

# 基于质谱的单细胞蛋白质组学研究进展

付航<sup>1,2,3</sup>, 王璐璐<sup>1,2</sup>, 翟琳辉<sup>4</sup>, 谭敏佳<sup>2,3</sup>

(1. 南京中医药大学新中药学院, 江苏 南京 210023; 2. 中国科学院上海药物研究所, 新药研究国家重点实验室, 上海 201203; 3. 中科中山药物创新研究院, 广东 中山 528400; 4. 同济大学附属上海市第四人民医院, 同济大学医学院脑功能与人工智能转化研究所, 上海 200434)

**摘要:** 单细胞蛋白质组学是继单细胞基因组学与转录组学之后兴起的前沿研究领域, 致力于在单细胞分辨率下系统性表征蛋白质的表达水平与功能状态, 从而直接揭示生命活动的分子执行基础。相较于传统的群体细胞分析技术, 该方法能够有效解析细胞群体内部的异质性, 识别被群体平均信号掩盖的关键生物学信息。然而, 由于样本起始量极低、目标蛋白质动态范围广以及蛋白质无法像核酸一样进行扩增, 使其分析面临严峻的技术挑战。本文系统综述了基于质谱技术的单细胞蛋白质组学全流程研究进展, 涵盖单细胞分选、样本前处理平台构建、色谱分离、质谱检测与数据采集策略、生物信息学分析方法, 以及该技术在生命科学多个领域的应用现状, 并对其未来的发展方向与前景进行展望。

**关键词:** 单细胞蛋白质组学; 细胞异质性; 单细胞分选; 质谱分析; 微流控技术; 数据非依赖性采集(DIA)

中图分类号: O657.63 文献标志码: A 文章编号: 1004-2997(2026)03-0313-18

DOI: 10.7538/zpxb.2025.0150 CSTR: 32365.14.zpxb.2025.0150

## Advances in Mass Spectrometry-Based on Single-Cell Proteomics

FU Hang<sup>1,2,3</sup>, WANG Lu-lu<sup>1,2</sup>, ZHAI Lin-hui<sup>4</sup>, TAN Min-jia<sup>2,3</sup>

(1. New School of Chinese Materia Medica, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China; 2. State Key Laboratory of Drug Research, Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201203, China; 3. Zhongshan Institute for Drug Discovery, Zhongshan 528400, China; 4. Translational Research Institute of Brain and Brain-Like Intelligence, Shanghai Fourth People's Hospital, School of Medicine, Tongji University, Shanghai 200434, China)

**Abstract:** Cellular heterogeneity is a fundamental characteristic of biological systems, influencing development, physiological function, and disease progression. While single-cell transcriptomics has revolutionized our understanding of gene expression, mRNA levels often correlate poorly with protein abundance due to post-transcriptional regulation. Consequently, single-cell proteomics (SCP) has emerged as a critical frontier, aiming to characterize the functional molecular executors of life at single-cell resolution. However, SCP faces significant technical hurdles compared to nucleic acid sequencing, primarily due to the ultra-low abundance of proteins in single cells (sub-nanogram levels), the inability to amplify proteins, and the high dynamic range of the proteome. This review systematically synthesized the rapid technological evolution across the entire SCP workflow.

1) Single-cell isolation: strategies ranging from fluorescence-activated cell sorting (FACS) to laser capture microdissection (LCM) for spatial context were discussed, highlighting the transition toward automated, image-guided dispensing systems (e.g., CellenONE) that ensure high cell viability and accurate isolation. 2) Sample preparation: the review emphasized the shift toward “miniaturization” and “integration” to mitigate surface adsorption and sample loss. The innovative nanoliter-scale processing platforms were introduced in this study, including droplet-based microfluidics (SODA, PiSPA), nanowell chips (nanoPOTS), and all-in-one devices (ProteoCHIP, Chip-Tip). These platforms have successfully reduced reaction volumes to the nanoliters scale, significantly enhancing peptide recovery. 3) Chromatography and mass spectrometry: the impact of narrow-bore capillary columns and robust low-flow LC systems (e.g., Evosep One) on sensitivity was analyzed. Furthermore, the integration of advanced ion mobility technologies (TIMS/PASEF) and high-field Orbitrap analyzers (e.g., Orbitrap Astral) have revolutionized detection limits, enabling the identification of over 5 000 proteins from single cells. 4) Data acquisition and analysis: the transition from data-dependent acquisition (DDA) to data-independent acquisition (DIA), particularly direct-DIA (library-free), is highlighted as a standard for improving data completeness and reproducibility. Additionally, the emergence of deep learning algorithms (e.g., scPROTEIN) and specialized databases (SingPro, SPDB) that address the challenges of high missing values and batch effects was discussed. The review highlighted the critical development of spatial proteomics (e.g., deep visual proteomics), which maps protein expression to tissue architecture, resolving the “loss of position memory” inherent in dissociated samples. This work further showcases the application of SCP in decoding macrophage heterogeneity, tracing stem cell differentiation trajectories, and elucidating drug resistance mechanisms in cancer. Despite remarkable progress, challenges remain regarding throughput, depth of coverage, and multi-omics integration. Future developments must focus on further automating sample preparation, enhancing the sensitivity of ionization sources, and integrating SCP with transcriptomics and metabolomics. Ultimately, standardization of workflows and data analysis is essential to translate SCP from an exploratory research tool into a robust clinical platform for precision medicine and biomarker discovery.

**Key words:** single-cell proteomics; cellular heterogeneity; single-cell sorting; mass spectrometry analysis; microfluidics technology; data-independent acquisition (DIA)

细胞是生物体形态和功能的基本单位。人体及其他真核生物均由数十亿个细胞构成,尽管同一个体来源的细胞通常具有相同的基因组,但受基因转录、翻译等遗传信息表达过程中的随机性,以及表观遗传调控和微环境差异等因素的影响,即使同一组织内的细胞也会表现出显著的表型异质性。这种细胞间异质性普遍存在于正常组织和疾病状态(如肿瘤)中,对生物体的发育、生理功能及疾病的发生发展具有重要影响<sup>[1-2]</sup>。然而,传统生物学研究主要基于大量细胞的群体(如组织、器官、细胞群等)分析,得到的结果是全部细胞的平均测量值,这不仅掩盖了细胞个体间的异质性,更可能遗漏关键生物学信

息<sup>[3]</sup>。因此,在单细胞分辨率下解析细胞间异质性,对于深入揭示生命活动规律和疾病机制具有重要意义。

近年来,基因扩增以及单细胞 RNA 测序(scRNA-seq)等技术的突破,使得在单细胞层面解析基因组与转录组成为现实。然而,mRNA 作为基因表达的中间产物,会经历转录调控、可变剪接等过程,导致最终丰度与蛋白质水平之间相关性较差,因此无法直接反映细胞的最终功能状态。相比之下,蛋白质是生命活动的主要执行者,其表达丰度和翻译后修饰状态等直接决定细胞的生物学表型。因此,单细胞蛋白质组学(single-cell proteomics, SCP)应运而生,其能够提

供比转录组更直接且功能相关的分子信息,在精准解析肿瘤异质性、高通量药物筛选<sup>[4]</sup>、细胞分化<sup>[5]</sup>、胚胎发育<sup>[6]</sup>等方面具有不可替代的研究价值。

目前,在单细胞水平上分析蛋白质组仍面临诸多挑战:1)样本蛋白质丰度极低:单个哺乳动物细胞直径约为10 μm<sup>[7]</sup>,其蛋白质含量低于0.4 ng,且蛋白质不能像DNA或RNA一样通过扩增手段提高其含量<sup>[8]</sup>,这对检测技术的灵敏度提出了极高要求;2)技术灵敏度与覆盖度要求高:细胞内蛋白质的丰度跨越多达10个数量级,高丰度蛋白质产生的离子信号会严重抑制低丰度蛋白质(如关键转录因子与激酶)的检测,导致后者难以被有效识别和鉴定<sup>[9]</sup>;3)高通量样本制备瓶颈:为获得具有统计学意义的检测结果,通常需对数百至数千个单细胞进行平行分析,然而,从单细胞分选、裂解、消化到肽段回收的多步骤流程存在效率低、样本损失严重等问题,限制了分析通量与实验重复性。因此,如何高效、无污染地获取大量单细胞,并最大限度减少样本损失,实现与下游质谱分析平台的高效衔接,已成为亟待解决的关键问题;4)数据解析的复杂度高:由于质谱采样深度低导致的高比例缺失值,以及实验操作产生的批次效应等,给后续的数据归一化、统计分析及生物学解析带来了巨大挑战<sup>[10]</sup>;5)蛋白质动态修饰检测难度大:蛋白质的功能高度依赖翻译后修饰(post-translational modifications, PTMs),如磷酸化、乙酰化等。在单细胞层面精确表征这些低丰度、动态变化的PTMs事件,对质谱检测技术的灵敏度和特异性提出了远超常规蛋白质组分析的要求。

尽管面临诸多挑战,近年来,研究人员在单细胞分选、微量样本处理、高灵敏度质谱数据采集以及数据分析方法等方面取得了一系列重要突破,推动了该领域的持续发展。本文将系统综述上述关键技术的进展,探讨其在临床研究中的潜在应用,并展望未来的发展前景。

## 1 单细胞分离技术

为实现单细胞蛋白质组学分析,首要步骤是从复杂生物样本中高效、精准地分离单个完整细胞。目前,常用的单细胞分离策略主要包括有

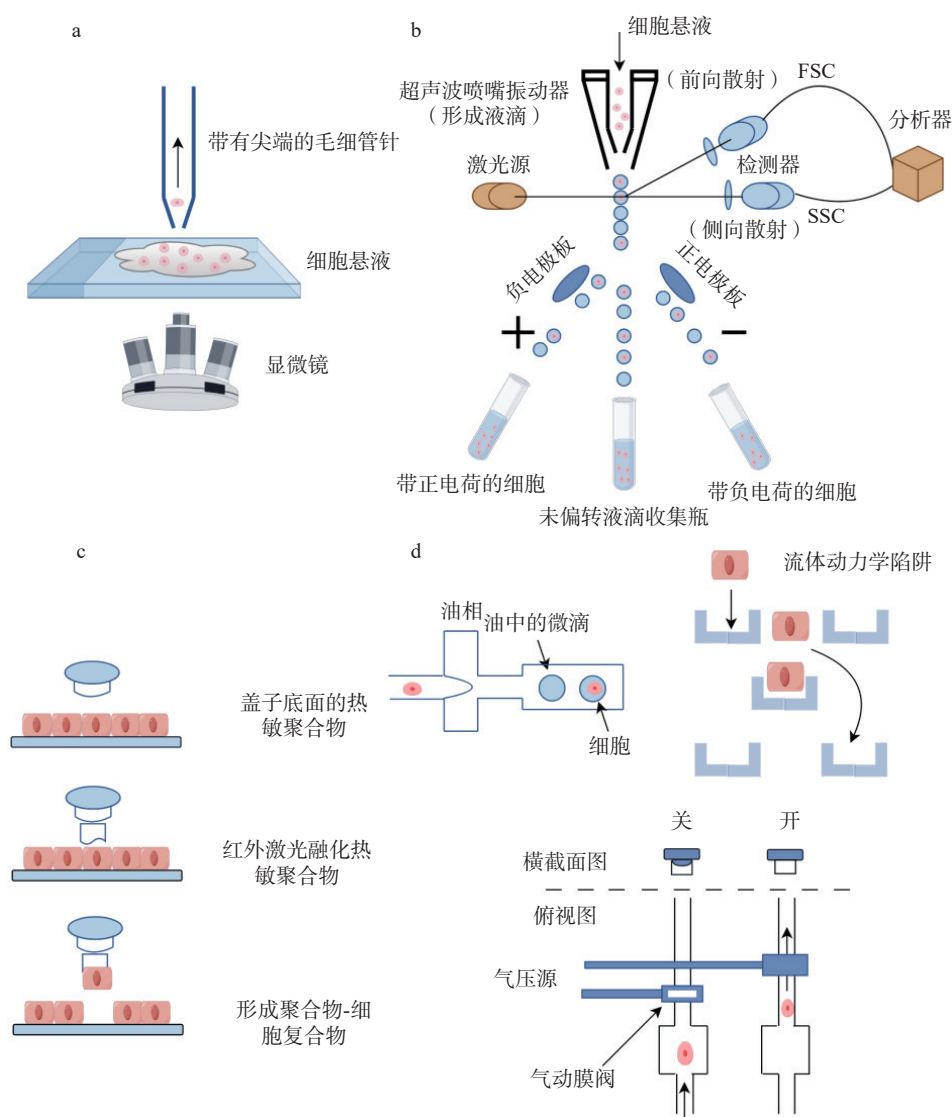
限稀释法、显微操作法、流式细胞荧光分选技术(fluorescence activated cell sorting, FACS)、激光捕获显微切割技术(laser capture microdissection, LCM)以及微流控技术,这些方法在操作原理、通量水平和适用场景上各具特色。

有限稀释法基于统计学原理,通过将细胞悬液梯度稀释至低浓度后分装至多孔板,使每个孔中平均仅含1个细胞。该方法操作简便、对设备要求低,但存在分离效率不高、通量受限以及难以确保单克隆性的缺点,因此目前主要应用于单细胞克隆培养等特定研究场景<sup>[11]</sup>。

显微操作法依赖高分辨率倒置显微镜与微吸管装置,通过负压吸附或机械移动实现对目标细胞的物理提取,示于图1a。该方法可精准选择形态完整且活性良好的细胞,尤其适用于粘附性较弱的细胞类型,但存在分离效率低、操作技术要求高等局限性,目前主要应用于生殖医学与胚胎学领域的精细操作<sup>[12]</sup>。

FACS是一种基于光学检测与液滴动力学原理的高通量单细胞分选方法,示于图1b。经荧光标记的细胞在鞘液驱动下以单列形式通过激光照射区,依据其光散射特性及荧光信号被实时识别,并触发液滴充电系统使其携带特定电荷,最终在高压电场中实现定向偏转与单细胞收集<sup>[13]</sup>。FACS具有分选速度快、多参数分析能力强等优势,广泛应用于血液、骨髓及肿瘤等复杂样本中的细胞分离<sup>[14-17]</sup>。然而,该技术依赖特异性荧光标记抗体,设备成本高昂,且在高速分选过程中可能因剪切力和激光暴露而影响细胞活性。

LCM是一种用于从实体组织样品中分离特定目标细胞的有效方法,示于图1c。该技术首先通过显微成像对感兴趣区域的细胞进行可视化定位,随后施加激光脉冲激活聚合物薄膜,使其受热膨胀并包裹目标细胞,从而实现从复杂异质性组织切片中精确分离目标细胞<sup>[18]</sup>。值得注意的是,与流式细胞术、微流控单细胞分选等典型单细胞技术不同,LCM本质上是一种基于形态学识别,具有高空间分辨率的“准单细胞”或靶向细胞群分离技术,其分离精度取决于操作者的界定,既可以精确到单个细胞,也可以是由数十个细胞组成的微小同质区域。因此,该方法在保留原始空间位置信息以及兼容各类固定与包埋组织样本方面具有独特优势,尤其适用于病理切



注: a. 显微操作单细胞分选图; b. 荧光激活细胞分选图; c. 激光捕获显微切割图; d. 不同微流控单细胞分离方法

图 1 单细胞分选技术

Fig. 1 Single-cell sorting technology

片中特定表型细胞区域的精准获取。然而, LCM 分离通量较低且激光活化过程可能引起局部热效应, 对细胞结构及生物大分子的完整性构成潜在风险, 进而影响下游分子分析的准确性。

微流控技术通过在  $\mu\text{m}$  级通道中精确操控  $\text{pL} \sim \mu\text{L}$  级的流体, 实现对单个细胞的高效操纵与分离, 示于图 1d。其主要策略包括: 1) 油基液滴分离: 利用油-水两相在微通道中形成独立微小液滴, 将细胞包裹于液滴内, 以实现单细胞隔离<sup>[19]</sup>; 2) 基于气动阀门的捕获: 通过调节气压控制芯片内柔性膜的形变, 进而开关微通道, 实现对单细胞的精准捕获与释放<sup>[20]</sup>; 3) 流体陷阱捕

获: 设计尺寸匹配细胞的微阱或微腔结构, 借助流体剪切力或重力作用实现单细胞的被动捕获。微流控平台具备高通量处理能力、极低试剂与样本消耗、良好的可集成性和自动化潜力, 已成为单细胞分析领域的重要技术平台<sup>[21]</sup>。

此外, 全自动单细胞分选技术 (CellenONE single-cell dispenser, CellenONE) 结合了图像引导的压电声学液滴分配技术与实时光学监控功能, 可在毛细管喷嘴处对流动中的细胞进行动态成像, 并仅分选符合预设标准的单细胞液滴。该系统具有样本起始量少、细胞活性保持良好、分选准确率高以及高度自动化等优势, 尤其适用于蛋

蛋白质组学等对细胞完整性和生理状态要求较高的研究场景。

## 2 单细胞蛋白质组学前处理平台

成功分离单细胞后,需对其进行蛋白质组学样本前处理,包括细胞裂解、蛋白质还原、烷基化及酶解等步骤。然而,传统操作流程因步骤繁多且频繁进行液体转移,易导致微量样本在管壁发生吸附或在操作过程中损失,进而显著降低蛋白质的鉴定覆盖度。因此,开发能够最大限度减少样本损失的前处理策略,已成为提升单细胞蛋白质组分析深度的关键环节。近年来,研究人员已开发出多种面向单细胞蛋白质样本的处理平台与技术方案,具体信息列于表1,其核心理念可归纳为“微型化”与“一体化”:通过将反应体系缩小至纳升甚至皮升级水平,并将多步处理流程集成在单一密闭装置中,可有效减少液面接触面积及样本转移次数,从而在提升检测通量的同时显著减少样本损耗。

2018年,Slavov团队<sup>[22]</sup>提出SCoPE-MS(single-cell proteomics by mass spectrometry)方法,采用人工显微操作实现单细胞分离,并结合声波裂解与同位素标记(tandem mass tag, TMT)技术,在单个细胞中成功鉴定出767种蛋白质。然而,该方法存在人工操作效率低、样本因管壁吸附而损失严重以及检测灵敏度有限(仅可检测拷贝数 $\geq 10^5$ 的蛋白质)等局限性。为克服上述问题,该团队在SCoPE-MS基础上进一步开发了SCoPE2方法。该方法采用流式细胞分选技术将单细胞分配至384孔板,利用mPOP(minimal proteomic sample preparation)方法(基于冷冻-加热循环)进行细胞裂解,并将反应体系缩小至1  $\mu\text{L}$ ,显著提高了实验通量与结果重复性,实现了对上千个单细胞的高通量TMT定量分析<sup>[23]</sup>。随后,该团队又开发了更先进的nPOP方法,通过引入CellenONE单细胞自动分选系统,可在纳升级液滴中并行处理超过2 000个细胞<sup>[24]</sup>。由于所用设备为商业化平台且具备良好的自动化兼容性,该方案更易于在常规实验室推广应用。

在“一锅法”样本处理策略方面,Tsai等<sup>[25]</sup>开发了SOP-MS(surfactant-assisted one-pot sample preparation coupled with mass spectrometry)方法,通过采用质谱兼容的表面活性剂与低吸附性材

料,实现了单细胞样本的“一锅法”制备。该方法可在单个细胞中定量分析146种蛋白质,在包含约20个细胞的组织切片样本中可将定量蛋白质数量提升至1 200。后续研究中,该团队进一步结合iBASIL(Improved boosting to amplify signal with isobaric labeling)策略,实现了对纳克级样本的高灵敏度磷酸化蛋白质组分析,在1  $\mu\text{g}$ 蛋白质裂解物中鉴定出超过3 000条磷酸肽<sup>[41]</sup>。此外,Masuda等<sup>[26]</sup>开发了一种油中水滴消解(water droplet-in-oil digestion, WinO)法,将分选后的单细胞引入乙酸乙酯包裹的水相液滴中,并在液滴内完成还原、烷基化及酶解等步骤,结合TMT标记技术,成功实现了单细胞中462种蛋白质的定量分析。针对单细胞样本中肽段易因管壁吸附而损失的问题,任艳等<sup>[27]</sup>设计了Mad-CASP(mass-adaptive coating-assisted single-cell proteomics)策略,通过引入特异性设计的合成肽段以占据容器表面的吸附位点,并利用其独特的酶切模式(每4个氨基酸插入1个赖氨酸残基),在质谱检测中有效排除了干扰信号。该方法无需依赖特殊仪器设备,可在3~4 h内完成96个样本的处理,并在单个HeLa细胞中鉴定约1 240种蛋白质。上述方法均基于常规实验室设备,通过化学与生物化学手段对操作流程进行系统优化,在保持较高通量的同时显著提升了单细胞蛋白质组分析的可行性与重复性,为其广泛应用提供了坚实的技术基础。

微流控技术因其具有样本消耗量少、高度集成化以及良好的封闭性等优势,已成为单细胞蛋白质组前处理的重要发展方向。近年来,多个研究团队相继开发出一系列代表性微流控平台,显著提升了单细胞蛋白质组分析的灵敏度与通量。

2013年,方群团队<sup>[42]</sup>研发了基于液滴的全自动微流控系统——序控液滴阵列(sequential operation droplet array, SODA),实现了皮升级至纳升级液滴在生成、融合与转移等过程中的全自动化操控。2018年,该团队<sup>[28]</sup>进一步基于SODA平台设计了一种纳米级油-气-液滴芯片(oil-air-droplet, OAD),通过引入原位固定式微反应器及油-气-液夹层结构设计,有效降低了样本与芯片表面的接触面积,并显著抑制了液滴蒸发带来的样品损失。利用该系统,研究团队成功从单个

表 1 代表性的单细胞蛋白质组学技术  
Table 1 Representative single-cell proteomics technology

单细胞蛋白质组学平台 Single-cell proteomics platform	单细胞分选方法 Single-cell isolation method	细胞类型 Cell type	标记方法 Labeling method	质谱型号 Mass spectrometer model	数据采集方法 Data acquisition mode	色谱梯度 LC gradient/min	单细胞蛋白质组鉴定深度 Identification depth of SCP	文献来源 Reference
SCOPE-MS	人工手动挑选	Jurakt U-937	TMT 10	LTQ Orbitrap Elite	DDA	30	767 (n=24)	[22]
SCoPE2	FASC	Monocyte macro-phage	TMT 16	Orbitrap Q-Exactive	DDA	95	3042 (n=1490)	[23]
nPOP	cellenONE	U-937 WM989	TMT 18	Orbitrap Q-Exactive	DDA	95	2844 (n=1543)	[24]
SOP-MS	FASC, LCM	MCF10A MCF7	非标记	Orbitrap Q-Exactive Plus	DDA	75	146 (n=1)	[25]
WinO	细胞分选仪	RPMI8226	TMT 10	Orbitrap Fusion Tribrid	DIA	—	845 (n=1)	[26]
Mad-CASP	FASC	HeLa	非标记	Orbitrap Eclipse Tribrid	DDA	—	1240 (n=1)	[27]
OAD	液滴微流控技术	HeLa	非标记	Orbitrap Elite	DDA	360	51 (n=1)	[28]
PiSPA	液滴微流控技术	A549	非标记	timsTOF Pro	DIA	21	3008 (n=1)	[29]
scPMA	液滴微流控技术	A549	非标记	timsTOF Pro	DDA	45	816 (n=1)	[30]
nanoPOTs	有限稀释法	HeLa	非标记	Orbitrap Fusion Lumos Tribrid	DDA	150	1517 (n=10~14)	[31]
nanoPOTs (N2)	CellenONE	C10 RAW SVEC	TMT pro 16plex	Orbitrap Eclipse Tribrid	DDA	120	2457 (n=108)	[32]
iProChip	微流控技术(细胞陷阱捕获)	PC-9	非标记	Orbitrap Eclipse	DIA	160	976 (n=1)	[33]
SciproChip		PC-9	非标记			90	1500 (n=1)	
AM-DMF-SCP	AM-DMF 技术	A549 HepG2	非标记	Orbitrap Astral	DIA	15	≈2000 (n=1)	[34]
ProteoCHIP EVO 96	CellenONE	HEK-293T	非标记	timsTOF Ultra	DIA	30	3500 (n=1)	[35]
T-SCP	FASC	HeLa	非标记	TimsTOF Pro	DDA	35	2083 (n=1)	[36]
One-tip	Uno单细胞分液器	HeLa	非标记	Orbitrap Astral	nDIA	31	>3000 (n=1)	[37]
Chip-Tip	CellenONE	HeLa	非标记	Orbitrap Astral	nDIA	12	>5000 (n=1)	[38]
DYP	激光显微切割	U2OS	非标记	timsTOF Pro	DIA	70	4500 (n=1)	[39]
FAXP	激光显微切割	小鼠肝细胞	非标记	Orbitrap Astral	DIA	25	3312 (n=1)	[40]

HeLa 细胞和单个小鼠卵母细胞中分别鉴定出 51 种和 355 种蛋白质。2024 年, 该团队<sup>[29]</sup>推出了 PiSPA (pick-up single-cell proteomic analysis) 平台, 该平台结合细胞悬液中靶细胞的明场形态特征或荧光标记信号, 通过图像引导的毛细管探针实现单细胞的精准捕获, 并将其分配至纳升级尺度的反应管中; 随后, 在反应管内加入纳升级试剂完成蛋白质组学前处理。此外, 该反应管可直接与液相色谱自动进样器联用, 显著减少了因反复移液导致的样品损耗, 最终在单个哺乳动物细胞中实现了超过 3 000 种蛋白质的定量分析。同年, 该团队<sup>[30]</sup>报道了 scPMA (single-cell proteome and metabolome analysis) 技术, 通过整合微流控平台与超高灵敏度质谱检测方法, 实现了单细胞水平上蛋白质组与代谢组的同步分析, 在单个 A549 细胞中平均定量了 816 种蛋白质和 72 种代谢物。

2018 年, Kelly 团队<sup>[31]</sup>开发了 nanoPOTs (nanodroplet processing in one pot for trace samples) 平台, 即一种基于玻璃芯片的纳米液滴反应系统, 集成多个纳米级反应孔, 能够在小于 200 nL 的微小体积内完成蛋白质组样本的前处理。该芯片不仅显著减少了反应过程中溶剂的挥发, 其表面的疏水特性还可有效抑制非特异性污染物的吸附。利用该平台, 研究人员成功从 10 个 HeLa 细胞中鉴定出约 1 500 种蛋白质; 进一步结合 FASC 技术与 nanoPOTs 平台, 实现了在单个 HeLa 细胞中鉴定出 669 种蛋白质<sup>[43]</sup>。该团队后续研发出嵌套式 nanoPOTs (N2) 芯片, 将反应体积进一步缩小至 30 nL, 通量提升至原来的 5 倍, 单次可并行处理 243 个细胞, 并兼容基于同位素标记的单细胞蛋白质组学定量分析<sup>[32]</sup>。应用 N2 芯片, 研究团队在 3 种不同细胞系的单细胞水平上稳定定量了约 1 500 种蛋白质, 并成功识别出多种膜蛋白标志物。

2022 年, 陈拥军团队<sup>[33]</sup>报道了集成细胞捕获、裂解、酶解和脱盐功能的 iProChip (integrated proteomics chip) 芯片, 可实现整个蛋白质组学工作流程自动化, 显著减少了因多次移液导致的样本损失。基于该平台, 该团队进一步开发了专用于单细胞分析的 SciproChip (single-cell integrated proteomics chip) 芯片, 通过缩小反应腔室体积、优化细胞捕获结构布局等改进措施, 使细胞利用

率提升了 40%。此外, 通过缩减芯片整体处理体积以及 C18 脱盐柱长度, 进一步减少了样品在处理过程中的损失。结合数据非依赖性采集 (DIA) 技术, 该方法在单个哺乳动物细胞中平均鉴定出约 1 500 种蛋白质。

2024 年, 周虎团队<sup>[34]</sup>提出一种基于有源矩阵数字微流控 (active-matrix digital microfluidic chip, AM-DMF) 的单细胞蛋白质组样本前处理方案 (active-matrix digital microfluidic chip for single-cell proteomics, AM-DMF-SCP)。该研究利用电场精确操控油包水微滴中的细胞悬液, 实现细胞的移动与分裂, 从而在芯片上直接完成单细胞分离与样本制备, 其反应体系低至 10 nL, 有效降低了样本损耗与试剂消耗。同时, 该平台支持多样本并行处理, 显著减少了传统逐一样本处理带来的批次效应。结合 DIA 分析策略, 在 15 min 液相色谱梯度洗脱下, 实现了对单个 HeLa 细胞平均 2 258 种蛋白质的鉴定。

尽管上述微流控平台在降低样本损失、提升检测通量及增加鉴定深度方面表现出显著优势, 但其广泛应用仍受限于对专用设备的依赖以及对操作经验的较高要求, 加之商业化系统较昂贵, 目前在常规实验室中的普及仍面临挑战。

为最大限度降低样本转移过程中的损失, 多个研究团队开发了可与液相色谱-质谱系统直接联用的一体化蛋白质组学前处理平台。Carr 团队<sup>[35]</sup>研发了一种专用于高通量样品制备芯片—proteoCHIP EVO 96。该芯片基于 96 孔板设计, 采用低吸附性聚四氟乙烯 (polytetrafluoroethylene, PTFE) 材料并通过微加工技术制造, 能够与 cellenONE 自动分选系统集成, 可实现单细胞样本的精准分配、细胞裂解及蛋白酶解。该平台通过与 Evosep One 液相色谱系统耦合, 将酶解产生的肽段直接导入 Evotips (一次性固相萃取柱) 进行脱盐与富集, 随后结合 Bruker timsTOF Ultra 质谱仪进行分析, 在单细胞水平实现了高达 4 000 种蛋白质的鉴定, 平均每个细胞鉴定约 3 500 种蛋白质, 检测动态范围跨越 4 个数量级。

2022 年, Mann 团队<sup>[36]</sup>提出了 T-SCP (true single-cell derived proteomics) 工作流, 该流程整合了流式细胞分选、微型化样品制备、超低流速液相色谱分离以及新型捕获离子迁移率质谱技术, 显著提升了检测灵敏度, 在单个 HeLa 细胞中

成功鉴定出 843 种蛋白质。为进一步简化蛋白质组学前处理流程, Olsen 团队<sup>[37]</sup>于 2024 年开发了 One-tip 方法, 基于 Evotip 技术, 仅需 2 次移液操作即可完成样本制备, 并实现与液相色谱-质谱(LC-MS)联用的在线连接, 有效减少了样品转移过程中的损失。该方法全流程耗时约 70 min, 具备较高的自动化水平。结合 Orbitrap Astral 质谱仪上的窄窗口数据独立采集(narrow-window data-independent acquisition, nDIA)策略, 在约 20 个细胞中可鉴定出超过 5 000 种蛋白质和 46 000 条肽段。随后, 该团队进一步整合 CellenONE 系统、proteoCHIP EVO 96 平台、Evosep One 液相色谱系统及 Orbitrap Astral 质谱仪, 构建了“Chip-Tip”工作流, 显著提高了单细胞蛋白质组学的样本通量与蛋白质鉴定深度<sup>[38]</sup>。该流程在单个 HeLa 细胞中实现了超过 5 000 种蛋白质的鉴定, 并能够在未经富集的样本中直接检测到磷酸化和糖基化等翻译后修饰, 为功能蛋白质组学研究提供了系统性的分析视角。

单细胞蛋白质组学技术已成功实现对单个细胞分子图谱的构建, 并揭示细胞间的异质性特征。然而, 该类技术依赖于组织解离过程, 导致细胞在原始微环境中的空间定位信息完全丧失。这种空间“位置记忆”的缺失, 制约了对细胞间相互作用、组织空间架构及其相关疾病病理机制的深入理解。为此, 近年来, 单细胞分辨率下的空间蛋白质组学技术快速发展, 旨在将蛋白质表达谱精确映射至组织的空间坐标, 从而在完整保留组织结构背景的前提下解析细胞功能与调控网络。

目前, 该方向已涌现多种技术路径, 如成像质谱流式技术(imaging mass cytometry, IMC)利用金属标记抗体与激光剥蚀-电感耦合等离子体质谱联用, 可实现数十种蛋白质标志物在组织切片中的单细胞空间定量<sup>[44]</sup>。基于抗体的空间蛋白质组学方法, 如循环荧光成像(co-detection by indexing, CODEX)等, 则通过多轮荧光成像, 可在单细胞分辨率下同时检测数十种蛋白质, 并保留其空间邻域信息<sup>[45]</sup>。在非抗体依赖的质谱空间蛋白质组学技术中, Mann 团队<sup>[39]</sup>开发了深度视觉蛋白质组学(deep visual proteomics, DVP)技术。该技术整合了人工智能辅助的细胞表型识别、自动化激光显微切割及超高灵敏度质谱分

析, 能够在保留组织空间信息的基础上, 实现单细胞水平的高覆盖率蛋白质组定量。郭天南团队<sup>[40]</sup>研发的 FAXP(filter-aided expansion proteomics)技术亦可在单细胞尺度上解析细胞或组织的空间蛋白质表达特征。该方法通过水凝胶介导的组织膨胀策略, 结合激光显微切割、自动化移液系统与高灵敏度质谱检测, 在肝细胞核和单个肝细胞中分别平均鉴定出 2 368 种和 3 312 种蛋白质。此外, 质谱成像(mass spectrometry imaging, MSI)技术, 如基质辅助激光解吸电离质谱成像(matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry imaging, MALDI-MSI)的常规空间分辨率为微米级。邹贻龙团队与 Piatkevich 团队通过将水凝胶膨胀技术与 MALDI-MSI 技术结合, 实现了高分辨率、高灵敏度的非靶向深度空间蛋白质组解析<sup>[46]</sup>。

然而, 该领域仍面临多重技术挑战: 首先, 灵敏度与分辨率的权衡——高空间分辨率通常意味着样本量极低, 对蛋白质组覆盖深度造成限制; 其次, 多路检测能力与通量——基于抗体的方法通量高, 但需依赖抗体质量与可用性, 成本较高, 质谱方法覆盖全面但通量较低; 此外, 数据分析的复杂性——空间蛋白质组数据兼具高维分子信息与二维/三维空间拓扑, 需要开发专门的计算工具进行整合解析。

未来发展趋势将集中在: 1) 技术整合与多组学空间映射: 将空间蛋白质组与转录组、代谢组等多层信息在单细胞水平关联, 构建更立体的分子调控网络; 2) 超高分辨率与高灵敏度质谱技术突破: 如结合单细胞蛋白质组前处理与亚细胞级激光捕获或开发新型电离技术; 3) 人工智能驱动的全自动分析: 从细胞表型识别、区域选择到数据整合与生物学解释, 实现端到端的智能空间生物学研究。

### 3 单细胞蛋白质组的色谱分离

高效的色谱分离能够有效降低样本复杂度, 减弱低丰度肽段的离子抑制效应, 从而显著提升蛋白质组检测的深度与动态范围。实现高效质谱检测的关键在于采用稳定的低纳升级流速的液相色谱系统, 选用更细内径及更小粒径填料的色谱柱, 并优化色谱梯度洗脱条件。

常规蛋白质组学研究通常采用内径为 50  $\mu\text{m}$

或 75  $\mu\text{m}$  的色谱柱。为满足单细胞样本分析需求, 研究人员开发出了更小内径的色谱柱。Zhu 等<sup>[47]</sup>将色谱柱内径从 75  $\mu\text{m}$  减小至 30  $\mu\text{m}$ , 流速由 350 nL/min 降至 60 nL/min, 使谱图信号强度提升 3 倍以上, 肽段鉴定数量增加 32%。Cong 等<sup>[48]</sup>采用 20  $\mu\text{m}$  内径的色谱柱, 在 20 nL/min 流速下对单细胞蛋白酶解产物进行分离, 并结合 Orbitrap Eclipse Tribrid 质谱仪, 实现了单个细胞中 362 种蛋白质的鉴定; 通过应用 MaxQuant 软件的运行间匹配功能, 将鉴定的蛋白质数量提升至 874 种; 相较于 30  $\mu\text{m}$  内径的色谱柱, 蛋白质和肽段的鉴定数量分别提高了 30% 和 50%。Xiang 等<sup>[49]</sup>开发了内径仅 2  $\mu\text{m}$  的窄开口毛细管柱 (narrow open tubular, NOT), 在 790 pL/min 极低流速下实现了肽段的高分辨率分离, 仅需输入 75 pg 肽段即可鉴定出超过 1 000 种蛋白质, 与 15  $\mu\text{m}$  或 30  $\mu\text{m}$  内径的填充柱以及毛细管电泳-质谱 (capillary electrophoresis mass spectrometry, CE-MS) 系统相比, 灵敏度提升了 10~100 倍。

在填料、色谱柱结构与工作模式方面, 研究人员开展多项改进与优化。 $\mu\text{PAC}$  (microfabricated parallel analysis columns) 微柱阵列色谱柱采用无孔颗粒与低结合活性设计, 显著降低了样本损耗, 适用于超低输入量的样品分析<sup>[50]</sup>。该技术可在 10 ng 细胞裂解物中鉴定出超过 2 400 种蛋白质, 是传统色谱柱肽段和独特蛋白质组鉴定数量的 2 倍, 展现出广阔的应用前景。Liang 等<sup>[51]</sup>开发了一种新型胺桥杂化整体柱, 有效减少了硅醇基团的非特异性吸附, 从而改善了峰形, 缩小了半峰宽并减轻了肽段峰拖尾现象; 使用该色谱柱在 200 pg 酶解物中平均可鉴定到 1 062 种蛋白质和 5 257 条肽段。Webber 等<sup>[52]</sup>提出了一种双柱交替工作模式, 以提升单细胞蛋白质组分析通量。该模式在使 1 根色谱柱进行肽段分离的同时, 另 1 根色谱柱同步执行洗涤与平衡步骤, 从而为下一次分离做准备, 实现了每个样本在 7 min 梯度内完成分析, 日通量可达 206 个样本, 为高通量单细胞蛋白质组学研究提供了切实可行的技术路径。Bache 等<sup>[53]</sup>推出了 Evosep One 液相系统, 通过集成 Evotip C18 捕集柱与预设梯度泵, 实现了“样品脱盐-进样-分离”一体化的分析流程。Evosep One 采用 4 个低压泵在存储环中预先建立分离梯度, 并由独立的高压泵将预形

成的梯度转移至连接分析柱与质谱的流路中, 从而实现快速高效分离。得益于预设梯度带来的流程简化, 该系统每日可完成 15~500 个样本的分析, 在保证高通量的同时具备良好的操作便捷性, 已广泛应用于单细胞及微量样本的蛋白质组学研究。

## 4 单细胞蛋白质组的质谱检测与数据采集

### 4.1 单细胞蛋白质组的质谱检测

随着单细胞水平样品制备技术的日趋成熟, 如何对这类极微量样本实现高效、灵敏且稳健的分析, 已成为单细胞蛋白质组学发展面临的关键问题。传统的液相色谱-质谱 (LC-MS/MS) 联用技术在应对单细胞样本时主要面临两大挑战: 1) 极低的样品载量要求质谱系统具备极高的检测灵敏度; 2) 高度复杂的样本化学组成要求仪器具有极短时间内实现快速、高分辨分离与检测的能力。近年来, 质谱硬件的迭代革新与数据采集模式的不断优化相互协同, 显著推动了单细胞蛋白质组学在分析深度与通量方面的持续提升。

质谱仪作为单细胞蛋白质组学分析的核心检测工具, 其检测限、扫描速度、质量精度和分辨率等关键性能参数直接影响数据质量与蛋白质鉴定深度。随着质量分析器技术的不断进步, 静电场轨道阱 (Orbitrap) 和捕集离子淌度-四极杆-飞行时间 (TimsTOF) 等高性能质谱平台已被广泛应用于单细胞蛋白质组学研究。

Orbitrap 系列分析器具有卓越的分辨率和质量精度, 已成为深度蛋白质组学研究的核心工具。Kelly 团队<sup>[47]</sup>系统评估了多种 Orbitrap 质谱仪在微量样本分析中的性能表现, 相较于早期型号 (如 LTQ-Orbitrap-XL), Orbitrap Fusion Lumos MS 在灵敏度和肽段测序速度方面均有明显改进; 在分析 2 ng 细菌裂解物胰蛋白酶消化样品时, 鉴定到的肽段和蛋白质数量分别提升了约 3 倍和 1.7 倍。随后, 该团队<sup>[48]</sup>在 Orbitrap Eclipse 质谱仪上开展单个 HeLa 细胞分析, 与 Orbitrap Fusion Lumos 相比, 肽段和蛋白质的覆盖率分别提升了 36% 和 20%。高场不对称波形离子迁移谱 (field asymmetric waveform ion mobility spectrometry, FAIMS) 技术对于提升单细胞蛋白质组检测的灵敏度具有显著优势, 该技术可在离子

进入质谱仪前,依据其在高低电场下的迁移率差异实现毫秒级预分离,从而有效降低背景干扰,显著提升信噪比。Cong 团队<sup>[54]</sup>整合纳米液滴样品制备、超低流速 nanoLC、FAIMS 及 Orbitrap Eclipse Tribrid 质谱仪,实现了从单个 HeLa 细胞中平均鉴定到 1 056 种蛋白质,较未使用 FAIMS 条件下的结果提升了 2.3 倍。Zhu 等<sup>[55]</sup>介绍了一种基于 FAIMS 过滤的迁移鉴定的 TIFF(translational ion mobility filtering)方法,利用三维特征匹配策略(保留时间、精确质荷比、FAIMS 补偿电压),显著增强了多肽序列的鉴定效率与可靠性。应用 TIFF 方法可在单个 HeLa 细胞中稳定鉴定出超过 1 100 种蛋白质,最高可达 1 700 种以上。Orbitrap Astral 质谱仪的问世推动了单细胞蛋白质组学的重大进展,该仪器具备高灵敏度与快速扫描能力,可通过窄小四极杆分离窗口实现精确的肽段分析。研究<sup>[56]</sup>表明,在结合 nDIA 策略时,其蛋白质鉴定数量可达 Orbitrap Exploris 480 等同类仪器的 2 倍。通过系统优化色谱洗脱梯度、FAIMS 电压与 DIA 参数,Bubis 等<sup>[57]</sup>在维持每日 50 个样本的高通量分析能力和优异重复性的前提下,成功在单个 A549 细胞中鉴定出超过 5 300 种蛋白质。类似的,Petrosius 团队<sup>[58]</sup>对 Orbitrap Eclipse 与 Orbitrap Astral 两款质谱仪的定量性能进行系统性比对,在相同条件下,后者定量的肽段数量约为前者的 2 倍。基于此结果,该团队进一步优化了基于 MS<sup>1</sup> 的 DIA 采集方法,最终在单个 HEK293、U937 及 CD34+ BM 细胞中分别实现了超过 3 500、2 500 和 1 300 种蛋白质的鉴定。

布鲁克公司推出的 timsTOF 系列质谱仪,尤其是专为单细胞蛋白质组学(scProteomics)优化设计的 timsTOF SCP,已成为该领域的领先平台,其核心技术包括捕集离子淌度分离(trapped ion mobility spectrometry, TIMS)和平行累积连续碎裂(parallel accumulation serial fragmentation, PASEF)<sup>[59]</sup>。TIMS 技术利用电场与气流之间的反向作用力,将离子稳定“捕获”于离子漏斗中,并依据离子淌度差异动态调节电场强度,从而实现基于迁移率的选择性释放。该过程在气相中引入额外的分离维度,显著提升了复杂样品中离子的利用率。PASEF 技术则实现了离子累积与碎裂过程的同步化,在前段 TIMS 区域进行离子

累积,在后段 TIMS 按淌度顺序依次释放离子,同时由四极杆选择母离子并在碰撞池中完成碎裂。这一设计使离子累积、分离与碎裂过程并行运行,大幅提高了扫描速度,在保持高灵敏度的同时显著增强了分析通量。Mun 等<sup>[60]</sup>通过优化 TIMS 参数发现,当离子积累时间为 180 ms、离子淌度范围控制在 0.7~1.3 V·s/cm<sup>2</sup> 时,蛋白质组覆盖深度及低丰度蛋白质的检测能力显著提升,运用该参数在单个 T 细胞中平均鉴定出 365 种蛋白质。Karagach 等<sup>[61]</sup>进一步提出 Slice-PASEF(parallel accumulation-serial fragmentation with slicing)方法,即设置一系列 *m/z* 重复但离子淌度不重叠的采集窗口,实现在一次离子淌度循环中完成多维数据采集。研究人员结合 cellenONE 细胞分选系统、Agilent Bravo 自动化液体处理平台、Evosep 液相色谱系统以及 timsTOF SCP 质谱仪,采用 Slice-PASEF 方法,成功实现了对单个细胞中超过 3 000 种蛋白质的稳定、可重复鉴定。

#### 4.2 单细胞蛋白质组的数据采集

蛋白质组学的质谱数据采集模式主要分为数据依赖性采集(DDA)和 DIA。

DDA 的基本原理是在完成 1 次全扫描(MS<sup>1</sup>)后,根据信号强度选择若干前体离子进行碎裂,从而获得其二级质谱图(MS<sup>2</sup>)。该技术成熟,产生的谱图可直接通过可靠的算法与数据库进行匹配。然而,由于固有的随机性以及“动态排除”机制的存在,其重复性较差,且易遗漏低丰度的前体离子。在单细胞样品中,由于整体信号强度较低,此采集方式常导致大量有效的 MS<sup>2</sup> 谱图缺失,限制了其在大规模单细胞蛋白质组研究中的应用。早期的单细胞蛋白质组学研究,如 OAD<sup>[30]</sup>、nanoPOTs<sup>[33]</sup>、nPOP<sup>[24]</sup>、SOP-MS<sup>[25]</sup>以及基于多通道标记定量策略的 ScoPE2<sup>[23]</sup>等均采用 DDA 数据采集模式。Truong 等<sup>[62]</sup>提出了一种 DDA 宽窗口采集(wide window acquisition, WWA)策略,通过扩大分离窗口实现相邻前体离子与目标前体离子的共分离与共碎裂,相较于标准 DDA,优化后的 WWA 可使 MS<sup>2</sup> 鉴定到的蛋白质数量提升约 40%。在缩短色谱梯度洗脱的条件下,WWA 的蛋白质组覆盖范围仅略低于 DIA,但其检测通量大幅提升。

DIA 为解决 DDA 存在的重现性问题提供了有效方案。与选择性碎裂特定离子的 DDA 不同,

DIA 采用系统性、无偏倚的方式, 将整个质荷比范围划分为多个隔离窗口, 并依次对各窗口内所有前体离子进行同步碎裂。该策略确保每次分析均可获取样品中全部离子的完整碎片信息, 避免了数据缺失, 显著提升了数据的重现性与完整性, 特别适用于大规模单细胞样本间的定量比较。目前, iProchip<sup>[36]</sup>、AM-DMF-SCP<sup>[37]</sup>、PiSPA<sup>[31]</sup>、DVP<sup>[32]</sup>、Chip-Tip<sup>[41]</sup>、FASP<sup>[45]</sup>等均采用 DIA 模式。在基于 DIA 的质谱数据采集过程中, 理论上扩大隔离窗口宽度会导致更多前体离子共洗脱, 进而产生更严重的谱图嵌合现象, 最终阻碍肽段的鉴定。Petrosius 等<sup>[63]</sup>发现, 对于低输入量的样本, 可通过提升分辨率或离子注入时间抵消谱图嵌合带来的负面影响。此外, 研究者还提出了结合高分辨 MS<sup>1</sup> (high resolution MS<sup>1</sup>, HRMS<sup>1</sup>) 与宽窗口 MS<sup>2</sup> 的采集策略: 通过在连续的 MS<sup>2</sup> 扫描之间插入高分辨 MS<sup>1</sup> 扫描, 将 MS<sup>2</sup> 数据按更细粒度分段采集, 不仅提升了 MS<sup>1</sup> 色谱峰的采样密度, 也为后续定量分析提供了可靠基础。结果表明, 该 HRMS<sup>1</sup> 方法在肽段鉴定深度和定量准确性方面均显著优于传统 DIA 方法。

## 5 单细胞蛋白质组学的数据分析

单细胞蛋白质组学的数据解析是研究流程中将原始质谱数据转化为生物学可解读信息的关键步骤。相较于传统的群体细胞蛋白质组学, 单细胞蛋白质组学数据具有较高的缺失值比例、显著的技术噪声、复杂的批次效应以及更为突出的生物异质性等特征。这些特性为数据分析方法的建立带来了严峻挑战, 其核心任务是如何从信噪比极低的数据中准确区分真实的生物变异与技术误差, 进而实现精确的细胞分型与蛋白质定量。近年来, 研究人员已开发出一系列针对单细胞蛋白质组学的数据分析工具, 旨在应对缺失值填补、批次效应校正等问题。

在 DDA 模式下, 通常基于谱图库搜索策略进行数据解析。该方法的核心原理是依据蛋白质序列, 模拟胰蛋白酶酶解后生成的肽段, 并进一步预测这些肽段在 MS<sup>2</sup> 阶段碎裂产生的理论碎片离子谱图。在实验中, 通过将检测获得的实验谱图与理论谱图进行匹配, 结合特定的质量控制规则和谱图相似性评分算法实现对肽段的鉴定。随后, 利用 MS<sup>1</sup> 中检测到的前体离子强度

或 MS<sup>2</sup> 中的报告离子信号进行定量分析<sup>[64]</sup>。该分析流程高度成熟, 可借助 Mascot、MaxQuant、FragPipe 等集成化软件平台高效完成。

DIA 数据解析旨在从全景质谱数据中解码特定的生物学信息, 其核心挑战在于如何对每个 MS<sup>2</sup> 谱图, 即多个肽段碎片离子的混合信号进行准确的去卷积处理, 并鉴定其中各肽段的身份及其相对信号丰度。当前主流的 DIA 数据分析策略主要分为基于谱图库的方法 (library-based DIA) 和非依赖谱图库的方法 (direct-DIA), 后者凭借其一体化的分析流程和更广泛的适用性成为当前主流的解决方案之一。direct-DIA 策略的基本原理是: 不依赖于外部预先构建的、基于数据依赖采集的谱图库, 而是利用深度学习算法直接从待分析的 DIA 数据本身和高分辨、高精度的 MS<sup>1</sup> 信息生成推断谱图库进行匹配<sup>[65]</sup>。该流程通常分为 2 个步骤: 首先, 通过对 DIA 数据中所有可检测的 MS<sup>1</sup> 色谱峰进行峰形解析和同位素分布拟合, 推导出可能的前体离子列表及其对应的高置信度 MS<sup>2</sup> 碎片模式, 从而构建一个专属的谱图库; 随后, 利用生成的谱图库对所有样本的 DIA 数据进行统一搜索和定量分析<sup>[66]</sup>。该策略的优势在于: 1) 简化流程降低偏倚: 无需提前构建 DDA 谱图库, 极大地简化了流程, 同时避免了因外部 DDA 库与当前实验条件不匹配而产生的系统性偏倚; 2) 提升鉴定深度与重现性: 其谱图库来源于全部样本的合并数据, 避免了因 DDA 随机采样而导致低丰度肽段丢失的问题, 更有利于鉴定低丰度或条件特异性肽段; 3) 节约珍贵样本: 对于非模式生物、单细胞或微量临床样本等稀有样本类型, 无需预先进行消耗样本的 DDA 建库实验, 可直接从同批次 DIA 数据中生成谱图库, 最大程度地保留并利用有限样本; 4) 保障数据完整性: DIA 通常依据 MS<sup>2</sup> 碎片离子的色谱峰面积进行定量, 由于所有肽段在所有样本中均被系统性碎裂, 因此数据缺失值低, 这为大样本队列的稳健比较提供了坚实基础。

近年来, 研究人员开发了一系列单细胞蛋白质组学数据分析软件来解决缺失值、消除批次效应与定量准确值等问题。DO-MS (data-driven optimization of MS) 平台可用于 LC-MS 参数优化与多维结果可视化<sup>[67]</sup>。SCoPE-MS 方法结合载体蛋白质组 and 同位素标记实现了对单个细胞的

分析,但当蛋白质含量过高时,从单细胞组获得的数据准确性和生物学结论均存在偏差。Cheung等<sup>[68]</sup>给出了载体蛋白质组水平和 SCoPE-MS 定量准确性之间的关系,还推出 SCPcompanion 软件工具,可快速评估单细胞蛋白质组学数据并推荐相关仪器和数据分析参数以提高数据质量。Chen等<sup>[69]</sup>开发了 DART-ID(data-driven alignment of retention times for IDentification),实施了原则性的贝叶斯框架,用于全局保留时间比对,并将保留时间估值纳入肽谱匹配的置信度估值中;实验表明,当分析批量或单细胞样本时,DART-ID 在错误发现率(false discovery rate, FDR)1%下将数据点数量增加了 30%~50%,减少了缺失数据。在提高蛋白质鉴定数量方面,Wang等<sup>[70]</sup>提出 DeepSCP,通过基于多个 SCP 样品集的保留时间和基于深度学习的碎片离子强度预测保留时间,构建肽谱匹配(PSM)的一系列特征,并使用优化的集成学习模型预测 PSM 标签;经验证,DeepSCP 可显著提高 SCP 的蛋白质鉴定数量。

数据间比对分析(match between runs, MBR)是根据同一条肽段的母离子保留时间和  $m/z$  在不同质谱检测运行中的信号关联起来,从而显著提高数据的完整性和定量准确性。Kalxdorf等<sup>[71]</sup>提出了一种 iceR(ion current extraction Re-quantification)定量工作流程,该流程使用离子流信息进行混合肽鉴定,具备 DDA 高识别率和 DIA 低缺失值的特点。与常规方法相比,IceR 在 DDA 和 DIA 质谱数据采集模式下均具有较好的定量精度、准确性、可靠性和数据完整性。

常规的蛋白质组学数据需经过复杂的批次校正、归一化以及缺失值的填充等步骤。Vanderaa等<sup>[72]</sup>开发了一种 scplainer 标准化分析方法,采用线性模型,通过最少的数据预处理步骤,有效解决了 SCP 数据分析中的批次效应、缺失值和数据异质性等核心挑战。Scplainer 提供方差分析、差异丰度分析和组分分析等一系列工具,能够从复杂的数据中提取可靠的生物学信息,基准测试和数据整合案例均证明了该方法的卓越性能和广泛适用性。

常规基于库的 DIA 分析需要人为进行实验,近年来,深度学习技术可实现二级质谱图的精准预测。Gessulat等<sup>[73]</sup>开发了 Prosit 深度神经网络模型,以肽段序列、母离子电荷状态和碰撞能量

为输入,直接预测肽段 MS/MS 谱图中碎片离子的信号强度分布。该模型通过大规模、高质量的质谱数据训练,能够准确模拟肽段在质谱仪中的碎裂行为。

针对当前 SCP 领域面临的肽段定量不确定、数据缺失、批次效应及噪声高等问题,Li等<sup>[10]</sup>设计了专门针对 SCP 数据分析的综合框架——scPROTEIN。该框架结合了多任务异方差回归模型的肽段量化不确定性评估与基于图对比学习的细胞嵌入生成技术,实现了量化不确定性估计、蛋白质数据去噪、消除批次效应及单细胞蛋白质组特异性嵌入编码等功能于一体的解决方案。scPROTEIN 不仅提升了单细胞蛋白质组数据分析的准确性与效率,还成功应用于细胞聚类、批次校正、细胞类型注释、临床分析及空间解析蛋白质组数据等多个领域,在推动精准医疗与生物学研究深入发展方面发挥了巨大潜力。

尽管各类算法与数据处理软件极大地提升了单细胞蛋白质组数据的处理能力,但该领域仍面临数据异质性高、重复性难以验证、不同研究间难以直接比较等问题。解决这些问题的关键在于推动数据的可访问性、可比较性与可重复性。在这一需求的强力驱动下,一系列单细胞蛋白质组学专用数据库应运而生。Lian等<sup>[74]</sup>开发了 SingPro 数据库,其独特之处在于:1)系统地基于质谱和流式细胞术研究提供 SCP 原始数据;2)明确描述 SCP 研究的实验细节和任何所研究蛋白质的表达谱。SingPro 数据库共收集 204 项研究(包括 129 项病例对照研究、21 项多类别研究和 54 项单臂研究),包含超过  $6.25 \times 10^8$  个细胞和超过 16 000 种蛋白质的 SCP 原始数据。Wang等<sup>[75]</sup>提出一种综合数据库 SPDB,其具有以下特点:1)数据规模大,收录了来自 4 种不同物种的 3 亿个细胞和 8 000 多种蛋白质;2)数据内容丰富,除单细胞蛋白质组外,还收录了对应的转录组与表观遗传数据;3)数据质量高,所有数据集均进行严格的质量控制和标准化处理,确保了数据的一致性和可比性。SPDB 数据库为促进单细胞蛋白质组学在肿瘤研究和药物研发领域的应用奠定了基础。

单细胞数据库的出现和普及是单细胞研究领域走向成熟和规模化的重要标志。通过将零散的数据点整合成系统性的知识网络,不仅解决

了当前的数据存储与分析问题,更为核心生物学规律的发现、疾病机制的解析以及未来精准医疗的发展提供了不可或缺的基础设施。

## 6 单细胞蛋白质组学的应用

单细胞蛋白质组学技术正以前所未有的分辨率揭示生命活动的精细图谱,在细胞异质性解析、癌症研究、免疫调控、发育生物学及药物作用机制等关键领域展现出广阔的应用前景。

在解析细胞异质性方面,Specht等<sup>[23]</sup>利用SCoPE2平台对1490个单核细胞与巨噬细胞中3042种蛋白质进行定量分析,揭示了巨噬细胞蛋白质组状态呈连续梯度分布,表明其异质性可在无外源极化细胞因子诱导的情况下自发形成。Brunner等<sup>[39]</sup>通过T-SCP工作流程识别药物干预下调细胞周期的关键标志蛋白,进一步揭示了不同细胞周期阶段之间的功能异质性。Mann团队<sup>[76]</sup>开发的单细胞深度视觉蛋白质组学技术(scDVP)实现了小鼠肝细胞蛋白质组在单细胞水平的空间解析,不仅完成了肝细胞形态的稳健分割与表征,还精准反映了肝小叶内的细胞分区特征。

在癌症研究领域,Tsai等<sup>[25]</sup>将SOP-MS应用于从患者循环肿瘤细胞(CTC)生成的患者来源细胞系异种移植(PCDX)小鼠模型中,揭示了原发性和转移性肿瘤之间的不同蛋白质特征以及同一细胞类型内的细胞异质性。结果发现,表达水平改变的蛋白质参与肿瘤免疫(如S100A家族成员61)、上皮细胞分化(CDSN)和EMT(vimentin38,62),这表明肿瘤细胞可能为适应免疫逃逸和维持细胞状态可塑性经历了选择性压力。

在发育生物学方面,单细胞蛋白质组学技术在蛋白质层面精确解析干细胞分化轨迹及细胞命运决定机制提供了前所未有的高分辨率视角。Ye等<sup>[41]</sup>利用Chip-Tip平台量化了人诱导多能干细胞中的干细胞标志物OCT4和SOX2,以及不同胚层来源细胞中谱系特异性标志物(包括内胚层标志物GATA4、中胚层标志物HAND1和外胚层标志物MAP2)的定量检测,从而系统描绘了多能干细胞定向分化的蛋白质动态图谱。

在药物机制研究方面,Fang等<sup>[32]</sup>采用scPMA策略在单细胞水平上系统评估了多柔比星对肿瘤细胞的干预效应,结果显示,给药后单细胞层

面呈现出显著的蛋白质组与代谢组协同变化特征。此外,Woo等<sup>[77]</sup>运用单细胞蛋白质组学技术对前列腺癌耐药细胞(DRCs)进行系统表征,并与亲本PC3细胞比较分析,识别出与细胞体积变化密切相关的功能亚群,同时还发现一系列在癌症进展中发挥关键作用的表面蛋白(如ACTN1、CD47和FAT1)及转录因子(如COPS2、DDX5、DNMT1、ENO1、SMARCA5、SNRPB)的表达上调现象,为阐明耐药细胞的分子机制提供了重要依据。

## 7 总结与展望

本文系统回顾了基于质谱的单细胞蛋白质组学在样本制备、色谱分离、质谱检测及数据分析等环节的全链条技术进展。在单细胞分离方面,从操作繁琐、成功率较低的有限稀释法逐步发展为采用CellenONE等全自动单细胞分选系统,实现了高通量且保持细胞高活性的分选,已成为当前的主流趋势;在样本前处理方面,微流控技术(如SODA、nanoPOTs、iProChip、AM-DMF-SCP)与一体化处理平台(如proteoCHIP、one-tip、Chip-Tip)的不断革新,显著提升了处理效率与样品利用率,推动了样本处理向微型化、自动化和集成化方向发展,已成为主导技术路径;在色谱分离与质谱检测方面,超细内径色谱柱、稳定高效的液相色谱系统(如Evosep One),以及具备超高灵敏度与高速扫描能力的新一代质谱仪(如Orbitrap Astral、timsTOF SCP),共同构建了强有力的硬件支撑体系;在数据采集与解析方面,DIA及其衍生技术(如diaPASEF、nDIA)凭借高重现性和低缺失值优势,正逐步成为大规模单细胞队列研究的标准采集策略,同时,针对单细胞数据特征开发的专用算法与软件(如scplainer、scPROTEIN),以及日益完善的公共数据库资源(如SingPro、SPDB),为从复杂数据中挖掘可靠的生物学信息提供了重要支持。

尽管单细胞蛋白质组学取得了显著进展,但仍面临诸多挑战,这亦构成了其未来技术发展及应用研究的主要方向。首先,实现更高通量与更深层次覆盖的整合是技术发展的核心目标,这要求样本前处理平台具备更高的自动化水平与并行处理能力,同时质谱仪在扫描速度和检测灵敏度方面有待进一步提升。将单细胞蛋白质组学

与转录组学、代谢组学等多组学技术在同一细胞层面进行整合分析,有望为全面解析细胞功能调控网络提供关键支持。其次,数据分析的标准化与智能化亟待加强,随着数据规模的迅速增长,建立稳健、标准化且用户友好的数据分析流程尤为重要,人工智能与机器学习技术将在数据质量控制、缺失值填补、批次效应校正、细胞类型自动注释以及从原始数据中直接预测生物学表型等方面发挥日益重要的作用。最后,推动临床转化与应用拓展是该领域的重要发展方向,单细胞蛋白质组学已在细胞异质性研究、癌症机制探索、发育生物学及药物作用机理分析等领域展现出广阔前景,未来的关键任务在于将实验室研究成果转化为稳定、可重复的临床检测手段,应用于疾病的早期诊断、分子分型、预后评估及个体化用药指导,从而助力精准医疗的飞速发展。

#### 参考文献:

- [1] ALTSCHULER S J, WU L F. Cellular heterogeneity: do differences make a difference[J]. *Cell*, 2010, 141(4): 559-563.
- [2] SLAVOV N. Unpicking the proteome in single cells[J]. *Science*, 2020, 367(6 477): 512-513.
- [3] AHMAD R, BUDNIK B. A review of the current state of single-cell proteomics and future perspective[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2023, 415(28): 6 889-6 899.
- [4] LABIB M, KELLEY S O. Single-cell analysis targeting the proteome[J]. *Nature Reviews Chemistry*, 2020, 4(3): 143-158.
- [5] FURTWÄNGLER B, ÜRESIN N, RICHTER S, SCHUSTERM B, BARMPOURI D, HOLZE H, WENZEL A, GRØNBÆK K, THEILGAARD-MÖNCH K, THEIS F J, SCHOOF E M, PORSE B T. Mapping early human blood cell differentiation using single-cell proteomics and transcriptomics[J]. *Science*, 2025, 390(6 770): eadr8 785.
- [6] STELLOO S, ALEJO-VINOGRADOVA M T, van GELDER C A G H, ZIJLMANS D W, van OOSTROM M J, VALVERDE J M, LAMERS L A, RUS T, SOBREVALS ALCARAZ P, SCHÄFFERS T, FURLAN C, JANSEN P W T C, BALTISSSEN M P A, SONNEN K F, BURGERING B, ALTELAAR M A F M, VOS H R, VERMEULEN M. Deciphering lineage specification during early embryogenesis in mouse gastruloids using multilayered proteomics[J]. *Cell Stem Cell*, 2024, 31(7): 1 072-1 090.
- [7] SCHMID A, KORTMANN H, DITTRICH P S, BLANKL M. Chemical and biological single cell analysis[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2010, 21(1): 12-20.
- [8] DENG Y, FINCK A, FAN R. Single-cell omics analyses enabled by microchip technologies[J]. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 2019, 21: 365-393.
- [9] WANG J, YANG F. Emerging single-cell technologies for functional proteomics in oncology[J]. *Expert Review of Proteomics*, 2016, 13(9): 805-815.
- [10] LI W, YANG F, WANG F, RONGY, LIU L, WU B, ZHANG H, YAO J. scPROTEIN: a versatile deep graph contrastive learning framework for single-cell proteomics embedding[J]. *Nature Methods*, 2024, 21(4): 623-634.
- [11] GREENFIELD E A. Single-cell cloning of hybridoma cells by limiting dilution[J]. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2019, DOI: [10.1101/pdb.prot103192](https://doi.org/10.1101/pdb.prot103192).
- [12] WRIGHT G, TUCKER M J, MORTON P C, SWEITZER-YODER L, SMITH S E. Micromanipulation in assisted reproduction: a review of current technology[J]. *Current Opinion in Obstetrics & Gynecology*, 1998, 10(3): 221-226.
- [13] GROSS A, SCHOENDUBE J, ZIMMERMANN S, STEEBM, ZENGERLE R, KOLTAY P. Technologies for single-cell isolation[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2015, 16(8): 16 897-16 919.
- [14] BROWN M, WITTEWER C. Flow cytometry: principles and clinical applications in hematology[J]. *Clinical Chemistry*, 2000, 46(8 Pt 2): 1 221-1 229.
- [15] DAVEY H M, KELL D B. Flow cytometry and cell sorting of heterogeneous microbial populations: the importance of single-cell analyses[J]. *Microbiological Reviews*, 1996, 60(4): 641-696.
- [16] McKINNON K M. Flow cytometry: an overview[J]. *Current Protocols in Immunology*, 2018, 120(1): 5.1.1-5.1.11.
- [17] VALET G. Past and present concepts in flow cytometry: a European perspective[J]. *Journal of Biological Regulation and Homeostatic Agents*, 2003, 17(3): 213-222.
- [18] ESPINA V, WULFKUHLE J D, CALVERT V S, VANMETERA, ZHOU W, COUKOS G, GEHO D H, PETRICCOIN E F III, LIOTTA L A. Laser-capture microdissection[J]. *Nature Protocols*, 2006, 1(2): 586-603.
- [19] BROUZES E, MEDKOVA M, SAVENELLI N, MAR-

- RAND, TWARDOWSKI M, HUTCHISON J B, ROTHBERG J M, LINK D R, PERRIMON N, SAMUELS M L. Droplet microfluidic technology for single-cell high-throughput screening[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009, 106(34): 14 195-14 200.
- [20] GÓMEZ-SJÖBERG R, LEYRAT A A, PIRONE D M, CHENC S, QUAKE S R. Versatile, fully automated, microfluidic cell culture system[J]. *Analytical Chemistry*, 2007, 79(22): 8 557-8 563.
- [21] Di CARLO D, WU L Y, LEE L P. Dynamic single cell culture array[J]. *Lab on a Chip*, 2006, 6(11): 1 445-1 449.
- [22] BUDNIK B, LEVY E, HARMANGE G, SLAVOVN. SCoPE-MS: mass spectrometry of single mammalian cells quantifies proteome heterogeneity during cell differentiation[J]. *Genome Biology*, 2018, 19(1): 161.
- [23] SPECHT H, EMMOTT E, PETELSKI A A, HUFFMANR G, PERLMAN D H, SERRA M, KHARCHENKO P, KOLLER A, SLAVOV N. Single-cell proteomic and transcriptomic analysis of macrophage heterogeneity using SCoPE2[J]. *Genome Biology*, 2021, 22(1): 50.
- [24] LEDUC A, HUFFMAN R G, CANTLON J, KHANS, SLAVOV N. Exploring functional protein covariation across single cells using nPOP[J]. *Genome Biology*, 2022, 23(1): 261.
- [25] TSAI C F, ZHANG P, SCHOLTEN D, MARTINK, 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. Surfactant-assisted one-pot sample preparation for label-free single-cell proteomics[J]. *Communications Biology*, 2021, 4: 265.
- [26] MASUDA T, INAMORI Y, FURUKAWA A, YAMAHIROM, MOMOSAKI K, CHANG C H, KOBAYASHI D, OHGUCHI H, KAWANO Y, ITO S, ARAKI N, ONG S E, OHTSUKI S. Water droplet-in-oil digestion method for single-cell proteomics[J]. *Analytical Chemistry*, 2022, 94(29): 10 329-10 336.
- [27] LI S, SU K, ZHUANG Z, QINQ, GAO L, DENG Y, LIU X, HOU G, WANG L, HAO P, YANG H, LIU S, ZHU H, REN Y. A simple, rapid, and practical method for single-cell proteomics based on mass-adaptive coating of synthetic peptides[J]. *Science Bulletin*, 2022, 67(6): 581-584.
- [28] LI Z, HUANG M, WANG X, ZHU Y, LI J, WONG C, FANG Q. Nanoliter-scale oil-air-droplet chip-based single cell proteomic analysis[J]. *Analytical Chemistry*, 2018, 90(8): 5 430-5 438.
- [29] WANG Y, GUAN Z, SHI S, JIANG Y, ZHANG J, YANG Y, WU Q, WU J, CHEN J, YING W, XU Q, FAN Q, WANG H, ZHOU L, WANG L, FANG J, PAN J, FANG Q. Pick-up single-cell proteomic analysis for quantifying up to 3000 proteins in a Mammalian cell[J]. *Nature Communications*, 2024, 15: 1 279.
- [30] WU J, XU Q, JIANG Y, CHEN J, YING W, FAN Q, WANG H, WANG Y, SHI S, PAN J, FANG Q. One-shot single-cell proteome and metabolome analysis strategy for the same single cell[J]. *Analytical Chemistry*, 2024, 96(14): 5 499-5 508.
- [31] 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. Nanodroplet processing platform for deep and quantitative proteome profiling of 10-100 mammalian cells[J]. *Nature Communications*, 2018, 9: 882.
- [32] WOO J, WILLIAMS S M, MARKILLIE L M, FENG S, TSAI C F, AGUILERA-VAZQUEZ V, SONTAG R L, MOORE R J, HU D, MEHTA H S, CANTLON-BRUCE J, LIU T, ADKINS J N, SMITH R D, CLAIR G C, PASA-TOLIC L, ZHU Y. High-throughput and high-efficiency sample preparation for single-cell proteomics using a nested nanowell chip[J]. *Nature Communications*, 2021, 12: 6 246.
- [33] GEBREYESUS S T, ALISİYAL A, KITATA R B, CHENE S, ENKHBAYAR B, ANGATA T, LIN K I, CHEN Y J, TU H L. Streamlined single-cell proteomics by an integrated microfluidic chip and data-independent acquisition mass spectrometry[J]. *Nature Communications*, 2022, 13: 37.
- [34] 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. AM-DMF-SCP: integrated single-cell proteomics analysis on an active matrixdigital microfluidic chip[J]. *JACS Au*, 2024, 4(5): 1 811-1 823.
- [35] CTORTECKA C, CLARK N M, BOYLE B W, SETHA, MANI D R, UDESHI N D, CARR S A. Automated single-cell proteomics providing sufficient proteome depth to study complex biology beyond cell type classifications[J]. *Nature Communications*, 2024, 15: 5 707.

- [36] BRUNNER A D, THIELERT M, VASILOPOULOU C, AMMARC, 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. Ultra-high sensitivity mass spectrometry quantifies single-cell proteome changes upon perturbation[J]. *Molecular Systems Biology*, 2022, 18(3): e10798.
- [37] YE Z, SABATIER P, MARTIN-GONZALEZ J, EGUCHIA, LECHNER M, ØSTERGAARD O, XIE J, GUO Y, SCHULTZ L, TRUFFER R, BEKKER-JENSEN D B, BACHE N, OLSEN J V. One-Tip enables comprehensive proteome coverage in minimal cells and single zygotes[J]. *Nature Communications*, 2024, 15: 2474.
- [38] YE Z, SABATIER P, vander HOEVEN L, LECHNERM Y, PHLAIRAHARN T, GUZMAN U H, LIU Z, HUANG H, HUANG M, LI X, HARTLMAYR D, IZAGUIRRE F, SETH A, JOSHI H J, RODIN S, GRIN-NEMO K H, HØRNING O B, BEKKER-JENSEN D B, BACHE N, OLSEN J V. Enhanced sensitivity and scalability with a Chip-Tip workflow enables deep single-cell proteomics[J]. *Nature Methods*, 2025, 22(3): 499-509.
- [39] MUND A, COSCIA F, KRISTON A, HOLLANDIR, KOVÁCS F, BRUNNER A D, MIGH E, SCHWEIZER L, SANTOS A, BZOREK M, NAIMY S, RAHBEKGJERDRUM L M, DYRING-ANDERSEN B, BULKESCHER J, LUKAS C, ECKERT M A, LENGYEL E, GNANN C, LUNDBERG E, HORVATH P, MANN M. Deep visual proteomics defines single-cell identity and heterogeneity[J]. *Nature Biotechnology*, 2022, 40(8): 1231-1240.
- [40] DONG Z, JIANG W, WU C, CHENT, CHEN J, DING X, ZHENG S, PIATKEVICH K D, ZHU Y, GUO T. Spatial proteomics of single cells and organelles on tissue slides using filter-aided expansion proteomics[J]. *Nature Communications*, 2024, 15: 9378.
- [41] TSAI C F, WANG Y, HSU C C, KITATAR B, CHU R K, VELICKOVIC M, ZHAO R, WILLIAMS S M, CHRISLER W B, JORGENSEN M L, MOORE R J, ZHU Y, RODLAND K D, SMITH R D, WASSERFALL C H, SHI T, LIU T. A streamlined tandem tip-based workflow for sensitive nanoscale phosphoproteomics[J]. *Communications Biology*, 2023, 6: 70.
- [42] ZHU Y, ZHANG Y, CAI L, FANG Q. Sequential operation droplet array: an automated microfluidic platform for picoliter-scale liquid handling, analysis, and screening[J]. *Analytical Chemistry*, 2013, 85(14): 6723-6731.
- [43] ZHU Y, CLAIR G, CHRISLER W B, SHENY, ZHAO R, SHUKLA A K, MOORE R J, MISRA R S, PRYHUBER G S, SMITH R D, ANSONG C, KELLY R T. Proteomic analysis of single mammalian cells enabled by microfluidic nanodroplet sample preparation and ultrasensitive NanoLC-MS[J]. *Angewandte Chemie (International Ed in English)*, 2018, 57(38): 12370-12374.
- [44] GIESEN C, WANG H A O, SCHAPIRO D, ZIVANOVICN, JACOBS A, HATTENDORF B, SCHÜFFLER P J, GROLIMUND D, BUHMANN J M, BRANDT S, VARGA Z, WILD P J, GÜNTHER D, BODENMILLER B. Highly multiplexed imaging of tumor tissues with subcellular resolution by mass cytometry[J]. *Nature Methods*, 2014, 11(4): 417-422.
- [45] GOLTSEV Y, SAMUSIK N, KENNEDY-DARLING J, BHATE S, HALE M, VAZQUEZ G, BLACK S, NOLAN G P. Deep profiling of mouse splenic architecture with CODEX multiplexed imaging[J]. *Cell*, 2018, 174(4): 968-981.
- [46] WANG F, SUN C, WU T, FU Y, FAN Y, ZHAO S, HUANG K, PAN Z, LU Y, HAN J R, JIA S, ZENG L, ZHANG S, CHEN T, AN S, MENG S, GUO X, LI W, LIAN H, SUN X, HU J, YANG C, FENG S, LI P, DU L, LIU X, PIATKEVICH K D, ZOU Y. iPEX enables micrometre-resolution deep spatial proteomics *via* tissue expansion[J]. *Nature*, 2026, 649(8096): 505-514.
- [47] ZHU Y, ZHAO R, PIEHOWSKI P D, MOORER J, LIM S, ORPHAN V J, PAŠA-TOLIĆ L, QIAN W J, SMITH R D, KELLY R T. Subnanogram proteomics: impact of LC column selection, MS instrumentation and data analysis strategy on proteome coverage for trace samples[J]. *International Journal of Mass Spectrometry*, 2018, 427: 4-10.
- [48] CONG Y, LIANG Y, MOTAMEDCHABOKI K, HUGUETR, TRUONG T, ZHAO R, SHEN Y, LOPEZFERRER D, ZHU Y, KELLY R T. Improved single-cell proteome coverage using narrow-bore packed NanoLC-columns and ultrasensitive mass spectrometry[J]. *Analytical Chemistry*, 2020, 92(3): 2665-2671.
- [49] XIANG P, ZHU Y, YANG Y, ZHAO Z, WILLIAMS S M, MOORE R J, KELLY R T, SMITH R D, LIU S. Picoflowliquid chromatography-mass spectrometry for ultrasensitive bottom-up proteomics using 2- $\mu$ m-i.d. open tubular columns[J]. *Analytical Chemistry*, 2020, 92(7): 4711-4715.
- [50] STADLMANN J, HUDECZ O, KRŠŠÁKOVÁ G,

- CTORTECKAC, van RAEMDONCK G, OP de BEECK J, DESMET G, PENNINGER J M, JACOBS P, MECHTLER K. Improved sensitivity in low-input proteomics using micropillar array-based chromatography [J]. *Analytical Chemistry*, 2019, 91(22): 14 203-14 207.
- [51] LIANG Y, WANG C, LIANG Z, ZHANG L, ZHANG Y. C18-functionalized amine-bridged hybrid monoliths for mass spectrometry-friendly peptide separation and highly sensitive proteomic analysis[J]. *Analytical Chemistry*, 2022, 94(16): 6 084-6 088.
- [52] WEBBER K G I, TRUONG T, JOHNSTON S M, ZAPATAS E, LIANG Y, DAVIS J M, BUTTARS A D, SMITH F B, JONES H E, MAHONEY A C, CARSON R H, NWOSU A J, HENINGER J L, LIYU A V, NORDIN G P, ZHU Y, KELLY R T. Label-free profiling of up to 200 single-cell proteomes per day using a dual-column nanoflow liquid chromatography platform [J]. *Analytical Chemistry*, 2022, 94(15): 6 017-6 025.
- [53] BACHE N, GEYER P E, BEKKER-JENSEN D B, HOERNING O, FALKENBY L, TREIT P V, DOLL S, PARON I, MÜLLER J B, MEIER F, OLSEN J V, VORM O, MANN M. A novel LC system embeds analytes in pre-formed gradients for rapid, ultra-robust proteomics[J]. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2018, 17(11): 2 284-2 296.
- [54] CONG Y, MOTAMEDCHABOKI K, MISAL S A, LIANGY, GUISE A J, TRUONG T, HUGUET R, PLOWEY E D, ZHU Y, LOPEZ-FERRER D, KELLY R T. Ultrasensitive single-cell proteomics workflow identifies >1000 protein groups per mammalian cell[J]. *Chemical Science*, 2021, 12(3): 1 001-1 006.
- [55] WOO J, CLAIR G C, WILLIAMS S M, FENG S, TSAI C F, MOORE R J, CHRISLER W B, SMITH R D, KELLY R T, PAŠA-TOLIĆ L, ANSONG C, ZHU Y. Three-dimensional feature matching improves coverage for single-cell proteomics based on ion mobility filtering[J]. *Cell Systems*, 2022, 13(5): 426-434.
- [56] GUZMAN U H, MARTINEZ-VAL A, YE Z, DAMOC E, ARREY T N, PASHKOVA A, RENUSE S, DENISOV E, PETZOLDT J, PETERSON A C, HARKING F, ØSTERGAARD O, RYDBIRK R, AZNAR S, STEWART H, XUAN Y, HERMANSON D, HORNING S, HOCK C, MAKAROV A, ZABROUSKOV V, OLSEN J V. Ultra-fast label-free quantification and comprehensive proteome coverage with narrow-window data-independent acquisition[J]. *Nature Biotechnology*, 2024, 42(12): 1 855-1 866.
- [57] BUBIS J A, ARREY T N, DAMOC E, DELANGHE B, SLOVAKOVA J, SOMMER T M, KAGAWA H, PICHLER P, RIVRON N, MECHTLER K, MATZINGER M. Challenging the Astral mass analyzer to quantify up to 5,300 proteins per single cell at unseen accuracy to uncover cellular heterogeneity[J]. *Nature Methods*, 2025, 22(3): 510-519.
- [58] PETROSIUS V, ARAGON-FERNANDEZ P, ARREY T N, WOESSMANN J, ÜRESIN N, de BOER B, SU J, FURTWÄNGLER B, STEWART H, DENISOV E, PETZOLDT J, PETERSON A C, HOCK C, DAMOC E, MAKAROV A, ZABROUSKOV V, PORSE B T, SCHOOF E M. Quantitative label-free single-cell proteomics on the Orbitrap astral MS[J]. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2025, 24(6): 100 982.
- [59] MEIER F, BRUNNER A D, KOCH S, KOCHH, LUBECK M, KRAUSE M, GOEDECKE N, DECKER J, KOSINSKI T, PARK M A, BACHE N, HOERNING O, COX J, RÄTHER O, MANN M. Online parallel accumulation-serial fragmentation (PASEF) with a novel trapped ion mobility mass spectrometer[J]. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2018, 17(12): 2 534-2 545.
- [60] MUN D G, BHAT F A, DING H, MADDENB J, NATE-SAMPILLAI S, BADLEY A D, JOHNSON K L, KELLY R T, PANDEY A. Optimizing single cell proteomics using trapped ion mobility spectrometry for label-free experiments[J]. *Analyst*, 2023, 148(15): 3 466-3 475.
- [61] KARAGACH S, SMOLLICH J, ATRAKCHI O, MOHANV, GEIGER T. High-throughput single-cell proteomics of *in vivo* cells[J]. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2025, 24(7): 101 018.
- [62] 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 A D N, ANDERSEN J L, PAYNE S H, KELLY R T. Data-dependent acquisition with precursor coisolation improves proteome coverage and measurement throughput for label-free single-cell proteomics[J]. *Angewandte Chemie (International Ed in English)*, 2023, 62(34): e202303415.
- [63] PETROSIUS V, ARAGON-FERNANDEZ P, ÜRESIN N, KOVACS G, PHLAIRAHARN T, FURTWÄNGLER B, OP de BEECK J, SKOVBAKKE S L, GOLETZ S, THOMSEN S F, KELLER U A D, NATARAJAN K N, PORSE B T, SCHOOF E M. Exploration of cell state heterogeneity using single-cell proteomics through sensi-

- tivity-tailored data-independent acquisition[J]. *Nature Communications*, 2023, 14: 5910.
- [64] NOOR Z, AHN S B, BAKER M S, RANGANATHANS, MOHAMEDALI A. Mass spectrometry-based protein identification in proteomics-a review[J]. *Briefings in Bioinformatics*, 2021, 22(2): 1620-1638.
- [65] DEMICHEV V, MESSNER C B, VERNARDIS S I, LILLEYK S, RALSER M. DIA-NN: neural networks and interference correction enable deep proteome coverage in high throughput[J]. *Nature Methods*, 2020, 17(1): 41-44.
- [66] TSOUC C C, AVTONOMOV D, LARSEN B, TUCHOLSKAM, CHOI H, GINGRAS A C, NESVIZHSHKII A I. DIA-Umpire: comprehensive computational framework for data-independent acquisition proteomics[J]. *Nature Methods*, 2015, 12(3): 258-264.
- [67] HUFFMAN R G, CHEN A, SPECHT H, SLAVOVN. DO-MS: data-driven optimization of mass spectrometry methods[J]. *Journal of Proteome Research*, 2019, 18(6): 2493-2500.
- [68] CHEUNG T K, LEE C Y, BAYER F P, McCOYA, KUSTER B, ROSE C M. Defining the carrier proteome limit for single-cell proteomics[J]. *Nature Methods*, 2021, 18(1): 76-83.
- [69] CHEN A T, FRANKS A, SLAVOV N. DART-ID increases single-cell proteome coverage[J]. *PLoS Computational Biology*, 2019, 15(7): e1007082.
- [70] WANG B, WANG Y, CHEN Y, GAO M, REN J, GUO Y, SITU C, QI Y, ZHU H, LI Y, GUO X. DeepSCP: utilizing deep learning to boost single-cell proteome coverage[J]. *Briefings in Bioinformatics*, 2022, 23(4): bbac214.
- [71] KALXDORF M, MÜLLER T, STEGLE O, KRIGSVELDJ. IceR improves proteome coverage and data completeness in global and single-cell proteomics[J]. *Nature Communications*, 2021, 12: 4787.
- [72] VANDERAA C, GATTO L. Scplainer: using linear models to understand mass spectrometry-based single-cell proteomics data[J]. *Genome Biology*, 2025, 26(1): 237.
- [73] GESSULAT S, SCHMIDT T, ZOLG D P, SAMARAS P, SCHNATBAUM K, ZERWECK J, KNAUTE T, RECHENBERGER J, DELANGHE B, HUHMER A, REIMER U, EHRLICH H C, AICHE S, KUSTER B, WILHELM M. Prosit: proteome-wide prediction of peptide tandem mass spectra by deep learning[J]. *Nature Methods*, 2019, 16(6): 509-518.
- [74] LIAN X, ZHANG Y, ZHOU Y, SUNX, HUANG S, DAI H, HAN L, ZHU F. SingPro: a knowledge base providing single-cell proteomic data[J]. *Nucleic Acids Research*, 2024, 52(D1): D552-D561.
- [75] WANG F, LIU C, LI J, YANG F, SONG J, ZANG T, YAO J, WANG G. SPDB: a comprehensive resource and knowledgebase for proteomic data at the single-cell resolution[J]. *Nucleic Acids Research*, 2024, 52(D1): D562-D571.
- [76] ROSENBERGER F A, THIELERT M, STRAUSS M T, SCHWEIZER L, AMMAR C, MÁDLER 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. Spatial single-cell mass spectrometry defines zonation of the hepatocyte proteome[J]. *Nature Methods*, 2023, 20(10): 1530-1536.
- [77] WOO J, LOYCANO M, AMANULLAH M, QIAN J, AMEND S R, PIENTA K J, ZHANG H. Single-cell proteomic characterization of drug-resistant prostate cancer cells reveals molecular signatures associated with morphological changes[J]. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2025, 24(4): 100949.

(收稿日期: 2025-11-18; 修回日期: 2025-12-31)