

[文章编号] 1000-1182(2008)06-0667-03

变异链球菌gtfs在不同pH条件下表达的差异性

陆玉^{1,2}, 刘天佳³, 杨锦波³

(1.口腔疾病研究国家重点实验室, 四川大学, 四川 成都 610041;

2.首都医科大学口腔医院 牙体牙髓科, 北京 100050; 3.四川大学华西口腔医院 牙体牙髓科, 四川 成都 610041)

[摘要] 目的 检测具有不同产胞外多糖(EPS)能力的变异链球菌菌株在不同pH条件下产EPS的能力及其与gtfA、gtfB、gtfC、gtfD表达变化的关系。方法 选取变异链球菌(血清型c)临床分离株502(高产糖株)和参考株UA159(低产糖株), 以实时定量逆转录聚合酶链反应(real-time RT-PCR)方法检测在不同pH条件下与变异链球菌产糖能力密切相关的毒力因子gtfA、gtfB、gtfC、gtfD的表达变化。结果 在pH5.5条件下, 高产糖株和低产糖株gtfA、gtfB、gtfD的表达均有不同程度的升高, 而gtfC略降低, 高产糖株gtfB、gtfC的表达水平高于低产糖株。结论 gtfA的表达水平与变异链球菌的致龋力密切相关。

[关键字] 变异链球菌; 葡萄糖基转移酶; 实时定量逆转录聚合酶链反应

[中图分类号] Q786 **[文献标识码]** A

Differential analyses of mRNA expression of gtfs from *Streptococcus mutans* in different pH condition LU Yu^{1,2}, LIU Tian-jia³, YANG Jin-bo³. (1. State Key Laboratory of Oral Diseases, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Dept. of Dentistry and Endodontics, Beijing Stomatological Hospital, Capital Medical University, Beijing 100050, China; 3. Dept. of Dentistry and Endodontics, West China College of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

[Abstract] **Objective** To determine the expression level of each gtf under different pH cultural conditions and to find the relationship between gtf expression levels with environmental pH in different strains of *Streptococcus mutans* (*S.mutans*). **Methods** *S.mutans* form clinical isolation with different extracellular polysaccharides(EPS) producibility and UA159 were selected. Their ability to produce EPS under pH5.5 and pH7 were tested. Then in two strains, the relative quantity of gtfA, gtfB, gtfC, gtfD's mRNA which were related to *S.mutan's* ability to produce EPC, were examined by real-time reverse transcription-polymerase chain reaction(real-time RT-PCR) methods under different pH culture condition. **Results** At pH5.5, expression levels of gtfA, gtfB, gtfD were increased while that of gtfC were decreased in both strains, and that of gtfB, gtfC were higher in strain which produces more ECP. **Conclusion** The expression levels of gtfs related closely to the cariogenicity of *S.mutan*.

[Key words] *Streptococcus mutans*; glucosyl transferases; real-time reverse transcription-polymerase chain reaction

龋病是一种细菌感染性疾病, 其发生以致龋菌在牙面的黏附为首要条件。变异链球菌(*Streptococcus mutans*, *S.mutans*)是主要致龋菌, 它以蔗糖为底物合成的细胞外葡聚糖能够介导细菌对牙面牢固的黏附, 从而增强变异链球菌的致龋作用^[1]。葡萄糖基转移酶(glucosyl transferases, GTFs)是变异链球菌自发合成的固有酶, 可以特异性地以蔗糖为底物合成细胞外葡聚糖。变异链球菌可产生3种葡萄

糖基转移酶, 分别为GTFB、GTFC、GTFD, 是变异链球菌重要的毒力因子, 其编码基因分别为gtfB、gtfC、gtfD。GTFB主要合成水不溶性葡聚糖, GTFC既合成水不溶性葡聚糖又合成水溶性葡聚糖, GTFD主要合成水溶性葡聚糖^[2]。

本课题组前期实验发现, 从部分高龋患者仅能分离出低致龋毒力株, 而从部分无龋患者仍能分离出高致龋毒力株, 这仅由变异链球菌的血清型和致龋毒力因子遗传多态性难以完全解释, 由此认为变异链球菌致龋毒力因子表达水平也影响龋病的发生。同时研究表明, 编码蔗糖磷酸化酶的gtfA也与变异链球菌的蔗糖依赖性黏附有密切关系^[3]。

变异链球菌在低pH条件下能够黏附至牙面, 并

[收稿日期] 2008-03-06; [修回日期] 2008-05-17

[基金项目] 高等学校博士学科点专项科研基金资助项目(20050610075)

[作者简介] 陆玉(1977-), 女, 陕西人, 主治医师, 博士

[通讯作者] 刘天佳, Tel: 028-85502208

且继续代谢产酸，这是其重要的致龋机制。pH5.5是导致牙面脱矿的临界pH值，因此在该pH条件下，变异链球菌gtfs的表达水平对研究其致龋力有重要意义。实时定量逆转录聚合酶链反应(real-time reverse transcription-polymerase chain reaction, real-time RT-PCR)是一种敏感、高效且可靠的定量检测RNA/DNA的方法。本实验的目的旨在定量检测变异链球菌在不同pH条件下gtfs的表达变化。

1 材料和方法

1.1 菌株和培养基

采用本课题组前期研究所获的变异链球菌(血清型c)临床分离株502(高产糖株)和参考株UA159(低产糖株)。培养基采用TPY培养基。

1.2 细菌的培养

将冻干变异链球菌(血清型c)临床分离株502和参考株UA159复苏并进行形态学鉴定，然后接种于TPY固体平板，厌氧培养48 h，挑取单菌落于相同条件下培养24 h增菌。按照菌液与培养基1:10(体积比)比例分别接种于pH7.0(对照组)和pH5.5的TPY培养基，培养至细菌的指数生长期第16 h，离心，弃上清液。

1.3 变异链球菌gtfs的real-time RT-PCR定量检测

1.3.1 RNA的提取 分别取不同培养条件下生长的临床分离株502和参考株UA159的10 mL菌液，按Trizol试剂说明书抽提细胞总RNA。取5 μL RNA样品行琼脂糖凝胶电泳检测。取5 μL RNA样品用紫外分光光度计检测 $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ ，分析其纯度和浓度。

1.3.2 引物设计 采用primer premier 5软件对gtfA、gtfB、gtfC、gtfD及recA进行引物设计，具体见表1。

表1 gtfA、gtfB、gtfC、gtfD及recA的引物序列

Tab 1 Primers of gtfA, gtfB, gtfC, gtfD and recA

基因名称	引物
gtfA-F	AGGTCGGTGCCAATGTCAATC
gtfA-R	CTTCAATACGGCCATCCAAATC
gtfB-F	TGCCGAGTCCCTTCTTATTC
gtfB-R	GCCATGTATTGCCCGTCATCT
gtfC-F	GTGCGCTACACCAATGACAGAG
gtfC-R	GCCTACTGGAACCCAAACACCTA
gtfD-F	TACCTTGGGCACCACAACACT
gtfD-R	TGCCGCTTATCATCTCACT
recA-F	GTGCGGAGATTGACGGAGATA
recA-R	CTTCCTTAAATGGTGGAGCAAC

1.3.3 逆转录聚合酶链反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) 将处理后的

RNA用cDNA合成试剂盒合成cDNA。在行定量PCR前需进行常规PCR，以确定目的基因在cDNA样品中是否表达，并确定PCR最佳扩增条件、反产物大小是否正常等。25 μL反应系统为：cDNA 0.5 μL、2.5 mmol/L dNTP 1 μL、10 μmol/L正向引物1 μL、10 μmol/L反向引物1 μL、10×PCR buffer 2.5 μL、Taq DNA Polymerase 0.5 μL、H₂O 18.5 μL。PCR反应的参数为：95 °C 1 min；94 °C 30 s，58 °C 30 s，72 °C 30 s，40次循环。反应产物取5 μL用于电泳检测。

1.3.4 real-time RT-PCR 先测定各目的基因与内参照基因的扩增效率。扩增效率是通过每个基因的5个浓度梯度的扩增来计算的。为确定实验的重复性，在检测扩增效率时，每个浓度梯度设3个平行管，以测定其相关系数。50 μL反应系统为：cDNA 1 μL、10 μmol/L正向引物1 μL、10 μmol/L反向引物1 μL、2×Platinum SYBR Green qPCR Super-Mix(Invitrogen)25 μL、ddH₂O 22 μL。PCR反应参数为：50 °C 2 min，95 °C 2 min；94 °C 30 s，58 °C 30 s，72 °C 60 s，45次循环。溶解曲线测定的PCR反应循环参数为95 °C 1 min；55 °C 1 min；55 °C 10 s，80次循环，每个循环温度升高0.5 °C。反应产物取5 μL用于电泳检测。

计算目的基因在样品与对照品间表达差异的倍数，公式为：

$$Rel.Quantity = \frac{GOI_{sample} / GOI_{control}}{Norm_{sample} / Norm_{control}} = \frac{(1+Eff)_{GOI}^{Ct_{control} - Ct_{sample}}}{(1+Eff)_{Norm}^{Ct_{control} - Ct_{sample}}}$$

其中Rel.Quantity为目的基因在样品与对照品间表达差异的倍数，GOI为目的基因，Norm为内参照基因，Eff为real-time RT-PCR扩增效率。

2 结果

2.1 细菌RNA的提取

琼脂糖凝胶电泳结果显示，从各组细菌提取的总RNA均完整无降解。所有实验菌株总RNA的纯度达到抽提的要求。

2.2 RT-PCR的检测结果

设计的引物均能有效扩增目的基因，且扩增特异性高。

2.3 real-time RT-PCR的检测结果

gtfA、gtfB、gtfC、gtfD、recA基因的扩增效率分别为99.3%、96.0%、99.5%、97.0%、99.9%，gtfA、gtfB、gtfC、gtfD、recA基因的相关系数分别为0.991、0.992、0.996、0.997、0.992。

2.4 gtfs在不同pH条件下的差异表达

与pH7.0条件下的表达水平相比较,在pH5.5条件下,UA159和临床分离株502的gtfA、gtfB、gtfD表达水平有不同程度的升高,而gtfC略降低(图1)。

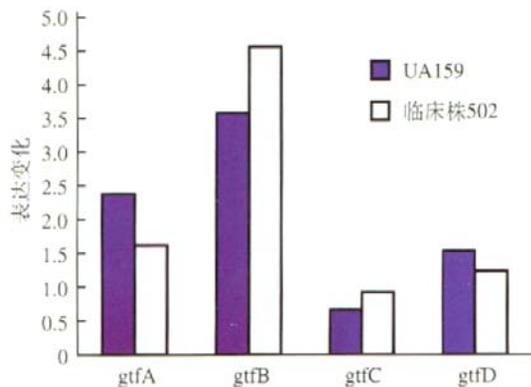


图1 gtfA、gtfB、gtfC、gtfD在pH5.5条件下的表达变化

Fig 1 The expression of gtfA, gtfB, gtfC, gtfD in pH5.5

3 讨论

龋病是致龋菌在牙面形成生物膜并在其中持续产酸致牙体脱矿而发生的一种疾病。胞外基质是生物膜形成和发展的基础,它使细菌易于黏附在牙体表面,且在细菌集聚中起作用^[4]。微生物学的研究发现胞外基质的主要成分是胞外多糖(extracellular polysaccharides, EPS),尤其是水不溶性多糖^[5]。GTFs是变异链球菌以蔗糖为底物合成水溶性和水不溶性葡聚糖的关键酶。研究证明,变异链球菌有多个GTFs,并有不同的生物学作用^[6],且不同变异链球菌菌株的GTFs致病性有差异。

以往对GTFs的研究发现,这些酶紧密相关且其产物在免疫学上有交叉反应,因此对其产物进行免疫学上的研究较为困难^[2]。gtfB和gtfC在基因组中呈前后邻接排列,其表达似乎有很强的相关性,但是也有研究显示gtfB和gtfC有不同的启动子^[6]。

本实验的结果显示,在pH5.5条件下,两株菌的gtfA、gtfB、gtfD表达均有升高,gtfC略降低。实验中观察到在该条件下,细菌生长较慢,进入指数生长期的时间也较晚,故gtfs各基因由其表达的高峰

处回落的时间较晚。分析各基因表达变化间的关系,仍符合前述结论。

在pH5.5条件下,有一个很特别的变化,就是gtfB的表达升高非常明显。在酸性条件下,能够耐受低pH值的细菌数量越来越少,细菌的生长和代谢受到威胁,水不溶性葡聚糖参与形成的生物膜有屏障作用,使微生物落中的细菌对外界环境有抵抗性,对细菌起到一定的保护作用。故笔者认为,gtfB的升高是变异链球菌作为一种致龋菌的特异性应激反应,更证明了水不溶性葡聚糖在变异链球菌致龋作用中的重要性。

此外,实验结果表明,在低pH条件下,高产糖株的gtfB、gtfC的表达水平高于低产糖株,提示gtfB、gtfC的表达水平与变异链球菌产胞外多糖能力密切相关,进而影响变异链球菌的致龋力。实验结果还显示,在pH5.5条件下,gtfA的表达升高也较为明显,gtfD也有不同程度的升高。低产糖株的gtfA、gtfD表达升高水平高于高产糖株的表达升高水平,与其相应的致龋力无正相关性。推测gtfA可能在变异链球菌耐酸机制中有着尚不清楚的作用,有待进一步研究。

【参考文献】

- [1] Colby SM, Russell RR. Sugar metabolism by *mutans streptococci* [J]. Soc Appl Bacteriol Symp Ser, 1997, 26 80S-88S.
- [2] Monchois V, Willemot RM, Monsan P. Glucansucrases: Mechanism of action and structure-function relationships[J]. FEMS Microbiol Rev, 1999, 23(2) :131-151.
- [3] Barletta RG, Curtiss R 3rd. Impairment of melibiose utilization in *Streptococcus mutans* serotype c gtfA mutants[J]. Infect Immun, 1989, 57(3) 992-995.
- [4] Leigh JA, Coplin DL. Exopolysaccharides in plant-bacterial interactions[J]. Annu Rev Microbiol, 1992, 46 307-346.
- [5] Dunne WM Jr. Bacterial adhesion: Seen any good biofilms lately[J]. Clin Microbiol Rev, 2002, 15(2) :155-166.
- [6] Smorawinska M, Kuramitsu HK. Primer extension analysis of *Streptococcus mutans* promoter structures[J]. Oral Microbiol Immunol, 1995, 10(3) :188-192.

(本文编辑 王 晴)

《国际口腔种植学会(ITI)口腔种植临床指南》出版发行

《国际口腔种植学会(ITI)口腔种植临床指南》是由国际口腔种植学会(ITI)组织世界级口腔种植专家编写的旨在提高口腔种植医师临床水平的技术指导丛书。本书为第1卷,主要介绍了美学牙种植学的定义和原则、种植前的系统评估和修复治疗计划、临床治疗程序和如何获得最佳美学效果、术后并发症及其起因等内容。本书采用深入浅出的形式并配以治疗过程的系列图片,便于读者理解,是口腔种植医师、全科医师以及本科生和研究生的重要参考书。本书由人民军医出版社于2008年5月出版发行。

人民军医出版社