

[文章编号] 1674-8115(2011)07-0875-05

· 论 著 ·

Rv1272 和 Rv1273 与结核分枝杆菌耐药相关性研究

程旭红^{1,2}, 孙 青¹, 姚玉峰², 周爱萍^{2,3}, 赵英伟¹

(1. 苏州大学 基础医学与生物科学学院, 苏州 215123; 2. 上海交通大学 基础医学院病原生物学教研室, 上海 200025; 3. 西藏民族学院, 咸阳 712082)

[摘要] 目的 研究结核分枝杆菌 Rv1272 和 Rv1273 基因编码蛋白与药物外排的关系。方法 利用生物信息学方法分析 Rv1272 和 Rv1273 基因及其编码蛋白的结构, 采用 PCR 技术扩增该两个基因, 并与 pMF406 质粒连接构建重组质粒, 测序正确后, 电穿孔法将重组质粒转化耻垢分枝杆菌 mc²155。采用 Western blotting 对两个目的蛋白进行亚细胞定位; 试管法测定重组菌株对常用的 9 种抗菌药物的最低抑菌浓度 (MIC), 以转化 pMF406 空质粒的耻垢分枝杆菌作为对照菌株。结果 经测序验证重组质粒构建成功, Western blotting 结果显示 Rv1272 和 Rv1273 为膜蛋白。试管法测定结果显示: 含有目的基因的重组菌株对 9 种抗菌药物的 MIC 与对照菌株比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。结论 Rv1272 和 Rv1273 蛋白为膜蛋白, 未发现其与结核菌耐药之间的直接关系。

[关键词] 结核分枝杆菌; Rv1272; Rv1273; 膜蛋白; 最低抑菌浓度

[DOI] 10.3969/j.issn.1674-8115.2011.07.002

[中图分类号] R378.911

[文献标志码] A

Association of *Mycobacterium tuberculosis* Rv1272 and Rv1273 with drug resistance

CHENG Xu-hong^{1,2}, SUN Qing¹, YAO Yu-feng², ZHOU Ai-ping^{2,3}, ZHAO Ying-wei¹

(1. School of Biology and Basic Medical Sciences, Suzhou University, Suzhou 215123, China; 2. Department of Medical Microbiology and Parasitology, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200025, China; 3. Tibet University for Nationalities, Xianyang 712082, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the association of two proteins coded by *Mycobacterium tuberculosis* Rv1272 and Rv1273 with drug efflux. **Methods** The structures of Rv1272 gene, Rv1273 gene and proteins coded by them were analyzed by bioinformatics, and these two genes were amplified by PCR and cloned into expression vector pMF406 to generate the recombinant plasmids. After verification by sequence analysis, the recombinant plasmids were transformed into *M. Smegmatis* mc²155 by electroporation. The subcellular localization of these two proteins was probed by Western blotting, and the minimal inhibitory concentrations (MIC) of nine commonly used antibiotics drugs were determined by test tube method, with *M. Smegmatis* as control strain. **Results** It was verified by sequence analysis that the recombinant plasmids were successfully constructed, and it was identified by Western blotting that Rv1272 and Rv1273 were membrane proteins. It was revealed by test tube method that there was no significant difference in MIC of nine commonly used anti-tuberculosis drugs between recombinant strains and control strain ($P > 0.05$). **Conclusion** Rv1272 and Rv1273 are membrane proteins, and their relationship with drug resistance to *Mycobacterium tuberculosis* is uncertain.

[Key words] *Mycobacterium tuberculosis*; Rv1272; Rv1273; membrane protein; minimal inhibitory concentration

结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*, MTB) 是结核病的病原菌, 同时也是世界范围内第二大主要导致人类死亡的病原体。据 WHO 统计, 全世界每年约有 200 万人死于结核病^[1]。近年来, 耐多药结核病 (multiple drug resistant tuberculosis, MDR-TB) 和广泛耐药结核病 (extensive drug resistant tuberculosis,

XDR-TB) 的出现使结核病的疫情更加严重^[2]。MTB 与其他细菌的耐药机制不同, 一般无法通过质粒的介导从其他细菌获得耐药性^[3]。因此, 染色体介导的耐药是 MTB 产生耐药的分子基础。1998 年 MTB 的 H37Rv 全基因组测序的完成使人们可以从基因水平上研究结核菌的耐药机制^[4]。目前, 对结核杆菌耐

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划 (“973” 计划) (2009CB522605) 资助项目 (National Key Basic Research Development Program, “973” Program, 2009CB522605)。

[作者简介] 程旭红 (1983—), 女, 硕士生; 电子信箱: chengxuhong0529@163.com。

[通信作者] 赵英伟, 电子信箱: zhaoyingwei1993@sina.com; 周爱萍, 电子信箱: abby_aiping@126.com。

药机制的研究主要集中在药物作用靶位及相关基因的突变上,且已经证明了基因突变是其耐药的主要机制^[5]。此外,生物信息学分析发现有 20 种膜蛋白被定义为假想的药物外排泵,可能与药物的外排有关。近年来,对这组蛋白的研究已受到广泛关注,并且部分蛋白的功能也已被确认。假想药物外排泵的确切功能的进一步鉴定,对结核菌耐药机制的研究、新药的研发及有效治疗方案的制定都具有重大的意义。

本研究通过生物信息学分析发现,MTB 的 Rv1272 和 Rv1273 基因编码的蛋白都同时含有跨膜结构域(membrane spanning domains, MSD)和核苷酸结构域(nucleotide binding domains, NBD),结合参考文献^[6-10],我们预测 Rv1272 和 Rv1273 蛋白可能是 ABC 型(ATP-binding cassette)药物外排泵。目前国内外关于该蛋白在药物外排中的作用及其他功能尚未见报道。本研究以 Rv1272 和 Rv1273 蛋白为研究对象,对这两个蛋白进行亚细胞定位,并对其重组菌株的最低抑菌浓度(minimal inhibitory concentration, MIC)进行探索性研究,以期对 MTB 耐药机制研究提供一定的实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、细胞株和质粒 MTB 标准株 H37Rv 基因组 DNA 由复旦大学生命科学学院提供。耻垢分枝杆菌标准株 mc²155 由 Johns Hopkins 大学医学

院结核病研究中心 Petros Karakousis 博士提供。克隆宿主大肠杆菌 DH5 α 由本实验室保存。质粒 pMF406 由上海市公共卫生临床中心范小勇博士惠赠。

1.1.2 培养基与生化试剂 酵母提取物和胰蛋白酶(Oxoid);PCR 产物纯化试剂盒和胶回收试剂盒(Omega);质粒提取试剂盒(上海博彩生物公司);Pfu DNA 聚合酶、dNTPs、T₄ DNA 连接酶、限制性核酸内切酶 *Bam*H I、*Eco*R I、*Eco*R V 和 DNA 相对分子质量标准(MBI);聚偏二氟乙烯(PVDF)膜(0.45 μ m)(Invitrogen);ECL 化学发光液(GE);化学发光成像分析系统 LAS-4000(Fujifilm);乙酰胺和引物合成(上海生工生物工程技术有限公司)。

1.2 MTB 的 Rv1272 和 Rv1273 基因及编码蛋白结构预测

利用生物信息学软件 TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0>)和 Artemis 以及结核杆菌基因分析网站(<http://genolist.pasteur.fr/TubercuList/>)及参考文献^[6],对 Rv1272 和 Rv1273 基因及编码蛋白进行序列分析,预测蛋白的跨膜结构及其特殊序列。

1.3 MTB 的 Rv1272 和 Rv1273 基因片段的克隆

根据目的基因及载体的序列特点设计引物,引物序列见表 1。以 H37Rv 的基因组 DNA 为模板对 Rv1272 和 Rv1273 基因进行 PCR 扩增。反应条件:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,60 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s,25 个循环;最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

表 1 PCR 引物序列及其内切酶

Tab 1 Primer sequences and endonucleases for PCR

基因	上游引物序列(5'→3')	下游引物序列(5'→3')	内切酶
Rv1272	TCTCGGAATTCGTGACCGCGCCACCGGGCGA	GAATTCGGCGCGCGCTCATCTGG	<i>Eco</i> R I
Rv1273	TCTCGGATCCATGCTCTGCGCCCTG	CTGCGCGCTACAGCCCCGACCGTGG	<i>Bam</i> H I

注:下划线处为酶切位点。

1.4 重组质粒的构建和鉴定

用 *Eco*R I 分别单酶切 Rv1272 基因和载体 pMF406;用 *Bam*H I 单酶切 Rv1273,用 *Bam*H I 和 *Eco*R V 双酶切载体 pMF406,电泳回收目的片段和载体,用 T₄ DNA 连接酶连接,然后转化感受态大肠杆菌 DH5 α ,涂布于含 50 μ g/mL 卡那霉素的 LB 平板上,筛选阳性克隆。重组质粒分别命名为 pMF406-Rv1272 和 pMF406-Rv1273。经 PCR 和酶切鉴定正确后送上海美季生物公司进一步测序验证。

1.5 耻垢分枝杆菌的电转化

取培养至对数生长期[*D*(600 nm)约 0.5]的耻垢分枝杆菌 mc²155,以预冷的 10% 甘油洗涤 3 次,制

备耻垢分枝杆菌感受态细胞。取 100 μ L 感受态细胞加入 0.5 μ g 重组质粒 pMF406-Rv1272 或 pMF406-Rv1273。冰浴 30 min,转入预冷的 2 mm 电穿孔杯中,在 2.5 kV、25 μ F、1 000 Ω 条件下电穿孔。放电完毕后即加入 900 μ L LBG 培养基,37 $^{\circ}$ C 震荡培养 2 h 后,涂布于含 20 μ g/mL 卡那霉素的 LBG 平板,37 $^{\circ}$ C 静置培养 3~4 d。

1.6 Rv1272 和 Rv1273 蛋白的亚细胞定位

1.6.1 Rv1272 和 Rv1273 蛋白的诱导表达 分别挑取含重组质粒 pMF406-Rv1272 或 pMF406-Rv1273 的耻垢分枝杆菌单个菌落接种于含 20 μ g/mL 卡那霉素的 LBG 液体培养基中,培养至对数期,然后按 2%

接种量转接于新鲜的 LBG(含 20 $\mu\text{g/mL}$)液体培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 震荡培养至 $D(600\text{ nm})$ 约 0.8 时, 加入 10% 乙酰胺溶液至终浓度为 0.02%, 继续培养 7 h, 以诱导目的基因表达; 以未诱导耻垢分枝杆菌作为对照。

1.6.2 目的蛋白的亚细胞定位 根据参考文献^[11], 取对数生长期的诱导和未诱导的耻垢分枝杆菌各 50 mL, 8 000 r/min 离心 20 min, 得到上清和沉淀。沉淀用 40 mmol/L PBS(pH6.5 含 1 mmol/L EDTA) 洗液洗 2 次。用 5 mL 40 mmol/L PBS(pH6.5 含 0.3 mmol/L PMSF、1 000 U DNase I、0.5 mg RNase A、2 mmol/L MgCl_2) 重悬。细胞重悬液超声破碎后, 13 000 r/min 离心 15 min, 弃沉淀。上清液经 32 000 r/min 离心 1~4 h, 上清即细胞质成分保存, 沉淀(细胞膜成分)用 40 mmol/L PBS(pH6.5 含 0.3 mmol/L PMSF、1 mmol/L EDTA) 洗涤, 然后溶解于 40 mmol/L PBS(pH6.5 含 1% Triton X-100), 经离心后, 其上清即为细胞膜。用 Western blotting 方法对 Rv1272 和 Rv1273 蛋白亚细胞定位。具体步骤如下: 分别将诱导与未诱导的胞质成分和膜成分进行 12% SDS-PAGE 电泳, 蛋白经 14 V、20 min 半干法电转至 PVDF 膜上, 用 5% 脱脂奶粉对非特异位点进行封闭, 加入 1:4 000 稀释的鼠源性的 His 标记的一抗, 4 $^{\circ}\text{C}$ 结合过夜, TBST 充分洗膜后, 加入 HRP 标记的羊抗鼠的二抗(1:4 000 稀释), 室温孵育 1 h 后洗涤, 经 ECL 方法显色后观察结果。

1.7 重组菌株 MIC 测定

为了评价 Rv1272 和 Rv1273 蛋白是否具有外排药物(尤其是喹诺酮类药物)的功能, 本实验测定了过表达含有目的基因的重组耻垢分枝杆菌菌株对以下药物的 MIC。检测的药物包括抗结核一线药物异烟肼、利福平、链霉素和二线药物氧氟沙星、左氧氟沙星以及报道较多的与耐药泵有关的万古霉素、盐酸四环素、氯霉素、氨苄霉素等。其中, 氧氟沙星和左氧氟沙星属于喹诺酮类药物, 是耐药外排泵的常见的底物。具体方法如下: 向含有相同菌量(1×10^6 CFU/mL)的菌液中分别加入不同浓度的目的药物, 37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养 72 h 后, 观察细菌生长情况, 以无可见细菌生长的最小药物浓度为 MIC, 统计不同药物对细菌的生长影响。药物质量浓度的倍比稀释: 异烟肼从 80 $\mu\text{g/mL}$ 到 5 $\mu\text{g/mL}$, 利福平从 400 $\mu\text{g/mL}$ 到 25 $\mu\text{g/mL}$, 链霉素从 80 $\mu\text{g/mL}$ 到 10 $\mu\text{g/mL}$, 氧氟沙星从 1 $\mu\text{g/mL}$ 到 0.031 $\mu\text{g/mL}$, 左氧氟沙星从 8 $\mu\text{g/mL}$ 到 0.125 $\mu\text{g/mL}$, 氯霉素从 64 $\mu\text{g/mL}$ 到

4 $\mu\text{g/mL}$, 盐酸四环素从 20 $\mu\text{g/mL}$ 到 0.002 $\mu\text{g/mL}$ 。异烟肼、链霉素、万古霉素和氨苄霉素采用无菌超纯水稀释; 四环素和氯霉素采用无水乙醇稀释; 利福平采用二甲基亚砜(DMSO)稀释; 氧氟沙星、左氧氟沙星采用 0.1 mol/L 的 NaOH 稀释。分别设相对应的溶剂为阴性对照。测定所使用菌株包括含 pMF406 空质粒的对照菌株及分别含有 pMF406-Rv1272 或 pMF406-Rv1273 重组质粒的实验菌株。

2 结果

2.1 Rv1272 和 Rv1273 蛋白序列分析

用生物信息学软件 TMHMM 对 Rv1272 和 Rv1273 蛋白进行序列分析, 预测其跨膜结构(图 1)。如图所示, 红色代表跨膜区, 蓝色代表胞内区, 粉色代表胞外区。可见 Rv1272 有 3 个跨膜螺旋, Rv1273 有 6 个跨膜螺旋, 即含有 ABC 泵的跨膜结构域, 能够形成物质跨膜转运的通道。另外, 根据网站(<http://genolist.pasteur.fr/TubercuList/>)和 Artemis 分析其蛋白序列, 显示 Rv1272 蛋白在 430~437 位氨基酸序列为 GPTGAGKT, Rv1273 在 369~376 位氨基酸序列为 GSTGSGKS 即 Walker A 模体(Walker A motif), 同时它们也都含有 ABC 转运家族特征性模体(ABC transporter family signature motif), 其为 ABC 转运子保守的特征性结构, 即 Rv1272 和 Rv1273 蛋白都有核苷酸结构域。因此可以预测 Rv1272 和 Rv1273 都是跨膜的 ATP-binding 转运蛋白, 并且它们组成一个操纵子。

2.2 重组质粒的构建鉴定

重组质粒 pMF406-Rv1272, pMF406-Rv1273 经酶切验证, 凝胶电泳检测, 在相应位置处出现条带, 分别与载体和目的基因片断的大小相符, 提示重组质粒构建成功。经测序 Rv1272 和 Rv1273 基因序列与 GenBank 上提交的序列相符, 结合载体序列进行分析, 确定其开放读码框架正确(图 2)。

2.3 目的蛋白的亚细胞定位

Western blotting 检测如图 3 所示。箭头所示处为目的条带, 泳道 4 和 8 分别是 Rv1272 和 Rv1273 经乙酰胺诱导的膜成分。Rv1272 相对分子质量为 63 000, Rv1273 相对分子质量为 58 000, 与预期大小一致。由此可见 Rv1272 和 Rv1273 定位在膜上, 是膜蛋白。同时可见部分 Rv1273 表达于胞质。

2.4 重组菌株的 MIC

试管法检测结果显示: 3 种重组菌株(转化 pMF406-Rv1272 或 pMF406-Rv1273 重组质粒的实验

菌株和转化 pMF406 空质粒的对照菌株)对 9 种常用抗结核药物的 MIC 比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$)(图 4),即过表达 Rv1272 和 Rv1273 蛋白的重

组耻垢分枝杆菌对所测药物的耐受性并无显著提高,提示膜蛋白 Rv1272 和 Rv1273 在重组菌株中并没有发挥对所测药物的外排作用。

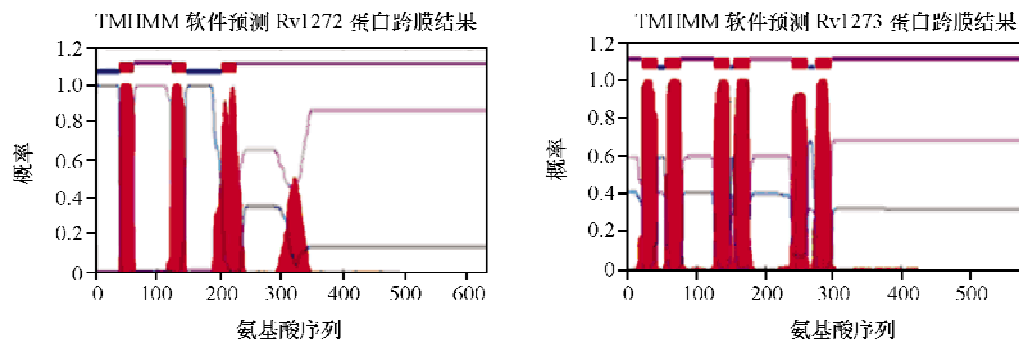
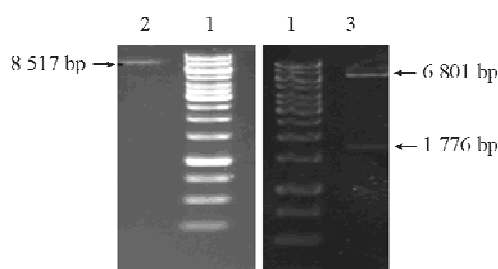


图 1 Rv1272 和 Rv1273 蛋白的跨膜预测结果

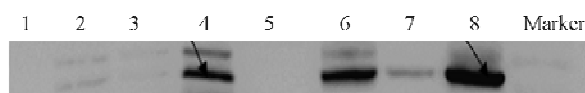
Fig 1 Prediction of transmembrane helices of Rv1272 and Rv1273 proteins



注: 1. DNA 标记物; 2. pMF406-Rv1272 经 *Bam*H I 单酶切; 3. pMF406-Rv1273 经 *Bam*H I/*Eco*R V 双酶切。

图 2 重组质粒酶切鉴定电泳图

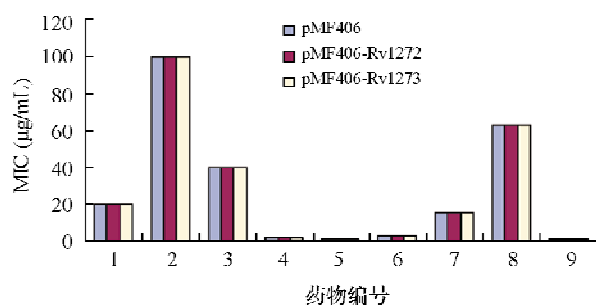
Fig 2 Electrophoresis results of recombinant plasmids digested by enzyme



注: 箭头所示处为目的条带; 1. Rv1272 未诱导的胞质成分; 2. Rv1272 诱导的胞质成分; 3. Rv1272 未诱导的膜成分; 4. Rv1272 诱导的膜成分; 5. Rv1273 未诱导的胞质成分; 6. Rv1273 诱导的胞质成分; 7. Rv1273 未诱导的膜成分; 8. Rv1273 诱导的膜成分。

图 3 Rv1272 和 Rv1273 的亚细胞定位

Fig 3 Subcellular localization of Rv1272 and Rv1273



注: 药物编号 1. 异烟肼; 2. 利福平; 3. 链霉素; 4. 氧氟沙星; 5. 左氧氟沙星; 6. 万古霉素; 7. 氟喹诺酮; 8. 氨基糖苷类; 9. 盐酸四环素。

图 4 重组菌株对药物的 MIC 测定

Fig 4 MIC of drugs for recombinant strains

3 讨论

药物外排泵根据其供能方式的不同可分为两类:一类由质子动力势供能^[6],另一类是依赖 ATP 水解供能 (ATP binding cassette transporter, ABC 转运子)。ABC 转运子广泛存在于原核和真核生物中,可以内向转运也可以外向转运物质,其编码基因在 MTB 基因组中大约占 2.5%^[6]。在结核分枝杆菌中,ABC 转运子由 2 个 MSD 和 2 个 NBD 组成或 1 个 MSD 和 1 个 NBD 的单分子组成。NBD 负责结合并水解 ATP 供能,参与物质转运。NBD 高度保守,几乎所有含有 NBD 的蛋白都与物质跨膜转运有关。其结构包括 Walker A 模体、Walker B 模体和 ABC 转运家族特征性模体, Walker A 的氨基酸序列为 GXXGXGKS (X 为任意氨基酸),是 ABC 转运子的特征性结构。MSD 由 4 到 8 个跨膜的 α 螺旋组成,形成一个物质跨膜转运的通道。

本研究首先通过生物信息学对 Rv1272 和 Rv1273 蛋白结构进行了分析,显示这两个蛋白都含有跨膜区,可能是膜蛋白。随后对这两个蛋白进行了亚细胞定位,经 Western blotting 检测,证实 2 个蛋白是膜蛋白,并且同时含有 Walker A 模体和 ABC 转运家族特征性模体,因此我们推测这两个蛋白可能是 ABC 型转运子。而 ABC 型转运子多与药物外排相关,因此,本研究在进一步探索目的蛋白功能时,首先选用了 9 种常见的抗菌药物,测定重组菌对 9 种药物的 MIC,以期发现它们与药物外排之间的关系。但实验结果显示重组菌株对所测药物耐受性并未增加,所测药物也并未抑制菌株生长,提示这 2 个基因编码的 ABC 转运蛋白的底物可能并不是上述药物,

而是其他物质如营养物质,提示今后可以用其他底物研究这 2 个蛋白的物质转运功能,如小分子物质、葡萄糖及离子等。此外,这两个蛋白在结核菌其他生理功能,如细胞信号的转导和细菌免疫等方面的作用也有待进一步研究。

根据 ABC 型耐药泵和 2 个目的蛋白的结构分析,发挥药物外排作用有两种可能。一种是 2 个蛋白单独发挥作用,形成只含有 1 个 MSD 和一个 NBD 的单分子或者形成 (MSD-NBD)₂ 型而独自发挥作用;另一种可能是这 2 个蛋白共同形成 MSD-NBD/MSD-NBD 串联型,从而完成外排药物的功能。有文献报道,Rv2686c-Rv2687c-Rv2688c^[10] 与 drrA-drrB^[7] 组成 1 个操纵子,当其结合在一起时,才能发挥药物外排的作用。而 Rv1819c^[12] 和 Rv0194^[9] 则是自身单独形成 (MSD-NBD)₂ 型而外排药物。Rv1348 和 Rv1349 是与 Rv2895^[13] 共同发挥维持细胞内外铁平衡的作用,Rv1348 负责向外转运铁离子,而 Rv1349 与 Rv2895 共同作用,负责向细胞内运输铁离子,从而保持细胞内外铁离子的平衡。此外,已有文献^[8] 报道,尽管结构预测表明 Rv1218c 与 Rv1217c 组成 1 个操纵子,需要结合在一起外排药物,但是 Rv1218c 能够单独完成对药物的外排。因此,我们可以推测,一方面 Rv1272 和 Rv1273 有单独发挥作用的可能,这需要我们扩大实验药物的种类(如增加吡咯类药物)进行验证;另一方面,它们也可能是共同发挥作用,为了验证该推测,我们试图构建 pMF406-Rv1272/1273 重组质粒,但是由于基因和相应载体结构的特殊性,未获得成功。因此,今后有必要采取更换载体等方法,构建同时含有 Rv1272 和 Rv1273 基因的重组菌株,然后再测定 MIC,验证这 2 个蛋白是否共同作用。此外,我们也可通过 pull-down 或非变性蛋白电泳等方法,来证明 Rv1272 和 Rv1273 是否共同作用。

本研究分析了 MTB Rv1272 和 Rv1273 蛋白的结构,成功地对其进行了亚细胞定位,并对其与结核菌耐药的关系进行了初步研究,为今后的功能研究及 MTB 的耐药机制研究奠定了基础。

【参考文献】

- [1] Alistair DC, Alecia AF, Megan M, et al. Emergence of increased resistance and extensively drug-resistant tuberculosis despite treatment adherence, South African [J]. Emerg Infect Dis, 2010, 16 (2): 264 - 271.
- [2] Dye C, Lönnroth K, Jaramillo E, et al. Trends in tuberculosis incidence and their determinants in 134 countries [J]. B World Health Organ, 2009, 87 (9): 683 - 691.
- [3] Zainuddin ZF, Dale JW. Does *Mycobacterium tuberculosis* have plasmids? [J] Tuberculosis, 1990, 71 (1): 43 - 49.
- [4] Cole ST, Brosch J, Parkhill R, et al. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence [J]. Nature, 1998, 393 (6685): 537 - 544.
- [5] Rabia J, Elizabeth MS, Gail EL, et al. Drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* [J]. Curr Issues Mol Biol, 2006, 8 (2): 99 - 111.
- [6] Brailant M, Gilot P, Content J. The ATP binding cassette (ABC) transport systems of *Mycobacterium tuberculosis* [J]. FEMS Microbiol Rev, 2000, 24 (4): 449 - 467.
- [7] Choudhuri BS, Bhakta S, Barik R, et al. Overexpression and functional characterization of an ABC (ATP-binding cassette) transporter encoded by the genes drrA and drrB of *Mycobacterium tuberculosis* [J]. Biochem J, 2002, 367 (Pt 1): 279 - 285.
- [8] Balganeshe M, Kuruppath S, Marcel N, et al. Rv1218c, an ABC transporter of *Mycobacterium tuberculosis* with implications in drug discovery [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2010, 54 (12): 5167 - 5172.
- [9] Danilchanka O, Mailaender G, Niederweis M, et al. Identification of a novel multidrug efflux pump of *Mycobacterium tuberculosis* [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2008, 52 (7): 2503 - 2511.
- [10] Pasca MR, Guglielame P, Arcesi F. Rv2686c-Rv2687c-Rv2688c, an ABC fluoroquinolone efflux pump in *Mycobacterium tuberculosis* [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2004, 48 (8): 3175 - 3178.
- [11] Sun Z, Cheng SJ, Zhang H, et al. Salicylate uniquely induces a 27-kDa protein in tubercle bacillus [J]. FEMS Microbiol Lett, 2001, 203: 211 - 216.
- [12] Domenech P, Kobayashi H, LeVier K, et al. BacA, an ABC transporter involved in maintenance of chronic murine infections with *Mycobacterium tuberculosis* [J]. J Bacteriol, 2008, 191 (2): 477 - 485.
- [13] Farhana A, Kumar S, Rathore SS, et al. Mechanistic insights into a novel exporter-importer system of *Mycobacterium tuberculosis* unravel its role in trafficking of iron [J]. PloS One, 2008, 3 (5): e2087.

【收稿日期】2011-03-18

【本文编辑】朱宝渊