

单细胞测序解决方案

Single-cell Sequencing Solution



目录

CONTENTS

- 技术背景
- 单细胞 RNA 测序解决方案
- 单细胞 TCR/BCR 测序解决方案
- 单细胞膜蛋白测序解决方案
- 单细胞 ATAC 测序解决方案
- 单细胞（核）悬液制备解决方案

| 关于伯豪生物

上海伯豪生物技术有限公司 (www.shbio.com) 是生物芯片上海国家工程研究中心的有机组成部分, 专注于提供领先的生物医药和疾病诊断创新技术、产品和优质的服务。

经过十多年的发展, 公司建立了前沿的分子生物技术平台、系统的营销管理体系、客户服务体系、产品研发生产体系以及质量管理体系, 从基因芯片到新一代测序、单细胞测序、空间转录组测序, 紧跟技术的发展, 公司不断引进前沿技术和方法, 并持续进行技术创新和配套产品的研发。为国内外客户提供常规多组学和单细胞多组学的技术服务和技术支撑。

公司先后获得国家基因检测技术应用示范中心、国家工信部专精特新“小巨人”、上海市科技小巨人、院士专家工作站、上海市专业技术服务平台、上海市服务外包公共平台、上海名牌、浦东新区企业研发机构等资质认证。



| 伯豪生物优势

技术服务 **18**年

承接项目数超过 **50000**个

用户单位 **5000**家以上

协助客户发表SCI论文 **2900**多篇

平均影响因子大于 **7**分

公司拥有 **40**多项发明专利和软件著作权

成功研发 **20**多种试剂产品



| 伯豪生物产品服务总览

科技服务

单细胞组学

- 单细胞(核)RNA 测序
- Flex 单细胞 RNA 测序
- 单细胞全转录组测序
- SMART单细胞RNA测序
- 单细胞免疫组库测序
- 单细胞ATAC测序
- 单细胞膜蛋白测序
- 单细胞CRISPR筛选

空间组学

- Stereo-seq时空转录组
- Visium HD空间转录组
- Visium空间转录组
- Xenium空间亚细胞原位分析
- 5D原位多组学

基因组学

- 全基因组重测序
- 全外显子组测序
- 甲基化芯片 (935K)
- 甲基化捕获测序 (EM-seq)
- 甲基化捕获测序 (MC-seq)
- CRISPR下一代分子诊断技术整体解决方案

转录组学

- 原核转录组测序
- 真核转录组测序
- Small RNA 测序
- 全转录组测序

蛋白质组学

- Olink蛋白质组学
- 基于全基因组的人细胞表面蛋白互作筛选服务

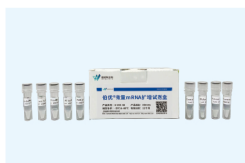
科学试剂



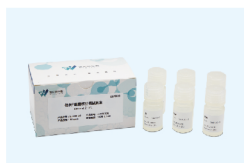
核酸保存系列试剂



核酸提取系列试剂



核酸扩增系列试剂



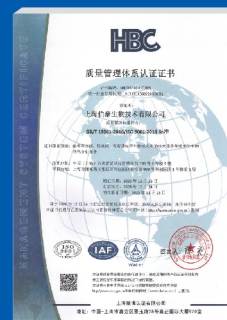
细胞核分离系列试剂



细胞悬液制备系列试剂

| 质量体系

伯豪生物建立了规范化的质量控制体系，通过了ISO9001:2015质量技术体系的认证，并参照GLP-L的标准，通过156个SOP文件对项目、样品、实验过程、生物信息分析过程、数据信息管理、保密等进行严格质控。



第一部分 技术背景

单细胞转录组测序 (Single-cell RNA-sequencing) 是指在单个细胞的水平上对 RNA 进行高通量测序和分析的新技术。在基因表达层面上, 不同的细胞具有独特的转录组, 即便是那些看似相同的细胞群, 细胞之间的 RNA 水平上却差异巨大。单细胞转录组测序技术有别于常规的 RNA 测序, 由于受到检测的灵敏度等技术限制, 常规方法所使用的材料都是组织或一群细胞的混合物, 即 Bulk Sequencing。因而得到的结果只是大量细胞的平均数据, 或者只是这群细胞的代表性信息, 单个细胞特异性的信息往往被掩盖了。

2011 年, Nature Methods 将单细胞测序列为当年度值得期待的技术之一^[1]; 2013 年 1 月, Science 杂志将单细胞测序列为年度最值得关注的六大领域榜首^[2]; 2014 年 1 月, Nature Methods 将单细胞测序列为 “Method of the Year 2013”^[3]。2019 年 Nature Methods 将单细胞多组学评为了 “Method of the Year 2019”^[4], 并在线发表 5 篇相关文章。目前, 单细胞测序已广泛应用于肿瘤异质性、免疫微环境、神经科学、胚胎发育、细胞分化等领域的研究。



nature methods

Editorial | Published: 06 January 2020

Method of the Year 2019: Single-cell multimodal omics

单细胞 RNA 扩增技术

最早的方法出现在 2009 年, 即 Tang' s method^[5]。Quartz-Seq 的方法, 实际上是对 Tang 的方法进行了优化, 进一步减少了扩增副产物的产生, 同时也简化了实验流程^[6]。CEL-seq 是用 IVT 代替 PCR 达到扩增的目的。基于 SMART 的第一种方法叫做 (Single-cell tagged reverse transcription, STRT), 但只有转录本的 5' 端才能被测序^[7]。后来出现的 SMART-Seq^[8] 和 SMART-Seq2^[9] 能够使转录本的全长都被测序, 而且已经有了较为成熟的商品化试剂盒, 是目前应用较多的手段。而后来出现的出现的基于微流控技术的各种平台, 对于单细胞 RNA 的扩增, 大多也是基于 SMART 的原理。

单细胞分离和检测技术

在单细胞 RNA 反转录之前, 如何分离获得单个细胞可以说是更加困难的一个环节。目前主要的单细胞分离方法有有限稀释法、显微操作法、流式细胞法。有限稀释法是一种传统的手段, 主要是通过稀释, 使某一体积的悬液中理论上只含有一个细胞, 然后用移液器吸取相应体积的细胞悬液, 便获得了单细胞。这一方法无需特殊设备, 目前仍被广泛应用, 但该方法依赖于梯度稀释计算, 并不是直观下的单细胞分离, 因此实际操作中的效率只有 20% 左右, 存在大量的空白或多细胞。相比而言, 显微操作法是一种能够直接观察到单细胞的方法。这一方法能够准确控制单个细胞的吸取与释放, 但是对实验操作的要求较高, 不利于规模化操作。而荧光激活细胞流式分选 (Fluorescence activated cell sorting, FACS) 则能够大规模获得单细胞样本, 该方法是利用流式细胞仪, 借助于细胞表面标记分选出特定群体的细胞或单个细胞。美国的 Fluidigm 公司的 C1 单细胞全自动制备系统虽然不能对单细胞成像, 但大幅提高了自动化水平, 该系统基于创新的微流体技术, 首先自动分离出 96 个单细胞, 随后, 在芯片上进行细胞裂解、RNA 反转录及预扩增, 整个过程前所未有的实现了从单细胞制备到 cDNA 合成放大的全面自动化和规模化^[10]。

高昂的成本是限制单细胞测序广泛应用的关键因素, 尤其在需要对大规模的细胞进行测序时。虽然测序本身的成本已经很低, 但因为每个细胞的扩增、文库构建都需要单独进行, 这部分的试剂成本非常高昂。哈佛大学医学院的研究人员开发了以微滴为基础的两种独立技术 Drop-seq^[11] 和 inDrop^[12]。他们利用微流体装置将微珠 (扩增引物固定在微珠上, 并

且引物带有用于识别细胞来源的条码) 和细胞一起装入微小的液滴, 建立了快速、廉价、高通量的单细胞 RNA-seq 方法。由此并行检测数以千计的细胞, 能够帮助科学家进一步对发人体细胞进行分类, 绘制复杂组织的细胞多样性图谱。类似的技术还有 SCRB-Seq^[13], CytoSeq^[14] 等。随后 10x Genomics 和 BD 推出的商业化平台使这些新的单细胞测序技术更加稳定和易于上手, 同时各家公司也在不断改进她们呢的技术, 并进一步拓展应用场景。

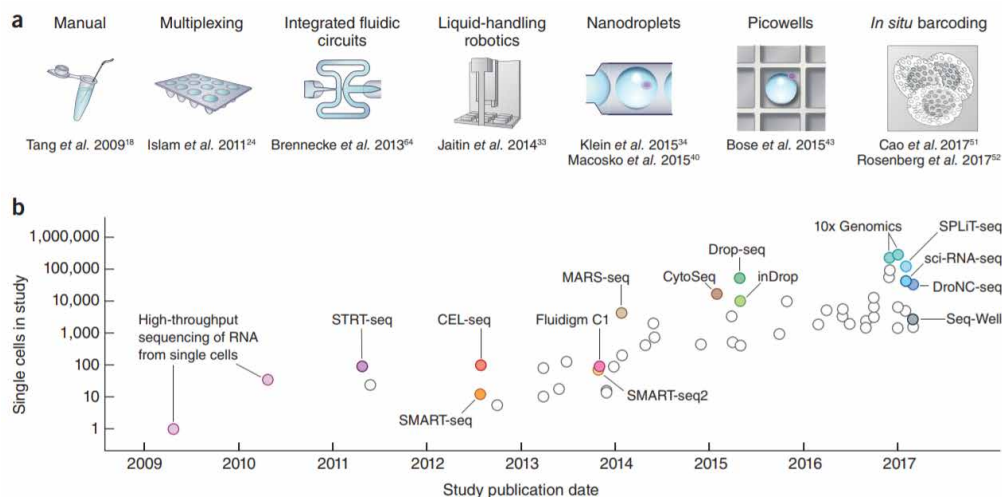


图 单细胞 RNA 测序技术的发展^[15]

参考文献

- [1] de Souza N. Single-cell genetics. *Nat Methods* 2013, 10(9):820.
- [2] The biology of genomes. Single-cell sequencing tackles basic and biomedical questions. *Science* 2012, 336(6084):976-7.
- [3] Method of the Year 2013. *Nat Methods* 2014, 11(1):1.
- [4] Method of the Year 2019: Single-cell multimodal omics. *Nat Methods* 2020, 17(1):1.
- [5] Tang F, Barbacioru C, Wang Y, et al. mRNA-Seq whole-transcriptome analysis of a single cell. *Nat Methods* 2009, 6(5):377-382.
- [6] Sasagawa Y, Nikaido I, Hayashi T, et al. Quartz-Seq: a highly reproducible and sensitive single-cell RNA sequencing method, reveals non-genetic gene-expression heterogeneity. *Genome Biol* 2013, 14(4):R31.
- [7] Islam S, Kjällquist U, Moliner A, et al. Characterization of the single-cell transcriptional landscape by highly multiplex RNA-seq. *Genome Res* 2011, 21(7):1160-7.
- [8] Ramsköld D, Luo S, Wang YC, et al. Full-length mRNA-Seq from single-cell levels of RNA and individual circulating tumor cells. *Nat Biotechnol* 2012, 30(8):777-782.
- [9] Picelli S, Faridani OR, Björklund AK, et al. Full-length RNA-seq from single cells using Smart-seq2. *Nat Protoc* 2014, 9(1):171-81.
- [10] Smith C. Cancer shows strength through diversity. *Nature* 2013, 499(7459):505-8.
- [11] Macosko EZ, Basu A, Satija R, et al. Highly Parallel Genome-wide Expression Profiling of Individual Cells Using Nanoliter Droplets. *Cell* 2015, 161(5):1202-14.
- [12] Klein AM, Mazutis L, Akartuna I, et al. Droplet barcoding for single-cell transcriptomics applied to embryonic stem cells. *Cell* 2015, 161(5):1187-201.
- [13] M Soumillon, D Cacchiarelli, S Semrau, et al. Characterization of directed differentiation by high-throughput single-cell RNA-Seq. *Anatomical Record* 2014, 217(1):16
- [14] Fan HC, Fu GK, Fodor SP. Expression profiling. Combinatorial labeling of single cells for gene expression cytometry. *Science* 2015, 347(6222):1258367.
- [15] Svensson V, Vento-Tormo R, Teichmann SA. Exponential scaling of single-cell RNA-seq in the past decade. *Nat Protoc* 2018, 13(4):599-604.

第二部分 单细胞 RNA 测序解决方案

2012 年，由美国和瑞典的科学家共同开发了称为 Smart-Seq (Switching mechanism at 5' end of the RNA transcript) 的技术。在 2013 年，Nature Methods 杂志上报告了新的方案，被称为 Smart-Seq2。2015 年后，微流控 (Drop-Seq) 和微孔板 (Micro-Well) 单细胞捕获技术的出现，大大提升了单细胞测序的通量和降低了单个细胞测序的成本。随着这些技术在 10x Genomics 的 Chromium (液滴法) 及 BD 的 Rhapsody (微孔法) 等商业化平台的优化及推广，单细胞转录组测序技术取得了重大突破和广泛应用。

一、技术平台

1、SMART-seq

2012 年，由美国和瑞典的科学家共同开发了称为 Smart-Seq (Switching mechanism at 5' end of the RNA transcript) 的技术^[1]。在 2013 年，Nature Methods 杂志上报告了新的方案，被称为 Smart-Seq2^[2]，随后在 2014 年他们公布了详细的操作流程^[3]。获取单细胞并裂解细胞后，含有 oligo-dT 的引物与 mRNA 的 poly-A 结合，逆转录酶 MMLV 进行逆转录，逆转录酶到达 mRNA 5' 末端时，MMLV 的末端转移酶活性会在链 cDNA 的 3' 末端增加额外的胞嘧啶，这时 TSO 引物 3' 末端的 rGrG+G 结合到第一链末端的胞嘧啶，然后以第一链 cDNA 为模板进行延伸合成互补的第二链，全长 cDNA 经过 PCR 扩增后进一步进行测序文库的构建。

■ 技术优势

◎ 起始量低

1 个细胞起始，适用于难以满足 10x Genomics 等平台起始细胞量要求的样本。

◎ 覆盖度高

测序覆盖 cDNA 的全长序列，每个细胞能够获得上万个基因的表达。

◎ 信息全面

除了获得基因表达信息，数据能够用于可变剪接，cSNP 等分析，以及带 poly-A 结构的 lncRNA 研究。

■ 文库结构

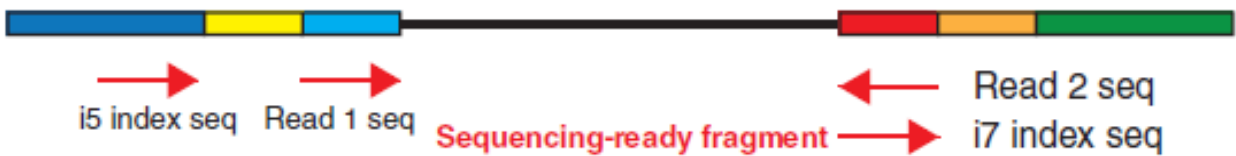


图 SMART-seq2 文库示意图

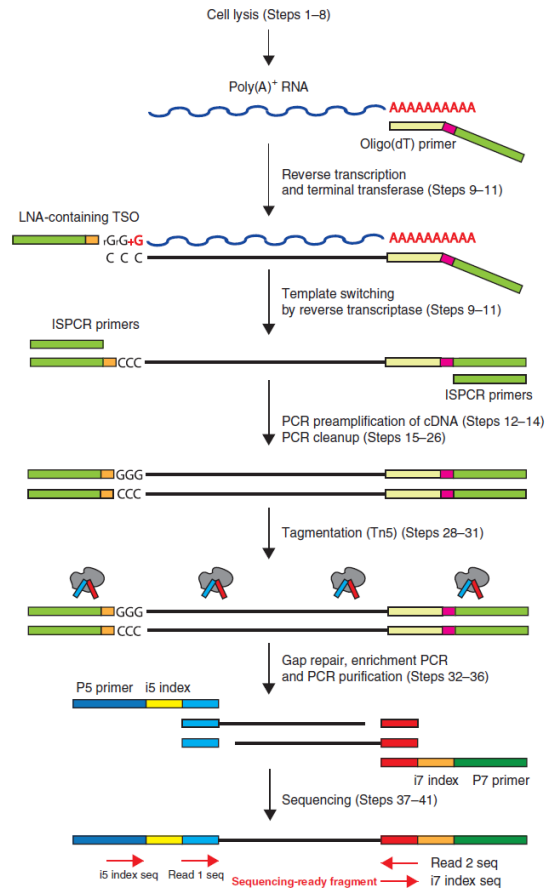


图 SMART-seq2 技术原理

■ 建议测序深度及参数

指标	参数
测序深度	6Gb/cell
测序类型	PE150

■ 样本要求

- ◎ 类型：新鲜组织，原代细胞，细胞系等。
- ◎ 来源：血液提取、磁珠富集、流式富集、组织解离等。
- ◎ 样本量：单个细胞（或微量细胞）。
- ◎ 保存运输：细胞放入 SMART-seq 试剂盒指定的裂解液中，-80°C 保存，干冰运输。

2、10x Genomics

10x Genomics 公司的 Chromium 系统利用 8 通道的微流体“双十字”交叉系统，将含 barcode 的凝胶珠 (Gel Beads)、细胞和酶的混合物、油二者混合，形成 GEMs (油包水的微体系)。GEMs 形成后，细胞裂解，凝胶珠自动溶解释放大量 barcode 序列，随后 mRNA 逆转录产生带有 10x barcode 和 UMI 信息的 cDNA，构建标准测序文库，其中 10x barcode 用于区分细胞，UMI 用于 mRNA 的定量。

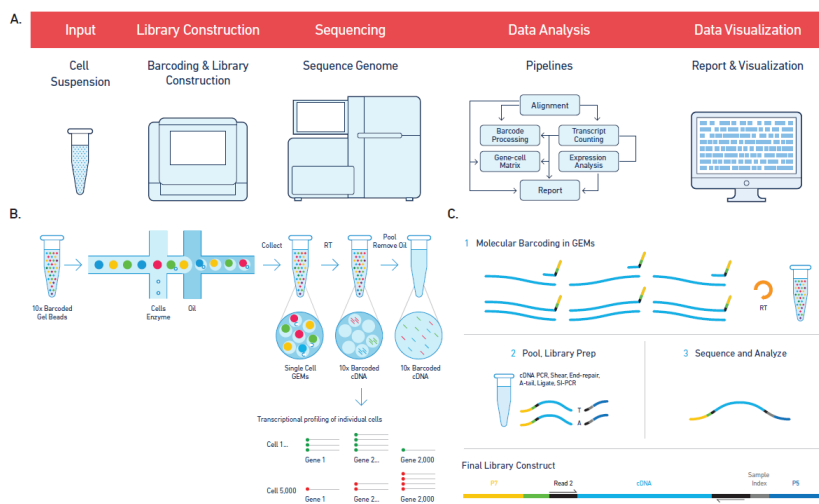


图 10x Genomics 基于 Poly A 捕获的 3' RNA 测序技术原理

■ 技术优势

- ◎ 通量高
10x Chromium X 仪器有 16 个通道，每个通道最多捕获 20,000 个细胞。
- ◎ 捕获率高
10x GEM-X 试剂 Chromium X 仪器细胞捕获率高达 80%，多胞率 4% (10000 细胞)。
- ◎ 样本兼容性强
可兼容新鲜组织、冷冻组织及 FFPE 样本等各种样本类型。
- ◎ 延展性强
除了获得单细胞 mRNA 的信息，还提供了单细胞 TCR/BCR、单细胞表面蛋白、单细胞 crispr 筛选、单细胞 ATAC 等多种解决方案。

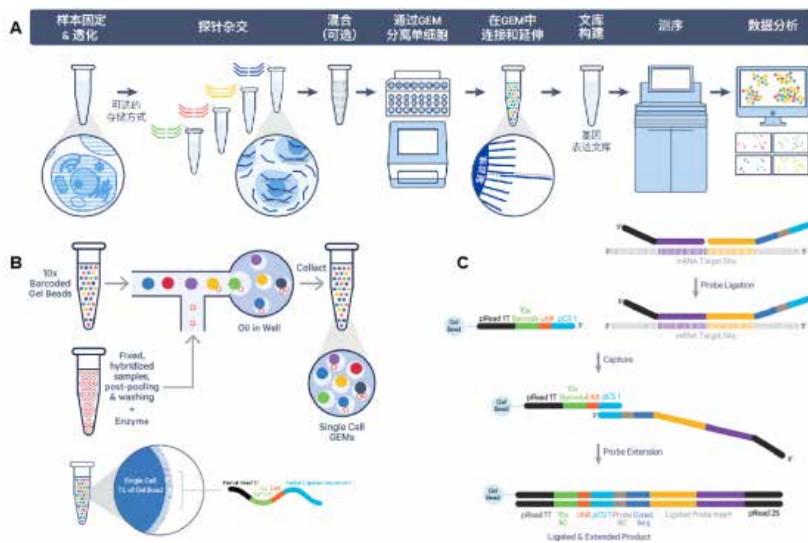


图 10x Genomics 基于探针捕获的 Flex 技术原理

文库结构

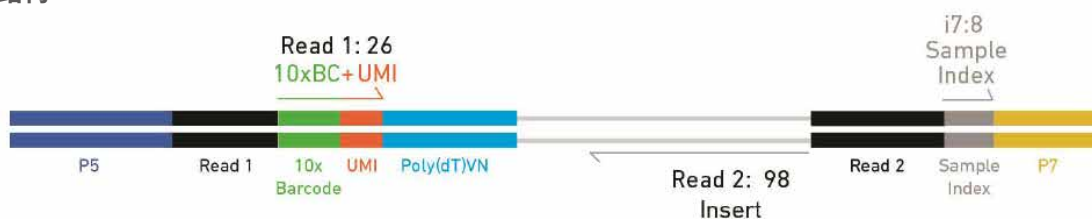


图 10x Genomics 3' gene expression 文库示意图

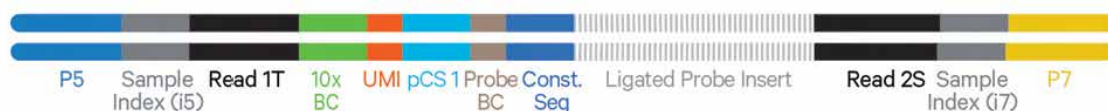


图 10x Genomics Flex 技术文库示意图

建议测序深度及参数

指标	参数
测序深度	30,000-100,000reads/cell
测序类型	PE150

样本要求

◎ 样本类型：

新鲜组织，冷冻组织，FFPE 样本，原代细胞，细胞系等。

◎ 样本量要求：

- 新鲜组织和冷冻组织：0.3cmx0.3cm (不超过 0.5cmx0.5cm) 的组织块，4~5 块；
- FFPE 样本：厚度不小于 25μm，被包埋组织横截面积不低于 0.3cmx0.3cm 的石蜡卷，3-4 卷。

◎ 质控要求：

- 新鲜组织细胞悬液：细胞计数 >5 万；
细胞活率 >80%；
细胞间无粘连 (成团率 <5%)：
无大于 40um 的细胞碎片或其他颗粒物：
不存在逆转录抑制剂和非细胞的核酸分子。
- 冷冻组织质控要求：细胞计数 >5 万；
细胞活率 >80%；
细胞间无粘连 (成团率 <5%)：
无大于 40um 的细胞碎片或其他颗粒物：
不存在逆转录抑制剂和非细胞的核酸分子。
- FFPE 样本质控要求：RNA 抽提质控：DV200>50%
细胞核计数 >50 万；
细胞间无粘连 (成团率 <5%)：
无大于 40um 的细胞碎片或其他颗粒物：
不存在逆转录抑制剂和非细胞的核酸分子。
- 血液：EDTA 抗凝的全血 (不可肝素抗凝)，>5mL。

◎ 保存运输：

(1) 细胞悬液：最好现场制备，如要运输，建议使用伯豪生物自主研发的单细胞保护液，4°C运输，48 小时内送达伯豪生物实验室。

- (2) 血液 :EDTA 抗凝的全血, 4°C运输, 2 小时内送达伯豪生物实验室, 或提取 PBMC 后冻存, 干冰运输。
- (3) 新鲜组织 : 建议使用伯豪生物自主研发的单细胞组织保护液, 4°C运输, 48 小时内送达伯豪生物实验室。
- (4) 冷冻组织 : 液氮速冻, -80°C保存, 干冰运输。
- (5) FFPE 样本 : 4°C或常温保存, 常温运输。

3、BD Rhapsody

BD Rhapsody 技术利用卡式芯片在磁性的寡核苷酸条形码标记微球上实现单细胞捕获和 mRNA 转录本的分子标签, 然后将这些微球合并到单个管中用于 cDNA 扩增和文库构建。可满足 100~10,000 个细胞的自动分选、扩增及建库。

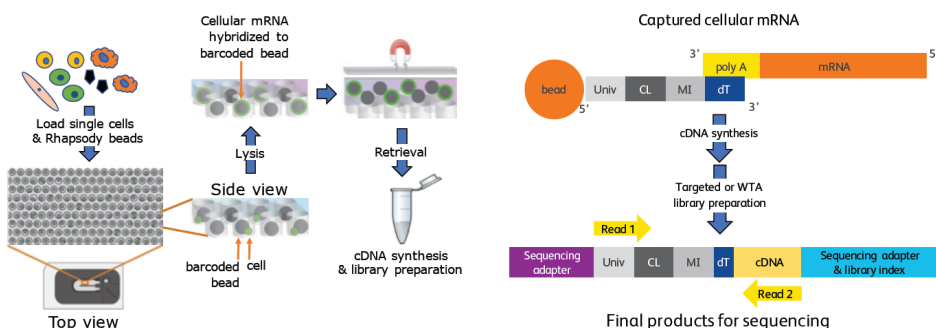


图 BD Rhapsody 技术原理

此外, 该技术使用带有寡核苷酸的高质量抗体 (Ab-oligos), 这条寡核苷酸带有抗体特异的条形码, 细胞在经过 Ab-oligos 标记后, 可在单细胞水平同时获得转录组和蛋白表达。

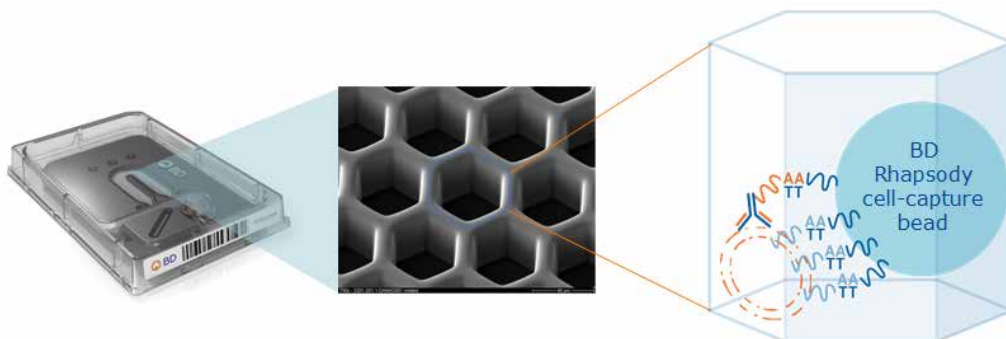


图 单细胞 mRNA 与蛋白同时测序

■ 技术优势

◎ 百万细胞通量, 随心所欲上样

BD Rhapsody™ HT Xpress 仪器每个样本每个通道可上 100-60,000 个细胞, 兼容稀少样本、常规样本、海量样本 8 个样本通道 / 微孔板, 叠加样本标签, 轻松实现百万级细胞通量

◎ 温和微孔技术, 无损细胞

自然沉降的微孔板技术对细胞温和而无损伤

适用于不同大小和形态的细胞, 包括脆弱的细胞类型

◎ 多细胞率低, 细胞捕获率高

实验强健而稳定, 特定细胞类型捕获率高达 80%

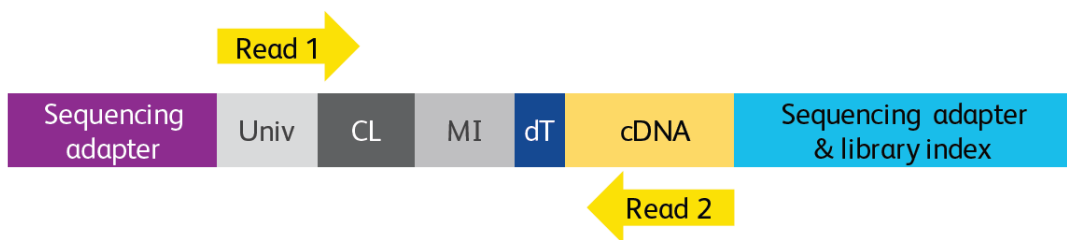
上机 2.5w, 多胞率约 5.2%。多细胞率低, 获得更高有效数据

◎ 单细胞多组学平台, 探索更多发现

BD Rhapsody™分析系统可同时进行转录组、蛋白组、免疫组库 (人 / 鼠) 研究

独特的混样技术可有效节约时间与成本, 满足不同的实验需求

文库结构



建议测序深度及参数

指标	参数
测序深度	30,000-100,000reads/cell
测序类型	PE150

样本要求

- ◎ 类型：新鲜组织，原代细胞，细胞系等。
- ◎ 来源：血液提取、磁珠富集、流式富集、组织解离等。
- ◎ 样本量及其它质控要求：

- (1) 细胞悬液：>10⁵ 目标细胞个数（最少 10,000 个细胞）；
活率 >80%；
浓度 500-1,000 个细胞 /μL；
细胞间无粘连（成团率 <5%）；
无大于 40μm 的细胞碎片或其他颗粒物；
不存在逆转录抑制剂和非细胞的核酸分子。

(2) 血液：EDTA 抗凝的全血（不可肝素抗凝），>5mL。

(3) 组织：0.3cm×0.3cm（不超过 0.5cm×0.5cm）的新鲜组织，4~5 块。

◎ 保存运输：

(1) 细胞悬液：最好现场制备，如要运输，建议使用伯豪生物自主研发的单细胞保护液，4°C 运输，48 小时内送达伯豪生物实验室。

(2) 血液：EDTA 抗凝的全血，4°C 运输，2 小时内送达伯豪生物实验室；或提取 PBMC 后冻存，干冰运输。

(3) 组织：建议使用伯豪生物自主研发的单细胞组织保护液，4°C 运输，48 小时内送达伯豪生物实验室。

二、数据分析

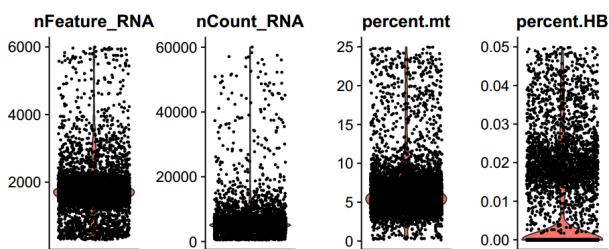


图 数据质控及过滤

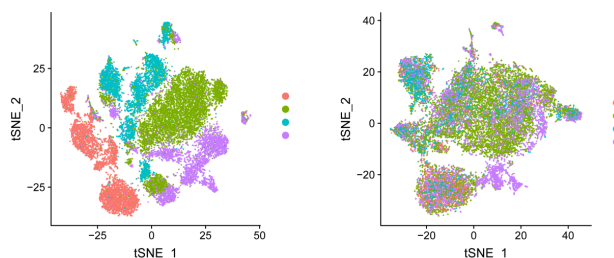


图 去除批次效应

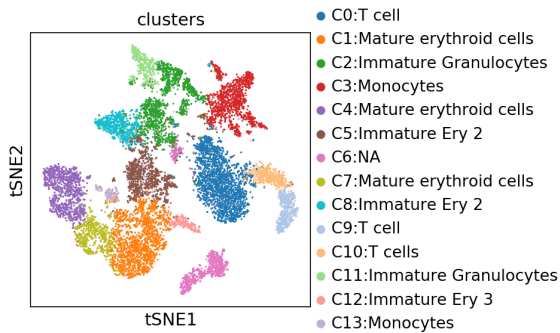


图 细胞亚群注释

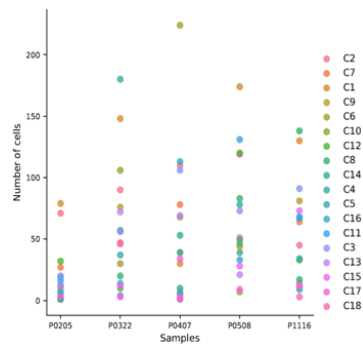


图 样本间的细胞构成差异

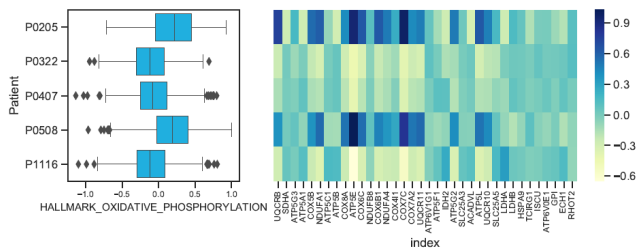


图 样本间的功能差异分析

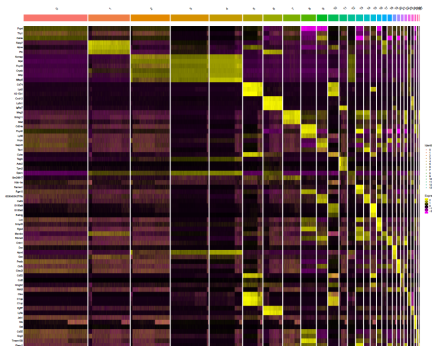


图 Marker 基因分析

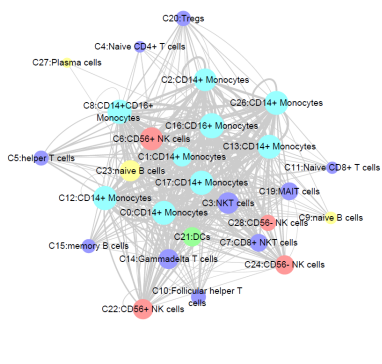


图 细胞通讯网络

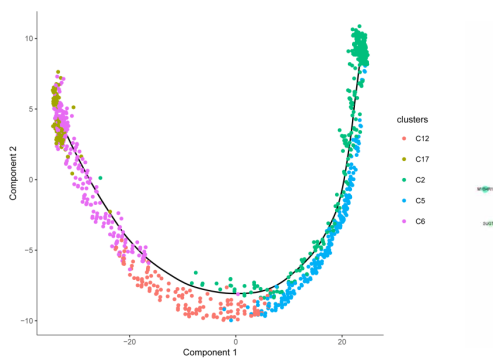


图 拟时序分析

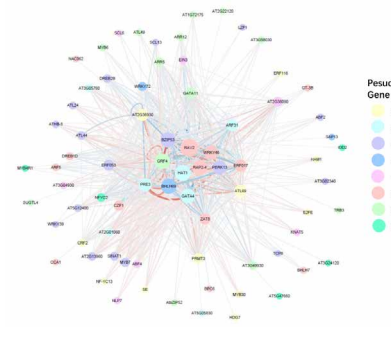


图 拟时序分化转录因子调控网络

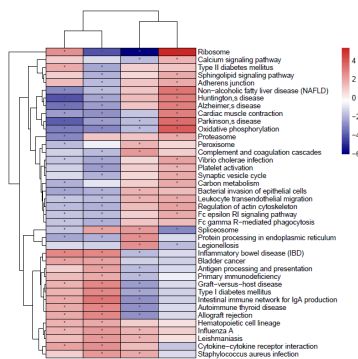


图 细胞亚群的功能富集在样本间的差异

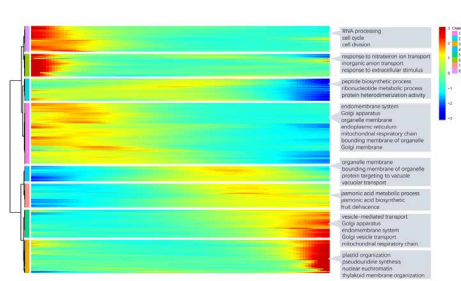


图 拟时序 GO 注释

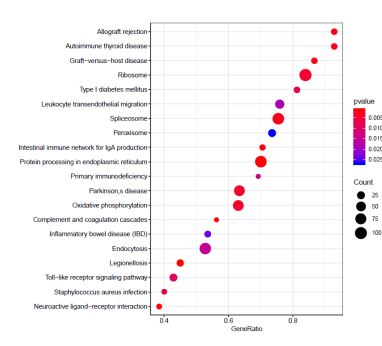


图 细胞亚群的功能富集分析

三、应用方向

1、胚胎发育

人类胚胎发育早期仅能收集微量的胚胎细胞和干细胞，这对于了解控制胚胎发育的基因调控网络是一个难题，利用单细胞 RNA-Seq 技术对转录组进行分析则克服了转录组分析对细胞数量要求的限制，近年来已有多篇相关报道。北京大学汤富酬教授课题组早在 2009 年就对单个小鼠卵裂球的进行 RNA-Seq^[4]，检测到了比微阵列技术多 75% (5270) 的表达基因，并且确定了 1753 个新的可变剪接位点。这种单细胞 mRNA-Seq 检测将大大提高我们对单个细胞在哺乳动物发展中转录复杂性的分析能力，尤其是胚胎发育早期和干细胞这类在体内罕见的细胞群。2013 年，他们又对 90 个处于不同发育阶段的人类早期胚胎细胞以及 34 个胚胎干细胞进行了详尽的分析^[5]，检测出了 22,687 个母源表达基因，其中包括 8,701 条长链非编码 RNAs，相比于以往通过 microarray 检测出的 9,735 个母源基因数量大大增加。研究还发现了 2,733 条新的 lncRNAs，其中许多只在特定的发育阶段表达。此外，实验还检测到 1498 个基因在上胚层 (Epiblast, EPI) 和体外人类胚胎干细胞间存在差异表达，证实了 EPI 和 ESCs 具有显著不同的转录组，有显示差异性表达，从而解答了人类上胚层和体外干细胞之间的基因表达是否相同这一由来已久的问题。

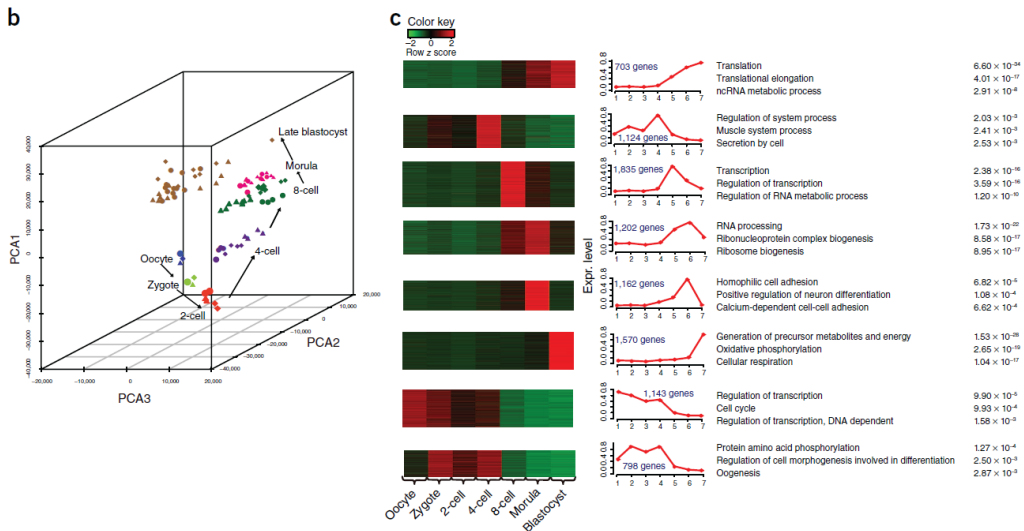


图 早期胚胎的单细胞测序^[5]

2、器官发育

发育是一个极其复杂的过程，器官发生涉及到多种细胞类型的协调作用，期间基因表达受到严密、精准的调控，这一过程中的基因表达调控机制仍然亟需深入研究。心脏是哺乳动物在胚胎期最先形成的功能器官之一。尽管已有对小鼠胚胎心脏发育的大量系统研究，但是人类与小鼠的心脏存在着很大差异。2019 年，汤富酬课题组和乔杰课题组合作，利用高精度单细胞转录组测序技术对人类胚胎 5 周至 25 周心脏的 4,000 多个单细胞进行了系统的分析^[6]。该研究系统鉴定了人类胚胎期心脏的主要细胞类型，包括心肌细胞、成纤维细胞、内皮细胞、瓣膜细胞、心外膜细胞、平滑肌细胞以及各种免疫细胞（包括肥大细胞、巨噬细胞、T 细胞和 B 细胞）。随着心脏发育进展，心房、心室中的心肌细胞比例显著下降，成纤维细胞、巨噬细胞等非心肌细胞的比例逐渐上升，这说明在发育过程中成纤维细胞等非心肌类型细胞对心脏发育的作用可能越来越重要。此外，还发现心肌细胞解剖位置特异性的基因表达特点，而这些特点在早至胚胎发育第 5 周时就已经有明确显现。此外，通过与已经发表的小鼠心脏发育的单细胞转录组数据进行系统比较，鉴定出一系列人类心脏发育过程中主要细胞类型特异表达的重要基因。该研究还发现人类与小鼠的心脏中心肌细胞是最为相似的细胞类型，而成纤维细胞等细胞类型的物种间差异较大，这为利用小鼠模型研究人类的心脏发育提供了参比标准。

The critical characteristics of each cell types/subtypes				Cell proportion over developmental stage		
Cell type	Markers	Subtype	Markers	Early	Mid	Late
Cardiomyocyte (CM)	TNNT2, TNNC1, ACTC1, TNNI3, ACTN2, NKX2-5, ENO3, COX6A2	CM-A	MYH6, TBX5, PAM, NR2A1			
		CM-V	MYH7, MYL2, LBH, NAV1, HAND1			
		Trabecular CM	ANGPT1, COL2A1, ITGA6, RELN, SLIT2, CRABP2			
		CME ¹	OPHN1, FOXK1, COL3A1, DCN			
Endothelial cell (EC)	RAMP2, EMCN, PECAM1, CDH5, TIE1, TEK, HES1	Coronary vascular EC	FABP4, CD36			
		Vascular EC	ELN, FNLN5			
		Valvar EC	NTRK2, NFATC1			
		Endocardial cells	CDH11, NPR3			
		proEP ²	KLK6, CRABP2			
Epicardia cell (EP)	UPK3B, ALDH1A2, WT1, TBX18	EP	CFB, C3, PRG4			
		Fibroblast	DCN, COL1A1, FBLN1, LUM, TCF21			
Valvar cell	APCDD1, EDIL3, SCRG1, SLN, NR4A2					
Mast cell	HDC, CPA3, KIT, GATA2, TPSB2, TPSAB1					
Macrophage	CD74, AIF1, CSF1R, CD163, CD68					
B/T cells	IFITM1, IL2RG, CD7, CD3E, CD3D					

¹ CME+: CMs expressing extracellular matrix genes; ² Proepicardial cell

图 心脏发育过程中主要细胞类型的时空特征^[6]

3、干细胞分化

造血干细胞 (HSC) 具有长期自我更新、分化成多种成熟血细胞的潜能。它起源于胚胎前体, 包括生血内皮细胞和造血干细胞前体 (pre-HSCs)。2016 年, 军事医学科学院刘兵课题组利用 pre-HSCs 特异性的表面标志, 分离出高纯度的 pre-HSCs。并针对 HSC 发育过程中具有代表性的 5 类细胞进行单细胞转录组测序, 绘制了 HSC 发育过程的转录组图谱, 揭示了 pre-HSC 在转录活性、基因表达、代谢状态、信号通路和转录因子网络等方面的特征^[7]。发现并揭示 mTOR 信号通路在特异性调控 HSC 发育中发挥了关键作用。此外, 还发掘出 Pre-HSC 的 98 个特征基因。该研究为今后阐明 HSC 的体内发育规律、发掘 HSC 的体外再生策略提供了可靠的理论依据和数据资源。基于以上单细胞转录组数据, 课题组在 2019 年进一步描绘出 HSC 发育全程的 lncRNA 动态表达图谱, 并鉴定到在 HSC 发育过程中重要的功能性 lncRNA 分子^[8]。本研究通过生物信息学分析筛选获得一组潜在的功能性 lncRNA, 并通过体外功能实验发现 6 个可能在胚胎造血发育中发挥作用的 lncRNA。利用条件基因敲除研究策略, 着重阐明了 lncRNA-H19 对于 AGM 区 HSC 发生的重要作用。lncRNA-H19 的缺失使得重要造血转录因子 (包括 Runx1 及 Spi1 等) 的启动子区域高甲基化并下调其表达, 以致血管内皮细胞向 pre-HSC 的转化阻滞。

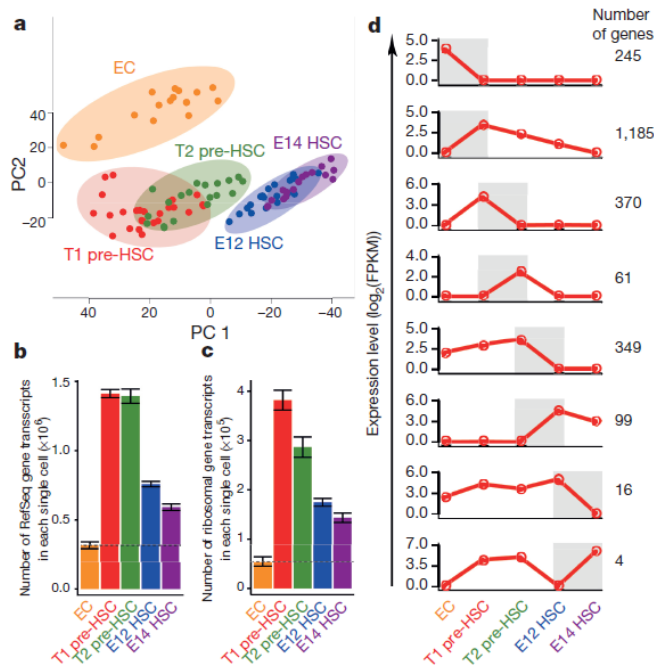


图 神经元单细胞测序及亚群分类^[9]

4、神经科学

神经科学是单细胞测序的另一个应用领域，哺乳动物的大脑中有数十亿个神经元，每个神经元可根据形态特征，电生理特性，分子标记进行归类。在一群细胞中，单个神经元特异性的信息就被稀释了，少数细胞特异的基因表达则有可能无法检测到。研究不同神经元的表达模式能够为我们提供更全面的基因表达图谱、甚至表达调控网络。而且，将单个神经元的基因表达于神经元的表型信息结合起来，还能帮助我们对神经元进行更加准确和细致的分类。上海伯豪助力中国科学院上海生命科学研究院神经科学研究所张旭院士研究组，通过高覆盖度的单细胞测序和以神经元大小为参考的层次聚类，对小鼠背根神经节初级感觉神经元进行了分类，又通过全细胞膜片钳在体记录结合单细胞 PCR 方法可检测各类初级感觉神经元对外周皮肤刺激的反应。该工作首次通过高覆盖的单细胞测序对初级感觉神经元进行了重新分类，并且建立了基因表达与在体功能的相互关系^[9]。

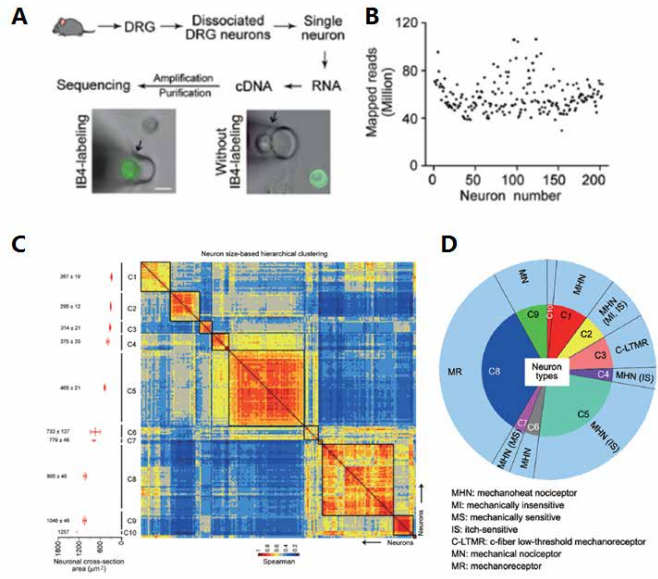


图 神经元单细胞测序及亚群分类^[9]

5、肿瘤微环境

肿瘤细胞能够采用不同策略，使人体的免疫系统受到抑制，不能正常杀伤肿瘤细胞，上述过程被称为免疫逃逸。免疫治疗通过激活人体自身的免疫系统，恢复机体正常的抗肿瘤免疫反应，从而控制与清除肿瘤。其中抗程序性死亡蛋白 1 (programmed death 1, PD-1) 及其配体 (PD-L1) 抑制剂是目前研究最多，发展最快的一种免疫疗法。在各种肿瘤中，接受 PD-1 /PD-L1 抑制剂单药治疗患者的客观有效率也仅为 10-30%，大部分患者对免疫检查抑制剂并不敏感。随着研究的深入，人们逐渐了解到肿瘤微环境的复杂性和多样性，以及它对免疫治疗的重要影响。肿瘤微环境与肿瘤细胞相互作用，共同介导了肿瘤的免疫耐受，从而影响了免疫治疗的效果。抗肿瘤免疫应答是由众多免疫细胞和分子参与的复杂过程，受到机体复杂而精细的调控，这其中的机制仍有待进一步研究。2017 年 6 月，北京大学张泽民课题组及其合作在 Cell 杂志发表了肝癌 T 细胞图谱研究^[10]，研究总共获得 5,063 个单细胞的数据，总共聚类为 11 个 T 细胞亚群，包括 5 个 CD8+T 细胞亚群和 6 个 CD4+T 细胞亚群。其中肝癌组织中浸润 Tregs 细胞亚群 (C8_CD4-CTLA4) 和耗竭性 CD8 T 细胞亚群 (C4_CD8-LAYN) 显著富集，并且在这两类细胞中表达的 PDCD1 和 TIGIT 等，是免疫治疗的靶点。在肿瘤浸润性 Tregs 中，共鉴定出 401 个特异表达基因，在耗竭性 CD8 T 细胞中，鉴定出 82 个特异表达基因，并且发现了新的耗竭 maker，如 LAYN, PHLDA1 和 SNAP47 等。值得注意的是，其中 22 个耗竭 marker 同时也在肿瘤浸润性 Tregs 细胞中高表达，例如 CTLA4 和 LAYN 等。并且利用 TCGA 的数据进行生存分析，发现 LAYN 的表达显著降低生存期。本研究还在单细胞水平进行了 TCR 测序和分析，结果发现，在肿瘤浸润的 exhausted T 细胞和 Tregs 细胞中，观察到 TCRs 发生了重复使用。在肿瘤组织中含有相同 TCR 的 T 细胞比例较高，而在外周血和正常组织中比例较低，这说明在肿瘤中的 exhausted T 细胞和 Tregs 细胞发生了克隆扩增。并且相比于早期病人，晚期病人中 T 细胞的克隆扩增更加明显。本研究为肿瘤免疫的图谱勾画做出了范式，也为今后其他肿瘤开展类似的研究及各类肿瘤免疫的发展提供基础。

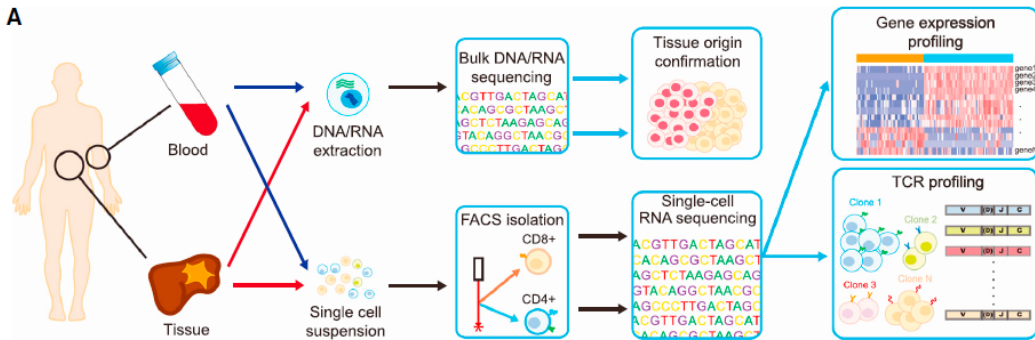


图 肝癌患者的单细胞测序^[10]

6、用药指导

药物诱发的超敏综合症 (DiHS/DRESS) 是一种致命的多器官炎症性疾病，与疱疹病毒再激活和诱发的自身免疫性疾病相关。病理生理学仍然不清楚，临床治疗的选择有限。2020 年 1 月发表在 Nature Medicine 上研究对 DiHS/DRESS 患者的皮肤和血液进行了 scRNA-seq 检测^[11]。皮肤活检组织通过单细胞 RNAseq 发现，患者对比健康人差异表达基因数量最多的是淋巴细胞群体。分析皮肤活检的淋巴细胞，发现患者淋巴细胞呈现不同的分群。患者淋巴细胞中高表达的代表性基因有 CCR10, JAK3, STAT1 等。

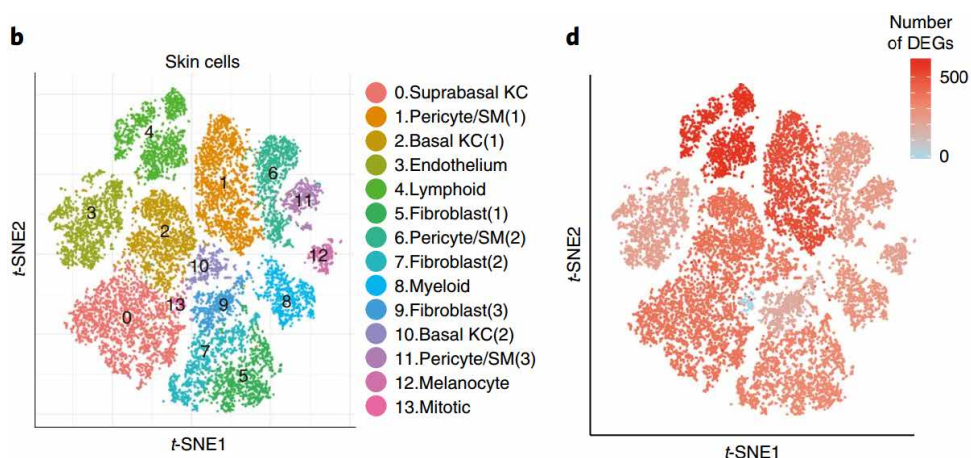


图 患者皮肤活检的淋巴细胞呈现不同的分群^[11]

血液 PBMCs 细胞通过单细胞测序发现，患者对比健康人差异表达基因数量最多的是 CD4 和 CD8 阳性的亚型细胞和增殖的细胞。比较血液 PBMCs 在患者和健康人中的细胞群体分布，发现 CCR4 和 CCR10 (免疫细胞皮肤归巢趋化因子受体) 高表达的 CD4 和 CD8 阳性细胞在患者中显著高于健康人。在患者的这个细胞群体中，表达 JAK3, STAT1, IL2RG 等基因的细胞比例明显高于健康人。

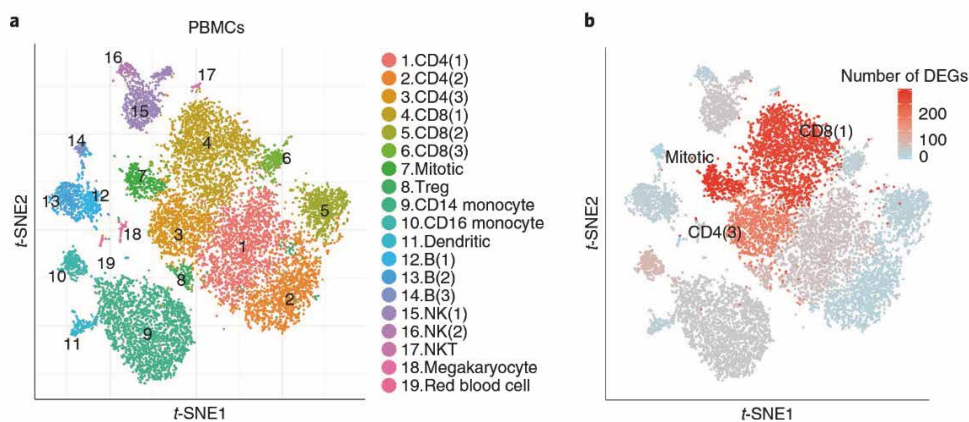


图 患者血液的 CD4 和 CD8 细胞呈现不同的分群^[11]

给予患者 JAK 抑制剂 (tofacitinib) 和口服抗疱疹病毒抑制剂 (valganciclovir) 后, 患者的症状得到了极大的临床获益。治疗前后的血液 PBMCs 细胞再次经过单细胞 RNAseq 检测发现细胞群体分布明显分化。体外实验也证实 JAK 抑制剂 (tofacitinib) 和抗病毒药物 (Ganciclovir 和 Artesunate) 能够有效抑制药物 (SMX-TMP) 诱导的 T 细胞增殖。

7、病毒感染

2020 年 1 月, 整个中国因新型冠状病毒 2019-nCov 得了一场“感冒”。疫情一开始, 武汉病毒研究所石正丽团队就用实验证实了血管紧张素转化酶 2 (Angiotensin-converting enzyme 2, ACE2) 是新型冠状病毒感染人体的受体基因。2020 年 1 月 26 日, 上海同济大学医学院左为研究团队在《bioRxiv》上发表了题为“Single-cell RNA expression profiling of ACE2, the putative receptor of Wuhan 2019-nCov”的文章^[12]。

该研究利用已有的数据库, 结合单细胞 RNA 测序技术中相关生信分析, 对 ACE2 在人肺内单个细胞的表达情况进行了分析, 共涉及 8 个样本, 43134 个细胞。结果表明: ACE2 受体主要在一部分 (1% 左右) II 型肺泡上皮细胞 (AT2) 中表达; 同时发现这些 AT2 细胞除了表达病毒受体, 还表达与病毒复制和传播相关的基因, 说明其很可能是冠状病毒的靶细胞。可见, 单细胞测序技术不仅是科研的利器, 同时还为破解疫情做了应有的贡献。

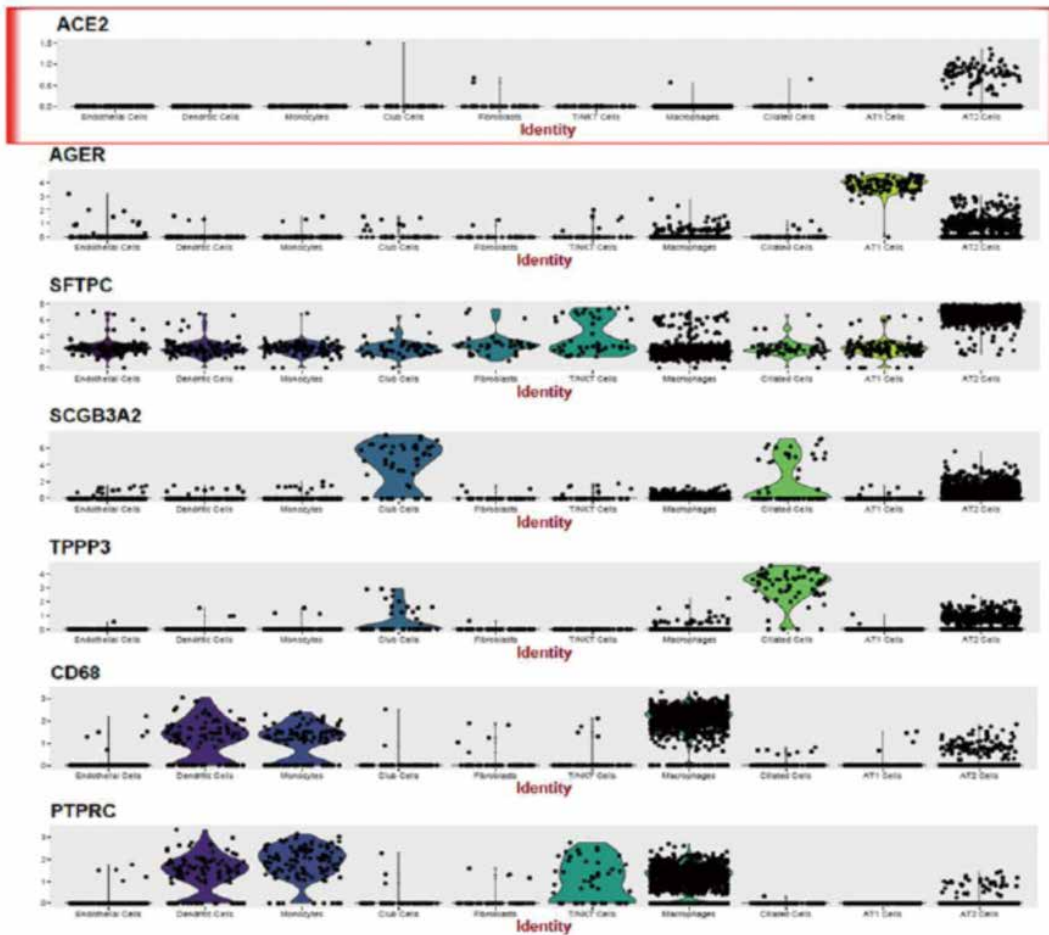


图 ACE2 和其它 marker 基因在细胞亚群中的表达^[12]

参考文献

- [1] Ramskold D, Luo S, Wang YC, et al. Full-length mRNA-Seq from single-cell levels of RNA and individual circulating tumor cells. *Nat Biotechnol* 2012, 30(8):777-782.
- [2] Picelli S, Björklund ÅK, Faridani OR, et al. Smart-seq2 for sensitive full-length transcriptome profiling in single cells. *Nat Methods* 2013, 10(11):1096-8.
- [3] Picelli S, Faridani OR, Björklund AK, et al. Full-length RNA-seq from single cells using Smart-seq2. *Nat Protoc* 2014, 9(1):171-81.
- [4] Tang F, Barbacioru C, Wang Y, et al. mRNA-Seq whole-transcriptome analysis of a single cell. *Nat Methods* 2009, 6(5):377-382.
- [5] Yan L, Yang M, Guo H, et al. Single-cell RNA-Seq profiling of human preimplantation embryos and embryonic stem cells. *Nat Struct Mol Biol* 2013, 20(9):1131-1139.
- [6] Cui Y, Zheng Y, Liu X, et al. Single-Cell Transcriptome Analysis Maps the Developmental Track of the Human Heart. *Cell Rep* 2019, 26(7):1934-1950.e5.
- [7] Zhou F, Li X, Wang W, et al. Tracing haematopoietic stem cell formation at single-cell resolution. *Nature* 2016, 533(7604):487-92.
- [8] Zhou J, Xu J, Zhang L, et al. Combined Single-Cell Profiling of lncRNAs and Functional Screening Reveals that H19 Is Pivotal for Embryonic Hematopoietic Stem Cell Development. *Cell Stem Cell* 2019, 24(2):285-298.e5.
- [9] Li CL, Li KC, Wu D, et al. Somatosensory neuron types identified by high-coverage single-cell RNA-sequencing and functional heterogeneity. *Cell Res* 2015, 26(1):83-102.
- [10] Zheng C, Zheng L, Yoo JK, et al. Landscape of Infiltrating T Cells in Liver Cancer Revealed by Single-Cell Sequencing. *Cell* 2017, 169(7):1342-1356.
- [11] Kim D, Kobayashi T, Voisin B, Jet al. Targeted therapy guided by single-cell transcriptomic analysis in drug-induced hypersensitivity syndrome: a case report. *Nat Med* 2020,26(2):236-243.
- [12] Yu Zhao, Zixian Zhao, Yujia Wang, et al. Single-cell RNA expression profiling of ACE2, the putative receptor of Wuhan 2019-nCov. *bioRxiv* 2020.

第三部分 单细胞 TCR/BCR 测序解决方案

免疫组库 (Immune Repertoire, IR) 是指机体内 T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞多样性的总和, 反映机体免疫系统在特定时间段内应对外界刺激应答的能力。通过单细胞平台, 可实现高通量的单细胞转录组和 V(D)J 测序。不但可以将 TCR/BCR 双链匹配, 而且能够同时获得基因表达信息。

一、技术平台

10x Genomics 平台

10x Genomics 单细胞免疫组库测序与单细胞 RNA 测序一样, 通过微流控系统将有带有条形码和引物的凝胶珠与单个细胞包裹在油滴中; 接下来在每个油滴内, 凝胶珠溶解, 细胞裂解释放 mRNA, 通过逆转录产生带有 10x barcode 和 UMI 信息的 cDNA。破油 (Breaking Emulsions) 之后, cDNA 一分为二, 后续同时进行基因表达和免疫组库的文库构建。其中 TCR 或者 BCR 的 V(D)J 序列通过设计在 C 区的巢式引物进行 PCR 富集; 而 mRNA 的信息, 与 10x Genomics 3'mRNA 文库不同, 保留的是 5' 端的信息。测序后即可一次性获得大量单细胞的基因表达和免疫组库数据。



图 5'mRNA 与 TCR/BCR 同时建库

BD Rhapsody 平台

BD Rhapsody 单细胞免疫组库测序通过微孔捕获、分子标签和靶向扩增这一核心技术组合, 在单细胞水平捕获 mRNA, 能完美地将来自同一个细胞的 TCR 或 BCR 的两条链进行匹配, 这对于理解功能性免疫受体的构成至关重要。

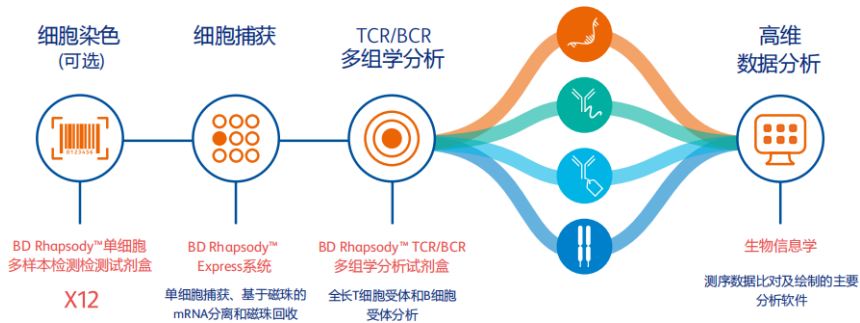


图 BD Rhapsody 单细胞免疫组库测序

二、技术优势

双链精准匹配：能精确配对 BCR 的重链与轻链或 TCR 的 α 链与 β 链。

超高分辨率：在单细胞水平揭示免疫组库的克隆组成和多样性。

多组学关联分析：可同时获得同一细胞的全转录组基因表达数据和 V(D)J 序列信息，从而将细胞克隆性与其功能状态、细胞亚群归属联系起来。

获得全长序列：优于传统方法仅能获得 CDR3 部分序列，能获取更完整的 V(D)J 全长信息，有助于发现新的受体序列。

■ 样本要求

◎ 类型：新鲜组织，原代细胞，细胞系等。

◎ 来源：血液提取、磁珠富集、流式富集、组织解离等。

◎ 样本量及其它质控要求：

(1) 细胞悬液： $>10^5$ 目标细胞个数（最少 10,000 个细胞）；

活率 $>80\%$ ；

浓度 500-1,000 个细胞 / μL ；

细胞间无粘连（成团率 $<5\%$ ）；

无大于 $40\mu\text{m}$ 的细胞碎片或其他颗粒物；

不存在逆转录抑制剂和非细胞的核酸分子。

(2) 血液：EDTA 抗凝的全血（不可肝素抗凝）， $>5\text{mL}$ 。

(3) 组织： $0.3\text{cm} \times 0.3\text{cm}$ （不超过 $0.5\text{cm} \times 0.5\text{cm}$ ）的新鲜组织，4-5 块。

◎ 保存运输：

(1) 细胞悬液：最好现场制备，如要运输，建议使用伯豪生物自主研发的单细胞保护液， 4°C 运输，48 小时内送达伯豪生物实验室。

(2) 血液：EDTA 抗凝的全血， 4°C 运输，2 小时内送达伯豪生物实验室；或提取 PBMC 后冻存，干冰运输。

(3) 组织：建议使用伯豪生物自主研发的单细胞组织保护液， 4°C 运输，48 小时内送达伯豪生物实验室。

■ 应用方向

◎ 基础免疫学

◎ 肿瘤免疫和免疫治疗

◎ 自身免疫性疾病和炎症性疾病

◎ 传染病和疫苗研究移植和免疫重建

三、应用案例

1、肝癌免疫微环境

2017 年，北京大学张泽民教授课题组通过大规模单细胞测序技术对肝癌相关 T 淋巴细胞进行了分析，首次在单细胞水平上描绘肝癌微环境中免疫图谱^[1]。研究者收集了 6 例肝癌患者的外周血，癌旁正常组织、肝癌组织作为实验样本，然后从各类样本中用流式分选出 $\text{CD}3+\text{CD}8+$ (cytotoxic T cells, Tc) 细胞，以及 $\text{CD}4+\text{CD}25-$ (Helper T cells, Th) 细胞和 $\text{CD}4+\text{CD}25+$ (regulatory T cells, Tregs) 细胞，并进行了单细胞转录组测序和单细胞 TCR 测序，总共获得 5,063 个单细胞的数据。其中，单细胞水平分析 TCR 序列发现，在肿瘤浸润的 exhausted T 细胞和 Tregs 细胞中，观察到 TCRs 发生了重复使用。在肿瘤组织中含有相同 TCR 的 T 细胞比例较高，而在外周血和正常组织中比例较低，这说明在肿瘤中的 exhausted T 细胞和 Tregs 细胞发生了克隆扩增。并且相比于早期病人，晚期病人中 T 细胞的克隆扩增更加明显。

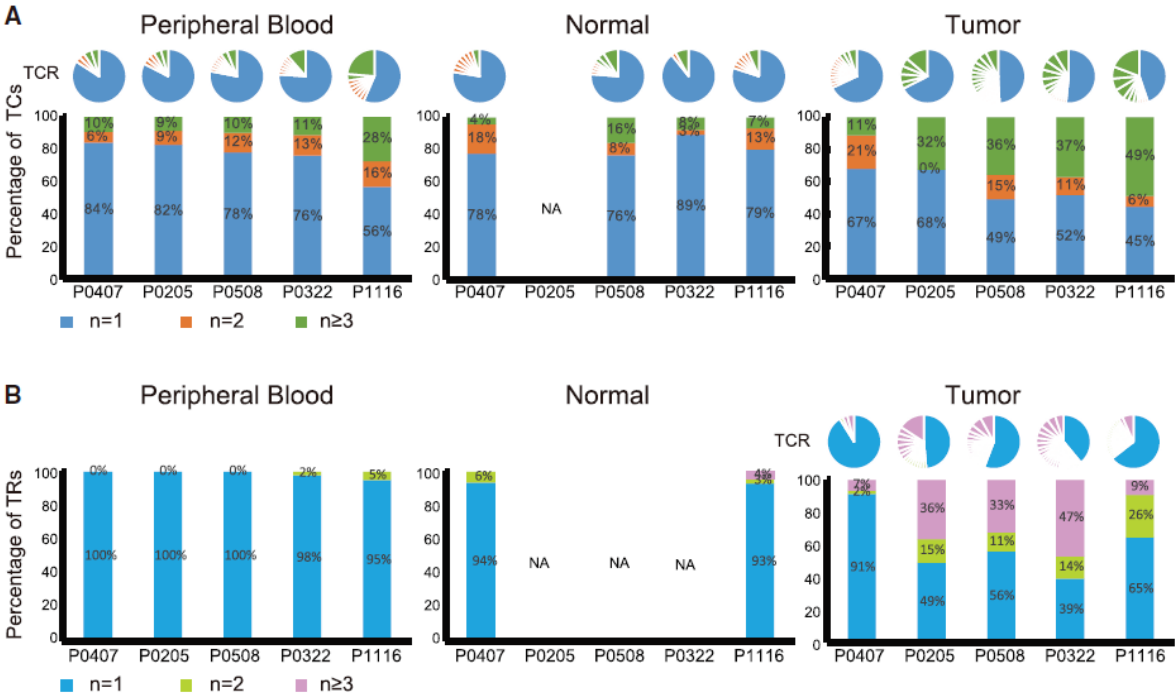


图 肝癌中 T 细胞的克隆扩增^[1]

2、黑色素瘤免疫微环境

2019 年发表在 Cell 上发表的一篇文章，对 25 个黑色素瘤患者肿瘤中总共 46,621 个免疫细胞进行了单细胞 RNA 和 TCR 测序^[2]。这些细胞被分成 7 个大群，包括 T 细胞 (CD3)，NK 细胞 (KLRD1)，树突细胞 (DCs; CD1C)，巨噬细胞 (C1Q)，单核细胞 (VCAN)，B 细胞 (CD19)，和浆细胞 (immunoglobulins)。初始 T 细胞高表达 IL7R, CCR7 和转录因子 TCF7，特异性表达的基因整体来说比其它类型的细胞少。而非初始 T 细胞具有很高的异质性，其中一小群是记忆 T 细胞，大部分细胞是过渡性 CD8 T 细胞 (transitional CD8 effector T)，细胞毒性 CD8 T 细胞 (cytotoxic CD8 effector T) 和丧失功能的 CD8 T 细胞 (dysfunctional CD8 T cells)，高表达 PD-1 和 LAG3。这些细胞类群的边界是模糊的，提示转录的梯度表达是造成 T 细胞异质性的原因。CD4 T 细胞主要有高表达 FOXP3 的 Treg，滤泡辅助 T 细胞 (CXCL13 表达)，以及一小群高表达免疫检查点分子的细胞 (dysfunctional CD4 T cells)。分析每名患者的免疫细胞组成，发现大部分 T 细胞类群在患者中都存在，但是病人之间不同细胞类群的丰度有很大差异。丧失功能的 CD8 T 细胞的负荷可能是黑色素瘤最本质的特征。

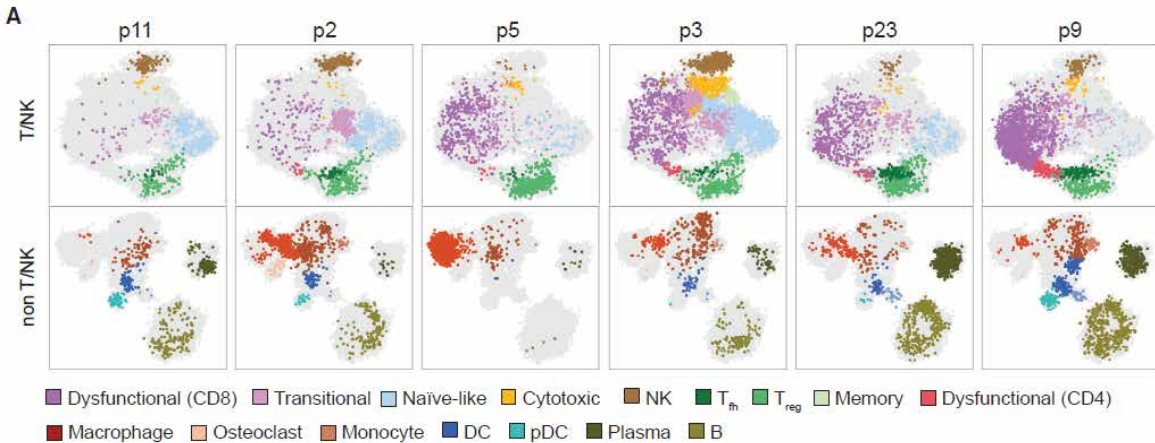


图 病人间免疫微环境异质性^[2]

通过分析 T 细胞的 TCR 序列，发现不同病人的 TCR 克隆型构成差异较大。一些大的克隆中细胞类型也不同，主要表现为丧失功能的 CD8 T 细胞的富集和初始 T 细胞的缺失。患者中丧失功能的 CD8 T 细胞的比例与 T 细胞的扩增程度呈现正相关。通过计算每个细胞的增殖分数，发现丧失功能的 CD8 T 细胞有最高增殖细胞比例，比初始 T 细胞高出 10 倍。

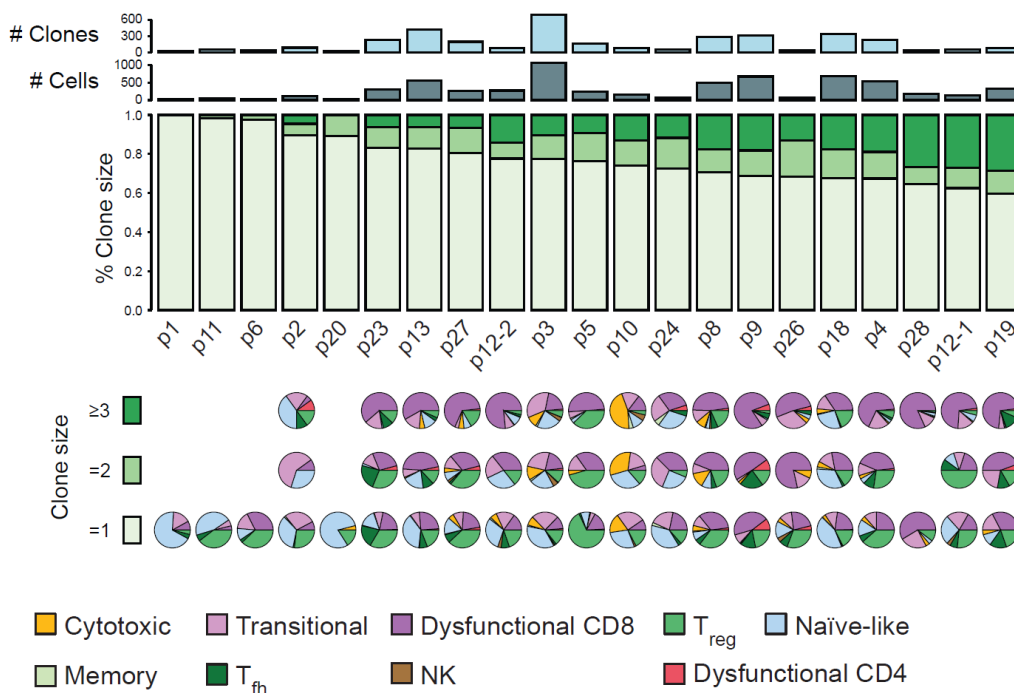


图 黑色素瘤中 T 细胞的克隆扩增^[2]

此外，研究人员还观察到一个有趣的现象，PD-1 抗体治疗后才出现的耗竭性 T 细胞表现出了新的 TCR 特异性。为了分析外周血中是否存在新发现的肿瘤浸润性 T 细胞，研究人员给患者的血液样品做了 TCR 测序，发现 35.5% 新肿瘤浸润性 T 细胞可以在 PD-1 抗体治疗后的外周血中找到，而在治疗前的外周血中只能找到 11.8% 的新肿瘤浸润性 T 细胞，不过治疗前的肿瘤里面却没有新肿瘤浸润性 T 细胞。

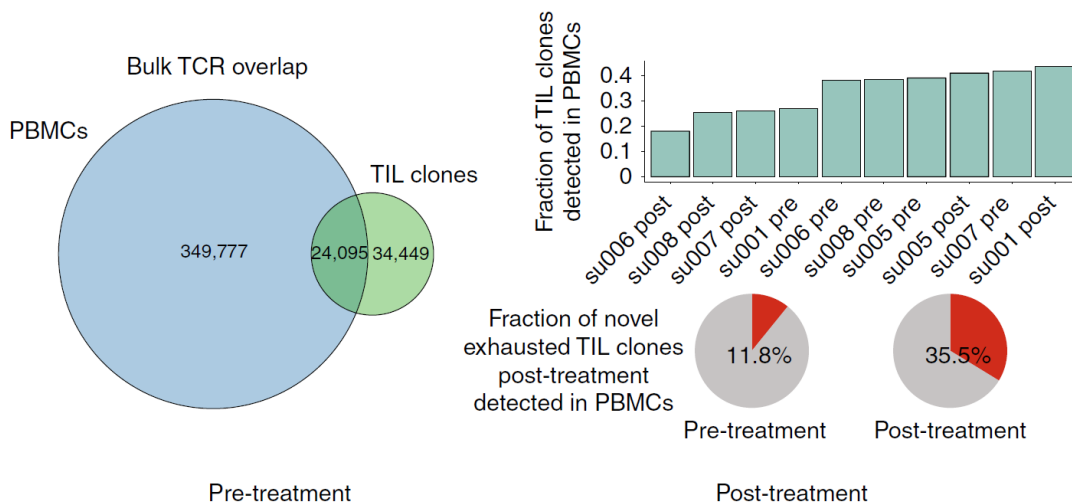


图 新发现的肿瘤浸润性 T 细胞在外周血中的比例^[3]

3、免疫治疗

靶向 PD-1/PD-L1 通路的免疫检查点抑制剂的出现，给癌症的临床治疗带来了革命性的变化。然而 PD-1 抗体的抑癌机制，并不完全为人所知。其中一个非常关键的问题是，PD-1 抗体的抑癌效果，究竟是依赖于在治疗前就存在于肿瘤中的浸润淋巴细胞的再激活，还是治疗之后，肿瘤外的杀伤 T 细胞进入肿瘤？这个问题，目前也是不清楚的。来自斯坦福大学医学院的研究团队，从接受 PD-1 抗体治疗前后的基底细胞癌 (BCC) 或鳞状细胞癌 (SCC) 患者身上采集了 7,9046 个细胞（包括癌细胞和各种免疫细胞），进行了单细胞 RNA 测序和 TCR 测序^[3]。基于单细胞 RNA 测序结果，细胞分成 19 个亚群。

本研究的重点是免疫细胞，尤其是浸润性免疫细胞，以及治疗前后的变化，以了解克隆性 T 细胞对 PD-1 抗体治疗的反应。因此研究人员把所有的 3,3106 个肿瘤浸润性 T 细胞做了个更细致的分类，包括表达 CD4 的调节性 T 细胞 (Treg) 细胞，滤泡辅助性 T (TFH) 细胞，T 辅助细胞 17 (TH17) 细胞；以及表达 CD8 的幼稚细胞，记忆 T 细胞，效应记忆 T 细胞，活化 T 细胞，慢性活化 / 耗竭 T 细胞，中度耗竭 / 活化细胞。进一步分析发现，在 PD-1 抗体治疗之后，滤泡辅助性 T 细胞，以及活化，耗竭和耗竭 / 活化的 CD8 阳性 T 细胞的频率增加，并且耗竭 T 细胞的克隆水平明显更高。更为让研究人员感到意外的是，对于同一个患者而言，治疗后记忆 T 细胞和效应 T 细胞频繁转换为活化状态，但是治疗前的耗竭 T 细胞却没有变成治疗后的非耗竭表型。这表明，即使在 PD-1 抗体治疗后，已经耗竭的肿瘤浸润 T 细胞也很难变成活化状态了。

总的来说，与“冷”肿瘤相比，“热”肿瘤之所以响应 PD-1 抗体的治疗，可能是由于“热”肿瘤自身的特性，让它能够不断吸引新 T 细胞进入，而不是重新激活已有的肿瘤浸润性 T 细胞。这项研究让我们对免疫检查点抑制剂的作用机制有了新的认知，这对临床治疗和疗效的检测都有一定的价值和意义。

参考文献

- [1] Ramskold D, Luo S, Wang YC, Li R, Deng Q, et al. Full-length mRNA-Seq from single-cell levels of RNA and individual circulating tumor cells. *Nat Biotechnol* 2012, 30(8):777-782.
- [1] Zheng C, Zheng L, Yoo JK, et al. Landscape of Infiltrating T Cells in Liver Cancer Revealed by Single-Cell Sequencing. *Cell* 2017, 169(7):1342-1356.e16.
- [2] Li H, van der Leun AM, Yofe I, et al. Dysfunctional CD8 T Cells Form a Proliferative, Dynamically Regulated Compartment within Human Melanoma. *Cell* 2018, pii: S0092-8674(18)31568-X.
- [3] Yost KE, Satpathy AT, Wells DK, et al. Clonal replacement of tumor-specific T cells following PD-1 blockade. *Nat Med* 2019, 25(8):1251-1259.

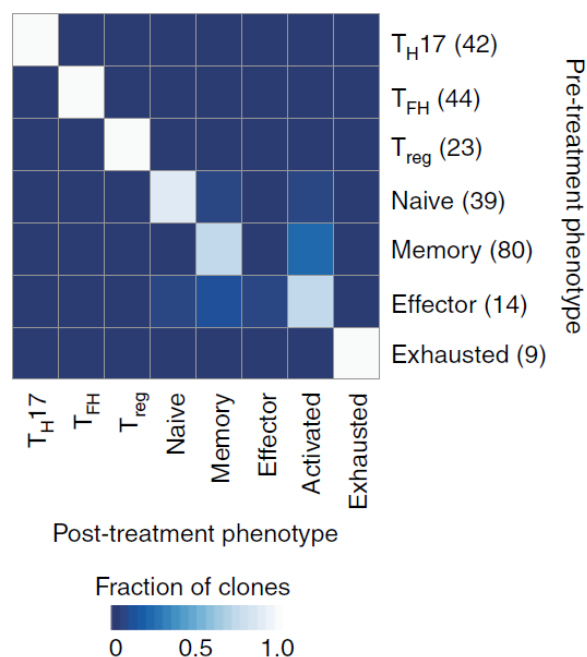


图 治疗前后 T 细胞的状态转换^[3]

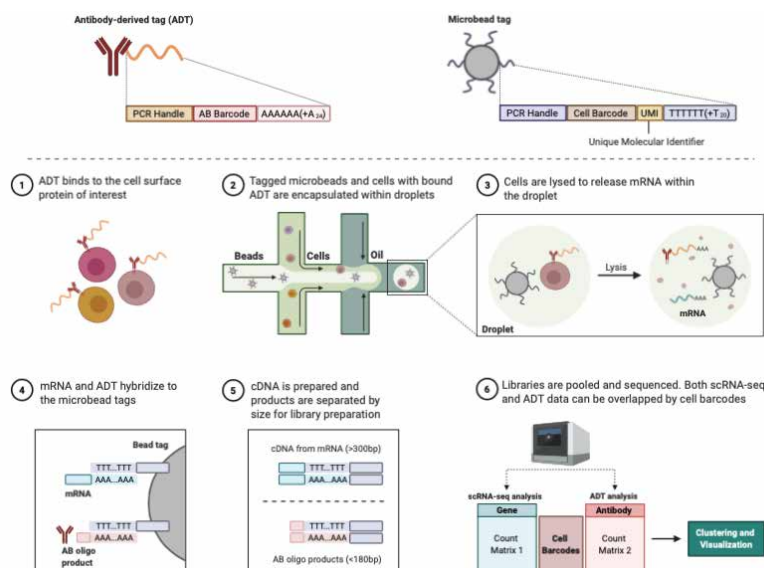
第四部分 单细胞膜蛋白测序解决方案

细胞功能的核心执行者最终是蛋白质分子。由于存在复杂的转录后调控机制，mRNA 与对应蛋白质的表达水平往往存在差异，这意味着仅通过 mRNA 检测并不能准确反映细胞内实际的蛋白丰度。这种生物学特性凸显了转录组联合蛋白质数据分析的重要性。单细胞膜蛋白检测（CITE-seq）技术作为单细胞多组学研究的重要突破，在传统单细胞转录组测序基础上，创新性地整合了细胞表面蛋白的同步检测功能。该技术通过特异性抗体标记系统，能够在单细胞分辨率下实现转录组与表面蛋白质组的联合解析。

一、技术平台

10x Genomics 平台

公司采用基于微流控技术的单细胞系统，可实现对细胞群体的划分与细胞群体间基因表达差异的检测，联合 BioLegend 公司推出了 TotalSeq™ 系列产品，可以通过高通量测序来分析单细胞水平的蛋白表达，在得到 RNA 信息的同时，也可以获得蛋白的信息。蛋白质是细胞的核心功能单位，在各种细胞过程中发挥关键作用。此外，蛋白组学有助于发现精细亚群、功能靶标、特征 Marker，也有助于连接单细胞和流式的联用。

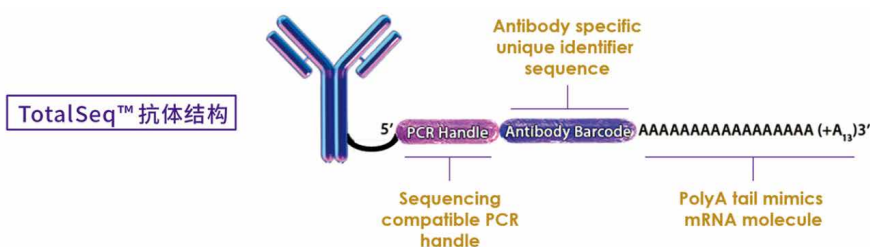


TotalSeq™ 抗体结构

每个 TotalSeq™ 抗体都偶联到一个独特的寡核苷酸，包含：

1. Capture sequence
2. Clone-specific barcode sequence

3. PCR handle compatible with Illumina® sequencing 与我们的抗体偶联的 TotalSeq™ 寡核苷酸也称为抗体衍生标签 (ADT) 或混样标签 (HTO)，具体取决于应用和用途。

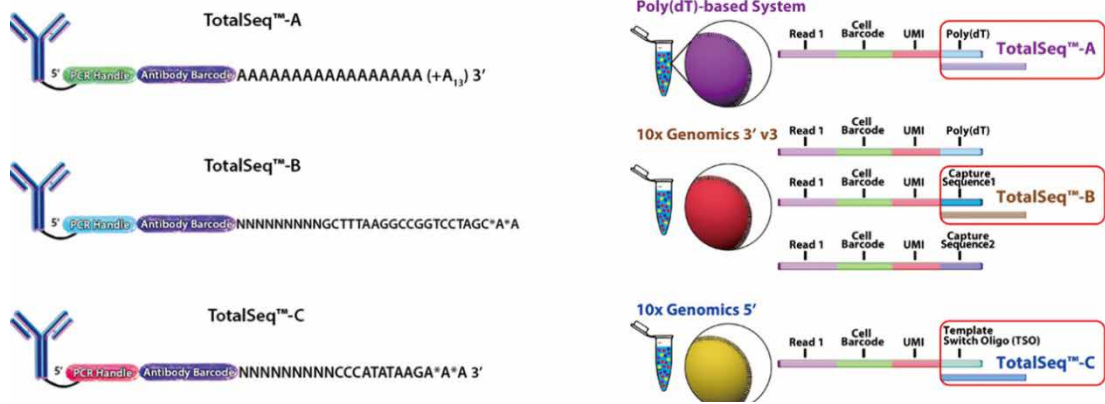


不同 TotalSeq™ 剂型的区别：

TotalSeq™ -A: 设计用于任何依赖 poly(dT) 寡核苷酸作为 mRNA 捕获方法的测序平台。TotalSeq™ -A 抗体包含模拟天然 mRNA 的 poly(A) 序列。

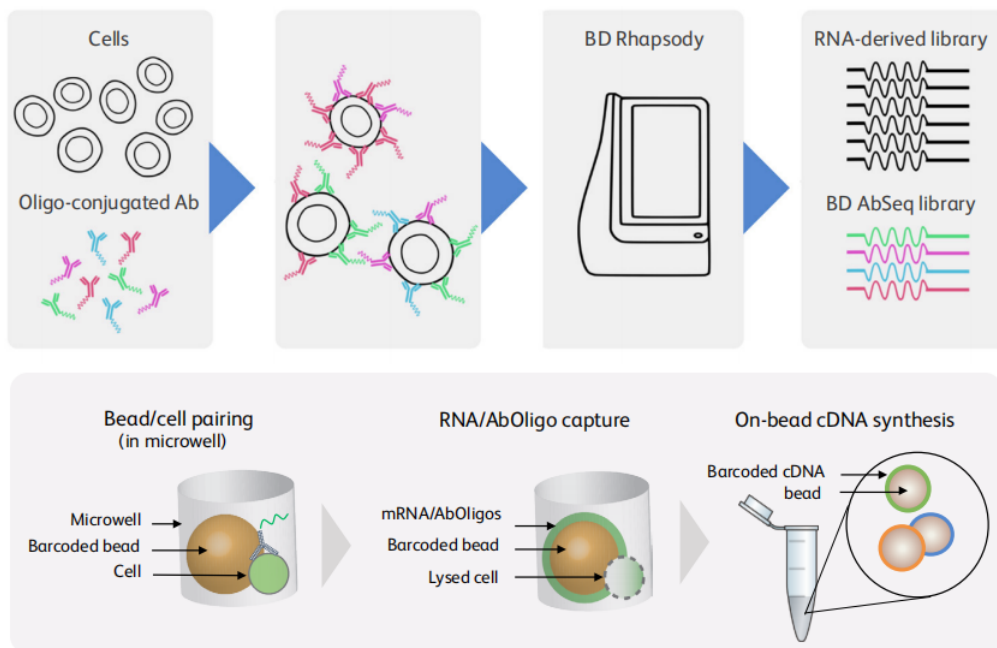
TotalSeq™ -B: 捕获序列与采用特征条码技术 (v3 或更高版本) 的 10x Genomics 的 Chromium Single Cell Expression Solution 3 试剂盒兼容。

TotalSeq™ -C: 捕获序列与 10x Genomics 的 Chromium single cell Immune Profiling Solution5' 试剂盒兼容，允许以单细胞分辨率对 T 和 B 细胞受体进行免疫谱分析。



BD Rhapsody 平台

BD Rhapsody 平台的单细胞膜蛋白检测核心技术称为 AbSeq。其核心是使用特殊的寡核苷酸偶联抗体。每种抗体的一端能特异性结合细胞表面的目标蛋白，另一端则连接着一段独特的 DNA 条形码序列。BD Rhapsody 平台采用静态微孔板技术，而非基于微流控的液滴系统。这块特殊的微孔板上有着超过 20 万个微孔，细胞和带有独特细胞条形码的磁珠依靠重力沉降，被一对一分隔在不同的微孔中。这种物理分隔方式能有效捕获脆弱细胞，并保持较低的多重细胞捕获率。细胞被捕获后，会在微孔中进行裂解。细胞内的 mRNA 会被磁珠上的 Oligo-dT 捕获。同时，结合在膜蛋白上的 AbSeq 抗体的 DNA 条形码也会被同一个磁珠捕获。



单细胞膜蛋白检测 (CITE-seq) 技术理论上具备无上限的抗体检测容量, 突破了流式细胞术的荧光通道限制和质谱流式的同位素标签瓶颈。然而实际应用中, 考虑到抗体交叉反应、检测成本等因素, 当前研究多采用蛋白检测组合 (Panel) 的模式。目前 BD Rhapsody 已推出的膜蛋白的 Panel 包括: 人免疫蛋白 panel (30 markers), T 细胞蛋白 panel (30 markers), NK 细胞蛋白 panel (30 markers), B 细胞蛋白 panel (30 markers), 以及肿瘤蛋白 panel、APC/ 髓系细胞蛋白 panel。各 panel 也可相互组合, 旨在助力不同专项领域单细胞研究。基于 T panel 的 30 个 Markers 解析

检测组合名称	Marker数量
BD OMICS-One Immune Profiler Protein Panel	30 markers
BD OMICS-One T-cell Protein Panel	30 markers
BD OMICS-One B-cell Protein Panel	30 markers
BD OMICS-One Tumor Protein Panel	30 markers
BD OMICS-One NK-cell Protein Panel	30 markers
BD OMICS-One APC/Myeloid-cell Protein Panel	30 markers
BD OMICS-One Adaptive Protein Panel	59 markers
BD OMICS-One Innate Protein Panel	58 markers
BD OMICS-One Immuno-Oncology Protein Panel	85 markers
BD OMICS-One Innate Immuno-Oncology Protein Panel	83 markers
BD OMICS-One Comprehensive Immuno-Oncology Pro. Panel	129 markers

二、技术优势

- ◎ 助力发现更精细的细胞亚群;
- ◎ 能在同一个细胞同时检测转录组与蛋白组的信息, 更全面的解析细胞 Marker 表达;
- ◎ 增加单细胞膜蛋白检测能够区分蛋白剪切变体 (CD45RO/CD45RA);
- ◎ 挖掘到的组学数据结果更便于进行流式实验验证;
- ◎ CITE-seq 灵活兼容单细胞免疫组库测序 (TCR/BCR-seq), 单细胞多组学探索研究新深度。

■ 样本要求

- ◎ 类型: 新鲜组织, 原代细胞, 细胞系等。
- ◎ 来源: 血液提取、磁珠富集、流式富集、组织解离等。
- ◎ 样本量及其它质控要求:
 - (1) 细胞悬液: $>10^5$ 目标细胞个数 (最少 10,000 个细胞);
活率 $>85\%$;
浓度 500-1,000 个细胞 / μL ;
细胞间无粘连 (成团率 $<5\%$); 无大于 $40\mu\text{m}$ 的细胞碎片或其他颗粒物;
不存在逆转录抑制剂和非细胞的核酸分子。

- (2) 血液: EDTA 抗凝的全血 (不可肝素抗凝), $>5\text{mL}$ 。
- (3) 组织: $0.3\text{cm} \times 0.3\text{cm}$ (不超过 $0.5\text{cm} \times 0.5\text{cm}$) 的新鲜组织, 4~5 块。

◎ 保存运输:

(1) 细胞悬液: 最好现场制备, 如要运输, 建议使用伯豪生物自主研发的单细胞保护液, 4°C 运输, 48 小时内送达伯豪生物实验室。

(2) 血液: EDTA 抗凝的全血, 4°C 运输, 2 小时内送达伯豪生物实验室; 或提取 PBMC 后冻存, 干冰运输。

应用方向

- ◎ 肿瘤研究与临床诊断
- ◎ 药物研发与靶点验证
- ◎ 细胞治疗与免疫监控
- ◎ 传染病与疫苗研发
- ◎ 基础细胞生物学研究

三、应用案例

1、肺癌肿瘤微环境

2021年发表在《Cancer Cell》的非小细胞肺癌（NSCLC）文章，在这项研究中，作者通过 CITE-seq、scRNA-seq 以及 TCR-seq 技术，整合免疫细胞表面标记的抗体分析，确定了肿瘤突变负荷以及 TP53 突变的情况，从而构建了 NSCLC 肿瘤的细化分类以及患者分层，为免疫疗法的响应提供了新的数据库参考。其中 CITE-seq 部分，开始使用了 15 种抗体用于细胞类型的初步注释，并在后续研究中增加至 81 种抗体，以实现更精细的细胞亚群分类。

该研究通过对 8 名患者的肿瘤和非肿瘤肺部组织进行了 CITE-seq，对另外 27 名患者进行了 scRNA-seq，还对三名患者进行了 scRNA-seq/TCR-seq 的联合分析，构建了早期肺癌免疫反应细胞图谱，并通过对其中免疫细胞类型的分析建立了对 NSCLC 肿瘤进行详细分型的肺癌激活模块（LCAM），LCAM 评分较高说明患者正在经历一个更有力的抗原特异性抗肿瘤适应性免疫应答过程，同时说明 LCAM 可以作为更直接的衡量抗原特异性抗肿瘤免疫激活的指标。

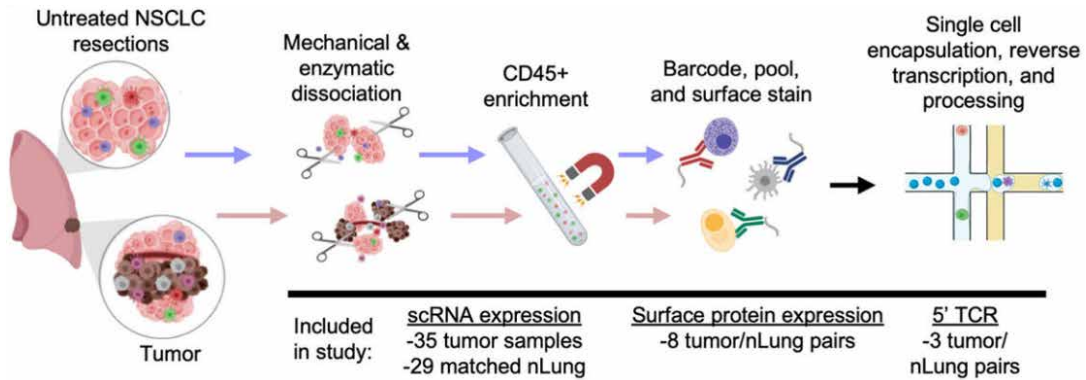
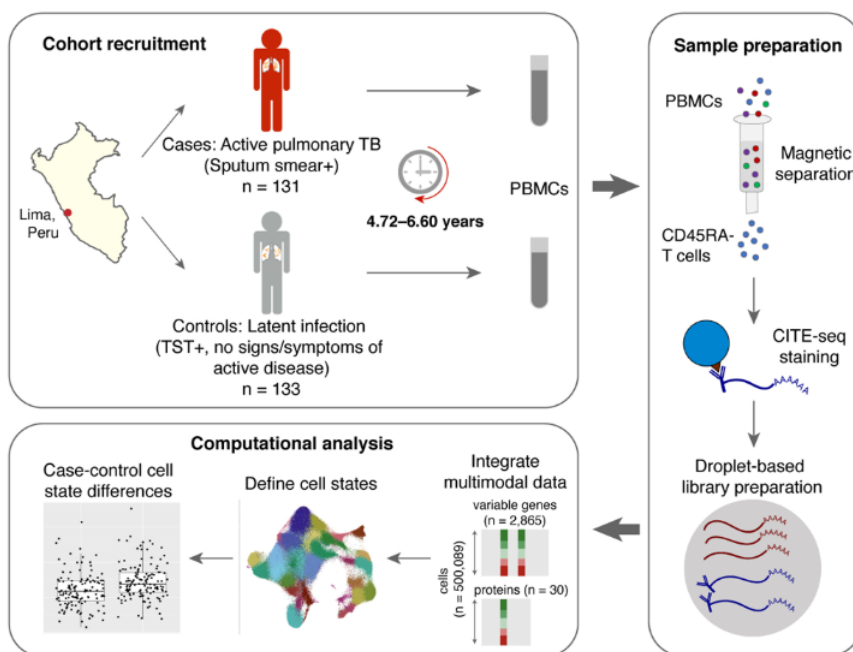


图 单细胞 RNA 测序（scRNA-seq）与单细胞膜蛋白测序（CITE-seq）揭示了肿瘤微环境中转录状态的多样性

2021年发表在《Nat Immunol》的肺结核研究文章，作者通过 CITE-seq 技术分析来自 259 个肺结核（tuberculosis, TB）病人的 500,089 个记忆 T 细胞。CITE-seq 技术提供高分辨率的免疫图谱，经分析发现年龄、性别、季节和遗传对 T 细胞组成的影响显著，并找到一群稀有细胞群体 C-12 与疾病进展密切相关。通过数据模型分析，这群细胞发展成肺结核病的过程中丰度和功能都有所下降。通过 CITE-seq 找到这群细胞的流式表型指标，是一种多能型 TH17 细胞状态。这些细胞的耗竭可能发生在活动性疾病之前并持续到活动性疾病之后，可能反映了宿主对结核分枝杆菌（M.tb）的易感反应。



参考文献

- [1] Leader AM, Grout JA, Maier BB, et al. Single-cell analysis of human non-small cell lung cancer lesions refines tumor classification and patient stratification. *Cancer Cell*. 2021 Dec 13;39(12):1594-1609.
- [2] Nathan A, Beynor JI, Baglaenko Y, et al. Multimodally profiling memory T cells from a tuberculosis cohort identifies cell state associations with demographics, environment and disease. *Nat Immunol*. 2021

第五部分 单细胞 ATAC 测序解决方案

单细胞 ATAC 测序 (Aaasay for transposase Accessible Chromatin with high throughput sequencing at the single cell level) 翻译成中文是在单细胞水平上通过高通量测序技术来研究染色质开放程度 (也叫染色质的可及性)。染色质开放程度 (染色质的可及性), 反映了染色质的转录活性状态, 是研究基因表达调控的重要方向, 在表观遗传图谱绘制、细胞分化和发育及各类疾病的发生发展研究中具有重要的作用。

对染色质可及性的研究是伴随着对染色体结构研究的发展逐渐兴起的。1971 年, Mirsky 首先使用 DNase 来研究染色质的结构, 发现 DNase 对于存在与染色中的 DNA 仍然可以切割, 表现出染色中的 DNA 对于 DNase 的可及性。1975 年, Burkholder 和 Weaver 研究发现 DNase I 对舒展状态的染色质的消化速率高于对压缩状态的染色质。同时指出 DNA 与染色质蛋白的结合程度的差异与这两种状态下染色质片段的功能相关。目前人们已经知道双螺旋的 DNA 与组蛋白结合后, 会以染色质或染色体的形式形成高级空间结构。以人的基因组为例, 每个组蛋白八聚体上缠绕有 146 个碱基对的 DNA。连接核小体与核小体之间的 DNA 序列称为连接序列。活细胞中染色质的结构总是处在动态变化中, 在不同类型的细胞中, 或在不同的生理条件和外界刺激下, 细胞核中染色中呈现不同的结构和状态。这些结构和动态变化的状态表现形式之一就是染色质可及性的变化。

2015 年 4 月, Science 发表了 Multiplex single-cell profiling of chromatin accessibility by combinatorial cellular indexing^[1] 的文章。同年 7 月, Nature 发表了 Single-cell chromatin accessibility reveals principles of regulatory variation^[2] 的文章。这两篇论文先后提出利用单细胞 ATAC-seq 技术对染色质可及性进行检测, 探索细胞转录调控机制, 解决了以往存在的细胞异质性难题, 成为 ATAC-seq 技术的一大突破。其中, 后者将 ATAC-seq 与 Fluidigm C1 单细胞平台整合, 利用微流控芯片完成捕获、裂解、转座、PCR 等实验过程, 建立了自动化的单细胞染色质可及性图谱研究方法。

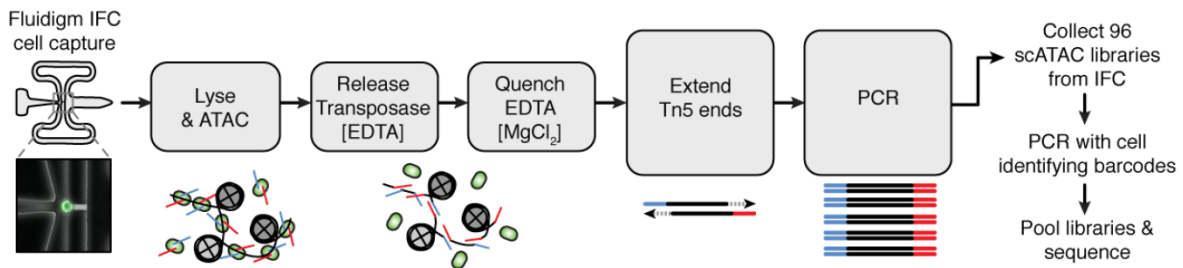


图 ATAC-seq 与 Fluidigm C1 单细胞平台整合的实验流程^[2]

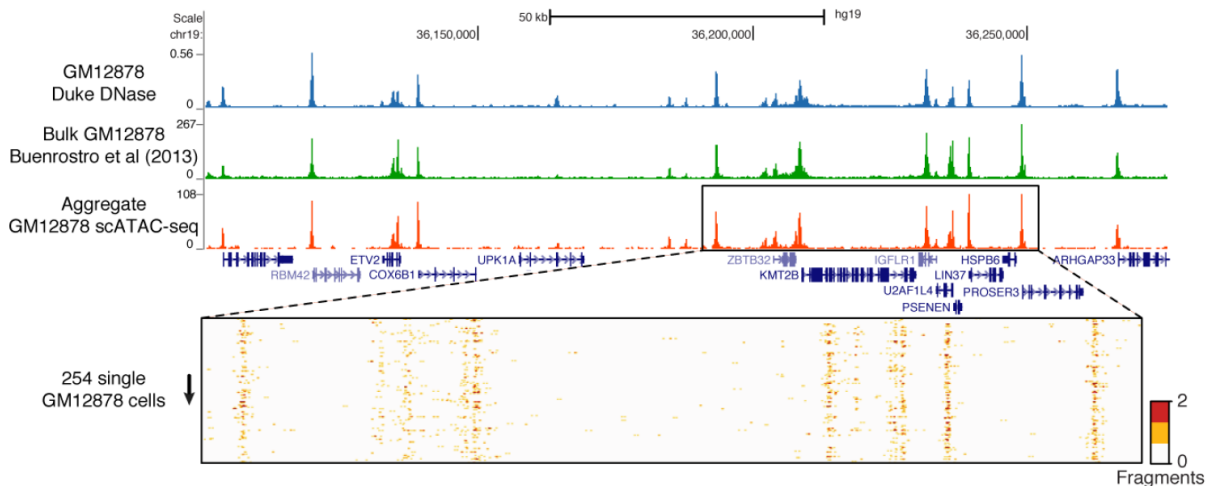


图 单细胞 ATAC-seq 与常规 ATAC-seq 的一致性^[2]

为了进一步验证方法的可靠性，作者又用 scATAC-seq 的方法对 ENCODE 细胞系，包括 H1 人类胚胎干细胞、K562 慢性粒细胞性白血病细胞、GM12878 类淋巴母细胞、V6.5 小鼠胚胎干细胞、EML1 细胞（小鼠造血祖细胞）、TF-1 细胞（人类成红细胞）、HL-60 cells（人类 promyeloblasts）和 BJ 成纤维细胞 HL-60 细胞进行了分析。结果发现在增殖细胞中，复制时序结构域（replication timing domains）的染色质可及性的变异性增加。同时，作者还发现不同的转录因子可以通过协同或者竞争性结合的作用促进或者抑制染色质可及性的可变性。通过此方法对作者对大量转录因子的 ChIP-seq 数据研究绘制出了转录因子协同作用改变染色质可接近性的图谱。此外，还发现与高可变性相关的转录因子的是细胞类型特异的，在单细胞中染色质状态与组蛋白修饰也与染色质可接近性变化相关。

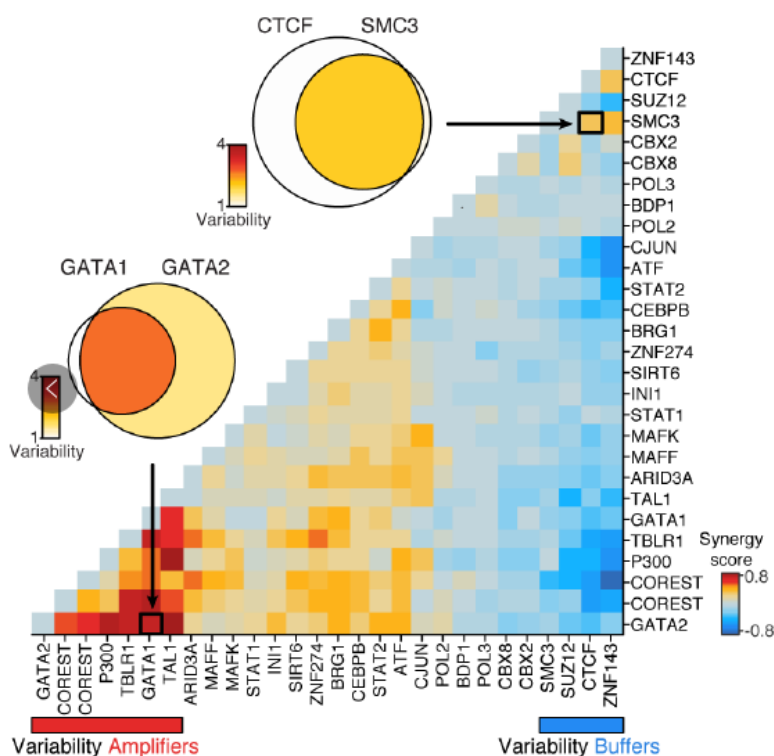


图 转录因子通过协同或者竞争性结合作用促进或者抑制染色质可及性的可变性^[2]

■ 实验原理

2018 年 10 月，10x Genomics 推出的 Chromium 单细胞 ATAC 解决方案提供了一种全面的、可扩展的方法来研究分析单个样本中成百上千个细胞中染色质的开放情况。通过转座酶对混合的细胞核悬液进行核 DNA 的切割，然后使用微流控芯片将溶液中的细胞核包裹到油滴中，形成纳米级的凝胶珠状乳液（GEMs）。采用 10x 条形码，对每个细胞核切割的 DNA 加上唯一的条形码。通过文库构建，测序，最终根据 10X 条形码将测序得到的序列关联到每个单独的细胞核上。

■ 实验流程

1、转座酶切割核 DNA

细胞核悬液在包括转座酶的混合液中孵育。转座酶进入细胞核，优先在染色质的开放区域将 DNA 片段化。同时，将测序接头序列添加到片段化的 DNA 片段的末端。

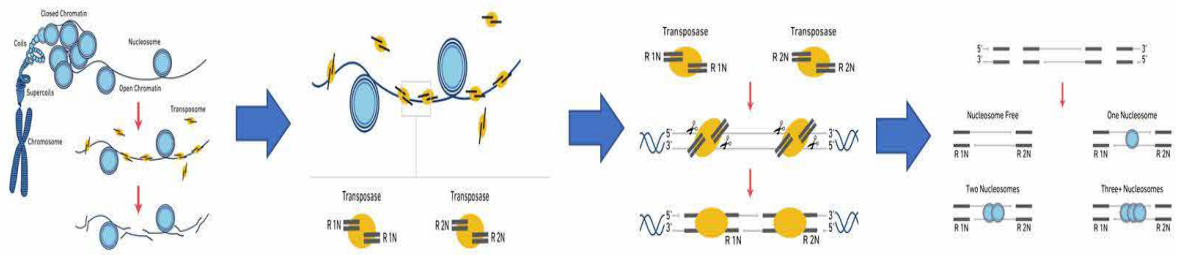
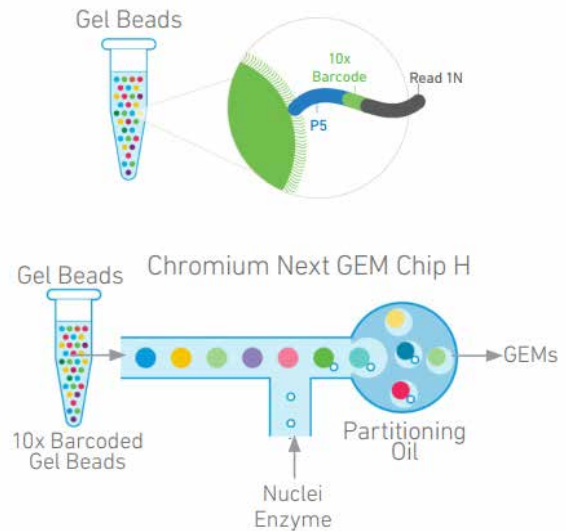


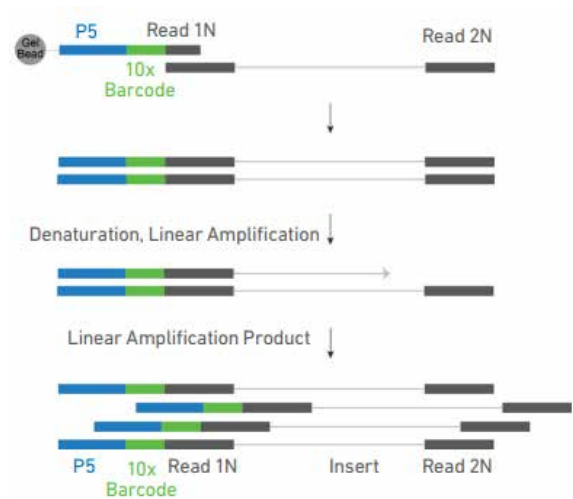
图 转座酶切割 DNA 示意图

2、GEM 生成及 Barcode 添加

在 Chromium Next GEM Chip H 芯片上，使包含有 barcode 的凝胶珠，转座酶切割后的细胞核，混合液（包括 ATAC buffer 和 ATAC 酶），以及油滴进行混合，最终生成 GEMs。为了达到每个油滴中包含有单个细胞核，需要对细胞核进行有限稀释，保证生成的大多数 GEMs (~90-99%) 不包含细胞核，而其余的为包含单个细胞核 GEMs。



GEMs 生成后，凝胶珠会溶解释放出含有 (i) Illumina P5 序列、(ii) 16nt 10x 条形码序列和 (iii) Read 1 (Read 1N) 序列的寡核苷酸。这些核苷酸序列会于片段化的 DNA，以及混合液进行混合。后续经过热循环后生成含有 10x barcode 的单链 DNA。经过孵育后，对 GEMs 进行破油处理，所有 GEMs 中的含有 10x barcode 的单链 DNA 混合在一起，并进行回收。



3、破油后的纯化

使用硅烷磁珠清除破油反应混合物中残留的生化试剂。固相可逆固定 (SPRI) 珠子用于从样本中消除未使用的 10x 条形码。

4、测序文库的构建及质检

通过 PCR 将 P7 接头以及样本的标签 (Index N) 添加到文库的两端，最终形成包含有 P5 和 P7 接头序列的文库，用于 Illumina 桥式 PCR 扩增。

文库结构

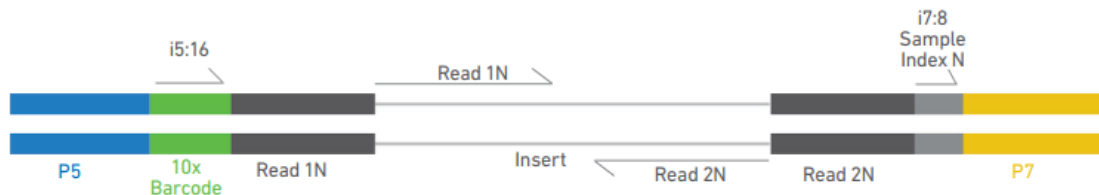


图 ATAC 文库组成示意图

通过Agilent TapeStation High Sensitivity D1000 ScreenTape 对文库进行质检,结果如下:

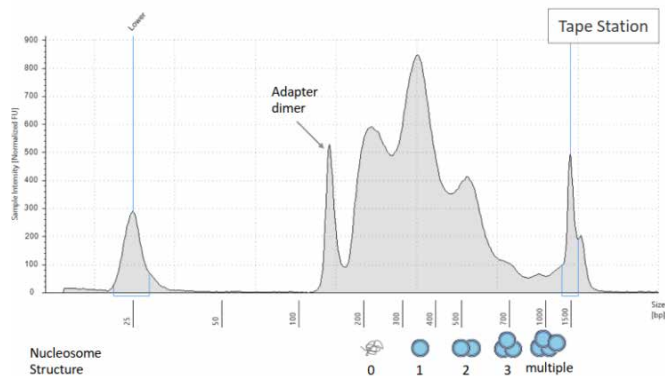


图 Agilent TapeStation High Sensitivity D1000 ScreenTape 文库质检结果

或者用 Agilent Bioanalyzer High Sensitivity DNA chip 来检测片段大小,结果如下:

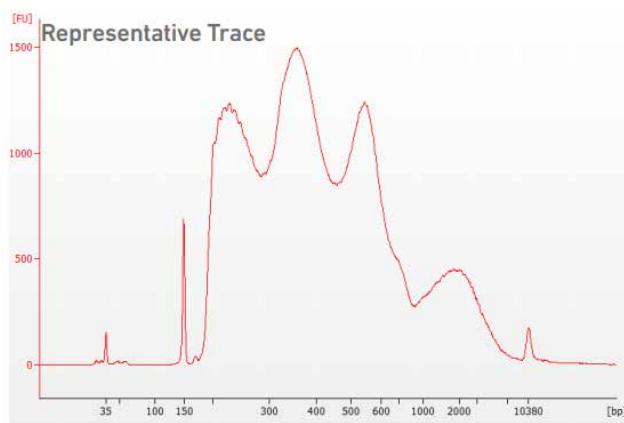


图 Agilent Bioanalyzer High Sensitivity DNA chip 质检结果

备注:

a、横坐标表示文库的片段程度,其中0代表核小体 free 的峰。1代表包含有一个核小体的峰;2代表包含有2个核小体的峰;以此类推。

b、核小体是由DNA和组蛋白形成的染色质基本结构单位。每个核小体由146bp的DNA缠绕组蛋白八聚体1.75圈形成。核小体核心颗粒之间通过50bp左右的连接DNA相连。加上两端的P5,P7接头,barcode, sample index, R1N序列,长度大概如下:核小体 free 的峰长度200多bp;1个核小体的峰约为300多bp;2个核小体的峰约为500bp,以此类推。

■ 建议测序深度及参数

指标	参数
测序深度	每个细胞核测 25,000 read pairs/ 细胞核
测序类型	PE150, dual-index (双 index 测序)

■ 技术优势

- ◎ 流程精简时效快：可检测单细胞转录调控区域中的开放性染色质。
- ◎ 通量高：每个通道 500-10,000 个细胞核。
- ◎ 效率高：细胞核捕获率高达 65%。
- ◎ 适用范围广：经验证适用于原代细胞，冻存细胞，新鲜组织等。
- ◎ 信息分析：获取信息量大，可精细化分析。
- ◎ 同一份样本可实现单细胞 ATAC、mRNA、TCR/BCR 同时测序，并整合数据。

■ 样本要求

- ◎ 类型：新鲜组织，原代细胞，细胞系等。
- ◎ 来源：血液提取、磁珠富集、流式富集、组织解离等。
- ◎ 样本量及其它质控要求：
 - (1) 细胞悬液：> 1×10^5 个细胞；
 - 活率 >80%；
 - 浓度 500-1,000 个细胞 / μ L；
 - 细胞间无粘连（成团率 <5%）；
 - 无大于 40 μ m 的细胞碎片或其他颗粒物；
 - 不存在逆转录抑制剂和非细胞的核酸分子。
 - (2) 血液：EDTA 抗凝的全血（不可肝素抗凝），>5mL。
 - (3) 组织：0.3cm \times 0.3cm（不超过 0.5 \times 0.5cm）的新鲜组织，4~5 块。
- ◎ 保存运输：
 - (1) 细胞悬液：最好现场制备，如要运输，建议使用伯豪生物自主研发的单细胞保护液，4 $^{\circ}$ C 运输，48 小时内送达伯豪生物实验室。
 - (2) 血液：EDTA 抗凝的全血，4 $^{\circ}$ C 运输，2 小时内送达伯豪生物实验室；或提取 PBMC 后冻存，干冰运输。
 - (3) 组织：建议使用伯豪生物自主研发的单细胞 ATAC-seq 组织保护液，4 $^{\circ}$ C 运输，48 小时内送达伯豪生物实验室。

■ 应用领域

- ◎ 干细胞 / 发育生物学
- ◎ 肿瘤学
- ◎ 免疫学
- ◎ 神经科学

■ 数据分析

1、The Cell Ranger ATAC 分析结果

10x genomics 官方的 Cell Ranger ATAC 流程会输出一个 HTML 文件，其中包含数据统计结果和初步的分析结果。

a、基本数据统计（细胞数，每个细胞测到的数据的中位值，比对到 peaks 上的数据的比例等）

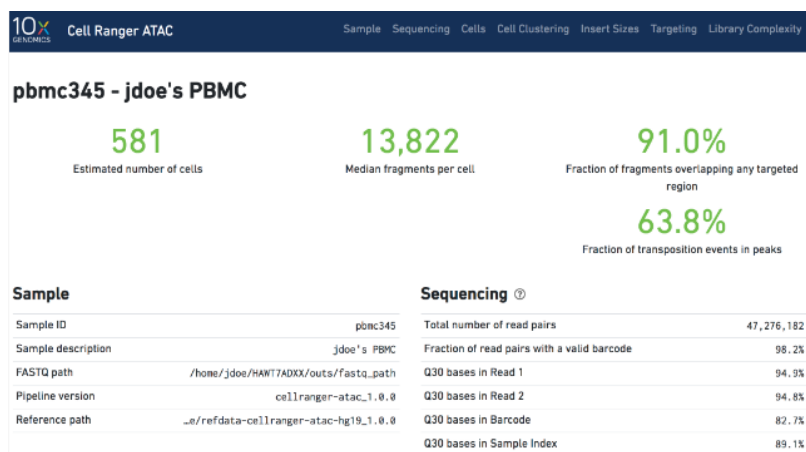


图 单细胞 ATAC 基本数据展示

b、插入片段长度统计（包括核小体 free 的比例，单核小体的比例）

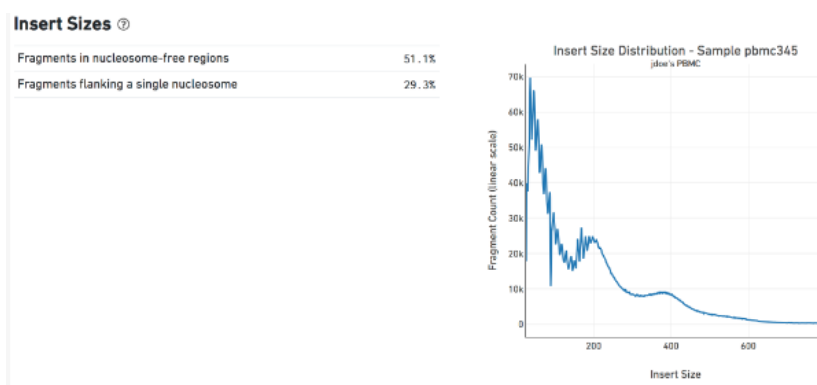


图 插入片段长度统计

c、细胞聚类结果

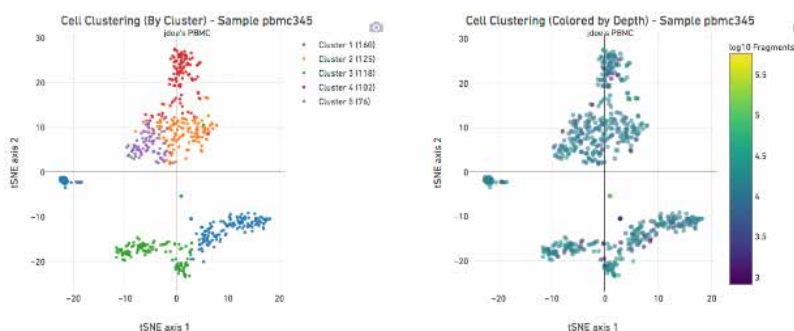


图 细胞聚类结果

2、Loupe Cell Browser 展示结果

Loupe Cell Browser 是一个适用于 Windows 和 MacOS 的桌面应用程序，它可以快速、轻松地可视化和分析 10x Chromium 单细胞 ATAC 数据。它在寻找显著的峰和识别转录因子基序、识别细胞类型、比较各组细胞之间的染色质可及性以及探索细胞簇内的子结构方面进行了优化。

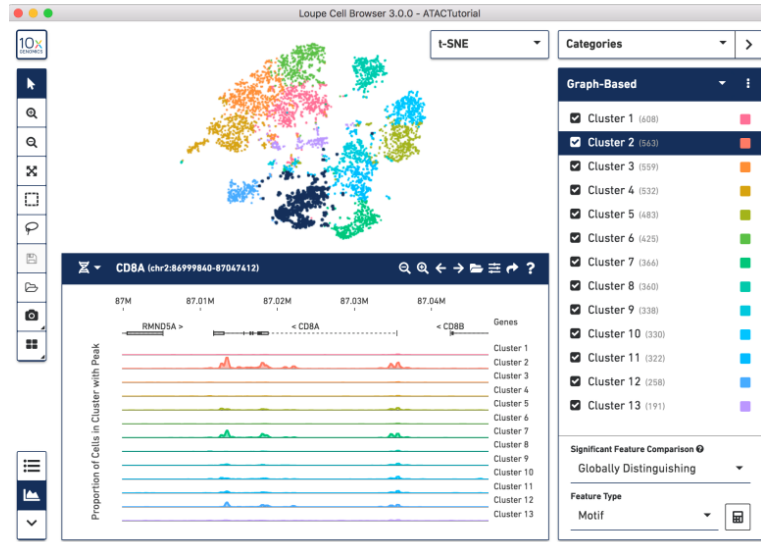


图 Loupe Cell Browser 展示细胞分群及 peaks

基于 RNA 的细胞注释结果,对 ATAC 的细胞类型进行打分注释。

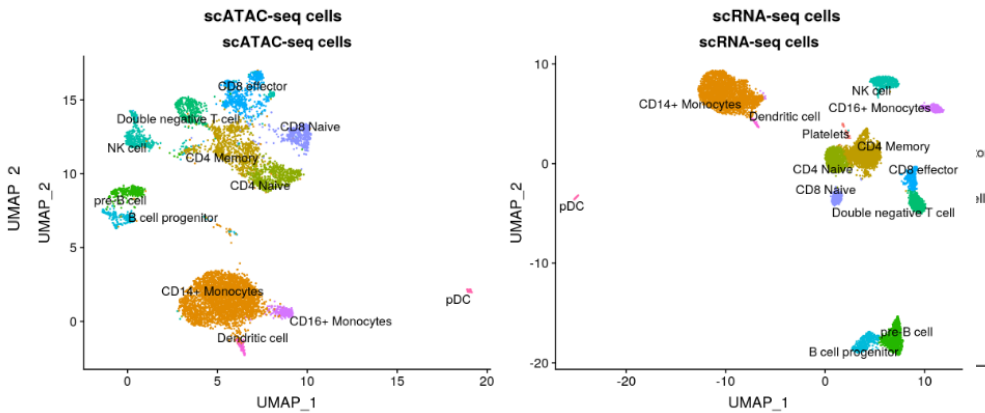


图 细胞类群注释结果

应用案例

1、干细胞分化

造血分化是从造血干细胞分化为具有不同功能的细胞过程。造血分化过程是一个复杂、多阶段的，受多种因子调控的过程，单细胞组学技术有助于解析造血干细胞转录和细胞命运异质性的顺式和反式调节机制。2018年，斯坦福大学的研究团队从健康人捐赠的骨髓中分选单个细胞进行 scATAC-seq^[3]，获得了造血系统 10 个细胞类型的染色质可及性图谱，构建了人类造血染色质可及性景观图来表征分化轨迹。作者利用 ChromVAR 鉴定不同细胞的 TF motif，发现了造血分化中主要的调控因子 GATA1, BATF, CEBPB 等。采用多种聚类方法对数据进行降维聚类分析，观察到髓系共同祖细胞 (common myeloid progenitors, CMP) 和粒-巨噬细胞祖细胞 (granulocyte-macrophage progenitors, GMPs) 的异质性，并绘制了各个谱系细胞分化连续轨迹。此外本研究整合了 scATAC-seq 和 scRNA-seq 数据，将髓系分化基因的动态表达映射到染色质的动态变化，并且发现了已知的髓系分化调节因子的表达模式。将转录因子表达与转录因子 motif 对比，共发现了 14,005 个顺式调控元件，这些调控元件随着染色质开放状态的变化也呈现显著的异质性。总的来说，这项工作为在单细胞分辨率下对人类原代组织复杂的调节动力学进行综合研究提供了一个框架。

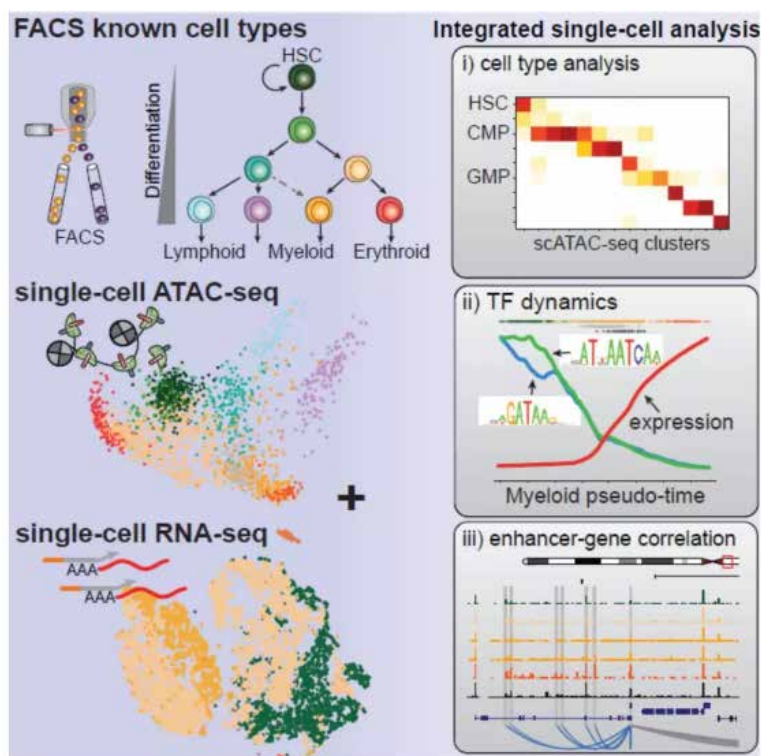


图 联合 scATAC-seq 与 scRNA-seq 研究造血分化^[3]

2、肿瘤异质性

乳腺癌具有高度异质性，至少可分为六种不同的固有亚型，即 luminal A、luminal B、HER2-enriched、basal-like、normal breast 和 claudin-low。乳腺癌起源于乳腺上皮，人类和小鼠中的乳腺上皮，由两个主要的细胞分层构成导管上皮网络，分别是内层管腔细胞和外层基底/肌上皮细胞。一系列最近的研究表明，在小鼠的这两个细胞层中存在进一步的异质性。本研究应用单细胞转录组测序 (scRNA-seq) 和单细胞染色质可及性测序 (scATAC-seq) 对分离的乳腺上皮细胞 (mammary epithelial cell, MECs) 进行分析^[4]，重建了小鼠 MEC 系统的细胞类型及其潜在的基因调控特征。并且在

管腔细胞的分泌类型中定义了新的分化状态，将管腔细胞分为祖细胞和成熟分泌细胞簇。通过整合 scRNA-seq 和 ATAC-seq，确定了在特定上皮细胞类型以及新定义的管腔分化状态中差异激活的 cis 和 trans 调节元件。这项工作提供了一个重要资源来揭示与 MEC 身份和分化相关的调节元件，这将为确定乳腺癌中染色质可及性的变化提供有价值的参考。

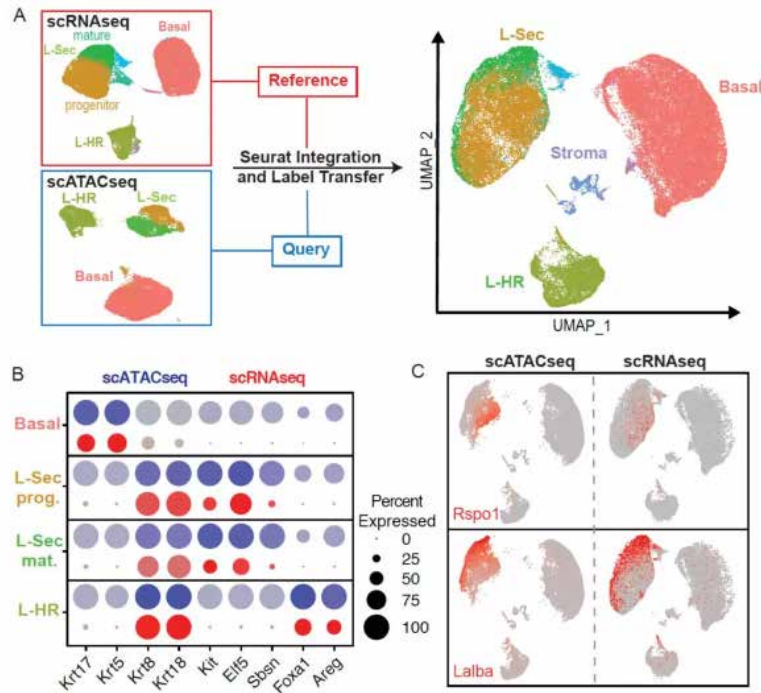


图 scATAC-seq 与 scRNA-seq 整合分析^[4]

3、免疫学

最近美国斯坦福大学的研究团队利用 10x Genomics 单细胞 ATAC-seq 技术，绘制了来自血液、基底细胞癌组织的 200,000 多个单细胞的染色质可及性图谱^[5]。文章对来源于 16 个健康人外周血及骨髓细胞的 63,882 个细胞核样本进行单细胞 ATAC 测序分析，基于染色质开放程度，鉴定出 31 个细胞亚群，并深入探索了免疫细胞谱系的调控轨迹。此外，研究团队还对 PD-1 治疗前后采集的基底细胞癌患者的原发性肿瘤样本进行了检测，通过分析 37,818 个细胞的 ATAC-seq 数据，发现来源于不同患者的基质细胞、免疫细胞基本聚到一起，而肿瘤细胞的亚群则表现出显著的异质性。在 PD-1 免疫治疗后，对治疗有相应的患者中出现两种 T 细胞亚群（耗竭性 CD8+ T 细胞和 CD4+ 滤泡辅助 T 细胞）的扩张，且比例相当，暗示这两种细胞类型在 PD-1 阻断后，其分化过程可能处于一致的调控模式。

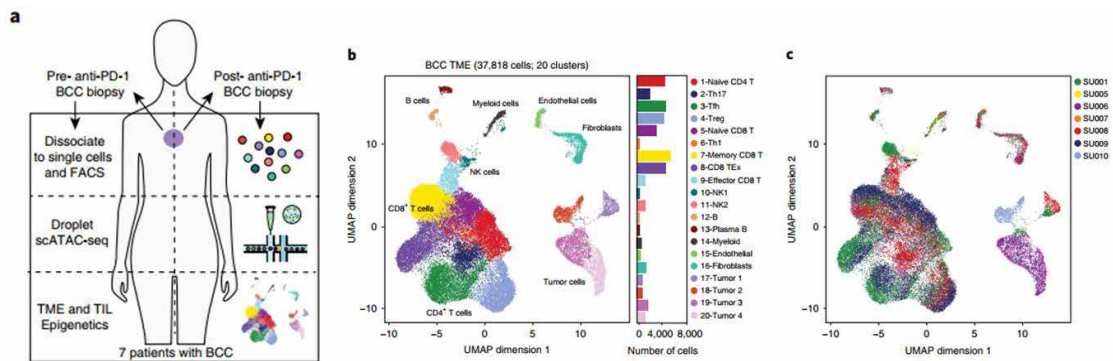


图 肿瘤细胞的的异质性及 PD-1 治疗前后细胞亚群的变化^[5]

4、神经科学

利用单细胞 ATAC-seq 技术对成年雄性小鼠 13 个组织的单细胞染色质可及性进行了分析^[6]。结果共鉴定出 85 个亚群和 40 万种调控元件。将单细胞染色质可及性与单细胞转录组比较分析，发现两种方法注释的细胞类型表现出高度一致性。为了研究神经元细胞中染色质可及性的异质性，对前额叶皮质细胞的数据进行分析，结果发现，兴奋性神经元和中间神经元明显地与神经胶质细胞、小胶质细胞和内皮细胞分离。并且在兴奋性神经元内仍存在显著的异质性，可能反映了前额叶皮质不同层中的表达和甲基化差异。

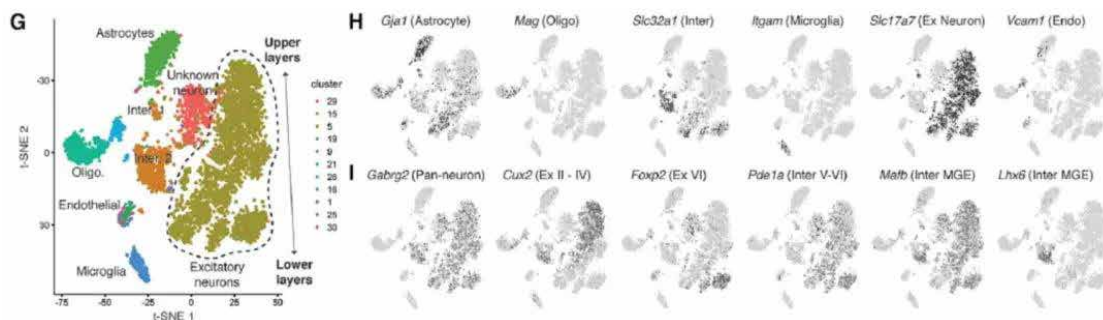


图 前额叶皮质细胞中染色质可及性的异质性^[6]

参考文献

- [1] Cusanovich DA, Daza R, Adey A, et al. Multiplex single cell profiling of chromatin accessibility by combinatorial cellular indexing. *Science* 2015, 348(6237):910-4.
- [2] Buenrostro JD, Wu B, Litzenburger UM, et al. Single-cell chromatin accessibility reveals principles of regulatory variation. *Nature* 2015, 523(7561):486-90.
- [3] Buenrostro JD, Corces MR, Lareau CA, et al. Integrated Single-Cell Analysis Maps the Continuous Regulatory Landscape of Human Hematopoietic Differentiation. *Cell* 2018, 173(6):1535-1548.
- [4] Nicholas P, Quy H, Guadalupe G, et al. Integrated single-cell transcriptomics and chromatin accessibility analysis reveals novel regulators of mammary epithelial cell identity. *Biorxiv* 2019 Aug 20; preprint. biorxiv: 10.1101/740746v1.
- [5] Satpathy AT, Granja JM, Yost KE, et al. Massively parallel single-cell chromatin landscapes of human immune cell development and intratumoral T cell exhaustion. *Nat Biotechnol* 2019, 37(8):925-936.
- [6] Cusanovich DA, Hill AJ, Aghamirzaie D, et al. A Single-Cell Atlas of In Vivo Mammalian Chromatin Accessibility. *Cell* 2019, 174:1309-1324.

第六部分 单细胞（核）悬液制备解决方案

一、单细胞悬液制备服务

开展单细胞 RNA 测序实验的第一步，通常要制备高质量的单细胞悬液。样本制备的具体方案因样本类型而异，例如血样，可以采用密度梯度离心的方法；对于组织样，通常采用机械法或酶解法，常用的消化酶包括 accutase, elastase, collagenase 以及商业化包装的组合酶。为了获得活性较高的单细胞悬液，必须充分了解样本类型并根据具体的样本来优化实验操作。方法不当，细胞基因表达谱可能会出现变化，甚至部分对环境较为敏感的细胞会出现死亡，并在裂解后向周围环境释放游离 RNA 造成检测中的背景噪音，从而影响单细胞数据的质量。因此实验过程中需要尽量避免细胞死亡和裂解，不断优化制备条件，加快实验流程，减少对样本细胞的刺激。

■ 样本要求

(1) 组织样本

客户根据项目设计的要求，采集临床手术样本或者动物模型样本。取材后，将组织切成 0.3cm×0.3cm 小块（不超过 0.5cm×0.5cm），可以收集 4-5 小块组织，重量约 200-400mg，迅速放入伯豪生物提供的组织保存液中，组织保护液务必提前 4°C 预冷，组织应完全浸没在组织保存液中，避免气泡，封口膜封闭管口，置于冰上或 4°C 短暂存放。

注意：组织保存液的体积应不小于采集样本体积的 5 倍，日常存放于 4°C 冰箱保存；严禁液氮速冻或放在 -20°C、-80°C 冰箱中保存。

(2) 血液样本

采用 EDTA 抗凝管收集血液，血液采集量 5mL；

采集好的血液应置于冰上或 4°C 短暂存放；

注意避免溶血以及凝血。

■ 能够提供悬液制备的样本类型

大小鼠					
序号	组织名称	活性	序号	组织名称	活性
1	脾脏	>90%	13	耳蜗基底膜	>90%
2	肺、肺移植瘤	>90%	14	胃粘膜	>90%
3	肝脏	>90%	15	背根神经节	>90%
4	血液	>90%	16	胰腺	>80%
5	肾脏	>90%	17	心脏	>90%
6	胃	>90%	18	门静脉	>80%
7	皮肤	>90%	19	前列腺	>80%
8	骨髓	>90%	20	脊髓	>90%
9	肠	>80%	21	牙齿根部软组织	>90%
10	大脑皮层(成年鼠、胚胎鼠)	>90%	22	淋巴结	>90%
11	海马	>90%	23	眼睑	>90%
12	视网膜、角膜	>90%			

斑马鱼		
序号	组织名称	活性
1	心脏	>90%

临床样本					
序号	组织名称	活性	序号	组织名称	活性
1	脾脏	>90%	26	角膜	>90%
2	肝癌	>90%	27	肾癌	>90%
3	血液	>90%	28	胆管	>90%
4	肺癌	>90%	29	胎盘、胎盘原位滋养细胞瘤	>90%
5	乳腺癌	>90%	30	海马	>90%
6	宫颈癌	>90%	31	鼻息肉、鼻粘膜	>90%
7	皮肤	>80%	32	胚胎神经干细胞	>90%
8	结肠癌	>90%	33	类器官	>90%
9	食管癌	>90%	34	卵巢癌	>90%
10	脑	>90%	35	前列腺癌	>90%
11	口腔癌	>90%	36	胶质瘤、脑膜瘤、颅咽管瘤	>90%
12	脂肪	>90%	37	肺穿、肾穿、脑穿、胸骨穿、前列腺穿刺样本、淋巴结穿刺	>80%
13	肾上腺	>90%	38	胃粘膜	>90%
14	血管	>90%	39	咽喉癌	>80%
15	骨髓	>90%	40	肠系膜	>90%
16	肺癌	>80%	41	视网膜	>90%
17	子宫内膜	>90%	42	鼻粘膜	>90%
18	睾丸癌	>90%	43	胆道	>90%
19	扁桃体	>90%	44	尤文肉瘤、骨肉瘤	>90%
20	甲状腺癌	>90%	45	胰腺癌	>90%
21	垂体瘤	>90%	46	膀胱癌	>90%
22	胆囊癌	>90%	47	血管瘤	>80%
23	心脏、心脏瓣膜	>90%	48	胸水	>90%
24	肌腱	>90%	49	韧带	>80%
25	胃癌	>90%			

鸡					
序号	组织名称	活性	序号	组织名称	活性
1	肾上腺	>90%	5	腺胃	>90%
2	下丘脑	>90%	6	肌胃	>80%
3	垂体	>90%	7	肌肉	>80%
4	肝脏	>90%	8	软骨	>80%

二、单细胞抽核服务

序号	组织名称	序号	组织名称	序号	组织名称
1	肝脏(组织、穿刺)	8	乳腺	15	淋巴瘤
2	心脏(人,小鼠、斑马鱼、爪蛙)	9	腰椎	16	脂肪
3	海马	10	视网膜	17	囊肿
4	脊髓	11	视神经	18	肌腱
5	大脑皮层	12	背根神经节	19	肌肉
6	下丘脑	13	胰腺	20	植物
7	胶质瘤	14	骨		

■ 悬液制备实例

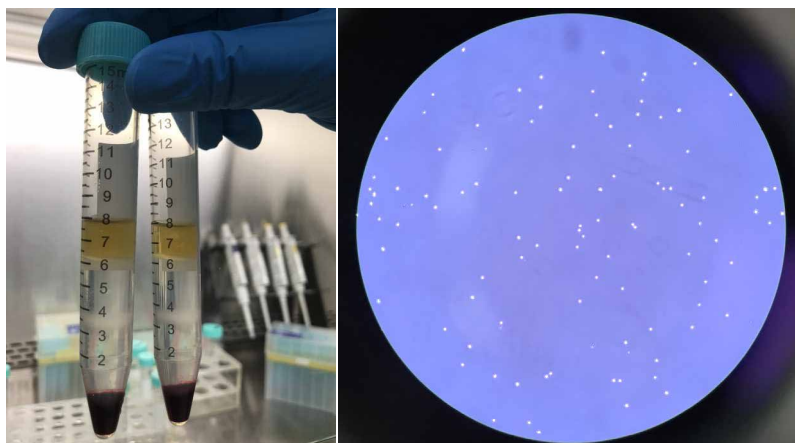


图 血液密度梯度离心分离 PBMC 和粒细胞 (活率 95%)



图 肝癌 (活率 92%)

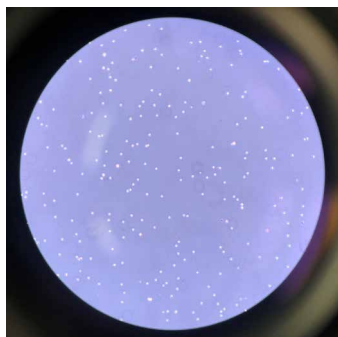


图 口腔鳞癌 (活率 92%)

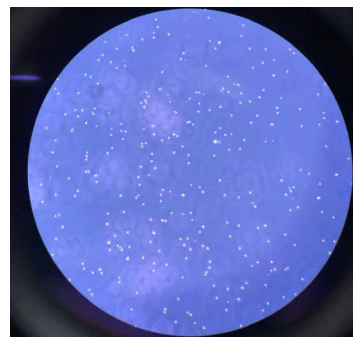


图 人脑皮层 (活率 92%)

三、伯优® 单细胞测序组织保存液

为保证细胞活力，单细胞测序目前多采取仪器上门的服务模式，取下新鲜组织后，样本即刻被制备成单细胞悬液，并在短时间内完成上机。然而临床样本具有很多制约因素，比如病人手术时间不确定，取样时间很难提前预约，仪器无法及时到达客户端；肿瘤样本有时需要等待病理结果确认；医院不具备组织消化的条件等。样本的制备与运输难，在一定程度上限制了单细胞技术应用。为了解决这些问题，我们集中研发力量联合攻关，自主研发了组织保存液，能够使样本安全到达伯豪生物实验室，然后由我们的专业人员提供悬液制备、单细胞测序和数据分析的全套服务。

■ 产品介绍

本产品可用于人和动物的新鲜组织样本的低温存储和运输，4°C条件下 72 小时内可保持细胞活性。保存后的组织样本可直接用于单细胞悬液制备，无需复苏等操作。经测试验证，经本产品保存的新鲜组织样本，制备成单细胞悬液后可用于目前主流单细胞测序平台，包括 10x Genomics 和 BD Rhapsody。

- ◎ 货号：21903-10
- ◎ 产品规格：10 × 2mL
- ◎ 储存条件：2-8°C 避光保存
- ◎ 本产品仅供研究使用

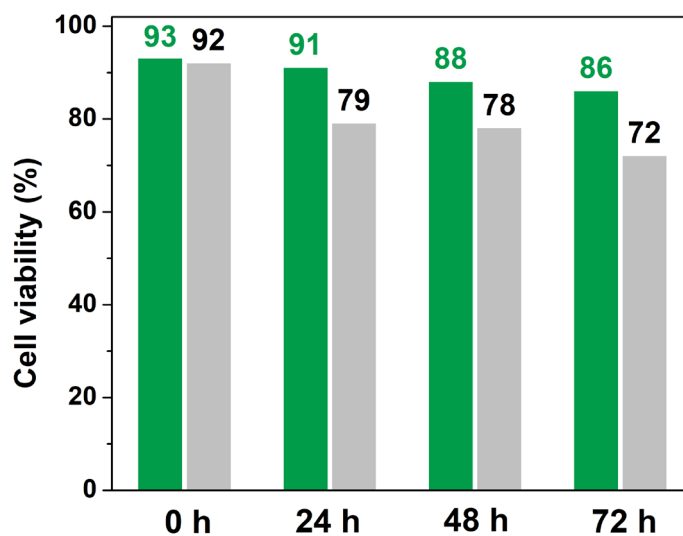


图 单细胞测序组织保存液

■ 性能测试

◎ 细胞活性

新鲜组织样本在 4°C 条件下，72 小时内可保持细胞活性。



█ 伯豪单细胞测序组织保存液
█ 竞品组织保存液

图 小鼠脾脏细胞活性测试 (4°C, 24-72h)



图 不同组织的细胞活性测试 (4°C, 2-60h)

◎ 基因表达测试

通过基因芯片, 对新鲜组织和保存后的组织进行基因表达检测, 相关性超过 0.95, 结果表明, 在 4°C 条件, 组织保存液能够维持转录组的稳定性。

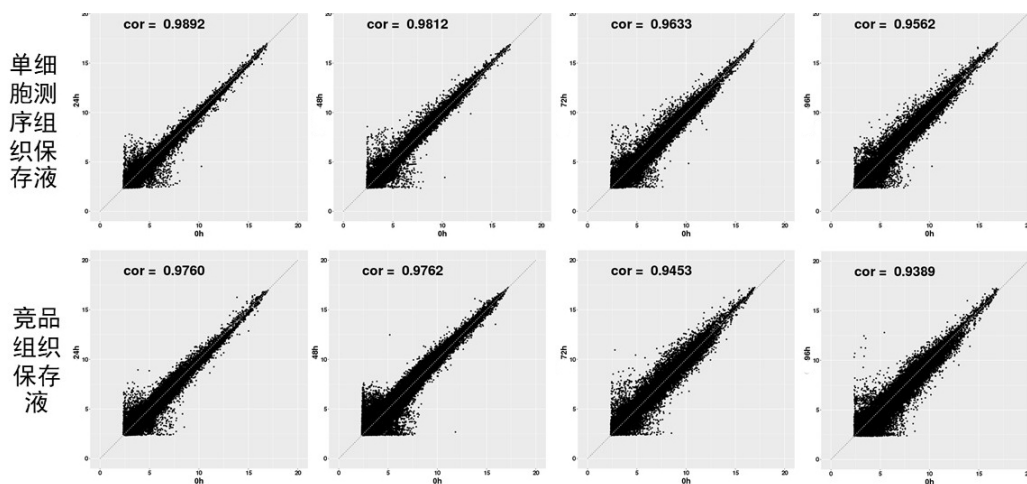



图 基因表达稳定性测试 (4°C, 24-96h)

操作说明

Step 1



采集人临床组织样本或动物模型样本。采集后迅速将新鲜组织切成0.3cm×0.3cm小块（务必不超过0.5×0.5cm），可收集4-5小块组织，重量约200-400 mg。

Step 2



迅速将组织切块放入保存液中，每管可放置1-2块。

注意：组织样本应完全浸没在保存液中，并避免气泡。

Step 3



将保存管盖拧紧，使用封口膜封好。


Step 4



将保存管置于4℃冰箱或装有冰袋的泡沫箱避光保存及运输。

注意：避免剧烈震荡，避免保存管与冰袋接触。

Step 5



待组织消化和单细胞悬液制备时，将组织取出后直接进行后续的实验操作，无需复苏。

注意：不可在-20℃及-80℃等冰箱冷冻保存。严禁使用干冰或液氮等冷冻运输。

取样尺寸



组织切成0.3cm×0.3cm小块
(务必不超过0.5×0.5cm)

四、伯优® 细胞核分离试剂盒

组织样本制备细胞核悬液流程适用于人或哺乳动物新鲜及冻存组织样本。通过裂解细胞膜，释放细胞核的同时保持细胞核膜的稳定。优化的细胞核重悬液能够有效维持细胞核膜的完整和染色质的空间结构稳定。于目前主流单细胞测序平台，包括 10x Genomics 和 BD Rhapsody。



产品应用

制备的细胞核悬液可用于：

- ◎染色质可及性分析（scATAC-seq/bulk ATAC-seq）；
- ◎核转录组测序（snRNA-seq/bulk RNA-seq）等相关实验。

■ 竞品对比测试

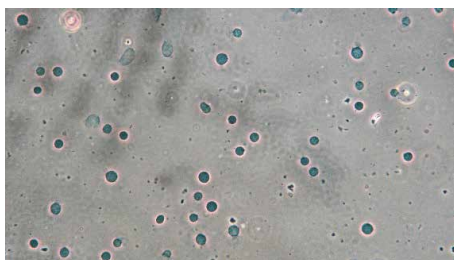


图 伯优® 细胞核分离试剂盒

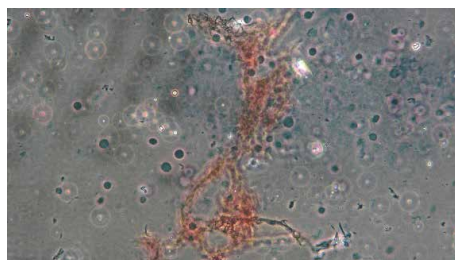


图 竞品细胞核分离试剂盒

伯优®细胞核分离试剂盒已被测试用于多种哺乳动物新鲜及冰冻组织的细胞核提取，如小鼠肝脏、心脏、大脑皮层、丘脑、海马、延髓等，人肝脏（癌和癌旁）、松果体、胶质瘤组织等

■ 结果图片

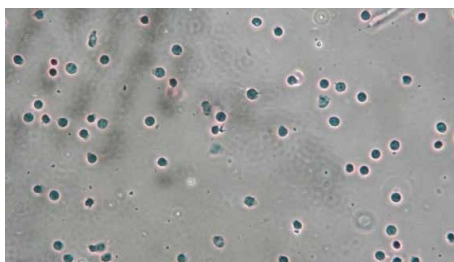


图 小鼠脑组织

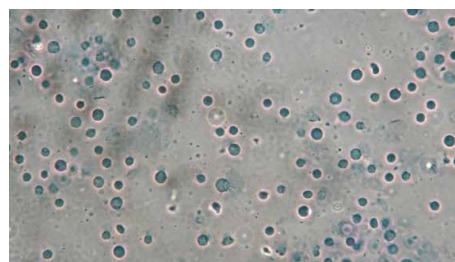


图 小鼠肝组织

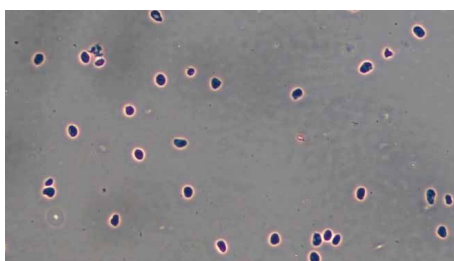


图 人脑组织

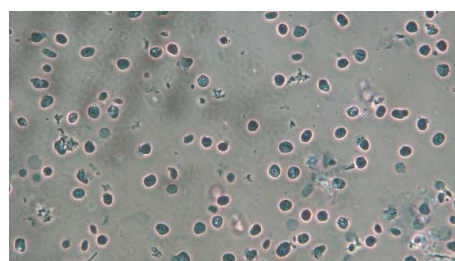


图 人肝组织

■ 产品列表

货号	产品名称	规格
52009-10	伯优® 细胞核分离试剂盒	10rxn

注：该产品仅供科研使用。



上海伯豪生物技术有限公司

上海微矩阵生物科技有限公司

地址:上海市浦东新区张江高科技园区蔡伦路999号1号楼

电话 :400-820-3699

邮箱:market@shbio.com

官网:www.shbio.com