

# 以苯丙氨酰-tRNA 合成酶为靶点的新型抗结核 药物高通量筛选模型的建立和应用

张志明 孙莹 赵莉莉 王莉宁 魏玉珍 苏静 张玉琴 余利岩\*

(中国医学科学院 北京协和医学院医药生物技术研究so 北京 100050)

**摘要:**【目的】建立结核分枝杆菌 PheRS 抑制剂高通量模型,并运用此模型筛选化合物和发酵液样品。【方法】克隆和表达结核分枝杆菌 PheRS 蛋白并优化其酶活测定方法,在此基础上建立结核分枝杆菌 PheRS 抑制剂高通量筛选模型,并通过耻垢分枝杆菌作为检定菌对筛选到的样品进行抗菌活性测定及细胞毒性评价。【结果】运用此模型筛选了化合物样品 11 600 个,发酵液样品 5 200 个,筛选得到阳性化合物 9 个,阳性发酵液 37 个。而后通过耻垢分枝杆菌作为检定菌的抗菌活性测定及细胞毒性评价后,得到了 6 个发酵液阳性样品。【结论】建立的 PheRS 抑制剂模型可成功用于化合物和微生物发酵液的高效筛选,得到的 6 个发酵液阳性样品在酶水平和抗分枝杆菌方面均具有良好活性且毒性较低,值得进一步研究。

**关键词:** 苯丙氨酰-tRNA 合成酶,靶点,高通量模型,结核分枝杆菌

## The establishment and application of a high throughput screening assay for inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis* Phenylalanyl-tRNA synthetase

ZHANG Zhi-Ming SUN Ying ZHAO Li-Li WANG Li-Ning WEI Yu-Zhen  
SU Jing ZHANG Yu-Qin YU Li-Yan\*

(Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking  
Union Medical College, Beijing 100050, China)

**Abstract: [Objective]** To establish a high-throughput drug screening model for screening in-

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 30870026); 国家微生物资源平台项目(No. NIMR-2011-3); “重大新药创制”  
科技重大专项项目(No. 2009ZX09301-003); 卫生部行业基金项目(No. 201002021)

\*通讯作者: Tel: 86-10-63187118; 信箱: yuliyan\_2000@yahoo.com

收稿日期: 2012-01-05; 接受日期: 2012-04-17

inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis* Phenylalanyl-tRNA synthetase (PheRS). **[Methods]** In this work, *Mycobacterium tuberculosis* pheRS gene was cloned and overexpressed in *E. coli*, and then the purified recombinant enzyme was used to establish an high-throughput drug screening model. After establishment and optimization of the screening assay, a primary screening was performed with compounds library and microbial fermentation collection in our institute, and their anti-bacterial activity and cytotoxicity were assessed further. **[Results]** 9 out of 11 600 compounds and 37 out of 5 200 microbial fermentation samples were identified as primary hits. **[Conclusion]** 6 microbial fermentation samples inhibited enzymatic activity of PheRS in vitro and growth of *Mycobacterium smegmatis*, and showed lower cytotoxicity.

**Keywords:** Phenylalanyl-tRNA synthetase, Target, High-throughput drug screening model, *Mycobacterium tuberculosis*

近年来, 曾经被有效控制的结核病大有卷土重来之势, 发病率和病死率均明显回升, 已成为与艾滋病、疟疾并称的传染病三大杀手。结核病死灰复燃的原因很多, 其中很重要的一个方面就是多重耐药菌的增加这类结核分枝杆菌对异烟肼和利福平等传统的一线抗结核药物均有较强的耐药性, 而在过去的 30 年里在全世界几乎没有新型高效的抗结核药物被研制开发出来<sup>[1-2]</sup>。因此, 寻找新的有效的抗结核药物成为我国乃至世界结核病防治重要任务。

氨酰-tRNA 合成酶在蛋白质的生物合成过程中起了至关重要的作用, 它催化氨基酸与相应的 tRNA 合成氨酰-tRNA<sup>[3-4]</sup>。对于病原菌而言, 一旦它的某种氨酰-tRNA 合成酶受到抑制失去功能, 就会导致其蛋白质的生物合成中断以及许多重要的生理过程受影响, 那么病原菌在体外或是在宿主体内的生长繁殖也就随之终止。目前, 氨酰-tRNA 合成酶已成为开发抗结核药物的理想靶点之一。但到目前为止, 只有一种氨酰-tRNA 合成酶抑制剂作为抗生素应用于临床, 其名称为 Mupirocin (莫匹罗星, 商品名为 Bactroban 百多邦)。此药可有效地抑制耐甲氧西林(Methicillin)的金黄色葡萄球菌(MRSA)现已被世界各国广泛应用<sup>[5-6]</sup>。还未见苯丙氨酰-tRNA 合成酶(PheRS)

抑制剂成药的相关报道<sup>[7]</sup>。

苯丙氨酰-tRNA 合成酶(PheRS)在不同细菌中的序列比较保守<sup>[7-8]</sup>, 而且与真核生物的同种功能的蛋白之间具有较大差异<sup>[9-10]</sup>, 这样利用结核分枝杆菌的氨酰-tRNA 合成酶为靶点构建的筛选模型有可能筛选到不仅对结核分枝杆菌而且对多种其它病原菌均有效的活性化合物, 而且所筛选到的阳性样品对人体的毒性也会比较小。另外, 苯丙氨酰-tRNA 合成酶是可溶的, 活性比较稳定的, 易于从重组表达系统中大量分离纯化<sup>[12-13]</sup>, 这对于构建筛选模型并运用于高通量药物筛选而言无疑是极为有利的。因此, 本研究通过对该基因的克隆表达, 利用得到的重组结核分枝杆菌苯丙氨酰-tRNA 合成酶, 建立高通量药物筛选模型, 筛选有效的 PheRS 抑制剂, 为发现以 PheRS 为靶点的新型抗菌药物或先导化合物奠定基础。

## 1 材料

### 1.1 菌株和载体

菌株: 大肠杆菌菌株 DH5 $\alpha$ , BL21 ( $\lambda$ DE3)均为本实验室保藏。

细胞株: 小鼠巨噬细胞株 Raw264.7 本所筛选实验室保藏。

载体: pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector, 购自 Promega

公司, 原核表达载体 pET30a(+)为本实验室保存。

## 1.2 主要试剂和仪器

Pyrobest DNA 聚合酶、限制性内切酶、T4 DNA 连接酶均购自宝生物工程(大连)有限公司; 肌激酶、丙酮酸激酶、乳酸脱氢酶均购自美国 Sigma 公司。ÄKTA 层析系统, GE Healthcare; PolarFluostar 多功能荧光检测仪, 德国 BMG 公司。

## 1.3 待测样品

化合物样品: 本所筛选实验室库存。

发酵液样品: 本所筛选实验室库存, 制备发酵样品的微生物菌种分离自北京黑龙潭, 北京密云水库, 新疆喀纳斯湖, 以及江西庐山等地的土壤样品。发酵液样品的制备如参考文献[15-16]所述。

# 2 实验方法

## 2.1 结核分枝杆菌苯丙氨酰-tRNA 合成酶基因原核重组质粒的构建及其表达

**2.1.1 PheRS 基因的体外扩增:** 利用目前网络数据库中已公开的结核分枝杆菌 H37Rv 的基因组序列信息(结核分枝杆菌 H37Rv 基因组序列的 RefSeq 号 NC\_000962.2), 查询苯丙氨酰-tRNA 合成酶的序列, 针对其大小亚基对应的不同序列 *pheT* 和 *pheS*, 设计适当的引物, 引物由上海生工合成, 序列如下:

*pheS*: 上游: 5'-CCGCATATGTTGTCGCCGG AG-3' (*Nde* I);

下游: 5'-CCGAGATCTTCAGGCACCCAC C-3' (*Xba* I)。

*pheT*: 上游: 5'-GTGTGTGCCCATATGCGGCT ACCCTA-3' (*Nde* I);

下游: 5'-CTTAAAGCTTCCAGCCACGCAG CAC-3' (*Hind* III)。

以结核分枝杆菌 H37Rv 基因组 DNA 为模板, PCR 反应扩增出目的基因片段。扩增产物通过 1% 的琼脂糖凝胶电泳鉴定, 进行回收纯化, 然后

将目的片段回收, 进行末端加 A 反应。加尾的 PCR 产物与 pGEM-T Easy 载体在 T4 DNA 连接酶的作用下进行连接, 连接后的重组质粒分别命名为 T-*pheS* 和 T-*pheT*。连接产物转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 筛选后提取质粒双酶切鉴定插入片段后, 测序验证序列的正确性。

**2.1.2 原核表达载体的构建:** 结核分枝杆菌 H37Rv 的苯丙氨酰-tRNA 合成酶全酶是由  $\alpha$  亚基和  $\beta$  亚基共同构成的( $\alpha\beta$ )<sub>2</sub> 四聚体结构。为保证表达出来的 PheRS 具有活性, 需要构建能同时表达  $\alpha$  亚基、 $\beta$  亚基的表达载体 pET30a-*pheST*。首先克隆载体 T-*pheT* 和 pET-30a 载体用 *Nde* I 和 *Hind* III 双酶切获得目的基因片段 *pheT* 和线性化的 pET30a, 将两者连接后转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 提取质粒 pET30a-*pheT* 用 *Xba* I 和 *Hind* III 酶切, 获得连接有 RBS (核糖体结合位点)的 *pheT* 基因片段。克隆载体 T-*pheS* 用 *Nde* I 和 *Xba* I 双酶切, 获得目的基因片段 *pheS*。pET30a 用 *Nde* I 和 *Hind* III 双酶切, 获得线性化的 pET30a。将得到的 3 个片段同时连接, 转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 构建 pET30a-*pheST* 表达载体。测序验证序列的正确性。

## 2.2 重组质粒在大肠杆菌中的诱导表达及纯化

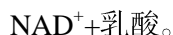
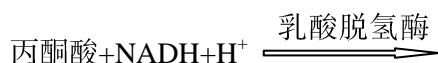
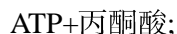
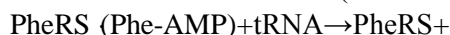
用构建好测序无误的 pET30a-*pheST* 质粒转化大肠杆菌 BL21(DE3), 挑取转化子在含 50 mg/L Kanamycin 的 LB 液体培养基中 37 °C、200 r/min 振荡培养至  $OD_{600}=0.8$ , 加入终浓度 1 mmol/L IPTG, 20 °C、200 r/min 培养过夜诱导表达。离心收获并裂解菌体细胞, 通过 SDS-PAGE 蛋白电泳检测目的蛋白在 BL21 中的表达。压力破碎后的菌体裂解液于 4 °C、12 000 r/min 离心 30 min, 取上清用 0.45  $\mu$ m 滤膜过滤。过滤后的裂解液采用 ÄKTA 系统进行蛋白的分离纯化, 以 1 mL 预装 HisTrap<sup>TM</sup> HP 镍离子亲和层析柱作为纯化介质, 用 Elution Buffer 梯度洗脱目的蛋白(20-800 mmol/L), 收集洗脱峰, 对纯化蛋白进行蛋白定量。脱盐后, 加

入蛋白保存液分装-80℃冻存。

### 2.3 PheRS 活性的测定

由于还原态的 NADH 在 340 nm 波长处有最大光吸收, 而氧化态的 NAD<sup>+</sup> 的最大光吸收在 260 nm 处。伴随着 NADH 到 NAD<sup>+</sup> 这一反应的进行, 反应体系在 340 nm 波长下的光吸收值会大大降低, 其数值可通过分光光度计或酶标仪测得。因此本研究通过分子生物学技术和生物化学的方法建立了一种优化的 PheRS 酶活测定体系。其与传统的用放射性同位素标记氨基酸的方法相比具有安全可靠, 简便易行, 高效价廉等优点, 是一种理想的抗生素筛选方法。方法的原理是通过检测反应体系在 340 nm 波长下的光吸收值变化来反映体系中 AMP 的生成量, 进而反映出 PheRS 的催化活性大小。酶活测定体系包括 100 mmol/L Hepes, 10 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 2.5 mmol/L 苯丙氨酸, 50 μg tRNA, 10 mmol/L ATP, 1 mmol/L 磷酸烯醇式丙酮酸, 1 mmol/L NADH, 1.8 U 肌激酶, 1.8 U 丙酮酸激酶, 1.8 U 乳酸脱氢酶, 以及待测 PheRS 4 μg, 总体积 100 μL。

酶活测定步骤:



### 2.4 结核分枝杆菌 PheRS 抑制剂酶水平筛选模型的建立、优化和应用

**2.4.1 筛选模型相关指标的测定:** 考察筛选模型的反应体系中对酶活性有影响的各组分, 确定最佳反应条件, 对模型进行优化。随后, 按 Zhang

等<sup>[17]</sup>的方法对孔板的稳定性、均一性进行评价。

计算下列模型评价指标:

$$\frac{S}{N} = \frac{\text{正常酶反应体系光值}}{\text{其他荧光值平均值}}$$

$$\text{CV} = \frac{SD}{X} \times 100\%$$

$$Z' = \frac{(AVG_{\max} - 3SD_{\max}/\sqrt{n}) - (AVG_{\min} + 3SD_{\min}/\sqrt{n})}{AVG_{\max} - AVG_{\min}}$$

式中, Z': 统计学指标, Z' ≥ 0.4 表示有意义; AVG<sub>max</sub>: 最大平均值; AVG<sub>min</sub>: 最小平均值; SD<sub>max</sub>: 最大标准差; SD<sub>min</sub>: 最小标准差; n: 孔数。

**2.4.2 待测样品的前处理:** 化合物样品: 10 mg 纯品化合物溶到 1 mL DMSO 中, 等体积 DMSO 稀释, 使其终浓度为 500 mg/L。发酵液样品: 发酵液用等体积丙酮抽提, 挥干后 DMSO 溶解。

**2.4.3 待测样品对 PheRS 抑制作用的测定:** 依照前文所述配制酶活测定反应体系, 并在每 100 μL 反应体系中加入 1 μL 待测化合物或发酵液样品。同时, 以不加 PheRS 为阳性对照(即酶活性被完全抑制), 以等体积的 DMSO 或发酵培养基抽提液代替待测样品为阴性对照(即未加抑制剂)。

酶抑制率 IP (%) =

$$\frac{\text{阴性对照孔} \Delta \text{OD}/\text{min} - \text{样品孔} \Delta \text{OD}/\text{min}}{\text{阴性对照孔} \Delta \text{OD}/\text{min} - \text{阳性对照孔} \Delta \text{OD}/\text{min}} \times 100\%$$

**2.4.4 假阳性结果的排除:** 假阳性排除体系: 100 mmol/L Hepes, 10 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 2.5 mmol/L 苯丙氨酸, 50 μg tRNA, 2 mmol/L AMP, 1 mmol/L 磷酸烯醇式丙酮酸, 1 mmol/L NADH, 1.8 U 肌激酶, 1.8 U 丙酮酸激酶, 1.8 U 乳酸脱氢酶, 并加入待测样品。将上述配好的反应体系加入 96 孔板, 放入酶标仪 37℃ 下监测, 5 min 内反应体系 OD<sub>340</sub> 值的变化。若反应体系的 OD<sub>340</sub> 值迅速降低, 则表明模型筛得的阳性化合物确实是 PheRS 的抑制剂而非后 3 个酶的抑制剂, 否则即为假阳性。

**2.4.5 平板法测定酶水平阳性样品的抗菌活性:** 通过平板纸片法(K-B)法测定抗菌活性。用耻垢分

枝杆菌(*Mycobacterium smegmatis* mc<sup>2</sup> 155)作为检定菌, 建立简便廉价而有效的细胞水平筛选方法。将耻垢分枝杆菌按 1.5% 接种于分枝杆菌培养基中, 倒平板(平皿直径 15 cm)。将加有样品的 5.6 mm 的纸片贴于平板上, 37 °C 培养 24 h 后测量抑菌圈的大小。采用异烟肼作为阳性对照。

阳性样品: 异烟肼: 50 µg/纸片;

化合物样品: 50 µg/纸片;

发酵液样品: 40 µL 发酵液/纸片。

**2.4.6 MTT 比色法检测阳性样品的细胞毒性:** 采用 MTT 法来检测筛选所得的阳性发样品对鼠单核-巨噬细胞 Raw264.7 细胞存活的影响情况, 从而初步判断阳性样品是否会对人体细胞的正常存活造成影响。MTT 检测步骤详见参考文献[18]。

细胞存活率计算式为:

$$\text{细胞存活率(\%)} = \frac{OD_{\text{加药组}} - OD_{\text{本底}}}{OD_{\text{空白对照组}} - OD_{\text{本底}}} \times 100\%。$$

### 3 结果

#### 3.1 原核表达载体的构建及表达

**3.1.1 pET30a-pheST 重组质粒的构建:** 分别以结核杆菌 H37Rv 基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 得到的 DNA 片段与苯丙氨酰-tRNA 合成酶的 *pheS* (1 026 bp) 和 *pheT* (2 496 bp) 的基因片段大小相符(图 1)。分别构建重组 T 质粒并命名为 T-*pheS* 和 T-*pheT*。如实验方法所述, 通过将合适的酶切片段包括连接有 RBS (核糖体结合位点) 的 *pheT* 基因片段、基因片段 *pheS* 以及线性化的 pET30a 同时连接, 获得重组质粒 pET30a-*pheST*。经 DNA 测序结果证明 *pheST* 基因序列和插入载体的方向均无误。

**3.1.2 结核分枝杆菌重组 PheRS 的表达和纯化:** 将重组表达质粒 pET30a-*pheST* 转化 *E. coli* BL21(DE3)感受态细胞(图 2), 经 IPTG 诱导后, 通过 SDS-PAGE 电泳检测总蛋白, 结果显示结

核分枝杆菌 PheRS 全酶得到了很好地表达, 其中, *pheS* 基因编码的 α 亚基约 35–40 kD, *pheT* 基因 β 亚基约 85–90 kD。SDS-PAGE 检测结果表明纯化后的蛋白具有较高的纯度, 杂带几乎不可见。

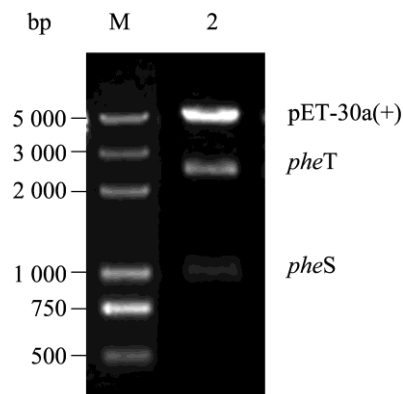


图 1 pET30a-*pheST* 重组质粒酶切鉴定图

**Fig. 1 Digestion analysis of pET30a-*pheST* by restriction enzymes**

注: M: DNA marker; 2: pET30a-*pheST*; 重组质粒经 *Nde* I、*Xba* I 和 *Hind* III 三酶切结果。

Note: M: DNA marker; 2: Recombinant plasmid pET30a-*pheST* digested with *Nde* I, *Xba* I and *Hind* III.

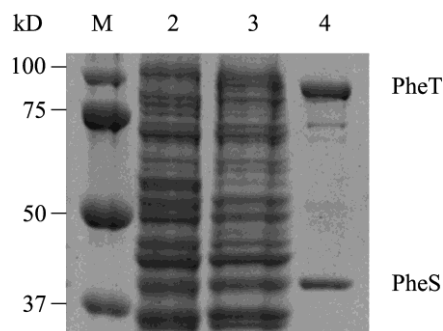


图 2 纯化后的目的蛋白 SDS-PAGE 图

**Fig. 2 The purification of PheRS expressed in *E. coli***

注: M: Protein marker; 2: 全菌蛋白; 3: 超声破碎后上清中的蛋白; 4: 经纯化蛋白。

Note: M: Protein marker; 2: Total cell lysates; 3: Supernatant fraction after centrifugation; 4: Purified recombinant PheRS.

#### 3.2 PheRS 的酶学性质测定

**3.2.1 重组 PheRS 蛋白比活力的测定:** 本研究把 37 °C 下, 每分钟催化 1 µmol/L 底物 ATP 生成产物 AMP 所需的 PheRS 量定义为一个活力单位

(U)。结果显示实验组  $\Delta mOD_{340}/\text{min}$  值为 15.675, 空白对照组  $\Delta mOD_{340}/\text{min}$  值为 3.925 (图 3), 每分钟反应的 NADH 量为  $18.69 \mu\text{mol/L}$ , 即每分钟反应的 ATP 量为  $18.69 \mu\text{mol/L}$ , 而反应体系中加入的酶量为  $4 \mu\text{g}$ , 由此计算得到每毫克重组 PheRS 的比活力是 4 672.5 U。

**3.2.2 反应速率与酶浓度的关系:** 本研究中保持反应体系中其它反应物的恒定浓度, 分别测定在不同 PheRS 浓度下的反应速率。结果发现: 反应速率随着酶浓度的增加而逐渐加快, 两者呈良好线性关系(图 4)。

**3.2.3 重组 PheRS 蛋白反应动力学研究:** 本研究中, PheRS 催化反应的底物分别为 ATP、Phe。为此在固定其他底物浓度的条件下, 分别设置一

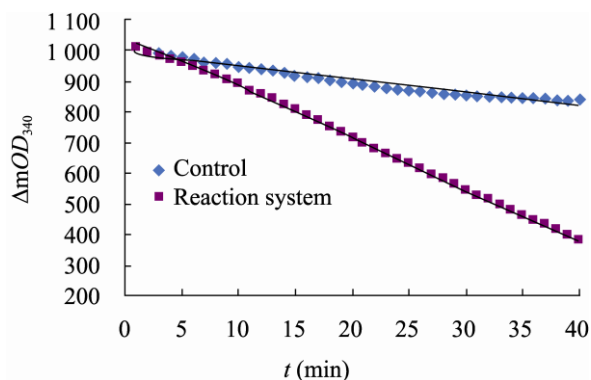


图 3 PheRS 催化反应体系光吸收变化曲线

Fig. 3 Experimental determination of the reaction rate

注: Control: 对照; Reaction system: 100  $\mu\text{L}$  反应体系中加入  $4 \mu\text{g}$  PheRS.

Note: Reaction system: Reaction system with the PheRS at  $4 \mu\text{g}/100 \mu\text{L}$ .

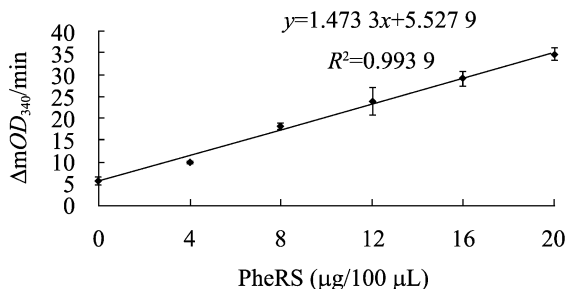


图 4 反应速率与酶浓度的关系

Fig. 4 The reactional rate as a function of the concentration of PheRS

系列 ATP 浓度和 Phe 浓度梯度, 研究其酶反应动力学。研究结果表明重组 PheRS 对底物 ATP 的米氏常数  $K_m$  值为  $0.133 (\text{mmol/L})$ , 最大反应速率  $V_{\text{max}}$  值为  $9.57 (\Delta mOD_{340}/\text{min})$  (图 5), 对底物 Phe 的米氏常数  $K_m$  值为  $0.062 (\text{mmol/L})$ , 最大反应速率  $V_{\text{max}}$  值为  $27.02 (\Delta mOD_{340}/\text{min})$  (图 6)。此结果说明 PheRS 与底物 ATP 的亲合力小于与底物 Phe 的亲合力。

**3.2.4 温度对重组 PheRS 酶活性的影响:** 本研究测定了不同温度对 PheRS 酶活性的影响(图 7)。结果表明: 在  $28 \text{ }^{\circ}\text{C}$ – $43 \text{ }^{\circ}\text{C}$  范围内, 随着反应温度的升高反应速率不断加快, 并在  $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$  时基本达到最高, 因此选择  $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$  为反应温度。

**3.2.5 反应时间对反应吸光值的影响:** 本研究测定了不同反应时间对反应体系的影响(图 8)。结果表明在一定的时间范围内, 反应体系的  $\Delta mOD_{340}$  值与反应时间处于良好线性关系。反应时间超过 50 min 后, 吸光值曲线明显趋于平直而不再下降,

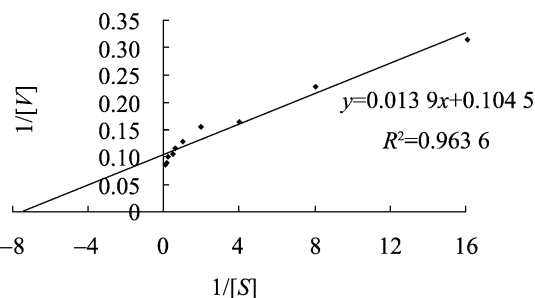


图 5 PheRS 对于底物 ATP 的米氏常数的测定

Fig. 5 The curve of Michaelis-Menten equation

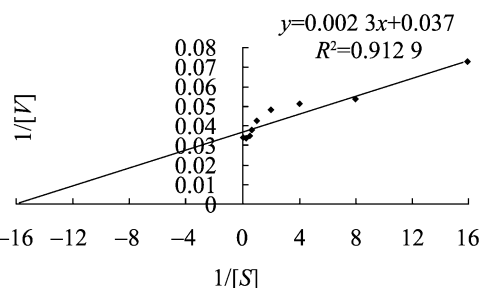


图 6 PheRS 对于底物 Phe 的米氏常数的测定

Fig. 6 The curve of Michaelis-Menten equation

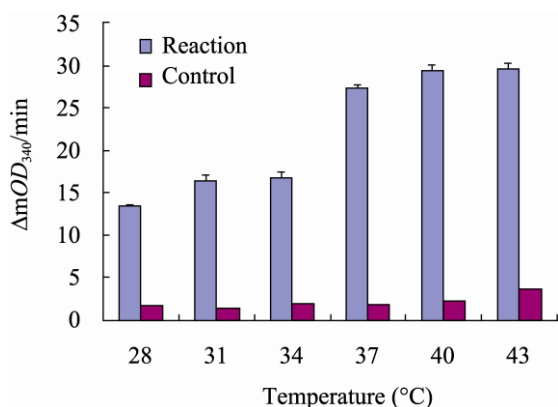


图 7 温度对酶活性的影响

Fig. 7 The effect of the temperature on fluorescence

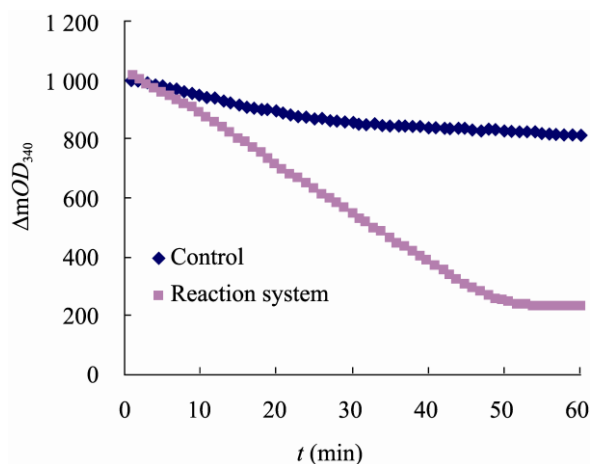


图 8 反应时间对吸光值的影响

Fig. 8 The effect of the reaction time on absorption

说明反应已达终末, 此后的数据不应再作为统计吸光值变化平均值的依据, 因此反应时间应控制在 50 min 之内为宜。

综上所述, 经优化后的酶反应条件为: 反应温度 37 °C; 反应时间 50 min; 酶浓度 4 μg/100 μL; 底物 ATP 终浓度为 2 mmol/L; Phe 终浓度为 2.5 mmol/L。

### 3.3 药物筛选模型的评价

**3.3.1 DMSO 浓度对酶活性的影响:** 反应体系中分别加入 0–6% DMSO, 观察不同 DMSO 浓度对反应体系中酶活性的影响(图 9)。结果表明, DMSO 浓度高于 3% 时 OD<sub>340</sub> 读数明显下降。因

此确定体系中最高 DMSO 浓度不超过 3%。

**3.3.2 反应体系中各成分的影响:** 本研究对反应体系中各成分对 340 nm 处吸收值的影响进行了考察(图 10), 计算该模型的信噪比=15/0.643 75=23.3, 符合筛选模型信噪比大于 3 的要求。

**3.3.3 孔板均一性和稳定性评价:** 本研究根据酶反应体系中阳性对照组和阴性对照组的数据来计

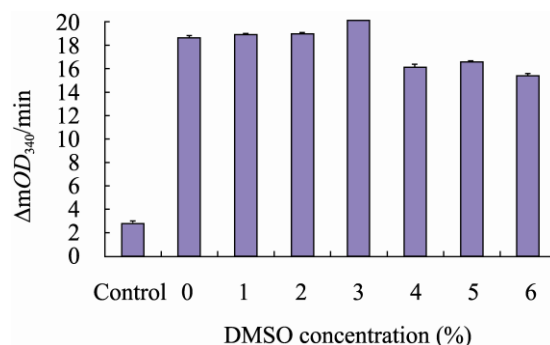


图 9 DMSO 浓度对酶活性的影响

Fig. 9 The effect of the concentration of DMSO on enzyme activity

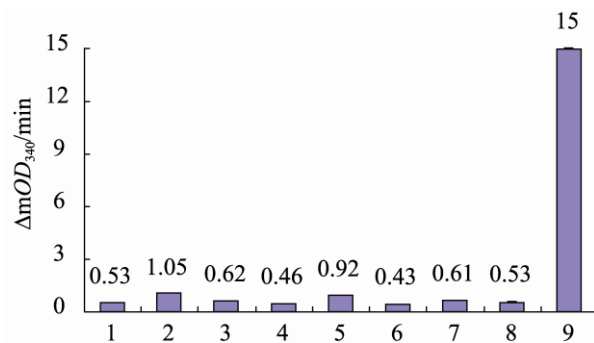


图 10 反应体系中各成分对酶活性检测的影响

Fig. 10 The effect of single component to the assay

注: 1: 阴性对照(反应缓冲液); 2: 阴性对照(反应缓冲液+底物 ATP); 3: 阴性对照(反应缓冲液+底物 tRNA); 4: 阴性对照(反应缓冲液+底物 Phe); 5: 阴性对照(反应缓冲液+酶); 6: 阴性对照(反应缓冲液+DMSO); 7–8: 阴性对照(反应缓冲液+发酵培养基); 9: 阳性对照。

Note: 1: Negative control (with reaction buffer); 2: Negative control (with reaction buffer and ATP); 3: Negative control (with reaction buffer and tRNA); 4: Negative control (with reaction buffer and Phe); 5: Negative control (with reaction buffer and PheRS); 6: Negative control (with reaction buffer and DMSO); 7–8: Negative control (with reaction buffer and ferment medium); 9: Positive control.

算变异系数(CV)以及 Z', 从而对模型进行可行性分析, 经优化的体系与 96 孔板中进行反应, 分别设阴性对照板(正常酶反应体系)和阳性对照板, 每天进行一次体系验证, 重复 3 d。 $CV_{\text{阴性对照}}=0.769\%<20\%$ ;  $CV_{\text{阳性对照}}=0.573\%<20\%$ ;  $Z'=0.90>0.4$ 。各项指标均符合模型筛选的要求。

3.4 样品筛选结果

本研究中将抑制率大于 30% 的样品认定为阳性样品。共筛选了 11 600 个化合物样品, 经过 3 次生物学重复和假阳性结果的排除, 最终获得 9 个阳性化合物样品, 阳性率为 0.078%。另外本研究还对样品库中的 5 200 个发酵液样品进行了筛选, 经过 3 次生物学重复以及假阳性结果的排除, 最终获得 37 个具有抑制 PheRS 活性的阳性发酵液样品, 阳性率为 0.71%。上述化合物样品和发酵液样品再经平板法测定抗菌活性, 结果表明 1 个阳性化合物(C-1)和 7 个阳性发酵液样品在酶水平和细胞水平均具有较好的生物学活性, 结果见表 1。

表 1 阳性样品的抑酶活性及抗菌活性 Table 1 The inhibitory effect of positive samples		
样品号 Sample	酶活抑制率 Inhibitory rate of PheRS activity (%)	对耻垢的抑菌圈直径 Inhibitory zone (mm)
C-1	61.3	24.5
I08AB-01310	34.1	8.5
I09FA-00482	41.5	8.0
I09FA-00484	47.5	8.0
I09FA-00494	44.5	8.5
I10AB-00614	48.6	8.5
I10AB-00631	53.1	11.0
I10AA-00733	35.4	12.5

3.5 MTT 法检测细胞存活率结果

本研究还采用 MTT 试验检测了在上述阳性发酵液样品作用下的鼠单核-巨噬细胞 Raw264.7

的细胞存活率, 7 个发酵液样品中, 仅有 I10AB-00614 的细胞毒性较大, 其余发酵液样品作用于细胞后存活率均在 80% 以上, 细胞毒性较小(表 2)。最终得到了 6 个在酶水平和抗分枝杆菌方面均具有良好的活性且毒性较低的发酵液阳性样品, 值得进一步深入研究。

表 2 阳性样品作用下的 Raw264.7 细胞存活率 Table 2 The survival rate of macrophage in the presence of the positive samples				
样品号 Sample	不同发酵液浓度下的细胞存活率 The survival rate of macrophage in different ferment medium			
	0.02%	0.05%	0.10%	0.20%
I09FA-00484	100.52	99.48	98.15	86.12
I09FA-00494	100.86	99.87	96.89	93.07
I10AB-00614	30.34	9.39	6.76	6.33
I10AA-00733	90.51	89.05	91.81	90.47
I08AB-01310	110.68	100.99	94.05	96.03
I09FA-00482	111.89	103.92	100.90	100.47
I10AB-00631	104.82	105.73	104.48	102.02

4 讨论

氨酰-tRNA 合成酶在蛋白质的生物合成过程中的作用尤为重要, 它催化氨基酸与相应的 tRNA 合成氨酰-tRNA。一旦病原菌的某种氨酰-tRNA 合成酶受到抑制, 将会导致其蛋白质的生物合成中断以及许多重要的生理过程受影响, 病原菌在体外或是在宿主体内的生长繁殖也就随之终止。苯丙氨酰-tRNA 合成酶(PheRS)与其它氨酰-tRNA 合成酶在结构以及催化特性方面的差异将有利于避免交叉耐药的问题。同时, PheRS 在不同细菌中的序列比较保守, 利用结核分枝杆菌 PheRS 为靶点构建的筛选模型有可能筛选到对多种病原菌都有效的广谱抗生素。

本研究对结核分枝杆菌 PheRS 进行了克隆表达、分离纯化, 获得了纯度较高的目的蛋白, 并



经酶活性的测定与评价,建立了以结核分枝杆菌重组 PheRS 为靶点的酶水平的筛选模型。利用该模型筛选了库存化合物样品 11 600 个,获得阳性化合物样品 9 个,经过细胞水平抗菌活性的初步验证,获得一个阳性化合物 C-1 (六氯酚),在酶水平和细胞水平均具有较好的活性。阳性化合物 C-1 (六氯酚)曾被用于外用抗菌制剂,并表现出极强的抗菌活性<sup>[16]</sup>,但文献报道其对真核生物具有很强的毒性<sup>[19-21]</sup>。因此,本研究不将其作为抗菌药物的研究对象,但因首次发现其对 PheRS 具有较强的抑制活性,考虑将对其作用机制进行深入的研究。另外,本研究对利用结核分枝杆菌 PheRS 酶水平筛选模型筛选了库存发酵液样品 5 200 个,对初筛阳性菌株进行两次重复发酵和筛选,选取对 *Mycobacterium smegmatis* mc<sup>2</sup> 155 和 PheRS 均有活性的菌株作为复筛阳性菌株。随后用细胞毒实验对阳性样品的真核生物毒性进行评价,最终得到了 6 个发酵液阳性样品在酶水平和抗分枝杆菌方面均具有良好的活性且毒性较低。

苯丙氨酰-tRNA 合成酶(PheRS)由于其本身具有的诸多优良特点,有利于作为新型、低毒、高效的药物筛选靶点而开展研究。在多重耐药菌日益严重的今天,为避免交叉耐药的出现,从微生物资源中获得具有新的作用机制的活性物质将成为新型抗结核药物开发的工作重点。本研究获得的阳性发酵液样品具有 PheRS 酶的特异抑制性,同时具有较高的抗菌活性和低毒性,为今后继续进行 PheRS 抑制剂筛选以及活性化合物的深入研究提供了初步的实验基础。

## 参 考 文 献

- [1] O'Brien RJ, Nunn PP. The need for new drugs against tuberculosis. Obstacles, opportunities, and next steps[J]. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, 2001, 163(5): 1055-1058.
- [2] Young DB, Cole ST. Leprosy, tuberculosis, and the new genetics[J]. Journal of Bacteriology, 1993, 175(1): 1-6.
- [3] Ibba M, Söll D. Aminoacyl-tRNA synthesis[J]. Annual Review of Biochemistry, 2000, 69: 617-650.
- [4] Ataide SF, Ibba M. Small molecules: big players in the evolution of protein synthesis[J]. ACS Chemical Biology, 2006, 1(5): 285-297.
- [5] Boyce JM. MRSA patients: proven methods to treat colonization and infection[J]. Journal of Hospital Infection, 2001, 48(Suppl A): S9-S14.
- [6] Brown MJ, Mensah LM, Doyle ML, et al. Rational design of femtomolar inhibitors of isoleucyl tRNA synthetase from a binding model for pseudomonas acid-A[J]. Biochemistry, 2000, 39(20): 6003-6011.
- [7] Hurdle JG, O'Neill AJ, Chopra I. Prospects for aminoacyl-tRNA synthetase inhibitors as new antimicrobial agents[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2005, 49(12): 4821-4833.
- [8] Ferrer E. Spotlight on targeting aminoacyl-tRNA synthetases for the treatment of fungal infections[J]. Drug News and Perspectives, 2006, 19(6): 347-348.
- [9] Racznik G, Ibba M, Söll D. Genomics-based identification of targets in pathogenic bacteria for potential therapeutic and diagnostic use[J]. Toxicology, 2001, 160(1/3): 181-189.
- [10] Gallant P, Finn J, Keith D, et al. The identification of quality antibacterial drug discovery targets: a case study with aminoacyl-tRNA synthetases[J]. Expert Opinion on Therapeutic Targets, 2000, 4(1): 1-9.
- [11] Macarrón R, Mensah L, Cid C, et al. A homogeneous method to measure aminoacyl-tRNA synthetase aminoacylation activity using scintillation proximity assay technology[J]. Analytical Biochemistry, 2000, 284(2): 183-190.
- [12] Beyer D, Kroll HP, Endermann R, et al. New class of bacterial phenylalanyl-tRNA synthetase inhibitors with high potency and broad-spectrum activity[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2004, 48(2): 525-532.
- [13] John WS, Martin H, Emma JJ, et al. Identification, cloning, and expression of a functional

- phenylalanyl-tRNA Synthetase (pheRS) from *Staphylococcus aureus*[J]. Protein Expression and Purification, 2001, 21(3): 470-484.
- [14] Camus JC, Pryor MJ, Mdigue C, et al. Re-annotation of the genome sequence of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv[J]. Microbiology, 2002, 148(10): 2967-2973.
- [15] 王宇, 赵莉莉, 李秋萍, 等. 绿脓杆菌 SecA ATPase 抑制剂筛选模型的建立和应用[J]. 微生物学通报, 2010, 37(12): 1771-1778.
- [16] 邵天舒, 魏玉珍, 李秋萍, 等. 以蛋白激酶 G 为靶点的抗结核药物筛选模型的建立和初步应用[J]. 微生物学通报, 2010, 37(2): 312-318.
- [17] Zhang JH, Chung TD, Oldenburg KR. A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throughput screening assays[J]. Journal of Biomolecular Screening, 1999, 4(2): 67-73.
- [18] 邹文进, 刘祖国, 蒋爱华, 等. 多西环素诱导单核细胞系 THP-1 凋亡的实验研究[J]. 中国病理生理杂志, 2007, 23(6): 159-162.
- [19] Haley CE, Marling-Cason M, Smith JW, et al. Bactericidal activity of antiseptics against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*[J]. Journal of Clinical Microbiology, 1985, 21(6): 991-992.
- [20] 苏国臣. 日用化学品与杀菌织品成分之一六氯酚胚胎毒作用的实验研究[J]. 国外医学卫生学分册, 1983(2): 94-95.
- [21] 靳家声, 余世珍. 驱虫药硫双二氯酚和六氯酚的应用概况[J]. 中国兽医杂志, 1994(9): 17-20.
- [22] 张鹭, 王庆忠, 徐颖, 等. 结核分枝杆菌泛酸激酶的克隆表达及酶学性质[J]. 第四军医大学学报, 2006, 27(23): 2135-2138.
- [23] 邵天舒. 以蛋白激酶 G 为靶点的新型抗结核分枝杆菌药物筛选模型的建立和应用[D]. 北京: 中国协和医科大学硕士学位论文, 2009.

## 稿件书写规范

### 论文中计量单位的表示方法

为执行国务院发布的《关于在我国统一实行法定计量单位的命令》的规定, 计量单位和单位符号按国家技术监督局发布的《量和单位》GB3100-3102-93 执行。单位符号均用英文小写(正体), 不允许随便对单位符号进行修饰。现将本刊常用计量单位和符号介绍如下, 希望作者参照执行。

时间: 日用 d; 小时用 h; 分钟用 min; 秒用 s 等表示。

溶液浓度: 用 mol/L, 不用 M (克分子浓度)和 N (当量浓度)等非许用单位表示。

旋转速度: 用 r/min, 不用 rpm。

蒸汽压力: 用 Pa 或 kPa、MPa 表示。

光密度: 用 OD (斜体)表示。

生物大分子的分子量: 蛋白质用 D 或 kD, 核酸用 bp 或 kb 表示。

图表中数值的物理量和单位: 物理量符号采用斜体, 单位用正体并用括号括起, 例如:  $t$  (h) (表示时间, 单位是小时)。带数值的计量单位: 计量单位不能省略, 跟数字之间加一空格(%除外), 例如: 20 cm×0.3 cm, 不能写成 20×0.3 cm; 3 °C-5 °C 不可写成 3-5 °C; 3%-6%不可写成 3-6%等。