·论　著·

聚合酶链反应-变性梯度凝胶电泳技术在口腔微生物多样性研究中的应用*

沈会平[1],苏健裕[1△],彭　帅[2],朱　啸[3],石　磊[1](华南理工大学:1.轻工与食品学院;2.生物科学与工程学院,广州 510640;3.第四军医大学口腔医学院修复科,西安 710032)

【摘要】 **目的**　应用聚合酶链反应(PCR)-变性梯度凝胶电泳(DGGE)技术,分析健康人的口腔菌群及其菌种组成的多样性。**方法**　抽取 8 名健康人唾液样本,分别提取唾液细菌总 DNA,PCR 扩增 16SrDNA 并进行 DGGE 和系统发育树分析。**结果**　8 名健康人唾液样本的 DGGE 指纹图谱条带差异性较大,仅有 65% 相似性,表明采用 PCR-DGGE 对口腔微生物多样性的检测是可行的。**结论**　PCR-DGGE 技术可较灵敏、直观地反映口腔微生物多样性情况。

【关键词】 微生物多样性;　口腔微生态;　变性梯度凝胶电泳

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2011.16.001　**文献标志码:**A　**文章编号:**1672-9455(2011)16-1921-02

The application of PCR-DGGE on the research of oral cavity microbial diversity*

SHEN Hui-ping[1],*SU Jian-yu*[1△],*PENG Shuai*[2],*ZHU Xiao*[3],*SHI Lei*[1](1.*College of Light Industry and Food Science*;2.*School of Bioscience and Bioengineering*,*South China University of Technology*,*Guangzhou* 510640,*China*;3.*College of Dentistry*,*The Fourth Military Medical University*,*Xi'an* 710032,*China*)

【**Abstract**】 **Objective**　Polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis(PCR-DGGE) were applied to the microbial diversity examination of oral cavity. **Methods**　Total DNAs were extracted from the plaques of 8 healthy people,16SrDNA of the bacteria was amplified and DGGE was also used to assess changes in bacterial composition from saliva microcosms from these 8 individual saliva samples. **Results**　DGGE fingerprint patterns of saliva from 8 different donors displayed greater variability (65% concordance). PCR-DGGE method was a viable approach to examine the microbial diversity of oral cavity. **Conclusion**　These results suggest that PCR-DGGE method is a sensitive and effective approach to examine the microbial diversity of oral cavity.

【**Key words**】 microbial diversity;　oral cavity microbial ecosystem;　DGGE

传统的微生物培养技术只能培养数量 0.11%～1.00% 自然界中微生物[1],且目前检测方法受采样和分析条件的影响,不能充分揭示微生物群落结构、空间分布、多样性及动态变化等相关信息。近年来,分子生物学的迅速发展使得微生物不需经过长时间的分离培养,而直接从样品里提取 DNA 来对微生物群落进行研究,能快速反应微生物的多样性和动态性变化。

由 Fischer 和 Lerman[2] 于 1979 年发明的变性梯度凝胶电泳(DGGE)技术依据双链 DNA 片段熔解行为的不同,分离聚合酶链反应(PCR)产物中长度相同但序列不同的 DNA 标记,其指纹图谱上的一条条带就代表一个微生物类群。因而,指纹图谱不但直观反映了微生物群落的结构和多样性,还可方便地判断出优势菌或功能菌。PCR-DGGE 技术已被广泛用于生物膜、土壤、海洋等环境样品中的微生物多样性检测和种群演替的研究[3]。人类口腔是一个由 700 多种细菌[4]组成的复杂生态体系。口腔内营养、水分都很充足,加之结构的复杂性,为各种微生物的生长、繁殖和定居提供了非常适宜的环境。因而,导致了附着于该表面的口腔微生物的多样性。这些微生物在口腔不同部位生长,发育,衰亡,并进行复杂的物质代谢活动。在一定的条件下,细菌及其产物不仅会对牙齿及其牙周组织造成损害,引起口腔疾病,同时,也会导致其他一系列诸如冠心病、脑梗塞等疾病的发生。国外学者已运用多种分子生物学方法对口腔及其牙周病原菌的检测和鉴定进行了研究[5]。然而鲜见对于健康人口腔微生物的研究。对于分析口腔中唾液细菌组成特征的研究,国内也鲜见报道。报道了解健康口腔微生物的群落组成结构和变化,对于预防及治疗人类疾病有重要意义。

研究者认为,口腔疾病治疗的关键在于对口腔微生物群落进行全面细致的评估和分析,然而有大量的口腔细菌是很难培养或不可培养的[6],基于传统的培养方法只能部分反映菌群结构变化。而直接对采取的口腔唾液进行分析,就可以比较全面地反映口腔菌群的情况。本研究拟采用 PCR-DGGE 指纹图谱技术分析健康人个体的唾液样品中菌群的多样性,从而了解不同健康人个体的口腔微生物群落的差异。

1　材料与方法

1.1　样品的采集与处理　抽取 8 名健康人样本,年龄为 16～25 岁(平均年龄为 20.5 岁,其中男 4 名,女 4 名,平均剩余牙齿为 28 颗),1～4 号个体为女,5～8 号个体为男。均无吸烟史,且检查无糖尿病及牙周炎病史。早晨起床空腹刷牙前,温水漱口后,同一时间收集 8 名健康人唾液作为样品。

1.2　实验仪器　实验用 PCR 仪为 iCycler™ Thermal Cycal 梯度 PCR 仪(Bio-Rad),离心机为法国 11174729 多功能高速冷冻离心机,电泳仪为 Dcode™ 的基因突变检测仪(Bio-Rad)。

1.3　实验方法

1.3.1　基因组 DNA 的提取　样品总 DNA 的抽提采用试剂盒方法,试剂盒由 Qiagen 公司生产。具体方法为:吸取 1 mL

*　**基金项目:**广东省自然科学基金博士启动项目(10451064101005160)。　△　**通讯作者**,E-mail:jysu@scut.edu.cn。

唾液滴入离心管，然后加入 2 mL 的磷酸盐缓冲液(PBS)，反复洗脱，然后吸取 1 mL 混合液滴入另一个离心管中；再加入 4 mL 的 PBS。在 5 000×g 时，离心 20 min；去除上清液，加入 180 μL 的酶液(20 g/L的溶菌酶溶液)，接下来的提取步骤按照试剂盒说明书进行。

1.3.2　PCR 扩增 16S rDNA

1.3.2.1　一次 PCR　引物：参考文献[7]合成引物 D88 和 E94。上游引物序列为：5′-GAG AGT TTG ATY MTG GCT CAG-3′；下游引物序列为：5′-GAA GGA GGT GWT CCA RCC GCA-3′。PCR 反应体系：10×PCR Ex Buffer 2.5 μL，4×三磷酸脱氧核糖核苷(dNTP)0.5 μL(2.5 mmol/μL)，引物 D88 和 E94 各 1 μL(10 pmol/μL)，Ex Taq DNA 酶 0.125 μL，模板 2 μL，加双蒸水补足 25 μL。

PCR 反应条件：95 ℃ 4 min；95 ℃ 45 s，58 ℃ 45 s，72 ℃ 90 s，扩增 30 个循环；72 ℃ 15 min。取 PCR 产物 3 μL，10 g/L 琼脂糖凝胶进行电泳，120 V 电泳 30 min。然后用 0.005%溴化乙锭(EB)进行染色。紫外灯下观察结果。

1.3.2.2　二次 PCR　引物采取通用的 16SrDNA 引物 Bac1 和 Bac2，参照文献[8]进行合成，并在上游引物 Bac1 的 5′端加上 40 个核苷酸的 GC 夹子[9]。

上游引物序列为 5′-CGC CCG GGG CGC GCC CCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GAC TAC GTG CCA GCA GCC-3′；下游引物序列为 5′-GGA CTA CCA GGG TAT CTA ATC C-3′。PCR 反应体系：10×PCR Buffer 5 μL，4×dNTP 1 μL(2.5 mmol/μL)，引物 Bac1 和 Bac2 各 2 μL(10 pmol/μL)，r Taq DNA 酶 0.25 μL，模板 0.5 μL，加双蒸水补足 50 μL。

PCR 反应条件：95 ℃ 5 min；95 ℃ 30 s，58 ℃ 30 s，72 ℃ 20 s，扩增 30 个循环；72 ℃ 7 min。PCR 产物 3 μL 用 20 g/L 琼脂糖凝胶进行电泳，100 V 电泳 30 min，然后用 0.005%EB 进行染色。紫外灯下观察结果。

1.3.3　PCR 反应产物的 DGGE 分析　用 Dcode™的基因突变检测系统对 PCR 产物进行分离。根据实验需要，使用梯度胶制备装置制备变性剂浓度从 30%～70%的聚丙烯酰胺凝胶垂直胶。使用的缓冲液为 1×TAE。上样量为浓缩后的15 μL PCR 样品，与 loading Buffer 混合后加入胶孔。在 60 V 的电压下，58 ℃电泳 16 h，电泳后用 EB 染色 15 min，再放在清水中浸泡 15 min，成像保存。

1.3.4　构建系统发育树　用 MEGA 3 生物软件中的邻结法(neighbor joiing，NJ)构建系统发育树，置信度(Boot strap)经 1 000次重复检验。

2　结　　果

2.1　16S rDNA 扩增　唾液样品经过第一次 PCR 后，均获得了特异性扩增片段大小在 1 508 bp 的片段，第二次 PCR 后，均获得特异扩增片段，其大小为 296 bp。

2.2　DGGE 结果与分析　将所得的 16S rDNA-PCR 产物通过变性梯度凝胶电泳分析，可以看到分离为一系列条带，见图 1。根据变性梯度凝胶电泳对 DNA 片断的分离原理，DGGE 图谱中的 22 个条带(从 A 到 V)代表 22 种不同的细菌。

8 名健康人口腔内唾液样品的唾液中有一些条带是一样的，如条带 D，这可能是口腔中的优势菌种。从 8 个样品的电泳图谱中可以得到样品中所含微生物的种类和组成。样品的图谱中，条带 A、B、C、J、G、V 的亮度微弱，说明 1 号个体口腔中，这几个条带所代表的微生物含量比较少，而条带 D、E 的亮度很强，说明这几个条带所代表的微生物含量较多。需要注意的是，3 号个体的条带与其他的个体有着明显的不同，如条带 K、L、M、O 似乎是其独有的一些条带，这可能与其口腔病变或者饮食习惯有关。有研究表明，从口腔唾液样品中提取到的 DNA 有来自食物和水中微生物的 DNA。对 8 个样品的条带进行比较，条带 D 所代表的微生物是口腔微生态环境中的优势菌种。但由于 DGGE 技术是通过 DNA 在胶中的不同迁移率而形成不同的条带，因此具有相似迁移率的序列也许会处于同一位置，导致一条条带可能并不只是代表一个种类[10]。

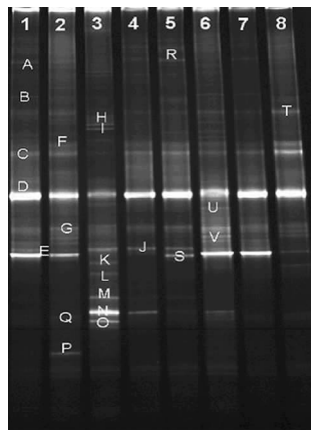

图 1　16S rDNA-PCR 产物的 DGGE 图谱

采用 MEGA 3 生物软件中的邻结法构建系统发育树。8 个样品在最小相似性(65%)下可分为 3 大类，即 1、4、7 为一类，2、5、6、8 为一类，3 单独为一类。这表明，个体间的菌群既有共同的一些细菌，又有个体独特携带的细菌，反映了不同人口腔微生物种群的多样性，见图 2。

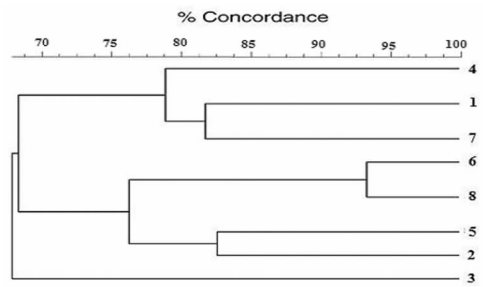

图 2　微生物系统聚类分析图

3　讨　　论

与传统的分离、培养法会受到所选用的培养基以及培养条件的限制一样，各种新兴的分子生态学方法也不可避免地在设计原理和技术操作上存在一些缺陷。本试验采用的 DGGE 是基于 PCR 技术的核酸分析法，不可避免地受到 PCR 扩增中一些不可控因素的限制。PCR 扩增的偏好性(preferential amplification) 是影响实验结果的一个重要因素，尤其是在对环境样品进行的多模板扩增中该现象比较严重。且不同微生物的基因组大小、16S rDNA 的拷贝数都会对 PCR 扩增产生影响，导致 PCR 扩增的产物量同其所反映的原始样品中相应微生物其数量间的相关性较差[10]。

同时 DGGE 所能检测到的微生物数量也是有限的。通过 DNA 的复性试验发现某人口腔中至少存在 103 种不同的基因组类型，但在 DGGE 电泳图谱上无法检测到这么多类群的微生物。研究结果表明，只有当该类群的微生物达到总微生物数量的 1%以上，才可以通过 DGGE 或单链构(下转第 1924 页)

测定金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、粪肠球菌、肺炎克雷伯菌(ESBL+)和白色念珠菌的 MIC 和 MBC，结果见表 1。不同浓度枸杞子浸出液对耐药菌均有一定程度抑菌效果，对金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌和粪肠球菌的抑菌作用强，MIC 均为7.9 g/L，MBC 分别为 12.5、6.25 g/L 和 12.5 g/L；对肺炎克雷伯菌和白色念珠菌的相对较弱，MIC 分别为 31.3 g/L 和 15.7 g/L，MBC 分别为 25.0 g/L 和 12.5 g/L。

表 1　7 种不同浓度枸杞子浸出液的最小抑菌浓度(MIC)和最小杀菌浓度(MBC)

菌株	金黄色葡萄球菌	大肠埃希菌	粪肠球菌	肺炎克雷伯菌(ESBL+)	白色念珠菌
MIC(g/L)	7.9	7.9	7.9	31.3	15.7
MBC(g/L)	12.5	6.25	12.5	25.0	12.5

3　讨　论

由于近年来抗生素的广泛使用，细菌和真菌的耐药现象越来越普遍，从天然产物中获取新的抗菌成分已成为目前抗菌方面研究的新重点[6]。本实验采用稀释法对不同浓度枸杞子浸出液对临床分离耐药菌金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、粪肠球菌、肺炎克雷伯菌和白色念珠菌的抑菌作用进行研究，证明不同枸杞子浸出液对耐药菌均有一定程度抑菌效果，对金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌和粪肠球菌的抑菌作用强，对肺炎克雷伯菌和白色念珠菌的相对较弱。

因此，本研究为枸杞子抗菌活性和抗菌机制的研究打下基础，为进一步开发枸杞子的药物价值提供了研究数据。由于该实验结果是在体外抑菌实验的研究基础上得到的，生物体内的免疫系统非常复杂，一种药物在机体内的杀菌效果与体外实验是有差异的，关于枸杞子在机体内的杀菌效果还有待于进一步研究。

参考文献

[1] Sze SC, Song JX, Wong RN, et al. Application of SCAR (sequence characterized amplified region) analysis to authenticate Lycium barbarum (wolfberry) and its adulterants[J]. Biotechnol Appl Biochem, 2008, 51(1): 15-21.

[2] Leung AY. Traditional toxicity documentation of Chinese Materia medica-an overview[J]. Toxicol Pathol, 2006, 34(4): 319-326.

[3] Chan Z, Huat Tan BK, Chan SH. Activation of T lymphocytes by polysaccharide-protein complex from Lycium barbarum L[J]. Int Immunopharmacol, 2008, 8(12): 1663-1671.

[4] Chang RC, So KF. Use of anti-aging herbal medicine, Lycium barbarum, against aging-associated diseases. What do we know so far? [J]. Cell Mol Neurobiol, 2008, 28(5): 643-652.

[5] Chen R, Moriya J, Yamakawa J, et al. Traditional Chinese medicine for chronic fatigue syndrome[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2010, 7(1): 3-10.

[6] 曾春兰，钟振国. 中药抗菌作用的研究进展[J]. 广西中医学院学报，2006(1)：51-53.

(收稿日期：2011-04-02)

(上接第 1922 页)

象多态性检测等方法被检测到。

作者运用 PCR-DGGE 分子技术对健康人口腔菌群进行研究，对 8 名健康个体唾液的微生物组成进行了分析，发现不同个体的菌群结构不仅在数量上有较大差异，而且出现了很多特异性条带。这一结果暗示了采用 PCR-DGGE 对口腔微生物多样性的检测是可行的。

口腔是微生物十分活跃的场所，研究人类口腔微生物的多样性及微生物的变化，对于了解人类自身的结构特征，防治人类口腔疾病，诸如龋齿的发生，以及人为控制口腔微生物与其宿主和微生物种群之间的平衡，有着重要意义。目前运用 DGGE 分子生物学技术监测和发现口腔内细菌群落，已作为研究微生物多样性的重要方法，在进一步研究口腔疾病领域必将得到更广泛的应用。

参考文献

[1] Jousset A, Lara E, Nikolausz M, et al. Application of the denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) technique as an efficient diagnostic tool for ciliate communities in soil[J]. Sci Total Environ. 2010, 408(5): 1221-1225.

[2] Fischer SG. Lerman LS. DNA fragments differing by single basepair substitutions are separated in denaturing gradient gels: correspondence with melting theory [J]. Proc Nati Acad Sci USA, 1983, 80(6): 1579-1583.

[3] Li Z, He L, Miao X. Cultivable bacterial community from South China Sea sponge as revealed by DGGE fingerprinting and 16S rDNA phylogenetic analysis [J]. Curr Microbiol, 2007, 55(6): 465-472.

[4] Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, et al. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity [J]. J Clin Microbiol, 2005, 43(11): 5721-5732.

[5] Bonetta S, Bonetta S, Carraro E, et al. Microbiological characterisation of Robiola di Roccaverano cheese using PCR-DGGE[J]. Food Microbiol, 2008, 25(6): 786-792.

[6] Theunissen J, Britz TJ, Torriani S, et al. Identification of probiotic microorganisms in South African products using PCR-based DGGE analysis [J]. Int J Food Microbiol, 2005, 98(1): 11-21.

[7] Bruce JP, Sasan K. Boches, et al. Bacterial Diversity in Human Subgingival Plaque [J]. J Bacteriol, 2001, 183(12): 3770-3783.

[8] Steinum T, Sjostad K, Falk K, et al. An RT PCR-DGGE survey of gill-associated bacteria in Norwegian seawater-reared Atlantic salmon suffering proliferative gill inflammation[J]. Aquaculture, 2009, 293(3): 172-179.

[9] Prol-García JM, Planas M, Pintado J. Different colonization and residence time of Listonella anguillarum and Vibrio splendidus in the rotifer Brachionus plicatilis determined by real-time PCR and DGGE[J]. Aquaculture, 2010, 302(1): 26-35.

[10] Kirk JL, Beaudette LA, Hart M, et al. Methods of studying soil microbial diversity [J]. J Microbiol Methods, 2004, 58(3): 169-188.

(收稿日期：2011-04-07)