

[文章编号] 1000-1182(2007)03-0219-04

变形链球菌F-ATPase亚基基因uncEBF 基因多态性的研究

杨德琴^{1,2}, 刘天佳¹, 付春华¹, 亓庆国³, 庄 姮¹, 李 颂⁴

(1.口腔生物医学工程教育部重点实验室, 四川大学, 四川 成都 610041;

2.遵义医学院附属口腔医院 口腔内科, 贵州 遵义 563003; 3.山东大学口腔医院 牙体牙髓科, 山东 济南 250012;

4.安徽医科大学口腔医院 牙体牙髓科, 安徽 合肥 230000)

[摘要] 目的 研究变形链球菌临床分离株耐酸因子F-ATPase亚基c、a、b联合基因uncEBF的遗传多态性, 并探讨基因多态与细菌耐酸力的关系。方法 选取18株变形链球菌高耐酸株、20株低耐酸株, 以特异引物从细菌组DNA扩增uncEBF, 行限制性内切酶长度多态性分析(RFLP)和测序比较。结果 不同限制性内切酶RFLP产生不同的基因型, 测序证实了导致多态出现的基因变异; 其中内切酶Alu 产生的A、B基因型在不同耐酸力菌株的分布不同($P<0.05$), 高耐酸性菌株中A型基因uncEBF的检出高于低耐酸性菌株。结论 变形链球菌F-ATPase亚基联合基因uncEBF具有明显基因多态性, 酸性环境下生存力强的菌株可能出现基因的适应性变异, 可认为不同基因型uncEBF分布与耐酸力不同相关。

[关键词] 变形链球菌; 耐酸性; 基因多态性

[中图分类号] R781.1 [文献标识码] A

Genetic Diversity of F-ATPase Subunits Gene uncEBF Amplified from *Streptococcus mutans* Clinical Isolates YANG De-qin^{1,2}, LIU Tian-jia¹, FU Chun-hua¹, QI Qing-guo³, ZHUANG Heng¹, LI Song⁴. (1. Key Laboratory of Oral Biomedical Engineering of Ministry of Education, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Dept. of Oral Medicine, Affiliated Hospital of Stomatology, Zunyi Medical College, Zunyi 563003, China; 3. Dept. of Operative Dentistry and Endodontics, College of Stomatology, Shandong University, Jinan 250012, China; 4. Dept. of Operative Dentistry and Endodontics, College of Stomatology, Anhui University of Medical Science, Hefei 230000, China)

[Abstract] Objective The purpose of this research was to study the genetic diversity of F-ATPase subunit gene uncEBF derived from *Streptococcus mutans* (*Smutans*) clinical isolates, furthermore to investigate the relationship between the genetic diversity of F-ATPase and *Smutans* aciduric ability. Methods 38 *Smutans* strains included 18 high acid tolerance strains and 20 low acid tolerance strains. Gene uncEBF of these isolates were amplified with specific primers from *Smutans* genomic DNA, and the PCR products were analyzed by RFLP and sequenced. SPSS 11.0 statistic software assayed the results. Results It was testified that two genotypes A and B of PCR-RFLP were revealed when digested with Alu and Dde digested fragments of uncEBF displayed two different patterns C and D. Fisher exact two-tail test showed that the distributions of A and B genotype strains with different acidurance were different ($P<0.05$), and the proportion of A genotype strains from high acidurance group was higher than that from low acidurance one. Some of these amplified uncEBF genes from different genotype were sequenced and testified that there existed variation of Alu and Dde recognized sites. Conclusion This study indicated that uncEBF gene of *Smutans* F-ATPase obviously exhibited genetic diversity.

[Key words] *Streptococcus mutans*; aciduric; genetic diversity

[收稿日期] 2006-08-25; [修回日期] 2006-10-25

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(30171013); 贵州省自然科学基金资助项目[黔科合计(2004)3055]; 贵州省优秀科技人才省长专项基金资助项目[(2005)244]

[作者简介] 杨德琴(1972-), 女, 广西人, 副教授, 博士

[通讯作者] 刘天佳, Tel: 028-85501439

龋病是牙菌斑生物膜依赖性疾病, 对酸性环境的耐受是牙菌斑的重要生态特征, 在龋病的病因学研究中占主要地位。酸耐受直接与菌斑细菌的质子移位膜ATP酶(membrane bound proton-translocating ATPase, F_0F_1 ATPase, 简称F-ATPase)相关, 而变形链球菌(*Streptococcus mutans* *Smutans*)简称变链

菌，是牙菌斑中的主要致龋菌之一，变链菌F-ATPase是重要致龋毒力因子^[1]。

牙菌斑中变链菌依靠酵解糖类生存，酵解产物有机酸导致环境pH降低，酸攻击牙面发生龋齿，牙菌斑低pH下细菌的致龋性主要与其酸耐性所决定。不同耐酸力的变链菌株致龋性不同，F-ATPase是其耐酸力的主要调节机制之一^[2]。

细菌的生物学功能在很大程度上由其遗传特征决定，诸多研究^[3-4]基因型上证实了变链菌组DNA和致龋毒力因子的基因多态性及其与致龋力的关系。本课题组^[5-7]在基因型和基因表达水平上系统探讨了血清c型变链菌临床株产酸因子乳酸脱氢酶、耐酸因子F-ATPase的质子通道cab结构亚基基因^[8]、催化亚基的结构基因^[9]及旋转中心亚基^[10]与细菌产酸耐酸力的关系。本研究选取18株变形链球菌高耐酸株、20株低耐酸株，以特异引物从细菌组DNA扩增uncEBF，行限制性内切酶长度多态性分析和测序比较，从而探讨血清c型变链菌临床株F-ATPase的亚基基因uncEBF多态性及其与细菌耐酸力的关系。

1 材料和方法

1.1 菌株和培养基

本课题组前期获得的38株变链菌临床分离株^[9]：18株表现高耐酸性、20株表现低耐酸性(pH为4-7不同培养条件下变链菌的生长浓度和曲线为指标)。TPY (tryptone polypepton yeast)培养基(自配)。

1.2 试剂

PCR反应试剂盒(大连宝生物有限公司)，ultraPure™基因组DNA快速提取试剂盒(北京赛百盛有限公司)，限制性内切酶(Fermentas公司，美国)，DNA相对分子质量Marker：DL2000(大连宝生物有限公司)，pGEM-7zf(+)DNA/Hae (华美生物有限公司)，1×TBE buffer和5×TBE buffer(自配)。

1.3 仪器和设备

UV-265型紫外分光光度计(日本岛津公司)，MR1812低温超速离心机(Jouan公司，法国)，梯PCR仪(Eppendorf Mastercycle Gradient公司，德国)。

1.4 细菌基因组DNA抽提

冻干变链菌临床株复苏、形态学鉴定后接种于TPY固体平板，37℃、80%N₂、10%H₂和10%CO₂条件下培养48 h，挑取单菌落于20 mL TPY液体培养基在相同条件培养12-16 h，增菌。按ultraPure™试剂盒说明书提取DNA，-20℃保存。测定A_{260nm}/A_{280nm}，确定DNA纯度和浓度。1%琼脂糖凝胶电泳100 V，25 min检测。

1.5 PCR扩增uncEBF基因

根据GS-5的F-ATPase亚基c、a、b编码基因uncEBF全序列(Genbank accession number U31170)，用Primer 3在线设计并合成uncEBF特异引物5'-AGCACTTGGGATTGCTGTTT-3'，5'-TGCCTTAA-CGCTTGATAGGG-3' (上海申能博采有限公司)，digo 5.0评价引物。按PCR试剂盒说明书体系加样，循环参数如下：94℃预变性5 min，94℃变性30 s，60℃退火45 s，72℃延伸2 min，35个循环，72℃总延伸5 min。产物uncEBF(21~1360 bp)行1%琼脂糖凝胶电泳，凝胶成像系统分析，产物-20℃保存，备用。

1.6 变链菌uncEBF基因RFLP分析

clone3.1 version软件(Scientific Education Software公司，美国)分析基因酶切位点，选择限制性内切酶Dde、Ssp和Alu分别消化PCR产物：产物5 μL，酶0.5 μL，10×buffer 2 μL，灭菌去离子水加至20 μL体系，按内切酶说明书控制酶切条件和时间。酶消化产物行6%聚丙烯酰胺凝胶垂直电泳，银染显色分析带型。

1.7 统计方法

对所获得的数据采用SPSS 11.0统计软件确切概率法分析。

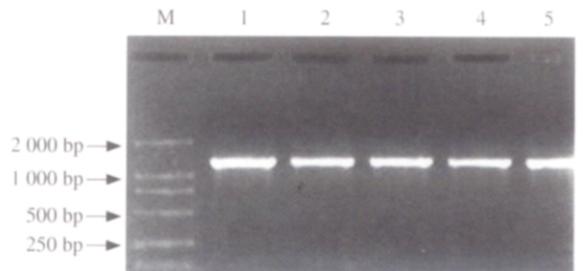
1.8 PCR产物测序分析

从RFLP分析不同基因型菌株中，各选择6个扩增样本进行纯化和测序(上海稽康有限公司)。序列行同源性分析，并与Genbank序列比较。clone3.1 version软件分析测序结果的变异位点。

2 结果

2.1 变链菌F-ATPase亚基uncEBF基因扩增

以达到纯度和浓度标准的变链菌临床株细菌组DNA为模板，特异引物扩增的基因uncEBF约1.34 kb(图1)。



M: DL2000 Marker; 1-5: 变链菌F-ATPase亚基uncEBF基因

图1 变链菌临床株F-ATPase亚基uncEBF基因扩增

Fig 1 uncEBF of *S.mutans* F-ATPase amplified by PCR

2.2 变链菌F-ATPase亚基uncEBF基因的RFLP分析

图2显示uncEBF基因RFLP分析发现Alu 消化

产物获得2种基因型A和B,而Dde 酶切扩增产物出现C、D 2种基因带型(图3)。A、B 2种基因型在不同耐酸力菌株中的分布为:A基因型在高、低耐酸力菌株中的分布分别为6和1株,B基因型在高、低耐酸力菌株中的分布分别为12和19株,以确切概率法双侧检验A、B基因型在高、低耐酸菌株中的差异具有统计学意义($P=0.038$, $P<0.05$)。RFLP的Dde 的酶切产物检出的D基因型只有3株,没有统计学意义。Ssp 酶切产物未表现多态带型。

2.3 变链菌F-ATPase亚基uncEBF基因clone3.1 version软件分析

根据clone3.1 version软件分析,变链菌的F-ATPase-uncEBF经Alu I 酶切后可观察到至少5条片段,为6%PAGE胶垂直电泳证实。

变链菌临床株的扩增产物uncEBF经Alu I 酶切后,对呈现的2种基因型A、B各6株进行测序,发现B基因型的Alu I 位点和参考株GS-5相同,而A基因型多出1个Alu I 位点:uncEBF在GS-5的1 279~1 282位5'-AGCC-3'突变为5'-AGCT-3',从而出现约80 bp小片段。

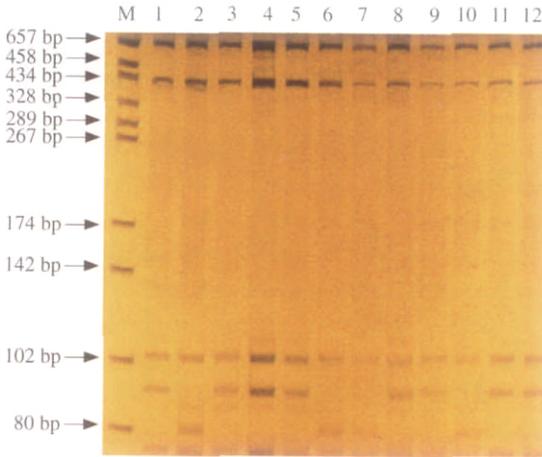
对Dde 酶切产生的D、C基因型uncEBF测序结果进行比较和分析发现,D型基因在1 190~1 194 bp的识别位点5'-CTAAG-3'突变为5'-CTAAA-3',因而C型基因有9个酶切位点,观察到6个片段,其余过小片段不可见,而D型基因只有8个识别位点,除了C型表现的6个片段还出现了约80 bp的可见片段。

3 讨论

F-ATPase位于细胞质,由两个功能不同结构域共同构成,即细胞质部分(F_1)和胞膜结合部分(F_0)。 F_0 多聚体包含a、b、c、d和e 5个亚基,此部分形成结合运输质子的特异通道。a、b、c亚基是构成质子通道、提供 F_1 和 F_0 结构连接的主要亚基,F-ATPase通过质子通道逐出质子,调节口腔链球菌群的胞内pH,以维持内外环境间pH^[11-12]:依照不同的膜电化学势能,当环境pH较高时运输膜外质子入胞内,同时将ADP和Pi合成ATP;当环境pH较低时则逆向移质子于胞外,并水解ATP以行使细胞功能。编码变链菌F-ATPase构成质子通道的这3个亚基的结构基因在操纵子(Genebank U31170)上的以c(757~976 bp)、a(990~1 079 bp)、b(1 727~2 224 bp)顺序排列,与大多数微生物的典型a、c、b排列不同,命名为uncEBF^[1]。

和其他细菌结构基因的研究^[1,13]表明,变链菌F-ATPase的胞膜结合部分 F_0 同源性低于细胞质部分 F_1 ,又因为 F_0 主要亚基c、a、b的操纵子排列与其他细菌相反,故对其编码基因uncEBF同源性研究一直广受关注,但针对不同耐酸力菌株的分析至今未见相关报道。本研究首次对来源于不同龋敏感人群的变链菌及不同耐酸力菌株的uncEBF进行遗传多态性分析,证实uncEBF具有明显的基因异质性。

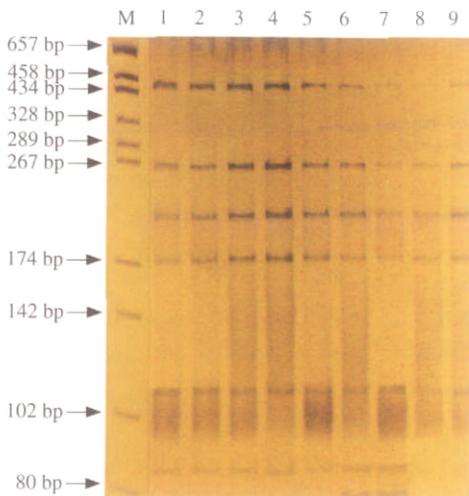
有研究证实,不同细菌F-ATPase耐酸能力不同,首先在于其膜结合结构域 F_0 的特异区别,变链菌c亚基的质子结合区及环状氨基酸构成的螺旋结



M: pGEM-7zf(+)-DNA/Hae III Marker; 1-12: 变链菌临床株F-ATPase亚基uncEBF基因,其中1、3、4、5、8、9、11、12为B基因型,2、6、7、10为A基因型

图2 变链菌临床株F-ATPase亚基uncEBF基因PCR-RFLP分析(Alu I 酶切)

Fig 2 PCR-RFLP patterns of uncEBF of *S.mutans* isolates (digested with *Alu I*)



M: pGEM-7zf(+)-DNA/Hae III Marker; 1-9: 变链菌临床株F-ATPase亚基uncEBF基因,其中1-5、8、9为C基因型,6、7为D基因型

图3 变链菌临床株F-ATPase亚基uncEBF基因PCR-RFLP分析(Dde I 酶切)

Fig 3 PCR-RFLP patterns of uncEBF of *S.mutans* isolates (digested with *Dde I*)

构和其他链球菌一致，c亚基的前30个氨基酸序列与枯草杆菌相似，而a亚基则与粪链球菌同源^[1,14]，即c、a亚基基因同源性较高。本实验也发现导致基因多态的碱基变异位点在b亚基的编码基因段，而c、a亚基基因较为高度保守。

A、B基因型uncEBF的分布在高低耐酸力菌株的分布不同，A基因型在高耐酸力菌株的检出较低耐酸菌株高，表明A型uncEBF基因的特殊位点的突变与致龋菌的耐酸力有关。可以认为变链菌在低pH环境中能够生存的菌株，需要加强F-ATPase这个重要的H⁺泵逐出胞内质子的能力，变链菌这种渐进的生理适应主要通过提高F-ATPase的活性，维持菌细胞跨膜 pH来实现的。

以c、a、b亚基为主要结构形成的质子通道在质子移位和维持细胞内外环境间的 pH起着必不可少的重要作用，编码基因位点的突变可能是一种细菌对环境耐酸性增强的相应的调节和适应^[15]，但这种突变是否导致基因表达以及所编码的亚基蛋白表达改变尚有待进一步探索。

[参考文献]

[1] Alan J, Robert G, Quivey Jr, et al. Cloning and nucleotide sequence analysis of the Streptococcus mutans membrane-bound, proton-translocating ATPase operon[J]. Gene, 1996, 183(1/2): 87-96.

[2] 杨德琴, 刘天佳, 杨锦波. 变形链球菌质子移位膜ATP酶研究进展[J]. 国外医学口腔医学分册, 2004, 31(3): 200-203.
YANG De-qin, LIU Tian-jia, YANG Jin-bo. Advance in membrane-bound proton-translocating ATPase of Streptococcus mutans[J]. Foreign Medical Sciences(Stomatology), 2004, 31(3): 200-203.

[3] 黄晓晶, 刘天佳, 陈国弟, 等. 变形链球菌(血清型c)临床分离株AP-PCR基因分型[J]. 中华口腔医学杂志, 2001, 36(4): 281-283.
HUANG Xiao-jing, LIU Tian-jia, CHEN Guo-di, et al. Typing of Streptococcus mutans(serotype c) by arbitrarily primed polymerase chain reaction[J]. Chin J Stomatol, 2001, 36(4): 281-283.

[4] 庄 姮, 刘天佳, 李 颂, 等. 变形链球菌表面蛋白A区遗传多态性的研究[J]. 华西口腔医学杂志, 2002, 20(6): 438-440.
ZHUANG Heng, LIU Tian-jia, LI Song, et al. A study on the genetic diversity within A-region of surface protein of Streptococcus mutans[J]. West China J Stomatol, 2002, 20(6): 438-440.

[5] 杨德琴, 刘天佳, 周学东, 等. 不同龋敏感人群变形链球菌分离株乳酸脱氢酶活性的初步研究[J]. 华西口腔医学杂志, 2005, 23(2): 116-119.
YANG De-qin, LIU Tian-jia, ZHOU Xue-dong, et al. Study on lactate dehydrogenase activity of Streptococcus mutans isolates derived from caries-active and caries-free individuals[J]. West

China J Stomatol, 2005, 23(2): 116-119.

[6] 杨德琴, 刘天佳, 肖晓蓉, 等. 变异链球菌临床株乳酸脱氢酶mRNA水平的表达研究[J]. 中华微生物学与免疫学杂志, 2005, 25(9): 723-726.
YANG De-qin, LIU Tian-jia, XIAO Xiao-rong, et al. Gene expression in lactate dehydrogenase of Streptococcus mutans from caries-active and caries-free individuals[J]. Chin J Microbiol Immunol, 2005, 25(9): 723-726.

[7] 杨德琴, 刘天佳, 李 颂, 等. 变形链球菌临床株乳酸脱氢酶基因遗传多态性研究[J]. 四川大学学报(医学版), 2006, 37(5): 781-784.
YANG De-qin, LIU Tian-jia, LI Song, et al. A study of genetic diversity in lactate dehydrogenase of Streptococcus mutans from clinical isolates[J]. J Sichuan Univ(Med Sci Ed), 2006, 37(5): 781-784.

[8] 杨德琴, 刘天佳, 元庆国, 等. 变形链球菌临床株F-ATPase亚基基因uncEBF在mRNA水平的表达研究[J]. 实用口腔医学杂志, 2005, 21(6): 737-741.
YANG De-qin, LIU Tian-jia, QI Qing-guo, et al. F-ATPase subunit uncEBF mRNA expression in Streptococcus mutans clinical isolates[J]. J Pract Stomatol, 2005, 21(6): 737-741.

[9] 杨德琴, 刘天佳, 庄 姮, 等. 变形链球菌F-ATPase亚基基因uncA遗传多态性的研究[J]. 中华口腔医学杂志, 2006, 41(1): 29-32.
YANG De-qin, LIU Tian-jia, ZHUANG Heng, et al. Genetic diversity of F-ATPase subunits gene uncA amplified from Streptococcus mutans clinical isolates[J]. Chin J Stomatol, 2006, 41(1): 29-32.

[10] 杨德琴, 刘天佳, 元庆国, 等. 变形链球菌临床株F-ATPase亚基基因uncG遗传多态性及mRNA表达水平研究[J]. 华西口腔医学杂志, 2007, 25(1): 1-4.
YANG De-qin, LIU Tian-jia, QI Qing-guo, et al. Genetic diversity and mRNA expression of F-ATPase subunit uncG gene of Streptococcus mutans clinical isolates[J]. West China J Stomatol, 2007, 25(1): 1-4.

[11] Futai M, Omote H, Sambongi Y, et al. Synthase(H(+))ATPase): Coupling between catalysis, mechanical work, and proton translocation[J]. Biochim Biophys Acta, 2000, 1458(2/3): 276-288.

[12] Suzuki T, Tagami J, Hanada N. Role of F₁F₀-ATPase in the growth of Streptococcus mutans GS5[J]. J Appl Microbiol, 2000, 88(4): 555-562.

[13] Robert G, Quivey Jr, Roberta C, et al. Polymerase chain reaction amplification, cloning, sequence determination and homologies of streptococcal ATPase-encoding DNAs[J]. Gene, 1991, 97(1): 63-68.

[14] Kuhnert WL, Quivey RG Jr. Genetic and biochemical characterization of the F-ATPase operon from Streptococcus sanguis 10904 [J]. J Bacteriol, 2003, 185(5): 1525-1533.

[15] Quivey RG Jr, Kuhnert WL, Hahn K, et al. Genetics of acid adaptation in oral Streptococci[J]. Crit Rev Oral Biol Med, 2001, 12(4): 301-314.

(本文编辑 汤亚玲)