

单细胞蛋白定量检测方法研究进展

沈燚昀^{1,2}, 齐谢敏³, 宋沁馨^{1,2*}, 周国华³

(¹药物质量与安全预警教育部重点实验室(中国药科大学), 南京 210009; ²中国药科大学药物分析教研室, 南京 210009; ³南京军区南京总医院药理科, 南京 210002)

摘要 蛋白质的存在及表达水平差异可以阐明生物体的生理或病理变化机制, 因此蛋白质的定量检测对疾病发生机制研究、疾病诊断和预后评价等具有重要意义。传统的组织水平上的蛋白定量检测反映的是细胞中蛋白质表达量的平均水平, 它往往忽略了单个细胞之间存在的差异, 而单细胞蛋白定量检测手段则更能真实地反映这种差异。近年来发展了一系列单细胞蛋白定量检测的方法, 如微流控技术、微孔技术、光导纤维纳米生物传感器技术、基于活性的荧光探针技术和质谱法等, 本文就这些方法的原理、优缺点等进行简要介绍。

关键词 单细胞蛋白质; 定量检测; 研究进展; 微流控技术; 微孔技术; 光导纤维纳米生物传感器; 荧光探针; 质谱法
中图分类号 Q26 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2015)05-0521-11
doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20150502

Research advances in quantitative detection of single cell protein

SHEN Yiyun^{1,2}, QI Xiemin³, SONG Qinxin^{1,2*}, ZHOU Guohua³

¹Key Laboratory of Drug Quality Control and Pharmacovigilance (China Pharmaceutical University), Ministry of Education, Nanjing 210009; ²Department of Pharmaceutical Analysis, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009; ³Department of Pharmacology, Jinling Hospital, Nanjing 210002, China

Abstract Proteins presence and differences of the expression level can clarify the physiological or pathological changes in organisms, so the quantitative detection of proteins is vital for disease mechanism research, diagnosis and prognosis evaluation. Traditional protein quantitation methods at the tissue level reflected the average protein expression in cells, but ignore the differences between individual cells. In contrast, approaches for quantitative detection at single-cell level can better reflect the differences. Recently, a number of approaches for such detection have been proposed, including microfluidics, microwell-based technology, optical fiber nanobiosensor, activity-based probe technology and mass spectrometry. The principles, advantages and drawbacks of these approaches are briefly introduced in this review.

Key words single cell protein; quantitative detection; research progress; microfluidics; microwell-based technology; optical fiber nanobiosensor; probe technology; mass spectrometry

This study was supported by the Social Development Project of Science and Technology Supporting Programs of Jiangsu Province (No. BE2012744); the Natural Science Foundation of Jiangsu Province (No. BK20151445); the General Financial Grant from China Postdoctoral Science Foundation (No. 2012M512179, No. 2013T60962); the Fundamental Research Funds for the Central Universities (No. 2015ZD008); the Open Project of MOE Key Laboratory of Drug Quality Control and Pharmacovigilance (No. DQCP2015MS02); the Priority Academic Program Development of Jiangsu Higher Education Institutions, and the “Qing-Lan” Project of Jiangsu Province

收稿日期 2015-04-17 * 通信作者 Tel: 025-80860196 E-mail: songqinxin@cpu.edu.cn

基金项目 江苏省科技支撑计划社会发展项目资助项目 (No. BE2012744); 江苏省自然科学基金资助项目 (No. BK20151445); 中国博士后科学基金资助项目 (No. 2012M512179, No. 2013T60962); 中央高校基本科研业务费重点资助项目 (No. 2015ZD008); 药物质量与安全预警教育部重点实验室资助项目 (No. DQCP2015MS02); 江苏高校优势学科建设工程资助项目; 江苏省高校“青蓝工程”资助项目

蛋白质是生理功能的执行者,是生命现象的直接体现者,它可直接作用于体内免疫应答、调节和催化等过程;蛋白标志物的存在及表达水平差异也将直接阐明生物体在生理或病理条件下的变化机制。因此,对蛋白标志物结构、功能和表达量的研究有利于监测疾病的发生和发展情况,指导临床治疗。

早期的蛋白质组学研究多利用基因组、转录组信息预测,但其前提是 DNA 遗传信息及 mRNA 丰度能反映蛋白质的功能和表达水平。然而,事实并非完全如此,从 DNA 到 mRNA,再到蛋白质,存在 3 个层次的调控,即转录水平调控、翻译水平调控、翻译后水平调控。随着基因沉默、RNA 编辑、翻译后修饰的发现,仅从 DNA 与 mRNA 的角度已不能准确地预测蛋白质组学信息。与基因组、转录组的研究相比,现今对蛋白质组学的直接研究给出了更终端、更直接的生物功能认识。

经典的蛋白质组学研究大多是组织水平上的研究,反映了细胞中蛋白质表达量的平均水平。然而,细胞之间往往存在显著的差异^[1-3],组织水平上的研究往往掩盖了细胞之间的决定性差异^[1],可能会出现假阴性或假阳性的结果^[4]。此外,往往引导疾病病理学的只是少数细胞^[5]。因此,单细胞分析能够避免总体均值导致的信息丢失^[6],反映出单个细胞的重要变异。

相比基因表达分析,测定单细胞中的蛋白质是一个更大的挑战,因为单细胞中蛋白质含量非常低(平均每个细胞中约含 8×10^9 个蛋白质分子,但却有 1 万多种蛋白质,某些种类的蛋白质分子甚至小于 100 个^[7]),且无法像 DNA、RNA 那样直接扩增^[8]。因此,灵敏的检测技术和先进的分离方法是分析单细胞中低丰度蛋白质所必需的^[9]。近年来,涌现了一系列单细胞蛋白定量检测的方法,本文就这些方法的原理、优缺点等作简要介绍。

1 微流控技术

微流控技术是一种使用几十到几百微米尺度的通道来精确控制和操控小体积($1 \times 10^{-9} \sim 1 \times 10^{-18}$ L)流体的技术^[10]。该技术一般使用实验室自制的微流控装置,可进行高分辨率、高灵敏度的分离和检测,具有检测通量高、快速准确、效益高、样本和试剂用量少等特点^[6,10-12]。

Heath 课题组设计了一种名为单细胞条码芯片(single-cell barcode chip, SCBC)的方法来进行单细胞蛋白检测,并发表了一系列文章。利用该方法,他们对单个肿瘤细胞的细胞质蛋白进行了多重分析^[13],揭示了表型相似的 T 细胞的高度功能异质性^[14],进行了单细胞分泌蛋白的多重分析^[15],对单个肿瘤细胞内的信号通路进行了轮廓分析^[16],对细胞间相互作用的距离进行定量^[17],对单个循环肿瘤细胞的分泌组进行了轮廓分析^[18],为临床免疫学监测和肿瘤诊断及预后监测提供了一个新平台。该方法利用一张由两层聚二甲基硅氧烷(PDMS)组成的含有 1 千多个微室的微流控芯片进行测定,其原理图如图 1 所示。由条码阵列组成一条条平行条带,每一条带利用 DNA 编码的抗体文库(DNA-encoded antibody library, DEAL)法^[19]包被特异性抗体,即在条带上先连接一段单链 DNA 分子,再利用碱基互补作用,连接上偶联了互补单链 DNA 的抗体,避免了直接连接抗体导致的降解;然后向微室中载入细胞,每个微室可能包含 0 个到几个细胞,其细胞数通过成像进行计数(图 1-B 中数字),服从泊松分布;继而利用多重 DEAL 抗体条码阵列特异性捕获来自单细胞的蛋白质,进行类似三明治结构的免疫测定,即捕获的蛋白质再与生物素标记的二抗结合,再通过链霉亲和素标记上荧光染料,利用荧光强度对蛋白质进行定量。SCBC 方法与传统的免疫测定法相比,其灵敏度高,能检测到 100 ~ 1 000 个蛋白分子,能同时定量测定十多种蛋白,且所需样本量小(约 1×10^4 个细胞),成本相对较低。

Huang 等^[11]设计了一种微流控装置,能在一块芯片上完成细胞处理、裂解、标记、分离和蛋白定量检测等过程,以此定量昆虫细胞中 β_2 肾上腺素能受体的表达量,分析单个蓝细菌细胞在去氮环境下生长后特定物质的显著变化,更好地理解细胞功能,监测基因表达和抑制。该微流控芯片装置的原理如图 2 所示,PDMS 材质的芯片由 3 部分组成:细胞处理、电泳分离和单分子检测。注入的细胞通过阀门控制,使之在反应室中被捕获;经过清洗后,注入裂解和标记缓冲液,使细胞裂解,释放出的目标蛋白与荧光标记的抗体特异性结合;随后注入分离缓冲液,使目标蛋白通过毛细管电泳与其他蛋白及多余的标记试剂得以分离;最后通过电荷耦合装

置 (CCD) 相机进行荧光分子检测。该课题组通过一系列改进,避免了常规单分子计数方法检测效率低、检测通道堵塞的问题,其检测限达到 7 个蛋白质分子。

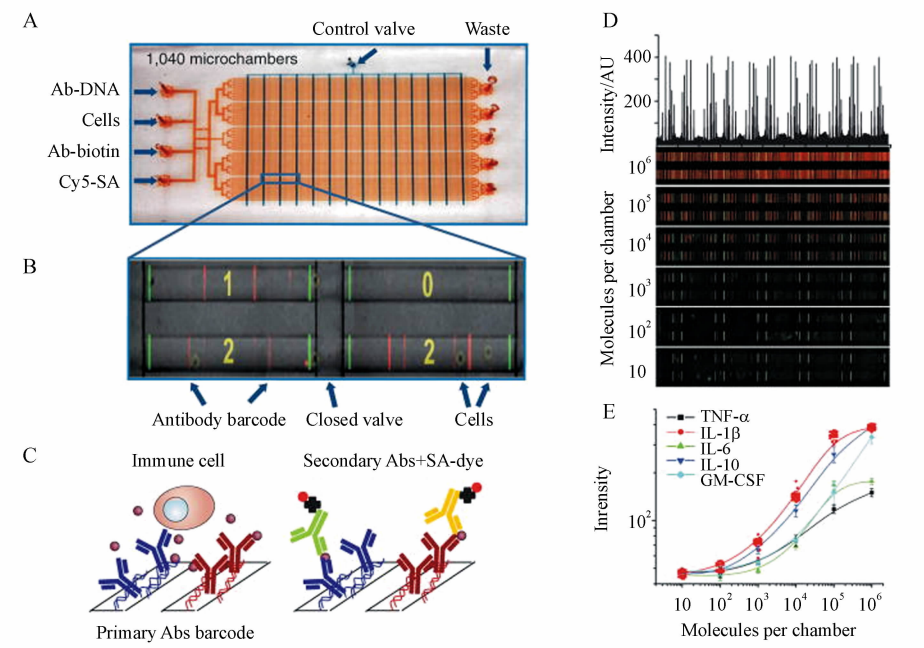


图 1 单细胞条码芯片技术原理图^[14]
A: SCBC 装置图; B: 微室放大图 (图中数字代表微室中细胞数); C: DEAL 法捕获分泌蛋白进行免疫测定; D: 利用重组蛋白测定抗体条码的扫描荧光图; E: 重组蛋白标准曲线图

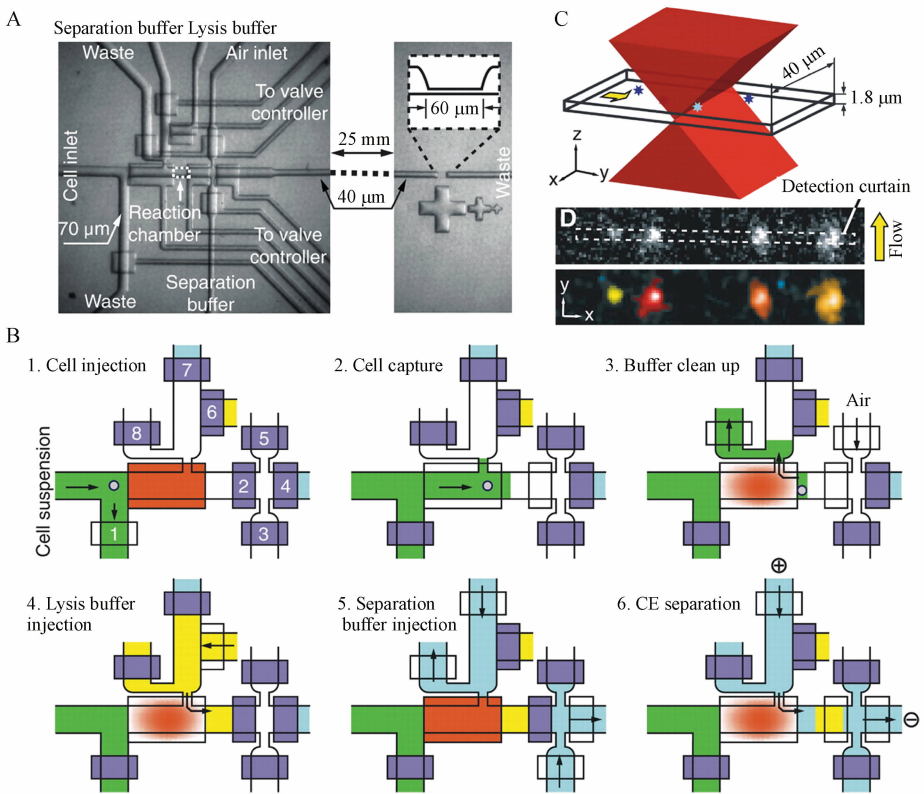


图 2 微流控芯片原理图^[11]
A: 单细胞芯片设计图 (左侧为细胞操作部分, 右侧为分子计数部分); B: 单细胞分析流程图; C: 显微镜聚焦激光和分子计数通道的维度示意图; D: 荧光分子流经分子计数部分的 CCD 图及其对应的鉴定结果图

Salehi-Reyhani 等^[20]发展了一种微流控抗体捕获芯片(MAC chips),对单细胞中 P53 肿瘤抑制蛋白的丰度进行检测。该方法可以用于蛋白质间相互作用及磷酸化作用的研究,揭示细胞间蛋白质拷贝数差异。其原理如图 3 所示,单细胞利用光阱技术进入独立的分析微室,在冲击波的作用下得以裂解;释放出的目标蛋白被固定在表面的特异性抗体捕获;随后,荧光标记的二抗与

之结合形成“三明治”结构;最后,通过全内反射荧光显微镜对单细胞释放出的蛋白进行计数。该法适用于各种细胞各种蛋白的检测,无需基因工程操作,具有足够的精密度与准确度,可平行检测多重蛋白,其检测限为 100 个蛋白质分子。然而,其所使用的光阱技术难以操作大量细胞,检测通量相对较低,仅具有 7 个微室;且该实验的失败率较高,为 50%。

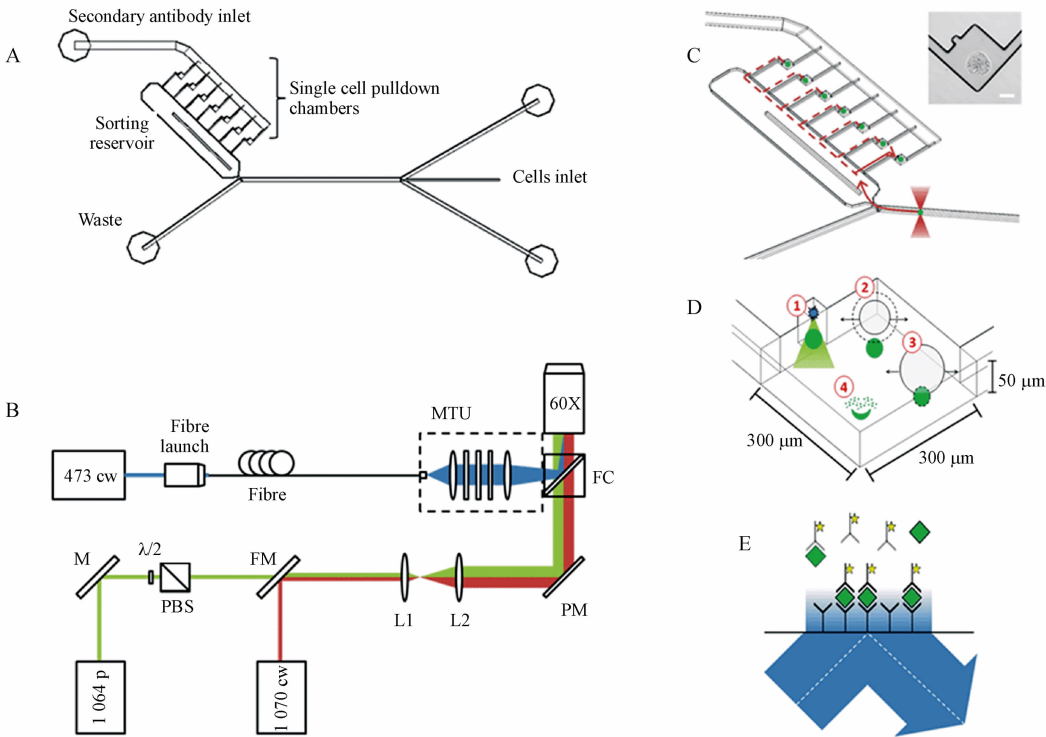


图 3 微流控抗体捕获芯片原理图^[20]
A:用于单细胞实验的装置示意图;B:光路示意图;C:利用光阱技术使单细胞进入独立分析微室;D:冲击波作用下裂解细胞;E:捕获并测定单细胞释放的蛋白质

Lu 等^[21]设计了一种高通量的单细胞分泌组分分析平台,以此来评估功能细胞的异质性。该方法可以用于临床的疾病诊断和治疗监测,也可用来对基础细胞生物学进行研究。其原理如图 4 所示,首先向微室阵列芯片中滴入单细胞悬液;然后,盖上含抗体条码阵列的玻片,以捕获单细胞分泌的蛋白质;继而进行类似“三明治”结构的免疫测定,利用荧光强度对蛋白质进行定量。该法可同时检测 14 种分泌蛋白、1 000 个单细胞,一次分析用时几小时到 1 d,其检测限约为 160 个蛋白质分子,但其无法保证一个微室正好捕获一个细胞。

2 微孔技术

微孔技术相比于全内反射荧光方法,可使酶在溶液中反应,而不是附着于表面^[22];其灵敏度高,可进行单分子检测。然而,不同微孔中存在浓度差异,且非特异性结合也会导致假阳性的出现。

2.1 数字化酶联免疫吸附测定法

Rissin 等^[23]利用由 50 fL 微室所组成的微孔板设计了一种数字化酶联免疫吸附测定(digital ELISA)方法,进行单分子血清蛋白的检测。该法可以通过对蛋白标志物的检测,来区分健康和疾病

状态,监测疾病进程。其原理如图 5 所示,单个蛋白质分子通过标准的 ELISA 试剂被抗体包被的磁珠所捕获;然后,将其分散在微孔板上,捕获到蛋白

质分子的磁珠符合泊松分布,且通过 ELISA 反应生成荧光产物;最后,利用光学显微镜获得其延时拍摄的荧光图像,进行单分子计数。

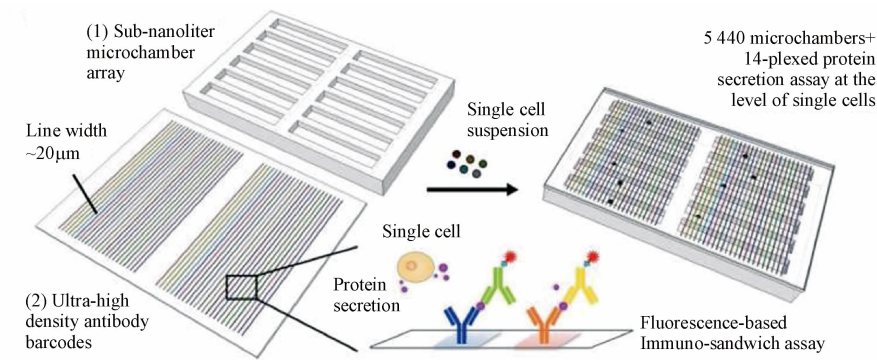


图 4 高通量单细胞分泌组分析技术原理图^[21]

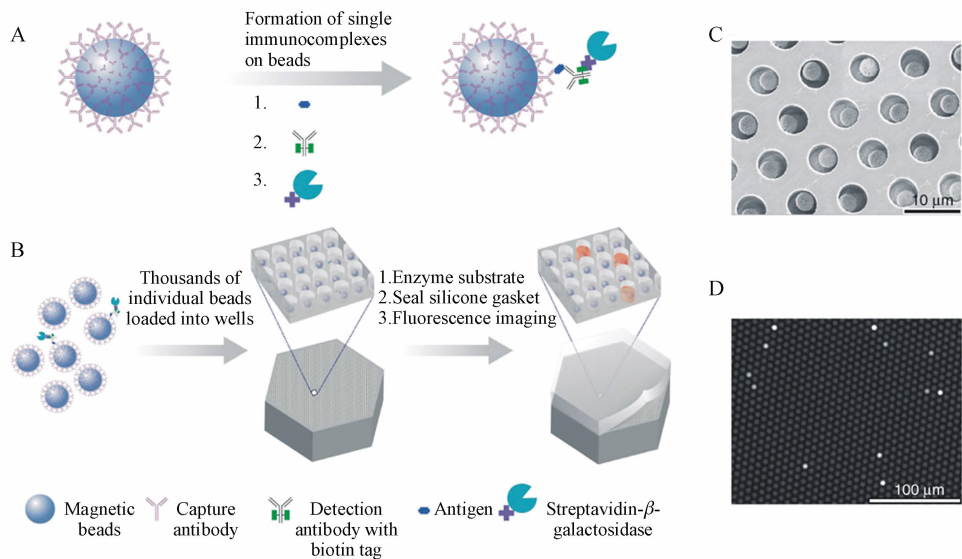


图 5 数字化 ELISA 技术原理图^[23]

A:利用标准 ELISA 试剂将单个蛋白质分子捕获并标记到磁珠上;B:将磁珠分散在微孔板上进行单分子荧光检测;C:微孔阵列局部扫描电子显微镜图;D:信号产生后的微孔阵列局部荧光图

该方法灵敏度高,理论上可进行单分子蛋白检测,但由于存在一定的背景信号,其检测限为 1×10^4 个蛋白质分子。此外,该课题组将其用于检测血清蛋白,若要应用于单细胞蛋白检测,仍需进行一定的改进。

2.2 单细胞蛋白质印迹法

Hughes 等^[24]发展了一种单细胞蛋白质印迹法 (single-cell Western blotting),测定蛋白介导的细胞间变异,在单细胞水平研究复杂细胞群。其原理如图 6 所示,在显微镜载玻片上包被一层含有

6 720 个微孔阵列的光敏聚丙烯酰胺凝胶;然后,细胞通过重力作用分布于微孔中;继而通过清洗、细胞裂解、聚丙烯酰胺凝胶电泳和紫外照射使细胞内蛋白质得以分离并固定于凝胶上;最后,通过不同一抗、二抗的循环标记与清洗过程检测不同的蛋白质,并以荧光强度对其进行定量。

该法能在 4 h 之内同时检测约 2 000 个单细胞,其检测限小于 30 000 个分子;且通过循环洗去和标记不同抗体以及二抗上标记不同的荧光染料可检测 11 重蛋白。然而,该法通过成像可见每个

微孔中一般含 0~4 个细胞,无法保证其正好含单个细胞。

2.3 基于 DNA 的纳米免疫测定法

Ganau 等^[25]发展了一种基于 DNA 的纳米免疫测定方法,进行细胞裂解产物中神经胶质原纤维酸性蛋白(GFAP)的无标记检测,研究肿瘤形成的分子特征,并将其应用于疾病诊断,指导临床治疗。其原理如图 7 所示,顶部微孔板首先固定单链 DNA(ssDNA),再通过碱基互补作用连接上链霉素

和素-DNA 偶联物,进而连接上生物素标记的抗体;然后,利用此表面修饰的微孔板去捕获单细胞裂解产物中的目标蛋白;最后,通过原子力显微镜(AFM)形貌分析来测定蛋白质含量。

该法可通过改变 DNA 链和捕获蛋白的抗体种类,进行多重蛋白检测;而且它不像 ELISA 反应那样需要两种不同的抗体,其检测一种目标蛋白仅需一种抗体。然而,该法无法保证每一个微孔中都正好含有一个细胞。

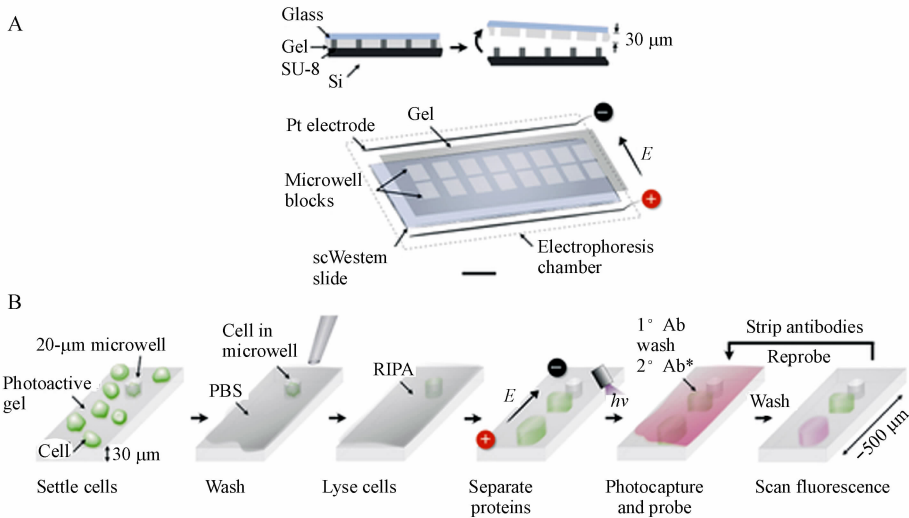


图 6 单细胞蛋白质印迹法原理图^[24]
A:显微镜载玻片包被一层含 6720 个微孔阵列的光敏聚丙烯酰胺凝胶;B:单细胞蛋白质印迹法流程图

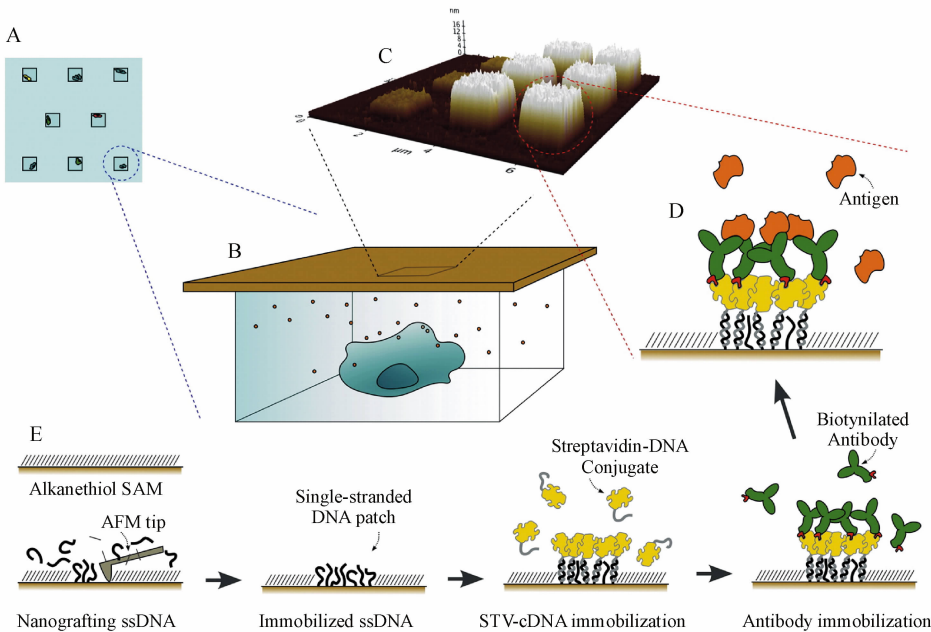


图 7 基于 DNA 的纳米免疫测定原理图^[25]
A:含单个细胞的微孔示意图;B:微孔中单细胞分泌一种感兴趣的蛋白质(抗原);C:基于 DNA 的纳米免疫传感器区域的典型原子力显微镜形貌图;D:纳米免疫传感器元素图;E:纳米免疫传感器形成原理图

3 光导纤维纳米生物传感器技术

Zheng 等^[4]构建了一种光导纤维纳米生物传感器(optical fiber nanobiosensor)技术,成功用于检测单个活细胞内端粒末端转移酶的过表达,以此检测肿瘤。其原理如图 8 所示,将固定了特异性抗体的纳米尖锥注入一个肿瘤细胞的细胞核,以此来捕获端粒末端转移酶;随后,进行体外 ELISA 反应,通过检测酶底物反应前后的荧光强度变化对单个活细胞端粒末端转移酶的表达量进行检测。

该法能检测单个活细胞,无需裂解、固定、渗透作用等制备过程,避免其可能造成的蛋白质构象的破坏,影响测定结果的准确性;它可检测到约 50 个端粒末端转移酶分子,也可用于单个活细胞中其他低表达蛋白的检测。然而,该法需要细胞培养,操作繁琐,技术要求高。

4 基于活性的荧光探针技术

Xu 等^[26]发展了一种基于活性的荧光探针(activity-based probe, ABP)的单细胞蛋白质组学新方法,对低丰度膜蛋白 GB1 受体及其可变剪切体进行鉴定。其原理如图 9 所示,从小鼠脑组织中分离出神经元细胞,利用 ABP 技术对其膜表面靶蛋白进行标记,并洗脱除去非特异性结合的 ABP;标记的单细胞被包裹在液滴中,在微流控芯片上形成阵列;随后通过微流控“板凳”带动毛细管的移动,并利用负压完成细胞的进样;单细胞在毛细管中裂解释放的蛋白质组通过毛细管电泳-激光诱导荧光

(CE-LIF) 系统进行检测。

该技术灵敏度高,能检测到约 500 多个蛋白质分子,达到单细胞检测水平;且具有较高的重现性,RSD 小于 0.1%。然而,该法使用负压吸入的方式进样,感兴趣的生长于器官和组织中的细胞往往由于与组织中其他结构结合紧密,难以取样。

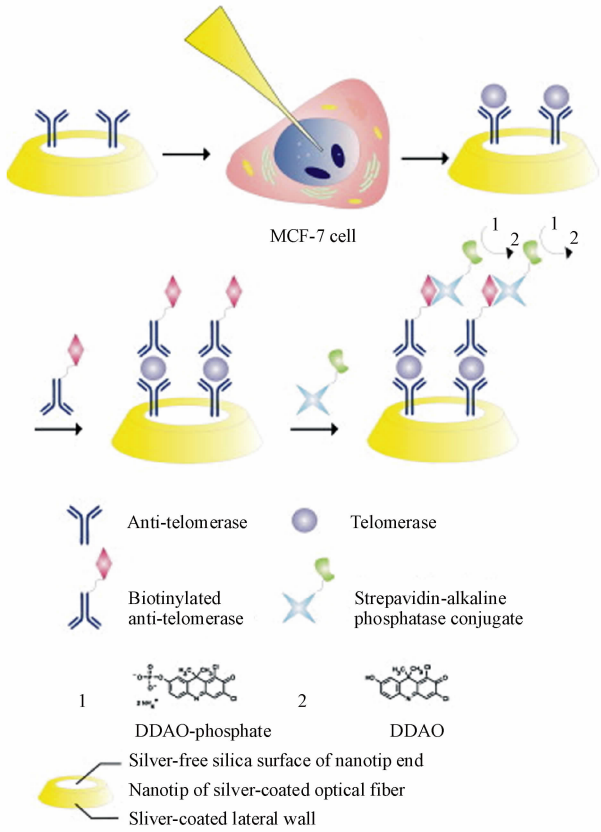


图 8 光导纤维纳米生物传感器技术原理图^[4]

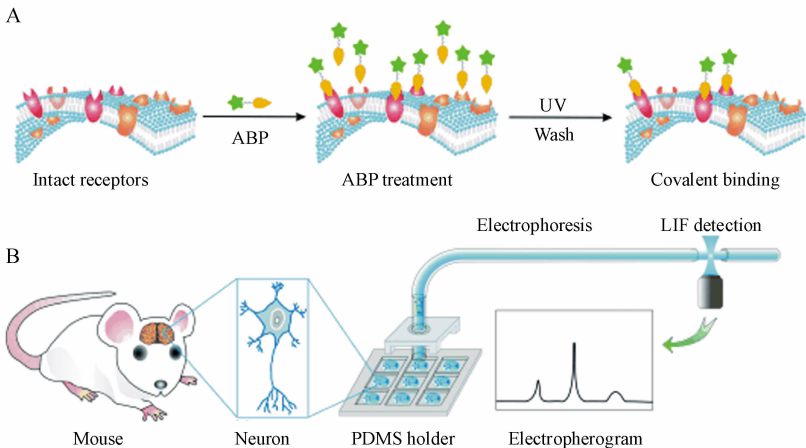


图 9 基于活性的荧光探针技术原理图^[26]
A: ABP 标记过程; B: 分离出的神经元细胞进行毛细管电泳-激光诱导荧光(CE-LIF)分析

5 质谱技术

质谱 (mass spectrometry, MS) 是目前常用的蛋白质组学分析技术,它无需标记^[27]、信息丰富^[28],可分析整个蛋白质组。然而,质谱法的灵敏度不够,检测单细胞中低丰度蛋白仍存在一定困难^[29],需要信号放大技术的支持,而且其仪器价格昂贵。

5.1 电喷雾离子化质谱技术

Mellors 等^[30]将细胞裂解、毛细管电泳 (CE) 和电喷雾离子化质谱 (ESI-MS) 整合到一张微流控芯片上,对单细胞进行自动化的实时分析。其原理如图 10 所示,贮存于细胞贮藏室 C 的细胞悬液在电压作用下,流至细胞裂解交叉口,裂解释放的内容物通过毛细管电泳得以分离,进入电喷雾接口,继而利用 ESI-MS 对目标蛋白进行测定。

该法每分钟能检测约 12 个单细胞,但其仅能检测细胞结构相对简单的高丰度蛋白,如红细胞中血红蛋白(每个红细胞中约含 10^8 个血红蛋白分子)。因此,需进一步提高该方法的灵敏度和分离效率,以实现单细胞中低丰度蛋白的快速检测。

5.2 质谱流式细胞技术

Bendall 等^[31]利用质谱流式细胞技术 (mass cytometry) 将流式细胞术与质谱技术相结合,同时测定单个健康人骨髓细胞的 34 种参数,对免疫细胞的应答模式进行轮廓分析。其原理如图 11 所示,利用含不同过渡金属同位素标签的抗体标记细胞,被标记的细胞随后进入质谱流式细胞仪,逐个喷出单细胞微滴,进入电感耦合等离子体质谱 (ICP-MS) 装置,通过对每个细胞中各种过渡金属元素标签进行定量检测,进而得知每个细胞中各目标蛋白的含量。

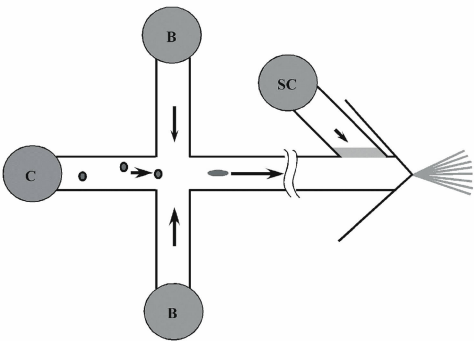


图 10 整合细胞裂解-CE-MS 的微流控芯片原理图^[30]
B:缓冲液贮存室;C:细胞贮存室;SC:电喷雾侧边通道

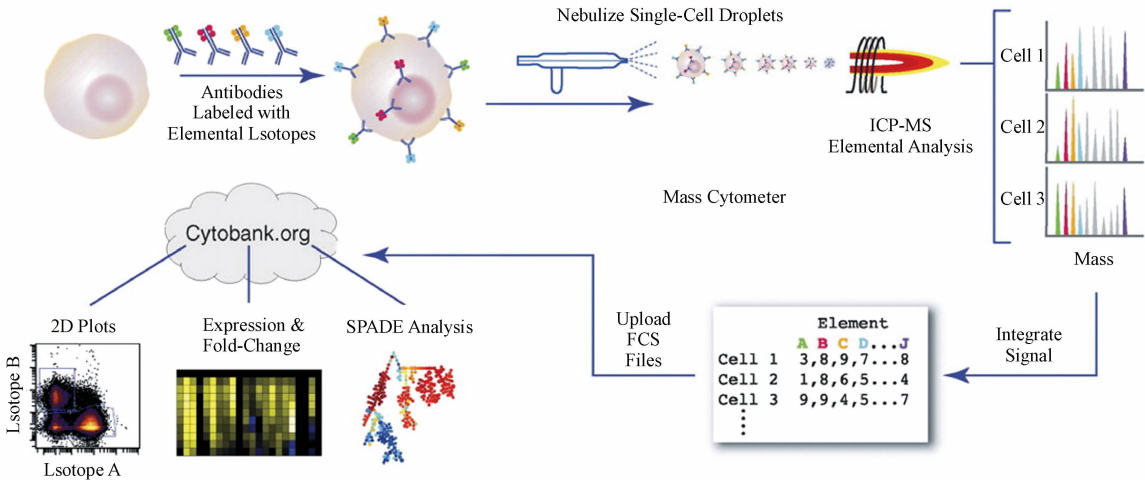


图 11 质谱流式细胞技术原理图^[31]

该法既具有传统流式细胞仪高速分析的特点,又具有质谱检测的高分辨能力;其 ICP-MS 装置具有非常宽的原子量检测范围 (88 ~ 210),可以进行多重检测,同时测定上百个不同的参数,且各通道

间无干扰;此外,由于金属标签与细胞组分的非特异性结合能力非常低,其背景信号极低^[32]。然而,该法的灵敏度比某些荧光检测方法低,且其高通量带来信息量的成倍增长,数据处理复杂。

5.3 同位素标记的 NanoSIMS 质谱成像技术

质谱成像 (mass spectrometry imaging, MSI) 技术是一种结合质谱分析和影像可视化的分子成像技术,它不需要任何特异性标记,一般针对生物组织样品可进行多点检测、多维数据获取,可实现多种分子高灵敏度的同时检测,并能够直接提供目标化合物的空间分布和分子结构信息。其原理如图

12 所示,首先获取和处理待测样本;然后利用质谱仪使样本表面的分子或离子解吸离子化,进入质量分析器,得到样本表面各像素点离子的质荷比和离子强度;再通过质谱成像软件处理后,可获得对应分子或离子在样本表面的二维分布图;最后对样本连续切片的二维分布图进一步处理,可获得待测物在样本中的三维质谱成像图^[33]。

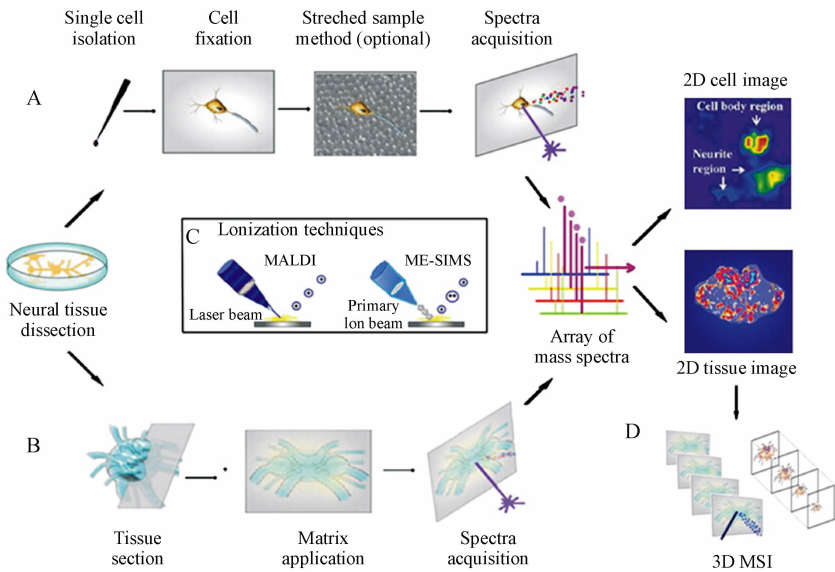


图 12 质谱成像技术原理图^[33]
A: 单细胞质谱成像流程图; B: 组织切片质谱成像流程图; C: 离子化技术; D: 三维质谱成像图获取原理

Delaune 等^[34]将同位素标记的 NanoSIMS 质谱成像技术成功用于单细胞中高丰度蛋白的检测。同位素标记的 NanoSIMS 质谱成像技术以动态二次离子 (D-SIMS) 为离子源,不仅能测定单细胞中目标蛋白的丰度,而且能得到其分布情况。然而,该技术仍存在一定缺陷:需要特定的离子源,仪器价格昂贵,操作难度高,不易普及;需要进行同位素标记,同位素选取种类有限,价格昂贵;检测通道数量有限,检测通量低;且由于检测限 (amol) 的限制,单细胞中只有高丰度的蛋白质才能被检测到^[35]。

6 总结与展望

蛋白质种类繁多、相对分子质量大,常规的检测方法灵敏度有限,难以准确定量多种蛋白,加之

单细胞体积微小,蛋白组成复杂且含量极低,这都导致单细胞蛋白定量检测存在一定的难度。然而,定量检测单细胞蛋白对疾病诊断、疾病发生机制研究和预后评价等具有重要意义。例如,乳腺癌依据蛋白标志物进行了 luminal A、luminal B、HER-2 过表达和基底样等分子分型;美国、欧盟根据蛋白表达量变化指导临床治疗,分别于 1998 年、2000 年批准曲妥珠单抗联合紫杉醇治疗 HER-2 过表达型乳腺癌。因此,对单细胞蛋白定量检测方法的研究以高灵敏度、高特异性、多重检测为目标仍在不断发展。各种单细胞蛋白定量检测方法的特点如表 1 所示。

随着科学技术的进步,高灵敏度、高特异性、低成本的多重单细胞蛋白定量检测方法必将出现并应用于临床,为人类健康作出贡献。

表 1 单细胞蛋白定量检测方法的特点

检测方法	可检测蛋白质分子个数	检测重数	优 点	缺 点
1. 微流控技术	因装置不同而异,约 10~10 ³	因装置不同而异,一般多重	高通量,高效益,快速准确,样本和试剂用量少	需要自制微流控装置,难以保证一个微室正好捕获一个细胞
2. 微孔技术			高通量,高灵敏	不同微孔中存在浓度差异,难以保证一个微孔正好捕获一个细胞
(1) 数字化酶联免疫吸附测定法	1×10 ⁴	单重		
(2) 单细胞蛋白质印迹法	<3×10 ⁴	11 重		
(3) 基于 DNA 的纳米免疫测定法	/	多重		
3. 光导纤维纳米生物传感器技术	~50	单重	无需裂解、固定、渗透作用等制备过程,可检测活细胞	需培养细胞,操作繁琐,技术要求高
4. 基于活性的荧光探针技术	~500	多重	灵敏度高,重现性高	取样困难
5. 质谱技术	/	多重	无需标记,信息丰富,可分析整个蛋白质组	灵敏度较低,仪器价格昂贵
(1) 电喷雾离子化质谱技术	/	多重		
(2) 质谱流式细胞技术	/	多重		
(3) 同位素标记的 NanoSIMS 质谱成像技术	1×10 ⁵	多重		

参 考 文 献

[1] Cohen D, Dickerson JA, Whitmore CD, *et al.* Chemical cytometry: fluorescence-based single-cell analysis [J]. *Annu Rev Anal Chem (Palo Alto Calif)*, 2008, **1**: 165 – 190.

[2] Lecault V, Vaninsberghe M, Sekulovic S, *et al.* High-throughput analysis of single hematopoietic stem cell proliferation in microfluidic cell culture arrays [J]. *Nat Methods*, 2011, **8** (7) : 581 – 586.

[3] Spiller DG, Wood CD, Rand DA, *et al.* Measurement of single-cell dynamics [J]. *Nature*, 2010, **465** (7299) : 736 – 745.

[4] Zheng XT, Li CM. Single living cell detection of telomerase over-expression for cancer detection by an optical fiber nanobiosensor [J]. *Biosens Bioelectron*, 2010, **25** (6) : 1548 – 1552.

[5] Chattopadhyay PK, Gierahn TM, Roederer M, *et al.* Single-cell technologies for monitoring immune systems [J]. *Nat Immunol*, 2014, **15** (2) : 128 – 135.

[6] Mu X, Zheng W, Sun J, *et al.* Microfluidics for manipulating cells [J]. *Small*, 2013, **9** (1) : 9 – 21.

[7] Sims CE, Allbritton NL. Analysis of single mammalian cells on-chip [J]. *Lab Chip*, 2007, **7** (4) : 423 – 440.

[8] Yin H, Marshall D. Microfluidics for single cell analysis [J]. *Curr Opin Biotechnol*, 2012, **23** (1) : 110 – 119.

[9] Borland LM, Kottogoda S, Phillips KS, *et al.* Chemical analysis of single cells [J]. *Annu Rev Anal Chem (Palo Alto Calif)*, 2008, **1**: 191 – 227.

[10] Whitesides GM. The origins and the future of microfluidics [J]. *Nature*, 2006, **442** (7101) : 368 – 373.

[11] Huang B, Wu H, Bhaya D, *et al.* Counting low-copy number proteins in a single cell [J]. *Science*, 2007, **315** (5808) : 81 – 84.

[12] Wei W, Shin YS, Ma C, *et al.* Microchip platforms for multiplex single-cell functional proteomics with applications to immunology and cancer research [J]. *Genome Med*, 2013, **5** (8) : 75.

[13] Shin YS, Ahmad H, Shi Q, *et al.* Chemistries for patterning robust DNA microbarcodes enable multiplex assays of cytoplasm proteins from single cancer cells [J]. *Chemphyschem*, 2010, **11** (14) : 3063 – 3069.

[14] Ma C, Fan R, Ahmad H, *et al.* A clinical microchip for evaluation of single immune cells reveals high functional heterogeneity in phenotypically similar T cells [J]. *Nat Med*, 2011, **17** (6) : 738 – 743.

[15] Ahmad H, Sutherland A, Shin YS, *et al.* A robotics platform for automated batch fabrication of high density, microfluidics-based DNA microarrays, with applications to single cell, multiplex assays of secreted proteins [J]. *Rev Sci Instrum*, 2011, **82** (9) : 094301.

[16] Shi Q, Qin L, Wei W, *et al.* Single-cell proteomic chip for profiling intracellular signaling pathways in single tumor cells [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012, **109** (2) : 419 – 424.

[17] Wang J, Tham D, Wei W, *et al.* Quantitating cell-cell interaction functions with applications to glioblastoma multiforme cancer cells [J]. *Nano Lett*, 2012, **12** (12) : 6101 – 6106.

[18] Deng Y, Zhang Y, Sun S, *et al.* An integrated microfluidic chip system for single-cell secretion profiling of rare circulating tumor cells [J]. *Sci Rep*, 2014, **4**: 7499.

[19] Bailey RC, Kwong GA, Radu CG, *et al.* DNA-encoded antibody libraries: a unified platform for multiplexed cell sorting and detection of genes and proteins [J]. *J Am Chem Soc*, 2007, **129**

- (7);1959–1967.
- [20] Salehi-Reyhani A, Kaplinsky J, Burgin E, *et al.* A first step towards practical single cell proteomics: a microfluidic antibody capture chip with TIRF detection[J]. *Lab Chip*, 2011, **11**(7): 1256–1261.
- [21] Lu Y, Chen JJ, Mu L, *et al.* High-throughput secretomic analysis of single cells to assess functional cellular heterogeneity[J]. *Anal Chem*, 2013, **85**(4): 2548–2556.
- [22] Walt DR. Protein measurements in microwells[J]. *Lab Chip*, 2014, **14**(17): 3195–3200.
- [23] Rissin DM, Kan CW, Campbell TG, *et al.* Single-molecule enzyme-linked immunosorbent assay detects serum proteins at subfemtomolar concentrations[J]. *Nat Biotechnol*, 2010, **28**(6): 595–599.
- [24] Hughes AJ, Spelke DP, Xu Z, *et al.* Single-cell western blotting[J]. *Nat Methods*, 2014, **11**(7): 749–755.
- [25] Ganau M, Bosco A, Palma A, *et al.* A DNA-based nano-immunoassay for the label-free detection of glial fibrillary acidic protein in multicell lysates[J]. *Nanomedicine*, 2015, **11**(2): 293–300.
- [26] Xu F, Zhao H, Feng X, *et al.* Single-cell chemical proteomics with an activity-based probe: identification of low-copy membrane proteins on primary neurons[J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2014, **53**(26): 6730–6733.
- [27] Norris JL, Caprioli RM. Analysis of tissue specimens by matrix-assisted laser desorption/ionization imaging mass spectrometry in biological and clinical research[J]. *Chem Rev*, 2013, **113**(4): 2309–2342.
- [28] Zenobi R. Single-cell metabolomics: analytical and biological perspectives[J]. *Science*, 2013, **342**(6163): 1243259.
- [29] Wu M, Singh AK. Single-cell protein analysis[J]. *Curr Opin Biotechnol*, 2012, **23**(1): 83–88.
- [30] Mellors JS, Jorabchi K, Smith LM, *et al.* Integrated microfluidic device for automated single cell analysis using electrophoretic separation and electrospray ionization mass spectrometry[J]. *Anal Chem*, 2010, **82**(3): 967–973.
- [31] Bendall SC, Simonds EF, Qiu P, *et al.* Single-cell mass cytometry of differential immune and drug responses across a human hematopoietic continuum[J]. *Science*, 2011, **332**(6030): 687–696.
- [32] Bendall SC, Nolan GP, Roederer M, *et al.* A deep profiler's guide to cytometry[J]. *Trends Immunol*, 2012, **33**(7): 323–332.
- [33] Ye H, Greer T, Li L. Probing neuropeptide signaling at the organ and cellular domains via imaging mass spectrometry[J]. *J Proteomics*, 2012, **75**(16): 5014–5026.
- [34] Delaune A, Cabin-Flaman A, Legent G, *et al.* 50nm-scale localization of single unmodified, isotopically enriched, proteins in cells[J]. *PLoS One*, 2013, **8**(2): e56559.
- [35] Passarelli MK, Ewing AG. Single-cell imaging mass spectrometry[J]. *Curr Opin Chem Biol*, 2013, **17**(5): 854–859.

· 校园信息 ·

中国药科大学 2015 年国家自然科学基金 资助项目创历史新高

近日,国家自然科学基金网站发布了“关于公布 2015 年度国家自然科学基金申请项目评审结果的通告”。通告结果显示,我校共有 97 个项目获得立项资助,总资助金额 4 042.6 万。其中面上项目 49 项,青年科学基金项目 47 项,重点项目 1 项。

中国药科大学今年共申报国家基金项目 250 项,创历史新高;申报项目形式审查通过率 100%;立项数排名全国高校 83 位,较 2014 年上升 14 位,比 2014 年净增 35 项,净增长率达 56.45%,在全国 TOP100 中立项增长率位居第 4。我校项目申报中标率达 38.80%,远远高于全国 22.5% 的中标率。立项总数、中标率均创我校国家自然科学基金项目申报工作历史新高。

(本刊讯)