

DOI:10.13364/j.issn.1672-6510.20150023

## 糖-量子点作为荧光探针研究糖-蛋白相互作用

杨 杨, 张文强, 李晓斌, 郁 彭  
(天津科技大学生物工程学院, 天津 300457)

**摘要:** 糖-蛋白的相互作用在多种病理和生理过程中扮演着重要角色. 借助量子点(quantum dots, QDs)优良的光学性质、巨大的比表面积和良好的生物相容性, 对其表面进行寡糖修饰后得到的糖-量子点荧光探针, 可以很好地模拟细胞表面的糖链结构, 为糖-蛋白、糖-糖的相互作用研究提供有力工具. 本文主要介绍近年来兴起的糖-量子点制备、表征及其在化学糖生物学中的应用.

**关键词:** 糖-量子点; 糖簇效应; 糖-蛋白相互作用; 荧光标记

中图分类号: O62 文献标志码: A 文章编号: 1672-6510(2015)05-0001-06

## Study of Carbohydrate-protein Interactions using Glyco-quantum Dots as Fluorescent Probes

YANG Yang, ZHANG Wenqiang, LI Xiaobin, YU Peng  
(College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

**Abstract:** Carbohydrate-protein interactions are important in a wide variety of physiological and pathological processes. A new glyconanotechnology, using quantum dots (QDs) with unique optical properties, a high specific surface area and good biocompatibilities as scaffolds to assemble oligosaccharides for multivalent display to mimic mammalian cell, has recently attracted considerable attention in studying carbohydrate-carbohydrate and carbohydrate-protein interactions. This review summarizes the latest reports on the preparation, characterization and application of the QDs in chemical glycobiology.

**Key words:** glyco-quantum dots; cluster glycoside effect; carbohydrate-protein interaction; fluorescent labeling

糖类化合物与核酸、蛋白质一起并称为3大类生命物质, 但是长期以来, 由于其结构的多样性和复杂性, 加之评价手段的局限性, 对其生物学作用的了解比较肤浅<sup>[1]</sup>. 近年来, 随着现代分离、分析技术的进步以及生物学研究的不断深入, 人们对糖类化合物的重要性有了越来越多的认识. 最近的研究结果表明, 哺乳动物细胞表面70%的蛋白被糖基化修饰, 糖链与其受体蛋白之间的相互识别在包括病毒入侵、免疫系统应答和衰减、细胞增殖、受精和着床等多种生理和病理过程中起着重要作用<sup>[2]</sup>. 研究糖链与其受体蛋白之间的相互识别和随后引发的一系列调控作用<sup>[3]</sup>, 是阐明细胞生物高级生命活动的关键. 由此应运而生的化学糖生物学<sup>[4]</sup>成为研究上述问题的重要手段

和工具.

化学糖生物学主要运用有机糖化学或酶促糖合成化学<sup>[5]</sup>制备各种广义的寡糖探针(包括糖芯片、糖类衍生物、糖蛋白模拟物等), 并以此为工具研究生物体系中复杂糖蛋白及糖链的功能及其变化规律, 为深入研究生命现象、调控糖蛋白的生物功能、寻找新的药物靶点、发现新的生物活性物质提供新的策略和手段<sup>[6]</sup>.

在化学糖生物学众多的探针中, 荧光探针由于具有灵敏度高、选择性好、响应时间短、可直接观察等优点<sup>[7]</sup>, 一直被广泛使用. 随着对糖链功能的进一步研究, 传统的通过将有机荧光染料(FITC, Rhodamine, AlexaFluor 488等)连接于寡糖分子上制

收稿日期: 2015-03-02; 修回日期: 2015-05-08

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(21402140); 国家国际科技合作专项资助项目(2013DFA31160)

作者简介: 杨 杨(1982—), 男, 天津人, 副教授; 通信作者: 郁 彭, 教授, yupeng@tust.edu.cn.

数字出版日期: 2015-07-31; 数字出版网址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/12.1355.N.20150731.1005.002.html>.

备的荧光探针已经越来越不能满足研究的需要. 近年来,以量子点 (Quantum dots, QDs) 为主的荧光纳米材料做骨架,经寡糖修饰的寡糖纳米材料 (glyconanoparticles) 的研究越来越引起化学糖生物学家的关注<sup>[8]</sup>. 本文主要就近年来寡糖-量子点 (glyco-QDs) 探针的制备、表征及其在糖生物学研究中的应用作以综述.

### 1 糖簇效应

在介绍寡糖探针之前,有必要首先介绍糖簇效应 (cluster glycoside effect)<sup>[9]</sup>. 细胞表面的糖参与或介导的生物学过程的最初阶段,被认为是糖与位于细胞表面相应的糖受体蛋白之间的结合. 这些结合过程与特定的细胞生命活动相关,因此自然而然地会让人想到这种糖与蛋白的相互作用是专一性的,而且是高结合力的. 但是体外研究表明单糖-蛋白的结合力很低 (解离常数  $K_D$  为 mmol/L 级别), 而且特异性也很差 (不同的糖与同样的蛋白之间几乎具有相同的结合力). 这样就使得糖的低结合力、低特异性的特点与其能参与特异性细胞活动的的能力之间产生了矛盾<sup>[10]</sup>.

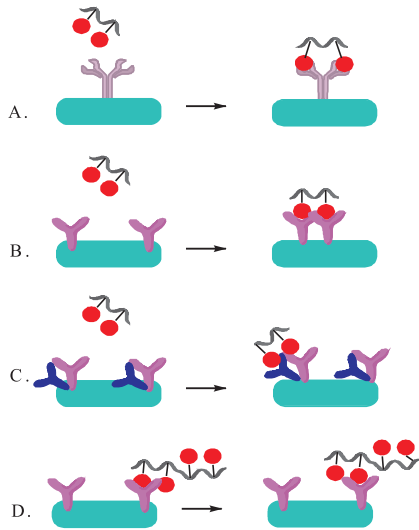


图 1 糖簇效应机理

Fig. 1 Mechanism of cluster glycoside effect

“糖簇效应”亦可以称为“多价效应 (multivalent effect)”的提出部分地解决了这个问题. 这一理论认为细胞表面的糖基受体是成簇存在的,而且糖受体蛋白与糖的结合也是多位点的. 大量的模型研究表明“糖簇效应”的存在可以显著地提高糖-蛋白的结合力. 人们尝试着从以下 4 个方面来解释糖簇效

应的产生<sup>[11]</sup>: 螯合效应 (chelating effect, 图 1A)、受体簇集效应 (receptor clustering effect, 图 1B)、亚位点结合效应 (subsite binding effect, 图 1C) 和统计效应 (statistical effect, 图 1D). 以这一理论为指导,在各种分子骨架表面修饰多个功能性寡糖分子制备的多价寡糖探针用于化学糖生物学研究在 21 世纪初蓬勃兴起. 一大批寡糖受体蛋白的结构和功能被逐步揭示,而这一结果又反过来对寡糖探针提出了更高的要求,因此寻找性质更加优良的糖探针成为了亟待解决的问题.

### 2 糖-量子点

大多数蛋白分子在尺度上和纳米材料相近,这就使得使用纳米材料作为骨架进行糖簇探针的组装成为可能<sup>[12]</sup>. 更加重要的是纳米材料具有巨大的比表面积,在其表面组装上糖基配体,由此引发的糖簇效应使得利用此类缀合物进行糖生物学的研究变得更加便利. 结合荧光纳米材料量子点独特的光学性质,寡糖修饰的荧光纳米探针应运而生.

#### 2.1 量子点

量子点 (QDs) 又称半导体纳米微晶体,是一种由 II-VI 族或 III-V 族元素组成的约 2~20 nm 的纳米晶粒. 其中研究较多的主要是 CdX (X = S, Se, Te). 由于量子尺寸效应,量子点具有发射荧光的特性,而且其发射波长是可调的. 与传统的荧光染料相比,量子点具有如下的优良特性: 激发谱宽、发射谱窄、抗漂白能力强、其表面可以修饰多种功能基等<sup>[13-14]</sup>.

关于使用蛋白 (抗体) 进行量子点修饰的文章已有大量专门的综述,本文不做过多探讨. 下面主要介绍使用小分子寡糖进行量子点的表面修饰的方法.

#### 2.2 糖-量子点的制备

##### 2.2.1 水相法

借鉴胶体金颗粒的合成方法<sup>[15]</sup>, 早期量子点的制备是在水溶液中进行的. 这种策略直接在水相中加入金属盐 ( $Cd(NO_3)_2$ 、 $Zn(NO_3)_2$  等), 然后加入含巯基的寡糖分子, 在调节 pH 呈碱性后, 自动组装成具有纳米结构的糖功能化量子点<sup>[16-17]</sup>.

这种一釜化的方法虽然简便,但其缺点也是显而易见的. 最主要的就是使用这种方法制备的量子点颗粒较大 (15 nm), 最大吸收半峰宽 (150 nm) 也比较宽,而且二硫键与金属的结合对于荧光的核结构有极大地破坏,使得荧光量子产率变低. 针对以上的缺

点, 现在已经比较少采用这种策略.

### 2.2.2 配体交换法

在糖-量子点缀合物的合成策略上, 配体交换法成为现在被广泛采用的策略(图 2). 该策略首先在有机相中制备出粒径均一、光谱学性质稳定、表面包裹有机分子(一般是三正辛基氧磷(TOPO)和油酸(OA))作为稳定剂的量子点<sup>[18]</sup>, 然后再使用含巯基的寡糖替换量子点表面原有配体, 得到的糖-量子点最终由有机相进入水相<sup>[19-22]</sup>, 经分离纯化可以得到糖-量子点缀合物.

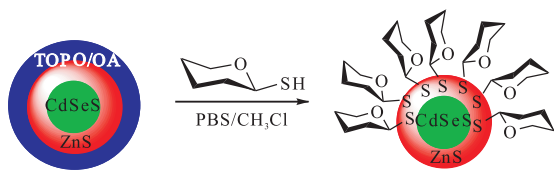


图 2 配体交换法合成糖-量子点(许可证号: 3577420695597)

Fig. 2 Preparation of glyco-QDs through ligand exchange (License No. 3577420695597)

相比于一釜法, 此种方法具有反应终点易于辨认, 后处理简单等优点, 但是由于巯基与量子点表面的共价结合仍然会破坏量子点的核壳结构, 在合成过程中会产生荧光淬灭和团聚的现象.

### 2.3 糖-量子点的表征

综合分析近年来发表的文章, 对于糖-量子点的表征主要采取以下手段. 粒径大小主要使用透射电镜进行测量, 水化半径采用动态光散射进行测定, 另有紫外、红外、荧光发射谱等对其光学性质进行表征. 但是如何对合成的纳米材料进行相对分子质量的测定一直没有很好地解决, 大多数文章对这一问题均采取估算的办法<sup>[23-24]</sup>, 这就使得进一步的定量糖-蛋白相互作用, 进而进行动力学常数的测定变得十分困难.

但是, 科学家发现当金颗粒的半径达到一定的尺度时, 一般是 18~24 个金原子集结成簇的情况下, 此类纳米材料(严格意义上应该叫金簇(gold cluster))具有荧光特性, 而且这种材料可以使用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight, MALDI-TOF)进行相对分子质量的测量. 最近的文献报道, 以蛋白为模板, 在原位还原纳米金簇(gold nanoclusters, AuNCs)已经制备成功<sup>[25]</sup>, 我们认为这将成为未来糖-纳米材料研究的一个值得关注的领域, 有兴趣的读者可以阅读相关文献<sup>[26-27]</sup>.

### 2.4 糖-蛋白相互作用

以小分子寡糖对荧光纳米材料进行修饰, 用以替代蛋白抗体对寡糖受体进行研究一直以来受到化学糖生物学家的青睐, 同时这也是近年来兴起的涉及多学科交叉的热点研究领域, 许多课题组在这一方面进行了开创性的工作.

Mukhopadhyay 等<sup>[17]</sup>使用水相合成法用于甘露糖量子点合成, 然后将这种糖-量子点缀合物用于大肠杆菌的黏附研究. 由于大肠杆菌(*E. coli*) ORN178 表面存在可特异性结合甘露糖 type 1 型菌毛, 在甘露糖-量子点的介导下, 大肠杆菌在量子点周围进行聚集, 而这种聚集又进一步引发了量子点的聚集, 产生出了大量的荧光; 而作为对照组(*E. coli*) ORN208 则没有这种现象产生.

Kikkeri 等<sup>[20]</sup>和 Yang 等<sup>[21]</sup>使用含有半乳糖的末端结构的糖-量子点, 对人肝癌细胞(HepG2)进行了标记. 进一步地通过激光共聚焦和流式细胞技术, 证实了 HepG2 细胞表面存在可以与末端半乳糖结构的寡糖链结合, 进而介导细胞内吞作用的去唾液酸受体(asialoglycoprotein receptor, ASGPR), 这种结合可以被 siRNA 所干扰. 随后的体内研究表明含半乳糖末端的糖-量子点可以靶向性地进入肝细胞.

Robinson 等<sup>[19]</sup>使用配体交换策略制备了 N-乙酰氨基葡萄糖-量子点缀合物(GlcNAc-QDs)和甘露糖-量子点缀合物(Man-QDs). 得到的糖-量子点缀合物平均粒径 5 nm, 表面寡糖数目大致为 210. 他们以此为探针进行了寡糖受体介导受精过程中的识别研究(图 3). 在荧光显微镜下可以清晰看到 GlcNAc-QDs 和 Man-QDs 在海胆和小鼠精子表面的结合. 进一步的分析表明, 海胆精子的头部主要存在 GlcNAc 寡糖受体, 而小鼠精子尾部主要存在 Man 寡糖受体.

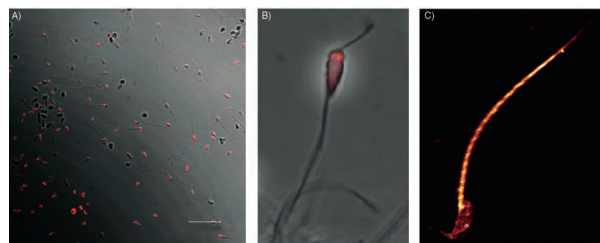


图 3 GlcNAc-QDs 和 Man-QDs 对海胆和小鼠精子的标记(许可证号: 3577400445045)

Fig. 3 Fluorescent labeling of sea urchin and mouse sperm with N-acetylglucosamine and Mannose quantum dots (License No. 3577400445045)

Yang 等<sup>[23]</sup>和 Yu 等<sup>[24]</sup>使用 1-巯基糖为修饰配体,两相配体交换法制备了平均粒径为 3~5 nm 的乳糖量子点 (Lac-QDs). 通过核磁内标定量法结合电感耦合等离子体发射光谱 (inductively coupled plasma optical emission spectrum, ICP-OES), 大致计算了上述缀合物的分子式,并在蛋白和细胞水平对上述量子点缀合物进行了生物学效应评价. 结果表明乳糖-量子点不仅可以作为细胞表面的糖蛋白的模拟物用于糖-蛋白、糖-糖的相互作用分析,而且作为优良的荧光探针可以方便地用于白细胞的标记.

Ohyanagi 等<sup>[22]</sup>采用化学与酶合成法联用,合成

了 N-乙酰氨基乳糖 (LacNAc)、唾液酸化 N-乙酰氨基乳糖 (sialyl LacNAc)、路易斯 X 寡糖抗原 (Le<sup>x</sup>) 和唾液酸化路易斯 X 寡糖抗原 (sialyl Le<sup>x</sup>) 等多种功能性寡糖,然后使用配体交换策略合成了上述多种寡糖修饰的量子点. 随后他们研究了各种寡糖-量子点缀合物在小鼠体内的代谢情况,发现末端半乳糖结构的 glyco-QDs (LacNAc-PC-QDs, Le<sup>x</sup>-PC-QDs) 经代谢后主要集中在肝脏,而末端唾液酸结构的 glyco-QDs (sialyl LacNAc-PC-QDs, sialyl Le<sup>x</sup>-PC-QDs) 在代谢后主要集中在肾脏 (图 4).

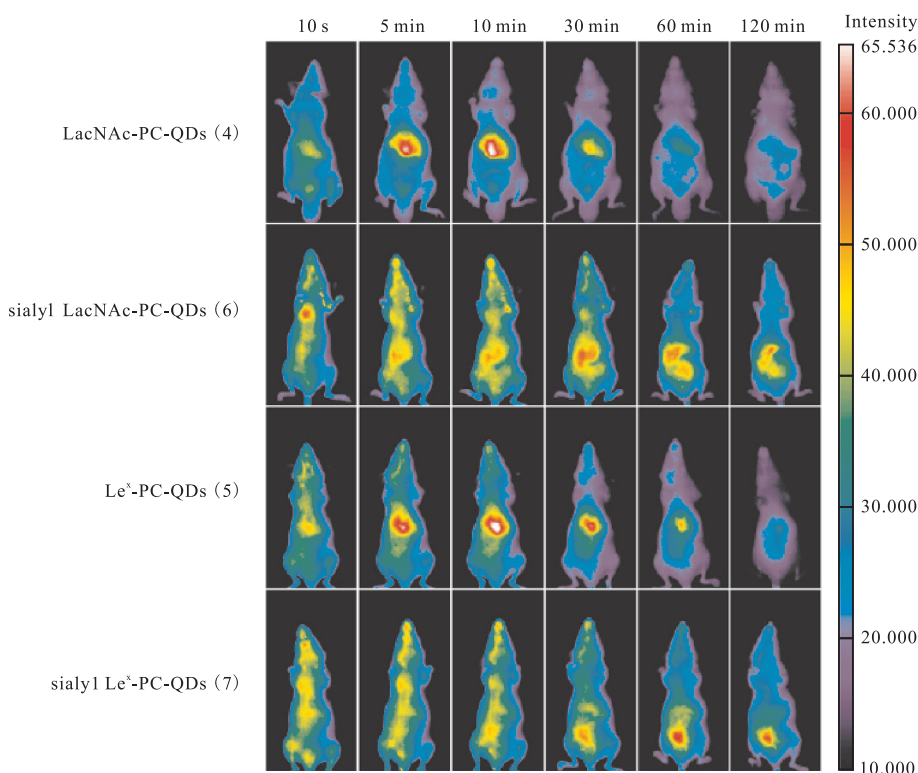
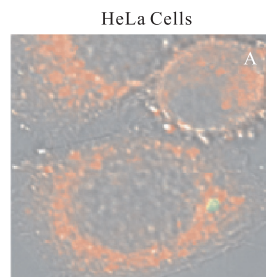


图 4 小鼠体内糖-量子点缀合物的活体成像 (美国化学学会许可转载)

Fig. 4 Live animal imaging of glyco-PC-QDs in mice (reprinted with permission from American Chemical Society)

Benito-Alifonso 等<sup>[28]</sup>合成了半乳糖和乳糖修饰量子点,随后他们研究了 HeLa 细胞和 Araki Sasaki 细胞与上述寡糖量子点的相互作用 (图 5). 结果表明,含有半乳糖末端的寡糖-量子点被 HeLa 细胞摄取后,主要存在于高尔基体,而对于 Araki Sasaki 细胞,半乳糖量子点主要分布于溶酶体,而乳糖量子点还在内质网有分布. 有趣的是当以甘露糖分子取代量子点表面 50% 的半乳糖后,与 Araki Sasaki 细胞共孵育的结果是,此寡糖量子点主要分布于早期内涵体;而使用麦芽三糖 50% 取代半乳糖后,与 HeLa 细胞共孵育的结果是荧光主要分布在高尔基体. 尽管

这一过程的机制目前还不清楚,但是可以肯定的是,寡糖分子对细胞代谢具有重要调控作用.



A. 半乳糖量子点 (绿色荧光) 附着于 HeLa 细胞高尔基体



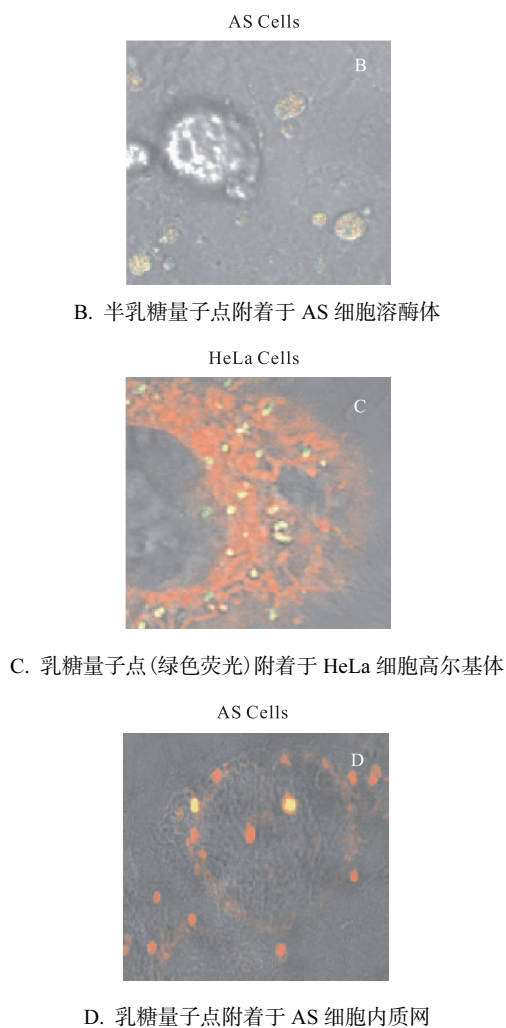


图 5 半乳糖、乳糖-量子点与 HeLa 和 Araki Sasaki 细胞相互作用(许可证号: 3622900215112)

Fig. 5 Interactions between Galactose-QDs and HeLa and Araki Sasaki cells (License No. 3622900215112)

### 3 展 望

糖-量子点作为新的荧光标记物,在化学糖生物学中得到了广泛地应用.但是,在糖-量子点的合成中仍然有很多问题没有解决,例如如何快速便捷地制备寡糖-量子点缀合物,尤其是非天然存在寡糖的量子点缀合物的制备仍是一大难点.现在通用的巯基取代法,由于巯基易氧化的性质,最主要的是对量子点结构的破坏使得荧光量子产率降低也是一个亟待解决的问题,仍需要进一步的研究.另外,由于此类缀合物的特殊性质,普通的有机化学分析方法不适用,这一类大分子物质的结构至今仍然没有很好地确认.最后由于半导体元素的存在,毒性问题将会制约这类探针进一步的生物学应用.但是我们相信,随着

研究的深入和多学科交叉的融合,上述问题终将得到解决.

### 参考文献:

- [1] 蔡孟深,李中军. 糖化学:基础、反应、合成、分离及结构[M]. 1版. 北京:化学工业出版社,2007.
- [2] Varki A. Biological roles of oligosaccharides: All of the theories are correct[J]. *Glycobiology*, 1993, 3(2): 97-130.
- [3] Prost L R, Grim J C, Tonelli M, et al. Noncarbohydrate glycomimetics and glycoprotein surrogates as DC-SIGN antagonists and agonists[J]. *ACS Chemical Biology*, 2012, 7(9): 1603-1608.
- [4] Bertozzi C R, Kiessling L L. Chemical glycobiology[J]. *Science*, 2001, 291(5512): 2357-2364.
- [5] Kiessling L L, Splain R A. Chemical approaches to glycobiology[J]. *Annual Review of Biochemistry*, 2010, 79: 619-653.
- [6] Kiessling L L, Grima J C. Glycopolymer probes of signal transduction[J]. *Chemical Society Reviews*, 2013, 42(10): 4476-4491.
- [7] Krutzik P O, Nolan G P. Fluorescent cell barcoding in flow cytometry allows high-throughput drug screening and signaling profiling[J]. *Nature Methods*, 2006, 3(5): 361-368.
- [8] Svarovsky S A, Barchi J J. De novo Synthesis of Bio-functional Carbohydrate-encapsulated Quantum Dots, *Frontiers in Modern Carbohydrate Chemistry*[M]. New York: Oxford University Press, 2007: 375-394.
- [9] Lundquist J J, Toone E J. The cluster glycoside effect[J]. *Chemical Reviews*, 2002, 102(2): 555-578.
- [10] Varki A, Lowe J B. *Essentials of glycobiology*[M]. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2009.
- [11] Kiessling L L, Gestwicki J E, Strong L E. Synthetic multivalent ligands in the exploration of cell-surface interactions[J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2000, 4(6): 696-703.
- [12] de la Fuente J M, Penades S. Glyconanoparticles: Types, synthesis and applications in glycoscience, biomedicine and material science[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 2006, 1760(4): 636-651.
- [13] Alivisatos P. The use of nanocrystals in biological detection[J]. *Nature Biotechnology*, 2004, 22(1): 47-52.

- [ 14 ] Klostranec J M, Chan W C W. Quantum dots in biological and biomedical research: Recent progress and present challenges[J]. *Advanced Materials*, 2006, 18(15): 1953–1964.
- [ 15 ] Brust M, Walker M, Bethell D, et al. Synthesis of thiol-derivatised gold nanoparticles in a two-phase Liquid-Liquid system[J]. *Journal of the Chemical Society Chemical Communications*, 1994, 7: 801–802.
- [ 16 ] de la Fuente J M, Penadés S. Glyco-quantum dots: A new luminescent system with multivalent carbohydrate display[J]. *Tetrahedron: Asymmetry*, 2005, 16(2): 387–391.
- [ 17 ] Mukhopadhyay B, Martins M B, Karamanska R, et al. Bacterial detection using carbohydrate-functionalised CdS quantum dots: A model study exploiting *E. coli* recognition of mannosides[J]. *Tetrahedron Letters*, 2009, 50(8): 886–889.
- [ 18 ] Peng X G, Wickham J, Alivisatos A P. Kinetics of II-VI and III-V colloidal semiconductor nanocrystal growth: “Focusing” of size distributions[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 1998, 120(21): 5343–5344.
- [ 19 ] Robinson A, Fang J M, Chou P T, et al. Probing lectin and sperm with carbohydrate-modified quantum dots[J]. *Chembiochem*, 2005, 6(10): 1899–1905.
- [ 20 ] Kikkeri R, Lepenies B, Adibekian A, et al. In vitro imaging and in vivo liver targeting with carbohydrate capped quantum dots[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2009, 131(6): 2110–2112.
- [ 21 ] Yang Y, Zhao Y T, Yan T T, et al. Design and fabrication of multivalent gal-containing quantum dots and study of its interactions with asialoglycoprotein receptor (ASGPR) [J]. *Tetrahedron Letters*, 2010, 51(32): 4182–4185.
- [ 22 ] Ohyanagi T, Nagahori N, Shimawaki K, et al. Importance of sialic acid residues illuminated by live animal imaging using phosphorylcholine self-assembled monolayer-coated quantum dots[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2011, 133(32): 12507–12517.
- [ 23 ] Yang Yang, Yu Min, Yan Tingting, et al. Characterization of multivalent lactose quantum dots and its application in carbohydrate-protein interactions study and cell imaging[J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2010, 18(14): 5234–5240.
- [ 24 ] Yu Min, Yang Yang, Han Rongcheng, et al. Polyvalent lactose-quantum dot conjugate for fluorescent labeling of live leukocytes[J]. *Langmuir*, 2010, 26(11): 8534–8539.
- [ 25 ] Xie Jianping, Zheng Yuangang, Ying J Y. Protein-directed synthesis of highly fluorescent gold nanoclusters[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2009, 131(3): 888–889.
- [ 26 ] Zhang Haiyan, Liu Qian, Wang T, et al. Facile preparation of glutathione-stabilized gold nanoclusters for selective determination of chromium(III) and chromium(VI) in environmental water samples[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2013, 770: 140–146.
- [ 27 ] Le Guével X, Daum N, Schneider M. Synthesis and characterization of human transferrin-stabilized gold nanoclusters[J]. *Nanotechnology*, 2011, 22(27): 275103.
- [ 28 ] Benito-Alifonso D, Tremel S, Hou Bo, et al. Lactose as a “Trojan Horse” for quantum dot cell transport[J]. *Ange wandte Chemie International Edition*, 2014, 53(3): 810–814.

责任编辑: 郎婧