

菜豆凝集素抑制剂的设计与 凝血活性

刘琴¹, 喻艳华², 陈伟达¹, 陈禅友¹, 赵蕴杰^{3,4}, 曾辰^{1,4}

(1. 江汉大学生命科学学院, 2. 交叉学科研究院, 武汉 430056;

3. 华中师范大学物理科学与技术学院, 武汉 430079;

4. 乔治华盛顿大学物理系, 华盛顿哥伦比亚特区 20052)

摘要 针对菜豆凝集素二聚体复合物的结构特征, 利用计算机辅助药物设计的方法设计抑制剂以破坏复合物结构; 进一步采用标准的 Fmoc 保护氨基酸 N^t氨基的固相法合成纯化了小肽抑制剂. 体外兔红细胞凝集实验结果表明, 该小肽对菜豆凝集素的凝血能力有一定的抑制效果. 该方法为植物凝集素凝血研究及菜豆相关的食品安全问题提供了一个新思路.

关键词 菜豆凝集素; 分子动力学; 药物设计; 抑制剂设计; 凝血活性

中图分类号 O629.7

文献标志码 A

菜豆(*Phaseolus vulgaris* L.)是全球重要的食用豆类之一, 因其富含碳水化合物、矿物质、人体必需氨基酸及多种维生素等^[1], 在营养缺乏的发展中国家是居民重要的植物蛋白来源, 在发达国家中则成为改善居民膳食结构的重要食物. 菜豆是世界上栽培面积仅次于大豆的食用豆类作物, 种植面积占全球食用豆类种植总面积的 38.3%^[2]. 作为菜豆的次级起源中心^[3], 中国是菜豆种植大国, 也是菜豆消费大国. 菜豆除被用作新鲜蔬菜食用外, 还可通过干制、盐渍及速冻等加工成罐头来满足市场需求.

人类误食尚未煮熟的菜豆会出现恶心、呕吐、腹痛腹泻、心慌胸闷和胃部灼烧感等中毒症状, 目前常用的解决方法是通过高温加热破坏并分解菜豆中的有毒物质. 然而, 菜肴烹饪过程中不注意火候温度或牲畜因食用含有凝集素的饲料而产生的中毒现象多有发生, 严重危害了人类健康并造成巨大经济损失. 仅 2004~2013 年全国共报告的 660 起植物性食物中毒事件中, 有 53.3% 的中毒事件是菜豆中毒引起的, 中毒人数占总植物性食物中毒人数的 68.8%^[4]. 因此, 急需研发能降低菜豆毒性的抑制剂.

前期研究表明, 菜豆中的 4 种抗营养因子——植物凝集素、皂苷、胰蛋白酶抑制剂和植酸是引发菜豆中毒的主要毒性成分^[5,6], 且研究主要集中在菜豆植物凝集素方面, 其致毒关键在于其能与动物小肠上皮细胞表面的糖蛋白特异性结合, 破坏小肠正常结构并引起病理性腹泻^[7-9]. 植物凝集素广泛存在于植物界中, 是一类可特异性结合碳水化合物及糖分子的蛋白质, 能使红细胞产生凝集现象^[10]. 昆虫和高等动物的消化道表面有很多细胞膜糖蛋白, 植物凝集素与该糖蛋白的特异性结合会引起昆虫和高等动物的不适, 从而起到保护植物的作用. 根据序列与结构特征可将植物凝集素分为 12 类, 且多数需要形成稳定的二聚体或者多聚体结构来实现其生物学功能^[11]. 目前, 科研人员正开展通过打开植物凝集素的二聚体结构以影响其相应生物学功能的研究. 如大蒜凝集素的单体为 β -prism

收稿日期: 2017-01-26. 网络出版日期: 2017-05-23.

基金项目: 武汉市第三批黄鹤英才计划项目(批准号: 武人才[2014]3号)、中央高校基本科研业务费(批准号: 23020205170045)和湖北省科技平台项目(批准号: 鄂科技通[2011]第 101 号)资助.

联系人简介: 赵蕴杰, 男, 博士, 副教授, 主要从事生物物理方面的研究. E-mail: yjzhao.wh@gmail.com

曾辰, 男, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事生物物理方面的研究. E-mail: chenz@gwu.edu

结构, 单体结构的尾部插入到另外一个单体结构中通过 β 相互作用形成二聚体结构. Banerjee 等^[12] 将氨基酸位点 G98 位突变为 D, 并插入 Asn99, Ser100, Asn101 和 Asn102 这 4 个氨基酸改变其单体中尾部的结构, 使之不能形成二聚体结构. 凝血活性检测结果表明, 未突变的大蒜凝集素能形成二聚体结构并使兔红细胞产生凝集现象, 而突变后的大蒜凝集素不能产生凝集现象, 也不形成二聚体. 此外, Marta Jimenez 等^[13] 通过对槲寄生中 AB-type 植物凝集素上的氨基酸位点进行化学修饰, 使其不能形成二聚体结构.

菜豆凝集素对人体口服急性毒性表现为恶心、呕吐、腹胀及腹泻等^[14], 是诱发菜豆中毒的主要有毒物质之一^[10]. 基于此, 本文利用计算机辅助药物设计的方法, 针对菜豆凝集素二聚体复合物的结构特征设计抑制其形成复合物的小肽, 并通过体外凝血活性实验检测抑制效果. 本文主要研究了菜豆凝集素二聚体的结构特征, 设计合成了抑制剂小肽, 并检测了菜豆凝集素与抑制剂的体外凝血活性. 结果表明, 该抑制剂部分削弱了菜豆凝集素的凝集能力, 为植物凝集素复合物抑制剂研究与相关应用提供了一个新思路.

1 理论与方法

1.1 试剂、仪器及兔红细胞的制备

O-苯并三氮唑-四甲基脒六氟磷酸酯 (HBTU)、1-羟基苯并三唑 (HOBT)、Fmoc-Val-OH、Fmoc-Ile-OH、Fmoc-Phe-OH、Fmoc-Ser(*t*Bu)-OH 和 Fmoc-Ser(*t*Bu)-Wang 树脂均购于上海吉尔生化有限公司; *N,N*-二异丙基乙胺 (DIPEA)、*N*-甲基吡咯烷酮 (NMP)、哌啶、乙醚、三氟乙酸 (TFA) 和三异丙基硅烷均购于 Sigma 公司; 菜豆凝集素 (PHA-E) 标准品购自 Sigma 公司, 用 0.2 mol/L 磷酸缓冲液 (PBS, pH=7.2) 配成浓度为 0.05 mg/mL 的标准溶液备用.

LC-20AT 型半制备高效反向液相色谱仪和 LC-20AD 分析型高效液相色谱 (日本岛津公司); PTI Tribute-UV 多肽合成仪 (美国蛋白质科技公司); MicroflexTM 基质辅助激光解析 (吸附) 电离串联飞行时间质谱仪 (瑞士布鲁克公司).

兔红细胞制备过程如下: 对雄性大白兔 (由江汉大学实验动物房提供) 耳缘静脉取血, 加少量阿氏液 (Alsever's) 混合均匀离心, 将红细胞沉淀用 10 倍体积的 PBS 缓冲液洗涤 3 次, 弃上层清液, 加 PBS 缓冲液制成体积分数为 2% 的兔红细胞悬液, 于 4 °C 冰箱中保存 (不超过 14 d). 使用前, 将兔红细胞悬液用 PBS 稀释后计数, 调整红细胞浓度为 $5 \times 10^7 \sim 5 \times 10^8$ 个/mL.

1.2 菜豆凝集素二聚体的结构特征分析

以蛋白质结构数据库 (www.rcsb.org) 中菜豆凝集素的实验结构 (PDBcode: 3WCR)^[15] 为研究对象, 进行序列保守性和结构特征分析. 序列比对方法为 CS-BLAST, 序列库为 UNIREF90^[16-18], 保守性共分为 9 个等级, 保守性 ≤ 3 表示该氨基酸序列趋向于变异, 保守性 ≥ 7 表示该氨基酸序列趋向于保守. 在菜豆凝集素的动态结构特征分析中, 采用分子动力学模拟软件 GROMACS (力场为 Amber03, 水模型为 TIP3P), 模拟时间为 50 ns^[19-21].

1.3 菜豆凝集素抑制剂的设计

菜豆凝集素主要通过 β 折叠结构之间的相互作用形成二聚体, 本文利用已知的 β 折叠结构设计抑制剂与菜豆凝集素的另外一个单体发生竞争, 从而降低菜豆凝集素二聚体的形成几率. 首先, 对 β 折叠结构相互作用区域进行结构特征分析, 找到潜在的抑制剂结合口袋 (预测方法为 DoGSiteScorer)^[22]; 其次, 针对菜豆凝集素二聚体结构, 分析二聚体接触界面上的空腔口袋分布与结构特征; 然后, 根据二聚体接触面的结构特征对 β 折叠结构 (GLU182-ASP217) 进行删减, 得到潜在的抑制剂; 最后, 用分子对接方法对潜在抑制剂进行验证.

1.4 小肽的合成及鉴定

1.4.1 小肽的合成 采用 Fmoc 保护氨基酸 N^T 氨基的固相法合成小肽^[23]. 将 Fmoc-Ser(*t*Bu)-Wang 树脂 (1.2 g, 0.5 mmol) 用 5 mL NMP 溶胀 1 h, 用 3 mL 哌啶/NMP (体积分数 20%) 处理 5 min 脱除树脂的 Fmoc 保护基 (用 UV 监测反应), 连接第一个氨基酸缬氨酸; 将 Fmoc-Val-OH (1.7 g, 5 mmol),

HBTU(2.0 g, 5 mmol)和 HOBt(0.675 g, 5 mmol)溶于 3 mL DIPEA/NMP(0.4 mol/L)溶液中,将混合液加入已脱除 Fmoc 保护基的 Wang 树脂中,搅拌 20 min,抽干后用 NMP(4 mL)洗涤 3 次,再用 3 mL 哌啶/NMP(体积分数 20%)处理 5 min 脱除氨基酸上的 Fmoc 保护基(用 UV 监测反应),采用相同方法依次连接异亮氨酸、苯丙氨酸和丝氨酸。

1.4.2 树脂裂解和去保护 将已连接 5 个氨基酸的多肽从多肽合成仪的反应器中取出,放入 20 mL 的圆底烧瓶中,加入 10 mL 预先配好的裂解液(三氟乙酸+三异丙基硅烷+水,体积分数分别为 95%, 2.5%和 2.5%),密闭反应 2 h. 反应结束后,将反应液过滤,收集滤液. 再以 1 mL 三氟乙酸洗涤剩余树脂 2 次,收集滤液. 将滤液平均放入 2 个 50 mL 的离心管中,分别加入 40 mL 预先冷冻的乙醚,以 2500 r/min 转速离心 10 min,得到的固体再用冷冻的乙醚洗涤 3 次,收集所得固体。

1.4.3 多肽的纯化 将得到的粗产品溶于 4 mL 三氟乙酸(体积分数 0.05%)/乙腈溶液中,利用岛津 LC-20AT 半制备高效反向液相色谱仪进行分离提纯. 选用 Inertsil ODS-SP C₁₈ 反向色谱柱(15 μm, 20 mm×25 cm),流动相组成: A 液为三氟乙酸(体积分数 0.05%)/水; B 液为三氟乙酸(体积分数 0.05%)/乙腈; 梯度设置: B 液 5%→65%(体积分数),时间 1 h,流速 5 mL/min,进样量 0.5 mL. 采用 486 检测器检测 220 nm 处的吸收峰,并分段收集. 注意主峰出现的位置、峰形,收集主峰析出液. 将收集的样品溶液倒入 50 mL 离心管中,利用液氮将其冷冻成固体状态,用冷冻干燥机冻干。

1.4.4 多肽纯度的鉴定 取少量纯化的多肽溶于三氟乙酸(体积分数 0.05%)/乙腈中,利用岛津 LC-20AD 分析型高效液相色谱柱进行纯度鉴定. 选用 Inertsil ODS-SP C₁₈ 反向色谱柱(5 μm, 4.6 mm×250 mm),流动相组成: A 液为三氟乙酸(体积分数 0.05%)/水; B 液为三氟乙酸(体积分数 0.05%)/乙腈; 梯度设置: B 液 5%→65%(体积分数),时间 15 min,流速 1 mL/min,进样量 10 μL. 采用 486 检测器检测 220 nm 处的吸收峰. 粗产物经 HPLC 分离纯化,验证其纯度为 100%,再经质谱分析确证其分子量。

1.5 小肽的抑制凝血活性检测

将纯化后的小肽用 PBS 缓冲液配成 0.05 mg/mL 的溶液. 凝集素的活性检测采用血凝法. 参照文献[24]方法,先进行菜豆凝集素标准溶液的倍比稀释: 向 96 孔“V”型血凝板中每孔中加入 25 μL PBS 缓冲液,然后吸取 25 μL 的菜豆凝集素标准溶液加入到“V”型血凝板的第一孔,混合后吸取 25 μL 混合液加入到第二孔,混合后取出 25 μL 加入到第三孔,以此类推作倍比稀释。

向作为阳性对照组的菜豆凝集素倍比稀释液中,每孔再加入 25 μL PBS 缓冲液,小肽处理样品组则每孔加入 25 μL 的小肽溶液. 微微摇动血凝板使凝集素与小肽充分接触,静置 30 min,最后向每孔中加入 25 μL 兔红细胞悬液(体积分数 2%),继续摇动血凝板 1 min,室温下放置 1 h 后,肉眼观察对照组与小肽处理组中红细胞的凝集反应情况. 无凝集时红细胞自然沉降于 V 型板底部,呈一小圆点;如发生凝集红细胞则相互聚集呈膜状附于液面。

2 结果与讨论

2.1 菜豆凝集素结构及动态结构特征分析

以 2013 年通过 X 射线晶体衍射结晶的菜豆凝集素二聚体复合物(Resolution: 0.25 nm)^[15]为例分析菜豆凝集素的三级结构与动力学特征. 图 1(A)示出了菜豆凝集素三级结构,可见菜豆凝集素为 2 个单体结构组成的复合物结构. 理论分析表明,菜豆凝集素三级结构的骨架拓扑结构非常保守,糖结合位点区域因特异性识别功能有较多突变^[11]. 菜豆凝集素必须形成稳定的二聚体结构才能发挥生物学功能,因此二聚体结合区域的三级相互作用稳定性对菜豆凝集素生物学活性非常关键. 图 1(A)中红色结构区域为菜豆凝集素二聚体接触面(GLU182-ASP217),其中 3 个 β 片结构(ALA184-ASP191, LEU196-TYR203 和 THR208-THR215)通过与另一单体的 β 片三级结构(GLU182-ASP217)相互作用形成稳定的二聚体结构. 图 1(B)和表 1 示出了该 β 片区域的保守性分析结果,变异性较强的氨基酸用蓝色表示(保守性≤3). 结果表明,该 β 片结构片段中只有 13.8%的氨基酸序列趋向于变异,并多分布在 β 片之间的 Loop 区域。

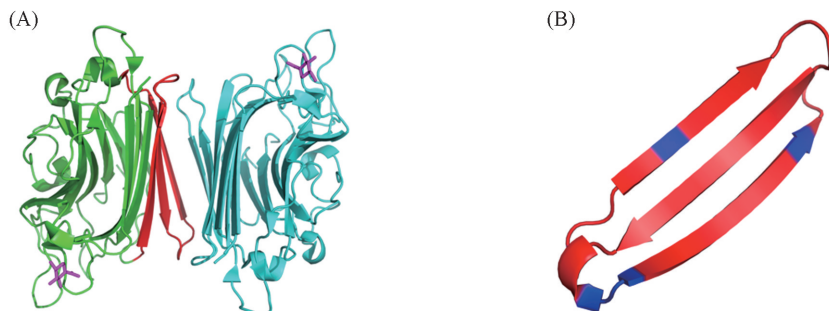


Fig.1 Structural analysis of common bean lectin dimer structure

(A) Common bean lectin dimer structure (PDB code: 3WCR, chain A, chain B, β strand and NAG are colored in green, cyan, red and magenta, respectively); (B) β strand interface structure (GLU182-ASP217, less conserved or variable residues are colored in blue).

Table 1 Conservation analysis of the common bean lectin dimer interface residues

Position	Residue	Conservation	Position	Residue	Conservation	Position	Residue	Conservation
182	GLU	3	194	THR	7	206	LEU	2
183	ASN	5	195	LYS	6	207	LYS	2
184	ALA	7	196	LEU	5	208	THR	6
185	GLU	5	197	LEU	8	209	SER	6
186	VAL	8	198	VAL	7	210	PHE	4
187	LEU	3	199	ALA	8	211	ILE	6
188	ILE	9	200	SER	6	212	VAL	5
189	THR	6	201	LEU	7	213	SER	7
190	TYR	9	202	VAL	5	214	ASP	3
191	ASP	6	203	TYR	5	215	THR	4
192	SER	7	204	PRO	4	216	VAL	8
193	SER	5	205	SER	6	217	ASP	8

分子动力学模拟可以从分子层次描述生物分子在水溶液中的运动情况和动力学特征. 因此, 对菜豆凝集素进行了分子动力学模拟和关联性分析. 动力学关联性的取值范围为 $-1 \sim 1$, 其中 $-1 \sim -0.4$ 表示运动方向相反, $-0.4 \sim 0.4$ 表示运动方向无关联, $0.4 \sim 1$ 表示运动方向相同, 有较高的运动协同性. 图 2 示出了菜豆凝集素分子动力学模拟中接触面 β 片结构 (GLU182-ASP217) 的动力学关联性分析结果, 动力学关联性大于 0.4 (橘色) 表明氨基酸残基之间有较高的运动协同性. 图中大部分氨基酸之间的关联性大于 0.4 (红色), 表示该结构之间有较高的运动一致性, β 片结构之间的三级相互作用使菜豆凝集素在动力学模拟过程中紧密结合.

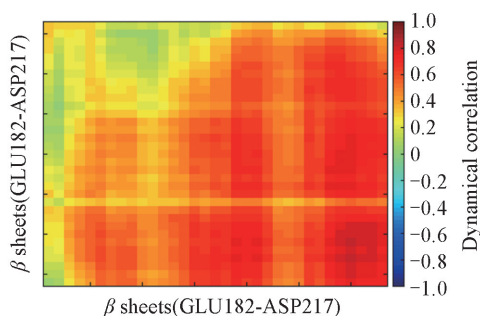


Fig.2 Dynamic correlation analysis of the interface residues (GLU182-ASP217) between two monomers

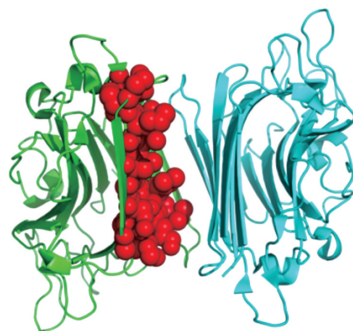


Fig.3 Potential binding pocket at the interface for inhibitor design

PDB code: 3WCR, chain A, chain B and pocket are colored in green, cyan and red, respectively.

2.2 菜豆凝集素界面分析与抑制剂设计

序列与动力学分析结果表明, 菜豆凝集素二聚体接触面对形成复合物十分重要. 图 3 中球形结构

区域示出了菜豆凝集素二聚体接触面区域空腔口袋的分布情况, 其体积为 0.34 nm^3 , 表面积为 8.25 nm^2 . 抑制剂如果结合在红色靶点区域, 将直接与菜豆凝集素的另外一个单体发生竞争, 从而直接降低菜豆凝集素二聚体的形成几率, 降低菜豆凝集素的生物学活性. 菜豆凝集素通过 2 个 β 折叠结构单元的相互作用形成二聚体结构, 根据二聚体接触面的结构特征对 β 折叠结构 (GLU182-ASP217) 进行删减, 并用分子对接方法进行验证. 结果表明, 小肽 Ac-SFIVS-NH₂ (丝氨酸-苯丙氨酸-异亮氨酸-缬氨酸-丝氨酸) 会结合在靶标位置, 可作为潜在的抑制剂.

2.3 小肽 Ac-SFIVS-NH₂ 的表征

对小肽 Ac-SFIVS-NH₂ 采用高效液相色谱和质谱进行表征. HPLC 条件: C₁₈ 柱, $\lambda = 214 \text{ nm}$, 5 肽浓度 0.5 mg/mL , 进样量 $50 \mu\text{L}$; 流动相 A 为 H₂O (体积分数 99.9%) / TFA (体积分数 0.1%); 流动相 B 为 CH₃CN (体积分数 70%) / H₂O / TFA (体积分数 0.09%).

HPLC 谱图出峰时间为 10.247 min , 面积为 100%; 其质谱图中 m/z 552.45 为 5 肽, 分子量与小肽 Ac-SFIVS-NH₂ 理论分子量一致.

2.4 小肽的抑制凝血活性分析

植物凝集素二聚体会结合红细胞表面的糖分子, 产生凝集现象; 植物凝集素单体不会使红细胞产生凝集现象, 在 V 型血凝版中静置后, 红细胞发生自然沉降成为一个小红点位于孔中央. 因此, 凝血活性分析实验能快速检测植物凝集素的生物学活性. 在 96 孔 V 型血凝板中对菜豆凝集素标准品倍比稀释后, 加入同等体积的小肽溶液, 待其与凝集素充分反应 30 min 后, 测定对兔红细胞的凝集效果. 小肽处理组中的试剂成分为 $25 \mu\text{L}$ 的菜豆凝集素 PHA-E 溶液 (从左至右依次倍比稀释) + $25 \mu\text{L}$ 小肽溶液 (0.05 mg/mL) + $25 \mu\text{L}$ 兔红细胞溶液 (体积分数 2%). 阳性对照组中的试剂成分为 $25 \mu\text{L}$ PHA-E (从左至右依次倍比稀释) + $25 \mu\text{L}$ PBS 溶液 + $25 \mu\text{L}$ 兔红细胞溶液. 阴性对照组中的试剂成分为 $25 \mu\text{L}$ 的小肽溶液 + $25 \mu\text{L}$ PBS 溶液 + $25 \mu\text{L}$ 兔红细胞溶液. 空白对照组中仅为 $50 \mu\text{L}$ PBS 溶液 + $25 \mu\text{L}$ 兔红细胞溶液.

由图 4 可见, 阴性对照组中的小肽自身对兔红细胞无凝集作用, 静置后红细胞发生自然沉降成为一个小红点位于孔中央. 阳性对照组中起始浓度为 0.05 mg/mL 的 PHA-E 标准品在横排倍比稀释至第 4 孔 (稀释 1/16) 处时, 仍能凝集红细胞并使其聚集呈膜状附于液面; 而相同浓度下的 PHA-E 标准品在加入 0.05 mg/mL 的小肽后对红细胞的凝集作用减弱, 红细胞部分发生沉降 (黑色箭头指示), 此时产生抑制效果的菜豆凝集素 PHA-E 浓度为 $3.12 \times 10^{-3} \text{ mg/mL}$, 小肽浓度为 0.05 mg/mL . 由此推测小肽与菜豆凝集素单体结合降低了二聚体的形成几率, 进而阻止红细胞凝集影响凝集素的凝集能力.

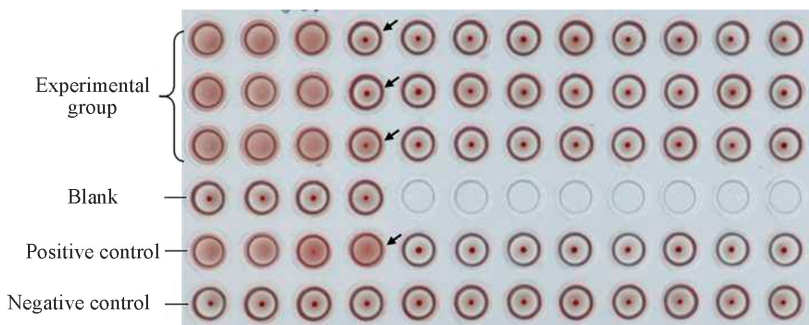


Fig.4 Inhibitory effect of the peptide in hemagglutination assay

传统的药物筛选或药物设计方法是通过实验检测药物分子库中药物与已知靶标蛋白的抑制效果. 该方法不但研发周期长, 且耗时费力. 利用计算机辅助药物设计通过分析蛋白质实验结构与序列信息等特征, 可高通量筛选、设计抑制剂或相关药物分子, 极大降低了药物的研发周期与成本^[25-28]. 菜豆凝集素的二聚体接触面较大, 仅依靠小分子的小肽通过竞争作用来打开庞大的二聚体复合物仍是一项艰巨的工程.

3 结 论

通过分析菜豆凝集素二聚体的结构和序列特征, 尝试设计小肽来抑制凝集素二聚体复合物的形成, 从而降低菜豆凝集素的活性, 解决菜豆植物性食物中毒的食品安全问题. 结果表明, 菜豆凝集素需要形成稳定的二聚体或多聚复合物结构实现其生物学功能; 二聚体结构接触面上氨基酸较为保守, 可利用其结构与序列特征设计抑制其形成复合物的小肽; 体外凝血实验表明, 该小肽对菜豆凝集素凝集红细胞有一定的抑制效果, 间接证明了小肽对菜豆凝集素二聚体复合物形成的抑制作用.

参 考 文 献

- [1] Wang P., Ren S. C., Wang G. L., *Food Res. Dev.*, **2009**, 30(12), 171—174(王鹏, 任顺成, 王国良. 食品研究与开发, **2009**, 30(12), 171—174)
- [2] Wilson R. F., Stalker H. T., Brummer E. C., *Legume Crop Genomics*, AOCs Press, Champaign, **2004**, 60—82
- [3] Xiao J., Li B., Shi X. H., E C. L., Guan H. B., Feng T., *Nor. Horticult.*, **2016**, (15), 194—198(肖靖, 李斌, 石晓华, 鄂成林, 管洪波, 凤桐. 北方园艺, **2016**, (15), 194—198)
- [4] Wang R., Ding F., Gao Y. J., Wang X. Y., Li Q., *Chin. J. Food Hygi.*, **2016**, 28(5), 580—584(王锐, 丁凡, 高永军, 王霄晔, 李群. 中国食品卫生杂志, **2016**, 28(5), 580—584)
- [5] Li J. N., Yang W., Peng N., Chen C. Y., *Scientia Agricultura Sinica*, **2015**, 48(4), 727—734(李佳楠, 杨薇, 彭娜, 陈禅友. 中国农业科学, **2015**, 48(4), 727—734)
- [6] Shang R., Wu H., Guo R., Liu Q., Pan L., Li J. N., Hu Z. H., Chen C. Y., *Acta Horticulturae Sinica*, **2015**, 42(11), 2163—2173(尚蕊, 吴华, 郭瑞, 刘琴, 潘磊, 李佳楠, 胡志辉, 陈禅友. 园艺学报, **2015**, 42(11), 2163—2173)
- [7] Yin X. L., Li T. T., Liu D. L., Wang Y., Sun S. R., *J. Chin. Biotechnol.*, **2011**, 31(7), 133—139(殷晓丽, 李婷婷, 刘东亮, 王燕, 孙素荣. 中国生物工程杂志, **2011**, 31(7), 133—139)
- [8] Teixeira-Sa D. M., Reicher F., Braga R. C., Beltramini L. M., de Azevedo M. R., *Phytochemistry*, **2009**, 70(17/18), 1965—1972
- [9] Rouge P., Culerrier R., Granier C., Rancé F., Barre A., *Molecular Immunology*, **2010**, 47(14), 2359—2366
- [10] Li X. M., *Food Science*, **2008**, 29(11), 328—331(李笑梅. 食品科学, **2008**, 29(11), 328—331)
- [11] Zhao Y. J., Liu Z. C., Liu Q., Chen G., Chen C. Y., Zeng C., *World J. Complex Medicine*, **2015**, 1(1), 34—39(赵蕴杰, 刘志超, 刘琴, 陈高, 陈禅友, 曾辰. 世界复合医学, **2015**, 1(1), 34—39)
- [12] Banerjee N., Sen Gupta S., Roy A., Ghosh P., Das K., Das S., *PLoS One*, **2011**, 6(4), e18593
- [13] Jimenez M., Saiz J. L., Andre S., Gabius H. J., Solis D., *Glycobiology*, **2005**, 15(12), 1386—1395
- [14] Menard S., Cerf-Bensussan N., Heyman M., *Mucosal. Immunol.*, **2010**, 3(3), 247—259
- [15] Nagae M., Soga K., Morita-Matsumoto K., Hanashima S., Ikeda A., Yamamoto K., Yamaguchi Y., *Glycobiology*, **2014**, 24(4), 368—378
- [16] UniProt C., *Nucleic Acids Res.*, **2010**, 38(Database issue), D142—D148
- [17] Angermuller C., Biegert A., Soding J., *Bioinformatics*, **2012**, 28(24), 3240—3247
- [18] Biegert A., Soding J., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2009**, 106(10), 3770—3775
- [19] Duan Y., Wu C., Chowdhury S., Lee M. C., Xiong G., Zhang W., Yang R., Cieplak P., Luo R., Lee T., Caldwell J., Wang J., Kollman P., *J. Comput. Chem.*, **2003**, 24(16), 1999—2012
- [20] Mahoney M. W., Jorgensen W. L., *J. Chemical Physics*, **2000**, 112(20), 8910—8922
- [21] Pronk S., Pall S., Schuiz R., Larsson P., Bjelkmar P., Apostolov R., Shirts M. R., Smith J. C., Kasson P. M., van der Spoel D., Hess B., *Bioinformatics*, **2013**, 29(7), 845—854
- [22] Volkamer A., Kuhn D., Rippmann F., Rarey M., *Bioinformatics*, **2012**, 28(15), 2074—2075
- [23] Chang C. D., Waki M., Ahmad M., Meienhofer J., Lundell E. O., Haug J. D., *European Journal of Allergy & Clinical Immunology*, **2009**, 15(1), 59—66
- [24] Sun C., Zhu Z., Mo Q. H., *Lectin*, Science Press, Beijing, **1988**, 117—130(孙册, 朱政, 莫庆汉. 凝集素, 北京: 科学出版社, **1988**, 117—130)
- [25] Zhao C., Xia C.G., Yu M., Pan Y., Wang L., *Chin. J. Antibiotics*, **2015**, 40(3), 234—240(赵晨, 夏春光, 于敏, 潘月, 王辂. 中国抗生素杂志, **2015**, 40(3), 234—240)
- [26] Huang Y. L., Gao X. F., *Chem. J. Chinese Universities*, **2016**, 37(5), 928—931(黄义玲, 高雪峰. 高等学校化学学报, **2016**, 37(5), 928—931)
- [27] Zhu Q. K., Zhu M. L., Zou J. X., Feng P. C., Fan G. T., Liu Z. B., Wang W. J., *Chem. Res. Chinese Universities*, **2013**, 29(6),

1153—1158

[28] Li W. Z., Meng W., Tian P., *Chem. Res. Chinese Universities*, **2015**, 31(1), 149—155

Design of Common Bean Lectin Inhibitor and Its Hemagglutination Activity[†]

LIU Qin¹, YU Yanhua², CHEN Weida¹, CHEN Chanyou¹,
ZHAO Yunjie^{3,4*}, ZENG Chen^{1,4*}

(1. School of Life Science, 2. Institute for Interdisciplinary Research, Jiangnan University, Wuhan 430056, China;
3. Department of Physics, Central China Normal University, Wuhan 430079, China;
4. Department of Physics, the George Washington University, Washington D.C 20052, USA)

Abstract Common bean (*Phaseolus vulgaris L.*), rich in protein and low in fat, is one of the most important legume crops in the world. However, consumption of improperly prepared common bean can lead to food poisoning. Previous studies have largely attributed this toxic effect to the high content in lectin, a plant protein that binds specifically to carbohydrate or carbohydrate structures displayed on cell surface. Since most lectin forms a dimer complex for biological functions, a short peptide was designed to break the dimer interface. Detailed dynamical network and structural characteristic analysis were performed to select this peptide. *In vitro* hemagglutination assay showed that this peptide, upon binding to lectin, disrupts the dimer formation partially and weakens the hemagglutination effect. Taken together, a novel peptide inhibitor was designed whose potency and specificity can be further optimized for anti-hemagglutination and food safety applications.

Keywords Common bean lectin; Molecular dynamics simulation; Drug design; Inhibitor design; Hemagglutination activity

(Ed.: P, H, F, K)

[†] Supported by the Huang He Talent Plan of Wuhan, China (No. Wu[2014]3), the Scientific Research Foundation of Central Normal University, China (No. 23020205170045) and the Hubei Science and Technology Platform Project, China (No. [2011]101).