

胶质类芽胞杆菌 PCR 快速检测方法

王璇^{1,2}, 马鸣超², 关大伟², 姜昕², 李力², 丁延芹¹, 李俊^{2*}

¹ 山东农业大学生命科学学院, 泰安 271018

² 中国农业科学院农业资源与农业区划研究所, 北京 100081

摘要: 【目的】胶质类芽胞杆菌 (*Paenibacillus mucilaginosus*) 是微生物肥料广泛应用的功能菌种之一, 筛选并鉴定其特异性引物, 建立该菌种快速检测方法, 对微生物肥料产品检测和评价至关重要。【方法】本文筛选了胶质类芽胞杆菌基因间的一段非编码序列作为特异性引物 (orf06701-F: 5'-ATGGAGGAAACATGGGGTGA-3'/orf06701-R: 5'-TCAGGAATGAAGCCCCCTT-3'), 通过 PCR 反应条件/体系的优化、特异性及灵敏度检测, 建立了胶质类芽胞杆菌快速检测方法。【结果】研究表明, 该引物仅能在以胶质类芽胞杆菌为模板时特异性扩增 333bp 保守序列, 其检出灵敏度为每微升反应体系 400-1000 个细胞, 以实验选取的类芽胞杆菌属其他菌株和芽胞杆菌属菌株为模板时均不能扩出该序列, 该引物具有良好的特异性; 同时, 用该方法成功地鉴定了从土壤中分离得到的胶质类芽胞杆菌, 并且得到的特异性片段序列同源性达到 100%。【结论】本研究为微生物肥料中胶质类芽胞杆菌的检测及生态评价提供技术支撑。

关键词: 胶质类芽胞杆菌, PCR 检测, 特异性引物

中图分类号: Q93-3 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2011) 11-1485-09

胶质类芽胞杆菌 (*Paenibacillus mucilaginosus*) 是土壤中一种重要功能菌, 通过其菌体自身代谢产生有机酸、氨基酸、多糖、激素等物质促进植物的生长, 并且能够分解含钾矿物, 释放出钾及其他营养元素, 有些菌株还具备溶磷和固氮功能^[1-4]。胶质类芽胞杆菌因其自身诸多优点成为目前我国微生物肥料产业应用最为广泛的功能菌株^[5]。近几年来, 我国微生物肥料产业发展迅速, 已形成了 800 多家生产企业, 产能 800 万吨, 产值超百亿元的产业规模^[6]。胶质类芽胞杆菌在农业生产中表现出提高土壤速效钾与速效磷含量、促进作物生长、提高作物

产量和品质等多方面的效应, 一直是微生物肥料研发的重点和热点之一。

胶质类芽胞杆菌作为微生物肥料产品中重要功能菌, 如何准确快速检测是产品检测和评价的关键。目前对于胶质类芽胞杆菌的检测主要依靠传统的形态学分析方法、生理生化实验、对解钾、溶磷等生物功能特性的验证以及基于 16S rDNA、*gyrB* 基因等保守序列的系统发育学分析。然而, 胶质类芽胞杆菌与土壤类芽胞杆菌 (*Paenibacillus edaphicus*) 是近缘菌, 两者具有及其相似的菌体形态、菌落特征和生理生化性质, 并且两者中的部分菌株都具有解钾、溶磷

基金项目: 863 计划资助项目-根际固氮微生物功能基因组 (2010AA10A203); 中央级公益性科研院所科研业务专项资助项目 (2011-42); 现代农业产业技术体系建设专项资助项目 (nycytx-004)

* 通信作者: Tel/Fax: +86-10-82106208; E-mail: jli@caas.ac.cn

作者简介: 王璇 (1985-), 女, 河南新乡人, 硕士研究生, 研究方向为生物固氮。

收稿日期: 2011-05-10; 修回日期: 2011-06-03

功能^[3,7],因此根据形态学、生理生化实验和生物功能特征设计检测方法,很难将两者分开。基于 16S rDNA、*gyrB* 基因等保守序列的系统发育学分析方法能够准确地鉴定胶质类芽胞杆菌^[11],但需要大量测序,过程繁琐且花费较高,在大批菌株的鉴定中并不适用。特异(引物) PCR 技术是在基因序列和指纹图谱分析基础上,针对不同的种属关系,根据特异的碱基序列设计引物进行特异 PCR,通过目的产物的有无和序列信息的分析进行微生物鉴定和分类。该技术具有特异性强、敏感度高、快速灵敏的优点,比起其它的分子生物学方法更加简便省时,并且避免了大量测序,节省检测成本,在微生物鉴定和检测方面有着巨大的应用前景,也逐渐被运用到胶质类芽胞杆菌的鉴定中。曹凤明等^[8]以 16S rDNA、*gyrA*、*rpoA* 为靶基因设计引物,建立多重 PCR 反应体系,快速准确鉴定枯草芽胞杆菌群的 4 个种。Wu 等^[3]基于 *gyrB* 基因序列成功设计、筛选得到胶质类芽胞杆菌特异引物,建立了 PCR 快速检测方法。

本文以微生物肥料生产中常用功能菌株为实验材料,根据胶质类芽胞杆菌 3016 已得到的全基因组序列设计引物,通过 PCR 反应条件优化和特异性及灵敏度实验,建立了一套完整的胶质类芽胞杆菌特异 PCR 快速检测技术,为微生物肥料中胶质类芽胞杆菌的检测和生态评价提供技术支持。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株:实验选用 15 株胶质类芽胞杆菌和 18 株非胶质类芽胞杆菌菌株,后者主要选取微生物肥料产品中常用功能菌株或与胶质类芽胞杆菌近缘的芽胞杆菌/类芽胞杆菌,作为参比菌株用于引物设计和特异性验证。供试菌株及编号见表 1。实验菌株采用适合的培养基^[9]和培养条件进行纯化培养。

1.1.2 主要试剂和仪器:*E. coli* DH5 α 高效率感受态细胞、pMD-19T Vector、*Taq* DNA 聚合酶、dNTP、Premix *Taq* Version2.0 等均购自大连宝生物工程公司;Amp、IPTG、X-Gal 等购自天根生化科技(北京)有限公司;PCR 产物纯化试剂盒(OMEGA 公司);C1000 PCR 仪及凝胶成像系统(Bio-Rad 公司);DYY-8C 电泳仪(北京市六一仪器厂);NanoDrop

ND-2000C 微量紫外分光光度计(Thermo)。

表 1 实验用参考菌株

Table 1 The bacterial strains used in this study

Species	No. of Strain ^a
<i>Paenibacillus mucilaginosus</i>	3012, 3014, 3015, 3016, 3017, 3018, 3020, 3022, 3021, 3023, 3024, 3025, 3026, 3027, VKPMB-7519 ^T
<i>Paenibacillus edaphicus</i>	VKPM B-7517 ^T
<i>Paenibacillus polymyxa</i>	CCTCCAB92076 ^T
<i>Paenibacillus azofixans</i>	CCTCCAB94023 ^T
<i>Paenibacillus azoreducens</i>	ACCC10250 ^T
<i>Paenibacillus macquariensis</i>	1. 2771
<i>Paenibacillus macerans</i>	1. 69
<i>Paenibacillus pulvifaciens</i>	1. 273
<i>Bacillus circulans</i>	CCTCCAB94026 ^T
<i>Bacillus cereus</i>	CCTCCAB93038 ^T
<i>Bacillus megaterium</i>	CCTCCAB92075 ^T
<i>Bacillus subtilis</i>	CCTCCAB92068 ^T
<i>Bacillus licheniformis</i>	CCTCCAB92069 ^T
<i>Bacillus pumilus</i>	CCTCCAB94044 ^T
<i>Brevibacillus laterosporus</i>	CGMCC1. 2012 ^T
<i>Brevibacillus brevis</i>	CCTCCAB94025 ^T
<i>Geobacillus thermodenitrificans</i>	ACCC10254 ^T
<i>Geobacillus thermoleovorans</i>	ACCC10255 ^T
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ACCC10500 ^T

a:ACCC:Agricultural Culture Collection of China; CCTCC:China Center for Type Culture Collection; CGMCC: China General Microbiological Culture Collection Center; Others: Center for Quality Supervision&Test of Microbial Fertilizers and Mushroom Spawn, Ministry of Agriculture, P. R. China.

1.2 总 DNA 的提取与纯度检测

挑取单菌落,接于菌体富集培养基(蔗糖 5.0 g/L, MgSO₄ 0.5 g/L, 酵母膏 1.0 g/L, K₂HPO₄ 1.0 g/L, 蛋白胨 1.0 g/L, pH 7.2-7.5), 30 °C 摇床培养 16 h(嗜热脱氮地芽胞杆菌、嗜热嗜油地芽胞杆菌摇床培养温度为 65 °C), 离心取沉淀, 根据文献^[10]方法, 提取每株供试菌的总 DNA, 并经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 用分光光度计法检测 DNA 浓度。

1.3 特异性引物设计

特异性引物设计过程中, 要求引物的长度一般为 18-30 bp, 引物太短易形成错配降低特异性, 过长会导致其延伸温度过高, 则不适于 *Taq* DNA 聚合酶进行反应; 引物序列 GC 含量为 40% - 60%, 过高或过低都不利于引发反应; 两引物之间不能互补, 尤其是 3' 末端不存在互补性, 避免产生二聚体及发夹结构, 否则会降低引物有效浓度而使 PCR 反应不能正常进行。

在 GenBank 数据库中收集 18 株参比菌株所有核酸数据信息, 根据胶质类芽胞杆菌菌株 3016 已得到的全基因组序列, 进行 blastn 比对, 找出种间特异序列。观察同种内菌株的同源性, 找出在种内有代表性的序列, 从而选择出适于设计种群特异引物的序列, 使用 primer 5.0 设计特异性引物, 并将引物进行 blast 比对, 保证引物在与目标菌种具有高度的同源性, 与其他种则不同源或同源性很低, 选择得到了较好的 8 对引物进行 PCR 验证, 详见表 2。引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。

表 2 特异 PCR 引物

No. of Primer	Primer	Sequence (5'→3')	Size/bp
1	orf00002 - F	CCTCGATCTCATGATCCAGTG	325
	orf00002 - R	CTACACCTCGATCGTCGTCAT	
2	orf00262 - F	CAATGAAGTAACGCTCGGTG	265
	orf00262 - R	GATGAAGAACGATCCCTCCG	
3	orf00804 - F	TCAAAAAGAACAGGTGCTG	273
	orf00804 - R	CTTCGGTTCGATCAGATTC	
4	orf01359 - F	CAAAGTCATAGATCCCCTTGC	268
	orf01359 - R	CGCATAGAGCTCGTCGCTGTA	
5	orf02487 - F	GGATTTTTACCGACCGTGGTT	226
	orf02487 - R	GGTATTCAACACGCTACCA	
6	orf03775 - F	GACATTCAGGCCATCCTGG	345
	orf03775 - R	GTCACCTCGGTTCTGGAACTG	
7	orf03794 - F	GCTCCGAAGTTCGAATCCTT	222
	orf03794 - R	CGGTGCCAAAGTAATGATTG	
8	orf06701 - F	ATGGAGGAAACATGGGGTGA	333
	orf06701 - R	TCAGGAATGAAGGCCCCCTT	

1.4 PCR 条件/体系的建立及验证

1.4.1 PCR 反应条件/体系的建立和优化: 以菌株 3016 的基因组 DNA 为模板, 进行 PCR 扩增。通过优化退火温度、模板 DNA 量、引物浓度和 Mg^{2+} 浓度, 建立适宜 PCR 反应条件/体系。

1.4.2 菌落 PCR 扩增: 用菌体富集培养基液体摇床培养胶质类芽胞杆菌 3016, 200 r/min, 30 °C, 12 - 16 h。取 1 μL 作为模板, 对最优化的 PCR 条件进行菌落 PCR 验证。

1.4.3 特异性验证: 以胶质芽胞杆菌群菌株 DNA 为模板, 进行最优化的 PCR 条件的扩增。用不加模板的作为空白对照。产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。以 15 株胶质类芽胞杆菌为阳性对照, 以非胶质类芽胞杆菌的参考菌株 DNA 为模板, 分别进行 PCR 扩增, 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 以验证引物

的特异性。

1.4.4 灵敏度检测: 用菌体富集培养基液体摇床培养菌株 3016, 200 r/min, 30 °C, 12 - 16 h, 用无菌水对上述培养液系列梯度稀释。分别取 1 μL 为模板, 进行最优条件的菌落 PCR 反应。并将稀释倍数为 10^5 、 10^6 和 10^7 的菌液于硅酸盐细菌培养基平板上进行菌落计数。每个稀释梯度做 3 个平行。

1.5 土壤样品的 PCR 扩增

1.5.1 土壤样品总 DNA 提取: 分别在陕西省延安农科所 (YA)、安徽省农科院阜阳农科所 (FY)、山东省济宁农科院 (JN) 提供的大豆种植试验田, 采取地表土壤, 转入采样袋中, 提取土壤样品总 DNA^[10]。

1.5.2 特异性检测: 分别以 3 种土壤样品的总 DNA 为模板, 以最优 PCR 反应条件进行 PCR 扩增, PCR 产物经试剂盒纯化后, 与 pMD-19T 载体连接, 转化至 *E. coli* DH5α 感受态细胞, 进行蓝白筛选, 随机挑取阳性克隆测序并进行多重序列比对。

1.5.3 土壤样品中胶质类芽胞杆菌的分离与鉴定: (1) 采用系列稀释分离法处理采集的 3 个土壤样品, 筛选与胶质类芽胞杆菌形态学特征相似的菌株。(2) 分别提取上述菌株总 DNA, 以通用引物 UP-1: 5'-CAYGCNGGNGGNAARTTYG-3' / UP-2r: 5'-CCRT-CNACRTCNGCRT CNGTCAT-3'^[11] 为引物进行 *gyrB* 基因 (1210 bp) 扩增, 不加模板的为空白对照。所得的 PCR 产物进行连接, 转化, 并挑取阳性克隆测序。(3) 用菌体富集培养基液体摇床培养上述与胶质类芽胞杆菌形态学特征相似的菌株, 200 r/min, 30 °C, 12 - 16 h。取 1 μL 作为模板, 用 PCR 快速检测体系对其进行菌落 PCR 验证。所得 PCR 产物直接送样测序。

2 结果和分析

2.1 PCR 条件/体系的优化和验证

2.1.1 PCR 条件的优化: 以菌株 3016 的基因组 DNA 为模板, 建立 PCR 反应条件/体系并进行优化。优化的 PCR 条件/体系及优化结果包括: 退火温度梯度 (50 °C - 65 °C) (图 1-A); 模板 DNA (1 - 30 ng) (图 1-B); 引物浓度 (0.1 - 0.5 μmol/L) (图 1-C); Mg^{2+} 浓度 (1.0 - 3.5 mmol/L) (图 1-D)。以 8 号引物 (orf06701-F/orf06701-R) 为例, 由电泳图可以看出, 退火温度在 50 - 57 °C 均有产物形成, 但考

考虑到较高的退火温度有利于 PCR 反应的特异性,所以选择 57 °C 作为最适的退火温度;在模板 DNA 含量为 10 ng 时有条带出现,但较暗,所以选择 15 ng 作为最适宜的模板 DNA 添加量;在引物浓度为 3.0 – 5.0 $\mu\text{mol/L}$ 均有产物形成,在 3.0 $\mu\text{mol/L}$ 时产物形成量较少,从成本考虑,选择最适引物浓度为 4.0 $\mu\text{mol/L}$;在 Mg^{2+} 浓度为 1.5 mmol/L 时开始出现明亮的条带,随着 Mg^{2+} 浓度增加扩增产物增加,当 Mg^{2+} 浓度达到 3.0 mmol/L 时,条带亮度开始减

弱,综合考虑,选择 1.5 mmol/L 作为 8 号引物 PCR 反应的最佳 Mg^{2+} 浓度。因此,通过优化条件,确定 8 号引物 (orf06701-F/orf06701-R) PCR 反应的最优体系为:10 \times PCR buffer (不含 Mg^{2+}) 2.5 μL , Mg^{2+} 1.5 mmol/L, dNTP (2.5 mmol/L) 2 μL , 引物 0.4 $\mu\text{mol/L}$, *Taq* DNA 聚合酶 0.3 U, 基因组 DNA 15 ng 左右,加 DEPC 水补足至 25 μL 。扩增程序:95 °C 5 min;95 °C 30 s, 57 °C 1 min, 72 °C 1 min, 30 个循环;72 °C 10 min。

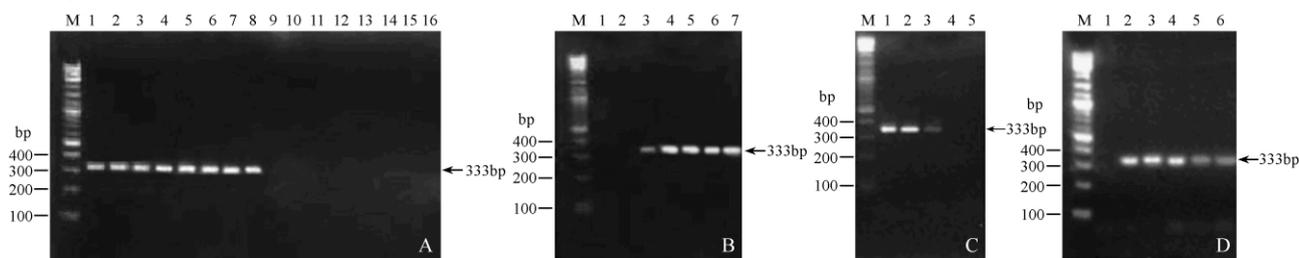


图 1 不同条件下胶质类芽胞杆菌 3016 的 PCR 扩增产物(8 号引物)

Fig. 1 Amplification products of *P. mucilaginosus* 3016 with different annealing temperature (A), various concentrations of templates (B), primers (C), and magnesium (D). A: Lanes 1–16: annealing temperature of 50.0 °C, 50.5 °C, 51.4 °C, 52.8 °C, 54.5 °C, 55.8 °C, 56.6 °C, 57 °C, 58 °C, 58.5 °C, 59.4 °C, 60.8 °C, 62.5 °C, 63.9 °C, 64.6 °C and 65.0 °C. B: Lanes 1–7: 1, 5, 10, 15, 20, 25 and 30 ng of DNA. C: Lanes 1–5: 0.5, 0.4, 0.3, 0.2, and 0.1 $\mu\text{mol/L}$ of each primer. D: Lanes 1–6: 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 and 3.5 mmol/L of MgCl_2 . M: 2-Log ladder Marker.

以 *P. mucilaginosus* 3016 菌液为模板,用 8 号引物 (orf06701-F/orf06701-R) 进行菌落 PCR 扩增,可扩增到 333 bp 长的特异性片段(图略)。由此可以说明,以基因组 DNA 为模板和以菌悬液为模板并无差别。因此,所建立的 PCR 快速检测方法是可行的。

2.1.2 PCR 特异性扩增:实验设计的 8 对特异性引物,以 15 株胶质类芽胞杆菌 DNA 为模板,用最优 PCR

条件进行扩增,所试菌株均能得到相应大小的特异性片段。但 1–7 号引物均能在以 *P. edaphicus* VKPM B-7517^T DNA 为模板时也得到相应大小的扩增片段,说明 1–7 号引物不能区分胶质类芽胞杆菌与土壤类芽胞杆菌。而 8 号引物 (orf06701-F/orf06701-R) 与胶质类芽胞杆菌具有高度的同源性,与其他种则不同源或同源性很低,可以作为该种的特异引物(图 2)。

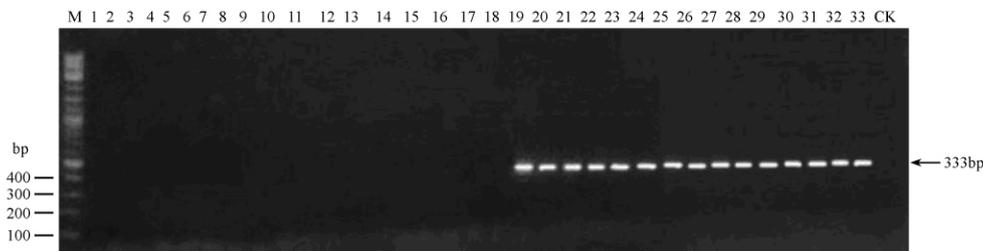


图 2 8 号引物特异性验证结果(333bp)

Fig. 2 PCR results of No. 8 primer specificity (333bp). 1: *P. edaphicus* VKPM B-7517^T; 2: *Paenibacillus polymyxa* CCTCCAB92076^T; 3: *Paenibacillus azofixans* CCTCCAB94023^T; 4: *Paenibacillus azoreducens* ACCC10250^T; 5: *Paenibacillus macquariensis* 1.2771; 6: *Paenibacillus macerans* 1.69; 7: *Paenibacillus pulvificiens* 1.273; 8: *Bacillus circulans* CCTCCAB94026^T; 9: *Bacillus cereus* CCTCCAB93038^T; 10: *Bacillus megaterium* CCTCCAB92075^T; 11: *Bacillus subtilis* CCTCCAB92068^T; 12: *Bacillus licheniformis* CCTCCAB92069^T; 13: *Bacillus pumilus* CCTCCAB94044^T; 14: *Brevibacillus laterosporus* CGMCC1.2012^T; 15: *Brevibacillus brevis* CCTCCAB94025^T; 16: *Geobacillus thermodenitrificans* ACCC10254^T; 17: *Geobacillus thermoleovorans* ACCC10255^T; 18: *Pseudomonas aeruginosa* ACCC10500^T; 19–33: *P. mucilaginosus* 3012–7519; 34: negative control; M: 2-Log ladder marker.

将 15 株胶质类芽胞杆菌 DNA 为模板特异 PCR 扩增产物 (333bp) 测序, 并利用软件 MEGA 4.0 进行 CLUSTAL 多重序列比对。结果显示 15 株胶质类芽胞杆菌该段序列同源率为 100%。说明该引物对各 DNA 序列的相应区段具有很强的忠实性、特异性和保守性。

2.1.3 引物扩增纯培养物的灵敏度: 将菌株 3016 的菌悬液连续稀释 10 倍, 以不同稀释梯度的菌液为模板, 最优 PCR 条件扩增。结果表明, 每微升 PCR 反应体系含有超过 400 个细胞时能扩增 333 bp 的特异性条带 (图 3)。因此, 所建立的 PCR 快速检测方法的灵敏限度是每微升反应体系达到 400 - 1000 个细胞。

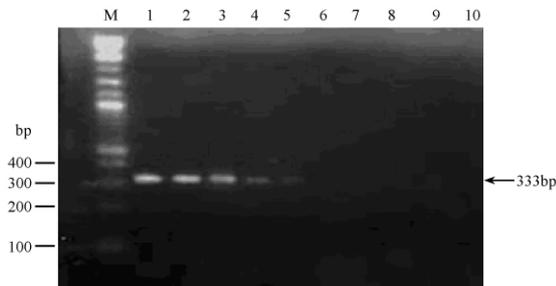


图 3 *P. mucilaginosus* 3016 菌液稀释梯度 PCR 扩增产物图

Fig. 3 The representative image of amplification products of serial dilutions of *P. mucilaginosus* 3016. Lanes 1 - 9: 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 and 100 cells per PCR mixture; lane 10: negative control. M: 2-Log ladder Marker.

2.2 特异性引物对土壤样品的扩增效果

2.2.1 引物特异性检测: 分别以 3 种土壤样品总 DNA 为模板, 用 8 号引物进行最优条件 PCR 扩增。其中只有延安土样 (YA) 总 DNA 能够得到 333 bp 特异性片段, 而对阜阳土样 (FY) 和济宁土样 (JN) 总 DNA 无扩增结果。用 PCR 产物纯化试剂盒对 YA 的扩增产物进行纯化, 检测后, 连接转化, 蓝白筛选, 随机挑取 24 个阳性克隆进行菌液 PCR 验证后测序, 结果和 15 株胶质类芽胞杆菌 333 bp 序列相似率为 100%。

2.2.2 土壤样品中胶质类芽胞杆菌的分离与鉴定结果: 对 3 个土壤样品进行系列梯度稀释后, 分离形态学特征与胶质类芽胞杆菌相似的菌株, 延安土样 (YA)、阜阳土样 (FY) 和济宁土样 (JN) 分别分离得到 6 株、3 株和 2 株。用所建立的 PCR 快速检测方法对 11 个分离物进行菌落 PCR 扩增, 发现其中 5

株 (Isolate YA-1, Isolate YA-2, Isolate YA-3, Isolate YA-4, Isolate YA-5) 能够在 333 bp 处得到特异性条带 (图 4), 且这 5 株均分离自延安土样 (YA)。测序后得到的序列与 15 株胶质类芽胞杆菌 333 bp 序列比对, 同源率高达 100%。将从 3 种土样中分离得到的 11 个分离物提取 DNA, 用通用引物 UP-1/UP-2r 扩增 *gyrB* 基因片段测序, 所得序列与 GenBank 中的数据进行相似性分析, 并用软件 MEGA 4.0 构建系统发育树 (图 5), 结果表明, 仅有自延安土样 (YA) 分离得到的 Isolate YA-1、Isolate YA-2、Isolate YA-3、Isolate YA-4、Isolate YA-5 与胶质类芽胞杆菌归为一类, 类群之间序列相似性达 97% - 99%, 其余 6 个菌株 (Isolate YA-6、Isolate FY-1、Isolate FY-2、Isolate FY-3、Isolate JN-1、Isolate JN-2) 与胶质类芽胞杆菌相似度较低, 分别与类芽胞杆菌其它种归为一类。即用纯培养的筛菌方法从延安土样中筛选得到胶质类芽胞杆菌 (Isolate YA-1、Isolate YA-2、Isolate YA-3、Isolate YA-4、Isolate YA-5), 与实验建立的 PCR 快速检测方法扩增结果一致。因此, 本文所建立的特异 PCR 快速检测技术可以成功的用于胶质类芽胞杆菌的快速检测。

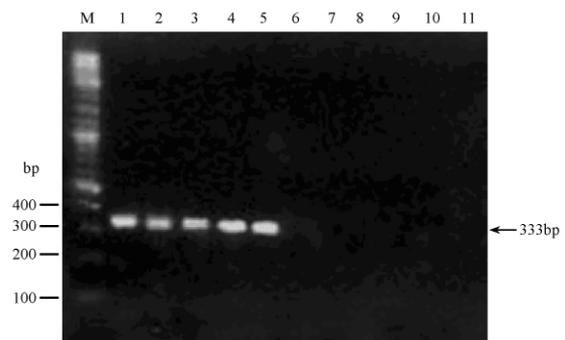


图 4 细菌分离物菌落 PCR 扩增

Fig. 4 the amplification of colony PCR of the isolates from soil using No. 8 primer. 1: Isolate YA-1; 2: Isolate YA-2; 3: Isolate YA-3; 4: Isolate YA-4; 5: Isolate YA-5; 6: Isolate YA-6; 7: Isolate FY-1; 8: Isolate FY-2; 9: Isolate FY-3; 10: Isolate JN-1; 11: Isolate JN-2; M: 2-Log ladder Marker.

3 讨论

特异引物的设计是特异 PCR 技术的关键环节, 往往需要通过比对不同种属、不同类型菌株的相关基因, 选择合适的靶序列, 充分考虑种内保守性和种间的特异性。16S rDNA 是微生物分类鉴定时最常

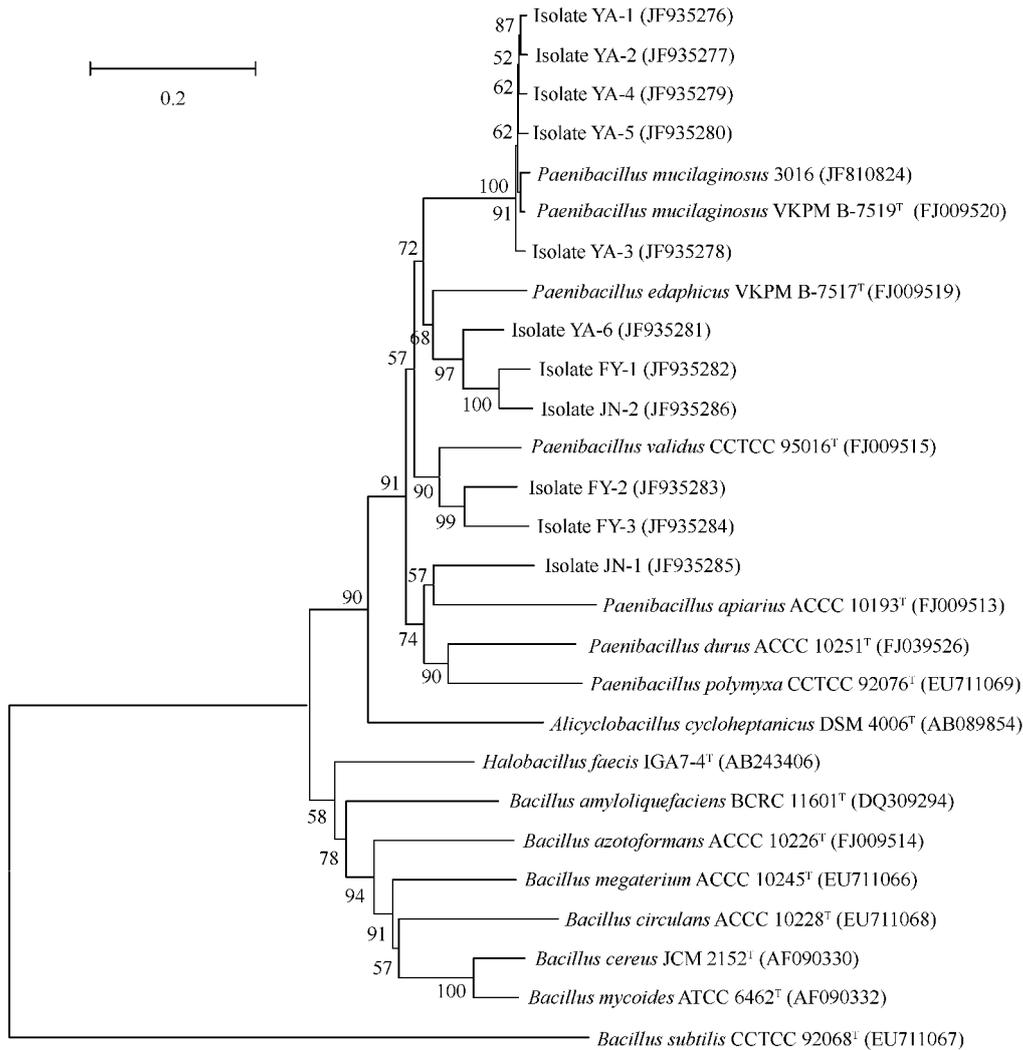


图 5 土样分离细菌基于 *gyrB* 基因序列的系统发育树

Fig. 5 Phylogenetic tree based on *gyrB* sequences of the isolates from soil. The tree was based on an alignment of *gyrB* gene sequences and was constructed using the Neighbour-Joining method (MEGA 4.0). The stability of the tree was assessed by 1000 bootstrap replications. The numbers in parentheses represent the sequences' accession number , the numbers next to the nodes represent the bootstrap values of 1000 replications ,the scale bar represents 2 nucleotide substitutions per 100 nucleotides.

选用的靶基因,但有时通过 16S rDNA 序列分析鉴定微生物结果并不理想。*gyrB* 基因是靶序列选择的另一常用对象,其编码促旋酶的一个亚基,因其序列存在高度保守和明显变异区段且分子进化速率大于 16S rDNA 而常常用于近缘种的鉴定^[12-18]。Hu 等^[11]通过研究,发现胶质类芽胞杆菌 16S rDNA 和 *gyrB* 基因序列种内相似度分别为 99.1% - 99.9% 和 98.2% - 99.9%,种间相似度分别为 90.4% - 96.4% 和 70.4% - 78.0%。Wu 等^[3]基于 *gyrB* 基因序列设计引物,成功筛选出胶质类芽胞杆菌特异引物,得到了 519 bp 的保守序列。同时,很多其它

功能基因也被用于微生物鉴定,如 *gyrA*、*cheA*、*gyrB*、*rpoA*、*rpoB*、*vrroA*、*spoOA* 等^[19-23]。通常引物设计是根据 GenBank 数据库中较常用的种属特异基因,针对特定种群,通过多重序列比对,确定引物序列,而本实验根据 *P. mucilaginosus* 3016 的全基因组序列,通过更全面的筛选与比对,从全基因组的范围内寻找 *P. mucilaginosus* 种群的特异序列,设计特异性引物,使得筛选范围更全面并且更可靠,并且通过基于全基因组序列进行的特异引物设计,一些基因间的特异非编码序列不会被忽视。

本实验中设计了 8 对特异性引物,有些是上述

特异分子鉴定的常用基因某一片段,有些只是基因间的非编码序列。8号引物(orf06701-F/orf06701-R)即为基因间的非编码序列。以胶质类芽胞杆菌种内参比菌株为模板时能够特异扩增得到333 bp大小条带,证实该引物在种内具有通用性;以实验选取的类芽胞杆菌属其他菌株和芽胞杆菌属菌株为模板时均不能扩出该序列,尤其是能有效的区分 *P. edaphicus*,说明该引物具有良好的种间特异性。

本实验通过灵敏度实验,确定所建立的特异PCR反应的灵敏度为0.6 ng/ μ L DNA模板,或者400-1000个细胞/ μ L,与曹凤明^[8]等学者特异PCR的灵敏度为100 pg/ μ L DNA模板结果相近。本实验建立的PCR快速检测体系具有较高的敏感性,在较低浓度DNA或者一定浓度的菌液为模板的体系中,可以方便快捷检测 *P. mucilaginosus*。

本快速检测方法成功地实现了直接从土壤中快速检测胶质类芽胞杆菌。以3种土样总DNA为模板,采用8号特异引物(orf06701-F/orf06701-R)扩增,仅延安土样(YA)能够扩得特异性片段。通过对3种土壤中筛选得到的11株与胶质类芽胞杆菌形态学相似的菌株进行菌落特异PCR验证,仅分离自延安土样(YA)的5株菌等得到333 bp特异性片段,同时对上述11株菌进行 *gyrB* 基因的测序分析,证明仅有上述分离自延安土样(YA)的5株菌为胶质类芽胞杆菌,其他6株与胶质类芽胞杆菌相似度较低,分别与类芽胞杆菌其它种归为一类。因此,用本实验建立的特异PCR检测方法对11株疑似胶质类芽胞杆菌菌株进行鉴定,结果与常规 *gyrB* 基因序列分析结果相同,但避免了DNA提取和测序等复杂环节,说明本实验建立的特异PCR快速检测技术可以成功的用于胶质类芽胞杆菌的快速检测。

4 结论

(1)设计并筛选了一对胶质类芽胞杆菌特异性引物:orf06701-F:5'-ATGGAGGAAACATGGGGTGA-3'/orf06701-R:5'-TCAGGAATGAAGGCCCCCTT-3',实验证明,该引物具有良好的种内保守性以及种间的特异性。

(2)建立了一套胶质类芽胞杆菌快速检测方法,反应体系:10 \times PCR buffer (不含 Mg^{2+}) 2.5 μ L, Mg^{2+} 1.5 mmol/L, dNTP (2.5 mmol/L)

2 μ L,引物 0.4 μ mol/L, *Taq* DNA 聚合酶 0.3U,基因组DNA 15 ng左右或400-1000个细胞/ μ L,加DEPC水补足至25 μ L;扩增程序:95 $^{\circ}$ C 5 min;95 $^{\circ}$ C 30 s,57 $^{\circ}$ C 1min,72 $^{\circ}$ C 1min,30个循环;72 $^{\circ}$ C 10 min;目标PCR产物长度333 bp。

(3)本方法应用于土壤样品胶质类芽胞杆菌快速检测,通过特异性实验和灵敏度实验,研究结果与常规菌株鉴定方法一致,证明此方法的可行性和结果的可靠性。

(4)本快速检测方法可用菌液为模板,省去了DNA提取等繁琐的环节,又避免了大量测序费用,只需短短几个小时,便可准确检测胶质类芽胞杆菌。该方法既适用于大量纯培养分离物的鉴定又适用于复杂土壤环境样品的检测。该方法的建立,为微生物肥料生产中胶质类芽胞杆菌的快速准确检测及生态评价提供技术支持,具有非常重要的现实意义。

参考文献

- [1] Chen S, Lian B, Liu CQ. Effect of *Bacillus mucilaginosus* on weathering of phosphorite and a preliminary analysis of bacterial proteins. *Chinese Journal of Geochemistry*, 2008, 27: 209-216.
- [2] Basak BB, Biswas DR. Influence of potassium solubilizing microorganism (*Bacillus mucilaginosus*) and waste mica on potassium uptake dynamics by sudan grass (*Sorghum vulgare* Pers.) grown under two Alfisols. *Plant and Soil*, 2009, 317: 235-255.
- [3] Wu JG, Wang JF, Zhang XH, Zhang SS, Hu XF, Chen JS. A *gyrB*-targeted PCR for rapid identification of *Paenibacillus mucilaginosus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 87: 739-747.
- [4] Sheng XF, He LY. Solubilization of potassium-bearing minerals by a wild-type strain of *Bacillus edaphicus* and its mutants and increased potassium uptake by wheat. *Canadian Journal of Microbiology*, 2006, 52: 66-72.
- [5] Liu WX, Xu XS, Wu XH, Yang QY, Luo YM, Peter Christie. Decomposition of silicate minerals by *Bacillus mucilaginosus* in liquid culture. *Environmental Geochemistry and Health*, 2006, 28(2): 120-130.
- [6] 李俊,沈德龙,林先贵. 农业微生物研究与产业化进展. 北京: 科学出版社 2011. 49-50.
- [7] 闫华晓,赵辉,朱硕斐,薛彦辉,许秀坤,王德虎. 6株硅酸盐细菌解磷解钾活性的研究. *安徽农业科学 (Journal of Anhui Agricultural Sciences)*, 2009, 37(28): 13728-13729.

- [8] 曹凤明,沈德龙,李俊,姜昕,李力,冯瑞华,杨小红,陈慧君,葛一凡. 应用多重 PCR 鉴定微生物肥料常用芽胞杆菌. 微生物学报 (*Acta Microbiologica Sinica*), 2008, 48 (5): 651-656.
- [9] 中华人民共和国农业部. 中华人民共和国农业行业标准 (NY 882-2004). 硅酸盐细菌菌种. 北京: 中国标准出版社, 2005.
- [10] 刘尧. 玉米秸秆腐解复合菌系 CSS1 的构建、菌群组成及腐解特性研究. 山东农业大学, 2010.
- [11] Hu XF, Li SX, Wu JG, Wang JF, Fang QL, Chen JS. Transfer of *Bacillus mucilaginosus* and *Bacillus edaphicus* to the genus *Paenibacillus* as *Paenibacillus mucilaginosus* comb. nov. and *Paenibacillus edaphicus* comb. nov.. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2010, 60: 8-14.
- [12] 侯晓丽,陈智. 分类及鉴别细菌的新靶标-*gyrB* 基因. 国外医学流行病学传染病学分册 (*Epidemiology Lemology Foreign Medical Sciences*), 2005, 32(1): 38-41.
- [13] 胡哲,王振国,刘金华,蔡阳,肖成蕊,王伟利,徐宝梁. 利用 PCR 技术检测鸡肉产品中的空肠弯曲杆菌. 吉林农业大学学报 (*Journal of Jilin Agricultural University*), 2005, 27(6): 671-674.
- [14] Yamamoto S, Harayama S. PCR amplification and direct sequencing of *gyrB* genes with universal primers and their application to the detection and taxonomic analysis of *Pseudomonas putida* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 1995, 61 (3): 1104 - 1109.
- [15] 喻国辉,牛春燕,陈远凤,陈燕红,杨紫红. 利用 16S rDNA 结 *gyrA* 和 *gyrB* 基因对生防芽胞杆菌 R31 的快速鉴定. 中国生物防治 (*Chinese Journal of Biological Control*), 2010, 26(2): 160-166.
- [16] Hiroaki K, Takayuki E, Shigeaki H. Differentiation of phylogenetically related slowly growing mycobacteria by their *gyrB* Sequences. *Journal of Clinical Microbiology*, 2000, 38(1): 301-308.
- [17] Suzuki M, Nakagawa Y, Harayama S, Yamamoto S. Phylogenetic analysis and taxonomic study of marine Cytophaga-like bacteria: proposal for *Tenacibaculum* gen. nov. with *Tenacibaculum maritimum* comb. nov. and *Tenacibaculum ovolyticum* comb. nov., and description of *Tenacibaculum mesophilum* sp. nov. and *Tenacibaculum amylolyticum* sp. nov.. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2001, 51: 1639-1652.
- [18] Dauga C. Evolution of the *gyrB* gene and the molecular phylogeny of Enterobacteriaceae: a model molecule for molecular systematic studies. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2002, 52: 531-547.
- [19] Blackwood KS, Turenne CY, Harmsen D, Kabani AM. Reassessment of sequence-based targets for identification of *Bacillus* species. *Journal of Clinical Microbiology*, 2004, 42 (4): 1626-1630.
- [20] Oleg NR, Christina D, Johan M, Fergus GP. Taxonomic characterization and plant colonizing abilities of some bacteria related to *Bacillus amyloloffquefaciens* and *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiology Ecology*, 2004, 48 (2): 249-259.
- [21] 张继瑜,金奇,侯云德. 福氏志贺菌 *gyrA* 和 *parC* 基因 QRDR 序列的测定与同源性分析. 动物医学进展 (*Progress In Veterinary Medicine*), 2002 (3): 47-50, 59.
- [22] Qi Y, Patra G, Liang XD, Williams LE, Rose S, Redkar RJ, DeVecchio VG. Utilization of the *rpoB* gene as a specific chromosomal marker for real-time PCR detection of *Bacillus anthracis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67 (8): 3720-3727.
- [23] Hurtle W, Bode E, Kulesh DA, Kaplan RS, Garrison J, Bridge D, House M, Frye MS, Loveless B, Norwood D. Detection of the *Bacillus anthracis gyrA* gene by using a minor groove binder probe. *Journal of Clinical Microbiology*, 2004, 42 (1): 179-185.

Rapid identification for *Paenibacillus mucilaginosus* by PCR

Xuan Wang^{1 2}, Mingchao Ma², Dawei Guan², Xin Jiang², Li Li²,
Yanqin Ding¹, Jun Li^{2*}

¹College of Life Sciences, Shandong Agricultural University, Taian, Shandong 271018, China

²Institute of Agricultural Resources and Regional Planning Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China

Abstract: [Objective] *Paenibacillus mucilaginosus* is widely used as microbial fertilizers, therefore, rapid identification of this species by Polymerase Chain Reaction (PCR) is necessary for detection and ecological evaluation of microbial fertilizer. [Methods] A species-specific primer pair of *P. mucilaginosus*, orf06701-F (5'-ATGGAGGAAACATGG-GGTGA-3')/orf06701-R (5'-TCAGGAATGAAGGCCCCCTT-3') was designed. Optimization of PCR, specificity and sensitivity determination were followed and the rapid identification was established. [Results] A single band with 333 bp was consistently amplified from all the strains of *P. mucilaginosus* tested and negative results were obtained from all the reference strains, such as other strains of *Paenibacillus* and *Bacillus*. The PCR detection limitation was 400 – 1000 cells per assay, indicating the sensitivity of the rapid culture-PCR method. To verify the rapid identification, soil was sampled and cultured. Five of 11 soil isolates were rapidly identified as *P. mucilaginosus* by the method, and the similarity of 333bp sequences were 100%. [Conclusion] The methods can be used in the rapid identification of *P. mucilaginosus* and the results will provide technical supports for the detection and ecological evaluation of microbial fertilizer.

Keywords: *Paenibacillus mucilaginosus*, PCR identification, species-specific primer pair

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Programs for High Technology Research and Development of China (2010AA10A203), by the Basic Scientific Research Special Fund of Public Research Institutions of Central Government (2011-42) and by the Special Fund for Establishment of Modern Agricultural R&D System, Ministry of Finance and Ministry of Agriculture, China (nycytx-004)

* Corresponding author. Tel/Fax: +86-10-82106208; E-mail: jli@caas.ac.cn

Received: 10 May 2010/Revised: 3 June 2011