

一株产耐高温 DNA 酶和蛋白水解酶的沙雷氏菌 FS14 (*Serratia* sp. FS14) 的分离与鉴定

郑朝成¹ 王长林² 付玲¹ 王伟武¹ 徐冬青^{1*}

(1. 南京农业大学生命科学学院 农业部农业环境微生物工程重点开放实验室 江苏 南京 210095)

(2. 南京农业大学园艺学院 江苏 南京 210095)

摘 要: 通过组织分离法从白术病害样品的茎秆部位分离到一株产红色色素的细菌 FS14, 参照《伯杰氏细菌鉴定手册》, 根据其形态学特征、生理生化特性, 同时结合 16S rDNA 序列分析结果, 发现该菌属于沙雷氏菌属。研究还发现, 从白术茎秆中分离到的这株中温型沙雷氏菌 FS14 能分泌耐高温的 DNA 酶和蛋白水解酶, 甚至在 100 °C 预处理 30 min 后仍有活性。沙雷氏菌能分泌耐高温的 DNA 酶和蛋白水解酶还未见报道。

关键词: 沙雷氏菌属, 胞外酶, 耐高温 DNA 酶, 耐高温蛋白酶

Isolation and chracterization of the *Serratia* sp. FS14 secreting thermostable DNase and protease

ZHENG Chao-Cheng¹ WANG Chang-Lin² FU Ling¹ WANG Wei-Wu¹
XU Dong-Qing^{1*}

(1. Key Laboratory of Microbiological Engineering of Agricultural Environment, Ministry of Agriculture, College of Life Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing, Jiangsu 210095, China)

(2. College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing, Jiangsu 210095, China)

Abstract: A red pigment producing bacterium strain FS14 was isolated from the stem of the diseased *Atractylodes macrocephala* Koidz. The strain was classified into *Serratia* according to its morphology, the physiological and biochemical features and 16S rDNA sequence. Different from the other reported *Serratia* species, the F14S strain could secrete the thermostable DNase and protease. These secreted thermostable enzymes were still active even after pretreated at 100 °C for 30 min, while less activity was found after pretreated at 60 °C–70 °C for 30 min. The reason for this phenomenon need to be further investigated.

Keywords: *Serratia*, Extracellular enzyme, Thermostable DNase, Thermostable protease

沙雷氏菌(*Serratia*)隶属于肠杆菌科,是一类兼性厌氧杆状细菌,在 LB 固体培养基上 25 °C–30 °C 培养 1–2 d 后,有的菌株可产生粉红色或红色色素,但在 37 °C 时培养时产色素不良^[1–2]。沙雷氏菌属菌株广泛分布于自然界,一般存在于土壤、水、植物叶片、动物以及人类的肠道和呼吸道中。沙雷氏菌是医院院内感染的主要条件致病菌之一,可引起呼吸道感染、尿道感染和伤口感染等疾病^[3]。而它产生的灵菌红素(Prodigiosin, PG)则是一种具有 3 个吡咯环骨架结构的红色细菌色素,具有抗细菌、抗真菌、抗痢疾、免疫抑制和抗肿瘤等活性^[4]。

此外,沙雷氏菌还可分泌多种胞外酶,如核酸酶、蛋白酶、脂肪酶及几丁质酶等^[1]。在缺乏直接可利用碳源情况下,粘质沙雷氏菌可分泌胞外核酸酶来降解环境中的核酸以获得能量,从而极大地增强了其生存能力^[5]。沙雷氏菌还能产生蛋白酶,如粘质沙雷氏菌 *Serratia marcescens* HR-3 可以分泌金属蛋白酶 Pr596^[6]。研究还显示,相当一部分具有致病性的沙雷氏菌菌株能分泌胞外蛋白酶,且该蛋白酶与致病性有关,如粘质沙雷氏菌 *S. marcescens* 分泌的金属蛋白酶 SMP 不仅能作为消炎药,还对昆虫具有较强的致病作用^[7]。

在分离白术(*Atractylodes macrocephala* Koidz)根腐病的病原菌过程中,我们从发病植株的茎秆内分离到一株能产红色色素的菌株 FS14,并对该细菌进行了分类鉴定,还对该菌所产的胞外 DNA 酶和蛋白酶进行了一些初步的研究。

1 材料与方法

1.1 培养基

PDA 培养基(g/L): 马铃薯 200, 蔗糖(或葡萄糖) 20, 琼脂 15–20; LB 培养基(g/L): NaCl 10, 胰蛋白胨 10, 酵母粉提取物 5。

1.2 方法

1.2.1 菌株的分离: 采用组织分离法,即切取病害的白术植株组织,先用 5% NaClO 溶液对组织表面消毒 1–2 min,然后用 75%酒精消毒 1–2 min,最后用无菌水清洗 3 次后置于 PDA 培养基上,于

28 °C 恒温培养箱培养 3–5 d 后观察结果,每个实验各设 3 个重复。取最后一次清洗样品后的水 50 μL 涂布于 PDA 平板,平板置于 28 °C 恒温培养箱培养作为对照,若平板无菌则说明植株表面消毒彻底^[8]。

1.2.2 菌株的鉴定: 对分离到的菌株参考《常见细菌鉴定手册》^[1]和《伯杰氏细菌鉴定手册》^[2]进行形态学和生理生化鉴定。生理特征鉴定主要测试其最适生长温度, pH 耐受范围,耐盐性;生化鉴定采用杭州天和生物有限公司提供的生化反应管,快速鉴定该菌的主要生理生化特性^[2]。16S rDNA 的分析采用菌落 PCR 方法进行 16S rDNA 扩增。16S rDNA 序列扩增的引物设计参照 Lane (1985)设计^[9],正向引物为 F: 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3';反向引物为 R: 5'-AAGGAGGTGWTCCARCC-3'。PCR 反应体系为: 10×*Taq* buffer 5 μL, dNTPs (2.5 mmol/L) 4 μL, MgCl₂ (25 mmol/L) 2.5 μL, PCR 引物各 4 μL, *Taq* plus DNA polymerase 1 μL, 挑取 FS14 单菌落,加灭菌双蒸水补至 50 μL。PCR 反应条件为: 94 °C 3 min; 94 °C 45 s, 58 °C 45 s, 72 °C 75 s, 35 个循环; 72 °C 10 min。PCR 产物与 PMD19-T 载体(TaKaRa)连接,酶切鉴定正确后,送上海华大基因有限公司测序。测序结果通过在线分析(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>),与 GenBank 中的 16S rDNA 序列进行同源性分析并构建系统发育树。

1.2.3 沙雷氏菌 FS14 的生长曲线测定: 主要采用光电比浊计数法(Perkin Elmer Lambda 25, UV/VIS spectrometer)来测定菌液浓度。将新鲜种子液按 1% 的接种量转接至新鲜 LB 液体培养基中,于 28 °C、200 r/min 振荡培养,连续测定菌株 FS14 在 LB 培养基中各个时间点的 A_{600} 值大小。以时间(h)为横坐标, A_{600} 值为纵坐标作图,将各点连接成一条平滑曲线,即为该菌在 LB 液体培养基中, 28 °C、200 r/min 培养时的生长曲线。

1.2.4 粗酶液的制备: 按 1% 的接菌量,转接活化的菌液至 250 mL LB 培养基中 28 °C、200 r/min 振荡培养 24 h 至 A_{600} 约 3.5 左右。将细菌培养液在 4 °C、15 000 r/min 离心 20 min,收集上清液。上清液用 0.22 μm 的微孔滤膜过滤,滤液即为粗酶液,置于

4 °C 备用。以下本研究中所有粗酶液的操作除特别指出外, 均在 4 °C 下完成。

1.2.5 不同生长时间下粗酶液蛋白酶活力的测定: 将新鲜种子液按 1% 的接种量转接至新鲜的 LB 液体培养基中, 于 28 °C、200 r/min 振荡培养, 参照 1.2.3 中所测得的细菌生长曲线, 分别收集各时间点的粗酶液, 并按照 Saleemuddin 等^[10]的方法测定酶活力。

1.2.6 温度对粗酶液中 DNA 酶活的影响: 将粗酶液分别于 4 °C、22 °C、37 °C、50 °C、60 °C、70 °C、80 °C、90 °C、100 °C 处理 30 min 后, 取各种温度处理的粗酶液分别与质粒 pET-28a 在 37 °C 下反应 1.5 h 和 3 h 观察酶切效果。反应体系为 pET-28a 质粒约 20 ng, 粗酶液 2 μ L, PBS (20 mmol/L, pH 7.4) 缓冲液 4 μ L, 25 mmol/L Mg^{2+} 1 μ L, 用水补至 10 μ L。反应结束后, 立即向上述反应体系中加入 6 \times loading buffer (TaKaRa) 以终止反应, 然后用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测酶切效果^[11]。

1.2.7 温度对 $(NH_4)_2SO_4$ 沉淀后的粗酶液中 DNA 酶活的影响: 将收菌后的上清粗酶液进行 80% $(NH_4)_2SO_4$ 沉淀, 12 000 r/min 离心 30 min, 收集沉淀, 将沉淀溶于 5 mL 20 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0)、100 mmol/L NaCl 溶液中, 并将其对含 20 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0)、100 mmol/L NaCl 的溶液进行透析, 透析后的样品经 12 000 r/min 离心 30 min 后, 分别取上清液 500 μ L 在不同温度下处理 30 min (4 °C, 22 °C, 37 °C, 50 °C, 60 °C, 70 °C, 80 °C, 90 °C, 100 °C), 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液进行 DNA 酶活检测, 酶活检测体系同 1.2.6。

1.2.8 温度对粗酶液中蛋白水解酶活性的影响: 将 1.2.4 制得的粗酶液在 4 °C、22 °C、37 °C、50 °C、60 °C、70 °C、80 °C、90 °C 和 100 °C 下分别预处理 30 min 后, 10 000 r/min 离心 10 min, 分别取上清, 并在上清中加入甘油至终浓度为 10%, 然后各取 15 μ L 样品在活性梯度聚丙烯酰胺凝胶上电泳^[12]。

1.2.9 温度对 $(NH_4)_2SO_4$ 沉淀后的粗酶液中蛋白水解酶活性的影响: 分别取 30 μ L 1.2.7 中用不同温度处理的硫酸铵沉淀后的粗酶液, 进行蛋白水解酶活性检测, 电泳方法参见 1.2.8。

2 结果

2.1 菌株的鉴定

2.1.1 菌株的形态学、生理生化特性鉴定: 菌体短杆状, 端圆。菌落不透明, 28 °C 产生红色色素, 37 °C 则不产生红色色素。FS14 能在最高达 42 °C 的温度下生长, 最适生长温度为 37 °C, 为中温型细菌。该菌能在 pH 4.0–10.0 的范围内生长, 最适生长 pH 为 7.0–8.0; 在 0–10% NaCl 的 LB 液体培养基均能生长, 最适 NaCl 浓度为 1%。生化性质具体鉴定结果见表 1。

从表 1 中可见, 所分离到的菌株与粘质沙雷氏菌的生理特性较一致, 而与嗜线虫沙雷氏菌则相差较大。

2.1.2 16S rDNA 区域的 PCR 扩增及系统发育树分析: 通过 PCR 扩增获得菌株 FS14 的 16S rDNA 序列, 结果如图 1 所示。所测得到的序列长度为 1 497 bp, GenBank 的序列登录号为 HM245061。将序列比较并构建发育树(图 2), 发现 FS14 与粘质沙雷氏菌菌株 KRED (AB061685) 和嗜线虫沙雷氏菌 DZ0503SBS1 (EU036987) 亲缘关系最为接近, 16S rDNA 的同源性分别为 97.476% 和 98.579%。因此, 结合 FS14 的形态特征、生长特性和生理生化特性, 本研究将其归类于沙雷氏菌属, 并将其命名为 *Serratia* sp. FS14。

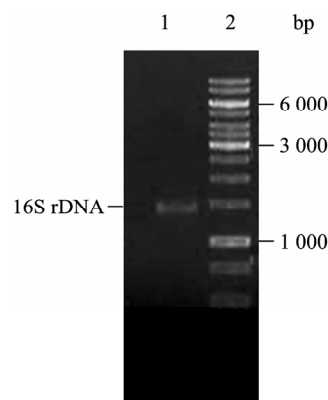


图 1 菌落 PCR 的 16S rDNA 扩增结果

Fig. 1 Colony PCR results of bacterial 16S rDNA

注: 1: 16S rDNA PCR 产物; 2: 1 kb DNA ladder.

Note: 1: PCR product of 16S rDNA; 2: 1 kb DNA ladder.

表 1 菌株 FS14 的常规生理生化反应特征				
Table 1 physiological and Biochemical characteristics of the strain FS14				
鉴定指标	FS14 鉴定结果	嗜线虫沙雷氏菌	粘质沙雷氏菌	
Identification index	Identification result	<i>S. nematodiphila</i> (EU036987)	<i>S. marcescens</i> (AJ233431)	
V-P reaction	+	+	+	
赖氨酸脱羧酶 Lysine decarboxylase	+	—	+	
精氨酸实验 Arginine test	—	—	—	
鸟氨酸脱羧酶 Ornithine decarboxylase	+	—	+	
明胶酶实验 Gelatinase	+	+	+	
葡萄糖实验 Glucose utilization	+	—	+	
阿拉伯糖 Arabinose utilization	—	—	—	
纤维二糖 Cellobiose utilization	—	+	—	
卫矛醇 Dulcitol utilization	—	—	—	
乳糖 Lactose utilization	—	—	—	
蜜二糖 Melibiose utilization	—	—	—	
α-甲基-葡萄糖苷 α-methyl-glucoside utilization	—	—	—	
棉籽糖 Raffinose utilization	—	—	—	
鼠李糖 Rhamnose utilization	—	—	—	
山梨醇 Sorbitol utilization	+	—	+	
蔗糖 Sucrose utilization	+	+	+	
木糖 Xylose utilization	—	+	—	
DNA 酶, 25 °C DNase, 25 °C	+	+	+	
脂酶 Lipase	+	+	+	
色素 Pigment	+	+	+	
ONPG 利用 ONPG utilization	+	+	+	
柠檬酸盐利用 Simmons utilization	+	+	+	
H ₂ S 反应 Hydrogen sulfide production	—	—	—	

注: +: 阳性反应; —: 阴性反应.
Note: +: Positive reaction; —: Negative reaction.

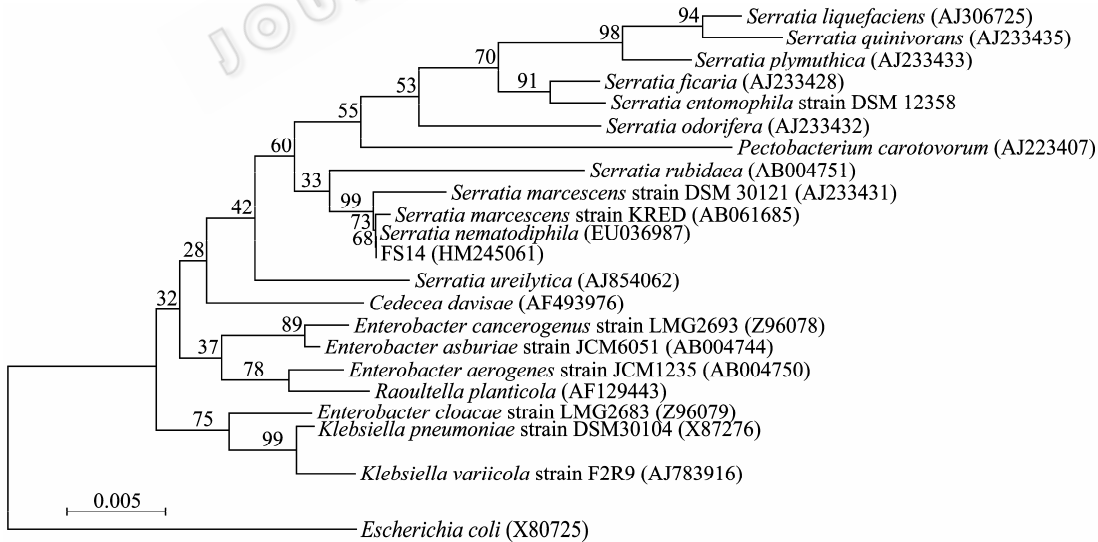


图 2 基于 16S rDNA 序列同源性的菌株 FS14 的系统发育树

Fig. 2 The phylogenetic tree based on the 16S rDNA sequence of strain FS14

注: 发育树节点的数字表示 Bootstrap 值; 括号内的数字是在 GenBank 上的序列登录号; 图例为遗传距离.
Note: Numbers at nodes present bootstrap percentages (based on 1 000 samplings). The number in the bracket are the GenBank accession number. Bar: 0.005 sequence divergence.

2.2 LB 培养基中沙雷氏菌的生长曲线的测定

如图 3 所示, 测定菌株 FS14 在 LB 培养基中的生长曲线, 表现出较为典型的细菌生长规律, 从曲线上可以发现: 0-2 h 内为延滞期; 2-42 h 为对数生长期; 42-68 h 为稳定期, 其后为衰亡期。

2.3 不同生长时间下粗酶液蛋白酶活力的测定

测定在不同的生长时间的粗酶液的蛋白酶活力, 将最高酶活值计为 100%, 而其余生长时间下的活力分别折算成相对酶活。以时间(h)为横坐标, 相对酶活力(%)为纵坐标, 结果如图 4 所示。

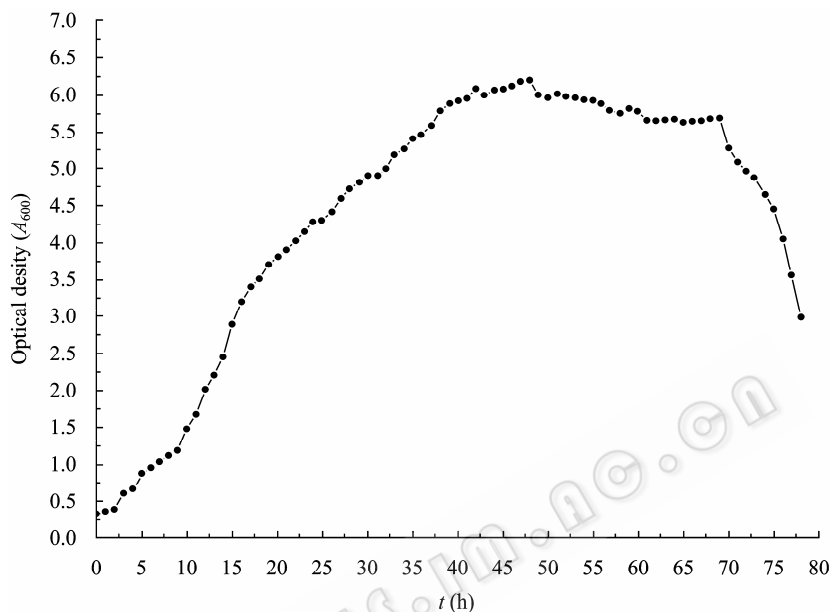


图 3 菌株 FS14 在 LB 培养基中的生长曲线

Fig. 3 The growth curve of FS14 in LB medium

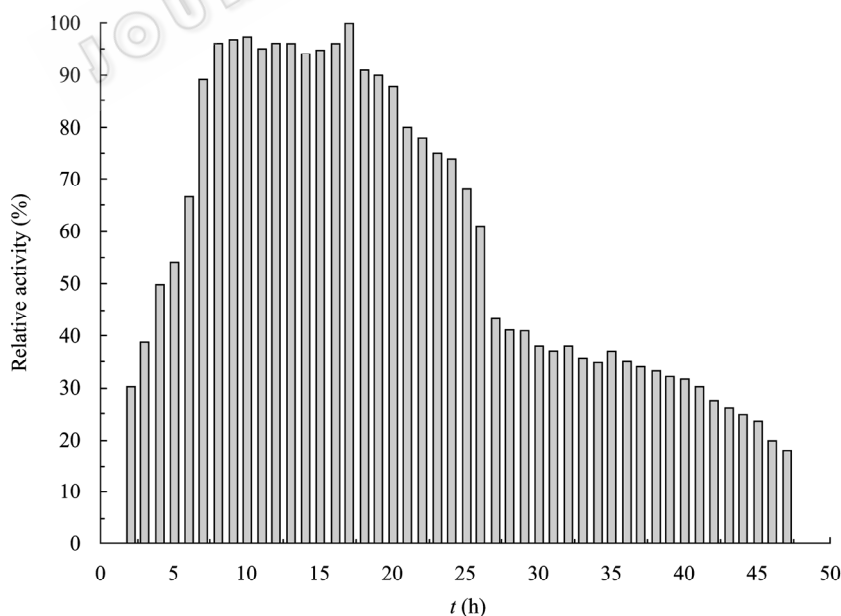


图 4 菌株 FS14 在 LB 培养基中分泌的胞外蛋白酶随时间的变化

Fig. 4 The changes of protease activity of FS14 in LB medium

从图 4 可以看出, 转接 7 h 后, 蛋白酶水解活力均保持在较高水平, 直到 19 h 左右, 20 h 后逐渐降低, 到对数生长期晚期, 蛋白水解酶的活性降低至最高活性的 35% 左右。因此参照所做的生长曲线, 在研究蛋白水解酶活力时, 选取 A_{600} 在 3.5 左右的培养液进行下一步研究。

2.4 温度对粗酶液中 DNA 酶活的影响

将粗酶液于不同温度下分别预处理 30 min 后, 与质粒 pET-28a 在 37 °C 下反应 1.5 h 和 3 h 的结果如图 5 所示。在 4 °C–100 °C 下预处理 30 min, 粗酶液对 pET-28a 均有不同程度的酶切效果, 其中以 37 °C 预处理 30 min 的粗酶液的效果最好, 此后随着温度的升高, DNA 酶活性降低。但令人奇怪的是, 虽然在 70 °C 和 80 °C 预处理 30 min 后的粗酶液酶切质粒的效果不佳, 但 90 °C、100 °C 处理的粗酶液却能够更好地切割 pET28a 质粒。这表明当预处理温度升高至 70 °C–80 °C 后, DNase 活性降低, 而当处理温度升至 90 °C–100 °C 时, DNA 酶的活性反而部分恢复了。

2.5 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 沉淀后的粗酶液在不同温度下的 DNA 酶活

经过硫酸铵沉淀后的粗酶液的 DNA 酶切效果如图 6 所示, 由图可见, 经 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 沉淀后的粗酶液仍具有较高的耐热性, 经 100 °C 处理 30 min 后, 仍能完全降解 DNA, 但样品经 60 °C 处理后, 酶活较其它处理低, 在反应条件下不能完全降解 DNA;

70 °C–80 °C 的处理后酶活略有上升, 但也低于 90 °C–100 °C 处理后的酶活。这个现象与用培养上清液的结果基本一致。

2.6 温度对粗酶液中蛋白水解酶活性的影响

将在不同温度下预处理的粗酶液样品, 进行梯度活性胶电泳检测其蛋白酶活力。结果如图 7 所示。从图 7 可以看出在 4 °C–100 °C 预处理 30 min 后均有蛋白酶活性, 表明胞外酶具有耐高温特性。当在 22 °C 或 37 °C 处理 30 min 后, 发现蛋白酶活性与对照相比没有明显变化; 而当处理温度在 50 °C–80 °C 之间时, 活力明显降低, 尤其是在 50 °C 处理下的样品其蛋白水解酶活性降到最低, 随后随预处理温度升高而有一定的恢复; 而预处理温度达到 90 °C–100 °C 时, 蛋白水解酶活力远高于 50 °C–80 °C 温度下的热处理, 而与对照相比相差不大。这种随温度升高蛋白酶活性先降后升的现象与该菌分泌的 DNA 酶活性随温度变化的特性相类似。

2.7 温度对 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 沉淀后的粗酶液中蛋白水解酶活性的影响

经过硫酸铵沉淀后的粗酶液的 DNA 酶切效果如图 8 所示, 样品具有较高的耐热性, 经高温处理 30 min 后, 依然具有蛋白酶活性, 但经 60 °C 处理后样品酶活为最低, 处理温度升高后, 酶活反而有所增强。这个现象与用培养上清液的结果基本一致。

A 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 B 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11

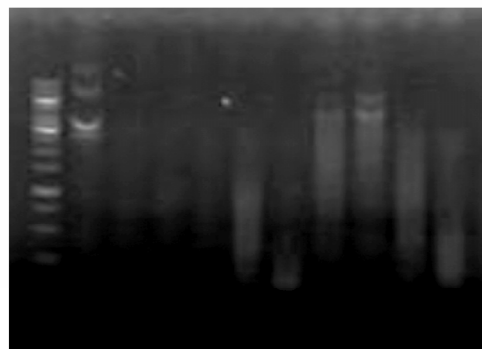
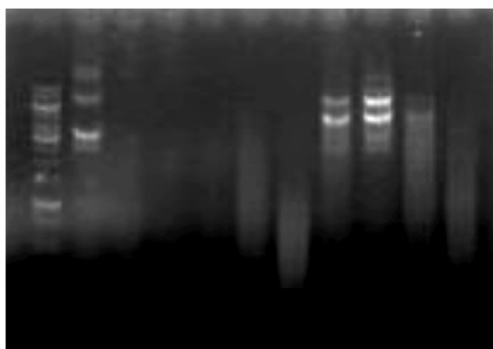


图 5 不同温度下预处理后的 DNA 酶活电泳图谱

Fig. 5 Electrophoresis map of DNase activities under the pre-treatment of different temperatures

注: A: 酶切时间 1.5 h; B: 酶切时间 3 h. 1: Marker; 2: pET-28a; 3: 4 °C; 4: 22 °C; 5: 37 °C; 6: 50 °C; 7: 60 °C; 8: 70 °C; 9: 80 °C; 10: 90 °C; 11: 100 °C.

Note: A: Incubated for 1.5 h; B: Incubated for 3 h. 1: Marker; 2: pET-28a; 3: 4 °C; 4: 22 °C; 5: 37 °C; 6: 50 °C; 7: 60 °C; 8: 70 °C; 9: 80 °C; 10: 90 °C; 11: 100 °C.

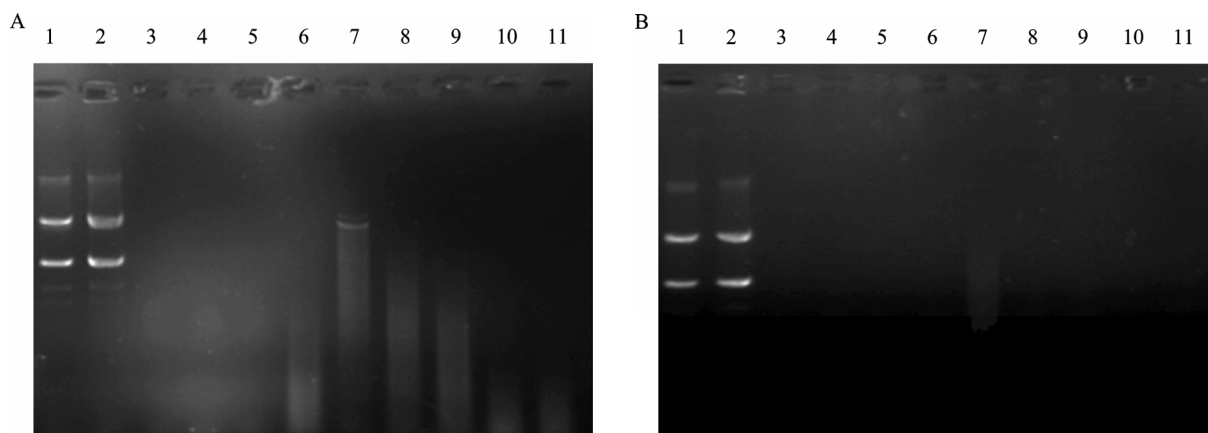


图 6 不同温度下预处理后的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 沉淀后的粗酶液的 DNA 酶活电泳图谱

Fig. 6 Electrophoresis map of DNase activities of the crude enzyme precipitated by ammonium sulfate under the pre-treatment of different temperatures

注: A: 酶切时间 1.5 h; B: 酶切时间 3 h. 1: 阴性对照; 2: pET-28a; 3: 4 °C; 4: 22 °C; 5: 37 °C; 6: 50 °C; 7: 60 °C; 8: 70 °C; 9: 80 °C; 10: 90 °C; 11: 100 °C.

Note: A: Incubated for 1.5 h; B: Incubated for 3 h. 1: Negative control; 2: Plasmid; 3: 4 °C; 4: 22 °C; 5: 37 °C; 6: 50 °C; 7: 60 °C; 8: 70 °C; 9: 80 °C; 10: 90 °C; 11: 100 °C.

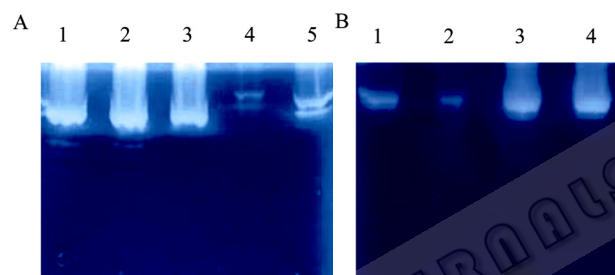


图 7 粗酶液经热处理后的梯度活性胶电泳图谱

Fig. 7 Protease activity pattern of heat treated crude enzyme

Note: A: 1: 4 °C; 2: 22 °C; 3: 37 °C; 4: 50 °C; 5: 60 °C. B: 1: 70 °C; 2: 80 °C; 3: 90 °C; 4: 100 °C.

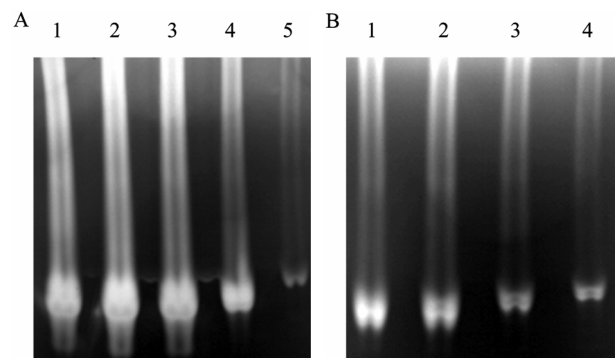


图 8 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 沉淀后的粗酶液经热处理后的梯度活性胶电泳图谱

Fig. 8 Protease activity pattern of heat treated crude enzyme precipitated by ammonium sulfate

Note: A: 1: 4 °C; 2: 22 °C; 3: 37 °C; 4: 50 °C; 5: 60 °C. B: 1: 70 °C; 2: 80 °C; 3: 90 °C; 4: 100 °C.

3 讨论

本研究从病害白术茎秆部位分离到一株能产生红色色素的菌株 FS14, 通过形态学、生理生化指标和 16S rDNA 系统发育树构建等对其进行了鉴定, 发现菌株 FS14 与粘质沙雷氏菌 KRED (AB061685) 和嗜线虫沙雷氏菌(EU036987)的 16S rDNA 的同源性最高, 分别达到 97.476% 和 98.579%, 但是 FS14 的生理生化性质与嗜线虫沙雷氏菌生理生化性质相差较大, 而与粘质沙雷氏菌生化性质相同。从细菌分布上来说, 粘质沙雷氏菌主要分布于水、食物和土壤等环境中^[1], 嗜线虫沙雷氏菌主要分布于昆虫体内^[13], 而我们分离的沙雷氏菌则是从发生根腐病的白术茎秆中分离出来的, 到目前为止, 只有居泉沙雷氏菌存在于植物叶片的报道^[1], 还未见有从植物内部分离到沙雷氏菌的报道; 此外, 在从沙雷氏菌已报道的胞外酶特性来看, 如 1963 年 Eaves 等第一次从粘质沙雷氏菌中提取到的核酸酶, 该酶对于单链、双链 DNA 和 RNA 均有裂解作用, 该酶的最适作用温度为 35 °C, 而最高能耐受 55 °C 的温度^[14]; 而在蛋白酶方面, 嗜线虫沙雷氏菌(*S. nematodiphila*)分泌的蛋白水解酶酶活在 43 °C 以下的温度范围内稳定, 最适温度为 35 °C^[13]; 粘质沙雷氏菌

KRED 蛋白水解酶的最适作用温度为 35 °C, 最高能耐 45 °C 的温度^[5]。而 FS14 菌株分泌的 DNA 酶和蛋白酶却具有耐高温, 即耐受高达 100 °C 高温的特性, 沙雷氏菌分泌的胞外酶能耐高温的现象还未见报道。

本研究中, FS14 菌株的耐热 DNA 酶的发现是在扩增 FS14 的 16S rDNA 时发现的, 我们发现 PCR 扩增产物于 4 °C 甚至在 -20 °C 放置一段时间后再进行电泳时, 发现泳道从上到下出现弥散型降解条带, 而如果在 PCR 扩增完成后, 立即向 PCR 产物中加入 6×loading buffer 后进行电泳则有清晰的 1.5 kb 的目的带。由于我们采用的是菌体 PCR, 因此这表明在菌体内或分泌物中可能存在 DNA 酶, 将目的条带降解; 此外鉴于 PCR 扩增时要经历高的变性温度和较高的扩增温度, 因此我们推测菌株 FS14 能分泌耐高温的 DNA 酶。本研究在确定该酶为胞外酶后, 通过在 4 °C–100 °C 之间进行不同温度的预处理, 然后在 37 °C 对质粒进行酶切反应, 来研究其 DNA 酶的耐热性。研究表明: 高温预处理 30 min 的粗酶液的确具有耐热的特性。我们还发现, 在 70 °C–80 °C 预处理 30 min 后, DNase 活性较低; 而随着预处理温度升高至 90 °C–100 °C 时, 酶活反而比 70 °C–80 °C 预处理的高。同时, 为了确定 FS14 菌株分泌的蛋白酶是否也具有耐高温特性, 我们对其蛋白酶的耐热性也进行了研究, 结果发现其分泌的蛋白酶也具有类似的耐热特性, 即 50 °C–80 °C 预处理后, 蛋白酶活性较低, 而更高温度即 90 °C–100 °C 预处理后的上清液中蛋白水解酶活力如 DNA 酶一样, 也反而高于 50 °C–80 °C 的处理。为了排除培养基成分对实验结果的影响, 我们对培养上清液进行了 80% 饱和度的硫酸铵沉淀, 并对沉淀的粗酶液进行了其特性研究, 结果与用培养上清液的特性一致, 说明这种耐热特性来源于蛋白本身。当然 FS14 分泌的胞外酶的这种特殊特性具体由什么原因导致的, 还有待进一步研究, 可能是由于粗酶液中蛋白成分比较复杂, 可能有多种不同耐热酶所导致。此外, FS14 为中温型细菌, 而分泌的酶却具有耐高温的特性, 这些耐高温的酶在菌的生长中起着什么样的作用, 这些

都有待于进一步研究。

沙雷氏菌广泛分布在自然界中, 沙雷氏菌属中很多种均可致病。如粘质沙雷氏菌作为人的条件致病菌, 可引起败血症或尿道感染等疾病^[15–16], 深红沙雷氏菌可以引起肺结核^[17], 液化沙雷氏菌感染会引起败血症^[18]等。陶科等也证明沙雷氏菌 HR-3 是蝗虫的致病菌^[6], 并验证了较高的蛋白酶活性是致病因素之一, 而且蛋白酶活性与毒力成正比关系^[6]。*Serratia* sp. FS14 是本研究在对正常和发生根腐病病害的白术组织样品进行真菌分离培养时, 从病害植株的茎秆部位分离得到的, 而从正常的茎秆组织中并未分离到类似菌株。到目前为止, 还尚未有从白术茎秆部位分离出沙雷氏菌属菌株的报道, 而且也未见沙雷氏菌可以使植物致病的报道, 因此沙雷氏菌菌株 FS14 在根腐病的发病过程是否起作用, 还需进一步验证。

参 考 文 献

- [1] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 94–95.
- [2] Garrity GM, Bell JA, Liburn TG. Bergey's manual of systematic bacteriology, second edition[M]. 北京: 科学出版社, 2004: 453–454.
- [3] 朱建国. 临床常见细菌鉴定手册[M]. 北京: 医科大学 & 中国协和医科大学联合出版社, 1993: 112–114.
- [4] Harashima K, Tsuchida N, Tanaka T, et al. Prodigiosin 25-C: isolation and the chemical structure[J]. Agric Biol Chem, 1967, 31: 481.
- [5] Wilkowske CJ, Washington JA, Martin WJ, et al. *Serratia marcescens*. Biochemical characteristics, antibiotic susceptibility patterns, and clinical significance[J]. JAMA, 1970, 214(12): 2157–2162.
- [6] Tao K, Long ZF, Liu K, et al. Purification and properties of a novel insecticidal protein from the locust pathogen *Serratia marcescens* HR-3[J]. Curr Microbiol, 2006, 52(1): 45–49.
- [7] Kim N, Kim SI. Characterization and primary specificity of an extracellular metalloproteinase from *Serratia marcescens*[J]. Can J Microbiol, 1994, 40(2): 120–126.
- [8] 潘永贵, 石晶莹, 陈维信. 鲜切荸荠黄化组织中微生物分离鉴定研究[J]. 西南大学学报, 2008, 30(3): 67–69.
- [9] Lane DJ, Pace B, Olsen GJ, et al. Rapid determination of

- 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1985, 82(20): 6955-6959.
- [10] Saleemuddin M, Hassan A, Athar H. A simple, rapid, and sensitive procedure for the assay of endoproteases using coomassie brilliant Blue G-250[J]. Anal Biochem, 1980, 105(1): 202-206.
- [11] Gerceker D, Karasartova D, Elyürek E. A new, simple, rapid test for detection of DNase activity of microorganisms: DNase tube test[J]. J Gen Appl Microbiol, 2009, 55(4): 291-294.
- [12] Rui Q, Xu LL. Characterization of endopeptidases in wheat leaves during dark-induced senescence[J]. Acta Botanica Sinica, 2003, 45(9): 1049-1054.
- [13] 杨寿运. 嗜线虫沙雷氏菌金属蛋白酶的分离纯化、理化活性研究与基因克隆[D]. 南京农业大学硕士学位论, 2008: 17-37.
- [14] Eaves GN, Jeffries CD. Effect of PH on the formation of extracellular nuclease in aging broth cultures of *Serratia marcescens*[J]. J Bacteriol, 1963, 85(6): 1194-1196.
- [15] William Jr TW, Sailer JE, Viroslav J, et al. *Serratia marcescens* as a postoperative pathogen. Am J Surg, 1971, 122(1): 64-69.
- [16] Voelz A, Müller A, Gillen J, et al. Outbreaks of *Serratia marcescens* in neonatal and pediatric intensive care units: clinical aspects, risk factors and management[J]. Int J Hyg Environ Health, 2010, 213(2): 79-87.
- [17] 周欣, 孟改霞. 从肺结核患者痰中分离出一株深红色沙雷氏菌[J]. 河北中西医结合杂志, 1999, 8(5): 707.
- [18] 胡金珠. 液化沙雷氏菌败血症 1 例[J]. 实用内科杂志, 1990, 10(3): 140.

征订启事

欢迎订阅《微生物学通报》

《微生物学通报》创刊于 1974 年, 是中国微生物学会和中国科学院微生物研究所主办, 国内外公开发行, 以微生物学应用基础研究及技术创新与应用为主的综合性学术期刊。刊登内容包括: 基础微生物学研究, 农业微生物学研究, 工业微生物学研究, 医学微生物学研究, 食品微生物学研究, 环境微生物学研究, 微生物功能基因组研究, 微生物蛋白质组学研究, 微生物模式菌株研究, 微生物工程与药物研究, 微生物技术成果产业化及微生物教学研究改革等。

本刊为中国生物科学类核心期刊。曾获国家级优秀科技期刊三等奖, 中国科学院优秀科技期刊三等奖, 北京优秀科技期刊奖, 2001 年被选入新闻出版署设立的“中国期刊方阵”并被列为“双效”期刊。

自 2008 年本刊已经全新改版, 由双月刊改为月刊, 发表周期缩短, 内容更加丰富详实。欢迎广大读者到邮局订阅或直接与本刊编辑部联系购买, 2011 年的每册定价为 48 元, 全年 576 元, 我们将按期免费邮寄。

另, 本编辑部现存有少量过期期刊, 如有需要者可直接与编辑部联系, 款到即免费寄上。(请事先与编辑部联系, 获悉每册售价。敬请在汇款单上注明所购刊物的年代、卷、期和数量)

邮购地址: (100101)北京朝阳区北辰西路 1 号院 3 号中国科学院微生物研究所《微生物学通报》编辑部

Tel: 010-64807511

E-mail: bjb@im.ac.cn, tongbao@im.ac.cn

网址: <http://journals.im.ac.cn/wwxtbcn>

国内邮发代号: 2-817; 国外发行代号: BM413