

# 利用无标记单细胞蛋白质组学方法构建小鼠外周血单个核细胞的细胞图谱

黄玉滢<sup>1,2</sup>, 于成鲲<sup>1,2</sup>, 刘斯奇<sup>2,3</sup>, 任艳<sup>2,4</sup>

(1. 浙江工业大学药学院, 杭州 310000;

2. 中国科学院杭州医学研究所, 杭州 310000;

3. 华大基因科技有限公司, 深圳 518000;

4. 上海中医药大学科技实验中心, 上海 200120)

**摘要** 采用抗体荧光标记法分离出T细胞、B细胞、自然杀伤细胞和树突状细胞. 使用CellenONE单细胞分选系统分选出相应的单细胞, 在分选过程中应用了质谱兼容的肽段包被单细胞蛋白质组学(Mad-CASP)技术. 将高疏水性肽段预先加入至分选的孔板中, 从而减少了蛋白在孔板和色谱柱上的吸附. 提取出单细胞蛋白并进行酶解, 采用液相色谱-质谱联用(LC-MS/MS)技术对获得的肽段进行数据采集, 并利用Maxquant软件中的谱图库及“运行中匹配”功能进行了蛋白质的搜库鉴定. 采用维恩图和统一流形近似与投影(UMAP)技术分析了4种细胞的蛋白表达差异, 对细胞的特异性蛋白进行了分子特征数据库小鼠免疫通路富集, 并对计数排序前2名的通路进行了分析, 同时利用模糊C均值聚类方法和京都大学基因与基因组数据库(KEGG)通路富集分析了免疫细胞共享蛋白定量值的变化, 绘制了专属于小鼠外周血单个核细胞的单细胞蛋白质组学图谱. 研究结果对深入理解免疫细胞的功能特征和发现疾病相关的关键蛋白标记物具有重要价值.

**关键词** 小鼠外周血单个核细胞; 质谱兼容的肽段包被单细胞蛋白质组学; 细胞图谱

中图分类号 O657

文献标志码 A

doi: 10.7503/cjcu20240355

## Cell Map of Mouse Peripheral Blood Mononuclear Cells with a Label-free Single-cell Proteomics Method

HUANG Yuying<sup>1,2</sup>, YU Chengkun<sup>1,2</sup>, LIU Siqu<sup>2,3</sup>, REN Yan<sup>2,4\*</sup>

(1. College of Pharmacy Science, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310000, China;

2. Hangzhou Institute of Medicine, Chinese Academy of Sciences, Hangzhou 310000, China;

3. Beijing Genomics Institute Technology Co., Ltd., Shenzhen 518000, China;

4. Science and Technology Experimental Center, Shanghai University of

Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200120, China)

**Abstract** Fluorescently labeled antibodies were used to isolate T cells, B cells, natural killer cells, and dendritic cells. Single cells were then sorted using the CellenONE single-cell sorting system. During the sorting process, an approach of mass-adaptive coating-assisted single-cell proteomics (Mad-CASP) was pre-added to the wells of the sorting plate to reduce subsequent protein adsorption to the plate and chromatography column. The single-cell proteins were extracted and digested, and the resulting peptides were analyzed using a liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). Protein identification was conducted using the Maxquant software's spectral library function in combination with the "match-between-runs" feature. Venn diagrams and UMAP (Uniform manifold

收稿日期: 2024-07-15. 网络首发日期: 2024-09-02.

联系人简介: 任艳, 女, 博士, 研究员, 主要从事物质谱和蛋白质组学方面的研究. E-mail: reny@genomics.cn

基金项目: 国家自然科学基金(批准号: 32371500)资助.

Supported by the National Natural Science Foundation of China(No.32371500).

approximation and projection) were employed to analyze the protein expression differences among the four cell types. The specific proteins of each cell type were subjected to molecular signature database mouse immune pathway enrichment, with the top two pathways selected for further analysis. Simultaneously, fuzzy C-means clustering and KEGG(Kyoto encyclopedia of genes and genomes) pathway enrichment were used to analyze the quantitative changes of shared proteins among immune cells. Finally, a single-cell proteomics map specifically for mouse peripheral blood mononuclear cells was generated, providing significant insights into understanding the functional characteristics of immune cells and identifying key protein markers related to diseases.

**Keywords** Mouse peripheral blood mononuclear cells; Mass-adaptive coating-assisted single-cell proteomics; Cell map

在生物医学研究中,免疫学是研究热点之一.小鼠是免疫学研究的典型动物模型,其外周血单个核细胞(Mouse peripheral blood mononuclear cells, mPBMCs)含有机体内的主要免疫细胞,如T细胞、B细胞、NK细胞(Nature killer cells)和DC细胞(Dendritic cells)等关键细胞亚群.通过研究mPBMCs,可深入了解免疫细胞的活化、增殖、分化及分泌细胞因子等功能特点.细胞具有显著的异质性,不同的免疫细胞具有不同的作用.单细胞核糖核酸(RNA)测序可测量出每个单细胞的基因表达水平,Teo等<sup>[1]</sup>对4只不同年龄小鼠的mPBMCs进行了单细胞测序,鉴别出5个T细胞簇、4个B细胞簇、1个NK细胞簇、1个DC细胞簇、1个单核细胞簇和1个巨噬细胞簇等,该结果证明了mPBMCs细胞种类的多样性.T细胞是主要免疫细胞亚群,负责细胞免疫应答,能够识别和清除感染细胞及肿瘤细胞,其分为CD4+辅助T细胞、CD8+细胞毒性细胞和调节性T细胞<sup>[2-4]</sup>.B细胞可在体液免疫应答中发挥作用,其分化的浆细胞可分泌抗体,并与抗原结合<sup>[5]</sup>.DC细胞可激活T细胞免疫应答.NK细胞可直接识别和溶解肿瘤细胞及感染细胞.对上述免疫细胞功能机制的研究对于开发治疗疾病的新方法具有重要意义.基因测序技术虽然可揭示基因表达,但却无法提供关于蛋白质组成和生物学功能的准确信息<sup>[6,7]</sup>.作为基因表达的最终产物,蛋白质不仅反映了机体的生命活动,还可能通过复杂的反馈机制影响基因表达.因此,需要开发在单细胞水平上分析mPBMCs细胞内蛋白及膜蛋白质的方法,这种对单细胞蛋白质组的研究将为疾病的诊断和治疗提供新途径<sup>[8]</sup>.

传统的蛋白质检测方法依赖于抗体检测特定蛋白质,通常仅能检测到细胞中的几十种蛋白质<sup>[9,10]</sup>.基于质谱的蛋白定量分析方法可鉴定和定量检测单细胞中成百上千种蛋白质,因而在单细胞蛋白质组学中具有更大潜力<sup>[11]</sup>.基于质谱的蛋白定量分析方法可分为标记定量<sup>[12,13]</sup>和无标记定量.随着样本制备技术、肽分离技术和仪器的不断发展,无标记蛋白定量方法的应用已成为目前单细胞蛋白质组学研究的热点<sup>[14,15]</sup>.

本文采用超低损失的无标记单细胞蛋白质定量方法对mPBMCs进行了研究.小鼠为哺乳动物,其细胞直径通常为10~15  $\mu\text{m}$ <sup>[16]</sup>,单细胞仅含有几十至几百pg蛋白<sup>[17]</sup>.因此,在研究单细胞蛋白质组学时,如何减少蛋白质的损失成为巨大挑战.CellenONE单细胞分选仪器可根据伸长率分辨活细胞,可准确识别单细胞和相应直径,进行参数优化后,该系统的细胞正确捕获率可达99.7%,实现了单细胞蛋白质组学样本制备的自动化<sup>[18]</sup>.在样本制备过程中,还可采用减少蛋白吸附的方法减少损失,如质谱兼容的肽段包被单细胞蛋白质组学技术(Mass-adaptive coating-assisted single-cell proteomics, Mad-CASP)是一种有效减少蛋白质损失的方法<sup>[19]</sup>.液相色谱-质谱联用(LC-MS)技术是目前研究蛋白质组学的重要工具.肽段经 $\text{C}_{18}$ 色谱柱分离后,通过电喷雾离子源电离产生多电荷离子<sup>[20]</sup>,这些离子被递送至质谱仪中进行一级检测、二级碎裂和检测,进而产生多个谱图.将这些谱图与搜库软件中的理论数据进行比对和打分<sup>[21]</sup>,可得出准确的肽段和蛋白序列信息.在数据分析中,MaxQuant软件和MaxLFQ算法被广泛应用于无标记定量单细胞蛋白质组学研究中<sup>[20,22]</sup>,其中“运行中匹配(Match-between-runs, MBR)”功能可对LC-MS/MS检测到的肽段进行精确的保留时间校准和质量漂移校正,并在不同运行之间匹配相同的肽段且对匹配到的肽段进行定量分析,同时还可对样本的其它信息进行合理的缺失值填补,并将结果汇总至蛋白质水平,显著提高了单细胞蛋白质定量分析的覆盖范围和精度.

## 1 实验部分

### 1.1 试剂与仪器

ICR 小鼠 mPBMCs, 立沃生物科技(深圳)有限公司; FITC anti-mouse CD3 荧光抗体标记试剂(0.5 mg/mL), Alexa Fluor<sup>®</sup> 700 anti-mouse CD19 荧光抗体标记试剂(0.5 mg/mL), PE/Cyanine7 anti-mouse CD49b 荧光抗体标记试剂(0.2 mg/mL)和 Brilliant Violet 421<sup>™</sup> anti-mouse CD11c 荧光抗体标记试剂(0.2 mg/mL), 美国 Biolegend 公司; 乙腈(ACN)和甲酸(FA), 均为色谱纯, 美国 Thermo 公司; P25861 合成肽段(色谱纯)、三羟甲基氨基甲烷(Thiourea, 生物技术纯)和三(羟甲基)氨基甲烷(Tris, 纯度 99%), 生物工程(上海)有限公司; 二硫苏糖醇(DTT, 试剂纯), 瑞士 Roche 公司; Tripsin 酶(质谱纯)和碘乙酰胺(IAM, 纯度 99%), 美国 Promega 公司; 四乙基溴化铵(TEAB, 1 mol/L), 美国赛默飞公司; 十二烷基- $\beta$ -D-麦芽糖苷(DDM, 纯度 99%), 意大利 Merck 公司; 尿素(Urea, 纯度 99%), 山东科源生化有限公司; 磷酸缓冲溶液(PBS, 标准浓度 1 $\times$ ), 美国 Gibco 公司; BCA 蛋白定量试剂盒, 上海碧云天生物科技有限公司。

F1.4 型 CellenONE 单细胞分选仪, 德国 Cellenion 公司; Agilent 1260 型高效液相色谱仪(HPLC), 美国 Agilent 公司; EASY-nLC 1200 型高效液相色谱仪和 Orbitrap Eclipse 型高分辨质谱仪(MS), 美国 Thermo 公司; Countstart Rigel S5 型荧光细胞分析仪, 上海睿钰生物科技有限公司。

### 1.2 实验过程

1.2.1 mPBMCs 的获取 先将 10 mL 完全培养基预热. 从液氮中快速取出 ICR mPBMCs, 于 37 °C 水浴解冻, 将解冻后的细胞缓慢滴加至预热好的复苏培养基中, 以 650g 离心 5 min, 弃去上层清液, 加入 1 mL PBS 缓冲液重悬细胞, 使用台盼蓝进行细胞计数。

1.2.2 细胞抗体荧光标记 将 4 份 100  $\mu$ L 细胞悬液分别置于 4 个 15 mL 离心管中, 分别加入对应浓度的 FITC anti-mouse CD3, Alexa Fluor<sup>®</sup> 700 anti-mouse CD19, PE/Cyanine7 anti-mouse CD49b 和 Brilliant Violet 421<sup>™</sup> anti-mouse CD11c 用以标记细胞, 于 4 °C 避光孵育 20 min, 加入 2 mL PBS 缓冲液, 以 350g 转速离心 5 min, 弃去上层清液, 加入 200  $\mu$ L PBS 缓冲液重悬细胞, 避光保存于冰盒中, 待分选。

1.2.3 单细胞的分选和肽段的制备 将 5 mg 高疏水性肽段用 50%(体积分数)ACN 配制成 2  $\mu$ g/ $\mu$ L 溶液, 用超纯水稀释至 0.2  $\mu$ g/ $\mu$ L, 向 384 孔板中加入 15  $\mu$ L 高疏水性肽段溶液, 于 4 °C 孵育 8 h 后吸干液体, 置于超净台中 10 min 至完全风干. 向含有高疏水性肽段的 384 孔板中加入 1  $\mu$ L 0.2 mol/L TEAB 溶液, 利用单细胞分选仪分选出 4 种抗体荧光标记的细胞, 入孔后瞬离. 向含有单细胞的孔中加入 1  $\mu$ L 混合溶液[10  $\mu$ L 100 ng/ $\mu$ L Tripsin 酶+20  $\mu$ L 1%(质量分数)DDM+10  $\mu$ L 1 mol/L TEAB+60  $\mu$ L 超纯水], 于 37 °C 水浴 2 h 得到肽段溶液, 待质谱分析。

1.2.4 建库组分肽段的制备 将分选剩余的细胞和未进行分选的细胞置于离心管中, 离心弃去上层清液, 加入 L3 裂解液[42%(质量分数)Urea+15.2%(质量分数)Thiourea+0.24%(质量分数)Tris 缓冲液+超纯水]和蛋白酶抑制剂, 超声 10 min, 以 2500g 转速离心 15 min, 收集上层清液并加入 DTT, 于 55 °C 水浴反应 30 min. 加入 IAM, 置于暗室中反应 15 min. 用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度, 将 100  $\mu$ g 蛋白液加入至 10 kDa 超滤管中, 以 1200g 转速离心 20 min, 加入 100  $\mu$ L TEAB, 离心 3 次, 加入 100  $\mu$ L Tripsin 酶解液, 酶解 12 h 得到肽段溶液, 将其冷冻抽干. 使用 HPLC 分离样品, 流动相 A 为 5%(体积分数)ACN 溶液(pH=9.8), 分离柱为 Gemini C18 柱(4.6 mm $\times$ 250 mm, 5  $\mu$ m), 流速为 1 mL/min, 流动相 C 为 95%(体积分数)ACN 溶液(pH=9.8), 梯度洗脱条件: 10 min, 5%C; 40 min, 5%~35%C; 1 min, 35%~95%C; 3 min, 100%C; 10 min, 5%C. 在 214 nm 波长下监测洗脱峰并每分钟收集一个组分, 按照色谱洗脱峰图合并样品, 得到 10 个组分, 将其冷冻抽干得肽段干粉, 待质谱分析。

1.2.5 高分辨质谱分析 用 0.1%(体积分数)FA 溶液将建库组分肽段稀释, 使用 HPLC 的单柱模式进行分离. 柱温 50 °C, 分离柱为自装 C<sub>18</sub> 柱(1.9  $\mu$ m $\times$ 75  $\mu$ m $\times$ 250 mm), 流动相 A 为 0.1%FA 溶液, 流速 250 nL/min, 梯度洗脱条件: 5 min, 4%~10%B(80% ACN 溶液+0.1% FA 溶液); 80 min, 10%~30%B;

15 min, 30%~40%B; 10 min, 40%~100%B; 10 min, 100%B. 经液相色谱分离的肽段通过 nanoESI 源离子化后, 使用串联质谱仪进行检测. 质谱分析采用数据依赖采集 (DDA) 模式, 主要参数设置: 离子源电压 2000 V, 一级质谱扫描范围  $m/z$  350~1500, 分辨率 12000, MS 动态增益控制 (AGC) 目标强度 Custom, MS 最大离子注入时间 50 ms, 二级质谱起始  $m/z$  120, 分辨率 30000. MS/MS AGC 目标强度 Custom, MS/MS 最大离子注入时间 100 ms. 二级碎裂的母离子筛选条件: 电荷  $2^+ \sim 7^+$ , 离子碎裂模式 HCD, 在质谱仪中检测碎片离子, 碎裂能量 28%, 分离窗口  $m/z$  1.6, 动态排除时间 60 s.

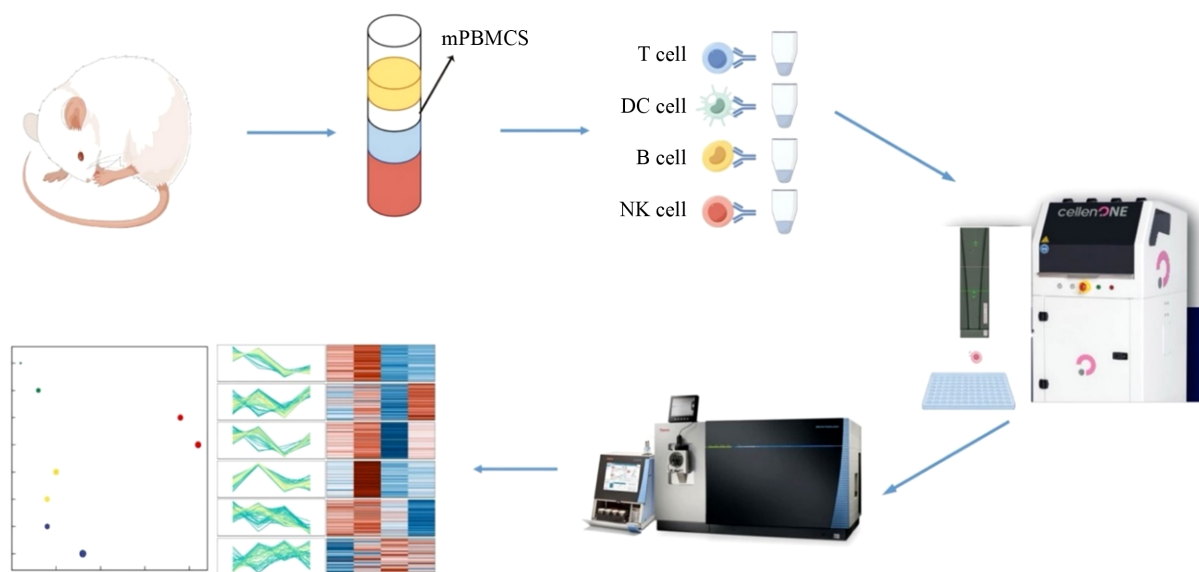
用 0.1% (体积分数) FA 溶液稀释单细胞肽段溶液, 采用与建库组分相同的液相色谱方法进行分离, 质谱分析采用 DDA 模式, 主要参数设置: 离子源电压 2000 V, 一级质谱扫描范围  $m/z$  350~1500, 分辨率 24000, MS AGC 目标强度 Custom, MS 最大离子注入时间 150 ms. 二级质谱起始  $m/z$  100, 分辨率 30000, MS/MS AGC 目标强度 Custom, MS/MS 最大离子注入时间 100 ms. 二级碎裂的母离子筛选条件: 电荷  $2^+ \sim 7^+$ , 离子碎裂模式 HCD, 在质谱仪中进行检测碎片离子, 碎裂能量 28%, 分离窗口  $m/z$  1.6, 动态排除时间 60 s.

1.2.6 数据的检索和分析 采用 MaxQuant (2.0.1.0) 搜库软件对质谱原始数据进行检索, 采用 UniProt 数据库 (2022 年, UP000005640\_9606) 进行肽段注释, 检索条件: 胰酶酶切, 最小肽段长度为 7 个氨基酸; 允许不大于 2 个漏切位点; 可变修饰为蛋氨酸的氧化和肽段 N-端的乙酰化; 选中 MBR; FDR 设置为 1%. 采用生信手段对蛋白定量表格进行 UMAP 分析, 采用维恩图和通路富集分析.

## 2 结果与讨论

### 2.1 实验过程

采用无标记单细胞蛋白质组学定量方法对 mPBMCs 进行了研究. 为了减少蛋白损失, 实验中采用了 Mad-CASP 技术, 在分选细胞前向 384 孔板中加入高疏水性的肽段并孵育, 随后去除肽段溶液并抽干, 使肽段附着在管壁上. 对获取的小鼠外周血单个核细胞进行计数, 并采用荧光标记法分选出 T 细胞、B 细胞、NK 细胞和 DC 细胞, 将其分选至预先处理好的 384 孔板中, 向每个孔内加入带蛋白酶的细胞裂解液以提取和酶解蛋白, 得到的肽段溶液经 LC-MS/MS 采集数据后, 使用 Maxquant 软件搜库分析. 在数据处理过程中, 加入了建库组分的数据并勾选运行中匹配功能 (MBR), 在搜库时常规量数据的二级谱图可形成谱图库供单细胞数据检索, 从而获得更多蛋白鉴定结果. 最终得到的蛋白定量表格可通过生物信息学手段绘制出 mPBMCs 的单细胞蛋白质组学图谱, 实验过程如 Scheme 1 所示.



Scheme 1 Single-cell proteomics preparation and analysis process for mPBMCs

## 2.2 细胞类型分选

据文献[18]报道,细胞中的蛋白数量取决于细胞体积的大小,淋巴细胞最低仅有20 pg蛋白.为了精确获取单细胞,实验中使用了CellenONE单细胞分选仪.该仪器能够生成微小液滴,每个液滴内包含一个细胞或少量样本.利用高速成像技术,单细胞分选仪可对每个液滴内的细胞进行实时检测,获取细胞的大小信息和荧光信号.在使用单细胞分选仪对mPBMCs进行检测时,发现mPBMCs的直径约为8~15  $\mu\text{m}$ ,伸长率为1.0~3.0(图1,  $n=391$ ).上述数据表明了mPBMCs体积的多样性和蛋白质含量的异质性.图2(A)示出了单细胞被分选入孔中的情况,图2(B)显示该细胞带有荧光信号,证明了分选过程的有效性和准确性.

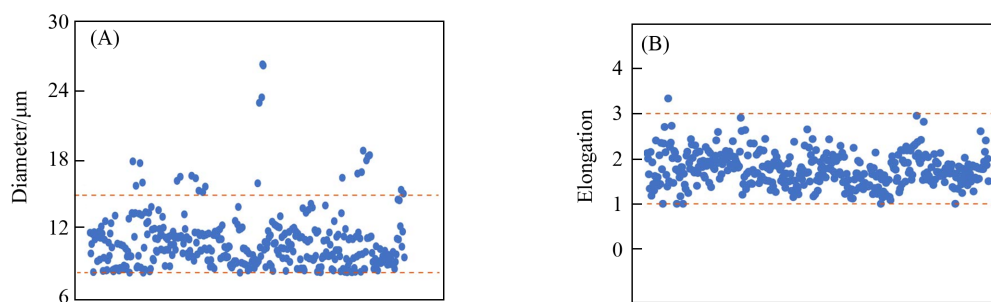


Fig. 1 Distribution of diameter(A) and elongation rate(B) of 391 mPBMCs obtained from CellenONE

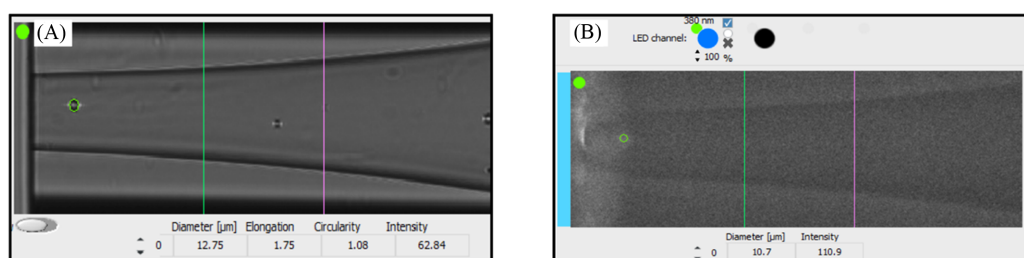


Fig. 2 Page of CellenONE sorting individual mPBMCs with fluorescent signals

(A) Sorting of cells; (B) recognition of fluorescence.

## 2.3 Mad-CASP技术减少蛋白损失

Mad-CASP技术的关键在于分选细胞前在384孔板中预先加入一定浓度的高疏水性肽段,主要原因如下:(1)合成肽段的高疏水性减少了由于蛋白质结合或黏附至孔板孔内而导致的样品损失;(2)在被胰蛋白酶消化后,高疏水性肽段可作为载体,减少了由于黏附至色谱柱侧面而导致的单细胞肽段的损失;(3)在质谱参数中, $m/z$ 设置较低,高疏水性肽段可在质谱数据采集中被排除,不会对单细胞肽段的鉴定产生影响.实验结果(图3)表明,该技术可明显降低细胞蛋白的损失,对去除污染库后的蛋白数据进行蛋白数目统计,可见用多肽涂层的单细胞蛋白鉴定数比普通处理的鉴定数多1倍,同时NK细胞蛋白可鉴定的蛋白最少,DC细胞可鉴定更多蛋白.

## 2.4 UMAP分析和维恩图分析

UMAP<sup>[23]</sup>用于将高维蛋白数据映射至低维空间,可使蛋白相近的数据聚成一簇,如图4(A)所示,每个点代表一个单细胞,点的颜色编码了该细胞中特定蛋白质的表达水平.图中形成了4个聚类簇,分别代表4种细胞,不同细胞群体表现出一定的功能异质性.通过分析上述聚类簇,可发现不同细胞

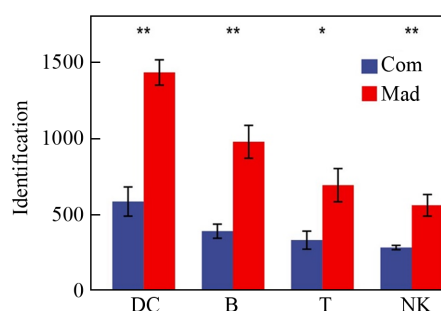


Fig. 3 Comparison of the number of protein identifications between the common pretreatment technique and the Mad-CASP technique

The error bars represent the standard deviation.

\* indicates  $P < 0.05$ , \*\* indicates  $P < 0.01$ ,  $n=5$ .

在免疫调节和炎症反应等生理过程中潜在的功能差异, 该结果有助于深入理解其异质性及在免疫机制中的作用. 为了研究 mPBMCs 中不同类型细胞的蛋白差异, 分选出 4 种细胞并对蛋白数据进行了统计. 如图 4(B) 所示, T 细胞共鉴定到 1508 个蛋白, B 细胞共鉴定到 1756 个蛋白, NK 细胞共鉴定到 1423 个蛋白, DC 细胞共鉴定到 2831 个蛋白. 维恩图分析结果显示, T 细胞有 199 个特异性蛋白, B 细胞有 214 个特异性蛋白, NK 细胞有 208 个特异性蛋白, 共享蛋白共有 555 个.

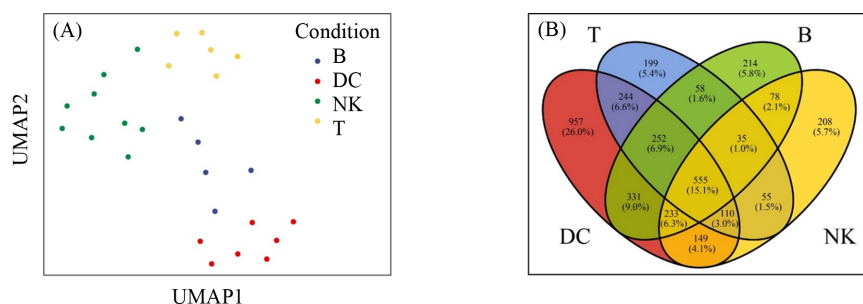


Fig. 4 UMAP analysis for clustering based on protein 2D analysis(A) and Venn diagram to analyze protein differences between different cells(B)

## 2.5 通路富集分析

对图 4(B) 中每种细胞的特异性蛋白进行了分子特征数据库 (Molecular signatures database, msigdb) 小鼠免疫通路富集<sup>[24]</sup>,  $P$  阈值设定为 0.05, 用计数排序前 2 的通路绘制了富集气泡图 (图 5). 在 GSE27786 数据集中找出了 NK 细胞的特异性基因, 显示 NK 细胞在免疫功能调节时与其它细胞存在差异, 基于此可进一步研究 NK 细胞的免疫调节作用. 对 DC 细胞特异性蛋白进行发现, DC 细胞在细胞毒性 T 细胞 (CTL) 免疫应答中起到关键作用, 可有效激活 CTL, 细胞因子干扰素  $\beta$ -1 (IFNB1) 是重要的抗病毒细胞因子<sup>[25]</sup>, 在 DC 细胞功能调控方面具有重要作用. 此外, DC 细胞是专业抗原递呈细胞<sup>[26]</sup>, 在初始 T 细胞激活和记忆 T 细胞维持中具有重要作用, 在 GSE3982 数据集中找出了树突状细胞与记忆 T 细胞的差异表达通路. 在对免疫功能强大的 T 细胞进行富集时找出了 T 细胞特异性蛋白对应的下调基因, 说明转化生长因子- $\beta$  (TGF- $\beta$ )<sup>[27]</sup> 在 CD4+ T 细胞分化和功能调控中具有重要作用, 以及 CD8+ T 细胞从急性效应向记忆转化过程中的功能变化, 有助于研究自身免疫性疾病的发病机制和发现潜在的治疗靶标. 通过对 B 细胞的特异性蛋白进行通路富集, 找出了 B 细胞向浆细胞分化过程中的通路以及与 DC 细胞表达差异的通路, 其与 B 细胞的免疫应答调节机制的功能有所关联.

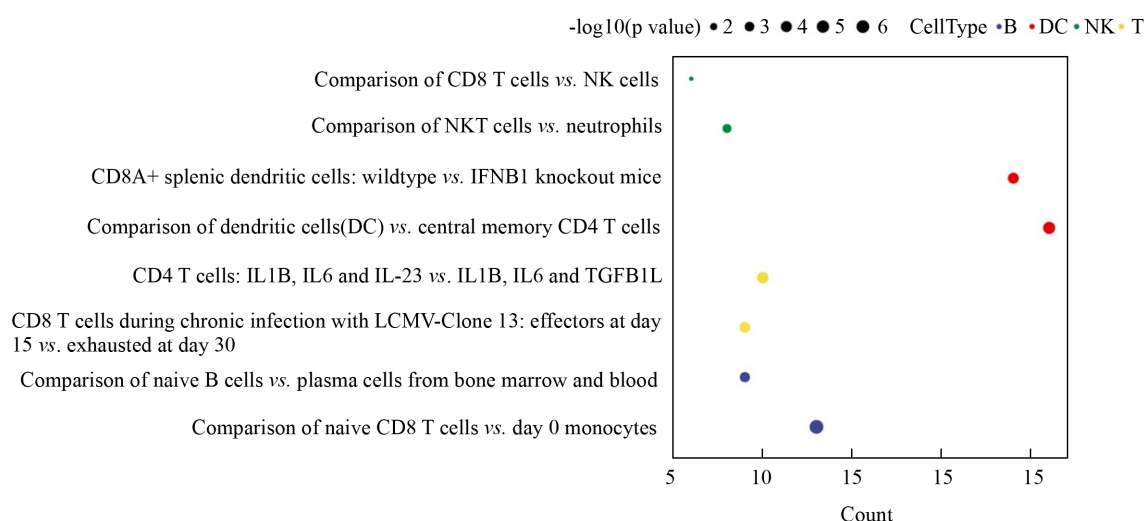


Fig. 5 Immune pathway enrichment for T cells, B cells, NK cells, and DC cells

为了研究免疫细胞中的蛋白与免疫功能的关系,采用Mfuzz包<sup>[28]</sup>对4种细胞的共享蛋白进行模糊C均值聚类(Fuzzy C-means)<sup>[29]</sup>,按照4种细胞的蛋白定量值的变化趋势将蛋白分成了6簇(图6),蛋白数分别为86, 91, 111, 97, 112和58,不同簇的蛋白在4种细胞的表达量显示出不同趋势.在不同簇中富集免疫系统及免疫性疾病相关KEGG通路,在不同簇中共富集出了8种通路,各种通路在不同细胞中的表达模式不同,表明不同细胞可能在不同的免疫反应和疾病过程中发挥不同的作用.通过分析上述聚类结果,可深入地了解不同蛋白质在免疫反应和免疫性疾病中的功能,进而为相关疾病的机制研究和潜在治疗靶点提供线索.

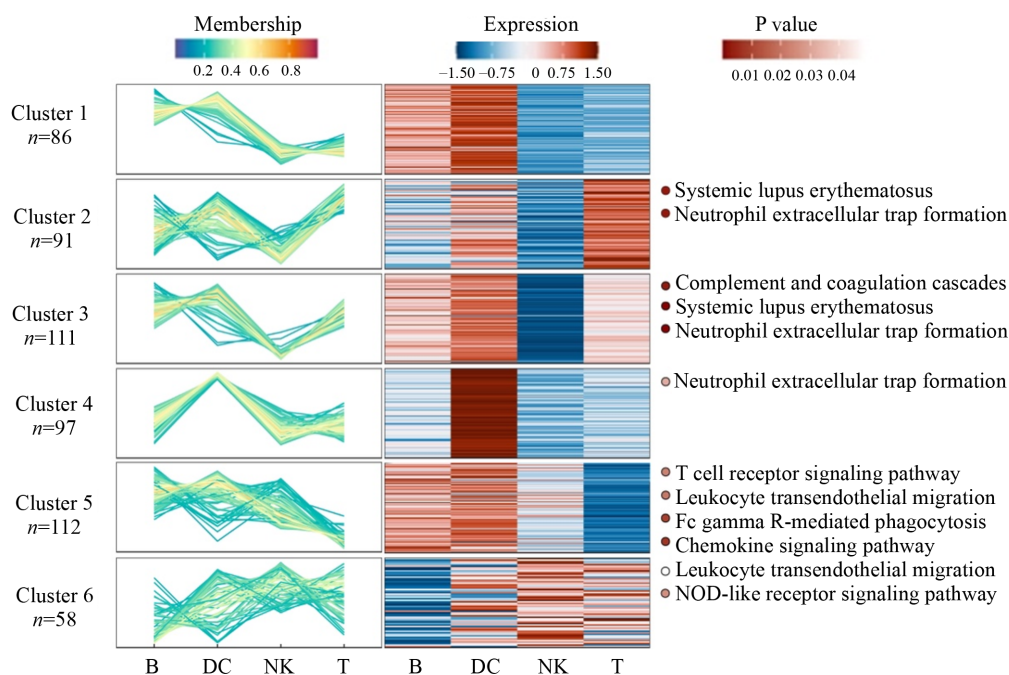


Fig. 6 C-means analysis and KEGG immune pathway enrichment on shared proteins of the cells

### 3 结 论

采用一种成熟的超低损失的无标记单细胞蛋白质组学方法采集mPBMCs的蛋白数据,分选出直径为8~15 μm和伸长率为1.0~3.0的小鼠外周血单个核细胞.在蛋白前处理过程中,采用Mad-CASP技术可明显降低蛋白的吸附,提高蛋白的鉴定数.通过数据分析分选出B细胞、T细胞、DC细胞和NK细胞,不同细胞具有明显异质性.采用生信手段进行msigdb小鼠免疫通路富集,并利用计数排序前2的通路绘制气泡图,得到了不同细胞的特异性通路,采用Mfuzz包对4种细胞的共享蛋白进行C均值聚类,得到了6簇表达模式不同的蛋白,富集出了相应表达模式的免疫通路.本文研究结果为小鼠及其它哺乳动物的免疫功能和免疫机制研究提供了基础.

### 参 考 文 献

- [1] Teo Y. V., Hinthorn S. J., Webb A. E., Neretti N., *Aging*, **2023**, *15*(1), 6—20
- [2] Kaeck S. M., Wherry E. J., Ahmed R., *Nat. Rev. Immunol.*, **2002**, *2*(4), 251—262
- [3] Liu Z., Li J. P., Chen M., Wu M., Shi Y., Li W., Teijaro J. R., Wu P., *Cell*, **2020**, *183*(4), 1117—1133.e19
- [4] Sakaguchi S., Yamaguchi T., Nomura T., Ono M., *Cell*, **2008**, *133*(5), 775—787
- [5] Kurosaki T., Kometani K., Ise W., *Nat. Rev. Immunol.*, **2015**, *15*(3), 149—159
- [6] Liu Y., Beyer A., Aebersold R., *Cell*, **2016**, *165*(3), 535—550
- [7] Segel M., Neumann B., Hill M. F. E., Weber I. P., Viscomi C., Zhao C., Young A., Agle C. C., Thompson A. J., Gonzalez G. A., Sharma A., Holmqvist S., Rowitch D. H., Franze K., Franklin R. J. M., Chalut K. J., *Nature*, **2019**, *573*(7772), 130—134
- [8] Specht H., Slavov N., *J. Proteome Res.*, **2018**, *17*(8), 2565—2571
- [9] Levy E., Slavov N., *Essays Biochem.*, **2018**, *62*(4), 595—605

- [10] Spitzer M. H., Nolan G. P., *Cell*, **2016**, 165(4), 780—791
- [11] Lombard-Banek C., Reddy S., Moody S. A., Nemes P., *Mol. Cell. Proteomics*, **2016**, 15(8), 2756—2768
- [12] Petelski A. A., Emmott E., Leduc A., Huffman R. G., Specht H., Perlman D. H., Slavov N., *Nat. Protoc.*, **2021**, 16(12), 5398—5425
- [13] 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
- [14] 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
- [15] Ctorcecka C., Clark N. M., Boyle B. W., Seth A., Mani D. R., Udeshi N. D., Carr S. A., *Nat. Commun.*, **2024**, 15(1), 5707
- [16] Budnik B., Levy E., Harmange G., Slavov N., *Genome Biol.*, **2018**, 19(1), 161
- [17] Rosenberger F. A., Thielert M., Mann M., *Nat. Methods*, **2023**, 20(3), 320—323
- [18] Matzinger M., Müller E., Dürnberger G., Pichler P., Mechtler K., *Anal. Chem.*, **2023**, 95(9), 4435—4445
- [19] Li S., Su K., Zhuang Z., Qin Q., Gao L., Deng Y., Liu X., Hou G., Wang L., Hao P., Yang H., Liu S., Zhu H., Ren Y., *Sci. Bull.*, **2022**, 67(6), 581—584
- [20] Kebarle P., Verkerk U. H., *Mass Spectrom. Rev.*, **2009**, 28(6), 898—917
- [21] Cox J., Mann M., *Nat. Biotechnol.*, **2008**, 26(12), 1367—1372
- [22] Cox J., Hein M. Y., Luber C. A., Paron I., Nagaraj N., Mann M., *Mol. Cell. Proteomics*, **2014**, 13(9), 2513—2526
- [23] Becht E., McInnes L., Healy J., Dutertre C. A., Kwok I. W. H., Ng L. G., Ginhoux F., Newell E. W., *Nat. Biotechnol.*, **2019**, 37(1), 38—44
- [24] Liberzon A., Subramanian A., Pinchback R., Thorvaldsdóttir H., Tamayo P., Mesirov J. P., *Bioinformatics* **2011**, 27(12), 1739—1740
- [25] Ferri F., Parcelier A., Petit V., Gallouet A. S., Lewandowski D., Dalloz M., van den Heuvel A., Kolovos P., Soler E., Squadrito M. L., De Palma M., Davidson I., Rousselet G., Romeo P. H., *Nat. Commun.*, **2015**, 6, 8900
- [26] Banchereau J., Steinman R. M., *Nature*, **1998**, 392(6673), 245—252
- [27] Deng Y., Xie M., Li Q., Xu X., Ou W., Zhang Y., Xiao H., Yu H., Zheng Y., Liang Y., Jiang C., Chen G., Du D., Zheng W., Wang S., Gong M., Chen Y., Tian R., Li T., *Circ. Res.*, **2021**, 128(2), 232—245
- [28] Kumar L., Futschik M. E., *Bioinformatics*, **2007**, 2(1), 5—7
- [29] Bezdek J. C., *Pattern Recognition with Fuzzy Objective Function Algorithms*, Plenum Press, New York, **1981**, 191—226

(Ed.: X, V, K)