

# 土壤类芽孢杆菌 PCR 鉴定方法的建立

张珊珊, 吴金光, 胡秀芳

(浙江理工大学生物工程研究所, 杭州 310018)

**摘要:** 以 *gyrB* 基因为靶标, 设计土壤类芽孢杆菌的特异性引物, 建立了土壤类芽孢杆菌的特异性 PCR 鉴定方法。该方法具有较高的特异性, 可有效区分胶质类芽孢杆菌及其它各种细菌菌种。该 PCR 方法也具有较好的灵敏度, 可检测只含 1 到 10 细胞之间的检测样品。

**关键词:** 土壤类芽孢杆菌; *gyrB* 基因; PCR 鉴定; 特异性; 灵敏性

**中图分类号:** Q939.3      **文献标识码:** A

## 0 引言

硅酸盐细菌是土壤中一类能够分解硅铝酸盐类矿物、产生钾和磷等元素的细菌<sup>[1]</sup>, 主要包括胶质类芽孢杆菌(*Paenibacillus mucilaginosus*)<sup>[2]</sup>、土壤类芽孢杆菌(*Paenibacillus edaphicus*)<sup>[3]</sup>和环状芽孢杆菌(*Bacillus circulans*)<sup>[4]</sup>等。由于硅酸盐细菌能分解土壤中的矿物提高土壤有效磷、钾等元素的含量<sup>[5]</sup>, 并对病原菌具有拮抗作用<sup>[6-7]</sup>, 因此能促进辣椒<sup>[5]</sup>、棉花<sup>[5]</sup>、芥菜<sup>[8]</sup>和番茄<sup>[9]</sup>等多种农作物生长并提高作物产量; 硅酸盐细菌能移除矿物中的杂质、因此可用来浸出矿物中有价值的金属<sup>[10]</sup>或提高陶瓷等级<sup>[11]</sup>; 硅酸盐细菌产生的胞外多糖是优良的絮凝剂, 可以吸附水体中的有机和无机悬浮颗粒以及金属离子、降低 BOD<sub>5</sub>(生化需氧量)和 COD(化学需氧量), 因此可用于处理各种废水、用于矿浆固液分离<sup>[12-14]</sup>以及吸附-浮选废水中的重金属, 加以回收利用<sup>[15]</sup>。因硅酸盐细菌具有上述广泛的用途, 故对满足各种用途的高效菌株的筛选和鉴定具有重要意义。Shelobolina<sup>[3]</sup>在 1997 年对 11 株硅酸盐细菌进行了分类, 将其中的一个菌株命名为土壤芽孢杆菌(*Bacillus edaphicus* sp. Nov.)并首次对这种菌的

特性进行了描述。Hu 等<sup>[16]</sup>于 2009 年根据土壤芽孢杆菌 16S rRNA 序列、*gyrB* 序列、DNA-DNA 同源性和脂肪酸成分等特性与有效类芽孢杆菌(*Paenibacillus validus*)的相似性比较, 将土壤芽孢杆菌归到类芽孢杆菌属, 并将其命名为土壤类芽孢杆菌(*Paenibacillus edaphicus* comb. nov.)。

目前, 对土壤类芽孢杆菌的鉴定主要局限于将其与典型菌株的形态和生理生化反应特征的比较。但由于其他种类的菌如胶质类芽孢杆菌等也具有相似的形态和生理生化反应特征, 因而给鉴定工作带来了困难。虽然一些分子水平上的方法如 DNA-DNA 同源性比较或 16S rRNA 测序<sup>[17]</sup>也应用于对土壤类芽孢杆菌的菌种鉴定上, 但是这些方法成本较高或操作繁琐, 不便于对大量分离物的鉴定工作。聚合酶链式反应(PCR)技术由于具有快速简便和灵敏度高的优点, 目前被广泛用于鉴定细菌<sup>[18]</sup>。PCR 检测的特异性主要取决于合适的靶基因的选择, 目前编码细菌核糖体小亚基 RNA 组分的基因(16S rRNA 基因)常被作为 PCR 检测的靶基因, 但由于 16S rRNA 基因进化速率慢, 序列保守性太高, 难以设计种特异性引物通过 PCR 反应来区分紧密相关的细菌。最近的研究表明基于 16S rRNA 基因设计

的引物不能用来区分短小芽孢杆菌 (*Bacillus pumilus*), 巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*), 环状芽孢杆菌 (*B. circulans*), 胶质类芽孢杆菌 (*P. mucilaginosus*) 和土壤类芽孢杆菌 (*P. edaphicus*)<sup>[19]</sup>。 *gyrB* 基因是细菌解旋酶的 B 亚单位基因, 由于细菌 *gyrB* 基因比 16S rRNA 基因进化速率更快<sup>[20]</sup>, 因而其序列具有更高的可变性, 更容易通过设计引物来区分紧密相关的细菌和鉴定菌种。 本论文探讨了基于 *gyrB* 序列设计引物, 以建立 PCR 法用于鉴定土壤类芽孢杆菌的可行性, 该方法可能适合于对大量分离物的快速鉴定。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验菌株和培养条件

本研究中用到的参考菌株列于表 1 中。 其中 *P. mucilaginosus* VKPM B-7519<sup>T</sup> 和 *P. edaphicus* VKPM B-7517<sup>T</sup> 用硅酸盐细菌无氮培养基培养, 其它菌株使用 LB 培养基培养, 各菌株都在 30℃ 下培养 36~48 h。

表 1 菌株及其来源

| 细菌属名                               | 菌株                         |
|------------------------------------|----------------------------|
| <i>Paenibacillus mucilaginosus</i> | VKPM B-7519 <sup>T</sup>   |
| <i>Paenibacillus edaphicus</i>     | VKPM B-7517 <sup>T</sup>   |
| <i>Paenibacillus apiarius</i>      | ACCC 10193 <sup>T</sup>    |
| <i>Paenibacillus azotofixans</i>   | ACCC 10251 <sup>T</sup>    |
| <i>Paenibacillus polymyxa</i>      | CCTCC AB92076 <sup>T</sup> |
| <i>Paenibacillus validus</i>       | CCTCC AB95016 <sup>T</sup> |
| <i>Bacillus azotoformans</i>       | ACCC 10226 <sup>T</sup>    |
| <i>Bacillus cereus</i>             | ACCC 10263 <sup>T</sup>    |
| <i>Bacillus circulans</i>          | ACCC 10228 <sup>T</sup>    |
| <i>Bacillus megaterium</i>         | ACCC 10245 <sup>T</sup>    |
| <i>Bacillus subtilis</i>           | CCTCC AB92068 <sup>T</sup> |
| <i>Brevibacillus brevis</i>        | ACCC 10248 <sup>T</sup>    |
| <i>Sinorhizobium meliloti</i>      | ACCC 17516                 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i>      | ATCC 15442                 |
| <i>Staphylococcus aureus</i>       | ATCC 6538                  |
| <i>Escherichia coli</i>            | ATCC 8099                  |

### 1.2 土样采集与总 DNA 提取

土壤样品于 2009 年 6 月采集于杭州下沙地区的新元村 (XYC) 和元城 (YC) 这两个蔬菜种植地。 采集的土壤样品用于提取总 DNA 以扩增土壤类芽孢杆菌的 *gyrB* 基因。 土样采集前去除表土, 于 5~15 cm 深度取土; 随机选取 5 个点的土样充分混合, 四分法留取 1 kg 土样带回实验室, 土样提取总 DNA 前保存于一 70℃。 土壤中总 DNA 的提取参考 Zhou<sup>[21]</sup> 等方法。

### 1.3 特异性引物设计

为设计土壤类芽孢杆菌的特异性引物, 从 GenBank 数据库获得 7 株胶质类芽孢杆菌的序列: FJ009516、FJ009517、FJ009518、FJ009520、FJ039525、FJ039527 和 EU711070; 1 株土壤类芽孢杆菌的序列: FJ009519; 类芽孢杆菌属 9 个其它种的 *gyrB* 基因序列及芽孢杆菌属 13 个种的 *gyrB* 基因序列<sup>[16]</sup>。 用 ClustalX (版本 1. 8. 3) 软件进行多序列比对, 然后选择土壤类芽孢杆菌序列上那些与其它种类的菌序列差异大的、长度在 19~23 bp 的区域作为备选引物。 将这些备选引物序列提交到 NCBI-BlastN 搜索数据库中的同源序列, 保留与其它菌种同源性最低的 5 对引物。 引物的 T<sub>m</sub> 值 (解链温度) 使用 Oligocalc (<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>) 计算, 所获得的目的引物序列由英潍捷基 (上海) 贸易有限公司合成。

### 1.4 PCR 反应的建立

PCR 扩增反应使用 25 μL 反应体系, 包括 1~10 ng 的总 DNA 模板、10 mmol/L Tris-HCl、50 mmol/L KCl、0. 2 mmol/L dNTP、1. 5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>、0. 1% Triton-100、0. 2 μmol/L 的上下游引物和 0. 65 U/mL 的 Taq DNA polymerase (广州东盛生物科技有限公司)。 PCR 循环条件: 预变性 (94℃, 3 min), 30 个循环 (94℃, 20 s; 60℃, 20 s; 72℃, 20 s), 延伸 (72℃, 3 min)。 扩增产物用琼脂糖凝胶电泳分离, EB 染色并用紫外凝胶成像仪 (上海天能科技有限公司) 拍照。

### 1.5 特异性引物筛选和验证

鉴于土壤类芽孢杆菌与胶质类芽孢杆菌的高度亲缘关系, 用这两种菌的典型菌株 *P. edaphicus* VKPM B-7517<sup>T</sup> 和 *P. mucilaginosus* VKPM B-7519<sup>T</sup> 进行 PCR 反应扩增以对各对引物进一步筛选。 为验证筛选后保留的引物扩增结果的正确性, 将各对引物扩增土壤类芽孢杆菌 VKPM B-7517<sup>T</sup> 产生的条带用 Axygen 公司的凝胶回收试剂盒割胶回收并进行克隆、测序和序列比对分析。

### 1.6 PCR 反应的特异性确定

使用所建立的 PCR 反应扩增芽孢杆菌属和类芽孢杆菌属等属的各种菌株 (见表 1), 电泳检测扩增条带, 以确定 PCR 方法的特异性。

用建立的 PCR 反应来扩增提取的土壤总 DNA, 并对得到的目的扩增产物进行回收、克隆、测序与序列分析, 以进一步检验 PCR 反应的特异性。

1.7 PCR反应的灵敏性确定

液体培养土壤类芽孢杆菌典型菌株 VKPM B-7517<sup>T</sup>,进行 10 倍系列稀释后涂板计数,计算每微升培养原液所含的细胞数。取适量培养原液用灭菌双蒸水调节至每微升稀释液含有的菌体细胞落在 10<sup>5</sup>、10<sup>4</sup>、10<sup>3</sup>、10<sup>2</sup>、10<sup>1</sup>、10<sup>0</sup> 和 10<sup>-1</sup>个范围内,取 1 μL 上述稀释液直接作为 PCR 反应模板,检测各稀释度下能否扩增出目的条带,PCR 反应循环数为 30。

1.8 序列分析与登录号

使用 DNASTar(版本 7.1.0)的 MegAlign 程序计算各对引物扩增的序列与 VKPM B-7517<sup>T</sup> 的 *gyrB* 序列(登录号 FJ009519)的同源性以及土壤克隆子序列与土壤类芽孢杆菌 VKPM B-7517<sup>T</sup> 的 *gyrB* 基因序列的相似性。

土壤类芽孢杆菌引物对扩增土壤总 DNA 产生

的克隆子在排除测序失败和测序错误的序列后剩下 41 个克隆子,这些克隆子序列的 GenBank 登录号是 GU396105~GU396145。

2 结 果

2.1 特异性引物设计与筛选

2.1.1 特异性引物的设计

本实验中共设计了 5 对土壤芽孢杆菌的引物(见表 2)。引物位置对应于大肠杆菌 K12 菌株的 *gyrB* 基因(GenBank 登录号 X04341)。引物对 F11-R13 的理论扩增产物长度为 223 bp(包括引物区),引物对 F11-R31 的理论扩增产物长度为 124 bp,引物对 F22-R2 的理论扩增产物长度为 235 bp,引物对 F22-R4 的理论扩增产物长度为 232 bp,引物对 F22-R43 的理论扩增产物长度为 193 bp。

表 1 表 2 基于 *gyrB* 基因的土壤类芽孢杆菌特异引物

| 引物  | 序列(5'-3')               | 位置        | 长度/bp | 解链温度/℃ |
|-----|-------------------------|-----------|-------|--------|
| F11 | TGATTTTCGATACGCTTCAGTCC | 546-567   | 22    | 57     |
| F22 | GGATGCTTCGATCAGCGAAGTT  | 1239-1260 | 22    | 60     |
| R2  | CTTGTGGTAGCGGGCCTTGGTA  | 1455-1476 | 22    | 61     |
| R4  | GTGGTAGCGGGCCTTGGTAATC  | 1452-473  | 22    | 59     |
| R13 | CAGGGCAACTTCCACCGTA     | 750-768   | 19    | 56     |
| R31 | GACGATCCCGCCCTCATACAT   | 649-669   | 21    | 59     |
| R43 | ACCTGTGCCCAGAGCAGTAATA  | 1410-1431 | 22    | 59     |

2.1.2 特异性引物的筛选与验证

采用所建立的 PCR 方法扩增土壤类芽孢杆菌 VKPM B-7517<sup>T</sup> 和胶质类芽孢杆菌 VKPM B-7519<sup>T</sup>,并用 2%的琼脂糖凝胶电泳检测,结果显示所设计 5 对引物都能成功地扩增土壤类芽孢杆菌且不起胶质类芽孢杆菌的扩增(见图 1)。

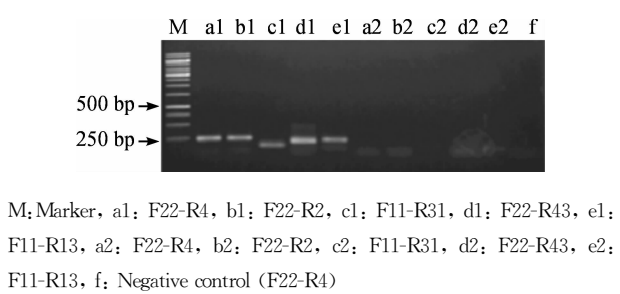


图 1 5 对引物的扩增效果验证

其中,4 对引物 F11-R13、F11-R31、F22-R2 和 F22-R4 扩增土壤类芽孢杆菌产生单一的目的条带;另外,有一对引物 F22-R43 扩增产生一条大小约为 450bp 的非特异性条带(见图1),因此该引物不适

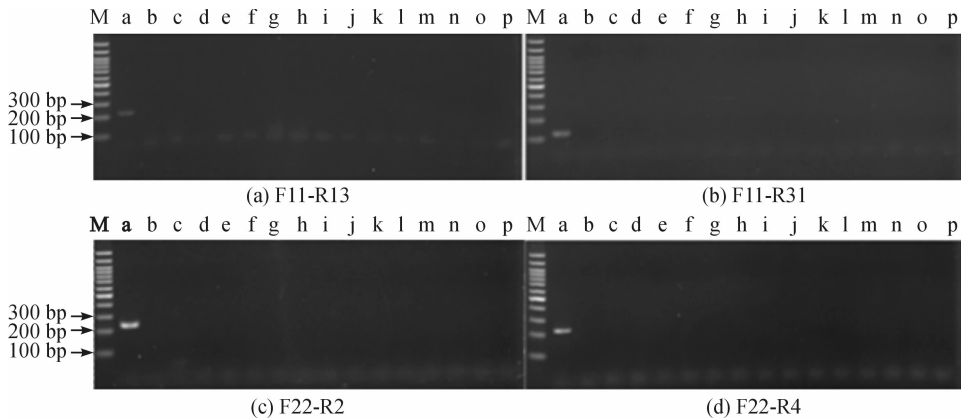
宜作为特异性引物,故被排除。

以土壤类芽孢杆菌 VKPM B-7517<sup>T</sup> 为模板,检验了引物对 F11-R13、F11-R31、F22-R2 和 F22-R4 的扩增结果。将扩增产物分别纯化、克隆后进行测序,测序结果采用 DNASTar 的 MegAlign 程序比对,结果显示其中四对引物 F11-R13、F11-R31、F22-R2 和 F22-R4 的扩增序列与 VKPM B-7517<sup>T</sup> 的 *gyrB* 序列(登录号 FJ009519)的同源性都为 100%,序列完全一致。可见,四对引物的扩增结果都是正确的。

2.2 PCR 检测的特异性

2.2.1 参考菌株的 PCR 特异性

采用建立的 PCR 方法,对表 1 所列的各个参考菌株进行 PCR 检测以确定各引物对的特异性,PCR 检测结果见图 2。从图 2 可见,对于四对引物 F11-R13、F11-R31、F22-R2 和 F22-R4,各个非土壤类芽孢杆菌菌株都未扩增出目的条带,表明四对引物对的特异性都较好。

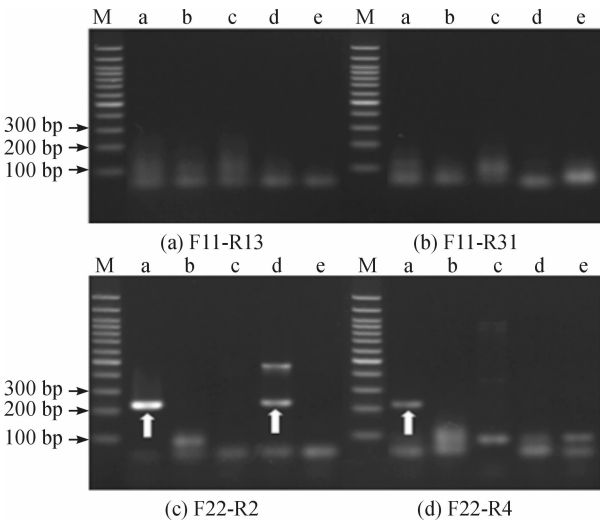


M: Marker, a: Positive control (*P. edaphicus*), b: *P. apiarius*, c: *P. azotofixans*, d: *P. polymyxa*, e: *P. validus*, f: *B. azotoformans*, g: *B. cereus*, h: *B. circulans*, i: *B. megaterium*, j: *B. subtilis*, k: *Br. brevis*, l: *Si. meliloti*, m: *Ps. aeruginosa*, n: *St. aureus*, o: *E. coli*, p: Negative control

图 2 PCR 特异性检测结果

2.2.2 土壤总 DNA 的 PCR 特异性

为进一步验证 PCR 检测的特异性,使用从土壤中提取的总 DNA 作为 PCR 反应的模板进行 PCR 扩增,PCR 扩增结果见图 3。从图 3 可见,对于引物对 F11-R13 和 F11-R31,所有检测的土壤样品都不能产生扩增条带。对于引物对 F22-R2 和 F22-R4,部分土壤样品的总基因组 DNA 获得扩增并产生特异性条带(白色箭头指示)和非特异性条带。



M: Marker, a:XYC1, b: XYC2, c: XYC3, d: YC, e: Negative control

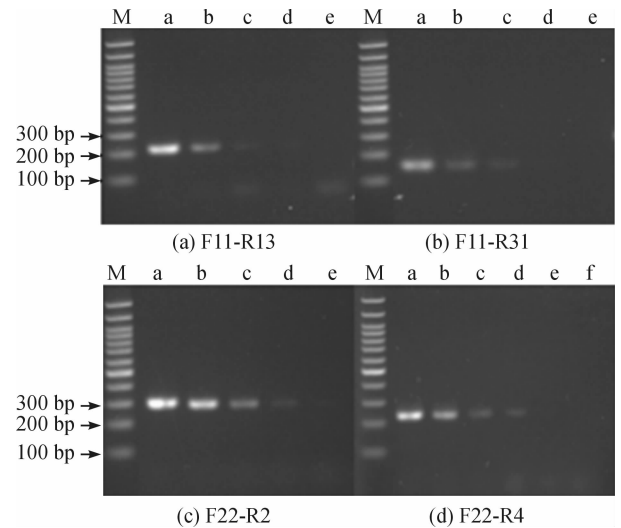
图 3 用土壤类芽孢杆菌的四对引物扩增土壤 DNA 的结果

将引物对 F22-R2 和 F22-R4 扩增产生的特异性扩增产物经割胶回收后,进行克隆并分别随即挑取 15 个克隆重组子测序。排除测序产生的重复序列、测序失败或不正确的序列,用 DNASTar 的 MegAlign 程序计算剩下的序列与土壤类芽孢杆菌 VKPM B-7517<sup>T</sup> 的序列相似性,结果显示所有序列与 VKPM B-7517<sup>T</sup> 的相似性只有 78.6%~83.2%,

表明这两对引物扩增土壤总 DNA 得到的都是非特异性产物,所以这两对引物用于检测复杂的 DNA 样品时的特异性不高。

2.3 PCR 检测的灵敏度

用 10 倍系列稀释的土壤类芽孢杆菌 VKPM B-7517<sup>T</sup> 液体培养物直接作为 PCR 反应的模板,进行 PCR 扩增反应的结果见图 4。从图 4 可见,对于每 25  $\mu$ L PCR 反应体系,引物对 F11-R13 和 F11-R31 可检出的最低菌量为 10 个细胞,引物对 F22-R2 和 F22-R4 可检出的最低菌量为 1 个细胞。从 PCR 检测的灵敏度看,引物对 F22-R2 和 F22-R4 优于 F11-R13 和 F11-R31,可能是由于引物对 F22-R2 和 F22-R4 的特异性弱于引物对 F11-R13 和 F11-R31 所致。



M: Marker, a: 10<sup>3</sup> cells, b: 10<sup>2</sup> cells, c: 10<sup>1</sup> cells, d: 10<sup>0</sup> cells, e: 10<sup>-1</sup> cells, f: Negative control

图 4 PCR 灵敏度检测结果

### 3 讨论

类芽孢杆菌属的特异性 PCR 鉴定方法已在部分物种鉴定中得到了研究和应用,其所用靶基因一般为 16S rRNA,目前这些方法在进行种的快速鉴定中还存在一些不足。如针对短小芽孢杆菌设计的 16S rRNA 引物在使用中不能区分短小芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌、环状芽孢杆菌、胶质类芽孢杆菌和土壤类芽孢杆菌<sup>[19]</sup>,因此筛选确定合适的用于设计引物的基因是保证所设计的引物具有高的特异性,进而确保建立成功的 PCR 方法的前提。Hu 等<sup>[16]</sup>的研究表明土壤类芽孢杆菌 *gyrB* 基因与其他类芽孢杆菌的相似性仅为 70.3%~79.2%,因此存在较多的种间差异序列可用来设计引物。鉴于此,本论文选择 *gyrB* 作为靶基因,设计了特异性引物并建立了 PCR 方法用于鉴定土壤类芽孢杆菌。

根据土壤类芽孢杆菌 *gyrB* 基因设计了 5 对引物,除其中 1 对引物引起土壤类芽孢杆菌产生非特异性扩增条带外,其他均为特异性单一条带;同时,这些引物对不引起胶质类芽孢杆菌以及各种检测的对照菌种的扩增,表明 4 对引物特异性较好。使用这 4 对引物扩增从土壤中提取的总 DNA 时,两对引物(F22-R2 和 F22-R4)虽然能扩增产生目的产物但产物序列与土壤类芽孢杆菌的 *gyrB* 基因序列有较大差异,PCR 扩增中也发现这两对引物能引起一些土壤样品产生非特异性扩增条带,因此这两对引物的特异性不高,而引物对 F11-R13 和 F11-R31 可能是更好的土壤类芽孢杆菌的种特异性的引物对。

本论文所建立的 PCR 方法的灵敏度较高,最低可检出 1~10 个细胞。虽然 *gyrB* 基因为单拷贝基因,与 16S rRNA 基因比较,其灵敏度会有所降低,但显然本实验中 *gyrB* 基因的拷贝数对灵敏度造成的影响很小。引物对 F11-R13 和 F11-R31 最低可检测到每 PCR 反应体系中 10 个细胞,引物对 F22-R2 和 F22-R4 最低可检测到每 PCR 反应体系中 1 个菌体细胞。

目前对土壤类芽孢杆菌的鉴定主要依赖于同参考菌株进行形态和生理生化特征的比较,这给大量分离物的鉴定工作带来了困难。使用本论文所建立的 PCR 方法进行鉴定所需的时间较短,从进行 PCR 反应到电泳检测扩增产物只需 1.5 h,且具有较高的特异性和灵敏度,因此所建立的 PCR 反应对大量分离物的快速鉴定具有积极的意义。

### 参考文献:

- [1] NY 882—2004 硅酸盐细菌菌种[S].
- [2] Avakyan Z A, Pivovarov T A, Karavaiko G I. Properties of a new species, *Bacillus mucilaginosus*[J]. Mikrobiologiya, 1986, 55(2): 477-482.
- [3] Shelobolina E S, Avakyan Z A, Bulygina E S, et al. Description of a new species of *mucilaginosus* bacteria from phenotypic and genotypic analysis[J]. Microbiology, 1997, 66(6): 681-689.
- [4] Lian B, Prithiviraj B, Souleimanov A, et al. Evidence for the production of chemical compounds analogous to nod factor by the silicate bacterium *Bacillus circulans* GY92[J]. Microbiol Res, 2001, 156(3): 289-292.
- [5] 盛下放, 何琳燕, 陈 珏. 土壤芽孢杆菌 NBT 菌株理化诱变筛选及其对作物生长的影响[J]. 中国农业科学, 2003, 36(4): 415-419.
- [6] 刘光烨, 林 洋, 黄昭贤. 硅酸盐细菌解钾兼拮抗活性菌株的筛选[J]. 应用与环境生物学报, 2001, 7(1): 66-68.
- [7] 赵秀香, 陈华民, 吴元华. 硅酸盐细菌 B925 对烟草黑胫病菌的抑制作用及其 16S rDNA 序列分析[J]. 烟草科技, 2007(3): 56-60.
- [8] Sheng X F, Jiang C Y, He L Y. Characterization of plant growth-promoting *Bacillus edaphicus* NBT and its effect on lead uptake by Indian mustard in a lead-amended soil[J]. Can J Microbiol, 2008, 54(5): 417-422.
- [9] Li X, Wu Z, Li W, et al. Growth promoting effect of a transgenic *Bacillus mucilaginosus* on tobacco planting[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2007, 74(5): 1120-1125.
- [10] 孙德四, 赵薪萍, 张 强. 用细菌从铝硅酸盐矿物中浸出硅的工艺研究[J]. 矿业快报, 2008, 43(3): 32-35.
- [11] Vainberg S N, Vlasov A S, Skripnik V P. Treating clays with silicate bacteria[J]. Glass Ceram, 1980, 37(8): 387-389.
- [12] 冯雅丽, 王宏杰, 李浩然, 等. 一株产絮凝剂硅酸盐细菌的筛选及其絮凝特性[J]. 中南大学学报: 自然科学版, 2008, 39(5): 934-939.
- [13] Deng S B, Bai R B, Hu X M, et al. Characteristics of a bioflocculant produced by *Bacillus mucilaginosus* and its use in starch wastewater treatment[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2003, 60(5): 588-593.
- [14] 陈 烨, 陈勤怡, 连 宾. 啤酒厂废水的生物处理[J]. 食品科学, 2004, 25(10): 148-150.
- [15] 代淑娟, 周东琴, 魏德洲, 等. 胶质芽孢杆菌对水中 Pb<sup>2+</sup>生物吸附-浮选性能研究[J]. 金属矿山, 2007, 34(5): 70-74.

- [16] Hu X F, Li S X, Wu J G, et al. Transfer of *Bacillus mucilaginosus* and *Bacillus edaphicus* to the genus *Paenibacillus* as *Paenibacillus mucilaginosus* comb. nov. and *Paenibacillus edaphicus* comb. nov.[J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2010, 60(2): 8-14.
- [17] 何琳燕, 殷永娴, 黄为一. 一株硅酸盐细菌的鉴定及其系统发育学分析[J]. 微生物学报, 2003, 43(2): 162-168.
- [18] Johnson J R. Development of polymerase chain reaction-based assays for bacterial gene detection[J]. J Microbiol Methods, 2000, 41(3): 201-209.
- [19] 曹凤明, 沈德龙, 李俊, 等. 应用多重 PCR 鉴定微生物肥料常用芽孢杆菌[J]. 微生物学报, 2008, 48(5): 651-656.
- [20] 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[J]. Appl Environ Microbiol, 1995, 61(3): 1104-1109.
- [21] Zhou J, Bruns M A, Tiedje J M. DNA recovery from soils of diverse composition[J]. Appl Environ Microbiol, 1996, 62(2): 316-322.

## Development of a PCR Identification Method for *Paenibacillus edaphicus*

ZHANG Shan-shan, WU Jin-guang, HU Xiu-fang

(Institute of Bioengineering, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China)

**Abstract:** In this paper, we design *P. edaphicus gyrB*-targeted specific primer pairs and develop a specific PCR identification method for *P. edaphicus*. *P. mucilaginosus* and the other bacterial species tested show no amplification in the PCR reaction, indicating good specificity of the developed PCR method. Good sensitivity is also demonstrated by the method with a detection limit of 1-10 cells.

**Key words:** *Paenibacillus edaphicus*; *gyrB* gene; PCR identification; specificity; sensitivity

(责任编辑: 许惠儿)