

基于鞭毛蛋白基因的坚强芽孢杆菌特异性套式 PCR 和荧光定量 PCR 方法的建立*

许彦芬^{1,2} 王海亮¹ 陈大恭^{1,2} 宋晓玲^{1,3} 黄 健^{1,2,3①}

(1. 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071;
2. 上海海洋大学 上海 201306; 3. 青岛海洋科学与技术国家重点实验室 青岛 266071)

摘要 细菌鞭毛蛋白编码基因 *hag* 具两端的保守序列及中间可变区域,在细菌的分类和鉴定中可作为分子标记。本研究克隆了坚强芽孢杆菌鞭毛蛋白编码基因 *hag* 部分序列,根据所得核酸序列设计套式引物 Bfho 和 Bfhi,进行菌株的套式 PCR 特异性检测。此外,采用内引物 Bfhi 建立坚强芽孢杆菌荧光定量 PCR 特异性检测方法并确定该方法的检测限,对 15 个模拟样品进行检测并对阳性组中坚强芽孢杆菌的含量进行定量分析。结果显示,克隆得到的坚强芽孢杆菌 *hag* 基因长为 1213 bp,经比对,与枯草芽孢杆菌 *hag* 基因相似性为 13%–15%。荧光定量 PCR 方法对坚强芽孢杆菌菌株 PC004 和 PC024 的检测限分别为 17.3×10^3 和 19.7×10^3 CFU/ml。模拟样品检测结果显示,15 个样品中检测出 7 个阳性,并同时定量各样品中坚强芽孢杆菌的含量。本研究建立的坚强芽孢杆菌检测方法特异性强、操作时间短、灵敏度高,可为该菌的实际检测提供技术支持。

关键词 坚强芽孢杆菌;鞭毛蛋白;*hag* 基因;套式 PCR;荧光定量 PCR

中图分类号 S917 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2015)03-0068-06

益生菌(Probiotics)在水产养殖中的应用倍受重视,不仅可以改善水体、促进水生动物生长,还能够通过非特异性免疫增强其免疫力和抗病性,具有十分显著的效果(王艳池等, 2011; Dalmin *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2005; Sakata, 1990)。芽孢杆菌(*Bacillus*)作为有益菌中的主要种类,现已受到广大研究者的青睐,其中坚强芽孢杆菌(*Bacillus firmus*)在增强免疫力、抵抗白斑综合征病毒(White Spot Syndrome Virus, WSSV)侵染方面有显著作用(刘君等, 2012; 孙艳等, 2012)。中国水产科学研究院黄海水产研究所养殖生物疾病控制与分子病理学研究室已分离得到两株坚强芽孢杆菌,PC004 分离自中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)养殖环境;PC024 分离自对虾肠道,两株菌均对 WSSV 感染具有抑制作用(刘君等, 2012)。

益生菌在生产中已得到广泛应用,市场上已经出

现了许多益生菌相关产品,快速特异的益生菌检测技术是评估实际使用效果、监测益生菌动态以及鉴定相关产品质量等的必要手段。但专门针对有益菌的快速特异性的检测方法很少报道,多数是基于非特异的简单平板计数法,研究中也有采用 16S rDNA 测序或 16S–23S rDNA 测序分析方法。16S rDNA 序列分析已广泛用于细菌的属、种和科的鉴定(Amann *et al.*, 1995; Woese, 1987),而 16S–23S rDNA 分析方法可有效区分形态、分类地位相近的细菌,成为细菌种和亚种水平分类鉴定的有利工具(Jensen *et al.*, 1993)。本实验室先前的研究表明,坚强芽孢杆菌 16S–23S rDNA 间区(ISR)存在多态性(王海亮等, 2013),用其对菌株鉴定存在难度。基于核糖体 rDNA 的细菌鉴定方法也需要投入较多的时间和资金,在细菌快速、特异性检测方面并不能作为首选方法,更很难在实际生产中应用。

* 公益性行业科研专项经费项目(201103034)、现代农业产业技术体系(CARS-47)、山东省泰山学者建设工程专项经费和农业部科研杰出人才和创新团队专项经费共同资助。许彦芬, E-mail: xuyanfen1988@126.com

① 通讯作者:黄 健,研究员, E-mail: huangjie@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2014-05-04, 收修改稿日期: 2014-06-24

因此, 开发针对特定种株的特异性检测方法十分必要。

细菌鞭毛蛋白基因(*hag*)包含保守区和可变区, 可作为细菌分类的标记之一(胡梁斌等, 2008; 梁海鹰等, 2010; Asano *et al*, 2001)。Asano 等(2001)依据 *hag* 基因将 60 株枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)分为两个亚组。该基因可变区还曾用于气肿疽梭菌(*Clostridium chauvoei*)的特异性检测(Kojima *et al*, 2001)。本研究采用坚强芽孢杆菌鞭毛蛋白的 *hag* 基因, 建立针对该菌的高效且特异的检测方法, 将为该菌株的产业化应用提供有效的检测手段。

1 材料与方 法

1.1 菌株

坚强芽孢杆菌菌株 PC004 和 PC024 为中国水产科学研究院黄海水产研究所海水养殖生物疾病控制与分子病理学研究室于 2010 年 5 月鉴定并保藏, 枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)、短小芽孢杆菌(*B. pumilus*)、地衣芽孢杆菌(*B. licheniformis*)、蜡样芽孢杆菌(*B. cereus*)、白翎芽孢杆菌(*B. baekryungensis*)、溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)为本实验室保存的菌株。于 2013 年 5 月, 进行各菌株的扩大培养。

1.2 细菌培养和 gDNA 的制备

接种坚强芽孢杆菌 PC004 和 PC024、枯草芽孢杆菌、短小芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、蜡样芽孢杆菌、白翎芽孢杆菌、溶藻弧菌于 2216E 液体培养基(胰酪 5 g, 酵母抽提物 1 g, FeSO₄ 0.01 g, 海水 1 L), 37℃ 180 r/min 振荡过夜培养。取 6 ml 菌液 10000×g (HITACHI Centrifuge CT15E)离心 2 min, 弃去上清液, 收集菌体。按照细菌基因组 DNA 提取试剂盒(天根, 北京)的步骤进行细菌基因组 DNA 的提取, 经 NanoDrop 2000c 进行核酸浓度的测定, 作为 PCR 扩增的模板。

1.3 坚强芽孢杆菌 *hag* 基因可变区的克隆

采用枯草芽孢杆菌 *hag* 基因扩增用 Bhag 引物(Asano *et al*, 2001), 以菌株 PC024 gDNA 为模板, 扩增坚强芽孢杆菌 *hag* 部分片段。25 μl PCR 反应体系内含 1×*Ex Taq* Buffer (含 Mg²⁺)、0.2 mmol/L dNTP、引物各 10 pmol、0.625 U *Ex Taq* DNA 聚合酶(TaKaRa, 大连)、模板 DNA 约 30 ng。反应程序: 94℃ 预变性 10 min; 94℃ 50 s, 45.2℃ 1 min, 72℃ 1 min, 35 个循环; 72℃ 10 min。

PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳, 用 Zymoclean 凝胶 DNA 回收试剂盒(Zymo, 美国)回收核酸, 与 pMD18-T 克隆载体进行链接并转化于 *E. coli* DH5α 感受态细胞(TaKaRa, 大连)中, 阳性克隆经 PCR 验证后送上海生工生物有限公司测序。

1.4 坚强芽孢杆菌的套式 PCR 检测

根据克隆测序得到的坚强芽孢杆菌 *hag* 基因的中间可变区序列, 用 Primer Premier 5 设计两对引物(表 1)。用套式 PCR 检测坚强芽孢杆菌 PC004 和 PC024, 枯草芽孢杆菌、短小芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、蜡样芽孢杆菌、白翎芽孢杆菌和溶藻弧菌等 8 株海洋细菌, 以检测引物的特异性。

第一步采用外引物对 BfhoF/BfhoR。50 μl 体系含 1×*Ex Taq* Buffer (含 Mg²⁺)、0.2 mmol/L dNTP、引物各 10 pmol、1.25 U *Ex Taq* DNA 聚合酶、模板 DNA 约 30 ng。程序: 94℃ 10 min; 94℃ 50 s, 59℃ 20 s, 72℃ 20 s, 循环数 20; 72℃ 10 min。

第二步采用内引物对 BfhiF/BfhiR。模板为第一步 PCR 产物的 10 倍或 100 倍稀释物。50 μl 体系含 1×*Ex Taq* Buffer (含 Mg²⁺)、0.2 mmol/L dNTP、引物各 10 pmol、1.25 U *Ex Taq* DNA 聚合酶、稀释的 PCR 产物 1 μl。程序: 94℃ 5 min; 94℃ 50 s, 59℃ 20 s, 72℃ 20 s, 循环数 20; 72℃ 5 min。进行 4% 琼脂糖凝胶电泳。

表 1 本研究中所用的引物
Tab.1 Primers used in this study

引物 Primers	序列 Sequences (5'→3')	序列号 GenBank Number	引物位点 Primer site	来源 Source
Bhag-F	ATG AGA ATT AAC CAC AAT AT	M26948	545-564 nt	Asano <i>et al</i> , 2001
Bhag-R	GTT GGT TTG CTT GAG CAA GC		1408-1427 nt	
BfhoF	CAT TTG ACG GAA CTA CAG GA	KC683536	868-887 nt	本研究 This study
BfhoR	CAG CGC TTC CAT CTG CAC G		1038-1056 nt	
BfhiF	GCT GCT GGG CCA GGA ACA G		906-924 nt	
BfhiR	TGC TTC TTT GCG AAC ACC		969-986 nt	

1.5 坚强芽孢杆菌的 FQ-PCR 检测方法

1.5.1 坚强芽孢杆菌的 FQ-PCR 特异性检测 过夜培养的菌体用血球计数板估算细菌总菌数后进行 10 倍梯度稀释, 所有菌株均选取 10^{-3} 稀释度的菌液(浓度 <40 CFU/ μ l)为模板, 采用 QuantiFast SYBR Green PCR Master Mix 试剂盒(Qiagen, 德国)进行扩增。20 μ l 体系含 2 \times SYBR Green Mix 10 μ l、Bfhi 引物(10 mmol/L)各 0.5 μ l、模板 1 μ l。FQ-PCR 检测采用 BIO-RAD CFX 系统进行。退火温度梯度选择 62.5–70.5 $^{\circ}$ C, 由软件自动生成温度梯度, 选择 63.1 $^{\circ}$ C、65.7 $^{\circ}$ C、69.2 $^{\circ}$ C 3 个温度进行实验。程序设置: 95 $^{\circ}$ C 5 min; 95 $^{\circ}$ C 10 s, 退火 20 s, 循环 40 次。

根据样品在 3 个退火温度下的检测结果, 确定合适的退火温度, 并在该温度下进行荧光定量 PCR 检测坚强芽孢杆菌菌株 PC004 和 PC024、枯草芽孢杆菌、短小芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、蜡样芽孢杆菌和白翎芽孢杆菌等。阳性对照模板为 Bfho PCR 产物 100 倍的稀释物, 空白对照为 dH_2O , 阴性对照为溶藻弧菌。每个样品设置两个平行。

1.5.2 坚强芽孢杆菌 FQ-PCR 检测极限的确定 坚强芽孢杆菌菌株 PC024 和 PC004 过夜培养菌液采用血球计数法估算细菌的总菌数(1×10^7 – 2×10^7 CFU/ml), 分别进行 10 倍梯度稀释, 取 10^{-2} – 10^{-7} 组稀释液用作 PCR 模板。每个处理组设置 3 个平行。体系组成和扩增程序同 1.5.1。

1.6 模拟样品的 FQ-PCR 检测

从本实验室中选取除坚强芽孢杆菌外的 11 株芽孢杆菌、1 株溶藻弧菌以及坚强芽孢杆菌 PC004 进行扩大培养, 过夜培养后, 13 株菌株随机组合于海水中并混匀, 共制备 15 个模拟样品, 各样品间菌的种类、数量、含量均不相同, 终体积均为 20 ml。坚强芽孢杆菌进行 10 倍梯度稀释, 取 10^{-1} – 10^{-6} 组稀释液 1 μ l 作为模板, 绘制标准曲线。样品组各取 1 μ l 菌液作为模板, 每个处理组均为 3 个平行, Bfhi 为引物, 进行 FQ-PCR 检测, 阳性对照模板为 Bfho PCR 产物 100 倍的稀释物, 空白对照为 dH_2O , 体系、程序同 1.5.1。

2 结果

2.1 坚强芽孢杆菌鞭毛蛋白可变区的克隆

采用 Bhag 引物扩增得到坚强芽孢杆菌 *hag* 基因为 1213 bp, 与 NCBI 数据库进行比对, 结果显示, 与枯草芽孢杆菌鞭毛蛋白的相似性为 13%–15%, 相

似性区域位于鞭毛蛋白的 N-端和 C-端保守区, 表明 *hag* 基因可变区不具备属的共性, 可根据中间可变区序列设计坚强芽孢杆菌的特异性检测引物。

坚强芽孢杆菌 *hag* 基因序列已由本实验室提交 GenBank 数据库, Accession No. KC683536。

2.2 套式 PCR 特异性检测结果

根据坚强芽孢杆菌 *hag* 基因核酸序列设计两对引物, 分别为外引物 Bfho 和内引物 Bfhi(表 1)。采用两步法套式 PCR 检测 8 株海洋细菌。外引物扩增片段的大小为 189 bp, 内引物的扩增大小为 81 bp。套式 PCR 的第二步检测结果(图 1)显示, 只有坚强芽孢杆菌 PC024 和 PC004 存在 81 bp 扩增子, 而其余各菌, 无论是进化上相近的芽孢杆菌还是相距甚远的革兰氏阴性菌(溶藻弧菌), 检测均为阴性。表明该方法可实现坚强芽孢杆菌的种特异性检测, 且整个操作过程周期只需 2 h。

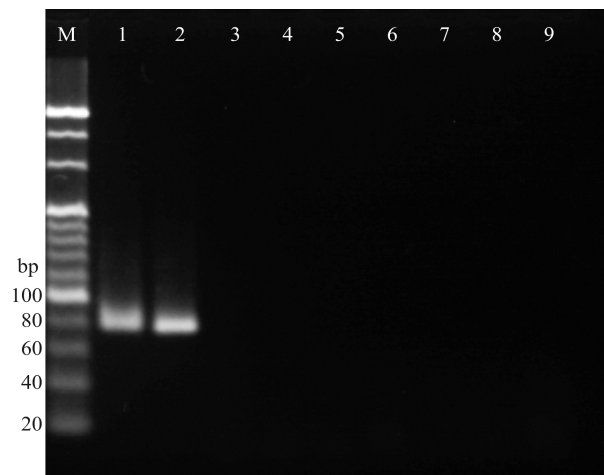


图 1 坚强芽孢杆菌的套式 PCR 特异性检测(Step II)
Fig.1 Step II of the nested PCR detection for *B. firmus*

M: 20 bp DNA marker (TaKaRa); 1 和 2: PC024 和 PC004;
3: 短小芽孢杆菌; 4: 枯草芽孢杆菌; 5: 地衣芽孢杆菌;
6: 蜡样芽孢杆菌; 7: 白翎芽孢杆菌; 8: 溶藻弧菌;
9: 空白对照

M: DL20 bp DNA marker, 1 and 2: PC024 and PC004,
3–8: *B. pumilus*, *B. subtilis*, *B. licheniformis*,
B. cereus, *B. baekryungensis*, and *V. alginolyticus*,
respectively; 9: Blank control

2.3 FQ-PCR 特异性检测结果

采用荧光定量 PCR 对 8 株细菌进行检测。Bfhi 退火温度梯度在 63.1 $^{\circ}$ C 和 65.7 $^{\circ}$ C 时, 地衣芽孢杆菌、短小芽孢杆菌和枯草芽孢杆菌的扩增曲线在 33 个循环以上开始有上升趋势; 而在 69.2 $^{\circ}$ C 时, 只有阳性对

照和坚强芽孢杆菌组的扩增曲线出现上升, 但温度过高降低了反应效率。综合考虑, 最终选取 66.5°C 作为退火温度进行荧光定量 PCR 检测。检测结果显示(图 2), 阳性对照组 C_q 为 13, 坚强芽孢杆菌 PC004 和 PC024 的 C_q 分别为 28 和 29, 其余各组以及空白对照组在 40 个循环内均无有效扩增。

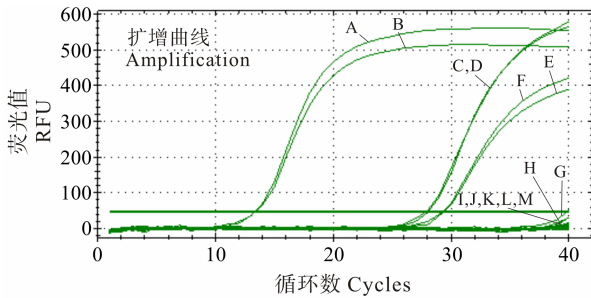


图 2 坚强芽孢杆菌 FQ-PCR 的特异性检测
Fig.2 FQ-PCR detection for *B. firmus*

A, B. 阳性对照组; C, D. 坚强芽孢杆菌菌株 PC004; E, F. 坚强芽孢杆菌菌株 PC024; G. 地衣芽孢杆菌; H. 溶藻弧菌; I, J, K, L, M: 分别为枯草芽孢杆菌、蜡样芽孢杆菌、白翎芽孢杆菌、短小芽孢杆菌和空白对照组
A, B. Positive control; C, D. *B. firmus* PC004; E, F. *B. firmus* PC024; G. *B. licheniformis*; H. *V. alginolyticus*; I, J, K, L, and M: *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. baekryungensis*, *B. pumilus*, and negative control, respectively

2.4 坚强芽孢杆菌 FQ-PCR 检测限确定

以坚强芽孢杆菌菌株 PC004 (浓度 1.73×10^9 CFU/ml) 和 PC024 (浓度 1.97×10^9 CFU/ml) 梯度稀释的菌液为模板, 分析 FQ-PCR 的检测限。

结果显示(图 3-A), 坚强芽孢杆菌 PC004 的 10^{-2} – 10^{-5} 稀释度组(从左到右浓度依次降低)的 C_q 值呈梯

度变化, 但 10^{-6} 和 10^{-7} 稀释度组不再继续呈现梯度。 10^{-6} 稀释度组有两个平行有效扩增, 而 10^{-7} 稀释度组只有 1 个平行扩增, 所以菌液稀释 10^6 倍后达到 FQ-PCR 检测限, 该稀释度的细菌浓度为 17.3×10^2 CFU/ml。

坚强芽孢杆菌 PC024 的检测结果(图3-B)中, 10^{-2} – 10^{-5} 稀释度组(从左到右浓度依次降低)的 C_q 值呈梯度变化, 10^{-6} 稀释度组各平行间的 C_q 值波动性变大, 但检测仍为阳性, 而 10^{-7} 稀释度组检测为阴性。因而, 坚强芽孢杆菌 PC024 菌液稀释 10^6 倍后检测也达到检测限, 此时细菌浓度为 19.7×10^2 CFU/ml。

其余各菌和空白对照均无有效扩增。

2.5 样品检测结果

针对制备的 15 个模拟样品的实时定量检测, 其中 1、2、6、8、9、11、13 共 7 个出现阳性扩增, 剩余的 8 个为阴性, 与预期结果一致。根据标准曲线计算各阳性组中坚强芽孢杆菌的含量, 结果见表 2。

3 讨论

微生物的 PCR 或 qPCR 检测方法多是针对病原微生物建立的。本研究建立了广泛使用的益生菌坚强芽孢杆菌的高灵敏、特异性的套式 PCR 和荧光定量 PCR 检测技术, 对于益生菌应用的必要性分析、应用效果评价、产品质量检测以及微生态状况分析等都将具有重要的价值。

细菌鞭毛蛋白包含 N-端、C-端保守区和中间可变区, 可变区序列可作为细菌分类的依据(Asano *et al*, 2001)和特异性检测的靶区(梁海鹰等, 2010)。坚强芽孢杆菌和枯草芽孢杆菌有较近的进化关系(王海亮等,

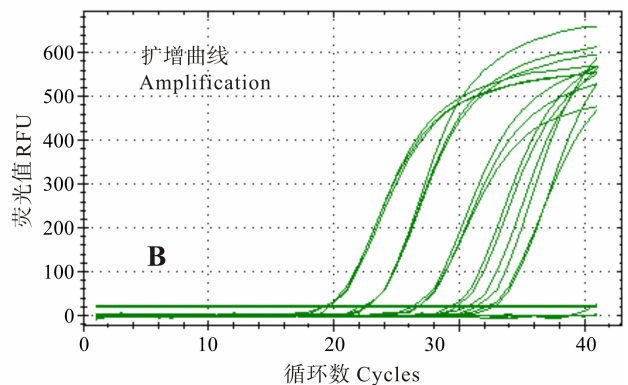
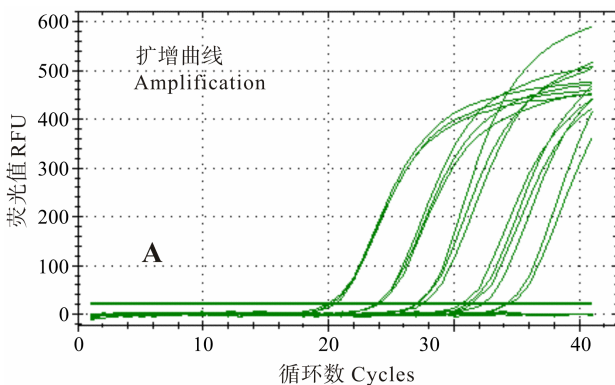


图 3 坚强芽孢杆菌的 FQ-PCR 检测极限确定
Fig.3 Detection limit of FQ-PCR for *B. firmus*

A. 坚强芽孢杆菌 PC004; B. 坚强芽孢杆菌 PC024
A. *B. firmus* PC004; B. *B. firmus* PC024

表2 15个样品的FQ-PCR检测的定量结果

Tab.2 The results FQ-PCR detection of 15 bioflocs (Mean±SD)

样品编号 Sample Number	<i>B. firmus</i> 含量 <i>B. firmus</i> number (CFU/ml)	样品编号 Sample Number	<i>B. firmus</i> 含量 <i>B. firmus</i> number (CFU/ml)
1	$6.80 \times 10^5 \pm 9.00 \times 10^4$	9	$4.27 \times 10^4 \pm 3.30 \times 10^3$
2	$4.75 \times 10^5 \pm 2.50 \times 10^4$	10	—
3	—	11	$1.35 \times 10^7 \pm 5.00 \times 10^5$
4	—	12	—
5	—	13	$1.55 \times 10^6 \pm 2.50 \times 10^5$
6	$1.53 \times 10^6 \pm 8.75 \times 10^5$	14	—
7	—	15	—
8	$1.9 \times 10^4 \pm 8.00 \times 10^3$		

— 阴性结果 Negative

2013), 因此, 利用枯草芽孢杆菌 *Bhag* 引物成功克隆得到了坚强芽孢杆菌 *hag* 基因的部分序列(1213 bp), 其中包含有该基因的中间可变区。坚强芽孢杆菌 *hag* 基因中间可变区序列与其他芽孢杆菌存在显著差异, 这为利用该基因建立坚强芽孢杆菌特异性检测方法奠定了基础。

基于细菌核糖体 rDNA 进行细菌鉴定和分类的方法, 如 16S rDNA 序列分析法和 16S-23S rDNA 间区分析法, 耗时较长且需要测序和序列比对分析, 不适用于做特定菌种的快速检测方法。而本研究根据坚强芽孢杆菌 PC024 鞭毛蛋白编码基因中间区域设计了一对套式引物, 并用套式 PCR 实现了对坚强芽孢杆菌的特异性检测。此外, 利用内引物 *Bfhi* 还建立了针对该菌的 FQ-PCR 检测方法。这两种方法均可实现坚强芽孢杆菌的快速特异性检测。

本研究测试了 FQ-PCR 法对坚强芽孢杆菌的检测限, 两株坚强芽孢杆菌的检测限比较接近, 分别为 17.3×10^3 和 19.7×10^3 CFU/ml。按照细菌浓度推定, 该方法基本可以实现单个细菌的检测。

本研究以生物絮团样品为例进行实际样品检测, 15 个样品只有 3 个得到扩增, 但扩增曲线上循环数均较高, 说明样品中含坚强芽孢杆菌量很少。通常, 芽孢杆菌是水产养殖常用的益生菌, 但多为枯草芽孢杆菌(于明超等, 2007), 坚强芽孢杆菌很少出现, 该结果与这一情况相符, 说明该方法可以用于实际样品的检测。

致谢: 本实验室王志杰、王磊为本研究提供了生物絮团样品, 关广阔、何晓东在实验上给予了帮助,

在此表示衷心感谢。

参 考 文 献

- 于明超, 李卓佳, 文国樑. 芽孢杆菌在水产养殖应用中的研究进展. 广东农业科学, 2007(11): 78-81
- 王艳池, 王宇. 有益微生物在水产养殖中的应用. 河北渔业, 2011(10): 60-61
- 王海亮, 李赞, 董萍萍, 等. 坚强芽孢杆菌(*Bacillus firmus*) 16S-23S rDNA 间区的克隆及多态性分析. 海洋与湖沼, 2013, 44(2): 519-524
- 刘君, 宋晓玲, 刘莉, 等. 2 株消化道优势菌对凡纳滨对虾免疫酶活性和抗白斑综合征病毒感染力的影响. 水产学报, 2012, 36(3): 444-450
- 孙艳, 刘飞, 宋晓玲, 等. 饲料中添加益生菌对凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 非特异性免疫基因表达量和抗病力的影响. 海洋与湖沼, 2012, 43(4): 845-851
- 胡梁斌, 杨静东, 章挺, 等. 枯草芽孢杆菌 B-FS01 鞭毛蛋白 FCD 基因克隆与拮抗活性. 扬州大学学报(农业与生命科学版), 2008, 29(3): 84-87
- 梁海鹰, 夏立群, 吴灶和, 等. 溶藻弧菌 HY9901 鞭毛蛋白 *flaB* 基因的克隆及原核表达. 水产学报, 2010, 34(1): 139-146
- Amann RI, Ludwig W, Schleifer H. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. Microbiol Rev, 1995, 59(1): 143-169
- Asano Y, Onishi H, Tajima K, et al. Flagellin as a biomarker for *Bacillus subtilis* strains; application to the DB9011 strain and the study of interspecific diversity in amino-acid sequences. Biosci Biotechnol Biochem, 2001, 65(5): 1218-1222
- Dalmin G, Kathiresan K, Purushothaman A. Effect of probiotics on bacterial population and health status of shrimp in culture pond ecosystem. Ind J Exp Biol, 2001, 39(9): 939-942
- Jensen M, Webster J, Straus N. Rapid identification of bacteria on the basis of polymerase chain reaction-amplified ribosomal DNA spacer polymorphisms. Appl Environ Microbiol, 1993, 59(4): 945-952
- Kojima A, Uchida I, Sekizaki T, et al. Rapid detection and identification of *Clostridium chauvoei* by PCR based on flagellin gene sequence. Vet Microbiol, 2001, 78(4): 363-371
- Sakata T. Microflora in the digestive tract of fish and shellfish. Microbiology in Poecilotherms, 1990: 171-176
- Wang YB, Xu ZR, Xia MS. The effectiveness of commercial probiotics in Northern White Shrimp (*Penaeus vannamei*) ponds. Fish Sci, 2005, 71(5): 1036-1041
- Woese CR. Bacterial evolution. Microbiol Rev, 1987, 51(2): 221-271

(编辑 冯小花)

Establishment of Specific Detection Methods by Nested PCR and qPCR for *Bacillus firmus* Based on the *hag* Gene

XU Yanfen^{1,2}, WANG Hailiang¹, CHEN Datian^{1,2}, SONG Xiaoling^{1,3}, HUANG Jie^{1,2,3}①

(1. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 2. Shanghai Ocean University, Shanghai 201306; 3. National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266071)

Abstract *Hag*, a Flagellin coding gene, has conserved domains on the ends and a central domain that is highly variable in the length and the sequence, and hence has been used as a molecular marker in bacterial classification and identification. In this study, the *hag* gene was amplified from *Bacillus firmus* with the primer set Bhag, which was designed based on the conserved regions of the *hag* gene of *B. subtilis* and other bacteria. Two primer sets, Bfho and Bfhi, were designed based on the obtained sequence of *hag* of *B. firmus* and were used in the nested PCR for the species-specific detection of *B. firmus*. Furthermore we developed another specific detection method using fluorescent quantification PCR based on the inner primer set Bfhi, and tested the detection limit. Some simulated samples were tested with this FQ-PCR method and in the positive samples the concentrations of *B. firmus* were determined with the same method. The sequence of *hag* cloned from *B. firmus* had 1213 bp and was only 13%–15% similar to that of *B. subtilis* according to NCBI BLAST, and most differences existed in the variable region. The detection limits of the FQ-PCR method were 17.3×10^3 CFU/ml and 19.7×10^3 CFU/ml for *B. firmus* strains PC004 and PC024 respectively. In 15 simulated samples, 7 were detected positive with the FQ-PCR method, and the concentrations of *B. firmus* in the samples were determined as well. The detection methods developed in our study have technical advantages such as high specificity, time-saving, and high sensitivity, and thus may become valuable tools in the practical application.

Key words *Bacillus firmus*; Flagellin; *hag* gene; Nested PCR; Fluorescent quantitative PCR

① Corresponding author: HUANG Jie, E-mail: huangjie@ysfri.ac.cn