

目录

5 简介

7 应用

癌症

宏基因组学

干细胞

发育生物学

免疫学

神经生物学

药物发现

生殖健康

微生物生态学和进化

植物生物学

法医学

等位基因 – 特定基因表达

50 样本制备

54 数据分析

60 DNA 方法

多链置换扩增技术

基因组和转录组测序

多次退火环状循环扩增技术

基因组 DNA 和 mRNA 测序

68 表观基因组学方法

染色质转座酶可接近性单细胞测序分析

单细胞亚硫酸氢盐测序 / 单细胞全基因组亚硫酸氢盐测序

单细胞甲基化组和转录组测序

单细胞简化的表观亚硫酸氢盐测序

单细胞染色质免疫沉淀测序

染色质构象捕获测序

基于液滴的染色质免疫沉淀测序

78 RNA 方法

基于设计引物的 RNA 测序

单细胞通用 Poly(A) 非依赖性 RNA 测序

Quartz-Seq

Smart-Seq

Smart-Seq2

单细胞甲基化组和转录组测序

基因组和转录组测序

基因组 DNA 和 mRNA 测序

T 细胞受体链配对

唯一分子标记

线性扩增测序分析细胞表达

流动细胞表面逆转录测序

单细胞标记逆转录测序

固定和回收的完整单细胞 RNA 测序

光漂白细胞标记法

索引液滴

Drop 测序

CytoSeq

单细胞 RNA 条形码标记和测序

高通量单细胞标记

简介

活组织由多种细胞类型组成。每种细胞类型都有不同的谱系和独特的功能，对组织和器官生物学产生影响，并最终定义机体整体的生物学功能。每个细胞的谱系和发育阶段决定细胞如何对其他细胞以及其天然环境应答。此外，相同类型细胞的亚群之间以及它们与其他细胞类型之间通常具有遗传异质性。¹最近，科学家们启动了雄心勃勃的人类细胞图谱计划，这是一项国际合作，致力于利用单细胞测序定位人体中的所有细胞类型。²

“单细胞测序已成为一种革命性的方法，它以前所未有的分辨率和规模揭示了生物学过程，对生物学和医学产生了重大影响。” —Benitez 等，2017 年

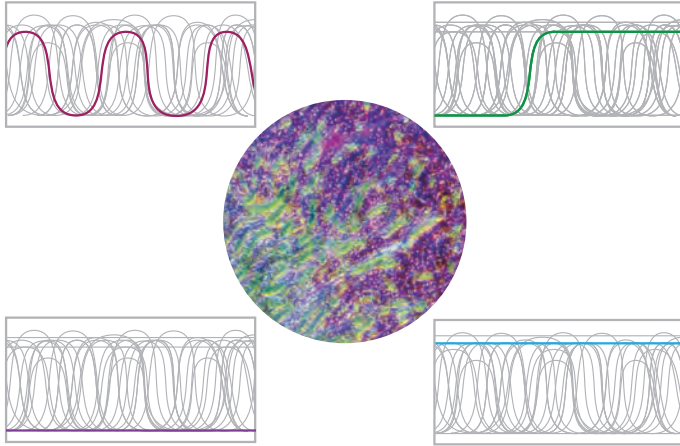
单细胞组织测序的主要动力来源于癌症研究，其中细胞谱系和残留疾病的检测至关重要。³当前，单细胞方法还用于提升我们对其他复杂生物系统的理解，包括中枢神经系统(CNS)、免疫系统和哺乳动物发育。⁴

单细胞测序还是鉴定在体外难以培养的机体的有效方法。⁵单细胞测序的发展已提高了对传染性疾病、食源性病原体 and 肠道环境中微生物多样性的检测和分析。^{6,7,8,9}

新一代测序(NGS)的高度准确性和特异性使其成为单细胞和低水平 DNA/RNA 测序的理想工具。单细胞技术日益增多，已发布的单细胞技术包括 DNA 突变、拷贝数变异(CNV)、DNA-蛋白质结合、RNA 剪接检测和 mRNA 表达测定。¹⁰最近，微流体平台和基于液滴的方法，使得大量单个细胞的 mRNA 大规模平行测序成为可能。^{11,12}单个细胞的功能在很大程度上取决于其与相邻细胞的相互作用。单细胞测序实验中通常缺少此空间信息，但新的方法^{13,14}和分析算法¹⁵将单细胞基因表达的测量与组织内的空间定位结合了起来。

本综述着重于近期发表的文献，展示了如何将 Illumina 技术用于单细胞测序应用和技术。了解更多有关 Illumina 测序和芯片技术的信息，请访问 www.illumina.com。

1. Tanay A and Regev A. Scaling single-cell genomics from phenomenology to mechanism. *Nature*. 2017;541:331-338
2. Regev A, Teichmann SA, Lander ES, et al. The Human Cell Atlas. *Elife*. 2017;6: e27041
3. Zhang X, Marjani SL, Hu Z, Weissman SM, Pan X and Wu S. Single-Cell Sequencing for Precise Cancer Research: Progress and Prospects. *Cancer Res*. 2016;76:1305-1312
4. Wang Y and Navin NE. Advances and applications of single-cell sequencing technologies. *Mol Cell*. 2015;58:598-609
5. Solden L, Lloyd K and Wrighton K. The bright side of microbial dark matter: lessons learned from the uncultivated majority. *Curr Opin Microbiol*. 2016;31:217-226
6. Bergholz TM, Moreno Switt AI and Wiedmann M. Omics approaches in food safety: fulfilling the promise? *Trends Microbiol*. 2014;22: 275-281
7. Woyke T, Doud DFR and Schulz F. The trajectory of microbial single-cell sequencing. *Nat Methods*. 2017;14:1045-1054
8. Mills E and Avraham R. Breaking the population barrier by single cell analysis: one host against one pathogen. *Curr Opin Microbiol*. 2017;36:69-75
9. Hug LA, Baker BJ, Anantharaman K, et al. A new view of the tree of life. *Nature Microbiology*. 2016;1:16048
10. Bacher R and Kendziorski C. Design and computational analysis of single-cell RNA-sequencing experiments. *Genome Biol*. 2016;17:63
11. Macosko EZ, Basu A, Satija R, et al. Highly Parallel Genome-wide Expression Profiling of Individual Cells Using Nanoliter Droplets. *Cell*. 2015;161:1202-1214
12. Klein AM, Mazutis L, Akartuna I, et al. Droplet barcoding for single-cell transcriptomics applied to embryonic stem cells. *Cell*. 2015;161:1187-1201
13. Lee JH, Daugharthy ER, Scheiman J, et al. Fluorescent in situ sequencing (FISSEQ) of RNA for gene expression profiling in intact cells and tissues. *Nat Protoc*. 2015;10:442-458
14. Lovatt D, Ruble BK, Lee J, et al. Transcriptome in vivo analysis (TIVA) of spatially defined single cells in live tissue. *Nat Methods*. 2014;11: 190-196
15. Satija R, Farrell JA, Gennert D, Schier AF and Regev A. Spatial reconstruction of single-cell gene expression data. *Nat Biotechnol*. 2015;33:495-502



相同基因可在同一组织内不同细胞类型中进行不同水平的表达，并由不同的调控机制影响。

综述

Baslan T and Hicks J. Unravelling biology and shifting paradigms in cancer with single-cell sequencing. *Nat Rev Cancer*. 2017;17:557-569

Benitez JA, Cheng S and Deng Q. Revealing allele-specific gene expression by single-cell transcriptomics. *Int J Biochem Cell Biol*. 2017;90:155-160

Haque A, Engel J, Teichmann SA and Lonnberg T. A practical guide to single-cell RNA-sequencing for biomedical research and clinical applications. *Genome Med*. 2017;9:75

Marioni JC and Arendt D. How Single-Cell Genomics Is Changing Evolutionary and Developmental Biology. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2017;33:537-553

Tanay A and Regev A. Scaling single-cell genomics from phenomenology to mechanism. *Nature*. 2017;541:331-338

Gawad C, Koh W and Quake SR. Single-cell genome sequencing: current state of the science. *Nat Rev Genet*. 2016;17:175-188

Liu S and Trapnell C. Single-cell transcriptome sequencing: recent advances and remaining challenges [version 1; referees: 2 approved]. *F1000Research*. 2016;5(F1000 Faculty Review):182

Grun D and van Oudenaarden A. Design and Analysis of Single-Cell Sequencing Experiments. *Cell*. 2015;163:799-810

Wang Y and Navin NE. Advances and applications of single-cell sequencing technologies. *Mol Cell*. 2015;58:598-609

应用

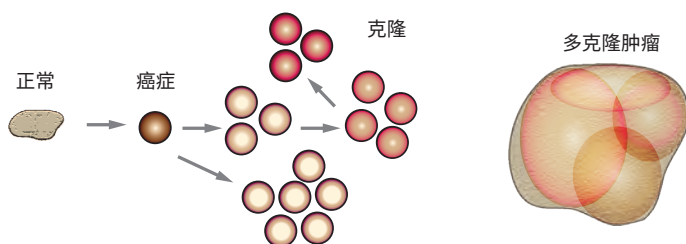
癌症

驱动突变经过肿瘤亚克隆的连续克隆扩张达尔文选择，进而导致肿瘤进展。因此，晚期肿瘤可能含有大量独特的亚克隆^{16,17,18}，带有不同的变异组、不同的组织病理学，对治疗具有不同的反应。^{19,20,21} 诊断时对所有亚克隆进行分子分析非常重要，因为仅占原发性肿瘤 0.3% 的亚克隆可能会在复发后成为优势克隆。²² 深度测序可检测低至总肿瘤细胞群 1% 的亚克隆丰度，但需要单细胞测序法在罕见细胞群上对治疗效果进行充分鉴定。^{23,24}

“理解在个体水平以及整体水平单个癌细胞一定会推动我们对治疗耐受性以及肿瘤生物学各个方面的理解。” —Baslan 和 Hicks, 2017 年

循环肿瘤细胞 (CTC) 还可用于检测癌症。^{25,26} 游离癌症核酸标志物检测——也称为液体活检——可更具敏感性和重复性。^{27,28} 用于癌症干细胞 (CSC) 和播散癌细胞分子分析的单细胞方法也增加了我们对肿瘤发展、转移和治疗反应的理解。^{29,30}

近期临床资料已表明免疫系统功能的治疗性增强可提高癌症预后。³¹ 阻断细胞毒性 T 淋巴细胞相关蛋白 -4 (CTLA-4) 的抗体和程序性死亡受体 -1 (PD-1) 在大量癌症中诱导临床反应，包括黑色素瘤、肺癌、肾癌、膀胱癌和霍奇金淋巴瘤。^{32,33} 单细胞测序法使我们有可能更深入地了解免疫细胞和肿瘤细胞之间复杂的相互作用，更彻底地鉴定肿瘤的细胞学生态体系。^{34,35,36}



肿瘤内异质性：体细胞突变的进行性累积导致异质性多克隆肿瘤，其中不同的克隆可能对治疗反应不同。³⁷

16. Ellsworth DL, Blackburn HL, Shriver CD, Rabizadeh S, Soon-Shiong P and Ellsworth RE. Single-cell sequencing and tumorigenesis: improved understanding of tumor evolution and metastasis. *Clin Transl Med.* 2017;6:15
17. Baslan T and Hicks J. Unravelling biology and shifting paradigms in cancer with single-cell sequencing. *Nat Rev Cancer.* 2017;17:557-569
18. Litzenger UM, Buenrostro JD, Wu B, et al. Single-cell epigenomic variability reveals functional cancer heterogeneity. *Genome Biol.* 2017;18:15
19. Li H, Courtois ET, Sengupta D, et al. Reference component analysis of single-cell transcriptomes elucidates cellular heterogeneity in human colorectal tumors. *Nat Genet.* 2017;49:708-718
20. DiLoreto R, Khush K and De Vlaminc I. Precision monitoring of immunotherapies in solid organ and hematopoietic stem cell transplantation. *Adv Drug Deliv Rev.* 2017;114:272-284
21. Gerber T, Willscher E, Loeffler-Wirth H, et al. Mapping heterogeneity in patient-derived melanoma cultures by single-cell RNA-seq. *Oncotarget.* 2017;8:846-862
22. Nadeu F, Delgado J, Royo C, et al. Clinical impact of clonal and subclonal TP53, SF3B1, BIRC3, NOTCH1, and ATM mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2016;127:2122-2130
23. Navin N and Hicks J. Future medical applications of single-cell sequencing in cancer. *Genome Med.* 2011;3:31
24. Hou Y, Song L, Zhu P, et al. Single-cell exome sequencing and monoclonal evolution of a JAK2-negative myeloproliferative neoplasm. *Cell.* 2012;148:873-885
25. Krasnitz A, Kendall J, Alexander J, Levy D and Wigler M. Early Detection of Cancer in Blood Using Single-Cell Analysis: A Proposal. *Trends Mol Med.* 2017;23:594-603
26. Kondo Y, Hayashi K, Kawakami K, Miwa Y, Hayashi H and Yamamoto M. KRAS mutation analysis of single circulating tumor cells from patients with metastatic colorectal cancer. *BMC Cancer.* 2017;17:311
27. Swanton C. Plasma-derived tumor DNA analysis at whole-genome resolution. *Clin Chem.* 2013;59:6-8
28. Newman AM, Bratman SV, To J, et al. An ultrasensitive method for quantitating circulating tumor DNA with broad patient coverage. *Nat Med.* 2014;20:548-554
29. Zhang X, Marjani SL, Hu Z, Weissman SM, Pan X and Wu S. Single-Cell Sequencing for Precise Cancer Research: Progress and Prospects. *Cancer Res.* 2016;76:1305-1312

综述

Baslan T and Hicks J. Unravelling biology and shifting paradigms in cancer with single-cell sequencing. *Nat Rev Cancer*. 2017;17:557-569

DiLoreto R, Khush K and De Vlaminck I. Precision monitoring of immunotherapies in solid organ and hematopoietic stem cell transplantation. *Adv Drug Deliv Rev*. 2017;114:272-284

Ellsworth DL, Blackburn HL, Shriver CD, Rabizadeh S, Soon-Shiong P and Ellsworth RE. Single-cell sequencing and tumorigenesis: improved understanding of tumor evolution and metastasis. *Clin Transl Med*. 2017;6:15

Zhang C, Guan Y, Sun Y, Ai D and Guo Q. Tumor heterogeneity and circulating tumor cells. *Cancer Lett*. 2016;374:216-223

Zhang X, Marjani SL, Hu Z, Weissman SM, Pan X and Wu S. Single-Cell Sequencing for Precise Cancer Research: Progress and Prospects. *Cancer Res*. 2016;76:1305-1312

参考文献

Chung W, Eum HH, Lee HO, et al. Single-cell RNA-seq enables comprehensive tumour and immune cell profiling in primary breast cancer. *Nat Commun*. 2017;8:15081

单细胞方法表明，肿瘤具有遗传异质性。在本研究中，作者使用 HiSeq™ 2500 系统对从乳腺癌肿瘤中分离出的 515 个单个细胞进行了 RNA-Seq。单细胞转录组分析确立了亚型特异性乳腺癌细胞的异质性及其保守的基因表达特征。除了乳腺癌细胞，作者还鉴定了 T 细胞、B 细胞和巨噬细胞的基因表达特征。单个 T 细胞包括激活 T 细胞和耗竭 T 细胞两类，这表明免疫细胞与肿瘤间的相互作用动态性且各异。这些数据表明，各个乳腺癌肿瘤微环境中包含的细胞都具有独特的基因表达模式，肿瘤亚型由肿瘤微环境内的肿瘤细胞和与免疫细胞共同决定。

illumina 的技术：Nextera™ XT DNA Sample Prep Kit、TruSeq™ Rapid SBS Kit、HiSeq 2500 系统

Giustacchini A, Thongjuea S, Barkas N, et al. Single-cell transcriptomics uncovers distinct molecular signatures of stem cells in chronic myeloid leukemia. *Nat Med*. 2017;23:692-702

癌症干细胞是某些肿瘤中存在的罕见细胞类型，具有正常干细胞的特征，能形成肿瘤。此外，癌症干细胞可耐受化疗，在缓解期时仍可存留。由于组织细胞的数量远多于癌症干细胞，并且癌症干细胞难以分离，因此从遗传上鉴定癌症干细胞极具挑战性。在本研究中，作者利用单细胞转录组分析对慢性粒细胞性白血病 (CML) 中的癌症干细胞进行了鉴定。CML 的典型特征是存在 *BCR-ABL* 融合基因，相较于其他癌症，在遗传上不那么复杂。作者结合 HiSeq 2000/4000 系统的 RNA 测序，开发了单细胞实验方案以提高对 *BCR-ABL* 的检测。随后，他们对 2000 多个来自 CML 样本的单个干细胞进行了 RNA-Seq。他们的数据揭示了 CML 癌症干细胞的异质性，并确立了与 CML 治疗反应不佳有关的基因表达特征。最后，他们的数据表明，CML 诊断中已有的癌症干细胞基因表达特征导致了对化疗的耐受性。

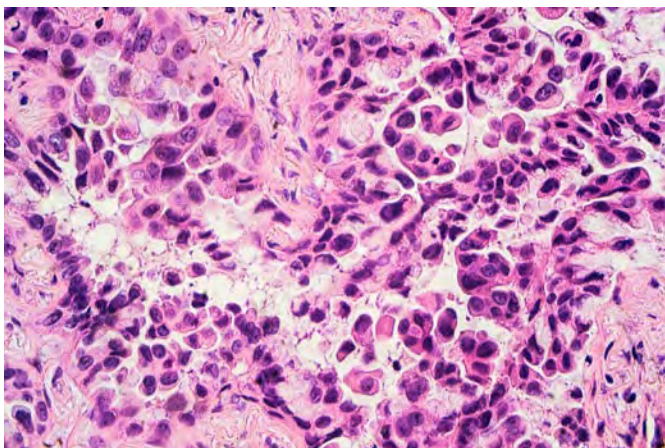
illumina 的技术：Nextera XT DNA Sample Preparation Kit、HiSeq 2000/4000 系统

Lavin Y, Kobayashi S, Leader A, et al. Innate Immune Landscape in Early Lung Adenocarcinoma by Paired Single-Cell Analyses. *Cell*. 2017;169:750-765 e7172

检查点阻断癌症免疫疗法通过改变宿主 T 细胞的功能发挥作用，对晚期非小细胞肺癌 (NSCLC) 的治疗具有重要影响。肿瘤浸润性骨髓细胞是向宿主 T 细胞呈递肿瘤相关抗原的宿主免疫细胞，影响着肿瘤进展和治疗反应。但是，目前仍缺乏对免疫系统如何应答肿瘤信号的详细了解。为解决这一知识缺口，作者对来自 NSCLC 患者肿瘤、非癌性肺组织和血液的免疫细胞进行了单细胞分析。他们发现，肿瘤中的免疫细胞数量多于非肿瘤肺组织。此外，在早期肺肿瘤中，T 细胞和 B 细胞富集，而自然杀伤 (NK) 细胞显著减少。此外，作者利用单细胞 RNA 测序发现了早期 NSCLC 中肿瘤浸润性单核细胞的遗传多样性，并确立了这些单核细胞类型在 NSCLC 不同阶段的基因表达特征。

illumina 的技术：未指明 illumina 系统

30. Zhang C, Guan Y, Sun Y, Ai D and Guo Q. Tumor heterogeneity and circulating tumor cells. *Cancer Lett*. 2016;374:216-223
31. Wucherpfennig KW and Cartwright AN. Genetic screens to study the immune system in cancer. *Curr Opin Immunol*. 2016;41:55-61
32. Wolchok JD, Hodi FS, Weber JS, et al. Development of ipilimumab: a novel immunotherapeutic approach for the treatment of advanced melanoma. *Ann N Y Acad Sci*. 2013;1291:1-13
33. Ansell SM, Lesokhin AM, Borrello I, et al. PD-1 blockade with nivolumab in relapsed or refractory Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med*. 2015;372:311-319
34. Tirosh I, Izar B, Prakadan SM, et al. Dissecting the multicellular ecosystem of metastatic melanoma by single-cell RNA-seq. *Science*. 2016;352:189-196
35. Zheng C, Zheng L, Yoo JK, et al. Landscape of Infiltrating T Cells in Liver Cancer Revealed by Single-Cell Sequencing. *Cell*. 2017;169:1342-1356 e1316
36. Chung W, Eum HH, Lee HO, et al. Single-cell RNA-seq enables comprehensive tumour and immune cell profiling in primary breast cancer. *Nat Commun*. 2017;8:15081
37. Navin NE. Cancer genomics: one cell at a time. *Genome Biol*. 2014;15:452



苏木精 - 伊红 (H&E) 染色的含有腺癌肺样本

Levine MS, Bakker B, Boeckx B, et al. Centrosome Amplification Is Sufficient to Promote Spontaneous Tumorigenesis in Mammals. *Dev Cell*. 2017;40:313-322 e315

中心体是动物细胞中主要的微管组织中心以及细胞周期进程的调控因子。在正常细胞中，每个细胞周期中心体仅复制一次，其中一个拷贝在有丝分裂中传给子细胞。但是在癌细胞中，额外的中心体很常见；它们与不良预后和染色体数量异常即非整倍性有关。目前，对于额外的中心体是否会导致癌症，或者其仅仅是因肿瘤发生而增多尚不明确。为解决这一问题，作者构建了中心体复制调控基因 Plk4 过表达的转基因小鼠。这些转基因小鼠多种组织细胞中的中心体数量持续增加。然后，作者使用 HiSeq 2500 系统，利用单细胞基因组拷贝数分析对 99 个单个表皮细胞进行了核型分析。他们的数据表明，中心体扩增足以引起转基因小鼠细胞中的染色体分离错误和非整倍性。此外，从 36 周开始，Plk4 转基因小鼠发生了自发性的非整倍性肿瘤。总之，这些数据表明，中心体扩增足以引起小鼠的非整倍性和癌形成。

illumina 的技术：TruSeq DNA Sample Preparation Kit v2、HiSeq 2500 系统

Venteicher AS, Tirosh I, Hebert C, et al. Decoupling genetics, lineages, and microenvironment in IDH-mutant gliomas by single-cell RNA-seq. *Science*. 2017;355:eaai8478

单细胞测序法可用于分析肿瘤细胞的遗传多样性以及鉴定肿瘤微环境。但是，已经有许多来自大型群体的批量数据，例如癌症基因组图谱计划 (TCGA)。在本研究中，作者结合了来自 16 个异柠檬酸脱氢酶 (IDH) 突变型胶质瘤的 14,266 个细胞的单细胞 RNA-Seq 与 165 个 TCGA 批量 RNA 表达谱。TCGA RNA 数据表明了 IDH 突变型胶质瘤的 2 个不同亚型星形胶质细胞瘤和少突胶质细胞瘤中的基因表达差异。单细胞 RNA-Seq 表明，基因表达差异是由特征肿瘤事件和肿瘤微环境组成所致。值得注意的是，两种胶质瘤亚型中的胶质细胞系相似。此研究证明了单细胞和 RNA-Seq 方法相结合的威力，其数据为 IDH 突变型胶质瘤的遗传组成带来了新的见解。

illumina 的技术：Nextera XT Library Prep Kit、NextSeq™ 500 系统

Zheng C, Zheng L, Yoo JK, et al. Landscape of Infiltrating T Cells in Liver Cancer Revealed by Single-Cell Sequencing. *Cell*. 2017;169:1342-1356 e1316

肝细胞癌 (HCC) 是全世界癌症死亡的主要原因，在亚洲和非洲的发病率最高。虽然癌症免疫疗法为其他肿瘤类型带来了希望，但其在 HCC 治疗上仍未取得成功，尽管 HCC 肿瘤含有高水平的肿瘤浸润性单核细胞。在本研究中，作者利用单细胞 RNA-Seq，试图了解和鉴定 HCC 中的肿瘤浸润性单核细胞。具体来说，他们从 6 个 HCC 样本的外周血、肿瘤和邻近的正常组织中分离了 5000 多个 T 细胞。然后使用 HiSeq 2500/4000 系统对单个 T 细胞进行了深度 RNA-Seq 以及 T 细胞受体 (TCR) 测序。结合单细胞转录组谱和 TCR 序列，鉴定了 11 个不同的 T 细胞亚型。值得注意的是，作者发现，耗竭的 CD8+ T 细胞和 T_{reg} 细胞在 HCC 中富集并克隆扩增。此研究证明了单细胞测序法在鉴定 HCC 肿瘤微环境和肿瘤浸润性细胞的特征中的用途。

illumina 的技术：HiSeq 2500/4000 系统

Tirosh I, Izar B, Prakadan SM, et al. Dissecting the multicellular ecosystem of metastatic melanoma by single-cell RNA-seq. *Science*. 2016;352:189-196

单细胞测序可通过评估肿瘤内的恶性程度、微环境和免疫状态提供治疗反应和耐药性信息。在本研究中，作者对从 19 位患有转移性黑色素瘤患者分离出的 4645 个单细胞（恶性的、间质的、免疫的、内皮的）进行 scRNA-Seq。该研究发现同一肿瘤内的恶性细胞显示出与细胞周期、空间关系和耐药性相关的转录异质性。同一肿瘤包含具有小眼畸形相关转录因子（MITF）高表达水平的细胞，以及具有低 MITF 水平和 AXL 激酶水平升高的细胞（易于发生早期耐药性的细胞）。浸润的 T 细胞分析揭示了排除程序、与 T 细胞活化 / 扩张的联系和患者变异性。本研究阐明了单细胞基因组如何能揭示肿瘤的细胞生态体系以及对靶向和免疫治疗产生的影响。

illumina 的技术：Nextera XT Sample Preparation Kit、NextSeq 500 系统

Wei W, Shin YS, Xue M, et al. Single-Cell Phosphoproteomics Resolves Adaptive Signaling Dynamics and Informs Targeted Combination Therapy in Glioblastoma. *Cancer Cell*. 2016;29:563-573

成胶质细胞瘤是致死性最高的癌症之一。成胶质细胞瘤在多个可用作药物治疗的通路中存在突变，由于快速和广泛的耐药性，已证明当前的靶向治疗无效。具体来讲，雷帕霉素（mTOR）通路靶向机制是 90% 成胶质细胞瘤的关键驱动力，但是肿瘤细胞发展了对 mTOR 靶向治疗的快速耐药性。在本研究中，作者使用 NextSeq 500 系统获得单细胞基因组数据，并将这些数据与使用 mTOR 抑制剂治疗的肿瘤细胞中的单细胞蛋白组数据联系起来。这些数据显示成胶质细胞瘤肿瘤细胞中对 mTOR 抑制剂的耐药性在药物治疗开始几天内发生。令人惊讶的是，与单细胞测序数据的关联表明此耐药性通过非遗传机制（上调特定信号磷蛋白）进行。该研究启发了一种在治疗成胶质细胞瘤中设计药物复合治疗的新方法。

illumina 的技术：NextSeq 500 系统

Engblom C, Pfirschke C, Zilionis R, et al. Osteoblasts remotely supply lung tumors with cancer-promoting SiglecF(high) neutrophils. *Science*. 2017;358:eaa15081

Gerber T, Willscher E, Loeffler-Wirth H, et al. Mapping heterogeneity in patient-derived melanoma cultures by single-cell RNA-seq. *Oncotarget*. 2017;8:846-862

Li H, Courtois ET, Sengupta D, et al. Reference component analysis of single-cell transcriptomes elucidates cellular heterogeneity in human colorectal tumors. *Nat Genet*. 2017;49:708-718

Litzenburger UM, Buenrostro JD, Wu B, et al. Single-cell epigenomic variability reveals functional cancer heterogeneity. *Genome Biol*. 2017;18:15

Wang Q, Hu B, Hu X, et al. Tumor Evolution of Glioma-Intrinsic Gene Expression Subtypes Associates with Immunological Changes in the Microenvironment. *Cancer Cell*. 2017;32:42-56 e46

Hou Y, Guo H, Cao C, et al. Single-cell triple omics sequencing reveals genetic, epigenetic, and transcriptomic heterogeneity in hepatocellular carcinomas. *Cell Res*. 2016;26:304-319

Kimmerling RJ, Lee Szeto G, Li JW, et al. A microfluidic platform enabling single-cell RNA-seq of multigenerational lineages. *Nat Commun*. 2016;7:10220

Nguyen A, Yoshida M, Goodarzi H and Tavazoie SF. Highly variable cancer subpopulations that exhibit enhanced transcriptome variability and metastatic fitness. *Nat Commun*. 2016;7:11246

Piccirillo SG, Colman S, Potter NE, et al. Genetic and functional diversity of propagating cells in glioblastoma. *Stem Cell Reports*. 2015;4:7-15

宏基因组学

虽然微生物是地球上最丰富和最多样的生命形式，但是在某些环境中仅培养出了其中 0.1%–1%。³⁸ 单细胞基因组方法使我们重新理解了微生物生态学，极大地拓宽了我们对生命树的视野。³⁹ 这一理解还揭示了环境中病毒的范围和重要性及其在菌群形成中的作用。单细胞测序与基于功能或表型的筛选相结合，可以鉴定编码特定功能或表型的微生物基因组。⁴⁰ 令人吃惊的是，细菌细胞克隆——微生物同质性的典范——还显示出复杂的集体动力学，可适应其局部环境。⁴¹

“对单个古菌和细菌细胞进行单细胞基因组测序，
是解密未培养出的微生物遗传组成的重要途径。”

——Bowers 等，2017 年



单细胞测序和元基因组学可帮助我们了解每种微生物对其周围环境的作用。

综述

Bowers RM, Doud DFR and Woyke T. Analysis of single-cell genome sequences of bacteria and archaea. *Emerging Topics in Life Sciences*. 2017;1:249-255

Doud DFR and Woyke T. Novel approaches in function-driven single-cell genomics. *FEMS Microbiol Rev*. 2017;41:538-548

Kodzios R and Gojoberi T. Single-cell technologies in environmental omics. *Gene*. 2016;576:701-707

Hedlund BP, Murugapiran SK, Alba TW, et al. Uncultivated thermophiles: current status and spotlight on 'Aigarchaeota'. *Curr Opin Microbiol*. 2015;25:136-145

Rashid M and Stingl U. Contemporary molecular tools in microbial ecology and their application to advancing biotechnology. *Biotechnol Adv*. 2015;33:1755-1773

-
38. Solden L, Lloyd K and Wrighton K. The bright side of microbial dark matter: lessons learned from the uncultivated majority. *Curr Opin Microbiol*. 2016;31:217-226
 39. Hug LA, Baker BJ, Anantharaman K, et al. A new view of the tree of life. *Nature Microbiology*. 2016;1:16048
 40. Doud DFR and Woyke T. Novel approaches in function-driven single-cell genomics. *FEMS Microbiol Rev*. 2017;41:538-548
 41. Cho H, Jonsson H, Campbell K, et al. Self-organization in high-density bacterial colonies: efficient crowd control. *PLoS Biol*. 2007;5:e302
-

参考文献

Kashtan N, Roggensack SE, Berta-Thompson JW, Grinberg M, Stepanauskas R and Chisholm SW. Fundamental differences in diversity and genomic population structure between Atlantic and Pacific *Prochlorococcus*. *ISME J*. 2017;11:1997-2011

原绿球藻 (*Prochlorococcus*) 是一种可以进行光合作用的蓝绿藻, 大量存在于海洋表面, 对海洋生产力具有一定的贡献。此前的研究表明, 大西洋中不同地点的原绿球藻群落表现出高度的基因组多样性, 这表明海洋生境可影响基因组的结构和多样性。⁴² 在本研究中, 作者从太平洋和大西洋的生境中采集了野生细胞群落样本。他们使用 Illumina GAIIx 系统对来自不同地点的原绿球藻进行了单细胞测序。他们发现, 来自 2 个不同海洋地点的原绿球藻由各不重合且差异巨大的亚群落组成, 具有不同的基因组骨架。这些数据表明, 环境选择压力以及地理隔离可影响原绿球藻群落。

Illumina 的技术: GAIIx 系统

Dykstra S, Bischof K, Fuchs BM, et al. Ubiquitous Gammaproteobacteria dominate dark carbon fixation in coastal sediments. *ISME J*. 2016;8:1939-1953

海洋沉积物是地球上最大的碳汇, 其中一半的化学合成海洋碳固定发生在近海岸沉积物。但是, 进行该活动的微生物却未知。通过测量横跨欧洲和澳大利亚 13 个近海岸沉积物的细菌 16S 核糖体 RNA (rRNA) 的基因多样性, 作者鉴定出了属于硫氧化细菌的 γ -变形菌纲。 ¹⁴C- 碳同化研究显示这些未培养出的 γ -变形菌纲占近海岸沉积物中碳固定的 80%。最后, 作者从环境样本分离出来单个细胞, 并执行了单细胞全基因组测序 (WGS) 以鉴定将氢氧化活动与硫氧化 γ -变形菌纲联系起来的基因。

Illumina 的技术: MiSeq™ 和 HiSeq 2000 系统

Eloe-Fadrosch EA, Paez-Espino D, Jarett J, et al. Global metagenomic survey reveals a new bacterial candidate phylum in geothermal springs. *Nat Commun*. 2016;7:10476

使用 16S rRNA 测序的分子环境调查已在很大程度上扩展了我们对微生物种族发育多样性的知识。但是, 一些细菌和古菌类群在当前调查中系统性代表性不足, 或全部缺失。在本研究中, 作者分析了 5.2 Tb 的元基因组学数据并发现了新的地热温泉中特有的细菌 (*Candidatus* Kryptonia)。由于在常用的 16S rRNA 引物中不匹配, 该谱系在经典元基因组学调查中缺失。作者将元基因组学数据与单细胞测序结合起来, 以生成代表了该门内四个独特属的高质量的基因组。

Illumina 的技术: MiSeq 系统

Mende DR, Aylward FO, Eppley JM, Nielsen TN and DeLong EF. Improved Environmental Genomes via Integration of Metagenomic and Single-Cell Assemblies. *Front Microbiol*. 2016;7:143

单细胞基因组已为未培养微生物带来了大量单个基因组草图; 但是, 扩增步骤期间多链置换扩增技术 (MDA) 杂峰导致覆盖不完整以及不均匀。元基因组学数据集不会发生相同序列偏移, 但微生物群落的基因组复杂性妨碍了基因组草图的再现。在本研究中, 作者研发了一种新的从元基因组学引导的、单细胞扩增基因组数据生成种群基因组的新方法。该研究通过完成海洋组 1 奇古菌门和 SAR324 类群浮游细菌的单细胞扩增基因组验证了该方法。SAR324 类群基因组改进的方法组合揭示了存在多个单细胞扩增基因组中未发现的基因。

Illumina 的技术: TruSeq LT Nano Kit、MiSeq 系统

Spencer SJ, Tamminen MV, Preheim SP, et al. Massively parallel sequencing of single cells by epicPCR links functional genes with phylogenetic markers. *ISME J*. 2016;10:427-436

在微生物生态学研究中, 16S rRNA 测序可鉴定微生物群落成员, 而鸟枪法元宏基因组学可确定群落的功能性多样性。但是, 将这两种方法组合起来在技术上具有挑战性。在本研究中, 作者研发了乳液法、配对分离和链状结合 PCR (epicPCR, 一项将功能基因与种系发育标记联系起来的技术)。该研究将此技术应用于来自马塞诸塞 Upper Mystic Lake 的淡水中数百万的未培养单个细胞。具体来说, 该研究分析了淡水湖群落内的硫酸盐还原群落, 并可鉴定新的假定硫酸盐还原硫酸盐还原菌。该方法适用于鉴定功能群体成员, 追踪基因导入并绘制微生物细胞内的生态学相互作用图。

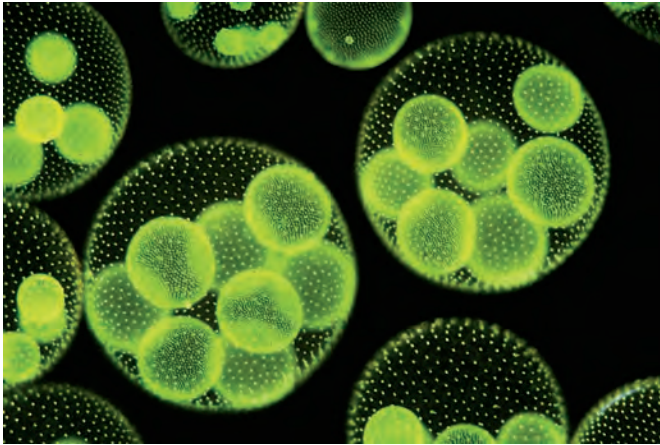
Illumina 的技术: MiSeq 系统

-
42. Kashtan N, Roggensack SE, Rodrigue S, et al. Single-cell genomics reveals hundreds of coexisting subpopulations in wild *Prochlorococcus*. *Science*. 2014;344:416-420
-

Lima-Mendez G, Faust K, Henry N, et al. Ocean plankton. Determinants of community structure in the global plankton interactome. *Science*. 2015;348:1262073

海洋浮游生物是世界范围内最大的生态体系，且由病毒、原核生物、真核微生物、浮游植物和浮游动物构成。该生态系统结构和组成受环境条件和养分供给的影响。在本研究中，作者分析了 313 个来自 Tara Oceans expedition 的浮游生物样本，并从 Illumina 测序的元基因组和 18S rDNA V9 序列获得了病毒、真核生物和原核生物丰度谱。研究使用网络推理和机器学习法构建浮游生物群组之间的相互作用组。特别是作者通过将假定的宿主重叠群与从单细胞基因组获得的病毒数据比较，确认了预测的病毒-宿主之间的相互作用。

Illumina 的技术: Illumina 测序的元基因组 (mi 标签) 和 18S rRNA V9 序列



金黄色团藻 (*Volvox aureus*)

Hosokawa M, Nishikawa Y, Kogawa M and Takeyama H. Massively parallel whole genome amplification for single-cell sequencing using droplet microfluidics. *Sci Rep*. 2017;7:5199

Lan F, Demaree B, Ahmed N and Abate AR. Single-cell genome sequencing at ultra-high-throughput with microfluidic droplet barcoding. *Nat Biotechnol*. 2017;35:640-646

Leon-Zayas R, Peoples L, Biddle JF, et al. The metabolic potential of the single cell genomes obtained from the Challenger Deep, Mariana Trench within the candidate superphylum Parcubacteria (OD1). *Environ Microbiol*. 2017;19:2769-2784

Neave MJ, Rachmawati R, Xun L, et al. Differential specificity between closely related corals and abundant Endozoicomonas endosymbionts across global scales. *ISME J*. 2017;11:186-200

Kolinko S, Richter M, Glockner FO, Brachmann A and Schuler D. Single-cell genomics of uncultivated deep-branching magnetotactic bacteria reveals a conserved set of magnetosome genes. *Environ Microbiol*. 2016;18:21-37

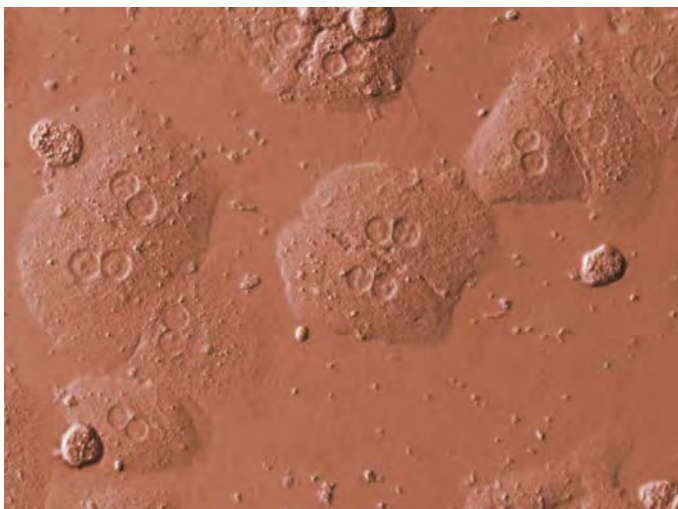
Mende DR, Aylward FO, Eppley JM, Nielsen TN and DeLong EF. Improved Environmental Genomes via Integration of Metagenomic and Single-Cell Assemblies. *Front Microbiol*. 2016;7:143

干细胞

人类生命始于单个卵母细胞，卵母细胞进行有丝分裂生成构成人胚胎的细胞群。⁴³ 胚胎干细胞 (ESC) 为来源于囊胚 (早期植入前的胚胎) 内细胞群的多能干细胞。每个干细胞都会进行一系列的细胞分裂，产生特定谱系，谱系决定了其遗传密码及其对局部环境因素的应答。这一过程产生了一系列独特的遗传异质性细胞。⁴⁴ 在分化过程中对这些单个干细胞的测序帮助了对潜在机制的阐明。^{45,46}

“单细胞测序为鉴定异质细胞群 (包括干细胞) 的组学级特征提供了有力工具。” —Wen 和 Tang, 2016 年

造血干细胞 (HSC) 和调控其分化为红系细胞、髓系细胞或淋巴系细胞谱系的机制是细胞发育的独特示例。⁴⁷ 单细胞测序已帮助鉴定出在脑损伤时反应性激活的神经干细胞群，⁴⁸ 揭示了治疗创伤性脑损伤的潜在方法。诱导多能干细胞 (iPSC) 为一类可直接从成熟细胞生成的多能干细胞，在细胞代替治疗中也具有潜在的使用价值。单细胞测序已帮助鉴定出单个 iPSC 的遗传异质性，以及调控其分化和多能性及其自组织为器官样结构的机制。^{49,50,51}



胚胎干细胞

43. Speicher MR. Single-cell analysis: toward the clinic. *Genome Med.* 2013;5:74
44. Voet T, Kumar P, Van Loo P, et al. Single-cell paired-end genome sequencing reveals structural variation per cell cycle. *Nucleic Acids Res.* 2013;41:6119-6138
45. Yao Z, Mich JK, Ku S, et al. A Single-Cell Roadmap of Lineage Bifurcation in Human ESC Models of Embryonic Brain Development. *Cell Stem Cell.* 2017;20:120-134
46. Kumar P, Tan Y and Cahan P. Understanding development and stem cells using single cell-based analyses of gene expression. *Development.* 2017;144:17-32
47. Paul F, Arkin Y, Giladi A, et al. Transcriptional Heterogeneity and Lineage Commitment in Myeloid Progenitors. *Cell.* 2015;163:1663-1677
48. Llorens-Bobadilla E, Zhao S, Baser A, Saiz-Castro G, Zwadlo K and Martin-Villalba A. Single-Cell Transcriptomics Reveals a Population of Dormant Neural Stem Cells that Become Activated upon Brain Injury. *Cell Stem Cell.* 2015;17:329-340
49. Camp JG and Treutlein B. Human organomics: a fresh approach to understanding human development using single-cell transcriptomics. *Development.* 2017;144:1584-1587
50. Li C, Kico JM, Helton NM, et al. Genetic heterogeneity of induced pluripotent stem cells: results from 24 clones derived from a single C57BL/6 mouse. *PLoS One.* 2015;10:e0120585
51. Cacchiarelli D, Trapnell C, Ziller MJ, et al. Integrative Analyses of Human Reprogramming Reveal Dynamic Nature of Induced Pluripotency. *Cell.* 2015;162:412-424

综述

Camp JG and Treutlein B. Human organomics: a fresh approach to understanding human development using single-cell transcriptomics. *Development*. 2017;144:1584-1587

Kumar P, Tan Y and Cahan P. Understanding development and stem cells using single cell-based analyses of gene expression. *Development*. 2017;144:17-32

Ye F, Huang W and Guo G. Studying hematopoiesis using single-cell technologies. *J Hematol Oncol*. 2017;10:27

Wen L and Tang F. Single-cell sequencing in stem cell biology. *Genome Biol*. 2016;17:71

参考文献

Cabezas-Wallscheid N, Buettner F, Sommerkamp P, et al. Vitamin A-Retinoic Acid Signaling Regulates Hematopoietic Stem Cell Dormancy. *Cell*. 2017;169:807-823 e819

HSC 是存在于骨髓中的多能干细胞，形成血液中的所有骨髓和淋巴细胞谱系。在小鼠中，少数 HSC 处于休眠状态，一生只分裂 5 次，维持着高长期重建潜能。休眠 HSC 可转变为激活 HSC，后者仍保持静止状态，但已准备好进入细胞周期。调控这一转变的机制尚不明确。在本研究中，作者利用单细胞测序比较了单个休眠 HSC、激活 HSC 和多能祖源细胞中的基因表达。他们利用荧光活化细胞分选 (FACS) 从 HSC 特异性绿色荧光蛋白 (GFP) 标志物过表达的转基因小鼠细胞中分离出了 HSC。单细胞转录组数据表明，休眠 HSC 的特征是 *Myc* 基因表达水平低，维甲酸基因表达水平高。此外，休眠 HSC 表达了低水平的基本生物合成通路所需的基因，而休眠 HSC 转化为激活 HSC 的特征是生物合成基因表达持续升高。总之，他们的数据为调控 HSC 激活的生物通路带来了新的见解，并表明了维甲酸 - 维生素 A 可调控小鼠 HSC 的可塑性。

Illumina 的技术: Nextera XT Sample Preparation Kit、HiSeq 2000/2500 系统

Velten L, Haas SF, Raffel S, et al. Human haematopoietic stem cell lineage commitment is a continuous process. *Nat Cell Biol*. 2017;19:271-281

传统 RNA-Seq 方法将单个细胞的基因表达数据一起进行了平均，破坏了细胞状态转化的关键信息。因此，传统 RNA-Seq 不适用于鉴定细胞状态或细胞在发育中的功能。单细胞 RNA-Seq 方法可测量大量单个细胞的基因表达，进而分类和确定细胞状态。目前的模型认为，在血细胞生成过程中，HSC 逐步分化为不同的多能祖源细胞谱系。⁵² 在本研究中，作者结合了单细胞 RNA-Seq 与功能分析以检验这一模型。他们使用 HiSeq 2500 系统对从人骨髓中分离的 1,413 个单个 HSC 进行了单细胞测序。另外，他们单独间接体内培养了 2038 个单个 HSC 以鉴定谱系潜能。然后整合了 2 个数据集，建立了转录组单细胞和功能单细胞数据的定量联系。他们的数据表明，单个 HSC 逐渐获得多个方向的谱系偏好，而没有转化为各层次的不同祖代细胞。

Illumina 的技术: HiSeq 2500 系统

Freeman BT, Jung JP and Ogle BM. Single-cell RNA-seq reveals activation of unique gene groups as a consequence of stem cell-parenchymal cell fusion. *Sci Rep*. 2016;6:23270

骨髓干细胞移植常用于治疗某些疾病 (如白血病和淋巴瘤)。移植后，间充质干细胞可与脑、肝脏、小肠和心脏的实质细胞融合。该杂交导致的效应尚属未知。在本研究中，作者使用 MiSeq 系统执行单个间充质干细胞 - 心肌细胞杂种的 scRNA-Seq，以鉴定全基因表达。细胞周期基因的表达在杂种细胞中普遍降低。但是，对于大多数其他基因组而言，各个杂种细胞在遗传上都各不相同。此外，两个杂种细胞在已遗传上与乳腺癌细胞相似，表明有必要监测干细胞移植是否出现肿瘤。

Illumina 的技术: Nextera XT Sample Preparation Kit、MiSeq 系统

-
52. Chao MP, Seita J and Weissman IL. Establishment of a normal hematopoietic and leukemia stem cell hierarchy. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 2008;73:439-449
-

Kang E, Wang X, Tippner-Hedges R, et al. Age-Related Accumulation of Somatic Mitochondrial DNA Mutations in Adult-Derived Human iPSCs. *Cell Stem Cell*. 2016;18:625-636

iPSC 使得自体细胞替代治疗成为可能。维持培养诱导性多功能干细胞的基因完整性是潜在治疗的重要考虑。作者鉴定了来自年轻或老年受试者细胞中体细胞线粒体 DNA (mtDNA) 突变的频率。数据显示诱导性多功能干细胞中的 mtDNA 突变频率随个体年龄增长而升高。结果强调基因监测诱导性多功能干细胞中 mtDNA 突变的重要性，尤其是来自老龄患者的突变。

Illumina 的技术: Nextera XT Sample Preparation Kit、MiSeq 系统

Luo Y, Coskun V, Liang A, et al. Single-cell transcriptome analyses reveal signals to activate dormant neural stem cells. *Cell*. 2015;161:1175-1186

组织特定干细胞的不足，以及其周围环境的复杂性使得单细胞测序对于鉴定这些细胞类型必不可少。在本研究中，作者使用单细胞测序和加权基因表达网络分析鉴定来自成年小鼠前脑神经区的 CD133+ 室管膜细胞为 NSC。将这些细胞亚群富集用于免疫应答基因以及基因编码血管生成因子富集。血管内皮细胞生长因子 (VEGF) 和碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF) 处理增强了迁移，并诱导分化为神经元和神经胶质细胞。

Illumina 的技术: HiSeq 2500 系统

Paul F, Arkin Y, Giladi A, et al. Transcriptional Heterogeneity and Lineage Commitment in Myeloid Progenitors. *Cell*. 2015;163:1663-1677

血细胞生成是一个发育过程，通过该过程骨髓来源的 HSC 分化为红系细胞、髓系细胞或淋巴系细胞谱系。在本研究中，作者将大量平行 scRNA-Seq 与荧光激发细胞分选术 (FACS)、染色质分析、遗传干扰和计算模型结合起来，以鉴定骨髓祖细胞群的转录组。单细胞转录数据将 HSC 分为具有 7 个分化状态的多个祖细胞亚群组。这些数据为在单细胞水平研究血细胞生成提供了新的参考模型。

Illumina 的技术: NextSeq 500 和 HiSeq 1500 系统

Athanasiadis EI, Botthof JG, Andres H, Ferreira L, Lio P and Cvejic A. Single-cell RNA-sequencing uncovers transcriptional states and fate decisions in haematopoiesis. *Nat Commun*. 2017;8:2045

Chen YJ, Friedman BA, Ha C, et al. Single-cell RNA sequencing identifies distinct mouse medial ganglionic eminence cell types. *Sci Rep*. 2017;7:45656

Dulken BW, Leeman DS, Boutet SC, Hebestreit K and Brunet A. Single-Cell Transcriptomic Analysis Defines Heterogeneity and Transcriptional Dynamics in the Adult Neural Stem Cell Lineage. *Cell Rep*. 2017;18:777-790

Kee N, Volakakis N, Kirkeby A, et al. Single-Cell Analysis Reveals a Close Relationship between Differentiating Dopamine and Subthalamic Nucleus Neuronal Lineages. *Cell Stem Cell*. 2017;20:29-40

Li L, Dong J, Yan L, et al. Single-Cell RNA-Seq Analysis Maps Development of Human Germline Cells and Gonadal Niche Interactions. *Cell Stem Cell*. 2017;20:858-873 e854

Yang J, Ryan DJ, Wang W, et al. Establishment of mouse expanded potential stem cells. *Nature*. 2017;550:393-397

Yao Z, Mich JK, Ku S, et al. A Single-Cell Roadmap of Lineage Bifurcation in Human ESC Models of Embryonic Brain Development. *Cell Stem Cell*. 2017;20:120-134

Dixit A, Parnas O, Li B, et al. Perturb-Seq: Dissecting Molecular Circuits with Scalable Single-Cell RNA Profiling of Pooled Genetic Screens. *Cell*. 2016;167:1853-1866 e1817

Milani P, Escalante-Chong R, Shelley BC, et al. Cell freezing protocol suitable for ATAC-Seq on motor neurons derived from human induced pluripotent stem cells. *Sci Rep*. 2016;6:25474

Zhao X, Han Y, Liang Y, Nie C and Wang J. RNA-Seq Reveals the Angiogenesis Diversity between the Fetal and Adults Bone Mesenchyme Stem Cell. *PLoS One*. 2016;11:e0149171

发育生物学

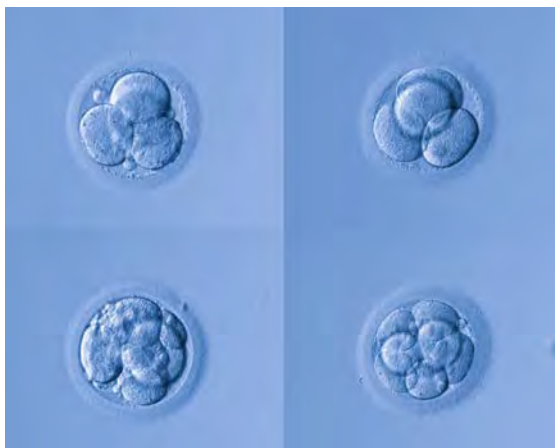
一般来说，对于研究者而言，仅少量细胞可用于研究发育生物学。细胞环境中的微小变化以及时序变化对细胞行为有深远影响。⁵³ 单细胞方法已使我们对肿瘤、^{54,55} 神经^{56,57} 和免疫系统^{58,59} 发育有了新的理解。这一理解反过来促使了对血细胞生成所涉及的细胞谱系和调控网络的突破性了解。^{60,61,62}

“在发育期间检测多个细胞的基因组揭示了发育谱系树，而细胞转录组则为我们提供了关于细胞的调控状态及其潜能上的逐步限制的信息。”

——Marioni 和 Arendt, 2017 年

人类胚胎植入前发育研究通常基于少量样本（常常混合）。⁶³ 这些研究无法捕获人类胚胎植入前发育前几天的详细情况。近期的单细胞测序研究开始捕获更多的全面详细的情况。⁶⁴

单细胞方法还提供了了解其他模式生物（如小鼠⁶⁵ 和斑马鱼⁶⁶ 以及秀丽隐杆线虫⁶⁷）胚胎发育的机会，并且有助于更好地理解人类胚胎发育所涉及的调控机制。^{68,69} 比较单细胞研究甚至开始揭示胚层的进化史——过去 150 年发育生物学中的基本概念。⁷⁰



人类胚胎形成过程中，单细胞合子多次分裂以形成桑椹胚。

53. Yalcin D, Hagguder ZM and Otu HH. Bioinformatics approaches to single-cell analysis in developmental biology. *Mol Hum Reprod.* 2016;22:182-192
54. Tirosh I, Izar B, Prakadan SM, et al. Dissecting the multicellular ecosystem of metastatic melanoma by single-cell RNA-seq. *Science.* 2016;352:189-196
55. Ortmann CA, Kent DG, Nangalia J, et al. Effect of mutation order on myeloproliferative neoplasms. *N Engl J Med.* 2015;372:601-612
56. Lodato MA, Woodworth MB, Lee S, et al. Somatic mutation in single human neurons tracks developmental and transcriptional history. *Science.* 2015;350:94-98
57. Quadrato G, Nguyen T, Macosko EZ, et al. Cell diversity and network dynamics in photosensitive human brain organoids. *Nature.* 2017;545:48-53
58. Stubbington MJT, Rozenblatt-Rosen O, Regev A and Teichmann SA. Single-cell transcriptomics to explore the immune system in health and disease. *Science.* 2017;358:58-63
59. Villani AC, Satija R, Reynolds G, et al. Single-cell RNA-seq reveals new types of human blood dendritic cells, monocytes, and progenitors. *Science.* 2017;356:eaah4573
60. Perie L and Duffy KR. Retracing the in vivo haematopoietic tree using single-cell methods. *FEBS Lett.* 2016;590:4068-4083
61. Velten L, Haas SF, Raffel S, et al. Human haematopoietic stem cell lineage commitment is a continuous process. *Nat Cell Biol.* 2017;19:271-281
62. Paul F, Arkin Y, Giladi A, et al. Transcriptional Heterogeneity and Lineage Commitment in Myeloid Progenitors. *Cell.* 2015;163:1663-1677
63. Zhang P, Zucchelli M, Bruce S, et al. Transcriptome profiling of human pre-implantation development. *PLoS One.* 2009;4:e7844
64. Mohammed H, Hernando-Herraez I, Savino A, et al. Single-Cell Landscape of Transcriptional Heterogeneity and Cell Fate Decisions during Mouse Early Gastrulation. *Cell Rep.* 2017;20:1215-1228
65. Bolton H, Graham SJ, Van der Aa N, et al. Mouse model of chromosome mosaicism reveals lineage-specific depletion of aneuploid cells and normal developmental potential. *Nat Commun.* 2016;7:11165
66. Junker JP, Noel ES, Guryev V, et al. Genome-wide RNA Tomography in the zebrafish embryo. *Cell.* 2014;159:662-675
67. Cao J, Packer JS, Ramani V, et al. Comprehensive single-cell transcriptional profiling of a multicellular organism. *Science.* 2017;357:661-667
68. Li L, Dong J, Yan L, et al. Single-Cell RNA-Seq Analysis Maps Development of Human Germline Cells and Gonadal Niche Interactions. *Cell Stem Cell.* 2017;20:858-873 e854
69. Otte J, Wruck W and Adjaye J. New insights into human primordial germ cells and early embryonic development from single-cell analysis. *FEBS Lett.* 2017;591:2226-2240
70. Hashimshony T, Feder M, Levin M, Hall BK and Yanai I. Spatiotemporal transcriptomics reveals the evolutionary history of the endoderm germ layer. *Nature.* 2015;519:219-222

综述

Marioni JC and Arendt D. How Single-Cell Genomics Is Changing Evolutionary and Developmental Biology. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2017;33:537-553

Woodworth MB, Girskis KM and Walsh CA. Building a lineage from single cells: genetic techniques for cell lineage tracking. *Nat Rev Genet.* 2017;18:230-244

Perie L and Duffy KR. Retracing the in vivo haematopoietic tree using single-cell methods. *FEBS Lett.* 2016;590:4068-4083

Yalcin D, Hakguder ZM and Otu HH. Bioinformatics approaches to single-cell analysis in developmental biology. *Mol Hum Reprod.* 2016;22:182-192

参考文献

Bae T, Tomasini L, Mariani J, et al. Different mutational rates and mechanisms in human cells at pregastrulation and neurogenesis. *Science.* 2018;359:550-555

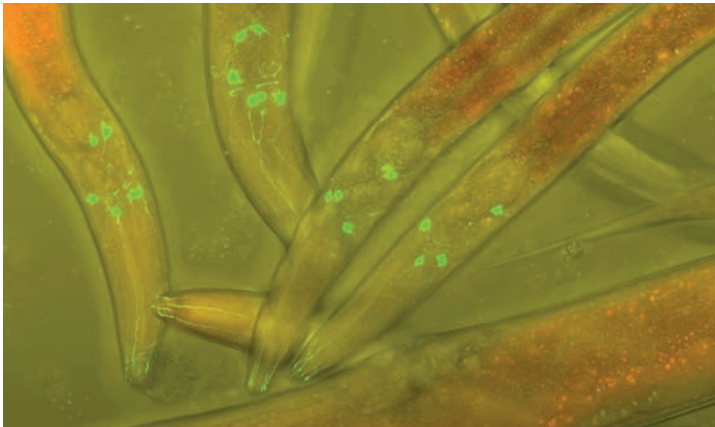
体细胞突变是基因组 DNA 序列的永久性改变，由细胞中 DNA 复制错误或环境因素导致。此前利用单细胞测序法进行的研究证明，单个神经元含有独特的单核苷酸变异 (SNV) 体细胞突变，这一现象称为基因组嵌合。⁷¹ 尽管基因组嵌合常见于多种细胞类型中，但是神经元是有丝分裂后细胞，因此 SNV 可持续存在并改变神经元功能。在本研究中，作者从胚胎样本的前脑中分离了单个神经元，在培养基中培养为小克隆。他们利用 HiSeq 平台分析了这些样本的基因组，从每个细胞中鉴定出了 200–400 个 SNV。这些胚胎神经元中的 SNV 模式与癌细胞基因组中的类似。通过分析不同胚胎发育阶段的神经元的基因组，研究确定，在神经发生过程中突变率加快。这些数据表明，相较于神经发育晚期的神经元，胚胎神经元受到保护不会发生突变。

Illumina 的技术：HiSeq 2500 和 HiSeq X 系统

Cao J, Packer JS, Ramani V, et al. Comprehensive single-cell transcriptional profiling of a multicellular organism. *Science.* 2017;357:661-667

单细胞测序法在分析生物组织的遗传和细胞多样性中有着重要作用。在本研究中，作者在一项全面的生物体的单细胞测序研究中扩展了这一观念。他们利用 NextSeq 500 系统对秀丽隐杆线虫 L2 幼虫阶段的全部 50,000 个细胞进行了单细胞 RNA-Seq。为实现这一目标，他们开发了组合索引方法以独特标记大量单个细胞的转录组，此方法称为 sci-RNA-seq。他们的单细胞转录组数据表明，秀丽隐杆线虫 L2 幼虫由 27 种不同细胞类型组成，其中包括一些在生物体中极为罕见的类型。此外，他们整合了 sci-RNA-seq 数据与染色质免疫沉淀测序 (ChIP-Seq) 数据，确定了转录因子对特定细胞类型的影响。他们的工作证明了单细胞测序法在重构整个生物体的细胞组成上的能力，并为线虫类生物学家提供了有价值的资源。

Illumina 的技术：Nextera XT Sample Preparation Kit、NextSeq 500 系统



圆虫秀丽隐杆线虫中荧光标记的细胞。

-
71. Lodato MA, Woodworth MB, Lee S, et al. Somatic mutation in single human neurons tracks developmental and transcriptional history. *Science.* 2015;350:94-98
-

Halpern KB, Shenhav R, Matcovitch-Natan O, et al. Single-cell spatial reconstruction reveals global division of labour in the mammalian liver. *Nature*. 2017;542:352-356

肝是代谢物解毒、产生载体蛋白和消化必需的生化物质的重要器官。从解剖学上讲，肝由肝小叶组成，肝小叶为六边形，对于将血液从肝中运输出去极为重要。肝小叶由 15 个肝细胞放射状层构成，肝细胞是肝内的主要细胞类型，各放射状层在不同的过程中特化。⁷² 由于各肝小叶内高度特化的微环境，批量测序方法的分辨率不足以鉴定每个放射状层内的区域基因表达。在本研究中，作者结合了分离的单个肝细胞的单细胞 RNA 测序和肝组织切片的单分子荧光原位杂交 (smFISH)。单细胞 RNA-Seq 能够测量数千个细胞的基因表达模式，而 smFISH 能够测量许多重要基因的原位表达水平。综合数据表明，肝小叶内表达的所有基因均为区域表达，50% 的肝基因进行了区域表达。此方法适于重构其他器官的空间基因表达。

illumina 的技术：HiSeq 2500 系统

Bolton H, Graham SJ, Van der Aa N, et al. Mouse model of chromosome mosaicism reveals lineage-specific depletion of aneuploid cells and normal developmental potential. *Nat Commun*. 2016;7:11165

人类胚胎植入前胚胎常显示出染色体嵌合现象，通常为整倍体 - 非整倍体嵌合，附带有正常和异常细胞。该嵌合现象在发育早期，受精后最开始的少数细胞分裂期间出现。虽然胚胎植入前嵌合现象常见，并导致较高的人早期妊娠失败率，胚胎中的非整倍体细胞的命运仍不清楚。在本研究中，作者通过在四到八细胞期对发育中的小鼠胚胎给予逆转录处理研发了一种胚胎植入前染色体嵌合现象的小鼠模型。发育的小鼠胚胎随后通过使用活细胞成像和单细胞测序的组合进行鉴定。数据显示非整倍体细胞通过细胞凋亡从胚胎中清除，从即将植入前开始。嵌合体整倍体 - 非整倍体胚胎与正常胚胎相比，只要含有充足的整倍体细胞比例，就有类似的发育潜力。

illumina 的技术：Nextera XT Sample Preparation Kit、HiSeq 2000/2500 系统

Adrian J, Chang J, Ballenger CE, et al. Transcriptome dynamics of the stomatal lineage: birth, amplification, and termination of a self-renewing population. *Dev Cell*. 2015;33:107-118

植物气孔便于植物与大气进行气体交换。在拟南芥中，气孔的产生和方式来自可解析成中间步骤的分散谱系。尽管核糖核酸酶 L (RNase L) 具有生物学显著性，但此酶切割的 RNA 尚未清楚地确定。在本研究中，作者使用 illumina 测序揭示宿主和病毒 RNA 中 RNase L 分裂位点的频率和位置。方法使用经 RNase L 和 RNase A 分裂的病毒 RNA，以及来自感染和未感染 HeLa 细胞系的 RNA 进行优化并验证。作者确定了受 RNase L 和其他单链特定核糖核酸内切酶作用的散在基因组区域。监测宿主和病毒 RNA 中 RNase L 内分裂位点的频率和位置揭示了这些酶如何对健康和疾病产生影响。

illumina 的技术：TruSeq SBS Kit v3-HS、HiSeq 2000 系统

Burns JC, Kelly MC, Hoa M, Morell RJ and Kelley MW. Single-cell RNA-Seq resolves cellular complexity in sensory organs from the neonatal inner ear. *Nat Commun*. 2015;6:8557

内耳的耳蜗和前庭感觉上皮细胞使用相似的细胞类型传导两种类型的刺激：声音和加速。但是，每个单独的感觉上皮细胞由解剖学和生理学异质性细胞类型组成，由于每种细胞类型的数量有限，使得对转录特性毫无头绪。在本研究中，作者对来自新生小鼠椭圆囊和耳蜗感觉上皮细胞的 301 个单独细胞执行了 RNA-Seq。聚类分析确定了每种细胞类型的不同转录谱。对椭圆囊和耳蜗内细胞类型表达数据的比较表明听觉和前庭细胞之间有差异。

illumina 的技术：Nextera XT DNA Sample Preparation Kit、Nextera XT DNA Sample Preparation Index Kit、HiSeq 1000 系统

-
72. Jungermann K and Kietzmann T. Zonation of parenchymal and nonparenchymal metabolism in liver. *Annu Rev Nutr*. 1996;16:179-203
-

Hashimshony T, Feder M, Levin M, Hall BK and Yanai I. Spatiotemporal transcriptomics reveals the evolutionary history of the endoderm germ layer. *Nature*. 2015;519:219-222

在动物中，胚层产生所有组织和器官，是发育生物学的组织原则。中胚层存在于复杂的两侧对称性动物中，但在腔肠动物和栉水母类（梳水母）中不存在，表明中胚层是进化的最终胚层。作者使用 HiSeq 2000 系统分析一起构成整个胚胎的单个线虫分裂球（AB、MS、E、C 和 P3）的转录组。研究还使用通过线性扩增测序（CEL-Seq）的细胞表达生成了整个胚胎的时序进程，横跨整个单细胞阶段至独立生存幼虫的过程，分辨率为 10 分钟。研究发现线虫中胚层的基因表达程序在外胚层和内胚层的基因表达程序之后诱导发生。此外，内胚层表达程序激活早于内胚层程序。该结果还观察了青蛙（非洲爪蟾热带属）、海葵（海葵目）和海绵（多孔动物门）的内胚层同源序列表达。总之，这些观察表明内胚层程序可追溯至多细胞起源，而外胚层则源自第二胚层。

illumina 的技术：HiSeq 2000 系统

Lodato MA, Woodworth MB, Lee S, et al. Somatic mutation in single human neurons tracks developmental and transcriptional history. *Science*. 2015;350:94-98

神经元是有丝分裂后细胞，因此其基因组尤其易受 DNA 损伤。在本研究中，作者通过执行 36 个单个皮层神经元的单细胞 WGS，对人类大脑中的体细胞核苷酸位点变异（SNV）情况进行了测量。最丰富的 SNV 包括非编码、非编码 RNA、内含子和基因间 SNV。编码、截取、拼接和沉默 SNV 的丰度要少很多。此外，数据显示每个皮层神经元都有独特的基因组，包含最多 1580 个体细胞 SNV。最后，体细胞 SNV 创建了嵌套连接树，表明体细胞突变可用于重建神经元的发育谱。

illumina 的技术：TruSeq Nano LT Sample Preparation Kit、MiSeq、HiSeq 2000 和 HiSeq X Ten 系统

Satija R, Farrell JA, Gennert D, Schier AF and Regev A. Spatial reconstruction of single-cell gene expression data. *Nat Biotechnol*. 2015;33:495-502

scRNA-Seq 是一种发现新细胞类型、了解调控网络和重建发育过程的成熟方法。但是，scRNA-Seq 通常涉及来自组织的分离细胞，因此破坏了其自然空间关系。为在 scRNA-Seq 数据中捕获空间关系，作者研发了 Seurat，一种将较小的引导空间指定的“标志”基因集的 scRNA-Seq 与补充性原位杂交数据结合起来的计算策略。研究通过空间绘制从斑马鱼胚胎分离的 851 个单个细胞并创建空间模式的全转录组图对 Seurat 进行了验证。Seurat 可正确定位细胞的罕见亚群，并可绘制空间受限细胞以及表达模式更分散的细胞。

illumina 的技术：Nextera XT DNA Sample Preparation Kit、HiSeq 2500 系统



斑马鱼 (*Danio rerio*)。

Tohonen V, Katayama S, Vesterlund L, et al. Novel PRD-like homeodomain transcription factors and retrotransposon elements in early human development. *Nat Commun.* 2015;6:8207

人类胚胎植入前发育需要在受精后的前三天进行胚胎基因组激活以及母体转录降解。考虑到样本稀少以及缺乏合适的方法,该阶段过程的研究在技术上富有挑战性。为克服这些阻碍,作者对来自两到三天人类胚胎的348个卵母细胞、受精卵和单个分裂球执行了scRNA-Seq。研究显示32和129基因分别在从卵母细胞转变为四细胞期以及从四细胞期转变为八细胞期的过程中转录。几个转录的基因未被标注为PRD样同源框基因,包括ARGFX、CPHX1、CPHX2、DPRX、DUXA、DUXB和LEUTX。

illumina 的技术: GA^{III}、HiSeq 1000、HiSeq 2000 和 MiSeq 系统

Zhan J, Thakare D, Ma C, et al. RNA sequencing of laser-capture microdissected compartments of the maize kernel identifies regulatory modules associated with endosperm cell differentiation. *Plant Cell.* 2015;27:513-531

谷类内胚乳是全球范围内食品、饲料和原料的主要来源,但是内胚乳细胞分化的基因控制尚不清楚。在本研究中,作者将激光捕获显微解剖(LCM)和illumina测序结合起来,以分析玉米(五蜀黍)仁的分化中内胚乳的五种主要细胞类型和四个代谢区的mRNA。研究确定了在各个代谢区专门累积的mRNA以及在一个或多个代谢区优势表达的基因。研究结果表明MRP-1转录因子可激活基底内胚乳转移层内的基因调控网络。这些数据提供玉米仁代谢区的高分辨率基因活动图集。研究还揭示了与主要内胚乳细胞类型分化相关的调控分子。

illumina 的技术: TruSeq DNA Sample Preparation v2 Kit、HiSeq 2000 系统

Li L, Dong J, Yan L, Yong J, Liu X, et al. Single-Cell RNA-Seq Analysis Maps Development of Human Germline Cells and Gonadal Niche Interactions. *Cell Stem Cell.* 2017;20:858-873 e854

Mohammed H, Hernando-Herraez I, Savino A, et al. Single-Cell Landscape of Transcriptional Heterogeneity and Cell Fate Decisions during Mouse Early Gastrulation. *Cell Rep.* 2017;20:1215-1228

Poran A, Notzel C, Aly O, et al. Single-cell RNA sequencing reveals a signature of sexual commitment in malaria parasites. *Nature.* 2017;551:95-99

Rizvi AH, Camara PG, Kandror EK, et al. Single-cell topological RNA-seq analysis reveals insights into cellular differentiation and development. *Nat Biotechnol.* 2017;35:551-560

Wurtzel O, Oderberg IM and Reddien PW. Planarian Epidermal Stem Cells Respond to Positional Cues to Promote Cell-Type Diversity. *Dev Cell.* 2017;40:491-504 e495

Chan SS, Chan HH and Kyba M. Heterogeneity of Mesp1+ mesoderm revealed by single-cell RNA-seq. *Biochem Biophys Res Commun.* 2016;474:469-475

Blakeley P, Fogarty NM, Del Valle I, et al. Defining the three cell lineages of the human blastocyst by single-cell RNA-seq. *Development.* 2015;142:3613

Boroviak T, Loos R, Lombard P, et al. Lineage-Specific Profiling Delineates the Emergence and Progression of Naive Pluripotency in Mammalian Embryogenesis. *Dev Cell.* 2015;35:366-382

Guo F, Yan L, Guo H, et al. The Transcriptome and DNA Methylome Landscapes of Human Primordial Germ Cells. *Cell.* 2015;161:1437-1452

Moignard V, Woodhouse S, Haghverdi L, et al. Decoding the regulatory network of early blood development from single-cell gene expression measurements. *Nat Biotechnol.* 2015;33:269-276

Pollen AA, Nowakowski TJ, Chen J, et al. Molecular identity of human outer radial glia during cortical development. *Cell.* 2015;163:55-67

Wurtzel O, Cote LE, Poirier A, Satija R, Regev A and Reddien PW. A Generic and Cell-Type-Specific Wound Response Precedes Regeneration in Planarians. *Dev Cell.* 2015;35:632-645

免疫学

免疫系统由大量在宿主免疫系统发挥独特作用的特定细胞类型组成。在适应性免疫系统中，T 和 B 淋巴细胞（T 和 B 细胞）表达特定表面受体（T 细胞受体 [TCR] 和 B 细胞受体 [BCR]），通过主要组织相容性复合体（MHC）识别并结合在抗原呈递细胞表面存在的特定抗原。通常，基于特定的表面分子标记，通过 FACS 分离各个免疫细胞类型。⁷³ 但是由于 FACS 的技术限制，FACS 分离的细胞可能仍由处在不同发育或激活阶段的混合群体组成，且 FACS 方法受可用的标记所限。⁷⁴ 与之相反，单细胞测序法不受特定分子标记的限制，并且可识别 T 细胞和 B 细胞中特定基因表达模式和剪接变异。^{75,76}

“计算机科学和单细胞测序技术的进步为免疫学带来了数据驱动型革新。” —Neu 等，2017 年

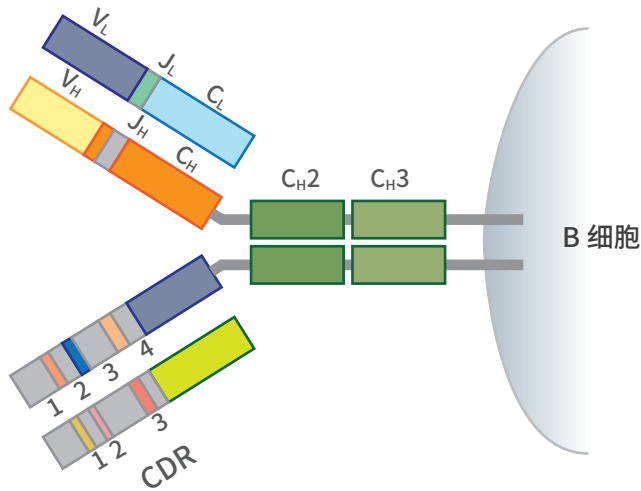
单细胞测序法正在重塑我们对过敏原特异性 B 细胞在食物过敏^{77,78} 以及 B 细胞介导的中和抗体对感染物的反应中所发挥的作用的理解。⁷⁹ 单细胞测序法还阐明了调控人类自体免疫性疾病中的 T 细胞分化和生物学过程的新机制，包括类风湿性关节炎、⁸⁰ 系统性红斑狼疮（SLE）、⁸¹ 多发性硬化症⁸² 型糖尿病、⁸³ 和自身免疫性脑脊髓炎。⁸⁴

阻断 CTLA-4 和 PD-1 的抗体在大量癌症中诱发临床反应，包括黑色素瘤、肺癌、肾癌、膀胱癌和霍奇金淋巴瘤。^{85,86} 单细胞测序法使我们有可能更深入地了解免疫细胞和肿瘤细胞之间复杂的相互作用，更彻底地鉴定肿瘤的细胞生态学体系。^{87,88,89}

73. Hackl H, Charoentong P, Finotello F and Trajanoski Z. Computational genomics tools for dissecting tumour-immune cell interactions. *Nat Rev Genet.* 2016;17:441-458
74. Newman AM and Alizadeh AA. High-throughput genomic profiling of tumor-infiltrating leukocytes. *Curr Opin Immunol.* 2016;41:77-84
75. Stubbington MJ, Lonnberg T, Proserpio V, et al. T cell fate and clonality inference from single-cell transcriptomes. *Nat Methods.* 2016;13:329-332
76. Villani AC, Satija R, Reynolds G, et al. Single-cell RNA-seq reveals new types of human blood dendritic cells, monocytes, and progenitors. *Science.* 2017;356:eaah4573
77. Patil SU, Ogunniyi AO, Calatroni A, et al. Peanut oral immunotherapy transiently expands circulating Ara h 2-specific B cells with a homologous repertoire in unrelated subjects. *J Allergy Clin Immunol.* 2015;136:125-134 e112
78. Hoh RA, Joshi SA, Liu Y, et al. Single B-cell deconvolution of peanut-specific antibody responses in allergic patients. *J Allergy Clin Immunol.* 2016;137:157-167
79. Tsioris K, Gupta NT, Ogunniyi AO, et al. Neutralizing antibodies against West Nile virus identified directly from human B cells by single-cell analysis and next generation sequencing. *Integr Biol (Camb).* 2015;7:1587-1597
80. Ishigaki K, Shoda H, Kochi Y, et al. Quantitative and qualitative characterization of expanded CD4+ T cell clones in rheumatoid arthritis patients. *Sci Rep.* 2015;5:12937
81. Tipton CM, Fucile CF, Darce J, et al. Diversity, cellular origin and autoreactivity of antibody-secreting cell population expansions in acute systemic lupus erythematosus. *Nat Immunol.* 2015;16:755-765
82. Held K, Bhonsle-Deeng L, Siewert K, et al. alpha T-cell receptors from multiple sclerosis brain lesions show MAIT cell-related features. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm.* 2015;2:e107
83. Eugster A, Lindner A, Catani M, et al. High diversity in the TCR repertoire of GAD65 autoantigen-specific human CD4+ T cells. *J Immunol.* 2015;194:2531-2538
84. Gaublotte JT, Yosef N, Lee Y, et al. Single-Cell Genomics Unveils Critical Regulators of Th17 Cell Pathogenicity. *Cell.* 2015;163:1400-1412
85. Wolchok JD, Hodi FS, Weber JS, et al. Development of ipilimumab: a novel immunotherapeutic approach for the treatment of advanced melanoma. *Ann N Y Acad Sci.* 2013;1291:1-13
86. Ansell SM, Lesokhin AM, Borrello I, et al. PD-1 blockade with nivolumab in relapsed or refractory Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med.* 2015;372:311-319
87. Tirosh I, Izar B, Prakadan SM, et al. Dissecting the multicellular ecosystem of metastatic melanoma by single-cell RNA-seq. *Science.* 2016;352:189-196
88. Chung W, Eum HH, Lee HO, et al. Single-cell RNA-seq enables comprehensive tumour and immune cell profiling in primary breast cancer. *Nat Commun.* 2017;8:15081
89. Zheng C, Zheng L, Yoo JK, et al. Landscape of Infiltrating T Cells in Liver Cancer Revealed by Single-Cell Sequencing. *Cell.* 2017;169:1342-1356 e1316

B 细胞抗体库

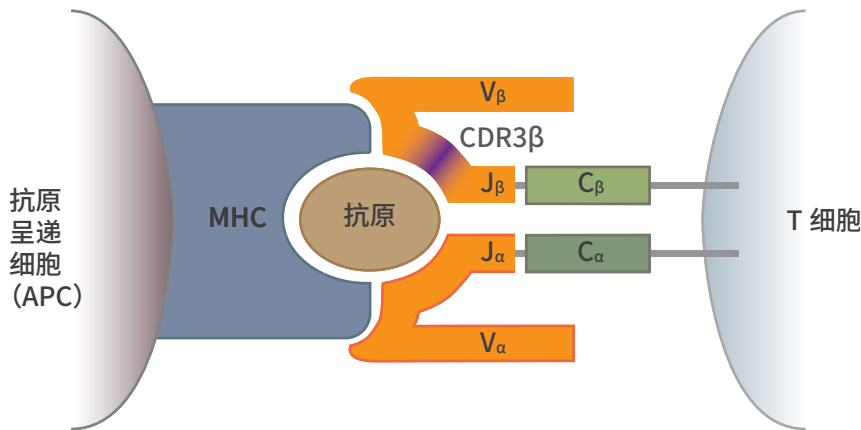
抗体由 B 细胞在贯穿机体整个生命过程的一系列以发育顺序进行的体细胞基因重排中产生。抗体由二硫键连接的重链 (V_H) 和轻链 (V_L) 构成, 决定了抗原结合的特异性。每个 B 细胞包含独特的由多个不同基因位点编码的 V_H 和 V_L 对。要正确预测抗体-抗原结合的特异性, 应从同一单个 B 细胞分析 V_H 和 V_L 基因。⁹⁰



抗体 V_H 库由差异 (V)、多样性 (D) 和连接 (J) 基因片段重组生成。
 V_L 、 V_H 的 VJ 重组和 V_L 异二聚体配对形成抗体。

T 细胞抗体库

每个 T 细胞表达独特的 TCR, TCR 为由 α 和 β 链的独特组合构成的异二聚体蛋白质。TCR 与抗原呈递细胞表面的 MHC 呈递的多肽抗原结合。^{91,92} 多种单细胞测序法可用于 TCR 测序, 而无需通过细胞裂解破坏 α 和 β 链配对。^{93,94}



TCR- 抗原-MHC 相互作用和 TCR 基因重组。抗原呈递细胞将多肽抗原键呈递给 MHC (蓝色)。与产生抗体多样性的机制类似, TCR (橙色) 库通过 V (D) J 重组生成。TCR 连接至 MHC 呈递的抗原。互补性决定区 3 (CDR3) 结构域显示为紫色。⁹⁵

90. Georgiou G, Ippolito GC, Beausang J, Busse CE, Wardemann H and Quake SR. The promise and challenge of high-throughput sequencing of the antibody repertoire. *Nat Biotechnol.* 2014;32:158-168
91. Birnbaum ME, Mendoza JL, Sethi DK, et al. Deconstructing the peptide-MHC specificity of T cell recognition. *Cell.* 2014;157:1073-1087
92. Mandl JN and Germain RN. Focusing in on T cell cross-reactivity. *Cell.* 2014;157:1006-1008
93. Woodsworth DJ, Castellarin M and Holt RA. Sequence analysis of T-cell repertoires in health and disease. *Genome Med.* 2013;5:98
94. Turchaninova MA, Britanova OV, Bolotin DA, et al. Pairing of T-cell receptor chains via emulsion PCR. *Eur J Immunol.* 2013;43:2507-2515
95. Woodsworth DJ, Castellarin M and Holt RA. Sequence analysis of T-cell repertoires in health and disease. *Genome Med.* 2013;5:98

综述

Neu KE, Tang Q, Wilson PC and Khan AA. Single-Cell Genomics: Approaches and Utility in Immunology. *Trends Immunol.* 2017;38:140-149

Stubbington MJT, Rozenblatt-Rosen O, Regev A and Teichmann SA. Single-cell transcriptomics to explore the immune system in health and disease. *Science.* 2017;358:58-63

Lossius A, Johansen JN, Vartdal F and Holmoy T. High-throughput sequencing of immune repertoires in multiple sclerosis. *Ann Clin Transl Neurol.* 2016;3:295-306

Proserpio V and Mahata B. Single-cell technologies to study the immune system. *Immunology.* 2016;147:133-140

Schober K and Busch DH. A synergistic combination: using RNAseq to decipher both T-cell receptor sequence and transcriptional profile of individual T cells. *Immunol Cell Biol.* 2016;94:529-530

Wucherpfennig KW and Cartwright AN. Genetic screens to study the immune system in cancer. *Curr Opin Immunol.* 2016;41:55-61

参考文献

[Chung W, Eum HH, Lee HO, Lee KM, Lee HB, et al. Single-cell RNA-seq enables comprehensive tumour and immune cell profiling in primary breast cancer. *Nat Commun.* 2017;8:15081](#)

单细胞方法表明，肿瘤具有遗传异质性。在本研究中，作者使用 HiSeq 2500 系统对从乳腺癌肿瘤中分离出的 515 个单个细胞进行了 RNA-Seq。单细胞转录组分析确立了亚型特异性乳腺癌细胞的异质性及其保守的基因表达特征。此外，作者还鉴定了 T 细胞、B 细胞和巨噬细胞的基因表达特征。单个 T 细胞包括激活 T 细胞和耗竭 T 细胞两类，这表明免疫细胞与肿瘤间的相互作用动态且各异。这些数据表明，各个乳腺癌肿瘤微环境种包含的细胞都具有独特的基因表达模式。此外，肿瘤亚型由肿瘤微环境中的肿瘤细胞以及免疫细胞共同决定。

Illumina 的技术：Nextera XT DNA Sample Prep Kit、TruSeq Rapid SBS Kit、HiSeq 2500 系统

[Martinez-Jimenez CP, Eling N, Chen HC, et al. Aging increases cell-to-cell transcriptional variability upon immune stimulation. *Science.* 2017;355:1433-1436](#)

随着细胞衰老，其生理和功能逐渐衰退。但是，这种时间依赖性衰退的分子机制目前尚不明确。在本研究中，作者利用单细胞 RNA-Seq 揭示了衰老对免疫系统的影响。他们使用 HiSeq 2500 系统对年幼和年老小鼠中经刺激和未经刺激的初始和记忆 CD4⁺ T 细胞进行了 RNA 测序。他们发现，较老的 T 细胞比年轻 T 细胞的基因表达变异性高很多。变异性增高也与年老小鼠的免疫应答协调缺失有关。这些数据表明，单个细胞中与年龄相关的转录变异性可能是衰老细胞的生物标志物。

Illumina 的技术：Nextera XT DNA Sample Kit、HiSeq 2500 系统

[Villani AC, Satija R, Reynolds G, et al. Single-cell RNA-seq reveals new types of human blood dendritic cells, monocytes, and progenitors. *Science.* 2017;356:eaah4573](#)

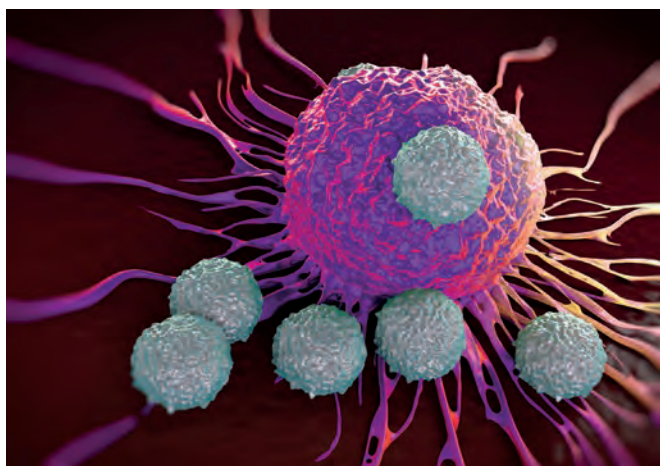
所有的血液细胞成分都源自 HSC，这一生物过程称为血细胞生成。在形成的多种细胞类型中，单核细胞和树突状细胞是免疫系统的关键组分。树突状细胞加工抗原并呈递给 T 细胞，从而激活适应性免疫应答。两种细胞类型都由多种亚型构成，不同的亚型通过结合细胞形态、定位和表面标记的表达进行区分。在本研究中，作者对从人类血液中分离并使用 FACS 对树突状细胞和单核细胞进行富集后的 2400 个单个细胞进行了单细胞测序。这一无偏策略重新鉴别出了 6 个树突状细胞和 4 个单核细胞亚型。这些数据提供了对树突状细胞和单核细胞的更精细的理解，也提出了确定免疫系统整体分类的新方法。

Illumina 的技术：Nextera XT DNA Sample Kit、HiSeq 2500 系统

Zheng C, Zheng L, Yoo JK, Guo H, Zhang Y, et al. Landscape of Infiltrating T Cells in Liver Cancer Revealed by Single-Cell Sequencing. *Cell*. 2017;169:1342-1356 e1316

HCC 是全世界癌症死亡的主要原因，在亚洲和非洲的发病率最高。虽然癌症免疫疗法为其他肿瘤类型带来了希望，但其在 HCC 治疗上仍未取得成功，尽管 HCC 肿瘤含有高水平的肿瘤浸润性单核细胞。在本研究中，作者利用单细胞 RNA-Seq，视图了解和鉴定 HCC 中的肿瘤浸润性单核细胞。具体来说，他们从 6 个 HCC 样本的外周血、肿瘤和邻近的正常组织分离了 5000 多个 T 细胞。然后使用 HiSeq 2500/4000 系统对单个 T 细胞进行了深度 RNA-Seq 和 TCR 测序。结合单细胞转录组谱和 TCR 序列，鉴定了 11 个不同的 T 细胞亚型。值得注意的是，作者发现，耗竭的 CD8⁺ T 细胞和 T_{reg} 细胞在 HCC 中富集并克隆扩增。此研究证明了单细胞测序法在鉴定 HCC 肿瘤微环境和肿瘤浸润性细胞的特征中的用途。

Illumina 的技术：HiSeq 2500/4000 系统



T 淋巴细胞（T 细胞）攻击癌细胞。

Kimmerling RJ, Lee Szeto G, Li JW, Genshaft AS, Kazer SW, et al. A microfluidic platform enabling single-cell RNA-seq of multigenerational lineages. *Nat Commun*. 2016;7:10220

单细胞测序已增强了鉴定癌症、免疫系统和多能干细胞中的转录异质性的分辨率。scRNA-Seq 测量通常依赖于单个时间点测量。可提供组织异质性的快照，但同时将这些测量扩展到一系列时间点，这样可大大增强我们对产生组织异质性的机制的理解。在本研究中，作者研发了一个微流控平台，可在多代谱系追踪之后进行芯片外 scRNA-Seq。他们使用该平台采集小鼠淋巴细胞白血病细胞谱系以及原代鼠 CD8⁺ T 细胞的单细胞转录数据。结果揭示了每种细胞类型的转录标记取决于谱系和细胞周期。

Illumina 的技术：NextSeq 500 系统

Stubington MJ, Lonnberg T, Proserpio V, et al. T cell fate and clonality inference from single-cell transcriptomes. *Nat Methods*. 2016;13:329-332

TCR 可高度特异性识别抗原。这部分是由于在 T 细胞发育过程中由 V (D) J 位点重组产生的 TCR 高度遗传异质性。在本研究中，作者研发了 TraCeR，一种可从 scRNA-Seq 数据重建全长配对 TCR 序列的算法。在 scRNA-Seq 数据中审视重组 TCR 序列的能力使得作者可通过揭示细胞和其转录谱之间的克隆关系，将 T 细胞特异性与功能性反应联系起来。

Illumina 的技术：Nextera XT DNA Sample Preparation Kit、HiSeq 2500 系统

Tirosh I, Izar B, Prakadan SM, Wadsworth MH, 2nd, Treacy D, et al. Dissecting the multicellular ecosystem of metastatic melanoma by single-cell RNA-seq. *Science*. 2016;352:189-196

单细胞测序可详细评估肿瘤内各个细胞中存在的基因和转录特性。该技术可通过评估肿瘤内的恶性程度、微环境和免疫状态提供治疗反应和耐药性信息。在本研究中，作者对从 19 位患有转移性黑色素瘤患者分离出的 4645 个单细胞（恶性的、间质的、免疫的、内皮的）进行 scRNA-Seq。该研究发现同一肿瘤内的恶性细胞显示出与细胞周期、空间关系和耐药性相关的转录异质性。同一肿瘤包含具有 MITF 高表达水平的细胞，以及具有低 MITF 水平和 AXL 激酶水平升高的细胞（易于发生早期耐药性的细胞）。浸润的 T 细胞分析揭示了排除程序、与 T 细胞活化 / 扩张的联系和患者变异性。本研究阐明了单细胞基因组如何能揭示肿瘤的细胞生态体系以及对靶向和免疫治疗产生的影响。

illumina 的技术：Nextera XT Sample Preparation Kit、NextSeq 500 系统

Avraham R, Haseley N, Brown D, et al. Pathogen Cell-to-Cell Variability Drives Heterogeneity in Host Immune Responses. *Cell*. 2015;162:1309-1321

免疫细胞和入侵病原体之间的相互作用决定感染过程。大量细胞测序法可掩藏细胞 - 病原体相互作用的异质性、随机性和动态性。在本研究中，作者使用 HiSeq 2500 系统通过荧光标记执行 scRNA-Seq，以探测 150 个单个巨噬细胞对沙门氏菌侵袭菌株的反应。研究数据显示，不同的 PhoPQ 活性，其可上调感染沙门氏菌中沙门氏菌毒力因子，通过修饰细菌亚组中的脂多糖（LPS）驱动了多种宿主细胞 I 型干扰素（IFN）应答。结果表明宿主细胞对感染应答的功能性异质性与感染病原体群体的细胞间变异有关。

illumina 的技术：HiSeq 2500 系统

Fan HC, Fu GK and Fodor SP. Expression profiling. Combinatorial labeling of single cells for gene expression cytometry. *Science*. 2015;347:1258367

单细胞组合标记快速且相对便宜，并且可在很大程度上提高大规模平行单细胞测序法的通量。在本研究中，作者研发了 CytoSeq，一种组合标记大量单个细胞的方法。单个细胞与包含细胞和转录本条形码探针的微粒组合文库一起放在单独的小孔中。作者对外周血单核细胞执行（PBMC）CytoSeq，并使用 MiSeq 系统对扩增的 cDNA 测序。研究分析了多个基因，并可确定 PBMC 的主要亚组。此外，通过比较初始和巨细胞病毒（CMV）激活的 CD8+ T 细胞的细胞异质性，研究确定了特定于 CMV 抗原的罕见细胞。CytoSeq 可用于不同大小和形状细胞的复杂混合体，以及其他生物分子。

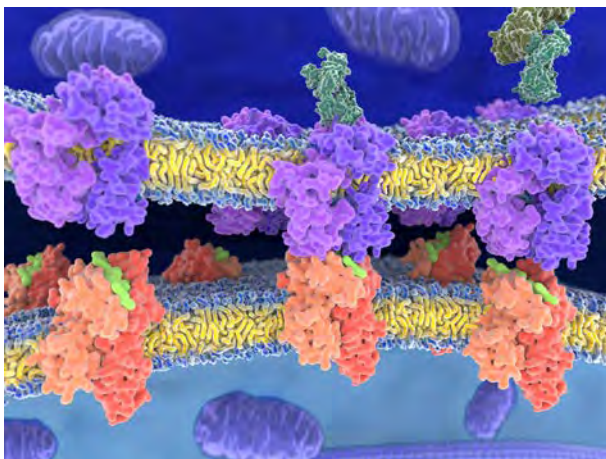
illumina 的技术：MiSeq 系统

Gaublomme JT, Yosef N, Lee Y, et al. Single-Cell Genomics Unveils Critical Regulators of Th17 Cell Pathogenicity. *Cell*. 2015;163:1400-1412

小鼠的自身免疫性脑脊髓炎（EAE）作为人类 CNS 脱髓鞘疾病（包括多发性硬化症和急性播散性脑脊髓炎）的动物模型被广泛研究。生成 IL-17 的 Th17 细胞是适应性免疫系统的及其重要部分，但也与自体免疫的发病机理有关。在本研究中，作者使用 HiSeq 2000/2500 系统对 976 个从患有 EAE 小鼠的 CNS 和淋巴结分离出的单个 Th17 细胞执行 RNA-Seq。scRNA-Seq 数据的计算分析揭示了 Th17 细胞的显著遗传异质性，并将其与覆盖调控到病原功能状态的 Th17 细胞谱联系起来。作者鉴定并验证了⁹⁶四个调控 Th17 致病性的基因（Grp65、Plzp、Toso、和 Cd51），揭示了自体免疫中的新药物靶点。

illumina 的技术：Nextera XT DNA Sample Preparation Kit、HiSeq 2000/2500 系统

-
96. Wang C, Yosef N, Gaublomme J, et al. CD5L/ AIM Regulates Lipid Biosynthesis and Restrains Th17 Cell Pathogenicity. *Cell*. 2015;163: 1413-1427
-



TCR 与 MHC II 类抗原复合物相互作用。

Tipton CM, Fucile CF, Darce J, et al. Diversity, cellular origin and autoreactivity of antibody-secreting cell population expansions in acute systemic lupus erythematosus. *Nat Immunol.* 2015;16:755-765

急性 SLE 为复发性自体免疫性疾病，攻击多种组织且无法治愈。自身免疫活动与 B 细胞骤增相关。美国食品药品监督管理局（FDA）批准的唯一 SLE 疗法——贝利单抗，靶向 B 细胞激活因子。在本研究中，作者从正在遭受 SLE 爆发的患者分离了 B 细胞，并使用深度测序和蛋白质组学分析 B 细胞的多样性。研究表明来自 SLE 爆发患者的 B 细胞为多克隆。通过测序单个 B 细胞，研究还鉴定了新激活的在 SLE 爆发期间提供自身抗体重要来源的 B 细胞亚群，表明 SLE 自体反应发生于多克隆激活期间。这些结果可指导患者治疗选择，并方便未来 SLE 治疗的计划。

Illumina 的技术：MiSeq 系统

Carmona SJ, Teichmann SA, Ferreira L, et al. Single-cell transcriptome analysis of fish immune cells provides insight into the evolution of vertebrate immune cell types. *Genome Res.* 2017;27:451-461

Engblom C, Pfrischke C, Zilionis R, Da Silva Martins J, Bos SA, et al. Osteoblasts remotely supply lung tumors with cancer-promoting SiglecF(high) neutrophils. *Science.* 2017;358:eaal5081

Haber AL, Biton M, Rogel N, et al. A single-cell survey of the small intestinal epithelium. *Nature.* 2017;551:333-339

Medaglia C, Giladi A, Stoler-Barak L, et al. Spatial reconstruction of immune niches by combining photoactivatable reporters and scRNA-seq. *Science.* 2017;358:1622-1626

Mildner A, Schonheit J, Giladi A, et al. Genomic Characterization of Murine Monocytes Reveals C/EBPbeta Transcription Factor Dependence of Ly6C- Cells. *Immunity.* 2017;46:849-862 e847

Wallrapp A, Riesenfeld SJ, Burkett PR, et al. The neuropeptide NMU amplifies ILC2-driven allergic lung inflammation. *Nature.* 2017;549:351-356

Bjorklund AK, Forkel M, Picelli S, et al. The heterogeneity of human CD127 innate lymphoid cells revealed by single-cell RNA sequencing. *Nat Immunol.* 2016;17:451-460

Brennecke P, Reyes A, Pinto S, et al. Single-cell transcriptome analysis reveals coordinated ectopic gene-expression patterns in medullary thymic epithelial cells. *Nat Immunol.* 2015;16:933-941

DeKosky BJ, Kojima T, Rodin A, et al. In-depth determination and analysis of the human paired heavy- and light-chain antibody repertoire. *Nat Med.* 2015;21:86-91

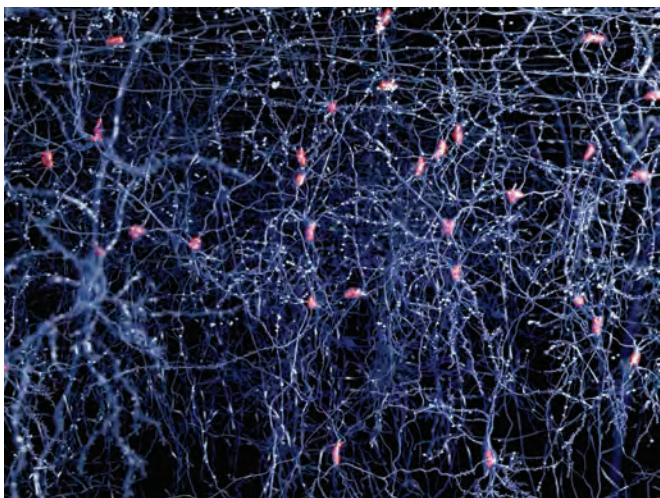
Eugster A, Lindner A, Catani M, et al. High diversity in the TCR repertoire of GAD65 autoantigen-specific human CD4+ T cells. *J Immunol.* 2015;194:2531-2538

神经生物学

在构成特定脑区域的细胞中，单细胞测序法在单个神经元中发现了基因组嵌合，包括 CNV 和体细胞 SNV。^{97,98} 脑中基因组嵌合涉及的遗传变异出现于胎儿发育期间，⁹⁹ 尽管其功能关联尚不完全明确，但近期的数据表明衰老和神经退行与神经元中的体细胞突变有关。¹⁰⁰ 近期的单细胞测序研究还在海马体和大脑皮层中鉴定出了高频率的体细胞 LINE-1 元件 (L1) 反转座，这可能对正常脑功能有重要意义；¹⁰¹ 但是，其他研究已确定大脑中的 L1 反转座率低于首次报道。¹⁰²

“单细胞 RNA 测序是一项令人兴奋的新技术，能够分析单个细胞的转录组，非常适用于应对中枢神经系统固有的复杂性和动态特征。” —Ofengeim 等，2017 年

除了 CNS 基因组多样性之外，近期的研究还扩展了我们对成人脑以及三维脑类器官单细胞水平 CNS 转录组多样性的理解。^{103,104,105,106} 单细胞转录组已确定了调控神经发育的机制，最近¹⁰⁷scRNA-Seq 研究开始揭示感觉神经元、¹⁰⁸ 胶质细胞、¹⁰⁹ 中间神经元、¹¹⁰ 和大脑中其他细胞类型的新生物学信息。¹¹¹ 单细胞测序的新技术成就结合了 scRNA-Seq 与单个神经元的电生理记录，^{112,113} 以及对与单个海马神经元中经验驱动的诱导活动相关的基因表达模式的鉴定。¹¹⁴ 最后，近期对来自单个神经元细胞核的 6000 个甲基化组进行了单细胞分析，确定了人前皮层中的神经元亚型。¹¹⁵



单细胞测序法发现了神经元中的基因嵌合现象。

97. McConnell MJ, Lindberg MR, Brennand KJ, et al. Mosaic copy number variation in human neurons. *Science*. 2013;342:632-637
98. Lodato MA, Woodworth MB, Lee S, et al. Somatic mutation in single human neurons tracks developmental and transcriptional history. *Science*. 2015;350:94-98
99. Bae T, Tomasini L, Mariani J, et al. Different mutational rates and mechanisms in human cells at pregastrulation and neurogenesis. *Science*. 2018;359:550-555
100. Lodato MA, Rodin RE, Bohrsen CL, et al. Aging and neurodegeneration are associated with increased mutations in single human neurons. *Science*. 2018;359:555-559
101. Upton KR, Gerhardt DJ, Jesuadian JS, et al. Ubiquitous L1 mosaicism in hippocampal neurons. *Cell*. 2015;161:228-239
102. Evrony GD, Lee E, Park PJ and Walsh CA. Resolving rates of mutation in the brain using single-neuron genomics. *Elife*. 2016;5:e12966
103. Spaethling JM, Na YJ, Lee J, et al. Primary Cell Culture of Live Neurosurgically Resected Aged Adult Human Brain Cells and Single Cell Transcriptomics. *Cell Rep*. 2017;18:791-803
104. Hanchate NK, Kondoh K, Lu Z, et al. Single-cell transcriptomics reveals receptor transformations during olfactory neurogenesis. *Science*. 2015;350:1251-1255
105. Quadrato G, Nguyen T, Macosko EZ, et al. Cell diversity and network dynamics in photosensitive human brain organoids. *Nature*. 2017;545:48-53
106. Bershteyn M, Nowakowski TJ, Pollen AA, et al. Human iPSC-Derived Cerebral Organoids Model Cellular Features of Lissencephaly and Reveal Prolonged Mitosis of Outer Radial Glia. *Cell Stem Cell*. 2017;20:435-449 e434
107. Luo Y, Coskun V, Liang A, et al. Single-cell transcriptome analyses reveal signals to activate dormant neural stem cells. *Cell*. 2015;161:1175-1186
108. Saraiva LR, Ibarra-Soria X, Khan M, et al. Hierarchical deconstruction of mouse olfactory sensory neurons: from whole mucosa to single-cell RNA-seq. *Sci Rep*. 2015;5:18178
109. Pollen AA, Nowakowski TJ, Chen J, et al. Molecular identity of human outer radial glia during cortical development. *Cell*. 2015;163:55-67
110. Frazer S, Prados J, Niquille M, et al. Transcriptomic and anatomic parcellation of 5-HT3AR expressing cortical interneuron subtypes revealed by single-cell RNA sequencing. *Nat Commun*. 2017;8:14219
111. Zeisel A, Munoz-Manchado AB, Codeluppi S, et al. Brain structure. Cell types in the mouse cortex and hippocampus revealed by single-cell RNA-seq. *Science*. 2015;347:1138-1142
112. Fuzik J, Zeisel A, Mate Z, et al. Integration of electrophysiological recordings with single-cell RNA-seq data identifies neuronal subtypes. *Nat Biotechnol*. 2016;34:175-183
113. Cadwell CR, Palasantza A, Jiang X, et al. Electrophysiological, transcriptomic and morphologic profiling of single neurons using Patch-seq. *Nat Biotechnol*. 2016;34:199-203
114. Lacar B, Linker SB, Jaeger BN, et al. Corrigendum: Nuclear RNA-seq of single neurons reveals molecular signatures of activation. *Nat Commun*. 2016;7:12020
115. Luo C, Keown CL, Kurihara L, et al. Single-cell methylomes identify neuronal subtypes and regulatory elements in mammalian cortex. *Science*. 2017;357:600-604

综述

Cuevas-Diaz Duran R, Wei H and Wu JQ. Single-cell RNA-sequencing of the brain. *Clin Transl Med.* 2017;6:20

Lein E, Borm LE and Linnarsson S. The promise of spatial transcriptomics for neuroscience in the era of molecular cell typing. *Science.* 2017;358:64-69

Ofengeim D, Giagtzoglou N, Huh D, Zou C and Yuan J. Single-Cell RNA Sequencing: Unraveling the Brain One Cell at a Time. *Trends Mol Med.* 2017;23:563-576

Harbom LJ, Chronister WD and McConnell MJ. Single neuron transcriptome analysis can reveal more than cell type classification: Does it matter if every neuron is unique? *Bioessays.* 2016;38:157-161

Bae BI, Jayaraman D and Walsh CA. Genetic changes shaping the human brain. *Dev Cell.* 2015;32:423-434

-
116. Lodato MA, Woodworth MB, Lee S, et al. Somatic mutation in single human neurons tracks developmental and transcriptional history. *Science.* 2015;350:94-98
 117. Tasic B, Menon V, Nguyen TN, et al. Adult mouse cortical cell taxonomy revealed by single cell transcriptomics. *Nat Neurosci.* 2016;19:335-346
 118. Zeisel A, Munoz-Manchado AB, Codeluppi S, et al. Brain structure. Cell types in the mouse cortex and hippocampus revealed by single-cell RNA-seq. *Science.* 2015;347:1138-1142
-

参考文献

Bae T, Tomasini L, Mariani J, Zhou B, Roychowdhury T, et al. Different mutational rates and mechanisms in human cells at pregastrulation and neurogenesis. *Science.* 2018;359:550-555

体细胞突变是基因组 DNA 序列的永久性改变，由细胞中 DNA 复制错误或环境因素导致。此前利用单细胞测序法进行的研究证明，单个神经元含有独特的 SNV 体细胞变异，这一现象称为基因组嵌合。¹¹⁶ 尽管基因组嵌合常见于多种细胞类型中，但是神经元是有丝分裂后细胞，因此 SNV 可持续存在并改变神经元功能。在本研究中，作者从胚胎样本的前脑中分离了单个神经元，在培养基中培养为小克隆。他们利用 HiSeq 平台分析了这些样本的基因组，从每个细胞中鉴定出了 200-400 个 SNV。这些胚胎神经元中的 SNV 模式与癌细胞基因组中的类似。通过分析不同胚胎发育阶段的神经元的基因组，研究确定，在神经发生过程中突变率加快。这些数据表明，相较于神经发育晚期的神经元，胚胎神经元受到保护不会发生突变。

illumina 的技术：HiSeq 2500 和 HiSeq X 系统

Luo C, Keown CL, Kurihara L, et al. Single-cell methylomes identify neuronal subtypes and regulatory elements in mammalian cortex. *Science.* 2017;357:600-604

单细胞 RNA-Seq 方法适用于确定脑中的多种神经元亚型。^{117,118} 在本研究中，作者开发了一种鉴定单个神经元细胞中的表观基因组多样性的技术。这一技术即单核苷酸甲基胞嘧啶测序 (snmC-seq)，该技术利用了神经元中大量存在的 5-甲基胞嘧啶。作者从小鼠大脑皮层中分离了 3400 个单个神经元并通过 FACS 收集了细胞核。然后用亚硫酸氢盐处理了核 DNA，将未甲基化的胞嘧啶转化为腺嘧啶，5-甲基和 5-羟甲基胞嘧啶不受影响。最后，混合、扩增样本并使用 HiSeq 4000 系统进行测序。作者利用 snmC-seq 生成了分离的神经元细胞核的 6000 个甲基化组，数据确定小鼠脑中有 16 个小鼠神经元亚型。他们还从人大脑皮层样本中分离的核进行了 snmC-seq，鉴定出了 21 个人类神经元亚型。因此，单细胞甲基化组技术扩展了脑细胞多样性的分类。此外，它确定了与神经元多样性相关的调控元件。

illumina 的技术：TruSeq Methylation Kit、HiSeq 4000 系统

Lodato MA, Rodin RE, Bohrsen CL, et al. Aging and neurodegeneration are associated with increased mutations in single human neurons. *Science.* 2018;359:555-559

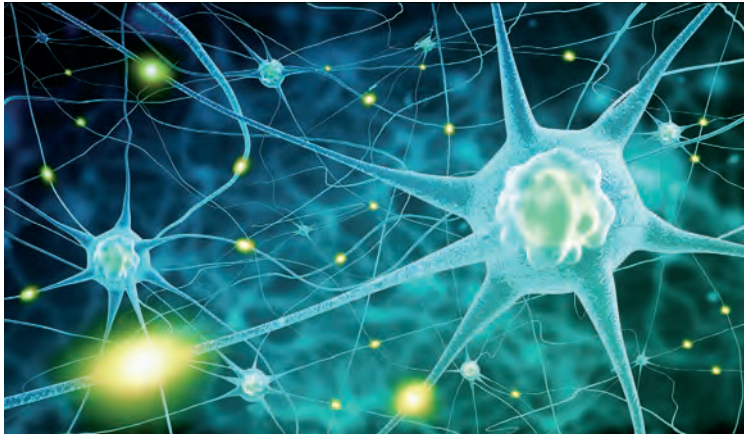
衰老与复制错误累积导致的细胞内体细胞突变增加有关。关于这是否适用于不分裂的有丝分裂后神经元尚不明确。在本研究中，作者从 4 个月到 82 岁的个体中分离了 161 个单个有丝分裂后神经元。他们对每个单个神经元进行了单细胞 WGS 以鉴定 SNV。数据表明，SNV 随着年龄增长线性增加。他们还从 8 个患有早发性神经退行性疾病的个体中分离了单个神经元。这些神经元的单细胞 WGS 表明其 SNV 比正常神经元中更为丰富。总之，这些数据表明，神经元中与年龄相关的 SNV 积累可能对神经元疾病而言相当重要。

illumina 的技术：TruSeq Nano LT Sample Preparation Kit、HiSeq 2000 和 HiSeq X10 系统

Quadrato G, Nguyen T, Macosko EZ, et al. Cell diversity and network dynamics in photosensitive human brain organoids. *Nature*. 2017;545:48-53

脑是极为复杂的器官，二维组织培养在理解脑功能方面能力有限。最近开发了三维组织培养脑类器官，寄望于理解脑生物学、疾病和发育。¹¹⁹ 在本研究中，作者试图鉴定脑类器官模拟全脑复杂度和细胞多样性的程度。他们对从 31 个人脑类器官种分离的 80,000 个单个细胞进行了单细胞 RNA-Seq。单细胞基因表达特征表明，人脑类器官发育产生了多种细胞类型，包括与成人皮层神经元和视网膜细胞相关的亚型。此外，类器官的细胞内存在神经元连接和突触。最后，类器官自发发育出了神经网络，光敏细胞甚至对光刺激敏感。总之，数据表明人脑类器官具有作为人脑体外模型的巨大潜力。

illumina 的技术：Nextera XT DNA Library Preparation Kit、NextSeq 500 系统



人脑类器官自发发育出神经网络。

Cadwell CR, Palasantza A, Jiang X, et al. Electrophysiological, transcriptomic and morphologic profiling of single neurons using Patch-seq. *Nat Biotechnol*. 2016;34:199-203

在本研究中，作者描述了 Patch-Seq，一种将全细胞电生理学特性、形态学特性和 scRNA-Seq 结合起来的方法。研究对来自小鼠新皮层 1 的 58 个神经细胞执行了 Patch-Seq。在研究确定单个神经元的电生理学特性后，使用膜片钳移液管抽吸细胞内含物并将其制备用于 RNA-Seq。作者基于电生理学 and 形态学，以及基因表达的模式将细胞进行分类。研究数据显示基因表达谱可推论轴突分支和动作电位幅度。

illumina 的技术：HiSeq 2000 系统

Lacar B, Linker SB, Jaeger BN, et al. Corrigendum: Nuclear RNA-seq of single neurons reveals molecular signatures of activation. *Nat Commun*. 2016;7:12020

scRNA-Seq 一直是亚分类细胞的关键方法，否则可仅基于形态学和解剖学进行区分。分析对激活应答的单个神经元转录组对于确定脑功能非常重要。在本研究中，作者对取自海马体吗齿状回单个小鼠神经元的并列普他唑刺激的分离细胞执行核 RNA-Seq (snRNA-Seq)。短暂曝光在新环境下之后，活化的神经元转录组中有大规模变化，包括诱导分裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 通路基因。数据显示已激活神经元的 snRNA-Seq 可进行即将超出早期基因以外的基因表达分析。

illumina 的技术：HiSeq 2500 系统

119. Kelava I and Lancaster MA. Stem Cell Models of Human Brain Development. *Cell Stem Cell*. 2016;18:736-748

Tasic B, Menon V, Nguyen TN, et al. Adult mouse cortical cell taxonomy revealed by single cell transcriptomics. *Nat Neurosci.* 2016;19:335-346

考虑到人脑的复杂性，了解单个细胞的遗传和功能多样性至关重要。在本研究中，作者对超过 1600 个来自小鼠初级视觉皮质的单个细胞执行了 scRNA-Seq。研究数据分析确定了 49 种独特转录组细胞类型。这些转录组细胞类型的亚组显示出特定的和不同的电生理学和轴突投射特性，可确认单细胞转录组特征可与特定细胞表型联系起来。

illumina 的技术：Nextera XT DNA Sample Preparation Kit、MiSeq 和 HiSeq 2000/2500 系统

Evrony GD, Lee E, Mehta BK, et al. Cell lineage analysis in human brain using endogenous retroelements. *Neuron.* 2015;85:49-59

有丝分裂后的体细胞突变会导致癌症，这些突变还可导致多种神经疾病，包括皮层畸形、癫痫、智力障碍和神经退行性疾病。研究致病性体细胞突变具有挑战性，因为其作用由正常发育造成的方式有多种。在人大脑中体细胞突变分布的整体模式没有清楚确定。在本研究中，作者使用 HiSeq 2000 系统对单个神经元执行高覆盖度的 WGS。来自多个 CNS 位置的单个神经元的体细胞突变分析确定了大脑中的多个细胞谱系，由不同的 L1 反转座事件标记。体细胞突变的模式与已知的大脑发育体细胞突变障碍一样，表明在病灶分布的体细胞突变也在正常大脑中存在。

illumina 的技术：HiSeq 2000 系统

Hanchate NK, Kondoh K, Lu Z, et al. Single-cell transcriptomics reveals receptor transformations during olfactory neurogenesis. *Science.* 2015;350:1251-1255

在哺乳动物中，嗅觉由鼻嗅上皮神经元中的 G 蛋白偶联的嗅觉感受器介导。成熟神经元通常在每个神经元表达单个嗅觉感受器。在本研究中，作者使用 HiSeq 2500 系统对小鼠发育过程中的单个上皮神经元执行 scRNA-Seq，并对每个发育阶段的多个细胞进行测序。单细胞数据确认了大多数神经元仅高水平地表达一个嗅觉感受器。但是，许多未成熟神经元低水平地表达多个嗅觉感受器，单个神经元可从最多七个不同染色体表达嗅觉感受器。数据显示发育通路最终在成熟神经元中限制嗅觉感受器的表达。

illumina 的技术：TruSeq DNA Sample Preparation Kit、HiSeq 2500 系统

Llorens-Bobadilla E, Zhao S, Baser A, Saiz-Castro G, Zwadlo K and Martin-Villalba A. Single-Cell Transcriptomics Reveals a Population of Dormant Neural Stem Cells that Become Activated upon Brain Injury. *Cell Stem Cell.* 2015;17:329-340

在人脑内部，NSC 池参与损伤后的大脑修复与再生。NSC 的活化与静息平衡取决于特定转录因子的诱导。在本研究中，作者使用 HiSeq 2000 系统执行从脑室下区分离出来的 NSC 的 scRNA-Seq。该研究确定了休眠 NSC 的特定亚群中谱系特定转录因子的表达。研究还发现脑缺血性损伤诱导了休眠 NSC 中的干扰素信号，促进其进入原始的静息状态。本研究揭示了 NSC 活化涉及的一般分子原理，并指明了脑再生医学的潜在方法。

illumina 的技术：Nextera XT Sample Preparation Kit、HiSeq 2000 系统

Lodato MA, Woodworth MB, Lee S, Evrony GD, Mehta BK, et al. Somatic mutation in single human neurons tracks developmental and transcriptional history. *Science.* 2015;350:94-98

神经元是有丝分裂后细胞，因此其基因组尤其易受 DNA 损伤。在本研究中，作者通过执行 36 个单个皮层神经元的单细胞 WGS，对人类大脑中的体细胞 SNV 情况进行了测量。最丰富的 SNV 包括非编码、非编码 RNA、内含子和基因间 SNV。编码、截取、拼接和沉默 SNV 的丰度要少很多。此外，数据显示每个皮层神经元都有独特的基因组，包含最多 1580 个体细胞 SNV。最后，体细胞 SNV 创建了嵌套连接树，表明体细胞突变可用于重建神经元的发育谱。

illumina 的技术：TruSeq Nano LT Sample Preparation Kit、HiSeq 2000 和 HiSeq X Ten 系统

Luo Y, Coskun V, Liang A, Yu J, Cheng L, et al. Single-cell transcriptome analyses reveal signals to activate dormant neural stem cells. *Cell*. 2015;161:1175-1186

由于组织特异性干细胞数量少，并且其周围环境复杂，因此必须使用单细胞测序法来鉴定这些细胞类型。在本研究中，作者使用单细胞测序和加权基因表达网络分析鉴定来自成年小鼠前脑神经区的 CD133+ 室管膜细胞为 NSC。将这些细胞亚群富集用于免疫应答基因以及基因编码血管生成因子富集。VEGF 和 bFGF 处理增强了迁移，并诱导分化为神经元和神经胶质细胞。

illumina 的技术：HiSeq 2500 系统

Upton KR, Gerhardt DJ, Jesuadian JS, et al. Ubiquitous L1 mosaicism in hippocampal neurons. *Cell*. 2015;161:228-239

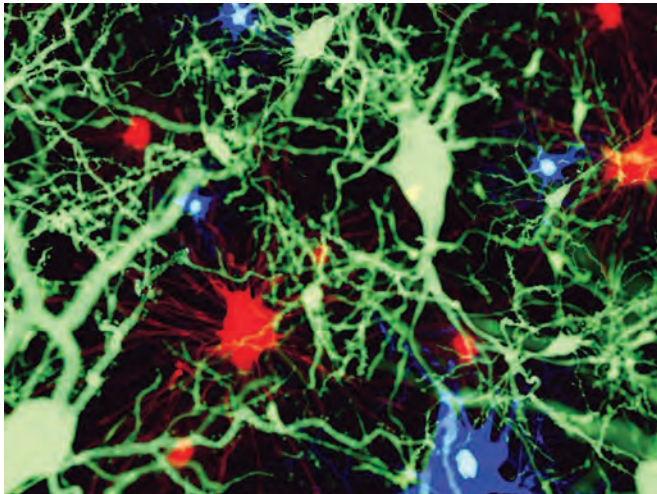
体细胞 L1 反转座发生于神经发生过程中，是神经元之间基因型变异的潜在来源。海马体中存在明显的 L1 活性，但其生物学效应尚不清楚。在本研究中，作者使用 MiSeq 系统对单个海马神经元、海马神经胶质细胞和皮层神经元执行单细胞反转座子捕获测序（RC-Seq）。这些实验已确定 L1 驱动的嵌合现象在海马体中大量存在，与先前估计的每个皮层神经元 < 0.1 个 L1 插入相比，每个海马神经元中具有 13.7 个体细胞 L1 插入。考虑到 L1 插入的丰富性，有理由假设 L1 驱动的嵌合现象可改变脑生物学和功能。

illumina 的技术：MiSeq 系统

Zeisel A, Munoz-Manchado AB, Codeluppi S, et al. Brain structure. Cell types in the mouse cortex and hippocampus revealed by single-cell RNA-seq. *Science*. 2015;347:1138-1142

大脑由大量细胞类型构成，神经元为其中一个亚组。要了解大脑功能，确定该高度特异性细胞的复合集合极其重要。在本研究中，作者基于 3005 个来自初级体感觉皮质和海马体 CA1 区域的单细胞转录组执行定量 scRNA-Seq。RNA 分子使用唯一的分子标识符（UMI）计算。双聚类算法揭示了细胞的 9 个主要类别，包括锥体神经元、中间神经元、少突胶质细胞、星形胶质细胞、小神经胶质细胞、血管内皮细胞、壁细胞和室管膜细胞。研究人员确定了 9 种细胞类型中的 47 个分子不同子类。研究还确定了与细胞类型、形态学和位置一致的唯一标记基因

illumina 的技术：HiSeq 2000 系统



脑细胞的多样性

Bershteyn M, Nowakowski TJ, Pollen AA, et al. Human iPSC-Derived Cerebral Organoids Model Cellular Features of Lissencephaly and Reveal Prolonged Mitosis of Outer Radial Glia. *Cell Stem Cell*. 2017;20:435-449 e434

Campbell JN, Macosko EZ, Fenselau H, et al. A molecular census of arcuate hypothalamus and median eminence cell types. *Nat Neurosci*. 2017;20:484-496

Frazer S, Prados J, Niquille M, et al. Transcriptomic and anatomic parcellation of 5-HT3AR expressing cortical interneuron subtypes revealed by single-cell RNA sequencing. *Nat Commun*. 2017;8:14219

Karlsson K and Linnarsson S. Single-cell mRNA isoform diversity in the mouse brain. *BMC Genomics*. 2017;18:126

Nowakowski TJ, Bhaduri A, Pollen AA, et al. Spatiotemporal gene expression trajectories reveal developmental hierarchies of the human cortex. *Science*. 2017;358:1318-1323

Spaethling JM, Na YJ, Lee J, et al. Primary Cell Culture of Live Neurosurgically Resected Aged Adult Human Brain Cells and Single Cell Transcriptomics. *Cell Rep*. 2017;18:791-803

Crocker A, Guan XJ, Murphy CT and Murthy M. Cell-Type-Specific Transcriptome Analysis in the Drosophila Mushroom Body Reveals Memory-Related Changes in Gene Expression. *Cell Rep*. 2016;15:1580-1596

Evrony GD, Lee E, Park PJ and Walsh CA. Resolving rates of mutation in the brain using single-neuron genomics. *Elife*. 2016;5:e12966

Finegersh A and Homanics GE. Chromatin immunoprecipitation and gene expression analysis of neuronal subtypes after fluorescence activated cell sorting. *J Neurosci Methods*. 2016;263:81-88

Fuzik J, Zeisel A, Mate Z, et al. Integration of electrophysiological recordings with single-cell RNA-seq data identifies neuronal subtypes. *Nat Biotechnol*. 2016;34:175-183

Habib N, Li Y, Heidenreich M, et al. Div-Seq: A single nucleus RNA-Seq method reveals dynamics of rare adult newborn neurons in the CNS. *Science*. 2016;353:925-928

Krishnaswami SR, Grindberg RV, Novotny M, et al. Using single nuclei for RNA-seq to capture the transcriptome of postmortem neurons. *Nat Protoc*. 2016;11:499-524

Li CL, Li KC, Wu D, et al. Somatosensory neuron types identified by high-coverage single-cell RNA-sequencing and functional heterogeneity. *Cell Res*. 2016;26:83-102

Milani P, Escalante-Chong R, Shelley BC, Patel-Murray NL, Xin X, et al. Cell freezing protocol suitable for ATAC-Seq on motor neurons derived from human induced pluripotent stem cells. *Sci Rep*. 2016;6:25474

Thomsen ER, Mich JK, Yao Z, et al. Fixed single-cell transcriptomic characterization of human radial glial diversity. *Nat Methods*. 2016;13:87-93

药物发现

现代药物发现涉及与疾病进程高度相关的新药物靶标的确定，随后为高度特异的、基于靶标的治疗干预研发。在给定的组织中，细胞可表达最多 400 个药物靶基因，表明药物靶标的相对丰度。¹²⁰ 但是，组织由多种遗传多样性细胞类型组成，且大量测序法中的衍生生物噪声可掩盖感兴趣的特定基因。单细胞测序法在发现和鉴定药物靶标以及提高制药筛选方面具有巨大前景。^{121,122,123}

“过去五年单细胞组学工具发展迅速，其在广泛的治疗方法和治疗策略发现和研发中的应用中具有巨大的潜力。” —Heath 等，2016 年

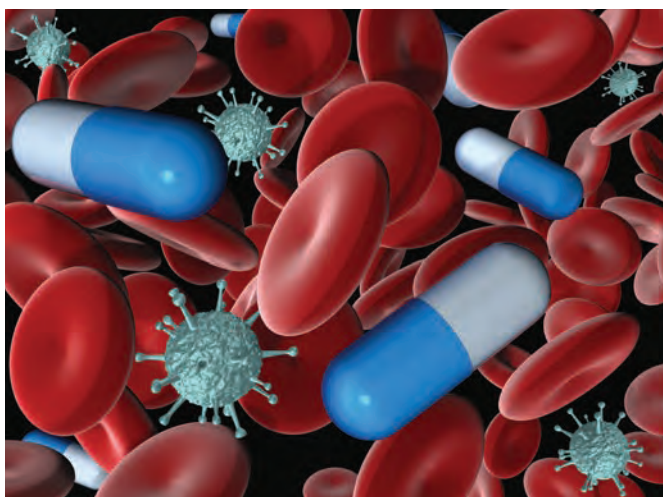
肿瘤细胞的单细胞测序增强了我们对肿瘤中肿瘤异质性、药物反应和耐药机制的理解。^{124,125} 同样，循环肿瘤细胞的单细胞分析着重于遗传异质性、治疗敏感性和转移潜力。^{126,127,128}

近期临床资料已表明免疫系统功能的治疗性增强可使癌症患者受益。¹²⁹ 阻断 CTLA-4 和 PD-1 的抗体在大量癌症中诱发临床反应，包括黑色素瘤、肺癌、肾癌、膀胱癌和霍奇金淋巴瘤。^{130,131} 单细胞测序法使我们有可能更深入地了解免疫细胞和肿瘤细胞之间复杂的相互作用，更彻底地鉴定肿瘤的细胞生态学体系。^{132,133,134}

除揭示肿瘤—宿主免疫相互作用的机制以外，单细胞法还揭示了对感染性病原微生物的宿主免疫应答。^{135,136} 我们对微生物多样性的理解和鉴定持续扩展，且单细胞测序可帮助鉴定环境中感染性病原体的丰度。¹³⁷ 最后，对无法培养的微生物进行基因组鉴定可帮助发现可在制药研发中用作新化学结构的新天然产物。¹³⁸

单细胞测序法正在重塑我们对过敏原特异性 B 细胞在食物过敏，^{139,140} 以及 B 细胞介导的中和抗体对感染物的反应中所发挥的作用的理解。¹⁴¹ 单细胞测序法还阐明了调控人类自体免疫性疾病中的 T 细胞分化和生物学过程的新机制，包括类风湿性关节炎、¹⁴² SLE、¹⁴³ 多发性硬化症¹⁴⁴、I 型糖尿病¹⁴⁵ 和自身免疫性脑脊髓炎。^{146,147}

120. Eberwine J, Sul J-Y, Bartfai T and Kim J. The promise of single-cell sequencing. *Nature Methods*. 2013;11:25-27
121. Bartfai T, Buckley PT and Eberwine J. Drug targets: single-cell transcriptomics hastens unbiased discovery. *Trends Pharmacol Sci*. 2012;33:9-16
122. Weaver WM, Tseng P, Kunze A, et al. Advances in high-throughput single-cell microtechnologies. *Curr Opin Biotechnol*. 2014;25:114-123
123. Heath JR, Ribas A and Mischel PS. Single-cell analysis tools for drug discovery and development. *Nat Rev Drug Discov*. 2016;15:204-216
124. Gerber T, Willscher E, Loeffler-Wirth H, et al. Mapping heterogeneity in patient-derived melanoma cultures by single-cell RNA-seq. *Oncotarget*. 2017;8:846-862
125. Zhang X, Marjani SL, Hu Z, Weissman SM, Pan X and Wu S. Single-Cell Sequencing for Precise Cancer Research: Progress and Prospects. *Cancer Res*. 2016;76:1305-1312
126. Shaffer SM, Dunagin MC, Torborg SR, et al. Rare cell variability and drug-induced reprogramming as a mode of cancer drug resistance. *Nature*. 2017;546:431-435
127. Zhang C, Guan Y, Sun Y, Ai D and Guo Q. Tumor heterogeneity and circulating tumor cells. *Cancer Lett*. 2016;374:216-223
128. Chung W, Eum HH, Lee HO, et al. Single-cell RNA-seq enables comprehensive tumour and immune cell profiling in primary breast cancer. *Nat Commun*. 2017;8:15081
129. Wucherpfennig KW and Cartwright AN. Genetic screens to study the immune system in cancer. *Curr Opin Immunol*. 2016;41:55-61
130. Wolchok JD, Hodi FS, Weber JS, et al. Development of ipilimumab: a novel immunotherapeutic approach for the treatment of advanced melanoma. *Ann N Y Acad Sci*. 2013;1291:1-13
131. Ansell SM, Lesokhin AM, Borrello I, et al. PD-1 blockade with nivolumab in relapsed or refractory Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med*. 2015;372:311-319
132. Tirosh I, Izar B, Prakadan SM, et al. Dissecting the multicellular ecosystem of metastatic melanoma by single-cell RNA-seq. *Science*. 2016;352:189-196
133. Chung W, Eum HH, Lee HO, et al. Single-cell RNA-seq enables comprehensive tumour and immune cell profiling in primary breast cancer. *Nat Commun*. 2017;8:15081
134. Zheng C, Zheng L, Yoo JK, et al. Landscape of Infiltrating T Cells in Liver Cancer Revealed by Single-Cell Sequencing. *Cell*. 2017;169:1342-1356 e1316
135. Combe M, Garjo R, Geller R, Cuevas JM and Sanjuan R. Single-Cell Analysis of RNA Virus Infection Identifies Multiple Genetically Diverse Viral Genomes within Single Infectious Units. *Cell Host Microbe*. 2015;18:424-432
136. Lonnberg T, Svensson V, James KR, et al. Single-cell RNA-seq and computational analysis using temporal mixture modelling resolves Th1/Th fate bifurcation in malaria. *Sci Immunol*. 2017;2:eaa12192
137. McLean JS and Lasken RS. Single cell genomics of bacterial pathogens: outlook for infectious disease research. *Genome Med*. 2014;6:108
138. Rashid M and Stingl U. Contemporary molecular tools in microbial ecology and their application to advancing biotechnology. *Biotechnol Adv*. 2015;33:1755-1773



单细胞基因组可在药物研究和设计中带来更高效率。

综述

DiLoreto R, Khush K and De Vlaminck I. Precision monitoring of immunotherapies in solid organ and hematopoietic stem cell transplantation. *Adv Drug Deliv Rev.* 2017;114:272-284

McConnell MJ, Moran JV, Abyzov A, et al. Intersection of diverse neuronal genomes and neuropsychiatric disease: The Brain Somatic Mosaicism Network. *Science.* 2017;356:eaal1641

Heath JR, Ribas A and Mischel PS. Single-cell analysis tools for drug discovery and development. *Nat Rev Drug Discov.* 2016;15:204-216

Wucherpfennig KW and Cartwright AN. Genetic screens to study the immune system in cancer. *Curr Opin Immunol.* 2016;41:55-61

Zhang X, Marjani SL, Hu Z, Weissman SM, Pan X, et al. Single-Cell Sequencing for Precise Cancer Research: Progress and Prospects. *Cancer Res.* 2016;76:1305-1312

Alizadeh AA, Aranda V, Bardelli A, et al. Toward understanding and exploiting tumor heterogeneity. *Nat Med.* 2015;21:846-853

Issigoni M and Newmark PA. Heal Thy Cell(f): A Single-Cell View of Regeneration. *Dev Cell.* 2015;35:527-528

Robinson WH. Sequencing the functional antibody repertoire--diagnostic and therapeutic discovery. *Nat Rev Rheumatol.* 2015;11:171-182

参考文献

Keren-Shaul H, Spinrad A, Weiner A, et al. A Unique Microglia Type Associated with Restricting Development of Alzheimer's Disease. *Cell.* 2017;169:1276-1290 e1217

阿茨海默病是慢性神经退行性疾病，无法治愈。其发病率随年龄增加，约6%的65岁及以上人群受此疾病影响。¹⁴⁸为了更好地理解阿茨海默病的细胞病因，作者对来自健康转基因小鼠和患阿茨海默病小鼠的约8000个单个免疫细胞进行了单细胞RNA-Seq。数据发现了一个与神经退行性疾病相关的新发小胶质细胞。这些小胶质细胞含有A β 颗粒，该颗粒是阿茨海默病的分子标志。数据表明，这一新免疫细胞类型具有限制神经退行的潜力，对治疗阿茨海默病具有潜在意义。

illumina 的技术：NextSeq 500 系统

Shaffer SM, Dunagin MC, Torborg SR, et al. Rare cell variability and drug-induced reprogramming as a mode of cancer drug resistance. *Nature.* 2017;546:431-435

许多肿瘤可通过化疗治愈，但它们最终会对癌症药物产生耐受性。因此，理解耐药性机制成为研究的热门领域。约60%的黑色素瘤的BRAF激酶基因中携带V600E突变，这使肿瘤细胞对BRAF抑制剂维莫非尼敏感；但是，一部分肿瘤细胞最终会产生耐药性。¹⁴⁹在本研究中，作者从黑色素瘤患者样本中分离了单个肿瘤细胞，然后在存在维莫非尼的条件下进行培养。对亲本细胞以及维莫非尼抗性亚克隆中119个癌症相关基因的靶向

139. Patil SU, Ogunniyi AO, Calatroni A, et al. Peanut oral immunotherapy transiently expands circulating Ara h 2-specific B cells with a homologous repertoire in unrelated subjects. *J Allergy Clin Immunol.* 2015;136:125-134 e112
140. Hoh RA, Joshi SA, Liu Y, et al. Single B-cell deconvolution of peanut-specific antibody responses in allergic patients. *J Allergy Clin Immunol.* 2016;137:157-167
141. Tsioris K, Gupta NT, Ogunniyi AO, et al. Neutralizing antibodies against West Nile virus identified directly from human B cells by single-cell analysis and next generation sequencing. *Integr Biol (Camb).* 2015;7:1587-1597
142. Ishigaki K, Shoda H, Kochi Y, et al. Quantitative and qualitative characterization of expanded CD4+ T cell clones in rheumatoid arthritis patients. *Sci Rep.* 2015;5:12937
143. Tipton CM, Fucile CF, Darce J, et al. Diversity, cellular origin and autoreactivity of antibody-secreting cell population expansions in acute systemic lupus erythematosus. *Nat Immunol.* 2015;16:755-765
144. Held K, Bhonsle-Deeng L, Siewert K, et al. alpha beta T-cell receptors from multiple sclerosis brain lesions show MAIT cell-related features. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm.* 2015;2:e107
145. Eugster A, Lindner A, Catani M, et al. High diversity in the TCR repertoire of GAD65 autoantigen-specific human CD4+ T cells. *J Immunol.* 2015;194:2531-2538
146. Gaublotme JT, Yosef N, Lee Y, et al. Single-Cell Genomics Unveils Critical Regulators of Th17 Cell Pathogenicity. *Cell.* 2015;163:1400-1412
147. Tischner D, Grimm M, Kaur H, et al. Single-cell profiling reveals GPCR heterogeneity and functional patterning during neuroinflammation. *JCI Insight.* 2017;2:e95063
148. Burns A and Iliffe S. Alzheimer's disease. *BMJ.* 2009;338:

DNA 测序表明，在抗性亚克隆中没有出现新突变。然后，他们对亲本细胞及维莫非尼抗性细胞进行了基于群落的 RNA-Seq，结果确定抗性细胞中多个已知的抗性标记基因表达增加。此外，暴露于药物中的抗性细胞中许多抗性标记基因表达增加。总之，这些数据提出了单个肿瘤细胞耐药性的新机制。

illumina 的技术：HiSeq 2500 系统

Nguyen A, Yoshida M, Goodarzi H and Tavazoie SF. Highly variable cancer subpopulations that exhibit enhanced transcriptome variability and metastatic fitness. *Nat Commun.* 2016;7:11246

肿瘤细胞遗传异质质在耐药性中发挥作用；但是在本研究中，作者专注于了解癌症表型异质质可能如何对癌症进展产生影响。研究分离了显示出高形态学变异的等基因克隆癌细胞。这些高度变异的亚群对大量抗癌药物的反应显示出升高的存活和转移潜力。作者对这些克隆执行 scRNA-Seq，并发现表达的形态学变异增强了转录组变异性，尽管在遗传上稳定。最后，研究将剪接体 - 机械基因表达中的高度变异与转录组变异和转移的促进联系起来。这些数据阐明了克隆内肿瘤异质质新的一面，并进一步表明升高的耐药性、存活和转移的机制。

illumina 的技术：Nextera Extended Exome Sequencing Kit、HiSeq 2500 系统

Wei W, Shin YS, Xue M, Matsutani T, Masui K, et al. Single-Cell Phosphoproteomics Resolves Adaptive Signaling Dynamics and Informs Targeted Combination Therapy in Glioblastoma. *Cancer Cell.* 2016;29:563-573

成胶质细胞瘤是致死性最高的癌症之一。成胶质细胞瘤在多个可用作药物治疗的通路中存在突变，由于其快速且广泛的耐药性，业已证明当前的靶向治疗无效。具体来讲，mTOR 通路的机械靶标是 90% 成胶质细胞瘤的关键驱动力，但是肿瘤细胞发展了对 mTOR 靶向治疗的快速耐药性。在本研究中，作者使用 NextSeq 500 系统获得单细胞基因组数据，并将这些数据与使用 mTOR 抑制剂治疗的肿瘤细胞中的单细胞蛋白组数据联系起来。这些数据显示出成胶质细胞瘤肿瘤细胞中对 mTOR 抑制剂的耐药性在药物治疗开始几天内发生。令人惊讶的是，与单细胞测序数据的关联表明此耐药性通过非遗传机制（上调特定信号磷酸蛋白）进行。该研究启发了一种在治疗成胶质细胞瘤中设计药物复合治疗的新方法。

illumina 的技术：NextSeq 500 系统

Gaublomme JT, Yosef N, Lee Y, Gertner RS, Yang LV, et al. Single-Cell Genomics Unveils Critical Regulators of Th17 Cell Pathogenicity. *Cell.* 2015;163:1400-1412

在适应性免疫系统中，促炎性 IL-17 生成的 Th17 细胞有助于病原体的清除，但也与自身免疫性和炎症性疾病存在关联。虽然 Th17 细胞显示出广泛的细胞异质质，该异质质的遗传基础还未清楚确定。在本研究中，作者使用 HiSeq 2000/2500 系统对从患有 EAE 的患者分离出的单个 Th17 细胞执行 scRNA-Seq。研究将该数据集与来自体外分化的正常 Th17 细胞的 scRNA-Seq 数据进行了比较。研究数据展示了来自自身免疫患者的 Th17 细胞中的遗传异质质。此外，研究使用转基因小鼠验证了参与 EAE 发展的 4 个基因 (*Gpr65*、*Plzp*、*Toso* 和 *Cd5l*)。这些结果可帮助发现自身免疫性疾病中的新药物靶标。

illumina 的技术：Nextera XT DNA Sample Preparation Kit、HiSeq 2000/2500 系统

Kim KT, Lee HW, Lee HO, et al. Single-cell mRNA sequencing identifies subclonal heterogeneity in anti-cancer drug responses of lung adenocarcinoma cells. *Genome Biol.* 2015;16:127

肿瘤内异质质与癌症的不良临床预后相关，但尚未完全理解该相关性的机制。在本研究中，作者分离了 34 个 PDX 肺腺癌肿瘤细胞，并使用 HiSeq 2000/2500 系统执行了 scRNA-Seq。通过簇生成 69 个肺腺癌预后基因（包括 *KRAS*），该研究可将 PDX 细胞分类为 4 个不同的亚组。从抗癌药物治疗存活下来的 PDX 细胞的 scRNA-Seq 表明带有活化 *KRAS* 变异的肿瘤细胞为抗癌药的靶标，尽管 *KRAS* 本身并不是靶标。该研究的 scRNA-Seq 数据还表明对耐药性有作用的肿瘤细胞可被大量肿瘤的基因组掩蔽。

illumina 的技术：Nextera XT DNA Sample Prep Kit、HiSeq 2000/2500 系统

149. Nazarian R, Shi H, Wang Q, et al. Melanomas acquire resistance to B-RAF(V600E) inhibition by RTK or N-RAS upregulation. *Nature.* 2010;468:973-977

Luna JM, Scheel TK, Danino T, et al. Hepatitis C virus RNA functionally sequesters miR-122. *Cell*. 2015;160:1099-1110

丙型肝炎病毒 (HCV) 为黄病毒科的 RNA 病毒, 是全球肝脏疾病的主要元凶。HCV 需要肝脏特异性肿瘤抑制因子 microRNA (miR) -122 进行复制, 但是 HCV 感染进行的内源性 miRNA 的调控尚不确定。在本研究中, 作者生成了 HCV 感染期间的整个 miRNA: 靶标相互作用图谱, 并阐明了 HCV 病毒 RNA 隔离 miR-122 以抑制正常宿主靶标。研究随后通过从包含 miR-122 位点的报告基因分析表达数据, 对 RNA 隔离在单细胞水平进行了验证和定量, 确认了 HCV 感染期间显著抑制。结果描述了 HCV 诱导的 miR-122 隔离的模型, 并指示了该机制可增强 HCV 的长期致癌潜力。

illumina 的技术: MiSeq 和 HiSeq 2000 系统

Suzuki A, Matsushima K, Makinoshima H, et al. Single-cell analysis of lung adenocarcinoma cell lines reveals diverse expression patterns of individual cells invoked by a molecular target drug treatment. *Genome Biol*. 2015;16:66

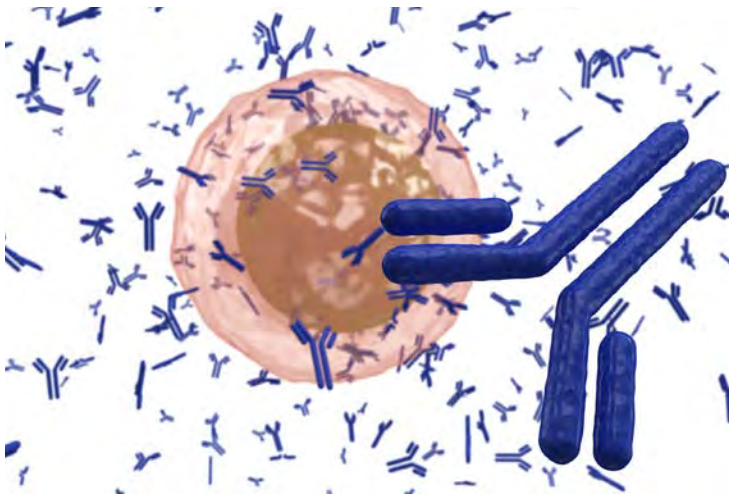
单个肿瘤细胞的单细胞测序具有将遗传异质性与药物反应和耐药性联系起来的潜力。在该研究中, 作者在 336 个来自细胞系的肺癌细胞单细胞基因表达中鉴定了异质性。该研究还在使用多酪氨酸激酶抑制剂 (凡德他尼) 治疗之前和之后分析了肺癌细胞。研究发现细胞看家基因的相对表达多样性在暴露于凡德他尼的癌细胞中降低。相比之下, 凡德他尼靶标基因 (包括 *EGFR* 和 *RET*) 的表达多样性仍不变。研究数据表明基因表达分散度的模式在肿瘤细胞获得耐药性方面发挥重要作用; 此外, 该基因多样性并没有由大量肿瘤的 RNA-Seq 揭示。

illumina 的技术: Nextera XT DNA Sample Preparation Kit、HiSeq 2500 系统

Tipton CM, Fucile CF, Darce J, Chida A, Ichikawa T, et al. Diversity, cellular origin and autoreactivity of antibody-secreting cell population expansions in acute systemic lupus erythematosus. *Nat Immunol*. 2015;16:755-765

急性 SLE 为复发性自体免疫性疾病, 攻击多种组织且无法治愈。自身免疫活动与 B 细胞骤增相关。美国 FDA 批准的唯一 SLE 疗法——贝利单抗, 靶标 B 细胞激活因子。在本研究中, 作者从正在遭受 SLE 爆发的患者分离了 B 细胞, 并使用深度测序和蛋白质组学分析 B 细胞的多样性。研究表明来自 SEL 爆发患者的 B 细胞为多克隆。通过测序单个 B 细胞, 研究还鉴定了新激活的在 SLE 爆发期间提供自身抗体重要来源的 B 细胞亚群, 表明 SLE 自体反应发生于多克隆激活期间。这些结果可指导患者治疗选择, 并方便未来 SLE 治疗的计划。

illumina 的技术: MiSeq 系统



B 淋巴细胞 (B 细胞) 分泌抗体。

Milholland B, Dong X, Zhang L, Hao X, Suh Y and Vijg J. Differences between germline and somatic mutation rates in humans and mice. *Nat Commun.* 2017;8:15183

Tischner D, Grimm M, Kaur H, et al. Single-cell profiling reveals GPCR heterogeneity and functional patterning during neuroinflammation. *JCI Insight.* 2017;2:e95063

Spaethling JM, Sanchez-Alavez M, Lee J, et al. Single-cell transcriptomics and functional target validation of brown adipocytes show their complex roles in metabolic homeostasis. *FASEB J.* 2016;30:81-92

Avraham R, Haseley N, Brown D, Penaranda C, Jijon HB, et al. Pathogen Cell-to-Cell Variability Drives Heterogeneity in Host Immune Responses. *Cell.* 2015;162:1309-1321

Combe M, Garijo R, Geller R, Cuevas JM and Sanjuan R. Single-Cell Analysis of RNA Virus Infection Identifies Multiple Genetically Diverse Viral Genomes within Single Infectious Units. *Cell Host Microbe.* 2015;18:424-432

Eirew P, Steif A, Khattri J, et al. Dynamics of genomic clones in breast cancer patient xenografts at single-cell resolution. *Nature.* 2015;518:422-426

Ortmann CA, Kent DG, Nangalia J, et al. Effect of mutation order on myeloproliferative neoplasms. *N Engl J Med.* 2015;372:601-612

Paguirigan AL, Smith J, Meshinchi S, Carroll M, Maley C and Radich JP. Single-cell genotyping demonstrates complex clonal diversity in acute myeloid leukemia. *Sci Transl Med.* 2015;7:281re282

Sekar S, McDonald J, Cuyugan L, et al. Alzheimer's disease is associated with altered expression of genes involved in immune response and mitochondrial processes in astrocytes. *Neurobiol Aging.* 2015;36:583-591

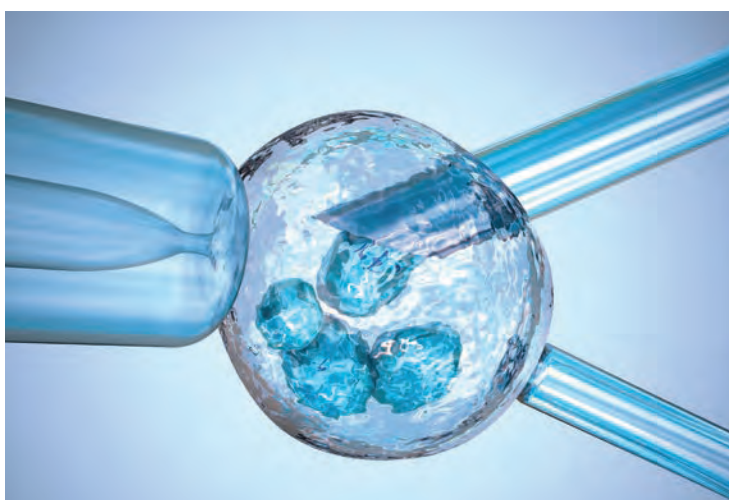
Tsioris K, Gupta NT, Ogunniyi AO, et al. Neutralizing antibodies against West Nile virus identified directly from human B cells by single-cell analysis and next generation sequencing. *Integr Biol (Camb).* 2015;7:1587-1597

生殖健康

产前诊断指出生前胎儿和胚胎疾病或遗传情况的检测。先天缺陷可通过检测受损染色体或 DNA 异常加以诊断。传统上，该诊断使用侵入性操作（如羊膜穿刺术）。非侵入性产前检测（NIPT）与传统检测方法相比更具可信度，仅需抽血。¹⁵⁰ 通过游离 DNA（cfDNA）测序的 NIPT 已用于临床并改善了产前诊断。¹⁵¹

“单细胞测序能够基因组、外显子组、转录组或表观基因组进行全局测序，进而对早期胚胎进行全面分析。” —Zhu 等，2017 年

单细胞测序在 PGS/PGD 领域也很有用，可在植入前筛查胚胎是否有染色体异常。^{152,153} 研究显示了测序如何帮助对用于研究或植入的体外产生配子（IVG）进行基因测试。¹⁵⁴ 单细胞测序诊断可加速研究、改善胚胎状态的早期检测，并确保能够移植健康的体外受精（IVF）胚胎。^{155,156}



胚胎的遗传检测可为染色体异常提供早期启示。

综述

Forsberg LA, Gisselsson D and Dumanski JP. Mosaicism in health and disease - clones picking up speed. *Nat Rev Genet.* 2017;18:128-142

Otte J, Wruck W and Adjaye J. New insights into human primordial germ cells and early embryonic development from single-cell analysis. *FEBS Lett.* 2017;591:2226-2240

Zhu W, Zhang XY, Marjani SL, et al. Next-generation molecular diagnosis: single-cell sequencing from bench to bedside. *Cell Mol Life Sci.* 2017;74:869-880

150. Chandrasekharan S, Minear MA, Hung A and Allyse M. Noninvasive prenatal testing goes global. *Sci Transl Med.* 2014;6:231fs215
151. Bianchi DW, Parker RL, Wentworth J, et al. DNA sequencing versus standard prenatal aneuploidy screening. *N Engl J Med.* 2014;370:799-808
152. 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;20:1131-1139
153. Wang J, Fan HC, Behr B and Quake SR. Genome-wide single-cell analysis of recombination activity and de novo mutation rates in human sperm. *Cell.* 2012;150:402-412
154. Palacios-González C, Harris J and Testa G. Multiplex parenting: IVG and the generations to come. *Journal of Medical Ethics.* 2014;40:752-758
155. Ong FS, Lin JC, Das K, Grosu DS and Fan JB. Translational utility of next-generation sequencing. *Genomics.* 2013;102:137-139
156. Tan Y, Yin X, Zhang S, et al. Clinical outcome of preimplantation genetic diagnosis and screening using next generation sequencing. *Gigascience.* 2014;3:30

参考文献

Krjtskov K, Katayama S, Saare M, et al. Single-cell transcriptome analysis of endometrial tissue. *Hum Reprod.* 2016;31:844-853

先前已对许多活检组织进行了单细胞转录组分析，但尚未发表子宫内膜的单细胞转录组分析。在本研究中，作者呈现了子宫内膜单细胞基因表达谱的完整流程，从采样到数据分析。研究从子宫内膜分离出单个基质细胞和上皮细胞，并使用 FACS 分离相应细胞类型，然后进行 scRNA-Seq。同时，研究培养了子宫内膜基质细胞，并与未培养的细胞比较了完整表达谱。作者发现，与活检细胞相比，有 2661 个基因（包含于 8622 个所检测的基因）在培养的基质细胞更具活性。此外，241 个基因在活检和培养的各个细胞中表达差异显著。

illumina 的技术：HiSeq 系统

Petropoulos S, Edsgard D, Reinius B, et al. Single-Cell RNA-Seq Reveals Lineage and X Chromosome Dynamics in Human Preimplantation Embryos. *Cell.* 2016;165:1012-1026

在人发育过程中，合子进行细胞分裂，形成成熟囊胚的 3 个细胞类型：滋养外胚层（TE）、原始内胚层（PE）和外胚层（EPI）。在本研究中，作者使用 HiSeq 2000 系统对从 88 个人植入前胚胎中分离出的 1529 个单个细胞进行了转录组测序。研究建立了人胚胎植入前发育的完整转录图谱，阐明了 TE、PE 和 EPI 的谱系都同时发生，并与胚泡形成重合。研究数据还确定了可能对胚胎植入前发育有重要作用的新基因，如 ARGFX、FOXA2 和 LINC00261。最后，转录图确定了人类 X 染色体剂量补偿的独特特征。

illumina 的技术：HiSeq 2000 系统

Kumar A, Ryan A, Kitzman JO, et al. Whole genome prediction for preimplantation genetic diagnosis. *Genome Med.* 2015;7:35

PGD 可进行人类胚胎的遗传分析，以在植入前筛查遗传性疾病。虽然单细胞测量的近期技术进步强调该方法在 PGD 中应用的前景，但 DNA 扩增偏向和相对较长的周转时间限制了该方法的应用。在本研究中，作者将单体型亲本基因组测序与快速胚胎基因分型结合起来，以预测一个五天人胚胎的全基因组序列。作者预测了 300 万个父本/母本杂合子位点的遗传（精度 > 99%），以及亲本 HBA1/HBA2 缺失的传播。数据表明 PGD 可加速胚胎中遗传疾病的诊断。

illumina 的技术：HiSeq 2000 系统、CytoSNP-12 Chip

Yan L, Huang L, Xu L, et al. Live births after simultaneous avoidance of monogenic diseases and chromosome abnormality by next-generation sequencing with linkage analyses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015;112:15964-15969

NGS 方法提高了 PGS/PGD 的精密度。虽然精确度受假阳性和假阴性 SNV 所限，连锁分析可克服该困难。在本研究中，作者研发了 MARSALA，一种将使用 HiSeq 平台的新一代测序与单细胞全 WGA 结合的方法。此方法可进行单分子精确度的胚胎诊断，并极大的降低了假阳性和假阴性错误。此为第一个基于集成式新一代测序的 PGD 程序，同时检测疾病导致的突变和染色体异常，并执行连锁分析。

illumina 的技术：HiSeq 2500 系统

Zamani Esteki M, Dimitriadou E, Mateiu L, et al. Concurrent whole-genome haplotyping and copy-number profiling of single cells. *Am J Hum Genet.* 2015;96:894-912

在分析单细胞 DNA-Seq 数据前，必须将 DNA 拷贝数异常与 WGA 杂峰区分开。该要求使得单细胞测序数据 DNA 拷贝数分析和单倍型分析有难度。在本研究中，作者研发了一种单细胞基因组分析法，可在单细胞全基因组确定单倍型和拷贝数——称为 haplarithmisis 的程序。方法解读单细胞的 SNP 等位基因片段，并将这些数据整合到计算工作流程中进行关联疾病变异的归因（siCHILD）。作者通过对来自人体外受精胚胎的单个淋巴细胞和人分裂球确定单细胞基因组中带有疾病等位基因的单倍型验证了该方法。

illumina 的技术：TruSeq DNA LT Sample Preparation Kit、HumanCytoSNP-12v2.1 BeadChips、HiSeq 2000/2500 系统

Moreira de Mello JC, Fernandes GR, Vibranovski MD and Pereira LV. Early X chromosome inactivation during human preimplantation development revealed by single-cell RNA-sequencing. *Sci Rep*. 2017;7:10794

Pavlicev M, Wagner GP, Chavan AR, et al. Single-cell transcriptomics of the human placenta: inferring the cell communication network of the maternal-fetal interface. *Genome Res*. 2017;27:349-361

Tukiainen T, Villani AC, Yen A, et al. Landscape of X chromosome inactivation across human tissues. *Nature*. 2017;550:244-248

Gerovska D and Arauzo-Bravo MJ. Does mouse embryo primordial germ cell activation start before implantation as suggested by single-cell transcriptomics dynamics? *Mol Hum Reprod*. 2016;22:208-225

Li N, Wang L, Wang H, et al. The Performance of Whole Genome Amplification Methods and Next-Generation Sequencing for Pre-Implantation Genetic Diagnosis of Chromosomal Abnormalities. *J Genet Genomics*. 2015;42:151-159

微生物生态学和进化

我们不仅持续发现新的物种和微生物，^{158,159} 当前的 NGS 技术可帮助我们了解微生物生态学和进化的动力学。这些发现包括产生选择压力导致物种进化的宿主-物种相互作用¹⁶⁰。^{158,160} 这类见解对了解复合生态体系和许多组成生态体系的独特微生物至关重要。¹⁶¹ 测序还可加速对这些新物种及其在相应环境中的进化作用的检测。^{162,163,164,165}

“来自宏基因组学和单细胞基因组的新基因组信息
可使我们了解微生物代谢协同和依赖性，创造新的
的培养方法。” —Solden 等，2016 年



单细胞分析可更好的评估不同机体的压力选择和共居机体的进化，以及宿主 - 病原体相互作用。

158. Kashtan N, Roggensack SE, Rodrigue S, et al. Single-cell genomics reveals hundreds of coexisting subpopulations in wild *Prochlorococcus*. *Science*. 2014;344:416-420
159. Hug LA, Baker BJ, Anantharaman K, et al. A new view of the tree of life. *Nature Microbiology*. 2016;1:16048
160. Martiny JB, Riemann L, Marston MF and Middelboe M. Antagonistic coevolution of marine planktonic viruses and their hosts. *Ann Rev Mar Sci*. 2014;6:393-414
161. Stepanauskas R. Single cell genomics: an individual look at microbes. *Curr Opin Microbiol*. 2012;15:613-620
162. Kaster A-K, Mayer-Blackwell K, Pasarelli B and Spormann AM. Single cell genomic study of *Dehalococcoides* species from deep-sea sediments of the Peruvian Margin. *The ISME Journal*. 2014;8:1831
163. Wasmund K, Schreiber L, Lloyd KG, et al. Genome sequencing of a single cell of the widely distributed marine subsurface *Dehalococcoidia*, phylum *Chloroflexi*. *ISME J*. 2014;8:383-397
164. Wang FP, Zhang Y, Chen Y, et al. Methanotrophic archaea possessing diverging methane-oxidizing and electron-transporting pathways. *ISME J*. 2014;8:1069-1078
165. Mangot JF, Logares R, Sanchez P, et al. Accessing the genomic information of unculturable oceanic picoeukaryotes by combining multiple single cells. *Sci Rep*. 2017;7:41498

综述

Howard-Varona C, Hargreaves KR, Abedon ST and Sullivan MB. Lysogeny in nature: mechanisms, impact and ecology of temperate phages. *ISME J.* 2017;11:1511-1520

Hug LA, Baker BJ, Anantharaman K, et al. A new view of the tree of life. *Nature Microbiology.* 2016;1:16048

Kodzius R and Gojobori T. Single-cell technologies in environmental omics. *Gene.* 2016;576:701-707

Solden L, Lloyd K and Wrighton K. The bright side of microbial dark matter: lessons learned from the uncultivated majority. *Curr Opin Microbiol.* 2016;31:217-226

参考文献

Dykma S, Bischof K, Fuchs BM, Hoffmann K, Meier D, et al. Ubiquitous Gammaproteobacteria dominate dark carbon fixation in coastal sediments. *ISME J.* 2016;8:1939-1953

海洋沉积物是地球上最大的碳汇，其中一半的化学合成海洋碳固定发生在近海岸沉积物。但是，进行该活动的微生物却未知。通过测量横跨欧洲和澳大利亚 13 个近海岸沉积物的细菌 16S rRNA 的基因多样性，作者鉴定出了属于硫氧化细菌的 γ -变形菌纲。¹⁴C-碳同化研究显示这些未培养出的 γ -变形菌纲占近海岸沉积物中碳固定的 80%。最后，作者从环境样本分离出来单个细胞，并执行了单细胞 WGS 以鉴定将氢氧化活动与硫化 γ -变形菌纲联系起来的基因。

illumina 的技术：MiSeq 和 HiSeq 2000 系统

Spencer SJ, Tamminen MV, Preheim SP, Guo MT, Briggs AW, et al. Massively parallel sequencing of single cells by epicPCR links functional genes with phylogenetic markers. *ISME J.* 2016;10:427-436

在微生物生态学研究，16S rRNA 测序可鉴定微生物群落成员，而鸟枪法元基因组学可确定群落的功能性多样性。但是，将这两种方法组合起来在技术上具有挑战性。在本研究中，作者研发了乳液法、配对分离和链状结合 PCR (epicPCR，一项将功能基因与种系发育标记联系起来的技术)。该研究将此技术应用于来自马塞诸塞 Upper Mystic Lake 的淡水中数百万的未培养单个细胞。具体来说，该研究分析了淡水湖群落内的硫酸盐还原群落，并可鉴定新的假定硫酸盐还原硫酸盐还原菌。该方法适用于鉴定功能群体成员，追踪基因导入并绘制微生物细胞内的生态学相互作用图。

illumina 的技术：MiSeq 系统

Tsementzi D, Wu J, Deutsch S, et al. SAR11 bacteria linked to ocean anoxia and nitrogen loss. *Nature.* 2016;536:179-183

SAR11 细菌是地球海洋中最丰富的微生物，构成所有富氧表层海洋中微生物细胞的一半。虽然认为需要氧，SAR11 在氧水平低的海洋环境中也丰富。在本研究中，作者使用 MiSeq 系统对来自海洋含氧量最低区域分离出的 SAR11 亚群的 19 个单细胞扩增基因组进行测序。研究发现已适应低氧环境的 SAR11 细菌编码大量呼吸硝酸盐还原酶。这些酶执行脱氮作用的第一步，是由微生物促进的可最终产生分子氮 (N_2) 的硝酸盐还原过程。这些数据重新定义了地球上最丰富生物组的生态位，并表明 SAR11 细菌对含氧量最低区域的脱氮有作用。

illumina 的技术：Nextera XT DNA Sample Preparation Kit、MiSeq 和 HiSeq 系统

Combe M, Garijo R, Geller R, Cuevas JM and Sanjuan R. Single-Cell Analysis of RNA Virus Infection Identifies Multiple Genetically Diverse Viral Genomes within Single Infectious Units. *Cell Host Microbe.* 2015;18:424-432

遗传多样性是病毒进行免疫逃逸和疫苗逃逸、产生耐药性和导致疾病的关键决定因素。假设单个病毒粒组成病毒感染单位。但是，作者对自 90 个单独感染细胞的 881 个 VSV 斑来执行了单细胞测序，并显示单个病毒感染单位由多个遗传多样性病毒基因组组成。研究还发现多个基因组病毒变异可同时传递给相同的单个细胞，且自发病毒突变率在各个单独细胞之间变化，对病毒产量有影响。本研究在单细胞水平开展，我们对病毒多样性和进化的理解有意义。

illumina 的技术：MiSeq 系统

Labonte JM, Swan BK, Poulos B, et al. Single-cell genomics-based analysis of virus-host interactions in marine surface bacterioplankton. *ISME J.* 2015;9:2386-2399

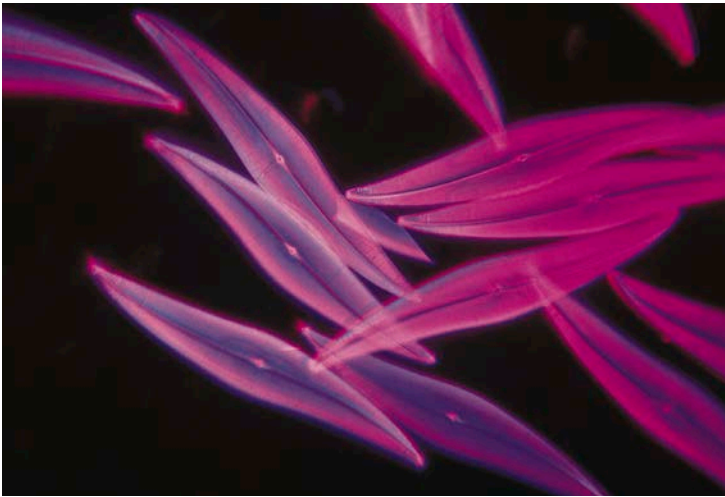
病毒感染可改变海洋群落的组成和代谢潜能，以及宿主群落的进化。所有海洋微生物都可能受病毒感染影响；但是，我们对宿主-病毒之间的相互作用的了解有限。在本研究中，作者对 58 个分离的海洋微生物使用单细胞 WGS，以确定单个细菌和古菌细胞内的以及其附属的病毒基因组蓝图。数据包括奇古菌门、海洋微生物、疣微菌门和 γ -变形菌纲的最早已知病毒。研究阐明了单细胞基因组发可洞察复杂环境中宿主-病毒之间的相互作用。

illumina 的技术：NextSeq 500 系统

Lima-Mendez G, Faust K, Henry N, Decelle J, Colin S, et al. Ocean plankton. Determinants of community structure in the global plankton interactome. *Science.* 2015;348:1262073

海洋浮游生物是世界范围内最大的生态系统，且由病毒、原核生物、真核微生物、浮游植物和浮游动物构成。该生态系统结构和组成受环境条件和养分供给的影响。在本研究中，作者分析了 313 个来自 Tara Oceans expedition 的浮游生物样本，并从 Illumina 测序的元基因组和 18S rDNA V9 序列获得了病毒、真核生物和原核生物丰度谱。研究使用网络推理和机器学习法构建浮游生物群组之间的相互作用组。特别是作者通过将假定的宿主重叠群与从单细胞基因组获得的病毒数据比较，确认了预测的病毒-宿主之间的相互作用。

illumina 的技术：Illumina 测序的元基因组 (mi 标签) 和 18S rRNA V9 序列



浮游植物占地球上所有光合作用的一半。

Martijn J, Schulz F, Zaremba-Niedzwiedzka K, et al. Single-cell genomics of a rare environmental alphaproteobacterium provides unique insights into Rickettsiaceae evolution. *ISME J.* 2015;9:2373-2385

立克次氏体科包括导致流行性斑疹伤寒的病原体普氏立克次氏体，因而立克次氏体科的宿主-病毒相互作用具有重要意义。在本研究中，作者发现了 *Candidatus Arcanobacter lacustris*，即一种从 Damariscotta 湖中分离出的立克次氏体科姐妹谱系 α -变形菌纲。研究使用 HiSeq 2000 系统对 *Candidatus Arcanobacter lacustris* 进行了单细胞 WGS。其基因组的种系发育和比较分析揭示了趋化性和鞭毛基因的存在。这些基因在立克次氏体科中唯一，并表明立克次氏体科的祖先可能具有兼性生活方式。

illumina 的技术：HiSeq 2000 系统

Haliburton JR, Shao W, Deutschbauer A, Arkin A and Abate AR. Genetic interaction mapping with microfluidic-based single cell sequencing. *PLoS One.* 2017;12:e0171302

Ionescu D, Bizic-Ionescu M, De Maio N, Cypionka H and Grossart HP. Community-like genome in single cells of the sulfur bacterium *Achromatium oxaliferum*. *Nat Commun.* 2017;8:455

Mangot JF, Logares R, Sanchez P, et al. Accessing the genomic information of unculturable oceanic picoeukaryotes by combining multiple single cells. *Sci Rep.* 2017;7:41498

Beam JP, Jay ZJ, Schmid MC, et al. Ecophysiology of an uncultivated lineage of Aigarchaeota from an oxic, hot spring filamentous 'streamer' community. *ISME J.* 2016;10:210-224

Cottinet D, Condamine F, Bremond N, et al. Lineage Tracking for Probing Heritable Phenotypes at Single-Cell Resolution. *PLoS One.* 2016;11:e0152395

Mwirichia R, Alam I, Rashid M, et al. Metabolic traits of an uncultured archaeal lineage--MSBL1--from brine pools of the Red Sea. *Sci Rep*. 2016;6:19181

Ngugi DK, Blom J, Stepanauskas R and Stingl U. Diversification and niche adaptations of Nitrospina-like bacteria in the polyextreme interfaces of Red Sea brines. *ISME J*. 2016;10:1383-1399

Gavelis GS, White RA, Suttle CA, Keeling PJ and Leander BS. Single-cell transcriptomics using spliced leader PCR: Evidence for multiple losses of photosynthesis in polykrikoid dinoflagellates. *BMC Genomics*. 2015;16:528

Nobu MK, Narihiro T, Rinke C, et al. Microbial dark matter ecogenomics reveals complex synergistic networks in a methanogenic bioreactor. *ISME J*. 2015;9:1710-1722

Youssef NH, Rinke C, Stepanauskas R, Farag I, Woyke T and Elshahed MS. Insights into the metabolism, lifestyle and putative evolutionary history of the novel archaeal phylum 'Diapherotrites'. *ISME J*. 2015;9:447-460

植物生物学

虽然转录组提高了我们对植物发育的理解，但单细胞转录组尚未在植物中广泛应用。^{166,167} 单细胞测序法可进一步大大提高我们对植物生物学的理解。^{168,169} 但是，植物细胞封闭在坚硬的细胞壁基质内，分离单个植物细胞在技术上仍有困难。在拟南芥中，大量技术已用于分离单个细胞，包括原生质体化以去除植物细胞壁随后进行FACS，^{170,171} 以及细胞壁消化随后进行玻片微小取量。¹⁷² 在玉米仁中，LCM 代谢区的RNA-Seq 已揭示了植物内胚乳细胞分化的细节，¹⁷³ 而单个玉米小的孢子 WGS 提高了我们对植物减数分裂重组的理解。¹⁷⁴ 虽然仍存在技术困难，scRNA-Seq 法将彻底改变我们有关植物生物学的知识。¹⁷⁵

“单细胞植物系统生物学的持续应用可能会改变我们对植物中不同细胞类型的关系、发育和进化的观点。” —Libault 等, 2017 年



单细胞分析将可更好的评估植物干细胞、植物细胞可塑性和局部细胞对环境变化应答的本质。

166. Brady SM, Orlando DA, Lee JY, et al. A high-resolution root spatiotemporal map reveals dominant expression patterns. *Science*. 2007;318:801-806
167. Birnbaum K, Shasha DE, Wang JY, et al. A gene expression map of the Arabidopsis root. *Science*. 2003;302:1956-1960
167. Efroni I and Birnbaum KD. The potential of single-cell profiling in plants. *Genome Biol*. 2016;17:65
169. Giacomello S, Salmen F, Terebieniec BK, et al. Spatially resolved transcriptome profiling in model plant species. *Nat Plants*. 2017;3:17061
170. Birnbaum K, Jung JW, Wang JY, et al. Cell type-specific expression profiling in plants via cell sorting of protoplasts from fluorescent reporter lines. *Nat Methods*. 2005;2:615-619
171. Adrian J, Chang J, Ballenger CE, et al. Transcriptome dynamics of the stomatal lineage: birth, amplification, and termination of a self-renewing population. *Dev Cell*. 2015;33:107-118
172. Efroni I, Ip PL, Nawy T, Mello A and Birnbaum KD. Quantification of cell identity from single-cell gene expression profiles. *Genome Biol*. 2015;16:9
173. Zhan J, Thakare D, Ma C, et al. RNA sequencing of laser-capture microdissected compartments of the maize kernel identifies regulatory modules associated with endosperm cell differentiation. *Plant Cell*. 2015;27:513-531
174. Li X, Li L and Yan J. Dissecting meiotic recombination based on tetrad analysis by single-microspore sequencing in maize. *Nat Commun*. 2015;6:6648
175. Efroni I, Ip PL, Nawy T, Mello A and Birnbaum KD. Quantification of cell identity from single-cell gene expression profiles. *Genome Biol*. 2015;16:9

综述

Libault M, Pingault L, Zogli P and Schiefelbein J. Plant Systems Biology at the Single-Cell Level. *Trends Plant Sci.* 2017;22:949-960

Efroni I and Birnbaum KD. The potential of single-cell profiling in plants. *Genome Biol.* 2016;17:65

参考文献

[Giacomello S, Salmen F, Terebieniec BK, et al. Spatially resolved transcriptome profiling in model plant species. *Nat Plants.* 2017;3:17061](#)

与哺乳动物系统类似，植物功能生物学由在不同组织中差异调控的具有空间朝向的基因表达程序驱动。利用单个植物细胞的单细胞 RNA-Seq 解析基因表达的空间组织是可行的，并已通过利用植物组织的激光捕获显微解剖 (LCM, 见下文) 和 FACS 得以实现。在本研究中，作者展示了产生植物空间转录组数据的新方法。他们将拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 组织冷冻切片在条形码标记的芯片上进行了成像，该芯片含有位点特异性条码，与寡聚 (dT) 寡核苷酸偶联。合成 cDNA 后，他们使用 NextSeq 系统鉴定了每个芯片位点内的基因表达。通过整合空间信息和基因表达数据，作者鉴定了拟南芥 8 个组织区域的基因表达差异。

illumina 的技术: NextSeq 系统

[Adrian J, Chang J, Ballenger CE, Bargmann BO, Alassimone J, et al. Transcriptome dynamics of the stomatal lineage: birth, amplification, and termination of a self-renewing population. *Dev Cell.* 2015;33:107-118](#)

植物气孔便于植物与大气进行气体交换。在拟南芥中，气孔的产生和方式来自可解析成中间步骤的分散谱系。尽管 RNase L 具有生物学显著性，但此酶切割的 RNA 尚未清楚地确定。在本研究中，作者使用 illumina 测序揭示宿主和病毒 RNA 中 RNase L 分裂位点的频率和位置。方法使用经 RNase L 和 RNase A 分裂的病毒 RNA，以及来自感染和未感染 HeLa 细胞系的 RNA 进行优化并验证。作者确定了受 RNase L 和其他单链特定核糖核酸内切酶作用的散在基因组区域。监测宿主和病毒 RNA 中 RNase L 内分裂位点的频率和位置揭示了这些酶如何对健康和疾病产生影响。

illumina 的技术: TruSeq SBS Kit v3-HS、HiSeq 2000 系统



玉米仁。

Li X, Li L and Yan J. Dissecting meiotic recombination based on tetrad analysis by single-microspore sequencing in maize. *Nat Commun.* 2015;6:6648

减数分裂重组通过等位基因组合，形成自然选择的底物，并改进真核生物基因组，在遗传多样性上发挥着重要作用。玉米已成功用作重组变异分解的遗传模型，但由于难以测序单个植物细胞和配子，在核苷酸水平分辨率下了解单个减数分裂事件在以前是不可能的。在本研究中，作者研发了一种方法，用于分离和 WGS 单个玉米四分体的四个小孢子。研究使用 HiSeq 2000 系统测序 96 个单独小孢子，确定了 600,000 个高质量 SNPs，进而可以非常高的分辨率鉴定重组模式。其高分辨率重组图谱揭示交换更易在基因而非基因间区域发生；此外，交换在注释基因的 5'-和 3'-端区域尤其常见。

Illumina 的技术：TruSeq DNA Sample Preparation Kit、HiSeq 2000 系统

Zhan J, Thakare D, Ma C, Lloyd A, Nixon NM, et al. RNA sequencing of laser-capture microdissected compartments of the maize kernel identifies regulatory modules associated with endosperm cell differentiation. *Plant Cell.* 2015;27:513-531

谷类内胚乳是全球范围内食品、饲料和原料的主要来源，但是内胚乳细胞分化的基因控制尚不清楚。在本研究中，作者将激光捕获显微解剖 (LCM) 和 Illumina 测序结合起来，以分析玉米 (五蜀黍) 仁的分化中内胚乳的五种主要细胞类型和四个代谢区的 mRNA。研究确定了在各个代谢区专门累积的 mRNA 以及在一个或多个代谢区优势表达的基因。研究结果表明 MRP-1 转录因子可激活基底内胚乳转移层内的基因调控网络。这些数据提供玉米仁代谢区的高分辨率基因活动图集。研究还揭示了与主要内胚乳细胞类型分化相关的调控分子。

Illumina 的技术：TruSeq DNA Sample Preparation Kit、HiSeq 2000 系统

Efroni I, Ip PL, Naway T, Mello A and Birnbaum KD. Quantification of cell identity from single-cell gene expression profiles. *Genome Biol.* 2015;16:9

Ranjan A, Townsley BT, Ichihashi Y, Sinha NR and Chitwood DH. An intracellular transcriptomic atlas of the giant coenocyte *Caulerpa taxifolia*. *PLoS Genet.* 2015;11:e1004900

法医学

NGS 已彻底改变了现代法医学的许多领域，包括短串联重复序列 (STR) 分析、单卵双生辨别、Y 染色体分析、线粒体全基因组研究、年龄估测、死亡原因确定、体液鉴定、取证微生物分析、物种鉴定和世系推理。^{176,177} 单细胞取证分析首次报告于 1997 年，当时 van Oorschot 等对 226 个显微操作分离的单个颊黏膜细胞执行了 STR 分析。¹⁷⁸ 单细胞测序法适用于由于生物材料极少量而受阻的犯罪调查。在性侵犯罪中，精子细胞可降解或可被受害者的上皮细胞污染，但是单个精子细胞的 mtDNA 分型可解决该问题。^{179,180} 单细胞 mtDNA 分析也已应用于其他人组织¹⁸¹ 和血液的单个细胞。^{182,183}



单细胞测序技术可帮助由于生物材料极少量而使证据的取证分析受阻的犯罪调查。

综述

Naue J, Hoefsloot HCJ, Kloosterman AD and Verschure PJ. Forensic DNA methylation profiling from minimal traces: How low can we go? *Forensic Sci Int Genet.* 2017;33:17-23

Yao YG, Kajigaya S and Young NS. Mitochondrial DNA mutations in single human blood cells. *Mutat Res.* 2015;779:68-77

Yang Y, Xie B and Yan J. Application of next-generation sequencing technology in forensic science. *Genomics Proteomics Bioinformatics.* 2014;12:190-197

参考文献

Jayaprakash AD, Benson EK, Gone S, et al. Stable heteroplasmy at the single-cell level is facilitated by intercellular exchange of mtDNA. *Nucleic Acids Res.* 2015;43:2177-2187

除细胞核基因组以外，真核细胞还携带有线粒体基因组，而 mtDNA 分析是法医鉴定法的有效工具。¹⁸⁴ 异质性（细胞中存在多个 mtDNA 单倍型）可在有重要意义的案例中增加 DNA 证据的强度。但是，由于 mtDNA 占细胞总 DNA 的 1% 以下，鉴定 mtDNA 多样性富有挑战性。在本研究中，作者研发了 Mseek，一种纯化并测序 mtDNA 的方法。研究使用 MiSeq 系统对来自人 PBMC 的 mtDNA 测序，以表明异质性在经过多次细胞分裂后在单个子细胞中保持稳定。

illumina 的技术：MiSeq 系统

176. Yang Y, Xie B and Yan J. Application of next-generation sequencing technology in forensic science. *Genomics Proteomics Bioinformatics.* 2014;12:190-197
177. Vidaki A, Daniel B and Court DS. Forensic DNA methylation profiling—potential opportunities and challenges. *Forensic Sci Int Genet.* 2013;7:499-507
178. van Oorschot RA and Jones MK. DNA fingerprints from fingerprints. *Nature.* 1997;387:767
179. Pereira J, Neves R, Forat S, Huckenbeck W and Olek K. MtDNA typing of single-sperm cells isolated by micromanipulation. *Forensic Sci Int Genet.* 2012;6:228-235
180. Lu S, Zong C, Fan W, et al. Probing meiotic recombination and aneuploidy of single sperm cells by whole-genome sequencing. *Science.* 2012;338:1627-1630
181. Nekhaeva E, Bodyak ND, Kravtsov Y, et al. Clonally expanded mtDNA point mutations are abundant in individual cells of human tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99:5521-5526
182. Yao YG, Kajigaya S, Samsel L, McCoy JP, Jr., Torelli G and Young NS. Apparent mtDNA sequence heterogeneity in single human blood CD34+ cells is markedly affected by storage and transport. *Mutat Res.* 2013;751-752:36-41
183. Yao YG, Kajigaya S and Young NS. Mitochondrial DNA mutations in single human blood cells. *Mutat Res.* 2015;779:68-77
184. Just RS, Irwin JA and Parson W. Mitochondrial DNA heteroplasmy in the emerging field of massively parallel sequencing. *Forensic Sci Int Genet.* 2015;18:131-139

Hanson E, Haas C, Jucker R and Ballantyne J. Specific and sensitive mRNA biomarkers for the identification of skin in 'touch DNA' evidence. *Forensic Sci Int Genet.* 2012;6:548-558

法医学案例工作经常关注犯罪现场留下的微量或痕量生物材料。来自这些样本的法医学图谱通过“触碰 DNA”证据阐述，可理解为通过物理接触从皮肤细胞转移到物体的 DNA。在本研究中，作者使用 Genome Analyzer_{IIx} 从大量人组织以及来自少量细胞的极少量 RNA (5–25 pg) 中获得转录组数据。通过比较各个样本的表达数据，研究确定了 5 种可在几乎所有触碰 DNA 样本中检测到的个人皮肤高度特性 mRNA 标记。

illumina 的技术: GAI, 系统

Geng T and Mathies RA. Minimizing inhibition of PCR-STR typing using digital agarose droplet microfluidics. *Forensic Sci Int Genet.* 2015;14:203-209

Pereira J, Neves R, Forat S, Huckenbeck W and Olek K. MtDNA typing of single-sperm cells isolated by micromanipulation. *Forensic Sci Int Genet.* 2012;6:228-235

185. Eckersley-Maslin MA and Spector DL. Random monoallelic expression: regulating gene expression one allele at a time. *Trends Genet.* 2014;30:237-244
186. Gendrel AV, Attia M, Chen CJ, et al. Developmental dynamics and disease potential of random monoallelic gene expression. *Dev Cell.* 2014;28:366-380
187. Saliba AE, Westermann AJ, Gorski SA and Vogel J. Single-cell RNA-seq: advances and future challenges. *Nucleic Acids Res.* 2014;42:8845-8860
188. Eckersley-Maslin M. A., Thybert D., Bergmann J. H., Marioni J. C., Flicek P., et al. (2014) Random monoallelic gene expression increases upon embryonic stem cell differentiation. *Dev Cell.* 28: 351-365

等位基因 – 特定基因表达

二倍体生物有两组染色体，从每个亲本各获得一组。基因可从一个等位基因（单等位基因表达）或从两个等位基因（双等位基因表达）转录。虽然群体测序提供基因表达的整体描述，但罕见异构体的表达水平可能会丢失。单细胞测序法可检测这些罕见异构体，以及单等位基因和双等位基因之间的变化。

与已建立的方法相比（如 RNA 荧光原位杂交 (FISH)、RNA 测序、PCR 和活细胞成像），单细胞 RNA 测序可提供对群体内单个细胞中单等位基因或双等位基因的最准确描述。¹⁸⁵ 将 RNA 表达数据与 SNP 数据结合起来可确定导致优势等位基因表达或沉默的特定 SNP。此外，该方法可阐明这些基因在癌症或组织特异性分化中的作用。^{186,187}



有丝分裂细胞累积了可在决定随机单等位基因表达中发挥作用的 SNP。¹⁸⁸

综述

Benitez JA, Cheng S and Deng Q. Revealing allele-specific gene expression by single-cell transcriptomics. *Int J Biochem Cell Biol.* 2017;90:155-160

Gawad C, Koh W and Quake SR. Single-cell genome sequencing: current state of the science. *Nat Rev Genet.* 2016;17:175-188

Grun D and van Oudenaarden A. Design and Analysis of Single-Cell Sequencing Experiments. *Cell.* 2015;163:799-810

Huang L, Ma F, Chapman A, Lu S and Xie XS. Single-Cell Whole-Genome Amplification and Sequencing: Methodology and Applications. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2015;16:79-102

Kolodziejczyk AA, Kim JK, Svensson V, Marioni JC and Teichmann SA. The technology and biology of single-cell RNA sequencing. *Mol Cell.* 2015;58:610-620

参考文献

Borel C, Ferreira PG, Santoni F, et al. Biased allelic expression in human primary fibroblast single cells. *Am J Hum Genet.* 2015;96:70-80

哺乳动物细胞中含有两个可发生基因转录的等位基因，mRNA 是从一个还是两个等位基因活跃转录而来是大量研究的主题。在本研究中，作者使用 HiSeq 2000 系统对 203 个单独的人原代成纤维细胞执行 RNA-Seq，以确定等位基因特异性表达水平。研究数据显示，对于一个细胞中的大多数基因，转录仅来自一个或两个等位基因。此外，在给定的细胞中基因表达两个等位基因非常罕见，其等位基因特异性表达与细胞转录水平相关。

Illumina 的技术：Nextera XT DNA Kit、TruSeq RNA Kit、TruSeq DNA Kit、HiSeq 2000 系统

Zhang CZ, Adalsteinsson VA, Francis J, et al. Calibrating genomic and allelic coverage bias in single-cell sequencing. *Nat Commun.* 2015;6:6822

在单细胞 DNA-Seq 中，某些必要的 DNA 扩增法会引入序列杂峰，如 MDA 和多次退火环状循环扩增技术 (MALBAC)。在本研究中，作者研发了一种新的统计方法，用于定量评估由于 WGA 产生的单细胞 DNA 扩增偏差。通过比较 MDA 和 MALBAC DNA 文库，研究提供由 MDA 和 MALBAC 生成的单细胞文库的基准比较，并还确定了扩增水平下基因组范围偏差的普遍特征。该研究的统计模型可校正单细胞 WGA 数据中的等位基因偏差。

Illumina 的技术：MiSeq 和 HiSeq 2500 系统

Soto M, Raaijmakers JA, Bakker B, et al. p53 Prohibits Propagation of Chromosome Segregation Errors that Produce Structural Aneuploidies. *Cell Rep.* 2017;19:2423-2431

Kim JK, Kolodziejczyk AA, Illicic T, Teichmann SA and Marioni JC. Characterizing noise structure in single-cell RNA-seq distinguishes genuine from technical stochastic allelic expression. *Nat Commun.* 2015;6:8687

样本制备

分离单个细胞是单细胞测序工作流程的第一步，可通过多种技术实现。^{189,190} 除现有的成熟技术（包括 FACS、连续稀释、微量吸取和 LCM）以外，微流体和基于液滴的技术增加了单细胞测序工作流程的通量，在单细胞数据分析中有更高的精确度和特异性。^{191,192,193} 本节着重介绍一些用于从混悬液或组织分离单细胞的技术（表 1）。



单细胞从离解组织分离出来并直接分选到 96 孔板中用于分析。

-
189. Saliba AE, Westermann AJ, Gorski SA and Vogel J. Single-cell RNA-seq: advances and future challenges. *Nucleic Acids Res.* 2014;42:8845-8860
 190. Wang Y and Navin NE. Advances and applications of single-cell sequencing technologies. *Mol Cell.* 2015;58:598-609
 191. Yu P and Lin W. Single-cell Transcriptome Study as Big Data. *Genomics Proteomics Bioinformatics.* 2016;14:21-30
 192. Gawad C, Koh W and Quake SR. Single-cell genome sequencing: current state of the science. *Nat Rev Genet.* 2016;17:175-188
 193. Huang L, Ma F, Chapman A, Lu S and Xie XS. Single-Cell Whole-Genome Amplification and Sequencing: Methodology and Applications. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2015;16: 79-102
-

表 1. 单细胞分离的方法

方法	描述	优势 ^{169, 170}	缺点 ^{169, 170}	成本 ¹⁷⁰
FACS ¹⁹⁴	使用电荷分离的带有单细胞的微滴	<ul style="list-style-type: none"> 细胞表面标记的特异性免疫标志提高了准确性 高通量 	<ul style="list-style-type: none"> 需要特异性抗体 / 标记 设备昂贵 	\$\$
连续稀释	连续稀释至每孔一个细胞	<ul style="list-style-type: none"> 方法简单 	<ul style="list-style-type: none"> 分离多个细胞的能力不足 	\$
口吸移液	使用玻璃移液管分离单个细胞	<ul style="list-style-type: none"> 简单方法 	<ul style="list-style-type: none"> 技术上困难 	\$
自动显微操作	自动微量移液管分离单个细胞	<ul style="list-style-type: none"> 高精度 	<ul style="list-style-type: none"> 低通量 	\$\$\$
微流体平台 ¹⁹⁵	微流体芯片分离流动槽中的细胞	<ul style="list-style-type: none"> 从小体积样本中分离细胞 高通量 	<ul style="list-style-type: none"> 要求细胞大小一致 昂贵耗材 	\$\$\$
光学镊 ¹⁹⁶	离解的细胞悬液	<ul style="list-style-type: none"> 细胞分离集中可控 利用荧光标记细胞 	<ul style="list-style-type: none"> 技术困难 长期激光照射可损伤细胞 	\$\$\$
单核 ¹⁹⁷	从组织匀浆分离细胞核并通过 FACS 分选	<ul style="list-style-type: none"> 柔和处理避免了基因表达杂峰 高通量 	<ul style="list-style-type: none"> 无法检测出细胞质转录本和小型 RNA 	\$\$
纳米过滤 ¹⁹⁸	过滤器上的尺寸排阻过滤	<ul style="list-style-type: none"> 通过大小选择细胞 	<ul style="list-style-type: none"> 细胞可粘附到过滤器上 	\$
Mag Sweeper ¹⁹⁹	带 EpCAM 抗体的旋转磁铁	<ul style="list-style-type: none"> 可富集罕见细胞 	<ul style="list-style-type: none"> 需要标记才可分离 	\$\$
显微操作 ²⁰⁰	离解的细胞悬液	<ul style="list-style-type: none"> 可从混合群体中分离多种细胞类型 	<ul style="list-style-type: none"> 低通量 需要较大的起始量 	\$
TIVA ²⁰¹	活的单细胞中的光激活 mRNA 捕获分子	<ul style="list-style-type: none"> 可兼容活组织, 保留单细胞微环境 非侵入性 	<ul style="list-style-type: none"> 低通量 	\$\$\$
CellSearch ²⁰²	含抗体偶联纳米粒的磁铁	<ul style="list-style-type: none"> 高通量 	<ul style="list-style-type: none"> 对分离标记存在偏向性 	\$\$\$
CellCelector ²⁰³	自动毛细管显微操作器	<ul style="list-style-type: none"> 高通量 	<ul style="list-style-type: none"> 昂贵 	\$\$\$
DEP-Array ²⁰⁴	带电介质架的微芯片	<ul style="list-style-type: none"> 高灵敏度, 可分离罕见细胞 	<ul style="list-style-type: none"> 低通量 耗时 	\$\$\$\$
LCM ²⁰⁵	在显微镜下通过激光从组织切片上切取细胞	<ul style="list-style-type: none"> 可保留空间信息 	<ul style="list-style-type: none"> 技术困难 对 RNA/DNA 有潜在的 UV 损伤 	\$\$\$

194. Vermeulen L, Todaro M, de Sousa Mello F, et al. Single-cell cloning of colon cancer stem cells reveals a multi-lineage differentiation capacity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105:13427-13432

195. Hsiao AP, Barbee KD and Huang X. Microfluidic Device for Capture and Isolation of Single Cells. *Proceedings of SPIE--the International Society for Optical Engineering*. 2010;7759:77590W_77591

196. Yoshimoto N, Kida A, Jie X, et al. An automated system for high-throughput single cell-based breeding. *Sci Rep*. 2013;3:1191

197. Krishnaswami SR, Grindberg RV, Novotny M, et al. Using single nuclei for RNA-seq to capture the transcriptome of postmortem neurons. *Nat Protoc*. 2016;11:499-524

198. Adams DL, Martin SS, Alpaugh RK, et al. Circulating giant macrophages as a potential biomarker of solid tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111:3514-3519

199. Powell AA, Talasz AH, Zhang H, et al. Single cell profiling of circulating tumor cells: transcriptional heterogeneity and diversity from breast cancer cell lines. *PLoS One*. 2012;7:e33788

200. Kuppers R, Zhao M, Hansmann ML and Rajewsky K. Tracing B cell development in human germinal centres by molecular analysis of single cells picked from histological sections. *EMBO J*. 1993;12:4955-4967

201. Lovatt D, Ruble BK, Lee J, et al. Transcriptome in vivo analysis (TIVA) of spatially defined single cells in live tissue. *Nat Methods*. 2014;11:190-196

202. Yu M, Stott S, Toner M, Maheswaran S and Haber DA. Circulating tumor cells: approaches to isolation and characterization. *J Cell Biol*. 2011;192:373-382

203. Choi JH, Ogunniyi AO, Du M, et al. Development and optimization of a process for automated recovery of single cells identified by microengraving. *Biotechnol Prog*. 2010;26:888-895

204. Altomare L, Borgatti M, Medoro G, et al. Levitation and movement of human tumor cells using a printed circuit board device based on software-controlled dielectrophoresis. *Biotechnol Bioeng*. 2003;82:474-479

205. Suarez-Quian CA, Goldstein SR, Pohida T, et al. Laser capture microdissection of single cells from complex tissues. *Biotechniques*. 1999;26:328-335

综述

Gawad C, Koh W and Quake SR. Single-cell genome sequencing: current state of the science. *Nat Rev Genet.* 2016;17:175-188

Liu S and Trapnell C. Single-cell transcriptome sequencing: recent advances and remaining challenges [version 1; referees: 2 approved]. *F1000Research.* 2016;5(F1000 Faculty Review):182

Grun D and van Oudenaarden A. Design and Analysis of Single-Cell Sequencing Experiments. *Cell.* 2015;163:799-810

Huang L, Ma F, Chapman A, Lu S and Xie XS. Single-Cell Whole-Genome Amplification and Sequencing: Methodology and Applications. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2015;16:79-102

Kanter I and Kalisky T. Single cell transcriptomics: methods and applications. *Front Oncol.* 2015;5:53

Kolodziejczyk AA, Kim JK, Svensson V, Marioni JC and Teichmann SA. The technology and biology of single-cell RNA sequencing. *Mol Cell.* 2015;58:610-620

Stegle O, Teichmann SA and Marioni JC. Computational and analytical challenges in single-cell transcriptomics. *Nat Rev Genet.* 2015;16:133-145

Wang Y and Navin NE. Advances and applications of single-cell sequencing technologies. *Mol Cell.* 2015;58:598-609

参考文献

[Binan L, Mazzaferri J, Choquet K, et al. Live single-cell laser tag. *Nat Commun.* 2016;7:11636](#)

由于单细胞测序法通常会导致细胞裂解和空间信息丢失，因此找到可在单细胞基因组分析中保留空间信息的方法及其重要。作者研发了一种通过光致漂白的细胞标记 (CLaP) 法，将细胞标记与单细胞基因组结合起来。培养中的单个细胞通过激光光致漂白标记，然后基于大量不同特性分离。在本研究中，作者使用 CLaP 标记大量单层生长细胞系的不同细胞。研究使用基于液滴的微流体分离单个细胞，并使用 HiSeq 2500 系统执行 RNA-Seq。将空间信息与单细胞基因组结合起来的能力使得该方法很好的适用于研究组织异质性。

illumina 的技术：Nextera XT DNA Sample Preparation Kit、HiSeq 2500 系统

[Cottinet D, Condamine F, Bremond N, Griffiths AD, Rainey PB, et al. Lineage Tracking for Probing Heritable Phenotypes at Single-Cell Resolution. *PLoS One.* 2016;11:e0152395](#)

确定单个微生物细胞的基因型和表型在了解微生物进化中至关重要。单细胞测序技术（包括 WGS），当前可以高分辨率检测突变。但是，缺乏类似的表型分析方法。在本研究中，作者呈现了一种基于液滴的微流体系统，可在进化中的菌群中进行可遗传表型的遗传检测。在各种时间点间隔，研究采样细胞并在 100 nL 液滴中将其分离出来，随后使用荧光蛋白报告基因监测生长。作者使用该方法在 30 天的饥饿期间追踪大肠杆菌菌群。数据显示大肠杆菌的表型多样性随饥饿升高，而单细胞测序可确定每个表型类的相应突变。

illumina 的技术：HiSeq 2500 系统

[Bigdeli S, Dettloff RO, Frank CW, Davis RW and Crosby LD. A simple method for encapsulating single cells in alginate microspheres allows for direct PCR and whole genome amplification. *PLoS One.* 2015;10:e0117738](#)

FACS 后进行 MDA，是当前单细胞样本处理的标准。由于高通量液体处理的试剂、耗材和设备成本升高，在单个孔中处理细胞可增加单细胞测序的成本。为降低平行单细胞测序的成本，作者研发了一种分离单细胞并大量制备 DNA 文库、随后分选的方法。研究将类球红细菌细胞包被到海藻酸盐微球中进行 MDA。研究将 DNA 从单个微球中提取出来，并使用 MiSeq 系统进行测序。该方法可改进从许多单个分离的细胞生成测序用 DNA 的流程。

illumina 的技术：MiSeq 系统

Bose S, Wan Z, Carr A, et al. Scalable microfluidics for single-cell RNA printing and sequencing. *Genome Biol.* 2015;16:120

在本研究中，作者展示了一种全新的可扩展的高密度微流体平台，可在玻璃盖玻片或多聚物微珠上固相捕获 RNA。研究将单细胞裂解产物吸入密封的皮升微孔中，这些微孔可在玻璃上复印 RNA 或在小球上捕获 RNA。研究将该样本制备方法与基于 CEL-Seq 的可扩展的 scRNA-Seq 技术结合起来。该技术相对便宜，耗材成本为每个细胞 \$0.10-\$0.20，并可平行处理数百个单独细胞。

illumina 的技术：TruSeq RNA-Seq Library Preparation Kit、NextSeq 500 和 HiSeq 2500 系统

Lee JH, Daugharthy ER, Scheiman J, et al. Fluorescent in situ sequencing (FISSEQ) of RNA for gene expression profiling in intact cells and tissues. *Nat Protoc.* 2015;10:442-458

scRNA-Seq 可分析整个细胞转录组的基因表达，但细胞分离通常会导致空间信息的丢失。原位杂交是确定基因标的位置的极佳技术，但限于固定数量的基因。在本研究中，作者展示了一种对细胞和组织中的基因表达进行原位分析的实验方案。此方法中，在共聚焦显微镜下，将 RNA 人工转化为交联的 cDNA 扩增子并测序。该方法添加了看家 / 结构基因环境特异性转录产物富集的益处，同时保留了转录位置的组织结构。

illumina 的技术：Nextera XT DNA Sample Preparation Kit、MiSeq 系统

Nishikawa Y, Hosokawa M, Maruyama T, Yamagishi K, Mori T and Takeyama H. Monodisperse Picoliter Droplets for Low-Bias and Contamination-Free Reactions in Single-Cell Whole Genome Amplification. *PLoS One.* 2015;10:e0138733

WGA 是单细胞测序流程的关键组成部分，而 MDA 是单细胞测序中最常用的 WGA 方法。尽管使用广泛，由于扩展偏差和 DNA 嵌合体的形成，MDA 通常产生不均匀的基因组覆盖。为克服该限制，作者研发了液滴 MDA，将这些技术杂峰降低到最低。研究使用微流体将提取的 DNA 片段分离到 67 pL 液滴中，而单个片段则随后使用 MDA 进行扩增。该方法通过测序大肠杆菌细胞的液滴 MDA 产物进行了验证，与使用传统 MDA 59% 的回收率相比，基因组回收率提高至 89%。

illumina 的技术：Nextera XT DNA Sample Preparation Kit、MiSeq 系统

Gierahn TM, Wadsworth MH, 2nd, Hughes TK, et al. Seq-Well: portable, low-cost RNA sequencing of single cells at high throughput. *Nat Methods.* 2017;14:395-398

Zhang Q, Wang T, Zhou Q, et al. Development of a facile droplet-based single-cell isolation platform for cultivation and genomic analysis in microorganisms. *Sci Rep.* 2017;7:411192

Mora-Castilla S, To C, Vaezeslami S, et al. Miniaturization Technologies for Efficient Single-Cell Library Preparation for Next-Generation Sequencing. *J Lab Autom.* 2016;21:557-567

Ungai-Salanki R, Gerecsei T, Furjes P, et al. Automated single cell isolation from suspension with computer vision. *Sci Rep.* 2016;6:20375

Xin Y, Kim J, Ni M, et al. Use of the Fluidigm C1 platform for RNA sequencing of single mouse pancreatic islet cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016;113:3293-3298

Campton DE, Ramirez AB, Nordberg JJ, et al. High-recovery visual identification and single-cell retrieval of circulating tumor cells for genomic analysis using a dual-technology platform integrated with automated immunofluorescence staining. *BMC Cancer.* 2015;15:360

Zsulwach KE, Chen P, Wang X, et al. Single-Cell Genetic Analysis Using Automated Microfluidics to Resolve Somatic Mosaicism. *PLoS One.* 2015;10:e0135007

数据分析

单细胞测序带来数据分析的独特挑战单个哺乳动物细胞包含 50,000–300,000 个转录本，且各个细胞间的基因表达值存在显著差异。²⁰⁶ 虽然每个单个细胞可表达数十万个转录本，但高达 85% 的转录本仅有 1–100 个拷贝。²⁰⁷ 因此，在 scRNA-Seq 中捕获低丰度 mRNA 转录本并扩增合成的 cDNA 以确保所有转录本最终在文库中均匀呈现至关重要。^{208,209} 已知丰度的外参定量标准可帮助区分具有生物学意义的基因表达改变导致的技术变异性 / 噪声。²¹⁰ 分子索引也可校正测序偏差，^{211,212} 而近期对自动样本处理的改进可进一步降低技术变异性。²¹³

“单细胞分析为生物信息学提供了新方法，因为大量细胞数据分析法可能不能直接应用于单细胞数据。” —Yalcin 等, 2016 年

DNA 扩增和单细胞 DNA-Seq 技术的杂峰可通过使用专为此目的设计的计算算法来减少。²¹⁴ 本节着重描述一些单细胞测序数据分析方法（表 2）。

表 2. 单细胞测序数据分析方法总结

名称	算法	数据	描述
Daley 和 Smith ²¹⁵	覆盖度	DNA-Seq	使用 Bayes Poisson 模型估计覆盖增益，测序深度从最初的浅测序升高。
Varbin ²¹⁶	CNV	DNA-Seq	使用可变的面元大小检出 CNV。
SNS ²¹⁷	CNV	DNA-Seq	使用可变的面元大小检出拷贝数。
Xu 等 ²¹⁸	CNV	DNA-Seq	使用简化的负二项分布检出 CNV。
siCHILD ²¹⁹	单倍型和 CNV	DNA-Seq	通过 haplarithmisis 确定单细胞全基因组的单倍型、CNV 和隔离起源单倍型。
Velvet-SC ²²⁰	组装	DNA-Seq	通过使用带动态阈值的 de Bruijn 图寻找低覆盖度区域。
SPAdes ²²¹	组装	DNA-Seq	单细胞和多细胞的单细胞组装器。
SmashCell ²²²	组装注释	DNA-Seq	使用分枝代表不同算法或参数选择的树图，多用于宏基因组学。
Kim 和 Simon ²²³	进化树	DNA-Seq	等位基因丢失、突变排序的贝叶斯方法、突变位点之间的时间关系的概似函数。
PyClone ²²⁴	克隆群体	DNA-Seq	在癌症中推论克隆群体结构的统计模型。
Subramanian 和 Schwartz ²²⁵	克隆群体	DNA-Seq	使用 k-mer 计数从单细胞测序数据中了解肿瘤进展的计算方法。

206. Wu AR, Neff NF, Kalisky T, et al. Quantitative assessment of single-cell RNA-sequencing methods. *Nat Methods*. 2014;11:41-46

207. Macaulay IC and Voet T. Single cell genomics: advances and future perspectives. *PLoS Genet*. 2014;10:e1004126

208. Bhargava V, Head SR, Ordoukhanian P, Mercola M and Subramaniam S. Technical variations in low-input RNA-seq methodologies. *Sci Rep*. 2014;4:3678

209. Grun D, Kester L and van Oudenaarden A. Validation of noise models for single-cell transcriptomics. *Nat Methods*. 2014;11:637-640

210. Marinov GK, Williams BA, McCue K, et al. From single-cell to cell-pool transcriptomes: stochasticity in gene expression and RNA splicing. *Genome Res*. 2014;24:496-510

211. Fu GK, Xu W, Wilhelmy J, et al. Molecular indexing enables quantitative targeted RNA sequencing and reveals poor efficiencies in standard library preparations. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111:1891-1896

212. Islam S, Zeisel A, Joost S, et al. Quantitative single-cell RNA-seq with unique molecular identifiers. *Nat Methods*. 2014;11:163-166

213. Streets AM, Zhang X, Cao C, et al. Microfluidic single-cell whole-transcriptome sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111:7048-7053

214. Yalcin D, Hakguder ZM and Otu HH. Bioinformatics approaches to single-cell analysis in developmental biology. *Mol Hum Reprod*. 2016;22:182-192

215. Daley T and Smith AD. Modeling genome coverage in single-cell sequencing. *Bioinformatics*. 2014;30:3159-3165

216. Baslan T, Kendall J, Rodgers L, et al. Genome-wide copy number analysis of single cells. *Nat Protoc*. 2012;7:1024-1041

217. Navin N, Kendall J, Troge J, et al. Tumour evolution inferred by single-cell sequencing. *Nature*. 2011;472:90-94

218. Xu B, Cai H, Zhang C, Yang X and Han G. Copy number variants calling for single cell sequencing data by multi-constrained optimization. *Comput Biol Chem*. 2016;

219. Zamani Esteki M, Dimitriadou E, Mateiu L, et al. Concurrent whole-genome haplotyping and copy-number profiling of single cells. *Am J Hum Genet*. 2015;96:894-912

220. Chitsaz H, Yee-Greenbaum JL, Tesler G, et al. Efficient de novo assembly of single-cell bacterial genomes from short-read data sets. *Nat Biotech*. 2011;29:915-921

221. Bankevich A, Nurk S, Antipov D, et al. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J Comput Biol*. 2012;19:455-477

222. Harrington ED, Arumugam M, Raes J, Bork P and Relman DA. SmashCell: a software framework for the analysis of single-cell amplified genome sequences. *Bioinformatics*. 2010;26:2979-2980

223. Kim KI and Simon R. Using single cell sequencing data to model the evolutionary history of a tumor. *BMC Bioinformatics*. 2014;15:27

224. Roth A, Khattra J, Yap D, et al. PyClone: statistical inference of clonal population structure in cancer. *Nat Methods*. 2014;11:396-398

225. Subramanian A and Schwartz R. Reference-free inference of tumor phylogenies from single-cell sequencing data. *BMC Genomics*. 2015;16 Suppl 11:S7

CheckM ²²⁶	基因组质量	DNA-Seq	使用参考基因组树中基因组推论谱系的特异性标记基因估计基因组完整度和污染。
Ji 等 ²²⁷	等位基因丢失	DNA-Seq	控制从单细胞扩增数据中检出的由于等位基因丢失产生的假阴性的方法。
GRM ²²⁸	归一化	RNA-Seq	用多项式伽玛回归模型拟合自外参的每百万条映射片段中每千个碱基的转录本所包含的片段 (FPKM) 数据。
SAMstr ²²⁹	归一化	RNA-Seq	利用内参对照归一化和估计每个细胞的转录本数量; 容忍测序深度中的变异。
BASiCS ²³⁰	鉴定变异基因	RNA-Seq	一种贝叶斯方法, 结合外参分子与目标细胞的基因建立模型。
Brennecke 等 ²³¹	鉴定变异基因	RNA-Seq	一种统计方法, 可使用户评估所观察到的基因变异是否提供了高生物学变异性的证据。
Kim 等 ²³²	鉴定变异基因	RNA-Seq	使用外参估计技术噪声相关参数, 考虑细胞间变异的差异。
scLVM ²³³	降噪	RNA-Seq	单细胞潜在变量模型可估计与隐藏因素相关的变异比例以鉴定亚群。
OEFinder ²³⁴	降噪	RNA-Seq	使用正交多项式回归在 Fluidigm C1 平台上鉴定特定位点表达杂峰显著升高的基因。
PCA/t-SNE ²³⁵	亚群 ID	RNA-Seq	用于无监管细胞簇的线性 / 非线性降维方法。
ZIFA ²³⁶	亚群 ID	RNA-Seq	针对丢失特性建模以改进模拟数据集和生物学数据集的降维方法。
Destiny ²³⁷	亚群 ID	RNA-Seq	延伸扩散映射以处理单细胞数据中的零值并解决采样数据的异质性问题。
SNN-Cliq ²³⁸	亚群 ID	RNA-Seq	使用基于共享最近邻相似性图形。图形分割自动鉴定细胞亚组。
RaceID ²³⁹	亚群 ID	RNA-Seq	两种技术噪声源: 随机抽样 (Poissonian) 噪声和由于测序效率特性产生的噪声。
SCUBA ²⁴⁰	亚群 ID	RNA-Seq	利用 k-均值沿二叉树对时间过程数据进行详细分枝事件聚类。
BackSPIN ²⁴¹	亚群 ID	RNA-Seq	一种基于将点分选到邻域中的分裂双向聚类法。
PAGODA ²⁴²	亚群 ID	RNA-Seq	基因集的主要成分分析 (PCA) 鉴定那些首次 PCA 显著超出基因组范围背景预期的基因集。
MAST ²⁴³	差异检测	RNA-Seq	两部分广义线性模型通过参数化随机丢失和双峰表达分布鉴定表达异质性。
SCDE ²⁴⁴	差异检测	RNA-Seq	单细胞差异表达对丢失使用独立模型, 并对差异表达使用贝叶斯模型。
scDD ²⁴⁵	差异检测	RNA-Seq	贝叶斯模型框架鉴定生物学条件下的表达, 且在不同条件下差异分布。
Monocle ²⁴⁶	伪时间排序	RNA-Seq	使用对降维独立成分分析, 并对细胞排序使用最小生成树。
Waterfall ²⁴⁷	伪时间排序	RNA-Seq	确定 RNA 测序测定的单个细胞表达谱时间顺序的聚类方法。

226. Parks DH, Imelfort M, Skennerton CT, Hugenholtz P and Tyson GW. CheckM: assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes. *Genome Res.* 2015;25:1043-1055

227. Ji C, Miao Z and He X. A simple strategy for reducing false negatives in calling variants from single-cell sequencing data. *PLoS One.* 2015;10:e0123789

228. Ding B, Zheng L, Zhu Y, et al. Normalization and noise reduction for single cell RNA-seq experiments. *Bioinformatics.* 2015;31:2225-2227

229. Katayama S, Tohonon V, Linnarsson S and Kere J. SAMstr: statistical test for differential expression in single-cell transcriptome with spike-in normalization. *Bioinformatics.* 2013;29:2943-2945

230. Vallejos CA, Marioni JC and Richardson S. BASiCS: Bayesian Analysis of Single-Cell Sequencing Data. *PLoS Comput Biol.* 2015;11:e1004333

231. Brennecke P, Anders S, Kim JK, et al. Accounting for technical noise in single-cell RNA-seq experiments. *Nat Methods.* 2013;10:1093-1095

232. Kim JK, Kolodziejczyk AA, Illicic T, Teichmann SA and Marioni JC. Characterizing noise structure in single-cell RNA-seq distinguishes genuine from technical stochastic allelic expression. *Nat Commun.* 2015;6:8687

233. Buettner F, Natarajan KN, Casale FP, et al. Computational analysis of cell-to-cell heterogeneity in single-cell RNA-sequencing data reveals hidden subpopulations of cells. *Nat Biotechnol.* 2015;33:155-160

234. Leng N, Choi J, Chu LF, Thomson JA, Kendziora C and Stewart R. OEFinder: a user interface to identify and visualize ordering effects in single-cell RNA-seq data. *Bioinformatics.* 2016;32:1408-1410

235. Van der Maaten L and Hinton G. Visualizing data using t-SNE. *J Mach Learn Res.* 2008;9:2579-2605

236. Pierson E and Yau C. ZIFA: Dimensionality reduction for zero-inflated single-cell gene expression analysis. *Genome Biol.* 2015;16:241

237. Haghverdi L, Buettner F and Theis FJ. Diffusion maps for high-dimensional single-cell analysis of differentiation data. *Bioinformatics.* 2015;31:2989-2998

238. Xu C and Su Z. Identification of cell types from single-cell transcriptomes using a novel clustering method. *Bioinformatics.* 2015;31:1974-1980

239. Grun D, Lyubimova A, Kester L, et al. Single-cell messenger RNA sequencing reveals rare intestinal cell types. *Nature.* 2015;525:251-255

240. Marco E, Karp RL, Guo G, et al. Bifurcation analysis of single-cell gene expression data reveals epigenetic landscape. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111:E5643-5650

241. Zeisel A, Munoz-Manchado AB, Codeluppi S, et al. Brain structure. Cell types in the mouse cortex and hippocampus revealed by single-cell RNA-seq. *Science.* 2015;347:1138-1142

242. Fan J, Salathia N, Liu R, et al. Characterizing transcriptional heterogeneity through pathway and gene set overdispersion analysis. *Nat Methods.* 2016;13:241-244

243. Finak G, McDavid A, Yajima M, et al. MAST: a flexible statistical framework for assessing transcriptional changes and characterizing heterogeneity in single-cell RNA sequencing data. *Genome Biol.* 2015;16:278

SinCell ²⁴⁸	伪时间排序	RNA-Seq	使用评估细胞间相似性的指标和图形构建算法从单细胞数据评估细胞状态分层的方法。
Oscope ²⁴⁹	伪时间排序	RNA-Seq	使用振荡子之间的共调控信息来确定假定振荡基因和每组样本的循环顺序。
Wanderlust ²⁵⁰	伪时间排序	RNA-Seq	一种基于图像的轨迹检测算法，基于细胞发育成熟度将其安排到统一轨迹。
Seurat ²⁵¹	细胞定位	RNA-Seq	一种计算机策略，通过将 scRNA-Seq 数据与原位 RNA 模式整合推断细胞定位。
Achim 等 ²⁵²	细胞定位	RNA-Seq	比较细胞的完整特异性加权 mRNA 图谱与源自基因表达图谱的位置基因表达谱。
VDJPuzzle ²⁵³	TCR 重建	RNA-Seq	重构来自单个抗原特异性 T 细胞的天然 TCR $\alpha\beta$ 并将其与单细胞基因表达谱相关联。

综述

Hardwick SA, Deveson IW and Mercer TR. Reference standards for next-generation sequencing. *Nat Rev Genet.* 2017;18:473-484

Bacher R and Kendziorski C. Design and computational analysis of single-cell RNA-sequencing experiments. *Genome Biol.* 2016;17:63

Liu S and Trapnell C. Single-cell transcriptome sequencing: recent advances and remaining challenges [version 1; referees: 2 approved]. F1000Research. 2016;5(F1000 Faculty Review):182

Yalcin D, Hakguder ZM and Otu HH. Bioinformatics approaches to single-cell analysis in developmental biology. *Mol Hum Reprod.* 2016;22:182-192

Yu P and Lin W. Single-cell Transcriptome Study as Big Data. *Genomics Proteomics Bioinformatics.* 2016;14:21-30

Grun D and van Oudenaarden A. Design and Analysis of Single-Cell Sequencing Experiments. *Cell.* 2015;163:799-810

Stegle O, Teichmann SA and Marioni JC. Computational and analytical challenges in single-cell transcriptomics. *Nat Rev Genet.* 2015;16:133-145

Woodhouse S, Moignard V, Gottgens B and Fisher J. Processing, visualising and reconstructing network models from single-cell data. *Immunol Cell Biol.* 2015;94:256-265

参考文献

[Dong X, Zhang L, Milholland B, et al. Accurate identification of single-nucleotide variants in whole-genome-amplified single cells. *Nat Methods.* 2017;14:491-493](#)

NGS 常用于检测组织基因组 DNA 中的 SNV，但是分析单细胞中的 SNV 易受到 WGA 相关杂峰的影响。为克服这一技术挑战，作者开发了单细胞多重置换扩增 (SCMDA) 以及相关的单细胞变异检出算法 SCaller。在本研究中，作者从成纤维细胞克隆中分离了未扩增的基因组 DNA。他们还从这些克隆中分离了单个细胞并使用 SCMDA 对单细胞基因组 DNA 进行了扩增。他们利用 HiSeq 2500 和 HiSeq X Ten 系统对经 SCMDA 扩增和未扩增的样本进行了全基因组测序，并使用 SCaller 对 SNV 进行了鉴定。通过比较来自单细胞和亲本克隆的 SNV，作者证实他们的程序能准确分析单细胞基因组中的 SNV。

Illumina 的技术：HiSeq 2500 和 HiSeq X Ten 系统

244. Kharchenko PV, Silberstein L and Scadden DT. Bayesian approach to single-cell differential expression analysis. *Nat Methods.* 2014;11:740-742
245. Korthauer KD, Chu L-F, Newton MA, et al. A statistical approach for identifying differential distributions in single-cell RNA-seq experiments. *Genome Biology.* 2016;17:222
246. Trapnell C, Cacchiarelli D, Grimsby J, et al. The dynamics and regulators of cell fate decisions are revealed by pseudotemporal ordering of single cells. *Nat Biotechnol.* 2014;32:381-386
247. Shin J, Berg DA, Zhu Y, et al. Single-Cell RNA-Seq with Waterfall Reveals Molecular Cascades underlying Adult Neurogenesis. *Cell Stem Cell.* 2015;17:360-372
248. Julia M, Telenti A and Rausell A. SinCell: an R/Bioconductor package for statistical assessment of cell-state hierarchies from single-cell RNA-seq. *Bioinformatics.* 2015;31:3380-3382
249. Leng N, Chu LF, Barry C, et al. Oscope identifies oscillatory genes in unsynchronized single-cell RNA-seq experiments. *Nat Methods.* 2015;12:947-950
250. Bendall SC, Davis KL, Amir el AD, et al. Single-cell trajectory detection uncovers progression and regulatory coordination in human B cell development. *Cell.* 2014;157:714-725
251. Satija R, Farrell JA, Gennert D, Schier AF and Regev A. Spatial reconstruction of single-cell gene expression data. *Nat Biotechnol.* 2015;33:495-502
252. Achim K, Pettit JB, Saraiva LR, et al. High-throughput spatial mapping of single-cell RNA-seq data to tissue of origin. *Nat Biotechnol.* 2015;33:503-509
253. Eltahla AA, Rizzetto S, Rasoli M, et al. Linking the T cell receptor to the single cell transcriptome in antigen-specific human T cells. *Immunol Cell Biol.* 2016;94:604-611

Mende DR, Aylward FO, Eppley JM, Nielsen TN and DeLong EF. Improved Environmental Genomes via Integration of Metagenomic and Single-Cell Assemblies. *Front Microbiol.* 2016;7:143

单细胞基因组已为未培养微生物带来了大量单个基因组草图；但是，扩增步骤期间 MDA 杂峰导致覆盖不完整以及不均匀。元基因组学数据集不会发生相同序列偏移，但微生物群落的基因组复杂性妨碍了基因组草图的再现。在本研究中，作者研发了一种新的从元基因组学引导的、单细胞扩增基因组数据生成种群基因组的新方法。该研究通过完成海洋组 1 奇古菌门和 SAR324 类群浮游细菌的单细胞扩增基因组验证了该方法。SAR324 类群基因组改进的方法组合揭示了存在多个单细胞扩增基因组中未发现的基因。

illumina 的技术：TruSeq LT Nano Kit、MiSeq 系统

Fan J, Salathia N, Liu R, et al. Characterizing transcriptional heterogeneity through pathway and gene set overdispersion analysis. *Nat Methods.* 2016;13:241-244

scRNA-Seq 法提供了研究复合组织和疾病的无偏倚方法。但是，数据会发生高水平的技术噪声，并强烈依赖于表达程度。当基于重要生物学差异聚类细胞时，细胞间差异具有挑战性。例如，分割方法（包括 k 均值聚类和 BackSPIN 算法）基于细胞周期分离细胞，而不是组织特异性信号。作者引入通路和基因集过离散分析 (PAGODA)，通过检测已测量细胞可分类的所有重要的和潜在的重叠通路克服了该挑战。

illumina 的技术：HiSeq 2000 系统

Ilicic T, Kim JK, Kolodziejczyk AA, et al. Classification of low quality cells from single-cell RNA-seq data. *Genome Biol.* 2016;17:29

现代单细胞测序技术，尤其那些涉及大规模平行方法的技术，常会分离出受压、破碎或灭活细胞。这些低质量细胞可导致数据杂峰，且必须从分析中将其排除。在本研究中，作者提供了 scRNA-Seq 的首个工具，可以简单彻底的方式处理并移除低质量细胞。分析流程使用了 20 个高度组织的整合到机器学习算法中的生物学和技术功能集。作者在 CD4+ T 细胞、骨髓树突状细胞和小鼠 ESC 上验证了该方法。方法还定义了视觉上无法检测的低质量细胞的新类型。

illumina 的技术：HiSeq 2000 系统

Buettner F, Natarajan KN, Casale FP, et al. Computational analysis of cell-to-cell heterogeneity in single-cell RNA-sequencing data reveals hidden subpopulations of cells. *Nat Biotechnol.* 2015;33:155-160

scRNA-Seq 数据集受固有技术噪声影响，不利于对细胞亚群的鉴定。为克服该困难以及影响基因表达异质性的未知隐藏因素，作者研发了一种模型 (scLVM)，以说明 RNA-Seq 数据集中未观察到的因素并使用单个小鼠 ESC 验证其模型。研究还是用 HiSeq 2000 系统在初始 T 细胞分化为 T_H2 细胞过程中执行单个 T 细胞的 RNA-Seq。研究将 scLVM 模型应用到 T 细胞 RNA-Seq 数据集并校正细胞周期基因表达。该研究能鉴定通过仅使用非线性 PCA 或 k 均值聚类无法发现的分化中 T 细胞的 2 个亚群。

illumina 的技术：Nextera XT DNA Sample Preparation Kit、HiSeq 2000 系统

Grun D, Lyubimova A, Kester L, et al. Single-cell messenger RNA sequencing reveals rare intestinal cell types. *Nature.* 2015;525:251-255

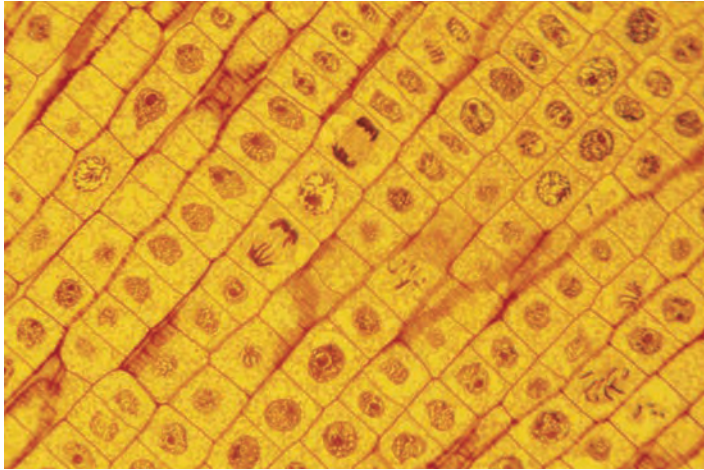
鉴定成分细胞类型对于了解给定器官或组织的功能至关重要。鉴定细胞类型的现有方法涉及基于特定标记成像和分离细胞，但是如果细胞类型稀有（如 CSC 或 CTC）则该方法具有挑战性。在本研究中，作者使用 HiSeq 2500 系统对数百个来自小鼠肠类器官的随机选定细胞执行 RNA-Seq。为鉴定类器官内的细胞亚群，研究研发了 RaceID，一种在细胞符合群体中鉴定稀有细胞类型的计算方法。研究通过在取样的类器官细胞群鉴定单个激素生成细胞类型验证了该算法，并确定 Reg4 作为这些稀有肠道内分泌细胞的新标记。最后，研究使用 Reg4 捕获这些稀有细胞，以研究其遗传多样性，确定大量肠道内分泌细胞谱系。

illumina 的技术：HiSeq 2500 系统

Leng N, Chu LF, Barry C, et al. Oscope identifies oscillatory genes in unsynchronized single-cell RNA-seq experiments. *Nat Methods*. 2015;12:947-950

scRNA-Seq 可在单个细胞群中捕获振荡动力学，并可发现大量测序试验中缺失的振荡。但是，连续 RNA-Seq 时期数列试验不可行，且对于大多数振荡系统可能无法同步化。先前已研发了 Monocle²⁵⁴ 计算算法来在 scRNA-Seq 数据中通过几个不同时间点的数据拟时间排序解决该挑战。在本研究中，作者研发了 Oscope，一种使用来自非同步细胞的 scRNA-Seq 数据确定并鉴定振荡基因的转录动力学的计算算法。研究通过将模型应用到多种 scRNA-Seq Illumina 数据集（包括人 ESC）对 Oscope 进行了验证，且研究发现了与 Fluidigm C1 芯片上的捕获位点和输出孔位置相关的振荡模式。

Illumina 的技术：Nextera XT DNA Sample Preparation Kit、HiSeq 2500 系统



统计方法可帮助在 scRNA-Seq 数据集中确定并鉴定振荡基因，如细胞周期基因。

Satija R, Farrell JA, Gennert D, Schier AF and Regev A. Spatial reconstruction of single-cell gene expression data. *Nat Biotechnol*. 2015;33:495-502

scRNA-Seq 是一种发现新细胞类型、了解调控网络和重建发育过程的成熟方法。但是，scRNA-Seq 通常涉及来自组织的分离细胞，因此破坏了其自然空间关系。为在 scRNA-Seq 数据中捕获空间关系，作者研发了 Seurat，一种将较小的引导空间指定的“标志”基因集的 scRNA-Seq 与补充性原位杂交数据结合起来的计算策略。研究通过空间绘制从斑马鱼胚胎分离的 851 个单个细胞并创建空间模式的全转录组图对 Seurat 进行了验证。Seurat 可正确定位细胞的罕见亚群，并可绘制空间受限细胞以及表达模式更分散的细胞。

Illumina 的技术：Nextera XT DNA Sample Preparation Kit、HiSeq 2500 系统

Shin J, Berg DA, Zhu Y, et al. Single-Cell RNA-Seq with Waterfall Reveals Molecular Cascades underlying Adult Neurogenesis. *Cell Stem Cell*. 2015;17:360-372

成体干细胞有助于组织发育和再生，但由于细胞异质性带来的挑战，干细胞行为的系统性分子分析仍步履维艰。在本研究中，作者使用 scRNA-Seq 鉴定成人海马体 qNSC 的发育动态。研究还研发了一种生物信息学流程，称之为“Waterfall”来沿重构发育轨迹定量单细胞表达数据。scRNA-Seq 和 Waterfall 的组合确定了成体 qNSC 的分子标记，并定义了 qNSC 活化和神经发生涉及的分子级联。

Illumina 的技术：HiSeq 2500 系统

254. Trapnell C, Cacchiarelli D, Grimsby J, et al. The dynamics and regulators of cell fate decisions are revealed by pseudotemporal ordering of single cells. *Nat Biotechnol*. 2014;32:381-386

Zamani Esteki M, Dimitriadou E, Mateiu L, Melotte C, Van der Aa N, et al. Concurrent whole-genome haplotyping and copy-number profiling of single cells. *Am J Hum Genet.* 2015;96:894-912

在分析单细胞 DNA-Seq 数据前, 必须将 DNA 拷贝数异常与 WGA 杂峰区分开。该要求使得单细胞测序数据 DNA 拷贝数分析和单倍型分析有难度。在本研究中, 作者研发了一种单细胞基因组分析法, 可在单细胞全基因组确定单倍型和拷贝数——称为 haplarithmisis 的程序。方法解读单细胞的 SNP 等位基因片段, 并将这些数据整合到计算工作流程中进行关联疾病变异的归因 (siCHILD)。作者通过对来自人体外受精胚胎的单个淋巴细胞和人分裂球确定单细胞基因组中带有疾病等位基因的单倍型验证了该方法。

Illumina 的技术: TruSeq DNA LT Sample Preparation Kit、HumanCytoSNP-12v2.1 BeadChips、HiSeq 2000/2500 系统

Zhang CZ, Adalsteinsson VA, Francis J, Cornils H, Jung J, et al. Calibrating genomic and allelic coverage bias in single-cell sequencing. *Nat Commun.* 2015;6:6822

在单细胞 DNA-Seq 中, 序列杂峰由必要的 DNA 扩增法引入, 如 MDA²⁵⁵ 和 MALBAC。²⁵⁶ 在本研究中, 作者开发了一种新的统计方法, 用于定量评估由于 WGA 产生的单细胞 DNA 扩增偏差。通过比较 MDA 和 MALBAC DNA 文库, 研究提供由 MDA 和 MALBAC 生成的单细胞文库的基准比较, 并还确定了扩增水平下基因组范围偏差的普遍特征。该研究的统计模型可校正单细胞 WGA 数据中的等位基因偏差。

Illumina 的技术: MiSeq 和 HiSeq 2500 系统

Bacher R, Chu LF, Leng N, et al. SCnorm: robust normalization of single-cell RNA-seq data. *Nat Methods.* 2017;14:584-586

Gong W, Rasmussen TL, Singh BN, Koyano-Nakagawa N, Pan W and Garry DJ. Dpath software reveals hierarchical haemato-endothelial lineages of Etv2 progenitors based on single-cell transcriptome analysis. *Nat Commun.* 2017;8:14362

Wang B, Zhu J, Pierson E, Ramazzotti D and Batzoglou S. Visualization and analysis of single-cell RNA-seq data by kernel-based similarity learning. *Nat Methods.* 2017;14:414-416

Zhu X, Ching T, Pan X, Weissman SM and Garmire L. Detecting heterogeneity in single-cell RNA-Seq data by non-negative matrix factorization. *PeerJ.* 2017;5:e2888

Eltahla AA, Rizzetto S, Rasoli M, et al. Linking the T cell receptor to the single cell transcriptome in antigen-specific human T cells. *Immunol Cell Biol.* 2016;94:604-611

Knouse KA, Wu J and Amon A. Assessment of megabase-scale somatic copy number variation using single-cell sequencing. *Genome Res.* 2016;26:376-384

Mende DR, Aylward FO, Eppley JM, Nielsen TN and DeLong EF. Improved Environmental Genomes via Integration of Metagenomic and Single-Cell Assemblies. *Front Microbiol.* 2016;7:143

Achim K, Pettit JB, Saraiva LR, et al. High-throughput spatial mapping of single-cell RNA-seq data to tissue of origin. *Nat Biotechnol.* 2015;33:503-509

Finak G, McDavid A, Yajima M, et al. MAST: a flexible statistical framework for assessing transcriptional changes and characterizing heterogeneity in single-cell RNA sequencing data. *Genome Biol.* 2015;16:278

Ji C, Miao Z and He X. A simple strategy for reducing false negatives in calling variants from single-cell sequencing data. *PLoS One.* 2015;10:e0123789

Scialdone A, Natarajan KN, Saraiva LR, et al. Computational assignment of cell-cycle stage from single-cell transcriptome data. *Methods.* 2015;85:54-61

Vallejos CA, Marioni JC and Richardson S. BASICS: Bayesian Analysis of Single-Cell Sequencing Data. *PLoS Comput Biol.* 2015;11:e1004333

-
255. Dean FB, Nelson JR, Giesler TL and Lasken RS. Rapid amplification of plasmid and phage DNA using Phi 29 DNA polymerase and multiply-primed rolling circle amplification. *Genome Res.* 2001;11:1095-1099
256. Zong C, Lu S, Chapman AR and Xie XS. Genome-wide detection of single-nucleotide and copy-number variations of a single human cell. *Science.* 2012;338:1622-1626
-

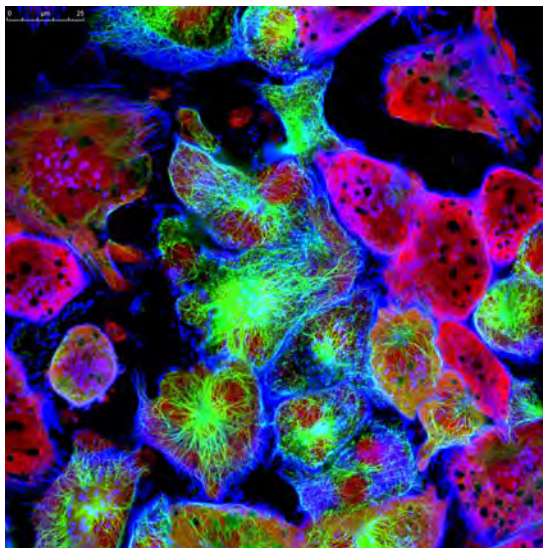
DNA 方法

有丝分裂过程中的 DNA 复制并不完全，细胞的渐进性增殖会累积体细胞突变。因此，我们机体中的每个细胞都有唯一的基因组特征，可使细胞谱系树的重建具有极高的精确度。²⁵⁷ 这些细胞谱系树可预测干细胞小亚群的存在。该信息在癌症发育^{258,259} 以及胚胎植入前和遗传诊断中具有指导意义。^{260,261,262}

“单细胞测序揭示了多种背景的细胞间基因组异质性的广泛性，包括哺乳动物脑中的体细胞非整倍性以及肿瘤内异质性。” —Vitak 等, 2017 年

单细胞 DNA-Seq 可确定获得的体细胞突变和 CNV，使得研究人员可回溯已分化细胞的谱系。²⁶³ 单细胞基因组还是鉴定难以或无法体外培养微生物的有效方法。单细胞基因组的进展促进了对感染性疾病爆发的诊断、对抗生素耐药性菌株和食源性病原体的理解以及对环境或肠道中微生物多样性的分类。^{264,265,266} 最新技术使用多重分析和微流体平台以提高单细胞 DNA-Seq 的通量并降低成本。^{267,268,269}

本节着重介绍一些单细胞 DNA-Seq 方法和近期发表的阐述 Illumina 技术如何用于单细胞 DNA-Seq 技术的文献。了解更多有关 Illumina 测序技术的信息，请访问 www.illumina.com/techniques/sequencing.html。



单细胞基因组可帮助鉴定肿瘤内的遗传和细胞异质性。

257. Frumkin D, Wasserstrom A, Kaplan S, Feige U and Shapiro E. Genomic variability within an organism exposes its cell lineage tree. *PLoS Comput Biol*. 2005;1:e50
258. Navin N, Kendall J, Troge J, et al. Tumour evolution inferred by single-cell sequencing. *Nature*. 2011;472:90-94
259. Potter NE, Ermini L, Papaemmanuil E, et al. Single-cell mutational profiling and clonal phylogeny in cancer. *Genome Res*. 2013;23:2115-2125
260. Blainey PC. The future is now: single-cell genomics of bacteria and archaea. *FEMS Microbiol Rev*. 2013;37:407-427
261. Van der Aa N, Zamani Esteki M, Vermeesch JR and Voet T. Preimplantation genetic diagnosis guided by single-cell genomics. *Genome Med*. 2013;5:71
262. Hou Y, Fan W, Yan L, et al. Genome analyses of single human oocytes. *Cell*. 2013;155:1492-1506
263. Shapiro E, Biezuner T and Linnarsson S. Single-cell sequencing-based technologies will revolutionize whole-organism science. *Nat Rev Genet*. 2013;14:618-630
264. Bergholz TM, Moreno Switt AI and Wiedmann M. Omics approaches in food safety: fulfilling the promise? *Trends Microbiol*. 2014;22:275-281
265. Stepanauskas R. Single cell genomics: an individual look at microbes. *Curr Opin Microbiol*. 2012;15:613-620
266. Hug LA, Baker BJ, Anantharaman K, et al. A new view of the tree of life. *Nature Microbiology*. 2016;1:16048
267. Baslan T, Kendall J, Ward B, et al. Optimizing sparse sequencing of single cells for highly multiplex copy number profiling. *Genome Res*. 2015;25:714-724
268. Fu Y, Li C, Lu S, et al. Uniform and accurate single-cell sequencing based on emulsion whole-genome amplification. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112:11923-11928
269. Leung ML, Wang Y, Kim C, et al. Highly multiplexed targeted DNA sequencing from single nuclei. *Nat Protoc*. 2016;11:214-235

综述

Gawad C, Koh W and Quake SR. Single-cell genome sequencing: current state of the science. *Nat Rev Genet.* 2016;17:175-188

Huang L, Ma F, Chapman A, Lu S and Xie XS. Single-Cell Whole-Genome Amplification and Sequencing: Methodology and Applications. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2015;16:79-102

Voet T and Van Loo P. SNES makes sense? Single-cell exome sequencing evolves. *Genome Biol.* 2015;16:86

Wang Y and Navin NE. Advances and applications of single-cell sequencing technologies. *Mol Cell.* 2015;58:598-609

-
270. Li H, Courtois ET, Sengupta D, et al. Reference component analysis of single-cell transcriptomes elucidates cellular heterogeneity in human colorectal tumors. *Nat Genet.* 2017;49:708-718
270. Gerber T, Willscher E, Loeffler-Wirth H, et al. Mapping heterogeneity in patient-derived melanoma cultures by single-cell RNA-seq. *Oncotarget.* 2017;8:846-862
-

参考文献

Chen C, Xing D, Tan L, et al. Single-cell whole-genome analyses by Linear Amplification via Transposon Insertion (LIANTI). *Science.* 2017;356:189-194

单细胞基因组学的挑战之一便是准确分析 CNV。在分析拷贝数之前必须对单细胞基因组进行扩增，尽管存在多种 WGA 技术，但它们都受到序列偏好性和低扩增保真度的影响。在本研究中，作者开发了一种优越的 WGA 方法，即通过转座子插入的线性扩增 (LIANTI)。在此方法中，将单细胞的基因组 DNA 片段化并用 LIANTI 转座子标记，然后在片段化链的两端加入双链 T7 启动子。将这些 DNA 转录为基因组 RNA，然后进行 RNase 消化和第二链合成，产生带条形码的双链 LIANTI 扩增子。这些扩增子可用于文库制备和随后的 NGS 测序。作者证明，LIANTI 可精确检测单个人 BJ 细胞中的 CNV，并且在所有的单细胞 WGA 方法中 LIANTI 的假阳性率最低。

Illumina 的技术：HiSeq 2500/4000 系统

Dong X, Zhang L, Milholland B, Lee M, Maslov AY, et al. Accurate identification of single-nucleotide variants in whole-genome-amplified single cells. *Nat Methods.* 2017;14:491-493

NGS 常用于检测组织基因组 DNA 中的 SNV，但是分析单细胞中的 SNV 易受到 WGA 相关杂峰的影响。为克服这一技术挑战，作者开发了单细胞多重置换扩增 (SCMDA) 以及相关的单细胞变异检出算法 SCaller。在本研究中，作者从成纤维细胞克隆中分离了未扩增的基因组 DNA。他们还从这些克隆中分离了单个细胞并使用 SCMDA 对单细胞基因组 DNA 进行了扩增。他们利用 HiSeq 2500 和 HiSeq X Ten 系统对经 SCMDA 扩增和未扩增的样本进行了全基因组测序，并使用 SCaller 对 SNV 进行了鉴定。通过比较来自单细胞和亲本克隆的 SNV，作者证实他们的程序能准确分析单细胞基因组中的 SNV。

Illumina 的技术：HiSeq 2500 和 HiSeq X Ten 系统

Martelotto LG, Baslan T, Kendall J, et al. Whole-genome single-cell copy number profiling from formalin-fixed paraffin-embedded samples. *Nat Med.* 2017;23:376-385

单细胞测序研究表明，肿瘤由多种在遗传上各不相同的细胞群体构成。^{270,271} 单细胞测序能追踪细胞谱系，并鉴定大量组织样本中隐藏的遗传变异。大部分人肿瘤样本为福尔马林固定、石蜡包埋 (FFPE)，用于临床诊断。尽管此技术能保存样本，但福尔马林固定通过化学方法改变了基因组 DNA，使其不适用于单细胞测序。为解决这一问题，作者开发了一种对从 FFPE 组织中提取的 DNA 进行单细胞全基因组拷贝数分析的方法。他们从对应的 FFPE、冷冻癌细胞系和新鲜肿瘤组织中分离了核，然后观察了核的拷贝数谱。此方法将使单细胞基因组学方法应用于 FFPE 样本的研究或临床分析成为可能。

Illumina 的技术：HiSeq 2000 系统

Hou Y, Guo H, Cao C, Li X, Hu B, et al. Single-cell triple omics sequencing reveals genetic, epigenetic, and transcriptomic heterogeneity in hepatocellular carcinomas. *Cell Res.* 2016;26:304-319

为透彻获取在单细胞水平上，基因组、转录组和 DNA 甲基化组之间的相互作用机制，理想的做法是在同一个细胞上用这 3 种独立的方法。在本研究中，作者报告了 scTrio-Seq，一种可同时分析单个哺乳动物细胞基因组 CNV、DNA 甲基化组和转录组的方法。研究在 25 个单个肝细胞癌原代细胞中使用 scTrio-Seq，以确定两个细胞亚群。研究还发现大范围 CNV 可导致基因亚组中的 RNA 表达成比例改变，但是 CNV 不影响相关基因组区域的 DNA 甲基化。

Illumina 的技术：HiSeq 2000/2500 系统

Baslan T, Kendall J, Ward B, et al. Optimizing sparse sequencing of single cells for highly multiplex copy number profiling. *Genome Res.* 2015;25:714-724

已知肿瘤细胞异质性会影响疾病进展、治疗耐药性和转移。但是，由于缺乏在全基因组水平审视遗传异质性的灵敏方法，我们对肿瘤异质性的了解有限。在本研究中，作者研发了一种 DNA 扩增法，将生物信息学和分子学方法结合起来，可进行高度多重的单细胞测序。他们应用该技术在 HiSeq 系统的单通道上生成了多达 100 个个体人类癌细胞以及活检组织的全基因组 CNV 谱。此方法可快速分析数以千计的单细胞基因组。

Illumina 的技术：HiSeq 系统

Fu Y, Li C, Lu S, et al. Uniform and accurate single-cell sequencing based on emulsion whole-genome amplification. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015;112:11923-11928

当前 WGA 方法受扩增产量波动，以及假阳性和假阴性 SNV 错误的限制。作者研发了一种基于乳液的扩增方法（eWGA），可解决扩增偏差并高精度检测 SNV。单细胞 DNA 分装入分散于油中的水性液滴，其中 DNA 片段可扩增至饱和，最小化乳化片段之间扩增增益的差异。方法与 MDA 兼容，并可用在单细胞，以提高的扩增均匀度和精确度来检测 CNV 和 SNV。

Illumina 的技术：MiSeq 和 HiSeq 2500 系统

Borgstrom E, Paterlini M, Mold JE, Frisen J and Lundeberg J. Comparison of whole genome amplification techniques for human single cell exome sequencing. *PLoS One.* 2017;12:e0171566

Stepanauskas R, Fergusson EA, Brown J, et al. Improved genome recovery and integrated cell-size analyses of individual uncultured microbial cells and viral particles. *Nat Commun.* 2017;8:84

Vitak SA, Torkenczy KA, Rosenkrantz JL, et al. Sequencing thousands of single-cell genomes with combinatorial indexing. *Nat Methods.* 2017;14:302-308

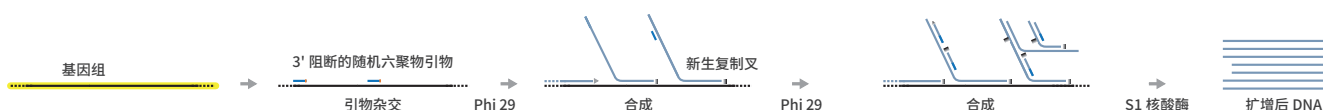
Zahn H, Steif A, Laks E, et al. Scalable whole-genome single-cell library preparation without preamplification. *Nature Methods.* 2017;14:167-173

Li N, Wang L, Wang H, Ma M, Wang X, et al. The Performance of Whole Genome Amplification Methods and Next-Generation Sequencing for Pre-Implantation Genetic Diagnosis of Chromosomal Abnormalities. *J Genet Genomics.* 2015;42:151-159

Ning L, Li Z, Wang G, et al. Quantitative assessment of single-cell whole genome amplification methods for detecting copy number variation using hippocampal neurons. *Sci Rep.* 2015;5:11415

多链置换扩增技术

MDA 是微生物基因组测序的常用方法，因为该方法能够扩增大于 0.5 Mbp 的模板，但该方法也可以用于研究其他大小的基因组。在该方法中，用 3' 端封闭的随机六聚物引物与模板杂交，然后使用 Phi 29 聚合酶进行合成。Phi 29 执行链置换 DNA 合成，可有效快速的扩增 DNA。对扩增后的 DNA 进行深度测序可得到准确的 read，而测序深度越大，序列的比对和一致性分析结果越好（表 3）。



MDA 的概述图。

表 3. MDA 的优点和缺点

优点	缺点
<ul style="list-style-type: none"> 模板可为环状 DNA（质粒和细菌 DNA）。 可测序大模板。 可进行单细胞测序或对起始材料极为有限的样本进行测序。 	<ul style="list-style-type: none"> 扩增偏倚较大。基因组覆盖度低至 ~6%。²⁷³ PCR 偏向性会导致对高 GC 含量的模板测序不足。 试剂污染可能会影响结果。²⁷⁴

参考文献

Dong X, Zhang L, Milholland B, Lee M, Maslov AY, et al. Accurate identification of single-nucleotide variants in whole-genome-amplified single cells. *Nat Methods*. 2017;14:491-493

NGS 常用于检测组织基因组 DNA 中的 SNV，但是分析单细胞中的 SNV 易受到 WGA 相关杂峰的影响。为克服这一技术挑战，作者开发了单细胞多重置换扩增（SCMDA）以及相关的单细胞变异检出算法 SCaller。在本研究中，作者从成纤维细胞克隆中分离了未扩增的基因组 DNA。他们还从这些克隆中分离了单个细胞并使用 SCMDA 对单细胞基因组 DNA 进行了扩增。他们利用 HiSeq 2500 和 HiSeq X Ten 系统对经 SCMDA 扩增和未扩增的样本进行了全基因组测序，并使用 SCaller 对 SNV 进行了鉴定。通过比较来自单细胞和亲本克隆的 SNV，作者证实他们的程序能准确分析单细胞基因组中的 SNV。

illumina 的技术：HiSeq 2500 和 HiSeq X Ten 系统

Leung ML, Wang Y, Kim C, et al. Highly multiplexed targeted DNA sequencing from single nuclei. *Nat Protoc*. 2016;11:214-235

该方法是对 SNES 的改进，包括添加 DNA 条形码以能够在单个测序反应中对 48-96 个单个细胞进行多重分析。与 SNES 相比，该新技术通量更高，且成本更低。作者表明 SNES 更适用于在碱基分辨率水平检测点突变和插入。

illumina 的技术：HiSeq 2000 系统

Leung ML, Wang Y, Waters J and Navin NE. SNES: single nucleus exome sequencing. *Genome Biol*. 2015;16:55

尽管单细胞测序方法在组织异质性研究方面有着巨大潜力，但目前的单细胞 DNA-Seq 方法仍存在技术误差和测序数据物理覆盖度较差的问题。在本研究中，作者开发了一种单细胞 DNA-Seq 方法——SNES，该方法结合了 G1/0 或 G2/M 细胞核流式分选、有时间限制的 MDA、基于 TruSeq Exome Enrichment Kit 的外显子组捕获以及 HiSeq 2000 系统测序。研究通过分选并测序来自成纤维细胞系的单个细胞核对 SNES 进行了验证。该方法在单个细胞有 96% 覆盖范围，并表明对 SNV 有 92% 的检测效率，对单细胞中的插入有 85% 的检测效率。

illumina 的技术：TruSeq Exome Enrichment Kit、HiSeq 2000 系统

272. Dean FB, Nelson JR, Giesler TL and Lasken RS. Rapid amplification of plasmid and phage DNA using Phi 29 DNA polymerase and multiply-primed rolling circle amplification. *Genome Res*. 2001;11:1095-1099
273. Navin N, Kendall J, Troge J, et al. Tumour evolution inferred by single-cell sequencing. *Nature*. 2011;472:90-94
274. Woyke T, Sczyrba A, Lee J, et al. Decontamination of MDA reagents for single cell whole genome amplification. *PLoS One*. 2011;6:e26161
275. Leung ML, Wang Y, Waters J and Navin NE. SNES: single nucleus exome sequencing. *Genome Biol*. 2015;16:55

Ning L, Li Z, Wang G, Hu W, Hou Q, et al. Quantitative assessment of single-cell whole genome amplification methods for detecting copy number variation using hippocampal neurons. *Sci Rep.* 2015;5:11415

在本研究中，作者通过测序单个海马神经元比较了 MDA、MALBAC 和 GenomePlex 扩增方法。研究使用三种不同的扩增方法从单个海马神经元扩增了基因组 DNA，然后在 HiSeq 2000 系统上以浅深度测序。研究结果显示来自 MALBAC 和 GenomePlex 方法的单细胞测序结果具有高度重复性并有较高成功率。MALBAC 确实显示出显著的 GC 偏差，但通过使用生物信息学工具可解决该问题。总的来说，研究确定 MALBAC 和 GenomePlex 在检测 CNV 时性能更佳。

illumina 的技术：HiSeq 2000 系统

Nishikawa Y, Hosokawa M, Maruyama T, Yamagishi K, Mori T, et al. Monodisperse Picoliter Droplets for Low-Bias and Contamination-Free Reactions in Single-Cell Whole Genome Amplification. *PLoS One.* 2015;10:e0138733

WGA 是单细胞测序流程的关键组成部分，而 MDA 是单细胞测序中最常用的 WGA 方法。尽管使用广泛，由于扩展偏差和 DNA 嵌合体的形成，MDA 通常产生不均匀的基因组覆盖。为克服该限制，作者研发了液滴 MDA，将这些技术杂峰降到最低。研究使用微流体将提取的 DNA 片段分离到 67 pL 液滴中，而单个片段则随后使用 MDA 进行扩增。该方法通过测序大肠杆菌细胞的液滴 MDA 产物进行了验证，与使用传统 MDA 59% 的回收率相比，基因组回收率提高至 89%。

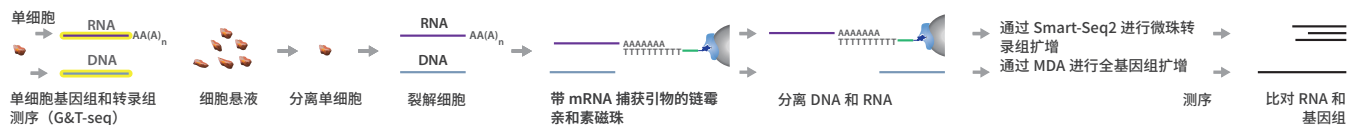
illumina 的技术：Nextera XT DNA Sample Preparation Kit、MiSeq 系统

Li N, Wang L, Wang H, Ma M, Wang X, et al. The Performance of Whole Genome Amplification Methods and Next-Generation Sequencing for Pre-Implantation Genetic Diagnosis of Chromosomal Abnormalities. *J Genet Genomics.* 2015;42:151-159

276. Macaulay IC, Haerty W, Kumar P, et al. G&T-seq: parallel sequencing of single-cell genomes and transcriptomes. *Nat Methods.* 2015;12:519-522

基因组和转录组测序

基因组和转录组测序 (G&T-Seq) 是从单个细胞分离并测序基因组 DNA 和全长 mRNA 的实验方案。²⁷⁶ 在该方法中，单细胞被分离并裂解。RNA 使用寡核苷酸修饰生物素 (dT) 捕获引物进行捕获，并使用链霉亲和素包被磁珠与 DNA 分离。Smart-Seq2 用于在微珠上扩增捕获的 RNA，而 MDA 则用于扩增 DNA。测序完成后，整合 DNA 和 RNA 序列信息，以深入了解单细胞的基因表达谱 (表 4)。



G&T-Seq 的概述图。

表 4. G&T-Seq 的优点和缺点。

优点	缺点
<ul style="list-style-type: none"> 兼容所有 WGA 方法。 由于捕获了全长转录本，序列读出数中无 3' 端偏差 由于 DNA 和 RNA 经过物理分离并进行独立扩增，因此分析时无需掩盖编码序列。 	<ul style="list-style-type: none"> DNA 和 RNA 的物理分离会增加样本丢失或污染的风险。 DNA 和 RNA 的物理分离会增加处理时间。

参考文献

Angermueller C, Clark SJ, Lee HJ, et al. Parallel single-cell sequencing links transcriptional and epigenetic heterogeneity. *Nat Methods*. 2016;13:229-232

多参数单细胞测序是一种发现基因组、转录组和表观遗传的异质性之间关系的有力工具。在本研究中，作者研发了单细胞甲基化和转录组测序 (scM&T-Seq)，一种可在同一细胞中进行甲基化和转录组测序的多参数测序法。研究使用 G&T-Seq 实验方案纯化单细胞 DNA，随后将 DNA 进行单细胞亚硫酸氢盐转化 (scBS-Seq)。²⁷⁷ 作者对 61 个小鼠 ESC 执行了 scM&T-Seq。研究发现许多多功能因子的基因表达水平与 DNA 甲基化负相关。这些数据表明表观遗传学异质性是 ESC 中波动多功能的重要机制。研究还表明 scM&T-Seq 可阐明以前不清楚的单个细胞中转录和 DNA 甲基化异质性之间的关系。

illumina 的技术: Nextera XT Kit、HiSeq 2000 系统

Macaulay IC, Haerty W, Kumar P, et al. G&T-seq: parallel sequencing of single-cell genomes and transcriptomes. *Nat Methods*. 2015;12:519-522

单细胞基因组测序可使我们了解细胞异质性以及细胞谱系和发育。单细胞转录组测序重新定义了我们对于细胞类型和状态的了解。在本研究中，作者研发了 G&T-Seq，一种可从单个细胞分离并随后测序基因组 DNA 和全长 mRNA 的方法。该方法补充了基因组 DNA 和 mRNA 测序 (DR-Seq) 方法，²⁷⁸ 但可与任何 WGA 方法配合使用，且还从同一细胞提供全长转录本。作者使用改进后的 Smart-Seq2 方案实现了 G&T-seq 的转录组分析，^{279,280} 并且在全自动液体处理工作站上实现了该方法自动化。研究使用 HiSeq 平台测序大量单细胞类型，包括人癌细胞、逆转录处理的小鼠胚胎分裂球和 iPSC 衍生神经元。值得注意的是，非整倍体分裂球的 G&T 测序分析表明单个细胞分裂过程中染色体获得 / 丢失导致了染色体范围相对基因表达的增加 / 丢失。

illumina 的技术: Nextera XT Kit、MiSeq、HiSeq 2500 和 HiSeq X Ten 系统

277. Smallwood SA, Lee HJ, Angermueller C, et al. Single-cell genome-wide bisulfite sequencing for assessing epigenetic heterogeneity. *Nat Methods*. 2014;11:817-820

278. Dey SS, Kester L, Spanjaard B, Bienko M and van Oudenaarden A. Integrated genome and transcriptome sequencing of the same cell. *Nat Biotechnol*. 2015;33:285-289

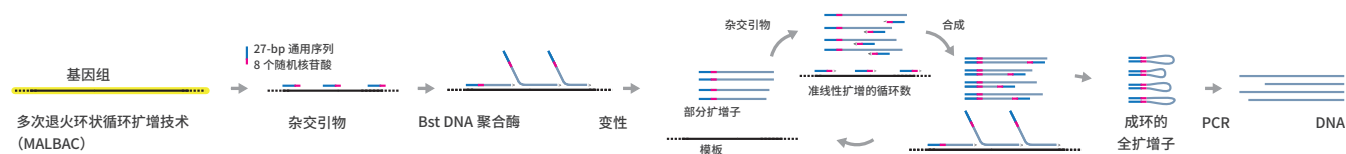
279. Picelli S, Bjorklund AK, Faridani OR, Sagasser S, Winberg G and Sandberg R. Smart-seq2 for sensitive full-length transcriptome profiling in single cells. *Nat Methods*. 2013;10:1096-1098

280. Picelli S, Faridani OR, Bjorklund AK, Winberg G, Sagasser S and Sandberg R. Full-length RNA-seq from single cells using Smart-seq2. *Nat Protoc*. 2014;9:171-181

281. Zong C, Lu S, Chapman AR and Xie XS. Genome-wide detection of single-nucleotide and copy-number variations of a single human cell. *Science*. 2012;338:1622-1626

多次退火环状循环扩增技术

MALBAC 旨在解决 MDA 的一些缺点。²⁸¹ 在本方法中，MALBAC 引物随机退火至 DNA 模板。较高水平的具有置换活性的聚合酶扩增模板，生成半扩增子。由于扩展和退火过程是重复进行的，半扩增子扩增为完整扩增子 (有 3' 端互补 5' 端)。因此，完整扩增子末端杂交以形成抑制环状扩增子进一步扩增环状结构，同时仅半扩增子和基因组 DNA 进行扩增。对全扩增子序列进行深度测序可得到准确的 read，而测序深度越大，序列比对效果越好 (表 5)。



MALBAC 的概述图。

表 5. MALBAC 的优点和缺点。

优点	缺点
<ul style="list-style-type: none"> • 可测序大模板。 • 可进行单细胞测序或对起始材料极为有限的样本进行测序。 • 完整扩增子成环抑制了模板过度表达，从而降低了 PCR 偏向性。 • 可扩增高 GC 含量的区域。 • 均匀覆盖基因组。 • 与 MDA 相比，等位基因丢失率更低。 	<ul style="list-style-type: none"> • 与 Phi 29 相比，聚合酶相对更易出错 • 实验方案对温度敏感。 • 虽然基因组覆盖度高达 ~90%，²⁸² 但对某些基因组区域始终测序不足。²⁸³

282. Lovett M. The applications of single-cell genomics. *Hum Mol Genet.* 2013;22:R22-26
283. Lasken RS. Single-cell sequencing in its prime. *Nat Biotechnol.* 2013;31:211-212

参考文献

Ning L, Li Z, Wang G, Hu W, Hou Q, et al. Quantitative assessment of single-cell whole genome amplification methods for detecting copy number variation using hippocampal neurons. *Sci Rep.* 2015;5:11415

在本研究中，作者通过测序单个海马神经元比较了 MDA、MALBAC 和 GenomePlex 扩增方法。研究使用三种不同的扩增方法从单个海马神经元扩增了基因组 DNA，然后在 HiSeq 2000 系统上以浅深度测序。研究结果显示来自 MALBAC 和 GenomePlex 方法的单细胞测序结果具有高度重复性并有较高成功率。MALBAC 确实显示出显著的 GC 偏差，但通过使用生物信息学工具可解决该问题。总的来说，研究确定 MALBAC 和 GenomePlex 在检测 CNV 时性能更佳。

illumina 的技术：HiSeq 2000

Yan L, Huang L, Xu L, Huang J, Ma F, et al. Live births after simultaneous avoidance of monogenic diseases and chromosome abnormality by next-generation sequencing with linkage analyses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015;112:15964-15969

NGS 方法提高了 PGS/PGD 的精确度。虽然精确度受假阳性和假阴性 SNV 所限，连锁分析可克服该困难。在本研究中，作者研发了 MARSALA，一种将使用 HiSeq 平台的新一代测序与单细胞全 WGA 结合的方法。此方法可进行单分子精确度的胚胎诊断，并极大的降低了假阳性和假阴性错误。这是首个基于 NGS 的集成式 PGD 程序，可同时检测致病突变和染色体异常，并进行连锁分析。

illumina 的技术：HiSeq 2500 系统

Li N, Wang L, Wang H, Ma M, Wang X, et al. The Performance of Whole Genome Amplification Methods and Next-Generation Sequencing for Pre-Implantation Genetic Diagnosis of Chromosomal Abnormalities. *J Genet Genomics.* 2015;42:151-159

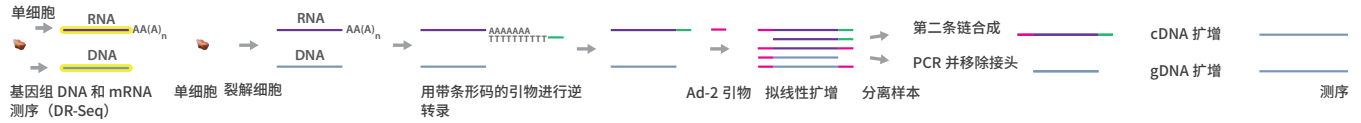
基因组 DNA 和 mRNA 测序

DR-Seq 通过测序研究单个细胞的基因组和转录组关系。物理分离前的核酸扩增降低了样本丢失和污染风险。DR 测序涉及多个扩增步骤，包括类似于 MALBAC 的准线性扩增技术。

首先，使用带 Ad-1x 接头的多聚 (dT) 引物从裂解的单个细胞反转录 mRNA，生成单链 cDNA (sscDNA)。Ad-1x 接头序列包含血包识别条形码、5' illumina 接头和 T7 启动子。下一步，gDNA 和 sscDNA 通过带 Ad-2 引物的准线性 WGA 同时扩增。这些引物与 MALBAC 接头类似，包含 8 个用于随机引导的随机核苷酸，后跟 5' 端的 27 个核苷酸恒定标签。该扩增步骤的产物一分为二。其中一半准备用于基因组测序，其中 gDNA 在 DNA 文库制备和测序前从其 Ad-2 接头进行 PCR 扩增并“释放”。另一半准备用于转录组测序，将其中第二条链合成 cDNA 并通过体外转录进行扩增。获得

的 RNA 产物仅从两侧有 Ad-1x 和 Ad-2 的 cDNA 片段生成，忽略 gDNA 片段的扩增。按照 Illumina 小 RNA 实验方案制备 RNA 文库用于测序。对来自同一细胞的 gDNA 和 mRNA 进行测序可保留基因组与其表达水平间的信息（表 6）。

284. Macaulay IC, Haerty W, Kumar P, et al. G&T-seq: parallel sequencing of single-cell genomes and transcriptomes. *Nat Methods*. 2015;12:519-522



DR-Seq 示意图。

表 6. DR-Seq 的优点和缺点。

优点	缺点
<ul style="list-style-type: none"> 可审视单细胞内的基因组和转录组行为。 分离前扩增减少了样本丢失和污染。 可利用基于长度的标签去除重复 read。 拟线性扩增降低了 PCR 偏向性。 	<ul style="list-style-type: none"> 人工单细胞分离有碍于高通量的实现。 拟线性扩增对温度敏感。 RNA read 具有 3' 端偏向性。²⁸⁴

参考文献

Dey SS, Kester L, Spanjaard B, Bienko M and van Oudenaarden A. Integrated genome and transcriptome sequencing of the same cell. *Nat Biotechnol*. 2015;33:285-289

单细胞基因组和转录组是定量单个细胞之间遗传和表达变异的有力工具。在本研究中，作者描述了 DR 测序，一种同时定量同一细胞基因组和转录组的方法。DR 测序不要求在扩增前物理分离核酸，这帮助将样本丢失或污染的机会降到最低。作者从小鼠 ESC 扩增了 gDNA 和 cDNA，随后分裂核酸进行进一步扩增和文库构建，并使用 HiSeq 2500 系统对两个文库进行测序。研究已表明在转录本数量方面有高细胞间变异的基因其 CNV 低，且反之亦然。

Illumina 的技术：HiSeq 2500 系统

表观基因组学方法

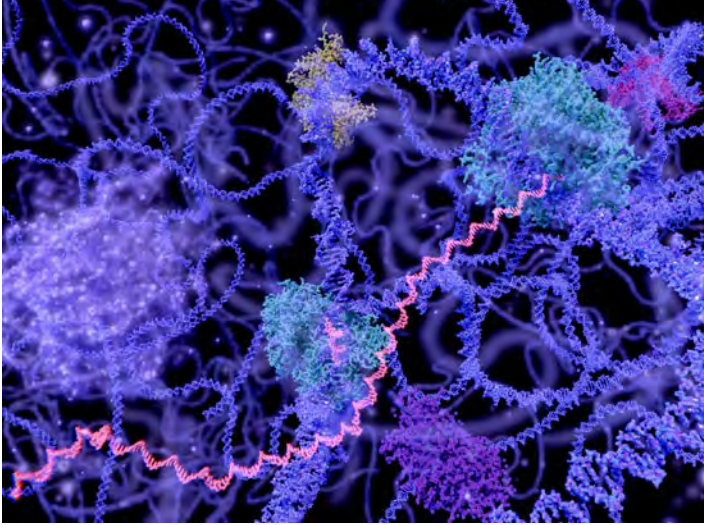
表观遗传学是控制基因活动的时间和空间的机制，与 DNA 序列无关，其在胚胎发生、分化、谱系特征和癌症进化中发挥着至关重要的作用。^{285,286} 在胚胎发生过程中，分化中的细胞的表观遗传学发生改变²⁸⁷，在后续过程中影响 RNA 表达和细胞表型。^{298,289} 在分化的体细胞以及干细胞中，表观遗传学标记可通过生活方式、环境因素、化学暴露、压力和其他因素进行调控。²⁹⁰ 表观遗传学改变在大量疾病中发挥着作用，包括癌症、神经退行性疾病、心血管疾病和呼吸系统疾病。²⁹¹

“现在，我们能够在单细胞分辨率水平探索大部分表观遗传学领域。” —Kelsey、Stegle 和 Reik, 2017 年

组织的大量测序缺乏分辨率，以了解基因型相同的单个细胞如何由于唯一的空间位置和时序产生唯一的基因型。单细胞表观基因组学技术（包括 DNA 甲基化和染色质免疫沉淀测序 [ChIP-Seq]）可与 RNA 表达和 SNP 数据相结合，进而确定表观遗传学在基因精确调控中的机制作用。²⁹² 最近，已研发了大规模平行测序技术来分析大量单个细胞的表观基因组学，该技术使我们能够以前所未有的分辨率了解表观基因组异质性。^{293,294} 此外，单细胞多参数法的发展可同时分析单个细胞的表观基因组和转录组改变，^{295,296} 近期的一项研究证明单细胞分析甚至可以同时对单个细胞的基因组、转录组和表观基因组（三组）改变进行分析。²⁹⁷

本节着重介绍一些单细胞表观遗传组测序方法和近期发表的阐述 Illumina 技术如何用于单细胞表观遗传组技术的文献。了解更多有关 Illumina 测序技术的信息，请访问 www.illumina.com/techniques/sequencing.html。

285. Clark SJ, Lee HJ, Smallwood SA, Kelsey G and Reik W. Single-cell epigenomics: powerful new methods for understanding gene regulation and cell identity. *Genome Biol.* 2016;17:72
286. Guo H, Zhu P, Yan L, et al. The DNA methylation landscape of human early embryos. *Nature.* 2014;511:606-610
287. Guo H, Zhu P, Wu X, Li X, Wen L and Tang F. Single-cell methylome landscapes of mouse embryonic stem cells and early embryos analyzed using reduced representation bisulfite sequencing. *Genome Res.* 2013;23:2126-2135
288. Xue Z, Huang K, Cai C, et al. Genetic programs in human and mouse early embryos revealed by single-cell RNA sequencing. *Nature.* 2013;500:593-597
289. Weaver WM, Tseng P, Kunze A, et al. Advances in high-throughput single-cell microtechnologies. *Curr Opin Biotechnol.* 2014;25:114-123
290. Alegria-Torres JA, Baccarelli A and Bollati V. Epigenetics and lifestyle. *Epigenomics.* 2011;3:267-277
291. Hyun BR, McElwee JL and Soloway PD. Single molecule and single cell epigenomics. *Methods.* 2015;72:41-50
292. Greenleaf WJ. Assaying the epigenome in limited numbers of cells. *Methods.* 2015;72:51-56
293. Cusanovich DA, Daza R, Adey A, et al. Multiplex single cell profiling of chromatin accessibility by combinatorial cellular indexing. *Science.* 2015;348:910-914
294. Rotem A, Ram O, Shores N, et al. Single-cell ChIP-seq reveals cell subpopulations defined by chromatin state. *Nat Biotechnol.* 2015;33:1165-1172
295. Angermueller C, Clark SJ, Lee HJ, et al. Parallel single-cell sequencing links transcriptional and epigenetic heterogeneity. *Nat Methods.* 2016;13:229-232
296. Hu Y, Huang K, An Q, et al. Simultaneous profiling of transcriptome and DNA methylome from a single cell. *Genome Biol.* 2016;17:88
297. Hou Y, Guo H, Cao C, et al. Single-cell triple omics sequencing reveals genetic, epigenetic, and transcriptomic heterogeneity in hepatocellular carcinomas. *Cell Res.* 2016;26:304-319



细胞周期不同阶段染色质，或从一个细胞类型到另一个类型的动态组成，
通过多个表观遗传学机制调控。

综述

Kelsey G, Stegle O and Reik W. Single-cell epigenomics: Recording the past and predicting the future. *Science*. 2017;358:69-75

Clark SJ, Lee HJ, Smallwood SA, Kelsey G and Reik W. Single-cell epigenomics: powerful new methods for understanding gene regulation and cell identity. *Genome Biol*. 2016;17:72

Greenleaf WJ. Assaying the epigenome in limited numbers of cells. *Methods*. 2015;72:51-56

Hyun BR, McElwee JL and Soloway PD. Single molecule and single cell epigenomics. *Methods*. 2015;72:41-50

Schwartzman O and Tanay A. Single-cell epigenomics: techniques and emerging applications. *Nat Rev Genet*. 2015;16:716-726

参考文献

Stevens TJ, Lando D, Basu S, et al. 3D structures of individual mammalian genomes studied by single-cell Hi-C. *Nature*. 2017;544:59-64

对细胞结构的理解通常通过使用显微镜成像技术进行细胞生物学研究实现。针对细胞核，已通过染色质构象捕获表观基因组方法（如 3C 和 Hi-C）对这些细胞生物学数据进行了改善。在这些表观基因组方法中，细胞核中物理距离相近的 DNA 序列被消化、连接并通过 NGS 进行了分析。为了更完整地解析哺乳动物基因组的三维结构，作者结合了成像和改进后的单细胞 Hi-C。此外，他们还证明，将表观基因组数据与转录组（RNA-Seq）和 ChIP-Seq 数据整合，详细了解了调控的基因的组织。他们的数据表明细胞之间环和拓扑结构相关域（TAD）的结构高度可变。而活性增强子和启动子结构则在各细胞的基因组范围内保持一致。

Illumina 的技术: Nextera XT DNA Library Preparation Kit、MiSeq 和 HiSeq 系统

Hou Y, Guo H, Cao C, Li X, Hu B, et al. Single-cell triple omics sequencing reveals genetic, epigenetic, and transcriptomic heterogeneity in hepatocellular carcinomas. *Cell Res.* 2016;26:304-319

为充分了解单细胞水平上基因组、转录组和 DNA 甲基化组之间的相互作用机制，理想的做法是在同一个细胞上独立应用 3 种方法。在本研究中，作者报告了 scTrio-Seq，一种可同时分析单个哺乳动物细胞基因组 CNV、DNA 甲基化组和转录组的方法。研究在 25 个单个肝细胞癌原代细胞中使用 scTrio-Seq，以确定两个细胞亚群。研究还发现大范围 CNV 可导致基因亚组中的 RNA 表达成比例改变，但是 CNV 不影响相关基因组区域的 DNA 甲基化。

illumina 的技术：HiSeq 2000/2500 系统

Zhang CZ, Spektor A, Corniis H, et al. Chromothripsis from DNA damage in micronuclei. *Nature.* 2015;522:179-184

染色体碎裂是一种癌症和先天性疾病中新的突变现象。在该过程中，广泛 DNA 重排和 DNA 拷贝数的振荡模式限于一个或几个染色体。染色体碎裂的机制未知，但已提出该过程涉及核仁中染色体的物理分离。在本研究中，作者将单细胞基因组测序与活细胞成像结合起来，以表明微核形成可导致一系列基因组重排，包括染色体碎裂。具体来说，染色体碎裂的机制似乎涉及单个核仁内单个染色单体的断裂和后续重组。

illumina 的技术：HiSeq 和 MiSeq 系统

Ramani V, Deng X, Qiu R, et al. Massively multiplex single-cell Hi-C. *Nat Methods.* 2017;14:263-266

Sanders AD, Falconer E, Hills M, Spierings DCJ and Lansdorp PM. Single-cell template strand sequencing by Strand-seq enables the characterization of individual homologs. *Nat Protoc.* 2017;12:1151-1176

Wu X, Inoue A, Suzuki T and Zhang Y. Simultaneous mapping of active DNA demethylation and sister chromatid exchange in single cells. *Genes Dev.* 2017;31:511-523

Fingersh A and Homanics GE. Chromatin immunoprecipitation and gene expression analysis of neuronal subtypes after fluorescence activated cell sorting. *J Neurosci Methods.* 2016;263:81-88

Milani P, Escalante-Chong R, Shelley BC, Patel-Murray NL, Xin X, et al. Cell freezing protocol suitable for ATAC-Seq on motor neurons derived from human induced pluripotent stem cells. *Sci Rep.* 2016;6:25474

Qu W, Tsukahara T, Nakamura R, et al. Assessing Cell-to-Cell DNA Methylation Variability on Individual Long Reads. *Sci Rep.* 2016;6:21317

Fortin JP and Hansen KD. Reconstructing A/B compartments as revealed by Hi-C using long-range correlations in epigenetic data. *Genome Biol.* 2015;16:180

Guo H, Zhu P, Guo F, et al. Profiling DNA methylome landscapes of mammalian cells with single-cell reduced-representation bisulfite sequencing. *Nat Protoc.* 2015;10:645-659

Jin W, Tang Q, Wan M, et al. Genome-wide detection of DNase I hypersensitive sites in single cells and FFPE tissue samples. *Nature.* 2015;528:142-146

染色质转座酶可接近性单细胞测序分析

染色质转座酶可接近性单细胞测序分析 (scATAC-Seq) 是通过将微流体和 Tn5 tagmentation 结合起来, 用于绘制单细胞基因组中可接近区域的试验方案。在 scATAC-Seq 中, 细胞悬液加载到微流体系统中并单个分选。这里, 细胞经过裂解, 且 Tn5 转座酶通过测序条形码标记开发染色质区域。标记的 DNA 片段经过纯化, 并通过细胞特异性条形码扩增。随后, 将来自所有单细胞的文库混合, 深度测序以碱基对分辨率呈现了基因组中无核小体区域 (表 7)。

298. Pott S and Lieb JD. Single-cell ATAC-seq: strength in numbers. *Genome Biol.* 2015;16:172
299. Buenrostro JD, Wu B, Litzenberger UM, et al. Single-cell chromatin accessibility reveals principles of regulatory variation. *Nature.* 2015;523:486-490



scATAC-Seq 的概述图。

表 7. scATAC-Seq 的优点和缺点。

优点	缺点
<ul style="list-style-type: none"> 可对单细胞中的开放染色质区域进行深度测序。 与组合索引 scATAC-Seq 相比, 每个细胞的平均 read 更多 (70,000 read)。 可通过显微镜在微流体元件中单独捕获每个活细胞。 	<ul style="list-style-type: none"> 通量比组合索引 scATAC-Seq (最多可平行分析 96 个细胞) 低。²⁹⁸

参考文献

Buenrostro JD, Wu B, Litzenberger UM, et al. Single-cell chromatin accessibility reveals principles of regulatory variation. *Nature.* 2015;523:486-490

全基因组 DNA 可及性研究方法表明, 多种细胞的调控区域间存在大量变异。为了测试该异质性是否在单个细胞中存在, 作者研发了 scATAC-Seq。在该方法中, 使用微流体平台捕获并检测单个细胞。在 PCR 扩增和添加标签后, 作者使用 HiSeq 和 NextSeq 系统对这些单细胞文库进行测序。研究从 254 个 GM12878 淋巴干细胞以及其他细胞系生成了 DNA 可接近性图。研究数据阐述了单细胞表观遗传学异质性。

Illumina 的技术: Nextera DNA Sample Prep Kit、HiSeq 和 NextSeq 系统

Cusanovich DA, Daza R, Adey A, et al. Multiplex single cell profiling of chromatin accessibility by combinatorial cellular indexing. *Science.* 2015;348:910-914

本研究使用组合索引在数千个单细胞中测量了染色质可及性。作者分离细胞核并在各个孔对其大量标记 Tn5 转座酶。下一步, 研究混合这些标记的细胞核、将其稀释并重新分配到第二组孔中 (这里使用 PCR 引入第二个条形码)。作者将组合索引与 scATAC-Seq 整合²⁹⁹ 以为超过 15,000 个人和小鼠的单细胞测量染色质可接近性。研究在 MiSeq 系统上测序了 scATAC-Seq 文库, 且研究数据确定了细胞类型之间染色质可接近性中的相关差异。

Illumina 的技术: MiSeq 和 NextSeq 系统

单细胞亚硫酸氢盐测序 / 单细胞全基因组亚硫酸氢盐测序

单细胞亚硫酸氢盐测序 (scBS-Seq) 或单细胞全基因组亚硫酸氢盐测序 (scWGBS) 是已构建好的亚硫酸氢盐测序 (BS-Seq) 和全基因组亚硫酸氢盐测序 (WGBS) 后亚硫酸氢盐接头标记 (PBAT) 实验方案的版本, 经过修改以从单个细胞检测基因组 DNA 中的甲基化胞嘧啶。在该方法中, 分离单个细胞后, 基因组 DNA 经过亚硫酸氢盐钠处理, 片段化 DNA。转化后的 DNA 随后经过数次随机引导, 并进行 PCR 扩增以供测序。深度测序以单核苷酸分辨率呈现了单细胞的甲基化胞嘧啶 (表 8)。



scBS/scWGBS 的概述图。

表 8. scBS/scWGBS 的优点和缺点。

优点	缺点
<ul style="list-style-type: none"> 可覆盖全基因组范围内的 CpG 和非 -CpG 甲基化位点, 并达到单碱基分辨率。 在密集、低密度和重复区域覆盖 5mC 	<ul style="list-style-type: none"> 亚硫酸氢盐将未甲基化的胞嘧啶转化为胸腺嘧啶会降低序列复杂性, 这会增加比对难度。 亚硫酸氢盐转化后, 胞嘧啶转换为胸腺嘧啶处的 SNP 将丢失。 亚硫酸氢盐转化无法区分 5mC 和 5hmC。

参考文献

Luo C, Keown CL, Kurihara L, Zhou J, He Y, et al. Single-cell methylomes identify neuronal subtypes and regulatory elements in mammalian cortex. *Science*. 2017;357:600-604

单细胞 RNA-Seq 方法适用于确定脑中的多种神经元亚型。^{300,301} 在本研究中, 作者开发了一种鉴定单个神经元细胞中的表观基因组多样性的技术。这一技术即单核苷酸甲基胞嘧啶测序 (snmC-seq), 该技术利用了神经元中大量存在的 5-甲基胞嘧啶。作者从小鼠大脑皮层中分离了 3400 个单个神经元并通过 FACS 收集了细胞核。然后用亚硫酸氢盐处理了核 DNA, 将未甲基化的胞嘧啶转化为胸腺嘧啶, 5-甲基和 5-羟甲基胞嘧啶不受影响。最后, 混合、扩增样本并使用 HiSeq 4000 系统进行测序。作者利用 snmC-seq 生成了分离的神经元细胞核的 6000 个甲基化组, 数据确定小鼠脑中有 16 个小鼠神经元亚型。他们还从人大脑皮层样本中分离的核进行了 snmC-seq, 鉴定出了 21 个人类神经元亚型。因此, 单细胞甲基化组技术扩展了脑细胞多样性的分类。此外, 它确定了与神经元多样性相关的调控元件。

illumina 的技术: TruSeq Methylation kit、HiSeq 4000 系统

Farlik M, Sheffield NC, Nuzzo A, et al. Single-cell DNA methylome sequencing and bioinformatic inference of epigenomic cell-state dynamics. *Cell Rep*. 2015;10:1386-1397

WGBS 是当前最流行的甲基化定位方法。在本研究中, 作者描述了为单个细胞修改的 WGBS 方法 (scWGBS)。研究使用 FACS 分选细胞, 并直接在裂解的细胞中亚硫酸氢盐转化 DNA。下一步, 研究制备单链文库, 并使用 HiSeq 2000/2500 系统对其进行测序。研究使用 250 多个样本在三种细胞分化体外模型 (包括 K562 红白血病来源细胞系、HL60 细胞系和诱导的小鼠 ESC) 中验证了该方法。在所有三种模型中, scWGBS 详细分析了表观基因组重构的特征模式和细胞间异质性。

illumina 的技术: HiSeq 2000/2500 系统

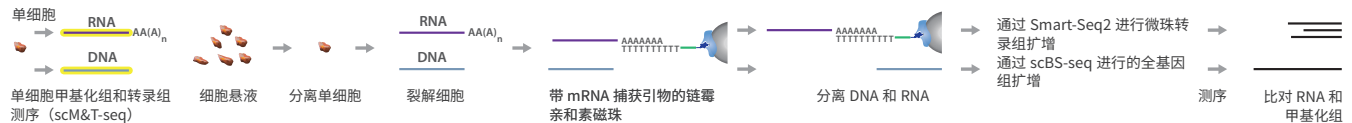
300. Tasic B, Menon V, Nguyen TN, et al. Adult mouse cortical cell taxonomy revealed by single cell transcriptomics. *Nat Neurosci*. 2016;19:335-346

301. Zeisel A, Munoz-Manchado AB, Codeluppi S, et al. Brain structure. Cell types in the mouse cortex and hippocampus revealed by single-cell RNA-seq. *Science*. 2015;347:1138-1142

单细胞甲基化组和转录组测序

scM&T-Seq 可使用 Smart-Seq2 和 scBS-Seq 从单个细胞进行表观遗传学和基因表达模式平行分析。scM&T-Seq 基于 G&T-Seq 构建，但不使用 MDA 进行 DNA 测序，而是使用 scBS-Seq 来解读 DNA 甲基化模式。

首先，单个细胞被分离出来并单个裂解。随后，使用链霉亲和素偶联 mRNA 捕获引物将 mRNA 分离，与 DNA 链物理分隔。Smart-Seq2 用于从 mRNA 生成 cDNA 文库，涉及伴随模板切换的逆转录和片段化。DNA 文库通过 scBS-Seq 制备，涉及 DNA 链的亚硫酸氢盐转化以确定甲基化胞嘧啶。两文库均可用于测序（表 9）。



scM&T-Seq 的概述图。

表 9. scM&T-Seq 的优点和缺点。

优点	缺点
<ul style="list-style-type: none"> 可研究单细胞内表观遗传学异质性与转录异质性之间的关联。 由于 DNA 和 RNA 经过物理分离并进行独立扩增，因此分析时无需掩盖编码序列。 	<ul style="list-style-type: none"> Smart-seq2 不具有链特异性，因此仅适用于 poly(A)⁺ RNA。 无法区分 5mC 和 5hmC。

参考文献

Angermueller C, Clark SJ, Lee HJ, Macaulay IC, Teng MJ, et al. Parallel single-cell sequencing links transcriptional and epigenetic heterogeneity. *Nat Methods*. 2016;13:229-232

多参数单细胞测序是一种发现基因组、转录组和表观遗传的异质性之间关系的有力工具。在本研究中，作者研发了 scM&T-Seq，一种可在同一细胞中进行甲基化组和转录组测序的多参数测序法。研究使用 G&T-Seq 实验方案纯化单细胞 DNA，随后将 DNA 进行单细胞亚硫酸氢盐转化（scBS-Seq）。³⁰² 使用 HiSeq 2000 系统，作者对 61 个小鼠 ESC 执行了 scM&T-Seq。研究发现许多多功能因子的基因表达水平与 DNA 甲基化负相关。这些数据表明表观遗传学异质性是 ESC 中波动多功能的重要机制。研究还表明 scM&T-Seq 可阐明以前不清楚的单个细胞中转录和 DNA 甲基化异质性之间的关系。

illumina 的技术：Nextera XT Kit、HiSeq 2000 系统

Hu Y, Huang K, An Q, et al. Simultaneous profiling of transcriptome and DNA methylome from a single cell. *Genome Biol*. 2016;17:88

在本研究中，作者开发了一种同时分析同一个单个细胞甲基化组和转录组的方法（scMT-Seq）。该方法与 scM&T-Seq 非常类似，除 scMT-Seq 使用单细胞简化的表观亚硫酸氢盐测序（scRRBS）进行甲基化组分析。作者通过在同时分析背根神经节（DRG）单个感觉神经元中的转录组和 DNA 甲基化组验证了该方法。研究数据确定了 DRG 神经元中的转录组和 DNA 甲基化组异质性。研究还发现基因甲基化和表达成正相关，但仅对于含有 CpG 岛启动子的基因如此。

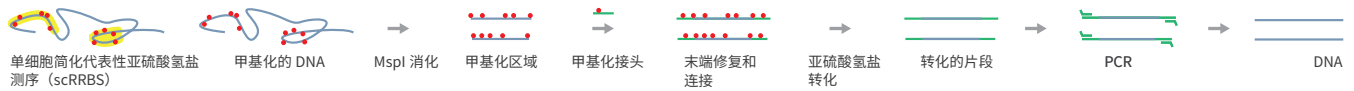
illumina 的技术：MiSeq 和 HiSeq 2500 系统

302. Smallwood SA, Lee HJ, Angermueller C, et al. Single-cell genome-wide bisulfite sequencing for assessing epigenetic heterogeneity. *Nat Methods*. 2014;11:817-820

单细胞简化代表性亚硫酸氢盐测序

RRBS 利用一种或多种限制酶处理基因组 DNA 进行序列特异性片段化。^{303,304} 再用亚硫酸氢盐处理片段化的基因组 DNA，然后测序。这是研究特定感兴趣区域的选择方法。该方法对启动子区和重复序列区等甲基化水平较高的位置尤其有效（表 10）。

303. Guo H, Zhu P, Guo F, et al. Profiling DNA methylome landscapes of mammalian cells with single-cell reduced-representation bisulfite sequencing. *Nat Protoc.* 2015;10:645-659
304. Guo H, Zhu P, Wu X, Li X, Wen L and Tang F. Single-cell methylome landscapes of mouse embryonic stem cells and early embryos analyzed using reduced representation bisulfite sequencing. *Genome Res.* 2013;23:2126-2135



scRRBS 的概述图。

表 10. scRRBS 的优点和缺点。

优点	缺点
<ul style="list-style-type: none"> • 能够以单碱基分辨率覆盖全基因组范围内的 CpG 岛。 • 覆盖 CpG 甲基化密集的区域 	<ul style="list-style-type: none"> • 限制酶在特异性位点切割，因此序列选择具有偏向性。 • 仅可测量基因组中 10%–15% 的 CpG。 • 无法区分 5mC 与 5hmC。 • 不覆盖非 CpG 区域、全基因组范围内的 CpG 以及不含限制性酶切位点区域内的 CpG。

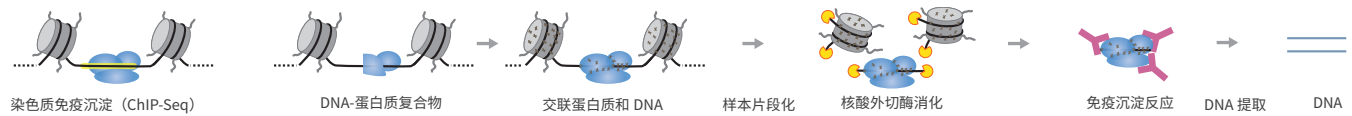
参考文献

Guo H, Zhu P, Guo F, Li X, Wu X, et al. Profiling DNA methylome landscapes of mammalian cells with single-cell reduced-representation bisulfite sequencing. *Nat Protoc.* 2015;10:645-659

单细胞染色质免疫沉淀测序

scChIP-Seq 是一种已经构建好的绘制特定蛋白质结合位点的方法。³⁰⁵ 在该方法中，DNA-蛋白质复合体在体内交联。样本随后片段化并使用核酸外切酶处理以修剪未结合的寡核苷酸。蛋白质特异性抗体用于免疫沉淀 DNA-蛋白质复合体。提取 DNA 并测序，得到高分辨率的蛋白质结合位点序列（表 11）。

305. Solomon MJ, Larsen PL and Varshavsky A. Mapping protein-DNA interactions in vivo with formaldehyde: evidence that histone H4 is retained on a highly transcribed gene. *Cell*. 1988;53:937-947
306. Zentner GE and Henikoff S. Surveying the epigenomic landscape, one base at a time. *Genome Biol*. 2012;13:250



scChIP-Seq 的概述图。

表 11. scChIP-Seq 的优点和缺点。

优点	缺点
<ul style="list-style-type: none"> 提供碱基对分辨率的蛋白质结合位点。 可定位具体的调控因子或蛋白质。 使用核酸外切酶消除了未结合 DNA 带来的污染。³⁰⁶ 	<ul style="list-style-type: none"> 非特异性抗体会稀释目标 DNA-蛋白质复合体。 目标蛋白质必须是已知的，并且能够产生抗体。

参考文献

Rotem A, Ram O, Shores N, et al. Single-cell ChIP-seq reveals cell subpopulations defined by chromatin state. *Nat Biotechnol*. 2015;33:1165-1172

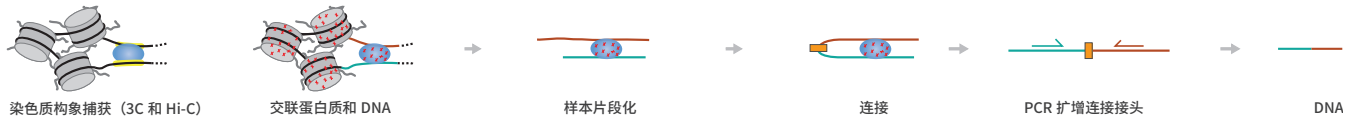
在本研究中，作者结合微流体、DNA 条形码和测序，在单细胞分辨率水平对染色质数据进行了分析。研究通过检测数千个单独细胞，并随后对每个细胞类型反褶积 ESC、成纤维细胞和造血祖细胞的混合物为染色质状态，验证了该技术。虽然来自单细胞的数据仅覆盖了 1000 个 read，检测数千个单独细胞的能力可鉴定一系列 ESC 亚群（由多功能和分化计时的染色质标记差异定义）。该方法揭示了 scRNA-Seq 单独无法捕获的表现遗传学异质性。

illumina 的技术：HiSeq 2500 系统

染色质构象捕获测序

染色质构象捕获测序 (Hi-C³⁰⁷ 或 3C-Seq³⁰⁸) 用于分析染色质相互作用。在该方法中, 使用甲醛交联 DNA-蛋白质复合物。样本片段化, 且 DNA 被连接和消化。得到的 DNA 片段进行 PCR 扩增并测序。深度测序以碱基对分辨率呈现了连接片段 (表 12)。

307. Lieberman-Aiden E, van Berkum NL, Williams L, et al. Comprehensive mapping of long-range interactions reveals folding principles of the human genome. *Science*. 2009;326:289-293
308. Duan Z, Andronescu M, Schutz K, et al. A genome-wide 3C-method for characterizing the three-dimensional architectures of genomes. *Methods*. 2012;58:277-288



Hi-C/3C-Seq 的概述图。

表 12. Hi-C/3C-Seq 的优点和缺点。

优点	缺点
<ul style="list-style-type: none"> • 能够检测长片段 DNA 相互作用。 • 高通量。 	<ul style="list-style-type: none"> • 检测可能会受到随机染色体碰撞的影响。 • 3C PCR 困难, 需要严格的控制和实验设计。 • 需要进一步确认相互作用。 • 由于步骤繁多, 因此需要大量起始材料。

参考文献

Kind J, Pagie L, de Vries SS, et al. Genome-wide maps of nuclear lamina interactions in single human cells. *Cell*. 2015;163:134-147

在间期, 哺乳动物染色体通过被称为核纤层相关结构域 (LAD) 的结构与核纤层 (NL) 相互作用。在本研究中, 作者研发了修改的 DNA 腺嘌呤甲基转移酶鉴定 (DamID) 方法, 以在 118 个单独的 KBM7 细胞中鉴定染色体 - NL 相互作用基因组范围绘图。数据显示在分析的大多数单个细胞中, 15% 的基因组与 NL 接触, 且该接触率为位点特异性。与在各个细胞间变异度更高的位点相比, 在各个细胞稳定的染色体 - NL 接触位点在基因中较少, 表明这些位点可发挥结构作用而不是表观遗传学作用。Hi-C 分析也显示带染色体内部协调 NL 接触的位点在细胞核空间极为接近。

illumina 的技术: HiSeq 2000/2500 系统

Nagano T, Lubling Y, Yaffe E, et al. Single-cell Hi-C for genome-wide detection of chromatin interactions that occur simultaneously in a single cell. *Nat Protoc*. 2015;10:1986-2003

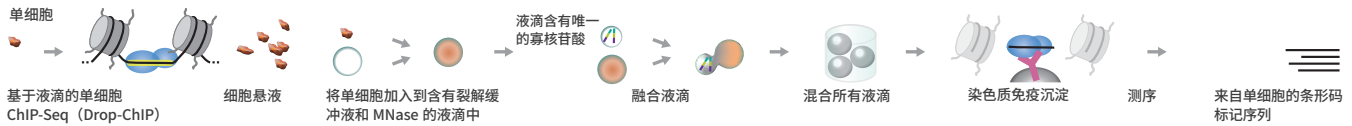
Hi-C 提供基因组区域上的配对信息, 在细胞核中空间位置相互极为接近。在本研究中, 作者通过核内连接修改了单细胞 Hi-C, 以鉴定数千个发生在单个细胞中的染色体相互作用。该修改可用磁珠捕获标记了的、交联连接接头, PCR 扩增单细胞 Hi-C 文库。作者通过对单个小鼠 T 辅助 1 (T_H1) 细胞进行单细胞 Hi-C, 验证了该方法。得到的 T_H1 相互作用组图谱提供了有关细胞核基因组组织和染色体结构的相关信息。

illumina 的技术: GA_{ITX} 系统

基于液滴的染色质免疫沉淀测序

基于液滴的单细胞染色质免疫沉淀测序 (Drop-ChIP-Seq) 通过微流体、唯一的分子条形码以及 NGS 来分析单个细胞的染色质状态。³⁰⁹ 首先, 将单个细胞分离到含有裂解缓冲液和 MNase 的液滴中, 随后将其与其他带有不同寡核苷酸的液滴融合。这些寡核苷酸带有细胞特异性条形码、测序接头和限制位点的序列。DNA 连接酶也与液滴融合以完成标记过程。接下来, 将载体染色质加入混合液滴中, 随后进行标准 ChIP-Seq 过程 (表 13)。

309. Rotem A, Ram O, Shoshani N, et al. Single-cell ChIP-seq reveals cell subpopulations defined by chromatin state. *Nat Biotechnol.* 2015;33:1165-1172



Drop-ChIP-Seq 的概述图。

表 13. Drop-ChIP-Seq 的优点和缺点。

优点	缺点
<ul style="list-style-type: none">可高度平行分析单细胞染色质状态。唯一的分子条形码可降低非特异性抗体带来的风险。	<ul style="list-style-type: none">需要大量样本细胞。

参考文献

Rotem A, Ram O, Shoshani N, Sperling RA, Goren A, et al. Single-cell ChIP-seq reveals cell subpopulations defined by chromatin state. *Nat Biotechnol.* 2015;33:1165-1172

在本研究中, 作者结合微流体、DNA 条形码和测序, 在单细胞分辨率水平对染色质数据进行了分析。研究通过检测数千个单独细胞, 并随后对每个细胞类型反褶积 ESC、成纤维细胞和造血祖细胞的混合物为染色质状态, 验证了该技术。虽然来自单细胞的数据仅覆盖了 1000 个 read, 检测数千个单独细胞的能力可鉴定一系列 ESC 亚群 (由多功能和分化计时的染色质标记差异定义)。该方法揭示了 scRNA-Seq 单独无法捕获的表现遗传学异质性。

illumina 的技术: HiSeq 2500 系统

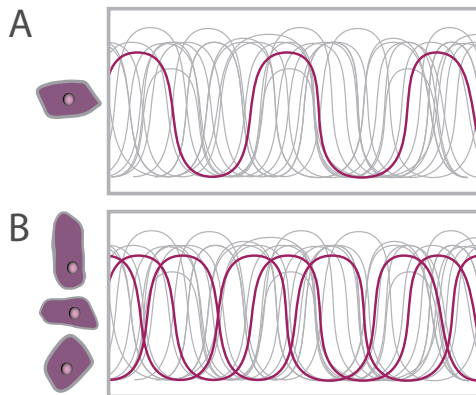
RNA 方法

低水平 RNA 检测指的是游离环境（如循环肿瘤 RNA）和单个细胞表达模式中稀有 RNA 分子的检测。组织由大量不同的细胞类型组成，每种类型具有独特的不同功能集。即使在单个细胞类型中，转录组也具有高度动态性，并反映时间、空间和细胞周期依赖性改变。扩增过程中的细胞收集、处理和技术有灵敏度和偏差问题加大了复杂性。要解决该多层次复杂性，需要分析数千个细胞。使用唯一条形码大大增加了可多路扫描和混合的样本数量，很少甚至不会降低每个样本相关的 read。近期在细胞捕获和样本制备上的进展可为我们提供更多的信息，速度更快且成本更低。^{310,311} 这一发展有望从根本上拓展我们对细胞功能的理解，对研究和人类健康具有重大意义。³¹²

“单细胞 RNA-seq 在分析复杂组织的细胞类型、动态状态和功能过程中变得愈发有用。” —Habib 等, 2017 年

最近，已开发出大规模平行测序技术，可分析数千个单个细胞的基因表达水平，使我们能够以前所未有的分辨率了解转录异质性。^{313,314} 此外，单细胞多参数方法的发展使我们可在单个细胞中同时分析转录组和表观基因组的改变。在近期的一项研究，甚至阐述了将单个细胞中基因组、转录组和表观遗传组（triple-omics）改变同时分析的方法。³¹⁵

本节着重介绍一些 scRNA-Seq 方法和近期发表的阐述 Illumina 技术如何用于 scRNA-Seq 的文献。了解更多有关 Illumina 测序技术的信息，请访问 www.illumina.com/techniques/sequencing.html。



单细胞转录组方法可在组织或器官的单个细胞中鉴定基因表达。

310. Saliba AE, Westermann AJ, Gorski SA and Vogel J. Single-cell RNA-seq: advances and future challenges. *Nucleic Acids Res.* 2014;42:8845-8860
311. Shapiro E, Biezuner T and Linnarsson S. Single-cell sequencing-based technologies will revolutionize whole-organism science. *Nat Rev Genet.* 2013;14:618-630
312. Spaethling JM and Eberwine JH. Single-cell transcriptomics for drug target discovery. *Curr Opin Pharmacol.* 2013;13:786-790
313. Macosko EZ, Basu A, Satija R, et al. Highly Parallel Genome-wide Expression Profiling of Individual Cells Using Nanoliter Droplets. *Cell.* 2015;161:1202-1214
314. Rotem A, Ram O, Shores N, et al. High-Throughput Single-Cell Labeling (Hi-SCL) for RNA-Seq Using Drop-Based Microfluidics. *PLoS One.* 2015;10:e0116328
315. Hou Y, Guo H, Cao C, et al. Single-cell triple omics sequencing reveals genetic, epigenetic, and transcriptomic heterogeneity in hepatocellular carcinomas. *Cell Res.* 2016;26:304-319

综述

Haque A, Engel J, Teichmann SA and Lonnberg T. A practical guide to single-cell RNA-sequencing for biomedical research and clinical applications. *Genome Med.* 2017;9:75

Liu S and Trapnell C. Single-cell transcriptome sequencing: recent advances and remaining challenges [version 1; referees: 2 approved]. *F1000Research.* 2016;5(F1000 Faculty Review):182

Faridani OR and Sandberg R. Putting cells in their place. *Nat Biotechnol.* 2015;33:490-491

Kanter I and Kalisky T. Single cell transcriptomics: methods and applications. *Front Oncol.* 2015;5:53

Kolodziejczyk AA, Kim JK, Svensson V, Marioni JC and Teichmann SA. The technology and biology of single-cell RNA sequencing. *Mol Cell.* 2015;58:610-620

Trapnell C. Defining cell types and states with single-cell genomics. *Genome Res.* 2015;25:1491-1498

Wang Y and Navin NE. Advances and applications of single-cell sequencing technologies. *Mol Cell.* 2015;58:598-609

316. Kurata M, Yamamoto K, Moriarity BS, Kitagawa M and Largaespada DA. CRISPR/Cas9 library screening for drug target discovery. *J Hum Genet.* 2018;63:179-186

参考文献

Datlinger P, Rendeiro AF, Schmid C, et al. Pooled CRISPR screening with single-cell transcriptome readout. *Nat Methods.* 2017;14:297-301

混合 CRISPR 筛选已成为功能基因组学的强大工具，用于鉴定生物学新机制、药物靶点和生物标记。³¹⁶ 此方法利用向导 RNA (gRNA) 载体文库转导细胞，并在选择性处理前后测量 gRNA 分布。这些筛选方法非常适用于相对简单的生物学产出，例如细胞存活、细胞增殖或单基因表达。在本研究中，作者开发了 CRISPR 液滴筛选 (CROP-seq)，可进行基于 CRISPR 的更复杂的基因表达筛选。他们将 gRNA 质粒文库引入 Jurkat 细胞，在每个细胞中表达 1 个可检测的 gRNA，然后用抗 CD3 和抗 CD28 抗体处理细胞以激活 T 细胞。他们对 Jurkat 细胞进行了 Drop-seq 以鉴定与单个 gRNA 有关的单细胞转录组，并鉴定了已知对 T 细胞激活极为重要的基因。此方法将 CRISPR 筛选与数千个单个细胞中的转录组应答联系起来，可实现单细胞转录组分辨率的 CRISPR 筛选。

illumina 的技术：BaseSpace™、HiSeq 2500 系统

Habib N, Avraham-Davidi I, Basu A, et al. Massively parallel single-nucleus RNA-seq with DroNc-seq. *Nat Methods.* 2017;14:955-958

单细胞 RNA-seq 是分析复杂组织的细胞类型、动态状态和功能过程的必备工具。同样，已经证实单个细胞核测序也可用于细胞类型区分，特别是用于难以分离单细胞的组织。目前的单细胞核测序方法依赖于使用 FACS 或 C1 微流体将单个细胞核分选到多孔板中，用于下游分析。在本研究中，作者开发了 DroNc-seq，该方法结合了单核测序和基于微流体的 Drop-seq。作者改进了 Drop-seq，不同于之前加入单细胞，而是向微流体液滴中加入单细胞核。他们对来自小鼠和人脑的约 39,000 个单个细胞核进行了大规模平行 RNA-Seq，成本低，且灵敏度与 Drop-seq 相似。

illumina 的技术：NextSeq 500 系统

Hou Y, Guo H, Cao C, Li X, Hu B, et al. Single-cell triple omics sequencing reveals genetic, epigenetic, and transcriptomic heterogeneity in hepatocellular carcinomas. *Cell Res.* 2016;26:304-319

为透彻获取在单细胞水平上，基因组、转录组和 DNA 甲基化组之间的相互作用机制，理想的做法是在同一个细胞上用这 3 种独立的方法。在本研究中，作者报告了 scTrio-Seq，一种可同时分析单个哺乳动物细胞基因组 CNV、DNA 甲基化组和转录组的方法。研究在 25 个单个肝细胞癌原代细胞中使用 scTrio-Seq，以确定两个细胞亚群。研究还发现大范围 CNV 可导致基因亚组中的 RNA 表达成比例改变，但是 CNV 不影响相关基因组区域的 DNA 甲基化。

illumina 的技术：HiSeq 2000/2500 系统

Jaitin DA, Weiner A, Yofe I, et al. Dissecting Immune Circuits by Linking CRISPR-Pooled Screens with Single-Cell RNA-Seq. *Cell*. 2016;167:1883-1896 e1815

在本研究中，作者开发了 CRISP-seq，该方法是一种 NGS 方法，结合了大规模平行单细胞 RNA-seq 和混合 CRISPR 筛选。他们利用此技术鉴定了数千个单个小鼠骨髓细胞的免疫发育和信号通路。通过分析单个细胞中的基因组干扰和转录组，他们鉴定了多个相互作用的因子，这些因子协调作用调控免疫信号通路。他们还特别鉴定了骨髓细胞中 Stat1 和 Rela 调控表达的一组特定基因。

illumina 的技术：MiSeq 和 NextSeq 500 系统

Lee JH, Daugharthy ER, Scheiman J, Kalhor R, Ferrante TC, et al. Fluorescent in situ sequencing (FISSEQ) of RNA for gene expression profiling in intact cells and tissues. *Nat Protoc*. 2015;10:442-458

scRNA-Seq 可分析整个细胞转录组的基因表达，但细胞分离通常会导致空间信息的丢失。原位杂交是确定基因位置的极佳技术，但限于固定数量的基因。在本研究中，作者展示了一种对细胞和组织中的基因表达进行原位分析的实验方案。此方法中，在共聚焦显微镜下，将 RNA 人工转化为交联的 cDNA 扩增子并测序。该方法添加了看家 / 结构基因环境特异性转录产物富集的益处，同时保留了转录位置的组织结构。

illumina 的技术：Nextera XT DNA Sample Preparation Kit、MiSeq 系统

Padovan-Merhar O, Nair GP, Biaesch AG, et al. Single mammalian cells compensate for differences in cellular volume and DNA copy number through independent global transcriptional mechanisms. *Mol Cell*. 2015;58:339-352

单个哺乳动物细胞在细胞大小和体积显示出广泛的多样性，但是保持了相同的绝对 DNA 含量。因此，很可能存在代偿机理来维持一致的基因表达产物浓度，尽管 DNA 浓度有差异。在此研究中，作者利用单分子计数和单细胞成像分析方法证明了单个人原代包皮成纤维细胞全局控制转录以补偿 DNA 量与细胞量在比例上的变化。研究使用 NextSeq 500 执行了 scRNA-Seq，并发现与其他基因相比，广泛表达的“看家基因”显示出更低的表达噪声水平。

illumina 的技术：Nextera XT DNA Sample Preparation Kit、NextSeq 500 系统

Lake BB, Codeluppi S, Yung YC, et al. A comparative strategy for single-nucleus and single-cell transcriptomes confirms accuracy in predicted cell-type expression from nuclear RNA. *Sci Rep*. 2017;7:6031

Sheng K, Cao W, Niu Y, Deng Q and Zong C. Effective detection of variation in single-cell transcriptomes using MATQ-seq. *Nat Methods*. 2017;14:267-270

Stoeckius M, Hafemeister C, Stephenson W, et al. Simultaneous epitope and transcriptome measurement in single cells. *Nat Methods*. 2017;14:865-868

Xie S, Duan J, Li B, Zhou P and Hon GC. Multiplexed Engineering and Analysis of Combinatorial Enhancer Activity in Single Cells. *Mol Cell*. 2017;66:285-299 e285

Dixit A, Parnas O, Li B, Chen J, Fulco CP, et al. Perturb-Seq: Dissecting Molecular Circuits with Scalable Single-Cell RNA Profiling of Pooled Genetic Screens. *Cell*. 2016;167:1853-1866 e1817

Habib N, Li Y, Heidenreich M, et al. Div-Seq: A single nucleus RNA-Seq method reveals dynamics of rare adult newborn neurons in the CNS. *Science*. 2016;353:925-928

Krishnaswami SR, Grindberg RV, Novotny M, Venepally P, Lacar B, et al. Using single nuclei for RNA-seq to capture the transcriptome of postmortem neurons. *Nat Protoc*. 2016;11:499-524

Mora-Castilla S, To C, Vaezeslami S, Morey R, Srinivasan S, et al. Miniaturization Technologies for Efficient Single-Cell Library Preparation for Next-Generation Sequencing. *J Lab Autom*. 2016;21:557-567

Achim K, Pettit JB, Saraiva LR, Gavriouchkina D, Larsson T, et al. High-throughput spatial mapping of single-cell RNA-seq data to tissue of origin. *Nat Biotechnol*. 2015;33:503-509

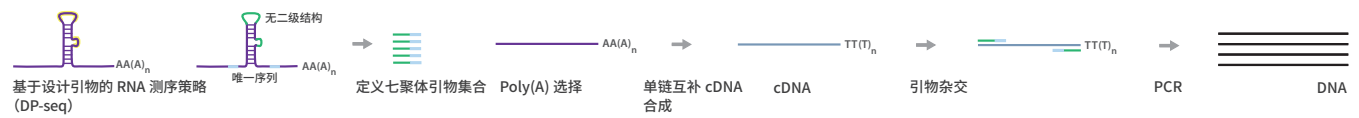
Dueck H, Khaladkar M, Kim TK, et al. Deep sequencing reveals cell-type-specific patterns of single-cell transcriptome variation. *Genome Biol*. 2015;16:122

Kim JK, Kolodziejczyk AA, Illicic T, Teichmann SA and Marioni JC. Characterizing noise structure in single-cell RNA-seq distinguishes genuine from technical stochastic allelic expression. *Nat Commun*. 2015;6:8687

Scialdone A, Natarajan KN, Saraiva LR, Proserpio V, Teichmann SA, et al. Computational assignment of cell-cycle stage from single-cell transcriptome data. *Methods*. 2015;85:54-61

基于设计引物的 RNA 测序

基于设计引物的 RNA 测序 (DP-Seq) 是一种从有限起始材料 (低至 50 pg) 扩增 mRNA 的方法。³¹⁷ 在该方法中, 设计了特异性七聚体引物集。富集的 poly(A)- 选定 mRNA 进行单链互补 cDNA 合成。设计的引物随后杂交至单链互补 cDNA, 随后为第二条链合成和 PCR。对扩增后的 DNA 进行深度测序, 可在单细胞水平准确检测特定 mRNA 的表达 (表 14)。



DP-Seq 的概述图。

表 14. DP-Seq 的优点和缺点。

优点	缺点
<ul style="list-style-type: none"> 使用少至 50 pg 的起始材料 转录本长度偏向性低。 	<ul style="list-style-type: none"> 目标区域的序列必须已知, 才能设计七聚体引物。 PCR 中的指数扩增可导致产生引物二聚体和假 PCR 产物。³¹⁸ 存在读长偏向性。

参考文献

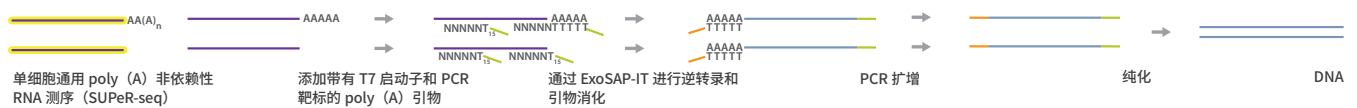
Bhargava V, Head SR, Ordoukhanian P, Mercola M and Subramaniam S. Technical variations in low-input RNA-seq methodologies. *Sci Rep.* 2014;4:3678

317. Bhargava V, Ko P, Willems E., Mercola M. and Subramaniam S. (2013) Quantitative transcriptomics using designed primer-based amplification. *Sci Rep* 3: 1740

318. Bhargava V, Head SR, Ordoukhanian P, Mercola M and Subramaniam S. Technical variations in low-input RNA-seq methodologies. *Sci Rep.* 2014;4:3678

单细胞通用 Poly(A) 非依赖性 RNA 测序

单细胞通用 Poly(A) 非依赖性 RNA 测序 (SUPeR-Seq) 可对单细胞的非 poly(A) 和 poly(A)+ RNA 进行测序。该方法专为绘制 RNA (circRNA) 种类设计。来自裂解的单个细胞的 RNA 样本与带有通用锚定序列 (AnchorX-T15N6) 的随机引物退火配对, 并逆转录生成 cDNA 的第一条链。在添加 poly(A) 束到 cDNA 的 3' 端之前, 未反应的引物会被消化以避免形成引物二聚体。通过以 100:1 的比例分别引入 dATP 和 ddATP 实现该目的。第二组随机引物也带有通用锚定序列 (AnchorY-T24), 退火配对至新合成的 poly(A) 束。第二条 cDNA 链通过逆转录生成, 且 cDNA 分子通过凝胶电泳纯化。纯化的 cDNA 分子使用 5'- 胺终止引物进行 PCR 扩增, 并按照 TruSeq DNA 文库制备实验方案制备用于测序。在测序 cDNA 文库后, circRNA 通过找到两个在参考基因组中远端但相邻的外显子 read, 且一个在数据集上倒转在另一个上得到确定。存在一个序列颠倒的相邻外显子即标志着此为环化 RNA (表 15)。



SUPeR-Seq 的概述图。

表 15. SUPeR-Seq 的优点和缺点。

优点	缺点
<ul style="list-style-type: none"> 可从单细胞中识别循环 RNA。 通过使用具有锚定序列的随机引物从而避免了 3' 偏向性。 由于使用随机引物, 因此可识别新的 circRNA。 	<ul style="list-style-type: none"> 依赖于数据集分析来鉴定 circRNA。

参考文献

Fan X, Zhang X, Wu X, et al. Single-cell RNA-seq transcriptome analysis of linear and circular RNAs in mouse preimplantation embryos. *Genome Biol.* 2015;16:148

虽然已研发了大量的 scRNA-Seq 方法, 但所有方法都只能特定检测多聚腺苷酸化的 RNA。哺乳动物细胞中大量表达的 RNA 缺乏 poly(A) 尾巴。在本研究中, 作者描述了 SUPeR-Seq, 一种 poly(A) 非依赖性 scRNA-Seq 方法。通过对小鼠胚胎植入前胚胎执行 SUPeR 测序, 研究发现了 2891 个 circRNAs 和 913 个芯线性转录本。该发现使得研究人员可分析哺乳动物胚胎发育中的 circRNA, 并鉴定 circRNA 的序列特征。

illumina 的技术: TruSeq DNA Sample Preparation Kit、TruSeq RNA Sample Preparation Kit、HiSeq 2000/2500 系统

Quartz-Seq

Quartz-Seq 方法可优化单细胞的全转录本扩增 (WTA)。³¹⁹ 在该方法中, 首先将带 T7 启动子的逆转录 (RT) 引物和 PCR 目的基因加入提取的 mRNA 中。逆转录合成单链互补 cDNA, 随后 RT 引物被核酸外切酶 I 消化。随后将 poly(A) 尾巴与包含 PCR 目的基因的 dT 引物一起添加到单链互补 cDNA 的 3' 端。在第二条链生成后, 添加阻断引物以确保 PCR 富集数量足够用于测序。深度测序能够准确、高分辨率地呈现单细胞的全转录组 (表 16)。

319. 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:R31



Quartz-Seq 的概述图。

表 16. Quartz-Seq 的优点和缺点。

优点	缺点
<ul style="list-style-type: none"> • 单试管反应, 适于自动化。 • 外切核酸酶 I 酶切逆转录引物可消除副产物的扩增。 • 在富集过程中抑制了短片段和副产物的生成。 	<ul style="list-style-type: none"> • PCR 偏向性会导致对高 GC 含量的模板测序不足。 • 由聚合酶导致的扩增错误将被错误地保留并测序。 • PCR 过程中, 聚合酶会优先扩增长度小于 500 bp 的靶标。

参考文献

Scialdone A, Natarajan KN, Saraiva LR, Proserpio V, Teichmann SA, et al. Computational assignment of cell-cycle stage from single-cell transcriptome data. *Methods.* 2015;85:54-61

单细胞 RNA-Seq 和转录分析拓展了我们对细胞异质性的理解, 这种理解是在大量测序水平下所无法实现的。重要的是, 细胞周期可为 scRNA-Seq 中转录异质性的主要驱动力。在本研究中, 作者使用 ESC 转录数据分析了六种受监管的计算算法来预测 G1、S 或 G2M 期。这些数据使用 Quartz-Seq 方法从使用 TruSeq Stranded RNA Sample Preparation Kit 构建的文库生成。通过在各种来自不同机体的 scRNA-Seq 数据集比较每种算法的性能, 作者得出基于主要成分分析的方法提供最佳结果的结论。

illumina 的技术: TruSeq Stranded RNA Sample Preparation Kit

Smart-Seq

Smart-Seq 研发作为单细胞测序实验方案，具有提高了的全转录本 read 覆盖范围。³²⁰ 完整覆盖全基因组可检测替代转录异构体和 SNP。在本实验方案中，细胞被裂解，且 RNA 杂交到包含引物的寡核苷酸（dT）。随后生成了第一条链，添加少数非模板 C 核苷酸。此 poly(C) 突出专门添加到全长转录本。寡核苷酸随后杂交到 poly(C) 突出并用于合成第二条链。对全长 cDNA 进行 PCR 扩增，获得纳克水平的 DNA。纯化 PCR 产物，用于测序（表 17）。



Smart-Seq 的概述图。

表 17. Smart-Seq 的优点和缺点。

优点	缺点
<ul style="list-style-type: none"> • 仅需 50 pg 的起始材料。 • 适用于未知的 mRNA 序列。 • 对全转录本的覆盖度更高。 • 可产生高水平的可定位 read。 	<ul style="list-style-type: none"> • 不具有链特异性。 • 无早期多重分析。³²¹ • 有转录本长度偏向性，对 4 kb 以上的转录本的转录效率不足。³²² • 优先扩增高表达的转录本。 • 纯化步骤可能导致材料丢失。 • 可能会有链入侵偏向性。³²³

参考文献

Bhargava V, Head SR, Ordoukhanian P, Mercola M and Subramaniam S. Technical variations in low-input RNA-seq methodologies. *Sci Rep.* 2014;4:3678

320. 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;30:777-782

321. Shapiro E, Biezuner T and Linnarsson S. Single-cell sequencing-based technologies will revolutionize whole-organism science. *Nat Rev Genet.* 2013;14:618-630

322. Bhargava V, Head SR, Ordoukhanian P, Mercola M and Subramaniam S. Technical variations in low-input RNA-seq methodologies. *Sci Rep.* 2014;4:3678

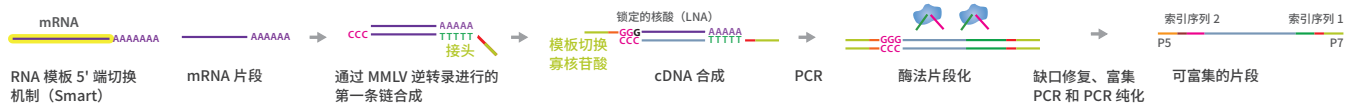
323. Tang DT, Plessey C, Salimullah M, et al. Suppression of artifacts and barcode bias in high-throughput transcriptome analyses utilizing template switching. *Nucleic Acids Res.* 2013;41:e44

Smart-Seq2

Smart-Seq2 对原有的 Smart-Seq 实验方案进行了若干改进。^{324,325} 新实验方案包括锁定的核酸 (LNA)、提高的 MgCl₂ 浓度、甜菜碱, 并减少了纯化步骤, 从而显著提高了文库产量。在本实验方案中, 在含有游离 dNTP 以及带有通用 5' 锚定序列和寡聚 (dT) 尾的寡核苷酸的缓冲液中裂解单细胞。通过逆转录在 cDNA 链的 3' 末端加入 2-5 个非模板核苷酸。加入一种模板切换引物探针 (TSO), 这种探针带有两个核糖鸟苷和一个经过修饰的鸟苷, 可生成一个 LNA 作为 3' 末端的最后一个碱基。第一条链合成后, cDNA 使用有限循环扩增。片段化随后用于从扩增的 cDNA 快速有效构建测序文库。

324. Picelli S., Bjorklund A. K., Faridani O. R., Sagasser S., Winberg G., et al. (2013) Smart-seq2 for sensitive full-length transcriptome profiling in single cells. *Nat Methods* 10: 1096-1098

325. Picelli S., Faridani O. R., Bjorklund Å. K., Winberg G., Sagasser S., et al. (2014) Full-length RNA-seq from single cells using Smart-seq2. *Nat. Protocols* 9: 171-181



Smart-Seq2 的概述图。

表 18. Smart-Seq2 的优点和缺点。

优点	缺点
<ul style="list-style-type: none"> • 仅需 50 pg 的起始材料。 • 适用于未知的 mRNA 序列。 • 对全转录本的覆盖度更高。 • 可产生高水平的可定位 read。 	<ul style="list-style-type: none"> • 不具有链特异性。 • 无早期多重分析。 • 仅适用于 poly(A)⁺ RNA。

参考文献

Krishnaswami SR, Grindberg RV, Novotny M, Venepally P, Lacar B, et al. Using single nuclei for RNA-seq to capture the transcriptome of postmortem neurons. *Nat Protoc.* 2016;11:499-524

为执行单细胞 RNA-Seq, 通常使用蛋白酶处理从组织中离解单个细胞。在本研究中, 作者显示该蛋白酶消化法改变了单个神经元的转录组。为克服该困难, 研究从死后的人大脑匀浆分离细胞核并通过 FACS 分选。研究还使用了 Smart-Seq2 从细胞核 mRNA 执行 cDNA 合成, 并使用 MiSeq 系统进行 Nextera XT 标记文库的测序。该方法对任何细胞解离需要苛刻处理的组织都适用。

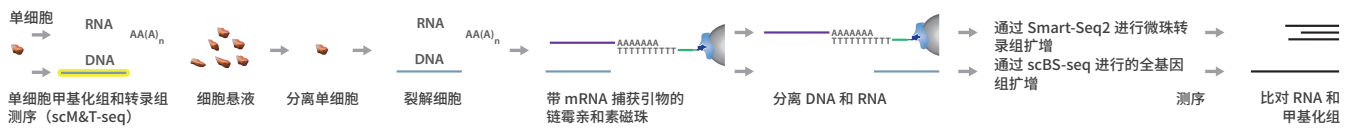
illumina 的技术: Nextera XT DNA Library Preparation Kit、MiSeq 系统

Ziegenhain C, Vieth B, Parekh S, et al. Comparative Analysis of Single-Cell RNA Sequencing Methods. *Molecular Cell.* 2017;65:631-643.e634

单细胞甲基化和转录组测序

scM&T-Seq 可使用 Smart-Seq2 和 scBS-Seq 从单个细胞进行表观遗传学和基因表达模式平行分析。scM&T-Seq 基于 G&T-Seq 构建，但不使用 MDA 进行 DNA 测序，而是使用 scBS-Seq 来解读 DNA 甲基化模式。

首先，单个细胞被分离出来并单个裂解。随后，使用链霉亲和素偶联 mRNA 捕获引物将 mRNA 分离，与 DNA 链物理分隔。Smart-Seq2 用于从 mRNA 生成 cDNA 文库，涉及伴随模板切换的逆转录和片段化。DNA 文库通过 scBS-Seq 制备，涉及 DNA 链的亚硫酸氢盐转化以确定甲基化胞嘧啶。两文库均可用于测序（表 19）。



scM&T-Seq 的概述图。

表 19. scM&T-Seq 的优点和缺点。

优点	缺点
<ul style="list-style-type: none"> 可研究单细胞内表观遗传学异质性与转录异质性之间的关联。 由于 DNA 和 RNA 经过物理分离并进行独立扩增，因此分析时无需掩盖编码序列。 	<ul style="list-style-type: none"> Smart-seq2 不具有链特异性，因此仅适用于 poly(A)⁺ RNA。 无法区分 5mC 和 5hmC。

参考文献

Angermueller C, Clark SJ, Lee HJ, Macaulay IC, Teng MJ, et al. Parallel single-cell sequencing links transcriptional and epigenetic heterogeneity. *Nat Methods*. 2016;13:229-232

多参数单细胞测序是一种发现基因组、转录组和表观遗传的异质性之间关系的有力工具。在本研究中，作者研发了 scM&T-Seq，一种可在同一细胞中进行甲基化和转录组测序的多参数测序法。研究使用 G&T 测序实验方案纯化单细胞 DNA，随后将 DNA 进行 scBS-Seq。³²⁶ 使用 HiSeq 2000 系统，作者对 61 个小鼠 ESC 执行了 scM&T-Seq。研究发现许多多功能因子的基因表达水平与 DNA 甲基化负相关。这些数据表明表观遗传学异质性是 ESC 中波动多功能的重要机制。研究还表明 scM&T 测序可阐明以前不清楚的单个细胞中转录和 DNA 甲基化异质性之间的关系。

illumina 的技术：Nextera XT Kit、HiSeq 2000 系统

Hu Y, Huang K, An Q, Du G, Hu G, et al. Simultaneous profiling of transcriptome and DNA methylome from a single cell. *Genome Biol*. 2016;17:88

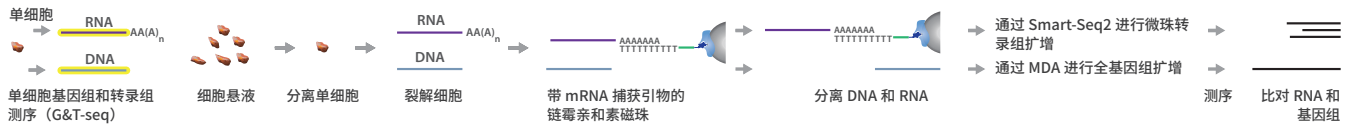
在本研究中，作者开发了一种同时分析同一个单个细胞甲基化和转录组的方法（scMT-Seq）。该方法与 scM&T-Seq 非常类似，除 scM&T-Seq 使用 scRRBS 进行甲基化组分析。作者通过在同时分析 DRG 单个感觉神经元中的转录组和 DNA 甲基化组验证了该方法。研究数据确定了 DRG 神经元中的转录组和 DNA 甲基化组异质性。研究还发现基因甲基化和表达成正相关，但仅对于含有 CpG 岛启动子的基因如此。

illumina 的技术：MiSeq 和 HiSeq 2500 系统

326. Smallwood SA, Lee HJ, Angermueller C, et al. Single-cell genome-wide bisulfite sequencing for assessing epigenetic heterogeneity. *Nat Methods*. 2014;11:817-820

基因组和转录组测序

G&T-Seq 是从单个细胞分离并测序基因组 DNA 和全长 mRNA 的实验方案。³²⁷ 在该方法中，单细胞被分离并裂解。RNA 使用寡核苷酸修饰生物素（dT）捕获引物捕获，并使用链霉亲和素包被磁珠与 DNA 分离。Smart-Seq2 用于在微珠上扩增捕获的 RNA，而 MDA 则用于扩增 DNA。测序后，整合 DNA 和 RNA 序列可使我们了解单细胞的基因表达谱。



G&T-Seq 的概述图。

表 20. G&T-Seq 的优点和缺点。

优点	缺点
<ul style="list-style-type: none"> 兼容所有 WGA 方法。 由于捕获的是全长转录本，因此序列 read 无 3' 端偏向性。 由于 DNA 和 RNA 经过物理分离并进行独立扩增，因此分析时无需掩盖编码序列。 	<ul style="list-style-type: none"> DNA 和 RNA 的物理分离会增加样本丢失或污染的风险。 DNA 和 RNA 的物理分离会增加处理时间。

参考文献

Angermueller C, Clark SJ, Lee HJ, Macaulay IC, Teng MJ, et al. Parallel single-cell sequencing links transcriptional and epigenetic heterogeneity. *Nat Methods*. 2016;13:229-232

多参数单细胞测序是一种发现基因组、转录组和表观遗传的异质性之间关系的有力工具。在本研究中，作者研发了 scM&T 测序，一种可在同一细胞中进行甲基化组和转录组测序的多参数测序法。研究使用 G&T 测序实验方案纯化单细胞 DNA，随后将 DNA 进行 scBS-Seq。³²⁸ 使用 HiSeq 2000 系统，作者对 61 个小鼠 ESC 执行了 scM&T 测序。研究发现许多多功能因子的基因表达水平与 DNA 甲基化负相关。这些数据表明表观遗传学异质性是 ESC 中波动多功能的重要机制。研究还表明 scM&T 测序可阐明以前不清楚的单个细胞中转录和 DNA 甲基化异质性之间的关系。

illumina 的技术：Nextera XT Kit、HiSeq 2000 系统

Macaulay IC, Haerty W, Kumar P, Li YI, Hu TX, et al. G&T-seq: parallel sequencing of single-cell genomes and transcriptomes. *Nat Methods*. 2015;12:519-522

单细胞基因组测序可使我们了解细胞异质性以及细胞谱系和发育。单细胞转录组测序重新定义了我们了解细胞类型和状态的了解。在本研究中，作者研发了 G&T 测序，一种可从单个细胞分离并随后测序基因组 DNA 和全长 mRNA 的方法。该方法补充了 DR-Seq 方法，³²⁹ 其可与任何 WGA 方法配合使用，并且可提供同一细胞的全长转录本。作者使用改进后的 Smart-Seq2 方案实现了 G&T-seq 的转录组分析，^{330,331} 并且在全自动液体处理工作站上实现了该方法自动化。研究使用 HiSeq 平台测序大量单细胞类型，包括人癌细胞、逆转录处理的小鼠胚胎分裂球和 iPSC 衍生神经元。值得注意的是，非整倍体分裂球的 G&T 测序分析表明单个细胞分裂过程中染色体获得 / 丢失导致了染色体范围相对基因表达的增加 / 丢失。

illumina 的技术：Nextera XT Kit、MiSeq、HiSeq 2500 和 HiSeq X Ten 系统

327. Macaulay IC, Haerty W, Kumar P, et al. G&T-seq: parallel sequencing of single-cell genomes and transcriptomes. *Nat Methods*. 2015;12:519-522
328. Smallwood SA, Lee HJ, Angermueller C, et al. Single-cell genome-wide bisulfite sequencing for assessing epigenetic heterogeneity. *Nat Methods*. 2014;11:817-820
329. Dey SS, Kester L, Spanjaard B, Bienko M and van Oudenaarden A. Integrated genome and transcriptome sequencing of the same cell. *Nat Biotechnol*. 2015;33:285-289
330. Picelli S, Bjorklund AK, Faridani OR, Sagasser S, Winberg G and Sandberg R. Smart-seq2 for sensitive full-length transcriptome profiling in single cells. *Nat Methods*. 2013;10:1096-1098
331. Picelli S, Faridani OR, Bjorklund AK, Winberg G, Sagasser S and Sandberg R. Full-length RNA-seq from single cells using Smart-seq2. *Nat Protoc*. 2014;9:171-181

基因组 DNA 和 mRNA 测序

DR-Seq 通过测序研究单个细胞的基因组和转录组关系。物理分离前的核酸扩增降低了样本丢失和污染风险。DR-Seq 涉及多个扩增步骤，包括类似于 MALBAC 的准线性扩增技术。

首先，使用带 Ad-1x 接头的多聚 (dT) 引物从裂解的单个细胞反转录 mRNA，生成 sscDNA。Ad-1x 接头序列包含血包识别条形码、5' Illumina 接头和 T7 启动子。下一步，gDNA 和 sscDNA 通过带 Ad-2 引物的准线性 WGA 同时扩增。这些引物与 MALBAC 接头类似，包含 8 个用于随机引导的随机核苷酸，后跟 5' 端的 27 个核苷酸恒定标签。该扩增步骤的产物一分为二。其中一本准备用于基因组测序，其中 gDNA 在 DNA 文库制备和测序前从其 Ad-2 接头进行 PCR 扩增并“释放”。另一半准备用于转录组测序，将其中第二条链合成 cDNA 并通过体外转录进行扩增。获得的 RNA 产物仅从两侧有 Ad-1x 和 Ad-2 的 cDNA 片段生成，忽略 gDNA 片段的扩增。按照 Illumina 小 RNA 实验方案制备 RNA 文库用于测序。对来自同一细胞的 gDNA 和 mRNA 进行测序可保留基因组与其表达水平间的信息 (表 21)。



DR-Seq 示意图。

表 21. DR-Seq 的优点和缺点。

优点	缺点
<ul style="list-style-type: none"> 可审视单细胞内的基因组和转录组行为。 分离前扩增减少了样本丢失和污染。 可利用基于长度的标签去除重复 read。 拟线性扩增降低了 PCR 偏向性。 	<ul style="list-style-type: none"> 人工单细胞分离有碍于高通量的实现。 拟线性扩增对温度敏感。 RNA read 具有 3' 端偏向性。³³²

参考文献

Dey SS, Kester L, Spanjaard B, Bienko M and van Oudenaarden A. Integrated genome and transcriptome sequencing of the same cell. *Nat Biotechnol.* 2015;33:285-289

单细胞基因组和转录组是定量单个细胞之间遗传和表达变异的有力工具。在本研究中，作者描述了 DR-Seq，一种同时定量同一细胞基因组和转录组的方法。DR-Seq 不要求在扩增前物理分离核酸，这帮助将样本丢失或污染的机会降到最低。作者从小鼠 ESC 扩增了 gDNA 和 cDNA，随后分裂核酸进行进一步扩增和文库构建，并使用 HiSeq 2500 系统对两个文库进行测序。他们证明，细胞间转录本数量差异大的基因 CNV 更低，反之亦然。

Illumina 的技术：HiSeq 2500 系统

332. Macaulay IC, Haerty W, Kumar P, et al. G&T-seq: parallel sequencing of single-cell genomes and transcriptomes. *Nat Methods.* 2015;12:519-522

T 细胞受体链配对

功能性 TCR 为由 α 和 β 链的独特组合构成的异二聚体蛋白质。对于准确的功能性分选，两个亚基必须一起测序以避免破坏 α - 和 β - 链在细胞裂解步骤配对。³³³



基于细胞的油包水 RT-PCR 技术可鉴定 TCR α - β 链配对。在各液滴中对释放的 TCR- α 和 TCR- β mRNA 进行逆转录、扩增和重叠延伸。产物从乳液中提取出来，且感兴趣融合分子被选择性扩增。使用阻断引物抑制未融合分子。³³⁴

参考文献

Ma Y, Mattarollo SR, Adjemian S, et al. CCL2/CCR2-dependent recruitment of functional antigen-presenting cells into tumors upon chemotherapy. *Cancer Res.* 2014;74:436-445

Papaemmanuil E, Rapado I, Li Y, et al. RAG-mediated recombination is the predominant driver of oncogenic rearrangement in ETV6-RUNX1 acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet.* 2014;46:116-125

333. Woodsworth DJ, Castellarin M and Holt RA. Sequence analysis of T-cell repertoires in health and disease. *Genome Med.* 2013;5:98

334. Turchaninova MA, Britanova OV, Bolotin DA, et al. Pairing of T-cell receptor chains via emulsion PCR. *Eur J Immunol.* 2013;43:2507-2515

335. Kivioja T, Vaharautio A, Karlsson K, et al. Counting absolute numbers of molecules using unique molecular identifiers. *Nat Methods.* 2012;9:72-74

唯一分子标记

UMI 为分子标记，可用于检查并定量唯一的 mRNA 转录本。³³⁵ 在该方法中，mRNA 文库通过片段化生成并随后逆转录为 cDNA。将带特异性测序接头的寡聚 (dT) 引物加到 cDNA 上。将另一个带有 10 bp 随机标签的测序接头以及索引序列加到模板的 5' 端，然后进行扩增和测序。测序产生了高分辨率的 read，可准确检测真实变异 (表 22)。



UMI 示意图。

表 22. UMI 的优点和缺点。

优点	缺点
<ul style="list-style-type: none"> 可测序单个 mRNA 转录本。 可用于检测低频转录本。 可根据特异于各条形码的测序 read 来定量转录本。 可应用于多个核型染色体平台。 	<ul style="list-style-type: none"> PCR 过程中，聚合酶会优先扩增长度小于 500 bp 的靶标。

参考文献

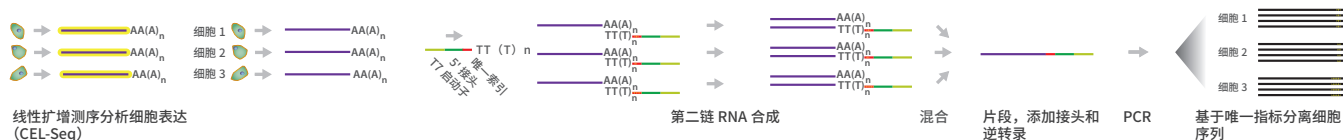
Cooper DA, Jha BK, Silverman RH, Hesselberth JR and Barton DJ. Ribonuclease L and metal-ion-independent endoribonuclease cleavage sites in host and viral RNAs. *Nucleic Acids Res.* 2014;42:5202-5216

Islam S, Zeisel A, Joost S, et al. Quantitative single-cell RNA-seq with unique molecular identifiers. *Nat Methods.* 2014;11:163-166

336. Hashimshony T, Wagner F, Sher N. and Yanai I. (2012) CEL-Seq: single-cell RNA-Seq by multiplexed linear amplification. *Cell Rep* 2: 666-673
337. Bhargava V, Head SR, Ordoukhanian P, Mercola M and Subramaniam S. Technical variations in low-input RNA-seq methodologies. *Sci Rep.* 2014;4:3678
338. Shapiro E, Biezuner T and Linnarsson S. Single-cell sequencing-based technologies will revolutionize whole-organism science. *Nat Rev Genet.* 2013;14:618-630

线性扩增测序分析细胞表达

CEL-Seq 应用 RNA 的标记和混合来克服低输入带来的困难。³³⁶ 在该方法中，每个细胞通过唯一的条形码引物在单个管中进行逆转录。第二条链合成后，来自所有反应管的 cDNA 进行混合并 PCR 扩增。通过对 PCR 产物的双向深度测序，可准确检测来自两条链的序列（表 23）。



CEL-Seq 的概述图。

表 23. CEL-Seq 的优点和缺点。

优点	缺点
<ul style="list-style-type: none"> 通过添加条形码和多样本混合，可进行多重分析，并一次性研究多个不同的单细胞。 由于每个细胞都在一个单独的管中进行处理，样本之间的污染大幅降低。 比单细胞标记逆转录测序 (STRT-Seq) 步骤更少。 几乎没有读长偏向性。³³⁷ 具有链特异性。 	<ul style="list-style-type: none"> 3' 偏向性很明显。³³⁸ 优先扩增高表达的转录本。 总共需要至少 400 pg RNA。

参考文献

Bose S, Wan Z, Carr A, Rizvi AH, Vieira G, et al. Scalable microfluidics for single-cell RNA printing and sequencing. *Genome Biol.* 2015;16:120

在本研究中，作者展示了一种全新的可扩展的高密度微流体平台，可在玻璃盖玻片或多聚物微珠上固相捕获 RNA。研究将单细胞裂解产物吸入密封的皮升微孔中，这些微孔可在玻璃上复印 RNA 或在小球上捕获 RNA。研究将该样本制备方法与基于 CEL-Seq 的可扩展的 scRNA-Seq 技术结合起来。该技术相对便宜，耗材成本为每个细胞 \$0.10-\$0.20，并可平行处理数百个单独细胞。

illumina 的技术: TruSeq RNA-Seq Library Preparation Kit、NextSeq 500 和 HiSeq 2500 系统

流动细胞表面逆转录测序

流动细胞表面逆转录测序 (FRT-Seq) 是一种在 2010 研发的转录组测序技术。³³⁹ 该方法为链特异性, 无需扩增, 并与双向测序兼容。首先, 用金属离子将 Poly(A)⁺ RNA 样本进行水解片段化并去磷酸化。然后, P7 引物连接到片段的 3' 端。接头序列在 5' 端从 RNA 的 20 核苷酸开始, 随后为 DNA 核苷酸。引物还 5' 磷酸化并在 3' 端通过铁红氧化 (ddC) 阻断。3' 接头连接后, 片段进行大小选择, 选择比接头长的核苷酸片段。片段的 5' 端磷酸化并连接到 P5 接头。这些接头的 5' 末端连有氨基 -C6 基团, 并被其阻断。现在片段两侧都有接头, 将其与流动槽杂交并逆转录, 然后进行簇生成和测序。FRT-Seq 可克服在单细胞测序中与 RNA 扩增相关的问题, 但是尚未在 scRNA-Seq 应用中使用。³⁴⁰



FRT-Seq 的概述图。

表 24. FRT-Seq 的优点和缺点。

优点	缺点
<ul style="list-style-type: none"> 可进行链特异性 poly(A)⁺ mRNA 测序, 用于转录组分析。 无扩增步骤——可更准确地呈现总 mRNA 群体, 避免扩增偏向性。 	<ul style="list-style-type: none"> 需要大量的输入 RNA 材料 (250 ng)。 仅选择 poly(A)⁺ mRNA 样本。

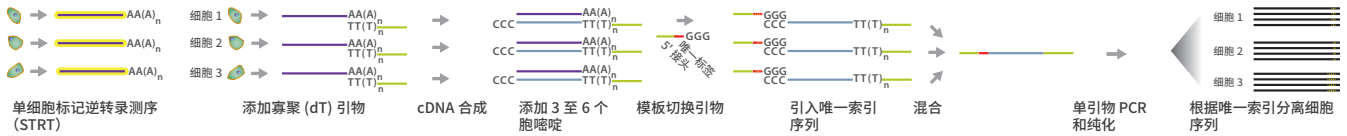
参考文献

Vergara-Irigaray M, Fookes MC, Thomson NR and Tang CM. RNA-seq analysis of the influence of anaerobiosis and FNR on *Shigella flexneri*. *BMC Genomics*. 2014;15:438

- Mamanova L, Andrews RM, James KD, et al. FRT-seq: amplification-free, strand-specific transcriptome sequencing. *Nat Methods*. 2010;7:130-132
- Wang X. Single Cell Sequencing and Systems Immunology. *Translational Bioinformatics*. 2015;5:177
- Islam S., Kjallquist U., Moliner A., Zajac P., Fan J. B., et al. (2011) Characterization of the single-cell transcriptional landscape by highly multiplex RNA-seq. *Genome Res* 21: 1160-1167

单细胞标记逆转录测序

STRT-Seq 是一种与 CEL-Seq 类似的方法, 包含唯一的标记和样本混合以克服材料有限样本带来的挑战。³⁴¹ 在该方法中, 首先在各个管中挑选单细胞, 其中单链互补 cDNA 合成使用添加了 3-6 个胞嘧啶的寡核苷酸 (dT) 引物合成。辅助寡核苷酸促进模板切换, 将条形码引入 cDNA。条形码标记 cDNA 随后通过单引物 PCR 扩增。深度测序可对单个细胞的转录组进行准确测序 (表 25)。



STRT-Seq 的概述图。

表 25. STRT-Seq 的优点和缺点。

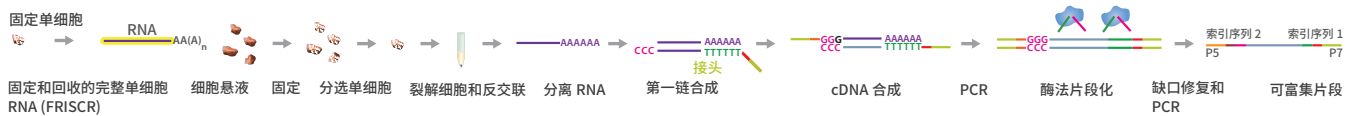
优点	缺点
<ul style="list-style-type: none"> 通过添加条形码和多样本混合，可进行多重分析，并一次性研究多个不同的单细胞。 由于每个细胞都在一个单独的管中进行处理，样本之间的污染大幅降低。 	<ul style="list-style-type: none"> PCR 偏向性会导致对高 GC 含量的模板测序不足。 非线性 PCR 扩增可导致序列偏向性，影响重现性和准确性。 由聚合酶导致的扩增错误将被错误地保留并测序。 PCR 过程中，聚合酶会优先扩增长度小于 500 bp 的靶标。

参考文献

Islam S, Zeisel A, Joost S, La Manno G, Zajac P, et al. Quantitative single-cell RNA-seq with unique molecular identifiers. *Nat Methods*. 2014;11:163-166

固定和回收的完整单细胞 RNA 测序

FRISCR 测序从固定的和染色的单细胞鉴定转录组谱。首先，细胞悬液使用多聚甲醛固定、透性化和免疫染色。单个细胞随后使用 FACS 分选到管中。这些细胞被裂解，且交叉联结通过在 56° C 孵育一小时被逆向交联。来自细胞的 mRNA 通过 dT25 磁珠拉下分离。mRNA 测序文库按照 Smart-Seq2 过程制备：1) 使用 Moloney 鼠白血病病毒逆转录酶进行模板切换逆转录；2) PCR 扩增得到的 cDNA；和 3) 使用 Nextera XT Library Preparation Kit 制备 cDNA 文库。片段现在两侧带有接头，并准备好可用测序（表 26）。



FRISCR 测序的概述图。

表 26. FRISCR 测序的优点和缺点。

优点	缺点
<ul style="list-style-type: none"> 对固定和染色后的单细胞的全长 mRNA 进行转录组分析。 免疫染色可识别罕见的细胞群体。 可生成全长 mRNA 的 read。 与 Triton-X100 裂解的固定细胞相比，可回收明显更多的 mRNA。 	<ul style="list-style-type: none"> 存在 3' 到 5' 偏向性。

342. Picelli S, Bjorklund AK, Faridani OR, Sagasser S, Winberg G and Sandberg R. Smart-seq2 for sensitive full-length transcriptome profiling in single cells. *Nat Methods*. 2013;10:1096-1098

参考文献

Thomsen ER, Mich JK, Yao Z, Hodge RD, Doyle AM, et al. Fixed single-cell transcriptomic characterization of human radial glial diversity. *Nat Methods*. 2016;13:87-93

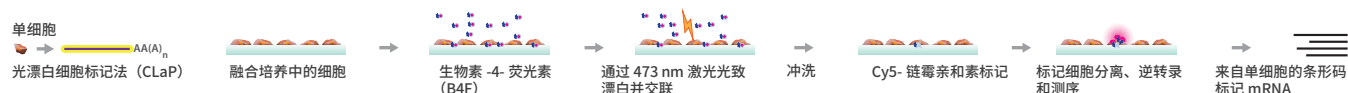
人新皮层从稀有祖细胞发育而来，尤其是 RG。这些细胞由于罕见难以鉴定，且由位置、形态和胞内标记共同确定。作者研发了一种方法，可进行单个已固定、染色和分选的细胞 RNA-Seq，称之为 FRISCR 测序。研究通过 FACS 分选出 RG 细胞并使用 Smart-Seq2²⁴² 制备 mRNA 文库，然后使用 MiSeq 系统测序。研究表明来自固定和纯化后单细胞的表达数据与从活细胞获得的数据相似。研究数据还鉴定了脑室带富集性 RG 和脑室下区局限性 RG 的亚群，以及每种亚型的新分子标记。

illumina 的技术：Nextera XT Library Preparation Kit、MiSeq 系统

光漂白细胞标记法

CLaP 是一种非侵入性、基于激光的单细胞标记技术。CLaP 在分离单个细胞进行测序前使用激光交联带荧光标记的特定细胞。

在 CLaP，使用激光照射感兴趣细胞通过交叉联结生物素 -4- 荧光素 (B4F) 标记细胞膜。链霉亲和耦合荧光标签随后连接到生物素标记的细胞。这些步骤可重复以使用多种荧光标记标记多个细胞类型。标记的细胞随后在测序前被分离并处理以生成 cDNA 文库 (表 27)。



CLaP 的概述图。

表 27. CLaP 的优点和缺点。

优点	缺点
<ul style="list-style-type: none"> 非侵入性，靶向基于激光的单细胞标记。 可以自动根据图像进行细胞选择。 可使用其他标签替代基于荧光的标签，如高电子密度分子。 可使用多色荧光染色剂。 	<ul style="list-style-type: none"> 基于图像的选择限制了高通量应用的潜力。 利用胞外基质和连续激光照射来扩散试剂会限制三维环境 / 组织的形成过程。 细胞特异性可能会在原代细胞培养过程中稍有降低。

参考文献

Binan L, Mazzaferri J, Choquet K, Lorenzo LE, Wang YC, et al. Live single-cell laser tag. *Nat Commun.* 2016;7:11636

由于单细胞测序法通常会导致细胞裂解和空间信息丢失，因此找到可在单细胞基因组分析中保留空间信息的方法及其重要。作者研发了一种 CLaP 法，将细胞标记与单细胞基因组结合起来。培养中的单个细胞通过激光光致漂白标记，然后基于大量不同特性分离。在本研究中，作者使用 CLaP 标记大量单层生长细胞系的不同细胞。研究使用基于液滴的微流体分离单个细胞，并使用 HiSeq 2500 系统执行 RNA-Seq。将空间信息与单细胞基因组结合起来的能力使得该方法很好的适用于研究组织异质性。

illumina 的技术：Nextera XT DNA Sample Preparation Kit、HiSeq 2500 系统

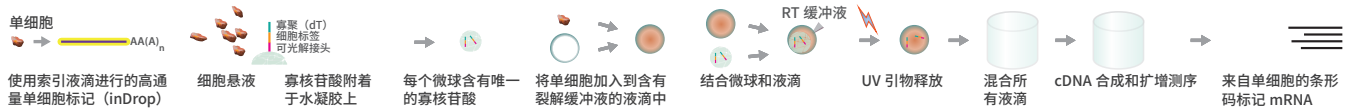
343. Macosko EZ, Basu A, Satija R, et al. Highly Parallel Genome-wide Expression Profiling of Individual Cells Using Nanoliter Droplets. *Cell.* 2015;161:1202-1214

344. Hashimshony T, Wagner F, Sher N and Yanai I. CEL-Seq: single-cell RNA-Seq by multiplexed linear amplification. *Cell Rep.* 2012;2:666-673

索引液滴

索引液滴 (inDrop) 用于高通量单细胞标记。该方法以 Drop 测序类似，³⁴³ 但使用水凝胶微球引入寡核苷酸。

来自细胞悬液的单细胞分离到含有裂解缓冲液的液滴中。细胞裂解后，细胞液滴与含有细胞特异性条形码的水凝胶微球融合，而另一液滴与酶融合用于逆转录。来自所有孔的液滴被混合并进行逆转录的等温反应。条形码寡核苷酸退火配对至 Poly(A)⁺ mRNA，并作为逆转录酶的引物发挥作用。每个 mRNA 链现在都有细胞特异性条形码。液滴被混合、破碎，且 mRNA 被纯化。cDNA 链的 3' 端在测序前连接到接头，扩增、退火配对至索引引物、并进一步扩增 (表 28)。测序方法与 CEL-Seq 类似。³⁴⁴



inDrop 的概述图。

表 28. inDrop 的优点和缺点。

优点	缺点
<ul style="list-style-type: none">使用微流体的高通量单细胞转录组分析。成本低：每个细胞 \$0.1 (实验需要 100 个细胞)。可高度扩展应用于更多细胞数量的实验。无片段化步骤。	<ul style="list-style-type: none">液滴中可能含有 2 个细胞或 2 个不同类型的条形码。

参考文献

Klein AM, Mazutis L, Akartuna I, et al. Droplet barcoding for single-cell transcriptomics applied to embryonic stem cells. *Cell*. 2015;161:1187-1201

大量单细胞测序的一个重大难题就是将单个细胞物理分离到单独的小室中。微流体平台可获得高度可扫描的单细胞测序法，但是这些系统仍昂贵，且样本通量有限。作者研发了 inDrop，一种基于高通量单细胞标记 (Hi-SCL) 方法，可在水凝胶液滴中物理分隔单个细胞，随后使用细胞特异性条形码进行 RNA-Seq。在本研究中，作者使用 MiSeq 和 HiSeq 系统执行数百个液滴分离的小鼠 ESC 和小鼠胚胎成纤维细胞 (MEF) 的 RNA-Seq。研究数据确认 inDrop 数据重复了大量数据，且 inDrop 数据可区分 ESC 和 MEF。

Illumina 的技术：MiSeq、HiSeq 2500 和 NextSeq 系统

Rotem A, Ram O, Shores N, et al. High-Throughput Single-Cell Labeling (Hi-SCL) for RNA-Seq Using Drop-Based Microfluidics. *PLoS One*. 2015;10:e0116328

考虑到单细胞数据的重要性，很有必要增加测序流程的通量。物理分隔大量单个细胞到微流体芯片小孔或小室的方法对于该努力至关重要。Hi-SCL 使用基于液滴的寡核苷酸条形码文库索引单个细胞。液滴用作微流体平台上的容器，且来自不同细胞的标记分子可混合而不会丢失细胞来源信息。在本研究中，作者使用 MiSeq 和 HiSeq 系统通过对数百个小鼠 ESC 和 MEF 执行 RNA-Seq 验证了 Hi-SCL。研究阐明单细胞数据可重复大量表达数据，且单细胞数据可区分 ESC 和成纤维细胞。与 Fluidigm C1 和 CEL-Seq 相比，Hi-SCL 是一种更快的、成本更低的大规模平行测序法。

Illumina 的技术：MiSeq 和 HiSeq 系统

Cacchiarelli D, Trapnell C, Ziller MJ, et al. Integrative Analyses of Human Reprogramming Reveal Dynamic Nature of Induced Pluripotency. *Cell*. 2015;162:412-424

Drop-Seq

Drop-Seq 以高度平行的方式分析来自单个细胞液滴的 mRNA 转录本。该单细胞测序法使用微流体设备分隔含有单细胞、裂解缓冲液和包被条形码标记引物的磁珠的液滴。每个引物包含：1) 一个 30 bp 寡核苷酸 (dT) 序列，以结合 mRNA；2) 一个 8 bp 分子索引，以唯一识别每条 mRNA 链；3) 一个对每个细胞唯一的 12 bp 条形码；4) 一个在所有小球完全一样的通用序列。分隔后，液滴中的细胞被裂解，且释放的 mRNA 杂交到引物小球的寡核苷酸 (dT) 束。所有液滴随后混合并破碎，以释放其中的小球。小球分离后，通过模板切换聚合酶逆转录。这生成第一条 cDNA 链，其 PCR 引物序列代替通用序列。cDNA 经过 PCR 扩增并使用 Nextera XT Library Preparation Kit 添加测序接头。条形码标记的样本准备好可进行测序 (表 29)。



Drop-Seq 的概述图。

表 29. Drop-Seq 的优点和缺点。

优点	缺点
<ul style="list-style-type: none"> 可高度平行分析单个细胞的序列。 唯一的分子和细胞条形码能够识别细胞和基因特异性 mRNA 链。 通过模板切换 PCR 进行逆转录可产生高产量的单细胞 read。 成本低——每个细胞 \$0.07（每 10,000 个细胞 \$653），且文库制备快速（每天 10,000 个细胞）。 	<ul style="list-style-type: none"> 用于液滴分离的微流体元件需要定制。 与其他 scRNA-Seq 方法相比，对每个细胞里的基因检测灵敏度偏低。³⁴⁵ 仅限于 mRNA 转录本。

345. Ziegenhain C, Vieth B, Parekh S, et al. Comparative Analysis of Single-Cell RNA Sequencing Methods. *Mol Cell*. 2017;65:631-643.e634

346. Fan HC, Fu GK and Fodor SP. Expression profiling. Combinatorial labeling of single cells for gene expression cytometry. *Science*. 2015;347:1258367

参考文献

Habib N, Avraham-Davidi I, Basu A, Burks T, Shekhar K, et al. Massively parallel single-nucleus RNA-seq with DroNc-seq. *Nat Methods*. 2017;14:955-958

单细胞 RNA-seq 是分析复杂组织的细胞类型、动态状态和功能过程的必备工具。同样，已经证实单个细胞核测序也可用于细胞类型区分，特别是用于难以分离单细胞的组织。目前的单细胞核测序方法依赖于使用 FACS 或 C1 微流体将单个细胞核分选到多孔板中，用于下游分析。在本研究中，作者开发了 DroNc-seq，该方法结合了单核测序和基于微流体的 Drop-seq。作者改进了 Drop-seq，不同于之前加入单细胞，而是向微流体液滴中加入单细胞核。他们对来自小鼠和人脑的约 39,000 个单个细胞核进行了大规模平行 RNA-Seq，成本低，且灵敏度与 Drop-seq 相似。

Illumina 的技术：NextSeq 500 系统

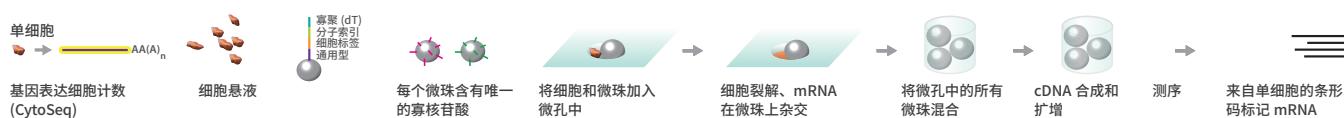
Macosko EZ, Basu A, Satija R, et al. Highly Parallel Genome-wide Expression Profiling of Individual Cells Using Nanoliter Droplets. *Cell*. 2015;161:1202-1214

scRNA-Seq 所面临的瓶颈之一为：可分离和分析的单个细胞数量受限。在本研究中，作者研发了 Drop-Seq，一种大规模平行 scRNA-Seq 方法，使用液滴中唯一的条形码标记引物小球和捕获的细胞。该包被方法可通过 RNA-Seq 在微流体平台上处理数千个单独细胞。作者通过应用该方法到小鼠视网膜验证了该技术。Drop-Seq 后，研究使用 NextSeq 系统对约 45,000 细胞执行 RNA-Seq，且确定了小鼠视网膜内 39 个不同细胞群。研究结果表明 Drop 测序可用于了解带多种细胞类型复合组织的生物学。

Illumina 的技术：Nextera XT DNA Sample Prep Kit、NextSeq 500 系统

CytoSeq

称为 CytoSeq 的基因表达血细胞计数实验方案可进行数千个单细胞的基因表达分析。³⁴⁶ 在本方法中，单个细胞首次随机沉积到小孔中。带特异性捕获探针的小球的组合文库添加到每个孔。细胞裂解后，mRNAs 杂交到小球，随后混合用于逆转录、扩增和测序。深度测序提供多个单细胞的准确的高覆盖基因表达谱（表 30）。



CytoSeq 的概述图。

表 30. CytoSeq 的优点和缺点。

优点	缺点
<ul style="list-style-type: none"> • 可稳定分析数十万 / 百万个细胞。 • 补充并扩展了基于荧光或质谱分析法的细胞计数能力。 • 可检测任何转录 mRNA，不受抗体可用性的限制。 • 可用于细胞数量不足、无法应用传统流式细胞术的小样本，以鉴定罕见细胞。 • 可直接分析细胞大小形状各不相同的复杂样本。 	<ul style="list-style-type: none"> • 测序深度需要大量 read（如，每个细胞 200,000 条转录本，实现 10x 覆盖度需要 2 百万条 read：1000 个细胞需要 20 亿条 read）。 • 单次运行更贵且耗时。 • 需要权衡测序深度和差异基因表达。

347. Buenrostro JD, Wu B, Litzgenberger UM, et al. Single-cell chromatin accessibility reveals principles of regulatory variation. *Nature*. 2015;523:486-490

参考文献

Cusanovich DA, Daza R, Adey A, Pliner HA, Christiansen L, et al. Multiplex single cell profiling of chromatin accessibility by combinatorial cellular indexing. *Science*. 2015;348:910-914

本研究使用组合索引在数千个单细胞中测量了染色质可及性。作者分离细胞核并在各个孔对其大量标记 Tn5 转座酶。下一步，研究混合这些标记的细胞核、将其稀释并重新分配到第二组孔中（这里使用 PCR 引入第二个条形码）。作者将组合索引与 scATAC 测序整合³⁴⁷以为超过 15,000 个人和小鼠的单细胞测量染色质可接近性。研究在 MiSeq 系统上测序了 scATAC 测序文库，且研究数据确定了细胞类型之间染色质可接近性中的相关差异。

Illumina 的技术：MiSeq 和 NextSeq 系统

Fan HC, Fu GK and Fodor SP. Expression profiling. Combinatorial labeling of single cells for gene expression cytometry. *Science*. 2015;347:1258367

单细胞组合标记快速且相对便宜，并且可在很大程度上提高大规模平行单细胞测序法的通量。在本研究中，作者研发了 CytoSeq，一种组合标记大量单个细胞的方法。单个细胞与包含细胞和转录本条形码探针的微珠组合文库一起放在单独的小孔中。作者对人 PBMC 执行 CytoSeq，并使用 MiSeq 系统测序扩增的 cDNA。研究分析了多个基因，并可确定 PBMC 的主要亚组。此外，通过比较初始和 CMV 激活的 CD8+ T 细胞的细胞异质性，研究确定了特定于 CMV 抗原的稀有细胞。CytoSeq 可用于不同大小和形状细胞的复杂混合物，以及其他生物分子。

Illumina 的技术：MiSeq 系统

单细胞 RNA 条形码标记和测序

单细胞 RNA 条形码标记和测序 (SCRB-Seq) 是一种有成本效益的 scRNA-Seq 技术。SCRB-Seq 使用 FACS 将单个细胞分离到小孔中。细胞裂解后，将有 Poly(A)⁺ 的 mRNA 退火至含有 poly(T) 链、UMI、标签序列并有生物素修饰的定制引物。模板切换逆转录和 PCR 扩增在 mRNA 上进行，生成条形码标记的全长 cDNA。所有小孔的 cDNA 链混合在一起以进行纯化。混合 cDNA 链通过 PCR 扩增并进行纯化。cDNA 文库使用含修饰 i5 引物的 Nextera XT kit 制备。得到的 cDNA 片段进行 300–800 bp 的大小选择并测序（表 310）。



SCRB-Seq 的概述图。

表 31. SCRB-Seq 的优点和缺点。

优点	缺点
<ul style="list-style-type: none"> 经济高效的高通量单细胞转录图谱分析。 与常用的 scRNA-Seq 技术相比, 可获得更高灵敏度的基因检测结果。³⁴⁸ 	<ul style="list-style-type: none"> 模板切换逆转录对全长 mRNA 有很强的偏向性。³⁴⁹

参考文献

Soumillon M, Cacchiarelli D, Semrau S, van Oudenaarden A and Mikkelsen TS. Characterization of directed differentiation by high-throughput single-cell RNA-Seq. *bioRxiv*. 2014;10.1101/003236

348. Ziegenhain C, Vieth B, Parekh S, et al. Comparative Analysis of Single-Cell RNA Sequencing Methods. *Molecular Cell*. 2017;65:631-643.e634

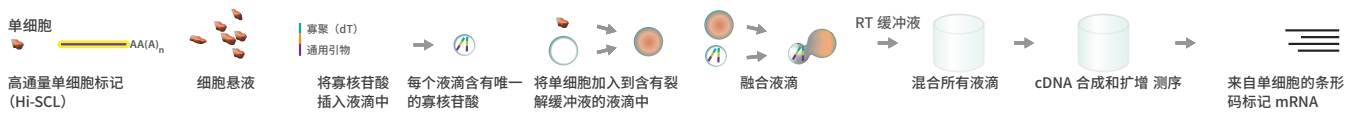
349. Shapiro E, Biezuner T and Linnarsson S. Single-cell sequencing-based technologies will revolutionize whole-organism science. *Nat Rev Genet*. 2013;14:618-630

350. Macosko EZ, Basu A, Satija R, et al. Highly Parallel Genome-wide Expression Profiling of Individual Cells Using Nanoliter Droplets. *Cell*. 2015;161:1202-1214

351. Klein AM, Mazutis L, Akartuna I, et al. Droplet barcoding for single-cell transcriptomics applied to embryonic stem cells. *Cell*. 2015;161:1187-1201

高通量单细胞标记

Hi-SCL 使用定制的微流体系统生成数千个单细胞的转录组谱, 与 Drop-Seq³⁵⁰ 和 inDrop 相似。³⁵¹ 来自细胞悬液 (细胞悬液) 的单细胞分离到含有裂解缓冲液的液滴中。细胞裂解后, 细胞液滴与含有细胞特异性条形码的液滴融合, 而另一液滴与酶融合用于逆转录。来自所有孔的液滴被混合并进行逆转录的等温反应。条形码寡核苷酸退火配对至 poly(A) + mRNA, 并作为逆转录酶的引物发挥作用。现在, 每条 mRNA 链都有细胞特异性条形码, 液滴被破碎且 mRNA 被纯化。cDNA 链的 3' 端在测序前连接到接头, 扩增、退火配对至索引引物、并进一步扩增 (表 32)。



Hi-SCL 的概述图。

表 32. Hi-SCL 的优点和缺点。

优点	缺点
<ul style="list-style-type: none"> 使用微流体系统的高通量单细胞转录组分析。 成本低——每个细胞 \$0.1 (实验需要 100 个细胞)。 可高度扩展应用于更多细胞数量的实验。 无片段化步骤。 	<ul style="list-style-type: none"> 寡核苷酸缺乏 UMI, 可能会产生扩增噪声。 液滴中可能含有 2 个细胞或 2 个不同类型的条形码。

参考文献

Rotem A, Ram O, Shores N, Sperling RA, Schnall-Levin M, et al. High-Throughput Single-Cell Labeling (Hi-SCL) for RNA-Seq Using Drop-Based Microfluidics. *PLoS One*. 2015;10:e0116328

考虑到单细胞数据的重要性，很有必要增加测序流程的吞吐量。物理分隔大量单个细胞到微流体芯片小孔或小室的方法对于该努力至关重要。Hi-SCL 使用基于液滴的寡核苷酸条形码文库索引单个细胞。液滴用作微流体平台上的容器，且来自不同细胞的标记分子可混合而不会丢失细胞来源信息。在本研究中，作者使用 MiSeq 和 HiSeq 系统通过对数百个小鼠 ESC 和 MEF 执行 RNA-Seq 验证了 Hi-SCL。研究阐明单细胞数据可重复大量表达数据，且单细胞数据可区分 ESC 和成纤维细胞。与 Fluidigm C1 和 CEL-Seq 等大规模平行测序相比³⁵²，Hi-SCL 更加快速、成本更低。

Illumina 的技术：MiSeq 和 HiSeq 系统

Cacchiarelli D, Trapnell C, Ziller MJ, Soumillon M, Cesana M, et al. Integrative Analyses of Human Reprogramming Reveal Dynamic Nature of Induced Pluripotency. *Cell*. 2015;162:412-424

352. Hashimshony T, Wagner F, Sher N and Yanai I. CEL-Seq: single-cell RNA-Seq by multiplexed linear amplification. *Cell Rep*. 2012;2:666-673

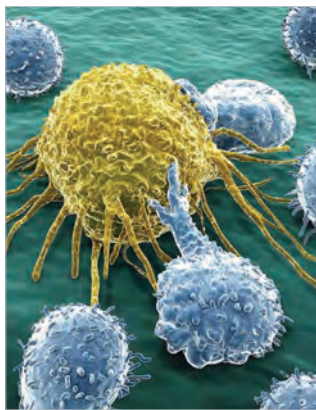
科学文献综述可从以下网站获取：

www.illumina.com/pubreviews



细胞生物学和复杂疾病研究的基因组解决方案

复杂疾病为多个基因和环境因素共同作用的结果。其与孟德尔氏遗传性状（或简单性状）不同，不遵循特定遗传模型，并且通常在群体中更常见。尽管其中一些疾病具有高度可遗传性，但当前已知的遗传变异仅可解释一部分估计的遗传率。本综述总体概述了基因组技术和新一代测序如何帮助复杂疾病研究。



癌症和免疫系统研究综述

高通量测序的进展极大提高了我们对癌症基因组以及肿瘤进展和治疗应答中涉及的胞内机制的理解。虽然到目前为止的主要关注点在癌细胞，该技术还可用于理解肿瘤细胞和肿瘤微环境周围环境中细胞之间的相互作用。

RNA 水平的表达分析可用于确定肿瘤微环境中通路的激活。由于常见的信号通路涉及多种癌症标志的表现（包括癌细胞增殖、存活、侵入、转移和免疫抑制），靶向这些共同的信号通路并联合免疫疗法，可能是一种有前景的癌症治疗策略。

本科学文献综述由 Illumina 公司出品。

Illumina 中国

上海办公室 · 电话 (021) 6032-1066 · 传真 (021) 6090-6279

北京办公室 · 电话 (010) 8455-4866 · 传真 (010) 8455-4855

技术支持热线 400-066-5835 · techsupport@illumina.com · www.illumina.com.cn

仅供研究使用。不得用于诊断。

© 2018 Illumina, Inc. 保留所有权利。Illumina, IlluminaDx, BaseSpace, BeadArray, BeadXpress, cBot, CSPro, DASL, DesignStudio, Eco, GAllx, Genetic Energy, Genome Analyzer, GenomeStudio, GoldenGate, HiScan, HiSeq, Infinium, iSelect, MiSeq, Nextera, NuPCR, SeqMonitor, Solexa, TruSeq, TruSight, VeraCode, VeriSeq PGS, 24sure®, Karyomapping, 南瓜橙色和 Genetic Energy 流媒体设计均为 Illumina, Inc 的商标或注册商标。本文档包含的所有其他品牌和名称均为其各自所有者的财产。

Pub. No. 770-2016-023- A QB6224 Current as of 29 September 2018



@illumina_china



@illumina

illumina®