

· 综述 ·

## 活性小分子化合物靶点验证方法的研究进展

陈树强,董国强,盛春泉,张万年(第二军医大学药学院,上海 200433)

**[摘要]** 随着科学的发展和时代的进步,药物化学的研究不仅仅局限于先导化合物的发现及其构效关系的研究,一些小分子药物靶点的确认正逐渐成为阻碍药物化学发展的瓶颈问题。因此,活性小分子化合物靶点的鉴定与确认也成为研究过程中最为关键和艰巨的任务,通常会起到决定性作用。本文简要总结活性小分子化合物靶点验证的现行方法,阐述通过合成探针进行靶标鉴别的手段,介绍探针的设计与合成思想,并列应用这些方法成功找到靶点的实例。

**[关键词]** 亲和层析;小分子药物;靶标确认;荧光探针

**[中图分类号]** R914 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2016)02-0097-06

**[DOI]** 10.3969/j.issn.1006-0111.2016.02.001

### Advances of validation of bioactive small molecule targets

CHEN Shuqiang, DONG Guoqiang, SHENG Chunquan, ZHANG Wannian (School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

**[Abstract]** With the development of science and the progress of age, medicinal chemistry is not only limited to the lead discovery and the structure-activity relationship studies, but also finding the target of bioactive small molecule drugs has become a tough issue to be solved. The identification and validation of bioactive small molecule targets has become the most critical and difficult task, which plays a decisive role in academic and pharmaceutical research. Herein we summarize the current methods for target identification of small molecules, and mainly discuss about the target identification method by the chemical probes. Recent cases of successful application were also introduced to demonstrate the strategy of probe synthesis and design.

**[Key words]** pulldown; small molecule drugs; target identification; fluorescent probes

活性小分子化合物是指可以通过调节蛋白的生物功能引起细胞或生物体表型改变的一类化合物。许多上市药物都是通过对其结构修饰得到的,因此,活性小分子化合物向来都是药物化学的研究热点。随着药物发现与中药现代化进程不断加快,高通量筛选和平行合成技术不断进步,大量的活性小分子化合物不断涌现,但是它们的作用靶点尚未明确,作用机制迟迟得不到阐明,导致了后续研究的盲目性,已经成为新药研发的主要瓶颈。更有甚者,药物的作用机制是在其应用于临床后才逐渐被揭开。因此,生物活性小分子靶标的确认在药物化学以及化学生物学中,已经逐渐成为最重要也是最艰巨的任务。

小分子药物靶标的鉴定方法有很多种,总体上可分为两大类:第一类是通过小分子与蛋白之间的

直接相互作用鉴别,如亲和层析;第二类是通过间接的方法找寻靶蛋白,如通过检测活性化合物所引起的生物现象改变、DNA的转录翻译、蛋白质组的表达变化等,结合已有实例,综合分析、推断靶蛋白。本文总结了几种靶标的鉴别方法,它们是互为补充的,将其联合应用或许可以让我们更直观地观测到小分子与蛋白的相互作用。

本文综述的方法主要是通过化合物与其靶标之间的直接作用来进行目标蛋白的鉴别,这种直接作用又分为2种类型,即共价结合与非共价结合,对于不同类型的结合所选用的鉴别策略也有所不同。由活性小分子化合物合成生物素化探针是比较常用的策略。合成的探针与亲和介质、细胞裂解物,或者活细胞等相互作用,并通过分离鉴别获得该化合物的靶点。其中,亲和矩阵作为靶分子共价结合的载体,已被广泛应用于各种结合实验;放射性标记/成像探针分子可用于靶标鉴别实验,通常用于共价结合的相互作用;光亲和探针可用于鉴别化合物与靶标的非共价结合。本文将探讨这些方法的优缺点,并针对每种方法列举代表性的实例。

**[基金项目]** 国家自然科学基金(81373278)

**[作者简介]** 陈树强,硕士研究生.Tel: (021) 81871232; E-mail: zhang13898173848@163.com

**[通讯作者]** 张万年,教授,博士生导师.研究方向:抗感染和抗肿瘤药物化学研究.E-mail: zhangwnk@hotmail.com

## 1 直接寻找靶点的方法

**1.1 亲和层析技术** 在众多方法中,亲和层析技术(pulldown)的应用最为广泛。其原理为:将某些具有特殊结构的亲和分子制成固相吸附剂,作为与目标蛋白亲和的载体,将其与目标蛋白溶液进行共孵育,再对蛋白进行洗脱,那些没有与载体结合的蛋白被洗脱掉,与小分子化合物产生相互作用的蛋白被保留下来,然后,结合物通过十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳进行分析,通过溴酚蓝对目标蛋白染色,将被染色的目标蛋白分离,并通过质谱的方法进行鉴定<sup>[1]</sup>(图1)。

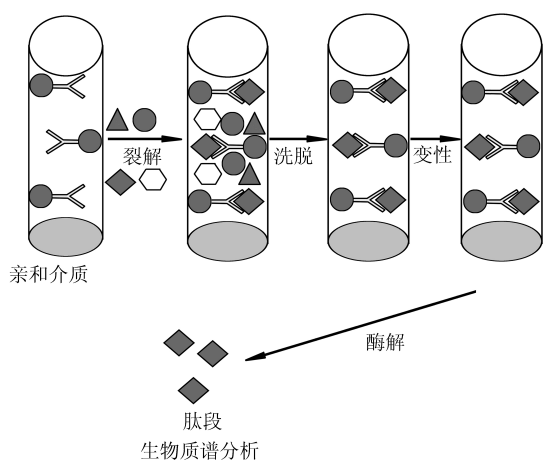


图1 亲和层析示意图

**1.2 化学探针技术** 化学探针作为一种探测工具,是指既可与特定的靶蛋白发生相互作用产生特异性结合,又可以被特殊方法检测的一类小分子物质。就其结构而言,包括3个部分(图2):与目标蛋白进行特异性结合的反应基团、调节反应的连接基团和一个便于鉴别靶蛋白的标签(标记基团)。目标化合物构成探针的反应基团,在探针合成之前,首先要进行目标化合物构效关系的研究,确定化合物结构的必需基团和非必需基团。目标化合物通过非必需基团与连接基团相连,然后再与标记基团相接,如生物素(biotin),这样一来,整个探针的结构就完整了。之后将探针与细胞裂解液等共孵育,进行一系列的后续操作(同亲和层析)。此外,药物一般还会与药物靶点以外的其他蛋白产生非特异性结合,所以要考虑进行阴性对照实验,对照实验中所用的化合物必须跟活性化合物结构相似,且要有相同的标签标记,关键还要有较低的生物活性。

在探针结构中,连接子起到重要作用,它必须具有以下两方面功能:①能够使功能基团固定化,并可

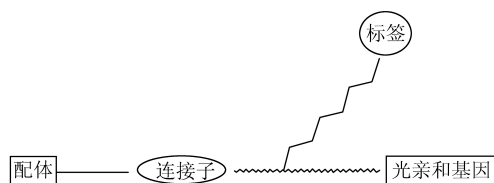


图2 探针结构

以使其与靶蛋白进行特异性结合;②必须有足够的空间位置维持其立体结构,从而保持分子活性,提高标记效率。据报道,烷基<sup>[2]</sup>、氨基酸多肽链<sup>[3-5]</sup>、乙二醇二缩水甘油醚(EGDE)<sup>[6]</sup>和酒石酸<sup>[7]</sup>等(图3)几种连接子应用较为广泛。连接基团一般是较长的链状结构,烷烃类作为疏水性的连接子,有利于其透过细胞膜,但同时会引起非特异性蛋白结合到探针上,这将增加靶蛋白分离的复杂性。用酒石酸作为连接子,可解决这一问题,大大降低了非特异性结合的比例<sup>[8,9]</sup>。

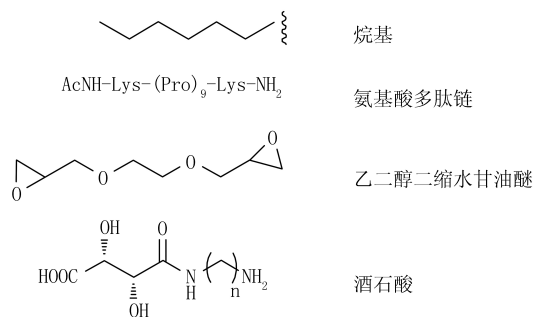


图3 几种常用的连接子

反应基团是小分子化合物自身的特定部分,其主要作用是在探针分子进入靶蛋白活性部位后,通过特异性的结合使探针分子与靶蛋白活性部位进行共价结合,为下一步靶蛋白的分离纯化与鉴别打下基础。

实验过程中,人们为了能够快速鉴别或分离纯化靶蛋白而引入的一种化学结构被称为报告基团(标签基团 Tag)。较为常用的报告基团有荧光基团、亲和基团等。亲和基团(如生物素)与荧光基团的联合使用被广泛应用于靶蛋白的分离纯化及检测,生物素标签有助于靶蛋白的富集,而荧光团可以促进凝胶上靶蛋白的检测,两者结合大大提高了靶标鉴别的效率。上述多功能探针被广泛用于靶标鉴别实验,特别是用于基于活性的蛋白质组研究(ABPP)<sup>[10,11]</sup>。

**1.2.1 生物素化探针技术** 这是一种靶标鉴定实验中应用较为广泛的方法。生物素又称维生素 B<sub>7</sub>,可以与抗生物素蛋白以及链霉抗生物素蛋白相结

合,其结合能力非常强,解离常数可以达到  $10^{-15}$  M。因此,当含有抗生物素蛋白的树脂与生物素化探针共孵育时,将会产生一种非常稳定的非共价亲和力,从而可将其分离开来。

生物素化探针的一大优点是该探针可以透过细胞膜,与靶蛋白在活细胞或者器官的原生环境中发生相互作用。具体操作方法如下:生物素化探针首先与活细胞共孵育一段时间,然后裂解细胞,加入链霉抗生物素蛋白树脂与其发生相互作用,离心去除上清液,剩下的就是探针树脂靶蛋白的结合物。Myers 等<sup>[12]</sup>报道使用生物素化探针与细胞裂解液相互作用最终发现,天然产物药物(+)-avrainvillamide 的靶标是一种在癌症患者体内过度表达的蛋白——核仁磷酸癌蛋白。Tosso 等<sup>[13]</sup>合成了生物素酰化的探针(图4),并进一步探究了其靶标的相互作用,证明其靶标为尤文式肉瘤家族肿瘤细胞中的一种融合蛋白——EWS-FLI1。该方法的缺点是生物素化的靶分子水溶性显著降低。

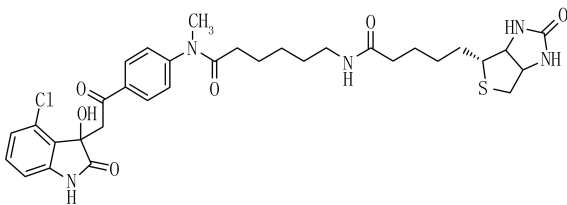


图4 生物素酰化探针

青蒿素,作为从中国传统中药青蒿中分离提取得到的天然产物,研究表明其具有良好的抗疟疾作用。但是其作用靶点一直没有得到详细的阐述,Wang 等<sup>[14]</sup>利用生物素酰化探针的方法,合成了带有炔基标记的青蒿素衍生物,然后通过 Click 反应引入生物素,经鉴别得到了124条与青蒿素共价结合的靶标蛋白,之后又通过 Click 反应引入荧光基团进行染色,最终确定血红素是使青蒿素活化的关键,从而揭示了其对寄生虫产生杀伤作用的机制。

**1.2.2 放射性标记或荧光标记探针** 某些文献报道在“没有标记基团”的情况下,测定并得到了某一天然产物靶蛋白,其实是运用蛋白质组学的分析方法在探针的一端引入叠氮基,再通过亚铜离子催化的环加成反应成功引入放射性标记基团,从而避免一些不良反应的发生。雷公藤甲素是从中草药雷公藤中分离得到的一种环氧二萜内酯化合物,有着良好的抗炎及免疫抑制作用。但是其作用靶点迟迟未得到阐明。Leuenroth 等<sup>[15]</sup>应用该方法合成了雷公藤甲素的小分子探针,与 HeLa 细胞相互作用,然后将细胞裂解,提取得到靶标蛋白并进行 SDS-

PAGE,最终鉴定其靶蛋白为钙离子通道蛋白 PC2。Bao 等<sup>[16]</sup>利用该方法合成了赖氨酸丙二酰化的探针(图5),并且在探针中引入炔基基团,与细胞相互作用之后又通过 Click 反应引入 Tag,最后通过电泳分离得到蛋白,经液相色谱-质谱联用(LC-MS)鉴别发现其靶蛋白是一种新的、未见报道的丙二酰化蛋白。

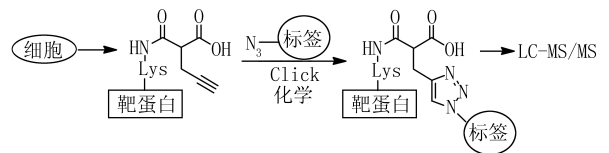


图5 探针相互作用原理

**1.2.3 光亲和探针** 理想的亲和探针应当在普通的光谱技术下就能进行鉴别,而且可以在活细胞内与靶蛋白进行相互作用。放射性标记探针与这种设想最为接近,但是此方法并不适用于非共价结合或者结合力较弱的结合。为了解决这一问题,科学家在化合物中引入了光敏基团。在没有紫外线的情况下,光敏基团十分稳定,未激活的探针可与靶蛋白特异性结合,而在特定的波长照射下,会产生活性反应组分与氨基酸残基发生反应,从而形成共价结合。靶标鉴别中最常见的3种光敏基团分别为:芳基叠氮化合物、苯甲酮以及双吡啶啉(图6)。

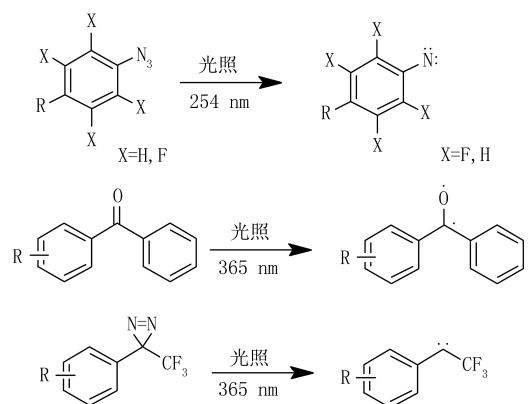


图6 光敏基团结构

Tomohiro 等<sup>[17]</sup>利用引入光致联基团的方法引入了4-[3-(三氟甲基)-3H-双吡啶啉-3-基]香豆素,在365 nm波长紫外线照射下即可发生反应并进行探针标记,最终合成了探针 GA photoprobe 3a(图7),实验表明探针靶点为 heat shock protein 90 (Hsp90)。Jessen 等<sup>[18]</sup>报道了一系列3,5-二芳基-1,2,4-二唑类化合物可以诱导细胞凋亡,并选择性抑制体内肿瘤生长。笔者用叠氮基取代4位的

氯,3位和5位用氟取代,然后与人乳腺癌细胞的裂解物共孵育,并用短波紫外线照射,经过质谱鉴定,其靶蛋白为类胰岛素生长因子 II 受体结合蛋白。

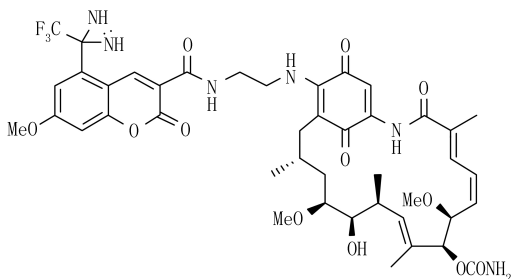


图7 探针 GA photoprobe 3a 的结构

**1.3 药物-靶蛋白复合物稳定性检测技术** 该技术作为探究药物-靶蛋白相互作用的一种方法,具有广泛的适用性。其原理(图8)为药物与靶蛋白发生相互作用形成复合物,该复合物与游离的靶蛋白相比,不易因蛋白水解酶的水解作用而分解<sup>[19]</sup>。小分子化合物与靶蛋白的结合会导致蛋白局部或者整体的稳定性有所提高<sup>[20]</sup>,原因可能与化合物遮挡住了蛋白水解酶的作用位点有关。例如,FKBP12-雷帕霉素与 FK506 的复合物可以不受枯草杆菌蛋白酶的破坏。然而,该方法的缺点是容易受到外界因素的干扰,比如药物靶相互作用的亲和力大小、待检测蛋白的丰度以及蛋白对蛋白水解酶作用的敏感性等等,这些都会对实验结果产生影响。

**1.4 通过色谱洗脱进行目标识别** 通过色谱洗脱进行目标鉴别(TICC)是基于配体靶标复合物在温和条件下进行 LC-MS 得到的馏分,检测化合物与靶标的相互作用的方法<sup>[21]</sup>。配体与靶标结合后,使得该化合物在色谱分析中的保留时间产生改变,随后再通过 HPLC-MS/MS 进行结合蛋白的鉴定。该方法的一大优点是适用于检测与药物亲和力较低(微摩尔级别)的靶蛋白的结合。

**1.5 生物芯片技术** 将大量生物大分子比如基因片段、DNA 片段或多肽、蛋白质、糖分子,甚至组织切片、细胞等生物样品,高密度地、有序地固定在介质上,称之为生物芯片。生物芯片技术是指生物芯片与已标记的待测生物样品中的靶分子杂交,通过特定的仪器对杂交信号强度进行快速、高效的检测,从而分析样品中是否含有靶分子。由于常用硅片作为介质,且在制备过程中模拟计算机芯片的制备技术,所以称之为生物芯片技术。

**1.5.1 蛋白质芯片** 蛋白芯片是一种可以直接用来检测靶蛋白与小分子药物相互作用的芯片。它需要克隆表达大量的 cDNA 文库蛋白,然后固定在玻

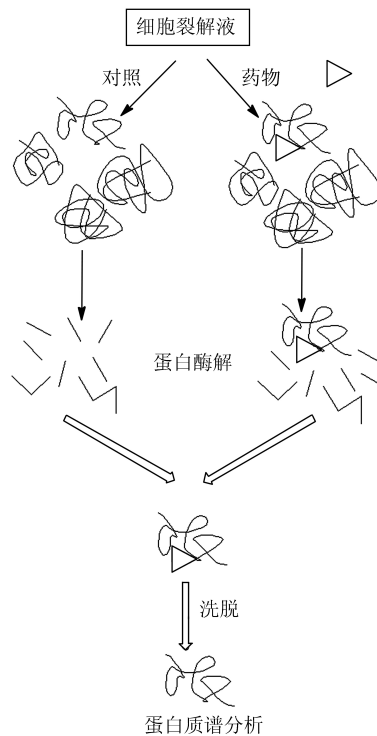


图8 药物-靶蛋白复合物稳定性检测技术原理

片上,从而形成蛋白芯片。芯片与含有标记基团的小分子化合物经过共孵育培养、洗脱、显色等步骤,与小分子药物发生相互作用的蛋白就可以被观察到<sup>[22]</sup>。但是该方法的缺陷是由于蛋白被固定,有些化合物因为空间位阻的关系不能与蛋白很好的结合,可能对实验结果造成影响。

**1.5.2 细胞转染芯片技术** 细胞芯片是将一系列的 cDNA 文库表达载体固定在玻片上,并用转染试剂进行覆盖。实验过程中,将含有细胞的培养液平铺在玻片上,表达载体转染进入细胞后可以表达多种蛋白质,与含有标记基团的小分子化合物共同孵育培养,经过洗脱就可以得到靶蛋白。该方法成功鉴定得到 SCH23390 的靶点为多巴胺受体<sup>[23]</sup>。与蛋白芯片相比,该方法使用的 DNA 比蛋白质要稳定得多,但是 DNA 的转染效率以及蛋白表达效率都会对实验结果造成较大影响。

**1.6 计算机模拟技术** 计算机模拟技术提供了一种可以替代实验的方法来进行靶标鉴别。Keiser 等<sup>[24]</sup>利用基于统计的相似性集成方法(SEA)预测了 878 个 FDA 批准的药物的新靶点。SEA 通过与靶点的已知配体的二维结构相似性进行比较,对每种结合用 SEA 计算出一个  $\Delta E$  值,对  $\Delta E$  值较高的化合物做进一步研究。通过该方法证实上市药物 Permax (培高利特)为 5-HT<sub>1D</sub> 受体激动剂<sup>[25]</sup>。

**1.7 反向分子对接技术** 该技术以某些生物活性小分子化合物(如某些先导化合物)为探针,在已知结构的化合物的靶点数据库内寻找与之匹配的可能发生结合的生物大分子,通过分子对接等方法构建靶点-配体复合物,计算对接时各个取向的受体与配体相互作用,进行分子动力学模拟和计算,求得复合物的最优化结合构象和结合能,从而预测药物潜在的作用靶点。根据受体与配体之间的结合程度,反向分子对接可分为药效团模型法、配体相似法和结合位点相似法等。目前主流的药物潜在靶点数据库有 Therapeutic Target Database (TTD)、Drug Adverse Reaction Target (DART) 和 Drug Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion Associated Protein Database (ADME-AP)等。

**1.8 基于核酸控制的靶点识别** 北京大学李笑宁课题组建立了一种运用 DNA 模板控制技术探寻小分子作用靶标的新方法 DPAL (DNA-programmed affinity labeling)。DPAL 是一个双探针体系,既包括小分子与 DNA 片段结合的探针,又包括光交联基团与 DNA 的互补片段结合而形成的捕获探针<sup>[26]</sup>。两者结合后,在光的照射下,光交联基团可以使该探针对小分子所结合的蛋白质靶点进行选择性的捕获。该技术解决了光交联基团对小分子本身和蛋白质结合性质的影响,实现了对低丰度蛋白质的选择性捕获和标记。

## 2 间接寻找靶点的方法

**2.1 基因组学方法分析** DNA 芯片是指表面含有以微阵列的方式存在的寡核苷酸或 cDNA 的一类芯片。DNA 芯片通过比较正常细胞与病变细胞所表达的基因的不同,从而发现某种基因作为药物的作用靶点。因此,DNA 芯片被广泛用于检测小分子化合物与细胞作用后,mRNA 的表达情况。Gould-Rothberg 等<sup>[27]</sup>运用 DNA 芯片,将一种挥发性的有机硫化合物 diallyl sulfide (DAS)作用于小鼠的肝脏细胞,发现其可以明显抑制在长春新碱药物作用时 P-glycoprotein (P-gp)的表达,从而得出该含硫化合物是通过抑制 P-gp 的表达来解决细胞多药耐药问题的结论。

**2.2 蛋白质组学方法分析** 该方法是在基因表达之后对翻译产生的蛋白质进行分析,由于蛋白质组学方法可以检测到仅影响蛋白质而不影响基因表达的因素,因此比基因组学方法分析更为全面。Kim 等<sup>[28]</sup>利用二维电泳技术探究了一系列可以抑制肿瘤生长的化合物对于蛋白质表达的影响,实验结果

表明,该  $\gamma$  蛋白被 N 端甲硫氨酸进行了修饰,发生了蛋白点的位移,从而验证了该实验的假说。

## 3 鉴定靶蛋白的验证

本文所述的关于药物靶点发现的方法,只是一种寻找靶点的工具,而我们的最终目的是要找到这个靶蛋白并且要能通过分离纯化得到,同时,需说明两者的相互作用是如何通过影响靶蛋白的变化来调节生物功能的。现代肽质量指纹图谱技术在靶蛋白识别过程中占据着越发重要的作用<sup>[29]</sup>。同时,药物与蛋白的相互作用可以通过表面等离子共振技术以及谐振声波共振技术进行检测,对于生物学功能的确认,可以用 PNA 干扰或者靶蛋白的过表达方法进行检测<sup>[30]</sup>。

## 4 结论与展望

化学小分子探针在药物靶标的发现过程中扮演着越发重要的角色,该技术的广泛应用使得大量与疾病相关的新靶点被发现,继而为新药研发提供了广阔的平台。在前期的研究中,化学小分子探针标记实验多在体外进行,常难以准确反映蛋白的相关信息,只能宏观解释某些细胞或动物体内蛋白功能状态的变化。随着化学生物学的不断发展与进步,“Click”化学被引入到小分子探针的设计中,从而可以更真实地“观察”到活细胞或动物体内蛋白功能状态的改变,从而可以发现与疾病相关的靶点蛋白。

虽然发现药物靶点的过程困难重重,但是利用探针可以让我们更加清晰地观测到活性小分子与其靶标蛋白在细胞中的相互作用;甚至在某些情况下,找寻生物活性小分子靶标能够促使我们发现一种全新的靶点蛋白,从而可以阐述一种全新的作用机制,为新药的研发提供有力的依据。

## 【参考文献】

- [1] Schuchardt S, Sickmann A. In plant systems biology [M]. Netherlands: Springer, 2007.
- [2] Duckert H, Pries V, Khedkar V, et al. Natural product-inspired cascade synthesis yields modulators of centrosome integrity [J]. Nat Chem Biol, 2012, 8(2): 179-184.
- [3] Weerapana E, Speers AE, Cravatt BF. Tandem orthogonal proteolysis-activity-based protein profiling (TOP-ABPP)—a general method for mapping sites of probe modification in proteomes [J]. Nat Protoc, 2007, 2(6): 1414-1425.
- [4] Speers AE, Cravatt BF. A tandem orthogonal proteolysis strategy for high-content chemical proteomics [J]. J Am Chem Soc, 2005, 127(28): 10018-10019.
- [5] Sato S, Kwon Y, Kamisuki S, et al. Polyproline-rod approach

- to isolating protein targets of bioactive small molecules; isolation of a new target of indomethacin [J]. *J Am Chem Soc*, 2007, 129(4): 873-880.
- [6] Shimizu N, Sugimoto K, Tang J, *et al*. High-performance affinity beads for identifying drug receptors [J]. *Nat Biotechnol*, 2000, 18(8): 877-881.
- [7] Shiyama T, Furuya M, Yamazaki A, *et al*. Design and synthesis of novel hydrophilic spacers for the reduction of non-specific binding proteins on affinity resins [J]. *Bioorg Med Chem*, 2004, 12(11): 2831-2841.
- [8] Piggott AM, Karuso P. Synthesis of a new hydrophilic onitrobenzyl photocleavable linker suitable for use in chemical proteomics [J]. *Tetrahedron Lett*, 2005, 46(47): 8241-8244.
- [9] Koopmans T, Dekker FJ, Martin N. A photocleavable affinity tag for the enrichment of alkyne-modified biomolecules [J]. *RSC Adv*, 2012, 2(6): 2244-2246.
- [10] Wirth T, Schmuck K, Tietze LF, *et al*. Duocarmycin analogues target aldehyde dehydrogenase 1 in lung cancer cells [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2012, 51(12): 2874-2877.
- [11] Böttcher T, Sieber SA.  $\beta$ -lactones as specific inhibitors of ClpP attenuate the production of extracellular virulence factors of *Staphylococcus aureus* [J]. *J Am Chem Soc*, 2008, 130(44): 14400-14401.
- [12] Wulff JE, Siegrist R, Myers AG. The natural product avrainvillamide binds to the oncoprotein nucleophosmin [J]. *J Am Chem Soc* 2007, 129(46), 14444-14451.
- [13] Tosso PN, Kong Y, Scher L, *et al*. Synthesis and structure-activity relationship studies of small molecule disruptors of EWS-FLI1 interactions in Ewing's sarcoma [J]. *J Med Chem*, 2014, 57(24): 10290-10303.
- [14] Wang J, Zhang CJ, Chia WN, *et al*. Haem-activated promiscuous targeting of artemisinin in *Plasmodium falciparum* [J]. *Nat Commun*, 2015, 6:10111.
- [15] Leuenroth SJ, Okuhara D, Shotwell JD, *et al*. Triptolide is a traditional Chinese medicine-derived inhibitor of polycystic kidney disease [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(11): 4389-4394.
- [16] Bao X, Zhao Q, Yang T, *et al*. A chemical probe for lysine malonylation [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2013, 52(18): 4883-4886.
- [17] Tomohiro T, Yamamoto A, Tatsumi Y, *et al*. [3-(Trifluoromethyl)-3 H-diazirin-3-yl] coumarin as a carbene-generating photocross-linker with masked fluorogenic beacon [J]. *Chem Commun*, 2013, 49(98): 11551-11553.
- [18] Jessen KA, English NM, Yu WJ, *et al*. The discovery and mechanism of action of novel tumor-selective and apoptosis-inducing 3, 5-diaryl-1, 2, 4-oxadiazole series using a chemical genetics approach [J]. *Mol Cancer Ther*, 2005, 4(5): 761-771.
- [19] Park C, Marqusee S. Pulse proteolysis: a simple method for quantitative determination of protein stability and ligand binding [J]. *Nat Methods*, 2005, 2(3): 207-212.
- [20] Lomenick B, Hao R, Jonai N, *et al*. Target identification using drug affinity responsive target stability (DARTS) [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(51): 21984-21989.
- [21] Chan JN, Vuckovic D, Sleno L, *et al*. Target identification by chromatographic co-elution: monitoring of drug-protein interactions without immobilization or chemical derivatization [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2012, 11(7): M111. 016642.
- [22] Freedland SJ, Seligson DB, Liu AY, *et al*. Loss of CD10 (neutral endopeptidase) is a frequent and early event in human prostate cancer [J]. *Prostate*, 2003, 55(1): 71-80.
- [23] Keiser MJ, Roth BL, Armbruster BN, *et al*. Relating protein pharmacology by ligand chemistry [J]. *Nat Biotechnol*, 2007, 25(2): 197-206.
- [24] Keiser MJ, Setola V, Irwin JJ, *et al*. Predicting new molecular targets for known drugs [J]. *Nature*, 2009, 462(7270): 175-181.
- [25] Peters JU, Schneider P, Mattei P, *et al*. Pharmacological promiscuity: dependence on compound properties and target specificity in a set of recent Roche compounds [J]. *Chem Med Chem*, 2009, 4(4): 680-686.
- [26] Li G, Liu Y, Liu Y, *et al*. Photoaffinity labeling of small-molecule-binding proteins by DNA-templated chemistry [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2013, 52(36): 9544-9549.
- [27] Gould-Rothberg BE, Sundseth SS, DiPippo VA, *et al*. The characterization of PPAR alpha ligand drug action in an *in vivo* model by comprehensive differential gene expression profiling [J]. *Funct Integr Genomics*, 2001, 1(5): 294-304.
- [28] Kim S, LaMontagne K, Sabio M, *et al*. Depletion of methionine aminopeptidase 2 does not alter cell response to fumagillin or bengamides [J]. *Cancer Res*, 2004, 64(9): 2984-2987.
- [29] Henzel WJ, Watanabe C, Stults JT. Protein identification: the origins of peptide mass fingerprinting [J]. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2003, 14(9): 931-942.
- [30] Kramer R, Cohen D. Functional genomics to new drug targets [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2004, 3(11): 965-972.

[收稿日期] 2015-09-07 [修回日期] 2016-01-22

[本文编辑] 李睿旻