

肺炎链球菌中青霉素结合蛋白 PBP3 在大肠杆菌中的可溶性表达及活性鉴定

周宇¹ 王长振² 侯燊¹ 李爽跃¹ 杨曙明^{1*}

(1. 中国农业科学院 农业质量标准与检测技术研究所 北京 100081)

(2. 军事医学科学院 放射与辐射医学研究所 北京 100850)

摘要: 【目的】克隆肺炎链球菌 R6 的 *pbp3* 基因, 构建原核表达载体并转化大肠杆菌表达, 为 PBP3 的结构及应用研究创造条件。【方法】利用 PCR 法克隆肺炎链球菌 R6 中 N 端截短的 *pbp3* 基因(15–413 aa), *Bam*H I 和 *Xho* I 酶切后插入 pGEX-6p-1 构建 pGEX-6p-pbp3* 表达质粒, 在大肠杆菌 BL21(DE3) 中胞内表达 GST-PBP3 融合蛋白, Glutathione-Sepharose 4B column 亲和纯化 GST-PBP3 融合蛋白, PreScission Protease 切除 GST 标签, 再次过谷胱甘肽亲和层析柱获得纯化的 PBP3 蛋白。利用 PBP3 对头孢喹诺的结合试验来鉴定表达蛋白是否有活性。【结果】经测序鉴定成功扩增出 N 端截短的 *pbp3* 基因, 成功构建了 pGEX-6p-pbp3* 表达载体, 并纯化出可溶性 PBP3 蛋白, 而且有活性。【结论】肺炎链球菌 *pbp3* 基因原核表达系统的成功构建以及有活性重组蛋白的获得, 为 PBP3 蛋白的结构及应用研究奠定了基础。

关键词: 肺炎链球菌, PBP3, 可溶性表达, 纯化, 活性鉴定

Soluble expression of *pbp3* of *Streptococcus pneumoniae* in *Escherichia coli* and identification of its activity

ZHOU Yu¹ WANG Chang-Zhen² HOU Can¹ LI Shuang-Yue¹ YANG Shu-Ming^{1*}

(1. Institute of Quality Standard and Testing Technology for Agro-Product, Chinese Academy of Agricultural Sciences (CAAS), Beijing 100081, China)

(2. Institute of Radiation and Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China)

Abstract: [Objective] To study the structure and application of penicillin-binding protein 3 (PBP3), the *pbp3* gene of *Streptococcus pneumoniae* R6 was cloned and the recombinant protein of PBP3 was expressed in *Escherichia coli* with expression vector pGEX-6p-pbp3*. [Methods] The truncated *pbp3* gene (15–413 aa) was cloned from *S. pneumoniae* R6 with PCR, and the *pbp3** fragment digested by *Bam*H I and *Xho* I was inserted into pGEX-6p-1 to generate pGEX-6p-pbp3* expression plasmid. GST-PBP3* fusion protein was expressed in cytoplasm of *E. coli* BL21(DE3) and purified with Glutathione-Sepharose 4B column. The recombinant fusion protein, GST-PBP3, was firstly digested by PreScission Protease for cutting off the GST tag, and

基金项目: 公益性行业科技专项项目(No. 201203023)

*通讯作者: Tel: 86-10-82106561; Fax: 86-10-82106560; ✉: yangshumingcaas@sina.com

收稿日期: 2013-03-19; 接受日期: 2013-04-24; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2013-10-11

then pass through the Glutathione-Sepharose 4B column for getting the purified PBP3 protein. The PBP3 activity was identified by its binding activity to β -lactam antibiotics, such as cefquinome. **[Results]** The truncated *pbp3* gene was verified by sequence analysis and the pGEX-6p-pbp3* expression plasmid was constructed successfully. Finally the soluble PBP3 protein with biologic activity was purified. **[Conclusion]** The active recombinant PBP3 was successfully obtained from prokaryotic expression system, and this laid a firm foundation for further study of the structure and application of PBP3.

Keywords: *Streptococcus pneumoniae*, PBP3, Soluble expression, Purification, Binding activity

青霉素结合蛋白(Penicillin binding proteins, PBPs)是一类结合在膜上的酶,有转肽酶、转糖酶和羧肽酶 3 种活性,对于细菌细胞壁的肽聚糖合成起重要作用^[1-2]。PBP 也是 β -内酰胺类抗生素的主要靶标,由于 β -内酰胺类抗生素的结构与肽聚糖前体的 D-Ala-D-Ala 末端结构类似,因此 β -内酰胺类抗生素作为酶激活不可逆抑制剂(自杀底物),通过与 PBP 转肽酶活性位点丝氨酸残基的酰化作用抑制酶活,影响细菌网状细胞壁的形成^[3]。

肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*)是人类主要的致病菌之一,如果没有抗生素治疗肺炎链球菌具有很高的致死率。肺炎链球菌对青霉素非常敏感,对青霉素 G 的最低抑菌浓度(MIC)低于 10 μ g/L,其 PBP 对 β -内酰胺类抗生素有较高的亲和力^[3]。在肺炎链球菌的各菌株中,R6 菌株是青霉素敏感性菌株,对 β -内酰胺类抗生素的 MIC 值最低,且不含荚膜,致病性大大减弱,是良好的实验室研究菌株。而且相对于其他细菌,肺炎链球菌具有相对简单的 6 个 PBP 的组合^[4],根据在 SDS-PAGE 上的位置命名为 PBP1a、1b、2x、2a、2b、3。其中 PBP3^[5]作为唯一的低分子量(Low-molecular-mass, lmm) PBP,具有 D-Ala、D-Ala (D,D)羧肽酶(Carboxypeptidase)功能,能够从胞壁肽上移除最后一个末端 D-Ala,控制肽聚糖的交联水平^[6],与 *Escherichia coli* 的 PBP5 同源;剩下的都是高分子量(High-molecular-mass, hmm) PBP。PBP1a、PBP1b 和 PBP2a 既能催化二糖肽段聚合成肽聚糖(转糖酶活性),又能催化胞壁肽的交联(转肽酶活性),称为 A 类 hmm PBP;而

PBP2b 和 PBP2x 只具有转肽酶活性,属于 B 类 hmm PBP。高分子量 PBP 通过短的 N 端疏水区段固定在细胞膜上,而 lmm PBP 则通过 C 端两亲性的螺旋附着在膜上。所有 PBP 蛋白的功能结构域都位于细胞膜外侧的周质空间中。

PBP3 的功能通过免疫荧光定位技术得到确定^[6]。PBP3 在细菌生长和分裂过程中起着重要作用,PBP3 的羧肽酶活性是移除肽聚糖羧基端五肽侧链(供体)的 D-Ala,导致转肽反应中供体不可用,因此具有调控肽聚糖的网状交联功能。在细胞周期的初始,除了之后的分裂位点处,PBP3 遍及整个细菌表面,而缺乏 PBP3 的肺炎链球菌突变菌株呈现不规则形态以及异位多隔膜^[7],因而 PBP3 通过确保分裂位点处五肽底物的特异可用性来保证 FtsZ-ring 与隔膜合成机制的空间协调。PBP3 是一个高效的羧肽酶,可溶性表达的 sPBP3* (15-394 aa)蛋白水解合成肽底物 *N,N*-diacetyl-L-Lys-D-Ala-D-Ala (Ac₂-KAA)的效率是 *E. coli* PBP5 的 180 倍,然而对酰基酶的脱酰基反应相较 *E. coli* 的 PBP5 慢 20 倍,意味着 PBP3 在控制革兰氏阳性细菌细胞壁的肽聚糖成网反应中发挥着特有的作用^[8]。除此之外,sPBP3*对其茎段肽底物的硫酯类似物 S2d 的水解效率比 PBP1a、PBP2a、PBP2b 高 200-1 000 倍,比迄今为止测得的最高效的肺炎链球菌的酶 PBP2x 高 20 倍^[9-14]。还有研究表明,PBP3 对 β -内酰胺类抗生素具有很高的亲和性,甚至高于主要靶标 PBP2x, IC₅₀ 值更低^[15-16]。这种高效活性、高亲和力可以作为研究肺炎链球菌中 PBP3 受体蛋白应用的理论基础。因此我们选择肺炎链球菌 R6 中的

PBP3 作为研究对象。

1 材料与方法

1.1 试剂和仪器

肺炎链球菌 R6 (*S. pneumoniae* R6) 购自 ATCC; 哥伦比亚血琼脂平板(PB0123A)、LB medium 均购自 OXOID 公司; pGEX-6p-1 质粒、GST 检测试剂盒、GSTrap 4B 亲和柱、Prescission Protease 均购自 GE Healthcare 公司; 细菌基因组 DNA 提取试剂盒(DP302)、大肠杆菌 JM105 感受态、BL21(DE3) 感受态细胞均购自天根生化科技有限公司; DL2000 DNA Marker、DL15000 DNA Marker, pMD18-T 购自 TaKaRa 公司; 限制性内切酶 *EcoR* I、*Bam*H I 和 *Xho* I、T4 DNA Ligase 购自 NEB 公司; DNA Purification System 以及 Gel and PCR Clean-Up System 购自 Promega 公司; 银染试剂盒, Bradford 试剂盒购自 Beyotime 公司; 2×Power Taq MasterMix (PR1701) 购自百泰克生物技术有限公司; HRP-Amp (HRP9339) 购自 Randox 公司; 蛋白预染 Marker 购自 Fermentas 公司; IPTG 购自 MERCK 公司; GSH 购自 Usb 公司; 盐酸胍购自 Ameresco 公司; 头孢喹诺 Cefquinome 标准品购自 Dr. Ehrenstorfer 公司; Costar 96 孔板。

DEC-810 PCR 仪, 东胜创新生物科技有限公司; SDS-PAGE 电泳仪, Bio-Rad 公司; Sunrise 酶标仪(波长 450 nm), Tecan 公司等。

1.2 实验方法

1.2.1 表达质粒 pGEX-6p-pbp3* 的构建及鉴定: 首先培养 *S. pneumoniae* R6 菌(THY 液体培养基, 含 0.5% 酵母浸出液的 Todd-Hewitt 培养基, 37 °C, 5% CO₂), 提取全基因组 DNA; 然后利用 PCR 方法扩增 N 端截短的 *pbp3** 基因, 上下游分别加 *Bam*H I 和 *Xho* I 酶切位点, 上下游引物分别为:

PBP3-upper: 5'-CGGGGATCCGGGGGTGCTTCTACTG-3';

PBP3-lower: 5'-GGCTCGAGTTATAATTTCTCGTTAACAAAACGGA-3'。

PCR 反应程序: 95 °C 2 min; 95 °C 1 min, 63 °C 30 s, 72 °C 80 s, 共 30 个循环; 72 °C 10 min; 4 °C 保存。扩增后的产物进行 1.0% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。胶回收后将目的片段先连入 T 载体 pMD18-T, 得到克隆载体 pMD18-T-pbp3*, 再进一步连接到表达载体 pGEX-6p-1, 构建 pGEX-6p-pbp3* 表达质粒, 转化到大肠杆菌 JM105 细胞。酶切质粒初步鉴定或者菌液 PCR 初步鉴定, 阳性结果送擎科公司测序最终鉴定。

1.2.2 青霉素结合蛋白 PBP3* 的诱导表达: (1) 预表达实验, 优化条件, 确定目的蛋白表达位置。然后扩大培养。

原核表达质粒 pGEX-6p-pbp3* 转化 *E. coli* BL21(DE3) 表达菌, 挑取已转化的单菌落, 接种于 5 mL 含 50 mg/L 氨苄青霉素的 LB 培养基中, 200 r/min、37 °C 培养过夜, 按 1:50 (体积比) 转种于 250 mL 含 50 mg/L 氨苄青霉素的 LB 培养基中, 继续培养至 OD₆₀₀ 值 0.8 时加 IPTG 诱导表达, IPTG 终浓度为 1 mmol/L, 25 °C 摇 4 h 收菌。

诱导前后细菌各取 200 μL 离心, 沉淀用 25 μL 水打匀, 加 25 μL 2×Loading buffer; IPTG 诱导后的细菌取 2 mL, 离心, 沉淀用 300 μL PBS (pH 7.4, 140 mmol/L NaCl, 2.7 mmol/L KCl, 10 mmol/L Na₂HPO₄, 1.8 mmol/L KH₂PO₄) 吹匀, 超声破碎, 超 3 s 停 4 s 超 4 次, 4 °C、12 000 r/min 离心 15 min, 沉淀加 25 μL 水打匀, 加 25 μL 2×Loading buffer, 上清取 25 μL, 加 25 μL 2×Loading buffer, SDS-PAGE 检测表达情况。

大量诱导表达蛋白, 4 °C、8 000 r/min 离心 10 min 收菌。用 PBS 将菌体悬浮, PBS 20 mL/g 湿菌体, 每管 20–25 mL 悬浮菌液, 反复冻融 3 次, 冰浴超声破碎, 振幅 40%, 超 3 s 停 4 s, 超 50 次。超声后 4 °C、12 000 r/min 离心 15 min, 取上清, 反复离心 2–3 次直到上清透明不再有沉淀离出。上清过 0.45 μm 膜后可用于 GSTrap 4B column 亲和纯化 GST-PBP3* 融合蛋白。

(2) 检测 GST 标签蛋白的酶活。

上清中含有 GST-PBP3*融合蛋白,若要检测 GST 标签蛋白是否有活性,可以采用生化比色实验, GST 能够催化底物 CDNB 和 GSH 反应生成黄色产物,在 340 nm 能够检测到,所以可通过 340 nm 处的吸光度变化来检测酶活。使用 GST 检测试剂盒。

1.2.3 PBP3*的纯化: (1) Glutathione-Sepharose 4B column 亲和纯化 GST-PBP3*融合蛋白。按照 GSTrap 4B 说明书操作。通过 SDS-PAGE 检测纯化效果以及融合蛋白的纯度和浓度,蛋白浓度测定用 Bradford 法,BSA 做标准。GSH 洗脱缓冲液(Elution buffer): 50 mmol/L Tris-HCl, 20 mmol/L GSH, pH 8.0。

(2) PreScission Protease 切除 GST-tag。GST 标签的切除可以在结合到 GSTrap 4B 柱上时切除,也可以在洗脱后的 GST 标记蛋白溶液中切除。本文采用一步纯化,柱上切除 GST 标签,流程按照说明书操作。纯化后的 PBP3 蛋白做氨基酸测序。GST 切除缓冲液(Prescission cleavage buffer): 50 mmol/L Tris-HCl, 150 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L DTT, pH 7.5。

1.2.4 利用头孢喹诺结合实验检测 PBP3*的活性:

(1) 标准样品的制备。将头孢喹诺(Cefquinome)溶于 PBS 缓冲溶液中配制成质量梯度为 0、0.5、1.5、4.5、13.5、40.5、121.5 和 200.0 $\mu\text{g/L}$ 的标准溶液。HRP-Amp 也溶于 PBS 缓冲溶液,使用浓度为 3 g/L。

(2) 利用纯化的 PBP3*作为包被蛋白。制板:纯化的 PBP3*用 PBS 稀释到蛋白浓度为 300 $\mu\text{g/L}$, 100 μL 包板, 37 $^{\circ}\text{C}$ 2 h; PBST (PBS+0.05% Tween-20)洗一遍拍干,加 1% BSA 封闭液 200 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 1 h, 拍干, 37 $^{\circ}\text{C}$ 烘干备用。

检测:加样,各个浓度标准品和 HRP-Amp 各加 50 μL ,轻敲混匀,室温暗孵育 1 h;倒掉, PBST 洗 3 遍,拍干;显色,加 50 μL A 液和 50 μL B 液,室温暗反应 15 min;加 50 μL 终止液(2 mol/L

H_2SO_4),蓝色变黄色,10 min 内测 A_{450} 。反应过程中,头孢喹诺和 HRP-Amp 竞争性结合 PBP3*,所以随着标准浓度的增大,HRP-Amp 结合在受体上的量越少,最终导致酶解液的吸光度变小,即样品中的头孢喹诺浓度与微孔中酶解液的吸光度成反比。

2 结果与讨论

2.1 从基因组中扩增 *pbp3**基因

采用细菌基因组 DNA 提取试剂盒,成功提取 *S. pneumoniae* R6 全基因组 DNA。用 PCR 方法扩增 N 端截短的 *pbp3**基因,全长 *pbp3* 基因长 1 242 bp,共 413 个氨基酸,N 端 Met1-Leu14 为短的信号肽序列,引导 PBP3 跨膜,截短后有利于胞内表达,不影响 PBP3 的功能。本实验中目的基因截取 N 端 14 个氨基酸,取 15-413 共 399 aa,长 1 200 bp,命名为 *pbp3**。扩增后的产物进行 1.0% 琼脂糖凝胶电泳鉴定,如图 1 所示,目标条带 *pbp3**出现在合适的位置。

2.2 表达载体 pGEX-6p-*pbp3**的构建

克隆载体 pMD18-T-*pbp3** (简写 p3T)与表达载体 pGEX-6p-1 各自酶切后连接,构建 pGEX-6p-*pbp3**表达质粒。酶切结果如图 2 所示,双酶切切下的目的片段 *pbp3**的位置正确。菌液 PCR 初步鉴定结果如图 3 所示,目的条带位置正确,说明已构建进去,测序结果表明 *pbp3**基因编码氨基酸序列与基因库 *pbp3* (ACM17686.1)的氨基酸序列完全一致,表达载体 pGEX-6p-*pbp3**构建成功。

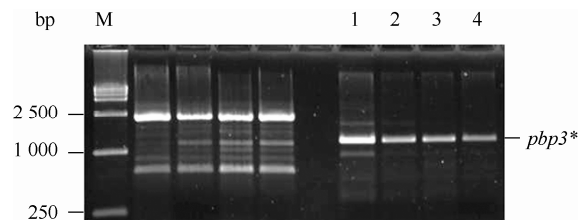


图 1 *pbp3**的扩增

Figure 1 *pbp3** amplification from *S. pneumoniae* R6 genome as template

注: 1-4: *pbp3**扩增.

Note: 1-4: *pbp3** band after PCR.

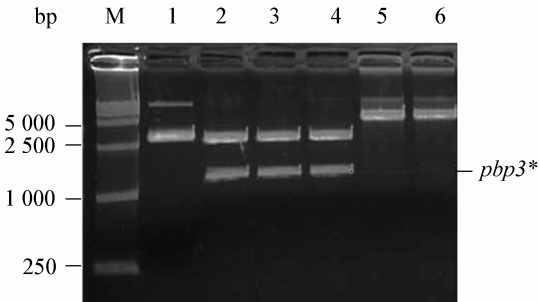


图 2 目的片段与载体的双酶切

Figure 2 Double digestion of p3T & pGEX-6p-1

注: 1: p3T 未酶切对照; 2-4: p3T 双酶切; 5、6: pGEX-6p-1 双酶切.

Note: 1: Control p3T without digestion; 2-4: Double digests of p3T; 5, 6: Double digests of pGEX-6p-1.

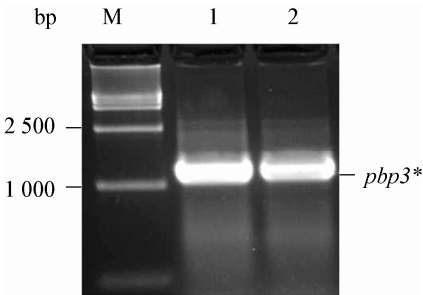


图 3 菌液 PCR 检测表达质粒 pGEX-6p-pbp3* 的构建

Figure 3 Detection of pGEX-6p-pbp3* constructs with colony PCR

注: 1、2: 两个菌落.

Note: 1, 2: Two colonies.

2.3 GST-PBP3*融合蛋白的表达和纯化

选择谷胱甘肽 S-转移酶(GST)亲和和标签, 因为 GST 融合系统具有明显优势, GST 标签不仅能够增加外源蛋白的可溶性, 还能够使重组蛋白更稳定, 免受细胞内蛋白酶的水解, 而且亲和纯化方便有效。pGEX 质粒表达载体除了扩展的多克隆位点外其上游还带有可以将 GST 切割下来的蛋白酶识别序列, 紧接着 GST 标签蛋白。而且 pGEX 质粒都带有 tac 启动子, 能够实现 IPTG 化学诱导的高水平表达。pGEX 质粒 P 系列表达载体是用 PreScission 蛋白酶进行切割, 它的消化温度只要 5 °C, 可以最大程度减小对目的蛋白的降解作用。这个蛋白酶本身通过基因操作也加上了一个 GST

标记, 所以它可以和被切下来的 GST 残余部分一起通过谷胱甘肽凝胶柱(Glutathione sepharose)纯化去除, 简化了纯化的步骤。所以本实验采用 pGEX-6p-1 质粒作为表达载体。

GST-PBP3*融合蛋白的预表达结果如图 4 所示, N 端截短的 PBP3*共 399 aa, 这样 PBP3*蛋白大约 43.6 kD, GST-PBP3*融合蛋白大约 71 kD, 目的条带位置标为 GST-PBP3*。可见没有 IPTG 诱导时该蛋白有本底表达, 诱导后蛋白表达量增加, 表达蛋白不会分泌到培养基中, 诱导后的沉淀与上清中都含有目标蛋白。上清中含有目标蛋白, 说明胞内可溶性表达的设计成功。

用 Glutathione-Sepharose 4B column 亲和纯化 GST-PBP3*融合蛋白, SDS-PAGE 银染结果如图 5 所示, 目的条带 GST-PBP3*融合蛋白大小约在 71 kD, 在 SDS-PAGE 胶上有些偏上, 但氨基酸测序结果显示确是 GST-PBP3*融合蛋白。洗脱液中有些杂带, 可能是因为 GST 标签与 PBP3 断开, 各自形成二聚体或者多聚体, 但融合蛋白已经纯化出来。

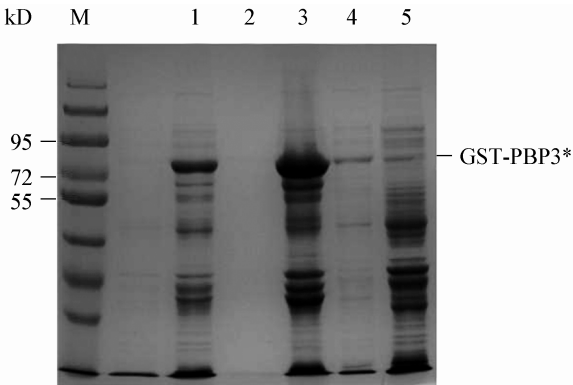


图 4 GST-PBP3*融合蛋白预表达

Figure 4 Priliminary expression of GST-PBP3* fusion protein

注: 1: 诱导后全菌; 2: 诱导后培养基; 3: 诱导后超声破碎后的沉淀; 4: 诱导后超声破碎后的上清; 5: 未诱导全菌.

Note: 1: Whole bacteria after induction; 2: Media after induction; 3: Precipitate after ultrasonication after induction; 4: Supernatant after ultrasonication after induction; 5: Whole bacteria without IPTG induction.

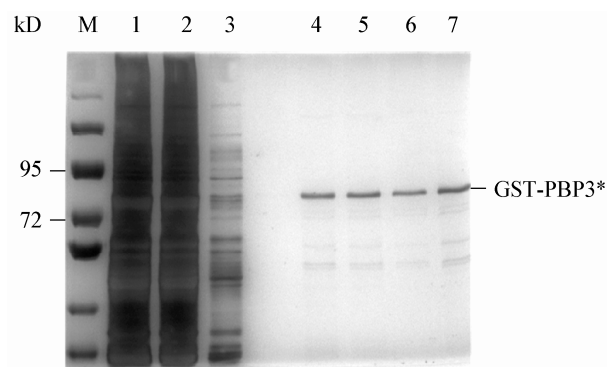


图5 GST-PBP3*融合蛋白的亲和纯化

Figure 5 Purification of GST-PBP3* fusion protein with GSTrap 4B affinity column

注: 1: 上柱样品; 2: 样品流出液; 3: PBS 冲洗流出液; 4-7: GSH 洗脱流出液。

Note: 1: Sample; 2: Sample eluate; 3: PBS washing eluate; 4-7: GSH elution buffer eluate.

2.4 GST 标签蛋白的酶活检测

采用生化比色实验来检测 GST 标签蛋白的活性, 图 6 为除去 CDNB 和 GSH 的本底反应后 GST 的催化活性, 表明 GST 标签蛋白在大肠杆菌中的可溶性以及高效酶活, 没有被蛋白酶水解, 预示 PBP3* 蛋白很可能是有活性的。

2.5 PBP3*蛋白的纯化

采用柱上切除 GST 标签, PBP3*存在于未吸附的洗脱液成分中, 而 GST 标签蛋白部分和 Prescission Protease 仍然结合在 GSTrap 4B 柱子上。从图 7 可以看到, 泳道 4 酶切体系过柱会冲下一些 GST-PBP3*融合蛋白, 泳道 5、6、7 为 GST

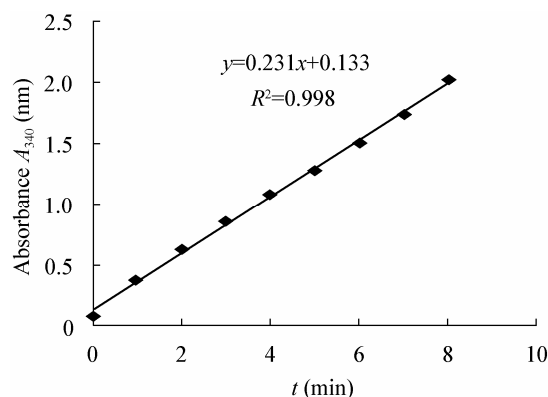


图6 GST 标签蛋白的活性测定

Figure 6 Detection of GST tag protein's activity

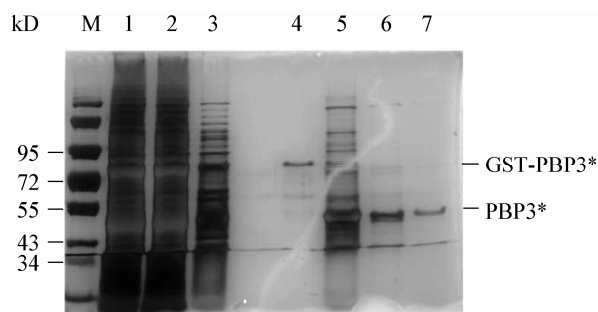


图7 PBP3*的一步纯化(Prescission 蛋白酶切除柱上的 GST-PBP3*的标签)

Figure 7 One-step purification of PBP3* (Prescission Protease cleavage GST-PBP3* bound to GSTrap 4B)

注: 1: 上柱样品; 2: 样品流出液; 3: PBS 冲洗流出液; 4: Prescission 蛋白酶切除体系流出液; 5-7: GSH 洗脱流出液。

Note: 1: Sample; 2: Sample eluate; 3: PBS washing eluate; 4: Prescission Protease buffer eluate; 5-7: GSH elution buffer eluate.

被切除后 GSH 洗流出液中的 PBP3*, 泳道 7 杂蛋白更少。目标条带位置仍然有些偏大, 但氨基酸测序结果已确定该条带为目的蛋白 PBP3*。胶下面一条杂带由银染引入。由此说明, 一步纯化法切除 GST 标签是有效的。

2.6 利用 PBP3*结合头孢喹诺实验来检测纯化后 PBP3*的活性

类似于竞争性 ELISA 的方式, 将纯化的 PBP3*直接作为包被蛋白来代替抗体, 检测 PBP3*对 β -内酰胺类抗生素的亲合力, 选择头孢喹诺作为标准品, 绘制标准曲线, 如图 8 所示。计算得出 PBP3*对头孢喹诺的 IC_{50} 值为 6.2 ppb。

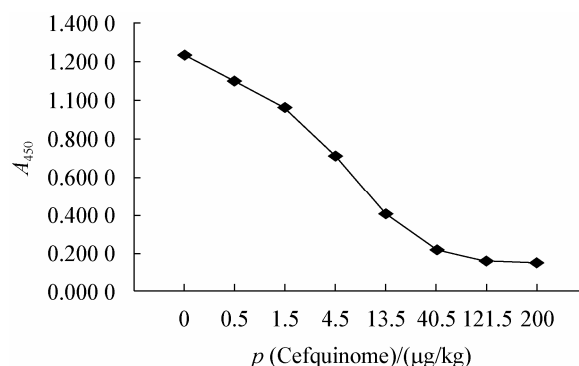


图8 头孢喹诺竞争结合 PBP3*的标准曲线

Figure 8 Typical standard curve of cefquinome competed with HRP-Amp on binding of PBP3*

可见纯化出的 PBP3*是有活性的,而且对头孢唑诺的结合力很高,可以进一步探索利用 PBP3*受体蛋白来检测 β -内酰胺类抗生素残留的快速检测方法。

3 结论

成功建立了肺炎链球菌 PBP3*蛋白的原核表达系统,能够方便的获得 PBP3*受体蛋白,并且证明了原核表达的可溶 PBP3*具有较高的活性。这为后续的结构和应用研究奠定了基础。Morlot C.等已经获得了 PBP3 可溶形式蛋白的晶体结构,分辨率 2.8 Å^[9]。在 PBP3 蛋白的晶体结构基础上,采用位置定向自旋标记-电子顺磁共振(SDSL-EPR)技术可以研究 PBP3 活性位点处的运动性及构象变化^[17-19]。

对于 PBP3*受体的应用研究,此前有利用肺炎链球菌 PBP2x 作为受体蛋白代替抗体的快速检测方法研究^[20-21],当时 PBP2x 被作为 β -内酰胺类抗生素的主要靶标而 PBP3 的重要性未得到充分认识,国外已经研发出基于 PBP2x 受体的试剂盒,比如 Randox,而且已有商品化的 PBP2x 蛋白出售。国内也已经开始研究,但尚未有商品化的试剂盒推出。鉴于 PBP3 比 PBP2x 更高的底物水解效率,甚至更低的 IC₅₀ 值,这为 PBP3 用于抗生素残留的快速检测方法研究提供了可靠性。

参考文献

- [1] Ghuyens JM. Serine beta-lactamases and penicillin-binding proteins[J]. Annual Reviews in Microbiology, 1991(45): 37-67.
- [2] Ghuyens JM. Molecular structures of penicillin-binding proteins and β -lactamases[J]. Trends in Microbiology, 1994, 2(10): 372-380.
- [3] Jamin M, Damblon C, Millier S, et al. Penicillin-binding protein 2x of *Streptococcus pneumoniae*: enzymic activities and interactions with β -lactams[J]. Biochemical Journal, 1993(292): 735-741.
- [4] Hakenbeck R, Briese T, Ellerbrok H. Antibodies against the benzylpenicilloyl moiety as a probe for penicillin-binding proteins[J]. European Journal of Biochemistry, 1986, 157(1): 101-106.
- [5] Hakenbeck R, Kohiyama M. Purification of penicillin-binding protein 3 from *Streptococcus pneumoniae*[J]. European Journal of Biochemistry, 1982, 127(2): 231-236.
- [6] Morlot C, Noirdlerc-Savoye M, Zapun A, et al. The D,D-carboxypeptidase PBP3 organize the division process of *Streptococcus pneumoniae*[J]. Molecular Microbiology, 2004, 51(6): 1641-1648.
- [7] Schuster C, Dobrinski B, Hakenbeck R. Unusual septum formation in *Streptococcus pneumoniae* mutants with an alteration in the D,D-carboxypeptidase penicillin-binding protein 3[J]. Journal of Bacteriology, 1990, 172(11): 6499-6505.
- [8] Nelson DE, Young KD. Penicillin binding protein 5 affects cell diameter, contour, and morphology of *Escherichia coli*[J]. Journal of Bacteriology, 2000, 182(6): 1714-1721.
- [9] Morlot C, Pernot L, Gouellec AL, et al. Crystal structure of a peptidoglycan synthesis regulatory factor (PBP3) from *Streptococcus pneumoniae*[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2005, 280(16): 15984-15991.
- [10] Di Guilmi AM, Mouz N, Andrieu JP, et al. Identification, purification, and characterization of transpeptidase and glycosyltransferase domains of *Streptococcus pneumoniae* penicillin-binding protein 1a[J]. Journal of Bacteriology, 1998, 180(21): 5652-5659.
- [11] Di Guilmi AM, Mouz N, Martin L, et al. Glycosyltransferase domain of penicillin-binding protein 2a from *Streptococcus pneumoniae* is membrane associated[J]. Journal of Bacteriology, 1999, 181(9): 2773-2781.
- [12] Pagliero E, Chesnel L, Hopkins J, et al. Biochemical characterization of *Streptococcus pneumoniae* penicillin-binding protein 2b and its implication in β -lactam resistance[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2004, 48(5): 1848-1855.
- [13] Mouz N, Di Guilmi AM, Gordon E, et al. Mutations in the active site of penicillin-binding protein PBP2x from *Streptococcus pneumoniae*[J]. The Journal of Biology Chemistry, 1999, 274(27): 19175-19180.
- [14] Lobkovsky E, Moews PC, Liu H, et al. Evolution of an enzyme activity: Crystallographic structure at 2-Å resolution of cephalosporinase from the *ampC* gene of *Enterobacter cloacae* P99 and comparison with a class A penicillinase[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A. 1993(90): 11257-11261.
- [15] Kosowska-Shick K, McGhee PL, Appelbaum PC. Affinity of ceftaroline and other β -lactams for penicillin-binding proteins from *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pneumoniae*[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2010, 54(5): 1670-1677.
- [16] Moisan H, Pruneau M, Malouin F. Binding of ceftaroline to penicillin-binding proteins of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pneumoniae*[J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2010(65): 713-716.
- [17] 王长振, 吴可. 位置定向自旋标记——电子顺磁共振技术在蛋白质结构研究中的应用[J]. 军事医学科学院院刊, 2006, 30(5): 472-475.
- [18] 王长振, 周宇, 丛建波, 等. 应用 SDSL-EPR 技术研究溶液中牛血清白蛋白的运动性及构象变化[J]. 科学通报, 2010, 55(14): 1365-1369.
- [19] 王长振, 杨俊涛, 周宇, 等. LSECTin CRD 结构域的运行性研究[J]. 生物物理学报, 2009, S1: 105-109.
- [20] Lamar J, Petz M. Development of a receptor-based microplate assay for the detection of beta-lactam antibiotics in different food matrices[J]. Analytica Chimica Acta, 2007, 586(1/2): 296-303.
- [21] 李铁柱, 孙永海, 郗伟东. 受体分析结合酶联免疫检测牛乳中的头孢噻唑残留[J]. 高等学校化学学报, 2008, 29(3): 473-476.