

# 变形链球菌表面蛋白 A 区遗传多态性的研究

庄 姮 刘天佳 李 颂 杨锦波 杨德琴

**摘要** 目的:探讨变形链球菌表面蛋白 A 区遗传多态性与其粘附性能的关系。方法:分别选取本实验室前期工作所获得的粘附能力较强和较弱的血清 c 型变形链球菌临床分离株,提取全菌 DNA,经 PCR 扩增表面蛋白 A 区编码基因 spaP-a 后,用限制性内切酶 *Hae* III 进行限制性片段长度多态性分析。结果:经 *Hae* III 酶切后,两组血清 c 型变形链球菌均出现了 4 种基因型,且 4 种基因型在两组菌株的构成情况不同。结论:血清 c 型变形链球菌临床分离的 spaP-a 具有遗传多态性,粘附能力较强的菌株比粘附能力较弱的菌株具有更明显的异质性。

**关键词** 变形链球菌 表面蛋白 A 区 基因型 粘附力

## A Study on the Genetic Diversity within A-region of Surface Protein of *Streptococcus mutans*

Zhuang Heng, Liu Tianjia, Li Song, et al

West China College of Stomatology, Sichuan University

### Abstract

**Objective:** The purpose of this study was to investigate the relationship between genetic diversity within A-region of surface protein of *Streptococcus mutans* (serotype c) and their binding abilities. **Methods:** The clinical isolates of *S. mutans* (serotype c) included two groups with different binding abilities (cpm > 2000, cpm < 1000), which were derived from former work in our experimental lab. The bacterial DNA was extracted, and the spaP-a (473 ~ 1571 bp) was amplified using polymerase chain reaction (PCR). Genetic diversity of spaP-a was assessed by using restriction fragment-length polymorphism (RFLP) with restriction endonuclease *Hae* III. **Results:** Four different patterns of the spaP-a PCR-RFLP among strains were revealed when digested with *Hae* III. The proportions of four genotypes of strains with different binding abilities were different ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** The genetic diversity exists within the spaP-a (473 ~ 1571 bp) of the clinical isolates of *S. mutans* (serotype C). The diversity of strains with higher binding ability was more apparent than those with lower one.

**Key words:** *Streptococcus mutans* A-region of surface protein genotype binding ability

变形链球菌 (*Streptococcus mutans*, *S. mutans*, 简称变链菌)是人类的主要致龋菌。表面蛋白 P1 是其重要的毒力因子,主要介导变链菌的非蔗糖依赖性粘附。研究表明,变链菌表面蛋白包括 A 区、P 区、V 区及 C 末端<sup>[1]</sup>等。大多数学者认为,在 P1 和 P1 样蛋白分子中可能存在着多个粘结活性位点,特异性抗体与这些结合位点反应后可以阻断变链菌在牙面的粘附<sup>[2]</sup>。不同菌株的粘附性能不同,而此差异是由其遗传性所决定的。本实验通过对变链菌临床分离株表面蛋白 A 区编码基因的研究,探讨其遗传多态性与粘附性能的关系。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要试剂和仪器

10× PCR 缓冲液、MgCl<sub>2</sub>、dNTP、TaqDNA 聚合酶、限制性内切酶 *Hae* III 和 DNA 胶回收试剂盒(均为上海生物工程有限公司产品),基因组 DNA 纯化试剂盒(北京赛百盛公司),DY-2 厌氧培养箱(浙江义乌冷冻机总厂),紫外分光光度计(UV-1601,日本),PCR 扩增仪(PERKIN ELMER9600,美国),离心机(GmbH22331,德国),电泳仪(BIO-RAD PAC3000,美国),电热恒温水槽(DK-8B 型,上海)。

### 1.2 实验菌株

本实验室前期工作<sup>[3]</sup>所获的不同 AP-PCR 基因型的 *S. mutans*(血清型 c)临床分离株,包括:低粘附能力(粘附量小于 1000 cpm)的菌株 22 株;高粘附能力(粘附量大于 2000 cpm)的菌株 22 株。

本课题为国家自然科学基金资助项目(编号 30171013)

作者单位:610041 四川大学华西口腔医学院

1.3 全菌 DNA 提取及鉴定

将甘油保存的菌种接种于 TPY 平板, 37℃ 微需氧培养 48 h, 检查菌落生长状况, 镜检无污染, 再接种于 TPY 液体培养基, 微需氧增菌 24 h, 镜检无污染。用基因组 DNA 纯化试剂盒提取各菌株 DNA, -20℃ 保存。预计全菌 DNA 约为 23 kb。1% 琼脂糖凝胶电泳(以 λDNA/*Hind* III marker 作为分子量参照标准), 并用紫外分光光度计测定 DNA 在 260 nm 和 280 nm 处的吸光度(OD 值)。

1.4 引物的设计与合成

据 Kelly 等<sup>[4]</sup>对 *S. mutans* (血清 c 型) NG5 表面蛋白基因序列的分析及 Brady 等<sup>[5]</sup>的文献报道, 用 www. Genome. wi. mit. edu 提供的引物设计软件 primer3.0 设计引物, 扩增 spaP-a(473 ~ 571 bp) 目的基因片段。并用美国 National Bioscience Inc 研制的核酸分析软件 oligo5.0 评价设计的引物。引物由基康公司合成。上游引物: 5' CAGCTGAAGAAG-CAGTCAA 3'; 下游引物: 5'TCTGCCAGTGCAGCTTTAAT 3'。

1.5 目的基因扩增

以变链菌临床分离株(血清 c 型)全菌基因组 DNA 为模板, 用 PCR 法扩增目的基因, PCR 反应条件: 10 × PCR 缓冲液 3.75 μl, dNTP 6 μl (1 mmol/L), MgCl<sub>2</sub> 2.25 μl (25 mmol/L), TaqDNA 聚合酶 0.5 μl (5 U/μl), 上下游引物各 0.3 μl (50 μmol/L), 模板 DNA 2.5 μl, 加去离子纯水至总反应体积 37.5 μl。循环参数: (94℃ 35 s, 56℃ 35 s, 72℃ 2.5 min) × 34 循环; 72℃ 延伸 10 min。PCR 产物作 1% 琼脂糖凝胶电泳, 验证是否获得 1.1 kb 的目的基因片段。用 DNA 胶回收试剂盒回收产物, -20℃ 保存。

1.6 限制性片段长度多态性分析 (restriction fragment-length polymorphism, RFLP)

胶回收产物 5 μl, 10 U/μl 内切酶 *Hae* III 1 μl, 10 × 酶切缓冲液 2 μl, 纯水补足总体积至 20 μl。混匀, 37℃ 水浴过夜, 80℃ 水浴 20 min 终止酶切反应。6% PAGE 胶垂直电泳证实酶切彻底, 比较各菌株的酶切电泳图谱。

1.7 统计分析

采用 SPSS 10.0 软件, 对不同粘附能力菌株的基因型分布情况用双侧 χ<sup>2</sup> 检验进行分析。

2 结 果

2.1 DNA 定量及鉴定

变链菌临床分离株全细菌基因组 DNA 抽提产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳证实, 抽提产物完整, 无降解, 无 RNA 污染, 分子量约为 23 kb(图 1)。抽提的基因组 DNA 浓度为 550 ~ 850 μg/ml, 共获得 30 ~ 50 μg 的纯化基因组 DNA。所有实验菌株 OD<sub>260nm</sub>/OD<sub>280nm</sub> 比值均在 1.6 ~ 1.8 之间。说明抽提产物无蛋白质、酚污染。

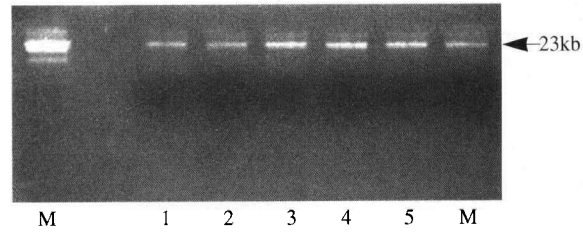


图 1 *S. mutans* 临床分离株全细菌基因组 DNA 的电泳图谱

Fig 1 The photos of genome DNA of *S. mutans* isolates

M: λDNA/*Hind* III marker; 1 ~ 6 为 *S. mutans* 临床分离株

2.2 PCR 扩增产物电泳结果

以变链菌全细菌基因组 DNA 为模板, 扩增出 1.1 kb 的目的片段, 分子量与预计的相同(图 2)。扩增产物电泳结果为单一条带, 未见任何杂带, 表明扩增特异性高。

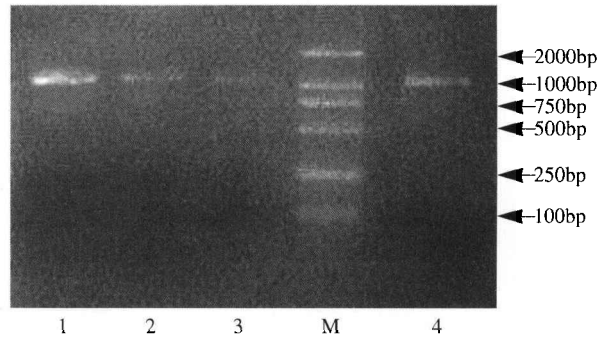


图 2 *S. mutans* 临床分离株 spaP-a(473 ~ 1571 bp) 基因扩增

Fig 2 Amplification of spaP-a(473 ~ 1571 bp) from clinical isolates of *S. mutans*

M: DL2000 marker; 1 ~ 4 为 *S. mutans* 临床分离株

2.3 RFLP 分析

变链菌临床分离株的扩增产物经 *Hae* III 酶切后在 1% 琼脂糖凝胶上共呈现 4 种基因型(即 a、b、c、d)(图 3), 各种类型在高、低粘附能力的菌株中所占例数见表 1。经双侧 χ<sup>2</sup> 检验表明, 不同粘附能力的菌株基因型构成比不同 ( $P < 0.05$ ), 但每种基因型在两组菌株中所占比例无显著差异 ( $P > 0.05$ )。

表 1 不同粘附能力变链菌(血清型 c) spaP-a(473 ~ 1571 bp) 的 PCR-*Hae* III 基因型分布

Tab 1 Distribution of PCR-*Hae* III genotype of spaP-a (473 ~ 1571 bp) of *S. mutans* isolates (serotype c) with different binding abilities

菌株	例数	基因型分布			
		a	b	c	d
高粘附能力	22	2	9	8	3
低粘附能力	22	1	18	1	2

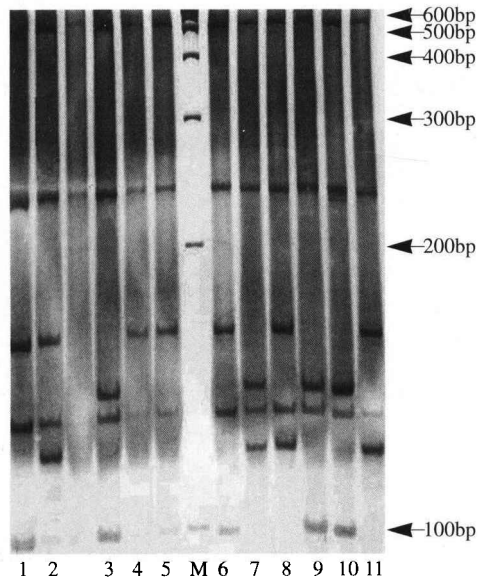


图3 *S. mutans* 临床分离株 spaP-a(473 ~ 1571 bp)被 *Hae* III 酶切后的 PCR-RFLP 类型

Fig 3 PCR-RFLP patterns of spaP-a(473 ~ 1571 bp) of *S. mutans* isolates digested by *Hinf* I

M: Gene Ruler™ 100 bp DNA Ladder; 带 1、4、5、6 为 c 型; 带 2、8、11 为 b 型; 带 3、9、10 为 d 型; 带 7 为 a 型

### 3 讨 论

临床观察发现,变链菌不同毒力克隆株的致病性不同,而其致病性差异的物质基础是毒力因子的遗传变异。变链菌表面蛋白作为主要的粘素之一,直接介导变链菌与牙面获得性膜上的蛋白成分特异性的结合,与变链菌在牙面的初始粘附、菌斑形成和龋病的发生密切相关。Crowley 等<sup>[6]</sup>的研究表明,缺乏表面蛋白 P1 表达的变链菌突变株致病性降低,说明表面蛋白是变链菌重要的毒力因子之一。表面蛋白由 1561 个氨基酸组成, N 末端存在一个由 38 个氨基酸残基构成的信号肽和 3 至 4 个由 82 个氨基酸残基组成的串联重复序列,该序列富含丙氨酸,形成  $\alpha$ -螺旋状结构,称之为 A 区;中间区域存在 2 至 3 个由 39 个氨基酸残基组成的串联重复序列,该序列富含脯氨酸,形成伸展状态的  $\beta$ -片层结构,称之为 P 区; C 末端包括 1 个亲水性壁跨区、1 个疏水性膜跨区、1 个保守的 LPXTGX motif 区和 1 个伸入胞浆的尾部<sup>[1]</sup>。现对于粘附功能区的定位大致有三种观点<sup>[7]</sup>: 位于分子 N 端或 A 区氨基酸序列中; 位于分子 C 端; 位于 P 区及邻近氨基酸序列中。表面蛋白基因 spaP 的全序列有 4865 个

碱基,其中 A 区、V 区、P 区编码序列分别为 655 ~ 1491 bp、2134 ~ 2512 bp、2617 ~ 2988 bp,分别对应氨基酸残基 186 ~ 464、679 ~ 823、840 ~ 963<sup>[5]</sup>。

本文作为系列课题的一部分,首先对变链菌表面蛋白 A 区编码基因的遗传多态性作一研究。本实验选取的菌株为前期工作所获得的粘附能力不同的变链菌临床分离株(血清 c 型)<sup>[3]</sup>。对其粘附功能区——表面蛋白 A 区进行 PCR-RFLP 分析,以了解变链菌临床分离株(血清 c 型)粘附能力差异与其遗传物质基础——spaP-a 多态性的关系。以变链菌临床分离株(血清 c 型)全菌基因组 DNA 为模板扩增出的目的基因片段,分子量约 1.1 kb,与预计的相同。电泳结果呈单一条带,无任何杂带,表明扩增特异性高。

PCR-RFLP 是分析生物体基因组结构最为经典的方法<sup>[8]</sup>,已广泛地用于口腔病原菌,如口腔链球菌、放线菌、牙龈卟啉菌等的分子流行病学的研究。其原理是用同一种限制性内切酶消化时,在同一种群的不同菌株中会出现不同长度的限制性片段类型。据此多态性可分辨菌株间的遗传变异。本实验选择识别序列为 GG↓CC 的限制性核酸内切酶 *Hae* III,结果显示经 *Hae* III 消化后,变链菌临床分离株表面蛋白 A 区编码基因出现了 4 种基因型。在不同粘附能力的菌株,4 种基因型的构成比不同。但每种基因型在两组菌株中所占比例未出现差异。粘附能力低的菌株以 b 型为主,而粘附能力高的菌株较之具有明显的异质性。提示由于 GGCC 位点的突变,导致变链菌临床分离株(血清 c 型)spaP-a 遗传多态性的出现。碱基突变可导致翻译的氨基酸改变,从而转译出不同的蛋白质。本实验未发现在两组菌株中所占比例不同的基因型,提示是否由于 GGCC 位点的突变而导致表面蛋白 A 区粘附性能的改变,尚需作进一步研究。

### 参考文献

- 1 Takahashi I, Okahashi N, Sasakawa C, et al. Homology between surface protein antigen genes of *Streptococcus sobrinus* and *Streptococcus mutans*. FEBS Lett, 1989, 249(2): 383 ~ 388
- 2 Crowley PJ, Brady LJ, Piacentini DA, et al. Identification of a salivary agglutinin-binding domain within cell surface adhesin P1 of *Streptococcus mutans*. Infect Immun, 1993, 61(4): 1547 ~ 1552

(下转第 456 页)

受影响的迹象。Nelson 等<sup>[6,7]</sup>的研究结果与之相同。

### 3.3 同期植骨术的手术方法

同期植骨与常规植骨术的设计原理有本质上的差异,应遵循如下原则:局部设计可用的粘膜瓣,做骨膜上有限分离,不剥离作为面中部生长发育中心的犁骨上颌缝,采用慢吸收缝线缝合伤口。本组病例因条件所限术前均未行矫形治疗,手术操作较难。Sadove 等<sup>[8]</sup>研究表明,裂宽小于 2 mm 时植骨成功率为 92%,裂宽超过 2 mm 时植骨成功率降至 70%,牙槽突裂宽度对手术成功的影响明显。作者认为,植骨术前用矫形的方法排齐上颌骨段是手术成功的关键,应该成为同期植骨的先决条件。

### 3.4 供骨区

髁嵴是牙槽突裂植骨修复术最常用的供骨区,亦是骨盆生长中心之一。儿童髁骨生长活跃,利于植骨成活,保存髁前上嵴开窗取骨术后反应轻微,无永久性并发症<sup>[9]</sup>。

### 3.5 植骨方式

牙槽突裂植骨修复通常分为嵌入式植骨和附贴式植骨两种(图 1)。上颌骨生长改建的规律是上牙槽突腭侧发生吸收,其唇侧骨质沉积,使牙槽骨弓增大。生长改建时会产生嵌入式植骨腭侧部分植入骨的吸收,加上植入骨在植骨术后的吸收会使植骨量相对不足。本组病例采用以附贴式为主的植骨方式,使植骨部位与上颌骨未来生长方向一致,保留尽可能多的最终植骨量,取得了较好的治疗效果。这说明唇腭裂修复术同期牙槽突裂植骨修复术在技术和方法上具有可行性,其长期疗效尚需进一步观察研究。

### 参考文献

1 Pickerell K, Quinn G, Massengill R. Primary bone grafting of

the maxilla in clefts of lip and palate. *Plast Reconstr Surg*, 1968,41(3):438 ~ 447

2 Robertson NRE, Jolleys A. Effects of early bone grafting in complete clefts of the lip and palate. *Plast Reconstr Surg*, 1968,42(5):414 ~ 420

3 Rehrmann AH, Koberg WR, Koch H. Long-term postoperative results of primary and secondary bone grafting in complete clefts of the lip and palate. *Cleft Palate J*, 1969,7(2):206 ~ 212

4 Krogman WM, Mazaheri M, Harding RL, et al. Longitudinal study of the craniofacial growth patterns in children with clefts as compared with normal, birth to six years. *Cleft Palate J*, 1975,12(1):50 ~ 53

5 Nelson CL, Chemello PD, Jones JE, et al. The effect of primary alveolar cleft bone grafting on facial growth. *J Oral Maxillofac Surg*, 1988,46(12): M33

6 Eppley BL. Alveolar Cleft Bone Grafting (Part I): Primary Bone Grafting. *J Oral Maxillofac Surg*, 1996, 54(1): 74 ~ 82

7 Sadove AM, Eppley BL. Timing of alveolar bone grafting: A surgeon's viewpoint. *Problems Plast Reconstr Surg*, 1992, 2(1):39 ~ 41

8 毛 驰,马 莲,李晓京. 大龄腭裂患者同期腭裂修复与齿槽嵴裂植骨的临床观察. *华西口腔医学杂志*, 2000, 18(5): 323 ~ 325

9 Mrazik J, Amato C, Lebau S. The ilium as a source of autogenous bone grafting: Clinical Considerations. *J Oral Surg*, 1980, 38(1): 29 ~ 35

(2001-01-16 收稿,2002-07-10 修回)

(本文编辑 邹玲莹)

(上接第 440 页)

3 黄晓晶,刘天佳,陈 舟,等. 高龋及无龋者变形链球菌临床分离株致病性研究 I 对唾液包被羟磷灰石的粘附实验. *华西口腔医学杂志*, 2000, 18(6): 416 ~ 418

4 Kelly C, Evans P, Bergmeier L, et al. Sequence analysis of the cloned streptococcal cell surface antigen I / II. *FEBS Lett*, 1989,258(1):127 ~ 132

5 Brady LJ, Crowley PJ, Ma JKC, et al. Restriction fragment length polymorphisms and sequence variation within the spaP gene of *Streptococcus mutans* serotype c isolates. *Infect Immun*, 1991, 59(5):1803 ~ 1810

6 Crowley PJ, Brady LJ, Michalek SM, et al. Virulence of a spaP mutant of *Streptococcus mutans* in a gnotobiotic rat model. *Infect*

*Immun*, 1999,67(3):1201 ~ 1206

7 Moisset A, Schatz N, Lepoivre Y, et al. Conservation of salivary glycoprotein-interacting and human immunoglobulin G cross-reactive domains of antigen I / II in oral streptococci. *Infect Immun*, 1994,62(1):184 ~ 193

8 Shiroza T, Shinozaki N, Watanabe T, et al. Rapid isolation of chromosomal DNA from oral streptococci and polymerase chain reaction-oriented restriction fragment-length polymorphism analysis for genetic heterogeneity. *Oral Microbiol Immunol*, 1998, 13(1): 11 ~ 16

(2002-07-08 收稿)

(本文编辑 刘 怡)