

应用多重 PCR 鉴定微生物肥料常用芽孢杆菌

曹凤明^{1,2}, 沈德龙^{1*}, 李俊², 关大伟², 姜昕², 李力¹, 冯瑞华², 杨小红², 陈慧君², 葛一凡²

(¹ 中国农业科学院农业资源与农业区划研究所, 北京 100081)

(² 农业部微生物肥料和食用菌菌种质量监督检验测试中心, 北京 100081)

摘要: 【目的】枯草群芽孢杆菌中枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)、解淀粉芽孢杆菌 (*B. amyloliquefaciens*)、地衣芽孢杆菌 (*B. licheniformis*) 和短小芽孢杆菌 (*B. pumilus*) 是微生物肥料中常用菌种, 用传统方法鉴定费时费力, 有必要建立检测和鉴定这些芽孢杆菌的种特异性 PCR 方法。【方法】利用已登录的 *gyrA*、*rpoA* 和 16S rRNA 基因序列分别设计和筛选上述菌种的特异引物并建立多重 PCR 反应体系。【结果】以基因组 DNA 为模板, 扩增芽孢杆菌、类芽孢杆菌和短芽孢杆菌 3 属 15 种的标准菌株 (共 33 株), 4 个目标种分别产生了大小不同的唯一的产物, 除个别种与短小芽孢杆菌引物有交叉反应外, 其余参考菌株均为阴性。从 23 株枯草群菌株的基因组 DNA 扩增发现, PCR 鉴定与常规鉴定结果一致。【结论】本文建立的多重 PCR 方法具有较好的特异性, 可快速准确鉴定枯草群的 4 个种, 在微生物肥料检测方面有良好的实用前景。

关键词: 多重 PCR; 种特异引物; 鉴定; 枯草群芽孢杆菌; 微生物肥料

中图分类号: Q78 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2008) 05-0651-06

微生物肥料产品中的微生物种类多种多样, 将各种微生物准确鉴别出来是产品检测和质量判定的依据。常规的检测方法是根据菌落、菌体特征结合菌种鉴定材料进行判断, 而面对表型特征不明显或含有多种微生物的样品时容易出现误判现象, 此时必须结合生化试验或一些仪器设备对菌种进行辨认。传统的生理生化试验耗时费力; BIOLOG 快速鉴定系统、脂肪酸分析等测定繁琐、成本高, 这些方法不能满足肥料检测中的快速、准确的需要。

枯草群芽孢杆菌是芽孢杆菌中最为复杂的一个类群, 除了较早定种的枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)、解淀粉芽孢杆菌 (*B. amyloliquefaciens*)、地衣芽孢杆菌 (*B. licheniformis*)、短小芽孢杆菌 (*B. pumilus*)、萎缩芽孢杆菌 (*B. atrophaeus*) 5 个种外, 近几年又陆续从枯草芽孢杆菌中分化出莫哈韦芽孢杆菌 *B. mojavensis*, 死谷芽孢杆菌 *B. vallismortis*, *B.*

sonorensis, *B. tequilensis* 5 个种, 并将枯草芽孢杆菌分为 *B. subtilis* subsp. *subtilis* 和 *B. subtilis* subsp. *spizizenii* 两个亚种^[1~6]。这些种有着共同的菌体特征: 直径小于 1.0 μm, 长为 1.0~3.0 μm, 单生或成短链, 有鞭毛, 芽孢中生、偏中生或偏端生, 椭圆或柱形, 芽孢囊不膨大; 菌落小, 扁平或微隆起, 干燥或湿润。根据菌落特征和菌体特征很难分辨不同的种, 而且这些种的生理生化特征也存在很多相同之处, 在鉴定或检测中很难准确区分^[7,8]。

基于 DNA 序列的特异 (引物) PCR 技术是当今快速、准确鉴定菌种的方法之一, 可避免培养方法和生化鉴定方法的烦琐, 在临床诊断、流行病学调查、食品检测、土壤微生物等领域广为应用。本文以微生物肥料中常见的枯草芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、短小芽孢杆菌为材料, 建立了特异 PCR 技术应用于菌种鉴定和微生物肥料检测。

基金项目: 国家科技支撑项目 (2006BAD25B04)

*通讯作者。Tel/Fax: +86-10-68975891; E-mail: dlshen@caas.ac.cn

作者简介: 曹凤明 (1972-), 女, 北京市平谷县人, 助理研究员, 硕士, 主要从事微生物肥料研究。Tel: +86-10-68918675; E-mail: fmc2004@yahoo.com.cn

收稿日期: 2007-06-04; 修回日期: 2008-01-02

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株:表 1 为 22 株枯草群参考菌株和 11 株非

枯草群参考菌株编号及来源;23 株枯草群菌株,根据菌落、菌体特征及生化试验从微生物肥料产品中分离筛选得到。所有菌株均采用营养肉汤平板划线分离与纯化。

表 1 实验用参考菌株
Table 1 The bacterial strains used in this study

Strains	Strain No. ^a
<i>B. subtilis</i>	ACCC10242 ^T , CCTCCAB92068 ^T , CGMCC1.1849, ATCC29056, JCM2499, CGMCC1.15, CGMCC1.108, CGMCC1.354
<i>B. amyloliquefaciens</i>	ACCC10226 ^T , CGMCC1.1131, CGMCC1.1099, CGMCC1.1226
<i>B. licheniformis</i>	CCTCCAB92069 ^T , CGMCC1.813, CGMCC1.265, CGMCC1.105, [2003]025, [2005]005
<i>B. pumilus</i>	CCTCCAB94044 ^T , CGMCC1.937, CGMCC1.940, CGMCC1.1847
<i>B. megaterium</i>	CCTCCAB92075 ^T
<i>B. cereus</i>	CCTCCAB93038 ^T
<i>B. mycoides</i>	CGMCC1.2014
<i>B. thuringiensis</i>	ACCC10325 ^T
<i>B. mucilaginosus</i>	7519 ^T
<i>B. edaphicus</i>	7517 ^T
<i>Brevibacillus laterosporus</i>	CGMCC1.2012 ^T
<i>Brevibacillus brevis</i>	CCTCCAB94025 ^T
<i>Paenibacillus azotofixans</i>	CCTCCAB94023 ^T
<i>Paenibacillus polymyxa</i>	CCTCCAB92076 ^T
<i>Paenibacillus cirulans</i>	CCTCCAB94026 ^T

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

1.1.2 主要试剂和仪器: *Taq* DNA 聚合酶和 dNTP 购自天根生物技术公司(北京), DNA marker 购自宝生物工程(大连)有限公司。PCR 仪(美国伯乐公司,

PTC-200),低温冷冻离心机(德国 sigma 公司, 3K15)。

1.1.3 引物:表 2 为各引物序列,由上海生工生物工程技术有限公司合成。

表 2 特异 PCR 引物
Table 2 Primers for specific PCR

Bacteria	Primer sequences (5'→3')	Gene	GenBank Accession No.	PCR product/bp
<i>B. subtilis</i>	BSL72 CGTAGAGCCACTTGAGCG	<i>rpoA</i>	Z99104.2	256
	BSR328 CTGCCGTTACAGTTCCTT			
<i>B. amyloliquefaciens</i>	L100 AAATCTGCCCGTATCGTGC	<i>gyrA</i>	AY212978.1	736
	R836 GCGTCACGGCGR(AG)ATCTCAA			
<i>B. licheniformis</i>	L168 TGGGATGACAAGTGATAA GC	<i>gyrA</i>	CP00002.21	346
	R514 CTCCGTTGACAAGCAAGTTCG			
<i>B. pumilus</i>	L354 AGGGAAGAACAAGTGC(GA)AGAG	16S rRNA	DQ120942	321
	R674 GCTCCTCAGCGTCAGTTACA			

1.2 PCR 扩增

1.2.1 基因组 DNA 模板的制备:挑取培养基上单个菌落,接种于营养肉汤液体,30℃快速振荡培养 16h,离心取沉淀,采用硅藻土吸附法快速提取各菌株的基因组 DNA^[9],作为 PCR 的模板。

1.2.2 种特异性 PCR 引物设计与合成:比较 GenBank 数据库中具有种特异性序列的基因,使用软件 primer 5.0 设计引物。将引物用 BLAST 软件于互联网上(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>)

进行比对,每条引物在本种内的同源性应为 100%,与其他种同源性则应很低,保证引物的种内通用、种间特异。通过分析比较筛选了 4 对种特异性引物,其中包括扩增枯草芽孢杆菌 RNA 聚合酶 α 亚单位 RpoA 核酸序列的引物 *B. subtilis* BSL72/BSR328、扩增解淀粉芽孢杆菌和地衣芽孢杆菌的细菌促旋酶 *gyrA* 基因的引物 *B. amyloliquefaciens* L100/R836 和 *B. licheniformis* L168/R514,扩增短小芽孢

杆菌 16S rRNA 基因的引物 *B. pumilus* L354/R674。

1.2.3 多重 PCR 反应体系及程序:以参考菌株的基因组 DNA 为模板,利用设计好的种特异性引物进行 PCR 扩增。经过多轮条件优化后,建立适宜多重 PCR 反应体系。多重 PCR 反应体系:10×PCR buffer (不含 Mg^{2+}) 2.0 μ L, $MgCl_2$ 2.0 mmol/L, dNTP 各 200 μ mol/L, 引物 BSL72/BSR328、L100/R836、L168/R514 和 R674 各 3 μ mol/L, 引物 L354 5 μ mol/L, 1U *Taq* DNA 聚合酶, 基因组 DNA 50 ng 左右,加水补足 20 μ L。扩增反应: 94 3 min; 94 40 s, 61.7 40 s, 72 25 s, 30 个循环; 72 10 min。产物经 2%琼脂糖凝胶电泳检测。

1.3 PCR 产物测序

对菌株 *B.amyloliquefaciens* 10226^T, *B.subtilis* 92068^T, *B.licheniformis* 92069^T, *B.pumilus* 94044^T 的 PCR 扩增产物进行测序,由上海生工生物工程技术有限公司完成。

1.4 生产菌株的检测

采用常规生化方法对 23 株枯草群菌株进行鉴定^[7],然后采用多重 PCR 方法对其进行分子鉴定,考察分子鉴定与常规生化试验结果是否一致。

2 结果

2.1 枯草群内参考菌株的 PCR 特异性检测

以 22 株枯草群参考菌株基因组 DNA 为模板分别进行多重 PCR 扩增,结果显示(图 1),均出现了单一的扩增条带。其扩增产物大小分别为:枯草芽孢杆菌 256 bp,解淀粉芽孢杆菌 736 bp、地衣芽孢杆菌 446 bp,短小芽孢杆菌 421 bp,均与预期大小一致。

由图 1 还可以看出,枯草芽孢杆菌 1.15、1.108 和 1.354 没有产生 256 bp 扩增产物,却形成了 736 bp 的扩增条带,与解淀粉芽孢杆菌的菌株反应相同,生化试验也支持这一结果,显示这三株菌为解淀粉芽孢杆菌。



图 1 以枯草群菌株基因组 DNA 为模板的多重 PCR 扩增结果
Fig. 1 The multiplex PCR amplification of *B. subtilis* group representative strains using genomic DNA as template. M1: 50 bp ladder marker; 2-6: *B. subtilis* 10242, 92068, 1.1849, 29056, 2499; 7-9: *B. subtilis* 1.15, 1.108, 1.354; 10-13: *B.amyloliquefaciens* 10226, 1.1131, 1.1099, 1.1226; 14-19: *B.licheniformis* 92069, 1.813, 1.265, 1.105, [2003]025, [2005]005; 20-23: *B.pumilus* 94044, 1.937, 1.940, 1.1847; M2: 100 bp ladder marker.

2.2 非枯草群菌株 PCR 特异性检测

以枯草群 4 个种的模式菌株为阳性对照,对非枯草群的参考菌株基因组 DNA 分别进行多重 PCR 扩增,其特异性检验结果显示(图 2),阳性对照均出现目标条带,所有菌株与引物 *B.subtilis* BSL72/BSR328、引物 *B.amyloliquefaciens* L100/R836、*B.licheniformis* L168/R514 无交叉反应,而短小芽孢杆菌引物 *B.pumilus* L354/R674 除了与巨大芽孢杆菌 (*B.megaterium*) 胶胨样芽孢杆菌 (*B.mucilaginosus*)、土壤芽孢杆菌 (*B.edaphicus*) 环状类芽孢杆菌(*Paenibacillus cirulans*) 有目标扩增产物外,与其它参考菌株无扩增产物。



图 2 以枯草群以外的芽孢菌基因组 DNA 为模板的多重 PCR 扩增结果

Fig. 2 The multiplex PCR amplification of other representative strains using genomic DNA as template. 1. *B.amyloliquefaciens* 10226; 2. *B.subtilis* 92068; 3. *B.licheniformis* 92069; 4. *B.pumilus* 94044; 5. *B.megaterium* 92075; 6. *B.cereus* 93038; 7. *B.mucilaginosus* 7519; 8. *B.edaphicus* 7517; 9. *B.thuringiensis*10325; 10. *Brevibacillus laterosporus* 1.2012; 11. *B.mycoides*1.2014; 12. *Brevibacillus brevis* 94025; 13. *Paenibacillus cirulans* 94076; 14. *Paenibacillus polymyxa* 92076; M. 50 bp ladder marker.

2.3 PCR 产物序列分析

对模式菌株的特异 PCR 产物进行测序,结果通过 GenBank 中 BLAST 比对,与数据库中的同一区段核酸序列的同源性达到:枯草芽孢杆菌 100% (Z99104.2) 解淀粉芽孢杆菌 99% (AF272015.1),地衣芽孢杆菌 100% (CP000002.21),短小芽孢杆菌 100% (AY456263.1),结果说明各特异性引物具有很强的忠实性、特异性和保守性。

2.4 生产菌株的检测

经过菌落大小、形态、颜色和菌体形态及生化实验等表型特征的测定,微生物肥料产品中 23 株枯草群的芽孢杆菌被分别定位到枯草群的 4 个种中。对这些菌株进行多重 PCR 扩增时发现,每个菌株都产生了唯一的扩增条带,根据片段大小将这些菌株划分到不同种中,分子鉴定结果与传统方法结果一致(表 3),表明 PCR 方法可以为微生物肥料产品的检测提供快速准确的技术支持。

表 3 枯草群芽孢杆菌的 PCR 鉴定和部分生化实验结果
Table 3 The identification results of *B.subtilis* group stains using biochemical and multiplex PCR methods

Strain	The amplifications of multiplex PCR				Starch hydrolysis	Anaerobic growth	Utilization of propionate	Acid produced from lactose	The result of biochemical identification
	<i>B.subtilis</i>	<i>B.amyloliquefaciens</i>	<i>B.licheniformis</i>	<i>B.pumilus</i>					
3002	-	+	-	-	+	-	-	+	<i>B.amyloliquefaciens</i>
3003	-	+	-	-	+	-	-	+	<i>B.amyloliquefaciens</i>
3004	-	+	-	-	+	-	-	+	<i>B.amyloliquefaciens</i>
3005	+	-	-	-	+	-	-	-	<i>B.subtilis</i>
3006	-	-	+	-	+	+	+	/	<i>B.licheniformis</i>
3008	+	-	-	-	+	-	-	-	<i>B.subtilis</i>
3009	-	+	-	-	+	-	-	+	<i>B.amyloliquefaciens</i>
3010	-	+	-	-	+	-	-	+	<i>B.amyloliquefaciens</i>
3011A	-	+	-	-	+	-	-	+	<i>B.amyloliquefaciens</i>
3011B	-	-	-	+	-	-	-	/	<i>B.pumilus</i>
3040	-	+	-	-	+	-	-	+	<i>B.amyloliquefaciens</i>
3041	+	-	-	-	+	-	-	-	<i>B.subtilis</i>
3042	-	-	+	-	+	+	+	/	<i>B.licheniformis</i>
3043	-	-	-	+	-	-	-	/	<i>B.pumilus</i>
3044	+	-	-	-	+	-	-	-	<i>B.subtilis</i>
3045	-	+	-	-	+	-	-	+	<i>B.amyloliquefaciens</i>
3046	-	-	+	-	+	+	+	/	<i>B.licheniformis</i>
3047	-	+	-	-	+	-	-	+	<i>B.amyloliquefaciens</i>
3048	-	-	+	-	+	+	+	/	<i>B.licheniformis</i>
3049	-	+	-	-	+	-	-	+	<i>B.amyloliquefaciens</i>
3050	+	-	-	-	+	-	-	-	<i>B.subtilis</i>
3051	-	+	-	-	+	-	-	+	<i>B.amyloliquefaciens</i>
3052	-	-	+	-	+	+	+	/	<i>B.licheniformis</i>
92068 ^T	+	-	-	-	+	-	-	-	<i>B.subtilis</i>
10226 ^T	-	+	-	-	+	-	-	+	<i>B.amyloliquefaciens</i>
92069 ^T	-	-	+	-	+	+	+	+	<i>B.licheniformis</i>
94044 ^T	-	-	-	+	-	-	-	/	<i>B.pumilus</i>

3 讨论

16S rDNA 是细菌鉴定时最先考虑的靶基因, 已广泛应用, 但是用 16S rDNA 鉴定枯草群的菌种时, 有时不尽人意^[10~12]。现已有很多功能基因用于特异性分析, 这些基因进化速率较慢, 在系统进化过程中非常保守, 但相对于 16S rRNA 基因进化速率快, 能够代表种以下水平的进化方向, 如 *gyrA*、*cheA*、*gyrB*、*rpoA*、*rpoB*、*vrrA*、*spoOA*、 α -amylase 等^[11,13~19]。Oleg NR^[13]和全春善^[20]等利用 *yjaR*、*yjaO* 和 *tetB*、*tetL* 基因排列的差异成功完成一些枯草芽孢杆菌和解淀粉芽孢杆菌的鉴定, 本文使用这些引物扩增枯草芽孢杆菌和解淀粉芽孢杆菌菌株, 结果不甚理想。

本文在 *gyrA*、*rpoA* 和 16S rRNA 基因序列基础上设计的引物, 既有种间差异又有产物大小差异。试

验证明, 以此建立的多重 PCR 方法具有很高的特异性, 能准确区分芽孢菌中亲缘关系密切的 4 个种 (枯草芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌和短小芽孢杆菌) 以及其他芽孢菌。对 23 株枯草群的鉴定结果也表明, 特异 PCR 方法具有良好的可靠性和准确性, 而少量快速的模板制备方法也使其在微生物肥料检测上具有更大的实用价值。

枯草群菌株具有很高的同源性, 一些菌株因没有更深入研究被鉴定为枯草芽孢杆菌, 本文采用的参考菌株枯草芽孢杆菌 CGMCC1.15、1.108、1.354 即是如此, 鉴别性生化试验以及特异 PCR 扩增均表明这 3 株菌为解淀粉芽孢杆菌。由此看来, 特异 PCR 技术不仅可以用于未知菌株的鉴定, 也可以用于更正一些菌株的分类错误。

枯草群中还有其他菌种,如莫哈韦芽孢杆菌、死谷芽孢杆菌、*B.sonorensis*、*B.tequilensis*等,由于未收集到这些菌株进行检测,本文建立的检测方法是否与其有交叉反应还有待进一步研究,但对一株枯草群分离物进行 PCR 扩增时无扩增产物,经过克隆测序和生化试验发现该菌株为 *B.atrophaeus* (待发表),由此也说明本文建立的菌种鉴定方法在枯草群中具有强特异性。

本文中巨大芽孢杆菌、胶胨样芽孢杆菌、土壤芽孢杆菌和环状芽孢杆菌与短小芽孢杆菌引物存在交叉反应,但枯草群菌株与这些种在菌落和菌体特征上易于区别^[7,8]。因此也说明,虽然多重 PCR 方法在微生物肥料产品检测的快速、准确方面具有很大优势,但是也有与其他一些芽孢菌发生交叉反应的可能,所以常规方法与分子生物学技术结合,可取得事半功倍的效果。

参 考 文 献

- [1] Nakamura LK. Taxonomic relationship of black-pigmented *Bacillus subtilis* strains and a proposal for *Bacillus atrophaeus* sp. nov.. *Int J Syst Bacteriol*, 1989, 39(3): 295–300.
- [2] Roberts MS, Nakamura LK, Cohan FM. *Bacillus mojavensis* sp. nov., distinguishable from *Bacillus subtilis* by sexual isolation, divergence in DNA sequence, and differences in fatty acid composition. *Int J Syst Bacteriol*, 1994, 44(2): 256–264.
- [3] Michael SR, Nakamura LK, Ferderick MC. *Bacillus vallismortis* sp. nov., a close relative of *Bacillus subtilis*, isolated from soil in Death Valley, California. *Int J Syst Bacteriol*, 1996, 46(2): 470–475.
- [4] Palmisano MM, Nakamura LK., Duncan KE, et al. *Bacillus sonorensis* sp. nov., a close relative of *Bacillus licheniformis*, isolated from soil in the Sonoran Desert, Arizona. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2001, 51(5): 1671–1679.
- [5] Gatson JW, Benz BF, Chandrasekaran C, et al. *Bacillus tequilensis* sp. nov., isolated from a 2000-year-old Mexican shaft-tomb, is closely related to *Bacillus subtilis*. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2006, 56(7), 1475–1484.
- [6] Nakamura LK, Roberts MS, Cohan FM. Relationship of *Bacillus subtilis* clades associated with strains 168 and W23: a proposal for *Bacillus subtilis* subsp. *Subtilis* subsp. nov. and *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* subsp. nov. *Int J Syst Bacteriol*, 1999, 49(3), 1211–1215.
- [7] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001.
- [8] Buchanan RE, Gibbons NE. 伯杰细菌鉴定手册. 中国科学院微生物研究所《伯杰细菌鉴定手册》翻译组译. 第 8 版. 北京: 科学出版社, 1984.
- [9] 陈强, 张小平, 李登煜, 等. 从豆科植物的根瘤中直接提取根瘤菌 DNA 的方法. *微生物学通报(Microbiology)*, 2002, 29 (6): 65–68.
- [10] Ash C, Farrow JA, Wallbanks S, et al. Phylogenetic heterogeneity of the genus *Bacillus* revealed by comparative analysis of small subunit ribosomal RNA sequences. *Lett Appl Microbiol*, 1991, 13: 202–206.
- [11] Blackwood KS, Turenne CY, Harmsen D, et al. Reassessment of sequence-based targets for identification of *Bacillus* species. *J Clin Microbiol*, 2004, 42 (4): 1626–1630.
- [12] Goto K, Omura T, Hara Y, et al. Application of the partial 16S rDNA sequence as an index for rapid identification of species in the genus *Bacillus*. *J Gen Appl Microbiol*, 2000, 46: 1–8.
- [13] Oleg NR, Christina D, Johan M, et al. Taxonomic characterization and plant colonizing abilities of some bacteria related to *Bacillus amyloliquefaciens* and *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol Ecol*, 2004, 48: 249–259.
- [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. *Appl Environ Microbiol*, 1995, 61(3): 1104–1109.
- [15] Yuan Q, Guy P, Xudong L, et al. Utilization of the *rpoB* gene as a specific chromosomal marker for real-time PCR detection of *Bacillus anthracis*. *Appl Environ Microbiol*, 2001, 67(8): 3720–3727.
- [16] Hurtle W, Bode E, Kulesh DA, et al. Detection of the *Bacillus anthracis gyrA* gene by using a minor groove binder probe. *J Clin Microbiol*. 2004, 42(1): 179–185.
- [17] 胡哲, 王振国, 刘金华, 等. 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.
- [18] 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.
- [19] 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.
- [20] 权春善, 王军华, 徐洪涛, 等. 一株抗真菌解淀粉芽孢杆菌的分离鉴定及其发酵条件的初步研究. *微生物学报(Acta Microbiologica Sinica)*, 2006, 46 (1): 7–12.

Multiplex-PCR approach to identify *Bacillus* species applied in microbial fertilizers

Fengming Cao^{1,2}, Delong Shen^{1*}, Jun Li², Dawei Guan², Xin Jiang², Li Li¹, Ruihua Feng², Xiaohong Yang², Huijun Chen², Yifan Ge²

¹ Institute of Agricultural Resources and Regional Planning, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 10081, China)

² Center for Quality Supervision and Test of Microbial Fertilizers and Mushroom Spawn, Ministry of Agriculture, Beijing 10081, China)

Abstract: [Objective] To discriminate the strains of *Bacillus subtilis* group including *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, and *B. pumilus*, a rapid and accurate distinguishing method is essential for the identification of the target strains to ensure the quality and safety of microbial fertilizers. **[Methods]** By analyzing unique nucleotide sequences of the *rpoA*, *gyrA* and 16S rDNA genes, 4 pairs of species-specific primers were optimized and the multiplex PCR was developed to discriminate and identify *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis* and *B. pumilus*. **[Results]** Thirty-three reference strains belonging to three genera of *Bacillus*, *Paenibacillus* and *Brevibacillus* were tested and the anticipated results appeared except for four species with cross amplification results with the primers of *B. pumilus*. However, the four species can be easily discriminated by morphology characters. In addition, the multiplex-PCR results of 23 strains of *B. subtilis* group isolated from MF products were identical with the biochemical assay. **[Conclusion]** The newly constructed multiplex-PCR assay is species-specific and effective. This method can be used to detect and identify the strains of *B. subtilis* group from microbial fertilizers products.

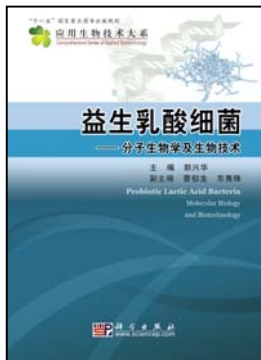
Keywords: multiplex-PCR; species-specific primers; identification; *Bacillus subtilis*; microbial fertilizers

Supported by the Ministry of Science and Technology (2006BAD25B04)

*Corresponding author. Tel: +86-10-68975891; Fax: +86-10-68975891; E-mail: dlshen@caas.ac.cn

Received: 4 June 2007/ Revised: 2 January 2008

科学出版社科学出版中心生命科学分社新书推介(2008-03)



益生乳酸细菌——分子生物学与生物技术

郭兴华 主编; 978-7-03-020039-6; ¥ 68.00; 2008年3月21日出版

本书分上、下两篇。篇有十二章, 主要介绍: 一、益生乳酸细菌的遗传组织结构及功能, 包括基因组学中的结构基因组学、蛋白质基因组学和功能基因组学。二、益生乳酸细菌的基因工程及其调控, 各类载体和受体的分子克隆体系及转化方法; 细胞表面工程及应用; 益生乳酸细菌作为抗原基因载体和药物分子载体的应用和前景; 食用乳酸菌的代谢及基因修饰。三、益生乳酸细菌对生产和应用中遇到的各种环境的应激反应机理。四、益生乳酸细菌的主要代谢产物和次生代谢产物。五、益生乳酸细菌的发酵工程, 包括直接式发酵、高密度培养、细胞的浓缩收集和噬菌体的防治。六、益生乳酸细菌在生产和应用中防御各种环境对细胞损伤的措施和定向靶位给药(菌)的方法。下篇有20个与上篇有关的实验, 包括菌的生理功能、分子生物学方法的鉴定、噬菌体的分离、DNA的提取、遗传转化和DNA洗牌育种等。

本书对从事微生物学、微生物生态学、食品科学、免疫学、疫苗、分子克隆、乳酸、多糖、细菌素等研究人员、教师、研究生以及从事益生菌、乳品工业、食品工业、制药工业、发酵工业的工作人员和其他相关人员具有重要的参考价值。

欢迎各界人士邮购科学出版社各类图书(免邮费)

邮购地址: 北京东黄城根北街16号 科学出版社 科学销售中心 邮编: 100717

联系人: 周文宇 联系电话: 010-64031535(带传真)

更多精彩图书请登陆网站 <http://www.lifescience.com.cn>, 欢迎致电索要书目