

临床医学

单细胞测序的技术概述

王权¹, 王铸^{1,2}, 张振¹, 李晨¹, 张萌萌¹, 叶颖江¹, 王杉¹, 姜可伟^{1*}

(1. 北京大学人民医院胃肠外科/外科肿瘤研究室/结直肠癌诊疗研究北京市重点实验室, 北京 100044;

2. 山东大学附属省立医院胃肠外科, 山东 济南 250021)

[摘要] 单细胞测序(single cell sequencing, SCS)技术,是指在单个细胞水平上对其携带的遗传信息进行测序,旨在分子层面获得某种细胞类型的基因序列、转录本、蛋白质及表观遗传学表达谱信息并进行整合分析,目前广泛应用于新物种鉴定、病原筛查、病原进化、发育生物学、神经科学、肿瘤异质性研究以及循环肿瘤细胞等。单细胞测序技术可深层次了解同类细胞不同亚群的分布及状态、作用过程及协作机制等,为探究生命形式和生物行为提供了全新的认识。本文从单细胞测序技术的发展及单细胞分离、多组学的测序等方面作以综述,以期后续研究提供参考。

[关键词] 单细胞测序;样品准备;单细胞分离;进展;概述

[中图分类号] Q819 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1009-0959(2020)07-0433-07

Overview of the Technology of Single Cell Sequencing

WANG Quan¹, WANG Zhu^{1,2}, ZHANG Zhen¹, LI Chen¹, ZHANG Mengmeng¹,YE Yingjiang¹, WANG Shan¹, JIANG Kewei^{1*}

(1. Department of Gastroenterological Surgery & Laboratory of Surgical Oncology & Beijing Key Laboratory of Colorectal Cancer Diagnosis and Treatment Research, Peking University People's Hospital, Beijing 100044, China; 2. Department of Gastrointestinal Surgery, Provincial Hospital Affiliated to Shandong University, Shandong Jinan 250021, China)

[Abstract] Single cell sequencing (SCS) technology refers to sequencing the genetic information at a single cell level, which aims to obtain and analyze the gene sequences, transcripts, proteins and epigenetic expression profile information of a specific cell type. It is widely used in new species identification, pathogen screening and evolution, developmental biology, neuroscience, tumor heterogeneity research and circulating tumor cells at present. SCS technology can make us gain a deeper understanding of different subgroups of the same type of cells, and provide a new understanding of exploring life forms and biological behaviors of organisms. Here, we conducted a brief overview of the development of SCS, single-cell isolation and multi-omics, and summarized their progression, to provide a reference for the further researches.

[Key Words] Single cell sequencing; Sample preparation; Single-cell separation; Progression; Overview

自1665年Hooke发现细胞以来,人类对细胞的研究持续进行,目前研究估计人体至少有37.2万亿细胞,22种组织,约300种细胞类型,但是存在更多的细胞亚型和细胞状态^[1]。为了获取高分辨率

的细胞类型、数量、位置、关系和分子表达信息,准确描述、定义健康和疾病的细胞组成及状态,一项具有时代意义的研究——人类细胞图谱(human cell atlas, HCA)计划被提出^[2]。然而,传统测序技术(bulk sequence)仅对比较两类不同来源组织的差异有所帮助,缺点在于无法研究组织内细胞间的异质性,且对于基因表达的本质研究也不够深入。究其原因,传统测序中的组织样本包含了成千上万的细胞,混合一起得到所有细胞的全基因组序列信息,故而最终测序结果反映的是一群细胞中所有基因信号的平均值,或代表其中数量占明显优势的细胞

[基金项目] 教育部科技发展中心产学研创新基金——“智融兴教”基金(项目编号:2018A01013;项目名称:基于真实世界及测序资料下结直肠癌诊疗大数据模型的构建与应用研究)

[作者简介] 王权,男,在读博士研究生,研究方向:结直肠癌肝转移关键基因的细胞筛选。E-mail: wangquan2013@126.com

***[通讯作者]** 姜可伟,男,主任医师,副教授,研究方向:胃肠道及甲状腺肿瘤的临床与基础研究。E-mail: jiangkewei@pkuph.edu.cn

遗传信息,而忽视了单个细胞所特有的基因信息^[3]。为了克服上述传统测序的缺点,基于全方位、多层次以及高通量的单细胞测序(single-cell sequencing, SCS)技术应运而生。单细胞测序技术的应用,在分子层面可获得某种细胞类型的基因序列、转录本、蛋白质及表观遗传学表达谱信息,通过功能分析能将这些遗传及表达信息与细胞行为联系起来,以及使用空间作图可将细胞定位于某个组织或器官之内,最终获得不同类型细胞的图谱^[4,5]。1990年,Brady等^[6]首次报道单细胞cDNA扩增方法;2009年,Tang等^[7]报道高通量测序的单细胞转录组测序(scRNA-seq)技术;2013年,单细胞测序技术被评选为年度技术^[8];单细胞测序技术不断发展。该技术一方面能更加精确地测量基因表达水平,且能检测到微量表达的非编码RNA;另一方面,能充分发挥特殊样本的测序优势,弥补特殊样本获取量少、不能满足传统的全基因组测序等问题,如肿瘤循环细胞、组织微阵列、早期发育的胚胎细胞等^[9,10]。本文从单细胞测序技术的发展及单细胞分离、多组学的测序等方面作

以综述,简单介绍了单细胞测序技术流程,回顾总结了当前该技术最新的进展、现状以及局限性,以期为后续研究提供参考。

1 单细胞测序技术

1.1 单细胞样本准备

和传统测序的样本准备相比,单细胞测序的样本显然要求更高。常见的单细胞测序技术的样本准备均采用新鲜组织样本分离的细胞,以此来避免从体内分离后缺血和缺氧对组织和细胞状态的影响。但由于实际操作过程中条件限制,样本实时处理无法进行;不同时间收集多个样本后进行同时处理可避免技术批次效应^[11]。

1.2 单细胞分离与提取

单细胞分离技术分类众多,单细胞分离溶解后获得pg级的核酸,通过扩增至ng或μg级,然后用于后续的测序。根据样本的状态、需要细胞的数量、分析的目的等不同,发展出了多种单细胞分离提取方法。见表1。

表1 主要的单细胞分离技术

单细胞分离技术	技术简介	优势	不足	分类	参考文献
有限稀释法	手动移液管、移液器将细胞悬液进行稀释来达到分离单细胞的目的	工艺简单,重复性好,成本低	不易进行细胞识别,且很难避免DNA污染情况	低通量	-
显微操作(手工细胞采集)	显微操作基础为目测细胞形态及染色特性,在显微镜下手动分离单个细胞	工艺简单,低成本且适用于悬浮细胞	识别细胞容易出错,且有DNA污染	低通量	[12]
激光捕获显微切割(LCM)	显微镜确认需要操作的目标细胞,激光会根据轨迹切除并分离提取标记区域细胞	可行活组织的细胞提取且福尔马林固定、石蜡包埋以及冷沉淀固定样本均可处理。结合免疫组化技术以实现单细胞水平的分析	手工操作,容易破坏细胞完整性,且单个细胞会混合相邻细胞的成分,降低准确性	低通量	[13]
荧光活化细胞分选(FACS)	将活的组织或细胞群制备成单细胞悬液,并用特异性荧光色素加以标记,在流体驱动下,细胞悬液排列成束状流动的形式通过激光照射区域,光探测器通过捕捉激光激发的细胞特有信号来分析细胞类型	应用领域广泛,不仅包括DNA含量分析、免疫表型、可溶性分子定量、细胞周期分析、造血干细胞、凋亡、亚群的定量、微生物分析和癌症诊断,而且还能筛选高度异质性细胞群中占有率小于1%的罕见细胞	样本须为单细胞悬液状态,丢失部分细胞功能和细胞间作用等信息;标志物表达相似的亚群荧光染料光谱存在重叠;低强度荧光样品无法检测;很难做到无菌操作等。	高通量	[14]
磁活化细胞分选(MACS)	同FACS,将带有磁珠的特异抗原与细胞表面特异性受体结合,进行磁力分选	同FACS,与FACS相比,MACS需要更少的设备和更少的时间	同FACS,MACS缺乏荧光标记所提供的灵敏度和细胞特异性	高通量	
微流体技术(microfluidic control)	用充满油性试剂的通道中容纳分离的水滴,包含有分离的单细胞。按照泊松分布随机分离单细胞;计算机控制开关,把微流体的通道调整成目标细胞的平均大小行单个细胞筛选	可最多每秒数千个细胞的高通量分离和分选;可平行进行大量细胞的操作。流体动力学捕获甚至可以集成到手动吸取单细胞,而不再需要显微镜下微型移液器操作等	成本较高	高通量	[15-18]

LCM:laser capture microdissection; FACS:fluorescence activating cell sorter; MACS:magnetic activated cell sorting

1.3 单细胞测序

1.3.1 单细胞基因组测序技术

单细胞基因组测序技术的原理是将分离的单个细

胞的微量全基因组DNA进行扩增,获得高覆盖率的完整基因组之后通过外显子捕获进而高通量测序,用于揭示细胞群体差异和细胞进化关系。利用精确的分离

技术分离出单个细胞,提取并通过新一代全基因组扩增(whole genome amplification, WGA)技术扩增其

DNA,获取单细胞全基因组的图谱。表 2 总结了当前主要应用最多的单细胞基因组测序技术。

表 2 主要的单细胞基因组测序技术

单细胞基因组测序技术	原理简介	优势	不足	分类	参考文献
引物延伸预扩增 PCR (PEP-PCR)	利用随机组成的 15 个寡核苷酸作为引物,在 DNA 聚合酶的作用下对基因组进行随机扩增	与传统 WGA 方法相比,基于 PCR 的部分随机引物的方法	非特异扩增高,且扩增效率不高,应用受限	低通量	-
连接锚定型 PCR (LA-PCR)	利用限制性内切酶将 DNA 消化成的片段,Klenow 修饰末端后连接特异性的接头作为起始模板,而接头序列作为引物进行扩增	除酶切位点间长度有偏差外,较少发生序列选择性偏移	非特异扩增高,且扩增效率不高,应用受限	低通量	[19]
退变寡核苷酸引物 PCR (DOP-PCR)	引物的 3' 含 6bp 的随机序列,可随机的和基因组 DNA 结合,从而实现全基因组的扩增	DOP-PCR 适合对染色体的 CNV 进行定量	PCR 的指数扩增,基因组覆盖度较低,非特异扩增且扩增效率不高(15%)	低通量	[20]
多重置换扩增法 (MDA)	依赖 Phi29 DNA 聚合酶和 Bst 大片段 DNA 聚合酶,且具有多重置换的特性。在等温下运用随机六聚体引物和本酶在多个位点上同时起始复制,沿模板合成 DNA,以链取代的方式扩增	Phi29DNA 聚合酶在较低/恒温下催化 DNA 延伸。可加工较长扩增产物和具有高效扩增能力。且实验方法简单	指数扩增过程易产生序列依赖性偏倚、全基因组覆盖度不均匀、等位基因丢失率可高达 65%,不适合进行 CNV 的分析	较高通量	[21]
多重退火环状循环扩增法 (MALBAC)	利用引物将扩增子的头尾互补行成环状连接,通过五轮 MDA 预扩增得到完整扩增产物;增加退火步骤达到链内杂交自我锁定,形成闭合的环状分子,避免指数扩增;再通过常规 PCR 进行扩增	操作较简单、最低起始模板需求量少,产量高、均一性高。采用线性扩增方式;可提高单细胞全基因组测序的精确度,发现个别细胞间的遗传差异	假阳性率的可能性较高,扩增均一性更好,但扩增效率相对较低	高通量	[22]
转座子插入的线性扩增 (LIANTI)	使用 Tn5 转座子随机切割 DNA,行体外转录和反转录,无需使用非特异性引物即可实现线性扩增	较大地减少扩增时的序列偏倚,高基因覆盖率,CNV 检测的高精确度	C-T 碱基对的假阳性较高	高通量	[23]

注:PEP-PCR:primer extension pre amplification PCR; LA-PCR:ligation anchorage PCR; DOP-PCR:degenerate oligonucleotide primer PCR; MDA:multiple permutation amplification of MDA; MALBAC:multiple annealing loop amplification method malbac; LIANTI:linear amplification of transposon insertion

1.3.2 单细胞转录组测序技术

单细胞转录组测序(single-cell transcriptomic sequencing)技术首先由 M Azim Surani 及汤富酬等研究团队于 2009 年研究报道^[7]。但直到 2014 年,随着该方法的逐渐成熟与测序成本的大幅度降低,这种方法才渐次进入公众的视野。表 3 总结了当前主要的单细胞转录组测序技术。

1.3.3 单细胞表观遗传测序技术

表观遗传是指基因组 DNA 序列以外可遗传的信息,包括 DNA 甲基化、RNA 甲基化、组蛋白修饰、染色质的重塑和三维空间构象等。尽管不同细胞拥有相同的 DNA 序列,但如果表观遗传层面发生变化,细胞的功能也会随之改变。目前 DNA 甲基化是该研究领域较为成熟的技术。见表 4。

1.3.4 单细胞蛋白质组学测序技术

单细胞蛋白质组学(single cell proteomics)研究最早可追溯到 2004 年,由 Nolan^[33]和 Dovichi^[34]共同提出,但两者的技术侧重点不同。其中

Nolan 应用流式细胞技术,在单个细胞水平上获取细胞信号,构建出每个细胞信号转导网络。而 Dovichi 则应用化学细胞术,在荧光标记的基础上,通过毛细管电泳分离,获得单个细胞整个蛋白质组的指纹图谱。随着技术的不断发展,不同的单细胞蛋白质测序方法渐次产生,比较有代表性的技术见表 5。

1.3.5 单细胞多组学联合分析(scCOOL-seq)

单细胞多组学联合分析,从同一个细胞中获取基因组、表观组、转录组和蛋白组的信息,可以整合多组学信息对单个细胞的综合理解。表 6 总结了当前具有代表性的单细胞多组学联合分析技术。

1.4 当前单细胞测序已有的商用平台简介

单细胞测序已进入 2.0 时代,基于微液滴或者微流控芯片技术,众多厂家推出了各自的高通量单细胞测序平台,目前主流的商用平台有以下 5 种。见表 7。

表3 主要的单细胞转录组测序技术

单细胞转录组测序技术	技术简介	优势	不足	参考文献
Tang RNA-seq	采用多聚 T 碱基为引物,合成 cDNA 并在 3'端添加多聚碱基 A,作为第二条 cDNA 链的多聚 T 碱基结合位点,通过 PCR 反应进行扩增	可测转录本的全长,检测基因表达更灵敏、更准确	对 3'端偏倚性较强,细胞通量少,价格较贵	[7]
Smart-seq	将 RNA 与包含 oligo (dT) 的引物杂交。后添加几个无模板的 C 核苷酸,生成第一条链,该 poly (C) 垂悬只添加到全长转录本上。然后将寡核苷酸引物与 poly (C) 突出杂交,合成第二条链	序列覆盖度较好。可实现选择性转录本异构体和 SNV 的检测。提高 mRNA 5'端覆盖率,为检测全长 mRNA 的技术	非链特异的扩增,且转录本长度偏向性,对大于 4 kb 的序列不能高效转录,优先扩增高丰度转录本以及纯化过程会导致材料损失等缺点	[9]
Smart-seq 2	在 cDNA 的 3'端添加 2~5 个无模板的 C 核苷酸。后加入模板转换寡核苷酸(TSO),在 3'端产生锁核苷酸修饰。第一链反应后,有限的循环扩增 cDNA	不需要纯化步骤,转录本覆盖度改善,大大提高产量及高水平可定位序列	非链特异的扩增,且只测序 poly (A) + RNA,细胞通量少,价格较贵	[24]
CEL-seq	是一种采用线性扩增的测序方法,采用体外转录法 (IVT) 进行扩增,通过将 T7 启动子连在 oligodT 引物上,可以在 cDNA 合成后启动 IVT	样本间的污染被大大降低,读长偏好非常低,链特异性	错误率比较低,但扩增和 PCR 都存在序列偏好,强烈的 3'偏好,高丰度转录本被优先扩增且至少需要 400 pg 总 RNA	[25]
Quartz-seq	采用抑制性 PCR 的策略使引物自杂交形成平底锅结构来降低副产物,将小片段第二链 cDNA 形成发卡结构	极大降低 PCR 副产物,使用一种高效的酶来适应单管反应,优化反转以及第二链 cDNA 合成的条件,减少小片段的污染	容易因为 GC 含量的差异造成扩增偏倚	[26]
STRT-seq	将分子标记与微流控技术相结合,可定量估计起始 mRNA 的表达	细胞通量高,价格相对便宜	只测转录本一端,检测基因表达灵敏度较低,不适合可变剪接、等位基因表达等分析	[27]
Drop-seq	基于微滴的方法。每个 cDNA 均标有细胞特异性条形码和 UMI	低成本,快速文库准备,单细胞高通量分析及多组学分析的可能性	需要微流控平台,单细胞基因的敏感性低	

表4 主要的单细胞表观遗传组测序技术总结

单细胞表观遗传组测序技术	技术简介	优势	不足	分类	参考文献
scRRBS	应用限制性内切酶 MspI 可识别 CGIs,且把该位点的基因剪切成片段,达到 CGIs 富集目的	单细胞水平全基因组覆盖 CpG 岛的单碱基的检测	纯化过程中存在 DNA 的丢失等	高通量	[28,29]
scATAC-seq	利用 ddSEQ 单细胞微滴制备系统来分离数千个细胞核,将每个包裹在微滴中。同时,采用活性极高的 Tn5 转座酶,将核小体之间的链切割成很短的片段	分析单细胞的染色体可及性,实现单细胞水平全基因组范围开放染色质测序	使用微流控芯片完成细胞捕获,裂解,转座和 PCR 的过程	高通量	[30]
scCOOL-seq	将全基因组核小体定位及 DNA 甲基化组测序技术和全基因组重亚硫酸盐测序整合并优化和提高,可同时分析单个细胞中染色质开放程度、核小体定位、DNA 甲基化、基因组拷贝数变异及染色体倍性等 5 个组学层面	可更好地覆盖全基因组,解决了 scATAC-seq 研究中线粒体片段过度富集导致的有效数据量过少等问题	—	高通量	[31]
CoBATCH	使用融合蛋白 PAT(蛋白 A-Tn5)识别和切割抗体结合的基因组区域,并与条形码标记的单细胞技术结合使用。将目的细胞与特定抗体孵育后,向细胞中加入 PAT 融合蛋白并与特定抗体结合后激活 PAT 活性,被抗体识别的特定基因组区域被 PAT 切割并带上接头序列。终止反应后,带上接头的目的 DNA 片段可直接用于 PCR 和建库	将染色质片段化和 PCR 接头添加融合在一步内完成,显著提高了 ChIP 的效率,同时用组合标签的方法实现了对单细胞进行高通量的标记,是目前最先进、高效的 ChIP-seq 技术	—	高通量	[32]

scRRBS: single-cell reduced-representation bisulfite sequencing technology; scATAC-seq: single-cell sequencing assay for transposase-accessible chromatin; scCOOL-seq: single-cell multi-omics sequencing; CoBATCH: combinatorial barcoding and targeted chromatin release, for single-cell profiling of genomic distribution of chromatin-binding proteins in cell culture and tissue

表 5 主要的单细胞蛋白质组学测序技术总结

单细胞蛋白质组学测序技术	技术简介	技术优势	参考文献
PLAYR 技术	应用含不同金属同位素抗体和探针分别标记的蛋白质与 RNA,利用质谱流式细胞技术测量同位素以分析蛋白组和转录物	测序成本低,用时短,检测细胞数量大,仅可检测 40 多种 mRNA 和蛋白质	[35]
CITE-seq 技术	采用寡核苷酸标记抗体和短寡核苷酸标记序列的磁珠,分别结合细胞表面蛋白与胞质 mRNA,扩增 RNA 和抗体标签并按大小分离,通过测序定量分析蛋白质和转录物	可在蛋白质定量可在单细胞 RNA 测序制备中丢弃的部分进行;且均可检测约 100 种蛋白质及数万种 RNA 转录物,但与 PLAYR 相比,每次检测的细胞数量更少。目前研究方向朝着细胞内蛋白质进展	[36]
REAP-seq 技术	类似于 CITE-seq 技术,采用寡核苷酸交联抗体,基于测序技术来检测细胞蛋白质和转录物水平		[37]

注:PLAYR 技术: proximity ligation assay for RNA; REAP-seq 技术: RNA expression and protein sequencing assay; CITE-seq 技术: cellular indexing of transcriptomes and epitopes by sequencing

表 6 主要的单细胞多组学联合测序技术总结

单细胞多组学测序技术	技术简介	技术优势	分类	参考文献
DR-seq 技术	基因组与转录组的平行测序,其原理是单细胞裂解后,同时扩增裂解物中的 DNA 和 RNA。后将扩增产物分成用于基因组测序和转录组测序	扩增过程将 DNA 和 RNA 保持一致,可最大限度减少核酸损失,但会导致潜在的交叉污染	高通量	[38]
G&T seq 技术	基因组与转录组平行测序方法。利用涂有结合 mRNA 的短寡核苷酸序列的磁珠,物理性地分离 mRNA 和 DNA。后将其分别扩增和测序	实现自动化,通量相对较高。避免潜在的交叉污染	高通量	[39]
scM&T-seq 技术	甲基化组和转录组测序。其原理基于 G&T-seq 技术,对基因组 DNA 进行亚硫酸氢盐处理,将未甲基化的胞嘧啶转化为尿嘧啶,然后扩增并测序以测定甲基化组	平行分析同一单细胞中的 DNA 甲基化和 RNA 信息。提供了有关单细胞 DNA 甲基化异质性与特定基因表达差异间的关系	高通量	[40]
scTrio-seq 技术	通过离心分离细胞核,选择性裂解细胞膜,将细胞质中的 mRNA 与完整细胞核中的基因组 DNA 分开。基因组 DNA 使用改良亚硫酸盐处理和测序方法来检测甲基化组	可同时分析单个细胞的基因组拷贝数变异(CNV),DNA 甲基化组和转录组	高通量	[41]

注:DR-seq:DNA-mRNA sequencing; G&T Seq:genome and tranome sequencing; scM&T-seq:simultaneous single-cell methylome and transcriptome sequencing; scTrio-seq:single-cell genome, DNA methylome, and transcriptome sequencing methods

表 7 当前主要的单细胞测序技术的商用平台概述

单细胞测序技术商用平台	技术简介	优势	不足	分类	参考文献
CI™ 单细胞全自动制备系统	世界上第一个商业化的用于基因组学研究的自动化单细胞分离制备系统。通过采用微流控技术,能够快速可靠地分离、处理、并对单一细胞进行多方向的基因组分析	可缩短时间并能获取转录组的全长信息	单细胞捕获成本高、通量低、周期慢等缺点明显,操作繁琐	通量低	[42]
ICELL8 Single-Cell System	Wafergen 公司开发的单细胞分选平台,具有通量高,周期快等特点,解决了传统单细胞扩增中通量低,价格贵的问题,在大量细胞的捕获筛选过程中提供了高效的平台	流程较简便,每次可分离细胞数较多(500 ~ 1 000),降低时间和经济成本	相对较低的细胞捕获效率,仅 30%	通量较高	[43]
BD Rhapsody™ Single-Cell Analysis System	采用分子标签技术,实现了单细胞水平上基因表达谱的绝对定量,同时,每个细胞也会被标记特异性细胞标签,这使高通量平行建库成为可能	单次实验可制备 100 ~ 10 000 个单细胞文库,将检测范围集中在目标基因,大幅降低成本	对于稀有细胞或者无特异型细胞标签的细胞无法建库	通量较高	[44]
Illumina® Bio-Rad® Single-Cell Sequencing Solution	平台应用 Bio-Rad 最好的液滴分离技术,对单细胞进行隔离和编制条形码,完成单个细胞的捕获,经过扩增、表达谱建库,进行下游测序,获得单个细胞表达谱数据。	操作简单,单次可捕获 500 ~ 10 000 个单细胞,成本较低	细胞捕获效率极低,仅为 3%	通量较高	[45,46]
10X Chromium Single Cell Gene Expression Solution	利用微流控技术行细胞分选,将带有条形码和引物的凝胶珠和单个细胞包裹在单个油滴中;通过逆转录产生带条形码的 cDNA 用于测序、文库构建,后续使用 Illumina 测序平台对文库进行测序检测,即可一次性获得大量单细胞的基因表达数据	一次可捕获 80 000 个细胞,通量高、周期快速,成本最低、细胞捕获效率高,单个样本细胞捕获率高达 65%;商业化仪器操作简便	细胞活性的要求较高,活度要求大于 90%	通量高	[47-49]

2 总结与展望

随着单细胞分选技术的完善和测序成本的降低,新的技术手段正在不断扩大基因覆盖率,增加更多层面的基因互作网络,增强实验的可靠性和稳定性。一方面,单细胞测序技术可深层次研究生理状态下,正常细胞的种类、状态、作用过程、协作机制,对探究生命形式和生物行为会有全新的认识。另一方面,单细胞测序技术可通过探索病理状态下,细胞的克隆分化、组织内细胞异质性、参与疾病发生发展的关键细胞类型及细胞亚群、免疫细胞的变化以及基因表达调控网络等,可更精准地认识相关疾病的发生发展,积极进行临床医学转化研究,真正符合个体化的精准治疗的理念。与此同时,单细胞测序技术的更新和发展将提供给研究者更多维更精准的研究视角,去系统、全面地揭示和解析细胞的功能。相信拥有优势的单细胞测序技术的不断发展会显现出较高的医学转化价值。特别地,随着单细胞多组学测序技术的发展,为理解分子网络和细胞网络间复杂的互作机制提供了更为精确的研究手段,且随着单细胞测序仪器的自动化和小型化,其在科研服务和临床中应用将会逐渐普遍化。

参考文献

- [1] Gawad C, Koh W, Quake SR. Single-cell genome sequencing: current state of the science[J]. *Nat Rev Genet*, 2016, 17(3):175-188.
- [2] Regev A, Teichmann SA, Lander ES, et al. The Human Cell Atlas[J]. *Elife*, 2017, 6:e27041.
- [3] Berge KVD, Perraudeau F, Soneson C, et al. Observation weights unlock bulk RNA-seq tools for zero inflation and single-cell applications[J]. *Genome Biol*, 2018, 19(1): 24.
- [4] Picelli S. Single-cell RNA-sequencing: The future of genome biology is now[J]. *RNA Biol*, 2017, 14(5):637-650.
- [5] Antoine-Emmanuel S, Alexander JW, Stanislaw AG, et al. Single-cell RNA-seq: advances and future challenges[J]. *Nucleic Acids Res*, 2014, 42(14): 8845-8860.
- [6] Brady G, Barbara M, Iscove NN. Representative in Vitro cDNA amplification from individual hemopoietic cells and colonies[J]. *Methods Mol Cell Biol*, 1990, 2(1):17-22.
- [7] Tang F, Barbacioru C, Wang Y, et al. mRNA-Seq whole-transcriptome analysis of a single cell[J]. *Nat Methods*, 2009, 6(5): 377-382.
- [8] Listed N. Method of the Year 2013[J]. *Nature Methods*, 2014, 9: 1.
- [9] Daniel RL, Shujun L, Yu-Chieh W, et al. Full-length mRNA-Seq from single-cell levels of RNA and individual circulating tumor cells[J]. *Nat Biotechnol*, 2012, 30(8): 777-782.
- [10] Yan L, Yang M, Guo H, et al. Single-cell RNA-Seq profiling of human pre-implantation embryos and embryonic stem cells[J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2013, 20(9): 1131-1139.
- [11] Lafzi A, Moutinho C, Picelli S, et al. Tutorial: guidelines for the experimental design of single-cell RNA sequencing studies[J]. *Nat Protoc*, 2018, 13(12): 2742-2757.
- [12] Lu Z, Moraes C, Zhao Y, et al. A micromanipulation system for single cell deposition[C]. In *IEEE International Conference on Robotics and Automation*, 2010:494-499.
- [13] Nakamura N, Ruebel K, Long J, et al. Laser capture microdissection for analysis of single cells[J]. *Methods Mol Med*, 2007, 132: 11-18.
- [14] Christian R, Janey L, Nandita N, et al. Obtaining genomes from uncultivated environmental microorganisms using FACS-based single-cell genomics[J]. *Nature Protocols*, 2014, 9: 1038-1048.
- [15] Paul C B. The future is now: single-cell genomics of bacteria and archaea[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2013, 37(3): 407-427.
- [16] Eric B, Martina M, Neal S, et al. Droplet microfluidic technology for single-cell high-throughput screening[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009, 106: 14195-14200.
- [17] Rafael GSB, Leyrat AA, Pirone DM, et al. Versatile, fully automated, microfluidic cell culture system[J]. *Analytical Chemistry*, 2007, 79(22): 8557-8563.
- [18] Di CD, Wu LY, Lee LP. Dynamic single cell culture array[J]. *Lab on A Chip*, 2006, 6(11):1445-1449.
- [19] CA klein, O Schmidt_kittler, JA Schardt, et al. Comparative genomic hybridization, loss of heterozygosity, and DNA sequence analysis of single cells[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1999, 96: 4494-4499.
- [20] Telenius H, Carter NP, Bebb CE, et al. Degenerate oligonucleotide-primed PCR: general amplification of target DNA by a single degenerate primer[J]. *Genomics*, 1992, 13(3):718-725.
- [21] Dean FB, Hosono S, Fang L, et al. Comprehensive human genome amplification using multiple displacement amplification[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(8):5261-5266.
- [22] Chenghang Z, Sijia L, Alec RC, et al. Genome-wide detection of single-nucleotide and copy-number variations of a single human cell[J]. *Science*, 2012, 338(6114):1622-1626.
- [23] Chen C, Xing D, Tan L, et al. Single-cell whole-genome analyses by Linear Amplification via Transposon Insertion (LIANTI)[J]. *Science*, 2017, 356(6334):189-194.
- [24] Simone P, Faridani OR, Björklund AK, et al. Full-length RNA-seq from single cells using Smart-seq2[J]. *Nature Protocols*, 2014, 9(1):171-181.
- [25] Hashimshony T, Wagner F, Sher N, et al. CEL-Seq: single-cell RNA-Seq by multiplexed linear amplification[J]. *Cell Reports*, 2012, 2(3): 666-673.
- [26] 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[J]. *Genome Biology*, 2013,14(4):R31.
- [27] Saiful I, Amit Z, Simon J, et al. Quantitative single-cell RNA-seq with unique molecular identifiers[J]. *Nature Methods*, 2014, 11(2):163-166.
- [28] Guo H, Zhu P, Wu X, et al. Profiling DNA methylome landscapes of mammalian cells with single-cell reduced-representation bisulfite sequencing [J]. *Nat Protoc*, 2015, 10(5): 645-659.
- [29] Guo H, Zhu P, Wu X, et al. Single-cell methylome landscapes of mouse embryonic stem cells and early embryos analyzed using reduced representation bisulfite sequencing [J]. *Genome Research*, 2013, 23(12): 2126-2135.
- [30] Cusanovich DA, Hill AJ, Aghamirzaie D, et al. A single-cell atlas of in vivo mammalian chromatin accessibility[J]. *Cell*, 2018, 174(5):1309-1324.
- [31] Guo F, Li L, Li J, et al. Single-cell multi-omics sequencing of mouse early embryos and embryonic stem cells[J]. *Cell research*, 2017, 27(8): 967-988.

- [32] Wang Q, Xiong H, Ai S, et al. CoBATCH for high-throughput single-cell epigenomic profiling[J]. Molecular cell, 2019, 76(1):206-216.
- [33] Irish JM, Hovland R, Krutzik PO, et al. Single cell profiling of potentiated phospho-protein networks in cancer cells[J]. Cell, 2004, 118(2):217-228.
- [34] Hu S, Michels D, Fazal M, et al. Capillary sieving electrophoresis/micellar electrokinetic capillary chromatography for two-dimensional protein fingerprinting of single mammalian cells[J]. Analytical Chemistry, 2004, 76(14):4044-4049.
- [35] Roussis IM, Myers FA, Scarlett GP. RNA whole-mount in situ hybridization proximity ligation assay (rISH-PLA), an assay for detecting RNA-protein complexes in intact cells[J]. Curr Protoc Cell Biol, 2017, 74(1):17.20.1-10.
- [36] Stoeckius M, Hafemeister C, Houckloomis B, et al. Simultaneous epitope and transcriptome measurement in single cells[J]. Nature Methods, 2017, 14(9):865-868.
- [37] Peterson VM, Zhang KX, Kumar N, et al. Multiplexed quantification of proteins and transcripts in single cells[J]. Nature Biotechnology, 2017, 35(10):936-939.
- [38] Dey SS, Lennart K, Bastiaan S, et al. Integrated genome and transcriptome sequencing of the same cell[J]. Nature Biotechnology, 2015, 33(3):285-289.
- [39] Macaulay IC, Haerty W, Kumar P, et al. G&T-seq: parallel sequencing of single-cell genomes and transcriptomes[J]. Nature Methods, 2015, 12(6):519-522.
- [40] Angermueller C, Clark SJ, Lee HJ, et al. Parallel single-cell sequencing links transcriptional and epigenetic heterogeneity[J]. Nature Methods, 2016, 13(3):229-232.
- [41] Yu H, Guo H, Chen C, et al. Single-cell triple omics sequencing reveals genetic, epigenetic, and transcriptomic heterogeneity in hepatocellular carcinomas[J]. Cell Research, 2016, 26(3):304-319.
- [42] Shalek AK, Wadsworth MH, Travis K Hughes, et al. Single-cell RNA-seq reveals dynamic paracrine control of cellular variation[J]. Nature, 2014, 510(7505):363-369.
- [43] Gierahn TM, Hughes TK, Bryson BD, et al. Seq-well: portable, low-cost RNA sequencing of single cells at high throughput[J]. Nature Methods, 2017, 14(4):395-398.
- [44] Birey F, Andersen J, Makinson CD, et al. Assembly of functionally integrated human forebrain spheroids[J]. Nature, 2017, 545(7652):54-59.
- [45] Yang J, Tanaka Y, Seay M, et al. Single cell transcriptomics reveals unanticipated features of early hematopoietic precursors[J]. Nucleic Acids Res, 2017, 45(3):1281-1296.
- [46] Isoda T, Moore AJ, He Z, et al. Non-coding transcription instructs chromatin folding and compartmentalization to dictate enhancer-promoter communication and T cell fate[J]. Cell, 2017, 171(1):103-119.
- [47] Zeisel A, Hochgerner H, Lonnerberg P, et al. Molecular architecture of the mouse nervous system[J]. Cell, 2018, 174(4):999-1014.
- [48] Rozenblatt-Rosen O, Stubbington MJT, Regev A, et al. The Human Cell Atlas: from vision to reality[J]. Nature, 2017, 550(7677):451-453.
- [49] Molin AD, Baruzzo G, Camillo BD. Single-cell RNA-sequencing: assessment of differential expression analysis methods[J]. Front Genet, 2017, 8(5):62.

(收稿日期:2020-05-28)

《中国医药导刊》约稿函

为稳步实施《国家药品监督管理局关于加快推进药品智慧监管的行动计划》,加快推进药品智慧监管,创新监管手段,国家药品监督管理局信息中心医药科技学术期刊《中国医药导刊》结合药监信息化建设实际,特别开设“智慧监管”专栏,涵盖“智慧监管”“药品追溯”“医疗器械唯一标识”等领域。

该专栏围绕如何破解药品“智慧监管”,加强药品信息化追溯体系建设,推进医疗器械唯一标识系统规则实施,深度融合互联网、物联网、大数据、人工智能监管新思路和新技术,广泛征集医药科技和医药产业信息领域药品智慧监管最新发展趋势、政策解读、标准研究以及应用案例等,共同探讨信息技术环境下药品“智慧监管”事业的发展现状、面临挑战以及监管效能提升策略,借以鼓励和引导更多科技工作者产出科研精品和原创性研究成果,为创新监管手段、药械安全综合治理提供智力支撑和宣传平台。

稿件撰写要求详见《中国医药导刊》官方网站(<http://www.zgyydk.cn>)投稿指南。

《中国医药导刊》热忱欢迎各级药品监管机构、各级医疗机构、医药科研机构、医药相关企业医药信息管理和研究等相关研究人员积极投稿。

投稿网址:<http://www.zgyydk.cn>

联系电话:010-88331994/1997/1995

咨询邮箱:yydk@nmpa.gov.cn

联系人:孙老师、张老师、于老师