

## 活体分析化学实验室 2009 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 35 项：主持国家基金委杰出青年基金 2 项、海外杰出青年基金 1 项、重大研究计划 4 项、重大国际合作 1 项、重点项目 1 项、面上基金 8 项；主持国家科技部“科技支撑计划”1 项、“973”课题 1 项、“863”项目 1 项，参加“973”课题 2 项；主持中科院方向性项目 2 项、实施中科院“百人计划”1 项；其他项目 10 项。

### 一、主要研究工作进展

#### 1. 仪器研制

研制成两台表面等离子体共振成像仪（SPRi）商品样机，完成了调试程序，自主编制了工作站，发布了两项企业产品标准。构建了一套无分子泵的离子阱微米尺度质谱新系统，可在普通真空条件下，准确测定了美国标准局 3 微米聚苯乙烯球的质量（ $8.81 \times 10^{12}$  Da）。基本构建了小型便携式质谱系统，调试工作正在之中。

#### 2. 生物识别与选择分析

(1) 信号转导与抗癌药物：设计、合成和表征了一系列钌基、铂基多靶点组合分子金属配合物，包括 18 种有机金属钌配合物，4 种三价钌配合物，9 种顺铂、卡铂类似物。应用自制的  $\text{TiO}_2$  纳米颗粒沉积毛细管柱分离富集蛋白激酶的磷酸化肽底物，发展了一种快速、灵敏、低成本的磷酸化肽 MALDI-TOF MS 定量分析方法，为蛋白酪氨酸激酶小分子抑制剂的快速筛选打下了良好的基础。发展、建立了一种基于二级质谱分析的蛋白质组学研究方法，研究了顺铂和人重组血清白蛋白（rHA）的相互作用，鉴定了 4 个共价作用位点。其中一个位点正是 HA 转运锌离子的主要结合位点，为解释顺铂导致与锌缺乏症相关的毒副作用提供了直接的证据。另外，顺铂能够诱导二硫键 Cys124-Cys169 断裂，并且与还原的 Cys124 的巯基共价结合，进而可能对血清白蛋白的生物功能产生重要影响。考察了有机金属钌抗肿瘤化合物与 DNA 结合时的序列选择性及其链间、链内的迁移特性；应用 LC-MS 研究了有机金属钌抗肿瘤化合物与 G-四链体的相互作用，研究发现，钌基基团主要结合在 G-四链体 5'端的 G 碱基上，并显著降低 G4 结构的稳定性。

(2) 相互作用及其分析应用：合成了一种蛋白酪氨酸磷酸酶的模型化合物一

邻巯基苯甲酰苯胺 (CPN), 研究了有机金属钇抗肿瘤化合物与 CPN 的相互作用。在不同的 pH 条件下, 钇化合物与 CPN 结合, 生成单核或双核复合物, 降低 CPN 与  $H_2O_2$ , GSH 的反应活性。因 Cys 的巯基与纳米金相互作用, 会导致纳米金颗粒产生团聚, 溶液颜色发生改变, 基于此现象以 CMC 修饰的纳米金颗粒为传感器, 建立了尿液中 Cys 的灵敏分析方法。筛选出能特异性结合链亲和素、植物激素系统素、色氨酸、酪氨酸的核酸适体, 并进行了结构优化和改造, 得到了一系列的亲合力强、特异性好、结构简单的核酸适体, 为下一步建立基于核酸适体的分析方法奠定了基础。通过分子设计构建了新的智能型双功能核酸适体, 新的适体只有与凝血酶结合后才能与链亲和素结合, 而且与链亲和素结合的适体的量与凝血酶的浓度直接相关, 可用于同时分离和检测凝血酶。同样的策略可用于构建针对其他靶分子的智能型双功能核酸适体, 用于特定靶分子或核酸序列的同时分离与检测。初步建立了活性赤霉素的 SPRi 分析方法。设计合成了酰胺键过渡态类似物  $\epsilon$ -对硝基苯磺酰-L-赖氨酸, 用其进行了具催化活性的寡聚核苷酸的筛选, 获得了与其特异性结合的核酸适体, 并进行了结构优化, 其催化活性表征正在进行中。探索了通过循环的“与链亲和素结合-洗涤-水解-放大”的过程筛选水解链亲和素的寡聚核苷酸的方法。

### 3. 生物分离分析方法

(1) 毛细管电泳 (CE): 建立了针对芳香胺和三聚氰胺的毛细管暂态等速电泳富集方法, 实现了大体积进样浓缩, 灵敏度提高 250 倍, 可用于食品及食品包装袋中有害组分分析; 发展了针对赤霉素 (GA) 的  $\beta$ -环糊精电动色谱、聚环氧乙烷动态涂层-非水 CE 和高效液相色谱质谱联用 (HPLC-MS) 分析方法, 可用于实际样品中 GA 的分析; 建立了大肠杆菌与抗菌药物相互作用的超速显微毛细管电泳分析方法, 成功研究了药物的作用过程。建立了 Zn-L-Aln 的手性离子配体交换 CE 新方法, 实现了 Dns-AAAs 的高效手性拆分, 并进一步用于生物体内 DAAO 酶的活性与含量研究, 发现其在大鼠体内含量的顺序为: 肾 > 肝 > 心 > 肺, 且大鼠肾缺血 60 min 后其 DAAO 酶活性大幅降低。

(2) 质谱新方法: 建立质量上移 MALDI-TOF MS 测定新方法, 成功克服了小分子测定干扰问题, 实现了小分子质量的准确测定, 已用于多种小分子如赤霉酸、肽、脂肪酸、黄酮等的测定。

(3) 芯片电泳: 发展了氨基酰胺的芯片电泳分析方法, 实现了 7 种氨基酰胺组分的分离, 并进一步应用于天冬酰胺酶 (治疗血癌之有效药物) 的动力学研

究中。制作了一系列不同尺寸的微流控芯片反应器，研究了 Baylis-Hillman 反应，使反应转化率提高了 5 倍。完善了多肽微流控合成体系，合成出了亮脑啡肽 YGGFL，三次合成粗产物的平均纯度为 88.5%，产率为 91.8%。初步构建了六通道阵列微流控多肽合成体系，以  $\beta$ -内啡肽的 3E7 mAb 亲和多肽库中活性较高的 6 种多肽为模型进行了多肽的阵列合成，同时获得了 6 种不同的多肽产物。

(4) 分离新介质：发展了拟模板分子印迹聚合物制备新方法，解决了一些难以获得模板分子的分子印迹问题，以 TMP 为拟模板制备了对 MTX 有高亲和力与高选择性分子印迹聚合物。用其作为固相萃取材料，可富集人血清中 MTX。运用一步溶胀聚合法并结合相分离技术，通过优化单体与致孔体系相比例和致孔体系中良/不良致孔剂组成，制备出超大孔径为 500 nm，中孔孔径为 60 nm 的双孔结构、粒径均匀、通透性良好的 PGMA 色谱基质微球，为高通量生物大分子分离分析提供可能。以环氧树脂为基质制备了具有三维连续骨架的聚合物整体柱，经柱表面接枝，制备了盐敏、温敏分离介质，实现了蛋白质的控制分离。以 ATRP 法合成了一系列不同分子量的 pGMA，利用其粘弹性控制自由基聚合反应中的相分离过程，制备了具有纳米级骨架的整体材料以及以 EDMA 为基质的整体柱，经表面接枝 pBMA 后，可用于蛋白质混合物的分离。以超浓乳液聚合法制备了纳、微多孔聚合物整体介质，发现其酶固定化介质可保持活性至少一个月，且可提高反应速度约 300 倍。制备了 BMA-EDMA-AMPS 毛细管整体柱，可用于维生素 B 类药物的 CEC 分析和尿液中药物的分析。

#### 4. 纳米及生物电化学和电分析化学

(1) 葡萄糖和乳酸双组分的活体在线电化学分析：在前期研究的基础上，综合考虑所建立的基于氧化酶的活体在线电化学分析体系对于氧气和溶液 pH 的强依赖性，以及在实际生理和病理过程中脑内氧气和 pH 的不稳定性，提出并建立了基于脱氢酶的葡萄糖和乳酸在线电化学分析新方法。该方法不依赖于氧气和 pH 的变化，且具有很好的稳定性，能够满足缺血/再灌注过程中脑内葡萄糖和乳酸两组分的活体在线电化学分析。

(2) Hb 的折叠/解折叠研究：利用血红蛋白 (Hb) 内部血红素基团的电化学信号变化，研究了 GdnHCl (盐酸胍) 诱导 Hb 解折叠的动力学过程。结果表明 GdnHCl 诱导 Hb 变性过程符合“二态模型”，说明基于血红素的电化学信号研究 Hb 解折叠过程是可行的。另外，酸、碱诱导 Hb 解折叠/重折叠过程得到的初步的电化学结果与之前报道的光谱法观察到的结果一致，说明建立的方法可用于酸、碱诱导

Hb 解折叠/重折叠过程的研究。

(3) 单胺类递质的在线分析：针对单胺类神经递质难以实现选择性电化学检测的问题，引入分离手段（如高效液相色谱），利用单胺类递质结构相似、极性不同的特点，以电化学作为检测方法，在几分钟内实现其完全基线分离，成功地建立了单胺类递质的在线高效液相色谱分离-电化学检测新方法。与传统方法相比，建立的方法具有较好的分离效果和较快的检测速度，并通过在电化学检测之前，先分流出抗坏血酸的方法，成功避免了由于抗坏血酸氧化产物在电极表面吸附，导致电极性能下降的问题。

### 5. 脑神经电分析化学研究

利用所建立的抗坏血酸活体在线电化学分析方法，研究了脑缺血早期神经病理过程中脑内抗坏血酸的变化规律。建立了 2-V0 全脑缺血/再灌注模型和左侧大脑中动脉栓塞的局灶性脑缺血/再灌注模型，研究了大鼠纹状体脑区抗坏血酸浓度在不同脑缺血/再灌注过程中的变化差异，发现了该脑区中抗坏血酸的浓度在不同缺血/再灌注模型中不同的变化规律，对于脑缺血过程中的生化机制的研究具有重要的意义。

### 6. 生物燃料电池研究

构建了血清中发电的微型生物燃料电池。利用有机小分子染料 poly(brilliant creysl blue) 对 NADH 氧化的优良电化学催化性能，基于染料分子与碳纳米管之间的相互作用，制备了基于 NAD<sup>+</sup>葡萄糖脱氢酶的生物燃料电池阳极。与此同时，基于胆红素氧化酶（BOD）在碳纳米管上的直接电化学，制备了基于 BOD 的生物燃料电池氧气阴极。在此基础上，将抗坏血酸氧化酶固定到微电极表面，研制了一种无抗坏血酸干扰的微型葡萄糖/氧气生物燃料电池，此电池在正常人血清中的最大输出功率比未固定抗坏血酸氧化酶的生物燃料电池提高了 50%。

### 7. 光学探针及生物分子局域结构分析

(1) 蛋白质的定位标记及局域结构分析：将极性敏感荧光探针 CGTDP 定位标记于  $\alpha$ -乳白蛋白的精氨酸残基 Arg10 上，定量测定了 Arg10 附近疏水核 II 的极性。此外，利用荧光探针 CMTDP 对巯基的选择性反应，将其定位标记于牛血清白蛋白的 Cys34 位点，定量研究了在正常生理条件下 Cys34 位点局部极性以及在 N $\rightarrow$ B 转化过程中该位点局部极性的变化趋势，研究结果为牛血清白蛋白的 pH 诱导的构象变化提供了一种直接的证据。还将活性基团  $\pi$ -烯丙基设置在极性敏

感的荧光体尼罗红分子中，发展了新的小分子极性敏感荧光探针 DBHA。在醋酸钯的催化作用下，探针中的烯丙基可选择性与酪氨酸的酚羟基反应。利用这一特性，将探针定位标记到超氧化物歧化酶的 Tyr108 残基上，定量测定了该区域的介电常数。该工作为信号转导蛋白中酪氨酸残基的区域结构分析提供了一种新的研究方法。

(2) 含可切断活性键的罗丹明类荧光探针的设计：合成了一种含可切断活性键的光开关探针化合物—罗丹明 B 羟酰胺，其中的羟酰胺基团可与  $\text{Cu}^{2+}$  形成螯合物，促进酰胺键的水解断裂，使罗丹明 B 得以释放，导致荧光的恢复。基于此，建立了一种  $\text{Cu}^{2+}$  的高选择性和高灵敏度荧光分析方法。利用罗丹明 B 内酯酯，构建了小鼠成纤维细胞中汞离子的荧光成像分析方法。

(3) 粘度检测荧光探针的设计及性能研究：以苯并[g]喹啉为荧光团、以可自由旋转的苯环作为粘度敏感单元，合成了五个不同取代的 2-苯基-苯并[g]喹啉衍生物，并对它们的光学性质进行了系统研究。其中，含供电子能力较强的取代基（-OH、-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>）的化合物 2-(4-羟基苯基)苯并[g]喹啉和 2-(4-二甲氨基苯基)苯并[g]喹啉，其荧光强度对粘度的变化比较敏感，可望用作检测粘度的荧光探针。

(4) 汞离子分子探针的研究：通过在酞菁分子中引入 4 个胸腺嘧啶分子构建了一种汞离子选择性传感器分子—4T-ZnPc。汞离子诱导 4T-ZnPc 聚集，导致其特征的 Q 吸收带减弱、荧光强度降低。这些光学特性的变化与汞离子的浓度呈线性相关，且具有很好的可逆性，其他金属离子不干扰光学信号变化。基于同样的机理合成了胸腺嘧啶修饰的纳米金，建立了汞离子选择性可视化检测方法。

## 二、发表论著、专利情况

本年度发表 SCI 论文 53 篇。申请专利 15 项，获得专利授权 2 项。

## 三、人才引进和培养

本年度引进研究员 1 人，副研 1 人，助研 3 人，行政秘书 1 人。现有博士后 2 人，在读博士生 41 人，硕士生 13 人。毕业博士研究生 9 人，出站博士后 1 人。

## 四、获奖情况

本年度获中国分析测试协会 (CAIA) 一等奖 1 项，有 12 名研究生获得 2008-2009 年度中国科学院研究生院“三好学生”，3 名研究生获得中国科学院研究生院“优秀学生干部”，1 名博士生获得中国科学院研究生院“优秀毕业生”；2 名研究生获得“化学所青年科学奖特别优秀奖”，9 名研究生获得“化学所青年

科学奖优秀奖”，3名研究生获得2008年度化学所“所长奖学金”，2名研究生获得化学所“宁波大成奖学金”。

#### **五、国际、国内合作与交流**

本年度与美国专家开展合作研究1项，邀请国外专家来访和学术交流8人次，出访交流6人次。全室共参加国际学术会议34人次，作邀请和大会报告11人次；参加国内学术会议53人次，做邀请和大会报告14人次。举办了“第十三届北京分析测试学术报告会及展览会（BCEIA）色谱分会”、共同举办了“2009有机质谱年会”。