

金属组学: 研究生命体系中金属离子的前沿交叉学科

葛瑞光^{①②†}, 陈卓^{②†}, 孙红哲^{①*}

① 香港大学化学系 化学生物学开放实验室, 香港;

② 中山大学生命科学学院整合生物学研究室, 广州 510006

* 通讯作者, E-mail: hsun@hkucc.hku.hk

† 同等贡献

收稿日期: 2009-01-21; 接受日期: 2009-03-16

摘要 金属组学是一门新兴的前沿交叉学科, 是对若干涉及金属相关生命过程的分子机制以及对细胞与组织内全部金属离子和金属配合物进行综合研究的学科. 在金属组学中, 生命体系中所有的金属蛋白质、金属酶以及其他含金属的生物分子统称为金属组, 这个概念与基因组学中的基因组和蛋白质组学中的蛋白质组相类似. 本文对金属组学中涉及的若干概念进行阐述, 并将着重介绍金属组学中的研究技术和方法, 特别是“组和技术”, 即把一种高分辨率分离技术如凝胶电泳/激光切除、色谱或者毛细管电泳与一项高灵敏度检测方法, 如电感耦合等离子体质谱、电喷雾电离质谱、基质辅助激光解吸/电离质谱或者 X 射线荧光/吸收光谱联合起来. 并重点分析了这些方法的优缺点以及在分离鉴别金属蛋白、磷酸化蛋白以及硒蛋白、确定金属蛋白的结构与功能的关系和医药中的金属药物活性抗药性方面的研究中的应用.

关键词

金属组学
金属组
金属药物
金属蛋白
化学物种

1 引言

尽管矿物元素在自然界中只是痕量存在, 但它们在生物体系的生理和病理中起到十分重要的作用. 至少有 20 种矿物元素, 例如铁、铜、钴、钼、硒和锌, 是生命必需的元素; 有些元素, 例如镉、汞和铅, 是潜在的毒素, 这类元素在细胞内的浓度必须得到精确的控制^[1]. 据估计, 每三个蛋白质中, 就有一个需要一种金属离子(通常为过渡金属离子, 比如铜、铁、锌或钼)作为协同因子来完成催化、调节或者结构功能, 因此这种蛋白质被称为“金属蛋白质(metalloprotein)”^[2]. 某些金属蛋白质, 比如金属硫蛋白(metallothionein), Hpn(一种幽门螺杆菌中的镍结合蛋白)和铁蛋白(ferritin)对于细胞内的金属动态平衡

和解毒过程起到决定性作用^[3-5]; 金属伴侣蛋白(metallochaperone)保护并且协助金属酶(metalloenzyme)的功能化^[6,7]; 某些金属蛋白质, 比如 Fur(ferric uptake regulator)、PerR(peroxide regulator)、MtsR(metal transport repressor)和 NikR(nickel responsive regulator)调控细胞内金属离子浓度和输运^[8,9]; 金属酶催化特定的酶反应, 比如核酸合成、代谢、抗氧化等. 因此, 化学元素分析成为诸多领域, 如生物化学、生物学、药理学、营养学、农学和环境科学等中的重要学科, 并被广泛地发展, 以便在分子层次上了解其对生物的重要性和毒性^[10,11].

随着 1995 年第一个生命体的基因组被测序^[12], 特别是 2000 年人类基因组的完成^[13,14], 生物学中各

类“组学(omics)”得到长足的发展. 组学着眼于利用高通量分子分析技术来研究生命体系中的一个特定组分, 其中比较常见的是基因组学和蛋白质组学, 前者侧重于生命体系的全基因组序列的测定, 而后者研究细胞、组织和器官中蛋白质的分布、结构、功能和相互作用^[15]. 目前在高通量样品分离技术, 特别是软电离质谱的长足发展, 使得系统生物学中蛋白质组的表征成为可能^[16~18].

“金属组(metallome)”特指对于细胞或者组织中所有的金属离子组分的研究, 例如元素分布、自由金属离子的平衡浓度或者在某个组织、细胞和器官中的自由元素的组成^[19~21]. 对于金属组的研究, 以及金属组与基因组、转录组、蛋白组和代谢组的关系被称为“金属组学(metallomics)”^[22]. 对于金属组学的研究, 通常需要特定的分析手段, 以完成体内分布、识别、量化, 体外功能分析和生物信息学的预测(图 1)^[21]. 因此金属组学是一门跨学科的, 致力于全面系统生物体系中金属离子的转运、利用和功能的研究, 从而与基因组学和蛋白质组学相辅相成. 金属组学其中一个重要的领域是金属蛋白质组学(metalloproteomics), 即对与蛋白质结合的金属离子功能的研究^[23~25].

金属组学相对于基因组学和蛋白质组学而言仍处于初级阶段, 但基因组学与蛋白质组学为金属组学提供了大量的数据资料以及若干能快速推进其发展的关键技术. 金属组学的几个重要研究方向:

(1) 金属蛋白质及其模拟物的结构-功能分析; (2) 环境和生物体系中金属蛋白质的分析识别和生物痕量元素的化学分析; (3) 金属离子的生物调控及代谢; (4) 与痕量金属元素有关的疾病的医学诊断以及金属药物(metallodrug)的医疗(前)应用. 蛋白质组学是在蛋白质层次上大规模研究基因及其细胞功能^[15,26], 因此金属组学与蛋白质组学之间的共同点是对金属蛋白质结构功能以及金属药物的医疗应用, 同时会涉及相关的分析技术. 有兴趣的读者可以参阅本领域的相关文献, 一般性的(比如 Haraguchi^[22], Łobinśki 等^[27], Sun 等^[28], Chance 等^[24], Szpunar^[20], Bettmer^[23], López-Barea 和 Gómez-Ariza^[29])或者以方法为中心(比如 Łobinśki 等^[10,17], Shah 和 Caruso^[18], Aebersold 和 Mann^[16], Szpunar^[30], Chance 等^[31], Gao 等^[32], Prange 和 Pröfrock^[33]).

2 硒/磷酸化/金属蛋白质的识别

2.1 金属结合蛋白

金属与蛋白质之间的相互作用在很大程度上决定了许多蛋白质的功能以及金属药物的药效. 金属离子结合到蛋白质分子的正确位置上依赖于一系列的调控过程, 包括金属伴侣蛋白质的运输和协助. 金属组学的一个重要目的是识别金属蛋白质(金属酶、金属运输蛋白质和金属应激蛋白质), 特别是蛋白质的金属结合位点, 证实生物体系中存在金属蛋白质以及金属/蛋白质结合比例.

两维电泳(2DE)常被用来分离生物体系中的蛋白质组分, 而金属螯合亲和层析柱(immobilized metal affinity chromatography, IMAC)可被用来预分蛋白质组分^[25,34], 从而提高蛋白质分离的效果. 作者曾经从幽门螺杆菌中利用 IMAC 和 2DE 分离鉴定了 22 个镍结合蛋白, 这些蛋白主要参与细胞进程、氧化应激和细菌代谢^[35]. 利用相似的方法, Sarkar 和同事从肝癌细胞株 HepG2 中分离鉴定了 67 个铜及锌结合蛋白质,

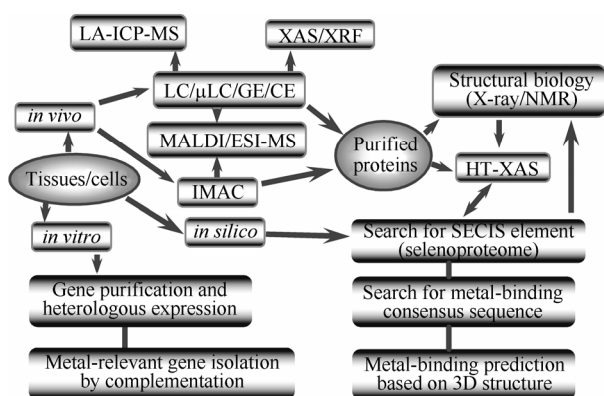


图 1 金属组学涉及的实验方法

对组织或细胞样品进行体内分布、识别、量化, 体外功能分析和生物信息学的预测. 蛋白质混合物经过若干技术的分离后利用质谱或者 X 射线荧光/吸收光谱进行化学元素分析. 纯化的蛋白质通过结构基因组学平台(X 衍射或者核磁共振)和高通量 X 射线吸收光谱识别金属蛋白质. 生物信息学利用蛋白质的一级序列结构来预测金属离子结合位点, 在前面分析步骤中获得的信息可以修正生物信息学的预测. 高通量 X 射线吸收光谱、序列分析以及比较模拟对金属蛋白质进行综合分析, 能够有效地提高结构基因组学平台的效率

其中大部分蛋白质具有金属结合位点, $C(X)_nC$ ($n = 2\sim 4$)或者 $H(X)_mH$ ($m = 0\sim 5$)^[36,37]. 上面的研究结果验证了金属组学对于搜索与金属动态平衡相关的蛋白质是非常有效的.

Nielsen 等人开创了将凝胶电泳/激光切除 (GE-LA)技术与电感耦合等离子质谱(ICP-MS)技术联合使用的新技术(GE-LA-ICP-MS), 因其具有较高的解析度而引起了人们的关注^[38]. 在电泳分离阶段, 必须考虑到十二烷基磺酸钠的浓度、pH 值以及电场大小, 以求达到最理想分辨率的同时保持金属-蛋白质复合物的自然状态. 在传统的电泳检测方法后, 利用放射自显影的方法对凝胶电泳进行检测. 这项技术的最大限制在于必须使用放射性标记的金属进行分析. 相对来说, LA-ICP-MS 是一种更为简便的方法, 因此是一种更具竞争力的替代检测方法. 随着检测下限下降到千万亿分之一摩尔, 且生物材料中有充足形态的微量元素, 可以利用自然界的同位素以及多种元素同时检测的技术. 在一个标准的 GE-LA-ICP-MS 实验过程中, 约束在一维或二维蛋白胶上的激光束通过切割或者打洞的方式分离出样品, 并在连续氦气的作用下转入 ICP-MS 进行质谱鉴定^[38,39]. 这种方法的有效性通过藻青菌中的一个研究较为透彻的锌和镉结合金属硫蛋白进行了验证, 并用来寻找和确认大肠杆菌细胞质中的锌和镉结合蛋白^[40]. 值得注意的是金属蛋白质复合物与共价键的蛋白质在蛋白胶中的解析度差别较大, 这使得非变性电泳的解析度成为 GE-LA-ICP-MS 应用中的瓶颈.

现在, 由于第三代同步辐射微探针光束仪器的使用以及方法的改进, 使得同步辐射 X 射线荧光 (XRF)更多地被用于检测单个细胞活细胞区室^[27]. 当原子受到足够能量的基础 X 射线的撞击后, 核内的电子被撞击出去, 使核处于激发状态, 激发态的核可以发出特征性的射线, 随后会出现灭磁, 这就可以提供照射区域样品的元素组成^[41]. X 射线微光束有很高的空间分辨率(约为 $0.1\ \mu\text{m}$), 且样品深度可达 $1\ \text{mm}$, 可以用来对细胞内痕量元素分配定位的分析, 例如利用痕量元素 Fe, Zn 与 P, S, Cl, K 通过 XRF 微光束检测绘制酿酒酵母以及人类癌细胞的化学图谱^[42]. 同样的方法也应用于亚细胞结构的线粒体及高尔基

体中的铜离子定位^[43]. 在 XRF 实验后加上如液相色谱或凝胶电泳的分离试验来检测生物样本中所含金属离子. 对脐橙的蛋白条带的扫描发现其含有 Ca, Cu, Fe, K 及 Zn, 随后通过火焰原子发射/吸收光谱法对其定量检测. 在另一个实验中, 对人类肝脏中癌细胞金属蛋白的分布进行了检测^[44-47], 通过等电聚焦对肿瘤的线粒体、细胞液及其周围正常组织的线粒体细胞液含 Zn, Cu, Fe 及 Mn 的蛋白质进行分离, 并通过 XRF 进行检测. 结果发现, 对于胞浆蛋白, 肿瘤组织的条带比周围正常组织的条带要低, 而在线粒体中的金属蛋白, 两个组的结果相近. 这指出了不同金属离子的分配可能会影响肝组织中肿瘤的生长^[46].

有些组织是通过整合过剩的金属离子以保护其自身免受重金属离子的毒害. 如富含半胱氨酸的一个小蛋白(约 $6\sim 7\ \text{kDa}$)—金属硫蛋白^[4]. 蛋白质对于生命必需金属如 Zn^{2+} , Cu^{+} 或者毒性金属(Cd^{2+} 、 Hg^{2+} 、 $\text{As}^{3/2+}$)的代谢、体内平衡控制、解毒等功能都是所必需的^[48-51]. 如幽门螺旋杆菌中含有镍的酶—脲酶以及氢化酶. 这两种酶的活性对于幽门螺杆菌在极端酸性的胃环境中的生长是必不可少的^[9]. 但是, 高浓度的镍离子对其却是有毒的, 所以体内需要一系列的蛋白去维持镍离子的浓度. 幽门螺杆菌合成了一种与众不同的富含组氨酸的蛋白, Hpn(图 2)^[49,52]、一个富含组氨酸及谷氨酸的与 Hpn 类似的蛋白 HpnI^[51] 以及一个末端富含组氨酸和半胱氨酸的 GroES 分子伴侣 HspA^[48]. 当有过剩的镍离子存在的条件下, Hpn 及 HpnI 的翻译都不受镍调控蛋白(NikR)的调控^[53]. 一个敲除了 hpn 基因的幽门螺旋杆菌细胞株, 对 Ni^{2+} 与 Bi^{3+} 的敏感性比野生型的幽门螺旋杆菌要高 4 倍. 这说明了它潜在的通过整合多余金属离子以缓解毒性的作用. 在中等浓度条件下($K_d = 7.1, 1.1$ 及 $3.8\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), Hpn, HpnI 与 HspA 分别与 5, 2 及 2 摩尔倍数的镍离子结合. 镍离子是可逆结合的, 与螯合配体 EDTA 及环境中的 pH(对应于 Hpn、HpnI 及 HspA, $\text{pH}_{1/2}$ 约 6.3, 4.6 及 3.8)相关. 与之相反的是 Bi^{3+} 离子的结合是不可逆的. 凝胶过滤质谱法与非变性电泳都证明了 apo-Hpn, HpnI 及 HspA 分别存在高分子量聚合物或者是在溶液中有一系列的高分子量聚合物. Bi^{3+} 与蛋白的结合会改变其四级结构, 使之从七聚物

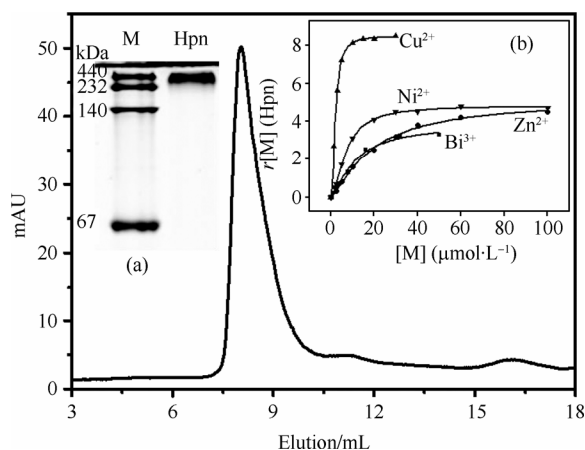


图 2

通过金属组学的方法对低聚物的形成以及富含组氨酸的 Hpn 的金属结合能力进行研究^[49,50]. Hpn 洗脱图(利用 ÄKTA explorer 100 FPLC 系统对 280 nm 吸收进行连续监控, 柱子为 Superose 12 (10/300)), 洗脱液含有 20 mmol·L⁻¹ HEPES, pH 7.4, 500 mmol·L⁻¹ NaCl, 500 mmol·L⁻¹ 咪唑以及 5 mmol·L⁻¹ DTT. (a) Hpn 蛋白非变性电泳相同的图; (b) 通过平衡透析以及 ICP-MS 研究蛋白的金属结合能力

变成了二聚物. 这暗示了铋离子可能干涉 HspA 的生物功能. 含有 hpn 基因的大肠杆菌的菌株比不含有 hpn 基因的大肠杆菌在 Ni^{2+} 压力的情况下生长得更快. 与之对应的是, 在 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 存在的条件下, 两种菌株的生长情况基本相同^[49,50]. 这些实验说明了 Hpn 对镍的储存及高浓度时的保护有一定影响^[9,54]. 使用 Ni^{2+} 过剩的 M9 培养基对大肠杆菌菌株 BL21(DE3) 培养, 其细胞表达的 HspA 有野生型及 C 末端缺失的突变型, 暗示了 C 末端可能在高浓度 Ni^{2+} 存在的条件下对细胞起到保护作用. 但大肠杆菌在高浓度 Bi^{3+} 条件下呈现的是相反的结果. 因此 HspA 可能扮演了双重角色: 在镍离子不足的条件, 它能够通过给出自身的 Ni^{2+} 以促进其它蛋白对镍离子的获得; 而在镍离子过剩的条件下, 可螯合镍离子以解毒. 同时 HspA 也可能是铋离子治疗幽门螺杆菌引起的胃溃疡的潜在靶位点^[48]. 敲除大肠杆菌 hpnI 基因的实验结果暗示了 HpnI 在外部镍离子浓度高时起到了一定作用. HpnI 可能扮演了结合/储存或是在高镍浓度时的解毒作用^[51]. 因此我们实验课题组所得的数据揭示了幽门螺杆菌中富含组氨酸的蛋白质都有如下特征与作用: 形成低聚物、保护细胞免受金属毒害以及保存/功能伴侣的作用.

2.2 磷酸化蛋白

翻译后修饰(PTM)可以改变酶的活性、结合位点、以及蛋白的结构. 在翻译后修饰的各种类型中, 蛋白的磷酸化是最常见的, 蛋白质的磷酸化就是在丝氨酸(约 90%)、色氨酸(约 10%)以及酪氨酸(约 0.05%)的侧链添加磷酸酯基团. 从生物学角度来看, 磷酸化是蛋白质最重要的共价修饰, 错调磷酸化与人类病理学密切相关, 因此它成为最值得研究的翻译后修饰种类^[55]. 磷酸化是可逆的且迅速的, 它可以精确地改变蛋白的性质, 因此影响许多关键的步骤, 如蛋白-蛋白之间的相互作用、细胞信号、细胞骨架的重新利用、细胞周期以及细胞间的相互作用^[56]. 因此, 对蛋白磷酸化程度的研究是十分重要的. 对蛋白磷酸化位点的了解可以揭示潜在的药物靶点以及有助于全面地了解生物系统网络. 传统地对磷酸化的研究是通过 ATP 或磷酸盐中的放射性元素 ^{32}P 或者 ^{33}P 与蛋白的共价结合来研究的. 但这种方法有其固有的缺点, 因此, 非放射性元素的方法被逐渐开发与改进.

磷酸化研究最大的问题就是磷酸化通常都是非常低计量的, 动态范围也有限, 高度复杂化的同时却难于定量^[57]. 至于其复杂性, 磷酸化的一个数据库 (<http://www.phosphosite.org>) 至 2008 年 12 月已经列出了超过 55000 个磷酸化位点, 且这一数字还将不断升高. 磷酸化的动态范围十分大(约 10^9), 在细胞中, 有的磷酸化的蛋白有上亿个拷贝, 有的磷酸化蛋白只有几个. 因此在对整个细胞或者组织溶解并对蛋白质进行消化后, 对所有磷酸肽的检测几乎是不可能的. 因此必须选择性地浓缩磷酸化的蛋白/肽, 其中较成熟的方法包括: 抗磷酸化酪氨酸抗体^[58]、金属亲和层析(IMAC)^[59]、化学修饰^[60,61]和强阳离子交换色谱法(SCX)^[62]. 图 3 总结了若干过去几年中最重要的工作. 用高结合力的抗磷酸化酪氨酸抗体与酪氨酸磷酸化蛋白/肽结合的免疫共沉淀的方法, 通常特异性好且回收率量较高. 但同样的方法应用于丝氨酸、色氨酸蛋白磷酸化的检测却难以得到较好的结果, 主要是因为这两种抗体结合能力较低. 总体来讲, 研究丝氨酸、色氨酸以及酪氨酸蛋白磷酸化, IMAC 可以说是最佳的方法^[63], 这种方法通过 ^{32}P 或 ^{33}P 放射性标记检测, 可以回收总细胞 90% 的磷酸化蛋白^[64].

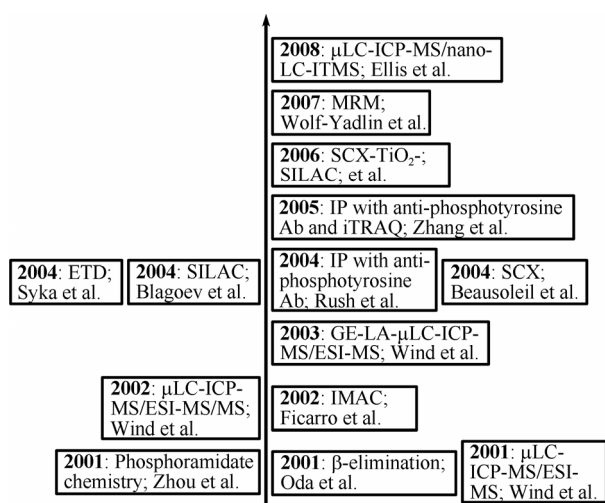


图3 定量磷酸化蛋白质组学时间轴发展里程碑

磷酸蛋白/肽带负电荷的磷酸基团与氰基乙酸(NTA)或者亚氨基二乙酸(IDA)结合的硬金属离子, 如 Fe^{3+} 、 Ga^{3+} 、 Al^{3+} ^[65]以及 Zr^{4+} ^[66]通过静电相互所用以及配位作用键合。通过严格控制实验条件或者通过盐酸饱和和甲醇甲基酯化羧酸以减少酸性氨基酸谷氨酸以及天冬氨酸的肽链与 IMAC 的非特异性结合^[67]。

基于水溶性磷酸盐选择性地与多空微球双齿结合^[68], 二氧化钛(TiO_2)逐渐成为最常用的富集磷酸化蛋白/肽的方法, 特别是样品经过 2, 5-二羟基苯甲酸(DHB)处理, 能有效地降低 TiO_2 的非特异性结合。因此, 可以不需要通过化学修饰样品就可以富集磷酸化肽^[69]。这种方法所需要的准备时间较短, 且相比金属离子亲和树脂层析效果更好。新兴的磷酸化蛋白质组工具, 特别是基质辅助激光解吸吸附质谱(MALDI)以及电喷雾电离(ESI)质谱^[57,65], 逐渐取代了传统的运用艾德曼测序以及 ^{32}P 磷酸化肽绘图对磷酸化位点的定位, 推动了全磷酸化蛋白质组研究的进展^[70]。IMAC 以及 TiO_2 都能无缝的与纳米液相色谱仪、ESI、MALDI-MS/MS 或电子转移分离(ETD) MS/MS 联合使用^[71], 使得分离与鉴定的重复性较好, 可以检测分离低至千万亿分之一摩尔范围的磷酸化肽^[68,72,73]。

强离子交换色谱法(SCX)是一种代替金属离子为基础的富集方法, 它可以为随后的质谱(MS)分析分离磷酸化的肽段^[62,29]。样品与强离子交换色谱柱结

合主要是依靠负电基团与正电基团之间的相互作用。如果加样是在强酸条件下(pH 约为 2.7), 羧酸呈中性, 只有赖氨酸、精氨酸、组氨酸以及肽链的 N 端带一个正电荷, 磷酸基团保持带负电, 胰蛋白酶水解得到 C 末端为赖氨酸、精氨酸的肽链。因此, 大多数胰蛋白酶解的未磷酸化肽链的净电量为+2, 而磷酸化的肽链总电量从+2 降到了+1, 因此相对未磷酸化肽链, 其对应的磷酸化肽链与 SCX 树脂结合能力减弱。增加洗脱液中盐浓度, 可以使磷酸化的肽链先于未磷酸化肽链洗脱出来, 因此可以选择性地富集。这项技术的一个缺点是需要大量的原材料(数十毫克的蛋白), 不能用于少量或数量有限的样品检测。

对复合生物样品的检测时, 单一的富集步骤往往无法得到足够特异性以及回收率。每一种金属元素富集磷酸化的肽链有轻微的不同, 多种金属离子在一次 IMAC 富集同时使用, 可能可以得到最大范围的结果。同时, 两次甚至三次联合使用 IMAC/ TiO_2 、IP 以及 SCX 富集可以提高对磷酸化肽链的检测。例如, 抗磷酸化酪氨酸 IP 与 IMAC 联用分析酪氨酸磷酸化被成功地应用于小鼠脂肪细胞、人类 Jurkat 细胞、以及人类乳腺癌表皮细胞的表皮生长因子受体(EGFR)信号网的检测^[65]。

ICP-MS 的引进为蛋白质磷酸化的研究提供了新的方法, 它具有对元素的高选择性、高灵敏度以及与结构无关反应, 能够得到明确的定性定量的结果。Wind 等人^[74-79]开创了平行使用 ICP-MS 和 ESI-MS, 并且与毛细管液相色谱(μ LC)无缝联用, 以研究 ^{31}P 特异性检测以及分子量的确定。 μ LC-ICP-MS 检测的最低限度约为 0.1 pmol 磷酸肽链。在一个研究中, ^{31}P 以及 ^{32}S 作为磷酸化的内标, 而 ^{32}S 作为去磷酸化的内标。通过 μ LC-ICP-MS 检测得到 ^{31}P 与 ^{32}S 比值, 并转化成为磷酸化程度的值。ESI-MS/MS 基于蛋白质特征性片段化模式用于鉴定磷酸化的残基, 从而在 Plx1 与 Plk1 中分别找到三个和一个新的磷酸化位点^[77]。类似的方法(μ LC-ICP-MS 加上 nano-LC-离子阱质谱(ITMS))被用于检测人类脑脊髓液蛋白磷酸化^[80]。GE-LA- μ LC-ICP-MS 也被用来鉴定磷酸化蛋白^[75], 这项技术对于 ^{31}P 信号强度与磷出现在凝胶电泳的量的相关性很好。联合使用 μ LC-ICP-MS 和 ESI-MS 是生物研究中最行之有效的方法。毛细管液相色谱有

许多优点, 如高分离效率、溶剂消耗率低以及所需样品量小. 然而, 大多数现有的 μ LC-ICP-MS 和 ESI-MS 的耦合系统都是相关实验室自己开发的系统, 只有能够达到商业化才能得到广泛应用.

2.3 硒蛋白

硒是生命活动所必不可少的元素, 但过量的硒却是有毒的. 在生物体系中, 硒以无机物的形式如 Se(IV) (亚硒酸盐, SeO_3^{2-}), Se(VI) (硒酸盐, SeO_4^{2-}), 硒化物(如 HgSe), 或者形成一系列具有不同分子量和电荷数的有机硒化合物, 例如从最简单的 MeSeH 到复杂的硒蛋白^[81]. 硒化酵母中有超过 20 种的硒化合物, 包括硒半胱氨酸、硒甲硫氨酸、甲基硒代半胱氨酸、腺苷硒代人属半胱氨酸以及无机物^[81].

硒半胱氨酸(Sec)通常由遗传密码子 UGA 编码,

这个密码子通常是作为终止信号, 但是受到具有茎环结构的真核生物以及古细菌 3'端 RNA 非编码区或细菌编码区(也就是所谓的硒半胱氨酸插入序列 (SECIS)元素及相关的核糖体机制改编程)刺激下, 重新翻译成为硒半胱氨酸^[82]. 由于某种未知原因, SECIS 元素在真核生物、细菌以及古细菌中并不存在高保守的初级序列或者二级结构. 因为 UGA 最常见的功能就是作为蛋白的终止密码, 现有的基因注释也只是将 UGA 记载为终止密码子. 因此, 在蛋白质预测中硒蛋白读码框经常被错译或者是漏译.

一种基于鉴定 SECIS 元素或其同系物以及编码潜在 UGA 密码子的算法被发展成为哺乳动物硒蛋白基因信号的标准^[83]. 利用该方法, 在人类、小鼠以及大鼠基因中鉴定出十六种已知的硒蛋白以及六种新的硒蛋白(表 1)^[83], 只有两种已知的哺乳动物硒蛋白

表 1 Kryukov 等报道的人类硒蛋白基因^[83]

Selenoprotein	Chromosomal location	No. of exons	No. of amino acids in the protein	Sec location
Thyroid hormone deiodinase 1; THD1	1p32.3	4	249	126
THD2	14q31.1	2	265	133
THD3	14q32	1	278	144
Glutathione peroxidase 1; GPx1	3p21.31	2	201	47
GPx2	14q23.3	2	190	40
GPx3	5q33.1	5	226	73
GPx4	19p13.3	7	197	73
GPx6	6p22.1	5	221	73
Selenoprotein H; SelH	11q12.1	4	122	44
SelI	2p23.3	10	397	387
SelK	3p21.31	5	94	92
SelM	22q12.2	5	145	48
SelN	1p36.11	12	556	428
SelO	22q13.33	9	669	667
SelP	5p12	4	381	59, 300, 318, 330, 345, 352, 367, 369, 376, 378
SelR; methionine-R-sulfoxide reductase; MsrB	16p13.3	4	116	95
SelS	15q26.3	6	189	118
SelT	3q24	6	182	36
SelV	19q13.13	6	346	273
SelW	19q13.32	6	87	13
Sep15	1p22.3	5	162	93
Selenophosphate synthetase 2	—	—	448	60
Thioredoxin reductase 1; TrxR1	12q23.3	15	499	498
TrxR2; TGR	3q21.2	16	656	655
TrxR3	22q11.21	18	523	522

没有被找到,这是由于人类基因组序列中 SPS2 基因的缺失以及硫氧还蛋白还原酶 2 中罕见的 SECIS 元素. 其中的谷胱甘肽过氧化物酶 6(GPx6)是通过同源性搜索人类基因组鉴定的. 半胱氨酸取代型的小鼠与大鼠 GPx6 解释了其无法直接通过此算法鉴定^[83]. 随后的实验通过用 ⁷⁵Se 代谢标记细胞证实了 Sec 插入新鉴定的硒蛋白中. 进一步的统计分析表明生物信息学的方法鉴定了所有人类以及啮齿动物基因组中所有常见的硒蛋白. 生物信息学鉴定出了人类基因组以及 EST 数据库中 10 个新的人类硒蛋白基因, 这些蛋白在人类基因组注释中没被正确预测或未被预测到^[13,14].

硒蛋白中相对较强的碳与硒之间的共价键使得在十二烷基磺酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)、2D 电泳或者放射自显影的时候硒不容易丢失. 通过在硒缺乏的动物体内加入 ⁷⁵Se 示踪剂的方法找到了 28 个分子量在 8~116 kDa 之间的含硒蛋白^[84,85]组织之间的差异性,说明了特定组织中含硒蛋白有其特殊的功能. 亚细胞结构间也存在差异性,说明一些硒蛋白对细胞内一些不同的活动起到一定的影响作用^[84,86]. 尽管这种方法灵敏性高,但还是需要用到放射性元素,因此无法用来进行人体实验. 另一种常用的方法是在 ESI MS/MS 鉴定前利用 ICP-MS 监视纯化硒复合物前体^[87],这种方法鉴定出甘蓝根中的硒-甲基化硒甲硫氨酸、葱和蒜中的 γ -谷酰-硒-甲基化硒半胱氨酸、巴西坚果中的一种含硒肽链、以及香菇中的硒复合物^[30]. 虽然非变性电泳分辨率不高,GE-LA-ICP-MS 并不是最理想的鉴定金属蛋白复合物的方法,但它在鉴定硒蛋白(含硒半胱氨酸)以及含硒蛋白(含硒甲硫氨酸)中非常有用. 用这种方法在被硒污染的地区的水鸟的胚胎与鱼类卵巢鉴定出许多与含硒蛋白条带^[88]. 在红细胞中通过 1D GE-LA-ICP-MS 鉴定出一条含谷胱甘肽过氧化物酶的条带^[39].

目前为止,总共找到 22 种哺乳动物的硒蛋白^[89],几乎所有都只有一个 Sec 残基. 其中比较重要的包括: 硒状态生化指标的主要蛋白——硒蛋白 P^[90], 硒酶如谷胱甘肽过氧化物酶(催化过氧化物降解)、1 型碘代甲腺原氨酸脱碘酶(催化甲腺素脱碘成为三碘甲腺原氨酸)以及硫氧还蛋白还原酶(触发细胞信号中

的氧化应激反应). 这些硒蛋白质的功能特点已经被详尽研究, Sec 通常都出现在酶的活性位点. 这些酶与其半胱氨酸取代型的酶相比活性提高 10~100 倍,这很可能是因为 Sec 独特的电离以及氧化还原性质^[82].

3 金属蛋白质的结构-功能研究

对蛋白结构的描绘是理解其功能以及结构与功能之间联系的基础. 传统的研究结构的工具是 X 射线结晶^[91]与核磁共振(NMR)^[92]. 其他的一些技术,如穆斯堡尔谱、X 射线吸收光谱测定法(XAS),电子顺磁共振(EPR)、共振拉曼光谱(RR)以及磁圆二色谱(MCD)在金属蛋白中金属结合位点的详细结构特征研究中是必须的^[32,93~95]. 在本文中,我们集中介绍 XAS 在金属蛋白的结构-功能研究中的应用. 对于 RR、MCD、EPR 或者穆斯堡尔谱进行的类似研究,读者可以参考其他针对性的综述^[94,96~99].

X 射线吸收光谱(XAS)是一种非侵入性技术,其原理是分析同步加速辐射源产生 X 射线的光子,被元素吸收后获得的光谱,接着检测所产生的荧光强度. X 射线吸收光谱是根据 X 射线的能量,分成两个区,靠近边缘(XANES)和远离边缘(EXAFS). XANES 给出了氧化状态、共价键、位点分子对称性以及配位数的信息;而 EXAFS 给出的是关于金属结合环境,如配位数、配体的识别(配位的元素如 O、N、S)以及金属与各自配体的距离的结构信息^[32]. XAS 可以方便地检测环境与生物样品中金属与金属配合物结构-功能的关系,如空间布局、元素的化学形态、金属的氧化状态. 例如,该方法被用来研究人类肺细胞^[100,101]中 Cr(VI)随时间摄取与分配以及人卵巢细胞^[100,101]中 Cr 的氧化状态. 结果发现在体外铬酸盐复合物的可溶性几乎决定了铬的氧化状态: 在细胞中可溶的 Cr(VI)盐被还原成为 Cr(III),而当细胞暴露于不可溶的(微溶的)铬酸盐复合物时有部分 Cr 仍保持 Cr(VI)^[101].

其他结构检测方法如 NMR 和 X 射线结晶学,这些技术可以联合或者作为一个补充被运用于鉴定金属环境. 考虑到原子核内部测定的高精确性(从 0.0001~0.001 nm), EXAFS 非常适用于检测金属结合位点发生的氧化还原或底物结合变化时,因为这类

反应结构的改变通常小于 0.01 nm, 远超出了蛋白质结晶谱学的精确值(大约 0.15 nm)^[32,102]. 通过联合使用 EXAFS、前稳态动力学和计算群论化学的技术, 得到了锌催化位点的配位数、结构以及伴随的金属配位键的键长的改变^[103]. XAS 可与 NMR 联合使用解析溶液中金属蛋白的结构. NMR 能够提供金属蛋白质中的质子间距离、二面角以及原子内向量这些结构信息. 单独使用 NMR 确定金属中心是不可能的. EXAFS 的数据提供了一些缺失的信息, 正如在研究细菌中铜转运蛋白中所体现的^[104].

阿尔茨海默氏病(AD)是一种神经逐步退行性疾病, 伴有 β -淀粉样蛋白 ($A\beta$, 含有 42 个氨基酸) 沉积. $A\beta$ 通常是以可溶的形式出现在生物液体中, 它的结构从自然状态过渡到 β 片层聚集形态, 并伴随并行增加神经毒素的功能. 越来越多的证据表明在 AD 影响的大脑中, 过渡金属如铜、铁参与了淀粉样蛋白沉淀升高的反应, 铜在 $A\beta$ 中准确的结合位点可能是 AD 病因的关键^[105]. 目前 XAS 对 $A\beta(1-40)-Cu^{2+}$ 的研究发现, 蛋白质与金属离子之间是以 1:1 的比率结合, 说明 Cu^{2+} 可能与三个组氨酸(His6、His13、His14)上三个氮键合(键长 0.185~0.194 nm)以及两个氧原子(一个键长 0.200 nm, 来自 Tyr10; 另一个键长 0.191 nm, 属于一个水分子或是另一个氨基酸)相连的^[106].

为了了解金属插入的过程, 簇合物的形成以及在不同生长阶段金属蛋白的表达调控, 可以采用高通量的 XAS 技术^[31,107,108]. 迄今为止, 这一领域所有已公布的工作都与结构基因组学有关, 其目的是确定一个蛋白功能家族中至少一个蛋白 3D 结构, 从而为家族的其他蛋白提供一个模板^[23]. 迄今, 结构基因组中心从纯化蛋白到最后 3D 结构的确定, 成功的比率仅约为 10%~15%^[109]. Scott 和同事设计了一个一英尺宽的聚碳酸酯材质的具有 25 孔, 每空直径 1.5 mm 的样品固定装置, 放入 XAS 液氦低温器^[108]. 在最初的研究计划中, 焦酚火球菌 2200 个开放读码框(ORF)中的大部分通过高通量技术被克隆纯化, 并用 X 射线结晶或 NMR 的方法对其结构进行检测. 每次操作, 可以对 25 个开放读码框检测样本同时进行, 样品量只需要 3 μ L. 通过 X 射线荧光检测金属离子 Co, Ni, Cu, Zn 的分布, 继而通过 XANES 以及 EXAFS 进一步分析, 得到的关于金属结合位点的结构可以用以

构建一个金属结合位点序列的数据库^[108].

4 金属药物的临床应用

4.1 抗幽门螺杆菌的铋金属药物

铋为基础的三联疗法已普遍应用于治疗与幽门螺杆菌(*H. pylori*)感染相关的胃炎、胃溃疡^[3]. 铋离子能伴随协同阴离子与人类转铁蛋白(hTF)以及乳铁传递蛋白的 N 以及 C 端的结合位点紧密连接^[110,111]. Bi_2 -hLF 复合物阻断了大鼠 IEC-6 细胞对 ^{59}Fe -hLF 的摄取, 表明装入了 Bi^{3+} 的 hLF 能通过“受体介导的内吞作用”被蛋白受体识别并摄取进入细胞^[111]. 已知病人的胃的分泌液中有大量的 hLF 以及胃酸, Bi^{3+} 可能因此阻挠铁的代谢或是在细菌中与蛋白质或酶相互作用. 对 Bi^{3+} 竞争性与人类肌蛋白或 hTF 结合的研究表明, 即使把肌蛋白的量提高到 13 倍, 超过 70% 的铋离子仍是与转铁蛋白结合^[112]. 因此 hTF 是在血浆中 Bi^{3+} 的主要运输者, 意味着它在铋的药物学研究中扮演了重要的角色.

病原微生物, 如幽门螺杆菌, 能产生大量的酶类, 因此人们认为铋金属抗溃疡药物主要是通过抑制酶的活性实现的. 铋已经证实可以抑制幽门螺旋杆菌中许多酶类, 如胞浆酒精脱氢酶(ADH)、F1-ATP 酶以及脲酶^[113]. 它能与酵母酒精脱氢酶的硫醇基团结合, 使得多聚体的酶逐步分解, 从天然状态的四聚体变成二聚体^[114]. 还发现铋金属复合物可能是通过阻断底物进入活性酶位点^[115]来抑制脲酶^[116].

金属蛋白质组学的技术, 例如 2DE, MALDI/ESI-MS 和 ICP-MS, 常用于金属药物与疾病病原学、病理学相关的分子靶位点的检测^[28]. 我们对未加入以及加入胶体次枸橼酸铋(CBS)处理的幽门螺杆菌的蛋白质组进行了比对分析^[117]. 发现通过 CBS 处理后有八种蛋白的表达量出现了上调或下调的变化. 其中四种蛋白(HspA, HspB, NapA 以及 TsaA)同时是铋结合蛋白, 暗示了抑制作用与直接与铋结合间存在着某种联系. HspA 被证实可以与 Ni^{2+} 以及 Bi^{3+} 结合, 而这种蛋白在调节 Ni^{2+} 体内动态平衡中起到重要作用^[48]. 幽门螺旋杆菌的细胞经过铋离子处理后脂质过氧化氢物与氯高铁血红素的增加证实了铋离子能降低氧化应激. 铋离子还导致了蛋白酶活性近八倍的下降. 因此, 酶活性的抑制、调节细胞氧化应激和干扰铋的

动态平衡可能是铂金属抗幽门螺杆菌分子机制的关键^[117]。

4.2 抗肿瘤铂金属药物

顺铂与卡铂已被世界范围内用于治疗多种恶性肿瘤, 尤其是睾丸癌和卵巢癌^[118~120]。它们被认为有类似的抗肿瘤机制, 也就是通过铂结合核 DNA 上的鸟嘌呤位点从而产生 DNA 内链交联以及 DNA 弯曲, 导致细胞的程序性死亡^[121]。顺铂是通过被动扩散或主动转运(通过铜转运蛋白 Ctrl)进入细胞的^[122,123], 这可以解释其有高系统毒性以及许多肿瘤产生的耐药性^[124]。因此需要发展一种智能的肿瘤特异性分配系统^[125], 将铂金属药物包裹于大分子中, 例如瓜环与脱铁铁蛋白^[126], 被证实有以下两个优点: (1) 防止药物被如谷胱甘肽、含硫醇蛋白这类亲核体降解; (2) 通过加强渗透以及保留影响提高药物对肿瘤特异性地识别^[127]。

虽然铂与核酸之间的相互作用十分重要^[121], 但只有很少一部分的顺铂与核 DNA 反应; 依据不同位点结合间的动力学平衡^[128~130], 铂-蛋白复合物实际上决定了是激活抗肿瘤物质还是使药物失活^[124]。当铂复合物如顺铂、逆铂、卡铂或奥沙利铂以 3:1 摩尔比计入蛋白溶液后, 在电喷雾质谱中单铂-细胞色素 *c* (cyt *c*) 物种为主要成分^[131]。因为铂(II)具有“软”的特点, 因此在 cyt *c* 中唯一的一个 Met65, 被认为是优先的结合位点, His26 与 His33 提供二级的结合位点。对牛红细胞超氧化物歧化酶(beSOD)X 射线晶体结构分析意外地发现铂与 His19 的 Nε、两个氯离子

子以及一个松散结构的水分子结合(图 4 (a))^[132]。这个发现说明 beSOD 与铂的结合比较特殊, 也就是遵循氨配体从铂释放; 这个发现同 Deubel 等人的理论研究相符^[133]: 在特定的大分子微环境下, 氨的缺失是可行的, 可能代表了顺铂的一个灭活途径, 因为两个氨配体是所谓的“非离开群体”, 是铂药物生物活性所必需的^[128]。同一个实验课题组所做的一个类似的研究中^[134], 铂被发现鸡蛋的溶菌酶中与 His15 的 Nε 结合, 两个氨分子还有一个可能存在的松散水分子结合(图 4 (b))。两个研究中铂结合位点的不同暗示了特定的蛋白微环境确定氨还是氯被释放^[133]。这两个铂蛋白的结构提示了组氨酸残基可能是铂的结合位点, 但对于铂(II)药物优先与氨还是含硫基团结合仍存在着争论^[129,130,135,136], 我们无法排除其他的因素使得这两种蛋白与众不同。

甲硫氨酸与组氨酸残基早已被认为与铂药物的活性有很大联系, 对药物蛋白在蛋白质组水平上相互作用的探索对了解含铂药物耐药性的分子研究有很大帮助。对人类铂敏感与耐铂的卵巢癌细胞系进行了金属组学的研究, 有多组与铂耐药性相关的蛋白已经被确定^[137~139]。Britten 和同事应用表面增强激光解析离子化飞行时间质谱(SELDI-TOF-MS), 找到了两个只出现在耐铂药物卵巢细胞而不出现在铂敏感细胞系中的候选生物标签(*m/z* 5041 和 7324)^[137]。2DE 与 MALDI-MS 帮助识别差异蛋白的表达^[138,139], 发现九种蛋白具有持续的变化, 包括 annexin A3 以及 IV, 细胞角蛋白 8 及 18, destrin, 醛脱氢酶 1, cofilin 1, GSTO1-1 以及 IDHc。对这些表达过度或不足的蛋白

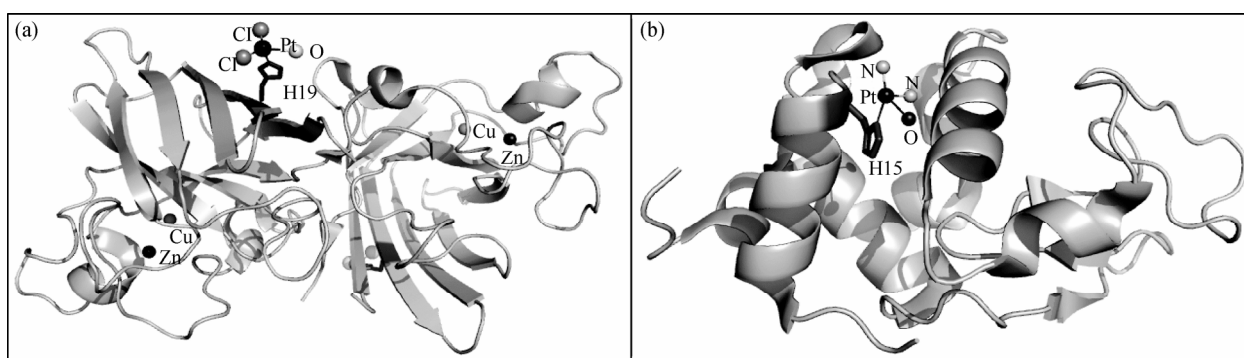


图 4 牛红细胞超氧化物歧化酶(beSOD) (PDB: 2AEO; (a)) 以及蛋清溶菌酶(PDB: 2I6Z; (b)) X 射线结构

铂(II)结合位点的变形平面突出表示。在铂化 beSOD 中铂(II)原子与组氨酸 19, 两个氯离子以及一个水分子(Pt-O 长度, 0.352 nm)结合; 在蛋清溶菌酶中铂与组氨酸 15 以及两个氨分子、一个水分子(Pt-O 长度, 0.391 nm)结合

序列的分析将十分有意义, 可能会发现新的蛋白标签, 以及发展新的治疗方法.

5 展望

金属组学是一门新兴的前沿交叉学科, 它与生物催化、环境化学、药物化学、植物生物化学/生理学以及营养学相互交叉. 它致力于对通过对基因、蛋白、新陈代谢以及生物系统中其他生物分子的研究来

了解生物体功能的分子机制. 有以下一些具体的问题亟待解决: (1) 金属蛋白质的结构-功能分析; (2) 生物体系中金属蛋白质的分析识别和生物痕量元素的化学分析; (3) 金属离子的生物调控及代谢; (4) 与痕量金属元素有关的疾病的医学诊断以及金属药物的应用. 随着金属组学技术的发展, 如体内研究技、体外功能研究技术以及生物信息学分析, 将会为以上问题提供解答.

致谢 本工作得到香港研究资助局(批准号: HKU7039/04P, HKU7512/05M, HKU7043/06P, HKU7042/07P, HKUST403C, HKU107C)、大学教育资助委员会“卓越科学领域”、香港大学、国家自然科学基金(批准号: 20801061)和广东省自然科学基金(批准号: 8451027501001233)资助, 特此一并致谢.

参考文献

- 1 Aitio A, Aro A, Jarvisalo J, Vainio H. Trace Elements in Health and Disease. Cambridge, UK: Royal Society of Chemistry, 1991. 1—246
- 2 Tainer J A, Roberts V A, Getzoff E D. Metal-binding sites in proteins. *Curr Opin Biotechnol*, 1991, 2(4): 582—591
- 3 Ge R, Sun H. Bioinorganic chemistry of bismuth and antimony: target sites of metallodrugs. *Acc Chem Res*, 2007, 40(4): 267—274
- 4 Vašák M, Hasler D W. Metallothioneins: new functional and structural insights. *Curr Opin Chem Biol*, 2000, 4(2): 177—183
- 5 Chasteen N D. Ferritin. Uptake, storage, and release of iron. *Met Ions Biol Syst*, 1998, 35(1): 479—514
- 6 Liberek K, Lewandowska A, Ziętkiewicz S. Chaperones in control of protein disaggregation. *EMBO J*, 2008, 27(2): 328—335
- 7 Casalot L, Rousset M. Maturation of the [NiFe] hydrogenases. *Trends Microbiol*, 2001, 9(5): 228—237
- 8 Andrews S C, Robinson A K, Rodriguez-Quinones F. Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiol Rev*, 2003, 27(2-3): 215—237
- 9 Dosanjh N S, Michel S L. Microbial nickel metalloregulation: NikRs for nickel ions. *Curr Opin Chem Biol*, 2006, 10(2): 123—130
- 10 Szpunar J, Łobinśki R. Multidimensional approaches in biochemical speciation analysis. *Anal Bioanal Chem*, 2002, 373(6): 404—411
- 11 Caruso J A, Montes-Bayón M. Elemental speciation studies— new directions for trace metal analysis. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2003, 56(1): 148—163
- 12 Fleischmann R D, Adams M D, White O, Clayton R A, Kirkness E F, Kerlavage A R, Bult C J, Tomb J F, Dougherty B A, Merrick J M, McKenney K, Sutton G, Fitzhugh W, Fields C, Gocavne J D, Scott J, Shirley R, Liu L I, Venter J C. Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science*, 1995, 269(5223): 496—512
- 13 Lander E S, Linton L M, Birren B, Nusbaum C, Zody M C, Baldwin J, Devon K, Dewar K, Doyle M, Fitzhugh W, Funke R, Gage D, Harris K, Heaford A, Howland J, Kann L, Lehoczy J, LeVine R, McEwan P, McKernan K, Meldrim J, Mesirov J P, Miranda C, Morris W, Naylor J, Raymond C, Rosetti M, Santos R, Sheridan A, Sougnez C, Stange-Thomann N, Stojanovic N, Subramanian A, Wyman D, Rogers J, Sulston J, Ainscough R, Beck S, Bentley D, Burton J, Clee C, Carter N, Coulson A, Deadman R, Deloukas P, Dunham A, Dunham I, Durbin R, French L, Grafham D, Gregory S, Hubbard T, Humphray S, Hunt A, Jones M, Lloyd C, McMurray A, Matthews L, Mercer S, Milne S, Mullikin J C, Mungall A, Plumb R, Ross M, Shownkeen R, Sims S, Waterston R H, Wilson R K, Hillier L W, McPherson J D, Marra M A, Mardis E R, Fulton L A, Chinwalla A T, Pepin K H, Gish W R, Chissole S L, Wendl M C, Delehaanty K D, Miner T L, Delehaanty A, Kramer J B, Cook L L, Fulton R S, Johnson D L, Minx P J, Clifton S W, Hawkins T, Branscomb E, Predki P, Richardson P, Wenning S, Slezak T, Doggett N, Cheng J F, Olsen A, Lucas S, Elkin C, Uberbacher E, Frazier M, Gibbs R A, Muzny D M, Scherer S E, Bouck J B, Sodergren E J, Worley K C, Rives C M, Gorrell J H, Metzker M L, Naylor S L, Kucherlapati R S, Nelson D L, Weinstock G M, Sakaki Y, Fujiyama A, Hattori M, Yada T, Toyoda A, Itoh T, Kawagoe C, Watanabe H, Totoki Y, Taylor T, Weissenbach J, Heilig R, Saurin W, Artiguenave F, Brottier P, Bruls T, Pelletier E, Robert C, Wincker P, Smith D R, Doucette-Stamm L, Rubenfield M, Weinstock K, Lee H M, Dubois J, Rosenthal A, Platzer M, Nyakatura G, Taudien S, Rump A,

- Yang H, Yu J, Wang J, Huang G, Gu J, Hood L, Rowen L, Madan A, Qin S, Davis R W, Federspiel N A, Abola A P, Proctor M J, Myers R M, Schmutz J, Dickson M, Grimwood J, Cox D R, Olson M V, Kaul R, Shimizu N, Kawasaki K, Minoshima S, Evans G A, Athanasiou M, Schultz R, Roe B A, Chen F, Pan H, Ramser J, Lehrach H, Reinhardt R, McCombie W R, de la Bastide M, Dedhia N, Blocker H, Hornischer K, Nordsiek G, Agarwala R, Aravind L, Bailey J A, Bateman A, Batzoglu S, Birney E, Bork P, Brown D G, Burge C B, Cerutti L, Chen H C, Church D, Clamp M, Copley R R, Doerks T, Eddy S R, Eichler E E, Furey T S, Galagan J, Gilbert J G, Harmon C, Hayashizaki Y, Haussler D, Hermjakob H, Hokamp K, Jang W, Johnson L S, Jones T A, Kasif S, Kasprzyk A, Kennedy S, Kent W J, Kitts P, Koonin E V, Korf I, Kulp D, Lancet D, Lowe T M, McLysaght A, Mikkelsen T, Moran J V, Mulder N, Pollara V J, Ponting C P, Schuler G, Schultz J, Slater G, Smit A F, Stupka E, Szustakowski J, Thierry-Mieg D, Thierry-Mieg J, Wagner L, Wallis J, Wheeler R, Williams A, Wolf Y I, Wolfe K H, Yang S P, Yeh R F, Collins F, Guyer M S, Peterson J, Felsenfeld A, Wetterstrand K A, Patrino A, Morgan M J, de Jong P, Catanese J J, Osoegawa K, Shizuya H, Choi S, Chen Y J. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, 2001, 409(6822): 860—921
- 14 Venter J C, Adams M D, Myers E W, Li P W, Mural R J, Sutton G G, Smith H O, Yandell M, Evans C A, Holt R A, Gocayne J D, Amanatides P, Ballew R M, Huson D H, Wortman J R, Zhang Q, Kodira C D, Zheng X H, Chen L, Skupski M, Subramanian G, Thomas P D, Zhang J, Gabor Miklos G L, Nelson C, Broder S, Clark A G, Nadeau J, McKusick V A, Zinder N, Levine A J, Roberts R J, Simon M, Slayman C, Hunkapiller M, Bolanos R, Delcher A, Dew I, Fasulo D, Flanigan M, Florea L, Halpern A, Hannenhalli S, Kravitz S, Levy S, Mobarry C, Reinert K, Remington K, Abu-Threideh J, Beasley E, Biddick K, Bonazzi V, Brandon R, Cargill M, Chandramouliswaran I, Charlab R, Chaturvedi K, Deng Z, Di Francesco V, Dunn P, Eilbeck K, Evangelista C, Gabrielian A E, Gan W, Ge W, Gong F, Gu Z, Guan P, Heiman T J, Higgins M E, Ji R R, Ke Z, Ketchum K A, Lai Z, Lei Y, Li Z, Li J, Liang Y, Lin X, Lu F, Merkulov G V, Milshina N, Moore H M, Naik A K, Narayan V A, Neelam B, Nusskern D, Rusch D B, Salzberg S, Shao W, Shue B, Sun J, Wang Z, Wang A, Wang X, Wang J, Wei M, Wides R, Xiao C, Yan C, Yao A, Ye J, Zhan M, Zhang W, Zhang H, Zhao Q, Zheng L, Zhong F, Zhong W, Zhu S, Zhao S, Gilbert D, Baumhueter S, Spier G, Carter C, Cravchik A, Woodage T, Ali F, An H, Awe A, Baldwin D, Baden H, Barnstead M, Barrow I, Beeson K, Busam D, Carver A, Center A, Cheng M L, Curry L, Danaher S, Davenport L, Desilets R, Dietz S, Dodson K, Doup L, Ferriera S, Garg N, Gluecksmann A, Hart B, Haynes J, Haynes C, Heiner C, Hladun S, Hostin D, Houck J, Howland T, Ibegwam C, Johnson J, Kalush F, Kline L, Koduru S, Love A, Mann F, May D, McCawley S, McIntosh T, McMullen I, Moy M, Moy L, Murphy B, Nelson K, Pfannkuch C, Pratts E, Puri V, Qureshi H, Reardon M, Rodriguez R, Rogers Y H, Romblad D, Ruhfel B, Scott R, Sitter C, Smallwood M, Stewart E, Strong R, Suh E, Thomas R, Tint N N, Tse S, Vech C, Wang G, Wetter J, Williams S, Williams M, Windsor S, Winn-Deen E, Wolfe K, Zaveri J, Zaveri K, Abril J F, Guigo R, Campbell M J, Sjolander K V, Karlak B, Kejariwal A, Mi H, Lazareva B, Hatton T, Narechania A, Diemer K, Muruganujan A, Guo N, Sato S, Bafna V, Istrail S, Lippert R, Schwartz R, Walenz B, Yoosheph S, Allen D, Basu A, Baxendale J, Blick L, Caminha M, Carnes-Stine J, Caulk P, Chiang Y H, Coyne M, Dahlke C, Mays A, Dombroski M, Donnelly M, Ely D, Esparham S, Fosler C, Gire H, Glanowski S, Glasser K, Glodek A, Gorokhov M, Graham K, Gropman B, Harris M, Heil J, Henderson S, Hoover J, Jennings D, Jordan C, Jordan J, Kasha J, Kagan L, Kraft C, Levitsky A, Lewis M, Liu X, Lopez J, Ma D, Majoros W, McDaniel J, Murphy S, Newman M, Nguyen T, Nguyen N, Nodell M, Pan S, Peck J, Peterson M, Rowe W, Sanders R, Scott J, Simpson M, Smith T, Sprague A, Stockwell T, Turner R, Venter E, Wang M, Wen M, Wu D, Wu M, Xia A, Zandieh A, Zhu X. The sequence of the human genome. *Science*, 2001, 291(5507): 1304—1351
- 15 Anderson N L, Anderson N G. Proteome and proteomics: new technologies, new concepts, and new words. *Electrophoresis*, 1998, 19(11): 1853—1861
- 16 Aebersold R, Mann M. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature*, 2003, 422(6928): 198—207
- 17 Łobinśki R, Schaumlöffel D, Szpunar J. Mass spectrometry in bioinorganic analytical chemistry. *Mass Spectrom Rev*, 2006, 25(2): 255—289
- 18 Shah M, Caruso J A. Inductively coupled plasma mass spectrometry in separation techniques: recent trends in phosphorus speciation. *J Sep Sci*, 2005, 28(15): 1969—1984
- 19 Williams R J P. Chemical selection of elements by cells. *Coord Chem Rev*, 2001, 216-217(1): 583—595
- 20 Szpunar J. Metallomics: A new frontier in analytical chemistry. *Anal Bioanal Chem*, 2004, 378(1): 54—56
- 21 Mounicou S, Szpunar J, Łobinśki R. Metallomics: The concept and methodology. *Chem Soc Rev*, 2009, (4): 1119—1138
- 22 Haraguchi H. Metallomics as integrated biometal science. *J Anal At Spectrom*, 2004, 19(1): 5—14
- 23 Shi W, Chance M R. Metallomics and metalloproteomics. *Cell Mol Life Sci*, 2008, 65(19): 3040—3048
- 24 Thierse H J, Helm S, Pankert P. Metalloproteomics in the molecular study of cell physiology and disease. *Methods Mol Biol*, 2008,

425(1): 139—147

- 25 Bettmer J. Metalloproteomics: A challenge for analytical chemists. *Anal Bioanal Chem*, 2005, 383(3): 370—371
- 26 Blackstock W P, Weir M P. Proteomics: Quantitative and physical mapping of cellular proteins. *Trends Biotechnol*, 1999, 17(3): 121—127
- 27 Łobinński R, Moulin C, Ortega R. Imaging and speciation of trace elements in biological environment. *Biochimie*, 2006, 88(11): 1591—1604
- 28 Sun X, Tsang C N, Sun H. Identification and characterization of metaldrug binding proteins by (metallo)proteomics. *Metallomics*, 2009, 1(1): 25—31
- 29 López-Barea J, Gómez-Ariza J L. Environmental proteomics and metallomics. *Proteomics*, 2006, 6 (Suppl 1): S51—S62
- 30 Szpunar J. Advances in analytical methodology for bioinorganic speciation analysis: metallomics, metalloproteomics and heteroatom-tagged proteomics and metabolomics. *Analyst*, 2005, 130(4): 442—465
- 31 Chance M R, Fiser A, Sali A, Pieper U, Eswar N, Xu G, Fajardo J E, Radhakannan T, Marinkovic N. High-throughput computational and experimental techniques in structural genomics. *Genome Res*, 2004, 14(10B): 2145—2154
- 32 Gao Y, Chen C, Chai Z. Advanced nuclear analytical techniques for metalloproteomics. *J Anal At Spectrom*, 2007, 22(8): 856—866
- 33 Prange A, Pröfrock D. Application of CE-ICP-MS and CE-ESI-MS in metalloproteomics: Challenges, developments, and limitations. *Anal Bioanal Chem*, 2005, 383(3): 372—389
- 34 Sun X, Chiu J F, He Q Y. Application of immobilized metal affinity chromatography in proteomics. *Expert Rev Proteomics*, 2005, 2(5): 649—657
- 35 Sun X, Ge R, Chiu J F, Sun H, He Q Y. Identification of proteins related to nickel homeostasis in *Helicobacter pylori* by immobilized metal affinity chromatography and two-dimensional gel electrophoresis. *Met Based Drugs*, 2008, 2008: 289490
- 36 She Y M, Narindrasorasak S, Yang S, Spitale N, Roberts E A, Sarkar B. Identification of metal-binding proteins in human hepatoma lines by immobilized metal affinity chromatography and mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics*, 2003, 2(12): 1306—1318
- 37 Smith S D, She Y M, Roberts E A, Sarkar B. Using immobilized metal affinity chromatography, two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry to identify hepatocellular proteins with copper-binding ability. *J Proteome Res*, 2004, 3(4): 834—840
- 38 Neilsen J L, Abildtrup A, Christensen J, Watson P, Cox A, McLeod C W. Laser ablation inductively coupled plasma-mass spectrometry in combination with gel electrophoresis: A new strategy for speciation of metal binding serum proteins. *Spectrochim Acta Part B: At Spectrosc*, 1998, 53(2): 339—345
- 39 Chery C C, Gunther D, Cornelis R, Vanhaecke F, Moens L. Detection of metals in proteins by means of polyacrylamide gel electrophoresis and laser ablation-inductively coupled plasma-mass spectrometry: Application to selenium. *Electrophoresis*, 2003, 24(19-20): 3305—3313
- 40 Binet M R, Ma R, McLeod C W, Poole R K. Detection and characterization of zinc-and cadmium-binding proteins in *Escherichia coli* by gel electrophoresis and laser ablation-inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Anal Biochem*, 2003, 318(1): 30—38
- 41 Jenkins R. X-ray Fluorescence Spectrometry. New York: John Wiley, 1999. 1—207
- 42 Ortega R, Bohic S, Tucoulou R, Somogyi A, Deves G. Microchemical element imaging of yeast and human cells using synchrotron X-ray microprobe with Kirkpatrick-Baez optics. *Anal Chem*, 2004, 76(2): 309—314
- 43 Yang L, McRae R, Henary M M, Patel R, Lai B, Vogt S, Fahrni C J. Imaging of the intracellular topography of copper with a fluorescent sensor and by synchrotron X-ray fluorescence microscopy. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(32): 11179—11184
- 44 Verbi F M, Arruda S C, Rodriguez A P, Pérez C A, Arruda M A. Metal-binding proteins scanning and determination by combining gel electrophoresis, synchrotron radiation X-ray fluorescence and atomic spectrometry. *J Biochem Biophys Methods*, 2005, 62(2): 97—109
- 45 Gao Y, Chen C, Chai Z, Zhao J, Liu J, Zhang P, He W, Huang Y. Detection of metalloproteins in human liver cytosol by synchrotron radiation X-ray fluorescence combined with gel filtration chromatography and isoelectric focusing separation. *Analyst*, 2002, 127(12): 1700—1704
- 46 Liu Y, Li L, Gao Y, Chen C, Li B, He W, Huang Y, Chai Z. Distribution of metalloproteins in hepatocellular carcinoma and surrounding tissues. *Hepatogastroenterology*, 2007, 54(80): 2291—2296
- 47 Gao Y, Chen C, Zhang P, Chai Z, He W, Huang Y. Detection of metalloproteins in human liver cytosol by synchrotron radiation X-ray fluorescence after sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal Chim Acta*, 2003, 485(1): 131—137
- 48 Cun S, Li H, Ge R, Lin M C, Sun H. A histidine-rich and cysteine-rich metal-binding domain at the C terminus of heat shock protein

- A from *Helicobacter pylori*: Implication for nickel homeostasis and bismuth susceptibility. *J Biol Chem*, 2008, 283(22): 15142—15151
- 49 Ge R, Watt R M, Sun X, Tanner J A, He Q Y, Huang J D, Sun H. Expression and characterization of a histidine-rich protein, Hpn: potential for Ni²⁺ storage in *Helicobacter pylori*. *Biochem J*, 2006, 393(1): 285—293
- 50 Ge R, Zhang Y, Sun X, Watt R M, He Q Y, Huang J D, Wilcox D E, Sun H. Thermodynamic and kinetic aspects of metal binding to the histidine-rich protein, Hpn. *J Am Chem Soc*, 2006, 128(35): 11330—11331
- 51 Zeng Y B, Zhang D M, Li H, Sun H. Binding of Ni²⁺ to a histidine- and glutamine-rich protein, Hpn-like. *J Biol Inorg Chem*, 2008, 13(7): 1121—1131
- 52 Gilbert J V, Ramakrishna J, Sunderman Jr F W, Wright A, Plaut A G. Protein Hpn: cloning and characterization of a histidine-rich metal-binding polypeptide in *Helicobacter pylori* and *Helicobacter mustelae*. *Infect Immun*, 1995, 63(7): 2682—2688
- 53 Contreras M, Thiberge J M, Mandrand-Berthelot M A, Labigne A. Characterization of the roles of NikR, a nickel-responsive pleiotropic autoregulator of *Helicobacter pylori*. *Mol Microbiol*, 2003, 49(4): 947—963
- 54 Seshadri S, Benoit S L, Maier R J. Roles of His-rich hpn and Hpn-like proteins in *Helicobacter pylori* nickel physiology. *J Bacteriol*, 2007, 189(11): 4120—4126
- 55 Lim Y P. Mining the tumor phosphoproteome for cancer markers. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(9): 3163—3169
- 56 Cohen P. The regulation of protein function by multisite phosphorylation—a 25 year update. *Trends Biochem Sci*, 2000, 25(12): 596—601
- 57 Mann M, Ong S E, Gronborg M, Steen H, Jensen O N, Pandey A. Analysis of protein phosphorylation using mass spectrometry: Deciphering the phosphoproteome. *Trends Biotechnol*, 2002, 20(6): 261—268
- 58 Pandey A, Podtelejnikov A V, Blagoev B, Bustelo X R, Mann M, Lodish H F. Analysis of receptor signaling pathways by mass spectrometry: Identification of vav-2 as a substrate of the epidermal and platelet-derived growth factor receptors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(1): 179—184
- 59 Andersson L, Porath J. Isolation of phosphoproteins by immobilized metal (Fe³⁺) affinity chromatography. *Anal Biochem*, 1986, 154(1): 250—254
- 60 Oda Y, Nagasu T, Chait B T. Enrichment analysis of phosphorylated proteins as a tool for probing the phosphoproteome. *Nat Biotechnol*, 2001, 19(4): 379—382
- 61 Zhou H, Watts J D, Aebersold R. A systematic approach to the analysis of protein phosphorylation. *Nat Biotechnol*, 2001, 19(4): 375—378
- 62 Beausoleil S A, Jedrychowski M, Schwartz D, Elias J E, Villen J, Li J, Cohn M A, Cantley L C, Gygi S P. Large-scale characterization of HeLa cell nuclear phosphoproteins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(33): 12130—12135
- 63 Paradela A, Albar J P. Advances in the analysis of protein phosphorylation. *J Proteome Res*, 2008, 7(5): 1809—1818
- 64 Dubrovskaya A, Souchelnyskiy S. Efficient enrichment of intact phosphorylated proteins by modified immobilized metal-affinity chromatography. *Proteomics*, 2005, 5(18): 4678—4683
- 65 Nita-Lazar A, Saito-Benz H, White F M. Quantitative phosphoproteomics by mass spectrometry: Past, present, and future. *Proteomics*, 2008, 8(21): 4433—4443
- 66 Feng S, Ye M, Zhou H, Jiang X, Zou H, Gong B. Immobilized zirconium ion affinity chromatography for specific enrichment of phosphopeptides in phosphoproteome analysis. *Mol Cell Proteomics*, 2007, 6(9): 1656—1665
- 67 Ficarro S B, McClelland M L, Stukenberg P T, Burke D J, Ross M M, Shabanowitz J, Hunt D F, White F M. Phosphoproteome analysis by mass spectrometry and its application to *Saccharomyces cerevisiae*. *Nat Biotechnol*, 2002, 20(3): 301—305
- 68 Pinkse M W, Uitto P M, Hilhorst M J, Ooms B, Heck A J. Selective isolation at the femtomole level of phosphopeptides from proteolytic digests using 2D-NanoLC-ESI-MS/MS and titanium oxide precolumns. *Anal Chem*, 2004, 76(14): 3935—3943
- 69 Larsen M R, Thingholm T E, Jensen O N, Roepstorff P, Jorgensen T J. Highly selective enrichment of phosphorylated peptides from peptide mixtures using titanium dioxide microcolumns. *Mol Cell Proteomics*, 2005, 4(7): 873—886
- 70 Bonilla L, Means G, Lee K, Patterson S. The evolution of tools for protein phosphorylation site analysis: From discovery to clinical application. *Biotechniques*, 2008, 44(5): 671—679
- 71 Syka J E, Coon J J, Schroeder M J, Shabanowitz J, Hunt D F. Peptide and protein sequence analysis by electron transfer dissociation mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(26): 9528—9533
- 72 Li X, Gerber S A, Rudner A D, Beausoleil S A, Haas W, Villen J, Elias J E, Gygi S P. Large-scale phosphorylation analysis of alpha-factor-arrested *Saccharomyces cerevisiae*. *J Proteome Res*, 2007, 6(3): 1190—1197

- 73 Ficarro S B, Salomon A R, Brill L M, Mason D E, Stettler-Gill M, Brock A, Peters E C. Automated immobilized metal affinity chromatography/nano-liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry platform for profiling protein phosphorylation sites. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2005, 19(1): 57—71
- 74 Wind M, Edler M, Jakubowski N, Linscheid M, Wesch H, Lehmann W D. Analysis of protein phosphorylation by capillary liquid chromatography coupled to element mass spectrometry with ^{31}P detection and to electrospray mass spectrometry. *Anal Chem*, 2001, 73(1): 29—35
- 75 Wind M, Feldmann I, Jakubowski N, Lehmann W D. Spotting and quantification of phosphoproteins purified by gel electrophoresis and laser ablation-element mass spectrometry with phosphorus-31 detection. *Electrophoresis*, 2003, 24(7-8): 1276—1280
- 76 Wind M, Gosenca D, Kubler D, Lehmann W D. Stable isotope phospho-profiling of fibrinogen and fetuin subunits by element mass spectrometry coupled to capillary liquid chromatography. *Anal Biochem*, 2003, 317(1): 26—33
- 77 Wind M, Kelm O, Nigg E A, Lehmann W D. Identification of phosphorylation sites in the polo-like kinases Plx1 and Plk1 by a novel strategy based on element and electrospray high resolution mass spectrometry. *Proteomics*, 2002, 2(11): 1516—1523
- 78 Wind M, Wegener A, Kellner R, Lehmann W D. Analysis of CheA histidine phosphorylation and its influence on protein stability by high-resolution element and electrospray mass spectrometry. *Anal Chem*, 2005, 77(7): 1957—1962
- 79 Wind M, Wesch H, Lehmann W D. Protein phosphorylation degree: determination by capillary liquid chromatography and inductively coupled plasma mass spectrometry. *Anal Chem*, 2001, 73(13): 3006—3010
- 80 Ellis J, Grimm R, Clark J F, Pyne-Gaithman G, Wilbur S, Caruso J A. Studying protein phosphorylation in low MW CSF fractions with capLC-ICPMS and nanoLC-CHIP-ITMS for identification of phosphoproteins. *J Proteome Res*, 2008, 7(11): 4736—4742
- 81 Łobinśki R, Edmonds J S, Suzuki K T, Uden P C. Species-selective determination of selenium compounds in biological materials. *Pure Appl Chem*, 2000, 72(3): 447—461
- 82 Stadtman T C. Selenocysteine. *Annu Rev Biochem*, 1996, 65(1): 83—100
- 83 Kryukov G V, Castellano S, Novoselov S V, Lobanov A V, Zhehtab O, Guigó R, Gladyshev V N. Characterization of mammalian selenoproteomes. *Science*, 2003, 300(5624): 1439—1443
- 84 Behne D, Hilmert H, Scheid S, Gessner H, Elger W. Evidence for specific selenium target tissues and new biologically important selenoproteins. *Biochim Biophys Acta*, 1988, 966(1): 12—21
- 85 Behne D, Weiss-Nowak C, Kalcklosch M, Westphal C, Gessner H, Kyriakopoulos A. Studies on the distribution and characteristics of new mammalian selenium-containing proteins. *Analyst*, 1995, 120(3): 823—825
- 86 Behne D, Scheid S, Hilmert H, Gessner H, Gawlik D, Kyriakopoulos A. Combination of neutron activation analysis, tracer techniques, and biochemical methods in the investigation of selenium metabolism. *Biol Trace Elem Res*, 1990, 26—27(6): 439—447
- 87 Casiot C, Vacchina V, Chassaing H, Szpunar J, Potin-Gautier M, Łobinśki R. An approach to the identification of selenium species in yeast extracts using pneumatically-assisted electrospray tandem mass spectrometry. *Anal Commun*, 1999, 36(3): 77—80
- 88 Fan T W M, Pruszkowski E, Shuttleworth S. Speciation of selenoproteins in Se-contaminated wildlife by gel electrophoresis and laser ablation-ICP-MS. *J Anal At Spectrom*, 2002, 17(12): 1621—1623
- 89 Behne D, Kyriakopoulos A. Mammalian selenium-containing proteins. *Annu Rev Nutr*, 2001, 21(1): 453—473
- 90 Persson-Moschos M, Huang W, Srikumar T S, Akesson B, Lindeberg S. Selenoprotein P in serum as a biochemical marker of selenium status. *Analyst*, 1995, 120(3): 833—836
- 91 Ilari A, Savino C. Protein structure determination by X-ray crystallography. *Methods Mol Biol*, 2008, 452(1): 63—87
- 92 Wüthrich K. Protein structure determination in solution by NMR spectroscopy. *J Biol Chem*, 1990, 265(36): 22059—22062
- 93 Que Jr L. *Physical Methods in Bioinorganic Chemistry: Spectroscopy and Magnetism*. Sausalito: University Science Books, 2000. 1—556
- 94 Solomon E I. Spectroscopic methods in bioinorganic chemistry: Blue to green to red copper sites. *Inorg Chem*, 2006, 45(20): 8012—8025
- 95 Solomon E I, Xie X, Dey A. Mixed valent sites in biological electron transfer. *Chem Soc Rev*, 2008, 37(4): 623—638
- 96 Andersson K K, Schmidt P P, Katterle B, Strand K R, Palmer A E, Lee S K, Solomon E I, Graslund A, Barra A L. Examples of high-frequency EPR studies in bioinorganic chemistry. *J Biol Inorg Chem*, 2003, 8(3): 235—247
- 97 Oshtrakh M I. Study of the relationship of small variations of the molecular structure and the iron state in iron containing proteins by Mössbauer spectroscopy: Biomedical approach. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, 2004, 60(1-2): 217—234
- 98 Murgida D H, Hildebrandt P. Disentangling interfacial redox processes of proteins by SERR spectroscopy. *Chem Soc Rev*, 2008,

37(5): 937—945

- 99 Friedman J M. Time-resolved resonance Raman spectroscopy as a probe of structure, dynamics, and reactivity in hemoglobin. *Methods Enzymol*, 1994, 232(1): 205—231
- 100 Harris H H, Levina A, Dillon C T, Mulyani I, Lai B, Cai Z, Lay P A. Time-dependent uptake, distribution and biotransformation of chromium(VI) in individual and bulk human lung cells: Application of synchrotron radiation techniques. *J Biol Inorg Chem*, 2005, 10(2): 105—118
- 101 Ortega R, Fayard B, Salome M, Deves G, Susini J. Chromium oxidation state imaging in mammalian cells exposed in vitro to soluble or particulate chromate compounds. *Chem Res Toxicol*, 2005, 18(10): 1512—1519
- 102 Dalba G, Fornasini P, Grisenti R, Purans J. Sensitivity of extended X-ray-absorption fine structure to thermal expansion. *Phys Rev Lett*, 1999, 82(21): 4240—4243
- 103 Kleinfeld O, Frenkel A, Martin J M, Sagi I. Active site electronic structure and dynamics during metalloenzyme catalysis. *Nat Struct Biol*, 2003, 10(2): 98—103
- 104 Banci L, Bertini I, Mangani S. Integration of XAS and NMR techniques for the structure determination of metalloproteins. Examples from the study of copper transport proteins. *J Synchrotron Radiat*, 2005, 12(1): 94—97
- 105 Strozyk D, Bush A I. The role of metal ions in neurology. An introduction. In: Sigel A, Sigel H, Sigel R, eds. *Metal Ions in Life Sciences*. Vol 1. Chichester: Wiley, 2006. 1—7
- 106 Stellato F, Menestrina G, Serra M D, Potrich C, Tomazzolli R, Meyer-Klaucke W, Morante S. Metal binding in amyloid beta-peptides shows intra- and inter-peptide coordination modes. *Eur Biophys J*, 2006, 35(4): 340—351
- 107 Shi W, Zhan C, Ignatov A, Manjasetty B A, Marinkovic N, Sullivan M, Huang R, Chance M R. Metalloproteomics: high-throughput structural and functional annotation of proteins in structural genomics. *Structure*, 2005, 13(10): 1473—1486
- 108 Scott R A, Shokes J E, Cosper N J, Jenney F E, Adams M W. Bottlenecks and roadblocks in high-throughput XAS for structural genomics. *J Synchrotron Radiat*, 2005, 12(1): 19—22
- 109 Bonanno J B, Almo S C, Bresnick A, Chance M R, Fiser A, Swaminathan S, Jiang J, Studier F W, Shapiro L, Lima C D, Gaasterland T M, Sali A, Bain K, Feil I, Gao X, Lorimer D, Ramos A, Sauder J M, Wasserman S R, Emtage S, D'Amico K L, Burley S K. New York-Structural GenomiX Research Consortium (NYSGXRC): A large scale center for the protein structure initiative. *J Struct Funct Genomics*, 2005, 6(2-3): 225—232
- 110 Sun H, Li H, Mason A B, Woodworth R C, Sadler P J. Competitive binding of bismuth to transferrin and albumin in aqueous solution and in blood plasma. *J Biol Chem*, 2001, 276(12): 8829—8835
- 111 Zhang L, Szeto K Y, Wong W B, Loh T T, Sadler P J, Sun H. Interactions of bismuth with human lactoferrin and recognition of the Bi(III)-lactoferrin complex by intestinal cells. *Biochemistry*, 2001, 40(44): 13281—13287
- 112 Sun H, Szeto K Y. Binding of bismuth to serum proteins: implication for targets of Bi(III) in blood plasma. *J Inorg Biochem*, 2003, 94(1-2): 114—120
- 113 Lambert J R, Midolo P. The actions of bismuth in the treatment of *Helicobacter pylori* infection. *Aliment Pharmacol Ther*, 1997, 11 (Suppl 1): 27—33
- 114 Zhang L, Mulrooney S B, Leung F K, Zeng Y B, Ko B B C, Hausinger R P, Sun H. Inhibition of urease by bismuth(III): implications for the mechanisms of action of bismuth drugs. *BioMetals*, 2006, 19(5): 503—511
- 115 Asato E, Kamamuta K, Akamine Y, Fukami T, Nukada R, Mikuriya M, Deguchi S, Yokota Y. Bismuth(III) complexes of 2-mercaptoethanol: Preparation, structural and spectroscopic characterization, antibactericidal activity toward *Helicobacter pylori*, and inhibitory effect toward *H. pylori*-produced urease. *Bull Chem Soc Jpn*, 1997, 70(3): 639—648
- 116 Jin L, Szeto K Y, Zhang L, Du W, Sun H. Inhibition of alcohol dehydrogenase by bismuth. *J Inorg Biochem*, 2004, 98(8): 1331—1337
- 117 Ge R, Sun X, Gu Q, Watt R M, Tanner J A, Wong B C, Xia H H, Huang J D, He Q Y, Sun H. A proteomic approach for the identification of bismuth-binding proteins in *Helicobacter pylori*. *J Biol Inorg Chem*, 2007, 12(6): 831—842
- 118 Jamieson E R, Lippard S J. Structure, recognition, and processing of cisplatin-DNA adducts. *Chem Rev*, 1999, 99(9): 2467—2498
- 119 Rosenberg B, van Camp L, Trosko J E, Mansour V H. Platinum compounds: a new class of potent antitumour agents. *Nature*, 1969, 222(5191): 385—386
- 120 Guo Z, Sadler P J. Metals in medicine. *Angew Chem Int Ed Engl*, 1999, 38(11): 1513—1531
- 121 Cohen S M, Lippard S J. Cisplatin: From DNA damage to cancer chemotherapy. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, 2001, 67(1): 93—130

- 122 Ishida S, Lee J, Thiele D J, Herskowitz I. Uptake of the anticancer drug cisplatin mediated by the copper transporter Ctr1 in yeast and mammals. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(22): 14298—14302
- 123 Lin X, Okuda T, Holzer A, Howell S B. The copper transporter CTR1 regulates cisplatin uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Pharmacol*, 2002, 62(5): 1154—1159
- 124 Martin L P, Hamilton T C, Schilder R J. Platinum resistance: The role of DNA repair pathways. *Clin Cancer Res*, 2008, 14(5): 1291—1295
- 125 Buijninx P C, Sadler P J. New trends for metal complexes with anticancer activity. *Curr Opin Chem Biol*, 2008, 12(2): 197—206
- 126 Yang Z, Wang X, Diao H, Zhang J, Li H, Sun H, Guo Z. Encapsulation of platinum anticancer drugs by apoferritin. *Chem Commun*, 2007, (33): 3453—3455
- 127 Kratz F, Muller I A, Ryppa C, Warnecke A. Prodrug strategies in anticancer chemotherapy. *ChemMedChem*, 2008, 3(1): 20—53
- 128 Reedijk J. New clues for platinum antitumor chemistry: Kinetically controlled metal binding to DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(7): 3611—3616
- 129 Deubel D V. On the competition of the purine bases, functionalities of peptide side chains, and protecting agents for the coordination sites of dicationic cisplatin derivatives. *J Am Chem Soc*, 2002, 124(20): 5834—5842
- 130 Deubel D V. Factors governing the kinetic competition of nitrogen and sulfur ligands in cisplatin binding to biological targets. *J Am Chem Soc*, 2004, 126(19): 5999—6004
- 131 Casini A, Gabbiani C, Mastrobuoni G, Messori L, Moneti G, Pieraccini G. Exploring metallodrug-protein interactions by ESI mass spectrometry: The reaction of anticancer platinum drugs with horse heart cytochrome c. *ChemMedChem*, 2006, 1(4): 413—417
- 132 Calderone V, Casini A, Mangani S, Messori L, Orioli P L. Structural investigation of cisplatin-protein interactions: selective platination of His19 in a cuprozin superoxide dismutase. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2006, 45(8): 1267—1269
- 133 Lau J K, Deubel D V. Loss of amine from platinum(II) complexes: implications for cisplatin inactivation, storage, and resistance. *Chemistry*, 2005, 11(9): 2849—2855
- 134 Casini A, Mastrobuoni G, Temperini C, Gabbiani C, Francese S, Moneti G, Supuran C T, Scozzafava A, Messori L. ESI mass spectrometry and X-ray diffraction studies of adducts between anticancer platinum drugs and hen egg white lysozyme. *Chem Commun*, 2007, (2): 156—158
- 135 Hahn M, Kleine M, Sheldrick W S. Interaction of cisplatin with methionine- and histidine-containing peptides: Competition between backbone binding, macrochelation and peptide cleavage. *J Biol Inorg Chem*, 2001, 6(5-6): 556—566
- 136 Reedijk J. Why does cisplatin reach guanine-N7 with competing S-donor ligands available in the cell? *Chem Rev*, 1999, 99(9): 2499—2510
- 137 Britten R A, Hardy C, Vlahou A, Gregory B, Giri P S, Drake R. Identification of reproducible low mass SELDI protein profiles specific to cisplatin resistance in human ovarian cancer cells. *Oncol Rep*, 2005, 14(5): 1323—1330
- 138 Le Moguen K, Lincet H, Deslandes E, Hubert-Roux M, Lange C, Poulain L, Gauduchon P, Baudin B. Comparative proteomic analysis of cisplatin sensitive IGROV1 ovarian carcinoma cell line and its resistant counterpart IGROV1-R10. *Proteomics*, 2006, 6(19): 5183—5192
- 139 Yan X D, Pan L Y, Yuan Y, Lang J H, Mao N. Identification of platinum-resistance associated proteins through proteomic analysis of human ovarian cancer cells and their platinum-resistant sublines. *J Proteome Res*, 2007, 6(2): 772—780

Metallomics: An integrated biometal science

GE RuiGuang^{1,2}, CHEN Zhou² & SUN HongZhe^{1*}

1. Department of Chemistry and Open Laboratory of Chemical Biology, The University of Hong Kong, Hong Kong, China;

2. The Laboratory of Integrative Biology, College of Life Sciences, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510006, China

Abstract: Metallomics is an emerging scientific area integrating the research fields related to the understanding of the molecular mechanisms of metal-associated life processes and the entirety of metal and metalloid species within a cell or tissue type. In metallomics, metalloproteins, metalloenzymes and other metal-containing biomolecules in a biological system are referred to as metallomes, similar to genomes and proteomes in genomics and proteomics, respectively. This review discusses the concept of metallomics with a focus on analytical techniques and methods, particularly the so-called hyphenated techniques which combine a high-resolution separation technique (gel electrophoresis/laser ablation, chromatography or capillary electrophoresis) with a highly sensitive detection method as elemental (inductively coupled plasma, ICP) or molecular (electron spray ionization (ESI) or matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI)) mass spectrometry, or nuclear X-ray fluorescence/absorption spectrometry. The applications of these advanced analytical methods in the identification of metallo-/phosphor-/seleno-proteins, probing of relationships between structure and function of metalloproteins, and study of clinically used metallodrugs will be selectively outlined, along with their advantages and limitations.

Keywords: metallomics, metallome, metallodrug, metalloprotein, chemical speciation