

[文章编号] 1000-1182(2009)04-0443-04

口腔常见放线菌代谢组学鉴定的初步研究

李多云¹ 郭强¹ 周学东¹ 熊萍¹ 贾向明² 肖晓蓉¹ 李伟¹ 肖丽英¹

(1.口腔疾病研究国家重点实验室, 四川大学; 2.四川大学 分析测试中心, 四川 成都 610041)

[摘要] 目的 初步将基于核磁共振氢谱(¹H-NMR)的代谢组学方法应用于口腔常见放线菌——内氏放线菌和衣氏放线菌的鉴定。方法 在BHI液体培养基中接种内氏放线菌和衣氏放线菌,用比浊法测定菌液密度,绘制生长曲线,选择稳定期的培养液检测核磁共振波谱,用主成分分析法进行数据分析。结果 主成分分析法显示2组数据内部有集中的聚类关系,可以区分2种放线菌。结论 代谢组学分析技术有望应用于口腔放线菌的快速鉴定。

[关键词] 代谢组学; 核磁共振; 主成分分析

[中图分类号] R 780.2 **[文献标志码]** A

Initial study on the discrimination of oral common *Actinomycetes* with metabonomics method LI Ming-yun¹, GUO Qiang¹, ZHOU Xue-dong¹, XIONG Ping¹, JIA Xiang-ming², XIAO Xiao-rong¹, LI Wei¹, XIAO Li-ying¹. (1. State Key Laboratory of Oral Diseases, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Analytical and Testing Center, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

[Abstract] **Objective** The method of metabonomics based on ¹H-nuclear magnetic resonance(¹H-NMR) was preliminarily applied to discriminate the oral common *Actinomycetes*, *Actinomyces naeslundii* ATCC12104 and *Actinomyces israelii* ATCC12102. **Methods** Solutions of *Actinomyces naeslundii* and *Actinomyces israelii* with same density were made and cultured respectively at BHI liquid culture medium. The concentration of bacteria was determined periodically, and then the growth curves were drawn. The culture solutions in stationary phase of the two bacteria were used to test with the ¹H-NMR spectroscopy respectively. The data of ¹H-NMR spectroscopy results were analyzed by principal components analysis(PCA). **Results** The PCA showed the obvious clustering phenomena and the points of two groups data stayed differentially together by two clusters. Therefore, the NMR-based metabolomics profiles can discriminate the two different kinds of bacteria. **Conclusion** The analysis technology of metabonomics is expected to be applied to rapid identification of actinomycetes.

[Key words] metabonomics; nuclear magnetic resonance; principal components analysis

微生物代谢组学是一门全面分析(定性和定量)细胞生长或生产周期某一时刻细胞内和细胞周围的所有低相对分子质量代谢产物的技术^[1]。高分辨率核磁共振(nuclear magnetic resonance, NMR)技术以其对样品的无破坏性、高通量、高灵敏度和检测结果的重现性好等优点,用于对细菌胞外微量代谢组分进行检测,可得到相应的代谢图谱。研究这些NMR图谱,可以找到不同细菌的标志性代谢产物,快速鉴定不同的细菌。放线菌是牙菌斑的优势菌已被广泛认可。临床和流行病学的调查表明,衣氏放线菌可引起面颈部、肺部和腹部的放线菌病等疾

患。内氏放线菌所导致的面颈部放线菌病很难与衣氏放线菌病相区别。内氏放线菌与牙周炎或感染根管有关,且为根面龋的主要致病菌之一。本研究采用核磁共振氢谱(¹H-nuclear magnetic resonance, ¹H-NMR)^[2]的代谢组学技术对口腔常见的衣氏放线菌(*Actinomyces naeslundii*, *A. naeslundii*)和内氏放线菌(*Actinomyces israelii*, *A. israelii*)稳定期的胞外代谢产物的核磁谱图进行比较,探讨采用该方法寻找特征性代谢产物从而鉴定口腔放线菌的可能性。

1 材料和方法

1.1 实验菌株、实验仪器

内氏放线菌 ATCC 12104、衣氏放线菌 ATCC 12102(四川大学口腔疾病研究国家重点实验室提供)。CH-2生物显微镜(Olympus公司,日本),比浊仪(Nephelometer公司,美国),高速低温离心机(Jouan

[收稿日期] 2008-10-21; [修回日期] 2009-02-19

[基金项目] 教育部科学技术研究重大资助项目(307022);四川省应用基础研究资助项目(07JY029-072)

[作者简介] 李多云(1983—),女,河北人,硕士

[通讯作者] 肖丽英, Tel: 028-61153332

公司,法国), -80°C 低温冰箱(Heto Ultra公司,美国),DRX600核磁共振仪(Bruker Biospin Rhein-stetten公司,德国)。分析软件SIMCA-P v11.0(Umea公司,瑞典)。

1.2 生长曲线的绘制

内氏放线菌和衣氏放线菌菌种在BHI固体培养基上经48 h复苏和一次24 h平板划线传代,并经显微镜形态学检查及生化鉴定为纯培养后,接种于BHI液体培养基。内氏放线菌在 37°C 、 $80\%\text{N}_2$ 、 $10\%\text{CO}_2$ 、 $10\%\text{H}_2$ 兼性厌氧气体条件下孵育约12 h,比浊仪测定浊度,调整菌悬液密度为 1.5×10^8 CFU/mL。取21支试管,各加入3 mL BHI液体培养基,18支中加 $100\ \mu\text{L}$ 内氏放线菌菌悬液,3支为阴性对照,置于兼性厌氧气体环境中培养;衣氏放线菌在 37°C 、 $100\%\text{N}_2$ 的专性厌氧气体条件下孵育约30 h,用比浊仪测定浊度,并调整菌悬液密度为 1.5×10^8 CFU/mL。将此菌悬液各 $100\ \mu\text{L}$ 加入盛有3 mL BHI培养液的18支试管中,另3支试管不加菌悬液为阴性对照,置于专性厌氧环境中培养。

在12、18、24、36、48、60 h这6个时间点取内氏放线菌和衣氏放线菌各3管,用比浊仪测定菌液密度,以BHI液体培养基为阴性对照,重复实验3次,取每个时间点的平均值,以时间(h)为横坐标,菌悬液密度(CFU/mL)的对数值(log)为纵坐标,经Excel绘制菌悬液密度随时间变化的生长曲线。

1.3 测试样本的制备

根据2种细菌的生长曲线确定细菌生长的稳定期,分别取稳定期中段的菌液在高速低温离心机上以 4°C 、 $15\ 000\ \text{r/min}$ 离心10 min沉淀细菌和大分子物质,取上清液1 mL加入磷酸盐缓冲液,混匀后静置10 min。再次相同条件离心,取 $0.5\ \text{mL}$ 上清液加入重水 $0.25\ \text{mL}$,混匀后将样品移入直径为5 mm的无菌核磁管中,密封管口,置于 -80°C 低温冰箱保存。NMR测定前取出,解冻并保持在 0°C 左右。

1.4 核磁共振图谱的采集和处理

采用Bruker公司的TXI探头,在超导傅立叶变换(Fourier transition, FT)NMR仪上调用ZGPR脉冲序列,谱宽 $7\ 788.162\ 11\ \text{Hz}$,采样点数32 K,叠加次数128次,饱和频率和中心频率都在水峰位置。所有样本的扫描温度设置为 $300\ \text{K}$,每个样本核磁扫描均收集到131 072个数据点,以 D_2O 为溶剂,并以溶剂峰为内标,获得32个样本的原始自由感应衰减信号(free induction decay, FID)。将这些FID信号导入MestReC v4.9.9.6软件进行FT后得到原始的核磁共振图谱,再进行相位调整和基线调整,以获得相位满意、对称性较好的 ^1H -NMR图谱。

调用软件的积分工具,每个样品的 ^1H -NMR图谱都进行同样的分段积分后,将所有的积分值导入到Excel文件中保存,用于主成分分析(principal components analysis, PCA)。

1.5 主成分法分析数据

将存有积分值的Excel文件导入SIMCA-P v11.0软件,求出主成分(principal components, PC),并以主成分矢量为坐标轴作二维得分图,从而对2组菌悬液进行分析,找出类别间的差异所在。

2 结果

2.1 放线菌的生长曲线

从图1可以看出实验菌株在BHI液体培养基中生长规律相似,衣氏放线菌到达稳定期的时间较内氏放线菌晚,选择稳定期中段(内氏放线菌生长30 h,衣氏放线菌生长40 h)的菌悬液测定核磁共振图谱。

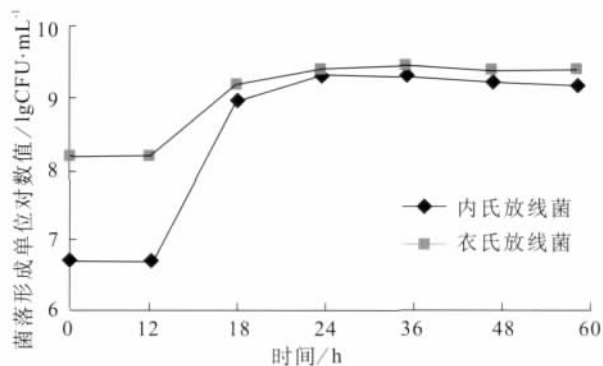


图1 内氏放线菌和衣氏放线菌生长曲线图

Fig 1 The growth curves of *A. naeslundii* and *A. israelii*

2.2 核磁共振图谱的测定

图2为*A. naeslundii*生长30 h、图3为*A. israelii*生长40 h的细菌胞外代谢物核磁共振图谱,所示为细菌的生长稳定期,代谢物已产生并处于较稳定状态。由图可见:*A. naeslundii*在化学位移 2.3×10^{-6} 、 1.0×10^{-6} 处有代谢强峰出现,*A. israelii*在化学位移 4.0×10^{-6} 、 2.3×10^{-6} 和 1.2×10^{-6} 处有特异峰出现。

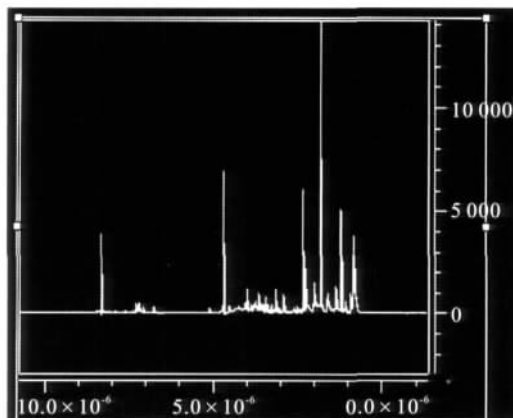


图2 生长30 h的内氏放线菌培养液的核磁共振图谱

Fig 2 ^1H -NMR spectra of *A. naeslundii* growing 30 hours in culture medium

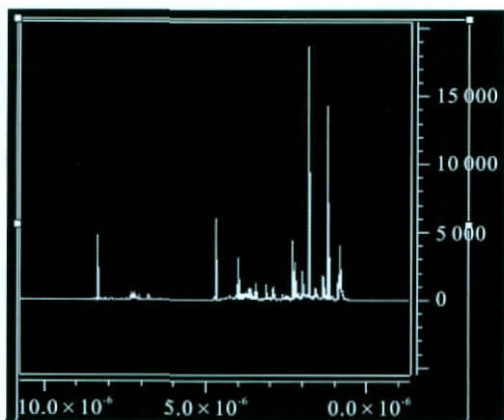


图3 生长40 h的衣氏放线菌培养液的核磁共振图谱

Fig 3 ^1H -NMR spectra of *A. israelii* growing 40 hours in culture medium

2.3 主成分分析

本实验将积分数据导入软件,以主成分矢量为坐标轴作图(二维或三维图,称为得分图),可反应类别间的差异。图4中的椭圆形区域代表95%的置信区间,从得分图可以看出2种细菌样品各自的聚集性比较强。

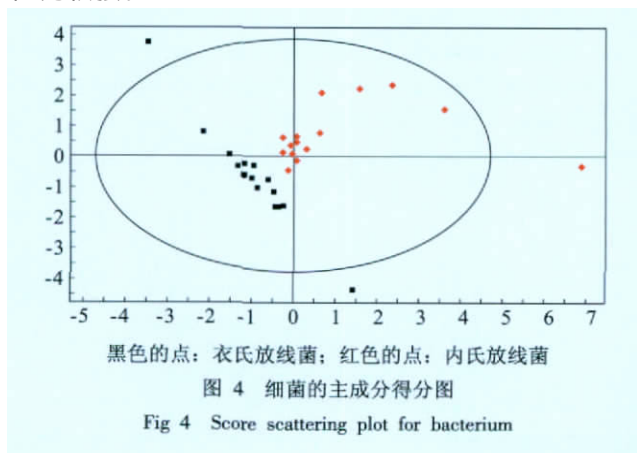


图4 细菌的主成分得分图

Fig 4 Score scattering plot for bacterium

3 讨论

代谢组学是20世纪90年代中期发展起来的一门对生物体或细胞所有低相对分子质量代谢产物进行定量和定性分析的新技术。传统的细菌鉴定依靠从标本中分离纯化细菌并进行形态学、生物化学及血清学鉴定等,鉴定过程耗时费力,且一些细菌只能鉴定到属。代谢组学展示的是细胞真实的生理过程,是无针对性的微生物生理的研究方法,可普遍应用于细菌及细菌生态学。大规模的代谢组学研究过程包括样品的制备、分离、检测、鉴定、数据分析与可视化以及建模与仿真等。目前,代谢组学分析技术最常用的还是NMR,其 ^1H -NMR谱峰与样品中各化合物的氢原子对应,根据一定的规则或与标准氢谱对比可以直接鉴定出代谢物的化学成分,信号的相对强弱则反映了各成分的相对含量。

微生物代谢组学是一门在细胞生长或生长循环某一特定时间点,以无偏、可重现的方式同时定性和定量分析细胞内、外存在的全部低相对分子质量代谢产物的技术。微生物代谢组学研究需要为从生物培养、灭活和代谢产物的提取到代谢物的定量分析的整个实验过程提出一整套耐用、可重现和可靠的实验方案^[3]。不同的培养条件对微生物代谢物的分布和丰度有很大影响。因此,在其代谢物组的测定中,为了最大可能地提高数据的可重复性,对培养条件进行了严格的限制。主要的限制步骤是在实验过程中配制培养基的试剂采用同一批次的厂家产品,严格规定了灭菌过程等。在接下来的核磁实验中证明,此培养条件下获得的数据有较高的重复性。本实验通过对细菌生长曲线的绘制,找到细菌生长稳定期的某一时间点,对该生长点的细菌胞外代谢产物进行无偏、可重现的定性分析。选择内氏放线菌稳定期30 h,衣氏放线菌稳定期40 h作为检测点,稳定期的细菌代谢产物比较稳定,具有可重现性。

在得到细菌培养液的NMR代谢图谱后,首先直观地看到2种细菌有各自的特征代谢峰,其次要对核磁图谱进行图形的处理、转换,将样本的核磁图形转换为数据,同时在图形的一定区间内进行积分和权重处理,用以简化复杂的核磁图谱,以数据形式代表原谱图。然后将处理后的数据输入SIMCA-P软件进行主成分分析^[4],进一步简化数据,通过图形转换生成的194组数据简化为7组主成分,主成分分析的特点是将分散在一组变量上的信息集中到某几个综合指标即主成分上,起到数据降维的作用。将这些主成分的得分图进行对比分析,可见主成分积分值集中分布于椭圆形散点图^[5](95%置信区内)的2个区域,2种细菌间无明显的重叠交叉,有各自的聚类关系,可以看出衣氏放线菌比内氏放线菌内聚性要好一些。至于图中出现的较为离散的甚至在95%置信区间以外的样本,可能是制样误差或者实验操作误差导致。可看出代谢组学技术在口腔微生物的鉴定中有良好应用前景。与现有的其他细菌鉴定方法相比较,基于NMR的代谢组学技术具有样品处理简单,用量少(样品只需10 mg),测定快速,上样检测只需5 min,无侵入性、不破坏样品的结构性质等优点。

本实验为代谢组学方法用于口腔致病菌研究^[6-7]的一部分,实验结果显示该方法可以区分不同的细菌,说明了基于 ^1H -NMR的代谢组学及一系列化学计量学和多元统计学方法可以很好地鉴别衣氏放线菌和内氏放线菌。

代谢组学作为一种重要的功能基因组学工具,已经在微生物性状改良等方面得到了应用。虽然NMR能够实现对样品的非破坏性分析^[8],但是如果对微生物细胞内的小分子代谢产物进行定性和定量分析,由于胞内代谢物的浓度通常在毫摩尔的水平,有的在微摩尔水平,NMR的低敏感性限制了其在代谢物组测定的应用。近年来,液/质联用因为其高敏感性,已逐渐被应用于代谢组学的测定分析中^[9-10]。

[参考文献]

- [1] Mashego MR, Rumbold K, De Mey M, et al. Microbial metabolomics: Past, present, and future methodologies [J]. *Biotechnol Lett*, 2007, 29(1): 1-16.
- [2] Troulis MJ, Kaban LB. Endoscopic approach to the ramus/condyle unit: Clinical applications [J]. *J Oral Maxillofac Surg*, 2001, 59(5): 503-509.
- [3] 周大伟, 朱之燕. 微生物代谢组学的样品前处理 [J]. *化学通报*, 2008, 71(6): 404-407.
ZHOU Da-wei, ZHU Zhi-yan. Sample preparation for microbial metabolome analysis [J]. *Chemistry*, 2008, 71(6): 404-407.
- [4] Bourne R, Himmelreich U, Sharma A, et al. Identification of *Enterococcus*, *Streptococcus*, and *Staphylococcus* by multivariate analysis of proton magnetic resonance spectroscopic data from plate culture [J]. *J Clin Microbiol*, 2001, 39(8): 2916-2923.
- [5] 王全军, 颜贤中, 吴纯启, 等. Z24经口染毒大鼠尿液的核磁共振谱代谢组学研究 [J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2004, 18(6): 460-465.

振谱代谢组学研究 [J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2004, 18(6): 460-465.

- WANG Quan-jun, YAN Xian-zhong, WU Chun-qi, et al. A nuclear magnetic resonance spectroscopic metabolomics analysis for urine from rats administrated Z24 [J]. *Chin J Pharmacol Toxicol*, 2004, 18(6): 460-465.
- [6] 李森, 肖丽英, 李继遥, 等. 常见致龋菌代谢组学鉴定的初步研究 [J]. *华西口腔医学杂志*, 2007, 25(4): 342-344.
LI Miao, XIAO Li-ying, LI Ji-yao, et al. Initial study on discrimination of microorganisms with the metabolomics technique [J]. *West China J Stomatol*, 2007, 25(4): 342-344.
- [7] 熊萍, 肖丽英, 李继遥, 等. 变异链球菌、血链球菌及嗜酸乳杆菌代谢组学鉴定的初步研究 [J]. *华西口腔医学杂志*, 2008, 26(5): 537-540.
XIONG Ping, XIAO Li-ying, LI Ji-yao, et al. Initial study on the discrimination of oral microorganisms with a metabolomics method [J]. *West China J Stomatol*, 2008, 26(5): 537-540.
- [8] Wang QZ, Wu CY, Chen T, et al. Integrating metabolomics into a systems biology framework to exploit metabolic complexity: Strategies and applications in microorganisms [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2006, 70(2): 151-161.
- [9] Jeffrey FM, Roach JS, Storey CJ, et al. ¹³C isotopomer analysis of glutamate by tandem mass spectrometry [J]. *Anal Biochem*, 2002, 300(2): 192-205.
- [10] Gonzalez B, Francos J, Renaud M. A rapid and reliable method for metabolite extraction in yeast using boiling buffered ethanol [J]. *Yeast*, 1997, 13(14): 1347-1355.

(本文编辑 汤亚玲)

(上接第442页)

- [6] Sassone L, Fidel R, Figueiredo L, et al. Evaluation of the microbiota of primary endodontic infections using checkerboard DNA-DNA hybridization [J]. *Oral Microbiol Immunol*, 2007, 22(6): 390-397.
- [7] Jacinto RC, Gomes BP, Desai M, et al. Bacterial examination of endodontic infections by clonal analysis in concert with denaturing high-performance liquid chromatography [J]. *Oral Microbiol Immunol*, 2007, 22(6): 403-410.
- [8] Siqueira JF Jr, Rôças IN, Santos SR, et al. Efficacy of instrumentation techniques and irrigation regimens in reducing the bacterial population within root canals [J]. *J Endod*, 2002, 28(3): 181-184.
- [9] Dametto FR, Ferraz CC, de Almeida Gomes BP, et al. *In vitro* assessment of the immediate and prolonged antimicrobial action of chlorhexidine gel as an endodontic irrigant against *Enterococcus faecalis* [J]. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 2005, 99(6): 768-772.

- [10] Vianna ME, Gomes BP, Berber VB, et al. *In vitro* evaluation of the antimicrobial activity of chlorhexidine and sodium hypochlorite [J]. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 2004, 97(1): 79-84.
- [11] Mattei MG, Roeckel N, Olsen BR, et al. Genes of the membrane-type matrix metalloproteinase (MT-MMP) gene family, MMP14, MMP15, and MMP16, localize to human chromosomes 14, 16, and 8, respectively [J]. *Genomics*, 1997, 40(1): 168-169.
- [12] Cootauco CJ, Rauschenberger CR, Nauman RK. Immunocytochemical distribution of human PMN elastase and cathepsin-G in dental pulp [J]. *J Dent Res*, 1993, 72(11): 1485-1490.
- [13] Rakita RM, Vanek NN, Jacques-Palaz K, et al. *Enterococcus faecalis* bearing aggregation substance is resistant to killing by human neutrophils despite phagocytosis and neutrophil activation [J]. *Infect Immun*, 1999, 67(11): 6067-6075.

(本文编辑 王晴)