

· 药学前沿 ·

## 单细胞蛋白质成像方法进展

姚春露, 张惟杰, 张云龙, 邓朝霞, 王梦灵, 张左玲, 王琛, 宋沁馨, 邹秉杰\*

(中国药科大学 药物质量与安全预警教育部重点实验室, 南京 210009)

**摘要** 单细胞蛋白质的差异化表达及其亚细胞定位同机体的生理状态和病理机制密切相关。单细胞蛋白质原位成像方法的发展为空间单细胞蛋白质组学研究以及单细胞蛋白图谱绘制提供了强有力的工具。本文对近几年开发的基于抗体有序多轮孵育的循环免疫荧光成像、基于金属元素标签抗体的质谱成像、基于抗体 DNA 条形码的荧光成像、基于基因编码的荧光蛋白成像、基于拉曼光谱或 X 射线的光谱成像等单细胞蛋白质成像方法进行了总结, 并对它们的成像原理作简要说明。文章重点关注了这些方法的多重性能、成像分辨率以及信号放大性能, 并分析了它们在实际科研和临床工作中的应用特点, 希望为新的单细胞蛋白质成像方法的开发提供参考, 并为生物医学和精准医学的发展提供助力。

**关键词** 单细胞蛋白质; 免疫荧光; 质谱成像; 荧光蛋白; 光谱成像; 进展

中图分类号 R318 文献标志码 A 文章编号 1000-5048(2024)02-0147-11

doi: 10.11665/j.issn.1000-5048.2024010205

引用本文 姚春露, 张惟杰, 张云龙, 等. 单细胞蛋白质成像方法进展 [J]. 中国药科大学学报, 2024, 55(2): 147–157.

Cite this article as: YAO Chunlu, ZHANG Weijie, ZHANG Yunlong, et al. Progress of single-cell protein imaging methods[J]. *J China Pharm Univ*, 2024, 55(2): 147–157.

## Progress of single-cell protein imaging methods

YAO Chunlu, ZHANG Weijie, ZHANG Yunlong, DENG Zhaoxia, WANG Mengling, ZHANG Zuoling, WANG Chen, SONG Qinxin, ZOU Bingjie\*

Key Laboratory of Drug Quality Control and Pharmacovigilance of Ministry of Education, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

**Abstract** The differential expression and subcellular localization of single-cell proteins are closely related to the physiological state and pathological mechanisms of the body. The development of single-cell protein *in situ* imaging methods provides powerful tools for spatial single-cell proteomics research and single-cell protein profiling. This article summarizes the single-cell protein imaging methods developed in recent years, including the circulating immunofluorescence imaging methods based on ordered multi-round antibody incubation, mass spectrometry imaging based on metal element labeled antibodies, fluorescence imaging based on DNA-barcoded antibody, gene encoded fluorescence protein imaging and spectral imaging based on Raman spectroscopy or X-ray spectroscopy, with brief explanation of the imaging principles of these methods. It focuses on the multiple performance, imaging resolution and signal amplification performance of these methods, and analyzes their application characteristics in practical scientific research and clinical work, in the hope of providing some reference for the development of more revolutionary single-cell imaging methods, and promoting the development of biomedical and precision medicine.

**Key words** single-cell protein; immunofluorescence; mass spectrometry imaging; fluorescent protein; spectral

收稿日期 2024-01-02 \* 通信作者 Tel: 13851938672 E-mail: zbj523@163.com

**基金项目** 国家自然科学基金项目 (No. 82173780); 江苏省重点研发计划社会发展面上项目 (No. BE2023843); 药物质量与安全预警教育部重点实验室资助项目 (No. DQCP20/21MS04); 江苏省研究生科研与实践创新计划项目 (No. KYCX23-0854); 大学生创新创业训练计划项目 (No. 2023103161187)

imaging; progress

This study was supported by the National Natural Science Foundation Project (No. 82173780); the Jiangsu Province Key R&D Program Social Development General Project (No. BE2023843); the Key Laboratory of Drug Quality and Safety Early Warning of the Ministry of Education (No. DQCP20/21MS04); Jiangsu Province Graduate Research and Practice Innovation Program (No. KYCX23-0854); and the Achievements of the College Student Innovation and Entrepreneurship Training Program Project (No. 2023103161187)

细胞是人体结构和功能的基本单位,而蛋白质是细胞内提供结构、传递基因组信息、调节基因表达、控制信号传导、催化代谢反应和运输物质的基本生物大分子,是细胞生命活动的主要承担者<sup>[1]</sup>。对蛋白质的结构、功能和含量的研究有助于了解人体生理结构功能<sup>[2]</sup>、疾病发生机制<sup>[3]</sup>、信号调节<sup>[4]</sup>等生物学过程,从而为疾病的诊断和治疗提供依据。

早期的蛋白质分析方法大多在组织水平上开展研究,以反映一种或多种蛋白质表达的群体平均特征<sup>[5]</sup>。然而,细胞异质性研究<sup>[6]</sup>表明,即使在同一起来源的培养细胞中,细胞表型也不尽相同。这是由于尽管人体中的细胞共享几乎相同的基因组,但经历转录、翻译以及翻译后修饰等过程<sup>[7]</sup>之后,其蛋白质表型往往千差万别,以此来发挥机体多样化的生物功能。人类细胞图谱计划(human cell atlas project, HCAP)<sup>[8]</sup>和人类生物分子图谱计划(human biomolecular atlas program, HuBMAP)<sup>[9]</sup>强调了相较于组织水平,单细胞水平的分析可以更加全面地揭示蛋白质的表达模式。

空间蛋白质组学技术<sup>[10]</sup>的发展揭示了蛋白质受到严格调控的亚细胞定位与机体疾病和健康的密切关系。在分析蛋白质的表达含量的同时,获取单细胞蛋白质的空间位置信息有助于对蛋白质生理功能、疾病发生机制和药物治疗机制进行更加全面深入的解读。例如,研究发现,人表皮生长因子受体 2(human epidermal growth factor receptor 2, HER2)蛋白具有核膜和细胞质膜两种定位模式<sup>[11]</sup>、中国仓鼠卵巢细胞(CHO 细胞系)膜上的白细胞分化抗原 20(CD20)受体在药物利妥昔单抗处理前后分别具有二聚体和高阶链状结构<sup>[12]</sup>。

单细胞蛋白质成像方法<sup>[13]</sup>可以将蛋白质的空间位置和表达量同时可视化,便于直观研究单细胞蛋白质的功能状态及其与疾病发生的内在关联。本文对近几年涌现出的单细胞蛋白质成像方法进行分类总结,并对它们的基本原理和应用优势等作简要介绍,重点关注了方法的多重性能、成像分辨

率和信号放大性能,以期新的单细胞蛋白质成像方法的开发提供参考,并为生物医学和精准医学的发展提供助力。

## 1 基于抗体有序多轮孵育的单细胞蛋白质荧光成像

抗原抗体结合是单细胞蛋白质外源性成像方法的核心原理,抗体对靶标蛋白质识别的高特异性和结合亲和力保证了成像的准确性和选择性<sup>[14]</sup>。免疫荧光(immunofluorescence, IF)<sup>[15]</sup>方法利用荧光基团标记的抗体识别单细胞靶标抗原,能够特异性地成像靶标蛋白质。然而,荧光显微镜有限的通道数和荧光基团的光谱重叠限制了免疫荧光成像方法的进一步发展,传统的免疫荧光成像最多只能同时成像 3~5 种蛋白质靶标。因此,研究人员致力于打破这些限制,开发更高多重的单细胞蛋白质免疫荧光成像方法。

Gerdess 等<sup>[16]</sup>提出了多重免疫荧光(multiplexed tissue immunofluorescence, MxIF)方法,在每轮成像过后使用碱性氧化化学策略在 15 min 内消除花青基染料荧光,之后再进行下一轮抗体孵育及成像。该方法为单细胞蛋白质的高通量荧光成像提供了思路。Lin 等<sup>[17]</sup>开发的循环免疫荧光(cyclic immunofluorescence, CycIF)方法(如图 1 所示)使用过氧化氢氧化使荧光基团失去活性,清洗过后再进行下一轮抗体孵育,以此实现多重成像。该方法对 15 种靶标进行了分析,降低了成像成本。Gut 等<sup>[18]</sup>提出的迭代间接免疫荧光成像(4i)方法,可在同一细胞样品中实现 40 种蛋白质成像,进一步提高了检测通量。这几种方法均使用了化学应对荧光基团进行灭活处理来实现迭代免疫荧光成像。

Mondal 等<sup>[19]</sup>介绍了化学可切割荧光抗体(cleavable fluorescent anti bodies, CFAs)方法(如图 2 所示),使用一种新的叠氮基可切割连接体来连接抗体与荧光基团,一轮成像结束后,启动化学反应断裂连接体,清洗去除荧光基团后再进行下一轮免

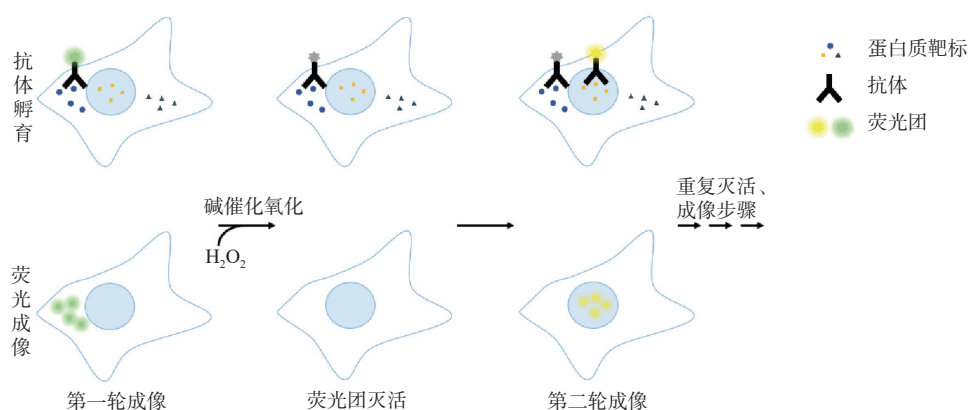


图 1 循环免疫荧光(CycIF)方法成像原理

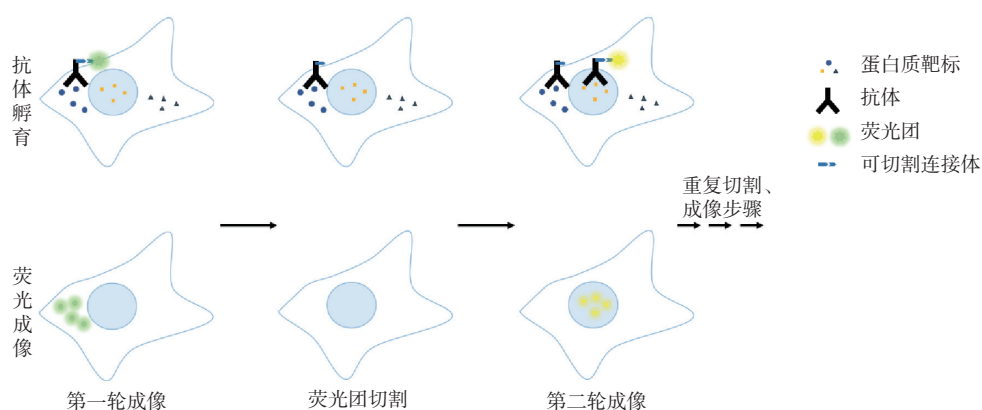


图 2 化学可切割荧光抗体(CFAs)成像原理

疫染色与成像。Ko 等<sup>[20]</sup>展示的分裂加速荧光团交换 (scission-accelerated fluorophore exchange, SAFE) 方法, 利用对生物体无毒的快速生物正交点击化学反应断裂荧光基团的结构, 以此来去除成像后的荧光基团, 实现了对活细胞的多重时空成像。这类方法是通过分离抗体和成像后的荧光基团来实现迭代成像。

上述方法利用抗体的多轮孵育迭代成像以及不同的荧光淬灭方法打破了荧光光谱重叠的限制, 实现了多重免疫荧光成像, 加速了免疫荧光成像研究的进程。然而, 抗体的迭代孵育过程非常耗时 (每轮孵育需数小时); 抗体剥离过程可能对单细胞抗原表位造成潜在的破坏, 对多重成像的质量产生影响; 缺少了对于荧光信号的放大, 只有使用分辨率较高的显微镜才能成像, 增加了成像成本。

## 2 单细胞蛋白质谱成像

质谱法 (mass spectrometry, MS)<sup>[21]</sup> 通过分子电离和质量分析获得分子的质荷比 ( $m/z$ ) 信息, 并通过

分子量计算及结构分析来推断待测物的种类。质谱成像<sup>[22]</sup> 方法使用离子束或激光对细胞样品进行逐像素扫描, 得到的离子通过质谱仪检测, 而后将质谱仪的检测数据整理重构还原为单细胞蛋白质的空间表达量图谱。这类方法以质荷比为依据来区分靶标蛋白质, 可以规避样品的生物自发荧光对成像的背景干扰, 显著降低成像的背景信号; 样品扫描和数据采集一次性完成, 避免了迭代过程对抗原表位的潜在损伤; 且使用带有不同金属同位素标签的抗体可以实现对单细胞蛋白质更高多重的成像。

多重离子束成像质谱 (multiplexed ion beam imaging, MIBI)<sup>[23]</sup> 用同位素纯元素金属报告标签标记的抗体对细胞样品进行免疫孵育 (如图 3 所示), 然后用二次离子质谱法对样品进行成像。这类方法可以同时分析 100 种靶标蛋白质, 且其分辨率可与高倍光学显微镜所达到的分辨率相媲美。

成像质量细胞术 (imaging mass cytometry, IMC)<sup>[24]</sup> (如图 4 所示) 将稀土金属标签标记的抗体用于免疫孵育, 然后用电感耦合等离子体质谱法对

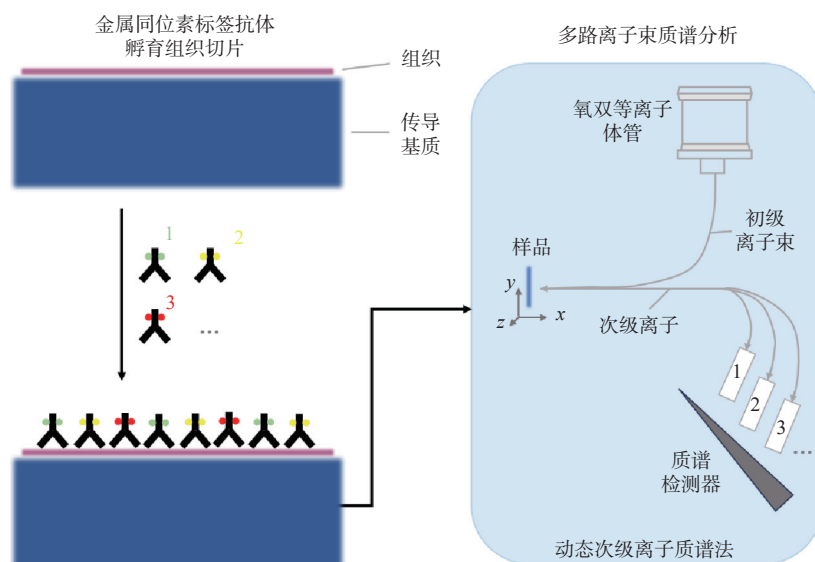


图 3 多路离子束成像质谱(MIBI)成像原理

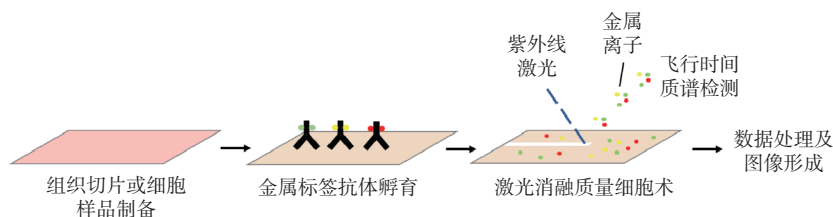


图 4 成像质量细胞术(IMC)成像原理

其进行激光消融,通过质谱仪分析来获得成像数据。该方法能达到  $1\ \mu\text{m}$  的横向分辨率,且可以对 40 多种靶标同时检测。Hosogane 等<sup>[25]</sup>将 IMC 方法与 DNA 信号扩增的 SABER(signal amplification by exchange reaction)方法联用来提高成像的灵敏度,使用稀土金属标签标记的 DNA 成像链对单细胞低丰度靶标蛋白质进行成像,拓宽了 IMC 方法的应用范围。

基质辅助激光解吸/电离(matrix-assisted laser desorption ionisation, MALDI)<sup>[26]</sup>技术是质谱法中常用于生物样本分析的一种软电离方式。方法使用辅助基质与样品表面分子形成共结晶薄膜,基质从照射到样品表面的激光中吸收能量使样品表面分子电离,产生分子离子用于质谱仪检测。基于 MALDI 的质谱成像不需要使用抗体,是一种无标记的成像方式。Kompauer 等<sup>[27]</sup>介绍的大气压基质辅助激光解吸/电离(MALDI)质谱成像方法,横向分辨率为  $1.4\ \mu\text{m}$ 。Niehaus 等<sup>[28]</sup>的透射模式几何结构基质辅助激光解吸电离质谱成像(t-MALDI-MSI)方法改进了激光照射的透镜结构,获得了小

于  $1\ \mu\text{m}$  的像素尺寸,在脑组织中的像素尺寸可达  $600\ \text{nm}$ 。

质谱成像具有高度机械化和自动化的特点,易于商业化应用。然而,质谱数据采集过程大多需要在真空条件下进行,方法对于分析环境、仪器设备及专业操作人员都有较高的要求,这限制了这类方法的进一步推广。且由于靶标离子化过程中使用的离子束或激光束的直径限制,目前报道的质谱成像方法的分辨率停留在微米或亚微米级别,对单细胞精细结构的成像能力有待提高。

### 3 基于抗体 DNA 条形码的单细胞蛋白质荧光成像

DNA 碱基配对的可编程性<sup>[29]</sup>使其能够用于大规模的信息传递,把 DNA 寡核苷酸单链与抗体结合起来,通过将 DNA 链的序列设计成条形码来区分不同的抗体,从而进一步区分抗体所对应的靶标蛋白质。这一思路大幅提高了单细胞蛋白质成像的通量,部分解决了重复抗体孵育耗时的问题;且能够引入概率成像模式,有利于成像分辨率的提高。



Jungmann 等<sup>[30]</sup>提出的 DNA 点积累纳米形貌成像 (points accumulation for imaging nanoscale topography, DNA-PAINT) 方法, 利用 DNA 条形码来实现单细胞蛋白质的高分辨率成像。方法对短 DNA 成像链与靶标抗体上 DNA 条形码瞬时结合的过程进行连续监测, 获得了小于 30 nm 成像分辨率。Chung 等<sup>[31]</sup>进行了 DNA 成像链设计的改进, 通过引入类似分子信标的茎环结构和个别碱基对不匹配, 精确控制了成像链的结合动力学, 进一步

提高了成像精度和速度, 同时减少了背景信号的干扰。Reinhardt 等<sup>[12]</sup>利用双色交换 DNA-PAINT 进一步提高了成像精度(如图 5 所示), 获得了亚纳米级的分辨率, 可用于单细胞精细结构的准确成像。然而 DNA-PAINT 方法分辨率的提高是以牺牲速度为代价的, 无法满足临床对于单细胞蛋白快速诊断的需求; 方法需使用昂贵的超分辨率显微镜, 成像成本较高, 仅适用于对少数靶标的精细成像, 在单细胞蛋白质多重成像方面的应用有限。

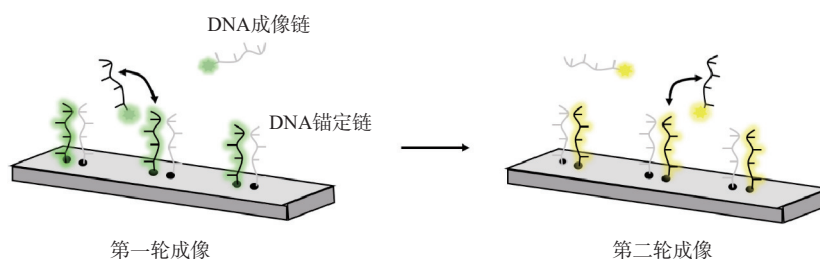


图 5 双色 DNA 点积累纳米形貌成像(DNA-PAINT)方法成像原理

Wang 等<sup>[32]</sup>提出的 DNA 交换成像 (DNA exchange imaging, DEI) 方法实现了快速有序的原位单细胞蛋白质成像。他们利用 DNA 条形码标签偶联的抗体对样本进行免疫孵育, 然后使用与条形码互补配对的 DNA 成像链(不同荧光基团修饰)对不同靶标进行成像。一轮成像结束后, 使用缓冲液快速地解离 DNA 成像链(10 min 以内), 洗涤后再进行下一轮成像。该方法只需要一次抗体孵育, 将抗体迭代过程替换为耗时更短的 DNA 配对及解链

过程, 这一设计大幅提高了多重成像的速度。

Goltsev 等<sup>[33]</sup>提出的索引共检测 (co-detection by indexing, CODEX) 方法(如图 6 所示)在一次抗体孵育之后, 利用不同荧光核苷酸 dNTP 的原位聚合实现了快速高多重的单细胞蛋白质成像。该方法的特点是每轮成像只采集一对 DNA 成像链的荧光信号, 适用于分析成对蛋白质的相互作用及其变化与疾病的关系。

Zhao 等<sup>[34]</sup>提出的多路原位标记 (multiplex in

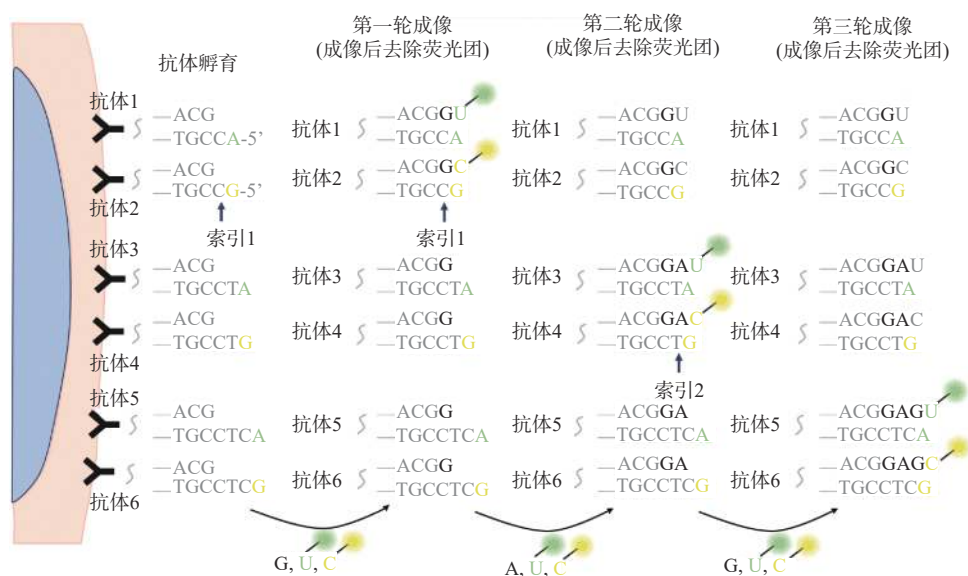


图 6 索引共检测(CODEX)方法成像原理

*situ* tagging, MIST)策略,将多色、多周期分子分析技术与条形码微珠抗体阵列和 DNA 编码抗体库相结合,检测 20 种靶标蛋白质,解码只需要使用 3 种荧光颜色、3 个连续的漂白和成像周期。该方法引入了荧光颜色顺序编码,可以快速分析单细胞中数十到数百种靶标,具有较高的成像通量。Makino 等<sup>[35]</sup>使用杂交链式反应(hybridization chain reaction, HCR)<sup>[36]</sup>开发了变色荧光条形码(color-changing fluorescent barcode, CCFB)方法(如图 7 所示)。他们在同一 DNA 条形码上杂交了多种颜色的成像链和对应的荧光淬灭链,条形码最初只呈现一种荧光颜色。一轮成像过后,置换下荧光淬灭链,呈现出相邻成像链的荧光颜色。该方法可以一次性杂交所有 DNA 成像链,再依次按顺序变换颜色,实现了同一靶标的有序颜色变化编码,使得成像通量呈指数级上升,使用  $m$  种颜色和  $n$  次成像可检测  $m^n$  种靶标,同时进一步提高了成像速度。

这些方法通过对于抗体上 DNA 条形码互补配对的 DNA 成像链的信号进行迭代检测,消除了耗时的多次抗体孵育过程,提高了成像速度和多重

性。然而,这些方法由于没有对抗体上的 DNA 条形码进行信号放大,因此仅适用于对细胞中高表达的蛋白质进行成像分析,对低丰度靶标蛋白质成像能力有限。

Saka 等<sup>[37]</sup>发明的免疫-交换反应(immuno-SABER)方法运用引物交换反应(primer exchange reaction, PER)<sup>[38]</sup>对抗体上的 DNA 条形码进行扩增(如图 8 所示),通过正交扩增子与 DNA 成像链的互补配对产生 5~180 倍的高度多重信号放大。这种信号放大方法可以将扩增子预先制备好再用于成像,缩短了成像周期,在提高成像灵敏度的同时降低了成像成本。但长单链扩增子并非原位生成,在投入细胞后的靶标识别过程中可能产生非特异性信号,干扰靶标蛋白质的成像。

滚环扩增(rolling circle amplification, RCA)<sup>[39]</sup>是一种等温核酸扩增的技术,利用独特的 DNA 聚合酶(例如 *phi* 29 DNA 聚合酶)在温和的温度条件下以环状单链 DNA 为模板对靶标 DNA 单链进行扩增,得到数百拷贝的长单链扩增子。Söderberg 等<sup>[40]</sup>使用 RCA 技术在原位对抗体上的 DNA 条形

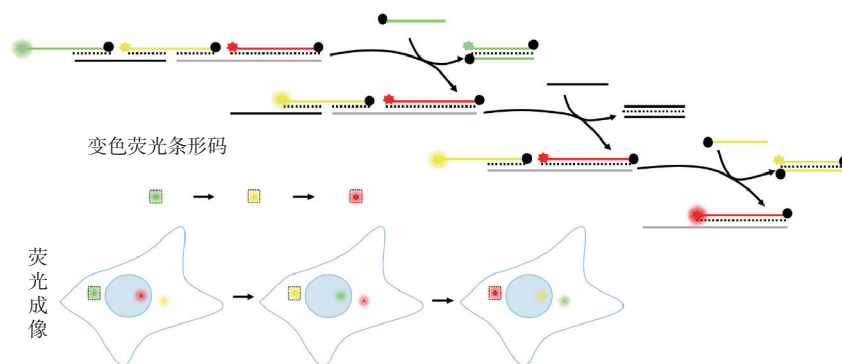


图 7 变色荧光条形码(CCFB)编码成像原理

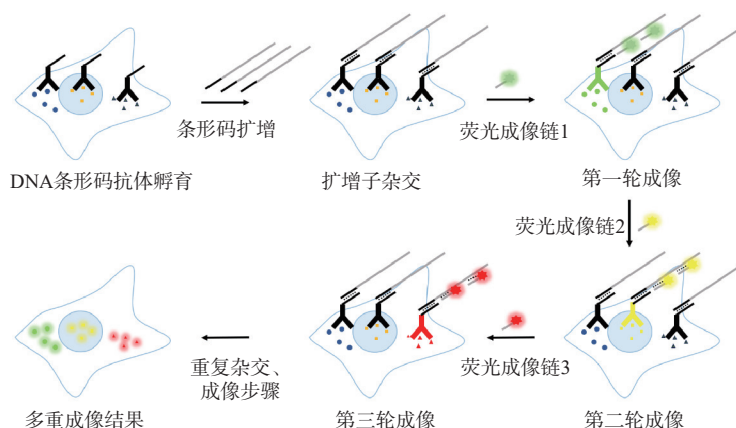


图 8 免疫-交换反应(Immuno-SABER)成像原理

码进行信号扩增(如图 9 所示), 观察到了单细胞内源性蛋白质的相互作用。相较于引物交换反应的方法, RCA 方法更加简便易行, 且放大倍数大幅提高, 为单细胞蛋白质多重信号放大成像提供了新的途径。

Liu 等<sup>[41]</sup> 利用杂交链式反应(HCR)技术开发了具有由靶标触发的可逆组装能力的 DNA 扩增系统(如图 10 所示), 可实现原位 100 倍信号放大。该方法同样可以在原位产生扩增子, 且扩增产物可以在清洗缓冲液中很快解链, 加快了循环成像的速度。

基于抗体和 DNA 条形码的单细胞蛋白质荧光成像方法实现了固定细胞中蛋白质靶标空间位置和表达量的直观可视化。DNA 成像链循环迭代打破了荧光光谱重叠的限制, DNA 条形码可编程和可扩增的特性将成像通量提高至数十甚至上百种, 且

能够产生数百倍的信号放大, 成像速度也不断加快。然而, 基于抗体的单细胞蛋白质成像方法适用于固定细胞的成像, 无法用于观测活细胞中的蛋白质运动以及蛋白表达水平的动态变化。

#### 4 基因编码的单细胞荧光蛋白成像

1962 年, 研究人员在水母中发现了荧光明亮、结构稳定的绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)<sup>[42]</sup>。自此, 基于基因编码的荧光蛋白成像方法成为活细胞生理活动可视化的强大工具。2008 年, 诺贝尔化学奖授予了发现和研究绿色荧光蛋白的 3 位科学家, 表彰他们为改变活细胞生物分子成像模式做出的贡献<sup>[43]</sup>。

Chalfie 等<sup>[44]</sup> 发现编码绿色荧光蛋白的 DNA 附近存在一段抑制绿色荧光蛋白表达的序列, 将这段序列删除后, 他们成功在异源的细菌和蠕虫中获

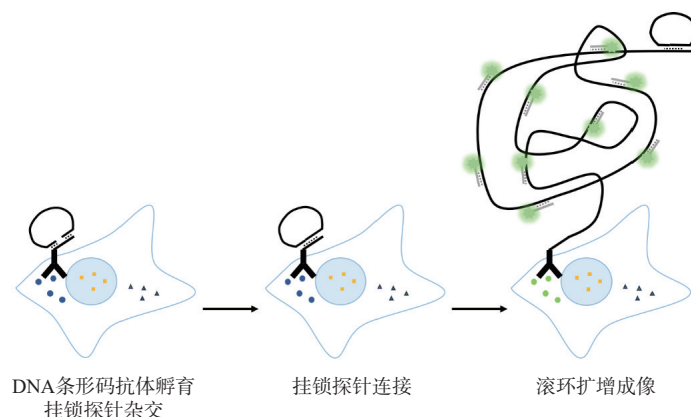


图 9 滚环扩增(RCA)成像原理

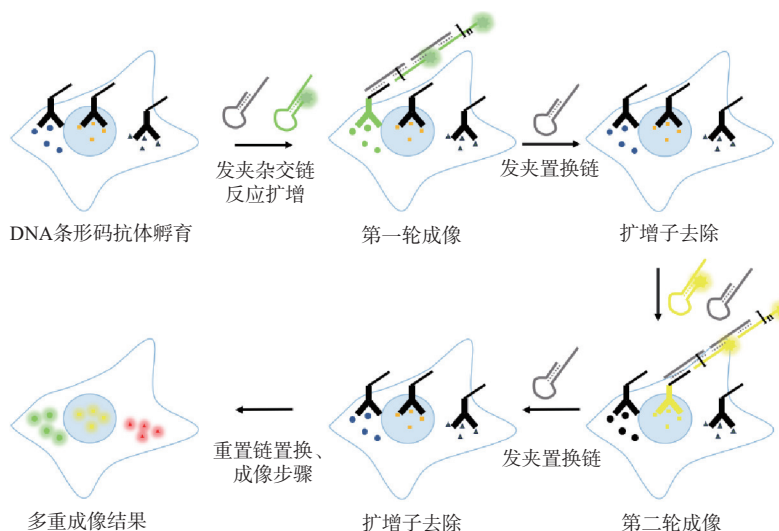


图 10 杂交链式反应(HCR)方法成像原理

得了稳定表达的绿色荧光蛋白。这项研究使得绿色荧光蛋白在活细胞成像中的应用成为可能。

Tanenbaum 等<sup>[45]</sup>开发了 SunTag 系统,该系统通过基因工程表达重复多肽阵列,招募多个拷贝的抗体融合蛋白与之结合。他们成功制备了增强绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescent protein, EGFP)融合的单链可变片段(single chain variable fragments, scFv)抗体,其与靶标蛋白共表达的多拷贝同源肽的结合可以将绿色荧光强度与靶标蛋白的动态表达关联起来,实现活细胞内靶标蛋白的原位信号放大荧光成像。Dufourt 等<sup>[46]</sup>使用 SunTag 方法对活果蝇胚胎中单个 mRNA(messenger ribonucleic acid)翻译的时间、位置和动力学进行了可视化成像(如图 11 所示),通过对上皮-间质转化诱导转录因子 Twist 新生多肽的观察,揭示了 mRNA 翻译效率的空间异质性。SunTag 方法允许在活细胞中对靶标蛋白进行动态成像,多拷贝同源肽的信号放大提高了成像精度。然而,仅使用绿色荧光蛋白难以对细胞内的多种蛋白质同时成像,且活细胞中游离的绿色荧光蛋白融合单链可变片段抗体(EGFP-scFv)也会产生的潜在背景荧光,干扰对于靶标蛋白的观察。

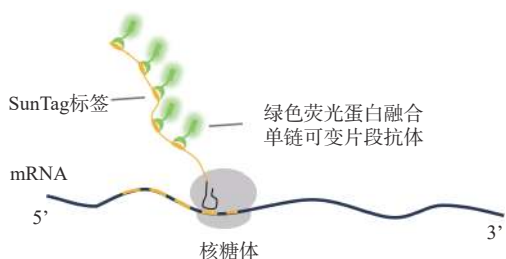


图 11 重复多肽阵列 SunTag 方法成像原理

为了提高荧光蛋白的成像通量,研究人员对绿色荧光蛋白的结构和发光原理进行了深入研究,并对其结构进行设计和优化,开发了一系列亮度更高、成熟更快且不易被光漂白的荧光蛋白变体,例如:黄色荧光蛋白(YFP)<sup>[47]</sup>、橙色荧光蛋白(OFP)<sup>[48]</sup>、蓝色荧光蛋白(BFP)<sup>[49]</sup>以及红色荧光蛋白(RFP)<sup>[50]</sup>等。这些荧光蛋白的开发允许活细胞内多种蛋白质的正交动态成像,拓展了荧光蛋白多重成像的应用范围。Qian 等<sup>[51]</sup>提出的时间多重成像(temporally multiplexed imaging, TMI)方法利用可逆光切换荧光蛋白(reversibly photoswitchable fluorescent proteins, rsFP)的荧光衰减特性实现了单

通道下多种靶标的同时成像,进一步提高了活细胞蛋白质多重成像性能,可用于细胞内分子信号网络的动态监测。

Cabantous 等<sup>[52]</sup>设计了分裂绿色荧光蛋白系统,只有当两个分裂体组合成完整的绿色荧光蛋白时,才能产生荧光。该设计降低了背景荧光对成像的干扰,提高了成像的灵敏度和特异性。Feng 等<sup>[53]</sup>又设计了更为明亮的双色分裂荧光蛋白,为内源性蛋白之间相互作用网络的成像提供了更多可能。Sekhon 等<sup>[54]</sup>开发的适应性开启成熟荧光传感器(adaptable, turn-on maturation, ATOM)同样利用了分裂荧光蛋白,将单体(monobody)或纳米体(nanobody)插入荧光蛋白结构中,只有单体或纳米体与靶标蛋白的特异性结合能够启动荧光蛋白成熟,产生荧光。该方法进一步提高了荧光蛋白成像的特异性和灵敏度。

基因编码的单细胞荧光蛋白成像方法在活细胞内源性蛋白质成像领域有着独特的优势和广阔的应用前景,适用于多种胞内生理现象的动态观察。然而,该方法需要通过生物工程手段让靶标蛋白融合标签,较为繁琐,并且难以用于临床样本如肿瘤组织、循环肿瘤细胞的蛋白分析。

## 5 单细胞蛋白质光谱成像

### 5.1 拉曼光谱成像

拉曼光谱<sup>[55]</sup>是激光照射样品表面后产生的波长发生变化的散射光,可以提供样品化学结构、相和形态、结晶度以及分子相互作用的详细信息。且相较于荧光光谱成像,拉曼光谱成像是一种无标记的显微镜成像方法,具有较高的成像分辨率和灵敏度。

受激拉曼激发荧光(stimulated Raman excited fluorescence, SREF)<sup>[56]</sup>方法是通过受激拉曼泵浦至中间振动本征态,再上转换至电子荧光态,将振动共振编码到荧光发射的激发光谱中。该方法利用窄振动线宽实现了细胞中多重 SREF 成像,打破了荧光的“颜色障碍”,将拉曼光谱与荧光光谱相结合。因其高灵敏度,无需等离子体增强便可实现全远场单分子拉曼光谱和成像。

高阶相干反斯托克斯拉曼散射(higher-order coherent anti-Stokes Raman scattering, HO-CARS)显微镜<sup>[57]</sup>方法研究了高阶非线性光学过程,使用新的



检测波长实现了高对比度。因此方法具有固有的高共振与非共振背景比, 打破了无标记、超分辨率振动成像的衍射极限, 并可以在活细胞中成像。

表面增强拉曼散射 (surface-enhanced Raman scattering, SERS)<sup>[58]</sup> 利用特殊设计的由金属纳米粒子、拉曼报告分子、生物相容性保护层和传感层组成的标签实现信号放大, 标签与抗体相结合用于单细胞蛋白质的成像。通过设计标签的尺寸、形状以及金属种类等可以实现多重成像。

拉曼光谱成像方法的扫描速度快, 灵敏度高, 是一种无损分析方法, 可以对 20 余种单细胞蛋白质同时成像。但由于难以与信号放大方法兼容, 成像的灵敏度相较于荧光成像方法还有待提高。

5.2 X 射线成像

X 射线能够无损地穿透细胞样品, 具有不同原子序数的元素在被 X 射线激发时会发出特征波长的荧光。X 射线荧光显微镜 (X-ray fluorescence microscopy, XFM) 成像<sup>[59]</sup> 方法利用这一特性将样品中的不同元素可视化, 可用于研究从整个生物体到亚细胞区室的元素分布, 具有卓越的空间分辨率和低至数百个原子的灵敏度。

Kounatidis 等<sup>[60]</sup> 提出了用于低温生物样品成像的方案, 将 3D 结构照明显微镜与同步加速器软 X 射线显微镜相结合, 可在扰动最小的细胞群中提供扩展细胞体积内细胞超微结构和分子组织的全面视图, 成像分辨率约 30 nm。

多元素 Z 标签 X 射线荧光 (multielement Z-tag X-ray fluorescence, MEZ-XRF) 成像<sup>[61]</sup> 策略使用具有不同原子序数的元素标签与抗体结合, 对细胞样品免疫孵育后, 使用不同直径的 X 射线束按一定的步长扫描样品表面, 采集特征荧光后将数据重构还原为单细胞蛋白质空间信息图谱。该方法利用 DNA 条形码与核酸信号放大的 SABER 方法兼容,

优化了对低丰度靶标蛋白质的成像方案, 获得了成像灵敏度的进一步提升。

X 射线荧光成像方法是一种相对无损的成像方法, 成像之后的样品仍可以用于后续实验处理, 易于与其他成像方法兼容。用于信号采集的样品中元素固有特征荧光不会因为检测次数增加而衰减, 因此可以对同一样品进行重复多次成像。

光谱成像的方法在室温或低温以及一个标准大气压条件下分析样品, 不需要类似质谱成像方法中苛刻的真空环境, 降低了分析成本。将特殊的金属标签连接在抗体上对单细胞蛋白质进行拉曼光谱或 X 射线成像, 扩展了光谱成像的应用范围, 也为单细胞蛋白质成像提供了新的发展方向。

6 总结与展望

各种单细胞蛋白质成像方法的特点如表 1 所示。单细胞蛋白质成像技术是单细胞蛋白质组学研究的重要工具, 是解析亚细胞水平上蛋白表达水平、空间分布、生理药理动态过程、蛋白相互作用及信号通路研究的不可替代的手段。随着科技进步, 单细胞蛋白质成像方法朝着高通量、高灵敏、高分辨率以及快速单分子成像的趋势发展, 并与基因组学、转录组学、翻译组学成像方法相结合, 发展单细胞空间多组学成像方法, 推进单细胞生物分子图谱的深入解析。

紧跟单细胞蛋白质成像方法发展的脚步, 用于大规模高通量成像数据处理分析的计算机算法技术也蓬勃发展。机器学习、深度学习、人工智能技术的运用为成像数据分析的自动化及精确计算提供了助力。

总之, 单细胞蛋白质成像技术具有较高的分析通量, 可以结合原位信号放大技术以较高的成像分辨率快速构建蛋白质的空间表达图谱, 荧光蛋白

表 1 单细胞蛋白质成像方法的特点

分类	方法	特点	应用
抗体多轮孵育	CycIF、SAFE	外源性荧光、迭代多重	细胞类型识别; 活细胞多重成像
质谱成像	MIBI、IMC	高通量、自动化	乳腺癌细胞成像; 肿瘤细胞亚群异质性分析
抗体DNA条形码	CCFB、Immuno-SABER	可编程、易扩增、高通量、高灵敏	免疫效应蛋白调节机制研究; 单个β-肌动蛋白成像
基因编码荧光蛋白成像	SunTag、TMI	基因工程、内源性荧光	活细胞蛋白质动态成像
光谱成像	拉曼光谱、X射线成像	无损分析、多路复用	组织细胞成像

CycIF: 循环免疫荧光法; SAFE: 分裂加速荧光团交换法; MIBI: 多重离子束成像质谱法; IMC: 成像质量细胞术; CCFB: 变色荧光条形码法; Immuno-SABER: 免疫-交换反应法; SunTag: SunTag肽阵列标签法; TMI: 时间多重成像法

成像方法还能够动态监测活细胞蛋白质生命过程。因此这些技术在药理药效研究、临床疾病诊断筛查等方面具有广阔的应用前景,值得进一步研究和开发。开发快速、高多重、高分辨的成像方法,配合适用于多种分析模式的图像数据处理算法,尽快将现有的成像方法应用于临床是未来单细胞蛋白质成像方法发展的落脚点,也是科学家们共同努力的方向。

## References

- [1] Labib M, Kelley SO. Single-cell analysis targeting the proteome[J]. *Nat Rev Chem*, 2020, **4**(3): 143-158.
- [2] Van Oostrum M, Blok TM, Giandomenico SL, et al. The proteomic landscape of synaptic diversity across brain regions and cell types[J]. *Cell*, 2023, **186**(24): 5411-5427.
- [3] Wang G, Liu X, Wang K, et al. Deep-learning-enabled protein-protein interaction analysis for prediction of SARS-CoV-2 infectivity and variant evolution[J]. *Nat Med*, 2023, **29**(8): 2007-2018.
- [4] Geffen Y, Anand S, Akiyama Y, et al. Pan-cancer analysis of post-translational modifications reveals shared patterns of protein regulation[J]. *Cell*, 2023, **186**(18): 3945-3967.
- [5] Gavin AC, Bösch M, Krause R, et al. Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes[J]. *Nature*, 2002, **415**(6868): 141-157.
- [6] Zeng Q, Mousa M, Nadukkandy AS, et al. Understanding tumour endothelial cell heterogeneity and function from single-cell omics[J]. *Nat Rev Cancer*, 2023, **23**(8): 544-564.
- [7] Messner CB, Demichev V, Muenzner J, et al. The proteomic landscape of genome-wide genetic perturbations[J]. *Cell*, 2023, **186**(9): 2018-2034.
- [8] Rood JE, Maartens A, Hupalowska A, et al. Impact of the Human Cell Atlas on medicine[J]. *Nat Med*, 2022, **28**(12): 2486-2496.
- [9] Jain S, Pei L, Spraggins JM, et al. Advances and prospects for the Human BioMolecular Atlas Program (HuBMAP)[J]. *Nat Cell Biol*, 2023, **25**(8): 1089-1100.
- [10] Lundberg E, Börner GHH. Spatial proteomics: a powerful discovery tool for cell biology[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2019, **20**(5): 285-302.
- [11] Thul PJ, Åkesson L, Wiking M, et al. A subcellular map of the human proteome[J]. *Science*, 2017, **356**(6340): eaar3321.
- [12] Reinhardt SCM, Masullo LA, Baudrexel I, et al. Ångström-resolution fluorescence microscopy[J]. *Nature*, 2023, **617**(7962): 711-716.
- [13] Lan C, Kim J, Ulferts S, et al. Quantitative real-time in-cell imaging reveals heterogeneous clusters of proteins prior to condensation[J]. *Nat Commun*, 2023, **14**(1): 4831.
- [14] Hickey JW, Neumann EK, Radtke AJ, et al. Spatial mapping of protein composition and tissue organization: a primer for multiplexed antibody-based imaging[J]. *Nat Methods*, 2022, **19**(3): 284-295.
- [15] TOMODA Y. Demonstration of foetal erythrocyte by immunofluorescent staining[J]. *Nature*, 1964, **202**(4935): 910-911.
- [16] Gerdes MJ, Sevinsky CJ, Sood A, et al. Highly multiplexed single-cell analysis of formalin-fixed, paraffin-embedded cancer tissue[J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2013, **110**(29): 11982-11987.
- [17] Lin JR, Fallahi-Sichani M, Sorger PK. Highly multiplexed imaging of single cells using a high-throughput cyclic immunofluorescence method[J]. *Nat Commun*, 2015, **6**: 8390.
- [18] Gut G, Herrmann MD, Pelkmans L. Multiplexed protein maps link subcellular organization to cellular states[J]. *Science*, 2018, **361**(6401): eaar7042.
- [19] Mondal M, Liao R, Xiao L, et al. Highly multiplexed single-cell in situ protein analysis with cleavable fluorescent antibodies[J]. *Angew Chem Int Ed*, 2017, **56**(10): 2636-2639.
- [20] Ko J, Wilkovich M, Oh J, et al. Spatiotemporal multiplexed immunofluorescence imaging of living cells and tissues with bioorthogonal cycling of fluorescent probes[J]. *Nat Biotechnol*, 2022, **40**(11): 1654-1662.
- [21] Donnelly DP, Rawlins CM, DeHart CJ, et al. Best practices and benchmarks for intact protein analysis for top-down mass spectrometry[J]. *Nat Methods*, 2019, **16**(7): 587-594.
- [22] Zhang H, Delafield DG, Li L. Mass spectrometry imaging: the rise of spatially resolved single-cell omics[J]. *Nat Methods*, 2023, **20**(3): 327-330.
- [23] Angelo M, Bendall SC, Finck R, et al. Multiplexed ion beam imaging of human breast tumors[J]. *Nat Med*, 2014, **20**(4): 436-442.
- [24] Giesen C, Wang HA, Schapiro D, et al. Highly multiplexed imaging of tumor tissues with subcellular resolution by mass cytometry[J]. *Nat Methods*, 2014, **11**(4): 417-422.
- [25] Hosogane T, Casanova R, Bodenmiller B. DNA-barcoded signal amplification for imaging mass cytometry enables sensitive and highly multiplexed tissue imaging[J]. *Nat Methods*, 2023, **20**(9): 1304-1309.
- [26] Cornett DS, Reyzer ML, Chaurand P, et al. MALDI imaging mass spectrometry: molecular snapshots of biochemical systems[J]. *Nat Methods*, 2007, **4**(10): 828-833.
- [27] Kompauer M, Heiles S, Spengler B. Atmospheric pressure MALDI mass spectrometry imaging of tissues and cells at 1.4- $\mu\text{m}$  lateral resolution[J]. *Nat Methods*, 2017, **14**(1): 90-96.
- [28] Niehaus M, Soltwisch J, Belov ME, et al. Transmission-mode MALDI-2 mass spectrometry imaging of cells and tissues at subcellular resolution[J]. *Nat Methods*, 2019, **16**(9): 925-931.
- [29] Lv H, Xie N, Li M, et al. DNA-based programmable gate arrays for general-purpose DNA computing[J]. *Nature*, 2023, **622**(7982): 292-300.
- [30] Jungmann R, Steinhauer C, Scheible M, et al. Single-molecule

- kinetics and super-resolution microscopy by fluorescence imaging of transient binding on DNA origami[J]. *Nano Lett*, 2010, **10**(11): 4756-4761.
- [31] Chung KKH, Zhang Z, Kidd P, *et al.* Fluorogenic DNA-PAINT for faster, low-background super-resolution imaging[J]. *Nat Methods*, 2022, **19**(5): 554-559.
- [32] Wang Y, Woehrstein JB, Donoghue N, *et al.* Rapid sequential in situ multiplexing with DNA exchange imaging in neuronal cells and tissues[J]. *Nano Lett*, 2017, **17**(10): 6131-6139.
- [33] Goltsev Y, Samusik N, Kennedy-Darling J, *et al.* Deep profiling of mouse splenic architecture with CODEX multiplexed imaging[J]. *Cell*, 2018, **174**(4): 968-981.
- [34] Zhao P, Bhowmick S, Yu J, *et al.* Highly multiplexed single-cell protein profiling with large-scale convertible DNA-antibody barcoded arrays[J]. *Adv Sci*, 2018, **5**(9): 1800672.
- [35] Makino K, Susaki EA, Endo M, *et al.* Color-changing fluorescent barcode based on strand displacement reaction enables simple multiplexed labeling[J]. *J Am Chem Soc*, 2022, **144**(4): 1572-1579.
- [36] Bi S, Yue S, Zhang S. Hybridization chain reaction: a versatile molecular tool for biosensing, bioimaging, and biomedicine[J]. *Chem Soc Rev*, 2017, **46**(14): 4281-4298.
- [37] Saka SK, Wang Y, Kishi JY, *et al.* Immuno-SABER enables highly multiplexed and amplified protein imaging in tissues[J]. *Nat Biotechnol*, 2019, **37**(9): 1080-1090.
- [38] Kishi JY, Schaus TE, Gopalkrishnan N, *et al.* Programmable autonomous synthesis of single-stranded DNA[J]. *Nat Chem*, 2018, **10**(2): 155-164.
- [39] Mohsen MG, Kool ET. The discovery of rolling circle amplification and rolling circle transcription[J]. *Acc Chem Res*, 2016, **49**(11): 2540-2550.
- [40] Söderberg O, Gullberg M, Jarvius M, *et al.* Direct observation of individual endogenous protein complexes in situ by proximity ligation[J]. *Nat Methods*, 2006, **3**(12): 995-1000.
- [41] Liu X, Mao D, Song Y, *et al.* Computer-aided design of reversible hybridization chain reaction (CAD-HCR) enables multiplexed single-cell spatial proteomics imaging[J]. *Sci Adv*, 2022, **8**(2): eabk0133.
- [42] Wang M, Da Y, Tian Y. Fluorescent proteins and genetically encoded biosensors[J]. *Chem Soc Rev*, 2023, **52**(4): 1189-1214.
- [43] Miyawaki A. Green fluorescent protein glows gold[J]. *Cell*, 2008, **135**(6): 987-990.
- [44] Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, *et al.* Green fluorescent protein as a marker for gene expression[J]. *Science*, 1994, **263**(5148): 802-805.
- [45] Tanenbaum ME, Gilbert LA, Qi LS, *et al.* A protein-tagging system for signal amplification in gene expression and fluorescence imaging[J]. *Cell*, 2014, **159**(3): 635-646.
- [46] Dufourt J, Bellec M, Trullo A, *et al.* Imaging translation dynamics in live embryos reveals spatial heterogeneities[J]. *Science*, 2021, **372**(6544): 840-844.
- [47] Nagai T, Ibata K, Park ES, *et al.* A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications[J]. *Nat Biotechnol*, 2002, **20**(1): 87-90.
- [48] Chu J, Oh Y, Sens A, *et al.* A bright cyan-excitable orange fluorescent protein facilitates dual-emission microscopy and enhances bioluminescence imaging *in vivo*[J]. *Nat Biotechnol*, 2016, **34**(7): 760-767.
- [49] Mena MA, Treynor TP, Mayo SL, *et al.* Blue fluorescent proteins with enhanced brightness and photostability from a structurally targeted library[J]. *Nat Biotechnol*, 2006, **24**(12): 1569-1571.
- [50] A brilliant monomeric red fluorescent protein combining high brightness and fast maturation[J]. *Nat Methods*, 2023, **20**(4): 497-498.
- [51] Qian Y, Celiker OT, Wang Z, *et al.* Temporally multiplexed imaging of dynamic signaling networks in living cells[J]. *Cell*, 2023, **186**(25): 5656-5672.
- [52] Cabantous S, Terwilliger TC, Waldo GS. Protein tagging and detection with engineered self-assembling fragments of green fluorescent protein[J]. *Nat Biotechnol*, 2005, **23**(1): 102-107.
- [53] Feng S, Sekine S, Pessino V, *et al.* Improved split fluorescent proteins for endogenous protein labeling[J]. *Nat Commun*, 2017, **8**(1): 370.
- [54] Sekhon H, Ha JH, Presti MF, *et al.* Adaptable, turn-on maturation (ATOM) fluorescent biosensors for multiplexed detection in cells[J]. *Nat Methods*, 2023, **20**(12): 1920-1929.
- [55] Hang Y, Boryczka J, Wu N. Visible-light and near-infrared fluorescence and surface-enhanced Raman scattering point-of-care sensing and bio-imaging: a review[J]. *Chem Soc Rev*, 2022, **51**(1): 329-375.
- [56] Xiong H, Shi L, Wei L, *et al.* Stimulated Raman excited fluorescence spectroscopy and imaging[J]. *Nat Photonics*, 2019, **13**(6): 412-417.
- [57] Gong L, Zheng W, Ma Y, *et al.* Higher-order coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy realizes label-free super-resolution vibrational imaging[J]. *Nat Photonics*, 2020, **14**(2): 115-122.
- [58] Gong TX, Das CM, Yin MJ, *et al.* Development of SERS tags for human diseases screening and detection[J]. *Coord Chem Rev*, 2022, **470**: 214711.
- [59] Graziotto ME, Kidman CJ, Adair LD, *et al.* Towards multimodal cellular imaging: optical and X-ray fluorescence[J]. *Chem Soc Rev*, 2023, **52**(23): 8295-8318.
- [60] Kounatidis I, Stanifer ML, Phillips MA, *et al.* 3D correlative cryo-structured illumination fluorescence and soft X-ray microscopy elucidates reovirus intracellular release pathway[J]. *Cell*, 2020, **182**(2): 515-530.
- [61] Strotton M, Hosogane T, di Michiel M, *et al.* Multielement Z-tag imaging by X-ray fluorescence microscopy for next-generation multiplex imaging[J]. *Nat Methods*, 2023, **20**(9): 1310-1322.