

## 基于质量编码探针的质谱多联检测研究进展

殷豪, 王伟, 闵乾昊\*

(南京大学生命分析化学国家重点实验室, 南京 210023)

**摘要** 质量编码探针是一类以质量标签分子对待测物进行特异性识别标记并输出其特征离子信号的探针工具, 其在疾病标志物多元分析和药物靶点筛选等方面都发挥着重要的作用。近年来, 研究者基于各类质谱分析方法, 开发了不同结构与功能的质量编码探针, 为生理环境中生物分子的多重检测以及组织样本的质谱成像提供了有力的技术工具。本文从探针结构组成、质谱分析方法以及在生化分析中的应用3个方面综述了质量编码探针在质谱多联检测方面的最新研究进展, 并对其未来的发展方向进行了展望。

**关键词** 质量编码探针; 质谱分析; 多联检测

中图分类号 R927 文献标志码 A 文章编号 1000-5048(2023)06-0706-12

doi: 10.11665/j.issn.1000-5048.2023062902

引用本文 殷豪, 王伟, 闵乾昊. 基于质量编码探针的质谱多联检测研究进展[J]. 中国药科大学学报, 2023, 54(6): 706 - 717.

Cite this article as: YIN Hao, WANG Wei, MIN Qianhao. Advances in mass-encoded probes for multiplex mass spectrometric detection[J]. J China Pharm Univ, 2023, 54(6): 706 - 717.

## Advances in mass-encoded probes for multiplex mass spectrometric detection

YIN Hao, WANG Wei, MIN Qianhao\*

State Key Laboratory of Analytical Chemistry for Life Science, School of Chemistry and Chemical Engineering, Nanjing University, Nanjing 210023, China

**Abstract** Mass-encoded probe is a probing tool that specifically identifies target molecules and thus outputs their characteristic ion signals with mass tags. It plays an important role in multiplex assay of disease markers, drug target screening and other biomedical applications. Based on various mass spectrometric methods, researchers have developed an array of mass tag-encoded probes with different structures and functions, providing powerful technical tools for multiplex detection of biomolecules in physiological environments and for mass spectrometry imaging of tissue samples. This review introduces the latest research progress of mass tag-encoded probes in multiplex mass spectrometric detection from three aspects, i. e. structural composition of the probes, mass spectrometric methods and their application in biochemical analysis, with a prospect of the future development of mass tag-encoded probes.

**Key words** mass-encoded probes; mass spectrometric analysis; multiplex detection

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 21974062, No. 92053102)

自然界中各类复杂的生命活动往往受到生物体内多种生物分子的共同调控。例如, 在转录水平上多种RNA共同调控基因的表达<sup>[1]</sup>, 在翻译后修

饰水平上多种酶共同调控蛋白的动态修饰<sup>[2]</sup>。在外界环境发生改变时, 这些生物分子在体内的丰度与活性也会随之改变。因此, 针对复杂生物体

收稿日期 2023-06-29 \*通信作者 Tel: 025-89681977 E-mail: minqianhao@nju.edu.cn

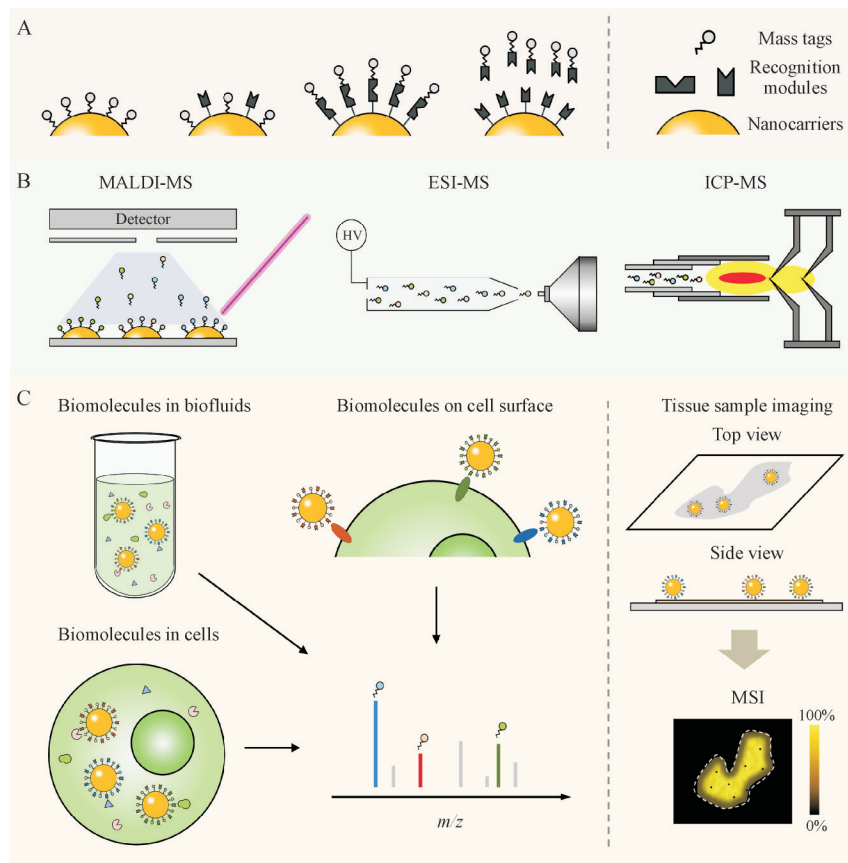
基金项目 国家自然科学基金资助项目(No. 21974062, No. 92053102)

系中多种生物分子的同时检测对了解靶标环境的病理生理状况有着重要的意义。多种生物分子的同时检测需要一种能产生多通道信号的分析方法。传统的荧光、拉曼等技术存在谱带串扰问题,因此在多目标物检测上应用受限<sup>[3]</sup>。质谱方法用待测物的质荷比来指示其目标物的存在,可以将大量的离子信号呈现于同一张谱图中,在生物靶标的多联检测上具有独特的技术优势。然而,生物大分子自身的电离效率较差,且在真实生物体系中浓度很低,往往无法实现质谱的直接检测<sup>[4-5]</sup>。

本世纪初,清华大学张新荣教授首次开发了基于镧系金属元素质量标签的质谱分析方法,为复杂生物体系中生物大分子的多重标记分析提供了一条新策略<sup>[6]</sup>。此后,质量标签标记技术在生物分子的定性定量检测<sup>[7]</sup>、药物筛选<sup>[8]</sup>和多组学分析<sup>[9]</sup>

等方面得到了进一步的应用。近年来,研究者们通过设计质量编码探针,利用易于电离的质量标签来反映目标物的存在、活性与空间分布(图 1)。质量编码探针是将质量标签和识别元件一体化的探针系统,通过探针的识别作用对目标物进行特异性标记与响应,将靶标分子的存在、活性等信息转换成质量标签的离子信号,最终实现多重目标生物分子的高灵敏同步检测。基于质量编码探针的质谱分析策略不仅为生理病理条件下复杂生命活动的多参数分析提供了思路,也为药物靶点筛选和临床医学诊断开辟了新的途径。

本文将系统介绍质量编码探针的结构特点以及基于此开发出的各种质谱定性定量分析方法,并详细阐述其在复杂体系生物分子多联检测与分析中的最新应用。



**Figure 1** Schematic illustration of mass-encoded probes for multiplex mass spectrometric detection

A: Structure composition of mass-encoded probes; B: Mass spectrometric approaches based on mass-encoded probes; C: Applications of mass-encoded probes in multiplex mass spectrometric analysis. MALDI: Matrix-assisted laser desorption/ionization

## 1 质量编码探针的结构组成

为了在复杂样本中实现对多种生物标志物的

同时分析,质量编码探针需要将目标物信号转换成可供质谱识别的质量标签信号,从而在质谱层

面实现多种标签信号的同时输出。质量编码探针通常包含质量标签、识别元件和纳米载体3个部分,这些组成部分分别承担着信号输出、目标物识别和转换以及功能元件承载的功能。质量标签与识别元件作为质量编码探针的核心组分,分别承载着信号输出与目标物识别的重要功能。研究者通常采用直接化学偶联或基于纳米材料介质的共组装方法实现质量标签与识别元件的整合。鉴于纳米结构的可设计性,近年来基于纳米层级结构理性设计和表面改性的质量编码探针已成为生物分子多联检测的重要探针工具。

### 1.1 质量标签

质量标签是一系列易于电离的分子或离子,可输出其特征质荷比信息。通过对待测靶标进行质量编码,依据其特征离子信号强度即可对靶标分子的浓度或活性进行定量分析。目前,金属元素<sup>[10-11]</sup>、有机小分子<sup>[12-13]</sup>、聚合物<sup>[14]</sup>、核酸<sup>[15-16]</sup>、多肽<sup>[17]</sup>等都可以作为质量标签用于待测靶标标记。

金属同位素因其在自然界极低的丰度和相对较强的稳定性而不易受到内源性物质的干扰,被认为是一种优异的质量标签<sup>[18]</sup>。常见的金属同位素标签有镧系元素、过渡金属元素和贵金属元素。通过匹配电感耦合等离子体质谱(ICP-MS)分析技术,金属同位素质量标签展现出极高的灵敏度和信噪比,被广泛用于生物标志物的多重标记。此外,有机小分子和寡聚物由于其优异的电离能力而常被用作质量标签修饰在纳米载体表面,在进行特异性标记的同时可实现信号放大。为了实现多重检测,研究者通常会设计一系列具有类似结构的小分子或聚合物来构建质量标签库。例如,刘虎威、白玉课题组设计合成了一组罗丹明衍生物的质量标签,这些质量标签在质谱检测时会发生两步裂解,利用解离后的罗丹明衍生物离子信号实现多重标记<sup>[19]</sup>。此外,核酸、多肽等生物分子也可用作质量标签。核酸、多肽经过链置换或水解反应后,释放出特定的标签序列,利用不同质荷比离子信号实现多重目标物的特异性标记与分析。

### 1.2 识别元件

许多生物识别元件,如核酸<sup>[20-21]</sup>、多肽<sup>[22]</sup>、抗体<sup>[23]</sup>等,可作为质量编码探针中的识别模块来实现待测靶标的特异性识别,进而将靶标的识别事件

转化为质量编码探针的组装、解体或变构行为,最终通过质量标签信号的变化对不同靶标进行特异性响应。

作为一种具有特定序列的分子,核酸可以依靠 Watson-Crick 碱基配对来对核酸靶标进行识别。而对于非核酸靶标,人工体外筛选获得的核酸适配体可以以较高的亲和力与之结合,从而实现探针的触发响应。林金明课题组提出了基于核酸适配体的细菌捕获策略,结合滚环扩增的信号放大方法,实现了食物中病原体的高效捕获和基于基质辅助激光解吸电离质谱(MALDI-MS)的高灵敏检测<sup>[16]</sup>。在 Caspase 家族<sup>[24]</sup>和基质金属蛋白酶(MMP)家族<sup>[25]</sup>等特定蛋白酶的作用下,连接探针不同模块的底物多肽可以发生水解断裂,导致探针负载质量标签数目发生变化,进而引发质谱响应信号的改变。此外,抗体作为一种具有特异性识别功能的蛋白,也可用于质量编码探针的构建。将固定在界面上的一抗作为目标物捕获抓手,以连接有信号放大模块的二抗作为标记探针,最终形成免疫夹心结构用于临床生化分析<sup>[26]</sup>。例如,Zhong 等<sup>[27]</sup>将抗人 IgE 抗体修饰在磁珠表面用于人 IgE 抗体的预捕获,并借助质量标签和抗原共修饰的金纳米粒子(AuNPs)对人 IgE 抗体进行特异性标记,实现了多种抗体的同时检测。

### 1.3 纳米载体

为了将质量标签和识别元件进行有效组合,研究者们通常利用化学偶联的方式将二者进行直接偶联,或借助纳米材料作为载体实现质量标签与识别元件的共同负载。质量标签和识别元件在纳米载体表面以特定的层级关系进行组装排布,最终形成具有识别标记和信号放大能力的探针工具。

在探针的构筑上,良好的生物相容性和稳定性赋予了 AuNPs 广阔的应用空间。例如,王建华课题组利用 AuNPs 作为载体负载修饰有稀土元素质量标签的 DNA 双链,实现对外泌体上多种蛋白标志物的直接标记<sup>[28]</sup>;刘虎威、白玉课题组将凝集素和有机小分子质量标签共修饰在 AuNPs 上,同时赋予了纳米载体生物识别和信号输出的功能<sup>[29]</sup>。此外,磁性纳米粒子的引入有助于反应后探针系统的分离和收集。吕弋课题组使用夹心法构建了基于镧系元素标签的磁性纳米探针,他们利用磁

性纳米粒子分离去除未与靶标结合的元素标签,从而实现多种肿瘤标志物的 ICP-MS 定量分析<sup>[30]</sup>。此外,纳米材料修饰基底也可以作为质量标签与识别元件的承载介质。纳米材料修饰基底通过其表面的识别元件捕获待测靶标,进一步结合具有特异性识别能力的质量标签,实现靶标一对一的标记。其中,典型的基底材料主要包括金基底<sup>[31]</sup>、玻璃基底<sup>[32]</sup>和纸基底<sup>[12]</sup>。例如,吴坤明课题组利用抗体修饰的玻璃基底实现目标蛋白的预捕获,借助抗体修饰的 AuNPs 和银纳米粒子(AgNPs)分别对捕获的蛋白进行标记,最终通过激光电离质谱(LI-MS)对 AuNPs 和 AgNPs 的分析反映目标蛋白的定量信息。

## 2 基于质量标签多元标记策略的质谱分析方法

### 2.1 MALDI-MS

MALDI-MS 是一种利用激光脉冲能量使待测物电离的质谱分析手段。该方法可以用于有机小分子、核酸、多肽等质量标签的解吸电离,在基于质量编码探针的质谱多联检测与分析上具有广泛的应用。

小分子寡聚物具有较高的激光解吸电离效率,因此可作为质量标签用于 MALDI-MS 分析。Rotello 课题组制备了不同聚乙二醇烷基硫醇修饰的 AuNPs,并验证了其在 MALDI-MS 中的电离能力<sup>[33]</sup>。随后,通过在 AuNPs 上共修饰烷基聚乙二醇质量标签和各种识别元件,进一步将其应用于对各类生物标志物的标记。刘虎威、白玉课题组在 AuNPs 上修饰烷基聚乙二醇质量标签和凝集素,实现了对多种聚糖的原位标记与 MALDI-MS 分析<sup>[29]</sup>。此外,本课题组将共修饰有烷基聚乙二醇质量标签和发夹 DNA 的 AuNPs 作为纳米标签,利用目标 RNA 介导的放大策略实现了 4 种 RNA 的 MALDI-MS 同步定量检测<sup>[14]</sup>。

由于 MALDI-MS 以高能激光作为解吸电离的能量来源,研究者在质量标签的设计时可以引入光裂解基团。纳米载体上的光裂解标签分子在激光的诱导下发生化学键的断裂,通过质量标签片段的释放实现待测物分析。聂宗秀课题组设计了一种光裂解探针用于细胞表面聚糖的标记<sup>[34]</sup>。探针由质量标签和凝集素两部分构成,两部分之间通过 C-S 键连接。在该策略中,利用 355 nm 激光

照射下 C-S 键发生断裂释放出的质量标签片段,最终实现细胞表面聚糖的质谱分析。除此以外,双链 DNA 之间存在的氢键在 MALDI-MS 的激光诱导下也会发生断裂。利用这一性质,林金明课题组开发了 DNA 介导的细胞表面工程化探针,该探针利用凝集素对目标糖型进行标记<sup>[35]</sup>。凝集素上修饰的引物在滚环扩增下产生具有重复序列的长链 DNA,进一步与 DNA 质量标签进行互补配对。形成的 DNA 双链在激光照射下会发生氢键断裂,短链 DNA 片段在 MALDI-MS 中较易发生电离,最终实现目标糖型的放大检测(图 2-A)。

作为一种软电离源,MALDI-MS 在对核酸、多肽等生物大分子的检测中有独特的优势。除了上述利用 DNA 作为质量标签的检测方法,鞠焜先课题组构建了多肽编码的靶板,以蛋白酶切割产生的报告肽段作为质量标签用于不同蛋白酶活性的评估<sup>[36]</sup>。为了对酶的活性进行可视化分析,该课题组进一步开发了基于阵列的细胞凋亡蛋白酶活性图谱芯片(Casp-PC),利用 MALDI-MS 成像对报告肽段的释放量进行分析<sup>[37]</sup>。在此基础上,该课题组还借助氟亲和作用将底物多肽修饰在 ITO 玻璃上,并利用上述策略对两种蛋白酶的活性进行定量检测和可视化分析<sup>[17]</sup>。

### 2.2 ESI-MS

与 MALDI-MS 类似,电喷雾电离质谱(ESI-MS)是一种广泛应用于小分子和生物大分子分析的软电离质谱技术,适用于不同类型质量标签分子的质谱解析。

陈芸课题组构建了一种光裂解的 DNA-PL-多肽探针,其中靶标 microRNA 作为桥梁将探针与琼脂糖纳米粒子偶联。他们利用 ESI-MS 检测光裂解探针中被释放的报告肽段,借助高效液相色谱(HPLC)定量报告肽段的总量,用于指示总 RNA 中目标 microRNA 的含量<sup>[38]</sup>。与之类似,为了对循环肿瘤 DNA(ctDNA)中的单核苷酸变体(SNV)进行准确定量,该课题组开发了质量标记连接酶链式反应(LCR)探针组<sup>[39]</sup>。该策略通过连接酶链式反应进行信号放大,并使用琼脂糖珠分离扩增的产物,在光诱导下释放出可被 ESI-MS 检测的报告肽段。以上工作均利用 ESI-MS 对多肽质量标签进行精确鉴定,结合 HPLC 实现了定量分析。此外,基于串联质量标签(TMT)的定量蛋白质组学通常也

会使用 HPLC 进行复杂样品分离,再结合 ESI-MS/MS 来对目标蛋白质组进行定量。Tate 课题组应用点击化学将化学标记的蛋白质与多功能捕获试剂偶联,经过纯化富集后借助 ESI-MS/MS 对多个细胞系中的蛋白质修饰进行定量分析<sup>[40]</sup>。

近年来,常压质谱技术迅猛发展,由于无需对样品进行特殊处理,可以实现复杂样品的快速在线检测。在 ESI 源的基础上,许多新型电离技术被报道并用于生物分子的多联检测。刘虎威、白玉课题组开发了阵列式电喷雾加速芯片喷雾电离(eCSI)装置,并结合罗丹明衍生物质量标签提出了常压质谱(AMS)免疫分析平台(图 2-B)<sup>[19]</sup>。在电喷雾的作用下,连接质量标签和纳米载体的 Au-S 键发生第一步断裂。第二步断裂由离子源内碰撞诱导的解离(CID)产生,由此释放出质量标签并产生特征离子信号。该课题组还进一步将 AMS 免疫分析平台进行改进后构建了纸基电喷雾电离(PS-ESI)装置,用于血清的快速直接分析<sup>[12]</sup>。最近,该研究团队还开发了基于纳米电喷雾电离质谱(nanoESI-MS)的多维有机质谱流式系统,利用 nanoESI 源将细胞表面的质量标签电离,通过输出单个细胞表面的分子信息实现单个细胞的分型<sup>[41]</sup>。

### 2.3 ICP-MS

ICP-MS 因其极高的灵敏度在基于质量标签的质谱多联检测中被广泛应用。ICP-MS 可以对金属元素进行高灵敏响应,因此在基于元素标签的质量编码探针中具有独特的技术优势。

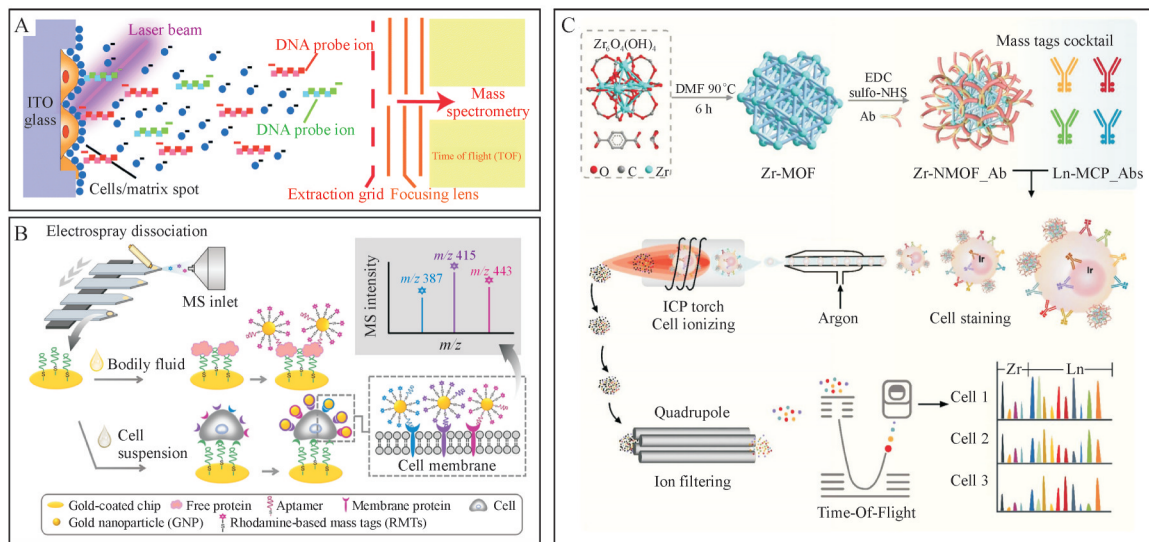
ICP-MS 对稀土元素的检测有着极高的灵敏度和较宽的线性范围,因此稀土元素的使用在元素质谱流式技术可以在更高维度输出细胞表面分子信息,已成为质量标签技术在生命分析领域的重要研究范式。与传统荧光流式不同,质谱流式技术以金属元素作为标签,以 ICP-MS 作为检测器,可以对单细胞多参数分析。新型质谱流式标记方法的开发可以提高标记的效率,更全面地揭示细胞所处的生理病理状态。Gonzalez 等<sup>[50]</sup>开发了一种基于荧光-质量杂交标签的纳米追踪器,应用于长时间的活细胞标记。这种纳米追踪器可以实现荧光流式和质谱流式双模态信号输出,兼顾了荧光标签在微观上的灵敏度和质量标签在宏观上的准确性。质谱流式技术以极高的通量呈现细胞表面或细胞内部蛋白的表达水平,为展现细胞

标记中占主体地位<sup>[42]</sup>。通过在探针上修饰多种稀土元素标签,可以实现多个目标物的高灵敏定量检测。例如,王秋泉课题组利用修饰有镧系元素标签的短链 DNA 与滚环扩增产生的长链 DNA 配对,实现了基于 ICP-MS 的多种 DNA 同时检测<sup>[43]</sup>。吕弋课题组使用可整合镧系元素标签的底物 DNA 链,并结合 DNA 酶步行器的信号放大实现了对多种 microRNA 的高灵敏测定<sup>[44]</sup>。胡斌课题组借助多组分核酸酶对修饰有元素标签的底物 DNA 的特异性切割,实现了多种 microRNA 的 ICP-MS 同时检测<sup>[45]</sup>。该课题组后续还结合镧系元素标记策略和熵驱动的催化扩增,实现了基于 ICP-MS 的多种 RNA 定量分析<sup>[46]</sup>。除了在 DNA 末端修饰元素标签,抗体与镧系元素标签的偶联也为多种蛋白质的免疫分析提供了标签工具。商业化的金属螯合聚合物(MCP)使用螯合试剂,如 DOTA<sup>[47]</sup>和 DTPA<sup>[48]</sup>等,借助氮原子和羧基与三价阳离子形成的稳定配合物将镧系元素偶联在聚合物上,并利用聚合物与抗体的共价连接构建基于元素标签的质量标记试剂。相比于只含有单个镧系原子的镧系金属标签,这种金属螯合聚合物可以同时螯合多个金属原子,提高了镧系元素标签的原子载量,大大提高了基于 ICP-MS 方法的检测灵敏度。为了承载更多数量的金属原子,丁显廷课题组开发了一种含 Zr 同位素的纳米金属有机框架(Zr-NMOF),并在其表面进行抗体修饰(图 2-C)。该复合型的纳米结构在细胞标记上拥有比传统 MCP 更高的灵敏度,从而拓展了 ICP-MS 在微量、痕量目标物分析上的应用<sup>[49]</sup>。

的生命活动提供了高维度的分子信号。结合生物信息学的数据处理手段,研究者们可以实现海量数据挖掘,为疾病诊疗、药效评价等方面提供数据支撑。Tislevoll 等<sup>[51]</sup>应用 32 维质谱流式细胞术来研究急性髓系白血病患者化疗后外周血样本中的细胞信号转导网络。通过无监督和有监督的机器学习,作者发现细胞外信号调节激酶(ERK)1/2 的减少和 p38 丝裂原活化蛋白激酶(MARK)的磷酸化是患者 5 年生存率的重要预测指标。

### 2.4 其他质谱分析方法

除了上述 3 种最常用的质谱分析方法,飞行时间二次离子质谱(ToF-SIMS)、基质辅助激光解吸电离-免疫组化(MALDI-IHC)、免疫-解吸电喷雾电



**Figure 2** Scheme of utilizing different mass spectrometric approaches to detect mass tags

A: MALDI-MS<sup>[35]</sup>; B: eCSI-MS<sup>[19]</sup>; C: ICP-MS<sup>[49]</sup>

离 (Immuno-DESI) 等分析手段也被用于质量编码探针的质谱检测。张俊龙课题组通过代谢标记将带有叠氮或炔基的分子引入细胞中的生物大分子,并利用点击化学将稀土金属标签与其偶联。通过采集镧系元素丰富的重组碎片离子,成功实现了多种生物标志物的 ToF-SIMS 成像<sup>[52]</sup>。Heeren 课题组开发了 6 种光切割质量标签抗体 (PC-MT), 结合靶向和非靶向质谱成像,将 MALDI-IHC 应用于深度空间蛋白质组学的研究中<sup>[53]</sup>。在 MALDI 紫外光的诱导下,质量标签和抗体之间的连接子发生断裂,从而释放出易于电离的多肽质量标签用于 MALDI 成像。这种 MALDI-IHC 技术拥有比普通免疫组化技术更高的检测通量,在对特定靶标进行成像的同时可以进行非靶向肽段的成像,为研究组织肿瘤微环境中的疾病标志物提供了一种新的策略。抗体偶联质量标签的分析策略也被用于 DESI-MSI 中。Zare 课题组设计了基于 Immuno-DESI 的质量标记策略,并对组织上的药物靶点和级联信号因子进行了多重成像<sup>[54]</sup>。DESI 离子源产生的酸性电喷雾微滴会诱导质量编码探针中的硼酸酯键发生断裂,产生硼酸质量标签被质谱实时采集,实现组织样本上生物大分子的在线分析。

### 3 质量编码探针在质谱多联检测与分析中的应用

#### 3.1 生物样本中多种靶标分子的定量分析

体液或细胞裂解液中存在多种与疾病相关的

生物分子,如核酸、蛋白质、脂质等。对于某种特定的疾病而言,仅仅检测某一种生物分子无法满足精准诊断的要求。对多种疾病标志物的同时检测有助于提高疾病诊断的准确率,减少假阳性或假阴性情况的发生。基于质量编码的质谱分析策略可以对体液或细胞裂解液中多种生物靶标进行同时高灵敏定量检测,从而为疾病诊断和药效分析提供指导和帮助。

核酸靶标的检测在临床检验中具有重要意义。王秋泉课题组结合镧系元素质量标签和滚环扩增技术,实现了对多种病毒 DNA (HIV, HAV, HBV) 的同时检测<sup>[43]</sup>。探针在 4T1 细胞裂解液和血清中的初步应用证实了该方法在临床检测上的实际应用价值。吕弋课题组开发了一种基于 ICP-MS 的三维 DNA 步行器,成功对肺癌相关的 miR-125b、miR-141 和 miR-21 在肺癌细胞 A549 和正常细胞 HBE 中的含量进行监测,验证了 3 种 microRNA 在肺癌细胞系中的过量表达<sup>[44]</sup>。

除了多种 DNA 或 RNA 的同时检测外,细胞裂解液中多种酶活性的同时评估有助于了解不同酶在生理条件下的作用。鞠焜先课题组开发了一种基于 MALDI-MS 的多肽编码靶板用于胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶活性的分析<sup>[36]</sup>。通过检测非胰腺细胞 (HeLa 和 MCF-7) 和胰腺癌细胞 (PANC-1 和 PC-3) 裂解液中两种酶的活性,证实这种方法可以有效区分胰腺细胞和非胰腺细胞。该课题组还利用

开发的蛋白酶活性图谱芯片,对 caspase 1、2、3 和 8 的活性进行同时评估<sup>[37]</sup>。此外,该课题组将开发的阵列应用于检测 MCF-7 细胞和 MCF/ADR 细胞在化疗药物阿霉素(DOX)处理前后多种细胞凋亡蛋白酶活性的变化。该方法可以呈现出两种细胞裂解液中酶活性的差异,为细胞耐药性评估和区分药物敏感/耐药提供了重要的技术手段。Mrksich 课题组提出了基于 MALDI-MS 的自组装单层膜技术(SAMDI-MS),并成功用于酶反应底物的高通量筛选<sup>[55]</sup>。该课题组利用 SAMDI-MS 技术测量了 CYP2C9 酶的催化活性,成功从 12 种药物中筛选出 CYP2C9 酶的抑制剂,并确定了抑制剂的抑制常数( $K_i$ )<sup>[56]</sup>。该方法可以用于更大规模的药物代谢水平研究和药物蛋白相互作用评估,从技术层面助力新型药物的筛选与开发。

### 3.2 细胞表面多种标志物的同时检测

细胞表面生物分子的表达与许多生命活动密切相关,例如细胞黏附<sup>[57]</sup>、细胞信号转导<sup>[58]</sup>、免疫应答<sup>[59]</sup>等。在疾病的发生和进展中,细胞表面的分子会出现异常表达。在时间和空间多个维度分析细胞表面疾病标志物,有助于更好地从分子层面上理解病理过程中细胞发生的变化,为后期药物开发奠定基础。质量编码探针上整合的生物识别元件赋予其出色的特异性,可用于细胞表面多种生物分子的同时准确定量。

刘宝红课题组利用质量标签修饰的 AuNPs 和抗体修饰的金基底,实现了单个细胞表面多种蛋白质的同时分析<sup>[31]</sup>。通过对比 MCF-7 细胞和 DU145 细胞,验证了 MUC1、EpCAM 和 CK19 3 种蛋白质在单个细胞水平上的差异化表达。细菌表面蛋白质的标记对菌群的识别和分选具有重要的意义。如图 3-A 所示,王秋泉课题组以镧系元素编码的多克隆抗体作为特异性的细菌身份标签(Ln-pAb-ID),实现了混合菌液中对单个菌株的计数和识别<sup>[60]</sup>。他们还将这种镧系元素编码的质谱分析策略应用于万古霉素和 AgNPs 的抗菌能力评估和机制探究。作者发现两种抗菌剂均能对模型细菌造成一定的杀伤,并且 AgNPs 杀伤细菌的机制有很多种,包括 AgNPs 自身对脂多糖层上连接 *N*-乙酰葡萄糖胺和 *N*-乙酰胞壁酸的糖苷键的打断,以及 AgNPs 上释放的  $Ag^+$  对细菌造成的氧化损伤。Chiu 课题组设计了一种具有荧光和质谱信号的镧系配

位半导体聚合物点,可以实现流式细胞术和质谱流式细胞术的双功能应用<sup>[61]</sup>。探针可以在 MCF-7 细胞和 Jurkat T 细胞的混合物中实现两种细胞的识别区分,并且成功应用于人外周血单核细胞(PBMC)的分型,展现了其在单细胞分析上的应用潜力。

疾病的发生往往伴随着细胞表面蛋白质糖基化修饰的异常改变<sup>[62]</sup>。原位检测细胞表面的多种聚糖有助于理解糖基化修饰的生物学功能,为相关药物的研发提供新思路。林金明课题组利用 DNA 介导的细胞表面工程化,实现了对  $\alpha$ -D-甘露糖/ $\alpha$ -D-葡萄糖和  $\beta$ 1-6N 乙酰葡萄糖胺的同时标记<sup>[35]</sup>。在此基础上,他们进一步将这种策略应用于评估肿瘤细胞的多药抗性与 N 聚糖表达量之间的关系。研究者发现在抗药的细胞系 MCF7/ADR 细胞中两种聚糖的表达量均高于 MCF-7 细胞,并且在衣霉素作用下 MCF7/ADR 细胞中两种聚糖的下调水平均高于 MCF-7 细胞。作者推测衣霉素诱导的糖基化改变与细胞多药抗性的降低具有相关性。聂宗秀课题组将制备的光裂解探针应用于 MCF-7 细胞和 MCF-7R 细胞中 4 种聚糖( $\alpha$ -D-甘露糖/ $\alpha$ -D-葡萄糖、 $\beta$ -半乳糖、*N*-乙酰葡萄糖胺/唾液酸、Neu5Aca2-6Gal(NAc)-R)的检测<sup>[34]</sup>,并在单细胞水平上对 4 种聚糖的比例进行了定量分析,发现细胞的抗药性与  $\beta$ -半乳糖和 Neu5Aca2-6Gal(NAc)-R 的明显上调有关。

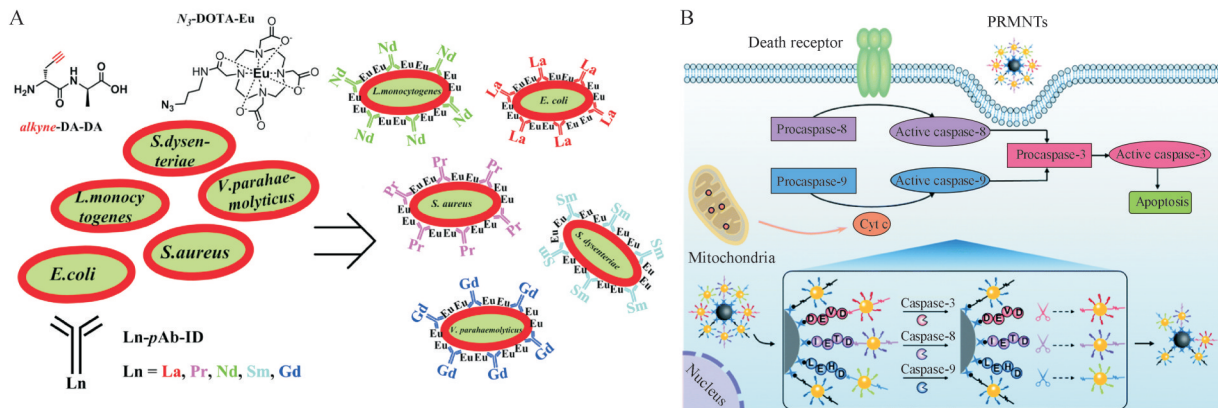
### 3.3 细胞内多种活性分子测定

在真实环境下评估生物分子的活性对了解细胞内生理活动的动态网络具有重要意义。探针层级结构的合理设计使得细胞内活性生物分子的存在及活性信息可以触发探针变构,进而在质谱层面呈现出质量标签离子信号的变化。

多酶活性的同时评估有助于研究相关信号通路中包含的多种酶在生理环境下的动态变化。此外,对多种酶的活性进行同时评估有助于阐明细胞在外源药物刺激下的生理状态改变,为药物靶点筛选和药效分析提供参考和借鉴。基于此,本课题组开发了核卫星结构蛋白酶响应型质量编码纳米翻译器(PRMNTs),用于同时评估多种细胞凋亡蛋白酶的活性(图 3-B)<sup>[24]</sup>。探针被细胞吞入后,细胞内蛋白酶对核卫星结构连接肽段进行水解,酶切后磁珠上剩余的不同 AuNPs 表面质量标签的

离子强度变化可最终用于呈现多种蛋白酶的活性。通过检测多种细胞凋亡蛋白酶的活性,作者发现在不同外源刺激下细胞程序性死亡涉及的凋亡途径具有差异性,不同蛋白酶的激活在细胞凋亡进程中存在特定的先后顺序。除了对细胞内

多种酶活性进行同时评估外,本课题组还构建了荧光-质量双编码纳米探针(FMNPs),借助荧光成像方法可视化 microRNA 在单个细胞中分布,并利用质谱技术实现 microRNA 的精确定量,成功实现了 miR-21 和 miR-141 在多种细胞中的双模态检测<sup>[63]</sup>。



**Figure 3** Schematic illustration of biomarker detection by mass-encoded probes

A: Single particle inductively coupled plasma mass spectrometric (spICPMS) method for bacteria counting and recognition<sup>[60]</sup>; B: Protease-responsive mass barcoded nanotranslators for assaying the activity of intracellular proteases<sup>[24]</sup>

### 3.4 组织样本中多目标物成像

质谱成像通过逐点采集样品表面单个像素点的分子信号,进一步利用软件重构以形成质谱成像图谱,可同时获取数百种分子的空间分布信息<sup>[64]</sup>。结合质量编码探针和质谱成像技术,研究人员可以对摄入体内的药物分子、载体以及纳米颗粒进行空间定位,并对组织上多种目标物进行同时标记,这为研究不同目标物的生物分布提供了图像信息。

在 LDI-MS 的激光照射下,某些纳米材料在低质量范围内会出现特征性的指纹信号。借助该特点,聂宗秀课题组对碳纳米材料(多壁碳纳米管、单层石墨烯、碳纳米点)、MoS<sub>2</sub> 纳米片和含碳气溶胶在亚器官上的分布进行了质谱成像探究。该研究团队通过在多壁碳纳米管上负载 DOX,实现了对负载有药物的碳纳米材料的成像以及对其在肿瘤组织中的定量<sup>[65]</sup>。此后,利用负载有 DOX 的 MoS<sub>2</sub> 纳米片的特征质谱信号,作者对 MoS<sub>2</sub> 的器官和肿瘤摄取以及 DOX 的原位释放进行了定量分析,并对 DOX/PEG-MoS<sub>2</sub> 在正常组织和肿瘤组织组织间和组织内的分布进行成像<sup>[66]</sup>。利用碳气溶胶中元素碳(EC)和有机碳(OC)的内在指纹图谱,该课题组提出了一种无标签的质谱成像策略,实现

了对器官中碳气溶胶沉积、转移和组成改变的成像和定量,加深了对气溶胶颗粒健康危害的理解<sup>[67]</sup>。

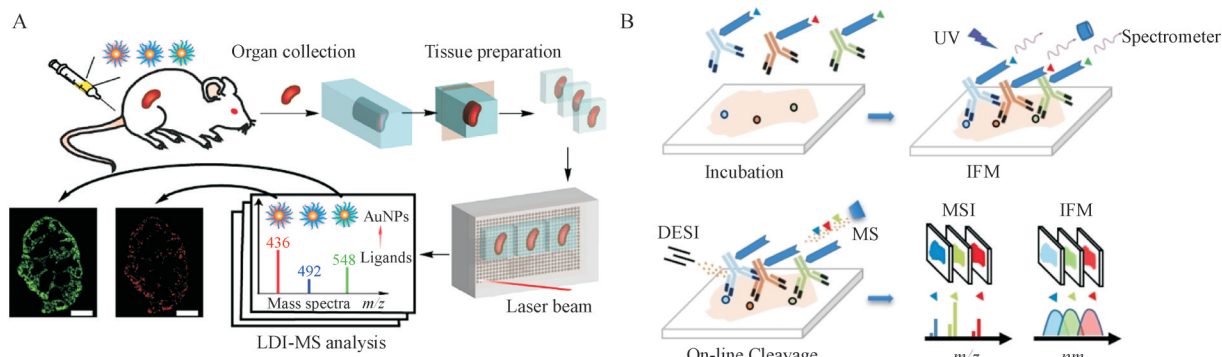
Rotello 课题组在 AuNPs 表面修饰上一系列具有不同端基的聚乙二醇烷基硫醇,并用 LDI-MSI 对多种 AuNPs 在小鼠体内的生物分布进行成像(图 4-A)<sup>[68]</sup>。脾脏成像的实验数据证明纳米粒子在亚器官的分布受到其表面化学的影响,为后续多重成像的研究奠定了基础。为了研究纳米粒子表面修饰的化学单层在生物体内稳定性,该课题组提出了 ICP-MS 和 LDI-MS 双模态成像策略<sup>[69]</sup>。通过 ICP-MS 确定 AuNPs 的总量,利用 LDI-MS 确定 AuNPs 上剩余的质量标签的数量,最终评估出 AuNPs 表面质量标签的稳定性。成像数据表明纳米粒子在脾脏不同位置具有不同的稳定性,这为理解纳米材料的药代动力学性质提供了有力的方法和工具。

质量编码探针可以对组织表面难电离的生物标志物进行标记,进而通过质量标签分子的质谱成像呈现出目标生物分子的组织空间分布。聂宗秀课题组将制备的光裂解探针应用于乳腺组织上多种聚糖的质谱成像,成功揭示了聚糖在癌症组织和癌旁组织的不同分布<sup>[34]</sup>。刘虎威、白玉课题组将双功能激光可裂解探针用于聚糖识别标记,最



终实现肝癌组织和癌旁组织的成像<sup>[29]</sup>。根据聚糖的空间分布差异,该工作实现了具有不同病理状态组织和不同微观结构组织的清晰区分,包括肝坏死组织、肝纤维化组织、上皮组织和结缔组织等。最近,Zare 课题组开发了一种基于硼酸质量标签(BMT)修饰抗体的免疫解吸电喷雾电离质谱

成像平台(图4-B)。通过对EGFR和其下游的级联信号因子(Raf、ERK、p-MEK、p-Raf、p-ERK)以及两种相关的酶(PLC、PKC)进行质量标签标记与成像,作者发现抗肿瘤药拉帕替尼可以通过调节下游信号通路和其他代谢途径,抑制EGFR介导的肿瘤生长<sup>[54]</sup>。



**Figure 4** Schematic illustration of mass-encoded probes for multiplex imaging in tissue samples

A: Multiplex imaging of different AuNPs in mouse splenic tissues by LDI-MS to unveil the distribution of nanoparticles<sup>[68]</sup>; B: Multiplex imaging of bio-molecules in mouse tumor tissues using immuno-desorption electrospray ionization mass spectrometry<sup>[54]</sup>

#### 4 总结和展望

基于质量编码探针的质谱分析技术能够对多种疾病标志物的同时高灵敏检测,有助于全面理解生命系统功能分子的内在关联,同时在方法学层面也拓宽了质谱在医学、药学等领域的应用。典型的质量编码探针由质量标签、识别元件和纳米载体3个部分构成。通过合理设计将3个功能组件有效整合,即可构筑具有特定功能的探针,最终用于不同应用场景下的质谱多联检测。针对于不同的质谱检测方式,质量编码探针的设计和使用也各具特色,为细胞内外多种疾病标志物的检测和成像提供了丰富有效的手段。

然而,质量编码探针在合成、作用及检测过程中还存在如下技术难点:(1)针对不同类型目标物开发一种通用型的质量编码探针一直是困扰研究者的重要问题。其中,质量标签的选取要在兼顾离子化效率和生物毒性的前提下,保证与探针其余部分偶联的稳定性。(2)由于探针递送过程中存在许多因素的影响,例如细胞内吞的效率和溶酶体逃逸的效率,因此细胞内活性分子的原位定量分析目前还较难实现。生物体各种内源性物质不仅会影响质量标签或识别元件在载体表面的稳定

性,也会由于基质效应影响质量标签电离的效率。(3)对于实际样品中丰度相对较低的生物分子,现有的信号放大策略主要依赖于酶催化反应和纳米材料质量标签载体,亟待开发级联放大系统或高标签载量的质量编码探针对于微量靶点进行信号增敏。

质量编码探针在生物学上的大规模应用也存在诸多挑战。首先,考虑到同源靶标在识别元件识别对应目标物时存在的干扰,质量编码探针在多目标物响应上的正交性仍需进一步优化。其次,由于无机纳米粒子和重金属元素存在未知的生物毒性,质量编码探针在活细胞乃至在活体上的应用受到了限制。此外,质量编码探针因其结构设计的复杂性和检测目标物的异质性,暂时无法实现大规模目标物的同时分析,在检测通量上还有很大提升空间。

为推进质量编码探针在生物体系中的应用,设计具有合理层级结构的探针将有助于实现原位靶标分析。此外,进一步建立质量标签库可以为生物标志物的多元检测乃至对药物靶点筛选和药物疗效评估起到推动作用。当前,将人工智能技术应用于生物化学等领域的研究已经成为当前学科发展的趋势。例如,美国麻省理工学院 Bhatia 课

题组近年来开发了一类可对疾病特异性蛋白酶组进行特异性响应的肾脏可清除质量编码探针,利用尿液中收集的质量标签丰度反映病理环境下的酶活性信息。同时,开发基于机器学习算法的疾病分类器,依据多种蛋白酶活性的异常调控水平成功实现了生命体生理病理状态的分类评估<sup>[70-72]</sup>。借助超高容量的质量编码探针库,结合机器学习和深度学习等技术,有望实现对不同类型生物标志物的超高容量多重标记以及多参数质谱分析。人工智能技术的应用不仅有助于多目标物的高通量检测,还能从繁杂的数据中提炼出有价值的分子信息,为新药靶点的发现提供多维度的数据支持。在可以预见的未来,以多重质量编码技术为工具,结合人工智能的质谱大数据分析将是生命分析和生物医药领域一个快速发展的重要研究方向。

## References

- [1] Engreitz JM, Haines JE, Perez EM, *et al.* Local regulation of gene expression by lncRNA promoters, transcription and splicing[J]. *Nature*, 2016, **539**(7629): 452-455.
- [2] Witkos TM, Chan WL, Joensuu M, *et al.* GORAB scaffolds COPI at the trans-Golgi for efficient enzyme recycling and correct protein glycosylation[J]. *Nat Commun*, 2019, **10**(1): 127.
- [3] Liu R, Zhang SX, Wei C, *et al.* Metal stable isotope tagging: renaissance of radioimmunoassay for multiplex and absolute quantification of biomolecules[J]. *Acc Chem Res*, 2016, **49**(5): 775-783.
- [4] Suttapitugsakul S, Sun FX, Wu RH. Recent advances in glycoproteomic analysis by mass spectrometry[J]. *Anal Chem*, 2020, **92**(1): 267-291.
- [5] Sejalon-Cipolla M, Bruyat P, Bregant S, *et al.* Targeting out of range biomolecules: chemical labeling strategies for qualitative and quantitative MALDI MS-based detection[J]. *Trac Trends Anal Chem*, 2021, **143**: 116399.
- [6] Zhang C, Wu FB, Zhang XR. ICP-MS-based competitive immunoassay for the determination of total thyroxine in human serum [J]. *J Anal At Spectrom*, 2002, **17**(10): 1304-1307.
- [7] Li PF, Pang JL, Xu SX, *et al.* A glycoform-resolved dual-modal ratiometric immunoassay improves the diagnostic precision for hepatocellular carcinoma[J]. *Angew Chem Int Ed*, 2022, **61**(21): e202113528.
- [8] Khsai AW, Rajagopal S, Sun JP, *et al.* Monitoring protein conformational changes and dynamics using stable-isotope labeling and mass spectrometry[J]. *Nat Protoc*, 2014, **9**(6): 1301-1319.
- [9] Messner CB, Demichev V, Bloomfield N, *et al.* Ultra-fast proteomics with scanning SWATH[J]. *Nat Biotechnol*, 2021, **39**(7): 846-854.
- [10] Liu JY, Jarzabek J, Majonis D, *et al.* Metal-encoded polystyrene microbeads as a mass cytometry calibration/normalization standard covering channels from yttrium (89 amu) to bismuth (209 amu)[J]. *Anal Chem*, 2020, **92**(1): 999-1006.
- [11] Zhang YF, Zabinyakov N, Majonis D, *et al.* Tantalum oxide nanoparticle-based mass tag for mass cytometry[J]. *Anal Chem*, 2020, **92**(8): 5741-5749.
- [12] Xu ST, Liu MX, Feng J, *et al.* One-step hexaplex immunoassays by on-line paper substrate-based electrospray ionization mass spectrometry for combined cancer biomarker screening[J]. *Chem Sci*, 2021, **12**(13): 4916-4924.
- [13] Tam TS, Cheng YH, Lok CN, *et al.* Surface optimization of gold nanoparticle mass tags for the sensitive detection of protein biomarkers via immuno-capture LI-MS[J]. *Analyst*, 2020, **145**(19): 6237-6242.
- [14] Zhang ZZ, Xu HM, Fan YY, *et al.* Mass nanotags mediate parallel amplifications on nanointerfaces for multiplexed profiling of RNAs[J]. *Nano Lett*, 2023, **23**(5): 1820-1829.
- [15] Ahmad R, Jang H, Batule BS, *et al.* Barcode DNA-mediated signal amplifying strategy for ultrasensitive biomolecular detection on matrix-assisted laser desorption ionization time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry[J]. *Anal Chem*, 2017, **89**(17): 8966-8973.
- [16] Li N, Zhang WF, Lin J, *et al.* A specific mass-tag approach for detection of foodborne pathogens using MALDI-TOF mass spectrometry[J]. *Anal Chem*, 2022, **94**(9): 3963-3969.
- [17] Ferreira MS, de Oliveira DN, Mesquita CC, *et al.* MALDI-MSI: a fast and reliable method for direct melatonin quantification in biological fluids[J]. *J Anal Sci Technol*, 2016, **7**: 1-6.
- [18] Xu ST, Liu HW, Bai Y. Highly sensitive and multiplexed mass spectrometric immunoassay techniques and clinical applications[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2022, **414**(18): 5121-5138.
- [19] Xu ST, Ma W, Bai Y, *et al.* Ultrasensitive ambient mass spectrometry immunoassays: multiplexed detection of proteins in serum and on cell surfaces[J]. *J Am Chem Soc*, 2019, **141**(1): 72-75.
- [20] Kuang YQ, Cao JX, Xu FF, *et al.* Duplex-specific nuclease-mediated amplification strategy for mass spectrometry quantification of MiRNA-200c in breast cancer stem cells[J]. *Anal Chem*, 2019, **91**(14): 8820-8826.
- [21] Yang YM, Wang WQ, Liu HM, *et al.* Sensitive quantification of microRNA in blood through multi-amplification toehold-mediated DNA-strand-displacement paper-spray mass spectrometry (TSD-PS MS) [J]. *Angew Chem Int Ed*, 2022, **61**(9): e202113051.
- [22] Mukherjee P, Berns EJ, Patino CA, *et al.* Temporal sampling of enzymes from live cells by localized electroporation and quantification of activity by SAMDI mass spectrometry[J]. *Small*,

- 2020, **16**(26): e2000584.
- [23] Hong SH, Kim JI, Kang H, *et al.* Detection and quantification of the Bcr/Abl chimeric protein on biochips using LDI-TOF MS[J]. *Chem Commun*, 2014, **50**(37): 4831-4834.
- [24] Xu HM, Huang XD, Zhang ZZ, *et al.* Protease-responsive mass barcoded nanotranslators for simultaneously quantifying the intracellular activity of cascaded caspases in apoptosis pathways[J]. *Chem Sci*, 2020, **11**(20): 5280-5288.
- [25] Anahtar M, Chan LW, Ko H, *et al.* Host protease activity classifies pneumonia etiology[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2022, **119**(25): e2121778119.
- [26] Jia JH, Ao LJ, Luo YX, *et al.* Quantum dots assembly enhanced and dual-antigen sandwich structured lateral flow immunoassay of SARS-CoV-2 antibody with simultaneously high sensitivity and specificity[J]. *Biosens Bioelectron*, 2022, **198**: 113810.
- [27] Zhong XQ, Qiao L, Gasilova N, *et al.* Mass barcode signal amplification for multiplex allergy diagnosis by MALDI-MS[J]. *Anal Chem*, 2016, **88**(12): 6184-6189.
- [28] Zhang XW, Liu MX, He MQ, *et al.* Integral multielement signals by DNA-programmed UCNP-AuNP nanosatellite assemblies for ultrasensitive ICP-MS detection of exosomal proteins and cancer identification[J]. *Anal Chem*, 2021, **93**(16): 6437-6445.
- [29] Ma W, Xu ST, Nie HG, *et al.* Bifunctional cleavable probes for *in situ* multiplexed glycan detection and imaging using mass spectrometry[J]. *Chem Sci*, 2019, **10**(8): 2320-2325.
- [30] Chen X, Song HJ, Li ZY, *et al.* Lanthanide nanoprobe for the multiplex evaluation of breast cancer biomarkers[J]. *Anal Chem*, 2021, **93**(40): 13719-13726.
- [31] Wang YN, Du RJ, Qiao L, *et al.* Ultrasensitive profiling of multiple biomarkers from single cells by signal amplification mass spectrometry[J]. *Chem Commun*, 2018, **54**(69): 9659-9662.
- [32] Cheng YH, Cheung YF, Siu-Chung Tam T, *et al.* Plasmonic metal nanoparticles as efficient mass tags for ion signal amplification and ultrasensitive detection of protein markers[J]. *Anal Chim Acta*, 2019, **1055**: 1-6.
- [33] Zhu ZJ, Ghosh PS, Miranda OR, *et al.* Multiplexed screening of cellular uptake of gold nanoparticles using laser desorption/ionization mass spectrometry[J]. *J Am Chem Soc*, 2008, **130**(43): 14139-14143.
- [34] Han J, Huang X, Liu HH, *et al.* Laser cleavable probes for *in situ* multiplexed glycan detection by single cell mass spectrometry[J]. *Chem Sci*, 2019, **10**(47): 10958-10962.
- [35] He ZY, Chen QS, Chen FM, *et al.* DNA-mediated cell surface engineering for multiplexed glycan profiling using MALDI-TOF mass spectrometry[J]. *Chem Sci*, 2016, **7**(8): 5448-5452.
- [36] Hu JJ, Liu F, Ju HX. Peptide code-on-a-microplate for protease activity analysis via MALDI-TOF mass spectrometric quantitation[J]. *Anal Chem*, 2015, **87**(8): 4409-4414.
- [37] Hu JJ, Liu F, Ju HX. MALDI-MS patterning of caspase activities and its application in the assessment of drug resistance[J]. *Angew Chem Int Ed*, 2016, **55**(23): 6667-6670.
- [38] Kuang YQ, Liu L, Wang ZC, *et al.* A photocleavable and mass spectrometric DNA-peptide probe enables fast and specific enzyme-free detection of microRNA[J]. *Talanta*, 2020, **211**: 120726.
- [39] Wang ZC, Li L, Kuang YQ, *et al.* Simultaneous quantification of multiple single nucleotide variants in PIK3CA ctDNA using mass-tagged LCR probe sets[J]. *Talanta*, 2023, **258**: 124426.
- [40] Kallemeijn WW, Lanyon-Hogg T, Panyain N, *et al.* Proteome-wide analysis of protein lipidation using chemical probes: in-gel fluorescence visualization, identification and quantification of *N*-myristoylation, *N*- and *S*-acylation, *O*-cholesterylation, *S*-farnesylation and *S*-geranylgeranylation[J]. *Nat Protoc*, 2021, **16**(11): 5083-5122.
- [41] Xu ST, Liu MX, Bai Y, *et al.* Multi-dimensional organic mass cytometry: simultaneous analysis of proteins and metabolites on single cells[J]. *Angew Chem Int Ed*, 2021, **60**(4): 1806-1812.
- [42] Liu ZR, Li XT, Xiao GY, *et al.* Application of inductively coupled plasma mass spectrometry in the quantitative analysis of biomolecules with exogenous tags: a review[J]. *Trac Trends Anal Chem*, 2017, **93**: 78-101.
- [43] Luo YC, Yan XW, Huang YS, *et al.* ICP-MS-based multiplex and ultrasensitive assay of viruses with lanthanide-coded biospecific tagging and amplification strategies[J]. *Anal Chem*, 2013, **85**(20): 9428-9432.
- [44] Wang CQ, Song HJ, Zhao X, *et al.* Multiplex DNA walking machines for lung cancer-associated miRNAs[J]. *Anal Chem*, 2022, **94**(3): 1787-1794.
- [45] Kang Q, He M, Chen BB, *et al.* MNzyme-catalyzed amplification assay with lanthanide tags for the simultaneous detection of multiple microRNAs by inductively coupled plasma-mass spectrometry[J]. *Anal Chem*, 2021, **93**(2): 737-744.
- [46] Kang Q, Chen BB, He M, *et al.* Simple amplifier coupled with a lanthanide labeling strategy for multiplexed and specific quantification of microRNAs[J]. *Anal Chem*, 2022, **94**(37): 12934-12941.
- [47] Han GJ, Zhang SC, Xing Z, *et al.* Absolute and relative quantification of multiplex DNA assays based on an elemental labeling strategy[J]. *Angew Chem Int Ed*, 2013, **52**(5): 1466-1471.
- [48] Liu JY, Wong ECN, Lu E, *et al.* Control of metal content in polystyrene microbeads prepared with metal complexes of DTPA derivatives[J]. *Chem Mater*, 2021, **33**(10): 3802-3813.
- [49] Dang JQ, Li HX, Zhang LL, *et al.* New structure mass tag based on Zr-NMOF for multiparameter and sensitive single-cell interrogating in mass cytometry[J]. *Adv Mater*, 2021, **33**(35): e2008297.
- [50] Delgado-Gonzalez A, Laz-Ruiz JA, Cano-Cortes MV, *et al.* Hybrid fluorescent mass-tag nanotrackers as universal reagents for long-term live-cell barcoding[J]. *Anal Chem*, 2022, **94**(30): 10626-10635.

- [51] Tislevoll BS, Hellesøy M, Fagerholt OHE, *et al.* Early response evaluation by single cell signaling profiling in acute myeloid leukemia[J]. *Nat Commun*, 2023, **14**(1): 115.
- [52] Jin GQ, Sun DE, Xia XQ, *et al.* Bioorthogonal lanthanide molecular probes for near-infrared fluorescence and mass spectrometry imaging[J]. *Angew Chem Int Ed*, 2022, **61**(43): e202208707.
- [53] Claes BSR, Krestensen KK, Yagnik G, *et al.* MALDI-IHC-guided In-depth spatial proteomics: targeted and untargeted MSI combined[J]. *Anal Chem*, 2023, **95**(4): 2329-2338.
- [54] Song XW, Zang QC, Li C, *et al.* Immuno-desorption electrospray ionization mass spectrometry imaging identifies functional macromolecules by using microdroplet-cleavable mass tags[J]. *Angew Chem Int Ed*, 2023, **62**(9): e202216969.
- [55] Rathore R, Corr JJ, Lebre DT, *et al.* Extending matrix-assisted laser desorption/ionization triple quadrupole mass spectrometry enzyme screening assays to targets with small molecule substrates[J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2009, **23**(20): 3293-3300.
- [56] Anderson LL, Berns EJ, Bugga P, *et al.* Measuring drug metabolism kinetics and drug-drug interactions using self-assembled monolayers for matrix-assisted laser desorption-ionization mass spectrometry[J]. *Anal Chem*, 2016, **88**(17): 8604-8609.
- [57] Kadem LF, Suana KG, Holz M, *et al.* High-frequency mechano-stimulation of cell adhesion[J]. *Angew Chem Int Ed*, 2017, **56**(1): 225-229.
- [58] Kim KL, Kim D, Lee S, *et al.* Pairwise detection of site-specific receptor phosphorylations using single-molecule blotting[J]. *Nat Commun*, 2016, **7**: 11107.
- [59] Titov DV, Cracan V, Goodman RP, *et al.* Complementation of mitochondrial electron transport chain by manipulation of the NAD<sup>+</sup>/NADH ratio[J]. *Science*, 2016, **352**(6282): 231-235.
- [60] Liang Y, Liu Q, Zhou Y, *et al.* Counting and recognizing single bacterial cells by a lanthanide-encoding inductively coupled plasma mass spectrometric approach[J]. *Anal Chem*, 2019, **91**(13): 8341-8349.
- [61] Wu X, DeGottardi Q, Wu IC, *et al.* Lanthanide-coordinated semi-conducting polymer dots used for flow cytometry and mass cytometry[J]. *Angew Chem Int Ed*, 2017, **56**(47): 14908-14912.
- [62] Ros M, Nguyen AT, Chia J, *et al.* ER-resident oxidoreductases are glycosylated and trafficked to the cell surface to promote matrix degradation by tumour cells[J]. *Nat Cell Biol*, 2020, **22**(11): 1371-1381.
- [63] Xu HM, Zhang ZZ, Wang YH, *et al.* Sense and validate: fluorophore/mass dual-encoded nanoprobe for fluorescence imaging and MS quantification of intracellular multiple microRNAs[J]. *Anal Chem*, 2022, **94**(16): 6329-6337.
- [64] Jiang LX, Yang MX, Wali SN, *et al.* High-throughput mass spectrometry imaging of biological systems: current approaches and future directions[J]. *Trends Analyt Chem*, 2023, **163**: 117055.
- [65] Chen SM, Xiong CQ, Liu HH, *et al.* Mass spectrometry imaging reveals the sub-organ distribution of carbon nanomaterials[J]. *Nat Nanotechnol*, 2015, **10**(2): 176-182.
- [66] Xue JJ, Liu HH, Chen SM, *et al.* Mass spectrometry imaging of the *in situ* drug release from nanocarriers[J]. *Sci Adv*, 2018, **4**(10): eaat9039.
- [67] Jiang YM, Sun J, Xiong CQ, *et al.* Mass spectrometry imaging reveals *in situ* behaviors of multiple components in aerosol particles[J]. *Angew Chem Int Ed*, 2021, **60**(43): 23225-23231.
- [68] Yan B, Kim ST, Kim CS, *et al.* Multiplexed imaging of nanoparticles in tissues using laser desorption/ionization mass spectrometry[J]. *J Am Chem Soc*, 2013, **135**(34): 12564-12567.
- [69] Elci SG, Yesilbag Tonga G, Yan B, *et al.* Dual-mode mass spectrometric imaging for determination of *in vivo* stability of nanoparticle monolayers[J]. *ACS Nano*, 2017, **11**(7): 7424-7430.
- [70] Kwong GA, Ghosh S, Gamboa L, *et al.* Synthetic biomarkers: a twenty-first century path to early cancer detection[J]. *Nat Rev Cancer*, 2021, **21**(10): 655-668.
- [71] Anahtar M, Chan LW, Ko H, *et al.* Host protease activity classifies pneumonia etiology[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2022, **119**(25): e2121778119.
- [72] Hao LL, Zhao RT, Welch NL, *et al.* CRISPR-Cas-amplified urinary biomarkers for multiplexed and portable cancer diagnostics [J]. *Nat Nanotechnol*, 2023, **18**: 798-807.



[专家介绍] 闵乾昊, 南京大学化学化工学院教授/博士生导师, 南京大学化学和生物医药创新研究院双聘PI, 国家优秀青年基金获得者。2007年获南京大学理学学士学位, 2012年获南京大学理学博士学位。2013—2014年赴斯坦福大学化学系从事访问学者研究(合作导师: Richard N. Zare)。2016年获国家自然科学基金优秀青年科学基金项目资助。主要研究方向为纳米生物分析与质谱分析, 包括基于纳米材料的智能药物载体开发、纳米质量标签质谱分析、原位电离质谱分析等。在 *Nat Commun*, *J Am Chem Soc*, *Angew Chem Int Ed*, *ACS Nano*, *Nano Lett*, *Chem Sci*, *Anal Chem* 等期刊发表论文 60 余篇。获 2018 年度江苏省自然科学奖一等奖(排名第四), 2015 年度中国分析测试协会科学技术奖一等奖(排名第四)。主持国家自然科学基金面上项目 2 项, 重大研究计划培育项目 1 项。