

全菌蛋白 SDS-PAGE 技术鉴别 口腔细菌分型的研究

黄毅 赵云凤 肖晓蓉 雷莉 张萍

摘要 采用十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)结合考马斯亮蓝染色和银染色法,鉴别口腔细菌。结果表明,同一菌株用不同菌体破碎方法(SDS沸水浴破碎和超声波破碎法),不同批次处理的样品,不同电泳、蛋白区带的不同染色法所得蛋白图型基本一致;而不同种的细菌电泳和扫描图型均不相同。提示 SDS-PAGE 可用于菌种间鉴别,细菌属间鉴别较属内鉴别更能反映细菌亲缘关系的远近。

关键词 口腔细菌 细菌鉴别 SDS-PAGE 细菌蛋白

长期以来,对细菌的分类鉴定多限于细菌形态学和生化反应特征,操作程序繁杂,对某些种属的鉴定准确性不高,仅能反映细菌 10%~20% 的基因特性¹。1975年 Kersters² 采用聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)研究了42株土壤杆菌的蛋白电泳谱,其结果与常规表型特征的分类和DNA同源性的研究一致。以后,Moore等³和 Tonner⁴对口腔龈下菌丛蛋白电泳谱的研究表明,聚丙烯酰胺凝胶电泳是一项简便、经济、准确的鉴别口腔细菌的方法。本研究采用 SDS-PAGE 鉴别几株口腔常住厌氧菌,为口腔细菌的鉴别寻找一种简便、快速、灵敏的方法。

1 材料和方法

1.1 实验菌株

实验菌株包括 牙龈二氧化碳噬纤维菌(Capnocytophaga gingivalis FDC₈₂₋₂₇), 生痰二氧化碳噬纤维菌(Capnocytophaga sputigena) FDC₈₂₋₄, 黄褐二氧化碳噬纤维菌(Capnocytophaga orchracea) FDC₈₂₋₆, 嗜沫嗜血杆菌(Haemophilus aphrophilus) FDC₈₂₋₉, 具核梭形杆菌(Fusobacterium nucleatum) ATCC 10953, 坏死梭形杆菌(Fusobacterium nucleatum) ATCC 25286, 变形链球菌(Streptococcus mutans) 6715, 血链球菌(Streptococcus sanguis) JFr, 粘性放线菌(Actinomyces viscosus) A. Vly-7, 实验菌株均系美国波士顿福赛牙科中心惠赠。

1.2 电泳样本处理方法

1.2.1 破碎方法 十二烷基磺酸钠(SDS)沸水浴破碎,1 ml 细菌悬液中加入 10% SDS 至终浓度为 0.2%,沸水浴 5 min, 10000 r/min 离心 30 min, 收集上清液贮存于 -20℃。

超声波破碎(仅用于二氧化碳噬纤维菌株), 1 ml 细菌悬液置冰浴中以 20 kHz 振幅超声 2 min, 间歇 1 min, 共 2 次, 然后 10000 r/min 离心 30 min, 收集上清液贮存于 -20℃。

1.2.2 菌体可溶性蛋白提取 菌体可溶性蛋白提取的流程如下:

BHI-S 血琼脂平皿中细菌

0.02 mol/L PBS 液收集菌体

7000 r/min 离心 10 min

菌体沉淀

SDS 沸水浴破碎

上清液

Hartree⁵ 法测蛋白浓度

蛋白样品贮存于 -20℃

1.3 十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)

1.3.1 垂直板状电泳 凝胶约 110 mm × 100 mm × 1 mm, 胶中 Tris- 硼酸浓度为 0.089 mol/L, SDS 浓度 0.01%, 30 ml 总胶溶液中加入 0.25 ml 10% 过硫酸胺溶液, 20 μl TEM ED, 室温聚胶 1 h。电泳缓冲液为 TBE 溶液(0.089 mol/L Tris- 硼酸, 0.002 mol/L EDTA), SDS 浓度为 0.1%, 蛋白样品和等体积的 2 倍样品缓冲液(1.5% Tris, 4% SDS, 10% β-巯基乙醇, 10% 蔗糖, 0.04% 溴酚蓝)⁶ 混合后沸水浴 4 min, 上样量约 30 μg, 银染时上样量约 15 μg, 电泳在室温下完成, 电压 10 V/cm, 电流约 15~18 mA, 约需 3~4 h。

1.3.2 凝胶染色 a 考马斯亮蓝染色, 凝胶在 0.025% 考

马斯亮蓝 R-250, 50% 乙醇, 10% 冰乙酸染色 4 h, 25% 乙醇, 10% 乙酸洗至背景无色。

b 银染色, 首先用 50% 甲醇, 12% 冰乙酸固定过夜, 然后用重蒸水洗涤 20 min, 加入 250 ml 1% 戊二醛硼砂液振摇 50 min, 重蒸水洗涤 20 min 共 3 次; 加入 250 ml 银铵溶液 (5 ml 1 mmol/L NaOH 中加入 10 ml 20% AgNO₃, 再加入浓氨水滴定至黑色沉淀消失, 重蒸水定容至 250 ml), 振摇 20 min, 移除银铵液, 用重蒸水洗 20 min; 加入 250 ml 还原液 (25 ml 无水乙醇, 1.5 ml 1% 柠檬酸, 65 μl 36% 甲醛液加重蒸水定容至 250 ml), 至区带清晰为止, 立即用重蒸水洗, 以终止反应。若底色太深, 再加 450 ml Farmer's 还原液 (440 ml 重蒸水, 5 ml 20% Na₂SO₃, 5 ml 1% K₃[Fe(CN)₆]), 至区带与背景清晰满意为止, 用重蒸水彻底洗涤, 否则将使条带消失。

1.3.3 凝胶扫描, 经考马斯亮蓝染色的凝胶拍照后, 切下电泳区带, 在 Qkick 光密度计上扫描, 扫描波长 595 nm, 狭缝 0.5 mm, 扫描速度 50 mm/m in, 走纸速度 100 mm/m in。

2 结 果

2.1 不同样品 SDS-PAGE 处理的结果

2.1.1 不同破碎方法 SDS 沸水浴和超声波破碎的二氧化碳噬纤维菌所得的蛋白质主带数目及位置分布基本一致, 次带有细微差别 (图 1, 2)。

2.1.2 同一菌株不同批样品的电泳 二氧化碳噬纤维菌同一菌株不同批处理的样品的蛋白质图型完全一样 (图 1, 2)。

2.1.3 不同次电泳 同一样品不同次电泳蛋白质图型有轻微差异。

2.1.4 不同染色方法 银染所显蛋白质区带比考马斯亮蓝染色多、清晰 (图 1, 2), 但粘性放线菌、变形链球菌、血链球菌所显区带并不比考马斯亮蓝多 (图 3, 4)。扫描图谱直观、容易比较。

2.2 SDS-PAGE 鉴别口腔菌群结果

实验菌株粘性放线菌、血链球菌、变形链球菌、具核梭形杆菌、坏死梭形杆菌、二氧化碳噬纤维菌等的 SDS-PAGE 结果见图 1~ 4。各菌种图型特征如下: 二氧化碳噬纤维菌蛋白主带分布于分子量 25 kD~ 90 kD 之间 (图 1, 2), 蛋白质主峰位于 Ef (相对迁移率) 0.7~ 0.2 之间; 链球菌属在分子量 25 kD 和 14 kD 处有两条主带, 但血链球菌在 100 kD 处有一主带和变形链球菌鉴别 (图 3, 4), 其扫描图谱和电泳图谱相符 (图 5); 具核梭形杆菌在 62 kD, 39 kD 和 14 kD 处有 3 条主带 (图 3, 4); 坏死梭

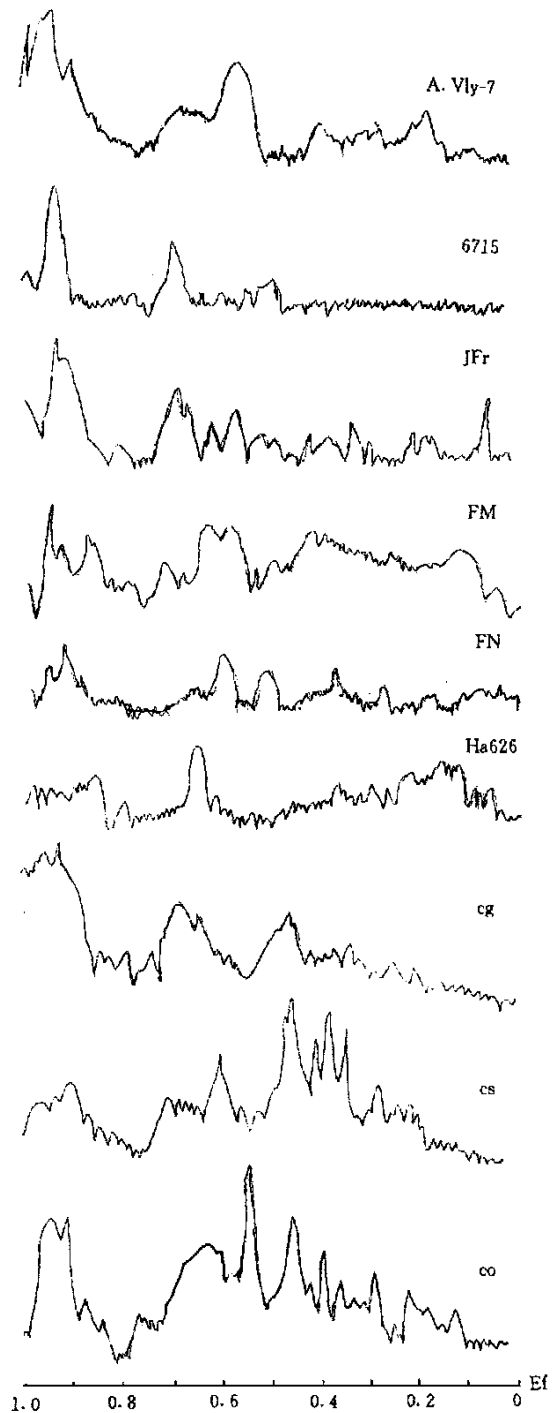


图 5 实验菌株蛋白电泳扫描图谱

粘性放线菌 A. Vly-7 变形链球菌 6715 血链球菌 JFr FM (坏死梭形杆菌 ATCC25286) FN (具核梭形杆菌 ATCC10953) Ha626 (嗜沫嗜血杆菌 FDC626) cg (牙龈二氧化碳噬纤维菌 FDC83-27) cs (生痰二氧化碳噬纤维菌 FDC82-4) co (黄褐二氧化碳噬纤维菌 FDC82-6)

形杆菌在 100, 45, 14 kD 处有 3 条主带(图 3, 4); 嗜沫嗜血杆菌在 Ef 0.65 处有一主峰(图 5)。由上可见, 各实验菌株的 SDS-PAGE 均具有某些特征, 不同属的细菌区别更为明显, 如链球菌属和二氧化碳噬纤维菌属较它们属内细菌的电泳图型差别更大(图 3, 4)。

3 讨 论

3.1 细菌样本的不同处理方法

本文比较了超声波与十二烷基磺酸钠沸水浴破碎的二氧化碳噬纤维菌电泳和扫描图谱, 发现不同破碎方法的电泳结果基本一致, 这可能是这两种方法对菌体的破碎程度和可溶性蛋白的溶解程度不同所致。同一菌株的不同批培养和同一批培养不同时间抽提的蛋白质电泳和扫描图谱完全一致, 表明本文提取蛋白的方法具有良好的重复性, 与 Taylor 等⁷、汪恩涛等⁸的报道一致。本研究发现不同次电泳有轻微的差异, 认为蛋白样品上样量的误差是影响不同次电泳重复性的主要因素, 同 Cato 等⁹的看法一致。Bert 等¹⁰报道, 银染色法比考马斯亮蓝染色法灵敏约 100 倍, 本研究采用两种染色法显示菌体蛋白区带, 银染上样量约为考马斯亮蓝一半, 但所显区带比考马斯亮蓝染色更多, 尤其是能显示考马斯亮蓝难以显示的含量甚微的蛋白质, 但对某些菌种如粘性放线菌、变形链球菌和血链球菌, 银染色法似乎并不比考马斯亮蓝染色法灵敏, 其原因尚待进一步研究。细菌蛋白区带较多, 肉眼比较有一定困难, 并且考马斯亮蓝染色的蛋白区带照像清晰度不高, 本研究对考马斯亮蓝染色的蛋白区带采用光密度计扫描记录, 扫描图谱的分析比较直观、容易, 和电泳图谱的分析相符。本研究也发现蛋白样品保存 2 周以后, 样品逐渐水解, 导致蛋白区带逐渐模糊, 颜色变淡, 最后完全消失, 严重影响实验的重复性。Moore 等³也发现, 某些菌种的蛋白质在细菌破碎后迅速水解, 加入蛋白酶抑制剂也难以防止。因此, 所提取的菌体蛋白应迅速电泳, 不宜存放。

3.2 口腔菌群 SDS-PAGE 鉴别

本研究结果表明: 不同种的细菌电泳和扫描图型均不相同, 如二氧化碳噬纤维菌蛋白质主带主要

分布于分子量 25 kD~90 kD 之间, 蛋白质主峰位于相对迁移率 0.7~0.2 之间, 链球菌属在分子量 25 kD 和 45 kD 处有两条主带, 这提示 SDS-PAGE 可用于种间细菌鉴别; 细菌属间区别较属内区别更为明显, 如血链球菌和变形链球菌均为同属细菌, 其电泳图型仅在 100 kD 处区带不同, 血链球菌在此处有一主带, 其余区域图型均相似, 而属于另一属的具核梭形杆菌却在 62 kD, 39 kD 和 14 kD 处有三条主带, 和链球菌属的区别更为明显, 这反应了细菌亲缘关系的远近, 同 Tanner⁴ 结果一致。

(本文图 1~4 见中心插页 2)

4 参考文献

- Owen RJ, Pitcher D. Current methods for estimating DNA base composition and levels of DNA-DNA hybridization. In: Good FM (eds). Chemical Methods in Bacterial Systematics. London: Academic Press, 1985: 67~93
- Kerstens K. Identification and grouping of bacteria by numerical analysis of their electrophoresis protein pattern. J Clin Microbiol, 1975, 87: 333
- Moore WEC, Hash DE, Holdeman LV, et al. Polyacrylamide slab gel electrophoresis of soluble protein for studies of bacteria floras. Appl Environ Microbiol, 1980, 39(4): 900
- Tanner ACR. Characterization of Wolinella spp. Campylobacter concisus, Bacteroides gracilis and Eikenella corrodens by polyacrylamide gel electrophoresis. J Clin Microbiol, 1986, 24(4): 562
- Hartree EF. Determination of protein modification of the lowry method that gives a linear photometric response. Ann Biochem, 1972, 48(2): 427
- T·曼尼阿蒂斯著, 邹福强译. 基因操作技术. 广州: 广东科技出版社, 199: 44
- Taylor AJ, Costas M, Owen J. Numerical analysis of electrophoretic protein patterns of bacteroides ureolyticus clinical isolates. J Clin Microbiol, 1987, 25(4): 660
- 汪恩涛, 陈文新, 李季伦, 等. SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳用于根瘤菌鉴定的研究. 微生物学通报, 1987, 14(2): 86
- Cato EP, Hase DE, Holdeman LV. Electrophoretic study of clostridium species. J Clin Microbiol, 1982, 15(4): 688
- Okakley BR, Kivsch DR, N·Ronald mom's. A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels. Ann Biochem, 1980, 105: 361

(1995-08-28 收稿, 1996-09-10 修回)

The Study on SDS-PAGE Technic Classification of the Whole Protein of Oral Bacteria

Huang Yi, Zhao Yunfeng, Xiao Xiaorong, et al

The Oral Bim edical Engeneering L aboratory of S tanatology, W est China U niversity of M edical S ciences

Abstract

Oral flora was classificated by SDS-PA GE combined with Com assie blue staining and silver staining The results showed that each species of the test oral bacteria expressed its specific electrophoretic protein pattern, the way of sample preparation, staining did not change the protein pattern This indicated that SDS-PA GE could be used to classificated oral flora The protein pattern was more obvious among the genus than that of within the genus This showed that different relationship was among the bacteria

Key words oral flora bacteria classification SDS-PA GE

氟化钙的体外抑菌试验

俞爱凤 赵德扬

氟化钙经证实能促使软化牙本质再硬化¹,洗必太对主要的致龋菌——变形链球菌有强有力的抑制作用²。本实验用氟化钙对变链菌及根管内常见的厌氧菌作体外抑菌试验,以氢氧化钙及洗必太为对照,并观察氟化钙与洗必太联合使用的效果,从而为氟化钙应用于临床实践提供依据。

1 材料和方法

材料: 氟化钙(上海制剂三厂)

氢氧化钙(上海第二医科大学医药材料厂)

醋酸洗必太(锦州制药一厂)

菌种: 变形链球菌(Ingbrit)

消化链球菌、产黑色素类杆菌、脆弱类杆菌(浙江医科大学附属儿童医院细菌室提供)

将各菌种按其所需条件接种于含相应培养液的试管内,微需氧或厌氧培养48h。

各称取0.25g的氟化钙、氢氧化钙、洗必太粉剂,分别与0.1ml蒸馏水调拌成稠糊状。另称取0.125g的洗必太粉剂2份,分别与等量的氟化钙或氢氧化钙粉剂混合,然后各加0.1ml蒸馏水调拌成稠糊状。

取灭菌培养皿20个,按菌种等分成4组,即每组5个培养皿,每个培养皿拟置入1种药物。

取各菌液0.1ml加入培养皿内,倒入溶化后冷却至45℃的含相应培养基的琼脂,混匀。凝固后用外径5mm的玻管在每一培养皿上打2个洞,将上述药物分别置于洞内,同一培养皿2洞内置同一种药物。培养48h后取出,测量抑菌圈直径。本实验重复作3次,求抑菌圈均值。

2 结果

附表 各种药物对实验菌的抑菌圈直径均值(mm)

菌种	CaF ₂	Ca(OH) ₂	洗必太	CaF ₂ + 洗必太	Ca(OH) ₂ + 洗必太
变形链球菌	36	13	37	35	0
消化链球菌	37	11	38	36	0
产黑色素 类杆菌	33	10	36	32	0
脆弱类杆菌	32	10	34	33	0

实验结果显示与龋病关系最为密切的变形链球菌及根管内常见的厌氧菌(消化链球菌、产黑色素类杆菌、脆弱类杆菌)对氟化钙及洗必太均敏感,而上述细菌对氢氧化钙的敏感性远低于前两种药物,氟化钙与洗必太混合后抑菌圈基本不变,仍然敏感,氢氧化钙与洗必太混合后无抑菌作用。

以上结果说明氟化钙的抑菌作用远较氢氧化钙为强,对牙本质的再硬化作用也优于后者¹,与洗必太无拮抗作用。因此氟化钙可望成为良好的间接盖髓剂及根管内药物充填的材料,也可与洗必太联合应用。

3 参考文献

- 1 高学军 氟化钙对软化牙本质的再矿化作用 中华口腔医学杂志,1987,22(2): 92
- 2 刘天佳,刘豫蓉,肖晓蓉,等. 洗必太对人体龋坏牙本质抗菌作用的研究 中华口腔医学杂志,1985,20(6): 354
(1993- 01- 18 收稿,1994- 05- 26 修回)

作者单位: 310006 杭州市中医院口腔科(俞爱凤), 杭州市中医院细菌室(赵德扬)