

活体分析化学实验室 2010 年度工作总结

主任：陈 义 副主任：毛兰群 主任助理：汪福意

本年度共承担各类国家项目 38 项：主持国家基金委杰出青年基金 1 项、重大研究计划 4 项、重大国际合作 1 项、重点项目 1 项、仪器专项 1 项、面上基金 13 项，参加面上基金 1 项；主持“973”课题 1 项、“863”项目 1 项、重大科技专项子课题 1 项，参加“973”课题 3 项；主持中科院方向性项目 1 项、课题 1 项、实施中科院“百人计划”1 项、“技术百人”1 项，参加中科院仪器项目 1 项；其他项目 5 项。

一、主要研究工作进展

1. 仪器研制

构建了一套无分子泵的离子阱微米尺度质谱新系统，在普通真空条件下，准确测定了美国标准局 3 微米聚苯乙烯球标样的质量 (8.81×10^{12} Da)；构建了小型便携式质谱系统，获得了氨基酸和罗丹明的校准质谱；使用微扰方法，从理论上论证了非线性囚禁场对离子阱质谱的特性影响。

完成了科技部支撑计划支持的 SPRi 商品化样机的研制工作，通过了结题验收。所研制的 SPRi 仪器具有宽温控、可变焦、高分辨、多功能的新特点，其性能全面超过现有商品仪器的水平。

2. 生物识别与选择分析

(1) 信号转导与抗癌药物

① 结合计算机辅助设计技术，尝试不同的设计策略，合成了 14 种含有潜在金属配位位点的蛋白酪氨酸激酶抑制剂及 7 种以其为配体的多靶点金属钌配合物。ELISA 和 Docking 分析结果表明，合成的喹唑啉类化合物和钌配合物都很好地保持了对表皮生长因子受体 (EGFR) 的特异性抑制活性，金属中心的引入使原有机小分子抑制剂的水溶性得到明显改善。

② 发展、建立了基于质谱分析的药物相互作用组学研究方法，比较研究了有机金属钌抗肿瘤化合物和顺铂与转铁蛋白 (Trf)、血红蛋白 (Hb) 和金属硫蛋白 (MT) 等的相互作用和作用位点。研究发现，有机金属钌化合物都能与 Trf 表面的组氨酸、蛋氨酸残基配位，但钌化合物的结合不会导致 Trf 变性型的构象变化，因而 Trf 受体对 Trf-Ru 复合物的特异性识别，将有助于钌化合物的胞吞和靶向传输；钌化合物与 Hb 的结合受化合物中有机配体的影响较为明显，只有对甲基异丙基苯化合物能与 α 链的 His45 (或 His50) 结合；无论是在中性还是

酸性条件下，顺铂都能取代锌离子与金属硫蛋白（MTs）上的 Cys 残基结合，而钆化合物与 MT 几乎没有反应，钆抗肿瘤药物对 MT 的惰性可能是其具有较低毒副作用，以及与顺铂没有交叉抗药性的原因之一。

③ 有机金属钆化合物 $[(\eta^6-p\text{-cymene})\text{Ru}(\text{acac})\text{Cl}]\text{PF}_6$ 能有效抑制蛋白酪氨酸磷酸酶 PTP1B 的催化活性（IC₅₀: 2.5 μM ）。除与表面的 His195、His296、Met133、Met256 结合外，化合物 2 和 5 还能与 PTP1B 表面的 Cys32 和 Cys121 以及位于“口袋”内的 Cys215 和 Cys231 结合，并诱导巯基氧化生成亚磺酰或亚磺酸。其中，Cys215 正是 PTP1B 的催化位点，这一发现表明有机金属钆化合物有可能通过与 PTP1B 的共价结合，抑制 PTP1B 的催化活性及其对胰岛素介导的信号转导过程的负调节作用，有望成为 II 型糖尿病治疗的先导化合物。

④ 应用 LC-MS 分析，从动力学和热力学两个方面系统地研究了有机金属钆抗肿瘤化合物与单、双链 DNA 的相互作用。首次发现 DNA 链中的 T 碱基在动力学上能与 G 竞争与钆的配位，而且，T 的结合对钆与 G 配位生成热稳定的 DNA 复合物具有显著的协同作用。这一发现表明胸腺嘧啶 T 在钆抗肿瘤化合物基于 DNA 损伤诱导的细胞凋亡信号转导过程中起着重要的作用。

（2）生物分子相互作用及其分析应用

① 建立了基于光偶联技术的天然糖分子可寻址探针阵列的制备方法，并由此发展了糖与凝集素相互识别的 SPRi 分析方法。

② 为深入了解三聚氰胺诱导泌尿系统结石的生成机理，以 FIA-QCM 传感体系构建了液相环境中三聚氰胺 M-三聚氰酸 CA 层层自组装超分子体系，并研究了其动态相互作用。在人工尿液条件下，M 和 CA 在 QCM 电极表面构建了七层超分子结构，获得了两种小分子在固-液界面动态结合曲线以及热力学与动力学参数。采用 AFM、表面红外、XPS 技术对该超分子体系进行了表征，从分子水平探讨了 M 与 CA 相互作用的机理，为肾脏结石的形成机理研究提供了有价值的信息。

③ 筛选出能特异性结合植物激素玉米素的核酸适体，并进行了结构优化和改造，得到了一系列的亲和力强、特异性好、结构简单的核酸适体，初步建立了基于核酸适体的玉米素传感器，可检测到水溶液中 0.2 μM 的玉米素，进一步的应用研究正在进行中。优化了 L-色氨酸的核酸适体，研究了其与色氨酸的结合机理。以其为配基建立了 D/L 色氨酸的分离方法；优化了 ϵ -对硝基苯磺酰-L-赖氨酸的核酸适体，初步建立了对硝基苯磺酰胺类化合物的检测方法。

④ 研究了汞离子与环状酰亚胺分子的相互作用，发现汞离子可以特异性的

与两分子酰亚胺结合，取代酰亚胺 N-H，形成 N-Hg-N 键，同时释放两当量的质子。该反应是可逆反应，在 pH 大于 4.5 时可快速进行。其他金属离子不与酰亚胺分子发生类似反应。该反应的发现为汞离子吸附剂、汞离子探针的设计提供了新的信息。

3. 生物分离分析方法

(1) 毛细管电泳 (CE)

① 发展了一种以毛细管电泳分离为基础的电迁移扩散谱 (EDS)，可以同时测量混合样品中多种组分的自扩散系数，EDS 法耗样少 ($<1\text{nL}$)、测定速度快 (约 10 min)、结果准确 (误差 $<2.2\%$)。建立了纳米金与牛血清白蛋白 (BSA) 相互作用的毛细管电泳研究方法，测得二者的结合常数和每个纳米颗粒吸附的 BSA 分子数，该方法可以推广到其他纳米颗粒的吸附研究中。

② 建立了一种以 Zn(II) -L-脯氨酰胺为手性选择剂的 CLE-CE 新方法，成功实现了丹酰氨基酸的手性拆分，并将该法用于 DAAO 的酶动力学研究。通过反应底物 D-Ser 浓度的降低表征了酶活性的高低，得到了苯甲酸钠对于 DAAO 活性的抑制曲线，小鼠腹腔注射苯甲酸钠后的药代学研究结果表明，该药会快速吸收分布，药效维持时间短并快速消除。此结果可为酶抑制剂苯甲酸钠后期的临床应用、精神分裂症的治疗及其新药开发提供指导性意见。

③ 以 ATRP 法制备了一种新型双亲嵌段共聚物，将其用作毛细管涂层，通过对 pH、缓冲盐种类和浓度、有机溶剂含量等因素的考察，建立了类固醇类药物及芳香胺类物质的分析方法，并对两种芳香胺在鼠血中的代谢过程进行了研究。利用 CEC、接触角及 AFM 图谱对分离机理进行了探讨，结果表明：该涂层具有自组装的性质，能形成胶束类聚集体，并起到类表面活性剂的作用。

(2) 质谱新方法

使用有机盐-蔡乙二胺为基质，获得了糖和代谢物等小分子 MALDI-TOF MS 的高灵敏质谱，为了进一步拓宽在活体研究中的应用，进行了耐盐性实验，最高可以在盐的饱和溶液中 (6.2M) 得到葡萄糖的质谱结果，并且和盐的浓度无关。

(3) 芯片电泳

① 建立了氨基酸的手性分离 MEKC 分析方法，并应用于天冬酰胺酶的动力学研究。设计制备了 GMA-EDMA 基质的整体柱和毛细管涂层酶反应器，考察了不同键合时间及键合长度对于酶解效率的影响。采用该酶反应器进行模拟白血病病人血清样品的酶解，研究结果表明：L-天冬酰胺确实能被固定于酶反应器上的天

冬酰胺酶分解，并能迅速生成酶解产物—L-天冬氨酸。此研究结果可为聚合物多孔介质酶反应器的应用研究及白血病治疗新药的开发提供重要和有力的依据。

② 利用微芯片中的流体会在弯道产生二次流的性质，设计了一种具有连续U型弯道的双层芯片，考察了混合器环形结构数目对混合效率的影响，同时也考察了在不同的流速下其混合程度的变化。研究发现：这种3D混合器可克服类似结构中混合程度先升高后可逆降低的缺陷，使层流样品在3mm的距离内能得到均匀的混合，该研究结果为化学反应液体的快速混合奠定了良好基础。

③ 针对多肽合成多组分、多步骤、循环反应、溶剂条件苛刻的特点，设计并构建了六通道阵列连续流微流控多肽合成系统，实现了多肽的原位合成与裂解。以 β -内啡肽的3E7mAb亲和多肽库中活性较高的六种多肽为模型进行了多肽的阵列合成，在4小时内同时获得了六种不同长度、不同序列的多肽，产物的平均纯度为85%。基于微流控多肽阵列合成平台，为构建高通量、高亲和多肽筛选与检测体系奠定了基础。

(4) 分离新介质

① 通过探索并优化三元致孔体系对超大孔形成、孔径分布和通透性的影响，运用溶胀聚合技术并结合相分离技术，获得了结构完整、粒径均匀且具有超大孔和中孔双孔结构PGMA色谱基质。微球的流速—柱压曲线呈良好的线性关系，该新型色谱基质为快速高通量生物大分子分离分析提供可能。

② 以超浓乳液聚合法制备了纳微多孔聚合物整体介质，并在其表面固定了HSA，制备了高效亲和色谱柱，成功地应用于手性固定相，开展了D,L-AAs的HPLC手性分离研究及DAAO酶动力学研究，并应用于人血清中D-AA实际样品的研究中。

③ 利用两步ATRP方法实现了整体柱的可控聚合和可控接枝，得到了同时具有pH响应和盐响应的整体柱，并用于类固醇类药物的分离分析。通过考察pH和盐浓度对小分子在接枝柱体上保留行为的影响，结果证实由于所接枝的聚合物长链的质子化作用和电荷的屏蔽效应使其具有双响应性。pH和盐浓度在调控过程中相互影响，盐浓度的影响较为明显，柱体的响应性正比于表面接枝时间。这一研究结果对开展蛋白质等生物大分子的分离调控研究具有指导意义。

4. 纳米及生物电化学和电分析化学

(1) 钙、镁离子的选择性电化学分析

除了神经递质（如抗坏血酸）、能量物质（如葡萄糖和乳酸）等在脑缺血过程中具有重要的生理意义，金属离子也扮演重要的角色。基于钙镁离子对NADH

的电化学催化氧化的增强效应，建立了钙镁离子的活体在线电化学分析新方法，用于鼠脑中钙镁离子的检测，获得满意结果。该方法为脑神经化学过程中钙镁离子的研究奠定了基础。

(2) 多巴胺的活体在线电化学分析

利用多巴胺易被氧化和氧化产物易发生分子内成环反应以及漆酶能够催化多巴胺氧化的性质，提出并建立了基于漆酶催化性能的多巴胺的电化学分析新原理和新方法。由于常见干扰物入抗坏血酸和 DOPAC（多巴胺的主要代谢产物）能够在漆酶的催化下被催化生成电化学非活性物质，而很难在电极上发生电化学氧化或还原，所以所建立的方法对于多巴胺的测定具有很高的选择性。通过进一步在线集成对于多巴胺具有选择性催化氧化的漆酶微反应器，并引入缓冲溶液在线调节溶液 pH，建立了多巴胺的选择性在线电化学分析方法。该方法具有很好的选择性和稳定性，能够应用于脑内多巴胺的活体在线分析。

(3) 葡萄糖的可视化分析

通过合理设计纳米金的表面化学，利用纳米金分散和聚集状态时所呈现的不同颜色，结合生物酶对于底物的选择性催化氧化性能，提出并建立了生物体系中葡萄糖的可视化分析方法。该方法选择性好，灵敏度高，简便易行，可望应用于信号转导过程中能量代谢过程的研究。

5. 生物燃料电池

利用电极上 SWNTs 和 NAD^+ 分子中腺嘌呤基团之间的 $\pi-\pi$ 相互作用，实现了 NAD^+ 在电极上的固定，并基于此构筑了以葡萄糖为燃料的生物阳极 GDH/ NAD^+ /SWNT。在此基础上，进一步通过在 SWNTs 上电化学聚合亚甲基绿(MG)得到聚亚甲基绿(polyMG/SWNT)复合物，并通过吸附 NAD^+ 且固定 GDH，构筑了葡萄糖生物燃料电池阳极 GDH/ NAD^+ /polyMG/SWNT，该阳极与未经 polyMG 修饰的生物阳极相比，对葡萄糖的催化氧化峰电位负移 350mV，与 Laccase/SWNT 阴极所构筑的生物燃料电池最大功率密度提高了 1.9 倍。

6. 光学探针与生化分析

(1) 光学探针的设计制备及其应用

以罗丹明为荧光母体，设计合成了适用于丙酮酸标记的水溶性长波长荧光探针 RBPH。利用该探针，发展了反应条件温和、简便的丙酮酸分析新方法，并成功地用于人血清中丙酮酸的测定，同时借助荧光酶法（乳酸脱氢酶法）印证了该方法的可靠性。

将 RBPH 作为双功能探针（可同时引入稳定的光学信号和正电荷）用于嗜热木聚糖酶的定位标记与区域结构分析。热失活实验表明，正电荷的引入几乎不改变该蛋白酶的热稳定性，从而揭示出了它的 N-末端区域对电荷的变化具有一定的保守性。

（2）新型近红外荧光探针的设计及其在酪氨酸酶活性检测中的应用

通过分子设计，将荧光体与酶的识别单元酪胺相连，构筑了一种具有近红外荧光发射特征的新型三碳菁类光学探针，具有水溶性好、反应条件温和等优点。利用该探针，发展了一种新的检测酪氨酸酶活性的简便、高选择性分析方法，为进一步了解酪氨酸酶的生物功能奠定了重要基础。

（3）活细胞中次氯酸、汞和银的荧光探针与成像分析新方法

借助二茂铁单元可发生分子内电荷转移并对葱的荧光产生猝灭作用，用乙烯键将二者连接，制备了可用于次氯酸检测 and 成像分析的高选择性荧光探针 9-葱基乙烯基二茂铁。该探针的双键可被次氯酸选择性切断，并伴随着剧烈的荧光增强，而其他活性氧物种则不与之发生反应。利用这一特性发展了活细胞中次氯酸的荧光成像分析方法。

为了揭示汞和银离子在生物毒性上的巨大差异，设计合成了一种对汞和银均具有荧光响应的新型光学探针罗丹明 B 内酯。通过比较汞和银离子在 HeLa 细胞中的荧光成像行为，发现银离子与探针的反应速度显著慢于汞离子，这可归因于细胞内高浓度的氯离子阻碍了银离子的反应。该研究对理解二者的不同生物毒性差异具有重要的启示作用。

（4）汞离子可视化传感器的研究

合成了巯基修饰的胸腺嘧啶分子，与金纳米粒子自组装构建了一种汞离子选择性的可视化传感器。汞离子诱导修饰有胸腺嘧啶分子的金纳米粒子聚集，导致发生由红到蓝的颜色变化以及相应的吸收光谱的变化。这些光学特性的变化与汞离子的浓度呈线性相关，其他金属离子不干扰光学信号变化。肉眼可观察到 0.5 μ M 汞离子引起的颜色变化。

（5）光气的可视化检测

基于纳米金聚集状态不同所导致的颜色变化以及光气与氨基的高反应活性，制备了半胱氨酸修饰的纳米金，并利用它发展了一种简单、灵敏的光气可视化检测方法。

二、发表论著、专利情况

本年度发表 SCI 论文 38 篇。申请专利 3 项，授权专利 6 项。

三、人才引进和培养

本年度引进助研 4 人，现有博士后 5 人，在读博士生 40 人，硕士生 28 人。毕业博士生 10 人，出站博士后 1 人，接纳本科毕业实习生 2 人，合作指导研究生 4 人，“西部之光”访问学者 1 人。

四、获奖情况

本年度有 1 人获研究生院“优秀毕业生”，1 人获研究生院“三好学生标兵”，9 人获研究生院“三好学生”，2 人获研究生院“优秀学生干部”，12 人获化学所青年科学奖优秀奖，7 人获所长奖学金，3 人获宁波大成奖学金，1 人获江阴科技创新奖学金，1 人获杭州泰达奖学金。

五、国际、国内合作与交流

本年度邀请国外专家来访和学术交流 10 人次。全室共参加国际学术会议 18 人次，作邀请和大会报告 12 人次；参加国内学术会议 47 人次，做邀请和大会报告 7 人次；举办了全国学术会议 1 次。