

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

邵天舒 魏玉珍 李秋萍 赵莉莉 岑山 余利岩*

(中国医学科学院 医药生物技术研究所 北京 100050)

摘要: 结核分枝杆菌可以产生 11 种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 其中蛋白激酶 G(PknG)对于结核分枝杆菌在巨噬细胞内以“滞留”状态长期存活有着重要作用。本研究以结核分枝杆菌基因组 DNA 为模板, 在大肠杆菌中克隆表达了 MTB PknG 蛋白, 并分离纯化得到 PknG 纯酶。本研究还采用三步级联反应方法测定了 PknG 酶活性, 建立和优化了 PknG 抑制剂高通量筛选模型。利用此模型共筛选发酵液样品 2120 个, 化合物样品 2300 个, 筛选得到阳性化合物 1 个, 阳性发酵液 13 个, 阳性率 0.32%。

关键词: 药物筛选模型, 滞留, PknG

The Establishment and Application of Anti-tuberculosis Drugs Screening Model Targeting to PknG

SHAO Tian-Shu WEI Yu-Zhen LI Qiu-Ping ZHAO Li-Li CEN Shan YU Li-Yan*

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

Abstract: *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) PknG, one of 11 Ser/Thr protein kinases produced by MTB, plays an essential role in the residing of MTB in the macrophages as persistent state. In this work, we amplified the *pknG* gene from the genome of H37Rv, and constructed a recombinant plasmid pET-*pknG* to express the PknG protein in the *E. coli*. Using purified PknG, we established and optimized a high-throughout screening model to screen for PknG inhibitors. Among 2120 samples of microbial fermentations and 2300 samples of compounds tested, one positive compound and 13 positive fermentation samples were identified with inhibitory effect on activity of PknG, resulting in a 0.32% of positive rate.

Keywords: Drugs screening model, Persistence, PknG

据世界卫生组织的统计, 全球有近 10 亿人感染有结核分枝杆菌, 而其中约有 1/3 是处于潜伏感染状态^[1-2]。

结核分枝杆菌在被巨噬细胞吞噬, 形成吞噬体后, 可以通过阻止吞噬体的成熟及其与溶酶体的融合, 而使其自身不被溶酶体酶降解, 从而在巨噬细

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 30970038); 国家科技基础条件平台项目(No. 2005DKA21203); “重大新药创制”科技重大专项(No. 2009ZX09301-003, 2009ZX09302-004)

* 通讯作者: Tel: 86-10-63187118; ✉: yuliyang_2000@yahoo.com

收稿日期: 2009-05-15; 接受日期: 2009-11-10

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

胞内长期存留下来^[3-4]。此时的细菌代谢活动降至最低, 生长繁殖几乎停止, 不易被抗菌药物杀灭, 这种类似于休眠的长期存活状态被称为“持留”状态^[5]。当机体免疫力下降时, 持留状态的细菌又可继续生长繁殖, 恢复致病力。持留状态形成的原因很复杂, 涉及多方面的机制。其中, 结核分枝杆菌分泌的蛋白激酶 G (PknG)——一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶对于持留状态的形成和维持有重要作用^[6-8]。本研究通过建立酶水平的筛选模型来筛选有效的 PknG 抑制剂, 为今后开发真正有效抑制持留菌的抗结核新药奠定基础。

1 材料

1.1 菌种和 DNA

大肠杆菌 DH5 α 、BI21(λ DE3), 均为本室保存。原核表达载体 pET30a (+) 为本室保存。结核分枝杆菌 H37Rv 基因组 DNA 由北京市结核病胸部肿瘤研究所李为民博士提供。

1.2 培养基

LB 培养基: 胰蛋白胨 10 g, 酵母粉 5 g, NaCl 10 g, 加去离子水 1000 mL 溶解。10 mol/L NaOH 调 pH 至 7.2, 1×10^5 Pa 灭菌 15 min。

1.3 主要试剂

Ampicillin、Kanamycin 购自北京华美转导科技有限公司; IPTG、NADH、ATP、PEP-K、Pyruvate kinase (Rabbit muscle)、Lactate dehydrogenase (Rabbit muscle) 均购自 Sigma 公司; 所有限制性内切酶和 T4 DNA 连接酶购自宝生物(中国)有限公司。THP-1 细胞由本所免疫室保藏。

2 实验方法

2.1 结核分枝杆菌 *pknG* 基因原核重组质粒的构建及其表达

2.1.1 *pknG* 基因的体外扩增: 根据结核分枝杆菌基因组数据库上公布的 *pknG* 基因序列, 设计 1 对引物: 上游 5'-TGGACATATGGCCAAAGCGTCAGAG-3', 下游 5'-TCGCTCGAGATAGAACGTGCTGG-3', (下划线标记部分分别为 *Nde* I 和 *Xho* I 酶切位点), 引物由上海生工生物工程有限公司合成。

扩增反应体系: 以结核分枝杆菌 H37Rv 基因组 DNA 为模板, 配制如下: $5 \times$ PrimeSTAR Buffer

10 μ L, dNTP Mixture (各 2.5 mmol/L) 4 μ L, 上下游引物 (20 pmol/L) 各 1 μ L, 模板 (70 ng/ μ L) 1 μ L, PrimeSTAR HS DNA Polymerase (2.5 U/ μ L) 0.5 μ L, ddH₂O 33.5 μ L, 总反应体积为 50 μ L。PCR 反应程序为: 98°C 10 s, 60°C 15 s, 72°C 3 min, 共进行 35 个循环。扩增产物通过 1% 的琼脂糖凝胶电泳鉴定, 并按琼脂糖凝胶 DNA 纯化试剂盒说明进行回收纯化。

2.1.2 pET30b-*pknG* 表达载体的构建: 将回收纯化的 PCR 产物和质粒载体 pET30a 均经过 *Nde* I 和 *Xho* I 双酶切后, 用 T4 DNA 连接酶于 16°C 连接 16 h。连接产物转化大肠杆菌 DH5 α , 涂布于含有 50 μ g/mL 卡那霉素的 LB 平板上, 37°C 培养 16 h 筛选重组子, 提取质粒, 双酶切鉴定插入片段后, 由上海生工生物工程有限公司测序。

2.1.3 *pknG* 基因在大肠杆菌中的表达及 PknG 蛋白的纯化: 将测序无误的 pET-*pknG* 质粒转化大肠杆菌 BI21(λ DE3)。挑取转化子在 LB 液体培养基中 37°C 振荡培养至 $OD_{600} = 0.6$, 加入终浓度 1 mmol/L IPTG, 28°C 诱导表达 8 h。离心收获菌体, 用裂解上样缓冲液 (25 mmol/L Tris-HCl, 0.5 mol/L NaCl, 20 mmol/L 咪唑, pH 7.9) 重悬, 以 400 W 功率超声裂解菌体, 将裂解液在 4°C, 15000 \times g 离心 25 min, 上清用 0.45 μ m 滤膜过滤。由于表达的重组 PknG 蛋白带有 His-tag, 因此, 将所得滤液上样至 5 mL HisTrapTM HP 镍离子亲和层析柱, 用洗脱缓冲液 (25 mmol/L Tris-Cl, 0.5 mol/L NaCl, 350 mmol/L 咪唑, pH 7.9) 洗脱, 收集洗脱峰, 对纯化蛋白进行蛋白定量。

2.2 重组 PknG 酶活性的测定

酶活测定反应体系包含: 100 mmol/L HEPES, 10 mmol/L MgCl₂, 10 mmol/L MnCl₂, 10 mmol/L ATP, 1 mmol/L 磷酸烯醇式丙酮酸, 1 mmol/L NADH, 1.8 U 丙酮酸激酶, 1.8 U 乳酸脱氢酶, 以及待测 PknG 5.5 μ g, 总体积 100 μ L。同时设不加 PknG 的空白对照, 以等体积 ddH₂O 代之。将上述反应体系加入 96 孔板, 置于 37°C 反应 40 min。分别于反应开始后 10 min 和 40 min 时用酶标仪测定各反应体系的 OD_{340} 值, 计算 $\Delta OD_{340}/\text{min}$ 。

2.3 重组 PknG 的酶学性质

2.3.1 最适反应温度的测定: 分别于 20°C、25°C、30°C、37°C、41°C、45°C 下测定重组 PknG 活性, 每组设 3 个平行试验, 探讨不同反应温度下酶活性的变化。

2.3.2 最适 pH 的测定: 分别用 pH 为 6.0、6.5、7.0、7.3、7.6、7.9 和 8.4 的 Hepes 缓冲液配制反应体系, 于 37°C 测定重组 PknG 活性, 每组设 3 个平行试验, 探讨不同 pH 下酶活性的变化。

2.3.3 反应速率与酶浓度的关系测定: 保持底物 ATP 浓度恒定, 测定不同 PknG 浓度(0、3.0、6.0、9.0、12.0 $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$)下的反应速率。

2.3.4 最适反应时间的测定: 连续监控反应开始后 1.5 h 内的 OD_{340} 值的变化曲线, 以确定最佳反应时间。

2.3.5 反应动力学参数的测定: 在自我磷酸化反应中, PknG 催化的底物有 2 个, 一是 PknG 自身, 另一个是 ATP。固定 PknG 的浓度, 探讨在不同 ATP 浓度下酶活性的变化。配制 11 个不同 ATP 终浓度(0.0625–50 mmol/L)的酶活测定体系, 分别于 37°C 测定酶促反应速率, 反应时间 40 min。以双倒数作图法确定 K_m 和 V_{max} 。

2.4 筛选模型的建立与应用

2.4.1 筛选模型相关指标的测定: 通过验证筛选模型的反应体系中各组分对酶活性检测结果的影响来计算筛选模型的信噪比(S/N), 并对模型进行可行性分析:

$$\frac{S}{N} = \frac{\text{正常酶反应体系的 } \Delta mOD / \text{min 值}}{\text{其他成分的 } \Delta mOD / \text{min 平均值}}$$

2.4.2 待测样品的前处理: 化合物样品: 10 mg 纯品化合物溶解到 1 mL DMSO 中, 取 10 μL 加 20 μL DMSO 稀释, 然后取 1 μL 加入到 100 μL 反应体系, 使其终浓度为 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

发酵液样品: 发酵液离心后取上清 10 mL 用 10 mL 的丙酮抽提, 干燥后, 用 1 mL 的 DMSO 溶解。取 10 μL 加 10 μL DMSO 倍比稀释, 取 1 μL 加入至 100 μL 反应体系。

2.4.3 待测样品对 PknG 抑制作用的测定: 依照 2.2 中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 PknG 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)。

2.4.4 抑制率的计算: 抑制率 $IR = \frac{\Delta N - \Delta S}{\Delta N - \Delta P} \times 100\%$

其中:

ΔN 是阴性对照孔 $\Delta mOD/\text{min}$ 值;

ΔP 是阳性对照孔 $\Delta mOD/\text{min}$ 值;

ΔS 是样品孔 $\Delta mOD/\text{min}$ 值。

2.4.5 假阳性结果的排除: 假阳性排除体系: 100 mmol/L Hepes, 10 mmol/L MgCl_2 , 10 mmol/L MnCl_2 , 10 mmol/L ADP, 1 mmol/L 磷酸烯醇式丙酮酸, 1 mmol/L NADH, 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°C 下监测 10 min 内反应体系 OD_{340} 值的变化。若反应体系的 OD_{340} 值迅速降低, 则表明模型筛得的阳性化合物确实是 PknG 的抑制剂而非后两个酶的抑制剂; 反之, 如果测得的光吸收值变化减少或者不发生变化, 则可以说明该抑制剂是丙酮酸激酶或乳酸脱氢酶的抑制剂, 不是我们所需要的阳性化合物。

2.4.6 MTT 法检测阳性药物对细胞存活的影响: 采用 MTT 法检测阳性样品作用下人单核巨噬细胞 THP-1 的存活率, 从而初步判断阳性样品的细胞毒性大小。MTT 检测步骤详见参考文献[9], 细胞存活率计算式为:

$$\text{细胞存活率} = \frac{OD_{490} \text{加药组} - OD_{490} \text{本底}}{OD_{490} \text{空白对照组} - OD_{490} \text{本底}} \times 100\%$$

3 实验结果

3.1 *pknG* 基因的体外扩增及质粒 pET30-*pknG* 的构建及其表达

3.1.1 重组质粒构建: 用设计的一对引物从结核分枝杆菌 H37Rv 基因组中 PCR 扩增出的 DNA 片段, 与 *pknG* 基因大小(2253 bp)相符合(图 1)。重组质粒 pET30-*pknG* 经 *Nde* I 和 *Xho* I 双酶切后得到两条 DNA 片段, 大小分别与 *pknG* 基因(2253 bp)和 pET30a 载体(5422 bp)相吻合(图 2)。经 DNA 测序结果证明, *pknG* 基因序列和插入载体的方向均无误, 重组质粒 pET30-*pknG* 构建成功。

3.1.2 重组 PknG 的表达及纯化结果: 转入重组质粒 pET-*pknG* 的大肠杆菌经 IPTG 诱导后, SDS-PAGE 检测菌体总蛋白显示, 在与目的蛋白大小(81 kD)相符的位置有明显粗重的蛋白条带, 显示 PknG 有大量表达(图 3)。SDS-PAGE 检测亲和层析得到的蛋白, 具有较高的纯度, 杂带几乎不可见(图 4)。

3.2 重组 PknG 的催化活性

酶活测定结果显示, 实验组 $\Delta mOD/\text{min}$ 为

15.30, 而空白对照组 $\Delta mOD/min$ 仅为 2.15 (图 5)。本研究把 37°C, 100 μL 反应体系中每分钟催化 1 $\mu mol/L$ 底物 ATP 生成产物 ADP 所需的 PknG 量定义为一个活力单位(U)。实验组 $\Delta mOD/min$ 值为 15.30, 对应每分钟反应的 NADH 为 8.43 $\mu mol/L$, 即每分钟酶催化反应的 ATP 为 8.43 $\mu mol/L$ 。由于反应体系中加入的酶量为 5.5 μg , 由此计算得到每 mg 重组 PknG 的比活力是 1533 U。

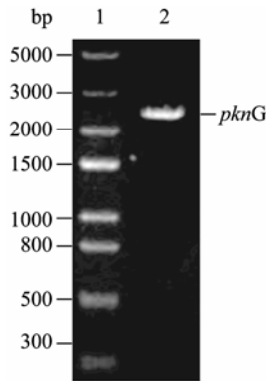


图 1 *pknG* 基因 PCR 扩增结果

Fig. 1 PCR product of *pknG* gene

注: 1: DNA marker III; 2: *pknG* 基因 PCR 产物。

Note: 1: DNA marker III; 2: PCR product.

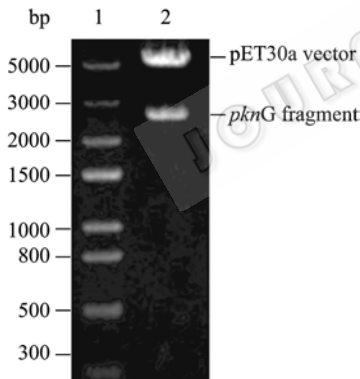


图 2 重组质粒 pET-*pknG* 双酶切分析

Fig. 2 Digestion analysis of pET-*pknG* by restriction enzymes

注: 1: DNA marker III; 2: 克隆质粒经 *Nde* I 和 *Xho* I 双酶切。

Note: 1: DNA marker III; 2: Recombinant plasmid pET-*pknG* digested with *Nde* I and *Xho* I.

3.3 重组 PknG 的酶学性质

3.3.1 温度对重组 PknG 活性的影响: 本研究对重组 PknG 最适温度进行了测定(图 6), 在 35°C–39°C 范围内, PknG 都有较高的催化活性, 反应速率变化不大。低于 35°C 或高于 39°C 时, 反应速率则有较明显的降低。

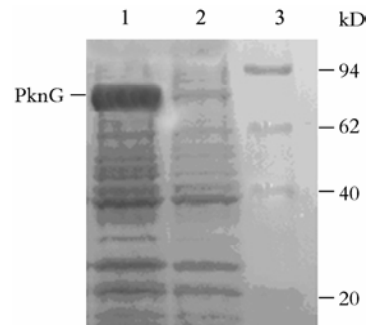


图 3 重组 PknG 蛋白表达的 SDS-PAGE 图

Fig. 3 The expression of PknG in *E. coli*

注: 1: 转入质粒 pET-*pknG* 的 BL21 宿主菌总蛋白; 2: 转入 pET30a 空质粒的 BL21 宿主菌总蛋白; 3: 蛋白分子量标准。

Note: 1: Recombinant strain of *E. coli* BL21(DE3)/pET-*pknG*; 2: Recombinant strain of *E. coli* BL21(DE3)/pET30a(+); 3: Protein molecular weight marker.

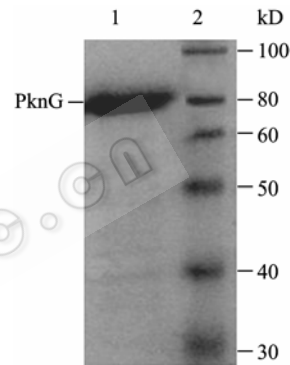


图 4 纯化后的目的蛋白 SDS-PAGE 图

Fig. 4 The purification of PknG expressed in *E. coli*

注: 1: 纯化后的重组 PknG 蛋白; 2: 蛋白分子量标准。

Note: 1: Purified recombinant PknG; 2: Protein molecular weight marker.

3.3.2 反应速率与酶浓度的关系测定: 本研究中保持恒定的底物 ATP 浓度, 分别测定了在不同酶浓度下的反应速率(图 7)。随着酶浓度的增加, 反应速率随之加快, 反应速率与酶浓度呈良好的直线关系。

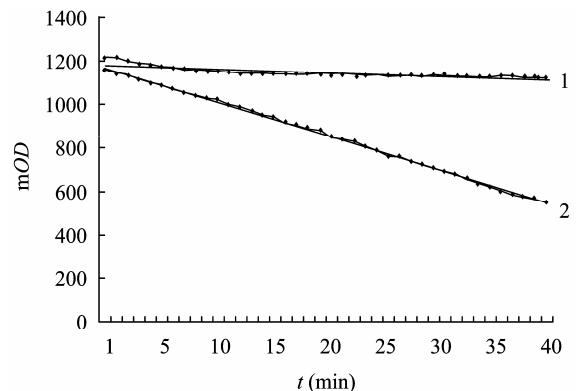


图 5 反应体系 OD_{340} 变化曲线

Fig. 5 Experimental determination of the reaction rate

注: 1: 对照; 2: 100 μL 反应体系中加入 5.5 μg PknG。

Note: 1: Control; 2: Reaction system with the PknG at 5.5 $\mu g/100 \mu L$.

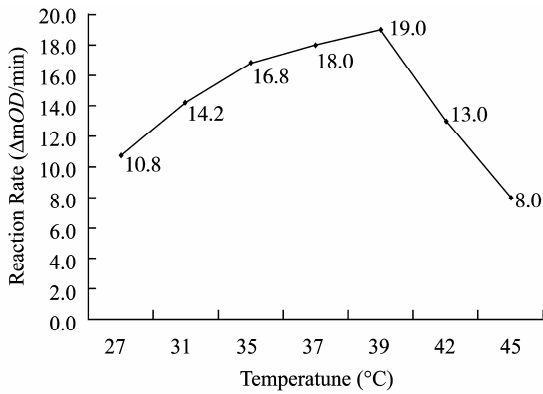


图 6 最适反应温度测定

Fig. 6 The effect of temperature on reaction rate

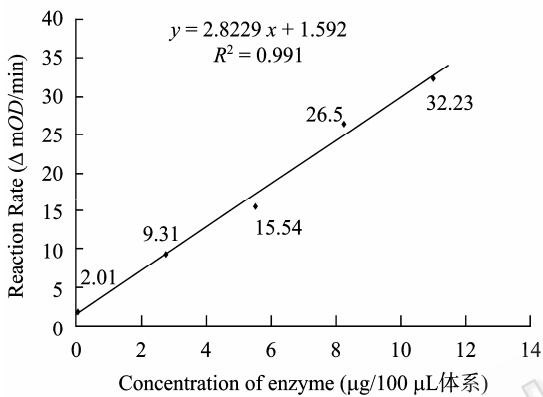


图 7 反应速率与酶浓度的关系

Fig. 7 The reactional rate as a function of the concentration of PknG

3.3.3 最适反应时间的测定: 本研究观察反应开始后 1.5 h 内的吸光值变化(图 8), 结果表明反应时间超过 60 min 后, 吸光值曲线明显趋于平直而不再下降, 因此反应时间应控制在 1 h 之内为宜。

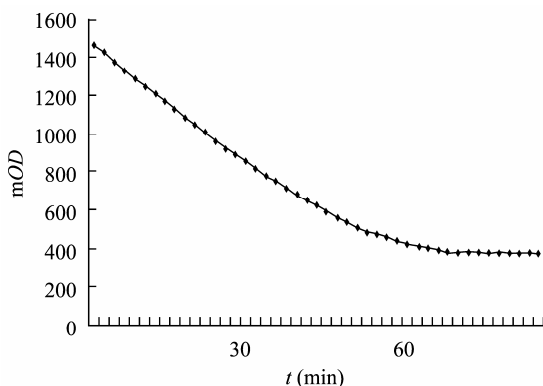


图 8 最适反应时间的测定

Fig. 8 The time evolution of the reaction

3.3.4 重组 PknG 的反应动力学研究: 为研究重组 PknG 的反应动力学特性, 设计了一系列底物 ATP 浓度梯度的反应体系, 并测定了其反应动力学常数。测定结果表明, 重组 PknG 的米氏常数 K_m 为 0.18 mmol/L, 最大反应速率 V_{max} 为 22.39 mOD/min, 即 12.33 μmol/L/min。

综上所述, 得出了优化后的酶活测定反应条件, 即: 反应温度为 37°C, 底物 ATP 终浓度为 1 mmol/L, 酶浓度 5.5 μg/100 μL, 反应时间 40 min。

3.4 酶水平筛选模型的建立与应用

3.4.1 反应体系中各组分对筛选结果的影响: 图 9 中的前 5 项反映了本筛选模型的“噪音”, 计算可得前 5 项的平均值为 1.69, 由此得出筛选模型的信噪比 $S/N=13.80/1.69=8.2$, 远高于筛选模型信噪比大于 3 的要求。

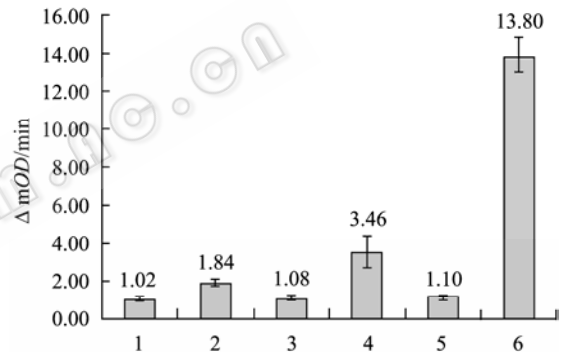


图 9 反应体系中各组分对结果的影响

Fig. 9 Validation of the screening 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+酶); 4: 阴性对照(反应缓冲液+发酵培养基); 5: 阴性对照(反应缓冲液+DMSO); 6: 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 PknG); 4: Negative control (with reaction buffer and ferment medium); 5: Negative control (with reaction buffer and DMSO); 6: Positive control.

3.4.2 样品筛选结果: 本研究中把抑制率大于 30% 的样品认定为阳性样品, 其抑制率结果见表 1。

3.4.3 细胞存活率检测结果: 本研究还采用 MTT 试验检测了在上述阳性样品作用下的人单核巨噬细胞 THP-1 的存活率, 结果如表 2 所示。

从 MTT 试验结果看出, 添加化合物 IMB 2036-F2 的细胞存活率在 10% 以下, 表明此化合物对于细胞毒性较大。而 13 个发酵液样品中, 仅有 I08AA-01218 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 1 阳性样品对 PknG 酶活性的抑制率
Table 1 The inhibitory rate to PknG of positive samples

样品编号 Sample ID	抑制率 Inhibitory rate (%)
Compound IMB2036-F2	65
Fermentation I08AA-00801	69
Fermentation I08AA-00802	70
Fermentation I08AA-01227	39
Fermentation I08AA-01218	47
Fermentation I08AB-01343	80
Fermentation I08AB-01353	75
Fermentation I08AB-01385	30
Fermentation I08AA-01398	95
Fermentation I08AB-01398	96
Fermentation I08AA-01459	86
Fermentation I08AA-01515	38
Fermentation I08AA-01615	86
Fermentation I08AB-01615	82

表 2 阳性样品作用下的 THP-1 细胞存活率
Table 2 The survival rate of macrophage in the presence of the positive samples

样品编号 Sample ID	细胞存活率 Survival rate (%)
Compound IMB2036-F2	6.2
Fermentation I08AA-00801	93.8
Fermentation I08AA-00802	92.9
Fermentation I08AA-01227	79.8
Fermentation I08AA-01218	5.5
Fermentation I08AB-01343	95.1
Fermentation I08AB-01353	95.1
Fermentation I08AB-01385	94.0
Fermentation I08AA-01398	100
Fermentation I08AB-01398	84.6
Fermentation I08AA-01459	92.2
Fermentation I08AA-01515	100
Fermentation I08AA-01615	100
Fermentation I08AB-01615	92.4

4 讨论

结核分枝杆菌的 PknG 具有自我磷酸化的功能, 它可以催化将 ATP 上的磷酸基团添加到 PknG 自身的丝氨酸/苏氨酸残基上使之磷酸化, 并生成 ADP^[10]。生成的 ADP 可与磷酸烯醇式丙酮酸在丙酮酸激酶催化下生成丙酮酸, 而生成的丙酮酸又可在乳酸脱氢酶催化下转变为乳酸, 此步骤伴随着还原

态的 NADH 转变为氧化态的 NAD⁺。由于还原态 NADH 的最大光吸收峰在 340 nm, 而氧化态 NAD⁺ 的最大光吸收峰在 280 nm, 伴随着 NADH 到 NAD⁺ 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^[11-12]。通过酶标仪检测反应体系在 340 nm 波长下的光吸收值变化可以反映体系中 ADP 的生成量, 进而反映出 PknG 的催化活性大小。

由于本实验采用的反应体系包括 3 个前后相接的级联反应, 涉及 PknG、丙酮酸激酶、乳酸脱氢酶共 3 个酶, 待测样品对其中任一种酶有抑制作用均可导致最后一步反应 NADH 向 NAD⁺ 的转变受阻而使得反应体系的 OD₃₄₀ 值不下降。因此, 我们采用了向反应体系中加入 ADP 直接从第二步引发反应的假阳性排除法, 以此排除由后两个酶抑制剂造成的假阳性。

以往的文献报道检测蛋白激酶活性一般都采用放射性同位素(γ -³²P 标记的 ATP)法直接检测, 检测的灵敏度很高。但由于采用这种方法需要专门的同位素室, 实验产生的废液也需专门处理, 若用于大规模筛选成本较高, 且有可能对操作人员和环境造成污染。而本文采用的三步级联反应, 通过检测 OD₃₄₀ 值变化间接反映 PknG 酶活性的方法, 只需在有酶标仪的普通实验室即可进行, 便于开展大规模高通量药物筛选。本研究从 4820 个样品中筛得有稳定生物活性且细胞毒性较小的阳性样品 13 个。下一步将对这些阳性样品进一步研究, 探索其是否对胞内滞留菌有抑制作用, 从而为真正开发出抑制滞留菌的抗结核新药打下基础。

参 考 文 献

- [1] Dye C, Scheele S, Dolin P, *et al.* Consensus statement. Global burden of tuberculosis: estimated incidence, prevalence, and mortality by country. WHO Global Surveillance and Monitoring Project. *J Am Med Assoc*, 1999, **282**(7): 677-686.
- [2] Parrish NM, Dick JD, Bishai WR. Mechanisms of latency in *Mycobacterium tuberculosis*. *Trends Microbiol*, 1998(6): 107-112.
- [3] Flynn JL, Chan J. Immunology of tuberculosis. *Annu Rev Immunol*, 2001(19): 93-129.
- [4] Andersen P, Munk ME, Pollock JM, *et al.* Specific immune-based diagnosis of tuberculosis. *Lancet*, 2000(356): 1099-1104.
- [5] Zhang Y. Persistent and dormant tubercle Bacilli and

- Latent tuberculosis. Front Biosci*, 2004(9): 1136–1156.
- [6] Walburger A, Koul A, Ferrari G, *et al.* Protein kinase G from pathogenic mycobacteria promotes survival within macrophages. *Science*, 2004(304): 1800–1804.
- [7] Székely R, Wácsek F, Szabadkai I, *et al.* A novel drug discovery concept for tuberculosis: inhibition of bacterial and host cell signaling. *Immunol Lett*, 2008, **116**(2): 225–231.
- [8] Hegyemi-Barakonyi B, Székely R, Varga Z, *et al.* Signalling inhibitors against *Mycobacterium tuberculosis*-early days of a new therapeutic concept in tuberculosis. *Curr Med Chem*, 2008, **15**(26): 2760–2770.
- [9] 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. 中国病理生理杂志, 2007, **23**(6): 159–162.
- [10] Scherr N, Müller P, Perisa D, *et al.* Survival of pathogenic mycobacteria in macrophages is mediated through auto-phosphorylation of protein kinase G. *J Bacteriol*, 2009, **191**(14): 4546–4554.
- [11] Pflerderer G, Kreiling A, Wieland T. On pantothenic acid synthetase from *E. coli*. I. Concentration with the aid of an optical test. *Biochem*, 1960(333): 302–307.
- [12] 龚立康. 以泛酸合成酶为靶点的抗结核药物筛选模型的建立和应用. 中国协和医科大学硕士学位论文, 2006.

~~~~~  
(上接 p.273)

## 征 稿 简 则

### 3.4 摘要写作注意事项

#### 3.4.1 英文摘要:

1) 建议使用第一人称, 以此可区分研究结果是引用文献还是作者得出的; 2) 建议用主动语态, 被动语态表达拖沓模糊, 尽量不用, 这样可以避免好多长句, 以求简单清晰; 3) 建议使用过去时态, 要求语法正确, 句子通顺; 4) 英文摘要的内容应与中文摘要一致, 但可比中文摘要更详尽, 写完后务必请英文较好且专业知识强的专家审阅定稿后再返回编辑部。5) 摘要中不要使用缩写语, 除非是人人皆知的, 如: DNA, ATP 等; 6) 在英文摘要中, 不要使用中文字体标点符号。

3.4.2 关键词: 应明确、具体, 一些模糊、笼统的词语最好不用, 如基因、表达……

## 4 特别说明

### 4.1 关于测序类论文

凡涉及测定 DNA、RNA 或蛋白质序列的论文, 请先通过国际基因库 EMBL (欧洲)或 GenBank (美国)或 DDBJ (日本), 申请得到国际基因库登录号 (Accession No.)后再投来。

### 4.2 关于版权

4.2.1 本刊只接受未公开发表的文章, 请勿一稿两投。

4.2.2 凡在本刊通过审稿、同意刊出的文章, 所有形式的 (即各种文字、各种介质的)版权均属本刊编辑部所有。作者如有异议, 敬请事先声明。

4.2.3 对录用的稿件编辑部有权进行文字加工, 但如涉及内容的大量改动, 将请作者过目同意。

4.2.4 文责自负。作者必须保证论文的真实性, 因抄袭剽窃、弄虚作假等行为引发的一切后果, 由作者自负。

### 4.3 审稿程序及提前发表

4.3.1 来稿刊登与否由编委会最后审定。对不录用的稿件, 一般在收稿 2 个月之内通过 E-mail 说明原因, 作者登陆我刊系统也可查看。稿件经过初审、终审通过后, 作者根据编辑部返回的退修意见进行修改补充, 然后以投稿时的用户名和密码登陆我刊网上传电子版修改稿, 待编辑部复审后将给作者发送稿件录用通知单, 请作者将修改稿纸稿和签字盖章后的承诺书一并寄回编辑部, 按照稿号顺序进入排队发表阶段。

4.3.2 对投稿的个人和单位一视同仁。坚持文稿质量为唯一标准, 对稿件采取择优先登的原则。如作者要求提前发表, 请在投稿的同时提出书面报告, 说明该研究成果的重要性、创新性、竞争性和提前发表的必要性, 经过我刊的严格审查并通过后, 可予提前刊出。

## 5 发表费及稿费

论文一经录用, 将在发表前根据版面收取一定的发表费并酌付稿酬、赠送样刊及单行本。

## 6 联系我们

地址: 北京市朝阳区北辰西路 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(100101)

Tel: 010-64807511

E-mail: tongbao@im.ac.cn

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