

# 生物组织完整蛋白原位电离与空间组学质谱技术的进展和挑战

杨治渝<sup>1</sup>, 杨婷婷<sup>1</sup>, 王娜<sup>1,2</sup>, 岳磊<sup>1</sup>

(1. 湖南大学生物学院, 化学生物传感全国重点实验室, 湖南长沙 410082;

2. 湖南科技大学化学化工学院, 理论有机化学与功能分子教育部重点实验室, 湖南湘潭 411201)

**摘要:** 目前, 原位条件下生物组织中蛋白质的提取、电离、分离与结构解析仍处于探索阶段, 尚未实现高灵敏度、高通量分析, 尤其对组织中的低丰度蛋白、蛋白复合物和膜蛋白的分析面临巨大挑战。原位质谱技术能够在组织层面直接实现蛋白质的解吸附与离子化, 为揭示蛋白质空间分布及分子结构特征提供了独特途径, 但组织原位质谱分析仍面临离子化效率低、气相分离手段不足、序列和结构解析深度有限等技术瓶颈, 限制了完整蛋白质的高通量检测与精准表征。与传统液相色谱-质谱联用技术相比, 离子淌度(也称离子迁移谱, ion mobility spectrometry, IMS)与自上而下(top-down)质谱技术的整合为突破技术瓶颈提供了新思路, 在提升蛋白质检测通量、改善空间分辨率及提高蛋白质构象和修饰解析精度等方面展现出潜力。本文系统梳理了原位质谱在蛋白质组织原位离子化与空间表征领域的最新进展, 重点讨论了蛋白质原位提取、原位电离、气相分离及结构解析的关键问题, 并探讨了 IMS 与 top-down 技术在原位体系中的融合前景。旨在推动原位条件下高空间分辨率、高质量分辨率、高结构解析准确率的空间蛋白质组学技术发展, 为实现组织样品中完整蛋白质从少到多、从结构分析不精确到精确、从空间信息含糊到明确的原位质谱表征技术提供思路 and 方向。

**关键词:** 生物组织; 蛋白质原位电离; 蛋白质质谱分析; 质谱成像; top-down 蛋白质组学; 离子淌度(IMS); 空间蛋白质组学

中图分类号: O657.63

文献标志码: A

文章编号: 1004-2997(2026)03-0331-18

DOI: 10.7538/zpxb.2025.0169

CSTR: 32365.14.zpxb.2025.0169

## *In Situ* Mass Spectrometry for Spatial Proteomics of Intact Proteins in Tissues: Advances and Challenges

YANG Zhi-yu<sup>1</sup>, YANG Ting-ting<sup>1</sup>, WANG Na<sup>1,2</sup>, YUE Lei<sup>1</sup>

(1. State Key Laboratory of Chemo and Biosensing, College of Biology, Hunan University, Changsha 410082, China;

2. Key Laboratory of Theoretical Organic Chemistry and Function Molecule of Ministry of Education, School of Chemistry and Chemical Engineering, Hunan University of Science and Technology, Xiangtan 411201, China)

**Abstract:** Under *in situ* conditions in biological tissues, the extraction, ionization, separation, and structural analysis of proteins remain in an exploratory stage. To date, no analytical strategies have been established that can simultaneously achieve high sensitivity and high throughput under such conditions. Consequently, the analysis of proteins within complex tissue environments remains highly challenging, particularly for low-abundance proteins, protein complexes, and membrane proteins. By enabling the direct desorption and ionization of proteins from tissue sections, *in situ* mass

spectrometry (MS) provides a unique approach for investigating both their spatial distribution and molecular structural characteristics. Currently, *in situ* MS analysis of tissue samples still encounters several technical bottlenecks, including low ionization efficiency, limited gas-phase separation capabilities, and restricted depth of sequence and structural characterization. These limitations collectively hinder the high-throughput detection of intact proteins and reduce the precision of structural characterization, ultimately compromising analytical resolution and confidence in protein identification. In comparison with conventional liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) approaches, the recent integration of ion mobility spectrometry (IMS) with top-down MS has offered a promising strategy to overcome these limitations. This multidimensional analytical framework demonstrates significant potential for enhancing protein detection throughput, improving spatial resolution in tissue analyses, and enabling more precise characterization of protein conformations and post-translational modifications, while preserving spatial integrity. This review provided a systematic overview of recent advances in *in situ* MS for protein ionization and spatial characterization within tissue samples. It specifically focused on critical challenges in protein extraction, *in situ* ionization, gas-phase separation, and structural analysis, discussing current technical bottlenecks and methodological considerations. Furthermore, the review explored the prospects of integrating IMS with top-down MS in *in situ* workflows, discussing how this combination could augment analytical capabilities and enable the spatially resolved characterization of intact proteins. The purpose of this review was to promote the development of spatial proteomics under *in situ* conditions, emphasizing high spatial resolution, high mass resolution, and precise structural characterization. By systematically summarizing current methodologies and technical challenges, this review aims to provide conceptual guidance for advancing *in situ* MS approaches that enable the analysis of intact proteins in tissue samples across a wide range of abundances, facilitating more accurate structural characterization and yielding clear, well-defined spatial information. Ultimately, these insights are intended to support the future development of comprehensive spatial proteomics workflows.

**Key words:** biological tissues; *in situ* protein ionization; protein mass spectrometry; mass spectrometry imaging; top-down proteomics; ion mobility spectrometry (IMS); spatial proteomics

蛋白质是维系生命系统运作的核心分子,其结构可塑性与修饰变体多样性赋予其在细胞信号传导、能量代谢及基因调控等过程中精确而复杂的功能调节能力<sup>[1-2]</sup>。深入解析蛋白质的时空中动态变化特征,是理解生命活动分子机制的核心<sup>[3]</sup>。随着现代质谱技术的发展,基于自下而上(bottom-up)、自中而下(middle-down)、自上而下(top-down)的蛋白质解析策略已经逐步完善,蛋白质的结构特征分析与多种修饰组学分析技术已被广泛应用,并实现了多维度的高通量定量研究<sup>[4-5]</sup>。其中, bottom-up 作为当前蛋白质组学的主流方法,通过对复杂的提取蛋白样品进行酶切,生成可使用液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)分析的肽段混合物,进而实现高通量的蛋白质组学研究<sup>[6-7]</sup>。然而,该类传统 bottom-up 质谱分析

策略丢失了完整蛋白质变体信息以及蛋白质的高级结构和相互作用信息<sup>[8]</sup>。

此外,蛋白质的组织空间分布信息也非常重要。传统的免疫组织化学(immunohistochemistry, IHC)<sup>[9]</sup>与免疫荧光(immunofluorescence, IF)<sup>[10]</sup>技术可在组织水平实现蛋白质的空间定位,但受限于检测通量与结构解析能力,难以同时揭示蛋白质变体(proteforms)的修饰状态。原位质谱技术的兴起为直接在生物组织中获取蛋白质空间分布及分子组成和结构特征提供了新策略。基质辅助激光解吸电离(matrix-assisted laser desorption/ionization, MALDI)是目前广泛应用的原位质谱成像(mass spectrometry imaging, MSI)技术之一,可在组织水平高精度定位蛋白质的空间分布<sup>[11-12]</sup>。然而, MALDI 产生的蛋白离子通常以低电荷态

为主,难以实现高效碎裂并开展 top-down 鉴定,同时其高  $m/z$  离子对质谱仪性能提出更高要求,限制了完整蛋白在原位条件下的高通量与深度表征。相比之下,基于电喷雾原理的敞开式离子源技术可在常压下直接从组织表面提取蛋白质并产生多电荷离子,更适用于完整蛋白质的识别与结构解析,其主要形式包括解吸电喷雾电离(desorption electrospray ionization, DESI)<sup>[13]</sup>、纳升级解吸电喷雾电离(nanospray desorption electrospray ionization, nano-DESI)<sup>[14]</sup>和液滴电喷雾萃取分析(liquid extraction surface analysis, LESA)<sup>[15]</sup>,现已广泛应用于可溶性蛋白质及其复合物的原位研究。

敞开式离子源在一定程度上拓展了原位蛋白质质谱的应用边界,但在实现高灵敏度与深度结构解析方面仍面临重要限制。一方面,复杂组织基质与高丰度小分子带来的电离抑制显著降低了蛋白质的离子化效率,尤其限制了低丰度蛋白、膜蛋白以及大分子质量复合物的检测<sup>[16]</sup>。另一方面,原位环境中同时产生的多类离子缺乏有效分离,信号拥挤与离子竞争现象进一步削弱了 top-down 的碎裂覆盖度,阻碍了蛋白质及其翻译后修饰的精确解析<sup>[17]</sup>。离子淌度技术(也称离子迁移谱, ion mobility spectrometry, IMS)的引入为突破上述瓶颈提供了关键的技术支撑。IMS 通过基于气相构象差异的额外分离维度,可有效降低同分异构离子的复杂度,提升整体蛋白质检测通量并改善 top-down 的序列覆盖度。然而,对于完整蛋白质的原位分析而言,蛋白质构象保持、离子传输效率及碎裂深度等限制仍未完全突破,从而使高置信度解析复杂蛋白质及其

变体的能力受到掣肘。

完整蛋白质 top-down 分析的通用策略示于图 1。原位 top-down 分析虽能最大程度保留蛋白质构象、翻译后修饰及空间信息,但受限于分离效率与碎裂能力,其覆盖度有限;而基于组织匀浆或蛋白质富集的 top-down 流程虽然显著提升了检测通量,却不可避免地破坏天然构象、改变序列结构或丢失关键修饰与空间定位,形成“信息完整性”与“检测深度”难以兼得的技术矛盾。总的来说,原位 top-down 与提取样品 top-down 在蛋白质信息完整性与检测深度之间存在显著差异,难以同时实现。因此,发展能够在保持蛋白质天然状态下实现高通量、高覆盖度与高置信度解析的原位 top-down 技术,已成为推动空间蛋白质组学向结构分辨、异质体解析与疾病机制研究深入发展的核心需求。

本文将系统梳理原位蛋白质质谱在蛋白质原位提取、原位电离、气相分离与结构解析等方面的最新进展,重点探讨敞开式离子源技术的演化、IMS 与 top-down 分析的整合优势,以及 MSI 与显微切割技术在空间蛋白质组学中的应用潜力。通过对关键技术路径的综合分析,旨在为实现高空间分辨率与分子层面深度解析并重的空间蛋白质组学研究提供思路与参考。

## 1 原位蛋白质离子化方法及技术进展

### 1.1 原位蛋白质离子化的原理与技术挑战

原位蛋白质质谱分析旨在绕开传统的蛋白质提取、酶解及纯化流程,直接在组织或细胞微区实现蛋白质离子化,从而保留其空间分布和原生构象信息,其基本流程包括: 1) 在样品表面通



图 1 完整蛋白质 top-down 分析的通用策略

Fig. 1 General strategies for top-down analysis of intact proteins

过液桥、溶剂流或激光作用释放蛋白分子; 2) 利用软电离策略(如电喷雾或激光解吸)将凝聚相蛋白质转化为多电荷气相离子; 3) 气相蛋白离子进入质谱系统, 实现高通量、高灵敏度的质荷比检测和精准表征。敞开式电喷雾原位离子源技

术可在常压下直接从组织表面提取蛋白并产生多电荷离子, 适用于完整蛋白质的分子识别与结构解析, 为原位蛋白质组学提供了高效解决方案, 其主要形式包括 DESI、nano-DESI 和 LESA, 示于图 2。

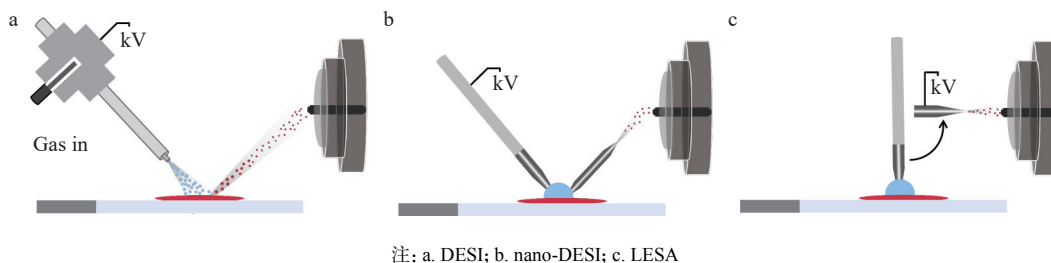


图 2 敞开式电喷雾原位离子源技术示意图

Fig. 2 Schematic illustrations of ambient electrospray-based *in situ* ionization sources

原位蛋白质质谱分析能够绕开传统提取和纯化流程, 实现空间维度上蛋白质的精准直接表征。然而, 蛋白质原位离子化仍存在挑战: 1) 组织基质中的高丰度小分子参与电荷竞争, 抑制蛋白质信号; 2) 低丰度蛋白质易被背景噪声掩盖, 进而导致其检测灵敏度和序列鉴定准确度显著降低; 3) 膜蛋白及非共价蛋白复合物因疏水性或结构不稳定而难以有效离子化; 4) 样品表面及微区溶剂条件的异质性会导致离子化效率波动<sup>[16,18-19]</sup>。总体而言, 提高低丰度蛋白、蛋白复合物以及膜蛋白在原位条件下的萃取效率以及离子化效率, 是当前原位蛋白质质谱技术亟需解决的核心问题。

## 1.2 敞开式原位离子化技术体系

### 1.2.1 解吸电喷雾电离技术

DESI 作为最早实现商品化应用的敞开式离子源技术, 由 Cooks 课题组于 2004 年提出, 并于 2005 年由 Prosolia 公司实现商品化, 2018 年 Waters 公司获得其独家许可权<sup>[13,20]</sup>。DESI 的核心原理是在常压条件下将带电溶剂微滴以一定角度高速喷射至样品表面, 通过动能碰撞和溶剂萃取释放分子, 再经电喷雾形成多电荷离子进入质谱系统。经过近 20 年的发展, DESI 已广泛应用于小分子、代谢物、脂类、肽及蛋白质等生物分子的原位检测<sup>[21]</sup>。在蛋白质研究中, 可通过优化 DESI 装置参数(喷雾角度、溶剂流速、喷雾距离、雾化气体压强及喷雾电压)<sup>[22]</sup>、溶剂组成<sup>[23]</sup>及基底材料<sup>[24]</sup>, 以提升离子化效率, 从而实现目标模式蛋白的表征。然而, DESI 在复杂生物组织中的蛋白质分析仍

面临多重限制: 低丰度及大分子蛋白质离子化效率低; 空间分辨率有限, 有研究报道, DESI 在脂质成像中可实现约 5  $\mu\text{m}$  的空间分辨率<sup>[25]</sup>, 但在完整蛋白成像中, 其有效空间分辨率通常约为 150~200  $\mu\text{m}$ ; 此外, 蛋白质复合物气相结构难以保持<sup>[16]</sup>。尽管如此, DESI 凭借操作简便、信号稳定及原位多分子检测能力, 仍是组织蛋白质原位分析中应用广泛的重要电喷雾离子化技术。

### 1.2.2 纳升级解吸电喷雾电离技术

为克服 DESI 在蛋白质原位分析中的离子化效率不足及空间分辨率有限等问题, Laskin 课题组<sup>[14]</sup>于 2010 年首次提出了 nano-DESI 技术。该技术以液桥为核心结构, 由 2 根毛细管形成稳定的微液体界面, 取代了传统 DESI 的喷雾撞击模式。蛋白分子经液桥溶剂高效萃取后, 直接由毛细管传输至电喷雾端完成离子化, 并最终经纳升电喷雾(nano-ESI)形式进入质谱分析。相比于 DESI, nano-DESI 通过纳升流速稳定维持液桥并形成更高效的 nano-ESI, 使蛋白分子在解吸后能在较低溶剂消耗下实现更高的离子化效率与更少的构象破坏; 同时, 其在解吸效率、喷雾稳定性及空间分辨率方面均显著提升, 可在常压条件下实现更温和且更可控的原位蛋白质精准检测。由于其尚未实现商品化, nano-DESI 主要应用于科研实验室。Laskin 课题组通过优化 nano 毛细管探针的几何结构(包括剪切力探针和微流控探针), 有效缩小了液桥尺寸并提升了采样精度; 同时结合可控溶剂输注与气动稳流系统, 进一步增强了液桥的稳定性和信号重现性; 并配合高精度自

动扫描平台,实现微区成像的高通量与可重复采集<sup>[26-28]</sup>。上述技术使 nano-DESI 获得更高的解吸-电离效率与信噪比,并实现 7  $\mu\text{m}$  空间分辨率的组织蛋白质成像<sup>[29]</sup>。此外,Cooper 等<sup>[30-35]</sup>将 nano-DESI 技术拓展至复杂蛋白体系,实现了膜蛋白及高分子质量蛋白复合物的原位检测与定量分析,为解析组织中蛋白质的空间分布及构象状态提供了重要工具。

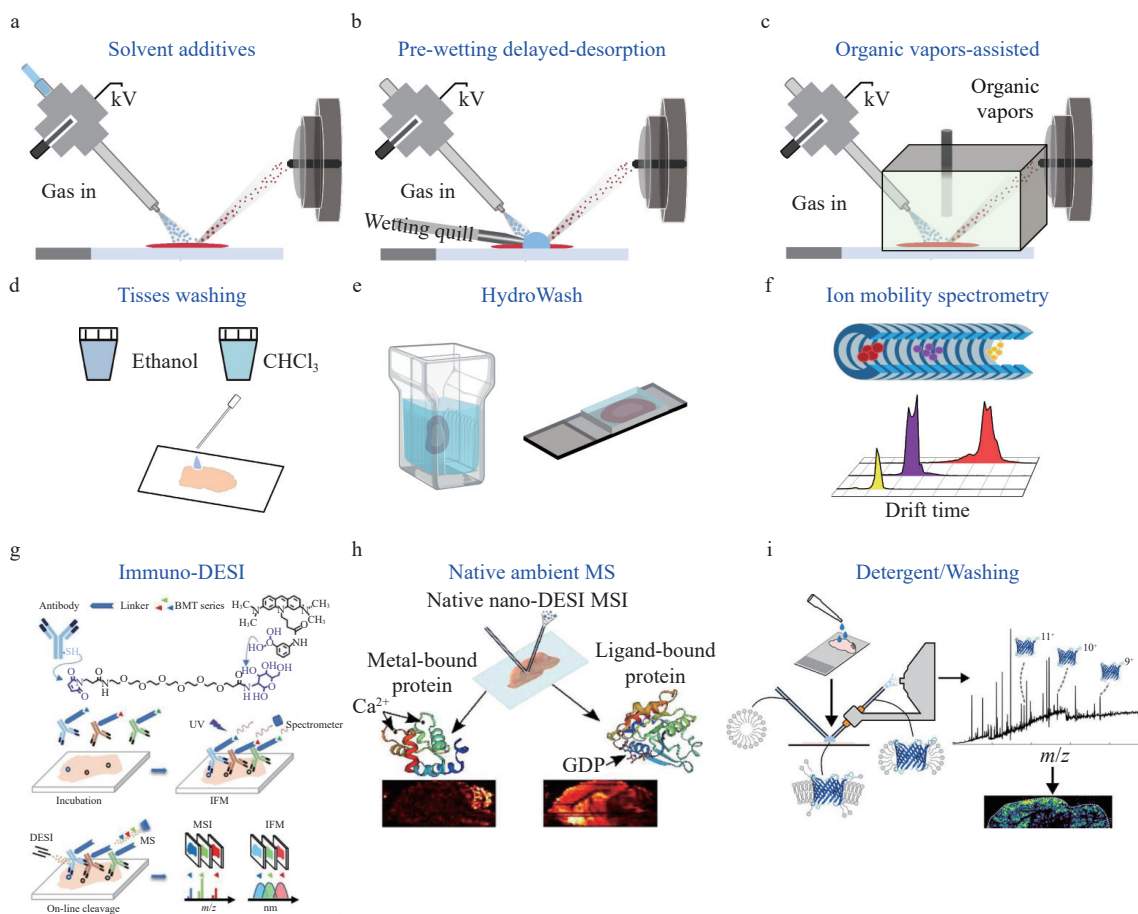
**1.2.3 液滴电喷雾萃取分析技术** 为实现对生物组织中高分子物质的温和、高效原位萃取, van Berkel 课题组<sup>[15]</sup>于 2009 年提出了 LESA 技术。该技术基于其先前开发的液体微结表面采样探针 (liquid microjunction surface sampling probe, LMJ-SSP) 技术,后续由 Advion 公司将其集成到自动化取样的商业化平台,从而提高了方法的稳定性与重复性<sup>[36]</sup>。LESA 通过在样品表面形成液体微结 (microjunction) 与组织充分接触,实现局部蛋白质溶出,并经纳升电喷雾离子化进入质谱检测。液体微结的较长接触时间 (数十秒至数分钟) 显著提升了蛋白质的溶出与离子化效率,尤其适用于大分子和低丰度蛋白质,从而获得高信噪比的完整蛋白质信号。尽管 LESA 的空间分辨率受液体微结体积限制 (约 1~2 mm),且单点分析耗时较长、通量有限<sup>[37]</sup>,其高效的蛋白离子化能力仍使得其对生物样本蛋白质的直接原位分析具有无可替代的优势;此外,结合 top-down 蛋白质组学策略,可获取完整蛋白质及其翻译后修饰信息,实现高信噪比的定量分析<sup>[38-39]</sup>。

### 1.3 蛋白质离子化效率的提升策略与应用

**1.3.1 低丰度蛋白质的增强离子化策略** 低丰度蛋白质信号难以获取是限制原位蛋白质质谱灵敏度的核心问题,而 DESI 的蛋白质解吸效率显著低于 nano-DESI 和 LESA,导致其在复杂组织中的检测能力受限。为提升 DESI 的蛋白质离子化效率,目前常用的解决方法有喷雾溶剂添加剂策略<sup>[40-43]</sup>、样本预湿润策略<sup>[44]</sup>以及气相溶剂调控策略<sup>[45]</sup>,示于图 3a~3c。为改善 DESI 分析蛋白质的灵敏度,Venter 课题组发现,在 DESI 喷雾溶剂中加入碳酸氢铵<sup>[40]</sup>、有机酸<sup>[41]</sup>以及氨基酸<sup>[42-43]</sup>等添加剂均能有效改善蛋白质的信噪比;然而,添加剂的使用可能导致蛋白质三维构象改变甚至非特异性展开,从而限制了其在完整蛋白质及复合物研究中的应用。在此基础上,Venter

课题组提出了样本预湿润策略,即采用两路流路协同工作:首先,通过预湿润流路在样品表面局部溶出蛋白质,延长蛋白质在液相中的停留时间以促进充分溶解;随后,由 DESI 主喷雾进行高效解吸与离子化,从而显著提升蛋白质离子的生成效率和质谱信号质量<sup>[44]</sup>。此外,通过在解吸氛围中通入乙酸乙酯等有机蒸气,可增强蛋白质的气相溶剂化与质子转移动力学,从而提高质谱信号强度,并实现分子质量大于 25 ku 蛋白质的有效电离,如碳酸酐酶 II (carbonic anhydrase II) 和牛血清白蛋白 (bovine serum albumin) 等蛋白质<sup>[45]</sup>。然而,对于蛋白质 DESI 分析而言,上述策略对模式蛋白质的信号增强效果更为显著;而在复杂组织样本中,该方法仍受基质背景干扰的明显限制,难以直接实现同等程度的灵敏度提升。

针对组织背景中小分子竞争电离与化学噪声对 DESI 蛋白质检测灵敏度的限制,研究主要从整体策略入手,通过协同降低背景干扰、优化局部微环境、实现特异性富集及增强谱图分离,系统地提升低丰度蛋白质的可检出性,具体方法包括组织洗涤策略、HydroWash 策略、IMS 气相分离策略以及基于抗体识别的 Immuno-DESI 技术,示于图 3d~3g。最早,Caprioli 课题组在组织蛋白质原位电离研究中提出,通过有机溶剂预先洗涤组织可有效去除脂类与小分子背景,从而显著降低化学噪声并提高蛋白质的可检测性<sup>[46]</sup>。这一策略随后被证实同样适用于 DESI 等敞开式常压原位电离技术的蛋白质成像<sup>[47]</sup>,但对高分子质量与低丰度蛋白质的信号提升仍较有限,且过度洗涤可能导致蛋白质离域。为克服上述不足,岳磊课题组提出了将组织洗涤与水凝胶调控结合的 HydroWash 策略,通过增强除盐与提升蛋白质溶解性来改善局域溶剂化环境,显著提高了 DESI 蛋白质解吸效率并获得了更高的空间成像分辨率<sup>[48]</sup>。与此同时,另一技术路线聚焦于靶向富集。Zare 课题组利用免疫识别实现了目标蛋白质锚定,有效减少了非特异性基质干扰并增强了低丰度蛋白质信号强度<sup>[49]</sup>,但该方法会丢失宝贵的蛋白质结构信息<sup>[50]</sup>。此外,IMS 技术通过在气相维度引入基于分子形状、尺寸与电荷的气相分离新维度,实现蛋白质与脂类等干扰分子的迁移时间区分,提高谱图解析度并降低复杂组织背景对 DESI 电离的影响<sup>[47,51]</sup>。这些策略在不同



注: a. 喷雾溶剂添加剂策略; b. 样本预湿润策略; c. 气相溶剂调控策略; d. 组织洗涤策略; e. HydroWash 策略; f. 离子淌度技术; g. Immuno-DESI 技术<sup>[49]</sup>; h. 非变性敞开式原位质谱技术<sup>[31]</sup>; i. 去垢剂/组织洗涤策略<sup>[35]</sup>

图 3 低丰度蛋白质、蛋白质复合物以及膜蛋白的原位质谱分析方法

Fig. 3 *In situ* mass spectrometry strategies for low-abundance proteins, protein complexes, and membrane proteins

层面协同作用,为复杂组织中低丰度蛋白质的原位检测提供了新的技术途径。

**1.3.2 蛋白质复合物的稳定提取与检测** 尽管 DESI 已能用于模式蛋白质复合物检测,但其高动能喷雾易造成碰撞解离,难以维持非变性条件,致使天然构象与弱相互作用难以稳定保留,因此尚未实现组织水平的可靠复合物原位分析。相较而言, nano-DESI 与 LESA 通过温和萃取和可控取样,更适配于非变性环境,使其成为当前组织内蛋白质复合物检测的优势途径。Cooper 课题组提出的非变性敞开式质谱(native ambient mass spectrometry, NAMS)技术(图 3h),将非变性质谱技术与 nano-DESI 以及 LESA 平台结合,通过优化溶剂体系与喷雾参数,成功实现了组织中低电荷蛋白质以及蛋白质复合物的检测<sup>[37]</sup>。该技术可在保持天然相互作用的状态下,

对组织中的蛋白质-小分子<sup>[32]</sup>、蛋白质-金属离子<sup>[31,52]</sup>以及蛋白质-蛋白质<sup>[30]</sup>等多种复合体系进行研究。值得强调的是,在此基础上引入红外激光去簇机制,可有效移除气相复合物离子束中的溶剂、盐或脂质簇,释放结构完整的复合物离子,实现分子质量最高达 50 ku 的完整蛋白质复合物离子的原位分析<sup>[53]</sup>。目前, NAMS 已实现对分子质量高达约 145 ku 的蛋白质复合物的稳定检测<sup>[54]</sup>。这一突破不仅推动了原位大分子复合体研究迈入更高质量区间,也为膜蛋白等难溶体系的原位构象解析提供了可实现的技术前景。

**1.3.3 膜蛋白的原位离子化与结构保持** 膜蛋白在细胞信号传导、物质转运及能量代谢等生理过程中发挥核心作用,尽管其仅占整体蛋白质组约 30%,却构成了约 60%的药物作用靶点<sup>[55]</sup>。因此,实现膜蛋白的精准定性与结构保持,对阐

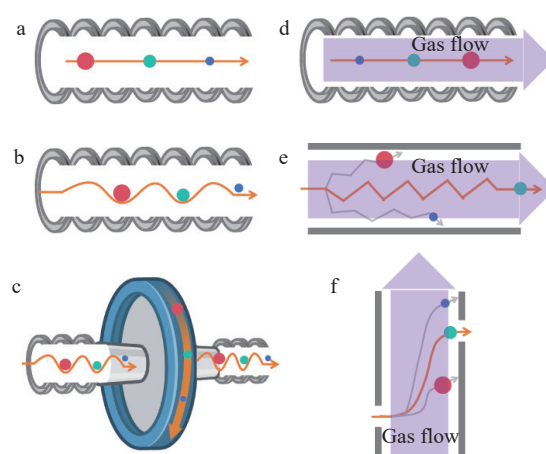
明细胞功能调控机制及发现药物靶点具有重要意义。然而,膜蛋白通常具有丰度低、疏水性强、异质性高及稳定性差等特性,导致其在质谱分析中面临解吸附和离子化困难的问题,尤其在原位分析条件下更具挑战性<sup>[56]</sup>。膜蛋白质谱的原位与非变性检测最早可追溯至 Robinson 课题组的探索(图 3i)。该团队系统评估了多类去垢剂对膜蛋白稳定性的影响,并优化了 DESI 离子传输条件,实现了从载玻片上对膜蛋白的直接喷雾检测,首次获得表达纯化膜蛋白及其复合物的可解析信号,证实了敞开式电喷雾平台用于膜蛋白分析的可行性与潜在拓展空间<sup>[57]</sup>。随后,Cooper 团队基于 nano-DESI 技术实现了晶状体组织中膜蛋白的原位检测,成功检测到水通道蛋白(aquaporin)的四聚体信号(分子质量约 113 ku),验证了 NAMS 技术在维持蛋白质天然构象方面的独特优势<sup>[34]</sup>。在此基础上,进一步提出了适用于组织样本的温和洗涤策略(醋酸铵洗涤),可在不破坏膜蛋白复合结构的前提下实现空间成像,从而拓展了膜蛋白原位质谱分析的适用范围<sup>[35]</sup>。最近,Cooper 团队成功利用 LESA 技术实现了从培养皿中的细菌直接提取并分析膜蛋白<sup>[58]</sup>。总体而言,膜蛋白原位分析虽面临诸多挑战,但通过对 nano-DESI 探针、溶剂及样本前处理策略的优化,可在保持膜蛋白天然构象下实现高灵敏度检测,为膜系统大分子蛋白解析提供可能。

## 2 蛋白质气相分离与结构鉴定

### 2.1 离子淌度技术原理与进展

IMS 是一种基于离子在气相中迁移率差异实现分离的技术,可在质谱分析中引入第三维分离维度,从而有效区分质荷比相近但构象或电荷状态不同的离子。目前,IMS 类型包括传统漂移管离子淌度(DTIMS)、行波离子淌度(TWIMS)及其循环形式(Cyclic IMS)、捕集离子淌度(TIMs)、高场非对称离子淌度(FAIMS)和差分离子淌度(DMA),其基本工作原理示于图 4<sup>[59]</sup>。IMS 的引入不仅可以提高蛋白质信噪比,还能够显著提升复杂生物体系中蛋白质及其复合物的分离效率和结构表征深度,为解析蛋白质构象动态、非共价相互作用及翻译后修饰提供了重要手段<sup>[60]</sup>。目前,适用于原位分析的主要 IMS 技术包括 TWIMS<sup>[61-62]</sup>、Cyclic IMS<sup>[63]</sup>以及 FAIMS<sup>[64-65]</sup>。随

着这些技术在空间分辨率、离子利用率及构象识别精度方面的不断提升,显著改善了组织样本中蛋白质及其复合物的原位分离效率与构象保持能力。通过对气相分离条件与离子传输参数的优化,有效提升了信噪比与构象可视化质量,同时提高了可检测的蛋白质数量。原位电离-IMS 技术在不同组织样本中的蛋白检测通量情况列于表 1,可见,鉴定的蛋白质数量显著提升。



注: a. DTIMS; b. TWIMS; c. Cyclic IMS; d. TIMS; e. FAIMS; f. DMA

图 4 离子淌度技术示意图

Fig. 4 Schematic overviews of ion mobility spectrometry

### 2.2 离子淌度技术在蛋白质原位质谱分析中的应用

TWIMS 利用移动电势波驱动离子在填充惰性气体的漂移管内迁移,通过离子与气体分子碰撞频率差异实现分离,因其装置结构紧凑,适合与质谱仪联用。2018 年, Towers 课题组报道了 TWIMS 与 DESI 离子源耦合检测到小鼠肝组织切片中 6 种完整蛋白质和 6 种肽段<sup>[47]</sup>。为进一步拓展对更大分子质量完整蛋白质及其复合物的原位解析, Cooper 课题组将 LESA 成像与 TWIMS 联用,在肝脏组织中捕获到血红蛋白的特征质谱信号(分子式  $(\alpha\beta^{2H})_2$ ,  $m/z$  3 970, 电荷数  $16^+$ , 分子质量 64 414 u)。此外,该团队以细胞色素 c、肌红蛋白及泛素等标准蛋白质为参照,构建了蛋白质碰撞截面积(CCS)的校准模型,并在不同电势波波幅条件下获得相应的校准公式,实现了对组织样本中蛋白质 CCS 值的精确计算<sup>[37]</sup>。该团队还发现,非变性质谱技术可最大程度保持

表1 原位电离-IMS 技术在不同组织样本中的蛋白质检测通量概览

Table 1 Overview of protein detection throughput achieved by *in situ* ionization-IMS across different tissue samples

离子源 Ion source	离子淌度 IMS	蛋白质数量 Number of proteins				Top-down鉴定 Top-down identification	参考文献 Reference
		脑 Brain	肾脏 Kidney	肝脏 Liver	睾丸 Testis		
LESA	TWIMS	11	6	6	-	No	[37,66]
	Cyclic	44	81	-	-	No	[67]
	FAIMS	34	59	-	75	Yes	[68-70]
LMJ-SSP	FAIMS	84	-	-	-	Yes	[68]
DESI	TWIMS	-	-	12	-	No	[47]
	FAIMS	16	11	-	-	Yes	[51]

组织中蛋白质及其复合物的类天然构象,而 CCS 数据则能够直观表征蛋白质构象状态的变化<sup>[66]</sup>。

尽管 IMS 技术可通过气相分离有效降低组织基质引发的背景干扰,但现有 TWIMS 的分辨率有限,难以进一步提升蛋白质的检测通量。为突破这一瓶颈,Green 等团队于 2019 年提出 Cyclic IMS 技术。该技术在传统 TWIMS 基础上引入环形迁移通道,通过多圈迁移实现分辨率的显著提升,目前其离子迁移分辨率可达到  $>750$ <sup>[63]</sup>。Cooper 课题组率先提出将 LESAs 与 Cyclic IMS 联用,用于组织样本中完整蛋白质的高通量检测<sup>[67]</sup>。研究表明,Cyclic IMS 可显著提升蛋白质的检出通量与分离能力。在小鼠脑组织样本中,未开启 IMS 时仅能检出 16 种蛋白质;采用单通道 Cyclic IMS 经提取感兴趣区域 (ROI) 的谱图后,可检出 30 种蛋白质;若进一步结合四极杆低质量截止策略(限制  $m/z$  600 以下的离子通过),检出数量最高可达 44 种。在大鼠肾组织样本中,未使用 IMS 时仅检测出 19 种蛋白质;开启 Cyclic IMS 可额外获得 60 种新的蛋白质,总数量增至 81 种,同时可有效消除  $\alpha/\beta$ -珠蛋白链等高丰度离子的干扰。随着循环次数的增加(2、3 次循环),离子淌度分辨率进一步提高,在窄  $m/z$  区间内,肾脏组织蛋白质的检出数量分别扩展至 37 种与 54 种,使低丰度蛋白质在复杂背景中得到更清晰的分离与解析。总体而言,高分辨率 Cyclic IMS 技术显著增强了组织原位完整蛋白质的检测深度与分辨能力,被认为是推动高通量 top-down MSI 的关键发展方向。

FAIMS 利用离子在高低电场下的迁移率差异,通过施加差分补偿电压实现目标离子的选择

性传输,可实时分离并去除背景干扰离子,从而在复杂组织基质中显著净化信号并提升目标蛋白质的检测灵敏度。Eberlin 课题组基于 DESI-高场非对称离子淌度(FAIMS)平台,建立了可实现组织中完整蛋白质原位成像的离子淌度质谱方法。该技术结合原位 top-down 分析策略,在小鼠肾脏和脑组织以及人类卵巢和乳腺组织中分别检出 11、16、14 和 16 种蛋白质及其变体,验证了 DESI-FAIMS 技术在组织蛋白空间分布解析及原位蛋白质组学研究中的可行性与应用潜力。同时,Eberlin 课题组以  $\alpha$ -珠蛋白为例,使用 193 nm 紫外光解离(UVPD)技术可将原位分析的序列覆盖率从碰撞诱导解离(CID)的 16% 提升至 32%,凸显了 UVPD 技术在复杂组织基质中实现高覆盖率蛋白质鉴定的优势<sup>[51]</sup>。为进一步提升组织蛋白质的萃取效率,该团队引入 LMJ-SSP 技术,尽管该技术的空间分辨率相较于 DESI 技术有所下降,但在小鼠脑组织样本中可检测到更多蛋白质及其变体,联用 FAIMS 后,蛋白质变体的检出数量由 67 种增加至 84 种<sup>[68]</sup>。Cooper 课题组在液滴电喷雾萃取-高场非对称离子淌度(LESA-FAIMS)平台上开展了一系列系统优化工作,有效提升了原位蛋白质成像的检测通量。该团队的早期研究首次将 LESAs 与 FAIMS 耦合,显著改善了蛋白质检测的信噪比,实现了组织原位的 top-down 蛋白质分析,并在小鼠脑组织中检测到 29 种蛋白质<sup>[69]</sup>。随后,通过启用 FAIMS 的“固定电场传输模式(static transmission)”功能,将小鼠脑组织中可检测的蛋白质数量从 15 种提升至 34 种<sup>[70]</sup>。为进一步拓展检测深度,该课题组引入“多步固定电

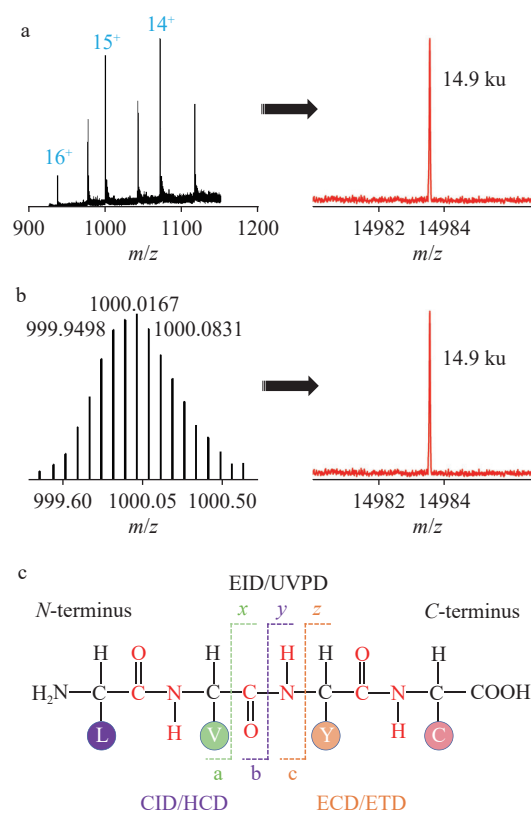
场传输模式(multi-step static)”FAIMS策略,相较于无FAIMS条件,蛋白质检出数量提升6~16倍,同时显著降低了对预处理(如去血红蛋白洗涤)的依赖<sup>[71]</sup>。

总体而言,IMS技术的引入为原位蛋白质质谱分析带来了突破性进展,尤其在提升蛋白检测通量及复杂组织样本中蛋白构象解析方面展现出质的飞跃。通过气相分离,IMS能够有效减少组织基质干扰,提高信噪比,使低丰度蛋白质和蛋白质复合物的分离与表征成为可能。然而,目前的IMS技术仍处于初步探索阶段,尚存在诸多局限性。首先,大分子蛋白质在气相中的分离难度较大,低分辨率与高分辨率IMS在蛋白质分离能力上存在显著差距,反映出当前仪器在复杂蛋白质气相分离方面仍存在性能瓶颈。其次,IMS的分离条件直接影响离子传输效率,分离度与检测灵敏度之间存在一定的权衡关系,在高分辨率条件下可能伴随离子传输效率下降,从而影响低丰度蛋白质的检测。最后,尽管IMS的应用能够提高蛋白质的原位检测通量,但目前可检测的蛋白数量相对有限,相较于传统蛋白质组学的覆盖水平仍有较大差距。综上,未来原位蛋白质组学的发展需要在空间分辨率与检测通量之间寻求平衡,同时有望通过多种分离策略的协同联动,进一步提升蛋白质组的覆盖度和分析效率。

### 2.3 Top-down 蛋白质结构表征策略

**2.3.1 分析原理与关键技术** 完整蛋白质的组织原位质谱分析面临巨大挑战,主要原因在于其分子质量较大且携带多重电荷,导致精准识别与高效去卷积鉴定的难度显著增加。为攻克这一技术难题,目前常用的策略包括同位素分布去卷积方法、电荷态去卷积方法<sup>[72]</sup>以及直接针对完整蛋白质的top-down分析策略方法,示于图5。基于同位素分布或电荷态的去卷积方法虽能实现完整蛋白质分子质量的精准测定,但无法提供蛋白质的详细序列与结构信息。相比之下,top-down技术通过直接对完整蛋白质离子进行碎裂与检测,可在单分子水平解析蛋白质的氨基酸序列信息、翻译后修饰(PMTs)及异构体结构,从而避免了底物酶解所造成的序列信息丢失<sup>[73-75]</sup>。Top-down分析策略的核心技术包括高效的蛋白质离子化、精准离子选择以及高效碎裂检测。在离子碎裂方式上,CID<sup>[76]</sup>和高能碰撞诱导解离

(higher-energy collisional dissociation, HCD)<sup>[77]</sup>是目前应用最广泛的能量驱动型碎裂模式。二者均通过带电离子与惰性气体碰撞,将振动能量转化为肽键断裂能,产生b/y型离子;该类碎裂模式具有碎片离子丰富且可控的优势,但在分析高修饰蛋白质时,可能导致修饰基团丢失,且碰撞过程会造成蛋白质结构和相互作用信息的丢失。电子俘获解离(electron capture dissociation, ECD)<sup>[78]</sup>和电子转移解离(electron transfer dissociation, ETD)<sup>[79]</sup>则通过向多价正离子转移低能电子使c/z型离子断裂,同时保留弱键修饰(如磷酸化、乙酰化),因此在解析修饰蛋白质及复合物方面具有独特优势。近年来发展的混合模式电子转移高能碰撞解离(ETHcD)结合了ETD与HCD的优点,兼具高序列覆盖率与修饰保真性<sup>[80]</sup>,在复杂糖蛋白鉴定中表现优异<sup>[81-83]</sup>。此外,电子激发解离(electron ionization dissociation, EID)通过高能电子激发蛋白质骨架断裂,主要产生a/x型离子并伴随部分c/z型离子,可在保留蛋



注: a. 电荷去卷积法; b. 同位素去卷积法; c. top-down

图5 组织完整蛋白质的分子识别方法

Fig. 5 Molecular identification strategies for intact proteins in tissue

白质翻译后修饰信息的同时,提供丰富的序列信息,适用于大分子质量、多修饰蛋白质的 top-down 分析<sup>[84]</sup>。

除电子驱动的碎裂模式外,高能光子驱动的 UVPD 为 top-down 蛋白质分析提供了独特优势。随着先进光源技术的发展,尤其是国产极紫外自由电子激光装置(大连相干光源, DCLS)的稳定运行,基于极紫外波段(50~150 nm)的 UVPD 已成为实现高效 top-down 蛋白质分析的重要手段<sup>[85]</sup>。该技术通过高能紫外光子直接激发化学键断裂,可产生丰富的 a/x、b/y、c/z 型离子,从而提升序列覆盖率与结构分辨能力<sup>[86]</sup>。与传统紫外光解离技术相比, DCLS 平台的 UVPD 在保留蛋白质高级结构和弱相互作用的同时,实现了高效碎裂,显著增强了原位完整蛋白的识别能力。

在实际应用方面,王方军团队依托该平台构建了基于 UVPD 的 top-down 质谱分析体系,将光解离策略引入复杂生物体系,为高信息量蛋白质碎片离子的生成提供了关键的技术支撑<sup>[87]</sup>。在方法学应用方面,该团队开发了用于细胞内紫外光诱导裂解 top-down 质谱策略(in-cell UVPD top-down MS),实现了细胞内蛋白质在天然环境下的序列解析及构象异质性分析,揭示了钙调蛋白在细胞内多构象共存及其 Ca<sup>2+</sup>结合相关调控特征<sup>[88]</sup>。此外,该团队利用时间分辨 UVPD 质谱技术,系统研究了基因突变对蛋白质稳定性及展开动力学的影响,展现了 UVPD 在蛋白质结构变化与构象转变过程中的独特优势<sup>[89]</sup>。这些工作表明,基于国产光源的 UVPD-top-down 技术在完整蛋白质序列解析、构象异质性研究及结构变化分析方面具有重要的应用潜力,为复杂生物体系中蛋白质的原位分析提供了核心技术支撑。

**2.3.2 数据解析与应用拓展** Top-down 蛋白质质谱在解析完整蛋白质结构时,会产生极高复杂度的质谱数据,需要借助专用算法和数据库进行精确匹配与注释,其核心在于碎裂离子识别、谱图匹配以及修饰位点定位。针对 top-down 分析和数据库搜索,已开发出多种工具,包括 ProSightPC<sup>[90]</sup>(Thermo Scientific)、SpectroGene<sup>[91]</sup>、TopPIC<sup>[92]</sup>、pTop<sup>[93]</sup>、TopMG<sup>[94]</sup>、MSPathFinder<sup>[95]</sup>以及 MASH Explorer<sup>[96]</sup>。这些工具均基于理论碎裂谱进行高精度匹配,并结合同位素峰识别,实现蛋白质序列、异构体及翻译后修饰的高置信度注释,为

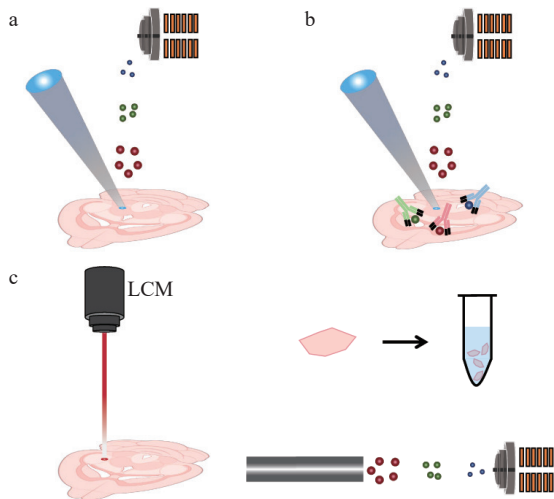
top-down 数据的系统解析提供了有力支持。

在应用层面, top-down 技术正从模式蛋白质分析逐步拓展至复杂生物体系,并通过与原位电离及 IMS 等技术联用,实现对组织中完整蛋白质的空间分布与结构特征的直接解析。Cooper 课题组采用液滴电喷雾萃取质谱(LESA-MS)技术,对健康肝组织与非酒精性脂肪肝组织进行分析,在全扫描谱图中共检测到约 15~25 个差异蛋白质信号峰,其中,通过 CID 以及 ETD 技术成功鉴定了 FABP1 蛋白及其变体、 $\alpha$ -血红蛋白和分子质量为 10 ku 的热休克蛋白<sup>[38]</sup>。此外,该课题组对多种革兰阳性与革兰阴性菌落进行分析,共鉴定到 39 种蛋白质,其中有 16 种是此前未曾通过任何其他实验技术观察到的新蛋白质<sup>[69]</sup>。nano-DESI 平台在原位蛋白质分析领域应用广泛,基于 HCD 的碎裂策略可同时鉴定组织中的可溶性蛋白和膜蛋白<sup>[30,34-35]</sup>。近期, Laskin 课题组将 nano-DESI 与 top-down 技术联用,成功绘制了小鼠脑组织样本中 44 种蛋白质及其变体的空间分布图谱<sup>[33]</sup>。除单一的 HCD 碎裂技术外,多种碎裂模式与辅助技术的结合,可实现组织中蛋白质的高效精准鉴定。例如,将 HCD 与红外激光结合,能够有效去除气相复合物中的溶剂、盐或脂质簇,释放结构完整的蛋白质复合物,进而提高鉴定效率<sup>[53]</sup>。通过引入质子转移化学修饰(PTCR)技术降低蛋白质离子的电荷态,可在 HCD 模式下成功鉴定分子质量高达 145 ku 的大分子蛋白质<sup>[54]</sup>。在 DESI 平台上, CID 技术可用于蛋白质结构解析,而引入 UVPD 碎裂模式则能够显著提升蛋白质鉴定效率和序列覆盖率。以  $\alpha$ -珠蛋白为例,在原位分析下, UVPD 的序列覆盖率可从 CID 的 16%提升至 32%<sup>[51]</sup>。目前, top-down 技术在蛋白质鉴定及疾病相关蛋白质的修饰分析方面展现出广阔的应用潜力。未来,通过与空间 MSI 与多维分离技术相结合,有望实现对组织微环境中蛋白质结构、修饰及功能状态的系统性解析,为蛋白质组学研究及疾病病理学探究提供更全面的分子层面证据。

### 3 原位蛋白质质谱向空间蛋白质组学的探索

Top-down 在蛋白质序列和修饰解析方面具有显著优势,但在组织水平的原位分析中,要兼

顾空间分辨率、检测通量与结构信息完整性,仍面临诸多技术难题。如何将 top-down 技术有机整合至空间蛋白质组学中,实现组织微环境中蛋白质的高通量精准鉴定,仍然是一个亟待解决的问题。目前主要的技术方法包括 MSI、抗体标记的质谱流式细胞术(IMC)与多路复用离子束成像(MIBI)的靶向 MSI 技术、以及基于激光显微切割(LCM)技术的蛋白质组学策略,示于图 6。



注: a. 质谱成像; b. 抗体标记法 (IMC/MIBI); c. 激光显微切割-蛋白质组学

图 6 基于质谱技术的空间蛋白质组学方法

Fig. 6 Mass spectrometry-based strategies for spatial proteomics

MSI 技术为空间蛋白质组学奠定了基础,其优势在于无需标记即可直接呈现组织中蛋白质的空间分布特征。然而,MSI 当前仍受限于检测通量低、蛋白质序列与结构解析不足等问题,难以实现大规模、高覆盖度的空间蛋白质组图谱构建。Laskin 课题组通过将 nano-DESI 与 top-down 技术相结合,成功绘制了小鼠脑组织中 44 种蛋白质及其变体的空间分布图谱,验证了原位完整蛋白质检测在组织水平的可行性<sup>[33]</sup>。在此基础上,Cooper 课题组引入高分辨 FAIMS 技术,将组织中可检测的蛋白质数量扩展至近 1 000 种,但未提供对应的 top-down 鉴定结果<sup>[97]</sup>。此外,Kelleher 课题组提出的 PiMS 技术,通过电荷检测质谱技术实现蛋白质识别,虽可在肿瘤组织中检测近 1 000 种蛋白质及其变体,但实际通过 top-down 鉴定的蛋白质仅为 73 种,最大分子质量为 54 ku<sup>[98]</sup>。尽管现有原位质谱体系可捕获近千种蛋白质离子,但 top-down 鉴定深度仍不

足以支撑百至千级蛋白质的空间覆盖,技术的进一步提升仍依赖于电离效率、信噪比以及碎裂与鉴定算法的协同优化。为突破瓶颈,基于抗体识别的靶向蛋白质成像技术近年来发展迅速,包括 IMC<sup>[99]</sup>与 MIBI 技术<sup>[100]</sup>。二者可实现上百种蛋白质的靶向检测,并具备亚细胞至单细胞级的空间分辨率,已在肿瘤微环境及多免疫细胞群共存区域的异质性分析中展现出强大的应用潜力<sup>[101]</sup>,其核心局限在于无法提供蛋白质高阶结构信息,难以区分蛋白质变体及 PTMs 状态,因此更适合作为高通量的表型映射工具,而非用于解析蛋白质构象及功能调控机制。

目前,实现真正意义上的空间蛋白质组研究最具应用潜力的策略是 LCM 与深度蛋白质组学的联用。LCM 是一种先进的组织分离技术,其结合激光切割与图像分析,能够快速、精确地从组织样本中选择和定位 ROI,实现单细胞或微区级别的富集,同时保留组织的空间信息,避免手工处理导致的样本污染<sup>[102]</sup>。早在 1996 年,Emmert-Buck 课题组报道了 LCM 方法<sup>[103]</sup>。该方法将热塑性转膜贴于组织切片上,在显微镜下定位靶细胞,用红外脉冲激光加热膜,使膜融化并粘附细胞,再将膜与细胞一起移除,从而实现对指定细胞的快速、精确采集,以用于后续分子分析。现阶段 LCM 已成为具备亚微米分辨率的通用细胞富集平台,可对石蜡包埋组织<sup>[104]</sup>及新鲜冷冻组织<sup>[105]</sup>进行精确的微区采样,并结合传统 bottom-up 蛋白质组学技术实现高通量蛋白质检测。在此基础上,田瑞军课题组围绕 LCM 平台,系统构建了一系列面向组织微区的 bottom-up 蛋白质组学样本制备与分析流程,显著提升了组织尺度下低量、异质样本的蛋白质检测深度与稳定性。其早期提出的 SISPROT 策略,通过针对组织微区样本的高效蛋白富集与损失控制,实现了从面积仅约 0.1 mm<sup>2</sup> 的肿瘤组织切片中开展可靠的蛋白质组分析,并在不同细胞类型(包括癌细胞、上皮细胞、淋巴细胞和平滑肌细胞)中分别鉴定出约 500~2 000 种蛋白质,为组织微环境中细胞类型特异性蛋白表达研究奠定了方法学基础<sup>[106]</sup>。在上述研究的基础上,该课题组进一步将 LCM 微区采样流程与免疫组织化学染色及 DIA 数据采集策略相结合,在约 0.2 mm<sup>2</sup> 的肝细胞癌组织微区中实现了 3 500 余种蛋白质的鉴

定;同时,在 $5\text{ mm}^2$ 组织区域尺度内成功区分癌细胞与癌相关成纤维细胞,均获得6 000余种蛋白质的定量信息,从而在细胞类型分辨率层面精准描绘了肿瘤组织的空间蛋白质组特征<sup>[107]</sup>。此外,该团队基于 spin-tip 的区域化样本处理策略,在小鼠脑组织中实现了高空间准确度的微区采样与处理,显著提升了低丰度糖蛋白的检测灵敏度,并获得其在组织中的空间分布信息,进一步拓展了 bottom-up 空间蛋白质组学在复杂修饰蛋白研究中的应用边界<sup>[108]</sup>。

以上研究基于 bottom-up 技术路线,在提升微区样本检测深度的同时,也暴露了其在空间构象保持和结构层级解析方面的局限性。具体而言, bottom-up 方法依赖酶解步骤,在样本处理中难以保留蛋白的天然构象、跨结构域相互作用、复合物装配状态及完整 PTMs 组合,从而限制了蛋白异质体在整体层面的准确定义。因此,该方法更适用于高通量的蛋白质表达筛查,而难以支撑对疾病关键蛋白质结构异质性、构象变化及修饰组合等深层特征的系统性解析。相比之下, top-down 策略通过直接分析完整蛋白质分子,在获取序列信息的同时,能够最大程度保留蛋白质的整体构象特征、复合物装配信息及 PTMs 的共现关系,从而在构象保持和修饰组合重建方面有效弥补了 bottom-up 方法的局限性。因此, top-down 方法为蛋白质变体的精确解析及构象层级研究提供了关键技术支撑。在此背景下,张丽华课题组将组织蛋白 MSI 与激光捕获显微切割联合 top-down(LCM-top-down)质谱分析相结合,并应用于阿尔茨海默病模型小鼠脑组织,实现了区域特异性蛋白质变体的空间注释,显著提升了组织中完整蛋白质及其变体的可鉴定深度<sup>[109]</sup>。然而,该策略仍受限于 top-down 质谱的通量与解析能力,尤其是在大分子蛋白质及复杂修饰组合的高效解析方面仍存在挑战。基于这一需求,周默为团队<sup>[110]</sup>构建了纳升微流控微量样本制备平台(nanoPOTS),并将其与 top-down 流程深度耦合,使微量样本条件下的完整蛋白质鉴定能力得到显著提升。在约200个细胞量级的样本中,完整蛋白质及其变体的鉴定数量由493种增加至700种,新增条目主要集中在核蛋白及其变体类别。这一结果表明,在保持蛋白质整体结构与修饰组合的前提下, top-down 结合微量制样平台能

够更加有效地捕获难检类别的完整蛋白质,进一步凸显了其在微量组织或细胞样本结构解析中的方法学优势。尽管当前基于 LCM 的流程仍受到样本量受限导致的灵敏度不足、组织微区判定依赖经验等因素的影响<sup>[111]</sup>,但随着样本利用率的提升以及 top-down 在完整蛋白质鉴定深度上的不断增强, LCM-top-down 正逐步展现出实现空间蛋白质组学深度检测的关键潜力。与此相对,原位 top-down 技术无需组织酶解和物理转移即可直接获取蛋白质的空间定位、天然构象与修饰共存信息,在构建真正意义上的空间结构蛋白质组学方面具有不可替代的优势。

随着 LCM-top-down 技术在结构解析深度上的进一步拓展,以及原位 top-down 技术在空间精准度与构象保持能力上的持续突破,二者的协同发展有望推动空间蛋白质组学向高分辨率、结构保真的方向迈进,为复杂疾病组织微环境的精细解析与临床转化研究提供更加可靠且具备转化潜力的技术支撑。

#### 4 总结与展望

原位质谱技术为揭示组织蛋白质的空间分布与结构多样性提供了独特途径,但仍面临电离效率有限,低丰度蛋白质、蛋白质复合物及膜蛋白检出率偏低,气相分离维度受限以及完整蛋白质解析深度不足等多重挑战。近年来,围绕减少组织基质噪声干扰、微区采样、目标蛋白质局域富集、IMS 气相分离以及 top-down 与 native MS 结构解析等方向的一系列技术发展,在一定程度上改善了组织完整蛋白质的原位检测灵敏度与构象保持能力。然而,这些改进尚不足以解决核心难题:低丰度蛋白质、复合物及膜蛋白的空间特征仍难以全面捕获,复杂组织背景下的信号抑制与蛋白质构象不稳定依旧限制了原位完整蛋白质的深度解析。同时,现有的样本处理方法和仪器性能仍无法完全满足 top-down 对高分辨率、宽动态范围和深度碎裂能力的需求,使完整蛋白质结构解析的广度与深度受限。

未来需要构建从组织微区温和提取、软电离、IMS 气相分离到 top-down 结构解析的完整连续技术链,实现 IMS-top-down-MSI 的深度耦合,形成贯穿“原位-分离-结构”的三维分析框架。在这一体系中, native MS 技术将成为突破

组织完整蛋白质空间结构解析的关键环节,其能够保持蛋白质天然构象、复合物装配状态及翻译后修饰共存关系,对于提升组织层面蛋白质状态判读的可信度具有不可替代的意义。然而,由于组织环境复杂、离子生成难以温和控制、传输与碎裂阶段易造成构象扰动, native MS 技术在组织原位 IMS-top-down 的实际应用仍十分有限,构象保持、离子传输效率与碎裂深度之间的平衡尚未有效建立。

在更宏观层面, top-down 技术在复杂组织中的应用仍面临方法学与仪器的双重障碍。在方法学方面,低丰度蛋白质、膜蛋白及复合物的空间解析与构象保持难以兼顾,而纯化、原位电离及气相分离过程均易破坏蛋白质的天然状态。在仪器方面,国产质谱仪在完整蛋白质分析能力上仍与国际高端设备存在差距,主要体现在电离与离子传输效率不足、多电荷处理能力有限以及谱图解析深度不够等方面。尽管国产质谱仪在小型化和微生物分析领域已取得突破,但在大分子 top-down、IMS 集成、长序列蛋白质分辨率及高通量检测能力方面仍需持续攻关。

总体来看,随着方法学与仪器性能的协同提升、微区采样策略的优化以及智能化数据处理技术的发展,基于 native MS 技术的原位 top-down 蛋白质组学有望在保持蛋白质天然构象和修饰信息共存关系的前提下,实现低丰度蛋白质、复合物及膜蛋白的高分辨率空间可视化,为肿瘤、感染及中枢神经系统疾病的机制研究与生物标志物开发提供可落地、可拓展的结构层面技术支撑。

#### 参考文献:

- [1] PAPASERGI-SCOTT M M, PEREZ-HERNANDEZ G, BATEBI H, GAO Y, ESKICI G, SEVEN A B, PANOVA O, HILGER D, CASIRAGHI M, HE F, MAUL L, GMEINER P, KOBILKA B K, HILDEBRAND P W, SKINIOTIS G. Time-resolved cryo-EM of G-protein activation by a GPCR[J]. *Nature*, 2024, 629: 1 182-1 191.
- [2] LEE J M, HAMMARÉN H M, SAVITSKI M M, BAEK S H. Control of protein stability by post-translational modifications[J]. *Nature Communications*, 2023, 14: 201.
- [3] BRESSAN D, BATTISTONI G, HANNON G J. The dawn of spatial omics[J]. *Science*, 2023, 381(6 657): eabq4964.
- [4] MÜLLER J B, GEYER P E, COLAÇO A R, TREIT P V, STRAUSS M T, OROSHI M, DOLL S, VIRREIRA WINTER S, BADER J M, KÖHLER N, THEIS F, SANTOS A, MANN M. The proteome landscape of the Kingdoms of life[J]. *Nature*, 2020, 582(7 813): 592-596.
- [5] GUO T, STEEN J A, MANN M. Mass-spectrometry-based proteomics: from single cells to clinical applications[J]. *Nature*, 2025, 638(8 052): 901-911.
- [6] YUAN H, ZHANG L, HOU C, ZHU G, TAO D, LIANG Z, ZHANG Y. Integrated platform for proteome analysis with combination of protein and peptide separation *via* online digestion[J]. *Analytical Chemistry*, 2009, 81(21): 8 708-8 714.
- [7] YUAN H, ZHANG S, ZHAO B, WENG Y, ZHU X, LI S, ZHANG L, ZHANG Y. Enzymatic reactor with trypsin immobilized on graphene oxide modified polymer microspheres to achieve automated proteome quantification[J]. *Analytical Chemistry*, 2017, 89(12): 6 324-6 329.
- [8] ROGAWSKI R, SHARON M. Characterizing endogenous protein complexes with biological mass spectrometry[J]. *Chemical Reviews*, 2022, 122(8): 7 386-7 414.
- [9] BISHOP D P, COLE N, ZHANG T, DOBLE P A, HARE D J. A guide to integrating immunohistochemistry and chemical imaging[J]. *Chemical Society Reviews*, 2018, 47(11): 3 770-3 787.
- [10] JIANG Y, PU K. Molecular probes for autofluorescence-free optical imaging[J]. *Chemical Reviews*, 2021, 121(21): 13 086-13 131.
- [11] ADDIE R D, BALLUFF B, BOVÉE J V M G, MORREAU H, McDONNELL L A. Current state and future challenges of mass spectrometry imaging for clinical research[J]. *Analytical Chemistry*, 2015, 87(13): 6 426-6 433.
- [12] RYAN D J, SPRAGGINS J M, CAPRIOLI R M. Protein identification strategies in MALDI imaging mass spectrometry: a brief review[J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2019, 48: 64-72.
- [13] TAKÁTS Z, WISEMAN J M, GOLOGAN B, COOKS R G. Mass spectrometry sampling under ambient conditions with desorption electrospray ionization[J]. *Science*, 2004, 306(5 695): 471-473.
- [14] ROACH P J, LASKIN J, LASKIN A. Nanospray desorption electrospray ionization: an ambient method for liquid-extraction surface sampling in mass spectrometry[J]. *Analyst*, 2010, 135(9): 2 233-2 236.

- [15] KERTESZ V, van BERKEL G J. Fully automated liquid extraction-based surface sampling and ionization using a chip-based robotic nanoelectrospray platform[J]. *Journal of Mass Spectrometry*, 2010, 45(3): 252-260.
- [16] VENTER A R. Protein analysis by desorption electrospray ionization mass spectrometry[J]. *Mass Spectrometry Reviews*, 2025, 44(5): 757-772.
- [17] MELBY J A, ROBERTS D S, LARSON E J, BROWN K A, BAYNE E F, JIN S, GE Y. Novel strategies to address the challenges in top-down proteomics[J]. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2021, 32(6): 1 278-1 294.
- [18] LIU H, HUANG S, YANG L, HE Y, JING Y, XIE Y, HU B, LI Z, BI H, LI Z. The application of desorption electrospray ionization mass spectrometry and mass spectrometry imaging in metabolomics, lipidomics and proteomics analysis[J]. *Talanta*, 2026, 297: 128 611.
- [19] HALE O J, COOPER H J. *In situ* mass spectrometry analysis of intact proteins and protein complexes from biological substrates[J]. *Biochemical Society Transactions*, 2020, 48(1): 317-326.
- [20] MORATO N M, COOKS R G. Inter-platform assessment of performance of high-throughput desorption electrospray ionization mass spectrometry[J]. *Talanta Open*, 2021, 4: 100 046.
- [21] MORATO N M, COOKS R G. Desorption electrospray ionization mass spectrometry: 20 years[J]. *Accounts of Chemical Research*, 2023, 56(18): 2 526-2 536.
- [22] SHIN Y S, DROLET B, MAYER R, DOLENCE K, BASILE F. Desorption electrospray ionization-mass spectrometry of proteins[J]. *Analytical Chemistry*, 2007, 79(9): 3 514-3 518.
- [23] GREEN F M, SALTER T L, GILMORE I S, STOKES P, O'CONNOR G. The effect of electrospray solvent composition on desorption electrospray ionisation (DESI) efficiency and spatial resolution[J]. *Analyst*, 2010, 135(4): 731-737.
- [24] VOLNÝ M, VENTER A, SMITH S A, PAZZI M, COOKS R G. Surface effects and electrochemical cell capacitance in desorption electrospray ionization[J]. *Analyst*, 2008, 133(4): 525-531.
- [25] ZHANG H, SHI X, LU H, LI L. Delineation of subcellular molecular heterogeneity in single cells *via* ultralow-flow-rate desorption electrospray ionization mass spectrometry imaging[J]. *Analytical Chemistry*, 2025, 97(18): 9 985-9 991.
- [26] YIN R, BURNUM-JOHNSON K E, SUN X, DEY S K, LASKIN J. High spatial resolution imaging of biological tissues using nanospray desorption electrospray ionization mass spectrometry[J]. *Nature Protocols*, 2019, 14(12): 3 445-3 470.
- [27] JIANG L, LI X, POLACK M, BELDER D, LASKIN J. High-spatial-resolution mass spectrometry imaging of biological tissues using a microfluidic probe[J]. *Nature Protocols*, 2026, 21(1): 18-36.
- [28] JIANG L, LASKIN J. Pneumatically assisted microfluidic probe for enhanced mass spectrometry imaging performance[J]. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2025, 36(4): 883-887.
- [29] YANG M, UNSIHUAY D, HU H, NGUELE MEKE F, QU Z, ZHANG Z Y, LASKIN J. Nano-DESI mass spectrometry imaging of proteoforms in biological tissues with high spatial resolution[J]. *Analytical Chemistry*, 2023, 95(12): 5 214-5 222.
- [30] HALE O J, COOPER H J. Native mass spectrometry imaging of proteins and protein complexes by nano-DESI[J]. *Analytical Chemistry*, 2021, 93(10): 4 619-4 627.
- [31] SISLEY E K, HALE O J, STYLES I B, COOPER H J. Native ambient mass spectrometry imaging of ligand-bound and metal-bound proteins in rat brain[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2022, 144(5): 2 120-2 128.
- [32] ILLES-TOTH E, HALE O J, HUGHES J W, STRITTMATTER N, ROSE J, CLAYTON B, SARGEANT R, JONES S, DANNHORN A, GOODWIN R J A, COOPER H J. Mass spectrometry detection and imaging of a non-covalent protein-drug complex in tissue from orally dosed rats[J]. *Angewandte Chemie (International Ed in English)*, 2022, 61(36): e202202075.
- [33] YANG M, HU H, SU P, THOMAS P M, CAMARILLO J M, GREER J B, EARLY B P, FELLERS R T, KELLEHER N L, LASKIN J. Proteoform-selective imaging of tissues using mass spectrometry[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2022, 61(29): e202200721.
- [34] HALE O J, COOPER H J. Native ambient mass spectrometry of an intact membrane protein assembly and soluble protein assemblies directly from lens tissue[J]. *Angewandte Chemie (International Ed in English)*, 2022, 61(31): e202201458.
- [35] SISLEY E K, HALE O J, HUGHES J W, COOPER H J. Tissue washing improves native ambient mass spectrometry detection of membrane proteins directly from tissue[J]. *Journal of the American Chemical Society*,

- 2023, 145(29): 15 658-15 662.
- [36] van BERKEL G J, KERTESZ V, KOEPLINGER K A, VAVREK M, KONG A T. Liquid microjunction surface sampling probe electrospray mass spectrometry for detection of drugs and metabolites in thin tissue sections[J]. *Journal of Mass Spectrometry*, 2008, 43(4): 500-508.
- [37] GRIFFITHS R L, SISLEY E K, LOPEZ-CLAVIJO A F, SIMMONDS A L, STYLES I B, COOPER H J. Native mass spectrometry imaging of intact proteins and protein complexes in thin tissue sections[J]. *International Journal of Mass Spectrometry*, 2019, 437: 23-29.
- [38] SARSBY J, MARTIN N J, LALOR P F, BUNCH J, COOPER H J. Top-down and bottom-up identification of proteins by liquid extraction surface analysis mass spectrometry of healthy and diseased human liver tissue[J]. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2014, 25(11): 1 953-1 961.
- [39] KOCUREK K I, STONES L, BUNCH J, MAY R C, COOPER H J. Top-down LESA mass spectrometry protein analysis of gram-positive and gram-negative bacteria[J]. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2017, 28(10): 2 066-2 077.
- [40] HONARVAR E, VENTER A R. Ammonium bicarbonate addition improves the detection of proteins by desorption electrospray ionization mass spectrometry[J]. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2017, 28(6): 1 109-1 117.
- [41] HONARVAR E, VENTER A R. Comparing the effects of additives on protein analysis between desorption electrospray (DESI) and electrospray ionization (ESI)[J]. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2018, 29(12): 2 443-2 455.
- [42] JAVANSHAD R, HONARVAR E, VENTER A R. Addition of serine enhances protein analysis by DESI-MS[J]. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2019, 30(4): 694-703.
- [43] JAVANSHAD R, VENTER A R. Effects of amino acid additives on protein solubility-insights from desorption and direct electrospray ionization mass spectrometry[J]. *Analyst*, 2021, 146(21): 6 592-6 604.
- [44] MASER T L, HONARVAR E, VENTER A R. Delayed desorption improves protein analysis by desorption electrospray ionization mass spectrometry[J]. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2020, 31(4): 803-811.
- [45] JAVANSHAD R, MASER T L, HONARVAR E, VENTER A R. The addition of polar organic solvent vapors during the analysis of proteins by DESI-MS[J]. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2019, 30(12): 2 571-2 575.
- [46] SEELEY E H, OPPENHEIMER S R, MI D, CHAURAND P, CAPRIOLI R M. Enhancement of protein sensitivity for MALDI imaging mass spectrometry after chemical treatment of tissue sections[J]. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2008, 19(8): 1 069-1 077.
- [47] TOWERS M W, KARANCSI T, JONES E A, PRINGLE S D, CLAUDE E. Optimised desorption electrospray ionisation mass spectrometry imaging (DESI-MSI) for the analysis of proteins/peptides directly from tissue sections on a travelling wave ion mobility Q-ToF[J]. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2018, 29(12): 2 456-2 466.
- [48] YANG Z, HE Z, SU W, ZHOU Z, PEI H, LIU S, WANG N, YUE L. Dual enhancement of protein imaging in complex tissues using HydroWash: a sequential washing and hydrogel conditioning strategy for DESI-MS[J]. *Analytical Chemistry*, 2025, 97(35): 19 092-19 100.
- [49] SONG X, ZANG Q, LI C, ZHOU T, ZARE R N. Immuno-desorption electrospray ionization mass spectrometry imaging identifies functional macromolecules by using microdroplet-cleavable mass tags[J]. *Angewandte Chemie (International Ed in English)*, 2023, 62(9): e202216969.
- [50] ZHANG H, DELAFIELD D G, LI L. Mass spectrometry imaging: the rise of spatially resolved single-cell omics[J]. *Nature Methods*, 2023, 20(3): 327-330.
- [51] GARZA K, FEIDER C L, KLEIN D R, ROSENBERG J A, BRODBELT J S, EBERLIN L S. Desorption electrospray ionization mass spectrometry imaging of proteins directly from biological tissue sections[J]. *Analytical Chemistry*, 2018, 90(13): 7 785-7 789.
- [52] HALE O J, WELLS T R, MEAD R J, COOPER H J. Mass spectrometry imaging of SOD1 protein-metal complexes in SOD1G93A transgenic mice implicates demetalation with pathology[J]. *Nature Communications*, 2024, 15: 6 518.
- [53] HALE O J, MIZE T H, COOPER H J. Infrared photoactivation enables nano-DESI MS of protein complexes in tissue on a linear ion trap mass spectrometer[J]. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2025, 36(1): 146-152.
- [54] HALE O J, HUGHES J W, SISLEY E K, COOPER H J. Native ambient mass spectrometry enables analysis of intact endogenous protein assemblies up to 145 kDa directly from tissue[J]. *Analytical Chemistry*, 2022,

- 94(14): 5 608-5 614.
- [55] OVERINGTON J P, AL-LAZIKANI B, HOPKINS A L. How many drug targets are there[J]. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2006, 5(12): 993-996.
- [56] CARROLL J, ALTMAN M C, FEARNLEY I M, WALKER J E. Identification of membrane proteins by tandem mass spectrometry of protein ions[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007, 104(36): 14 330-14 335.
- [57] AMBROSE S, HOUSDEN N G, GUPTA K, FAN J, WHITE P, YEN H Y, MARCOUX J, KLEANTHOUS C, HOPPER J T S, ROBINSON C V. Native desorption electrospray ionization liberates soluble and membrane protein complexes from surfaces[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2017, 56(46): 14 463-14 468.
- [58] DU Y, COOPER H J. Native ambient mass spectrometry of membrane proteins directly from bacterial colonies[J]. *Chemical Communications*, 2025, 61(21): 4 168-4 171.
- [59] DODDS J N, BAKER E S. Ion mobility spectrometry: fundamental concepts, instrumentation, applications, and the road ahead[J]. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2019, 30(11): 2 185-2 195.
- [60] RIVERA E S, DJAMBAZOVA K V, NEUMANN E K, CAPRIOLI R M, SPRAGGINS J M. Integrating ion mobility and imaging mass spectrometry for comprehensive analysis of biological tissues: a brief review and perspective[J]. *Journal of Mass Spectrometry*, 2020, 55(12): e4614.
- [61] SHVARTSBERG A A, SMITH R D. Fundamentals of traveling wave ion mobility spectrometry[J]. *Analytical Chemistry*, 2008, 80(24): 9 689-9 699.
- [62] RICHARDSON K, LANGRIDGE D, GILES K. Fundamentals of travelling wave ion mobility revisited: I. Smoothly moving waves[J]. *International Journal of Mass Spectrometry*, 2018, 428: 71-80.
- [63] GILES K, UJMA J, WILDGOOSE J, PRINGLE S, RICHARDSON K, LANGRIDGE D, GREEN M. A cyclic ion mobility-mass spectrometry system[J]. *Analytical Chemistry*, 2019, 91(13): 8 564-8 573.
- [64] GUEVREMONT R. High-field asymmetric waveform ion mobility spectrometry: a new tool for mass spectrometry[J]. *Journal of Chromatography A*, 2004, 1 058(1/2): 3-19.
- [65] COOPER H J. To what extent is FAIMS beneficial in the analysis of proteins[J]. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2016, 27(4): 566-577.
- [66] HALE O J, SISLEY E K, GRIFFITHS R L, STYLES I B, COOPER H J. Native LESA TWIMS-MSI: spatial, conformational, and mass analysis of proteins and protein complexes[J]. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2020, 31(4): 873-879.
- [67] SISLEY E K, UJMA J, PALMER M, GILES K, FERNANDEZ-LIMA F A, COOPER H J. LESA cyclic ion mobility mass spectrometry of intact proteins from thin tissue sections[J]. *Analytical Chemistry*, 2020, 92(9): 6 321-6 326.
- [68] FEIDER C L, ELIZONDO N, EBERLIN L S. Ambient ionization and FAIMS mass spectrometry for enhanced imaging of multiply charged molecular ions in biological tissues[J]. *Analytical Chemistry*, 2016, 88(23): 11 533-11 541.
- [69] SARSBY J, GRIFFITHS R L, RACE A M, BUNCH J, RANDALL E C, CREESE A J, COOPER H J. Liquid extraction surface analysis mass spectrometry coupled with field asymmetric waveform ion mobility spectrometry for analysis of intact proteins from biological substrates[J]. *Analytical Chemistry*, 2015, 87(13): 6 794-6 800.
- [70] GRIFFITHS R L, CREESE A J, RACE A M, BUNCH J, COOPER H J. LESA FAIMS mass spectrometry for the spatial profiling of proteins from tissue[J]. *Analytical Chemistry*, 2016, 88(13): 6 758-6 766.
- [71] GRIFFITHS R L, SIMMONDS A L, SWALES J G, GOODWIN R J A, COOPER H J. LESA MS imaging of heat-preserved and frozen tissue: benefits of multi-step static FAIMS[J]. *Analytical Chemistry*, 2018, 90(22): 13 306-13 314.
- [72] HALE O J, COOPER H J, MARTY M T. High-throughput deconvolution of native protein mass spectrometry imaging data sets for mass domain analysis[J]. *Analytical Chemistry*, 2023, 95(37): 14 009-14 015.
- [73] HABECK T, BROWN K A, des SOYE B, LANTZ C, ZHOU M, ALAM N, HOSSAIN M A, JUNG W, KEENER J E, VOLNY M, WILSON J W, YING Y, AGAR J N, DANIS P O, GE Y, KELLEHER N L, LI H, LOO J A, MARTY M T, PAŠA-TOLIĆ L, SANDOVAL W, LERMYTE F. Top-down mass spectrometry of native proteoforms and their complexes: a community study[J]. *Nature Methods*, 2024, 21(12): 2 388-2 396.
- [74] ROBERTS D S, LOO J A, TSYBIN Y O, LIU X, WU S, CHAMOT-ROOKE J, AGAR J N, PAŠA-TOLIĆ L, SMITH L M, GE Y. Top-down proteomics[J]. *Nature Reviews Methods Primers*, 2024, 4: 38.
- [75] BENNETT J L, EL-BABA T J, ZOUBOULIS K C, KIRSCHBAUM C, SONG H, BUTROID F I,

- BENESCH J L P, LUTOMSKI C A, ROBINSON C V. Uncovering hidden protein modifications with native top-down mass spectrometry[J]. *Nature Methods*, 2025, 22(10): 2 127-2 137.
- [76] PAIZS B, SUHAI S. Fragmentation pathways of protonated peptides[J]. *Mass Spectrometry Reviews*, 2005, 24(4): 508-548.
- [77] OLSEN J V, MACEK B, LANGE O, MAKAROV A, HORNING S, MANN M. Higher-energy C-trap dissociation for peptide modification analysis[J]. *Nature Methods*, 2007, 4(9): 709-712.
- [78] ZUBAREV R A, KELLEHER N L, McLAFFERTY F W. Electron capture dissociation of multiply charged protein cations. A nonergodic process[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 1998, 120(13): 3 265-3 266.
- [79] KIM M S, PANDEY A. Electron transfer dissociation mass spectrometry in proteomics[J]. *Proteomics*, 2012, 12(4/5): 530-542.
- [80] FRESE C K, MAARTEN ALTELAAR A F, van den TOORN H, NOLTING D, GRIEP-RAMING J, HECK A J R, MOHAMMED S. Toward full peptide sequence coverage by dual fragmentation combining electron-transfer and higher-energy collision dissociation tandem mass spectrometry[J]. *Analytical Chemistry*, 2012, 84(22): 9 668-9 673.
- [81] LU H, ZHANG Y, YANG P. Advancements in mass spectrometry-based glycoproteomics and glycomics[J]. *National Science Review*, 2016, 3(3): 345-364.
- [82] LIU M, ZENG W, FANG P, CAO W, LIU C, YAN G, ZHANG Y, PENG C, WU J, ZHANG X, TU H, CHI H, SUN R, CAO Y, DONG M, JIANG B, HUANG J, SHEN H, WONG C, HE S, YANG P. pGlyco 2.0 enables precision N-glycoproteomics with comprehensive quality control and one-step mass spectrometry for intact glycopeptide identification[J]. *Nature Communications*, 2017, 8: 438.
- [83] ZENG W, CAO W, LIU M, HE S, YANG P. Precise, fast and comprehensive analysis of intact glycopeptides and modified glycans with pGlyco3[J]. *Nature Methods*, 2021, 18(12): 1 515-1 523.
- [84] VOINOV V G, BENNETT S E, BAROFSKY D F. Electron-induced dissociation of peptides in a triple quadrupole mass spectrometer retrofitted with an electromagnetostatic cell[J]. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2015, 26(5): 752-761.
- [85] YANG J, DONG W, JIANG L, YUAN K, WANG F, WU G, QIAO D, ZHANG W, YANG X. Scientific research at Dalian coherent light source[J]. *Scientia Sinica Chimica*, 2023, 53(11): 2 103-2 116.
- [86] CANNON J R, CAMMARATA M B, ROBOTHAM S A, COTHAM V C, SHAW J B, FELLERS R T, EARLY B P, THOMAS P M, KELLEHER N L, BRODBELT J S. Ultraviolet photodissociation for characterization of whole proteins on a chromatographic time scale[J]. *Analytical Chemistry*, 2014, 86(4): 2 185-2 192.
- [87] XUE J, LIU Z, WANG F. Applications of native mass spectrometry and ultraviolet photodissociation in protein structure and interaction analysis[J]. *Chinese Journal of Chromatography*, 2024, 42(7): 681-692.
- [88] YANG S, HOU Z, LIU Z, JIN Z, ZHAO H, CAO K, ZHAO S, ZHANG W, XIAO C, YANG X, HUANG G, WANG F. In-cell mass spectrometry and ultraviolet photodissociation navigates the intracellular protein heterogeneity[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2025, 147(6): 4 714-4 719.
- [89] LUO P, LIU Z, LAI C, JIN Z, WANG M, ZHAO H, LIU Y, ZHANG W, WANG X, XIAO C, YANG X, WANG F. Time-resolved ultraviolet photodissociation mass spectrometry probes the mutation-induced alterations in protein stability and unfolding dynamics[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2024, 146(13): 8 832-8 838.
- [90] ZAMDBORG L, LeDUC R D, GLOWACZ K J, KIM Y B, VISWANATHAN V, SPAULDING I T, EARLY B P, BLUHM E J, BABAI S, KELLEHER N L. ProSight PTM 2.0: improved protein identification and characterization for top down mass spectrometry[J]. *Nucleic Acids Research*, 2007, 35: W701-W706.
- [91] KOLMOGOROV M, LIU X, PEVZNER P A. SpectroGene: a tool for proteogenomic annotations using top-down spectra[J]. *Journal of Proteome Research*, 2016, 15(1): 144-151.
- [92] KOU Q, XUN L, LIU X. TopPIC: a software tool for top-down mass spectrometry-based proteoform identification and characterization[J]. *Bioinformatics*, 2016, 32(22): 3 495-3 497.
- [93] SUN R, LUO L, WU L, WANG R, ZENG W, CHI H, LIU C, HE S. pTop 1.0: a high-accuracy and high-efficiency search engine for intact protein identification[J]. *Analytical Chemistry*, 2016, 88(6): 3 082-3 090.
- [94] KOU Q, WU S, TOLIC N, PAŠA-TOLIC L, LIU Y, LIU X. A mass graph-based approach for the identification of modified proteoforms using top-down tandem mass spectra[J]. *Bioinformatics*, 2017, 33(9): 1 309-1 316.
- [95] PARK J, PIEHOWSKI P D, WILKINS C, ZHOU M,

- MENDOZA J, FUJIMOTO G M, GIBBONS B C, SHAW J B, SHEN Y, SHUKLA A K, MOORE R J, LIU T, PETYUK V A, TOLIĆ N, PAŠA-TOLIĆ L, SMITH R D, PAYNE S H, KIM S. Informed-Proteomics: open-source software package for top-down proteomics[J]. *Nature Methods*, 2017, 14(9): 909-914.
- [96] WU Z, ROBERTS D S, MELBY J A, WENGER K, WETZEL M, GU Y, RAMANATHAN S G, BAYNE E F, LIU X, SUN R, ONG I M, McILWAIN S J, GE Y. MASH explorer: a universal software environment for top-down proteomics[J]. *Journal of Proteome Research*, 2020, 19(9): 3 867-3 876.
- [97] GRIFFITHS R L, HUGHES J W, ABBATIello S E, BELFORD M W, STYLES I B, COOPER H J. Comprehensive LESA mass spectrometry imaging of intact proteins by integration of cylindrical FAIMS[J]. *Analytical Chemistry*, 2020, 92(4): 2 885-2 890.
- [98] McGEE J P, SU P, DURBIN K R, HOLLAS M A R, BATEMAN N W, MAXWELL G L, CONRADS T P, FELLERS R T, MELANI R D, CAMARILLO J M, KAFADER J O, KELLEHER N L. Automated imaging and identification of proteoforms directly from ovarian cancer tissue[J]. *Nature Communications*, 2023, 14: 6 478.
- [99] GIESEN C, WANG H A O, SCHAPIRO D, ZIVANOVIC N, JACOBS A, HATTENDORF B, SCHÜFFLER P J, GROLIMUND D, BUHMANN J M, BRANDT S, VARGA Z, WILD P J, GÜNTHER D, BODENMILLER B. Highly multiplexed imaging of tumor tissues with subcellular resolution by mass cytometry[J]. *Nature Methods*, 2014, 11(4): 417-422.
- [100] ANGELO M, BENDALL S C, FINCK R, HALE M B, HITZMAN C, BOROWSKY A D, LEVENSON R M, LOWE J B, LIU S, ZHAO S, NATKUNAM Y, NOLAN G P. Multiplexed ion beam imaging of human breast tumors[J]. *Nature Medicine*, 2014, 20(4): 436-442.
- [101] de SOUZA N, ZHAO S, BODENMILLER B. Multiplex protein imaging in tumour biology[J]. *Nature Reviews Cancer*, 2024, 24(3): 171-191.
- [102] WU M, TAO H, XU T, ZHENG X, WEN C, WANG G, PENG Y, DAI Y. Spatial proteomics: unveiling the multidimensional landscape of protein localization in human diseases[J]. *Proteome Science*, 2024, 22(1): 7.
- [103] MURUGANANDHAN J, SUJATHA G, PATIL S, RAJ A T. Laser capture microdissection in oral cancer[J]. *The Journal of Contemporary Dental Practice*, 2018, 19(5): 475-476.
- [104] WIŚNIEWSKI J R, OSTASIEWICZ P, MANN M. High recovery FASP applied to the proteomic analysis of microdissected formalin fixed paraffin embedded cancer tissues retrieves known colon cancer markers[J]. *Journal of Proteome Research*, 2011, 10(7): 3 040-3 049.
- [105] ZHU Y, DOU M, PIEHOWSKI P D, LIANG Y, WANG F, CHU R K, CHRISLER W B, SMITH J N, SCHWARZ K C, SHEN Y, SHUKLA A K, MOORE R J, SMITH R D, QIAN W J, KELLY R T. Spatially resolved proteome mapping of laser capture microdissected tissue with automated sample transfer to nanodroplets[J]. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2018, 17(9): 1 864-1 874.
- [106] XU R, TANG J, DENG Q, HE W, SUN X, XIA L, CHENG Z, HE L, YOU S, HU J, FU Y, ZHU J, CHEN Y, GAO W, HE A, GUO Z, LIN L, LI H, HU C, TIAN R. Spatial-resolution cell type proteome profiling of cancer tissue by fully integrated proteomics technology[J]. *Analytical Chemistry*, 2018, 90(9): 5 879-5 886.
- [107] HUANG P, KONG Q, GAO W, CHU B, LI H, MAO Y, CAI Z, XU R, TIAN R. Spatial proteome profiling by immunohistochemistry-based laser capture microdissection and data-independent acquisition proteomics[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2020, 1 127: 140-148.
- [108] HUANG P, LI H, GAO W, CAI Z, TIAN R. A fully integrated spintip-based approach for sensitive and quantitative profiling of region-resolved *in vivo* brain glycoproteome[J]. *Analytical Chemistry*, 2019, 91(14): 9 181-9 189.
- [109] SUN Y, LIU D, LIANG Y, YANG X, LIU X, ZHAO B, LIANG Z, ZHANG Y, ZHANG L. High-throughput proteoform imaging for revealing spatial-resolved changes in brain tissues associated with Alzheimer's disease[J]. *Advanced Science*, 2025, 12(17): 2 416 722.
- [110] LIAO Y C, FULCHER J M, DEGNAN D J, WILLIAMS S M, BRAMER L M, VELIČKOVIĆ D, ZEMAITIS K J, VELIČKOVIĆ M, SONTAG R L, MOORE R J, PAŠA-TOLIĆ L, ZHU Y, ZHOU M. Spatially resolved top-down proteomics of tissue sections based on a microfluidic nanodroplet sample preparation platform[J]. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2023, 22(2): 100 491.
- [111] MAO Y, WANG X, HUANG P, TIAN R. Spatial proteomics for understanding the tissue microenvironment[J]. *Analyst*, 2021, 146(12): 3 777-3 798.

(收稿日期: 2025-12-14; 修回日期: 2026-01-15)