

单细胞蛋白质组学描绘人原代 CD8⁺ T 细胞蛋白图谱

李春雨, 张越阳, 张汉卿, 叶 慧

(中国药科大学多靶标天然药物全国重点实验室, 江苏 南京 210009)

摘要: 本研究建立了针对单个人原代 CD8⁺ T 细胞的单细胞蛋白质组学分析方法。采用 CellenONE 全自动单细胞分选仪, 实现对单细胞的温和、精准分离, 使用 timsTOF Ultra 2 质谱仪进行蛋白质及翻译后修饰的高灵敏鉴定。结果表明, 从单个人原代 CD8⁺ T 细胞中鉴定到 2 500 余种蛋白质和 16 000 余条肽段; 蛋白亚细胞定位分析显示其分布主要为细胞质(1 186 个)、细胞核(891 个)、线粒体(261 个)及细胞膜(181 个)。翻译后修饰分析显示, 在单个细胞中鉴定到 32 种磷酸化、64 种甲基化及 356 种乙酰化修饰蛋白。功能富集分析表明, 所鉴定到的蛋白质功能主要富集于核糖体与免疫相关通路。综上, 本研究描绘了人原代 CD8⁺ T 细胞的蛋白质组组成及翻译后修饰谱, 证实了单细胞蛋白质组学技术在解析单细胞复杂生命活动方面的应用潜力。

关键词: 单细胞蛋白质组学; 人原代 CD8⁺ T 细胞; 翻译后修饰; 质谱

中图分类号: O657.63

文献标志码: A

文章编号: 1004-2997(2025)06-0859-09

DOI: 10.7538/zpxb.2025.0091

CSTR: 32365.14.zpxb.2025.0091

Single-Cell Proteomic Profiling of Human Primary CD8⁺ T Cells

LI Chun-yu, ZHANG Yue-yang, ZHANG Han-qing, YE Hui

(State Key Laboratory of Natural Medicines, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

Abstract: Single-cell proteomics (SCP) has emerged as a transformative technique that overcomes the averaging effects inherent in bulk-cell analyses, enabling high-resolution profiling of protein expression and post-translational modification (PTM) with single-cell resolution. Human primary CD8⁺ T cells serve as central effector cells in the human immune response, playing crucial roles in combating pathogenic infections and mediating immune surveillance. Understanding the proteomic architecture of human immune cells is crucial for elucidating their diverse functional states, yet human primary CD8⁺ T cells remain largely unexplored by single-cell proteomics (SCP) due to their characteristically small cellular size and extremely limited protein content, which collectively pose significant technical obstacles for high-sensitivity protein identification and PTM detection at the single-cell level. This study successfully established a robust SCP analytical workflow to characterize the proteomic landscape of individual human primary CD8⁺ T cells. The workflow first utilized the CellenONE automated single-cell sorter for gentle and precise cell isolation, and was followed by the analysis of protein composition and PTM identification using the high-sensitivity timsTOF Ultra 2 mass spectrometer. This SCP approach consistently identified over 2 500 proteins and more than

16 000 peptides from individual human primary CD8⁺ T cells. Protein abundance across single cells demonstrate strong reproducibility, with pairwise correlations exceeding 0.77 and a median coefficient of variation (CV) of 28.61%. Subcellular localization analysis revealed that the identified proteins are primarily distributed in the cytoplasm (1 186 proteins), nucleus (891 proteins), mitochondria (261 proteins), and cell membrane (181 proteins), reflecting the diverse functional compartments within human primary CD8⁺ T cells. Furthermore, PTM profiling identifies 32 phosphorylated, 64 methylated, and 356 acetylated proteins per cell, with acetylation being the most prevalent modification. These PTM proteins are also mainly localized to the cytoplasm and nucleus. Gene Ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) analyses indicated that the functional categories of proteins in human primary CD8⁺ T cells are predominantly enriched in ribosomal and immune-related pathways, emphasizing the central role of protein synthesis and immune regulatory networks in human primary CD8⁺ T cell function. In conclusion, the SCP workflow developed in this study presents the first high-resolution proteome and PTM atlas of human primary CD8⁺ T cells, providing a valuable foundation for elucidating complex cellular processes and guiding future research into disease mechanisms and therapeutic targeting.

Key words: single-cell proteomics; human primary CD8⁺ T cells; post-translational modification; mass spectrometry

单细胞蛋白质组学(single-cell proteomics, SCP)技术可在单个细胞水平实现蛋白质的定性定量及蛋白翻译后修饰(post-translational modification, PTM)分析,突破了传统群体细胞平均化分析的局限,在解析细胞功能表型异质性及挖掘潜在治疗靶点等领域具有重要的应用前景^[1]。近年来,单细胞分选技术和高灵敏、高分辨率质谱技术迎来了飞速发展,为单细胞蛋白质组的深度解析提供了技术支撑^[2]。例如,由Wang等^[3]开发的PiSPA(pick-up single-cell proteomic analysis)技术将单个哺乳动物细胞的蛋白鉴定量提升至3 000种;Sabatier等^[4]和Ye等^[5]分别开发的SC-pSILAC(single-cell pulsed stable isotope labeling by amino acids in cell culture)和Chip-Tip技术,在单个HeLa细胞中成功鉴定出4 000余种和5 000余种蛋白质。

目前,主流的单细胞分选技术是微流控(microfluidics)和全自动单细胞分选(CellenONE)技术。微流控技术具有试剂消耗量少、检测灵敏度高、子系统集成量大等优点^[6];全自动单细胞分选技术具有自动化程度高、温和无损伤、精确度高、实时图像记录等优点^[7]。两者均是单细胞捕获的有力工具,且均可低损耗地完成样品前处理^[8-9]。高灵敏度质谱仪的发展显著提升了蛋白质组检测深度,为单细胞蛋白质组的深度检测

和生物医学研究奠定了基础。例如,timsTOF Ultra 2已被报道能够在极微量样本上实现高灵敏度的蛋白质组学分析^[10-11]。

CD8⁺ T细胞是人体免疫应答的核心效应细胞,在对抗致病性损伤和免疫监视中发挥关键作用:既可杀伤恶性细胞,又可通过记忆T细胞实现对继发性感染的长期保护^[12]。CD8⁺ T细胞的功能发挥是一个高度复杂的动态过程^[13],涉及多种蛋白质的表达及翻译后修饰的精准调控^[14]。当前对人原代CD8⁺ T细胞的单细胞功能认知主要依赖单细胞转录组技术,因此迫切需要建立单细胞蛋白质组学技术,为解析其蛋白质和PTM的动态变化提供支撑。

本研究以人原代CD8⁺ T细胞为研究对象,系统描绘原代免疫细胞的单细胞蛋白质组学特征。并整合单细胞分选和高灵敏蛋白质组检测技术,建立适用于人原代CD8⁺ T细胞的单细胞蛋白质组学分析方法,旨在为免疫机制研究和疾病治疗提供技术支撑。

1 实验部分

1.1 主要仪器与装置

timsTOF Ultra 2 捕集离子淌度质谱仪、nanoElute2 液相分离系统:德国Bruker公司产品;

CellenONE 单细胞分选平台: 法国 Cellenion 公司产品; 低温高速离心机: 美国 Thermo Fisher Scientific 公司产品; 细胞计数仪: 中国瑞沃德公司产品。

1.2 主要材料与试剂

磷酸盐缓冲液(PBS): 中国 Servicebio 公司产品; Ficoll、EasySepTM Human CD8⁺ T cell Isolation Kit 试剂盒: 加拿大 STEMCELL Technologies 公司产品; Human CD3/CD28.2: 美国 Biolegend 公司产品; Kongsfi 肝素钠抗凝管: 中国菏泽京宁辉安生物科技有限公司产品; 红细胞裂解液: 德国美天旎公司产品; RPMI 1640 粉末、青链霉素混合溶液: 美国 Gibco 公司产品; 胎牛血清(FBS): 中国依科赛公司产品; Recombinant Human IL-2: 美国 PeproTech 公司产品; 甲酸(FA, 质谱级)、三乙基碳酸氢铵(TEAB): 美国 Thermo Fisher Scientific 公司产品; 乙腈、水: 均为质谱级, 德国 Merck 公司产品; 月桂酰基麦芽糖苷(DDM): 中国阿拉丁公司产品; Sequence 级胰蛋白酶(Trypsin): 中国北京生夏蛋白技术公司产品。

1.3 实验条件

1.3.1 人原代 CD8⁺ T 细胞的提取 抽取健康志愿者外周血至肝素钠抗凝管, 将全血转移至 50 mL 离心管后, 用等体积 PBS 稀释。加入 1.5 倍体积 Ficoll, 以 800 r/min 离心 20 min, 弃去上清后将细胞层转移至 15 mL 离心管。加满 PBS 进行洗涤, 以 1 500 r/min 离心 10 min 后弃去上清液。再加入 1 mL 红细胞裂解液, 4 °C 静置 5 min 裂解红细胞, 随后用 PBS 洗涤 2 次。弃去上清液后用 1 mL PBS 重悬细胞, 依据说明书按细胞量加入 Cocktail 抗体, 室温旋转孵育 5 min。然后加入适量磁珠振荡 30 s, 混匀, 使用磁力架磁吸 2~3 次。用 1 mL 含 Human CD28.2 及 IL-2 的 10%FBS 1640 培养基将分选后的细胞重悬并计数, 最后以 1×10⁶ 个细胞/mL 密度接种于预包被 Human CD3 的 6 孔板中培养。

1.3.2 单细胞蛋白组样品的制备 将新鲜细胞用无菌 PBS 缓冲液重悬, 调节细胞浓度至 (2~3)×10⁵ 个细胞/mL。在 384 孔板各孔中预先加入 1 μL Master Mix(超纯水中含 0.2%DDM、20 mg/L 胰蛋白酶、100 mmol/L TEAB 的单细胞裂解酶解液), 随后使用 CellenONE 分选流程进行单细胞分选。分选完成后, 用封口膜密封孔板, 将 CellenONE 冷水机温度设为 50 °C, 加湿器湿度调

至 70%; 将孔板置于 50 °C 环境中孵育 1.5 h 进行酶解。酶解结束后, 向每孔补加 2.5 μL 0.1% 甲酸水溶液(A 相溶液)。

1.3.3 数据采集方法 采用 nanoElute2 超高效液相色谱仪与 timsTOF Ultra 2 质谱仪(配备 CaptiveSpray 离子源)联用分析。单细胞样品在 15 cm 自填充色谱柱(内径 50 μm, 1.6 μm C18 填料)上分离, 柱温 50 °C; 流动相: A 相为 0.1% 甲酸水溶液, B 相为 0.1% 甲酸乙腈溶液; 洗脱梯度: 0~10 min(4%~28%B), 10~13 min(28%~35%B), 13~14 min(35%~80%B), 14~21 min(80%B); 流速 150 nL/min。

质谱仪采用 Compass Hystar 软件, 以正离子模式运行数据非依赖采集的平行累积连续碎裂(DIA-PASEF)模式。质量扫描范围 m/z 300~1 500; $1/K_0$ (离子淌度的倒数)起始 0.64 Vs/cm²、终止 1.45 Vs/cm², 斜坡时间 120 ms, 锁定循环比 100%; 毛细管电压 1 600 V, 干燥气流量 3.0 L/min, 干燥温度 200 °C。二级质谱参数: 循环时间 1.13 s, 在 m/z 395~996 范围内设 25 个 25 Th 隔离窗口, 碰撞能量随离子迁移率线性变化($1/K_0=1.6$ Vs/cm² 时为 59 eV, $1/K_0=0.6$ Vs/cm² 时为 20 eV)。

1.3.4 数据分析 所有数据均采用 Spectronaut v18(Biognosys)软件的 directDIA+方法结合 Uniprot 2025 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%, 数据分析时删除角质蛋白(keratin)等污染蛋白^[15]。蛋白质的乙酰化、甲基化、磷酸化和甲硫氨酸氧化(M)被设定为可变修饰, 半胱氨酸氨甲酰化被设定为固定修饰。

亚细胞蛋白数据信息来源于 Uniprot 网站(Universal Protein, <https://www.uniprot.org>)。将蛋白编号序列导入网站, 批量获取所有蛋白的亚细胞定位信息, 然后筛选为“Nucleus、Cytoplasm、Mitochondrion、Cell membrane”这 4 个类别。

2 结果与讨论

2.1 单细胞蛋白质组学工作流程

相较于 HeLa 等易培养细胞系, 人原代 CD8⁺ T 细胞体积更小(直径~10 μm^[16])且蛋白含量低(约 47.35 pg/细胞^[17]), 这给蛋白质组学分析技术提出了更高要求, 详情列于表 1。为实现温和高

表1 本研究方法与现有单细胞蛋白质组学技术的性能对比

方法 Method	细胞类型 Cell type	细胞分离分选方法/质谱仪 Cell isolation/MS instrument	单细胞蛋白鉴定量 Protein identifications per cell/种	单细胞直径 Cell diameter/ μm	单个细胞蛋白含量 Protein content per cell/pg
PiSPA	HeLa 细胞	液滴微流控技术/timsTOF Pro	~3000	~20 ^[18]	250 ^[19]
SC-pSILAC	HeLa 细胞	CellenONE/Orbitrap Astral	~4000	~20 ^[18]	250 ^[19]
Chip-Tip	HeLa 细胞	CellenONE/Orbitrap Astral	~5000	~20 ^[18]	250 ^[19]
本研究方法	人原代 CD8 ⁺ T 细胞	CellenONE/timsTOF Ultra 2	~2500	~10 ^[16]	47.35 ^[17]

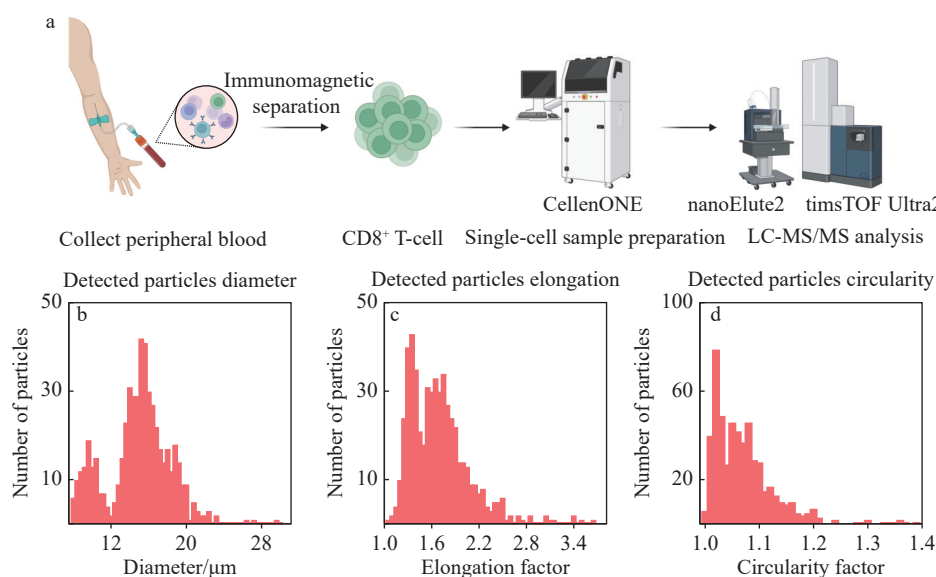
效的单细胞处理,本研究采用 CellenONE 全自动单细胞分选平台,其采用压电液滴生成技术,避免机械接触导致的细胞损伤,几乎对各类细胞(如肿瘤细胞、免疫细胞、神经细胞)实现“零损伤”;且液流速度远低于传统流式分选,显著降低剪切力影响;仪器配备荧光和明场双光路成像系统,结合 AI 算法精准筛选细胞直径、圆度等参数。此外,该平台支持纳升级反应体系,有效降低样本需求与试剂用量,适用于低丰度、高灵敏的单细胞样品前处理流程^[20]。timsTOF Ultra 2 质谱仪采用捕集离子淌度(TIMS)技术,具有超高的离子传输效率与灵敏度,仅需 25 pg 蛋白即可检测出超千种蛋白质,为外周血单个核细胞(PBMC)、免疫细胞、细菌细胞或亚细胞器的蛋白质组学开辟了新的细胞和疾病生物学研究范式^[21]。

本研究建立了单细胞蛋白质组学分析流程,示于图 1a,并将其应用于人原代 CD8⁺ T 细胞的

蛋白质组学功能分析。首先利用 anti CD8⁺ T 磁珠从人血液样本中分选出人原代 CD8⁺ T 细胞群,经培养后,通过 CellenONE 全自动单细胞分选仪完成温和、高效的单细胞分选与样本前处理,最后利用 timsTOF Ultra 2 质谱仪进行信息采集。分选前,先统计 100 个目标细胞的粒径、伸长率和圆度,将符合正态分布的参数区间设置为人原代 CD8⁺ T 细胞的分选标准^[22]。粒径分布参数为 13~17 μm ,伸长率分布参数为 1.3~2,圆度参数为 1~1.1,示于图 1b~1d。

2.2 单细胞蛋白质组学鉴定人原代 CD8⁺ T 细胞的蛋白特征

对 10 个人原代 CD8⁺ T 细胞的分析结果表明,单细胞检测的蛋白质数量和肽段数量存在一定异质性。在 10 个单细胞中,CD8⁺ T cell-5 检测到的蛋白质和肽段数量最多(3 078 种蛋白质,20 489 条肽段),CD8⁺ T cell-8 最少(2 189 种蛋白



注: a. 工作流程; b. 粒径; c. 伸长率; d. 圆度

图1 单细胞蛋白质组学分析工作流程及人原代 CD8⁺ T 细胞分选参数

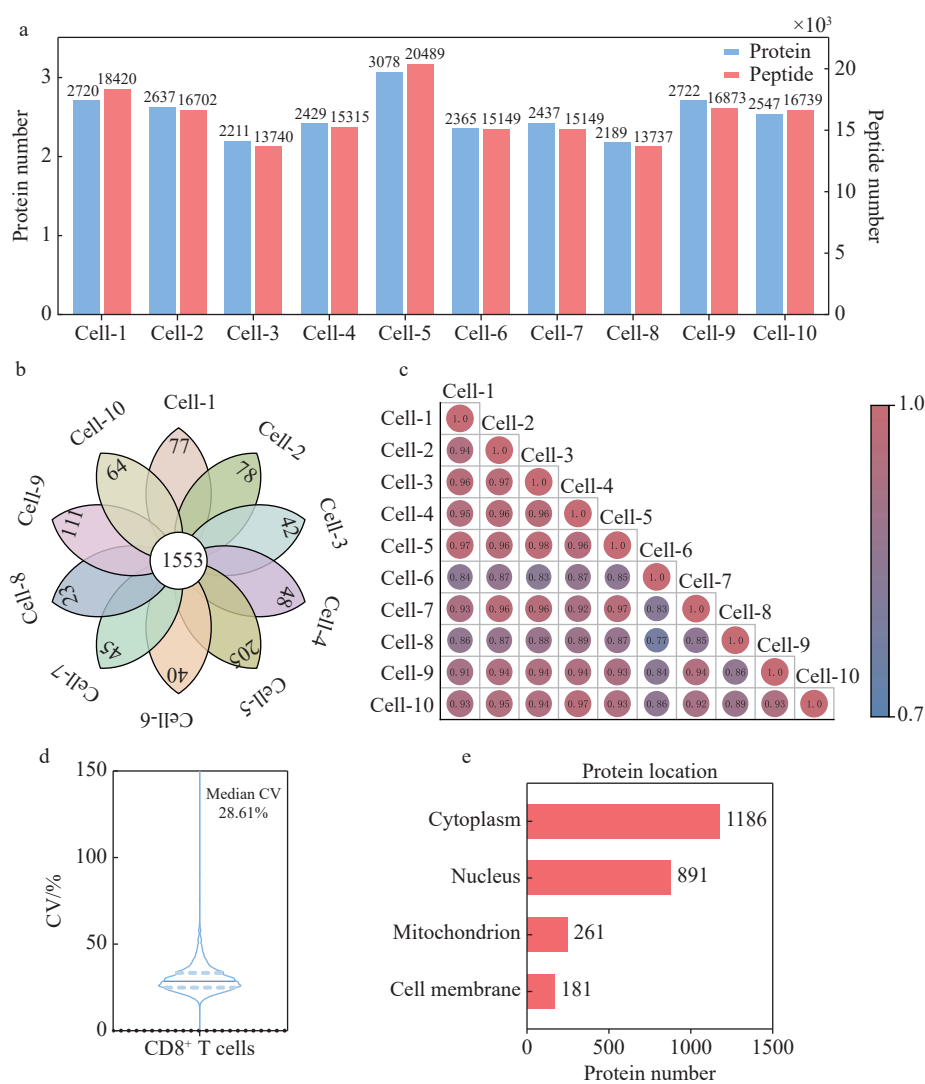
Fig. 1 Workflow of single-cell proteomics analysis and sorting parameters of human primary CD8⁺ T cells

质, 13 737 条肽段), 平均可检测到 2 500 余种蛋白质和 16 000 余种肽段, 示于图 2a。在 10 个细胞中共鉴定到 3 956 种蛋白质, 其中 1 553 种为共同表达, 示于图 2b。相关性分析显示, 单细胞间蛋白质丰度具有较高相关性($R > 0.77$, 中位变异系数(CV)值 28.61%), 示于图 2c、2d。对 10 个细胞整体鉴定到的蛋白质亚细胞定位分析表明, 有 1 186、891、261、181 个蛋白质分别定位于细胞质、细胞核、线粒体和膜蛋白, 示于图 2e。上述结果成功实现了单个人原代 CD8⁺ T 细胞的深度蛋白质组覆盖, 证明所建立的方法可在单细胞水平系统解析复杂免疫细胞的蛋白质组构成。相较于传统群体细胞分析, 单细胞水平的蛋白质

组学研究突破了“平均化”瓶颈, 能够直接揭示免疫细胞内部真实的蛋白质丰度、空间定位及其功能状态, 为解析人原代 CD8⁺ T 细胞中的蛋白质分布和功能提供了丰富信息。

2.3 单细胞蛋白质组学解析人原代 CD8⁺ T 细胞蛋白质的功能特征

蛋白质是维持细胞基本生命活动的主要承担者, 与疾病的发生发展密切相关。在单细胞分辨率下解析蛋白质谱, 能够突破群体细胞分析中功能信息被平均化的局限, 揭示蛋白质在基本生命活动、核心功能执行及特定调控路径中的潜在分工。为深入解读人原代 CD8⁺ T 细胞蛋白质组的蛋白质功能和生物学意义, 本研究综合



注: a. 10 个 CD8⁺ T 细胞分别鉴定到的蛋白质数量和肽段数量; b. 10 个 CD8⁺ T 细胞鉴定到的蛋白质重叠情况; c. 重现性比较线性拟合; d. 蛋白质表达量的 CV 值; e. 蛋白质的亚细胞定位情况

图 2 单细胞蛋白质组学描绘人原代 CD8⁺ T 细胞的蛋白质特征

Fig. 2 Single-cell proteomics profiles the protein characteristics of human primary CD8⁺ T cells

10个单细胞的蛋白质组学数据进行GO(gene ontology analysis)分析与KEGG(kyoto encyclopedia of genes and genomes analysis)分析。GO分析表明,其显著富集于剪接体介导的mRNA剪接、细胞质翻译等生物学过程,示于图3a;KEGG分析表明,其富集于肌萎缩侧索硬化症、帕金森症相关通路,示于图3b。以上研究表明,单细胞蛋白质组学能够深入揭示免疫细胞的功能分工与分子特征,为理解蛋白质在免疫调控中的复杂作用提供了高分辨率的视角。

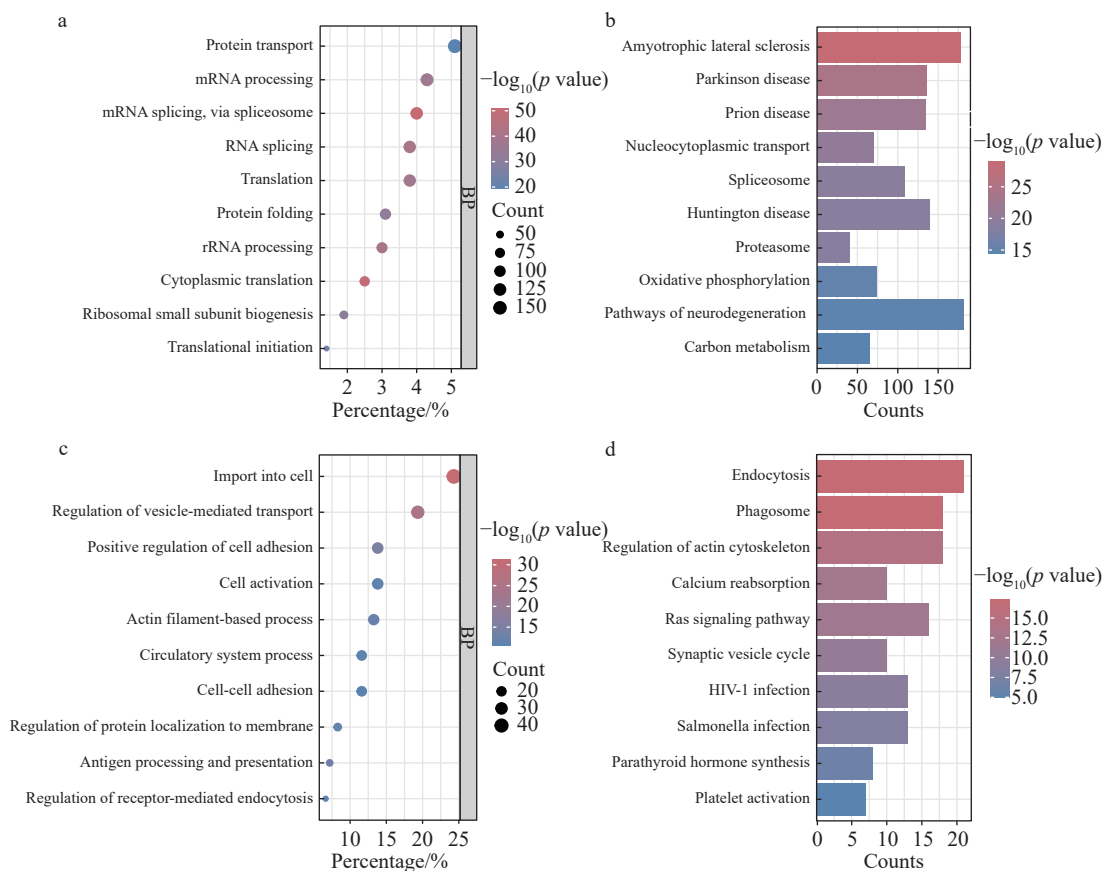
膜蛋白是T细胞免疫应答的关键介质^[23],对图2e中检测到的细胞膜蛋白进行GO分析,表明其显著富集于细胞内导入、囊泡介导的运输调控和细胞黏附的正向调控等生物学过程,提示细胞通讯的关键作用,示于图3c。同时,KEGG分析表明,膜蛋白富集于内吞作用、吞噬体等物质转运通路,且与抗原加工呈递通路和免疫激活相关,示于图3d。上述结果表明,单细胞膜蛋白

组学可揭示T细胞亚群膜蛋白特征,为精准免疫干预提供依据。

2.4 单细胞蛋白质组学描绘人原代CD8⁺T细胞蛋白质组的翻译后修饰谱

翻译后修饰是细胞内蛋白质功能调控的重要机制,涉及多种类型的化学修饰。这些修饰参与调控蛋白质的稳定性、活性、亚细胞定位及与其他分子的相互作用^[24],不仅在细胞信号传导、代谢调控等生理过程中发挥作用,也在疾病的发生发展中扮演关键角色^[25];并且翻译后修饰谱是转录组等其他组学技术难以实现的。因此,单细胞蛋白质组学在揭示关键修饰位点、解析免疫细胞功能调控机制中具有不可替代的应用价值^[26]。

综合10个单细胞的PTM数据,单个人原代CD8⁺T细胞蛋白质组中平均可鉴定到32种磷酸化修饰蛋白、64种甲基化修饰蛋白及356种乙酰化蛋白,示于图4a。通过对10个细胞综合鉴



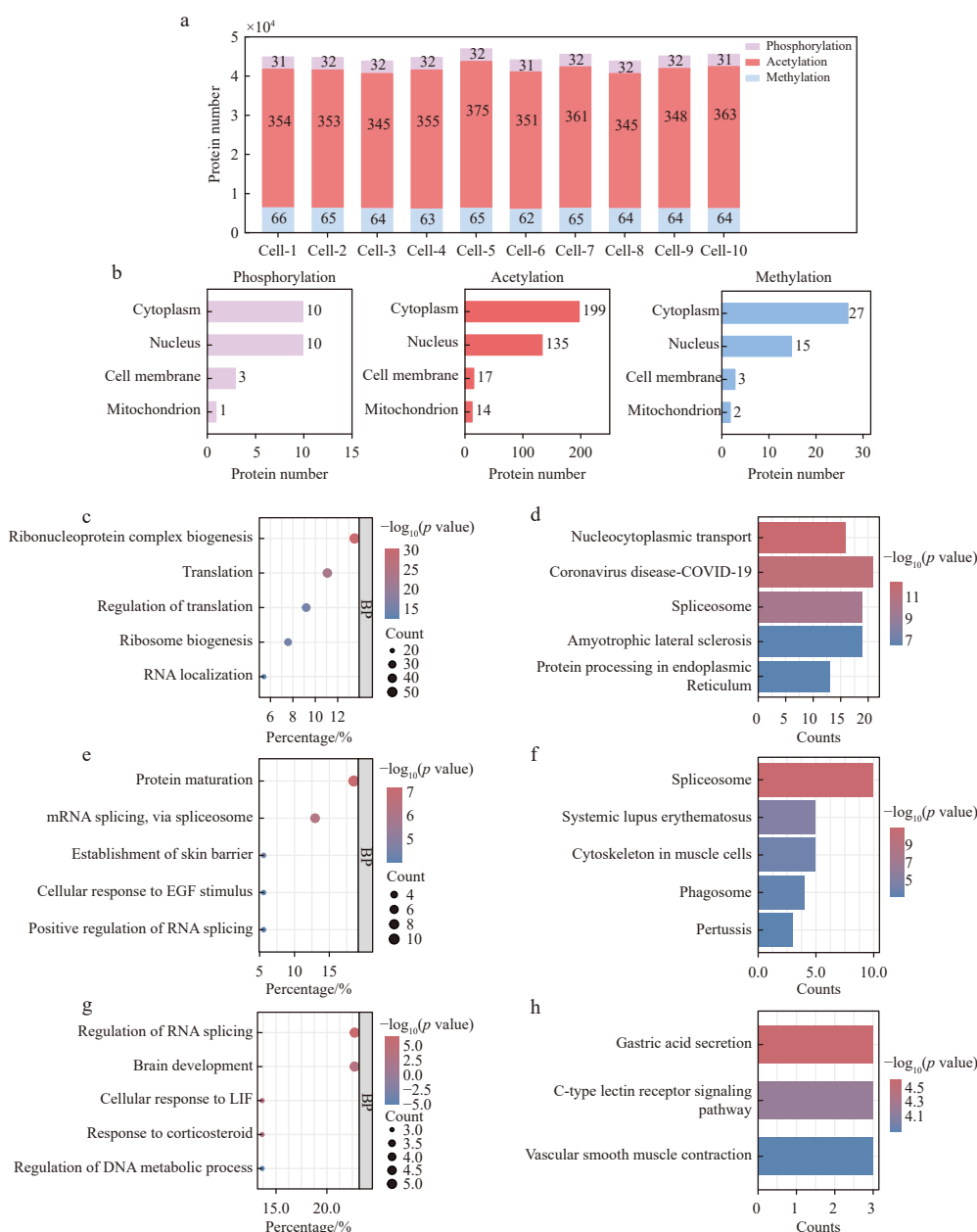
注: a. 全蛋白的GO分析; b. 全蛋白的KEGG分析; c. 细胞膜蛋白的GO分析; d. 细胞膜蛋白的KEGG分析

图3 全蛋白和细胞膜蛋白的功能富集分析

Fig. 3 Functional enrichment analysis of global proteins and cell membrane proteins

定到的上述 3 种翻译后修饰蛋白进行亚细胞定位分析,发现大部分主要分布在细胞质和细胞核,少部分分布在线粒体和细胞膜,示于图 4b。随后对 10 个细胞综合鉴定到的 3 种翻译后修饰蛋白进行 GO 分析,发现乙酰化修饰蛋白显著富集于核糖核蛋白复合物生物发生、翻译等生物学过程,示于图 4c; KEGG 通路富集分析表明,乙酰化修饰蛋白主要富集在核质转运、冠状病毒

病、剪接体等相关通路,示于图 4d。甲基化修饰蛋白显著富集于蛋白质成熟、mRNA 剪接等生物学过程,示于图 4e; 甲基化修饰蛋白主要富集在剪接体、系统性红斑狼疮等相关通路,示于图 4f。磷酸化修饰蛋白显著富集于 RNA 剪接调控、脑发育等生物学过程,示于图 4g; 磷酸化修饰蛋白主要富集在胃酸分泌、C 型凝集素受体信号通路和血管平滑肌收缩相关通路,示于图 4h。



注: a. 10 个 CD8⁺ T 细胞分别鉴定到的乙酰化、甲基化、磷酸化蛋白质数量; b. 3 种翻译后修饰蛋白质的亚细胞定位情况; c. 乙酰化修饰蛋白的 GO 分析; d. 乙酰化修饰蛋白的 KEGG 分析; e. 甲基化修饰蛋白的 GO 分析; f. 甲基化修饰蛋白的 KEGG 分析; g. 磷酸化修饰蛋白的 GO 分析; h. 磷酸化修饰蛋白的 KEGG 分析

图 4 人原代 CD8⁺ T 细胞蛋白质组的翻译后修饰特征

Fig. 4 PTM profiles of the proteome in human primary CD8⁺ T cells

3 结论

本研究基于 CellenONE 全自动单细胞分选平台与 timsTOF Ultra 2 捕集离子淌度质谱仪的联用技术,建立了高灵敏度的单细胞蛋白质组学分析方法。该方法在蛋白质含量极低(~ 47.35 pg)的单个人原代 CD8⁺ T 细胞中实现了 2 500 多种蛋白质的系统性鉴定,具有高稳定性与可靠性。对磷酸化、甲基化和乙酰化 3 种翻译后修饰的分析显示,乙酰化修饰蛋白占比显著高于其他修饰类型,且其亚细胞定位特征与全蛋白质组分布一致——多数分布于细胞质和细胞核,少数分布于线粒体和细胞膜。通过 GO/KEGG 功能富集分析发现,全蛋白、膜蛋白与翻译后修饰蛋白均主要富集于核糖体相关通路及免疫相关通路,提示人原代 CD8⁺ T 细胞在免疫应答过程中存在活跃的蛋白质合成与功能调控网络。综上,本研究揭示了人原代 CD8⁺ T 细胞蛋白质组及翻译后修饰谱,为解析免疫应答中细胞功能的动态调控机制提供了研究路径和谱学数据。

致谢: 感谢布鲁克(北京)科技有限公司上海分公司提供的 timsTOF Ultra 2 捕集离子淌度质谱仪及相关技术支持;感谢上海埃飞电子科技有限公司提供的 CellenONE 全自动单细胞分选仪。

参考文献:

- [1] SLAVOV N. Unpicking the proteome in single cells[J]. *Science*, 2020, 367(6 477): 512-513.
- [2] SLAVOV N. Single-cell protein analysis by mass spectrometry[J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2021, 60: 1-9.
- [3] 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): 1 279.
- [4] SABATIER P, LECHNER M, GUZMÁN U H, BEUSCH C M, ZENG X, WANG L, IZAGUIRRE F, SETH A, GRITSENKO O, RODIN S, GRINNEMO K H, YE Z, OLSEN J V. Global analysis of protein turnover dynamics in single cells[J]. *Cell*, 2025, 188(9): 2 433-2 450.
- [5] YE Z, SABATIER P, van der HOEVEN L, LECHNER M 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, GRINNEMO 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.
- [6] LIU D, SUN M, ZHANG J, HU R, FU W, XUANYUAN T, LIU W. Single-cell droplet microfluidics for biomedical applications[J]. *Analyst*, 2022, 147(11): 2 294-2 316.
- [7] ESHGHI A, XIE X, HARDIE D, CHEN M X, IZAGUIRRE F, NEWMAN R, ZHU Y, KELLY R T, GOODLETT D R. Sample preparation methods for targeted single-cell proteomics[J]. *Journal of Proteome Research*, 2023, 22(6): 1 589-1 602.
- [8] 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.
- [9] LEDUC A, GRAY HUFFMAN R, CANTLON J, KHAN S, SLAVOV N. Exploring functional protein covariation across single cells using nPOP[J]. *Genome Biology*, 2022, 23(1): 261.
- [10] LIN H L, WEBBER K G I, NWOSU A J, KELLY R T. Review and practical guide for getting started with single-cell proteomics[J]. *Proteomics*, 2025, 25(1/2): e202400021.
- [11] 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.
- [12] SALERNO F, TURNER M, WOLKERS M C. Dynamic post-transcriptional events governing CD8⁺ T cell homeostasis and effector function[J]. *Trends in Immunology*, 2020, 41(3): 240-254.
- [13] TANG Y, CHEN Z, ZUO Q, KANG Y. Regulation of CD8⁺ T cells by lipid metabolism in cancer progression[J]. *Cellular & Molecular Immunology*, 2024, 21(11): 1 215-1 230.
- [14] McLANE L M, ABDEL-HAKEEM M S, JOHN WHERRY E. CD8⁺ T cell exhaustion during chronic viral infection and cancer[J]. *Annual Review of Immunology*, 2019, 37: 457-495.

- [15] GELADAKI A, KOČEVAR BRITOVŠEK N, BRECKELS L M, SMITH T S, VENNARD O L, MULVEY C M, CROOK O M, GATTO L, LILLEY K S. Combining LOPIT with differential ultracentrifugation for high-resolution spatial proteomics[J]. *Nature Communications*, 2019, 10(1): 331.
- [16] NAWAZ A A, URBANSKA M, HERBIG M, NÖTZEL M, KRÄTER M, ROSENDAHL P, HEROLD C, TOEPFNER N, KUBÁNKOVÁ M, GOSWAMI R, ABUHATTUM S, REICHEL F, MÜLLER P, TAUBENBERGER A, GIRARDO S, JACOBI A, GUCK J. Intelligent image-based deformation-assisted cell sorting with molecular specificity[J]. *Nature Methods*, 2020, 17(6): 595-599.
- [17] NICOLET B P, WOLKERS M C. The relationship of mRNA with protein expression in CD8⁺ T cells associates with gene class and gene characteristics[J]. *PLoS One*, 2022, 17(10): e0276294.
- [18] CTORTECKA C, HARTLMAYR D, SETH A, MENDJAN S, TOURNIAIRE G, UDESHI N D, CARR S A, MECHTLER K. An automated nanowell-array workflow for quantitative multiplexed single-cell proteomics sample preparation at high sensitivity[J]. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2023, 22(12): 100 665.
- [19] ROSENBERGER F A, THIELERT M, MANN M. Making single-cell proteomics biologically relevant[J]. *Nature Methods*, 2023, 20(3): 320-323.
- [20] SANCHEZ-AVILA X, de OLIVEIRA R M, HUANG S, WANG C, KELLY R T. Trends in mass spectrometry-based single-cell proteomics[J]. *Analytical Chemistry*, 2025, 97(11): 5 893-5 907.
- [21] LI S, LI S, LIU S, REN Y. Mass spectrometry-based solutions for single-cell proteomics[J]. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*, 2025, 23(1): qzaf012.
- [22] VALLONE V F, TELUGU N S, FISCHER I, MILLER D, SCHOMMER S, DIECKE S, STACHELSCHIED H. Methods for automated single cell isolation and subcloning of human pluripotent stem cells[J]. *Current Protocols in Stem Cell Biology*, 2020, 55(1): e123.
- [23] SMITH-GARVIN J E, KORETZKY G A, JORDAN M S. T cell activation[J]. *Annual Review of Immunology*, 2009, 27: 591-619.
- [24] LEE J M, HAMMARÉN H M, SAVITSKI M M, BAEK S H. Control of protein stability by post-translational modifications[J]. *Nature Communications*, 2023, 14(1): 201.
- [25] MIAO C, HUANG Y, ZHANG C, WANG X, WANG B, ZHOU X, SONG Y, WU P, CHEN Z, FENG Y. Post-translational modifications in drug resistance[J]. *Drug Resistance Updates*, 2025, 78: 101 173.
- [26] GUO T, STEEN J A, MANN M. Mass-spectrometry-based proteomics: from single cells to clinical applications[J]. *Nature*, 2025, 638(8 052): 901-911.

(收稿日期: 2025-06-15; 修回日期: 2025-08-28)