

标志物研究中常用蛋白组学质谱方法的定量准确性评估

张磊, 申华莉

(复旦大学生物医学研究院, 上海 200032)

摘要 在疾病发生过程中, 蛋白质的表达水平、修饰状态或相互作用模式的变化有可能反映病理状态或疾病进展, 因此蛋白质常被用作疾病标志物。基于质谱的蛋白质组学发现了大量的潜在疾病标志物, 这些标志物及其质谱检测方法能否进一步推广至临床检测, 定量准确性和稳定性是关键。本文合成了 32 条标准肽段, 对数据非依赖性采集(DIA)、多反应监测(MRM)及平行反应监测(PRM) 3 种有潜力在临床质谱方面大规模应用的定量方法进行了比较和评估。将肽段稀释成 4 个不同的浓度来模拟不同丰度的实际样本, 用以上 3 种质谱方法采集数据后, 比较了肽段发现率、标准曲线线性、日间和日内精密性及保留时间(RT)漂移等情况, 总结了 3 种定量方法各自的优缺点和潜在应用方向。结果表明, MRM 定量方法最适合临床应用, 在于其优异的日间日内稳定性、灵敏度和定量精度; PRM 适合科研方向靶向定量, 因其拥有最高灵敏度和较高稳定性定量精度; 而 DIA 由于高通量而依赖于软件和算法解析, 定量数目多的同时, 对于特定肽段定量准确性比 PRM/MRM 差。

关键词 临床质谱; 蛋白质组学; 平行反应监测; 多反应监测; 数据非依赖性采集

中图分类号 O657

文献标志码 A

doi: 10.7503/cjcu20240311

Quantitative Accuracy Evaluation of Mass Spectrometry Based Proteomics Methods Commonly Used in Biomarker Research

ZHANG Lei, SHEN Huali*

(Institute of Biomedical Science, Fudan University, Shanghai 200032, China)

Abstract In the progression of diseases, changes in protein expression levels, modification states, or interaction patterns may reflect pathological conditions or disease advancement, making proteins commonly used as disease biomarkers. Mass spectrometry-based proteomics has identified numerous potential disease biomarkers. However, these biomarkers and their mass spectrometry detection methods need to have high quantitative accuracy and stability for further clinical application. This study synthesized 32 standard peptides and evaluated three quantitative methods: data independent acquisition(DIA), multiple reaction monitoring(MRM), and parallel reaction monitoring (PRM), for their potential in large-scale clinical applications in mass spectrometry. We simulated actual samples at four different concentrations to assess peptide discovery rates, standard curve linearity, inter-day and intra-day precision, and retention time shift using the aforementioned three mass spectrometry methods. The results indicate that MRM quantification is most suitable for clinical applications due to its good stability, sensitivity, and quantitative accuracy. PRM is suitable for targeted quantification in research settings, which can offer high sensitivity and stability. Finally, despite its high throughput nature, DIA demonstrates inferior quantitative accuracy for specific peptides compared to PRM and MRM.

收稿日期: 2024-06-26. 网络首发日期: 2024-08-09.

联系人简介: 申华莉, 女, 博士, 研究员, 主要从事基于质谱的蛋白质组学和脂质组学方面的研究. E-mail: shenhuali@fudan.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金(批准号: 82272174)和上海市科委科技创新行动计划项目(批准号: 22S31901900)资助.

Supported by the National Natural Science Foundation of China(No. 82272174), and the Science and Technology Innovation Action Plan of STCSM, China(No. 22S31901900).

Keywords Clinical mass spectrometry; Proteomics; Parallel reaction monitoring; Multiple reaction monitoring; Data independent acquisition

蛋白质在细胞的各种生物学功能中扮演着核心角色,包括但不限于酶催化、信号传递和细胞结构维持等^[1]. 在疾病状态下,蛋白质的表达水平、修饰状态或相互作用模式可能会发生变化,这些变化有可能反映病理状态或疾病进程. 蛋白质组学是在基因组学之后发展起来的一门研究蛋白质大规模表达、结构和功能的科学^[2]. 它关注生物体内全部蛋白质的组成、结构、功能和相互作用,以及随时间、环境或疾病状态的改变而发生的变化. 蛋白质组的研究对于理解生物学过程、疾病机制、药物发现和治疗策略的制定具有重要意义^[3,4]. 自2000年开始,蛋白质组学取得了长足的进步和发展,特别是近年来研究人员对人类各种器官的不同疾病进行了详实的蛋白基因组学研究和分析,发现了诸多潜在的疾病标志物和药物靶点,从而开创了蛋白质组学驱动精准医学新时代^[5-8].

在科学研究中已经发现了大量新型潜在疾病标志物,针对 COVID-19、菌血症、癌症和心血管疾病等的血清蛋白标志物的开发研究已广泛开展^[9,10]. 基于质谱的蛋白质组学技术在发现新的潜在蛋白质标志物和诊断模型方面具有广泛应用和巨大的科研前景. 研究表明,通过质谱技术在血浆外泌体或血清中发现的蛋白质组合在多种癌症检测中具有较高的灵敏度和特异性. 如, Hoshino 等^[11]通过血浆外泌体中的蛋白组合发展了一种多癌检测方法,对肺癌、前列腺癌等疾病显示出较高的准确性. Guo 等^[12]面对新冠疫情,迅速鉴定了病毒的蛋白和代谢物标志物,开发了机器学习算法用于预测疾病分型. Shen 等^[13]发展了一种基于血清的靶向质谱多癌诊断方法,使用定量方法对多种癌症进行诊断,该方法具有可靠性和高灵敏度,并且与临床质谱常用的多反应监测(MRM)方法相似,具有潜在的临床应用前景. 不同于传统的发现和验证分开的方法,上述技术将发现和验证合为一步. 这些研究找到了大量潜在的疾病标志物,但是这些新发现的标志物甚少真正用于临床检验,以癌症为例临床检验中常用的血清标志物仍然是一些经典蛋白质,包括用于前列腺癌的 PSA 和用于肝癌的 AFP 等. 另一方面,基于质谱的蛋白质组学技术尚未被临床检测接受. 随着越来越多的蛋白质生物标志物被发现,急需发展可靠技术将大量潜在标志物应用于临床检测,以造福于病患.

在过去10年中,高灵敏和高通量质谱平台取得了巨大的发展. 在传统的标记定量方法之外,以 DIA/SWATH^[14-16]为代表的非数据依赖定量方法因具有较高的鉴定深度和定量准确性,而被大规模用于发现潜在疾病蛋白质标志物,对于组织和细胞样本,配合新型质谱仪器,单针上样定量深度能突破12000个蛋白,可发现大量低丰度的标志物. 第二类是基于传统靶向定量方法的多反应监测/平行反应监测(MRM/PRM)^[17,18]定量方法,作为小分子定量的金标准被应用于激素等的临床质谱检测. 传统MRM方法基于三重四极杆质谱仪,PRM则基于高分辨质谱仪,两者均可以实现蛋白质/肽段的靶向定量.

为了测试这3种定量方法应用于蛋白质标志物定量时的准确度,合成了32个蛋白的32条标准肽段,对DIA,MRM和PRM3种有潜力在临床质谱方向大规模应用的定量方法进行了比较和评估. 将肽段稀释成4个不同的浓度(8,40,200,1000 fmol/ μ L)来模拟不同丰度的实际样本,将其用3种不同的定量方法采集数据后,比较了发现率、标准曲线线性、日间日内精密度及保留时间漂移等情况,最终总结了3种定量方法的优缺点和潜在应用方向,并为未来的蛋白质临床质谱检测应用提供数据参考.

1 实验方法

1.1 试剂与仪器

标准肽段, SYNPEPTIDE Co. Ltd.; 质谱级乙腈、甲醇和甲酸溶液, Thermo Fisher 公司.

MRM 分析采用 ACQUITY UPLC H-Class(美国 Waters 公司)液相色谱-6500Qtrap(美国 Sciex 公司)质谱联用仪; PRM 和 DIA 分析采用 nanoElute2(美国 Bruker Daltonics 公司)液相色谱-timsTOF Pro(美国 Bruker Daltonics 公司)飞行时间质谱联用仪.

1.2 肽段选择

人工合成了32条标准肽段(纯度>95%),序列如表1所示,将其混合后按5倍比例稀释为4个梯度浓度(8, 40, 200和1000 fmol/ μ L).

Table 1 Detail of the 32 peptide sequence

No.	Peptide sequence	No.	Peptide sequence
1	VSVHVIEGDHR	17	YLENYDAIR
2	AVTEQGHLSNEER	18	EANLLNAVIVQR
3	LVGSQEELASWGHEYVR	19	TEHINIHLR
4	AQLFALTGVQPAR	20	AIGSASEGAQSSLQEVYHK
5	IQALQQQADEAEDR	21	TAFQEALDAAGDK
6	LVLVGDGCTGK	22	VYALPEDLVEVNP
7	EAAENSLVAYK	23	NIETINTFHQYSVK
8	SVTEQGAELSNEER	24	SGGASHSELIHNL
9	FASENDLPEWK	25	SAGPQSLLASVIAEK
10	LQDAEIAR	26	YFHVVIAGPQDSPFEGCTFK
11	LALQAQVPDELVTK	27	TEGDGVYTLNNEK
12	FSGWYDADLSPAGHEEAK	28	VILENIASHEPR
13	IIFEDDR	29	ESSSHHPGIAEFPSR
14	AIVQLVNER	30	LVNEVTEFAK
15	VSEEIEDIHK	31	EQLTPLIK
16	HLFTGPVLSK	32	VGAHAGEYGAEALER

1.3 实验方法

1.3.1 MRM方法参数 ACQUITY UPLC H-Class液相色谱-6500Qtrap质谱联用仪, ACQUITY UPLC BEH C18色谱柱(2.1 mm \times 100 mm), 色谱流速0.2 mL/min. 流动相A为0.1%甲酸水溶液, 流动相B为0.1%甲酸乙腈溶液. 色谱梯度: 0 min, 5% B, 0.5 min, 5% B, 12.5 min, 35% B, 12.6 min 80% B, 16 min 80% B, 16.1 min, 5% B, 20 min 5% B. 质谱参数: Curtain gas: 40, Collision gas: Medium, IonSpray voltage: 5500V, Temperature: 500 $^{\circ}$ C, Ion source gas1: 40, Ion Source gas2: 40, Declustering potential: 80, Entrance potential: 10, Collision cell exit potential: 10.

1.3.2 PRM方法参数 nanoElute2液相色谱- timsTOF Pro飞行时间质谱联用仪, IonOpticks Aurora一体化色谱柱(25 cm \times 75 μ m), 色谱流速200 nL/min. 流动相A为0.1%甲酸水溶液, 流动相B为0.1%甲酸乙腈溶液. 色谱梯度: 0 min, 2% B, 45 min, 22% B, 50 min, 37% B, 55 min 80% B, 60 min 80% B. 质谱参数: 采用纳升喷雾离子源, 扫描范围 m/z 100~1700, 离子淌度范围0.7~1.3 Vs/cm², 电压1500 V, 辅助气流速3 L/min, 离子源温度180 $^{\circ}$ C, 采用prm-PASEF靶向采集模式.

1.3.3 DIA方法参数 nanoElute2液相色谱- timsTOF Pro飞行时间质谱联用仪, IonOpticks Aurora一体化色谱柱(25 cm \times 75 μ m), 色谱流速200 nL/min. 流动相A为0.1%甲酸水溶液, 流动相B为0.1%甲酸乙腈溶液. 色谱梯度: 0 min, 2% B, 45 min, 22% B, 50 min, 37% B, 55 min 80% B, 60 min 80% B. 质谱参数: 采用纳升喷雾离子源, 扫描范围为 m/z 100~1700, 离子淌度范围设置为0.7~1.3 Vs/cm², 电压为1500 V, 辅助气氮气流速3 L/min, 离子源温度设置为180 $^{\circ}$ C, 采用dia-PASEF采集模式, 设置32个扫描窗口, 覆盖扫描范围.

1.3.4 质谱数据分析 MRM和PRM数据采用Skyline软件(版本22.2)分析, 所有峰面积由人工二次确认后导出分析. DIA数据采用Spectronaut软件(版本18.0)分析, 设置为directDIA检索模式, 数据库为32条肽段的独立fasta文件, 检索误差设置为动态调整, PSM假阳性设置为1%, XIC Extraction设置为动态, cross-run normalization设置为关闭, 导出的肽段定量面积用于后续分析.

1.3.5 统计方法 标准曲线线性拟合和箱型图等统计作图均采用Graphpad软件(版本6.0)计算和绘制.

2 结果与讨论

2.1 实验设计

如图1所示,将32条标准肽段按质量比1:1混合后,按5倍比率稀释为4个浓度(8, 40, 200和1000 fmol/ μ L),模拟低丰度和中丰度肽段实际样本,考察3个数量级定量性能.对各浓度肽段采用MRM, PRM和DIA定量方法分别进行分析.实验中分别在日内对4个浓度标准肽段进行3次技术重复质谱采集,然后在连续3日内对样品进行日间的重复采集,获得的质谱数据用于后续软件检索和统计分析.对获得的定量列表,分别考察和对比肽段发现率、日间日内定量变异系数、定量曲线 R^2 和保留时间漂移等5项指标,用于观察和评估各方法在临床应用中的优势.

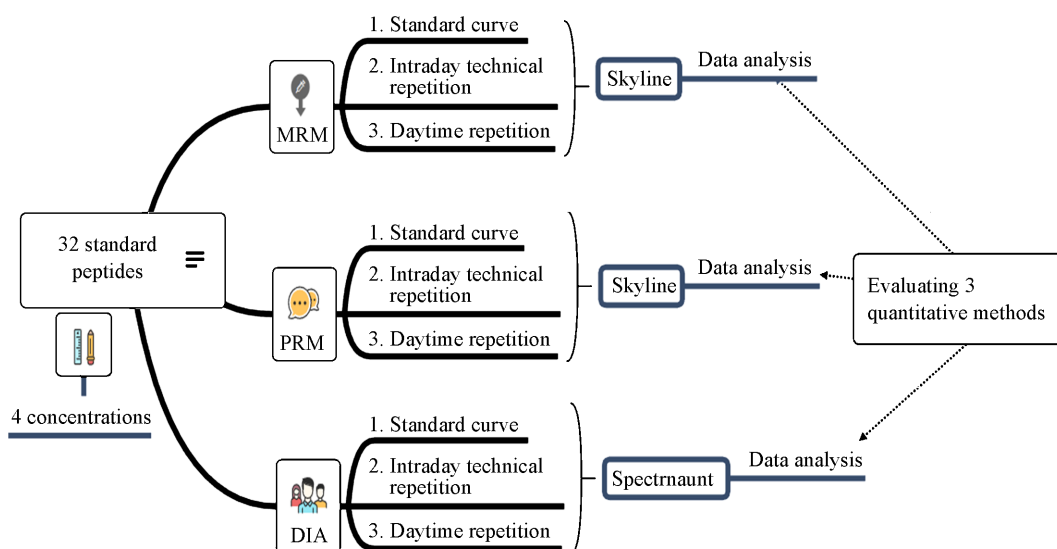


Fig. 1 Evaluation of three quantitative methods using 32 standard peptides at four concentrations

Each method includes the creation of a standard curve, intraday technical repetition, and daytime repetition. Data analysis is performed using Skyline for MRM and PRM, and Spectronaut for DIA, to evaluate the performance and reliability of these quantitative methods.

2.2 灵敏度对比

在3种质谱定量方法采集的数据中,32条肽段均被成功鉴定和定量.其中,在最低浓度样品中,DIA,PRM和MRM具有相近的信号噪音比值(信噪比,S/N),3种方法均具有较高灵敏度,而PRM具有最高的信噪比.如图2所示,EANLLNAVIVQR肽段在最低浓度(8 fmol/ μ L)数据中,DIA、PRM和MRM信噪比均大于5倍,其中PRM使用更新版本的质谱仪采集,有更高的信噪比(>10).MRM方法使用早期型号的三重四极杆质谱仪和更稳定的离子源,可以获得与以上两种方法相似的灵敏度.

2.3 技术重复定量偏差比较

如图3(A)所示,由每条肽段技术重复的定量面积计算出相对标准偏差,对于浓度由低到高的4次MRM实验,分别标记为1~4四个组别,变异系数(Coefficient of variation, CV)值中位数从0.15降至0.05,与之相对应的PRM定量结果中CV值按浓度从低到高均维持在0.05附近,表明PRM的高灵敏度带来的高信噪比对定量的相对标准偏差有正向反馈.而在最高的两个浓度结果中,PRM和MRM定量表现出类似的CV值和类似的技术重复定量准确性.此外,DIA的定量面积显示出相对于前两种定量方法较高的CV值,4个浓度的肽段均显示出较高的CV值,但是其中位数均小于0.2,表明有半数以上的肽段定量重复性较好.考虑到DIA方法定量面积是由软件自动计算得到,而PRM和MRM是由手工确认,DIA是为大规模定量而设计,在实验中无法由人工完成确认,因此该结果仍展现了3种方法较好的定量性能.特别是PRM显示了灵敏度和稳定性兼备的良好表现.如图3(B)所示,MRM方法在相对中高浓度(3和4两组重复)中,CV值表现出与PRM一致的定量稳定性,均在0.05附近,两者具有相似的

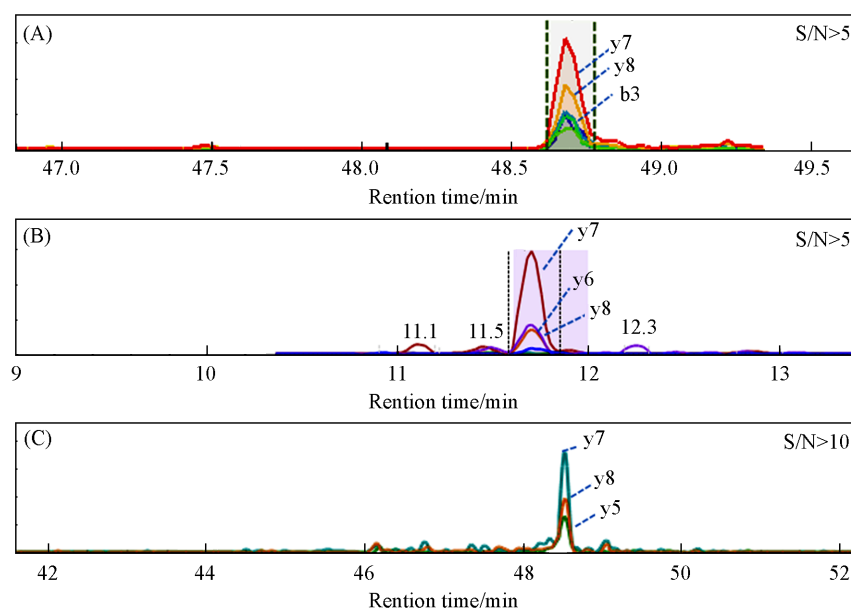


Fig. 2 Detection and quantification of peptide EANLLNAVIVQR at 8 fmol/ μ L using DIA(A), MRM(B), and PRM(C) methods

Different colors represent different MS2 fragments.

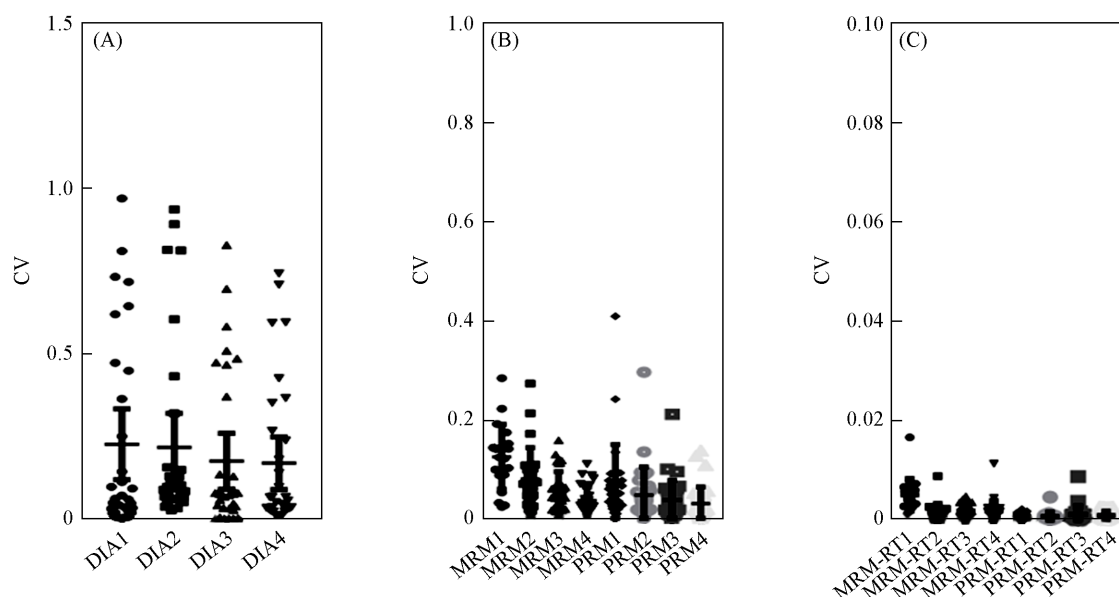


Fig. 3 Coefficient of variation(CV) analysis for peptide quantification methods

(A) Using DIA across four concentrations; (B) using MRM and PRM; (C) comparison of CV for the retention time (RT) between MRM and PRM across four replicates.

定量稳定性.

如图3(C)所示,从保留时间稳定性观察,PRM和MRM在日内重复实验中均显示出较高的稳定性,CV值均小于0.02,两种色谱工作状态均较好. DIA采用direct模式,所有数据软件做了保留时间校正和关联后用于提取峰面积定量,因此未参与对比.此外,MRM和PRM 3次重复定量值的相关系数均大于0.99.

2.4 定量曲线准确性对比

在现有的检验科临床检测项目中,涉及的代谢物定量线性 R^2 均达到0.99以上.因此,依据浓度和面积对每一条肽段在3种定量方法中作了线性拟合[图4(A)~(C)],以肽段TEHINIHLQR为例, DIA

结果的线性为0.84, 而PRM和MRM分别为0.96和0.99, 可见MRM线性高于另外两种定量方法. 如图4(D)所示, 对于所有肽段, PRM和MRM均具有超过0.95的 R^2 , 而DIA方法的所有肽段 R^2 相对较低. 由图3(E)可见, MRM实验中所有 R^2 均大于0.98, 部分大于0.99; 与之对应的PRM方法中, 所有 R^2 均大于0.95, 集中于0.96附近.

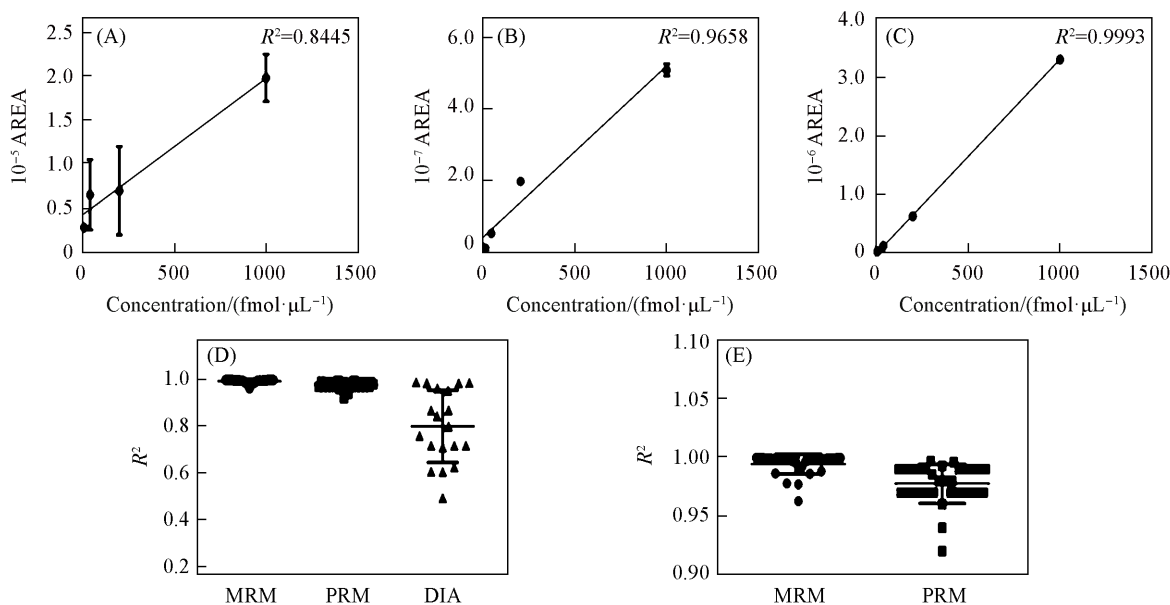


Fig. 4 Quantitative performance using DIA, PRM, and MRM methods on peptide TEHINIHLQR

(A—C) Standard curves using DIA, PRM, and MRM respectively; (D) comparison of R^2 in the quantification of the 32 peptides across MRM, PRM, and DIA methods, indicating the linearity of the quantification for each method; (E) detailed comparison of R^2 for MRM and PRM methods, showing high reproducibility and accuracy in the quantification.

2.5 日间定量偏差对比

临床质谱方向的应用会涉及较大规模样本, 需要长时间仪器稳定性和定量准确性, 因此比较了PRM和MRM两种方法在日间的技术重复性, DIA由于在之前的实验中不适用于需要定量曲线绘制的绝对定量实验, 因此未进行比较. 如图5(A)和(B)所示, 首先考察了系统保留时间稳定性, 以

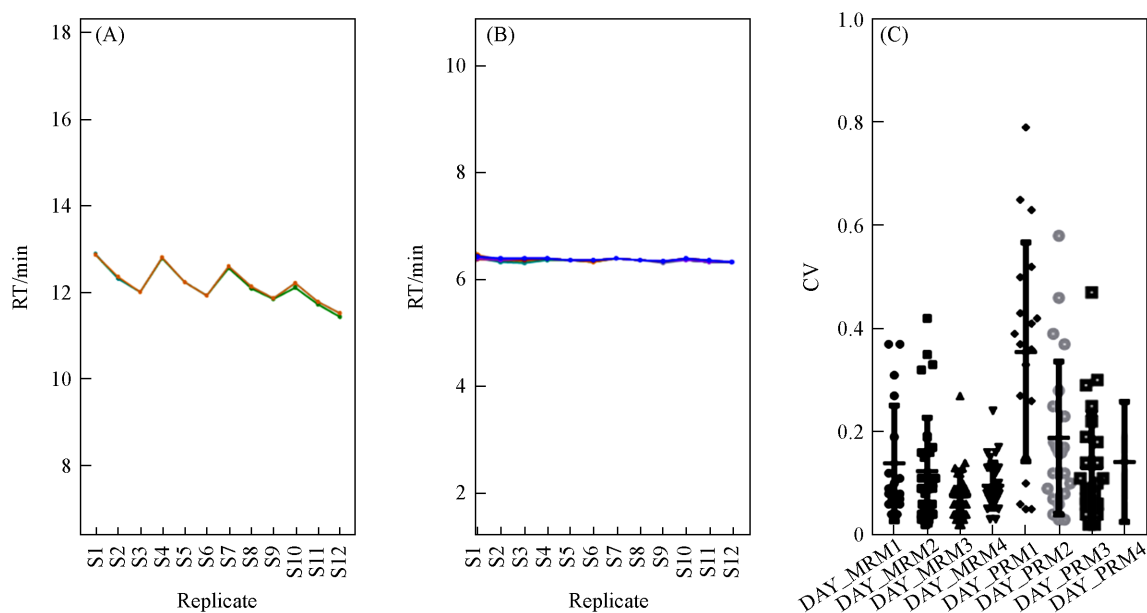


Fig. 5 Daytime RT shift and CV of peak areas for PRM(A) and MRM(B) methods of VSVHVEGDHR and CVs of peak areas between MRM and PRM methods across different days(C)

VSVHVIEGDHR 肽段为例, PRM 由于使用更精密的纳升液相系统和色谱柱, 易发生其它样本的污染和残留, 因此在日间定量中保留时间出现了约 1 min 的漂移. 而 MRM 系统由于使用较大流速和较大内径色谱柱, 抗污染能力强, 在日间定量中显示出更加稳定的保留时间, 均小于 0.1 min, 更加适用于大量临床样本的连续分析.

由图 5(C) 可见, 在日间定量中, MRM 由于系统稳定性高, 4 种浓度的 CV 值均小于 0.15, PRM 在低浓度样本中显示出相对较高的 CV 值, 分布于 0.2 附近. 以上结果表明, MRM 定量在 4 种浓度中均显示出最好的日间稳定性, 在周期更长的定量实验中, MRM 定量方法显示出更小的定量 CV 值.

2.6 讨论

2.6.1 DIA 在验证阶段定量精度有待提升 DIA 是近年发展出来的蛋白组学新技术, 拥有高通量的技术优势. 大量临床蛋白组学研究采用 DIA 模式发现了很多有潜在价值的标志物. DIA 方法对细胞和组织的鉴定深度突破了 12000 个蛋白^[19], 相对于 PRM 和 MRM 方法, 有巨大的深度优势, 此类方法较多用于疾病标志物发现阶段的研究. 如 Wong 等^[7] 直接采用 DIA 方法对尿液样本进行大规模 DIA 分析, 找到了新冠疾病潜在标志物. Mann 等^[20,21] 采用 DIA 方法分析了 600 多例非酒精性和酒精相关脂肪肝疾病样本, 确定了多种生物标志物, 可以检测和区分显著纤维化、轻度炎症活动和任何脂肪变性. Mann 等^[22] 提出了矩形策略, 认为多个队列共同发现的标志物就可以确认. 但是本研究发现 DIA 策略在定量准确性上不能满足临床检验的要求, DIA 策略发现的标志物需要进一步开发更准确的临床定量方法, 有助于其推广和应用. 本文中, 与 PRM 与 MRM 方法由人工确定峰位置不同的是, DIA 分析中采用了现实分析中的一般流程, 由软件完成保留时间预测和峰面积确认以及后续的定量. 另一方面, MRM 和 PRM 都对母离子进行了选择性碎裂, 因此串联谱图包含的信息更单纯来自于母离子, 而 DIA 的碎裂模式导致其串联谱图相对复杂, 需要依靠软件解析确认相应母子离子的强度, 也会造成一定程度的不准确, 因此部分肽段定量准确性有待提升. 在不远的将来, 随着定量解析算法和色谱系统稳定性的提高, 如能将高通量和定量准确性二者结合得更好, DIA 方法在临床检验质谱方向必将取得重大突破.

2.6.2 PRM 和 MRM 有潜力应用于临床检验 相对于 DIA 技术单次上样突破 10000 个蛋白的定量能力, PRM 和 MRM 技术定量通道数较少, Doellinger 等^[23] 基于高分辨质谱发展的 PRM 技术, 单针定量超过 800 个肽段, 可在重标肽段校正帮助下获得高精度靶向定量数据. Marto 等^[24] 发展的 PRM-LIVE 技术通过保留时间实时校正技术, 单个采集循环中最大限度提升通量, 可在 1 h 内定量超过 2000 条肽段. 通过对比数据发现, PRM 方法相对于其它两种方法的最大优势为灵敏度. 灵敏度在生物样本定量中至关重要, 如 Wong 等^[25] 采用 PRM 靶向技术结合 TMT 试剂, 获得了抗原刺激下 TCR-CD3 免疫沉淀(IP) 复合物中不同酪氨酸位点的磷酸化/非磷酸化在不同时间点的定量结果. 针对科研样本对定量灵敏度和准确度高的需求, 如磷酸化、乳酸化等低丰度修饰的准确定量, PRM 定量方法拥有巨大的潜力. 在可预见的未来, 如能进一步发展稳定的纳升喷雾技术, 提升该方法的稳定性, 有望将该技术推广至临床检测, 最大化提升临床检验中的质谱灵敏度. PRM 的定性定量下限优于 MRM, 考虑到 PRM 采用的是 200 nL/min 的流速, 灵敏度得益于低流速纳升喷雾带来的高离子化效率, 同时, 与临床质谱 MRM 实验采用的微升流速相比, 低流速纳升喷雾也有稳定性较低的缺点.

相对于采用纳升喷雾的 PRM 技术, 微升喷雾的 MRM 技术由于其稳定性好而被广泛应用于临床检验, 如维生素、类固醇等成熟检验项目^[26]. 在日间稳定性对比中, MRM 方法显示出更小的定量和保留时间标准偏差, 同时表现出较好的标准肽段线性. 同时, 微升喷雾显示出比纳升喷雾更好的长时间稳定能力, 尽管一定程度上牺牲了灵敏度, 但仍能将低丰度肽段稳定检出. 因此, 在未来的蛋白质组临床检验中, MRM 技术由于其稳定性、灵敏度和定量线性好, 以及其在小分子端成熟的临床应用, 最有潜力被应用于蛋白组学标志物临床检验.

3 结论

通过以上对比发现, 靶向定量在临床检验方面有较大优势, DIA 方法对于靶向肽段定量, 其稳定

性和定量线性有待提升。MRM定量方法具有最佳日间日内稳定性、灵敏度和定量精度，同时仪器成本较低，适用于临床研究；PRM具有最高灵敏度和较高稳定性定量精度，但是仪器成本和维护成本较高，由于其离子传输距离长，有较多富集装置，可能会对定量线性有影响。本文探讨了可能用于蛋白质标志物临床定量的质谱方法，并发现MRM, PRM等靶向定量技术展现出优越的灵敏度和绝对定量准确性。继续优化和稳定这些质谱方法及相关的样本处理方法，将有助于蛋白质质谱检测方法向临床检验的真正推广。

参 考 文 献

- [1] Kim M. S., Pinto S. M., Getnet D., Nirujogi R. S., Manda S. S., Chaerkady R., Madugundu A. K., Kelkar D. S., Isserlin R., Jain S., Thomas J. K., Muthusamy B., Leal-Rojas P., Kumar P., Sahasrabudhe N. A., Balakrishnan L., Advani J., George B., Renuse S., Selvan L. D. N., Patil A. H., Nanjappa V., Radhakrishnan A., Prasad S., Subbannayya T., Raju R., Kumar M., Sreenivasamurthy S. K., Marimuthu A., Sathe G. J., Chavan S., Datta K. K., Subbannayya Y., Sahu A., Yelamanchi S. D., Jayaram S., Rajagopalan P., Sharma J., Murthy K. R., Syed N., Goel R., Khan A. A., Ahmad S., Dey G., Mudgal K., Chatterjee A., Huang T. C., Zhong J., Wu X. Y., Shaw P. G., Freed D., Zahari M. S., Mukherjee K. K., Shankar S., Mahadevan A., Lam H., Mitchell C. J., Shankar S. K., Satishchandra P., Schroeder J. T., Sirdeshmukh R., Maitra A., Leach S. D., Drake C. G., Halushka M. K., Prasad T. S. K., Hruban R. H., Kerr C. L., Bader G. D., Iacobuzio-Donahue C. A., Gowda H., Pandey A., *Nature*, **2014**, *509*(7502), 575—581
- [2] Wilhelm M., Schlegl J., Hahne H., Gholami A. M., Lieberenz M., Savitski M. M., Ziegler E., Butzmann L., Gessulat S., Marx H., Mathieson T., Lemeere S., Schnatbaum K., Reimer U., Wenschuh H., Mollenhauer M., Slotta-Huspenina J., Boese J. H., Bantschke M., Gerstmaier A., Faerber F., Kuster B., *Nature*, **2014**, *509*(7502), 582—587
- [3] Uhlen M., Fagerberg L., Hallström B. M., Lindskog C., Oksvold P., Mardinoglu A., Sivertsson A., Kampf C., Sjöstedt E., Asplund A., Olsson I., Edlund K., Lundberg E., Navani S., Szizyarto C. A., Odeberg J., Djureinovic D., Takanen J. O., Hober S., Alm T., Edqvist P. H., Berling H., Tegel H., Mulder J., Rockberg J., Nilsson P., Schwenk J. M., Hamsten M., von Feilitzen K., Forsberg M., Persson L., Johansson F., Zwahlen M., von Heijne G., Nielsen J., Pontén F., *Science*, **2015**, *347*(6220), 1260419
- [4] Zhang H., Liu T., Zhang Z., Payne S. H., Zhang B., McDermott J. E., Zhou J. Y., Petyuk V. A., Chen L., Ray D., Sun S. S., Yang F., Chen L. J., Wang J., Shah P., Cha S. W., Aiyetan P., Woo S., Tian Y., Gritsenko M. A., Clauss T. R., Choi C., Monroe M. E., Thomas S., Nie S., Wu C. C., Moore R. J., Yu K. H., Tabb D. L., Fenyö D., Bafna V., Wang Y., Rodriguez H., Boja E. S., Hiltke T., Rivers R. C., Sokoll L., Zhu H., Shih I. M., Cope L., Pandey A., Zhang B., Snyder M. P., Levine D. A., Smith R. D., Chan D. W., Rodland K. D., Investigators C., *Cell*, **2016**, *166*(3), 755—765
- [5] Jiang Y., Sun A. H., Zhao Y., Ying W. T., Sun H. C., Yang X. R., Xing B. C., Sun W., Ren L. L., Hu B., Li C. Y., Zhang L., Qin G. R., Zhang M. H., Chen N., Zhang M. L., Huang Y., Zhou J. N., Zhao Y., Liu M. W., Zhu X. D., Qiu Y., Sun Y. J., Huang C., Yan M., Wang M. C., Liu W., Tian F., Xu H. L., Zhou J., Wu Z. Y., Shi T. L., Zhu W. M., Qin J., Xie L., Fan J., Qian X. H., He F. C., CNHPP Consortium, *Nature*, **2019**, *567*(7744), 257—261
- [6] Gao Q., Zhu H. W., Dong L. Q., Shi W. W., Chen R., Song Z. J., Huang C., Li J. Q., Dong X. W., Zhou Y. T., Liu Q., Ma L. J., Wang X. Y., Zhou J., Liu Y. S., Boja E., Robles A. I., Ma W. P., Wang P., Li Y. Z., Ding L., Wen B., Zhang B., Rodriguez H., Gao D. M., Zhou H., Fan J., *Cell*, **2019**, *179*(5), 561—577
- [7] Tian W. M., Zhang N., Jin R. H., Feng Y. M., Wang S. Y., Gao S. X., Gao R. Q., Wu G. Z., Tian D., Tan W. J., Chen Y., Gao G. F., Wong C. C. L., *Nature Commun.*, **2020**, *11*(1), 5859
- [8] Xu J. Y., Zhang C., Wang X., Zhai L., Ma Y., Mao Y., Qian K., Sun C., Liu Z., Jiang S., Wang M., Feng L., Zhao L., Liu P., Wang B., Zhao X., Xie H., Yang X., Zhao L., Chang Y., Jia J., Wang X., Zhang Y., Wang Y., Yang Y., Wu Z., Yang L., Liu B., Zhao T., Ren S., Sun A., Zhao Y., Ying W., Wang F., Wang G., Zhang Y., Cheng S., Qin J., Qian X., Wang Y., Li J., He F., Xiao T., Tan M., *Cell*, **2020**, *182*(1), 245—261
- [9] Guo Y., You J., Zhang Y., Liu W. S., Huang Y. Y., Zhang Y. R., Zhang W., Dong Q., Feng J. F., Cheng W., Yu J. T., *Nature Aging*, **2024**, *4*(2), 247—260
- [10] You J., Guo Y., Zhang Y., Kang J. J., Wang L. B., Feng J. F., Cheng W., Yu J. T., *Nature Commun.*, **2023**, *14*(1), 7817
- [11] Hoshino A., Kim H. S., Bojmar L., Gyan K. E., Cioffi M., Hernandez J., Zambirinis C. P., Rodrigues G., Molina H., Heissel S., Mark M. T., Steiner L., Benito-Martin A., Lucotti S., Di Giannatale A., Offer K., Nakajima M., Williams C., Nogués L., Vatter F. A. P., Hashimoto A., Davies A. E., Freitas D., Kenific C. M., Ararso Y., Buehring W., Lauritzen P., Ogitani Y., Sugiura K., Takahashi N., Aleckovic M., Bailey K. A., Jolissant J. S., Wang H. J., Harris A., Schaeffer L. M., García-Santos G., Posner Z., Balachandran V. P., Khakoo Y., Raju G. P., Scherz A., Sagi I., Scherz-Shouval R., Yarden Y., Oren M., Malladi M., Petriccione M., De Braganca K. C., Donzelli M., Fischer C., Vitolano S., Wright G. P., Ganshaw L., Marrano M., Ahmed A., DeStefano J., Danzer E., Roehrl M. H. A., Lacayo N. J., Vincent T. C., Weiser M. R., Brady M. S., Meyers P. A., Wexler L. H., Ambati S. R., Chou A. J., Slotkin E. K., Modak S., Roberts S. S., Basu E. M., Diolaiti D., Krantz B. A., Cardoso F., Simpson A. L., Berger M., Rudin C. M., Simeone D. M., Jain M., Ghajar C. M., Batra S. K., Stanger B., Bui J., Brown K. A., Rajasekhar V. K., Healey J. H., de Sousa M., Kramer K., Sheth S., Baisch J., Pascual V., Heaton T. E., La Quaglia M. P., Pisapia D. J., Schwartz R., Zhang H. Y., Liu Y., Shukla A., Blavier L., DeClerck Y.

- A., LaBarge M., Bissell M. J., Caffrey T. C., Grandgenett P. M., Hollingsworth M. A., Bromberg J., Costa-Silva B., Peinado H., Kang Y. B., Garcia B. A., O'Reilly E. M., Kelsen D., Trippett T. M., Jones D. R., Matei I. R., Jarnagin W. R., Lyden D., *Cell*, **2020**, *182*(4), 1044—1061
- [12] Shen B., Yi X., Sun Y. T., Bi X. J., Du J. P., Zhang C., Quan S., Zhang F. F., Sun R., Qian L. J., Ge W. G., Liu W., Liang S., Chen H., Zhang Y., Li J., Xu J. Q., He Z. B., Chen B. F., Wang J., Yan H. X., Zheng Y. F., Wang D. L., Zhu J. S., Kong Z. Q., Kang Z. Y., Liang X., Ding X., Ruan G., Xiang N., Cai X., Gao H. H., Li L., Li S. N., Xiao Q., Lu T., Zhu Y., Liu H. F., Chen H. X., Guo T. N., *Cell*, **2020**, *182*(1), 59—72
- [13] Hu A. Q., Zhang L., Wang Z. X., Yuan C. Y., Lin L., Zhang J. Y., Gao X., Chen X. G., Guo W., Yang P. Y., Shen H. L., *Anal. Chem.*, **2023**, *95*(2), 862—871
- [14] Zhou M. T., Haque R. U., Dammer E. B., Duong D. M., Ping L. Y., Johnson E. C. B., Lah J. J., Levey A. I., Seyfried N. T., *Clinical Proteomics*, **2020**, *17*(1), 19
- [15] Demichev V., Messner C. B., Vernardis S. I., Lilley K. S., Ralser M., *Nature Methods*, **2020**, *17*(1), 41—44
- [16] Messner C. B., Demichev V., Bloomfield N., Yu J. S. L., White M., Kreidl M., Egger A. S., Freiwald A., Ivoosev G., Wasim F., Zelezniak A., Jürgens L., Suttorp N., Sander L. E., Kurth F., Lilley K. S., Müllerle M., Tate S., Ralser M., *Nature Biotechnology*, **2021**, *39*(7), 846—854
- [17] Vidova V., Spacil Z., *Anal. Chim. Acta*, **2017**, *964*, 7—23
- [18] Zecha J., Lee C. Y., Bayer F. P., Meng C., Vincent, Zerweck J., Schnatbaum K., Michler T., Pichlmair A., Ludwig C., Kuster B., *Molecular & Cellular Proteomics*, **2020**, *19*(9), 1503—1521
- [19] Heil L. R., Damoc E., Arrey T. N., Pashkova A., Denisov E., Petzoldt J., Peterson A. C., Hsu C., Searle B. C., Shulman N., Riffle M., Connolly B., MacLean B. X., Remes P. M., Senko M. W., Stewart H. I., Hock C., Makarov A. A., Hermanson D., Zabrouskov V., Wu C. C., MacCoss M. J., *J. Proteome Res.*, **2023**, *22*(10), 3290—3300
- [20] Niu L., Geyer P. E., Albrechtsen N. J. W., Gluud L. L., Santos A., Doll S., Treit P. V., Holst J. J., Knop F. K., Vilsbol T., Junker A., Sachs S., Stemmer K., Müller T. D., Tschöp M. H., Hofmann S. M., Mann M., *Molecular Systems Biology*, **2019**, *15*(3), e8793
- [21] Niu L. L., Thiele M., Geyer P., Rasmussen D. N., Webel H. E., Delgado A., Gupta R., Meier F., Strauss M., Kjærsgaard M., Lindvig K. P., Israelsen M., Rasmussen S., Hansen T., Mann M., Krag A., *J. Hepatology*, **2022**, *77*, 500—501
- [22] Niu L. L., Thiele M., Geyer P. E., Rasmussen D. N., Webel H. E., Santos A., Gupta R., Meier F., Strauss M., Kjaergaard M., Lindvig K., Jacobsen S., Rasmussen S., Hansen T., Krag A., Mann M., *Nature Medicine*, **2022**, *28*(6), 1277—1287
- [23] Grossegeisse M., Hartkopf F., Nitsche A., Doellinger J., *J. Proteome Research*, **2020**, *19*(7), 2854—2862
- [24] Zhu H., Ficarro S. B., Alexander W. M., Fleming L. E., Adelmant G., Zhang T. H., Willetts M., Decker J., Brehmer S., Krause M., East M. P., Gray N. S., Johnson G. L., Kruppa G., Marto J. A., *Anal. Chem.*, **2021**, *93*(41), 13791—13799
- [25] Wu W., Zhou Q. P., Masubuchi T., Shi X. S., Li H., Xu X. Y., Huang M., Meng L., He X., Zhu H. Y., Gao S. X., Zhang N., Jing R. R., Sun J., Wang H. P., Hui E. F., Wong C. C., Xu C. Q., *Cell*, **2020**, *182*(4), 855—871
- [26] Wang Z. X., Wang H., Peng Y. F., Chen F. J., Zhao L., Li X. M., Qin J. Q., Li Q. Q., Wang B. L., Pan B. S., Guo W., *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, **2020**, *58*(9), 1477—1487

(Ed.: N, K)