

[文章编号] 1000-1182(2007)04-0342-03

常见致龋菌代谢组学鉴定的初步研究

李 淼, 肖丽英, 李继遥, 孔祥丽, 于佳辉, 周京琳, 肖晓蓉, 朱 砾, 龚其美, 李 伟
(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)

[摘要] 目的 初步将基于核磁共振的代谢组学方法应用于口腔致龋菌的鉴定, 期望寻找一种能快速鉴定口腔致龋菌的方法。方法 在改良TPY培养基中接种变形链球菌及粘性放线菌, 用比浊法绘制生长曲线, 选择两种细菌生长后4个时期的培养液检测核磁共振波谱, 用主成分分析法进行数据分析。结果 主成分分析显示两组数据内部有集中的聚类关系, 可以区分两种细菌。结论 代谢组学技术有望应用于口腔细菌的快速鉴定。

[关键词] 代谢组学; 核磁共振技术; 细菌; 鉴定

[中图分类号] R780.2 [文献标识码] A

Initial study on discrimination of oral microorganisms with the metabonomics technique LI Miao, XIAO Li-ying, LI Ji-yao, KONG Xiang-li, YU Jia-hui, ZHOU Jing-lin, XIAO Xiao-rong, ZHU Zhu, GONG Qi-mei, LI Wei. (Key Laboratory of Oral Biomedical Engineering of Ministry of Education, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

[Abstract] Objective To evaluate the feasibility of employing metabonomics method in identification of oral pathogenic bacteria. Methods The *Streptococcus mutans* ATCC25175 and *Actinomyces viscosus* ATCC15987 were respectively inoculated in same certain culture medium. The growth curves of the inoculated bacteria were drawn by turbidimetry. The culture solutions in four different growth phases of the both bacteria were used to test with the ^1H -Nuclear magnetic resonance (^1H -NMR) spectroscopy respectively. The data of ^1H -NMR spectroscopy results were analyzed by principal components analysis (PCA). Results The PCA showed the obvious clustering phenomena and the points of two group data stayed differentially together by two clusters. Therefore, the NMR-based metabonomics profiles can discriminate the two different kind of bacteria. Conclusion The metabonomics can be expected to be a kind of promising useful method in quick discrimination of oral pathogenic bacteria.

[Key words] metabonomics; nuclear magnetic resonance; bacterium; identification

口腔细菌的鉴定对龋病和牙周病等感染性疾病病因的研究和治疗十分重要。现有的细菌鉴定方法在快速、准确鉴定及分类口腔细菌方面都不尽如人意。代谢组学是20世纪90年代中期发展起来的一门对某一生物或细胞所有低相对分子质量代谢产物进行定性和定量分析的一门新学科^[1]。代谢组学的研究方法为核磁共振技术(nuclear magnetic resonance, NMR)。本研究尝试将代谢组学的方法用于致龋菌的鉴定, 旨在寻找一种快速鉴定口腔细菌的方法。

1 材料和方法

1.1 实验菌株、实验仪器及培养液制备

变形链球菌(*Streptococcus mutans*, S.mutans) ATCC25175和粘性放线菌(*Actinomyces viscosus*, A.

viscosus) ATCC15987由四川大学口腔生物医学工程教育部重点实验室提供。高速离心机TGL-16B(上海安亭科学仪器厂), 比浊仪(Biored公司, 美国), 生物显微镜(Olympus公司, 日本), 核磁共振仪(Bruker公司, 德国)。改良的TPY培养基由0.100 g/L胰酶分解的酪蛋白胨、0.005 g/L的酵母提取物、0.050 g/L的葡萄糖、0.050 g/L的NaCl配制而成。

1.2 生长曲线的绘制

将复苏48 h的实验菌株涂片经检查及生化鉴定为纯培养后, 接种于改良TPY培养基中孵育12 h, 用比浊仪调整菌悬液使终浓度达到 1.5×10^8 CFU/mL。在12支试管中分别加入改良TPY培养液3 mL, 每支试管中加入S.mutans菌悬液150 μL 。同样A.viscosus也培养在12支试管中。在80% N_2 、20% CO_2 、37 $^\circ\text{C}$ 下培养, 每隔4 h取S.mutans和A.viscosus各1支, 用比浊仪测菌悬液浓度, 观察至48 h。重复3次, 取每个时间点的平均值, 以时间(h)为横坐标, 以菌落形成

[收稿日期] 2006-11-14; [修回日期] 2007-03-05

[作者简介] 李 淼(1978-), 女, 江苏人, 硕士

[通讯作者] 肖丽英, Tel: 028-81802617

单位数(CFU/mL)的对数为纵坐标绘制生长曲线。

1.3 核磁共振仪检测代谢物图谱

为了将两种细菌在同一个时间作比较,均选取细菌生长在6、20、30、48 h的培养液代表迟缓期、对数期、稳定期、衰退期的代谢产物。分别取两种细菌生长的迟缓期(6 h)、对数生长期(20 h)、稳定期(30 h)、衰退期(48 h)的培养液,15 000 r/min离心20 min,沉淀细菌。将上清液放置在-80 °C低温冰箱中,解冻并保持在0 °C左右,在400 MHz核磁共振仪上测细菌代谢物图谱。每次实验重复两次。为检测该方法的稳定性及同种菌主成分的共性,共获得16个原始的自由感应衰减信号(free induction decay, FID)数据。将FID信号输入MESTREC-v4.7软件转化成¹H-NMR图谱,并对¹H-NMR图谱进行分段积分,积分区间为0.04宽,获得16组积分值,其中每个FID信号有200个积分值。

1.4 主成分法(principal component analysis, PCA)分析数据

采用SIMCA-P 11.0统计软件对200个积分值进行化学计量上的处理,以主成分矢量为坐标轴作二维图,称为得分图,可以反映类别间的差异。

2 结果

2.1 两种细菌的生长曲线

变形链球菌及粘性放线菌的生长曲线见图1。由图1可见两种细菌的生长规律相似,在6 h以前细菌生长很少,6~24 h快速增殖,24~40 h细菌繁殖速度降低,以后细菌数有减少趋势。

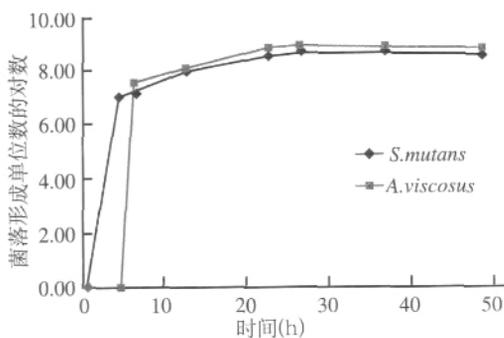


图1 变形链球菌和粘性放线菌的生长曲线

Fig 1 The growth curves of *S.mutans* and *A.viscosus*

2.2 核磁共振图谱的测定结果

6 h时细菌只有生长而没有代谢,本实验得到的细菌20、30、48 h的代谢物核磁共振波谱相似,但30 h更为典型,有代表性,此时代谢产物已产生并处于较稳定状态。*S.mutans*和*A.viscosus*生长30 h的细胞外核磁共振图谱见图2、3。*S.mutans*在化学位移值为1.4 ppm处有一个很强的峰出现,而*A.viscosus*在2 ppm及2.5 ppm处有新的代谢物出现,可以用来

区分两种细菌。

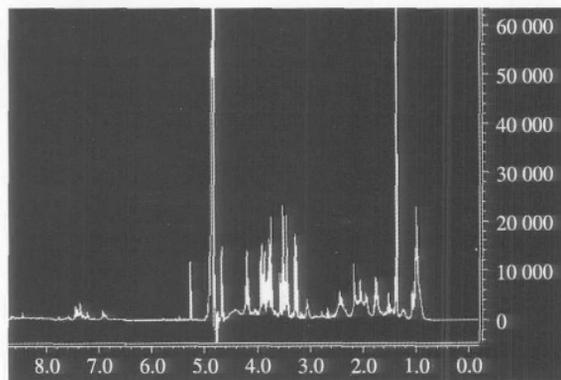


图2 生长30 h的*S.mutans*培养液的核磁共振图谱

Fig 2 ¹H-NMR spectra of *S.mutans* which grew 30 h in culture medium

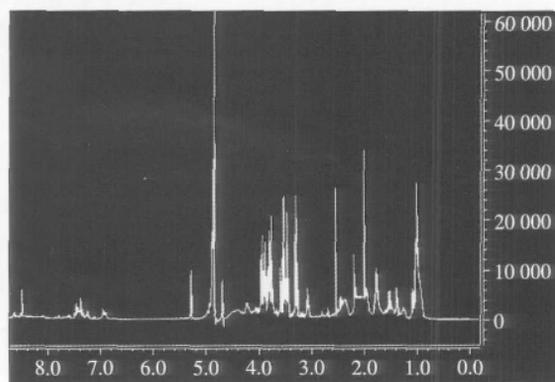


图3 生长30 h的*A.viscosus*培养液的核磁共振图谱

Fig 3 ¹H-NMR spectra of *A.viscosus* which grew 30 h in culture medium

2.3 主成分分析结果

PCA的目的是发现数据集中的聚类关系。从数据中提出4个主成分。主成分得分图可以看出两组数据并不是杂乱无章,虽然没有截然分开,但有各自的聚类关系(图4)。FID信号经过积分处理、主成分分析后,这个模型获得的化学位移值,理论上说正是这些离散的化学位移值对应的物质是区分两种细菌的特征产物。

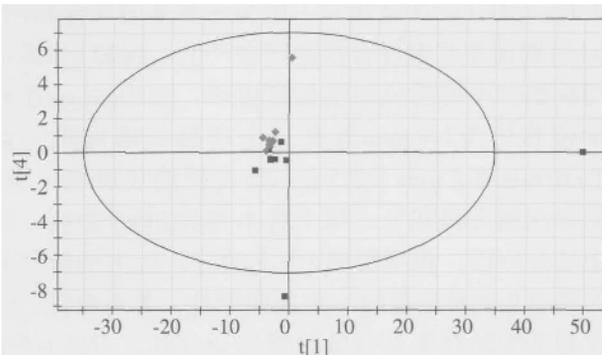


图4 主成分得分图,红色为*S.mutans*,黑色为*A.viscosus*

Fig 4 The scores of PC, the red represent *S.mutans*, the black represent *A.viscosus*

3 讨论

代谢组学^[2]方法的提出旨在新陈代谢的动态进程中,系统研究代谢产物的变化规律,揭示机体生命活动代谢本质的科学。其研究对象为相对分子质量1 000以下的小分子物质。代谢组学研究希望应用于疾病的诊断,通过对人体液核磁共振谱的分析找出异常的代谢物。同理这一方法可用于新药安全性的评价及筛选,现有部分研究开展于动物实验,如观察给药前后动物体内代谢物的变化^[3]。植物的细胞代谢组学研究^[4]通过研究植物细胞中的代谢组在基因变化和环境变化后的相应变化,去寻找植物代谢过程中的关键基因,掌握有关植物代谢的途径,改良植物的品种。代谢组学是系统生物学的重要组成部分,核磁共振技术的优点为高通量、高分辨率、对样本无破坏性,但其对样本制备要求高,低浓度的代谢物监测灵敏度低,其昂贵的设备及维护费用限制了它的使用。Bourne等^[5]对包括葡萄球菌属及链球菌属的312个菌株进行代谢组学的分析鉴定,与传统鉴定方法的相符率为92%。本研究首次将代谢组学方法应用于口腔致龋菌的细胞外代谢产物研究,结果提示该方法可以区分两种不同的细菌。

在代谢组学的研究中除借助核磁共振仪器外,最重要的数据处理方法是PCA, PCA是一种对数据降维处理的方法^[6]。对NMR谱进行分段积分,得到大量的数据,PCA的基本算法是一种空间变换方式,把标准化后的原始变量线性组合成若干个相互正交的矢量,即主成分(principal components, PC),其中第一主成分可反映样本之间的最大差异,其他主成分所反映的差异程度依次降低,以主成分矢量为坐标轴作图可以反映类别间的差异。对于由NMR谱组成的样本,其元素是化学位移区间,因此只要知道引起类别间差异的化学位移区间就可以知道对应的物质。在用核磁共振仪检测标本后发现两种细菌生长6 h的代谢图谱相似,因为培养基的成分相同,6 h有细菌生长但没有代谢产物产生,到20 h以后可观察到在不同的位移值处有强峰,如S.mutans在化学位移值为1.4 ppm处有一个很强的峰出现,而A.viscosus在2 ppm及2.5 ppm处有新的代谢物出现。把NMR谱分段积分,每个样本得到200个数据,经主成分分析,模型提出4个主成分。由主成分矢量作图可见两种细菌有一定的团聚性,并不杂乱。但理想的实验结果是两组数据完全分开,可能有3个原因:1)两种细菌在相同培养液生长的大体代谢物相同,在NMR谱中只看到个别峰强弱不同。2)与实验条件的掌握有关,因为代谢物的变化速度极快,

温度等环境极易影响核磁共振仪检测样本。3)当对分析方法更加深入掌握后,对不同样本量或不同类别的样本分析方法将更加完善。

经典的细菌鉴定方法为形态学和生化鉴定,该方法费时费力,且口腔细菌只能鉴定到属,而核磁共振仪的检测样本一维谱的时间仅要5 min。本实验发现核磁共振及主成分分析的方法可区分S.mutans及A.viscosus,该方法简便,但代谢物易受外界环境的干扰,当建立了口腔微生物的标准代谢物图谱结合模式识别方法,即主成分法就可达到细菌的快速鉴定及分类。今后的研究可将该方法与色谱分析方法相结合,探讨引起差异的化学位移值具体是哪种物质,以期用该方法区别遗传背景相似的细菌,这样代谢组学必将在功能基因组学中^[7]发挥更大作用,帮助人们更好更深入地认识生物体中各种复杂的相互作用及生物系统对环境及基因变化的响应。

[参考文献]

- [1] 陈慧梅,刘志红. 代谢组学及其研究方法和应用[J]. 肾脏病与透析肾移植杂志, 2005, 14(1): 59-64.
CHEN Hui-mei, LIU Zhi-hong. The research methods and application of metabolomics[J]. Chin J Nephrol Dialy Transplant, 2005, 14(1): 59-64.
- [2] Bundy JG, Willey TL, Castell RS, et al. Discrimination of pathogenic clinical isolates and laboratory strains of *Bacillus cereus* by NMR-based metabolomic profiling[J]. FEMS Microbiol Lett, 2005, 242(1): 127-136.
- [3] 王全军, 颜贤忠, 吴纯启, 等. Z24经口染毒大鼠尿液的核磁共振谱代谢组学研究[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2004, 18(6): 460-465.
WANG Quan-jun, YAN Xian-zhong, WU Chun-qi, et al. A nuclear magnetic resonance spectroscopic metabolomics analysis for urine from rats administrated Z24 [J]. Chin J Pharmacol Toxicol, 2004, 18(6): 460-465.
- [4] 许国旺, 杨军. 代谢组学及其研究进展[J]. 色谱, 2003, 21(4): 316-320.
XU Guo-wang, YANG Jun. Metabolomics and its progress[J]. Chin J Chromatography, 2003, 21(4): 316-320.
- [5] Bourne R, Himmelreich U, Sharma A, et al. Identification of *Enterococcus*, *Streptococcus*, and *Staphylococcus* by multivariate analysis of proton magnetic resonance spectroscopic data from plate culture[J]. J Clin Microbiol, 2001, 39(8): 2916-2923.
- [6] 邱玉洁, 夏圣安, 叶朝辉, 等. 生物医学核磁共振中的模式识别方法[J]. 波谱学杂志, 2005, 22(1): 99-111.
QIU Yu-jie, XIA Sheng-an, YE Chao-hui, et al. Pattern recognition methods in biomedical magnetic resonance[J]. Chin J Magnetic Resonance, 2005, 22(1): 99-111.
- [7] 杨军, 宋硕林, Jose Castro-Perez, 等. 代谢组学及其应用[J]. 生物工程学报, 2005, 21(1): 1-5.
YANG Jun, SONG Shuo-lin, Jose Castro-Perez, et al. Metabolomics and its applications[J]. Chin J Biotechnol, 2005, 21(1): 1-5.