

口腔微生物组研究主要取样部位及方法

Major Sampling Sites and Methods of Oral Microbiome

卢洪叶^{1, #}, 张翼飞^{2, #}, 张倩², 陈智滨^{1, *}, 陈峰^{2, *}

¹北京大学口腔医学院牙周科, 北京; ²北京大学口腔医学院中心实验室微生物平台, 北京

*通讯作者邮箱: chenfeng2011@hsc.pku.edu.cn; kqyehui21@bjmu.edu.cn

#共同第一作者/同等贡献

摘要: 本文介绍了口腔微生物组研究主要取样部位及方法, 包括唾液、牙面菌斑、龋损菌斑、龈下菌斑、植体周黏膜下菌斑、根管内菌斑、舌背菌斑及其他黏膜表面菌斑样本。收集的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。方法所使用的材料和设备皆为临床科室或实验室所常见的, 可行性较高。而且文中所介绍取样方法的可靠性均已得到多个研究的证实。

关键词: 口腔, 样本采集, 唾液, 菌斑

材料与试剂

1. 牙科吸潮纸尖, 35#或者 40# (柳苑, catalog number: 30)
2. 滤纸条 (Whatman, catalog number: 1004-070)
3. 15 ml 无菌离心管 (Corning, catalog number: 430790)
4. 1.5 ml 无菌离心管 (Axygen, catalog number: MCT-150-C)
5. 无菌牙科探针
6. 牙周刮治器 (catalog number: 7/8 号或 5/6 号)

仪器设备

1. 超低温冰箱 (-80 °C)
2. 低温冰箱 (-20 °C)
3. 低温高速离心机

实验步骤

一、唾液样本的采集(周学东等, 2009; 程广强, 2017; Maribasappa *et al.*, 2017)

1. 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，唾液菌斑也会受进食、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。
2. 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。刺激性唾液主要用来评估唾液腺的功能，此处不再详细介绍。非刺激性唾液是完全处于生理自然条件下收集的样本，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：受试者唾液先聚集在口底，再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，两种方法通常收集 5-10 min，冰盒转运。
3. 唾液样本的处理：将收集的唾液分装入 1.5 ml 无菌离心管中，低温离心(13,000×g, 4℃, 15min)，吸取上层清亮液体入 1.5 ml 无菌离心管内（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。
4. 样本贮存：短期（1 个月）内可存放于-20℃ 冰箱，长期贮存需加入冷冻保护剂（甘油、二甲基亚砷 DMSO 或脱脂牛奶（Cody *et al.*, 2008, 朱志宁等, 2011））置于-70℃ 超低温冰箱中。

二、牙面菌斑样本的采集(Nascimento *et al.*, 2019; Peterson *et al.*, 2013; Corby *et al.*, 2005)

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. 样本采集与转运：首先，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 0.5 ml 无菌离心管中。也可以使用无菌小毛刷(Peterson *et al.*, 2013) 或软刮板(Corby *et al.*, 2005)收集牙面菌斑，然后在准备好的缓冲液中荡洗 1min 将样本洗脱下。最后将收集的样本放入冰盒转运。（单位点的样本可用以研究该位点的微生物组；将多个指数牙的样本集合在一起可用以研究患者水平的微生物组；将具有相同临床特征的多个位点的样本集合在一起可用以研究该临床特征所对应的微生物组）

3. 样本贮存：短期 (1 个月) 内可存放于-20 °C 冰箱，长期贮存需加入冷冻保护剂（甘油、二甲基亚砷 DMSO 或脱脂牛奶 (Cody *et al.*, 2008, 朱志宁等, 2011)) 置于-70 °C 超低温冰箱中。

三、龋损菌斑样本的采集(肖晓蓉, 1993; Nascimento *et al.*, 2019)

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。

4. 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；
5. 样本采集与转运：首先用无菌棉隔湿，不同部位的牙菌斑的采集方式有所不同。咬合面沟裂菌斑一般采用无菌的探针采集；邻面菌斑标本可采用探针、牙线或正畸用细钢丝；根面龋的菌斑样本可用无菌刮匙；龈上或龈缘菌斑样本采用无菌匙形器采集。将菌斑收集到 0.5 ml 无菌离心管中，冰盒转运。（单位点的样本可用以研究该位点的微生物组；将多个指数牙的样本集合在一起可用以研究患者水平的微生物组；将具有相同临床特征的多个位点的样本集合在一起可用以研究该临床特征所对应的微生物组）

2. 样本贮存：短期 (1 个月) 内可存放于-20 °C 冰箱，长期贮存需加入冷冻保护剂（甘油、二甲基亚砷 DMSO 或脱脂牛奶 (Cody *et al.*, 2008, 朱志宁等, 2011)) 置于-70 °C 超低温冰箱中。

四、龈下菌斑、植体周黏膜下菌斑样本的采集(肖晓蓉, 1993; do Nascimento *et al.*, 2011; Lu *et al.*, 2019; Zheng *et al.*, 2015)

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. 样本采集与转运：

吸附法：用无菌镊子将吸潮纸尖（剪掉尖端 0.5-1 cm）（陈智滨等，2008；do Nascimento *et al.*, 2011）或滤纸条（2*10 mm）（Guentsch *et al.*, 2011）沿牙面插入牙周袋内遇阻力停置 30 s 取出，放入无菌的 0.5 ml 无菌离心管中；

刮匙法：用无菌的牙周刮治器取牙周袋内的龈下菌斑（Lu *et al.*, 2019）、及种植体黏膜下菌斑（Zheng *et al.*, 2015），放入无菌的 0.5 ml 无菌离心管中，冰盒转运。

（单位点的样本可用以研究该位点的微生物组；将多个指数牙的样本集合在一起可用以研究患者水平的微生物组；将具有相同临床特征的多个位点的样本集合在一起可用以研究该临床特征所对应的微生物组）

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 0.5 ml 无菌离心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 μ l 常温荡洗 30-60 min，将上述 0.5 ml 无菌离心管放入无菌的 1.5 ml 无菌离心管中，对称放入低温高速离心机内，低温离心（13,000 \times g，4 $^{\circ}$ C，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 $^{\circ}$ C 冰箱，长期贮存需加入冷冻保护剂（甘油、二甲基亚砷 DMSO 或脱脂牛奶（Cody *et al.*, 2008，朱志宁等，2011））置于-70 $^{\circ}$ C 超低温冰箱中。

五、根管内菌斑样本的采集（周学东等，2009；Parahitiyawa *et al.*, 2015）

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. 样本采集与转运：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 30 s），取出，放入无菌 1.5 ml 无菌离心管中，冰上保存转移至实验室处理（周学东等，2009）。（单位点的样本可用以研究该位点的微生物组；将多个指数牙的样本集合在一起可用以研究患者水平的微生物组；将具有相同临床特征的多个位点的样本集合在一起可用以研究该临床特征所对应的微生物组）

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 °C 冰箱，长期贮存需加入冷冻保护剂 (甘油、二甲基亚砷 DMSO 或脱脂牛奶 (Cody *et al.*, 2008, 朱志宁等, 2011)) 置于-70 °C 超低温冰箱中。

六、舌背菌斑样本采集(周学东等, 2009; Iwauchi *et al.*, 2019)

1. 采样前准备：取样前轻轻漱口去除食物残渣。
2. 样本采集与转运：受试者微张口，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，低温离心 (13,000×g, 4 °C, 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 °C 冰箱，长期贮存需加入冷冻保护剂 (甘油、二甲基亚砷 DMSO 或脱脂牛奶 (Cody *et al.*, 2008, 朱志宁等, 2011)) 置于-70 °C 超低温冰箱中。

七、其他黏膜表面菌斑样本的采集(Datar *et al.*, 2013; Kullaa *et al.*, 2014)

口腔内的其他黏膜表面菌斑取样位点主要包括：颊黏膜、上颌等。

1. 采样前准备：取样前轻轻漱口去除食物残渣。
2. 样本采集与转运：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(Datar *et al.*, 2013; Kullaa *et al.*, 2014)。留取荡洗后的液体，冰盒转运。
3. 样本处理：低温离心 (13,000×g, 4 °C, 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 °C 冰箱，长期贮存需加入冷冻保护剂 (甘油、二甲基亚砷 DMSO 或脱脂牛奶 (Cody *et al.*, 2008, 朱志宁等, 2011)) 置于-70 °C 超低温冰箱中。

八、其他口腔菌斑样本的采集

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 (周学东等, 2009) ；若分泌量较小可选用滤纸条或无菌纸尖吸取(Wang *et al.*, 2020) 。

参考文献

1. 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.
2. 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, *牙体牙髓牙周病学杂志*, 1(5): 13-15.
3. 肖晓蓉. (1993). 口腔微生物学及实用技术. 北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社.
4. 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.
5. 朱志宁, 赵燕, 黄惠 & 任晓明. (2011) 不同种冷冻保护剂嗜酸乳杆菌保存效果的比较研究, *中国农学通报*, 27, 412-417.
6. 陈智滨, 孙晓军, 栾庆先 (2008) 滤纸条与吸潮纸尖采集龈沟液样本比较, *现代口腔医学杂志*, 22 (2), 137-140.
7. Cody, W. L., Wilson, J. W., Hendrixson, D. R., McIver, K. S., Hagman, K. E., Ott, C. M., Nickerson, C. A. & Schurr, M. J. (2008) Skim milk enhances the preservation of thawed -80 degrees C bacterial stocks. *J Microbiol Methods*, 75, 135-138.
8. Corby, P. M., Lyons-Weiler, J., Bretz, W. A., Hart, T. C., Aas, J. A., Boumenna, T., Goss, J., Corby, A. L., Junior, H. M., Weyant, R. J. & Paster, B. J. (2005) Microbial risk indicators of early childhood caries. *J Clin Microbiol*, 43, 5753-5759.
9. Datar U, Angadi PV, Hallikerimath S and Kale AD.(2013) 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.* 57(5):516-521.
10. do Nascimento, C., Monesi, N., Ito, I. Y., Issa, J. P. & de Albuquerque Junior, R. F. (2011) Bacterial diversity of periodontal and implant-related sites detected by the DNA Checkerboard method. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 30, 1607-1613.

11. Guentsch, A., Kramesberger, M., Sroka, A., Pfister, W., Potempa, J. & Eick, S. (2011) Comparison of gingival crevicular fluid sampling methods in patients with severe chronic periodontitis. *J Periodontol*, 82, 1051-1060.
12. Hintao J, Teanpaisan R, Chongsuvivatwong V, Ratarasan C and Dahlen G. (2007) The microbiological profiles of saliva, supragingival and subgingival plaque and dental caries in adults with and without type 2 diabetes mellitus. *Oral Microbiology Immunology*, 22: 175-181.
13. Iwauchi, M., Horigome, A., Ishikawa, K., Mikuni, A., Nakano, M., Xiao, J. Z., Odamaki, T. & Hironaka, S. (2019) Relationship between oral and gut microbiota in elderly people. *Immun Inflamm Dis*, 7, 229-236.
14. Kullaa, Arja M. Asikainen, P., Herrala, M., Ukkonen, H. and Mikkonen, J.W.(2014) Microstructure of Oral Epithelial Cells as an Underlying Basis for Salivary Mucosal Pellicle. *Ultrastructural Pathology*. 38(6): 382–386.
15. Lu, H., Zhao, Y., Feng, X., He, L. & Meng, H. (2019) Microbiome in maintained periodontitis and its shift over a single maintenance interval of three months. *J Clin Periodontol*, 46(11):1094-1104.
16. Maribasappa K, Radhika GB, Eunice MP, Swapna G, Sirkka A. (2017) Effect of preparation method and storage period on the stability of saliva DNA. *Archives of Oral Biology*, 81: 21-25.
17. Nascimento, M. M., Alvarez, A. J., Huang, X., Browngardt, C., Jenkins, R., Sinhoreti, M. C., Ribeiro, A. P. D., Dilbone, D. A., Richards, V. P., Garrett, T. J. & Burne, R. A. (2019) Metabolic Profile of Supragingival Plaque Exposed to Arginine and Fluoride. *J Dent Res*, 98, 1245-1252.
18. Parahitiyawa, N. B., Chu, F. C., Leung, W. K., Yam, W. C., Jin, L. J. & Samaranayake, L. P. (2015) Clonality of bacterial consortia in root canals and subjacent gingival crevices. *J Investig Clin Dent*. 6, 32-39.
19. Peterson, S. N., Snesrud, E., Liu, J., Ong, A. C., Kilian, M., Schork, N. J. & Bretz, W. (2013) The dental plaque microbiome in health and disease. *PLoS One*, 8, e58487.
20. 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*. 91(10):1284-1294.
21. Xime´nez-Fyvie LA, Haffajee AD and Socransky SS. (2000) Comparison of the microbiota of supra- and subgingival plaque in health and periodontitis, *Journal of*

- 206 *Clinical Periodontology*, 27: 648-657.
- 207 22. Zheng, H., Xu, L., Wang, Z., Li, L., Zhang, J., Zhang, Q., Chen, T., Lin, J. & Chen,
- 208 F. (2015) Subgingival microbiome in patients with healthy and ailing dental
- 209 implants. *Sci Rep*, 5, 10948.
- 210
- 211
- 212