

基于液质联用技术的蛋白质-蛋白质相互作用研究进展^{*}

陈玉宛^{a,c} 周雯^{a,c} 李欣蔚^{a,b} 杨开广^{*,a} 梁振^a

张丽华^{*,a} 张玉奎^a

(^a 中国科学院大连化学物理研究所 中国科学院分离分析化学重点实验室 大连 116023)

(^b 大连理工大学 张煜学院 大连 116024)

(^c 中国科学院大学 北京 100049)

摘要 蛋白质-蛋白质相互作用调控着细胞内众多生物过程, 蛋白质间相互作用网络的绘制对解析复杂的生物过程至关重要. 面对生物体中复杂的蛋白质-蛋白质相互作用, 液质联用技术不仅具有灵敏度高的鉴定优势, 还可以对数以千计的蛋白质进行定量分析. 因此, 对目标蛋白质进行富集、标记或共分级的处理后, 结合液质联用技术对蛋白质准确而灵敏的鉴定, 这类技术已被广泛应用于复杂样本中蛋白质-蛋白质相互作用网络的解析. 目前基于液质联用技术的几种常用的方式, 包括亲和纯化质谱方法(AP-MS)、近程标记质谱方法(PDB-MS)、化学交联质谱方法(XL-MS)和共分级偶联质谱方法(CF-MS)等. 本综述讨论了这些方法的基本原理、优点和在细胞内解析蛋白质间相互作用的应用.

关键词 液质联用技术; 蛋白质-蛋白质相互作用; 亲和纯化; 近程标记; 化学交联质谱; 共分级偶联质谱

Research Progress of Protein-Protein Interaction Based on Liquid Chromatography Mass Spectrometry^{*}

Chen, Yuwan^{a,c} Zhou, Wen^{a,c} Li, Xinwei^{a,b} Yang, Kaiguang^{*,a} Liang, Zhen^a
Zhang, Lihua^{*,a} Zhang, Yukui^a

(^a CAS Key Laboratory of Separation Science for Analytical Chemistry, Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, China)

(^b Zhang Dayu School of Chemistry, Dalian University of Technology, Dalian 116024, China)

(^c University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract Protein-protein interactions are involved in the regulation of many biological processes in cells, and the mapping of protein-protein interaction networks is crucial for understanding complex biological processes. Liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) can identify and quantify thousands of proteins simultaneously in complex organisms with its high sensitivity and accuracy. Therefore, after the enrichment, labeling or co-fractionation of target proteins, combined with LC-MS technology to identify proteins accurately and sensitively, such techniques have been widely used in the analysis of protein-protein interaction networks in the complex samples. There are LC-MS-based methods for studying protein-protein interactions, including affinity purification mass spectrometry (AP-MS), proximity-dependent biotinylation coupled to mass spectrometry (PDB-MS), chemical cross-linking with mass spectrometry (XL-MS) and co-fractionation mass spectrometry (CF-MS). This review discusses the mechanism, advantages and applications of these methods for the identification towards the protein-protein interactions in cells.

Keywords LC-MS; protein-protein interactions; affinity purification; proximity-dependent labeling; chemical cross-linking with mass spectrometry; co-fractionation mass spectrometry

1 引言

蛋白质-蛋白质相互作用调节着生物体中多种细胞过程, 例如细胞信号通路的执行、蛋白质复合物的结合

和亚细胞器的连接等. 蛋白质-蛋白质相互作用的研究不仅能够实现全面的蛋白质间相互作用网络的绘制, 更有助于蛋白质功能以及其与配体结合自由能的研究^[1], 对于揭示重大疾病发生发展机制、探索药物靶点具有重

^{*} Dedicated to the 10th anniversary of the Youth Innovation Promotion Association, CAS.

^{*} E-mail: yangkaiguang@dicp.ac.cn; lihuazhang@dicp.ac.cn; Tel.: 0411-84379720; Fax: 0411-84379779

Received January 29, 2022; published March 31, 2022.

Project supported by the National Key R&D Program of China (Nos. 2020YFE0202200, 2018YFA0507703), National Natural Science Foundation of China (Nos. 21874131, 21991082), Innovative Research Funds of Dalian Institute of Chemical Physics (DICP I202030), Talent innovation support program of Dalian (No. 2019CT07) and CAS Youth Innovation Promotion Association (No. Y2021058).

^{*} 庆祝中国科学院青年创新促进会十年华诞.

项目受国家重点研发(Nos. 2020YFE0202200, 2018YFA0507703)、国家自然科学基金(Nos. 21874131, 21991082)、中科院大连化学物理研究所创新基金(DICP I202030)、大连市人才创新支持计划(No. 2019CT07)和中科院“青年创新促进会”(No. Y2021058)资助.

要意义^[2-3].

液质联用技术是当前解析蛋白质-蛋白质相互作用的常用方法. 根据质谱的软电离方式, 蛋白质-蛋白质相互作用的质谱可以分为: 基于电喷雾电离(Electrospray ionization, ESI)质谱^[4]和基于基质辅助激光解吸电离(Matrix assisted laser desorption/ionization, MALDI)质谱^[5], 但是由于 ESI 源质谱与液相色谱(LC)具有更优异的兼容性, 因此 ESI 源成为该项技术中最常用的电离方式^[6]. 以基于 ESI 源质谱的纳流液质联用系统(nano-flow LC-MS/MS)^[7]/微流液质联用系统(micro-flow LC-MS/MS)^[8]解析蛋白质-蛋白质相互作用为例, 其分析的过程如图 1 所示: 第一步获得蛋白质样本; 第二步为蛋白质样品的预处理; 第三步对肽段样品进行 LC-MS/MS 分离检测, 具体过程为色谱分离后的样品经电喷雾接口在 ESI 源处发生“库仑爆炸”, 使液滴转化为带电的气相离子, 随后经质谱检测器进行高分辨和高灵敏的一级谱图和二级谱图的鉴定; 第四步基于 LC-MS/MS 的质谱数据进行蛋白质-蛋白质相互作用的数据解析. 通过液质联用技术检测蛋白质-蛋白质相互作用具有以下优势: (1)能与多种方法手段结合进行蛋白质-蛋白质相互作用检测, 例如亲和纯化方法、近程标记方法、化学交联方法等; (2)通过凝胶电泳或色谱的多维分离, 可以辅助实现复杂样本中数以千计的蛋白质/肽段的高覆盖鉴定; (3)基于 LC-MS/MS 的鉴定方式, 可实现溶液状态下蛋白质的信息鉴定.

基于液质联用的蛋白质-蛋白质相互作用方法, 根据蛋白质样品预处理的不同, 可以分为: 亲和纯化质谱方法(Affinity purification mass spectrometry, AP-MS); 近程标记质谱方法(Proximity-dependent biotinylation coupled to mass spectrometry, PDB-MS); 化学交联质谱方法

(Chemical cross-linking with mass spectrometry, XL-MS)以及共分级偶联质谱方法(Co-fractionation mass spectrometry, CF-MS)等. 本综述将对基于液质联用的蛋白质-蛋白质相互作用解析方法, 从原理、适用范围、优势进行总结.

2 基于液质联用技术的蛋白质-蛋白质相互作用研究流程

基于液质联用的蛋白质-蛋白质相互作用研究的实验流程总体上分为四步: 蛋白质样本获得、样品预处理、质谱鉴定和数据处理.

在蛋白质样本获得方面, 主要有三种方式: (1)对蛋白质进行直接或表位标签标记后经亲和纯化获得. 具体为在 AP-MS 中, 经特定抗体孵育后或经目标蛋白质融合的表位标签表达后的细胞裂解液, 与可特异性结合抗体或表位标签的微球(常用的微球有: Protein A/Protein G 的琼脂糖珠, 链霉亲和素的磁珠)共同孵育以捕获目标蛋白质复合物, 然后经程序洗涤以减少非特异性结合蛋白质, 最后洗脱纯化获得目标蛋白质复合物^[9]. (2)生物素富集后获得. 具体为在 PDB-MS 中, 诱饵蛋白融合生物素连接酶于目标细胞系中表达, 在生物素条件下, 诱饵蛋白表达空间位置附近或具有相互作用的蛋白质被生物素化, 最后通过链霉亲和素对细胞裂解后的生物素化蛋白质进行亲和纯化^[10]. (3)化学交联剂标记蛋白质之后直接或经富集获得. 具体为在 XL-MS 中, 交联剂对蛋白质、分离的亚细胞器、细胞、组织或其他生物样本交联后, 直接或经富集获得交联剂标记的蛋白质样本^[11].

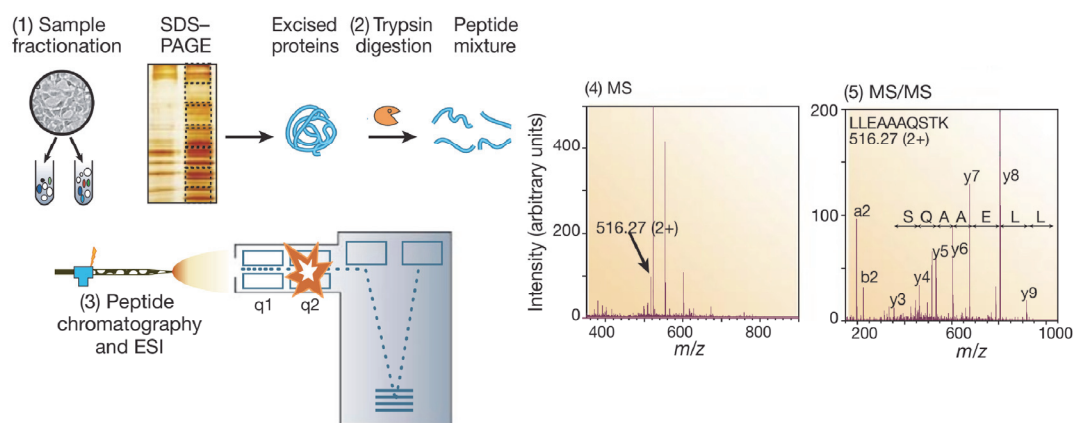


图 1 基于 ESI 源的液质联用系统(LC-MS/MS)的蛋白质-蛋白质相互作用鉴定的实验流程图. (1)蛋白质样品的提取; (2)蛋白质被胰蛋白酶水解为肽段; (3)肽段样品经 LC-MS/MS 被洗脱及离子化; (4)通过一级质谱检测洗脱肽; (5)通过二级质谱检测洗脱肽. 已获得文献[6]的转载许可, 版权所有 2003 Springer Nature

Figure 1 Experimental flow chart of liquid chromatography coupled with ESI mass spectrometry (LC-MS/MS) for studying protein-protein interactions. (1) Extraction of protein samples; (2) proteins are hydrolyzed into peptides by trypsin; (3) peptide samples were eluted and ionized in LC-MS/MS; (4) MS₁ mass spectra of spot-eluted peptides (5) tandem or MS/MS spectra of partially selected peptides. Reprinted with permission from ref. [6]. Copyright 2003 Springer Nature

在复杂蛋白质样品的预处理方面, 由于目前基于液质联用的蛋白质-蛋白质相互作用鉴定主要是基于肽段水平的鉴定, 因此蛋白质的酶解和肽段分离是此方面的重点, 此外由于蛋白质-蛋白质相互作用定量的需要, 常常还包括肽段水平或蛋白质水平的标记^[12]. 基于肽段水平的鉴定是通过具有特异性切割位点的蛋白酶将复杂的蛋白质混合物水解为肽段混合物(常用的蛋白质水解酶为胰蛋白酶), 酶解后的肽段经质谱检测及搜库匹配到相对应的蛋白质. 在 XL-MS 中, 交联后的蛋白质因赖氨酸被反应后, 其 C 末端不能被 trypsin 酶切, 故通过常规酶解方式得到的交联肽比普通肽长, 因此不利于质谱鉴定和数据检索, 造成交联位点鉴定覆盖度低的问题. 张丽华团队^[13]发展了原位顺序酶切的方法以增加交联肽的位点鉴定覆盖度, 具体为在 trypsin 酶切之前用其他位点水解酶酶切(例: AspN, LysC, GluC), 通过补充/增强正交酶切的方式提高交联位点的鉴定覆盖度. 为了实现酶解后复杂蛋白质混合物的高覆盖度鉴定, 需要结合凝胶电泳或高效液相色谱对样品进行分离以降低样品的复杂度, 在此常用的色谱分离模式有: 尺寸排阻色谱(SEC)、离子交换色谱(IEX)、强阳离子色谱(SCX)、强阴离子色谱(SAX)、以及疏水相互作用色谱(HIC)等^[14]. SEC/IEX/HIC 可以实现在生理状态下分离生物化学/生物物理性质相似的蛋白质, 因此常被用于 CF-MS 方法中通过依靠分子量/电荷/亲水性的分离以增加蛋白质-蛋白质相互作用鉴定覆盖度^[14]. 面对蛋白质-蛋白质相互作用构象区域的变化鉴定时, 需要结合质谱的定量方法确定. 相比于无标定量方法, 基于同位素标记的蛋白质定量方法需在肽段水平或蛋白质水平进行氨基酸的同位素标记以定量检测肽段或蛋白质相对含量的变化^[6](例: 蛋白质在细胞生长状态下(¹⁵N-盐, ¹³C-标记的氨基酸)进行代谢同位素标记, 或在酶切水解过程中进行羧基 ¹⁸O 标记).

在蛋白质-蛋白质相互作用的鉴定方面, 质谱将蛋白质/肽段进行气相离子化, 并通过质量分析器对分析离子的质荷比(m/z)进行鉴定. 主要的电离方式为电喷雾电离(ESI)和基质辅助激光解吸电离(MALDI). ESI 是通过液滴的“库伦爆炸”离子化, 可实现溶液状态下的相互作用蛋白质/肽段的检测. MALDI 是通过激光脉冲从干燥的结晶基质中升华和电离样品, 可用于蛋白质指纹图谱/相对简单肽混合物的鉴定. 用于蛋白质-蛋白质相互作用研究的质谱质量分析器有四种: 基于离子飞行时间差异的飞行时间质谱分析器(TOF), 基于特定所需质荷比离子筛选的四极杆质量分析器, 基于电磁场限定有限空间内运动离子的离子阱, 以及基于傅立叶算法和强磁场分离的傅立叶变换离子回旋共振. 近几十年来, 随着质谱仪的发展, 其分析精度和分辨率也越来越高, 以商品化的 Orbitrap Eclipse™三合一质谱仪为例, 其质荷比(m/z)分配精确性优于质谱的质量偏差, 其以超高分辨率(m/z 200 下为 1,000,000 FWHM)获得质量测量值.

在蛋白质-蛋白质相互作用数据处理方面, 通过搜索引擎对质谱数据进行质量控制和定性检索, 利用具有数据库搜索功能的软件(例: MaxQuant^[15], SEQUEST^[16]和 ProteinPilot™)对复杂样品进行高通量分析. 检索所需的常规蛋白质数据库通过 UniProt 或 NCBI 获得, 对一些特定蛋白质的检索可从特定的数据库获得, 如针对线粒体蛋白质的 Mitocarta3.0^[17]数据库和植物基因的 Phytozom 数据库. 在 XL-MS 中, 酶解得到的交联肽具有组合更丰富、谱图更复杂和数据搜索空间呈指数增长的特点, 一些具有专用计算算法的检索软件(例: pLink^[18], XlinkX^[19]和 Kojak^[20])应运而生. 通过数据集成成的计算方法对检索结果中的蛋白质-蛋白质相互作用进行归类分析, 其中相互作用组的显著性分析(SAINT)的统计方法^[21]常被用于对 AP-MS 实验中的蛋白质-蛋白质相互作用数据进行概率评分. 最后, 鉴定到的相互作用网络通过软件进行可视化展示, Cytoscape 是常用的蛋白质-蛋白质间相互作用的可视化软件; xiNET^[22]、Pro XL^[23]以及 XLinkDB^[24]是相互作用交联残基网络的可视化分析软件.

3 基于亲和纯化质谱的蛋白质-蛋白质相互作用研究

亲和纯化质谱(AP-MS)是常用的检测蛋白质-蛋白质相互作用的方法, 它可特异性识别诱饵蛋白的相互作用蛋白质并对其进行选择性富集. 通过负载于固体支撑物上的配体特异性识别诱饵蛋白, 经洗脱后通过质谱方法对诱饵蛋白及相互作用蛋白进行鉴定(图 2). 该方法具有对目标蛋白及其互作蛋白选择性亲和纯化的特点, 根据是否需要对目标蛋白进行额外修饰, 又可以细分为: 基于天然抗体亲和纯化的免疫沉淀串联质谱分析方法(Immunoprecipitate Mass spectrometry, IP-MS), 以及基于表位标签融合表达的亲和纯化质谱分析方法^[9].

IP 是验证蛋白质-蛋白质相互作用的经典方法, 近年来传统的 IP 结合质谱方法也逐渐应用于复杂样本中内源性蛋白质-蛋白质相互作用的规模化解析. 因生物学研究在阐明细胞内源性蛋白质-蛋白质相互作用及其网络的需要, Malovannaya 等^[25]使用 1796 种一抗进行了 3290 次免疫共沉淀实验, 每组实验蛋白经过一维凝胶分离后, 再酶解, 利用 LC/LC-ESI-linear trap quadrupole (LTQ)鉴定到约 300,000 个蛋白. 该规模化的 IP-MS 数据集包含尚未报道的蛋白质间联系(例: ZMYND8, ZNF687 和 ZNF592 组成的一个转录网络); 一些相互作用网络中通过共同鉴定的蛋白质解释了分层的相互作用信息, 包括最小内源模块组成的细胞蛋白质组, 核心复合体的异构体和复合体与复合体相互作用网络信息三层面的信息. 该研究结果补充了相关基因组与转录调节蛋白间的空白, 为进一步研究共同调节蛋白参与人类多基因疾病的发展提供了数据平台. 尽管 IP-MS

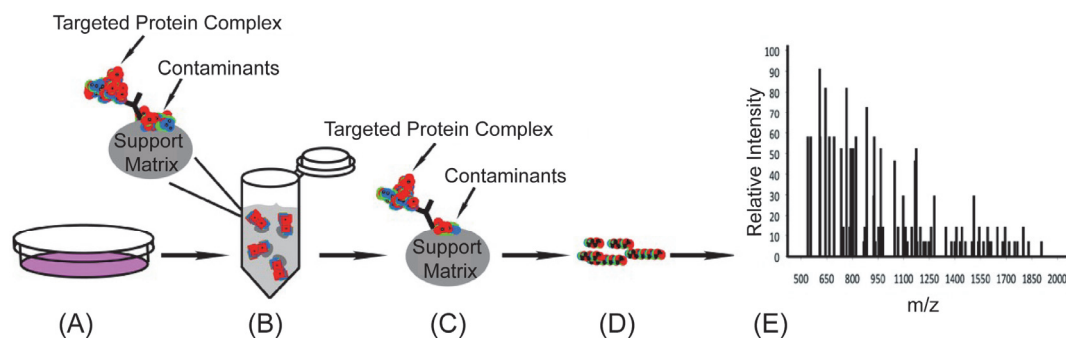


图 2 亲和纯化结合质谱技术(AP-MS): (A)培养和收获表达目标蛋白质的细胞(或者组织匀浆细胞), (B)通过靶向蛋白质本身或表位标签亲和纯化蛋白质, (C)洗涤非特异性蛋白质, 获得目标蛋白质, (D)用蛋白酶消化目标蛋白质, (E)液相色谱法分离得到的肽并用质谱法鉴定. 可以并行分析对照组样品(对照组: 与无关蛋白质融合的表位标签表达的细胞), 以鉴定与表位标签或亲和基质相互作用的蛋白质. 已获得文献[9]的转载许可, 版权所有 2012 John Wiley and Sons

Figure 2 Affinity purification mass spectrometry (AP-MS): In a generic AP-MS experiment: (A) Culture and harvesting the cells expressing a protein of interest; (B) purification of the protein by an affinity reagent or an epitope tag; (C) washing nonspecific proteins; (D) digestion of the target protein with the protease; (E) separation by liquid chromatography and identification by mass spectrometry towards the above mentioned resulting peptides. Control experiments (e.g. cells expressing an epitope tag fused to an irrelevant protein) can be analyzed or processed in parallel to identify proteins that interact with the epitope tag or affinity matrix. Reprinted with permission from ref. [9]. Copyright 2012 John Wiley and Sons

可以对生理水平的未标记诱饵蛋白进行内源性蛋白质-蛋白质间相互作用表征, 但它存在抗体库和诱饵蛋白表达水平低的问题.

AP-MS 是一种基于改进的样品富集和色谱分离的方法. 相比传统的 IP-MS, AP-MS 将感兴趣的基因与表位标签(Epitope tag)进行融合, 然后在选定的细胞系中高表达, 利用标记外源蛋白质的亲和纯化(AP)与串联质谱(MS)相结合, 能够从数十到数千种不同“诱饵蛋白”实验中分离和表征稳定的相关蛋白质组成(图 4). 在 AP-MS 中最常用的表位标签包括肽类标签 FLAG^[26]、C-myc^[27]、His-Tag^[28]和 Strep-tag II^[29]; 蛋白质类标签 GST^[30]、GFP^[31]和 ProteinA^[32]; 多重肽标签 FLAG-HA^[33]等. 表位标签标记至编码蛋白质的 DNA 序列中的 C 端或 N 端, 该序列与诱饵蛋白一起转录并且包含一个标签, 可以使用亲和树脂对标签进行分离. 每个标签基于不同性质以特定条件进行洗脱和释放, 例: FLAG 可以被肠激酶切割从而释放靶标蛋白; Protein A 在低 pH 变性条件下可从与基质结合的 IgG 中释放出来; Strep-tag II 可通过对链霉亲和素和素琼脂糖上脱硫生物素二硫键的断裂进行洗脱. 表位标签融合目标蛋白质的亲和纯化方法存在诱饵蛋白过表达问题, 从而导致蛋白质纯化处于非天然表达水平下. Rigaut 等^[34]构建了高结合力的串联亲和纯化(TAP)标签, 该标签融合了编码钙调素结合肽(CBP)、烟草花叶病毒(TEV)蛋白酶识别位点和金黄色葡萄球菌蛋白 A(ProtA), 实现了在近天然表达水平下目标蛋白的亲和纯化. 表达融合 TAP 标签的目标蛋白经亲和树脂结合 ProtA 第一次纯化, 在 TEV 蛋白酶选择性酶切条件下分离蛋白质复合物, 随后经包被钙调蛋白的树脂二次亲和纯化, 通过螯合试剂竞争性洗脱靶向蛋白质复合物, 最后通过质谱分析确定天然环境中的蛋白质复合物.

Dunham 等^[35]使用 FLAG 标记的四种明确生物学功能和不同亚细胞分布的诱饵蛋白(COPS5, eIF4A2, RAF1, MEPCE), 利用多维色谱进行样品分离(蛋白样品经 SDS-PAGE 分离后胶上酶解, 或酶解为肽段后经强阳离子交换色谱或碱性 pH 下的反相色谱分级)和不同扫描速度的质谱仪(LTQ 质谱、LTQ-Orbitrap 质谱或 TripleTOF 5600 质谱), 分别探究两种因素对于蛋白质相互作用鉴定数目的影响. 在这一研究中, 更快扫描速率的质谱仪(TripleTOF 5600 质谱)和与多维分离相结合的 LTQ 质谱仪获得相似的鉴定数目. 随着快速扫描质谱仪的扫描速度提高, AP-MS 样品的多维分级的优势可能会进一步降低. 该研究为 AP-MS 方法高覆盖度鉴定蛋白质间相互作用提供了指导. 除了对 AP-MS 方法优化建立, Gururharsha 等^[33]将 AP-MS 方法用于解析果蝇蛋白质复合物网络. 研究者使用 FLAG-HA 表位标签标记了 4273 种黑腹果蝇蛋白质, 经过 3488 次单独的亲和纯化共鉴定出 4927 种黑腹果蝇蛋白质, 确定了黑腹果蝇中 556 种蛋白质复合物内的蛋白质-蛋白质相互作用图谱(DPiM), 其涉及 2240 种蛋白质. 利用该图谱, 该团队定义了蛋白酶体和 SNARE 复合物(可溶性 NSF 附着蛋白受体)的潜在亚基成员, 并为 586 种先前缺乏实验注释的蛋白质编码基因提供了经验证据和功能验证. 该研究为分析果蝇蛋白质复合物进化提供了最大的蛋白质复合物网络图谱, 其高质量的数据为果蝇蛋白质组提供了范式.

AP-MS 也存在一定的限制, 首先, 它需要比通常 MS 实验更温和的裂解条件; 其次, 亲和质谱需裂解细胞后纯化诱饵蛋白和其相互作用蛋白质, 会使蛋白质失去细胞膜的天然局限环境, 并且稀释蛋白质浓度可能造成一些瞬态或者弱相互作用的丢失. 更多地, 因为蛋白质与抗体或固体基质的非特异性结合, 因此 AP-MS 在

诱饵蛋白鉴定时会不可避免地存在“假阳性”的污染蛋白质。

4 基于酶催化近程标记质谱的蛋白质-蛋白质相互作用研究

基于酶催化邻近标记的蛋白质组检测方法(PDB-MS)是一项与AP-MS互补的方法,该方法将目标蛋白与工具酶融合,酶催化产生的高反应活性小分子共价标记一定空间距离的蛋白质(10~20 nm)^[36-38],从而实现相互作用蛋白质的捕获。融合诱饵蛋白所使用的酶包括辣根过氧化物酶(HRP)、混杂生物素连接酶(BirA*/BioID)和工程改造的抗坏血酸过氧化物酶(APEX)(图3)。基于上述酶催化的PDB-MS已成功用于活细胞表面、胞内和亚细胞区室的蛋白质-蛋白质相互作用组的绘制。

Kotani等^[39]于2008年发展了酶介导的自由基源激活(EMARS)方法,利用辣根过氧化物酶(HRP)偶联的抗体或HRP融合蛋白于宿主细胞或生物体中表达,在芳基叠氮化物-生物素试剂存在情况下,HRP会产生一种活性自由基物质,标记距离酶约200~300 nm范围内的蛋白质^[39],该方法用于识别活细胞表面蛋白质-蛋白质相互作用。HRP融合蛋白的细胞表达已被用于研究活细胞表面脂筏中糖基磷脂酰肌醇锚定蛋白和受体酪氨酸激酶(RTK)之间的关联^[10,40]。辣根过氧化物酶(HRP)常用于在细胞表面进行邻近标记,在动物细胞质中表达时,其活性是丧失的,因此其使用范围受限。

Roux等^[41]于2012年发展了BioID方法,基于大肠

杆菌中的混杂生物素连接酶BirA*(R118G位点被突变)融合诱饵蛋白,以标记和筛选发生在活细胞内的靠近诱饵蛋白的蛋白质中的伯胺(例:赖氨酸),反应过程约18~24 h。随后,该团队于2016年发展了基于更小的混杂生物素连接酶变体的BioID2^[42]方法,通过将已知最小的生物素连接酶*A. aeolicus*进行人源化并突变了生物素催化结构域(R40G)内的一个保守残基,以实现混杂的生物素化。BioID2可以在更少的生物素下(0.1 $\mu\text{mol/L}$ 生物素,同等条件下BioID需1 $\mu\text{mol/L}$ 生物素)选择性生物素化融合诱饵蛋白的相互作用蛋白,并且能够增强邻近蛋白的标记且缩短标记时间至16 h。Antonicka等^[43]用BioID方法对活细胞中线粒体的相互作用网络进行了全方面的绘制。该方法选择了100种线粒体诱饵蛋白,对线粒体亚区室的所有蛋白进行生物素化。LC-MS/MS共鉴定了1465种蛋白质,绘制出包含15626种独特且高置信度的蛋白质-蛋白质相互作用的网络图。该相互作用网络图能够涵盖大约一半的线粒体蛋白质,将蛋白质分配至功能簇和特定模块能够发现双重定位的蛋白质和细胞质蛋白质与其他细胞器膜蛋白质的特定相互作用。由于Bio-ID标记具有简单、无毒的特点,且在生物素存在的情况下即可标记活细胞内蛋白质-蛋白质相互作用组,现已被广泛用于酵母^[44]、植物原生质体^[45]、哺乳动物细胞^[46]甚至活体小鼠^[47]内蛋白质-蛋白质相互作用解析。

Rhee等^[48]于2013年发展了APEX方法,在活细胞中,使用可遗传靶向的工程改造的抗坏血酸过氧化物酶,在一定 H_2O_2 和生物素苯酚的条件下,催化产生短寿命、高反应性和不透膜的自由基(生物素苯酚自由基),

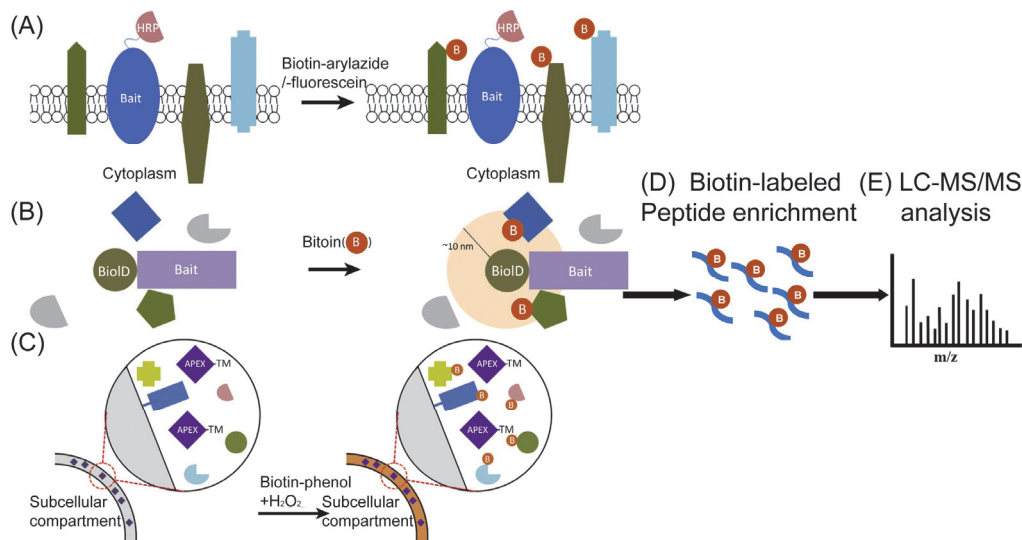


图3 基于酶催化近程蛋白标记技术。(A)基于辣根过氧化物酶(HRP)的近程蛋白标记鉴定方法;(B)基于生物素连接酶的近程蛋白标记鉴定方法(BioID);(C)基于工程改造的抗坏血酸过氧化物酶(APEX)的近程蛋白标记鉴定方法。(D)生物素化肽段的富集。(E)液质联用质谱分析。已获得文献[10]的转载许可,版权所有 2016 Elsevier

Figure 3 Several approaches are based on enzymatic proximity labeling of target proteins. (A) Horseradish peroxidase (HRP)-based method for labeling proximal proteins; (B) the approach for biotin identification (BioID) using a promiscuous biotin ligase fused to a bait protein; (C) engineered ascorbate peroxidase (APEX)-based method for labeling proximal proteins approach. (D) Biotin-labeled Peptide enrichment. (E) LC-MS/MS analysis. Reprinted with permission from ref. [10]. Copyright 2016 Elsevier

进而在 1 min 的时间范围、<20 nm 的空间范围对蛋白质中富含电子的氨基酸(例: 酪氨酸、色氨酸、组氨酸和半胱氨酸)进行生物素化标记, 标记的蛋白质经纯化后, 最终通过 LC-MS/MS 进行鉴定. 研究者使用这种方法鉴定到人类线粒体基质中的 495 种蛋白质, 其中包括 31 种新发现的线粒体蛋白质. APEX 对于线粒体蛋白质的标记特异性强并且可以区分面向基质的内膜蛋白质与膜间隙(IMS)蛋白质. 针对第一代 APEX 在较低浓度下无法生物素化和较高浓度时对细胞器扰动较大的问题, APEX2^[49]使用酵母表面展示方法和流式细胞荧光分选方法(FACS), 经过三轮筛选得到 A134P 的 APEX 突变体, 实现了更强的活性, 即在较低的 APEX2 表达下可以实现较高的生物素化活性并能通过生物电镜表征蛋白质的定位. 除此之外, APEX2 还展示出对内源性线粒体和内质网膜蛋白质的较好富集能力. APEX 方法依赖 H₂O₂ 与生物素苯酚产生自由基, 以实现活细胞中线粒体蛋白质组的标记和相互作用蛋白质的鉴定, 但 H₂O₂ 对细胞具有一定生理毒性.

为了发展更快和生物相容性更好的标记策略, Brannon 等^[50]在 BioID 酶的基础上结合 APEX2 中酵母表面展示方法和流式细胞荧光分选方法(FACS), 发展了 TurboID 和 miniTurbo 方法(两个混杂的连接酶: 35 kD TurboID 相对于野生型 BirA 有 15 个突变; 28 kD miniTurbo 的 N 端结构域被删除, 相对于野生型 BirA 有 13 个突变). 该方法可以实现低毒性和更快的生物素递送, 能够在 10 min 内实现细胞内近程标记. Cho 等^[51]随后发展了 split-TurboID 方法将 TurboID 酶分成两个无活性的片段. 这些片段在细胞中共表达, 当蛋白质-蛋白质相互作用或细胞器/膜-膜接触时, TurboID 酶活性被重建. 在内质网-线粒体的接触位点, 重组的 TurboID 催化空间受限的蛋白质生物素化, 富集和鉴定到超过 100 种内源性蛋白质, 其中包括许多以前未观察到的与内质网-线粒体接触相关的蛋白质.

近程标记鉴定到的互作蛋白是细胞内与诱饵蛋白天然互作的, 符合体内真实生理情况, 可信度高; 并且弱结合蛋白和瞬时互作蛋白也能被检测到. 但是, 该方法不能区分直接相互作用和间接相互作用; 最后, 诱饵蛋白的互作蛋白质中如果不含可被酶催化标记的氨基酸位点(例: 伯胺或富含电子的氨基酸)则不能被生物素化, 其无法检测.

5 基于化学交联质谱的蛋白质-蛋白质相互作用研究

化学交联质谱(XL-MS)是根据蛋白质残基之间的距离约束以解析蛋白质复合物结构和相互作用信息的方法. 该方法通过化学交联剂将空间距离较近的蛋白质残基位点以共价键的形式连接, 结合质谱鉴定方法解析交联肽的氨基酸序列和修饰的残基位点(图 4). 随着

XL-MS 方法的进步, 该方法不仅能实现对蛋白质复合物的鉴定, 还被应用于复杂的生物样本(例: 细胞裂解液、完整细胞或组织层面)的交联, 进而解析整体的蛋白质-蛋白质相互作用. 近年来, 能够反映天然环境中蛋白质信息的体内化学交联质谱(In vivo XL-MS)获得了广泛关注^[11].

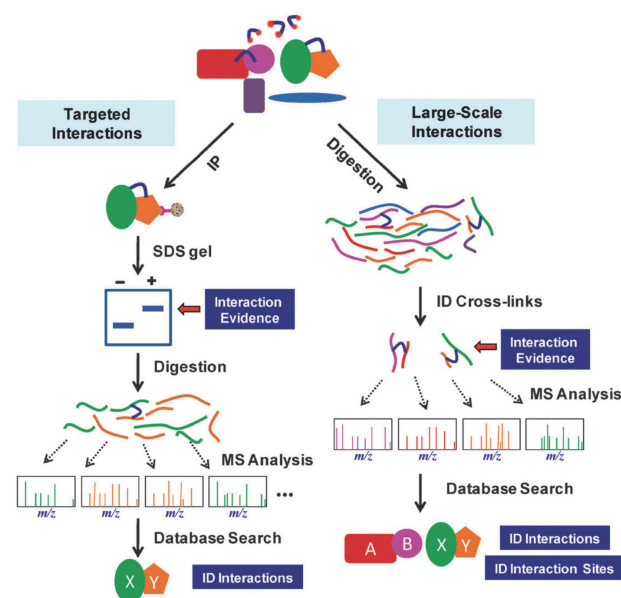


图 4 化学交联质谱鉴定蛋白质-蛋白质相互作用: 特定的蛋白质-蛋白质相互作用鉴定和大规模蛋白质-蛋白质相互作用鉴定. 已获得文献[54]的转载许可, 版权所有 2010 Royal Society of Chemistry
Figure 4 Identification of protein-protein interactions by chemical cross-linking with mass spectrometry: identification of targeted protein-protein interactions and identification of large-scale protein-protein interactions. Reprinted with permission from ref. [54]. Copyright 2010 Royal Society of Chemistry

化学交联反应的核心是交联剂, 交联剂由连接臂和其连接的两个或多个反应性基团组成. 交联剂根据反应性基团可归类为: 针对蛋白质伯胺的胺类交联剂(例: *N*-羟基琥珀酰亚胺酯)、针对蛋白质巯基的巯基类交联剂(例: 顺丁烯二酸亚胺)和针对蛋白质多种类型基团且具有高活性的光敏交联剂(例: 氮烯或碳烯化合物). *N*-羟基琥珀酰亚胺酯类交联剂是目前使用最广泛的交联剂, 具有反应效率高和副产物少的特点(例: DSS, BS3, DSSO 和 PIR)^[52]. 交联剂的臂长被用作“标尺”, 用于估计它所连接的两个氨基酸残基之间的距离. 多数交联剂的臂长在 1.0~1.5 nm 之间, 连接臂的长度越长, 越易于生成丰富且距离约束较宽的交联位点, 更适于蛋白质-蛋白质相互作用的研究(例: 具有 4.3 nm 连接臂长的 PIR)^[52].

交联蛋白质经特异性酶水解后, 可获得三种类型的交联肽: (1) Inter 型交联肽(交联剂两端连接两条肽段); (2) Intra 型或 Loop 型交联肽(交联剂两端连接同一条肽段); (3) Mono 型交联肽(交联剂只一端连接肽段)^[53], 其中仅 Inter 型交联肽提供蛋白质-蛋白质相互作用的信息.

由于复杂蛋白质混合物中交联肽具有低丰度的特点,所以当前许多研究工作致力于交联剂的功能化修饰,以实现低丰度交联肽的准确鉴定,这其中包括了同位素标记、亲和标签和质谱可碎裂基团的修饰^[54]。Bruce 课题组^[54]在 2005 年发展了 PIR 交联剂用来研究生物体内的蛋白质-蛋白质相互作用。该交联剂由胺反应功能团、用于富集的亲和标签(生物素)和选择性不稳定键(碰撞激活(CID)或光激活裂解)构成。其中,用于富集的亲和标签(生物素),可从复杂的蛋白质和酶消化样品中富集低丰度的交联产物;选择性不稳定键(一般为天冬氨酸和脯氨酸连接键),用来释放完整的交联肽和质谱分析报告离子(交联肽释放后残留生物素标签的特征离子片段),以利于交联肽可被常规数据检索软件进行鉴定。

XL-MS 已广泛应用于生物体内蛋白质-蛋白质相互作用规模化网络解析,包括酵母、细胞以及亚细胞器。Bartolec 等^[55]用质谱可断裂交联剂双琥珀酰亚胺亚砷(DSSO)对完整的酵母细胞核进行交联,并使用混合 MS2-MS3 方法进行分析,该方法鉴定到的相互作用约一半是没有被酵母双杂交或 AP-MS 方法检测到的,作者推测 XL-MS 作为一种测量相互作用的有力手段,可对酵母双杂交和亲和纯化方法得到的相互作用信息进行补充。在细胞层面上, Wheat 等^[56]通过其构建的多功能质谱可碎裂交联剂 (Alkyne-A-DSBSO)与样品制备策略和高分辨率质谱相结合平台,成功构建出迄今最大的体内蛋白质-蛋白质相互作用网络,包括 2484 种蛋白质之间的 6439 个相互作用。该工作标志着系统级体内蛋白质-蛋白质相互作用映射方法的进步,并且可以将其推广用于绘制任何生物体中的蛋白质-蛋白质相互作用图谱。在亚细胞器层面上, Schweppe 等^[57]首先将 PIR 用于分离的小鼠心脏中线粒体蛋白质相互作用网络绘制,共鉴定到 327 个线粒体蛋白质之间的 459 个相互作用,这些信息提供了电子传递链复合物 I-III 组装的直接物理证据,并能够预测复合物的原位界面区域。随后, Ryl 等^[58]用 DSS(双琥珀酰亚胺辛二酸酯)实现人源细胞中分离线粒体的相互作用网络的绘制。Linden 等^[59]用 BS3 揭示了甘油和葡萄糖条件下酿酒酵母线粒体中的蛋白质-蛋白质相互作用信息,还用稳定同位素标记的 BS3 对蛋白质-蛋白质相互作用进行定量分析。

XL-MS 也用于解析植物蛋白界面的相互作用, Albanese 等^[60]通过两种臂长互补的化学交联剂 EDC (1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐)与 DSSO,结合冷冻电镜方法探究了不同光照条件下豌豆成对的 PSII-LHCIIsc 在基质间隙的相互作用细节,解决了因复合物埋藏在生物膜中而解析困难的问题,并且很好地区分出了高序列相似性的 Lhcb2 和 Lhcb1 亚基。鉴定到的交联肽大多涉及 PSII-LHCIIsc 的柔性区域,且 35%~45%分布于暴露在基质的 LHCII N 端环,根据紧密构成的 N 端环网络推测 Lhcb2 定位于 S-trimer 内。通过化学交联鉴定化学计量亚基和具有柔性区域的蛋白质结构

细节,对于推进完整蛋白质的深入分析具有重要意义。

与其他方法相比,化学交联质谱方法的一个显著优势是可以在细胞裂解之前,通过共价键稳定蛋白质-蛋白质相互作用,能一定程度保留天然、弱和瞬时相互作用,并揭示它们的物理相互作用,从而确定细胞中相互作用蛋白质的成员、位点以及界面信息。目前化学交联质谱方法已经能够与其他方法相结合,以提供蛋白质-蛋白质相互作用的界面信息。

6 基于共分级偶联质谱的蛋白质-蛋白质相互作用研究

共分级偶联质谱(CF-MS)是通过分析具有相似共分级特征的蛋白质以研究蛋白质-蛋白质相互作用的方法。在 CF-MS 中,细胞裂解液中的蛋白质复合物在非变性条件下先通过色谱或电泳方法分离,然后再用 LC-MS/MS 进行分析,对其蛋白质组的组成进行识别和定量。该方法有可能在一次实验中测量数千种蛋白质复合物,是近年来蛋白质相互作用组绘制的有力工具。

CF-MS 运用了蛋白质相关性分析(PCP)的概念,该概念最初是用于亚细胞器蛋白质组的绘制,以识别新的细胞器蛋白质。在该方法中,通过梯度密度离心的方法进行样本的分离,然后经质谱鉴定所有亚细胞成分的蛋白质^[61]。CF-MS 通过分子量/电荷/亲疏水性的差异,将生物化学/生物物理性质相似的蛋白质在生理状态进行分离,对每个馏分进行串联质谱鉴定,通过算法对鉴定结果相似性进行评分(例:蛋白质定量、质量控制、预处理和洗脱曲线),以推断分析蛋白质-蛋白质相互作用。Havugimana 等^[62]采用了非变性多重离子交换高效液相色谱(IEX-HPLC)与互补的蔗糖梯度离心和等电聚焦相结合的方法,对总共 8 个核提取物和 5 个细胞溶质提取物进行分离实验,获得 1163 个不同的级分,并利用串联质谱法进行定量分析。该结果系统地识别了 3006 种稳定相关的、可溶性人类蛋白质之间 13993 种高可信物理相互作用,报告了 622 种假定蛋白质复合物,并且其中多数与核心生物过程有关,还提供了候选疾病基因和未注释的蛋白质以解析机制。由于目前 CF-MS 对实验条件(例:分级的数目或生物重复次数)和结果数据分析没有明确的标准, Skinnider 等^[63]开展了元分析(Meta-analysis),定义了共分馏质谱实验设计和分析原则。研究者重新分析了来自 206 次 CF-MS 实验的原始 MS 数据,涵盖 12000 个馏分,产生了超过 1100 万个蛋白质定量的资源,并且根据数据分析提出了关于 CF-MS 实验设计的具体建议,为 CF-MS 研究的设计和分析建立了明确的标准。

CF-MS 是一种在天然或接近天然条件下解析具有生化/生物物理联系的蛋白质间相互作用的方法,理论上该方法适用于任何生物模型。但是,该方法仅提供蛋白质-蛋白质相互作用间接证据,还需要其他方法对

其阳性结果进行验证.

7 总结与展望

在这些方法中(表 1), AP-MS 是鉴定蛋白质-蛋白质相互作用的经典方法, 以捕获和识别与诱饵蛋白直接和间接结合的蛋白. IP 纯化是利用在生理水平表达的未标记诱饵蛋白来表征内源性蛋白质-蛋白质间相互作用; 对于缺乏天然抗体的目标蛋白, 表位标签标记蛋白的亲亲和纯化方式提供了一种补充研究蛋白质复合物的方式. 但在亲和纯化洗脱的过程中, 一些弱结合的相互作用可能会丢失, 随后发展的 TAP 标签或串联亲和纯化的方法, 使 AP-MS 实现了正常生理环境表达下的蛋白质-蛋白质相互作用的研究.

随后发展的 PDB-MS 方法是对 AP-MS 的一种补充, 在活细胞中利用酶催化近程标记诱饵蛋白的邻近蛋白, 展现出对瞬时、微弱、低丰度或高周转相互作用捕获的优势. 辣根过氧化物酶(HRP)介导的自由基源激活(EMARS)方法, 被用于识别活细胞表面分子相互作用. 不受细胞局限的 BioID 和 APEX 方法被应用于多种生物体的活细胞内蛋白质-蛋白质相互作用或活细胞线粒体中蛋白质-蛋白质相互作用的解析. 因 BioID 标记时间久和 APEX 依赖于对细胞存在一定毒性的 H_2O_2 , 标记速度更快和生物相容性更好的 TurboID 和 miniTurbo 方

法应运而生, 能在 10 min 内实现细胞内近程标记并被用于细胞器膜间相互作用的研究.

XL-MS 是研究蛋白质结构和相互作用的强大方法, 可以通过交联剂与蛋白质残基形成化学键稳定蛋白质-蛋白质相互作用. 相比于其他方法, XL-MS 不仅提供蛋白质-蛋白质相互作用信息, 还能提供相互作用位点信息以及一定的距离约束信息. 随着功能化的交联剂及其对应交联方法的开发, XL-MS 已经广泛应用于生物体的蛋白质-蛋白质相互作用的规模化分析之中. 体内化学交联质谱(In vivo XL-MS)因能反映天然环境中体内的蛋白质信息而获得了广泛关注, 并成为研究生物体天然环境内蛋白质-蛋白质相互作用的重要方法.

CF-MS 依赖相关算法从蛋白质的共定位和共聚集数据推断蛋白质间相互作用, 但不提供物理相互作用的直接证据. 在 CF-MS 中, 一些低丰度蛋白的相互作用存在检测不到的情况, 并且为了得到更高的分辨率和覆盖率, 该方法需要较高的色谱分离馏分数.

生物体中天然状态下的蛋白质信息的解析一直广受关注, 如生物正交反应技术的发展^[64], 其能够在不干扰生物体天然生物化学过程进行化学反应. 目前对于蛋白质-蛋白质相互作用的研究, 本综述中各个方法的发展也趋向于解析天然状态下的蛋白质-蛋白质相互作用信息, 如 AP-MS 中的 TAP 标签对于天然生理状态下的

表 1 基于液质联用技术的蛋白质-蛋白质相互作用检测方法、原理及过程

Table 1 LC-MS-based protein-protein interaction detection method, principle and process

基于液质联用技术的蛋白质-蛋白质相互作用检测方法	蛋白质-蛋白质相互作用的捕获原理	蛋白质-蛋白质相互作用的解析过程	参考文献
亲和纯化质谱(AP-MS)	基于抗体的免疫共沉淀(IP)纯化	通过天然抗体对生物样本中的未修饰的天然蛋白质进行亲和纯化, 结合串联质谱解析内源性蛋白质-蛋白质相互作用.	[9,25-35]
	基于表位标签(Epitope tag)标记的诱饵蛋白的亲亲和纯化(AP)	通过在宿主生物体中高表达的融合目标蛋白的表位标签, 对目标蛋白进行亲和纯化, 结合串联质谱, 可解析数千种“诱饵蛋白”的相互作用. 通过在宿主生物体中以天然水平表达的融合目标蛋白的串联亲和和标签(TAP), 对目标蛋白进行两次亲和纯化, 结合串联质谱, 可实现对天然表达水平的目标蛋白相互作用解析.	
近程标记质谱(PDB-MS)	基于酶催化的近程标记策略(生物素连接酶(BirA*/BioID), 辣根过氧化物酶(HRP)和抗坏血酸的过氧化物酶(APEX)融合的诱饵蛋白)	通过 HRP 偶联的抗体或 HRP 融合蛋白表达于宿主细胞或生物体, 在芳基叠氮化物-生物素试剂存在情况下, 标记距离酶约 200~300 nm 范围内的蛋白质, 对生物素化的蛋白质亲和纯化, 结合串联质谱鉴定蛋白质-蛋白质相互作用.	[10,36-51]
		通过混杂的生物素连接酶 BirA*融合诱饵蛋白, 在生物素和 ATP 存在下标记(约 16~24 h), 对其邻近蛋白质上(约 10 nm)的伯胺(例: 赖氨酸侧链)生物素化, 对生物素化的蛋白质亲和纯化, 结合串联质谱鉴定蛋白质-蛋白质相互作用. 通过工程改造的抗坏血酸过氧化物酶融合蛋白表达于宿主细胞和生物体, 在一定 H_2O_2 和生物素苯酚的条件下, 催化活细胞中短寿命、高反应性和不透膜自由基(生物素苯酚自由基)的产生, 然后以 1 min 的时间分辨率对活细胞线粒体内附近(<20 nm)的蛋白质中富电子氨基酸进行生物素化, 对生物素化的蛋白质亲和纯化, 结合串联质谱鉴定蛋白质-蛋白质相互作用.	
化学交联质谱(XL-MS)	基于化学交联剂以共价键连接蛋白质的氨基酸残基	通过化学交联剂与空间距离较近的蛋白质残基位点间的化学反应生成新的共价键, 结合串联质谱鉴定交联肽的氨基酸序列和修饰的残基位点, 通过对分子间交联肽的解析鉴定蛋白质-蛋白质间相互作用信息.	[11,52-60]
共分级偶联质谱(CF-MS)	相同生化成分的蛋白质能在色谱中共流, 进而依赖相关算法从蛋白质的共定位和共聚集数据推断蛋白质-蛋白质相互作用	通过分子量/电荷/亲疏水性的差异, 将生物化学/生物物理性质相似的蛋白质在生理状态进行分离, 对每个馏分进行串联质谱鉴定, 通过算法对鉴定结果相似性进行评分(例: 蛋白质定量、质量控制、预处理和洗脱曲线), 最后推断分析蛋白质-蛋白质相互作用.	[61-63]

弱蛋白间相互作用的解析; PDB-MS 中发展的 TurboID 和 miniTurbo 方法, 不依赖对细胞存在扰动的 H_2O_2 催化, 可以实现胞内蛋白质的快速标记; XL-MS 中以 PIR 方法为代表的, 对于活细胞中蛋白质信息的捕获和解析; CF-MS 用于天然或接近天然条件下具有生化/生物物理联系的蛋白质-蛋白质相互作用信息解析。

每种方法对于蛋白质-蛋白质相互作用的鉴定各有所长, 多种方法的结合成为蛋白质-蛋白质相互作用解析的趋势. 如 Liu 等^[65]结合 AP-MS 的亲纯化和 Bio-ID 的一定空间范围标记的两个优势, 发展了组合的标签(MAC)策略, 通过 18 个标签蛋白提供了 1911 个相互作用的蛋白库, 该 MAC 策略通过 AP-MS 和 BioID 的组合分析可以推导出复合物中蛋白质的相对空间距离. Leissing 等^[66]发展了交联和串联亲和纯化与质谱联用 (XL-TAP-MS) 方法, 将此方法用于拟南芥中的 MKK2-丝裂原活化蛋白激酶(MPK4)信号传导模块的研究. XL-TAP-MS 方法实现了从生物样品中纯化出低丰度蛋白质复合物, 并发现了新的蛋白质-蛋白质相互作用。

作者简介



陈玉宛, 分析化学硕博连读生, 2017 年 7 月毕业于内蒙古大学化学基地专业, 同年保送至中国科学院大连化学物理研究所, 师从杨开广、张丽华研究员. 主要研究方向为: 蛋白质复合物原位分析新技术新方法。



杨开广, 中国科学院大连化学物理研究所研究员, 博士生导师, 中国蛋白质组学会青年委员会委员; 中国生物材料学会血液净化材料分会委员会委员. 2017 年入选第七批中科院“青年创新促进会”会员并获支持, 2021 年获中科院“青年创新促进会”优秀会员. 曾承担国家重点研发计划、国家高技术研究发展计划(863 计划)、国家自然科学基金重大仪器专项、国家自然科学基金面上项目等科研项目. 一直从事蛋白质组学新技术新方法的研究。



张丽华, 中国科学院大连化学物理研究所研究员, 博士生导师, 1995 年毕业于吉林大学化学系. 同年进入中国科学院大连化学物理研究所攻读博士学位, 师从张玉奎院士. 1999 年赴德国国家环境与健康研究中心博士联合培养, 师从 A. Kettrup 教授. 2000 年获得理学博士学位. 2001 年~2003 年 3 月, 在日本德岛大学马场嘉信教授研究室做博士后. 2003 年 4 月回国中国科学院大连化学物理研究所工作; 2005 年晋升为研究员, 课题组长. 获得国家自然科学二等奖、辽宁省自然科学一等奖、中国分析测试协会 CAIA 一等奖和中国化学会青年化学奖等奖项. 2012 年入选科技部“中青年科技创新领军人才”(万人计划). 2017 年获国家杰出青年基金项目资助. 主要研究方向为: 蛋白质组定性定量及相互作用新技术新方法研究。

References

- [1] Fu, H.; Chen, H.; Zhang, H.; Shao, X.; Cai, W. *Acta Chim. Sinica* **2021**, 79, 472 (in Chinese). (付浩浩, 陈洪川, 张宏, 邵学广, 蔡文生, 化学学报, **2021**, 79, 472.)
- [2] Britt, H. M.; Cragnolini, T.; Thalassinou, K. *Chem. Rev.* **2021**, <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.1c00356>
- [3] Richards, A. L.; Eckhardt, M.; Krogan, N. J. *Mol. Syst. Biol.* **2021**, 17, e8792.
- [4] Fenn, J. B.; Mann, M.; Meng, C. K.; Wong, S. F.; Whitehouse, C. M. *Science* **1989**, 246, 64.
- [5] Karas, M.; Hillenkamp, F. *Anal. Chem.* **1988**, 60, 2299.
- [6] Aebersold, R.; Mann, M. *Nature* **2003**, 422, 198.
- [7] Link, A. J.; Eng, J.; Schieltz, D. M.; Carmack, E.; Mize, G. J.; Morris, D. R.; Garvik, B. M.; Yates, J. R., 3rd. *Nat. Biotechnol.* **1999**, 17, 676.
- [8] Bian, Y.; Zheng, R.; Bayer, F. P.; Wong, C.; Chang, Y.-C.; Meng, C.; Zolg, D. P.; Reinecke, M.; Zecha, J.; Wiechmann, S.; Heinzlmeir, S.; Scherr, J.; Hemmer, B.; Baynham, M.; Gingras, A.-C.; Boychenko, O.; Kuster, B. *Nat. Commun.* **2020**, 11, 1.
- [9] Dunham, W. H.; Mullin, M.; Gingras, A.-C. *Proteomics* **2012**, 12, 1576.
- [10] Kim, D. I.; Roux, K. J. *Trends Cell Biol.* **2016**, 26, 804.
- [11] Chavez, J. D.; Mohr, J. P.; Mathay, M.; Zhong, X.; Keller, A.; Bruce, J. E. *Nat. Protoc.* **2019**, 14, 2318.
- [12] Wilkins, M. R.; Appel, R. D.; Williams, K. L.; Hochstrasser, D. F., *Proteome Research: Concepts, Technology and Application*, Second Edition, Eds.: Wilkins, M. R.; Zhang, L., Science Press, Beijing, **2010**, p. 52.
- [13] Zhao, L.; Zhao, Q.; Shan, Y.; Fang, F.; Zhang, W.; Zhao, B.; Li, X.; Liang, Z.; Zhang, L.; Zhang, Y. *Anal. Chem.* **2020**, 92, 1097.
- [14] Low, T. Y.; Syafruddin, S. E.; Mohtar, M. A.; Vellaichamy, A.; NS, A. R.; Pung, Y. F.; Tan, C. S. H. *Cell Mol. Life Sci.* **2021**, 78, 5325.
- [15] Cox, J.; Mann, M. *Nat. Biotechnol.* **2008**, 26, 1367.
- [16] Eng, J. K.; Fischer, B.; Grossmann, J.; Maccoss, M. J. *J. Proteome Res.* **2008**, 7, 4598.
- [17] Rath, S.; Sharma, R.; Gupta, R.; Ast, T.; Chan, C.; Durham, T. J.; Goodman, R. P.; Grabarek, Z.; Haas, M. E.; Hung, W. H. W.; Joshi, P. R.; Jourdain, A. A.; Kim, S. H.; Kotrys, A. V.; Lam, S. S.; McCoy, J. G.; Meisel, J. D.; Miranda, M.; Panda, A.; Patgiri, A.; Rogers, R.; Sadre, S.; Shah, H.; Skinner, O. S.; To, T. L.; Walker, M. A.; Wang, H.; Ward, P. S.; Wengrod, J.; Yuan, C. C.; Calvo, S. E.; Mootha, V. K. *Nucleic Acids Res.* **2021**, 49, D1541.
- [18] Yang, B.; Wu, Y. J.; Zhu, M.; Fan, S. B.; Lin, J.; Zhang, K.; Li, S.; Chi, H.; Li, Y. X.; Chen, H. F.; Luo, S. K.; Ding, Y. H.; Wang, L. H.; Hao, Z.; Xiu, L. Y.; Chen, S.; Ye, K.; He, S. M.; Dong, M. Q. *Nat.*

- Methods* **2012**, 9, 904.
- [19] Anderson, G. A.; Tolic, N.; Tang, X.; Zheng, C.; Bruce, J. E. *J. Proteome Res.* **2007**, 6, 3412.
- [20] Hoopmann, M. R.; Zelter, A.; Johnson, R. S.; Riffle, M.; MacCoss, M. J.; Davis, T. N.; Moritz, R. L. *J. Proteome Res.* **2015**, 14, 2190.
- [21] Teo, G.; Liu, G.; Zhang, J.; Nesvizhskii, A. I.; Gingras, A. C.; Choi, H. *J. Proteomics* **2014**, 100, 37.
- [22] Combe, C. W.; Fischer, L.; Rappsilber, J. *Mol. Cell. Proteomics* **2015**, 14, 1137.
- [23] Riffle, M.; Jaschob, D.; Zelter, A.; Davis, T. N. *J. Proteome Res.* **2016**, 15, 2863.
- [24] Schweppe, D. K.; Zheng, C.; Chavez, J. D.; Navare, A. T.; Wu, X.; Eng, J. K.; Bruce, J. E. *Bioinformatics* **2016**, 32, 2716.
- [25] Malovannaya, A.; Lanz, R. B.; Jung, S. Y.; Bulynko, Y.; Le, N. T.; Chan, D. W.; Ding, C.; Shi, Y.; Yucer, N.; Krenciute, G.; Kim, B. J.; Li, C.; Chen, R.; Li, W.; Wang, Y.; O'Malley, B. W.; Qin, J. *Cell* **2011**, 145, 787.
- [26] Hopp, T. P.; Prickett, K. S.; Price, V. L.; Libby, R. T.; March, C. J.; Pat Cerretti, D.; Urdal, D. L.; Conlon, P. J. *Nat. Biotechnol.* **1988**, 6, 1204.
- [27] Evan, G. I.; Lewis, G. K.; Ramsay, G.; Bishop, J. M. *Mol. Cell. Biol.* **1985**, 5, 3610.
- [28] Hochuli, E.; Bannwarth, W.; Döbeli, H.; Gentz, R.; Stüber, D. *Nat. Biotechnol.* **1988**, 6, 1321.
- [29] Schmidt, T. G.; Skerra, A. *Protein Eng.* **1993**, 6, 109.
- [30] Smith, D. B.; Johnson, K. S. *Gene* **1988**, 67, 31.
- [31] Chalfie, M.; Tu, Y.; Euskirchen, G.; Ward, W. W.; Prasher, D. C. *Science* **1994**, 263, 802.
- [32] Uhlén, M.; Nilsson, B.; Guss, B.; Lindberg, M.; Gatenbeck, S.; Philipson, L. *Gene* **1983**, 23, 369.
- [33] Guruharsha, K. G.; Rual, J. F.; Zhai, B.; Mintseris, J.; Vaidya, P.; Vaidya, N.; Beekman, C.; Wong, C.; Rhee, D. Y.; Cenaj, O.; McKilip, E.; Shah, S.; Stapleton, M.; Wan, K. H.; Yu, C.; Parsa, B.; Carlson, J. W.; Chen, X.; Kapadia, B.; VijayRaghavan, K.; Gygi, S. P.; Celniker, S. E.; Obar, R. A.; Artavanis-Tsakonas, S. *Cell* **2011**, 147, 690.
- [34] Rigaut, G.; Shevchenko, A.; Rutz, B.; Wilm, M.; Mann, M.; Seraphin, B. *Nat. Biotechnol.* **1999**, 17, 1030.
- [35] Dunham, W. H.; Larsen, B.; Tate, S.; Badillo, B. G.; Goudreault, M.; Tehami, Y.; Kislinger, T.; Gingras, A. C. *Proteomics* **2011**, 11, 2603.
- [36] Bendayan, M. *Science* **2001**, 291, 1363.
- [37] Mayer, G.; Bendayan, M. *J. Histochem. Cytochem.* **1997**, 45, 1449.
- [38] Kim, D. I.; Birendra, K. C.; Zhu, W.; Motamedchaboki, K.; Doye, V.; Roux, K. J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2014**, 111, E2453.
- [39] Kotani, N.; Gu, J.; Isaji, T.; Udaka, K.; Taniguchi, N.; Honke, K. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2008**, 105, 7405.
- [40] Miyagawa-Yamaguchi, A.; Kotani, N.; Honke, K. *PLoS One* **2014**, 9, e93054.
- [41] Roux, K. J.; Kim, D. I.; Burke, B. *Curr. Protoc. Protein Sci.* **2013**, 74, 19.23.1.
- [42] Kim, D. I.; Jensen, S. C.; Noble, K. A.; Kc, B.; Roux, K. H.; Motamedchaboki, K.; Roux, K. J. *Mol. Biol. Cell* **2016**, 27, 1188.
- [43] Antonicka, H.; Lin, Z. Y.; Janer, A.; Aaltonen, M. J.; Weraarpachai, W.; Gingras, A. C.; Shoubridge, E. A. *Cell Metab.* **2020**, 32, 479.
- [44] Opitz, N.; Schmitt, K.; Hofer-Pretz, V.; Neumann, B.; Krebber, H.; Braus, G. H.; Valerius, O. *Mol. Cell. Proteomics* **2017**, 16, 2199.
- [45] Lin, Q.; Zhou, Z.; Luo, W.; Fang, M.; Li, M.; Li, H. *Front. Plant Sci.* **2017**, 8, 749.
- [46] Gupta, G. D.; Coyaoud, E.; Goncalves, J.; Mojarad, B. A.; Liu, Y.; Wu, Q.; Gheiratmand, L.; Comartin, D.; Tkach, J. M.; Cheung, S. W.; Bashkurov, M.; Hasegan, M.; Knight, J. D.; Lin, Z. Y.; Schueler, M.; Hildebrandt, F.; Moffat, J.; Gingras, A. C.; Raught, B.; Pelletier, L. *Cell* **2015**, 163, 1484.
- [47] Uezu, A.; Kanak, D. J.; Bradshaw, T. W.; Soderblom, E. J.; Catavero, C. M.; Burette, A. C.; Weinberg, R. J.; Soderling, S. H. *Science* **2016**, 353, 1123.
- [48] Rhee, H. W.; Zou, P.; Udeshi, N. D.; Martell, J. D.; Mootha, V. K.; Carr, S. A.; Ting, A. Y. *Science* **2013**, 339, 1328.
- [49] Lam, S. S.; Martell, J. D.; Kamer, K. J.; Deerinck, T. J.; Ellisman, M. H.; Mootha, V. K.; Ting, A. Y. *Nat. Methods* **2015**, 12, 51.
- [50] Branon, T. C.; Bosch, J. A.; Sanchez, A. D.; Udeshi, N. D.; Svinkina, T.; Carr, S. A.; Feldman, J. L.; Perrimon, N.; Ting, A. Y. *Nat. Biotechnol.* **2018**, 36, 880.
- [51] Cho, K. F.; Branon, T. C.; Rajeev, S.; Svinkina, T.; Udeshi, N. D.; Thoudam, T.; Kwak, C.; Rhee, H. W.; Lee, I. K.; Carr, S. A.; Ting, A. Y. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2020**, 117, 12143.
- [52] Chen, Z. L.; Cao, Y.; He, S. M. *Prog. Biochem. Biophys.* **2021**, <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2161.Q.20210728.1624.006.html>. (陈镇霖, 曹勇, 贺思敏, 生物化学与生物物理进展, **2021**, 网络首发.)
- [53] Fan, S. B.; Wu, Y. J.; Yang, B.; Chi, H.; Meng, J. M.; Lu, S.; Zhang, K.; Wu, L.; Sun, R. X.; Dong, M. Q.; He, S. M. *Prog. Biochem. Biophys.* **2014**, 41, 1109 (in Chinese). (樊盛博, 吴妍洁, 杨兵, 迟浩, 孟佳明, 卢珊, 张昆, 郭龙, 孙瑞祥, 董梦秋, 贺思敏, 生物化学与生物物理进展, **2014**, 41, 1109.)
- [54] Tang, X.; Bruce, J. E. *Mol. Biosyst.* **2010**, 6, 939.
- [55] Bartolec, T. K.; Smith, D. L.; Pang, C. N. I.; Xu, Y. D.; Hamey, J. J.; Wilkins, M. R. *Anal. Chem.* **2020**, 92, 1874.
- [56] Wheat, A.; Yu, C.; Wang, X.; Burke, A. M.; Chemmama, I. E.; Kaake, R. M.; Baker, P.; Rychnovsky, S. D.; Yang, J.; Huang, L. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2021**, 118, e2023360118.
- [57] Schweppe, D. K.; Chavez, J. D.; Lee, C. F.; Caudal, A.; Kruse, S. E.; Stuppard, R.; Marcinek, D. J.; Shadel, G. S.; Tian, R.; Bruce, J. E. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2017**, 114, 1732.
- [58] Ryl, P. S. J.; Bohlke-Schneider, M.; Lenz, S.; Fischer, L.; Budzinski, L.; Stuijver, M.; Mendes, M. M. L.; Sinn, L.; O'Reilly, F. J.; Rappsilber, J. *J. Proteome Res.* **2020**, 19, 327.
- [59] Linden, A.; Deckers, M.; Parfentev, I.; Pflanz, R.; Homberg, B.; Neumann, P.; Ficner, R.; Rehling, P.; Urlaub, H. *Mol. Cell. Proteomics* **2020**, 19, 1161.
- [60] Albanese, P.; Tamara, S.; Saracco, G.; Scheltema, R. A.; Pagliano, C. *Nat. Commun.* **2020**, 11, 1361.
- [61] Mann, M. *Proteomics* **2020**, 20, 1900330.
- [62] Havugimana, P. C.; Hart, G. T.; Nepusz, T.; Yang, H.; Turinsky, A. L.; Li, Z.; Wang, P. I.; Boutz, D. R.; Fong, V.; Phanse, S.; Babu, M.; Craig, S. A.; Hu, P.; Wan, C.; Vlasblom, J.; Dar, V. U.; Bezginov, A.; Clark, G. W.; Wu, G. C.; Wodak, S. J.; Tillier, E. R.; Paccanaro, A.; Marcotte, E. M.; Emili, A. *Cell* **2012**, 150, 1068.
- [63] Skinnider, M. A.; Foster, L. J. *Nat. Methods* **2021**, 18, 806.
- [64] Wang, X.; Zhang, X.; Huang, Z.; Fan, X.; Chen, P. *Acta Chim. Sinica* **2021**, 79, 406 (in Chinese). (汪欣, 张贤睿, 黄宗煜, 樊新元, 陈鹏, 化学学报, **2021**, 79, 406.)
- [65] Liu, X.; Salokas, K.; Tamene, F.; Jiu, Y.; Weldatsadik, R. G.; Ohman, T.; Varjosalo, M. *Nat. Commun.* **2018**, 9, 1188.
- [66] Leissing, F.; Misch, N. V.; Wang, X.; Werner, L.; Huang, L.; Conrath, U.; Beckers, G. J. M. *Plant Physiology* **2021**, 187, 2381.

(Cheng, B.)