

基于质谱的单细胞分辨的空间蛋白质组学新技术研究

沈枫林^{1#}, 冯兆莹^{2#}, 方静¹, 张磊¹, 刘晓慧², 周新文¹

(1. 复旦大学生物医学研究院, 上海 200032;

2. 上海交通大学转化医学研究院, 上海 200240)

摘要 细胞的异质性普遍存在, 单细胞及单细胞分辨的空间蛋白质组学的研究能够帮助人类更加深入地了解疾病机理。然而, 受限于单细胞中蛋白含量低以及检测技术灵敏度等问题, 单细胞分辨的蛋白质组学的发展面临着一系列重大技术挑战。近年来, 随着质谱仪器的灵敏度、分辨率和扫描速度等方面的提升, 许多新的基于质谱的单细胞分辨率的空间蛋白质组学新技术被开发出来, 并用于定量单个细胞中数千种的蛋白, 给疾病、环境和医药等研究领域提供了高分辨的数据, 具有广阔的应用前景。本文综合评述了这些基于质谱的单细胞分辨率的空间蛋白质组学的新技术, 并对其未来的发展趋势进行了展望。

关键词 单细胞蛋白质组学; 空间蛋白质组学; 质谱技术

中图分类号 O657; Q816

文献标志码 A

doi: 10.7503/cjcu20240299

New Technologies for Mass Spectrometry-based Single-cell Resolved Spatial Proteomics Research

SHEN Fenglin^{1#}, FENG Zhaoying^{2#}, FANG Jing¹, ZHANG Lei¹,

LIU Xiaohui^{2*}, ZHOU Xinwen^{1*}

(1. Institute of Biomedical Sciences, Fudan University, Shanghai 200032, China;

2. Institute of Translational Medicine, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China)

Abstract Cell-to-cell heterogeneity prevails in biological systems. Single-cell and single-cell resolved spatial proteomics can help human gain better understanding of the mechanism of any disease. Limited to the extremely low protein content in a single cell and sensitivity of detection technology, the development of the single-cell proteomic technology faces major technical challenges. Over the last few decades, the sensitivity, resolution and scanning speed of mass spectrometry have improved dramatically. Recently, new MS-based single cell resolved spatial proteomics methods have been developed for quantifying thousands of proteins in individual human cells. These spatial proteomics analyses at the single-cell level provide high-resolution data for disease, environment and biochemistry research. This review mainly focuses on the mass spectrometry-based approaches for the study of single-cell resolved spatial proteomics.

Keywords Single-cell proteomics; Spatial proteomics; Mass spectrometry technology

收稿日期: 2024-06-21. 网络首发日期: 2024-09-11.

联系人简介: 刘晓慧, 女, 博士, 高级工程师, 主要从事蛋白质组学方面的研究. E-mail: liuxiaohuijd@sjtu.edu.cn

周新文, 男, 硕士, 高级工程师, 主要从事蛋白质组学方面的研究. E-mail: zhouxinwen@fudan.edu.cn

基金项目: 上海科技计划项目(批准号: 22DZ2291700)资助.

Supported by the Shanghai Science and Technology Program, China(No.22DZ2291700).

共同第一作者.

人类有成百上千种细胞类型，每一种细胞类型根据它们在体内的位置都可以随时间的推移改变它们的状态^[1]。在疾病的发生发展过程中，正常细胞和疾病细胞始终保持在同一组织中。异质性在细胞系统中普遍存在，是单个细胞固有的性质，可以反映遗传、表观遗传或随机影响^[2]。目前，生物学研究中常采用的集合平均分析方法能够识别复杂代谢、信号和转录网络内部成分之间的相互作用，反映了群体的主要生物学特征，而细胞间的差异通常是不清晰的。从单细胞着手可以揭示不同于种群平均值的独特特征的罕见细胞亚种群的存在，这对建立准确的生物现象和疾病生物学模型具有重要意义^[3]。同时，几乎所有复杂的生物学过程都发生在三维空间，研究最简单的组织和器官不仅需要破译成千上万细胞的分子图谱，还需要了解它们的空间环境对它们行为的影响。生物过程发生在空间背景下，组织中细胞的三维排列对其功能有着深远的影响。随着人类基因组计划的成功实施，科学家们逐渐认识到要深入研究基因及其相互作用，需要从空间角度出发，考虑其在细胞、组织、器官等不同层次上的作用。因此，空间组学，尤其是基于单细胞分析技术的高分辨空间组学应运而生，并且于2020年被Nature Methods评为年度技术方法之一^[4]。

随着下一代测序工具发展推动RNA测序的进步，单细胞基因分析及空间转录组学领域在过去的10年里高速发展^[5,6]。然而，虽然基因组和转录组的改变是疾病的驱动因素，但它们编码的蛋白质是关键生物过程的主要载体和执行者，其翻译后修饰状态更与疾病发展的动态紧密相关^[7]。如蛋白质磷酸化调控许多细胞过程，已被广泛认为是药物发现的有效工具^[8]。

目前，在FDA批准药物的分子靶点中，人类蛋白为667个，占总数的74.7%^[9]，生物体及其器官和组织细胞蛋白表达谱的空间组织决定了细胞功能，是理解疾病病理的关键^[10]。单细胞空间蛋白质组学的研究能够从机理上帮助我们理解基因产物如何相互作用产生细胞表型，以及进行精细的标志物溯源和药物靶标发现^[11]。

质谱技术是蛋白组研究的核心技术，两种主要的基于质谱的蛋白质组学研究方法分别是以肽为中心的“自下而上”(Bottom-up)策略和以蛋白质为中心的“自上而下”(Top-down)策略。传统的基于质谱的蛋白质组学可以解决关于蛋白质的一系列问题，如蛋白质的序列、表达丰度、亚细胞定位、蛋白功能、三维结构、化学反应性及蛋白质-蛋白质相互作用等，但无论是采用“自下而上”还是“自上而下”策略都需要较大的样本量(1000个细胞及以上)^[12]，所以其仅仅提供了一个蛋白质表达水平的平均结果。

单细胞蛋白组(Single-cell proteomics, SCP)能够处理在任何给定时间内单个细胞中所有功能的蛋白质。但SCP全流程分析技术还处于初级的阶段，仍然需要大量的改进。尽管在过去的十多年中，许多诺贝尔奖的产生证明了该领域研究的重要性(如，1984年的单抗技术、2002年的质谱技术、2008年的绿色荧光融合蛋白技术)，但这些技术在单细胞蛋白质组学领域的应用依旧面临如下挑战：单个细胞难以获取；蛋白含量少，不能扩增；前处理流程复杂，容易造成蛋白样品的损失；质谱仪器的精度需要进一步提升；检测过程中存在系统损失等，因此需要更先进的采样和前处理方法来减少蛋白的损失，同时也需要更高灵敏度和精确度的蛋白质组学分析方法^[13]。目前，有一些研究已经开发了基于Top-down策略的单细胞蛋白质组学新技术，并应用于单个肌肉细胞、哺乳动物细胞的研究中^[14,15]。由于肽段比完整的蛋白质更容易分离、电离和碎片化，Bottom-up的蛋白质组学策略依旧是基于质谱的蛋白质组学研究的主力。

为了能在单细胞分辨率下研究组织的空间蛋白质组学，许多研究都致力于从取样、前处理以及整合的全流程单细胞空间蛋白组分析方法等各方面进行技术创新。为了能让相关的研究人员对单细胞分辨率的空间蛋白质组新技术发展有全面的认识，本文首先介绍了几种主要的单细胞取样技术，然后分别介绍了基于质谱的单细胞分辨的空间蛋白质组的3类分析技术，其中质谱流式成像(IMC)和质谱成像(IMS)鉴定深度有限，并且不能得到蛋白的定量信息。采用Bottom-up策略基于LC-MS/MS检测的单细胞空间蛋白质组分析技术是目前最常用的技术手段，并介绍了目前最新的样品制备技术以及最前沿的分析方法(图1)。

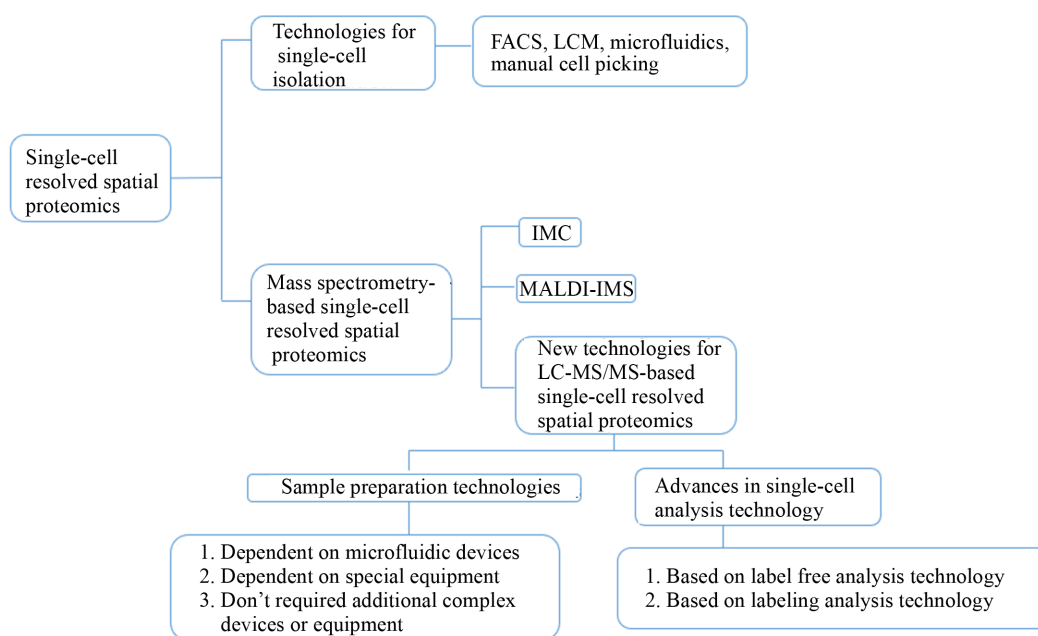


Fig. 1 New technologies of single-cell resolved spatial proteomics research

1 单细胞取样技术

在分析单细胞前,更为重要的是如何从组织中分离单细胞,目前单细胞的取样技术包括流式细胞荧光分选技术(Fluorescence activated Cell Sorting, FACS)、手动单细胞分离、激光捕获显微切割(Laser capture microdissection, LCM)和微流控技术(图2)。

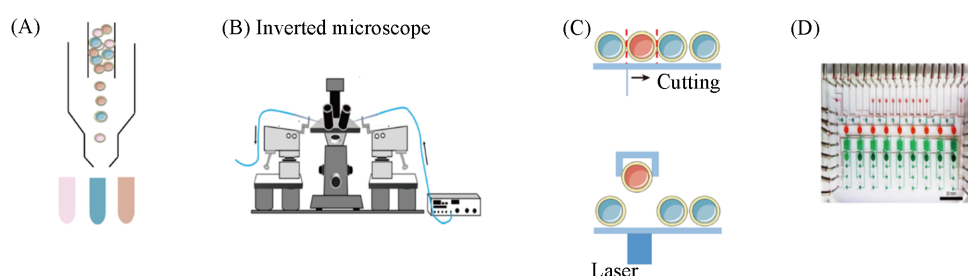


Fig. 2 Singlecell separation technologies

(A) FACS; (B) manual cell picking; (C) LCM; (D) microfluidics.

FACS是一种特殊的流式细胞术,可以根据每个细胞的光散射和荧光特性分离出感兴趣的细胞[图2(A)]. 样本范围几乎涵盖了血液、骨髓、肿瘤、植物、原生质体、酵母、细菌甚至病毒等所有细胞类型^[16-20].

人工手动分离单细胞通常在显微操作系统下进行,显微操纵系统通常由倒置显微镜与微移液器相结合,可通过机动机械台移动[图2(B)]. 整个过程都是通过人工来完成. 微操纵器可以控制从悬浮液中分离选定的活细胞,甚至可以分离原核细胞^[21],可广泛应用于生殖医学领域^[22].

激光捕获显微切割是一种从固体组织样本分离单个细胞或细胞区室的技术[图2(C)]. 主要分为红外和紫外激光捕获显微解剖^[23,24]. 近年来,随着现代显微镜多功能性、分辨率和多模态性以及人工智能(AI)的发展,有研究将亚微米分辨率成像同基于AI的单细胞表型图像分析相结合,在机器学习和深度学习的基础上开发了一套名为“BIAS”的综合图像分析软件,配套激光显微切割系统(蔡司PALM MicroBeam、徕卡LMD6和LMD7),优化后,LMD7每小时可以自动切割1250个高分辨率轮廓,相当于每个样品50~100个细胞^[25].

微流控技术利用小型设备进行精确的流体控制, 具有更少的样品消耗, 更低成本的分析, 因而被认为是研究细胞系统最强大的技术之一[图 2(D)]^[26]. 大部分微流控装置都根据以下 3 种原理之一来分离细胞[图 3(A)~(C)]: 基于液滴的分离; 基于气动阀门的分离, 利用加压空气使得弹性体膜偏转; 基于流体动力学陷阱捕获.

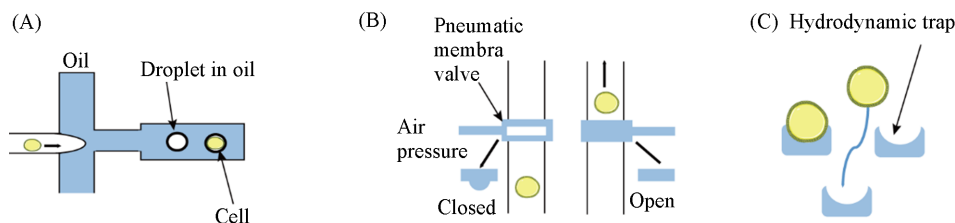


Fig. 3 Schematic overview of different microfluidic methods for single-cell isolation

(A) An aqueous stream of cells is broken up into individual droplets-in-oil containing random distribution of cells; (B) pneumatic membrane valves use air pressure to close a microfluidic channel by membrane deflection, this stops the flow and can trap a cell; (C) hydrodynamic traps are passive elements that only fit single cells and hold them at one position.

2 基于质谱的空间蛋白质组学分析技术

2.1 质谱流式

质谱流式(CyTOF)由流式细胞分选和质谱检测两部分组成, 流式细胞用于分选单细胞, 质谱用于鉴定蛋白, 它采用金属同位素标记的特异性抗体来标记细胞表面和内部的蛋白, 标记好的细胞通过流式细胞技术被分离成单个细胞并依次进行离子化, 飞行时间质谱(TOF)通过检测每个细胞上各种金属标签得到单细胞蛋白的相对定量数据^[27]. 由于镧系元素基本上不存在于生物材料中, 且可以非常精确地区分它们的质量, 因而可被广泛应用[图 4(A)]. 质谱流式可用于了解单个细胞中不同的蛋白质及其特性, 细胞中不同蛋白的表达水平可以反映细胞的行为^[28-31]. 质谱流式成像(Imaging mass cytometry, IMC)技术也得到发展. 在 IMC 中, 抗体通过螯合物结合到金属上. 在成像过程中, 激光逐个像素地蒸发组织, 从每个点释放的金属离子通过质谱仪定量. 金属的分布可以用来推断组织中特定蛋白质的空间分布[图 4(B)]. IMC 的分辨率约为 $1\ \mu\text{m}$ ^[32]. Bodenmiller 团队^[32]利用 IMC 分析了 500 例乳腺癌临床样本, 展现了特定的肿瘤微环境的基序, 并表明空间特征与患者预后密切相关. 但是这种依赖抗体的分析方法鉴定蛋白的数量十分有限.

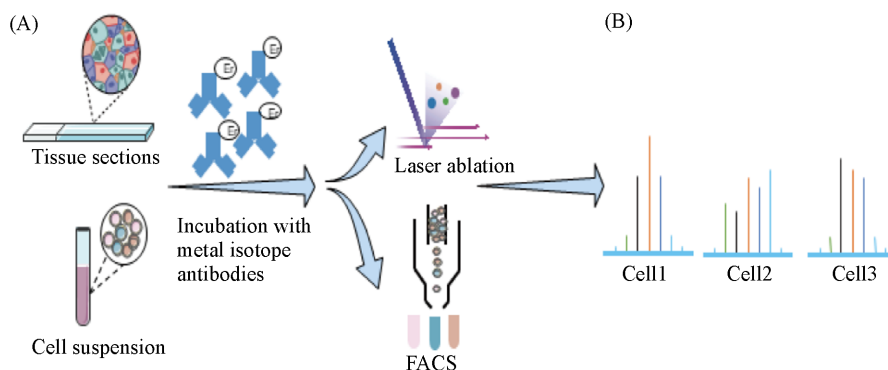


Fig. 4 Schematic diagram of CyTOF(A) and IMC(B)

2.2 质谱成像

质谱成像(Mass Spectrometry Imaging, MSI)是空间蛋白质组学研究不可或缺的分析技术, 可以提供复杂样品中数百个分子的详细空间图谱, 具有高灵敏度和亚细胞空间分辨率. 根据 MSI 电离方法主要可以分为 3 类: 基质辅助激光解析质谱成像技术(Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Mass Spectrometry Imaging, MALDI-MSI)、次级离子质谱成像技术(Secondary Ion Mass Spectrometer-Mass

Spectrometry Imaging, SIMS-MSI)和电喷雾解析电离成像技术(Desorption Electrospray Ionization-Mass Spectrometry Imaging, DESI-MSI),这3种技术都是在利用质谱进行质荷比(m/z)测定的基础上,结合特定的成像软件,对待测物不同部位的目标分子进行检测、鉴定、成像和叠加,进而得到反映待测物含量的空间分布情况的图像^[33].

由于其灵活的质量范围、软电离,特别是在速度和空间分辨率方面的进步,MALDI是目前临床研究中最为常用的MSI工具^[34,35].MALDI-MSI技术通过将组织切片表面的蛋白进行原位酶解,然后覆盖上基质辅助解析电离,在质谱仪中,对组织标本进行光栅扫描,为每个测量点生成质谱数据^[36],不同的分析物类别可选择不同基质.MALDI成像的巨大优势在于通过保留质谱测量被分析物的空间定位信息,将分子信息与传统组织学相关联,并且无需标记,允许同时对同一组织切片中的数百到数千个分子进行多重分析.

MALDI-MSI的样品应用类型非常广泛,从亚细胞水平到全身组织切片,包括器官组织切片、全身切片、三维(3D)细胞培养中的球体、福尔马林固定和石蜡包埋(FFPE)组织等^[37].目前,该技术已经成功应用于肿瘤细胞的病理分类研究,对肾嗜瘤细胞瘤、透明细胞肾细胞癌及嗜色性肾细胞癌等多种癌症进行分类^[38];通过检测和定位多种蛋白标记物,清晰地区分肿瘤区域和非肿瘤区域^[39].与空间分辨率糖蛋白组学的组合,可用于研究癌症中n-糖基化的变化,为了解癌症中糖基化变化的空间变异性提供了一种独特的方法^[40].在单细胞层面,Kompauer等^[41]成功地绘制了单细胞尾草履虫和多细胞轮虫生物的亚细胞脂质、代谢物和肽分布图谱.但迄今为止,绝大多数高空间分辨率MALDI-MSI研究都是使用内部定制的仪器进行,并且将蛋白质原位消化成肽可能导致分析物脱位.单细胞水平空间分辨率的增加也会导致灵敏度的丧失,从而导致分子信息的丢失.同时,相较于电喷雾质谱技术,MALDI不适用于多肽的定量^[42].

2.3 基于LC-MS/MS检测的空间蛋白质组学分析技术

2.3.1 单细胞蛋白质组样品制备新技术 样品的制备是整个分析流程的基础,已经有许多不同的样品制备技术被开发出来,它们能处理微量至单细胞水平的样品.这些方法的总体原则是使样品裂解,蛋白质提取和酶解小型化,并尽可能减少样品的损失,提高样品制备的通量^[43-60].

(1) 基于微流控芯片装置的单细胞蛋白质组样品制备技术.方群课题组^[43]设计了一种纳米级油-气-液滴芯片(Oil-Air-Droplet, OAD),实现了复杂样品的多步骤预处理和进样,用于单细胞蛋白质组学分析.该系统允许在纳米级液滴中进行所有样品的预处理和进样过程,使样品损失最小,进样效率高.OAD芯片包括4层结构:避免液滴蒸发的油层、用于分离油滴的隔离层、用于装载样品的液滴层、用于芯片定位的定位层(图5).该设备采用SODA液滴操作模式在OAD芯片中操作细胞样品液滴.同时采用一种自对准单片设备(Self-aligning monolithic, SAM),自动实现毛细管探针/毛细管液相色谱柱与OAD芯片的同轴对准.并将商用气动高压泵与OAD芯片和SAM装置相结合,将液滴样品注入自制的毛细管色谱柱.该团队利用这套系统成功对单个Hela细胞和单个小鼠卵母细胞中的蛋白进行鉴定^[43].整个系统充分显示出样品损耗低、效率高、系统构建和使用方便等特点.其可被广泛应用于不同的领域,如阐明细胞的异质性及其潜在原因、临床研究如分析循环肿瘤细胞中的单个细胞、体外受精的质量控制、其它疾病的诊断和预后^[43].

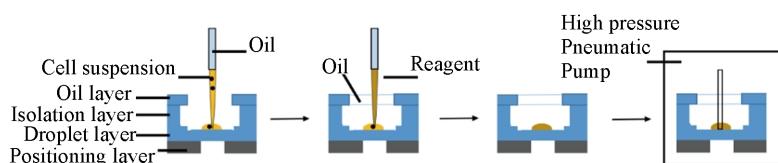


Fig. 5 Schematic diagrams of OAD

后续该课题组又发展了PiSPA(Pick-up single-cell proteomic analysis)的方法^[44],该平台主要根据细胞悬液样品中靶细胞的亮场表现特性或标记的荧光信号来进行单细胞鉴定、拾取和分配3步操作完成

细胞分选, 整个过程需要 20 s, 单细胞分选率达到了 95%(图 6). 在拾取操作模式(Pick-up mode)下, 连续采用单细胞捕获平台完成多步纳升级试剂添加操作, 依次实现细胞裂解、蛋白质还原、烷基化、消化和反应终止, 最后进行质谱分析. 利用该套系统, 一个哺乳动物细胞中能深度鉴定出 3000 个蛋白. 研究者将该技术用于单个 HeLa 细胞迁移的研究中, 观察到细胞迁移过程中明显的细胞异质性. PiSPA 采用拾取模式分选细胞, 对靶细胞的选择和挑选具有较强的可控性、确定性和可靠性, 同时保留了这些靶细胞的表型, 这是使用基于流式细胞术的单细胞分选技术难以实现的, 但是 PiSPA 平台在单细胞分选中的通量(约 20 s/细胞)远低于基于流式细胞术的系统. PiSPA 平台将微流控液体处理机器人与插入管阵列集成在一起, 利用机器人的拾取操作和插入管的锥形底端作为纳升反应容器, 实现单细胞液滴的加载和随后的多步纳升级样品预处理. 与微流控芯片反应器相比, 该插入管具有成本低、易于获得、使用方便等优点^[44]. 此外, 这样的结合也使得单细胞分选、纳升级样品预处理以及随后的样品自动化液相色谱进样无缝集成, 显著提高了单细胞蛋白质组学分析整个工作流程的可操作性、可靠性和成功率. 这对于促进单细胞蛋白质组学分析的普及具有重要意义.

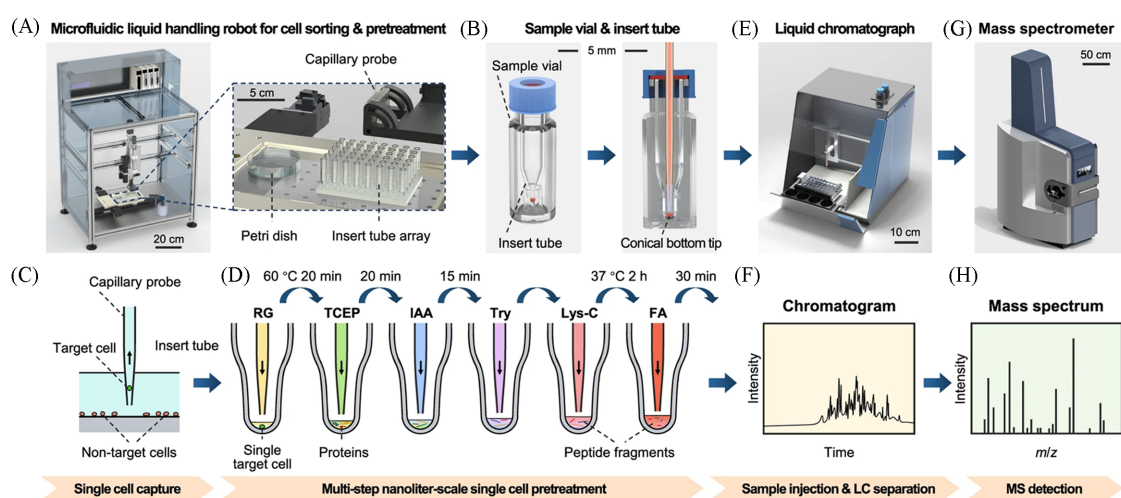


Fig. 6 Schematic diagram of the PiSPA workflow^[44]

(A) Microfluidic liquid handling robot with an insert tube array; (B) sorting of single cells and the multi-step pretreatment of the single cell samples; (C) sample preparation steps; (D) insert tubes coupled with sample vials were used as the nanoliter microreactors for sample pretreatment of single cell; (E) LC separation; (F) MS detection; (G) mass spectrometer; (H) mass spectrum.
Copyright 2024, Nature Communications.

类似的, 还有 Kelly 团队^[45]开发的 nanoPOTs 平台(Nanodroplet Processing in One pot for Trace Samples), nanoPOTs 的玻璃芯片由疏水表面包围的光刻图案化亲水性底座制成, 作为纳米液滴反应容器, 用于多步骤蛋白质组学样品的处理(图 7). 整个处理过程在 200 nL 或更小的液滴中进行, 以减少样品在反应容器表面吸附造成的损失, 并保证足够的蛋白浓度, 从而有效地在溶液中进行酶解消化. 采用 nanoPOTs 结合 Orbitrap Fusion Lumos 质谱, 约 10 个细胞平均鉴定量为 3092 个蛋白^[45]. 结合 FACS, 与超灵敏 nanoLC-MS/MS 连用, nanoPOTs 技术可从单个哺乳动物细胞中鉴定到 700 种蛋白^[46]. 后续该团队开发了一种 WWA(Wide window acquisition)的数据采集模式, 采用较大的隔离窗口, 有意地将相邻母离子与选定的母离子一起共分离和共碎裂, 结合 nanoPOTs, 在 1 个 HeLa 细胞中鉴定到了 1758 个蛋白^[47]. 目前, nanoPOTs 可与 LCM 结合, 应用于分离和分析胰腺、脑和肝脏薄片以及植物组织中感兴趣区域内的蛋白质^[48-50].

Gebreyesus 等^[51]开发的 iProChip 技术将微流控芯片用于一体化蛋白质组学样品制备和数据依赖采集(DIA)模式相结合, 用于单细胞水平的蛋白质组学分析, 蛋白质组学芯片可在单个设备中实现多复通路和自动化细胞分离/计数/成像和样品处理. iProChip 具有两层的俯顶几何结构, 可通过定制程序控制的 34 个阀门进行精确的流体操作, 芯片的 9 个单元控制着整个单细胞捕获和样品前处理过程, 后续通过 DIA 分析单个哺乳细胞, 平均蛋白鉴定量可达到约 1500.

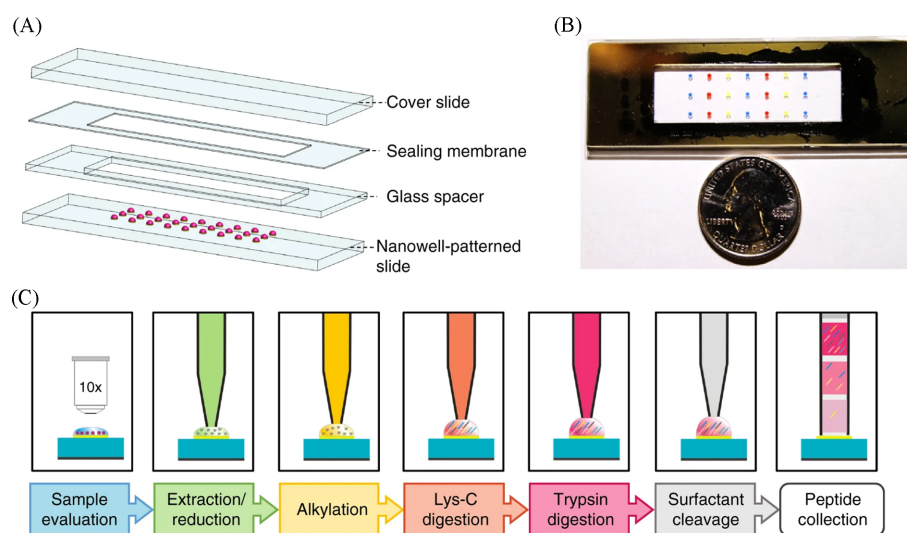


Fig. 7 Proteomic sample preparation with nanoPOTs^[45]

(A) Schematic drawing; (B) photograph showing the nanoPOTs chip with each nanowell filled with 200 nL of colored dye;

(C) one-pot protocol for proteomic sample preparation and capillary-based sample collection.

Copyright 2018, Nature Communications.

AM-DMF-SCP (Active Matrix Digital Microfluidic Chip) 是一种基于数字微流控芯片的一体化的单细胞蛋白组样品前处理平台，在数字微流控 (DMF) 芯片上可以实现单细胞分离和样品制备的整个流程。此外，DMF 芯片内的所有单细胞可以同时混合并与试剂反应。这意味着并行样品处理有效地避免了串行样品处理带来的个体差异。采用该平台，单个 HeLa 细胞中可平均鉴定出 2258 个蛋白质^[52]。目前奥素科技公司基于 AM-DMF-SCP 技术发布了商业化的 BOXmini™ SCP 平台。

以上基于微流控芯片的单细胞样品制备新技术都依赖复杂的微流控装置，且大部分没有商品化的设备使用，商业化的设备造价较高，因而难以在实验室间进行广泛推广，不利于普通实验室推进单细胞蛋白组的研究。

(2) 依赖特殊设备的单细胞样品制备技术。Mann 团队^[53] 在 2022 年提出了一种称为 T-SCP (True single-cell-derived proteomics) 的技术 (图 8)。T-SCP 方法首先用含有 1 μ L 裂解液的 384 孔板收集分选的

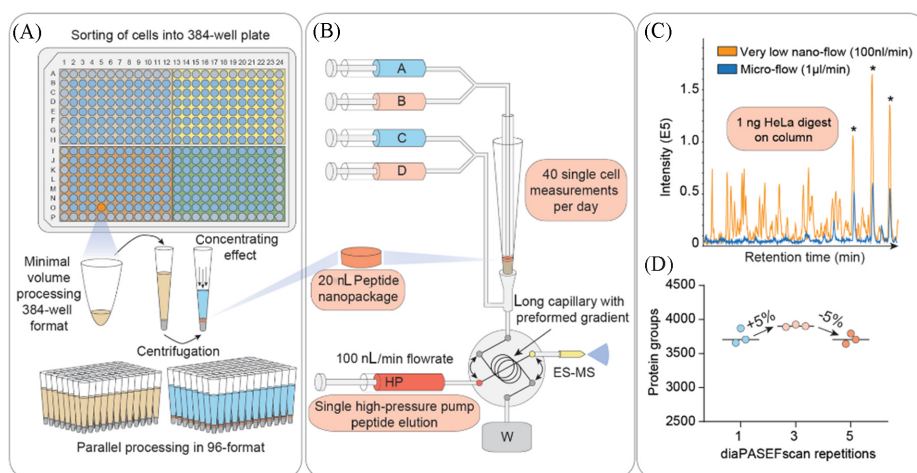


Fig. 8 Schematic diagram of the T-SCP workflow^[53]

(A) A Single cells are sorted in a 384-well format into 1 μ L lysis buffer by FACS with outer wells serving as qualitative and quantitative controls; (B) these tips are automatically picked and peptide nanopackages are eluted in a sub-100-nL volume; (C) base-peak chromatogram of the standardized nanoflow (100 nL/min, orange) and microflow (1 μ L/min, blue) gradients with 1 ng of HeLa digest on the StageTip; (D) nanoflow (100 nL/min) and short-gradient diaPASEF method combined.

Copyright 2022, Molecular systems biology.

单细胞. 然后进行加热并进一步加入总体积为 2 μL 的含有消化酶的缓冲液, 所有的步骤都在封闭的空间进行. 酶解完的多肽在 EvoTip 中浓缩至 20 nL (类似于 StageTip 的功能), 肽段被推进分析柱后进行分离, 后续结合 TimsTOF 进行分析, 1 个 HeLa 细胞能鉴定出 843 个蛋白. T-SCP 方法结合了小型化样品制备与极低流量液相色谱和新型质谱仪, 在稳定分析单细胞的前提下灵敏度至少增加了一个数量级, 并且易于商业化^[53].

传统的样品制备步骤通常需要加入与质谱不兼容的裂解液, 纯化步骤会造成样品的损失并且使得自动化样品制备变得复杂. mPOP (Minimal ProteOmic sample Preparation, mPOP) 通过冷冻-热循环裂解的方法, 在纯水中有效地提取蛋白质, 从而简化了纯化步骤^[54]. 后续在 mPOP 的基础上又优化了 nPOP (nano-ProteOmic sample Preparation) 的样品制备系统, 能在体积缩小至纳升的液滴中同时自动处理数百个单细胞^[55]. 重要的是, 这两种方法使用了大多数实验室都能使用的廉价设备, 并且易于自动化.

同样地, 基于微小反应体系, Ye 等^[56]报道了一种 One-Tip 的方法 (图 9), 该方法采用 Evtip™ 技术, 仅需要两个移液步骤. 经过 70 min 的 Evtip 标准制备步骤即可用于质谱分析, 无需进一步的样品处理, 直接将样品制备与 LC-MS 分析集成在一起, 没有任何样品损失, 并具有较高的通量. OneTip 与 Orbitrap Astral 质谱结合, 通过 nDIA 方法可从大约 20 个细胞中鉴定出超过 5000 个蛋白质和超过 46000 条修饰肽, 性能超过了单细胞蛋白质组学制备系统 CellenONE. 另外的一些技术如 iPAD-1, 该设备直接与质谱相连, 在显微镜下将单个细胞吸入毛细管中进行前处理, 细胞裂解液通过真正的零死体积单元直接被转移到色谱柱上, 进行 LC-MS/MS 分析. 整个流程仅需要 1 h, 在单个 HeLa 细胞中最多能鉴定到 328 个蛋白^[57].

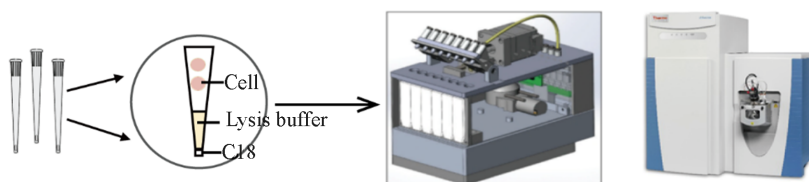


Fig. 9 Schematic diagram of the One-Tip workflow

(3) 不依赖于复杂装置或特殊设备的单细胞样品制备技术. 一些不需要额外设备或装置的、可以广泛适用的单细胞蛋白组学样品制备方法也已被报道. WinO (Water droplet-in-oil digestion) 是一种基于羧基包被珠和相转移表面活性剂的水滴-油消化方法. 该方法使用细胞分选器将细胞装载入乙酸乙酯中的水滴中 (含有苯并酶、磁珠、相转移表面活性剂和 100 mmol/L 溴化四乙铵), 然后将还原、烷基化和消化的溶液加入乙酸乙酯 (EtAc) 中, 酶解完成后加入串联质谱标签 (TMT) 试剂进行标记, 使用 StageTip 除盐后进行 LC-MS/MS 分析 [图 10(A)]. 该方法旨在减少样品溶液与容器之间的接触面积, 从而减少吸附过程中蛋白质和多肽的损失, 使蛋白质和肽的回收率提高了 10 倍. WinO 方法结合加入载体样本成功地定量到单细胞中的 462 个蛋白. 此外, WinO 方法具有结合高通量自动化平台的潜力. 当然, 这种方法也存在一定的局限性, 该研究在单细胞样品中加入了大量的载体样品, 载体的加入提高了肽的回收率, 但会影响到定量结果的准确性^[58].

还有的样品制备方法采用“一体化”策略, 包括消除所有样品转移步骤来最大限度地减少表面吸附损失. 表面活性剂辅助的单锅样品制备与质谱联用 (SOP-MS) 技术就是利用了质谱兼容的非离子表面活性剂 [n-十二烷基- β -D-麦芽糖苷 (DDM, n-Dodecyl β -D-maltoside)] 和疏水表面低结合管或多孔板的组合进行“一体化”样品制备 [图 10(B)]. 使用 SOP-MS 可从单个人体细胞中鉴定到约 146 个蛋白, 在小组织切片 (约 20 个细胞) 中鉴定到约 1200 个蛋白质^[59]. Yang 等^[60]发展了 SMID (Miniaturized in-solution digestion) 方法: 一种一体化、小型化的溶液内微量样品前处理方法, 该方法简化了样品前处理步骤, 使用可兼容的还原烷基化试剂和辅助酶解试剂, 整个流程仅需要 3 h, 广泛适用于 $10^1\sim 10^5$ 个细胞的蛋白组分析^[12]. 蛋白磷酸化是最普遍和最重要的翻译后修饰之一, 在 SMID 的基础上, 研究人员又开发了一种微量样品磷酸化蛋白组样品前处理方法 miniPhos. miniPhos 在 4 h 内完成样品前处理, 能从 10 μg 的

肽中鉴定到超过4500个磷酸化位点,进一步应用于不同层次的小鼠脑显微切片的研究中,该方法为小鼠大脑中最相关的神经退行性疾病、癌症和信号通路提供了蛋白质丰度和磷蛋白调控的定量信息,展示了该方法在单细胞空间磷酸化蛋白组中的应用潜力.这些无需特殊的设备和复杂装置的前处理方法具有广阔的自动化和高通量应用前景.

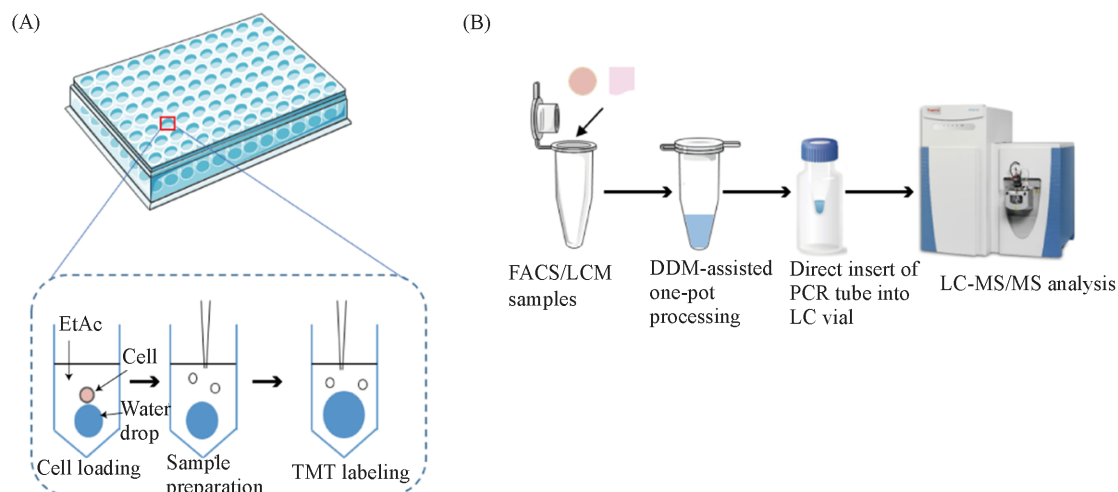


Fig. 10 Schematic diagram of the WinO workflow(A) and the SOP-MS workflow(B)

2.3.2 单细胞分辨率的空间蛋白质组学分析技术 (1) 基于非标的分析技术. 现代显微镜的多功能性、分辨率和多模态特性为单细胞异质性和组织提供了越来越详细的图像信息. Mann 团队^[25]开发了一种深度视觉蛋白质组学技术(Deep Visual Proteomics, DVP), 结合了亚微米分辨率成像、基于人工智能的单细胞表型图像分析和超灵敏蛋白质组学工作流程, 该技术可以定义细胞的身份和异质性. 在黑色素瘤组织中, 该方法精确分析出仅在肿瘤区域中出现的与免疫调控和DNA复制相关的特征性蛋白. DVP技术通过将成像技术与蛋白质组学相结合, 以量化细胞中表达蛋白的数量, 揭示组织或细胞类型特异性蛋白质组, 确定潜在的药物和诊断的靶点; 阐明了癌症进展中失调的关键通路. 此外, DVP还可以表征罕见的细胞状态和相互作用.

同年, 该团队与Ertürk^[61]合作开发了一种新的空间蛋白质组学技术DISCO-MS, 他们将组织透明化技术和3D成像与人工智能组织提取技术、四维(4D)超高灵敏度质谱技术进行结合, 实现对全组织区域进行无偏的空间蛋白质组学分析, 并保留其三维立体空间背景信息, 以发现各种疾病模型中初始病理事件相关的空间-分子图谱. 同时开发了一套机械组织提取系统DISCO-bot, 并将DISCO-bot辅助的DISCO-MS方法应用于人冠状动脉疾病中, 发现在早期冠状动脉斑块形成过程中区域特异性的失调蛋白.

为了增加鉴定肽的数量, 研究人员会将质谱成像(IMS)与LC-MS结合使用, 其中一个组织切片由IMS分析, 而相邻的切片由LC-MS/MS均质分析. 然而, 由于哺乳动物组织切片的高度复杂性, 将这两种MS模式联系起来是具有挑战性的, 会导致假阳性的结果^[62,63]. 2020年, Kelly 团队^[64]报道了一种高分辨率和深度蛋白组成像的自动化流程, 首先将nanoPOTS与LCM结合构成自动化样品收集与前处理部分, 经过LC-MS/MS分析后, 用LCM解剖的坐标对样本数据集进行匹配, 并使用Trelliscope对蛋白质和肽数据进行可视化, 最后得到组织切片的蛋白组空间谱图. 后续研究人员将这种蛋白质组可视化平台应用于早期胚胎黏附前怀孕小鼠的子宫截面的研究中, 以100 μm的空间分辨率绘制超过2000种蛋白质, 从而捕获子宫腔内的腔内上皮细胞、间质细胞和分散的腺上皮细胞的独特蛋白质表达模式.

上述依赖于nanoPOTs样品制备平台的空间蛋白质组分析技术需要特殊的装置, 极大地限制了单细胞空间蛋白质组学研究的普适性. 2022年, Piatkevich 团队^[65]报道了一种使用手动微采样、无需定制或特殊设备的新技术ProteomEx. 该方法首先进行化学固定组织切片, 然后将处理过的样品嵌入水凝胶中, 接下来, 用比色染料考马斯蓝对样品进行染色, 使肉眼和简单的成像设置能够有效地可视化扩张

脑组织的形态细节,并以约 100 μm 的精度手工解剖感兴趣的单个区域,并进行凝胶内消化提取肽段,然后进行 LC-MS/MS 分析和数据处理.最后可将蛋白质组图谱映射到组织形态上.同传统的组织质谱分析方法相比,ProteomEx 被证明了其在绘制哺乳动物组织(包括脑、肝、乳腺癌)形态的定量蛋白质组图谱方面的实用性,并成功应用于阿尔茨海默氏症小鼠的特定脑亚区失调蛋白的鉴定.虽然该方法不依赖于其它特殊的设备,但需要人工显微取样,难以实现全自动化,因而极大限制了样品分析的通量.

(2) 基于标记的分析技术.为了进一步提高单细胞蛋白质组的鉴定深度,在上述提到的单细胞样品制备技术 T-SCP 的基础上, Mann 等^[66]提出了一种使用二甲基标记的多复通路的 mDIA 流程(图 11).他们设计了一种基于 *Lys-N* 介导的蛋白酶解,结合五重二甲基标记的 mDIA 方法($\Delta 0$, $\Delta 2$, $\Delta 4$, $\Delta 6$, $\Delta 8$),并将其与之前开发的 T-SCP 结合.整个样品制备过程包括 Evotips 在线除盐时标记通道的组合都实现了自动化,提高了通量.此外,研究者还引入了 Reference channel 的概念,由所有样本中相同的输入材料组成,通过算法 RefQuant 使得单细胞的蛋白鉴定量增加到了中位数 2377 种,最高鉴定量能达到 4000.最后,研究者将 mDIA 与空间蛋白质组学相结合,将 DVP 的微切割通量提高了 7 倍,将质谱分析通量提高了 4 倍.将其应用于原发性皮肤黑色素瘤,研究者发现了不同肿瘤微环境中细胞的蛋白质组学特征,展示了其在精准肿瘤研究中的潜力.

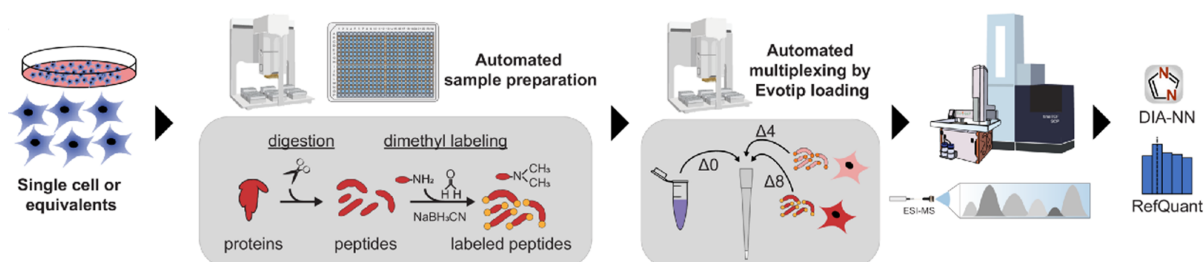


Fig. 11 Schematic diagram of the mDIA workflow^[66]

Copyright 2023, Molecular systems biology.

为了在单细胞分辨率下绘制小鼠肝细胞的蛋白质组图谱,2023年, Mann 团队^[67]在 Nature Methods 上报道了一种 scDVP 的技术. scDVP 的工作流程结合了 T-SCP 和 mDIA,包括新鲜小鼠肝组织的包埋、染色和高分辨显微镜、人工智能引导的肝细胞分割、激光解剖显微镜下细胞的切割和分选以及肽段的制备,后续利用 timsTOF SCP 进行定量分析.此研究在一个切点中最多能鉴定到 2769 个蛋白,在全部切点中共检测到 3738 个蛋白.

另外一种基于标记的非靶向性单细胞分析技术是 SCoPE-MS (Single Cell Proteomics by Mass Spectrometry),该方法通过人工在显微镜下分离单细胞后进行超声裂解、蛋白酶解后进行 TMT 标记,同时在每组 TMT 标记样品中加入载体肽段,既可以为肽序列鉴定提供足够的离子,同时也可减少由于肽段黏附在纳升液相柱上而造成的损失.在后续质谱采集,研究者通过增加离子累积时间而单位时间内定量肽段减少为代价,使其更适用于微量的样品检测,最后采用 SCoPE-MS 对小鼠胚胎干细胞中的 1000 多种蛋白质进行定量^[68].第二代 SCoPE2 在此前的基础上优化实验设计和增强数据解读(图 12).相较于第一代 SCoPE-MS, SCoPE2 将裂解体积降低了 10 倍,耗材和设备的成本降低了 100 倍以上,并通过并行处理将样品制备的通量提高了 100 倍以上. SCoPE2 也引入了一个参考通道,用于质谱

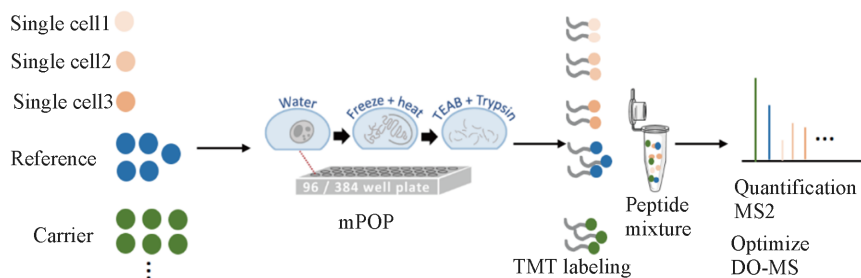


Fig. 12 Schematic diagram of the SCoPE2 workflow

每针样品之间的归一化,并且通过一种数据驱动的MS(DO-MS)优化质谱和色谱参数.利用SCoPE2平均每个单细胞定量超过2500条肽段以及1000个蛋白.最近发表的SCREEN平台是基于此前SCoPE的基础上又做了进一步的改进:采用自动化样品前处理设备;将载体蛋白质组标记通道从131位移动到126位,并从MS2谱图检测中删除该峰,以提高谱图质量,并创造一个环境,使更多的MS2谱图可以在更多的单细胞中被识别,该方法能将蛋白平均鉴定量提高至2900^[69].

3 总结与展望

生物学和病理学过程总是发生在空间环境中.组织中细胞的空间、高分辨率的分子分析将是未来几年生物学的主要前沿研究之一.蛋白作为显示细胞功能最接近的指标,为单细胞生物学增加一个重要的维度.本文综合评述了几种单细胞取样技术,目前也有商业化的全自动单细胞分选仪CellenOne被发布.在所有的取样技术中,LCM更加适用于组织样品的单细胞取样,因而更加常用于单细胞/微量样品空间蛋白组的研究中^[25,61,64,65].而其它几种更适用于分离细胞悬液中单细胞的取样技术无法获得细胞的空间信息.

单细胞空间蛋白质组学的一个关键挑战在于将空间信息与单细胞蛋白质组检测相关联.虽然质谱流式成像(IMC)和质谱成像(IMS)技术可以用于直接分析组织切片,保留质谱测量后被分析物的空间定位信息,但它们的鉴定深度有限^[70,71].IMC依赖于抗体标记,最多只能检测到40~50种蛋白.MALDI-IMS虽然无需标记,但将蛋白质原位消化成肽可能导致分析物脱位,单细胞水平空间分辨率的增加也会导致灵敏度的丧失,从而导致分子信息的丢失^[52].同时,这两种成像技术都不适合用于蛋白的定量.

相较于上述两种分析技术,基于LC-MS/MS检测单细胞分辨的空间蛋白组分析技术具有更深的蛋白鉴定覆盖度,并且更适合用于蛋白定量.而样品的制备是整个分析流程的基础,近年来,许多样品制备的研究致力于提高单细胞蛋白组的鉴定深度和通量,有些需要复杂的微流控装置,有些需要特殊的商业化或改造的设备,也有不依赖于额外设备和装置的前处理方法^[43-60].本文总结的基于LC-MS/MS检测的单细胞空间蛋白质组的分析方法通过改进的质谱分析方法,以及更智能的数据分析和建模工具等,目前已经应用于一些疾病的研究中,在表征组织中单细胞或单细胞类型或状态的能力方面取得了突破^[25,61,64-69].

综上所述,本文综合评述了各种基于质谱的单细胞分辨空间蛋白质组学的分析方法,研究人员需要在空间信息和覆盖深度、通量以及数据采集时间之间进行权衡,以选择最适合的技术进行研究.

感谢复旦大学上海医学院质谱技术平台、上海交通大学临床多组学技术中心质谱平台提供的技术支持.

参 考 文 献

- [1] Regev A., Teichmann S. A., Lander E. S., Amit I., Benoist C., Birney E., Bodenmiller B., Campbell P., Carninci P., Clatworthy M., Clevers H., Deplancke B., Dunham I., Eberwine J., Eils R., Enard W., Farmer A., Fugger L., Gottgens B., Hacohen N., Haniffa M., Hemberg M., Kim S., Klenerman P., Kriegstein A., Lein E., Linnarsson S., Lundberg E., Lundeberg J., Majumder P., Marioni J. C., Merad M., Mhlanga M., Nawijn M., Netea M., Nolan G., Pe'er D., Phillipakis A., Ponting C. P., Quake S., Reik W., Rozenblatt-Rosen O., Sanes J., Satija R., Schumacher T. N., Shalek A., Shapiro E., Sharma P., Shin J. W., Stegle O., Stratton M., Stubbington M. J. T., Theis F. J., Uhlen M., van Oudenaarden A., Wagner A., Watt F., Weissman J., Wold B., Xavier R., Yosef N., *Human Cell Atlas Meeting*, *P. Elife*, **2017**, *6*
- [2] Kaern M., Elston T. C., Blake W. J., Collins J. J., *Nat. Rev. Genet.*, **2005**, *6*(6), 451—464
- [3] Altschuler S. J., Wu L. F., *Cell*, **2010**, *141*(4), 559—563
- [4] *Nat. Methods*, **2021**, *18*(1), 1
- [5] Tang F., Barbacioru C., Wang Y., Nordman E., Lee, C., Xu N., Wang X., Bodeau J., Tuch B. B., Siddiqui A., Lao K., Surani M. A., *Nat. Methods*, **2009**, *6*(5), 377—382
- [6] Mamlouk S., Childs L. H., Aust D., Heim D., Melching F., Oliveira C., Wolf T., Durek P., Schumacher D., Blaker H., von Winterfeld M., Gastl B., Mohr K., Menne A., Zeugner S., Redmer T., Lenze D., Tierling S., Mobs M., Weichert W., Folprecht G., Blanc E.,

- Beule D., Schafer R., Morkel M., Klauschen F., Leser U., Sers C., *Nat. Commun.*, **2017**, *8*, 14093
- [7] Aebersold R., Mann M., *Nature*, **2016**, *537*(7620), 347—355
- [8] Cui L., Lu H., Lee Y. H., *Mass Spectrom. Rev.*, **2018**, *37*(6), 772—792
- [9] Lanekoff I., Sharma V. V., Marques C., *Curr. Opin. Biotechnol.*, **2022**, *75*, 102693
- [10] Davis S., Scott C., Oetjen J., Charles P. D., Kessler B. M., Ansorge O., Fischer R., *Nat. Commun.*, **2023**, *14*(1), 7710
- [11] Vistain L. F., Tay S., *Trends Biochem. Sci.*, **2021**, *46*(8), 661—672
- [12] Yang S., Xiong Y., Du Y., Wang Y. J., Zhang L., Shen F., Liu Y. J., Liu X., Yang P., *Anal. Chem.*, **2022**, *94*(2), 768—776
- [13] Arias-Hidalgo C., Juanes-Velasco P., Landeira-Vinuela A., Garcia-Vaquero M. L., Montalvillo E., Gongora R., Hernandez A. P., Fuentes M., *Int. J. Mol. Sci.*, **2022**, *23*(12), 6707—6725.
- [14] Melby J. A., Brown K. A., Gregorich Z. R., Roberts D. S., Chapman E. A., Ehlers L. E., Gao Z., Larson E. J., Jin Y., Lopez J. R., Hartung J., Zhu Y., McIlwain S. J., Wang D., Guo W., Diffie G. M., Ge Y., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2023**, *120*(19), e2222081120
- [15] Johnson K. R., Gao Y., Gregus M., Ivanov A. R., *Anal. Chem.*, **2022**, *94*(41), 14358—14367
- [16] Brown M., Wittwer C., *Clin. Chem.*, **2000**, *46*(8 Pt 2), 1221—1229
- [17] Valet G., *J. Biol. Regul. Homeost. Agents.*, **2003**, *17*(3), 213—222
- [18] Davey H. M., Kell D. B., *Microbiol. Rev.*, **1996**, *60*(4), 641—696
- [19] Lacombe F., Belloc F., *Hematol. Cell Ther.*, **1996**, *38*(6), 495—504
- [20] McCoy J. P. Jr., Carey J. L., *Immunol. Ser.*, **1990**, *53*, 171—187
- [21] Fröhlich J., König H., *Fems. Microbiol. Rev.*, **2000**, *24*(5), 567—572
- [22] Wright G., Tucker M. J., Morton P. C., Sweitzer-Yoder C. L., Smith S. E., *Curr. Opin. Obstet. Gyn.*, **1998**, *10*(3), 221—226
- [23] Emmert-Buck M. R., Bonner R. F., Smith P. D., Chuaqui R. F., Zhuang Z., Goldstein S. R., Weiss R. A., Liotta L. A., *Science*, **1996**, *274*(5289), 998—1001
- [24] Liu A., *JBT.*, **2010**, *21*(3), 120—125
- [25] Mund A., Coscia F., Kriston A., Hollandi R., Kovacs F., Brunner A. D., Migh E., Schweizer L., Santos A., Bzorek M., Naimy S., Rahbek-Gjerdum L. M., Dyring-Andersen B., Bulkescher J., Lukas C., Eckert M. A., Lengyel E., Gnann C., Lundberg E., Horvath P., Mann M., *Nat. Biotechnol.*, **2022**, *40*(8), 1231—1240
- [26] Hu P., Zhang W., Xin H., Deng G., *Front. Cell Dev. Biol.*, **2016**, *4*, 116
- [27] Bandura D. R., Baranov V. I., Ornatsky O. I., Antonov A., Kinach R., Lou X., Pavlov S., Vorobiev S., Dick J. E., Tanner S. D., *Anal. Chem.*, **2009**, *81*(16), 6813—6822
- [28] Yoshida Y., Yoshio S., Yamazoe T., Mori T., Tsustui Y., Kawai H., Yoshikawa S., Fukuhara T., Okamoto T., Ono Y., Takahashi Y., Hashida R., Kawaguchi T., Taketomi A., Kanto T., *Cells*, **2021**, *10*(6), 1495
- [29] Spitzer M. H., Gherardini P. F., Fragiadakis G. K., Bhattacharya N., Yuan R. T., Hotson A. N., Finck R., Carmi Y., Zunder E. R., Fantl W. J., Bendall S. C., Engleman E. G., Nolan G. P., *Science*, **2015**, *349*(6244), 1259425
- [30] Bodenmiller B., Zunder E. R., Finck R., Chen T. J., Savig E. S., Bruggner R. V., Simonds E. F., Bendall S. C., Sachs K., Krutzik P. O., Nolan G. P., *Nat. Biotechnol.*, **2012**, *30*(9), 858—867
- [31] Krishnaswamy S., Spitze, M. H., Mingueneau M., Bendall S. C., Litvin O., Stone E., Pe'er D., Nolan G. P., *Science*, **2014**, *346*(6213), 1250689
- [32] Giesen C., Wang H. A., Schapiro D., Zivanovic N., Jacobs A., Hattendorf B., Schuffler P. J., Grolimund D., Buhmann J. M., Brandt S., Varga Z., Wild P. J., Gunther D., Bodenmiller B., *Nat. Methods*, **2014**, *11*(4), 417—422
- [33] Lohani V., Anikumar R. A., Kundu S., Akhter M. Q., Bag S., *ACS Omega*, **2023**, *8*(20), 17499—17510
- [34] Norris J. L., Caprioli R. M., *Chem. Rev.*, **2013**, *113*(4), 2309—2342
- [35] Flatley B., Malone P., Cramer R., *Biochimica. Et. biophysica. Acta.*, **2014**, *1844*(5), 940—949
- [36] Schnackenberg L. K., Thorn D. A., Barnette D., Jones E. E., *Metab. Brain. Dis.*, **2022**, *37*(1), 105—121
- [37] Zhu X., Xu T., Peng C., Wu S., *Front. Chem.*, **2021**, *9*, 782432
- [38] Moginger U., Marcussen N., Jensen O. N., *Oncotarget*, **2020**, *11*(44), 3998—4015
- [39] Hoffmann F., Umbreit C., Kruger T., Pelzel D., Ernst G., Kniemeyer O., Guntinas-Lichius O., Berndt A., von Eggeling F., *Proteomics Clin. Appl.*, **2019**, *13*(1), e1700173
- [40] Malaker S. A., Quanico J., Raffo-Romero A., Kobeissy F., Aboulouard S., Tierny D., Bertozzi C. R., Fournier I., Salzet M., *Cell Chem. Biol.*, **2022**, *29*(1), 30—42 e34
- [41] Kompauer M., Heiles S., Spengler B., *Nat. Methods*, **2017**, *14*(1), 90—96
- [42] Mund A., Brunner A. D., Mann M., *Mol. Cell*, **2022**, *82*(12), 2335—2349
- [43] Li Z. Y., Huang M., Wang X. K., Zhu Y., Li J. S., Wong C. C. L., Fang Q., *Anal. Chem.*, **2018**, *90*(8), 5430—5438
- [44] Wang Y., Guan Z. Y., Shi S. W., Jiang Y. R., Zhang J., Yang Y., Wu Q., Wu J., Chen J. B., Ying W. X., Xu Q. Q., Fan Q. X., Wang H. F., Zhou L., Wang L., Fang J., Pan J. Z., Fang Q., *Nat. Commun.*, **2024**, *15*(1), 1279
- [45] Zhu Y., Piehowski P. D., Zhao R., Chen J., Shen Y., Moore R. J., Shukla A. K., Petyuk V. A., Campbell-Thompson M., Mathews C. E., Smith R. D., Qian W. J., Kelly R. T., *Nat. Commun.*, **2018**, *9*(1), 882
- [46] Zhu Y., Clair G., Chrisler W. B., Shen Y., Zhao R., Shukla A. K., Moore R. J., Misra R. S., Pryhuber G. S., Smith R. D., Ansong C.,

- Kelly R. T., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **2018**, *57*(38), 12370—12374
- [47] Truong T., Webber K. G. I., Madisyn Johnston S., Boekweg H., Lindgren C. M., Liang Y., Nydegger A., Xie X., Tsang T. M., Jayatunge D., Andersen J. L., Payne S. H., Kelly R. T., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **2023**, *62*(34), e202303415
- [48] Zhu Y., Dou M., Piehowski P. D., Liang Y., Wang F., Chu R. K., Chrisler W. B., Smith J. N., Schwarz K. C., Shen Y., Shukla A. K., Moore R. J., Smith R. D., Qian W. J., Kelly R. T., *Mol. Cell Proteomics*, **2018**, *17*(9), 1864—1874
- [49] Xu K., Liang Y., Piehowski P. D., Dou M., Schwarz K. C., Zhao R., Sontag R. L., Moore R. J., Zhu Y., Kelly R. T., *Anal. Bioanal. Chem.*, **2019**, *411*(19), 4587—4596
- [50] Liang Y., Zhu Y., Dou M., Xu K., Chu R. K., Chrisler W. B., Zhao R., Hixson K. K., Kelly R. T., *Anal. Chem.*, **2018**, *90*(18), 11106—11114
- [51] Gebreyesus S. T., Siyal A. A., Kitata R. B., Chen E. S., Enkhbayar B., Angata, T., Lin K. I., Chen Y. J., Tu H. L., *Nat. Commun.*, **2022**, *13*(1), 37
- [52] Yang Z., Jin K., Chen Y., Liu Q., Chen H., Hu S., Wang Y., Pan Z., Feng F., Shi M., Xie H., Ma H., Zhou H., *JACS Au*, **2024**, *4*(5), 1811—1823
- [53] Brunner A. D., Thielert M., Vasilopoulou C., Ammar C., Coscia F., Mund A., Hoerning O. B., Bache N., Apalategui A., Lubeck M., Richter S., Fischer D. S., Raether O., Park M. A., Meier F., Theis F. J., Mann M., *Mol. Syst. Biol.*, **2022**, *18*(3), e10798
- [54] Specht H., Harmange G., Perlman D. H., Emmott E., Niziolek Z., Budnik B., Slavov N., *bioRxiv.*, **2018**, doi: org/10.1101/399774.
- [55] Leduc A., Huffman R. G., Cantlon J., Khan S., Slavov N., *Genome Biol.*, **2022**, *23*(1), 261—290
- [56] Ye Z., Sabatier P., Martin-Gonzalez J., Eguchi A., Lechner M., Ostergaard O., Xie J., Guo Y., Schultz L., Truffer R., Bekker-Jensen D. B., Bache N., Olsen J. V., *Nat. Commun.*, **2024**, *15*(1), 2474
- [57] Shao X., Wang X., Guan S., Lin H., Yan G., Gao M., Deng C., Zhang X., *Anal. Chem.*, **2018**, *90*(23), 14003—14010
- [58] Masuda T., Inamori Y., Furukawa A., Yamahiro M., Momosaki K., Chang C. H., Kobayashi D., Ohguchi H., Kawano Y., Ito S., Araki N., Ong S. E., Ohtsuki S., *Anal. Chem.*, **2022**, *94*(29), 10329—10336
- [59] Tsai C. F., Zhang P., Scholten D., Martin K., Wang Y. T., Zhao R., Chrisler W. B., Patel D. B., Dou M., Jia Y., Reduzzi C., Liu X., Moore R. J., Burnum-Johnson K. E., Lin M. H., Hsu C. C., Jacobs J. M., Kagan J., Srivastava S., Rodland K. D., Steven Wiley H., Qian W. J., Smith R. D., Zhu Y., Cristofanilli M., Liu T., Liu H., Shi T., *Commun. Biol.*, **2021**, *4*(1), 265
- [60] Yang S., Han Y., Li Y., Zhang L., Yan G., Yuan J., Luo Q., Shen H., Liu X., *Anal. Chem.*, **2023**, *95*(28), 10703—10712
- [61] Bhatia H. S., Brunner A. D., Ozturk F., Kapoor S., Rong Z., Mai H., Thielert M., Ali M., Al-Maskari R., Paetzold J. C., Kofler F., Todorov M. I., Molbay M., Kolabas Z. I., Negwer M., Hoehner L., Steinke H., Dima A., Gupta B., Kaltenecker D., Caliskan O. S., Brandt D., Krahrer N., Muller S., Lichtenthaler S. F., Hellal F., Bechmann I., Menze B., Theis F., Mann M., Erturk A., *Cell*, **2022**, *185*(26), 5040—5058
- [62] Meding S., Martin K., Gustafsson O. J., Eddes J. S., Hack S., Oehler M. K., Hoffmann P., *J. Proteome Res.*, **2013**, *12*(1), 308—315
- [63] Rauser S., Marquardt C., Balluff B., Deininger S. O., Albers C., Belau E., Hartmer R., Suckau D., Specht K., Ebert M. P., Schmitt M., Aubele M., Hoffer H., Walch A., *J. Proteome Res.*, **2010**, *9*(4), 1854—1863
- [64] Piehowski P. D., Zhu Y., Bramer L. M., Stratton K. G., Zhao R., Orton D. J., Moore R. J., Yuan J., Mitchell H. D., Gao Y., Webb-Robertson B. M., Dey S. K., Kelly R. T., Burnum-Johnson K. E., *Nat. Commun.*, **2020**, *11*(1), 8
- [65] Li L., Sun C., Sun Y., Dong Z., Wu R., Sun X., Zhang H., Jiang W., Zhou Y., Cen X., Cai S., Xia H., Zhu Y., Guo T., Piatkevich K. D., *Nat. Commun.*, **2022**, *13*(1), 7242
- [66] Thielert M., Itang E. C., Ammar C., Rosenberger F. A., Bludau I., Schweizer L., Nordmann T. M., Skowronek P., Wahle M., Zeng W. F., Zhou X. X., Brunner A. D., Richter S., Levesque M. P., Theis F. J., Steger M., Mann M., *Mol. Syst. Biol.*, **2023**, *19*(9), e11503
- [67] Rosenberger F. A., Thielert M., Strauss M. T., Schweizer L., Ammar, C., Madler S. C., Metousis A., Skowronek P., Wahle M., Madden K., Gote-Schniering J., Semenova A., Schiller H. B., Rodriguez E., Nordmann T. M., Mund A., Mann M., *Nat. Methods*, **2023**, *20*(10), 1530—1536
- [68] Budnik B., Levy E., Harmange G., Slavov N., *Genome Biol.*, **2018**, *19*(1), 161
- [69] Petelski A. A., Emmott E., Leduc A., Huffman R. G., Specht H., Perlman D. H., Slavov N., *Nat. Protoc.*, **2021**, *16*(12), 5398—5425
- [70] Amstalden van Hove E. R., Smith D. F., Heeren R. M., *J. Chromatogr. A*, **2010**, *1217*(25), 3946—3954
- [71] Vaysse P. M., Heeren R. M. A., Porta T., Balluff B., *Analyst*, **2017**, *142*(15), 2690—2712

(Ed.: V, K, S)