

研究报告

大肠杆菌拓扑异构酶 I 结合重金属的特性及
功能影响王晓冰¹ 陈世良² 吴卉卉³ 黄招竹² 姜风英² 王伍^{2*} 杨娟娟^{2*}

(1. 温州医科大学附属第一医院风湿免疫科 浙江 温州 325000)

(2. 温州医科大学检验医学院 生命科学学院 浙江 温州 325000)

(3. 温州医科大学附属第一医院重症医学科 浙江 温州 325000)

摘要:【背景】大肠杆菌拓扑异构酶 I (*Escherichia coli* topoisomerase I, *E. coli* TopA) 在 DNA 复制、转录、重组和基因表达调控等过程发挥关键作用。研究表明 *E. coli* TopA 只有结合锌离子才具有活性, 然而 *E. coli* TopA 能否结合其他金属离子尤其是重金属离子, 以及结合其他金属后是否具有活性, 目前仍不清楚。【目的】探究大肠杆菌拓扑异构酶 I 是否结合环境中常见重金属离子, 研究重金属离子结合 *E. coli* TopA 蛋白后对其活性的影响。【方法】在分别添加有锌、钴、镍、镉、铁、汞、砷、铬、铅、铜离子的 M9 基础培养中表达、纯化出 *E. coli* TopA 蛋白, 并对纯化得到的蛋白用电感耦合等离子体质谱仪进行相应金属离子含量的测定; 利用表达 *E. coli* TopA 锌指结构的突变体蛋白鉴定重金属离子的结合位点; 通过体外超螺旋 DNA 松弛实验测定不同金属结合 *E. coli* TopA 的拓扑异构酶活性; 通过测定蛋白内源性荧光推测不同金属结合 *E. coli* TopA 的空间构象差异。【结果】*E. coli* TopA 在体内除了能结合锌和铁之外, 还能够结合钴、镍、镉 3 种离子, 但是不能结合汞、砷、铬、铅、铜离子。钴、镍、镉结合形式的 *E. coli* TopA, 每个蛋白分子最多可以结合 3 个相应的金属离子, 他们与 TopA 蛋白的结合位点也是位于 3 个锌指结构域, 而且每个锌指结构域结合 1 个金属离子。此外, *E. coli* TopA 结合钴、镍、镉离子后, 其 DNA 拓扑异构酶活性并未受到影响, 可能是由于钴、镍、镉离子结合形式的 *E. coli* TopA 蛋白, 其空间构象与锌结合形式相比并未发生显著变化。【结论】由于 DNA 拓扑异构酶在维持细胞正常生理功能中发挥关键作用, 研究表明 *E. coli* TopA 的功能不会受到常见重金属的干扰(不结合或者结合后活性无影响), 这也有可能是大肠杆菌在进化过程中

Foundation items: Natural Science Foundation of Zhejiang Province (LY13C050003); Special Research Fund for Non-profit Sector of Zhejiang Province (2016C33027); College Students in Zhejiang Province Science and Technology Innovation Activity Plan (Planted Talent Plan) (2016R413073); Starting Foundation for Advanced Talents of Wenzhou Medical University (QTJ15013)

*Corresponding authors: WANG Wu: Tel: 86-577-86699385; E-mail: wayne55555@163.com
YANG Juan-Juan: Tel: 86-577-86689717; E-mail: 2769689738@qq.com

Received: April 04, 2017; **Accepted:** June 02, 2017; **Published online** (www.cnki.net): June 26, 2017

基金项目: 浙江省自然科学基金(LY13C050003); 浙江省公益技术研究项目(2016C33027); 浙江省大学生科技创新活动计划(新苗人才计划)(2016R413073); 温州医科大学人才启动基金(QTJ15013)

*通信作者: 王伍: Tel: 86-577-86699385; E-mail: wayne55555@163.com

杨娟娟: Tel: 86-577-86689717; E-mail: 2769689738@qq.com

收稿日期: 2017-04-04; 接受日期: 2017-06-02; 网络首发日期(www.cnki.net): 2017-06-26

产生的对抗环境中重金属离子毒害作用的一种自我保护和耐受机制,具有重要的生理意义。

关键词: 大肠杆菌拓扑异构酶 I, 重金属结合, 拓扑异构酶活性, 锌指结构

Effect of heavy metal binding on the function of *Escherichia coli* topoisomerase I

WANG Xiao-Bing¹ CHEN Shi-Liang² WU Hui-Hui³ HUANG Zhao-Zhu²
JIANG Feng-Ying² WANG Wu^{2*} YANG Juan-Juan^{2*}

(1. Department of Rheumatology, The First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Wenzhou, Zhejiang 325000, China)

(2. School of Laboratory Medicine and Life Sciences, Wenzhou Medical University, Wenzhou, Zhejiang 325000, China)

(3. Department of Intensive Care Medicine, The First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Wenzhou, Zhejiang 325000, China)

Abstract: [Background] *Escherichia coli* topoisomerase I (*E. coli* TopA) plays essential role in DNA replication, transcription, recombination and regulation of gene expression. It is active only if it is bound with zinc. However, it remains unknown if it could bind other metals, especially heavy metals. [Objective] This study is aimed to characterize the binding activity of *E. coli* TopA to some toxic heavy metals in the environment, and to verify the potential effect of heavy metals on the topoisomerase activity of *E. coli* TopA. [Methods] We expressed and purified *E. coli* TopA from *E. coli* cells grown in M9 minimal media supplemented with exogenous zinc, cobalt, nickel, cadmium, iron, mercury, arsenic, chromium, lead or copper separately. The metal contents of purified TopA proteins were determined by ICP-MS (Inductively coupled plasma mass spectrometry). By using *E. coli* TopA mutants in which the zinc-finger motifs were disrupted, the binding sites of these metals in TopA were identified. The *in vitro* DNA relaxation assay was conducted to study the topoisomerase activity of *E. coli* TopA bound with different metals. Finally, intrinsic fluorescences of *E. coli* TopA bound with different metals were also measured to discover potential conformation diversity among them. [Results] We found that *E. coli* TopA could maximally bind three atoms of cobalt, nickel or cadmium per protein monomer respectively, while could not bind mercury, arsenic, chromium, lead or copper. The binding sites of these three metals in TopA were just located in the zinc-finger motifs, in which one atom of metal iron was coordinated with each zinc-finger motif respectively. It also showed that the DNA topoisomerase activity of TopA remained active when bound with cobalt, nickel or cadmium. Moreover, intrinsic fluorescence measurement showed that the protein conformation of cobalt, nickel or cadmium bound TopA would be similar as that of zinc bound. [Conclusion] In light of the crucial role of DNA topoisomerase in maintenance of cell viability, these results indicate that the topoisomerase activity of TopA would not be disrupted by common heavy metals (no binding or binding without inhibition of enzyme activity), which could be considered as an evolutionary mechanism for *E. coli* in resistance to toxicity of heavy metals in environment.

Keywords: *Escherichia coli* TopA, Heavy metal binding, Topoisomerase activity, Zinc-finger motif

DNA 拓扑异构酶广泛存在于从细菌到人类等各种生物体中^[1], 它主要通过催化 DNA 链的断裂和再连接控制其拓扑结构, 在 DNA 复制、转录、重组、基因表达调控及细胞分裂等方面发挥重要功能^[2]。DNA 拓扑异构酶根据松解超螺旋结构 DNA 过程中切割 DNA 链的数目可分为 I 型(切割单链)和 II 型(切

割双链)两种亚型^[3]。大肠杆菌拓扑异构酶 I (*E. coli* TopA)是最早被发现的 DNA 拓扑异构酶^[1]。从序列结构上分析,完整的 *E. coli* TopA 蛋白可分为 N 端的催化片段(67 kD)和 C 端锌指结构域(30 kD)。晶体结构研究^[4]发现 N 端形成一个能够容纳双链 DNA 底物的中央空环结构,具有切断单链 DNA 的活

性,而 C 端锌指结构域具有很强的单链 DNA 结合功能^[5],另外锌指结构域能直接与大肠杆菌 RNA 聚合酶进行结合,在 DNA 转录过程中起到重要作用^[6]。锌指结构域中存在 3 个相互邻近、并排串联的 Cys-X₂-Cys-Gly-X₂-Met-X₁₂₋₁₃-Cys-X₄₋₁₀-Cys 序列,被认为是 TopA 结合锌的特异性位点,其中每一个序列中的 4 个半胱氨酸结合一个锌原子^[7]。当 *E. coli* TopA 锌指结构域中锌离子被去除后,其在体外实验中显示无拓扑异构酶活性,表明 *E. coli* TopA 锌指结构域结合锌离子,对于负超螺旋 DNA 结构的松弛和解开是必需的^[8]。此外,*E. coli* TopA 除了可以结合锌离子,同样也可以结合铁离子^[9]和镉离子^[10]。其中铁离子可以竞争锌离子对蛋白的结合,通过减弱 TopA 的 DNA 结合能力,改变其蛋白空间构象而抑制其拓扑异构酶活性^[11]。

随着现代工业的迅速发展,重金属污染危害已在全球范围造成影响。重金属离子非常稳定,不易被生物降解,水体和土壤中的重金属首先被一些植物或动物吸收并在体内积累,最后通过食物链在人体内蓄积,可累积全身多个脏器并引起各种疾病,如癌症^[12]、神经退行性病变^[13]、心血管系统疾病^[14]等,对机体具有严重的危害作用。重金属离子对机体的毒理机制作用目前仍不完全清楚,主要认为其可以通过引起氧化应激反应对细胞内核酸、脂质和蛋白质造成不可逆的损害,并且损伤 DNA 修复能力、影响细胞周期调控,导致细胞凋亡或过度增殖^[15]。其中,蛋白质被认为是重金属离子毒害机体的首要靶点,重金属可通过与蛋白质直接结合,引起空间结构的紊乱和异常折叠,造成蛋白质凝集、变性并丧失活性^[16]。由于金属离子在蛋白中往往具有相似的配体结合特性,某些重金属离子可以与机体内广泛存在的锌指结构蛋白、铁/铁硫簇结合蛋白进行竞争性结合,改变其空间构象,从而影响功能^[17]。

鉴于 *E. coli* TopA 已经被发现能够结合锌、铁后对其功能造成影响,所以有必要进一步探索 *E. coli* TopA 是否能与一些环境污染较严重、对机体

危害较大的重金属离子结合,并且深入研究 TopA 结合重金属后其功能是否受到影响。本研究发现,*E. coli* TopA 在细胞内除了能够结合已报道的锌、铁离子外,还可以结合钴、镍、镉离子,但是不能结合汞、砷、铬、铅、铜离子。与锌相似,每个 *E. coli* TopA 蛋白分子能够分别结合 3 个镉、钴、镍离子,并且他们的结合位点也是分别位于 TopA 的 3 个锌指结构域。此外,这 3 种金属结合形式的 *E. coli* TopA 与锌结合形式的蛋白一样,具有松解超螺旋 DNA 的拓扑异构酶活性。由于 *E. coli* TopA 在维持细胞内 DNA 正常拓扑构象的过程中发挥关键作用,本研究进一步研究其拓扑异构酶活性是否会受到这些常见重金属离子的影响,具有重要的生理意义。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

菌株 *Escherichia coli* BL21(DE3) 和基因型 F-ompThsdS(rB-mB-)galdcm(DE3) 由本实验室保存; pET28b-*E. coli* TopA (GenBank 登录号: 945862) 是大肠杆菌拓扑异构酶 I 的野生型表达质粒, pET28b-ZM1/-mut-TopA、pET28b-ZM1/2-mut-TopA、pET28b-ZM1/2/3-mut-TopA 分别是大肠杆菌拓扑异构酶 I 3 个锌指结构中第 1 个锌指结构单突变 (C599S/C602S)、第 1 和第 2 个锌指结构双突变 (C599S/C602S/C662S/C665S) 以及 3 个锌指结构都发生突变的三突变 (C599S/C602S/C662S/C665S/C711S/C714S) 蛋白表达质粒(为充分破坏指定的锌指结构,每个锌指结构中的第 1 个和第 2 个半胱氨酸均被同时突变替换成丝氨酸),均由本实验前期构建并保存^[11],N 端带有 6 个组氨酸标签;pUC18 质粒由本实验室保存,从大肠杆菌内抽提出来的 pUC18 质粒呈超螺旋结构,在凝胶电泳中的泳动速度较快,而在 *E. coli* TopA 的拓扑异构酶活性作用下,其超螺旋结构会被解开呈松弛状态,因此在凝胶电泳中的泳动速度相对较慢。通过低电压凝胶电泳中超螺旋结构和松弛结构的 pUC18 质粒条带

所处位置的比例间接衡量 *E. coli* TopA 的拓扑异构酶活性。

1.1.2 培养基

M9 基础培养基(g/L): $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 12.80, KH_2PO_4 3.00, NaCl 0.50, NH_4Cl 1.00, MgSO_4 0.24, CaCl_2 0.011, 葡萄糖 4.00, 20 种天然氨基酸分别各 0.01, 维生素 B_1 0.005。

1.1.3 主要试剂及仪器

硫酸锌(ZnSO_4)、氯化钴(CoCl_2)、硫酸镍(NiSO_4)、硫酸镉(CdSO_4)、柠檬酸铁($\text{FeC}_6\text{H}_5\text{O}_7$)、氯化汞(HgCl_2)、亚砷酸钠(NaAsO_2)、重铬酸钾($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$)、硝酸铅($\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$)、硫酸铜(CuSO_4)等金属试剂均购自 Sigma 公司;其他试剂为国产分析纯,购自国药集团化学试剂有限公司。

蛋白纯化仪,美国 GE 公司;紫外可见分光光度仪、荧光分光光度仪,日本日立公司;电感耦合等离子质谱仪,美国安捷伦科技有限公司。

1.2 蛋白表达和纯化

过夜培养的含有野生型 TopA 蛋白表达质粒 pET28b-*E. coli* TopA 或锌指结构突变的各种突变蛋白表达载体的 *E. coli* BL21 菌株分别在 500 mL M9 基础培养基中, 37 °C、250 r/min 培养至 A_{600} 约为 1.0, 在 M9 培养基中不添加任何金属离子或分别添加一系列终浓度梯度为 2、10、25、50 $\mu\text{mol/L}$ 的各种金属离子溶液(Zn^{2+} 、 Co^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Hg^{2+} 、 As^{3+} 、 Cr^{6+} 、 Pb^{2+} 、 Cu^{2+}), 继续振荡 10 min 后在培养基中加入终浓度为 200 $\mu\text{mol/L}$ 的 IPTG, 37 °C、250 r/min 振荡培养 7–8 h, 4 °C、8 000 r/min 离心 10 min 收集菌体, 用蛋白纯化缓冲液(500 mmol/L NaCl , 20 mmol/L pH 8.0 Tris-HCl)重悬菌体并离心, 清洗 2 次, 再用 45 mL 预冷的蛋白纯化缓冲液重悬菌体。用压力破碎仪破碎菌体, 重复 2–3 次。破碎后的细菌裂解液于 4 °C、24 000 r/min 离心 45 min, 上清用 0.45 μm 滤膜过滤。利用 Ni-Agarose 柱(QIAGEN), 使用蛋白纯化仪进行目的蛋白的纯化分离, 并用脱盐柱(GE Health Care HiTrap Desalting 5 mL)对蛋白进行脱盐, 脱盐结

束后收集目的蛋白, 用于后续分析或 -80 °C 保存备用。

1.3 蛋白的紫外可见分光光谱学分析以及浓度、纯度分析

用紫外可见分光光度仪对纯化得到的不同金属处理的 *E. coli* TopA 蛋白进行 250–700 nm 全波长扫描并记录光吸收曲线, 同时用蛋白纯化缓冲液作为空白对照。由于蛋白在 280 nm 处具有吸收峰, 通过其在 280 nm 处特定的消光系数, TopA 消光系数为 97.35 mmol/(L·cm), 可根据公式计算相应蛋白的摩尔浓度。计算公式: 蛋白摩尔浓度=(蛋白 A_{280} -对照 A_{280}) \times 1 000/消光系数(单位: $\mu\text{mol/L}$)。将纯化后的蛋白用 SDS-PAGE 电泳进行纯度鉴定。

1.4 蛋白中金属结合含量的分析

将纯化得到的不同金属处理的野生型或锌指结构突变的 *E. coli* TopA 蛋白溶液首先用去离子水稀释 10 倍, 稀释后的蛋白样品无需消解。用电感耦合等离子质谱仪以含有待测金属离子的混合标准液做标准曲线, 直接对蛋白溶液中金属离子的质量浓度进行检测。电感耦合等离子质谱仪工作参数: 等离子体射频功率为 1 550 W, 等离子体气流速为 15.0 L/min, 辅助气流速为 1.0 L/min, 雾化气流速为 1.0 L/min, 采样深度流速为 10.0 mm, 氦气模式碰撞池。

测得的金属质量浓度(单位: $\mu\text{g/L}$)除以此种金属离子的原子质量, 即得到蛋白溶液中的金属摩尔浓度(单位: $\mu\text{mol/L}$)。将蛋白溶液中的金属摩尔浓度除以样品中的蛋白摩尔浓度, 即可得到单个蛋白分子中所含的金属离子数。计算公式: 单个蛋白结合金属离子数=金属质量浓度/金属原子量 \times 蛋白摩尔浓度。

1.5 大肠杆菌拓扑异构酶 I 松解超螺旋 DNA 的活性分析

将不同金属结合形式的 *E. coli* TopA 蛋白溶液稀释到实验浓度, 加入 1 μL 的 10 \times 反应缓冲液(500 mmol/L pH 8.0 Tris-HCl, 30 mmol/L MgSO_4)和 250 ng 的 pUC18 质粒, 用去离子水补齐到 10 μL ,

反应体系放到 37 °C 水浴锅中, 孵育 30 min 后加入 1 μ L 10 \times 终止缓冲液(5% SDS, 15% 甘油)终止反应。反应体系加入到 1% 琼脂糖凝胶的点样孔中, 按 2 V/cm 的电压电泳 16 h, 然后泡入含有 EB 的去离子水中染色 2 h, 凝胶成像仪中拍照。

1.6 蛋白的内源性荧光光谱学分析

将待分析的蛋白样品用蛋白纯化缓冲液调整浓度到 2 μ mol/L。开启荧光分光光度仪, 启动温度循环水浴泵, 使检测池温度恒定在 37 °C。每个蛋白样品吸取 300 μ L 加入到 1 cm 光径的全透光石英杯中, 以 280 nm 为固定激发波长, 在 300–500 nm 范围扫描荧光发射波谱。

2 结果与分析

2.1 不同金属处理的 *E. coli* TopA 蛋白中的金属结合情况

为研究不同金属处理的 *E. coli* TopA 蛋白中的金属结合情况, 向 M9 培养基中直接添加一系列终浓度梯度为 2、10、25、50 μ mol/L 的不同种金属水溶液, 之后从添加有不同种类金属以及不同金属浓度下的 M9 培养基中纯化得到的 TopA 蛋白, 并用 ICP-MS 对其蛋白中相应金属的含量进行测定。如图 1 所示, 随着培养基中添加的金属浓度逐渐升高, 在添加锌、钴、镍、镉、铁离子的 M9 培养基中纯化得到 TopA 蛋白, 每个蛋白结合的金属含量也随之逐渐增加。当培养基中金属离子达到 25 μ mol/L

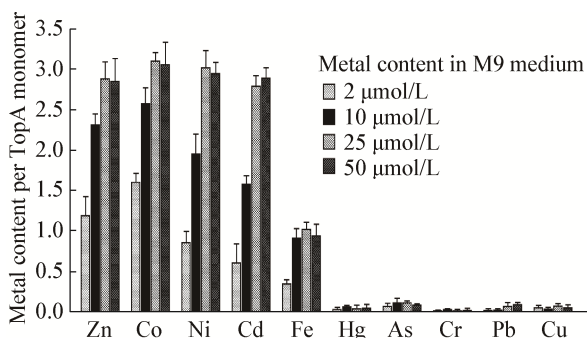


图 1 大肠杆菌拓扑异构酶 I 结合的不同金属含量测定
Figure 1 Contents of metals bound in *E. coli* TopA treated with different metals

时, 锌、钴、镍、镉离子处理的蛋白, 每个蛋白可以结合 3 个左右对应的金属离子, 而铁结合的 TopA 蛋白只能结合 1 个铁离子。金属离子浓度继续升高到 50 μ mol/L, 单位蛋白分子的金属结合含量并未增加, 提示培养基中 25 μ mol/L 的金属离子浓度已经使蛋白中金属结合含量呈饱和状态, 因此用此浓度下纯化得到的 TopA 蛋白用于后续实验。锌、铁离子结合 TopA 的情况已经报道, 本研究进一步证明 *E. coli* TopA 还可以结合钴、镍、镉离子, 并且金属/蛋白的结合比例与锌相似, 即每个蛋白分子最多可以结合 3 个金属离子。此外, 对于汞、砷、铬、铅、铜离子处理的 TopA 蛋白, 即使培养基中添加高浓度的金属离子(50 μ mol/L), 仍然不能显著结合相应的金属离子。如果在培养基中添加更高浓度(>100 μ mol/L)的这 5 种金属离子, 此时大肠杆菌的生长和 TopA 蛋白表达几乎完全被抑制, 说明已经超出了细菌的耐受程度。这表明 *E. coli* TopA 在正常状态的细胞内一般不会结合汞、砷、铬、铅、铜这 5 种重金属离子。砷离子和铬离子分别具有不同的价态, 如 As(III)、As(V)和 Cr(III)、Cr(VI)。结果表明(未显示), 即使在 M9 培养基中添加砷和铬的不同价态化合物, *E. coli* TopA 也不会显著结合 As(III)、As(V)以及 Cr(III)、Cr(VI)。

2.2 不同金属处理的 *E. coli* TopA 蛋白的表达和纯化

在分别添加有终浓度为 25 μ mol/L 各种金属离子(Zn²⁺、Co²⁺、Ni²⁺、Cd²⁺、Fe³⁺、Hg²⁺、As³⁺、Cr⁶⁺、Pb²⁺、Cu²⁺)的 M9 培养基中, 用 IPTG 诱导野生型 TopA 蛋白表达, 随后用亲和层析方法将蛋白纯化出来。纯化获得的蛋白用 SDS-PAGE 电泳鉴定, 图 2 显示可以得到纯度较高的不同金属处理的 TopA 蛋白。

2.3 不同金属结合的 *E. coli* TopA 的紫外可见吸收光谱分析

某些金属与蛋白质结合后蛋白质会呈现特殊的颜色, 在紫外可见光谱扫描曲线上即表现为特异性的金属吸收峰, 这些特异性吸收峰往往与所结合

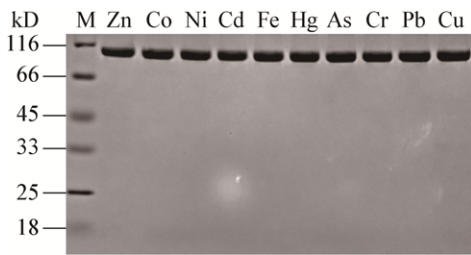


图 2 大肠杆菌拓扑异构酶 I 经不同金属处理后的表达和纯化

Figure 2 Expression and purification of *E. coli* TopA treated with different metals in *E. coli* cells

注: M: 标准蛋白 Marker.

Note: M: Standard protein marker.

的金属离子特异性对应。通过分析特异性吸收峰对应的波长及幅度,即可简便推算出蛋白所结合的金属种类和金属含量。图 1 证明 *E. coli* TopA 在体内可以结合锌、钴、镍、镉、铁离子,所以有必要对这些金属结合形式的 *E. coli* TopA 进行紫外可见吸收光谱分析。如图 3 所示,与无金属结合的 TopA (Apo-TopA)相似(图 3A),锌离子和镉离子结

合 *E. coli* TopA 后,除了 280 nm 的蛋白质吸收峰外(未显示),并没有其他特异性吸收峰出现(图 3B 和 3C)。但是钴、镍、铁离子结合 *E. coli* TopA 后,分别会出现各自独有的特异性吸收峰(图 3D、E 和 F),如 Co-TopA: 345 nm 和 690 nm; Ni-TopA: 350 nm 和 445 nm; Fe-TopA: 482 nm 和 563 nm。其中 Fe-TopA 的吸收峰已经被报道^[9],而本文首次报道了 Co-TopA 和 Ni-TopA 的特异性吸收峰。此外,由于 *E. coli* TopA 不结合汞、砷、铬、铅、铜这 5 种重金属离子,所以经这些金属处理的 *E. coli* TopA 从 M9 培养基中纯化出来,在紫外可见光谱扫描曲线上并未出现特异性的金属吸收峰(结果未显示)。

2.4 不同金属结合 *E. coli* TopA 的金属结合位点鉴定

上述结果表明 *E. coli* TopA 在体内可以结合锌、钴、镍、镉、铁离子,所以有必要对这些金属与 *E. coli* TopA 的结合位点进行鉴定。由于金属离子在蛋白中往往具有相似的配体结合特性,推测钴、镍、

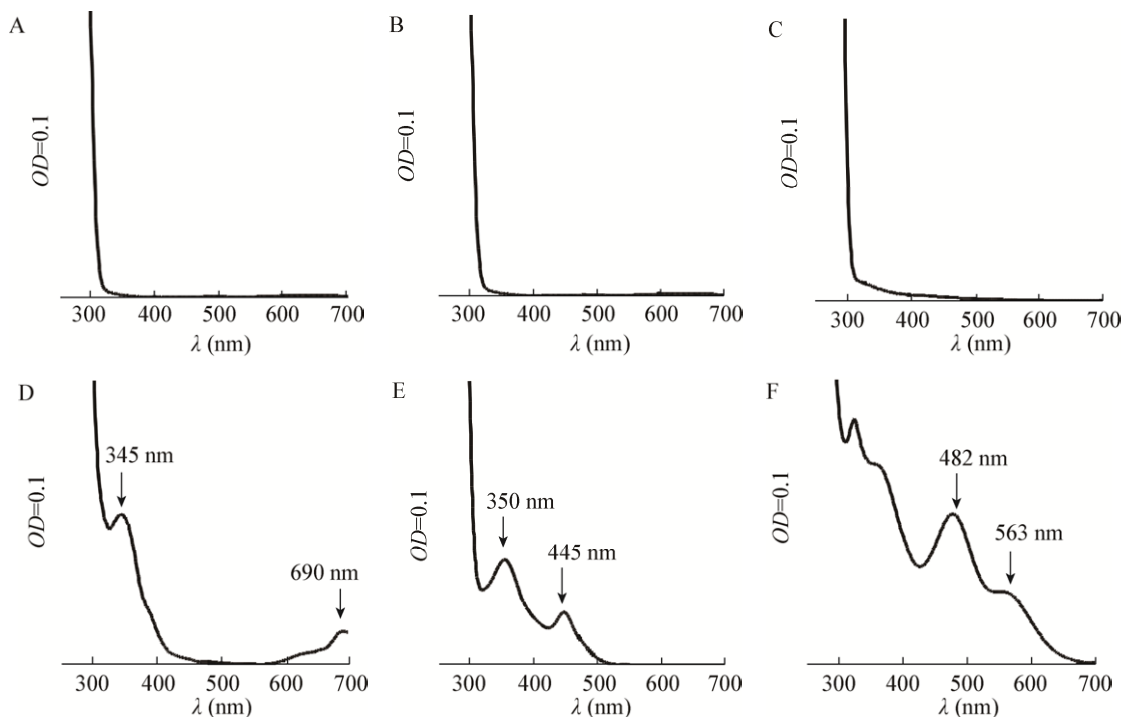


图 3 结合不同金属大肠杆菌拓扑异构酶 I 的紫外可见分光光谱扫描图

Figure 3 UV-vis spectra of *E. coli* TopA bound with different metals

Note: A: Apo-TopA; B: Zn-TopA; C: Cd-TopA; D: Co-TopA; E: Ni-TopA; F: Fe-TopA.

镉这 3 种离子与锌离子在 TopA 中的结合位点相似。利用定点突变技术, 将野生型 *E. coli* TopA 蛋白的 3 个锌指结构分别进行单个、两个和三个突变, 分别得到 ZM1/-mut-TopA、ZM1/2-mut-TopA 和 ZM1/2/3-mut-TopA 3 种突变体蛋白表达载体^[11]。分别将野生型和这 3 种突变型 TopA 蛋白在添加有 25 μmol/L 锌、钴、镍、镉、铁离子的 M9 培养基中进行表达和纯化。如图 4 所示, 每个野生型 TopA 蛋白分子可以分别结合 3 个锌、钴、镍、镉离子, 但只能结合 1 个铁离子, 这与图 2 结果一致。当第 1 个锌指结构突变后, 锌、钴、镍、镉离子和 TopA 的金属/蛋白结合比例减少到 2 个左右; 第 1 个和第 2 个锌指结构同时突变后, 锌、钴、镍、镉离子和 TopA 的金属/蛋白结合比例减少到 1 个左右; 当 3 个锌指结构全部突变后, 锌、钴、镍、镉离子基本上不能与 TopA 结合。由于锌离子与 *E. coli*

TopA 的结合位点已经研究清楚, 所以此结果表明钴、镍、镉离子与 *E. coli* TopA 的结合位点与锌离子相似, 即分别与 *E. coli* TopA 的 3 个锌指结构一一对应结合。此外, 铁离子与 TopA 的结合方式与报道一致^[11], 即 1 个铁离子同时与第 1 个和第 2 个锌指结构结合。

2.5 不同金属结合 *E. coli* TopA 的 DNA 拓扑异构酶活性分析

E. coli TopA 在 DNA 复制、转录、基因表达调控及细胞分裂等生理过程中发挥重要的功能, 我们已经发现 *E. coli* TopA 除了可以结合锌和铁之外, 还可以与钴、镍、镉这 3 种重金属离子结合。由于过量的钴、镍、镉等重金属离子在细胞内累积会对机体产生严重的毒害作用, 所以有必要对钴、镍、镉离子结合 *E. coli* TopA 后对其 DNA 拓扑异构酶活性是否产生影响进行探索。从图 5 可以看出, 超

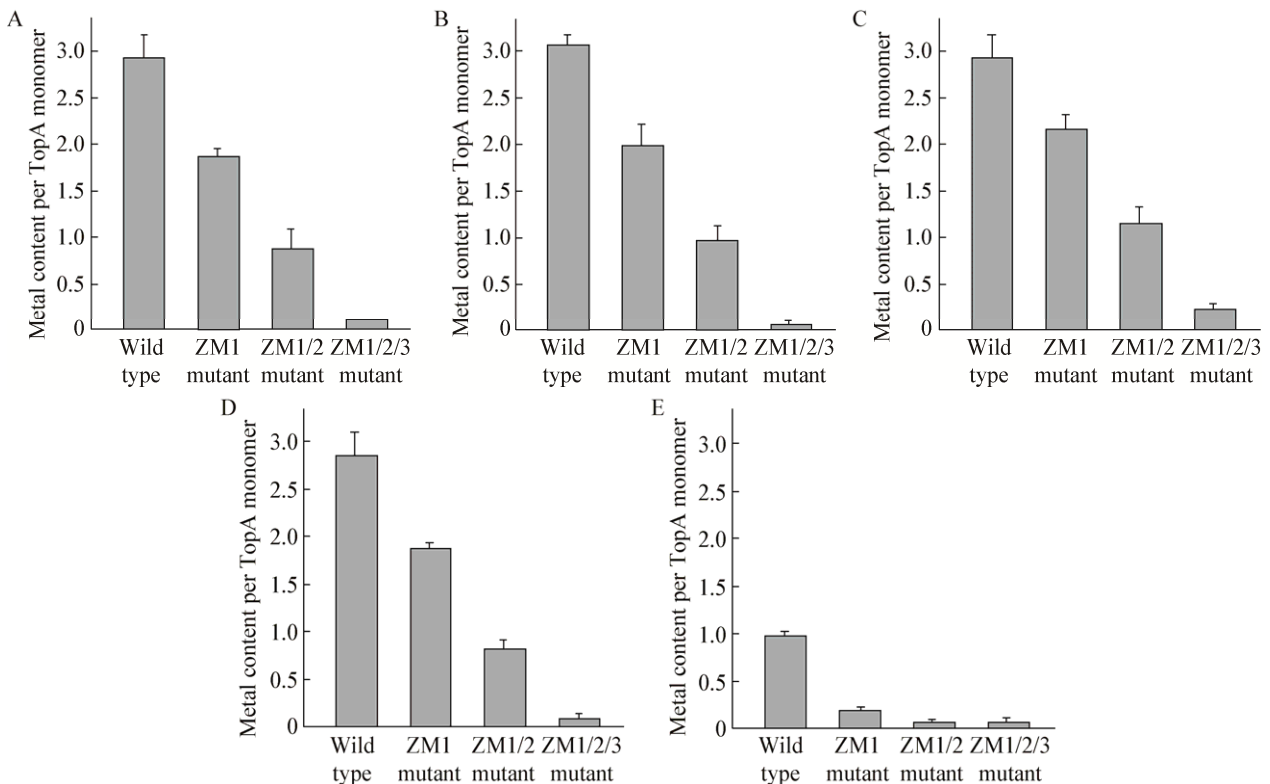


图 4 野生型和锌指结构突变的大肠杆菌拓扑异构酶 I 结合的不同金属含量测定

Figure 4 Metal contents of wild-type and zinc-finger mutated *E. coli* TopA treated with different metals

Note: A: Zn-TopA; B: Co-TopA; C: Ni-TopA; D: Cd-TopA; E: Fe-TopA.

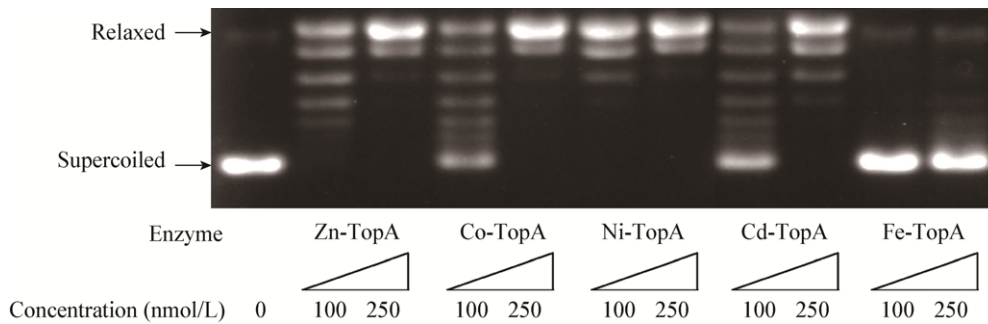


图 5 不同金属结合大肠杆菌拓扑异构酶 I 的拓扑异构酶活性分析

Figure 5 DNA relaxation activity of *E. coli* TopA bound with different metals

螺旋状态的 DNA 底物与不同金属结合的 TopA 在体外相同的实验条件孵育下, Co-TopA、Ni-TopA、Cd-TopA 与 Zn-TopA 类似, 均具备较强的松弛和解开超螺旋构象 DNA 的活性。此外, Fe-TopA 在体外松解超螺旋 DNA 的活性十分微弱, 与以往报道一致^[9]。这表明钴、镍、镉这 3 种重金属离子结合 *E. coli* TopA 后, 并不会显著影响其 DNA 拓扑异构酶活性。

2.6 不同金属结合对 *E. coli* TopA 空间构象的影响

图 5 表明钴、镍、镉这 3 种重金属离子与锌离子相似, 结合 *E. coli* TopA 后并不会影响其 DNA 拓扑异构酶活性, 而铁离子与 TopA 结合后, 其活性受到抑制。由于蛋白的功能总是与空间构象密切相关, 推测锌、钴、镍、镉、铁离子与 *E. coli* TopA 结合影响其功能是由于蛋白空间构象差异所导致, 所以有必要进一步探索这些离子对 TopA 空间构象的影响。有文献报道蛋白内源性荧光强度的改变往往可以反映蛋白质空间构象发生变化^[18], 所以检测蛋白质内源性荧光是研究其在不同状态下空间构象改变的简便方法。

将纯化得到的锌、钴、镍、镉、铁离子结合形式的 *E. coli* TopA 浓度均调整到 2 $\mu\text{mol/L}$, 在恒定温度下检测相同浓度和相同体积 TopA 蛋白溶液的内源性荧光光谱。如图 6 所示, 在相同实验条件下, Zn-TopA、Co-TopA、Ni-TopA、Cd-TopA 在 330 nm

左右的荧光值较为相近, 这表明锌、钴、镍、镉结合 TopA 后, 它们的空间构象比较相似。而相比之下 Fe-TopA 的荧光值显著较低(大约是 Zn-TopA 的 2/3), 与无金属结合的 Apo-TopA 相近。这间接提示 Fe-TopA 的空间构象与上述 4 种金属结合形式蛋白有所差异。此结果与图 5 一致, 表明钴、镍、镉离子结合 TopA 后, 其空间构象与锌结合的相似, 所以对 TopA 的 DNA 拓扑异构酶活性并未产生明显影响, 但是 Fe-TopA 的空间构象发生较大改变, 与已经报道无活性的 Apo-TopA 相似, 所以其功能也受到抑制。

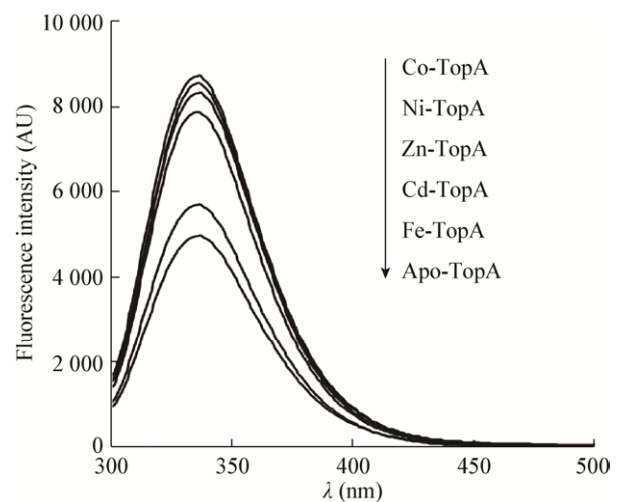


图 6 不同金属结合大肠杆菌拓扑异构酶 I 的空间构象差异分析

Figure 6 Conformational change of *E. coli* TopA upon different metals binding

3 讨论与结论

DNA 拓扑异构酶是一种几乎存在于所有生物体中的关键性生物酶, 对 DNA 复制、转录、染色体分离及基因表达调控等过程中的 DNA 拓扑结构起着重要的调节作用^[3]。作为细胞生长和分裂增殖中必不可少的重要蛋白酶, 其表达调控和功能活性与病原体繁殖和肿瘤发生发展密切相关, 已经成为研发抗生素和抗肿瘤药物的重要靶点^[19-20]。

第一个拓扑异构酶是 1971 年首先在大肠杆菌中被发现的^[21], 随后被命名为大肠杆菌拓扑异构酶 I (*E. coli* TopA)。*E. coli* TopA 是一个含有 3 个锌指结构域的经典锌指蛋白^[7]。锌指蛋白在体内广泛存在, 其锌指结构能够结合锌离子, 在多种生理过程中发挥着极其重要的作用。锌在生物体内是一种必需的金属元素, 往往通过与蛋白的锌指结构结合参与蛋白质的正确折叠, 维持空间结构的稳定并执行一些重要蛋白酶的催化功能^[22]。有意思的是, 铁等一些金属元素和锌在蛋白中具有相似的氨基酸残基结合特性^[23], 即能够通过锌指结构中的 C₄、C₂H₂ 等氨基酸残基与锌指结构结合。*E. coli* TopA 作为一个经典锌指蛋白, 除了能够结合锌, 已有文献报道它也能够结合铁, 而且结合铁后其活性受到抑制^[9]。Tse-Dinh 等发现无金属结合的 TopA 在体外能够以 1:3 的摩尔比例与镉离子重组结合, 而且镉离子结合的 TopA 与锌离子结合的蛋白一样都具有较高活性^[10], 这与本文结论一致, 但他们未提供镉离子在体内与 TopA 蛋白结合的结果。本研究通过在 M9 培养基中添加金属离子的体内实验, 首次报道了 *E. coli* TopA 在细菌体内还能够结合钴、镍、镉离子, 但是不能结合汞、砷、铬、铅、铜这几种重金属离子, 而且证明前 3 种金属离子与 TopA 的结合位点是位于 3 个锌指结构域中。

值得引起关注的是, 很多锌指蛋白都非常容易受到一些有毒重金属的攻击^[17,24-25], 这些重金属包括镉、钴、镍、铅、汞、砷等以及它们的化合物形式。此类重金属对人体而言是潜在的致癌物和致畸

形物, 但是它们的致癌机制仍然没有被完全阐明。有研究认为这些重金属可以引起氧化应激, 干扰 DNA 修复和信号传导通路, 导致细胞凋亡^[26-27]。不过有研究认为锌指蛋白是重金属攻击生物体的重要靶点^[17], 因为锌指蛋白在细胞内广泛存在着。这些重金属对锌指蛋白的影响作用也并不相同^[28-29]。一种比较认可的解释是, 这些重金属取代锌离子而与锌指结构结合, 可能会导致重金属和锌指结构之间的键合不完整或者不正确, 使得锌指结构的键合变得扭曲或者空间构象发生改变^[17], 也就是说这些锌指结构是否会受到重金属离子的影响和它与哪种重金属结合并不直接关联, 而是取决于与重金属结合之后其空间结构是否发生改变。本研究发现钴、镍、镉离子结合 *E. coli* TopA 后, 其活性并未受到影响, 并且进一步利用内源性荧光检测发现, 钴、镍、镉离子结合的 TopA 其空间构象与锌结合的 TopA 相似, 这也从空间构象方面解释了这 3 种重金属结合 TopA 但不会影响 TopA 拓扑异构酶活性的原因。

由于 *E. coli* TopA 在维持细胞内 DNA 正常拓扑构象的过程中发挥关键的作用, 本研究表明其拓扑异构酶活性并不会受到这些常见重金属离子的干扰和影响(不结合或结合后功能未被抑制), 具有重要的生理意义, 也可以被认为是大肠杆菌在进化过程中产生的对抗环境中重金属离子毒害作用的保护和耐受机制。

REFERENCES

- [1] Forterre P, Gabelle D. Phylogenomics of DNA topoisomerases: their origin and putative roles in the emergence of modern organisms[J]. *Nucleic Acids Research*, 2009, 37(3): 679-692
- [2] Schoeffler AJ, Berger JM. DNA topoisomerases: harnessing and constraining energy to govern chromosome topology[J]. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 2008, 41(1): 41-101
- [3] Champoux JJ. DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism[J]. *Annual Review of Biochemistry*, 2001, 70: 369-413
- [4] Zhang ZT, Cheng BK, Tse-Dinh YC. Crystal structure of a covalent intermediate in DNA cleavage and rejoining by *Escherichia coli* DNA topoisomerase I[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108(17): 6939-6944
- [5] Ahumada A, Tse-Dinh YC. The Zn(II) binding motifs of *E. coli* DNA topoisomerase I is part of a high-affinity DNA binding

- domain[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1998, 251(2): 509-514
- [6] Cheng BK, Zhu CX, Ji CL, et al. Direct interaction between *Escherichia coli* RNA polymerase and the zinc ribbon domains of DNA topoisomerase I[J]. Journal of Biological Chemistry, 2003, 278(33): 30705-30710
- [7] Tse-Dinh YC, Beran-Steed RK. *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
- [8] Ahumada A, Tse-Dinh YC. The role of the Zn(II) binding domain in the mechanism of *E. coli* DNA topoisomerase I[J]. BMC Biochemistry, 2002, 3: 13
- [9] Lu JX, Wang W, Tan GQ, et al. *Escherichia coli* topoisomerase I is an iron and zinc binding protein[J]. Biometals, 2011, 24(4): 729-736
- [10] Tse-Dinh YC. Zinc(II) coordination in *Escherichia coli* DNA topoisomerase I is required for cleavable complex formation with DNA[J]. Journal of Biological Chemistry, 1991, 266(22): 14317-14320
- [11] Wang W, Su XL, Wang XB, 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
- [12] Yuan WZ, Yang N, Li XK. Advances in understanding how heavy metal pollution triggers gastric cancer[J]. Biomed Research International, 2016, 2016: 7825432
- [13] Chen P, Miah MR, Aschner M. Metals and neurodegeneration[J]. F1000Res, 2016, 5: F1000
- [14] Lamas GA, Navas-Acien A, Mark DB, et al. Heavy metals, cardiovascular disease, and the unexpected benefits of chelation therapy[J]. Journal of the American College of Cardiology, 2016, 67(20): 2411-2418
- [15] Hartwig A, Asmuss M, Ehleben I, et al. Interference by toxic metal ions with DNA repair processes and cell cycle control: molecular mechanisms[J]. Environmental Health Perspectives, 2002, 110(S5): 797-799
- [16] Tamás MJ, Sharma SK, Ibstedt S, et al. Heavy metals and metalloids as a cause for protein misfolding and aggregation[J]. Biomolecules, 2014, 4(1): 252-267
- [17] Hartwig A. Zinc finger proteins as potential targets for toxic metal ions: differential effects on structure and function[J]. Antioxidants & Redox Signaling, 2001, 3(4): 625-634
- [18] Hansen SB, Radić Z, Talley TT, et al. Tryptophan fluorescence reveals conformational changes in the acetylcholine binding protein[J]. Journal of Biological Chemistry, 2002, 277(44): 41299-41302
- [19] Tse-Dinh YC. Targeting bacterial topoisomerase I to meet the challenge of finding new antibiotics[J]. Future Medicinal Chemistry, 2015, 7(4): 459-471
- [20] Xu Y, Her C. Inhibition of topoisomerase (DNA) I (TOP1): DNA damage repair and anticancer therapy[J]. Biomolecules, 2015, 5(3): 1652-1670
- [21] Wang JC. Interaction between DNA and an *Escherichia coli* protein ω [J]. Journal of Molecular Biology, 1971, 55(3): 523-533
- [22] Berg JM, Shi Y. The galvanization of biology: a growing appreciation for the roles of zinc[J]. Science, 1996, 271(5252): 1081-1085
- [23] Dauter Z, Wilson KS, Sieker LC, et al. Zinc-and iron-rubredoxins from *Clostridium pasteurianum* at atomic resolution: a high-precision model of a ZnS₄ coordination unit in a protein[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1996, 93(17): 8836-8840
- [24] Zawia NH, Crumpton T, Brydie M, et al. Disruption of the zinc finger domain: a common target that underlies many of the effects of lead[J]. Neurotoxicology, 2000, 21(6): 1069-1080
- [25] Hartwig A, Asmuss M, Blessing H, et al. Interference by toxic metal ions with zinc-dependent proteins involved in maintaining genomic stability[J]. Food and Chemical Toxicology, 2002, 40(8): 1179-1184
- [26] Lu HT, Shi XL, Costa M, et al. Carcinogenic effect of nickel compounds[J]. Molecular and Cellular Biochemistry, 2005, 279(1/2): 45-67
- [27] Beyersmann D, Hartwig A. Carcinogenic metal compounds: recent insight into molecular and cellular mechanisms[J]. Archives of Toxicology, 2008, 82(8): 493-512
- [28] Bittel D, Dalton T, Samson SLA, et al. The DNA binding activity of metal response element-binding transcription factor-1 is activated *in vivo* and *in vitro* by zinc, but not by other transition metals[J]. Journal of Biological Chemistry, 1998, 273(12): 7127-7133
- [29] Asmuss M, Mullenders LHF, Eker A, et al. Differential effects of toxic metal compounds on the activities of Fpg and XPA, two zinc finger proteins involved in DNA repair[J]. Carcinogenesis, 2000, 21(11): 2097-2104