

doi: 10.19969/j.fxcxb.22071503

膜蛋白质复合物提取方法研究进展

褚宏伟^{1,2}, 郑诗颖^{1,3}, 赵群¹, 赵宝锋¹, 梁振¹,
张丽华^{1*}, 张玉奎^{1,2}

(1. 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, 国家色谱研究分析中心, 辽宁 大连 116023; 2. 大连理工大学 张大煜学院, 辽宁 大连 116024; 3. 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要: 膜蛋白质通过与其他蛋白质相互作用形成膜蛋白质复合物(Membrane protein complexes, MPCs)形式来行使重要的生物学功能, 譬如参与细胞-细胞交流、信号传导与分子识别等。MPCs的功能异常会导致多种疾病的发生和临床治疗耐药等问题。研究完整MPCs的组装对于绘制全景式蛋白质-蛋白质相互作用网络, 进而揭示膜蛋白质机器的功能具有重要意义。然而, 由于MPCs的过表达和纯化仍面临巨大挑战, 如何从细胞中实现MPCs的高效提取尤为重要。因此, 亟需发展既可确保MPCs提取效率, 并能保持其结构稳定性的提取方法。该文对现有MPCs提取方法及其应用进展进行了综述, 并对其发展前景加以展望, 以期对MPCs的功能解析提供技术支撑。

关键词: 膜蛋白质复合物; 蛋白质-蛋白质相互作用; 高效提取; 结构稳定

中图分类号: O629.73; G353.11 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-4957(2022)09-1387-08

Advances on Extraction Methods of Membrane Protein Complexes

CHU Hong-wei^{1,2}, ZHENG Shi-ying^{1,3}, ZHAO Qun¹, ZHAO Bao-feng¹, LIANG Zhen¹,
ZHANG Li-hua^{1*}, ZHANG Yu-kui^{1,2}

(1. CAS Key Laboratory of Separation Sciences for Analytical Chemistry, National Chromatographic Research & Analysis Center, Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, China; 2. Zhang Dayu School of Chemistry, Dalian University of Technology, Dalian 116024, China; 3. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: Membrane proteins are able to carry out important biological functions attributable to the formation of membrane protein complexes(MPCs), which takes place when they collaborate with other proteins. These functions include participating in the communication between cells, signal transduction, and the recognition of molecular targets. The dysfunction of MPCs can lead to the occurrence of various diseases and clinical drug resistance. Investigation on the formation of intact MPCs is of great importance for both the mapping of a comprehensive protein-protein interaction network and the subsequent understanding of the function of membrane protein machinery. The overexpression and purification of MPCs still face significant challenges. Hence, how the MPCs are to be extracted from cells efficiently is of critical importance. As a result, there is an urgent need for the development of an extraction method which is capable of both ensuring the extraction efficiency for MPCs and simultaneously maintaining their structural stability. In this paper, the existing MPCs extraction methods and their application progress are reviewed, and their development prospects are prospected, in order to provide a technical support for the functional analysis of MPCs.

Key words: membrane protein complexes; protein-protein interactions; efficient extraction; structural stability

膜蛋白质作为细胞膜结构和功能的主要承担者, 参与分子转运、信号转导和细胞间交流等生物学过程^[1]。目前约60%的药物靶标均为膜蛋白质^[2-3]。其功能的发挥大多依赖与其他蛋白质相互作用形成的膜蛋白质复合物(Membrane protein complexes, MPCs)^[4]。除鉴定蛋白质种类并研究其含量的动态变化外, 解析蛋白质-蛋白质相互作用(Protein-protein interactions, PPIs)也是理解细胞生物过程的重

收稿日期: 2022-07-15; 修回日期: 2022-08-16

基金项目: 国家自然科学基金项目(21834006)

* 通讯作者: 张丽华, 博士, 研究员, 研究方向: 蛋白质组定性定量及相互作用新方法, E-mail: lihuazhang@dicp.ac.cn

要信息来源^[5-7]。由于大多数膜蛋白质的丰度低,且疏水性强,使得对 MPCs 的过表达和纯化面临诸多挑战。因此亟需发展既能从细胞中直接高效提取 MPCs,且能维持 PPIs 稳定性的方法^[4,8]。本文针对 MPCs 的提取方法及其应用进展进行综述,并对其发展前景加以展望。

1 基于表面活性剂的 MPCs 提取

表面活性剂是一类具有疏水和亲水基团的两亲性分子,可通过自组装形成胶束,进而模拟脂质双分子层与蛋白质的疏水区结合,从而实现 MPCs 的高效提取^[9-10]。然而,为确保在提取过程中复合物结构的完整性,目前多采用比较温和的表面活性剂。

以聚乙二醇辛基苯基醚(Triton X-100)、乙基苯基聚乙二醇(Nonidet P-40, NP-40)和 *n*-十二烷基- β -D-麦芽糖苷(*n*-Dodecyl- β -D-maltopyranoside, DDM)为代表的非离子型表面活性剂,能破坏脂类-脂类和脂类-蛋白质间的相互作用但不破坏 PPIs,常被用于 MPCs 的溶解和提取^[11]。Zheng 等^[12]使用 NP-40 裂解液对 Rat-2 细胞中表皮生长因子受体(EGFR)复合物提取后进行免疫共沉淀-质谱(co-Immunoprecipitation-mass spectrometry, co-IP-MS)分析,鉴定到 EGFR 复合物中 41 种相互作用蛋白,参与蛋白质磷酸化、脂质代谢和内吞作用等多条信号通路。Tian 等^[13]采用 NP-40 裂解液提取细胞培养条件下稳定同位素标记技术(Stable isotope labeling with amino acids in cell culture, SILAC)标记的 Jurkat 细胞,结合 co-IP-MS 分析,构建膜蛋白质 CD28 的相互作用网络和信号通路,鉴定到 28 种 CD28 的相互作用蛋白,其中超过 50% 的蛋白参与免疫信号通路。为全面了解 CD28 的相互作用网络,研究人员进一步在 STRING 和 BioGRID 数据库中查询了上述 28 种蛋白的相互作用蛋白,获得 93 种蛋白质,高度富集在细胞内信号级联和肌动蛋白-细胞骨架组织中。研究还发现,扩展的 CD28 相互作用网络围绕 PI3K 家族、STAT 家族、GRB2、CD2AP、CIN85 以及 CBL 等蛋白质形成清晰的磷酸化依赖性相互作用中心。Carlson 等^[14]比较了 3 种不同的非离子型表面活性剂(DDM、N, N-二甲基十二烷基胺-N-氧化物和辛基- β -D-葡萄糖苷)以及 1 种离子型表面活性剂(脱氧胆酸钠)对大肠杆菌(*Escherichia coli*, *E. coli*) MPCs 的提取效果,基于十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)和考马斯亮蓝染色对内膜蛋白质标记物 MsbA 提取效率的评价,最终选择 DDM 为最佳提取体系。Lorenzen 等^[15]使用 DDM 裂解 HEK293 细胞,并通过在膜蛋白质周围形成胶束环境,维持了 GPCR-RAMP 复合物在提取过程中的结构完整性。Lee 等^[16]研究了 DDM 和辛基葡萄糖苷对前列腺癌细胞 PC3-mm2 中膜蛋白质 Cad11 复合物提取的影响,发现 DDM 不会干扰 mAb 1A5 与 Cad11 的结合,而辛基葡萄糖苷则会干扰二者结合。以 DDM 提取分离 PC3-mm2 细胞中的 Cad11 复合物,通过胶上酶解-MS 分析复合物中的蛋白质。使用 1% FDR 检索并扣除常见污染蛋白,重复鉴定出 20 种 Cad11 相互作用蛋白质。此外,通过 iTRAQ 定量分析比较了 DDM、Triton X-100 和胆酸钠对 Cad11 复合物的提取能力,发现 DDM 和 Triton X-100 对已知的 Cad11 相互作用蛋白质的提取能力相当,均优于胆酸钠(图 1)。

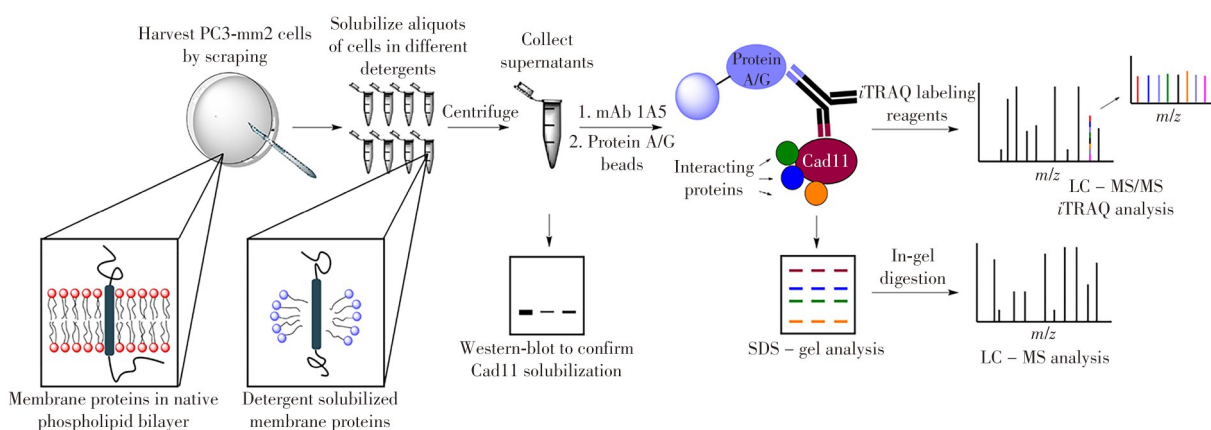


图 1 基于表面活性剂的 Cad11 复合物提取及其相互作用蛋白分析^[16]

Fig. 1 Experimental flowchart for extraction of Cad11 complexes by detergents and analysis of interacting proteins^[16]

尽管非离子型表面活性剂目前应用最为广泛,但该类溶剂的温和性质影响了其对MPCs的提取能力^[12,17]。因此,采用多种表面活性剂的组合逐渐受到人们关注。Greenblatt等^[17]利用Triton X-100、DDM和八甘醇单正十二烷基醚3种表面活性剂的组合,从酿酒酵母中鉴定了1 726种由膜蛋白参与的PPIs以及501种MPCs。Emili等^[18]采用上述相同的组合从*E. coli*中提取,并结合亲和纯化MS分析,不仅鉴定了785种MPCs,而且从鉴定到的蛋白质相互作用网络中发现了新的复合物。尽管上述研究采用表面活性剂的组合在一定程度上提高了MPCs的鉴定覆盖率,但对复合物的稳定性仍有影响,并增加了蛋白质聚集的可能性^[9,19-21]。

以SDS为代表的阴离子型表面活性剂,其长烷基链尾部可与蛋白质的疏水区相互作用,而带负电的亲水头部与蛋白质侧链正电荷结合,可协同促进对蛋白质的溶解和提取能力。然而该类表面活性剂的提取能力强,会破坏PPIs,因此无法直接用于MPCs的提取和分析。化学交联可通过在近端氨基酸残基之间形成共价键来捕获瞬态蛋白质相互作用,有效地固定低亲和力与瞬时蛋白质相互作用^[22]。化学交联与MS的结合已成为获得蛋白质复合物动态构象和相互作用界面的强大技术^[23-24]。Bruce等^[25]报道了蛋白质相互作用报告基因(Protein interaction reporter, PIR)技术,其交联剂结合胺基反应基团、MS可断裂和亲和富集标签,且具有透膜性;进一步将PIR交联用于多药耐药鲍曼不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*, *A. baumannii*)菌株AB5075中蛋白质相互作用的原位解析^[26]。交联后采用4% SDS裂解,MS分析鉴定了2 068对交联肽,包含245种分子内和398种分子间相互作用,涉及94种膜蛋白、230种可溶性蛋白和103种未表征的蛋白。其中MPCs构成了725对交联肽,为膜蛋白质相互作用结构解析提供了数据支撑。此外,Gao等^[27]开发的一种双琥珀酰亚胺酯交联剂BSP具有细胞膜通透性,可在5 min内实现活细胞内蛋白质复合物的高效快速交联。借鉴该思路,可以设计合成具有不透膜性,且对膜蛋白具有强反应活性的交联剂,通过化学交联的方式先在活细胞水平原位固定MPCs的PPIs,再采用SDS等具有强提取能力的溶剂体系提取蛋白质复合物,有望为实现MPCs的深度覆盖分析提供新的策略。

对于大多数生物学研究来说,为了分离感兴趣的MPCs,依赖非离子型表面活性剂提取的方法使用较为广泛,但它们形成的胶束环境与天然细胞膜之间的物理性质还存在一定差异,难以兼顾MPCs的高效溶解和结构的稳定。可考虑改变表面活性剂中烷基链长或组合不同功能基团,开发新型表面活性剂,在保证提取效率的前提下,提高MPCs的稳定性。

2 基于离子液体辅助的MPCs提取

离子液体(Ionic liquids, ILs)是指在低于100 °C时呈现液态的有机熔融盐类,由大且不对称的有机阳离子和有机/无机阴离子组成^[28-32]。作为新兴的绿色、可设计、环境友好的溶剂,ILs因具有溶解能力强、结构可设计性等优点,近年来已被用于蛋白质提取等研究中。在前期工作中,本课题组通过对不同结构ILs的分子动力学模拟和实验评价,筛选出适用于蛋白质组高效提取且与后续胰蛋白酶酶活兼容的IL—1-十二烷基-3-甲基咪唑氯化物(1-Dodecyl-3-methylimidazolium chloride, C12Im-Cl),并建立了深度覆盖的膜蛋白质组 and 全蛋白质组分析方法^[33-37]。然而由于C12Im-Cl与蛋白质间的相互作用力强,在蛋白质复合物提取过程中会破坏其结构的稳定性。

Chu等^[38]筛选出能够保持PPIs稳定性的IL—三乙胺乙酸盐(Triethylamine acetate, TEAA),并通过分子对接模拟,发现TEAA会占据蛋白质之间的反竞争性结合位点,通过疏水相互作用和盐桥维持PPIs稳定。基于此,发展了TEAA辅助NP-40的提取体系*i*-TAN,提高了对MPCs的提取能力。与传统的NP-40提取体系相比,采用*i*-TAN体系可将从HeLa细胞中鉴定的EGFR相互作用蛋白数目由73种提高到90种。此外,从曲妥珠单抗敏感和耐药的乳腺癌细胞中鉴定到74种EGFR相互作用蛋白质,其中13种蛋白质在敏感细胞中丰度更高,41种蛋白质在耐药细胞中丰度更高。生物信息学分析发现,除了ERBB信号通路及其下游PI3K通路的激活会影响曲妥珠单抗治疗响应以外,AP-2接头复合蛋白的上调也会促进网格蛋白介导的内吞作用,使得ERBB2的表达和下游信号通路的活性下调,导致曲妥珠单抗耐药细胞对曲妥珠单抗的响应不佳,为理解乳腺癌曲妥珠单抗耐药机制提供了新的思路。此外,Chu等^[39]将定量蛋白质组学技术用于肝癌(Hepatocellular carcinoma, HCC)索拉非尼耐药机制研究,发现在Huh7耐药细胞中膜蛋白质FOLR1显著高表达;进一步利用*i*-TAN体系提取结合co-IP-

MS 分析, 鉴定到 124 种 FOLR1 相互作用蛋白。对 FOLR1 相互作用蛋白质进行了分析以及后续生物学验证, 发现 FOLR1 过表达可能影响叶酸异常转运, 促进细胞自噬, 进而引起索拉非尼耐药, 为通过抑制 FOLR1 预防索拉非尼耐药提供了新的思路。

与传统的表面活性剂提取体系相比, 离子液体辅助的提取方法形成的胶束环境更加均一, 并且可占据蛋白质之间的结合位点, 促进 MPCs 的稳定和提取。基于离子液体阴阳离子结构的可设计性, 结合分子对接等理论模拟技术, 有望筛选最优化的离子液体, 并建立基于离子液体(不含表面活性剂)的 MPCs 提取体系。

3 基于变性剂的交联 MPCs 提取

以尿素为代表的变性剂通过氢键、疏水相互作用和静电作用等促进蛋白质分子氨基酸残基的伸展, 从而改变蛋白质的高级结构, 实现蛋白质的溶解和提取^[40-42]。由于变性剂会破坏蛋白质的结构使 PPIs 发生变化, 因此无法直接用于 MPCs 的提取。Wang 等^[23]先通过具有透膜性的甲醛交联细胞内的蛋白质复合物, 然后使用 8 mol/L 尿素提取, 并结合尺寸排阻色谱(Size exclusion chromatography, SEC)分离和数据非依赖性采集 MS 分析, 从 HEK293 细胞中共鉴定到 272 种蛋白质复合物。Bruce 等^[43]将定量化学交联应用于紫杉醇处理的 SILAC 标记 HeLa 细胞, 再采用 8 mol/L 尿素进行提取, 分析细胞中的蛋白质相互作用组变化。通过 SILAC 定量分析获得了 746 种交联蛋白中 683 种的相对丰度水平。对关键蛋白进行分析, 发现其中定位于质膜且在酪氨酸激酶信号通路中起作用的 PHB 蛋白与 PHB2 蛋白之间有 8 对交联肽。此外, 研究发现交联水平的变化大于 PHB 或 PHB2 蛋白水平的增加, 这可能表明 PHB-PHB2 复合物水平增加或反映了亚细胞定位的变化。Huang 等^[44]先利用开发的具有透膜性、可富集性和 MS 可断裂性的交联剂 Alkyne-A-DSBSO 对 HEK293 细胞交联后, 再采用 8 mol/L 尿素进行提取, 鉴定到 2 484 种蛋白质(接近 12% 的蛋白质具有质膜定位)之间的 6 439 种相互作用。上述研究为挖掘生物体内 MPCs 原位信息以及构建实时、准确的蛋白质相互作用网络提供了基础数据。

化学交联固定化天然的 MPCs 后再提取的方法, 为原位解析 MPCs 的组成提供了新方案。虽然能够用于蛋白质组学分析, 但难以获得天然的膜蛋白复合物用于其他的生物学应用。因此, 仍亟需发展新型高效的 MPCs 提取技术, 用于提升 MPCs 的提取效率和 MPCs 结构稳定性, 以适应蛋白质组学和生物学研究的需求。

4 基于膜模拟两亲物的 MPCs 提取

近年来由于可提供保持 MPCs 稳定的微环境, 磷脂纳米盘和两亲聚合物等膜模拟两亲物在 MPCs 结构和功能研究中发挥了重要作用。

磷脂纳米盘是由双层磷脂组成的合成双层系统, 如棕榈酰-油酰-磷脂酰胆碱被 2 个相同的两亲性 α -螺旋膜支架蛋白包围, 提供面向脂质的疏水表面和面向溶剂的亲水表面, 可用于稳定被组装的 MPCs^[45-47]。磷脂纳米盘高度溶于水, 为研究配体与膜蛋白以及 PPIs 的结合活性创造了类似天然的脂质环境, 已被成功用于 *E. coli* 核糖体膜上的 SecYEG 复合物的冷冻电镜结构表征^[48]。磷脂纳米盘可通过使用不同长度的膜支架蛋白以满足对不同尺寸的膜蛋白质稳定需求, 然而较大的磷脂纳米盘(直径 > 15 nm)通常较不稳定^[4]。为解决这一问题, Carlson 等^[14]开发了一种新型膜模拟支架——肽盘来保持 MPCs 的稳定性, 并采用 DDM 实现了 *E. coli* 膜蛋白相互作用组的提取。在最大限度保证 MPCs 提取效率和结构稳定性的前提下, 共鉴定到 1 209 个蛋白质(含 591 种膜蛋白)组成的 4 911 种相互作用, 其中包含很多新发现的和瞬时的 PPIs, 在细胞包膜的运输过程和生物发生机制中发挥重要作用。

两亲聚合物通过在跨膜区域周围形成致密层实现 MPCs 的提取和稳定^[4]。已有研究将两亲聚合物用于牛线粒体超复合物 I 中电子传递链组分的 I₁, I₃, I₄ 的提取; 其可与膜蛋白紧密结合, 覆盖 1.5 ~ 2.0 nm 层中的疏水表面积, 稳定膜蛋白并保持其在溶液中的活性, 有助于后续对复合物进行结构解析^[49]。Dörr 等^[50]利用两亲共聚物—苯乙烯-马来酸共聚物(Styrene-maleic acid copolymers, SMAs)直接从 *E. coli* 膜中分离了四聚体钾通道 KcsA。SMAs 不会完全破坏脂质双层, 而是自发地插入并提取完整的膜片; 其形式为纳米大小的盘状颗粒, 可保留原始的生物膜组分。此外, SMAs 能够直接提取含有大型功能性蛋

白质复合物(如参与细胞分裂^[51]和光合作用^[52]的蛋白质,以及ABC转运蛋白家族的成员^[53])的天然磷脂纳米盘。Korotych等^[54]利用SMAs从植物类囊体中分离超分子MPCs。通过考察12种具有不同物理化学性质的SMAs从菠菜类囊体膜中提取MPCs的能力,发现SMA® 1440、XIRAN® 25010、XIRAN® 30010、SMA® 17352和SMA® PRO 10235的效率最高;进一步用于从菠菜和豌豆类囊体膜中分离超分子MPCs,发现XIRAN® 30010和SMA® PRO 10235相较于其他3种,偏向提取具有较小尺寸或较低密度的MPCs(图2)。

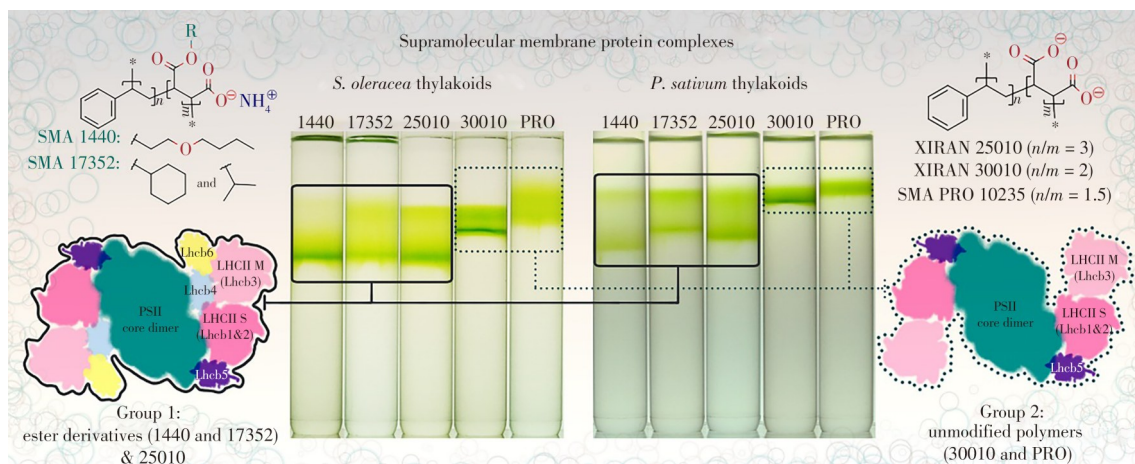


图2 基于5种SMAs的菠菜和豌豆类囊体膜中超分子MPCs的提取^[54]

Fig. 2 Extraction of supramolecular MPCs from *Spinacia oleracea* and *Pisum sativum* by five SMAs^[54]

新型膜模拟两亲物的开发,譬如通过在磷脂纳米盘内重建膜模拟环境,或使用SMA保护MPCs局部的膜环境,均取得了显著的效果,并且与冷冻电镜兼容,有助于实现特定MPCs的提取和结构解析。但目前尚无法模仿整个膜环境,还有待开发更大尺寸且稳定的膜模拟两亲物。

5 基于超声处理的MPCs提取

超声处理是采用不同频率的声波交替破坏细胞结构,从而提取蛋白质。近年来,Robinson等^[55-56]报道了在维持细胞膜完整性的前提下,适用于MS分析的脂质囊泡超声处理方法(Sonication of lipid vesicles for mass spectrometry, SoLVe-MS)。利用不同来源的膜制备脂质囊泡,在醋酸铵中进行超声处理,破坏并浓缩包裹MPCs的囊泡,将其引入质谱仪中电离,进而实现MPCs的原位质谱解析(图3)。该研究可揭示天然膜中未被表征的相互作用,譬如*E. coli*外膜中F₀F₁ATP酶-SecYEG复合物(与F₀中的c亚基结合),以往研究显示其在表面活性剂提取过程中丢失或在其他方法中被过滤掉^[57];发现*E. coli*内膜中CydX和AppX能够同时与CydAB相互作用形成异源四聚体。此外,还在牛线粒体内膜中鉴定到复合物Ⅲ和Ⅳ。研究结果体现了天然膜环境对于保留膜蛋白质组的小分子结合、亚基相互作用和相互作用蛋白的重要性。

该方法无需传统的化学干预及处理(例如使用表面活性剂),也无需构建复杂的MPCs过表达体系,为MPCs解析提供了新的思路。值得注意的是,尽管这些天然膜囊泡尽可能地模拟蛋白质的天然环境,但它们并未完全概括天然膜的所有特性。此外,一些膜囊泡很难纯化或大量生产,如真核细胞质膜,可能过于复杂而无法分析。随着样品变得更加复杂并由更多的蛋白质组成,将需要大量的生物材料。这可能会成为该方法使用受限的原因之一。

6 总结与展望

MPCs因其所处的天然膜环境相对疏水,在提取过程中易解离,稳定性较差。本文介绍了5种MPCs提取方法,其中基于非离子型表面活性剂和离子液体辅助的提取方法可以很好的与生物学研究兼容,促进MPCs关键生物功能的挖掘;基于化学交联固定化后再提取以及超声处理的方法为深度覆盖的原位膜蛋白相互作用解析提供了新的策略;基于膜模拟两亲物的提取方法为MPCs的结构解析提供了有力支撑。针对不同方法的适用性,可根据需求选择合适的提取方法。目前对于MPCs的提取和鉴

定还明显落后于可溶性蛋白质, 在未来研究中, 整合多种提取方法实现 MPCs 的深度覆盖分析, 解析全景式膜蛋白相互作用组值得进一步探索。此外, 针对分布在特定亚细胞器的 MPCs 以及特定功能性 MPCs 的提取, 还需要开发相应的靶向提取策略, 不仅要具备足够的提取能力和维持复合物中 PPIs 的稳定性, 而且要提升对特定 MPCs 的靶向选择性。随着提取方法的不断发展, 对 MPCs 的鉴定和认识也会逐步深入, 将会发现更多与疾病相关的靶标膜蛋白质, 为临床药物开发提供理论支撑。

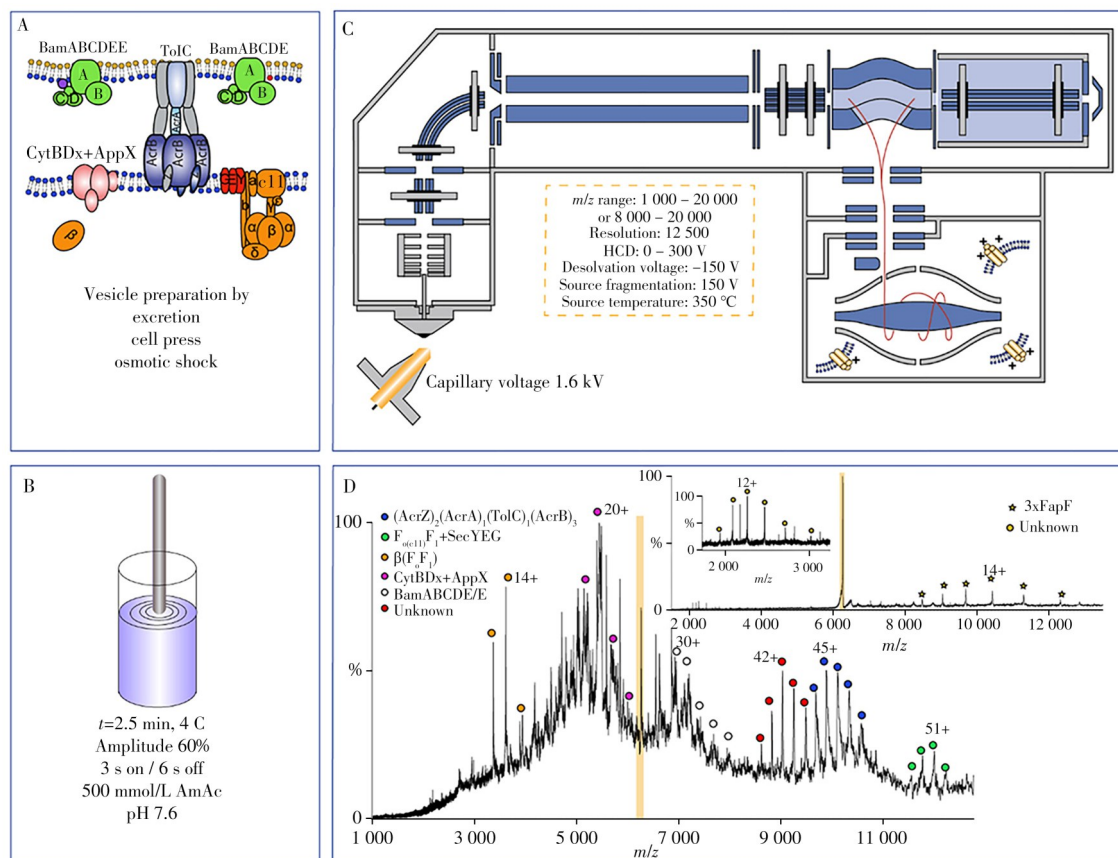


图3 *E. coli* 内外膜上 SoLVe-MS 分析的关键步骤^[56]

Fig. 3 Key steps in the process of SoLVe-MS performed on *E. coli* inner and outer membranes^[56]

A, B: vesicles are generated from membranes and collected by ultracentrifugation for sonication (囊泡从膜产生并通过超速离心收集后进行超声处理); C, D: membrane vesicles are injected into the mass spectrometer and ionized to obtain MPCs spectra (将膜囊泡引入质谱仪中电离, 获得 MPCs 图谱)

参考文献:

- [1] Cao S Y, Peterson S M, Müller S, Reichelt M, Amador C M, Martinez-Martin N. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2021**, 118(39): e2025451118.
- [2] Freed D M, Bessman N J, Kiyatkin A, Salazar-Cavazos E, Byrne P O, Moore J O, Valley C C, Ferguson K M, Leahy D J, Lidke D S, Lemmon M A. *Cell*, **2017**, 171(3): 683-695.
- [3] Santos R, Ursu O, Gaulton A, Bento A P, Donadi R S, Bologa C G, Karlsson A, Al-Lazikani B, Hersey A, Oprea T I, Overington J P. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **2017**, 16(1): 19-34.
- [4] Zorman S, Botte M, Jiang Q Y, Collinson I, Schaffitzel C. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **2015**, 32: 123-130.
- [5] Chen P W, Zuo H, Xiong H, Kolar M J, Chu Q, Saghatelian A, Siegwart D J, Wan Y H. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2017**, 114(3): 580-585.
- [6] Paul M D, Hristova K. *Chem. Rev.*, **2019**, 119(9): 5881-5921.
- [7] Huttlin E L, Bruckner R J, Navarrete-Perea J, Cannon J R, Baltier K, Gebreab F, Gygi M P, Thornock A, Zaraga G, Tam S, Szpyt J, Gassaway B M, Panov A, Parzen H, Fu S, Golbazi A, Maenpaa E, Stricker K, Guha Thakurta S, Zhang T, Rad R, Pan J, Nusinow D P, Paulo J A, Schweppe D K, Vaiteas L P, Harper J W, Gygi S P. *Cell*, **2021**, 184(11): 3022-3040.
- [8] O'Brien E S, Fuglestad B, Lessen H J, Stetz M A, Lin D W, Marques B S, Gupta K, Fleming K G, Wand A J. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2020**, 59(27): 11108-11114.

- [9] Das M, Du Y, Ribeiro O, Hariharan P, Mortensen J S, Patra D, Skiniotis G, Loland C J, Guan L, Kobilka B K, Byrne B, Chae P S. *J. Am. Chem. Soc.*, **2017**, 139(8): 3072 – 3081.
- [10] Chipot C, Dehez F, Schnell J R, Zitzmann N, Pebay – Peyroula E, Catoire L J, Miroux B, Kunji E R S, Veglia G, Cross T A, Schanda P. *Chem. Rev.*, **2018**, 118(7): 3559 – 3607.
- [11] Ratkeviciute G, Cooper B F, Knowles T J. *Biochem. Soc. Trans.*, **2021**, 49(4): 1763 – 1777.
- [12] Zheng Y, Zhang C J, Croucher D R, Soliman M A, St – Denis N, Pasculescu A, Taylor L, Tate S A, Hardy W R, Colwill K, Dai A Y, Bagshaw R, Dennis J W, Gingras A C, Daly R J, Pawson T. *Nature*, **2013**, 499(7457): 166 – 171.
- [13] Tian R J, Wang H P, Gish G D, Petsalaki E, Pasculescu A, Shi Y, Mollenauer M, Bagshaw R D, Yosef N, Hunter T, Gingras A C, Weiss A, Pawson T. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2015**, 112(13): E1594 – E1603.
- [14] Carlson M L, Stacey R G, Young J W, Wason I S, Zhao Z, Rattray D G, Scott N, Kerr C H, Babu M, Foster L J, Duong Van Hoa F. *eLife*, **2019**, 8: e46615.
- [15] Lorenzen E, Dodig – Crnković T, Kotliar I B, Pin E, Ceraudo E, Vaughan R D, Uhlén M, Huber T, Schwenk J M, Sakmar T P. *Sci. Adv.*, **2019**, 5(9): eaaw2778.
- [16] Lee Y C, Baath J A, Bastle R M, Bhattacharjee S, Cantoria M J, Dornan M, Gamero – Estevez E, Ford L, Halova L, Kernan J, Kurten C, Li S R, Martinez J, Sachan N, Sarr M, Shan X W, Subramanian N, Rivera K, Pappin D, Lin S H. *J. Proteome Res.*, **2018**, 17(1): 348 – 358.
- [17] Babu M, Vlasblom J, Pu S Y, Guo X H, Graham C, Bean B D M, Burston H E, Vizeacoumar F J, Snider J, Phanse S, Fong V, Tam Y Y C, Davey M, Hnatshak O, Bajaj N, Chandran S, Punna T, Christopolous C, Wong V, Yu A, Zhong G Q, Li J, Stagljar I, Conibear E, Wodak S J, Emili A, Greenblatt J F. *Nature*, **2012**, 489(7417): 585 – 589.
- [18] Babu M, Bundalovic – Torma C, Calmettes C, Phanse S, Zhang Q Z, Jiang Y, Minic Z, Kim S, Mehla J, Gagari-nova A, Rodionova I, Kumar A, Guo H B, Kagan O, Pogoutse O, Aoki H, Deineko V, Caufield J H, Holtzapple E, Zhang Z G, Vastermark A, Pandya Y, Lai C C L, El Bakkouri M, Hooda Y, Shah M, Burnside D, Hooshyar M, Vlasblom J, Rajagopala S V, Golshani A, Wuchty S, Saier M, Uetz P, T F M, Parkinson J, Emili A. *Nat. Biotech-nol.*, **2018**, 36(1): 103 – 112.
- [19] Privé G G. *Methods*, **2007**, 41(4): 388 – 397.
- [20] Das M, Du Y, Mortensen J S, Ribeiro O, Hariharan P, Guan L, Loland C J, Kobilka B K, Byrne B, Chae P S. *Chem. Sci.*, **2017**, 8(2): 1169 – 1177.
- [21] Yang Z R, Wang C, Zhou Q X, An J L, Hildebrandt E, Aleksandrov L A, Kappes J C, DeLucas L J, Riordan J R, Urbatsch I L, Hunt J F, Brouillette C G. *Protein Sci.*, **2014**, 23(6): 769 – 789.
- [22] Leissing F, Misch N V, Wang X R, Werner L, Huang L, Conrath U, Beckers G J M. *Plant Physiol.*, **2021**, 187(4): 2381 – 2392.
- [23] Wang Y F, Hu Y W, Höti N, Huang L, Zhang H. *Anal. Chem.*, **2022**, 94(3): 1537 – 1542.
- [24] Yu C, Wang X R, Huang L. *Anal. Chem.*, **2022**, 94(10): 4390 – 4398.
- [25] Tang X T, Munske G R, Siems W F, Bruce J E. *Anal. Chem.*, **2005**, 77(1): 311 – 318.
- [26] Wu X, Chavez J D, Schweppe D K, Zheng C X, Weisbrod C R, Eng J K, Murali A, Lee S A, Ramage E, Gallagher L A, Kulasekara H D, Edrozo M E, Kamischke C N, Brittnacher M J, Miller S I, Singh P K, Manoil C, Bruce J E. *Nat. Commun.*, **2016**, 7: 13414.
- [27] Gao H, Zhao L L, Zhong B W, Zhang B R, Gong Z, Zhao B F, Liu Y, Zhao Q, Zhang L H, Zhang Y K. *Anal. Chem.*, **2022**, 94(21): 7551 – 7558.
- [28] Lei Z G, Chen B H, Koo Y M, MacFarlane D R. *Chem. Rev.*, **2017**, 117(10): 6633 – 6635.
- [29] Ventura S P M, Fa E S, Quental M V, Mondal D, Freire M G, Coutinho J A P. *Chem. Rev.*, **2017**, 11(10): 6984 – 7052.
- [30] Trujillo – Rodriguez M J, He N, Varona M, Emaus M N, Souza I D, Anderson J L. *Anal. Chem.*, **2019**, 91(1): 505 – 531.
- [31] Schroder C. *Top. Curr. Chem.*, **2017**, 375(2): 25.
- [32] Smiatek J. *J. Phys. Condens. Matter*, **2017**, 29(23): 233001.
- [33] Zhao Q, Fang F, Liang Y, Yuan H M, Yang K G, Wu Q, Liang Z, Zhang L H, Zhang Y K. *Anal. Chem.*, **2014**, 86(15): 7544 – 7550.
- [34] Fang F, Zhao Q, Li X, Liang Z, Zhang L H, Zhang Y K. *Anal. Chim. Acta*, **2016**, 945: 39 – 46.
- [35] Zhao Q, Fang F, Shan Y C, Sui Z G, Zhao B F, Liang Z, Zhang L H, Zhang Y K. *Anal. Chem.*, **2017**, 89(10): 5179 – 5185.
- [36] Fang F, Zhao Q, Chu H W, Liu M W, Zhao B F, Liang Z, Zhang L H, Li G H, Wang L M, Qin J, Zhang Y K. *Mol. Cell Proteomics*, **2020**, 19(10): 1724 – 1737.

- [37] Yang K G, Liu J H, Sun J D, Zhou Y, Zhao Q, Li S W, Liu L K, Zhang L H, Zhao J Y, Zhang Y K. *Sci. Bull.*, **2017**, 62(18): 1251 – 1255.
- [38] Chu H W, Zhao Q, Liu J, Yang K G, Wang Y L, Liu J H, Zhang K, Zhao B F, He H Y, Zheng Y, Zhong S J, Liang Z, Zhang L H, Zhang Y K. *Anal. Chem.*, **2022**, 94(2): 758 – 767.
- [39] Chu H W, Wu C Q, Zhao Q, Sun R, Yang K, Zhao B F, Liu Y, Liang Z, Zhong S J, Zhang L H, Zhang Y K. *Carcinogenesis*, **2021**, 42(5): 753 – 761.
- [40] Lu Y, Li X R. *Prog. Chem.*, **2005**, 17(5): 905 – 910.
- [41] Poulsen J W, Madsen C T, Young C, Poulsen F M, Nielsen M L. *J. Proteome Res.*, **2013**, 12(2): 1020 – 1030.
- [42] Singh R, Hassan M I, Islam A, Ahmad F. *PLoS One*, **2015**, 10(6): e0128740.
- [43] Chavez J D, Keller A, Zhou B, Tian R, Bruce J E. *Cell Rep.*, **2019**, 29(8): 2371 – 2383.
- [44] Wheat A, Yu C, Wang X R, Burke A M, Chemmama I E, Kaake R M, Baker P, Rychnovsky S D, Yang J, Huang L. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2021**, 118(32): e2023360118.
- [45] Phạm T T T, Rainey J K. *Biochem. Cell Biol.*, **2021**, 99(6): 683 – 692.
- [46] Keener J E, Zambrano D E, Zhang G, Zak C K, Reid D J, Deodhar B S, Pemberton J E, Prell J S, Marty M T. *J. Am. Chem. Soc.*, **2019**, 141(2): 1054 – 1061.
- [47] Qian H W, Wu X L, Du X M, Yao X, Zhao X, Lee J, Yang H Y, Yan N. *Cell*, **2020**, 182(1): 98 – 111.
- [48] Frauenfeld J, Gumbart J, Sluis E O, Funes S, Gartmann M, Beatrix B, Mielke T, Berninghausen O, Becker T, Schulten K, Beckmann R. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **2011**, 18(5): 614 – 621.
- [49] Althoff T, Mills D J, Popot J L, Kuhlbrandt W. *EMBO J.*, **2011**, 30(22): 4652 – 4664.
- [50] Dörr J M, Koorengel M C, Schäfer M, Prokofyev A V, Scheidelaar S, van der Cruysen E A, Dafforn T R, Baldus M, Killian J A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2014**, 111(52): 18607 – 18612.
- [51] Paulin S, Jamshad M, Dafforn T R, Garcia – Lara J, Foster S J, Galley N F, Roper D I, Rosado H, Taylor P W. *Nanotechnology*, **2014**, 25(28): 285101.
- [52] Swainsbury D J, Scheidelaar S, van Grondelle R, Killian J A, Jones M R. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2014**, 53(44): 11803 – 11807.
- [53] Gulati S, Jamshad M, Knowles T J, Morrison K A, Downing R, Cant N, Collins R, Koenderink J B, Ford R C, Overduin M, Kerr I D, Dafforn T R, Rothnie A J. *Biochem. J.*, **2014**, 461(2): 269 – 278.
- [54] Korotych O I, Nguyen T T, Reagan B C, Burch – Smith T M, Bruce B D. *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, **2021**, 1862(3): 148347.
- [55] Chorev D S, Baker L A, Wu D, Beilsten – Edmands V, Rouse S L, Zeev – Ben – Mordehai T, Jiko C, Samsudin F, Gerle C, Khalid S, Stewart A G, Matthews S J, Grunewald K, Robinson C V. *Science*, **2018**, 362(6416): 829 – 834.
- [56] Chorev D S, Tang H, Rouse S L, Bolla J R, von Kügelgen A, Baker L A, Wu D, Gault J, Grunewald K, Bharat T A M, Matthews S J, Robinson C V. *Nat. Protoc.*, **2020**, 15(5): 1690 – 1706.
- [57] Sobti M, Smits C, Wong A S, Ishmukhametov R, Stock D, Sandin S, Stewart A G. *eLife*, **2016**, 5: e21598.

(责任编辑: 丁 岩)