

基于质谱的单细胞分析技术研究新进展

尤穆英楠^{1,2,3}, 刘心昱^{1,2}, 石先哲^{1,2}, 许国旺^{1,2,3}

(1. 中国科学院大连化学物理研究所, 中国科学院分离分析化学重点实验室, 辽宁 大连 116023;

2. 辽宁省代谢组学重点实验室, 辽宁 大连 116023; 3. 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要: 细胞是生物体最基本的结构和功能单位。近年来, 人们对细胞异质性的关注越来越多。为了分析细胞的这种异质性, 避免单细胞信息被群体细胞的平均值所淹没, 单细胞分析技术不断发展起来。由于单细胞的体积小, 内含物质含量低且种类繁多, 某些物质在细胞内的变化迅速, 分析过程中不同物质之间相互干扰, 造成了单细胞分析极具挑战性。基于质谱的单细胞分析技术具有通用性强、无需标记、高灵敏度、高分辨率、高选择性的优点, 已逐渐在单细胞分析技术中脱颖而出, 成为单细胞分析的理想工具。本文系统地总结了近 5 年来基于质谱的单细胞分析技术的最新进展, 包括电喷雾电离质谱、激光解吸电离质谱、二次离子质谱、电感耦合等离子体质谱, 并对未来的研究和技术方向进行展望, 希望为单细胞质谱分析技术的研究提供参考。

关键词: 单细胞; 电喷雾电离质谱(ESI-MS); 激光解吸电离质谱(LDI-MS); 二次离子质谱(SIMS); 电感耦合等离子体质谱(ICP-MS)

中图分类号: O657.63

文献标志码: A

文章编号: 1004-2997(2024)03-0316-16

doi: 10.7538/zpxb.2023.0137

New Advances of Single-cell Analysis Based on Mass Spectrometry

YOU Mu-ying-nan^{1,2,3}, LIU Xin-yu^{1,2}, SHI Xian-zhe^{1,2}, XU Guo-wang^{1,2,3}

(1. CAS Key Laboratory of Separation Science for Analytical Chemistry, Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, China; 2. Liaoning Key Laboratory of Metabolomics, Dalian 116023, China;

3. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: Cells are the most basic structural and functional unit of living organisms. In recent years, people have paid more attention to cell heterogeneity. In order to characterize the heterogeneity of cells and prevent the life information in an individual cell from being overwhelmed by the average level of the population gained from traditional cell biology research, many new analytical techniques have been developed for single-cell analysis. However, single-cell analysis is extremely challenging due to the minimal cell volume, low content and wide variety of analytes in single cells, some of analytes change rapidly in cells and others may interfere with each other during analysis. Mass spectrometry has gradually become an ideal tool for single-cell analysis due to its high sensitivity, high resolution and high selectivity. In this review, several techniques of single-cell analysis based on mass spectrometry in the recent five years were systematically summarized and discussed including electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS), laser desorption ionization mass spectrometry

(LDI-MS), secondary ion mass spectrometry (SIMS) and inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). Finally, this review also looked into future developments of these mass spectrometry-based techniques. With the development of cell biology, the requirement for single-cell analysis technology is increasing as well. In the meanwhile, single-cell analysis, which focuses on studying the mechanisms of cellular and molecular behavior, has aroused more and more attention from various branches of life sciences in recent years. Although higher spatial resolution and detection sensitivity have become the development trends for single-cell mass spectrometry, none of these mass spectrometry-based techniques can be recognized flawless, which means they all have certain flaws to some extent. Consequently, single-cell analysis technology based on mass spectrometry is developing towards methodological diversification. On the one hand, it is of great importance to choose one suitable mass spectrometry-based technique according to the research purpose and actual conditions. On the other hand, it should be also emphasized that different methods can complement each other and jointly provide a more comprehensive analysis environment for single-cell mass spectrometry, thereby improving and innovating existing single-cell analysis techniques based on mass spectrometry. This review will provide insights into better understanding on and development of single-cell analysis by mass spectrometry.

Key words: single-cell; electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS); laser desorption ionization mass spectrometry (LDI-MS); secondary ion mass spectrometry (SIMS); inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS)

细胞是生物体最基本的结构和功能单位。近年来,随着分析技术的发展,人们逐渐关注到细胞具有明显的异质性^[1],即使是在相同条件下培养的同源细胞,在形态、基因表达及生长特性等方面也可能具有差异性,这种差异性可以帮助人们更好地理解细胞的生命过程。为了分析细胞的异质性,防止单细胞的生命信息被传统细胞生物学对细胞群体的研究得出的平均值所淹没^[2-3],单细胞分析技术不断发展起来。通过单独分析感兴趣的特定细胞,如循环肿瘤细胞、肿瘤干细胞等稀有细胞,对人们了解肿瘤形成等病理过程或其他重要的生理过程具有重要帮助^[4]。但是,单细胞分析也面临着许多挑战。首先,单细胞的体积小,分离或富集样品的难度较大;其次,单细胞中的物质含量极低,对分析方法的灵敏度要求较高;最后,单细胞中的代谢物种种类繁多,在细胞内变化迅速,分析过程中不同物质之间可能相互干扰,对分析方法的选择性要求较高^[5-7]。

目前,用于单细胞分析的技术主要可以归纳为基于光谱、基于电化学、基于质谱的单细胞分析技术。基于光谱的单细胞分析技术主要包括拉曼光谱、X射线光谱、红外光谱、核磁共振波

谱及荧光光谱,其中荧光光谱在单细胞分析领域最常用。应用荧光光谱测定时,荧光标记物需要与待测物质特异性结合,通过检测荧光来检测目标化合物的分布和含量。由于细胞中绝大部分的分子自身没有荧光,需要预先进行标记,这会对分子本身的理化性质产生一定的影响,尤其是一些小分子;此外,由于光谱重叠的原因,荧光探针具有一定的波长范围,只能检测个别几种没有相互干扰的分子,无法同时检测细胞中多种化学物质^[8]。基于电化学的单细胞分析技术通常使用微米或纳米级超细电极对单细胞中的化学物质进行实时定量分析,其灵敏度较高。然而,电化学方法只能用于电活性物质,分析的物质有限。此外,与荧光光谱分析类似,电化学方法也不适用于同时检测多种化学物质^[9]。基于质谱的单细胞分析技术通过测量离子的质荷比,具有通用性,而且不需要预先标记即可检测细胞中的化学物质;此外,还具有高灵敏度、高分辨率、高选择性的优点,能够满足单细胞分析对技术层面提出的要求,可以同时检测多种化学物质并识别特定分子结构^[10-13],已逐渐在单细胞分析技术中脱颖而出,成为单细胞分析的理想工具。

本文将重点关注单细胞质谱分析的电离方

法,如电喷雾电离质谱(ESI-MS)、激光解吸电离质谱(LDI-MS)、二次离子质谱(SIMS)和电感耦合等离子体质谱(ICP-MS),系统地综述其基本原理与实际应用,以及近5年的最新进展,总结不同电离方法的优势与不足,并对未来的研究和技術发展方向进行展望。

1 电喷雾电离质谱

电喷雾电离(ESI)是一种高电离效率的软电离技术,广泛应用于质谱分析中。软电离是一种给样品施加较小能量以产生样品分子离子的电离方式。与其他质谱技术不同,ESI-MS适用于活体单细胞的原位分析^[6]。目前应用比较广泛的5种ESI技术是纳升电喷雾电离(Nano-ESI)、探针电喷雾电离(PESI)、解吸电喷雾电离(DESI)、激光烧蚀电喷雾电离(LAESI)、毛细管电泳电喷雾电离(CE-ESI)。

1.1 纳升电喷雾电离技术

Nano-ESI是在显微镜下使用纳升尖端直接从活体单细胞中提取样品,然后对样品施加高电压形成电喷雾^[7]。这种直接从活体单细胞中提取样品的方式可以有效减少代谢物损失与代谢组紊乱^[14];此外,由于其具有样品消耗低、对盐和缓冲液的耐受性好等优点^[15],该技术非常适用于单细胞质谱分析。与传统的ESI技术相比,Nano-ESI具有更小的电喷雾发射器尖端和更低的流量,这使其灵敏度有较大提高。

杨志柏等^[16]设计的一种新型T探针能够快速裂解活的非贴壁单细胞,然后立即进行质谱分析。这种新型T探针由提供溶剂的毛细管、采样探针和纳升电喷雾发射器3个组件构成,将它们嵌入2个聚碳酸酯载玻片之间,并通过T型结连接。该设计的创新点在于可以对悬浮细胞进行取样分析,同时可以对整个细胞进行在线快速裂解分析。细胞可以从溶液中取出,然后在纳升电喷雾发射器内快速裂解,避免了细胞内容物的损失。该团队已成功将这种新型T探针应用于Nano-ESI MS中,分别对对照组和抗癌药物处理组的结肠癌细胞(HCT-116)进行单细胞质谱分析,检测了多种细胞内物种,并使用串联质谱(MS²)对选定的离子进行结构鉴定。

尽管Nano-ESI是一种非常适用于单细胞质谱分析的方法,但由于严重的基质效应和高浓度

盐的影响,对小体积样品(如单细胞中低丰度代谢物)的高灵敏度检测仍然面临挑战。为了消除高通量单细胞分析过程中严重的离子抑制,Xu等^[17]提出了一种结合电喷雾和纳升电喷雾电离(ESI-nESI)的新型双喷雾电离技术,可以实现单细胞样品的高效在线脱盐和敏感分析。Zhang等^[18]设计了一种双电极纳升电喷雾源,利用喷雾尖端的电泳传输成功实现了脱盐过程。龚晓云团队^[19]开发了一种极性反转纳升电喷雾电离(PR-nESI)技术,脱盐效果得到显著提高。该团队还利用负极性PR-nESI成功检测了单细胞生物样品中痕量的代谢性羟基多环芳烃(OH-PAHs)。黄光明团队^[20]通过改进Nano-ESI,发展了诱导纳升电喷雾电离(InESI),为细胞内浓盐环境提供了稳定的质谱信号并克服了严重的基质离子抑制效应,有助于细胞质原位ESI-MS分析。在此基础上,该团队进一步建立了一个与膜片钳技术兼容的质谱方案,用于单细胞分析和神经元活动记录,揭示了单个神经元细胞内成分的代谢过程^[21]。

随着离子化技术的不断革新,近年来出现了Nano-ESI与其他电离技术联用的复合电离源,提高了对极性范围跨度大化合物的分析灵敏度。常压化学电离(APCI)和常压光电离(APPI)是2种传统的离子源,适用于分析低极性和非极性化合物。最近,许国旺团队^[22]设计了一种新型的同轴纳升电喷雾电离-大气压化学电离复合电离源(concentric nanoESI-APCI hybrid source),提高了细胞中低丰度、低电离效率和弱极性代谢物的检测能力,从单个哺乳动物细胞中鉴定到254种代谢物。方向团队^[23]研制了一种纳升大气压光电离(Nano-APPI)源,用于小体积生物样品(如单细胞)中低极性多环芳烃的分析,它结合了Nano-ESI对样品的低消耗和APPI对低极性化合物的高电离效率的优点。介质阻挡放电电离(DBDI)源是一种灵敏、高效、廉价的低温等离子体源,它与ESI有着完全不同的电离过程。等离子体含有许多反应物质,通过电荷转移、电子冲击或潘宁电离过程使非极性化合物带电以及通过质子化使极性化合物电离。Zenobi团队^[24]设计了一种用于单细胞分析的NanoESI-DBDI混合源,其中Nano-ESI主要电离极性化合物,DBDI作为后电离源电离非极性或弱极性化

合物和ESI电离效率低的化合物,示于图1。该团队利用NanoESI-DBDI混合源将洋葱细胞中不同极性代谢物的覆盖范围从50种提高到86种,将PANC-1细胞中代谢物的覆盖范围从40种提高到111种。

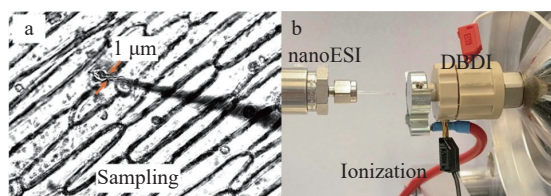


图1 单细胞采样过程(a)和 NanoESI-DBDI 混合源(b)^[24]

Fig. 1 Single-cell sampling process (a) and photo of the nanoESI-DBDI ionization source (b)^[24]

1.2 探针电喷雾电离技术

PESI是由Hiraoka等^[25]于2007年开发的一种电喷雾电离技术,用固体针状探针接触样品,针尖处捕获样品后,在针尖施加高电压形成电喷雾并使样品电离。目前已开发了浸渍PESI(dPESI)、鞘流PESI(sfPESI)和可调sfPESI(ad-sfPESI)作为PESI的改进版本,这些技术相互补充,以适用于各种生物样品的表面和整体分析。Yu等^[26]提出了一种压电喷墨辅助直接采样探针快速电喷雾电离质谱分析植物单细胞中代谢物的方法,改进的PESI包括1个具有足够锐度及高表面亲水性的不锈钢取样探针和1个压电喷墨系统作为溶剂微液滴源。

张新荣团队^[27]提出了一种使用钨探针电喷雾电离的单细胞分析方法,实现了细胞和亚细胞水平的代谢物检测,将尖端直径约1 μm的钨探针直接插入活细胞中,然后将富集的代谢物从探针尖端直接解吸/电离用于质谱检测。与将富集的分析物洗脱到液相中用于质谱检测的传统方法相比,该工作的创新点在于从探针尖端直接解吸/电离富集代谢物的采样和检测方法极大地提高了灵敏度,约达30倍。该团队仍在进一步完善该方法^[28-29],对探针进行适当的表面修饰,以实现代谢物的靶向富集;进一步对探针微型化,以减少对细胞内含物的干扰;使用特殊的微型化探针,以实现单细胞的连续监测;在探针上原位衍生富集代谢物,以进一步提高灵敏度。

1.3 解吸电喷雾电离技术

DESI是由Cooks等于2004年开发的一种电喷雾电离技术^[30]。DESI本质上是在雾化气体的帮助下,高电压激发溶剂形成带电液滴喷雾与样品板表面发生碰撞,使样品解吸产生气态离子,所产生的气态离子通过大气压离子传输线传递到质谱仪进行检测。DESI方法的优点是样品制备过程简单、不需要衬底、可以在环境条件下直接采样,使原位成像成为可能,并可用于活体组织取样。目前应用最广泛的是纳升解吸电喷雾电离(Nano-DESI),其是在DESI的基础上加以改进——利用2个毛细管形成溶剂桥,实现了电离和解吸过程的分离,大大降低了样品的飞溅损失。Nano-DESI具有低通量静态检测和高通量自动检测2种模式,其中自动表面扫描法的灵敏度高、检测速度快等优点使Nano-DESI在单细胞分析领域具有一席之地。Marques等^[31]设计了一种用于气动辅助纳升喷雾解吸电喷雾电离(PA Nano-DESI)质谱的锥形探针,由2根外径缩小至约23 μm的熔融二氧化硅毛细管组成,示于图2,其显著减小了2根毛细管之间液桥的尺寸,保留的内径确了解吸物质从表面到电喷雾发射器尖端的有效转移。该团队使用PA Nano-DESI增强了代谢物信号,通过将PA Nano-DESI与锥形毛细管探针相连接,成功显示了较大的IMR-90细胞的细胞成像和单个INS-1细胞(其直径小至15 μm)的整个代谢组。另外,Nano-DESI还可用于高通量单细胞分析。Bergman等^[32]报道了使用Nano-DESI检测人类口腔细胞内源

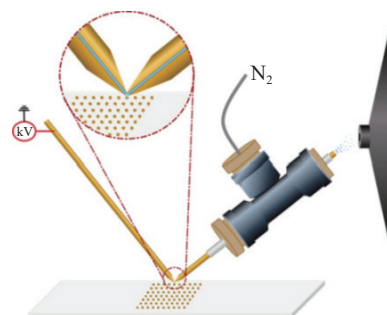


图2 PA nano-DESI 探针与锥形毛细管在液桥区域的示意图^[31]

Fig. 2 Schematic diagram of the PA nano-DESI probe with tapered capillaries in the liquid bridge area^[31]

代谢物和脂质,并对人类口腔细胞中的磷脂酰胆碱进行定量分析,测定其含量为 1.2 pmol。

1.4 激光烧蚀电喷雾电离技术

在 LAESI 中,使用聚焦在样品表面的中红外激光从富含水的样品中烧蚀分析物,光子迅速激发电水分子的 O—H 键,导致过热、相爆炸和样品从表面有效烧蚀,烧蚀释放的样品颗粒被正交电喷雾形成的液滴吸收而电离成离子输入质谱检测仪,示于图 3^[33]。目前,LAESI 已广泛应用于分子成像、单细胞和细胞群分析,对极性化合物,如蛋白质、多肽和磷脂具有较高的电离效率,但对非极性和中性化合物的电离效率相对较低^[34]。

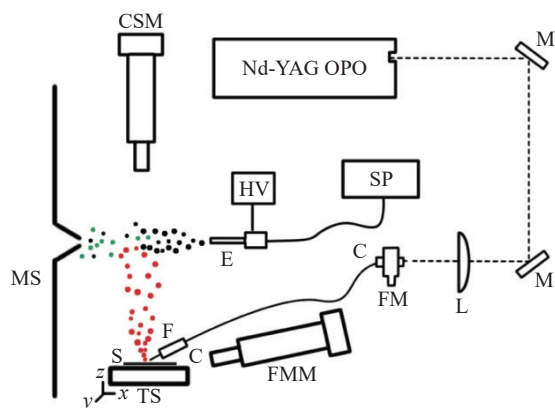


图 3 激光烧蚀电喷雾电离质谱单细胞分析装置示意图^[33]

Fig. 3 Schematic diagram of instrumental setup for single-cell analysis by LAESI-MS^[33]

为了保留与直接采样相结合分离步骤的优势,Stopka 等^[35]提出了一种使用 LAESI-MS 结合离子迁移率分离(IMS)对贴壁哺乳动物细胞进行直接分析的方法。该方法扩大了分子覆盖范围,提高了信噪比,通过确定离子碰撞截面(CCS)增加分子鉴定的可信度,并能够区分同分异构体。众所周知,傅里叶变换离子回旋共振质谱(FTICR-MS)具有超高的质量分辨力,可以最大限度地减少分子干扰,增加质谱峰容量,并测量代谢物的同位素精细结构(IFS)。Samarah 等^[36]提出了一种基于光纤的激光烧蚀电喷雾电离(f-LAESI)与 21T-FTICR-MS 相结合的单细胞分析方法。f-LAESI 利用光纤尖端的中红外激光烧蚀直接对细胞进行原位分析,无需对样品进行处理;强大的 21T-FTICR-MS 可以同时从单细胞中捕获多种代谢物的 IFS,然后对其进行计算处

理,以快速确定相应的元素组成。该课题组已将这种分析方法用于获得大豆根瘤细胞和洋葱表皮细胞代谢物的精细结构。该方法的核心是光纤的制备(需要与分析的细胞大小匹配)与 21T-FTICR-MS 数据的获取。

1.5 微分离电喷雾电离技术

CE-ESI 是毛细管电泳(CE)与 ESI 技术相结合的电喷雾电离技术。在电离和质谱分析之前进行化学分离,通过最大限度地减少电离和光谱干扰,有效地增加了组学覆盖,并通过提供分离时间辅助分子鉴定。CE-ESI 凭借高分离性能和对有限体积样品的相容性,在单细胞的定性定量分析中占有一席之地。

Portero 等设计的微分析 CE-ESI 平台具有极高的灵敏度(nmol 级),已初步在加利福尼亚海兔^[37]、大鼠^[38]单个神经元和非洲爪蟾^[39]单个胚胎细胞中鉴别出数十种代谢物。然而,目前 ESI 模式下的有限稳定性限制了对阴离子代谢物的单细胞 CE-MS 研究。同时,由于单细胞包含的物质的含量非常有限,以及细胞异质性的原因,对单细胞分别进行独立的阳离子和阴离子分析具有挑战性。因此,Portero 等^[40]提出了一种使用 CE-ESI-MS 对活胚胎中同一细胞进行阳离子-阴离子表征的策略。该策略扩展了微探针单细胞取样,即一锅微萃取阳离子和阴离子代谢物,并将 CE-ESI-MS 检测推广到负离子模式。该装置建立在同轴鞘流界面上,为了减少或消除 ESI 在负离子模式下的放电,将 CE-ESI 发射器尖端封闭在“环境室”中,用干燥的氮气以可控的速率和相对于电喷雾发射器的入射流角对“环境室”进行净化。该腔室直接安装在质谱仪的大气压界面上,并设有 1 个孔,用于在质谱仪进口孔前的腔室中精确定位 CE-ESI 发射器尖端,同时采用双向照明和长工作距离立体显微镜监测电喷雾的稳定性。结果表明,改进的 CE-ESI-MS 具有对单细胞代谢物提取物进行连续阳离子和阴离子分析的潜力。

与 CE-ESI 类似,nanoLC-ESI 将纳升液相色谱(nanoLC)与 ESI 相结合,在单细胞蛋白质组学质谱分析领域有一定的应用。Williams 等^[41]开发了一种 nanoPOTS 平台,并展示其在单细胞蛋白质组学中的广泛实用性。由于样品的体积为纳升级,nanoPOTS 平台与自动化 LC-MS 不兼

容, 该团队进一步开发了 nanoPOTS 自动进样器以及样品干燥提取装载一系列工作流程, 实现可重复可靠的样品注射, 通过自动化和样品处理流程的微型化减少了肽损失, 提高了灵敏度。目前, nanoPOTS 将样品处理降低到约 200 nL, 可以从单个 MCF10A 细胞中鉴定约 731 种蛋白质。

2 激光解吸电离质谱

激光解吸电离质谱(LDI-MS)可分为基质辅助激光解吸电离(MALDI)法和无基质激光解吸电离法。在 MALDI 中, 基质与样品首先形成共晶, 基质吸收激光的能量促使样品的相变和电离。应用 MALDI 进行单细胞分析时, 首先将靶细胞放在 ITO 载玻片上, 与底物共结晶, 随后在真空条件下用激光对晶体进行处理, 使样品发生相变和电离。无基质激光解吸电离法的基本原理与 MALDI 相似, 但其不需要基体与样品混合后共晶, 而需要一个可以将激光能量传输到样品的表面。

目前, 由于 LDI-MS 具有可以在保留空间信息的同时应用于样品分析、可以清晰地给出样品的一个或几个峰(其中最突出的峰对应于分子离子峰)、不需要在线色谱即可应用于复杂混合物分析等优点^[42-44], 该技术被广泛应用于微生物表征, 并越来越多地用于单细胞成像。与 ESI-MS 相比, LDI-MS 的优点是不需要人工采样, 并且具有成像分析的功能; 与 SIMS 不同, LDI 是软离子源。此外, 飞行时间分析具有灵敏度高、检测质量范围宽、离子通量高的特点, MALDI-TOF-MS/MS 是单细胞分析的有力工具^[45]。

2.1 基质辅助激光解吸电离

单细胞 MALDI 分析靶点最开始是神经元中的多肽, 例如, Veelen 等^[46]使用 MALDI 分析了静水椎实螺单个神经元细胞的多肽; Rubakhin 等^[47-48]使用 MALDI 分析了加州海兔单个神经元的神经肽; Gholipour 等^[49]改进了取样过程, 使 MALDI 方法可以用于分析亚皮升体积的植物细胞质提取物。此外, MALDI 还可以与其他分析技术相结合, Page 等^[50]利用 MALDI 与毛细管电泳技术联用分析了加州海兔单个神经元细胞的激素和神经肽, 并进行 35S-MET 放射性核素检测。

MALDI 还可用于单细胞质谱成像, 目前研

究的关键在于如何改进 MALDI 以提高质谱成像的空间分辨率。Caprioli 团队^[51]设计了一种传输聚焦真空离子源(t-MALDI-MSI), 将 MALDI 离子源中的激光束聚焦到小于 1 μm 的尺寸, 允许以亚细胞分辨率直接成像单个细胞。但这种 t-MALDI-MSI 也存在缺陷, 如离子丰度在小像素尺寸下会显著降低, 从而可能导致目标化合物信号丢失。激光诱导后电离(MALDI-2)的引入可以有效解决这一缺陷, Dreisewerd 团队^[52]将这 2 种技术结合开发了 t-MALDI-2 离子源, 将 t-MALDI-2 离子源与 Orbitrap 质量分析仪耦合, 在亚细胞水平上观察 Vero B4 细胞中磷脂和糖脂的分布, 展示了 t-MALDI-2-MSI 技术在单细胞脂质成像上的巨大潜力。

由于光学衍射极限和透镜像差的限制, 利用 MALDI 这种基于激光的质谱成像技术在亚细胞分辨率下获取样品信息仍很困难。Zare 团队^[53]开发了一种用微透镜光纤代替传统激光路径系统的策略。在不改变原始电离机制的情况下, 微透镜光纤与 MALDI-MSI 平台结合以实现亚细胞空间分辨率。通过改变激光能量以及光纤尖端与样品表面之间的距离, 可以获得直径在 350 nm~10 μm 之间的采样点。标准网格样品的 MSI 表明, 在最佳条件下, 这种微透镜光纤改进策略可以达到~300 nm 空间分辨率。目前, 该课题组已将这种微透镜纤维应用于单细胞成像, 在细胞器水平上实现了多种药物和纳米材料的单细胞成像, 利用 MALDI-MSI 平台, 在 HeLa 细胞的细胞质和核仁中发现了微量的吡啶黄碱和蔚蓝 B(2 种抗炎药)^[54]。

虽然 MALDI-MS 已被广泛应用, 但仍存在明显的局限性^[55], 如过剩的有机基质干扰低质量目标分析物的分析、真空源处基质升华导致测量信号随时间波动、基质选择及优化过程复杂、基质与样品共结晶表面大小形状不同导致应用 MALDI 分析的重复性不好等。为此, 杭纬团队^[56]报道了一种近场解吸后电离飞行时间质谱(NDPI-TOF MS), 克服了样品表面起伏对成像结果的干扰, 展示了其在单细胞内形貌和化学成分成像的潜力。该质谱仪引入纳米有孔针尖(nano-AT), 将横向分辨率提高到 250 nm, 并作为原子力显微镜(AFM)探针提供形貌信息; 在真空条件下采样, 提高了样品利用率, 且无大气-真空传输损

失;使用后电离源极大地提高了电离产率。考虑到近场器件的简单性和紧凑的尺寸,该技术可以引入到 MALDI-MS 中以扩展 MS 在纳米级分辨率下的多模态能力。

2.2 无基质激光解吸电离

由于 MALDI-MS 的一些局限性,无基质激光解吸电离逐渐被开发出来,尤其适用于小分子目标物的分析^[57]。无基质激光解吸电离质谱分析的一种思路是分析物的直接解吸/电离,但仅限于 m/z 小于 2 000 的分析物,并且非常依赖分析物的性质;此外,由于无基质,解吸分析物需要更高的激光功率,直接解吸/电离通常会促使离子碎裂。另一种思路是调整样品表面,使其能够向分析物传递足够的能量以解吸/电离样品。

Jaschinski 等^[58]利用无基质激光解吸电离对具有特殊细胞壁结构的硅藻格氏圆筛藻和假微型海链藻进行单细胞分析,检测了叶绿素、氨基酸、磷脂等。这些藻类具有生物矿化的纳米结构细胞壁,其主要成分是 SiO_2 , 这种结构不需要基质在激光照射后就会自行电离,该工作为微藻单细胞的研究提供了新经验。Hölscher 等^[59]利用无基质激光解吸电离在单细胞水平上研究金丝桃属植物细胞吸收紫外线后产生的代谢物,由于检测到的金丝桃素对紫外线吸收较强,适合直接无基质分析。该工作的创新点在于应用了适合单细胞取样的激光显微解剖(LMD)技术,并为今后利用无基质激光解吸电离进行单细胞分析提供了新思路,即寻找类似金丝桃素这种具有强紫外吸收的代谢物。此外,无基质激光解吸电离在质谱成像上也有新应用,Stopka 等^[60]提出了一种在硅纳米柱阵列(NAPA)结构上用激光解吸电离对贴壁细胞进行质谱成像的方法,已用于对哺乳动物细胞进行单细胞分辨率的成像。

3 二次离子质谱

二次离子质谱(SIMS)是一种表面分析质谱技术^[61],具有高空间分辨率(几十纳米级别)、可以分析非常小的表面区域(微米尺度)等优点^[62-63]。此外, SIMS 还可用于分析样品中化合物的分子质量和分子结构,对多种成分的检测具有较高的灵敏度,是表面分析中灵敏度最高的技术^[64]。然而,与 ESI-MS 和 LDI-MS 不同, SIMS 使用相对“硬”的离子源,即利用高能初级离子

束轰击样品表面会产生许多靶分子的碎片离子,这给生物大分子的分析带来了困难。因此, SIMS 更适用于分析脂类、小分子代谢物、分子片段和元素。根据初级离子束的剂量密度, SIMS 可分为动态 SIMS(以 Nano-SIMS 为代表)和静态 SIMS(以 TOF-SIMS 为代表)。

3.1 飞行时间二次离子质谱

TOF-SIMS 通常使用单原子初级离子和簇团初级离子,而 Nano-SIMS 只使用单原子初级离子。与单原子初级离子相比,簇团初级离子更有利于生成分子离子或大片段碎片离子,使 TOF-SIMS 更利于提供样品的元素组成、分子离子或片段信息。

由于 TOF-SIMS 具有高空间分辨率、高灵敏度以及高特异性^[65],在单细胞成像中表现优异。TOF-SIMS 能够在原位精确分析多种靶分子,包括元素、脂质和氨基酸,因此可以在单细胞水平上研究细胞异质性和功能,近年来受到极大关注。早期 TOF-SIMS 单细胞成像用于分析冷冻细胞样品, Nuffel 等^[66]建立了低温飞行时间二次离子质谱(cryo-TOF-SIMS)对斑马鱼幼体冷冻水合切片的视网膜色素上皮层(RPE)化学成像的方法,示于图 4。视网膜色素上皮由单层色素上皮细胞排列构成, TOF-SIMS 成像的亚细胞精度使其正好适合发现和可视化 RPE 黑色素相关分子的标志物离子。应用该方法成功识别出 RPE 独有的新标志物,一种真黑素生物合成的中间体能够更好地特异性检测含黑色素的组织。这一发现引起了参与黑素细胞基础科学人员的极大兴趣。

TOF-SIMS 还可以与其他技术联用,以亚微米的横向分辨率对包括细菌在内的单细胞进行成像, Allouche 团队^[67]提出了一种基于俄歇电子能谱分析(AES)和 TOF-SIMS 非原位组合配备串联质谱仪在单细胞水平上对细菌表面成像的新方法,已用于大肠杆菌细胞的成像,对来自纳米颗粒和细菌相互作用的物种进行了明确的分子识别。TOF-SIMS 提供分子信息, AES 提供纳米尺度的元素分布数据, 2 种技术较好互补。这种方法强调了细菌表面化学指纹识别的可能性,为研究病原体外膜或细胞表面生物标志物的表征开辟了新路径。

通过发展新的细胞固定方法可以提高 TOF-

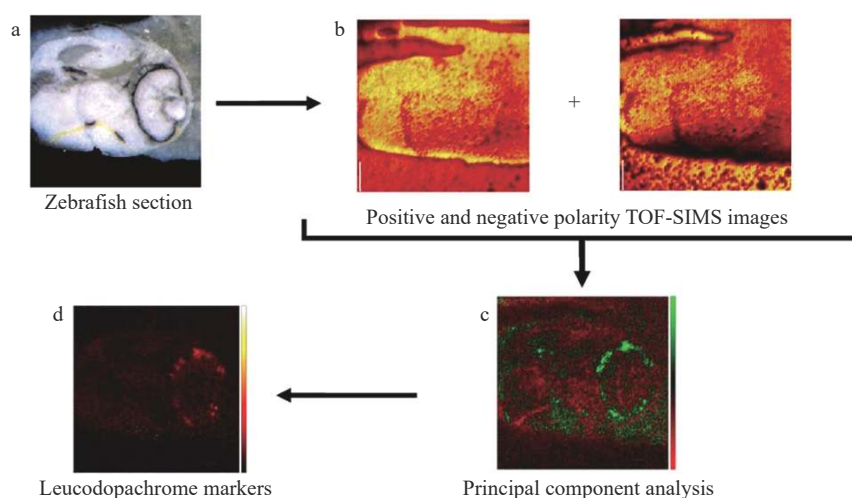


图4 冷冻干燥的斑马鱼头部横截面样品的光学显微镜图像(a); 正、负极性 TOF-SIMS 图像(b); 正、负极性离子图像数据转换为单个高光谱数据集进行主成分分析(c); 无色多巴色素标志物离子图像(d)^[66]

Fig. 4 Reconstructed optical microscopy image of the freeze-dried zebrafish embryo's eye cross section (a); positive (left) and negative (right) polarity TOF-SIMS images (b); PCA of a single data set of positive and negative polarity ion images (c); ion images of marker ions for leucodopachrome (d)^[66]

SIMS 成像的质量。Setou 等^[68]开发了戊二醛(GA)固定法作为 TOF-SIMS 样品制备的化学固定方法, 虽然不妨碍 TOF-SIMS 对细胞脂肪酸(FAs)的电离和成像, 但获得的 TOF-SIMS 图像无法展现 FAs 的细胞器对应分布/亚细胞分布。随后, Setou 等^[69]建立了 GA 和醋酸铀(UA)的双重固定法来固定 FAs 并保持细胞的超微结构, 通过冷冻升华和低温溅射去除水分子, 这种 GA 和 UA 双重固定的样品可用于气团离子束(GCIB)-TOF-SIMS, 以实现单细胞水平的多层成像。

与脂质相比, 大多数蛋白质太大不能作为完整的分子检测, 较难在复杂的细胞样品中用 TOF-SIMS 识别。使用不同的同位素进行代谢标记将允许 TOF-SIMS 对蛋白质和脂质进行平行成像^[70], 在细胞培养中对氨基酸进行稳定同位素标记(SILAC)可以将标记结合到新合成的蛋白质中, 用于基于质谱的定量蛋白质组学。然而, SILAC-MS 不能提供新合成蛋白在亚细胞区域的空间信息。张新荣团队^[71]提出了一种结合 SILAC 和 TOF-SIMS 优势的策略来标记细胞生长和分裂过程中新合成的蛋白质, 并以亚细胞空间分辨率对蛋白质和脂质进行成像。通过将¹⁵N 精氨酸和¹⁵N 赖氨酸引入到新合成的蛋白质中, 利用 TOF-SIMS 同时检测¹⁵N 标记的氨基酸和特定的脂质碎片分子离子的特征峰, 获得了在亚微米分辨率下细胞分裂时新合成的蛋白质和

特定脂质的二维和三维图像。

TOF-SIMS 单细胞成像还常用于研究药物的亚细胞分布以及药物分子与生物靶点之间的相互作用。汪福意等^[72-75]利用 TOF-SIMS 成像系统地研究了几种基于钨和铂的双靶点抗肿瘤化合物的亚细胞分布, 用含钨或铂的抗肿瘤化合物处理 A549 细胞, 并使用 TOF-SIMS 对其进行成像。结果表明, 这些化合物分布于细胞膜和细胞核, 其分布随配体(钨和铂)的不同而有显著差异, 该结果不仅证实了这些化合物的双靶向抗肿瘤活性, 而且解释了抗肿瘤活性差异的原因。

3.2 纳米二次离子质谱

Nano-SIMS 是一种动态 SIMS, 用高能连续初级离子束(如 Cs⁺或 O⁻)轰击样品表面, 将从表面溅射出来的二次离子引入质量分析器的磁场中。由于高能连续离子束产生的二次离子具有相当大的初始动能, Nano-SIMS 通常使用双聚焦磁扇形质量分析器来提高同位素比例测量的精度^[76]。此外, 高能的原原子初级离子破坏性极高, 倾向于生成单原子和双原子的二次离子, 同时, 连续初级离子通常比脉冲初级离子有更高的溅射速率和更高的灵敏度。因此, Nano-SIMS 常用于元素和同位素组成分析。

Nano-SIMS 通常与各种显微镜联用, 在观察样品的基础上进一步绘制元素/同位素组成图

谱,同时由于其高灵敏度、高横向分辨率的特点,可以发现在光学显微镜或电子显微镜观测不到的情况。Radziwill-Bienkowska等^[77]将 Nano-SIMS 与扫描电镜(SEM)和透射电镜(TEM)相结合用于研究食品级 TiO₂ 对细菌的毒性,选取大肠杆菌和乳酸乳杆菌作为研究模型,结果显示, TiO₂ 仅在少数情况下导致大肠杆菌和乳酸乳杆菌的形态和结构损伤。利用 Nano-SIMS 成像技术探索 TiO₂ 在细菌细胞的内化,与乳杆菌相反,暴露于食品级 TiO₂ 的大肠杆菌细胞中约有 7% 发生内化,并且其生长动力学改变和活力降低最大。这一发现为进一步研究以食品级 TiO₂ 对大肠杆菌为代表的肠道共生菌和以乳酸乳杆菌为代表的食源性细菌的机制具有重要价值。

多同位素成像质谱(MIMS)法是 Nano-SIMS 的一种形式,其特点是与稳定同位素示踪剂方法相结合,能够在 30~100 nm 横向分辨率下量化原子同位素比值。Narendra等^[78]提出了一种 MIMS 代谢成像方法,用于定量分析细胞中单个细胞器中蛋白质的流转和追踪小鼠体内组织中的细胞复制。由于传统用于显微镜的超薄切片比较脆弱,不适用于 MIMS 分析,所以专门制备了硅片以用于 MIMS 的样品支撑。在 MIMS 代谢实验中,通常选择 7 个离子进行分析,包括代谢示踪剂中的稀有原子以及样品中的常见元素,以提供细胞和组织学背景。

4 电感耦合等离子体质谱

电感耦合等离子体质谱(ICP-MS)利用等离子炬的高温在常压下气化、电离微量元素(主要为金属元素),将其转化为带正电的离子引入质谱仪,根据不同的质荷比进行分析^[79]。作为定量微量元素最可靠的工具之一,ICP-MS 凭借自身快速读取分析、低检出限、低基质效应、高分辨率、宽线性动态范围以及可以检测多种元素等优点^[80-81],在单细胞元素分析领域得到广泛应用,尤其是在单细胞金属组学研究中备受关注。目前,基于 ICP-MS 的单细胞分析方法主要有 2 种类型^[79],即基于瞬态元素信号时间分辨分析的单细胞电感耦合等离子体质谱(SC-ICP-MS)和用于单细胞元素成像的激光烧蚀电感耦合等离子体质谱(LA-ICP-MS)。

4.1 单细胞电感耦合等离子体质谱

SC-ICP-MS 是将 ICP-MS 分析中的数据采集设置为时间分辨分析(TRA)模式,以高分辨率测量极短的瞬态信号。细胞在通过 TRA-ICP-MS 时的行为与溶液中的离子不同,与均匀溶液相比,离散细胞悬浮液不再均匀分布,存在离子爆发,导致强度高于背景峰值,从而单个细胞的信号不被背景平均,信噪比显著提高^[82]。只要停留时间和细胞密度设置得当,就可以假定每次停留只检测到 1 个细胞,从而信号的频率与细胞样本的数量有关,每次读取的信号强度与单个细胞的质量信息有关。

为了提高单细胞导入等离子体焰炬的引入效率,王海龙等^[83]制作了一个高效细胞引入系统(HECIS),由包裹有加热丝的单通道喷雾室(工作温度为 80~200 °C)和可拆卸的微同心雾化器组成。这一设计大大减少了进入等离子体焰炬的水蒸气负荷,并将引入效率提高到常规雾化器用于 ICP-MS 分析时的 10 倍。此外,由于在较高温度下的脱溶性能,该温度下测得的元素灵敏度大约是常温下的 2 倍。

为了满足 SC-ICP-MS 快速瞬态分析的要求,对 ICP-MS 质量分析器进行改造以提高数据采集能力。Sharp 团队^[84]通过使用一种“即插即用”式多通道电路板来提高扇形磁场电感耦合等离子体质谱仪(ICP-SF-MS)在 10 μs 时间分辨率下的数据采集特性;Miyashita 等^[85]使用外部离子脉冲计数单元和函数信号发生器直接读取四极杆电感耦合等离子体质谱仪(ICP-Q-MS)的离子脉冲电流,无死时间,可将时间分辨率提高到 0.1 ms。与原来 10 ms 静置时间相比,ICP-Q-MS 的信噪比提高了 13 倍。而飞行时间电感耦合等离子体质谱仪(ICP-TOF-MS)的分析速度快,分辨率及灵敏度高,具有优异的瞬间信号分析能力,能够同时检测多种核素,尤其是基于 ICP-TOF-MS 的质谱流式细胞术已成为使用金属标记抗体代替荧光染料测定单细胞特性的最先进技术^[86]。

4.2 激光烧蚀电感耦合等离子体质谱

LA-ICP-MS 实际上是激光烧蚀技术作为取样系统与 ICP-MS 联用。在激光烧蚀过程中,脱水后的细胞被固定在玻璃载玻片上以保持细胞形态,然后用一束高功率激光烧蚀固定着的细胞样品,并将产生的气溶胶引入高温等离子体中进

行电离^[87]。整个细胞样品在导入 ICP-MS 前采用渐进式激光烧蚀,这种特殊的采样方式为样品分析提供了较高的空间分辨率和灵活性,大大提高了检测灵敏度^[88]。目前,LA-ICP-MS 已成功用于单细胞内质或标记元素的可视化、单点模式定量元素或蛋白质和单细胞水平定量成像。

孟一凡等^[89]设计了一种采用微透镜光纤和“三向”结构烧蚀室的激光烧蚀系统,示于图 5,实现了空间分辨率可调至 400 nm 的纳米级电感耦合等离子体质谱成像,在石英晶片上培养含有不同浓度卡铂的 HeLa 细胞,使用上述设计的激

光烧蚀电感耦合等离子体质谱成像(LA-ICP-MSI)技术观察细胞中的药物靶点,发现卡铂主要位于细胞核中。这一结果验证了卡铂与 DNA 结合诱导癌细胞凋亡,引起交联,从而破坏 DNA 功能,抑制细胞有丝分裂的机制。此外,随着金属抗体标记和其他金属相关生物技术的发展,生物样品中金属元素的分析受到广泛关注,这种成像技术可以与质谱流式细胞术相结合,在单细胞中定位金属标记的生物分子。由此可见,LA-ICP-MS 在单细胞分析的潜力以及高分辨率的优势将为探索细胞器水平的化学分布提供机会。

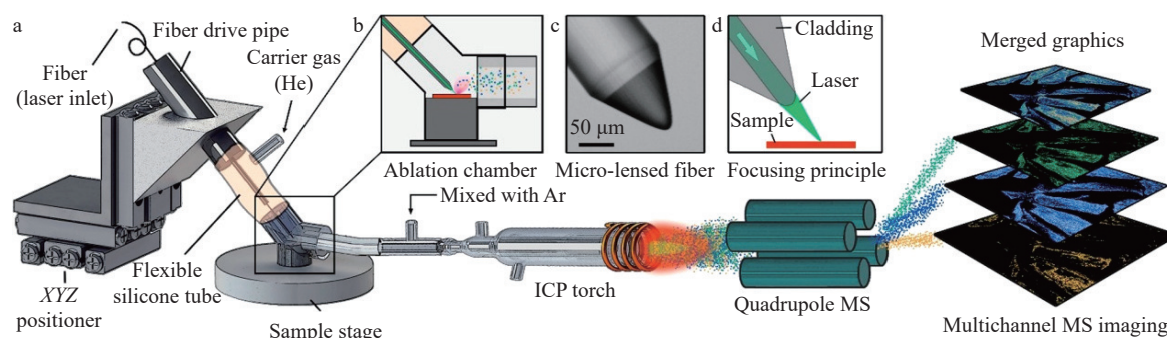


图 5 微透镜光纤和“三向”结构烧蚀室的 LA-ICP-MSI 平台示意图^[89]

Fig. 5 Schematic diagram of nanoscale LA-ICP-MSI platform with a micro-lensed fiber and a “three-way” structure ablation chamber^[89]

实际上,在 LA-ICP-MS 广泛应用于单细胞分析之前,仍需要克服 2 个主要障碍。第一个障碍是缺乏通用的单细胞参考物质,阻碍了 LA-ICP-MS 精确测定单细胞中元素或纳米颗粒及不同实验室间实验数据的比对。目前,许多课题组在努力尝试编制内部基质匹配标准。Malderen 等^[90]将已知数量的元素添加到明胶中,并使用一种微制造技术生产高密度微阵列明胶标准品。Jakubowski 等^[91-92]提出将掺杂纳米颗粒的悬浮液或标准溶液的硝化纤维素膜作为基质匹配校准以定量分析单细胞中的目标分析物。因为标准与单个细胞之间可能存在差异,这些用于外部校准的内部标准难以完全补偿基质效应。第二个障碍是 LA-ICP-MS 单细胞分析的通量低,目前多是单细胞在显微镜下手工定位消融再用 LA-ICP-MS 分析。Löhr 等^[93]通过使用可分配单细胞的专用声压定位器,生产了用于高通量 LA-ICP-MS 分析的单细胞阵列。而其他方法^[94],如细胞光学捕获“光学分子镊”和细胞固定化技术已成功产生了单细胞阵列,并且可以与 LA-ICP-MS

耦合。但这些方法需要额外的仪器和专业技术知识,给 LA-ICP-MS 的实验室应用带来不便。

对此,丰伟悦团队^[95]开发了一种 LA-ICP-MS 定量单细胞中纳米颗粒的方法,将其命名为单细胞同位素稀释分析(SCIDA),示于图 6。在该方法中,单个细胞被放置在阵列中,并通过微流体技术转移到衬底上;阵列中的每个细胞都用商用喷墨打印机精确地分配了已知的皮升富集同位素溶液液滴;同时烧蚀单细胞和打印液滴,并使用 LA-ICP-MS 进行同位素稀释分析。该团队以巨噬细胞(RAW 264.7)为模型,在单细胞水平上研究了纳米银的摄取,无需单细胞参考物质就可实现单细胞中纳米银的精确定量,同时极大地提高了分析通量。

此外,基于流体操纵的阵列式单细胞捕获和单细胞聚焦/封装微流控芯片可以实现快速、高通量的单细胞处理。然而,当分离特定的单个细胞时,仍需要复杂的二次操作,这不利于非连续采样检测方法,如 LA-ICP-MS。王建华团队^[96]报道了一种新的单细胞捕获芯片,即模块化单细

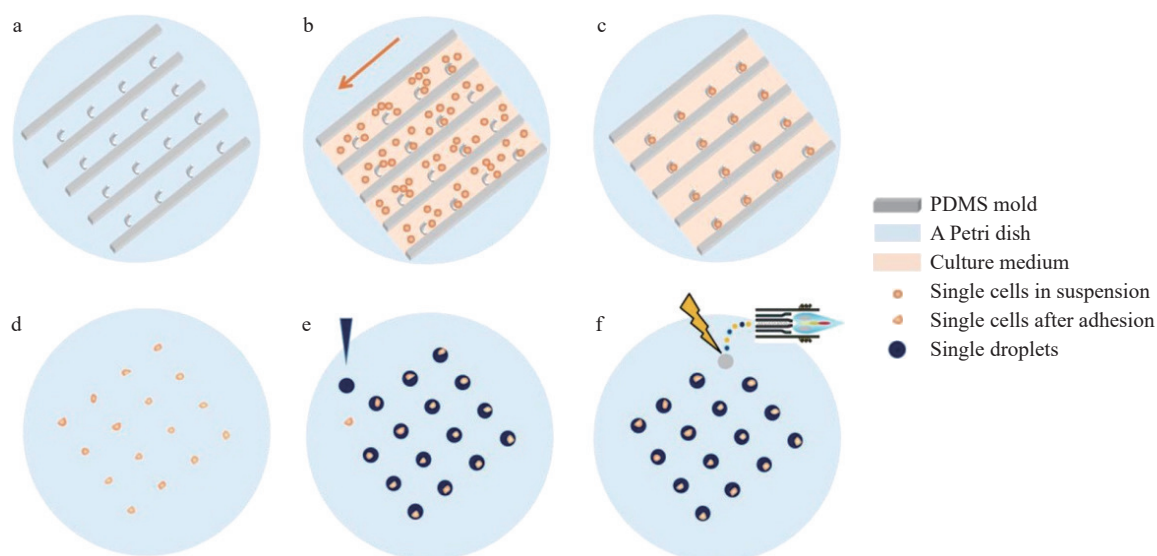


图6 LA-ICP-MS 单细胞同位素稀释分析示意图^[95]

Fig. 6 Schematic diagram of SCIDA with LA-ICP-MS^[95]

胞移液器(mSCP),它由Z形通道和水平连接微通道组成,成功解决了捕获细胞的稳定性问题,能够快速、方便、高效地从细胞悬液中分离出单个活细胞。目前,mSCP已被开发为ICP-MS采样平台,可实现高精度的单细胞分析/检测。

5 总结与展望

单细胞分析研究细胞和分子行为机制,近年来在生命科学各个分支领域得到广泛关注,同时质谱技术也在创新发展,向快速分析、无需标记、原位分析、高灵敏度、高分辨率的单细胞乃至亚细胞水平分析的方向不断努力。但目前这些质谱技术都存在着优点与缺点。

电喷雾电离质谱适用于活体单细胞的原位分析,精确控制采样过程的同时在亚细胞水平上进行观察和研究,但这也在一定程度上限制了分析方法的通量;激光解吸电离质谱目前被广泛应用于微生物表征与单细胞成像,无需人工采样,可以进行单细胞高通量分析,能够同时检测多种代谢物质,但受限于激光光源分辨率,难以进行亚细胞水平的观察和研究;二次离子质谱是一种高分辨率、高灵敏度的表面分析技术,可以实现单细胞三维成像,但由于其使用相对“硬”的离子源,利用高能初级离子束轰击样品表面会产生许多靶分子的碎片离子,不适用于生物大分子成像;电感耦合等离子体质谱适用于单细胞元素分析,凭借其快速读取分析、低检出限、低基质效

应、高分辨率、宽线性动态范围以及可以检测多种元素等优点已成为定量微量元素最优工具之一,尤其在金属组学研究中备受关注,但其将细胞样品引入等离子炬的效率不佳,难以保证各元素形态的稳定性。因此,在实际科研中,一方面应根据研究目的和实际条件选择适合的质谱,另一方面也要注意对现有基于质谱的单细胞分析技术进行改进与创新,如ESI-MS在高通量分析方面受到一定限制,但与微流控技术联用可以很好地实现高通量分析。近期,许国旺团队^[97]开发了一种新型不对称蛇形通道微流控芯片耦合脉冲电场诱导电喷雾电离-高分辨率质谱(chip-PEF-ESI-HRMS)法用于高通量单细胞分析,分析通量可达80个细胞/分钟,整个系统可连续稳定运行3h以上,一次实验可分析3000多个单细胞。

综上所述,随着生命科学的不断发展,国内外研究团队根据分析的具体要求和样品种类对基于质谱的单细胞分析装置进行针对性的开发与改造,基于质谱的单细胞分析技术正朝着百花齐放的方向发展,而单细胞质谱分析也将在生命科学的发展中发挥越来越重要的作用。

参考文献:

- [1] MASUJIMA T. Live single-cell mass spectrometry[J]. *Analytical Sciences:the International Journal of the Japan Society for Analytical Chemistry*, 2009, 25(8): 953-960.

- [2] ZENOBI R. Single-cell metabolomics: analytical and biological perspectives[J]. *Science*, 2013, 342(6 163): 1 243-259.
- [3] JAIN M, NILSSON R, SHARMA S, MADHUSUDHAN N, KITAMI T, SOUZA A L, KAFRI R, KIRSCHNER M W, CLISH C B, MOOTHA V K. Metabolite profiling identifies a key role for glycine in rapid cancer cell proliferation[J]. *Science*, 2012, 336 (6 084): 1 040-1 044.
- [4] SHAO X, WENG L, GAO M, ZHANG X. Single-cell analysis for proteome and related researches[J]. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2019, 120: 115-666.
- [5] ZHANG L, VERTES A. Single-cell mass spectrometry approaches to explore cellular heterogeneity[J]. *Ange wandte Chemie (International Ed in English)*, 2018, 57(17): 4 466-4 477.
- [6] ZHU G, SHAO Y, LIU Y, PEI T, LI L, ZHANG D, GUO G, WANG X. Single-cell metabolite analysis by electrospray ionization mass spectrometry[J]. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2021, 143: 116-351.
- [7] 王举铎, 宋佳峰, 李畅, 戴新华, 方向, 龚晓云, 叶子弘. 单细胞质谱分析方法研究进展[J]. *分析化学*, 2020, 48(8): 969-980.
WANG Juduo, SONG Jiafeng, LI Chang, DAI Xinhua, FANG Xiang, GONG Xiaoyun, YE Zihong. Recent advances in single cell analysis methods based on mass spectrometry[J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2020, 48(8): 969-980(in Chinese).
- [8] XIE C, LI Y Q, TANG W, NEWTON R J. Study of dynamical process of heat denaturation in optically trapped single microorganisms by near-infrared Raman spectroscopy[J]. *Journal of Applied Physics*, 2003, 94(9): 6 138-6 142.
- [9] GANESANA M, LEE S T, WANG Y, VENTON B J. Analytical techniques in neuroscience: recent advances in imaging, separation, and electrochemical methods[J]. *Analytical Chemistry*, 2017, 89(1): 314-341.
- [10] XU S, YANG C, YAN X, LIU H. Towards high throughput and high information coverage: advanced single-cell mass spectrometric techniques[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2022, 414(1): 219-233.
- [11] LIU R, YANG Z. Single cell metabolomics using mass spectrometry: techniques and data analysis[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2021, 1 143: 124-134.
- [12] FENG D, XU T, LI H, SHI X, XU G. Single-cell metabolomics analysis by microfluidics and mass spectrometry: recent advances[J]. *Journal of Analysis and Testing*, 2020, 4(3): 198-209.
- [13] XU T, FENG D, LI H, HU X, WANG T, HU C, SHI X, XU G. Recent advances and typical applications in mass spectrometry-based technologies for single-cell metabolite analysis[J]. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2022, 157: 116-763.
- [14] HU R, LI Y, YANG Y, LIU M. Mass spectrometry-based strategies for single-cell metabolomics[J]. *Mass Spectrometry Reviews*, 2023, 42(1): 67-94.
- [15] LENEY A C, HECK A J R. Native mass spectrometry: what is in the name?[J]. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2017, 28(1): 5-13.
- [16] ZHU Y, LIU R, YANG Z. Redesigning the T-probe for mass spectrometry analysis of online lysis of non-adherent single cells[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2019, 1 084: 53-59.
- [17] XU S, XUE J, BAI Y, LIU H. High-throughput single-cell immunoassay in the cellular native environment using online desalting dual-spray mass spectrometry[J]. *Analytical Chemistry*, 2020, 92(24): 15 854-15 861.
- [18] ZHANG Z, PULLIAM C J, FLICK T, COOKS R G. Electrophoretic desalting to improve performance in electrospray ionization mass spectrometry[J]. *Analytical Chemistry*, 2018, 90(6): 3 856-3 862.
- [19] TAN S, WANG J, LI M, YIN X, GAO X, LI C, JIANG Y, DAI X, GONG X, FANG X. Direct analysis of hydroxylated polycyclic aromatic hydrocarbons in biological samples with complex matrices using polarity-reversed nanoelectrospray ionization[J]. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2022, 36(5): e9237.
- [20] HUANG G, LI G, COOKS R G. Induced nanoelectrospray ionization for matrix-tolerant and high-throughput mass spectrometry [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2011, 50(42): 9 907-9 910.
- [21] ZHU H, ZOU G, WANG N, ZHUANG M, XIONG W, HUANG G. Single-neuron identification of chemical constituents, physiological changes, and metabolism using mass spectrometry[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2017, 114(10): 2 586-2 591.
- [22] XU T, LI H, DOU P, LUO Y, PU S, MU H, ZHANG Z, FENG D, HU X, WANG T, TAN G, CHEN C, LI H, SHI X, HU C, XU G. Concentric hybrid nanoelectrospray ionization-atmospheric pressure chemical ionization source for high-coverage mass spectrometry analysis of single-cell metabolomics[J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2024: e2306659.

- [23] TAN S, YIN X, FENG L, WANG J, XUE Z, JIANG Y, DAI X, GONG X, FANG X. Nanoliter atmospheric pressure photoionization-mass spectrometry for direct bioanalysis of polycyclic aromatic hydrocarbons[J]. *The Analyst*, 2023, 148(16): 3 730-3 739.
- [24] LIU Q, LAN J, WU R, BEGLEY A, GE W, ZENOBI R. Hybrid ionization source combining nanoelectrospray and dielectric barrier discharge ionization for the simultaneous detection of polar and nonpolar compounds in single cells[J]. *Analytical Chemistry*, 2022, 94(6): 2 873-2 881.
- [25] HIRAOKA K, ARIYADA O, USMANOV D T, CHEN L C, NINOMIYA S, YOSHIMURA K, TAKEDA S, YU Z, MANDAL M K, WADA H, RANKIN-TURNER S, NONAMI H. Probe electrospray ionization (PESI) and its modified versions: dipping peSI (dPESI), sheath-flow PESI (sfPESI) and adjustable sfPESI (ad-sfPESI)[J]. *Mass Spectrometry*, 2020, 9(1): A0092.
- [26] YU Z, CHEN L C, NINOMIYA S, MANDAL M K, HIRAOKA K, NONAMI H. Piezoelectric inkjet assisted rapid electrospray ionization mass spectrometric analysis of metabolites in plant single cells *via* a direct sampling probe[J]. *Analyst*, 2014, 139(22): 5 734-5 739.
- [27] GONG X, ZHAO Y, CAI S, FU S, YANG C, ZHANG S, ZHANG X. Single cell analysis with probe ESI-mass spectrometry: detection of metabolites at cellular and subcellular levels[J]. *Analytical Chemistry*, 2014, 86(8): 3 809-3 816.
- [28] ZHAI R, GONG X, XIE J, YUAN Y, XU F, JIANG Y, HUANG Z, DAI X, ZHANG Y, QIAN X, FANG X. Ultrasensitive analysis of heat shock protein 90 α with antibodies orderly arrayed on a novel type of immunoprobe based on magnetic COFs[J]. *Talanta*, 2019, 191: 553-560.
- [29] WEI Z, ZHANG X, SI X, GONG X, ZHANG S, ZHANG X. Development of Pico-ESI-MS for single-cell metabolomics analysis[M]. *Single Cell Metabolism*, 2020: 31-59.
- [30] TAKÁTS Z, WISEMAN J M, GOLOGAN B, COOKS R G. Mass spectrometry sampling under ambient conditions with desorption electrospray ionization [J]. *Science*, 2004, 306(5 695): 471-473.
- [31] MARQUES C, FRIEDRICH F, LIU L, CASTOLDI F, PIETROCOLA F, LANEKOFF I. Global and spatial metabolomics of individual cells using a tapered pneumatically assisted nano-DESI probe[J]. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2023, 34(11): 2 518-2 524.
- [32] BERGMAN H M, LANEKOFF I. Profiling and quantifying endogenous molecules in single cells using nano-DESI MS[J]. *The Analyst*, 2017, 142(19): 3 639-3 647.
- [33] SHRESTHA B, VERTES A. *In situ* metabolic profiling of single cells by laser ablation electrospray ionization mass spectrometry[J]. *Analytical Chemistry*, 2009, 81(20): 8 265-8 271.
- [34] VAIKKINEN A, SHRESTHA B, NAZARIAN J, KOSTIAINEN R, VERTES A, KAUPPILA T J. Simultaneous detection of nonpolar and polar compounds by heat-assisted laser ablation electrospray ionization mass spectrometry[J]. *Analytical Chemistry*, 2013, 85(1): 177-184.
- [35] STOPKA S A, VERTES A. *Metabolomic profiling of adherent mammalian cells in situ* by LAESI-MS with ion mobility separation[M]//*Ion Mobility-Mass Spectrometry*. New York: Humana, 2020: 235-244.
- [36] SAMARAH L Z, VERTES A, ANDERTON C R. Single-cell metabolomics with rapid determination of chemical formulas from isotopic fine structures[M]//*Mass Spectrometry Imaging of Small Molecules*. New York: Humana, 2022: 61-75.
- [37] NEMES P, RUBAKHIN S S, AERTS J T, SWEEDLER J V. Qualitative and quantitative metabolomic investigation of single neurons by capillary electrophoresis electrospray ionization mass spectrometry[J]. *Nature Protocols*, 2013, 8(4): 783-799.
- [38] AERTS J T, LOUIS K R, CRANDALL S R, GOVINDAIAH G, COX C L, SWEEDLER J V. Patch clamp electrophysiology and capillary electrophoresis-mass spectrometry metabolomics for single cell characterization[J]. *Analytical Chemistry*, 2014, 86(6): 3 203-3 208.
- [39] ONJIKO R M, PORTERO E P, MOODY S A, NEMES P. *In situ* microprobe single-cell capillary electrophoresis mass spectrometry: metabolic reorganization in single differentiating cells in the live vertebrate (*Xenopus laevis*) embryo[J]. *Analytical Chemistry*, 2017, 89(13): 7 069-7 076.
- [40] PORTERO E P, NEMES P. Dual cationic-anionic profiling of metabolites in a single identified cell in a live *Xenopus laevis* embryo by microprobe CE-ESI-MS[J]. *The Analyst*, 2019, 144(3): 892-900.
- [41] WILLIAMS S M, LIYU A V, TSAI C F, MOORE R J, ORTON D J, CHRISLER W B, GAFFREY M J, LIU T, SMITH R D, KELLY R T, PASA-TOLIC L, ZHU Y. Automated coupling of nanodroplet sample preparation with liquid chromatography-mass spectrometry for high-

- throughput single-cell proteomics[J]. *Analytical Chemistry*, 2020, 92(15): 10 588-10 596.
- [42] van BELKUM A, WELKER M, PINCUS D, CHARRIER J P, GIRARD V. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry in clinical microbiology: what are the current issues?[J]. *Annals of Laboratory Medicine*, 2017, 37(6): 475-483.
- [43] MURUGAIYAN J, ROESLER U. MALDI-TOF MS profiling-advances in species identification of pests, parasites, and vectors[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2017, 7: 184.
- [44] BODZON-KULAKOWSKA A, SUDER P. Imaging mass spectrometry: instrumentation, applications, and combination with other visualization techniques[J]. *Mass Spectrometry Reviews*, 2016, 35(1): 147-169.
- [45] LI L, GARDEN R W, SWEEDLER J V. Single-cell MALDI: a new tool for direct peptide profiling[J]. *Trends in Biotechnology*, 2000, 18(4): 151-160.
- [46] van VEELLEN P A, JIMÉNEZ C R, LI K W, WILDERING W C, GERAERTS W P M, TJADEN U R, van der GREEF J. Direct peptide profiling of single neurons by matrix-assisted laser desorption-ionization mass spectrometry[J]. *Organic Mass Spectrometry*, 1993, 28(12): 1 542-1 546.
- [47] RUBAKHIN S S, GREENOUGH W T, SWEEDLER J V. Spatial profiling with MALDI MS: distribution of neuropeptides within single neurons[J]. *Analytical Chemistry*, 2003, 75(20): 5 374-5 380.
- [48] RUBAKHIN S S, SWEEDLER J V. Quantitative measurements of cell-cell signaling peptides with single-cell MALDI MS[J]. *Analytical Chemistry*, 2008, 80(18): 7 128-7 136.
- [49] GHOLIPOUR Y, NONAMI H, ERRA-BALSELLS R. Application of pressure probe and UV-MALDI-TOF MS for direct analysis of plant underivatized carbohydrates in subpicoliter single-cell cytoplasm extract[J]. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2008, 19(12): 1 841-1 848.
- [50] PAGE J S, RUBAKHIN S S, SWEEDLER J V. Single-neuron analysis using CE combined with MALDI MS and radionuclide detection[J]. *Analytical Chemistry*, 2002, 74(3): 497-503.
- [51] ZAVALIN A, TODD E M, RAWHOUSER P D, YANG J, NORRIS J L, CAPRIOLI R M. Direct imaging of single cells and tissue at sub-cellular spatial resolution using transmission geometry MALDI MS[J]. *Journal of Mass Spectrometry*, 2012, 47(11): 1 473-1 481.
- [52] NIEHAUS M, SOLTWISCH J, BELOV M E, DREISEWERD K. Transmission-mode MALDI-2 mass spectrometry imaging of cells and tissues at subcellular resolution[J]. *Nature Methods*, 2019, 16(9): 925-931.
- [53] MENG Y, HANG W, ZARE R N. Microlensed fiber allows subcellular imaging by laser-based mass spectrometry[J]. *Nature Protocols*, 2023, 18(8): 2 558-2 578.
- [54] MENG Y, CHENG X, WANG T, HANG W, LI X, NIE W, LIU R, LIN Z, HANG L, YIN Z, ZHANG B, YAN X. Micro-lensed fiber laser desorption mass spectrometry imaging reveals subcellular distribution of drugs within single cells[J]. *Angewandte Chemie (International Ed in English)*, 2020, 59(41): 18 020-18 027.
- [55] MUTHU M, CHUN S, WU H F, DUNCAN M W, GOPAL J. The ongoing evolution of laser desorption/ionization mass spectrometry: some observations on current trends and future directions[J]. *Journal of Mass Spectrometry*, 2018, 53(6): 525-540.
- [56] YIN Z, CHENG X, LIU R, LI X, HANG L, HANG W, XU J, YAN X, LI J, TIAN Z. Chemical and topographical single-cell imaging by near-field desorption mass spectrometry[J]. *Angewandte Chemie (International Ed in English)*, 2019, 58(14): 4 541-4 546.
- [57] PETERSON D S. Matrix-free methods for laser desorption/ionization mass spectrometry[J]. *Mass Spectrometry Reviews*, 2007, 26(1): 19-34.
- [58] JASCHINSKI T, HELFRICH E J N, BOCK C, WOLFRAM S, SVATOŠ A, HERTWECK C, POHNERT G. Matrix-free single-cell LDI-MS investigations of the diatoms *Coscinodiscus granii* and *Thalassiosira pseudonana*[J]. *Journal of Mass Spectrometry*, 2014, 49(2): 136-144.
- [59] HÖLSCHER D, SHROFF R, KNOP K, GOTTSCHALDT M, CRECELIUS A, SCHNEIDER B, HECKEL D G, SCHUBERT U S, SVATOS A. Matrix-free UV-laser desorption/ionization (LDI) mass spectrometric imaging at the single-cell level: distribution of secondary metabolites of *Arabidopsis thaliana* and *Hypericum species*[J]. *The Plant Journal*, 2009, 60(5): 907-918.
- [60] STOPKA S A, VERTES A. Toward single cell molecular imaging by matrix-free nanophoton laser desorption ionization mass spectrometry[M]//Single Cell Metabolism. New York: Humana, 2020: 135-146.
- [61] LI Z. Time-of-flight secondary ion mass spectrometry [J]. *Bulletin of Mineralogy Petrology and Geochemistry*, 2020, 39(6): 1 173-1 190.

- [62] KIM Y P, SHON H K, SHIN S K, LEE T G. Probing nanoparticles and nanoparticle-conjugated biomolecules using time-of-flight secondary ion mass spectrometry[J]. *Mass Spectrometry Reviews*, 2015, 34(2): 237-247.
- [63] WIRTZ T, PHILIPP P, AUDINOT J N, DOWSETT D, ESWARA S. High-resolution high-sensitivity elemental imaging by secondary ion mass spectrometry: from traditional 2D and 3D imaging to correlative microscopy[J]. *Nanotechnology*, 2015, 26(43): 434 001.
- [64] BENNINGHOVEN A. Surface analysis by secondary ion mass spectrometry (SIMS)[J]. *Surface Science*, 1994, 299(1/2/3): 246-260.
- [65] GILMORE I S, HEILES S, PIETERSE C L. Metabolic imaging at the single-cell scale: recent advances in mass spectrometry imaging[J]. *Annual Review of Analytical Chemistry*, 2019, 12(1): 201-224.
- [66] van NUFFEL S, ANG K C, LIN A Y, CHENG K C. Chemical imaging of retinal pigment epithelium in frozen sections of zebrafish larvae using ToF-SIMS[J]. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2021, 32(1): 255-261.
- [67] COURRÈGES C, BONNECAZE M, FLAHAUT D, NOLIVOS S, GRIMAUD R, ALLOUCHE J. AES and ToF-SIMS combination for single cell chemical imaging of gold nanoparticle-labeled *Escherichia coli*[J]. *Chemical Communications*, 2021, 57(44): 5 446-5 449.
- [68] NAGATA Y, ISHIZAKI I, WAKI M, IDE Y, HOSSEN M A, OHNISHI K, SANADA N, SETOU M. Glutaraldehyde fixation method for single-cell lipid analysis by time-of-flight secondary ion-mass spectrometry[J]. *Surface and Interface Analysis*, 2014, 46: 185-188.
- [69] ZHANG C, HORIKAWA M, KAHYO T, MATSUDAIRA T, TANAKA T, XU L, TAKEI S, SETOU M. Glutaraldehyde and uranyl acetate dual fixation combined sputtering/unroofing enables intracellular fatty acids TOF-SIMS imaging with organelle-corresponding subcellular distribution[J]. *Microscopy*, 2022, 71(6): 324-333.
- [70] TYLER B J, TAKENO M M, HAUCH K D. Identification and imaging of ^{15}N labeled cells with ToF-SIMS[J]. *Surface and Interface Analysis*, 2011, 43(1/2): 336-339.
- [71] SHENG L, CAI L, WANG J, LI Z, MO Y, ZHANG S, XU J J, ZHANG X, CHEN H Y. Simultaneous imaging of newly synthesized proteins and lipids in single cell by TOF-SIMS[J]. *International Journal of Mass Spectrometry*, 2017, 421: 238-244.
- [72] DU J, KANG Y, ZHAO Y, ZHENG W, ZHANG Y, LIN Y, WANG Z, WANG Y, LUO Q, WU K, WANG F. Synthesis, characterization, and *in vitro* antitumor activity of ruthenium(II) polypyridyl complexes tethering EGFR-inhibiting 4-anilinoquinazolines[J]. *Inorganic Chemistry*, 2016, 55(9): 4 595-4 605.
- [73] LIU S, ZHENG W, WU K, LIN Y, JIA F, ZHANG Y, WANG Z, LUO Q, ZHAO Y, WANG F. Correlated mass spectrometry and confocal microscopy imaging verifies the dual-targeting action of an organoruthenium anticancer complex[J]. *Chemical Communications*, 2017, 53(29): 4 136-4 139.
- [74] ZHANG Y, LUO Q, ZHENG W, WANG Z, LIN Y, ZHANG E, LU S, XIANG J, ZHAO Y, WANG F. Luminescent cyclometallated platinum(II) complexes: highly promising EGFR/DNA probes and dual-targeting anticancer agents[J]. *Inorganic Chemistry Frontiers*, 2018, 5(2): 413-424.
- [75] LI C, XU F, ZHAO Y, ZHENG W, ZENG W, LUO Q, WANG Z, WU K, DU J, WANG F. Platinum(II) terpyridine anticancer complexes possessing multiple mode of DNA interaction and EGFR inhibiting activity[J]. *Frontiers in Chemistry*, 2020, 8: 210.
- [76] McDONNELL L A, HEEREN R M A. Imaging mass spectrometry[J]. *Mass Spectrometry Reviews*, 2007, 26(4): 606-643.
- [77] RADZIWIŁL-BIENKOWSKA J M, TALBOT P, KAMPHUIS J B J, ROBERT V, CARTIER C, FOURQUAUX I, LENTZEN E, AUDINOT J N, JAMME F, RÉFRÉGIERS M, BARDOWSKI J K, LANGELLA P, KOWALCZYK M, HOUDEAU E, THOMAS M, MERCIER-BONIN M. Toxicity of food-grade TiO_2 to commensal intestinal and transient food-borne bacteria: new insights using nano-SIMS and synchrotron UV fluorescence imaging[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 794.
- [78] NARENDRA D P, STEINHAUSER M L. Metabolic analysis at the nanoscale with multi-isotope imaging mass spectrometry (MIMS)[J]. *Current Protocols in Cell Biology*, 2020, 88(1): e111.
- [79] ZHU Y. Single-cell analysis based on ICP-MS[J]. *Analytical Sciences*, 2021, 37(12): 1 653-1 654.
- [80] PRÖFROCK D, PRANGE A. Inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) for quantitative analysis in environmental and life sciences: a review of challenges, solutions, and trends[J]. *Applied Spectroscopy*, 2012, 66(8): 843-868.
- [81] BINGS N H, BOGAERTS A, BROEKAERT J A C.

- Atomic spectroscopy[J]. *Analytical Chemistry*, 2013, 85(2): 670-704.
- [82] MIYASHITA S I, FUJII S I, SHIGETA K, INAGAKI K. Single cell analysis by using ICP-MS[M]//Ogra Y, Hirata T. *Metallomics*. Tokyo: Springer, 2017: 107-124.
- [83] WANG H, WANG M, WANG B, ZHENG L, CHEN H, CHAI Z, FENG W. Interrogating the variation of element masses and distribution patterns in single cells using ICP-MS with a high efficiency cell introduction system[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2017, 409(5): 1 415-1 423.
- [84] MANAGH A J, DOUGLAS D N, MAKELLA COWEN K, REID H J, SHARP B L. Acquisition of fast transient signals in ICP-MS with enhanced time resolution[J]. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2016, 31(8): 1 688-1 692.
- [85] MIYASHITA S I, GROOMBRIDGE A S, FUJII S I, MINODA A, TAKATSU A, HIOKI A, CHIBA K, INAGAKI K. Highly efficient single-cell analysis of microbial cells by time-resolved inductively coupled plasma mass spectrometry[J]. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2014, 29(9): 1 598-1 606.
- [86] TANNER S D, BANDURA D R, ORNATSKY O, BARANOV V I, NITZ M, WINNIK M A. Flow cytometer with mass spectrometer detection for massively multiplexed single-cell biomarker assay[J]. *Pure and Applied Chemistry*, 2008, 80(12): 2 627-2 641.
- [87] YU X, HE M, CHEN B, HU B. Recent advances in single-cell analysis by inductively coupled plasma-mass spectrometry: a review[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2020, 1 137: 191-207.
- [88] CHEN J, WANG R, MA M, GAO L, ZHAO B, XU M. Laser ablation-inductively coupled plasma-mass spectrometry (LA-ICP-MS)-based strategies applied for the analysis of metal-binding protein in biological samples: an update on recent advances[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2022, 414(24): 7 023-7 033.
- [89] MENG Y, GAO C, LU Q, MA S, HANG W. Single-cell mass spectrometry imaging of multiple drugs and nanomaterials at organelle level[J]. *ACS Nano*, 2021, 15(8): 13 220-13 229.
- [90] van MALDEREN S J, VERGUCHT E, de RIJCKE M, JANSSEN C, VINCZE L, VANHAECKE F. Quantitative determination and subcellular imaging of Cu in single cells via laser ablation-ICP-mass spectrometry using high-density microarray gelatin standards[J]. *Analytical Chemistry*, 2016, 88(11): 5 783-5 789.
- [91] ZHAO F J, MOORE K L, LOMBI E, ZHU Y G. Imaging element distribution and speciation in plant cells[J]. *Trends in Plant Science*, 2014, 19(3): 183-192.
- [92] MUELLER L, HERRMANN A J, TECHRITZ S, PANNE U, JAKUBOWSKI N. Quantitative characterization of single cells by use of immunocytochemistry combined with multiplex LA-ICP-MS[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2017, 409(14): 3 667-3 676.
- [93] LÖHR K, BOROVIKSKAYA O, TOURNIAIRE G, PANNE U, JAKUBOWSKI N. Arraying of single cells for quantitative high throughput laser ablation ICP-TOF-MS[J]. *Analytical Chemistry*, 2019, 91(18): 11 520-11 528.
- [94] WALLING M A, SHEPARD J R E. Cellular heterogeneity and live cell arrays[J]. *Chemical Society Reviews*, 2011, 40(7): 4 049-4 076.
- [95] ZHENG L N, FENG L X, SHI J W, CHEN H Q, WANG B, WANG M, WANG H F, FENG W Y. Single-cell isotope dilution analysis with LA-ICP-MS: a new approach for quantification of nanoparticles in single cells[J]. *Analytical Chemistry*, 2020, 92(21): 14 339-14 345.
- [96] WEI X, YANG M, JIANG Z, LIU J, ZHANG X, CHEN M, WANG J. A modular single-cell pipette microfluidic chip coupling to ETAAS and ICP-MS for single cell analysis[J]. *Chinese Chemical Letters*, 2022, 33(3): 1 373-1 376.
- [97] FENG D, LI H, XU T, ZHENG F, HU C, SHI X, XU G. High-throughput single cell metabolomics and cellular heterogeneity exploration by inertial microfluidics coupled with pulsed electric field-induced electrospray ionization-high resolution mass spectrometry[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2022, 1 221: 340 116.

(收稿日期: 2023-12-06; 修回日期: 2024-01-23)