

## 单细胞代谢组学分析技术研究进展

朱洪影, 易林, 汪子怡, 熊伟

(中国科学技术大学生命科学学院, 安徽合肥 230027)

**摘要:** 细胞是构成生物体结构和功能的基本单位, 在各种生命活动中扮演了极其重要的角色. 细胞生物学研究, 尤其是对单个细胞的研究, 是了解生命过程的重要手段. 细胞代谢在细胞生命活动中处于重要地位, 并对其结构和功能产生重要影响, 因此近年来细胞代谢组学受到越来越多的关注. 本文介绍了数种应用于单细胞层面的分析方法, 包括与荧光、电化学、色谱、质谱等多种手段结合的研究方法. 其中, 近年来发展的单细胞质谱检测能够对单个细胞的代谢进行精准分析, 检测代谢通路中的小分子, 并将细胞代谢与细胞的各种生命活动联系起来, 具有直接、快速、原位取样与检测等优点, 拥有广阔的应用前景.

**关键词:** 单细胞; 代谢组学; 质谱; 技术进展

**中图分类号:** Q25; O657.63      **文献标识码:** A      doi: 10.3969/j.issn.0253-2778.2018.10.011

**引用格式:** 朱洪影, 易林, 汪子怡, 等. 单细胞代谢组学分析技术研究进展[J]. 中国科学技术大学学报, 2018, 48(10):842-852.

ZHU Hongying, YI Lin, WANG Ziyi, et al. Recent advances in analytical techniques for single-cell metabolomics[J]. Journal of University of Science and Technology of China, 2018, 48(10):842-852.

### Recent advances in analytical techniques for single-cell metabolomics

ZHU Hongying, YI Lin, WANG Ziyi, XIONG Wei

(School of Life Sciences, University of Science and Technology of China, Hefei 230027, China)

**Abstract:** The cell is the fundamental unit of structure and function of all living organisms and plays critical roles in various biological processes. The biological research at the cellular level, especially at the single-cell level, is a unique way for discovering the secret of life. Single cell metabolomics has attracted increasing attention in recent years since cell metabolism exists and plays important roles in almost all biological processes. This review introduced several methods that have been applied to the single-cell level research, including fluorescence, electrochemistry, chromatography and mass spectrometry. The recently developed single-cell mass spectrometry technique provides accurate metabolic information on the cell and

**收稿日期:** 2018-08-02; **修回日期:** 2018-09-05

**基金项目:** 国家自然科学基金青年科学基金(81701068)资助.

**作者简介:** 朱洪影, 女, 1988年生, 博士. 研究方向: 单细胞质谱离子方法的开发及在各种神经系统疾病研究中的应用.  
E-mail: zhuhy62@mail.ustc.edu.cn

**通讯作者:** 熊伟, 教授, 博士生导师, 中国科学院脑科学与智能技术卓越创新中心成员. 北京大学学士与博士学位, 美国国立卫生研究院博士后. 2013年入选中组部“青年千人计划”. 长期从事神经化学领域的相关科学研究. 在 Cell, Nature Neuroscience, Nature Chemical Biology, PNAS, Journal of Neuroscience 等国际期刊发表多篇第一及通讯作者论文. 主持过多项国家级科研项目, 包括 863 青年科学家专题计划、基金委重大研究计划重点及培育项目、基金委面上项目、科技部“十三五”国家重点研发计划(课题组长)等. 曾获“中国科学院优秀导师奖”、科技部“中青年科技创新领军人才”、中国科学技术大学“杰出研究校长奖”等. E-mail: wxiong@ustc.edu.cn



combines cell metabolism with various biological processes. Single-cell mass spectrometry technology has plenty of advantages such as directness, rapidity, high efficiency and in situ sampling and analysis, promising broad applications of this technology in biological research in the future.

**Key words:** single cell; metabolomics; mass spectrometry; technology advances

## 0 引言

细胞是生物体生命活动和形态结构的最基本单位,生物体的生命运动都是在细胞层次上实现的.细胞的生命活动和状态,影响着生物体的生长和分化、代谢和繁殖、运动和交换、遗传和进化、衰老和死亡等<sup>[1]</sup>.为更好地掌握生物体生命过程的规律,以单个细胞为研究对象,探索单个细胞以及细胞间的生命活动,以此为基础来揭秘生物体各种生命活动的规律,最终才能够达到诊断治疗疾病、改善人类生活、提高农作物产量、保护环境等目的<sup>[1-3]</sup>.细胞之间是不同的,其异质性导致一个细胞的属性被大量细胞的平均属性掩盖,想要研究大量细胞组成的群体中由于统计原因无法发现的机制和相关病理生理机制,则必须对单个细胞的化学成分进行检测(图 1).研究单个细胞甚至是细胞器,对研究细胞的生命活动与其化学组分间的联系、判断细胞功能、探索细胞通信的生化机制有重要意义.

单细胞质谱分析是医学、生物学、化学的交叉学科,主要是针对单个细胞层面的化学分析,研究细胞化学物质成分和生物化学反应的进行,主要用于研究细胞的生物学功能,及其与胞内化学物质的关系<sup>[4-5]</sup>.单细胞分析可以鉴定细胞内生化组分及性质,同时可研究代谢与细胞功能和细胞发育分化的联系.利用这种方法,可对疾病状态下细胞的病理机制进行研究,同时有助于临床鉴别诊断和预测预后<sup>[6-9]</sup>.此外该技术还可了解详细的细胞信息,减少以往研究方法中由于统计和数据处理带来的问题<sup>[5, 9]</sup>.该技术用于癌症的相关研究,对早期诊断和预防具有重大意义.

根据单细胞中研究对象的不同,现已形成了各种单细胞“组学”<sup>[10]</sup>,包括基因组学、表观基因组学、转录组学、蛋白质组学、多肽组学、代谢物组学以及金属组学等<sup>[7]</sup>.以代谢物组学为例,其研究对象主要是细胞中分子量小于 1 kD 的小分子代谢物<sup>[31]</sup>.细胞内常见的一些小分子化合物,如氨基酸、葡萄糖、乳酸、三磷酸腺苷(ATP)、二磷酸腺苷(ADP)以及单磷酸腺苷(AMP)等都属于单细胞代谢物组学的研究范畴.同时一些在细胞内自然存在而不是由蛋白质降解所产生的小分子多肽也属于代

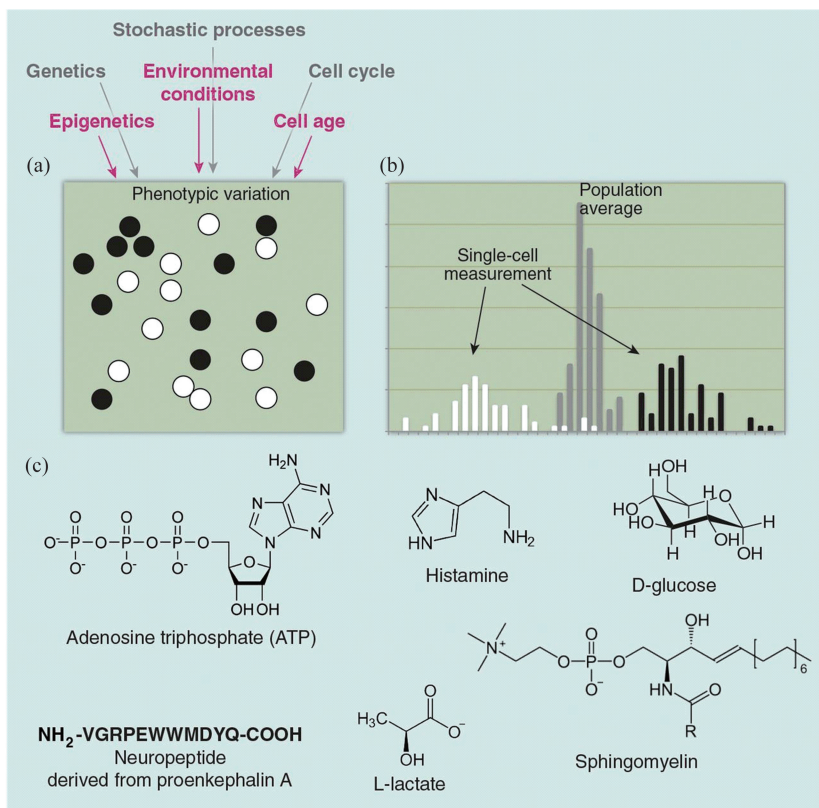
谢物组学的研究范围,如神经肽等.而小分子量的核酸属于转录组学的研究范畴,并不属于代谢物组学的研究范围.此外,细胞中的无机盐类并不被认为是代谢物<sup>[13]</sup>.

单细胞代谢物组学分析的概念在近年来广受关注,主要是因为代谢物组学所涉及的小分子代谢物对细胞的能量平衡、细胞间相互作用以及渗透压调节等多种正常生理活动的维持至关重要.但要真正实现单细胞中代谢物的检测和分析却又困难重重<sup>[5]</sup>.首先,单细胞的尺寸体积非常小;通常,动物细胞的直径为 10~20  $\mu\text{m}$ ,植物细胞的直径为 10~100  $\mu\text{m}$ .它们的内液体积一般在 fL~pL 量级,取样和预处理在这样的尺寸上极为不便;其次,单细胞中的物质含量较低,对检测方法的灵敏度提出了较高的要求;再次,单细胞中的物质种类繁多,且代谢物之间的浓度含量差异可以高达  $10^6\sim 10^9$  倍,这要求检测方法不仅同时对多种物质具有响应,而且还要具有较宽的响应范围;最后,由于不同的细胞状态下,细胞内的代谢物组成均会发生较大的变化,所以要求检测方法具有不破坏细胞状态的能力.总之,单细胞分析技术要求灵敏度高、样品体积小、选择性好、响应速度快以及不对细胞状态产生影响等特点.本文总结并介绍了几种较为常见的单细胞分析方法,以及近年来主要的研究进展,展望了单细胞分析及相应方法的发展前景.

## 1 单细胞分析常用方法

### 1.1 荧光法

早期单细胞的研究主要是依赖于光学显微镜对细胞进行观察研究.其中经典的分析方法之一是荧光法<sup>[12-14]</sup>.该方法的基本原理是利用荧光衍生反应,通过加入某一试剂使非荧光物质产生化学变化,转化为荧光物质,加入的试剂就是荧光衍生试剂.目前应用于单细胞分析的荧光衍生试剂主要有两大类:荧光生成试剂和荧光标记试剂.荧光生成试剂本身是非荧光试剂,与细胞内组分反应后产生荧光物质.例如在亲核试剂氰离子( $\text{CN}^-$ )存在下,2,3-萘二甲醛<sup>[48]</sup>可与细胞内氨基酸发生反应,生成具有强荧光特性的多芳环化合物.该试剂可用于检测细胞内的氨基酸类物质.而在无  $\text{CN}^-$  存在的条件下,它会与



(a) 产生细胞个体差异性的可能原因. 图中的黑点和白点代表由同源细胞在经过一段时间的培养后, 由于细胞在新陈代谢过程中所发生的一些随机过程, 而产生的具有不同表型的子代细胞. (b) 大量群体细胞匀浆实验和单个细胞分析所产生实验结果的比较. (c) 细胞中一些常见的代谢物及其结构, 说明代谢组学所涵盖的化合物的结构具有多样性.

图 1 细胞具有异质性<sup>[5]</sup>

Fig.1 Heterogeneity in cells<sup>[5]</sup>

谷胱甘肽 (GSH) 反应生成带有强荧光的异吲哚加成物, 通过荧光强度可对细胞内的谷胱甘肽含量进行检测. 荧光标记试剂则是自身带有较强荧光的基团, 如荧光素异硫氰酸酯 (FITC), 它的分子结构中既有荧光基团, 又有 NCS 反应活性基团. 通过该反应活性基团与细胞内的氨基酸、蛋白质或多肽 N-端氨基发生偶合反应, 使底物带上荧光, 用于对细胞内这些物质的分析. 但是该方法有两个缺点: ① 细胞中绝大多数分子没有荧光, 需要标记, 但对细胞中未知分子则无法进行标记检测; ② 荧光探针具有一定的波长宽度, 在有限光窗下只能检测 3~4 种不互相干扰的分子.

## 1.2 超微电极电化学方法

自 20 世纪 70 年代, 超微电极电化学开始发展起来, 成为一门新兴的电化学学科. 其主要特点是采用了微米或纳米级的超细电极, 能够在高时间和空间分辨下实时检测单细胞、单囊泡释放及突触间隙化学信号分子传导. 例如, 罗国安等<sup>[16]</sup> 利用 2~5  $\mu\text{m}$  碳纤维电极直接检测  $\text{a}_2$ -自体受体对牛肾上腺细胞儿茶酚胺释放的影响; Henzel 等<sup>[17]</sup> 采用碳纤维电

极差示脉冲伏安法测量了甲硝唑哇和安替比林二种药物渗透到蜗牛的拟副交感神经时神经细胞释放物质的变化, 以检测这两种药物在体内渗透和清除的动力学过程. 超微电极电化学方法已经被广泛应用于研究体外培养细胞和机体原位细胞的物质分析, 但其主要是应用在检测细胞释放的物质上, 而非真正的细胞内物质的检测<sup>[16, 18]</sup>. 此外, 超微电极电化学方法也只能用于检测能够产生电化学反应的单胺类物质, 其检测的物质种类范围有限.

## 1.3 色谱法

色谱法包括高效液相色谱法 (HPLC)、开管毛细管亲和液相色谱 (OTAC) 和毛细管电泳法 (CE) 等, 这些检测手段由于质量检测限低、分离效率高等特点, 已成功应用于单细胞组分的检测<sup>[2]</sup>. 毛细管电泳分析法因其具有进样体积小、分离效率高、分离速度快等优点, 可在检测微量样品中化学成分的同时, 定量测定物质含量. 同时毛细管电泳具有分离的特性, 其与高灵敏度的检测器如激光诱导荧光、电化学分析等联用后, 不但可以达到分离和同时测定单细胞内多种化学组分的目的, 还可消除基体对测定所

带来的干扰。Ewing<sup>[20]</sup>和 Sweedler<sup>[21]</sup>等研究组开创性地将毛细管电泳用于非哺乳类动物神经细胞的分析。1988年, Ewing等<sup>[22]</sup>首次将毛细管电泳-安培检测用于单细胞的分析中。他们首先将玻璃毛细管内径拉制到 7.5  $\mu\text{m}$ , 然后灌入缓冲溶液作为微量进样器, 采用电动进样的方式进样, 得到了单个池塘蜗牛脑中大多巴胺神经元的细胞质中的物质的电泳图, 开辟了毛细管电泳在研究非哺乳类动物细胞方面的先河。为了提高毛细管电泳法的灵敏度, Yeung等<sup>[23]</sup>采用双酶柱上反应与毛细管电泳相结合, 采用激光诱导荧光的方法来检测单个人血红细胞中的谷氨酸含量, 能够使谷氨酸的检出限降为  $10^{-8}$  mol/L, 与之前报道的类似的分析方法相比降低了一个数量级。然而, 毛细管电泳法和色谱法的缺点在于, 为了能够达到较好的分离和检测, 通常需要花费较长的时间进行样品前处理、衍生和分离, 导致对样品的分析速度较慢, 无法满足单细胞生物学和临床诊断对单细胞分析的需要。此外, 样品中的分析物可能在预处理时丢失或发生变化, 对分析结果产生干扰甚至得到假的阳性结果, 这些都是亟待改进的方面。

#### 1.4 单细胞质谱法

质谱法(mass spectrometry, MS)具有快速、选择性高、灵敏度高等优点, 因此被广泛应用于单细胞分析中<sup>[5-6]</sup>。它可以检测物质的分子量, 因此基于质谱的单细胞分析无需荧光标记或衍生, 具有通用性。目前, 人们已经发展出了多种离子化方法, 能够对不同类型的样品进行解吸附/离子化, 主要包括电喷/纳喷雾离子化(electrospray/nano-electrospray ionization, ESI/Nano-ESI)、激光剥蚀/激光解吸附离子化(laser ablation/laser desorption ionization, LA/LDI)以及二次离子电离(secondary ionization mass spectrometry, SIMS)等。这些离子化方法能对不同种类的物质进行离子化, 如蛋白质、多肽、酯类、小分子代谢物<sup>[51-52]</sup>以及元素等。由于单细胞质谱分析无需标记, 且能够进行多组分的同时分析, 因而在近年来的单细胞研究中逐渐受到关注<sup>[53-56]</sup>。下文将重点介绍单细胞质谱的基本原理及研究进展。

## 2 单细胞质谱法研究进展

在质谱法中, 被分析物的分子在离子源中离子化并被转化成气相, 然后进入质谱仪, 利用磁场或电场将运动的离子按它们的质荷比进行分离, 随后被检测器检测。离子源是质谱仪的核心, 被分析物分子必须通过离子源转化成离子才能被质谱仪检测。不同物质的分子量分析范围、离子化机理和离子源结

构决定了质谱的分析范围和分析物类型。根据分析物是否在真空系统中离子化, 现有的单细胞质谱法可分为真空式离子源和常压或敞开式离子源。

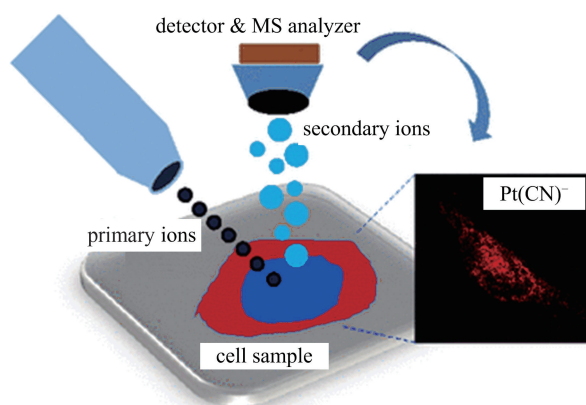


图 2 二次离子质谱 (secondary ionization mass spectrometry, SIMS) 示意图<sup>[32]</sup>

Fig.2 Diagram of secondary ionization mass spectrometry(SIMS)<sup>[32]</sup>

在单细胞质谱分析中, 二次离子质谱(secondary ion mass spectrometry, SIMS, 如图 2)<sup>[31-32]</sup>和基质辅助激光解析附质谱(matrix assisted laser desorption ionization mass spectrometry, MALDI-MS, 如图 3)<sup>[33-34]</sup>是两类较为常用的质谱方法, 其均采用在真空的条件下对被分析物进行离子化然后再进一步检测的方式。SIMS 主要是利用具有高能加速一次离子束如 Cs, Si 或 Ga 等轰击目标表面, 此时一部分入射离子发生背散射, 而其他部分则到达多个原子层, 与晶格中的原子相互发生弹性或非弹性的碰撞。在整个过程中, 一次离子所带的能量就会全部或部分转移到样品原子, 使得它们发生晶格移位或引起化学反应。再经过一系列的级联碰撞后, 样品表面的原子或原子团就可能吸收能量而向外溅射。溅射出的粒子只有小部分是带电的离子、分子或团簇, 其他大部分为电中性物质, 然后带电离子就会经过质谱而被检测<sup>[36-37]</sup>。SIMS 的主要特点就是空间分辨率高, 对生物细胞表面特别是细胞膜上的磷脂有着较好的分析能力<sup>[37-38]</sup>。如 kurczy等<sup>[38]</sup>利用 SIMS 检测单细胞生物四膜虫在不同的时间段交配时细胞膜上磷脂的变化, 提示了在四膜虫的交配过程中由于结合过程中膜结构的变化, 导致细胞膜上磷脂种类的变化, 进而阐明了四膜虫交配的生物行为学过程中的物质基础。但是由于 SIMS 中的一次离子能量通常较大(千电子伏特~兆电子伏特), 所以可能在离子化的过程中使一些其他物质特别是分子量较大的多肽或蛋白质产生裂解, 形成较多的离子碎片, 进而对结构解析产生影响。

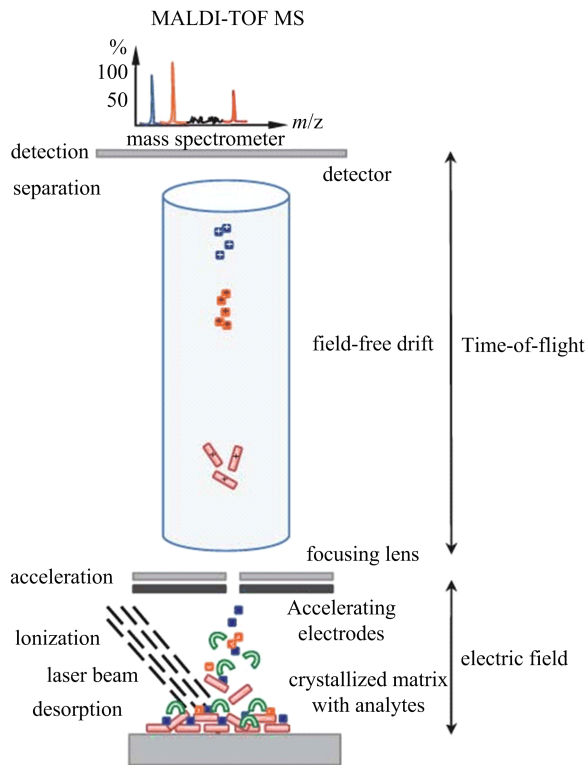


图 3 基质辅助激光解吸附离子源 (Matrix assisted laser desorption ionization, MALDI) 示意图<sup>[35]</sup>

Fig.3 Diagram of matrix assisted laser desorption ionization (MALDI)<sup>[35]</sup>

MALDI 是一种软电离型的离子源,它是将一种对光子具有较强吸收能力的物质与目标物质均匀混合后点在样品板上,待其干燥形成共结晶薄膜,然后将该样品置于真空,再使样品经过一定强度的激光,基质与样品之间就会发生电荷转移,使样品分子电离<sup>[34-35]</sup>.该离子源可以同时分析不同类型的多种化合物,尤其是蛋白质和多肽,因此被普遍应用于生物学分析.它在单细胞分析方面已经得到了广泛的应用.如 Sweedler 等<sup>[39]</sup>利用 MALDI-MS 分析了温度和光照时间对 *Closterium acerosum* 细胞代谢物组成的影响,揭示了不同的培养条件可以产生细胞的特异性.MALDI-MS 也可以用于鉴定一些影响细胞代谢通路和组成物质的动态变化.如 Masujima 等<sup>[40]</sup>在 2002 年利用单细胞基质辅助激光解吸时间飞行质谱 (MALDI-TOF-MS) 监测老鼠骨髓肥大细胞的生长过程和组胺含量的变化.此外,将样品的尺寸和体积大小降至微米级, MALDI-MS 已经成功用于单细胞细胞器的化合物分析.如 Sweelder 等<sup>[41]</sup>在 2000 年将 MALDI-MS 第一次应用于心房腺细胞的细胞器内含物分析,成功地在每一个细胞器中发现超过十种的多肽.虽然 MALDI 在单细胞分析

中取得了许多成果,但是由于背景干扰较大、分析物的稀释和要求真空条件等因素,所以对实验条件提出了一定的限制.为了可以直接简单快速地进行单细胞分析,一些大气压敞开式离子源也逐渐应用于单细胞分析中.

单细胞分析的离子源有如下形式:激光离子化、喷雾离子化以及两者的结合.Northen 等<sup>[42]</sup>开发的纳米结构引发的质谱属于一种激光离子化质谱(图 4).该方法使用引发剂可使物质被纳米结构捕获,之后纳米结构被激光加热,并释放离子包裹的物质分子.该方法拥有较高的空间分辨率,灵敏度高且干扰小.这种方法用于检测单个乳腺癌细胞,其离子强度比 MALDI 中 400 个细胞匀浆产生的离子强度还要强.Venters 等<sup>[43]</sup>研发了纳米棒阵列的激光解析离子源(图 5),可分析更小的细胞的代谢.激光型离子源难以分析分子量较大的物质,离子化时大分子发生断裂,而且碎片会造成很多干扰.

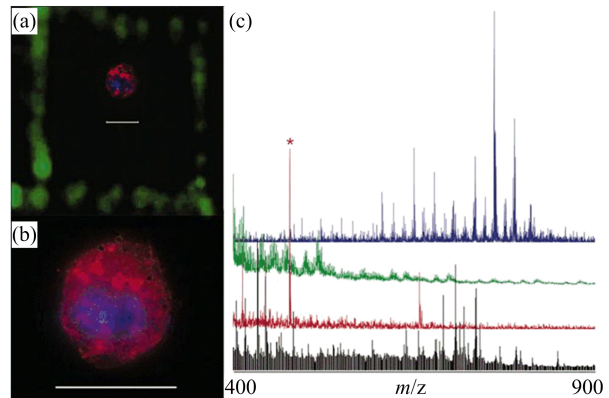


图 4 纳米结构-引发剂质谱

(nanostructure-initiator mass spectrometry, NIMS) 与荧光显微镜结合用于单个乳腺癌细胞 (MDA-MB-231 cancer cell) 的分析<sup>[42]</sup>

Fig.4 Nanostructure-initiator mass spectrometry (NIMS) combined with fluorescence microscopy facilitates single MDA-MB-231 cancer cell analysis<sup>[42]</sup>

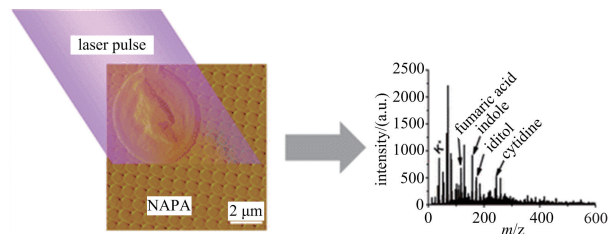


图 5 纳米棒阵列为基础的激光解吸附离子源 (nanopost arrays based laser desorption ionization, NAPA-based LDI) 分析单个细胞示意图<sup>[43]</sup>

Fig.5 Diagram of single cell analysis using nanopost arrays based laser desorption ionization (NAPA-based LDI)<sup>[43]</sup>

喷雾型离子源则能够用于分析大分子物质,并不会导致其裂解.这类离子源主要有纳升电喷雾离子源<sup>[44-46]</sup>与探针电喷雾离子源(probe electrospray ionization, PESI)<sup>[47]</sup>.纳升电喷雾离子源使用特殊喷雾针,其尖端镀有金属涂层.在显微镜下将喷针插入细胞,抽取细胞内液,之后从喷针后部灌入喷雾液,随后可在质谱装置上分析(图 6).该方法为可视化取样,具有准确的取样位置,由于需要使基质效应降低同时保证采样时间,样品经过了 10 万倍的稀释<sup>[47]</sup>.在这种情况下,低浓度物质的检测受到影响. Sweedler 等<sup>[48]</sup>将膜片钳与上述取样技术结合,取样时则可以监测电流和电阻的变化,以监测喷针与细

胞的位置关系.样品经过离心和萃取,之后使用毛细管电泳质谱进行分析(图 7).然而,这种方法也存在稀释效应、样品处理时间长、低通量等缺点.在 PESI 方法中,细胞内含物吸附在金属探针表面,然后对该探针施加一定的电压使其喷雾并离子化.该方法具有一定的富集作用(图 8).以上方法都是采用取样后再离子化,不能够实现连续取样并检测. Yang 等<sup>[49]</sup>研发的“单探针质谱”(single-probe MS)用 theta 石英管控制喷针,从喷针的一侧连续不断地注液体,液体在喷针尖端形成液滴萃取细胞内的物质,然后通过另一侧的孔道导出并送入纳升电喷雾离子源,实现了对单个细胞内的样品连续取样并直接检测(图 9).

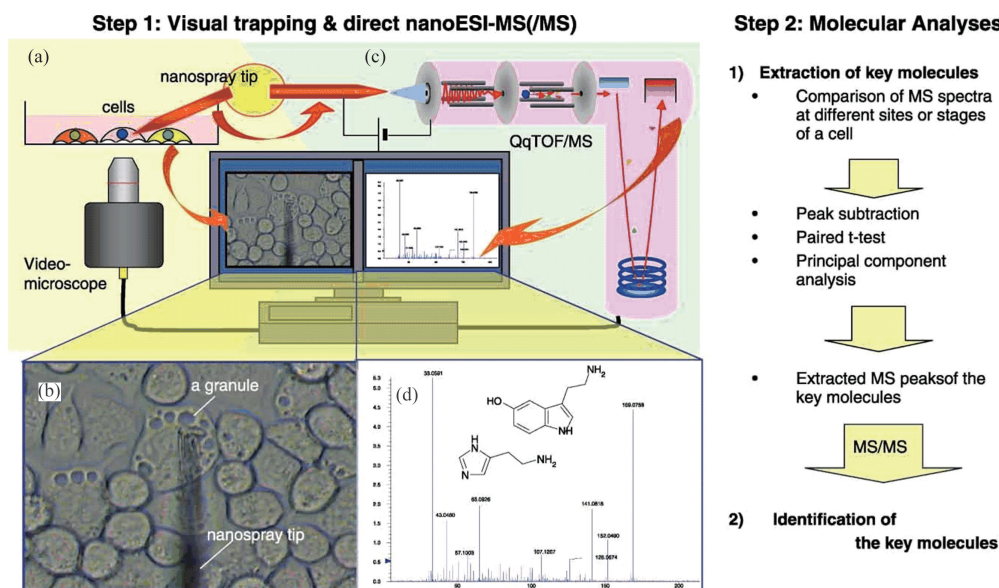


图 6 “实时单细胞视频质谱法”(live video MS)分析单个细胞的示意图和大致流程<sup>[44]</sup>

Fig.6 Diagram of the protocol of live video MS in single cell analysis<sup>[44]</sup>

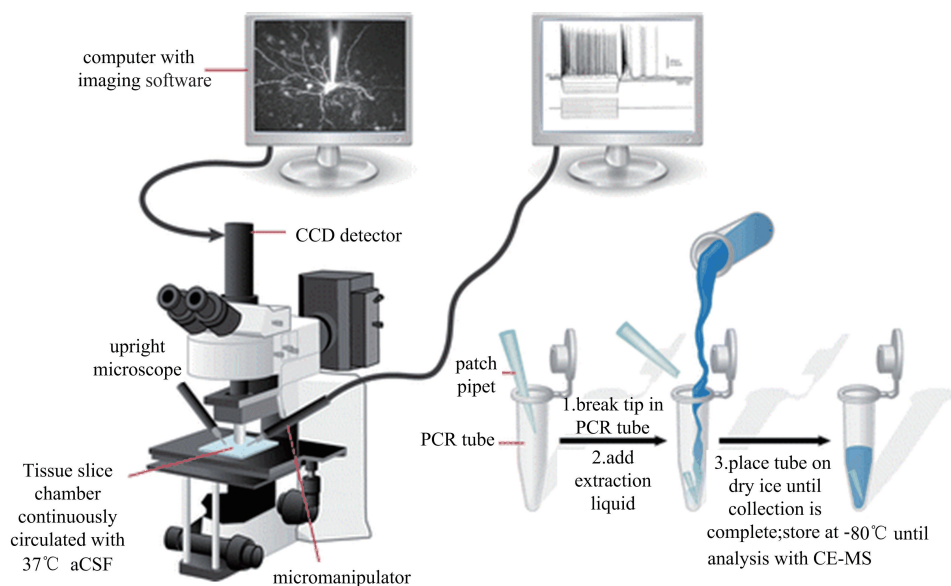


图 7 膜片钳技术与毛细管电泳技术相结合检测单细胞内代谢物流程图<sup>[48]</sup>

Fig.7 Diagram of a protocol of patch clamp combined with capillary electrophoresis in analysis of metabolites in single cells<sup>[48]</sup>

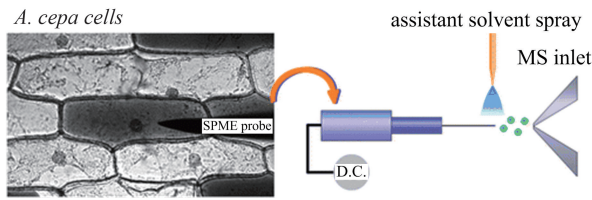


图 8 探针电喷雾离子源 (probe electrospray ionization, PESI) 分析单细胞示意图<sup>[47]</sup>

Fig.8 Diagram of probe electrospray ionization (PESI) in single cell analysis<sup>[47]</sup>

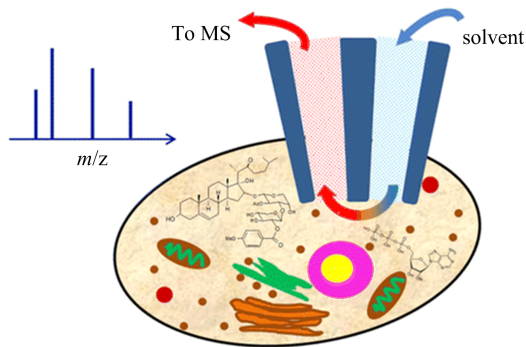


图 9 “单探针质谱”(single-probe MS)分析单细胞示意图<sup>[49]</sup>

Fig.9 Diagram of single-probe MS in single cell analysis<sup>[49]</sup>

在单细胞的分析中,为了能够达到高通量和高空间分辨率,一些离子化方法,如激光剥蚀的电喷雾离子化法 (laser ablation electrospray ionization, LAESI)<sup>[50-53]</sup>,可将两种方法的优点结合. Veters 等<sup>[53]</sup>应用 LAESI 对洋葱表皮亚细胞结构进行了分析,他们分析了细胞核的组成成分,并能够和细胞质进行区分.该方法在植物细胞中的效果较好;而动物细胞由于体积较小且内容物少,且该方法产生的物质分子会发生散开,多数都无法到达后离子化区,

因此动物细胞多数都采用细胞匀浆法分析,而不是真正的单细胞分析. Veters 等<sup>[51]</sup>研发了利用毛细管对电喷雾产生的气相物质进行汇聚,然后再用激光对其进行后离子化的方法,能够提高检测的灵敏度.然而,即便极大地提高了灵敏度,但水环境仍然会将细胞裂解后的产物稀释;同时该方法裂解了完整的细胞,故无法确认物质在细胞内的具体来源.

目前,单细胞质谱技术主要都是用来获得单细胞内化学物质组成的信息,而无法同时在一个细胞中获得其生物学的信息,这也就大大限制了单细胞质谱在生物学实际问题中的应用.为了更好地与生物学系统,尤其是脑神经系统,相兼容, Xiong 和 Huang 等<sup>[54]</sup>把电生理膜片钳技术与感应纳升电喷雾离子质谱 (induced NanoESI-MS, InESI/MS) 相结合,建立了原位单细胞代谢物质谱检测技术.利用此项技术,可以对小鼠大脑单个神经元进行取样 (< 5 pL),然后直接用质谱检测分析,并且同时记录该神经元的电生理活动(图 11).该技术既可以确保所取样细胞的活性,也可以在获得该细胞的电生理活动等信

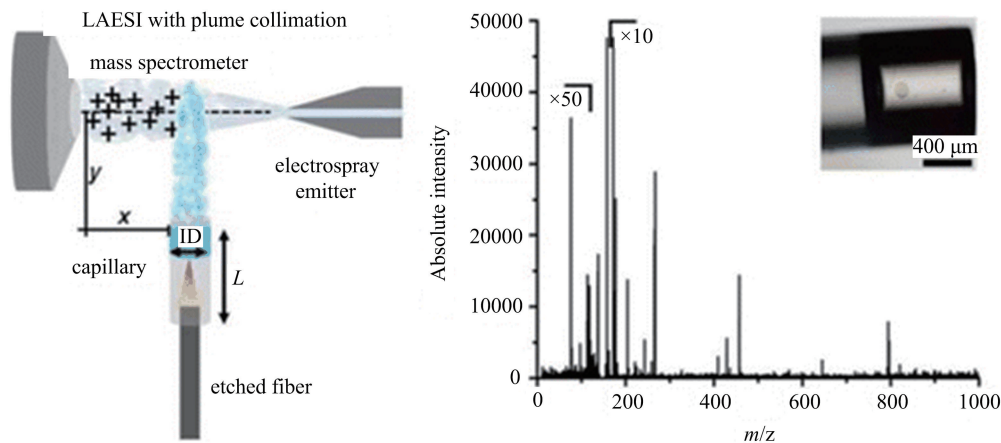
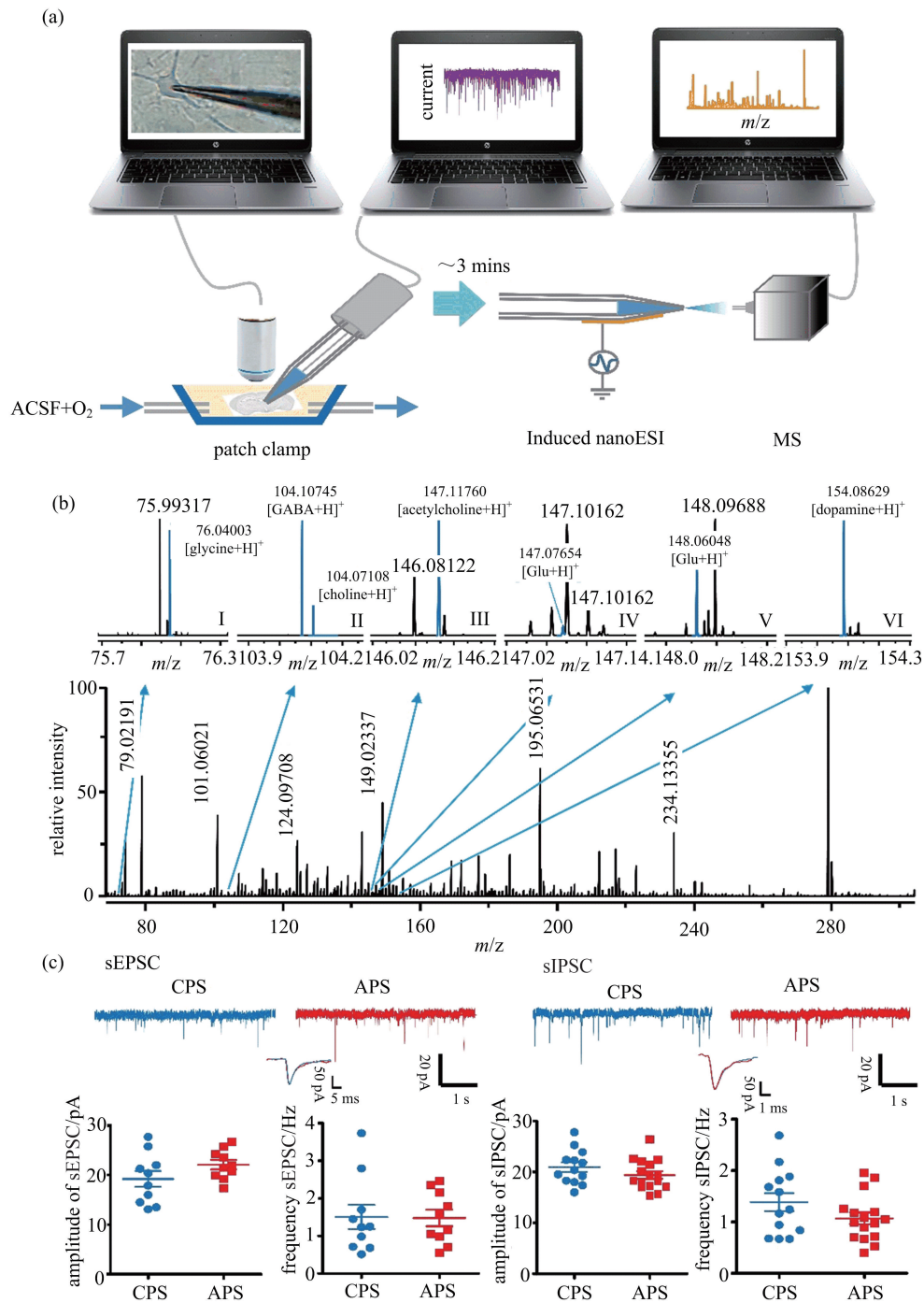


图 10 激光剥蚀电喷雾离子化 (laser ablation electrospray ionization, LAESI) 使用毛细管汇聚目标物质气体方式分析单细胞样品示意图<sup>[51]</sup>

Fig.10 Diagram of laser ablation electrospray ionization (LAESI) with capillary convergence of target substance gases in single cell analysis<sup>[51]</sup>



(a) 实验装置示意图；(b) 小鼠大脑海马单个神经元内典型质谱图；(c) 传统电极内液 (CPS) 和该技术使用的电极内液 (APS) 对小鼠海马脑区神经元电生理记录的比较, 无显著性差异。

图 11 电生理膜片钳技术与感应纳升电喷雾离子质谱 (induced NanoESI-MS, InESI/MS) 相结合的原位单细胞质谱技术<sup>[54]</sup>

Fig.11 In situ single cell MS technology with patch clamp electrophysiology combined with induced NanoESI-MS<sup>[54]</sup>

### 3 单细胞质谱分析方法的发展趋势

质谱分析是一种可以得到非常丰富数据量的分析技术, 具有高灵敏度, 在无需标记的情况下即可对细胞样品内的数百种生物分子进行多重测量。是目

前应用于单细胞代谢组学、多肽组学和蛋白质组学研究中的最前沿技术。

单细胞质谱研究的对象是从生物体中取出单个细胞内的物质并送至质谱仪器的样品。通过微操等方式对单细胞进行取样后再检测的模式, 实验通量



较低,比较适用于对一小部分细胞进行详细分析  
的实验,不太能满足一次实验需要大量细胞(1000 以  
上)的表征.通过 MALDI 和 SIMS 自动分析整个组  
织,可以一次实验收集来自数千个细胞的质谱数据,  
但是目前这两种方法尚未解决基质效应和亚细胞成  
分引发的难题.目前,细胞通量最高的单细胞质谱技  
术当属单细胞流式质谱仪(mass cytometry).该方  
法主要是利用带有金属标签的抗体对细胞进行标  
记,然后细胞进入流式仪之后分离成单个细胞,逐  
个通过电感耦合等离子体质谱(inductively coupled  
plasma mass spectrometry, ICP-MS)检测装置,之

后对每个细胞中各种金属标签进行定量检测,进  
而得知每个细胞中各目标蛋白的含量(图 12)<sup>[56]</sup>.  
该技术结合了传统流式细胞仪的高速分析特点和  
质谱检测的高分辨能力,可以较高通量地对单  
细胞进行蛋白检测.但是,由于该技术需要通过  
带金属标签的抗体对细胞进行标记,所以其单  
个细胞内检测的物质数量受到抗体及标签金属  
种类的限制,一次实验所能获得的蛋白量也只  
有 30 多种.此外,该技术分析的对象必须是  
细胞溶液,所以无法得到细胞在组织上的原  
位信息.

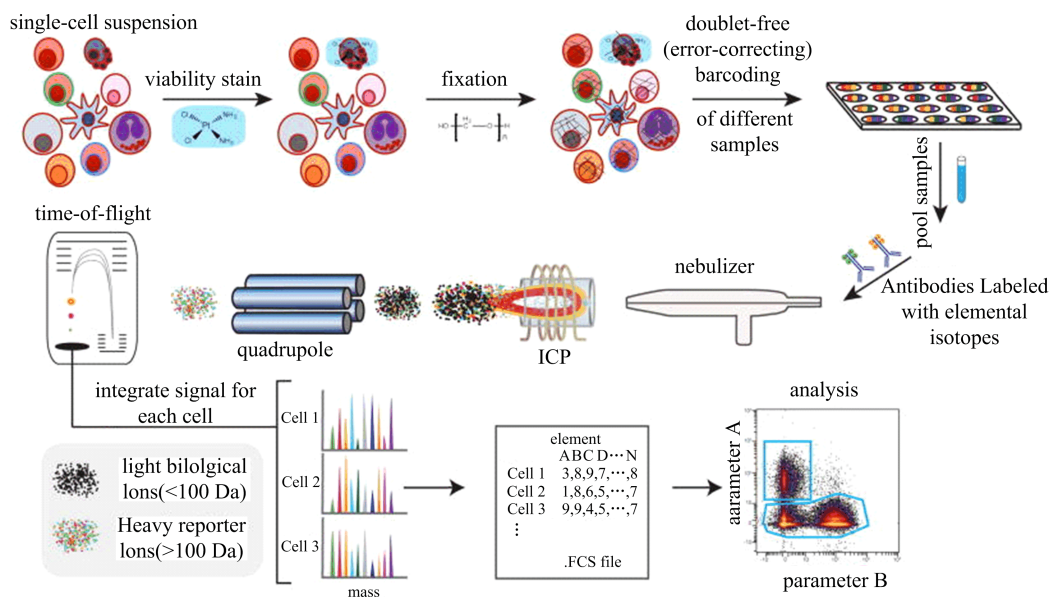


图 12 单细胞流式质谱仪(mass cytometry)实验流程示意图<sup>[56]</sup>

Fig.12 Diagram of a protocol of single cell mass cytometry<sup>[56]</sup>

## 4 结论

文中每种方法都具备一套独特的性能特征,适  
用于解决特定的生物学问题.然而,本文所讨论方  
法的一个关键缺点是它们在质谱研究范围之外的  
应用范围有限.因此,大量细胞计数法可通过每  
小时数千个细胞的速率提供数百种抗原的定量  
测定分析,其作为流式细胞术的替代方法,拥有  
更好的应用前景.这些有针对性的研究方法,与  
无需标记的质谱分析一起,极大地增强了单细  
胞质谱技术在发现和验证假设的研究中发挥的  
重要作用.通过促进其与常规的基因组学和转  
录组学的研究手段的进一步整合,可进一步扩  
大单细胞质谱技术在实际生物学问题中所能解  
决的问题的范畴.此外,简化工作流程并简化  
数据处理,将会吸引更多广泛的多学科研究人  
群的关

注和使用.单细胞质谱的出现,创造了使用更为  
精细的方法探索“局部颠簸”的可能.通过跨学  
科研究,我们得以发现可能引起显著表型变化  
的大量均质细胞群中低密度的少数细胞群.具  
备高通量、高时空分辨率的采样技术能够在  
区分细胞异常分布和统计噪声的同时测定单  
个细胞特性.单细胞质谱检测技术测得的实验  
结论与转录组学和基因组学手段测得的结果  
一致,方便人们更详细地了解正常和病理状  
态期间单个细胞发生的变化,并以期应用在医  
学研究中.

### 参考文献(References)

- [1] STENDER A S, MARCHUK K, LIU C, et al. Single cell optical imaging and spectroscopy[J]. Chem Rev, 2013, 113: 2469-2527.
- [2] RHEE H W, ZOU P, UDESHI N D, et al. Proteomic mapping of mitochondria in living cells via spatially

- restricted enzymatic tagging[J]. *Science*, 2013, 339: 1328-1331.
- [ 3 ] SCHMID A, KORTMANN H, DITTRICH P S, et al. Chemical and biological single cell analysis[J]. *Curr Opin Biotechnol*, 2010, 21: 12-20.
- [ 4 ] ROMANOVA E V, AERTS J T, CROUSHORE C A, et al. Small-volume analysis of cell-cell signaling molecules in the brain[J]. *Neuropsychopharm*, 2014, 39: 50-64.
- [ 5 ] ZENOBI R. Single-cell metabolomics: analytical and biological perspectives [ J ]. *Science*, 2013, 342: 1243259.
- [ 6 ] RUBAKHIN S S, ROMANOVA E V, NEMES P, et al. Profiling metabolites and peptides in single cells[J]. *Nat Methods*, 2011, 8: S20-S29.
- [ 7 ] ZANGLE T A, TEITELL M A. Live-cell mass profiling: an emerging approach in quantitative biophysics[J]. *Nat Methods*, 2014, 11: 1221-1228.
- [ 8 ] FERNANDEZ-SUAREZ M, TING A Y. Fluorescent probes for super-resolution imaging in living cells[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2008, 9: 929-943.
- [ 9 ] JAIN M, NILSSON R, SHARMA S, et al. Metabolite profiling identifies a key role for glycine in rapid cancer cell proliferation[J]. *Science*, 2012, 336: 1040-1044.
- [10] WANG J, BODOVITZ S. Single cell analysis: the new frontier in 'omics'[J]. *Trends Biotechnol*, 2010, 28: 281-290.
- [11] GERMAN J B, HAMMOCK B D, WATKINS S M. Metabolomics: building on a century of biochemistry to guide human health[J]. *Metabolomics*, 2005, 1: 3-9.
- [12] HUANG B, BABCOCK H, ZHUANG X W. Breaking the diffraction barrier: super-resolution imaging of cells [J]. *Cell*, 2010, 143: 1047-1058.
- [13] KNER P, CHUN B B, GRIFFIS E R, et al. Super-resolution video microscopy of live cells by structured illumination[J]. *Nat Methods*, 2009, 6: 339-342.
- [14] LIU J, MISLER S.  $\alpha$ -Latrotoxin-induced quantal release of catecholamines from rat adrenal chromaffin cells[J]. *Brain Res*, 1998, 799: 55-63.
- [15] SIEGEL R M, CHAN F K, ZACHARIAS D A, et al. Measurement of molecular interactions in living cells by fluorescence resonance energy transfer between variants of the green fluorescent protein[J]. *Science Signaling*, 2000, 38: 1-6.
- [16] ZHOU R, LUO G A, EWING A G. Direct observation of the effect of autoreceptors on stimulated release of catecholamines from adrenal cells[J]. *J Neuroscience*, 1994, 14: 2402-2407.
- [17] MEULEMANS A, POULAIN B, BAUX G, et al. Micro carbon electrode for intracellular voltammetry[J]. *Anal Chem*, 1986, 58: 2088-2091.
- [18] PANTANO P, MORTON T H, KUHR W G. Enzyme-modified carbon-fiber microelectrodes with millisecond response times[J]. *J Am Chem Soc*, 1991, 113: 1832-1833.
- [19] CHIU D T. Probing single secretory vesicles with capillary electrophoresis [J]. *Science*, 1998, 279: 1190-1193.
- [20] OILMAN S D, EWING A G. Analysis of single cells by capillary electrophoresis with on-column derivatization and laser induced fluorescence detection [J]. *Anal Chem*, 1995, 67: 58-64.
- [21] CRUZ L, MOROZ L L, GILLETTE R, et al. Nitrite and nitrate levels in individual molluscan neurons-single-cell capillary electrophoresis analysis [J]. *J Neurochem*, 1997, 69: 110-115.
- [22] WALLINGFORD R A, EWING A G. Capillary zone electrophoresis with electrochemical detection in 12.7  $\mu$ m diameter columns [J]. *Anal Chem*, 1988, 60: 1972-1975.
- [23] TONG W, YEUNG E S. Monitoring single-cell pharmacokinetics by capillary electrophoresis and laser-induced native fluorescence[J]. *J Chrom B*, 1997, 689: 321-325.
- [24] LEI Z T, HUHMANN D V, SUMNER L W. Mass spectrometry strategies in metabolomics [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286: 25435-25442.
- [25] OIKAWA A, SAITO K. Metabolite analyses of single cells[J]. *Plant J*, 2012, 70: 30-38.
- [26] GRIFFIN N M, SCHNITZER J E. Overcoming key technological challenges in using mass spectrometry for mapping cell surfaces in tissues[J]. *Mol Cell Proteom*, 2011, 10: 1-14.
- [27] SVATOS A. Single-cell metabolomics comes of age: new developments in mass spectrometry profiling and imaging[J]. *Anal Chem*, 2011, 83: 5037-5044.
- [28] TSUYAMA N, MIZUNO H, MASUJIMA T. Mass spectrometry for cellular and tissue analyses in a very small region[J]. *Anal Sci*, 2011, 27: 163-170.
- [29] TSUYAMA N, MIZUNO H, MASUJIMA T. Molecular and functional analysis of cellular phenomena using single-cell mass spectrometry [J]. *Biol Pharm Bull*, 2012, 35: 1425-1431.
- [30] WU B, BECKER J S. Imaging of elements and molecules in biological tissues and cells in the low-micrometer and nanometer range [J]. *Int J Mass Spectrom*, 2011, 307: 112-122.
- [31] MCCLAIN M A, CULBERTSON C T, JACOBSON S C, et al. Microfluidic devices for the high-throughput chemical analysis of cells[J]. *Anal Chem*, 2003, 75:

- 5646-5655.
- [32] WU K, JIA F F, ZHENG W, et al. Visualization of metallodrugs in single cells by secondary ion mass spectrometry imaging[J]. *J Biol Inorg Chem*, 2017, 22: 653-661.
- [33] IBANEZ A J, FAGERER S R, SCHMIDT A M, et al. Mass spectrometry-based metabolomics of single yeast cells[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110: 8790-8794.
- [34] LI L J, GARDEN R W, SWEEDLER J V. Single-cell MALDI: a new tool for direct peptide profiling[J]. *Trends Biotechnol*, 2000, 18: 151-160.
- [35] LAVIGNE J P, ESPINAL P, DUNYACH-REMY C, et al. Mass spectrometry: a revolution in clinical microbiology? [J]. *Clin Chem Lab Med*, 2013, 51: 257-270.
- [36] FLETCHER J S, LOCKYER N P, VAIDYANATHAN S, et al. TOF-SIMS 3D biomolecular imaging of *Xenopus laevis* oocytes using buckminsterfullerene (C<sub>60</sub>) primary ions[J]. *Anal Chem*, 2007, 79: 2199-2206.
- [37] PIEHOWSKI P D, CARADO A J, KURCZY M E, et al. MS/MS methodology to improve subcellular mapping of cholesterol using TOF-SIMS [J]. *Anal Chem*, 2008, 80: 8662-8667.
- [38] KURCZY M E, PIEHOWSKI P D, VAN BELL C T, et al. Mass spectrometry imaging of mating *Tetrahymena* show that changes in cell morphology regulate lipid domain formation[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107: 2751-2756.
- [39] AMANTONICO A, URBAN P L, FAGERER S R, et al. Single-cell MALDI-MS as an analytical tool for studying intrapopulation metabolic heterogeneity of unicellular organisms [J]. *Anal Chem*, 2010, 82: 7394-7400.
- [40] SHIMIZU M, LEVI-SCHAFFER F, OJIMA N, et al. A single-cell matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass-spectroscopic assay of the cell-maturation process[J]. *Anal Sci*, 2002, 18: 107-108.
- [41] RUBAKHIN S S, GARDEN R W, FULLER R R, et al. Measuring the peptides in individual organelles with mass spectrometry[J]. *Nature Biotechnol*, 2000, 18: 172-175.
- [42] NORTHEN T R, YANES O, NORTHEN M T, et al. Clathrate nanostructures for mass spectrometry [J]. *Nature*, 2007, 449: 1033-1036.
- [43] WALKER B N, STOLEE J A, VERTES A. Nanophotonic ionization for ultratrace and single-cell analysis by mass spectrometry[J]. *Anal Chem*, 2012, 84: 7756-7762.
- [44] MIZUNO H, TSUYAMA N, HARADA T, et al. Live single-cell video-mass spectrometry for cellular and subcellular molecular detection and cell classification[J]. *J Mass Spectrom*, 2008, 43: 1692-1700.
- [45] TSUYAMA N, MIZUNO H, TOKUNAGA E, et al. Live single-cell molecular analysis by video-mass spectrometry[J]. *Anal Sci*, 2008, 24: 559-561.
- [46] MIZUNO H, TSUYAMA N, DATE S, et al. Live single-cell metabolomics of tryptophan and histidine metabolites in a rat basophil leukemia cell [J]. *Anal Sci*, 2008, 24: 1525-1527.
- [47] GONG X, ZHAO Y, CAI S, et al. Single cell analysis with probe ESI-mass spectrometry: detection of metabolites at cellular and subcellular levels[J]. *Anal Chem*, 2014, 86: 3809-3816.
- [48] AERTS J T, LOUIS K R, CRANDALL S R, et al. Patch clamp electrophysiology and capillary electrophoresis-mass spectrometry metabolomics for single cell characterization[J]. *Anal Chem*, 2014, 86: 3203-3208.
- [49] PAN N, RAO W, KOTHAPALLI N R, et al. The single-probe: a miniaturized multifunctional device for single cell mass spectrometry analysis[J]. *Anal Chem*, 2014, 86: 9376-9380.
- [50] NEMES P, VERTES A. Laser ablation electrospray ionization for atmospheric pressure, in vivo, and imaging mass spectrometry[J]. *Anal Chem*, 2007, 79: 8098-8106.
- [51] STOLEE J A, VERTES A. Toward single-cell analysis by plume collimation in laser ablation electrospray ionization mass spectrometry [J]. *Anal Chem*, 2013, 85: 3592-3598.
- [52] NEMES P, WOODSAND A S, VERTES A. Simultaneous imaging of small metabolites and lipids in rat brain tissues at atmospheric pressure by laser ablation electrospray ionization mass spectrometry[J]. *Anal Chem*, 2010, 82: 982-988.
- [53] STOLEE J A, SHRESTHA B, MENGISTU G, et al. Observation of subcellular metabolite gradients in single cells by laser ablation electrospray ionization mass spectrometry[J]. *Angew Chem Int Ed*, 2012, 51: 10386-10389.
- [54] ZHU H Y, ZOU G C, WANG N., et al. Single-neuron identification of chemical constituents, physiological changes, and metabolism using mass spectrometry[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, 114: 2586-2591.
- [55] ZHU H Y, WANG N, YAO L, et al. Moderate UV exposure enhances learning and memory by promoting a novel glutamate biosynthetic pathway in the brain[J]. *Cell*, 2018, 173: 1716-1727.
- [56] SPITZER M H, NOLAN G P. Mass cytometry: single cells, many features[J]. *Cell*, 2016, 165: 780-791.