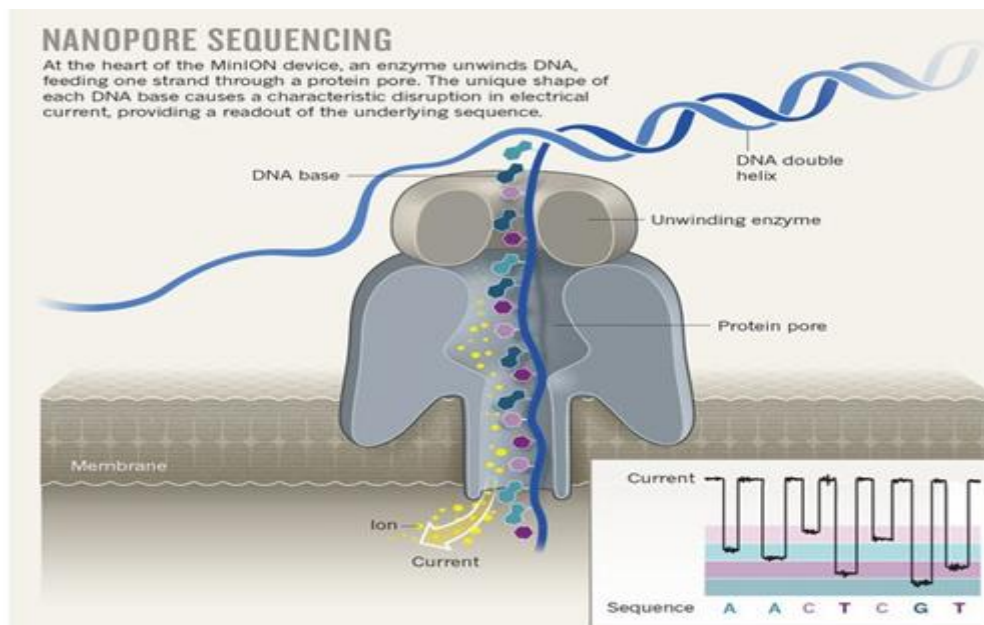
定序儀外觀。



圖四、Nanopore 定序流程圖。(資料來源：<https://community.nanoporetech.com/protocols>, 2020)。DNA barcoding 以區別樣本，adapter 為引導要定序的 DNA 至 flowcell 的通道蛋白，為 nanopore 定序的讀取進行準備。

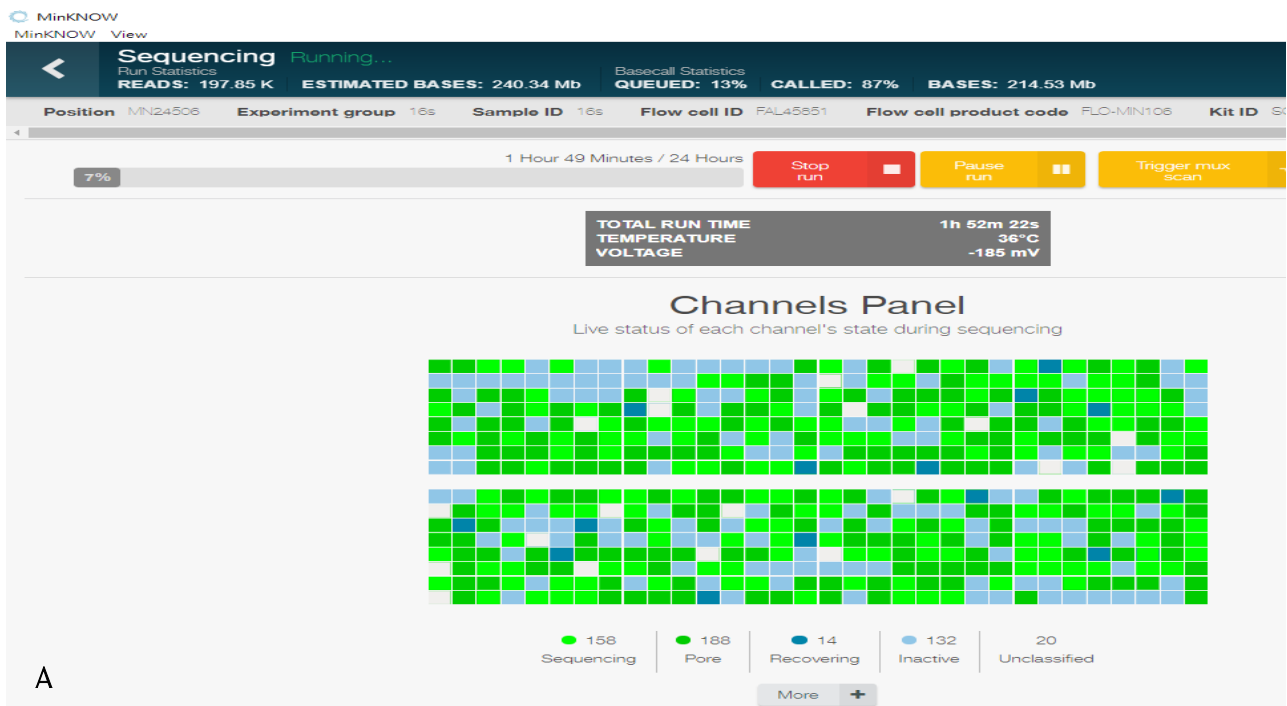
#### (四) Nanopore 定序分析操作

整個 nanopore 定序原理如圖五。利用一個含有將雙股 DNA 解旋功能之牽引蛋白質，將目標 DNA 牽引至通道蛋白結合，DNA 雙股螺旋打開後以單股形式通過通道蛋白質，藉由 DNA 通過通道蛋白質造成的電流變化進行解碼與序列分析( Base calling)。在 Nanopore 的定序芯片上共有 512 組通道蛋白質，每組各有四個通道蛋白，在每次開始進行定序前，定序系統會逐一偵測各組通道蛋白質，從中挑選一個開始進行定序，此技術在定序過程中不斷的重複進行。基因定序以桌上型電腦利用 MinKnow 軟體進行定序分析。將定序儀接到電腦上後開啟 MinKnow 軟體，軟體會自動偵測連接機型以及定序芯片種類。之後進行使用試劑種類、定序時間長度、分析完檢體儲存設定等條件設定後，點選作業平台右下角 Start run 開始進行定序，定序的孔洞定序情況以及讀取的片段大小可由軟體進行即時監測(圖六)。

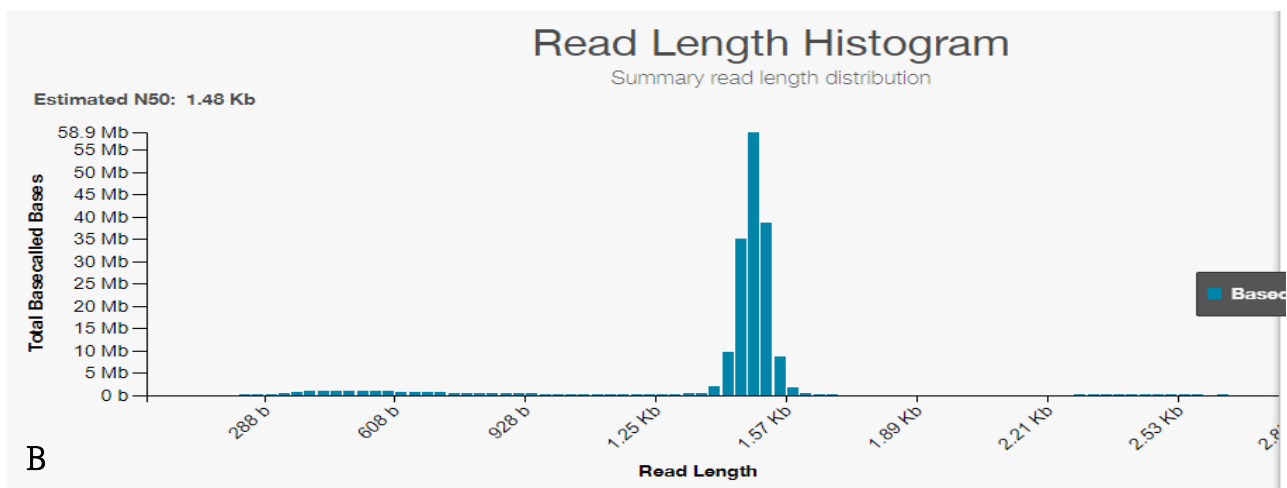


圖五、Nanopore 定序原理解析圖(資料來源 <http://blogs.nature.com/naturejobs/2017/10/16/>

techblog- the-nanopore-toolbox/, 2017)。Nanopore 技術介紹。



A

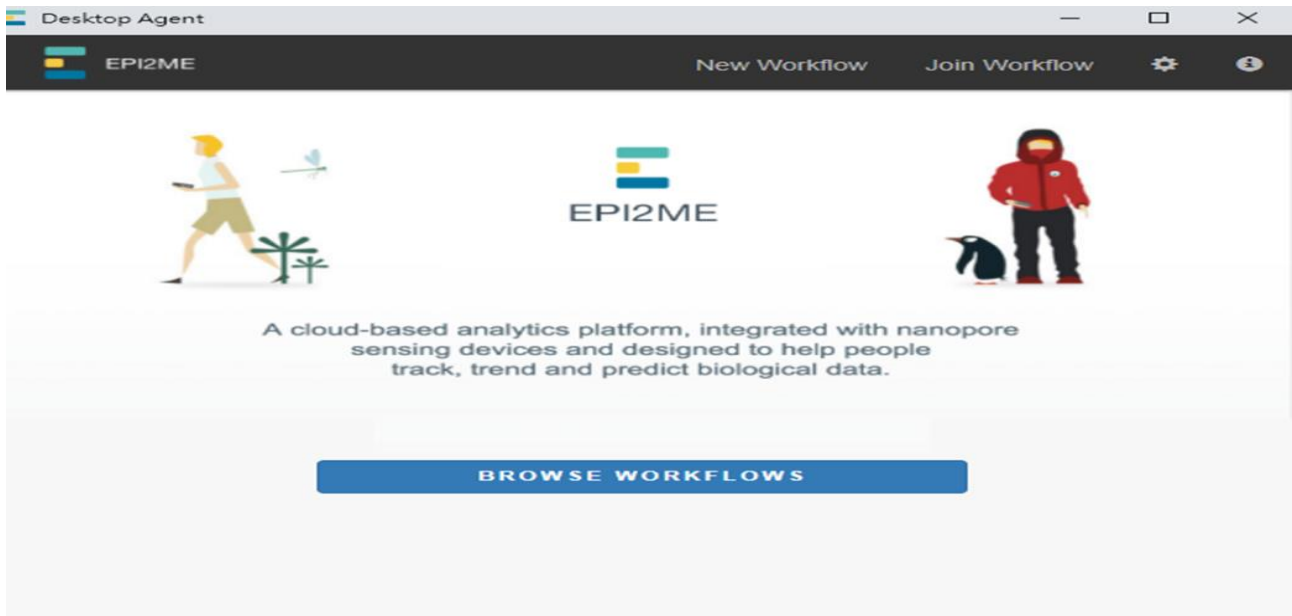


B

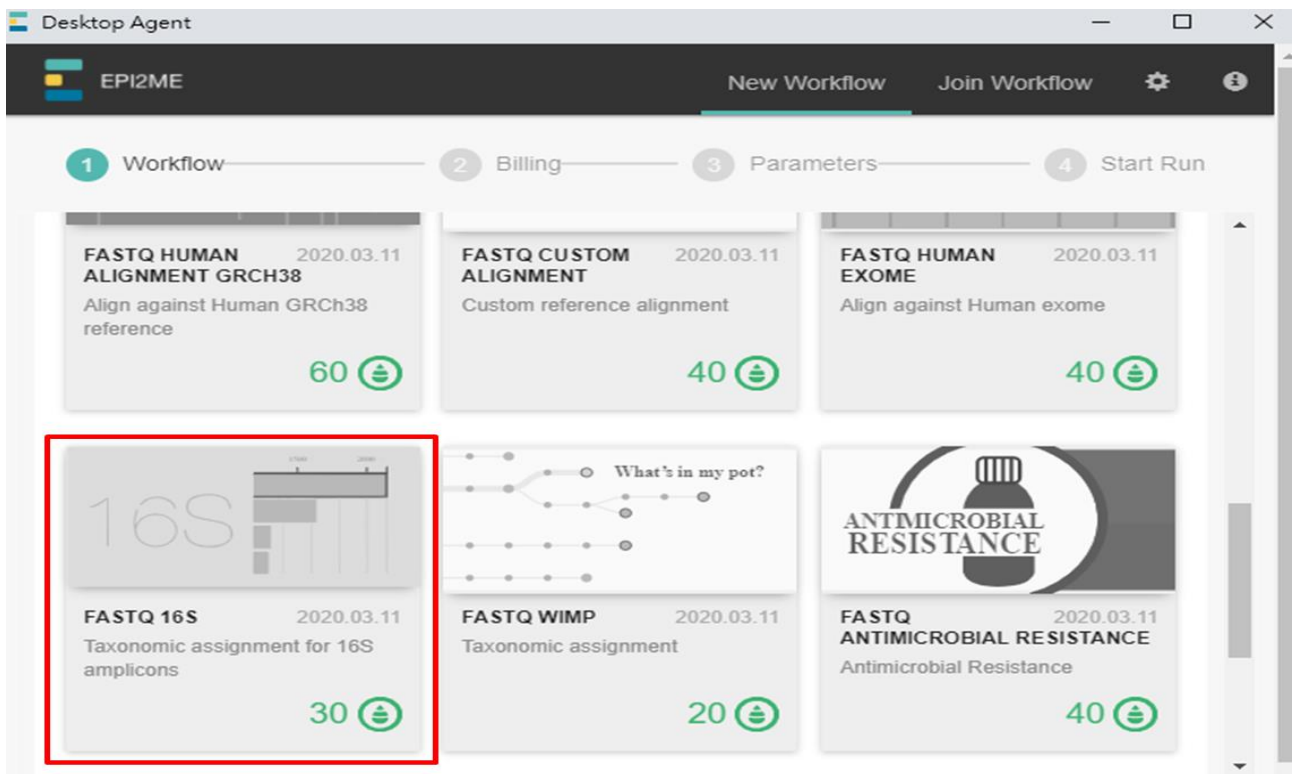
圖六、MinKNOW 定序作業圖。(A)中每個方格代表每個奈米孔洞，亮綠色代表定序中，深綠色為可進行定序的奈米孔，藍色代表實驗中 inactive 的孔洞，部分待實驗完畢後透過清洗可回復為可定序狀態。(B) 橫軸顯示讀取樣本之長度(kilobase)，縱軸顯示讀取樣本之數量(megabyte)。

### (五)基因序列資料分析

定序完成的資料以 Nanopore 雲端軟體 EPI2ME(圖七)進行序列解讀，利用軟體中的 Fastq 16s 分析程式進行 DNA 菌種判讀分析(圖八) 打開程式後輸入進行使用定序試劑組名稱設定參數以及分析完的資料儲存位置等，點選作業平台下方 Start run 開始進行 DNA 序列解讀。



圖七、EPI2ME 分析軟體(資料來源: <https://epi2me.nanoporetech.com/>, 2020)。  
EPI2ME 系統初始的頁面。



圖八、FASTQ 16S 分析軟體。(資料來源: <https://epi2me.nanoporetech.com/>, 2020)。  
EPI2ME 功能欄選擇。

## 參、研究結果與討論

### 一、急性腹瀉患者檢體來源背景資料

本次研究隨機收集了 50 名 2020 年 5 月到 8 月間有急性腹瀉症狀的患者糞便檢體進行腸道菌叢表現分析，當腹瀉的時間在四週以內稱為急性腹瀉。若腹瀉時間大於四週，因需要考慮可能是其他身體疾病例如胰臟功能不良、吸收不良症、小腸或大腸的慢性疾病等，故不列入本次研究對象。而為符合醫學研究倫理規範，患者的個資均不列入資料收集範圍。50 個糞便檢體來源有 24 名為女性，26 名為男性，男女比約為 1:1。患者的年齡分布分為 3 個群組，分別是以小於 18 歲的學生及嬰幼兒族群、18 到 50 歲的社會人士、以及大於 50 歲的長者族群，其中小於 18 歲的患者共 11 位，約占所有患者的 22%。18 到 50 歲的患者共 24 位，占所有患者比例的 48%，而 50 歲以上的長者共計 15 位，佔 30%（表一）。

表一、腹瀉患者性別、年齡及腹瀉病原檢測結果統計表。實驗男女數量接近 1:1，以接近現實狀況，各年齡層人數為隨機收集以推估人數比例。

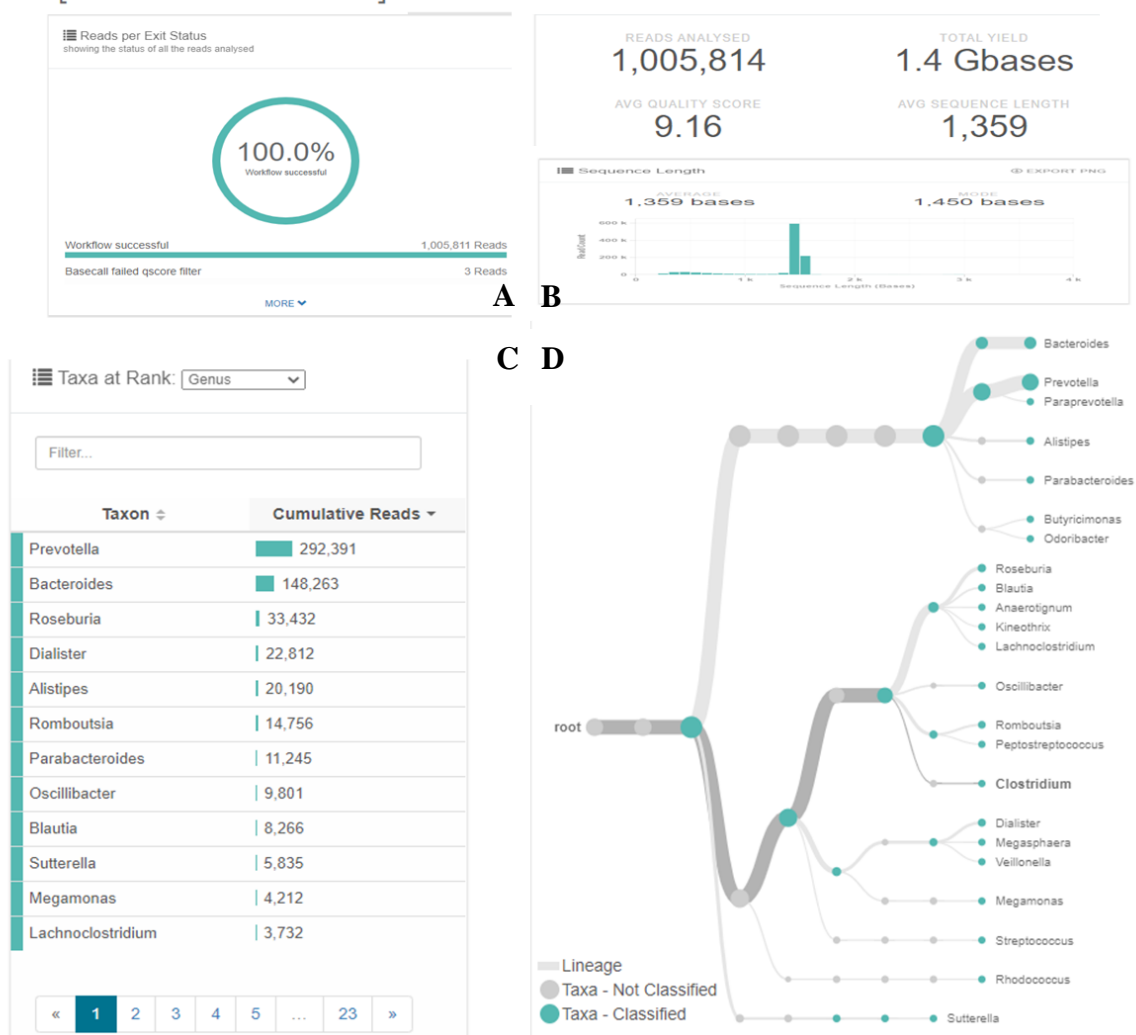
|    |       | 個案數 (總共 50 位) |
|----|-------|---------------|
| 項目 |       | 人數 (%)        |
| 性別 | 女性    | 24 (48.0)     |
|    | 男性    | 26 (52.0)     |
| 年齡 | <18   | 11(22.0)      |
|    | 18-50 | 24 (48.0)     |
|    | >50   | 15 (30.0)     |

### 二、Nanopore 次世代定序結果解讀分析

16S rRNA 為原核生物核糖體次單元的重要組成之一，序列包含數個保守區域和 9 個高變異區域，其中高變異區具有屬或種的特異性，被認為是最適合當做細菌系統發育和分類鑑定的指標。在 16S metagenomics 中，操作分類單元 Operational taxonomic unit (OTU) 是根據序列的相似性做分類。其方法為叢集相似的 16S rRNA 基因序列的定序的片段，在每一個叢集中根據設定的序列相似性程度呈現一個 OTU，形成的 OTU 可能為細菌的屬或種層級。一般

而言，在 16S metagenomics 分析中最多以 97% 序列相似性為典型的 OTU 叢集分析的門檻，因此分類出的 OTU 中會包含多個物種，大致上可以準確到屬 (Genus)，因此本研究將資料選擇分類以 Genus 來呈現。將 Nanopore 解讀完的序列經由 EPI2ME 分析，可得到產出的菌屬資料如圖九，在總分析數 1005814 條序列中，得到的總資料量是 1.4 Gbases 圖九(B)，平均片段長度是 1359 bp，辨識率達 100% 圖九(A)，產出序列的平均品質檢測分數(Quality score)為 9.16，顯示每一條序列的可辨別度良好。分類得到的各菌屬以及 reads 數由多至少依序呈現於資料左下方圖九 (C)，軟體將序列雲端即時連上美國國家生物技術資訊中心 NCBI 網站進行比對及分類結果則以右下樹狀圖九 (D) 表示。

Fastq 16S [Instance ID: 235830]

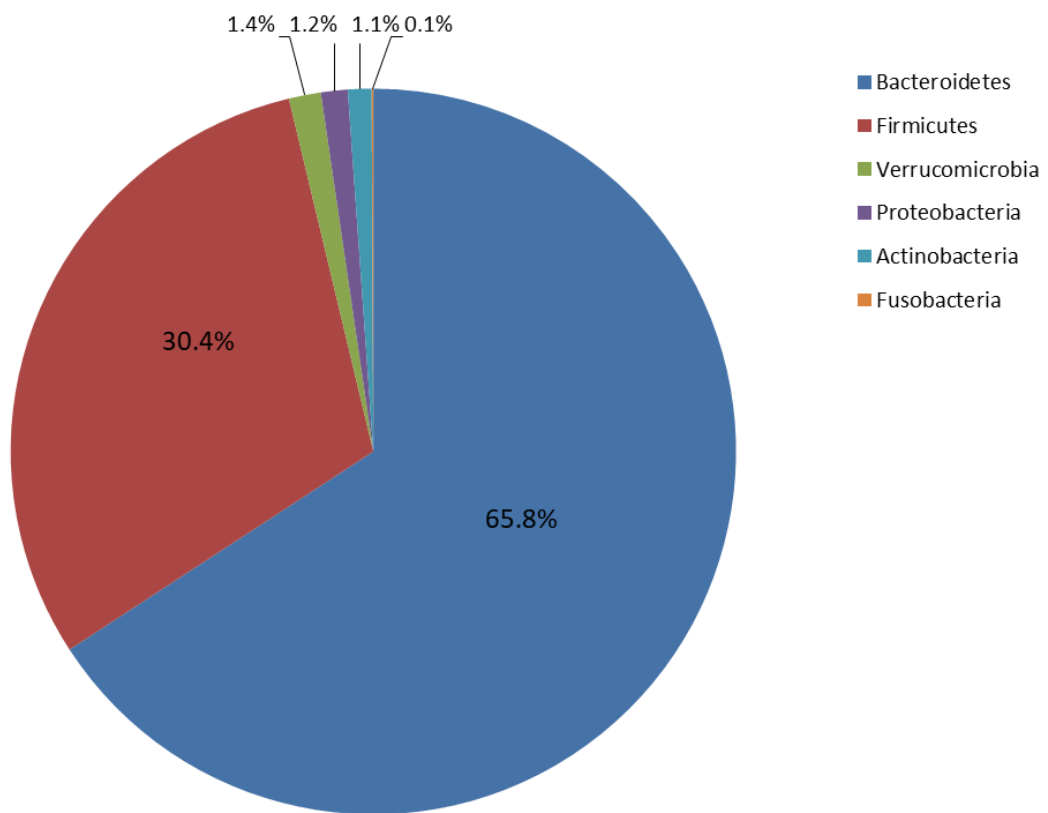


圖九、EPI2ME 軟體 16s 序列分析結果。(A)辨識率(B)顯示讀取條數、讀取量、平均品質檢測分數、平均片段長度(C)菌屬名及各自長度(D)親緣關係

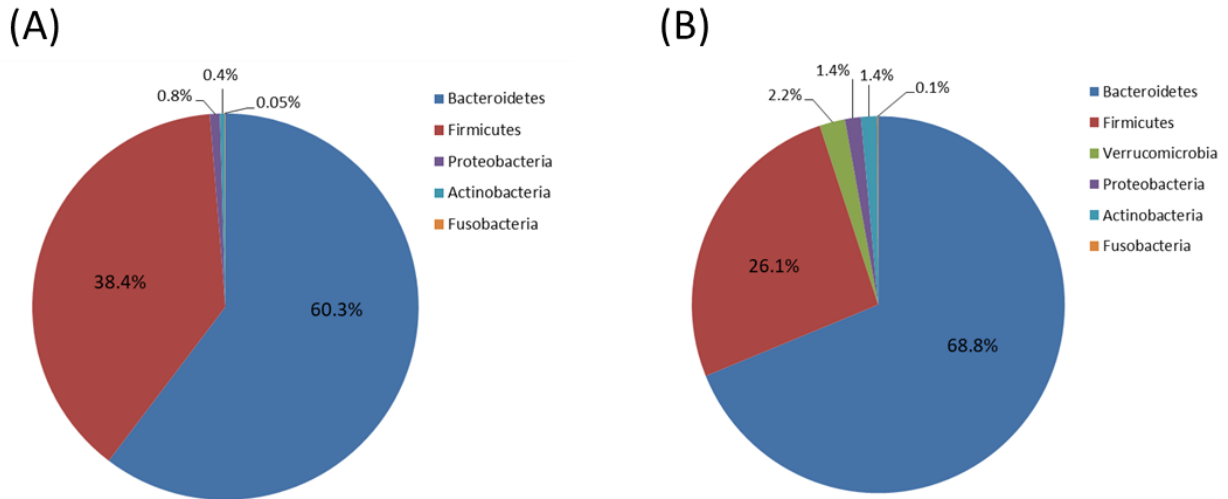


### 三、急性腹瀉患者腸道菌叢組成及豐富度分析

本次研究檢測結果將 Nanopore 分析得到的各菌屬逐一查出所屬細菌的門後進行分析 (Nanopore 所得數字為鹼基片段讀取數，用來推估相對比例，非實際細菌數量)，發現在腹瀉群聚患者 (n=50) 體內主要以擬桿菌門 (Bacteroides) 為最大宗，佔總測得菌叢的 65.8%，其次為厚壁菌門 (Firmicutes) (30.4%)，其他還包括放線菌門 (Actinobacteria)、變形菌門 (Proteobacteria)、疣微菌門 (Verrucomicrobia) 以及梭桿菌門 (Fusobacteria) 等 (圖十)。若依患者性別不同進行分析，發現不同性別間的菌門比例差異不大，皆以擬桿菌門為第一大菌門 (女：60.3%、男：68.8%)，厚壁菌門為第二大 (女 38.4%、男:26.1%)，統計顯示男女的兩大菌門比例相近，故不對性別差異進行細部探討 (Pearsan's  $X^2$  test,  $p = 0.1927$ ,  $n=50$ ) (圖十一)。

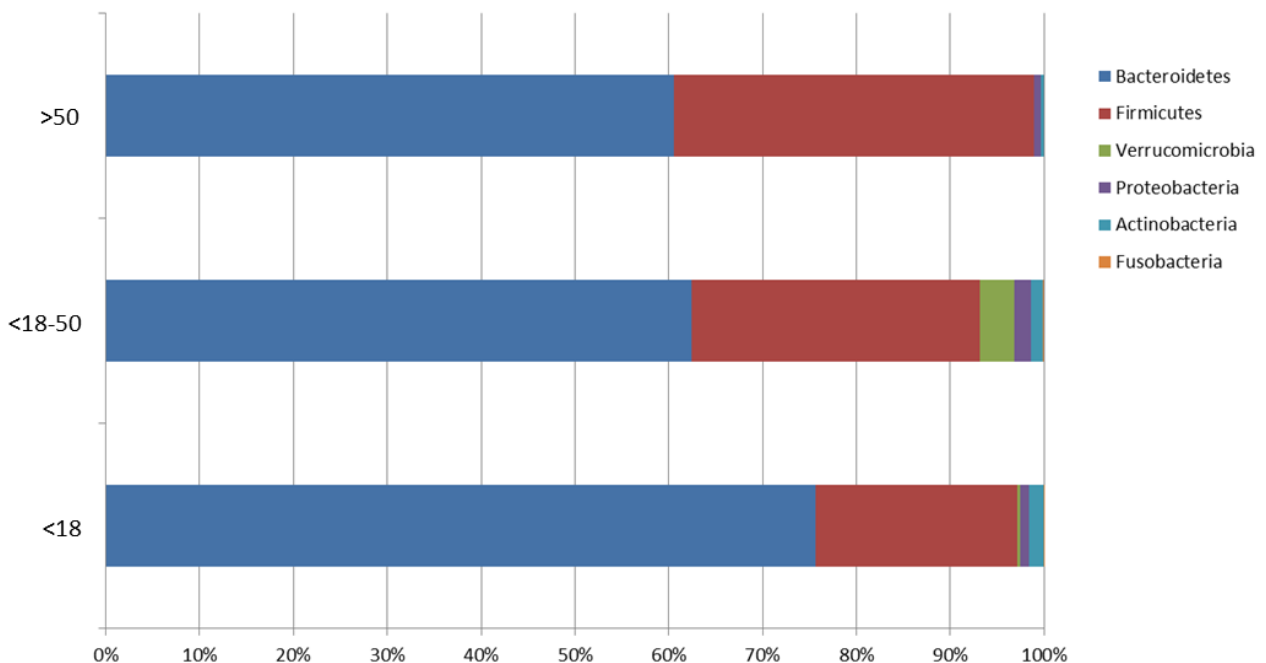


圖十、50 名腹瀉患者腸道菌叢分布圖。本次實驗患者的菌叢分布，厚壁菌門 (Firmicutes) (30.4%)、放線菌門 (Actinobacteria) (1.1%)、變形菌門 (Proteobacteria) (1.2%)、擬桿菌門 (Bacteroides) (65.8%)



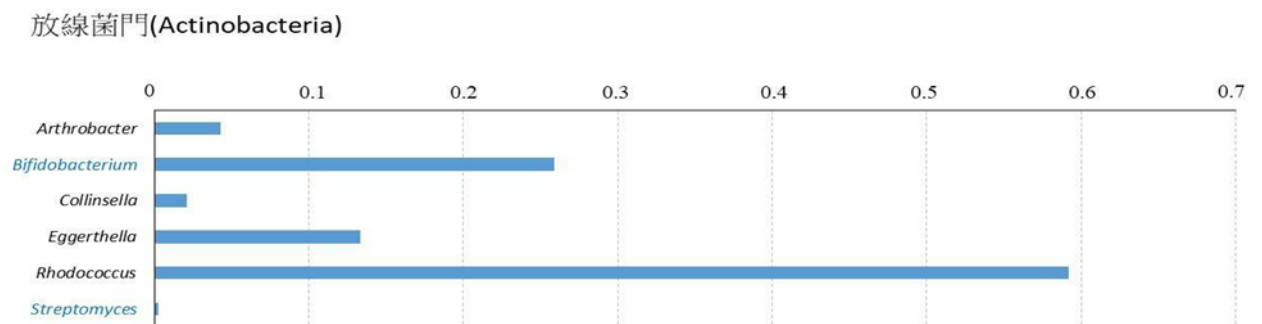
圖十一、不同性別腹瀉患者腸道菌叢分布圖，(A) 為女性，(B) 為男性。統計顯示男女患者菌門比例相近，故不對性別差異進行細部探討 (Pearsan's  $X^2$  test,  $p = 0.1927$ ,  $n=50$ )。

18-50 歲族群的腸道菌門種類相較其他年齡層族群也較為多樣化(均勻度)，18 歲以下的族群次之，50 歲以上的族群多樣化最為單調。(圖十二) 18-50 歲族群菌叢較多樣可能與出社會的上班族外食機率較高的飲食習慣有關，18 歲以下的族群多為學生，學校的營養午餐由營養師分析調配，中央廚房統一烹調，不但注重衛生，營養也較為均衡，所以多樣性也不至於太單一，50 歲以上可能部分民眾對均衡飲食不講究。



圖十二、不同年齡群急性腹瀉患者腸道菌門比例分布圖。各年齡層各菌門分布情況。

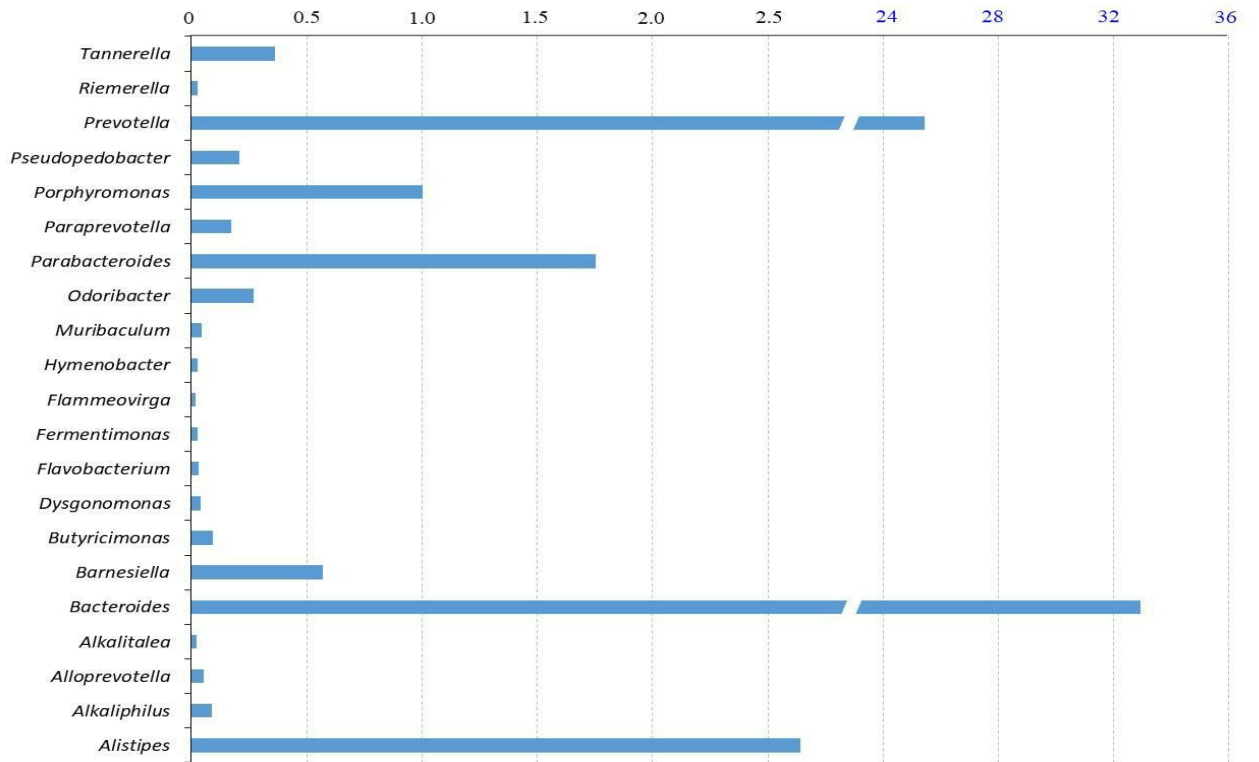
本研究結果將各菌門內的菌屬進一步加以分析 (圖十三到圖十六)，結果發現在急性腹瀉患者腸道菌叢四大菌門中以厚壁菌門種類最多，但單一菌屬的數量則以擬桿菌門的 *Bacteroides* 以及 *Prevotella* 兩個菌屬為最大宗，目前已知這兩種菌屬均屬於人體常見的中間菌。現今一些醫學上常被拿來作為益生菌的菌屬包括放線菌門的 *Bifidobacterium*、*Streptomyces*，以及厚壁菌門的 *Lactobacillus* 以及 *Enterococcus* 等，在急性腹瀉患者菌叢中相對的比例非常少。*Bifidobacterium* 以及 *Enterococcus* 因會合成包括硫胺素 (thiamine, B1)，葉酸 (folate, B9)，生物素 (biotin, B7)，核黃素 (riboflavin, B2)和泛酸 (panthothenic acid, B5)等人體所需水溶性維生素，所以歸類為好菌。而常見的腹瀉致病原包括 *Staphylococcus*、*Bacillus*、*Clostridium*、*Samonella*、*Shigella*、*Campylobacter* 等分屬於厚壁菌門、擬桿菌門以及變形菌門，因其會對人體造成疾病，被歸類為壞菌。



圖十三、急性腹瀉患者腸道菌叢中放線菌門之菌屬數量比例 (Frequency, %) 分布圖。

中間菌以黑字字體標示，好菌以藍色字體標示。

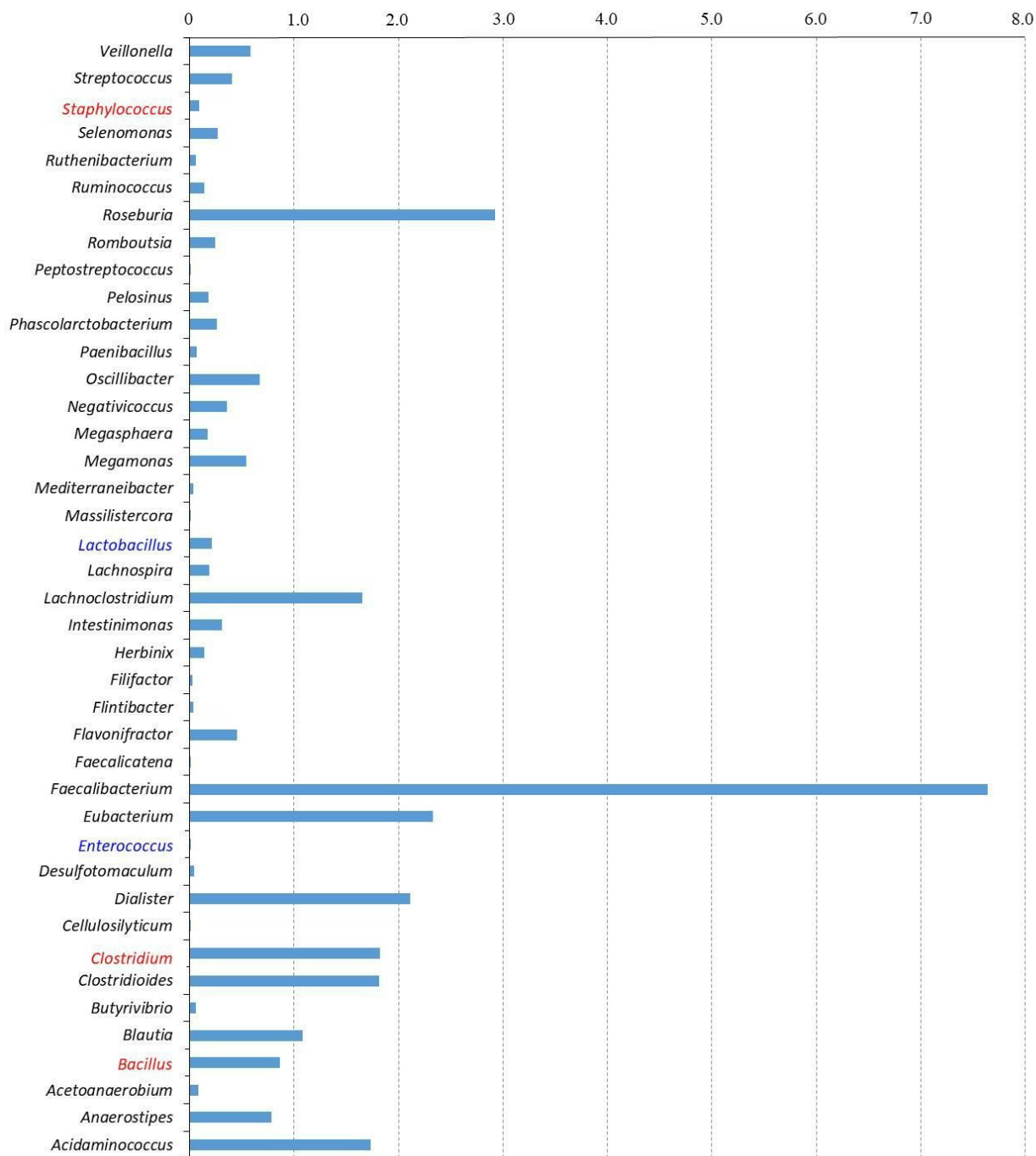
擬桿菌門(Bacteroidetes)



圖十四、急性腹瀉患者腸道菌叢中擬桿菌門之菌屬數量比例 (Frequency, %) 分布圖。

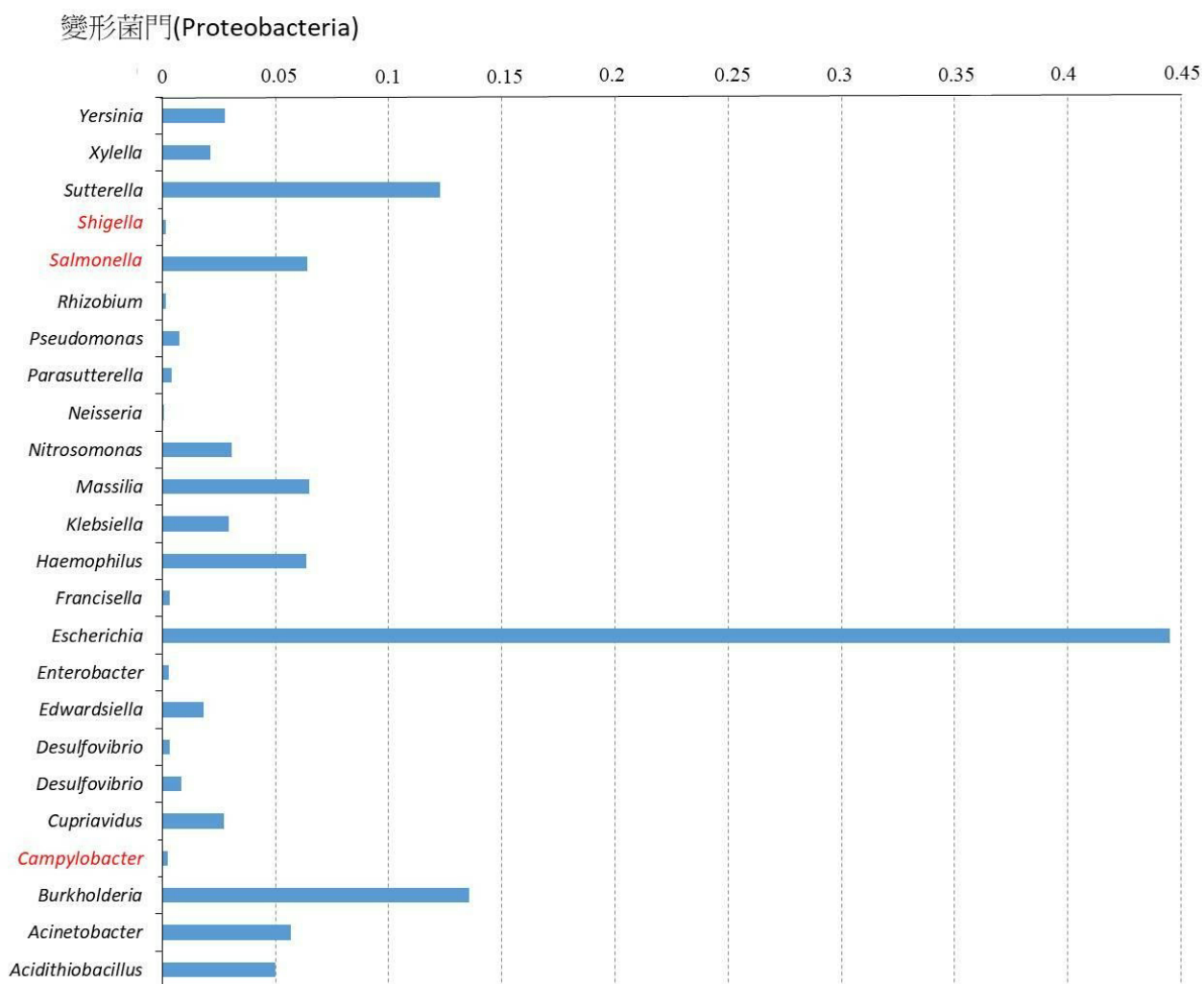
中間菌以黑色字體標示。

厚壁菌門(Firmicutes)



圖十五、急性腹瀉患者腸道菌叢中厚壁菌門之菌屬數量比例 (Frequency, %) 分布圖。

中間菌以黑色字體標示，好菌以藍色字體標示，壞菌以紅色字體表示。

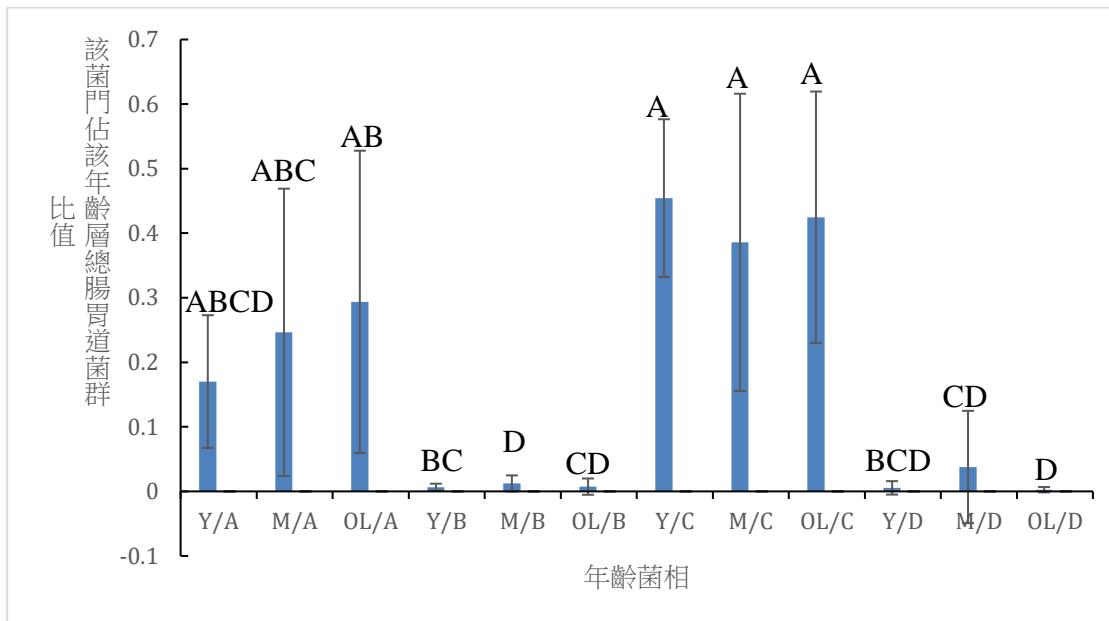


圖十六、急性腹瀉患者腸道菌叢中變形菌門之菌屬數量比例 (Frequency, %) 分布圖。  
中間菌以黑色字體標示，壞菌以紅色字體標示。

一般健康民眾腸道菌叢中的好菌：壞菌：中間菌的比例約為 20：10：70(陳邦基，2015)。我們將本研究測得的腸道菌叢依照好壞菌比例分析，結果發現這些急性腹瀉患者的腸道菌叢中壞菌的數量比好菌高 8 倍以上(圖十三到圖十六)，好菌：壞菌：中間菌的比例約為 1：9：90。結果顯示急性腹瀉患者腸道中的壞菌以及中間菌的比例與健康民眾接近，但好菌的比例顯著低於健康民眾。

#### 四、急性腹瀉患者間腸道菌叢的差異分析

Y 是該菌門佔該年齡層測得總讀取數比值，並使用 Tukey-Kramer HSD 進行統計分析，結果顯示年齡 (Y 代表年輕人(<18)，M 代表中年人(18~50)，OL 代表老人(>50))之間無顯著差異 ( $p>0.05$ )。厚壁菌門 (A) 與擬桿菌門 (C) 的平均比值無顯著差異，變形菌門 (B) 與放線菌門 (D) 的平均比值無顯著差異，(C) 的平均比值顯著大於 (B) 與 (D) (圖十七)。由結果得知，擬桿菌門和厚壁菌門為優勢菌門，可能含有之後研究欲培養，以及在數量方面容易增加的益菌屬。



圖十七、每個年齡層各菌門比例互相比較

橫軸座標:A 為厚壁菌門，B 為變形菌門，C 為擬桿菌門，D 為放線菌門。縱軸座標: 該菌門佔該年齡層總腸胃道菌群比值。誤差線上的 ABCD 為 Tukey-Kramer HSD 判別顯著差異的代號，A 為數量最多的代號，B 次之，以此類推。Y 為 18 歲以下，M 為 18~50，OL 為 50 歲以上。n=23。p = 0.05。

此研究統計到 *Prevotella* 顯著大於 *Faecalibacterium* 與非前三大屬。*Clostridium* 顯著大於非前三大屬，*Faecalibacterium* 無顯著大於其他屬。(圖十八)*Clostridium* 與 *Faecalibacterium* 的數量無顯著差異，推論此二屬好壞菌的影響可抗衡。*Prevotella* 數量顯著大於其他非前三大的屬，故推論此 23 位患者壞菌比例顯著多於益菌，與正常人好菌：壞菌：中間菌的比例 20：10：70 不同。





綠色為厚壁菌門，紅色為變形菌門，藍色為擬桿菌門，黃色為放線菌門。23 位病患總菌群比例其餘皆為 C。益菌以藍色柱狀標示，壞菌以紅色藍色柱狀標示。ABC 為 Tukey-Kramer HSD 判別顯著差異的代號。p = 0.05

日本人長壽且健康國際知名，近期有期刊探討日本健康民眾其他包括丹麥、西班牙、美國、中國大陸、瑞士、俄羅斯、委內瑞拉、馬拉威、澳洲、法國及祕魯的腸道菌叢研究，結果發現在人體腸道菌叢四大菌門中，日本人的放線菌門 (*Actinobacteria*) 菌數比其他國家的民眾高，而變形菌門 (*Proteobacteria*) 與擬桿菌門 (*Bacteroidetes*) 的比例則相對其他國低。進一步去探究日本健康民眾腸道菌叢內放線菌門裡的菌屬組成，結果發現原來是其中的 *Bifidobacterium* 數量比其他 11 個國家人民高出許多，研究結論表示由於日本的飲食習慣，日本的傳統食物中有許多含有大量的 *Bifidobacterium* (Nishijima, S et al., 2016)，可見提升腸道菌叢中好菌的比例有助於保障民眾的健康。

## 肆、結論與應用

人體內的微生物群可提供的功能包括產生能量、生成人體所需維生素以及抗發炎反應等，維持腸道菌叢的穩定有助於提升人體對於疾病的免疫力。腸道微生物群的乳酸桿菌屬 (*Lactobacillus*) (Jones, S. E., & Versalovic, J. (2009) 和雙歧桿菌屬 (*Bifidobacterium*) Riedel, C. U., et al (2006) 中的部分菌種有抑制發炎的作用，另有腸道微生物可使促進抗病原菌感染反應的 Th17 細胞增加，因此維持腸道微生物的多樣性，可讓腸道免疫系統達到穩定的動態平衡。本研究應用 Nanopore 次世代基因定序技術分析急性腹瀉患者的腸道菌叢組成，結果顯示這些病人體內的壞菌不但多於好菌，而且腸道菌叢中的好菌比例比一般健康的人少非常多，增加腸道菌叢內好菌的數量有助於促進患者恢復健康。

建議急性腹瀉患者的治療除了現行的補充水分或電解質等消極的支持性療法以外，國人平常可透過直接攝取市售的益生菌產品提升腸道內好菌的比例來改變腸道壞菌的生長環境，例如多吃優格、優酪乳或納豆等帶有好菌的食物來提升體內腸道菌叢的好菌數。腸胃中益菌的大量繁殖能有效淘汰腸道內可能引起疾病的有害菌，本次研究完成之調查報告可提供各衛生主管機關參考，俾利有效推動各項健康促進計畫。

## 伍、參考文獻

1. 疾病管制署官網 (2018)。取自  
<https://www.cdc.gov.tw/Category/Page/sndL3ibQOtZXgLelyyteHQ>
2. 陳邦基(2016)。腸道菌群與人體健康及疾病。I 醫健康網。取自  
[http://www.healthott.com/ott/Cmartdtl/5IIIUFD0JWA\\_4973.do](http://www.healthott.com/ott/Cmartdtl/5IIIUFD0JWA_4973.do)
3. 陳邦基(2015)。腸道菌群與人體健康及疾病。長庚醫訊第三十六卷第六期。取自  
[https://www.cgmh.org.tw/cgmn/category\\_s.asp?id\\_seq=1505037](https://www.cgmh.org.tw/cgmn/category_s.asp?id_seq=1505037)
4. 臺大醫院醫學研究部共同研究室電子報 (2014)。次世代基因定序 (Next Generation Sequencing, NGS)介紹。取自  
<https://ntuhmc.ntuh.gov.tw/epaper-11th.htm>
5. 人體腸道菌叢種類及分布圖 (2016)。取自  
<https://www.nature.com/articles/nrcardio.2016.183>
6. 急性腹瀉患者糞便檢體 DNA 純化流程圖 (2010)。取自  
<https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=c8fe97e7-78cc-4275-bbac-72c9b7c3de38&lang=en>
7. 傳染病 標準檢驗方法手冊 (2019)。取自  
<https://www.cdc.gov.tw/Uploads/8d740f34-5a9d-4cfb-91b0-1e20265e588c.pdf>
8. Nanopore 定序儀及定序芯片 (2020)。取自  
<https://nanoporetech.com/>
9. Nanopore 定序流程圖 (2020)。取自  
<https://community.nanoporetech.com/protocols>
10. Nanopore 定序原理解析圖 (2017)。取自  
<http://blogs.nature.com/naturejobs/2017/10/16/techblog-the-nanopore-toolbox/>
11. EPI2ME 分析軟體 (2020)。取自

<https://epi2me.nanoporetech.com/>

12. FASTQ 16S 分析軟體 (2020)。取自

<https://epi2me.nanoporetech.com/>

13. Barko, PC., McMichael, MA., Swanson, KS., Williams, DA. (2018) The gastrointestinal microbiome: a review. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 32(1):9-25.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29171095/>

14. Bolen, B. (2020) Causes of Diarrhea After Eating. Available at:

<https://www.verywellhealth.com/diarrhea-after-eating-1944811>

15. Behjati, S., Tarpey, PS. (2013) What is next generation sequencing? *Archives of Disease in Childhood Education and Practice Edition* 98(6): 236-8.

<http://europepmc.org/article/med/23986538>

16. Chow, CM., Leung A. KC., Hon, KL. (2010) Acute gastroenteritis: from guidelines to real life. *Clinical and experimental gastroenterology*, 3, 97-112.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21694853/>

17. Durack, J., Lynch SV. (2019) The gut microbiome: Relationships with disease and opportunities for therapy. *Journal of Experimental Medicine*. 216(1):20-40.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6314516/>

18. Deamer, D., Akeson, M., Branton, D. (2016) Three decades of nanopore sequencing. *Nature Biotechnology*. 34(5):518-24.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27153285/>

19. Garibyan, L., Avashia, N. (2013) Research techniques made simple: polymerase chain reaction (PCR). *The Journal of investigative dermatology*, 133(3): e6.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4102308/>

20. Guarino, A., Vecchio, AL., Canani, RB. (2009) Probiotics as prevention and treatment for diarrhea. *Current Opinion in Gastroenterology*, 25(1): 18-23.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19114770/>

21. Jonsson AL., Backhed F. (2017) Role of gut microbiota in atherosclerosis. *Nature Review Cardiology*, 14(2):79-87.  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27905479/>
22. Land, MH., Rouster-Stevens, K., Woods, CR., Cannon, ML., Cnota, J., Shetty, AK. (2005) Lactobacillus sepsis associated with probiotic therapy. *Pediatrics*, 115(1):178-81.  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15629999/>
23. Mowat, A. M., & Agace, W. W. (2014). Regional specialization within the intestinal immune system. *Nature Reviews Immunology*, 14(10), 667-685.  
<https://www.nature.com/articles/nri3738?page=2>
24. Nishijima, S., Suda, W., Oshima, K., Kim, S., Hirose, Y. Morita, H., Hattori, M. (2016) The gut microbiome of healthy Japanese and its microbial and functional uniqueness. *DNA Research*, 32(2): 125-33.  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26951067/>
25. Perdigon, G., De Macias, ME., Alvarez, S., Oliver, G., de Ruiz Holgado, AA. (1986) Effect of perorally administered lactobacilli on macrophage activation in mice. *Infection and immunity*, 53(2):404-10.  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3110233/>
26. Qian, Y., Yang, X., Xu, S., Wu, C., Song, Y., Qin N. (2018) Alternative of the fecal microbiota in Chinese patients with Parkinson's disease. *Brain, Behavior, and Immunity*. 70: 194-202.  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29501802/>
27. Szajewska, H., Guarino, A., Hojsak, I., Indrio, F., Kolacek, S., Shamir, R., Weizman, Z. (2014) Use of probiotics for management of acute gastroenteritis: a position paper by the ESPGHAN Working Group for Probiotics and Prebiotics. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 58(4): 531-9.  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24614141/>
28. WHO (2013). Ending preventable deaths from pneumonia and diarrhea by 2025. Available at: [https://www.who.int/maternal\\_child\\_adolescent/news\\_events/news/2013/gappd\\_launch/en/](https://www.who.int/maternal_child_adolescent/news_events/news/2013/gappd_launch/en/)

29. Zheng, P., Li, Z., Zhou Z. (2018) Gut microbiome in type 1 diabetes: A comprehensive review. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*. 34(7): e3043. Available at:<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6220847/>
30. Riedel, C. U., Foata, F., Philippe, D., Adolfsson, O., Eikmanns, B. J., & Blum, S. (2006). Anti-inflammatory effects of bifidobacteria by inhibition of LPS-induced NF- $\kappa$ B activation. *World journal of gastroenterology: WJG*, 12(23), 3729.
31. Jones, S. E., & Versalovic, J. (2009). Probiotic *Lactobacillus reuteri* biofilms produce antimicrobial and anti-inflammatory factors. *BMC microbiology*, 9(1), 1-9.

## 【評語】 070005

1. 收集了 50 名急性腹瀉症狀的患者糞便檢體進行腸道菌叢表現分析，應用次世代基因定序技術，偵測微生物 16S rRNA 的高變異區域分析患者腸道微生物菌相組成、菌種豐富度分析及菌種鑑定。
2. 研究具重要性及實用價值，然而對高中科展而言缺乏主動性與原創性，若能對於實驗背後的原理或問題提出進一步的看法會更好，而不要僅單存使用套裝試劑或已知的分析軟體套用得到一些數據。
3. 摘要非簡介，除列出問題、方法外，應說明研究所獲結果及貢獻。
4. 偵測微生物 16S rRNA 的高變異區所使用之引子為何？
5. 本研究有初步的定序分析結果，總結則與已知的醫學知識相近，較無創新論點。
6. 屬技術性報告，較缺研究內涵，Nanopore 定多過程詳細，但結果沒有顯出特別的意義，急性腹瀉不用次世代基因定序，也必然是壞菌多於好菌。
7. 所得結果為電腦結序分析所得，但未能得到和疾病的必然關連性。
8. 創意不足及研究主題不夠聚焦。