

- J West China University Medical Sciences, 1995, 26 (1) :11-14.)
- [2] 黄隆庆, 朱智敏, 张 萌, 等. 计算机图形图像处理技术在牙颌及修复体三维形态数字模型建立中的应用[J]. 华西口腔医学杂志, 1997, 16 (1) :76-78.
(HUANG Long-qing, ZHU Zhi-min, ZHANG Meng et al. Applications of computer image processing and graph processing technologies in digital modelling of 3-D shapes of teeth, jaw and prosthesis[J]. West China J Stomatology, 1997, 16 (1) :76-78.)
- [3] 周学军, 赵志河, 赵美英. 下颌骨三维有限元模型的边界约束设计[J]. 华西口腔医学杂志, 1999, 17 (1) 29-32.
(ZHOU Xue-jun, ZHAO Zhi-he, ZHAO Mei-ying. The boundary design of mandibular model by means of the three-dimensional finite element method[J]. West China J Stomatology, 1999, 17

- (1) 29-32.)
- [4] Blenkinsop PA, Evans WJ, Flower HM. Titanium 95 science and technology [M]. London UK: Cambridge University Press, 1995: 1828-1835.
- [5] 张杰魁, 陈治清. 人体硬组织替换材料弹性模量变化对种植界面力学状态的影响——三维各向异性有限元分析[J]. 华西口腔医学杂志, 1998, 16 (3) 274-278.
(ZHANG Jie-kui, CHEN Zhi-qing. The study of effects of changes of the elastic modulus of the materials substitute to human hard tissues on mechanical state in the implant-bone interface by three-dimensional anisotropic finite element analysis[J]. West China J Stomatology, 1998, 16 (3) 274-278.)

(本文编辑 李 彩)

[文章编号] 1000-1182 (2006) 01-0091-02

gtfB寡核苷酸探针对高龋及无龋者唾液变形链球菌的检测

宋衍芹¹, 郭青玉¹, 吴 文¹, 张 硕²

(1.西安交通大学口腔医院 口腔内科, 陕西 西安 710004; 2.青岛大学医学院 药理学教研室, 山东 青岛 266021)

[中图分类号] R781.1 [文献标识码] A

变形链球菌是目前公认的、最重要的一种致龋菌, 早期鉴定人群口腔中的变形链球菌对于龋病活性检测和早期预防有着重要意义^[1]。变形链球菌的常规检测方法很多, 但均操作复杂, 检测周期长, 且特异性和敏感性不高。近年来, 分子生物学技术在细菌的鉴定和分类学中逐步被采用。核酸探针是分子生物学的基本工具, 具有示踪性和显示性的特点。本文利用自行设计并经灵敏度和特异度检测的、针对变形链球菌国际标准株主要毒力因子gtfB的寡核苷酸探针, 对80名不同龋敏感者口腔中的变形链球菌进行检测, 定性分析gtfB基因片段检出率与龋病的关系, 为以后寡核苷酸探针作为一种筛检方法用于临床奠定基础。

1 材料和方法

1.1 主要材料和仪器

Smutans国际参考株ATCC 25176 口腔生物医学工程教育部重点实验室), 蛋白酶K (大连宝生物工程有限公司), 2×Taq PCR MasterMix (北京天为时代科技有限公司), 溶菌酶、溶葡萄球菌素、鲑精DNA、单克隆抗地高辛抗体 (Sigma公司, 美国), 碱磷酶底物BCIP/NBT显色浓缩液 (北京中山生物技术有限公司)。

主要仪器: 分子杂交仪 (北京新技术应用研究所), PCR

仪 MJRESTARTCH公司, 美国), Dolphin-DOC凝胶成像系统 Wealtec公司, 中国台湾)。

地高辛标记gtfB探针和gtfB序列引物是前期实验已经设计好的并经灵敏度和特异度检测的探针和引物, 由北京奥科生物工程公司合成。上游引物为5' ACAACCGAAG(C/T)GAC-ATCTAAGCA3', 下游引物为5' ACGAACTTTGCCGTTATT-GTCAT3'。探针为5' ACCGAAGCTGATACAGATGTTATTGA-TGATAGCAATGCAGCCAATCTACA3'。扩增的片段长345 bp, 从第903—1 247 bp。扩增片段与探针杂交位点为1 120—1 169 bp。

1.2 方法

1.2.1 研究对象 从2004年8月在西安交通大学口腔医院口腔内科就诊的患者和在校学生中选取符合纳入要求者80名为研究对象, 其中高龋者40名, 无龋者40名。研究对象纳入要求: 年龄20—40岁, 近2周末服用抗生素, 口腔卫生良好, 无全身系统性疾病; 按照WHO龋病的诊断标准, DMFT 6定为高龋, DMFT=0定为无龋。

1.2.2 临床样本的收集和处理 早餐后2 h收集受试者的漱口液, 取液前受检者不刷牙不漱口, 让受试者用10 mL生理盐水漱口并收集于已经消毒的口中杯, 4℃下保存。

1.2.3 分离DNA^[2] 在12 h内把收集的漱口液置于10 mL离心管中8 000 r/min, 离心15 min, 弃上清, 收集菌体。加蛋白酶K裂解液、溶菌酶、1 mg/mL溶葡萄球菌素水浴2 h, 再加入等体积的酚:氯仿:异戊醇 (25:24:1) 抽提1次, 12 000 r/min离心5 min, 取上清200 μL, 加冰乙醇, -20

[收稿日期] 2005-01-28; [修回日期] 2005-06-10

[基金项目] 陕西省科技攻关基金资助项目 2004K12-G4 [3]

[作者简介] 宋衍芹 (1978-), 女, 山东人, 硕士研究生

[通讯作者] 郭青玉, Tel: 029-87287539

过夜, 12 000 r/min 离心 15 min, 弃上清, 溶于 15 μ L TE 缓冲液中。

1.2.4 PCR 扩增 gtfB 片段 按照 2 \times Taq PCR MasterMix 的说明进行。PCR 循环条件为: 预变性 95 10 min, 变性 95 1 min, 退火 58 1 min, 延伸 72 1 min, 共进行 34 个循环, 最后 72 延伸 10 min。PCR 扩增产物 3 μ L 在 1.2% 的琼脂糖凝胶中电泳。以 *S.mutans* ATCC 25175 基因组 DNA 的 PCR 产物为阳性对照, 无菌水为阴性对照。

1.2.5 PCR 扩增产物与 gtfB 探针进行斑点杂交 取 1 μ L 扩增产物点样于尼龙膜, 以 *S.mutans* ATCC 25175 基因组 DNA 的 PCR 产物为阳性对照, 无菌水为阴性对照。经过变性、固定、预杂交、杂交、封闭、抗体孵育等步骤, 最后用碱磷酸酶底物 BCIP/NBT 显色浓缩液在暗室环境下显色 1 h, 无菌水冲洗终止反应, 记录结果。

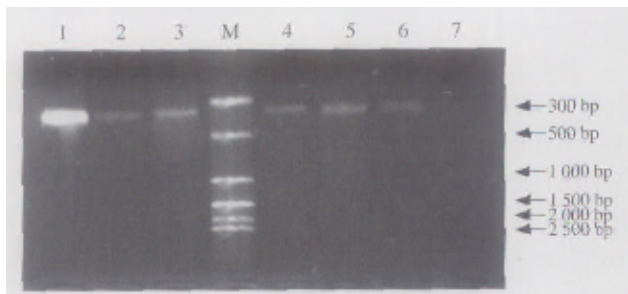
1.3 统计分析

采用 SPSS 10.0 软件, 对高龋组和无龋组 gtfB 基因片段的阳性检出率进行四格表资料的 χ^2 检验分析。

2 结果

2.1 PCR 扩增 gtfB 片段

高龋组 40 例 DNA 样本经过 PCR 扩增后, 有 35 例扩增出了预计的 345 bp 大小片段, 5 例没有扩增出 345 bp 大小片段, gtfB 基因片段的阳性检出率为 87.5% (图 1)。无龋组 40 例 DNA 样本经过 PCR 扩增后, 有 4 例扩增出了 345 bp 大小片段, 36 例没有扩增出 345 bp 大小片段。



1: 阳性对照; 2—6: 高龋者; 7: 阴性对照; M: Marker

图 1 PCR 扩增产物电泳图

Fig 1 Amplificated product by PCR

2.2 PCR 扩增产物与 gtfB 探针进行斑点杂交

高龋组 40 例 PCR 扩增产物经过与 gtfB 寡核苷酸探针斑点杂交后, 有 38 例出现阳性结果, gtfB 基因片段的阳性检出率为 95%。无龋组 40 例 PCR 扩增后产物经过与斑点杂交后有 7 例出现了阳性结果。四格表资料的 χ^2 检验结果表明, 高龋组变形链球菌 gtfB 基因片段的阳性检出率显著高于无龋组, 二者之间的差异有统计学意义 ($\chi^2=48.81$, $P<0.05$)。

3 讨论

变形链球菌的致龋性主要在于它能够牢固地粘附于牙面并代谢食物中的碳水化合物产酸^[3], 其葡糖基转移酶 (glucosyltransferase, GTF) 通过合成水不溶性和水溶性葡聚糖而在这一过程中发挥重要作用^[4]。变形链球菌的 GTF 有 3 种不同类型, 即 GTF-I、GTF-SI 和 GTF-S。gtfB 是与变形链球菌致龋性关系较密切的 GTF 相关基因, 它所编码的 GTF-I

利用蔗糖作为底物合成的水不溶性葡聚糖参与了细菌之间及细菌与牙体之间的蔗糖依赖性粘附。研究发现龋病的发生与特定基因型高致龋性变形链球菌的定植有关^[5]。高龋者个体通常携带有 GTFs 合成能力高的菌株^[6]。本文采用的是前期实验已经设计好的特异性强、联合 PCR 后灵敏度检测达到 0.01 pg。针对致龋性基因片段 gtfB 的寡核苷酸探针, 对高龋和无龋者口腔中的变形链球菌进行检测, 定性分析 gtfB 基因片段检出率与龋病 DMFT 的关系, 为今后筛选龋高危人群、有针对性地开展预防工作提供实验依据。

实验结果表明, 在 40 名高龋者的唾液中有 38 名 (95%) 检测到了变形链球菌 gtfB 基因片段, 而 40 名无龋者中只有 7 名 (17.5%) 检测到了变形链球菌 gtfB 基因片段, 高龋组变形链球菌 gtfB 特异基因片段的阳性率显著高于无龋组, 这提示变形链球菌 gtfB 特异基因片段与致龋性密切相关。同时研究表明, PCR 技术与核酸探针的有机结合, 使其检测的敏感性和特异性大为提高。实验中 PCR 扩增 gtfB 后, 高龋组的阳性检测率只有 87.5%, 而经进一步与 gtfB 探针杂交后阳性率提高到 95%, 此表明二者的有机结合可进一步提高探针的敏感性。由于变形链球菌有多种毒力因子, 而本实验中的引物只是针对其中之一设计; 同时龋病是多种细菌混合感染的疾病, 在致龋菌中除了变形链球菌之外还包括远缘链球菌、乳酸杆菌等, 因此本实验设计还有待进一步完善。

[参考文献]

- [1] 邢向辉, 杨富生. 聚合酶链反应 (PCR) 方法检测远缘链球菌[J]. 实用口腔医学杂志, 2003, 19(6): 594-597.
(XING Xiang-hui, YANG Fu-sheng. Detection of *Streptococcus sobrinus* by polymerase chain reaction[J]. J Pract Stomatol, 2003, 19(6): 594-597.)
- [2] 苏明权, 张建芳, 樊新, 等. 采用 PCR 快速检测金葡菌的 mecA 基因[J]. 细菌与分子免疫学杂志, 2002, 16(6): 642-643.
(SU Ming-quan, ZHANG Jian-fang, FAN Xin, et al. Rapid detection of the gene mecA of staphylococcus by PCR[J]. Chin J Cell Mol Immunol, 2002, 16(6): 642-643.)
- [3] Vincent I, Brendtro S, Gillespie R, et al. Effect of an orphan response regulator on *Streptococcus mutans* sucrose-dependent adherence and cariogenesis[J]. Infect Immun, 2003, 71(8): 4351-4360.
- [4] Devulapalle KS, Mooser G. Glucosyltransferase inactivation reduces dental caries[J]. J Dent Res, 2001, 80(2): 466-469.
- [5] Mattos-Graner RO, Smith DJ. Water-insoluble glucan synthesis by *Mutans streptococcal* strains correlates with caries incidence in 12- to 30-month-old children[J]. J Dent Res, 2000, 79(6): 1371-1377.
- [6] 黄晓晶, 刘天佳, 杨锦波, 等. 高龋及无龋者变形链球菌临床分离株致龋性研究合成细胞外多糖能力的实验研究[J]. 华西口腔医学杂志, 2000, 18(6): 419-421.
(HUANG Xiao-jing, LIU Tian-jia, YANG Jin-bo, et al. Evaluation of cariogenic potential of *Streptococcus mutans* isolated from caries-free and -active persons: Abilities to synthesize water-soluble and insoluble glucans[J]. West China J Stomatology, 2000, 18(6): 419-421.)

(本文编辑 李 彩)