



基于质谱的组蛋白修饰鉴定技术及新修饰发现

陈凯峰^{1,2}, 赵雯思¹, 章珺^{1,2}, 赵帅³, 李海涛³, 谭敏佳^{1,2*}

1. 中国科学院上海药物研究所, 原创新药全国重点实验室, 上海 201203

2. 中国科学院大学, 北京 100049

3. 清华大学基础医学院, 北京 100084

*通讯作者, E-mail: mjtan@simmm.ac.cn

收稿日期: 2025-02-26; 接受日期: 2025-03-14; 网络版发表日期: 2025-03-24

国家自然科学基金重大研究计划集成项目(编号: 92153302)资助

摘要 组蛋白修饰是表观遗传调控的重要机制, 在生命活动调节中发挥基础作用. 组蛋白修饰高度复杂, 目前已报道30多种化学修饰类型和数百个修饰位点, 因此组蛋白修饰全景高效表征技术的开发对于组蛋白修饰解析和后续生物学功能研究至关重要. 近年来随着高分辨质谱技术的发展, 质谱技术已成为系统性鉴定组蛋白修饰的主要手段. 质谱通过检测修饰引入的质量位移, 一方面可以对不同组蛋白修饰类型进行无偏向性鉴定和定量分析, 另一方面还能检测到未知翻译后修饰的质量位移, 成为新型翻译后修饰发现的最关键技术之一. 本评述关注近年来基于质谱的组蛋白修饰鉴定技术研究, 并且总结了近年来报道的新型组蛋白修饰.

关键词 蛋白组学, 组蛋白修饰, 新型翻译后修饰

1 引言

真核生物的染色质基本单元为核小体, 由约147 bp的DNA缠绕核心组蛋白(H2A、H2B、H3、H4)八聚体组成, 核小体间通过H1相连^[1]. 组蛋白的氨基酸残基上可发生多种酶促或非酶促反应, 形成30余种结构各异的组蛋白翻译后修饰(histone PTM)^[2,3], 发生于近180个不同氨基酸位点上^[2,4], 形成复杂的“组蛋白密码”(histone code). 组蛋白修饰受到精细调控: 包括催化修饰添加的修饰酶(writer)、催化修饰去除的去修饰酶(eraser)以及识别修饰基团的读取器(reader)^[5]. 组蛋白修饰起到重要表观遗传调控作用^[6], 可通过改变电荷分布促进染色体解聚, 还能通过reader影响下游

效应分子的募集^[7]来调控基因表达^[8~10]. 组蛋白PTM的失调与神经系统疾病、炎症和肿瘤等多种疾病相关^[11,12], 是药物研发的重要靶点, 如美国食品药品监督管理局(FDA)已批准靶向组蛋白乙酰化的HDAC抑制剂伏立诺他、罗米地辛等用于T细胞淋巴瘤、多发性骨髓瘤治疗^[13]等.

组蛋白修饰检测的主要手段包括蛋白免疫印迹分析、染色质免疫共沉淀测序(ChIP-seq)分析、质谱分析等. 其中蛋白免疫印迹是使用抗体检测蛋白翻译后修饰的经典分子生物学手段. ChIP-seq分析^[14]结合化学交联、抗体富集以及高通量测序手段, 可分析目标修饰位点在基因组上的分布. 在ChIP-seq基础上开发的核酸酶靶向切割和释放(CUT&RUN)技术、靶向剪

引用格式: Chen K, Zhao W, Zhang J, Zhao S, Li H, Tan M. Mass spectrometry-based technologies for histone PTM analysis and novel PTM discovery. *Sci Sin Chim*, 2025, 55: 977–985, doi: [10.1360/SSC-2025-0043](https://doi.org/10.1360/SSC-2025-0043)

切及转座酶(CUT&Tag)技术可简化实验流程、降低样本起始量并缩短检测周期。但上述方法均高度依赖抗体,并且单次只能分析单个修饰位点,即便最新报道的多通道定量ChIP (MINUTE-ChIP)技术也仅能同时分析6个修饰位点^[15],难以系统解析复杂的组蛋白密码。

随着高分辨质谱技术的发展,蛋白质组学技术已成为蛋白及蛋白翻译后修饰研究的关键工具,包括自上而下(top-down)、自中而下(middle-down)和自下而上(bottom-up)三种检测策略,其中自下而上策略应用最为广泛。质谱通过检测PTM引入的质量位移,可无偏地对PTM进行高通量分析,并且可以鉴定到未知翻译后修饰的质量位移。进一步结合化学同位素标记、代谢同位素标记、非标定量等策略,还可实现对组蛋白PTM的系统定量分析。因此在组蛋白修饰的全景表征、新型修饰的鉴定等研究中被广泛应用,如图1所示。本评述主要关注基于蛋白质组学的组蛋白修饰鉴定技术的发展,以及近年来基于质谱的新型组蛋白修饰的报道。

2 基于质谱的组蛋白修饰鉴定技术

利用质谱进行组蛋白PTM的分析一般需要对样本中的组蛋白进行分离纯化。组蛋白提取通常采用酸提法:即通过低渗溶液破碎细胞膜后以酸性溶液抽提组蛋白,最后使用三氯乙酸进行沉淀^[16,17]。组蛋白样本可进一步通过十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)按分子量分离^[18],或者经由反相高效液相色谱法(RP-HPLC)按亲疏水性分离^[19]。分离后的组蛋白可由经典溶液内酶切或胶内酶切进行质谱样本准备。

2.1 基于化学衍生化的组蛋白修饰质谱分析

胰蛋白酶(trypsin)是经典蛋白质组学中常用的工具酶,可特异性切割赖氨酸(K)和精氨酸(R)残基C末端。但由于组蛋白富含K和R,酶切后产生的部分肽段较短且亲水性强,在液相色谱-质谱联用(LC-MS/MS)分析中的色谱行为较差。2007年, Garcia等^[20]提出基于

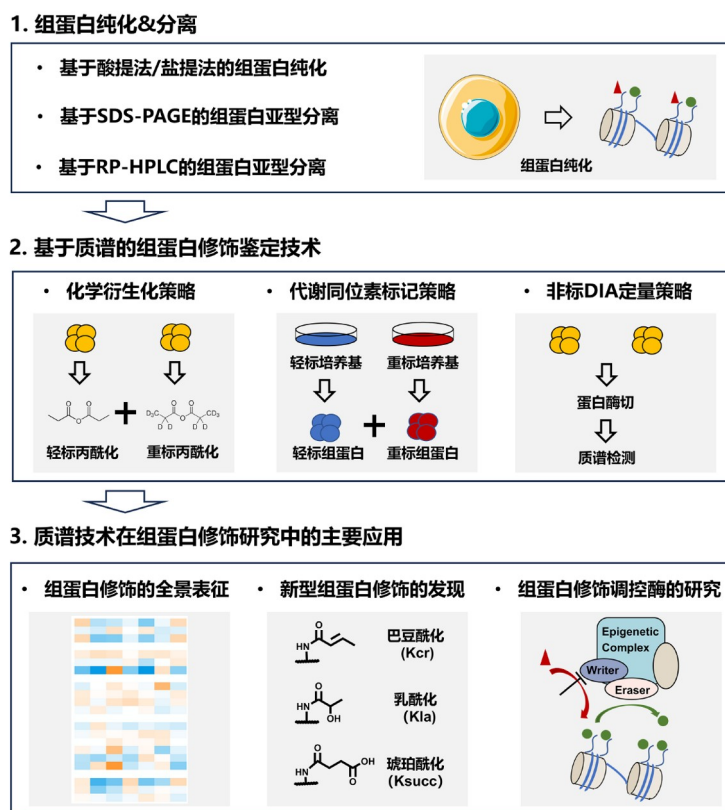


图1 (网络版彩图)基于蛋白质组学的组蛋白修饰鉴定策略及主要应用

Figure 1 (Color online) Proteomic-based strategies for histone PTMs identification and their major applications.

化学丙酰化标记的组蛋白修饰鉴定方法, 在酶切前使用丙酸酐对游离氨基和单甲基化的氨基进行丙酰化标记, 使trypsin仅能切割R以避免产生过短肽段; 酶切后继续对新生肽段N端的 α -氨基进行丙酰化标记, 提高肽段疏水性以改善色谱行为, 主要获得的2价与3价衍生化肽段也易于后续质谱解析. 该方法还可结合稳定同位素化学标记(如氘代丙酸酐)对组蛋白修饰进行相对定量^[21].

除了使用丙酸酐以外, 后续研究也开发了基于其他衍生化试剂的组蛋白修饰鉴定策略. 例如, 丙酸酐标记存在较高副反应, 如丝/苏/酪氨酸(S/T/Y)上的过丙酰化、酸性氨基酸和C末端的酯化或酰胺化等^[22,23]. 为了改善上述问题, 2013年, Liao等^[24]使用反应活性较低的*N*-羟基琥珀酰亚胺丙酸酯(NHS-Pr)替代丙酸酐以减少过丙酰化. 2015年, Maile等^[25]提出使用异氰酸苯酯(PIC)标记肽段N端以提高肽段离子化效率, 使低丰度修饰(如H3K4甲基化)更易被检测. 2021年, Kucharikova等^[26]用三甲基乙酸酐(TMA)替代丙酸酐, 实现对修饰异构肽(isobaric peptide)的色谱分离. 同年Zappacosta实验室^[27]采用化学乙酰化标记分析H4上K与R的单/双甲基化等.

2.2 基于代谢同位素标记的组蛋白修饰质谱分析

基于细胞培养的稳定同位素标记(SILAC)技术通过在培养基中添加稳定同位素标记的重标氨基酸对蛋白进行标记, 通过轻重标肽段一级质谱峰曲线下面积(AUC)进行相对定量. 该方法标记效率高、无化学衍生化的副反应且操作误差小. 如2018年, 耿美玉等^[28]利用SILAC分析了EZH2抑制剂对肿瘤细胞组蛋白修饰的影响, 对111个组蛋白修饰位点进行了准确定量. 脉冲式技术(pSILAC)通过切换细胞培养条件(如将轻标培养基切换为重标)来标记新生蛋白, 以分析蛋白的合成、降解与修饰周转率^[29]. 2010年, Garcia团队^[30]利用pSILAC评估不同组蛋白亚型及其修饰周转率, 发现乙酰化的整体周转率高于甲基化. 2015年, Alabert等^[31]结合pSILAC与新生染色质捕获技术, 分析了染色质复制中组蛋白修饰的变化. 超级SILAC (super-SILAC)技术则扩展了SILAC在组织样本中的应用. 其引入SILAC重标的组蛋白标准品作为内参, 实现组织样本间的修饰相对定量^[32]. 此外, 添加同位素标记的修饰供体也可标记对应组蛋白修饰类型以进行质谱分

析. 如2010年, Garcia团队^[33]使用重甲基化SILAC (hm-SILAC), 利用重标甲硫氨酸作为甲基化供体进行标记, 实现高可信度的组蛋白甲基化鉴定.

2.3 基于DIA的组蛋白修饰质谱分析

传统的数据依赖性采集(DDA)模式仅碎裂并检测高强度前体离子, 而低丰度肽段不易被检测到, 数据重现性低且缺失值较多^[34]. 而数据非依赖性采集(DIA)模式通过分窗口扫描, 对一级谱的所有前体离子进行检测, 获得碎片离子混合谱图^[35]. 该方法增强了对低丰度肽段的检测, 减少了批次差异, 提高了重现性, 已被广泛应用于蛋白组学和磷酸化修饰组学等研究^[36,37].

在组蛋白修饰分析中, DIA模式还可解析修饰异构肽. 修饰异构肽由于分子量和序列相同, 在DDA模式下难以区分, 如包含H4K5/8/12/16的GKGGKGLG-KGGAKR单乙酰化肽段由于修饰位点的不同可能有4种异构体^[38,39], 而DIA模式可利用二级谱(MS2)中不同异构体的特征碎片离子对它们进行精准区分与定量^[38]. 另外, DIA相比DDA对低丰度肽段友好, 其在单细胞蛋白组学中具有广泛应用. 2024年, Sidoli等^[40]通过结合cellenONE单细胞分选及样本制备系统和timsTOF Ultra质谱DIA采集技术, 在单细胞水平进行组蛋白修饰定量分析, 该方法定量分析了68种组蛋白修饰肽, 通过组蛋白修饰水平的差异区分了HDAC抑制剂处理组与对照组的细胞, 并识别了药物响应异质性细胞亚群, 为表观遗传药物机制研究提供了新技术手段.

2.4 基于抗体富集的组蛋白修饰质谱分析

基于抗体的修饰肽段富集策略也经常与质谱分析结合, 应用于鉴定低丰度组蛋白修饰. 该策略通常使用针对特定PTM类型的泛抗体, 对带有目标修饰的酶切肽段进行基于免疫沉淀(IP)的富集, 以提高目标修饰肽段在待测样本中的相对丰度并提高质谱鉴定深度. 若与定量策略整合使用还能实现对低丰度组蛋白修饰的深度定量分析. 例如, 2019年, 芝加哥大学赵英明团队^[41]使用泛乙酰化抗体富集对组蛋白乙酰化位点进行质谱鉴定, 并结合SILAC策略对组蛋白乙酰化定量全景进行表征. 该方法能针对特定修饰类型进行深度质谱检测, 但是局限于对抗体的依赖并且每次检测主要针对一种修饰类型.

2.5 其他基于质谱的组蛋白修饰分析

2014年, Garcia团队^[42]利用靶向质谱技术研究组蛋白修饰, 通过体外实验获得修饰肽段的质荷比、保留时间以建立靶向列表, 进而针对目标肽段进行MS2扫描, 改善对组蛋白修饰特别是低丰度修饰的检测效果. 2019年, 该团队还提出基于直接进样的质谱检测(DI-MS)方法, 实现1 min内检测近200种组蛋白修饰肽, 相比常规LC-MS/MS分析显著缩短了质谱分析的时间^[43]. 2024年, 该团队将捕集型离子淌度(TIMs)与平行累积连续碎裂(PASEF)模式结合进行组蛋白修饰分析, 其中TIMs可基于离子淌度区分不同肽段以提高鉴定分离维度, PASEF则加快了MS2扫描使得修饰肽鉴定数量大幅增加^[44].

3 基于蛋白质组学的新型组蛋白修饰报道

经典的组蛋白修饰——乙酰化和甲基化在1963~1964年被相继发现^[45,46]. 组蛋白甲基化包括赖氨酸单/双/三甲基化(Kme1/2/3)和精氨酸单/双甲基化(Rme1/Rme2), 都来源于S-腺苷甲硫氨酸. 不同甲基化位点发挥不同的表观遗传调控功能, 如H3K4、H3K79甲基化激活转录, 而H3K9、H3K27、H4K20甲基化等抑制转录^[47,48]. 赖氨酸乙酰化(Kac)供体为乙酰辅酶A, 其来源包括ATP柠檬酸裂合酶^[49]及乙酰辅酶A合成酶(ACSS2)催化^[50,51]产生. Kac一方面通过中和赖氨酸的正电荷降低组蛋白-DNA静电作用并开放染色质, 另一方面能被含溴结构域(BRD)蛋白识别并介导后续调控^[3].

近些年得益于质谱技术的发展, 大量研究基于质谱鉴定未知质量位移, 发现了新的组蛋白修饰类型. 经典新型组蛋白PTM的研究流程如下: (1) 高分辨质谱识别未报道的质量位移; (2) 推测修饰的潜在元素组成与结构; (3) 结合多学科方法进行验证, 包括化学生物学(合成修饰肽段并对比色谱质谱行为)、免疫化学(基于抗体的蛋白免疫印迹检测)与分子生物学(研究修饰供体、底物及上下游调控酶等)等手段. 按照该流程, 近20年来相继报道了二十余种新型组蛋白修饰, 特别是新型组蛋白酰化修饰(图2), 拓展了组蛋白修饰密码及其表观遗传调控网络.

3.1 新型组蛋白酰化修饰

2011年, 美国芝加哥大学赵英明研究团队^[52]整合溶液内酶切、胶内酶切和化学丙酰化标记的策略, 使用限制性搜库和非限制性搜库的数据库检索方法鉴定组蛋白修饰全景. 该研究总共检测到130个组蛋白修饰位点, 其中包括未报道的修饰位点如18个赖氨酸单甲基化、8个精氨酸单甲基化, 并发现了一种新修饰类型赖氨酸巴豆酰化(Kcr). 研究人员首先合成巴豆酰化肽段与内源修饰肽段进行LC-MS/MS分析, 结果两者在色谱中保留时间一致、在质谱中二级谱碎裂模式一致. 随后利用重标巴豆酸对细胞进行代谢标记, 在质谱检测中成功鉴定到重标巴豆酰化修饰. 上述质谱分析结果证明鉴定到的内源质量位移属于赖氨酸巴豆酰化. 该修饰具有刚性平面结构, 其供体巴豆酰辅酶A是丁酰辅酶A和乙酰辅酶A的代谢中间产物, 也可由

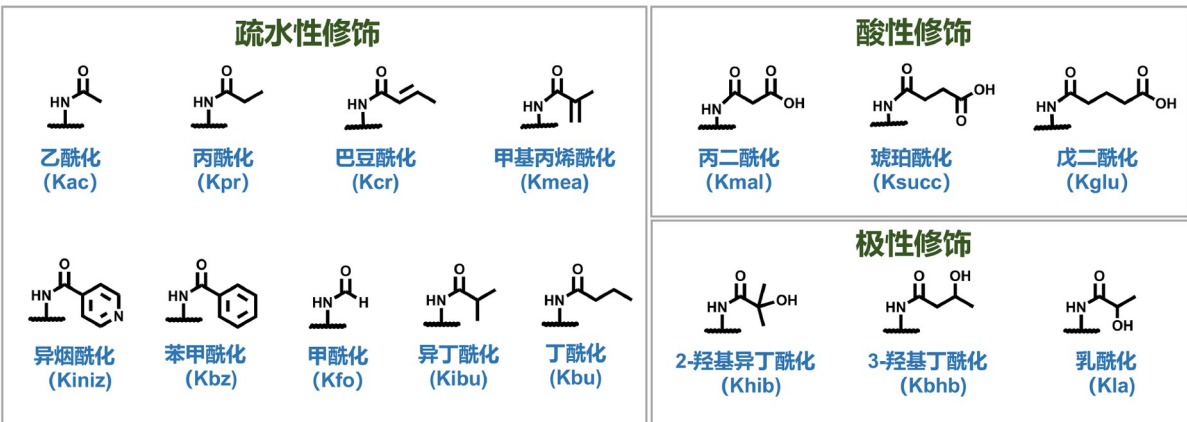


图2 (网络版彩图)组蛋白主要新型酰化修饰结构示意图
Figure 2 (Color online) Structures of representative histone acylation.

ACSS2催化巴豆酸生成. 其催化酶包括p300/CBP、GCN5、MOF, 去修饰酶包括HDAC1/2/3/8和SIRT1/2/3, 可被YEATS和DPF结构域相关蛋白识别^[3].

在随后几年中, 带有酸性侧链的丙二酰化(Kmal)^[53]、琥珀酰化(Ksucc)^[53]、戊二酰化(Kglu)^[54]和带有极性侧链的2-羟基异丁酰化(Khib)^[55]、 β -羟基丁酰化(Kbhb)^[56]等相继被报道. 带有酸性侧链的Ksucc、Kmal和Kglu将赖氨酸残基转化为负电荷状态, 更显著地促进染色质解聚. 其中Ksucc供体琥珀酰辅酶A来自三羧酸循环(TCA)和支链氨基酸代谢^[57], Kmal供体丙二酰辅酶A由Ac-CoA羧化或奇数脂肪酸 β -氧化生成^[58], Kglu供体戊二酰化辅酶A与赖氨酸和色氨酸代谢相关^[54]. GCN5被报道可催化Ksucc和Kglu的添加, SIRT5可催化这三种酸性酰化修饰去除^[59], SIRT7则有去除Ksucc和Kglu的活性^[60]. 在reader研究方面, GAS41被报道可识别Ksucc, 但具体表观遗传调控功能未知^[61]. 带有极性侧链的Khib于2014年被报道^[55], 潜在供体是2-羟基异丁酰辅酶A, 可能来源于肠道菌群代谢, p300和TIP60可催化修饰形成, HDAC1/2/3催化去除^[62-64]. 2016年发现的Kbhb与Khib是异构体^[56], 以酮体代谢产物 β -羟基丁酸为供体, 受p300和HDAC1/2/3动态调控^[65].

2018年, 外源组蛋白修饰苯甲酰化(Kbz)被发现^[66], 其供体苯甲酰辅酶A来源于食品添加剂苯甲酸钠. 苯甲酰化可由GCN5添加, SIRT2去除^[67], 被MOZ、AF9、YEATS2识别^[68]. 2019年, 乳酰化修饰(Kla)被报道, 其代谢来源于糖酵解产物乳酸^[41]. 该修饰由p300添加, HDAC1/2/3去除^[69], ACSS2与GTP特异性琥珀酰辅酶A合成酶(GTPSCS)被报道可介导其供体乳酰辅酶A生成^[70,71]. 乳酰化有三种可能异构体, 分别是L型乳酰化、D型乳酰化和羧乙基化, 这三种异构体可通过LC-MS/MS分析加以区分. 在常规LC-MS/MS分析中, 羧乙基化合成肽段保留时间与细胞内源肽段不一致, 而通过手性衍生化串联LC-MS/MS分析能进一步区分L型与D型乳酰化, 研究人员通过上述方法证明细胞内主要乳酰化形式为L型乳酰化^[72]. 2021年发现的异烟酰化(Kinic)是一种含吡啶环的酰化修饰, 和Kbz一样属于外源代谢物引入的组蛋白修饰, 其供体异烟碱辅酶A来源于抗结核类药物异烟肼, 修饰水平受p300/CBP和HDAC3调控^[73]. 同年, Kibu和Kmea也被报道, 分别是Kbu和Kcr的异构体, 但相关表观遗传

传功能尚未充分研究^[74,75].

2023年, 另一个酮体代谢相关的组蛋白修饰乙酰乙酰化(Kacac)被发现, 其主要由HBO1添加, HDAC3去除^[76], 供体乙酰乙酰辅酶A是酮体代谢途径的代谢物^[77]. 2023年, 乙酰甲基化(Kacme)的发现颠覆了相同位点不能同时发生Kac与Kme的传统认知. 研究发现, 一些甲基化位点可在p300催化下发生乙酰化修饰形成赖氨酸乙酰甲基化. 该修饰与丙酰化质量位移一致, 但两者二级质谱图中会产生不同的诊断离子: 其中Kacme在二级谱图中存在诊断离子 m/z 157.1335和 m/z 270.1812, 而Kpr诊断离子为 m/z 140.1070, 研究人员正是通过质谱检测中的特征诊断离子差异对两者加以区分^[78].

3.2 其他新型组蛋白修饰

2019年, 第一种组蛋白单胺化修饰5-羟色胺化(Qser)被发现, 其供体5-羟色胺可在谷氨酰胺转移酶(TGM2)催化下生成H3Q5ser. 该修饰位点与H3K4me3形成共修饰, 增强与转录因子TFIID的结合, 促进转录激活^[79], 同时阻遏去甲基化酶KDM5和LSD1的结合, 抑制H3K4me3的去除, 维持转录激活状态^[80]. 2020年, 研究人员发现了另一种单胺化修饰——组蛋白多巴胺化(Qdop), 同样以神经递质多巴胺为供体, 可被TGM2催化产生H3Q5dop, 并与药物成瘾相关^[81]. 随后在2025年, 研究人员发现了另一个神经递质介导的组蛋白修饰——组胺化(Qhis)^[82]. 与5-羟色胺化不同, H3Q5his阻遏H3K4甲基转移酶的结合并抑制H3K4甲基化. 另外, 人们发现TGM2能同时催化H3Q5单胺化的添加和去除, 在TGM2调控下, 该H3Q5his水平存在昼夜节律性并调节相关基因的表达. 上述研究揭示神经递质可直接修饰组蛋白, 通过调控表观遗传影响神经系统功能.

除了上述单胺化修饰外, 2023年研究人员发现的新型组蛋白修饰——脯氨酸羟化, 也能与H3K4甲基化交互调控^[83]. 脯氨酸羟化酶EGLN2能催化组蛋白H3P16的羟基化(H3P16oh), 该位点进一步募集去甲基化酶KDM5以降低H3K4me3水平, 形成的EGLN2-H3P16oh-KDM5A通路在三阴性乳腺癌中调控WNT/ β -catenin信号网络. 此外, 由于组蛋白对亲电基团敏感, 易发生非酶促共价修饰(NECM). 例如, 甲基乙二醛(MGO)可通过米拉德反应与K、R形成羧乙基化修饰,

该修饰可被脱糖酶DJ1去除^[84]。乙二醛、3-脱氧葡萄糖醛酮等也可形成非酶促糖化修饰^[85]。脂质过氧化产物4-氧代-2-壬烯醛(4-ONE)可通过迈克尔加成反应形成4-氧代壬酰化(Kgon)修饰,并被SIRT2去除^[86]。尿素循环中产生的氨甲酰磷酸能够形成氨甲酰化(Kcp)修饰^[87]。甲硫氨酸代谢产生的同型半胱氨酸可形成同型半胱氨酸化(Khcy)修饰^[88]。这些NECM被推测与酶促修饰在相同位点上发生竞争,但具体表观遗传调控机制仍需研究^[89]。

4 总结与展望

随着高分辨质谱技术的发展,基于蛋白质组学进

行组蛋白修饰分析的技术被不断报道,包括基于化学衍生化的技术、基于代谢同位素标记技术、DIA技术等,这些方法实现了对细胞样本和组织样本内组蛋白修饰水平的全景定量。另外,质谱也是研究新型翻译后修饰的关键技术手段,在过去的二十年里包括新型酰化修饰、单胺化修饰、非酶促共价修饰等在内的二十多种新型组蛋白修饰被报道,这些新型修饰极大丰富了组蛋白修饰密码,拓宽了表观遗传调控机制。目前,这些新型组蛋白修饰特别是低丰度修饰的质谱鉴定流程仍比较复杂,一般通过特异性泛抗体对目标修饰肽段进行富集后再进行质谱检测,这限制了对新型组蛋白修饰的研究,因此低丰度组蛋白修饰的系统鉴定技术仍有待开发。

参考文献

- Bannister AJ, Kouzarides T. *Cell Res*, 2011, 21: 381–395
- Millán-Zambrano G, Burton A, Bannister AJ, Schneider R. *Nat Rev Genet*, 2022, 23: 563–580
- Hao B, Chen K, Zhai L, Liu M, Liu B, Tan M, Xue Y. *Genomics Proteomics BioInf*, 2024, 22: qzae019
- Andrés M, García-Gomis D, Ponte I, Suau P, Roque A. *Int J Mol Sci*, 2020, 21: 5941
- Dai Z, Ramesh V, Locasale JW. *Nat Rev Genet*, 2020, 21: 737–753
- Egger G, Liang G, Aparicio A, Jones PA. *Nature*, 2004, 429: 457–463
- Xu Y, Shi Z, Bao L. *Mol Cell Proteomics*, 2022, 21: 100193
- Xu H, Wu M, Ma X, Huang W, Xu Y, Pandi G. *Biomed Res Int*, 2021, 2021: 6635225
- Hyun K, Jeon J, Park K, Kim J. *Exp Mol Med*, 2017, 49: e324
- Wang GG, Song J, Wang Z, Dormann HL, Casadio F, Li H, Luo JL, Patel DJ, Allis CD. *Nature*, 2009, 459: 847–851
- Li J, Ahn JH, Wang GG. *Cell Mol Life Sci*, 2019, 76: 2899–2916
- Netea MG, Joosten LAB, Latz E, Mills KHG, Natoli G, Stunnenberg HG, O'Neill LAJ, Xavier RJ. *Science*, 2016, 352: aaf1098
- Zhai L, Chen K, Hao B, Tan M. *Acta Pharmacol Sin*, 2022, 43: 3112–3129
- Barski A, Cuddapah S, Cui K, Roh TY, Schones DE, Wang Z, Wei G, Chepelev I, Zhao K. *Cell*, 2007, 129: 823–837
- Kumar B, Navarro C, Yung PYK, Lyu J, Salazar Mantero A, Katsori AM, Schwämmle H, Martin M, Elsässer SJ. *Nat Protoc*, 2025, 20: 779–809
- Murray K. *J Mol Biol*, 1966, 15: 409–419
- Von Holt C, Brandt W F, Greyling H J, Lindsey GG, Retief JD, Rodrigues JD, Schwager S, Sewell BT. *Methods Enzymol*, 1989, 170: 431–523
- Johns EW. *Biochem J*, 1967, 104: 78–82
- Shechter D, Dormann HL, Allis CD, Hake SB. *Nat Protoc*, 2007, 2: 1445–1457
- Garcia BA, Mollah S, Ueberheide BM, Busby SA, Muratore TL, Shabanowitz J, Hunt DF. *Nat Protoc*, 2007, 2: 933–938
- Plazas-Mayorca MD, Zee BM, Young NL, Fingerman IM, LeRoy G, Briggs SD, Garcia BA. *J Proteome Res*, 2009, 8: 5367–5374
- Paternoster V, Edhager AV, Sibbersen C, Nielsen AL, Børglum AD, Christensen JH, Palmfeldt J. *Proteomics*, 2016, 16: 2059–2063
- Meert P, Dierickx S, Govaert E, De Clerck L, Willems S, Dhaenens M, Deforce D. *Proteomics*, 2016, 16: 1970–1974
- Liao R, Wu H, Deng H, Yu Y, Hu M, Zhai H, Yang P, Zhou S, Yi W. *Anal Chem*, 2013, 85: 2253–2259
- Maile TM, Izrael-Tomasevic A, Cheung T, Guler GD, Tindell C, Masselot A, Liang J, Zhao F, Trojer P, Classon M, Arnott D. *Mol Cell Proteom*, 2015, 14: 1148–1158
- Kuchariková H, Dobrovolná P, Lochmanová G, Zdráhal Z. *Mol Cell Proteom*, 2021, 20: 100114
- Zappacosta F, Wagner CD, Della Pietra Iii A, Gerhart SV, Keenan K, Korenchuck S, Quinn CJ, Barbash O, McCabe MT, Annan RS. *Mol Cell*

Proteom, 2021, 20: 100067

- 28 Huang X, Yan J, Zhang M, Wang Y, Chen Y, Fu X, Wei R, Zheng X, Liu Z, Zhang X, Yang H, Hao B, Shen Y, Su Y, Cong X, Huang M, Tan M, Ding J, Geng M. *Cell*, 2018, 175: 186–199.e19
- 29 Schwanhäusser B, Busse D, Li N, Dittmar G, Schuchhardt J, Wolf J, Chen W, Selbach M. *Nature*, 2011, 473: 337–342
- 30 Zee BM, Levin RS, DiMaggio PA, Garcia BA. *Epigenet Chromatin*, 2010, 3: 22
- 31 Alabert C, Barth TK, Reverón-Gómez N, Sidoli S, Schmidt A, Jensen ON, Imhof A, Groth A. *Genes Dev*, 2015, 29: 585–590
- 32 Noberini R, Savoia EO, Brandini S, Greco F, Marra F, Bertalot G, Pruneri G, McDonnell LA, Bonaldi T. *Clin Epigenet*, 2021, 13: 145
- 33 Zee BM, Levin RS, Xu B, LeRoy G, Wingreen NS, Garcia BA. *J Biol Chem*, 2010, 285: 3341–3350
- 34 Link AJ, Eng J, Schieltz DM, Carmack E, Mize GJ, Morris DR, Garvik BM, Yates Iii JR. *Nat Biotechnol*, 1999, 17: 676–682
- 35 Kitata RB, Yang JC, Chen YJ. *Mass Spectrometry Rev*, 2023, 42: 2324–2348
- 36 Yang Y, Liu X, Shen C, Lin Y, Yang P, Qiao L. *Nat Commun*, 2020, 11: 146
- 37 Lou R, Cao Y, Li S, Lang X, Li Y, Zhang Y, Shui W. *Nat Commun*, 2023, 14: 94
- 38 Krautkramer KA, Reiter L, Denu JM, Dowell JA. *J Proteome Res*, 2015, 14: 3252–3262
- 39 Cole J, Hanson EJ, James DC, Dockrell DH, Dickman MJ. *Rapid Comm Mass Spectrometry*, 2019, 33: 897–906
- 40 Cutler R, Corveleyn L, Crtorteca C, Cantlon J, Jacome VSA, Deforce D, Vijg J, Dhaenens M, Papanastasiou M, Carr Steven A, Sidoli S. *BioRxiv*, 2024, doi: 10.1101/2024.07.05.602213
- 41 Zhang D, Tang Z, Huang H, Zhou G, Cui C, Weng Y, Liu W, Kim S, Lee S, Perez-Neut M, Ding J, Cxyz D, Hu R, Ye Z, He M, Zheng YG, Shuman HA, Dai L, Ren B, Roeder RG, Becker L, Zhao Y. *Nature*, 2019, 574: 575–580
- 42 Simithy J, Sidoli S, Yuan ZF, Coradin M, Bhanu NV, Marchione DM, Klein BJ, Bazilevsky GA, McCullough CE, Magin RS, Kutateladze TG, Snyder NW, Marmorstein R, Garcia BA. *Nat Commun*, 2017, 8: 1141
- 43 Sidoli S, Kori Y, Lopes M, Yuan ZF, Kim HJ, Kulej K, Janssen KA, Agosto LM, Cunha JPC, Andrews AJ, Garcia BA. *Genome Res*, 2019, 29: 978–987
- 44 Fuller CN, Valadares Tose L, Vitorino FNL, Bhanu NV, Panczyk EM, Park MA, Garcia BA, Fernandez-Lima F. *J Proteome Res*, 2024, 23: 3867–3876
- 45 Phillips D. *Biochem J*, 1963, 87: 258–263
- 46 Allfrey VG, Faulkner R, Mirsky AE. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1964, 51: 786–794
- 47 Cornett EM, Ferry L, Defossez PA, Rothbart SB. *Mol Cell*, 2019, 75: 1092–1101
- 48 Sterling J, Menezes SV, Abbassi RH, Munoz L. *Intl J Cancer*, 2021, 148: 2375–2388
- 49 Wellen KE, Hatzivassiliou G, Sachdeva UM, Bui TV, Cross JR, Thompson CB. *Science*, 2009, 324: 1076–1080
- 50 McDonnell E, Crown SB, Fox DB, Kitir B, Ilkayeva OR, Olsen CA, Grimsrud PA, Hirschey MD. *Cell Rep*, 2016, 17: 1463–1472
- 51 Shvedunova M, Akhtar A. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2022, 23: 329–349
- 52 Tan M, Luo H, Lee S, Jin F, Yang JS, Montellier E, Buchou T, Cheng Z, Rousseaux S, Rajagopal N, Lu Z, Ye Z, Zhu Q, Wysocka J, Ye Y, Khochbin S, Ren B, Zhao Y. *Cell*, 2011, 146: 1016–1028
- 53 Xie Z, Dai J, Dai L, Tan M, Cheng Z, Wu Y, Boeke JD, Zhao Y. *Mol Cell Proteomics*, 2012, 11: 100–107
- 54 Tan M, Peng C, Anderson KA, Chhoy P, Xie Z, Dai L, Park J, Chen Y, Huang H, Zhang Y, Ro J, Wagner GR, Green MF, Madsen AS, Schmiesing J, Peterson BS, Xu G, Ilkayeva OR, Muehlbauer MJ, Braulte T, Mühlhausen C, Backos DS, Olsen CA, McGuire PJ, Pletcher SD, Lombard DB, Hirschey MD, Zhao Y. *Cell Metab*, 2014, 19: 605–617
- 55 Dai L, Peng C, Montellier E, Lu Z, Chen Y, Ishii H, Debernardi A, Buchou T, Rousseaux S, Jin F, Sabari BR, Deng Z, Allis CD, Ren B, Khochbin S, Zhao Y. *Nat Chem Biol*, 2014, 10: 365–370
- 56 Xie Z, Zhang D, Chung D, Tang Z, Huang H, Dai L, Qi S, Li J, Colak G, Chen Y, Xia C, Peng C, Ruan H, Kirkey M, Wang D, Jensen LM, Kwon OK, Lee S, Pletcher SD, Tan M, Lombard DB, White KP, Zhao H, Li J, Roeder RG, Yang X, Zhao Y. *Mol Cell*, 2016, 62: 194–206
- 57 Zhang Z, Tan M, Xie Z, Dai L, Chen Y, Zhao Y. *Nat Chem Biol*, 2011, 7: 58–63
- 58 Peng C, Lu Z, Xie Z, Cheng Z, Chen Y, Tan M, Luo H, Zhang Y, He W, Yang K, Zwaans BMM, Tishkoff D, Ho L, Lombard D, He TC, Dai J, Verdin E, Ye Y, Zhao Y. *Mol Cell Proteomics*, 2011, 10: M111.012658
- 59 Du J, Zhou Y, Su X, Yu JJ, Khan S, Jiang H, Kim J, Woo J, Kim JH, Choi BH, He B, Chen W, Zhang S, Cerione RA, Auwerx J, Hao Q, Lin H. *Science*, 2011, 334: 806–809

- 60 Li L, Shi L, Yang S, Yan R, Zhang D, Yang J, He L, Li W, Yi X, Sun L, Liang J, Cheng Z, Shi L, Shang Y, Yu W. *Nat Commun*, 2016, 7: 12235
- 61 Wang Y, Jin J, Chung MWH, Feng L, Sun H, Hao Q. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2018, 115: 2365–2370
- 62 Huang H, Tang S, Ji M, Tang Z, Shimada M, Liu X, Qi S, Locasale JW, Roeder RG, Zhao Y, Li X. *Mol Cell*, 2018, 70: 663–678.e6
- 63 Huang H, Luo Z, Qi S, Huang J, Xu P, Wang X, Gao L, Li F, Wang J, Zhao W, Gu W, Chen Z, Dai L, Dai J, Zhao Y. *Cell Res*, 2018, 28: 111–125
- 64 Wang N, Jiang Y, Peng P, Liu G, Qi S, Liu K, Mei Q, Li J. *Oxidative Med Cell Longev*, 2022, 2022: 4571319
- 65 Huang H, Zhang D, Weng Y, Delaney K, Tang Z, Yan C, Qi S, Peng C, Cole PA, Roeder RG, Zhao Y. *Sci Adv*, 2021, 7: eabe2771
- 66 Huang H, Zhang D, Wang Y, Perez-Neut M, Han Z, Zheng Y, Hao Q, Zhao Y. *Nat Commun*, 2018, 9: 3374
- 67 Wang D, Yan F, Wu P, Ge K, Li M, Li T, Gao Y, Peng C, Chen Y. *Nat Commun*, 2022, 13: 1369
- 68 Ren X, Zhou Y, Xue Z, Hao N, Li Y, Guo X, Wang D, Shi X, Li H. *Nucleic Acids Res*, 2021, 49: 114–126
- 69 Moreno-Yruela C, Zhang D, Wei W, Bæk M, Liu W, Gao J, Danková D, Nielsen AL, Bolding JE, Yang L, Jameson ST, Wong J, Olsen CA, Zhao Y. *Sci Adv*, 2022, 8: eabi6696
- 70 Liu R, Ren X, Park YE, Feng H, Sheng X, Song X, AminiTabrizi R, Shah H, Li L, Zhang Y, Abdullah KG, Dubois-Coyne S, Lin H, Cole PA, DeBerardinis RJ, McBrayer SK, Huang H, Zhao Y. *Cell Metab*, 2025, 37: 377–394.e9
- 71 Zhu R, Ye X, Lu X, Xiao L, Yuan M, Zhao H, Guo D, Meng Y, Han H, Luo S, Wu Q, Jiang X, Xu J, Tang Z, Tao Y, Lu Z. *Cell Metab*, 2024, 37: 361–376
- 72 Zhang D, Gao J, Zhu Z, Mao Q, Xu Z, Singh PK, Rimayi CC, Moreno-Yruela C, Xu S, Li G, Sin YC, Chen Y, Olsen CA, Snyder NW, Dai L, Li L, Zhao Y. *Nat Chem Biol*, 2025, 21: 91–99
- 73 Jiang Y, Li Y, Liu C, Zhang L, Lv D, Weng Y, Cheng Z, Chen X, Zhan J, Zhang H. *Nat Commun*, 2021, 12: 5548
- 74 Delaney K, Tan M, Zhu Z, Gao J, Dai L, Kim S, Ding J, He M, Halabelian L, Yang L, Nagarajan P, Parthun MR, Lee S, Khochbin S, Zheng YG, Zhao Y. *Cell Discov*, 2021, 7: 1–4
- 75 Zhu Z, Han Z, Halabelian L, Yang X, Ding J, Zhang N, Ngo L, Song J, Zeng H, He M, Zhao Y, Arrowsmith CH, Luo M, Bartlett MG, Zheng YG. *Nucleic Acids Res*, 2021, 49: 177–189
- 76 Gao Y, Sheng X, Tan D, Kim SJ, Choi S, Paudel S, Lee T, Yan C, Tan M, Kim KM, Cho SS, Ki SH, Huang H, Zhao Y, Lee S. *Adv Sci*, 2023, 10: 2300032
- 77 Fu Q, Nguyen T, Kumar B, Azadi P, Zheng Y. *BioRxiv*, 2024, 10: doi: 10.1101/2024.10.31.621296
- 78 Lu-Culligan WJ, Connor LJ, Xie Y, Ekundayo BE, Rose BT, Machyna M, Pintado-Urbanc AP, Zimmer JT, Vock IW, Bhanu NV, King MC, Garcia BA, Bleichert F, Simon MD. *Nature*, 2023, 622: 173–179
- 79 Farrelly LA, Thompson RE, Zhao S, Lepack AE, Lyu Y, Bhanu NV, Zhang B, Loh YHE, Ramakrishnan A, Vadodaria KC, Heard KJ, Erikson G, Nakadaï T, Bastle RM, Lukasak BJ, Zebroski Iii H, Alenina N, Bader M, Berton O, Roeder RG, Molina H, Gage FH, Shen L, Garcia BA, Li H, Muir TW, Maze I. *Nature*, 2019, 567: 535–539
- 80 Zhao S, Chuh KN, Zhang B, Dul BE, Thompson RE, Farrelly LA, Liu X, Xu N, Xue Y, Roeder RG, Maze I, Muir TW, Li H. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2021, 118: e2016742118
- 81 Lepack AE, Werner CT, Stewart AF, Fulton SL, Zhong P, Farrelly LA, Smith ACW, Ramakrishnan A, Lyu Y, Bastle RM, Martin JA, Mitra S, O' Connor RM, Wang ZJ, Molina H, Turecki G, Shen L, Yan Z, Calipari ES, Dietz DM, Kenny PJ, Maze I. *Science*, 2020, 368: 197–201
- 82 Zheng Q, Weekley BH, Vinson DA, Zhao S, Bastle RM, Thompson RE, Stransky S, Ramakrishnan A, Cunningham AM, Dutta S, Chan JC, Di Salvo G, Chen M, Zhang N, Wu J, Fulton SL, Kong L, Wang H, Zhang B, Vostal L, Upad A, Dierdorff L, Shen L, Molina H, Sidoli S, Muir TW, Li H, David Y, Maze I. *Nature*, 2025, 637: 974–982
- 83 Liu X, Wang J, Boyer JA, Gong W, Zhao S, Xie L, Wu Q, Zhang C, Jain K, Guo Y, Rodriguez J, Li M, Uryu H, Liao C, Hu L, Zhou J, Shi X, Tsai YH, Yan Q, Luo W, Chen X, Strahl BD, von Kriegsheim A, Zhang Q, Wang GG, Baldwin AS, Zhang Q. *Nat Genet*, 2022, 54: 1721–1735
- 84 Zheng Q, Omans ND, Leicher R, Osunsade A, Agustinus AS, Finkin-Groner E, D'Ambrosio H, Liu B, Chandarlapaty S, Liu S, David Y. *Nat Commun*, 2019, 10: 1289
- 85 Maksimovic I, David Y. *Trends Biochem Sci*, 2021, 46: 718–730
- 86 Cui Y, Li X, Lin J, Hao Q, Li XD. *ACS Chem Biol*, 2017, 12: 47–51
- 87 O'Neil LJ, Barrera-Vargas A, Sandoval-Heglund D, Merayo-Chalico J, Aguirre-Aguilar E, Aponte AM, Ruiz-Perdomo Y, Gucek M, El-Gabalawy H, Fox DA, Katz JD, Kaplan MJ, Carmona-Rivera C. *Sci Adv*, 2020, 6: eabd2688
- 88 Zhang Q, Bai B, Mei X, Wan C, Cao H, Dan Li H, Wang S, Zhang M, Wang Z, Wu J, Wang H, Huo J, Ding G, Zhao J, Xie Q, Wang L, Qiu Z,

Zhao S, Zhang T. *Nat Commun*, 2018, 9: 3436

89 Zheng Q, Prescott NA, Maksimovic I, David Y. *Chem Res Toxicol*, 2019, 32: 796–807

Mass spectrometry-based technologies for histone PTM analysis and novel PTM discovery

Kaifeng Chen^{1,2}, Wensi Zhao¹, Jun Zhang^{1,2}, Shuai Zhao³, Haitao Li³, Minjia Tan^{1,2*}

¹ State Key Laboratory of Drug Research, Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201203, China

² University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

³ School of Basic Medical Sciences, Tsinghua University, Beijing 100084, China

*Corresponding author (email: mjtan@simmm.ac.cn)

Abstract: Histone post-translational modifications (PTMs) serve as a crucial mechanism in epigenetic regulation and play a fundamental role in the regulation of biological activities. The complexity of histone modifications is remarkable, with over 30 types of modifications and hundreds of modification sites reported, which makes the development of global histone PTM analysis techniques critical. In recent years, with advancements in mass spectrometry technology, proteomics has emerged as a powerful tool for histone modification identification. By detecting mass shifts induced by PTMs, mass spectrometry enables the unbiased identification of multiple histone modification types, as well as the detection of new PTMs with unknown amino acid mass shifts. In this review, we focus on recent developments in mass spectrometry-based techniques for global histone PTM identification and summarize recently discovered new types of histone modifications.

Keywords: proteomics, histone PTM, novel PTM

doi: [10.1360/SSC-2025-0043](https://doi.org/10.1360/SSC-2025-0043)