

doi: 10.12452/j.fxcxb.26051401

用于配体靶蛋白鉴定的溶剂诱导蛋白质沉淀方法的发展与应用

张晓磊^{1,2#}, 叶玉莹^{1,2#}, 叶明亮^{1,2*}

(1. 中国科学院大连化学物理研究所, 中国科学院分离分析化学重点实验室, 辽宁 大连 116023;
2. 中国科学院大学, 北京 101408)

摘要: 药物通过与靶蛋白结合调控生命活动, 解析药物与蛋白相互作用是阐明作用机制、降低毒副作用、克服耐药性及推动新药研发的关键。传统靶标鉴定方法常需对药物进行化学修饰, 易干扰天然结合并产生假阳性结果。溶剂诱导蛋白质沉淀法(SIP)无需化学修饰, 通过检测配体结合引发的蛋白质稳定性变化实现靶蛋白高通量筛选, 具有操作简便、适用性广等优势。近年来, 研究人员在SIP基础上发展出溶剂蛋白质组分析(SPP)、溶剂蛋白质组积分溶解度变化(solvent-PISA)、整合溶剂诱导蛋白沉淀方法(iSPP)以及活细胞溶剂诱导部分细胞固定法(SICFA)等一系列衍生方法, 显著提升了检测通量与体系适配性。该文系统综述SIP的基本原理、技术演进与优势局限, 总结其在肿瘤、帕金森病、抗菌耐药及疟疾等领域的靶标发现与验证应用, 为靶标精准鉴定与创新药物开发提供参考。

关键词: 靶标鉴定; 化学免修饰配体; 蛋白质组学; 液相色谱-质谱联用

中图分类号: O629.7; G353.11 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-4957(2026)08-1785-12

Development and Application of Solvent-induced Protein Precipitation Method for Ligand-target Protein Identification

ZHANG Xiao-lei^{1,2#}, YE Yu-ying^{1,2#}, YE Ming-liang^{1,2*}

(1. CSA Key Laboratory of Separation Science for Analytical Chemistry, Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, China; 2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 101408, China)

Abstract: Drugs regulate biological processes by binding to target proteins. Characterizing drug and protein interactions is therefore critical for elucidating mechanisms of action, reducing toxic side effects, overcoming drug resistance, and advancing novel drug discovery. Conventional target identification methods often require chemical modification of drugs, which tends to disturb native binding interactions and produce false-positive results. Solvent-induced protein precipitation (SIP) is a label-free approach that enables high-throughput drug target screening by detecting protein stabilization induced upon ligand binding, offering distinct advantages including simple operation and broad applicability. In recent years, researchers have developed a series of SIP-derived methods, including SPP, solvent-PISA, iSPP, and the live-cell in situ technique SICFA, which have greatly improved throughput and system compatibility. This review systematically summarizes the fundamental principles, technological evolution, advantages, and limitations of SIP, and highlights its applications in target discovery and validation across cancer, Parkinson's disease, antimicrobial resistance, malaria, and other fields. We aim to provide a useful reference for precise target identification and innovative drug development.

Key words: target protein identification; chemical modification-free ligand; proteomics; LC-MS/MS

收稿日期: 2026-05-14; 修回日期: 2026-06-18

基金项目: 国家重点研发计划项目(2021YFA1302601); 辽宁省自然科学基金面上项目(2024-MSBA-64)

* 通讯作者: 叶明亮, 博士, 研究员, 研究方向: 蛋白质翻译后修饰、药物靶标鉴定的蛋白质组学分析新技术新方法,
E-mail: mingliang@dicp.ac.cn

共同第一作者

网络首发日期: 2026-06-29

蛋白质作为生命活动的直接执行者,参与机体代谢、信号传导、物质转运等一系列的生命过程,系统解析药物与靶蛋白的相互作用,是阐明药物作用机制、评估其毒副作用、优化药物分子设计的核心环节,对药物研发与基础医学研究具有重要意义^[1-2]。传统鉴定策略如基于活性的探针分析(ABPP)^[3-4]、亲和层析法^[5]等,需要对小分子药物进行化学修饰或衍生化处理,这类修饰操作不仅增加了实验复杂度,更可能改变配体结构、干扰药物与靶蛋白的天然结合活性,从而导致假阳性或假阴性结果,存在明显局限性。因此,无需对药物或小分子进行任何化学修饰的靶蛋白鉴定方法,因能更真实地反映药物与蛋白的生理相互作用状态,已成为该领域的研究热点与发展趋势。

目前应用最广泛的配体免修饰靶蛋白鉴定技术是热蛋白质组分析(TPP)^[6-8],其核心原理为:当配体与靶蛋白特异性结合时,会显著改变靶蛋白的热稳定性,使其更难在高温条件下发生变性沉淀;通过定量分析配体加入前后上清液中蛋白质的丰度变化,即可直接获取配体与蛋白的结合信息^[6]。TPP技术的显著优势在于无需修饰配体、不改变化合物结构,能够在全蛋白质组范围内高通量鉴定配体与蛋白质的相互作用;此外,该技术可同时应用于体外与体内体系,其中活细胞内的TPP分析还能进一步揭示配体扰动引发的下游信号通路变化。尽管TPP技术已获得广泛应用,但其方法原理仍存在一定局限性:该方法对本身具有较高热稳定性的蛋白质敏感度较低^[9],其配体结合引发的热位移效应微弱,难以被有效捕捉。事实上,除温度变化会影响蛋白质的热力学稳定性外,pH波动、变性剂作用或机械力也会打破蛋白热力学平衡,诱发蛋白构象解折叠、变性甚至聚集沉淀。相较于游离蛋白,配体-蛋白复合物具有更低的体系自由能,可改变蛋白折叠平衡、增强靶蛋白热力学稳定性,使其比游离状态更能抵御各类变性条件引发的沉淀。基于这一核心原理,本课题组提出了溶剂诱导蛋白质沉淀技术(SIP)^[10]、pH依赖性蛋白质沉淀(pHDPP)^[11]、机械应力诱导蛋白质沉淀方法^[12]等免修饰的新型方法。其中,相较于其他技术,SIP凭借操作简便、体系稳定、适用范围广的优势,现已成为药物靶标鉴定领域的主流技术之一。

1 SIP方法

SIP方法是本团队最早提出的一种无需对配体进行化学修饰、基于有机溶剂改变蛋白质溶解度实现靶标鉴定的技术方法。该方法采用混合有机溶液(如丙酮、乙醇、乙酸(体积比50:50:0.1),简称AEA)作为蛋白质沉淀诱导剂,一方面可显著降低溶液的介电常数,破坏蛋白质表面水化层,使其内部疏水基团暴露;另一方面,通过强化疏水相互作用,促使变性蛋白质发生不可逆聚集并析出^[10]。SIP的主要工作流程如下:首先设置配体组与阴性对照组,向细胞裂解液中分别加入目标配体与等量对照溶剂共孵育,保证两组孵育条件完全一致,使配体与靶蛋白充分发生特异性结合。随后向所有样本中加入AEA混合溶剂诱导蛋白变性沉淀。体系中未结合配体的游离蛋白会发生构象解折叠,通过疏水作用发生不可逆聚集并沉淀,而与配体特异性结合的靶蛋白因局部构象稳定性提升,对有机溶剂诱导的变性沉淀具备更强抗性,从而更多留存于上清液中。经离心完成上清与沉淀组分分离后,收集各组上清中的可溶性蛋白,依次开展蛋白酶酶解、肽段脱盐及液相色谱-质谱定量检测。通过对比配体组与阴性对照组上清蛋白的丰度差异,在蛋白质组层面完成小分子配体靶蛋白的高通量鉴定(图1)。

SIP方法已成功应用于甲氨蝶呤(MTX)和SNS-032两种模式药物的已知靶标蛋白鉴定,验证了该方法的可行性与有效性。利用广谱激酶抑制剂星形孢菌素开展的进一步研究表明,SIP能够高特异性地捕获发生稳定性改变的蛋白激酶,证实其在复杂背景下的靶标识别能力。以HSP90抑制剂格尔德霉素为研究对象,SIP不仅成功鉴定其已知靶标,还新发现了潜在脱靶蛋白NDUFV1,为阐释格尔德霉素诱导肝毒性的分子机制及优化HSP90抑制剂分子设计提供了关键依据。同时,

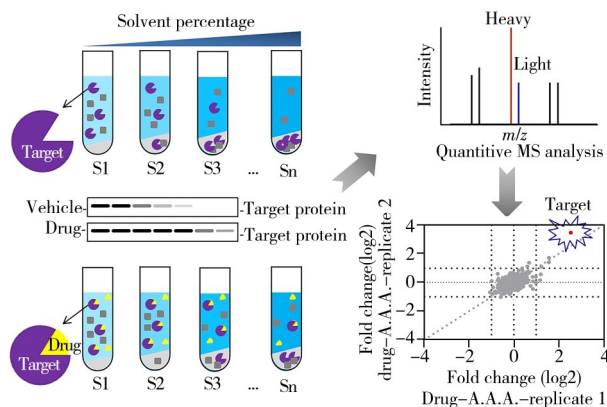


图1 SIP方法流程图^[10]

Fig. 1 The workflow of SIP method^[10]

SIP可实现对配体与靶蛋白相互作用亲和力的评估,进一步拓展了其在药物相互作用研究中的应用价值。鉴于沉淀机制不同,SIP与TPP方法可形成正交互补的验证策略。在星形孢菌素的对比研究中,两种方法共同鉴定出5个激酶靶标;另有SIK、KCC2D、STK10、KKCC1等4个激酶仅在SIP中呈现显著的稳定性变化,而在TPP中未被检出,提示不同变性条件可触发不同的蛋白去折叠路径,二者联用能够更全面地绘制配体的靶蛋白谱,提升鉴定的广度与完整性。综上,SIP无需配体修饰、适用体系广泛,且可与TPP形成高效互补,在药物靶标规模化鉴定中具备突出优势。尽管如此,传统SIP在通量与体系适用性方面仍存在一定局限,推动了一系列衍生技术的持续开发与优化,使其在药物靶标发现领域展现出更广阔的应用前景。

2 SIP方法的发展

在本团队建立的SIP方法的基础上,国内外其他团队持续开展方法革新与应用拓展,不断推动其在配体靶蛋白鉴定领域的性能升级与场景延伸。经由一系列方法学优化,以SIP为核心的溶剂诱导技术体系逐步发展为高通量、多维度、可适配活细胞原位分析的技术体系。

2.1 溶剂蛋白质组分析和溶剂蛋白质组积分溶解度变化

2021年,哈佛医学院Gygi团队以有机溶剂梯度变性为核心,在SIP方法基础上引入TMT多重定量蛋白质组,建立了溶剂蛋白质组分析(SPP)与溶剂蛋白质组积分溶解度变化(solvent-PISA)两种策略,提升了配体与靶蛋白互作鉴定的通量和定量精度。

SPP方法^[13]以梯度浓度的丙酮/乙醇/乙酸混合溶剂(AEA)处理蛋白样品,借助TMTpro等多重标记技术定量不同溶剂浓度下的可溶性蛋白丰度,通过拟合sigmoidal变性曲线获得蛋白的熔解浓度(C_m),以配体结合引发的 C_m 偏移判定靶标结合事件,可在蛋白质组水平精准获取高质量溶解曲线并实现靶标特异性识别(图2)。研究人员首先利用梯度AEA混合溶剂解析了HCT116细胞蛋白质组的溶剂诱导变性特征,将TMTpro 16重标记定量技术与传统SIP方法相结合,解决了传统方法通量低的问题。该分析体系单次实验可定量近8 500个蛋白质,两组生物学重复共鉴定到7 600多个共有蛋白。以 $R^2>0.8$ 、平台值 <0.3 作为筛选标准,有超过5 800个蛋白可拟合出高质量变性曲线并完成 C_m 计算。实验数据表明,重复样本间蛋白 C_m 的皮尔逊相关系数高达0.90,数据重现性良好,且蛋白 C_m 整体分布在7%~21% AEA浓度区间内,证明该方法具有良好的普适性。研究人员以结直肠癌HCT116细胞为模型,利用SCIO-469、Alisertib、MK2206 3种小分子抑制剂为工具药物,经SPP技术检测后,均成功精准识别出3种药物的已知作用靶蛋白p38丝裂原活化蛋白激酶(p38 MAPK)、极光激酶A(AURKA)和蛋白激酶B(AKT),证实了方法的可靠性。

为进一步简化流程、提升实验效率,研究者借鉴曲线下面积(AUC)分析思路开发了solvent-PISA方法^[13]:将梯度溶剂处理后的各上清组分等量混合富集,仅通过单次质谱定量比较对照组与加药组的蛋白丰度差异,即可整合评估配体导致的蛋白溶解度变化,无需拟合完整变性曲线。在HCT116细胞模型与多类小分子药物验证中,solvent-PISA与SPP的鉴定结果吻合。该方法大幅降低了样本与质谱消耗,可支持多浓度、多重复、多化合物的并行分析,且验证结果与SPP高度一致。与热蛋白质组分析(TPP)相比,SPP/solvent-PISA与TPP呈现非冗余的靶标覆盖特征,二者联用可显著增加高质量溶解曲线数量、扩大可筛选蛋白质组范围,为药物靶标鉴定与作用机制解析提供更全面的正交互补策略。

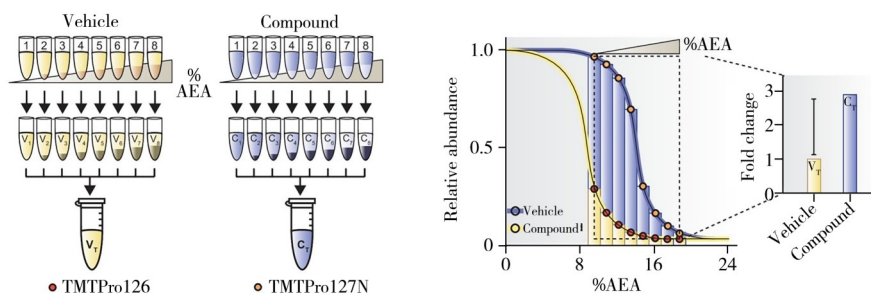


图2 solvent-PISA方法流程图^[13]

Fig. 2 The workflow of solvent-PISA method^[13]

2.2 整合溶剂诱导蛋白沉淀方法

2024 年, Hannes Hahne 团队在 SIP 与 SPP 技术框架下, 针对病原微生物开发了整合溶剂诱导蛋白沉淀方法(iSPP)^[14], 成为 SIP 技术面向抗菌药物靶标鉴定的重要衍生方法。iSPP 延续了配体结合可提升蛋白耐溶剂变性能力的原理, 通过梯度有机溶剂诱导蛋白变性沉淀, 以定量质谱比较加药组与对照组的可溶性蛋白丰度差异, 实现配体与靶蛋白相互作用的全局评估(图 3)。

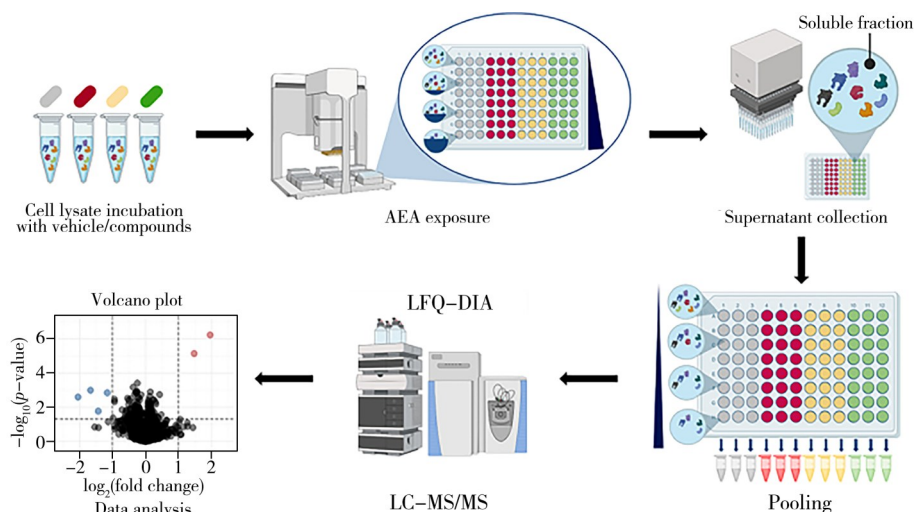


图 3 iSPP 方法流程图^[14]

Fig. 3 The workflow of iSPP method^[14]

针对病原微生物普遍存在样本获取困难、蛋白得率低的问题, 研究团队对 iSPP 实验流程进行了优化。首先实现超微量样本检测, 单组实验仅需 20 μg 总蛋白即可完成分析, 极大降低了样本用量, 适配难培养致病菌的分析需求; 其次根据不同菌种的蛋白变性特征, 差异化设定 AEA 溶剂浓度梯度, 有效放大靶蛋白的稳定性变化信号, 提升了检测灵敏度; 采用无标记数据非依赖采集(DIA)定量策略, 摆脱了同位素标记限制, 可在大肠杆菌、肺炎克雷伯菌、铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌等多重耐药菌中实现广谱蛋白质组覆盖。在工作流程上, iSPP 继承 solvent-PISA 的整合溶解度思路: 将梯度溶剂处理后的可溶性上清等量混合富集, 通过单次质谱定量完成溶解度积分变化检测, 无需拟合完整溶解曲线, 兼具通量与灵敏度, 显著提升了方法在难培养病原体、低蛋白产量样本中的适用性。

2.3 溶剂诱导部分细胞固定法

药物进入细胞后通常会经历一系列复杂的代谢过程, 其作用机制具有显著的时间依赖性和动态特征, 这与细胞裂解液中相对静态的环境存在本质差异。因此, 仅依赖裂解体系难以全面反映药物在细胞内的真实作用状态。在此背景下, 系统解析药物与其直接相互作用蛋白的关系, 对于阐明药物作用机制、解析下游级联效应具有重要意义。2025 年, 本团队将溶剂诱导变性策略从细胞裂解体系扩展至活细胞水平, 发展了溶剂诱导部分细胞固定法(SICFA)^[15], 可在维持细胞结构完整的条件下实现蛋白质稳定性的原位定量检测, 标志着 SIP 技术从细胞裂解体系迈向完整活细胞体系的跨越。

该方法利用基于有机溶剂的细胞固定剂(丙酮、乙醇、乙酸混合液)对活细胞内蛋白质的部分固定作用, 通过梯度浓度固定剂处理活细胞, 诱导蛋白质在细胞内原位发生可控、梯度的变性聚集(图 4)。结合定量质谱分析可溶蛋白的变化, 系统评估细胞内蛋白质稳定性的变化。研究人员利用 SICFA 技术有效鉴定了雷替曲塞、达沙替尼、甲氨蝶呤等多种药物的经典已知靶点胸苷酸合成酶(TYMS)、Src 家族酪氨酸激酶(LYN)、二氢叶酸还原酶(DHFR), 且该体系能够维持细胞膜结构完整, 充分验证了该方法具有良好的准确性与稳定性。相较于传统裂解液分析手段, SICFA 不仅可精准识别药物直接作用靶点, 还能够捕获药物结合后引发的下游蛋白稳定性改变。以甲氨蝶呤为例, 该方法除检测到其直接靶点 DHFR 发生蛋白稳定效应外, 还检出代谢通路下游胸苷酸合成酶(TY)、甲硫氨酸合成酶还原酶(MTR)的稳定性变化, 而这一生物学特征在裂解液实验中无法观测到。SICFA 方法突破了传统 SIP 方法对裂解体系的依赖, 不仅能够在全蛋白质组范围内识别药物的直接作用靶点, 还能够系统捕捉与靶点

相关的下游早期蛋白复合物及信号通路的协同稳定性变化，其灵活、高通量的工作流程还支持药物结合效力的定量分析和时间分辨研究，为全面解码药物的作用机制提供了强大的系统性研究框架。该方法不仅显著提升了药物靶标的发现能力，其在5-FU研究中揭示的早期RNA调控新机制，更展现出在精准药物开发与复杂药理过程解析中的巨大潜力。综上，SICFA极大拓展了溶剂诱导型技术的适用范围与生物学深度，能够成为药物靶标鉴定、作用机制解析与信号通路调控研究中强有力的工具。

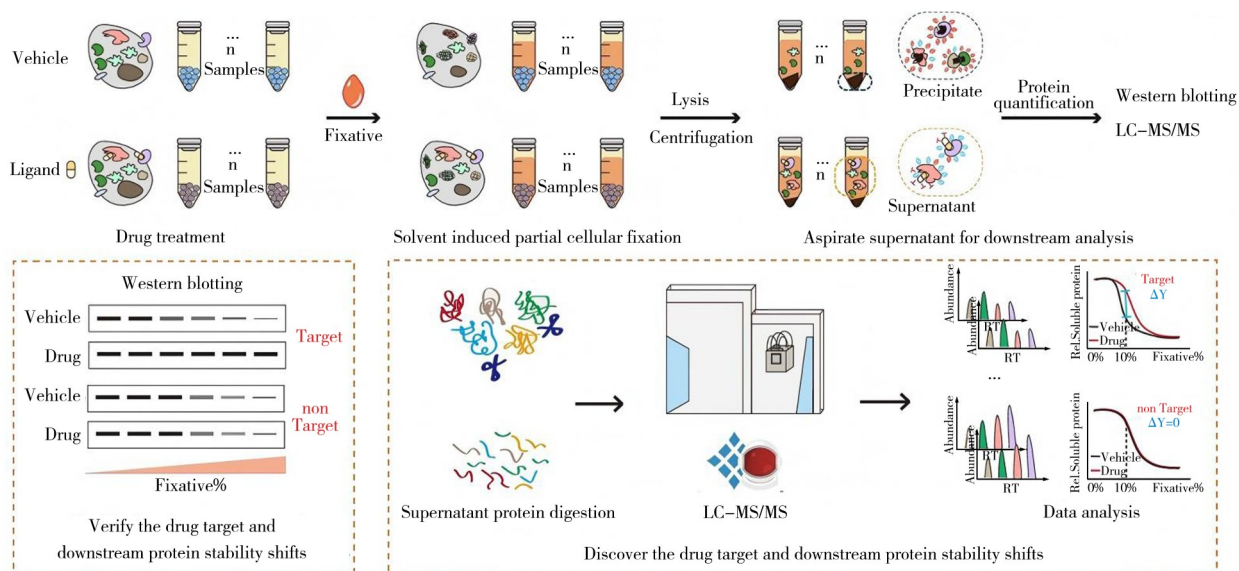


图4 SICFA方法流程图^[15]

Fig. 4 The workflow of SICFA method^[15]

3 SIP方法的应用

SIP方法作为一种无标记靶点解析技术，近年来在药物研发中得到广泛应用。根据其在研究流程中的功能，其应用场景可主要归纳为两类：靶点发现与靶点验证。

3.1 靶点发现

在药物研发早期，明确潜在作用靶点，不仅有助于阐明药物作用机制，还能为药物毒理评价、耐药性机制解析以及药物结构优化提供关键支撑。SIP技术通过检测配体结合前后蛋白质稳定性的变化，可在蛋白组水平高效筛选候选靶点，通常与TPP、ABPP等方法联合使用，借助多方法交叉验证，大幅提升靶标鉴定的准确性与可靠性。

在帕金森病(PD)治疗研究中，Sun等^[16]发现中药苦参的主要活性成分苦参酮(Kurarinone)可缓解1-甲基-4-苯基-1, 2, 3, 6-四氢吡啶(MPTP)诱导的小鼠帕金森样行为障碍，并减轻模型动物多巴胺能神经元损伤。为系统解析苦参酮的分子作用靶点，该研究联合SIP与TPP两种互补的蛋白稳定性分析技术开展定量蛋白质组学筛选。实验同步检测蛋白质在有机溶剂、梯度温度两种不同变性条件下的稳定性改变，对两组数据进行比对分析。SIP与TPP方法共定量鉴定出3 245个蛋白质，以 $\log_2FC \pm 1$ 作为筛选阈值，最终从神经炎症相关蛋白群体中筛选得到14个差异候选蛋白，包括可溶性环氧化物水解酶(sEH, 基因名Ephx2)、桥斑蛋白(desmoplakin)、黏附G蛋白偶联受体B1(adgrb1)以及囊泡单胺转运体2(slc18a2)等。根据先前对PD的研究，sEH在神经炎症中起作用，这表明sEH可能是苦参酮发挥药效的靶点(图5)。后续结合体外抑制动力学、表面等离子体共振及共结晶实验验证，证实苦参酮通过抑制sEH稳定环氧二十碳三烯酸(EETs)水平，进而缓解MPTP诱导的PD小鼠神经炎症与多巴胺能神经元损伤，为PD的天然药物治疗提供了靶点依据。

在结直肠癌疾病的治疗中，Yu等^[17]通过表型发现紫草素(SHK)能剂量依赖性抑制LoVo、RKO等结直肠癌细胞增殖(IC_{50} 0.6~2.5 $\mu\text{mol/L}$)，诱导细胞周期G0/G1期阻滞与凋亡；体内LoVo移植瘤模型中，SHK(2.5、5 mg/kg)可显著缩小肿瘤体积、降低肿瘤重量。为解析SHK的分子作用靶点，研究整合SIP与TPP两种蛋白稳定性分析技术开展高通量筛选，两种方法共定量到3 245个蛋白质。以 $-\lg p=3.5$ 作

为显著性判定阈值, 筛选出 22 个 SHK 引起稳定性发生显著变化的蛋白。结合生物信息学通路解析, 最终锁定炎症相关功能簇的核因子 κ B 必需调节蛋白 (NEMO) 及核因子 κ B 抑制蛋白激酶 β (IKK β) 为候选靶蛋白 (图 6)。通过基于 SIP 和 CETSA 的免疫印迹实验 (Western blot) 验证, 确认 SHK 可直接作用于 NEMO/IKK β 复合物, 破坏二者相互作用 (IC₅₀ 约 170 nmol/L), 进而抑制 NF- κ B 通路激活, 减少 CRC 细胞增殖与炎症因子释放, 为开发靶向 NEMO/IKK β 复合物的分子抑制剂提供了关键靶标发现手段。SIP 技术与 TPP 等方法联用能够提高靶蛋白鉴定的可靠性。Wang 等^[18] 也通过采用 ABPP 联合 SIP 技术, 确定高迁移率族蛋白 B1 (HMGB1) 为天然活性小分子 3-Bz-20-DOI 在非小细胞肺癌中的治疗靶点, 证明了 3-Bz-20-DOI 通过结合 HMGB1 的 Lys44 位点调节核转运, 从而调节核易位, 最终促进细胞自噬、诱导非小细胞肺癌细胞发生凋亡。

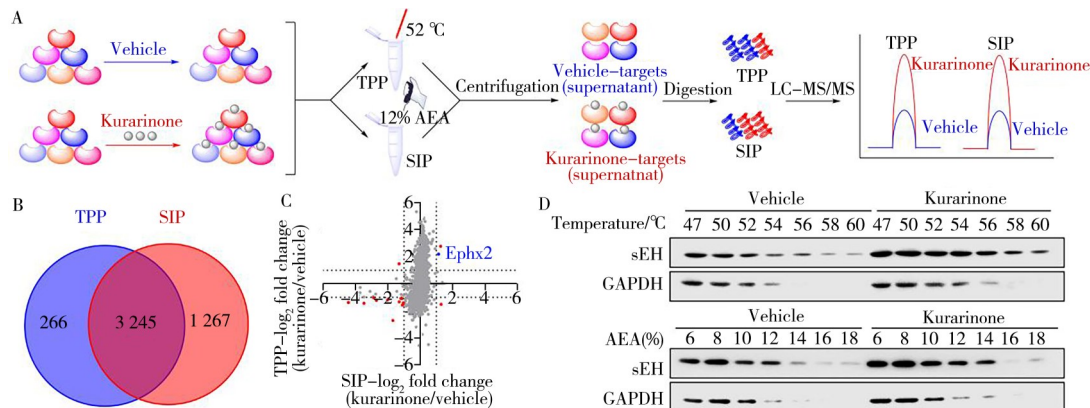


图 5 中药苦参酮靶向 sEH 抑制结肠癌生长^[16]: 利用 SIP 和 TPP 方法筛选苦参酮靶蛋白流程 (A); SIP 和 TPP 方法共同鉴定的蛋白质 (B); 苦参酮靶蛋白的鉴定 (C) 与验证 (D)

Fig. 5 The traditional Chinese medicine component kurarone targets sEH to inhibit the growth of colorectal cancer^[16]: workflow for screening target proteins of kurarone using SIP and TPP methods (A); overlapping proteins identified by SIP and TPP; identification (C) and validation of target proteins of kurarone (D)

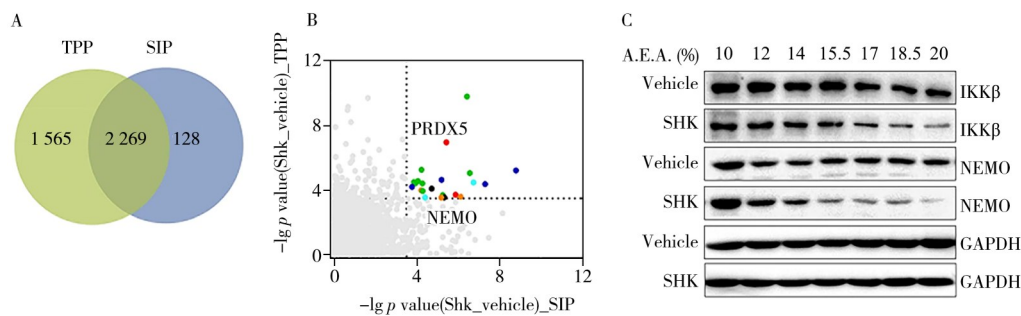


图 6 中药紫草素靶向 NEMO/IKK β 抑制结肠癌生长^[17]: SIP 和 TPP 方法共同鉴定的蛋白质 (A); 紫草素靶蛋白的鉴定 (B); 基于 Western blot 检测的 SIP 方法验证靶蛋白 (C)

Fig. 6 The shikonin targets NEMO/IKK β to suppress colorectal cancer growth^[17]: overlapping proteins identified by SIP and TPP (A); identification of target proteins of shikonin (B); validation of target proteins by using Western blot-based SIP (C)

在抗菌素耐药性 (AMR) 研究中, Bizzarri 等^[19] 通过优化有机溶剂 AEA 梯度和减少样本用量建立了 iSPP 方法。研究选取大肠杆菌、肺炎克雷伯菌、铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌 4 种耐药致病菌作为研究模型, 利用 iSPP 技术实现多个抗菌药物及 MEP 通路抑制剂的靶点鉴定。精准识别出利福平、氨苄西林、哌拉西林、亚胺培南、磷霉素等多种抗生素的已知作用靶标, 包括青霉素结合蛋白 (PBPs) 与 RNA 聚合酶亚基等。磷霉素除经典靶点木酮糖还原异构酶 (DXR) 外, 还被证实可作用于天冬氨酰-tRNA 合成酶 (AspRS) (图 7)。同时, 该方法被成功应用于 MEP 通路小分子抑制剂的靶标评估, 准确识别出已知靶蛋白 DXR、丁烯基二磷酸合酶 (IspG) 和丁烯基二磷酸还原酶 (IspH) 等, 并同步挖掘出 AspRS、脱硫生物素合成酶 (BioD2)、钴胺腺苷转移酶 (CobA) 等潜在靶蛋白与协同作用蛋白。作为一种无需修饰、适用物种广泛、接近生理条件的靶标鉴定手段, iSPP 为耐药菌背景下抗菌药物的靶标发现、作用机制解析及耐药机制研究提供了高效可靠的技术支撑。

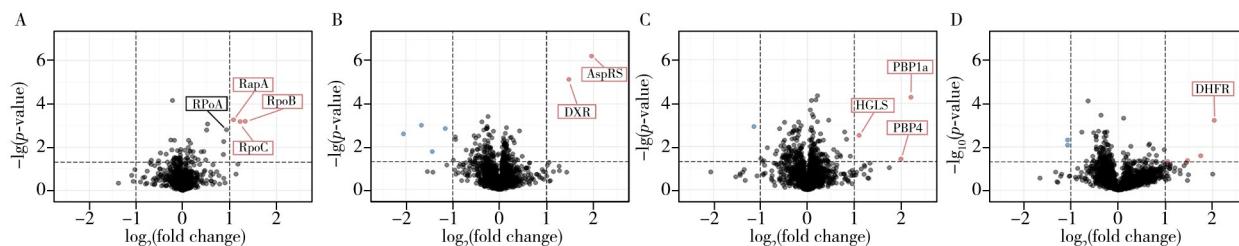


图7 iSPP方法在大肠杆菌细胞裂解液中鉴定模型药物利福平(A)、膦胺霉素(B)、氨苄西林(C)与甲氨蝶呤(D)靶蛋白^[19]

Fig. 7 Identification of target proteins of model drugs rifampicin(A), fosmidomycin(B), ampicillin(C) and methotrexate in *E. coli* lysates(D) using the iSPP approach^[19]

疟疾是由疟原虫属寄生虫引发的烈性传染病,对人类健康威胁重大,且现有药物耐药性加剧,深入解析耐药机制、研发靶向新靶点的抗疟新药已迫在眉睫。Bravo等^[14]将iSPP方法用于疟原虫的耐药性研究,构建了较为全面的疟原虫蛋白质组溶剂变性图谱,并系统解析了6种抗疟药物的潜在耐药靶点。iSPP方法成功鉴定到乙胺嘧啶、DSM265、MMV390048及磺胺多辛的已知作用靶点二氢叶酸还原酶(PfDHFR)、二氢乳清酸脱氢酶(PfDHODH)、磷脂酰肌醇4-激酶(PfPI4K)与二氢蝶酸合酶(PfDHPS)(图8)。多种药物也对转录调控、蛋白转运及信号转导相关蛋白产生稳定作用。磷霉素虽未鉴定到已知结合蛋白PfDXR的变化,但在显著上调的蛋白中鉴定到天冬氨酰-tRNA连接酶(PfAspRS)。此外,磺胺多辛除稳定已知靶蛋白PfDHPS外,还鉴定到多个稳定性上调的蛋白,其中包含多个核糖体蛋白亚基(60S核糖体蛋白L7、L22、L34、L7a及40S核糖体蛋白S2等)。甲氟喹同样可分别引起数十种蛋白发生稳定与去稳定化改变,提示抗疟药物在疟原虫体内的作用网络并非单一通路,这既能解释部分抗疟药物耐药性产生的复杂成因,也为研发多靶点高效抗疟新药提供了关键思路。

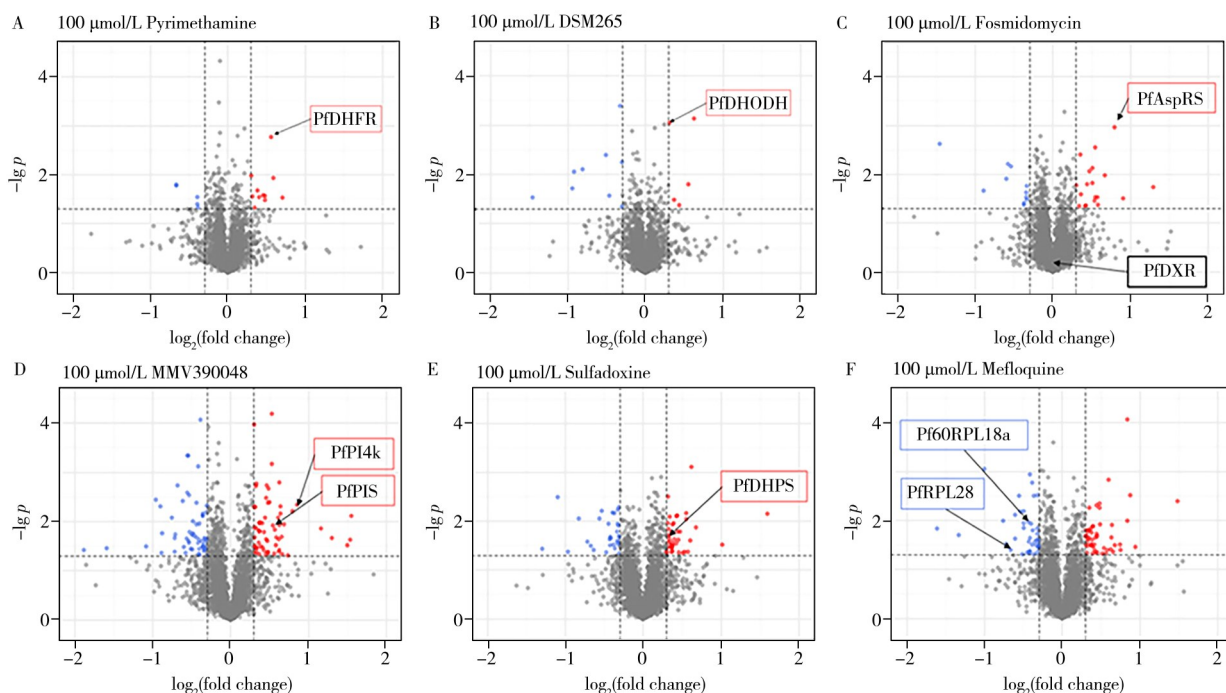


图8 iSPP方法在恶性疟原虫细胞裂解液中鉴定模型药物乙胺嘧啶(A)、DSM265(B)、膦胺霉素(C)、MMV390048(D)、磺胺多辛(E)与甲氟喹(F)靶蛋白^[14]

Fig. 8 Identification of target proteins of model drugs pyrimethamine(A), DSM265(B), fosmidomycin(C), MMV390048(D), sulfadoxine(E) and mefloquine(F) in *Plasmodium falciparum* cell lysate using the iSPP approach^[14]

Ji等^[20]也将SPP方法应用于抗疟药物靶点解析,进一步验证了其在复杂寄生虫体系中的可行性。研究借助Orbitrap Astral质谱结合LFQ-DIA技术,在3D7疟原虫裂解液中鉴定到3 839个蛋白,覆盖约72%的理论3D7疟原虫蛋白质组。研究人员首先开展单药实验,针对乙胺嘧啶、阿托伐醌、西帕加明等5种抗疟药物,成功识别出各自经典靶点:乙胺嘧啶作用的PfDHFR、西帕加明靶向的PfATP4、

MMV1557817结合的氨肽酶M1/M17、OSM-S-106作用的天冬酰胺酰-tRNA合成酶；同时完整解析出阿托伐醌靶向的线粒体细胞色素bc1复合物全部亚基及多种关联蛋白，验证了SPP在全蛋白组水平解析药物-蛋白相互作用的能力。研究还发现，部分靶蛋白仅在特定溶剂浓度下出现稳定性变化，逐点分析溶剂梯度可有效避免传统积分法造成的信号丢失。随后，作者提出了“one-pot”策略，将多种抗疟药物混合后与疟原虫裂解液共同孵育，在乙胺嘧啶、阿托伐醌的联合实验中，SPP方法能够成功识别出这两种药物的多个靶点。该法显著提高了实验的通量，减少了时间和成本，同时保证了结果的可靠性。此外，作者还将SPP方法扩展到活细胞体系(live-cell SPP)，在完整疟原虫中成功检测到乙胺嘧啶的已知靶蛋白P₁DHFR，对比分析显示，裂解液与活细胞体系中半数以上蛋白稳的定性趋势一致，也有部分蛋白受胞内微环境影响呈现差异。SPP不仅适用于体外裂解液条件，也能够在接近生理环境的活细胞中高效识别药物靶点。

3.2 靶点验证

在筛选得到候选靶蛋白后，关键环节便是验证小分子与靶蛋白之间是否存在真实、特异的相互作用。SIP技术不仅能够依托高通量质谱实现配体未知靶蛋白的无差别、全局性鉴定，同时也可直接作为配体与靶蛋白相互作用的验证方法，常与基于抗体的免疫印迹技术联合使用，进一步提升结果可靠性。与SPR^[21]、ITC^[22]等依赖纯蛋白的方法不同，SIP无需蛋白纯化步骤，可直接在细胞、组织裂解液等复杂生理体系中评估结合行为，从而提供更贴近体内真实状态的相互作用证据。凭借这一优势，SIP在靶点验证阶段展现出实用价值，成为从候选靶点走向功能确证的重要技术手段。

阻断CSF-1/CSF-1R通路已成为一种有前景的策略，通过重新编程肿瘤相关巨噬细胞(TAMs)来重塑肿瘤免疫微环境(TME)。Lv等^[23]通过合理的药物设计，发现了一种新型CSF-1R抑制剂C19，可诱导M2样TAMs转化为M1，并显示出良好的抗结直肠癌作用。但在随后的药代动力学特性评估中，发现C19的口服生物利用度非常低(F<1%)，这限制了其进一步发展。因此，需要进一步优化C19的可药性。为确认化合物C19是否直接靶向CSF-1R，研究人员采用SIP等方法进行多重验证。将骨髓来源的巨噬细胞(BMDMs)裂解液分别与C19(500 nmol/L)或二甲基亚砜(DMSO)共同孵育1 h。随后，细胞裂解液经不同百分比有机试剂AEA处理，采用Western blot技术检测加药组和对照组中CSF-1R蛋白的稳定性变化。结果发现结合C19的CSF-1R相较于对照组游离蛋白具有更高的稳定性，对有机溶剂变性蛋白表现出更强的耐受能力。剂量梯度实验进一步证实，在16% AEA条件下，C19可呈剂量依赖性增强CSF-1R的蛋白稳定性，证明C19与CSF-1R存在特异性结合(图9)。结合表面等离子体共振(SPR)与细胞热迁移实验(CETSA)进一步验证，确认C19通过结合CSF-1R抑制其下游AKT/mTORC1通路，诱导M2型肿瘤相关巨噬细胞(TAMs)向M1型重编程，并促进CXCL9分泌以招募CD8⁺T细胞，增强PD-1抗体的抗结直肠癌疗效，为C19的靶标特异性及免疫治疗协同机制提供了直接验证依据。

溃疡性结肠炎是与NLRP3炎症小体过度激活相关的炎症性肠病之一，线粒体磷酸酶PGAM5可调控巨噬细胞中NLRP3炎症小体活化。Gao等^[24]通过APEX2接近标记法和定量蛋白质组学分析，发现PGAM5与NEK7之间存在新的相互作用，并以不依赖其磷酸酶活性的方式促进NLRP3炎症小体组装与激活，提示PGAM5-NEK7相互作用可作为溃疡性结肠炎等NLRP3相关炎症疾病的潜在治疗靶点。基于SPR小分子筛选发现，石榴皮来源天然产物安石榴苷(Punicalagin)可直接结合PGAM5，为进一步确认二者在细胞内复杂生物环境中的相互作用，作者通过SIP、CETSA和药物亲和响应靶点稳定性分析

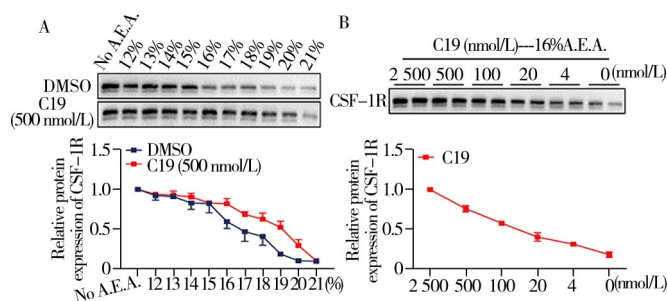


图9 SIP方法验证C19与CSF-1R蛋白的相互作用^[23]：结合C19的CSF-1R相较于对照组游离蛋白对有机溶剂变性蛋白具有更强的耐受能力(A)；在16% AEA条件下，C19可呈剂量依赖性增强CSF-1R的蛋白稳定性(B)

Fig. 9 The SIP method validates the interaction between C19 and CSF-1R protein^[23]: CSF-1R bound to C19 exhibited higher tolerance to organic solvent(AEA)-induced denaturation than free CSF-1R in the control group(A); C19 increased the stability of CSF-1R in a dose-dependent manner at 16% AEA(B)

(DARTS)开展交叉验证。在SIP实验中,将BMDMs细胞分别与安石榴苷(20 mmol/L)或DMSO孵育3 h后,收获细胞并用PBS洗涤3次。细胞裂解后,收集上清液并将加药组和对照组均分成12份,随后加入不同百分比的AEA混合液,设置有机溶剂浓度梯度为12%~32%。基于Western blot的SIP结果证实安石榴苷可显著提升PGAM5蛋白的稳定性,该效应在有机溶剂浓度24%~28%区间尤为明显(图10)。通过SIP等方法的交叉验证,证实了安石榴苷与PGAM5蛋白的相互作用。该化合物不仅能特异性结合PGAM5,还可阻断PGAM5与NEK7的相互作用,进而抑制NEK7与NLRP3的结合,最终减少NLRP3炎症小体的组装与过度活化,为其靶向干预机制提供了可靠的实验依据。

Dans等^[25]经表型筛选发现化合物M-833可抑制疟原虫裂殖子入侵红细胞后的发育,随后通过诱导M-833耐药疟原虫株、对其进行全基因组测序,发现耐药株中PfSTART1基因可能是抗疟潜在新靶点。为确认M-833系列化合物是否直接靶向PfSTART1,作者利用SIP方法进行验证。因PfSTART1属于高热稳定蛋白,常规热CETSA方法适用性有限,故研究人员优先采用SIP方法。分别使用终浓度10 μ mol/L的W-991与等体积DMSO孵育疟原虫裂解液3 min,设为实验组与对照组;两组样本再采用梯度浓度混合溶剂AEF(丙酮:乙醇:甲酸=50:50:0.1,体积比)处理,溶剂终浓度区间设置为0%~25%。通过采用Western blot技术检测化合物存在时PfSTART1的可溶性变化,发现W-991(M-833系列类似物)显著提高PfSTART1在19%~21% AEF浓度下的稳定性,证明二者直接结合(图11)。揭示了化合物通过抑制PfSTART1功能阻断疟原虫裂殖子入侵红细胞后的空泡膜扩张,为疟疾新型靶向药物的作用机制验证提供了关键证据。

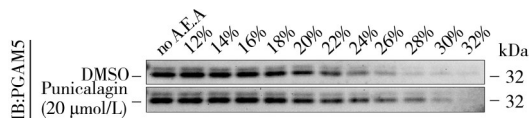


图10 SIP方法验证Punicalagin与PGAM5蛋白的相互作用^[24]

Fig. 10 The SIP method validates the interaction between Punicalagin and PGAM5 protein^[24]

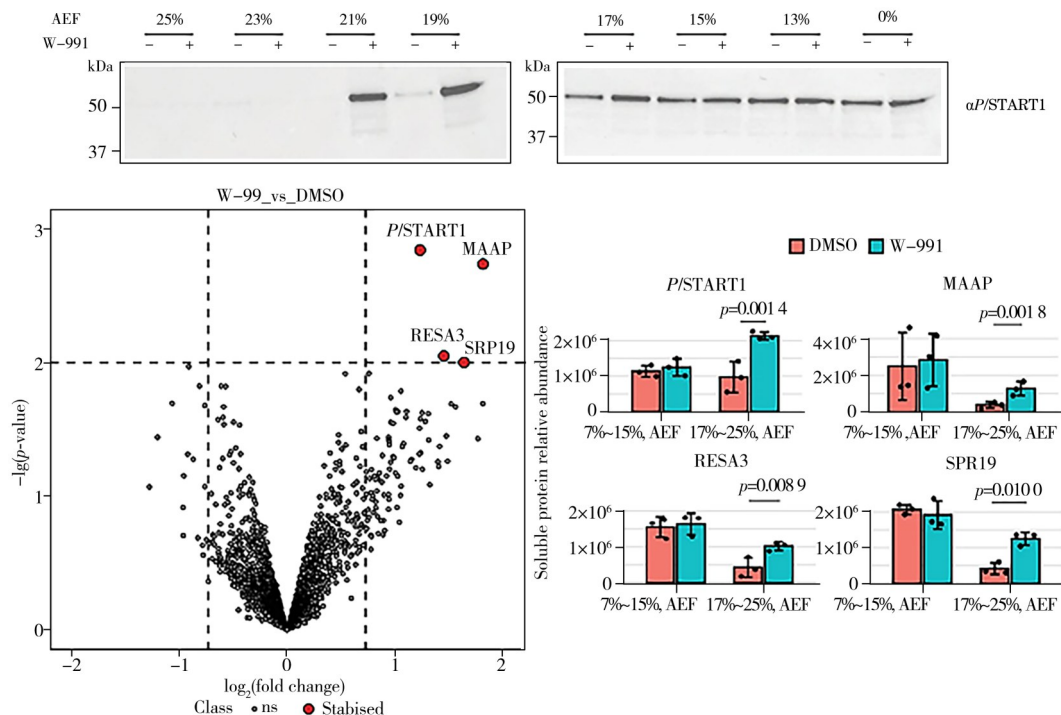


图11 SIP方法鉴定W-991与PfSTART1蛋白的相互作用^[25]

Fig. 11 The SIP method validates the interaction between W-991 and PfSTART1 protein^[25]

在天然产物抗肿瘤研究中,肠道微生物介导的类固醇激素生物转化为活性分子的发现提供了新的药物来源。Tian等^[26]通过多种肠道真菌对睾酮和诺龙进行体外生物转化,共鉴定获得22种代谢产物,其中部分新化合物表现出显著的抗肿瘤活性。在对这些产物的功能筛选中,研究人员发现代谢产物26对HeLa细胞具有最强的细胞毒作用,可显著抑制细胞增殖并诱导凋亡。进一步机制研究表明,该化合

物能够上调肿瘤抑制蛋白 p53 及其下游 p21 的表达, 提示其抗肿瘤作用可能与 p53 信号通路激活密切相关。然而, 仅凭通路变化尚不能证明该化合物是否直接作用于 p53 蛋白。为此, 研究人员引入 SIP 方法对其靶点进行验证。在该实验中, 将 HeLa 细胞裂解液与化合物 26 共孵育后, 加入梯度浓度的有机溶剂 (丙酮/乙醇/乙酸混合体系 AEA), 并通过 Western blot 检测不同条件下 p53 蛋白的可溶性变化。结果显示, 与对照组相比, 代谢物 26 显著降低了 p53 蛋白的溶剂稳定性, 该效应在有机溶剂浓度 10%~16% 区间尤为明显, 但对 GAPDH 无显著影响, 表明代谢物 26 作用于 p53 并改变其蛋白构象 (图 12)。进一步结合分子对接分析结果, 该化合物可能通过与 p53 关键氨基酸残基形成氢键, 从而稳定其构象并抑制其降解, SIP 方法的实验结果为天然产物来源抗肿瘤药物的靶点解析提供了有力支持。

4 总 结

SIP 技术是本团队提出的一种无需对小分子配体进行化学修饰的新型靶蛋白鉴定方法, 通过检测配体结合介导的蛋白质稳定性变化, 可在蛋白质组水平系统解析小分子与靶蛋白的特异性相互作用。该技术具备突出的方法学优势: 整体操作简便、所需有机溶剂均为实验室常规试剂, 无需特殊耗材与复杂前处理; 规避了传统化学修饰带来的配体结构改变与活性干扰问题, 最大程度保留了药物-蛋白相互作用的生理真实性; 样本适用性广, 可兼容纯蛋白体系、细胞裂解液及组织样本, 能够更贴合复杂生理环境开展靶点分析。同时, 结合剂量梯度实验, SIP 还可定量反映药物与靶蛋白的结合亲和力, 为高效、高通量的药物靶点筛选提供可靠技术支撑。

在技术体系中, SIP 兼具靶点筛选与结合验证的双重功能, 可独立完成从候选靶标挖掘到相互作用确证的完整分析流程, 是衔接高通量靶点发现与后续功能验证的重要技术桥梁。相较于 SPR、ITC 等仅适用于纯化蛋白体系的经典验证手段, SIP 无需蛋白纯化, 可直接在复杂生物样本中鉴定药物结合蛋白, 提供更贴合生理状态的互作证据。此外, 将 SIP 与免疫共沉淀、分子对接等技术联合开展交叉验证, 可有效剔除假阳性结果、提升靶点鉴定的准确度与可信度, 获得更为严谨可靠的药物-蛋白互作结论。目前, SIP 及其衍生技术已广泛应用于肿瘤、神经退行性疾病、抗菌耐药及寄生虫感染等研究领域, 在药物靶点挖掘、分子作用机制解析及创新药物研发中展现出重要应用价值。

尽管 SIP 技术优势显著, 但仍存在一定方法学局限性。由于实验需在维持蛋白天然构象与活性的条件下完成蛋白提取, 该方法对膜蛋白的提取与检测效率较低, 难以高效鉴定膜蛋白靶点, 该缺陷可通过添加低浓度 NP-40 等表面活性剂进行优化改善。为进一步突破单一技术的应用局限, 国内外很多研究团队基于我们提出的 SIP 核心原理, 陆续开发出 SPP、solvent-PISA、iSPP 等一系列衍生技术, 有效提升了检测通量、降低了样本用量、优化了多物种适配性, 大幅降低了技术应用门槛。另外, 目前 SIP 方法大多仅检测上清组分以鉴定药物靶蛋白。小分子与蛋白结合会改变其空间构象与热力学稳定性, 使得靶蛋白在上清、沉淀两组分中的分布比例产生差异, 有些靶蛋白仅在沉淀中呈现出明显的稳定性变化^[11,27]。若仅分析上清样本, 会丢失这部分关键实验信息, 无法描绘配体与蛋白的全景结合谱, 进而造成潜在靶点漏检, 降低鉴定的覆盖度与灵敏度。而上清、沉淀双组分联合检测可实现信息互补, 全面解析蛋白的变性行为, 有效弥补单一检测模式的不足, 大幅提升药物靶标筛选的完整性与结果可靠性。

值得关注的是, 新型 SICFA 技术成功将传统 SIP 的裂解液检测体系拓展至活细胞水平。相较于裂解液检测体系, SICFA 能够最大程度保留细胞原生生理微环境, 避免细胞裂解引发的蛋白构象改变与互作信号丢失, 检测结果更贴合体内真实生理状态。SICFA 丰富了配体免修饰蛋白稳定性检测的技术

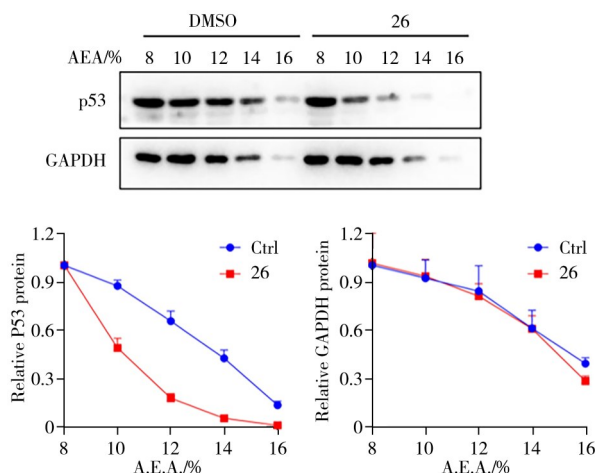


图 12 SIP 方法鉴定代谢产物 26 与 p53 蛋白的相互作用^[26]

Fig. 12 The SIP method validates the interaction between metabolite 26 and p53 protein^[26]

体系,拓展了该类技术在活细胞动态机制研究中的应用场景。未来, SICFA可广泛应用于小分子药物早期作用机制解析、弱结合靶点挖掘、胞内动态信号通路调控等研究,为活细胞层面精准解析药物-蛋白相互作用提供了全新技术手段。同时,多技术联用的整合分析策略,进一步推动了靶蛋白鉴定体系的完善升级。SIP与TPP技术具备良好的方法互补性,对热变性不敏感的蛋白可能对有机溶剂变性敏感,二者结合可实现靶点的全方位深度挖掘;而SIP与PELSA(PEptide-centric Local Stability Assay,肽段中心局部稳定性分析)^[28]技术的联合应用,不仅能够提升靶蛋白鉴定深度,还可精准解析配体结合区域,将研究层面从初步靶蛋白鉴定推进至分子结合机制解析,为阐明小分子药物作用机制提供了多层次实验依据。整体而言,以SIP为核心、多衍生技术与联用技术协同发展的检测体系,为创新药物靶点发现、机制研究及新药研发提供了高效、精准、贴近生理真实的全新技术平台,具备广阔的发展前景与应用价值。

参考文献:

- [1] Huang J L, Wu L M, Wu S Q, Yuan F Y, Weng H Z, Huang D, Gan L, Chen S B, Tang G H, Yin S. *Nat. Chem. Biol.*, **2026**, 22(3): 1-12.
- [2] Frosch M, Shimizu T, Wogram E, Amann L, Gruber L, Groisman A I, Fliegau M, Schwabenland M, Chhatbar C, Zechel S, Rosewich H, Gärtner J, Quintana F J, Buescher J M, Blank T, Binder H, Stadelmann C, Letzkus J J, Hopf C, Masuda T, Knobeloch K P, Prinz M. *Nature*, **2025**, 646(8086): 913-924.
- [3] Weerapana E, Wang C, Simon G M, Richter F, Khare S, Dillon M B D, Bachovchin D A, Mowen K, Baker D, Cravatt B F. *Nature*, **2010**, 468(7325): 790-795.
- [4] Reinhardt T, El Harraoui Y, Rothemann A, Jauch A T, Müller-Deubert S, Köllen M F, Risch T, Jacobs L J H C, Müller R, Traube F R, Docheva D, Zahler S, Riemer J, Bach N C, Sieber S A. *Angew. Chem. Int. Edit.*, **2025**, 64(18): e202421424.
- [5] Ziegler S, Pries V, Hedberg C, Waldmann H. *Angew. Chem. Int. Edit.*, **2013**, 52(10): 2744-2792.
- [6] Savitski M M, Reinhard F B M, Franken H, Werner T, Savitski M F, Eberhard D, Molina D M, Jafari R, Dovega R B, Klaeger S, Kuster B, Nordlund P, Bantscheff M, Drewes G. *Science*, **2014**, 346(6205): 1255784.
- [7] Meng Y Z, Wei T T, Zhang C L, Yu A Q, Liu Y, Xiao J Y, Wang C. *Chem. Sci.*, **2025**, 16(30): 13838-13846.
- [8] Zhang Y L, Cao Y F, Wu X, Chen Z H, Chen B W, Wang A H, Guo Y S, Chen W, Xue R L, Liu Z H, Li Y P, Li T, Cheng R Q, Zhou N, Li J, Liu Y, Zhao X H, Luo H X, Xu M, Li H H, Geng Y Q. *Nat. Commun.*, **2024**, 15(1): 8936-8952.
- [9] Almqvist H, Axelsson H, Jafari R, Dan C, Mateus A, Haraldsson M, Larsson A, Molina D M, Artursson P, Lundbäck T, Nordlund P. *Nat. Commun.*, **2016**, 7: 11040-11050.
- [10] Zhang X, Wang Q, Li Y, Ruan C, Wang S, Hu L, Ye M. *Anal. Chem.*, **2019**, 92(1): 1363-1371.
- [11] Zhang X L, Wang K Y, Wu S J, Ruan C F, Li K J, Wang Y, He Z, Liu X Y, Liua Z, Li G H, Hu L H, Ye M L. *Chem. Sci.*, **2022**, 13: 12403-12418.
- [12] Lyu J, Wang Y, Ruan C, Zhang X, Li K, Ye M. *Anal. Chim. Acta*, **2021**, 1168: 338612.
- [13] Van Vranken J G, Li J, Mitchell D C, Navarrete-Perea J, Gygi S P. *eLife*, **2021**, 10: e70784.
- [14] Bravo P, Bizzarri L, Steinbrunn D, Lohse J, Hirsch A K H, Mäser P, Rottmann M, Hahne H. *ACS Infectious Diseases*, **2024**, 10(12): 4073-4086.
- [15] Yu T, Wang Y, Wang K, Fang Z, Zhu H, Zhang X, Li Y, Ye M. *Nat. Commun.*, **2025**, 16(1): 10475.
- [16] Sun C P, Zhou J J, Yu Z L, Huo X K, Zhang J, Morisseau C, Hammock B D, Ma X C. *P Natl. Acad. Sci. USA*, **2022**, 119(9): e2118818119.
- [17] Yu Z L, Gao J, Zhang X L, Peng Y L, Wei W L, Xu J R, Li Z W, Wang C, Zhou M R, Tian X G, Feng L, Huo X K, Liu M, Ye M L, Guo D A, Ma X C. *Signal Transduct. Target. Ther.*, **2022**, 7(1): 71-83.
- [18] Wang Y X, Liu Y, Zhuang Y, Luo W N, Pan L, Gu L W, Wang J G, Liu Q B, Song S J. *Acta Pharm. Sin. B*, **2026**, 16(4): 2587-2592.
- [19] Bizzarri L, Steinbrunn D, Quennesson T, Lacour A, Bianchino G I, Bravo P, Chaignon P, Lohse J, Mäser P, Seemann M, Van Calenbergh S, Hirsch A K H, Hahne H. *ACS Infect. Dis.*, **2024**, 10(12): 4087-4102.
- [20] Ji Y, Morrow J P, MacRaid C A, Zhang H, Giannangelo C, Schittenhelm R B, Creek D J, Siddiqui G. *Int. J. Parasitol.: Drugs Drug Resist.*, **2025**, 29: 100626.
- [21] Hu H T, Li R Z, He K C, Wu L L, Li R R, Lu J Y, Tian R M, Zhang C H, He J Y, Chen Y L, Lai R G, Zhang J Q, Wu J Q, Zheng Y, He J L, Liu L, Chen X M, Pan H D. *Signal Transduct. Tar.*, **2025**, 10(1): 397-411.
- [22] Gu J, Li Y, Chen Q Y, Song Z Y, Qian Q F, Liang Y, Huang T N, Qiao L, Li X Y, Yu M, Liu M, Zhou J R, Shao Q, Xu X Z, Zeiser R, Lu L. *Cell*, **2026**, 189(2): 418-434.
- [23] Lv Q, Yang H Q, Wang D, Zhou H K, Wang J, Zhang Y S, Wu D P, Xie Y, Lv Y S, Hu L H, Wang J W. *J. Med.*

- Chem.*, **2024**, 67(8): 6854–6879.
- [24] Gao C L, Song J, Wang H, Shang Q, Guan X, Xu G, Wu J, Wu D, Zheng Y, Wu X, Zhao F, Liu X, Shi L, Pang T. *Acta Pharm. Sin. B*, **2025**, 15(1): 349–370.
- [25] Dans M G, Boulet C, Watson G M, Nguyen W, Dziekan J M, Evelyn C, Reaksudsan K, Mehra S, Razook Z, Geoghegan N D, Mlodzianoski M J, Goodman C D, Ling D B, Jonsdottir T K, Tong J S, Famodimu M T, Kristan M, Pollard H, Stewart L B, Brandner–Garrod L, Sutherland C J, Delves M J, Mcfadden G I, Barry A E, Crabb B S, de Koning–Ward T F, Rogers K L, Cowman A F, Tham W H, Sleebs B E, Gilson P R. *Nat. Commun.*, **2024**, 15(1): 5219–5231.
- [26] Tian M, Han C, Hu Y, Luan S, Tian X, Guo P, Li X, Sui L, Wang C, Ma X, Li D. *Bioorg. Chem.*, **2025**, 166: 109102.
- [27] Ruan C F, Ning W S, Liu Z, Zhang X L, Fang Z, Li Y A, Dang Y J, Xue Y, Ye M L. *ACS Chem. Biol.*, **2022**, 17(1): 252–262.
- [28] Li K J, Chen S J, Wang K Y, Wang Y, Xue L J, Ye Y Y, Fang Z, Lyu J W, Zhu H Y, Li Y N, Yu T, Yang F, Zhang X L, Guo S Q, Ruan C F, Zhou J H, Wang Q, Dong M M, Luo C, Ye M L. *Nat. Methods*, **2025**, 22(2): 278–282.

(责任编辑: 丁 岩)