

深度可视化蛋白质组学（DVP）

周加
201801073

1

摘要

- 尽管已有基于成像和基于质谱的空间蛋白质组学方法，但将图像与单细胞分辨率蛋白质丰度测量联系起来仍然是一个关键挑战。
- 在这里，我们介绍了深度可视化蛋白质组学（DVP），它将人工智能驱动的红细胞表型图像分析与自动单细胞或单核激光显微切割和超高灵敏度质谱相结合。
- DVP 将蛋白质丰度与复杂的细胞或亚细胞表型联系起来，同时保留空间背景。通过从细胞培养物中单独切除细胞核，我们根据已知和未表征的蛋白质定义的蛋白质组学谱对不同的细胞状态进行了分类。在已存档的原发性黑色素瘤组织中，DVP 识别出正常黑色素细胞转变为完全侵袭性黑色素瘤时的空间分辨蛋白质组变化，揭示出随着癌症进展而以空间方式发生变化的途径，例如转移性垂直生长中的 mRNA 剪接失调，这与干扰素信号传导和抗原呈递减少相吻合。

2

背景

- **蛋白质靶标的限制：**目前的研究大多只能锁定一小部分蛋白质，难以全面覆盖蛋白质组的复杂性。因此，无法充分体现细胞内的全部蛋白质变化或复杂的生物学过程。
- **当前的 LMD 方法：**保留了空间背景，但大多局限于人眼可观察到的表型，并且需要手动选择细胞，这通常会导致不同细胞类型的混合。

3

框架

- **实验流程的集成：**作者将亚微米分辨率成像（可精确到细胞内部的细节）、基于AI的单细胞表型分析、细胞或亚细胞分离技术，与超灵敏的蛋白质组学分析流程结合，形成了一个综合性平台。
- **主要技术挑战：**准确定义单细胞边界和细胞类型，特别是在复杂组织中，并将自动识别出的特征信息转化为可以进行蛋白质分析的样本，是这项研究中的关键挑战。
- **BIAS软件的功能：**为了解决上述挑战，研究团队开发了“BIAS”（生物图像分析软件）。这个软件为了从物理上提取使用 BIAS 发现的细胞特征，作为扫描显微镜和 LMD 显微镜之间的接口。BIAS 在显微镜之间传输细胞轮廓，保持完全准确性，从而实现了对细胞培养物或存储的组织样本（如甲醛固定、石蜡包埋的FFPE样本）的高信息量成像，并结合深度学习算法进行细胞分割和细胞类型识别。

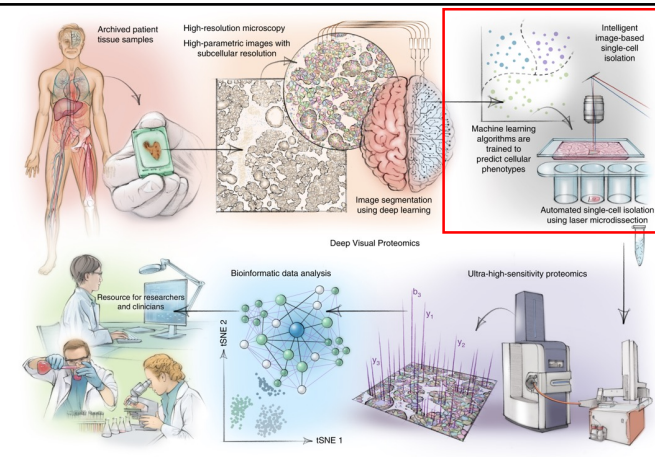
4

框架

- **自动化蛋白质分析流程**：在BIAS系统的指导下，AI可以自动或经人为指令选择特定的细胞或亚细胞结构，通过激光微切技术分离这些目标，然后对其进行蛋白质组分析。
- **数据挖掘与分析**：利用DVP（Data Visualization and Processing）技术，生成的蛋白质数据可以挖掘出特定的蛋白质特征，从而在保留空间信息的前提下，深入理解蛋白质在细胞表型层面的变异及其潜在的生物学意义。

5

框架



6

算法实现

- 研究团队基于最新的DL算法¹对细胞核和细胞质进行分割，使用合成图像训练了深度神经网络，以实现特定细胞区域（例如细胞核或细胞质）的精准分割。该算法与其他两种领先的DL方法（unet4nuclei和Cellpose）以及一种基于自适应阈值和对象分割的方法进行了对比，结果表明该算法在细胞培养物和组织中的细胞和细胞核分割精度最高。
- BIAS支持交互式的细胞表型发现，通过特征提取对细胞形态和邻域特征进行分析，并结合了监督和非监督的ML方法。这种基于特征的表型分类还可以与抗体染色的生物标志物表达水平相结合，实现精确的细胞分类。虽然ML以前被用于图像分析和细胞选择，但在过去的应用中并未结合无偏的蛋白质组学数据。

¹ Hollandi, R. et al. nucleAIzer: a parameter-free deep learning framework for nucleus segmentation using image style transfer. *Cell Syst.* 10, 453–458 (2020).

7

DVP相比单细胞蛋白质组学的优势

1. 保持空间信息和原位细胞类型分析

传统的单细胞蛋白质组学通常通过细胞消化或分离后分析，而此过程会破坏组织的空间结构，导致丢失细胞在组织内的位置和其空间上下文。

BIAS与LMD结合，能够在分离前通过高分辨率成像确定细胞在组织中的具体位置，从而保留其空间信息。这对研究疾病状态或细胞类型的空间特性（如癌症早期起源部位）尤为关键。

2. 细胞选择的自动化与高通量

传统方法大多依赖手动选择或基于流式细胞分选的方式分离细胞，容易受到人为主观性限制，且速度较慢。

BIAS与LMD系统的接口允许自动化高通量切割细胞轮廓，减少了手动选择的误差和限制，每小时可分离1,250个高分辨率轮廓，相当于50到100个细胞。此过程还能够防止不同细胞类型混合，有利于精确分析。

8

DVP相比传统LMD的优势

1. 自动切割与细胞轮廓精准转移

BIAS实现了自动切割，而传统激光显微切割通常需要人工操作。这种自动化不仅提高了效率，还减少了人工干预带来的误差。BIAS会在扫描显微镜和LMD显微镜之间精确转移细胞的轮廓信息，确保切割过程精准对准目标细胞。这意味着在两个显微系统之间，可以无缝地定位到感兴趣的细胞，提高了切割精度，而传统方法很难达到这种精确的轮廓匹配。

2. AI驱动的智能分割和分类

BIAS使用深度学习和机器学习算法自动识别、分割和分类细胞。传统方法则通常依赖肉眼观察选择切割细胞，且主要基于简单的形态学特征，而BIAS可以通过图像特征提取和表型分类，精准定位特定类型的细胞。这种AI算法的应用不仅降低了人为判断错误的风险，还使得细胞分割和分类更加高效和一致。

3. 细胞类型高纯度分离

BIAS通过结合特异性抗体染色和自动化切割，可以实现细胞类型的高度纯化。这避免了传统手动切割过程中不同细胞类型混杂的情况，确保分离后的细胞群体具有高纯度，尤其在处理复杂组织时尤为重要。

4. 无偏定量蛋白质组分析

BIAS与后续的质谱蛋白质组学无缝衔接，通过无偏的全蛋白质分析，可以全面检测细胞蛋白表达谱，超越了传统单细胞蛋白质组学仅靠特定标志物分析的局限性。传统手动切割常难以在精确分离和高通量无偏蛋白质分析之间找到平衡。

9

DVP相比传统质谱分析的优势——“无偏”的质谱蛋白质组学分析

1. 质谱策略差异

传统单细胞蛋白质组学多采用数据依赖采集（Data Dependent Acquisition, DDA）策略，这种方法在扫描时会优先选择信号强的离子进行碎片化和分析。然而，DDA策略的选择具有偏向性，容易偏向丰度高的蛋白质，而导致低丰度蛋白质的识别和定量不全。此外，由于细胞内样本量极小，传统的单细胞蛋白质提取和转移步骤多，增加了蛋白质损失的风险，导致了整体检测灵敏度的降低。

DVP采用的是一种数据无关采集（Data Independent Acquisition, DIA）方法，特别是基于“diaPASEF”的策略。DIA不依赖于蛋白丰度，而是将所有检测到的离子同时碎裂分析，尽量覆盖所有可检测的蛋白质。这种方法可以避免偏向性，检测到更多低丰度和稀有蛋白，从而实现更广泛和无偏的蛋白质组数据采集。这对于细胞状态标记物、特定功能蛋白或潜在新标志物的发现至关重要。

10

DVP相比传统质谱分析的优势——“无偏”的质谱蛋白质组学分析

2. 样本处理流程的优化

在传统流程中，单细胞蛋白质提取过程涉及多个样本转移和净化步骤，这增加了蛋白质损失的风险。每一步的蛋白损失都会导致检测灵敏度下降，特别是在处理单细胞或亚细胞级别的极小样本时。

DVP在样本处理上做了显著优化，通过超低量样本输入流程，实现了直接从384孔板中完成质谱分析而无需多次转移。这种设计极大减少了样本损失，确保了更多的蛋白质可以被有效回收并参与定量分析，提高了数据的灵敏度和准确性。

11

DVP可在亚细胞层面（如细胞和细胞核间对比）进行蛋白质组学分析

- 通过不同样本的重复实验，证实了细胞和细胞核蛋白质组具有很高的量化一致性（Pearson相关系数达0.96）。细胞和细胞核的蛋白质组成表现出预期的差异，这一结果符合传统亚细胞蛋白质组学实验的发现。

12