



基于质谱技术的单细胞蛋白质组学*

谢井盛^{1,2)} 叶子璐^{1)**}

⁽¹⁾ 中国医学科学院系统医学研究院/苏州系统医学研究所, 重大疾病共性机制研究全国重点实验室, 苏州 215123;

⁽²⁾ 苏州大学附属第二医院妇产科, 苏州 215004)

摘要 近年来, 单细胞测序技术的发展极大地推动了单细胞基因组和转录组的研究。然而, 直接关联单细胞生命过程的蛋白质组学研究则因技术进展缓慢而受限。随着样品前处理技术、色谱分离技术和质谱检测技术的进步, 单细胞蛋白质组学 (single-cell proteomics, SCP) 的分析灵敏度显著提升。本综述深入回顾了 SCP 的发展历程及其在生命科学研究中的应用。在样品前处理方面, 针对不同细胞的存在形式, 研究者开发了基于声波激发、微流控芯片和激光切割等单细胞分选方法, 并逐步从多步法前处理流程统一到一步法, 降低了样品处理过程中的损失。在质谱技术方面, 无标记定量 (label-free quantification, LFQ) 与基于同位素和同质素标记的方法都得到了充分的探索, 各具技术优势与不足。在应用层面, SCP 已在胚胎细胞早期发育、干细胞分化、肝脏组织空间异质性等方面揭示了新的生物学发现。最后, 总结了当前 SCP 技术面临的挑战, 包括检测通量、成本和数据分析的复杂性, 并展望了其未来的发展方向, 强调了 SCP 在基础研究和临床应用中的广阔前景。

关键词 单细胞, 蛋白质组学, 液相色谱, 质谱

中图分类号 Q6-33

DOI: 10.16476/j.pibb.2024.0285

人类和许多其他真核生物均由数十亿个细胞构成, 这些细胞虽然共享相同的遗传物质, 但却具有高度的异质性, 以适应不同的生理功能^[1-2]。这种异质性反映在细胞类型和功能的多样性上, 受内在和外在因素的双重调控。内在因素包括基因组、表观基因组、转录组、蛋白质组和代谢组等复杂的层级结构^[3-4], 这些层级之间相互作用, 形成了细胞功能的基础。外在因素则通过邻近细胞的相互作用、信号分子及微环境的影响, 以直接的物理接触或远程信号转导来调节细胞功能。传统生物学研究通常聚焦于细胞群体, 往往忽略了单个细胞的独特性。然而, 同一机体不同的单个细胞在表型和功能上存在显著差异, 尤其在转录调控、基因表达和信号转导方面。这种异质性在研究恶性肿瘤细胞的突变模式、区域差异、进化规律和耐药机制时尤为重要。因此, 对于深入理解多细胞生物从全能单细胞发育成复杂个体的过程, 以及其功能、衰老和疾病机制, 单细胞多组学技术是必不可少的。近年来, 随着单细胞 RNA 测序 (scRNAseq) 等技术的突破^[5-6], 在单细胞层面深入研究基因组和转录组成

为现实。高通量单细胞转录组测序技术不仅揭示了细胞之间的异质性, 还保留了传统群体分析中发现的共性机制, 提高了研究的准确性和深度, 有助于更全面地理解细胞的功能和相互作用。正是由于这些技术的优势, 单细胞层面的研究正逐步成为相关科学领域的主流方向^[7]。

蛋白质是机体所有生理活动的直接执行者, 具有复杂的结构和多样的功能^[8]。蛋白质的多样性主要源自氨基酸序列的排列、可变剪切以及翻译后修饰等因素^[9], 这些特性使得蛋白质的多样性远超 DNA 和 RNA。基于质谱技术的蛋白质组学研究, 因其在蛋白质层面对生物学功能的多样性和复杂性的揭示, 逐渐成为研究的焦点。而单细胞蛋白质组学 (single-cell proteomics, SCP) 提供了深入

* 中国医学科学院医学与健康科技创新工程 (2023-I2M-2-005), 中国医学科学院中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金 (2023-RC180-03) 和江苏省基础研究计划自然科学基金 (BK20240443) 资助项目。

** 通讯联系人。

Tel: 0512-6287378, E-mail: yzl@ism.pumc.edu.cn

收稿日期: 2024-07-01, 接受日期: 2024-08-24

理解蛋白质在单细胞层面行为的新途径,有望在生物学各个领域带来新的见解。尽管单细胞RNA测序等技术已经成熟,并积累了大量数据,但这些数据存在固有的局限性。首先,转录物的数量与蛋白质浓度之间没有直接的定量关系。通常认为,转录组和蛋白质组之间的相关系数为0.6~0.7^[10],但在特定细胞类型中,如卵细胞,这一关联性可能更低,仅为0.3左右^[11]。这意味着尽管转录组数据可以提供基因表达的信息,但无法依此直接推断出蛋白质的实际变化。其次,真核生物的转录和翻译分别在细胞核和细胞质中进行,转录组的变化需要时间才能反映在蛋白质组中,从而影响细胞的生理功能。许多蛋白质在经过翻译后修饰(如磷酸化)或特定蛋白酶解等反应之前并不具备生物活性,这些信息也无法从转录组数据中获取。SCP能够弥补这些不足,提供每个细胞中蛋白质及其翻译后修饰的定量信息。这不仅有助于分析蛋白质的丰度,还可以研究其功能状态和调控机制,从而更全面地理解细胞内的生物学过程。

由于单细胞中所含的蛋白质总量极低,例如一个HeLa细胞约含250 pg蛋白质,且蛋白质本身无法进行数量扩增,因此样品前处理损失和检测仪器的灵敏度极大地限制了单细胞蛋白质组学的发展。然而,随着样品前处理技术和色谱-质谱联用仪器性能的不断进步,单细胞蛋白质组的分析灵敏度在近些年得到了显著提升。本综述将回顾单细胞蛋白质组学的发展历史,重点关注单细胞样品处理方法、质谱数据采集方法和数据分析方法的进步。首先,讨论样品处理技术的改进,这些方法能够高效地进行单细胞样品的裂解、酶解和标记,从而最大限度地减少样品损失。其次,介绍质谱技术的发展,包括新型色谱-质谱联用技术和高灵敏度质谱仪的应用,这些技术显著提高了单细胞蛋白质检测的灵敏度和准确性。通过这些技术的进步,SCP已经在多个生物学领域展现出其应用潜力。本文将深入探讨这些应用,包括在肿瘤研究和神经科学中的应用实例,并展望SCP未来的发展前景。

1 单细胞蛋白质组学技术

1.1 单细胞蛋白质组学样品前处理

1.1.1 细胞分选与接收平台

近年来,单细胞蛋白质组学研究经历了深度与广度的重大变化。由于蛋白质不可复制且单细胞内蛋白质含量极少,同时在此前的单细胞蛋白质组学

研究中也缺乏与质谱检测相适配的单细胞分选方法,导致蛋白质鉴定量少、质谱检测通量低和实验结果可重复性差等问题一直困扰着研究人员。而随着近年来新的单细胞分选方法实现了与质谱检测的低损失对接,同时质谱检测通量和灵敏度也大幅增加,单细胞蛋白质组学研究已经从最开始的只能手动挑取卵细胞或受精卵进行检测分析,逐渐发展到可以对高通量自动化地对半径仅数十微米的细胞进行分选与检测(图1)。如今单细胞蛋白质组学的研究对象已经扩展到多种存在形式的细胞,以下将详细介绍近年来在单细胞分选技术方面的进展。

细胞的存在形式分为游离以及彼此之间相互作用形成各种组织器官,针对不同存在形式的细胞有不同的分选策略。针对游离细胞,方群与黄超兰团队^[12]于2018年推出的OAD chip (Nanoliter-Scale Oil-Air-Droplet Chip)通过在纳升级油-气-液滴环境中进行高效样本处理,实现了用于单细胞蛋白质组学分析的样品多步法预处理和质谱进样分析,在单细胞水平鉴定到51个蛋白质。同年Rayn T. Kelly团队^[13]推出的nanoPOTS (Nanodroplet Processing in One Pot for Trace Samples)蛋白质组学技术通过减小反应体积而减少样本损耗,将蛋白质前处理过程集成在nanoPOTS玻璃芯片上,利用微量移液系统,在单细胞中鉴定到了超过600个蛋白质,部分实现了极微量样本的自动化蛋白质组学前处理。此后,在2020年的一项研究中利用荧光激活细胞分选仪(fluorescence-activated cell sorter, FACS)实现单细胞分选,并采用nanoPOTS技术进行蛋白质组学前处理,最终鉴定到了超过1 716个蛋白质的表达^[14]。同样在2018年Nikolai Slavov团队^[15]推出的SCoPE-MS方法,通过在显微镜下用毛细管人工挑取的方式从稀释过的细胞悬液中获得单细胞,并进行酶解处理与后续质谱检测,最终鉴定到了767个蛋白质。在2021年推出的SCoPE2方法,相对SCoPE针对性的改善了单细胞分选流程以及蛋白质处理方法,利用FACS或CellenONE分选单细胞,单日即可处理超过200个单细胞,能够在单细胞水平鉴定到1 000个蛋白质^[16]。2023年,Karl Mechtler团队^[17]利用CellenONE平台进行单细胞分选,并利用于CellenONE适配的proteoCHIP芯片进行蛋白质前处理,提高了流程自动化水平的同时,在单细胞水平鉴定到1 940个蛋白质的表达(20x-carrier)。在2024年,方群团队^[18]推出的PiSPA (Pick-up Single-Cell Proteomic Analysis)技

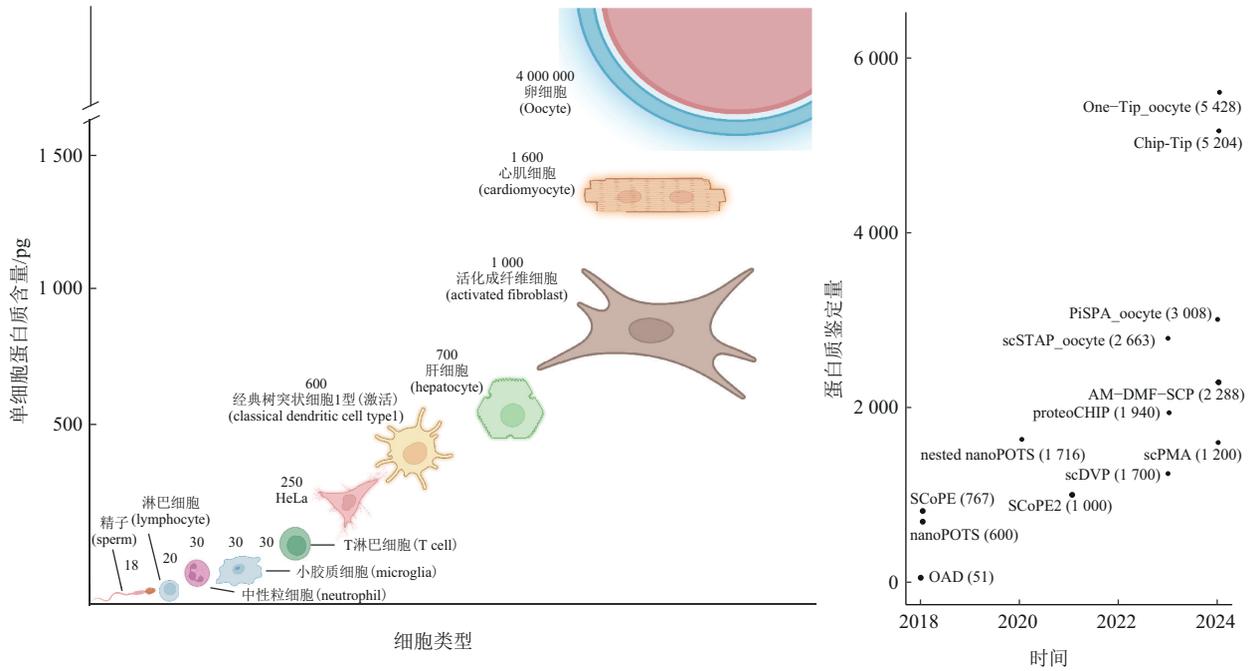


Fig. 1 Protein amount of different cell type and identified protein numbers

图1 单细胞蛋白质含量与蛋白质鉴定数目的增长

不同种类细胞蛋白质含量 (推测) (左) 与不同单细胞分选方法的蛋白质鉴定数目 (右)。

术, 利用微流控技术精确挑取分离单个目标细胞, 随后结合高灵敏度质谱分析, 实现了对单细胞蛋白质组的鉴定与定量, 在单个哺乳动物细胞中检测到最多3 000个蛋白质。同年, 方群团队^[19]推出了scPMA (Single-Cell Proteome and Metabolome Analysis) 技术, 通过结合微流控技术和质谱分析技术, 能够在单细胞水平上同时进行蛋白质组和代谢组的高灵敏度检测和精确定量, 能对卵细胞与单个体细胞的蛋白质组和代谢组进行解析, 并在单个A549细胞中同时检测到132个代谢成分和超过1 200个蛋白质。同样由方群团队^[20]在2023年推出scSTAP (Single-Cell Simultaneous Transcriptome and Proteome) 技术, 则基于微流控技术对同一卵细胞的转录组与蛋白质组进行分析, 在单个卵细胞中检测到了2 663个蛋白质与19 948个基因。周虎团队^[21]在2024年推出的自动电控微液滴单细胞分选技术AM-DMF-SCP (Active-Matrix Digital Microfluidic Chip for Single-Cell Proteomics) 则开创了全新的单细胞分选方法: 利用电场控制油包水芯片内的细胞悬液移动分裂, 最终使得一个液滴内仅包含一个细胞, 并进行后续处理, 该技术在单细胞(HeLa)水平上平均检测到2 288个蛋白质表达。Jesper V. Olsen团队^[22]在2024年最新提出的

One-Tip方法, 将所有的样本前处理过程都集成在一枚Evotip中, 整个一步法处理过程仅有一次涉及样品的移液, 自动化程度高, 这些都极大地降低了移液所带来的样品损失。结合当今灵敏度最高的质谱检测系统, One-Tip方法在卵细胞与早期胚胎单细胞以及极微量样本中的蛋白质鉴定种类数倍于其他技术路线, 鉴定到约6 000个蛋白质。该团队而后开发了Chip-Tip方法, 结合CellenONE高通量的从细胞悬液中分选单细胞, 并在proteoCHIP-EVO96进行后续蛋白质处理, 能够稳定的在单HeLa细胞水平鉴定到超过5 000种蛋白质, 实现单细胞水平全面的蛋白质组学研究^[23]。

针对以组织器官形式存在的细胞, Matthias Mann团队^[24]在2023年推出了scDVP (Single-Cell Deep Visual Proteomics) 技术, 利用AI辅助识别组织切片中细胞之间的边界, 并利用激光将其切割, 单次切割半径可达到10 μm 精度(约250 pg蛋白质), 结合Evosep One-timsTOF SCP系统, 在单细胞分辨率鉴定到1 700个蛋白质。空间单细胞蛋白质组学技术在进行蛋白质组学检测的同时还保留了细胞的空间定位关系, 扩展了蛋白质组学研究的维度(图2)。

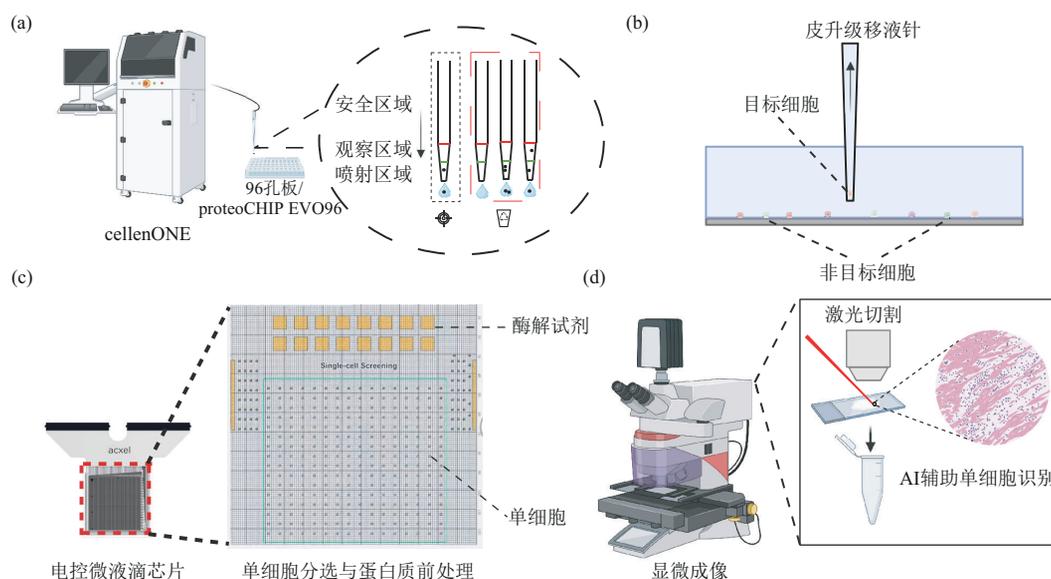


Fig. 2 Single-cell isolation method

图2 单细胞分选方式

(a) 基于cellenONE系统的单细胞分选^[23]; (b) 基于微流控系统的单细胞分选^[20]; (c) 基于电控微液滴的单细胞分选^[21]; (d) 基于激光切割显微镜的空间单细胞分选^[25]。

1.1.2 蛋白质样品前处理

在自下而上 (bottom-up) 蛋白质组学研究中, 蛋白质的前处理可分为多步法与一步法。在单细胞蛋白质组学技术发展的早期, 受限于质谱灵敏度与定量技术, 通常参考群体蛋白质组学 (bulk proteomics) 样品准备方式, 采用多步法进行蛋白质前处理^[13, 26]。多步法蛋白质前处理流程中, 在通过不同的方法获得单细胞后, 向体系中加入还原烷基化试剂以破坏细胞膜结构和蛋白质二硫键, 将肽链充分暴露后再加入蛋白酶将蛋白质酶解为肽段。若之后的质谱检测采取标签定量策略则添加标签试剂, 标记完成后将同一检测批次的样品混合并上样检测^[27-28]; 若采取非标签定量策略, 则加入酸化试剂终止酶解后直接质谱上样检测^[29]。多步法处理整体流程较为复杂繁琐, 使用的试剂较多, 操作过程中涉及样品的移液次数多, 样本损失较大, 在单细胞蛋白质含量极低与质谱检测灵敏度有限的前提下, 这样的损失会造成检测结果的显著偏倚, 降低结果的可重复性和蛋白质定量的可信度, 同时蛋白质检出种类数还显著低于批量样本。

降低损失使得单细胞研究中质谱检测进样量可以更高, 而反应体积的降低则使得肽段离子化效率得以提升, 这些都使得有更多的离子化肽段能够被纳入检测。近年来为了降低单细胞样本前处理过程中的损失, 通过整合细胞裂解、蛋白质提取与酶

解, 开发了 Master Mix 试剂达到了一步法蛋白质样品前处理流程^[22]。一步法流程减少了处理过程中液体转移次数, 根据蛋白质样本状态不同, 在样品中加入对应体积 Master Mix 后孵育一定时间, 酸化终止反应后即可直接进行质谱上样检测。虽然对蛋白质样品处理的整合会使酶解时漏切率略微增加, 但一步法样品处理法极大地降低了蛋白质样本处理过程中的损失, 同时使得前处理能够在更小的反应体系中进行。同时, 近年来质谱检测灵敏度大幅度提升, 经过一步法进行单细胞蛋白质样品前处理后利用高灵敏度质谱系统进行检测, 在鉴定到的蛋白质种类数上已与批量样本相当, 且鉴定种类与定量结果可重复性好。因此, 如今单细胞蛋白质组学研究中推荐使用一步法前处理。

1.2 单细胞蛋白质组学研究中的质谱定量方法

在自下而上的蛋白质组学研究中, 常用的定量策略包括无标记定量 (label free quantification, LFQ)^[29] 和同位素标记定量 (isotope labeling quantification)。LFQ 通过提取样品中的蛋白质, 将其酶解成肽段, 并通过质谱分析, 比较顺序分析样品中提取的肽段离子色谱图来进行定量。同位素标记定量方法可以分为体内标记或代谢标记 (如氨基酸稳定同位素标记 (stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC)), 体外标记或化学标记肽段 (如二甲基化标记), 以及体外同重

素 (sobaric) 标记肽段 (如串联质谱标签 (tandem mass tag, TMT) 等)。这些方法各有优缺点。LFQ 方法操作相对简单, 但其定量精度可能受到电离效率和样品复杂性的影响。SILAC 标记方法提供了高度准确的定量信息, 但需要在细胞培养过程中进行标记, 增加了实验复杂性。TMT 等同重素标记方法允许同时分析多个样本, 提高了通量, 但可能存在比率压缩问题, 影响定量准确性。有趣的是, 这些在传统群体蛋白质组学中开发的方法在单细胞蛋白质组学中也得到了广泛应用, 并展现出了不同的特性。

1.2.1 同重素标记定量

单细胞蛋白质组学中的早期经典方法之一是基于同重素标记的 SCoPE-MS 方法^[16]。SCoPE (Single-Cell Proteomics by Mass Spectrometry) 技术的核心是 TMT^[27], 这是一种具有相同分子质量但不同同位素位点的同重素标签。在蛋白质定量分析中, 不同的同重素标签被用于标记不同处理条件样本中的肽段。标记之后, 所有肽段样品被混合在一起并在单次检测中进行分析。

由于所有的同重素标签具有相同的化学性质, 在液相色谱 (liquid chromatography, LC) 分离过程中, 带有不同 TMT 标记但具有相同分子质量的肽段会发生共洗脱。这些肽段进入一级质谱 (MS) 后, 会同时被检测为单个且不可区分的前体离子峰, 随后在碎裂过程中, 各个 TMT 标签将在二级质谱 (MS/MS) 的低质荷比 (m/z) 区生成独特的报告离子。该蛋白质鉴定和定量策略基于数据依赖性采集 (DDA) 模式, 通过将产生的碎片离子峰与已知碎片数据库中的离子峰进行匹配来实现蛋白质的定性分析, 并通过 MS 母离子丰度结合报告离子的强度完成肽段的定量分析。

与群体蛋白质组学相比, SCoPE-MS 方法的显著特点是加入了载体蛋白组 (carrier/booster proteome) 来提升整体样品的蛋白质含量, 从而降低对 LC-MS 系统的灵敏度要求。此外, 当前已有最高通量为 32 plex 的 TMT 标签, 在不加入载体蛋白质的情况下能够同时对 32 个样本进行相对定量分析, 显著提升了分析通量。虽然 TMT 蛋白质定量方法能提高母离子的总浓度, 使其在 MS 中呈现更强信号而更易被检出, 但其基于 DDA 的数据采集模式导致蛋白质鉴定数目较低, 且较高含量的载体蛋白的加入也影响蛋白质定量的精确度。因此, 在应用 TMT 标签进行单细胞蛋白质组学研究时,

蛋白质组的鉴定深度往往较低, 定量精度与准确度也受到较大影响。

1.2.2 稳定同位素标记的肽段定量

稳定同位素标记方法生成化学性质相同但质量不同的肽段。这些方法包括细胞培养中的 SILAC 和化学标记^[30], 如相对和绝对定量的胺修饰标签 (mTRAQ)^[31] 或二甲基标记^[32]。后两种方法是在蛋白质或肽段纯化后进行的化学标记过程。在所有这些方法中, 每个样品的标记都会引入质量变化 (如 4 u、8 u), 这些变化可以在 MS 全扫描中检测到。值得注意的是, 这些方法可以同时 MS 和二级质谱 (MS/MS) 层面定量。更重要的是, 这些标记方法与数据非依赖性采集 (data independent acquisition, DIA) 方法兼容, 因此能在提升总体肽段信号强度并提升通量的同时不显著降低检测深度^[33]。

这类方法在单细胞蛋白质组学研究中有三种标志性的应用。Nikolai Slavov 团队^[34] 开发了一种基于多重通路 (multiplex) 的 DIA 数据采集和分析方法, 即 plexDIA。在不减少数据覆盖深度和定量精确度的同时, 实现多重样本的独立分析。他们将 plexDIA 用于平行分析多种单细胞的蛋白质组, 在 Thermo Q-Exactive 质谱仪中, 仅 5 min 的有效梯度就从单个细胞中定量了约 1 000 种蛋白质。mDIA (multiplex DIA) 是最新的一种集成了标签定量以及 DIA 采集模式的方法, 兼具标签定量与 DIA 数据采集模式的优点, 提高了蛋白质检测的通量、深度与可重复性, 降低了成本的同时保证了检测水平^[32]。mDIA 利用稳定且经济的二甲基标签对批量或单细胞样本进行标记, 能够同时在 MS1 与 MS2 中进行定量。虽然 mDIA 在联合胰酶酶解时通道限制在 3 个, 改用 lys-N 酶解后, 通道数提升至 5 个。在深度视觉蛋白质组学 (deep visual proteomics, DVP) 研究中, mDIA 相当具有吸引力, 因为空间上分离的不同细胞状态可以直接相互比较, 同时参考通道的引入让空间蛋白质组学研究中可以采取更小的切割区域。这些优势使得在研究稀有细胞系时, DVP 结合 mDIA 能够达到更深的蛋白质组深度与空间分辨率, 有助于实现真正意义上的空间单细胞蛋白质组学分析, 这将成为推动肿瘤精准治疗发展的关键技术。在一项最新的研究中, Jesper V. Olsen 团队^[35] 利用脉冲稳定同位素标记氨基酸方法 (pSILAC), 以同时评估单细胞中的蛋白质丰度和周转 (SC-pSILAC)。SC-pSILAC 展示了在单个 HeLa 细胞中检测到约 4 000 种蛋白质的两个

SILAC 标签，再现了已知生物学现象，并研究了药物对单细胞中全局和特定蛋白质周转的影响。

1.2.3 无标记定量

随着自动化前处理技术的发展，以及 LC-MS 系统灵敏度和检测通量的提高，单细胞蛋白质组学研究越来越倾向于使用 LFQ 方法。LFQ 不依赖同位素化学标签，主要通过低损耗的离子化肽段采集与特定的数据分析策略实现肽段定量分析。然而，基于 LFQ 的单细胞蛋白质组学方法对系统的灵敏度提出了巨大的挑战。为了保证数据质量，需要对全流程进行深入开发与优化：

a. 尽量无损的一锅式处理方法。如 proteoCHIP EVO 96 等无损处理方法，通过简化和优化样品处理流程，最大限度地保留蛋白质组的完整性。

b. 高灵敏度的纳升液相系统。如 Evosep 的 Whisper 方法和 Thermo Fisher 的 Vanquish Neo 色谱仪，这些系统能够提供极高的分离效率和灵敏度，适配单细胞蛋白质组学的需求。同时，IonOpticks

开发的 Aurora 系列商业化色谱柱也是色谱分离的关键。Aurora Series 柱的特色在于两个关键技术进步：独特的一体式喷射器设计与 nanoZero® 技术。这些技术特点共同作用，最大化色谱效率，大幅提升性能，为肽段和代谢物的 LC-MS 分离提供了最佳解决方案。

c. 超高灵敏度质谱系统。例如 Thermo Fisher 公司的 Orbitrap Astral 质谱仪和 Bruker 公司的 timsTOF Ultra 系列质谱仪，这些系统能够提供前所未有的检测灵敏度和定量精度。

d. 高效的数据分析系统。如 Spectronaut 和 DIA-NN 软件，这些数据分析工具能够高效地处理和解释复杂的质谱数据，进一步提高定量分析的准确性和可靠性。

通过这些技术的结合和优化，LFQ 方法在单细胞蛋白质组学研究中展现了巨大的潜力，为深入理解细胞内蛋白质动态变化提供了强有力的工具（图 3）。

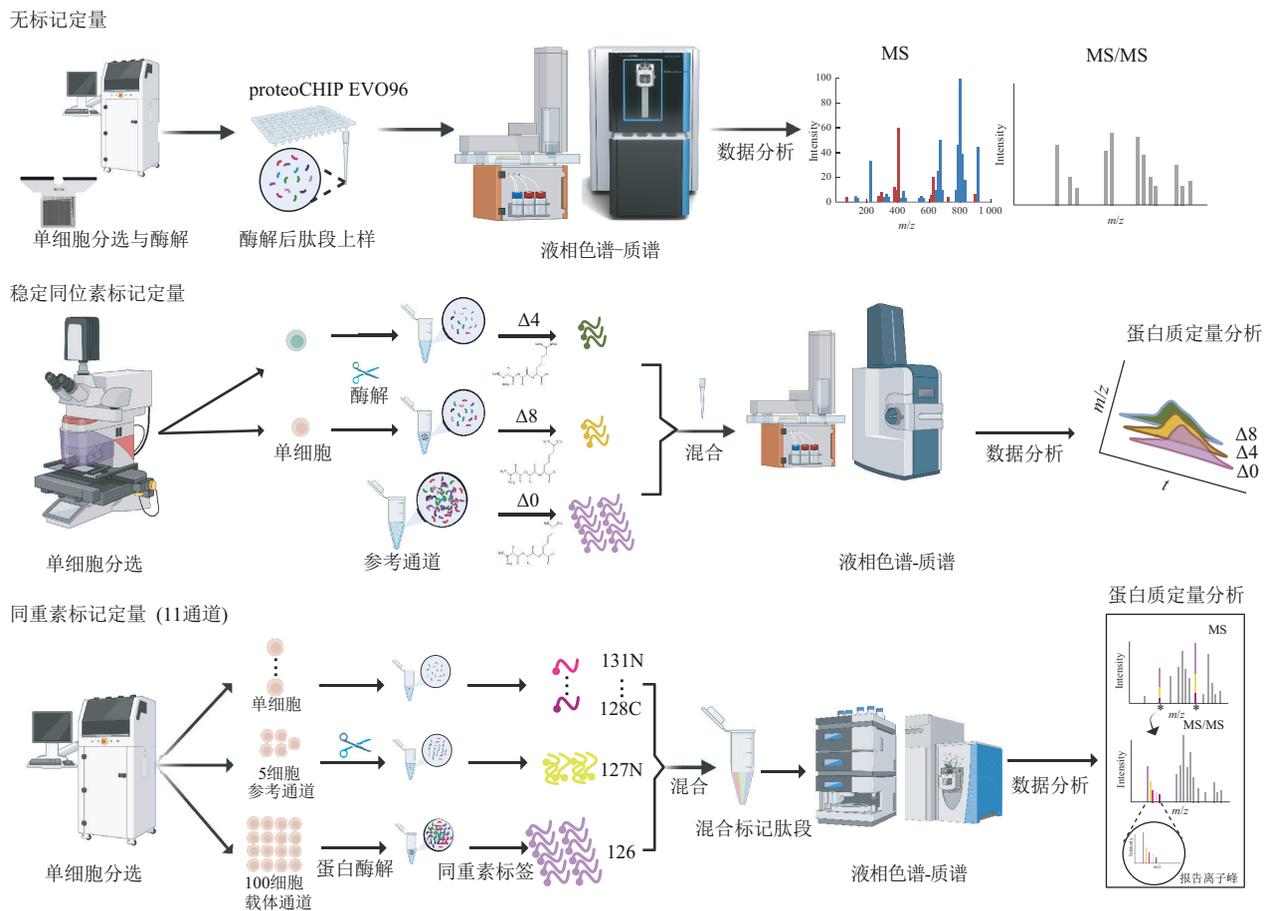


Fig. 3 Mass spectrometry quantification methods in single-cell proteomics research

图3 单细胞蛋白质组学方法流程原理

无标记定量 (上)^[23]、稳定同位素 (二甲基标签) 标记定量 (中)^[32] 与同重素标签定量 (下)^[15] 工作流程与定量原理。

2 单细胞蛋白质组技术的应用

单细胞蛋白质组学的技术进步使得我们能够与此前完全不同的视角去研究生物学问题, 并因其与细胞生理活动关联更为直接, 单细胞蛋白质组学与传统基因组、转录组以及分子生物学等研究方法能够形成互补, 极大地丰富了科研工具箱。当前单细胞层面蛋白质检出数量已接近极限, 如何对庞大的蛋白质组学数据进行分析, 发掘其中包含的生物学信息已成为当今蛋白质组学研究的前沿。

2.1 生殖系细胞

生殖细胞是机体内最重要的单细胞, 雌雄配子结合形成受精卵标志着新生命的开始。解析生殖细胞成熟与早期胚胎形成的机制对于了解生命代际传递有着重要意义。在哺乳动物中, 相比雄性个体每时每刻都在不断生成并成熟的精子, 雌性个体成熟卵细胞作为哺乳动物体积最大的单细胞, 其前体卵母细胞从出生后就停止数量增长, 并经过一套复杂的筛选机制使得仅有其中部分卵母细胞最终发育成熟^[36-37]。基于质谱的单细胞蛋白质组学技术具备足够的灵敏度, 为解析生殖细胞的成熟与早期胚胎发育机制提供了更全面的视角。

在卵细胞成熟等生物学过程中, RNA与蛋白质的变化并非总是保持一致, 单细胞蛋白质组能更真实地反映卵细胞的状态^[11]。一项针对卵细胞单细胞转录组和蛋白组学多组学联合分析中发现, 虽然部分基因如 *Cpeb1* 与 *Gtsfl* 等在卵细胞成熟过程中转录组与蛋白质组共同下调, 但是还有 *Bubl1*、*Slbp*、*Hlfoo* 和 *Rbx1* 等在转录组中上调时蛋白质组中呈现下调^[20]。

单细胞蛋白质组学能够更好地发现生殖细胞成熟过程中, 以及早期胚胎发育过程中具有代表性的生物学标志物。有研究基于在批量小鼠卵细胞库以及卵细胞单细胞样本中检测到的蛋白质组数据库, 对不同发育阶段卵细胞丰度排名前 2 500 的蛋白质进行关联性分析, 发现 GV 期卵细胞不同样本间相关系数平均为 0.634, MII 期卵细胞不同样本间相关系数则为 0.630^[20]。在蛋白质标志物层面, 有研究通过单细胞蛋白质组学数据发现 BTG4 与 CNOT7 仅在 MII 期卵细胞被定量检测到, 可能是 MII 期卵细胞的标志性蛋白质, 同时部分母源性蛋白如 TLE6、ZAR1、OOSP1 以及 PADI6 在卵细胞成熟期间蛋白质含量存在显著变化^[38]。有研究通过机械手段将小鼠卵细胞与一至四细胞期早期胚胎

分离为单细胞, 从单细胞层面对卵细胞和早期胚胎的蛋白质组进行精准定量, 得到超高深度的单细胞蛋白质组学数据。通过对数据的分析研究发现, 早期胚胎发育过程中的重要生物学过程在蛋白质组的变化中能得到较好的反映^[22]。正是由于单细胞蛋白质组学技术的特性, 后续其在卵细胞和早期胚胎的生理与疾病机制研究中有着广泛的应用价值。

2.2 细胞悬液

机体血液、淋巴液与部分组织间液中存在大量游离细胞, 组织器官经过处理也可以制备细胞悬液, 这些细胞或在机体内循环往复, 或仅在部分组织器官内周转定植, 各自都具有其独特的功能与临近生态, 研究其中特定的细胞群系往往有着重要意义。由于游离细胞种类多, 且含量变异较大, 传统基于流式分选的研究方法难以对其中特定系群进行精确分选鉴定。同时利用传统批量样本方法得到的蛋白质相对表达信息会掩盖细胞间个体差异, 而单细胞蛋白质组学技术能很好地解决这一问题。

单细胞蛋白质组学技术能够很好地反映不同细胞之间的异质性。循环免疫细胞是一群随着血液与淋巴循环在全身迁移的细胞群系, 其在机体排除自身异常细胞与外部抗原过程中发挥着重要作用^[39-40]。循环免疫细胞中的 T 淋巴细胞互相之间具有高度异质性, 根据其发挥的功能不同可以将其分为很多不同的功能亚群。因此, 利用单细胞蛋白质组学技术对循环 T 细胞异质性进行研究, 发现能够发挥新功能的 T 淋巴细胞, 或者在某一功能亚群中再细分出承担某种专一功能的 T 淋巴细胞群系, 都对研究机体免疫功能及其调节有着重要意义^[41-43]。干细胞是一种具有自我复制能力以及多向分化潜能的细胞, 每个干细胞可能都具有其独特的分化方向, 具有较强的异质性^[44]。而干细胞分化方向的决定机制, 即对于分化起到决定性影响的因素一直不是十分明确。当前针对干细胞单细胞转录组与基因组的研究非常多^[45], 而对其蛋白质组的研究却始终停留在批量样本层面。利用单细胞蛋白质组学技术, 分析同一条件下获得的干细胞经过相同诱导刺激后产生的异质性, 能够与单细胞转录组和基因组的研究结果形成相互补充, 对于干细胞分化机制进行全面而深入的解析^[46-47]。

除此之外, 单细胞蛋白质组学技术能够反映机体内相对占比极低细胞的生理功能与特性。循环肿瘤细胞 (circulating tumor cells, CTC) 是外周血中各类肿瘤细胞的统称, 其来源为自发脱落, 或因手

术操作导致肿瘤细胞从原位肿瘤病灶脱离^[48]。大部分CTC在进入外周血后发生凋亡或被循环免疫细胞吞噬,但也有少部分能够逃逸免疫反应并锚定发育为转移肿瘤,增加了恶性肿瘤患者的死亡风险。循环肿瘤细胞在外周血中数量较低且不稳定,彼此之间异质性强^[49],肿瘤转移是造成恶性肿瘤患者死亡的重要原因,因此通过单细胞蛋白质组学技术对循环肿瘤细胞进行分析,能够对肿瘤的转移机理进行研究。同时在临床转化方面,对CTC进行综合检测分析还能够评估癌症疾病进程以及治疗效果,有着良好的发展前景。

2.3 组织样本与空间样本

在组织器官中,细胞彼此之间相互结合共同发挥功能,组织器官中的细胞在器官整体功能的发挥中扮演了怎样的角色是领域内一直关注的焦点^[50]。空间单细胞蛋白质组学技术对于研究细胞间相互作用以及组织器官生理病理机制有着重要意义。神经系统包括中枢神经系统与外周神经系统,参与组成中枢神经系统的大脑主要由神经细胞及其支持细胞相互交联组成^[6, 51]。不同的脑区所擅长的功能不同,这种偏差使得研究者认为不同脑区中的神经细胞之间应当具备相当的异质性,但相应的组学数据并不完善。一方面,将大脑细胞破碎处理为细胞悬液再通过流式分选脑神经细胞的方法丢失了重要的脑神经细胞的定位信息,这也间接导致将脑神经细胞悬液分选为单细胞并进行单细胞转录组学研究中,结果呈现了较高级别的异质性^[52],这也使得下一步有必要在单细胞蛋白质组层面进行更深入的解析;另一方面,受样品采集处理技术的限制,空间单细胞蛋白质组学检测通量受到极大的限制,缺少行之有效的高通量手段,在保留空间定位的同时的实现大量单细胞的采集与处理。

保留最原始空间定位信息的组织切片是空间单细胞蛋白质组学的重要基础。将组织器官处理成为单细胞当前已有多种切实可行的方法,但是这往往都会导致细胞空间定位的丢失。虽然可以限定采样范围从而缩小细胞所来源的区域,但结果表明这并没有从根本上解决组织器官中单细胞蛋白质组学研究所面临的准确空间定位问题。相比由组织器官处理得来的细胞悬液,组织切片完整的保存了组织器官中单细胞的空间定位。Matthias Mann团队^[24]开发了scDVP技术,该技术通过AI辅助图像识别在组织切片上识别细胞边界,利用激光切下选定边界内的样品收集至蛋白处理管内,边界直径最小可以

达到接近单细胞水平(直径10 μm),并进行后续蛋白质组学检测。该方法能够应用于在单细胞以及亚细胞蛋白质组层面研究脑、肝脏、结肠以及癌组织的异质性。利用scDVP技术从肝脏组织切片中采集单细胞,并采用当前最尖端的检测仪器进行蛋白质组学检测,在单细胞水平(直径10 μm)鉴定到的蛋白质数目达到1 700,且经过分析发现鉴定结果良好地反映了同一组织种类、不同空间定位的单细胞之间的异质性。除了AI辅助识别-激光切割的空间单细胞采集策略,当前也有部分基于采样探头,在图像识别单细胞之后在组织病理切片中利用探针对单细胞进行挑取,相关技术仍在发展完善当中。另外,MALDI-2串联质谱具备超高的空间分辨率(<1 μm),通过控制激光能量与脉冲频率,可以实现亚细胞分辨率的组织切片整体精细分析^[53]。但是由于离子化效率低,无法精确识别分析单个细胞等,当前该技术主要用于代谢小分子与脂质的研究,在构建宏观层面、单细胞分辨率级别的代谢图谱方面更为适用,而难以被应用于基于组织切片单细胞蛋白质组学研究中。

3 单细胞蛋白质组学当前面临的主要问题与发展方向

基于质谱的单细胞蛋白质组学技术近年来的快速发展丰富了科研工具箱,使得研究者们能够从与实际生理病理状态关联更直接的蛋白质组层面进行研究,且与已经较为成熟的单细胞转录组和基因组技术相互补充,拓展对生理病理过程认知的维度^[54]。随着样品前处理以及相应色谱质谱技术的进展,在单个HeLa细胞中单细胞蛋白质组学技术已经能检出超过5 000种蛋白质,在检测深度上取得了突破性的进展。但是当前单细胞蛋白质组学技术发展也面临着一些亟待解决的问题。首当其冲的便是检测通量与成本问题,通量问题不仅是单细胞分选处理的通量,也是质谱检测的通量,当前单细胞质谱检测通量普遍较低,即便通过自动化手段已经可以做到在数小时内分选处理96个单细胞,质谱检测所耗费的时间却往往超过2 d,同时单个样本的检测成本居高不下,这也限制了单细胞蛋白质组学技术的广泛应用。其次,单细胞蛋白质组学技术进步带来了检测数据量极大的膨胀,如何对单次实验产生的庞大单细胞蛋白质组学数据进行分析,并筛选出其中有价值的生物学信息一直困扰着领域内研究人员^[8, 55]。最后,如何选定需要研究的单

细胞也存在一定的困难, 培养细胞系中因其遗传背景稳定, 处理后通过大小形状或者荧光标记技术即可实现分选, 但是对于来自临床的原代细胞或病理组织样本, 仍未有较好的手段对其中的单细胞进行功能筛选。以上问题也是基于质谱的蛋白质组学技术未来的发展方向, 即更快更稳定的蛋白质前处理方法与更高的检测通量、更低的检测成本、更特异的单细胞筛选技术(异质性除外)以及更全面的数据处理工具方法。

值得注意的是, 单细胞蛋白质组学研究中的质控应当贯彻全流程, 从实验设计到单细胞的分选挑取再到后续的处理检测, 任何一个环节的偏差都会对最终实验结果产生较大的影响^[56-57]。在质谱检测前阶段, 单细胞分选时应当充分清洗培养基, 降低整个流程移液次数, 采用更集成化的前处理流程等, 其核心是尽量减少谱上样前处理过程中的样品损失、避免引入偏差。质谱检测方面, 大批量样本检测所耗费的样品准备与质谱检测时间较长, 仪器因素例如液相色谱柱状态与质谱灵敏度的波动等在检测过程中也较为常见, 这就导致不同时间、不同批次检测之间的批次效应在单细胞研究中更加明显, 以至于会影响到最终结果的可信度^[55, 58]。在当今质谱检测灵敏度与通量逐渐提升的背景下, 如何消弭批次效应是基于质谱的单细胞蛋白质组学大量应用前亟需解决的问题。

单细胞蛋白质组原始数据的处理也亟需同一合适的参照标准, 如何对蛋白质丰度数据进行标准化, 对于空缺值应当如何处理等仍然没有形成统一认可的标准方法。在单细胞水平上检测到的蛋白质数量逐渐逼近极限的当下, 如何获取并处理分析高质量的定量蛋白质组学数据, 并解析其中所包含的生物学信息是技术发展下一步更急迫的需求。

在应用层面, 单细胞蛋白质组学技术还有望应用于抗癌药物筛查等。将癌组织酶解至单细胞水平, 对收集到的每一个癌细胞采用不同药物进行处理, 对处理后的癌细胞单细胞蛋白质组进行检测以评估不同药物治疗方案对癌细胞生理状态的影响。也可以仅对循环肿瘤细胞单细胞蛋白质组异质性进行分析^[59], 从而研究具有何种特征的癌细胞更容易逃逸凋亡与免疫系统最终迁移定植等。相关研究的可能性层出不穷, 科学工作者们都期盼着一个成本更低廉、稳定性和可重复性更好且检测通量更高的单细胞蛋白质组学技术出现, 单细胞蛋白质组学技术在现在与将来也会助力越来越多研究的开展。

参 考 文 献

- [1] Vandereyken K, Sifrim A, Thienpont B, *et al.* Methods and applications for single-cell and spatial multi-omics. *Nat Rev Genet*, 2023, **24**(8): 494-515
- [2] Carter B, Zhao K. The epigenetic basis of cellular heterogeneity. *Nat Rev Genet*, 2021, **22**(4): 235-250
- [3] Guillemins M, Scott C L. Liver macrophages in health and disease. *Immunity*, 2022, **55**(9): 1515-1529
- [4] Papalexi E, Satija R. Single-cell RNA sequencing to explore immune cell heterogeneity. *Nat Rev Immunol*, 2018, **18**(1): 35-45
- [5] Xu C, Prete M, Webb S, *et al.* Automatic cell-type harmonization and integration across Human Cell Atlas datasets. *Cell*, 2023, **186**(26): 5876-5891.e20
- [6] Winter C C, Jacobi A, Su J, *et al.* A transcriptomic taxonomy of mouse brain-wide spinal projecting neurons. *Nature*, 2023, **624**(7991): 403-414
- [7] Sheridan C. Can single-cell biology realize the promise of precision medicine?. *Nat Biotechnol*, 2024, **42**(2): 159-162
- [8] MacCoss M J, Alfaro J A, Faivre D A, *et al.* Sampling the proteome by emerging single-molecule and mass spectrometry methods. *Nat Methods*, 2023, **20**(3): 339-346
- [9] Tao Y, Zhang Q, Wang H, *et al.* Alternative splicing and related RNA binding proteins in human health and disease. *Signal Transduct Target Ther*, 2024, **9**(1): 26
- [10] Gry M, Rimini R, Strömberg S, *et al.* Correlations between RNA and protein expression profiles in 23 human cell lines. *BMC Genomics*, 2009, **10**: 365
- [11] Hu W, Zeng H, Shi Y, *et al.* Single-cell transcriptome and translome dual-omics reveals potential mechanisms of human oocyte maturation. *Nat Commun*, 2022, **13**(1): 5114
- [12] Li Z Y, Huang M, Wang X K, *et al.* Nanoliter-scale oil-air-droplet chip-based single cell proteomic analysis. *Anal Chem*, 2018, **90**(8): 5430-5438
- [13] Zhu Y, Piehowski P D, Zhao R, *et al.* Nanodroplet processing platform for deep and quantitative proteome profiling of 10-100 mammalian cells. *Nat Commun*, 2018, **9**(1): 882
- [14] Williams S M, Liyu A V, Tsai C F, *et al.* Automated coupling of nanodroplet sample preparation with liquid chromatography-mass spectrometry for high-throughput single-cell proteomics. *Anal Chem*, 2020, **92**(15): 10588-10596
- [15] Budnik B, Levy E, Harmange G, *et al.* SCoPE-MS: mass spectrometry of single mammalian cells quantifies proteome heterogeneity during cell differentiation. *Genome Biol*, 2018, **19**(1): 161
- [16] Petelski A A, Emmott E, Leduc A, *et al.* Multiplexed single-cell proteomics using SCoPE2. *Nat Protoc*, 2021, **16**(12): 5398-5425
- [17] Ctordecka C, Hartlmayr D, Seth A, *et al.* An automated workflow for multiplexed single-cell proteomics sample preparation at unprecedented sensitivity. *Mol Cell Proteomics*, 2023, **22**(12): 100665
- [18] Wang Y, Guan Z Y, Shi S W, *et al.* Pick-up single-cell proteomic

- analysis for quantifying up to 3000 proteins in a Mammalian cell. *Nat Commun*, 2024, **15**(1): 1279
- [19] Wu J, Xu Q Q, Jiang Y R, *et al.* One-shot single-cell proteome and metabolome analysis strategy for the same single cell. *Anal Chem*, 2024, **96**(14): 5499-5508
- [20] Jiang Y R, Zhu L, Cao L R, *et al.* Simultaneous deep transcriptome and proteome profiling in a single mouse oocyte. *Cell Rep*, 2023, **42**(11): 113455
- [21] Yang Z, Jin K, Chen Y, *et al.* AM-DMF-SCP: integrated single-cell proteomics analysis on an active matrix digital microfluidic chip. *JACS Au*, 2024, **4**(5): 1811-1823
- [22] Ye Z, Sabatier P, Martin-Gonzalez J, *et al.* One-Tip enables comprehensive proteome coverage in minimal cells and single zygotes. *Nat Commun*, 2024, **15**(1): 2474
- [23] Ye Z, Sabatier P, van der Hoeven L, *et al.* High-throughput and scalable single cell proteomics identifies over 5000 proteins per cell. *bioRxiv*, 2023. DOI:10.1101/2023.11.27.568953
- [24] Rosenberger F A, Thielert M, Strauss M T, *et al.* Spatial single-cell mass spectrometry defines zonation of the hepatocyte proteome. *Nat Methods*, 2023, **20**(10): 1530-1536
- [25] Mund A, Coscia F, Kriston A, *et al.* Deep Visual Proteomics defines single-cell identity and heterogeneity. *Nat Biotechnol*, 2022, **40**(8): 1231-1240
- [26] Petrosius V, Schoof E M. Recent advances in the field of single-cell proteomics. *Transl Oncol*, 2023, **27**: 101556
- [27] Li J, Cai Z, Bomgardner R D, *et al.* TMTpro-18plex: the expanded and complete set of TMTpro reagents for sample multiplexing. *J Proteome Res*, 2021, **20**(5): 2964-2972
- [28] Tian X, de Vries M P, Permentier H P, *et al.* A versatile isobaric tag enables proteome quantification in data-dependent and data-independent acquisition modes. *Anal Chem*, 2020, **92**(24): 16149-16157
- [29] Ammar C, Schessner J P, Willems S, *et al.* Accurate label-free quantification by directLFQ to compare unlimited numbers of proteomes. *Mol Cell Proteomics*, 2023, **22**(7): 100581
- [30] Mann M. Functional and quantitative proteomics using SILAC. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2006, **7**(12): 952-958
- [31] Matsumoto M, Matsuzaki F, Oshikawa K, *et al.* A large-scale targeted proteomics assay resource based on an *in vitro* human proteome. *Nat Methods*, 2017, **14**(3): 251-258
- [32] Thielert M, Itang E C, Ammar C, *et al.* Robust dimethyl-based multiplex-DIA doubles single-cell proteome depth *via* a reference channel. *Mol Syst Biol*, 2023, **19**(9): e11503
- [33] Guzman U H, Martinez-Val A, Ye Z, *et al.* Ultra-fast label-free quantification and comprehensive proteome coverage with narrow-window data-independent acquisition. *Nat Biotechnol*, 2024. DOI: 10.1038/s41587-023-02099-7
- [34] Derks J, Slavov N. Strategies for increasing the depth and throughput of protein analysis by plexDIA. *J Proteome Res*, 2023, **22**(3): 697-705
- [35] Sabatier P, Ye Z, Lechner M, *et al.* Global analysis of protein turnover dynamics in single cells. *bioRxiv*, 2024. DOI:10.1101/2024.05.30.596745
- [36] Telfer E E, Grosbois J, Odey Y L, *et al.* Making a good egg: human oocyte health, aging, and *in vitro* development. *Physiol Rev*, 2023, **103**(4): 2623-2677
- [37] Guo Y, Cai L, Liu X, *et al.* Single-cell quantitative proteomic analysis of human oocyte maturation revealed high heterogeneity in *in vitro*-matured oocytes. *Mol Cell Proteomics*, 2022, **21**(8): 100267
- [38] Li Q, Mu L, Yang X, *et al.* Discovery of oogenesis biomarkers from mouse oocytes using a single-cell proteomics approach. *J Proteome Res*, 2023, **22**(6): 2067-2078
- [39] Klein S L, Flanagan K L. Sex differences in immune responses. *Nat Rev Immunol*, 2016, **16**(10): 626-638
- [40] Lewis E D, Wu D, Meydani S N. Age-associated alterations in immune function and inflammation. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2022, **118**: 110576
- [41] Zhang F, Wei K, Slowikowski K, *et al.* Defining inflammatory cell states in rheumatoid arthritis joint synovial tissues by integrating single-cell transcriptomics and mass cytometry. *Nat Immunol*, 2019, **20**(7): 928-942
- [42] Sharabi A, Tsokos G C. T cell metabolism: new insights in systemic lupus erythematosus pathogenesis and therapy. *Nat Rev Rheumatol*, 2020, **16**(2): 100-112
- [43] Galletti G, De Simone G, Mazza E M C, *et al.* Two subsets of stem-like CD8⁺ memory T cell progenitors with distinct fate commitments in humans. *Nat Immunol*, 2020, **21**(12): 1552-1562
- [44] Xia J, Liu M, Zhu C, *et al.* Activation of lineage competence in hemogenic endothelium precedes the formation of hematopoietic stem cell heterogeneity. *Cell Res*, 2023, **33**(6): 448-463
- [45] Wen L, Tang F. Single-cell sequencing in stem cell biology. *Genome Biol*, 2016, **17**: 71
- [46] Brunner A D, Thielert M, Vasilopoulou C, *et al.* Ultra-high sensitivity mass spectrometry quantifies single-cell proteome changes upon perturbation. *Mol Syst Biol*, 2022, **18**(3): e10798
- [47] Zhou F, Li X, Wang W, *et al.* Tracing haematopoietic stem cell formation at single-cell resolution. *Nature*, 2016, **533**(7604): 487-492
- [48] Lawrence R, Watters M, Davies C R, *et al.* Circulating tumour cells for early detection of clinically relevant cancer. *Nat Rev Clin Oncol*, 2023, **20**(7): 487-500
- [49] Lapin M, Tjensvoll K, Oltedal S, *et al.* Single-cell mRNA profiling reveals transcriptional heterogeneity among pancreatic circulating tumour cells. *BMC Cancer*, 2017, **17**(1): 390
- [50] Williams C G, Lee H J, Asatsuma T, *et al.* An introduction to spatial transcriptomics for biomedical research. *Genome Med*, 2022, **14**(1): 68
- [51] Crouch E E, Doetsch F. FACS isolation of endothelial cells and pericytes from mouse brain microregions. *Nat Protoc*, 2018, **13**(4): 738-751
- [52] Yao Z, van Velthoven C T J, Kunst M, *et al.* A high-resolution transcriptomic and spatial atlas of cell types in the whole mouse brain. *Nature*, 2023, **624**(7991): 317-332

- [53] Niehaus M, Soltwisch J, Belov M E, *et al.* Transmission-mode MALDI-2 mass spectrometry imaging of cells and tissues at subcellular resolution. *Nat Methods*, 2019, **16**(9): 925-931
- [54] Huang J, Chen P, Jia L, *et al.* Multi-omics analysis reveals translational landscapes and regulations in mouse and human oocyte aging. *Adv Sci*, 2023, **10**(26): e2301538
- [55] Gatto L, Aebersold R, Cox J, *et al.* Initial recommendations for performing, benchmarking and reporting single-cell proteomics experiments. *Nat Methods*, 2023, **20**(3): 375-386
- [56] Yu S H, Chen S C, Wu P S, *et al.* Quantification quality control emerges as a crucial factor to enhance single-cell proteomics data analysis. *Mol Cell Proteomics*, 2024, **23**(5): 100768
- [57] Li L, Zhu S, Shu W, *et al.* Characterization of metabolic patterns in mouse oocytes during meiotic maturation. *Mol Cell*, 2020, **80**(3): 525-540.e9
- [58] Haghverdi L, Lun A T L, Morgan M D, *et al.* Batch effects in single-cell RNA-sequencing data are corrected by matching mutual nearest neighbors. *Nat Biotechnol*, 2018, **36**(5): 421-427
- [59] Lawson D A, Kessenbrock K, Davis R T, *et al.* Tumour heterogeneity and metastasis at single-cell resolution. *Nat Cell Biol*, 2018, **20**(12): 1349-1360

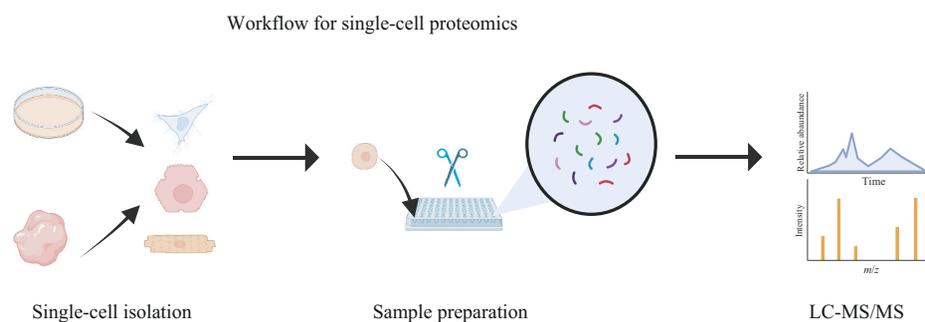
Mass Spectrometry Based Single-cell Proteomics*

XIE Jing-Sheng^{1,2}, YE Zi-Lu¹**

¹State Key Laboratory of Common Mechanisms Research for Major Diseases, Suzhou Institute of Systems Medicine, Chinese Academy of Medical Sciences, Suzhou 215123, China;

²Department of Obstetrics and Gynecology, The Second Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215004, China)

Graphical abstract



Abstract In recent years, the development of single-cell sequencing technology has significantly advanced our understanding of single-cell genomics and transcriptomics. However, the study of proteomics, directly related to single-cell life processes, has been limited by slow technological progress. With advancements in sample preparation techniques and chromatography-mass spectrometry instruments, the analytical sensitivity of single-cell proteomics (SCP) has markedly improved. In this review, we thoroughly examine the development of SCP and its applications in life sciences. Regarding sample preparation, various methods such as gentle acoustic dispensing, microfluidic chips, and laser microdissection have been developed for single-cell sorting, gradually transitioning from multi-step to one-step processing, thereby reducing sample loss. In mass spectrometry, both label-free quantification and methods based on isotopic and isobaric labeling have been extensively explored, each with their own technical strengths and weaknesses. SCP has unveiled new biological insights in early embryonic cell development, stem cell differentiation, and spatial heterogeneity of liver tissues. Finally, we summarize the current challenges facing SCP technology, including detection throughput, cost, and data analysis complexity, while envisioning its future directions and emphasizing its broad potential in basic research and clinical applications.

Key words single-cell, proteomics, liquid chromatography, mass spectrometry

DOI: 10.16476/j.pibb.2024.0285

* This work was supported by grants from the Chinese Academy of Medical Sciences (CAMS) Innovation Fund for Medical Sciences (2023-I2M-2-005), the Non-profit Central Research Institute Fund of the Chinese Academy of Medical Sciences (2023-RC180-03), and Natural Science Foundation of Jiangsu Province (BK20240443).

** Corresponding author.

Tel: 86-512-6287378, E-mail: yzl@ism.pumc.edu.cn

Received: July 1, 2024 Accepted: August 24, 2024