

李彩霞, 刘盼盼, 陈晓慧, 等. 穿心莲内酯对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌关键耐药蛋白 PBP2a 的抑制作用 [J]. 畜牧与兽医, 2024, 56 (3): 31-38.

LI C X, LIU P P, CHEN X H, et al. Inhibition of key resistance protein PBP2a of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by andrographolide [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2024, 56 (3): 31-38.

穿心莲内酯对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌关键耐药蛋白 PBP2a 的抑制作用

李彩霞, 刘盼盼, 陈晓慧, 罗小凤, 王桂琴*

(宁夏大学动物科技学院, 宁夏 银川 750021)

摘要: 本试验旨在为探究穿心莲内酯 (andrographolide, AP) 对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA) 关键耐药蛋白青霉素结合蛋白 2a (penicillin binding protein 2a, PBP2a) 的抑制作用。采用实时荧光定量 PCR 检测 AP 对 PBP2a 编码基因 *mecA* 的转录影响, 通过在线软件 SWISS-MODEL 等对蛋白质结构进行分析, 经 PyMOL 以及 AutoDock Tools 软件进行分子对接来探究 AP 与 PBP2a 结合的可能机制, 运用动力学模拟来验证 AP 与 PBP2a 蛋白结合的可靠性, 进一步原核表达 PBP2a 并制备其多克隆抗体, 通过蛋白质免疫印迹检测 AP 作用下 MRSA 中 PBP2a 蛋白含量的变化。结果显示: 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 AP 即可显著下调 *mecA* 的转录水平, AP 与 PBP2a 蛋白的 GLU170、GLU239 和 THR238 之间可以形成稳定的氢键作用力; 成功表达并纯化获得 38 kDa 的 PBP2a 蛋白转肽酶区, 且制备出的多克隆抗体可以与 PBP2a 蛋白特异性结合; 随着 AP 浓度的升高, PBP2a 的表达量逐渐降低。总之, 本研究分子模拟提示 AP 对 PBP2a 蛋白存在抑制潜力, 试验结果表明 AP 可以通过抑制 *mecA* 的转录进而抑制 PBP2a 表达, 从而揭示了 AP 使 MRSA 对 β -内酰胺类抗生素增敏的可能机制。

关键词: 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌; PBP2a; 穿心莲内酯; 分子模拟

中图分类号: S852.6 文献标志码: A 文章编号: 0529-5130(2024)03-0031-08

Inhibition of key resistance protein PBP2a of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by andrographolide

LI Caixia, LIU Panpan, CHEN Xiaohui, LUO Xiaofeng, WANG Guiqin*

(College of Agriculture, Ningxia University, Yinchuan 750021, China)

Abstract: This study was to explore the inhibitory effect of andrographolide (AP) on the critical drug-resistant and protein penicillin-binding protein 2a (PBP2a) of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Here, the effect of AP on *mecA* gene transcription was detected by real-time fluorescence quantitative PCR. The protein structure was analyzed by the online software SWISS-MODEL. Pymol and AutoDock Tools software performed molecular docking to explore the potential mechanism of AP binding to PBP2a, and kinetic simulation was used to verify the reliability of AP binding to PBP2a protein. Then, prokaryotic expression of PBP2a was further performed, and its polyclonal antibody was prepared. The change of PBP2a protein content in MRSA under the action of AP was detected by Western blot. The results showed that AP significantly down-regulated the transcription level of *mecA* at 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$, and a stable hydrogen bond force was formed between AP and GLU170, GLU239, and THR238 of PBP2a protein. The transpeptidase domain of 38 kDa PBP2a protein was successfully expressed and purified, and the prepared polyclonal antibody specifically bound to the PBP2a protein. With the increase in AP concentration, the expression of PBP2a decreased gradually. In conclusion, the molecular simulation in this study suggested that AP had the potential to inhibit PBP2a protein. The present results indicated that AP could inhibit the expression of PBP2a by inhibiting the transcription of *mecA*, thus revealing the possible mechanism of AP sensitizing MRSA to β -lactam antibiotics.

Keywords: methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; PBP2a; andrographolide; molecular simulation

耐药菌株引起的高发病率和病死率已经严重威胁

到人和动物的生命安全, 并已成为全球关注的公共卫

生问题^[1]。金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 是引起奶牛乳房炎主要的致病菌之一, 抗菌药物的使用仍为奶牛乳房炎主要治疗手段。我国奶牛乳房炎金黄色葡萄球菌分离株耐药性严重, 80%~90% 菌株对 β -内酰胺类药物耐药, 远远高于其他国家, 部分省

收稿日期: 2023-03-12; 修回日期: 2023-12-27

基金项目: 宁夏自然科学基金重点项目 (No. 2020AAC02009)

第一作者: 李彩霞, 女, 硕士

* 通信作者: 王桂琴, 教授, 研究方向: 兽医药理与毒理学,

E-mail: nxwgq@126.com.

区 90% 以上金黄色葡萄球菌分离株耐药^[2]。地区不同, 耐药也有很大区别。从新疆地区分离出的菌株对青霉素耐药率高达 93.0%, 浙江地区分离出的菌株对青霉素耐药率为 77.35%^[3]。

耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (methicillin-resistant *S. aureus*, MRSA) 的耐药机制包括靶位改变、钝化酶产生、主动外排等, 其中抗生素作用靶位的改变是最主要的耐药机制。细菌细胞壁的肽聚糖合成是由青霉素结合蛋白 (penicillin binding proteins, PBPs) 催化完成, 金黄色葡萄球菌通常可产生 4 种 PBPs, 即 PBP1、PBP2、PBP3 和 PBP4, 它们参与细胞壁的合成并在细菌细胞周期中发挥至关重要的作用。PBPs 具有转肽酶 (transpeptidase, TPase) 活性和转糖基酶 (glycosyltransferase, TGase) 活性, 而 β -内酰胺类药物能与 PBPs 转肽酶功能域选择性结合, 使 TPase 失活^[4]。MRSA 菌株中存在可移动遗传元件葡萄球菌盒式染色体 *mec* (SCC*mec*), 该元件携带 *mecA* 基因, 编码具有转肽酶活性的青霉素结合蛋白 2a (penicillin binding protein 2a, PBP2a) 蛋白^[5]。PBP2a 蛋白包含 3 个功能区, 其中 N 末端跨膜区 (1~23 aa) 将 PBP2a 固定在细胞膜表面, 非青霉素结合区 (24~326 aa) 主要负责蛋白质的延伸和固定, 转肽酶区 (327~668 aa) 发挥转肽酶活性。PBP2a 的转肽酶区含有 β -内酰胺类抗生素作用的低亲和力位点, 与 β -内酰胺类药物难以结合, 当其他 PBPs 被抑制时, PBP2a 可代替其功能, 完成肽聚糖合成, 维持细菌正常生长。

穿心莲内酯 (andrographolide, AP) 是一类多靶点的萜类小分子化合物, 具有多种生物活性, 如抗炎和抗菌等作用^[6-7]。AP 与 β -内酰胺类抗生素联合使用可以增强 MRSA 对 β -内酰胺类抗生素的敏感性^[8]。而 PBP2a 为 MRSA 关键耐药蛋白, 那么是否 AP 通过影响 PBP2a 表达及功能进而使金黄色葡萄球菌对 β -内酰胺类药物增敏? 为探究这一科学问题, 本研究首先通过生物信息学及分子模拟等手段分析 PBP2a 的蛋白分子特性及 AP 与 PBP2a 蛋白的作用及其结合模式, 探究 AP 对 PBP2a 蛋白功能的影响; 随后, 测定了 AP 作用下 PBP2a 转录水平变化; 通过原核表达纯化 PBP2a 蛋白, 制备多克隆抗体, 检测 AP 对 PBP2a 表达量的影响。

1 材料与方法

1.1 菌株

金黄色葡萄球菌参考菌株 ATCC33591 购自中国药品与生物制品检定所, 试验菌株为本实验室从宁夏不同地区奶牛场乳房炎乳样中分离出的 MRSA

(WLD10、WLD1、XF2)。

1.2 实验动物

8 周龄成年新西兰大白兔, 购自四川里来思诺生物科技有限公司。

1.3 药品与试剂

穿心莲内酯, 纯度 99.89%, 购自美国 Med Chem Express 公司; TRIzol 试剂购自日本 TaKaRa 公司; 二甲基亚砜 (DMSO) 和 0.2 μ m PVDF 膜均购自德国 Merck 公司; 荧光定量试剂购自美国 ABclonal 公司; 内切酶 *Bam*H I 和 *Eco*R I 购自纽英伦生物技术 (北京) 有限公司; ECL 化学发光显色液试剂购自上海雅酶生物医药科技有限公司; 辣根过氧化物 (HRP) 标记山羊抗兔 IgG 购自亚科因 (武汉) 生物技术有限公司; 异丙基-D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 购自北京索莱宝科技有限公司; Ni²⁺ 亲和层析柱购于上海生物工程技术有限公司; BCA 蛋白含量检测试剂购自江苏凯基生物技术股份有限公司; 脱脂奶粉购自美国 BD 公司。

1.4 荧光定量 PCR 检测 AP 对 *mecA* 基因转录水平的影响

选择 4 株 MRSA 菌株 ATCC33591、WLD10、WLD1、XF2 划线培养, 挑取单菌落过夜培养至对数生长期, 按 1:100 的比例稀释, 然后分别加至终浓度为 0、64、128、256 μ g/mL 的 AP, 继续培养 12 h。使用 TRIzol 法提取总 mRNA, 使用逆转录试剂盒将 mRNA 转录为 cDNA。以 *gyrB* 为内参基因, 使用 SYBR Green Real-time 荧光 PCR 预混液在 20 μ L 反应体系进行 qPCR 反应。利用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 法对结果进行处理^[9], 引物序列信息见表 1。

表 1 引物序列信息

基因	引物序列 (5'→3')	退火温度/°C
<i>gyrB</i>	F: GCCGATTGCTCTAGTAAAAGTCC	55
	R: GATTCTGTACCAAATGCTGTG	
<i>mecA</i>	F: AAAACTAGGTGTGTGTAAGATATACC	55
	R: GAAAGGATCTGTACTGGGTTAATCAG	

1.5 蛋白分子结构分析

利用在线软件 NPS @ : SOPMA (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html) 对 PBP2a 蛋白二级结构进行预测和分析。采用在线服务器 Consurf Web Serve (<http://consurf.tau.ac.il/>) 进行同源性建模和保守性分析^[10]。利用 PyMOL 软件将保守性氨基酸映射到 PBP2a 蛋白的三维结构上, 并分析氨基酸保守性与蛋白结构和功能的

联系。

1.6 分子对接

采用 SWISS-MODEL 进行同源建模, 获得 PBP2a 蛋白的三级结构。将能量最小化的优势构象作为 PBP2a 蛋白对接的初始构象。AP 小分子结构文件来源于 PubChem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>), 随后利用 PyMOL 软件将结构文件转化为 PDB 格式。使用 AutoDock 对蛋白去水、加氢、计算电荷以及设置小分子的旋转键等预处理后进行半柔性分子对接。最终选取兼顾打分和构象契合的最优结果, 使用 BIOVIR Discovery Studio 2020 进行可视化^[11]。

1.7 动力学模拟

进一步验证 AP 与 PBP2a 蛋白的结合稳定性。分子对接后, 以 PBP2a-AP 复合物作为初始构象, 使用 Gromacs 2020 版本对复合物进行分子动力学模拟 (molecular dynamics simulation, MD)^[12]。此处, MD 模拟的分子力场选择为 OPLS3e, 并使用 TIP3 水模型对系统进行溶剂化, 通过添加离子对系统电荷进行中和, 整个系统的能量最小化是使用全原子型 OPLS3e 力场来实现^[13]。水分子的几何结构、重原子的键长和键角都是通过 SHAKE 算法来约束^[14]。通过应用周期性边界条件对连续系统进行模拟, 并通过粒子网格 Ewald 方法维持长程静电^[15]。在进行动力学模拟之前先对模型进行优化: (1) 限制溶剂, 进行能量最小化; (2) 没有限制, 能量最小化; (3) 温度 10 K, Berendsen 热力学方法, 运行 12 ps, 每 1 ps 重新采样 1 次; (4) NPT 系综, 温度 300 K, 压力 1.01×10^5 Pa, 正常压力释放系数, 运行 24 ps^[16]; (5) MD 成品: 前期准备结束后, 以 1.2 fs 的时间进行 100 ns 的运行, 每 25 ps 进行一次轨迹记录, 总计记录 4 000 帧。计算 PBP2a 蛋白及复合物主链原子的均方根偏差 (RMSD), 衡量复合物体系的稳定性; 以均方根波动 (RMSF) 反映蛋白氨基酸残基的结构柔性; 通过回旋半径 (Rg) 考量 AP 对 PBP2a 蛋白结构折叠紧密度的影响, 捕捉 PBP2a 与 AP 间氢键数目及持续时间主链原子的 RMSD, 以了解蛋白质-配体相互作用的性质。

1.8 PBP2a 蛋白的原核表达

1.8.1 *mecA* 基因的 PCR 扩增

从 NCBI 基因数据库中下载 *mecA* 基因序列, 根据基因序列设计引物, 并送至生工生物工程股份有限公司合成。在引物两端加入限制性酶切位点保护碱基, 目的基因上游引物序列为: 5'-CGGGATCCACT-ATTGATGCTAAAGTTCA-3', 下游引物序列为: 5'-GGAATTCGCAACCCACGTTACCGGATTG-3', Prime STAR Max DNA Polymerase 进行 PCR 扩增, 并胶回收

目的片段。引物序列下划线处分别为 *Bam*H I 和 *Eco*R I 酶切位点。

1.8.2 重组质粒 pET28a-*mecA* 的构建

将回收目的片段及质粒 pET28a 经 *Bam*H I 和 *Eco*R I 双酶切, 酶切产物回收后使用 T4 DNA 连接酶 16 °C 过夜连接。转化至 DH5 α 感受态, 经卡那霉素筛选及 PCR 鉴定获得阳性菌落, 提取质粒进行酶切鉴定, 鉴定正确的质粒送至生工生物工程股份有限公司进行测序验证。

1.8.3 重组质粒转化

将测序正确的重组质粒 pET28a-*mecA* 转化至 BL21 (DE3) 感受态细胞, 经卡那霉素抗性筛选, PCR 鉴定获得阳性菌落, 于 -80 °C 保存备用。

1.8.4 重组蛋白 PBP2a 的诱导表达

将新鲜的单菌落挑取至 5 mL 含有卡那霉素 (50 μ g/mL) 的 LB 过夜培养, 1 : 100 转接至 100 mL 卡那霉素抗性 LB。37 °C 200 r/min 震荡培养 3 h, 当菌液 OD_{600} 值为 0.6~0.8 时, 加入 IPTG (1 mmol, 1 : 1 000) 诱导剂, 160 r/min, 25 °C 诱导 24 h 后进行 SDS-PAGE 分析。

1.8.5 重组蛋白的鉴定

同 1.8.4 方法制备样品经 SDS-PAGE 分离后, 120 V 转印 PVDF 膜, 用 5% 脱脂奶 4 °C 封闭过夜, 一抗为抗 His 标签抗体 (1 : 2 000 稀释), 孵育 1 h 后 TBST 缓冲液洗 4 次, 每次 10 min; 二抗为 HRP 标记的山羊抗兔 IgG (1 : 2 000 稀释), 孵育 1 h, TBST 洗涤 4 次, ECL 显色。

1.9 PBP2a 多克隆抗体的制备

1.9.1 重组蛋白纯化

同 1.8.4 方法小量诱导表达目的蛋白, 离心取上清液和沉淀进行 SDS-PAGE 鉴定, 以相同条件大量诱导表达重组蛋白, 使用 Ni²⁺ 亲和和层析柱进行纯化。然后进行最适洗涤浓度确定, 20、50、75、100、150、250 mmol/L 咪唑缓冲液洗涤, 确定目的蛋白不被洗脱的最大咪唑浓度为最佳洗涤浓度。

1.9.2 免疫程序

第一次免疫使用弗氏完全佐剂与 0.2 mg 的重组蛋白进行等体积乳化, 背部皮下多点注射, 在一免后 14 d 进行二免, 28 d 进行三免, 二免、三免使用弗氏不完全佐剂。

1.9.3 蛋白质免疫印迹检测抗体特异性

含有 pET28a-*mecA* 的质粒并诱导后的大肠杆菌作为对照, 同时使用 MRSA 菌株制备样品, 以制备的抗重组蛋白 PBP2a 的多克隆抗体作为一抗, HRP 标记的山羊抗兔 IgG 作为二抗, 鉴定多克隆抗体对重组 PBP2a 蛋白和 MRSA 源 PBP2a 的特异性。

1.10 蛋白质免疫印迹检测 AP 作用下 PBP2a 蛋白含量的变化

过夜培养 MRSA 菌株 WLD10, 1 : 100 接种至 TSB 培养基, 培养至对数生长期, 加入 AP 使各管浓度分别为 0、64、128、256 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 过夜培养。次日将菌液浊度调整至 $OD_{600} = 1.0$, 用超声仪破碎。使用 BCA 法测定蛋白含量, 将蛋白总含量稀释一致后使用 5 \times loading Buffer 进行金属浴加热 10 min, 样品制备完成进行 SDS-PAGE, 转膜, 封闭, 孵育一抗 (PBP2a 蛋白多克隆抗体), 孵育二抗 (HRP 标记的山羊抗兔 IgG), ECL 显影检测蛋白表达量。

2 结果与分析

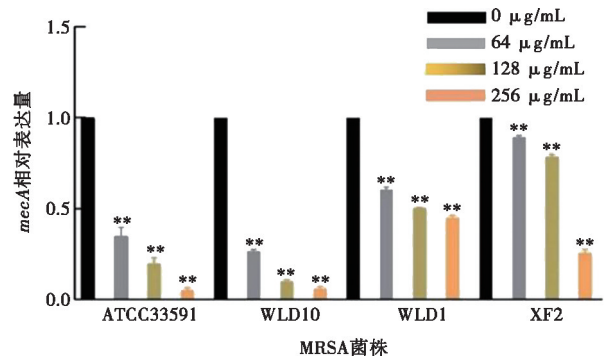
2.1 荧光定量 PCR 分析 *mecA* 基因转录水平

经 64、128、256 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度的 AP 处理, MRSA 菌株 ATCC33591、WLD10、WLD1、XF2 中 *mecA* 基因的转录水平均显著下调 ($P < 0.01$), 且随着 AP 浓度的升高, 4 株菌 *mecA* 的转录水平均逐渐降低 (图 1)。

2.2 PBP2a 蛋白分子特征分析

二级结构预测分析显示, PBP2a 蛋白为单体及二聚体结构, 含有 33.98% α 螺旋、18.11% 延伸链、7.93% β 转角、39.97% 无规则卷曲。利用 Consurf 服务器进行保守性分析, 通过 PyMOL 软件将保守性和溶剂可及性赋值投影至三维结构上, 从而关联保守性氨基酸与结构和功能的关系。结果显示, Met1-Lys3、Asp156-Asn158、Ser261-Lys265、Thr354-Leu360、Val361-Tyr369、Ser462-Arg469、Leu514-

Gly520、Ile595-Lys604、Gln613-Ile618 区域和 GLU284、ASP288 残基高度保守。氨基酸溶剂可及性通过卷积神经网络算法预测, 其中包含多个埋藏于蛋白内部用于维持结构特异性的高度保守性残基, 它们分别是 Val45、Tyr46、Trp127、Ile154、Leu264、Tyr373、Phe395、Ala471 等氨基酸残基; Met1、Arg65、Thr103、Gly106、Ile132、Arg150、Gly151、ASP288、Gln333、Ser437 等保守残基位于 PBP2a 蛋白表面, 可能在生物学功能发挥中起到至关重要的作用。



** 表示与对照组 (0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ AP) 比较 $P < 0.01$ 。下同。

图 1 不同浓度 AP 对 *mecA* 转录水平的影响

2.3 AP 和 PBP2a 蛋白的结合模式分析

对接结果的 3D、2D 结合构象可视化见图 2, AP 与蛋白 PBP2a 的 GLU170、GLU239 和 THR238 残基形成 4 个氢键, 并通过烷基间分子作用力与残基 VAL277、PRO258 结合、与残基 TYR373 形成 π -烷基堆积作用力, 结合能显示 PBP2a 蛋白与 AP 小分子具有较强结合能力。

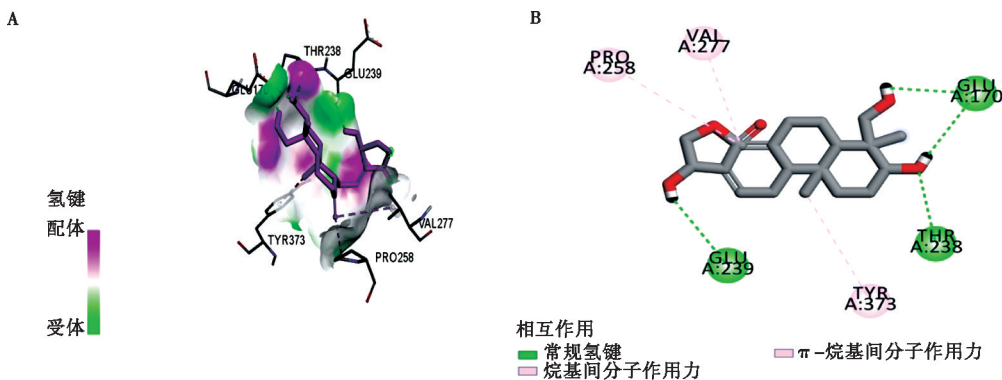


图 2 分子对接结果 3D (A)、2D (B) 展示

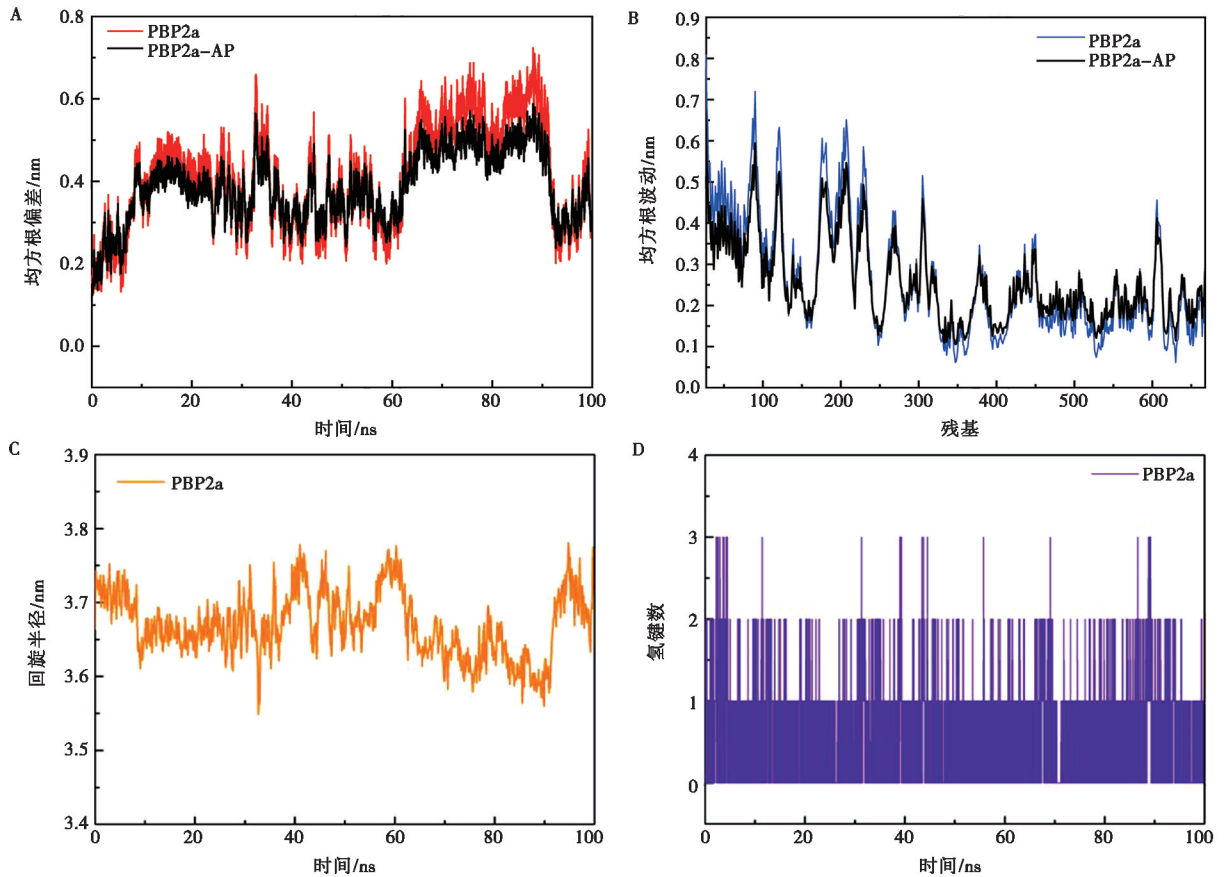
2.4 分子动力学模拟

为进一步研究 AP 分子与 PBP2a 蛋白的相互作用, 本研究对 PBP2a-AP 复合物进行了 100 ns 的分子动力学模拟。如图 3A 所示, 复合物的 RMSD 小于 4.5 \AA , 而且复合物在较短的 (18 ns) 时间内达到了

动态平衡, 这表明 AP 与靶蛋白 PBP2a 能够形成稳定的复合物。根据图 3B 可知, 大部分的氨基酸构象变化较小, AP 分子可通过结合降低 PBP2a 蛋白中残基的结构柔性。这也是复合物 RMSD 变化较小的主要原因。氢键在复合物形成中的作用也很关键, 形成的

氢键越多，两者将具有更强的结合活性，再结合 R_g ， R_g 越小，表明 AP 对蛋白结构折叠的影响越轻微。从图 3C 和图 3D 可知，小分子与蛋白结合良好，能够形成稳定的复合物从而实现小分子其活性功能。在整个分子动力学模拟过程，活性位点残基的结合情况可反映 PBP2a 蛋白与配体 AP 间更详尽的能量细节。根据结合能（表 2）可以看到，蛋白的 GLU145，GLU170，ASN164，ASP275，VAL277，GLU284，

ASP288，ASP295，TYR373 等氨基酸贡献的结合自由能最为突出，特别是与 VAL277 结合能达到 -6.78 kJ/mol，位于 PBP2a 蛋白的功能区氨基酸 TYR373 结合自由能达到 -5.1994 kJ/mol（图 4），对稳定蛋白口袋中的小分子有着重要作用，另一方面也表明了分子与蛋白位点存在的这些作用可有效促使小分子牢牢地锚定在蛋白活性位点，从而形成稳定的复合物。



A. PBP2a-AP 复合物的 RMSD; B. 表示复合物的 RMSF; C. PBP2a-AP 配合物的 R_g ; D. 表示 PBP2a 和 AP 的氢键数。

图 3 PBP2a-AP 复合物动力学模拟

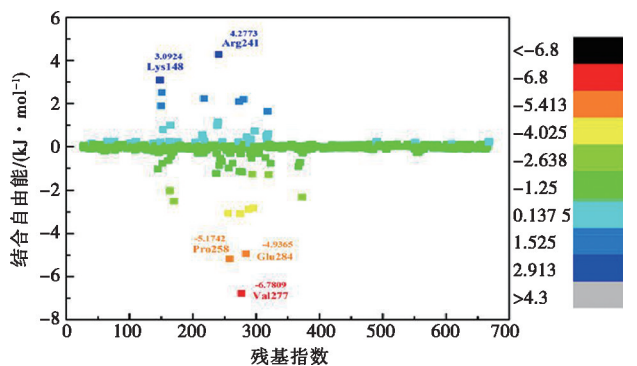


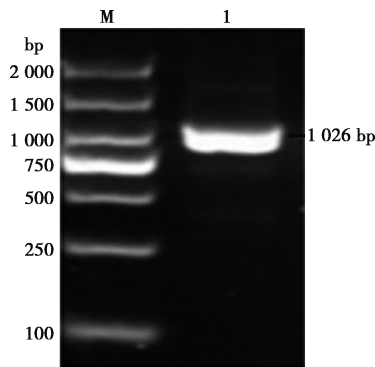
图 4 与配体相互作用的每个蛋白质残基的结合自由能的分解

表 2 结合能及其所选生物活性分子的组成能

残基	结合能	极性溶剂 化自能	非极性溶剂 化自能	总结合 自由能
GLU-145	-1.065 1	0.022 3	0.000 0	-1.042 7
ASN-164	0.484 5	-2.504 8	0.000 0	-2.021 8
GLU-170	-0.993 3	-1.483 8	-0.017 8	-2.498 3
ASP-275	-2.672 9	-0.335 4	-0.053 2	-3.075 4
VAL-277	-6.812 0	0.939 3	-0.909 7	-6.780 9
GLU-284	6.399 2	-11.336 0	0.000 0	-4.936 5
ASP-288	2.991 8	-5.871 5	0.000 0	-2.880 0
ASP-295	-2.040 8	-0.770 0	0.000 0	-2.812 9
TYR-373	-5.199 4	3.422 9	-0.528 0	-2.310 8
PRO-258	-4.275 3	-0.164 9	-0.735 0	-5.174 2

2.5 PCR 扩增 *mecA* 片段

mecA 基因 PCR 扩增所得产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳, 结果如图 5 所示, 在 1 000 bp 附近存在条带, 与预期 1 026 bp 符合。

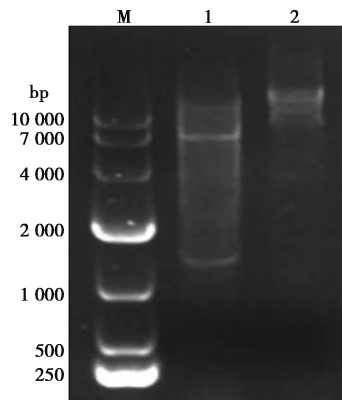


M. DL2000 Marker; 1. PCR 扩增产物。

图 5 PCR 扩增产物电泳

2.6 重组质粒 pET28a-*mecA* 的酶切鉴定

提取的重组质粒经 *Bam*H I 和 *Eco*R I 酶切鉴定结果如图 6 所示。重组质粒的 *mecA* 基因序列未出现突变和移码, 表明原核表达载体 pET28a-*mecA* 成功构建。



M. DL10000 Marker; 1. 重组质粒双酶切; 2. 重组质粒。

图 6 重组质粒酶切鉴定

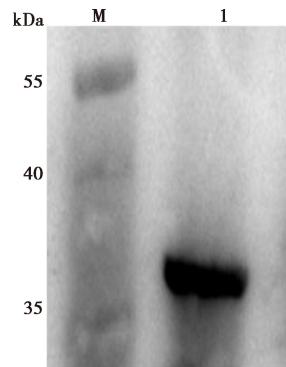
2.7 重组蛋白 PBP2a 的表达

通过不断优化诱导表达条件, 发现在 1 mmol/L 的 IPTG 浓度下, 低温 25 °C 诱导 24 h 可获得目的蛋白。经蛋白质免疫印迹检测 PBP2a 蛋白的 N 端 His 标签, 特异性反应条带约为 38 kDa, 见图 7, 与预期结果相符。

2.8 重组蛋白 PBP2a 的纯化

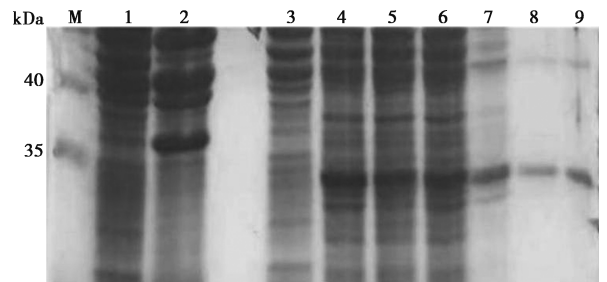
重组蛋白经 IPTG 诱导, 用超声破碎仪破碎后, 离心分别取上清液和沉淀进行 SDS-PAGE 鉴定, 发

现沉淀和上清液都存在目的蛋白, 取上清液经 Ni²⁺ 纯化柱进行纯化, 最佳洗涤的咪唑浓度为 75 mmol/L, 用 150 mmol/L 的咪唑对目的蛋白进行洗脱, 获得大小约 38 kDa 的目的蛋白 (图 8)。



M. 蛋白 Marker; 1. PBP2a 重组蛋白。

图 7 蛋白质印迹检测重组蛋白 PBP2a 表达



M. 蛋白 Marker; 1~6. 75 mmol/L 咪唑洗涤蛋白; 7~9. 150 mmol/L 咪唑洗脱蛋白。

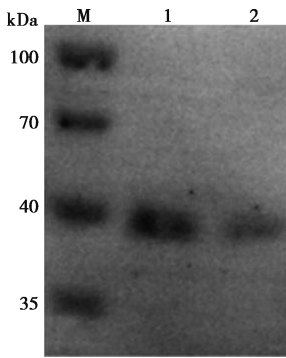
图 8 重组蛋白 PBP2a 的纯化

2.9 蛋白质免疫印迹分析 PBP2a 蛋白多克隆抗体的特异性

使用制备的抗重组蛋白 PBP2a 的多克隆抗体对 PBP2a 重组蛋白及 MRSA 菌株中的 PBP2a 蛋白进行免疫反应性分析。如图 9 所示, 在 38 kDa 左右出现特异性目的条带, 表明该多克隆抗体可与原核表达的 PBP2a 蛋白及 MRSA 菌株中的 PBP2a 蛋白发生特异性反应, 进而实现对 PBP2a 蛋白表达量的检测。

2.10 蛋白质免疫印迹检测 AP 作用下 PBP2a 蛋白含量的变化

将经 0、64、128、256 μg/mL 的 AP 处理的 MRSA 菌株, 标定总蛋白含量制样, 蛋白质免疫印迹测定 PBP2a 的蛋白含量变化。结果如图 10 所示, 在 38 kDa 左右处出现目的条带, 与未处理的 MRSA 菌株内 PBP2a 蛋白相比, 经处理的 PBP2a 蛋白表达量显著降低 ($P < 0.01$), 且随着 AP 浓度的升高, PBP2a 的表达量逐渐降低。



M. 蛋白 Marker; 1. 重组蛋白 PBP2a; 2. MRSA 菌内 PBP2a 蛋白。

图9 蛋白质免疫印迹验证 PBP2a 蛋白抗体特异性

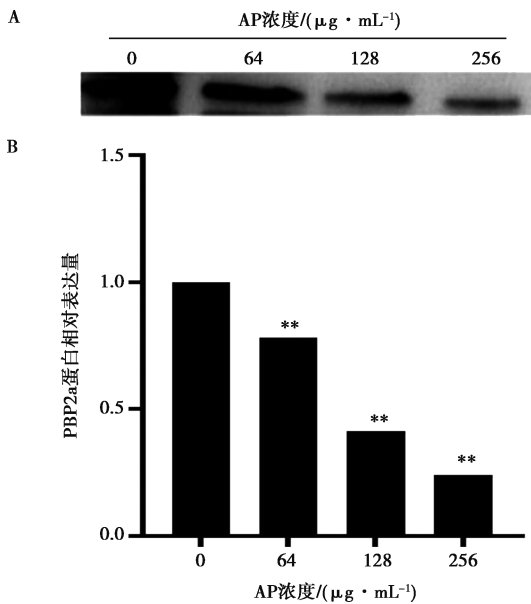


图10 蛋白质免疫印迹检测 PBP2a 蛋白表达量

3 讨论

细菌耐药性已成为威胁全球公共卫生健康的重要因素之一，革兰阳性和阴性菌中的多重耐药模式导致传统抗菌剂难以治疗甚至无法治疗^[17]。MRSA 几乎耐所有的 β -内酰胺类药物，且对多种抗生素耐药，引起的感染也极难治疗。因此，开发有效的抗 MRSA 感染治疗策略或抑制剂对治疗至关重要。随着对植物抗微生物成分的探索，一些候选药物表现出潜在的抑菌活性，被认为是安全、无毒、不易产生副作用的天然化合物，因此被广泛应用于研究^[18-19]。

PBPs 在细菌细胞壁的肽聚糖合成中发挥作用^[20]。PBPs 主要参与肽链桥的形成，催化邻近糖链，肽侧链之间的特定交联来辅助细胞壁的合成。当 β -内酰胺类抗生素使 PBPs 失去活性时，PBP2a 却能代替其功能继续完成肽聚糖的合成，使细菌可以继续

生长，并呈现高度耐药性^[21]。因此，抑制 PBP2a 的功能，进而抑制细菌细胞壁肽聚糖的合成是使 MRSA 对 β -内酰胺类增敏的可能途径。

AP 是穿心莲的主要活性成份，具有多种生物学效应，其抗炎、抗肿瘤、抗病毒、抗菌并治疗多种疾病，在体内和体外有广泛的治疗作用，具有大量药理学靶点^[22]。本试验通过荧光定量 PCR 测定发现，不同浓度 AP 处理的 MRSA 菌株 *mecA* 基因的转录水平均有下调，且具有浓度依赖；进一步通过原核表达及抗体制备获得 PBP2a 重组蛋白及其多克隆抗体，经蛋白质免疫印迹验证，表明 AP 可以通过抑制 *mecA* 基因的转录和表达来抑制 PBP2a 蛋白。

分子模拟在很多研究中被用于筛选抗金黄色葡萄球菌的有效分子^[23-24]。本试验采用半柔性分子对接及全原子动力学模拟来探究 AP 与 PBP2a 蛋白的相互作用及结合模式，其中分子对接结果显示，AP 会与 PBP2a 形成 4 个氢键，还存在烷基间分子作用力，同时，会在 π -烷基堆积作用力下形成复合物，这些氨基酸残基与 AP 结合可能会损害其生物学功能，且氢键的出现对复合物的形成至关重要，几乎起到决定性作用^[22]。其中 TYR373 残基位于 PBP2a 蛋白的功能区，AP 与 TYR373 残基的结合会使 PBP2a 蛋白无法发挥其转肽酶功能。这些结果都说明 AP 对 PBP2a 蛋白有一定抑制潜力。分子动力学模拟被认为是一项分析蛋白质配体相互作用的关键技术，为了分析 AP 和 PBP2a 蛋白结合的可靠性，将 AP-PBP2a 复合物进行了分子动力学模拟。分析结果发现复合物的 RMSD 小于 4.5 Å，复合物 RMSD 变化较小，Rg 也在比较小的范围内波动，这些都说明 AP-PBP2a 复合物比较稳定。再结合活性位点残基的结合情况分析，小分子与蛋白位点的氨基酸存在很好的氢键以及疏水相互作用，其中残基 GLU284，ASP288 是高度保守的残基，AP 与其结合可能使 PBP2a 蛋白的生物学功能受到影响；与 VAL277 残基的结合能达到 -6.78 kJ/mol，结合能越低对稳定蛋白口袋中的小分子有着重要作用，与功能区氨基酸 TYR373 结合能达到 -5.199 4 kJ/mol。以上分析说明 AP 对 MRSA 主要耐药蛋白 PBP2a 存在抑制作用，并显示出巨大的潜力。

综上，本研究从分子模拟的角度提出了 AP 与 PBP2a 蛋白存在结合效应，揭示了 AP 对 PBP2a 的抑制潜力。同时发现，AP 下调 *mecA* 转录水平，并抑制 MRSA 菌株中 PBP2a 蛋白的表达，且呈剂量依赖性。总之，AP 可抑制 PBP2a 蛋白的转录和表达，并有可能损坏其构象来提高 MRSA 对 β -内酰胺类抗生素的敏感性。

参考文献:

- [1] 孟丹, 孟庆玲, 乔军, 等. 奶牛源 MRSA 流行株的耐药特性 SCC *mecA* 分型研究 [J]. 中国动物传染病学报, 2017, 25 (4): 24-28.
- [2] 刘朝, 王京仁, 张成栋, 等. 湖北地区奶牛乳房炎病原菌的分离鉴定与耐药性分析 [J]. 中国奶牛, 2007 (7): 35-38.
- [3] 李建平, 周海健, 袁林, 等. 奶牛乳房炎金黄色葡萄球菌脉冲场凝胶电泳分型研究 [J]. 中国预防兽医学报, 2009 (9): 684-687.
- [4] 原薇薇, 杨杰, 王冬梅, 等. 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 PBP2a 相互作用蛋白的筛选 [J]. 第三军医大学学报, 2010, 32 (8): 749-753.
- [5] YOU Y O, CHOI N Y, KANGS Y, et al. Antibacterial activity of rhus javanica against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2013, 2013: 549207.
- [6] GUPTA S, MISHRA K P, GANJU L. Broad-spectrum antiviral properties of andrographolide [J]. Arch Virol, 2017, 162 (3): 611-623.
- [7] DAI G F, ZHAO J, JIANG Z W, et al. Anti-inflammatory effect of novel andrographolide derivatives through inhibition of NO and PGE₂ production [J]. Int Immunopharmacology, 2011, 11 (12): 2144-2149.
- [8] 张璐璐, 包梅, 杨伟峰, 等. 穿心莲内酯联合头孢西丁对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的协同抑制作用 [J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2020 (7): 2556-2562.
- [9] SELVARAJ A, JAYASREE T, VALLAMMAI A, et al. Myrtenol attenuates MRSA biofilm and virulence by suppressing SarA expression dynamism [J]. Front Microbiol, 2019, 10: 2027.
- [10] BIASINI M, BIENERT S, WATERHOUSE A, et al. SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information [J]. Nucleic Acids Res, 2014, 42 (Web Server issue): W252-W258.
- [11] TEMML V, KASERER T, KUTIL Z, et al. Pharmacophore modeling for cox-1 and -2 inhibitors with ligand scout in comparison to discovery studio [J]. Future Med Chem, 2014, 6 (17): 1869-1881.
- [12] BARRERA E, MACHADO M R, PANTANO S. Fat SIRAH: coarse-grained phospholipids to explore membrane-protein dynamics [J]. J Chem Theory Comput, 2019, 15 (10): 5674-5688.
- [13] HARDERE, DAMM W, MAPLE J, et al. OPLS3: a force field providing broad coverage of drug-like small molecules and proteins [J]. J Chem Theory Comput, 2016, 12 (1): 281-296.
- [14] PAPAVALSILEIOUK D, PERISTERAS L D, BICK A, et al. Molecular dynamics simulation of pure n-alkanes and their mixtures at elevated temperatures using atomistic and coarse-grained force fields [J]. J Phys Chem B, 2019, 123 (29): 6229-6243.
- [15] LAGADERE L, LIPPARINI F, POLACK E, et al. Scalable evaluation of polarization energy and associated forces in polarizable molecular dynamics; II. towards massively parallel computations using smooth particle mesh ewald [J]. J Chem Theory Comput, 2014, 10 (4): 1638-1651.
- [16] PADARYIA M, KALATHYIYA U, BAGINSKI M. Structural and dynamic changes adopted by EmrE, multidrug transporter protein; studies by molecular dynamics simulation [J]. Biochim Biophys Acta, 2015, 1848 (10 Pt A): 2065-2074.
- [17] RANI N, VIJAYAKUMAR S, THANGA V L, et al. Quercetin 3-o-rutinoside mediated inhibition of PBP2a: computational and experimental evidence to its anti-MRSA activity [J]. Mol Biosyst, 2014, 10 (12): 3229-3237.
- [18] PINHO M G, DE LENCASTRE H, TOMASZ A. An acquired and a native penicillin-binding protein cooperate in building the cell wall of drug-resistant staphylococci [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001, 98 (19): 10886-10891.
- [19] KATAYAMA Y, ZHANG H Z, CHAMBERSH F. Effect of disruption of *Staphylococcus aureus* PBP4 gene on resistance to beta-lactam antibiotics [J]. Microb Drug Resist, 2003, 9 (4): 329-336.
- [20] ZHANG L, WEN B, BAO M, et al. Andrographolide sulfonate is a promising treatment to combat methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and its biofilms [J]. Front Pharmacol, 2021, 12: 720685.
- [21] SANTOS L, FERREIRA R S, CAFFARENA E R. Integrating molecular docking and molecular dynamics simulations [J]. Methods Mol Biol, 2019, 2053: 13-34.
- [22] CHEN D, OEZGUEN N, URVILP, et al. Regulation of protein-ligand binding affinity by hydrogen bond pairing [J]. Sci Adv, 2016, 2 (3): e1501240.
- [23] DALAL V, GOLEMI-KOTRA D, KUMAR P. Quantum mechanics/molecular mechanics studies on the catalytic mechanism of a novel esterase (FmtA) of *Staphylococcus aureus* [J]. J Chem Inf Model, 2022, 62 (10): 2409-2420.
- [24] RATHI R, KUMARI R, PATHAKS R, et al. Promising antibacterial for LLM of *Staphylococcus aureus* using virtual screening, molecular docking, dynamics, and MMPBSA [J]. J Biomolecular Struct Dyn, 2023, 41 (15): 7277-7289.