

抑菌剂与 DNA 作用方式的研究方法

王德娴^{1,2}, 胡新月^{1,2}, 宋丽雅^{1,2*}

(1. 北京工商大学化学材料与工程学院, 北京 100048; 2. 北京植物资源研究与开发重点实验室, 中国轻工化妆品重点实验室, 北京 100048)

摘要: 防腐剂是食品工业中不可缺少的物质, 但是食品防腐剂仍存在种类少、耐药性和安全性等问题, 新型抑菌剂的研发及其作用机制研究已经成为研究者们关注的重点。脱氧核糖核苷酸(DNA)是抑菌剂发挥作用的重要靶点, 抑菌剂与 DNA 作用可以抑制微生物的生长繁殖。抑菌剂与 DNA 的作用方式有直接结合和间接影响, 直接结合主要为非共价结合, 包括静电结合、沟槽结合和嵌插结合; 间接影响是通过抑制 DNA 复制中关键酶活性影响 DNA 正常的生理功能。抑菌剂与 DNA 的作用方式研究方法的梳理和探究对明确抑菌机制具有重要意义。本文综述了抑菌剂与 DNA 作用方式的研究方法, 包括光谱法、电化学方法和热力学方法等常规方法, 以及分子对接、分子动力学模拟及单分子力谱技术等新兴方法, 为抑菌机制的研究、新型抑菌剂的开发及在食品工业中的应用提供思路。

关键词: 抑菌剂; 微生物 DNA; 光谱法; 电化学方法; 热力学方法

Research technique for action modes of bacteriostatic agents and DNA

WANG De-Xian^{1,2}, HU Xin-Yue^{1,2}, SONG Li-Ya^{1,2*}

(1. School of Chemistry and Materials Engineering, Beijing Technology and Business University, Beijing 100048, China;
2. Beijing Key Laboratory of Plant Resources Research and Development, China Light Industry Cosmetics Key Laboratory, Beijing 100048, China)

ABSTRACT: Preservatives are indispensable in the food industry, but there are still some problems such as few kinds of food preservatives, drug resistance and safety of food preservatives. It has been the focus of researchers to develop new bacteriostatic agents and study their mechanism of action. Deoxyribonucleotide (DNA) is a significant target for the action of antibacterial agents, which interact with DNA to inhibit the growth and reproduction of microorganisms. The action modes of bacteriostatic agent and DNA included direct binding and indirect influence. Direct bonding is mainly non-covalent bonding, including electrostatic bonding, groove bonding and intercalation binding. The indirect influence is to affect the normal physiological function of DNA by inhibiting the activity of key enzymes in DNA replication. The research technique of combing and exploring the action mode of bacteriostatic agent and DNA is of great significance to clarify the bacteriostatic mechanism. This article summarized the research techniques for action modes of bacteriostatic agent and DNA, including spectroscopy, electrochemical and thermodynamic methods, as well as emerging methods such as molecular docking, molecular dynamics simulation and single-molecule force spectroscopy, so as to provide ideas for the research of mechanism and the development of

基金项目: 2021 年研究生科研能力提升计划项目

Fund: Supported by the 2021 Postgraduate Research Ability Enhancement Program

*通信作者: 宋丽雅, 教授, 主要研究方向为化妆品植物功效添加剂的研究与开发。E-mail: songly@th.btbu.edu.cn

*Corresponding author: SONG Li-Ya, Professor, Beijing Technology and Business University, No.11, Fucheng Road, Haidian District, Beijing 100048, China. E-mail: songly@th.btbu.edu.cn

new antibacterial agents and their applications in the food industry.

KEY WORDS: antibacterial agents; microbial DNA; spectroscopy; electrochemical method; thermodynamic method

0 引言

食品中含有丰富的营养物质,易受到微生物的侵袭而腐坏变质,通常需要在加工和储存过程中采取防腐措施。加入防腐剂是一种重要的手段,防腐剂可以抑制食品中微生物的生长繁殖,延长其保质期。但是目前食品防腐剂种类仍较少,长期使用易产生耐药性,作用效果显著下降。此外,食品防腐剂多为化学防腐剂,如山梨酸盐、亚硝酸盐和苯甲酸盐等,可能会对人类身体健康造成一定的安全风险,如 SEVCAN 等^[1]研究发现,山梨酸钠对体外培养的人体外周淋巴细胞具有遗传毒性,可能会对人体产生潜在的毒害作用。新型抑菌剂的研发已成为未来发展的大趋势,许多抗菌肽和植物提取物都具有很好的抑菌效果,且相比起化学防腐剂更加的绿色、安全、不易产生耐药性,是新型抑菌剂的重要潜力资源^[2-3]。但是,目前对抑菌剂作用机制的研究还不够深入,减缓了新型抑菌剂的开发及应用进程,只有真正了解抑菌剂的作用机制才能充分发挥抑菌剂自身优势,更好地应用于食品工业中。抑菌剂主要通过细胞壁膜、蛋白质和遗传物质 3 方面发挥作用,其中抑菌剂与遗传物质(DNA)的相互作用较为复杂,研究抑菌剂与 DNA 的作用方式有助于深入探讨抑菌剂的作用机制,加快其应用。本文重点综述了抑菌剂与 DNA 作用的研究方法,包括用于探究抑菌剂与 DNA 的结合方式、结合常数等基本信息的光谱法、电化学方法和热力学方法等常规方法,以及可以得到更加准确的微观信息的分子对接、分子动力学模拟及单分子力谱技术等新兴方法,以期对抑菌机制的研究、新型抑菌剂的开发及在食品工业中的应用提供思路。

1 DNA 结构与功能

DNA 携带有合成 RNA 和蛋白质所必需的遗传信息,是微生物体内重要的遗传物质,是保证微生物独特性状及性状延续的基础。在细胞天然状态下, DNA 多以右手螺旋 B-DNA 结构存在,是由两条反向平行的多核苷酸链围绕同一中心轴构成的右手螺旋结构。链间有螺旋形的凹槽,其中较浅的为小沟(约 1.2 nm 交叉),较深的为大沟(约 2.2 nm 交叉),大沟和小沟都是由于碱基堆积和 DNA 骨架扭转造成的,是抑菌剂结合的重要位点,抑菌剂可以通过与 DNA 大小沟的结合抑制其复制活性,达到抑菌效果。双螺旋结构进一步扭曲盘绕形成更复杂的特定空间结构,其中,超螺旋结构为高级结构的主要形式,其中负超螺旋是细胞内常见的超螺旋结构。

2 抑菌剂与 DNA 的作用方式

抑菌剂可以通过与 DNA 直接结合阻止 DNA 的复制和转录,也可以通过影响 DNA 复制过程中关键酶活性进而影响 DNA 正常的生理功能。小分子物质与 DNA 之间的结合包括共价作用和非共价作用^[4]。共价作用是指具有一定亲核性和亲电性的小分子与 DNA 碱基之间发生共价键结合,使 DNA 的双链解旋并发生弯曲,且反应不可逆。非共价作用是指小分子与 DNA 结合过程中不涉及共价键的断裂,主要有 3 种模式(如图 1):静电结合、沟槽结合和嵌插结合。静电结合是指 DNA 带负电荷的磷酸骨架与抑菌剂带正电荷基团的结合,通常不具备选择性;黄云坡等^[5]研究发现,苯乳酸可以与小牛胸腺 DNA 发生静电结合,影响 DNA 正常的生理功能。与静电结合不同,沟槽结合和嵌插结合均具有选择性。沟槽结合是指抑菌剂与 DNA 的大沟或小沟的碱基对边缘结合,主要是通过氢键或范德华力作用。王弋^[6]研究发现槲皮素与鲑鱼精 DNA 的结合方式为沟槽结合。嵌插结合是指抑菌剂嵌入 DNA 碱基对中,其作用力主要是 $\pi-\pi^*$ 共轭作用及疏水作用。杨昆等^[7]发现乳源蛋白抗菌肽 BCp12 可以嵌入大肠杆菌(*Escherichia coli*) DNA 的双链内部的碱基对,影响 DNA 的正常复制。抑菌剂与 DNA 结合模式多为非共价结合,是可逆的。大多数抑菌剂与 DNA 非共价相互作用可以改变 DNA 构象、扭转张力,并可能导致 DNA 链断裂。DNA 复制和转录过程中需要多种酶的作用,如 DNA 聚合酶、DNA 拓扑异构酶等。若酶的活性受到影响 DNA 的复制过程也将受阻,这是抑菌剂与 DNA 作用发挥抑菌功能的又一重要途径。 α -蒎烯和 δ -3-蒎烯是意大利柏精油的主要成分,研究发现两种化合物对食源性细菌鼠伤寒沙门菌(*Salmonella typhimurium*)金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)的拓扑异构酶 II、RNA 聚合酶和 DNA 聚合酶都有良好的抑制作用^[8]。

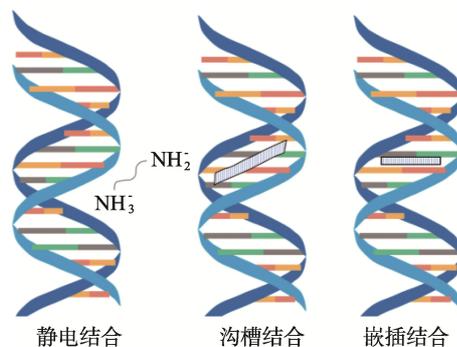


图 1 抑菌剂与 DNA 的非共价相互作用模式

Fig.1 Non-covalent binding mode of bacteriostatic agent and DNA

3 抑菌剂与 DNA 作用方式的研究方法

目前, 研究抑菌剂与 DNA 作用方式的常规研究方法主要包括光谱法、电化学方法和热力学方法等, 可以推测出抑菌剂与 DNA 的结合方式, 这些方法应用较多, 已经十分成熟, 尤其是光谱法。分子对接、分子动力学模拟和单分子力谱等方法为近年来新发展起来的方法, 可获得常规方法不能得到的微观信息。

3.1 常规研究方法

3.1.1 光谱法

(1) 紫外-可见吸收光谱

紫外-可见吸收光谱 (ultraviolet-visible absorption spectroscopy) 利用某些物质的分子吸收 200~800 nm 光谱区辐射来进行测定分析, 是研究抑菌剂与 DNA 结合方式的一种经典方法。DNA 中碱基间电子的相互作用产生紫外吸收, 碱基的有序堆积会降低吸收作用, 若 DNA 双螺旋打开使碱基露出, 会产生增色效应^[9-10]。DNA 分子有特定的吸收光谱, 可吸收 250~280 nm 波长的紫外光, 其吸收峰值在 260 nm。抑菌剂与 DNA 结合导致光谱吸收强度增强可推测为发生了嵌插结合, 降低或伴有红移现象则为静电结合或凹槽结合。光谱的变化与 DNA 双螺旋结构紧密相关, 因此, 可以通过此方法评价 DNA 二级结构变化。CUI 等^[11]研究丁香油中的主要成分丁香酚对单核细胞增生李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*) 的抑菌机制, 加入 DNA 后丁香酚的紫外-可见光谱出现减色效应且伴有红移, 推测丁香酚与 DNA 形成复合物改变了 DNA 的结构。

(2) 荧光光谱

荧光光谱也是研究抑菌剂与 DNA 结合的常用光谱法^[12]。抑菌剂与 DNA 结合后荧光光谱发生增强或猝灭, 通过加入不同浓度的 DNA, 根据抑菌剂的荧光光谱荧光强度变化情况可以推测两者的作用^[5,13]。荧光猝灭主要分为静态猝灭和动态猝灭, 猝灭机制一般用 Stern-Volmer 方程进行分析, 见公式(1):

$$F_0/F = 1 + K_q \tau_0 [Q] = 1 + K_{SV} [Q] \quad (1)$$

其中, F_0 、 F 分别表示不存在抑菌剂和抑菌剂浓度为 $[Q]$ 时的荧光强度, K_q 是猝灭速率常数, τ_0 为不存在抑菌剂时荧光物质的平均荧光寿命, K_{SV} 是 Stern-Volmer 荧光猝灭常数。

静态猝灭中抑菌剂与 DNA 形成基态复合物, 猝灭常数随着温度的升高而降低, 而动态猝灭与之相反, 可以通过测定不同温度下的猝灭常数判断体系荧光猝灭的机制。

竞争性分析是利用荧光分子探针来判定抑菌剂与 DNA 结合方式的方法, 常用的分子探针有嵌插结合剂溴化乙锭 (ethidium bromide, EB) 和沟槽结合剂 4',6-二脒基-2-苯基吲哚 (4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)^[14-15]。DNA 只能产生微弱的荧光, 与分子探针结合后荧光强度显著增强, 若抑菌剂与分子探针结合方式相同, 两者将会竞争结合位

点, 分子探针被置换出来, 发生荧光猝灭, 可以推断抑菌剂的作用方式。此外, 分子探针还有沟槽结合剂赫斯特 (Hoechst)、嵌插结合剂吖啶橙 (acridine orange) 等。NING 等^[16]探究了苯乳酸对单核细胞增生李斯特菌和大肠杆菌的作用机制, EB 竞争性分析推测苯乳酸通过插入 DNA 的碱基对中破坏 DNA 的正常复制与转录。

利用荧光光谱测定抑菌剂与 DNA 的结合方式还有其它方法, 如碘化钾淬灭实验^[17], 单链和双链 DNA 对比实验^[18]和 NaCl 对离子强度影响实验^[19]等。NaCl 对离子强度影响实验可以推测抑菌剂是否与 DNA 发生静电结合。若抑菌剂与 DNA 存在静电作用, 由于带负电荷的磷酸基的竞争, Na^+ 的加入使抑菌剂和 DNA 表面之间的静电力减弱, 从而导致体系荧光强度的变化。IRFAN 等^[20]探究了植物化学物质 β -间苯二酸 (β -resorcylic acid, BR) 与 DNA 的结合方式, 加入不同浓度的 NaCl 后, BR 单独存在和 BR-DNA 复合物的荧光发射光谱没有明显的变化, 因此, 可以排除静电作用。

综合分析可知, 紫外-可见吸收光谱和荧光光谱是研究抑菌剂与 DNA 结合最常用的两种方法, 通过紫外-可见吸收光谱可以推测两者的结合方式, 利用荧光光谱可以进一步确证。圆二色谱和共振散射光谱等^[21-22]也可以被用来测定抑菌剂与 DNA 作用方式。这些光谱各有优缺点, 通常可以联合使用、相互补充, 使结果更加准确。光谱学方法操作简单、结果直观易于分析, 可以得到抑菌剂与 DNA 的结合方式和结合常数等信息, 但是光谱学方法不适用于光谱强度弱或与 DNA 结合后变化不明显的样本。光谱在抑菌剂与 DNA 作用研究中使用较为集中, 单种光谱得到的信息有限, 往往需要联合使用, 应积极探索可以直接得到更加全面结合信息的新型光谱技术。部分抑菌剂与 DNA 的作用方式及使用的光谱方法见表 1。

3.1.2 电化学方法

电化学方法将电化学方法与生物学分析相结合, 为揭示抑菌剂与 DNA 作用机制提供了更多的可能。电化学方法主要是通过检测加入 DNA 后整个体系的电化学特性变化, 得到抑菌剂与 DNA 的结合方式、动力学及热力学参数。如抑菌剂嵌入 DNA 后氧化还原峰的变化、扩散系数变化等。有研究表明, 当抑菌剂与 DNA 发生嵌插结合时, 峰值电位向正方向移动, 静电结合时峰值电位向负方向移动^[32]。根据加入 DNA 后体系电化学参数的变化可以判断两者形成的复合物是否具有电活性, 如电荷转移系数 α 和标准速率常数 k_s 。常用的电化学方法有伏安分析法、库伦分析法、电位分析法及电化学发光分析法等。电化学方法不需要各种间接标记物, 具有成本低、原理简单和检测精确等优点。除了某些无电活性的抑菌剂以外, 吸收光谱弱或作用后光谱特征不明显的抑菌剂更适用于使用电化学方法进行研究。万红艳^[33]研究芦荟大黄素、大黄酸和茜素对鲑鱼精

表 1 几种抑菌剂与 DNA 的结合方式及光谱研究方法
Table 1 Binding methods of several bacteriostatic agents to DNA and spectroscopy

抑菌剂	DNA	方法	结果	参考文献
苯乳酸	单核细胞增多性李斯特菌和大肠杆菌	荧光光谱	嵌插结合	[16]
ϵ -聚赖氨酸	枯草芽孢杆菌(<i>Bacillus subtilis</i>)	紫外-可见吸收光谱、荧光光谱	嵌插结合	[23]
	金黄色葡萄球菌	圆二色谱	嵌插结合	[24]
阿魏酸己酯	单核细胞增多性李斯特菌	紫外-可见吸收光谱、荧光光谱	沟槽结合	[25]
蜂毒肽	ct-DNA	圆二色谱、紫外-可见吸收光谱、荧光光谱	沟槽结合	[26]
槲皮素-铜(II)配合物	ct-DNA	紫外-可见吸收光谱、荧光光谱	嵌插结合	[27]
落叶松皮原花青素	金黄色葡萄球菌	紫外-可见吸收光谱、荧光光谱	沟槽结合	[28]
柚皮素	金黄色葡萄球菌	圆二色谱、紫外-可见吸收光谱	沟槽结合	[29]
青蒿素	ct-DNA	紫外-可见吸收光谱、荧光光谱、共振散射光谱	沟槽结合	[30]
抗菌肽 CecXJ-37C、CecXJ-37N、mCecXJ	大肠杆菌和金黄色葡萄球菌	紫外-可见吸收光谱	沟槽结合	[31]

子 DNA 的作用方式, 由 α 和 k_s 的结果表明, 3 者都能够嵌入到 DNA 碱基对中, 形成一种非电活性的超分子化合物。高颜等^[34]使用伏安循环法研究茜草色素光泽汀与 DNA 相互作用机制, 加入不同浓度的 DNA 后, 光泽汀的氧化还原峰降低, 且加入 EB 后氧化还原峰又有所增加, 推测二者发生了嵌插结合。

随着电化学技术的不断进步, DNA 电化学生物传感器也得到极大的发展。李红英等^[35]制备了对绿原酸响应灵敏的传感器, 并发现绿原酸与 DNA 发生静电结合, 结合常数为 1.62×10^3 L/mol。陈玉^[36]基于伴刀豆球蛋白与脂多糖的特异性结合构建了电化学发光细菌生物传感器, 并通过此传感器检测了 4 种不同的抗生素对大肠杆菌的最低抑菌浓度。DNA 电化学传感器主要被应用于食品、环境检测和药物筛选等方面^[37-38], 具有价格低廉、方法简单等优点, 虽然在抑菌剂与 DNA 作用的研究中应用较少, 但仍是极具潜力技术手段。

3.1.3 热力学方法

热力学方法也经常被用于抑菌剂与 DNA 相互作用的研究, 通过二者结合过程中热力学信息变化明确二者的结合模式^[39]。如测定 DNA 的熔融温度(T_m)、等温滴定量热法(isothermal titration calorimetry, ITC)和差示扫描量热法(differential scanning calorimetry, DSC)等。ITC 是唯一能够从单个实验中获得所有热力学参数的技术, 可以研究抑菌剂结合 DNA 后的焓(ΔH)、熵(ΔS)、吉布斯自由能(ΔG)、结合常数(ΔK_b)和结合位点数量(N)的变化。据报道, 抑菌剂通过沟槽模式结合 DNA 是焓驱动的过程, 而嵌插结合是熵驱动的, 焓驱动主要来自氢键和范德华相互作用, 而熵驱动主要来自疏水和去溶剂化作用^[40]。 T_m

是指 DNA 变性过程中紫外吸收达到最大值一半时的温度, DNA 与抑菌剂结合后会导致 T_m 发生变化。一般来说, 如果两者发生嵌插结合, 熔化温度将升高约 $5 \sim 8^\circ\text{C}$ 。而沟槽结合时 T_m 变化不明显^[41]。姜黄素是姜黄中的主要活性成分, 药食价值很高, 常被用作食品添加剂。HARIS 等^[42]探究姜黄素与 DNA 的结合方式, ITC 实验中姜黄素与 ct-DNA 的结合后焓变为负, ΔG (-6.69 kcal/mol)与一些较小的沟槽结合药物的报道值一致, 推测为沟槽结合。随着姜黄素浓度的增加, T_m 值变化不大, 佐证了 ITC 的实验结果。热力学方法不像光谱学方法或电化学法对样本存在限制, 灵敏度高, 但是热力学方法所需时间较长, 不能对反应过程进行实时监测。

3.1.4 其他研究方法

研究抑菌剂与 DNA 作用时也会用到一些其他的研究方法, 虽然不能直接得出两者结合的具体信息, 但可以推测出抑菌剂阻止了 DNA 的正常复制转录。琼脂糖凝胶电泳通过相对分子质量大小及所带电荷不同将小分子物质进行区分^[43]。DUAN 等^[44]分离得到了副干酪乳杆菌 ifx-6, 并研究了其对从变质鸡胸肉中分离出的腐殖单胞菌的作用机制, 随着抑菌剂的浓度增加, DNA 条带的逐渐变暗, 迁移率逐渐降低, 推测抑菌剂可以直接结合菌体 DNA。DNA 复制过程中需要多种蛋白酶参与才能保证复制的完整性与准确性, 通过研究蛋白酶活性可以从侧面验证抑菌剂对 DNA 的作用。MAGDALENA 等^[45]发现野樱莓、木瓜和山茱萸 3 种提取物均可以抑制大肠杆菌 DNA 回旋酶的活性, 阻止 DNA 正常的复制转录。其他的研究方法是常规方法的有益补充。

3.2 新兴研究方法

3.2.1 分子对接和分子动力学模拟

随着科技的不断发展, 计算机技术也逐渐被应用于更多的研究领域。分子对接的推测原理包括空间匹配的刚性模型和能量匹配的柔性模型, 可被用来模拟抑菌剂与 DNA 的最佳结合方式与结合位点, 推测具体的结合机制^[46]。目前比较常用的计算机模拟软件有 AUTODOCK、DOCK 和 FlexX 等。IRFAN 等^[20]利用分子对接研究 β -间苯二酸(BR)与 ct-DNA 的作用方式, 结果表明 BR 通过沟槽结合的方式与 DNA 结合, 并且两者的相互作用中有 5 个氢键。分子对接技术也可用于模拟推测抑菌剂与 DNA 相关酶的结合方式, SONG 等^[47]分离得到泡菜乳酸菌产生的抗菌肽, 分子对接结果表明该肽通过盐桥、氢键相互作用和金属接触与 DNA 回旋酶和二氢叶酸还原酶相互作用。

分子动力学模拟对 DNA 及抑菌剂与 DNA 体系进行了力场模拟, 然后运用经典牛顿力学方法计算微观分子随时间的运动轨迹, 再利用统计力学的原理得到体系的宏观性质。其优势在于可以在高维空间和时间尺度上提供原子之间的动力学信息, 可以实时从原子水平上观测到分子的位置和结构变化^[48-49]。通常均方根误差(root-mean-square deviation, RMSD)、均方根浮动(root-mean-square fluctuation, RMSF)、溶剂可及表面区域(solvent accessible surface area, SASA)、氢键数量和旋转半径(R_g)是抑菌剂与 DNA 形成复合物稳定性的重要指标, 通过分子力学/泊松-玻尔兹曼表面积(molecular mechanics/Poisson Boltzmann surface area, MM/PBSA)方法可估算结合能。ZAHIN 等^[50]探究黑胡椒的主要成分胡椒碱和胡椒烯与 DNA 作用, 分子对接结果表明两种化合物在 DNA 的小沟槽处作用, 结合能分别为-7.6 和-5.3 kcal/mol, 分子模拟过程中两种化合物与 DNA 形成的复合物的 RMSD 较为稳定, RMSF 曲线、SASA 的变化不明显均证明了两个复合物的稳定性, MM-PBSA 分析中两种配体与 DNA 相互作用的结合能主要是范德华力, 与分子对接结果一致。以上两种方法的样品多为具有抑菌作用的新合成的化合物或植物化学物质, 可精准快速分析抑菌剂与菌体 DNA 的结合方式, 但是需要研究者能够熟练的使用计算机软件并储备大量的生物学知识。

3.2.2 单分子力谱

单分子力谱技术是研究分子内与分子间相互作用的新型技术, 可应用于药物与 DNA 之间相互作用的研究^[51-52]。单分子力谱技术主要包括原子力显微镜(atomic force microscope, AFM)、磁镊、光镊和生物膜力探针等^[53-54]。基于原子力显微镜的单分子力谱技术是将单个 DNA 分子连在针尖与基底之间, 然后垂直拉伸, 通过记录力随拉伸长度的变化得到力-拉伸曲线^[55]。磁镊通过磁场控制超顺磁性小珠的移动捕捉 DNA 分子, 光镊是采用紧密聚焦的激光束对介电小球施加辐射压来操控小球捕捉 DNA 分子。

通过分析 DNA 与抑菌剂作用后力学曲线的变化情况可以推测两者的结合方式。BAZONI 等^[56]利用单分子力谱探究羟氯喹与 DNA 的作用机制, 力延伸曲线、伸直和持久性长度分析发现了两种不同的结合模式, 即低药物浓度时的小沟槽结合和高药物浓度时的嵌插结合, 平衡结合常数也与先前报道的一致。对单个 DNA 分子的拉动实验使我们能够以高时间分辨率监测构象转变并测量其力学性能变化, 单分子力谱技术可以同时测量或施加小至几个飞牛顿级的力, 其测量精度是许多生物学方法不能达到的。声力谱(acoustic force spectroscopy, AFS)是近年来发展起来的利用声驻波研究单分子的测量工具, 主要通过使用振荡电压驱动压电元件, 在流通池上方共振产生平面声驻波而使微球运动^[57-58]。AFS 测量的动力范围大, 许多单个分子可以并行操作和跟踪, 可以同时大规模的测量。AFS 装置简单, 成本较低, 后续也可以应用于抑菌剂与 DNA 相互作用的研究中。

3.2.3 量子点荧光传感器

量子点(quantumdots, QDs)是一种新型的纳米荧光材料, 主要由硒化镉(CdSe)、碲化镉(CdTe)和硫化镉(CdS)等组成, 可作为新兴的荧光标记材料。量子点的发光原理是受到激发时, 价带上的电子吸收能量跃迁至导带产生空穴, 高能级电子从导带跃迁回价带时与空穴复合并发射出光子, 从而发出荧光。如果量子点表面产生缺陷, 会导致荧光强度降低甚至发生猝灭^[59]。基于量子点的荧光可逆“OFF-ON”传感器, 具有简单、灵敏、快速等优点, 可根据量子点与配体的作用机制不同分为荧光共振能量转移、光诱导电子能量转移(photoinduced electronic energy transfer, PIET)及电化学发光等几大类。YANG 等^[60]利用基于 PIET 机制的 CdTe:Zn²⁺量子点荧光传感器研究头孢克肟与 DNA 的结合方式, 带正电荷的头孢克肟在带负电荷的量子点表面结合产生 PIET, 阻止了量子点中电子和空穴的正常重组, 导致量子点的荧光处于“关闭”状态。然后, 随着 ct-DNA 的加入, 荧光强度逐渐恢复, 并优先与头孢克肟结合, 将其从量子点表面去除, 荧光被“打开”。目前, 量子点荧光传感器多用于癌症等重大疾病的研究, 未来也可以在抑菌剂与 DNA 的作用研究中发挥重大作用。

除上述方法外, 还有一些其他新兴研究方法, 如基于超高分辨率结构照明显微镜、共振拉曼光谱等, 多是将其他领域的先进技术应用于分子生物学的研究中, 将不同领域的方法结合起来或许可以打破原有的技术壁垒, 取得新的发现。

3.3 研究方法总结

光谱法、电化学方法和热力学方法均是研究抑菌剂与 DNA 相互作用的常规方法, 每种方法的具体应用范围不同, 研究者需要根据样品特点加以选择。常规的研究方法是研究抑菌剂与 DNA 作用的有力工具, 但是其获得的信息较少, 对于具体的结合位点等难以确定。随着科研技术的不断发展

进步,许多其他领域先进的技术可以应用于分子生物学的研究,是常规方法的有益补充。如利用计算机软件模拟分子对接和分子动力学可以推测抑菌剂与 DNA 具体的结合位点、结合方式等。单分子力谱法可以观察到药物与 DNA 结合后单个 DNA 分子力学性能上的变化,得到结合动力学和亲和力的信息。文中列举的方法总结见表 2。

4 结束语

随着人们对食品抑菌剂研究的不断深入,越来越多的抑菌剂与 DNA 的作用方式被揭示出来,如苯乳酸可以与单核细胞增多性李斯特菌和大肠杆菌的 DNA 发生嵌插结合, ϵ -聚赖氨酸可与枯草芽胞杆菌和金黄色葡萄球菌的 DNA 发生嵌插结合,柚皮素则通过与金黄色葡萄球菌 DNA 发生沟槽结合来抑制菌体的生长。研究抑菌剂与 DNA 的作用方式有利于开发新型抑菌剂并加速在食品工

业中的应用,对相关研究方法的总结也具有重要意义。本文列举的抑菌剂与 DNA 作用方式的研究方法涵盖了化学方法、物理方法、生物学方法等多种方法,每种研究方法都具有优缺点,可以根据研究样本的不同选择合适的研究方法,研究者通常采取几种方法联用来相互印证实验结果以保证准确性。在现有的研究方法的基础上不断改进,是推进抑菌剂与 DNA 相互作用机制的研究的方向之一。而且,将不同领域的方法结合起来或许可以突破现有技术瓶颈,取得意想不到的新发现。现在针对小分子与 DNA 相互作用的研究多为解决癌症等许多重大疾病,其中许多新兴的研究方法可以被借鉴应用于研究抑菌剂与 DNA 的相互作用,将非常有利于抑菌剂对 DNA 的抑菌机制研究及新型抑菌剂的开发。随着科学技术的不断进步,抑菌剂与 DNA 作用的研究方法也会不断完善,使得实验操作更加简单,效率得到提升,实验结果更加准确。

表 2 抑菌剂与 DNA 结合方式研究方法总结
Table 2 Summary of methods on the combination of bacteriostatic agents and DNA

研究方法	原理	优点	缺点
光谱法	通过测定抑菌剂作用后引起的体系光学性质的变化推测二者的结合方式	实验结果直观便于分析	样品处理周期长;方法中常用的分子探针 EB、DAPI 有毒性
电化学法	通过加入 DNA 后体系电化学特性的变化推测抑菌剂作用机制	灵敏,成本低,不需要对样本进行标记,可对反应过程进行实时监测	难以得出结构信息变化情况
热力学方法	通过抑菌剂与 DNA 结合时热力学信息变化推测两者的结合方式	不限制实验样本,得到的热力学参数较为全面,灵敏度高	实验时间较长,不能对反应过程进行实时监测
琼脂糖凝胶电泳	通过电泳和“分子筛”将不同分子量电荷量的 DNA 区分开,可以定量、分离、鉴定受到抑菌剂作用而裂解的 DNA 片段	实验材料易于制备,操作简单,可以分离相差较小的 DNA 片段	实验操作步骤烦琐,实验中用到的 EB 有毒性
DNA 相关蛋白	通过测定抑菌剂对 DNA 关键酶活性推断抑菌剂对 DNA 复制过程的作用	间接证明抑菌剂阻止菌体 DNA 的复制转录	不能得出抑菌剂与 DNA 作用的具体结合方式
分子对接和分子动力学模拟	通过计算机软件模拟推测抑菌剂与 DNA 的结合方式	简便,可以推测抑菌剂作用的具体方式及结合位点,减少了实验工作量	研究者需熟练操作及使用计算机软件,储备大量抑菌剂作用知识
单分子力谱	通过检测抑菌剂与 DNA 作用后力学性能的改变,推测两者的结合方式	所需样品量小,灵敏度高,精准度好	不同仪器和方法测量结果差异较大,复现性较差,样品制作难度大,单个分子不具有客观性
量子点荧光传感器	通过量子点荧光传感器可逆“OFF-ON”荧光光谱的变化推测抑菌剂与 DNA 的结合方式	简单,灵敏,选择性好不易被干扰	量子点的制备工艺复杂,多有毒性

参考文献

- [1] SEVCAN M, DENIZ Y, FATM A, *et al.* Genotoxicity of food preservative sodium sorbate in human lymphocytes *in vitro* [J]. *Cytotechnology*, 2012, 64(5): 553–562.
- [2] 肖怀秋,李玉珍,林亲录,等.金属抗菌肽 SIF_4 对大肠杆菌的抑菌机制[J].*食品与发酵工业*, 2022, 48(1): 111–116.
XIAO HQ, LI YZ, LIN QL, *et al.* Antimicrobial mechanism of metal antimicrobial peptide SIF4 against *Escherichia coli* [J]. *Food Ferment Ind*, 2022, 48(1): 111–116.
- [3] 谭婉静,张笑薇,白泓,等.丁香油与月桂酸对金黄色葡萄球菌的协同抑制作用[J].*现代食品科技*, 2022, 38(2): 278–285, 265.
TAN WJ, ZHANG XW, BAI H, *et al.* Synergistic inhibitory effect of clove oil and lauric acid on *Staphylococcus aureus* [J]. *Mod Food Sci Technol*, 2022, 38(2): 278–285, 265.
- [4] 廖见培. DNA 与小分子药物相互作用的研究[D].长沙:湖南大学, 2001.
LIAO JP. Study on the interaction between DNA and small molecule drugs [D]. Changsha: Hunan University, 2001.
- [5] 黄云坡,孙晶,梅红霞,等.光谱法探究苯乳酸与小牛胸腺 DNA 的作用机制[J].*食品科技*, 2018, 43(10): 26–31.
HUANG YP, SUN J, MEI HX, *et al.* Spectroscopic study on the mechanism of interaction between phenyllactate and calf thymus DNA [J].

- Food Technol, 2018, 43(10): 26–31.
- [6] 王弋. 槲皮素与 DNA 的相互作用[J]. 生物工程学报, 2020, 36(12): 2877–2891.
WANG G. Interaction of quercetin and DNA [J]. Chin J Biotechnol, 2020, 36(12): 2877–2891.
- [7] 杨昆, 王欢, 高洁, 等. 抗菌肽 BCp12 对大肠杆菌壁膜及 DNA 损伤的机制[J]. 食品科学, 2021, 42(19): 114–121.
YANG K, WANG H, GAO J, *et al.* Mechanism by which antimicrobial peptide BCp12 acts on the cell wall and membrane of *Escherichia coli* cells and induces DNA damage [J]. Food Sci, 2021, 42(19): 114–121.
- [8] AKERMIS, SMAOUI, ELHADEFK, *et al.* Cupressus sempervirens essential oil: Exploring the antibacterial multitarget mechanisms, chemcomputational toxicity prediction, and safety assessment in zebrafish embryos [J]. Molecules, 2022, 27: 2630.
- [9] LI QS, YANG P, WANG HF, *et al.* Diorganotin (IV) antitumor agent (C₂H₅)₂SnCl₂(phen)/nucleotides aqueous and solid-state coordination chemistry and its DNA binding studies [J]. J Inorg Biochem, 1996, 64(3): 181–195.
- [10] MARIA O, CAM D. Electrochemical study of quercetin-DNA interactions: Part II. In situ sensing with DNA biosensors [J]. Bioelectrochemistry, 2004, 64(2): 143–150.
- [11] CUI HY, ZHANG CH, LI CZ, *et al.* Antimicrobial mechanism of clove oil on *Listeria monocytogenes* [J]. Food Control, 2018, 94: 140–146.
- [12] WANG LH, WANG MS, ZENG XA, *et al.* Membrane destruction and dna binding of staphylococcus aureus cells induced by carvacrol and its combined effect with a pulsed electric field [J]. J Agric Food Chem, 2016, 64: 6355–6363.
- [13] LIANG HY, HE KK, LI T, *et al.* Mechanism and antibacterial activity of vine tea extract and dihydromyricetin against *Staphylococcus aureus* [J]. Sci Rep-UK, 2020, 10(1): 21416.
- [14] JOLANTA S, MARCIN P, MALGORZATA J, *et al.* Interaction of new tri-, tetra-, and pentacyclic azaphenothiazine derivatives with calf thymus DNA: Spectroscopic and molecular docking studies [J]. Spectrochim Acta Part A, 2021, 262: 120105.
- [15] CUI SM, LI T, WANG Q, *et al.* Antibacterial effects of *Schisandra chinensis* extract on *Escherichia coli* and its applications in cosmetic [J]. Curr Microbiol, 2020. DOI: 10.1007/s00284-019-01813-6
- [16] NING YW, YAN AH, YANG K, *et al.* Antibacterial activity of phenyllactic acid against *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* by dual mechanisms [J]. Food Chem, 2017, 228: 533–540.
- [17] AMEEN F, SIDDIQUI S, JAHAN I, *et al.* Studying the interaction of scopolamine with calf-thymus DNA: An *in vitro* and *in silico* approach and genotoxicity [J]. Spectrochim Acta Part A, 2022, 265: 120391.
- [18] BI SY, ZHOU HF, WU J, *et al.* Micronomicin/tobramycin binding with DNA: Fluorescence studies using of ethidium bromide as a probe and molecular docking analysis [J]. J Biomol Struct Dyn, 2019, 37(6): 1464–1476.
- [19] WANI TA, ALSAIF N, BAKHEIT AH, *et al.* Interaction of an abiraterone with calf thymus DNA: Investigation with spectroscopic technique and modelling studies [J]. Bioorg Chem, 2020, 100: 103957
- [20] IRFAN H, SANA F, SHARMIN S, *et al.* Exploring the binding mechanism of β -resorcylic acid with calf thymus DNA: Insights from multi-spectroscopic, thermodynamic and bioinformatics approaches [J]. Spectrochim Acta Part A, 2021, 260: 119952.
- [21] JIANG Q, LOU ZX, WANG HX, *et al.* Antimicrobial effect and proposed action mechanism of cordycepin against *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* [J]. Microbiol Soc Korea, 2019, 57(4): 288–297.
- [22] 黄国霞, 阎柳娟, 李军生, 等. 共振散射光谱法研究槲皮素与 DNA 相互作用[J]. 广西工学院学报(自然科学版), 2010, 21(3): 19–22.
HUANG GX, YAN LJ, LI JS, *et al.* Studies on the interaction of quercetin with herring sperm DNA by resonance scattering spectra [J]. J Guangxi Inst Technol (Nat Sci Ed), 2010, 21(3): 19–22.
- [23] 刘洪霞. ϵ -聚赖氨酸、Nisin 和纳他霉素的抑菌特性及协同抑菌机理研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2013.
LIU HX. The inhibition activity and synergistic mechanism of ϵ -polylysine, nisin and natamycin [D]. Taian: Shandong Agricultural University, 2013.
- [24] NING HQ, LI YQ, LIN H, *et al.* Apoptosis-induction effect of ϵ -poly-llysine against *Staphylococcus aureus* and its application on pasteurized milk [J]. LWT, 2020. DOI: 10.1016/j.lwt.2020.110493
- [25] 卞立晴. 阿魏酸己酯对单增李斯特菌的抑菌活性及亚细胞机理研究[D]. 杭州: 浙江工商大学, 2019.
BIAN LQ. Antibacterial activity and subcellular mechanism of hexyl ferulate against *Listeria monocytogenes* [D]. Hangzhou: Zhejiang University of Commerce and Industry, 2019.
- [26] 张文龙, 胡颖媛, 王颖莉, 等. 蜂毒肽与 CT-DNA 的相互作用[J]. 无机化学学报, 2022, 38(4): 629–636.
ZHANG WL, HU YY, WANG YL, *et al.* Interaction of melittin and calf thymus DNA [J]. Acta Inorg Chem, 2022, 38(4): 629–636.
- [27] NI YN, DU S, KOKOT S. Interaction between quercetin-copper(II) complex and DNA with the use of the Neutral Red dye fluorophor probe [J]. Anal Chim Acta, 2006. DOI: 10.1016/j.aca.2006.11.006
- [28] LI XC, HE CF, SONG LY, *et al.* Antimicrobial activity and mechanism of Larch bark procyanidins against *Staphylococcus aureus* [J]. Acta Biochim Biophys Sin, 2017, 49(12): 19–27.
- [29] WANG LH, WANG MS, ZENG XA, *et al.* Membrane and genomic DNA dual-targeting of citrus flavonoid naringenin against *Staphylococcus aureus* [J]. Integ Biol, 2017, 9(10): 820–829.
- [30] 金丽虹, 王梦欣, 周雅静, 等. 光谱法及分子模拟研究青蒿素与小牛胸腺 DNA 的相互作用[J]. 发光学报, 2018, 39(12): 1765–1771.
JIN LH, WANG MX, ZHOU YJ, *et al.* Binding interaction of artemisinin and DNA: Spectroscopic methodologies and molecular docking [J]. Luminous Newspaper, 2018, 39(12): 1765–1771.
- [31] LIU DL, LIU J, LI JY, *et al.* A potential food biopreservative, CccXJ-37N, non-covalently intercalates into the nucleotides of bacterial genomic DNA beyond membrane attack [J]. Food Chem, 2017, 217: 576–584.
- [32] RODRIGUEZ M, BARD AJ. Electrochemical studies of the interaction of metal chelates with DNA. 4. voltammetric and electrogenerated chemiluminescent studies of the interaction of tris (2,2'-bipyridine)osmium (II) with DNA [J]. Anal Chem, 1990, 62(24): 2658–2662.
- [33] 万红艳. 萘醌类小分子化合物与 DNA 相互作用的机理及其应用研究[D]. 福州: 福建医科大学, 2007.
WAN HY. Study on the Mechanism and application of the interaction between anthraquinone small molecule compounds and DNA [D]. Fuzhou: Fujian University of Medicine, 2007.
- [34] 高颜, 李军生, 王倩倩, 等. 茜草色素光泽汀与 DNA 相互作用机理的研究[J]. 现代食品科技, 2014, 30(12): 43–47, 132.
GAO Y, LI JS, WANG QQ, *et al.* A mechanistic study on the interaction between DNA and lucidin using madder color [J]. Mod Food Sci Technol, 2014, 30(12): 43–47, 132.

- [35] 李红英, 赵炜, 王学亮, 等. 中药制剂中绿原酸的电化学敏感测定及其与 DNA 的相互作用[J]. 分析测试学报, 2017, 36(3): 398–402, 408.
LI HY, ZHAO W, WANG XL, *et al.* Sensitive electrochemical determination of chlorogenic acid in traditional chinese medicine product and its interaction with DNA [J]. J Instrum Anal, 2017, 36(3): 398–402, 408.
- [36] 陈玉. 基于 DNA 三臂交联结构和抗菌药物调控的电化学发光生物传感器研究[D]. 西安: 西北大学, 2020.
CHEN Y. DNA three-way-junction and antibiotics modulated electrochemiluminescence biosensor [D]. Xi'an: Northwest University, 2020.
- [37] FIROUZEH HM, MOHAMMAD T, HASSAN K. Doxorubicin anticancer drug monitoring by ds-DNA-Based electrochemical biosensor in clinical samples [J]. Micromachines-Basel, 2021, 12(7): 808.
- [38] DE CPAV, LOPES IC, HYEDA CE, *et al.* Electrochemical behaviour of anticancer drug lomustine and in situ evaluation of its interaction with DNA [J]. J Pharmaceut Biomed, 2019, 176: 112786.
- [39] SARWAR T, ISHQI HM, REHMAN SU, *et al.* Caffeic acid binds to the minor groove of calf thymus DNA: A multi-spectroscopic, thermodynamics and molecular modelling study [J]. Int J Biol Macromol, 2017, 98: 319–328.
- [40] QAIS FA, AHMAD I. *In vitro* interaction of cefotaxime with calf thymus DNA: Insights from spectroscopic, calorimetric and molecular modelling studies [J]. J Pharm Biomed Anal, 2018, 149: 193–205.
- [41] AFRIN S, RAHMAN Y, SARWAR T, *et al.* Molecular spectroscopic and thermodynamic studies on the interaction of anti-platelet drug ticlopidine with calf thymus DNA [J]. Spectrochim Acta Part A, 2017, 186: 66–75.
- [42] HARIS P, MARY V, APARNA P, *et al.* A comprehensive approach to ascertain the binding mode of curcumin with DNA [J]. Spectrochim Acta Part A, 2017, 175: 155–163.
- [43] LAI DN, ZHOU AR, TAN BK, *et al.* Preparation and photodynamic bactericidal effects of curcumin- β -cyclodextrin complex [J]. Food Chem, 2021, 361: 130117.
- [44] DUAN XX, CHEN SY, DUAN S, *et al.* Antibiotic activities of the natural antimicrobial substance produced by *Lactobacillus paracasei* FX-6 against *Pseudomonas putida* [J]. LWT, 2020, 123: 109096.
- [45] MAGDALENA E, AGNIESZKA N, AGATA C, *et al.* Antibacterial mechanisms of *Aronia melanocarpa* (Michx.), *Chaenomeles superba* Lindl. and *Cornus mas* L. leaf extracts [J]. Food Chem, 2021, 350: 129218.
- [46] 陈雨, 武艺, 唐祉娟, 等. 分子对接技术对二酮哌嗪类物质抑菌机制研究[J]. 哈尔滨商业大学学报(自然科学版), 2020, 36(6): 653–659.
CHEN Y, WU Y, TANG ZJ, *et al.* Study on antibacterial mechanism of diketopiperazine compounds by molecular docking technology [J]. J Harbin Univ Commer (Nat Sci Ed), 2020, 36(6): 653–659.
- [47] SONG JJ, PENG SD, YANG J, *et al.* Isolation and identification of novel antibacterial peptides produced by *Lactobacillus fermentum* SHY10 in Chinese pickles [J]. Food Chem, 2021, 348: 129097.
- [48] MAJUM DR, DAS CK, BANERJEE I, *et al.* Screening of the prime bioactive compounds from aloe vera as potential anti-proliferative agents targeting DNA [J]. Comput Biol Med, 2021, 141: 105052.
- [49] MARYAM D, ZEINAB AT, NARGES M, *et al.* A novel view of the separate and simultaneous binding effects of docetaxel and anastrozole with calf thymus DNA: Experimental and in silico approaches [J]. Spectrochim Acta Part A, 2020, 228: 117528.
- [50] ZAHIN M, BOKHARI NA, AHMAD I, *et al.* Antioxidant, antibacterial, and antimutagenic activity of *Pipernigrum* seeds extracts [J]. Saud J Biol Sci, 2021, 28(9): 5094–5105.
- [51] MOURA TA, JUNIOR RLR, ROCHA MS. Caffeine modulates the intercalation of drugs on DNA: A study at the single molecule level [J]. Biophys Chem, 2021, 277: 106653.
- [52] SILVA EFDDF, UNIVERSIDADE FDV, VICOSA, *et al.* Dodecyltrimethylammonium bromide surfactant effects on DNA: Unraveling the competition between electrostatic and hydrophobic interactions [J]. Phys Rev E, 2020, 102(3-1): 032401.
- [53] ALEKSANDRA K, WERONIKA L, KAJA F, *et al.* Profound nanoscale structural and biomechanical changes in DNA helix upon treatment with anthracycline drugs [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(11): 4142.
- [54] JU LN, CHEN YF, LI KT, *et al.* Dual biomembrane force probe enables single-cell mechanical analysis of signal crosstalk between multiple molecular species [J]. Biophys J, 2018, 114(3): 14185.
- [55] DEVIN T, EDWARDS, JAEVYN K, *et al.* Force spectroscopy with 9 μ s resolution and sub-pN stability by tailoring AFM cantilever geometry [J]. Biophys J, 2017, 113(12): 2595–2600.
- [56] BAZONI RF, MOURA TA, ROCHA MS. Hydroxychloroquine exhibits a strong complex interaction with DNA: Unraveling the mechanism of action [J]. J Phys Chem Lett, 2020, 11(22): 9528–9534.
- [57] LIN SN, QIN L, WUITE GJL, *et al.* Unraveling the biophysical properties of chromatin proteins and DNA using acoustic force spectroscopy [J]. Methods Mol Biol, 2018, 1837: 301–316.
- [58] MAJA S, SONA K, MARKETKA V, *et al.* Quantum dots-fluorescence resonance energy transfer-based nanosensors and their application [J]. Biosens Bioelectron, 2015, 74: 562–574.
- [59] ZHANG YL, ZHANG Y, YANG WH, *et al.* Fluorescent reversible regulation based on photoinduced electron transfer from DNA to quantum dots and intercalation binding of DNA intercalator to DNA [J]. Talanta, 2018, 188: 7–16.
- [60] YANG CZ, LIU YC, XU C, *et al.* A sensitive fluorescent sensor based on the photoinduced electron transfer mechanism for cefixime and ct-DNA [J]. J Mol Recog: JMR, 2020, 33(3): e2816.

(责任编辑: 郑丽 张晓寒)

作者简介



王德娴, 硕士研究生, 主要研究方向为日用化学品科学与技术。

E-mail: 2223132531@qq.com

宋丽雅, 教授, 主要研究方向为化妆品植物功效添加剂的研究与开发。

E-mail: songly@th.btbu.edu.cn