

活体分析化学实验室 2013 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 43 项：主持国家基金委重大研究计划 3 项、重大国际合作 2 项、重点项目 3 项、仪器专项 2 项、面上基金 7 项、青年基金 6 项、外国青年科学家基金 1 项，参加重大项目 1 项，重大仪器专项 1 项；主持科技部创新方法工作专项 1 项、“863”项目 1 项，参加创新方法工作专项 1 项、“973”子课题 5 项；主持中科院创新交叉团队 1 项、科研装备项目 1 项、创新工程项目 1 项、方向性项目课题 1 项、国际合作人才交流项目 1 项，参加方向性项目课题 1 项、先导科技 A1 项、仪器项目 1 项；实施化学所“百人计划”1 项。2013 年 9 月参加了中国科学院重点实验室评估，被评为 B 类实验室。

一、主要研究工作进展

1. 仪器研制和应用开发

① 构建了一套线形离子阱质谱分析研究装置，包括自行设计构造的线形离子阱质量分析器和不连续大气进样方法，含微型机械泵，微型分子泵，微型真空腔等。质谱仪内部结构有矩形平板离子阱和电子倍增管。使用模具成型方法，获得了双曲面构型的线性离子阱和三维离子阱质量分析器加工新方法，每套模具可开发十万套离子阱，批量生产每套离子阱的成本价不到 10 美金。

② 完成了飞行时间-二次离子质谱(TOF-SIMS)成像仪的安装、调试；建立了微纳米材料化学成分的 TOF-SIMS 成像和深度剖析分析方法，实现了硅纳米棒阵列表面污染物的检测；以包裹荧光染料的硅球和聚苯乙烯球为分析对象，实现了 STED 光学成像与 SIMS 成分成像的初步联用；对高分子薄膜材料进行深度剖析研究，考察了高分子链末端在温度变化前后的取向变化。

③ 研制基于光学液心结构的全反射折光系统，基此构建了新概念的表面等离子体共振成像 (SPRi) 新装置，可以实现折射率的动态调节，以改善成像质量，实现了蛋白质、糖点阵的高质量成像和分析应用研究。

2. 生物识别与选择分析

(1) 信号转导与抗癌药物

① 以 EGFR 抑制剂吉非替尼类似物为配体，设计、合成和表征了一系列钕/铂基金属配合物。体外实验表明，这一系列配合物均具有较高的 EGFR 抑制活性，

同时金属中心保持了与 DNA 碱基（如鸟嘌呤）的反应活性。其中 6 种钆配合物比单功能抗肿瘤药物具有更高的诱导早期细胞凋亡的能力，并对高表达 EGFR 的肿瘤细胞的 EGF 诱导增殖表现出选择性抑制活性。

② 比较研究了两种钆配合物和顺铂与转铁蛋白（Tf）的相互作用及其对金属配合物细胞摄入和生物利用度的影响。结果表明，顺铂和钆配合物与 Tf 表面残基的结合不影响 Tf 与其受体的特异性识别。但是，与 Tf 结合显著降低顺铂的细胞摄入量、DNA 结合量和生物利用度，从而降低顺铂的细胞毒性。相反，结合 Tf 对有机金属钆化合物的细胞摄入量和细胞毒活性几乎没有影响，对其生物利用度还有一定的增强作用。该结果表明 Tf 可以作为钆基抗癌药物的靶向载体。

③ 研究了有机金属钆抗肿瘤化合物与谷胱甘肽（GSH）和 DNA 的竞争性反应，发现无论在 GSH 是否过量存在的条件下，两种钆基配合物均能与 DNA 中的鸟嘌呤选择性结合。该结果为解释钆基有机金属抗肿瘤化合物具有较低的毒副作用提供了有力的实验依据。

④ 比较研究了有机金属钆抗肿瘤化合物与谷胱甘肽转移酶(GSTs)的相互作用和作用位点。结果表明三种钆基配合物均能与两种 GST 相互作用，但结合位点不尽相同，正是不同的作用位点导致三种钆基配合物对 GST 表现出不同程度的活性抑制。

⑤ 研究了铜伴侣蛋白(Atox1)与顺铂的相互作用，发现尽管顺铂与 Atox1 上铜结合位点结合，但一价铜的存在仍有助于 Atox1 的铂化。该研究显示铜离子对顺铂的细胞代谢具有调控作用。

⑥ 构建了一种纳米金亲和探针-HPLC-MS 联用蛋白质组学方法，捕获和鉴定肿瘤细胞裂解液中顺铂损伤 DNA 的应答蛋白。研究发现人核蛋白辅助因子 PC4 能与一种反铂抗癌化合物 (*trans*-PtTz) 交联损伤的 DNA 特异性结合，为进一步研究抗肿瘤活性的反铂化合物的细胞应答机制奠定了基础。

⑦ 建立了 Bottom-up 和 Top-down 相结合的质谱分析方法，研究了 DNA 中 G/T 碱基与有机金属钆抗肿瘤化合物的竞争结合。研究发现，有机金属钆化合物优先与单链 DNA 上的 G 碱基配位，但当富 G 序列形成 G-四链体时，钆化合物优先与四链体末端的 T 碱基结合。该研究揭示 T 碱基在钆基抗癌化合物与 DNA 相互作用中扮演重要的角色。

⑧ 深入研究了光活性铂类抗癌化合物 *trans, trans, trans*-[Pt(N₃)₂(OH)₂(MA)(Py)] (MA = methylamine, Py = pyridine) 的光反应机理。在紫外光 UVA (365 nm) 或蓝色光 (420–450 nm) 照射下, 该化合物发生复杂的光化学反应, 其 N₃ 配体离去, 生成 N₃·自由基或者 N₃⁻阴离子, N₃ 配体还可能失去 N₂ 形成强氧化性的 {Pt-N} 氮宾 (nitrene) 中间体, OH 配体离去并原位产生单线态氧 (¹O₂)。与此同时, 四价 Pt 被还原成二价, 并迅速与鸟嘌呤 (G) 碱基结合, 与铂结合的鸟嘌呤也可能被 ¹O₂ 或者氮宾中间体氧化。该研究为进一步研究光活性铂类抗癌化合物的作用机理提供了实验依据。

(2) 生物分子相互作用及其分析应用

① 应用质谱分析研究了人血清白蛋白 (HSA) 在 Boc5 代谢中的作用。Boc5 是一种非肽类 GLP-1 受体激动剂, 在人、猪和鼠的肝脏中均十分稳定, 但是在血浆中可以通过两步连续的水解得到两个代谢产物, 而这个水解过程是通过 HSA 而不是酯酶来完成的。采用类似的方法, 发现几种某些脂肪酸类药物分子也可以与 HSA 上的活性位点相结合, 并通过 HSA 水解、代谢。

② 分别以耐药肿瘤细胞株 MCF-7/MDR 和恶性程度高的前列腺癌细胞株 PC-3 为靶标, 筛选到识别 MCF-7/MDR 细胞株的核酸适配体 8-A1、8-A2、17-A2、17-A7, 以及识别 PC-3 细胞株的核酸适配体 wy5a。这些核酸适配体具有非常高的特异性, 只识别靶细胞, 不识别其他的细胞株。利用荧光标记的 wy5a 检测临床来源的前列腺癌组织切片, 发现 wy5a 可对恶性程度高的前列腺癌组织染色, 染色的荧光强度随癌症恶性程度升高而升高, 对正常前列腺增生组织不染色。这些核酸适配体可作为分子工具用于肿瘤恶性生物学行为的研究、检测以及肿瘤耐药监测和耐药机理研究。

③ 基于核酸碱基 T 可与汞离子特异性地形成 T-Hg-T 碱基对, 以 T-T 错配的碱基替换链霉亲和素核酸适配体结构中双链部分的少量碱基, 构建了汞离子调控的链霉亲和素核酸适配体。新构建的核酸适配体不与链霉亲和素结合, 只有在汞离子存在下与链霉亲和素结合; 以该核酸适配体构建了通过汞离子调控的 G-四链体过氧化物酶平台, 实现了汞离子对酶量的调控。另外将 ATP 分子的核酸适配体分成两段, 以其替换链霉亲和素核酸适配体中的一段双链结构, 构建了 ATP 调控的链霉亲和素核酸适配体。新构建的核酸适配体不与链霉亲和素结合, 只有

在 ATP 存在下才能与链霉亲和素结合，该核酸适配体探针成功用于生物样品中 ATP 的检测。

④ 以特异性识别肿瘤标志蛋白 LAPT M4B 的多肽 AP2H 和具有聚集诱导荧光增强效应的四苯乙烯为基元，构建了信号可控的多肽荧光探针 (TPE-AP2H)。在识别多肽 AP2H 的导向下，TPE-AP2H 探针可特异性与肿瘤细胞表面的 LAPT M4B 蛋白结合，并激活 TPE 荧光团的信号，实现了目标分子的高信噪比检测。多肽序列中的多重组氨酸赋予了探针在弱酸性条件下更强的亲和力与更显著的荧光信号增强效应，表明 TPE-AP2H 不仅可识别肿瘤细胞的生物标志物，而且能对肿瘤细胞特有的酸性微环境产生响应，可望在肿瘤发生、发展相关的关键分子事件的示踪监测中发挥重要作用。

⑤ 设计并构建了集成化进样并原位检测的四层 3D 结构微流控芯片筛选检测体系。针对多单元样品的引入问题，设计了具有独特偏心轴结构的双层分流芯片，通过顶层两个进样口便可实现向筛选层 6 个单元 12 个通道的立体化进样，并实现 36 个实验点的同时筛选。设计了具有不同性质 C 端氨基酸的六条模型 SP 多肽，基于磁珠荧光免疫反应，进行了 SP 肽与 β -内啡肽抗体在不同 pH 条件下的原位识别与检测。基于多单元筛选与立体化分流，提高了反应效率，免除了复杂的外部装置和纷繁的管路连接，为芯片体系的集成化和微型化提供了借鉴。

⑥ 针对石英晶体微天平 (QCM) 传感器在生物活性小分子分析检测中响应信号低，灵敏度欠佳的问题，开展了具有信号放大效应的生物传感新体系研究。利用金纳米颗粒比表面积大、可有效降低分子相互作用时空位阻的优势，发展了一种快速、高灵敏度、高选择性的纳米金增敏 QCM 传感新方法。即使以小的金属离子—铜离子为模型目标，亦可获得优异的免标记响应信号，检测限达到 3.1 μM ，且重现性好。该方法为实现基于 QCM 技术的小分子检测提供了一个新的思路。

⑦ 基于石英晶体微天平 (QCM) 技术实时、动态、免标记的优点，开展了针对免疫球蛋白 G (IgG) 的小分子药物筛选研究。构建了以 IgG 为识别元件的流动注射—石英晶体微天平生物传感系统 (FIA-QCM)，通过对 IgG 与不同药物的实时动态相互作用的动力学与热力学研究，筛选得到与 IgG 作用力最强的药物 L-组氨酸。为构建基于 QCM 传感技术的高效、高通量筛选新平台奠定了基础。

(3) 纳米新材料的制备及其生化分析应用研究

① 采用 ATRP 方法在磁性纳米颗粒表面修饰了不同长度的 PGMA 聚合物链,制备得到了具有较高酶固定量的新型酶反应器,并将其用于蛋白的快速酶解,发现: PGMA 聚合物的链长对于酶的固定量有极大的影响。为聚合物修饰纳米颗粒的制备及其蛋白酶的固定化研究提供了新的思路。

② 采用 RAFT 方法合成了结构可控的数种聚丙烯酰胺衍生物聚合物,并以此制备了单分散性良好的聚合物保护的纳米金颗粒 (GNPs),研究结果表明:所合成制备的 PNIPAM-GNPs 具有良好的温敏性质,可用于尿样中半胱氨酸的定量分析研究。

③ 采用绿色快速可控的方法合成了 L-脯氨酸保护的荧光纳米簇,并用于选择性地检测血清样品中的 Fe^{3+} 。为今后设计更多基于荧光纳米簇的生物传感器提供新的研究思路,也拓展了荧光 AuNCs 的应用领域,并为建立快速、高选择性的检测与疾病临床诊断相关的分析物的平台开辟了新的道路。

3. 生物分离分析方法

(1) 毛细管/芯片电泳 (CE/MCE)

① 将酶@纳米金键合于毛细管内壁,实现了 L-天冬酰胺酶的高效固定,发展了基于手性拆分的酶底物及产物的 MCE 分析新方法;考察了酶的键合时间及酶浓度对于酶键合量和酶解效率的影响,开展了酶反应动力学研究。为 L-天冬酰胺酶的固定化提供了新材料,并为白血病的治疗开拓了新的体外循环法给药方式。

② 建立了基于 Zn-L-Ala 的 CLE-CE 新体系,实现了氨基酸的良好手性拆分,进一步开展了酶反应动力学及基于曲酸的酶抑制剂筛选研究。

③ 研究了不同结构咪唑类离子液体 (ILs) 作为 CLE-CE 体系添加剂时对手性分离效率的影响,发现:不同结构的 ILs 会对 EOF 并进而对氨基酸样品的手性分离效率产生不同的影响。还合成了一系列以咪唑衍生物为阳离子,以 L-赖氨酸为阴离子的新型 AAILs,建立了 CLE-CE 新体系并用于氨基酸的手性分析研究中。所合成制备的 AAILs 可作为 Zn(II)配合物的有效配体使用,所建立的 CLE-CE 新体系在生命分析中具有良好的应用前景。

(2) 质谱新方法

① 使用碳纳米量子点为基质，实现了 MALDI-TOF 对多种小分子质谱分析，在成人尿液和血液中，获得了肌酐和葡萄糖的高选择质谱分析；使用同位素标记的方法，进行了肌酐和葡萄糖的定量分析。

② 开发了一种基于辉光放电等离子体离子源，将该离子源应用于中国白酒中品质分析，首先获得白酒的主成分的指纹质谱，然后使用主成分统计分析方法，成功用于白酒质量好坏快速鉴别。

③ 开发了一种诱导双喷雾方法，使用该方法可对质谱仪器进行内标校准，在分辨率为 7000 普通质谱条件下，获得了正负离子模式的高精度质谱测量值，正离子精度为 1ppm，负离子精度为 3ppm。

④ 开发了一种叶喷雾离子源，对广泛存在于桑树中的多羟基生物碱类物质进行了快速检测，并且利用 MS/MS 确定了 7 种多羟基生物碱的结构组成，进而又对桑树叶、茎、皮等 5 种不同组织部位 1-DNJ 的相对含量进行了比较。

⑤ 建立 MALDI-TOF MS 定量方法分析血液中溶血磷脂酰胆碱。聚苯乙烯 (PS) 光子晶体小球可以在靶表面自组装形成均匀的界面，利用该界面，样品与基质在样品靶上的结晶均一性大幅提高，克服点样的不均与甜点现象，提高了 MALDI-TOF MS 定量分析的能力。这种制样方法可以用于血浆中溶血磷脂酰胆碱的定量测定。

⑥ 建立 UPLC-ESI-QTOF MSE 及 UPLC-ESI-QTrap MS/MS 方法分析生物样本中脂质组分。结合 UPLC 与质谱技术，分离并定性定量分析大量生物样本中复杂的脂质组分。迄今为止，已建立 20 余类近 500 种脂质的检测方法，结果在整理中。

(3) 分离新介质

① 发展基于光子晶体的高规整高效高速分离介质制备方法，构建了基于光子晶体的超高速分离新方法。

② 建立了一种快速、方便制备固相微萃取涂层的方法。所建方法可在 23 s 内制备石墨烯固相微萃取纤维头，所得纤维头涂层厚度可控、稳定、重现性好，已用于水、食品（烧烤类、油炸类等）、报纸等样品中多环芳烃类物质的检测。

③ 针对复杂生命体系中生物大分子的快速、高效分离、分析与纯化，以具有双孔结构的聚甲基丙烯酸环氧丙酯 (PGMA) 微球为基质，以葡萄糖进行表面

亲水改性，制备了强阳离子交换色谱填料。葡萄糖亲水改性增进了填料的生物相容性，提高了蛋白质样品的回收率；双孔结构及较高的比表面积赋予填料良好的柱渗透性和样品负载量。以标准蛋白为样品，考察了该填料对生物样品分离性能。在 6 min 内实现了 4 种蛋白质的基线分离，以溶菌酶为样品，填料的吸附容量为 39.5 mg/mL 树脂，在蛋白质快速分离纯化分析中显示了良好的应用前景。

④ 采用 ATRP 法制备得到了寡聚乙二醇类聚合物接枝的温敏型聚合物整体柱，将其作为 HPLC 固定相，以纯水为流动相，通过调节柱温，实现了三类固醇药物的良好分离。我们不仅可通过控制接枝聚合物链的长度和调节聚合物中的共聚单体的比例来改变柱体表面的疏水性，还可以以此来调控溶质分子的疏水性及其在柱体上的保留顺序，为构建新型温敏型色谱固定相提供了一种新的研究思路。

⑤ 以冰为模板，以嵌段聚合物为表面活性剂，采用超浓乳液技术，制备了具有多种孔径分布的聚合物整体材料；将其用作 HPLC 固定相，实现了多环芳烃样品的良好分离，为基于冰模板及超浓乳液技术的聚合物整体介质的低温制备奠定了研究基础。

(4) 细胞成像

① 利用壳聚糖与戊二醛的交联反应制得生物兼容的固体红光材料，结合微乳液方法制备出水溶性、具有红色荧光的纳米颗粒 (5.6nm)，所得颗粒与 HeLa 细胞共孵育，实现了 HeLa 细胞核 (核仁) 的标记和荧光成像，有望用于基因诊断和载体运输等生物医药领域。

② 建立了单细胞 SIMS 成像分析方法，研究了两种含不同配体的钌基有机金属抗肿瘤化合物在 MCF7 乳腺癌细胞中的分布，发现单功能细胞毒性化合物主要分布在细胞核区域，而含有吉非替尼衍生物配体的化合物在细胞膜和细胞核区域均有分布，表明该化合物有可能同时作用于细胞膜上的 EGFR 和细胞核内的 DNA，证实了该化合物多靶点作用特性。配合使用自制的微刻度样品板，实现了光学形貌成像和 SIMS 成分成像的联用，及结果的精确比对。

③ 以 RAFT 聚合法合成了具有多个氨基反应位点的 PNAS 聚合物长链，再将具有荧光特性的 Ova-AuNCs 和叶酸同时键合到 PNAS 聚合物长链上，制备了荧光纳米聚合物新材料，并将其用于癌细胞的靶向识别成像研究中。为荧光聚合

物纳米新材料的合成制备及其癌细胞的靶向成像研究提供了新的路径。

4. 生物电化学传感器的研究

(1) 纳米及生物电化学和电分析化学

① **焦磷酸根的可视化分析**: 可视化方法由于具有灵敏度高, 选择性好, 操作简单, 适用于快速现场分析等特点被广泛地应用于复杂生物体系的目标生物分子的检测。在本年度中, 我们利用半胱氨酸和焦磷酸根 (PPi) 与铜离子竞争配位作用, 发展了一种基于纳米金的焦磷酸根的可视化分析方法, 并可用于关节病患者滑液中 PPi 的检测。在此基础上, 利用 PPase 调控 PPi 的含量进而控制半胱氨酸和与铜离子竞争配位, 可逆地调节纳米金的分散和聚集状态, 从而实现了对 PPase 活性的实时可视化监测。

② **肝素的电化学分析**: 肝素是一种酸性黏多糖, 大约带 70 个负电荷, 具有很好的抗凝作用, 临床医学上广泛用于防治血栓栓塞性疾病、心肌梗死、心血管手术、血液透析等。在本年度的研究中, 我们设计合成具有高正电荷的聚咪唑阳离子作为阴离子受体, 通过合理调控电化学探针 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ 和肝素与咪唑阳离子之间的相互作用, 实现了肝素的电化学分析, 并通过给大鼠腹腔注射肝素, 研究了肝素在动物体内的代谢过程。本研究不但首次实现了肝素的安培分析, 而且为扩展电分析化学在非电活性物质方面的检测提供了新的思路。

(2) 活体分析化学

① **基于框架结构的活体在线分析新方法研究**: 沸石咪唑酯骨架类材料 (ZIFs) 是一类多孔晶体材料, 其结构是由有机咪唑酯桥联沸石咪唑酯框架材料 (Zeolitic Imidazolate Frameworks, ZIFs)。ZIFs 表现了持久的多孔性及高的热力学和化学稳定性, 这使得它们在很多方面如分离、气体的储存和催化等都引起了人们广泛的研究兴趣。大的比表面积以及配体的可修饰性也使得 ZIFs 在传感方面有着潜在的应用价值。在本项目中, 我们发现 ZIFs 能够同时吸附电催化剂 (以 MG 为例) 和酶 (以葡萄糖糖脱氢酶 GDH 为例), 基于此, 我们通过系统的研究选择了 ZIF-70 作为 MG 和 GDH 的载体制得了高选择性高灵敏度的葡萄糖传感器, 结合微透析技术, 将其成功地用于鼠脑内葡萄糖的检测。与传统方法相比, 该方法具有高灵敏度和高稳定性, 能够完全满足活体在线电化学分析的需要。本研究为活体在线电分析化学的进一步发展提供了新原理及新方法。

② 基于配位聚合物的活体在线分析新方法研究：无限配位聚合物是通过金属离子和多齿配体通过配位作用形成的一类新型超分子聚合物。在前期研究中，我们发现辅酶 NAD 与 Tb^{3+} 形成无限配位聚合物以后，仍然可以与脱氢酶复合具有很高的催化效率。在本年度研究中，我们通过将单壁碳纳米管与此种无限配位聚合物掺杂形成三维导电框架，并与活体微透析技术连用，构建了高灵敏度、高选择性的活体电化学检测体系。与传统方法相比，本方法可以在基于辅酶 NAD^+ 与金属离子 Tb^{3+} 无限配位聚合物自组装形成的过程中，将其他生物传感元件如电催化剂亚甲基绿、葡萄糖脱氢酶一并包裹其中。结果表明，此种方法不但操作简单，制备重现，更重要的是相比于未掺杂单壁碳纳米管构建的无限配位聚合物生物传感器，该电化学生物传感器表现出更高的灵敏度、选择性和稳定性，且可用于活体在线检测豚鼠脑透析液中的葡萄糖。本研究提供了一种简单制备电化学生物传感器的方法，将有望用于监测某些生理和病理过程中葡萄糖的变化规律。

③ 抗氧化活性评价分析平台的建立：抗坏血酸是中枢神经系统中存在的一种重要的神经调质，其作为一种抗氧化物，对大脑具有重要的保护作用，也是标记缺血相关类神经病理过程的重要分子。我们利用微透析选择性检测电化学平台，在线检测了鼠脑海马脑区中抗坏血酸的变化规律，并首次证明了此方法可用于评估抗氧化剂对于大脑的保护作用。研究发现，在双侧颈总动脉缺血模型中，缺血引起大鼠海马脑区中的抗坏血酸浓度明显升高，而抗氧化剂（如抗坏血酸，谷胱甘肽）则对于缺血导致的抗坏血酸的升高有明显的抑制作用，并且脑细胞的存活率得到明显改善。

④ 基于微流控芯片的活体在线研究：实现在线的对脑内多种物质同时检测是活体分析长期面临的挑战性课题。在本年度的研究中，我们利用微流控芯片成本低，易制作，样品需求量小，且结构可设计性等优点，通过对其结构进行合理设计，以抗坏血酸和镁离子为例，实现双组份的微流控活体在线分析。活体脑内细胞外液的多种生理过程都有抗坏血酸和镁离子的参与，因此，实时在线同时检测抗坏血酸和镁离子具有重要的生理与病理意义。我们通过合理设计微流控芯片，上层为包含单通道的聚二甲基硅氧烷模板，下层为氧化铟锡导电玻璃，导电玻璃上集成了上述两种电化学传感器，通过对微流控芯片的合理利用及设计，成功避免了同时检测抗坏血酸和镁离子时存在的交叉干扰，实现了鼠脑内抗坏血酸

与镁离子的同时实时在线检测。

5. 光学探针与生化分析

(1) 光学探针的设计策略之归纳与评述

在这篇综述中，我们对水溶性小分子光学探针的设计策略做了全面的评述。小分子光学探针的主要反应机理包括：①质子化-去质子化反应；②络合反应（包括直接络合和竞争性取代络合）；③共价键的切断与形成；④氧化还原反应。这些反应虽已被广泛用来设计小分子光学探针，然而它们还没有被系统地总结过。我们对此进行了归纳和评述，包括我们课题组在该方面近 20 年的经验总结，希望这篇综述对该领域有兴趣的人能有所帮助。

(2) 硝基还原酶光学探针及其用于细胞缺氧成像和大肠杆菌中硝基还原酶的检测

我们以 resorufin 为母体，5-硝基咪唑作为特异性识别基团，设计合成了一种可用于硝基还原酶检测的荧光探针，并且据此发展了一种新的检测硝基还原酶活性的简便、高选择性分析方法。我们还将该探针用于 HeLa 和 A549 细胞缺氧成像研究，结果表明实体瘤细胞缺氧可伴随硝基还原酶的增加。因此，该方法可通过检测硝基还原酶来研究细胞的缺氧行为。

进一步，我们将淬灭能力更强的 5-硝基噻吩作为特异性响应基团并引入到 resorufin 母体中，发展了更灵敏的检测硝基还原酶荧光探针，检测限可达 0.1 ng/mL，是目前所报道的灵敏度最高的荧光探针。该探针已用于大肠杆菌生长过程中产生的硝基还原酶含量的测定。

(3) 基于氧化石墨烯的光学探针用于区分叶酸受体高表达和低表达的细胞

利用氧化石墨烯对荧光染料的淬灭性质以及叶酸与叶酸受体的特异性识别作用，设计了一种细胞靶向的打开型纳米荧光探针。由于叶酸能特异性识别叶酸受体，而叶酸受体在大多数肿瘤细胞表面高表达，在正常细胞表面低表达，因此，基于这一行为，可实现肿瘤细胞的靶向识别。该探针不仅可以区别叶酸受体表达量不同的细胞，还能区别形态结构相似的叶酸受体高表达和低表达的细胞，在癌症的诊断研究中具有应用潜力。

(4) 硫化氢光学探针及其用于活体斑马鱼的荧光成像研究

近年来，H₂S 被认为是继 NO 与 CO 之后生物体内的第三种气体信号分子。

我们将吸电子基团的叠氮基引入到荧光染料甲酚紫中，制得了一种对硫化氢具有高选择性响应的比率型荧光探针。在该探针中，叠氮基可被 H_2S 选择性还原为氨基，从而使荧光发射波长发生红移以达到比例型检测 H_2S 的目的。该方法对 H_2S 的检测限为 $0.1 \mu\text{M}$ ，且已成功应用于活细胞及斑马鱼的活体 H_2S 成像研究。

(5) 基于试卤灵的光学探针用于臭氧的检测

发展了一种基于试卤灵的新型荧光探针并用于臭氧的灵敏检测。该探针对臭氧表现出选择性的显色及荧光响应，且可用于细胞中臭氧的荧光成像和空气样品中臭氧的检测。

(6) 纳米材料在生物分析应用中的若干问题

以目前常用的三种纳米材料即碲化镉量子点、纳米金和碳纳米点为例，通过具体地考察它们在实际生物分析应用中的行为，较全面地揭示了其存在的毒性、非均一性和环境敏感性等问题。我们希望该研究能够引起人们在实际应用中对相关纳米材料进行重新的审视和合理的选择。

(7) 基于荧光适配体的腺苷脱氢酶的荧光传感分析

我们将荧光分子及淬灭剂分别标记在适配体的两端，并借助 ADA 可破坏腺苷及其适配体所形成的发卡结构而导致荧光增强作用，发展了一种可实时、定量地检测 ADA 的方法。该方法操作简单，灵敏度高，已被用于老鼠血清中所添加的 ADA 的测定。

(8) 谷胱甘肽转移酶荧光探针的设计及其在细胞成像分析中的应用

我们利用谷胱甘肽转移酶 (hGSTP) 催化谷胱甘肽中的巯基与探针中吸电子基团 (3,4-二硝基苯甲酰胺) 之间的反应，发展了一种检测 hGSTP 的高选择性、高灵敏度的方法。该方法可用于正常细胞和肿瘤细胞内胎盘型谷胱甘肽转移酶的荧光成像分析，并表明 hGSTP 在不同细胞中的表达水平存在着差异。

(9) 分子间激发态质子转移探针的设计与合成

因为具有分子间激发态质子转移特性的分子在结构生物学研究和荧光探针的设计中具有重要意义。我们设计合成了一个新的胍基取代的 1,8-萘酰亚胺荧光团，该荧光团具有激发态质子转移和激发态分子内电荷转移特性。在水溶液中该发色团的基态 pK_a 为 ~ 8.5 ，激发态 pK_a 为 ~ 0.9 。该荧光团的质子化和去质子化形式均具有大的 Stokes 位移 (Ex/Em: 350/460 nm 和 400/580 nm) 和具有双发射

的特性 (Em:460 and 580 nm; Ex: 350 nm)。该荧光团还可用于氟离子的特异性识别。

(10) G-四链体荧光探针的设计与合成

G-四链体结构在基因的转录与翻译过程中发挥着重要作用，与癌症的形成密切相关，发展识别特定结构的 G-四链体探针对 G-四链体的研究具有重要意义。我们设计合成了一个二苯并咪唑联咪唑类化合物 (BPBC)。BPBC 在水溶液中没有荧光发射，但当其与 G-四链体结构的核酸结合，可导致紫外吸收光谱出现一个新的吸收带，并且产生强荧光。BPBC 对 G-四链体，特别是正平行结构的 G-四链体具有高的特异性。识别机理研究表明 BPBC 与 G-四链体末端的 G-四分体平面形成 π - π 堆积相互作用。肿瘤细胞增殖抑制实验表明 BPBC 对不同肿瘤细胞有较强的增殖抑制活性， IC_{50} 为 1-10 μ M。说明 BPBC 可作为分子探针用于 G-四链体结构与功能研究，且具有作为抗肿瘤药物的潜力。

(11) 锌与镉离子探针的设计与合成

发展了一种荧光增强型的锌和镉离子的探针 PDI-DIDPA。探讨了该探针在不同 pH 条件下对 Zn^{2+} 和 Cd^{2+} 的响应机理。该探针可分别在不同 pH 条件下检测 Zn^{2+} 和 Cd^{2+} 的浓度，检测限可达 32 nM (Zn^{2+}) 和 48 nM (Cd^{2+})。通过调节溶液的 pH，该探针可区别 Zn^{2+} 和 Cd^{2+} 。

二、发表论著、专利情况

本年度发表 SCI 论文 75 篇 (其中 $IF > 5$ 的论文 35 篇， IF 介于 3-5 的论文 26 篇。授权专利 16 项，申请专利 16 项 (其中 PCT3 项)。

三、人才引进和培养

本年度获得基金委创新群体 1 项，中组部“青年千人计划”1 项，基金委优秀青年基金 1 项；引进化学所“百人计划”1 人，助研 2 人；晋升副研 4 人；现有在站博士后 6 人，在读博士生 48 人，硕士生 19 人；毕业博士生 12 人，出站博士后 3 人；接纳本科毕业实习生 4 人，合作指导研究生 26 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 人获中国科学院大学“三好学生标兵”，10 人获中国科学院大学“三好学生”，2 人获中国科学院大学“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。

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 8 人次；参加国际学术会议 29 人次，作邀请和大会报告 11 人次；参加国内学术会议 33 人次，做邀请和大会报告 12 人次。此外，还主办活体分析国际研讨会 1 次。