**口腔微生物基因组研究常见取样部位与方法**

标题要求准确、简洁且尽可能体现实验方案的专一性

英文标题要与中文标题要严格对应以方便被英文文献引用

卢洪叶2，陈智滨2, \*，陈峰1, \*

1北京大学口腔医学院中心实验室微生物平台，北京；

2北京大学口腔医学院牙周科，北京；

\*通讯作者邮箱: [chenfeng2011@hsc.pku.edu.cn；kqyehui21@bjmu.edu.cn](mailto:chenfeng2011@hsc.pku.edu.cn；kqyehui21@bjmu.edu.cn)。

#共同第一作者/同等贡献

**摘要**

采集唾液、龈上菌斑、龈下菌斑、植体周黏膜下菌斑、根管内菌斑、及黏膜表面菌斑样本，可用于口腔微生物组学研究及口腔常见菌的分离、培养和鉴定。

**关键词:** 唾液，口腔，菌斑、样本采集

**材料与试剂**

主要产品名称

牙科吸潮纸尖，35# 或者40#（品牌：柳苑；产地：中国；货号：30）

滤纸条（品牌：Whatman；产地：英国；货号： 1004-070 ）

15 mL无菌离心管（品牌：Corning；产地：日本；货号： 430790 ）

1.5 mL无菌离心管（品牌：Axygen；产地：美国；货号： MCT-150-C）

无菌牙探针（品牌：；产地：；型号：）

牙周刮治器（品牌：Hu-Friedy；产地：美国；型号：7/8号）

**仪器设备**

超低温冰箱（品牌：SANYO）

**实验步骤**

1. **唾液样本的采集**[1-3]
2. 唾液样本采集时间：一天中不同时间点唾液的流率有所不同，唾液菌斑也会收到进食、口腔卫生措施的影响。因此，样本采集建议选择在晨起刷牙之前或两餐之间。
3. 唾液样本采集方法：唾液样本分为非刺激性唾液和刺激性唾液，非刺激性唾液完全处于生理自然条件，大多数微生物研究选择非刺激性唾液作为研究样本，样本采集有两种方法：方法一，患者手持唾液收集容器 ；静坐，低头，口微张、睁开眼、头微微前倾 ；避免吞咽，固定时间间隔内将唾液吐入唾液收集容器中。（特点：唾液聚集在口底，受试者将唾液吐出到容器内）。方法二，手持唾液收集容器；静坐，低头，口微张、睁开眼、头微微前倾 ；避免吞咽，使唾液自然流入唾液收集容器中，通常需要5-10分钟，收取0.5-1ml的唾液。冰盒转运。
4. 唾液样本的处理： 唾液分装入1.5mL Ep管中，离心13000 g，15 min，吸取上层清亮液体入1.5mL Ep管内（可用于其他研究），沉淀中含有大量细菌、脱落细胞等可用于微生物分析检测。
5. 唾液样本的保存：将分离出来的唾液上清样本和沉淀样本存入-70°超低温冰箱中保存待测。
6. **龈上牙面菌斑样本的采集**

以下操作在口腔治疗牙椅上进行，注意采样器材需满足无菌要求。

1. 采样前准备：取样前请受检者清水漱口，去除口中可能含有的食物残渣；

2. 样本采集：用无菌棉隔湿，用无菌探针/匙形刮治器采集目标牙面的菌斑样本，收集到1.5 mL无菌离心管中，冰盒转运。

3. 样本贮存：短期（1个月）内可存放于-20℃冰箱，长期需贮存于-70℃超低温冰箱。

1. **龈下菌斑、植体周黏膜下菌斑样本的采集**

以下操作在口腔治疗牙椅上进行，注意采样器材需满足无菌要求。龈下菌斑、植体周黏膜下菌斑常用的方法有：刮匙法和吸附法（滤纸条/纸尖）。两种方法通常选用其中一种。取样位点常选用目标牙位的近中颊侧和远中颊侧，能够尽量避免唾液污染，取样难度较小。

1. 采样前准备：样本采集之前请受检者用清水漱口，去除口中可能含有的食物残渣；探针刮除牙面龈上菌斑、软垢，用无菌棉球隔湿；

2. 样本采集：吸附法：用无菌镊子将吸潮纸尖（剪掉尖端0.5-1 cm）或滤纸条（2\*10 mm）沿牙面插入牙周袋内遇阻力停置30秒后取出，放入无菌的0.5 mL Ep管中；

刮匙法：用无菌的牙周刮治器取牙周袋内的龈下菌斑、及种植体黏膜下菌斑，放入无菌的 0.5ml Ep管中，冰盒转运。

3. 样本处理：套管法洗提无菌纸尖或滤纸上龈下菌斑方法：在 0.5mL Ep管底部中央用烧红的针尖快速刺入拔出，形成小孔（＜吸潮纸尖直径），加入缓冲液100常温荡洗30-60分钟，将上述0.5mL Ep管放入无菌的1.5mL Ep管中，对称放入告诉低温离心机内，13000g离心15min，轻轻吸取上清入另一离心管中留存，沉淀则为龈下菌斑样本。

4. 样本贮存：短期（1个月）内可存放于-20℃冰箱，长期需贮存于-70℃超低温冰箱。

1. **根管内菌斑样本的采集**

感染根管内菌斑样本通常采用无菌纸尖采样法，以下操作在口腔治疗牙椅上进行，注意采样器材需满足无菌要求。

1. 采样前准备：取样前去除牙冠上的食物残渣、牙石、菌斑、软垢，以免造成污染。另外，取样需要开放髓腔，获取根管入路（注意应尽量避免大量冲水造成的菌斑破坏）。

2. 样本采集：用无菌棉球隔湿。用无菌吸潮纸尖，插入根管内，静置一段时间（通常30s），取出，放入无菌1.5 mL Ep管中，冰上保存转移至实验室处理[1]。

3. 样本处理：同上（套管法）。

4. 样本贮存：短期（1个月）内可存放于-20℃冰箱，长期需贮存于-70℃超低温冰箱。

1. **舌背菌斑样本采集**

1. 采样前准备：取样前轻轻漱口去除食物残渣。

2. 样本采集：患者微张口，用无菌毛刷从舌背一次叠瓦状刷过到另一侧，将含有样本的毛刷部分剪下，放入无菌管内。

3. 样本处理：加入缓冲液荡洗。将毛刷从液体中取出，13000g低温离心15min，轻轻吸取弃去上清，沉淀为舌背菌斑样本。

4. 样本贮存：短期（1个月）内可存放于-20℃冰箱，长期需贮存于-70℃超低温冰箱。

1. **其他黏膜表面菌斑样本的采集**

口腔内的其他黏膜表面菌斑取样位点主要包括：颊黏膜、上颚等。

1. 采样前准备：取样前轻轻漱口去除食物残渣。

2. 样本采集：用无菌木板刮取或棉拭子擦取黏膜表面的菌斑，放入配套的无菌管中，在装有缓冲液的管中反复荡洗[7-8]。留取荡洗后的液体，冰盒转运。

3. 样本处理： 13000g低温离心15min，轻轻吸取弃去上清，沉淀为舌背菌斑样本。

4. 样本贮存：短期（1个月）内可存放于-20℃冰箱，长期需贮存于-70℃超低温冰箱。

1. **其他口腔菌斑样本的采集**

口腔内常出现的脓肿有：牙周脓肿、根尖周脓肿、植体周粘膜溢脓等。若分泌量较大可用无菌注册器吸取[1]；若分泌量较小可选用滤纸条或无菌纸尖吸取[9]。

**致谢**

输入正文

此部分可包含(但并不仅限于)以下内容:

1. 作者应致谢支持其工作的经费来源渠道。
2. 列出已发表的使用过本实验方案的文章。
3. 若实验方案摘自或改编自毕业论文或先前发表的文章，请在此致谢先前的研究工作。

**参考文献**

周学东，肖丽英，肖晓蓉. (2009) 实用口腔微生物学与技术，人民卫生出版社

Maribasappa K, Radhika GB, Eunice MP, Swapna G, Sirkka A. (2017) Effffect of preparation method and storage period on the stability of saliva DNA, Archives of Oral Biology, 81: 21-25.

程广强. (2017) 口腔癌患者唾液及尿液中游离芳香族氨基酸的检测方法及应用研究, 福建分析测试, 26(4): 7-15.

Hintao J, Teanpaisan R, Chongsuvivatwong V, et al. (2007) The microbiological profifiles of saliva, supragingival and subgingival plaque and dental caries in adults with and without type 2 diabetes mellitus, Oral Microbiology Immunology, 22: 175-181.

Xime´nez-Fyvie LA, Haffajee AD, Socransky SS. (2000) Comparison of the microbiota of supra- and subgingival plaque in health and periodontitis, Journal of Clinical Periodontology, 27: 648-657.

吴亚菲, 张举之. (1995)牙周炎患者附着菌斑和非附着菌斑的比较,牙体牙做牙周病学杂志,1(5): 13-15.

Datar U, Angadi PV, Hallikerimath S, Kale AD. Cytological assessment of Barr bodies using aceto-orcein and papanicolaou stains in buccal mucosal smears and their sex estimation efficacy in an Indian sample. *Acta Cytol*. 2013;57(5):516-521. doi:10.1159/000353216.

Kullaa, Arja M., et al. “Microstructure of Oral Epithelial Cells as an Underlying Basis for Salivary Mucosal Pellicle.” Ultrastructural Pathology, vol. 38, no. 6, 2014, pp. 382–386.

Wang, Q., Lu, H., Zhang, L., Yan, X., Zhu, B., and Meng, H. (2020). Peri-implant mucositis sites with suppuration have higher microbial risk than sites without suppuration. Journal of periodontology.

**投稿邮箱：**yuanzhen@bio-protocol.org

**投审稿过程中有任何问题，请与袁珍博士联系（**yuanzhen@bio-protocol.org**；电话：**010-62966488）

# 更多参考实例:

下面是其他领域正式发表实验手册中阅读量较高的文章，格式和内容供参考。

本项目示例文章正在紧张制作中，将进一步提高方法的可重复性和易用性，近期发布！

## 中文实验手册参考示例(实验类)：

1. 水稻白叶枯病菌及细菌性条斑病菌培养及接种(含视频) <https://bio-protocol.org/bio101/e1010180>
2. DNA甲基化检测(含视频) <https://bio-protocol.org/bio101/e1010110>
3. 外源蛋白在烟草叶片瞬时表达 <https://bio-protocol.org/bio101/e1010127>
4. 水稻重要发育时期表型观察<https://bio-protocol.org/bio101/e1010178>
5. PCR扩增及克隆基因<https://bio-protocol.org/bio101/e1010202>
6. Gateway系统构建双元表达载体 <https://bio-protocol.org/bio101/e1010201>
7. 实验用果蝇的饲养及管理 <https://bio-protocol.org/bio101/e1010250>
8. 人外周血免疫细胞亚群25色流式全景分析<https://bio-protocol.org/bio101/e1010325>
9. 常用细胞周期流式检测方法<https://bio-protocol.org/bio101/e1010328>

## 中文实验手册参考示例(分析类)：

1. miRNA-seq数据分析<https://bio-protocol.org/bio101/e1010249>
2. mRNA-seq分析 <https://bio-protocol.org/bio101/e1010251>

已经完成的实验手册 (水稻、柑橘、果蝇、流式细胞术)，更多文章详见：

<https://bio-protocol.org/bio101/Special_Issues.aspx>

## Bio-protocol(英文版)稿件参考实例：

优秀中文方法稿件(原方法已发表于高水平杂志)，可推荐英文版投稿Bio-protocol （Pubmed和ESCI收录）。

1. Quantification of the Composition Dynamics of a Maize Root-associated Simplified Bacterial Community and Evaluation of Its Biological Control Effect(玉米根系相关简化细菌群落组成动力学定量及其生物防治效果评价) <https://bio-protocol.org/e2885>
2. Extraction and 16S rRNA Sequence Analysis of Microbiomes Associated with Rice Roots(模式生物小鼠口腔微生物组鉴定) <https://bio-protocol.org/e2884>
3. Oral Microbiome Characterization in Murine Models(水稻根系相关微生物群落的分离及其16S rRNA序列分析) <https://bio-protocol.org/e2655>
4. Human, Bacterial and Fungal Amplicon Collection and Processing for Sequencing(人、细菌和真菌扩增子的采集、处理并测序)
5. Single-step Precision Genome Editing in Yeast Using CRISPR-Cas9 <https://bio-protocol.org/e2765>
6. Adapting the Smart-seq2 Protocol for Robust Single Worm RNA-seq <https://bio-protocol.org/e2729>