

以蛋白激酶 B 为靶点的新型抗结核药物高通量筛选模型的建立和应用

邢韵 黄彬 徐建 赵莉莉 司书毅 王玉成 游雪甫 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以 北京 100050)

摘要:【目的】建立以结核分枝杆菌蛋白激酶 B 为靶点的高通量筛选模型, 并运用此模型进行化合物的筛选。【方法】克隆和表达结核分枝杆菌蛋白激酶 B, 并以其为靶酶建立并优化 PknB 抑制剂高通量筛选模型, 利用该模型对化合物样品进行筛选, 并对筛选到的阳性化合物进行抗菌和抑酶活性评价。【结果】利用该模型筛选了化合物样品 18 000 个, 得到具有抑酶活性的阳性化合物 8 个, 其中 3 个化合物具有较好的对结核分枝杆菌、海分枝杆菌、耻垢分枝杆菌的抗菌活性。【结论】建立的以 PknB 为靶点的抗结核药物高通量筛选模型具有灵敏度高、稳定性强等优点, 可成功用于化合物的高效筛选。筛选得到 3 个在抑酶水平和抗菌方面均具有良好活性的阳性化合物样品, 值得进一步研究。

关键词: 蛋白激酶 B, 药物筛选模型, 结核分枝杆菌

The establishment and application of a high throughput screening assay for inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis* protein kinase B

XING Yun HUANG Bin XU Jian ZHAO Li-Li SI Shu-Yi WANG Yu-Cheng
YOU Xue-Fu YU Li-Yan*

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

Abstract: [Objective] To establish and apply an high-throughput assay for screening inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis* protein kinase B (PknB). [Methods] The kinase domain of *Mycobacterium tuberculosis* PknB was first cloned and expressed in *Escherichia coli*. The purified protein is utilized for a high-throughput assay for screening PknB inhibitor. [Results] Eight out of 18 000 compounds were identified as exhibiting inhibitory effect upon PknB activity using the screening assay, among which three compounds showed antibacterial activity against *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium marinum* and *Mycobacterium smegmatis*. [Conclusion] The high-throughput screening model has advantages of high sensitivity and stability, which can be used in anti-TB drug screening. Three compounds are worth further study because of their great activities against both

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 30970038, 81373452); 国家微生物资源平台项目(No. NIMR-2013-3)

*通讯作者: Tel: 86-10-63187118; 邮箱: yly@cpcc.ac.cn

收稿日期: 2013-08-27; 接受日期: 2013-11-08; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2013-11-26

PknB and bacterial growth.

Keywords: PknB, High-throughput drug screening model, *Mycobacterium tuberculosis*

肺结核(TB)是由结核分枝杆菌(*Mycobacteria tuberculosis*, Mtb)引起的一种严重威胁人类健康的传染病,在全球范围内,每年造成的死亡人数达三百多万。自 20 世纪 70 年代中期,即利福平被首次应用以来,抗结核药物的研发进展异常缓慢,直到 2012 年 12 月才只有一种抗结核新药贝达喹啉(Bedaquiline)被 FDA 批准^[1-2],但结核分枝杆菌的多重耐药性和广泛耐药性的出现,使得已开发的药物远远不能满足人们的需要。因此,必须加快研发新型抗结核药物。

结核分枝杆菌中存在 11 种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 (Ser/Thr protein kinases, STPKs) PknA-PknL^[3-4],其中 PknB 在结核分枝杆菌生长分裂和细胞形态的调节中发挥着重要作用^[5-7],菌体过表达 PknB 蛋白或敲除 *pknB* 基因都会降低菌体生长速度并改变细胞形态^[8-10]。因此, PknB 为结核分枝杆菌生长所必需,可作为抗结核药物的筛选靶点。而这 11 种 STPKs 与人的 STPKs 相似度较小,其序列相似度低于 30%。在 Annemarie 等绘制的结核分枝杆菌和人的全部 STPKs 进化树上,结核分枝杆菌丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶形成独立的一簇,与人类蛋白激酶差异显著^[11-12]。这种结核分枝杆菌与人 STPKs 的低相似性尤其适合其作为有效、低毒的抗菌药物筛选靶点。

结核分枝杆菌 PknB 全酶由胞外结构域、胞内结构域和中间起链接作用的跨膜螺旋体三部分组成^[13],其中胞内部分为 PknB 的激酶结构域(PknB-N),具有自磷酸化功能,能与 ATP 及其类似物相结合^[14]。在自磷酸化检测中, PknB-N 的激酶活性与 PknB 全酶活性相似,同时其溶解性更好^[15-17],因此本研究选择建立以 PknB-N 为靶点的药物筛选模型,期望发现新型、高效、低毒的酶抑制剂,为开发以 PknB 为靶点的新型抗结核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 α 、BL21(λ DE3),耻垢分枝杆菌 mc²155,海分枝杆菌 ATCC 927 为本实验室保存;结核分枝杆菌 H37Rv,结核分枝杆菌 6133 (MDR 菌株),结核分枝杆菌 12153 (MDR 菌株)由北京市结核病研究所药物研究室保存。

载体:原核表达载体 pET-28a(+)为本实验室保存。

1.2 主要试剂和仪器

Pfu DNA 聚合酶购自北京全式金生物技术有限公司;限制性内切酶, T4 DNA 连接酶, IPTG 均购自宝生物工程(大连)有限公司; Kinase-Glo[®] Plus Luminescent Kinase Assay 试剂盒购自 Promega 公司;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陆宇老师惠赠; Veriti 96 well Thermal Cycler PCR 扩增仪为美国 ABI 公司产品; ÄKTA purifier TM 10 层析系统为美国 GE Healthcare 公司产品; Polar Fluostar 多功能检测仪为德国 BMG 公司产品。

1.3 待测样品

化合物样品:本所筛选实验室保存,化合物均购自百灵威科技有限公司。

2 实验方法

2.1 结核分枝杆菌 PknB-N 蛋白基因原核重组质粒的构建及蛋白的表达纯化

2.1.1 目的基因的克隆:根据结核分枝杆菌 H37Rv *pknB* 基因 N 端序列设计合成引物,上游引物: 5'-TAACATATG(*Nde* I)ACCACCCCTTCCCA-3',下游引物: 5'-ATAAGCTT(*Hind* III)CTAACCGTTGTGCACGCGGA-3',以结核分枝杆菌 H37Rv 基因组 DNA 为模板,用 *Pfu* DNA 聚合酶进行 PCR 扩增,分离并回收目的产物。

2.1.2 蛋白表达载体的构建:分别用 *Nde* I 和 *Hind* III 限制性内切酶对回收纯化的 *pknB-N* PCR 产物和质粒载体 pET-28a 进行双酶切,获得目的基因片段和线性化的 pET-28a。用 T4 连接酶在 16 °C 连接 20 h, 连接后的重组质粒命名为 pET-28a-*pknB-N*。并用该质粒转化大肠杆菌 DH5 α , 接种于含 40 mg/L 卡那霉素的 LB 液体培养基中, 提取质粒, 双酶切鉴定, 并测序验证片段的正确性及插入方向的正确性。

2.1.3 重组质粒在大肠杆菌中的诱导表达和纯化:用构建成功的 pET-28a-*pknB-N* 质粒转化 BL21(λ DE3), 接种于含 40 mg/L 卡那霉素的 LB 液体培养基中, 37 °C 振荡培养至 $OD_{600}=0.8$ 时, 加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG, 于 20 °C、200 r/min 旋转培养过夜, 诱导目的蛋白的表达。收获并裂解菌体细胞, 通过 SDS-PAGE 蛋白电泳检测 PknB-N 在 BL21 中的表达。高压细胞破碎仪裂解菌体后得到的裂解液于 4 °C、15 000 \times g 离心 40 min, 得到的上清用 0.45 μ m 滤膜过滤。使用 ÄKTA 系统对目的蛋白进行分离纯化, 以 1 mL 预装 HisTrapTM 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, 得到高纯度的目的蛋白溶液。

2.2 PknB-N 酶活性的检测

2.2.1 检测方法:通过 Promega 公司的 Kinase Glo[®] Luminescent Kinase Assay Platform Plus 试剂盒进行酶活测定, 测定体系包括 25 mmol/L Tris, 5 mmol/L MgCl₂, 2 mmol/L MnCl₂, 1 mmol/L DTT, 100 μ mol/L ATP, 5 μ g PknB-N, 总体积 50 μ L。

2.2.2 筛选模型的优化和评价:本研究考察了一系列温度(25–45 °C)、酶浓度(1–8 μ g)、反应时间(30–240 min)、ATP 浓度(10–200 μ mol/L)对酶活性测定的影响, 以确定最佳反应条件, 对模型进行优化。考察了 DMSO 浓度(1%–10%)对酶活性的影响, 并对孔板的均一性、稳定性进行了评价^[18-19]。

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

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

式中, Z' : 统计学指标, $Z' \geq 0.4$ 为有意义; AVG_{\max} : 最大平均值; AVG_{\min} : 最小平均值; SD_{\max} : 最大标准差; SD_{\min} : 最小标准差; n : 孔数。

2.2.3 待测样品的预处理:化合物样品 2 mg 溶到 1 mL DMSO 中, 取 1 μ L 作用于 50 μ L 反应体系, 使其终浓度为 40 mg/L。

2.2.4 待测样品对 PknB-N 抑制作用的测定:依照 2.2 所述配制酶活测定反应体系, 在每 50 μ L 反应体系中加入 1 μ L 待测化合物样品。同时, 以等体积的 ddH₂O 代替 PknB-N 为阳性对照, 以等体积的 DMSO 代替待测样品为阴性对照。用 96 孔板进行样品筛选, 温控 37 °C 进行反应, 180 min 后取出, 每孔均加入 50 μ L 萤光素酶反应液, 置于酶标仪中测定每孔发光值, 并按照下述公式进行酶活抑制率的计算。

$$\text{酶活抑制率 } IP(\%) = \frac{\Delta F_N - \Delta F_S}{\Delta F_N - \Delta F_P} \times 100$$

式中: ΔF_N 是阴性对照孔发光值, ΔF_P 是阳性对照孔发光值, ΔF_S 是样品实验孔发光值。

2.2.5 阳性样品的最小抑菌浓度(MIC)测定:使用微稀释法, 将耻垢分枝杆菌 mc²155 和海分枝杆菌 ATCC 927 分别接种于相应的液体培养基, 37 °C 振荡培养至 OD_{600} 约为 0.8。用对应培养基将上述培养物稀释至麦氏浊度 0.5, 再稀释 100 倍后以 100 μ L 的体积接种于 96 孔板中, 后加入用相应培养基梯度稀释的化合物样品 100 μ L, 37 °C 培养。当阴性对照组检定菌生长明显时, 观察并记录化合物的最小抑菌浓度(MIC)^[20-21]。参照陆宇等^[22-23]的方法, 测定化合物对结核分枝杆菌 H37Rv、结核分枝杆菌 6133、结核分枝杆菌 12153 三种检定菌的最小抑菌浓度(MIC)。

3 结果与分析

3.1 原核表达载体的构建和重组蛋白的表达

3.1.1 pET-28a-*pknB-N* 重组质粒的构建:以结核分枝杆菌 H37Rv 基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 得到的 DNA 片段与 *pknB-N* (837 bp) 的基因片段大小相符。将其与线性化的 pET-28a 进行连接,

获得重组质粒 pET-28a-*pknB-N*。经酶切验证(图 1)和 DNA 测序, 表明 *pknB-N* 基因序列和载体插入的方向均正确。

3.1.2 重组结核分枝杆菌 PknB-N 蛋白的表达和纯化: 将重组表达质粒 pET-28a-*pknB-N* 转化 BL21(λ DE3)感受态细胞, 1 mmol/L IPTG 20 °C 诱导表达 16 h, SDS-PAGE 电泳检测其总蛋白(图 2), 结果显示结核分枝杆菌 PknB-N (36 kD)得到了很好的表达, 而且亲和层析得到的重组蛋白具有较高的纯度, 杂带几乎不可见。

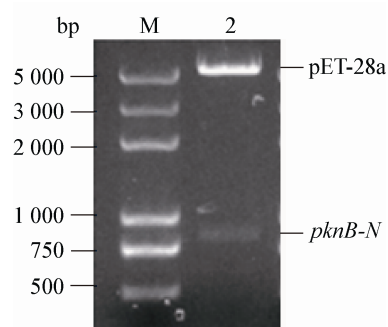


图 1 重组质粒 pET-28a-*pknB-N* 酶切验证

Figure 1 Digestion analysis of pET-28a-*pknB-N* by restriction enzymes

注: M: DNA marker; 2: 重组质粒 pET-28a-*pknB-N* 经 *Nde* I 和 *Hind* III 双酶切产物。

Note: M: DNA marker; 2: Recombinant plasmid pET-28a-*pknB-N* digested with *Nde* I and *Hind* III.

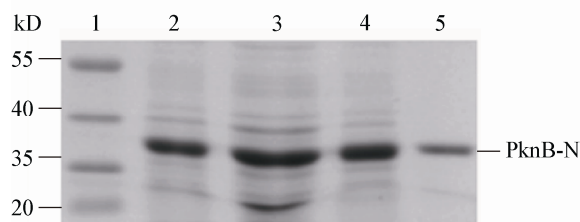


图 2 重组结核分枝杆菌 PknB-N 蛋白的诱导表达和纯化

Figure 2 The purification of recombinant MTB PknB-N expressed in *E. coli*

注: 1: Protein marker; 2: 全菌蛋白; 3: 菌体破碎后沉淀中的蛋白; 4: 菌体破碎后上清中的蛋白; 5: 纯化后的蛋白。

Note: 1: Protein marker; 2: Total cell lysates; 3: Precipitation fraction after centrifugation; 4: Supernatant fraction after centrifugation; 5: Purified recombinant PknB-N.

3.2 重组结核分枝杆菌 PknB-N 酶学性质测定

3.2.1 重组结核分枝杆菌 PknB-N 酶活性的测定:

将反应体系充分混匀加入 96 孔板, 37 °C 反应 180 min 后加入 50 μ L 萤光素酶反应液, 用酶标仪测定各反应体系的发光值(图 3), 计算 PknB-N 反应速率为 159 603 Δ LUC/min。空白对照组与实验组的发光值差异显著。由此可知重组 PknB-N 酶具有良好的催化活性。

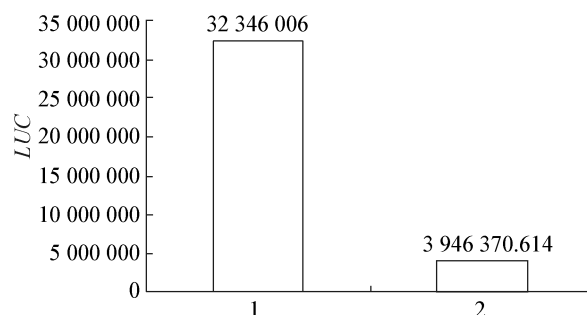


图 3 重组结核分枝杆菌 PknB-N 蛋白的酶活确定

Figure 3 The catalytic activity of purified PknB-N

注: 1: 空白对照组; 2: 加 PknB-N 酶反应组。

Note: 1: Blank control; 2: Reaction group with PknB-N.

3.2.2 温度对重组结核分枝杆菌 PknB-N 酶活

定的影响: 本研究对重组 PknB-N 的最适反应温度进行了测定(图 4)。测定结果显示, 在 25–45 °C 范围内, 随着反应温度的升高反应速率不断加快, 而超过 37 °C 时反应速率随温度的升高降低。因此, 选择 37 °C 为重组 PknB-N 的最适反应温度。

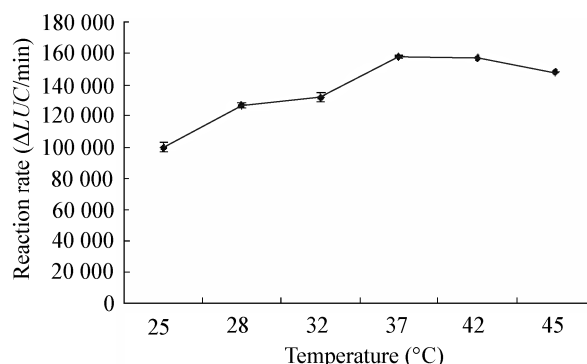


图 4 温度与反应速率的关系

Figure 4 The relationship between the temperature and the reaction rate

3.2.3 酶浓度对重组结核分枝杆菌 PknB-N 酶反应速率的影响: 本研究保持体系中除重组 PknB-N 酶外的其他组分恒定,测定不同酶浓度下的反应速率(图 5)。测定结果显示,反应速率与酶浓度间保持着良好的线性关系,伴随酶浓度的增加,反应速率相应加快。为了既保证筛选的灵敏度,又节约筛选成本,最终选择的反应体系酶浓度是 5 g/50 L。

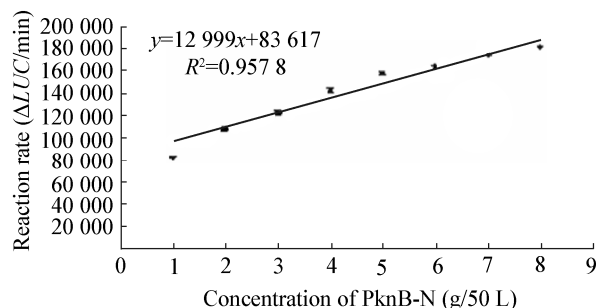


图 5 反应速率与酶浓度的关系

Figure 5 The reaction rate as a function of the concentration of PknB-N

3.2.4 反应时间对重组结核分枝杆菌 PknB-N 酶活测定体系的影响: 本研究测定反应开始后 240 min 内发光值的变化(图 6)。结果表明随着时间的延长,实验组发光值不断降低,但超过 180 min 后,发光值几乎不再有明显的变化。为节省反应时间,同时兼顾酶活测定的灵敏度,最终选择反应时间为 180 min。

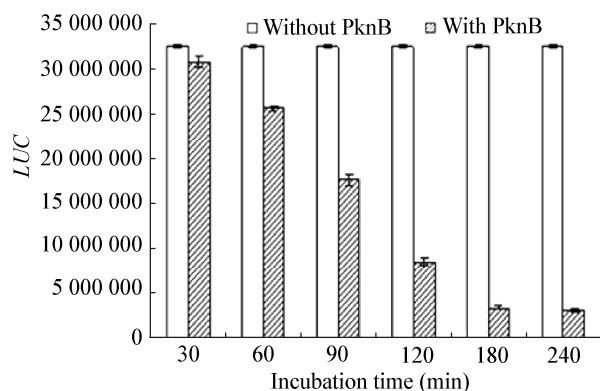


图 6 酶活测定体系中反应时间的优化

Figure 6 The time optimization of the assay

3.2.5 重组结核分枝杆菌 PknB-N 酶反应速率与 ATP 浓度的关系: 本研究设定了 7 个 ATP 浓度,测定 ATP 在 10–200 μmol/L 浓度下的反应速率(图 7)。ATP 浓度达到 80 μmol/L 时,反应速率最大,ATP 浓度已达到饱和。为保证反应速率,排除 ATP 竞争性抑制剂的影响,选择 ATP 的浓度为 100 μmol/L。

综上所述,优化后的酶活测定体系为:每 50 μL 反应体系加入 5 μg PknB-N,反应温度 37 °C,反应时间 180 min,ATP 浓度 100 μmol/L。

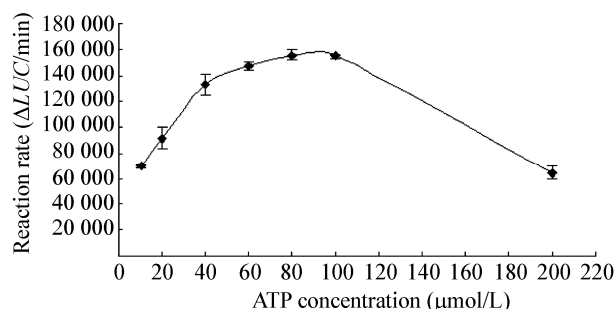


图 7 反应速率与 ATP 浓度关系

Figure 7 The relationship between the reaction rate and the concentration of ATP

3.3 药物筛选模型的评价

3.3.1 DMSO 浓度对酶活性的影响: 本研究分别测定了反应体系中 0–10% 的 DMSO 浓度下的酶反应速率。结果表明(图 8),DMSO 浓度(体积比)高于 2% 即对系统造成影响,因此 50 μL 体系中 DMSO 的用量不应超过 1 μL。

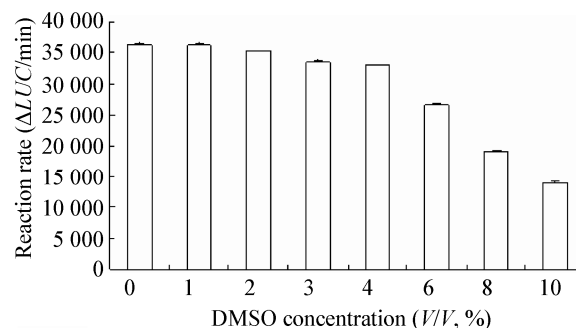


图 8 体系中 DMSO 浓度对酶活性的影响

Figure 8 The effect of the concentration of DMSO on enzyme activity

3.3.2 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。经优化的体系于 96 孔板中反应, 分别设阴性对照板(正常酶反应体系)和阳性对照板, 每天进行体系验证, 重复 3 d。由实验结果可得: 板上数据不存在明显趋势, 无明显边缘效应; $CV_{\text{空白对照}} = 0.98\% < 20.00\%$; $CV_{\text{阴性对照}} = 11.86\% < 20.00\%$; $Z' = 0.93 > 0.40$ 。各项指标均符合筛选模型的要求。

3.4 化合物筛选结果

3.4.1 阳性化合物对 PknB-N 酶活性抑制:本研究将酶抑制率大于 30% 的样品认定为阳性样品。对 18 000 个化合物样品进行了筛选, 经过 3 次生物学重复, 最终得到 8 个阳性样品, 阳性率 0.044%, 其抑制率结果见表 1。

3.4.2 阳性化合物抗分枝杆菌活性:本研究完成了阳性化合物对耻垢分枝杆菌、海分枝杆菌、结核分枝杆菌最小抑菌浓度(MIC)的测定。筛选得到的 3 个阳性化合物, 均表现出了良好的抗菌活性, 其中以 YH-8 的抗性最为突出, 结果见表 2。

4 讨论

蛋白激酶 B 在结核分枝杆菌生长分裂和细胞形态的调节中发挥着重要作用, 且为结核分枝杆菌生长所必需, 其作为潜在的药物靶点已被广泛认

表 1 阳性化合物的抑酶活性 Table 1 The inhibitory effect of positive compounds	
样品号 Sample	酶活抑制率 Inhibitory rate of PknB activity (%)
YH-1	47.68
YH-2	61.78
YH-3	61.22
YH-4	60.78
YH-5	30.39
YH-6	31.15
YH-7	65.98
YH-8	42.25

同, 并且 PknB 与真核蛋白激酶的差异较大, 序列相似性低。基于以上两点考虑, 研究者认为有望利用这些特点筛选到对 PknB 有较强选择性的新型抗结核药物。

本研究对结核分枝杆菌 PknB 进行了克隆表达和分离纯化, 经电泳验证获得了纯度较高的目的蛋白, 后经酶活测定与评价, 建立了以结核分枝杆菌重组 PknB 蛋白为靶点的酶水平的高通量筛选模型。利用该模型筛选了库存化合物样品 18 000 个, 获得阳性化合物样品 8 个, 经过细胞水平抗菌活性的初步筛选, 得到阳性化合物 3 个: YH-6、YH-7 和 YH-8。

表 2 阳性化合物对分枝杆菌最小抑菌浓度(MIC)的确定 Table 2 Minimum inhibitory concentration (MIC) of positive compounds					
菌株 Strains	化合物 MIC (mg/L)				
	YH-6	YH-7	YH-8	Rifampicin	Isoniazid
耻垢分枝杆菌 mc ² 155 <i>Mycobacterium smegmatis</i> mc ² 155	8	8	4.000	64.000	1.000
海分枝杆菌 ATCC 927 <i>Mycobacterium marinum</i> ATCC 927	8	>64	8.000	64.000	64.000
结核分枝杆菌 H37Rv <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv	8	64	0.125–0.250	0.025	0.050
结核分枝杆菌 6133 <i>Mycobacterium tuberculosis</i> 6133	16	64	0.125–0.250	>40.000	10.000
结核分枝杆菌 12153 <i>Mycobacterium tuberculosis</i> 12153	16	64	0.125–0.250	10.000	2.500

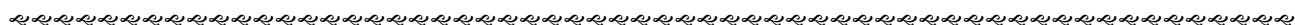
在多重耐药菌日益严重、结核病威胁不断加剧的今天,获得具有新作用机制的活性物质将成为新型抗结核药物开发的工作重点。根据文献调研,国外报道的结核分枝杆菌 PknB 抑制剂多为氨基嘧啶类和氨基胍类化合物^[24-28],在抗结核分枝杆菌活性检测中,活性最强的氨基嘧啶类化合物 MIC 为 5 $\mu\text{mol/L}$, 活性最强的氨基胍类化合物 MIC 为 34 $\mu\text{mol/L}$, 均未超过本研究筛选得到的化合物 YH-8。目前,国内外还没有一种以 PknB 为靶点的抗结核临床药物出现,得到的 PknB 抑制剂也都还停留在结构优化、靶点确证、机制研究等方面,但 PknB 抑制剂的发现为开发新型抗结核药物提供了一个良好的平台,为抗结核药物的研究提供了新的方向。

本研究应用所建立的筛选模型获得的阳性化合物 YH-8 为 α,β -不饱和丁烯酸类衍生物,体外抗耐药结核分枝杆菌活性强, MIC 在 0.625–1.25 $\mu\text{mol/L}$ 之间,且与异烟肼、利福平及链霉素均不产生交叉耐药,具有一定的优势,有望作为先导化合物进行抗结核药物的研究开发。

参 考 文 献

- [1] O'Brien RJ, Nunn PP. The need for new drugs against tuberculosis[J]. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, 2001, 163(5): 1055-1058.
- [2] Mahajan R. Bedaquiline: First FDA-approved tuberculosis drug in 40 years[J]. International Journal of Applied and Basic Medical Research, 2013, 3(1): 1-2.
- [3] de Chastellier C. The many niches and strategies used by pathogenic mycobacteria for survival within host macrophages[J]. Immunobiology, 2009, 214: 526-542.
- [4] 高鹏, 肖春玲, 姜威, 等. Ser/Thr 蛋白激酶信号转导系统-抗结核药物筛选的新靶点[J]. 药研动态, 2007, 28(2): 50-55.
- [5] Ortiz-Lombardía M, Pompeo F, Boitel B, et al. Crystal structure of the catalytic domain of the PknB serine/threonine kinase from *Mycobacterium tuberculosis*[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2003, 278(15): 13094-13100.
- [6] Narayan A, Sachdeva P, Sharma K, et al. Serine threonine kinases of mycobacterial genus: phylogeny to function[J]. Physiological Genomics, 2007, 29(1): 66-75.
- [7] Villarino A, Duran R, Wehenkel A, et al. Proteomic identification of *Mycobacterium tuberculosis* protein kinase substrates: PknB recruits GarA, a FHA domain-containing protein, through activation loop-mediated interaction[J]. Journal of Molecular Biology, 2005, 350(5): 953-963.
- [8] Sharma K, Gupta M, Krupa A, et al. EmbR, a regulatory protein with ATPase activity, is a substrate of multiple serine/threonine kinases and phosphatase in *Mycobacterium tuberculosis*[J]. The FEBS Journal, 2006, 273(12): 2711-2721.
- [9] Dasgupta A, Datta P, Kundu M, et al. The serine/threonine kinase PknB of *Mycobacterium tuberculosis* phosphorylates PBPA, a penicillin-binding protein required for cell division[J]. Microbiology, 2006, 152(Pt2): 493-504.
- [10] Kang CM, Abbott DW, Park ST, et al. The *Mycobacterium tuberculosis* serine/threonine kinases PknA and PknB: substrate identification and regulation of cell shape[J]. Genes and Development, 2005, 19(14): 1692-1704.
- [11] Annemarie W, Marco B, Martin G, et al. Mycobacterial Ser/Thr protein kinases and phosphatases: physiological roles and therapeutic potential[J]. Biochimica et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics, 2008, 1784(1): 193-202.
- [12] Boitel B, Ortiz-Lombardía M, Durán R, et al. PknB kinase activity is regulated by phosphorylation in two Thr residues and dephosphorylation by PstP, the cognate phospho-Ser/Thr phosphatase, in *Mycobacterium tuberculosis*[J]. Molecular Microbiology, 2003, 49(6): 1493-1508.
- [13] Barthe P, Mukamolova GV, Roumestand C, et al. The structure of PknB extracellular PASTA domain from *Mycobacterium tuberculosis* suggests a ligand-dependent kinase activation[J]. Cell Press, 2010, 18(5): 606-615.
- [14] Young TA, Delagoutte B, Endrizzi JA, et al. Structure of *Mycobacterium tuberculosis* PknB supports a universal activation mechanism for Ser/Thr protein kinases[J]. Nature Structural Biology, 2003, 10(3): 168-174.
- [15] Av-Gay Y, Jamil S, Drews SJ. Expression and characterization of the *Mycobacterium tuberculosis* serine/threonine protein kinase B[J]. Infection and Immunity, 1999, 67(11): 5676-5682.
- [16] Fernandez P, Saint-Joanis B, Barilone N, et al. The Ser/Thr protein kinase PknB is essential for sustaining mycobacterial growth[J]. Journal of Bacteriology, 2006, 188(22): 7778-7784.
- [17] Mieczkowski C, Iavarone AT, Alber T. Auto-activation mechanism of the *Mycobacterium tuberculosis* PknB receptor Ser/Thr kinase[J]. The EMBO Journal, 2008, 27(23): 3186-3197.
- [18] 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.
- [19] 张志明, 孙莹, 赵莉莉, 等. 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[J]. 微生物学通报, 2012, 39(10): 1437-1446.
- [20] Collins L, Franzblau SG. Microplate alamar blue assay versus BACTEC 460 system for high-throughput screening of compounds against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium*[J]. Antimicrob Agents Chemother, 1997, 41(5): 1004-1009.

- [21] 张丽蓉, 赵莉莉, 魏玉珍, 等. 以肽脱甲酰基酶为靶点的抗结核药物高通量筛选模型的建立和应用[J]. 中国医药生物技术, 2012, 7(2): 110-115.
- [22] 陆宇, 王彬, 郑梅琴, 等. 应用 Alamar Blue 和 MTT 测定抗结核药物最低抑菌浓度的研究[J]. 中国防痨杂志, 2007, 29(6): 499-501.
- [23] Lu Y, Zheng M, Wang B, et al. Clofazimine analogs with efficacy against experimental tuberculosis and reduced potential for accumulation[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2011, 55(11): 5185-5193.
- [24] Chapman MT, Boulouc N, Buxton SR, et al. Substituted aminopyrimidine protein kinase B (PknB) inhibitors show activity against *Mycobacterium tuberculosis*[J]. Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters, 2012, 22(9): 3349-3353.
- [25] Lougheed EAK, Osborne AS, Saxty B, et al. Effective inhibitors of the essential kinase PknB and their potential as anti-mycobacterial agents[J]. Tuberculosis, 2011, 91(4): 277-286.
- [26] Seal A, Yogeeswari P, Sriram D, et al. Enhanced ranking of PknB Inhibitors using data fusion methods[J]. Journal of Cheminformatics, 2013, 5(1): 2.
- [27] Szekely R, Waczek F, Szabadkai I. A novel drug discovery concept for tuberculosis: inhibition of bacterial and host cell signaling[J]. Immunology Letters, 2008, 116(2): 225-231.
- [28] Barakonyi HB, Szekely R, Varga Z, et al. Signalling inhibitors against *Mycobacterium tuberculosis*—early days of a new therapeutic concept in tuberculosis[J]. Current Medicinal Chemistry, 2008, 15(26): 2760-2770.



(上接 p.613)

征 稿 简 则

3.3 摘要写作注意事项

3.3.1 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, 被动语态表达拖拉模糊, 尽量不用, 这样可以避免长句, 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。

3.3.2 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系统上传修改稿, 待编辑部复审后将给作者发稿件录用通知单, 稿件按照投稿先后排队发表。

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。

6 联系方式

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>