

# 一种热蛋白质组学分析数据的归一化方法

甄雪妍, 周宝津, 刘静雯, 任 艳

(上海中医药大学科技实验中心, 上海 201203)

**摘要** 建立了一种小分子靶标蛋白的鉴定方法, 即引入索引保留时间(Indexed retention time, iRT)肽段作为非标记热蛋白质组学(Thermal proteome profiling, TPP)分析定量归一化内标, 实现对小分子靶标的准确挖掘. 将iRT肽段加入到表征良好的模型药物甲氨蝶呤(Methotrexate, MTX)处理的293T细胞提取液中, 在不同温度加热处理时它们稳定存在, 因此可作为定量归一化的标准. 实验结果表明, 以iRT作为定量校正, 不仅对总蛋白含量有良好的校正效果, 同时对MTX的靶标蛋白二氢叶酸还原酶(Dihydrofolate reductase, DHFR)热熔解拟合曲线也有一定改善. 该方法简单方便、经济高效, 具有较强实用性和推广性, 为非标记TPP技术的实施及定量准确性提供了重要的实验依据.

**关键词** 非标记定量蛋白质组学; 热蛋白质组学分析; 索引保留时间; 数据归一化

中图分类号 O657

文献标志码 A

doi: 10.7503/cjcu20240286

## A Data Normalization Method of Thermal Proteome Profiling

ZHEN Xueyan, ZHOU Baojin, LIU Jingwen, REN Yan\*

(Experiment Center for Science and Technology, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China)

**Abstract** We developed a simple, cost-effective method with wide application for the accurate identification of small molecule target proteins, in which indexed retention time (iRT) peptides were adopted to be an internal standard for quantification normalization in label-free quantitative thermal proteome profiling (TPP) analysis. The iRT standard peptides were supplemented into the lysates of 293T cells treated by a well-characterized model drug methotrexate (MTX). These peptides were quite stable during heating under different temperatures and it is reasonable to use them for quantification normalization. The results showed that iRT peptides used as an internal standard provided a good normalization effect on the global proteomes. Meanwhile, the melting curve of the target protein dihydrofolate reductase (DHFR) of MTX has been improved. This method provides an important experimental basis for the implementation and quantitative accuracy of label-free TPP techniques.

**Keywords** Label-free quantitative proteomics; Thermal proteome profiling; Indexed retention time; Data normalization

找到活性小分子的靶标是药物研发的关键步骤之一<sup>[1]</sup>. 应用蛋白质组学定量技术寻找小分子靶标是目前药物研发的重要工具<sup>[2]</sup>. 热蛋白质组学分析(Thermal proteome profiling, TPP)是一种有效挖掘小分子靶标蛋白的方法, 是基于蛋白质与配体结合后可以增加蛋白的热稳定性, 导致溶解曲线发生位移这一原理发展的鉴定活性小分子靶标蛋白的技术<sup>[3,4]</sup>. 简而言之, 蛋白质在加热过程中会发生热变性解折叠, 而靶标蛋白由于与配体结合发生相互作用或翻译后修饰而更稳定, 在梯度加热过程中受配体保护而导致蛋白质沉淀减少, 通过质谱(MS)技术可定量那些沉淀减少的蛋白质, 从而实现对靶标蛋白质

收稿日期: 2024-06-14. 网络首发日期: 2024-09-06.

联系人简介: 任 艳, 女, 博士, 研究员, 主要从事生物质谱和蛋白质组学方面的研究. E-mail: reny@genomics.cn

基金项目: 国家自然科学基金(批准号: 32371500)资助.

Supported by the National Natural Science Foundation of China(No.32371500).

的检测<sup>[5]</sup>。该技术无需化学修饰,且可在体外及活细胞层面对靶标蛋白实现高通量识别,因此在小分子化合物的靶标筛选中应用广泛<sup>[6]</sup>。为了消除不同温度处理样本的定量误差,TPP通常结合标记定量蛋白质组学方法使用。标记定量的稳定性优于非标记定量,但是标记定量存在定量比值压缩情况,成本高而且操作复杂。而非标记定量TPP方法也可以实现靶标蛋白的准确鉴定,并且非标记定量不依赖任何同位素标记试剂,成本低,实验流程简单,蛋白质定量比值更接近真实情况<sup>[7,8]</sup>。因此,非标记定量蛋白质组学技术在生物医学研究中具有广泛的应用价值。然而,非标记定量蛋白质组学方法在数据的可重复性方面具有一定的挑战性。受样品处理方法、质谱检测条件和统计分析方法等条件带来的异质性影响,通常很难得到较好的数据重复性<sup>[9]</sup>。而且在评估重复性的过程中,通过多次重复实验,对同一蛋白在不同样本中的信号强度进行比较来实现定量,也无疑增加了时间和经济成本。因此,为了准确地进行不同样本间的比较及减少成本,在非标记定量蛋白质组学方法的基础上,找到可以稳定实现数据可重现性的方法具有十分重要的意义。

液相色谱-质谱联用(LC-MS/MS)分析复杂生物样品已经成为蛋白质组学研究的重要基础工具<sup>[10]</sup>。蛋白质组学分析中色谱保留时间(RT)在蛋白质的鉴定和定量方面起着重要作用<sup>[11]</sup>。肽段RT是独立于质谱分析结果的肽段特征信息,可以作为质谱定量的辅助信息。靶标肽段可以根据特定肽段的RT进行预测,以提高肽段的可信度,或为数据依赖采集(Data-dependent acquisition, DDA)样品提供辅助信息,提高谱图匹配的准确性<sup>[12,13]</sup>。由于不同样本在检测过程中的RT会随着柱温、流动相体系等差异产生不确定的偏移,且每次更改单个参数时都需要重新进行验证<sup>[14]</sup>。因此,为更好地评估质谱检测数据的准确性和可复现性,实验过程中通常需要采用稳定且对样品无干扰的标准物质进行校正。目前可以使用基于标准肽数据进行RT预测的靶向蛋白质组学新方法,即索引保留时间(Indexed retention time, iRT),来实现数据的精确性和可重复性。iRT量表的标准肽由11种不同于任何一个已知天然序列的肽构成,其采集窗口小、量化精度高,可以作为辅助和验证指标,在几乎所有LC-MS系统上被检测,并且iRT标准肽段具有良好的稳定性,经过加热、冻融、干燥等处理后,仍可以被稳定检测<sup>[15]</sup>。并且该标准品不受样本差异的限制,在样品前处理之前即可加入,既可监测待测组分在样品前处理时的变化,也可检测实验方法的可行性。此外,通过对iRT的监测,不仅能校准色谱系统并准确预测目标肽的RT,同时可作为质谱数据的互补填充,极大地提高了蛋白质组学数据分析的检出率和准确性<sup>[16]</sup>。由此可见,iRT不失为无标记定量TPP靶标蛋白研究的一种重要工具。

对TPP数据进行分析时,重要的一环是对数据的归一化。通过归一化可以消除由实验因素引入的任何可变性,包括蛋白质提取和消化。而使用不同的归一化方法可能会影响最终的量化结果,因此选择合适的归一化分析方法至关重要<sup>[17]</sup>。经典的TPP分析方法采用“S”形溶解曲线拟合的算法进行热蛋白质组的数据处理,将不同温度下可溶性蛋白的相对丰度变化转化为溶解曲线,将实验组与对照组中同一蛋白熔点变化值( $\Delta T_m$ )作为小分子与蛋白结合的衡量指标<sup>[18,19]</sup>。类似地,Mosley等<sup>[20]</sup>通过将每个温度下的每个丰度值除以最低温度下的丰度值来归一化每个蛋白质的丰度值。这两种数据归一化方法在TPP的应用中较为广泛,但对于获得理想的溶解曲线较为困难<sup>[21]</sup>,尤其是具有不规则溶解曲线的蛋白。而这类拟合不佳的蛋白往往会在数据处理过程中被忽略,进而导致重要配体-蛋白互作信息的丢失<sup>[22]</sup>,这无疑会影响到TPP技术的拓展应用及靶标筛选的准确性。基于此,为了提高靶标筛选的准确率,Björklund等<sup>[23]</sup>采用稳定蛋白对数据进行归一化。该研究中对稳定蛋白的筛选要求如下:(1)在对照样品中较高温下相对丰度增加的蛋白质;(2)蛋白在59 °C时的平均丰度至少是37 °C的5倍;(3)至少能够被鉴定到5个独特的肽段。基于稳定蛋白的数据归一化方法可以较好地解释TPP样本中可溶性蛋白的总量随着温度的升高而下降,以及某些不随温度变化而变化的蛋白,同时可以获得较好的拟合曲线。然而,该方法使用的稳定蛋白不具有普适性,稳定蛋白的筛选标准也因实验而异。不同细胞、组织或微生物中的稳定蛋白具有差异,且稳定蛋白对温度点的设置及阈值的选择没有统一的原则。因此,本文尝试通过iRT标准肽来实现TPP数据的归一化。

本文使用表征良好的模型药物甲氨蝶呤(Methotrexate, MTX)<sup>[24]</sup>以及模式细胞293T来验证所建立

方法的可行性. 通过采用高分辨质谱仪鉴定 MTX 与已知靶标蛋白二氢叶酸还原酶(Dihydrofolate reductase, DHFR)<sup>[25,26]</sup>结合时发生的显著热稳定性变化, 结合生物信息学分析, 以 iRT 标准肽段为依据, 对实验数据拟合曲线进行归一化处理. 分析结果表明, iRT 与 TPP 结合可以获得所有样本通道总体蛋白良好的丰度归一化效果以及更佳的 DHFR 拟合曲线, 并且数据重复性和准确性均得到了较大提高.

## 1 实验部分

### 1.1 试剂与仪器

乙腈和甲醇, 色谱纯, 中国沃凯公司; 甲酸, 色谱纯, 德国 CNW 公司; 蛋白酶磷酸酶抑制剂混合物、BCA 蛋白定量试剂盒, 碧云天生物科技有限公司; DL-dithiothreitol, Iodoacetamide 和 Methotrexate, 美国 Sigma-Aldrich 公司; Trypsin, 美国 Promega 公司; 肾细胞(293T)细胞系, 中国科学院上海细胞库.

1901031E 型多功能酶标仪, 美国 BioTek 公司; LVS22513060034 型真空冷冻干燥仪, 丹麦 Labo-Gene 公司; XM-250T 型超声波细胞粉碎仪, 小美超声仪器有限公司; Orbitrap Eclipse 质谱仪, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司.

### 1.2 实验过程

1.2.1 细胞培养 将 293T 细胞系采用含体积分数为 10% 的胎牛血清(BIOEXPLORER, BS1612-109)和 1% 青霉素-链霉素(MeilunBio, MA0110)的 DMEM 培养基(MeilunBio, MA0212), 在 37 °C 和体积分数 5% 的 CO<sub>2</sub> 恒温培养箱(Thermo Fisher Scientific, BB150)中孵育. 当细胞生长密度达到 70%~80% 时, 加入 0.25% 的胰蛋白酶(MeilunBio, MA0233)进行消化、传代和培养.

1.2.2 细胞处理和收集 将 293T 细胞接种于直径为 10 cm 的细胞培养皿中, 于 37 °C 和 5% CO<sub>2</sub> 条件下在培养箱中培养; 待细胞生长至约 80%, 更换无血清培养基; 分别加入 10 μmol/L MTX<sup>[27,28]</sup> 及等体积 DMSO, 将各组细胞继续在 37 °C 培养箱中孵育 3 h 后, 使用预冷的 PBS 缓冲溶液洗涤 2 次; 将洗涤后的细胞悬浮于含有蛋白酶抑制剂的 PBS 缓冲溶液中, 于冰上超声充分裂解细胞; 在 4 °C 下以 20000g 转速离心 20 min; 用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度.

1.2.3 热蛋白质组学分析 根据蛋白质定量结果进行分组, 每组各分 8 等份进行热处理, 每份含 50 μg 蛋白. 按照标准品/蛋白(质量比)为 1:5000, 每份添加 10 ng iRT 标准品; 将 8 对样品分别在 37, 42, 47, 52, 57, 62, 67 和 72 °C 下平行加热 3 min, 然后在室温下孵育 3 min; 将细胞裂解液在 4 °C 下 20000g 转速离心 20 min, 从沉淀蛋白中分离出可溶性蛋白; 收集上层清液, 避免接触沉淀和管壁.

1.2.4 用于 MS 分析的样品制备 根据 BCA 定量结果将蛋白溶液体积归一化, 即以 MTX 组或 DMSO 组的最低温度点为基准进行等体积吸取可溶性蛋白溶液上层清液, 确保两组各 8 份样品中的 iRT 肽段的含量保持一致. 每个样品加 8 mol/L 变性剂, 再加入终浓度为 5 mmol/L 的二硫苏糖醇(DTT), 在 37 °C 水浴还原 1 h; 加入终浓度为 10 mmol/L 的碘乙酰胺(IAM)避光反应 45 min; 然后使用 500 mmol/L 碳酸氢铵(ABC)将样品稀释至 50 mmol/L 的终浓度后, 以酶/蛋白质量比为 1:50 加入胰蛋白酶, 于 37 °C 酶解过夜; 使用 20% TFA 停止消化, 使 pH<2; 将酶切后的肽段样品用 MonoSpin C18 进行脱盐, 并使用真空浓缩仪干燥, 将样品于 -80 °C 保存, 待质谱分析.

1.2.5 质谱条件 将肽段用 0.1% 甲酸溶液复溶. 采用 Orbitrap Eclipse 高分辨质谱仪, 70 min 色谱梯度对 293T 细胞蛋白质进行定量分析, 质谱扫描范围  $m/z$  160 ~ 1500, 碰撞能量 20 ~ 59 eV. 采用 DDA 采集模式平行进行 2 次重复实验.

1.2.6 数据分析 使用搜库软件 MaxQuant(2.0.3.1 版本)对质谱数据进行蛋白鉴定, 所使用数据库为 SwissProt\_human(20211020 版本, 加入 iRT 序列). 搜索参数设置包括前体离子和片段离子的质量精度分别为  $4.5 \times 10^6$  和  $2 \times 10^7$ . 使用完全胰蛋白酶酶切特异性(Trypsin/P), 最多允许 2 个缺失的裂解位点, 固定修饰设为半胱氨酸还原烷基化, 可变修饰设为甲硫氨酸氧化、蛋白质 N 端乙酰化. 蛋白质鉴定设置 Match between run, 鉴定阈值为蛋白和图谱匹配水平上假阳性<1%. 数据后处理使用 R 软件(4.2.2 版

本). 去除大于50%缺失的蛋白, 缺失值使用K近邻方法补全. 蛋白熔解曲线拟合和熔点计算使用 R 包 TPP(3.28.0版本), 数据可视化使用R包 ggplot2(4.2.3版本).

## 2 结果与讨论

### 2.1 TPP质谱定量结果分析

参照文献[29]报道的步骤展开实验, 并在此基础上稍作改动, 实验流程如图1所示. 在经MTX或DMSO处理过的293T细胞的蛋白提取液中加入iRT标准肽段, 经TPP手段获得不同温度处理后蛋白的酶切肽段, 随后样品采用DDA数据采集模式进行定量分析. 为评估DDA采集模式对非标记定量数据的重现性, 分别对MTX或DMSO组的8个温度点样本进行2次重复实验, 共得到32个质谱数据. 通过R软件(4.2.2版本)对数据进行后处理. 数据筛选条件: 去除大于50%缺失的蛋白, 缺失值使用K近邻方法补全. 50%缺失即指蛋白质在16个或以上质谱数据中缺失. 经质谱检测, 在200 ng样品中平均可以鉴定出(2152±61)个蛋白质, 具体鉴定数为2109和2195个蛋白质, 两次重复实验中对照组和MTX组的蛋白鉴定数如图2(A)所示. iRT标准肽段比较稳定, MTX组与对照组中的iRT[图2(B)]均可在37~68 °C的范围内被鉴定.

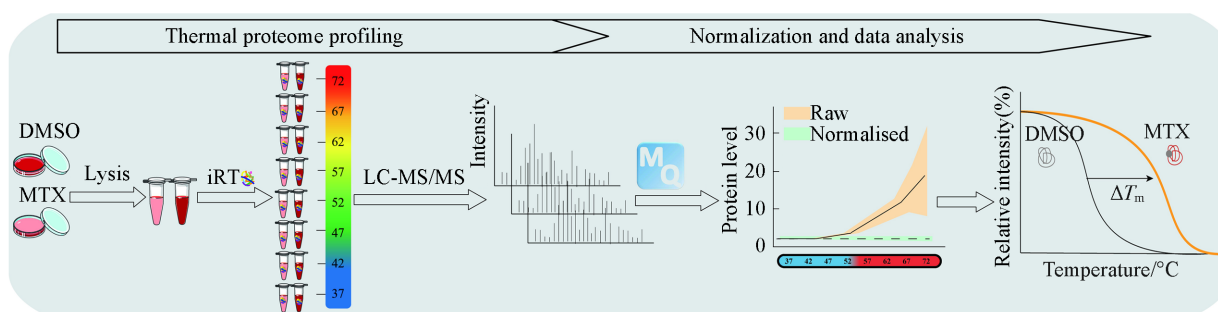


Fig. 1 Workflow of TPP coupled with iRT for target identification in 293T cell

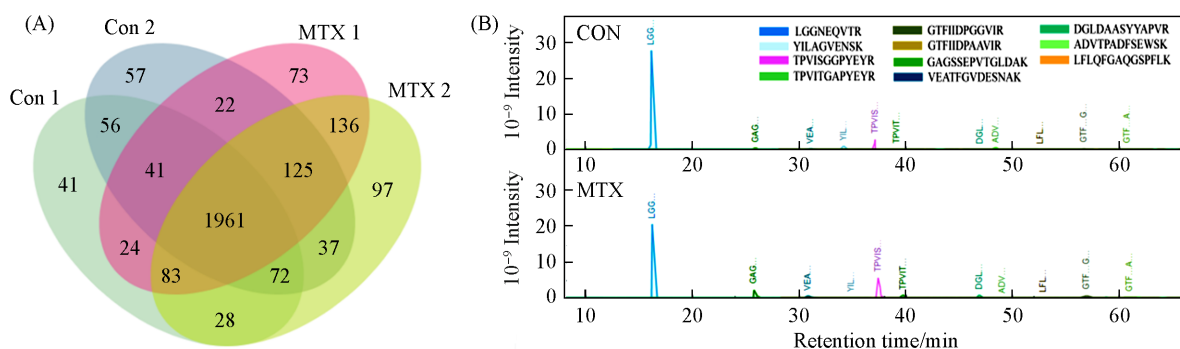
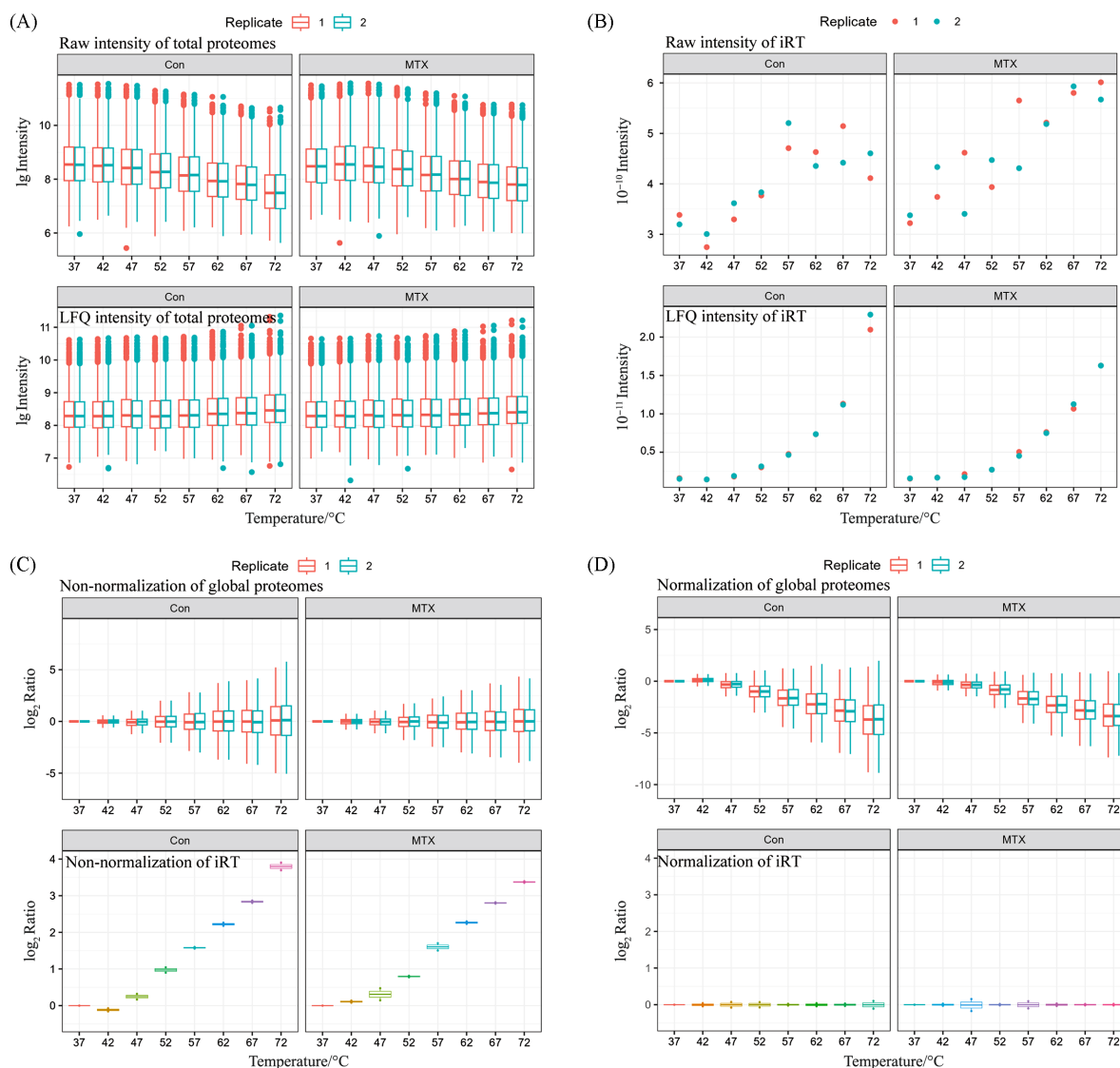


Fig. 2 Venn diagram showing the amount of proteins in control and MTX groups in two replicates(A) and retention time of iRT(B)

为了获得最佳的数据分析结果, 对数据进行了归一化处理. 首先, 为尽可能减少样本前处理、仪器分析等实验操作造成的样本间差异, 以及对非标记TPP定量分析方法的优化, 对质谱采集的总蛋白和iRT信号强度(Intensity)进行了比较[图3(A)和(B)]. 图3(C)和(D)中居上者为两次重复实验中对全蛋白和iRT原始信号强度的分析结果, 居下者为使用MaxQuant软件中非标记定量(Label-free quantification, LFQ)数值对全蛋白和iRT强度的分析结果. 通过使用两种定量方法分别对全蛋白和iRT的信号强度进行比较发现, LFQ方法更能呈现蛋白质在实验过程中的变化规律. 且针对同一蛋白在不同样本间的差异表达, LFQ可实现较好的数据重现性. 由此可知, MaxQuant的LFQ方法是适合TPP数据分析的有效方法. 然后, 通过LFQ对DMSO和MTX组的总蛋白和iRT分别进行基于比率的定量分析可以看出, 未经校正的蛋白原始比率分析[图3(C)]变化趋势不符合总蛋白量在加热过程中的变化趋势. 因为蛋白质在不同温度下会表现出不同的稳定性. 通常蛋白质在40~90 °C的温度范围内会发生蛋

白变性,使其分子空间结构发生改变而失去原有的生物活性<sup>[30]</sup>.这一现象主要是由于LFQ方法对不同样本间比较时一般会出现过度校正的情况.所以,为消除LFQ的过度校正,需要基于稳定的iRT对原始的相对丰度进行归一化处理[图3(D)].从图3(B)可以看出,经iRT校正后的总蛋白变化趋势归于合理.由此可知,基于iRT的归一化方法具有可行性.



**Fig. 3** Proteome profiling with raw intensity(top) and LFQ intensity(bottom) in Maxquant software(A), sum intensity of iRT peptides with raw intensity(top) and LFQ intensity(bottom)(B), ratio profiling in the global proteome(top) and iRT peptides(bottom) using LFQ intensity(C), and ratio profiling in global proteome(top) and iRT peptides(bottom) using LFQ intensity normalized with iRT peptides(D)

## 2.2 数据归一化对靶蛋白 DHFR 溶解曲线的影响

蛋白质的化学特性和空间构象会随着环境温度的升高而发生变化,使得蛋白质的热稳定性和溶解性降低.而配体与靶蛋白结合,可以改变靶蛋白的构象、增强靶蛋白的热稳定性.因此,有配体结合的蛋白比无配体结合的蛋白更稳定,热变性中点温度( $T_m$ )也更高<sup>[19,30]</sup>.本实验限定靶蛋白的 $\Delta T_m \geq 4$  °C.此外,TPP实验中优质的靶蛋白还需要满足3个标准<sup>[6]</sup>:(1)拟合曲线决定系数 $R^2 > 0.8$ ; (2)曲线斜率(slope)  $< -0.06$ ; (3)溶剂对照组曲线的平台期(plateau)  $< 0.3$ .基于以上条件,实验中鉴定到了MTX的已知靶蛋白二氢叶酸还原酶(Dihydrofolate reductase, DHFR)以及一些潜在的靶蛋白AIMP1, SC31A和DYHC1等,其中DHFR表现出显著的相对丰度,且在2次重复实验中均表现出很好的热稳定性.

为评估 iRT 对靶蛋白丰度值的校正作用, 采用不同的方法对 DHFR 进行拟合. 通过原始强度及 LFQ 两种方法分别对 DHFR 的信号强度进行基于相对丰度、稳定蛋白和 iRT 的校正分析. 由图 4(A) 和 (D) 可见, 基于 DHFR 的相对丰度进行归一化, 曲线拟合结果较差. 本实验欲为基于 iRT 的数据归一化方法提供比较性, 因此参照文献[23]报道的基于稳定蛋白的数据归一化方法进行分析. 稳定蛋白指对照样品中在较高温度下相对丰度增加的蛋白质. Björklund 等<sup>[23]</sup>筛选数据的条件为蛋白在 59 °C 下的平均丰度是 37 °C 下的 5 倍, 且至少被鉴定到 5 个独特的肽段. 因为此处所使用的细胞类型和药物与本实验不同, 仅对 59 °C 的条件进行筛选可能不够全面, 且稳定蛋白的筛选标准尚未有明确规定, 因此在数据分析中, 具体的筛选标准仍需要根据实验类型进行调整. 本文参考上述分析理念, 在保证肽段数量的前提下, 设定了稳定蛋白的选择条件: 蛋白在 62 °C 下的平均丰度至少是 37 °C 的 2 倍, 在 67 °C 下的平均丰度至少是 37 °C 的 3 倍, 在 72 °C 下的平均丰度至少是 37 °C 的 4 倍. 通过筛选, 找到了满足条件的 366 个在较高温度下依旧保持稳定的蛋白, 并通过对稳定蛋白的平均相对丰度进行数据归一化, 可以获得较好的 DHFR 蛋白的拟合曲线[图 4(B) 和 (E)]. 由图 4(C) 可见, 通过 iRT 校正, 拟合曲线质量较好, 但重复性不及图 4(F). 图 4(E) 和 (F) 均呈现出很好的拟合结果, 但图 4(E) 基于稳定蛋白的方法没有统一的评估标准, 稳定蛋白的选择会因样本差异、温度的设置而进行调整, 很难适用于所有 TPP 实验的分析. 而图 4(F) 中基于 iRT 的校正方法不仅达到了预期效果, 而且  $R^2$  更接近于 1, 说明其数据重复性和拟合质量更佳. 综合分析结果表明, 采用 LFQ 定量方法进行 iRT 归一化后 DHFR 的拟合曲线质量和重复性更好[图 4(F)]. 本实验采用 iRT 进行归一化后, DHFR 的平均  $\Delta T_m$  为 5.535 °C (两次重复分析的  $\Delta T_m$  分别为 4.55 和 6.52 °C). 本实验通过 TPP 技术很好地验证了 DHFR 是 MTX 的靶点<sup>[27,28]</sup>, 同时说明将 iRT 与 TPP 联合应用的方法具有非常好的应用前景.

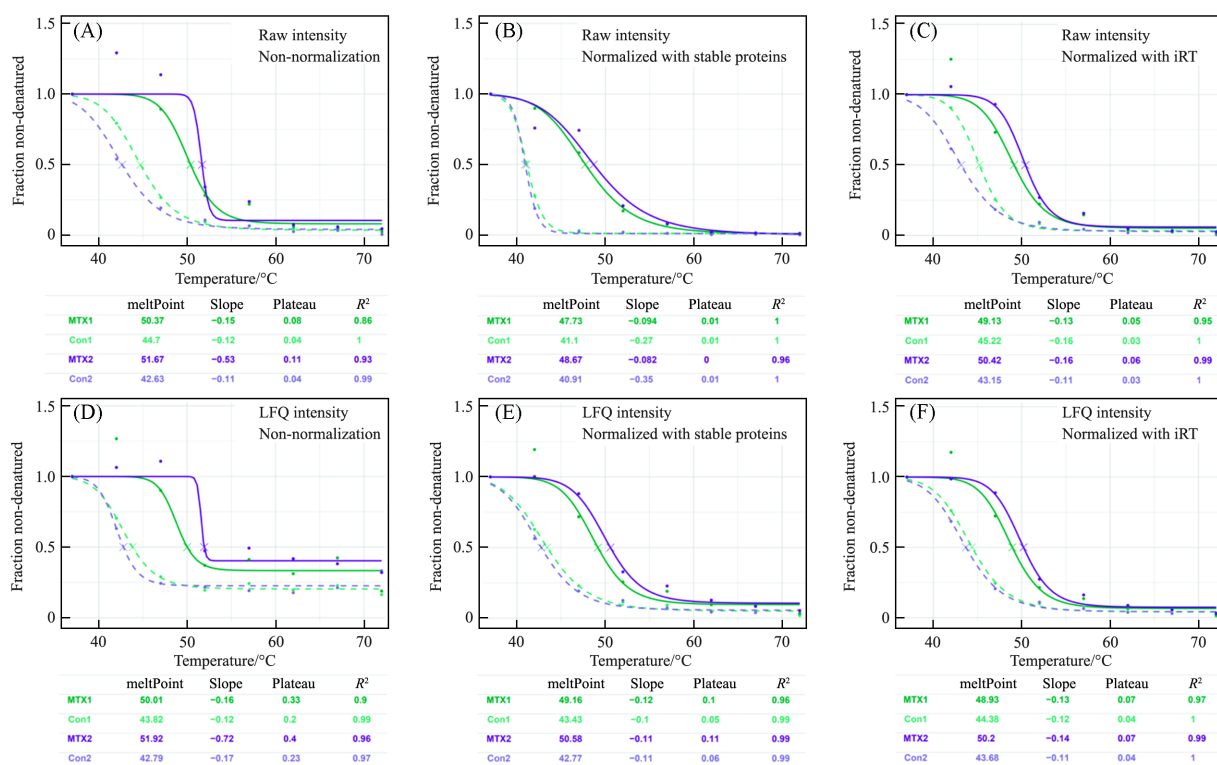


Fig. 4 Melting curve of dihydrofolate reductase

(A) Raw intensity of DHFR; (B) raw intensity normalized with stable proteins; (C) raw intensity normalized with iRT;  
(D) LFQ intensity; (E) LFQ intensity normalized with stable proteins; (F) LFQ intensity normalized with iRT.

### 3 结 论

在基于 LC-MS 技术的蛋白质组学中, 找到更具普适性的归一化方法, 对于 TPP 方法的扩展应用非

常重要<sup>[21]</sup>。本文提出了一种将 iRT 与 TPP 结合的方法,可以有效用于药物小分子靶标蛋白的高灵敏度筛选与鉴定。通过分析抗肿瘤药物 MTX 的已知靶标蛋白 DHFR 的拟合曲线,来证明该方法的可行性。通过使用不同的分析方法对 DHFR 的熔解曲线进行归一化发现,将 iRT 作为内标可获得良好的数据重现性,在降低实验背景影响的同时,还可改善 DHFR 的热熔解拟合曲线。该方法比目前已有的 TPP 归一化方法表现出一定的优势,可提高靶标蛋白鉴定的可信度。同时,该方法除了具有定量准确、数据重现性好的优势外,还具有操作简单、方便且经济有效的优势,可广泛应用于各种 TPP 实验中。该方法为未来更多药物分子靶标蛋白的全面鉴定提供了一种新的参考与思路。

### 参 考 文 献

- [ 1 ] Schurmann M., Janning P., Ziegler S., Waldmann H., *Cell Chem. Biol.*, **2016**, 23(4), 435—441
- [ 2 ] Frantzi M., Latosinska A., Mischak H., *Proteom. Clin. Appl.*, **2019**, 13(2), e1800087
- [ 3 ] Mateus A., Maatta T. A., Savitski M. M., *Proteome Sci.*, **2016**, 15, 13
- [ 4 ] Franken H., Mathieson T., Childs D., Sweetman G. M., Werner T., Tögel I., Doce C., Gade S., Bantscheff M., Drewes G., Reinhard F. B., Huber W., Savitski M. M., *Nat. Protoc.*, **2015**, 10, 1567—1593
- [ 5 ] Le Sueur C., Hammaren H. M., Sridharan S., Savitski M. M., *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2022**, 71, 102225
- [ 6 ] Savitski M. M., Reinhard F. B., Franken H., Werner T., Savitski M. F., Eberhard D., Martinez Molina D., Jafari R., Dovega R. B., Klaeger S., Kuster B., Nordlund P., Bantscheff M., Drewes G., *Science*, **2014**, 346, 1255784
- [ 7 ] Rozanova S., Barkovits K., Nikolov M., Schmidt C., Urlaub H., Marcus K., *Methods Mol. Biol.*, **2021**, 2228, 85—116
- [ 8 ] Pappireddi N., Martin L., Wühr M., *Chembiochem*, **2019**, 20(10), 1210—1224
- [ 9 ] Aebersold R., Mann M., *Nature*, **2003**, 422(6928), 198—207
- [ 10 ] Shuken S. R., *J. Proteome Res.*, **2023**, 22(7), 2151—2171
- [ 11 ] Liu Y., Chang C., Zhu Y. P., *Chin. J. Biotechnol.*, **2022**, 38(3), 961—975(刘祎, 常乘, 朱云平. 生物工程学报, **2022**, 38(3), 961—975)
- [ 12 ] Du Z. K., Shao W., Qin W. J., *Chinese J. Chromatography*, **2021**, 39(3), 211—218(杜卓锟, 邵伟, 春伟捷. 色谱, **2021**, 39(3), 211—218)
- [ 13 ] Hollebrands B., Hageman J. A., van de Sande J. W., Albada B., Janssen H. G., *Anal. Bioanal. Chem.*, **2023**, 415(14), 2715—2726
- [ 14 ] Perez J. J., Chen C. Y., *Anal. Bioanal. Chem.*, **2019**, 411(19), 4701—4708
- [ 15 ] Escher C., Reiter L., MacLean B., Ossola R., Herzog F., Chilton J., MacCoss M. J., Rinner O., *Proteomics*, **2012**, 12(8), 1111—1121
- [ 16 ] Chen K., Li C., Li B., *J. China Pharm. Univ.*, **2021**, 52(4), 422—430(陈可, 李翠翠, 李博. 中国药科大学学报, **2021**, 52(4), 422—430)
- [ 17 ] Cui M., Cheng C., Zhang L., *Lab. Invest.*, **2022**, 102(11), 1170—1181
- [ 18 ] Zhao T., Tian J., Wang X., Hao Y., Xu M., Zhao Y., Liu X., Chen Y., Jia C., *Anal. Chem.*, **2022**, 94(18), 6809—6818
- [ 19 ] Mateus A., Kurzawa N., Becher I., Sridharan S., Helm D., Stein F., Typas A., Savitski M. M., *Mol. Syst. Biol.*, **2020**, 16(3), e9232
- [ 20 ] McCracken N. A., Liu H., Runnebohm A. M., Wijeratne HRS., Wijeratne A. B., Staschke K. A., Mosley A. L., *Mol. Cell Proteomics*, **2023**, 22(9), 100630
- [ 21 ] Figueroa-Navedo A. M., Ivanov A. R., *Cell Rep Methods*, **2024**, 4(2), 100717
- [ 22 ] Ruan C., Ning W., Liu Z., Zhang X., Fang Z., Li Y., Dang Y., Xue Y., Ye M., *ACS Chem. Biol.*, **2022**, 17(1), 252—262
- [ 23 ] Miettinen T. P., Peltier J., Härtlova A., Gierliński M., Jansen V. M., Trost M., Björklund M., *EMBO J.*, **2018**, 37(10), e98359
- [ 24 ] Zhao S., Wang Z., Lin Z., Wei G., Wen X., Li S., Yang X., Zhang Q., Jing C., Dai Y., Guo J., He Y., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **2022**, 61(36), e202204139
- [ 25 ] Rana S., Dranchak P., Dahlin J. L., Lamy L., Li W., Oliphant E., Shrimp J. H., Rajacharya G. H., Tharakan R., Holland D. O., Whitten A. S., Wilson K. M., Singh P. K., Durum S. K., Tao D., Rai G., Inglese J., *Cell Chem. Biol.*, **2024**, 31(2), 221—233
- [ 26 ] Gaetani M., Sabatier P., Saei A. A., Beusch C. M., Yang Z., Lundström S. L., Zubarev R. A., *J. Proteome Res.*, **2019**, 18(11), 4027—4037
- [ 27 ] 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
- [ 28 ] Zhang W., Li X., Zhang X., Dong Y., Hu L., *Anal. Methods*, **2021**, 13(3), 411—418
- [ 29 ] Shi Z., Ren Y., Li S., Hao P., *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2024**, 38(1), e9673
- [ 30 ] Tomberg E., *Meat Sci.*, **2005**, 70(3), 493—508

(Ed.: N, K)