

[文章编号 1000-1182(2005)06-0524-05]

利用抑制消减杂交技术构建变形链球菌 高毒力株特异的基因文库

郭丽宏¹, 史俊南², 张莹²

(1. 北京大学口腔医学院 生物教研室, 北京 100081; 2. 第四军医大学口腔医院 牙体病科, 陕西 西安 710032)

[摘要] 目的 构建 c 血清型变形链球菌高毒力株特异的基因文库, 为变形链球菌毒力基因的筛选奠定基础。方法 从一对 c 血清型变形链球菌高、低毒力株中提取基因组 DNA, 用四碱基限制性内切酶酶切, 以高毒力株的 DNA 酶切产物为 tester DNA, 低毒力株的 DNA 酶切产物为 driver DNA, tester DNA 连接接头后与 driver DNA 进行抑制消减杂交, 并检测连接效率与消减效率。将获得的消减 PCR 产物与 pCR2.1 载体连接, 转化 *E. coli* TOP10F 感受态细胞, 进行蓝白筛选。结果 从识别四碱基序列的限制性内切酶中, 筛选出 *Alu*, 用于制备变形链球菌基因组 DNA 的代表性片段, 产生的酶切产物位于 0.1 ~ 2.0 kb。tester DNA 与接头的连接效率大于 25%, 抑制消减杂交后消减效率检测显示, 同时存在于 tester 与 driver DNA 中的 23S rRNA 基因在消减组中出现时间较未消减组晚 6 个循环, 将消减 PCR 产物克隆后, 挑取 96 个转化子, 构建高毒力株特异的基因文库。结论 利用抑制消减杂交技术, 进行 c 血清型变形链球菌高、低毒力株之间基因组 DNA 的比较, 初次构建了高毒力株特异的基因文库。

[关键词] 变形链球菌; 抑制消减杂交; 基因组 DNA

[中图分类号] R 781.1 **[文献标识码]** A

Construction of a Virulence-related Gene Library of *Streptococcus mutans* by Suppression Subtractive Hybridization

GUO Li-hong¹, SHI Jun-nan², ZHANG Ying². (1. Dept. of Biology, College of Stomatology, Peking University, Beijing 100081, China; 2. Dept. of Oral Medicine, College of Stomatology, The Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

[Abstract] **Objective** To construct a suppression subtractive library of virulence-related genes from c serotype *Streptococcus mutans* (*S. mutans*), and lay foundations for screening the virulent genes. **Methods** After being isolated from virulent and avirulent strain of *S. mutans* respectively, the intact and high-pure genomic DNA was digested with three appropriate four-base-cutting restriction endonucleases to produce fragments of optimal length. The digested DNA of the virulent strain ligated with adaptor was used as tester DNA, and that of the avirulent strain as driver DNA. Then the suppression subtractive hybridization was carried out, and the efficiency of ligation and subtraction detected respectively. The subtracted fragments were inserted into vector pCR2.1 using T/A cloning kit, and transformed into *E. coli* TOP10F competent cells. Those white colonies were selected to construct the suppression subtractive library. **Results** *Alu* chosen from three restriction endonucleases was verified to be suitable for preparing restriction fragments from *S. mutans* genomic DNA. Through electrophoresis of *Alu*-digested DNA, a smear ranged from 0.1 to 2.0 kb was observed. The ligation efficiency of tester DNA with adaptor was at least higher than 25 percent. The subtraction efficiency of suppression subtractive hybridization confirmed the success in enrichment of differential genes between virulent and avirulent strain of *S. mutans*. In the subtracted group, the appearance time of the 23S rRNA gene both in tester and driver DNA was later than that in the unsubtracted group by six cycles. It suggested that suppression subtractive hybridization happened indeed. After the subtracted fragments were cloned, 96 colonies were picked up for constructing the suppression subtractive library of virulence-related genes of *S. mutans*. **Conclusion** Suppression subtractive hybridization allows rapid and easy construction of virulence-related gene library of *S. mutans*.

[Key words] *Streptococcus mutans*; suppression subtractive hybridization; genomic DNA

随着微生物基因组序列的大量测定, 通过微生物

基因组之间的差异比较研究微生物的致病机制, 已成为新近微生物基因组研究的一大热点¹。龋病是影响人类健康的三大疾病之一, 变形链球菌是龋病的主要致病菌, 其中又以 c 血清型在人口腔内检出率最高。20 多年来, 许多学者研究了变形链球菌与粘

[收稿日期 2004-10-25; 修回日期 2005-05-10]

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (30271417); 北京市自然科学基金资助项目 (7042035)

[作者简介] 郭丽宏 (1972-), 女, 福建人, 副教授, 博士

[通讯作者] 郭丽宏, Tel: 010-62179977-2535

附^{2,3}、糖代谢产酸⁴及多糖储存⁵有关的基因,这些研究多从变形链球菌的各个毒力因子着手,进行变形链球菌致龋能力的探讨。而变形链球菌致龋是多种毒力因子综合作用的结果,因此从整体水平上进行变形链球菌的毒力研究就显得尤其重要。比较基因组学,作为后基因组学的重要研究方法,正是从整个基因组水平来筛选与致病和遗传分化相关的差异基因/差异DNA片段。鉴于此,本研究初次提出了构建变形链球菌高毒力株特异的基因文库这一设想。利用抑制消减杂交技术进行变形链球菌高、低毒力株之间基因组的比较,筛选高毒力株特异的差异基因/差异DNA片段,将差异基因/差异DNA片段与载体连接后,转化大肠杆菌,构建高毒力株特异的基因文库,将为研究高、低毒力株之间的致龋能力差异、阐述变形链球菌致龋的分子机制奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 c血清型变形链球菌的高、低毒力株 由同一高龋患者(龋失补牙数大于或等于10)口腔筛选出一对均为c血清型变形链球菌的高、低毒力株⁶,并进行基因组指纹分析⁷。

1.1.2 主要试剂及试剂盒 Wizard Genome DNA Purification Kit (Promega公司,美国),溶菌酶、RNase A、Alu、Rsa、Hae (Roche公司,美国), Proteinase K (Sigma公司,美国), PCR-Select Genome Subtraction Kit、Advantage cDNA Polymerase Mix、T4 DNA Ligase (Clontech公司,美国), Original TA Cloning Kit (Invitrogen公司,美国), X-Gal、IPTG (Promega公司,美国)。

1.1.3 接头及引物 接头1:5'-CTAATACGACTCAGTATAGGGCTCGAGCGGCCGCCGGGCA GGT-3',3'-GGCCGCTCCA-5';接头2R:5'-CTAATACGACTCACTATAGGCCAGCGTGGTCCGCGCCGAGGT-3',3'-GCCGGCTCCA-5';PCR引物1:5'-CTAATACGACTCACTATAGGGC-3';巢式引物1:5'-TCGAGCGGCCGCCGGGCA GGT-3';巢式引物2R:5'-AGCGTGGTCCGCGCCGAGGT-3';23S RNA正向引物:5'-CTACCTTAGGACCGTTATAGTTAC-3';23S RNA反向引物:5'-GAAGGAAGTGGCAAAATGGTGCC-3';pac-P(pac 2 606~3 829 bp)反向引物:5'-GGCCCTCGAGCTATTAACTACATAGTAAAAATCCTT-3'。根据变形链球菌 MT8148 菌株的 pac 基因序列²设计,经DNASIS、Oligo 5.0软件评价,由TaKaRa生命工程技术公司合成并经HPLC脱盐纯化定量。

1.2 方法

1.2.1 变形链球菌高、低毒力株基因组DNA制备 c血清型变形链球菌高、低毒力株分别增菌至100 ml,

加入5 g甘氨酸,空气摇床中摇45 min,离心、收集沉淀,用48 ml含0.45 mol/L蔗糖及50 mmol/L EDTA(pH 8.0)的缓冲液重悬,加入6 ml 10 g/L溶菌酶,37℃孵育1 h后,加入6 ml 1 g/L Proteinase K,继续孵育1 h,采用Wizard Genome DNA Purification Kit大量提取高、低毒力株的基因组DNA,-20℃贮存。通过0.7%琼脂糖凝胶电泳,检测所抽提的基因组DNA的完整性和纯度,并测OD_{260 nm}、OD_{280 nm}。用前将浓度调整为0.2 g/L。

1.2.2 基因组DNA经四碱基限制性内切酶酶切

采用以下体系由Alu、Rsa、Hae 3种识别四碱基序列的限制性内切酶中选择一种可产生0.1~2.0 kb酶切图谱的内切酶。10 μl酶切体系中含基因组DNA 0.2 μg,限制性内切酶(Alu/Rsa/Hae) 5 U,37℃孵育3 h,电泳检测3种酶的酶切效率,从中选择合适的四碱基限制性内切酶,使酶切图谱呈0.1~2.0 kb的Smear。酶切产物的制备与纯化。2 μg基因组DNA经20 U选定的限制性内切酶酶切16 h,加2.5 μl 0.2 mol/L EDTA终止反应。酚/氯仿抽提、纯化酶切产物,-20℃贮存。用前将浓度调整为300 μg/L。

1.2.3 接头连接 以高毒力株基因组的所有酶切产物为实验组tester DNA,以低毒力株基因组的所有酶切产物为实验组driver DNA。将实验组tester DNA平均分为两份,一份与接头1连接,命名为tester 1-1;另一份与接头2R连接,命名为tester 1-2;将tester 1-1与tester 1-2各取1.5 μl混匀,16℃孵育过夜,这样tester DNA两端分别连接有接头1及2R,命名为tester 1-c,作为tester 1-1、1-2的阴性对照,不进行消减杂交。

以E. coli基因组的酶切产物作为阳性对照。以E. coli基因组DNA/RsaI产物与X174/Hae产物的混合物作为阳性对照组的tester DNA(其中每5×10⁶ bp E. coli基因组中含1拷贝Hae消化的X174),以E. coli基因组DNA/RsaI产物作为阳性对照组的driver DNA。E. coli对照组按照上述方式也分为3组,分别为tester 2-1、2-2、2-c。tester 2-c作为tester 2-1、2-2的阴性对照。

1.2.4 连接效率的检测 对于E. coli对照组,采用23S RNA正、反向引物扩增E. coli 23S rRNA基因中的270 bp区域。此外还采用上述一对引物中的正向引物,结合PCR引物1扩增接头/酶切产物连接处。通过比较两种扩增产物的荧光强度从而检测连接效率。对于实验组,采用pac-P反向引物,结合PCR引物1扩增pac-P基因中的314 bp区域。

25 μl反应体系中含连接产物0.06 ng, dNTPs 5 nmol,引物20 pmol。72℃2 min补平末端,立即进

行 PCR 扩增,对照组的 PCR 循环参数为 94 30 s,23 个循环:94 10 s,65 30 s,68 1 min,最后 68 延伸 5 min;实验组的 PCR 循环参数为 94 30 s,27 个循环:94 10 s,62 30 s,68 1 min,最后 68 延伸 5 min。电泳检测连接效率。

1.2.5 消减杂交 第一轮消减杂交。设置杂交样本 1、2,分别加入接头 1-tester DNA 或接头 2R-tester DNA 1.0 μ l,Driver DNA 2.0 μ l,4 \times 杂交缓冲液 1.0 μ l,98 $^{\circ}$ C 变性 1.5 min,61 $^{\circ}$ C 杂交 1.5 h。第二轮消减杂交。1 μ l driver DNA 与 1 μ l 2 \times 杂交缓冲液混合后,98 $^{\circ}$ C 变性 1.5 min,随后将变性的 driver DNA 与杂交样本 1、2 管混匀,61 $^{\circ}$ C 杂交过夜,加入稀释缓冲液,使消减产物终浓度为 0.06 μ g/L,61 $^{\circ}$ C 7 min,-20 $^{\circ}$ C 贮存。

1.2.6 PCR 扩增 抑制 PCR。消减了的以及未消减的 DNA 各取 0.06 ng,72 $^{\circ}$ C 2 min 补平末端,采用 PCR 引物 1 进行 PCR 扩增,循环参数为 94 30 s,25 个循环:94 10 s,66 30 s,72 1.5 min。以 PCR-Select Genome Subtraction Kit 提供的两端分别连接有接头 1 与 2R 的 X174/*Hae* 产物作为阳性对照。电泳检测 PCR 产物。巢式 PCR。将抑制 PCR 产物 1:40 稀释后作为模板,采用巢式引物 1 和 2R 进行扩增。循环参数为 94 30 s,15 个循环:94 10 s,68 30 s,72 1.5 min。电泳检测 PCR 产物。

1.2.7 消减效率的检测 采用 PCR 法检测 23S rRNA 基因在消减前与消减后的丰度。23S rRNA 基因在 *E. coli* 及变形链球菌中保守,同源性高,因此可采用 *E. coli* 23S rRNA 基因的一对引物扩增变形链球菌中的 23S rRNA 基因,但由于该基因中存在 *Alu*I 酶切位点,因而改用 23S rRNA 正向引物和 PCR 引物 1 扩增其中的一段区域。

将消减与未消减的实验组巢式 PCR 产物 10 倍稀释,并使两者的浓度一致,进行 PCR 扩增。94 $^{\circ}$ C 预变性 10 s,之后 18 个循环:94 10 s,60 30 s,68 2 min。取出 5 μ l,其余继续 PCR 扩增。分别在第 18、21、24、27 循环各取 5 μ l,于 2% 琼脂糖/EtBr 凝胶中电泳。

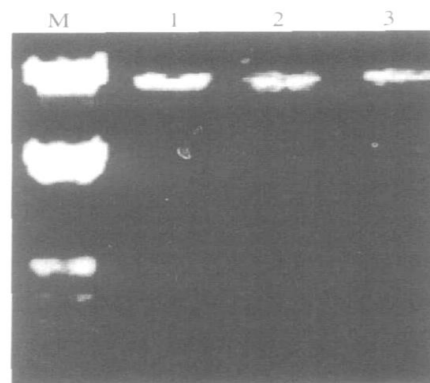
1.2.8 PCR 产物的克隆 消减的 PCR 产物与 50 ng pCR2.1 载体 14 $^{\circ}$ C 连接 20 h,取 2 μ l 连接产物转化 50 μ l 新鲜制备的 *E. coli* TOP10F 感受态细胞,进行蓝白筛选。

2 结果

2.1 大量抽提的变形链球菌基因组 DNA

图 1 为大量抽提的变形链球菌高、低毒力株基因组 DNA,可见相对大分子质量的单一条带,无拖尾,

无降解,加样孔内未见荧光,无蛋白质污染,同时也无 RNA 污染。可从 100 ml 菌培养物中获得 0.6 mg 左右的变形链球菌基因组 DNA, $OD_{260\text{ nm}}/OD_{280\text{ nm}}$ 为 1.8 ~ 1.9。



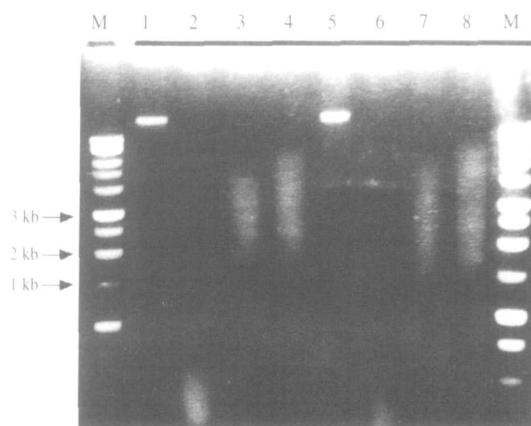
M: DNA/*Eco*R + *Hind* III DNA Marker; 1: 变形链球菌 ATCC 25175; 2: 变形链球菌高毒力株; 3: 变形链球菌低毒力株

图 1 变形链球菌高、低毒力株基因组 DNA 电泳分析

Fig 1 Electrophoresis of genomic DNA of *S. mutans* virulent and avirulent strains

2.2 变形链球菌高、低毒力株基因组 DNA 的酶切

2.2.1 识别四碱基序列的限制性内切酶的选择 用 *Alu*、*Rsa*、*Hae* 分别酶切变形链球菌高、低毒力株基因组,得到不同的酶切图谱,见图 2。*Alu* 酶切产生的片段位于 0.1 ~ 2.0 kb,而 *Rsa*、*Hae* 酶切后则有大于 3 kb 的条带存在。另外从图中也可以看出高、低毒力株基因组 DNA 经 *Alu* 酶切后产生的酶切图谱存在差异。因此选用 *Alu* 酶切变形链球菌高、低毒力株基因组 DNA,用于制备具有代表性的酶切产物。



M: 1 kb DNA ladder; 1: 高毒力株的基因组 DNA; 2: 高毒力株基因组 DNA 的 *Alu* 酶切; 3: 高毒力株基因组 DNA 的 *Rsa* 酶切; 4: 高毒力株基因组 DNA 的 *Hae* 酶切; 5: 低毒力株的基因组 DNA; 6: 低毒力株基因组 DNA 的 *Alu*I 酶切; 7: 低毒力株基因组 DNA 的 *Rsa*I 酶切; 8: 低毒力株基因组 DNA 的 *Hae* 酶切

图 2 变形链球菌基因组 DNA 经四碱基限制性内切酶酶切

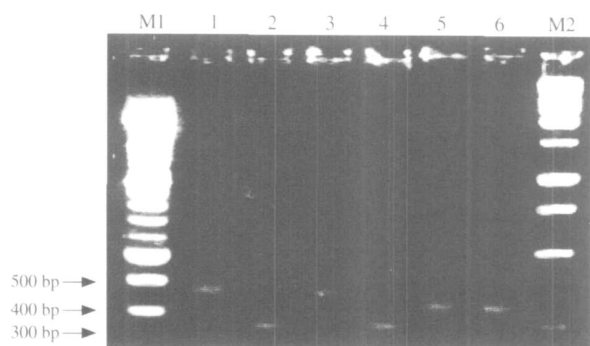
Fig 2 Restriction enzyme digestion of *S. mutans* genomic DNA with

three appropriate four-base-cutting restriction endonucleases

2.2.2 酶切产物的检测 于 *Alu* 酶切的第13、15、16 h 分别取酶切产物电泳,发现酶切产物的相对分子质量的大小不随时间改变而改变,也不存在大于2 kb 的条带。

2.3 连接效率

将变形链球菌高、低毒力株基因组以及对照 *E. coli* 基因组的酶切产物分别与接头1、2R 连接,检测连接效率,结果见图3。可见分别连接了接头1、2R 的 *E. coli* tester 2-1、2-2 采用23S rRNA 正、反向引物能扩增出270 bp 的单一一条带,以23S rRNA 正向引物和PCR 引物1 扩增出374 bp 的单一一条带,并且这4 条带的荧光强度基本一致,未相差4 倍以上,说明连接效率至少大于25 %。而以变形链球菌的 *pac-P* 基因的反向引物和PCR 引物1 扩增连接产物 tester 1-1、1-2, 扩增出314 bp 的单一一条带。这些结果显示接头与 tester DNA 的连接效率较高,能满足抑制消减杂交的要求。



M1:100 bp DNA ladder; M2:1 kb DNA ladder; 1:23S rRNA Forward 和 PCR Primer 1 一对引物,以 tester 2-1 (Adaptor 1 连接) 为模板; 2:23S rRNA Forward 和 Reverse 一对引物, tester 2-1 (Adaptor 1 连接) 为模板; 3:23S rRNA Forward 和 PCR Primer 1 一对引物,以 tester 2-2 (Adaptor 2R 连接) 为模板; 4:23S rRNA Forward 和 Reverse 一对引物, tester 2-2 (Adaptor 2R 连接) 为模板; 5:*pac-P* 基因的反向引物和 PCR Primer 1 一对引物,以 tester 1-1 (Adaptor 1 连接) 为模板; 6:*pac-P* 基因的反向引物和 PCR Primer 1 一对引物,以 tester 1-2 (Adaptor 2R 连接) 为模板

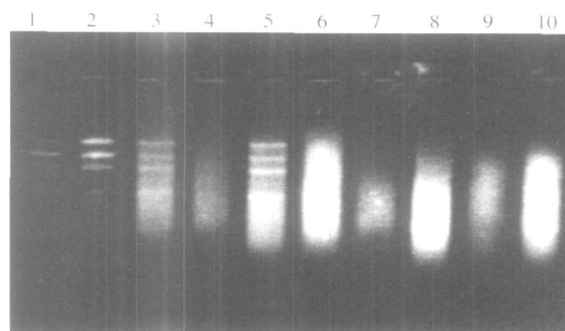
图3 *Alu* I 酶切产物——Adaptor 连接效率的检测

Fig 3 The ligation efficiency analysis

2.4 变形链球菌高、低毒力株之间的抑制消减杂交

连接产物与变性的 driver DNA 通过两轮消减杂交、抑制 PCR 及巢式 PCR 之后得到的消减 PCR 产物经2 % 琼脂糖/EtBr 凝胶电泳,结果见图4,可见 *E. coli* 消减 PCR 产物的条带方式同于阳性对照,表明 *E. coli* tester 与 driver 之间的差异 DNA,即 X174/*Hae* 产物已被筛选出来,且经过巢式 PCR 之后条带更为清晰,而未消减的 PCR 产物呈0.2 ~ 2.0 kb 的 Smear,其带形完全不同于消减后的 PCR 产物。由于 X174/*Hae* 产物是以低拷贝的形式存在于 *E. coli* tester DNA 中,每 5×10^6 bp *E. coli* 基因组中仅含1 拷

贝的 *Hae* 消化的 X174 DNA,因而最终的抑制消减成功也表明该方法可用于低拷贝差异基因/差异 DNA 片段的筛选。变形链球菌高、低毒力株之间的消减 PCR 产物的电泳图谱带型明显不同于未消减的 PCR 产物。



1:阳性对照 (X174/*Hae* 产物) 的第一轮 PCR; 2:阳性对照的第二轮 PCR; 3:*E. coli* 对照组已消减的第一轮 PCR; 4:*E. coli* 对照组未经消减的第一轮 PCR; 5:*E. coli* 对照组已消减的第二轮 PCR; 6:*E. coli* 对照组未经消减的第二轮 PCR; 7:实验组已消减的第一轮 PCR; 8:实验组已消减的第二轮 PCR; 9:实验组未经消减的第一轮 PCR; 10:实验组未经消减的第二轮 PCR

图4 变形链球菌高、低毒力株之间抑制消减杂交结果

Fig 4 Subtractive PCR amplification before and after suppression subtractive hybridization between virulent and avirulent strains of *S. mutans*

2.5 消减效率

消减效率的检测结果显示23S rRNA 基因区段的条带在消减组中出现时间较未消减组晚6 个循环。说明同时存在于 tester 与 driver 中的23S rRNA 基因经过抑制消减杂交后被去除,的确发生了抑制消减,实验是成功的,获得的消减 PCR 产物中含有高毒力株特异的基因/DNA 片段。

2.6 抑制消减文库

随机挑取96 个白色或白色菌落中央有蓝色的菌落,建成变形链球菌高毒力株特异的基因文库。

3 讨论

3.1 抑制消减杂交技术的原理

抑制消减杂交是建立在抑制 PCR 与消减杂交技术基础上的更简单、更快速的分离差异基因的方法⁸。消减杂交运用了杂交二级动力学原理,即丰度高的单链 DNA 在退火时产生同源杂交的速度快于丰度低的单链 DNA,从而使原来在丰度上有差别的单链 DNA 的相对含量达到基本一致,此时消减富集并均一化了特异的差异片段。而抑制 PCR 则是利用链内退火优于链间退火的特点,使非目的序列片段两端反向重复序列在退火时产生类似发卡的互补结构,无法作为模板与引物配对,从而选择性地抑制了非目的基因片段的扩增,高效率的动力学富集了差异片段。

3.2 抑制消减杂交技术的优、缺点

过去,人们对差异基因的分离、构建基因文库主要依赖于差异显示技术⁹和代表性差异分析技术¹⁰,但它们都存在以下缺点:敏感性低,低丰度的mRNA一般不易被检出;假阳性率高,可高达70%,因而结果的可信性差,给研究工作带来了极大的障碍。抑制消减杂交技术最大的优点是假阳性率低,并且采用了均一化和富集目的基因片段的方法,使高丰度和低丰度的基因达到均衡,有利于筛选低拷贝基因。该方法仅需两轮杂交和两轮PCR扩增,能快速得到差异表达基因,是一种简单而有效的基因克隆方法,并且结果的复杂程度低,对研究基因的表达及新基因的发现均有重要的应用前景。该技术的关键是酶切后DNA与接头的连接效率,如果连接效率不高,则难以发现某些有差异的基因,这也是该技术的缺点。另外,该技术的最大障碍是所需的基因组DNA量较大,一般需几微克,不适于来源困难的样本。此外酶切位点较少的基因组无法用抑制消减杂交技术筛选。尽管抑制消减杂交存在一些不足,但作为一种克隆基因的新技术,为功能基因组学研究提供了新的手段,进一步把基因克隆的研究推向基因功能的研究¹¹。

3.3 对抑制消减杂交技术的改进措施

根据变形链球菌基因组序列的特异性,对实验操作包括抑制消减杂交技术作了如下的改进。基因组序列的特异性决定了四碱基内切酶的选择。用3种四碱基内切酶(*Alu*、*Rsa*、*Hae*)酶切消化变形链球菌基因组,结果显示*Alu*效果最佳,而*Rsa*、*Hae*酶切有大于3 kb片段存在;基因组酶切片段与接头连接的有效性直接影响消减文库的质量,因此在进行消减杂交前必须先行连接效率的检测。对对照组酶切产物/接头连接处进行扩增,发现四条带亮度基本一致,提示对照组连接效率较高,但这并不能说明实验组的连接效率也高,因此选用变形链球菌特异的pac-P基因为靶序列,自行设计引物进行扩增检查。由于pac-P基因序列中有*Alu*酶切位点(位于2 706、2 823、2 993、3 088、3 182、3 191、3 553 bp处),只能选用pac-P基因反向引物和PCR引物1进行扩增。结果显示见接头1-tester DNA和接头2R-tester DNA扩增出的314 bp条带亮度基本一致,综合对照组的连接效率,证实实验组的连接是有效的;

由于变形链球菌G+C含量在36%~38%¹²,较平均值(40%~51%)低,所以在实验中将消减杂交温度由63℃降为61℃,有利于降低仅轻度不同的同源序列的检出。

[参考文献]

- Vitreschak AG, Lyubetskaya EV, Shirshin MA, et al. Attenuation regulation of amino acid biosynthetic operons in proteobacteria: Comparative genomics analysis J. FEMS Microbiol Lett, 2004, 234(2): 357-370.
- Okahashi N, Sasakawa C, Yoshikawa M, et al. Molecular characterization of a surface protein antigen gene from serotype c *Streptococcus mutans*, implicated in dental caries J. Mol Microbiol, 1989, 3(5): 673-678.
- 黄定明, 罗宗莲, 周学东. 钙对变形链球菌 MT6R(血清型 c) 表面蛋白 P1 粘附的影响 J. 华西口腔医学杂志, 2000, 18(3): 163-164.
(Huang DM, Luo ZL, Zhong XD. Effect of calcium on adherence of *Streptococcus mutans* MT6R (serotype c) surface protein P1 J. West China J Stomatology, 2000, 18(3): 163-164.)
- Hillman JD, Duncan MJ, Stashenko KP. Cloning and expression of the gene encoding the fructose-1, 6-diphosphate-dependent L-(+)-lactate dehydrogenase of *Streptococcus mutans* J. Infect Immun, 1990, 58(5): 1290-1295.
- Yamashita Y, Bowen WH, Burne RA, et al. Role of the *Streptococcus mutans* gtf gene in caries induction in the specific-pathogen-free rat model J. Infect Immun, 1993, 61(9): 3811-3817.
- 郭丽宏, 史俊南, 朱 殊, 等. 同一口腔中 c 血清型变形链球菌高、低毒力株的筛选 J. 牙体牙髓牙周病学杂志, 2003, 13(10): 543-547.
(Guo LH, Shi JN, Zhu Z, et al. Isolation of high and low virulent strains of *Streptococcus mutans* of serotype c from the same oral cavity J. Chin J Conserv Dent, 2003, 13(10): 543-547.)
- 郭丽宏, 史俊南, 肖晓蓉, 等. 高龋者口腔中 c 血清型变形链球菌的基因组指纹分析 J. 牙体牙髓牙周病学杂志, 2003, 13(11): 609-613.
(Guo LH, Shi JN, Xiao XR, et al. Genomic fingerprint analysis of *Streptococcus mutans* serotype c from high-caries subject by arbitrarily primed polymerase chain reaction J. Chin J Conserv Dent, 2003, 13(11): 609-613.)
- Akopyants NS, Fradkov A, Diatchenko L, et al. PCR-based subtractive hybridization and differences in gene content among strains of *Helicobacter pylori* J. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95(22): 13108-13113.
- Liang P, Pardee AB. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction J. Science, 1992, 257(5072): 967-971.
- Lisitsyn N, Lisitsyn L, Wigler M. Cloning the differences between two complex genomes J. Science, 1993, 259(5097): 946-951.
- Sorsa LJ, Dufke S, Schubert S. Identification of novel virulence-associated loci in uropathogenic *Escherichia coli* by suppression subtractive hybridization J. FEMS Microbiol Lett, 2004, 230(2): 203-208.
- Ajdic D, McShan WM, McLaughlin RE, et al. Genome sequence of *Streptococcus mutans* UA159, a cariogenic dental pathogen J. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99(22): 14434-14439.

(本文编辑 汤亚玲)