

温度控制的泛素/三磷酸腺苷相互作用的电喷雾质谱研究

刘思盈^{1#}, 粟雯^{1,2#}, 周仲燕¹, 杨治渝¹, 裴华夫¹,
何芷茹¹, 王娜^{1,3}, 岳磊¹

(1. 湖南大学生物学院, 化学生物传感与化学计量学国家重点实验室, 长沙 410000;
2. 邵阳学院药学院, 邵阳 422000; 3. 湖南科技大学化学与化学工程学院, 湘潭 411101)

摘要 通过基于温度控制的蛋白质小分子相互作用电喷雾质谱(PSMI-ESI-MS)技术探究了模式蛋白质泛素(Ubi)与重要的生物活性小分子三磷酸腺苷(ATP)体系. 在室温条件下, 泛素和ATP以1 $\mu\text{mol/L}$:50 $\mu\text{mol/L}$ 浓度比混合溶液的电喷雾质谱图和自然状态下泛素的电荷特征一致, 主要形成了+5, +6, +7电荷态下的3类峰. ATP主要和+5, +6的泛素分别形成摩尔比为1:1和1:2的复合物, 而+7的泛素-ATP复合物实验中相对较少, 说明低电荷态时的泛素对ATP有更强的亲合力. 通过不同浓度比泛素-ATP的质谱行为分析, 发现浓度维度上的结合状态没有显著差异, 而在不同温度的泛素及泛素-ATP复合物的电荷分布情况有明显差异. 计算得到的结合亲和力随温度的增大而增大, 说明去折叠后的泛素和ATP的相互作用增强. 通过热力学进一步分析了不同浓度ATP对泛素折叠和去折叠吉布斯自由能的影响, 发现ATP的存在增加了泛素去折叠所需的能量, 因此增强了泛素的稳定性. 根据泛素和ATP在温度维度下的电喷雾质谱分析得到了化学计量比、结合亲和力和吉布斯自由能等多维度的信息, 为蛋白质分析, 尤其是与小分子相互作用的研究提供了参考.

关键词 电喷雾质谱; 泛素; 三磷酸腺苷; 蛋白质小分子相互作用

中图分类号 O657.6 文献标志码 A doi: 10.7503/cjcu20240382

Protein-Small Molecule Interaction Electrospray Ionization Mass Spectrometry Study of the Ubiquitin/Adenosine Triphosphate Couple over Temperature Variation

LIU Siying^{1#}, SU Wen^{1,2#}, ZHOU Zhongyan¹, YANG Zhiyu¹,
PEI Huafu¹, HE Zhiru¹, WANG Na^{1,3*}, YUE Lei^{1*}

(1. College of Biology, State Key Laboratory of Chemo/Biosensing and Chemometrics, Hunan University, Changsha 410000, China; 2. College of Pharmacy, Shaoyang University, Shaoyang 422000, China; 3. School of Chemistry and Chemical Engineering, Hunan University of Science and Technology, Xiangtan 411101, China)

Abstract In this paper, protein-small molecule interaction electrospray ionization mass spectrometry (PSMI-ESI-

收稿日期: 2024-08-07. 网络首发日期: 2024-09-04.

联系人简介: 岳磊, 男, 博士, 教授, 主要从事离子淌度质谱仪器开发和应用方面的研究. E-mail: yuelei@hnu.edu.cn

王娜, 女, 博士, 副教授, 主要从事光谱质谱联用和气相离子化学方面的研究. E-mail: wna@hnust.edu.cn

基金项目: 国家重点研发计划项目(批准号: 2023YFF0600040)、国家自然科学基金(批准号: 22174037)、湖南省自然科学基金(批准号: 2023JJ50255)和长沙市自然科学基金(批准号: 202269490128)资助.

Supported by the National Key Research and Development Program of China(No.2023YFF0600040), the National Natural Science Foundation of China(No.22174037), the Joint Funds of Natural Science Foundation of the Hunan Province, China(No.2023JJ50255) and the Project of Natural Science Foundation of Changsha, China(No.202269490128).

共同第一作者.

MS) was used to study a model protein, ubiquitin(Ubi), and one of the most important bioactive small molecules, adenosine triphosphate(ATP) system. At room temperature, the electrospray mass spectra of the Ubi/ATP couple at the concentration ratio of 1 $\mu\text{mol/L}$: 50 $\mu\text{mol/L}$ mainly showed charge states at +5, +6, and +7, corresponding well with the charge of Ubi in native state. ATP mainly formed 1:1 and 1:2(molar ratio) complexes with +5 and +6 ubiquitin while complexes with +7 was much less abundant, indicating that ubiquitin in lower charge state has a stronger binding affinity for ATP. Analysis of Ubi/ATP mass spectra at different ratios showed that there was no significant difference in the binding state at the concentration dimension. However, there was a significant difference in the charge distribution of Ubi and Ubi-ATP complexes at temperature variation. The calculated binding affinity increased with increasing temperature, indicating that the interaction between Ubi and ATP was enhanced after unfolding. Furthermore, Gibbs free energy of folded and unfolded Ubi indicated that the presence of ATP increased the energy required for unfolding, thereby enhancing the stability of ubiquitin. In this study, multi-dimensional information such as stoichiometric ratio, affinity, and Gibbs free energy were obtained based on electrospray mass spectrometry analysis of ubiquitin and ATP in the temperature dimension. It provides a general strategy for subsequent studies on protein-small molecule interactions.

Keywords Electrospray ionization mass spectrometry; Ubiquitin; Adenosine triphosphate; Protein-small molecule interaction

蛋白质与小分子的相互作用是普遍存在的,它对细胞的许多生命活动具有重要影响^[1-3].近年来,围绕蛋白质和小分子在不同环境下的相互作用已经开展了越来越多的研究,在触觉和温度传感方面的诺贝尔奖也激发了更深层次的相关探索.泛素[Ubiquitin,图1(A)]是一类真核细胞内广泛存在的蛋白质,也是被最广泛选择的模式蛋白之一.泛素化也是非常重要的生理过程,泛素和小分子的相互作用已被证实与泛素化的作用机制有很大的关联性^[4].三磷酸腺苷[Adenosine triphosphate, ATP,图1(B)]是生物体内特别重要且广泛存在的小分子,它为各种生命活动提供能量,驱动了大量的新陈代谢过程,包括肌肉收缩、神经冲动、蛋白质稳态、化学合成和信号转导等^[5,6].

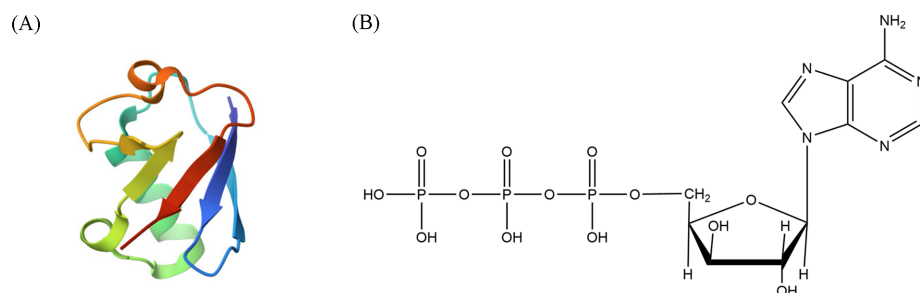


Fig. 1 Three-dimensional structure of ubiquitin(A) and chemical structure of ATP(B)

已用分子模拟^[7-9]、荧光光谱^[10-12]和圆二色谱^[13]等方法研究ATP与蛋白质相互作用的结果表明,当ATP的浓度小于10 mmol/L时,它可有效稳定蛋白质的结构,抑制蛋白质的聚集等^[14].而ATP作为一种“能量货币”,往往瞬态浓度在1~100 $\mu\text{mol/L}$ 范围内就对相关的蛋白活动起作用^[15,16].但是由于检测灵敏度等方面的限制,关于ATP与蛋白质的研究却局限于mmol/L量级的浓度^[17-19],因此难以有效地反映生物体内ATP和关键蛋白的作用机制.质谱法(MS)已经成为研究蛋白质和小分子的元素组成、结构分析、相互作用等方面的重要方法^[20-24].串联质谱的发展和离子源的改进也拓宽了质谱方法的应用范围^[25-27].相比于其它方法(如圆二色谱法、X射线晶体学方法^[28]、核磁共振波谱法^[29,30]等),质谱具有灵敏度高、免标记、通量高、检测范围宽等优势^[31,32].值得一提的是,近年来“非变性质谱(Native mass spectrometry)”提出,电喷雾离子化技术可能保留蛋白质在溶液中或生命体内的原始状态甚至完整结构^[33-37].电喷雾质谱也能真实地反映蛋白质在含有小分子或其它添加剂的混合溶液中的化学状态^[38].

通过质谱跟踪蛋白质带电状态在温度维度下的变化,温控电喷雾电离(TC-ESI)与质谱的联用可以

用来检测蛋白质微小构象的变化,进一步对生物大分子及其配体体系进行相关的热力学分析^[39,40]. TC-ESI在蛋白热力学数据上的研究也被证实与量热法、光谱法等一致^[41-47]. 目前,已有许多课题组使用温控电喷雾质谱(TC-ESI-MS)研究蛋白质、多肽和寡核苷酸等多种分子的相互作用^[48-52]. TC-ESI-MS也应用于ATP对伴侣蛋白GroEL和GroEL-GroES复合物的研究^[53]. 在此基础上,本课题组^[54]发展了温控电喷雾和串联质谱技术研究蛋白和黄酮类小分子的相互作用,该技术在通过串联质谱研究蛋白和小分子相互作用结合力的同时,也可以分析蛋白和小分子的化学计量关系,并利用蛋白在温度维度上的响应分析蛋白在黄酮类小分子作用下引起的微小构象上的变化,并进一步通过相应的质谱数据完成热动力学的研究.

相对于之前研究的黄酮类小分子而言,ATP在生物体内具有更广泛的研究意义. 很多研究局限于mmol/L量级,难以有效地反映生物体内瞬态ATP和关键蛋白的作用机制,而电喷雾质谱的灵敏度高、免标记、检测范围宽等优势可以补充低浓度ATP与泛素蛋白相互作用的数据. 本文进一步通过基于温度控制的蛋白小分子相互作用电喷雾质谱开展了泛素-ATP相互作用的研究,并且在温度维度上进行了系统的质谱学和热力学分析,得到了蛋白质和小分子系统在蛋白电荷分布、化学计量比、亲和力和吉布斯自由能等多维度的信息,将为蛋白和ATP等关键生物活性小分子的相互作用提供有价值的参考.

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

泛素(纯度 $\geq 95\%$),科生景肽生物技术有限公司;三磷酸腺苷二钠盐($C_{10}H_{14}N_5Na_2O_{13}P_3$, ATP-2Na, 分析纯),索莱宝生物科技有限公司;蒸馏水(H_2O , 纯度 $>99.9\%$),香港屈臣氏水公司;乙酸(CH_3COOH , 纯度 $>99.9\%$),Sigma-Aldrich西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司.

LTQ XL型线性离子阱质谱仪(美国赛默飞世尔科技公司);自主设计开发的温度控制模块和电喷雾离子源(图S1,见本文支持信息);1700系列微量进样针(1750 RNR 500 μL Syr,上海哈美顿实验器材有限公司);Harvard 11进样泵(美国Harvard Apparatus公司).

1.2 实验过程

泛素、ATP母液分别为10和300 $\mu mol/L$ 水溶液,不同浓度的实验样品在母液基础上按比例用蒸馏水混合稀释. 实验样品通过添加1%(质量分数)醋酸保持其pH值在 2.8 ± 0.1 . 使用微量进样针连续进样,质谱数据使用Thermo Scientific Xcalibur软件收集. 实验过程中仪器参数:电喷雾电压为2.8 kV,毛细管电压为49 V,管路透镜电压为100 V,毛细管温度为275 $^{\circ}C$,电喷雾进样流速为5 $\mu L/min$. 实验过程中未使用其它辅助气体,电喷雾离子源尖端距离质谱入口约1 cm.

2 结果与讨论

如图2所示,在室温条件下将泛素和ATP以浓度比1 $\mu mol/L$:50 $\mu mol/L$ 混溶于水溶液中,得到的电喷雾质谱图主要形成了+5, +6, +7电荷态下的3类峰:泛素峰($[U]^{n+}$),泛素与一个ATP结合峰($[UA]^{n+}$),泛素与两个ATP结合峰($[UA_2]^{n+}$),而这也和泛素在自然状态下一般呈现+5 ~ +8电荷状态一致^[55]. 由于泛素还处于折叠状态, $[U]^{8+}$ 及更高电荷状态的泛素形式及其复合物暂时未观察到^[56].

泛素与ATP以摩尔比1:1结合形成的复合物 $[UA]^{5+}$, $[UA]^{6+}$ 和 $[UA]^{7+}$ 相对丰度较高,以摩尔比1:2结合形成的复合物 $[UA_2]^{5+}$ 和 $[UA_2]^{6+}$ 相对丰度较低, $[UA_2]^{7+}$ 复合物没有明显的质谱峰. 这

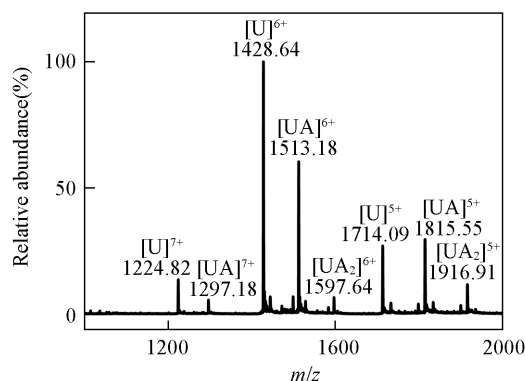


Fig. 2 Mass spectra of ubiquitin/ATP (1 $\mu mol/L$: 50 $\mu mol/L$) in aqueous solution

也指示了 50 $\mu\text{mol/L}$ 的 ATP 和 1 $\mu\text{mol/L}$ 的泛素已经产生了足够的化学计量比的复合物, 因此, 接下来主要关注 50 $\mu\text{mol/L}$ 及以下浓度的 ATP 对泛素的影响. 此外, 其中 $[\text{UA}]^{5+}$ 已经高于 $[\text{U}]^{5+}$, $[\text{UA}]^{6+}$ 和 $[\text{UA}]^{7+}$ 相对其对应电荷态的泛素丰度较低, 说明低电荷态时的泛素可能对 ATP 有更强的亲合力. 为了进一步得到泛素和 ATP 相互作用的热力学信息, 开展了不同温度下泛素和 ATP 复合物的电荷研究(图 3), 并在此基础上进行了吉布斯自由能的计算分析.

通过不同溶液温度下的电荷状态分布的加权平均值来确定熔化温度 (Melting temperature, T_m)^[57], T_m 值是蛋白受热伸展过渡中点的温度, 根据玻尔兹曼函数拟合确定为跃迁的中点^[49,58]. 使用不同电荷态的强度来计算在每个溶液温度下确定的加权平均电荷态^[50]:

$$\bar{z} = \frac{\sum_{j=1}^n z_j i_j}{\sum_{j=1}^n i_j} \quad (1)$$

式中: n 为电荷态个数; j 为从 1 开始到 n 结束, 每次递增 1; i_j 是电荷态为 z_j 的质谱峰强度.

如图 3 所示, 泛素水溶液经过不同温度下铜块加热后得到的 T_m 值 (64.5 $^{\circ}\text{C}$)、电喷雾质谱图(图 3 插图)与 El-Baba 等^[49] 的实验结果一致. 研究表明, 泛素溶液的 pH 值从 3.0 到 2.75 的变化使 T_m 值从 74.1 $^{\circ}\text{C}$ 变化到 66.3 $^{\circ}\text{C}$ ^[59,60]. 将泛素与 ATP 以 1 $\mu\text{mol/L}$: 10 $\mu\text{mol/L}$, 1 $\mu\text{mol/L}$: 20 $\mu\text{mol/L}$, 1 $\mu\text{mol/L}$: 30 $\mu\text{mol/L}$, 1 $\mu\text{mol/L}$: 40 $\mu\text{mol/L}$ 和 1 $\mu\text{mol/L}$: 50 $\mu\text{mol/L}$ 5 种不同的浓度比混合, 发现不同混合液中泛素的 T_m 值分别为 66.4, 67.9, 69.1, 66.9 和 66.1 $^{\circ}\text{C}$, 均高于纯泛素溶液中泛素的 T_m 值 (64.5 $^{\circ}\text{C}$), 但 T_m 值仅仅增高 1.6~4.6 $^{\circ}\text{C}$ 左右, 说明低浓度 ATP 虽然已经产生了化学计量比的质谱结合峰, 但在溶液中对泛素分子的影响并不显著.

如图 4 所示, 随着温度的升高, 不同浓度比 ATP 与泛素的结合保持相同的结合化学计量比, 并未观察到新的结合峰, 但是在不同浓度下泛素-ATP 复合物的相对丰度随电喷雾加热温度的变化趋势有所不同. 以 $[\text{UA}]^{6+}$ 为例, 由图 4(A)~(C) 可见, 溶液中 ATP 浓度分别为 10, 20 和 30 $\mu\text{mol/L}$, 泛素-ATP 复合物的相对丰度随着温度升高 (25~85 $^{\circ}\text{C}$) 有明显的升高. 由图 4(D) 和 (E) 可见, ATP 浓度分别为 40 和 50 $\mu\text{mol/L}$ 时, 泛素-ATP 复合物的相对丰度随着温度升高 (25~85 $^{\circ}\text{C}$) 有一个先升高后降低的趋势. 因此, 单独从质谱中结合峰和温度的相对变化无法直观地分析 ATP 和泛素的相互作用机制.

为了更好地理解泛素与 ATP 的结合机制, 通过下式^[61]对质谱中复合物的化学计量关系进一步开展了亲和力 (Binding affinity) 的分析.

$$\text{Binding affinity} = \frac{I(1:1) + I(1:2) + \dots}{I(p) + I(1:1) + I(1:2) + \dots} \quad (2)$$

式 (2) 常被用于表示蛋白质和小分子的相对结合亲和力, 其中, p 代表未与小分子结合的蛋白, $1:n$ 代表形成的蛋白质小分子复合物中蛋白与小分子的化学计量比, $I(p)$ 和 $I(1:n)$ 分别表示每一个电荷状态下未与 ATP 结合的泛素的相对峰强度和以不同化学计量比结合的泛素-ATP 复合物的相对峰强度. 假设蛋白质或复合物在质谱中的相对强度与它们在溶液中相对含量成正相关^[61,62], 则计算所得的亲和力值越高, 表明结合亲和度越高.

有研究发现 ATP 与蛋白质中的某些柔性、碱性或疏水区域存在弱相互作用, 这在它们的非共价结

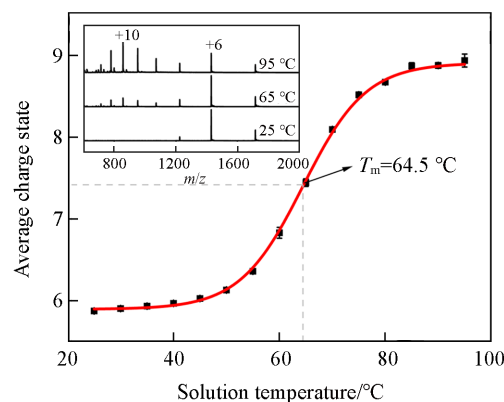


Fig. 3 Weighted average charge state of ubiquitin vs. solution temperature with midpoint melting temperature $T_m=64.5^{\circ}\text{C}$. Inset shows mass spectra of ubiquitin in an acidified aqueous solution collected at 25, 65 and 95 $^{\circ}\text{C}$.

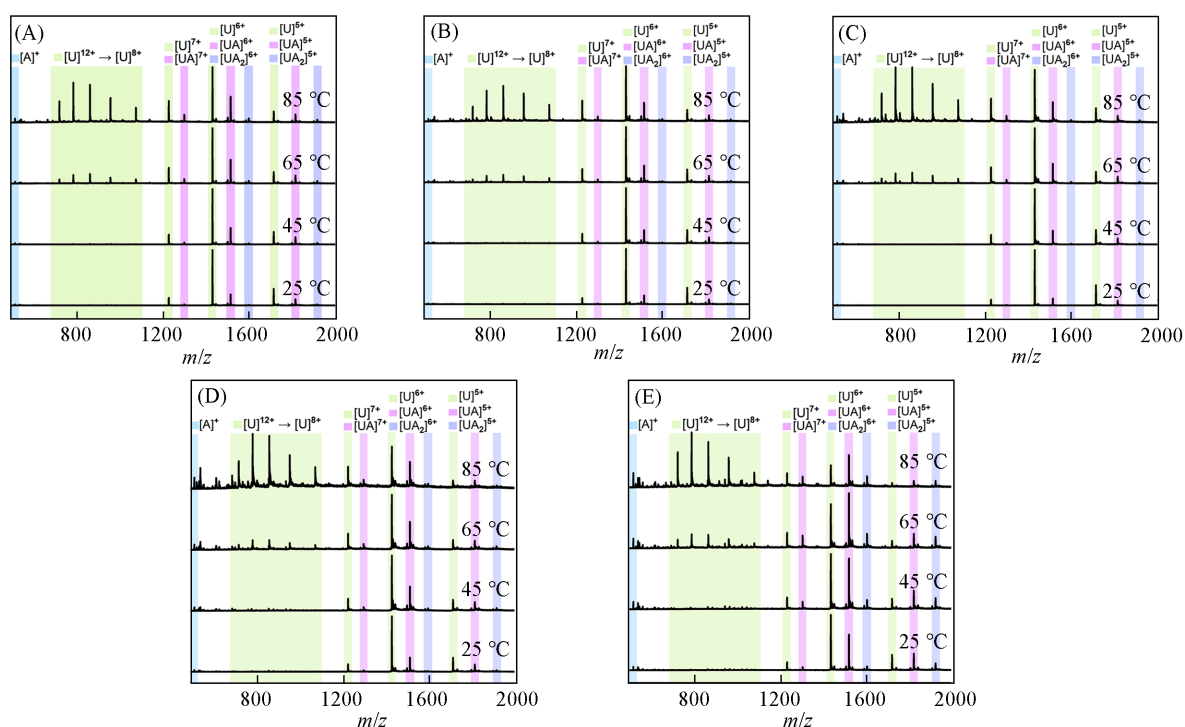


Fig. 4 Mass spectra showing the region corresponding to the Ubi-ATP complexes under various temperature conditions(25—85 °C)

(A) 1 $\mu\text{mol/L}$ Ubi: 10 $\mu\text{mol/L}$ ATP; (B) 1 $\mu\text{mol/L}$ Ubi: 20 $\mu\text{mol/L}$ ATP; (C) 1 $\mu\text{mol/L}$ Ubi: 30 $\mu\text{mol/L}$ ATP; (D) 1 $\mu\text{mol/L}$ Ubi: 40 $\mu\text{mol/L}$ ATP; (E) 1 $\mu\text{mol/L}$ Ubi: 50 $\mu\text{mol/L}$ ATP.

合中起着关键作用^[63]. 以 1 $\mu\text{mol/L}$ Ubi: 30 $\mu\text{mol/L}$ ATP 为例, 计算了不同温度下的亲和力值, 如表 1 所示, 将其进行可视化, 如图 5 所示. 发现不同电荷状态下的泛素与 ATP 的结合亲和力均随温度的升高而增加, 这表明这些配合物是通过吸热过程形成的. 其它不同浓度混合液在不同温度下的详细亲和力值见表 S1~表 S4(见本文支持信息), 它们的结合亲和力趋势图见图 S2~图 S5(见本文支持信息), 与图 5 有类似的趋势. 因此, 上述数据表明 ATP 与泛素的弱相互作用可能与泛素 T_m 值的升高有关.

Table 1 Binding affinities of 1 $\mu\text{mol/L}$ Ubi:30 $\mu\text{mol/L}$ ATP complexes at different temperatures^{*}

Temperature	Binding affinity		
	+5	+6	+7
25	0.25409	0.14033	0.10602
30	0.28473	0.16355	0.12327
35	0.30595	0.17651	0.13735
40	0.33775	0.20401	0.15042
45	0.33963	0.20024	0.15920
50	0.34574	0.21277	0.15783
55	0.36097	0.22623	0.17905
60	0.37048	0.23116	0.18121
65	0.38075	0.24318	0.19477
70	0.37893	0.24403	0.19047
75	0.39394	0.25536	0.20730
80	0.41139	0.27629	0.22023
85	0.41140	0.27295	0.22110
90	0.41321	0.28789	0.21197
95	0.40912	0.28124	0.22615

* The values are presented as mean \pm standard deviation($n=3$).

以 1 $\mu\text{mol/L}$ Ubi: 30 $\mu\text{mol/L}$ ATP 溶液为例, 其实验得到的 T_m 值为 69.1 $^{\circ}\text{C}$, 比纯泛素溶液的 T_m 值增加了 4.6 $^{\circ}\text{C}$. 这个变化过程可以进一步通过计算不同温度下的吉布斯自由能(ΔG)进行研究^[54]. 吉布斯自由能与温度的关系图通常被称为稳定性曲线或吉布斯-亥姆霍兹曲线, 它常用于蛋白质折叠和配体结合研究, 通过吉布斯-亥姆霍兹方程可以得到蛋白质的热力学值^[46,64]:

$$\Delta G(T) = -RT \ln [K_{\text{eq}}(T)] \quad (3)$$

式中: R (8.314 $\text{kJ}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$) 为气体常数; T (K) 为溶液温度; 对于蛋白质的去折叠反应(从低电荷态逐渐转变至高电荷态), 平衡常数(K_{eq}) 为同一温度下的高电荷态相对丰度与低电荷态相对丰度的比值^[50,65].

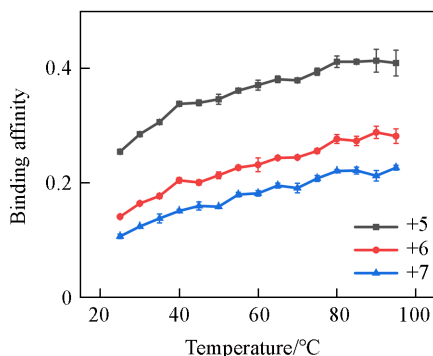


Fig. 5 Calculated binding affinities of 1 $\mu\text{mol/L}$ Ubi: 30 $\mu\text{mol/L}$ ATP complexes at different temperatures

The values are presented as mean \pm standard deviation ($n=3$).

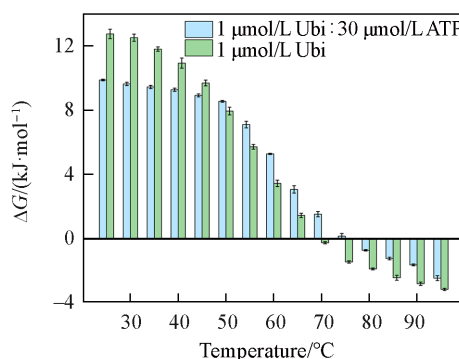


Fig. 6 ΔG values for ubiquitin and Ubi-ATP calculated at various temperatures

The values are presented as mean \pm standard deviation ($n=3$).

当溶液温度较低时, 泛素去折叠的过程需要吸收能量来破坏分子内的稳定结构, 因此吉布斯自由能均 >0 ^[66]. 如图6所示, 在70和75 $^{\circ}\text{C}$ 时, 单独泛素的 ΔG 值为负, 但有 ATP 的存在下, ΔG 值为正, 表明 ATP 使其展开需要更多的能量, 验证了 ATP 对于泛素有一定的保护作用. 而值得注意的是, 在45 $^{\circ}\text{C}$ 之前, 在含有 ATP 的溶液中泛素的 ΔG 值低于纯泛素溶液. 而在45 $^{\circ}\text{C}$ 之后, 在含有 ATP 的溶液中泛素的 ΔG 值高于纯泛素溶液. 说明去折叠程度增加后, ATP 的存在增加了泛素去折叠所需的能量, 因此增强了泛素的稳定性.

3 结 论

通过发展温度控制的蛋白质小分子相互作用电喷雾质谱(PSMI-ESI-MS)技术, 将泛素作为一种模型蛋白和 ATP 展开了研究. 研究表明, 常温下的电喷雾质谱得到了和泛素天然状态一致的电荷价态, 且低电荷的泛素和 ATP 亲和力较高. 增加温度后, 泛素的电荷价态逐渐增加, 表现出了从折叠到去折叠状态的转变, 同时其和 ATP 的结合峰也发生了相应的变化. 由此计算得到的亲和力随温度的增加而增加, 说明去折叠后的泛素和 ATP 的相互作用增强. 而根据复合物电荷变化得到的热力学信息发现, 泛素去折叠的过程中吉布斯自由能从正转负, 表明需要吸收能量来破坏分子内的稳定结构, 与理论预期一致. 吉布斯自由能的变化在热力学上解释了 ATP 使泛素稳定性增强的原因. 温度控制的相互作用电喷雾质谱可以得到蛋白质和小分子体系在蛋白电荷分布、折叠和去折叠变化、化学计量比、亲和力和吉布斯自由能等多维度的信息, 将在更多的蛋白和蛋白小分子相互作用研究中得到应用.

支持信息见 <http://www.cjcu.jlu.edu.cn/CN/10.7503/cjcu20240382>.

参 考 文 献

- [1] Chen F., Gülbakan B., Weidmann S., Fagerer S. R., Ibáñez A. J., Zenobi R., *Mass Spectrom. Rev.*, **2016**, 35(1), 48—70

- [2] Loo J. A., *Mass Spectrom. Rev.*, **1997**, *16*(1), 1—23
- [3] Bennett J. L., Nguyen G. T. H., Donald W. A., *Chem. Rev.*, **2022**, *122*(8), 7327—7385
- [4] Bhogaraju S., Kalayil S., Liu Y., Bonn F., Colby T., Matic I., Dikic I., *Cell*, **2016**, *167*(6), 1636—1649
- [5] Westheimer F. H., *Science*, **1987**, *235*(4793), 1173—1178
- [6] Lehninger A. L., Nelson D. L., Cox M. M., *Lehninger Principles of Biochemistry*, New York, W. H. Freeman and Company, **2005**
- [7] Zaboli M., Saeidnia F., Zaboli M., Torkezadeh-Mahani M., *Process Biochem.*, **2021**, *101*, 26—35
- [8] Naidu K. T., Rao D. K., Prabhu N. P., *J. Phys. Chem. B*, **2020**, *124*(45), 10077—10088
- [9] Arsiccio A., McCarty J., Pisano R., Shea J. E., *J. Am. Chem. Soc.*, **2020**, *142*(12), 5722—5730
- [10] Liu W. W., Zhu Y., Fang Q., *Anal. Chem.*, **2017**, *89*(12), 6678—6685
- [11] Chen F., Di H., Wang Y., Cao Q., Xu B., Zhang X., Yang N., Liu G., Yang C. G., Xu Y., Jiang H., Lian F., Zhang N., Li J., Lan L., *Nat. Chem. Biol.*, **2016**, *12*(3), 174—179
- [12] Molina D. M., Jafari R., Ignatushchenko M., Seki T., Larsson E. A., Dan C., Sreekumar L., Cao Y., Nordlund P., *Science*, **2013**, *341*(6141), 84—87
- [13] Fujimoto K. J., Inoue K., *J. Chem. Phys.*, **2020**, *153*(4), 045101
- [14] Ou X., Lao Y., Xu J., Wutthinitikornkit Y., Shi R., Chen X., Li J., *JACS Au*, **2021**, *1*(10), 1766—1777
- [15] Merlevede W., Vandenhede J. R., Goris J., Yang S. D., *Curr. Top. Cell. Regul.*, **1984**, *23*, 177—215
- [16] Apstein C. S., *In Diastolic Relaxation of the Heart: The Biology of Diastole in Health and Disease*, 2 Ed., Edited by Lorell B. H., Grossman W., Springer US, Boston, MA. **1994**, 125—134
- [17] Song J., *Protein Sci.*, **2021**, *30*(7), 1277—1293
- [18] Kota D., Prasad R., Zhou H. X., *J. Am. Chem. Soc.*, **2024**, *146*(2), 1326—1336
- [19] Rickard M. M., Luo H., de Lio A., Gruebele M., Pogorelov T. V., *J. Phys. Chem. Lett.*, **2022**, *13*(42), 9809—9814
- [20] Eschweiler J. D., Kerr R., Rabuck-Gibbons J., Ruotolo B. T., *Annu. Rev. Anal. Chem.*, **2017**, *10*(1), 25—44
- [21] Zhang T., Lyu J., Yang B., Yun S. D., Scott E., Zhao M., Laganowsky A., *Nat. Commun.*, **2024**, *15*(1), 5946
- [22] Yen H. Y., Jazayeri A., Robinson C. V., *Pharmacol. Rev.*, **2023**, *75*(3), 397—415
- [23] Le J., Loo J. A., *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **2023**, *34*(12), 2620—2624
- [24] Wen X., Liu C., Tovar K., Curran P., Richards M., Agrawal S., McLaren D. G., *J. Am. Chem. Soc.*, **2024**, *146*(29), 19792—19799
- [25] Zhao H. X., Li Z., Zhao M. Y., Tian L., Xiao Y. S., Wang Z. H., Yue H., Xiu Y., *Chem. J. Chinese Universities*, **2023**, *44*(4), 20220576 (赵幻希, 李卓, 赵孟雅, 田璐, 肖禹圣, 王震寰, 越皓, 修洋. 高等学校化学学报, **2023**, *44*(4), 20220576)
- [26] Huang L., Wang J., Jiang H., Chen L., Chen H., *Chin. Chem. Lett.*, **2024**, 109896
- [27] Feng T., Gao Y. L., Hu D., Yuan K. Y., Gu S. Y., Gu Y. H., Yu S. Y., Feng Y. Q., Wang J., Yuan B. F., *Chin. Chem. Lett.*, **2024**, *35*(8), 109259
- [28] Blundell T. L., Patel S., *Curr. Opin. Pharmacol.*, **2004**, *4*, 490—496
- [29] Cala O., Guillièrè F., Krimm I., *Anal. Bioanal. Chem.*, **2014**, *406*, 943—956
- [30] Pellecchia M., Bertini I., Cowburn D., Dalvit C., Giralt E., Jahnke W., James T. L., Homans S. W., Kessler H., Luchinat C., Meyer B., Oschkinat H., Peng J., Schwalbe H., Siegal G., *Nat. Rev. Drug Discov.*, **2008**, *7*(9), 738—745
- [31] Erba E. B., Zenobi R., *Annu. Rep. Prog. Chem. Sect. C: Phys. Chem.*, **2011**, *107*, 199—228
- [32] Rathore D., Faustino A., Schiel J., Pang E., Boyne M., Rogstad S., *Expert Rev. Proteomics*, **2018**, *15*(5), 431—449
- [33] Chowdhury S. K., Katta V., Chait B. T., *J. Am. Chem. Soc.*, **1990**, *112*, 9012—9013
- [34] Ganem B., Li Y. T., Henion J. D., *J. Am. Chem. Soc.*, **1991**, *113*, 6294—6296
- [35] Ganem B., Li Y. T., Henion J. D., *J. Am. Chem. Soc.*, **1991**, *113*, 7818—7819
- [36] Loo R. R. O., Goodlett D. R., Smith R. D., Loo J. A., *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, *115*(5), 4391—4392
- [37] Baca M., Kent S. B. H., *J. Am. Chem. Soc.*, **1992**, *114*(39), 92—93
- [38] Vallejo D. D., Rojas Ramirez C., Parson K. F., Han Y., Gadkari V. V., Ruotolo B. T., *Chem. Rev.*, **2022**, *122*(8), 7690—7719
- [39] Pruska A., *Mass Spectrometric Methods for Studying Thermodynamic Properties of Biomolecular Systems*, ETH Zurich, Zurich, **2023**
- [40] Laganowsky A., Clemmer D. E., Russell D. H., *Annu. Rev. Biophys.*, **2022**, *51*, 63—77
- [41] Ibarra-Molero B., Naganathan A. N., Sanchez-Ruiz J. M., Muñoz V., *Methods Enzymol.*, **2016**, *567*, 281—318
- [42] Mahran R., Vello N., Komulainen A., Malakoutikhah M., Härmä H., Kopra K., *Sci. Rep.*, **2023**, *13*(1), 20066
- [43] Pruška A., Marchand A., Zenobi R., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2021**, *60*(28), 15390—15398
- [44] Li G., Zheng S., Chen Y., Hou Z., Huang G., *Anal. Chem.*, **2018**, *90*(13), 7997—8001
- [45] Jordan J. S., Williams E. R., *Anal. Chem.*, **2022**, *94*(48), 16894—16900
- [46] Marchand A., Czar M. F., Eggel E. N., Kaeslin J., Zenobi R., *Nat. Commun.*, **2020**, *11*(1), 566
- [47] Pruška A., Harrison J. A., Granzhan A., Marchand A., Zenobi R., *Anal. Chem.*, **2023**, *95*(38), 14384—14391
- [48] Cong X., Liu Y., Liu W., Liang X., Russell D. H., Laganowsky A., *J. Am. Chem. Soc.*, **2016**, *138*(13), 4346—4349
- [49] El-Baba T. J., Woodall D. W., Raab S. A., Fuller D. R., Laganowsky A., Russell D. H., Clemmer D. E., *J. Am. Chem. Soc.*, **2017**, *139*(18), 6306—6309
- [50] Raab S. A., El-Baba T. J., Woodall D. W., Liu W., Liu Y., Baird Z., Hales D. A., Laganowsky A., Russell D. H., Clemmer D. E.,

- J. Am. Chem. Soc.*, **2020**, *142*(41), 17372—17383
- [51] El-Baba T. J., Raab S. A., Buckley R. P., Brown C. J., Lutomski C. A., Henderson L. W., Woodall D. W., Shen J., Trinidad J. C., Niu H., Jarrold M. F., Russell D. H., Laganowsky A., Clemmer D. E., *Anal. Chem.*, **2021**, *93*(24), 8484—8492
- [52] Liu J., Wang Y., Wang X., Qin W., Li G., *Int. J. Mass Spectrom.*, **2023**, *494*, 117151
- [53] Walker T. E., Shirzadeh M., Sun H. M., McCabe J. W., Roth A., Moghadamchargari Z., Clemmer D. E., Laganowsky A., Rye H., Russell D. H., *J. Am. Chem. Soc.*, **2022**, *144*(6), 2667—2678
- [54] Su W., Liu S., Zhang Q., Zhou Z., Wang N., Yue L., *Chin. Chem. Lett.*, **2024**, 110237
- [55] Wyttenbach T., Bowers M. T., *J. Phys. Chem. B*, **2011**, *115*(42), 12266—12275
- [56] Reddy G., Thirumalai D., *J. Phys. Chem. B*, **2017**, *121*(5), 995—1009
- [57] Benesch J. L., Sobott F., Robinson C. V., *Anal. Chem.*, **2003**, *75*(10), 2208—2214
- [58] Marchand A., Rosu F., Zenobi R., Gabelica V., *J. Am. Chem. Soc.*, **2018**, *140*(39), 12553—12565
- [59] Wintrode P. L., Makhatazde G. I., Privalov P. L., *Proteins*, **1994**, *18*(3), 246—253
- [60] El-Baba T. J., Fuller D. R., Woodall D. W., Raab S. A., Conant C. R., Dilger J. M., Toker Y., Williams E. R., Russell D. H., Clemmer D. E., *Chem. Commun.*, **2018**, *54*(26), 3270—3273
- [61] Wan C., Cui M., Song F., Liu Z., Liu S., *Int. J. Mass Spectrom.*, **2009**, *283*(1—3), 48—55
- [62] Mazzitelli C. L., Chu Y., Reczek J. J., Iverson B. L., Brodbelt J. S., *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **2007**, *18*(2), 311—321
- [63] Nishizawa M., Walinda E., Morimoto D., Kohn B., Scheler U., Shirakawa M., Sugase K., *J. Am. Chem. Soc.*, **2021**, *143*(31), 11982—11993
- [64] LiCata V. J., Liu C. C., *Methods Enzymol.*, **2011**, *488*, 219—238
- [65] Blanc J. L., Beuchemin D., Siu K., Blanc L., Guevremont R., Berman S., *Org. Mass Spectrom.*, **1991**, *26*(10), 831—839
- [66] Nandi T., Desai A., Ainaravapu S. R. K., *Phys. Chem.*, **2020**, *22*(40), 23158—23168

(Ed.: Y, K, S)