•专家论坛•

# 药物研究中的化学生物学: 宏观表型与微观靶标互动和先导物发现

陆朦辰[1], 尤启冬[1,2*], 郭宗儒[3*]

(1. 苏州大学苏州医学院药学院, 江苏省抗体靶向药物研究重点实验室, 江苏 苏州 215006; 2. 中国药科大学药学院, 江苏省创新药物设计与成药性优化重点实验室, 江苏 南京 210009; 3. 中国医学科学院 北京协和医学院, 药物研究所, 北京 100050)

**摘要**: 基于表型的药物发现 (phenotypic drug discovery, PDD) 是“首创”(first-in-class) 药物研发的重要源头, 但其核心瓶颈在于“有效而机制不明”, 这一困境已成为现代药物化学的核心挑战。本文论述了化学生物学作为连接表型筛选与靶标确证的关键纽带, 如何通过其集成的技术体系—化学蛋白质组学、基因编码生物传感器、化学遗传学等与表型筛选链接, 加速驱动“表型研究→靶标鉴定→药物化学优化”的研发迭代。文章结合蛋白降解靶向嵌合体技术 (proteolysis targeting chimera, PROTAC)、分子胶等前沿技术研究实例, 剖析了化学生物学在先导物发现、靶标去卷积、作用机制解析及创新药物模式设计中的核心作用。面向未来, 该领域将深度融合人工智能 (artificial intelligence, AI) 驱动的药物设计与单细胞化学基因组学等新兴技术, 持续攻克难成药靶标, 并推动天然产物的现代化复兴; 其研究范式亦将从单一分子机制解析拓展为对生命系统的全局性调控, 从而为精准医疗和新型药物形式的开发奠定坚实的技术基础。

**关键词**: 药物化学; 化学生物学; 表型研究; 靶标确证; 先导物发现

**中图分类号**: R914 **文献标识码**: A **文章编号**: 0513-4870(2026)09-3276-16

# Chemical biology in drug research: Crosstalk between macroscopic phenotypes and microscopic targets, and lead discovery

LU Meng-chen[1], YOU Qi-dong[1,2*], GUO Zong-ru[3*]

(*1. School of Pharmacy, Suzhou Medical College, Soochow University, Jiangsu Key Laboratory of Antibody-Targeted Drug Research, Suzhou 215006, China; 2. School of Pharmacy, China Pharmaceutical University, Jiangsu Key Laboratory of Drug Design and Optimization, Nanjing 210009, China; 3. Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100050, China*)

**Abstract**: Phenotypic drug discovery (PDD) represents a vital source of first-in-class drug innovation; however, its central bottleneck — demonstrating efficacy without a clear mechanism of action — remains a fundamental challenge in modern medicinal chemistry. This review discusses how chemical biology serves as a critical link between phenotypic screening and target validation, leveraging an integrated technological repertoire — including chemical proteomics, genetically encoded biosensors, and chemical genetics — to seamlessly connect phenotypic assays with target deconvolution, thereby accelerating the iterative cycle of "phenotypic investigation → target identification → medicinal chemistry optimization". Drawing upon cutting-edge modalities such as proteolysis targeting chimera (PROTACs) and molecular glues, we analyze the pivotal role of chemical biology in lead discovery, target deconvolution, mechanistic elucidation, and the design of novel drug modalities. Looking forward, the field is poised to deeply integrate artificial intelligence (AI) -driven drug design and single-cell chemical

收稿日期: 2026-06-01; 修回日期: 2026-07-15.
基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82273768, 82574254).
*通讯作者 Tel: 86-25-83271351, E-mail: youqd@163.com; zrguo@imm.ac.cn
DOI: 10.16438/j.0513-4870.2026-0647

genomics to tackle previously undruggable targets and drive the modern revival of natural products. Concurrently, its research paradigm is shifting from a narrow focus on molecular mechanisms toward a systems-level regulation of biological networks, ultimately laying a solid technological foundation for precision medicine and the development of next-generation therapeutic modalities.

**Key words**: medicinal chemistry; chemical biology; phenotypic research; target identification; lead discovery

## 1 从表型筛选到靶标确证的范式挑战

人类对疾病的诊疗和药物的发现与应用, 正由过去的表型效应和经验性识别进入分子和机制的层面, 以靶标为主导的现代药物研发, 起始于表型与靶标/分子机制双向驱动的范式, 但表型与靶标研究两种范式的交互进行与验证, 又揭示了药物分子的作用本质, 深化并加速着新药的研发[1]。

药物创制常以靶标为主导, 而靶标的发现与确定则源于表型研究。表型研究不预设分子靶标, 通过在细胞或整体动物模型上观察化合物对疾病表型的逆转效应, 因其更贴近疾病生理环境的复杂性, 在发现新机制药物方面展现出独特优势。基于表型的研究所面临的根本困境在于“靶标黑箱”现象: 即所发现的强效活性分子, 难以确认其作用靶标和分子机制, 严重制约后续的结构优化、安全性评价和机制研究。

早期的药物研究和基于天然产物的药物发现都属于表型研究, 其靶标发现与确证滞后且耗时长。阿司匹林自上市到明确靶标为环氧合酶历经近百年[2]; 二甲双胍的临床应用也已近百年, 但其确切作用机制迄今仍未阐明[3]; 1992年上市的甲异靛, 其借“分子胶”机制诱导靶蛋白泛素化降解的抗慢性白血病机制, 直至2025年方得证实[4]。靶标确证的滞后严重阻碍了基于结构的理性设计、脱靶毒性评估及适应症的理性拓展。因此, 构建贯通宏观表型与微观靶标的高效精准技术体系, 成为提升新药研发效率之关键。

## 2 化学生物学: 表型筛选与靶标确证的核心桥梁

药物化学 (medicinal chemistry) 是以发现能调控生理功能, 治疗疾病的药物为主要任务。化学生物学 (chemical biology) 则主要是利用外源性化学物质、化学方法或途径, 对生命体系进行精准修饰或调控的研究。化学生物学可在表型与靶标之间建起关键纽带, 能有效弥合表型筛选与靶标确证之间的断层。因而, 以特异性小分子探针为工具, 整合多组学、成像技术与基因编辑等技术, 通过系统性扰动生物系统并解析其效应网络, 可实现从宏观表型特征向微观靶标或信号通路节点的分子机制跨越。这一路径不仅加速了靶标发现与机制阐释, 也为基于表型药物发现的靶标确证和生物学机制研究提供了帮助, 形成了基于表型药物发现研究的新模式: 表型研究 → 化学生物学解析 (靶标去卷积与机制阐明) → 靶标确证 → 药物化学创制 (理性设计与结构优化) → 表型验证 (临床前及临床评价) → 药物上市。

## 3 药物研发中的化学生物学技术

药物研发中的化学生物学是运用化学工具主动干预并解析生物过程, 从分子层面理解及操控由小分子驱动的生物决策机制, 其核心技术体系主要包括化学蛋白质组学、基因编码的生物传感与成像技术, 以及化学遗传学与表型筛选技术等。

### 3.1 化学蛋白质组学技术

药物研发的首要关键是药物靶标的发现与确证。化学蛋白质组学 (chemical proteomics) 整合了合成化学、细胞生物学及蛋白质组学等多学科方法, 通过设计可与靶蛋白特异性相互作用的化学小分子, 在组学尺度上探测蛋白质功能及其与配体的相互作用, 从而精准定位药物结合位点[5]。随着化学生物学与蛋白质组学的协同发展, 化学蛋白质组学已成为用活性小分子发现并鉴定靶标的主流策略, 成为化学生物学的核心技术。化学蛋白质组学技术主要分为两类: 其一是化学衍生法, 利用固定化或标记的化合物, 凭借其与靶蛋白的亲和性从复杂蛋白质组中捕获靶蛋白; 其二是非衍生化法, 依据配体–靶蛋白互作所致蛋白稳定性、构象或翻译后修饰变化实现靶标识别。化学蛋白质组学应用甚广, 涵盖已知药物的靶标筛选、功能蛋白的活性调控分子发现、代谢物靶标组分析、活性蛋白功能位点鉴定, 以及探针分子反应性评估等[6]。

#### 3.1.1 基于衍生化修饰的化学蛋白质组学技术

基于衍生化修饰的化学蛋白质组学技术, 通过设计含报告基团的化学探针对活性药物或功能分子进行衍生化标记, 可在复杂生物体系中全景式捕获并鉴定其相互作用蛋白质, 进而揭示药物作用的分子网络, 为干预治疗提供理论依据 (图1)。此类探针既可来源于已知活性药物或其代谢物的结构衍生, 也可基于功能未知化合物构建。作为连接化学扰动与生物学响应的核心工具, 化学探针可作为药物发现工作之珍贵端绪。

**3.1.1.1 基于活性的蛋白谱分析** 基于活性的蛋白谱分析 (activity-based protein profiling, ABPP) 的核心

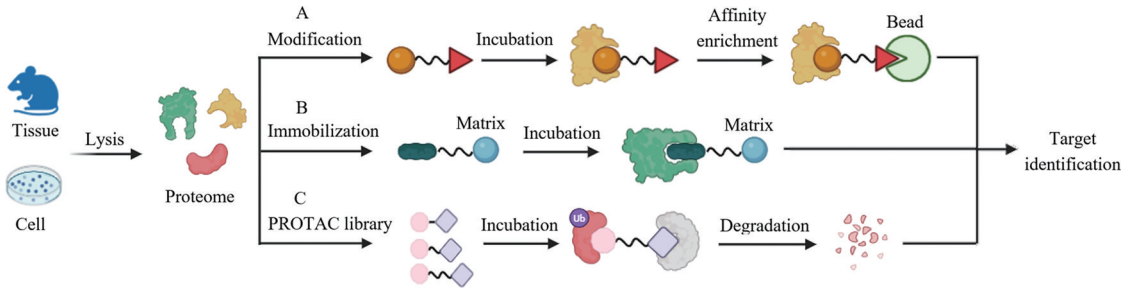



**Figure 1** Labeled target identification strategies. A: Activity-based protein profiling (ABPP); B: Affinity-based protein profiling (AfBPP); C: Degradation-based protein profiling (DBPP). PROTAC: Proteolysis targeting chimera. Created in BioRender. Lu, E. (2026)https://BioRender.com/upntqpu

在于设计“活性分子探针 (activity-based probe, ABP)”, 将探针与活细胞、细胞裂解液或组织匀浆共孵育, 探针特异性共价结合于靶标蛋白的活性中心, 经富集后进行质谱分析, 并借助蛋白质组学技术, 如表面等离子共振 (surface plasmon resonance, SPR)、微量热泳动 (microscale thermophoresis, MST)、等温滴定量热 (isothermal titration calorimetry, ITC) 等生物物理方法, 鉴定和验证靶标, 结合功能实验评估药理效应[7]。

天然产物是新药研发的重要源泉, 其多靶标作用机制常难以系统解析, 化学蛋白质组学为此提供了高效研究策略。在对青蒿素 (artemisinin, **1**) 的研究中, Lin 及团队[8]曾使用 ABPP 技术首次说明青蒿素的抗疟效果与其过氧桥键被血红素特异性激活相关。在青蒿虎酯 (artesunate) 结构上引入炔基得到探针分子 **2** (图 2A), 炔基与连接荧光素或生物素标签的叠氮基团可经点击化学反应生成三氮唑, 从而将探针标记上相应标签, 分别用于靶标示踪或提取出来加以验证。将 **2** 与疟原虫细胞系共孵育后提取裂解液, 经点击化学标记、亲和层析、质谱鉴定及化学蛋白质组学分析, 系统鉴定出 124 个共价结合蛋白。其中血红素 (而非游离铁) 是激活青蒿素的关键因子; 青蒿素仅在疟原虫 (或癌细胞) 内被血红素激活为自由基, 进而烷基化多个关键蛋白, 抑制多条信号通路, 实现高效杀虫并降低耐药风险。后续功能实验完成了机制研究的闭环。2023 年, 该团队[9]在前期基础上进一步突破, 系统鉴定了青蒿素在疟原虫中的非共价与共价作用靶标。研究者设计了一种兼具光亲和与点击化学修饰的双功能探针 **3** (图 2A): 其中光敏基团双吖丙啶经紫外光激发生成卡宾, 捕获非共价相互作用蛋白; 炔基则用于点击化学连接报告标签。利用 **3** 与疟原虫细胞共孵育并经紫外光激活, 可同时捕获共价与非共价结合的靶标蛋白。该研究发现 45 个首次报道的非共价靶标, 显著拓展了青蒿素的作用谱。其中糖酵解关键酶 PfTIM、PfGAPDH、PfLDH 等被确认为重要靶标, 表明青蒿素可通过抑制这些酶切断对疟原虫能量供应。该研究阐明青蒿素不仅作为“自由基炸弹”发挥直接杀伤作用, 更作为“代谢锁链”, 通过共价与非共价双重机制抑制疟原虫糖酵解过程, 从而实现高效且低耐药的抗疟效果。

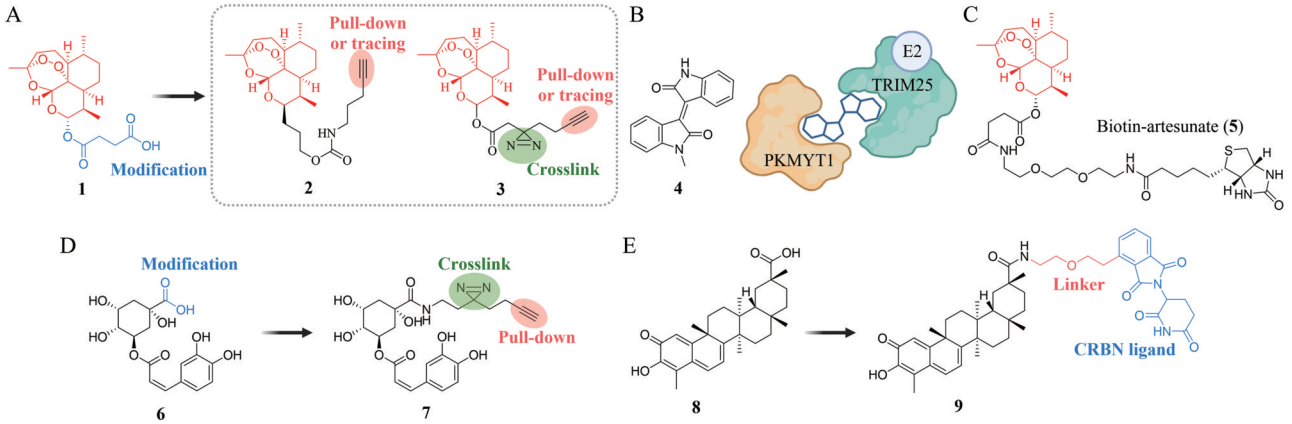



**Figure 2** Chemical structures of compounds **1**−**9**. A: Chemical structures of **1** and its probes **2** and **3**; B: Chemical structure of **4** and the schematic diagram of **4** as a molecular glue to mediate the interaction between PKMYT1 and TRIM25; C: Design of biotin-artesunate probe **5**; D: Chemical structures of **6** and its probe **7**; E: Chemical structures of **8** and its probe **9**. Created in BioRender. Lu, E. (2026)https://BioRender.com/upntqpu

ABPP技术在靶标确证中的另一卓越案例, 见于抗慢性粒细胞白血病 (chronic myeloid leukemia, CML) 药物甲异靛 (meisoindigo, **4**) 的作用机制研究。该药源于中药复方当归芦荟丸, 经拆方优化表型研究而得, 临床应用逾三十年, 然而其分子靶标与作用机制长期不明。2025年Zhang等[4]采用ABPP策略, 在甲异靛结构中引入炔基经点击反应构建探针分子, 在验证其保留原药活性的基础上, 分别连接荧光标签进行细胞内靶标示踪, 或置换为生物素标签开展提取富集, 结合质谱分析, 最终确证PKMYT1为甲异靛的直接作用靶标 (图2B)。进一步研究表明, 甲异靛作为“分子胶”, 可逆共价结合PKMYT1的Cys301, 显著增强其与E3泛素连接酶TRIM25的相互作用, 诱导PKMYT1泛素化降解, 抑制CML增殖。该研究首次阐明药物甲异靛的分子靶标及作用机制, 解决了长期悬而未决的临床药物机制问题, 并为CML治疗提供了新靶标与策略参考[10]。

**3.1.1.2 基于亲和性蛋白质组分析** 基于亲和性蛋白质组分析 (affinity-based protein profiling, AfBPP) 也称作以化合物为中心的化学蛋白质组学 (compound-centric chemical proteomics, CCCP), 是由经典药物亲和色谱发展而来, 融合现代蛋白质组学技术, 能在全蛋白质组水平系统鉴定小分子靶标。AfBPP与ABPP不同, 是先将药物分子固载于磁珠等基质, 早期常用策略是将药物固定于惰性树脂作为亲和诱饵, 或将其与生物素连接后依托链霉亲和素层析富集, 随后与细胞裂解液共孵育, 经洗涤去除非特异性结合, 即可对洗脱蛋白进行组学鉴定与功能验证 (图1B)[7]。

此处仍以青蒿素研究为例。为探究青蒿素对多囊卵巢综合征 (polycystic ovary syndrome, PCOS) 的干预机制, Liu等[11]利用AfBPP技术解析其直接作用靶标。该研究构建了生物素标记的青蒿琥酯探针 (biotin-artesunate, **5**), 通过提取和蛋白质组学分析, 鉴定出线粒体蛋白酶LONP1为直接结合靶标, 随后运用SPR、ITC等无标记技术验证与LONP1的定量结合以及热稳定性, 功能实验证实LONP1介导了青蒿素对CYP11A1的降解, 从而缓解了PCOS的症状 (图2C)。该工作不仅阐明青蒿素通过LONP1-CYP11A1轴调控雄激素代谢的新机制, 也为PCOS的临床干预提供了新策略。

2024年Wang等[12]利用AfBPP策略成功解析天然产物氯原酸 (CGA, **6**) 的直接作用靶标。**6**治疗胶质瘤已进入II期临床, 但直接作用靶标未知, 限制其精准用药与适应症拓展。基于此, Wang等在保留药效活性的基础上, ① 在**6**的分子中引入光亲和 (photo-affinity labeling, PAL) 基团双吖丙啶和炔基手柄, 设计了PAL-AfBPP双功能探针**7** (图2D); ② 继而通过光交联富集与质谱鉴定, 发现线粒体蛋白ACAT1为**6**的特异性结合蛋白; ③ 随后用SPR、ITC等无标记技术验证二者的直接相互作用; ④ 通过解析ACAT1-**6**共晶复合物, 揭示**6**通过阻断ACAT1$^{Y407}$磷酸化发挥抗肿瘤功能; ⑤ 最终在细胞与动物模型中确证ACAT1为**6**抗癌的必要靶标, 从而完成从探针设计、靶标发现到功能与结构阐释的完整研究闭环。该工作不仅为**6**的临床应用提供了机制依据, 也为鉴定“非共价–弱亲和”类天然产物的靶标建立了完整的AfBPP研究范式。

**3.1.1.3 基于降解的蛋白质组分析** 基于降解的蛋白质组分析 (degradation-based protein profiling, DBPP) 是一种新兴策略, 通过融合蛋白降解靶向嵌合体技术 (proteolysis targeting chimera, PROTAC)、定量蛋白质组学与质谱技术, 系统性解析药物的多重作用靶标 (图1C)。DBPP是将活性分子转化为PROTAC分子, 使传统的“结合”事件转化为可被质谱定量检测的“降解”信号, 从而实现了在复杂蛋白质组中系统性发现和鉴定药物靶标。该技术不依赖小分子与蛋白质间的直接结合, 而是利用靶蛋白–降解子–E3泛素连接酶三元复合物所介导的蛋白–蛋白相互作用来诱导靶蛋白降解。因此, DBPP对小分子–靶标亲和力的要求较为宽松, 尤其适用于非共价结合、转录因子、骨架蛋白等非酶难成药靶标及弱结合靶标的鉴定。Ni等[13]以天然产物雷公藤红素 (celastrol, **8**) 为活性分子, 构建了基于E3连接酶CRBN配体、以PEG为连接链的PROTAC分子**9**, 在细胞模型中验证了其抗增殖活性较**8**更为显著 (图2E)。通过整合定量蛋白质组学与免疫沉淀–质谱 (IP-MS) 分析, 不仅确认了IKK$\beta$、磷酸肌醇3-激酶$\alpha$ (phosphatidylinositol 3-phosphate kinase, PI3K$\alpha$)、CIP2A等已知靶标, 还鉴定出CHK1、*O*-GlcNAcase及ERCC6L等多个潜在新靶标。基于PROTAC的靶标鉴定方法可行性高且结果可靠, 有望成为天然产物靶标系统性发现的重要工具。

上述几种基于衍生化修饰的化学蛋白质组学技术兼具系统性、无偏性与高通量优势。三种衍生化策略各具特点: ABPP“先结合、后富集”, 反映蛋白功能状态; AfBPP将药物固定于载体, 无偏性强, 可鉴定无酶活蛋白; DBPP以“降解”代替“结合”, 适合难成药靶标, 避免假阳性。三者皆循“探针设计→靶标富集→鉴定→验证”之常轨。典型探针采用模块化结构, 包含反应基团、报告标签与连接链。然而探针结构并非一成不变, 当前技术正朝多功能一体化与智能化发展, 可拓展至临床样本、类器官、时空转录组学 (spatiotemporal transcriptomics) 等复杂环境, 为精准干预与靶向治疗

奠定基础[14]。然而, 化学探针与样品中非目标生物大分子之间发生的物理吸附或化学相互作用等非特异性结合, 导致非目标蛋白被错误鉴定为真实靶标的假阳性问题, 需要引起研究者的关注。系统的质控策略应从实验设计和数据分析两个层面构建。在实验层面, 关键参数应严格优化: 探针连接链建议以PEG2-PEG6为起始参考区间, 避免过短产生空间位阻或过长引入非特异疏水作用; 探针浓度推荐0.1～10 μmol·L$^{-1}$, 以梯度实验平衡信号强度与选择性; 光亲和探针的光照时间宜控制在冰上15～30 min, 防止标记不足或非特异共价标记增多。核心对照实验包括: 采用10～100倍过量未标记母体化合物进行竞争性预孵育, 通过比较竞争/非竞争组质谱信号差异识别真实靶标; 使用结构相似但不含活性基团的阴性探针作为对照, 评估骨架本身的非特异性背景; 对于生物素化探针, 标记前用链霉亲和素磁珠预孵育裂解液, 去除内源性生物素化蛋白; 设置热灭活对照组, 将样品加热使酶失活后再标记, 以识别活性依赖与非活性依赖信号; 及优化洗涤条件 (≥ 3 次, 可添加 500 mmol·L$^{-1}$ NaCl), 以去除弱吸附蛋白。数据分析层面, 可结合细胞培养中氨基酸稳定同位素标记技术或串联质谱定量技术进行背景扣减, 筛选竞争组中丰度显著降低的蛋白作为高置信度候选靶标。上述策略需联合使用, 最终候选靶标还应通过靶标结合、基因敲除等正交方法独立验证, 以确保鉴定结果的可靠性。

### 3.1.2 基于非衍生化的化学蛋白质组学技术

相较于衍生化修饰策略, 非衍生化技术主要依据小分子与靶蛋白结合后引发的物理化学稳定性及抗酶解能力变化, 直接从复杂生物裂解液中鉴定药物靶标。该方法无需对活性分子进行化学修饰, 能够完整保持其天然活性。目前已发展出多种非衍生化策略用于直接鉴定药物靶蛋白。

**3.1.2.1 基于蛋白水解的靶标鉴定技术** 该类技术的基本原理在于, 靶标与小分子配体结合后可能改变其结构, 从而影响靶标蛋白对蛋白酶水解的敏感性。主要以药物亲和响应靶标稳定性技术 (drug affinity responsive target stability, DARTS) 与蛋白有限水解质谱技术 (limited proteolysis-mass spectrometry, LIP-MS) 为代表 (图3A)。

DARTS[15]无需对小分子进行化学修饰, 直接将小分子药物与蛋白样品共孵育后, 加入蛋白酶消化。药物结合可保护靶蛋白、降低其酶解程度, 通过对比药物处理组与对照组的蛋白水解图谱 (如凝胶电泳染色), 即可辨识受保护的蛋白条带, 进而利用质谱鉴定潜在靶标。该技术避免了化学修饰可能引入的偏差或活性损失, 适用于鉴定与各类小分子相互作用的蛋白。

2025年Wu等[16]利用含有四氢噻吩并吡啶骨架的YTHDF1选择性抑制剂**10** (图4), 可精准占位m$^6$A结

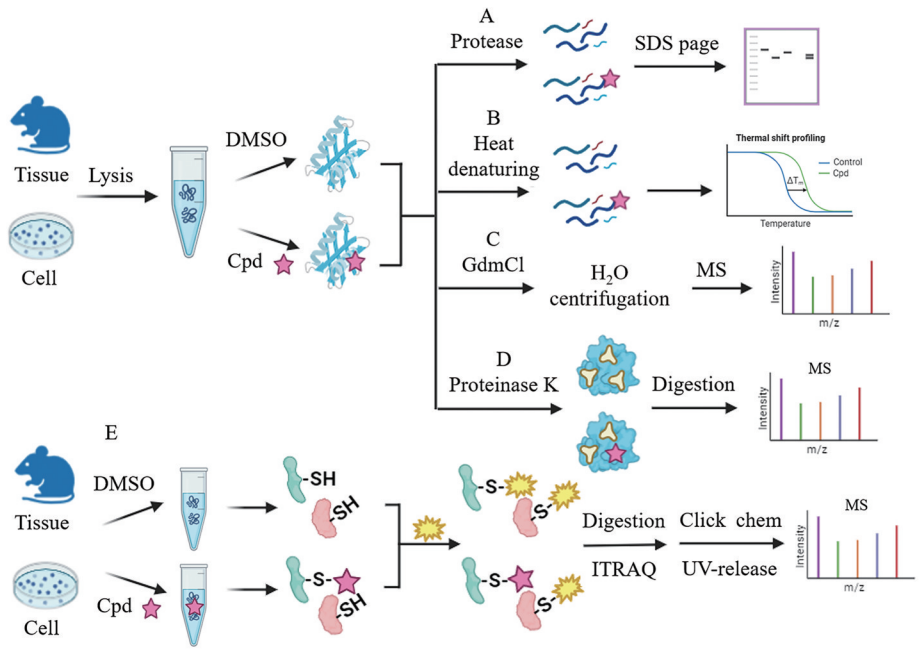



**Figure 3** Label-free target identification strategies. A: Proteolytic techniques; B: Thermal stability techniques; C: Protein precipitation techniques; D: Target-responsive accessibility profiling (TRAP); E: Multiplex thiol reactivity profiling (MTRP). ITRAQ: Isobaric tags for relative and absolute quantitation; SDS page: Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. Created in BioRender. Lu, E. (2026)https://BioRender.com/upntqpu

合腔, 体内外实验表明能高效阻断乳腺癌进展。针对YTH家族高度同源、缺乏单亚型探针之困, 作者构建“荧光偏振技术–高通量筛选”快速验证靶标的可药性→结构导向迭代优化→热稳定性/ABPP多维占靶→功能组学确证的化学生物学闭环, 获得首个单亚型、高特异性、体内有效、机制清晰的探针分子。整项工作中涵盖多类可任选的“化学生物学工具箱”。为明确**10**与YTHDF1的相互作用, 作者采用DARTS技术, 发现**10**以浓度依赖的方式增强YTHDF1对蛋白酶消化的抗性, 证实二者间形成了稳定结合。该工作为乳腺癌$m^6A$靶向治疗提供了可快速推至临床前候选物的先导分子。

蛋白有限水解质谱 (LIP-MS) 是在DARTS方法基础上发展的重要改进方法, 其核心在于引入广谱蛋白酶K作为“结构探针”。实验中先以低浓度蛋白酶K对样品进行有限水解, 该酶倾向于切割蛋白质表面未折叠或柔性的区域。当小分子与靶标结合后, 可诱导局部构象与空间位阻发生变化, 导致原有酶切位点被掩蔽或暴露, 从而改变蛋白酶K切割模式, 产生差异化片段。后续经胰酶 (特异性切割赖氨酸/精氨酸) 精准处理, 将上述片段转化为适合质谱检测的肽段, 通过分析差异酶切谱筛选关键“构象肽”, 即可推断小分子在蛋白上的结合区域[17]。

Chen等[18]通过药物基因组学数据库筛选发现, 贯叶金丝桃素 (hyperforin, **11**, 图4) 能诱导脂肪燃烧, 具有抗肥胖潜力。为探明其直接作用靶标, 作者采用LIP-MS技术鉴定出二氢硫辛酰胺S-乙酰转移酶 (Dlat) 为**11**的直接结合靶标。功能实验表明, 敲低Dlat可显著削弱**11**在体外及体内诱导脂肪组织的褐变作用; 全基因组关联分析提示, Dlat的遗传变异与人类肥胖显著相关。该研究整合了药物基因组学数据库筛选、LIP-MS及多层次功能验证, 首次阐明**11**通过直接结合Dlat, 激活AMPK-PGC1$\alpha$-Ucp1信号通路, 促进脂肪产热并抑制肥胖合成。该工作不仅为抗肥胖药物研发提供了新靶标, 也完整展示了从小分子靶标发现、作用机制解析到脂肪代谢表型验证的系统研究路径。

以DARTS、LIP-MS为代表的基于蛋白水解的靶标鉴定技术存在局限: 其一, 低丰度靶蛋白即使被药物保护, 也难以在凝胶上显影; 其二, 蛋白质对蛋白酶的敏感性受其构象能量景观 (即折叠与聚集状态下的能量分布) 调控, 部分蛋白本身具有较高蛋白酶抗性, 难以有效酶解; 再者, 药物结合不仅改变靶蛋白酶切模式, 也会影响其相互作用蛋白或复合物中其他组分的蛋白酶敏感性, 从而引入非特异性信号。但此特性亦可转化为方法优势: 药物结合所引发的、超越单一靶标的蛋白酶敏感性变化, 能够间接反映蛋白–蛋白相互作用及复合物动态场景, 为解析药物作用时的蛋白质组装与解离信息提供新的视角。

**3.1.2.2　基于蛋白热稳定性的靶标鉴定技术**　基于蛋白质–配体结合可增强其蛋白对热稳定性的原理, 热蛋白质组学通过比较药物处理组与对照组在不同温度下的可溶性蛋白残留量, 评估蛋白热稳定性变化, 进而推断药物作用靶标。该技术是目前唯一可在活细胞乃至组织原位进行靶标鉴定的生物物理学方法 (图3B)。

细胞热迁移技术 (cellular thermal shift assay, CETSA) 是基于上述原理建立检测药物与细胞内靶蛋白的结合技术[19]。药物的结合通常使靶蛋白构象更稳定; 升温使未结合药物的蛋白变性聚集, 而药物–蛋白复合物则在相同温度下保留更高的可溶性, 导致热熔曲线右移。热蛋白质组学分析技术 (thermal proteome profiling, TPP) 系CETSA的组学拓展, 二者原理相通[20]。TPP整合定量质谱, 可高通量监测数千种蛋白的热稳定位移$T_m$值, 不仅可识别直接结合靶标, 也能揭示间接作用的下游蛋白及生物过程, 已广泛应用于药物靶标与脱靶效应识别、蛋白–代谢物及蛋白–蛋白互作解析, 为化学生物学研究提供有力工具。

Liu等[21]采用人类蛋白质组微阵列筛选发现, 蟾酥主要活性成分蟾毒灵 (bufalin, **12**) 的直接作用靶标为转录因子E2F2。**12**作为分子胶, 促进E2F2与非典型泛素连接酶ZFP91形成三元复合物, 进而通过泛素–蛋白酶体途径降解E2F2, 抑制肝癌发展。**12**由甾体母核与$\alpha$-吡喃酮片段构成。为明确其结合模式, 作者分别以雄酮 (甾体类似物) 与$\alpha$-吡喃酮作为竞争结合探针, 发现雄酮显著阻断**12**与E2F2的结合, 而$\alpha$-吡喃酮则特异性抑制其与ZFP91的相互作用。CETSA实验进一步证实, $\alpha$-吡喃酮可增强ZFP91的热稳定性, 雄酮则

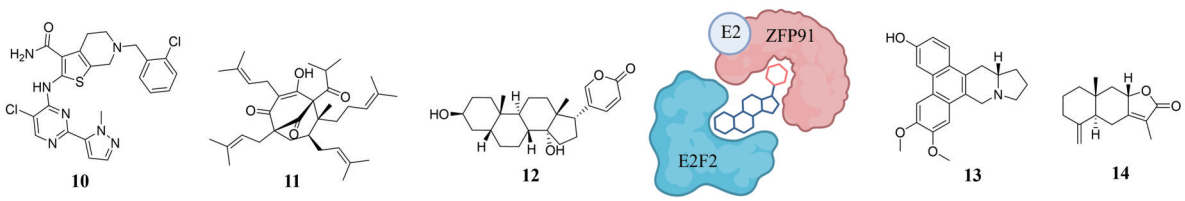



**Figure 4**　Chemical structures of **10**–**14**. Created in BioRender. Lu, E. (2026)https://BioRender.com/upntqpu

无此效应, 表明**12**主要通过*α*-吡喃酮片段与ZFP91结合 (图4)。近期, Jiang等[22]通过AI筛选再次验证了**12**的另一分子胶功能, 其可促进雌激素受体*α* (estrogen receptor *α*, ER*α*)与E3连接酶STUB1形成三元复合物, 诱导ER*α*降解, 从而克服他莫昔芬的临床耐药。上述研究共同揭示天然小分子作为分子胶实现抗肿瘤作用的独特机制, 为抗肿瘤药物的研究提供了新的结构类型。

神经胶质瘤因其独特的肿瘤微环境与血脑屏障而治疗棘手。天然菲并吲哚里西啶生物碱 (PF403, **13**, 图4) 具潜在抗瘤活性, 其作用机制未明。Li等[23]初期尝试ABPP技术构建探针, 但所获探针化学稳定性不足, 难以保持原药活性。遂转向非衍生化的TPP技术, 以完整保留**13**的天然活性。通过细胞内全蛋白组的无偏筛查, 初步锁定四个候选靶蛋白。继而借助灵敏度更高的CETSA验证, 发现**13**对烟酰胺磷酸核糖转移酶 (nicotinamide phosphoribosyltransferase, NAMPT)的热稳定效应最为显著。进一步在活细胞、细胞裂解液及重组蛋白三个层面完成热位移验证, 证实**13**可显著稳定NAMPT。靶标实验证实二者间的良好亲和力($K_d$ = 2.69 μmol·L$^{-1}$); 共晶解析与氨基酸点突变精确阐明了其结合模式。该工作确证了**13**通过直接结合并抑制NAMPT, 耗竭细胞内NAD$^+$, 从而抑制胶质瘤生长, 是TPP与CETSA联用技术解析天然产物靶标的经典案例。

对比上述两种蛋白热稳定分析技术在药物发现中的应用, TPP与CETSA各具特色、相辅相成。TPP联用质谱, 可对接算法, 具备高通量、全局性与无偏性优势, 适于探索未知靶标; 但对低丰度膜蛋白、分泌蛋白敏感性不足, 与超稳定蛋白易拟合失准, 存假阳/阴性之虞。CETSA则侧重靶向验证, 须预设特定靶标并依赖特异性抗体, 故难发现新靶, 且通量有限、仅半定量; 但检测特定蛋白热位移极为灵敏, 操作简便, 可适配活细胞、组织及重组蛋白等多种场景, 更接近生理状态, 利于推广。研究实践中, 二者常协同并用: 以TPP广筛初探, 再以CETSA精准确证, 此组合策略已成靶标研究之典范。然而, 这两种方法均基于蛋白质的热变性, 属于“非平衡”方法, 多数蛋白质的热变性是不可逆的。此外, 除$T_m$值以外, 从CETSA和TPP数据中难以获取折叠自由能、结合自由能和$K_d$值等热力学参数; 且$T_m$偏移可能源于药物直接结合, 也可能由下游信号激活等间接效应引起, 并不总是与亲和力正相关[24]。

**3.1.2.3 基于氧化速率蛋白稳定性和蛋白沉淀的靶标鉴定技术** 如果说DARTS与CETSA之功在于“寻靶”, 那么基于氧化速率之蛋白稳定性技术 (stability of proteins from rates of oxidation, SPROX) 则旨在解析“如何结合、结合强弱”之问题。SPROX同样利用配体诱导的靶蛋白稳定性变化实现靶标识别, 但其信号源自甲硫氨酸 (Met) 残基的氧化水平: 蛋白质样品经药物或对照溶剂孵育后, 在递增浓度的化学变性剂存在下以过氧化氢将甲硫氨酸氧化为甲硫氨酸亚砜 (Met-O) 或砜 (Met-$O_2$), 淬灭反应后经胰酶消化和质谱分析, 获得含甲硫氨酸肽段的氧化速率曲线, 依据化学变性曲线转移中点偏移确定靶标并推算结合$K_d$值 (图3C)。相较于依赖热变性的DARTS与CETSA等技术, SPROX采用化学变性, 能够有效区分直接与间接作用, 并可获得$K_d$值等热力学参数, 信息维度更为丰富。然而, 其局限性在于依赖甲硫氨酸残基氧化, 导致蛋白质组覆盖度受限, 且通常需较高药物浓度。但甲硫氨酸氧化的不可逆特性也为定量标记提供了便利, 可将SPROX与串联质谱标签或稳定同位素标记联用, 提升全蛋白质组覆盖度[25]。

对于热稳定性变化不显著的靶蛋白, 可采用化学变性剂诱导蛋白沉淀法 (chemical denaturant and protein precipitation, CPP)。该方法融合了SPROX的化学变性原理与TPP的沉淀分离策略, 通过化学变性诱导蛋白沉淀, 实现折叠与去折叠蛋白的有效区分, 从而避免了对甲硫氨酸残基氧化的依赖, 较SPROX在蛋白质组覆盖度与假阳性控制方面均有提升 (图3C)。Fitzgeral等[24]在一项原理验证研究中, 利用CPP技术于酵母中成功鉴定了环孢素A和格尔德霉素的已知靶标, 并获取了这些药物的折叠自由能与解离常数$K_d$值, 所得$K_d$值与文献报道基本吻合。同时, 该技术亦在人MCF-7细胞裂解液中成功鉴定出甲基转移酶抑制剂西奈芬净的靶标蛋白, 相较于SPROX技术 (覆盖约800种蛋白), CPP技术的蛋白质组覆盖度提升至约1 200种 (提高约30%), 且错误发现率显著降低。

**3.1.2.4 靶向响应可及性和多重巯基反应谱** 靶向响应可及性 (target-responsive accessibility profiling, TRAP) 基于配体结合后遮蔽靶蛋白表面活性赖氨酸残基、降低其共价标记效率的原理, 能够在活细胞内全局性识别药物直接作用靶标[26](图3D)。Zhu等[27]运用TRAP技术筛选发现, 腺苷酸环化酶相关蛋白1 (cyclase associated protein 1, CAP1) 为雷公藤红素 (celastrol) 的直接作用靶标; 经CETSA证实celastrol可增强CAP1的细胞内热稳定性, 并通过MST、ITC及biotin-celastrol的提取实验验证了雷公藤红素与CAP1的结合, 从而阻断了cAMP-PKA-NF-*κ*B炎症信号通路, 最终改善高脂肪饮食诱导的小鼠代谢综合征。该研究不仅揭示了雷公藤红素作用的新靶标与新机制, 也为代谢综合征

的抗炎治疗提供了新方向。

TRAP技术以其广泛的蛋白覆盖能力和高效的通量特性著称, 但其依赖于活细胞内赖氨酸残基的预先标记步骤可能扰动配体–靶蛋白间的天然相互作用。为克服这一局限, Tian等[28]发展了多重巯基反应谱分析 (multiplex thiol reactivity profiling, MTRP), 用于鉴定亲电性天然产物的共价靶标。该方法采用无标记流程: 天然产物处理后裂解细胞, 以炔基碘乙酰胺探针标记半胱氨酸, 经酶解与质谱分析, 通过检测天然产物对探针标记的竞争性抑制, 精准鉴定靶蛋白及其修饰位点 (图3E)。运用此策略, 研究首次揭示藤黄酸与输出蛋白2的共价结合模式, 并发现乙酰基广藿香内酯通过与HSP60共价结合从而抑制其分子伴侣活性。MTRP法兼具低样本量、高分辨率与高效率优势, 在氧化还原生物学与药物发现领域前景广阔[29]。

综上, 上述非衍生化方法共同基于配体诱导的靶蛋白稳定性增强——如抗酶解、抗氧化、耐热、抗沉淀或抗标记——实现靶标鉴定。各技术适用场景与局限各异, 需因研究目标择善而行。多策略联用可显著提升靶标鉴定的准确性与可靠性, 为系统解析药物作用机制、推进后续研发奠定坚实基础。

### 3.2 基因编码生物传感器与成像技术

基因编码生物传感器通过基因重组或DNA合成构建的生物分子系统, 可将化学或物理信号转换为光学信号, 实现活体或细胞内生物分子互作、定位、动态及微环境变化的实时示踪。

基因编码荧光传感器主要由识别模块和报告模块构成: 前者特异性结合目标分子, 后者则将结合事件转化为可检测信号 (如荧光)。根据工作原理与结构特征, 主要分为三类: 单荧光蛋白 (fluorescent protein, FP) 传感器、基于共振能量转移的传感器 (包括荧光与生物发光共振能量转移), 以及分子荧光互补系统 (如双分子与三分子荧光互补)[30]。三类传感器各具优势, 为细胞代谢研究提供了多元化的技术策略 (图5)。

#### 3.2.1 单荧光蛋白传感器

单FP传感器基于荧光蛋白的环状置换技术构建, 通过对$\beta$-桶状结构的环状区域进行切割与重连, 使暴露的荧光团对局部微环境变化敏感 (图5A)。该类传感器采用单一荧光蛋白架构, 具有分子质量小 (200余氨基酸)、对宿主蛋白功能干扰小等结构优势; 其单波长强度响应特性尤适于低丰度代谢物的高灵敏度检测。但其构建较为困难, 常需逐残基筛选融合位点, 且属强度测量型, 定量成像适用性有限[31]。

钙离子作为关键胞内信号分子, 是神经递质接收和膜去极化的第二信使。基因编码$Ca^{2+}$指示剂 (genetically encoded calcium indicator, GECI) 是目前最成熟的神经元活性成像工具, 其与钙离子结合后发生构象变化, 导致荧光强度改变, 从而实现神经元活动的实时监测。钙成像技术已广泛应用于神经元活动监测、神经网络研究、神经环路功能解析、神经发育分析、神经系统疾病研究及药物筛选评估等领域。GECI中最具代表性的GCaMP系列, 系将荧光蛋白 (如GFP等) 与钙调蛋白 (calmodulin, CaM) 及肌球蛋白轻链激酶M13结构域融合而成, 其$\Delta F/F_{min}$可达百倍以上, 已成为神经科学标配[32]。近年来, 研究者在GCaMP基础上迭代优化, 新型变体在结合动力学与成像效果方面实现多维提升[33,34]。

#### 3.2.2 基于共振能量转移的传感器

**3.2.2.1 基于荧光共振能量转移的传感器** 与单FP传感器不同, 荧光共振能量转移 (Förster resonance energy transfer, FRET) 传感器采用供体–受体双荧光蛋白对, 借助二者间距离与取向依赖的非辐射能量转移实现检测[30]。其典型结构由特异性靶标结合域、供体 (如CFP) 与受体 (如YFP) 荧光蛋白经柔性连接子串联而成 (图5B)。靶标结合诱导传感域构象变化, 改变供受体间距离 (1～10 nm) 与相对取向, 进而调制FRET效率, 呈现供体荧光淬灭与受体荧光增强的双重信号响应, 实现对活细胞内分子互作与构象动态的实时监

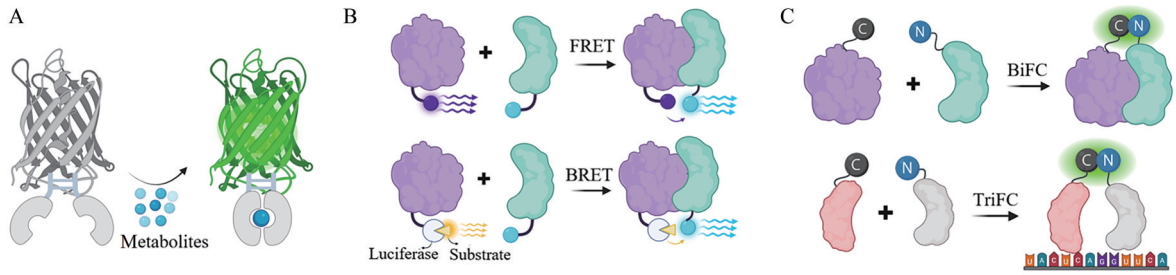



**Figure 5** Technical classification and structural characteristics of genetically encoded fluorescent biosensors. A: Single-FP based sensors; B: FRET/BRET-based sensors; C: Molecular fluorescent complementation. FRET: Förster resonance energy transfer; BRET: Bioluminescence resonance energy transfer; BiFC: Bimolecular fluorescent complementation; TriFC: Trimolecular fluorescence complementation. Created in BioRender. Lu, E. (2026)https://BioRender.com/upntqpu

测。该设计赋予传感器优异的稳健性, 对外界扰动不敏感, 尤适于长时程动态观测, 已成为解析蛋白相互作用、核酸动态、信号转导及药物结合等过程的重要工具。然其较大分子质量 (通常 > 54 kDa) 可能干扰目标蛋白功能, 且能量转移效率受限, 在复杂组织中成像仍具挑战。

Zheng 等[35]构建了一套基于 FRET 的 PKC*ε* 活性实时监测体系, 用于高通量筛选靶向 *sn*-1,2-DAG-PKC*ε* 通路的天然产物。通过表达 CFP-PKC*ε*-YFP 双荧光融合蛋白, 并监测其 FRET 比值变化反映 PKC*ε* 的活化状态: 其比值随 PKC*ε* 活化构象展开而降低。结合高内涵成像筛选天然产物库和 UPLC-TOF-MS 质谱分析, 发现白术内酯 II (**14**, 图 4) 可抑制 PKC*ε* 转位与激活, 进而缓解肥胖相关的胰岛素抵抗。进一步利用 ABPP 技术, 鉴定出二酰基甘油激酶 DGKQ 为 **14** 的直接作用靶标, 提示 **14** 可能作用于 DGKQ 的新型变构域以调节激酶活性。该研究完整呈现了“FRET 筛选−功能验证−化学蛋白质组学靶标鉴定”的标准化研究范式。

基于 FRET 原理, 已衍生出多种先进技术。其中两类方法在提升检测能力方面尤为突出, 分别为基于荧光寿命成像 (fluorescence lifetime imaging microscopy, FLIM) 的 FRET 生物传感器和均相时间分辨荧光共振能量转移 (time-resolved FRET, TR-FRET) 传感器。FRET 生物传感器融合了 FRET 能量转移机制与荧光寿命检测方法[36]。该技术保留传统 FRET 的分子构建方式, 但通过监测供体荧光寿命的衰减来定量 FRET 效率, 取代了依赖荧光强度的比率法。其优势在于仅需探测供体荧光寿命, 简化了探针设计并规避了受体光物理特性的干扰; 同时提供定量化的空间分布信息, 实现对代谢物浓度等的绝对测量, 在活细胞微环境研究与显微成像中具有不可替代的价值。信号转导与转录激活因子 (signal transducer and activator of transcription, STAT) 家族是恶性肿瘤与自身免疫性疾病治疗的重要靶标, 然而实时监测手段的缺失制约了靶向药物研发。近期, Nguyen 等[37]开发了基于 FRET-FLIM 的生物传感器家族 STATeLights, 实现对活细胞内 STAT 激活状态的动态观测。研究以 STAT5A 为对象, 在其特定位点融合供体与受体荧光蛋白, 构建 STATeLight5A 传感器。STAT5A 磷酸化激活后发生构象变化, 荧光蛋白间距减小致使 FRET 效率升高, 供体荧光寿命缩短; FLIM 技术通过检测寿命的变化从而量化构象改变。该策略进一步推广至 STAT 全家族, 均获得有效的 FRET 响应。研究进一步证实 STATeLight5A 可作为高效抑制剂筛选平台, 测试了 STAT5 抑制剂可完全阻断其二聚化。该新型 FLIM-FRET 生物传感器能够实时、高效监测活细胞内 STAT 激活动态, 不仅为探究 JAK-STAT 信号转导及疾病相关突变提供了动态追踪工具, 亦为靶向 JAK/STAT 途径的药物筛选提供了有力支持。

TR-FRET 生物传感器则整合了时间分辨荧光与 FRET 的双重优势。其利用镧系元素 (如 $Eu^{3+}$、$Tb^{3+}$) 的长寿命荧光作为供体, 通过延迟检测有效滤除短寿命背景荧光。通过分析受体与供体的稳态荧光强度比, 精确计算结合常数与亲和力。该方法抗干扰能力卓越, 适用于复杂生物样本, 且通量高、数据稳定性强, 因而在生物分子相互作用研究及高通量药物筛选中展现出极高的灵敏度与信噪比优势。Konstantinidou 等[38]近期研究旨在开发可稳定 14-3-3*σ* 与 ER*α* 相互作用的小分子, 以抑制 ER*α* 转录活性, 为 ER*α* 阳性乳腺癌提供新治疗策略。研究采用基于多组分反应化学驱动的骨架跃迁策略对先导物进行快速衍生与优化。作者首先通过质谱与共晶结构初筛得到多个共价结合候选分子, 通过 TR-FRET 平台对上述筛选体系进行验证, 得到可稳定 14-3-3*σ* 与 ER*α* 相互作用的优势分子胶。研究者构建了带有 His 标签的 14-3-3*σ* 蛋白, 以及生物素化的 ER*α* 磷酸化多肽, 分别用于结合铽 (Tb) 标记的 His 抗体和链霉亲和素抗体, 通过两个蛋白结合后的能量转移检测三元复合物的结合 (图 6)。该研究为基于分子胶的药物发现提供了高效、可靠的筛选与验证体系。

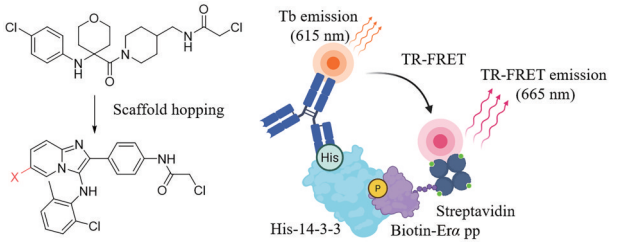



**Figure 6** Time-resolved fluorescence lifetime imaging microscopy (TR-FRET) application in the discovery of new molecular glues. Created in BioRender. Lu, E. (2026)https://BioRender.com/upntqpu

#### 3.2.2.2 基于生物发光共振能量转移的传感器

生物发光共振能量转移 (bioluminescence resonance energy transfer, BRET) 与 FRET 原理相似, 但其供体为荧光素酶 (luciferase)[39]。在底物存在下, 荧光素酶的生物发光通过能量转移激发受体荧光团发光, 从而探测蛋白质相互作用。实验中将目标蛋白分别与供体 (荧光素酶) 或受体荧光蛋白融合。当蛋白互作使两者足够接近时, 即发生能量转移, 由此指示相互作用 (图 5B)。

相较于FRET, BRET无需外源光激发, 避免了光漂白、光损伤及组织自发荧光干扰, 信噪比更高。两者均适用于活细胞成像中的蛋白互作、ATP、代谢物及离子检测等研究。常见荧光素酶供体包括海肾 (Rluc)、北萤 (Pluc) 及纳米荧光素酶 (Nluc) 等。其中, Nluc因小分子质量 (19 kDa) 与高亮度成为商业应用新标准, 基于其开发的NanoBRET技术尤其适用于活细胞内蛋白质/小分子相互作用研究[40]。

Zhang 等[41]近期首次报道了NanoBRET与ABPP联用的靶标发现策略。针对同源蛋白选择性配体结合腔穴的发现难题, 该研究以细胞周期蛋白同源物CCNE1与CCNE2 (同源性55%) 为模型。首先利用ABPP技术证实了CCNE2中半胱氨酸C109的共价配体潜力, 并将CCNE1中对应残基突变 (N112C), 获得可与色胺啉丙烯酰胺探针发生立体专一共价反应的突变体。基于此构建NanoBRET-ABPP高通量筛选平台 (Nluc-CCNE1$^{N112C}$ + 荧光共价探针 **15**) 用以筛选能阻断探针与突变体相互作用的小分子 (图7)。该平台成功鉴定出可逆抑制N112C突变型及野生型CCNE1: CDK2复合物的化合物。共晶揭示在N112相邻的CCNE1: CDK2界面存在一个隐秘的变构域, 可与上述可逆抑制剂结合。该工作显示了ABPP与BRET互补性结合模式: ABPP快速识别新型蛋白–配体相互作用, 进而转化为BRET探针, 得以发现或验证蛋白质组中新型抗药性靶标。

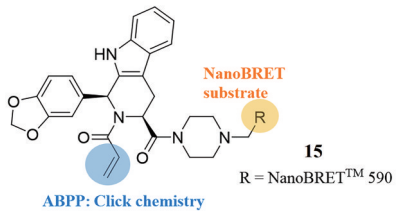



**Figure 7** NanoBRET combines with ABPP for target discovery strategy

### 3.2.3 分子荧光互补系统

分子互补系统是利用蛋白片段互补技术构建的传感体系。以荧光蛋白为信号元件的分子互补系统主要包括双分子荧光互补 (bimolecular fluorescent complementation, BiFC) 和三分子荧光互补 (trimolecular fluorescence complementation, TriFC) 系统等。

BiFC技术通过对荧光蛋白进行基因剪接, 将其分割为自发无荧光的N端与C端片段, 分别与一对待测靶蛋白融合表达。若该对靶蛋白相互作用, 则带动两荧光蛋白片段在空间上靠近, 通过结构互补实现荧光蛋白分子的重构与荧光恢复; 反之则无荧光信号产生 (图5C)[42]。目前, BiFC探针已广泛应用于蛋白–蛋白相互作用研究, 是寻找疾病治疗靶标和药物的有效工具。在此基础上, 进一步衍生出BiFC-FRET融合系统, 通过分割FRET受体实现对多蛋白相互作用的协同检测[43]。BiFC也广泛用于病毒与宿主相互作用研究, 对揭示病毒生命周期和致病机制具有重要意义。

Aslam 等[44]为研究甲型流感病毒1 (nonstructural protein 1, NS1) 蛋白与PI3K的相互作用, 构建了BiFC平台以追踪病毒蛋白对宿主信号复合物的重编程过程。该平台将YFP的N端片段 (YN) 与PI3K催化亚基p110$\alpha/\beta/\delta$的N端融合, YFP的C端片段 (YC) 则与调节亚基p85$\alpha/\beta$的C端融合, 只有当两者正确组装为功能性异源二聚体时方可恢复YFP荧光, 从而实现对不同PI3K异二聚体的选择性追踪。研究发现NS1特异性结合p85$\beta$, 并通过p110亚型 ($\alpha/\beta/\delta$) 决定PI3K复合物的亚细胞定位与功能走向。PI3K催化与调节亚基上的临床致癌突变可模拟NS1诱导的效应, 部分弥补因p85$\beta$结合缺陷所致的病毒适应性损失。该研究以单一YN/YC片段对成功解析了PI3K七种亚型的动态命运, 实现致癌信号活细胞可视化, 充分体现了BiFC在操作简便性、系统通用性及实时动态跟踪方面的显著优势。

TriFC系统由BiFC衍生而来, 用于解析细胞内蛋白质-RNA相互作用。其将荧光蛋白C端片段通过已知互作的蛋白质A′与RNA (D) 附着于报告mRNA上, N端片段则与RNA结合蛋白B′融合表达。若B′蛋白能够识别并结合报告mRNA中的特定序列, 则介导N端与C端片段相互接近, 恢复荧光蛋白构象并发光 (图5C)[45]。TriFC不仅可用于鉴定蛋白质-RNA相互作用, 还可实现在活细胞内对互作过程进行时空动态分析。

基因编码荧光传感器以遗传密码为蓝本, 通过分子自组装形成内源荧光团, 突破传统生化方法在实时性与空间分辨率上的局限性, 实现了从单细胞到细胞器层面的精准定量, 为揭示药物扰动下的代谢与信号网络变化提供了实时、直观的分子视野。其优势包括生物相容性、亚细胞定位精准、遗传性稳定及分辨率高, 可追踪毫秒级动态与亚微米结构。目前该技术已广泛应用于药物高通量筛选、代谢网络可视化及疾病代谢异常的早期诊断等领域。

## 3.3 化学遗传学

化学遗传学 (chemical genetics) 是以小分子化合物为工具, 通过干扰或调节生理过程研究蛋白质功能及生命现象[46], 其目标是解析基因表达机制与药物靶标发现。

化学遗传学分为正向与反向两种策略 (图8)。正向化学遗传学 (forward chemical genetics) 从表型出

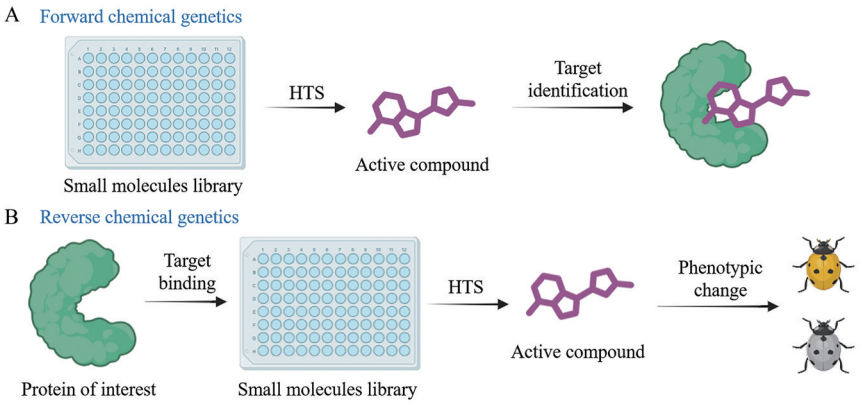



**Figure 8** The experimental workflow of chemical genetics. A: Forward chemical genetics; B: Reverse chemical genetics. HTS: High-throughput screening. Created in BioRender. Lu, E. (2026)https://BioRender.com/jfa8ll3

发, 通过高通量筛选寻找可引起特定表型变化的活性分子, 进而解析其作用靶标, 可理解为“基于表型的药物发现”。反向化学遗传学 (reverse chemical genetics) 则从靶标出发, 筛选能特异性结合目标蛋白的化合物, 通过观测其在生物系统中引发的表型变化, 揭示该蛋白的生物学功能, 可理解为“基于靶标的药物发现”。化学遗传学融合了化学工具的精确性与遗传学的逻辑框架, 为揭示生命机制和加速药物研发提供了有力且灵活的研究路径。此两类研究策略均高度依赖于高通量筛选和大规模化合物库等技术, 以实现对大量化合物的快速评价。

### 3.3.1 DNA编码文库

DNA 编码化合物库 (DNA Encoded Compound Library, DEL) 作为新兴高通量筛选平台, 融合了组合化学与遗传条形码技术, 可针对多种生物靶标快速筛选小分子配体[47]。近三十年来, DEL 凭借库容量大、化学空间广、通量高、周期短、成本低及操作简便等优势备受关注, 并在多个药物靶标上取得了显著进展, 成为药物发现前沿技术之一。传统 DEL 多依赖经验性、广谱性建库策略, 常致命中率低、脱靶效应明显及药物相关结构多样性受限等问题。近年来, 该技术正逐步从盲筛工具转向更为理性、精准为导向的筛选策略[48]。

Schafer 等[49]针对传统视为“不可成药”的剪接体核心蛋白 USP39, 为降低筛选不确定性, 采用聚焦化合物库 (200 个分子, 靶向表观遗传/剪接相关靶标) 与 DEL (容量 6 亿分子) 并行筛选的策略 (图 9)。经蛋白热稳定性分析、亲和层析与测序富集分析, 发现含噻唑骨架的小分子 **16**、**17** 在两个平台中均显著富集。进一步借助 AlphaFold 模拟对接、点突变验证及结合实验, 确认了小分子 **16** 与 USP39 的变构域结合。研究者随后将其转化为高效的 USP39 靶向 PROTAC 降解剂 **18**, 该分子于 1 nmol·L$^{-1}$ 浓度下即可实现 USP39 的高效降解, 且全蛋白质组学分析证实其脱靶效应极低。该工作不仅实现了对 USP39 的高活性、高选择性降解, 更揭示了一种通过“中等亲和力配体”结合并驱动“诱导邻近”效应来靶向结合传统难成药蛋白的新模式。此研究中 DEL 技术并非辅助工具, 而是实现从“不可成药”到“可降解”突破的关键起点: 其高通量特性实现了对噻唑母核的高效识别, 为先导化合物获得及后续 PROTAC 分子设计奠定了决定性基础。

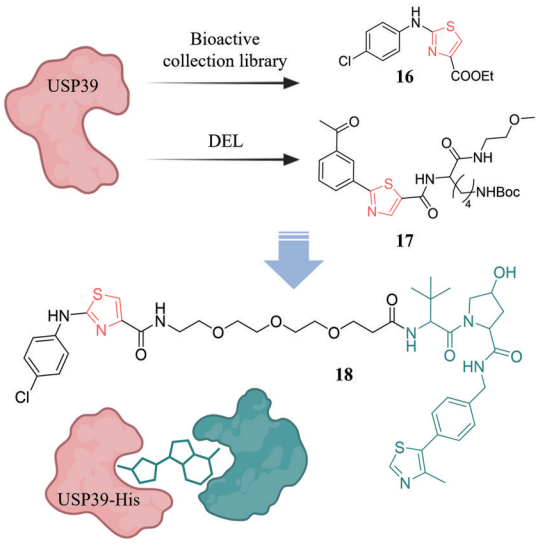



**Figure 9** Discovery of USP39 inhibitors and degraders by DNA Encoded Compound Library (DEL). Created in BioRender. Lu, E. (2026)https://BioRender.com/upntqpu

Zhang 等[50]针对传统 DEL 筛选的盲目性与成功率有限等瓶颈, 提出“快速靶标追踪与配体发现平台” (fully functionalized tags-biocatDEL, FF tags-biocatDEL), 是以化学蛋白质组学引导、生物催化构建为特征, 首先利用基于吲哚的化学蛋白质组学探针进行细胞层面全景式分析, 锁定磷酸甘油酸脱氢酶 (phosphoglycerate

dehydrogenase, PHGDH) 为潜在靶标。随后依据探针结构设计了针对 PHGDH 的定制化 DEL, 并成功鉴定出新型 PHGDH 抑制剂, 初步验证了平台可行性 (图 10)。该平台利用化学蛋白质组学系统性识别细胞中的潜在靶标, 降低传统筛选随机性; 同时引入生物催化反应, 在保持 DNA 兼容性的前提下, 有效拓展了化合物库的结构多样性。通过多维技术融合实现了 DEL 与生物靶标的高效匹配, 并基于靶标信息反向指导定制化 DEL 的设计与筛选。该智能化策略, 为难成药靶标的配体发现提供了新的策略。

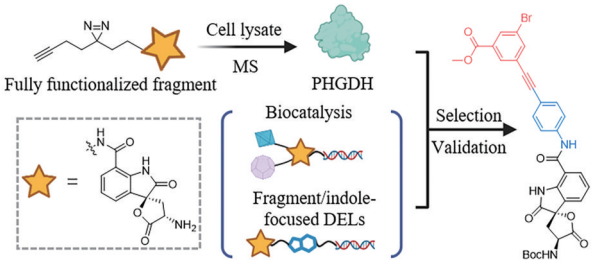



**Figure 10** Fully functionalized tags-biocatDEL (FF tags-biocatDEL) selection strategy. PHGDH: Phosphoglycerate dehydrogenase. Created in BioRender. Lu, E. (2026)https://BioRender.com/upntqpu

### 3.3.2 靶标去卷积 (target deconvolution)

靶标去卷积旨在系统鉴定化合物调控的基因、蛋白与信号通路, 对于化学基因组学及药物研发具有核心价值。它不仅能指导先导物优化、阐释药物作用机制, 还有助于揭示新的生物学通路, 并为基于个体遗传或蛋白表达特征的精准医疗提供依据。常用方法涵盖基因操作 (转录组测序、RNA 干扰、CRISPR 技术)、代谢组学、化学蛋白质组学及计算生物学预测等。相较于遗传学方法的表型模拟度不足、代谢组学的网络复杂性、计算方法的可靠性争议, 化学蛋白质组学直接聚焦于功能蛋白, 提供了一种更为直接、无偏倚的靶标发现路径。

作者所在团队[51]长期致力于转录因子 Nrf2 的药物化学生物学研究。Nrf2 在多种癌症中呈组成性激活, 是驱动肿瘤进展及化疗/放疗耐药的关键致癌因子, 但是对靶向 Nrf2 的有效治疗策略知之甚少。基于此, ① 首先建立细胞内荧光素酶报告基因系统对内部化合物库进行表型筛选, 发现可在细胞内抑制 Nrf2 活性的小分子 **19**; ② 随后设计了基于 ABPP 的光亲和探针 **20** 用于靶标富集, 经质谱鉴定其结合靶标为 14-3-3ζ; ③ 通过 ITC、SPR、MST 等生物物理法及 CETSA 实验验证结合; ④ 通过位点突变等遗传学手段, 精确解析 WS3 与 14-3-3ζ的结合模式, 发现其作用于 14-3-3ζ的二聚体别构腔穴, 诱导 14-3-3ζ构象变化, 阻断其与 pGSK3$\beta$ 的互作, 进而促进 pGSK3$\beta$ 对 Nrf2 的磷酸化, 最终激活 $\beta$-TrCP/CUL1 介导的 Nrf2 泛素化降解通路; ⑤ 功能实验证实 **19** 可有效诱发氧化应激, 并增强 Nrf2 驱动型肿瘤对化疗及铁死亡的敏感性, 于表型层面完成了从发现到验证的研究闭环 (图 11A)。该研究从表型筛选出发, 通过化学蛋白质组学指导的靶标去卷积, 成功将 **19** 的靶标从“黑箱”状态精确解析至 14-3-3 家族蛋白, 为开发靶向 14-3-3 的别构抑制剂、治疗 Nrf2 高表达肿瘤奠定了基础。

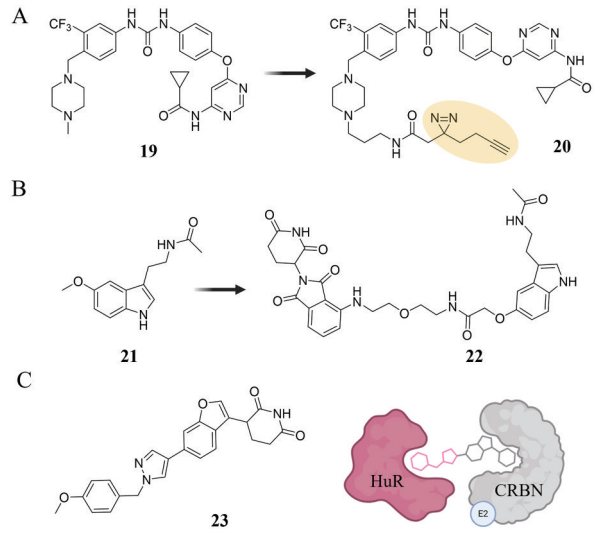



**Figure 11** Chemical structures of compounds **19**–**23**. A: Discovery of **19** as an allosteric 14-3-3 inhibitor for Nrf2 degradation *via* phenotypic screening and chemoproteomic-based target deconvolution; B: AI-driven discovery of dual antiaging and anti-AD therapeutics *via* PROTAC target deconvolution; C: Chemical structure of the molecular glue degrader **23** and characterization of CRBN-**23**-HuR ternary complex formation. Created in BioRender. Lu, E. (2026)https://BioRender.com/upntqpu

前已提及, 分子胶[52]与 PROTAC 等降解剂, 相较传统依赖高亲和力结合的化学探针, 具有独特优势: 它们不要求强靶标结合力, 尤其适用于结合活性适中或非共价的弱相互作用靶标; 且以“降解”替代“结合”, 可有效规避传统小分子探针的假阳性结果, 因而成为靶标去卷积研究中的重要工具。例如, 为探寻兼具抗衰老与抗阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 效应的安全持久疗法, Sun 等[53]构建了一套 AI 引导的筛选系统——通路与转录组驱动的药物疗效预测器, 从 92 种已上市助眠药物中筛选出褪黑素 (melatonin, **21**) 显示其具有双重抗衰老与抗 AD 潜力。临床样本分析和体内外实验证实 **21** 可挽救认知功能、抑制神经炎症并缓解衰老相关表型。在靶标确证环节, 研究团队设计了靶向降解 **21** 的 PROTAC 分子 **22**, 采用 DBPP 技术进行

靶标去卷积, 鉴定出组蛋白乙酰转移酶p300为**21**的直接作用靶标 (图11B)。进一步结合转录组测序等靶标去卷积技术, 辅以药理学验证, 揭示**21**特异性作用于位于超增强子区域的p300/SP1转录复合物, 从而强烈驱动昼夜节律关键调控因子BMAL1的转录激活。在AD与细胞衰老模型中均证实了**21**的治疗效果, 显示其通过多靶标协同作用同时缓解衰老标志与AD病理的能力。该研究整合AI药物发现与PROTAC驱动的靶标去卷积策略, 为衰老相关神经退行性疾病的多靶标药物研发提供了新路径。

利用组学技术开展分子胶药物的发现和靶标去卷积, 已成为当前药物发现领域的前沿方向。近日, Lu等[54]报道了一种靶向人抗原R (human antigen R, HuR) 的分子胶降解剂用于BRAF突变结直肠癌的治疗。研究人员设计了包含逾万种化合物的CRBN结合分子库, 借助串联质谱标签定量蛋白质组学, 在CRBN野生型与敲除细胞中筛选出RNA结合蛋白HuR为CRBN依赖性降解靶点, 并优化获得高效分子胶降解剂**23**, 其半数降解浓度低至3.8 nmol·L$^{-1}$, 最大降解率达96%。冷冻电镜解析了CRBN-**23**-HuR复合物结构。CRISPR敲除实验表明, BRAF突变结直肠癌细胞对HuR缺失高度敏感, 证实**23**的抗癌效果依赖HuR降解。RNA测序揭示, **23**通过降解HuR, 使后者对BRAF的剪接调控功能丧失, 从而抑制BRAF蛋白合成及下游MAPK通路。**23**在BRAF抑制剂耐药及患者来源异种移植的结直肠癌模型中均显示出良好的口服抗肿瘤活性和耐受性 (图11C)。该研究首次将分子胶降解剂的靶标拓展至“难成药”的RNA结合蛋白家族, 为靶向该类蛋白开辟了新的药物开发范式。

分子胶和PROTAC在靶标去卷积中虽具独特优势, 但其作用机制的复杂性对表型数据解读构成显著挑战。这种复杂性首先源于三元复合物形成的非特异性: PROTAC的连接链设计或弹头选择性不足, 易使E3连接酶与非靶蛋白结合, 导致脱靶降解; 而以CRBN配体为代表的E3结合配体本身具有降解锌指蛋白 (如IKZF1/3) 的内在倾向, 且E3连接酶的时空分布差异进一步加剧了底物识别的混杂性。此外, 浓度依赖的“hook效应”使降解活性与剂量呈非线性关系, 增加了表型归因的难度; 分子胶因缺乏对靶蛋白的独立结合能力, 其脱靶谱的预测更为困难。在系统层面, 降解剂劫持泛素−蛋白酶体系统, 可能因大量非靶蛋白降解而导致系统超载, 间接扰动全局蛋白周转; 同时, 靶蛋白降解会触发细胞补偿性反馈网络, 进一步干扰对靶蛋白功能的准确归因。

为规避上述问题, 研究中应采用多维度全局分析策略: ① 以全蛋白质组学为核心工具, 无偏覆盖尽可能全面的蛋白表达谱; ② 设计多层次对照实验, 包括溶剂对照、非活性类似物、E3配体单独处理及时间/剂量梯度, 以区分非特异性降解的干扰; ③ 结合邻近标记、热稳定性分析和遗传学验证等正交方法, 对蛋白质组学发现的候选靶标进行交叉确认, 从而将真实靶标效应与脱靶及间接效应可靠区分。

综上所述, 正向和反向化学遗传学二向并进的技术体系, 映射出化学遗传学“分子干预”与“靶标回归”之双重逻辑。正向策略以表型为始, 依赖高效靶标捕获技术逆向溯因; 反向策略则由靶标出发, 理性构建, 仰赖纯化蛋白以验证分子机制。二者相辅相成, 共构活性分子发现与功能阐释的闭环。融合结构生物学与计算化学, 不仅加速配体优化进程, 更使反向设计渐从经验走向理性, 从微观结构预见宏观表型, 进一步强化化学工具在系统生物学中的解析能力。

## 4 总结与展望

未来药物化学与药物发现领域将步入诸法融汇、百工出新、精微致用的变革期。尽管近几十年来药物研发领域成本投入不断增长, 药物研发生产力却显著下降 (即反摩尔定律, Eroom′s Law), 药物开发面临多重挑战。基于机制的药物发现取决于药物靶标的确定; 同时, 随着对分子、细胞和整体层面认知的不断深化, 大量蛋白质被确认为潜在靶标, 从而对加速药物发现方法提出了迫切需求。化学生物学凭借其强大且持续演进的工具箱, 成功地将表型药物发现从一项经验性、不确定性的探索, 转变为一条可系统解析、精准干预的科学路径。它不仅充当了连接表型与靶标的关键桥梁, 更孕育了相分离调节剂、PROTAC、分子胶等一系列全新的药物作用模式。诸技合流, 正赋予研究者前所未有的、全景式的药物研发洞察力。文中代表性技术的优势、局限及适用场景总结于表1。

总而言之, 化学生物学与药物化学的紧密协同, 正共同引领药物研发进入一个靶标与表型互作并重、理性设计与创新发现交融的新纪元。唯有持续深化这一交叉领域的投入与创新, 方能不断揭示生命机制的深层次奥秘, 以应对日益复杂的疾病挑战。正是:

时兴药物著玲珑, 药物化学主其中。
上溯化学生物学, 下接制剂倚工程。
茫茫分子若瀚海, 细细筛出赖表型。
表型靶点当互作, 生物鹊桥跨长空。
亲和钓饵捕精髓, 质谱分痕辨是非。
筛测酶活亲和力, 荧光热稳共振微。
共价靶标不可逆, 转录谱图察变机。
数策同勘凝佐证, 表型靶点自昭晖。

**Table 1** Comparison of representative chemical biology technologies: Advantages, limitations, and applications

| Technical category | Specific technique | Advantage | Limitation | Application |
|---|---|---|---|---|
| Chemoproteomics based on derivatization | ABPP | Directly reports on active-site status of proteins; high quantitative accuracy | Applicable only to covalently modified proteins; probe design dependent on active-site architecture; high nonspecificity | Suited for various enzyme families; natural product target discovery |
| | AfBPP | Relatively flexible probe design; enables identification of enzymatically inactive proteins | Requires ligand modification without loss of activity; capture efficiency affected by binding affinity; high nonspecificity | Target identification for known compounds; affinity screening |
| | DBPP | No probe modification required; compatible with live-cell treatment | Depends on meticulous optimization of proteolytic conditions; nonspecific degradation; perturbation of protein homeostasis | Identification of undruggable targets; preliminary assessment of target druggability |
| Chemoproteomics without derivatization | DARTS/LIP-MS | No chemical modification required; operationally straightforward; LIP-MS offers high resolution | Relies on protein conformational changes; poor applicability to membrane proteins; low-abundance proteins difficult to detect | Preliminary target discovery; rapid screening of natural product targets |
| | CETSA | No probe modification required; compatible with live-cell treatment; operationally simple | Requires pre-specified target; dependent on specific antibodies; low throughput | Validation of pre-defined targets; target pathway analysis |
| | TPP | Panoramic, unbiased screening; high-throughput | Large sample requirement; intensive MS acquisition; insufficient sensitivity for low-abundance membrane proteins | Exploration of unknown targets; multi-target network interaction analysis |
| | SPROX | No thermal or enzymatic treatment required; provides thermodynamic parameters | Dependent on methionine content; limited proteome coverage; high drug concentrations required | Thermodynamic evaluation of ligand binding |
| | CPP | Low false-positive rate; broader proteome coverage than SPROX | Requires chemical denaturant treatment; applicable only to soluble proteins | Affinity determination; protein-drug interaction screening |
| | TRAP | High proteome coverage; high-throughput | Relies on lysine labeling; relatively low sensitivity; high false-negative rate | Rapid cross-validation of candidate targets |
| | MTRP | No lysine labeling required; high resolution | Limited by MS acquisition depth | High-resolution thermal stability analysis in complex systems |
| Genetically encoded biosensors & imaging technologies | Single-FP | Enables real-time monitoring of dynamic changes; genetically encodable | Challenging engineering; spectral overlap; applicable only to validated targets | Live-cell binding analysis and real-time imaging |
| | FRET/BRET | Ratiometric detection corrects for experimental artifacts; BRET requires no external excitation, offering low background | FRET requires meticulous spectral crosstalk correction; BRET signal intensity dependent on substrate levels; limited dynamic range | Real-time detection of target-ligand interactions in live cells; high-throughput drug screening |
| | BiFC/TriFC | High sensitivity; detects weak/transient interactions; low background | Irreversible complementation; may interfere with native protein function | Detection of protein-protein interactions and ligand-induced complexes |
| Chemical genetics | DEL | High-throughput; low sample requirement; short screening cycle; operationally simple | Requires purified target protein; constrained by physicochemical properties of DNA | Large-scale high-throughput screening of lead compounds |
| | Target deconvolution | Establishes phenotype-target causal relationships; low false-positive rate | Lengthy timeline; compensatory effects; lethality upon knockout of certain essential targets | Target and mechanistic validation following phenotypic screening |

**作者贡献**: 陆朦辰负责文章资料收集与撰写; 尤启冬、郭宗儒负责文章的选题与修改。

**利益冲突**: 本文无利益冲突。

## References

[1] Sadri A. Is target-based drug discovery efficient? Discovery and "off-target" mechanisms of all drugs [J]. J Med Chem, 2023, 66: 12651-12677.

[2] Vane JR, Botting RM. The mechanism of action of aspirin [J]. Thromb Res, 2003, 110: 255-258.

[3] Lamoia TE, Shulman GI. Cellular and molecular mechanisms of metformin action [J]. Endocr Rev, 2021, 42: 77-96.

[4] Zhang ZX, Li SY, Li FF, et al. Meisoindigo acts as a molecular glue to target PKMYT1 for degradation in chronic myeloid leukemia therapy [J]. Adv Sci (Weinh), 2025, 12: e2413676.

[5] Meissner F, Geddes-Mcalister J, Mann M, et al. The emerging role of mass spectrometry-based proteomics in drug discovery

[J]. Nat Rev Drug Discov, 2022, 21: 637-654.

[6] Gao YH, Ma MZ, Li WY, et al. Chemoproteomics, a broad avenue to target deconvolution [J]. Adv Sci (Weinh), 2024, 11: 2305608.

[7] Chen X, Wang YT, Ma N, et al. Target identification of natural medicine with chemical proteomics approach: Probe synthesis, target fishing and protein identification [J]. Signal Transduct Target Ther, 2020, 5: 72.

[8] Wang J, Zhang CJ, Chia WN, et al. Haem-activated promiscuous targeting of artemisinin in *Plasmodium falciparum* [J]. Nat Commun, 2015, 6: 10111.

[9] Gao P, Chen JY, Sun P, et al. Chemical proteomic profiling with photoaffinity labeling strategy identifies antimalarial targets of artemisinin [J]. Chin Chem Lett, 2023, 34: 12.

[10] Guo ZR. Enlightenment from Danggui Aloe Pills to the discovery of molecular glue [J]. Acta Pharm Sin (药学学报), 2025, 60: 2913-2917.

[11] Liu Y, Jiang JJ, Du SY, et al. Artemisinins ameliorate polycystic ovarian syndrome by mediating LONP1-CYP11A1 interaction [J]. Science, 2024, 384: eadk5382.

[12] Wang QH, Du TT, Zhang ZH, et al. Target fishing and mechanistic insights of the natural anticancer drug candidate chlorogenic acid [J]. Acta Pharm Sin B, 2024, 14: 4431-4442.

[13] Ni Z, Shi Y, Liu QL, et al. Degradation-based protein profiling: A case study of celastrol [J]. Adv Sci (Weinh), 2024, 11: 2308186.

[14] Tan XY, Wang D, Yao YR, et al. Chemical proteomics probes: Classification, applications, and future perspectives in proteome-wide studies [J]. Proteomics, 2025, 25: 62-75.

[15] Lomenick B, Hao R, Jonai N, et al. Target identification using drug affinity responsive target stability (DARTS) [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009, 106: 21984-21989.

[16] Wu YY, Feng GT, Shuai W, et al. Identification of a selective YTHDF1 inhibitor targeting the $m^6A$ recognition domain for breast cancer [J]. Angew Chem Int Ed, 2025, 64: e202509316.

[17] Malinovska L, Cappelletti V, Kohler D, et al. Proteome-wide structural changes measured with limited proteolysis-mass spectrometry: An advanced protocol for high-throughput applications [J]. Nat Protoc, 2023, 18: 659-682.

[18] Chen SZ, Liu XX, Peng C, et al. The phytochemical hyperforin triggers thermogenesis in adipose tissue *via* a Dlat-AMPK signaling axis to curb obesity [J]. Cell Metab, 2021, 33: 565-580.

[19] Savitski MM, Reinhard FB, Franken H, et al. Tracking cancer drugs in living cells by thermal profiling of the proteome [J]. Science, 2014, 346: 1255784.

[20] Reinhard FB, Eberhard D, Werner T, et al. Thermal proteome profiling monitors ligand interactions with cellular membrane proteins [J]. Nat Methods, 2015, 12: 1129-1131.

[21] Liu TT, Yang H, Zhuo FF, et al. Atypical E3 ligase ZFP91 promotes small-molecule-induced E2F2 transcription factor degradation for cancer therapy [J]. EBioMedicine, 2022, 86: 104353.

[22] Jiang SL, Liu KY, Jiang T, et al. Harnessing artificial intelligence to identify bufalin as a molecular glue degrader of estrogen receptor alpha [J]. Nat Commun, 2025, 16: 7854.

[23] Li FF, Zhang ZX, Shi QY, et al. Thermal proteome profiling (TPP) reveals NAMPT as the anti-glioma target of phenanthroindolizidine alkaloid PF403 [J]. Acta Pharm Sin B, 2025, 15: 2008-2023.

[24] Meng H, Ma R, Fitzgerald MC. Chemical denaturation and protein precipitation approach for discovery and quantitation of protein-drug interactions [J]. Anal Chem, 2018, 90: 9249-9255.

[25] Ma J, Liu Q. Identification techniques of small molecule drug target proteins without chemical modification and its applications: A review [J]. Chin J Biotechnol (生物工程学报), 2021, 37: 1131-1138.

[26] Tian Y, Wan N, Zhang HQ, et al. Chemoproteomic mapping of the glycolytic targetome in cancer cells [J]. Nat Chem Biol, 2023, 19: 1480-1491.

[27] Zhu YY, Wan N, Shan XN, et al. Celastrol targets adenylyl cyclase-associated protein 1 to reduce macrophages-mediated inflammation and ameliorates high fat diet-induced metabolic syndrome in mice [J]. Acta Pharm Sin B, 2021, 11: 1200-1212.

[28] Tian CP, Sun R, Liu KK, et al. Multiplexed thiol reactivity profiling for target discovery of electrophilic natural products [J]. Cell Chem Biol, 2017, 24: 1416-1427.

[29] Wang SY, Zhang Y, Yu RZ, et al. Labeled and label-free target identifications of natural products [J]. J Med Chem, 2024, 67: 17980-17996.

[30] Wang MJ, Da YF, Tian Y. Fluorescent proteins and genetically encoded biosensors [J]. Chem Soc Rev, 2023, 52: 1189-1214.

[31] Nasu Y, Shen Y, Kramer L, et al. Structure- and mechanism-guided design of single fluorescent protein-based biosensors [J]. Nat Chem Biol, 2021, 17: 509-518.

[32] Baird GS, Zacharias DA, Tsien RY. Circular permutation and receptor insertion within green fluorescent proteins [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999, 96: 11241-11246.

[33] Dana H, Sun Y, Mohar B, et al. High-performance calcium sensors for imaging activity in neuronal populations and microcompartments [J]. Nat Methods, 2019, 16: 649-657.

[34] Chen TW, Wardill TJ, Sun Y, et al. Ultrasensitive fluorescent proteins for imaging neuronal activity [J]. Nature, 2013, 499: 295-300.

[35] Zheng ZG, Xu YY, Liu WP, et al. Discovery of a potent allosteric activator of DGKQ that ameliorates obesity-induced insulin resistance *via* the *sn*-1, 2-DAG-PKC$\varepsilon$ signaling axis [J]. Cell Metab, 2023, 35: 101-117.

[36] Wallrabe H, Periasamy A. Imaging protein molecules using FRET and FLIM microscopy [J]. Curr Opin Biotechnol, 2005, 16: 19-27.

[37] Nguyen TAN, Meledin R, Seubert-Buholzer KJ, et al. Real-time visualization of STAT activation in live cells using genetically encoded biosensors [J]. Nat Chem Biol, 2026, 22: 369-378.

[38] Konstantinidou M, Zingiridis M, Pennings MAM, et al. Scaffold-hopping for molecular glues targeting the 14-3-3/ER$\alpha$ complex [J]. Nat Commun, 2025, 16: 6467.

[39] Capener JL, Schwalm MP, Vasta JD, et al. Advances in BRET probes for intracellular target engagement studies [J]. Nat Chem Biol, 2026, 22: 691-701.

[40] Machleidt T, Woodroofe CC, Schwinn MK, et al. Nanobret—a novel BRET platform for the analysis of protein-protein interactions [J]. ACS Chem Biol, 2015, 10: 1797-1804.

[41] Zhang YJ, Liu ZL, Hirschi M, et al. An allosteric cyclin E-CDK2 site mapped by paralog hopping with covalent probes [J]. Nat Chem Biol, 2025, 21: 420-431.

[42] Ghosh I, Hamilton AD, Regan L. Antiparallel leucine zipper-directed protein reassembly: Application to the green fluorescent protein [J]. J Am Chem Soc, 2000, 122: 5658-5659.

[43] Shyu YJ, Suarez CD, Hu CD. Visualization of ternary complexes in living cells by using a BiFC-based FRET assay [J]. Nat Protoc, 2008, 3: 1693-1702.

[44] Aslam S, Sanchez-Aparicio MT, Siempelkamp BD, et al. Influenza A virus NS1 protein mimics oncogenic PI3K resulting in isoform specific cellular redistribution and activation [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2025, 122: e2423066122.

[45] Rackham O, Brown CM. Visualization of RNA-protein interactions in living cells: FMRP and IMP1 interact on mRNAs [J]. EMBO J, 2004, 23: 3346-3355.

[46] Bredel M, Jacoby E. Chemogenomics: An emerging strategy for rapid target and drug discovery [J]. Nat Rev Genet, 2004, 5: 262-275.

[47] Gloger A, Scheuermann J. DNA-encoded chemical libraries on stage [J]. Nat Chem Biol, 2025, 21: 20-21.

[48] Wang XD, Li LJ, Shen XJ, et al. Rational design strategies in DNA-encoded libraries for drug discovery [J]. Angew Chem Int Ed, 2025, 64: e202511839.

[49] Schafer D, Prieto-Garcia C, Wang JH, et al. Targeting the spliceosomal protein USP39 through allosteric ligands and PROTAC-induced degradation [J]. Angew Chem Int Ed, 2026, 65: e16809.

[50] Zhang YW, Lan YQ, Fan RF, et al. Biocatalytic- and chemoproteomic-guided discovery of a PHGDH inhibitor from chemoenzymatic-promoted DNA-encoded libraries selection platform [J]. J Am Chem Soc, 2025, 147: 44396-44405.

[51] Zhao JL, Jiang H, Zhao KM, et al. Discovery of an allosteric 14-3-3 inhibitor for suppressing NRF2-driven cancer *via* phenotypic screening and chemoproteomic-based target deconvolution [J]. Chem Sci, 2025, 16: 17248-17260.

[52] Guo ZR. Molecular glue in drugs [J]. Acta Pharm Sin (药学学报), 2021, 56: 2682-2688.

[53] Sun Y, Liu S, Chen L, et al. AI-driven discovery of dual antiaging and anti-AD therapeutics *via* PROTAC target deconvolution of a super-enhancer-regulated axis [J]. Sci Adv, 2025, 11: eadz9283.

[54] Lu X, Wang X, Yang Z, et al. Molecular glue degraders of HuR suppress BRAF-mutant colorectal cancer [J]. Nature, 2026, 655: 780-789.