

# 基于动态光散射技术的含乳糖组装体与蛋白质相互作用

张攀<sup>1</sup>, 孙鹏飞<sup>2</sup>, 林铭昌<sup>1</sup>, 高振飞<sup>1</sup>, 陈国颂<sup>1</sup>

(1. 复旦大学高分子科学系, 上海 200433;

2. 南京邮电大学材料科学与工程学院, 南京 210023)

**摘要** 采用非共价键合胶束(NCCM)的组装策略, 制备了表面为糖聚合物的纳米粒子, 利用动态光散射技术, 实时跟踪了在溶液中糖与蛋白相结合的动力学数据, 并以聚集体形成的速度来体现不同的蛋白对相同组装体的结合能力强弱. 实验结果表明, 对表面覆盖 100%乳糖的组装体, 各蛋白的结合能力表现为  $SBA \gg LecA \approx Galectin\ 3 > ECA \approx Galectin\ 1$ , 表明蛋白的糖结合位点个数及其空间分布对多价作用的动力学有较大影响. 基于此模型, 对人半乳糖凝集素-3 与糖结合的方式进行了初步探究.

**关键词** 糖聚合物; 凝集素; 动态光散射; 多价作用

**中图分类号** O631      **文献标志码** A

对糖-蛋白间相互作用的研究有助于理解包括免疫响应、信息传递等在内的多种生物学过程<sup>[1-4]</sup>. 采用动态光散射技术, 能实时监测溶液中发生的糖与凝集素<sup>[5]</sup>的识别作用, 获得该多价作用的动力学相关特征, 有别于局限在特定平面上的传统“糖芯片”研究<sup>[6-10]</sup>. 我们此前的工作<sup>[11,12]</sup>表明, 通过合成糖聚合物并进一步将其组装得到表面为糖的纳米粒子, 在加入凝集素后, 动态光散射跟踪到了溶液中粒子的流体动力学半径变化与糖-蛋白的特异性识别相关. 上述研究利用了邻羟基苯硼酸半酯与糖能形成动态共价键的特性<sup>[13,14]</sup>, 采用非共价键合胶束(NCCM)的组装<sup>[15,16]</sup>, 得到核的结构一致、亲水壳层有所区别的含糖组装体.

在此基础上, 我们合成了含乳糖的聚合物, 并通过非共价键合胶束, 得到表面为乳糖的组装体, 对不同的半乳糖结合蛋白加入溶液后的变化进行跟踪, 分析得出影响结合快慢的 2 个主要因素: 糖结合域在凝集素上的位点个数及分布. 由于采用非共价键合的组装方法, 只需调控不同糖聚合物的比例, 便能方便地获得表面乳糖密度不同的含糖组装体, 进一步研究密度<sup>[6,17]</sup>对该作用的影响. 将人半乳糖凝集素-3 应用于该简单模型, 通过与其它凝集素相比较, 验证了人半乳糖凝集素-3 的复杂结合模式<sup>[18,19]</sup>.

## 1 实验部分

### 1.1 试剂与仪器

大豆凝集素(SBA)与鸡冠珊瑚树凝集素(ECA)购于 Vector Laboratories, Inc.; LecA (PA-IL) Pseudomonas aeruginosa 购于 Elicityl 公司; 人半乳糖凝集素-3 (Human Galectin 3) 及人半乳糖凝集素-1 (Human Galectin 1) 购于 PeproTech, Inc; 4-羟基乙基哌嗪乙磺酸(HEPES)购于北京索莱宝科技有限公司. 其余试剂均购于国药集团化学试剂有限公司. 糖聚合物 PLac 和 PGlc 参照本课题组的方法<sup>[12]</sup>合成 (Scheme S1, 见本文支持信息), 含苯硼酸聚合物 PtBMA-co-PBOB 根据文献<sup>[13]</sup>方法合成 (Scheme S2, 见本文支持信息).

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz) 核磁共振谱在 Avance III HD 型核磁共振仪上测定. 样品形貌表征在 Philips

收稿日期: 2018-05-17. 网络出版日期: 2018-10-15.

基金项目: 国家自然科学基金(批准号: 21504016)资助.

联系人简介: 陈国颂, 女, 博士, 教授, 主要从事大分子自组装的研究. E-mail: guosong@fudan.edu.cn

CM120 透射电子显微镜(TEM)下观察, 加速电压为 80 kV, 将样品滴在亲水处理后的铜网上, 抽真空干燥 2 h. 分子量及分子量分布使用 Waters Breeze 1515 型凝胶渗透色谱(GPC)仪测定, 以 *N,N*-二甲基甲酰胺(DMF)加 0.5 mol/L 溴化锂为流动相, 流速 1 mL/min, 温度为 25 °C, 使用 PEO(购于 TOSOH 公司)标准样品对分子量及分子量分布进行校正. 样品经 450 nm Millipore PTFE 滤膜过滤后, 在 ALV/5000 激光光散射仪上进行检测. 该光散射仪配有 ALV5000 数字相关器和 632 nm, 22 mW 的单色 He-Ne 激光光源, 在 90°下测试, 并用 CONTIN 拟合得到流体力学半径( $\langle R_h \rangle$ ). 单次测试时间 300 s, 每个样品测 3 次取平均, 测试温度 25 °C.

## 1.2 实验过程

配制实验所需的 HBS 缓冲溶液, 其组成为: 4-羟基乙基哌嗪乙磺酸(10 mmol/L), 氯化钙(1 mmol/L), 氯化锰(1 mmol/L)和氯化钠(150 mmol/L). 先根据所用溶液总体积称取 4-羟基乙基哌嗪乙磺酸及氯化钠, 以适当的蒸馏水溶解后, 用氢氧化钠调节其 pH 至约 7.4, 再加入氯化锰及氯化钙, 使其完全溶解, 使用前需通过 450 nm 滤膜处理.

以非共价键合胶束制备含糖胶束. 以 Lac-100 为例对组装过程进行说明. 首先将 PtBMA-co-PBOB 和 PLac 分别溶解在 DMF 中, 制成 1 mg/mL 的储备液. 在超声条件下, 将 200  $\mu$ L PLac 加入到 200  $\mu$ L PtBMA-co-PBOB 中, 继续超声 30 min, 随后用微量注射器在 15 min 内加入 3 mL 蒸馏水. 此后, 将混合溶液转移至透析袋(分子量 3500)中进行透析, 最后一次置换为 HBS 缓冲液. 取出透析袋中的溶液, 用 HBS 缓冲液定容至 10 mL, 得到 0.04 mg/mL 的储备液用于后续的实验. 在制备糖聚合物储备液时根据表 1 的比例混合 PLac 及 PGlc, 来调控组装体表面的乳糖含量. 其余步骤相同.

Table 1 Mass fraction (%) of the shell and core of glyco-micelles

Sample	PGlc (shell)	PLac (shell)	PtBMA (core)
Lac-0	100	0	100
Lac-25	75	25	100
Lac-50	50	50	100
Lac-75	25	75	100
Lac-100	0	100	100

在进行动态光散射测试前配制 1 mg/mL 的凝集素溶液. 将 2 mL 0.04 mg/mL 的含糖溶液经 450 nm 滤膜过滤后置于干净的光散射瓶中, 测试未加入凝集素时的光强及粒径, 随后轻缓地加入凝集素缓冲液, 每次 10  $\mu$ L, 记录连续 3 次的( $\langle R_h \rangle$ )数值, 每次 300 s, 取 3 次的平均值用于作图分析. 每次测试的 Diode 和  $\text{CH}_0$  数值也同样进行记录, 用以计算  $I_s/I_0$ .

## 2 结果与讨论

### 2.1 糖聚合物的组装

聚合物的结构如图 1 所示, 相应的表征参见图 S1~图 S3(见本文支持信息).

将 PtBMA-co-PBOB 和 PLac 溶解在二者的共溶剂 DMF 中, 在超声下加入 PtBMA-co-PBOB 的不良溶剂水, 使其自组装形成以 PtBMA-co-PBOB 为疏水核, PLac 为亲水壳层的胶束, 其中亲疏水部分由苯硼酸与糖分子之间的动态共价键相连. 透析除去有机溶剂后, 得到含糖纳米粒子. 通过图 2 的透射电子显微镜(TEM)照片, 可观察到直径约为 100 nm 的球状胶束, 其通过动态光散射测得的流体力学半径约为 60 nm.

保持每次组装所使用的糖聚合物储备液的体积不变, 按照表 1 调整 PLac 和 PGlc 的比例, 便能得到表面乳糖密度不同的含糖组装体, 省去了合成乳

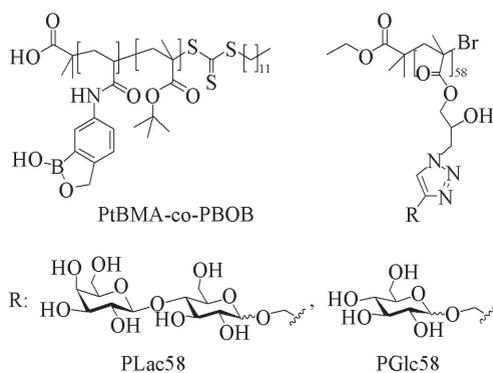


Fig.1 Structures of PtBMA-co-PBOB and glycopolymers PLac and PGlc

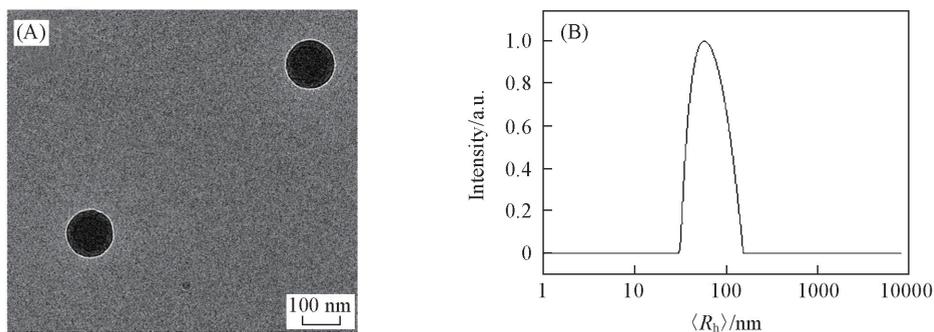


Fig.2 TEM image of Lac-100(A) and  $\langle R_h \rangle$  of Lac-100(B)

糖含量逐级变化的糖聚合物所需要的大量合成工作. 我们以其表面分布的糖分子中乳糖的百分比分别命名, 并进行形貌表征. 透射电子显微镜照片参见图 S4(见本文支持信息), 所得粒子均呈球形, 动态光散射结果列于表 2. 可见流体动力学半径在 60~80 nm 之间. 非杂壳的 Lac-0 和 Lac-100 的均一性相对较好.

Table 2 Hydrodynamic radius of glyco-micelles with different coverage degree of lactose\*

Sample	$\langle R_h \rangle/\text{nm}$	PDI
Lac-0	63	0.08
Lac-25	60	0.22
Lac-50	72	0.28
Lac-75	80	0.38
Lac-100	60	0.10

\* PDI: polydispersity index.

## 2.2 含糖组装体与凝集素作用的动态光散射谱

选用与乳糖有特异性识别作用的大豆凝集素(SBA)、鸡冠珊瑚树凝集素(ECA)、人半乳凝素-3(Galectin-3)、人半乳凝素-1(Galectin-1)及来源于绿脓杆菌的 LecA(PA-IL)进行实验. 在滴加凝集素的过程中, 使用动态光散射谱实时跟踪, 以测得的流体动力学半径的变化来反映不同凝集素与相同含糖组装体之间相互作用的动力学特性.

先将大豆凝集素分别加入 Lac-100 和 Lac-0 中检验实验方案设计的有效性. 从图 3(A) 可以看到, Lac-100 和 Lac-0 对 SBA 的响应存在巨大的差异. DLS 几乎未检测到 Lac-0 粒子的聚集, 而随着凝集素的加入, Lac-100 粒子的流体动力学半径出现了迅速增长, 说明含糖组装体表面的乳糖分子与凝集素之间发生了识别作用, 加入凝集素后测得的粒径分布见图 3(B). Lac-0 粒子表面都是葡萄糖, 而葡萄糖与大豆凝集素之间不存在特异性识别, 实验结果与已知的理论相符. 据此推出, 葡萄糖可作为乳糖

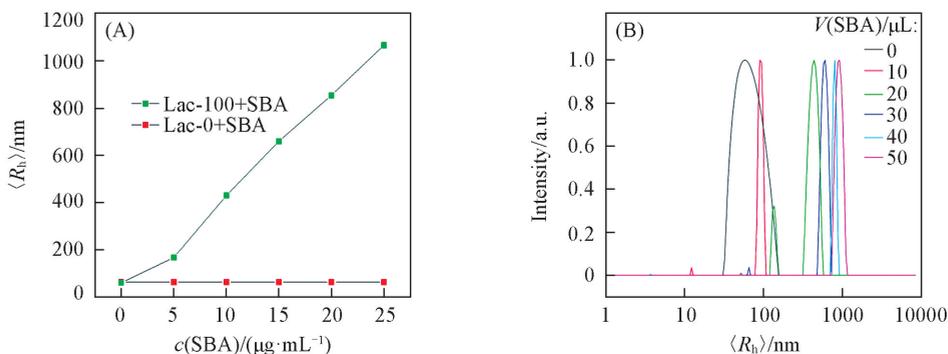


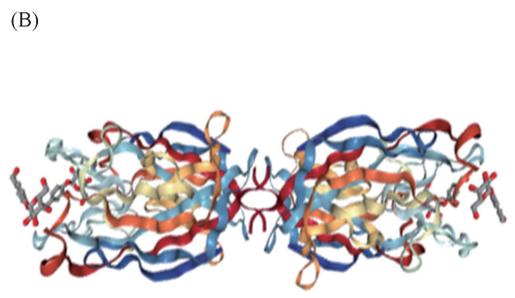
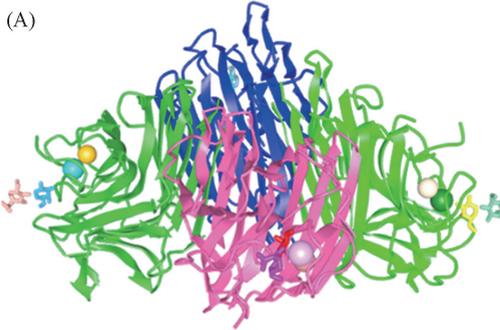
Fig.3  $\langle R_h \rangle$  of Lac-100 and Lac-0 with titration of SBA(A) and  $\langle R_h \rangle$  distribution of Lac-100 with titration of SBA(B)

Sidenotes are the volume of SBA added to the solution. Mean value of three continuous experiments.

Concentration of glyco-micelles is 0.04 mg/mL.

的稀释分子来调控组装体表面的乳糖密度。

图4给出了Lac-100与不同凝集素作用的动力学半径分布. 随着凝集素的加入, 溶液中粒子发生交联形成聚集体, 使得体系的流体动力学半径逐渐增大, 但各凝集素所引起的增长幅度有所区别. 对Lac-100粒子, 凝集素的作用速率分别为 $SBA \gg LecA \approx Galectin\ 3 > ECA \approx Galectin\ 1$ . 根据已有的研究结果<sup>[20,21]</sup>, SBA和LecA均有4个结合位点, 与半乳糖的结合常数也在同样的数量级, 因此结合速率的差异主要是4个结合位点的分布方式不同. 图5给出了SBA和LecA的结构. SBA的结合位点处在四面体的4个顶点, 而LecA的结合位点处在长方形的4个顶点, 位于同一平面, 更具有刚性. 因此, SBA在结构上具备更加灵活的结合特性.

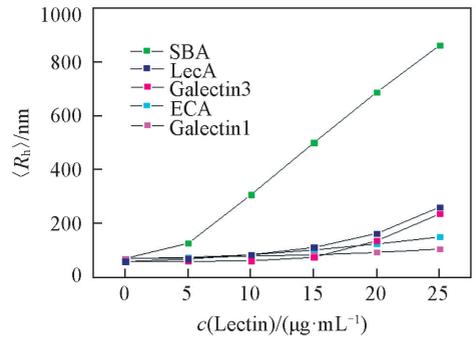


**Fig.5** Crystal structure of SBA complexed with 2,6-pentasaccharide(PDB code 2SBA) (A) and pseudomonas aeruginosa lectin(LecA) complexed with GalA-QRS(PDB code 4LKD) (B)

只有2个结合位点的ECA<sup>[22]</sup>和Galectin-1<sup>[23]</sup>表现出较为缓慢的结合, 这与糖-蛋白作用的多价实质<sup>[24]</sup>相符. 与Galectin-1不同的是, Galectin-3是一个具有嵌合结构<sup>[25]</sup>的凝集素, 其生物学功能备受关注. 科学家提出了N型<sup>[18]</sup>和C型<sup>[19]</sup>2种可能的自缔合机理来解释Galectin-3的作用机制. 我们将Galectin-3加入对照实验, 以探究其交联作用动力学. 随着Galectin-3的加入, Lac-100体系的粒子逐渐发生聚集, 其流体动力学半径的增长曲线与具有4个结合位点及结构相对刚性的LecA接近, 这意味着随着乳糖与之发生识别作用, Galectin-3单体的结构可能发生了变化, 使其更有利于与含糖组装体发生交联, 并且这种变化存在着一定的限制, 使其不会具备像SBA那么强的交联能力. 在本文的实验范围内, Galectin-3的诱导组装体聚集的能力优于二聚体Galectin-1.

进一步将上述实验拓展至表面乳糖密度不同的含糖组装体. 各粒子对植物凝集素的响应速度遵从如下顺序:  $SBA \gg LecA > ECA$ , 如图6所示[图S5(见本文支持信息)仅保留了这3组凝集素的比较, 更为直观]. 对于SBA和LecA, 含糖组装体表面的乳糖密度越高, 与凝集素作用的速度越快(图S6, 见本文支持信息). 但对于Galectin 3, 糖密度与其结合能力并非线性关系(图7和图S7, 见本文支持信息). 从图6的比较可以看到, 对糖密度较高的Lac-75和Lac-100, Galectin-3交联含糖粒子的效率与LecA相当, 但对低密度的Lac-25, Galectin-3明显快于LecA, 在Lac-50这一组测试中, Galectin-3则具有与SBA相当的交联效率. 这个现象与Galectin-3在与糖结合时会改变其组织形式的假设相符, 密度变化作为环境变化的一种因素, 对Galectin-3结合行为的影响是巨大的, 适当的密度有利于Galectin-3突破结构上的限制, 达到更优的交联效果, 这为研究Galectin-3提供了新的线索.

综上所述, 采用非共价键合胶束的组装策略, 制备了表面为乳糖且其密度逐渐变化的球形含糖纳米粒子, 其流体动力学半径在60~80 nm之间, 通过动态光散射谱跟踪了这些粒子与不同凝集素的作用



**Fig.4**  $\langle R_h \rangle$  of Lac-100 with the titration of different lectins

$c(\text{Lac-100}) : 0.04 \text{ mg/mL}$ .

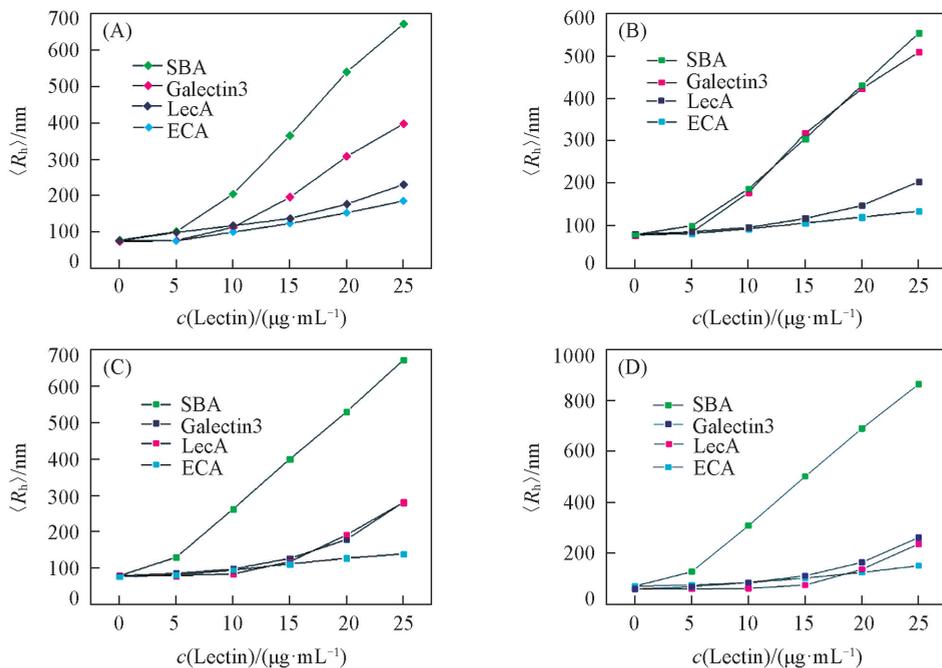


Fig.6  $\langle R_h \rangle$  of glyco-micelles with titration of different lectins

(A) Lac-25; (B) Lac-50; (C) Lac-75; (D) Lac-100.

用过程. 结果显示, 凝集素上糖结合位点的个数及其分布是主导糖-蛋白相互作用的 2 个关键因素, 在实验所采用的凝集素中, 大豆凝集素由于拥有最多的结合位点且其分布更具灵活性而拥有最强的结合能力. 由于 3 种植物凝集素的结构较为明确, 与糖结合的模式相较之下可预见性更好, 可以用作标尺来研究其它与半乳糖有特异性识别作用的凝集素. 本文将人半乳凝素-3 纳入到该模型中进行研究, 证实了其自缔合的特性, 并且更进一步地发现糖配体的密度是解释人半乳凝素-3 在与乳糖发生作用时不可或缺的一个影响因素.

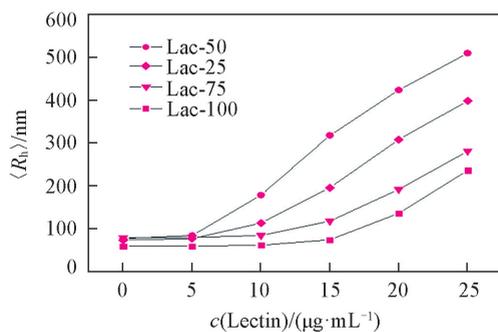


Fig.7  $\langle R_h \rangle$  of glyco-micelles with titration of Galectin 3

支持信息见 <http://www.cjcu.jlu.edu.cn/CN/10.7503/cjcu20180367>.

## 参 考 文 献

- [1] Dwek R. A., *Chem. Rev.*, **1995**, 23(1), 1—25
- [2] Imberty A., Varrot A., *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **2008**, 18(5), 567—576
- [3] Huang Y., Huang J. H., Xie Q. J., Yao S. Z., *Prog. Chem.*, **2008**, (6), 942—950 (黄毅, 黄金花, 谢青季, 姚守拙. 化学进展, **2008**, (6), 942—950)
- [4] Pang P. C., Dell A., *Science*, **2011**, 333(6050), 1761—1764
- [5] Lis H., Sharon N., *Chem. Rev.*, **1998**, 98(2), 637—674
- [6] Godula K., Bertozzi C. R., *J. Am. Chem. Soc.*, **2012**, 134(38), 15732—42
- [7] Liang P. H., Wang S. K., Wong C. H., *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, 129(36), 11177—84
- [8] He X. P., Wang X. W., Jin X. P., *J. Am. Chem. Soc.*, **2011**, 133(10), 3649—3657
- [9] Wan A. J., Wang K., Zhang H. C., Li H. L., Wang D. N., *Chinese J. Anal. Chem.*, **2012**, 40(11), 1780—1788 (万钢俊, 王琨, 张洪才, 李慧丽, 王德农. 分析化学, **2012**, 40(11), 1780—1788)
- [10] Zhao X. L., *The Interactions of Marine Polysaccharides and Their Derivatives with Proteins by Carbohydrate Microarray*, Ocean University of

- China, Qingdao, **2013**(赵小亮. 利用糖芯片研究海洋多糖及其衍生物与蛋白质的相互作用, 青岛: 中国海洋大学, **2013**)
- [11] Su L., Zhao Y., Chen G. S., *Polym. Chem.*, **2012**, 3(6), 1560—1566
- [12] Sun P. F., Lin M. C., Chen G. S., *Sci. Chinese Chem.*, **2016**, 59(12), 1—5
- [13] Lin M. C., Chen G. S., *Acta Polym. Sin.*, **2017**, (7), 1113—1120(林铭昌, 陈国颂. 高分子学报, **2017**, (7), 1113—1120)
- [14] Lin M. C., Sun P. F., Chen G. S., *Chem. Commun.*, **2014**, 50(68), 9779—9782
- [15] Zhu H., Yuan X. F., Zhao H. Y., Liu S. Y., Jiang M., *Chinese J. Appl. Chem.*, **2001**, (5), 336—341(朱蕙, 袁晓凤, 赵汉英, 刘世勇, 江明. 应用化学, **2001**, (5), 336—341)
- [16] Guo M. Y., Jiang M., *Soft Matter*, **2009**, 5(3), 495—500
- [17] Christopher W. C., Jason E. G., Motomu K., *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, 124(8), 1615—1619
- [18] Nieminen J., Kuno A., Hirabayashi J., *J. Biol. Chem.*, **2007**, 282(2), 1374—1383
- [19] Adriana L., Emma S., Nilsson U. J., *J. Biol. Chem.*, **2012**, 287(26), 21751—56
- [20] De B. H., Lis H., Van T. H., *J. Biol. Chem.*, **1984**, 259(11), 7067—7074
- [21] Kadam R. U., Myriam B., Matthew H., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2011**, 50(45), 10631—35
- [22] Iglesias J. L., Lis H., Sharon N., *Eur. J. Biochem.*, **1982**, 123(2), 247—252
- [23] Camby I., Mercier M. L., Lefranc F., *Glycobiology*, **2006**, 16(11), 137—138
- [24] Li M. M., Xiong Y. T., Qing G. Y., Sun T. L., *Prog. Biochem. Biophys.*, **2016**, 43(2), 115—127(李闵闵, 熊雨婷, 卿光焱, 孙涛垒. 生物化学与生物物理进展, **2016**, 43(2), 115—127)
- [25] Di L. S., Sundblad V., Cerliani J. P., *Biochemistry*, **2011**, 50(37), 7842—7857

## Kinetic Study of the Interaction Between Lactose-containing Assembly and Protein Through Dynamic Light Scattering Technique<sup>†</sup>

ZHANG Pan<sup>1</sup>, SUN Pengfei<sup>2</sup>, LIN Mingchang<sup>1</sup>, GAO Zhenfei<sup>1</sup>, CHEN Guosong<sup>1\*</sup>

(1. Department of Macromolecular Science, Fudan University, Shanghai 200433, China;

2. Institute of Advanced Materials, Nanjing University of Posts and Telecommunications, Nanjing 210023, China)

**Abstract** Non-covalently connected micelles (NCCM) strategy was employed to obtain glyco-micelles covered by sugars in a convenient way. The impact factors for the recognition between carbohydrate and protein in solution were studied using dynamic light scattering (DLS) in real time. The results indicate that the agglutination ability of different lectins is of significant distinction, as measured by the formation rate of aggregates. For glyco-micelles covered by 100% lactose, the binding rates to different lectins can be recorded as SBA ≫ LecA ≈ Galectin 3 > ECA ≈ Galectin 1, which suggests that not only number of binding sites but also how they are displayed have great influence on the kinetics of the multivalent interaction. Meanwhile, Human Galectin 3, a protein of important biological function with rather mysterious binding behavior, was studied further as an application of the method.

**Keywords** Glycopolymers; Lectin; Dynamic light scattering; Multivalent interaction

(Ed.: D, Z)

<sup>†</sup> Supported by the National Natural Science Foundation of China (No.21504016).