

[文章编号] 1000-1182(2011)04-0355-03

口腔链球菌密度感应信号系统comE基因及luxS基因的检测分析

徐蓉蓉¹ 王斌² 葛久禹¹

(1.南京大学口腔医学院 口腔内科学教研室, 南京 210008;

2.南京大学生命科学院 分子进化实验室, 南京 210093)

[摘要] 目的 检测口腔链球菌密度感应系统中的2个重要基因comE以及luxS。方法 选取口腔链球菌临床分离株NH521为研究对象,提取基因组DNA,通过聚合酶链式反应进行电泳鉴定和DNA测序,并与GenBank数据库中相关序列进行比较分析。结果 电泳鉴定表明口腔链球菌NH521存在comE和LuxS基因。所测序列与GenBank相关序列比较分析表明:luxS、comE基因在口腔链球菌种内不同株系间的DNA序列一致度分别为95.0%和99.6%;对比口腔链球菌与变异链球菌, luxS和comE基因的DNA序列一致度分别为74.1%和12.7%。结论 口腔链球菌NH521中存在comE和luxS基因序列,并且luxS基因在种内不同株系间比comE基因积累了更多变异,而comE基因在不同链球菌物种间却更加分化。

[关键词] 口腔链球菌; 密度感应; comE基因; luxS基因

[中图分类号] R 780.2 **[文献标志码]** A **[doi]** 10.3969/j.issn.1000-1182.2011.04.005

Detection and analysis of comE and luxS genes in quorum sensing signal pathway from *Streptococcus oralis*
Xu Rongrong¹, Wang Bin², Ge Jiuyu¹. (1. Dept. of Oral Medicine, School of Dentistry, Nanjing University, Nanjing 210008, China; 2. Lab of Molecular Evolution, School of Life Sciences, Nanjing University, Nanjing 210093, China)

[Abstract] **Objective** To detect and analyze two important genes, comE and luxS, in quorum sensing signal pathway from *Streptococcus oralis* (*S.oralis*). **Methods** The total genomic DNA of *S.oralis* NH521(a clinically isolated strain) was firstly extracted. The comE and luxS genes were then amplified by polymerase chain reaction(PCR) and further sequenced. The obtained sequences were compared with related sequences in GenBank. **Results** Target bands of both comE and luxS genes were detected by electrophoresis. The obtained gene sequences were similar to the corresponding sequences from another *Soralis* strain(luxS, 95.0%; comE, 99.6%); however, comparing to gene sequences of another species *Streptococcus mutans*, comE was more divergent(12.7%) than luxS gene(74.1%). **Conclusion** This study successfully amplified and sequenced comE and luxS genes from *S.oralis* NH521 strain. The luxS gene accumulated more mutations than comE gene did between two *S.oralis* strains, but comE gene is more divergent than luxS gene between two *Streptococcus* species.

[Key words] *Streptococcus oralis*; quorum sensing; comE gene; luxS gene

龈上和龈下牙菌斑的形成是牙龈炎发生的重要因素,往往导致牙周疾病和龋坏^[1]。离散的口腔链球菌并不具备致病能力,但当它定植于牙面后往往快速繁殖,并通过密度感应系统(quorum sensing, QS)来激发诱导相关基因的表达,统一协调整个菌群的行为,使整群细菌能够表现出共同的生物学特性,如形成生物膜、表现出耐酸性、产生细菌毒素等,从而具备了离散细菌所不具备的致病能力^[1]。由此可见,

密度感应系统在口腔细菌的致病过程中发挥着重要的作用。在口腔链球菌中,种内的密度感应系统由CSP(competence stimulating peptide)信号肽与调控系统组成,至少包括6个基因(comA、B、C、D、E、X)^[2]。其中comE基因编码胞内反应调控蛋白,负责结合并调节下游目标基因的表达,以帮助链球菌适应牙菌斑内高密度的生存环境^[3]。不同链球菌种间的密度感应信号由另外一类信号分子——自诱导体2(autoinducer-2, AI-2)来传导。此信号分子的合成途径已经基本确定,其中标志性的酶称为luxS蛋白酶,是luxS基因的编码产物。luxS蛋白酶参与合成的AI-2同样可调控不同口腔细菌的生理功能和毒力,

[收稿日期] 2010-10-23; [修回日期] 2011-02-10

[作者简介] 徐蓉蓉(1978—),女,江苏人,住院医师,硕士

[通讯作者] 葛久禹, Tel: 025-83620227

以适应周围环境的变化^[4-5]。

本实验将检测口腔链球菌临床分离株系NH521中是否存在相关密度感应基因 $comE$ 及 $luxS$ ，并将其基因序列与GenBank数据库中的相关序列进行比较，为研究密度感应系统的相关基因在不同口腔链球菌种内及种间的分化模式和作用机制奠定基础。

1 材料和方法

1.1 主要仪器和试剂

基因扩增仪(Biometra公司, 德国), 凝胶电泳仪(上海天能科技有限公司), 凝胶成像分析系统(UVP公司, 美国), 离心机(Sigma公司, 德国); 细菌基因组提取试剂盒(杭州爱思进生物技术有限公司), 引物合成、基因测序(南京金斯瑞生物科技有限公司), Taq 酶及其他聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)相关试剂(大连宝生物工程有限公司), PCR产物纯化试剂盒(上海捷倍思基因技术有限公司)。

1.2 细菌分离和培养

口腔链球菌(*Streptococcus oralis*)临床分离株NH521由上海交通大学医学院微生物教研室从牙周病患者口腔菌斑中分离鉴定后提供。采用连续的厌氧菌培养技术, 将复苏48 h经鉴定为纯培养的口腔链球菌接种于TSB液体培养基, 37℃厌氧培养18 h。

1.3 细菌DNA的提取

取3 mL培养菌液, 按照细菌基因组提取试剂盒相关步骤进行。所提基因组DNA经过凝胶电泳检测, 证实可用并调节至合适的质量浓度($20\text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$)。

1.4 引物设计

根据GenBank数据库中口腔链球菌ATCC35037株系的 $comE$ 及 $luxS$ 基因序列, 利用Oligo 6软件设计引物。其中 $comE$ 基因的上游引物为: 5'-GAAAATG-ATGAAGTAAACCAG-3', 下游引物为: 5'-GAAC-TTTCAAACGGGTAATCG-3'。 $luxS$ 基因的上游引物为: 5'-TTTTGAACCTTGACCACACCA-3', 下游引物为: 5'-GCATCATCTGAAATTCCTTG-3'。

1.5 PCR反应

反应体系为50 μL , 其中超纯水32.5 μL , MgCl_2 4 μL , dNTP 4 μL , 10倍缓冲液5 μL , 上游、下游引物($10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)各1 μL , Taq 酶0.5 μL , 细菌基因组DNA 2 μL 。反应程序为: 预变性94℃ 4 min, 变性94℃ 30 s, 退火52℃ 30 s, 延伸72℃ 60 s, 反应进行35个循环后, 72℃延伸10 min。

1.6 基因检测及测序

PCR产物经琼脂糖凝胶电泳鉴定其片段大小, 所采用的DNA分子标记为DNA2000 plus(北京全式金生物技术有限公司)。纯化后的产物DNA由南京金斯瑞

生物科技有限公司测序。

1.7 基因序列比较分析

将从口腔链球菌NH521株系中分离得到的 $comE$ 及 $luxS$ 基因序列分别与GenBank数据库中的口腔链球菌ATCC35037株系和变异链球菌UA159株系中的 $comE$ 及 $luxS$ 基因序列进行Blast比对, 分析这2个基因序列在链球菌种内和种间的差异程度。

2 结果

2.1 PCR产物电泳

PCR产物经琼脂糖凝胶电泳测定片段大小, 如图1所示。根据 $comE$ 基因设计的引物预期扩增出一条约570 bp的条带, 而用 $luxS$ 基因引物预期扩增出一条约435 bp的条带。这2个条带中, $comE$ 略大于500 bp标记条带, $luxS$ 略小于500 bp标记条带, 大小均符合预期, 表明口腔链球菌NH521存在 $comE$ 和 $luxS$ 基因。

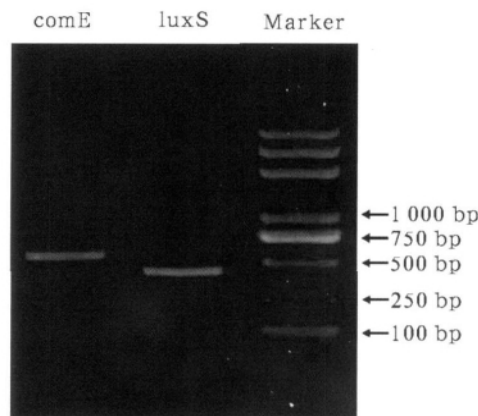


图1 口腔链球菌相关密度感应基因的PCR电泳图谱

Fig 1 Electrophoregram results for PCR products of quorum sensing genes amplified from *Streptococcus oralis*

2.2 基因序列测定及比较

将所测定的序列与GenBank数据库中的口腔链球菌ATCC35037株系以及变异链球菌UA159株系中的 $comE$ 及 $luxS$ 基因序列进行比对, 结果见表1。

表1 $comE$ 及 $luxS$ 基因在链球菌种内和种间的序列一致性比较

Tab 1 Comparison of sequence identity within species and between species for $comE$ and $luxS$ genes

基因	种内基因序列一致性(口腔链球菌NH521:ATCC35037)	种间基因序列一致性(口腔链球菌:变异链球菌)
luxS	DNA序列 95.0%	DNA序列 74.1%
	氨基酸序列 100%	氨基酸序列 84.5%
comE	DNA序列 99.6%	DNA序列 12.7%
	氨基酸序列 100%	氨基酸序列 38.4%

luxS、comE基因在口腔链球菌种内不同株系间的DNA序列一致度分别为95.0%和99.6%，其氨基酸序列均未发生改变；但对比口腔链球菌与变异链球菌，luxS基因只有74.1%的DNA序列一致度和84.5%的氨基酸序列一致度，comE基因的DNA序列一致度和氨基酸序列一致度则分别为12.7%和38.4%。

3 讨论

牙菌斑是由多种不同种属细菌相互之间以及和宿主之间长期相互作用形成的有机聚生体，是牙周病及龋病的主要病因之一^[1]。细菌种内和种间的密度感应系统可以调控菌斑内不同致病菌和有益菌的生长竞争、代谢物转化、毒力因子的表达积累等生物学行为，从而决定整个菌群的生存发展方向与致病能力^[6-7]。另外，血链球菌、口腔链球菌等可以产生过氧化氢，被认为是重要的牙周有益菌^[8-10]，可能用作效应菌定植于口腔，对潜在的可疑致病菌起到有效的拮抗作用。因此，了解口腔链球菌相关密度感应基因的存在和分化程度将有助于牙周病的生物防治。

本实验根据GenBank数据库中的相关comE及luxS基因序列设计引物，提取口腔链球菌临床分离株系NH521的基因组DNA，通过PCR反应以及基因测序，直接检测到实验菌株中与密度感应直接相关的comE基因和luxS基因的存在。通过与GenBank中口腔链球菌ATCC35037株系的相关基因序列比较发现：分离得到的新株系NH521在密度感应相关基因comE和luxS的序列上都非常保守。其中氨基酸序列未发生改变，意味着功能上的一致性。在DNA序列上，luxS基因在2个口腔链球菌株系间呈现出的不同碱基数，约占整个基因片段长度的5%；而comE基因在NH521和ATCC35037株系间的不同碱基数，只占整个片段长度的0.4%。这表明luxS基因在链球菌种内更加容易积累变异。将口腔链球菌与变异链球菌的comE及luxS基因序列进行比较后发现：luxS基因在2个物种间还保持了一定的相似性，其中DNA序列的一致度为74.1%，而氨基酸序列的一致度为84.5%。这说明2种链球菌在合成种间密度感应信号分子AI-2的关键酶(luxS蛋白酶)上仍然比较保守。与此大为不同的是，comE基因在2个物种间的序列一致度很低，其中DNA序列一致度仅为12.7%，而氨基酸序列的一致度也不到40%。这说明用于传递各自种内密度感应信号CSP的comE基因产物(胞内反应调控蛋白)已经在不同链球菌物

种间发生了很高程度的分化，并且luxS基因在种内不同株系间比comE基因积累了更多变异，而comE基因在不同链球菌物种间却更加分化。由于comE基因编码的胞内反应调控蛋白负责结合并调控许多下游基因的表达，不同链球菌物种间comE基因序列的巨大差异暗示了在不同种间被调控的下游基因在组成和表达上都可能存在较大的差异，从而表现出生理、生化以及功能上的差异。

本研究在一定程度上揭示了口腔链球菌密度感应系统的相关基因在种内和种间的分化程度差异，为研究菌群中相关口腔细菌的分化模式和作用机制奠定了基础，今后将进一步研究这2种密度感应基因的功能。

[参考文献]

- [1] 周学东. 实用口腔微生物学与技术[M]. 北京：人民卫生出版社，2009 257-258.
Zhou Xuedong. Applied oral microbiology and technique[M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2009 257-258.
- [2] Suntharalingam P, Cvitkovitch DG. Quorum sensing in streptococcal biofilm formation[J]. Trends Microbiol, 2005, 13(1) 3-6.
- [3] Petersen FC, Pecharki D, Scheie AA. Biofilm mode of growth of *Streptococcus intermedius* favored by a competence-stimulating signaling peptide[J]. J Bacteriol, 2004, 186(18) 6327-6331.
- [4] Bassler BL, Wright M, Showalter RE, et al. Intercellular signalling in *Vibrio harveyi*: Sequence and function of genes regulating expression of luminescence[J]. Mol Microbiol, 1993, 9(4) 773-786.
- [5] Bassler BL, Wright M, Silverman MR. Multiple signalling systems controlling expression of luminescence in *Vibrio harveyi*: Sequence and function of genes encoding a second sensory pathway[J]. Mol Microbiol, 1994, 13(2) 273-286.
- [6] Ohtani K, Hayashi H, Shimizu T. The luxS gene is involved in cell-cell signalling for toxin production in *Clostridium perfringens* [J]. Mol Microbiol, 2002, 44(1) 171-179.
- [7] Mah TF, Pitts B, Pellock B, et al. A genetic basis for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm antibiotic resistance[J]. Nature, 2003, 426 (6964) 306-310.
- [8] Roberts FA, Darveau RP. Beneficial bacteria of the periodontium [J]. Periodontol 2000, 2002, 30 40-50.
- [9] Hillman JD, Shivers M. Interaction between wild-type, mutant and revertant forms of the bacterium *Streptococcus sanguis* and the bacterium *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in vitro and in the gnotobiotic rat[J]. Arch Oral Biol, 1988, 33(6) 395-401.
- [10] García-Mendoza A, Liébana J, Castillo AM, et al. Evaluation of the capacity of oral streptococci to produce hydrogen peroxide[J]. J Med Microbiol, 1993, 39(6) 434-439.

(本文编辑 李彩)