

# 青霉素结合蛋白的重组表达及其在 $\beta$ -内酰胺类 抗生素检测中的应用

刘艳容<sup>1</sup>, 黄璐<sup>2\*</sup>, 李宁<sup>1</sup>, 顾慧丹<sup>1</sup>, 周帆<sup>1</sup>, 胡飞杰<sup>1</sup>, 杨瑶<sup>3</sup>

(1. 南京市产品质量监督检验院, 南京 210019; 2. 浙江商业职业技术学院旅游烹饪学院, 杭州 310053;  
3. 南京师范大学食品与制药工程学院, 南京 210023)

**摘要:** **目的** 获得纯化的重组青霉素结合蛋白(penicillin binding proteins, PBPs), 研究其在 $\beta$ -内酰胺类抗生素检测中的应用。**方法** 以来源于肺炎链球菌 *Streptococcus pneumoniae* R6 的 PBP2x 蛋白为对照, 以 PBP1a 蛋白作为目标受体, 研究其与 $\beta$ -内酰胺类抗生素的亲合作用。**结果** 经纯化后的重组蛋白 PBP2x 和 PBP1a 检测头孢噻吩、青霉素 G、氨苄青霉素、喷沙西林、阿莫西林的半抑制浓度(inhibitory concentration, IC<sub>50</sub>)都在 7.02 ng/mL 以下, 明确了 PBP1a 和 PBP2x 具有 $\beta$ -内酰胺类抗生素结合能力。**结论** 该研究为开发新的基于 PBPs 蛋白检测 $\beta$ -内酰胺类抗生素的免疫学方法奠定了基础。

**关键词:** 青霉素结合蛋白; 重组表达;  $\beta$ -内酰胺类抗生素; 免疫; 检测

## Recombinant expression of penicillin binding proteins and application in detection of $\beta$ -lactam antibiotics

LIU Yan-Rong<sup>1</sup>, HUANG Lu<sup>2\*</sup>, LI Ning<sup>1</sup>, GU Hui-Dan<sup>1</sup>, ZHOU Fan<sup>1</sup>, HU Fei-Jie<sup>1</sup>, YANG Yao<sup>3</sup>

(1. Nanjing Institute of Product Quality Inspection, Nanjing 210019, China; 2. School of Tourism and Culinary Arts, Zhejiang Business College, Hangzhou 310053, China; 3. School of Food Science and Pharmaceutical Engineering, Nanjing Normal University, Nanjing 210023, China)

**ABSTRACT: Objective** To obtain the purified recombinant penicillin binding proteins (PBPs) and study the application of these recombinant PBPs in the detection of  $\beta$ -lactam antibiotics. **Methods** The PBP2x protein derived from *Streptococcus pneumoniae* R6 was used as a control and PBP1a protein was used as the target receptor to study its affinity with  $\beta$ -lactam antibiotics. **Results** The purified recombinant proteins PBP2x and PBP1a detected for ceftiofur, penicillin G, ampicillin, pensacillin, and amoxicillin with inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) all below 7.02 ng/mL, which confirmed that PBP1a and PBP2x had  $\beta$ -lactam antibiotic binding ability. **Conclusion** This study lays the foundation for the development of a new immunological method based on PBPs protein to detect  $\beta$ -lactam antibiotics.

**KEY WORDS:** penicillin binding proteins; recombinant expression;  $\beta$ -lactam antibiotics; immunity; detection

基金项目: 南京市市场监督管理局重点科技项目(Kj2019001)、国家市场监督管理总局科技计划项目(2020MK136、2020MK139)

**Fund:** Supported by the Nanjing Market Supervision Administration Key Science and Technology Projects (Kj2019001), and the Science and Technology Project of State Administration for Market Regulation (2020MK136, 2020MK139)

\*通信作者: 黄璐, 博士, 讲师, 主要研究方向为食品安全检测与食品营养。E-mail: hlu\_lu@yeah.net

\*Corresponding author: HUANG Lu, Ph.D, Lecturer, Zhejiang Business College, No.470, Binwen Rode, Binjiang District, Hangzhou 310053, China. E-mail: hlu\_lu@yeah.net

## 0 引言

$\beta$ -内酰胺类抗生素(beta-lactam antibiotics, BLAs)是一类化学结构中含有  $\beta$ -内酰胺基母核的抗生素, 种类繁多, 包括天然青霉素及其衍生物如头孢菌素、头霉素类、碳青霉烯类、 $\beta$ -内酰胺酶抑制剂等, 是目前临床应用最广泛的抗生素类群<sup>[1-4]</sup>。BLAs 在乳牛的养殖过程中也会使用, 如治疗金黄色葡萄球菌感染的乳腺炎中常使用青霉素类药物; 而治疗链球菌感染, 常使用头孢菌素类药物; 因此,  $\beta$ -内酰胺类抗生素是牛乳抗生素残留检测工作的重点。

目前, BLAs 残留的检测方法有以下几种。微生物检测法(microorganism inhibitory test, MIT)的原理是抗生素抑制指示菌, 该方法操作简单, 但其缺点是检测时间长、稳定性差、人为干扰多<sup>[5]</sup>。理化检测法主要包括高效液相色谱法、液相色谱质谱联用法、气相色谱法等一系列使用相关仪器检测的方法, 检测灵敏度高、检测限低且耗时少, 但仪器设备昂贵、检测成本高<sup>[6]</sup>。免疫分析法(immunoassay, IA)是利用抗原抗体的特异性结合的检测方法, 作用直接、灵敏、快速, 是当下热门的快速检测技术。

青霉素结合蛋白(penicillin binding proteins, PBPs)是一类膜蛋白, 分子量一般在 30~150 kDa, 因其可与青霉素共价结合而命名<sup>[7-9]</sup>。几乎所有细菌都有 PBPs<sup>[10]</sup>。肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*, SP)是人类常见致病菌之一, 目前已知肺炎链球菌的 6 种青霉素结合蛋白, 分别是 A 类高分子质量的 PBP1a、PBP1b、PBP2a, B 类高分子质量的 PBP2b、PBP2x, 以及低分子质量的 PBP3。NAGAI 等<sup>[11]</sup>综述了不同种 SP 中的不同 PBPs, 其中 PBP1a 的氨基酸改变尤为关键。

WALSH 等<sup>[12-13]</sup>在阐述抗生素的作用机制的文献中提出新一代抗生素的靶蛋白是转糖基酶结构域。青霉素结合蛋白在抗生素残留检测中的应用研究也应运而生<sup>[14-17]</sup>。但是, 目前作为检测应用研究最多的受体 PBP2x 只具有转肽酶活性。考虑到 PBP1a 既具有转糖基酶活性也具有转肽酶活性, 本研究将以 PBP2x 为对照, 以 PBP1a 作为目标受体, 研究其与  $\beta$ -内酰胺类抗生素的亲合作用, 为开发新的  $\beta$ -内酰胺类抗生素检测的免疫学方法奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株和质粒

本研究中涉及使用的菌株和质粒见表 1。

### 1.2 抗生素及主要试剂

氨苄青霉素、卡那霉素等抗生素[USP 级别, 生工生物工程(上海)股份有限公司]; 分子克隆试剂 *Ex Taq*、DNA Marker、Ligation Mix、DNA 切胶回收试剂盒、*XhoI*、*BamHI* 限制性内切酶[宝生物工程(大连)有限公司]; 异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷(isopropyl- $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside, IPTG)(纯度  $\geq 99.0\%$ )、细菌全基因组提取试剂盒、SK3071 非干扰型蛋白浓度测定试剂盒、HRP-conjugated Anti-GST mouse monoclonal antibody 等[生工生物工程(上海)股份有限公司]; 3,3',5',5'-四甲基联苯胺(3,3',5',5'-tetramethyl benzidine, TMB)显色液[普洛麦格(北京)生物技术有限公司]; 6x-His Tag Antibody(美国赛默飞世尔科技公司); Glutathione-Sepharose 4B 亲和柱(北京 GE Healthcare 公司)。

表 1 本研究中的菌株和质粒  
Table 1 Bacterial strains and plasmids used in this study

菌株及质粒	特性	来源
<i>S. pneumoniae</i>		
R6 (ATCC 49619)	呼吸研究, 质量控制菌株	购自美国模式培养物集存库
<i>E. coli</i>		
DH5 $\alpha$	高效 DNA 克隆的基因工程宿主菌株	本实验室保藏
BL21	高效表达宿主菌株	本实验室保藏
Plasmids		
pMD18-T	Amp <sup>r</sup> , 高效 TA 克隆载体	购自宝生物工程(大连)有限公司
pET30a	Kan <sup>r</sup> , 高效表达载体, 含 His 标签	购自生工生物工程(上海)股份有限公司
pGEX-6p-1	Amp <sup>r</sup> , 表达载体, 含 GST 标签	购自生工生物工程(上海)股份有限公司
pGEX6p	Kan <sup>r</sup> , 基于 pGEX-6p-1, 利用卡那霉素编码基因及其启动子替换载体上 Amp 抗性基因	本实验室构建保藏
pGEX6p-pbp1a	Kan <sup>r</sup> , 基于 pGEX6p, 插入了 <i>pbp1a</i> 基因片段	本研究构建
pET30a-pbp2x	Kan <sup>r</sup> , 基于 pET30a, 插入了 <i>pbp2x</i> 基因片段	本研究构建

注: Amp<sup>r</sup>: 氨苄青霉素抗性; Kan<sup>r</sup>: 卡那霉素抗性。

### 1.3 引物

根据 NCBI 基因库提供的序列设计相关引物, 本研究中所有引物见表 2。

### 1.4 实验方法

#### 1.4.1 目标基因片段的克隆子构建

以试剂盒法提取的 *S. pneumoniae* R6 全基因组为模板, 利用引物对 pbp1a-F/pbp1a-R 扩增 *pbp1a* 基因片段; 利用引物对 pbp2x-1/pbp2x-R 及 pbp2x-F/pbp2x-R 扩增 *pbp2x* 基因片段, 快速克隆测序。测序正确的 2 种阳性克隆子经 *Bam*HI 和 *Xho*I 双酶切, 分别与相同酶切处理的 pGEX6p 载体和 pET30a 载体进行连接, 构建获得的 pGEX6p-pbp1a 和 pET30a-pbp2x 表达载体转化 BL21 菌株, 获得重组表达菌株 BL21 (pGEX6p-pbp1a) 和 BL21 (pET30a-pbp2x)。

#### 1.4.2 重组蛋白的表达及纯化

对 *pbp1a* 基因采用 IPTG 1 mmol/L, 15 °C 诱导过夜, 而 *pbp2x* 基因采用 IPTG 1 mmol/L, 20 °C 诱导过夜。诱导结束后, 用磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer saline, PBS) 洗涤 2 次, 使用超声破碎仪破碎细胞, 破碎结束后离心 (4 °C, 12000 g, 20 min), 取上清和沉淀重悬样品备用。测定所有沉淀样品及上清液蛋白浓度, 准备进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecylsulphate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 检测。

pGEX6p 载体表达的蛋白标签是 GST, 而 pET30a 的蛋白标签是 His, 针对两种融合蛋白进行 Western Blot 检测时所使用的标签抗体不同, 其他步骤相同。

重组蛋白 PBP1a-GST 和 PBP2x-His 的纯化及标签切除方法为蛋白纯化常规方法<sup>[18]</sup>。

#### 1.4.3 头孢喹诺结合实验检测 PBPs 活性

##### (1) 标准样品的制备

将 50 mg 头孢喹诺溶于 1 mL PBS 缓冲液, 配制及稀释得到质量浓度梯度为 0、0.5、1.5、4.5、13.5、40.5、121.5、200.0 μg/L 的标准溶液。氨苄青霉素-辣根过氧化物酶标记物 (ampicillin-peroxidase conjugate, Amp-HRP) 的质量浓度

为 3 mg/mL。

##### (2) 制板

利用纯化后的 PBP1a 和 PBP2x 作为包被蛋白, 用 PBS 缓冲液稀释到蛋白质量浓度为 50 μg/mL, 每孔加入 100 μL 蛋白溶液包板, 4 °C 过夜; 再用 100 μL PBST 洗涤液洗 1 遍拍干, 加 1% BSA 封闭液 200 μL, 37 °C 封闭 1 h, 拍干, 37 °C 烘干备用。

##### (3) 样品检测

每孔加样各浓度标准样品和 Amp-HRP 各 50 μL, 轻敲混匀, 37 °C 避光孵育 1 h; 倒掉, PBST 洗 3 遍, 拍干。显色, 取现配 TMB 底物显色液 100 μL, 37 °C 避光孵育 15 min 后, 加 50 μL 终止液, 溶液由蓝色变为黄色, 10 min 内检测 450 nm 处吸光值  $A_{450}$ , 标准液质量浓度为 0 μg/L 时为  $A_{MAX}$ , 通过数据处理可知线性范围和标准曲线, 并计算得到  $IC_{50}$ 。

#### 1.4.4 氨苄青霉素结合实验检测 PBPs 活性

标准样品的制备: 将 50 mg 氨苄青霉素溶于 1 mL PBS 缓冲液, 配制及稀释得到质量浓度梯度为 0、0.5、1.0、1.5、3、4.5、9、13.5 μg/L 的标准液。

制板和检测样品方法同 1.4.3。

#### 1.4.5 PBPs 与不同 β-内酰胺类抗生素的亲合性

标准样品的制备: 选择青霉素 G、氨苄青霉素、头孢喹诺、双氯西林、头孢噻唑、头孢氨苄、喷沙西林、萘夫西林、阿莫西林和头孢匹林配制及稀释至一定浓度梯度。Amp-HRP 的质量浓度为 40 μg/mL。

制板和检测样品方法同 1.4.3。

## 2 结果与分析

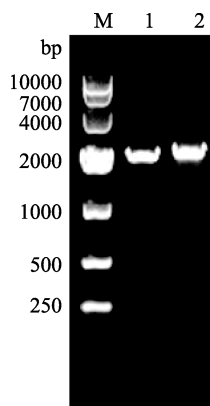
### 2.1 目标片段的获取及鉴定

以 *S. pneumoniae* R6 菌株基因组为模板, 使用本研究的引物分别扩增 *pbp1a* 和 *pbp2x* 基因, 目标片段分别为 2052 和 2154 bp (图 1)。PCR 产物经快速克隆测序结果与公布序列一致。

表 2 本研究中使用的引物序列  
Table 2 Sequence of primers used in this study

引物名称	引物序列(5'→3') <sup>a</sup>	产物大小/bp
pbp1a-F	<u>GGATCC</u> AGCAAGGCTCCTAGCCTATC	26
pbp1a-R	CTCGAGTTAGCGAAATAGATTGACTATCG	29
pbp2x-F	<u>GGATCC</u> ATGAAGTGGACAAAAAGAGTAATCCGTTATGCGACCAAAAATCGGGGACAG GCACTCGCTTTG	70
pbp2x-1	GGGACAGGCACTCGCTTTG	19
pbp2x-R	CTCGAGTTAGTCTCCTAAAGTTAATG	26

注: <sup>a</sup> 酶切位点为引物序列中下划线部分。



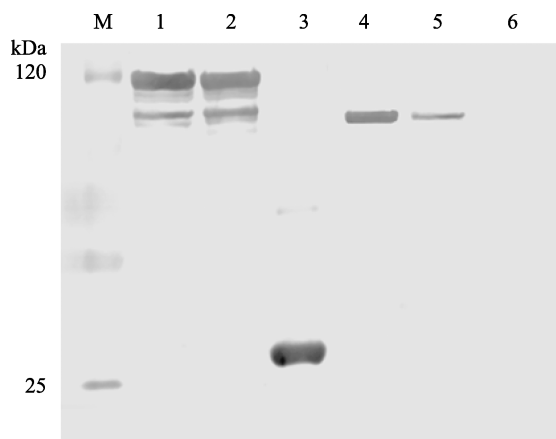
注: M: DL10000 分子量标准; 1: *pbp1a* 目标基因片段; 2: *pbp2x* 目标基因片段。

图 1 PCR 扩增结果

Fig.1 Results of PCR amplification

## 2.2 重组蛋白的表达与纯化

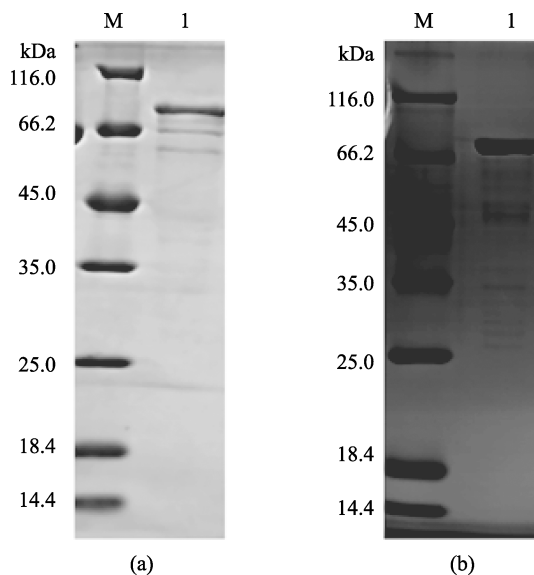
依方法 1.4 构建表达载体 pGEX6p-pbp1a 和 pET30a-pbp2x, 转化获得表达菌株。重组蛋白经诱导表达, 进行 SDS-PAGE 检测, 结果显示样本中均有预期大小的目标蛋白表达。Western Blot 结果显示, 检测到的蛋白条带大小与含 GST 标签的融合蛋白 PBP1a-GST 以及含 His 标签的 PBP2x-His 蛋白一致(图 2), 表明重组菌株诱导表达出的蛋白即为目标蛋白, 且标签完整。目标蛋白经纯化和切标签纯化后 SDS-PAGE 结果见图 3。如图 3 所示, 切除 GST 标签的 PBP1a 蛋白以及 PBP2x-His 融合蛋白与预测的 79 kDa 分子量大小一致, 且纯度较高, 杂蛋白数量明显减少。最终, 本研究获得纯化后的目标蛋白 PBP1a 和 PBP2x。



注: M: 25~120 kDa 预染蛋白分子量标准; 1: PBP1a-GST(上清样品); 2: PBP1a-GST(沉淀样品); 3: GST 蛋白(阳性对照); 4: PBP2x-His(上清样品); 5: PBP2x-His(沉淀样品); 6: 阴性对照。

图 2 Western Blot 检测结果

Fig.2 Results of Western Blot



注: (a) PBP1a 纯化结果, M: 14.4~116 kDa 蛋白分子量标准; 1: 切除 GST 的 PBP1a。(b) PBP2x-His 纯化结果, M: 14.4~116 kDa 蛋白分子量标准; 1: PBP2x-His 融合蛋白。

图 3 凝胶层析纯化结果

Fig.3 Results of purification by gel chromatography

## 2.3 头孢唑诺结合实验检测 PBP 活性

参考竞争性酶联免疫吸附测定法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA), 纯化后的受体蛋白 PBP1a 和 PBP2x 作为包被物, 选择头孢唑诺作为标准样品, Amp-HRP 作为竞争显色标记, 以 PBP1a 和 PBP2x 为包被蛋白的测定结果如表 3 所示。

取  $IC_{10} \sim IC_{90}$  之间的有效数据进行线性分析, 线性范围大约在 1.5~40.5 ng/mL。为保证实验完整性, 选取质量浓度为 27.0、54.0、81.0  $\mu\text{g/L}$  的标准溶液再次实验。最终得到以 PBP1a 为包被蛋白的标准曲线, 线性范围为 1.5~54.0 ng/mL,  $Y = -1.4952X + 91.602$ ,  $r^2 = 0.99702$ , 计算半抑制浓度 (inhibitory concentration,  $IC_{50}$ ) 值为 27.8 ng/mL, 检出限理论值  $IC_{10}$  为 1.07 ng/mL。表明 PBP1a 具有活性, 头孢唑诺与 PBP1a 的亲合力好。以 PBP2x 为包被蛋白的标准曲线, 线性范围为 1.5~54.0 ng/mL,  $Y = -1.2491X + 91.082$ ,  $r^2 = 0.99042$ , 计算  $IC_{50}$  值为 32.9 ng/mL, 检出限理论值  $IC_{10}$  为 0.87 ng/mL。表明 PBP2x 具有活性, 头孢唑诺与 PBP2x 的亲合力好。

头孢唑诺结合实验可以验证 PBP1a 和 PBP2x 具有活性, 但是  $IC_{50}$  值与已有研究报道的相差较大。为进一步确认 PBP1a、PBP2x 的活性, 以及不同  $\beta$ -内酰胺类抗生素与 PBP1a、PBP2x 的亲合力差异, 又设计和优化了氨苄青霉素结合实验。

表 3 头孢喹诺竞争结合 PBP1a 和 PBP2x 测定结果  
Table 3 Detection results of cefquinome binding to PBP1a and PBP2x

头孢喹诺/(ng/mL)	$A/A_{MAX}/\%$	
	PBP1a	PBP2x
0	100	100
0.5	94.09±2.14	95.80±1.97
1.5	88.99±1.96	89.95±1.55
4.5	84.42±2.05	84.27±1.67
13.5	73.08±1.27	71.73±1.79
27.0	49.11±1.69	61.32±1.04
40.5	33.44±1.05	43.05±1.21
54.0	9.76±0.68	29.51±0.97
121.5	5.14±0.34	13.84±0.52
200.0	3.52±0.08	7.16±0.12

## 2.4 氨苄青霉素结合实验检测 PBP 活性

经优化,包被蛋白 PBP1a 和 PBP2x 的使用浓度为 5 μg/mL, Amp-HRP 的使用浓度为 40 μg/mL, 以 PBP1a 和 PBP2x 为包被蛋白的测定结果如表 4 所示。

取  $IC_{10}$ ~ $IC_{90}$  之间的有效数据进行线性分析, 得到以 PBP1a 为包被蛋白的标准曲线, 线性范围为 0.5~13.5 ng/mL,  $Y=-6.0071X+91.288$ ,  $r^2=0.9965$ , 计算  $IC_{50}$  值为 6.87 ng/mL, 检出限  $IC_{10}$  为 0.21 ng/mL。

以 PBP2x 为包被蛋白的标准曲线, 线性范围为 0.5~13.5 ng/mL,  $Y=-5.843X+91.016$ ,  $r^2=0.9984$ , 计算  $IC_{50}$  值为 7.02 ng/mL, 检出限  $IC_{10}$  为 0.17 ng/mL。

## 2.5 PBP 与不同 β-内酰胺类抗生素的亲水性

使用优化后的 ELISA 检测 10 种 β-内酰胺类抗生素, 确定了其线性范围和线性方程, 以 PBP1a 和 PBP2x 为包被蛋白的检测结果, 分别见表 5 和表 6。检测抗生素的  $IC_{50}$

越低, 证明该抗生素与 PBP 的亲水性越好。

表 4 氨苄青霉素竞争结合 PBP1a 和 PBP2x 测定结果  
Table 4 Detection results of ampicillin binding to PBP1a and PBP2x

氨苄青霉素/(ng/mL)	$A/A_{MAX}/\%$	
	PBP1a	PBP2x
0.5	89.24±2.01	89.36±1.94
1.0	83.674±1.68	84.73±1.88
1.5	81.96±1.45	80.73±1.32
3.0	72.549±1.67	72.78±1.52
4.5	67.342±1.12	65.82±1.23
9.0	35.28±1.04	39.51±0.97
13.5	10.738±0.74	11.36±0.81

## 3 结论与讨论

细菌青霉素结合蛋白 PBP 的活性作为耐药机制的重要影响因素, 近年来对其的研究报道逐渐增多。肺炎链球菌的 PBP1a 是其中一种结合蛋白, 其同时具备转糖基酶和转肽酶结构功能域, 对新一代抗生素的亲水能力相较于只含转肽酶活性的 PBP2x 应更高, 因此本研究选择将肺炎链球菌 R6 中编码 PBP1a 蛋白的基因 *pbp1a* 进行体外原核系统的克隆表达, 以研究其对青霉素的结合能力, 为进一步实现其应用价值奠定研究基础。有报道<sup>[19]</sup>发现 PBP2x 上的跨膜转运蛋白会影响其结合抗生素的能力及稳定性, 且转运蛋白本身并不具备酶活性, 去除后不会影响 PBP2x 的活性, 因而在对 PBP2x 进行研究时, 会移除其转运蛋白(第 15~48 aa)。本研究基于前人基础, 扩增 *pbp1a* 基因时去除了其前 36 个氨基酸编码的碱基, 扩增 *pbp2x* 基因时去除上述 34 个氨基酸编码的碱基, 以此来截断转运蛋白的表达。

表 5 PBP1a 与多种 β-内酰胺类抗生素结合的线性和交叉率结果  
Table 5 Linearity and cross-reactivity results of PBP1a with various β-lactams

抗生素名称	分子式	分子量	检出限/(ng/mL)	欧盟最大残留限量/(μg/kg)	半抑制浓度/(μg/L)	反应交叉率/%	线性范围/(ng/mL)	线性方程
青霉素 G	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> S	334.39	0.57	4	6.46	100.00	0.5~12.0	$Y=-6.786X+93.868$
氨苄青霉素	C <sub>16</sub> H <sub>19</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub> S·3H <sub>2</sub> O	403	0.21	4	6.87	94.03	0.5~13.5	$Y=-6.0071X+91.288$
双氯西林	C <sub>19</sub> H <sub>17</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub> S	470.33	1.12	30	35.00	18.46	1.5~70.0	$Y=-1.156X+91.298$
头孢噻吩	C <sub>19</sub> H <sub>17</sub> N <sub>5</sub> O <sub>7</sub> S <sub>3</sub>	523.56	0.31	100	5.30	121.89	0.5~9.0	$Y=-7.957X+92.465$
头孢喹诺	C <sub>23</sub> H <sub>24</sub> N <sub>6</sub> O <sub>5</sub> S <sub>2</sub> ·H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	626.69	2.15	20	12.70	50.87	3.0~18.0	$Y=-4.712X+110.131$
头孢氨苄	C <sub>16</sub> H <sub>17</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub> S	347.39	9.12	100	22.90	28.21	10.0~36.0	$Y=-2.896X+116.415$
喷沙西林	C <sub>22</sub> H <sub>32</sub> IN <sub>3</sub> O <sub>4</sub> S	487	0.69	4	6.44	100.31	1.0~12.0	$Y=-6.954X+94.798$
萘夫西林	C <sub>21</sub> H <sub>23</sub> N <sub>2</sub> NaO <sub>6</sub> S	454.47	0.87	30	7.03	91.89	1.0~13.5	$Y=-6.491X+95.647$
阿莫西林	C <sub>16</sub> H <sub>19</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub> S·3H <sub>2</sub> O	419.46	0.42	4	6.34	101.89	0.5~12.0	$Y=-6.756X+92.838$
头孢匹林	C <sub>17</sub> H <sub>17</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub> S <sub>2</sub>	423.47	1.78	60	12.26	52.69	3.0~18.0	$Y=-3.817X+96.794$

表 6 PBP2x 与多种  $\beta$ -内酰胺类抗生素结合的线性和交叉率结果  
Table 6 Linearity and cross-reactivity results of PBP2x with various  $\beta$ -lactams

抗生素名称	分子式	分子量	检出限 (ng/mL)	欧盟最大残留 限量/( $\mu$ g/kg)	半抑制 浓度/( $\mu$ g/L)	反应 交叉率/%	线性范围 (ng/mL)	线性方程
青霉素 G	$C_{16}H_{18}N_2O_4S$	334.39	0.35	4	6.11	100.00	0.5~12.0	$Y=-6.945X+92.431$
氨苄青霉素	$C_{16}H_{19}N_3O_4S \cdot 3H_2O$	403	0.17	4	7.02	87.04	0.5~13.5	$Y=-5.843X+91.016$
双氯西林	$C_{19}H_{17}Cl_2N_3O_5S$	470.33	1.52	30	19.98	30.58	15.0~36.0	$Y=-2.167X+93.294$
头孢噻吩	$C_{19}H_{17}N_3O_7S_3$	523.56	0.27	100	5.39	113.36	0.5~12.0	$Y=-7.819X+92.111$
头孢唑啉	$C_{23}H_{24}N_6O_5S_2 \cdot H_2SO_4$	626.69	1.96	20	8.84	69.12	3.0~18.0	$Y=-5.816X+101.399$
头孢氨苄	$C_{16}H_{17}N_3O_4S$	347.39	9.50	100	27.08	22.56	10.0~45.0	$Y=-2.275X+111.613$
喷沙西林	$C_{22}H_{32}IN_3O_4S$	487	0.61	4	6.63	92.16	1.0~12.0	$Y=-6.645X+94.053$
萘夫西林	$C_{21}H_{23}N_2NaO_6S$	454.47	1.05	30	7.40	82.57	1.0~13.5	$Y=-6.257X+96.57$
阿莫西林	$C_{16}H_{19}N_3O_5S \cdot 3H_2O$	419.46	0.56	4	6.34	96.37	1.0~12.0	$Y=-6.916X+93.873$
头孢匹林	$C_{17}H_{17}N_3O_6S_2$	423.47	2.05	60	13.10	46.64	3.0~24.0	$Y=-3.617X+97.415$

目前, 青霉素结合蛋白 PBP 的活性鉴定方法没有公认统一的推荐方法, 到 20 世纪末出现了商品化的荧光系统 BOCILLIN FL<sup>[20]</sup>, 更多研究在 PBP 的实际应用中通过和  $\beta$ -内酰胺类抗生素的结合能力反推 PBP 的活性功能。商品化的 BOCILLIN FL 本是首选, 但考虑到进口试剂采购周期长、成本高, 故本实验转而探索 ELISA 法检测 PBP1a、PBP2x 与  $\beta$ -内酰胺类抗生素的亲合力, 间接对 PBP 的活性进行鉴定。ELISA 法多为自行探究的研究体系, 区别主要在于包被原和标记物的选择, 目前在 PBP 蛋白活性鉴定研究中已有很多文献报道<sup>[21-24]</sup>。不同种类的青霉素结合蛋白与同种抗生素的亲合力不同, 同种青霉素结合蛋白与不同抗生素的亲合力亦不同。本研究首先尝试了头孢唑啉结合实验, 研究实验条件借鉴中国农业大学杨曙明教授实验室, 得到了较宽的线性范围和较低的检出限, 但是 IC<sub>50</sub> 分别为 27.8 ng/mL 和 32.9 ng/mL, 高出欧洲联盟和国家标准的 20 ppb, 猜测包被蛋白浓度过高、Amp-HRP 过量、响应值总体偏大、PBP1a、PBP2x 与头孢唑啉的亲合力没有与氨苄青霉素的亲合力高, 都可能是灵敏度不高的原因, 因此改变方案, 以氨苄青霉素作为标准溶液, 进行由 Amp 和 Amp-HRP 共同竞争结合 PBP 的免疫实验, 避免了因亲合力不同导致的误差。经过多次优化后, 选择 PBP1a 或 PBP2x 的使用质量浓度为 5  $\mu$ g/mL, 包被量为 100  $\mu$ L, Amp-HRP 使用质量浓度为 40  $\mu$ g/mL, 标准溶液梯度设想在 0~100  $\mu$ g/L 内, 通过实际测定确定具体的测定浓度, 以确保线性曲线更接近实际。所有免疫反应的缓冲体系和环境一致, 均为 37  $^{\circ}$ C 孵育 1 h。最终优化的活性检测法获得了氨苄青霉素结合 PBP1a 和 PBP2x 的 IC<sub>50</sub> 分别为 6.87 和 7.02 ng/mL。

随后, 以 PBP1a 和 PBP2x 分别作为包被蛋白进行了 10 种  $\beta$ -内酰胺类抗生素的检测, 并拟合出线性关系, 得到

IC<sub>50</sub> 值。实验结果显示, 重组后的 PBP1a 和 PBP2x 蛋白与头孢噻吩、青霉素 G、氨苄青霉素、喷沙西林、阿莫西林等抗生素不仅亲合力较好, 且检出限也更低, 如重组 PBP1a 与青霉素 G、阿莫西林、双氯西林结合后的检出限分别为 0.57、0.42 和 1.12  $\mu$ g/L, 而重组 PBP2x 与青霉素 G、阿莫西林、双氯西林结合后的检出限分别为 0.35、0.56 和 1.52  $\mu$ g/L, 以上结果均显著低于国家标准中高效液相色谱法的检出限(青霉素 G 和阿莫西林的检出限为 4  $\mu$ g/L, 双氯西林为 30  $\mu$ g/L), 为 30  $\mu$ g/L, 充分说明了 PBP 蛋白结合的灵敏度。综上所述, 经过原核系统表达纯化后的 PBP1a 和 PBP2x 都保有较高水平的活性, 可用于后续免疫分析法的开发。

#### 参考文献

- [1] GU B, ZHOU M, KE X, *et al.* Comparison of resistance to third-generation cephalosporins in *Shigella* between Europe-America and Asia-Africa from 1998 to 2012 [J]. *Epidemiol Infect*, 2015, 143(13): 2687-2699.
- [2] 颜青, 肖永红, 何绥平. 必须重视  $\beta$ -内酰胺类抗生素与其酶抑制剂复方制剂的科学开发[J]. *中国临床药理学杂志*, 2007, 16(4): 259-261.  
YAN Q, XIAO YH, HE SP. Attention must be paid to the scientific development of  $\beta$ -lactam antibiotics and their enzyme inhibitor compound preparations [J]. *Chin J Clin Pharm*, 2007, 16(4): 259-261.
- [3] SERGIO MS, MARILIA H, DUARTE AC, *et al.* Development and application of a capillary electrophoresis based method for the simultaneous screening of six antibiotics in spiked milk samples [J]. *Talanta*, 2007, 71(2): 731-737.
- [4] KARAGEORGOU EG, SAMANIDOU VF, PAPADOYANNIS IN. Ultrasound-assisted matrix solid phase dispersive extraction for the simultaneous analysis of  $\beta$ -lactams (four penicillins and eight cephalosporins) in milk by high performance liquid chromatography with

- photodiode array detection [J]. *J Sep Sci*, 2015, 35(19): 2599–2607.
- [5] LI Y, METCALF BJ, CHOCHUA S, *et al.* Validation of  $\beta$ -lactam minimum inhibitory concentration predictions for pneumococcal isolates with newly encountered penicillin binding protein (PBP) sequences [J]. *Bmc Genomics*, 2017, 18(1): 621.
- [6] 王淑婷, 孙晓亮, 曹旭敏, 等. 牛奶中  $\beta$  内酰胺类抗生素残留检测技术研究进展[J]. *动物医学进展*, 2018, 39(12): 170–174.  
WANG ST, SUN XL, CAO XM, *et al.* Advance in detection techniques of  $\beta$ -lactam antibiotics residues in dairy milk [J]. *Prog Vet Med*, 2018, 39(12): 170–174.
- [7] DEKA RK, MACHIUS M, NORGARD MV, *et al.* Crystal structure of the 47-kDa lipoprotein of *treponema pallidum* reveals a novel penicillin-binding protein [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(44): 41857.
- [8] SAUVAGE E, KERFF F, TERRAK M, *et al.* The penicillin-binding proteins: Structure and role in peptidoglycan biosynthesis [J]. *FEMS Microbiol Rev*, 2008, 32(2): 234–258.
- [9] ZAPUN A, CONTRERASMARTEL C, VERNET T. Penicillin-binding proteins and  $\beta$ -lactam resistance [J]. *FEMS Microbiol Rev*, 2008, 32(2): 361–385.
- [10] 夏澜, 冯朝艳, 黄鑫, 等. 青霉素结合蛋白在残留检测中的应用研究[J]. *安徽农业科学*, 2013, 41(19): 8092, 8270.  
XIA L, FENG CY, HUANG X, *et al.* Application of penicillin-binding proteins in residues detection [J]. *J Anhui Agric Sci*, 2013, 41(19): 8092, 8270.
- [11] NAGAI K, DAVIES TA, JACOBS MR, *et al.* Effects of amino acid alterations in penicillin-binding proteins (PBPs) 1a, 2b, and 2x on PBP affinities of penicillin, ampicillin, amoxicillin, cefditoren, cefuroxime, cefprozil, and cefaclor in 18 clinical isolates of penicillin-susceptible, -intermediate, and -resistant pneumococci [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2002, 46(5): 1273–1280.
- [12] WALSH CT, LOSEY HC, FREEL MCL. Antibiotic glycosyltransferases [J]. *Biochem Soc Trans*, 2003, 31(3): 487–492.
- [13] WALSH CT. Where will new antibiotics come from [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2003, 1(1): 65–70.
- [14] 鞠守勇, 陈其国, 李莉. 利用青霉素结合蛋白检测青霉素类抗生素残留[J]. *食品研究与开发*, 2018, 39(15): 144–148.  
JU SY, CHEN QG, LI L. Detection of penicillin antibiotic residues using penicillin binding protein [J]. *Food Res Dev*, 2018, 39(15): 144–148.
- [15] 尹致丹, 肖志明, 李阳, 等. 青霉素结合蛋白在  $\beta$ -内酰胺类抗生素受体分析法中的应用[J]. *农产品质量与安全*, 2018, (3): 60–65.  
YIN ZD, XIAO ZM, LI Y, *et al.* Application of penicillin binding protein to  $\beta$ -lactam antibiotic receptor analysis method [J]. *Qual Saf Agro-prod*, 2018, (3): 60–65.
- [16] 张静. 基于青霉素结合蛋白 PBP3 的  $\beta$ -内酰胺类药物残留检测及蛋白结构的初步研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2015.  
ZHANG J. A preliminary study on penicillin binding protein 3 and its application in determination of  $\beta$ -lactam antibiotics [D]. Beijing: China Agricultural University, 2015.
- [17] 李铁柱. 青霉素结合蛋白克隆表达及在牛乳青霉素残留检测中的应用[D]. 长春: 吉林大学, 2008.  
LI TZ. The clone and expression of PBP 2x and detection of penicillins residue in milk [D]. Changchun: Jilin University, 2008.
- [18] SAMBROOK J, RUSSELL DW. 分子克隆实验指南(第三版)[M]. 北京: 科学出版社, 2002.  
SAMBROOK J, RUSSELL DW. *Molecular cloning a laboratory manual (Third Edition)* [M]. Beijing: Science Press, 2002.
- [19] ZENG K, ZHANG J, WANG Y, *et al.* Development of a rapid multi-residue assay for detecting  $\beta$ -lactams using penicillin binding protein 2x [J]. *Biomed Environ Sci*, 2013, 26(2): 100–109.
- [20] SHAPIRO AB, GU RF, GAO N, *et al.* Continuous fluorescence anisotropy-based assay of BOCILLIN FL penicillin reaction with penicillin binding protein 3 [J]. *Anal Biochem*, 2013, 439(1): 37–43.
- [21] BASUINO L, JOUSSELIN A, ALEXANDER JAN, *et al.* PBP4 activity and its overexpression are necessary for PBP4-mediated high-level  $\beta$ -lactam resistance [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2018, 73(5): 1177–1180.
- [22] DANIEL S, GRO AS, KARI HB, *et al.* Identification of pneumococcal proteins that are functionally linked to penicillin-binding protein 2b (PBP2b) [J]. *Mol Microbiol*, 2017, 103(1): 99–116.
- [23] CRISTIAN JA, AYALA SC, PAULINO G. *In vivo* functional and molecular characterization of the penicillin-binding protein 4 (DacB) of *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *BMC Microbiol*, 2016, 16(1): 234.
- [24] 周宇, 王长振, 侯粲, 等. 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[J]. *微生物学通报*, 2014, 41(2): 327–333.  
ZHOU Y, WANG CZ, HOU C, *et al.* Soluble expression of pbp3 of *Streptococcus pneumoniae* in *Escherichia coli* and identification of its activity [J]. *Inst Microbiol*, 2014, 41(2): 327–333.

(责任编辑: 于梦娇 郑 丽)

## 作者简介



刘艳容, 硕士, 工程师, 主要研究方向为微生物与分子生物学检测。  
E-mail: liuyr090@163.com



黄璐, 博士, 讲师, 主要研究方向为食品安全检测与食品营养。  
E-mail: hlu\_lu@yeah.net