

毛细管电泳技术快速检测牙周病原菌

李振庆^{*1}, 孟凡明¹, 刘晨晨¹, 张大伟¹, 山口佳则²

(1. 上海理工大学光电信息与计算机工程学院, 上海 200093;

2. 大阪大学应用物理系, 大阪 565-0871)

摘要:建立了毛细管电泳快速检测牙龈卟啉单胞菌(*P. g*)、齿垢密螺旋体(*T. d*)、福赛斯坦纳菌(*T. f*) 3种牙周病病原菌种的方法。紫外分光光度法表明,采用无菌吸潮纸尖及PBS缓冲液可以实现牙周病原菌的快速有效提取。对提取的牙周病病原菌种做多聚酶链式反应(PCR)与多重PCR反应,最后以20 cm长,75 μm 内径的石英毛细管作为分离通道,分离电压4000 V,1.2% 羟乙基纤维素(HEC,250 K)为筛分介质,牙周病病原菌菌种*P. g*,*T. d*,*T. f* PCR及多重PCR产物12 min内得到较好分离。结果表明,毛细管电泳与PCR技术相结合,可以实现牙周病原菌种快速鉴定,且检测限低至 4.80×10^{-11} ng/ μL 。方法已用于牙周病原菌菌种的快速检测。

关键词:毛细管电泳;牙周病原菌;聚合酶链式反应;脱氧核糖核酸

中图分类号: O657.8

文献标识码: A

文章编号: 1000-0720(2014)09-1009-04

牙周病是由细菌、菌斑等始动因子诱发的一种牙周支持组织慢性炎症破坏性疾病,与牙周病有关的微生物主要是牙菌斑,特别是龈下菌斑中的革兰氏阴性厌氧菌和吞噬二氧化碳菌,如牙龈卟啉单胞菌(*P. g*)、齿垢密螺旋体(*T. d*)、福赛斯坦纳菌(*T. f*),是目前公认的牙周病可疑致病菌^[1,2]。长期以来,对病原菌的传统分类鉴定主要采用分离培养^[3]、形态特征^[4]、生化反应^[5]和免疫学^[6]等方法。毛细管电泳法(CE)具有高效、快速、环保等特点,已被广泛用于生物学检测^[7-10]。本文提出了一种在口腔内快速提取牙周病原菌种的实验方法,并采用毛细管电泳法对*P. g*,*T. d*,*T. f* 3种牙周病原菌聚合酶链式反应(PCR)目标产物进行分离分析,该方法对牙周病病原菌种的准确、快速检测具有重要的临床应用价值。

1 实验部分

1.1 试剂

羟乙基纤维素(HEC, Sigma公司,美国); SYBR Green I (Invitrogen公司,美国); $10 \times$ Tris-borate-EDTA (TBE) (Bio-Rad公司,美国); PBS缓

冲溶液(Sigma-Aldrich公司,瑞士); DNA primers (Fasmac公司,日本); 20 bp与100 bp DNA ladder, λ -DNA以及SpeedSTARTM HS DNA Polymerase购于日本Takara株式会社。

将HEC, SYBR Green I, TBE混合配制成筛分介质溶液;将20 bp与100 bp DNA ladder以1:1.3体积比在 $0.5 \times$ TBE缓冲液中混合成13 ng/ μL 的标准样品。标准样品中包含19个不同长度的DNA片段,分别为:20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1500 bp, 将此样品4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.2 毛细管电泳光学检测系统

实验室自制毛细管电泳系统核心部件^[10]如下:石英毛细管(Polyimicro Technologies, 美国), 毛细管总长度/有效长度(L_t/L_e):20/15 cm; 倒置显微镜IX71(Olympus, 日本); MODEL 610E高压电源(Trek, 美国); 汞灯光源发出的光经U-MWIB-3滤光片(Olympus, 日本)过滤后产生波长为460~495 nm的激发光, 荧光经60X物镜PlanApo/IR(Olympus, 日本)之后收集于光电倍增管R928

收稿日期:2014-05-27

基金项目:国家自然科学基金(21205078)、高等学校博士学科点专项科研基金博导类资助课题(20123120110002)、上海市教育发展基金会曙光计划项目(11SG44)和上海高校青年教师培养资助计划(51-13-302-102)资助

E-mail: zhenqingli@163.com

(Hamamatsu Photonics, 日本)。为降低电渗流, 采用线性聚丙烯酰胺对毛细管内壁镀膜处理^[11,12]。电泳过程在 25 °C 恒温下的暗室中完成。

1.3 牙周病原菌种 DNA 的提取

随机选定 4 名志愿者作为研究对象, 令志愿者咀嚼口香糖以清洁其口腔卫生; 将无菌纸尖置于志愿者门牙牙龈处约 1.0 min 后, 将无菌纸尖放入盛有 1.0 mL PBS 缓冲液的离心管内约 3.0 min; 将离心管放入 Spin 215 离心机离心约 2.0 min 后, 取上清液 2.0 μ L 供牙周病原菌种的 16S rRNA PCR 扩增反应使用。

1.4 多聚酶链式反应(PCR)

对应于 3 种牙周病原菌种, 其 PCR 引物(生物工程(上海)公司)分别如下:

牙龈卟啉单胞菌: 5'-TG TAGATGACTGATG GTGAAAACC - 3' 和 5'-ACGTCATCCCCACCTTC CTC - 3'

齿垢密螺旋体: 5'-AAGCGGTAGAGCC GCTCA - 3' 和 5'-AGCCGCTGTCGAAAAG CCCA - 3'

福赛斯坦纳菌: 5'-GCGTATGTAACCTGCC CGCA - 3' 和 5'-TGCTTCAGTGTCAGTTA TACCT - 3'

牙周病致病菌种 PCR 反应步骤如下: 将 10 \times Fast Buffer I 5 μ L, dNTP Mixture 4 μ L, 细菌 DNA 2 μ L、引物(最终浓度约 0.2 μ mol/L)、SpeedSTARHS 0.25 μ L, 33.8 μ L 灭菌水配制成 50 μ L 反应液于离心管内。细菌 DNA 的扩增和检测在 T100 Thermal Cycler PCR 仪上进行, 采用两步法 PCR 扩增标准程序, 循环参数为 95 °C 预变性 2.0 min 后, 95 °C 变性 10 s, 64 °C 退火 30 s, 40 个循环。P. g, T. d 和 T. f PCR 反应后目标产物片段大小分别为 197 bp, 311 bp, 641 bp。

2 结果与讨论

2.1 DNA 纯度测定

核酸中所含嘌呤和嘧啶分子具有共轭双键, 在波长 260 nm 处具有最大吸收峰。蛋白在 280 nm 波长处有具大吸收峰。当 DNA 样品中含有蛋白质、酚或其他小分子污染物时, 会影响 DNA 吸光度的准确测定。为检测溶液的浊度和其它干扰因子, 测量其在 320 nm 处吸光度值, 若该值不是接近于 0, 表明溶液中有悬浊物, 需纯化样品。采用 UV756 紫外可见分光光度计考察了牙周病原菌种 DNA PCR 产物在波长 260, 280 及 320 nm 处的吸光度值(表 1)。结果表明, 牙周病原菌种 DNA 样本

表 1 牙周病原菌种 P. g PCR 反应后吸光度值测量

Tab. 1 The absorbance of P. g PCR product

样品	A_{260}	A_{280}	A_{320}	A_{260}/A_{280}
1	0.955	0.531	0.008	1.798
2	0.942	0.515	0.004	1.829
3	0.92	0.502	0.018	1.833
4	1.115	0.615	0.003	1.813

在 260 与 280 nm 处吸光度之比 A_{260}/A_{280} 接近于 1.8, 在 320 nm 处吸光度 A_{320} 接近于 0, 样品纯度已达到毛细管电泳分析的要求。

2.2 电泳分离条件的优化

2.2.1 筛分介质浓度 考察了电场强度 200 V/cm, 质量分数 0.4% ~ 1.6% HEC (250 K) 筛分介质含量对 DNA ladder 分离的影响。实验结果表明, 当 HEC 含量低于 0.4% 时, 样品中各 DNA 片段几乎重合在一起而不能被有效分离, 这主要是由于 HEC 含量过低不能形成有效筛分网络所致; 当 HEC 含量高于 0.6% 时, 可以实现高分辨率分离 20 ~ 1500 bp DNA 片段。然而, 当 HEC 含量越高, DNA 分离时间越长。为此, 选择质量分数 1.2% HEC 作为毛细管电泳 DNA 筛分介质溶液。

2.2.2 电场强度 考察了质量分数 1.2% HEC (250 K) 筛分介质时, 140 ~ 240 V/cm 电场强度对 DNA ladder 分离的影响。实验结果表明, 电场强度越高, DNA 分离时间越短。当电场强度由 140 V/cm 提高至 200 V/cm, 20 bp DNA 片段迁移时间由 7.5 min 降至 5.51 min。当电场强度高于 200 V/cm 时, DNA 迁移时间降低的同时, 相邻 DNA 片段间分离度也明显下降。为此, 选择 200 V/cm 作为毛细管电泳时电场强度。

2.3 毛细管电泳技术鉴定

对牙周病原菌种 P. g, T. d, T. f 分别做 PCR 与多重 PCR 反应(Multi-PCR), 并在优化的毛细管电泳条件下分析牙周病原菌 PCR 产物。为确定 PCR 产物大小, 在相同的实验条件下毛细管电泳分析了 20 ~ 1000 bp DNA ladder。图 2 显示了电场 200 V/cm 下, 在 1.2% HEC (250 K) 溶液中毛细管电泳 DNA 样品图。结果表明, 毛细管电泳时, 当单独对 P. g 做 PCR 反应时, P. g 很容易被检测出, 且目标产物(197 bp)电泳峰检出时间与 DNA ladder 中 200 bp 峰检出时间基本吻合。当毛细管电泳 P. g, T. d, T. f 多重 PCR 反应产物时, P. g, T. d, T. f 电泳峰检出位置略有延迟, 这主要是由于实验误差所致。此外, 电泳图 2 中 20 bp 峰检出时间前后出

现的电泳峰主要来源于 PCR 反应过程中缓冲液内 PCR 引物过剩所致。

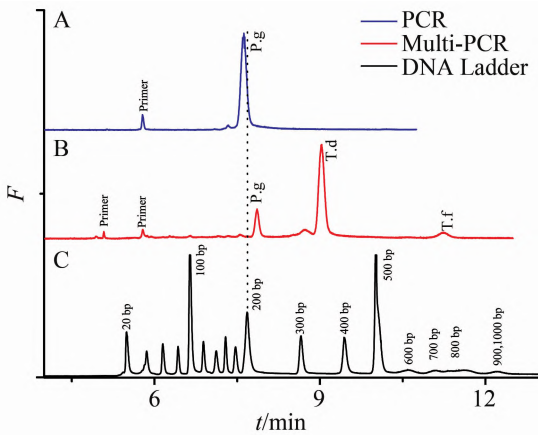


图1 毛细管电泳分离(A) P. g PCR 产物;(B) P. g, T. d 与 T. f PCR 产物;(C) DNA Ladder

Fig. 1 Capillary electropherograms of (A) PCR product of P. g; (B) PCR products of P. g, T. d, and T. f; (C) DNA ladder

电泳条件:毛细管有效/总长度(15/20 cm),电场强度(200 V/cm),进样(100 V/cm, 2.0 s),筛分介质(1.2% HEC, 250 K)

2.4 检出限

在相同的 PCR 缓冲液中对 λ-DNA 做不同浓度梯度溶液配制,之后测其 260 nm 处吸光度值。经线性拟合,从而获得该缓冲液中 DNA 吸光度与其浓度关系(图2)。根据该拟合函数以及 PCR 扩增产物在 260 nm 处吸光度值,可以推测出 4 个样本中 DNA

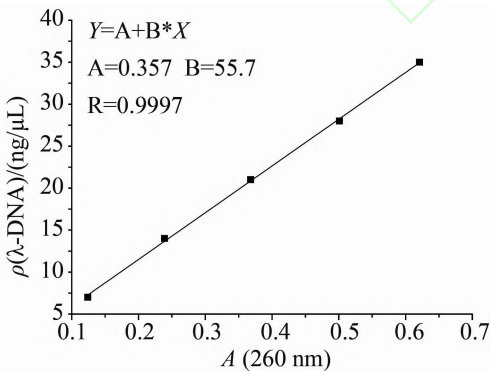


图2 不同浓度 λ-DNA 在 260 nm 处吸光度测量
Fig. 2 Absorbance of λ-DNA at 260 nm

质量浓度分别约为 53.6, 52.8, 51.6 和 62.5 ng/μL。由于 PCR 反应过程经历 40 个热循环,可以推测出口腔内检测位置处样本质量浓度约为 4.87×10^{-11} , 4.80×10^{-11} , 4.69×10^{-11} 和 5.68×10^{-11} ng/ μL。

3 结论

本文提出了简单方便的牙周病病原菌种快速提取的实验方法,并通过毛细管电泳分离 P. g, T. d, T. f PCR 产物,实现了牙周病病原菌种的快速检测。结果表明,该方法可在 5.0 min 内实现样品取样,27 min 内实现 PCR 牙周病病原菌种扩增,12 min 内实现菌种身份鉴定,因此对实现口腔内细菌快速鉴定具有很高的可行性,对研究细菌与牙周病的关系,建立牙周病的快速检测方法和作为牙周病的预防和治疗监测的手段有非常重要的临床应用价值。

参考文献

- [1] Loomer P M. Periodontology 2000, 2004, 34(1): 49
- [2] Ezzo P J, Cutler C W. Periodontology 2000, 2003, 32(1): 24
- [3] 王颖童,孙印旗,贾肇一,等. 疾病监测, 2013, 28(6): 438
- [4] 盛金良,陈创夫,郑永峰,等. 石河子大学学报:自然科学版, 2007,25(1):51
- [5] 陈 茶,屈平华,黄 彬,等. 中华医学感染杂志, 2013, 23(15): 3572
- [6] 杨颐康,朱文杰,吴自荣. 微生物学报, 1985, 25(2):91
- [7] 李 艳,岑兆丰,李晓彤. 光学仪器, 2003, 25(1): 8
- [8] 阮 佳,许 欣,孙成均,等. 分析试验室, 2013, 32(9): 6
- [9] 施志波,马文丽,梁 斌,等. 光学仪器, 2005, 27(2): 67
- [10] 黄宝美,莫金垣. 分析试验室, 2006, 25(7):1
- [11] Li Z Q, Liu C C, Dou X M, et al. J Chromatogr A, 2014, 1331: 100
- [12] Hjerten S. J Chromatogr A,1985, 347: 191
- [13] Schmalzing D, Piggee C A, Foret F. J Chromatogr A, 1993, 652: 149

Rapid detection of periodontal pathogens by capillary electrophoresis

LI Zhen-qing^{*1}, MENG Fan-ming¹, LIU Chen-chen¹, ZHANG Da-wei¹ and YAMAGUCHI Yoshinori² (1. School of Optical-Electrical and Computer Engineering, University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai 200093; 2. Departemnt of Applied Physics, Graduate School of Engineering, Osaka University, Yamadaoka Suita-city, Osaka 565 -0871, Japan), Fenxi Shiyanshi, 2014, 33(9): 1009 ~ 1012

Abstract: We developed a rapid way to detect periodontal pathogens (e. g. , *Porphyromonas gingivlis*, (P. g.), *Treponema denticola*, (T. d) , and *Tannerella forsythia*, (T. f)) by capillary electrophoresis (CE) in this work. Ultraviolet-visible spectrophotometric method demonstrated that the periodontal pathogens could be effectively extracted by paper points and phosphate buffered saline (PBS) solution. Then we performed polymerase chain reaction (PCR) and multi-PCR reaction of periodontal pathogens. Finally a coated silica capillary column (75 μm i. d \times 20 cm) was employed as the separation channel, 4000 V as the separation voltage, 1.2% hydroxyethyl cellulose (250 K) as the separation polymer, the PCR and multi-PCR products of P. g, T. d and T. f were effectively resolved within 12 min. Results show that CE conjunct with PCR can realize rapid detection of periodontal pathogens, and the limit of detection can reach as low as 4.80×10^{-11} ng/ μL . Such a method is of great clinical significance for rapid detection of periodontal pathogens.

Keywords: Capillary electrophoresis; Periodontal pathogens; Polymerase chain reaction; DNA