

坚强芽孢杆菌(*Bacillus firmus*)16S—23S rDNA 间区的克隆及多态性分析

王海亮^{1,2} 李 赟¹ 董萍萍¹ 宋晓玲² 黄 捷²

(1. 中国海洋大学水产学院 青岛 266003; 2. 中国水产科学院黄海水产研究所 青岛 266071)

摘要 采用 16S 和 23S rDNA 保守区设计的引物对两株坚强芽孢杆菌(*Bacillus firmus*)16S—23S rDNA 间区(Intergenic spacer region, ISR)进行了 PCR 扩增, 并克隆到 pMD18-T 载体上进行测序; 利用生物信息学进行了 16S—23S rDNA 间区序列及其内所含 tRNA 基因的分析。2 株坚强芽孢杆菌共得到 11 条 16S—23S rDNA 间区特征区带(包括 300、400、500 和 600bp 等)序列, ISR 类型包括 ISR⁰、ISR^G、ISR^{IA} 和 ISR^{GLV} 四种, 其中 ISR⁰、ISR^G 和 ISR^{IA} 可能在坚强芽孢杆菌中普遍存在。相同类型的 ISR 序列具有较高的相似性(达 52.2%—100.0%), 而不同类型的 ISR 序列间差异较大。此外, ISR 序列在靠近 16S 和 23S 区域存在不同长度的保守区域, 可能成为针对坚强芽孢杆菌特异性检测的引物和探针的靶区, 这也为坚强芽孢杆菌新的检测方法的建立奠定了基础。坚强芽孢杆菌的 16S—23S rDNA 间区序列及其多态性分析均为首次报道。

关键词 坚强芽孢杆菌; 16S—23S rDNA 间区; tRNA 基因; 多态性分析

中图分类号 Q346

利用 16S rDNA 基因已成为细菌的种、属和科鉴定的标准方法(Woese, 1987; Amann *et al*, 1995)。某些细菌的 16S rDNA 序列却十分相似(Ash *et al*, 1991; Stackebrandt *et al*, 1994; Chun *et al*, 1999), 利用此种方法不能有效地区分。而细菌的 16S—23S rDNA 间区进化速率比 16S rDNA 快 10 多倍(Gurtler *et al*, 1996), 是利用 rDNA 基因进行细菌种、属鉴定的良好补充, 还可有效区分形态、分类地位相近的细菌, 成为对细菌在种和亚种水平上进行分类鉴定的有力工具(Jensen *et al*, 1993), 在细菌的鉴定与分类学上的应用愈加广泛。

芽孢杆菌作为益生菌(probiotics)的主要组成之一, 在水产养殖的水环境调控、病原控制和健康养殖中已广泛应用(Moriarty, 1998; Rengpipat *et al*, 2000; Farzanfar, 2006; Guo *et al*, 2009; Liu *et al*, 2010; 邓应能等, 2012; 刘君等, 2012; 孙艳等, 2012)。本实验室

在前期研究中, 从对虾肠道中分离到对白斑综合征病毒(white spot syndrome, WSSV)感染具有抑制作用的一株坚强芽孢杆菌(*Bacillus firmus*) (PC024), 还从中国对虾养殖环境中分离到了一株坚强芽孢杆菌(PC004)。为了区分这两株坚强芽孢杆菌的分类关系, 本文对这两株坚强芽孢杆菌野生菌株的 16S—23S rDNA 间区进行克隆、测序, 对得到的 11 条 ISR 序列进行分析, 以期阐明 2 株坚强芽孢杆菌 16S—23S rDNA ISRs 的种内关系。目前未见有关坚强芽孢杆菌特异性检测和 16S—23S rDNA 间区结构分析的报道, 本文的研究将为坚强芽孢杆菌新的检测方法的建立奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌株和试剂

选用的 2 株芽孢杆菌均为中国水产科学研究院

* 公益性行业(农业)科研专项经费资助, 201103034 号; 现代农业产业技术体系专项资金资助, CARS-47 号。王海亮, 硕士研究生, E-mail: whl846130@126.com

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

收稿日期: 2012-05-29, 收修改稿日期: 2012-07-24

黄海水产研究所海水养殖生物疾病控制与分子病理学实验室(病研室)分离、鉴定并保藏。所用引物和PCR产物测序工作均委托上海生工完成。*Ex Taq* DNA聚合酶、pMD18-T载体、*Escherichia coli* DH5 α 、DL2000 DNA marker和DL15000 DNA marker均购自TaKaRa公司。细菌基因组DNA提取试剂盒为天根细菌基因组DNA提取试剂盒(离心柱型)。PCR产物采用Zymoclean凝胶DNA回收试剂盒(Gel DNA Recovery Kit, Zymo)进行胶回收。

1.2 方法

1.2.1 菌株培养和模板DNA的制备 接种4℃保藏的菌种于2216E液体培养基, 37℃ 180r/min振荡培养16h。取6ml菌液10000g (HITACHI Centrifuge CT15E)离心2min, 弃去上清, 收集菌体。按照天根细菌基因组DNA提取试剂盒的步骤进行细菌基因组DNA的提取, 并将其作为PCR模板DNA。

1.2.2 16S rDNA序列分析与系统发育分析 用细菌16S rDNA通用引物, 正向引物27F: 5' AGA GTT TGA TC(C/A) TGG CTC AG 3', 反向引物1492R: 5' TAC GG(C/T) TAC CTT GTT ACG ACT T 3'对两株菌进行PCR扩增。得到的PCR产物由上海生工进行测序。

两株菌的16S rDNA序列与NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)的GenBank数据库中获得其它细菌的16S rDNA序列, 用Clustal X (1.83)软件进行多序列比对(multiple alignments), 并用MEGA 4进行聚类分析, 采用邻接法(neighbor joining methods)构建系统发育树。

1.2.3 16S—23S rDNA间区扩增 采用Jensen等(1993)根据16S和23S rRNA序列保守区设计的对应引物, 分别为16S端的特异性引物G1 5' GAA GTC GTA ACA AGG 3'和23S端的特异性引物L1 5' CAA GGC ATC CAC CGT 3'。25 μ l PCR反应体系内含2.5 μ l 10 \times *Ex Taq* buffer (含Mg²⁺), 2 μ l dNTP Mixture (各2.5mmol/L), 上下游引物(10 μ mol/L)各1 μ l, 0.125 μ l *Ex Taq* DNA聚合酶(5U/ μ l), 模板DNA约30ng。反应在热循环仪(Veriti 96-well Thermal Cycler, ABI)上进行, 参数设置如下: 94℃ 10min; 94℃ 1min, 55℃ 7min, 72℃ 2min, 循环25次; 72℃ 7min。反应完毕后分别取4 μ l进行2%琼脂糖凝胶电泳, 凝胶成像系统(培清JS-680B)成像并拍照。

1.2.4 PCR产物的克隆和测序 PCR产物经2%琼脂糖凝胶电泳后用Zymoclean凝胶DNA回收试剂盒进行切胶回收, 并用NanoDrop 2000c (Thermo Scien-

tific)测定其DNA含量。按照TaKaRa克隆试剂盒推荐的载体DNA: 插入片段DNA = 1:2—10的摩尔比, 在冰上添加pMD18-T载体和胶回收后DNA, 添加dH₂O (Solarbio)补齐至5 μ l, 加入5 μ l Solution I。16℃连接40min。10 μ l连接产物转化40 μ l *E. coli* DH5 α 。在LB平板(含氨苄青霉素50 μ g/ml)进行转化子的筛选, 恒温培养箱37℃过夜培养14—16h左右。

分别随机挑取单菌落用pMD18-T载体通用引物M13-47/RV-M (浓度均为10 μ mol/L)进行菌落PCR筛选阳性转化子。PCR采用25 μ l体系(组成同方法1.2.3)。PCR仪参数设置为: 94℃热变性5min; 94℃ 50s, 55℃ 30s, 72℃ 30s, 30个循环; 72℃延伸10min。经2%琼脂糖凝胶电泳检测, 阳性转化子的未纯化PCR产物由上海生工完成序列测定。

1.2.5 序列比较与分析 用DNASTAR软件包中的MegAlign程序对16S—23S rDNA间区序列进行相似性比对分析。用Accelrys Gene软件进行间区内tRNA基因的分析。

2 结果与分析

2.1 坚强芽孢杆菌16S rDNA的系统发育分析

为了验证PC004和PC024两株菌的分类地位, 测定了这两株菌的16S rDNA序列, 并从GenBank数据库中选择18条芽孢杆菌16S rDNA序列构建系统发育树(图1)。比对结果显示PC004和PC024很自然地与坚强芽孢杆菌聚成一支。证实本实验所采用的两株菌均为坚强芽孢杆菌。

2.2 坚强芽孢杆菌16S—23S rDNA间区PCR扩增及电泳图分析

用细菌16S—23S rDNA间区两端16S/23S rDNA保守序列, 参照Jensen等(1993)设计的引物和PCR程序对2株坚强芽孢杆菌进行扩增。两株芽孢杆菌的16S—23S rDNA间区呈现明显的长度多态性, 均能扩增至少5条大小不等的条带, 分别在300bp、350bp、400bp、500bp和600bp左右, 大小分布于250—1000bp范围内(图2), 表明两株菌中均存在多个*rrn*操纵子(*rrn* operon), 不同株系间ISR也可能存在保守区。此外, PC024株除具有PC004株的5条特征带外, 还具有750bp和1000bp的条带, 表明两株芽孢杆菌的ISR存在可变性和种内差异性。两株芽孢杆菌的16S—23S rDNA ISR不仅呈现明显的长度多态性, 而且各带明暗不均, 说明它们在两株菌内的拷贝数也不尽相同。300bp、400bp和600bp的特征带的亮度

明显高于其它带, 说明它们存在相对较高的拷贝数。

2.3 16S—23S rDNA ISRs 克隆测序

2 株坚强芽孢杆菌 ISR 特征带分别进行克隆, 共获得 11 条 ISR 序列。每个克隆片段 5'、3'端的序列分别与 16S、23S rDNA 保守序列相一致, 表明 PCR 产物为细菌 16S—23S rDNA 间区序列。根据 16S rDNA 3'端(5'CACCTC CTT 3')和 23S rDNA 5'端(5' GGT TA 3')的保守序列去除 ISR 两端的 rDNA 序列, 但是保留保守序列, 以便对 ISR 序列进行分析。

2.4 ISRs 序列相似性分析

利用 DNASTAR 中 MegAlign 程序对测序得到的两株菌的 11 条 ISR 序列进行相似性比对分析(表 1)。结果表明, 同一菌株中不同大小的 ISR 序列和相同大小的序列在不同株系中都具有不同程度的相似性。尤其是, 两株菌(PC004/PC024)中 300bp、400bp 和 600bp ISR 高拷贝特征带(分别为 PC004/PC024-300、PC004/PC024-400 和 PC004/PC024-600)具有很高的相似性, 分别达到 96.4%、98.7% 和 100.0%, 低拷贝特征带 PC004-500 和 PC024-500 序列相似性达 100%。

2.5 ISRs 类型及其结构分析

根据含有的 tRNA 基因的种类不同, ISR 类型可分为有 ISR^{GLAV}、ISR^{GLV}、ISR^{IA}、ISR^G、ISR^A 和 ISR⁰ 六类(邓先余等, 2006)。利用 Accelrys Gene 软件对每条 ISR 序列中的 tRNA 基因进行分析(图 3), 结果坚强芽孢杆菌 ISR 类型主要有 ISR⁰、ISR^G、ISR^{IA} 和 ISR^{GLV} 四类, 各 ISR 内含有的 tRNA 基因的数目为 0—3 不等。PC004 株 ISR 类型只有 ISR⁰、ISR^G 和 ISR^{IA} 三种, 而 PC024 株 ISR 类型有 ISR⁰、ISR^G、ISR^{IA} 和 ISR^{GLV} 四类。相同类型的 ISR 序列长度存在多态性(图 3), ISR⁰ 存在 161bp、223bp、322bp、221bp、292bp 和 316bp 六种 ISR; ISR^G 长度均为 445bp; ISR^{IA} 存在 523bp 和 522bp 两种, 两者相差一个核苷酸, PC024-600 在 PC004-600 359 位置缺失一个 T; ISR^{GLV}

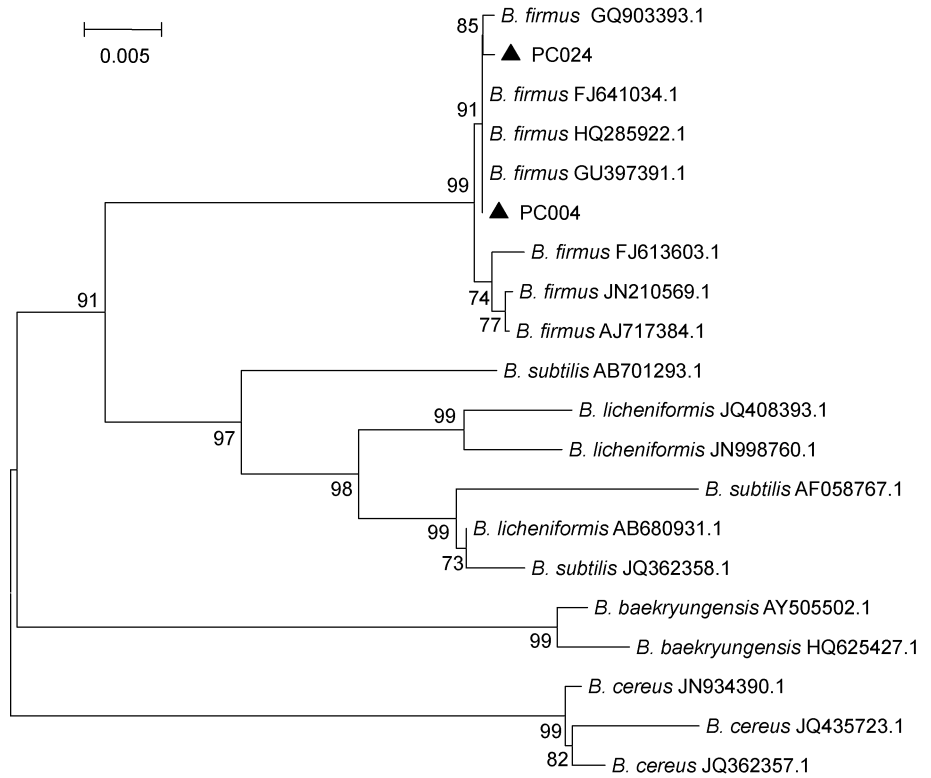


图 1 坚强芽孢杆菌 PC004 和 PC024 基于 16S rDNA 序列的系统发育树

Fig.1 Phylogenetic tree based on 16S rDNA sequences of *B. firmus* strains PC004 and PC024
注: 图中 “▲” 分别代表 PC004 和 PC024

长度为 698bp。ISR⁰ 因不含任何 tRNA 基因片段最短, ISR^{GLV} 含有 tRNA^{Glu}、tRNA^{Lys}、tRNA^{Val} 基因而最长。

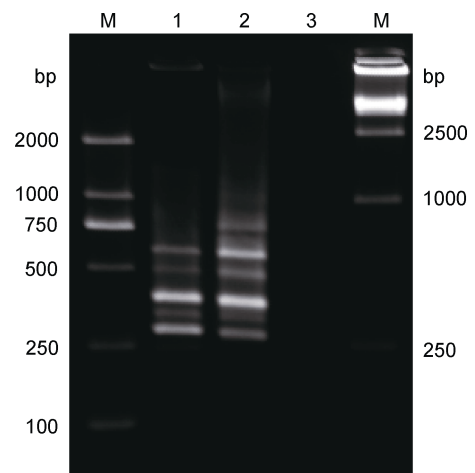


图 2 两株坚强芽孢杆菌 16S—23S rDNA 间区的 PCR 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳

Fig.2 Agarose gel electrophoresis of amplified PCR products of 16S—23S rDNA intergenic spacer regions of two strains of *B. firmus*

注: 泳道 M 分别为 DL2000 DNA marker 和 DL15000 DNA marker, 泳道 1—3 分别为 PC004、PC024 和空白对照

表 1 坚强芽孢杆菌 16S—23S rDNA ISR 序列相似性
Tab.1 Similarities of 16S—23S rDNA ISR sequences of *B. firmus*

PC004-25 0 ISR ⁰	PC004-30 0 ISR ⁰	PC004-40 0 ISR ⁰	PC004-50 0 ISR ^G	PC004-60 0 ISR ^{IA}	PC024-300 ISR ⁰	PC024-350 ISR ⁰	PC024-400 ISR ⁰	PC024-500 ISR ^G	PC024-600 ISR ^{IA}	PC024-750 ISR ^{GLV}	类型
	53.4	52.8	14.9	39.8	52.2	10.6	53.4	10.6	39.8	18.0	PC004-250 ISR ⁰
		67.7	3.6	32.3	96.4	18.4	74.0	27.8	32.3	11.2	PC004-300 ISR ⁰
			4.0	71.1	66.5	4.8	98.7	4.3	71.1	7.5	PC004-400 ISR ⁰
				1.3	4.5	72.9	2.5	100.0	1.3	93.2	PC004-500 ISR ^G
					32.6	7.5	73.4	10.6	100.0	22.5	PC004-600 ISR ^{IA}
						8.1	72.9	8.1	32.6	8.1	PC024-300 ISR ⁰
							6.2	72.9	7.5	72.3	PC024-350 ISR ⁰
								19.6	73.4	7.9	PC024-400 ISR ⁰
									10.6	22.6	PC024-500 ISR ^G
										95.5	PC024-600 ISR ^{IA}
											PC024-750 ISR ^{GLV}

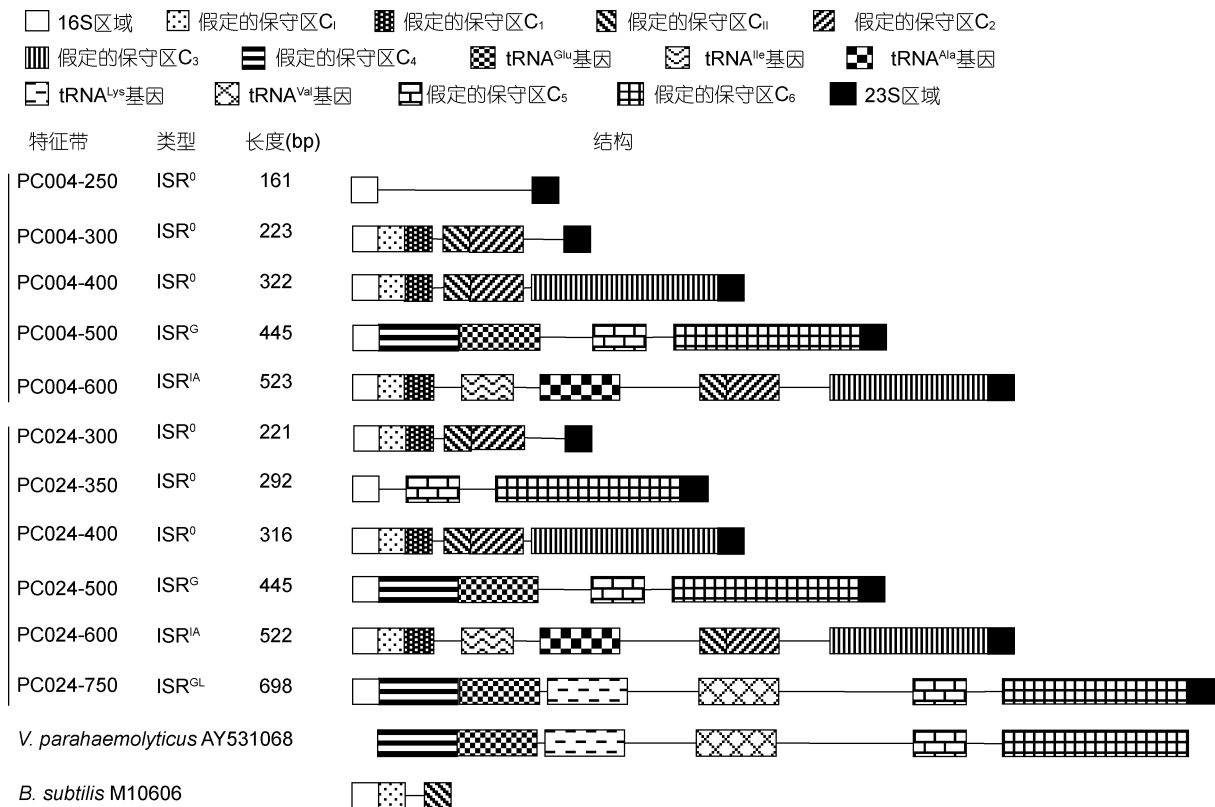


图 3 坚强芽孢杆菌 PC004 和 PC024 16S—23S rDNA 间区保守域结构分析

Fig.3 Structural analysis of the conserved domains in the 16S—23S rDNA ISRs of *B. firmus* strains PC004 and PC024

3 讨论

16S rDNA 是目前细菌种、属鉴定的常用手段之一, 16S—23S rDNA 间区也存在 16S rDNA 类似的保守区和可变区(Gurtler, 1999), 且片段较小, 在细菌种和亚种水平及相近细菌的分类、鉴定中应用愈加广泛。Jensen 等(1993)已利用 16S—23S rDNA 间区成功

鉴定了 8 属和 28 个种及相关的致病菌 300 余株。邓先余等(2004, 2006)对水产养殖中常见致病菌如溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)和副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)的 ISR 结构进行了报道。枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)作为革兰氏阳性菌的典型代表, 其基因组中含有 10 个 *rrn* 操纵子(Loughney *et al*, 1982; Shaver *et al*, 2001), 16S、23S rDNA 和 ISR 的 tRNAs

与大肠杆菌(*E. coli*)的非常相似,但是它们基因之间的序列并不相同(Loughney *et al.*, 1982)。枯草芽孢杆菌 16S—23S rDNA ISR 中存在 ISR^{IA} (Loughney *et al.*, 1982), ISR^{IA} 类型可能在革兰氏阳性菌中普遍存在(焦振泉等, 2001)。

坚强芽孢杆菌作为益生菌应用于水产养殖中,可以提高凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)免疫酶活性、免疫基因表达量和抗白斑综合征病毒(white spot syndrome virus, WSSV)感染能力(刘君等, 2012; 孙艳等, 2012), 可望成为对虾白斑综合征生物防控的途径之一(刘君等, 2012)。但是, 目前并未见坚强芽孢杆菌分子生物学特异性检测方法的报道, 也未见其 16S—23S rDNA 间区结构分析的报道。

本文对两株海洋野生菌株坚强芽孢杆菌的 16S—23S rDNA 间区进行了克隆、测序和基因结构的分析。两株坚强芽孢杆菌具有明显的 5 条特征带(图 2), 分别在 300bp、350bp、400bp、500bp 和 600bp 左右, 其中高拷贝的 300bp、400bp 和 600bp 的片段易于克隆得到, 而 350bp 和 500bp 的条带由于其拷贝数低, 在切胶回收时难与相邻的条带分开而不易得到其克隆, 比如, PC004-350 条带因随机选择测序数量有限而未得到其克隆。此外, 有些低拷贝的 ISR 条带(如 PC004-250)在紫外灯下或者电泳图中不可见, 但可能经克隆测序得到其序列, Maeda 等(2000)、邓先余等(2004)均有过类似报道。

对坚强芽孢杆菌 ISR 序列中的 tRNA 基因进行分析揭示, tRNA^{Glu}、tRNA^{Ile} 和 tRNA^{Ala} 等 tRNA 基因可能以单独或两者甚至以上组合的形式普遍存在于坚强芽孢杆菌 400bp 以上的 16S—23S rDNA ISR 序列中。在 ISR^{IA} 和 ISR^G 中的 tRNA^{Ile}、tRNA^{Ala} 和 tRNA^{Glu} 基因序列分别完全相同, ISR^G 与 ISR^{GLV} 中的 tRNA^{Glu} 基因序列也完全相同, ISR^{GLV} 中的 tRNA^{Glu}、tRNA^{Lys}、tRNA^{Val} 基因序列与副溶血弧菌(GenBank Accession: AY531068)的序列完全相同。

两株坚强芽孢杆菌普遍存在 ISR⁰、ISR^G 和 ISR^{IA} 三种间区类型, 经过序列相似性比对分析, 相同 ISR 类型(除 PC024-350 外)序列相似性达 52.2%—100.0%, 具有较高的相似性, 而不同 ISR 类型的种内序列相似性较低(表 1)。相同 ISR 类型中的少数碱基差异可能是由于个别碱基替代或者缺失而导致, 而 tRNA 基因的差异是造成不同 ISR 类型同源性较低的原因之一, 这在细菌 16S—23S rDNA ISR 中普遍存在(Gurtler, 1999)。

笔者认为坚强芽孢杆菌 ISR tRNA 基因两侧存在保守区。经核酸序列比对发现: PC004-300、PC004-400、PC004-600、PC024-300、PC024-400 和 PC024-600 可聚为组 I, PC004-500、PC024-350、PC024-500 和 PC024-750 可聚为组 II, PC004-250 为组 III; 组 I 在紧邻 16S 和 23S 的区域分别存在 63bp 和 54bp 的保守片段(图 3 中 C1 和 C2), 同时, 在枯草杆菌(GenBank Accession: M10606)中也发现了这两段保守片段中的部分序列, 分别为 5' TAA GGA TAT T 3'和 5' GTT CTT TGA AAA CTA GAT A 3' (图 3 中 CI 和 CII); 组 II (除 PC024-350 外)在靠近 16S 区域存在 88bp 保守片段(图 3 中 C4), 但在靠近 23S 区域都存在 35bp 和 163bp 的两段保守区(图 3 中 C5 和 C6), 在副溶血弧菌(GenBank Accession: AY531068)中也发现了高同源性序列; 组 III 并不存在上述所有典型的保守区域。邓先余等(2006)对病原弧菌 16S—23S rDNA 间区序列的研究也发现了 tRNA 基因侧翼可能的保守序列。笔者也认为, 这些非编码 tRNA 的区域可能是种内比较保守的区域, 可能成为针对坚强芽孢杆菌的特异性检测的引物和探针设计的靶区。

致谢 本实验室孙艳和赵培博士在菌株材料方面给予帮助, 耿伟光、刘群在实验方面给予协助, 谨致谢忱。

参 考 文 献

- 邓先余, 王智学, 何建国, 2004. 3 株杂色鲍致病菌——副溶血弧菌的 16S—23S rDNA 间区序列的分析. 微生物学报, 44(3): 304—308
- 邓先余, 王智学, 孙成波等, 2006. 3 株水产病原弧菌(*Vibrio*)的 16S—23S rDNA 间区(IGSs)的克隆、测序与分析. 海洋与湖沼, 37(2): 162—170
- 邓应能, 赵培, 孙运忠等, 2012. 生物絮团在凡纳滨对虾封闭养殖试验中的形成条件及作用效果. 渔业科学进展, 33(2): 69—75
- 刘君, 宋晓玲, 刘莉等, 2012. 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, 36(3): 444—450
- 孙艳, 刘飞, 宋晓玲等, 2012. 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, 43(4): 845—851
- 焦振泉, 刘秀梅, 2001. 细菌分类与鉴定的新热点: 16S—23S rDNA 间区. 微生物学通报, 28(1): 85—89
- Amann I, Ludwig W, Schleifer H, 1995. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. Microbiological Reviews, 59: 143—169
- Ash C, Farrow J, Dorsch M *et al.*, 1991. Comparative analysis of

- Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and related species on the basis of reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 41(3): 343—346
- Chun J, Huo A, Colwell R, 1999. Analysis of 16S—23S rRNA intergenic spacer regions of *Vibrio cholerae* and *Vibrio mimicus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(5): 2202—2208
- Farzanfar A, 2006. The use of probiotics in shrimp aquaculture. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 48: 149—158
- Guo J-J, Liu K-F, Cheng S-H *et al*, 2009. Selection of probiotic bacteria for use in shrimp larviculture. *Aquaculture Research*, 40: 609—618
- Gurtler V, 1999. The role of recombination and mutation in 16S—23S rDNA spacer rearrangements. *Gene*, 238: 241—252
- Gurtler V, Stanisich V, 1996. New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S—23S rDNA spacer region. *Microbiology*, 142: 3—16
- Jensen M, Webster J, Straus N, 1993. Rapid identification of bacteria on the basis of polymerase chain reaction-amplified ribosomal DNA spacer polymorphisms. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(4): 945—952
- Liu K-F, Chiu C-H, Shiu Y-L *et al*, 2010. Effects of the probiotic, *Bacillus subtilis* E20, on the survival, development, stress tolerance, and immune status of white shrimp, *Litopenaeus vannamei* larvae. *Fish and Shellfish Immunology*, 28: 837—844
- Loughney K, Lund E, Dahlberg J, 1982. tRNA genes are found between the 16S and 23S rRNA genes in *Bacillus subtilis*. *Nucleic Acids Research*, 10(5): 1607—1624
- Maeda T, Takada N, Furushita M *et al*, 2000. Structural variation in the 16S—23S rRNA intergenic spacers of *Vibrio parahaemolyticus*. *FEMS Microbiology Letters*, 192: 73—77
- Moriarty D, 1998. Control of luminous *Vibrio* species in penaeid aquaculture ponds. *Aquaculture*, 164: 351—358
- Rengpipat S, Rukpratanporn S, Piyatiratitivorakul S *et al*, 2000. Immunity enhancement in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) by a probiont bacterium (*Bacillus* S11). *Aquaculture*, 191: 271—288
- Shaver Y, Nagpal M, Fox K *et al*, 2001. Variation in 16S—23S rRNA intergenic spacer regions among *Bacillus subtilis* 168 isolates. *Molecular Microbiology*, 42(1): 101—109
- Stackebrandt E, Goebel B, 1994. Taxonomic note. A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 44: 846—849
- Woese R, 1987. Bacterial evolution. *Microbiological Reviews*, 51: 221—271

CLONING AND ANALYSIS OF THE POLYMORPHISM OF THE 16S—23S rDNA INTERGENIC SPACER REGIONS OF *BACILLUS FIRMUS*

WANG Hai-Liang^{1,2}, LI Yun¹, DONG Ping-Ping¹, SONG Xiao-Ling², HUANG Jie²
(1. Fishery College, Ocean University of China, Qingdao, 266003; 2. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao, 266071)

Abstract Using the primers targeting the conserved regions flanking the 3' end of the 16S and the 5' end of the 23S rDNAs, the 16S—23S rDNA intergenic spacer regions (ISRs) of two strains of *Bacillus firmus* were amplified with polymerase chain reaction (PCR). The amplified products were cloned into pMD18-T vector and sequenced, subsequently. The sequences and their contained tRNA genes were analyzed by bioinformatics methods. The sequences of 11 typical bands of ISRs (the length including 300bp, 400bp, 500bp, and 600bp, etc.) were obtained from the 2 strains of *B. firmus*. Analyses suggested that these sequences contain 4 types of polymorphic ISRs, namely, ISR^0 , ISR^G , ISR^{IA} and ISR^{GLV} . The types ISR^0 , ISR^G , and ISR^{IA} may widely exist in *B. firmus*. Furthermore, the comparative analysis showed the sequences of the same type of ISRs have higher identity percentage (varying from 52.2% to 100.0%), while the sequences of different ISR types differentiate greatly. Additionally, the hypothetical conserved domains different in length flanking the 16S and the 23S rDNAs may be candidates for the targets, according to which the species-specific PCR primer set and/or detection probes are possibly designed, and will lay a foundation for developing a novel diagnostic method for *B. firmus*. To date, the 16S—23S rDNA sequences and their polymorphism of *B. firmus* are first reported.

Key words *Bacillus firmus*; 16S—23S rDNA intergenic spacer region; tRNA gene; polymorphic analysis