

# 基于 MALDI-MS 和 UHPLC-MS/MS 的 微量活细胞系蛋白质快速分析

闫凌

(宁波东方理工大学(暂名), 浙江宁波 315100)

**摘要:** 本研究结合基质辅助激光解吸电离质谱(MALDI-MS)和超高效液相色谱-串联质谱(UHPLC-MS/MS)技术,系统地探索了功能化微型酶反应器在微量活细胞系蛋白质组快速分析中的应用,并对其分析效能进行全面评估。通过将功能化酶纳反应器封装于枪头内,结合盐酸胍和双酶系统(胰酶与 DNase I),实现了细胞裂解、蛋白质提取和酶解的一体化操作,显著提高了蛋白质提取和酶解效率。结果表明,该方法在处理微量细胞样品( $1 \times 10^4$  个细胞)时,蛋白质提取效率显著优于传统的过滤器辅助样品前处理(FASP)流程。活细胞样品在酶纳反应器中的反应时间仅需 6 min,整个分析流程不超过 1 h,展示了功能化酶纳反应器在高通量在线前处理方面的巨大潜力。本研究不仅为微量活细胞系蛋白质组的快速高通量分析提供了技术平台,还通过 MALDI-MS 与 UHPLC-MS/MS 整合策略实现了微量蛋白质组学前处理方法的全面评估与应用。

**关键词:** 基质辅助激光解吸电离质谱(MALDI-MS);超高效液相色谱-串联质谱(UHPLC-MS/MS);功能化微型酶反应器;蛋白质组学;微量活细胞;前处理

中图分类号: O657.63

文献标志码: A

文章编号: 1004-2997(2025)02-0133-07

DOI: 10.7538/zpxb.2025.0013

CSTR: 32365.14.zpxb.2025.0013

## Rapid Analysis of Trace Amount of Proteins in Live Cells Using MALDI-MS and UHPLC-MS/MS

YAN Ling

(Ningbo Eastern Institute of Technology, Ningbo 315100, China)

**Abstract:** Proteomic analysis has become a cornerstone of modern biomedical research, providing critical insights into physiological and pathological processes within biological systems, particularly in molecular diagnostics. The construction of proteomic profiles of cancer cells holds significant importance for understanding disease mechanisms, diagnosis, and treatment. Due to cellular heterogeneity, the study of small-scale and single-cell samples has emerged as a persistent focus in proteomics, while the application of proteomics in biomedicine faces several challenges, including the scarcity of samples, low efficiency of sample preparation, lengthy workflows, low throughput, and significant sample loss. However, significant advancements have been made in proteomic research technologies recently. Firstly, instrument manufacturers have introduced innovative techniques and instruments with enhanced sensitivity, providing scientists with advanced tools that have greatly facilitated the feasibility of proteomic analysis for small-scale and single-cell samples. Secondly, the development of rapid and integrated platforms has helped to shorten workflows and increase throughput. Among all the studies, micro- and nanoscale techniques have the potential to overcome

the challenges mentioned above. In this study, the matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry (MALDI-MS) and ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS) were combined to explore the application of functionalized micro-enzyme reactors in the rapid analysis of trace amount of live cell line proteomes, and a comprehensive evaluation of their analytical performance was provided. Efficient cell lysis and protein extraction are achieved by encapsulating the functionalized enzymatic micro-reactors in pipette tips and combining guanidine hydrochloride with a dual-enzyme system (trypsin and DNase I). The experimental results demonstrated that this method enables efficient online cell lysis, protein extraction, and digestion for trace cell samples. Notably, when processing  $1 \times 10^4$  cells, the protein extraction efficiency is significantly superior to that of the traditional filter-aided sample preparation (FASP) method. Moreover, the reaction time for live cell samples in the enzymatic micro-reactor is only 6 min, and the entire analysis process is completed in less than 1 h, highlighting the potential of this functionalized micro-enzymatic reactor system for high-throughput online sample preparation. This study provides a new technological platform for the rapid high-throughput proteomic analysis of trace live cell lines. Integrating MALDI-MS and UHPLC-MS/MS enables a comprehensive evaluation and application of proteomics sample preparation method.

**Key words:** matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry (MALDI-MS); ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS); functionalized micro-enzymatic reactor; proteomic; small-scale live cells; preparation

蛋白质组学分析为现代生物医学研究提供了重要信息,尤其在分子诊断、疾病机理研究和治疗策略开发中具有关键作用<sup>[1-5]</sup>。癌细胞蛋白质组图谱的构建不仅有助于揭示癌症的发病机制,还为生物标志物的发现提供了重要依据<sup>[1,3,5]</sup>。近年来,由于细胞异质性等因素,微量细胞及单细胞样本的研究成为蛋白质组学领域的热点<sup>[3,6-7]</sup>。然而,蛋白质组学在生物医学中的应用面临诸多挑战,如样品稀少、前处理效率低、流程繁琐、通量不足及样品损失较大等问题。

近年来,蛋白质组学技术在多个方面取得了显著进展。首先,通过提高灵敏度,仪器厂商推出了创新型技术和设备,极大地推动了微量细胞样品及单细胞蛋白质组学分析的可行性。其次,快速整合平台的建立有效地缩短了工作流程并提高了分析通量。如,Chen等<sup>[8]</sup>开发了100个活细胞(LOD=200 zmol)整合酶解、富集及液相色谱-质谱(LC-MS)分析平台,通过色谱柱上的六通阀调控液体流动实现高效分析。Ye等<sup>[9]</sup>提出了One-Tip工作流程,通过与细胞分选装置Uno Single Cell Dispenser™结合,实现微量细胞样品的高效前处理,并成功应用于单个胚胎细胞的蛋白质组学分析。Gebreyesus等<sup>[10]</sup>开发了iProChip

平台,可用于1~100个细胞样品的蛋白质组学前处理,该实验流程中的蛋白质酶解时间为16 h。Wang等<sup>[11]</sup>提出了PiSPA工作流程,基于纳升级微流控液体处理机器人实现单细胞的捕获、预处理与注射,并结合探针式微流控液体处理机器人、商用液相色谱仪与捕获离子迁移谱(trapped ion mobility spectrometry, TIMS)-四极杆飞行时间质谱(quadrupole time of flight mass spectrometer, QTOF),成功定量分析了单个哺乳动物细胞中的多达3 000种蛋白质。综上,微纳米尺度技术的研究为实现上述目标提供了重要支撑。

尽管现有方法已将酶解时间从传统的12~18 h缩短至2 h<sup>[11]</sup>,但酶解仍然是限制高通量分析的关键瓶颈。为此,本课题组开发了基于纳反应器材料封装的枪头,并成功应用于蛋白质酶解及癌细胞蛋白质组分析<sup>[12]</sup>。在此基础上,本文进一步引入双酶系统,即将活细胞样品直接加载至功能化微型酶反应器(trypsin-MOSF-loaded tip)中,并在酶解溶液(碳酸氢铵)中加入盐酸胍实现细胞裂解,释放的蛋白质在反应器内迅速酶解为肽段,以提高酶解效率和整体分析性能。

液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)作为蛋白质组学分析的核心技术,已广泛应用于蛋白质鉴

定和定量分析,但在微量样品分析中的灵敏度和通量还存在一定限制。相比之下,基质辅助激光解吸电离质谱(MALDI-MS)以高灵敏度、快速分析和低样品消耗等特点,在微量样品分析中展现出巨大潜力,然而,其在蛋白质组学中的应用尚未得到充分挖掘。本研究将结合超高效液相色谱-串联质谱(UHPLC-MS/MS)与MALDI-MS技术的优势,探索其在微量活细胞系蛋白质组分析中的应用,为蛋白质组学研究提供技术平台。

## 1 实验部分

### 1.1 主要仪器与装置

Applied Biosystem 5800 蛋白质组分析器:美国 Applied Biosystem 公司产品;线性离子阱-轨道离子阱(LTQ-Orbitrap)质谱仪:美国 Thermo Fisher 公司产品,配有电喷雾离子源(ESI)及 Xcalibur1.2 数据处理系统;nanoACQUITY 液相色谱系统:美国 Waters 公司产品;TS-2A/L0107-2A 注射泵:保定兰格恒流泵有限公司产品;2000c NanoDrop UV 光谱仪:上海赛默飞世尔科技公司产品;Image Scanner III 图像扫描系统:瑞典通用电气公司产品。

### 1.2 主要材料与试剂

胰酶(trypsin,  $\geq 10\ 000$  BAEE units/mg 蛋白)、细胞色素 C(CYC,  $\geq 95\%$ )、 $\alpha$ -氰基-4-羟基肉桂酸(CHCA,  $\geq 98\%$ , 薄层层析法测定)、柠檬酸氢二铵( $\geq 99.0\%$ , 特纯)、三氟乙酸( $99\%$ , ReagentPlus<sup>®</sup>)、二硫苏糖醇(DTT,  $99.5\%$ , 分子生物级)、碘乙酰胺(IAA,  $\geq 99\%$ , NMR 级)、碳酸氢铵(ABC,  $\geq 99.5\%$ , 分子生物级): Sigma Aldrich (上海)贸易有限公司产品;脱氧核糖核酸酶 I (DNase I,  $70\ \text{U}/\mu\text{L}$ ): 宝生物工程(大连)有限公司产品;乙腈( $\geq 99.8\%$ , HPLC 级)、甲酸(FA,  $\geq 88.0\%$ , 分析纯): 上海国药集团化学试剂有限公司产品;去离子水( $18.4\ \text{M}\Omega\cdot\text{cm}$ ): 由美国 Millipore 公司生产的 Milli-Q 系统制备。

没有特别标明时,ABC 溶液均指  $25\ \text{mmol/L}$  碳酸氢铵水溶液( $\text{pH}\sim 7.8$ ),ABC-盐酸胍溶液均指裂解反应液( $25\ \text{mmol/L}$  ABC,  $200\ \text{mmol/L}$  盐酸胍)。

### 1.3 细胞样品的裂解和提取蛋白质的酶解

本实验使用 HepG2、293T 和 HeLa 细胞系。癌细胞经胰酶(美国 Gibco BRL 生物技术公司产

品)消化后,用磷酸盐缓冲液(PBS)(Hyclone, 美国赛默飞世尔科技有限公司产品)清洗并稀释至  $1\times 10^6$  个/mL,置于  $4\ ^\circ\text{C}$  保存,备用。使用裂解液( $8\ \text{mol/L}$  尿素、 $2\ \text{mol/L}$  硫脲,  $1\times$ 蛋白酶抑制剂混合液)在冰上裂解对照蛋白质样品  $30\ \text{min}$ ,随后超声处理,并加入核酸酶 I( $0.1\ \text{U}$ , E1014, Sigma Aldrich(上海)贸易有限公司产品)降解核酸,离心后收集上清液。样品经 DTT 还原( $56\ ^\circ\text{C}$ , 处理  $30\ \text{min}$ )和 IAA 烷基化( $37\ ^\circ\text{C}$ , 避光反应  $30\ \text{min}$ )处理后,溶解于 ABC 溶液或 ABC-盐酸胍溶液中。

通过负载胰酶的纳反应器材料枪头完成细胞裂解-蛋白酶解实验,其流程图示于图 1。用注射泵以  $6.67\ \mu\text{L}/\text{min}$  流速将反应缓冲液注入功能化微型反应器中,收集反应产物后真空干燥,凝胶电泳分析。样品经 C18 脱盐柱(Sep-Pak Vac C18, 美国 Waters 公司产品)处理后,平均分装为 3 管,冷冻干燥,分别用于 MALDI-MS、UHPLC-MS/MS 和  $280\ \text{nm}$  紫外吸收蛋白质定量法( $\text{UV}_{280}$ )分析。

通过负载 CYC 的纳反应器材料枪头(CYC-MOSF-loaded tip)完成蛋白质提取实验,其过程同细胞裂解-蛋白酶解实验,样品分别用于 MALDI-MS、二辛可宁酸(BCA)蛋白质定量法和  $\text{UV}_{280}$  分析。

### 1.4 MALDI-MS 分析条件

采用夹心法进行点靶操作:首先,将  $0.5\ \mu\text{L}$  CHCA 基质( $4\ \text{mg}$  CHCA 和  $0.4\ \text{mg}$  柠檬酸氢二铵溶解于  $1\ \text{mL}$  乙腈-水-三氟乙酸(ACN- $\text{H}_2\text{O}$ -TFA)溶液( $50:49.9:0.1, V/V/V$ )中)点涂于 MALDI 靶板上;然后,取  $1.5\ \mu\text{L}$  在 1.3 节分装的冻干样品点于基质上,待溶剂挥发后,再滴加  $0.5\ \mu\text{L}$  CHCA 基质。

MALDI-MS 实验在 Applied Biosystem 5800 蛋白质组分析器上进行,激光器工作波长  $355\ \text{nm}$ ,重复频率  $400\ \text{Hz}$ ,加速电压  $20\ \text{kV}$ ,质量扫描范围  $m/z\ 700\sim 4\ 000$ 。一级质谱条件:激光强度  $6\ 000$ ,数据采样单元大小(bin size) $0.5\ \text{ns}$ ,离子提取延迟时间(extraction delay time) $450\ \text{ns}$ ,每个子谱图采集  $20$  次,总采集次数  $1\ 000$ 。

### 1.5 UHPLC-MS/MS 分析条件

1.5.1 色谱条件 C18 色谱柱( $75\ \mu\text{m}\times 25\ \text{cm}, 1.7\ \mu\text{m}$ );流动相: A 相为  $0.1\%\ \text{FA}-\text{H}_2\text{O}$  溶液, B 相为  $0.1\%\ \text{FA}-\text{ACN}$  溶液;流速  $300\ \text{nL}/\text{min}$ ;梯度洗脱:在  $150\ \text{min}$

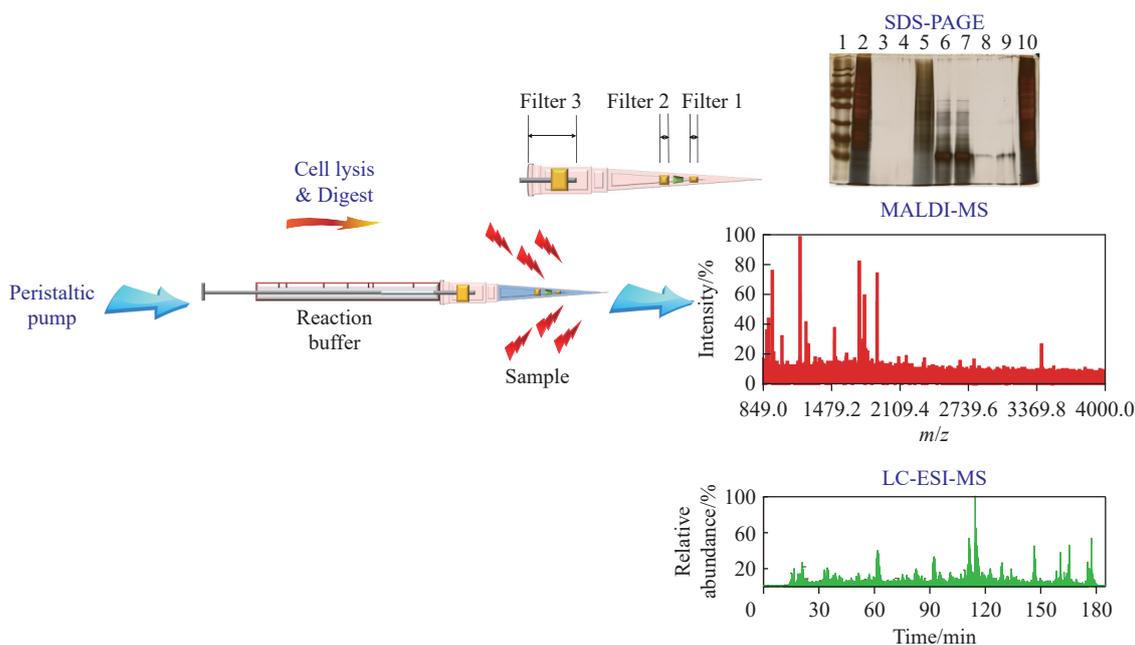


图1 MALDI-MS 和 UHPLC-MS/MS 快速分析微量活细胞系蛋白质的工作流程图  
Fig. 1 Workflow diagram for rapid analysis of proteins in trace amounts of live cell line using MALDI-MS and UHPLC-MS/MS

内, B 相由 3% 线性增加至 35%。

**1.5.2 质谱条件** 纳升级电喷雾电离源 (nano-ESI); 正离子模式, 电离电压 1 500 V, 离子入口管温度 200 °C; Orbitrap 轨道离子阱分辨率 60 000; 串联质谱设定动态排除时间 60 s, 数据独立采集 (data-independent acquisition, DIA) 模式下采集 Top10 母离子。

## 1.6 数据分析

MALDI-MS 数据通过 MASCOT 肽质量指纹 (PMF) 分析。分析参数设置如下: 使用 SwissProt 数据库, 选择 trypsin, 允许的可变修饰为氧化 (oxidation (M)), 最大漏切位点数为 1, 一级质量容差范围为  $\pm 0.5$  u, 质量值为单同位素 MH<sup>+</sup>, 肽段电荷数为 1+。

UHPLC-MS/MS 数据通过 pXtract 软件转换为 MGF 格式后, 使用 MASCOT 分析。分析参数设置如下: 使用 SwissProt 数据库, 选择 trypsin, 最大漏切位点数为 1, 物种设定为 Homo sapiens, 固定修饰为氨基甲酰甲基化 (carbamidomethyl (C)), 可变修饰为蛋白 N 端的乙酰化 (acetyl (protein N-term)) 和氧化, 一级质量容差范围为  $1 \times 10^{-5}$ , 二级质量容差范围为  $\pm 0.6$  u, 肽段电荷数为 2+, 3+, 4+, 质量值为单同位素 MH<sup>+</sup>, 数据格

式为 Mascot generic, 仪器类型为 ESI-TRAP, 反库 (Decoy) 启用, 蛋白质鉴定结果的假阳性率 (FDR) 卡值约为 1%。

## 2 结果与讨论

### 2.1 功能化微型酶反应器直接用于活细胞研究的 MALDI-MS 及十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分析

样品前处理的关键是确保反应条件的兼容性。本实验选择不加酶的细胞样品和来自相同数量细胞的全蛋白样品 (均为 100  $\mu$ L,  $1 \times 10^6$  个/mL 细胞溶液) 作为对照, 通过 MALDI-MS 和 SDS-PAGE 分析, 评估功能化微型酶反应器在细胞样品前处理中的效果。

MALDI-MS 分析结果表明, 从酶解后的蛋白样品和活细胞样品的质谱图中均能观察到丰富的肽段信号, 示于图 2b。采用 trypsin-MOSF-loaded 枪头处理后的细胞样品能够成功鉴定 Actin-like protein、Histone H2B 等高丰度蛋白, 详细信息列于附表 1、2 (请登录《质谱学报》网站 <https://zpxb.xml-journal.net> 下载, 下同)。SDS-PAGE 结果进一步验证了盐酸胍对蛋白酶解效果无显著影响, 示于图 2a, 2c。

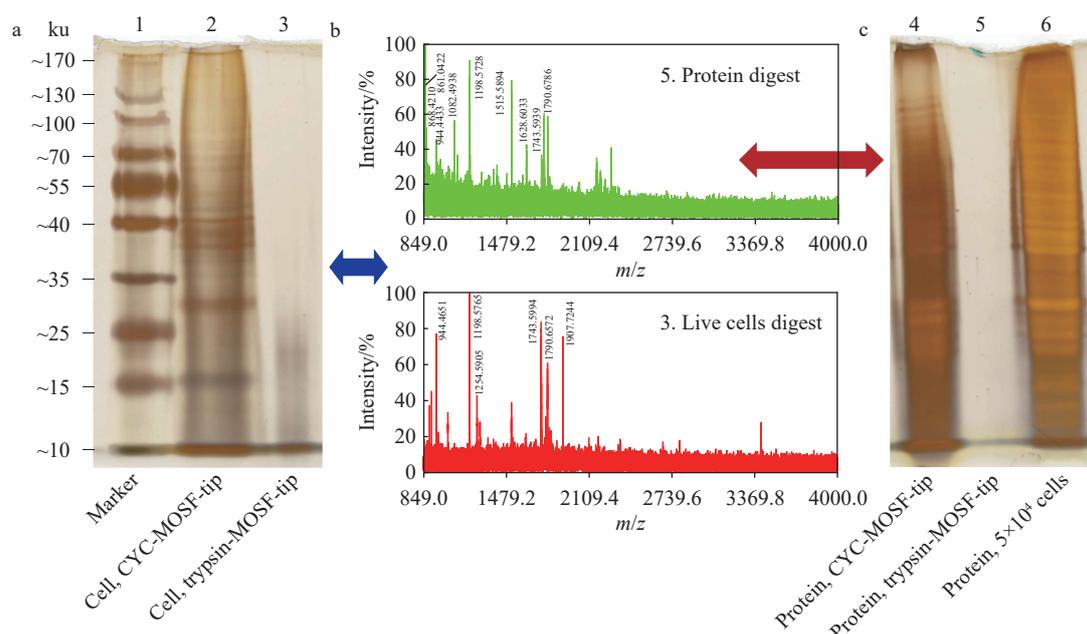


图2 功能化微型酶反应器在 $1 \times 10^5$ 细胞样品中的MALDI-MS(b)和SDS-PAGE(a, c)分析结果  
Fig. 2 MALDI-MS (b) and SDS-PAGE (a, c) results of trypsin-MOSF-loaded tip in the analysis of  $1 \times 10^5$  cell samples

在阳性对照实验中,使用CYC-MOSF-loaded枪头替代trypsin-MOSF-loaded枪头,尽管细胞被裂解并释放蛋白,但未发生酶解反应,因此,在4号孔中观察到大量不同大小的蛋白,示于图2c。在阴性对照实验中,未检测到任何质谱信号,示于附图1b,且在不添加盐酸胍的活细胞样品(7号孔)中未显示条带,示于附图1a。

传统的溶液内酶解反应受限于传质效率,反应速率较低;而功能化微型酶反应器通过将酶分子固定在纳米孔内,显著加速了酶解反应。MOSF材料约100 nm的孔径能够快速吸附小于10 nm的蛋白质分子,且吸附过程仅需1 min。通过在纳米孔内进一步富集蛋白,局部浓度提升约3个数量级,从而大幅提高了酶解过程的传质效率<sup>[12]</sup>。实验结果表明,微型酶反应器的反应时间仅需6 min,显著缩短了酶解时间。

## 2.2 功能化微型酶反应器直接用于活细胞样品整合前处理的效果评估

本研究使用HepG2和HeLa 2种细胞系,采用BCA绝对定量法和紫外可见光谱UV<sub>280</sub>相对定量法比较功能化微型酶反应器直接用于活癌细胞系分析与改进后的过滤器辅助样品前处理(FASP)方法的实验结果。实验分为2个阶段:首先,分别采用两种方法进行独立的蛋白质提取

实验;随后,将两种方法分别整合应用于细胞裂解、蛋白质提取、酶解及肽段产物回收的一体化实验流程中,以全面评估其性能差异。结果表明,FASP法得到的蛋白质产率为文献报道<sup>[13]</sup>的91.5%,结果接近,表明该方法具有较好的可靠性;基于功能化微型酶反应器的蛋白质提取效率为文献报道<sup>[13]</sup>的86.7%,在可接受的范围内;FASP法和功能化微型酶反应器法的酶解产率分别为80.0%、73.4%,整体回收率分别为73.2%、63.6%,验证了功能化微型酶反应器法在蛋白质组学分析中的可行性和可靠性,结果列于表1。

## 2.3 UHPLC-MS/MS辅助优化功能化微型酶反应器用于活细胞直接分析

### 2.3.1 DNase I-MOSF酶纳反应器材料对活细胞样品分析的影响

为确保功能化微型酶反应器在蛋白质提取中的良好效果,本文制备了同时包含胰酶和DNase I的双酶反应器。DNase I能够水解细胞样品中的核酸分子<sup>[14]</sup>,降低蛋白质提取过程中产物的黏性,进而提高蛋白质提取效率。本实验中的细胞用量为 $1 \times 10^5$ 个。

本实验采用UHPLC-MS/MS法分析经含trypsin-MOSF和含trypsin-MOSF、DNase I-MOSF 2种纳反应器材料处理的细胞样品的肽段产物。结果表明,加入DNase I后,细胞样品的肽段信号强

表1 蛋白质及肽段定量结果

Table 1 Quantification results of proteins and peptides

方法 Method	蛋白质提取效率 Protein extraction efficiency/%	酶解产率 Proteolysis yield/%	总体回收率 Overall recovery/%
过滤器辅助样品前处理 <sup>[13]</sup>	100(参考标准)	—	—
过滤器辅助样品前处理	91.5	80.0	73.2
功能化微型酶反应器	86.7	73.4	63.6

度增强约1倍,但鉴定到的蛋白数量变化不大。相对而言,在不同纳反应器材料条件下,蛋白样品的鉴定结果和信号强度(约40%)变化较小,表明DNase I的引入对蛋白样品的影响几乎可以忽略,结果列于表2。综上, DNase I对中等数量活细胞的蛋白质鉴定未产生显著影响。

**2.3.2 功能化微型酶反应器用于微量细胞样品蛋白质组分析的样品前处理** 为了考察DNase I对微量细胞样品蛋白质提取效率的影响,本研究将细胞用量减少至 $1 \times 10^4$ 个,其他实验条件与

2.3.1节一致。

采用UHPLC-MS/MS分析实验产物,经过trypsin-MOSF和DNase I-MOSF枪头处理的细胞样品的肽段信号强度和鉴定到的蛋白数量均显著多于仅使用trypsin-MOSF纳反应器材料处理的样品,结果列于表2。此外,功能化微型酶反应器在处理微量细胞样品时表现出明显优于标准FASP流程的优势。值得注意的是, DNase I在蛋白提取过程中提高了微量活细胞样品的提取效率,提升幅度超过2倍。

表2 酶解产物的UHPLC-MS/MS结果

Table 2 UHPLC-MS/MS results of enzymatic digests

样品类型 Sample type	样品名称 Sample name	蛋白质匹配数 Protein hit number	鉴定蛋白数量 Number of identified protein	肽段峰强度 Intensity of peptide
293T细胞系蛋白( $1 \times 10^5$ 个细胞)	胰酶	1176	1045	$1.58 \times 10^9$
	胰酶+核酸酶I	1183	1027	$2.23 \times 10^9$
293T细胞系( $1 \times 10^5$ 个细胞)	胰酶	1195	1047	$1.15 \times 10^9$
	胰酶+核酸酶I	1181	1042	$2.50 \times 10^9$
293T细胞系蛋白( $1 \times 10^4$ 个细胞)	过滤器辅助样品前处理	7	7	$3.95 \times 10^7$
293T细胞系( $1 \times 10^4$ 个细胞)	胰酶	538	499	$1.39 \times 10^8$
	胰酶+核酸酶I	1300	1138	$7.18 \times 10^8$

### 3 结论

本研究结合MALDI-MS与UHPLC-MS/MS技术,实现了微量活细胞系蛋白质的快速分析,并评估了功能化微型酶反应器在微量细胞蛋白质组学中的应用效果。基于功能化微型酶反应器开发的一体化前处理方法集成了细胞裂解、蛋白质提取与酶解,显著拓展了纳反应器材料的应用领域。该方法具有快速、高效、操作简单的优势,活细胞样品的反应时间仅为6 min,整体分析时间小于1 h。质谱分析结果表明,双酶组合模式可以显著提高蛋白质提取和酶解效率,适用于低至 $1 \times 10^4$ 个细胞的微量样品,且优于传统的FASP流程。该方法在微量细胞高通量蛋白质组学分析中具有重要的应用前景,能够为微量细胞蛋白质组学研究提供高效、可靠的技术平台。

### 参考文献:

- [1] 张宝会,王晨桐,郭森,肖华. 基于亲和色谱的肺癌细胞磷酸化蛋白质组研究及其应用[J]. 色谱, 2021, 39(1): 77-86.  
ZHANG Baohui, WANG Chentong, GUO Miao, XIAO Hua. Affinity chromatography based phosphoproteome research on lung cancer cells and its application[J]. *Chinese Journal of Chromatography*, 2021, 39(1): 77-86(in Chinese).
- [2] KOBEISSY F, KOBALSI A, PENG W, BARSA C, GOLI M, SIBAH I A, EL HAYEK S, ABDELHADY S, ALI HAIDAR M, SABRA M, OREŠIČ M, LOGROSCINO G, MONDELLO S, EID A H, MECHREF Y. Glycomic and glycoproteomic techniques in neurodegenerative disorders and neurotrauma: towards personalized markers[J]. *Cells*, 2022, 11(3): 581.

- [3] MUND A, COSCIA F, KRISTON A, HOLLANDI R, KOVÁCS F, BRUNNER A D, MIGH E, SCHWEIZER L, SANTOS A, BZOREK M, NAIMY S, RAHBEK-GJERDRUM 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): 1 231-1 240.
- [4] NIU L, THIELE M, GEYER P E, RASMUSSEN D N, WEBEL H E, SANTOS A, GUPTA R, MEIER F, STRAUSS M, KJAERGAARD M, LINDVIG K, JACOBSEN S, RASMUSSEN S, HANSEN T, KRAG A, MANN M. Noninvasive proteomic biomarkers for alcohol-related liver disease[J]. *Nature Medicine*, 2022, 28(6): 1 277-1 287.
- [5] ZHANG Y, CHEN F, CHANDRASHEKAR D S, VARAMBALLY S, CREIGHTON C J. Proteogenomic characterization of 2002 human cancers reveals pan-cancer molecular subtypes and associated pathways[J]. *Nature Communications*, 2022, 13(1): 2 669.
- [6] BRUNNER A D, THIELERT M, VASILOPOULOU C, AMMAR C, 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.
- [7] GEORG P, ASTABURUAGA-GARCÍA R, BONA-GURO L, BRUMHARD S, MICHALICK L, LIPPERT L J, KOSTEVIC T, GÄBEL C, SCHNEIDER M, STREITZ M, DEMICHEV V, GEMÜND I, BARONE M, TOBERLAU P, HELBIG E T, HILLUS D, PETROV L, STEIN J, DEY H P, PACLIK D, IWERT C, MÜLLEDER M, AULAKH S K, DJUDJAJ S, BÜLOW R D, MEI H E, SCHULZ A R, THIEL A, HIPPENSTIEL S, SALIBA A E, EILS R, LEHMANN I, MALL M A, STRICKER S, RÖHMEL J, CORMAN V M, BEULE D, WYLER E, LANDTHALER M, OBERMAYER B, von STILLFRIED S, BOOR P, DEMIR M, WESSELMANN H, SUTTORP N, UHRIG A, MÜLLER-REDETZKY H, NATTERMANN J, KUEBLER W M, MEISEL C, RALSER M, SCHULTZE J L, ASCHENBRENNER A C, THIBEAULT C, KURTH F, SANDER L E, BLÜTHGEN N, SAWITZKI B, GROUP P S. Complement activation induces excessive T cell cytotoxicity in severe COVID-19[J]. *Cell*, 2022, 185(3): 493-512.
- [8] CHEN Q, YAN G, GAO M, ZHANG X. Ultrasensitive proteome profiling for 100 living cells by direct cell injection, online digestion and nano-LC-MS/MS analysis[J]. *Analytical Chemistry*, 2015, 87(13): 6 674-6 680.
- [9] YE Z, SABATIER P, MARTIN-GONZALEZ J, EGUCHI A, 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(1): 2 474.
- [10] 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.
- [11] WANG Y, GUAN Z Y, SHI S W, JIANG Y R, ZHANG J, YANG Y, WU Q, WU J, CHEN J B, YING W X, XU Q Q, FAN Q X, WANG H F, ZHOU L, WANG L, FANG J, PAN J Z, 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.
- [12] YAN L, QIAO L, JI J, LI Y, YIN X, LIN L, LIU X, YAO J, WANG Y, LIU B, QIAN K, LIU B, YANG P. In-tip nanoreactors for cancer cells proteome profiling[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2017, 949: 43-52.
- [13] KULAK N A, PICHLER G, PARON I, NAGARAJ N, MANN M. Minimal, encapsulated proteomic-sample processing applied to copy-number estimation in eukaryotic cells[J]. *Nature Methods*, 2014, 11: 319-324.
- [14] CAVALCANTI P V, MILAZZOTTO M P, SIMOES R, NICHI M, de OLIVEIRA BARROS F R, VISINTIN J A, ORTIZ D'AVILA ASSUMPCAO M E. Cell viability of bovine spermatozoa subjected to DNA electroporation and DNase I treatment[J]. *Theriogenology*, 2016, 85(7): 1 312-1 322.

(收稿日期: 2025-02-10; 修回日期: 2025-02-15)