

小沟聚合物探针实时检测变形链球菌和远缘链球菌

凌均棨,林家成,唐志英,陈 罕,高 燕

(中山大学光华口腔医学院 附属口腔医院,广东 广州 510055)

[摘要] 目的 寻求一种快速检测变形链球菌(*S. mutans*)和远缘链球菌(*S. sobrinus*)的方法,研究变形链球菌群在儿童猛性龋患者口中的分布。方法 设计并合成针对 *S. mutans* 和 *S. sobrinus* 葡糖基转移酶基因(*gff*)的特异性引物和小沟聚合物探针(MGB 探针),对 9 株变形链球菌群参考菌株直接提取 DNA 及扩增纯培养后提取 DNA 分别进行检测,比较二者检测结果的异同。采集 92 例猛性龋儿童菌斑样本,用 MGB 探针进行实时检测。结果 采用 MGB 探针可以特异性地鉴别 *S. mutans* 和 *S. sobrinus*,直接检测和扩增纯培养后的定性检测结果完全一致,前者荧光出现的时间略迟。92 例猛性龋患儿中 *S. mutans* 检出率为 96.7%,*S. sobrinus* 检出率为 32.6%,所有检出 *S. sobrinus* 的菌斑样本均可检出 *S. mutans*。结论 采用特异性 MGB 探针方法可以对菌斑中 *S. mutans* 和 *S. sobrinus* 进行实时检测,提高检测效率。

[关键词] 变形链球菌; 远缘链球菌; 小沟聚合物探针; 儿童猛性龋; 实时检测

[中图分类号] R 788⁺.1 **[文献标识码]** A

MGB Probes Detect Streptococcus Mutans and Streptococcus Sobrinus in Real Time LING Jun-qi, LIN Jia-cheng, TANG Zhi-ying, CHEN Han, GAO Yan. (Guanghua School of Stomatology, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510055, China)

[Abstract] **Objective** To detect and distinguish *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) and *Streptococcus sobrinus* (*S. sobrinus*) quickly in epidemiology and investigate the distribution of *S. mutans* in the oral of children with rampant caries. **Methods** Designed minor groove binder (MGB) probes according to the *gff* gene of *S. mutans* and *S. sobrinus*. Detected 9 reference strains of *Streptococcus mutans* group by MGB probes in real time and after cultivation. Evaluated the results of these two methods. 92 dental plaques from pre-school children with rampant caries were detected in real time with MGB probes. **Results** The primers could amplify the target sequences specificity and distinguished *S. mutans* and *S. sobrinus* from each other using MGB probes. Though the fluorescence occurred earlier in *S. mutans* than in *S. sobrinus*, they had the same results in nature. In 92 children with rampant caries, the detective ratio of *S. mutans* was 96.7% and that of *S. sobrinus* was 32.6%. All the samples which could detect *S. sobrinus* were positive for *S. mutans*. **Conclusion** The primers and probe designed from *gff* genes of *S. mutans* and *S. sobrinus* can amplify the target sequence and distinguish them from each other in real time.

[Key words] *Streptococcus mutans*; *Streptococcus sobrinus*; minor groove binder probes; rampant caries; real time detection

变形链球菌群与龋病发生关系密切,不同菌种的致龋能力不同。变形链球菌(*Streptococcus mutans*, *S. mutans*) (血清型为 c、e、f 型)和远缘链球菌(*Streptococcus sobrinus*, *S. sobrinus*) (血清型为 d、g、h 型)被认为是最主要的两种致病菌。本实验设计引物扩增 *S. mutans* 和 *S. sobrinus* 的葡糖基转移酶基因(*glucosyl-transferase*, *gff*),采用小沟聚合物(minor groove binder, MGB)探针对儿童猛性龋菌斑样本进行实时检测,寻求一种快速直接检测 *S. mutans* 和 *S. sobrinus* 的方法。

1 材料和方法

1.1 变形链球菌群国际参考菌株和猛性龋菌斑样本的获得

本实验所采用的菌株为:仓鼠链球菌(*Streptococcus cricetus*, *S. cricetus*) AHT 菌株;大鼠链球菌(*Streptococcus rattus*, *S. rattus*) BHT 菌株;*S. mutans* c 型 ATCC10449 和 TK18 菌株、e 型 LM7 菌株、f 型 OMZ175 菌株;*S. sobrinus* d 型 OMZ176 菌株、g 型 6715 和 OMZ65 菌株。菌株保存于 -20℃、体积分数为 30% 甘油培养基中。

选择广州市内 92 名猛性龋患儿(平均年龄为 6 岁)采集菌斑样本。要求被采样的儿童上前牙无缺

[收稿日期 2004-04-23; 修回日期 2004-07-21]

[作者简介]凌均棨(1953-),女,四川人,教授,博士

[通讯作者]凌均棨, Tel: 020-83860994

失、无脱落,无系统性疾病,采样前 2 周内未使用任何抗生素。用无菌探针取这些患儿乳磨牙唇颊面无龋区域的菌斑进行检测。猛性龋的诊断标准采用 WHO (1987 年)关于幼儿猛性龋定义的标准。菌斑采集遵照 WHO(1997 年)制定的《口腔健康调查的基本方法》标准执行。参考菌株样本分成 2 部分,样本 a 分离纯培养后提取 DNA 检测,样本 b 直接提取 DNA 检测;菌斑样本采样后 4 h 内直接提取 DNA 进行检测。

1.2 样本的接种和孵化

将样本 a 振荡均匀,置入含有 5 ml 硫代硫酸钠溶液的试管中稀释后,取 20 μ l 接种在消毒的 TYSCB 琼脂培养基中,37 $^{\circ}$ C 厌氧培养 48 h。在体视显微镜下挑取生长形态典型的菌落,革兰染色阳性,并在每个平板上随机挑取 20 个以上的菌落置入 BHI 液体培养基进行次代纯培养。在含参考菌株和分离培养菌斑样本的试管中提取菌液 1 ml,在分光光度计上测量其读数,加入三蒸水调整菌液浓度,使其读数约为 0.30。粗略估算该浓度下 1 ml 菌液约含菌量 10^7 个。取该浓度下菌液 500 μ l 加入 1.5 ml 消毒离心管中备用。

1.3 DNA 的提取和鉴定

采用酚-氯仿法提取 DNA。将备好的参考菌株和猛性龋菌斑样本 1 500 r/min 离心 10 min,去上清,加入 0.01 mol/L pH7.4 的 PBS 溶液冲洗,离心 10 min 去上清,离心管中加入裂解液 500 μ l,37 $^{\circ}$ C 置于水浴温箱中保温 1 h。加入 10 mg/ml 蛋白酶 K10 μ l 至终浓度为 100 μ g/ml。轻摇离心管至反应体系呈粘稠状,置于 56 $^{\circ}$ C 水浴恒温箱中过夜。冷却到室温加入等体积饱和酚溶液,上下震动使之混匀,反复振荡至水相和有机相混匀呈乳白色,12 000 r/min 离心 15 min,吸取上清转移至另一离心管。加入等体积酚氯仿-异戊醇(25:24:1),振荡混匀抽提 2 次。吸取上清液加入到 2 倍体积的冷乙醇中,5 000 r/min 振荡离心 10 min。去上层无水乙醇,室温下干燥,所得 DNA 溶解于 200 μ l TE 溶液。吸取 50 μ l DNA 溶液加入 450 μ l 三蒸水,紫外分光光度计测定波长为 260 nm 和 280 nm 时 DNA 含量与纯度,余下 DNA 溶液-20 $^{\circ}$ C 保存。

1.4 MCB 引物和探针的设计与合成

引物和探针的设计采用 Primer-Express 软件,由上海基康公司合成。*S. mutans* 目标序列为 *gff* 第 906 ~ 1 054 位。*S. sobrinus* 目标序列为 *gff* 第 1 196 ~ 1 428 位。引物和探针的分子量均为 20 bp。

S. mutans 引物 1:反义链 5'-CGAAGCGACATCTA-AGCAAG3';*S. mutans* 引物 2:正义链 5'-GAAGCT-TTTCACCATTAGAAGCT3';*S. mutans* MCB 探针:5-

FAM-AGCTGCTAGTAGTCAA-3' TAMRA;*S. sobrinus* 引物 1:反义链 5'-TGGTGAAAAGCGAAAAGCC-3';*S. sobrinus* 引物 2:正义链 5'-TGCACGACTGGATTGGAAT-3';*S. sobrinus* MCB 探针:5'-VIC-TACGATGATCACTTGCAA-3' TAMRA。

其中 *S. mutans* MCB 探针 5' 端标记 6-甲基荧光素(6-carboxyfluorescein, FAM),荧光下显示为红色,*S. sobrinus* 5' 端标记 2-脒基酮酸钠(vic-2-amidite, VIC),荧光下显示为绿色,2 种细菌的 3' 端标记淬灭基团 6-羧基四甲基诺丹酮(tetramethylrhodamine, TAMRA)。

1.5 MCB 探针荧光检测

使用 7700 型荧光 PCR 仪,反应体系为 50 μ l,具体组成如下:*S. mutans* 引物 1、2,*S. sobrinus* 引物 1、2 各 20 pmol, MCB 探针各 20 pmol, 10 \times Buffer 5 μ l, 25 mmol/L $MgCl_2$ 4 μ l, 2.5 mmol dNTP 4 μ l, 1 U/ μ l Taq 酶 2 μ l,细菌 DNA 模板 2 μ l,加纯水至 50 μ l,最后在反应体系上加 10 μ l 灭菌石蜡油。PCR 反应的温度条件:预变性 94 $^{\circ}$ C 3 min,变性 94 $^{\circ}$ C 30 s,退火 55 $^{\circ}$ C 50 s,延伸 72 $^{\circ}$ C 1 min,反应共进行 40 个循环,循环结束后于 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min 并于-4 $^{\circ}$ C 保存。

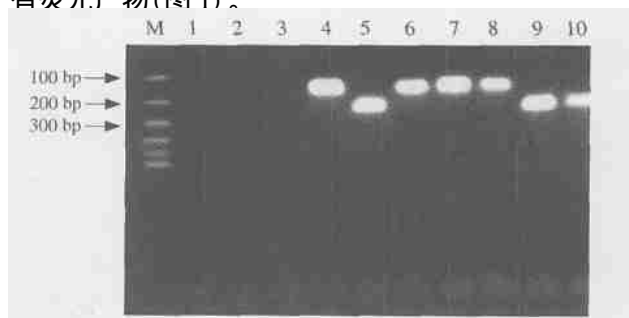
1.6 统计方法

参考菌株样本 a 和样本 b 检测出荧光的时间差异采用 *t* 检验,类错误的概率定为双侧 0.01。

2 结果

2.1 变形链球菌群参考菌株的检测

变形链球菌群参考菌株的普通 PCR 检测结果显示菌株 ATCC10449、TK18、LM7 和 OMZ175 可见有 150 bp 大小的扩增产物;菌株 OMZ176、6715、OMZ65 可见有 230 bp 大小的扩增产物;菌株 AHT、BHT 未见有荧光产物(图 1)。



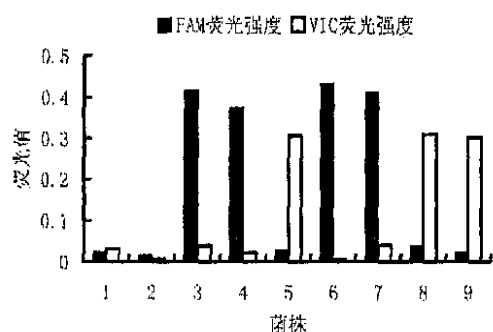
M: 100 bp DNA ladder; 1: 空白对照; 2: AHT; 3: BHT;
4: ATCC10449; 5: OMZ176; 6: LM7; 7: OMZ175;
8: TK18; 9: 6715; 10: OMZ65

图 1 9 株变形链球菌群参考菌株普通 PCR 结果

Fig 1 The result of the PCR with 9 strains of *Streptococcus mutans* group

参考菌株的荧光 PCR 检测结果显示菌株 ATCC10449、TK18、LM7 和 OMZ175 的 PCR 产物可见红

色荧光;菌株 OMZ176、6715、OMZ65 的 PCR 产物可见绿色荧光;菌株 AHT、BHT 未见有荧光产物(图 2)。



1: AHT; 2: BHT; 3: ATCC10449; 4: TK18;

5: OMZ176; 6: LM7; 7: OMZ175; 8: 6715; 9: OMZ65

图 2 9 株变形链球菌参考菌株荧光 PCR 结果

Fig 2 The results of the fluorescence PCR with 9 strains of *Streptococcus mutans* group

由图 2 可见 *S. mutans* 菌株 LM7、OMZ175、ATCC10449 和 TK18 的 FAM 荧光强度大于 0.05,检测结果阳性,其余菌株 FAM 荧光检测为阴性;*S. sobrinus* 菌株 OMZ65、OMZ176 和 6715 的 VIC 荧光检测阳性,其余菌株 VIC 荧光检测阴性。

样本 a 检测到荧光的时间为 (39.4 ± 2.6) min,样本 b 检测到荧光的时间为 (49.3 ± 1.7) min。经过培养扩增的样本达到可测出荧光的时间早于直接检测样本 ($P < 0.01$),但检测结果完全相同,培养扩增的样本可以检测到的 FAM 或 VIC 荧光标记,直接检测的样本最终也能检测到,表明采用荧光 PCR 的方法可以对菌斑样本实现实时检测。

2.2 猛性龋菌斑样本的检测

92 名猛性龋患儿的菌斑样本中,89 名儿童检出 *S. mutans*,检出率为 96.7%;30 名儿童检出 *S. sobrinus*,检出率为 32.6%。所有检出 *S. sobrinus* 的菌斑样本均可以检出 *S. mutans*。

3 讨论

变形链球菌群与龋病发生关系密切,不同的菌种致龋能力不同。按照血清学分类标准可以将其分成 a~h 8 个族,又可分成 *S. mutans*、*S. sobrinus*、*S. cricetus*、*S. rattus*、野鼠链球菌(*Streptococcus ferus*)。随着分子生物学技术的发展,DNA 杂交技术、限制性内切酶技术、限制性片段长度多态性、随机引物扩增聚合酶链反应等相继出现,对变形链球菌群的检测更为准确

迅速^{1~4}。近年来,随着人们对其基因序列的逐步了解,不少学者采用特异性引物直接进行 PCR 扩增的方法来检测变形链球菌群^{5,6}。该方法操作简单快捷,敏感性好,能用于已知基因序列多态性的检测。有学者设计引物扩增 *S. mutans* 和 *S. sobrinus* 的基因片段,并把扩增后的片段与细菌基因组杂交,特异性地鉴别两种细菌,并由此认为 *S. sobrinus* 的检出率远远高于目前文献的报道⁵。Tsuda 等⁶ 分别设计针对 *S. mutans* *gtfB* 基因和 *S. sobrinus* *gtfI* 基因的引物检测唾液中的这两种细菌,结果发现在 10 μ l 唾液里含有 10³ 个细菌时就可以检测出来。进一步的实验表明,将上述试验扩增出来的基因片段作为模板,并设计新的引物,可以将检测的敏感度在此基础上提高 10 倍。本实验利用特异性引物直接检测的原理扩增 *S. mutans* 和 *S. sobrinus* *gtf* 基因上的一段序列,并用 MGB 荧光探针进行实时检测,特异性地鉴别 *S. mutans* 和 *S. sobrinus*,提高了检测效率和灵敏度。该方法对菌斑的实时检测获得满意的结果,为变形链球菌群流行病学检测和分子生物学研究提供一种有效的工具。

[参考文献]

- 1] Schleifer KH, Kilpper R, Kraus J. Relatedness and classification of *Streptococcus mutans* and "mutans-like" streptococci J. J Dent Res, 1984, 63(8): 1047-1050.
- 2] Kulkarni GV, Chan KH, Sandham HJ. An investigation into the use of restriction endonuclease analysis for the study of transmission of *mutans streptococci* J. J Dent Res, 1989, 68(7): 1151-1161.
- 3] Jayarao BM, Dore JJ, Baumbach GA. Differentiation of *Streptococcus uberis* from *Streptococcus parauberis* by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis of 16S ribosomal DNA J. J Clin Microbiol, 1991, 29 (12): 2774-2778.
- 4] Li Y, Caufield PW. Arbitrarily primed polymerase chain reaction fingerprinting for the genotypic identification of *mutans streptococci* from humans oral J. Oral Microbiol Immunol, 1998, 13(1): 17-22.
- 5] Igarashi T, Yamamoto A, Goto N, et al. Sequence analysis of the *Streptococcus mutans* ingbritt *dexA* gene encoding extracellular dextranase J. Microbiol Immunol, 1995, 39(11): 853-860.
- 6] Tsuda H, Yamashita Y, Tomihisa K, et al. Role of serotype-specific polysaccharide in the resistance of *Streptococcus mutans* to phagocytosis by human polymorphonuclear leukocytes J. Infect Immunol, 2000, 68 (2): 644-650.

(本文编辑 王 晴)