

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学号: 20520061152016

UDC_____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

两亲性嵌段共聚高分子自组装的多价糖纳米颗粒的
生物化学方法表征

**Biochemical Characterization of Multivalent
Glyco-nanoparticles Assembled from Amphiphilic
Diblock Polymers**

苏荣敏

指导教师姓名: 韩守法 教授

专业名称: 化学生物学

论文提交日期: 2009 年 6 月

论文答辩日期: 2009 年 6 月

学位授予日期: 2009 年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2009 年 6 月



**Biochemical Characterization of Multivalent
Glyco-nanoparticles Assembled from Amphiphilic
Diblock Polymers**

Dissertation Submitted to

Xiamen University

For the Degree of

Master of Natural Science

By

Su Rongmin

Directed by

Professor Shoufa Han

Department of Chemistry, Xiamen University

Xiamen, Fujian, P.R. China

June, 2009

厦门大学学位论文原创性声明

兹提交的学位论文，是本人在导师指导下独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考的其他个人或集体的研究成果，均在文中以明确方式标明。本人依法享有和承担由此论文而产生的权利和责任。

声明人（签名）：

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人完全了解厦门大学有关保留、使用学位论文的规定。厦门大学有权保留并向国家主管部门或其指定机构送交论文的纸质版和电子版，有权将学位论文用于非赢利目的的少量复制并允许论文进入学校图书馆被查阅，有权将学位论文的内容编入有关数据库进行检索，有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

本学位论文属于

1、保密（ ），在 年解密后适用本授权书。

2、不保密（ ）

（请在以上相应括号内打“√”）

作者签名：

日期： 年 月 日

导师签名：

日期： 年 月 日

摘要

蛋白组学主要研究基因衍生的蛋白质之间的相互作用。由于很多蛋白质在表达之后会被糖基化，要完全了解蛋白质之间的作用机制，需要对蛋白质上的聚糖链 (glycan)的功能进行专门的研究。由于单价的糖配体与糖蛋白受体之间的结合力很弱，自然界利用多个糖配体与多个蛋白受体的多价结合，即“多价效应”来获得提高的结合力与选择性。

本论文首先制备了带有氨基的甘露糖和半乳糖衍生物，然后分别与聚苯乙烯-聚(苯乙烯-交替-马来酸酐)骨架中的马来酸酐酰化反应，得到了可以在水溶液中自组装成表面含有多价糖探针（甘露糖或半乳糖）的高分子纳米颗粒。

我们将所制备的含有糖探针的、包埋有荧光猝灭剂的纳米颗粒与荧光分子 FITC标记的伴刀豆球蛋白Concanavalin A (FITC-Con A)直接结合，通过荧光共振能量转移 (FRET) 试验直接测量了蛋白-聚糖的结合常数，计算出四聚体的FITC-ConA/NP-甘露糖复合物的结合平衡常数是 1.5×10^5 ，即NP-甘露糖/ConA复合物的结合常数与单价D-甘露糖/ConA复合物的结合常数相比提高了大约是 5 个数量级。表明了NP-甘露糖与FITC-ConA是通过多价作用连接的。

我们进一步将所制备的含有糖探针的、包埋有荧光分子的纳米颗粒与人精子相互作用，结果表明NP-甘露糖处理过的精子细胞形成聚集体。而在高浓度甘露糖下(2 M)，可以观察到精子的正常形态。该聚集可以被高浓度的甘露糖所抑制，表明 NP-甘露糖和精子细胞表面的凝集素之间的相互作用比单价态的甘露糖的作用要强得多。这说明含有酸酐分子基团的两亲性高分子可以作为简单有效的多价糖探针载体。 这些高分子在研究细胞表面的多糖-蛋白调节的生物功能中将有潜在的应用前景。

关键词：糖探针 多价作用 凝集素 蛋白-聚糖的相互作用

Abstract

Glycomics involves the study of protein-glycan interactions mediated biology. Due to lots of protein glycosylated after expression, it is necessary to specially investigate the function of the glycan on the protein to fully understand the mechanism of protein interaction with glycan. Although the intrinsic affinities of lectin-glycan interactions are low, nature utilizes multivalency to achieve stable binding for the initiation of subsequent biological activities.

In this dissertation, poly {styrene-*co*-[(*D*-mannopyranosyl- α -1-ethylamido-maleic acid)-*alt*-styrene]} and poly {styrene-*co*-[(*D*-galactopyranosyl- β -1-ethylamidomaleic acid)-*alt*-styrene]} was first successfully prepared by amidation of poly {styrene-*co*-[(maleic anhydride)-*alt*-styrene]} with 1-O-aminoethyl- α -*D*-mannopyranoside or 1-O-aminoethyl- β -*D*-galactopyranoside.

The efficacy of the hairy nanoparticles as multivalent glycan probes was evaluated by the interaction of NP-mannose with *concanavalin-A* (Con A). In this system, lectin-glycan interactions was directly monitored *via* fluorescence resonance energy transfer (FRET) between the fluorescein isothiocyanate-labeled Con A (FITC-Con A) (donor) with the ethyl ester of methyl red trapped in the NP-mannose cores (quencher). The binding equilibrium constant was 1.5×10^5 , favored the formation of the NP-mannose/Con A complex by roughly 5 orders of magnitude relative to the monovalent *D*-mannose/Con A complex, indicating that multivalent binding to the tetrameric subunits of Con A was occurring.

NP-mannose was further tested for its ability to bind cell surface lectins. In the presence of multivalent NP-mannose, the sperm cells tend to aggregate. The aggregation of sperms was gradually inhibited with increasing amounts of mannose. At high concentrations of mannose (2 M), normal morphology of sperms was observed. The inhibitory effects of high concentrations of mannose indicate that the interaction between NP-mannose and sperm cell surface lectins

is much stronger than with monovalent mannose. This amphiphilic diblock multivalent polymer was a glycan-displaying scaffold for protein-glycan interaction, which could be valuable for the study of cell surface protein-glycan mediated biology.

Keywords: Glycol-probes; Multivalent effect; Lectin; Protein-glycan interaction

厦门大学博硕士学位论文摘要库

主要缩略语及中英文对照

AcCl	Acetyl Chloride 乙酰氯
Amp	Ampicillin 氨苄青霉素
BSA	Bovine Serum Albumin 牛血清白蛋白
Con A	Conacanavalin A 伴刀豆球蛋白
DMAP	4-Dimethylaminopyridine 4-二甲基氨基吡啶
DMF	Dimethylformamide N, N'-二甲基甲酰胺
DMSO	Dimethyl Sulfoxide 二甲亚砜
EDC	1-Ethyl-3-(3'-(dimethylamino)propyl)carbodiimide 1-乙基-3-(3'-二甲基氨基丙基) 碳化二亚胺盐酸盐
EDTA	Ethylene Diamine Tetracetic Acid 乙二胺四乙酸
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbant Assay 酶连免疫吸附分析
FITC	Fluorescein isothiocyanate 异硫氰酸荧光素
Gal	Galactose 半乳糖
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-erhanesulfonic acid 4-羟乙基哌嗪乙磺酸
IC ₅₀	Concentration at 50% inhibition 半数抑制浓度
Man	Mannose 甘露糖
NP	Nano particular 纳米颗粒
OD	Optical density 光密度
PBS	Phosphate Buffer Solution 磷酸缓冲液
PS	Polystyrene 聚苯乙烯
TEA	Triethylamine 三乙胺
THF	Tetrahydrofuran 四氢呋喃
TLC	Chromatography of thin layer 薄层层析法
TMS	Tetramethylsilane 四甲基硅烷

Tris	Trihydroxymethyl amino methane	羟基甲胺
L	Liter	升
mL	Milligram	毫克
μg	Microgram	微克
μL	Microliter	微升
M	mol per liter	摩尔/升
m M	Millimol per liter	毫摩尔/升

厦门大学博硕士学位论文摘要库

目 录

中文摘要.....	I
英文摘要.....	II
主要缩略语及中英文对照.....	IV
第一章 前言.....	1
1.1 糖生物学中的多价效应	1
1.2 多价效应的功能优点及其应用	4
1.2.1 多价效应的功能优点	4
1.2.2 多价效应在糖生物学上的应用.....	7
1.3 课题设计	13
1.3.1 立题依据.....	13
1.3.2 本课题研究的意义.....	14
1.3.3 合成路线设计.....	15
1.4 展望.....	19
第二章 材料与方法	20
2.1 材料.....	20
2.1.1 主要仪器.....	20
2.1.2 主要试剂.....	21
2.2 实验方法	24
2.2.1 有机合成部分.....	24
2.2.2 生物活性实验.....	37
2.3 小结.....	40
第三章 实验结果与讨论	41
3.1 NP-甘露糖/NP-半乳糖中连接的甘露糖/半乳糖含量的测定	41

3.2 NP-甘露糖/NP-半乳糖的尺寸表征	43
3.3 FRET 表征蛋白-糖基相互作用的研究	47
3.3.1 四聚体 FITC-ConA/NP-甘露糖复合物的 FRET 试验.....	49
3.3.2 二聚体 FITC-ConA/NP-甘露糖复合物的 FRET 试验.....	52
3.4 包埋有罗丹明 6G 的 NP-甘露糖对生物模型的作用研究.....	54
3.4.1 包埋有罗丹明 6G 的 NP-甘露糖与大肠杆菌的相互作用	54
3.4.2 包埋有罗丹明 6G 的 NP-甘露糖与人精子的相互作用	55
第四章 结语	59
参考文献.....	62
附录 部分化合物的谱图	77
硕士期间发表的学术论文	85
致 谢.....	86

Table of Contents

Abstract in Chinese.....	I
Abstract.....	II
Abbreviation.....	IV
Chapter 1 Preface.....	1
1.1 Multivalency in glycobiology	1
1.2 Properties and applications of multivalent effect	4
1.2.1 Properties of multivalent effect.....	4
1.2.2 Applications of multivalent effect in glycobiology.....	7
1.3 Dissertation design	13
1.3.1 Background.....	13
1.3.2 Research significance.....	14
1.3.3 Proposal.....	15
1.4 Prospect	19
Chapter 2 Materials and methods.....	20
2.1 Materials	20
2.1.1 Main instruments	20
2.1.2 Reagents and materials	21
2.2 Methods	24
2.2.1 Preparation of sugars.....	24
2.2.2 Experiments for bioactivity test.....	37
2.3 Conclusions	40
Chapter 3 Results and discussion.....	41
3.1 Colorimetric determination of the composition of polysaccharides.....	41
3.2 Determination of sizes of NP-mannose/NP-galactose by DLS.....	43

3.3 FRET assay for interaction of protein-glycan	47
3.3.1 FRET assay for tetrameric FITC-ConA/NP-mannose complex	49
3.3.2 FRET assay for dimeric FITC-ConA/NP-mannose complex	52
3.4 Interaction of biological models and NP-mannose doped with Rhodamine 6G	54
3.4.1 Interaction of <i>Escherichia.coli</i> with NP-mannose doped with Rhodamine 6G.....	53
3.4.2 Interaction of Human spermatozoa with NP-mannose doped with Rhodamine 6G.....	55
Chapter 4 Sumarry.....	59
Reference.....	62
Appendix Compounds Spectrums.....	77
Publication.....	85
Acknowledgements.....	86

第一章 前言

1.1 糖生物学中的多价效应

蛋白组学主要研究基因衍生的蛋白之间的相互作用。由于很多蛋白在表达之后会被糖基化，要完全了解蛋白之间的作用机制，需要对蛋白上的聚糖链 (glycan) 的功能进行专门的研究。聚糖链与蛋白的相互作用调节着非常广泛的生物功能：如流感病毒或细菌对宿主的侵袭 (图 1-1)，白细胞转移到发炎组织，免疫系统中的细胞信号传导等 [1-5]。

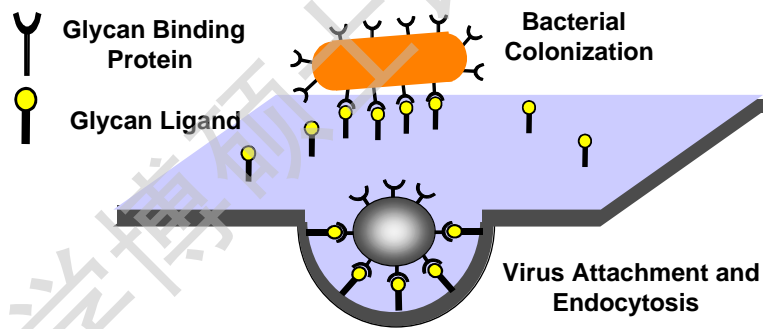


图 1-1. 聚糖链配体与蛋白受体的相互作用调节病毒或一些细菌对宿主的侵袭

复合糖 (糖蛋白、糖脂等) 是由脂类或蛋白与糖类化合物通过共价键结合而形成的一类生物大分子。细胞表面有大量的复合糖，这些复合糖与胞外环境直接相互作用 (图 1-2)。

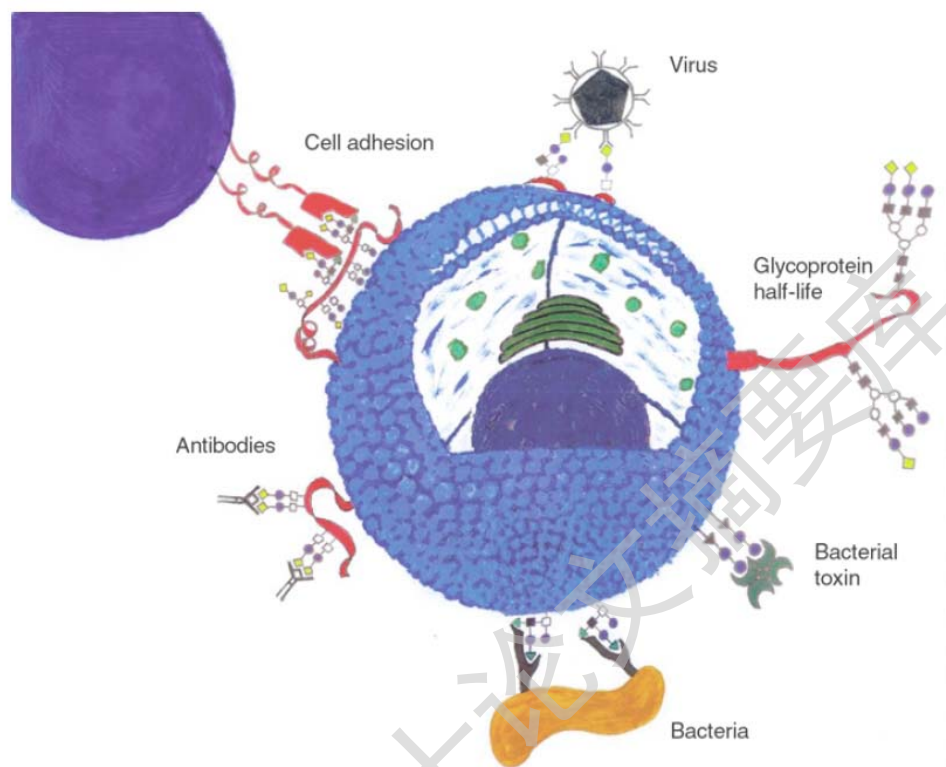


图 1-2^[6]. 说明细胞表面糖类-蛋白之间相互作用的图示

研究发现，虽然蛋白与糖之间的结合作用与别的生物体内大分子之间的相互作用一样，可以通过氢键、疏水作用、静电作用等结合，但是单价的糖配体与糖蛋白受体之间的结合力很弱，解离常数 K_d 值一般在 μM 到 mM 范围 ($10^{-6}\text{ M}\sim 10^{-3}\text{ M}$)。例如，流感病毒与单个唾液酸 (sialic acid) 结合的 K_d 在 mM (10^{-3} M) 范围^[7]。然而在生理条件下流感病毒与宿主细胞的受体 (唾液酸, sialic acid) 的 K_d 却达到 nM (10^{-10} M) 级别。

自然界利用多个糖配体与多个蛋白受体的多价结合 (multivalency) 来获得稳定的相互作用 (图 1-2)。若干个单糖链-蛋白相互作用产生的协同作用增加了结合力 (binding affinity) 和特异性 (specificity)，也就是产生了“多价效应(multivalent effect)”或者“簇集效应 (cluster effect)”^[8,9]。蛋白与聚糖链的多价的相互作用有不同的表现形式。其实现方式可以为糖蛋白存在的

多拷贝的聚糖链，与含有多个聚糖链结合位点的多聚体凝集素受体的相互作用。例如伴刀豆球蛋白 (*Concanavalin A*, Con A) 在 $\text{pH} \geq 7$ 的溶液中以四聚体形式存在，可以同时连接四个甘露糖。曾有人报道，Con A或连接有聚苯乙烯的Con A能够以高亲和力 (high affinity) 与HIV的甘露糖连接蛋白 (mannose-binding protein) gp120 相互作用，从而干预HIV对细胞的感染^[10-16] (图 1-3)。另一种实现方式也可以为细胞表面多个单价糖配体与其他细胞表面的多个单价蛋白受体的同时相互作用。例如，有研究表明，在CD22 天然配体的唾液酸 9 位上加入联苯基团而得到CD22 的高结合力配体(high affinity ligand)^[17, 18]，可以与细胞表面多个CD22 蛋白受体同时结合，其结合力比天然配体提高了 20 倍^[19]。

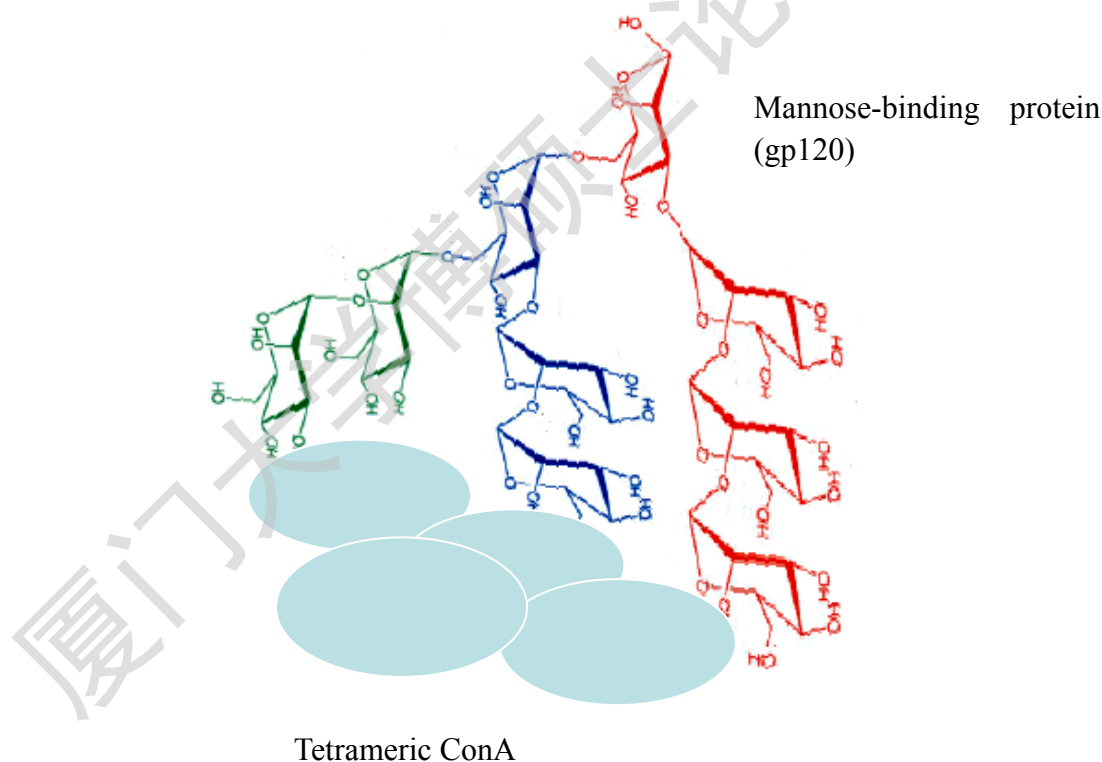


图 1-3. ConA 与 gp120 的多价连接作用

生物体内糖和蛋白之间的这种多价效应或簇集效应不仅能够增加它

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库