

## 随机引物聚合酶链反应指纹法对变形链球菌标准株进行基因分型

陈 罕, 凌均<sup>✉</sup>, 刘建伟, 高 燕, 杨国平, 林正梅

(中山医科大学口腔医学院口腔内科, 广东 广州 510055)

**摘 要:**【目的】探索一种利用随机引物聚合酶链反应指纹法技术进行变形链球菌基因分型的方法。【方法】利用变形链球菌不同血清型标准株和通用引物 5'-TGCCGAGCTG-3', 研究了在不同条件下进行聚合酶链反应的结果, 寻找满意的聚合酶链反应条件。【结果】找到了较为满意的聚合酶链反应条件: 94 °C 30 s, 36 °C 30 s, 72 °C 1 min, 反应进行 45 个循环。【结论】随机引物聚合酶链反应指纹法技术在一定的控制条件下可用于变形链球菌的鉴定和分型。

**关键词:** 龋齿/ 病因学; 变形链球菌/ 分类; 细菌分型技术; 聚合酶链反应/ 方法

中图分类号: R378.1; R781.1; Q756 文献标识码: A 文章编号: 1000-257X(2000)04-0251-02

## Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction Finger Printing for the Genotypic Identification of *Streptococcus mutans*

CHEN Han, LING Jun-qi, LIU Jian-wei, GAO Yan, YANG Guo-ping, LIN Zheng-mei

(Department of Oral Medicine, College of Stomatology, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510055, China)

**Abstract:** 【Objective】 To find out an ideal method used in genotypic identification of *Streptococcus mutans* by arbitrarily primed polymerase chain reaction finger printing (AP-PCR). 【Method】 The *Streptococcus mutans* standard strains were used with different polymerase chain reaction (PCR) conditions on general primer (5'-TGCCGAGCTG-3') to select an ideal result. 【Result】 An ideal PCR reaction was found: 94 °C 30 s, 36 °C 30 s, 72 °C 1 min, 45 cycles. 【Conclusion】 AP-PCR method could be used as an ideal method for *Streptococcus mutans* strains' genotypic identification.

**Key words:** dental caries/etiology; *Streptococcus mutans* /classification; bacterial typing technique; polymerase chain reaction/methods

龋病是一种由口腔内细菌引起, 具有传染性的感染性疾病<sup>[1]</sup>。变形链球菌 (*Streptococcus mutans*, *S. mutans*) 已被公认为是龋病的主要致病菌。对变形链球菌进行分型, 直至进行单个特定菌株的个体识别是非常必要和重要的, 这有助于对变形链球菌在龋病过程中的作用、传播的方式、感染的途径进行有效的研究。传统的分型方法有血清型分型法、生化反应鉴定法等, 由于效率低、可靠性差, 目前仅用于变形链球菌的初步鉴定。现代采用的有染色体 DNA 指纹图、核糖体分型等, 但这些

方法都由于技术上操作复杂, 费用昂贵而较难广泛使用。随着分子生物学技术的发展, 一种新的方法由于操作简便, 可靠性高而在微生物鉴定分类学上得到了较为广泛的应用, 即随机引物聚合酶链反应指纹法(arbitrarily primed polymerase chain reaction finger printing, AP-PCR)。本研究旨在利用 AP-PCR 技术对变形链球菌的标准菌株进行 AP-PCR 鉴定, 分型, 为以后利用此技术进行龋病学研究提供实验基础。

收稿日期: 2000-03-03

基金项目: 中山医科大学科研基金资助项目(1998年度)

作者简介: 陈 罕(1967-) 男, 江苏扬州人, 博士, 讲师

## 1 材料与方 法

### 1.1 细菌菌株

变形链球菌标准株(本室保存): AHT(血清型 a)、10449(血清型 c)、Ingbritt(血清型 c)、6715(血清型 d)、LM7(血清型 e)、OMZ175(血清型 f)、OMZ65(血清型 g)、菌株-20℃保存于体积分数为30%甘油 BHI 培养基。

### 1.2 细菌培养与染色体 DNA 提取

将各标准菌株接种于 5 mL BHI 液体培养基中, 37℃, 体积分数为 90% N<sub>2</sub>、5% CO<sub>2</sub>、5% H<sub>2</sub> 培养 18 h, 3 500×g (Biofuge, r=0.35 m) 离心 20 min 收集菌体, 加入 0.6 mL 混合液(160 g/L PEG, lysozyme 3.3 g/L, RNase 166 mg/L) 37℃水浴 60 min, 15 000×g (Biofuge, r=0.35 m) 离心 2 min, 沉淀加 0.45 mL TE, 50 μL 100 g/L SDS, 37℃水浴 2 h, 加 0.8 mL 无水乙醇, 15 000×g (Biofuge, r=0.35 m) 离心 2 min, 沉淀加 0.5 mL 10 g/L SDS 68℃水浴 20 min, 加 500 μL 平衡酚、500 μL 氯仿抽提, 上清液加 0.8 mL 无水乙醇, 15 000×g 离心 15 min, 沉淀溶于 100 μL TE 液溶解, -20℃保存。

### 1.3 AP-PCR 反应

引物: 5'-TGCCGAGCTG-3'(上海生工合成), 以 50 μL 做为反应体积, 分别加入 200 ng 染色体 DNA, 100 pmol 引物, 5 μL 10×反应缓冲液, 2.5 U *Taq* 酶, 10 mL dNTP。不足体积用 ddH<sub>2</sub>O 补齐。反应条件: 94℃30 s, 36℃30 s, 72℃1 min, 反应进行 45 个循环。取反应产物 10 μL 在 10 g/L 琼脂糖中电泳(TAE 缓冲液), 观察并记录实验结果。

### 1.4 试剂与仪器

酶与试剂均购自华美公司, BHI 培养基购自 Becton Dickinson 公司, PCR 反应在 PE9600 PCR 仪上进行。

## 2 结 果

本实验所采用的引物和实验条件, 可扩增出较为稳定和清晰的条带。本实验方法经多次重复实验, 稳定与重复性较好。变形链球菌 c 血清型的标准株 *S. mutans* 10449、Ingbritt 的染色体 DNA 较稳定地扩增出了 8~10 个条带, 可方便地进行菌株

的鉴定和识别, 其它血清型的菌株扩增出的条带数较少(图 1)。

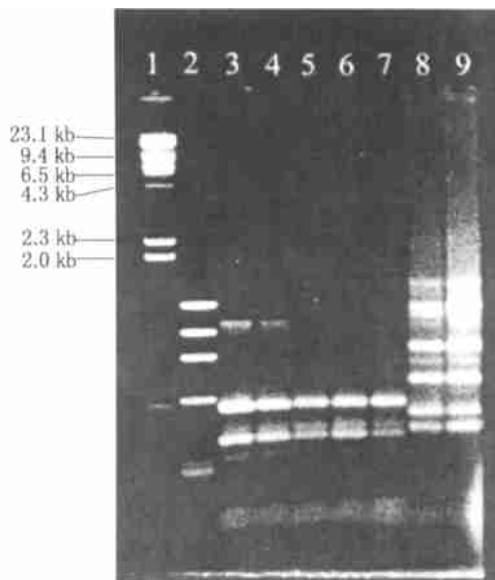


图 1 变形链球菌标准株 AP-PCR 产物

Fig. 1 *S. mutans* standard strains AP-PCR products

Lane 1: Marker λDNA/ *Hind* III; Lane 2: Marker φ174/ *Hea* III; Lane 3: *S. mutans* AHT; Lane 4: *S. mutans* 6715; Lane 5: *S. mutans* LM7; Lane 6: *S. mutans* OMZ175; Lane 7: *S. mutans* OMZ65; Lane 8: *S. mutans* 10449; Lane 9: *S. mutans* Ingbritt

## 3 讨 论

变形链球菌已被确认为是龋病的重要病原菌, 因而已对它进行了广泛的研究。利用从不同病人的口腔中分离的变形链球菌株, 进行菌斑形成和致龋性实验, 发现各个菌株的致龋力相差较大。为了有效地预防龋病, 对各个变形链球菌菌株进行个体识别, 判定它的致龋能力是非常重要的<sup>[2]</sup>。变形链球菌的鉴定、分型是变形链球菌致龋作用研究的基础。已有的变形链球菌鉴定分型手段已不能满足当前研究工作的需要, 迫切要求建立新的快速、简便、准确的分型及单个特定菌株个体鉴定的方法。细菌 AP-PCR 技术是利用 PCR 原理, 应用通用寡核苷酸引物, 对细菌染色体 DNA 进行扩增, 利用琼脂糖电泳将扩增产物按分子大小分开, 获得一定的条带模式即指纹图谱。这种指纹图谱可利用来进行细菌的基因分型工作。AP-PCR 已成功地应用于 *Helicobacter pylori*、*Porphyromonas gingivalis* 等的基因分型工作<sup>[3]</sup>。本实验采用了变形链球菌染色

## 参考文献:

- [1] Hu J W. Response properties of nociceptive and non-nociceptive neurons in the rat's trigeminal subnucleus caudalis (medullary dorsal horn) related to cutaneous and deep craniofacial afferent stimulation and modulation by diffuse noxious inhibitory controls[J]. Pain, 1990, 41(3): 331.
- [2] Takemura M, Nagase Y, Yoshida A, et al. The central projections of the monkey tooth pulp afferent neurons [J]. Somatosens Mot Res, 1993, 10(2): 217.
- [3] Morgan J I, Curran T. Stimulus-transcription coupling in the nervous system: involvement of the inducible proto-oncogenes fos and jun[J]. Annu Rev Neurosci, 1991, 14(1): 421.
- [4] Wallois F, Gros F, Masmoudi K, et al. C-Fos-like immunoreactivity in the cat brainstem evoked by sneeze-inducing air puff stimulation of the nasal mucosa[J]. Brain Res, 1995, 687(1~2): 143.
- [5] 林正梅, 凌均, 凌征宇, 等. 实验性牙髓炎疼痛动物模型的建立[J]. 广东牙病防治杂志, 1999, 7(4): 249.

- [6] Marota J J, Crosby G, Uhl G R. Selective effects of pentobarbital and halothane on c-fos and jun-B gene expression in rat brain[J]. Anesthesiology, 1992, 77(2): 365.
- [7] Coimbra F, Coimbra A. Dental noxious input reaches the subnucleus caudalis of the trigeminal complex in the rat as shown by c-fos expression upon thermal or mechanical stimulation[J]. Neurosci Lett, 1994, 173(1~2): 201.
- [8] Dong W K, Chudler E H, Kawakami Y. Tooth pulp-evoked potentials in the trigeminal brainstem nuclear complex[J]. Brain Res, 1990, 529(1~2): 131.
- [9] Allen G V, Barbrick B, Esser M J. Trigeminal parabrachial connections: possible pathway for nociception-induced cardiovascular reflex responses[J]. Brain Res, 1996, 715(1~2): 125.
- [10] Bouhassira D, Villanueva L, Le Bars D. Effects of systemic morphine on diffuse noxious inhibitory controls: role of the periaqueductal grey[J]. Eur J Pharmacol, 1992, 216(2): 149.

(编辑 关淡庄)

(上接第 252 页)

体 DNA 小规模快速提取法, 取得的染色体 DNA 达到了进行 PCR 扩增的纯度要求。随机扩增采用的引物长度为 10 个 base, 并应用经过优化的扩增条件, 保证了能扩增出 8 至 12 个较为稳定、重复性较好的条带。经过多次重复实验, 对 *S. mutans* 10449、Ingbritt 菌株染色体 DNA 均扩增出了相似的条带区, 说明这些条带代表了变形链球菌中的保守区, 利用这些保守区的信息, 可将这些条带做为标准模式带用于变形链球菌的鉴定。标准模式带以外的条带, 根据条带的有无、多少和位置可进行菌株的个体识别, 而进行变形链球菌致病性的分子流行病学研究, 如进行变形链球菌某菌株在母婴和家庭间传播的研究<sup>[4]</sup>。本实验方法如果在临床分离株进行, 可望确定某些条带与龋病的发生和患者 DMFT 数的关系进而利用这些特征条带进行变形链球菌毒力株确定。本研究表明 AP-PCR 技术做为分子生物学现代技术可望应用于龋病的微生物

分子流行病学、毒力株与非毒力株、基因分型的研究。

## 参考文献:

- [1] Loesche W J. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay [J]. Microbiol Rev, 1986, 50(1): 353.
- [2] de Soet J J, van Loveren C, Lammens A J, et al. Differences in cariogenicity between fresh isolates of *Streptococcus sobrinus* and *Streptococcus mutans* [J]. Caries Res, 1991, 25(2): 116.
- [3] Menard C, Mouton C. Randomly amplified polymorphic DNA analysis confirms the biotyping scheme of *Porphyromonas gingivalis* [J]. Res Microbiol, 1993, 144(3): 445.
- [4] Li Y, Caufield P W. Arbitrarily primed polymerase chain reaction finger printing for the genotypic identification of mutans streptococci from humans [J]. Oral Microbiol Immunol, 1998, 13(1): 17.

(编辑 张敏瑞)