

[文章编号] 1000-1182(2010)05-0565-05

变链素的纯化

杨柳¹ 许晓芳¹ 杨佰霞² 柳雯¹ 李颂¹

(1.安徽医科大学口腔医学院 口腔内科教研室; 2.安徽医科大学第一附属医院 检验科, 安徽 合肥 230032)

[摘要] 目的 从变异链球菌临床株中分离纯化变链素,为进一步从分子水平研究变链素奠定基础。方法 通过抑菌活性检测,从变异链球菌临床株中选择出抑菌活性较强的菌株。用氯仿抽提法从该菌株培养液中粗提变链素,经固相萃取和反相高效液相色谱(RP-HPLC)对粗提物进行纯化。结果 获得变链素活性较强的菌株1G。从其200 mL液体培养基中粗提出变链素约15 μ g,经固相萃取柱洗脱,再经过RP-HPLC的2次纯化,得到有抑菌活性的成分,此为纯化的变链素。结论 变链素相对分子质量小,分离提纯步骤复杂,本实验得到纯化的变链素,为下一步研究变链素的氨基酸序列和基因序列奠定了基础。

[关键词] 变异链球菌; 变链素; 反相高效液相色谱

[中图分类号] R 781.1 **[文献标志码]** A **[doi]** 10.3969/j.issn.1000-1182.2010.05.028

Purification of mutacin YANG Liu¹, XU Xiao-fang¹, YANG Bai-xia², LIU Wen¹, LI Song¹. (1. Dept. of Endodontics, College of Stomatology, Anhui Medical University, Hefei 230032, China; 2. Dept. of Clinical Laboratory, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230032, China)

[Abstract] **Objective** To purify mutacin produced from isolated *Streptococcus mutans* (*S.mutans*) strains in order to, contribute to molecular biological research of mutacin. **Methods** The antibacterial activity of 80 isolated strains was tested by the stab culture technique against *Streptococcus oralis* ATCC 10557. The mutacin produced by strain 1G, was initially purified by solid-phase extraction(SPE) after crude extraction by chloroform. And then the active substances were purified by twice reversed-phase high performance liquid chromatography(RP-HPLC). The purified target peptide(mutacin) was collected and freeze-dried for further study. **Results** The greatest active strain of these *S.mutans* isolates, the strain 1G was obtained. Roughly 15 μ g crude mutacin was extracted from 200 mL liquid medium of this strain 1G. The purified mutacin through SPE and twice RP-HPLC was obtained. **Conclusion** It was much complex to separate and purify mutacin due to its small molecular mass, and extracting and purifying of mutacin may make an important contribution to the further research of mutacin.

[Key words] *Streptococcus mutans*; mutacin; reversed-phase high performance liquid chromatography

变异链球菌(*Streptococcus mutans*, *S.mutans*)是已知的人类口腔主要致龋菌^[1],它所产生的细菌素叫变链素(mutacin)^[2],变链素对与其密切相关的菌种和其他革兰阳性细菌具有抑制活性,变链素还具有最低抑菌浓度和抑制耐药菌株的特性,这些生物学特性都可能使变链素成为某些耐药抗生素的替换剂,逐渐走向治疗用途^[3]。

自1975年日本大阪大学牙科学院的Hamada等^[2]把变异链球菌产生的细菌素样抑菌物质(bacteriocin-

like inhibitory substances, BLIS)定义为变链素之后,不断有新的变链素被发现。Caufield研究小组在1999至2001年间相继分离纯化变链素、^[4-6]Novák等^[7]于1994年提取出变链素。其他研究者也已经分离纯化了几种变链素,如变链素N、M46、M19、H7^[8-9],变链素B-Ny266^[3],变链素1140^[10],2005年Hale等^[11]从变异链球菌菌株UA159提纯出变链素,2006年Nicolas等^[12]发现H-29B与变链素类似,2007年Robson等^[13]分离出变链素K8,目前这些变链素都已进入蛋白质结构分析和基因分析阶段。

但是由于变链素相对分子质量小,天然产量低,直接从细菌体内提取天然多肽物质时,分离提纯存在一定困难,而且步骤复杂,在一定程度上阻碍了国内外学者们对新变链素的发现和研究。本实

[收稿日期] 2009-06-22; [修回日期] 2009-10-20

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(30640074);安徽省教育厅重点基金资助项目(KJ2007A027);安徽医科大学博士基金资助项目(2004)

[作者简介] 杨柳(1982—),女,河南人,硕士

[通讯作者] 李颂, Tel: 15155113796

旨在探索和掌握变链素的分离纯化方法,为进一步从分子水平研究变链素奠定基础。

1 材料和方法

1.1 实验菌株

前期研究中得到的80株*S.mutans*临床菌株,并经过抑菌活性检测,详见参考文献[14],选择出抑菌活性最强的菌株1G(抑菌环平均直径为20 mm)。指示菌株:口腔链球菌(*Streptococcus oralis*, *S.oralis*) ATCC 10557。

1.2 主要试剂

胰蛋白胨-多价蛋白胨-酵母提取物(tryptone polypepton yeast-extract, TPY)液体培养基。孔径0.22 μm一次性滤器(Millipore公司,美国)。色谱分析柱tc-C18(Agilent tc-C18, 4.6 mm×150 mm, Agilent公司,美国)。

1.3 主要仪器

Sep-Pak[®]固相萃取柱(Waters公司,美国),厌氧培养箱(浙江义乌冷冻机总厂),超净台(苏州佳宝净化工程设备有限公司),冷冻干燥机(FTS公司,美国),高效液相色谱仪(Agilent公司,美国)。

1.4 变链素的粗提^[2]

TPY培养基中的微量元素调整^[5,12]为:每1 L水中七水硫酸亚铁($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)0.005 g,磷酸氢二钾(K_2HPO_4)0.2 g,磷酸二氢钾(KH_2PO_4)1 g,七水硫酸镁($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)0.7 g,硫酸锰(MnSO_4)0.005 g,酵母提取物20 g,干酪乳清蛋白60 g,碳酸钙(CaCO_3)10 g。

复苏已筛选的临床株1G,接种于TPY固体培养基,厌氧条件下培养48 h,挑单菌落接种于10 mL的调整配方后的TPY液体培养基中,厌氧培养16~24 h,再转种于200 mL的调整配方后的TPY液体培养基中继续增菌48 h,将培养液8 000 r·min⁻¹离心20 min,取上清液,再经0.22 μm孔径的滤器过滤。将滤液与等量氯仿混合,4 000 r·min⁻¹离心10 min,收集水氯仿界面上的蛋白成份后,加等体积的双蒸水混匀,8 000 r·min⁻¹离心10 min,弃上清,得到有抑菌活性的沉淀即为变链素的粗提物^[15]。

1.5 变链素粗提物抑菌活性检测^[16]

将粗提物点样于含指示株(*S.oralis* ATCC 10557)的TPY琼脂皿上,过夜厌氧培养,观察抑菌环大小,相同条件重复实验6次,取平均值,观察其抑菌活性。

1.6 变链素粗提物的初步纯化

1.6.1 样品制备 将粗提物样品(约15 μg)与1 mL双蒸水充分混匀。

1.6.2 固相萃取柱的活化 先用1 mL甲醇冲洗固相萃取柱中的填料,再用1 mL双蒸水冲洗,最后再用1 mL的甲醇冲洗,上样前勿让填料中甲醇流干。

1.6.3 上样 将制备的样品加到柱床上,以1~5 mL·min⁻¹低流速通过填料。

1.6.4 冲洗 使用乙腈(5 mL)洗脱吸附在固相萃取柱上的样品至收集管中,每1 mL收集1管,共5管,将收集液冻干后,再分别重溶于0.1%三氟乙酸(trifluoroacetic acid, TFA)的100 μL中,并从各管中取5 μL检测活性,最后将有抑菌活性的样品管合并冻干,进行下一步实验^[12]。

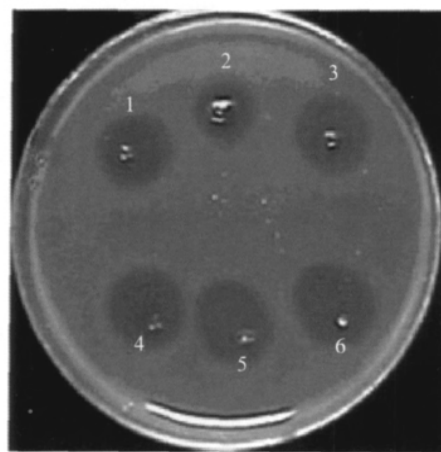
1.7 反相高效液相色谱(reversed-phase high performance liquid chromatography, RP-HPLC)纯化

将上述实验得到的抑菌活性的样品冻干重溶于体积分数约0.1%的TFA 100 μL中。选用Agilent的色谱分析柱tc-C18柱,流动相选用AB缓冲液,A(0.1% TFA),B(100%乙腈),流速1.0 mL·min⁻¹,紫外线检测波长220 nm,洗脱程序:A液平衡分析柱4 min,再A、B缓冲液线性梯度洗脱30 min,进样量为100 μL,柱温为室温。4 min后开始收集洗脱液(每1管收集1 mL,并记录每管的时间和流动相B的体积分数),冻干后测定所有洗脱液的抑菌活性,将有活性的物质合并,冻干,再次重溶于100 μL 0.1%的三氟乙酸中,以相同的洗脱条件进行第2次RP-HPLC纯化,收集洗脱液并检测活性,将有活性的部分收集并保存。

2 结果

2.1 变链素粗提结果

变异链球菌临床分离株1G的变链素粗提物点样后产生的抑菌环直径平均值约为8 mm(图1)。



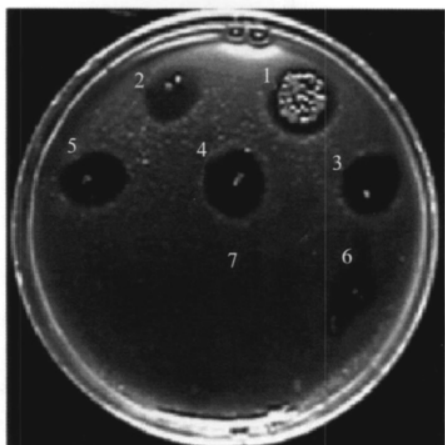
1-6: 变链素粗提物产生的抑菌环。

图1 菌株1G的变链素粗提物对指示株*S.oralis* ATCC 10557产生的抑菌环

Fig 1 Inhibition zone of mutacin crude extract (*S.mutans* strain 1G) on *S.oralis* ATCC 10557

2.2 变链素粗提物的初步纯化结果

粗提物经固相萃取柱处理后的洗脱液检测活性的结果见图2。由图2显示,收集的共5管洗脱液均含有抑菌物质,产生的抑菌环直径均在5 mm以上。另外0.1%的TFA的检测活性结果显示无抑菌环产生,提示0.1%TFA对菌株*S.oralis* ATCC 10557无抑制作用,对活性检测结果无影响。



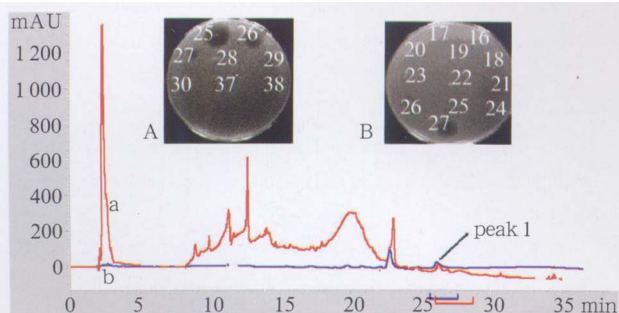
1: 菌株1G的变链素粗提物产生的抑菌环,直径为6 mm; 2~6: 收集的第1~5管洗脱液产生的抑菌环,直径均在5 mm以上; 7: 0.1% TFA活性检测结果,无抑菌环产生。

图2 菌株1G的变链素粗提物经固相萃取后的洗脱液活性检测结果

Fig 2 The antibacteria activity of elution from crude mutacin extract(*S.mutans* strain 1G) by solid phase extraction

2.3 第1次RP-HPLC纯化结果

收集的洗脱液第25~27管,对应的洗脱时间为26.4 min到28.3 min之间(图3的红色加粗部分),经检测对*S.oralis* ATCC 10557有较明显的抑菌活性(图3A),流动相B的体积分数为75.2%到81.3%。



a(红色曲线): 第1次纯化; b(蓝色曲线): 第2次纯化; peak 1: 活性峰; A: 第1次RP-HPLC纯化收集液的活性检测结果,即第25~27管产生抑菌环;其余管无。B: 第2次RP-HPLC纯化收集液的活性检测结果,即第26、27管产生抑菌环;其余管无。

图3 菌株1G的变链素粗提物的RP-HPLC纯化图

Fig 3 RP-HPLC profile of crude mutacin extract(*S.mutans* strain 1G)

2.4 第2次RP-HPLC分离纯化结果

收集的洗脱液第26和27管,对应的洗脱时间为25.8 min到27.5 min(图3的蓝色加粗部分),经检

测对*S.oralis* ATCC 10557有较明显的抑菌活性(图3B),流动相B的体积分数为73%到76.8%。2次RP-HPLC纯化的活性部分在色谱图上的位置有重叠的部分,即75.2%~76.8%之间,且在同样的位置有一明显的峰出现即“peak 1”。

3 讨论

变链素是变异链球菌产生的具有抗菌作用的多肽^[2],相对分子质量小,天然产量低,分离纯化步骤繁琐,不易通过生物技术提取,而人工合成多肽的技术成本昂贵^[17]。因此变链素的提取和纯化困难成为众多国内外研究者们研究和发现新变链素的最大阻碍。

有学者^[18-19]依据已知的变链素基因来寻找其氨基酸序列中具有活性的片段,并用来取代原多肽,该学者从变异链球菌菌株CH43中克隆出mutA基因片段,通过原核表达得到变链素的工程菌,为进一步大量制备纯化和研究其抑菌活性及抑菌作用机制奠定了基础。但是对于寻找未知序列的新型变链素来说,显然这种纯化方法是无法完成的。因此必须从变异链球菌临床株的天然培养物中分离纯化测序才能寻找到新的变链素。

关于变链素的分离纯化,国内外学者做过大量的研究。例如在培养基中增加微量元素^[5],增加酵母提取物的含量^[3,12],改变RP-HPLC的洗脱条件^[6],或增加反相高效色谱纯化前的样品预处理^[12],或反复RP-HPLC纯化^[5-6]来增加最后纯化物的纯度等。

Caufield的实验室为了增加变链素的产量^[5],在TH培养基中加入一些微量元素,即每1 L水中加入FeSO₄·7H₂O(0.005 g)、K₂HPO₄(0.2 g)、KH₂PO₄(1 g)、MgSO₄·7H₂O(0.7 g)、MnSO₄(0.005 g),该学者认为加入这些微量元素可以维持液体培养基上清液中较高水平的变链素产量,而且还可以抑制其他肽类的生长。而Mota-Meira等^[3]和Nicolas等^[12]培养产生变链素B-Ny266和H-29B的菌株时所采用的TSB培养基均加入了干酪乳清蛋白(质量分数6%),碳酸钙(质量分数1%),酵母提取物(质量分数2%),研究者认为以上3种物质不仅价廉,而且其质量分数是获得变链素最佳产生量所需碳水化合物的最小质量分数。

本实验将所用的TPY培养基中的微量元素含量调整,再加入干酪乳清蛋白(质量分数6%),碳酸钙(质量分数1%),酵母提取物(质量分数2%),达到提高变链素产量的效果。

在变链素的初步分离纯化的研究方法方面,即色谱纯化前样品处理方面,研究者们尝试了各种方法。Novák等^[7]在1994年从变异链球菌菌株T8的液体

培养基中提取变链素，该学者将大量的培养液经过相对分子质量逐渐减小的滤膜进行超滤(从 1×10^5 、 1×10^4 到 1×10^3)，再将最终的滤液与等量的氯仿混合萃取出粗提物，经RP-HPLC和艾德曼降解法来进行纯化、氨基酸分析和测定。但是小相对分子质量的滤膜造价昂贵且过滤时有一定的损失，因此沿用此方法的学者较少。

之后2001年Qi等^[6]采用氯仿抽提法对变异链球菌株CH43的液体培养基先进行粗提变链素，再将粗提物重溶于尿素后再置于Source 15RPC色谱柱进行反相高效液相色谱分析，质谱法测定相对分子质量范围，再送生物公司测序，此纯化方法步骤简单，样品损失较少，受到后继学者们的青睐。

Balakrishnan等^[8-9]在2000年至2002年间发现了变链素N、M46、M19、H7，采用的是XAD系列离子交换树脂(美国罗门哈斯公司)进行色谱分离。2006年Nicolas等^[12]发现了变链素H-29B，分离纯化时采用的方法类似于变链素B-Ny266。具体方法为第1步使用XAD-7树脂(弱极性大孔聚烷酯吸附树脂)直接分离培养液，第2步采用疏水色谱Sep-Pak[®]的tc-C18固相萃取柱进行样品纯化和浓缩，第3步RP-HPLC纯化，使用色谱分析柱C18。该学者的3步纯化法提高了最终产物的纯度($\geq 99.9\%$)。

RP-HPLC与常规的高效液相色谱相反，是流动相的极性大于固定相极性的色谱。变链素的研究者在分离纯化变链素的实验中几乎都采用了RP-HPLC方法，只是采用的色谱分析柱的类型和色谱洗脱的条件不同，洗脱出活性物质时流动相的体积分数有所不同。Qi等^[5]分离纯化变链素采用的是Source15RPC色谱柱。洗脱体系为缓冲液A(0.1% TFA)和缓冲液B(0.085% TFA溶于80%甲醇)，经3次纯化，在流动相B的体积分数为90%左右洗脱出活性物质，且3次纯化的色谱图在洗脱出活性峰的位置出现唯一的共同的独立的峰，该学者推测此峰物质即是纯化了的变链素物质。该研究小组分离纯化变链素和时^[6]的洗脱体系与上述类似，只将流动相B中的甲醇替换成乙腈，2次纯化后变链素和分别在流动相B体积分数为31.8%和34.8%时洗脱出来，同样在色谱图上观察到2条色谱曲线含有共同的唯一的独立峰。Robson等^[13]于2007年分离纯化出变链素K8，使用的是Phenomenex Jupiter C18分析柱(4.6 mm×250 mm)，是用于反相分离和提纯蛋白质专用柱，线性洗脱55 min，2次纯化在流动相B(100%乙腈)体积分数为35%时洗脱出活性峰，与变链素和的洗脱体积分数相近。而在本实验中，采用的是Angilent tc-C18(4.6 mm×150 mm)分析柱，洗脱体

系为A(0.1% TFA)，B(100%乙腈)，线性洗脱30 min，2次RP-HPLC纯化，色谱图上同样在洗脱出活性物质的位置出现共同的唯一的独立峰，该活性峰(即图3的peak 1)被洗脱时的流动相B的体积分数为75%左右，可推测该峰物质即为纯化的变异链球菌临床株1G产生的变链素。

上述反相高效液相色谱洗脱情况显示，变链素经色谱纯化时，洗脱出活性物质时流动相的体积分数差异较大，分析其原因可能与不同变链素的性质差异，色谱柱的选择，洗脱体系和洗脱条件的不同有较大关系。但是RP-HPLC纯化结果相同，即色谱图上纯化洗脱出的活性峰即是多次纯化的共同的唯一独立峰，提示只要洗脱条件不变，同一种变链素会在相同的洗脱体积分数下被分离纯化。

由于变链素具有不同种类和不同性质，对于分离纯化的样品，尚没有标准品可供鉴定。国内外的研究仅以其产生的抑菌性能而鉴定，因为在变异链球菌产生的蛋白质成分中，没有其他成分具有抑菌性能。本实验中，由于样品经过多次收集、冻干、再重现溶解这些过程，会有部分样品丢失，因此纯化后的变链素抑菌环反而小。

【参考文献】

- [1] 樊明文. 牙体牙髓病学[M]. 2版. 北京: 人民卫生出版社, 2004: 22-24.
FAN Ming-wen. Dentistry and endodontics[M]. 2nd ed. Beijing: People's Medical Publishing House, 2004 22-24.
- [2] Hamada S, Ooshima T. Inhibitory spectrum of a bacteriocinlike substance(mutacin) produced by some strains of *Streptococcus mutans*[J]. J Dent Res, 1975, 54(1): 140-145.
- [3] Mota-Meira M, LaPointe G, Lacroix C, et al. MICs of mutacin B-Ny266, nisin A, vancomycin, and oxacillin against bacterial pathogens[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2000, 44(1): 24-29.
- [4] Chen P, Qi FX, Novak J, et al. Effect of amino acid substitutions in conserved residues in the leader peptide on biosynthesis of the lantibiotic mutacin [J]. FEMS Microbiol Lett, 2001, 195(2): 139-144.
- [5] Qi F, Chen P, Caufield PW. Purification of mutacin from group *Streptococcus mutans* UA787 and genetic analyses of mutacin biosynthesis genes[J]. Appl Environ Microbiol, 1999, 65(9): 3880-3887.
- [6] Qi F, Chen P, Caufield PW. The group strain of *Streptococcus mutans*, UA140, produces both the lantibiotic mutacin and a nonlantibiotic bacteriocin, mutacin [J]. Appl Environ Microbiol, 2001, 67(1): 15-21.
- [7] Novák J, Caufield PW, Miller EJ. Isolation and biochemical characterization of a novel lantibiotic mutacin from *Streptococcus mutans*[J]. J Bacteriol, 1994, 176(14): 4316-4320.
- [8] Balakrishnan M, Simmonds RS, Carne A, et al. *Streptococcus mutans* strain N produces a novel low molecular mass non-lan-

- tibiotic bacteriocin[J]. FEMS Microbiol Lett, 2000, 183(1):165-169.
- [9] Balakrishnan M, Simmonds RS, Kilian M, et al. Different bacteriocin activities of *Streptococcus mutans* reflect distinct phylogenetic lineages[J]. J Med Microbiol, 2002, 51(11):941-948.
- [10] Hillman JD, Novák J, Sagura E, et al. Genetic and biochemical analysis of mutacin 1140, a lantibiotic from *Streptococcus mutans* [J]. Infect Immun, 1998, 66(6):2743-2749.
- [11] Hale JD, Ting YT, Jack RW, et al. Bacteriocin(mutacin) production by *Streptococcus mutans* genome sequence reference strain UA159: Elucidation of the antimicrobial repertoire by genetic dissection[J]. Appl Environ Microbiol, 2005, 71(11):7613-7617.
- [12] Nicolas G, Morency H, LaPointe G, et al. Mutacin H-29B is identical to mutacin (J-T8)[J]. BMC Microbiol, 2006, 6:36.
- [13] Robson CL, Wescombe PA, Klesse NA, et al. Isolation and partial characterization of the *Streptococcus mutans* type AII lantibiotic mutacin K8[J]. Microbiology, 2007, 153(Pt 5):1631-1641.
- [14] 杨柳, 许晓芳, 何海辉, 等. 高龋菌株产生的变链素对口腔链球菌抑制活性的比较[J]. 中国微生态学杂志, 2008, 20(4):380-382.
- YANG Liu, XU Xiao-fang, HE Hai-hui, et al. A comparative evaluation on mutacin of *Streptococcus mutans* isolates from caries-active against *Streptococcus oralis* [J]. Chin J Microecol, 2008, 20(4):380-382.
- [15] Qi F, Chen P, Caufield PW. Functional analyses of the promoters in the lantibiotic mutacin biosynthetic locus in *Streptococcus mutans*[J]. Appl Environ Microbiol, 1999, 65(2):652-658.
- [16] 李颂, 刘天佳, 胡晓燕, 等. 变链素活性与变形链球菌基因多态性的关系研究[J]. 中国微生态学杂志, 2007, 19(3):253-255.
- LI Song, LIU Tian-jia, HU Xiao-yan, et al. A study on relationship between genotypic diversity and mutacin activity of *Mutans streptococci*[J]. Chin J Microecol, 2007, 19(3):253-255.
- [17] 丁芸, 凌均荣, 陈罕. 人工合成多肽防龋疫苗HDS的研究—多肽HDS序列合成和鉴定[J]. 实用口腔医学杂志, 2003, 19(4):343-345.
- DING Yun, LING Jun-qi, CHEN Han. A study of peptide vaccine HDS from *Streptococcus mutans* glucosyltransferase—the synthesis and appraisalment of peptide HDS[J]. J Pract Stomatol, 2003, 19(4):343-345.
- [18] 石馨, 倪龙兴, 田宇, 等. 变形链球菌CH43变链素基因片段的克隆及表达[J]. 实用口腔医学杂志, 2005, 21(3):339-342.
- SHI Xin, NI Long-xing, TIAN Yu, et al. Cloning of mutA and expression of its coding protein[J]. J Pract Stomatol, 2005, 21(3):339-342.
- [19] 陈亮, 倪龙兴, 张虎明. 人工合成mutacin的抑菌活性研究[J]. 牙体牙髓牙周病学杂志, 2007, 17(6):333-336.
- CHEN Liang, NI Long-xing, ZHANG Hu-ming. Study of antimicrobial effects of synthetic peptide mutacin from *Streptococcus mutans in vitro*[J]. Chin J Conserv Dent, 2007, 17(6):333-336.
- (本文编辑 汤亚玲)

中山大学光华口腔医学院·附属口腔医院与香港大学牙医学院 举办“显微根管治疗新进展”学习班通知

中山大学光华口腔医学院·附属口腔医院与香港大学牙医学院定于2010年11月24—29日联合举办国家级继续教育项目“显微根管治疗新进展”学习班(继续教育 类学分10学分)。理论课程包括:难治性根尖周炎的感染控制与显微根管再治疗、镍钛机动预备、热牙胶充填和超声等显微根管治疗技术的临床应用、牙髓疑难病例的展示和讨论、根管治疗后牙体修复临床新进展等。届时,学习班还将邀请首都医科大学侯本祥教授授课。实验课程包括根管预备和充填技术、失败病例的再治疗、桩核冠设计及制备技术等。学习班费用:第1阶段1200元/人,免费提供工作午餐,其他食宿交通费用自理,可代办。第2阶段港币400元/人(代收),食宿交通费用自理。凡报名参加第2阶段学习的学员,请提前在当地自行办好港澳通行证。(注:第1阶段学习由广州市中山大学光华口腔医学院·附属口腔医院举办,第2阶段由香港大学牙医学院举办)。

通信地址:广州市陵园西路56号中山大学附属口腔医院牙体牙髓病科,邮政编码:510055。联系人:刘建伟、麦穗;联系电话:020-83762040、020-83861544;传真:020-83822807。报名截止日期:2010年10月25日。

中山大学光华口腔医学院·附属口腔医院
香港大学牙医学院