

以SecA为靶点的新型抗绿脓杆菌药物细胞水平筛选模型的建立和应用

赵莉莉 李秋萍 魏玉珍 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所 北京 100050)

摘要: Sec途径(即分泌途径 secretion pathway)是蛋白质转运的主要途径。其中,最为关键的组分之一是SecA ATP酶,是蛋白质转运途径中的“动力泵”,通过ATP的水解循环驱使蛋白质前体穿过细菌内膜,在细菌中是不可缺少的。我们推测抑制SecA ATP酶活性的化合物,必然会在一定程度上抑制蛋白质的转运和分泌。通过绿脓杆菌与大肠杆菌SecA蛋白的互补作用,利用本实验室构建的高效表达SecA蛋白的基因工程菌,建立了SecA蛋白ATP酶活性抑制剂的细胞水平筛选模型。利用所纯化的绿脓杆菌SecA蛋白的ATP酶活测定体系,验证了所建立的细胞水平筛选模型具有一定的特异性。研究结果表明其中两个酯相组分在细胞水平和蛋白水平均具有活性,值得进行深入的研究。

关键词: 药物筛选, SecA蛋白, 绿脓杆菌, 蛋白转运

The Establishment and Application of Anti-*Pseudomonas aeruginosa* Cell-based Screening Model Targeting to SecA

ZHAO Li-Li LI Qiu-Ping WEI Yu-Zhen ZHANG Yu-Qin YU Li-Yan*

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

Abstract: The most of secreted proteins are exported by Sec translocase (secretion pathway). SecA ATPase is one of the most important subunit in the Sec translocase, which is preprotein translocase nanomotor that undergo membrane insertion and deinsertion to drive preprotein across the bacterial inner membrane, and SecA is indispensable to bacteria. It should be presumed that the compound which inhibits the activity of SecA ATPase probably can be used as the candidate of bactericide. A *secA* gene from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 was amplified and expressed in *Escherichia coli* BL21.19 (*secA13*). It has been shown that the wild-type SecA of *Pseudomonas aeruginosa* could fully complement the *E. coli* amber (*secA13*) mutant at the non-permissive temperature. So a cell level screening model targeting on SecA was established based on the above result. The inhibition of PaSecA ATPase activity was applied to validate the specificity of the cell-based method. Two positive samples based on both of cell and enzyme activities will be further studied.

Keywords: Drugs screening, SecA, *Pseudomonas aeruginosa*, Protein translocation

铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*), 又名绿脓杆菌, 是假单胞菌属中的代表菌种, 是一种重要的院内感染条件致病菌, 常常感染免疫力低下的病人, 引起菌血症、肺炎和泌尿系统感染。近几年的研究表明绿脓杆菌与大多数囊性纤维化病人的发病率和死亡率有关^[1], 81%的成年病人感染了绿脓杆菌^[2]。绿脓杆菌具有先天及后天的多重耐药性, 经常表现对 β -内酰胺类、氯霉素类、喹诺酮类、磺胺类等多种抗生素的多重耐药, 临床治疗十分困难。因此, 迫切需要新型、低毒并且有效的抗绿脓杆菌药物。

三分之一的蛋白质在合成后要被转运到细胞质外才能发挥功能^[3-5]。大多数是通过Sec途径(即分泌途径 secretion pathway)进行转运的^[6]。SecA蛋白是Sec途径中的“动力泵”, 它是一种ATP酶, 并且是Sec途径中唯一已知的能量转化酶, 可通过水解ATP产生的能量推动多肽穿过细胞膜。而在真核细胞的Sec系统中不存在对应的具有ATP酶活性的组分, 而是由热休克蛋白Bip来完成与SecA ATP酶相似的功能^[7]。因此SecA蛋白是细菌所独有且不可缺少的。我们推测, 抑制SecA ATP酶活性的化合物必然在一定程度上抑制蛋白的转运和分泌, 因此可以将SecA蛋白作为筛选抗菌药物的崭新和低毒的靶点。本研究通过建立细胞水平的筛选模型, 然后通过蛋白水平酶活抑制验证的方法对发酵液样品进行筛选, 寻找SecA蛋白的ATP酶抑制剂。

1 材料

1.1 菌株

BL21.19[*secA(am)sup^{Fs}trp(am)zch::Tn10recA::cat clp A::kan*], 由佐治亚州州立大学生物系Tai 博士惠赠。BL21.19/pET20b/*PasecA*: 高效表达绿脓杆菌SecA蛋白的温度敏感型大肠杆菌表达宿主细胞BL21.19, 为本实验室构建并保藏。BL21.19/pET5a/*EcsecA*: 高效表达大肠杆菌SecA蛋白的温度敏感型大肠杆菌表达宿主细胞 BL21.19, 为本实验室构建并保藏。BL21.19/pET20b: 携带 pET20b 空质粒的温度敏感型大肠杆菌 BL21.19, 为本实验室构建并保藏。野生型绿脓杆菌(PAO1), 为本实验室保藏。

1.2 质粒

pET20b, 为本实验室保藏。

1.3 培养基

1.3.1 TA(g/L): K_2HPO_4 7, KH_2PO_4 3, $(NH_4)_2SO_4$ 1, 柠檬酸钠($C_6H_5Na_3O_7 \cdot H_2O$) 0.47, 胰蛋白胨 10, NaCl 5, (若需固体另加琼脂 18 g), pH 7.0。

1.3.2 S(g/L): 蛋白胨 5, 牛肉膏 3, (若需固体另加琼脂 18 g), pH 8.0。

1.3.3 LB(g/L): 胰蛋白胨 10, 酵母粉 5, NaCl 10, (若需固体另加琼脂 18 g), pH 7.0。

1.4 主要溶液

1.4.1 酶反应缓冲液: 0.5 mol/L Tris-HCl, 0.2 mol/L KCl, 0.2 mol/L NH_4Cl , 10 mmol/L DTT, 20 mmol/L $Mg(OAc)_2$ 。置于4℃保存。

1.4.2 颜色试剂: 4.2%钼酸铵溶解于4 mol/L HCl, 与0.45%孔雀绿按1:3混合并过滤, 然后加入Triton X-100, 至终浓度0.1%。置于室温保存。

1.5 主要仪器

蛋白垂直电泳槽购自北京市六一仪器厂, 高速低温离心机购自 Thermo 公司, 荧光检测仪购自 BMG 公司。

2 实验方法

2.1 样品的准备

细胞水平筛选样品的准备: 将分离自四川、江西、北京等地土壤的放线菌菌株, 经过纯化后, 进行28℃发酵培养96 h。然后取10 mL 菌株发酵液至试管中, 3000 r/min 离心得到的上清即为用于细胞水平筛选的样品。

蛋白水平验证样品的准备: 由于酶活测定体系不能引入外源磷酸根离子, 因此须将发酵液加入等体积乙酸乙酯抽提, 离心后的上层酯相即为用于蛋白水平验证的样品。

2.2 细胞水平筛选方法的建立

BL21.19 是一株温度敏感型琥珀突变的大肠杆菌, 正常的生长温度是30℃, 在这个温度它的 *secA* 基因可以正常表达。当温度达到42℃时, *secA* 基因不能表达出有功能的蛋白质, 细菌不能生长。将绿脓杆菌的 *secA* 基因插入到表达载体中, 再转化到大肠杆菌 BL21.19 中, 在42℃时, 若绿脓杆菌 *secA* 基因的表达可以弥补温度敏感型 BL21.19 在非允许温度下的生长缺陷, 细菌可以正常生长。因此, 我们分别挑取 BL21.19/pET20b、BL21.19/pET20b/*PasecA*、BL21.19/pET5a/*EcsecA* 的单菌落, 在两个相同的含

有 100 μg/mL 氨苄青霉素的 LB 平板上划线。并将两个相同的平板分别放在 30℃ 和 42℃ 培养过夜。观察 42℃ 时 BL21.19/pET20b/*PasecA* 能否正常生长。

2.3 细胞水平筛选

细胞水平的筛选是通过纸片法进行的, 即将 TA 和 S 固体培养基加热熔化, 冷却至温度接近体温时, 往 TA 培养基中加入氨苄青霉素和 50%葡萄糖溶液, 终浓度分别为 100 μg/mL、0.5%(即为 TAG 培养基)。将 BL21.19/pET20b/*PasecA*、BL21.19/pET5a/*EcsecA* 及 BL21.19/pET20b 的过夜培养的菌液分别加入至含有 100 μg/mL 氨苄青霉素的 TAG 培养基中, 菌液终浓度为 2%, 将 PAO1 的过夜培养的菌液加入至 S 培养基中, 菌液终浓度为 1%。将含有菌液的培养基迅速倒入含有边框的透明玻璃平板, 厚度约 3 mm。

待培养基凝固后, 用 6 mm 纸片沾取发酵液上清, 然后整齐并保持一定间隔地贴在检定板上。将铺有 BL21.19/pET20b/*PasecA* 和 BL21.19/pET5a/*EcsecA* 两种检定菌的检定板放在 42℃ 培养, BL21.19/pET20b 放在 30℃ 培养, PAO1 放在 37℃ 培养。第二天测量抑菌圈的大小。

2.4 绿脓杆菌 SecA 蛋白的纯化

绿脓杆菌 SecA 蛋白的表达及纯化过程请参见文献[8]。

2.5 阳性样品在蛋白水平活性的验证

绿脓杆菌 SecA 蛋白 ATP 酶活测定体系如表 1 所示。

将反应体系在 37℃ 孵育 30 min。然后加入 160 μL 颜色试剂反应 1 min。最后加入 20 μL 34%柠檬酸钠溶液终止反应。在 660 nm 测吸光值。

表 1 绿脓杆菌 SecA 蛋白 ATP 酶活测定体系
Table 1 The test system of *Pseudomonas aeruginosa* SecA ATPase activity

	阳性对照组 Positive control group	阴性对照组 Negative control group	空白对照组 Control group	筛选样品组 Sample screening group
酶反应缓冲液 Reaction buffer	+	+	+	+
20 mmol/L ATP	+	+	+	+
ATP 酶 ATPase	+(热失活)	+	-	+
去离子水 ddH ₂ O	+	+	+	-
微生物发酵液 Microbial fermentation broth	-	-	-	+

3 实验结果

3.1 42℃ 下外源 secA 基因对 BL21.19 缺陷的互补作用

分别挑取 BL21.19/pET20b、BL21.19/pET20b/*PasecA*、BL21.19/pET5a/*EcsecA* 的单菌落, 在两个相同的含有 100 μg/mL 氨苄青霉素的 LB 平板上划线。并将两个相同的平板分别放在 30℃ 和 42℃ 培养过夜。BL21.19/pET20b 由于没有外源的 *secA* 基因弥补其在非允许温度下的生长缺陷, 故其在 42℃ 时不生长。BL21.19/pET5a/*EcsecA* 携带有大肠杆菌的 *secA* 基因, 因此它在 30℃ 和 42℃ 都能够正常生长。BL21.19/pET20b/*PasecA* 携带有绿脓杆菌的 *secA* 基因, 它在 42℃ 也可以正常生长(图 1)。实验结果表明绿脓杆菌的 SecA 蛋白能够弥补温度敏感型

BL21.19 在非允许温度下的生长缺陷。

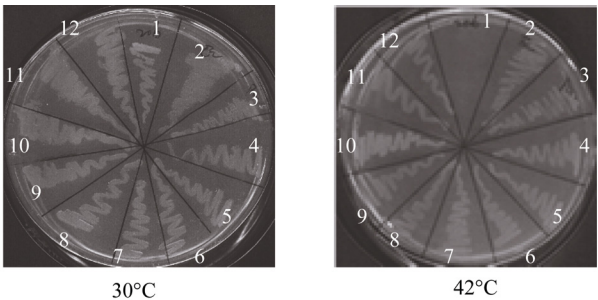


图 1 绿脓杆菌和大肠杆菌 SecA 蛋白对温度敏感型 BL21.19 在非允许温度下生长缺陷的互补作用

Fig. 1 Complementation of SecA Protein between *E. coli* and *Pseudomonas aeruginosa*

1: BL21.19/pET20b; 2: BL21.19/pET5a/*EcsecA*; 3~12: BL21.19/pET20b/*PasecA*

鉴于以上实验结果, 建立了细胞水平的 SecA 蛋白抑制剂的筛选模型。将能够表达绿脓杆菌和大肠杆菌 SecA 蛋白的温度敏感型大肠杆菌 BL21.19 (即 BL21.19/pET20b/ *PasecA* 和 BL21.19/pET5a/ *EcsecA*)及 PAO1 作为检定菌, BL21.19/pET20b 作为对照, 分别观察发酵液样品或化合物在 42°C、37°C 或 30°C 下对检定菌或对照菌生长抑制的差异, 从而筛选得到选择性作用于绿脓杆菌 SecA 蛋白 ATP 酶活性的阳性样品。

若检定菌都能正常生长, 说明发酵液样品对 SecA 蛋白没有抑制作用。若检定菌 BL21.19/pET20b/ *PasecA* (42°C)不能生长, 而 BL21.19/pET20b (30°C)和 BL21.19/pET5a/ *EcsecA* (42°C)能正常生长, 则该样品有可能对绿脓杆菌 SecA 蛋白有选择性抑制作用。

3.2 细胞水平筛选结果

利用所建立的细胞水平的筛选模型, 对 7614 个发酵液样品进行了筛选, 通过测量抑菌圈(抑菌圈大于 7 mm 即认为该发酵液样品为阳性)并经过两次生物学重复, 最终得到 30 个在 42°C 对检定菌 BL21.19/pET20b/ *PasecA* 的生长有抑制作用, 而对 BL21.19/pET20b (30°C)和 BL21.19/pET5a/ *EcsecA* (42°C)无抑制作用的阳性发酵液样品(表 1)。其中 I06AB-02747 的发酵液不仅对 BL21.19/pET20b/ *PasecA* (42°C)有活性, 对 PAO1 (37°C)的生长也有抑制作用的样品, 说明它的活性组分能够透过绿脓杆菌的外膜, 很有研究潜力。

3.3 绿脓杆菌 SecA 蛋白纯化结果

表达后的菌体经过破碎、离心后, 弃去沉淀, 上清用硫酸铵沉淀先除去一部分杂蛋白, 然后再经过阳离子交换及分子筛, 最终能够得到纯度在 95%以上的 SecA 蛋白, 能够满足活性检测的要求(图 2)。

3.4 阳性样品对绿脓杆菌 SecA 蛋白 ATP 酶活抑制作用的测定

为了检测阳性样品对绿脓杆菌 SecA 蛋白的选择性抑制活性, 由于酶活测定系统中不能引入外源的磷酸根离子, 因此, 对活性稳定的 30 个发酵液样品进行了乙酸乙酯抽提, 将得到的酯相成分在蛋白水平测定酶活抑制率。SecA 蛋白 ATP 酶活抑制百分率的计算公式如下:

$$\text{抑制率}(\%) = \{1 - [A_{660}(\text{样品}) - A_{660}(\text{阳性对照})] / [A_{660}(\text{阴性对照}) - A_{660}(\text{阳性对照})]\} \times 100$$

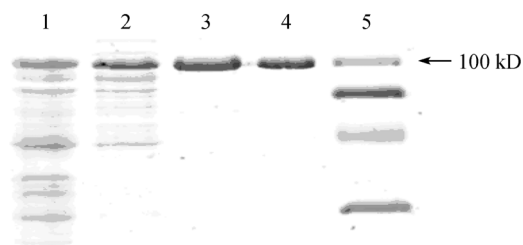


图 2 绿脓杆菌 SecA 蛋白的纯化

Fig. 2 Purification of protein of *P. aeruginosa* SecA

1: 细胞全蛋白; 2: 经硫酸铵沉淀后的蛋白; 3: 经过阳离子交换后的蛋白; 4: 经过分子筛后的蛋白; 5: 蛋白分子量标准

1: Whole cells; 2: Ammonium sulfate fractionation; 3: After SP column chromatography; 4: After size exclusion column chromatography; 5: Protein standard marker

其中 96.7%的样品对绿脓杆菌 SecA 蛋白的 ATP 酶活性有抑制作用(表 2), 而空白培养基的酯相组分对酶活则几乎没有抑制活性, 在细胞筛选阴性样品中只有 5.1%对酶活有较低的抑制作用。结果表明, 我们所建立的细胞水平筛选模型具有一定的特异性, 并且快速方便、成本较低, 可用于大规模样品的初筛。

3.5 阳性样品的酯相组分的抗菌活性

将在蛋白水平上有活性的 29 个酯相样品进一步在细胞水平筛选模型测定了其抗菌活性, 最终得到了两株阳性菌株, 其发酵液酯相组分对 BL21.19/pET20b/ *PasecA* 或 PAO1 有抑菌活性。实验结果参见表 3, 其中 I06A-01517 为细胞水平筛选的阴性菌株。

鉴于这两个酯相样品在细胞水平和蛋白水平上均具有较好的活性, 我们又进一步考察了不同样品量对酶活抑制活性的影响, 结果如图 3 所示, 随着反应体系中发酵液样品量的增加, 对蛋白酶活的抑制作用的确有明显增强的趋势。

由此可见, 菌株 I03A-04530 和 I06A-02747 的发酵液酯相在细胞水平和酶水平上均对绿脓杆菌 SecA 蛋白具有选择性抑制活性, 尤其是后者既能穿透绿脓杆菌的细胞外膜, 而且对酶活抑制作用也较强, 可作为分离纯化有效化合物的候选菌株。阴性样品 I06A-01517 的酯相组分在细胞水平对鉴定菌 BL21.19/pET20b/ *PasecA* 的生长无抑制作用, 酶活抑制实验结果也表明, 随着发酵样品量的增加, 其酶活抑制率上升缓慢, 且抑制率较低(9.8%)。此实验结果进一步又说明所建立的细胞水平的筛选模型具有一定的特异性。

表 2 阳性样品在细胞水平的抑菌活性及其酯相对绿脓杆菌 SecA 蛋白的酶活抑制率
Table 2 The cellular level activity and inhibitory rate to PaSecA protein of positive samples

菌号 No. of bacteria	抑菌圈*(mm) Inhibition zone	酶活抑制率(%) Inhibitory rate of ATPase activity	菌号 No. of bacteria	抑菌圈*(mm) Inhibition zone	酶活抑制率(%) Inhibitory rate of ATPase activity
I03AB-04530	11.5	42.3	I06AA-00291	7	41.3
I03AA-04868	7.5	61.6	I06AB-00367	16	82.2
I03AB-05138	7.5	51.1	I06AA-01001	12	30.5
I03AB-06187	20	39.4	I06AB-01001	12	24.1
I03AB-09335	13.8	37.8	I06AB-01002	12	19.5
I03AB-09336	12.5	41	I06AA-01059	12	24.8
I03AB-09397	7.5	2.2	I06AB-01113	7	29.2
I03AB-09790	15	25.7	I06AB-01138	7.5	56.8
I03FB-09004	14.5	50.2	I06AA-01161	7	76.8
I03FB-09017	7.5	14.6	I06AA-01190	7	27
I05BB-00221	7.5	13.3	I06AA-01199	7.5	32.4
I05BA-00858	7.5	63.2	I06AB-01199	14	46.3
I05BA-00860	7.5	10	I06AA-02348	12.4	22.2
I06AA-00147	7.5	81	I06AB-03163	7	61.6
I06AB-00288	18	0	I06AB-02747	8	74.1

注：*：以 BL21.19/pET20b/PasecA 作为检定菌，培养温度为 42℃
Note: *: BL21.19/pET20b/PasecA bacteria as a test strain, and the cultivation temperature is 42℃

表 3 乙酸乙酯抽提后各相活性统计表
Table 3 Screening results statistics of ester soluble fraction

	PAO1			BL21.19/pET5a/EcsecA			BL21.19/pET20b/PasecA			BL21.19/pET20b		
	全部	水相	酯相	全部	水相	酯相	全部	水相	酯相	全部	水相	酯相
I03A-04530	—	—	—	—	—	—	11.5	10	9	—	—	—
I06A-02747	7.5	—	9	—	—	—	8	—	+	—	—	—
I06A-01517(Negative control)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

注：—：无抑菌活性；+：有较低的抑菌活性
Note: —: No antibacterial activity; +: Lower antibacterial activity

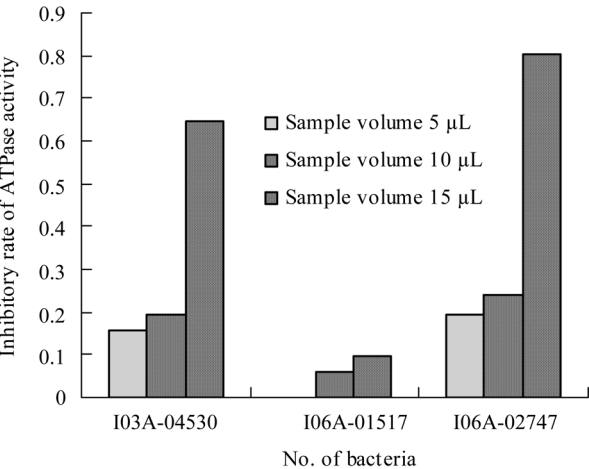


图 3 发酵液样品对酶活性的抑制率
Fig. 3 The inhibitory rate of SecA activity of liquid fermentation samples

4 讨论

SecA是细菌生存必不可少的蛋白之一，是蛋白质转运的“动力泵”，因此，我们推测抑制SecA ATP酶活性的化合物必然在一定程度上抑制蛋白的转运和分泌，可以将SecA作为筛选抗菌药物的崭新和低毒的靶点。为了减低筛选成本并保证模型具有一定的特异性，我们建立了以不同微生物SecA蛋白功能互补为理论依据的细胞水平初筛模型。目前的研究表明，革兰氏阳性菌的SecA蛋白基本上不能够弥补生长缺陷型革兰氏阴性菌的生长。如：金黄色葡萄球菌的SecA蛋白可以弥补温度敏感型枯草芽孢杆菌的生长缺陷，却不能弥补温度敏感型大肠杆菌的生长缺陷；另外，野生型枯草芽孢杆菌、变青链霉菌、

结核分枝杆菌的SecA蛋白也不能弥补温度敏感型大肠杆菌的生长缺陷^[9-14]。

不同的革兰氏阴性菌的SecA蛋白也不完全能彼此替代。如: 溶藻弧菌的SecA蛋白能够完全弥补温度敏感型大肠杆菌的生长缺陷; 而伴放线放线杆菌的SecA蛋白就不能弥补温度敏感型大肠杆菌的生长缺陷^[15,16]。本文通过将野生型绿脓杆菌的secA基因导入生长缺陷型大肠杆菌中, 证明绿脓杆菌的SecA蛋白能够基本上弥补温度敏感型大肠杆菌的生长缺陷, 功能蛋白之间的互补作用正是本细胞水平筛选方法的理论基础。

本研究在筛选对绿脓杆菌 SecA 蛋白有选择性抑制作用的发酵液样品的同时, 还得到了 9 个有可能对大肠杆菌 SecA 蛋白有选择性抑制作用的发酵液样品, 和 100 余个有可能同时作用于大肠杆菌和绿脓杆菌 SecA 蛋白的样品(大肠杆菌和绿脓杆菌 SecA 蛋白序列同源性为 64%)。对这些样品进行深入研究, 有希望得到特异性抑制大肠杆菌 SecA 蛋白或者是作用于 SecA 蛋白保守区域的广谱抗菌的先导化合物。

参 考 文 献

- [1] Song Z, Wu H, Ciofu O, *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* alginate is refractory to Th1 immune response and impedes host immune clearance in a mouse model of acute lung infection. *J Med Microbiol*, 2003, **52**(Pt 9): 731-740.
- [2] Renders N, Verbrugh H, Belkum A. Dynamics of bacterial colonization in the respiratory tract of patients with cystic fibrosis. *Infection, Genetics and Evolution*, 2001, **1**: 29-39.
- [3] Anastassios E. Bacterial protein translocase: a unique molecular machine with an army of substrates. *Federation of European Biochemical Societies*, 2000, **476**: 18-21.
- [4] Anastassios E. Bacterial secretome: the assembly manual and operating instructions. *Molecular Membrane Biology*, 2002, **19**: 159-169.
- [5] Eser M, Ehrmann M. SecA-dependent quality control of intracellular protein localization. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, **100**(23): 13231-13234.
- [6] Manting EH, Driessen AJ. *Escherichia coli* translocase: the unraveling of a molecular machine. *Mol Microbiol*, 2000 Jul, **37**(2): 226-238.
- [7] Frank VV, Ben DK. Role of lipids in the translocation of proteins across membranes. *Biochem J*, 2000, **347**: 601-612.
- [8] Liyan Yu, Hsiuchin Yang, Quynh Ho, *et al.* Purification and characterization of *Pseudomonas aeruginosa* SecA. *Protein Expression and Purification*, 2006 Dec, **50**(2): 179-184.
- [9] Klose M, Schimz KL, van der Wolk J, *et al.* Lysine 106 of the putative catalytic ATP-binding site of the *Bacillus subtilis* SecA protein is required for functional complementation of *Escherichia coli* secA mutants *in vivo*. *J Biol Chem*, 1993, **268**(6): 4504-4510.
- [10] Takamatsu H, Nakane A, Oguro A, *et al.* A truncated *Bacillus subtilis* SecA protein consisting of the N-terminal 234 amino acid residues forms a complex with *Escherichia coli* SecA51(ts) protein and complements the protein translocation defect of the secA51 mutant. *J Biochem*, 1994, **116**(6): 1287-1294.
- [11] Klein M, Meens J, Freudl R. Functional characterization of the *Staphylococcus carnosus* SecA protein in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* secA mutant strains. *FEMS Microbiol Lett*, 1995, **131**(3): 271-277.
- [12] Gilbert M, Ostiguy S, Kluepfel D, *et al.* Cloning of a secA homolog from *Streptomyces lividans* 1326 and overexpression in both *S. lividans* and *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta*, 1996, **1296**(1): 9-12.
- [13] Blanco J, Coque JJ, Martín JF. Characterization of the secA gene of *Streptomyces lividans* encoding a protein translocase which complements and *Escherichia coli* mutant defective in the ATPase activity of SecA. *Gene*, 1996, **176**(1-2): 61-65.
- [14] Owens MU, Swords WE, Schmidt MG, *et al.* Cloning, expression, and functional characterization of the *Mycobacterium tuberculosis* secA gene. *Quinn FD FEMS Microbiol Lett*, 2002, **211**(2): 133-141.
- [15] Kunioka E, Matsuyama S, Tokuda H. Cloning and expression of the secA gene of a marine bacterium, *Vibrio alginolyticus*, and analysis of its function in *Escherichia coli*. *Gene*, 1998, **216**(2): 303-309.
- [16] Novak KF, Nonnemacher MR, Pourhamidi J. Molecular characterization and functional analysis of a secA gene homolog in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Microbiol Immunol*, 2000, **44**(2): 143-148.