

•学科进展与展望•

金属组学及其研究方法 with 前景

江桂斌* 何 滨

(中国科学院生态环境研究中心, 北京 100085)

[摘 要] 金属组学是继基因组学、蛋白质组学和代谢组学后提出的一种新的组学。本文将在介绍金属组学概念、研究方法的基础上, 展望金属组学的发展前景。

[关键词] 金属组学, 金属与蛋白结合, 化学组成, 金属组, 形态分析

1 金属组学的概念

金属元素是生命存在的重要物质基础之一。金属生物分子(Metallobiomolecules)如金属蛋白(Metalloproteins)、金属酶(Metalloenzymes)以及其他含有金属的生物分子以及各种游离的金属离子如 K^+ 、 Na^+ 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 等在人类生命活动中具有重要作用。

金属组学(Metallomics)是继基因组学(Genomics)、蛋白质组学(Proteomics)和代谢物组学之后提出的一种新的组学^[1]。金属组学研究不仅将解答生物体的金属与蛋白结合的化学组成问题, 而且为探讨金属蛋白等生命物质担负生命活动的机理开辟新的研究途径。在金属组学中, 和基因组学、蛋白质组学和代谢物组学中基因组(Genomes)、蛋白质组(Proteomes)和代谢组(Metabollomes)相对应的名词是金属组(Metallomes)。在金属组学中, 细胞、器官或生物组织中含有的金属蛋白、金属酶和其他含有金属的生物分子以及游离金属离子的集合被定义为“金属组”。在生命体系的大部分情况下, 没有不同种类的金属离子和金属酶的参与, 基因(DNA, RNA)和蛋白质的合成与代谢是无法完成的。研究已经表明: 一些微量金属元素在生物体液和器官中可以与不同的蛋白分子结合形成金属蛋白, 当金属蛋白在生物细胞和器官中催化或调控生化反应、影响生理功能时被称为“金属酶”。金属酶与蛋白在不同活性位点结合, 从而催化 DNA 和 RNA 的合成, 影响代谢

和抗氧化性等。确定金属组并阐明它们在生物体系中的生物的或生理的功能是金属组学的主要研究目标。金属组学研究范围是细胞、器官或生物组织中含有的金属生物分子和游离金属离子的价态、形态、浓度、时空分布、生物功能以及与基因组(Genomes)、蛋白质组(Proteomes)和代谢组(Metabollomes)之间的联系。

金属和类金属元素在生物体中都具有一定的化学价态和形态, 包括游离水合离子、与生物分子配体形成的络合物, 以及构成硬组织的难溶化合物等。金属的生物功能和毒性效应不仅与其含量有关, 更与其存在的化学形态如氧化态、配体性质及分子结构等密切相关。然而到目前为止, 还不能从分子水平上完全了解依赖于金属的生物化学过程, 细胞中金属被感知、储存或成为辅助因子的机理尚不清楚, 人们急需了解一种金属或类金属在生物体内存在的全部形态信息, 以便彻底了解生命过程, 弄清金属及其化合物在正常生命过程、重大疾病的发生、诊断和治疗过程中的作用机理, 而基因组学、蛋白质组学和代谢组学研究的发展为识别所有的金属蛋白及其酶代谢物、全面了解必需金属和毒性金属在健康和疾病中的作用提供了前所未有的机遇。

细胞是生物体的基本结构和功能单位, 细胞内的物质代谢, 能量代谢和信息传递是生命活动的三大基本要素。一个细胞的化学特性不仅需用它的基因组和蛋白质组表征, 而且须用金属和类金属在细胞器中的形态分布, 即金属组, 来表征。金属组中金

* 1998 年度国家杰出青年科学基金获得者。

本文于 2005 年 3 月 4 日收到。

属和类金属生物分子包括金属和类金属与有机酸、蛋白质、糖或 DNA 片断等内源性或生物诱导的生物分子形成复合物^[3]。受基因组学、蛋白质组学和代谢组学的启发, Haraguchi 提出的金属组学主要研究金属和类金属元素在细胞中的分布、存在的形态、与其他生物大分子结合的结构及其在生物体中的作用与功能^[4]。

随着基因组学和蛋白质组学研究的深入, 对金属组学的全面研究已是蓄势待发。早期的研究主要集中在元素在环境及生物体的分布及所造成的影响, 研究的是元素的总量, 现代金属组学要求研究金属离子和类金属在细胞内的分布及形态、与基因组、蛋白质组和代谢组之间的关系, 并从分子生物学的角度出发对其与生物大分子的复杂体, 特别是金属蛋白、金属酶进行结构、功能和活性的分析。在金属组学中为了有效地阐述与金属结合的蛋白、酶等金属组的功能, 须解决金属的全形态分析。目前一些发达国家逐渐对单个金属在细胞中的含量、分布、形态以及与蛋白的作用展开研究。

2 生物金属和类金属化合物的分类

在生物体中只有少数金属如 Na^+ 和 K^+ 以自由离子形态参与生命活动, 大多数金属和类金属只有和各自的配体结合后才表现出生物活性, 若以自由离子存在则表现出或多或少的毒性。金属配体又分为小分子配体如氨基酸、核苷酸、 HCO_3^- 、 HPO_4^{2-} 和大分子配体如蛋白质、核酸等两类。非必需元素与生物配体的结合是生物体中毒或戒毒的机理。根据金属和类金属的在生物体内存在的形态、分子大小, 可分为:

(1) 自由离子: 如钾、钙、钠、镁。 Na^+ 和 K^+ 是维持细胞内外液容量和渗透压的主要阳离子, Na^+ 多以自由离子式存在于细胞外, 而 K^+ 多为细胞内离子, 与膜电位的形成关系密切。 Na^+ 和 K^+ 成对相互作用, 两者之间维持一定的浓度梯度, 形成 $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ 金属泵, 细胞以摄 K^+ 排 Na^+ 的方式消耗 ATP, 从而使膜蛋白成为分子马达在膜上旋转。

(2) 小分子金属化合物: 包括金属无机结构物质、氨基酸与金属形成的络合物以及含金属(类金属)—C 键的生物合成分子。金属无机结构物质, 如 Ca 和少量的 Mg 可以与 HCO_3^- 、 HPO_4^{2-} 等小分子配体结合, 形成难溶无机化合物形态存在于硬组织中, 是构成骨骼和牙齿的主要成分。半胱氨酸、蛋氨酸能与亲硫的 Cd、Cu 和 Zn 形成络合物, 存在于谷胱甘

肽、植物螯合肽和金属硫蛋白中^[5]。

(3) 金属与生物合成的大环螯合剂形成的低分子量配合物: 这类化合物中最重要的一组是四吡咯及其同系物, 它们的去质子形式能与较活泼的二价金属阳离子紧密结合, 其中广为人知的包括含 Mg^{2+} 的叶绿素及其降解产物、钴胺素以及卟啉。

(4) 生物大分子金属化合物: 包括金属与蛋白、肽、核酸及类似物等需要金属结合的大分子形成的络合物, 其中包括催化、贮存和转换功能的各种酶。金属蛋白包括调节蛋白(如钙调蛋白)、转运蛋白(如细胞色素、铁硫蛋白、血红蛋白、肌红蛋白、血蓝蛋白、血钒蛋白等)和储存蛋白(如铁蛋白、金属硫蛋白等), 金属酶包括水解酶(含 Zn、Cu、Mg)、氧化酶(含 Fe、Cu、Mo、Zn)和辅酶, 其中研究较多的是 β -淀粉酶(Cu)、乙醇脱氢酶(Zn)、碳酸酐酶(Cu, Zn), 金属-肽络合物包括调节肽。

(5) 生物大分子配合物: 主要指多糖和糖蛋白与金属形成的配合物, 这方面的研究尚不多见。

除上述内源性的金属生物分子外, 生物体内还存在外源性的有机金属化合物, 即金属药物。如顺铂、醋硫葡金和 $\text{Ru}^{3+}[\text{fac-RuCl}_3(\text{NH}_3)_3]$ 是众所周知的抗癌药, 苹果酸硫金(aurithiomalate)和葡萄硫金(aurothioglucose)是重要的治风湿药物, 而含钆化合物被广泛用于肾、心脏、脑等疾病和各种癌的诊断显象。对顺铂抗癌机理的研究表明了生物大分子配体与金属元素结合之后金属元素自身的作用机理。

3 金属组学的一些研究方法

过去许多与生物体系有关的问题是由元素的总量来说明的, 现在人们越来越认识到生物体中元素化学形态的重要性, 如氧化态、配体性质以及分子结构。发展生物体中金属及其化合物的新形态分析技术和方法, 以及金属元素的形态与生物活性分子相互作用研究的方法学至关重要。

由于具有较强的分离能力和灵敏特效的检测能力, 色谱—光谱联用技术已成为金属组学研究的主要方法。由于生物体中的金属和类金属与生物配体通常形成难挥发的共价化合物, 故 HPLC 和电泳是常用的分离技术, Jakubowski 等总结了各种分离技术对不同大小的生物分子的分离能力, 表明 HPLC 适用于小分子化合物和基体较简单的样品的分离, 对于较复杂的样品可用多维色谱分离, 而排阻色谱、电泳、毛细管电泳、毛细管电色谱和聚丙烯酰胺凝胶电泳适用于大分子化合物和复杂样品的分离^[6]。ICP-

MS 由于具有高的灵敏度且分析快速,是一个理想的检测手段,而 ES-MS 则被用于表征分子结构。

3.1 HPLC 分离技术

在金属组学研究中常用的 HPLC 分离方法包括排阻色谱(size-exclusion)、离子交换色谱(ion-exchange)和反相色谱(reversed-phase),对于含多种金属蛋白的复杂样品多维色谱是有效的分离手段。在色谱分离前可用超速离心法、透析或硫酸铵沉淀法将样品进行预分离,将样品连续通过截流分子量为 30 000、5000 和 500 u 的超滤膜可简化进入 HPLC 的样品基体,这也是研究金属形态在不同分子量大小的化合物中的分布的方法之一^[7]。

(1) 排阻色谱(size-exclusion chromatography, SEC)

SEC 是基于分子筛的作用将不同形态的化合物按分子大小进行分离,对于一定形状分子,特别是较大的蛋白质和多聚糖,其在固定相空隙间的平均停留时间与其大小即分子量直接相关,而对于分子量较小的形态,特别是荷质比较高的离子,被分离物在固定相上会发生二次吸附和离子交换从而影响分离效率,这一现象虽然一度妨碍了 SEC 的应用,但却被证明有益于有机硒和有机砷的分离^[8]。

SEC 的优点是有较高的抗基体干扰能力,流动相中可不用缓冲盐,从而简化了中心馏分和冻干组分的基体,流动相流速适当($0.7 - 1.0 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$),这些优点使之易于与 FAAS、ICP-AES 和 ICP-MS 联用。SEC 的缺点是待测物在色谱过程中被多倍稀释,柱体积越大稀释倍数越高,对检测器灵敏度的要求越高。另外,SEC 的分辨率不高,每一馏分中可能含有上千种化合物,通常需用离子交换或反相色谱进一步分离。

(2) 离子交换色谱(ion-exchange chromatography, IEC)

IEC 是基于流动相中待分离的化合物离子与固定相中带相反电荷的官能团之间的相互作用的强弱对分析物进行分离。IEC 广泛用于金属形态特别是有机砷和有机硒的分离,也是分离金属硫蛋白和血清蛋白的有效手段^[8]。

阳离子交换色谱在生物金属化合物分离中的应用较少,但由于其流动相多为含几个 mmol 吡啶—甲酸缓冲液的弱酸或几个 mmol 的硝酸,该法适于与 ES-MS 联用。

(3) 反相色谱(reversed-phase chromatography, RPC)

RPC 是指极性流动相中的待分离组分在非极性固定相上的分离。RPC 具有高的分离能力,可以分离相差一个氨基酸的金属硫蛋白^[9]。在生物无机分析中 RPC 主要用于 10ku 超滤样品或样品萃取液中形态的分离,也可用于经 SEC 和 IEC 分离后的金属硫蛋白的分离,在流动相中加入离子对试剂后,RPC 还可用于离子型化合物的分离。由于固定相中没有金属配体,RPC 比 SEC 和 IEC 更适合于金属生物分子的分离。

3.2 电泳分离技术

(1) 毛细管电泳(capillary electrophoresis, CE)

CE 所具有的高分离能力使之可以用来分离极性和带电荷的化合物,是分离金属和类金属蛋白的有效技术。毛细管区带电泳(capillary zone electrophoresis, CZE)是基于分子荷质比的差异来实现分析物的分离,具有高效、快速、所需样品量少的特点,广泛用于金属生物分子的分离,但传统的 UV 检测器缺乏选择性,灵敏度差,不适用于实际样品分析,近年来发展的 CZE-ICP-MS 由于具有高选择性和灵敏度,已成为金属生物分子形态分析的有力工具。但由于 CZE 的低进样量以及外气流(sheath flow)的稀释作用,CZE-ICP-MS 多用于方法研究,在实际样品中的应用仍有限^[10]。

(2) 平板凝胶电泳(flatbed gel electrophoresis, FGE)

聚丙烯酰胺凝胶电泳(polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE)、等电聚焦电泳(isoelectric focusing, IEF)、免疫电泳等形式的 FGE 具有用样量少、分辨率高等特点,也被用于金属生物分子的分离,在二维体系中一次运行即可分离上千种蛋白。

通过十二烷基磺酸钠(sodium dodecyl sulfonate, SDS)与蛋白反应而使蛋白失活, PAGE 可将蛋白质转化成分子量不同而结构相似的物质,因此无论蛋白的性质如何,均可根据分子量的不同而得到分离,质荷比小的蛋白移动得快、远,质荷比大的蛋白移动得慢。SDS-PAGE 法分辨率高,重现性好,但须加入 SDS 和二巯苏糖醇(dithiothreitol, DDT),这两种化合物均可导致蛋白失活和蛋白—金属键的断裂。若不使蛋白失活,则 PAGE 的分辨率很差。

3.3 多维色谱分离

对于复杂样品,一维色谱难于是现代分子形态的完全分离,而需采用对维色谱分离。如先用 SEC 发将生物分子量大小分成不同的馏分,然后再用 IEC 或 RPC 进一步将含有待测物的馏分离^[11],或

将样品先用 IEC 分离,然后再经 SEC 分离。

SDS-PAGE 不能将折叠度较高的蛋白完全断裂为次一级的结构,因而会给出来源于同一化合物的几个标记带,此时需用二维电泳(2-D electrophoresis)进一步分离。在一级电泳中蛋白质根据质荷比在梯度凝胶中被分离,在二级电泳中蛋白质根据其在特定 pH 梯度时的等电点不同而被分离,带电的蛋白质在 pH 梯度中迁移,当迁移至 pH 与某一蛋白的 pI 值相等处时,该蛋白所带电荷为零,停止迁移而被聚集在特定区带上,从而达到分离的目的。凝胶中带有抗体的免疫电泳也可作为第二级电泳用于分离蛋白质。二维电泳广泛用于蛋白质和生物分析的定性研究,在金属生物分子形态分离中的应用还不多。

3.4 原子光谱检测技术

金属蛋白在生物体系中常作为催化剂,在信号传输、基因表达等方面起着至关重要的作用,把这些痕量蛋白质从复杂的生命体系中检测出来虽然有多种方法,但原子光谱联用技术因具有高度的选择性且灵敏快速,仍是金属组学研究中一种重要的分析工具。原子吸收(AAS)由于具有高选择性和较高的测定灵敏度,其与 HPLC 的联用技术最先被用于金属蛋白的分离测定。FAAS 可与 HPLC 在线联用,但须调整 HPLC 的流速使之与 FAAS 雾化器的提升速率相当。FAAS 多用于含 Cd、Zn、Cu 等测定灵敏度较高的金属化合物或可在线生成氢化物的 As、Se、Cd 的化合物的测定。ETAAS 由于采用不连续加热,尚难实现与色谱在线联用,离线联用在金属硫蛋白分析中用较多。随着自动进样器和高度自动化的流通池(flow-through cell)的发展,可实现 ETAAS 于色谱的半在线联用。AAS 的缺点是只能进行单元素测定,要实现多元素测定需采用原子发射光谱(AES),但 AES 灵敏度较差,不能满足实际样品的多元素测定。当用毛细管技术分离或当样品量很少时(如单细胞金属组研究),测定灵敏度成为分析的关键,在这方面 ICP-MS 具有明显的优势,因而成为金属组学研究必不可少的方法。

ICP-MS 具有高的测定灵敏度和多元素测定能力,由于能够区分色谱流出液中含金属和不含金属的形态,或通过激光消融(laser ablation)技术区分二维凝胶点上的这两类化合物,其与各种色谱的联用技术已被广泛用于生物分子形态分析,但由于 SEC-ICP-MS 和 IEC-ICP-MS 的选择性较低,所得到的峰通常是含有同种金属元素且分子大小、所带电荷或疏水性相同或近似的一组化合物,而非单一形态的化

合物,使得这种联用技术在金属组学或金属蛋白质组学研究中只能作为样品前处理技术。最近,ICP-MS 技术的最新发展已使它成为金属组学研究中必不可少的方法。

ICP-MS 联用技术中的关键是接口技术。LC 的流速通常为 $0.5\text{--}2\text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$,与 ICP-MS 的吸喷速率相当,故可用一根细孔径的连接管将色谱流出液直接导入 ICP-MS,采用液压雾化器(hydraulic high-pressure nebulizer)或超声雾化器可提高喷雾效率。当与维孔径色谱联用时可采用直接注射雾化器(DIN),DIN 没有雾化室,样品被直接导入 ICP 炬管的中心通道,由于死体积小($< 2\text{ }\mu\text{l}$),避免了峰展宽,有利于低流速的使用,而且样品容易清洗,减少了记忆效应。柱后氢化物发生进样可将金属和类金属化合物转化成挥发性的物质后吹扫进 ICP-MS,无须使用雾化器,在线微波辅助消解—清华无法生发消除了样品基体和流动相组成对测定的干扰,可将灵敏度提高 20–100 倍,但背景噪声的增加又使检测限降低了 2–10 倍^[12]。

3.5 分子光谱检测技术

与原子光谱只对元素产生相应不同,分子光谱还可以给出化合物形态或其片段的信息。在蛋白质组学研究中应用 2-D 凝胶电泳分离、样品点原位胰蛋白酶消解、MALDI TOF MS 测定可以得到肽段指纹图,还可用于纳电喷雾(nanoelectrospray)MS/MS 进行测序^[13]。ESI-MS 用作色谱检测器,含碳的金属或类金属的小分子在 ESI 源中产生单一的质子化离子,因而可根据其分离质量鉴定化合物。ES-MS 适用于共价结合的有机金属化合物和结合牢固的金属络合物,而结合较弱的金属络合物会与金属离子在气相中发生配体取代或分子间电荷转移反应,使形态结构发生变化,而得到错误地分析结果。ESI-MS 的缺点是灵敏度较低,用于痕量样品的测定上有困难。

虽然分子光谱能够给出大量结构信息,但在实际样品定量方面尚显不足。将色谱或毛细管电泳与 ICP-MS 和 ES-MS 并联体系联合使用的联用技术结合了色谱或毛细管电泳的高分离能力、ICP-MS 的高测定灵敏度和 ES-MS 的高表征能力,具有同时获得化合物定量和结构信息的优点,已成为金属组学研究的主要方法^[14]。

4 发展前景展望

金属组学是基因组学、蛋白质组学和代谢组学以后提出的一种新的组学,金属组学研究不仅将解

答生物体金属与蛋白等的化学组成问题,而且为探讨生命物质担负生命活动的机理开辟新途径。

目前在金属组学研究中无论是方法学还是机理研究中都还存在许多难点。生物体中金属配体多种多样,包括小分子有机配体、大环螯合分子和生物大分子,一些类金属如砷、硒等经代谢后可生成共价键合的大分子化合物如砷糖、硒蛋白等,许多与生物分子相连的金属含量相对较低,而用于分离皮克或纳克量的金属化合物的色谱技术仍不成熟,在分离过程中常会发生金属吸附或配体交换等现象,许多类金属化合物或蛋白易吸附于毛细管壁或色谱固定相上。金属蛋白在分离过程中分解也为定量测定带来较大误差。由于许多元素存在于培养液或缓冲溶液中,因此许多常规分析技术存在样品沾污。许多金属生物分子结构未知,缺乏相应的标准物质和参考物质来进行结构鉴定和定量分析。

在金属组学研究中,含相同金属元素结构相差一个或几个氨基酸的生物大分子的分离和鉴定、大量痕量和超痕量新化合物的发现、不稳定生物分子的分析、具有高分辨能力和高灵敏度的联用仪器的开发是各国科学家面临的巨大挑战。

目前,各国都在开展新的生物金属化合物标准物质和参考物质的制备工作,一些相对简单的化合物如砷糖等已能通过提取等方法制备标准物质,亦可获得商品化的甲基汞、二甲基砷和丁基锡等参考物质。在分析方面,联用技术是进行金属组学研究的有效手段,当待分离形态的物化性质相近时分离技术的选择是研究的关键,当待分析形态的浓度较

低时需要考虑检测器的灵敏度,当色谱流速和流动相组成与检测器不兼容时接口成为联用技术的关键。仪器的小型化和多离子源及多检测器质谱的串联或并联是未来发展的趋势,随着新的分离技术和ICP-MS、ES-MS的不断发展,新的标准物质和参考物质的不断研制,必将促进金属组学研究的不断深入。

参 考 文 献

- [1] Haraguchi H, Matsuura H. Proceedings of International Symposium on Bio-Trace Elements 2002 (BITRE 2002), eds. Enomoto S, Seko Y. The Institute of Physical and Chemical Research (RIKEN), Wako, 2003, 3—8.
- [2] 王夔主编. 生命科学中的微量元素, 北京: 中国计量出版社, 1991.
- [3] Szpunar J. Anal. Bioanal. Chem., 2004, 378, 54—56.
- [4] Haraguchi H. J. Anal. At. Spectrom., 2004, 19, 5—14.
- [5] Szpunar J. Analyst, 2000, 125, 963—988.
- [6] Jakubowski N, Lobinski R, Moens L. Metallobiomolecules. J. Anal. At. Spectrom., 2004, 19, 1—4.
- [7] Lange K, Hesse, Fresenius. J. Anal. Chem., 1994, 350, 68—73.
- [8] Pan A H, Tie F, Ru B G et al. Biomed. Chromatogr., 1992, 6, 205—211.
- [9] Lobinski R, Chassaigne H, Szpunar J. Talanta, 1998, 46, 271—289.
- [10] Michalke B. J. Anal. At. Spectrom., 1999, 14, 1297—1302.
- [11] Michalke B, Schramel P. J. Anal. At. Spectrom., 2004, 19, 121—128.
- [12] Gonzalez LaFuente J M, Marchante-Gayon J M, Fernandez Sanchez M L et al. Talanta, 1999, 50, 207—217.
- [13] Hancock W S, Wu S L, Shieh P. Proteomics, 2002, 2, 352—359.
- [14] Goenaga Infante H, Cuyckens F, Van Campenhout K et al. J. Anal. At. Spectrom., 2004, 19, 159—166.

METHODOLOGY AND FOREGROUND OF METALLOMICS

Jiang Guibin He Bin

(Research Center for Eco-Environmental Sciences, CAS, Beijing, 100085)

Abstract Metallomics is proposed as a new omics to follow genomics, proteomics and metabolomics. Researches on metallomics not only answer the question of the chemical compose of metals and proteins, but also pioneer a new way for probing into the mechanisms of life substances such as metalloproteins in life activity. In metallomics, metalloproteins, metalloenzymes and other metal-containing biomolecules are defined as “metallomes”. Syntheses and metabolic functions of genes (DNA and RNA) and proteins cannot be performed without the aid of various metal ions and metalloenzymes. The main research targets of metallomics are to identify the metallomes and to elucidate their biological or physiological functions in biosystem. Chemical speciation analysis is a key technology in metallomics study. This paper prospects the development of metallomics based on the introduction of the concept of metallomics and its methodology.

Key words metallomics, combination of metal and protein, chemical compose, metallomes, speciation