

# 绿脓杆菌 SecA ATPase 抑制剂筛选模型 的建立和应用

王宇 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(分泌途径, Secretion pathway)是蛋白质转运的主要途径。其中, SecA ATPase 是蛋白质转运途径中的“动力泵”,它通过 ATP 的水解循环驱使蛋白质前体穿过细菌内膜。SecA 蛋白在细菌中是独有且不可缺少的。克隆和高效表达绿脓杆菌 PsecAN75 蛋白(绿脓杆菌 SecA 蛋白 N 端 645 个氨基酸残基组成的片段,大小约 75 kD)并优化其 ATPase 酶活测定体系,在此基础上建立了更为灵敏的 SecA 蛋白 ATPase 活性抑制剂的筛选模型。运用该模型从化合物库的 3220 个样品中筛选得到可抑制绿脓杆菌 SecA ATP 酶的活性阳性化合物 4 个,从 7196 个微生物发酵液中得到 66 个阳性样品,筛选阳性率为 0.67% (以抑制率大于 30%为筛选阳性标准)。而后通过已建立的细胞水平筛选模型对其抗菌活性进行验证。研究结果表明 3 个化合物样品和 6 个发酵液样品在酶水平和细胞水平对绿脓杆菌 SecA ATPase 均有较好的抑制作用,值得进一步研究。

**关键词:** 药物筛选模型, 绿脓杆菌 SecA 蛋白, 化合物, 发酵液

## The Establishment and Application of Inhibitors Screening Model Targeting to *Pseudomonas aeruginosa* SecA ATPase

WANG Yu 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, China)

**Abstract:** The most of secreted proteins are exported by Sec translocase (Secretion pathway). SecA ATPase is the preprotein translocase nanomotor that undergoes membrane insertion and deinsertion to drive preprotein across the bacterial inner membrane, which is unique and 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. *Pseudomonas aeruginosa* secA gene product, whose amino acid sequence displays PaSecAN75 (The N-terminal first 645 amino acids of *Pseudomonas aeruginosa* SecA), was cloned, overexpressed and purified in order to establish enzyme inhibitor screening model. After establishment and optimization of screening assay, a primary screening was performed with compounds library and microbial fermentation collection in our institute. 4 out of 3220 compounds and 66 out of 7196

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 30570040); 国家科技基础条件平台项目(No. 2005DKA21203); “重大新药创制”科技重大专项项目(No. 2009ZX09301-003, 2009ZX09302-004)

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

收稿日期: 2010-06-07; 接受日期: 2010-09-03

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

microbial fermentation samples were identified as primary hit. To confirm the hits from the primary screening, a cell-based SecA activity assay was used to assess their inhibitory effect *in vivo*. Results showed that 3 compounds and 6 microbial fermentation samples inhibited enzymic activity of SecA *in vitro* and impaired its function *in vivo*.

**Keywords:** Drugs screening model, *Pseudomonas aeruginosa* SecA, Compounds, Fermentation liquor

铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*, PA), 又名绿脓杆菌, 是假单胞菌属中的代表菌种。它广泛分布于医院内各种环境, 可以引起多种类型的感染。由于其外膜通透性低并存在着主动外排系统(Active efflux systems), 因此表现为具有天然耐多种抗生素的特性, 且感染后不易被控制。绿脓杆菌是一种重要的院内感染条件致病菌, 研究显示, 医院ICU(Intensive care unit)超过60%的死亡病例都与绿脓杆菌感染相关<sup>[1-4]</sup>。近年来, 除了多尼培南<sup>[5]</sup>没有新的抗绿脓杆菌药物入市。因此, 迫切需要发现新型低毒、高效抗绿脓杆菌药物。

蛋白质的翻译是在细胞质中进行的, 但大约有25%~30%的蛋白质必须穿过细胞内膜运送到周质或分泌到细胞外才能发挥它们正常的功能<sup>[6]</sup>。蛋白质转运最主要的途径被称之为分泌途径(Secretion pathway), 简称Sec途径<sup>[7]</sup>。SecA是一种ATPase, 是Sec途径中唯一已知的能量转化酶, 可通过水解循环驱使蛋白质前体穿过细菌内膜, 研究结果表明SecA蛋白是细菌生存不可缺少的<sup>[8]</sup>。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相似的功能<sup>[9]</sup>。因此SecA可用来作为抗菌药物筛选的靶蛋白。目前, 已有研究者通过虚拟筛选的方法得到了首个针对大肠杆菌SecA ATPase的抑制剂<sup>[10]</sup>, 但是尚未有针对SecA ATPase抑制剂的大规模、实质性筛选工作, 也尚未发现针对绿脓杆菌SecA ATPase的抑制剂。

本研究在原核表达系统中表达出具有良好催化活性的PaSecAN75蛋白, 并利用该重组蛋白建立并优化了酶水平的绿脓杆菌SecA ATPase抑制剂体外高通量筛选模型。运用该模型对本所化合物库、发酵液库样品进行筛选, 经过3次生物学重复, 共得到化合物阳性样品4个、发酵液阳性样品66个。本研究同时将绿脓杆菌SecA ATPase抑制剂细胞水平筛选模型<sup>[11]</sup>作为复筛模型, 将酶水平筛选得到的阳性样品进行细胞水平的复筛, 最终得到3个化合物阳性样品和6个发酵液阳性样品, 为进一步发展新

型抗绿脓杆菌药物奠定了基础。

## 1 材料

### 1.1 菌株

大肠杆菌菌株DH5 $\alpha$ 以及BL21( $\lambda$ DE3)为本实验室保藏。BL21.19 [*secA(am)supFtstrp(am)zch :: Tn10recA::cat clp A::kan*], 由佐治亚州立大学生物系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/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<sup>[11]</sup>。

### 1.2 质粒

pET30a为本实验室保藏。

### 1.3 培养基和主要溶液

见参考文献[11]。

## 2 实验方法

### 2.1 PaSecA N75蛋白ATPase抑制剂筛选方法的建立及优化

**2.1.1 pET30a/*pasecAN75*质粒的构建:** 根据绿脓杆菌*secA*基因序列分别设计合成了上、下游引物。引物序列如下(引物由上海生工合成):

*pasecAN75*: 上游5'-gagatatacatatgtttgcgcctttg-3' (*Nde* I); 下游5'-aagcttcagttgcttgcgga-3' (*Hind* III)。

以绿脓杆菌PAO1基因组DNA为模板, 通过PCR方法分别扩增出目的基因片段, 将回收纯化的PCR产物和质粒载体pET30a经过*Nde* I和*Hind* III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 $\alpha$ , 涂布于含有40 mg/L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。

**2.1.2 目的蛋白的诱导表达以及分离纯化:** 将测序无误的重组质粒pET30a/*pasecAN75*转化大肠杆菌

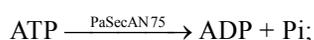
BL21 ( $\lambda$ DE3)。挑取转化子在含有 40 mg/L 卡那霉素的 TAG 液体培养基中 37°C 振荡培养至  $OD_{600} = 0.8$ , 加入终浓度 0.5 mmol/L IPTG, 20°C 诱导表达过夜。离心收集菌体, 超声裂解菌体后, 将裂解液在 4°C、15000  $\times$  g 离心 30 min, 上清用 0.45  $\mu$ m 滤膜过滤。使用 1 mL HisTrap<sup>TM</sup> HP 镍离子亲和层析柱纯化 PaSecAN75 蛋白。

## 2.2 PaSecA 全酶与 PaSecAN75 蛋白 ATPase 活性比较

PaSecA 全酶的表达纯化过程见参考文献[12], 酶活测定体系见参考文献[12], 脂质体的制备方法见参考文献[13]。在有/无脂质体的情况下, 在反应体系中分别加入一定量的 PaSecA 全酶和 PaSecAN75 蛋白, 分别计算其比活力。

## 2.3 酶水平筛选模型的建立与应用

### 2.3.1 PaSecAN75 酶活的检测: PaSecA 是 ATP 酶, 它催化 ATP 生成 ADP 和自由磷酸根离子, 同时释放能量:



ADP + 磷酸烯醇式丙酮酸  $\xrightarrow{\text{丙酮酸激酶}}$  ATP + 丙酮酸;



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。因此本实验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 ADP 的生成量<sup>[14]</sup>, 进而反映出 PaSecAN75 的催化活性大小。

酶活测定反应体系包含: 100 mmol/L Hepes, 10 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 10 mmol/L ATP, 1 mmol/L 磷酸烯醇式丙酮酸, 1 mmol/L NADH, 3.6 U 丙酮酸激酶, 3.6 U 乳酸脱氢酶, 以及待测 PaSecAN75 6  $\mu$ g, 总体积 200  $\mu$ L。同时设不加 PaSecAN75 的空白对照, 以等体积 ddH<sub>2</sub>O 代之。将上述反应体系加入 96 孔板, 置于 37°C 反应 50 min, 计算 50 min 的  $\Delta mOD_{340}/\text{min}$ 。

### 2.3.2 PaSecAN75 酶学性质分析: 本研究考察了一系列温度、NADH 浓度、酶浓度以及反应时间对酶活性测定的影响, 选择最佳反应条件。

### 2.3.3 待测样品的预处理: 化合物样品: 10 mg 纯品化合物溶到 1 mL DMSO 中, 取 10 $\mu$ L 加 10 $\mu$ L DMSO 倍比稀释, 取 1 $\mu$ L 作用于 200 $\mu$ L 反应体系, 使其终浓度为 25 mg/L。

发酵液样品: 从斜面上挑取一小块培养物种入盛有 50 mL 发酵培养基的 250 mL 三角瓶中, 28°C、190  $\times$  g 旋转摇床培养 4 d。取 10 mL 发酵液用 10 mL 的丙酮抽提, 挥干后用 1 mL 的 DMSO 溶解。取 1  $\mu$ L 作用于 200  $\mu$ L 反应体系。

### 2.3.4 PaSecAN75 抑制剂的筛选: (1) 筛选模型相关指标分析。

本研究考察了 DMSO 浓度、发酵培养基抽提液以及反应体系中各种成分对酶活性的影响, 并对孔板的稳定性、均一性进行评价。

计算下列指标:

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

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

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

(2) 待测样品对 PaSecAN75 抑制作用的测定。

配制优化后的酶活测定反应体系: 100 mmol/L Hepes, 10 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 10 mmol/L ATP, 1 mmol/L 磷酸烯醇式丙酮酸, 1.5 mmol/L NADH, 3.6 U 丙酮酸激酶, 3.6 U 乳酸脱氢酶, 以及待测 PaSecAN75 6  $\mu$ g, 总体积 200  $\mu$ L, 并在每 200  $\mu$ L 反应体系中加入 1  $\mu$ L 待测样品。同时设立阳性对照与阴性对照, 阳性对照是以不加 PaSecAN75 的空白对照模拟 100% 抑制酶活性, 化合物样品的阴性对照是以 DMSO 代替样品模拟无抑制作用, 发酵液样品的阴性对照以空白发酵培养基丙酮抽提物代替样品模拟无抑制作用。体系反应温度 37°C, 反应时间 40 min。

(3) 抑制率的计算。

抑制率 IR =

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

### 2.3.5 假阳性结果的排除<sup>[14]</sup>: 在反应体系中不加入 PaSecAN75 和 ATP, 而是直接加入 ADP, 其他反应组分不变, 同样检测反应体系在 340 nm 波长下的光吸收值变化情况。

### 2.3.6 酶水平阳性样品的细胞水平活性检测: 运用 PaSecA 细胞水平筛选方法<sup>[11]</sup>对酶水平阳性样品的抗菌活性进行测定。

### 3 实验结果

#### 3.1 pET30a/pasecAN75 重组质粒的构建

用设计的一对引物从绿脓杆菌 PAO1 基因组中扩增出 DNA 片段, 其大小与 *pasecAN75* 基因(1935 bp)相符。重组质粒 pET30a/pasecAN75 经 *Hind* III 和 *Nde* I 双酶切所得到的 DNA 片段分别与 *pasecAN75* (1935 bp)和 pET30a (5422 bp)相吻合(图 1)。经上海生工生物技术有限公司测序, 结果显示重组质粒中所插入的目的基因片段序列正确, 证明 *pasecAN75* 基因已正确插入到表达质粒 pET30a 中。

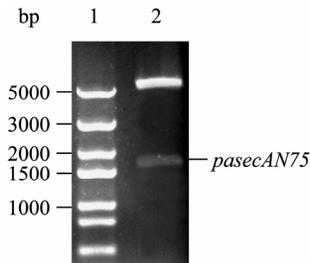


图 1 pET30a/pasecAN75 重组质粒酶切鉴定图

Fig. 1 Digestion analysis of pET30a/pasecAN75 by restriction enzymes

注: 1: DNA marker; 2: *Hind* III 和 *Nde* I 双酶切结果。

Note: 1: DNA marker; 2: pET30a/pasecAN75 by *Hind* III and *Nde* I.

#### 3.2 PaSecAN75 蛋白的表达及纯化结果

转化重组质粒 pET30a/pasecAN75 的大肠杆菌 BL21 经 IPTG 诱导后, 由 SDS-PAGE 电泳结果(图 2)可以看出: 在 20°C 诱导表达 PaSecAN75 蛋白时, 大部分目的蛋白在上清中以可溶性状态存在, 沉淀中所含不可溶蛋白量较少, 易于后期分离纯化。通过 Hisrap™ HP 镍离子亲和层析柱进行分离纯化, 最终得到高纯度目的蛋白。

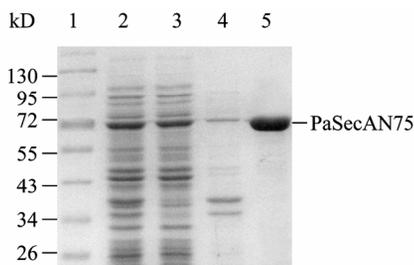


图 2 PaSecAN75 蛋白的诱导表达和纯化

Fig. 2 The expression of PaSecA in *E. coli*

注: 1: Marker; 2: 全菌蛋白; 3: 超声破碎后上清中的蛋白; 4: 超声破碎后沉淀中的蛋白; 5: 经纯化蛋白。

Note: 1: Protein marker; 2: Total cell lysates after induction; 3: Supernatant fraction after centrifugation; 4: Sediment fraction after centrifugation; 5: Pooled peak fractions after Hisrap™ HP column.

#### 3.3 PaSecA 全酶与 PaSecAN75 蛋白 ATPase 酶活比较

本研究将 PaSecAN75 与 PaSecA 全酶进行了 ATPase 酶活比较, 其结果表明: 在不添加脂质体的情况下, PaSecAN75 的酶活明显高于 PaSecA 全酶; 在添加脂质体的情况下, PaSecA 全酶被脂质体激活, 酶活有所提高, 而 PaSecAN75 的酶活仍要高于 PaSecA 全酶(图 3)。为了提高筛选的灵敏度, 降低筛选成本, 本研究选择在无需添加脂质体的情况下, 以 PaSecAN75 蛋白为绿脓杆菌 SecA ATPase 抑制剂筛选模型的靶酶。

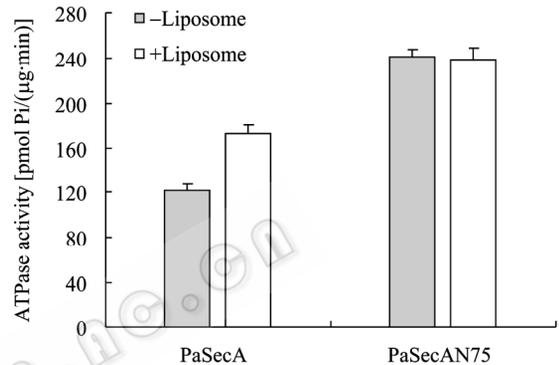


图 3 PaSecA 全酶与 PaSecAN75 蛋白酶活比较

Fig. 3 ATPase activity of PaSecA and PaSecAN75

#### 3.4 酶水平筛选模型的建立与应用

3.4.1 PaSecAN75 酶活性检测: (1) 酶促反应过程中的光吸收值变化曲线。

本研究把 37°C 下每分钟催化 1 μmol/L 底物 ATP 生成产物 ADP 所需的 PaSecAN75 量定义为一个活力单位(U)。实验组  $\Delta mOD_{340}/min$  值为 16.43, 空白对照组  $\Delta mOD_{340}/min$  值为 3.29(图 4)。计算得到每毫克 PaSecAN75 的比活力是 4380 U, 即每 nmol PaSecAN75 的比活力为 328.5 U。

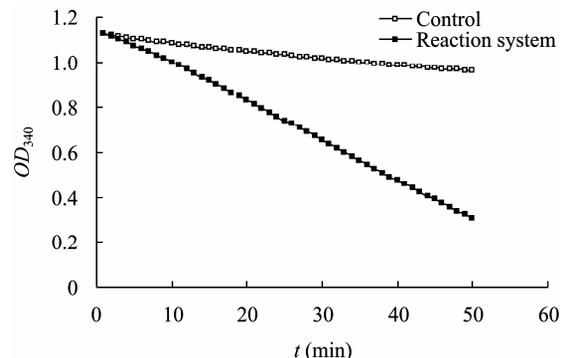


图 4 PaSecAN75 催化反应体系光吸收变化曲线

Fig. 4 Experimental determination of PaSecAN75 reaction rate

## (2) 酶浓度-反应速率曲线。

本研究中保持反应体系中其它反应物的恒定 ATP 浓度, 分别测定了在不同酶浓度下的反应速率 (图 5)。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。为了既保证筛选的灵敏度, 又降低筛选成本, 最终选择反应体系中 PaSecAN75 浓度为 6 g/200 L。

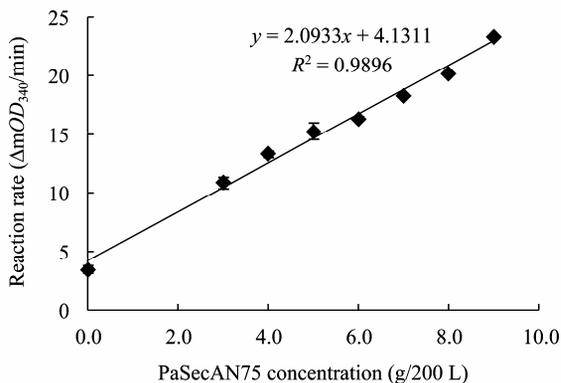


图 5 PaSecAN75 酶浓度-反应速率曲线  
Fig. 5 The reaction rate as a function of the concentration of PaSecA

## 3.4.2 PaSecAN75 酶学性质分析: (1) 温度对 PaSecAN75 酶活性的影响。

反应测定了不同温度对 PaSecAN75 酶活性的影响 (图 6)。结果表明: 在 22°C–37°C 之间, 随着反应温度的升高反应速率不断加快, 并在 37°C 时基本达到最高; 而在 37°C–45°C 时, 反应速率维持恒定。因此, 选择 37°C 为反应温度。

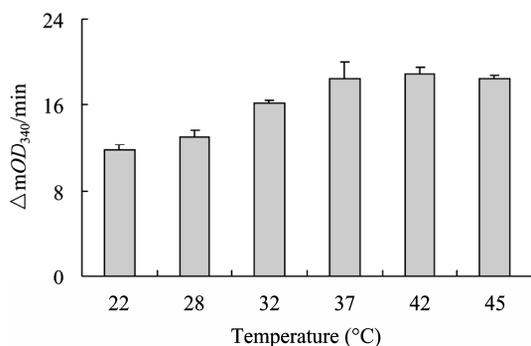


图 6 温度与反应速率的关系  
Fig. 6 The effect of temperature on reaction rate

## (2) NADH 浓度对 PaSecAN75 酶活性的影响。

本研究中设置了 5 个 NADH 浓度, 其与反应速率的关系如图 7 所示。由实验结果可知: 当 NADH

浓度达到 1.5 mmol/L 时, 反应速率达到最大, 随着 NADH 浓度的提高反应速率维持稳定不再升高。故选择最佳 NADH 浓度 1.5 mmol/L。

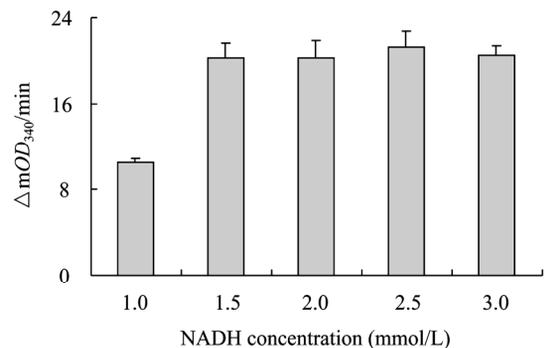


图 7 NADH 浓度与反应速率的关系  
Fig. 7 The effect of the concentration of NADH on reaction rate

## (3) 酶反应动力学参数研究。

ATP 为 PaSecAN75 催化的唯一底物, 因此本研究设置了一系列 ATP 浓度, 研究其酶反应动力学, 底物浓度-反应速率曲线见图 8。由图可见, 当 ATP 浓度  $\leq 10$  mmol/L 时, 反应速率随着底物浓度的增加而逐渐增加, 当 ATP 浓度达到 10 mmol/L 时反应速率达到最大。之后随着反应底物的增加反应速率反而有所减低, 表明过高的底物浓度可能会对酶活性产生一定的抑制作用。

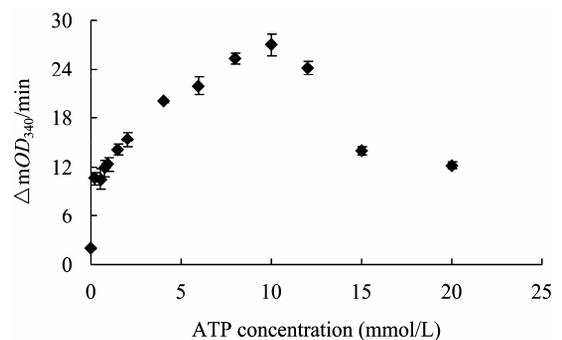


图 8 ATP 浓度与反应速率的关系  
Fig. 8 The effect of the concentration of ATP on reaction rate

利用双倒数作图法, 将图 8 转变为  $1/[v]$  与  $1/[S]$  的直线关系, 如图 9 所示。计算得:  $V_{\max} = 24.04$  mOD/min;  $K_m = 0.7548$  mmol/L。由于反应中 ATP 浓度为 10 mmol/L 时, 反应速率达到最大, 故选择反应体系中 ATP 浓度为 10 mmol/L。

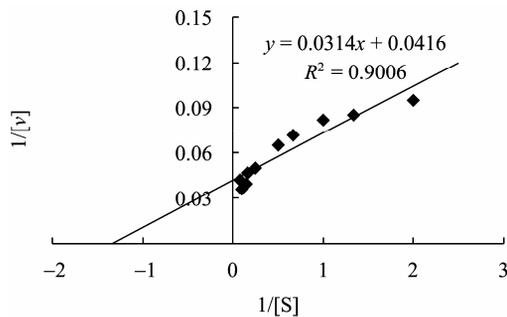


图9 PaSecAN75 米氏常数的测定  
Fig. 9 The curve of Michaelis-Menten equation

#### (4) 最佳反应时间的确定。

在优选的反应条件下(温度 37°C, NADH 浓度 1.5 mmol/L, 底物 ATP 终浓度为 10 mmol/L, 酶浓度 6 g/200 L), 60 min 之内, 吸光值持续下降, 并与反应时间成线性关系; 60 min 之后, 吸光值曲线明显趋于平直而不再下降(图 10), 说明反应已达终末, 因此反应时间应控制在 1 h 之内为宜。

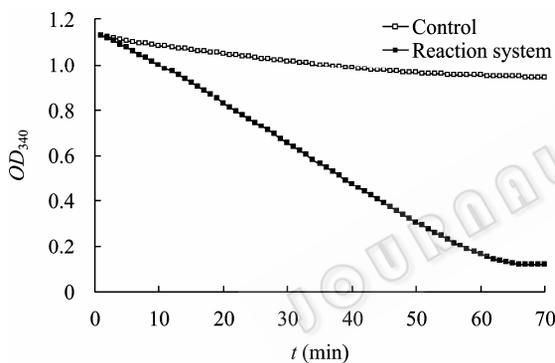


图10  $OD_{340}$  随反应时间的变化曲线  
Fig. 10 The time evolution of the reaction

综上所述, 确定优化后的酶活测定反应条件为: 反应温度 37°C, NADH 浓度 1.5 mmol/L, 底物 ATP 终浓度为 10 mmol/L, 酶浓度 6 g/200 L, 反应时间 40 min。

#### 3.4.3 酶水平筛选模型相关指标的测定: (1) DMSO 浓度对酶活性的影响。

反应体系中分别加入 0–10% DMSO, 观察不同 DMSO 浓度对反应体系中酶活性的影响(图 11)。实验结果表明, DMSO 浓度高于 6% 时  $OD_{340}$  读数明显下降。因此确定体系中最高 DMSO 浓度不超过 6%。

#### (2) 发酵培养基抽提液的影响。

反应体系中分别加入 0、1.0%、1.5%、2.0%、3.0% 的空白发酵培养基 A1、A2 的抽提液, 观测其

对  $\Delta OD_{340}$  的影响(图 12)。由实验结果可知, 反应体系中浓缩发酵培养基浓度控制在 3% 以内对结果的影响都在可接受范围之内。实际筛选模型中每个反应体系加入 1  $\mu$ L 抽提浓缩发酵液样品, 发酵培养基浓度为 0.5%, 在允许范围之内。

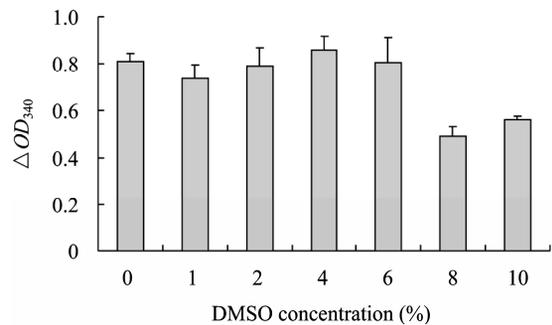


图11 DMSO 浓度对反应的影响  
Fig. 11 The effect of the concentration of DMSO on  $\Delta OD_{340}$

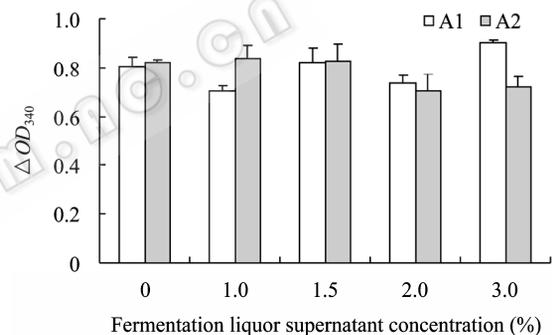


图12 发酵培养基对反应的影响  
Fig. 12 The effect of the concentration of fermentation medium on  $\Delta OD_{340}$

#### (3) 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, 结果如图 13 所示。计算该模型的信噪比 =  $16.36/1.89 = 8.65$ , 符合筛选模型信噪比大于 3 的要求。

#### (4) 孔板均一性评价。

将经优化的体系于 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, 每日进行 1 次体系验证, 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;

$CV_{\text{阳性对照}} = 18.40\% < 20\%$ ;  $CV_{\text{阴性对照}} = 7.13\% < 20\%$ ;

$Z' = 0.95 > 0.4$ 。

各项指标均符合筛选模型的要求。

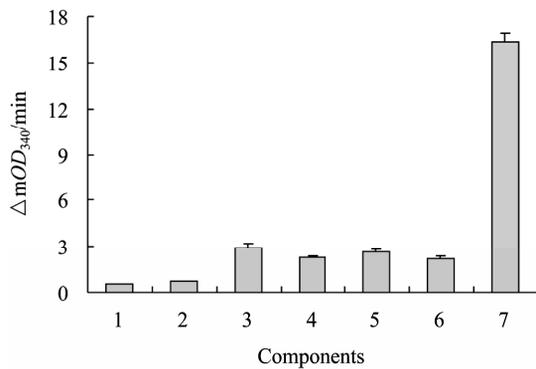


图 13 反应体系中各成分对酶活检测的影响

Fig. 13 Validation of the screening assay

注: 1: 酶反应缓冲液的空白对照; 2: 酶反应缓冲液 + 底物 ATP; 3: 酶反应缓冲液 + 酶的对照; 4: 酶反应缓冲液 + 酶 + A1 发酵培养基的对照; 5: 酶反应缓冲液 + 酶 + A2 发酵培养基的对照; 6: 酶反应缓冲液 + 酶 + DMSO 的对照; 7: 正常酶反应体系。

Note: 1: Buffer; 2: Buffer + ATP; 3: Buffer + PaSecAN75; 4: Buffer + PaSecAN75 + A1; 5: Buffer + PaSecAN75 + A2; 6: Buffer + PaSecAN75 + DMSO; 7: Reaction system.

**3.4.4 样品筛选结果:** 本研究从化合物库、微生物发酵液库中共筛选 10416 个样品, 其中 3220 个化合物, 7196 个发酵液样品。经 3 次生物学重复并经假阳性排除, 得到 4 个化合物阳性样品, 66 个发酵液阳性样品, 阳性率  $70/10416 = 0.67\%$  (以抑制率  $>30\%$  为筛选阳性标准)。

**3.4.5 酶水平阳性样品细胞水平的活性检测:** 本研究利用本实验室已建立的细胞水平筛选模型, 对酶水平筛选得到的 4 个化合物阳性样品和 66 个发酵液阳性样品进行了细胞水平的筛选。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 2 次生物学重复, 最终得到 3 个阳性化合物样品和 6 个阳性发酵液样品, 这些样品对检定菌 BL21.19/pET20b/pasecA 具有抑菌作用 (表 1、图 14), 对 BL21.19/pET20b (30°C) 的生长也有明显的抑制作用, 未发现特异性抑制 BL21.19/pET20b/pasecA (42°C) 生长的样品。

## 4 讨论

最新的 SecA 蛋白晶体结构解析<sup>[15]</sup>显示, SecA 蛋白完整的 ATPase 结构域是 N 端 1-621 个氨基酸残基, 其中包括核苷酸结合结构域(NBD 1-220 和 377-416)、前蛋白结合结构域(PBD 221-376)以及分子内 ATP 酶调节结构域(IRA2 417-621)。研究表明 SecA 蛋白的 C 末端结构域(34 kD)对酶活性主要起

表 1 阳性样品对 PaSecA ATP 酶活的抑制作用  
Table 1 The inhibitory rate to PaSecA of positive samples

样品号 Sample	酶水平抑制率 Inhibitory rate of ATPase activity (%)	对检定菌的抑菌圈 Inhibitory zone (mm)		
		P	PAO1	C
2029501	32.80	11.2	9.2	10.0
2030271	43.00	9.2	+	9.8
2039021	66.80	10.9	12.2	10.5
I08AB-01353	41.20	9.7	8.1	10.0
I09AB-00018	106.20	11.4	11.5	12.8
I09AB-00042	104.00	11.5	12.5	13.1
I09AB-00127	32.76	9.3	+	12.2
I09AA-00562	84.23	12.2	12.4	12.2
I09AB-00562	78.24	12.3	13.5	13.5

注: P: 检定菌 BL21.19/pET20b/pasecA, 42°C 培养; PAO1: 野生型绿脓杆菌, 37°C 培养; C: 检定菌 BL21.19/pET20b, 30°C 培养; +: 抑制活性较弱。化合物样品每纸片 50 μg, 发酵液样品每纸片 40 μL 新鲜发酵液样品。

Note: P: BL21.19/pET20b/pasecA bacteria as a test strain, cultivated at 42°C; PAO1: Wild type *Pseudomonas aeruginosa* as a test strain, cultivated at 37°C; BL21.19/pET20b bacteria as a test strain, cultivated at 30°C; +: Lower antibacterial activity; Compound samples: 50 μg per paper disk; Microbial fermentation samples: 40 μL per paper disk.

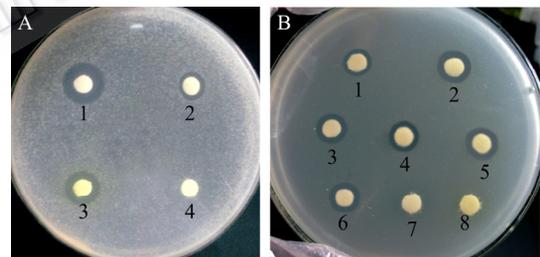


图 14 酶水平阳性样品纸片法测活结果

Fig. 14 The inhibing effect to BL21.19/pET20b/pasecA of positive samples to PaSecAN75

注: A: 1: 2029501; 2: 2030271; 3: 2039021; 4: 对照。B: 1: I08AB-01353; 2: I09AB-00018; 3: I09AB-00042; 4: I09AB-00127; 5: I09AA-00562; 6: I09AB-00562; 7: 空白发酵培养基 A1; 8: 空白发酵培养基 A2。

Note: A: 1: 2029501; 2: 2030271; 3: 2039021; 4: Control. B: 1: I08AB-01353; 2: I09AB-00018; 3: I09AB-00042; 4: I09AB-00127; 5: I09AA-00562; 6: I09AB-00562; 7: Fermentation medium A1 control; 8: Fermentation medium A2 control.

到下调作用, 因此, 从理论上讲 SecA N 端 ATP 酶结构域的酶活应显著高于 SecA 全酶。本研究克隆表达了 PaSecAN75 片段, 它包括 N 端 1-645 个氨基酸残基, 具有完整的 NBD、PBD 和 IRA2 结构域。IRA2 在 SecA 蛋白中的作用主要是通过与蛋白质前体结合结构域(PBD)的相互作用调节其 ATP 酶结构域的构象, 当蛋白质前体结合到 SecA 之后, 启动它

的 ATPase 活性。从活性比较结果上看, PaSecAN75 片段的比活力要显著高于被脂质体激活后 PaSecA 全酶活性。因此, 本研究采用 SecAN75 片段作为靶酶, 在一定程度上提高了模型的灵敏度, 并降低了筛选成本。

以往文献报道的 SecA 酶活性检测一般采用经典的孔雀绿比色法<sup>[10,12]</sup>, 该方法仅有一步反应, 简便、灵敏、筛选成本较低。但由于其检测原理是通过检测体系中的自由磷酸根离子来反映酶活性, 因此对于筛选含有磷酸根离子的样品(如发酵液样品)存在一定的局限性。故本研究中采用 NADH 比色法。该法的原理是通过三步级联反应检测体系中 ADP 的生成量, 通过检测 OD<sub>340</sub> 值来间接反映 PaSecA 的 ATP 酶活性。该法灵敏、稳定, 且不受磷酸根的干扰, 可用于筛选各类样品, 有效克服了孔雀绿比色法的缺陷。

本研究共筛选了 3220 个化合物样品和 7196 个发酵液样品, 经过酶水平的初筛及细胞水平的复筛最终得到 3 个化合物阳性样品和 6 个发酵液阳性样品。其中, 3 个化合物阳性样品在细胞水平对检定菌 BL21.19/pET20b/pasecA 和 BL21.19/pET20b 均有明显的抑制作用。由于绿脓杆菌与大肠杆菌 SecA 蛋白序列同源性为 64%, 并且均含有 6 个相对应的保守区, 因此抑制 PaSecA 的活性成分很可能也同时抑制 EcSecA。6 个发酵液阳性样品中除 I09AB-00127 之外, 均对绿脓杆菌有较强的抑菌作用, 说明其活性成分可有效穿透绿脓杆菌细胞外膜, 是很有潜力的抗绿脓杆菌 SecA 活性化合物分离纯化候选菌株。

SecA 是细菌所独有, 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 相似的功能<sup>[9]</sup>。但是, 特异性抑制绿脓杆菌 SecA ATPase 活性的药物对人体是否低毒, 仍需要进一步细胞毒性实验的验证。

## 参 考 文 献

[1] Nicasio AM, Kuti JL, Nicolau DP. The current state of multidrug-resistant gram-negative bacilli in North Amer-

ica. *Pharmacotherapy*, 2008(28): 235-249.

- [2] Souli M, Galani I, Giamarellou H. Emergence of extensively drug-resistant and pandrug-resistant gram-negative bacilli in Europe. *Eurosurveillance*, 2008(13): 1-11.
- [3] Siegel RE. Emerging gram-negative antibiotic resistance: daunting challenges, declining sensitivity, and dire consequences. *Respir Care*, 2008(53): 471-479.
- [4] Giske CG, Monnet DL, Cars O, *et al*. On behalf of the react-action on antibiotic resistance: clinical and economic impact of common multidrug resistant gram-negative bacilli. *Antimicrob Agents Chemother*, 2008(52): 813-821.
- [5] Shakil S, Danishuddin M, Khan AU. Doripenem versus bacteria: an emerging battleground. *Chemother*, 2009, 21(5): 482-492.
- [6] Eser M, Ehrmann M. SecA-dependent quality control of intracellular protein localization. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(23): 13231-13234.
- [7] Nishiyama K, Mizushima S, Tokuda H. A novel membrane protein involved in protein translocation across the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *EMBO*, 1993, 12(9): 3409-3415.
- [8] Mitchell C, Oliver D. Two distinct ATP-binding domains are needed to promote protein export by *Escherichia coli* SecA ATPase. *Mol Microbiol*, 1993(10): 483-497.
- [9] Anastassios E. Bacterial secretome: the assembly manual and operating instructions. *Molecular Membrane Biology*, 2002(19): 159-169.
- [10] Li MY, Huang YJ, Tai PC, *et al*. Discovery of the first SecA inhibitors using structure-based virtual screening. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2008(368): 839-845.
- [11] 赵莉莉, 李秋萍, 魏玉珍, 等. 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. *微生物学通报*, 2008, 35(12): 1-6.
- [12] Yu LY, Yang H, Ho Q, *et al*. Purification and characterization of *Pseudomonas aeruginosa* SecA. *Protein Expression and Purification*, 2006, 50(2): 179-184.
- [13] 赵荣生, 侯新朴, 严宝霞. 两性霉素 B 脂质体的制备及稳定性研究. *中国医药工业杂志*, 2001, 32(4): 160-162.
- [14] 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. *微生物学通报*, 2010, 37(2): 312-318.
- [15] Yannis Papanikolaou, Maria Papadovasilaki. Structure of dimeric SecA, the *Escherichia coli* preprotein translocase motor. *Mol Biol*, 2007(366): 1545-1557.