

基于有源矩阵数字微流控芯片样品处理平台的高灵敏度单细胞蛋白质组集成化分析新策略

焦雨欣¹, 靳凯², 马汉彬², 钱小红¹, 秦伟捷¹

(1. 医学蛋白质组国家重点实验室, 北京蛋白质组研究中心, 国家蛋白质科学中心(北京), 军事科学院军事医学研究院, 北京 102206; 2. 中国科学院生物医学检验技术重点实验室, 中国科学院苏州生物医学工程技术研究所, 江苏 苏州 215163)

摘要: 传统的群体细胞研究掩盖了个体细胞间的异质性, 而单细胞组学以全新的研究视角揭示了细胞多样性及其关联的分子机制, 为精准解析复杂生物过程提供了重要支持。针对蛋白质组常规前处理方法中难以避免的样本损失, 本研究利用有源矩阵数字微流控芯片(active-matrix digital microfluidic, AM-DMF)构建了可操控纳升级液滴反应容器的单细胞蛋白质组集成样品处理平台, 并结合 timsTOF Pro 2 质谱仪, 开发了低损失、高灵敏的单细胞蛋白质组分析新策略。结果表明, 采用 AM-DMF 平台和数据非依赖性采集(DIA)可从单个 HeLa 细胞中平均鉴定出近 3 000 种蛋白质, 相较于其他样品前处理方法, 鉴定深度增加了 58%, 且定量结果具有较高的重复性, 该方法的稳定性和一致性较好。同时, 该策略在单细胞层面实现了 HeLa、A549 和 HepG2 三种肿瘤细胞系的有效区分, 证明了其在揭示单细胞异质性和解析复杂生物学问题方面的应用潜力。

关键词: 液相色谱-质谱(LC-MS); 单细胞; 蛋白质组学; 有源矩阵数字微流控(AM-DMF)

中图分类号: O657.63 文献标志码: A 文章编号: 1004-2997(2025)06-0849-10

DOI: 10.7538/zpxb.2025.0011 CSTR: 32365.14.zpxb.2025.0011

An Integrated Sample Preparing Platform for Highly Sensitive Single-Cell Proteomics Analysis Using Active Matrix Digital Microfluidic Chips

JIAO Yu-xin¹, JIN Kai², MA Han-bin², QIAN Xiao-hong¹, QIN Wei-jie¹

(1. State Key Laboratory of Medical Proteomics, Beijing Proteome Research Center, National Center for Protein Sciences (Beijing), Beijing Institute of Lifeomics, Beijing 102206, China;

2. Suzhou Institute of Biomedical Engineering and Technology, CAS Key Laboratory of Bio-Medical Diagnostics, Chinese Academy of Sciences, Suzhou 215163, China)

Abstract: Traditional bulk cell studies obscure the heterogeneity between individual cells, whereas single-cell omics provides a novel research perspective to reveal cellular diversity and its associated molecular mechanisms, offering a crucial support for the precise analysis of complex biological processes. To address the unavoidable sample loss in conventional proteomics sample preparation methods, an integrated sample processing platform was established for single-cells using active-matrix digital microfluidics (AM-DMF), that manipulated nanoliter level droplets as the reaction vessels. Combining AM-DMF and timsTOF Pro 2 mass spectrometer enabled low-loss and high-

sensitivity single-cell proteomic analysis. In this study, the surfactant used in the AM-DMF platform was firstly optimized to ensure proper droplet movement and sorting on the chip surface, and chromatographic conditions were also optimized to determine the ideal column length for single-cell protein identification. Then, the AM-DMF platform was compared to cellenONE, which was another commonly used single-cell sorting and sample processing platform. The results showed that using the AM-DMF platform combined with data-independent acquisition (DIA), nearly 3 000 proteins can be identified on average from a single HeLa cell, with an average single-cell sorting time of 2 s. Compared to other sample preparation methods, the identification depth increases by 58%, and the single-cell sorting time is reduced by 74%. The quantitative results exhibit high reproducibility, demonstrating the stability and consistency of this method. These findings validate the advantages of the AM-DMF platform in terms of identification depth, sensitivity, and sample processing throughput. Finally, the single-cell proteomes of HepG2, A549, and HeLa cells were systematically compared on the AM-DMF platform. The results revealed that an average of 2 831, 2 541, and 2 403 proteins are identified in single HepG2, A549, and HeLa cells were systematically compared on the AM-DMF platform, respectively. Principal component analysis (PCA) showed that single-cell proteomic data from the same cell line cluster together, while those from different cell lines are clearly separated, indicating the high stability of AM-DMF in single-cell sample preparation and qualitative and quantitative consistency, preserving the intrinsic proteomic characteristics and differences of the cells. Furthermore, an analysis of variance (ANOVA) with adjusted *p*-values less than 0.05 identifies 149 proteins with significantly different abundances across the three cell types. Gene ontology (GO) enrichment analysis of differentially expressed proteins showed that three cell types are enriched in distinct biological processes. Through a comparative analysis of HepG2, A549 and HeLa cell lines at the single-cell proteome level, this study highlights distinct proteomic expression patterns across different cell types, demonstrating the potential of the AM-DMF platform for single-cell proteomics research. This approach is expected to provide technical support for further investigation in complex biological questions, such as cell differentiation, tumor heterogeneity, and the immune microenvironment, and also holds promise for applications in the analysis of even smaller samples, such as single-cell extracellular vesicles and secreted proteins, offering refined molecular-level insights for precision medicine, drug screening, and personalized therapy.

Key words: liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS); single-cell; proteomics; active-matrix digital microfluidics (AM-DMF)

异质性是细胞间的普遍特征,决定着不同细胞的功能和发展轨迹^[1-2]。但常规组学研究大多聚焦于群体细胞,忽视了细胞间的异质性,往往导致只能得到平均化结果^[3-5]。近年来,单细胞分辨的组学研究受到科学界越来越多的关注^[6-8]。虽然单细胞转录组是目前最成熟、应用最广泛的技术,但 mRNA 作为基因表达的中间产物,并不直接调控细胞的功能和活动^[9]。作为细胞功能的直接执行者,蛋白质能够为生物学研究提供更直接的信息,从而更全面地揭示复杂生命系统中的异质性^[10-13]。因此,单细胞蛋白质组研究在

解析疾病发生、发展规律及发现药物靶标等方面具有重要价值。

基于质谱的单细胞蛋白质组分析流程主要包括单细胞分选、蛋白质组样品制备和质谱数据采集。要实现高灵敏度的单细胞蛋白质组鉴定,最关键的是在分选和样品制备过程中,采用尽可能微量的样品体系对单个细胞进行独立的精准控制,从而降低样品损失。在前期研究中,已有系列超低体积样品前处理技术的报道,如纳升级的油-气-液滴芯片(oil-air-droplet, OAD)^[14]、纳升液滴平台(nanodroplet processing in one pot for

trace samples, nanoPOTS)^[15]、集成蛋白质分析设备 (integrated proteome analysis device, iPAD)^[16]、集成蛋白质组学芯片 (integrated proteomics chip, iProChip)^[17]等技术和装置可将样品处理体积缩小至纳升至微升级。数字微流控 (digital microfluidic, DMF) 技术通过在阵列上应用电力将样品和试剂处理为纳升大小的液滴^[18-19], 最大限度减少液滴的样品处理体积及与吸附表面的相互作用, 从而减少非特异性吸附造成的蛋白质/肽损失, 提高样品回收率, 在超微量样品处理方面极具应用潜力。同时, DMF 封闭性和自动化性降低了手动操作可能引入的实验误差和污染。新兴的有源矩阵数字微流控 (active-matrix digital microfluidic, AM-DMF) 技术通过采用有源矩阵背板取代数字 DMF 芯片上的传统电极, 克服了传统 DMF 芯片上电极尺寸和数量引起的通量限制, 能够满足大规模单细胞分选和单细胞蛋白质组分析的要求^[20-21]。

本研究以 AM-DMF 平台为主要技术手段, 旨在为单细胞蛋白质组学提供一种集成化且易使用的样品处理策略。AM-DMF 平台的单细胞蛋白质组分析流程示于图 1。该平台利用 DMF 技术, 通过光学显微成像和人工智能视觉筛选合适的液滴, 实现对芯片上液滴的精准操控, 高效筛选目标单细胞。同时, 该芯片操作平台通过自动化液滴操控, 集成单细胞分选、蛋白质提取、蛋白质

还原与烷基化以及酶解步骤, 实现全流程的单细胞蛋白质组样品制备, 从而减少样品损失和污染, 提高单细胞蛋白的鉴定深度和灵敏度。AM-DMF 单细胞样品处理平台将反应体系降低至 10 nL, 以最大限度减少样品损失; 并通过自动化液滴操控避免人为影响和样品污染, 提高实验重现性。此外, 本研究还验证了不同细胞系在 AM-DMF 平台上的适用性, 以期探索本方法在揭示单细胞蛋白质组学异质性方面的潜力。

1 实验部分

1.1 主要仪器与装置

timsTOF Pro 2 离子淌度飞行时间质谱仪: 德国 Bruker 公司产品; Ultimate 3000 纳升超高效液相色谱仪: 美国 Thermo Scientific 公司产品; 毛细管: 美国 Polymicro Technologies 公司产品; TC20™ 自动细胞计数器: 美国 Bio-Rad 公司产品; cellenONE 单细胞分选平台: 法国 Cellenion 公司产品; BOXmini™ SCP 单细胞样品处理平台: 广东奥素液芯微纳科技有限公司产品。

1.2 主要材料与试剂

磷酸缓冲盐溶液 (PBS)、正十二烷基 β -D-麦芽糖苷 (DDM)、乙腈 (质谱级)、甲酸: 均为美国 Thermo Fisher 公司产品; 完全培养基 (DMEM)、青霉素/链霉素双抗溶液: 英国 Gibco 公司产品; 胰蛋白酶: 美国 Promega 公司产品; 三(2-羧乙

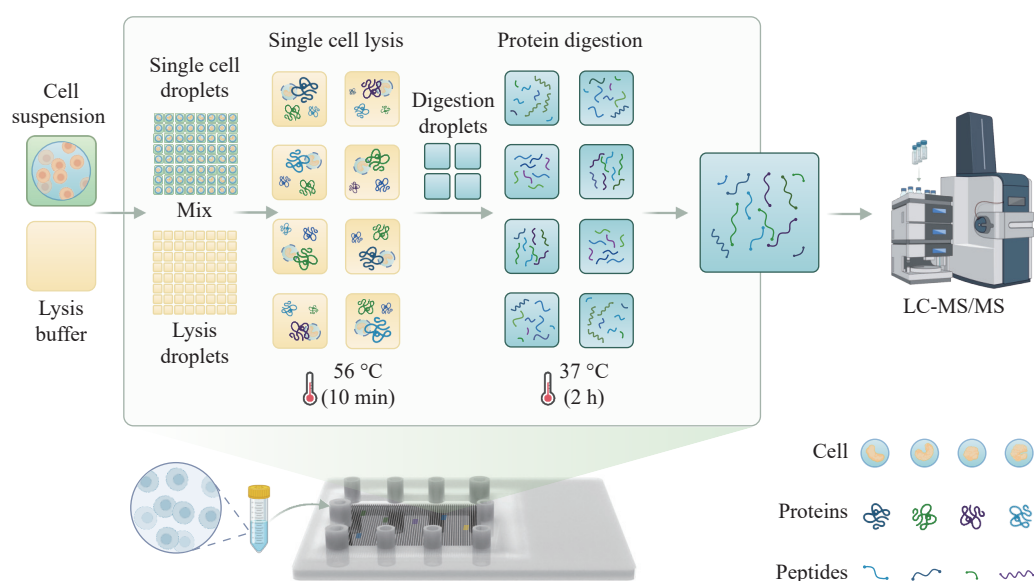


图 1 AM-DMF 平台的单细胞蛋白质组分析流程示意图

Fig. 1 Schematic diagram of single-cell proteomics workflow on the AM-DMF platform

基)膦溶液(TCEP):美国 Merck 公司产品;氯乙酰胺(CAA)、三乙基铵碳酸氢盐溶液(TEAB)、聚氧乙烯-聚氧丙烯-聚氧乙烯三嵌段共聚物(Pluronic F68):美国 Sigma-Aldrich 公司产品; RapiGest™ SF:美国 Waters 公司产品。

1.3 实验条件

1.3.1 细胞培养与细胞活率测定 HeLa、A549 和 HepG2 细胞在 Dulbecco 改良的 Eagle 培养基(DMEM)中培养,并补充了 10%(V/V)胎牛血清和青霉素-链霉素(100 U/mL),在 37 °C、5%CO₂ 条件下孵育。用冰冷的磷酸盐缓冲液(1×PBS)冲洗细胞 2 次,通过刮取解离,向解离的细胞中加入冰冷的 1×PBS,离心收集细胞沉淀,并用 1×PBS 冲洗 2 次,然后用 PBS 稀释至 3.5×10⁵ 个细胞/mL 的浓度后,待后续分析。

1.3.2 裂解液、单细胞悬液和酶解液的制备 分别添加 0.05%和 0.15%表面活性剂 RapiGest SF 至裂解液(0.2%DDM、10 mmol/L TCEP、40 mmol/L CAA、100 mmol/L TEAB, pH 8.5)和酶解液(100 mg/L 胰蛋白酶、100 mmol/L TEAB, pH 8.5)中,并分别添加 0.15%RapiGest SF 和 0.15%Pluronic F68 至单细胞悬液中,待后续样品制备。

1.3.3 单细胞蛋白质组学样品的制备 该流程在 AM-DMF 平台上进行,具体的液滴控制参数参见之前的报道^[20]。简而言之,扫描电压 V_{scan} 设置为 50 V,用于打开薄膜晶体管开关;数据电压 V_{data} 设置为 45 V,通过介电润湿效应控制液滴移动。在实验开始前,需要先启动软件以建立与 AM-DMF 芯片硬件系统的连接,并在软件中编辑液滴生成路径,通过指定的注入口向芯片内注入介质油十六烷;在软件中运行样品注入程序,通过对样品注入口周围的电极施加驱动电压,使其表面呈亲水特性,促进裂解液、单细胞悬液、酶解液的顺利加载。随后,按照设定好的自动化工作流程,先后将裂解液、单细胞悬液和酶解液分选成单个体积为 3 nL 的液滴,通过光学显微成像和人工智能视觉筛选合适的液滴;先将裂解液液滴与单细胞液滴混合,在 56 °C 下进行还原和烷基化反应 15 min 后,再与酶解液液滴混合,37 °C 酶切 120 min,然后注入 0.1%甲酸(FA)液滴,样品与防蒸发的 0.1%FA 液滴结合后移动到出样口;将芯片温度调至 10 °C,利用十六烷的高熔点特性使其转化为固态,实现介质油与样品液

滴的物理分离。最终,将样品液滴从输出孔溢出,使用毛细管将其转移至进样小瓶,待后续的液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)分析。

1.3.4 色谱条件 使用 Ultimate 3000 纳升超高效液相色谱仪,通过纳喷电离源在线连接到 timsTOF Pro 2 质谱仪进行分离。使用 C18 色谱柱(20 cm×75 μm)分离肽段,填充粒径为 1.9 μm 的 ReproSil C18 树脂,柱温 50 °C,流速 300 nL/min。流动相为 0.1%甲酸(A)和含有 0.1%甲酸的 80%乙腈(B)。肽段分离梯度:0~2 min(6%B),2~24 min(6%~25%B),24~30 min(25%~40%B),30 min(40%~99%B)。

1.3.5 质谱条件 在数据非依赖性采集(DIA)模式下,采用数据独立采集-并行累积串行碎裂(data-independent acquisition coupled with parallel accumulation-serial fragmentation, diaPASEF)技术进行样本分析。源毛细管电压 1 600 V(正离子模式),干燥气流量 3 L/min,温度 180 °C,共采集 8 个循环,每个质量窗口内进一步划分为 2~3 个迁移率窗口,总计 21 个质量窗口(每个窗口宽度为 25 u,范围覆盖 475~1 000 u),离子迁移率范围(1/K₀)覆盖 0.85~1.27 V·s/cm²,每次 PASEF 扫描的采集时间设定为 100 ms,总循环时间约 0.89 s。

1.3.6 数据分析 所有数据均采用 Spectronaut v19(Biognosys)软件的 directDIA+方法结合 Uniprot 2024 版本的人类参考数据库进行分析。胰蛋白酶特异性设置为允许最多 2 个漏切位点,蛋白质和肽段的假发现率(FDR)均设置为不超过 1%。蛋白质 N 端乙酰化和甲硫氨酸(M)氧化被设定为可变修饰,半胱氨酸的羧甲基被设定为固定修饰。

2 结果与讨论

2.1 表面活性剂优化

在 AM-DMF 平台上将单细胞悬液、裂解液和酶解液精准分离成约 3 nL 微液滴是实现高效单细胞蛋白质组样品前处理的前提。一方面,在移动过程中,由于裂解液和酶解液的表面张力与液滴的形成机制不同,容易在芯片表面产生不同程度的拖尾现象,从而影响其精准的分离效率。另一方面,单细胞 PBS 悬液与芯片表面之间的摩擦力较大,阻碍了微液滴的平稳运动和精准分

离。在液滴中加入表面活性剂是满足上述需求的有效途径, 表面活性剂的选择需要能够兼容蛋白酶和质谱, 避免额外的脱盐操作或对后续的蛋白质酶解和质谱分析造成干扰。因此, 本研究对表面活性剂种类和浓度进行了考察。RapiGest SF 具有在酸性条件下快速降解、生成质谱兼容的小分子产物的特点^[22], 因此, 将其应用于裂解液和酶解液。通过对比含有不同浓度 RapiGest SF 的裂解液和酶解液的分选情况, 观察到分选效率随所用 RapiGest SF 浓度增加而提升, 在浓

度为 0.15% 时达到 100%, 具有最佳的分选效果, 示于图 2a。针对单细胞悬液, 采用同样的 RapiGest SF 浓度作为促进单个细胞移动的表面活性剂, 观察到单细胞的平均分选效率仅能达到 0.1%, 可能是因为 RapiGest SF 主要用于提高蛋白质的溶解性和酶解效率, 不适用于微流控系统内的细胞表面润滑或移动^[22]。相反, 使用有利于降低细胞与表面相互作用的相同浓度的 Pluronic F68^[23], 细胞分选效率明显提升, 达到 100%, 示于图 2b。

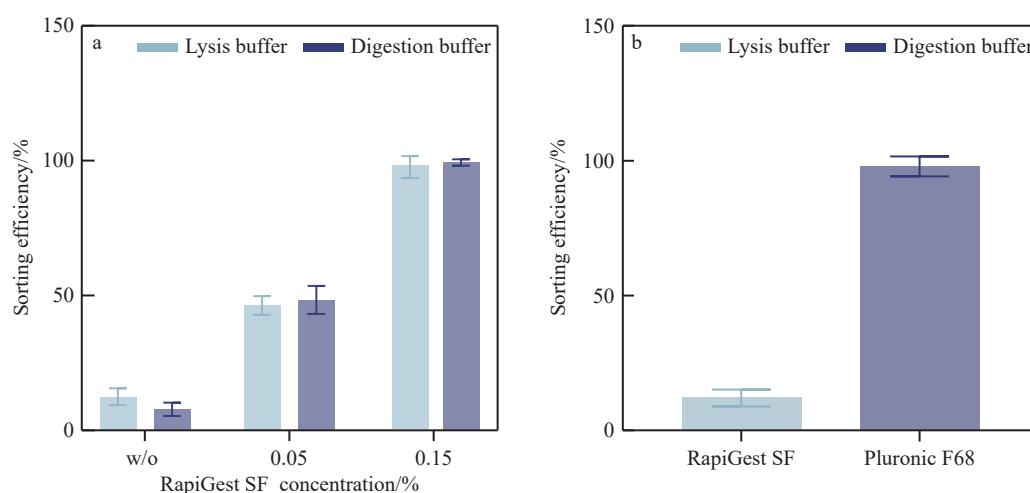


图 2 裂解液、酶解液(a)和细胞液(b)在不同表面活性剂下液滴的分选效率($n=3$)

Fig. 2 Droplet sorting efficiency of lysis, digestion buffer (a) and cell fluid (b) under different surfactants ($n=3$)

2.2 片上酶切时间优化

为深入探讨 AM-DMF 平台上不同酶解时间对单细胞蛋白质组分析的影响, 系统地分析了单个 HeLa 细胞在不同胰蛋白酶酶解时间下的蛋白质、肽段和前体的数量, 并评估了漏切率的变化。结果表明, 酶解 2 h 的蛋白质、肽段及前体的鉴定数量最高, 漏切率在 2 h 内快速下降至 10%, 并且随着时间的延长无显著差异, 表明酶解在 2 h 充分完成, 示于图 3。本研究在保证酶切效率大于 90% 的同时, 将传统单细胞蛋白溶液酶切法所需的 4~6 h 酶切时间缩短了 50% 以上, 这是由于 AM-DMF 平台为单细胞样品酶解提供了相对封闭的环境, 电极控温方式能够在保证稳定酶解温度的同时有效减少液体蒸发, 提升单细胞蛋白的鉴定效果, 展现了该平台对于增强酶解动力学的重要优势。

2.3 色谱条件优化

在基于液相色谱-质谱的单细胞蛋白质组分

析中, 液相色谱所用的不同长度色谱柱直接决定着蛋白质的分离效果, 影响蛋白质的鉴定深度。

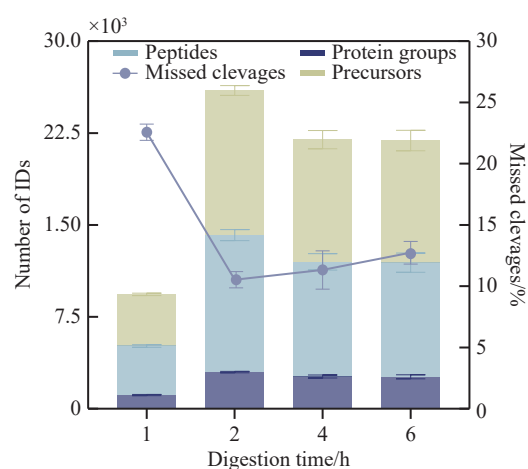


图 3 不同片上酶切时间的单细胞蛋白质组鉴定效果($n=3$)

Fig. 3 Identification of single-cell proteomics under different on-chip digestion time ($n=3$)

因此,本研究考察了色谱柱长度分别为15、20、25 cm的鉴定效果,结果示于图4。可见,随着色谱柱长度的增加,蛋白质、肽段和肽谱匹配(peptide spectrum matches, PSM)的鉴定量均呈上升趋势,增幅分别为43%、21%、22%。这一现象可能是由于较长的色谱柱提供了更好的分离效果,有助于扫描速度有限的质谱仪能够更充分地捕获复杂的肽段混合物,从而减少信息丢失,提

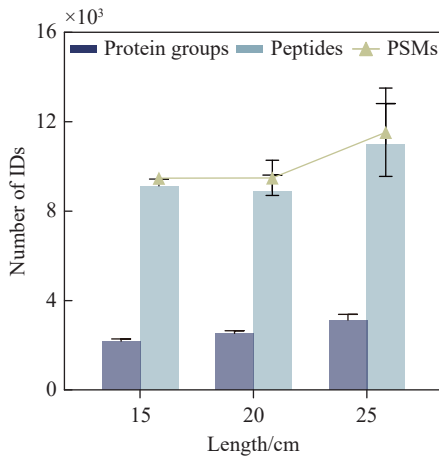


图4 不同长度色谱柱的单细胞蛋白质组的鉴定深度($n=3$)

Fig. 4 Coverage depth of single-cell proteomics using chromatographic columns of different lengths ($n=3$)

升单细胞样品的覆盖深度^[24]。因此,在后续分析中均使用25 cm色谱柱进行分离,以确保最佳的鉴定深度和灵敏度。

2.4 不同单细胞分选和样品处理平台的单细胞蛋白质组鉴定水平比较

为进一步考察AM-DMF平台的有效性,将其与另一种常用的单细胞分选和样品处理平台,即cellenONE进行比较。cellenONE是1个集成单细胞分离和纳升级试剂分配的高精度平台,通过微流控技术捕捉单细胞,同时自动分配纳升级试剂进行后续的样本制备流程。结果表明,AM-DMF的平均鉴定水平可达近3000种蛋白/HeLa单细胞,数量显著高于cellenONE($p<0.001$, t检验),鉴定深度提高了58%,示于图5a。比较2种方法在6个HeLa单细胞中所鉴定到的蛋白质后发现,AM-DMF覆盖了cellenONE结果的87.3%,并额外鉴定出1407种蛋白质,初步证明了其在单细胞蛋白质组样本前处理方面的优势,示于图5b。与cellenONE平台1 μ L单细胞样品处理体系相比,AM-DMF平台的油相样本处理环境能够有效防止样本蒸发,从而将处理体系降低至10 nL级别,进一步减少了蛋白质的吸附损失;并且,AM-DMF平台通过全自动化的液滴操控,实现了单细胞分选和各种试剂添加,有效避

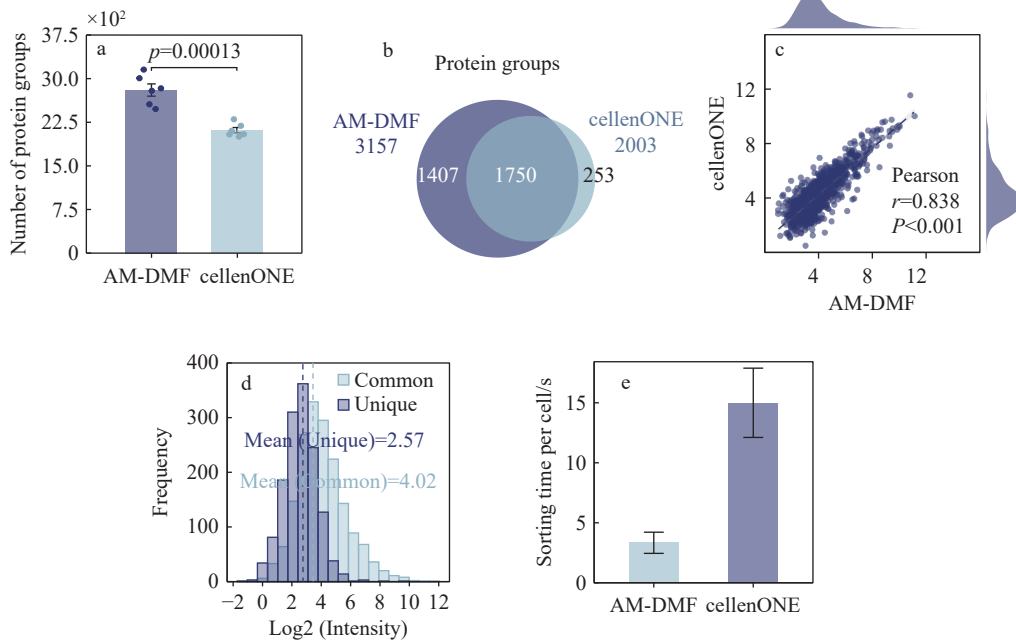


图5 2种单细胞蛋白质组学样品处理平台的比较($n=6$)

Fig. 5 Comparison of the two single-cell proteomics sample processing platforms ($n=6$)

免了样品转移过程中的损失。此外,对2组共同鉴定到的蛋白质进行强度相关分析,结果显示显著正相关($r=0.838, p<0.001$),验证了2种方法定量结果的高度一致性,示于图5c。通过比较AM-DMF独立鉴定到的蛋白和与cellenONE共鉴定的蛋白,发现独立鉴定到蛋白的整体丰度值更低,说明AM-DMF方法对低丰度蛋白质具有更高的检测灵敏度,示于图5d。AM-DMF平台对单个细胞的分选时间比cellenONE下降了75%,示于图5e。这一优势主要源于cellenONE需逐个识别分选,而AM-DMF平台能够并行分选多个细胞,降低了单个细胞的分选时间,提高了样品处理通量。综上,AM-DMF平台在单细胞蛋白质组鉴定深度、灵敏度以及样品处理通量方面均表现出明显优势,能够在单细胞层面实现更全面的蛋白质组覆盖。

2.5 AM-DMF平台在单细胞蛋白质组样品制备中的重现性考察

为进一步验证AM-DMF平台在单细胞蛋白质组样品制备中的重现性,使用HepG2、A549和HeLa 3种不同的细胞系在Chip1和Chip2两

张芯片上进行样品制备。在3种细胞系中,分别对2张芯片上共同鉴定到的蛋白质进行强度相关性分析,均表现出极高的相关性($r=0.99, p<0.001$),示于图6a。这可能是由于细胞系里细胞种类和生长环境单一,导致异质性较低,而原代细胞直接来源于生物体组织,保留了体内环境的生物学特性,具有更高的异质性。在后续研究中,将使用AM-DMF平台对原代细胞进行单细胞样品分析,以期将该平台应用于特定的生物学研究中。所以,现在观察到的单细胞间极小的差异并不影响单细胞蛋白质组研究的必要性。此外,本实验通过计算每种单细胞内每种蛋白质的变异系数(coefficient of variation, CV),研究不同细胞系间的变异性,发现随着蛋白质丰度增加, CV呈下降趋势,表明高丰度蛋白质的检测稳定性更高,而低丰度蛋白质的检测波动较大。这一趋势在3种细胞系中表现一致,且单细胞蛋白质组定量中位CV值均小于0.1,示于图6b。验证了AM-DMF平台在处理不同样本类型时的可靠性和一致性,进一步证明了其在单细胞蛋白质组研究中作为有效工具的潜力。

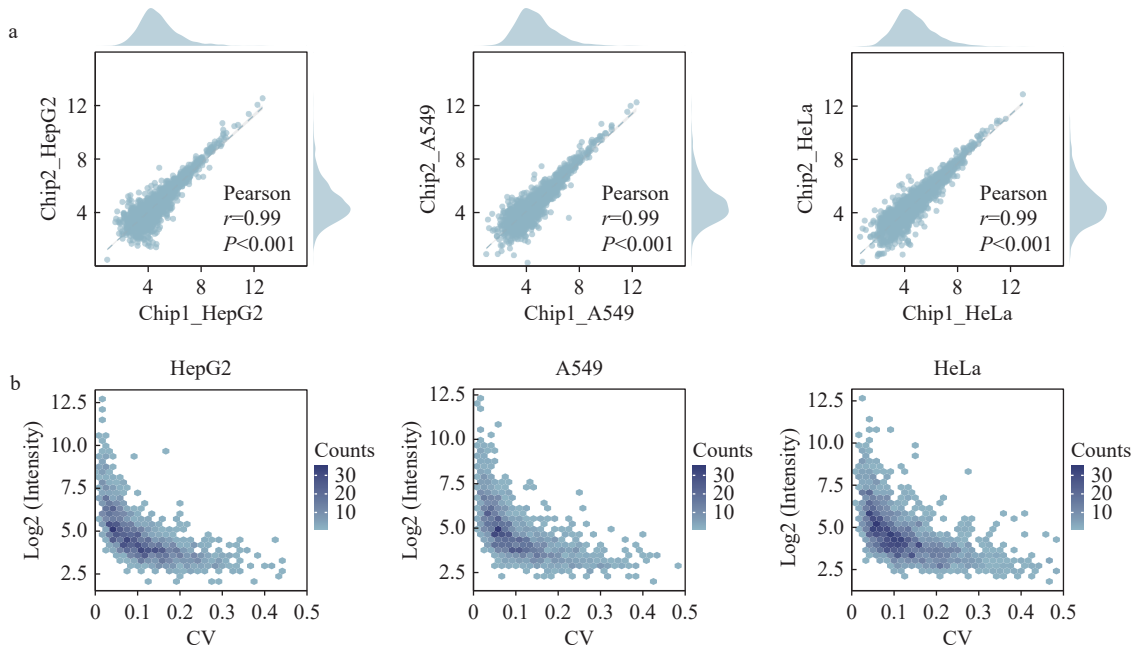


图6 3种细胞系在不同芯片上的单细胞蛋白质组样品重现性分析

Fig. 6 Reproducibility of single-cell proteomics sample preparation from three cell lines on different chips

2.6 基于AM-DMF平台的3种人源癌细胞系的单细胞蛋白质组比较

本研究使用AM-DMF平台在单细胞层面系

统地比较了HepG2、A549和HeLa 3种细胞系的蛋白质组异同,分别平均鉴定到2 403、2 541、2 831种蛋白质,其中HeLa细胞系的鉴定数量略

高于 A549 和 HepG2, 示于图 7a。这可能是由于 3 种细胞系的直径存在差异, 其中, HeLa 细胞系的平均直径为 27 μm , 比另外 2 种细胞系稍大, 所以鉴定量更高。主成分分析(PCA)清晰地显示了 3 种细胞系间的差异, 示于图 7b。同种细胞系的单细胞蛋白质组数据聚在一起, 而不同细胞系的结果明显分离, 表明 AM-DMF 平台具有较好的单细胞样本制备和定性定量稳定性, 能够保持细胞原有的蛋白质组特征和差异。此外, 本研究还使用方差分析(校正后 $p < 0.05$)对 3 种细胞系进行比较, 共鉴定出 149 种在 3 种细胞类型中丰度显著差异的蛋白质。利用这些差异表达蛋白质进行聚类分析并绘制热图, 示于图 7c, 展示了 3 种细胞系各自特有的差异表达蛋白, 进一步表

明了 AM-DMF 平台的高灵敏度, 并提示开展单细胞研究对于解析细胞间异质性的作用。此外, 本工作还进行了基因本体富集分析(GO), 以识别与每个细胞系中独特上调或下调的蛋白质相关的生物过程, 示于图 7d。在 HeLa 细胞中, 与细胞质翻译(cytoplasmic translation)、核糖体生物发生(ribosome biogenesis)和 RNA 剪接(RNA splicing)相关的蛋白质显著上调, 表明 HeLa 细胞在蛋白质合成和翻译调控方面具有较高的活性, 支持其快速增殖和肿瘤特性^[25]。对于 A549 细胞, 与中间丝细胞骨架组织(intermediate filament cytoskeleton organization)和角质细胞分化(keratinocyte differentiation)相关的蛋白质显著上调, 表明 A549 在细胞骨架相关功能中具有活跃

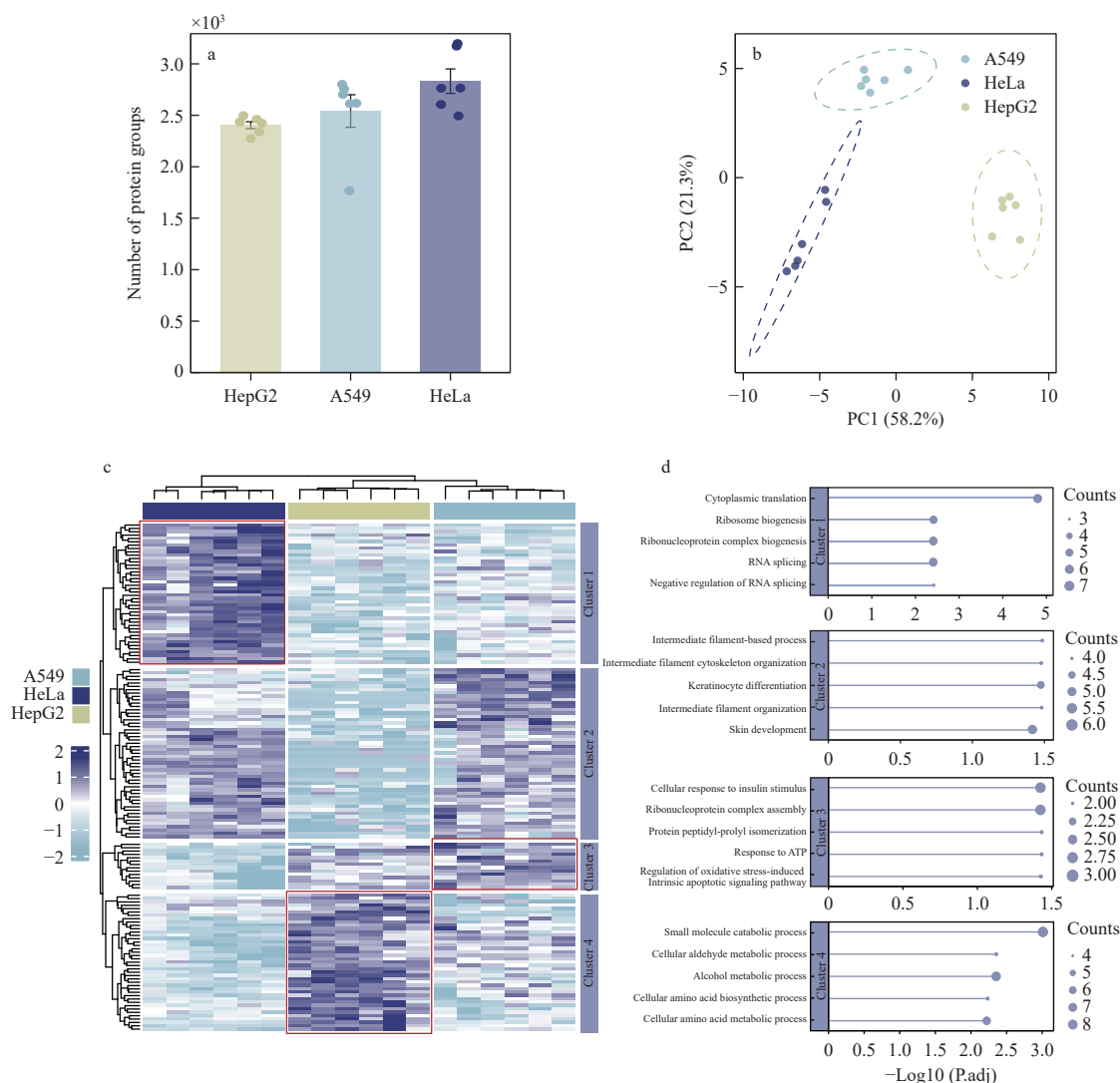


图 7 AM-DMF 平台用于 3 种细胞系的单细胞蛋白质组比较分析($n=6$)

Fig. 7 Comparative analysis of single-cell proteomics from three cell lines using the AM-DMF platform ($n=6$)

性,可能与其结构特性及潜在的转移能力相关^[26]。在 HepG2 细胞中,与氨基酸代谢 (cellular amino acid metabolic process)、醇代谢 (alcohol metabolic process) 和小分子代谢 (small molecule catabolic process) 相关的蛋白质显著上调,这与其作为肝细胞系在代谢调控方面的特性密切相关^[27]。

3 结论

本工作开展了基于 AM-DMF 平台的单细胞蛋白质组分析新方法,通过大幅度缩小反应体积并减少样品转移步骤,有效降低了单细胞样品制备过程中的蛋白质和肽段损失,从而提高了蛋白质组的鉴定深度和灵敏度,在单细胞蛋白质组分析中具有良好的重现性、可靠性和广泛适用性。通过对 HepG2、A549 和 HeLa 3 种细胞系在单细胞蛋白质组层面的比较分析,揭示了不同细胞系在蛋白质表达谱上的差异特征,证明了 AM-DMF 平台用于单细胞蛋白质组研究的潜力,以期为进一步探索如细胞分化、肿瘤异质性以及免疫微环境等复杂生物学问题提供技术支撑。同时,有望在后续研究中将 AM-DMF 平台应用于更微量的样本,如单细胞的外囊泡和分泌蛋白等,为精准医学、药物筛选以及个体化治疗提供更精细的分子层面信息。

参考文献:

- [1] ZHANG D, QIN Q, QIAO L. Mass spectrometry profiling of single bacterial cells reveals metabolic regulation during antibiotics induced bacterial filamentation[J]. Chinese Chemical Letters, 2023, 34(6): 107-113.
- [2] TAO W B, XIE N B, CHENG Q Y, FENG Y Q, YUAN B F. Sensitive determination of inosine RNA modification in single cell by chemical derivatization coupled with mass spectrometry analysis[J]. Chinese Chemical Letters, 2023, 34(10): 108-113.
- [3] BARABÁSI A L, OLTVAI Z N. Network biology: understanding the cell's functional organization[J]. Nature Reviews Genetics, 2004, 5: 101-113.
- [4] ZHU G, ZHAO Y, ZHANG W, WU Y, LIU Y, GUO G, WANG X, LIU Z. Single-cell mass spectrometry studies of drug metabolism heterogeneity and primary resistance to gefitinib in non-small cell lung cancer cells[J]. Chinese Chemical Letters, 2024, 35(2): 108-113.
- [5] WANG C, HU W, GUAN L, YANG X, LIANG Q. Single-cell metabolite analysis on a microfluidic chip[J]. Chinese Chemical Letters, 2022, 33(6): 2 883-2 892.
- [6] 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.
- [7] QIU S, SHEN C, JIAN X, LU Y, TONG Z, WU Z, MAO H, ZHAO J. Single-cell level point mutation analysis of circulating tumor cells through droplet microfluidics[J]. Chinese Chemical Letters, 2022, 33(5): 2 701-2 704.
- [8] CHANG X, WANG N, JIANG D, CHEN H Y, JIANG D. Nanokit coupled electrospray ionization mass spectrometry for analysis of angiotensin converting enzyme 2 activity in single living cell[J]. Chinese Chemical Letters, 2023, 34(3): 107-113.
- [9] LIU Y, BEYER A, AEBERSOLD R. On the dependency of cellular protein levels on mRNA abundance[J]. Cell, 2016, 165(3): 535-550.
- [10] SLAVOV N. Unpicking the proteome in single cells[J]. Science, 2020, 367(6 477): 512-513.
- [11] COHEN A A, GEVA-ZATORSKY N, EDEN E, FRENKEL-MORGENSTERN M, ISSAEVA I, SIGAL A, MILO R, COHEN-SAIDON C, LIRON Y, KAM Z, COHEN L, DANON T, PERZOV N, ALON U. Dynamic proteomics of individual cancer cells in response to a drug[J]. Science, 2008, 322(5 907): 1 511-1 516.
- [12] MARX V. A dream of single-cell proteomics[J]. Nature Methods, 2019, 16(9): 809-812.
- [13] DONG C, MENG X, ZHANG T, GUO Z, LIU Y, WU P, CHEN S, ZHOU F, MA Y, XIONG H, SHU S, HE A. Single-cell EpiChem jointly measures drug-chromatin binding and multimodal epigenome[J]. Nature Methods, 2024, 21(9): 1 624-1 633.
- [14] LI Z Y, HUANG M, WANG X K, ZHU Y, LI J S, WONG C C L, FANG Q. Nanoliter-scale oil-air-droplet chip-based single cell proteomic analysis[J]. Analytical Chemistry, 2018, 90(8): 5 430-5 438.
- [15] DOU M, CLAIR G, TSAI C F, XU K, CHRISLER W B, SONTAG R L, ZHAO R, MOORE R J, LIU T, PASATOLIC L, SMITH R D, SHI T, ADKINS J N, QIAN W J, KELLY R T, ANSONG C, ZHU Y. High-throughput single cell proteomics enabled by multiplex isobaric labeling in a nanodroplet sample preparation platform[J]. Analytical Chemistry, 2019, 91(20): 13 119-13 127.
- [16] SHAO X, WANG X, GUAN S, LIN H, YAN G, GAO M, DENG C, ZHANG X. Integrated proteome analysis device for fast single-cell protein profiling[J]. Analytical

- Chemistry, 2018, 90(23): 14 003-14 010.
- [17] GEBREYESUS S T, SIYAL A A, KITATA R B, CHEN E S, ENKHBAYAR B, ANGATA T, LIN K I, CHEN Y J, TU H L. Streamlined single-cell proteomics by an integrated microfluidic chip and data-independent acquisition mass spectrometry[J]. *Nature Communications*, 2022, 13(1): 37.
- [18] XU X, LIN L, YANG J, QIAN W, SU R, GUO X, CAI L, ZHAO Z, SONG J, YANG C. Simultaneous single-cell genome and transcriptome sequencing in nanoliter droplet with digital microfluidics identifying essential driving genes[J]. *Nano Today*, 2022, 46: 101 596.
- [19] XU Y, CHEN B, HE M, CUI Z, HU B. All-in-one microfluidic chip for online labeling, separating, and focusing rare circulating tumor cells from blood samples followed by inductively coupled plasma mass spectrometry detection[J]. *Analytical Chemistry*, 2023, 95(37): 14 061-14 067.
- [20] HU S, YE J, SHI S, YANG C, JIN K, HU C, WANG D, MA H. Large-area electronics-enabled high-resolution digital microfluidics for parallel single-cell manipulation[J]. *Analytical Chemistry*, 2023, 95(17): 6 905-6 914.
- [21] 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 matrix digital microfluidic chip[J]. *JACS Au*, 2024, 4(5): 1 811-1 823.
- [22] CHEN E I, COCIORVA D, NORRIS J L, YATES J R. Optimization of mass spectrometry-compatible surfactants for shotgun proteomics[J]. *Journal of Proteome Research*, 2007, 6(7): 2 529-2 538.
- [23] THARMALINGAM T, GHEBEH H, WUERZ T, BUTLER M. Pluronic enhances the robustness and reduces the cell attachment of mammalian cells[J]. *Molecular Biotechnology*, 2008, 39(2): 167-177.
- [24] HSIEH E J, BEREMAN M S, DURAND S, VALASKOVIC G A, MacCOSS M J. Effects of column and gradient lengths on peak capacity and peptide identification in nanoflow LC-MS/MS of complex proteomic samples[J]. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2013, 24(1): 148-153.
- [25] GAO M, WILUSZ C J, PELTZ S W, WILUSZ J. A novel mRNA-decapping activity in HeLa cytoplasmic extracts is regulated by AU-rich elements[J]. *The EMBO Journal*, 2001, 20(5): 1 134-1 143.
- [26] LI X, WANG J. Mechanical tumor microenvironment and transduction: cytoskeleton mediates cancer cell invasion and metastasis[J]. *International Journal of Biological Sciences*, 2020, 16(12): 2 014-2 028.
- [27] JIMÉNEZ-LÓPEZ J M, CARRASCO M P, SEGOVIA J L, MARCO C. Resistance of HepG2 cells against the adverse effects of ethanol related to neutral lipid and phospholipid metabolism[J]. *Biochemical Pharmacology*, 2002, 63(8): 1 485-1 490.

(收稿日期: 2025-02-05; 修回日期: 2025-03-03)