

· 综 述 ·

口腔微生物的多相分类

袁 艺综述 肖丽英, 李继遥审校

(口腔疾病研究国家重点实验室, 四川大学 四川 成都 610041)

[摘要] 随着分子生物学技术的迅速发展, 口腔微生物的分类亦从传统的表型分类进入到各种分子水平分类。多相分类综合了表型和遗传型以及系统发育特征, 更加客观地反映了生物间系统进化的关系。本文就蛋白质电泳图谱、G+C 摩尔分数、分子杂交、16S rRNA 序列分析和代谢组学等口腔微生物多相分类方法作一综述。

[关键词] 口腔微生物; 多相分类; 表型; 遗传型

[中图分类号] R 780.2 [文献标志码] A [doi] 10.3969/j.issn.1673-5749.2010.06.012

Polyphasic taxonomy of oral bacteria YUAN Yi, XIAO Li-ying, LI Ji-yao. (State Key Laboratory of Oral Diseases, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

[Abstract] With the rapid development of molecular biology, the classify and identify of oral bacteria have come up to various molecule type classification standards from the traditional phenotype classification. Polyphasic taxonomy has synthesized the characteristics of phenotype, genotype and systematic growth, and it makes the classified method more objective and reasonable, representing the systematic evolution relationship between creatures. In this paper, several method in classify and identify of oral bacteria including electrophoresis, DNA G+C mole fraction, hybridization, the sequence analysis of 16S rRNA, metabonomics were reviewed.

[Key words] oral bacteria; polyphasic taxonomy; phenotypic; genotypic

在 20 世纪 70 年代以前, 口腔微生物主要是通过其形态结构、生理生化表型特征等来鉴别分类的, 某些细菌难以鉴定到种和型。但在研究工作中, 往往需要从型、亚型、株甚至分子水平上去研究口腔病原菌。随着分子生物学技术的发展, 人们以蛋白质和核酸等生物大分子结构来对口腔微生物进行鉴别, 获得了更多的分类信息。

多相分类源自 Colwell^[1], 旨在将细菌的各种信息和数据(包括表型和遗传型以及系统发育特性等)综合起来, 用多种方法综合比较、相互验证、互为补充, 进而更加合理地确定微生物的分类及其与系统发育间的关系, 准确地描述分类单位, 全面地反映微生物的多样性。一般来说, 表型信息源自蛋白质及其功能以及各种不同的化学标志等表型特征; 遗传信息源自细菌中的核酸, 特别是那些被看作是系统发育进化时钟的核酸序列, 如 16S rRNA 序列。多相分类技术对于现代微生物

分类具有重要的意义, 也是细菌多样性研究中常采用的技术手段。

1 蛋白质电泳图谱分析

蛋白质电泳图谱分析是微生物表型分类之一, 其分子生物学基础是菌体蛋白质由细菌染色体上的基因控制, 亲缘关系相近的微生物也应具有相似的蛋白质。由此, 人们利用细菌的蛋白质特征, 以电泳技术对微生物进行分类鉴定。具体方法是把一株菌株产生的可溶性蛋白质或全细胞蛋白质提取液在标准条件下电泳, 产生其特征性电泳图谱, 将电泳条带扫描图谱与标准菌株进行比较, 即可得到分类结果。一般生物样品, 常在十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)中分离鉴别。SDS 是一种阴离子去污剂, 可缠绕在多肽骨架上使蛋白质带负电荷, 电荷量与蛋白质的相对分子质量呈正比, 蛋白质在胶中移动距离的对数和相对分子质量基本成线性关系, 而与其所带电荷和形状无关, 从而提高了电泳的分辨力和准确度。目前, 电泳分析全菌蛋白质图谱已可提供与分子杂交分辨力相似的结果。此项

[收稿日期] 2009-09-22; [修回日期] 2010-08-03

[基金项目] 教育部科学技术研究重大基金资助项目(307022); 四川省应用基础研究基金资助项目(07JY029-072)

[作者简介] 袁 艺(1985—), 女, 重庆人, 硕士

[通讯作者] 肖丽英, Tel: 028-61153332

技术简便、经济、准确，在口腔微生物分类鉴别研究中也得到了运用。

Tanner^[2]将类杆菌属以及简明弯曲杆菌、纤维弯曲杆菌和啮蚀艾肯菌进行超声处理后行 SDS-PAGE，用银染显示其蛋白质区带，成功地鉴别出 4 种细菌。他认为，全菌蛋白质电泳对于细菌属间区别较属内区别更为明显，可以反映细菌亲缘关系的远近。黄毅等^[3]用 SDS-PAGE 所得蛋白质图形鉴别出二氧化碳嗜纤维菌属中的 3 个菌种。试验中，不同批次处理的样品，其蛋白质区带的不同染色所得的蛋白质图形基本一致；而不同种的细菌电泳和扫描图形均不相同。Teanpaisan 等^[4]将 PCR 扩增 16S rRNA 基因限制性片段分析和 SDS-PAGE 结合，对口腔中放线菌属中的不同菌种进行了分析。对于放线菌属中限制性酶切片片段模式相近或相同的 4 种细菌，通过 SDS-PAGE 都能成功鉴别。SDS-PAGE 可快速大量地对口腔放线菌进行种间鉴别。

虽然蛋白质电泳图谱分析技术以简便快捷得到了广泛的应用，但其也有一些局限性，如较小的电泳条件的不同就可改变每条光谱带间距离，以不同的凝胶进行电泳得到的结果也比较复杂，这为不同实验室间的结果比较带来一定麻烦^[5]。

2 DNA 的 G+C 摩尔分数测定

在生物体内，其 DNA 中 G、C、A、T 碱基的排列和比例是 DNA 特性的决定因素。在 DNA 中，G、C 的摩尔分数即遗传物质的碱基组成情况通常是恒定的，不受菌龄和生长等外部条件的影响。在判定细菌种系间的亲缘关系时，G+C 摩尔分数不同的菌株，肯定不是同一菌种，但 G+C 摩尔分数相同的菌株未必是同种或相近的菌种，即在实际运用中应与细菌的表型特征相结合，或需要分子杂交技术来进一步的分析。Weber 等^[6]将从人类龈上菌斑中分离的 5 株菌株，通过热变形温度法得到其 G+C 摩尔分数，再与其底物利用方式、终产物发酵方式等表型特征结合，鉴定出其中 2 株菌株为食果胶密螺旋体。

3 分子杂交技术

分子杂交技术是在 DNA 变性和复性的基础上建立起来的一种分子生物学技术。在微生物分类鉴定中，该技术通过比较微生物的 DNA 碱基的互补程度，即 DNA 碱基顺序的相似性来分析细菌之

间的同源性。当一群 G+C 摩尔分数法相近(差别<5%)的菌株不能确定其种系时，以分子杂交技术检测其碱基序列的相似性则可判定其种系，因此分子杂交技术常用于细菌种系水平的研究。在检测时，需先游离纯培养细菌的 DNA 双链，然后用特殊物质标志备用。用酶处理待鉴定的细菌，待 DNA 降解成单链后将备用的核苷酸链加入。如果这 2 株细菌的同源性高，那么将有大部分碱基配对，杂交率就高；反之，杂交率就低。若是来源于同一菌株的 DNA 变性成链，再重新结合时，其杂交率应为 100%。1987 年，国际系统细菌学委员会规定：DNA 同源性 >70%，杂交分子的热解链温度差 $\Delta T_m < 5^\circ\text{C}$ 的一群细菌菌株为同一个种^[7]。这个定义比较客观、明确，避免了表型变化、基因突变等造成的主观性。

Mättö 等^[8]用无放射性的种间特异寡核苷酸探针进行分子杂交，成功地从 344 株雷沃菌中鉴别出 111 株中间普雷沃菌和 233 株产黑普雷沃菌，且验证结果与电泳吻合。Kiyama 等^[9]将无放射活性的分子探针与 PCR 技术结合，用 PCR 扩增出目标微生物的特异 DNA 片段，再将这些特异性片段用非放射性的探针标志，则口腔放线菌鉴别的敏感性大大提高。

1989 年，荧光原位杂交(fluorescence *in situ* hybridization, FISH)技术^[9]以 rRNA 为靶分子，应用荧光标志寡核苷酸探针进行原位杂交检测鉴定微生物种类，鉴别过程中不需要分离纯化细菌，更加方便快速，使得分子杂交微生物鉴定方面的应用得到了进一步发展。Thurnheer 等^[10]应用 FISH 技术对 144 个牙菌斑样本上的细菌进行鉴别，将特异性寡核苷酸探针与样本原位杂交，成功地鉴别出咽峡炎链球菌、绿色链球菌和变异链球菌等，证实了特异性探针的杂交技术对同属不同种的细菌有良好的鉴别能力。

分子杂交技术在鉴别微生物时操作技术复杂，对 DNA 消耗较大，同时 DNA 探针也存在自身杂交、非特异结合和交叉反应等问题。

4 16S rRNA 基因序列分析

在 20 世纪 70 年代，Woese^[11]通过寡核苷酸编目制订出一种新的微生物分类标准，即通过 16S rRNA 基因序列这一比较稳定的遗传编码来分析和鉴定细菌的种系发生关系，判断其亲缘性来对微生物进行分类。

rRNA 是与核糖体蛋白质结合的 RNA 分子, 在蛋白质的翻译中起着重要作用。而在目前所有包含有遗传信息的生物分子中, 16S rRNA 因具备多种优点被作为常用的微生物分类标准。16S rRNA 基因序列分析的优点: 存在于所有生物体并执行相同功能, 包含足够的遗传信息和充分的同源保守性, 分子大小适合操作等。16S rRNA 基因序列分析是在进化的基础上对细菌进行分类的, 较过去的不稳定表型分析方法更能确定细菌之间的亲缘关系, 甚至可以纠正过去的一些错误认识。其具体操作过程包括: 从微生物样本中取得 rRNA 基因片段, 通过酶切、克隆、探针杂交或用 16S rRNA 引物 PCR 扩增等方式获取基因序列信息, 再进行比较。此项技术指标单一明确, 以保守基因序列为基准, 通过找出序列的差异鉴定种属, 对于物种水平微生物的鉴定是一项里程碑式的发现。

用 16S rRNA 序列设计种间特异性寡核苷酸探针, 通过免疫杂交可鉴别出口腔链球菌中的变异链球菌、唾液链球菌、口腔链球菌和咽峡炎链球菌^[12]。扩增 16S rRNA 限制性酶切片段, 利用 *Hae* 和 *Hpa* 限制性内切酶行双酶切, 可简单快速地对自临床分离的 457 株放线菌进行分析, 并将其与乳杆菌、双歧杆菌等不知名的细菌进行鉴别^[13]。Strauss 等^[14]在以 16S rRNA 基因序列和变性梯度凝胶电泳分析来自患者口腔和胃肠活检样本中的具核梭杆菌时发现, 这 2 种标本中的具核梭杆菌具有同源性, 而且胃肠内的具核梭杆菌可能来自口腔菌株的迁移。

目前, 16S rRNA 基因序列分析已成为细菌分类鉴定最常用的方法之一, 但应防止核酸污染而出现 PCR 假阳性结果。故在试验中应严格遵循无菌操作原则, 避免污染; 每次检测时应设立阳性、阴性和空白对照等, 以减少假阳性结果的发生。

5 代谢组学分析

代谢组学^[15]是一门利用磁共振、气相色谱-质谱和高效液相色谱-质谱等现代分析技术, 对某一生物或细胞的所有相对低分子质量的代谢产物进行定性和定量分析的新学科。在口腔微生物分类操作时, 需先将样品衍生化, 而后行磁共振、气相色谱-质谱和高效液相色谱-质谱或薄层色谱分析, 最后通过特征峰比对进行分类^[16]。与传统

的基于表型或基因型的微生物分类相比较, 代谢组学操作简单, 易获得微生物整体的细胞功能信息, 具有快速、高通量和全面的特点, 展示的是细胞真实的生理过程, 是无针对性的微生物生理研究方法。特别是在某些微生物的表型分类和基因型分类发生冲突的时候, 以代谢组学对其进行分析, 无疑为微生物的多相分类提供了新的思路。

Bourne 等^[17]在对葡萄球菌属和链球菌属的 312 株菌株进行代谢组学分析时, 通过磁共振质子波谱和多元统计分析的联合应用, 结果与表型鉴定的相似率达到 92%。李森等^[18]以磁共振检测了 2 种常见致病菌生长稳定期的培养液, 得到轮廓相似但不同波谱的峰图, 主成分分析表明, 这 2 种细菌的数据内部具有集中的聚类关系。

6 结语

现在, 各种凝胶电泳和 PCR 等技术的日趋完善, DNA 合成仪、顺序分析仪和氨基酸分析仪等的逐渐普及, DNA 信息库的全球公开化, 将推动微生物基因信息的网络化、国际化, 加速口腔微生物分类及其进化研究进程。由于生物的多样性表现在其能产生大量不同的分子, 口腔微生物的分类已不能仅仅从某一个侧面进行, 所以多相分类表现出日益重要的作用。一个新的微生物描述需要综合其表观特征和基因特征, 虽然以 rRNA 测序为基础的系统进化树是微生物分类的一大进步, 但适当的表观特征也能使进化树更加稳定。

目前, 细菌的多相分类尚无严格的规则, 可利用任一较重要的信息, 满足大部分的要求。多相分类并不因任何单独的概念偏差受到影响, 信息越多, 结果越能反应实际情况。对于任一新的分离菌株, 单相的分类方法是不可靠的, 需要诸多信息的综合。口腔微生物多相分类代替任何单相分类已不可避免, 故对其进行更多的研究, 口腔微生物分类理论才能日臻完善。

7 参考文献

- [1] Colwell RR. Polyphasic taxonomy of the genus *Vibrio*: Numerical taxonomy of *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, and related *Vibrio* species[J]. J Bacteriol, 1970, 104(1): 410-433.
- [2] Tanner AC. Characterization of *Wolinella* spp ampylobacter concisus, *Bacteroides gracilis*, and *Eikenella corrodens* by polyacrylamide gel electrophoresis[J]. J Clin

- Shewanella oneidensis* MR-1 LuxS in biofilm development and sulfur metabolism[J]. Appl Environ Microbiol, 2009, 75(5) :1301-1307.
- [23] van Houdt R, Moons P, Jansen A, et al. Isolation and functional analysis of luxS in *Serratia plymuthica* RVH1 [J]. FEMS Microbiol Lett, 2006, 262(2) :201-209.
- [24] Lebeer S, De Keersmaecker SC, Verhoeven TL, et al. Functional analysis of luxS in the probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* GG reveals a central metabolic role important for growth and biofilm formation[J]. J Bacteriol, 2007, 189(3) :860-871.
- [25] Gao Y, Song J, Hu B, et al. The luxS gene is involved in AI-2 production, pathogenicity, and some phenotypes in *Erwinia amylovora*[J]. Curr Microbiol, 2009, 58(1) :1-10.
- [26] Rezzonico F, Duffy B. The role of luxS in the fire blight pathogen *Erwinia amylovora* is limited to metabolism and does not involve quorum sensing[J]. Mol Plant Microbe Interact, 2007, 20(10) :1284-1297.
- [27] Kozlova EV, Popov VL, Sha J, et al. Mutation in the S-ribosylhomocysteinase (luxS) gene involved in quorum sensing affects biofilm formation and virulence in a clinical isolate of *Aeromonas hydrophila*[J]. Microb Pathog, 2008, 45(5/6) :343-354.
- [28] Hullo MF, Auger S, Soutourina O, et al. Conversion of methionine to cysteine in *Bacillus subtilis* and its regulation[J]. J Bacteriol, 2007, 189(1) :187-197.
- [29] 黄正蔚, 刘正, 唐子坚, 等. 变形链球菌luxS基因缺失对生物膜早期形成的影响[J]. 中华口腔医学杂志, 2009, 44(2) :72-75.
- [30] 王蓉, 边专, 聂敏. 变异链球菌中LuxS介导的群体感应系统的研究进展[J]. 国际口腔医学杂志, 2007, 34(1) :7-9.
- [31] Wen ZT, Burne RA. LuxS-mediated signaling in *Streptococcus mutans* is involved in regulation of acid and oxidative stress tolerance and biofilm formation[J]. J Bacteriol, 2004, 186(9) :2682-2691.
- [32] McNab R, Ford SK, El-Sabaeny A, et al. LuxS-based signaling in *Streptococcus gordonii*: Autoinducer 2 controls carbohydrate metabolism and biofilm formation with *Porphyromonas gingivalis*[J]. J Bacteriol, 2003, 185(1) :274-284.

(本文编辑 汤亚玲)

(上接第663页)

- Microbiol, 1986, 24(4) :562-565.
- [3] 黄毅, 赵云凤, 肖晓蓉. 全菌蛋白质SDS-PAGE技术鉴别口腔细菌分型的研究[J]. 华西口腔医学杂志, 1997, 15(1) :21-24.
- [4] Teanpaisan R, Dahlén G. Use of polymerase chain reaction techniques and sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for differentiation of oral *Lactobacillus* species[J]. Oral Microbiol Immunol, 2006, 21(2) :79-83.
- [5] Lukácsi G, Takó M, Nyilasi I. Pulsed-field gel electrophoresis: A versatile tool for analysis of fungal genomes [J]. Acta Microbiol Immunol Hung, 2006, 53(1) :95-104.
- [6] Weber FH, Canale-Parola E. Pectinolytic enzymes of oral spirochetes from humans [J]. Appl Environ Microbiol, 1984, 48(1) :61-67.
- [7] DeLong EF, Wickham GS, Pace NR. Phylogenetic stains: Ribosomal RNA-based probes for the identification of single cells[J]. Science, 1989, 243(4896) :1360-1363.
- [8] Mättö J, Saarela M, von Troil-Lindén B, et al. Distribution and genetic analysis of oral *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens*[J]. Oral Microbiol Immunol, 1996, 11(2) :96-102.
- [9] Kiyama M, Hiratsuka K, Saito S, et al. Detection of *Actinomyces* species using nonradioactive riboprobes coupled with polymerase chain reaction[J]. Biochem Mol Med, 1996, 58(2) :151-155.
- [10] Thurnheer T, Gmür R, Giertsen E, et al. Automated fluorescent *in situ* hybridization for the specific detection and quantification of oral streptococci in dental plaque [J]. J Microbiol Methods, 2001, 44(1) :39-47.
- [11] Woese CR. Bacterial evolution[J]. Microbiol Rev, 1987, 51(2) :221-271.
- [12] Bentley RW, Leigh JA. Determination of 16S ribosomal RNA gene copy number in *Streptococcus uberis*, *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae* and *S. parauberis*[J]. FEMS Immunol Med Microbiol, 1995, 12(1) :1-7.
- [13] Hall V, Talbot PR, Stubbs SL, et al. Identification of clinical isolates of *Actinomyces* species by amplified 16S ribosomal DNA restriction analysis[J]. J Clin Microbiol, 2001, 39(10) :3555-3562.
- [14] Strauss J, White A, Ambrose C, et al. Phenotypic and genotypic analyses of clinical *Fusobacterium nucleatum* and *Fusobacterium periodonticum* isolates from the human gut[J]. Anaerobe, 2008, 14(6) :301-309.
- [15] Fiehn O, Kopka J, Dörmann P, et al. Metabolite profiling for plant functional genomics[J]. Nat Biotechnol, 2000, 18(11) :1157-1161.
- [16] 周宏伟, 谭凤仪, 钟音, 等. 代谢组学及其在微生物领域的研究进展[J]. 分析化学, 2007, 35(2) :309-314.
- [17] 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 cultures[J]. J Clin Microbiol, 2001, 39(8) :2916-2923.
- [18] 李森, 肖丽英, 李继遥, 等. 常见致龋菌代谢组学鉴定的初步研究[J]. 华西口腔医学杂志, 2007, 25(4) :342-344.

(本文编辑 汤亚玲)