

活体分析化学实验室 2011 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 45 项：主持国家基金委重大研究计划 1 项、重大国际合作 1 项、重点项目 1 项、仪器专项 2 项、面上基金 14 项、主任基金 2 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 6 项；主持中科院科研装备项目 1 项、方向性项目课题 1 项、实施中科院“百人计划”1 项、“技术百人”1 项，参加中科院方向性项目课题 1 项、仪器项目 1 项；其他项目 8 项。

一、主要研究工作进展

1. 仪器研制

构建了一套数字波离子阱颗粒质谱新系统，该系统可以工作在没有分子泵的低真空条件，使用三角波和方波简化了实验电子学系统，获得了和正弦波类似的实验结果，并准确测定了健康和贫血红细胞的质量（32.6pg 和 29.1pg）；使用格林函数方法，求解了平面离子阱的囚禁特性，获得了不同参数下平面阱的势能分布、阱深和稳定区。

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，在此前合成的含有金属配位位点的蛋白酪氨酸激酶抑制剂的基础上，设计、合成了 15 个多靶点金属钌配合物。ELISA 和 Docking 分析结果表明，3 个 Ru DMSO 配合物和 6 个有机金属钌配合物较好地保持了其中的配体对表皮生长因子受体（EGFR）的特异性抑制活性。体外细胞活性测试表明，一个三价钌 DMSO 配合物和 5 个有机金属钌配合物对人乳腺癌细胞株 MCF-7 的 EGF 刺激生长表现出选择性的抑制活性，证明了我们多靶点金属抗肿瘤配合物设计思路的正确性和可行性。

② 应用 TiO_2 磁性空心微球（MHMSS）分离富集蛋白酪氨酸激酶 EGFR 的磷酸化底物肽，实现了高灵敏度、高选择性的磷酸化肽的 MALDI-TOF MS 定量测定。该方法用于蛋白激酶抑制剂的快速筛选及 IC_{50} 值的测定，避免了使用昂贵的生化试剂和放射性同位素标记试剂，在大规模蛋白激酶抑制剂快速筛选中将有广阔的应用前景。

③ 应用 LC-MS/MS 方法分析鉴定了抗肿瘤药物顺铂与血清白蛋白的结合位点, 研究发现, 除能与蛋白表面的蛋氨酸、组氨酸残基结合外, 顺铂还能与血清白蛋白上的 67、247 位组氨酸残基形成交联复合物, 占据锌在该蛋白上的结合位点, 干扰人体对锌元素的摄入, 导致锌缺乏综合征。这一研究结果在 *Chem. Commun.* 上发表后, *Chemistry World* 和 *C&E News* 都进行了评述和推介。

④ 发展、建立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及顺铂与转铁蛋白 (Tf) 的相互作用和作用位点。研究发现, 顺铂倾向于与蛋白表面的蛋氨酸残基结合, 而钌配合物倾向于与蛋白表面的组氨酸残基配位。进一步的研究表明, 尽管顺铂和钌配合物与 Tf 的结合, 不影响 Tf 与其受体 TfR 的特异性识别, 但是, 与 Tf 结合显著降低顺铂的生物利用度, 而对有机金属钌化合物的生物利用表现出一定程度的增强作用。

⑤ 比较研究了有机金属钌化合物 $[(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})\text{Ru}(\text{XY})\text{Cl}]\text{PF}_6$ (XY= acac (1), en (2)) 与蛋白酪氨酸磷酸酶 PTP1B 的相互作用。两种化合物都能与表面的 His195, His296, Met133, Met256, Cys32 和 Cys121 残基结合, 化合物 1 还能与 PTP1B 位于“口袋”内的催化位点 Cys215 结合, 并诱导巯基氧化生成亚磺酰基, 所以化合物 1 对 PTP1B 表现出很高的抑制活性。这一发现表明有机金属钌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。

⑥ 应用 HPLC-MS 分析, 研究了有机金属钌抗肿瘤化合物在双链 DNA 上的迁移行为。结果表明, 结合在鸟嘌呤碱基上的钌经由 SN1 路径在双链上迁移, 双链的形成破坏有机金属钌化合物上的氨基氢与鸟嘌呤碱基的氢键是导致钌迁移的主要驱动力。

(2) 生物分子相互作用及其分析应用

① 以氯三嗪为偶联试剂, 建立了一种在固体界面上共价固定天然糖的新方法, 并由此发展了糖与凝集素相互识别的 SPRi 及可视化分析方法。

② 开展了小分子多肽探针的设计合成、筛选与肝癌活细胞成像分析, 发展了基于反义肽筒并性的功能导向筛选新方法, 并成功应用于肝癌 LAPTM4B 蛋白靶向的多肽探针的筛选。在生理条件下, 所获得的小分子多肽探针 AP2H 与靶多肽具有高亲和作用力, 并显示出替代抗体的潜力, 在生物分析中具有生物相容性好、

穿透性强、免疫原性低等特点。荧光标记的 AP2H 探针实现了对肝癌细胞 LAPTM4B 蛋白的识别、定位与动态分析。AP2H 多肽探针可发展成为一种新型肝癌快速诊断试剂，并作为特异性抗癌药物的小分子载体。

③ 对 G-四链体/血红素复合物的过氧化物酶活性进行了研究，发现正平行结构的 G-四链体与血红素复合物具有强过氧化物酶活性，可快速催化氧化维生素 C、色氨酸、酪氨酸以及含色氨酸的多肽等还原性底物，其底物特异性与天然辣根过氧化物酶完全不同。进一步研究发现 G-四链体/血红素过氧化物酶容易失活，失活的原因是由于血红素被快速降解所致，通过对 G-四链体/血红素过氧化物酶的失活动力学、催化动力学研究提出了该酶的催化与失活机理。为核酸类模拟酶的构建以及其在分析检测中的应用提供了依据。

④ 筛选出能特异性识别可待因，植物细菌的核酸适配体。分别优化了系统素、对硝基苯基苯磺酰保护的氨基化合物的核酸适配体，研究了其结合机理，以此构建了系统素和对硝基苯磺酰胺类化合物荧光探针。系统考察了 5 种肿瘤细胞特异性的核酸适配体 sgc3b, sgc4e, sgc8c, TLS9a 和 TLS11a 与 15 种不同肿瘤细胞的结合谱。为下一步相关肿瘤标志物分子的分离鉴别，以及肿瘤分子探针的构建打下了基础。

⑤ 建立了血液及细胞培养液中端粒 G-四链体的高灵敏度分析方法；对端粒 G-四链体碎片的检测限达到 10pM。基于此初步测定了血清中的端粒 G-四链体碎片，考察了阿霉素处理的肿瘤细胞培养液中端粒 G-四链体碎片产生的过程。为下一步端粒碎片与疾病的相关性研究奠定了基础。

⑥ 设计并构建了可原位检测的六单元集成化 3D 微流控芯片多肽筛选系统，六个独立的筛选反应单元包括可分别产生六个线性 pH 系列的梯度发生器及亲和筛选区域。具有独特偏心轴向结构的双分流层作为集成化进样模块的设计，有效解决了多单元样品的引入问题。通过互为镜像的两个轴向分流芯片，仅需要顶层两个进样口便可实现 36 个实验点的同时原位筛选。以所构建的微流控芯片，探索进行了靶向多肽的亲合和筛选研究。

3. 生物分离分析方法

(1) 毛细管电泳 (CE)

① 发展了复杂氨基酸混合物的一锅衍生及毛细管区带电泳 (CZE) 分离分

析方法。所建立的一锅衍生法不需要任何纯化步骤、简便、温和、快速（16min）且衍生产物稳定性好；且衍生时，同时引入了高灵敏检测基团和电荷，利用最简单的 CZE 分离模式，25 min 内即可实现 19 个氨基酸混合物的完全分离。此方法已成功应用于生物体液（人血清、人尿液、人唾液）中游离氨基酸的分析测定。

② 建立了基于 Zn(II)-L-Prn 体系的手性氨基酸的 CLE-CE 分析方法，并应用于 AAO 酶抑制剂的筛选研究中；还研究了小鼠腹腔注射酶抑制剂 SB 之后的药代动力学过程。该结果可为研究这种治疗精神分裂症潜在药物的体内代谢过程及其临床应用提供指导意见，并能为其对体内神经调质的影响提供新的研究思路。

③ 利用 ATRP 法制备得到了一种新型 PBA-b-PGMA 双亲嵌段共聚物，建立了类固醇类药物及芳香胺类物质的 CEC 分析方法，并对芳香胺在鼠血中的代谢过程进行了研究；还利用 CEC、AFM 及接触角表征图谱对该双亲嵌段共聚物涂层的分离机理进行了探讨，结果表明：该嵌段聚合物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。

④ 建立了氨基酸的 MCE-LIF 分析新方法，开展了与肝炎密切相关的谷丙转氨酶（ALT）的双向酶促反应动力学研究，并成功获得了酶促反应动力学常数，该研究能为肝病的治疗和 ALT 的分析提供新的思路。

（2）质谱新方法

使用有机盐-萘乙二胺为基质，在活体脑脊液中，获得了葡萄糖的 MALDI-TOF MS 的高灵敏质谱；使用同位素标记的方法，在安静、缺血、再灌注三种不同的生理情况下，进行了葡萄糖的定量分析。

开发了一种基于辉光放电的离子源，将该离子源与热解析相结合，成功用于土壤中炸药成分的分析。

（3）芯片电泳

① 构筑了以 GMA-EDMA 为基质的整体柱和涂层柱酶反应器，考察了不同键合时间及键合长度对于酶反应效率的影响，还结合体外循环给药系统及 MCE-LIF 分析方法，对模拟白血病人血清样品进行了酶解研究，结果表明：酶底物能被快速酶解。该研究为聚合物多孔介质酶反应器在体外循环给药系统的应用及新型抗癌药物的开发研制提供了有力的依据。

② 构建了新型微流控芯片反应器，并通过对温度和电场的调节使 B-H 反应

的速率提高了数倍，还探讨了其对反应速率影响的机理。

(4) 分离新介质

① 以血红素和茚二胺衍生物为配基，以葡聚糖微球和 PGMA 微球为载体，通过不同的偶联方法构建了多种分离核酸 G-四链体的亲和分离基质，对这些基质与 G-四链体的分离特性进行了系统研究，成功实现了血浆中 G-四链体的选择性分离，为 G-四链体结构的生物功能研究和应用提供了重要的方法。

② 发展了金包磁核壳磁性纳米粒子 (400nm)，通过金硫键可高密度偶联核酸适配体 sgc8c 和 sgc3b，成功用于肿瘤细胞的分离，为下一步核酸适配体靶分子的分离和肿瘤靶向治疗奠定了基础。

③ 利用一种具有亚微网络骨架结构和高孔隙率的多孔介质作为整体基质，制备了新型酶反应器；建立了胰蛋白酶的在线酶促反应技术并发展了蛋白质水解的 HPLC 分析方法。固定化酶与游离酶的活性比较研究结果显示：固定化酶的米氏常数仅为游离酶的 2 倍，而最大反应速度则提高了 300 倍，充分显示了该酶反应器在蛋白质组学研究中的潜在应用价值。

④ 利用两步 ATRP 法实现了整体柱的可控聚合和可控接枝，由于所接枝的聚合物长链的质子化和去质子化作用以及电荷的屏蔽效应而使该整体柱同时具有了 pH 和盐响应性，以此实现了对小分子药物的调控分离。该研究从色谱学的角度证明了 ATRP 方法在表面接枝方面的可控性，对开展蛋白质等生物大分子的分离调控研究具有一定的指导意义。

⑤ 利用自由基聚合法制备了 E-51 环氧树脂基质的整体柱，并在其表面以在线 ATRP 法接枝共聚了温敏聚合物长链，再以 RP-HPLC 模式实现了 6 种蛋白混合物的基线分离。

⑥ 开展了核壳结构磁性纳米材料的制备与双酚 A 高选择性分离分析研究，获得了良好包埋的 Fe_3O_4 /聚氯甲基苯乙烯的磁性纳米粒子，通过对纳米粒子表面进行衍生以及进一步的 Si-ATRP 反应制备出以双酚 A 为模板分子的超顺磁性核-壳结构纳米分子印迹聚合物材料。具有高化学稳定性、高模板选择性、结合快速、操控简单等特点，显示出对模板双酚 A 的专一性识别，并实现了实际样品中双酚 A 的高效富集检测。

4. 生物电化学传感器的研究

(1) 基于石墨烯的生物电化学传感器的研究

利用石墨烯本身带有的负电荷，实现了其与带正电荷的小分子染料（亚甲基绿）和咪唑阳离子功能化的碳管之间的层层组装。研究发现，利用以上的静电相互作用，可以构筑基于石墨烯和亚甲基绿、石墨烯和碳纳米管的电极/溶液界面。通过进一步结合酶对于底物的专一性高效催化，我们成功地实现了生物分子（如葡萄糖和乙醇）的生物电化学催化和传感。该研究为高效生物传感器的构筑提供了新的思路。

(2) 基于配位聚合物生物电化学传感器的研究

针对基于脱氢酶生物电化学传感器研究中，传感单元在电极表面固定繁琐和由此而引起的电极制备复杂和传感器间重现性差的问题，我们选择以 NAD^+ 为配体的镧系无限配位聚合物作为构建单元。在该无限配位聚合物中， NAD^+ 的核酸碱基和磷酸基与镧系金属离子配位，而 NAD^+ 依然保持其辅酶的活性。进一步，我们在合成过程中将电化学催化剂（亚甲基绿，MG）和（葡萄糖脱氢酶，GDH）同时包裹到 Tb-NAD^+ 的框架中，形成了一个含有所有传感单元的具有生物电化学活性的纳米结构。通过将所形成的纳米结构一步滴涂在电极的表面，即可制备出对于葡萄糖具有很好响应的生物电化学传感器。与传统的方法相比，本方法具有突出的优点。首先，本方法大大简化了传感器的制备步骤，省去了许多繁琐的程序。其次，该方法中具有生物电化学活性的纳米结构的合成条件温和，环境友好。最后，由该方法制备的传感器间的重现性较好。所报道的方法在电化学传感器和生物燃料电池的研究中具有很大的应用前景。

(3) 基于离子液体的电化学生物传感器的研究

基于碳纳米管和离子液体可以形成凝胶的特点，利用碳纳米管良好的电子导电性和丰富的表面化学性质以及离子液体良好的离子导电性和溶解性能，制备了多功能的离子液体/碳纳米管凝胶，该凝胶不但集成了电化学生物传感器换能器所需要的所有元件和性能，包括电子导体，离子导体，辅酶以及电化学催化剂，更重要的是该凝胶可以通过研磨的方式的非常方便而又快速地修饰到电极表面，解决了以往电化学传感器需要一步一步修饰进而影响电化学传感器重现性差的关键问题。研究表明，由此方法所制备的电极，不论是单根电极对于同一样品多次测定的重现性，还是多根电极同时测定同一样品单次测定的重现性，其相对标

准偏差均在 5%以内。该研究对于促进生物电化学传感器在实际研究中的应用具有重要的意义。

5. 光学探针与生化分析

(1) 一种简单灵敏的基质金属蛋白酶 2 检测方法

基于氧化石墨烯和肽段之间的非共价相互作用可使二者形成复合物以及它的荧光淬灭性质,发展了一种简单灵敏的基质金属蛋白酶 MMP2 的荧光检测方法。这种方法还被成功地用于监测 HeLa 细胞所分泌的 MMP2 的含量。

(2) 罗丹明 B 内酯酯在一氧化氮的荧光成像分析中的应用

利用特殊的化学反应 (NO 与酯化物之间的化学反应以及内酰胺的开环切割反应),以长波长的罗丹明 B 内酯酯作为荧光探针,发展了一种新型 NO 荧光探针,并应用于 NO 的高选择性荧光成像分析。

(3) 模型植物拟南芥对汞离子的吸收行为的荧光成像研究

我们利用新型光学探针罗丹明 B 内酯酯,结合激光共聚焦荧光显微镜,开展了 Hg^{2+} 在模型植物拟南芥中的吸收与分布的荧光成像研究。研究表明,大部分 Hg^{2+} 驻留在根冠部分和分生区,只有少部分 Hg^{2+} 可以进入到成熟区;并且,在根冠部分和分生区, Hg^{2+} 只分布在原生质体中,而不出现于细胞壁。这说明含巯基的亲汞物种主要分布在原生质体中,提示汞中毒可能发生在该区域。进入成熟区的汞离子主要聚集在环状导管的外部,表明导管外部富含亲汞物种。该结果将有助于了解植物对 Hg^{2+} 的中毒机制。

(4) N-(3-羧基)丙烯酰基罗丹明 B 酰肼的设计合成及其在铜离子和次氯酸根的荧光检测中的应用

制备了 N-(3-羧基)丙烯酰基罗丹明 B 酰肼,并在不同条件下分别用于 Cu^{2+} 和次氯酸根的荧光检测。

(5) 以 BODIPY 为母体的巯基化合物的荧光探针的设计及应用

以羟基 BODIPY 为母体,引入 2,4-二硝基苯磺酰基团,制备了对巯基物质有特异性响应的荧光探针,并用于人血清中非蛋白结合态的半胱氨酸含量的测定。

(6) FRET 型荧光探针的设计合成及其在次氯酸检测中的应用

设计制备了水溶性 FRET 型次氯酸荧光探针,并将该探针用于 HeLa 细胞中次

氨酸的荧光成像分析。

(7) 面粉增白剂过氧化苯甲酰的快速检测方法研究

以罗丹明 6G 作母体，合成了一种新荧光探针。利用该探针发展了一种快速检测面粉增白剂中过氧化苯甲酰的方法。

(8) 比例型 pH 探针的设计合成

设计合成了新的并杂环萘酰亚胺化合物，该化合物的吸收光谱和荧光光谱在 pH 5.5-7.5 的范围内，随 pH 升高发生较大的红移，且其在酸性和碱性条件下均具有较高的荧光量子产率，是理想的比例型 pH 探针。

(9) 锌、镉离子荧光探针的设计合成

设计合成了茚二吡啶胺分子，对其吸收光谱与荧光光谱随 pH 的变化进行了系统研究，发现锌离子和镉离子可在不同 pH 范围内增强茚二吡啶胺分子的荧光强度，通过调节缓冲液 pH 可分别对两种离子进行选择性的检测，检测灵敏度可达 nM 水平。

(10) 蛋白质中色氨酸的快速可视化检测研究

基于 DMSO 对 Trp 在 HCl/HCOOH 中显色反应具有特异性双重效应的新发现，发展了一种快速、简便、高选择性的色氨酸及其相关多肽、蛋白质的可视化检测方法。机理研究表明，DMSO 催化显色反应的原因在于“偶极非质子溶剂效应”；而生成无色 Oia 的副反应则是高含量 DMSO 抑制显色现象的根源所在。该方法实现了 20 种氨基酸混合物中 Trp 的特异性快速目视检测，检测限为 5.1 μ M，大大提高了灵敏度和检测效率。此外，在 10min 内成功实现了多种含色氨酸残基的生物活性多肽及蛋白质的快速目视检测。

二、发表论著、专利情况

本年度发表 SCI 论文 48 篇。申请专利 17 项，授权专利 8 项。

三、人才引进和培养

本年度现有在站博士后 5 人，在读博士生 50 人，硕士生 19 人。毕业博士生 13 人，出站博士后 1 人，接纳本科毕业实习生 6 人，合作指导研究生 4 人，联合培养博士后 1 人，“西部之光”访问学者 2 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 1 人获研究生院“三好学生标兵”, 10 人获研究生院“三好学生”, 2 人获研究生院“优秀学生干部”, 2 人获化学所青年科学奖特别优秀奖, 10 人获化学所青年科学奖优秀奖, 2 人获第一届美中女化学家学术研讨会“优秀墙报奖”。

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 17 人次; 参加国际学术会议 25 人次, 作邀请和大会报告 10 人次; 参加国内学术会议 52 人次, 做邀请和大会报告 13 人次。