



陈扬博士, 主要研究方向为膜性细胞器发生的生物学机制和基于质谱的蛋白组学应用。研究新细胞器迁移体、外泌体等细胞外囊泡发生、物质分选运输、细胞间信号传输的分子细胞生物学机制。应用蛋白质组技术在临床队列中大规模地筛选疾病的生物标志物, 探索疾病发生规律, 重点关注基于细胞外囊泡的疾病诊断标志物鉴定和疾病发生发展机制。

基于质谱的蛋白组学技术在细胞器研究中的应用

王泓力^{1,2} 史冬雪^{1,2} 陈扬^{1,2*}

(¹北京大学医学部精准医疗多组学研究中心, 北京 102206; ²北京大学医学部基础医学院, 北京 100191)

摘要 细胞器是真核细胞内具有特定结构及生物学功能的区室。系统、深度解析蛋白质在不同细胞器中的丰度、空间分布、互作和运输等, 对于理解细胞器的功能和疾病的机制至关重要。基于质谱的蛋白组学方法已经广泛用于鉴定和定量各种复杂的蛋白质系统, 同样大量应用在细胞器的研究中。基于质谱的蛋白组学技术与细胞器的物理分离方法、邻位标记的细胞器蛋白富集方法、邻位标记的细胞器互作位点鉴定, 以及多重时空的邻位标记等方法联用, 这种组学技术在细胞器蛋白图谱绘制、物质转运、翻译后修饰和疾病机制研究等方面取得了重大突破。细胞器研究对于蛋白质组学的需求与日俱增, 痕量样本的蛋白质组学技术等未来将在细胞器疾病图谱的绘制和细胞器在疾病中的功能解析等方面显示出巨大的应用潜力。

关键词 细胞器; 蛋白组学; 质谱技术; 邻位标记技术; 翻译后修饰

Application of Mass Spectrometry-Based Proteomics in Organelle Research

WANG Hongli^{1,2}, SHI Dongxue^{1,2}, CHEN Yang^{1,2*}

(¹Center for Precision Medicine Multi-Omics Research, Peking University Health Science Center, Beijing 102206, China;

²School of Basic Medical Sciences, Peking University Health Science Center, Beijing 100191, China)

Abstract Organelles are specialized compartments within eukaryotic cells with distinct structures and biological functions. In-depth analysis of protein abundance, protein spatial distributions, interactions, and transportations in different organelles is crucial for understanding organelle functions and disease mechanisms. Mass spectrometry-based proteomics has been extensively utilized for identification and quantification of various complexed biological samples, and hence, is widely applied in organelle research. Mass spectrometry-based proteomics,

收稿日期: 2023-11-01

接受日期: 2024-01-04

国家自然科学基金(批准号: 32300570)和国家重点研发计划(批准号: 2023YFF0613402)资助的课题

*通信作者。Tel: 010-82805976, E-mail: chen yang1816185048@bjmu.edu.cn

Received: November 1, 2023

Accepted: January 4, 2024

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.32300570) and the National Key Research and Development Program of China (Grant No.2023YFF0613402)

*Corresponding author. Tel: +86-10-82805976, E-mail: chen yang1816185048@bjmu.edu.cn

accompanied by centrifugation or proximity labeling, has played a central role in advancing our understanding of organelle proteomes, inter-organelle transportations, post-translational modifications, and the mechanisms underlying various diseases. The demand for proteomic technologies in organelle research is growing, and the proteomics of trace samples will potentially have a tremendous application in mapping disease-related organelle proteome and deciphering the functions of organelles in diseases in the future.

Keywords organelle; proteomics; mass spectrometry; proximity labeling; post-translational modification

细胞器是真核细胞内具有特定结构及生物学功能的区室。从传统意义上来说,细胞器是包含高尔基体、内质网和线粒体等多种膜结构,以及中心体等非膜结构的区室。近年来研究者还定义了一系列新型细胞器,如管状内质网-高尔基体的中间体(tubular ER-Golgi intermediate compartment, t-ERGIC)^[1],以及迁移体(migrasome)^[2]和相分离液滴(如RNA颗粒)^[3-4]等。由于不同区室的理化环境和区室中的各类生物分子存在差异,细胞器蛋白的定位对其功能有很大影响。一方面,细胞的信号转导、生长、增殖和凋亡等过程均涉及蛋白质亚细胞定位的动态变化^[5]。另一方面,蛋白质在细胞器中的错误定位与多种疾病如痴呆、癌症和代谢紊乱^[6-9]等相关。因此,系统、深度解析蛋白质在不同细胞器中的丰度、空间分布、互作、运输等,对于理解细胞器的功能至关重要。

研究细胞器蛋白质的方法通常是细胞器分离技术和蛋白免疫印迹、免疫荧光(immunofluorescence, IF)和免疫电镜技术(immuno-electron microscopy, IEM)等免疫化学手段联用,这些方法依赖特定的抗体去评估细胞器蛋白的丰度和亚细胞定位^[10]。另外,研究者们结合先进的显微成像技术,在特定亚细胞结构中表达多种融合的荧光蛋白,以观察蛋白在特定细胞器中的定位以及运输情况^[11]。随着高内涵显微镜(high content microscopy, HCM)技术的快速发展,以上基于显微成像的细胞器蛋白研究方法进入了组学时代。依赖可自动采集图像的荧光显微镜,被研究的细胞器蛋白的通量达到了数千个^[12]。然而,基于显微成像的蛋白组学技术,其亲和试剂(如抗体)或荧光蛋白的标记系统创建过程较为费时费力,且结果处理过程中的图像识别还有一定的主观性^[13]。基于质谱的蛋白组学技术,与细胞器分离纯化技术或蛋白质邻位标记技术联用,可以高通量检测蛋白质在亚细胞组分中的丰度和分布,目前在细胞器研究领域逐步占据了重要地位^[14]。

之前不乏优秀的综述对基于质谱的蛋白质组学

技术的经典方法和应用进展进行过全面总结。而近几年该技术在细胞器研究领域发展迅速,相关应用也层出不穷。本文主要总结了基于质谱的蛋白组学方法在细胞器领域的相关研究,这些研究包括细胞器蛋白的定性、定量和互作等方面的技术应用,以及对细胞器相关的分子机制和疾病发生机理的解读(图1)。

1 基于质谱的经典定量蛋白组学技术

基于质谱的蛋白组学一方面可以对蛋白及其修饰进行“有或无”的定性研究,另一方面,随着技术的进步,蛋白组学可以对鉴定到的蛋白进行相对和绝对定量,大大拓展了其应用领域。定量蛋白组学可以分为非靶向和靶向蛋白组学两类。非靶向蛋白组学是一种相对定量技术,又可以进一步分为标记定量和非标记定量两种定量技术。相对和绝对定量的同位素标记技术(isobaric tag for relative and absolute quantitation, iTRAQ)和串联质量标签技术(tandem mass tag, TMT)是目前广泛使用的两种化学标记方式^[15-16],均是在蛋白质酶解后取等量肽段进行标记反应。商品化的iTRAQ有4标和8标,TMT常用的有6标、10标和16标,即可以一次性实现对4~16个样品的标记及分析。基于氨基酸标记的稳定同位素氨基酸细胞培养技术(stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC)是一种典型的代谢标记方式^[17]。其特征为在细胞培养时加入带有轻/重标签的必需氨基酸,经过多次传代进行蛋白的充分标记后,再收集细胞进行蛋白提取、前处理实验以及后续的质谱分析。相对于TMT标记,SILAC可以展现活体细胞内的蛋白丰度变化,避免了后期肽段标记带来的定量误差。标记定量技术应用广泛,同时也存在一些不可避免的缺点,比如标记试剂盒价格高昂、样本制备步骤复杂以及样本数受限等。与标记定量技术相对应的非标记定量技术(label-free quantification)有效避免了以上缺陷。该技术直接将质谱信号量化,使得样本制备步骤得以简化,且其定量准确度较高,因此适用于大样本量的

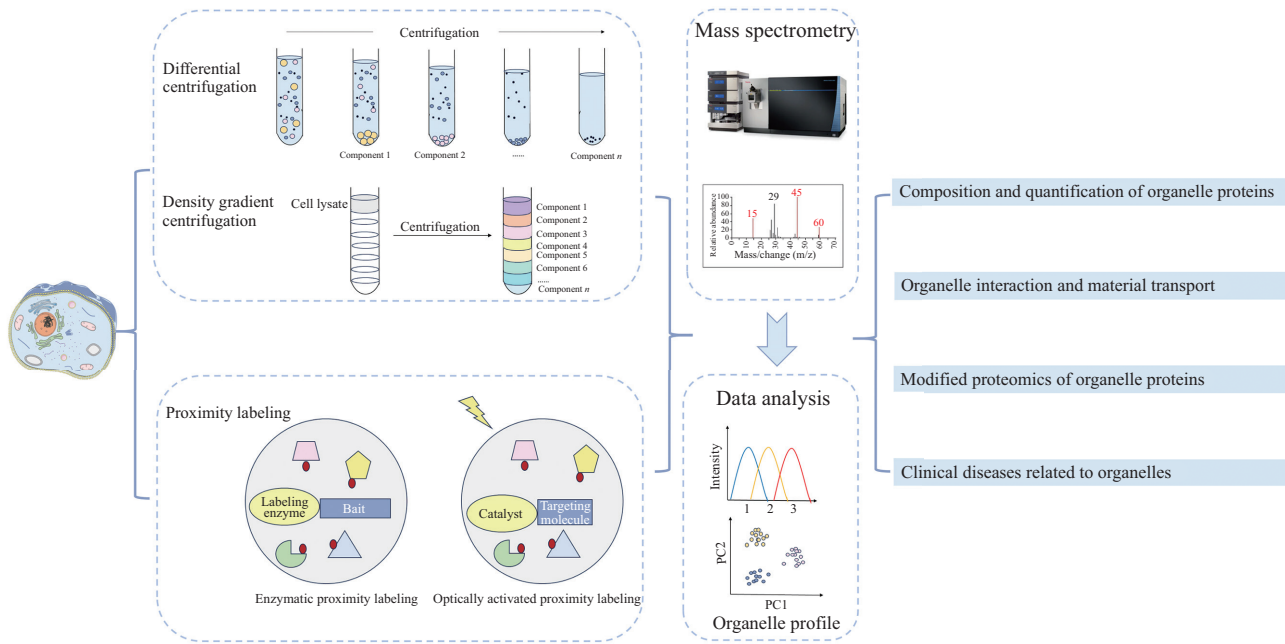


图1 基于质谱的蛋白组学技术在细胞器研究中的应用

Fig.1 Application of mass spectrometry-based proteomics in organelle research

队列研究^[18]。质谱仪上的数据采集模式可以分为数据依赖采集模式(data-dependent acquisition, DDA)和数据非依赖采集模式(data-independent acquisition, DIA)。DDA采用“鸟枪法”蛋白组学策略,该方法仅对离子强度较高的一部分母离子进行二级碎裂,其结果在不同样本间的平行性较差。而2000年被研究者提出的DIA法在质谱扫描时将质荷比范围分为若干连续的窗口,并依次采集每个窗口的所有碎片离子信息,提高了定量技术的灵敏度和精确度^[19]。对于一些已知的兴趣蛋白,可以靶向特定蛋白进行绝对定量研究。多重反应监测(multiple reaction monitoring, MRM)和平行反应监测(parallel reaction monitoring, PRM)是两种常用的靶向蛋白组学方法。这两种技术可利用特定肽段的保留时间和碎片离子质荷比等参数,对肽段实现高通量定量^[20]。

2 细胞器蛋白的组成和定量

2.1 细胞器物理分离偶联定量蛋白组学技术

细胞器的定量蛋白质组学研究集中在描绘静态和动态情况下的细胞器、特定亚细胞结构的蛋白图谱。通常采用的方法是从细胞中分离纯化特定的细胞器,利用蛋白组学技术获取细胞器蛋白的定量信息,再通过差异蛋白比较等数据分析,挖掘重要信息^[21-23]。在细胞器分离中,按照密度等物理性质进

行离心分离是相对传统的方法,该方法主要通过差速离心、基于以蔗糖或Percoll为介质的密度梯度离心实现细胞器的分离。基于蔗糖密度梯度离心通常能够实现细胞器的高分辨率分离,缺点是它需要根据不同的目的优化梯度中介质的浓度、需要较长的离心时间、起始样本量需求较大等^[24]。而差速离心尽管分辨率相对较低,但所需时间更短,效率更高。

对于分离单一细胞器,MOOTHA等^[25-26]将细胞裂解液以600 ×g离心后,收集上清液并以7 000 ×g离心15 min获得线粒体粗提物,将粗提物加载到浓度为30%和70%的Percoll不连续梯度的最上层,以68 450 ×g在4 °C下离心40 min,收集膜性结构所在位置的样品(即为线粒体)。通过对其进行无标记定量质谱分析,鉴定到了399种蛋白质,并发现了163种以前未注释过的线粒体蛋白质。

ANDERSEN等^[27]使用不连续的(70%、50%、40%)蔗糖密度梯度离心对中心体进行分离,并对中心体所在梯度层及相邻几个梯度层进行质谱鉴定。由于梯度分离纯度有限,可能存在污染,质谱鉴定的灵敏度又极高,因此作者无法将从中心体所在的梯度层中鉴定到的所有蛋白注释成中心体蛋白。作者基于来自相同细胞器的蛋白质在梯度液的不同组分中具有一致的特征表达谱的假设^[28],通过对比鉴定所得蛋白和已知的中心体标记蛋白在不同组分中的

分布模式,寻找分布模式类似的蛋白,最终确定了23个新的中心体组成成分和41个可能的候选蛋白,该方法即为蛋白关联分析(*protein correlation profiling, PCP*)。该方法的有效性还在其他多种不同的亚细胞结构(如过氧化物酶体等^[29])中得到了验证。

除了基于梯度离心的方法外,基于荧光标记的细胞器分离方法也是一个有潜力的发展方向。CAO等^[30]使用荧光激活囊泡分选方法(*fluorescence-activated vesicle sorting, FAVS*)分离G2A Naked2-EGFP、DiD双标记的特定囊泡,成功描绘了以Rab10和肌球蛋白IIA为核心机制,Na⁺/K⁺-ATP酶 α 1为货物的分子调控网络。GE等^[31]开发了荧光激活颗粒分选技术(*fluorescence-activated particle sorting, FAPS*)。该研究描述了与GFP-LC3结合性不同的两种蛋白聚集体,并通过流式分选和非标记定量蛋白质谱两种方法鉴定了这两类蛋白聚集体特异性的结合蛋白,从而鉴定出了新的能够降解蛋白聚集体的受体蛋白。

近年来的研究更多地关注同时分离各类细胞器或亚细胞组分,进行蛋白全局分析^[14,32]。这些大范围的细胞器研究极大地丰富了细胞器和亚细胞结构的标志蛋白库^[33]。PCP方法在整个细胞水平上的细胞器蛋白全局分析中也被广泛使用。

FOSTER等^[34]将除去细胞核的细胞裂解样品加载到1.0 mol/L到2.0 mol/L和0.3 mol/L到1.6 mol/L的两个连续蔗糖梯度上,4 °C、95 000 \times g离心110 min,将每个梯度分为24个组分进行质谱分析,采用PCP方法对质谱数据进行深度分析。该研究选用130 kDa高尔基体磷蛋白(130 kDa Golgi phosphoprotein, GPP130)(高尔基体)、AP-2复合物17 kDa蛋白(AP-2 17 kDa protein, AP17)(质膜)、早期内体抗原1(*early endosome antigen 1, EEA1*)(早期内体)、转铁蛋白受体2(循环内体)、钙联蛋白(内质网)、p115(内质网/高尔基体衍生的囊泡)、F1-F0 ATP合酶 β 亚基(线粒体)以及蛋白酶体和核糖体亚基的蛋白质作为各亚细胞结构的参考标志蛋白,将1 400个蛋白质定位到10个细胞区室,实现了对蛋白质在不同亚细胞组分之间的表达模式分析。DUNKLEY等^[35]介绍了一种用于确定膜蛋白亚细胞定位的蛋白质组学方法:使用同位素标签的细胞器蛋白定位(*localization of organelle proteins using isotope tagging, LOPIT*)技术。在该技术中,DUNKLEY等^[35]使用蔗糖密度梯度离心从细胞裂解物中分离产生12个梯度组分,并在使用同位素编码亲和标记(*isotope-cod-*

ed affinity tag, ICAT)的方法标记样本后进行质谱检测,通过已知定位蛋白质建立模型,辅以聚类分析,最终将质谱鉴定到的蛋白质对应到不同的细胞器中。具体来讲,DUNKLEY等^[35]对170个蛋白质进行了鉴定和细胞器归类,并使用28个已知定位蛋白质对该技术进行了验证。在此基础上,CHRISTOFOROU等^[36]通过优化样本制备和数据采集等,开发了通过同位素标记实现细胞器蛋白质的超复合定位(*hyperplexed localisation of organelle proteins by isotope tagging, hyperLOPIT*)技术。该技术引入了TMT标记,通过同步母离子选择MS³(*synchronous precursor selection MS³, SPS-MS³*)³在Orbitrap Fusion Tribrid质谱仪(Thermo Fisher Scientific)上,实现了一级MS高达 1.2×10^5 ,三级MS高达 6×10^4 的分辨率。对于获取的质谱数据,该方法采用支持向量机(*support vector machine, SVM*)进行监督学习和聚类分析,提高了蛋白质亚细胞定位的预测准确度。该方法在一个实验中定位超过5 000种蛋白质,并明确地将2 855个蛋白质分配到14个离散的细胞器和亚细胞器区室中。GELADAKI等^[37]在hyperLOPIT的基础上结合差速离心技术对LOPIT进行了升级,开发了差速超速离心后通过同位素标记的细胞器蛋白定位(*localisation of organelle proteins by isotope tagging after differential ultracentrifugation, LOPIT-DC*)方法,该方法在采用200 \times g的离心条件去除未裂解的完整细胞后,依次使用1 000 \times g、3 000 \times g、5 000 \times g、12 000 \times g、15 000 \times g、30 000 \times g、79 000 \times g、120 000 \times g获取了10个不同组分并利用TMT标记各组分相应的肽段后进行了质谱分析,多次差速离心替代了hyperLOPIT中蔗糖密度梯度离心所需要的较长时间的分离过程。与hyperLOPIT相比,LOPIT-DC在细胞器分离过程中分辨率略低,但对胞质和蛋白酶体区室以及线粒体和过氧化物酶体有更好的分离鉴定效果。SHIN等^[38]使用该方法实现了细胞内的囊泡内容物的鉴定。

综上,细胞器的蛋白全局分析引入多种标记策略及质谱方法,结合高效的PCP等数据分析手段,使得研究者能够确定稳态下的蛋白质分布,更准确地了解它们的亚细胞定位情况,同时跳出需要纯化特定细胞器才能区分真正的细胞器成分和污染物的局面^[37,39]。

生物化学技术和质谱技术的发展和交叉融合极大推动了细胞器蛋白的定性和定量研究的发展,因此产生的数据量和数据复杂程度与日俱增。生物信息学的发展使得质谱鉴定所得的庞大数据得到了有

效的分析和挖掘,进一步推广了基于质谱的蛋白组学技术在细胞器研究中的应用。例如,ORRE等^[40]通过差速离心从5个不同的细胞系中分别分离了它们各自的5个亚细胞组分,并通过*t*-分布随机邻域嵌入(*t*-distributed stochastic neighbour embedding, *t*-SNE)对蛋白质的质谱数据进行降维,将鉴定到的蛋白质聚类为11个不同亚细胞区室的15个蛋白簇,最终成功地将9 594个蛋白质定位到特定细胞器区室,获得了12 125个蛋白质的大致定位。同时,由于数据库注释信息的丰富,研究者们逐步建立了Prolocate^[41]和SubCellBarCode^[40]等蛋白质亚细胞定位数据库,为细胞器的研究提供了坚实的数据基础。

2.2 基于邻位标记技术定量研究细胞器的蛋白组成

上述基于离心的细胞器分离方法配合质谱法能够解决的问题主要集中在对细胞及各细胞器整体状态的描述方面,同时离心分离在维持无膜细胞器或蛋白质复合物的完整性方面是相对困难的。依赖邻位标记的亲亲和纯化策略结合基于质谱的蛋白组学技术,可以更精细地将蛋白定位在细胞器或亚细胞区室中^[42]。

一般来说,依赖酶的邻近标记方法有4种,分别是邻位依赖的生物素鉴定(proximity-dependent biotin identification, BioID)^[43]方法、依赖辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)^[44]的邻近标记策略、依赖工程化抗坏血酸过氧化物酶(engineered ascorbate peroxidase, APEX)^[45-46]的邻近标记策略和基于pupylation的相互作用标记(pupylation-based interaction tagging, PUP-IT)^[47]方法,其中基于APEX和BioID的方法是当前细胞器相关研究主要采用的方法,而HRP和PUP-IT更多应用于细胞膜蛋白提取分离的研究中。在邻位标记技术中,具有特定细胞器定位的“诱饵”蛋白质与标记酶融合,酶将底物活化后可以共价标记细胞中相邻的“猎物”蛋白质。由于活化后的底物快速扩散或被水解,其浓度会降低到能进行有效标记的浓度之下,因此标记酶只会对其邻近的蛋白质进行非特异性的标记。研究者们可以通过亲和纯化和质谱检测获取被标记蛋白质的定性定量信息,进而获得具有细胞器空间分辨率的蛋白质的组学数据^[48]。被标记的蛋白包括但不限于与诱饵蛋白直接结合的蛋白,单个诱饵可以鉴定许多邻近蛋白质,特别是在细胞器的有限空间内,少量的诱饵蛋白可以尽可能多地标记位于同一个细胞器空间结构内的蛋白质,产生丰富的空间信

息^[49]。对于APEX或其衍生物APEX2^[50-51],使用过氧化物进行刺激会活化生物素苯酚(biotin-phenol, BP),使半径在20 nm内的蛋白质的酪氨酸、色氨酸残基等富含电子的氨基酸生物素化。BioID的标记酶是BirA*,它是一种大肠杆菌来源的生物素连接酶BirA的突变形式^[52]。在生物素和ATP存在条件下,BirA*周围半径约10 nm的邻近空间内的蛋白质的特定赖氨酸残基生物素化^[53]。在质谱分析之前,生物素化的蛋白质可以通过与链霉亲和素结合,而被亲和纯化分离,进而被从裂解物中回收,此后还使用一系列高盐、高pH值和含高浓度尿素的洗涤剂以彻底去除其中的非生物素化的蛋白质。相对于APEX可以在处理细胞1 min内完成标记,BirA*需要18 h以上才能完成,这种长时间的处理过程严重限制了BioID的应用^[54]。后续研究者为解决这个问题,开发了嗜热菌*Aquifex aeolicus*来源的BioID2^[55]和枯草芽孢杆菌来源的BASU^[56]这两种生物素连接酶标记体系。此后BRANON等^[57]还开发了活性更高的miniTurbo与TurboID,实现了10 min内完成标记。

在邻位标记技术被开发后,细胞器蛋白鉴定和定量的体量和精确性迅速增加,彻底改变了细胞器蛋白质组学的研究^[58]。YOUNG等^[59]利用119个BioID的诱饵蛋白,鉴定了与mRNA加工、运输、翻译和降解等生物学过程相关的1 792种蛋白以及mRNA加工体和应激颗粒的144种核心蛋白。GUPTA等^[60]使用58个诱饵蛋白鉴定了1 405种中心体-纤毛界面蛋白。GIN-GRAS等^[42]在除了高尔基体内腔外的31个不同的亚细胞区室中都成功表达了BioID的诱饵蛋白,并利用192个诱饵蛋白确定了4 145个蛋白质在HEK293细胞内的定位。上述实验体系依赖活细胞的基因编辑,适用于活细胞水平的细胞器研究。SANTOS-BARRIOPE-DRO等^[61]将TurboID和抗体识别分子Protein A重组融合,开发了ProtA-TurboID,该标签可以识别靶向细胞器的抗体,因此可以在原代细胞中实现基于邻位标记的蛋白组学鉴定。

除了基于上述酶系统的邻位标记方法外,多个团队还基于邻位标记的思路开发出了不同类型的光催化邻位标记方法,目的是提高邻位标记的可控性,控制非特异性标记导致的过高背景^[62]。MÜLLER等^[63]开发和应用了一种基于光激活的靶向小分子的单线态氧发生器(singlet oxygen generator, SOG)标记蛋白的邻位标记技术,即LUX-MS。这项技术通过

将 SOG 偶联在抗体或药物小分子上, 可以使 SOG 在细胞内实现对目标蛋白的靶向识别; 而光激活 SOG 则能够在靶向特定范围蛋白的同时对这些蛋白进行生物素标记, 最后即可对被标记分子进行亲和纯化和质谱鉴定。该方法能够在不引入遗传操作的条件 下用抗体亲和纯化分离特定空间位置的蛋白质。在此基础上, ZHENG 等^[64]基于基因编码的 SOG, 开发了 rinID 方法, 实现了活细胞水平的标记, 鉴定了 477 个线粒体基质蛋白、150 个内质网膜蛋白、50 个细胞核蛋白, 证明了该方法在多种细胞器研究中的应用潜力^[65]。GERI 等^[66]基于过渡金属配合物开发了光催化的邻近标记技术 MicroMap, 通过抗体结合的光催化剂, 实现了对细胞表面相互作用蛋白的鉴定, 且光催化剂对靶蛋白邻近区域进行标记的特异性比基于 APEX 的方法更强。除了基于抗体的靶向性标记外, HUANG 等^[67]利用一种生物正交的可以分解前体物质产生生物素自由基的线粒体靶向催化剂 Ir(ppy)₂bpy, 开发了另一种光控的线粒体蛋白组邻近标记方法 CAT-Prox。该方法通过小分子量物质实现了对线粒体的特异性靶向及邻近催化标记, 在 Raw264.7 细胞中鉴定了 300 个邻近蛋白, 且其中 216 个具有线粒体特异性。此外还有研究者尝试使用细胞器定位化学分子 (organelle-localizable reactive molecules, ORM) 来标记不同的细胞器, ORM 可以穿透生物膜并自发地积累在活细胞的靶细胞器中, 并与靶细胞器中的蛋白质发生共价反应, 从而实现标记^[68]。目前已经实现的 ORM 标记方法主要有基于 Hoechst 的核定位反应分子^[69]以及基于四乙基罗丹明 (Et4-Rhod) 的线粒体定位反应分子的标记^[70], 它们分别标记并鉴定了 58 个细胞核蛋白和约 200 个线粒体蛋白。TAMURA 等^[71]在此基础上还开发了基于 ORM 的光激活邻近标记, 鉴定了 22 个细胞核蛋白。目前, 基于小分子光催化剂的邻近标记方法^[72]由于其靶向能力还未被广泛开发, 它的应用还局限于细胞表面、线粒体或细胞核等已知靶向定位小分子的细胞器的蛋白组学分析。

3 细胞器互作和物质转运

各种细胞器必须协调活动, 才能使细胞作为生物系统正常运作。细胞器间的膜结合位点 (inter-organelle membrane contact sites, MCS) 是代谢物交换和细胞器重塑的枢纽。离子、脂质和蛋白质在 MCS 处传递, 且

线粒体和内体的分裂发生在与内质网密切接触的部位。细胞器相互作用在细胞器生物发生和生长过程中也起着重要作用。例如自噬体和过氧化物酶体等细胞器的膜即来源于包括内质网和线粒体在内的多个其他细胞器。邻近标记技术能够捕获生物分子之间的弱相互作用或瞬时相互作用, 因此在细胞器蛋白质-蛋白质相互作用研究中也 被广泛应用, 成功鉴定了多种细胞器互作的位点^[48,74]。JING 等^[75]利用 APEX 研究了内质网与质膜的相互作用, 发现了 STIMATE 对内质网-质膜连接点 STIM1 斑块的影响。HUNG 等^[76]利用 APEX 鉴定了线粒体-内质网接触位点的蛋白组成。HAN 等^[77]开发了 sAPEX (split-APEX) 系统, 消除了 APEX 的脱靶效应, 实现了对线粒体-内质网接触位点的准确鉴定。LEE 等^[78]将响应蓝光发生构象变化的光敏 LOV 结构域与邻近标记酶 TurboID 融合, 开发了光调控 TurboID 激活系统 LOV-Turbo, 在内质网引入邻近标记, 用光照实时激活邻近标记反应, 再给予细胞内质网应刺激同时移除光照进行追踪, 最终通过分离纯化内质网、线粒体和细胞核, 富集生物素标记的蛋白进行质谱检测, 描述了内质网应激下, 内质网-细胞核-线粒体之间的蛋白转运情况。除了可以被光照调控激活外, LOV-Turbo 也可以通过荧光素酶的生物发光共振能量转移来激活, 即具有了与荧光素酶联合标记, 在活细胞中研究蛋白质亚复合物的相互作用的潜力, 使得标记更具有特异性。无独有偶, 为了使得 TurboID 的标记更具有特异性, CHO 等^[79]开发了 split-TurboID 技术, 将 TurboID 分裂成两个无活性的片段, 这些片段在细胞中共表达, 并通过药物小分子介导、蛋白质-蛋白质相互作用或细胞器接触等方式组装在一起后恢复了 TurboID 酶的活性, 随后他们进行了下游蛋白的生物素标记以及标记蛋白的富集和质谱检测。CHO 等^[79]使用 split-TurboID 来描述内质网-线粒体接触位点的蛋白质组成, 该研究成果对线粒体分裂、脂质代谢以及钙信号调控均有重要的提示意义。

以上综述的方法均为基于酶催化的生物素标记策略的各种变体, 由于 BioID 和 APEX 都是在目标蛋白上进行生物素标记, 所以只能实现同一细胞内的单一蛋白标记。近期, LI 等^[80]开发了新的 APEX 底物炔基苯酚 (alkyne-phenol, AP), 通过点击化学的应用, 可以实现炔基标记, 标记后的炔基可以再标记可用于亲和纯化的标签。APEX 新底物的开发使得 BioID 和 APEX 两种酶的底物不同, 其反应彼此正交, 使得两种反应可

可以在一个生物过程中的两个阶段进行。QIN等^[81]结合APEX的AP底物以及叠氮化荧光素的点击化学反应,实现了基于APEX的荧光素标记,并利用TurboID和APEX这两种正交的邻位标记酶开发了TransitID技术。由于TurboID和APEX反应的正交性,使用两者进行标记可以在时间上实现分离,加之两种标记酶与不同亚细胞定位蛋白的融合,可以在空间上实现标记的分离。同时,两种酶所标记的具体氨基酸残基也不完全一致,这意味着同一个蛋白可以同时进行两种标记,通过两次不同的亲和纯化结合质谱检测,可以分离得到在一段时间内从一个特定细胞器转移到另一个细胞器的蛋白质,因此也就实现了活细胞内和活细胞间的蛋白质运输的动态定位。QIN等^[81]利用TransitID技术绘制了细胞质与线粒体、细胞质与细胞核、细胞核与应激颗粒之间的蛋白质组运输图谱,揭示了应激颗粒在保护转录因子JUN免受氧化应激中的重要作用。

细胞器的定量蛋白质组学还可以通过分析蛋白质在各种亚细胞器中的丰度来研究不同状态下蛋白质在细胞器间的转运情况^[82]。ITZHAK等^[83]开发了可以提供关于蛋白质丰度的定量数据的动态细胞器图谱(dynamic organellar maps, DOMs)的方法。他们使用SILAC标记活细胞,取轻标细胞并使用差速离心方法将其分离为6个不同组分,并将重标细胞通过两次离心分离为细胞核、细胞质及细胞器3个组分。对以上样本均进行质谱定量蛋白组学检测,获得鉴定数据后,基于SILAC的定量值建立一个SVM模型,进而预测了5 265个蛋白的定位。在此基础上,可以通过统计蛋白质在各组分间分布的变化,分析一定处理条件下蛋白质在细胞器间的易位情况。之后,同研究组的SCHESSNER等^[82]将DOM方法和DIA结合,开发了DIA-DOM技术。该技术使用与前期相同的实验流程,增加了2倍的鉴定深度,并且显著提高了分析的精度和重复性。DIA-DOM技术同时实现了高通量分析和超深度覆盖,对于绘制不同刺激条件下细胞器的蛋白图谱和蛋白在细胞间的转运图谱等工作具有重要意义。SCHESSNER等^[82]应用该方法获得了饥饿或溶酶体pH环境破坏条件下细胞器的蛋白定位变化,发现了经由内体在细胞内循环的高尔基蛋白质亚群。DOMs目前还应用于捕捉表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)诱导的蛋白定位变化^[83-84]、发现AP-4缺陷导致的自噬相关蛋白9A(autophagy-related protein 9A, ATG9A)的错误分选以及自噬失调机制^[85]等方面。

4 细胞器蛋白修饰组学

细胞器的蛋白质组成是控制其功能的关键因素。翻译后修饰(post-translational modification, PTM)提供了一种节能机制,可以快速、可逆地调节蛋白质功能^[86]。绘制细胞器特异性PTM图谱有利于研究者更加全面地探索生物体的生理和疾病机制。

最近基于质谱的研究已经在哺乳动物蛋白质组中鉴定出了数十万个PTM位点,其中在人类蛋白质组中发现的PTM位点有数百个^[87]。在大规模PTM研究中,由于翻译后修饰的肽段在总肽段中相对丰度较低,需要使用各种PTM亲和富集策略对修饰的肽段进行富集,才能更高效地通过质谱进行鉴定分析^[88]。通过结合多种非标记/标记定量蛋白组学方法,可以在不同样品中或生物状态下测定PTM的相对和绝对丰度。

随着细胞器分离技术和蛋白质组学技术的不断发展,细胞器蛋白修饰组学已经得到了广泛应用。线粒体中存在蛋白质的乙酰化修饰。KOENTGES等^[89]使用可识别赖氨酸乙酰化的抗体对线粒体蛋白进行了免疫沉淀并进行了质谱检测。在鉴定到的165种赖氨酸乙酰化的蛋白质中,84种蛋白质显示在SIRT3(Sirtuin 3)缺陷小鼠线粒体中的乙酰化程度显著升高。这些高乙酰化的蛋白质和/或酶可能是导致SIRT3缺陷小鼠的线粒体功能障碍的重要影响因素;可逆磷酸化是另一种在线粒体功能中起关键作用的PTM。APONTE等^[90]分离猪的心脏和肝脏线粒体后,结合Phos-Tag染色凝胶和质谱技术从线粒体中鉴定出了64种磷酸化蛋白质,其中有超过20种蛋白质在线粒体孵育过程中被³²P动态性掺入,进一步阐述了心脏和肝脏的线粒体基质中存在的广泛的蛋白磷酸化以及动态变化;细胞器中特异性的蛋白磷酸化同样在脂质代谢中发挥重要作用。KRAHMER等^[91]在一项非酒精性脂肪性肝病的研究中分别分析了小鼠肝细胞的全细胞以及细胞器的蛋白组和磷酸化蛋白组,监测了肝脏脂肪变性发展过程中约6 000种肝脏蛋白和16 000种磷酸肽的含量和细胞分布。该研究对肝脏蛋白质亚细胞重排和细胞器特异性磷酸化进行了系统分析,描述了营养超负荷如何导致细胞重组和细胞功能障碍的现象。

5 临床疾病中的细胞器蛋白组学研究

细胞器功能失调伴随着一系列疾病的发生。线粒体受损主要体现在能量产生障碍,对应“纯”肌病、

心肌病或者视神经病变^[92]。内质网应激时的未折叠蛋白反应(unfolded protein response, UPR)可诱发细胞凋亡和炎症反应,这种UPR与心肌梗死、糖尿病性心脏病以及肥厚性心肌病等多种心血管疾病关联密切^[93-95]。溶酶体的功能障碍和自噬过程的改变已在多种疾病(包括自身免疫疾病、代谢性疾病和肾脏疾病)中被发现^[96]。作为免疫代谢细胞器的过氧化物酶体在免疫紊乱、炎症和癌症等疾病中发挥重要作用^[97]。基于质谱的蛋白组学在细胞器蛋白质的定性和定量鉴定,以及细胞器间互作和物质转运的相关研究中应用广泛,是细胞器临床研究领域的一大利器。

一些病毒能够操纵宿主体内细胞器,以成功地进行复制和传播,但病毒感染对宿主细胞器的全局性影响尚不清楚。结合显微镜、亚细胞分离和质谱分析,JEAN BELTRAN等^[98]对人巨细胞病毒(human cytomegalovirus, HCMV)感染的整个过程中原代成纤维细胞的细胞器进行了全细胞范围内的研究。研究通过非标记和TMT标记蛋白质组学鉴定了近4 000种宿主蛋白和100种病毒蛋白,然后使用机器学习将这些蛋白归类到特定的细胞器中,同时发现了在不同的感染时间,蛋白质在其分泌途径、质膜和线粒体定位等方面的变化,为了解HCMV发病过程中的宿主和病毒生物学提供了全面的信息。

在多种临床疾病中,单个细胞器的蛋白组研究同样发挥了重要作用。AMBEKAR等^[99]基于TurboID融合蛋白的标记方法,实现了对小鼠体内伯氏疟原虫核孔复合物的可视化并有效识别了其中的组分,确定了共10个核孔蛋白,将其中5种缺乏注释的蛋白质确定为核孔复合物,并通过绿色荧光蛋白标记验证了这5种蛋白的定位,为深入研究核孔复合物的结构、组分、动力学特性、核孔蛋白的核质运输以及其非运输功能提供了新的研究思路,并为疟原虫的诊断治疗研究奠定了基础。恶性疟原虫是人类疟疾寄生虫中最致命的种类,其线粒体蛋白是经过临床验证的药物靶标。鉴于近年来恶性疟原虫抗药性的提高,恶性疟原虫体内其他重要的线粒体蛋白作为新型药物靶点的候选者被广泛研究。LAMB等^[100]采用邻位标记和定量蛋白质谱在恶性疟原虫中进行了靶向线粒体的蛋白组学研究。将线粒体标志蛋白HSP60的先导序列通过TurboID策略靶向到线粒体,通过生物素标记和富集偶联质谱检测预测了122种线粒体蛋白质。进一步验证其定位后成功确定了4种功能未知的线粒体

候选蛋白。该研究中鉴定的122种蛋白质也有助于理解恶性疟原虫的线粒体生物学并可服务于后续的抗疟药物的研发工作。BOYKOV等^[101]采用差速离心的方式提取了肝癌和结直肠癌小鼠的线粒体以进行蛋白组学分析。数据显示线粒体中的线粒体氧化磷酸化(oxidative phosphorylation, OXPHOS)复合体和相关的脱氢酶的丰度,在患有两种不同癌症的小鼠中保持不变甚至低于对照组,意味着患癌组织的OXPHOS依赖性远低于其他高氧化需求器官,提示临床中对线粒体能量代谢进行阻断的治疗手段可能会先一步对健康的需氧器官造成损害,才能再进一步影响肿瘤组织的线粒体供能。纤毛是一种相对未被广泛认识的细胞器,其缺陷影响约千分之一的人群,可能导致一系列严重的健康问题,如失明、耳聋、心力衰竭、糖尿病等^[102]。BOLDT等^[103]使用串联亲和和纯化质谱(tandem affinity purification MS, TAP-MS),利用217种标记的人类纤毛蛋白鉴定了1 319种蛋白质、4 905种相互作用和52种复合物,针对纤毛的这种细胞器特异性靶向策略获取的数据,提供了包括新的纤毛相关蛋白、相互作用和复合物在内的多方面信息,对于纤毛疾病的理解有重要的推动作用。

细胞外囊泡可由多种细胞分泌,包含蛋白质、脂质和核酸等物质,在体液中广泛存在。通过体液细胞外囊泡的定量蛋白组学,研究者们可鉴定疾病的临床标志物,并进一步对其机制进行探索。CAI等^[104]利用循环血浆外泌体的蛋白质组学分析揭示了阿尔茨海默病的新生物标志物。在该研究中,作者使用超速离心法获得了血浆中的外泌体,通过无标记蛋白组学技术发现了31种差异表达的外泌体蛋白,利用靶向蛋白质分析技术PRM验证了其中的12种差异蛋白,最终建立了包含6种蛋白的阿尔茨海默病诊断预测模型,这体现了质谱技术在临床疾病研究中的重要作用。

6 总结和展望

基于质谱的蛋白组学技术可以在复杂样本中鉴定和定量多种蛋白质,并对存在修饰的蛋白质进行研究,因此成为细胞器研究的重要工具。蛋白组学技术是多学科交叉融合的技术,蛋白组学技术的应用离不开针对不同目的、不同样本的处理策略和数据分析,因此生物物理、化学生物学方法暴发性的进展以及数据分析方法的创新,极大地推进了蛋白组学技术在细胞器研究中的应用(表1)。

表1 细胞器研究中的蛋白组学方法
Table 1 Proteomic methods in organelle research

应用分类 Classification of application	细胞器方面的应用 Application in organelles	样本制备 Sample preparation	标记方法/质谱方法 Labeling methods/mass spectrometry methods	数据分析 Data analysis
Quantitative proteomic technology after physical separation of organelles	Analysis of single organelle proteins (mitochondria) ^[25]	Density gradient centrifugation (Percoll)	Lable-free quantification	-
	Analysis centrosome protein ^[27]	Density gradient centrifugation (Sucrose)	Lable-free quantification	PCP
	Analysis of extracellular vesicle proteins ^[30]	FAVS	Lable-free quantification	-
	Identification of receptor of protein aggregates ^[31]	FAPS	Lable-free quantification	-
	Global analysis of organelle proteins ^[34]	Density gradient centrifugation (Sucrose)	Lable-free quantification	PCP
	Global analysis of organelle proteins ^[35]	Density gradient centrifugation (Sucrose)	LOPIT (ICAT)	PLS-DA
	Global analysis of organelle proteins ^[36]	Density gradient centrifugation (Optiprep)	hyperLOPIT, SPS-MS ³	SVM
Quantitative proteomic technology integrated with proximity labeling	Global analysis of organelle proteins ^[37]	Differential centrifugation	LOPIT-DC, TMT, SPS-MS ³	SVM
	Global analysis of organelle proteins ^[40]	Differential centrifugation	TMT	<i>t</i> -SNE
	Analysis of proteins in stress granules and processing bodies ^[59]	BioID	DIA	-
	Analysis centrosome-cilium interface proteins ^[60]	BioID	Lable-free quantification	-
	Extensive protein localization in HEK293 cells ^[42]	BioID	Lable-free quantification	<i>t</i> -SNE
	Map the architecture of functional immunosynapses ^[63]	SOG tag	LUX-MS	-
	Analysis of mitochondrial, nuclear and ER proteins ^[65]	RinID	Lable-free quantification	-
Organelle interaction	Analysis of mitochondrial proteins ^[67]	CAT-Prox	Lable-free quantification	-
	Study on the interaction between ER and plasma membrane ^[75]	APEX	Lable-free quantification	-
	Identification of mitochondria-ER contact sites proteins ^[76]	APEX	SILAC	-
	Discover proteins that traffic between ER, nuclear and mitochondrial compartments ^[78]	LOV-Turbo	TMT	-
	Map the protein composition of endoplasmic reticulum-mitochondria contact sites ^[79]	Split-TurboID	Lable-free quantification	-
	Dynamic organellar maps ^[83]	DOMs	SILAC	SVM
	Identify subset of Golgi proteins that cycle through endosomes ^[82]	DOMs	DIA	PCA, SVM
Proteomic modification of organelles	Map proteome trafficking between cytosol and mitochondria, cytosol and nucleus, and nucleolus and SGs (stress granules) ^[81]	TransitID	TMT	ROC curves
	Mitochondrial acetylation ^[89]	Immunoprecipitation and in-gel digest	Lable-free quantification	-
	Mitochondrial matrix phosphorylation ^[90]	Phos-tag protein phosphorylation fluorescent stain	Lable-free quantification	-

续表1

应用分类 Classification of application	细胞器方面的应用 Application in organelles	样本制备 Sample preparation	标记方法/质谱方法 Labeling methods/mass spectrometry methods	数据分析 Data analysis
	Organelle-specific phosphorylation ^[91]	Density gradient centrifugation (Sucrose) and the EasyPhos workflow	Lable-free quantification and PRM	-
Proteomics in organelle-related diseases	Global influence of virus infection on host organelles ^[98]	Density gradient centrifugation (Sucrose)	Lable-free quantification and TMT	Random forest and support vector machines
	Protein visualization of plasmodium berghei nuclear pore complex ^[99]	TurboID	Lable-free quantification	-
	Proteomics of <i>Plasmodium falciparum</i> targeting mitochondria ^[100]	TurboID	Lable-free quantification	-
	Mitochondrial proteomics of mice with liver cancer and colorectal cancer ^[101]	Differential centrifugation	Lable-free quantification and TMT	-
	Ciliary proteome and fibrosis ^[102]	Density gradient centrifugation (Sucrose) and affinity purification	Tandem affinity purification-MS	-
	Exosomes proteome in Alzheimer's disease ^[104]	Ultracentrifugation	Lable-free quantification and PRM	ROC curves

PCP: 蛋白关联分析; FAVS: 荧光辅助囊泡分选; FAPS: 荧光激活颗粒分选; LOPIT: 使用同位素标签的细胞器蛋白定位; ICAT: 同位素编码亲和和标记; hyperLOPIT: 通过同位素标记实现细胞器蛋白质的超复合定位; SPS-MS³: 同步母离子选择MS³; SVM: 支持向量机; LOPIT-DC: 差速超速离心后通过同位素标记的细胞器蛋白定位; TMT: 串联质量标签技术; BioID: 邻位依赖的生物素鉴定; *t*-SNE: *t*-分布随机邻域嵌入; SOG: 单线态氧发生器; RinID: 活性氧诱导的蛋白质标记和鉴定; APEX: 工程化抗坏血酸过氧化物酶; SILAC: 基于氨基酸标记的细胞培养稳定同位素标记技术; DOMs: 动态细胞器图谱; ROC: 受试者工作特征; PRM: 平行反应监测; ER: 内质网; PCA: 主成分分析; -: 无特定数据分析方法。

PCP: protein correlation profiling; FAVS: fluorescence-activated vesicle sorting; FAPS: fluorescence-activated particle sorting; LOPIT: localization of organelle proteins using isotope tagging; ICAT: isotope-coded affinity tags; hyperLOPIT: hyperplexed localisation of organelle proteins by isotope tagging; SPS-MS³: synchronous precursor selection MS³; SVM: support vector machine; LOPIT-DC: localisation of organelle proteins by isotope tagging after differential ultracentrifugation; TMT: tandem mass tag; BioID: proximity-dependent biotin identification; *t*-SNE: *t*-distributed stochastic neighbour embedding; SOG: singlet oxygen generator; RinID: reactive oxygen species induced protein labeling and identification; APEX: engineered ascorbate peroxidase; SILAC: stable isotope labeling by amino acids in cell culture; DOMs: dynamic organellar maps; ROC: receiver operating characteristic; PRM: parallel reaction monitoring; ER: endoplasmic reticulum; PCA: principal component analysis; -: no specific data analysis method.

随着样本制备流程的优化以及质谱技术的快速更新迭代,超微量蛋白组学技术已经在蛋白研究领域崭露头角。目前研究者已经能够直接分析单个哺乳动物细胞和其他痕量样品中的蛋白质表达情况^[105],可在单个细胞鉴定到1 000个以上蛋白质^[106],样本需求量已经减少至纳克和皮克水平。虽然细胞器蛋白组学方面的痕量样本投入的研究目前仍鲜有报道,但临床细胞器样本的稀缺性使得微量样本的研究成为一个必然的发展趋势。使用纳米毛细管的分离方法,研究者们已经实现了对线粒体^[107]、溶酶体^[108]等单个细胞器的提取,辅以超高分辨率的质谱技术,未来直接分析从活细胞中提取的单个细胞器也将成为可能。因此超微量蛋白质组学技术在细胞器研究中的应用将会是未来的热点问题和发展方向。当前的多种技术开发,均以细胞样本为主,细胞器的研究最终将与疾

病的功能相关联。因此绘制疾病状态下,来源于疾病样本的细胞器蛋白组成和丰度、细胞器互作和物质转运等方面的图谱,将进一步提升当前疾病蛋白组学图谱分辨率,对于理解疾病的机制,筛选疾病可能的标志物和药物靶标将会有重要的推动作用。

参考文献 (References)

- [1] YAN R, CHEN K, WANG B, et al. SURF4-induced tubular ER-GIC selectively expedites ER-to-Golgi transport [J]. *Dev Cell*, 2022, 57(4): 512-25, e8.
- [2] MA L, LI Y, PENG J, et al. Discovery of the migrasome, an organelle mediating release of cytoplasmic contents during cell migration [J]. *Cell Res*, 2015, 25(1): 24-38.
- [3] MITREA D M, KRIWACKI R W. Phase separation in biology; functional organization of a higher order [J]. *Cell Commun Signal*, 2016, 14: 1.
- [4] WHEELER R J, HYMAN A A. Controlling compartmentalization by non-membrane-bound organelles [J]. *Philos Trans R Soc*

- Lond B Biol Sci, 2018, 373(1747): 20170193.
- [5] PANKOW S, MARTÍNEZ-BARTOLOMÉ S, BAMBERGER C, et al. Understanding molecular mechanisms of disease through spatial proteomics [J]. *Curr Opin Chem Biol*, 2019, 48: 19-25.
- [6] GUARDIA C M, DE PACE R, MATTERA R, et al. Neuronal functions of adaptor complexes involved in protein sorting [J]. *Curr Opin Neurobiol*, 2018, 51: 103-10.
- [7] BANWORTH M J, LI G. Consequences of Rab GTPase dysfunction in genetic or acquired human diseases [J]. *Small GTPases*, 2018, 9(1/2): 158-81.
- [8] BRIDGES R J, BRADBURY N A. Cystic fibrosis, cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and drugs: insights from cellular trafficking [J]. *Handb Exp Pharmacol*, 2018, 245: 385-425.
- [9] MEYER K, KIRCHNER M, UYAR B, et al. Mutations in disordered regions can cause disease by creating dileucine motifs [J]. *Cell*, 2018, 175(1): 239-53, e17.
- [10] ZHU D, ZHANG M, GAO C, et al. Protein trafficking in plant cells: tools and markers [J]. *Sci China Life Sci*, 2020, 63(3): 343-63.
- [11] PENDIN D, GREOTTI E, LEFKIMMIATIS K, et al. Exploring cells with targeted biosensors [J]. *J Gen Physiol*, 2017, 149(1): 1-36.
- [12] MATTIAZZI USAJ M, STYLES E B, VERSTER A J, et al. High-content screening for quantitative cell biology [J]. *Trends Cell Biol*, 2016, 26(8): 598-611.
- [13] THUL P J, ÅKESSON L, WIKING M, et al. A subcellular map of the human proteome [J]. *Science*, 2017, 356(6340): eaal3321.
- [14] CHRISTOPHER J A, STADLER C, MARTIN C E, et al. Subcellular proteomics [J]. *Nat Rev Methods Primers*, 2021, 1: 32.
- [15] ROSS P L, HUANG Y N, MARCHESE J N, et al. Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2004, 3(12): 1154-69.
- [16] CAO J Y, XU Y P, CAI X Z. TMT-based quantitative proteomics analyses reveal novel defense mechanisms of *Brassica napus* against the devastating necrotrophic pathogen *Sclerotinia sclerotiorum* [J]. *J Proteomics*, 2016, 143: 265-77.
- [17] ONG S E, BLAGOEV B, KRATCHMAROVA I, et al. Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2002, 1(5): 376-86.
- [18] ARSHAD M, PURI A, SIMKOVICH A J, et al. Label-free quantitative proteomic analysis of alfalfa in response to microRNA156 under high temperature [J]. *BMC Genomics*, 2020, 21(1): 758.
- [19] SCHUBERT O T, RÖST H L, COLLINS B C, et al. Quantitative proteomics: challenges and opportunities in basic and applied research [J]. *Nat Protoc*, 2017, 12(7): 1289-94.
- [20] AWASTHI S, MAITY T, OYLER B L, et al. Dataset describing the development, optimization and application of SRM/MRM based targeted proteomics strategy for quantification of potential biomarkers of EGFR TKI sensitivity [J]. *Data Brief*, 2018, 19: 424-36.
- [21] WARNOCK D E, FAHY E, TAYLOR S W. Identification of protein associations in organelles, using mass spectrometry-based proteomics [J]. *Mass Spectrom Rev*, 2004, 23(4): 259-80.
- [22] NEMES P. Mass spectrometry comes of age for subcellular organelles [J]. *Nat Methods*, 2021, 18(10): 1157-8.
- [23] DREGER M. Subcellular proteomics [J]. *Mass Spectrom Rev*, 2003, 22(1): 27-56.
- [24] BORNER G H H. Organellar maps through proteomic profiling: a conceptual guide [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2020, 19(7): 1076-87.
- [25] MOOTHA V K, BUNKENBORG J, OLSEN J V, et al. Integrated analysis of protein composition, tissue diversity, and gene regulation in mouse mitochondria [J]. *Cell*, 2003, 115(5): 629-40.
- [26] MOOTHA V K, LEPAGE P, MILLER K, et al. Identification of a gene causing human cytochrome c oxidase deficiency by integrative genomics [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(2): 605-10.
- [27] ANDERSEN J S, WILKINSON C J, MAYOR T, et al. Proteomic characterization of the human centrosome by protein correlation profiling [J]. *Nature*, 2003, 426(6966): 570-4.
- [28] DE DUVE C, PRESSMAN B C, GIANETTO R, et al. Tissue fractionation studies. 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue [J]. *Biochem J*, 1955, 60(4): 604-17.
- [29] WIESE S, GRONEMEYER T, OFMAN R, et al. Proteomics characterization of mouse kidney peroxisomes by tandem mass spectrometry and protein correlation profiling [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2007, 6(12): 2045-57.
- [30] CAO Z, LI C, HIGGINBOTHAM J N, et al. Use of fluorescence-activated vesicle sorting for isolation of Naked2-associated, basolaterally targeted exocytic vesicles for proteomics analysis [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2008, 7(9): 1651-67.
- [31] MA X, LU C, CHEN Y, et al. CCT2 is an aggregophagy receptor for clearance of solid protein aggregates [J]. *Cell*, 2022, 185(8): 1325-45, e22.
- [32] QIU X, DOYLE L M, WANG M Z. Development of a UPLC-MRM-based targeted proteomic method to profile subcellular organelle marker proteins from human liver tissues [J]. *Sci Rep*, 2022, 12(1): 10985.
- [33] ANDREYEV A Y, SHEN Z, GUAN Z, et al. Application of proteomic marker ensembles to subcellular organelle identification [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2010, 9(2): 388-402.
- [34] FOSTER L J, DE HOOG C L, ZHANG Y, et al. A mammalian organelle map by protein correlation profiling [J]. *Cell*, 2006, 125(1): 187-99.
- [35] DUNKLEY T P, WATSON R, GRIFFIN J L, et al. Localization of organelle proteins by isotope tagging (LOPIT) [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2004, 3(11): 1128-34.
- [36] CHRISTOFOROU A, MULVEY C M, BRECKELS L M, et al. A draft map of the mouse pluripotent stem cell spatial proteome [J]. *Nat Commun*, 2016, 7: 8992.
- [37] GELADAKI A, KOČEVAR BRITOVŠEK N, BRECKELS L M, et al. Combining LOPIT with differential ultracentrifugation for high-resolution spatial proteomics [J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 331.
- [38] SHIN J J H, CROOK O M, BERGEAUD A C, et al. Spatial proteomics defines the content of trafficking vesicles captured by golgin tethers [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 5987.
- [39] GATTO L, BRECKELS L M, BURGER T, et al. A foundation for reliable spatial proteomics data analysis [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2014, 13(8): 1937-52.
- [40] ORRE L M, VESTERLUND M, PAN Y, et al. SubCellBarCode: proteome-wide mapping of protein localization and relocalization [J]. *Mol Cell*, 2019, 73(1): 166-82, e7.
- [41] JADOT M, BOONEN M, THIRION J, et al. Accounting for pro-

- tein subcellular localization: a compartmental map of the rat liver proteome [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2017, 16(2): 194-212.
- [42] GO C D, KNIGHT J D R, RAJASEKHARAN A, et al. A proximity-dependent biotinylation map of a human cell [J]. *Nature*, 2021, 595(7865): 120-4.
- [43] ROUX K J, KIM D I, BURKE B. BioID: a screen for protein-protein interactions [J]. *Curr Protoc Protein Sci*, 2013, 74: 19.23.1-19.23.14.
- [44] REES J S, LI X W, PERRETT S, et al. Selective proteomic proximity labeling assay using tyramide (SPPLAT): a quantitative method for the proteomic analysis of localized membrane-bound protein clusters [J]. *Curr Protoc Protein Sci*, 2017, 88: 19.27.1-19.27.18.
- [45] RHEE H W, ZOU P, UDESHI N D, et al. Proteomic mapping of mitochondria in living cells via spatially restricted enzymatic tagging [J]. *Science*, 2013, 339(6125): 1328-31.
- [46] HUNG V, ZOU P, RHEE H W, et al. Proteomic mapping of the human mitochondrial intermembrane space in live cells via ratio-metric APEX tagging [J]. *Mol Cell*, 2014, 55(2): 332-41.
- [47] LIU Q, ZHENG J, SUN W, et al. A proximity-tagging system to identify membrane protein-protein interactions [J]. *Nat Methods*, 2018, 15(9): 715-22.
- [48] KIM D I, ROUX K J. Filling the void: proximity-based labeling of proteins in living cells [J]. *Trends Cell Biol*, 2016, 26(11): 804-17.
- [49] LUNDBERG E, BORNER G H H. Spatial proteomics: a powerful discovery tool for cell biology [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2019, 20(5): 285-302.
- [50] HUNG V, UDESHI N D, LAM S S, et al. Spatially resolved proteomic mapping in living cells with the engineered peroxidase APEX2 [J]. *Nat Protoc*, 2016, 11(3): 456-75.
- [51] LAM S S, MARTELL J D, KAMER K J, et al. Directed evolution of APEX2 for electron microscopy and proximity labeling [J]. *Nat Methods*, 2015, 12(1): 51-4.
- [52] ROUX K J, KIM D I, RAIDA M, et al. A promiscuous biotin ligase fusion protein identifies proximal and interacting proteins in mammalian cells [J]. *J Cell Biol*, 2012, 196(6): 801-10.
- [53] KIM D I, BIRENDRA K C, ZHU W, et al. Probing nuclear pore complex architecture with proximity-dependent biotinylation [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111(24): E2453-E61.
- [54] REES J S, LI X W, PERRETT S, et al. Protein neighbors and proximity proteomics [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2015, 14(11): 2848-56.
- [55] KIM D I, JENSEN S C, NOBLE K A, et al. An improved smaller biotin ligase for BioID proximity labeling [J]. *Mol Biol Cell*, 2016, 27(8): 1188-96.
- [56] RAMANATHAN M, MAJZOUB K, RAO D S, et al. RNA-protein interaction detection in living cells [J]. *Nat Methods*, 2018, 15(3): 207-12.
- [57] BRANON T C, BOSCH J A, SANCHEZ A D, et al. Efficient proximity labeling in living cells and organisms with TurboID [J]. *Nat Biotechnol*, 2018, 36(9): 880-7.
- [58] GINGRAS A C, ABE K T, RAUGHT B. Getting to know the neighborhood: using proximity-dependent biotinylation to characterize protein complexes and map organelles [J]. *Curr Opin Chem Biol*, 2019, 48: 44-54.
- [59] YOUN J Y, DUNHAM W H, HONG S J, et al. High-density proximity mapping reveals the subcellular organization of mRNA-associated granules and bodies [J]. *Mol Cell*, 2018, 69(3): 517-32, e11.
- [60] GUPTA G D, COYAUD É, GONÇALVES J, et al. A dynamic protein interaction landscape of the human centrosome-cilium interface [J]. *Cell*, 2015, 163(6): 1484-99.
- [61] SANTOS-BARRIOPEDRO I, VAN MIERLO G, VERMEULEN M. Off-the-shelf proximity biotinylation for interaction proteomics [J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 5015.
- [62] FANG Y, ZOU P. Photocatalytic proximity labeling for profiling the subcellular organization of biomolecules [J]. *Chembiochem*, 2023, 24(8): e202200745.
- [63] MÜLLER M, GRÄBNITZ F, BARANDUN N, et al. Light-mediated discovery of surfaceome nanoscale organization and intercellular receptor interaction networks [J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 7036.
- [64] SHU X, LEV-RAM V, DEERINCK T J, et al. A genetically encoded tag for correlated light and electron microscopy of intact cells, tissues, and organisms [J]. *PLoS Biol*, 2011, 9(4): e1001041.
- [65] ZHENG F, YU C, ZHOU X, et al. Genetically encoded photocatalytic protein labeling enables spatially-resolved profiling of intracellular proteome [J]. *Nat Commun*, 2023, 14(1): 2978.
- [66] GERI J B, OAKLEY J V, REYES-ROBLES T, et al. Microenvironment mapping via Dexter energy transfer on immune cells [J]. *Science*, 2020, 367(6482): 1091-7.
- [67] HUANG Z, LIU Z, XIE X, et al. Bioorthogonal photocatalytic decaging-enabled mitochondrial proteomics [J]. *J Am Chem Soc*, 2021, 143(44): 18714-20.
- [68] ZHU H, TAMURA T, HAMACHI I. Chemical proteomics for subcellular proteome analysis [J]. *Curr Opin Chem Biol*, 2019, 48: 1-7.
- [69] YASUEDA Y, TAMURA T, HAMACHI I. Nucleus-selective chemical proteomics using hoechst-tagged reactive molecules [J]. *Chem Lett*, 2016, 45(3): 265-7.
- [70] YASUEDA Y, TAMURA T, FUJISAWA A, et al. A set of organelle-localizable reactive molecules for mitochondrial chemical proteomics in living cells and brain tissues [J]. *J Am Chem Soc*, 2016, 138(24): 7592-602.
- [71] TAMURA T, TAKATO M, SHIONO K, et al. Development of a photoactivatable proximity labeling method for the identification of nuclear proteins [J]. *Chem Lett*, 2020, 49(2): 145-8.
- [72] LIU H, LUO H, XUE Q, et al. Antigen-specific T cell detection via photocatalytic proximity cell labeling (PhoXCELL) [J]. *J Am Chem Soc*, 2022, 144(12): 5517-26.
- [73] COHEN S, VALM A M, LIPPINCOTT-SCHWARTZ J. Interacting organelles [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2018, 53: 84-91.
- [74] SHKEL O, KHARKIVSKA Y, KIM Y K, et al. Proximity labeling techniques: a multi-omics toolbox [J]. *Chem Asian J*, 2022, 17(2): e202101240.
- [75] JING J, HE L, SUN A, et al. Proteomic mapping of ER-PM junctions identifies STIMATE as a regulator of Ca²⁺ influx [J]. *Nat Cell Biol*, 2015, 17(10): 1339-47.
- [76] HUNG V, LAM S S, UDESHI N D, et al. Proteomic mapping of cytosol-facing outer mitochondrial and ER membranes in living human cells by proximity biotinylation [J]. *eLife*, 2017, 6: e24463.
- [77] HAN Y, BRANON T C, MARTELL J D, et al. Directed evolution of split APEX2 peroxidase [J]. *ACS Chem Biol*, 2019, 14(4): 619-35.
- [78] LEE S Y, CHEAH J S, ZHAO B, et al. Engineered allosterism in

- light-regulated LOV-Turbo enables precise spatiotemporal control of proximity labeling in living cells [J]. *Nat Methods*, 2023, 20(6): 908-17.
- [79] CHO K F, BRANON T C, RAJEEV S, et al. Split-TurboID enables contact-dependent proximity labeling in cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2020, 117(22): 12143-54.
- [80] LI Y, TIAN C, LIU K, et al. A clickable APEX probe for proximity-dependent proteomic profiling in yeast [J]. *Cell Chem Biol*, 2020, 27(7): 858-65, e8.
- [81] QIN W, CHEAH J S, XU C, et al. Dynamic mapping of proteome trafficking within and between living cells by TransitID [J]. *Cell*, 2023, 186(15): 3307-24, e30.
- [82] SCHESSNER J P, ALBRECHT V, DAVIES A K, et al. Deep and fast label-free dynamic organellar mapping [J]. *Nat Commun*, 2023, 14(1): 5252.
- [83] ITZHAK D N, TYANOVA S, COX J, et al. Global, quantitative and dynamic mapping of protein subcellular localization [J]. *eLife*, 2016, 5: e16950.
- [84] ITZHAK D N, DAVIES C, TYANOVA S, et al. A mass spectrometry-based approach for mapping protein subcellular localization reveals the spatial proteome of mouse primary neurons [J]. *Cell Rep*, 2017, 20(11): 2706-18.
- [85] DAVIES A K, ITZHAK D N, EDGAR J R, et al. AP-4 vesicles contribute to spatial control of autophagy via RUSC-dependent peripheral delivery of ATG9A [J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 3958.
- [86] WALSH C T, GARNEAU-TSODIKOVA S, GATTO G J, Jr. Protein posttranslational modifications: the chemistry of proteome diversifications [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2005, 44(45): 7342-72.
- [87] PRUS G, HOEGL A, WEINERT B T, et al. Analysis and interpretation of protein post-translational modification site stoichiometry [J]. *Trends Biochem Sci*, 2019, 44(11): 943-60.
- [88] CHOUDHARY C, MANN M. Decoding signalling networks by mass spectrometry-based proteomics [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2010, 11(6): 427-39.
- [89] KOENTGES C, PFEIL K, SCHNICK T, et al. SIRT3 deficiency impairs mitochondrial and contractile function in the heart [J]. *Basic Res Cardiol*, 2015, 110(4): 36.
- [90] APONTE A M, PHILLIPS D, HOPPER R K, et al. Use of ³²P to study dynamics of the mitochondrial phosphoproteome [J]. *J Proteome Res*, 2009, 8(6): 2679-95.
- [91] KRAHMER N, NAJAFI B, SCHUEDER F, et al. Organellar proteomics and phospho-proteomics reveal subcellular reorganization in diet-induced hepatic steatosis [J]. *Dev Cell*, 2018, 47(2): 205-21, e7.
- [92] PITCEATHLY R D, MCFARLAND R. Mitochondrial myopathies in adults and children: management and therapy development [J]. *Curr Opin Neurol*, 2014, 27(5): 576-82.
- [93] BLACKWOOD E A, HOFMANN C, SANTO DOMINGO M, et al. ATF6 regulates cardiac hypertrophy by transcriptional induction of the mTORC1 activator, Rheb [J]. *Circ Res*, 2019, 124(1): 79-93.
- [94] FRANK D, RANGREZ A Y, POYANMEHR R, et al. Mice with cardiac-restricted overexpression of Myozap are sensitized to biomechanical stress and develop a protein-aggregate-associated cardiomyopathy [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2014, 72: 196-207.
- [95] LIU Z W, ZHU H T, CHEN K L, et al. Protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase (PERK) signaling pathway plays a major role in reactive oxygen species (ROS)-mediated endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in diabetic cardiomyopathy [J]. *Cardiovasc Diabetol*, 2013, 12: 158.
- [96] GROS F, MULLER S. The role of lysosomes in metabolic and autoimmune diseases [J]. *Nat Rev Nephrol*, 2023, 19(6): 366-83.
- [97] DI CARA F, SAVARY S, KOVACS W J, et al. The peroxisome: an up-and-coming organelle in immunometabolism [J]. *Trends Cell Biol*, 2023, 33(1): 70-86.
- [98] JEAN BELTRAN P M, MATHIAS R A, CRISTEA I M. A portrait of the human organelle proteome in space and time during cytomegalovirus infection [J]. *Cell Syst*, 2016, 3(4): 361-73, e6.
- [99] AMBEKAR S V, BECK J R, MAIR G R. TurboID identification of evolutionarily divergent components of the nuclear pore complex in the malaria model *Plasmodium berghei* [J]. *mBio*, 2022, 13(5): e0181522.
- [100] LAMB I M, RIOS K T, SHUKLA A, et al. Mitochondrially targeted proximity biotinylation and proteomic analysis in *Plasmodium falciparum* [J]. *PLoS One*, 2022, 17(8): e0273357.
- [101] BOYKOV I N, MONTGOMERY M M, HAGEN J T, et al. Pan-tissue mitochondrial phenotyping reveals lower OXPHOS expression and function across cancer types [J]. *Sci Rep*, 2023, 13(1): 16742.
- [102] WATERS A M, BEALES P L. Ciliopathies: an expanding disease spectrum [J]. *Pediatr Nephrol*, 2011, 26(7): 1039-56.
- [103] BOLDT K, VAN REEUWIJK J, LU Q, et al. An organelle-specific protein landscape identifies novel diseases and molecular mechanisms [J]. *Nat Commun*, 2016, 7: 11491.
- [104] CAI H, PANG Y, WANG Q, et al. Proteomic profiling of circulating plasma exosomes reveals novel biomarkers of Alzheimer's disease [J]. *Alzheimers Res Ther*, 2022, 14(1): 181.
- [105] LIANG Y, ACOR H, MCCOWN M A, et al. Fully automated sample processing and analysis workflow for low-input proteome profiling [J]. *Anal Chem*, 2021, 93(3): 1658-66.
- [106] CONG Y, MOTAMEDCHABOKI K, MISAL S A, et al. Ultrasensitive single-cell proteomics workflow identifies >1 000 protein groups per mammalian cell [J]. *Chem Sci*, 2020, 12(3): 1001-6.
- [107] NADAPPURAM B P, CADINU P, BARIK A, et al. Nanoscale tweezers for single-cell biopsies [J]. *Nat Nanotechnol*, 2019, 14(1): 80-8.
- [108] PAN R, XU M, BURGESS J D, et al. Direct electrochemical observation of glucosidase activity in isolated single lysosomes from a living cell [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2018, 115(16): 4087-92.