

肺炎链球菌中青霉素结合蛋白 PBP3 的功能与结构研究进展

周宇¹, 王长振², 侯 粲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 PBP3 作为肺炎链球菌唯一的 D,D-羧肽酶, 能够从肽聚糖五肽上移除最后一个末端 D-Ala, 导致转肽反应中供体不可用, 因此控制了肽聚糖的网状交联水平, 在细胞分裂和生长中起重要作用。文中对 PBP3 的功能与结构进行了综述, 为今后 PBP3 的深入研究与应

关键词 青霉素结合蛋白 PBP3; 肺炎链球菌; 结构与功能

中图分类号 S188 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2013)08-03319-04

Research on Structures and Functions of Penicillin-binding Protein 3 of *Streptococcus pneumoniae*

ZHOU Yu et al (Institute of Quality Standard and Testing Technology for Agro-Product, CAAS, Beijing 100081)

Abstract As the single D-Ala, D-Ala(D,D)-carboxypeptidase in *Streptococcus pneumoniae*, PBP3 plays a key role in cell division and growth by trimming the last residue of pentapeptides to reduce the availability of donors for the transpeptidation reaction and thus limits the reticulation of the peptidoglycan. The structure and functions of PBP3 was reviewed, which will provide basic data for deep research and application of PBP3.

Key words PBP3; *Streptococcus pneumoniae*; Structure and function

细菌细胞壁由许多 β -1,4-糖苷键连接的 N-乙酰葡萄糖胺-N-乙酰胞壁酸(GlcNAc-MurNAc)多聚体组成, GlcNAc-MurNAc 多聚体之间通过 L-Ala-D-Glu-m-DAP/L-Lys-D-Ala-D-Ala 五肽连接, 肽链接在 N-乙酰胞壁酸 MurNAc 上称为胞壁肽, 不同糖链上的肽链交联形成一个肽聚糖(又称胞壁质、粘肽)的网状结构, 这对于细胞的正常生存是必须的^[1]。肽聚糖合成的交联反应是通过转肽酶(transpeptidase)将聚糖链上的肽单位(胞壁肽)连在一起的, 负责糖链延伸的则是转糖酶(transglycosylase), 而编码这些活性的酶已被鉴定为一类青霉素结合蛋白^[2-4]。

青霉素结合蛋白(penicillin-binding protein, PBP)是一类结合在膜上的酶, 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, 因此其作为酶激活不可逆抑制剂(自杀底物), 通过打开的环酰胺的羰基共价结合到 PBP 的丝氨酸活性位点发生酰化作用, 抑制了转肽酶和羧肽酶活性, 这样网状细胞壁即无法形成, 最终导致细菌死亡^[5]。

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则会造成很高的致死率。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 ng/ml, 其 PBP 对 β -内酰胺类抗生素有较高的亲和力^[5]。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, 致病性大幅减弱, 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 组合^[6], 根据在 SDS-PAGE 上的位置命名为 PBP1a、1b、2x、2a、2b、3。其中 PBP3^[7]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(carboxypeptidation)功能, 能够从胞壁肽上移除最后一个末端 D-Ala, 从而控制肽聚糖的交联水平^[8], 肺炎链球菌的 PBP3 与 *E. coli* 的 PBP5 直系同源, 结构相似, 功能相同; 其余的 PBP 均为高分子量(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 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。笔者在文中对 PBP3 的功能与结构进行综述, 旨在为其今后的深入研究与应用提供一定的基础资料。

1 PBP3 的功能

D,D-羧肽酶是低分子量 PBP。相较于合成细胞壁肽聚糖的 HMM PBPs, D,D-羧肽酶被认为具有调控肽聚糖交联程度的功能。肽聚糖由通过肽桥交联的二糖链多聚体组成, 这些肽桥由转肽反应形成。连在糖链上的受体茎段肽的伯胺(m-DAP/L-Lys-NH₂), 与连在相邻糖链上的供体茎段五肽(D-Ala-D-Ala)反应, 同时供体五肽末端最后一个 D-Dla 被除去, 这就是转肽反应的过程。而 D,D-羧肽酶能够除去供体五肽的最后一个 D-Dla, 导致转肽反应中供体不可用, 从而限制了肽聚糖的网状交联^[8]。

D,D-羧肽酶以前通常被认为是非必需的, 在分裂机制中不被作为主要参与者, 尽管在电子显微镜下已观察到肺炎链球菌 *dacA* 突变体在其唯一 D,D-羧肽酶 PBP3 缺失时呈现出异常分裂位点, 出现多隔膜的缺陷, 而且细菌传代变慢、胞壁质厚度增加^[9]。同样大肠杆菌 *dacA* 突变体缺失 PBP5 时也呈现出规则形态^[10-12]。最终 Morlot 等证明了在肺炎链球菌中 D,D-羧肽酶 PBP3 对分裂过程的组构极为重要^[8]。

有研究者通过免疫荧光定位确定了 PBP3 的功能^[8]。在细胞周期的初始, 除之后的分裂位点处, PBP3 遍及整个细菌

基金项目 公益性行业科技专项(201203023)。

作者简介 周宇(1986-), 女, 山东肥城人, 博士研究生, 研究方向: 农产品质量安全, E-mail: zhouyu0228@163.com。* 通讯作者, 研究员, 博士生导师, 从事农产品质量控制研究, E-mail: yangshumingcaas@sina.com。

收稿日期 2013-03-21

表面。鉴于 PBP3 的羧肽酶活性是移除肽聚糖羧基端五肽侧链的 D-Ala, PBP3 的半球分布意味着邻近细胞分裂位点的细胞区域是唯一的全长五肽作为转肽反应底物的可用空间。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, 所以底物五肽的完整可用性可能引导了 HMM PBP3 的定位^[9]。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。这说明 D,D-羧肽酶 PBP3 在细菌生长和分裂过程中起重要作用, 可作为支持 D,D-羧肽酶是细菌形态发生组装中关键元件^[13]观点的又一证据。

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 (k_{cat}/K_m 值), 然而对酰基酶的脱酰基反应相较 *E. coli* 的 PBP5 慢 20 倍 (k_3 值), 这意味着 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^[10]。除此之外, sPBP3* 对其茎段肽底物硫酸酯类似物 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肺炎链球菌的酶 PBP2x 高 20 倍^[14-19]。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, IC_{50} 值更低^[20-21]。这种高效活性、高亲和力可作为人们研究肺炎链球菌中 PBP3 受体蛋白应用的理论基础。

在 PBP3 催化的羧肽酶反应中, PBP3 上的活性 Ser-OH 与肽聚糖胞壁肽 D-Ala-D-Ala 的末端-COOH 反应形成短暂的酰化酶复合物, 此复合物随后被水解。该反应形成的四肽只能作为随后其他 PBP3 催化的转肽反应所需受体。在转肽酶反应时, 羧肽酶的活性被青霉素和其他 β -内酰胺类抗生素所抑制, 因为 β -内酰胺类抗生素的结构与五肽侧链羧基末端的 D-Ala-D-Ala 结构类似。这些抗生素与 PBP 反应形成稳定的酰化酶, 导致对酶活性的持续抑制。

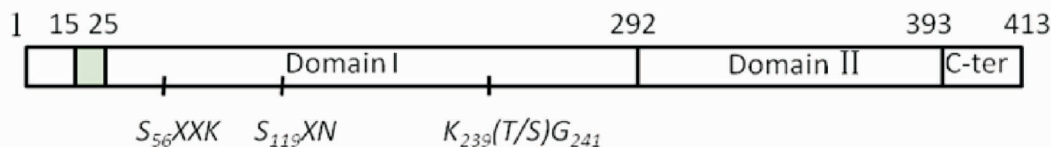
2 PBP3 的结构

2.1 PBP3 的总体结构 肺炎链球菌 R6 菌株中的 PBP3 蛋白共 413 个氨基酸, 其编码基因 *pbp3* 全长 1 242 bp。对 β -内

酰胺类抗生素敏感的菌株的 *pbp3* 序列与肺炎链球菌 R6 菌株的 *pbp3* 序列是相似的, 而肺炎链球菌的其他抗性菌株的 *pbp3* 序列通常含有一些氨基酸突变。PBP3 的一级结构 (图 1) 主要包括 NH₂-端信号肽序列、2 个结构域和 COOH-端结合到膜上的两亲螺旋。Morlot 等已获得了 PBP3 可溶形式蛋白的晶体结构, 分辨率 2.8 Å^[14]。在一个不对称晶格单元中含 4 个 PBP3 单体, 单个 sPBP3* 的晶体结构见图 2, N 端 Domain I 图中为青色, 包含从第 25 ~ 292 的氨基酸, 具有青霉素酰胺基-丝氨酸转移酶家族显著的折叠拓扑结构 (能识别 β -内酰胺类抗生素), 包含 PBP3 的活性位点。根据标准的二级结构分类, Domain I 主要由中间的五链反平行 β -sheets ($\beta 3/\beta 4/\beta 5/\beta 1/\beta 2$) 和 2 个主要螺旋 ($\alpha 8/\alpha 11$) 组成。除此之外, Domain I 还包含 3 个双链反平行 β -sheets ($\beta 2a/\beta 2d, \beta 2b/\beta 2c, \beta 2e/\beta 2f$) 和 3 个螺旋 ($\alpha 2a/\alpha 4/\alpha 5$)。C 端 Domain II 包含氨基酸 293 ~ 393, 具有一个纵长结构, 由 2 个反平行 β -sheets 形成一个三明治结构。比较在一个非对称单元中存在的 4 个 PBP3 分子, 结果显示最大的不同在 C 端 Domain II 内映射环状区域的 C α 水平图, 在某些区域电子密度非常低, 尤其是结构域 I 和结构域 II 表面相互作用的很大区域 (包含 6 个可能氢键), 这保证了全长分子的稳定性, 因为在一个非对称晶体单元格中的 4 个分子的结构域 I 和结构域 II 之间的角度只有细微差别^[14]。

sPBP3* 的总体结构与 *E. coli* PBP5 非常相似^[22], 只是其 Domain II 二级结构单元更短, 明显不如 PBP5 的紧凑。而 sPBP3* 的 Domain I 与链霉菌 K15 转肽酶的整体结构高度相似^[23], 但 K15 活性位点的裂缝必须包住 2 个肽链才能催化转肽酶反应, PBP3 只催化 D,D-羧肽反应, 说明 PBP3 也许能识别更加复杂的网状茎段肽底物而不仅是通常的五肽。肺炎链球菌 PBP2x 转肽酶^[24] 和金黄色葡萄球菌 PBP2a 转肽酶^[25] 都含有保守的青霉素结合结构域催化残基, 这些二级结构单元与 sPBP3* 的 Domain I 有相似的位置定向, $\beta 3, \alpha 2, \alpha 4, \alpha 5$ 都起着重要作用。但在活性位点之外的所有其他区域两者间都有很大不同, 叠加结果较弱。

PBP3 from *Streptococcus pneumoniae*
Penicillin-susceptible R6 strain
(Low-Molecular Mass PBP)



注: PBP3 包含短的信号肽序列 (Met1-Leu14); Domain I (25 ~ 292 aa); Domain II (293 ~ 393 aa); 羧基末端螺旋 (C-ter) 结合在膜上。活性位点位于 Domain I, 下方显示 3 个保守序列模块。

图 1 PBP3 一级结构图解

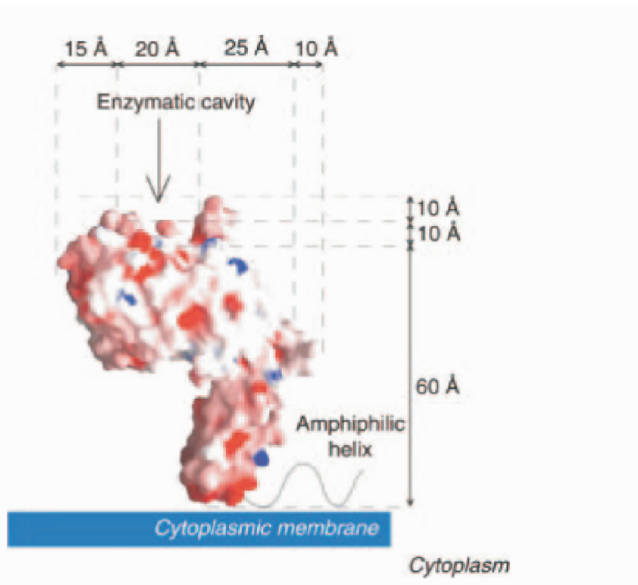
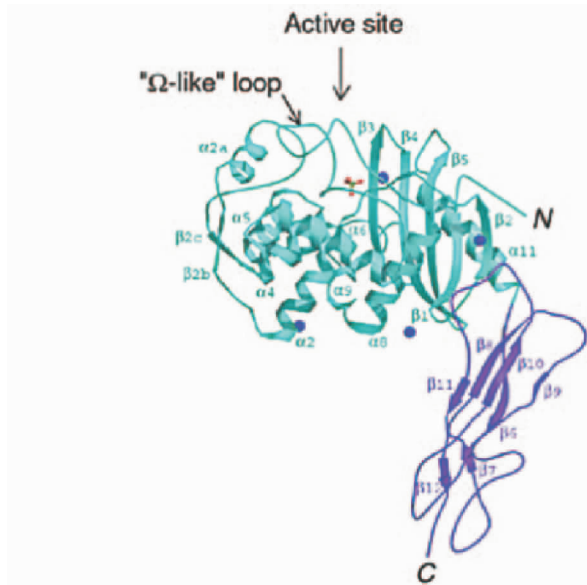
2.2 PBP3 的活性位点及氢键网络 PBP3 的活性位点在远离羧基端的 Domain I 的顶部, 如图 2 所示。观察其他羧肽酶以及青霉素代谢酶类, 活性位点主要由 3 个保守结构模块来确定: SXXK (Ser⁵⁶-Ile⁵⁷-Thr⁵⁸-Lys⁵⁹), 含有亲核的 Ser⁵⁶ 残基, 位于氨基端的 $\alpha 2$ 螺旋; SXN (Ser¹¹⁹-Ala¹²⁰-Asn¹²¹), 形成沟左

侧 $\alpha 4$ 和 $\alpha 5$ 螺旋之间的拐角; K (T/S) G (Lys²³⁹-Thr²⁴⁰-Gly²⁴¹), 位于 $\beta 3$ 链。除此之外, 必需氨基酸 Ser⁵⁶ 和 Thr²⁴² 残基的-NH-骨架占据了与氧离子共存的位置, 这一穴位是催化所必需的。 $\alpha 11$ 螺旋的末端 NH₂ 及 $\alpha 6$ 和 $\beta 2d$ 之间的 loop 环都存在活性位点。这包括 Arg²⁷⁸, 位于腔的正顶端角度;

Thr¹⁶⁰和结构上的 Gly¹⁶¹,位于腔底部的延伸环上。

活性位点内部的氢键网络是广泛的,而且不对称晶格单元内 4 个分子的氢键是相同的。Lys⁵⁹的 ϵ -NH₂ 基团在该氢键网络中担任中枢,与 Ser⁵⁶和 Ser¹¹⁹的羟基、侧链 Asn¹²¹的胺基以及骨架结构上 Thr¹⁶⁰的羧基都形成氢键,如图 3 所示。肺炎链球菌的 PBP3 与同源的 *E. coli* PBP5 以及链霉菌 K15

转肽酶活性位点的结构是相似的^[22-23,26],这 3 个分子都能识别肽底物,也都在裂缝底部有一个保守的 Gly 残基,分别是 Gly¹⁶¹(sPBP3^{*})、Gly¹⁵²(PBP5)、Gly¹⁴⁴(K15),但它们在 3 组重要催化残基的位置定向上仍有明显不同,在 PBP5 活性位点内并没有形成经典的氢键网络。



注:左图 sPBP3^{*} 包括 N 端 Domain I(青色)和 C 端 DomainIII(紫色)。右图 PBP3 通过 C 端两性螺旋结合到内膜外侧,活性位点在顶部 Domain I 凹沟区。

图 2 sPBP3^{*} 的二级结构及定位^[14]

菌肽聚糖茎段肽第三位含有 DAP 组分的一类 D,D-羧肽酶,如 *E. coli* PBP5、枯草芽孢杆菌 PBP,都有较短 Ω 环的特征;细菌肽聚糖茎段肽第三位是 Lys 组分的 D,D-羧肽酶一级蛋白序列有较长的 Ω 环,如肺炎链球菌的 PBP3,多 14 个氨基酸。而且具有较长 Ω 环的羧肽酶在其第三个催化基序(KTG)下游还含有 6 个氨基酸的插入片段,这在三级折叠结构中邻近 Ω 环。因此可推测,这种结构特征解释了肽聚糖合成中识别不同底物的机制^[27]。

3 结语与展望

肺炎链球菌作为革兰氏阳性菌肽聚糖层次较多(厚度可达 10~50 nm),而革兰氏阴性菌如 *E. coli* 的肽聚糖层较薄(1~3 层,厚度约 2~3 nm),而且 *E. coli* 至少有 3 个 D,D-羧肽酶(PBP5、PBP6、PBP6b)共同完成革兰氏阴性菌细胞壁肽聚糖加工过程。因此并不奇怪 PBP3 作为肺炎链球菌中唯一的 D,D-羧肽酶一定具有高效的催化活性,因为它必须限制除分裂位点外遍布细菌细胞表面的肽聚糖中茎段五肽的数目,如免疫荧光定位所显示的一样。

总的来说,在细胞分裂初期,PBP3 作为高效的 D,D-羧肽酶可能在膜表面滑动来修剪肽聚糖的茎段肽和网状五肽,转肽反应所需要的供体五肽,就会只出现在之后的分裂位点,这是肽聚糖合成所必需的。一旦肽聚糖合成开动,D,D-羧肽酶就要占据新合成的肽聚糖区域,这样能够与茎段肽或网状五肽发生反应,来调节最后胞壁质的网状交联程度。

目前对肺炎链球菌 PBP3 的结构和功能研究并不多,人

注:活性残基以球棒状标出,可能的氢键以橙色虚线表示。

图 3 肺炎链球菌 PBP3 活性位点处结构示意图^[14]

2.3 PBP3 的 Ω 环 Ω 环(Ω -loop)如图 2 所示,位于 DomainI 顶端,在 D,D-羧肽酶内部是一个关键的结构特征,可能作为指示基序识别不同细菌肽聚糖成分。PBP3 的 Ω 环对应于 151~181 aa, *E. coli* PBP5 对应于 147~158 aa,在 PBP3 中由于多插入 14 个氨基酸残基其 Ω 环要更长一些。对于不同细菌中类似 PBP5 结构的 D,D-羧肽酶蛋白一级序列分析显示,基于 Ω 环氨基酸残基的数目可以分为 2 类:细

们所了解到的结构与功能也许只是冰山一角,这与最初人们认为 PBP3 并没有重要功能有关。但这并不妨碍人们对 PBP3 的应用研究。鉴于 PBP3 作为青霉素受体能够与 β -内酰胺类青霉素结合,研究者尝试利用 PBP3 受体代替抗体应用于 ELISA 来检测食品中的 β -内酰胺类抗生素残留。受体结合检测方法能够用一种试剂盒、一种酶标竞争物检测多种 β -内酰胺类抗生素残留,而 ELISA 试剂盒需要多种试剂盒检测多种抗生素残留,相比之下,受体分析法较免疫分析法有一定优势。此前有利用肺炎链球菌 PBP2x 进行的快速检测方法研究^[28-29],当时 PBP2x 被作为 β -内酰胺类抗生素的主要靶标,而 PBP3 的重要性尚未得到充分认识,国外已研发出基于 PBP2x 受体的试剂盒,如 Randox,而且仅有商品化的 PBP2x 蛋白出售。目前国内也已开始研究,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 IC_{50} 值^[20-21],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,而对 PBP3 结构与功能的了解也有助于人们对 PBP3 应用的开发。同时在 PBP3 蛋白的晶体结构基础上,笔者所在课题组准备采用位置定向自旋标记-电子顺磁共振(SDSL-EPR)技术研究 PBP3 活性位点处的运动性及构象变化^[30-32],以进一步补充 PBP3 的结构。

参考文献

- [1] NANNINGA N. Morphogenesis of *Escherichia coli* [J]. Microbiol Mol Biol Rev, 1998, 62(1): 110-129.
- [2] WILLIAMSON R, HAKENBECK R, TOMASZ A. In vivo interaction of beta-lactam antibiotics with the penicillin-binding proteins of *Streptococcus pneumoniae* [J]. Antimicrob Agents, 1980, 18(4): 629-637.
- [3] GHUYSEN J M. Serine beta-lactamases and penicillin-binding proteins [J]. Annu Rev Microbiol, 1991, 45: 37-67.
- [4] GHUYSEN J M. Molecular structures of penicillin-binding proteins and β -lactamases [J]. Trends Microbiol, 1994, 2(10): 372-380.
- [5] JAMIN M, DAMBLON C, MILLIER S, et al. Penicillin-binding protein 2x of *Streptococcus pneumoniae*: enzymic activities and interactions with β -lactams [J]. Biochem J, 1993, 292: 735-741.
- [6] HAKENBECK R, BRIESE T, ELLERBROK H. Antibodies against the benzylpenicilloyl moiety as a probe for penicillin-binding proteins [J]. Eur J Biochem, 1986, 157: 101-106.
- [7] HAKENBECK R, KOHIYAMA M. Purification of penicillin-binding protein 3 from *Streptococcus pneumoniae* [J]. Eur J Biochem, 1982, 127: 231-236.
- [8] MORLOT C, NOIRDLERC-SAVOYE M, ZAPUN A, et al. The D, D-carboxypeptidase PBP3 organize the division process of *Streptococcus pneumoniae* [J]. Mol Microbiol, 2004, 51(6): 1641-1648.
- [9] 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]. J Bacteriol, 1990, 172(11): 6499-6505.
- [10] NELSON D E, YOUNG K D. Penicillin binding protein 5 affects cell diameter, contour, and morphology of *Escherichia coli* [J]. J Bacteriol, 2000, 182(6): 1714-1721.
- [11] NELSON D E, YOUNG K D. Contributions of PBP5 and D, D-carboxypeptidase penicillin binding proteins to maintenance of cell shape in *Escherichia coli* [J]. J Bacteriol, 2001, 183(10): 3055-3064.
- [12] NELSON D E, GHOSH A S, PAULSON A L, et al. Contribution of membrane-binding and enzymatic domains of penicillin binding protein 5 to maintenance of uniform cellular morphology of *Escherichia coli* [J]. J Bacteriol, 2002, 184(13): 3630-3639.
- [13] YOUNG K D. Bacterial shape [J]. Mol Microbiol, 2003, 49(3): 571-580.
- [14] MORLOT C, PERNOT L, VERNET T, et al. Crystal structure of a peptidoglycan synthesis regulatory factor (PBP3) from *Streptococcus pneumoniae* [J]. J Biol Chem, 2005, 280(16): 15984-15991.
- [15] DI GUILMI A M, MOUZ N, ANDRIEU J P, et al. Identification, purification, and characterization of transpeptidase and glycosyltransferase domains of *Streptococcus pneumoniae* penicillin-binding protein 1a [J]. J Bacteriol, 1998, 180(21): 5652-5659.
- [16] DI GUILMI A M, MOUZ N, MARTIN L, et al. Glycosyltransferase domain of penicillin-binding protein 2a from *Streptococcus pneumoniae* is membrane associated [J]. J Bacteriol, 1999, 181(9): 2773-2781.
- [17] 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]. Antimicrob Agents Chemother, 2004, 48(5): 1848-1855.
- [18] MOUZ N, DI GUILMI A M, GORDON E, et al. Mutations in the active site of penicillin-binding protein PBP2x from *Streptococcus pneumoniae* [J]. J Biol Chem, 1999, 274(27): 19175-19180.
- [19] LOBKOVSKY E, MOEWS P C, 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]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993, 90: 11257-11261.
- [20] KOSOWSKA-SHICK K, MCGHEE P L, APPELBAUM P C. Affinity of cefotaxime and other β -lactams for penicillin-binding proteins from *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pneumoniae* [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2010, 54(5): 1670-1677.
- [21] MOISAN H, PRUNEAU M, MALOIN F. Binding of cefotaxime to penicillin-binding proteins of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pneumoniae* [J]. J Antimicrob Chemother, 2010, 65: 713-716.
- [22] NICHOLAS R A, KRINGS S, TOMBERG J, et al. Crystal structure of wild-type penicillin-binding protein 5 from *Escherichia coli*: implications for deacylation of the acyl-enzyme complex [J]. J Biol Chem, 2003, 278: 52826-52833.
- [23] FONZE E, VERMEIRE M, NGUYEN-DISTECHE M, et al. The crystal structure of a penicilloyl-serine transferase of intermediate penicillin sensitivity (the DD-transpeptidase of *Streptomyces K15*) [J]. J Biol Chem, 1999, 274(31): 21853-21860.
- [24] PARES S, MOUZ N, PETILLOT Y, et al. X-ray structure of *Streptococcus pneumoniae* PBP2x, a primary penicillin target enzyme [J]. Nat Struct Biol, 1996, 3: 284-289.
- [25] LIM D, STRYNADKA N. Structural basis for the β -lactam resistance of PBP2a from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [J]. Nat Struct Biol, 2002, 9(11): 870-876.
- [26] DAVIES C, WHITE S W, NICHOLAS R A. Crystal structure of a deacylation-defective mutant of penicillin-binding protein 5 at 2.3 Å resolution [J]. J Biol Chem, 2001, 276(1): 616-623.
- [27] NEMMARA V V, DZHEKIEVA L, SARKAR K S, et al. Substrate specificity of low-molecular mass bacterial DD-peptidases [J]. Biochemistry, 2011, 50: 10091-10101.
- [28] 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: 296-303.
- [29] 李铁柱, 孙永海, 郝伟东. 受体分析结合酶联免疫检测牛乳中的头孢噻吩残留 [J]. 高等学校化学学报, 2008, 29(3): 473-476.
- [30] 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.
- [31] 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.
- [32] 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.