

金属抗菌肽SIF₄对大肠杆菌拓扑异构酶活性及胞内核酸合成的影响

李玉珍¹, 肖怀秋^{1*}, 周慧恒¹, 李 篮¹, 匡 燕¹, 刘 淼¹, 赵谋明²

(1. 湖南化工职业技术学院制药与生物工程学院, 湖南 株洲 412000;

2. 华南理工大学食品科学与工程学院, 广东 广州 510000)

摘要: 为系统阐明金属抗菌肽SIF₄基于DNA拓扑异构酶靶点的非细胞质膜抑菌机理, 以大肠杆菌为模式菌株, 研究了金属抗菌肽SIF₄与基因组DNA的结合方式、对DNA拓扑异构酶I/II活性以及胞内核酸生物合成的影响机理。研究发现, 金属抗菌肽SIF₄可能以类似溴化乙锭嵌插方式与基因组DNA结合, 对拓扑异构酶I有较强抑制活性, 但对拓扑异构酶II影响较小, 可通过影响DNA负超螺旋解链和RNA聚合酶结合催化RNA转录过程发挥抑菌活性。研究还发现, 经金属抗菌肽SIF₄处理12 h后, 大肠杆菌胞内总DNA和总RNA生物合成量均受到不同程度的抑制, 且呈现良好的量-效关系, 1/2最小抑菌浓度 (minimal inhibitory concentration, MIC) 组与对照组 (0 MIC) 相比, 胞内DNA和RNA生物量差异不显著 ($P > 0.05$), MIC和2 MIC组与对照组相比, 胞内DNA和RNA生物量差异显著 ($P < 0.05$)。实验结果可为金抗肽SIF₄在食源性大肠杆菌生物防控中的应用提供理论支持。

关键词: 金属抗菌肽; 大肠杆菌; 拓扑异构酶; 核酸; 抗菌剂

Effect of Metal-Binding Antimicrobial Peptide SIF₄ on Topoisomerases Activity and Intracellular Nucleic Acid Biosynthesis in *Escherichia coli*

LI Yuzhen¹, XIAO Huaiqiu^{1*}, ZHOU Huiheng¹, LI Lan¹, KUANG Yan¹, LIU Miao¹, ZHAO Mouming²

(1. School of Pharmaceutical and Bioengineering, Hunan Chemical Vocational Technology College, Zhuzhou 412000, China;

2. School of Food Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510000, China)

Abstract: To systematically elucidate how metal-binding antimicrobial peptide SIF₄ exerts its antimicrobial activity by targeting DNA topoisomerase without destroying the cytoplasmic membrane, *Escherichia coli* was used as a model strain to investigate the binding mode of SIF₄ with its genomic DNA and the impact of SIF₄ on DNA topoisomerase I and II activities and intracellular nucleic acid biosynthesis. Results showed that SIF₄ could bind to genomic DNA in a manner similar to ethidium bromide (EB) intercalation with strong inhibitory effect on topoisomerase I but weak effect on topoisomerase II, and catalyzed RNA transcription to exert antimicrobial activity by interfering with the unwinding of negative DNA supercoils and RNA polymerase binding. It was also found that the biosynthesis of intracellular DNA and RNA was inhibited to different degrees after 12 h treatment with SIF₄, which exhibited a good dose-effect relationship. There was no significant difference in the amounts of intracellular DNA and RNA between the 1/2 minimum inhibitory concentration (MIC) group and the control group ($P > 0.05$), but there was a significant difference between the MIC and 2 MIC groups and the control group ($P < 0.05$). Our results may provide theoretical support for the application of SIF₄ in the biocontrol of foodborne *E. coli*.

Keywords: metal-binding antimicrobial peptide; *Escherichia coli*; topoisomerase; nucleic acid; antimicrobial agent

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20230422-214

中图分类号: TS201.3; TS201.6

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2024) 02-0149-06

收稿日期: 2023-04-22

基金项目: 湖南省自然科学基金科教联合基金项目 (2022JJ60046)

第一作者简介: 李玉珍 (1981—) (ORCID: 0000-0002-6696-4422), 女, 副教授, 硕士, 研究方向为食源性致病微生物生物控制。E-mail: yuzhenli@163.com

*通信作者简介: 肖怀秋 (1981—) (ORCID: 0000-0002-0509-0848), 男, 教授, 硕士, 研究方向为食品抗菌与保鲜。E-mail: xiaohuaiqiu@163.com

引文格式:

李玉珍, 肖怀秋, 周慧恒, 等. 金属抗菌肽SIF₄对大肠杆菌拓扑异构酶活性及胞内核酸合成的影响[J]. 食品科学, 2024, 45(2): 149-154. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20230422-214. <http://www.spkx.net.cn>

LI Yuzhen, XIAO Huaiqiu, ZHOU Huiheng, et al. Effect of metal-binding antimicrobial peptide SIF₄ on topoisomerases activity and intracellular nucleic acid biosynthesis in *Escherichia coli*[J]. Food Science, 2024, 45(2): 149-154. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-20230422-214. <http://www.spkx.net.cn>

大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 是引起食品公共安全事故与食物中毒的重要致病菌, 已成为当前食品公共卫生主要威胁之一^[1], 特别是多重交叉耐药菌株的出现使食源性致病菌防控变得复杂。姜晓冰等^[2]分析河南新乡超市和农贸市场鲜肉来源的*E. coli*质粒介导喹诺酮耐药基因 (*PMQR*) 分布及耐药决定区靶基因 (*QRDR*) 突变情况发现, *PMQR*基因阳性菌株检出率高达7.8%, *QRDR*靶位突变普遍存在; 徐旭等^[3]采集陕西宝鸡地区冷冻食品样本360份, *E. coli*检出率为13.6%, 毒力基因以肠外致病性相关基因*FyuA*和*iss*检出率最高, 部分菌株对13种抗生素耐药; 杨承霖等^[4]对从四川不同养殖场患病动物样本分离的444株*E. coli*分析发现, 鸡源和猪源样本超广谱β-内酰胺酶菌株检出率分别为42.2%和12.8%, 耐药基因以*bla*_{TEM-1}、*bla*_{TEM-52}、*bla*_{CTX-M-55}、*bla*_{CTX-M-65}和*bla*_{CTX-M-14}为主要流行亚型并以水平传播为主。

拓扑异构酶是所有细菌DNA复制转录、染色体分离、基因表达调控及细胞分裂等过程的关键代谢调控酶, 且结构相对保守, 人基因组没有编码该基因, 已成为当前抗菌药物研究重要且理想的新效应靶点^[5-6], 分为I和II两个亚型^[7]。I型拓扑异构酶最早在*E. coli*中被发现, 最初称为ω蛋白, 由*topA*基因编码, 分为N端催化片段 (67 kDa) 和C端锌指结构域 (30 kDa), 对负超螺旋DNA解链是必需的^[8]。II型拓扑异构酶含GyrA (105 kDa) 和GyrB (95 kDa) 两个亚基, GyrA亚基与DNA链断裂和重连有关, 参与DNA结合、裂解和连接反应, GyrB亚基有合成ATP功能, 为GyrA亚基参与的DNA切割/连接反应供能^[9]。氟喹诺酮类抗生素和氨基香豆素可分别靶向作用于GyrA亚基和GyrB亚基发挥抗菌效应^[10-11]。山苍子精油对拓扑异构酶I和II有抑制作用且呈良好量效正相关^[12], 喜树碱可靶向拓扑异构酶I从而阻断胞内核酸合成, 香豆霉素可靶向拓扑异构酶并干扰酶DNA复合物形成^[13], 三唑邻苯二甲酸衍生物可抑制拓扑异构酶II活性并能嵌入DNA与拓扑异构酶形成复合物^[14]; Polydatin仅对拓扑异构酶II有抑制作用, 可优先与DNA轻微凹槽结合^[15]。课题组研究发现, 金属抗菌肽 (简称金抗肽) SIF₄对*E. coli*有较好抑制活性, 可破坏菌体细胞质膜结构并诱导胞内物质泄漏和造成细胞聚沉^[16], 也可调控糖酵解途径和影响呼吸代谢等发挥非细胞质膜靶向抑菌活性^[17-18], 但对拓扑异构酶和胞内核酸生物合成的影响尚不明确。为阐明基于胞内拓扑异构酶

效应靶点的非细胞质膜抑菌机理, 实验研究金抗肽SIF₄对拓扑异构酶I/II以及胞内核酸合成的影响, 以期金抗肽SIF₄在食源性*E. coli*的生物防控中提供理论支持。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

金抗肽SIF₄为课题组制备, 对*E. coli*最小抑菌浓度 (minimal inhibitory concentration, MIC) 为0.4 mg/L^[16]; *E. coli* ATCC25922 上海保藏生物技术中心; ATP、pBR322DNA、蛋白酶K、溶菌酶、RNase、溴化乙锭 (ethidium bromide, EB) 生工生物工程 (上海) 股份有限公司; 牛肉膏、蛋白胨、NaCl 国药集团化学试剂有限公司; 其他试剂为国产分析纯。

1.2 仪器与设备

UV-2550紫外分光光度计 日本岛津公司; H1850R高速冷冻离心机 湖南湘仪实验室仪器开发有限公司; Infinite F200 pro多功能酶标仪 瑞士帝肯公司; DanoDrop超微量分光光度计 美国赛默飞世尔科技公司; YXQ-LS-70A立式高压灭菌锅 上海博迅医疗生物仪器股份有限公司; 琼脂糖凝胶电泳装置 北京六一生物科技有限公司。

1.3 方法

1.3.1 基因组DNA的提取

将菌体接种至LB培养基, 37 °C、120 r/min培养过夜。取10 mL菌液5 000 r/min离心10 min, 磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS) 洗涤菌体2次, 5 000 r/min离心10 min, 菌体沉淀重悬于4 mL TE缓冲液, 加入8 μL溶菌酶 (50 mg/mL) 37 °C温育30 min; 加入10 μL RNAase (10 mg/mL) 和0.5 mL十二烷基硫酸钠 (sodium dodecyl sulfate, SDS) (10 g/100 mL) 溶液, 37 °C温育30 min; 加入10 μL蛋白酶K (20 mg/mL), 37 °C温育90 min, 加入等体积苯酚-氯仿-异戊醇 (25:24:1, V/V) 混匀, 8 000 r/min离心5 min。上清液转入离心管, 加入1.8 mL乙酸钠 (3 mol/L)、18 mL冰无水乙醇, 12 000 r/min离心2 min, 重复抽提2次, 沉淀即基因组DNA。沉淀用70%乙醇溶液洗涤一次, 室温干燥。加入0.5 mL TE缓冲液溶解并测定OD_{260 nm}和OD_{280 nm}, -20 °C保藏备用^[19]。

1.3.2 金抗肽SIF₄对基因组DNA的影响

将基因组DNA溶于TE缓冲液,加入金抗肽SIF₄使终质量浓度分别为1/2 MIC、MIC和2 MIC,以不加SIF₄为对照组,混匀后室温放置60 min。取混合液9 μL与1 μL 10×上样缓冲液混匀,用0.8%琼脂糖凝胶(EB, 5 μg/L)电泳检测(100 V, 30 min)DNA迁移情况,初步判定SIF₄与基因组DNA结合方式^[20]。

1.3.3 金抗肽SIF₄对DNA拓扑异构酶的影响

对数生长期菌液于6 000 r/min离心10 min,菌体沉淀用PBS清洗3次,于TMN溶液(NaCl 0.295 g、MgCl₂ 0.072 5 g,溶于1.0 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5),并定容至200 mL)中洗涤1次,4℃、6 000 r/min离心15 min,沉淀重悬于1 mL粗酶提取缓冲液中,冰浴30 min。超声破碎菌体(750 W, 5 s,间隔30 s,循环10次),破碎液于4℃、12 000 r/min离心15 min,上清液为粗酶提取液(含拓扑异构酶I和II),4℃冰箱保存备用。1)拓扑异构酶I活性测定:在含0.50 μg pBR322 DNA的离心管中加入2.5 μL拓扑异构酶解旋缓冲液I,用三蒸水定容至20 μL,37℃温育30 min,加入2 μL SDS(10%)及1 μL蛋白酶K(10 mg/mL)终止反应,37℃孵育30 min,取8 μL样品加入2 μL 5×上样缓冲液于1%琼脂糖凝胶电泳,EB染色观察;2)拓扑异构酶II活性测定:在含0.50 μg pBR322 DNA的离心管中加入2.5 μL拓扑异构酶解旋缓冲液II,用三蒸水定容至20 μL,37℃孵育30 min,加入2 μL SDS(10%)和1 μL蛋白酶K(10 mg/mL)终止反应,37℃孵育30 min,取8 μL样品加入2 μL 5×上样缓冲液于1%琼脂糖凝胶中电泳,染色后观察;3)SIF₄对拓扑异构酶I和II活性影响的测定:拓扑异构酶I反应体系为0.5 μg pBR322 DNA、2.5 μL DNA解旋缓冲液I、2.5 μL粗酶提取液(拓扑异构酶I活性约1.0 U),三蒸水定容至20 μL;拓扑异构酶II反应体系为0.5 μg pBR322 DNA、2.5 μL DNA解旋缓冲液II、2.5 μL粗酶提取液(拓扑异构酶II活性约1.0 U)、4 mmol/L ATP,三蒸水定容至20 μL,电泳后染色观察。

1.3.4 金抗肽SIF₄对胞内DNA和RNA生物合成的影响

将菌种接种至LB液体培养基中,加入金抗肽SIF₄至终质量浓度分别为1/2 MIC、MIC和2 MIC,以未添加SIF₄为对照组,37℃、120 r/min恒温振荡培养12 h。1)总DNA提取:取菌液3 mL于5 000 r/min离心10 min, PBS洗涤3次,菌体沉淀重悬于567 μL TE缓冲液(含10 g/L溶菌酶),室温处理5 min;加入30 μL SDS(100 g/L)和3 μL蛋白酶K(20 mg/mL),37℃温育60 min,加入100 μL NaCl(5 mol/L),再加入80 μL十六烷基三甲基溴化铵(cetyl trimethyl ammonium bromide, CTAB)溶液(50 g/L CTAB、0.5 mol/L NaCl),65℃温育10 min。加入等体积苯酚-氯仿-异戊醇(25:24:1, V/V)

抽提,加入60%体积异戊醇混匀并沉淀DNA,用70%乙醇溶液洗沉淀2次后用TE溶解沉淀,4℃备用或-20℃保存^[21]。用酶标仪测定样本230、260 nm和280 nm波长处吸光度。2)总RNA提取:取菌液3 mL于5 000 r/min离心10 min, PBS洗涤3次,将菌体沉淀重悬于200 μL TE缓冲液(含10 g/L溶菌酶),室温处理5 min。加入1 mL TRIzol试剂并反复抽吸,4℃、12 000 r/min离心10 min,转移上清液至离心管中,室温静置5 min,加入1/5体积的氯仿用力振摇15 s,室温静置2~3 min。4℃、12 000 r/min离心15 min,转水相至新离心管并加入等体积异丙醇,上下轻轻颠倒混匀,室温静置10 min;4℃、12 000 r/min离心10 min,弃上清液,加入1 mL 75%预冷乙醇溶液(DEPC水配制),混匀,4℃、7 500 r/min离心5 min,弃上清液,室温倒置于纸巾上5~10 min使乙醇挥发,用30~50 μL RNase-free水重溶,55~60℃温育10 min,加入1 μL RNA酶抑制剂后于4℃备用或-20℃保存备用^[22]。

1.3.5 胞内总DNA和总RNA含量的测定

根据Lambert-Beer定律可知, $A = \varepsilon cp$,因此, $c = 1/\varepsilon p \times A$,式中, c 为样本浓度, A 为样本吸光度, ε 为样本中物质的摩尔消光系数, p 为光程/cm。令 $1/\varepsilon p$ 为系数 f (ng·cm/μL),则 $c = f \times A$ 。对于Nanodrop, dsDNA的系数 $f = 50$ ng·cm/μL, ssDNA的系数 $f = 33$ ng·cm/μL, RNA的系数 $f = 40$ ng·cm/μL^[23]。核酸最大吸收峰为260 nm,上式中 A 为260 nm波长处吸光度,根据吸光度 $A_{260\text{ nm}}$ 和 f 可计算出样本中总DNA和总RNA含量。

1.4 数据统计分析

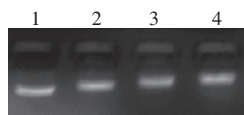
实验结果均表示为 $\bar{x} \pm s$ ($n=3$),用SPSS Statistic 25软件进行平均值差异多重比较,采用LSD法进行事后多重比较。 $P < 0.05$,差异显著且具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 SIF₄对基因组DNA的影响

小分子物质与基因组DNA结合后会使得DNA在琼脂糖凝胶上的迁移率出现不同程度的滞后。SIF₄与基因组DNA结合凝胶阻滞电泳结果如图1所示。可以看出,对照组与实验组DNA电泳图谱均呈现单一条带,无明显弥散现象,各条带明暗无显著差异,说明SIF₄与基因组DNA结合后并未破坏基因组DNA结构完整性,与brevilaterin作用一致^[24],但与 ε -聚赖氨酸作用机制不同, ε -聚赖氨酸与基因组DNA结合后可破坏其双螺旋结构^[25];研究还发现,SIF₄与基因组DNA结合后,出现明显阻滞现象,阻

滞程度与金抗肽SIF₄质量浓度呈正相关, 2 MIC组的基因组DNA样本在琼脂糖凝胶上迁移距离最短, 其次为MIC组, 1/2 MIC组迁移距离最长, 推测抗菌肽SIF₄可与基因组DNA以类似EB嵌插方式强力结合并影响基因组DNA在琼脂糖凝胶中的迁移速率^[26]。



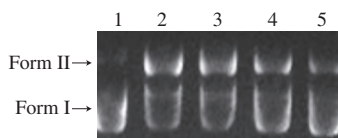
1.基因组DNA; 2.基因组DNA+1/2 MIC SIF₄; 3.基因组DNA+MIC SIF₄; 4.基因组DNA+2 MIC SIF₄。

图1 SIF₄与基因组DNA结合凝胶阻滞图

Fig. 1 Gel retardation analysis of SIF₄ binding to genomic DNA

2.2 SIF₄对DNA拓扑异构酶I的影响

拓扑异构酶I是细菌胞内广泛存在的非ATP依赖型酶, 催化DNA单链断裂和重连, 主要参与DNA超螺旋解旋及复制、转录和重组等反应。超螺旋状态 (Form I) 是pBR322 DNA主要存在形式, 在拓扑异构酶的催化作用下可解旋形成线性或缺口形式 (Form II)。分析金抗肽SIF₄处理后pBR322 DNA状态的变化可解析SIF₄对拓扑异构酶I活性的影响 (图2)。



1. pBR322 DNA; 2. pBR322 DNA+拓扑异构酶; 3. pBR322 DNA+拓扑异构酶+1/2 MIC SIF₄; 4. pBR322 DNA+拓扑异构酶+MIC SIF₄; 5. pBR322 DNA+拓扑异构酶+2 MIC SIF₄。

图2 SIF₄对拓扑异构酶I结构的影响

Fig. 2 Effect of SIF₄ on topoisomerase I structure

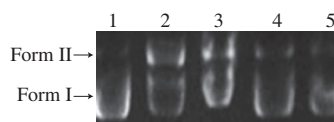
由图2可以看出, 对于拓扑异构酶I, 空白对照组pBR322 DNA主要以Form I形式存在, 电泳条带明亮。金抗肽SIF₄处理后, 实验组在拓扑异构酶I作用下, Form II条带变亮, Form I条带变暗, 说明pBR322 DNA在拓扑异构酶I作用下, DNA存在形式发生了显著变化, 拓扑异构酶I将超螺旋Form I形式解链成线性或缺口的Form II形式^[27]。由图2还可以看出, 1/2 MIC、MIC和2 MIC组的pBR322 DNA解旋作用被不同程度抑制, 与阴性对照组相比, Form I增多, Form II减少, 1/2 MIC、MIC和2 MIC组的Form II条带渐暗, 表明金抗肽SIF₄可抑制拓扑异构酶I活性。

2.3 SIF₄对DNA拓扑异构酶II的影响

拓扑异构酶II可断裂DNA双链并重连, 是一种ATP依赖性酶, 主要介导DNA解旋、断裂和重排^[28]。分析SIF₄

处理后pBR322 DNA存在形式的变化可解析其对拓扑异构酶II的影响。

由图3可以看出, 对拓扑异构酶II来说, 空白对照组Form I条件较亮, 实验组中Form II条带比Form I条带明亮, 说明pBR322 DNA存在形式发生改变, 超螺旋的Form I形式解链成了线性或缺口的Form II形式。由图3可以看出, 在1/2 MIC、MIC和2 MIC组别中, Form I条带相对较亮, 而Form II条带较暗, 说明pBR322 DNA仍以超螺旋的Form I形式为主, 线性或缺口的Form II形式较少, 据此可推断金抗肽SIF₄对拓扑异构酶II抑制作用相对较弱, 主要抑制拓扑异构酶I的活性, 借此影响DNA单链断裂和重连, 影响超螺旋解链, 从而调控DNA复制、RNA转录以及蛋白质翻译等生物过程^[29]。



1. pBR322 DNA; 2. pBR322 DNA+拓扑异构酶; 3. pBR322 DNA+拓扑异构酶+1/2 MIC SIF₄; 4. pBR322 DNA+拓扑异构酶+MIC SIF₄; 5. pBR322 DNA+拓扑异构酶+2 MIC SIF₄。

图3 SIF₄对DNA拓扑异构酶II结构的影响

Fig. 3 Effect of SIF₄ on DNA topoisomerase II structure

2.4 SIF₄对胞内总DNA和总RNA生物合成的影响

质量较好的基因组DNA其OD_{260 nm}/OD_{280 nm}比值范围为1.6~1.8, 小于1.6可能受蛋白质污染, 大于1.8可能含RNA, 通常情况下, OD_{260 nm}/OD_{230 nm}应大于2, 若比值小于1.8, 可能含有胍盐等污染物^[30]。RNA样本OD_{260 nm}/OD_{280 nm}比值范围一般为1.9~2.1, 小于1.9可能有蛋白质残留, 大于2.1时RNA可能发生降解, 若OD_{260 nm}/OD_{230 nm}比值小于2.0, 可能残留异硫氰酸胍和β-巯基乙醇等试剂^[22]。实验数据表明, 抽提的各实验组DNA样本, 其OD_{260 nm}/OD_{280 nm}比值范围在1.95~1.97, OD_{260 nm}/OD_{230 nm}比值均大于2, RNA样本OD_{260 nm}/OD_{280 nm}和OD_{260 nm}/OD_{230 nm}均大于2.0, 说明抽提的DNA和RNA样本质量较好。经金抗肽SIF₄处理12 h后, *E. coli*各实验组样本总DNA和总RNA含量如图4所示。

由图4A可以看出, 1/2 MIC组与对照组相比, 胞内总DNA含量无显著差异 ($P>0.05$), MIC组和2 MIC组间总DNA含量有显著差异 ($P<0.05$), 且与对照组相比, 胞内总DNA含量均显著降低 ($P<0.05$), 表明经1/2 MIC金抗肽SIF₄处理12 h后, 胞内总DNA合成量并没有显著降低, 但经MIC和2 MIC金抗肽SIF₄处理后, 胞内DNA合成受到明显抑制, 与金抗肽SIF₄对拓扑异构酶作用趋势一致。由图4B可以看出, 1/2 MIC组与对照组胞内RNA含量也无显著差异 ($P>0.05$), 而相比对照组,

MIC组和2 MIC组胞内RNA含量显著降低 ($P < 0.05$)，且MIC组和2 MIC组组间也存在显著差异 ($P < 0.05$)，由此可说明，金抗肽SIF₄对*E. coli*胞内总DNA和总RNA合成的抑制效应与处理剂量存在正相关关系，与拓扑异构酶活性抑制规律基本一致。

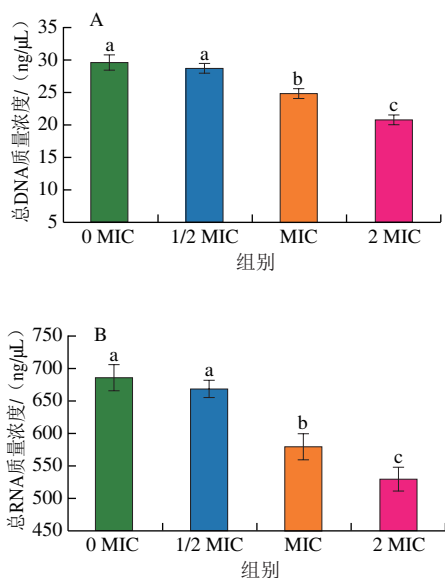


图4 SIF₄对总DNA (A) 和总RNA (B) 的影响
Fig. 4 Effect of SIF₄ on total DNA (A) and RNA (B)

3 讨论与结论

DNA拓扑异构酶主要通过改变DNA的拓扑结构影响基因复制、表达和调控。拓扑异构酶I近似球形，直径约65 Å，由4个结构域组成，酶促活性位点包埋于结构域I和III之间（图5）。N端67 kDa多肽片段是原核生物几乎所有该类型酶的同源保守序列，可作为抗菌药物效应靶点^[30]，C端锌指结构域可结合铁，结合后表现为拓扑活性减弱或丧失^[31]。

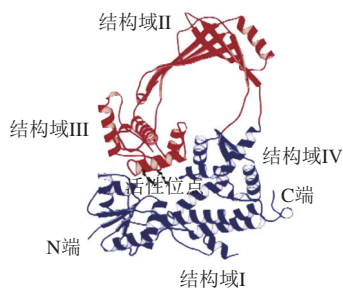


图5 *E. coli*拓扑异构酶I的结构
Fig. 5 Topoisomerase I structure from *E. coli*

金抗肽SIF₄结合锌指结构域后，拓扑异构酶I活性降低可能与亚铁与锌指结构域结合而影响其拓扑活性并影响胞内铁参与的氧化还原系统有关^[32-33]。拓扑异构酶

I是一个含有3个锌指结构域的经典蛋白，结构中第1个和第2个锌是维持拓扑异构酶I空间构象和拓扑活性必需的，第3个锌指结构常不参与铁结合，对拓扑异构酶活性影响有限^[34]，拓扑异构酶I活性与结合金属类别无关，而与结合金属数目有关^[34]。II型拓扑异构酶含GyrA和GyrB两个亚基，亚基间以异四聚体 (A₂B₂) 形式结合，GyrA亚基包含N末端断裂-重聚结构域和羧基末端结构域 (CTD)，GyrB亚基包含ATP酶结构域和Toprim结构域（图6），其结构中内源依赖DNA的ATP酶是解旋供能主要来源^[35]。

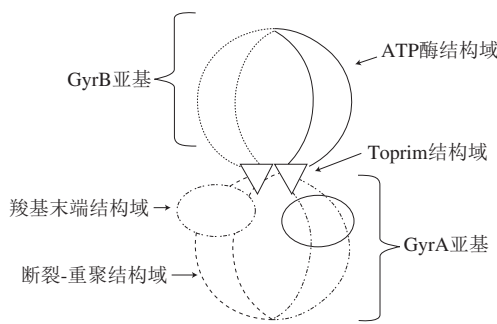


图6 *E. coli*拓扑异构酶II结构
Fig. 6 Topoisomerase II structure from *E. coli*

拓扑异构酶II抑制剂可通过嵌入方式插入到断裂的DNA链，形成抑制剂-DNA-拓扑异构酶稳定复合物，从而阻碍DNA重连并阻止拓扑结构改变，使胞内积累大量断裂DNA并激发SOS-DNA修复反应，若修复无法完成则诱导菌体细胞进入程序性死亡^[36]。研究发现，金抗肽SIF₄对拓扑异构酶II活性抑制较弱，主要通过抑制拓扑异构酶I活性影响DNA解链等发挥抑菌活性，类似茚异喹啉作用机制^[37]，相异于Polydatin^[15]作用机制，Polydatin仅对拓扑异构酶II有抑制作用。凝胶阻滞结果表明，金抗肽SIF₄可与基因组DNA以嵌插方式强力结合。课题组认为，金抗肽SIF₄可能与DNA-拓扑异构酶II二元复合物发生结合并形成拓扑异构酶I-DNA-SIF₄三元复合物，该复合物积累会阻止拓扑异构酶I对DNA链的解链、断裂DNA重连及DNA切口修复等产生不同程度的影响。前期研究发现，SIF₄处理后，*E. coli*内源ROS得到不同程度增强，可能与断裂DNA未能得到及时修复和断裂DNA累积有关^[17]。研究还发现，经金抗肽SIF₄处理后，胞内总DNA和总RNA生物合成均受到不同程度抑制，抑制效果与处理剂量呈正相关，胞内核酸合成生物量变化趋势与拓扑异构酶受抑制变化基本同步，可能是由于金抗肽SIF₄抑制了DNA拓扑异构酶I活性，对DNA的解链和拓扑异构结构改变产生了影响，DNA复制、RNA转录和蛋白质翻译等下游生物活动受到影响，从而表现抑制*E. coli*增殖的效果^[38]。下一步拟将通过分子对接手段研究金抗肽SIF₄与DNA拓扑异构酶I的对接靶点，以进一步阐明金抗肽SIF₄与DNA拓扑异构酶的互作机制^[39]。

参考文献:

- [1] WITSHENSHAW S M, SMITH R P, DAVIES R, et al. A systematized review and qualitative synthesis of potential risk factors associated with the occurrence of non-O157 *Shiga* toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in the primary production of cattle[J]. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2022, 21(3): 2363-2390. DOI:10.1111/1541-4337.12929.
- [2] 姜晓冰, 张家洋, 王艳博, 等. 动物性食品源大肠杆菌质粒介导喹诺酮的耐药机制研究[J]. *现代食品科技*, 2016, 32(1): 58-64. DOI:10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.1.009.
- [3] 徐旭, 杨静, 张鹏飞, 等. 陕西省典型冷冻食品中大肠杆菌的分子特征及耐药性检测[J]. *食品科学*, 2022, 43(14): 280-288. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20210915-186.
- [4] 杨承霖, 舒刚, 赵小玲, 等. 2010-2016年四川省食品动物源大肠杆菌的耐药性研究[J]. *西北农林科技大学学报(自然科学版)*, 2020, 48(9): 24-30; 36. DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2020.09.004.
- [5] TSE-DINH Y C. Targeting bacterial topoisomerase I to meet the challenge of finding new antibiotics[J]. *Future Medicinal Chemistry*, 2015, 7(4): 459-471. DOI:10.4155/FMC.14.157.
- [6] ORRITT K M, FENG L, NEWELL J F, et al. *De novo* design of type II topoisomerase inhibitors as potential antimicrobial agents targeting a novel binding region[J]. *RSC Medicinal Chemistry*, 2022, 13(7): 831-839. DOI:10.1039/D2MD00049K.
- [7] CHAMPOUX J J. DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism[J]. *Annual Review of Biochemistry*, 2001, 70: 369-413. DOI:10.1146/annurev.biochem.70.1.369.
- [8] AHUMADA A, TSE-DINH Y C. The role of the Zn(II) binding domain in the mechanism of *E. coli* DNA topoisomerase I[J]. *BMC Biochemistry*, 2002, 3: 13. DOI:10.1186/1471-2091-3-13.
- [9] BAX B D, GARIB M, ANTHONY M, et al. DNA topoisomerase inhibitors: trapping a DNA-cleaving machine in motion[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2019, 431(18): 3427-3449. DOI:10.1016/j.jmb.2019.07.008.
- [10] SINGH P K, SINGH U, JAIN A. Emergence of specific *gyrA* mutations associated high-level fluoroquinolone-resistant *Mycobacterium tuberculosis* among multidrug-resistant tuberculosis cases in north India[J]. *Microbial Drug Resistance*, 2021, 27(5): 647-651. DOI:10.1089/mdr.2020.0240.
- [11] THANI A B. Detection of novel *GyrB* mutations associated with *Escherichia coli* clinical isolates[J]. *Journal of Biomimetics, Biomaterials and Biomedical Engineering*, 2018, 35: 88-95. DOI:10.4028/www.scientific.net/JBBBE.35.88.
- [12] HU W, LI C Z, DAI J M, et al. Antibacterial activity and mechanism of *Litsea cubeba* essential oil against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)[J]. *Industrial Crops and Products*, 2019, 130: 34-41. DOI:10.1016/j.indcrop.2018.12.078.
- [13] SEKIGUCHI J, STIVERS J T, MILDVAN A S, et al. Mechanism of inhibition of vaccinia DNA topoisomerase by novobiocin and coumermycin[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1996, 271(4): 2313-2322. DOI:10.1074/jbc.271.4.2313.
- [14] SAKR H, AYYAD R E R, EL-HELBY A A, et al. Discovery of novel triazolophthalazine derivatives as DNA intercalators and topoisomerase II inhibitors[J]. *Archiv der Pharmazie*, 2021, 354: e2000456. DOI:10.1002/ardp.202000456.
- [15] ŞÖHRETOĞLU D, BARUT B, SARI S, et al. *In vitro* and *in silico* investigation of DNA interaction, topoisomerase I and II inhibitory properties of polydatin[J]. *Chemistry Biodiversity*, 2022, 19: e202200352. DOI:10.1002/cbdv.202200352.
- [16] 肖怀秋, 李玉珍, 林亲录, 等. 金属抗菌肽SIF₄对大肠杆菌的抑菌机制研究[J]. *食品与发酵工业*, 2022, 48(1): 111-116. DOI:10.13995/j.cnki.11-1802/ts.027742.
- [17] 李玉珍, 肖怀秋, 王琳, 等. 金抗肽SIF₄基于糖代谢途径和细胞质膜氧化损伤的大肠埃希菌抑菌机理[J]. *食品与发酵工业*, 2022, 48(20): 122-129. DOI:10.13995/j.cnki.11-1802/ts.032698.
- [18] 李玉珍, 肖怀秋, 刘森, 等. 金属抗菌肽SIF₄对大肠杆菌呼吸代谢与能量代谢的抑制机理[J]. *食品科学*, 2023, 44(17): 36-42. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20220801-008.
- [19] 李玉珍, 肖怀秋, 刘森, 等. 金属抗菌肽SIF₄基于胞内生物大分子靶点的大肠杆菌非膜损伤抑菌机理[J]. *食品科学*, 2023, 44(21): 62-68. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20221121-230.
- [20] SUSMITA B, MERYL L, SIVARAMAN J, et al. Model membrane interaction and DNA-binding of antimicrobial peptide Lasioglossin II derived from bee venom[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 2013, 430(1): 1-6. DOI:10.1016/j.bbrc.2012.11.015.
- [21] 宋宏新, 邹联柱, 马冬, 等. PCR检测牛乳中大肠杆菌基因组DNA的提取方法[J]. *食品科学*, 2010, 31(24): 308-310. DOI:CNKI:SUN:SPKX.0.2010-24-067.
- [22] 邹晓蕾, 刘礼崔, 罗立新. 细菌总RNA提取方法的比较[J]. *现代食品科技*, 2013, 29(8): 1948-1954. DOI:CNKI:SUN:GZSP.0.2013-08-038.
- [23] DESJARDINS P R, CONKLIN D S. *Microvolume quantitation of nucleic acids*[M]. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc. 2010. DOI:10.1002/0471142727.mba03js93.
- [24] 何俊杰, 宓博凯, 任朝华, 等. 两性物质对DNA电荷逆转及凝聚的影响[J]. *生物物理学报*, 2014, 30(4): 291-299. DOI:10.3724/SP.J.1260.2014.40003.
- [25] 周祺, 刘芳, 范晓然, 等. ϵ -聚赖氨酸对肠球菌的抑菌作用及机制[J]. *中国食品学报*, 2018, 18(1): 65-72. DOI:10.16429/j.1009-7848.2018.01.009.
- [26] NAFISI S, SABOURY A A, KERAMAT N, et al. Stability and structural features of DNA intercalation with ethidium bromide, acridine orange and methylene blue[J]. *Journal of Molecular Structure*, 2007, 827(1/2/3): 35-43. DOI:10.1016/j.molstruc.2006.05.004.
- [27] ZHANG Z F, YU J, CAO K, et al. Studies on the supercondensed pBR322 DNA isolated from *Escherichia coli* topA-mutant[J]. *Process in Biochemistry and Biophysics*, 2007, 34(3): 306-311. DOI:10.1088/0967-3334/28/3/R01.
- [28] KHAN T, SANKHE K, SUVARNA V, et al. DNA gyrase inhibitors: progress and synthesis of potent compounds as antibacterial agents[J]. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 2018, 103: 923-938. DOI:10.1016/j.biopha.2018.04.021.
- [29] RAPISARDA A, MELILLO G. UVC inhibits HIF-1 α protein translation by a DNA damage- and topoisomerase I-independent pathway[J]. *Oncogene*, 2017, 26: 6875-6884. DOI:10.1038/sj.onc.1210489.
- [30] 杨焕蝶, 杨金玉, 陈相艳, 等. 肠道集聚性大肠杆菌基因组脱氧核糖核酸提取方法比较与改进[J]. *济南大学学报(自然科学版)*, 2021, 35(2): 144-149. DOI:10.13349/j.cnki.jdxn.20201112.001.
- [31] ZHANG Z T, CHENG B K, TSE-DINH Y C. Crystal structure of a covalent intermediate in DNA cleavage and rejoining by *Escherichia coli* DNA topoisomerase I[J]. *PNAS*, 2011, 108(17): 6939-6944. DOI:10.1073/pnas.1100300108.
- [32] WANG W, SU X L, WANG X B, et al. Iron inhibits *Escherichia coli* topoisomerase I activity by targeting the first two zinc-binding sites in the C-terminal domain[J]. *Protein science*, 2014, 23(11): 1619-1628. DOI:10.1002/pro.2542.
- [33] 卢彬彬, 陈世良, 杨娟娟, 等. 氧化还原对铁结合的大肠杆菌拓扑异构酶I活性的调控[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2017, 33(4): 362-370. DOI:10.13865/j.cnki.cjmb.2017.04.08.
- [34] TSE-DINH Y C, BERAN-STEED R.K. *Escherichia coli* DNA topoisomerase I is a zinc metalloprotein with three repetitive zinc-binding domains[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1988, 263(31): 15857-15859. DOI:10.1016/S0021-9258(18)37526-4.
- [35] BROWN P O, PEEBLES C L, COZZARELLI N R. A topoisomerase from *Escherichia coli* related to DNA gyrase[J]. *PNAS*, 1979, 76(12): 6110-6114. DOI:10.1073/pnas.76.12.6110.
- [36] DWYER D J, KOHANSKI M A, HAYETE B, et al. Gyrase inhibitors induce an oxidative damage cellular death pathway in *Escherichia coli*[J]. *Molecular Systems Biology*, 2007, 3(1): 91-105. DOI:10.1038/msb4100135.
- [37] CUSHMAN M. Design and synthesis of indenoisoquinolines targeting topoisomerase I and other biological macromolecules for cancer chemotherapy[J]. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2021, 64(24): 17572-17600. DOI:10.1021/acs.jmedchem.1c01491.
- [38] RANI P, KALLADI S M, BANSIA H, et al. A type IA DNA/RNA topoisomerase with RNA hydrolysis activity participates in ribosomal RNA processing[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2020, 432(20): 5614-5631. DOI:10.1016/j.jmb.2020.08.012.
- [39] ARTHUR D E, UZAIRU A. Molecular docking study and structure-based design of novel camptothecin analogues used as topoisomerase I inhibitor[J]. *Journal of the Chinese Chemical Society*, 2018, 65(10): 1160-1178. DOI:10.1002/jccs.201700314.