

計畫名稱：轉糖鏈球菌分子流行病學及表面蛋白致病因子之探討

計畫編號：DOH94-DC-1006

執行機構：台灣大學醫學院

計畫主持人：賈景山

計畫主持人服務單位：微生物學科

計畫主持人職稱：教授

研究報告中文摘要：

不同的致病菌為適應不同的生活形態其生理和毒力特性反映出有不同的基因存在，近十年來，眾多的致病菌基因圖譜已被建構完成，加速了對細菌基因演化的了解。利用基因體比對，顯示參與細菌基因體演化的機轉主要可分為兩種：一是基因的獲得；另一則為基因的喪失。黴漿菌、披衣菌、分枝桿菌屬和立克次體等細胞內病原生物的基因會有缺失的情形，而一些感染性病原菌，則可從不同的跳躍因子獲得毒力基因。此外，越來越多的研究發現，不管是高度保留性或高度重組性的細菌，皆有大規模的基因體重組經由大片段基因互換所產生，且經常是沿著複製的起始點具有對稱性。

轉糖鏈球菌 (*Streptococcus mutans*) 為草綠色鏈球菌的一員，是人類齲齒、及感染性心內膜炎等疾病的病原菌。利用生化鑑定或血清型鑑定已證實該菌具有高度變異性存在，而同一血清型 c 的分離株間仍有變異性存在其中，例如產生 bacteriocin，發酵 melibiose 和其他醣類的能力。本實驗室先前的研究已發現轉糖鏈球菌同一血清型 c 的分離株之營養需求不同，而且與致病力相關之細菌表面蛋白質的表現例如 *gbpA* 的合成與否，也有差異。但至今尚未有系統性關於轉糖鏈球菌染色體中，是否具有大規模的基因重組或大片段的基因互換的研究。而另一方面，卻有新菌種不屬於已知任何之血清型的菌株，自心內膜炎的血液中分離出來。因此更加顯示利用基因體尋找分類及與致病力相關的因子之重要性及必要性。本實驗的目的是 (1) 利用分子生物學方法分析分別從健康人、高齲齒罹患者口腔當中，和心內膜炎患者血液中分離出之臨床菌株轉糖鏈球菌染色體的變異性，(2) 找到基因重組或大片段的基因互換的位置及分子機轉。

我們總共篩選了 7 株實驗室菌株，58 株臨床菌株 (50 株口腔菌株，8 株血液菌株)，利用 *NotI* 和 *I-CeuI* 水解不同 *Streptococcus mutans* 菌株的 DNA，利用 PFGE 分析其基因變異，並以已定序出來的 *S. mutans* UA159 當作比對的依據。比較實驗室菌株之間的差異性，設計不同的探針分別與實驗室菌株 *S. mutans* UA159、GS-5(S)、和 GS-5(R) 不同的限制酵素水解片段雜合，顯示，GS-5(S) 當中有一個大片段的基因互換在兩個相反方向的核糖體之間。而 GS-5(R) 中則有兩個酵素 *NotI* 辨認的切割點有變異。

我們選用 PFGE 分類法將 *S. mutans* 分類並以 GelCompar 軟體分析 *Streptococcus mutans* 菌株的 PFGE 形式，試圖將之分類，結果顯示 *NotI* 水解的片段過於複雜，難以將其分類，顯示 *S. mutans* 具有很高的基因特異性。

中文關鍵詞(至少三個)：轉糖鏈球菌、基因變異、表面蛋白、致病力

## 1.前言：

### 一、研究背景：

轉糖鏈球菌群 (mutans streptococci) 是造成齲齒的主要病原菌之一，1924 年 Clarke 從人類齲齒的窩洞 (cavity) 中分離出來，因為革蘭氏染色的形狀比其他鏈球菌較為橢圓，可能為其他鏈球菌的突變種，因此稱之為 *S. mutans* (Loesche, 1986)，之後陸續有其他人從不同個體的齲齒中採樣，顯示 *S. mutans* 與人類齲齒有相關性 (Loesche, 1982.)。從不同來源所收集到的 *S. mutans* 菌株，在血清學和基因上顯示有很大的變異性 (Boyar *et al.*, 1985)，因此可利用血清學和一些生化鑑定將 *S. mutans* 再細分歸類為 mutans streptococci。

根據 16S rRNA 基因序列的分析，將 mutans streptococci 分成六種：*S. mutans*, *S. sobrinus*, *S. cricetus*, *S. rattus*, *S. macacae*, 和 *S. downei*。以往已知 mutans streptococci 包含八種血清型，a-h，但在 2004 年一月，Nakano 等人在患有菌血症或心內膜炎的病人血液中分離出與以往已知血清型不同的菌株，這類轉糖鏈球菌表面血清學分類特有的多醣體抗原缺乏葡萄糖側支，他們將之歸類為新的血清型 k (Nakano *et al.*, 2004)。

*S. mutans* 包含 c、e、f 三種血清型，但是約有 70% 至 100% 的人類分離株為 serotype c 的菌株，顯示 *S. mutans* 似乎為 mutans streptococci 中的 human type (Loesche, 1986)。在 MS (mitis salivarius) 的培養基上，serotype c、e、f 的 *S. mutans* 大多形成較小、表面粗糙的菌落 (Hamada *et al.*, 1984)，但另有研究者分離出較大、表面平滑的 serotype c *S. mutans*，並初步的發現較平滑菌落的形成，可能與其 FTase 的活性高有關 (Okahashi *et al.*, 1984)。

至今，口腔鏈球菌中，只有 *S. mutans* UA159 的基因被完整的定序出來。*S. mutans* UA159，血清型 c 的菌株，由 2,030,936 個鹼基對所組成的圓形基因體，GC 組成平均為 36.82%，與其他低 GC 組成的細菌有相似性。*S. mutans* UA159 含有 65 個 tRNAs 和五個 rRNA operons，基因體中，包含了 1963 個 ORFs，約 85.66% 顯示為 protein-coding 序列，其中約 63% 有推測的功能，21% 與其他種類的細菌有同質性，16% 為 *S. mutans* 所特有的。此外，許多與疾病相關的毒力因子、與代謝相關的基因和一些跳躍基因，皆被鑑別出來 (Ajdic *et al.*, 2002)。

長久以來，科學家普遍認為在菌株之間有 *S. mutans* 變異性存在，雖然利用生化鑑定或血清型鑑定可以區分 mutans streptococci，但仍然不是非常有效的來區分個別的菌株，同樣是血清型 c 的 *S. mutans* 被證實有一些變異性在其中，例如血清型 c 的 *S. mutans* 可利用產生 bacteriocin 的能力，和免疫力的能力而再被區分 (Berkowitz and Jordan, 1975；Davey and Rogers, 1984；Rogers, 1977)。

1991 年，Beighton 等人比較所收集來的 *S. mutans* 菌株之間的發酵和酵素反應，發現有許多 *S. mutans* 的分離菌株缺乏發酵 melibiose 和其他醣類的能力 (Beighton *et al.*, 1991)。之後，Robinson 等人發現這是由於這類 *S. mutans* 的菌株其染色體有缺失，在篩檢所有無法代謝 melibiose 的菌株後顯示，其原本含有 *msm* 和 *gal* 操縱子的 18 kb 區域，被一個不完整的插入序列，ISSmu3，所取代。此外，這些菌株也無法代謝  $\beta$ -glucosidase，作者分析發現是由於 *bgl* 調控子有一個約 4 kb 的缺失 (Robinson *et al.*, 2003)。

許多分類的方法被用來確認菌種之間的相似性，早期大都依賴著一些生化分析，如不同基質的使用能力、酵素的的存在與否、細胞結構及組成成分等，這些分析方法通常也都非常費時。至今，隨著分子生物學知識快速的成長，一些以分子生物學為基礎的分析技術也陸續發展出來，並應用在微生物辨識上。大致來講，

這些技術所需時間少，準確性及再現性也都比傳統生化方法來得好。這些分析方法主要是利用微生物本身染色體上基因序列的差異，而大部分的方法都應用了聚合酶連鎖反應法（polymerase chain reaction，簡稱 PCR）來將微生物 DNA 上所含有的特殊功能基因序列（functional gene）、重複性基因序列（repetitive elements）、或核糖體 RNA 等具有細菌親緣代表性的基因，在短時間給大量複製出，並利用複製出 DNA 片段長度分布的差異、或經過限制酵素反應（restriction enzyme digestion）後，限制片段多型性的差異、或是基因序列組成的相對相似性（homology），來判斷出微生物及微生物之間的差異。因此在 2002 年，Wu 等人將目前已知的常用分類方法整理歸類。依其比較的特質，將分類法分為表現型分類法和分子分類法。一個理想的分類方法，應該兼具快速、易操作、便宜、再現性高、鑑別力強和廣泛應用在各種微生物間等特質。雖然現在許多傳統的分類方法，例如，噬菌體分類法和血清學分類法，不再被用來當作主要的分類依據，但可當作輔助分子分類法的工具（Wu and Della-Latta, 2002）。

許多分析基因型的技術被利用來做為微生物的分類法。有些分析技術因其原理及所用的生物指標，只能適用於局部或特殊的微生物辨識，有些方法能有效地將微生物「株」與「株」之間的差異給區分，但卻不能提供此細菌在系統分類學上所占有位置的資訊。相反地，有些方法，如核糖體 RNA 序列分析，能有效地判斷出細菌在系統分類學上所占有的位置，但卻不能判斷出「株」與「株」之間的差異。基因分類的方法大致分為兩類，一種不需將 DNA 增幅（amplify），另一種則需要（Wu and Della-Latta, 2002）。需將 DNA 增幅（amplify）的基因分類法包含：

#### 1. 隨機增幅多型性分析 Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) —

RAPD 又叫做 AP-PCR，即利用任意的引子（primer）來做 PCR。是一項較新的技術被廣泛的應用於族群分佈變異或亞種間差異的研究。此分類法最早是由 Welsh 和 McClelland 在 1990 年所發展出來，RAPD 是利用短的（通常為 10 到 15 個鹼基對）、任意選取的引子，來複製基因體的 DNA 中具有同質性的序列，菌株間可利用洋菜膠電泳所顯示的片段數目和大小來分類。由於相同族群或相同亞種的個體間核酸序列變異較少，所以複製出的核酸片段大小差異較小，而不同族群或亞種的個體間的差異則較大，所以複製出的核酸片段大小差異亦較大。最近科學家們利用此分類法，來區分轉糖鏈球菌群中的 *S. mutans* 和 *S. sobrinus*，這兩種菌皆是轉糖鏈球菌群中與人類相關的菌種（Truong *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2001），且對 *dexA* 基因具有專一性的引子可用來偵測及鑑定 *S. mutans*（Igarishi *et al.*, 1996）。此外，也有報導指出，利用 AP-PCR 來分類 mitis group 鏈球菌所得到的結果，與利用表現型分類法相似（Rudney and Larson, 1999）。雖然 RAPD 可以用來偵測較多的核酸序列的差異，但是在進行實驗時的重複再現性非常的難以掌握。若將這種分類法與其他分子分類法做比較，可發現它比 RFLP 有較高的鑑別力，但較 Rep-PCR 差，因為引子與目標處（target sites）可能會有不完全的雜合且不同的 annealing 溫度可能會導致不同的結果。

#### 2. Repetitive PCR (Rep-PCR) —

在腸內細菌中可發現短的重複性基因序列家族，這個重複性基因序列最早是在大腸桿菌和沙門氏傷寒桿菌中被發現，這些序列包含高度保留性、反向的重複性序列，而且這些序列可區分為沒有顯著相關性的兩類（Gilson *et al.*, 1984；Hulton *et al.*, 1991；Sharples *et al.*, 1990；Stern *et al.*, 1984）。第一類是由重複的 extragenic plindromic elements (REPs) 所組成（Stern *et al.*, 1984），即大家所熟

知的plindromic units (Gilson E *et al.*, 1984); 第二類是由腸內重複的intergenic 一致的序列 (ERIC) 所組成 (Hulton *et al.*, 1991), 即intergenic repeat units (Sharples *et al.*, 1990)。比較REP-type和ERIC-type的基因序列, 可發現分別都有一致的基因序列, 這些elements皆包含高度保留性的plindromic inverted repeat序列 (Hulton *et al.*, 1991; Stern *et al.*, 1984)。1991年時, Versalovic等人利用這些一致性的基因序列設計專一性的引子, 且利用這些引子偵測其他不同的細菌, 發現在大多數的細菌中都可以找到有顯著相關性的REP-like和ERIC-like基因序列, 因此REP和ERIC聚合酶連鎖反應法可用來當作細菌基因體指紋的分類法。1999年Alam等人曾用此種分類法來區分當時已知的口腔鏈球菌, 發現此種分類法對口腔鏈球菌而言區別性太大, 以致於無法做species-level的鑑定。

### 3. 增幅片段長度多型性 Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) —

AFLP 是結合了 RFLP 與 RAPD 兩項的技術可以更精確的提供菌種間的差異性, 更進而提供所謂核酸指紋(DNA fingerprinting)的根據。原則上, 在分析 AFLP 的第一步時, 基因體 DNA 被一個切割 DNA 較頻繁的限制酶(例如, *MseI*, 認識 4 bp 長的序列)水解和另一個切割 DNA 較不頻繁的限制酶(例如, *EcoRI*, 認識 6 bp 長的序列)水解, 所得到的片段末端被一對 adaptor 分子連接。接著, 利用與 adaptor 序列互補的引子來做 PCR 使此 DNA 片段被複製, AFLP 的引子包含三部分: adaptor 的核心序列、限制酵素專一序列(ENZ)並且一個有選擇性的延伸核酸 (EXT)。最後利用洋菜膠電泳分析 (Vos *et al.*, 1995)。此種分類方法發展至今, 被證明其再現性高 (Janssen *et al.*, 1997) 且可有效的區分不同的菌株 (Gibson *et al.*, 1998)。AFLP 分類法的缺點是其屬於勞動密集型 (Wu and Della-Latta, 2002), 因此最近已有人研發自動化的 AFLP (Goering, 1998)。

### 4. DNA 定序 —

DNA sequencing 則是最直接的檢測方法, 由核酸序列來直接比對兩者之間的差異。此方法也是近年來最被大多數人採用的方法。然而核酸的序列相當龐大, 不可能將所有的核酸序列全面性的解出, 所以目的基因的選取則變得格外的重要。目的基因要相當的具有保留性(conserved), 這種保留性可以讓我們能夠區別種內與種間的差異甚而不同族群間的差異 (Wu and Della-Latta, 2002)。

不需將DNA增幅 (amplify) 的基因分類法包含:

#### 1. 限制酶切割片段長度多樣性 (Restriction fragment length polymorphism, RFLP) —

同種生物個體間的基因組成雖大致相同, 但有微小差異, 稱為多形性 (polymorphism)。這種 DNA 分子上的差異, 可以用限制酶偵測出來, DNA 會被水解成不同長度的片段, 洋菜膠電泳後, 比較所得圖型的異同, 可得知個體間基因關係的遠近。由於基因的序列可能會因種內族群的不同而有所不同, 或是種與種之間的差異而不同, 而這種差異度或序列的變化如果發生在限制酵素的切位上, 即可由 RFLP 的方法偵測到 (Wu and Della-Latta, 2002)。1992 年的時候 Rudney 等人曾用 RFLP 來將口腔鏈球菌分類, 他們發現利用酵素水解所得到的片段太過複雜, 以致於無法分類 (Rudney *et al.*, 1992)。

#### 2. 核糖核酸分類法 (Ribotyping) —

此種分類法是利用對 16S rRNA 或 23S rRNA 序列有專一性的探針, 對基因體片段做雜合, 其中的 16Sr RNA 分子序列更是最普遍使用的。這是因為這個分子序列具有下列幾個特性。第一, 它是每個生命個體都共同具有的, 再者, 16S rRNA 序列長度適當 (約為 1500 鹼基對), 含有充分的基因序列訊息, 而整個基

因序列分布，可分為保守區段 (conserved region)，及可異變區段 (variable region)。在保守區段序列，幾乎是每一個生物體都相同；而在可異變區段的序列，則隨著生物親緣性的差異而有程度上的不同。更因為，此序列上的差異往往與演化有關，因此 16S rRNA 就好像扮演著一個生物分子時鐘的角色，非常適合於系統分類研究。但是此種分類法只觀察到核糖核酸的基因序列變化，因此它的鑑別力是有限的，所以大多用來當做初步篩檢一般分離出來菌種的關聯性 (Wu and Della-Latta, 2002)。

### 3. Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) —

Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) 於 1984 年被 Schwartz 和 Cantor 所研發出來，由於它的再現性高、鑑別力好，所以是目前最常被運用的分類法，目前 PFGE 已被廣泛的應用在至少 98 種不同的致病菌研究上，包含革蘭氏陽性菌和革蘭氏陰性菌。例如，在 2003 年的時候，Murchan 等人利用 PFGE 分析 21 株金黃色葡萄球菌菌株，依其相似性將此 21 株菌株分為三類 (Murchan et al., 2003)。PFGE 主要的特性即是它有能力的將 10~800kb 的 DNA 片段分離，因為它所用的方法與一般的電泳槽不同，它利用不同方向電極的產生 (“pulsed”)，使得大片的 DNA 可因此被有效的分離。(Wu and Della-Latta, 2002)

一般解釋 PFGE 的結果時有一個準則，將 PFGE 的形式粗略的分為四種：(1) 無法區分的 (indistinguishable) (2) 密切相關的 (closely related) (3) 可能相關的 (possibly related) (4) 不相關的 (unrelated) (Tenover et al., 1995)。

除了上述的準則外，現今許多相關的軟體都被發展出來分析菌種之間的相似性，其中最常使用的計算方法為 Dice 係數，其算式為  $2a/2a + b + c$ ， $a$  為互相吻合的片段數目， $b, c$  則為相互不吻合片段的數目，而最後則利用 unweighted pair-group method (UPGMA) 方法將之分類 (Struelens et al., 1996)。

## 二、研究現況：

1999 年的時候，Cappiello 等人使用四種專一性的限制酶來水解 *S. mutans* GS-5 的基因，再利用 PFGE 及設計一些專一的 probe 建構出 *S. mutans* GS-5 生理上和基因上的圖譜 (Fig.1A)。此外，在 2002 年的時候 *S. mutans* UA159 的基因被完整的定序出來，因此我們將此菌株的基因圖譜為藍圖當作實驗比對的標準，利用電腦軟體仿照 1999 年 Cappiello 等人的論文將 *S. mutans* UA159 的基因圖譜畫出來 (Fig.1B)。比較 *S. mutans* GS-5 和 UA159 的基因圖譜，我們發現這兩株菌株有一部分基因的次序上似乎有些許不同，*S. mutans* GS-5 的基因體當中可能有基因重組的現象。此外，選用較不頻繁切割的酵素 *NotI* 水解 DNA，再以 Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) 分析其基因型的差異，並利用 Southern blots 驗證 *S. mutans* UA159、GS-5(S) 是否如資料庫的比對有基因重組發生，且檢測其他實驗室菌株 GS-5(R) 是否也有相似或其他的基因變異。電腦軟體分析從口腔和血液分離出來的臨床菌株，其利用酵素 *NotI* 水解切割經 pulsed-field gel electrophoresis 展開之染色體 DNA 片段。目前實驗順利，發現 *S. mutans* 實驗室菌株之間的基因變異，之後將尋找基因重組或大片段基因互換的可能原因及其與致病的關連性。

## 三、研究目的：

1. 觀察實驗室常用菌株 *S. mutans* UA159、GS-5(S) 和 GS-5(R) 之間的整體基因型差異性

2. 找到基因重組或大片段的基因互換的位置及分子機轉
3. 利用分子生物學方法分析分別從健康人、高齙齒罹患者口腔當中，和心內膜炎患者血液分離出之臨床菌株轉糖鏈球菌染色體的變異性
4. 確認染色體的變異與致病力的相關性
5. 尋找未知之可能的致病基因

## 2.材料與方法：

### 一、實驗菌種和生長條件

1. 本實驗所用的菌種請參閱 Table 1
2. 本實驗所用的引子請參閱 Table 2
3. 細菌的培養
  - 3.1.以腦心萃取培養基 (brain heart infusion, BHI; Difco, 美國) 培養實驗室的 *S. mutans*。
  - 3.2.以 MS 培養基 (mitis salivarius agar; Difco, 美國), 口腔鏈球菌 (oral streptococci) 的選擇性培養基, 培養臨床上的 *S. mutans*。

### 二、血清型篩檢

將細菌培養液以 3000 rpm、離心 10 分鐘, 倒掉上清液, 加入 100  $\mu$ l 0.85 % 的食鹽水, 經高溫高壓滅菌後, 得到該菌的抗原。血清型檢查採用雙向免疫擴散法 (double immuno-diffusion method), 取 15-20  $\mu$ l 抗原置入塑膠器皿上 sodium chloride saline agar (agrose 以 0.8% saline 配成 1.5 %) 四週的小洞中, 再於中央分別加入對血清型 c 有專一性的兔子抗體, 最後將塑膠器皿置於室溫下、保溫狀態中, 觀察沉澱線的出現 (約 3 小時後)。

### 三、染色體的抽取

將細菌培養液以 3000 rpm、4 $^{\circ}$ C、離心 10 分鐘, 倒掉上清液, 用 5 ml solution I (50 mM glucose, 10 mM EDTA, 25 mM Tris buffer, pH 8.0) 與菌體混合, 加入 lysozyme 使其最終濃度為 5 mg/ml, 置於 37 $^{\circ}$ C 30 分鐘, 之後加入 10% SDS (sodium dodecyl sulfate) 600  $\mu$ l 及 20 mg/ml proteinase K, 於 55 $^{\circ}$ C 作用 1 小時。之後利用 5 ml phenol 萃取液體, 以 10000 rpm、4 $^{\circ}$ C、離心 5 分鐘, 重複此步驟一次, 再將取出之上清液以體積 1:1 的 phenol/chloroform 萃取一次, 以 12000 rpm、4 $^{\circ}$ C、離心 5 分鐘, 取上清液至乾淨試管中, 而後加入 5 M NaCl 250  $\mu$ l 與 95% 酒精 10 ml 混合均勻, 即可看到白色 DNA 沉澱物出現, 可用 75%酒精將 DNA 上的鹽類洗掉, 抽氣風乾後溶於水中。利用分光光度計 (spectrophotometer; Pharmacia, 美國) 測其吸光值及 260/280 的比值, 得知 DNA 的濃度與純度。

### 四、聚合酶連鎖反應 (Polymerase chain reactin, PCR)

#### 1. 一般大小 DNA :

聚合酶連鎖反應是依照 Mullis 等人的方法進行。在 0.5 ml 反應管中, 加入 0.5~1  $\mu$ g 的染色體 DNA 當作模板, 再分別加入 10  $\mu$ l 10 $\times$  PCR buffer (500 mM KCl, 1 % gelatin, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 % Triton X-100, 100 mM Tris-HCl, pH 8.0)、8  $\mu$ l 2.5 mM dNTP、1  $\mu$ l Protaq DNA polymerase (2 U/ $\mu$ l) 及 5  $\mu$ l primer 混和液 (各 20  $\mu$ M), 加入滅菌水使總體積為 100  $\mu$ l, 之後再以 50  $\mu$ l 礦物油覆蓋。將之放入 DNA thermal cycler (MiniCycler<sup>TM</sup>), 設定條件為: 先以 94 $^{\circ}$ C, 3 分鐘使雙股 DNA 變性; 之後以 94 $^{\circ}$ C, 1 分鐘; primer T<sub>m</sub> 值, 1 分鐘; 72 $^{\circ}$ C, 2 分鐘, 為一個循環, 共 35 個循環; 再以 72 $^{\circ}$ C, 7 分鐘結束反應; 保存於 4 $^{\circ}$ C, 最後利用洋菜膠電泳分析其長度。

## 五、洋菜膠電泳分析

製備 0.8% 的洋菜膠，將 0.8 g 的洋菜粉末與 100ml 1×TBE buffer (45 mM Tris-borate, 1 mM EDTA, pH8.0) 混合，以微波爐加熱溶解，待溫度降至 45°C ~55°C 之後，加入 3-5  $\mu$ l 的 EtBr (10 mg/ml)，混合後倒入適當模型冷凝。將分析的 DNA 加入 0.8% 洋菜膠的凹槽中，以 110 V 電壓進行電泳 20-30 分鐘，之後，以 300 nm 的 UV 光進行觀察。

## 六、洋菜膠中 DNA 的純化

將 DNA 以洋菜膠電泳分析後，在 300 nm UV 照射下，將欲分離的 DNA 片段由洋菜膠上切下，再利用 Gel-M™ Gel Extraction System (Viogene, USA) 純化 DNA。將切下來含有 DNA 的洋菜膠置於微量離心管中，加入 0.5 ml GEX buffer (Gel-M™ Gel Extraction System; Viogene, USA)，60°C、10 分鐘，將溶解的膠移至 Gel-M™ column 中，室溫、12000rpm、30 秒，倒掉濾液，加入 0.5 ml WF buffer (Gel-M™ Gel Extraction System; Viogene, USA) 沖洗，室溫、12000rpm、30 秒，倒掉濾液，加入 0.7 ml WS buffer (Gel-M™ Gel Extraction System; Viogene, USA)，室溫、12000rpm、30 秒，倒掉濾液，再以室溫離心 12000rpm、3 分鐘，將 column 移至新的微量離心管，加入 30 $\mu$ l 滅菌水，室溫靜置 5-10 分鐘，室溫離心 12000rpm、3 分鐘，便得到純化的 DNA。

## 七、DNA plug 的製備

將細菌培養液以 3000 rpm、離心 10 分鐘，倒掉上清液，加入 1 ml 的 PIV buffer (1M NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 8.0) 以 14000 rpm、離心 3 分鐘，倒掉上清液，再加入 500  $\mu$ l 的 PIV buffer 與菌體混合，調整 OD<sub>550</sub> 至 3，將 200  $\mu$ l 的菌液和 200  $\mu$ l、1.6% 的洋菜膠混合，注入模型，放入 4 °C 冰箱使之凝固，再將 DNA plug 置於 1 ml 的 EC buffer (6 mM Tris, pH 8.0; 1 M NaCl; 0.1 M EDTA, pH 8.0; 0.5 % sarkosyl) 與 10  $\mu$ l 的 lysozyme (100 mg/ml) 中，以 37 °C 放置隔夜，藉此打破細胞壁，之後再將 DNA plug 置於 1 ml 的 ES buffer (0.5 mM EDTA, pH 9.0, 1% sarkosyl) 與 50  $\mu$ l 的 proteinase K (20 mg/ml) 中，以 50°C 放置隔夜，之後以 TE buffer (10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, pH 8.0) 沖洗 DNA plug 四次，每次 30 分鐘，將 DNA plug 置於 TE buffer 中保存於 4 °C 冰箱 (Martin *et al.*, 1998 and modification)。

## 八、Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE)

將 DNA plug 切成小塊 (長約 5 mm、寬約 2mm)，以 1 $\mu$ l 的 *NotI* (10 U/ $\mu$ l) 或 2 $\mu$ l 的 *I-CeuI* (5 U/ $\mu$ l) 限制酶切割，之後將小塊的 DNA plug 置於 1 ml 的 TE buffer 中 37 °C, 1 小時。將小塊的 DNA plug 埋入 1% 的洋菜膠中，接著利用 PFGE 電泳分析，最後再以 ethidium bromide 染色並照相存證。

Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) 電泳分析的條件—

1. 14 °C, 2L, 0.5×TBE buffer (22.5 mM Tris-borate, 0.5 mM EDTA, pH8.0), 6 V/cm, 120°, switching time: 5 s-32 s, 跑膠時間共 20 hr。
2. 15 °C, 2L, 0.5×TBE buffer, 4.5 V/cm, 120°, switching time: 5 s-120 s, 跑膠時間共 48 hr。
3. 14 °C, 2L, 0.5×TBE buffer, 6 V/cm, 120°, 跑膠時間共 23 hr  
Block1, switching time: 5 s-15 s, 跑膠時間 10 hr  
Block2, switching time: 15 s-60 s, 跑膠時間 13 hr (Murchan *et al.*, 2003)

## 九、DNA 探針的製備

DNA 探針是依照 Taylor 等人於 1976 年之 random oligonucleotide primer 的原

理製備放射性標定的探針，步驟則是依照 NEBlot<sup>®</sup> Kit (New England Biolabs, Beverly, USA, 2002) 的操作手冊所進行。將 DNA 片段分離純化，取 25 ng 的 DNA 溶於 33  $\mu$ l nuclease free H<sub>2</sub>O 中，置於沸水中煮 5 分鐘使 DNA 變性，置於冰上 5 分鐘，4°C、快速離心，依序加入下列溶液：5  $\mu$ l 10 $\times$  Labeling buffer (NEBlot<sup>®</sup> Kit; New England Biolabs, Beverly, USA)，2  $\mu$ l dATP、dTTP、dGTP (分別為 0.5 mM)，5  $\mu$ l [ $\alpha$ -P<sup>32</sup>]dCTP (400 Ci/mmol; 10 mCi/ml)，及 1  $\mu$ l DNA polymerase I-Klenow fragment (3'→5'exo-) (5 U/ $\mu$ l)，於 37°C 反應 1 小時，將含有  $\alpha$ -P<sup>32</sup> 標定的 DNA 混合液置於 QIAquick<sup>®</sup> spin column (Qiagen, USA) 中，加入 0.5 ml PN buffer (QIAquick Nucleotide Removal Kit; Qiagen, USA)，室溫、6000rpm、1 分鐘，倒掉濾液，加入 0.5 ml PE buffer (QIAquick Nucleotide Removal Kit; Qiagen, USA) 沖洗，室溫、6000rpm、1 分鐘，倒掉濾液，重複上述加 PE buffer 步驟一次，再以室溫離心 12000rpm、1 分鐘，之後，將 column 移至新的微量離心管，加入 50  $\mu$ l EB buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.5)，室溫靜置 1 分鐘，室溫離心 12000rpm、1 分鐘，便得到純化的已標定探針。

#### 十、南方墨點法 (Southern hybridization)

將 PFGE 的洋菜膠以變性緩衝液 (denature buffer; 0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl) 浸泡 15 分鐘，再移至中和緩衝液 (neutralization buffer, 1 M Tris, 0.53 N HCl, 1.5 M NaCl) 浸泡 15 分鐘，重複上述步驟一次。將洋菜膠置於已含 10 $\times$ SSC (1.5 M NaCl, 0.15 M sodium citrate, pH 7.0) 的轉印台上，並用硝化纖維膜 (NC paper; Millipore, 美國) 覆蓋於膠上，加以重物放置隔夜，使核酸轉印到 NC paper 上，以 UV-crosslink (120000  $\mu$ J) 將 DNA 固定於膜上。將已有 DNA 之 NC paper，於 42°C 下預雜合 (prehybridization) 2 小時，再加入已用 [ $\alpha$ -P<sup>32</sup>]dCTP 標記的探針 (probe) 以每毫升 10<sup>6</sup> cpm 作雜合 (hybridization) 約 16 小時以上。將具放射性液體去除，在室溫以 2 $\times$ SSC, 0.1% SDS 洗兩次，每次 15 分鐘，再用 0.1 $\times$ SSC, 0.1% SDS 於 55°C 洗兩次，每次 15 分鐘。最後晾乾 NC paper，以 X 光片壓片，至於 -80°C，隔夜洗片即可知結果 (Maniatis *et al.*, 1982)。

#### 十一、分析軟體

1. 利用 Vector NTI Advance 軟體分析 *S. mutans* UA159 的完整基因序列，藉此推測限制酶 *NotI* 和 *I-CeuI* 所切割出來的基因片段。
2. 利用 GelCompar 4.2 軟體分析 *S. mutans* 菌株的相似性，並藉此分類。

#### 3. 結果：

利用 *NotI* 水解 *Streptococcus mutans* 實驗室菌株的 DNA，請參閱 Fig.2A，從 Lane2 推測 GS-5(S) DNA *NotI* 水解片段的大小發現與 Cappiello 等人的所 *S. mutans* GS-5 PFGE 形式相似。接著我們利用軟體分析 *S. mutans* UA159 被 *NotI* 水解所推測的片段，將之與 Fig. 2A lane4 比較，顯示 Fig.2A *S. mutans* UA159 PFGE 形式與軟體所推測的片段大小相似，所以之後的實驗除了 lambda concatemer size standards (New England Biolabs, Beverly, USA) 當作 marker 外，也以 *S. mutans* UA159 當作 standard。此外，我們可以發現各個菌株之間的 PFGE 形式略有差異，其中 *S. mutans* GS-5(R) 的 PFGE 形式與其他三株 *S. mutans* 菌株差異性最大。

接著以 *S. mutans* UA159 的基因圖譜為範本，設計不同的 probe (Fig.3A) 分別與 *S. mutans* UA159、GS-5(S)、和 GS-5(R) 不同的 *NotI* 切割片段雜合 (Fig.3B)。

#### 1. *S. mutans* UA159 和 GS-5(S) 的變異性：

比較 *S. mutans* UA159 和 GS-5(S) 的基因片段，我們觀察到在 GS-5(S) 中



probe3 與 probe2 雜合到相同的 *NotI* 水解片段 (Fig.3B, Lane 1), 約 433kb, probe9 則雜合至約 287kb 的片段 (Fig.3B, Lane 5), 而 UA159 得到的結果則與 GS-5(S) 相反 (Fig.3B, Lane 3, Lane 4), 將結果整理於 Fig.3A, 顯示在 GS-5(S) 當中應該如之前所推測的有基因互換發生, 且互換的端點可能在 *NotI* 206kb 和 493kb 片段中。

## 2. *S. mutans* UA159 和 GS-5(R) 的變異性

從 Fig.2A 的 Lane 3 我們可以觀察到 *NotI* 水解 GS-5(R) DNA 的 PFGE 形式比其他實驗室菌株差異性較大, 因此我們試圖針對 GS-5(R) 的每一條 band 作分析。首先利用不同的條件將 GS-5(R) 最上方 band 跑開, 再利用軟體推算其可能的大小, 從 Fig.2B 當中的 Lane 1 可知 GS-5(R) 最上面的 band 約為 822.03 kb。比較 *S. mutans* UA159 和 GS-5(R) 的基因片段, 從 Fig.3B 的 Lane 2 顯示 GS-5(R) 中 probes 1、2、3 皆雜合至同一個 *NotI* 水解片段, 將 UA159 probes 1、2、3 所對應到的 *NotI* 水解片段相加, 其值與之前推估 GS-5(R) 最上方 band 的大小相似, 因此我們推測可能 GS-5(R) 有兩個 *NotI* 切割點變異 (*NotI* 1942205, *NotI* 52167)。此外從 Southern blots 結果顯示, GS-5(R) 可能還有兩個 *NotI* 水解片段, 393.7kb 和 70.1kb 有基因缺失 (Fig. 3C)。

利用對血清型 c 有抗性的兔子血清抗體篩檢臨床菌株, 結果共篩檢出 50 株口腔菌株, 其中從健康的人分離出 25 株菌株; 患有齲齒的人分離出 25 株菌株, 以及 8 株血液分離菌株。

利用 GelCompar 軟體分析 *Streptococcus mutans* 菌株 *NotI* 水解的 PFGE 形式, 試圖將之分類 (Fig.4), 但是結果顯示, *Streptococcus mutans* 菌株之間的基因型的差異性非常大, 難以將其分類。

## 4. 討論:

藉由細菌間整個基因體的比對, 顯示細菌為了適應環境而重組其基因的結構, 有越來越多的證據顯示, 無論是革蘭氏陽性或陰性的細菌, 其基因體常有大片段的基因互換, 雖然到目前為止造成這種大片段基因互換的機制尚不清楚, 然而曾有科學家發現從患者身上分離出來的 *Bordetella pertussis*、*Salmonella typhi* 和 *Neisseria meningitidis* 的菌株當中, 顯示這種基因重組可能使細菌可以有有效的逃避免疫系統造成感染 (Hughes, 2000)。此外, 也有研究發現, 細菌基因 *oriC* 和 *terC* 之間的長度必須保持平衡, 當基因的位置改變的時候可能會影響特殊基因的表現, 或造成基因結構三維的障礙, 因此常在基因互換的端點發現獲得或失去基因 (Itaya, 1997)。細菌體內的基因重組除了基因互換之外, 還可能是從外界得到基因, 或者是因為同方向、相似的序列造成基因重複或缺失, 例如, 寄生生物和細胞內病原生物 (即黴漿菌、披衣菌、分枝桿菌屬和立克次體) 對他們的寄主細胞生理環境產生適應, 因此通常他們的基因會有缺失的情形, 僅留下負責必須新陳代謝的基因和需要從宿主得來的代謝產物基因; 反之, 一些具有感染性的病原菌, 則可能因為從一些跳躍因子而獲得毒力基因, 像是 pathogenicity island。從前面的結果已知, *S. mutans* UA159 和 GS-5(S) 相比, 位於兩個核糖體核酸之間有大片段的基因互換, 篩選所收集來的臨床菌株, 其中有類似的基因互換的比率約為一半。

長久以來, 科學家普遍認為在菌株之間有 *S. mutans* 變異性存在, 如何將 *S. mutans* 有效的分類一直是一個大問題, 即使已利用血清型鑑定來區分 *mutans streptococci*, 但是同一血清型的 *mutans streptococci* 當中仍有許多變異性存在。

由於分子生物技術的發展，因此也有科學家利用分子分類法將轉糖鏈球菌分類，例如，1992 年的時候 Rudney 等人曾用 RFLP 來將口腔鏈球菌分類，但是他們發現利用酵素水解所得到的片段太過複雜，以致於無法分類 (Rudney *et al.*, 1992)；1999 年 Alam 等人曾用 REP 和 ERIC 聚合酶連鎖反應法來區分當時已知的口腔鏈球菌，但是也發現此種分類法對口腔鏈球菌而言區別性太大。由於 *mutans streptococci* 的 heterogeneity 因此直到目前為止還未有可以有效分類 *mutans streptococci* 的方法。

PFGE 常用來當作流行病學的研究，研究院內感染菌株與同種菌株的差異性及其來源，除此之外他也被廣泛的用在其他細菌的分類，和細菌基因體圖譜的構築。PFGE 分類法的好處為再現性高，而且我們可以觀察到細菌整體基因的變異。由於之前 *S. mutans* 的研究都是針對特定基因做分類，或是利用辨認較頻繁的限制酵素水解，所呈現的結果太過複雜以致於無法有效的分類，所以我們選用 PFGE 分類法將 *S. mutans* 分類。但是 PFGE 分類法的缺點在於如果細菌的變異剛好在限制酵素辨認的切位上，則可能就會造成 PFGE 型式的差異，從軟體分析結果顯示，即使是血清型 c 的 *S. mutans*，菌株之間仍有 heterogeneity 存在。

#### 5. 結論：

在我們的研究當中將分類的範圍縮小至血清型 c 的 *S. mutans*，並且利用 Pulsed-Field Gel Electrophoresis 將之分類。結果顯示，在如此相近的菌株當中，其染色體基因的變異仍是非常大的。

#### 6. 參考文獻：

1. 莊雅如：突變型鏈球菌血清型之鑑定與齲齒相關性之研究。台灣大學醫學院臨床牙醫學研究所碩士論文 2001。
2. Ajdic D, McShan WM, et al: Genome sequence of *Streptococcus mutans* UA159, a cariogenic dental pathogen. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2002; 99(22):14434-14439.
3. Alam S, Brailsford SR, et al: PCR-based methods for genotyping viridans group streptococci. J. Clin. Microbiol 1999; 37:2772-2776.
4. Beighton D, Russell RRB, and Whiley RA: A simple biochemical scheme for the differentiation of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*. Caries Res 1991; 25:174-178.
5. Berkowitz RJ and Jordan HV: Similarity of bacteriocins of *Streptococcus mutans* from mother and infant, Arch. Oral. Biol. 1975; 20:1-6.
6. Boyar RM and Bowden GH: The microflora associated with the progression of incipient carious lesions in teeth of children living in a water-fluoridated area. Caries Res. 1985; 19:298-306.
7. Cappiello MG, Hantman MJ, et al: Physical and genetic map of *Streptococcus mutans* GS-5 and localization of five rRNA operons. Oral Microbiol. Immunol. 1999; 14:225-232.
8. Davey AL and Rogers AH: Multiple types of the bacterium *Streptococcus mutans* in the human mouth and their intra-family transmission. Arch. Oral. Biol. 1984; 29:453-460.
9. Gibson JR, Slater E, et al: Use of an amplified-fragment length polymorphism technique to fingerprint and differentiate isolates of *Helicobacter pylori*. J. Clin. Microbiol. 1998; 36:2580-2585.
10. Gilson E, Clement JM, et al: A family of dispersed repetitive extragenic

- palindromic DNA sequences in *E. coli*. EMBO. J. 1984; 3:1417-1421.
11. Goering RV: The molecular epidemiology of nosocomial infection. An overview of principles, application and interpretation, in Specter S, Bendirelli M and Freedman H (eds): Rapid Detection of Infectious Agents, New York, NY, Plenum Press. 1998; 131-157.
  12. Hughes D: Evaluating genome dynamics: the constraints on rearrangements within bacterial genomes. Genome Biol. 2000; 1: REVIEWS0006.
  13. Hulton CSJ, Higgins CF, and Sharp PM: ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enteric bacteria. Mol. Microbiol. 1991; 5:825-834.
  14. Igarishi T, Yamamoto A, and Goto N: Direct detection of *Streptococcus mutans* in human dental plaque by polymerase chain reaction Oral Microbiol. Immunol. 1996; 11:294-298.
  15. Itaya M: Physical map of the *Bacillus subtilis* 166 genome: evidence for the inversion of an approximately 1900 kb continuous DNA segment, the translocation of an approximately 100 kb segment and the duplication of a 5 kb segment. Microbiology. 1997; 143:3723-3732.
  16. Janssen P, Maquelin K, et al: Discrimination of *Acinetobacter* genomic species by AFLP fingerprinting. Int. J. Syst. Bacteriol. 1997; 47:1179-1187.
  17. Li Y, Caufield PW, et al: Differentiation of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* via genotypic and phenotypic profiles from three different populations. Oral Microbiol. Immunol. 2001; 16:16-23.
  18. Loesche WJ: Dental caries: a treatable infection. Charles C Thomas, Publisher, Springfield, Ill 1982.
  19. Loesche WJ: Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. Microbiol. Rev. 1986; 50:353-380.
  20. Murchan S, Kaufmann ME, et al: Harmonization of Pulsed-Field Gel Electrophoresis Protocols for Epidemiological Typing of Strains of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: a Single Approach Developed by Consensus in 10 European Laboratories and Its Application for Tracing the Spread of Related Strains. J. Clin. Microbiol. 2003; 41(4):1574-1585.
  21. Nakano K, Nomura R, et al: Demonstration of *Streptococcus mutans* with a cell wall polysaccharide specific to a new serotype, k, in the human oral cavity, J. Clin. Microbiol. 2004; 42(1):198-202.
  22. Okahashi N, Asakawa H, et al: Clinical Isolates of *Streptococcus mutans* serotype c with altered colony morphology due to fructan synthesis. Infect. Immun. 1984; 44(3): 617-622.
  23. Robinson WG, Old LA, et al: Chromosomal insertions and deletions in *Streptococcus mutans*. Caries Res. 2003; 37:148-156.
  24. Rogers AH: Evidence for the transmissibility of human dental caries. Aust. Dent. J. 1977; 22:53-56.
  25. Rudney JD and Larson CJ: Restriction endonuclease-fragment polymorphisms of oral viridans streptococci, compared by conventional and field-inversion gel electrophoresis. J. Dent. Res. 1992; 71:1182-1188.
  26. Rudney JD and Larson C J: Identification of oral Mitis Group streptococci by arbitrarily primed polymerase chain reaction Oral. Microbiol. Immunol. 1999; 14:33-42.
  27. Schwartz DC and Cantor CR: Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed-field gradient gel electrophoresis. Cell 1984; 37:67-75.
  28. Sharples GJ and Lloyd RG: A novel repeated DNA sequence located in the

- intergenic regions of bacterial chromosomes. *Nucleic Acids Res.* 1990; 18:6503-6508.
29. Stern MJ, Ames GFL, et al: Repetitive extragenic palindromic sequences: a major component of the bacterial genome. *Cell* 1984; 37:1015-1026.
  30. Struelens MJ: Consensus guidelines for appropriate use and evaluation of microbial epidemiologic typing systems. *Clin. Microbiol. Infect.* 1996; 2(1):2-11.
  31. Tenover FC, Arbeit RD, et al: Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol.* 1995; 33(9):2233-2239.
  32. Truong TL, Ménard C, et al: Identification of mutans and other oral streptococci by random amplified polymorphic DNA analysis. *J. Med. Microbiol.* 2000; 49:63-71.
  33. Versalovic J, Koeuth T and Lupski JR: Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res.* 1991; 19: 6823-6831.
  34. Vos P, Hogers R, et al: AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 1995; 23:4407-4414.
  35. Wu F, and Della-Latta P: Molecular typing strategies. *Seminars in Perinatology* 2002; 26(5):357-366.

## 7.圖表：

Table1. *S. mutans* strains used in the present study.

Strains	Serotype	Features	Reference
UA159	c	Laboratory strains, rough colony	ATCC
GS-5(S)	c	Laboratory strains, smooth colony	H. K. Kuramitsu
GS-5(R)	c	Laboratory strains, rough colony	Y. Sato
MT8148	c	Laboratory strains, rough colony	Y. Hamada
JH1005	c	Laboratory strains, smooth colony	S. F. Lee, 2001
PC3370	c	Laboratory strains, rough colony	A. Bleiweis, 1999
XC	c	Laboratory strains, rough colony	Y. Yamashita, 1996
2	c	Oral isolate from a patient with caries, rough colony	This study
6-1	c	Oral isolate from a healthy person, rough colony	This study
6-2	c	Oral isolate from a healthy person, rough colony	This study
8-1	c	Oral isolate from a healthy person, rough colony	This study
8-2	c	Oral isolate from a healthy person, rough colony	This study
14-2	c	Oral isolate from a healthy person, rough colony	This study
16-1	c	Oral isolate from a patient with caries, rough colony	This study
16-2	c	Oral isolate from a patient with caries, rough colony	This study
19	c	Oral isolate from a healthy person, smooth colony	This study
27-1	c	Oral isolate from a patient with caries, rough colony	This study
29-2	c	Oral isolate from a patient with caries, rough colony	This study
30-1	c	Oral isolate from a patient with caries, rough colony	This study
32-1	c	Oral isolate from a patient with caries, rough colony	This study
37	c	Oral isolate from a patient with caries, rough colony	This study
40-2	c	Oral isolate from a patient with caries, rough colony	This study
41-2	c	Oral isolate from a patient with caries, rough colony	This study
64-1	c	Oral isolate from a healthy person, smooth colony	This study
99-1	c	Oral isolate from a healthy person, rough colony	This study
114-1	c	Oral isolate from a healthy person, rough colony	This study
128-2	c	Oral isolate from a patient with caries, rough colony	This study
130-1	c	Oral isolate from a patient with caries, rough colony	This study
139-1	c	Oral isolate from a patient with caries, smooth colony	This study
144-2	c	Oral isolate from a patient with caries, rough colony	This study
190-1	c	Oral isolate from a healthy person, rough colony	This study
199	c	Oral isolate from a patient with caries, rough colony	This study
202-2	c	Oral isolate from a patient with caries, smooth colony	This study
215	c	Oral isolate from a healthy person, rough colony	This study
216-1	c	Oral isolate from a healthy person, rough colony	This study
222-1	c	Oral isolate from a patient with caries, smooth colony	This study
223-1	c	Oral isolate from a healthy person, rough colony	This study
227-1	c	Oral isolate from a healthy person, rough colony	This study
229-2	c	Oral isolate from a healthy person, rough colony	This study
240-1	c	Oral isolate from a healthy person, rough colony	This study
245-2	c	Oral isolate from a healthy person, rough colony	This study
250-1	c	Oral isolate from a healthy person, rough colony	This study
256-1	c	Oral isolate from a healthy person, rough colony	This study
260-1	c	Oral isolate from a healthy person, rough colony	This study
275-1	c	Oral isolate from a healthy person, rough colony	This study
281-1	c	Oral isolate from a healthy person, rough colony	This study
296-1	c	Oral isolate from a patient with caries, rough colony	This study
305-1	c	Oral isolate from a patient with caries, rough colony	This study
310-2	c	Oral isolate from a patient with caries, rough colony	This study
311-2	c	Oral isolate from a patient with caries, rough colony	This study
314-1	c	Oral isolate from a patient with caries, rough colony	This study
318-1	c	Oral isolate from a patient with caries, rough colony	This study
321-1	c	Oral isolate from a healthy person, rough colony	This study
323-1	c	Oral isolate from a patient with caries, rough colony	This study
325-1	c	Oral isolate from a patient with caries, rough colony	This study
329-4	c	Oral isolate from a patient with caries, rough colony	This study
421-1	c	Oral isolate from a patient with caries, rough colony	This study
433-2	c	Oral isolate from a patient with caries, rough colony	This study
525-3	c	Oral isolate from a patient with caries, rough colony	This study
1020	c	Blood isolate from a patient with infective endocarditis, rough colony	This study
3432	c	Blood isolate from a patient with infective endocarditis, smooth colony	This study
3930	c	Blood isolate from a patient with infective endocarditis, smooth colony	This study
5526	c	Blood isolate from a patient with infective endocarditis, rough colony	This study
7470	c	Blood isolate from a patient with infective endocarditis, rough colony	This study
7691	c	Blood isolate from a patient with infective endocarditis, rough colony	This study
8585	c	Blood isolate from a patient with infective endocarditis, rough colony	This study
8931	c	Blood isolate from a patient with infective endocarditis, rough colony	This study

Table 2. Name of primers and positions of PCR products.

Name	Forward	Rerverse	Length of PCR product (bp)
1	F708(708-725)	R20756(20739-20756)	20048
2	F94257(94257-94274)	R95535(95518-95525)	1268
3	F183750(183750-183767)	R185214(185197-185214)	1464
4	F514905(514905-514922)	R516030(516013-516030)	1125
5	F563789(563789-563806)	R564585(564568-564585)	796
6	F1701070(1701070-1701087)	R1702471(1702453-1702470)	1400
7	F1788144(1788144-1788161)	R1789174(1789157-1789174)	1030
8	F1874458(1874458-1874482)	R1889425(1889401-1889425)	14967
9	F1889401(1889401-1889425)	R1900379(1900355-1900379)	10978
10	F1900355(1900355-1900372)	R1920340(1920323-1920340)	19985
11	F1920323(1920323-1920340)	R1939444(1939427-1939444)	19121
12	F1938418(1938418-1938435)	R1940347(1940330-1940347)	1929
13	F1940323(1940323-1940347)	R1955534(1955510-1955534)	15211
14	F1955510(1955510-1955534)	R1970872(1970848-1970872)	15362
15	F1970855(1970855-1970872)	R1990902(1990885-1990902)	20047
16	F1990885(1990885-1990902)	R2010936(2010919-2010936)	20051
17	GBPA promoter-5'(1982211-1982235)	GBPA promoter-3'(1981918-1981892)	317
18	GBPA-5'(1981872-1981888)	GBPA-3'(1980004-1980030)	1884
19	GBPC5'(1324473-1324490)	GBPC3'(1325547-1325564)	1091
20	GBPD5'(719893-719910)	GBPD3'(721316-721333)	1440
21	IS3SM-5'(1781960-1781977)	IS3SM-3'(1783502-1783519)	1559
22	IS982SM-5'(95692-95709)	IS982SM-3'(96446-96463)	771
23	IS199SM-5'(119-137)	IS199SM-3'(1158-1176)	1057

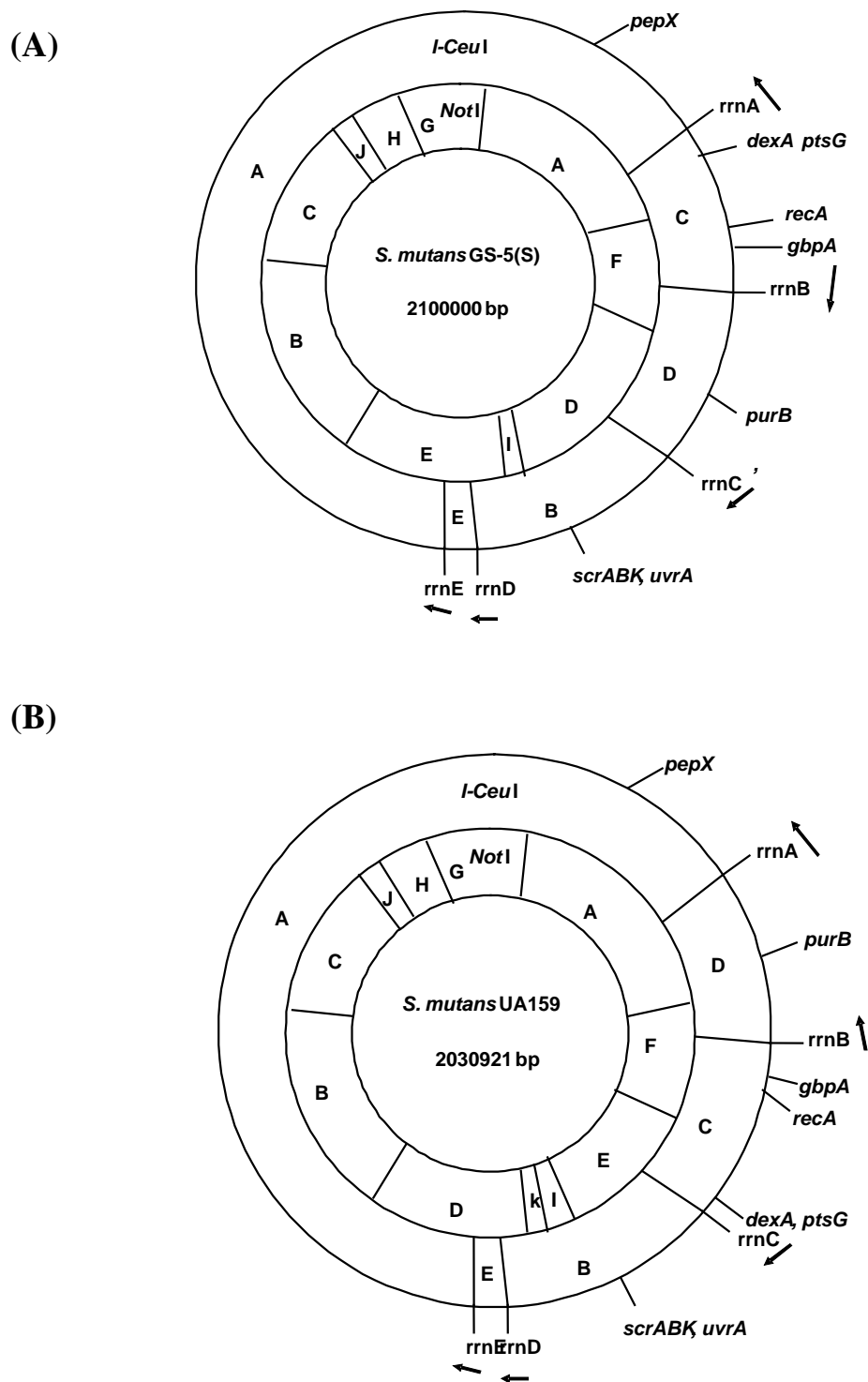


Fig.1 . (A) Physical and genetic map of the *S. mutans* GS-5(S) genome constructed using *I-Ceu* and *Not* restriction enzymes ( Oral Microbiol Immunol 1999;14:225-232 ) and (B) *S. mutans* UA159 genome constructed using *I-Ceu* and *Not* restriction enzymes. Restriction fragments are labeled in order of their size. Arrows indicate the direction of transcription of the five putative *rrn* operons.

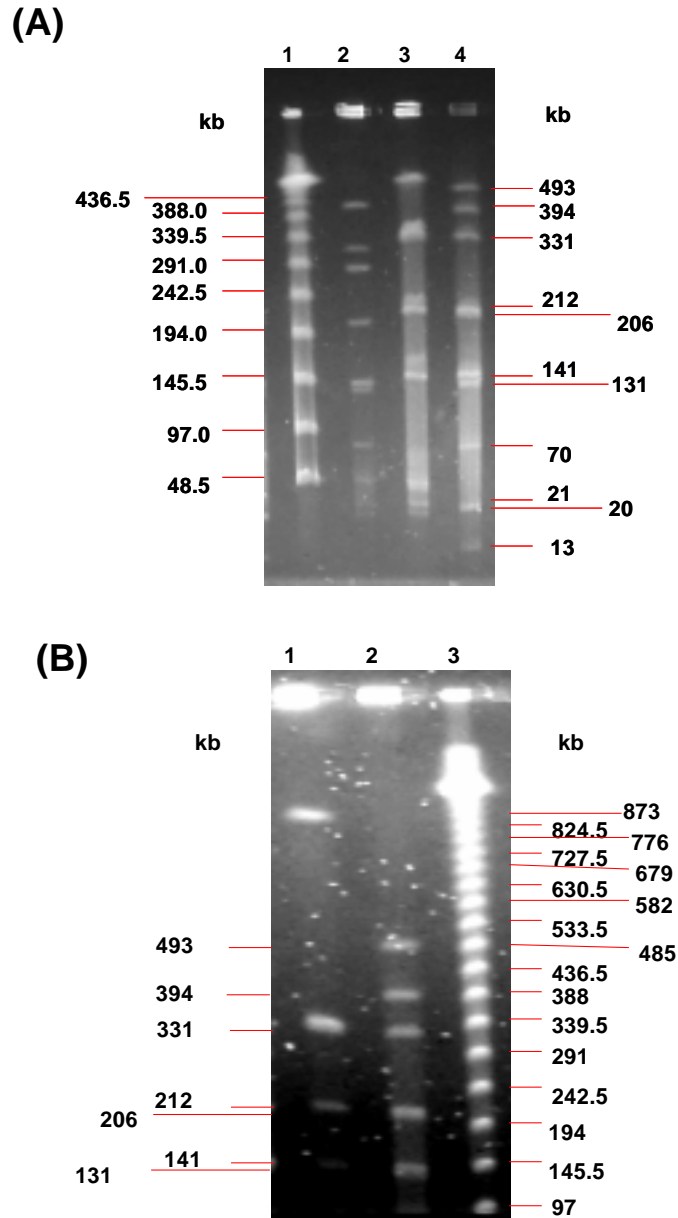


FIG. 2. PFGE of DNAs from *S. mutans* strains digested with *NotI*. (A) Lanes: 1, lambda concatemer size standards (each band is a 48.5-kb multimer); 2, GS-5(S) DNA; 3,GS-5(R) DNA; 4, UA159 DNA (standard).The total run time is 23 h, the first-block switch time is 5s-15s for 10 h, and the second-block switch time is 15s-60s for 13 h (Murchan et al., 2003) .(B) Lanes: 1, GS-5(R) DNA; 2, UA159 DNA (standard); 3, lambda concatemer size standards (each band is a 48.5-kb multimer), The total run time is 48 h, the switch time is 5s-120s for 48 h. The voltage for the run is 6 V/cm at 14°C.



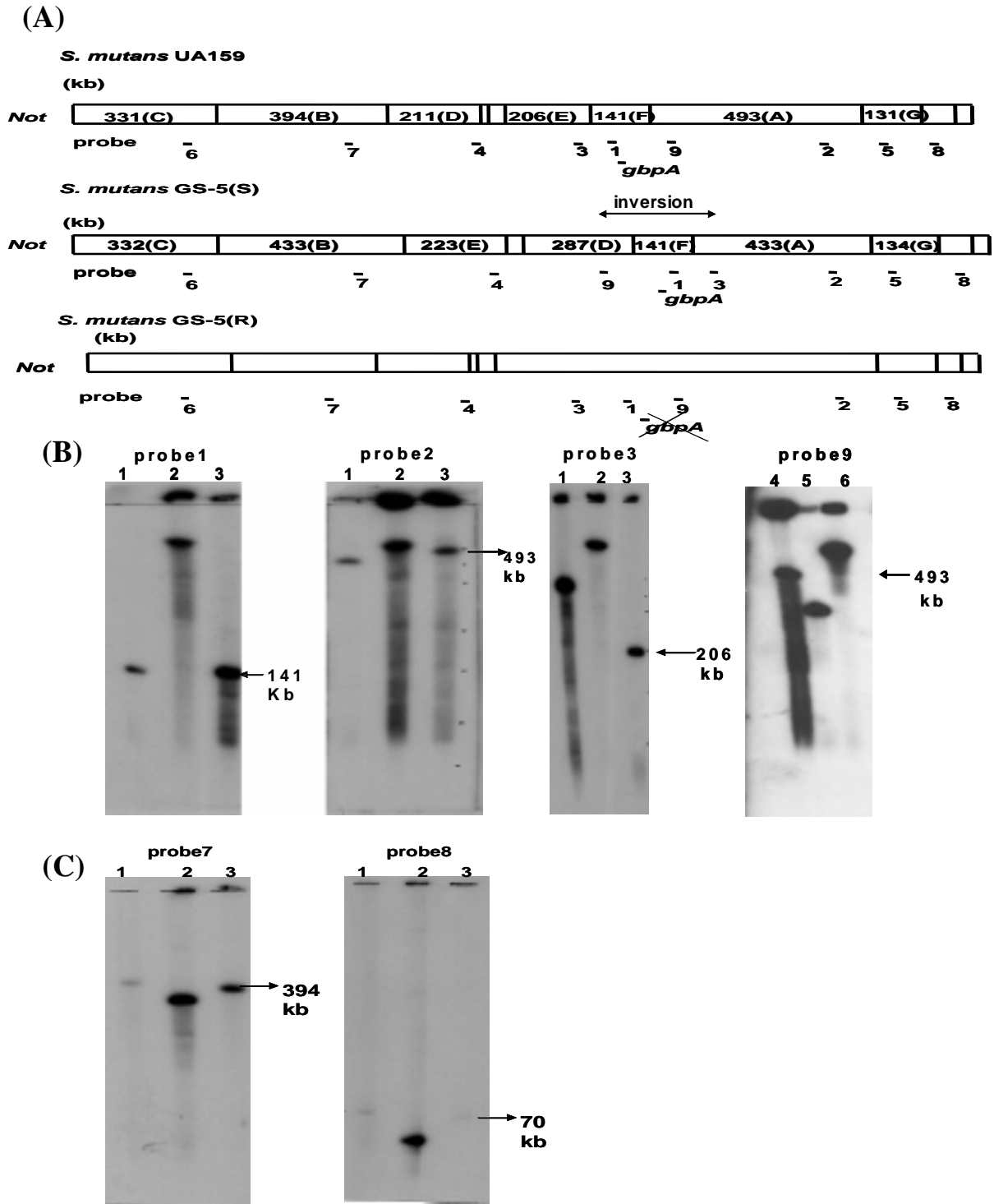


Fig.3. (A) Comparison of the maps digested with restriction enzymes *Not* of the three *S. mutans* strains. Fragments are numbered as in reference strains *S. mutans* UA159 and *S. mutans* GS-5 (Cappiello et al., 1999). The inversions present in the strains GS-5(S) by arrows. The hybridized probes are indicated by black lines. (B) Hybridization of PFGE-separated *S. mutans* strains DNA digested with *Not* with the various probes. Lanes: 1,5, GS-5(S) DNA; 2,6, GS-5(R) DNA; 3,4, UA159 DNA (standard). (C) Lanes: 1, GS-5(S) DNA; 2, GS-5(R) DNA; 3, UA159 DNA (standard).

The fragments of *S. mutans* UA159 DNA digested with *NotI* are indicated by arrows.

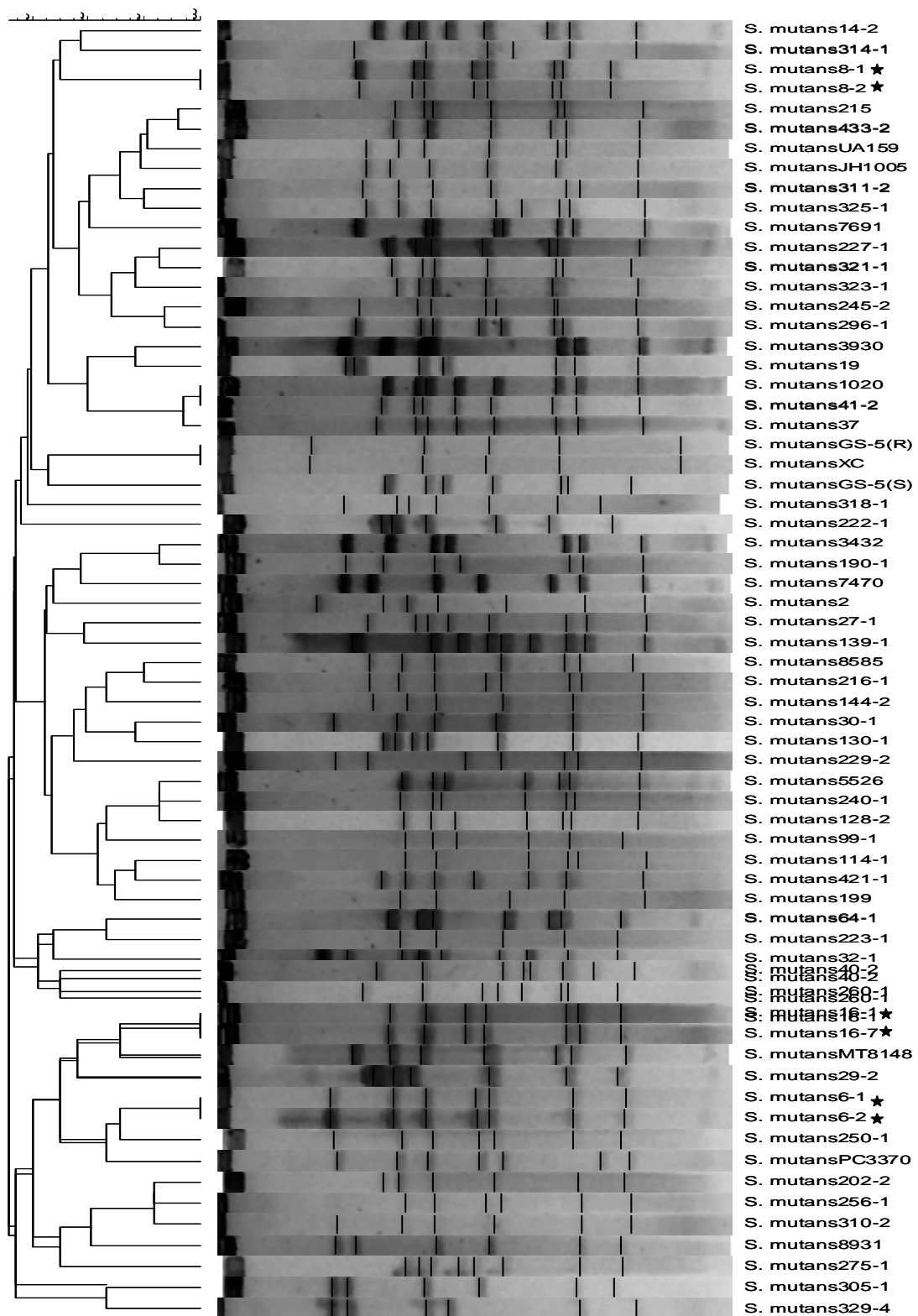


Fig.4. Dendrogram of all *S. mutans* DNA digested with *NotI* from laboratory, oral cavity and blood strains, using Gelcompar with percent similarity calculated by Dice coefficient (tolerance of 1% and optimization of 0.5%) and represented by UPGMA. Stars indicated *S. mutans* strains were isolated from the same person.

## 94 年度計畫重要研究成果

計畫名稱：轉糖鏈球菌分子流行病學及表面蛋白致病因子之探討

主持人：賈景山 計畫編號：DOH94-DC-1006

### 1. 計畫之新發現或新發明

- (1) 發現同一血清型細菌間大片段基因重組的位置。
- (2) 發現相同血清型菌株之間的基因變異性。

### 2. 計畫對民眾具教育宣導之成果

轉糖鏈球菌群 (mutans streptococci) 是造成齲齒的主要病原菌也是引發感染性心內膜炎伺機感染原之一，其中 *S. mutans* 為轉糖鏈球菌群中的 human type，長久以來，科學家普遍認為在菌株之間有 *S. mutans* 變異性存在，利用生化鑑定或血清型鑑定已證實該菌具有高度變異性存在，然而同一血清型 c 的分離株間有變異性存在其中，至今尚未有系統性關於轉糖鏈球菌染色體中，是否具有大規模的基因重組或大片段的基因互換的研究。本計畫的主要目的是利用分子生物學方法分析分別從健康人、高齲齒罹患者口腔當中，及心內膜炎患者血液中分離出之臨床菌株轉糖鏈球菌染色體的變異性，本計畫預期達到的目標是，確認染色體的變異與致病力的相關性，尋找未知之可能的致病基因。而初步的結果是，篩選了 7 株實驗室菌株，58 株臨床菌株 (50 株口腔菌株，8 株血液菌株)，利用 PFGE 和 Southern blot 分析其基因變異。顯示，實驗室菌株 GS-5(S) 當中有一個大片段的基因互換在兩個相反方向的核糖體之間，而 GS-5(R) 中則有兩個酵素 *NotI* 辨認的切割點有變異。此外，GelCompar 軟體分析結果顯示血清型 c 的 *S. mutans*，菌株之間的確有 heterogeneity 存在。

### 3. 計畫對醫藥衛生政策之具體建議

- (1) 大規模基因體重組的發現有助於瞭解細菌演化及找尋與致病力相關之機轉。
- (2) 利用分子生物分類方法分析具有尋找致病潛力之菌株之。

計畫編號：DOH94-DC-1006

行政院衛生署疾病管制局九十四年度科技研究發展計畫

轉糖鏈球菌分子流行病學及  
表面蛋白致病因子之探討

計畫名稱

研究報告

執行機構：台灣大學醫學院微生物學科

計畫主持人：賈景山教授

研究人員：陳珩昌、鄭全皓

執行期間：94年1月1日至94年12月31日

\*本研究報告僅供參考，不代表衛生署疾病管制局意見\*