

The Application of 16SrRNA Sequences Analysis in Oral Microbial Community

Chunxiang Li¹, Haijing Wang²

¹School of Life Science, Jilin University, Changchun Jilin

²College of Chemistry, Jilin University, Changchun Jilin

Email: chunxiangli@jlu.edu.cn, wanghj@jlu.edu.cn

Received: Apr. 14th, 2015; accepted: May 8th, 2015; published: May 12th, 2015

Copyright © 2014 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

Abstract

The oral cavity harbors large numbers of bacteria, which plays a vital role in maintaining the homeostasis of oral cavity. Oral microbiota may be crucial to the health or disease status of the human host. Therefore, it is important to know the oral microbial community. Molecular biology tools, avoiding the limitations of classical microbiological techniques, reflect the microbial diversity more reliable and more directly, among which 16SrRNA sequence analysis is one of the most extensive and effective means to study oral bacteria. This paper aims to critically review current knowledge about the characteristic of 16SrRNA gene, the principle and the progress of sequences analysis technology and its application in oral microbial flora. This review will provide some help for studying oral microbial community using 16SrRNA sequence analysis method.

Keywords

16rRNA, Sequence Analysis, Oral Microbial, Community Diversity

16SrRNA序列分析技术在口腔微生物群落中的应用

李春香¹, 王海晶²

¹吉林大学生命科学学院, 吉林 长春

²吉林大学化学学院, 吉林 长春

Email: chunxiangli@jlu.edu.cn, wanghj@jlu.edu.cn

收稿日期: 2015年4月14日; 录用日期: 2015年5月8日; 发布日期: 2015年5月12日

摘 要

人类口腔微生物种类繁多, 结构复杂, 与人类常见的口腔疾病有着密切的关系, 与血管硬化、心脏病突发等疾病也可能存在关联。因此, 对口腔微生物菌群进行研究具有重要意义。分子生物学手段可避免经典微生物技术在多样性研究中的局限性, 更可靠、更直接地反映微生物多样性在生态系统中的原始构成, 其中16SrRNA序列分析是目前研究口腔微生物菌落最为广泛, 最为有效的手段之一。现对16SrRNA基因的特点, 序列分析技术的原理及进展, 以及其在口腔微生物群落中的应用做一综述, 以期为更好应用16SrRNA序列分析方法研究口腔微生物提供一些帮助。

关键词

16SrRNA, 序列分析, 口腔微生物, 菌落多样性

1. 引言

人的口腔环境结构复杂, 是很多微生物的繁殖地, 包括细菌、病毒、真菌等, 而这其中细菌数量最大, 整个口腔中细菌的种类达到 1000 多种[1]。口腔内温度、湿度和营养的来源以及理化性质的不同为口腔内各种微生物的生长、繁殖和定居提供适宜的环境, 因而也就形成了口腔微生物的多样性[2]。分析微生物群体的多样性和群落结构的经典方法是分离、培养和鉴定, 需要进行一系列繁杂的形态特征和生理生化试验。这种方法最大的缺点是耗时, 且不能对分离物种进行精确的鉴定, 不能反映物种间的系统发育关系; 其次, 约有一半的口腔细菌不能应用常规方法来培养[3]。因此, 不能利用传统的微生物技术获得口腔微生物多样性的真正概貌。近年来, 逐步发展起来的分子生物学手段可避免经典微生物技术在多样性研究中的局限性, 更可靠、更直接地反映微生物多样性在生态系统中的原始构成, 其中 16SrRNA 序列分析是目前研究口腔微生物多样性最为广泛, 最为有效的手段。现对 16SrRNA 基因的特点, 序列分析技术的原理及进展, 以及其在口腔微生物鉴定中的应用做一综述。

2. 16sRNA 基因的特点及序列分析技术的基本原理

16sRNA 是原核生物的核糖体 RNA, 在进化的过程中, 保持相对恒定的结构, 普遍存在于细菌生物中, 并具有种属的特异性, 是细菌系统分类中最常见的分子钟。16sRNA 基因序列可分为 8 处高度保守的区域区和 9 处可变区, 保守区为所有细菌所共有, 可变区在不同细菌间有不同程度的差异, 具有种属水平的特异性, 因此两种区域的存在为细菌的种属鉴定提供了便利[4] [5]。另外, 16sRNA 基因大小适宜, 即符合快速测序的需求又含有足够多的信息位点, 同时, 16sRNA 基因一般在细菌中含有 5~10 个拷贝, 适合对一些低灵敏度的细菌进行检测。16sRNA 基因的这些特点使其成为最适合系统分类的基因。在研究细菌的多样性中, 主要针对保守的序列区域设计各种细菌的通用引物, 然会对高可变序列区域进行 PCR 扩增, 对扩增的序列进行分析, 并与数据库中的已知种属的序列进行比对, 从而对细菌进行分类和鉴定。在对一些已知的致病菌等进行检测中, 则在特异区针对特异细菌设计特异引物, 例如对螺旋体菌及变形链球菌的研究[6] [7]。

3. 16S rRNA 序列分析方法

3.1. 克隆文库的 Sanger 测序

Sanger 双脱氧链特异测序法是最为传统的经典测序方法，也是实验室常用的序列分析方法[8]。首先应用通用引物或是特意引物对目的基因进行 PCR 扩增，然后对 PCR 产物进行克隆，建立克隆文库，随后对克隆文库进行 Sanger 测序。将测得的序列与数据库中的序列进行比对，应用统计学软件构建系统发育树，从而分析未知生物与已知物种的关系。此方法的优势就是能够扩增培养和非培养的细菌，目前单次测序长度可长达 1000 bp，一次能进行 96 或 384 个样本的测序，准确率高达 99.999%。因此获得的信息位点较多，获得的系统发育关系较精细[9]。其缺点就是存在 PCR 退火偏差[10]，克隆偏差，并且因耗时耗力，取样量往往不够，测序深度较浅[11]。因此，该测序方法测定的主要是 PCR 产物中的优势拷贝，对于混合菌株中的低含量的菌株序列则很难获得，对特定环境中的菌群多样性进行分析不如二代测序技术灵敏。应用 Sanger 测序法分析 16S rRNA 基因已经广泛应用到牙周疾病与健康的研究中了。例如，Hutter 等人通过对 26 个牙周疾病患者牙菌斑进行 Sanger 测序法分析以后发现 12 种与牙周疾病相关的致病菌[12]，而 Kumar 等人通过比对健康人群与牙周疾病患者的口腔细菌多样性发现，牙周疾病是这个口腔菌落平衡被扰乱的结果而不是某一特定病原菌的变化造成的[13]。

3.2. 通用引物高通量指纹技术

变性梯度凝胶电泳，温度梯度凝胶电泳，单链构象多态性(DGGE, T-RFLP, SSCP 等)及限制性酶切长度多态性等都是基于 PCR 技术发展起来的指纹技术，省去了建立克隆基因文库的麻烦，因此被广泛应用于微生物群体多样性的研究。将特定微生物群落 DNA 库中的 16S rRNA 基因进行 PCR 扩增，将 PCR 混合产物进行 DGGE/TGGE，DGGE 和 TGGE 分别通过逐渐增加的化学变性剂线性浓度梯度和线性温度梯度可以把长度相同但只有一个碱基不同的 DNA 片段分离。DNA 序列不同，在不同变性浓度下变性获得的电泳条带位置也不相同，理论上认为一个条带就代表一种细菌[14]。实验所获得的指纹图谱反应了群落的结构，包括其复杂性以及每一个被检测种属的相对含量。将凝胶上的条带进行回收、克隆及测序，便可鉴定对应微生物的种属。这一技术能够提供群落中优势种类信息并同时分析多个样品，具有可重复和操作简单等特点，适合于调查种群的时空变化，并且可通过对条带的序列分析特异性探针杂交分析鉴定群落组成。例如，Ledder 等人对 47 个牙菌斑样本进行 DGGE 分析，并对其中的特异条带进行测序分析，结果表明在牙周炎患者中放线杆菌属中的伴放线菌聚集菌含量较高[15]。PCR-SSCP 技术则是利用单链 DNA 因序列不同而具有不同的空间构象，其在凝胶中具有不同的迁移率，因此长度相同可以进行序列差异的测定，而敏感度会随着片段长度的增加而降低。但是只要条带被凝胶电泳分离开就可以进行系统发育的研究。该方法受电泳条件限制，对操作手法要求较为苛刻，因此，影响了该技术在口腔微生物中的应用。PCR-RFLP 是一种非常流行的被广泛应用的高通量指纹图谱技术。因为不同的菌属在 16S rRNA 基因的不同位置含有不同数量的限制性内切酶的酶切位点，因此也可以将 PCR 产物应用不同的限制性内切酶进行水解，水解后产物进行电泳则得到不同细菌的酶切图谱，实验获得的“指纹”图谱反应了菌群的结构。PCR-RFLP 结合测序技术被广泛应用到口腔微生物研究中，特别是对临床疗效的评估中。例如，Sakamoto 等人发现对牙周疾病治疗三个月以后，牙龈卟啉单胞菌，链球菌，齿垢密螺旋体等含量下降[16]，表明这些菌种与牙周疾病有关。总之，指纹技术是一种高效可重复的技术，常常用于监测菌群结构和组成的变化[17]-[19]，其缺点就是不同的指纹图谱数据难以进行比较。

3.3. 通用引物结合基因芯片法

该技术的原理是基于 DNA-DNA 杂交技术。DNA-DNA 杂交技术就是两个单链 DNA 分子互补碱基

退火的过程。应用一个带有标签的已知 DNA 序列作为探针来结合目标序列，从而达到鉴定目标序列的目的。将一种菌的 16sRNA 基因的多个可变区域的序列制作成探针，若目标群落中有这种菌在这几个探针位点上会有信号显示。从而达到鉴定的目的。将已知菌种的 16sRNA 基因序列制成探针，将他们以点的形式固定到一块固体基片上就成了基因芯片。芯片技术操作简单、检测快速，但是芯片检测出的菌必须是数据库里含有的 16sRNA 的基因，因此会忽略了一些未知的、未被发现的细菌的存在。这个方法比较适合在特定环境中寻找某种特定的菌以及测定特定微生物种群 16sRNA 在总 sRNA 中的比例。例如，Haffajee 等人应用 DNA-DNA 杂交技术研究了吸烟对口腔微生物构成的影响，结果发现吸烟与非吸烟的人菌群差异主要在上颌牙菌斑中，并且其差异并不表现在菌的数量和比例上，而是表现在流行菌株的不同[20]。

3.4. 焦磷酸测序

焦磷酸测序技术是由 4 种酶催化的同一反应体系中的酶级联化学发光反应。焦磷酸测序技术的原理是：引物与模板 DNA 退火后，在 DNA 聚合酶(DNA polymerase)、ATP 硫酸化酶(ATP sulfurylase)、荧光素酶(luciferase)和三磷酸腺苷双磷酸酶(Apyrase)4 种酶的协同作用下，将引物上每一个 dNTP 的聚合与一次荧光信号的释放偶联起来，通过检测荧光的释放和强度，达到实时测定 DNA 序列的目的[21]。该技术不需要凝胶电泳，也不需要 DNA 样品进行任何特殊形式的标记和染色，具有高通量、快速、直观的特点。为了增加同时测序量及降低成本，一些研究者在引物前面加入模板特异性的“条形码”序列，在边合成边测序时就可根据“条形码”序列得知模板来源[22]。焦磷酸测序技术早在 1996 年就被用于口腔微生物的研究中[23]。但是由于最初价格昂贵，大多数研究者都只是对少量样本采用此方法。近年来由于测序成本的降低，该方法被大规模广泛的应用到临床口腔微生物的研究中[24]-[27]。Ahn J 等人比较了芯片法和焦磷酸测序技术，结果表明焦磷酸测序技术获得的菌谱更广，检测更加灵敏[28]。与 Sanger 测序法相比，焦磷酸测序技术具有高通量快速等优势，已经成为口腔细菌多样性研究的重要手段。该技术的缺点就是测序长度有一定的限制，一般长度在 150 bp 左右，因此，焦磷酸测序的策略，不能针对整个基因进行测序，而主要针对各个可变区进行测序。既要考虑测序长度的限制又要尽可能获得更多的信息位点，通常情况下都是几个可变区联用[24] [26] [27]。由于研究者所选取的区域并不相同，给数据的比较带来了较大的问题，为了探讨哪些可变区域更适合研究口腔细菌，Kumar 等人将 16sRNA 基因的 9 个高可变区分成三段，通过与 sanger 测序法比较，发现 V1-3 结合 V7-9 区所获得的结果与克隆全长测序结果相一致，表明焦磷酸测序 16sRNA 基因的 V1-3 和 V7-9 区是研究口腔细菌多样性最为合适的方法[5]。最近，美国 Thermofisher 公司针对 16sRNA 基因高可变区开发了一个试剂盒(Ion 16S metagenomics kit)，此试剂盒包含的引物对覆盖 V2-V4 及 V6-V9 区，可以获得极为准确的微生物信息，使得口腔细菌 16sRNA 基因序列多样性研究更为简单快捷。

总之，以上各种序列分析方法各有优缺点(见表 1)，我们应该根据研究目的的不同选择相适宜的方法。

Table 1. The advantages and disadvantages of the 16sRNA gene sequence analysis methods and their applicable scope
表 1. 16sRNA 基因序列分析方法优缺点的比较及其适用范围

序列分析方法	优点	缺点	适用研究方向
Sanger 测序	读长长，质量高，信息量高	测序深度浅，只检测优势菌种，费时	对特定菌种进行研究
通用引物高通量指纹技术	可重复，操作简单	不同指纹数据无法进行比较	菌群的时空变化
通用引物结合基因芯片法	操作简单、检测快速	无法检测未知的菌种	特定环境中特定的菌的分析
焦磷酸测序(二代测序技术)	测序深度深，灵敏，高通量，快速	昂贵，读长短，信息量少	对未知环境菌群多样性进行分析

4. 16S rRNA 序列分析技术在口腔微生物中的应用

4.1. 口腔微生物群多样性的鉴定

口腔中的正常菌群是微生物与其宿主在共同进化中形成的微生物群体，其多样性是宿主与环境共同作用的结果[29]。这种多样性包括个体的差异[30]，以及同一个体不同部位的[22]，同一部位不同时间菌群构成的[31]。16S rRNA 序列分析最初应用在对口腔微生物菌群的鉴定中，采用的是传统的指纹技术和一代测序技术，近年来主要采用高通量焦磷酸测序技术来研究口腔微生物的多样性。这一技术的应用已经揭示出人类口腔细菌的高度多态性。例如，Nasidze 等人分别从美洲、欧洲、亚洲以及非洲等不同地区提取了 120 个人的唾液样本，对这些唾液样本中细菌 16S rRNA 基因的研究结果表明口腔微生物组存在很大的个体差异性，并且不受任何地区结构的影响[30]。Keijser 等人对 98 个健康成年人的牙菌斑进行分析，发现了一万个微生物类型，比以往应用传统方法简单出的 700 多个微生物类型多出了一个数量级。一个健康的口腔微生物群落应该是受控于一个对健康有利的核心微生物组。这些丰富的微生物类群将保持一个健康生态系统的功能稳定性和动态平衡[24]。

4.2. 16S rRNA 基因在口腔微生物与口腔疾病的关系研究中的应用

口腔是全身寄居微生物密度最高、种类最多的部位之一。大部分可以相互关联并形成生物膜，抵抗机械清除力或抗生素治疗，但在环境变化或其他口腔情况(如个人口腔卫生质量)变化触发时它们也可成为致病微生物。查看这些微生物在人类健康和疾病之间所扮演的角色，对于人为控制，保持人类口腔的健康，防治各种口腔疾病十分必要。目前，对于这些微生物在人类口腔疾病方面的作用已有了一定的认识。

龋齿病俗称虫牙、蛀牙，发病率高，分布广，是口腔主要的常见病。口腔是牙齿的外环境，与龋病的发生密切相关。细菌利用食物残渣繁殖增生，产生酸性物质，造成口腔环境适合喜好酸的菌种生存，这些菌株持续的产生酸性物质是诱发龋齿发生的主要原因[32]。了解龋齿病形成早期人类口腔细菌的变化能够在龋洞或牙齿硬组织病损出现以前进行诊断和治疗。早期研究表明，变形链球菌和乳杆菌与龋病发生有直接关系[33] [34]。然而，近期研究发现从饮食中产生酸的细菌种类很多，它们可能都与龋齿发生有关[22] [35]。例如，Ling 等人应用 PCR-DGGE 及焦磷酸测序方法对 60 个龋齿患儿和健康儿童唾液及牙菌斑进行研究[22]，结果表明牙菌斑中的链球菌属，韦荣球菌属，放线菌属，纤毛菌属，颗粒链球菌属和硫单胞菌属与龋齿形成有关。Gross 等人通过 Sanger 测序 16S 基因发现，除了变形链球菌及乳杆菌，轻型链球菌，月型单胞菌属，奈瑟氏菌属在龋齿患者中的水平也很高[36]。最近发现，韦格斯卡多维亚菌和双歧杆菌也与龋齿发生有关[36] [37]。另外，口腔中一些细菌能够从尿素和精氨酸中产生氨，从而提高口腔环境的 PH，他们与产酸的菌群互相作用，从而维持口腔环境动态平衡[38]。由此可见，龋齿相关生物组是非常复杂的。

牙龈炎是指发生在牙龈(gingiva)组织的急、慢性炎症，常见表现为牙龈出血，红肿，胀痛，是最为普遍的一种牙周疾病。Huang 等人应用高通量测序技术分析 16S rRNA 基因的 V1-3 区，结果发现具有齿龈炎的个体与健康个体在牙菌斑上的生物菌落有明显差异，但在唾液中没有明显差异[39]，表明牙菌斑是牙龈炎的始动因子。牙齿表面的正常菌群主要是革兰氏阳性需氧或半需氧菌，例如链球菌和放线菌等[40]，而在成熟的牙菌斑中则主要是革兰氏阴性菌厌氧菌，例如梭菌属和密螺旋体属等[41] [42]。牙龈炎的发生与特定的细菌没有关系，而是与牙菌斑的多少有关。坚持保持口腔卫生，减少牙菌斑的形成及陈旧性牙菌斑的存在则能减少牙龈炎的发生。

牙周炎是累及四种牙周支持组织(牙龈、牙周膜、牙槽骨和牙骨质)的慢性感染性疾病，往往引发牙周支持组织的炎性破坏，严重的导致失牙。宿主易感性和吸烟环境是诱发牙周炎的主要原因[43]。与牙周炎

有关的菌属包括能够体外培养的牙龈卟啉单胞菌, 齿垢密螺旋体和福赛斯坦纳菌[44]和不能够培养的隐藏真杆菌, 牙髓卟啉单胞菌, 栖牙普氏菌等[45]。最近应用高通量测序方式的研究显示, 牙周疾病生物菌落与健康生物菌落构成不同, 存在一个疾病相关的菌落[46]。

5. 小结

人类口腔微生物与人体处于动态生态平衡状态, 为维护人体的健康发挥重要的作用, 也与多种口腔疾病的发生发展有密切关系, 因此, 应用各种技术对这些微生物的16sRNA基因进行序列分析以及对它们的生理功能进行深入解析, 可为各类疾病的预防和治疗带来全新的思路和方法。

基金项目

本成果获得吉林大学基本科研业务费项目 - 平台基地项目(450060481025)资助。

参考文献 (References)

- [1] Li, Y., Saxena, D., Chen, Z., Liu, G., Abrams, W.R., Phelan, J.A., Norman, R.G., Fisch, G.S., Corby, P.M., Dewhirst, F., Paster, B.J., Kokaras, A.S. and Malamud, D. (2014) HIV infection and microbial diversity in saliva. *Journal of Clinical Microbiology*, **52**, 1400-1411.
- [2] 丁迎春, 平文祥, 孙剑秋, 周东坡 (1996) 人类口腔小生境微生物的多样性. *生物多样性*, **2**, 103-108.
- [3] Dewhirst, F.E., Chen, T., Izard, J., Paster, B.J., Tanner, A.C., Yu, W.H., Lakshmanan, A. and Wade, W.G. (2010) The human oral microbiome. *Journal of Bacteriology*, **192**, 5002-5017.
- [4] Peer, Y.V., Chapelle, S. and Wachter, D.R. (1996) A quantitative map of nucleotide substitution rates in bacterial rRNA. *Nucleic Acids Research*, **24**, 3381-3391.
- [5] Kumar, P.S., Brooker, M.R., Dowd, S.E. and Camerlengo, T. (2011) Target Region Selection Is a Critical Determinant of Community Fingerprints Generated by 16S Pyrosequencing. *Plos One*, **6**, e20956.
- [6] Sato, T. and Kuramitsu, H.K. (1999) Restriction fragment-length polymorphism analysis of 16S ribosomal RNA genes amplified by polymerase chain reaction for rapid identification of cultivable oral treponemes. *Oral Microbiology and Immunology*, **14**, 117-121.
- [7] Sato, T., Hu, J.P., Ohki, K., Yamaura, M., Washio, J. and Matsuyama, J. (2003) Identification of mutans streptococci by restriction fragment length polymorphism analysis of polymerase chain reaction-amplified 16S ribosomal RNA genes. *Oral Microbiology and Immunology*, **18**, 323-326.
- [8] Sanger, F. and Coulson, A.R. (1975) A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *Journal of Molecular Biology*, **94**, 441-448.
- [9] Kroes, I., Lepp, P.W. and Relman, D.A. (1999) Bacterial diversity within the human subgingival crevice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **96**, 14547-14552.
- [10] Suzuki, M.T. and Giovannoni, S.J. (1996) Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, **62**, 625-630.
- [11] Nossa, C.W., Oberdorf, W.E., Yang, L., Aas, J.A., Paster, B.J., DeSantis, T.Z., Brodie, E.L., Malamud, D., Poles, M.A. and Pei, Z. (2010) Design of 16S rRNA gene primers for 454 pyrosequencing of the human foregut microbiome. *World Journal of Gastroenterology*, **16**, 4135-4144.
- [12] Hutter, G., Schlagenhauf, U., Valenza, G., Horn, M., Burgemeister, S., Claus, H. and Vogel, U. (2003) Molecular analysis of bacteria in periodontitis: Evaluation of clone libraries, novel phylotypes and putative pathogens. *Microbiology*, **149**, 67-75.
- [13] Kumar, P.S., Griffen, A.L., Moeschberger, M.L. and Leys, E.J. (2005) Identification of candidate periodontal pathogens and beneficial species by quantitative 16S clonal analysis. *Journal of Clinical Microbiology*, **43**, 3944-3955.
- [14] 薛晶, 肖丽英, 周学东 (2010) 人体口腔微生物组研究最新进展. *华西口腔医学杂志*, **1**, 5-8
- [15] Ledder, R.G., Gilbert, P., Huws, S.A., Aarons, L., Ashley, M.P., Hull, P.S. and McBain, A.J. (2007) Molecular analysis of the subgingival microbiota in health and disease. *Applied and Environmental Microbiology*, **73**, 516-523.
- [16] Sakamoto, M., Huang, Y., Ohnishi, M., Umeda, M., Ishikawa, I. and Benno, Y. (2004) Changes in oral microbial profiles after periodontal treatment as determined by molecular analysis of 16S rRNA genes. *Journal of Medical Microbiology*, **53**, 563-571.

- [17] Balaji, K., Thenmozhi, R., Sundaravadivel, M. and Pandian, S.K. (2012) Comparison of bacterial communities in the throat swabs from healthy subjects and pharyngitis patients by terminal restriction fragment length polymorphism. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **167**, 1459-1473.
- [18] Takeshita, T., Nakano, Y., Kumagai, T., Yasui, M., Kamio, N., Shibata, Y., Shiota, S. and Yamashita, Y. (2009) The ecological proportion of indigenous bacterial populations in saliva is correlated with oral health status. *The ISME Journal*, **3**, 65-78.
- [19] Siqueira Jr., J.F. and Rôças, I.N. (2010) The oral microbiota: General overview, taxonomy, and nucleic acid techniques. In: Seymour, G.J., Cullinan, M.P. and Heng, N.C.K., Eds., *Oral Biology, Methods in Molecular Biology*, Humana Press, New York, 55-69.
- [20] Haffajee, A.D. and Socransky, S.S. (2001) Relationship of cigarette smoking to the subgingival microbiota. *Journal of Clinical Periodontology*, **28**, 377-388.
- [21] 汤华阳, 杜卫东, 张学军 (2007) 焦磷酸测序技术及应用. *医学分子生物学杂志*, **3**, 272-275.
- [22] Ling, Z., Kong, J., Jia, P., Wei, C., Wang, Y., Pan, Z., Huang, W., Li, L., Chen, H. and Xiang, C. (2010) Analysis of oral microbiota in children with dental caries by PCR-DGGE and barcoded pyrosequencing. *Microbial Ecology*, **60**, 677-690.
- [23] Dymock, D., Weightman, A.J., Scully, C. and Wade, W.G. (1996) Molecular analysis of microflora associated with dentoalveolar abscesses. *Journal of Clinical Microbiology*, **34**, 537-542.
- [24] Keijsers, B.J.F., Zaura, E., Huse, S.M., van der Vossen, J.M.B.M., Schuren, F.H.J., Montijn, R.C., ten Cate, J.M. and Crielaard, W. (2008) Pyrosequencing analysis of the oral microflora of healthy adults. *Journal of Dental Research*, **87**, 1016-1020.
- [25] Alcaraz, L.D., Belda-Ferre, P., Cabrera-Rubio, R., Romero, H., Simón-Soro, A., Pignatelli, M. and Mira, A. (2012) Identifying a healthy oral microbiome through metagenomics. *Clinical Microbiology and Infection*, **4**, 54-57.
- [26] Kianoush, N., Adler, C.J., Nguyen, K.A., Browne, G.V., Simonian, M. and Hunter, N. (2014) Bacterial profile of dentine caries and the impact of pH on bacterial population diversity. *PLoS ONE*, **9**, e92940.
- [27] Langfeldt, D., Neulinger, S.C., Heuer, W., Staufenbiel, I., Künzel, S., Baines, J.F., Eberhard, J. and Schmitz, R.A. (2014) Composition of microbial oral biofilms during maturation in young healthy adults. *PLoS ONE*, **9**, e87449.
- [28] Ahn, J., Yang, L., Paster, B.J., Ganly, I., Morris, L., Pei, Z. and Hayes, R.B. (2011) Oral microbiome profiles: 16S rRNA pyrosequencing and microarray assay comparison. *PLoS ONE*, **6**, e22788.
- [29] Rasiyah, I.A., Wong, L., Anderson, S.A. and Sissons, C.H. (2005) Variation in bacterial DGGE patterns from human saliva: Over time, between individuals and in corresponding dental plaque microcosms. *Archives of Oral Biology*, **50**, 779-787.
- [30] Nasidze, I., Li, J., Quinque, D., Tang, K. and Stoneking, M. (2009) Global diversity in the human salivary microbiome. *Genome Research*, **19**, 636-643.
- [31] Gusberti, F.A., Mombelli, A., Lang, N.P. and Minder, C.E. (1990) Changes in subgingival microbiota during puberty: A 4-year longitudinal study. *Journal of Clinical Periodontology*, **17**, 685-692.
- [32] Takahashi, N. and Nyvad, B. (2011) The role of bacteria in the caries process: Ecological perspectives. *Journal of Dental Research*, **90**, 294-303.
- [33] Munson, M.A., Banerjee, A., Watson, T.F. and Wade, W.G. (2004) Molecular analysis of the microflora associated with dental caries. *Journal of Clinical Microbiology*, **42**, 3023-3029.
- [34] Kleinberg, I. (2002) A mixed-bacteria ecological approach to understanding the role of the oral bacteria in dental caries causation: An alternative to Streptococcus mutans and the specific-plaque hypothesis. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, **13**, 108-125.
- [35] Gross, E.L., Leys, E.J., Gasparovich, S.R., Firestone, N.D., Schwartzbaum, J.A., Janies, D.A., Asnani, K. and Griffen, A.L. (2010) Bacterial 16S sequence analysis of severe caries in young permanent teeth. *Journal of Clinical Microbiology*, **48**, 4121-4128.
- [36] Kaur, R., Gilbert, S.C., Sheehy, E.C. and Beighton, D. (2013) Salivary levels of bifidobacteria in caries-free and caries-active children. *International Journal of Paediatric Dentistry*, **23**, 32-38.
- [37] Downes, J., Mantzourani, M., Beighton, D., Hooper, S., Wilson, M.J., Nicholson, A. and Wade, W.G. (2011) *Scardovia wiggsiae* sp. Nov., isolated from the human oral cavity and clinical material, and emended descriptions of the genus *Scardovia* and *Scardovia inopinata*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **61**, 25-29.
- [38] Tanner, A.C.R., Kent Jr., R.L., Lif Holgersson, P., Hughes, C.V., Loo, C.Y., Kanasi, E., Chalmers, N.I. and Johansson, I. (2011) Microbiota of severe early child hood caries before and after therapy. *Journal of Dental Research*, **90**, 1298-1305.
- [39] Huang, S., Yang, F., Zeng, X., Chen, J., Li, R., Wen, T., Li, C., Wei, W., Liu, J., Chen, L., Davis, C. and Xu, J. (2011)

- Preliminary characterization of the oral microbiota of Chinese adults with and without gingivitis. *BMC Oral Health*, **11**, 33.
- [40] Nyvad, B. and Kilian, M. (1987) Microbiology of the early colonization of human enamel and root surfaces *in vivo*. *Journal of Dental Research*, **95**, 369-380.
- [41] Zijnge, V., van Leeuwen, M.B., Degener, J.E., Abbas, F., Thurnheer, T., Gmür, R. and Harmsen, H.J. (2010) Oral biofilm architecture on natural teeth. *PLoS ONE*, **5**, e9321.
- [42] Lovegrove, J.M. (2004) Dental plaque revisited: Bacteria associated with periodontal disease. *Journal of the New Zealand Society of Periodontology*, **87**, 7-21.
- [43] Van Dyke, T.E. and Sheilesh, D. (2005) Risk factors for periodontitis. *Journal of the New Zealand Society of Periodontology*, **7**, 3-7.
- [44] Haffajee, A.D., Socransky, S.S., Patel, M.R. and Song, X. (2008) Microbial complexes in subgingival plaque. *Oral Microbiology and Immunology*, **25**, 134-144.
- [45] Kumar, P.S., Griffen, A.L., Barton, J.A., Paster, B.J., Moeschberger, M.L. and Leys, E.J. (2003) New bacterial species associated with chronic periodontitis. *Journal of Dental Research*, **82**, 338-344.
- [46] Wang, J., Qi, J., Zhao, H., He, S., Zhang, Y., Wei, S. and Zhao, F. (2013) Metagenomic sequencing reveals microbiota and its functional potential associated with periodontal disease. *Scientific Reports*, **3**, 1843.