

武汉大学本科毕业论文（设计）

开 题 报 告

毕业论文（设计）题目：____基于 GRN 的垂体基因表达差异分析____

学院：____弘毅学堂____ 学号：____2017300030039____ 姓名：____郑晖____

1 毕业论文题目来源

国家自然科学基金项目

2 毕业论文选题的目的和意义

在病毒或细菌感染期间，免疫因子会在人体中释放，通常会导致组织发炎并导致严重的疾病行为，例如食欲不振，嗜睡，退出正常的社交活动，疲劳，探索力下降，嗜睡，运动性快感不足，并减少情绪。

人们认为疾病行为是由可溶性促炎性细胞因子触发的，该因子由感染部位的免疫细胞产生。一些主要的促炎细胞因子包括 interleukin-1 (IL-1)，tumor necrosis factor α (TNF- α) 和 interleukin-6 (IL-6)。如所报道的，这些源自免疫系统和免疫细胞的促炎细胞因子可对神经内分泌系统，特别是下丘脑-垂体-肾上腺 (HPA) 轴产生深远的影响。

HPA 轴是体内的压力反应中心，连接中枢神经系统 (CNS) 和内分泌系统。HPA 轴的激活导致下丘脑释放促肾上腺皮质激素释放激素 (CRH)，促使垂体释放肾上腺皮质激素 (ACTH) 和肾上腺糖皮质激素（人体内糖皮质激素的活性形式是皮质醇，而啮齿动物中的皮质激素是皮质甾酮）。糖皮质激素作用于下丘脑和垂体，对免疫细胞产生负反馈，以抑制细胞因子的进一步合成和释放（图1），从而保护宿主免受过度活跃的免疫反应的有害影响。

重要的是，由炎症事件诱导的细胞因子 (IL1, IL6, TNF- α , IFN- γ) 通常循环至垂体前叶，并主要作用于垂体的促肾上腺皮质激素，从而促进释放抗炎激素，例如肾上腺皮质激素 (ACTH)。ACTH 被携带到肾上腺并作用于 ACTH 受体，从而上调肾上腺皮质肾上腺皮质细胞中皮质醇的释放。随后，皮质醇在下丘脑和垂体在 HPA 轴上产生负反馈，以抑制促炎性细胞因子的进一步合成和释放。

此外，卵泡细胞代表垂体前叶中唯一的非内分泌细胞类型，并释放可能潜在影响垂体局部激素产生的 IL1 和 IL6，从而构成调节炎症反应的复杂系统。

因此，垂体积极参与炎症事件的调节。我们推测，基于垂体细胞转录谱的分

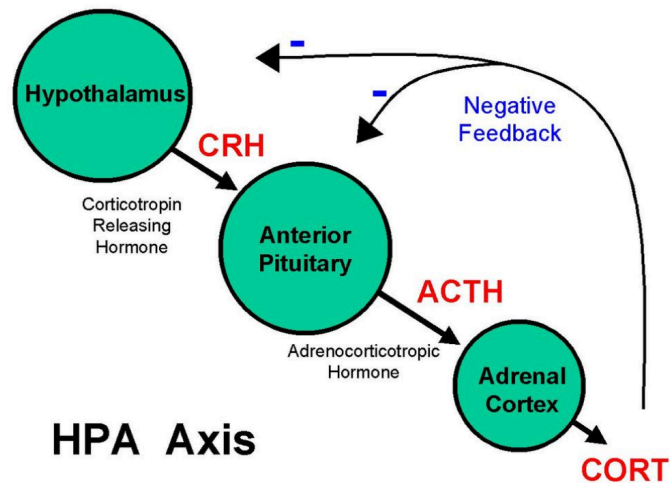


图 1 炎症状态下的 HPA 轴

析，对垂体细胞进行彻底和详细的分类，可以为后续研究其在炎症事件中的功能提供有价值的资源。

3 国内外关于该课题的研究现状和发展趋势

3.1 什么是单细胞测序

人类各种组织之间细胞的类型，状态和相互作用差异巨大。而单细胞 RNA 测序 (snRNA-seq) 技术提供了在单细胞水平观测基因表达的方法，可以更好地研究这些组织及其中存在的不同类型的细胞。

这一技术可以用于：

- 研究一个组织中到底存在哪些种类的细胞
 - 识别未知或少见的细胞类型或状态
 - 阐明在分化过程或时间及状态变化中基因表达的改变
 - 找出在不同条件下（如加药组和疾病组）在某一特定类型的细胞中差异表达的基因
 - 探究一种细胞类型之间基因表达的变化，同时纳入空间，调控和蛋白质信息
- 单细胞测序中解决一些较常见问题的方法 [1, 2] 包括：

1. 探究异质性 (Studying heterogeneity)
2. 谱系路径分析 (Lineage tracing study)
3. 随机基因表达研究 (Stochastic gene expression study)

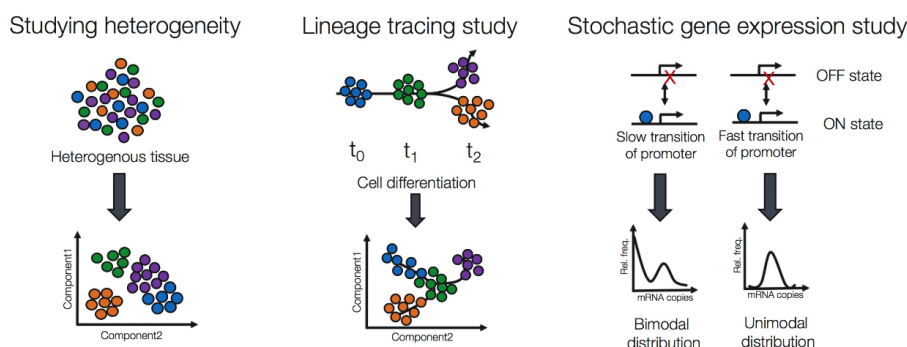


图2 单细胞测序中解决一些较常见问题的方法

3.2 单细胞测序技术的发展

单细胞测序技术是本课题所主要依赖的一项技术，下面将对单细胞测序技术近年来的发展进行介绍。

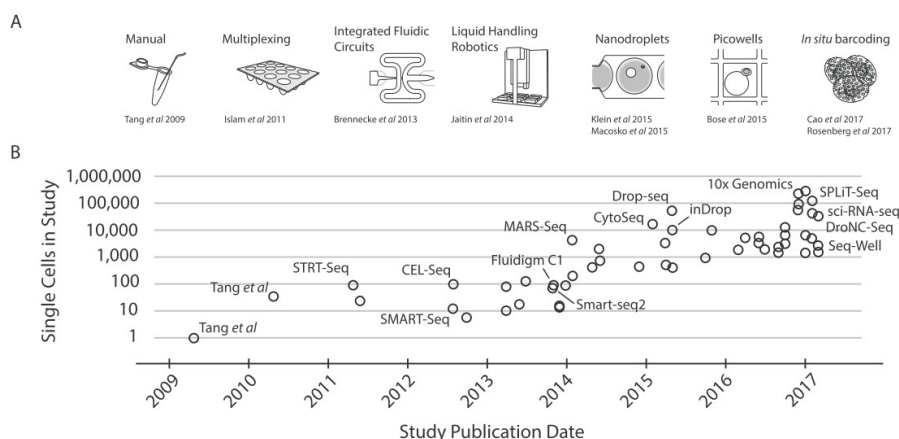


图3 单细胞测序技术近年来的发展

单细胞测序技术最初起于 2006 年 Kurimoto 等人在 *Nucleic Acids Research* 上发表的一篇文章 [3]，这篇文章对于后来单细胞转录组测序的原理发展有很大的影响。该研究主要特点在于加入了 T7 启动子，主要有如下两点考虑：

1. cDNA 经历了两次扩增，分别为 20 个循环和 9 个循环，这将比直接扩增 29 个循环减少 PCR 扩增的偏差
2. 由于试验后期并不是直接测序，而是通过 T7 启动子逆转录 cDNA 为 RNA，再通过 Affymetrix GeneChip Rat Genome 230 2.0 Array 芯片杂交获得转录本信息。

到 2009 年，汤富酬等人在 *Nature Methods* 上发表了一篇关于单细胞测序的文章 [4]，正式拉开了单细胞转录组的大门。这项研究延用了 Kurimoto 等人在 2006 年

工作 [3] 在末端加 A 思路,但是在最后读取 cDNA 信息的时候,这里使用了 Applied Biosystem 的二代测序 SOLiD system 平台,也就是取代了芯片的读取方式。值得注意的是,2005 年 454 系统问世,2007 年 SOLiD system 问世。可以说,是二代测序成就了这篇文章。

目前应用最广泛的是模板转换法,主要代表技术便是 SMART-seq[5, 6],这也是我们在本课题中主要使用的测序技术。其实,在 2011 年的 START-seq[7],就已经用到模板转换法,同时运用 Barcode 标记思路来达到相对高通量的单细胞转录组测序方法。稍微改进这种方法,将 Barcode 加在 3' 端,便可以富集 3' 端测序,同时在一开始就将测序接头设计到引物里去,以后不用再引入,便可以做高通量。如若再不加 Barcode,一个细胞的 cDNA 建立一个库,这样就可以获得全长的 cDNA 信息,也就是有了后来的 SMART-seq1&2。

3.3 单细胞测序技术在垂体研究中的使用

现在,这种技术的应用范围从微生物生态系统的多样性到人类癌症的基因组学。近年来,有很多使用单细胞测序技术探究在生理、病理等状态下细胞异质性的研究 [8–13]。在关于垂体的研究中也广有使用,但以往的研究 [14–17] 主要关注于某个发育过程中的静态分类问题,很少有研究使用单细胞转录组测序来进行动态功能研究。

我们很好奇不同的垂体细胞如何响应炎症刺激。在这项研究中,我们将基于病毒或细菌感染建立炎症小鼠模型,并主要使用单细胞转录组测序以及数据分析和数据挖掘来找出炎症、垂体和激素之间的关系,动态炎症研究将成为我们实验中最重要的部分。

我们相信这项研究可以使我们对人体对病毒或细菌感染的免疫防御具有更清晰的认识,更重要的是,它具有非常重要的临床意义,我们希望获得用于免疫诊断的特定标记。顺便说一下,它也可以为我们提供关于单细胞转录组测序技术应用的新思路。

4 毕业论文的主要内容、研究方法、技术路线及可行性分析

4.1 小鼠垂体单细胞测序

在小鼠垂体单细胞中进行转录组测序,然后在垂体细胞中定义和分类特定的细胞类型。

4.1.1 假设

垂体是下丘脑的重要输出靶，并且是许多生理功能（例如生长，繁殖和内分泌释放）的中央调节器。鉴于我们了解其在释放几种主要激素中的作用，垂体细胞，特别是位于垂体前叶的垂体细胞（腺垂体）可分为五种细胞类型。

考虑到日益发展的单细胞测序技术，可以并行分析数百个细胞，从而提供了种群中单个细胞异质性的无偏见。单细胞测序方法有很多，例如 STRT（单细胞标记逆转录），CEL-seq（通过线性扩增和测序的细胞表达），Smart-seq，Smart-seq2，这些技术为我们提供了强大的工具投资很多生物学问题。尽管由于金钱和时间的浪费，这些方法只能对少量的单个细胞进行测序，但我们无法获得大型的样品库。虽然 Drop-seq 是一种通过将细胞包裹在微小液滴中来分析数千个单个细胞中 mRNA 表达的方法，但液滴-通过在微流体装置中精确结合水流和油流形成的纳升级水室已被用作 PCR 的微小反应室和逆转录。这种方法似乎具有很多优点，例如便宜，高效，文库质量不高，基因检测率不高，例如每个细胞只能检测 2000-3000 个基因。对我们而言，重要的是选择一种基于高通量和高度自动化的适当单细胞测序方法，以确保我们可以获得高灵敏度和准确性的测序数据。

我们从 Tang Lab（FuChou Tang 博士）那里获得了一种新的改进的 Smart-seq2 方法，该方法可最大程度地减少操作并利用单管反应来避免部分材料损失。反转录时，它将为每个细胞提供特定的细胞条形码，除了为每个 mRNA 提供不同的独特分子标识符（UMI）外，我们还可以将细胞集中在一起以进行测序文库构建，并使用 UMI 进行质量控制，以便获得高质量的单细胞基因表达数据。

4.1.2 研究方法与技术路线

(1) 垂体细胞解剖和消化方法的研究

尽管看似微不足道，但快速高效地捕获单个细胞却是单细胞测序的主要挑战之一。由于没有用于单细胞消化的标准方法，因此我们需要开发一种用于获取垂体细胞的有效方案。垂体位于下丘脑下方的颅骨底部。通过举起小鼠大脑，垂体很容易暴露，并可以直接收获结构。用无菌手术刀将腺切成小块，然后将小组织片在室温下分别在 1mg / mL 胶原酶 ii 和 iv 中孵育 22 分钟，并在消化期间上下吸移。胶原酶孵育后，在消化管中加入等体积的 0.25% 胰蛋白酶 2 分钟。消化一段时间后，我们可以使用 40um 过滤器收集单个细胞，然后添加相同体积的 DPBS。然后将细胞悬液以 1000g 离心 5 分钟。离心后，我们丢弃上清液并将细胞重悬于

DMEM 培养基中。我们可以使用显微镜观察细胞状态并计数细胞数量（图4）。

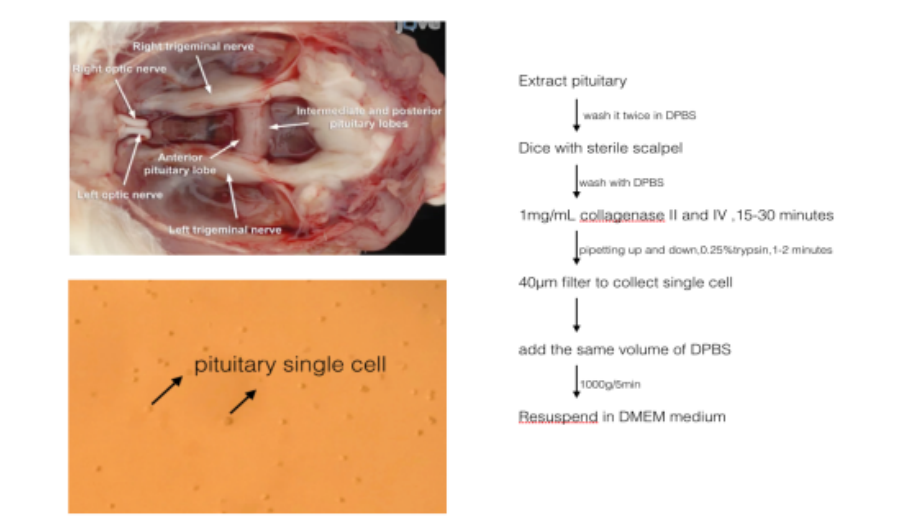


图 4 垂体细胞解剖和消化

(2) 使用基于 smart-seq2 测序的单细胞转录组分析方法获得垂体单细胞转录组

我们使用了改良的 Smart-seq2 协议，该协议是从 Tang Lab 获得的应用于单细胞 RNA-seq 的协议。简短地，垂体消化后，用白蛋白牛血清（BSA）溶液洗涤单个垂体细胞，然后通过移液管将其置于裂解缓冲液中。在逆转录反应之前，将细胞剧烈涡旋 40 秒，以完全裂解细胞。逆转录反应使用 25 nt oligo (dT) 引物进行锚定，该引物锚定有 8 nt 细胞特异性条形码和 8 nt 唯一分子标识符（UMI）。第一链合成后，合成第二链 cDNA，并通过 16 个 PCR 循环扩增 cDNA。然后将单个细胞的扩增 cDNA 汇集在一起 以进行以下步骤。使用生物素化的预索引引物，通过另外 4 个 PCR 循环进一步扩增 PCR 产物，以将生物素标签引入扩增的 cDNA 的 3' 末端。Covaris S2 将大约 300 ng cDNA 剪切至大约 300 bp，并通过 Dynabeads MyOne 链霉亲和素 C1 珠（Thermo Fisher）捕获 cDNA 的 3' 末端。RNA-seq 文库使用 Kapa Hyper Prep 试剂盒（Kapa Biosystems）构建，并在 Illumina HiSeq 4000 平台（由 Novogene 测序）上进行 150 bp 的末端测序（图5）。

(3) 单细胞测序数据分析

原始读段将首先被附加在双端读段的读段 2 中的特定细胞条形码信息分隔。将 UMI 信息与相应的读取 1 对齐，然后对其进行修剪以除去模板开关寡核苷酸（TSO）序列和 poly A 尾序列。随后，去除带有接头污染物和低质量碱基的读数（N>10%）。G1 周期以外的单元也将被删除。接下来，使用 TopHat（2.0.12 版）将

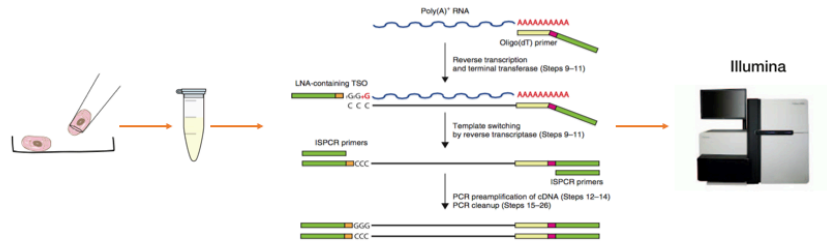


图 5 SMART-seq2 工作流程

干净的读数与 mm10/GRCm38 对齐。然后，使用 HTSeq 包中的 htseq-count 对唯一映射的读数进行计数，并按特定于细胞的条形码分组。根据 UMI 信息，删除每个基因具有相同 UMI 序列的重复转录本。最后，将给定细胞内每个基因的不同 UMI 计为该基因的转录本拷贝数。对于最终的测序数据，我们将量化每个细胞中基因和转录本的数量。检测到的基因少于 2000 个或转录本少于 100,000 个的细胞将被过滤掉。表达水平通过 $\log_2(TPM/10 + 1)$ 进行归一化，其中 TPM（每百万转录本）的计算方法是：每个基因的 UMI 数除以给定细胞的所有 UMI。

Seurat 方法将用于分析关于 $\log_2(TPM/10 + 1)$ 表达值的单细胞数据。我们将使用 t-SNE（t 分布随机邻居嵌入）对收集单元进行分离和分类。我们将使用垂体细胞标记物来验证已测序的单个细胞实际上是来自垂体。

4.1.3 可行性分析及潜在问题讨论

我们期望描绘小鼠垂体细胞的基因表达情况，并定义垂体中特定的细胞类型。

因为在许多转录本测序案例中，尤其是对于单细胞测序，细胞消化可能非常具有挑战性，因为用胰蛋白酶或胶原酶对组织进行酶处理可能会对细胞活力产生未知影响，从而可能影响每个细胞的转录谱。因此，我们首先要关注的是常规的全细胞消化程序是否会人为地引起线粒体应激和转录干扰。为了解决这个问题，我们首先可以通过台盼蓝排斥试验来测试消化细胞的活力。锥虫蓝排除测试基于以下原理：活细胞具有完整的细胞膜，不包含某些染料，例如锥虫蓝，曙红或丙啉，而死细胞则没有。因此，在细胞解离后，垂体单个细胞将悬浮在含锥虫蓝的 PBS 中，然后进行检查以确定具有透明细胞质的细胞（活细胞）相对于具有蓝色细胞质的细胞（非活细胞）的百分比。这样，我们可以确保要测序的细胞是健康的和存活的。我们还可以通过在细胞消化过程中使用转录抑制剂（例如放线菌素 D (ActD)) 来最大程度地减少人为诱导的转录干扰，并忠实检测基线转录谱和急性转录变化。

ActD 抑制所有三种真核 RNA 聚合酶介导的转录过程，并提供广谱，快速的转录抑制作用，几乎没有可逆的可逆性。

该实验的主要挑战是通过手工收集可获取的垂体细胞数量有限，以及通过手工收集垂体细胞引起的潜在偏倚。细胞捕获非常耗时，并且获取足够的细胞用于细胞类型分类将花费大量的精力。除此之外，由于我们只是一厢情愿地选择完整且丰满的细胞更适合测序，因此我们会选择单个细胞，因此我们可能会错过许多看起来不如完整细胞的细胞。为了解决这个问题，我们可以将我们的原始数据与垂体发育论文上的先前论文进行比较，并更仔细地分析我们的测序数据，试图找到与 300 个垂体单细胞的基因相关性。我们还将尝试获取尽可能多的单个单元格以扩大样本量。

4.2 建立炎症小鼠模型

建立病毒或细菌感染的炎症小鼠模型，并检查该炎症小鼠模型的可行性。

4.2.1 假设

垂体在调节人体的生长，发育及许多其他重要功能中起着关键作用，它是 HPA 轴的一部分，并且是大脑的内分泌中心，它控制激素的分泌。炎性细胞因子可以刺激垂体释放激素的分泌，例如肾上腺皮质激素和 β -内啡肽，它们对炎症或应激刺激具有抗炎特性。垂体前叶细胞可产生 IL1 和 IL6，这可能会影响局部激素的产生。因此，垂体积极参与免疫反应和炎症过程。

LPS 和 Poly I:C 在炎症过程中是有效的免疫刺激。它们的行为就像细菌或病毒感染一样。将此类免疫激活剂应用于小鼠可引起严重的免疫反应。我们建议使用行为范式和细胞因子 Elisa 方法来测试使用 LPS 和 Poly I:C 诱导炎症小鼠模型的可行性。使用可靠的炎症反应小鼠模型，可以轻松地进行进一步的测序实验，以测试炎症诱导的小鼠垂体细胞转录谱的变化。

4.2.2 研究方法与技术路线

(1) 给小鼠外周注射 LPS 或 Poly I:C 以模仿细菌或病毒感染，或外周注射 TNF- α 模仿炎症反应

由于垂体内分泌细胞与激素分泌有关，而垂体细胞可能受到雌性激素水平的影响，因此我们选择只使用雄性小鼠进行实验，以保证实验数据的一致性。我们将分析急性 LPS 和细胞因子刺激后的免疫反应。

将两个月大的小鼠随机分配至治疗组，并以每公斤体重 50 mg 的剂量通过细

菌性脂多糖（来自大肠杆菌 O111: B4, Sigma 的 LPS）进行腹膜内（ip）注射，并使用双链 RNA Polyinosinic-聚胞苷酸钠盐（Sigma 公司生产的 Poly I:C），每公斤体重 20mg。对于外周细胞因子治疗，将以重组小鼠细胞因子 TNF- α 处理小鼠，剂量为每公斤体重 500 μ g。用于对照实验的小鼠将接受媒介物注射（盐水）。注射药物后，等待约 6 个小时，对小鼠进行开放式试验，并从眼眶中收集全血。

(2) 通过行为测试范例测试炎性小鼠模型的可行性

免疫刺激注射已显示出诱导免疫攻击和疾病行为，运动能力的持续下降表明。我们使用开放式试验中运动的减少作为检验炎症诱导小鼠模型的功效和可行性的基准。

免疫刺激约 6 小时后，将对小鼠进行公开测试。野外测试使用一个大的立方体箱，长 1m× 宽 1m× 高 1m。立方体的顶部通常不被覆盖。我们将鼠标放在底部表面的中间，随着鼠标自由移动并探索环境，在 5 分钟的过程中记录了鼠标的移动。在测试过程中，我们将通过相机记录其运动轨迹。测试完成后，将使用计算机跟踪程序（MATLAB）分析动物随时间的运动。在野外试验之后，我们将比较炎症诱发小鼠和对照小鼠之间的运动，以得出有关炎症诱发小鼠模型可行性的结论。

(3) 测量血液促炎细胞因子水平

对我们而言，收集小鼠炎症信息很重要。免疫刺激约 6 小时后，我们将通过 Elisa 试剂盒从眼眶收集全血并测量血液促炎细胞因子，例如 IL-1，IL-6，TNF- α 。同时，将通过定量 PCR 评估垂体解剖中 TNF- α ，IL-1，IL-6 的 mRNA 水平。

4.2.3 可行性分析及潜在问题讨论

在可行的炎症诱导的小鼠模型中，我们期望看到减少的运动，通过 Elisa 血液样本测定的促炎因子水平升高以及通过 qPCR 评估的垂体细胞促炎因子 mRNA 水平升高。这些指标在治疗（注射 Poly I:C，LPS，TNF- α ）与对照组之间的小鼠重复测量中应保持一致，这将有助于我们得出结论：炎症诱导的小鼠模型是可行的。

该实验的主要挑战将是 Poly I:C 注射是否会导致对小鼠的一致性免疫作用。在我们的一些初步测试中，我们发现即使高剂量的 Poly I:C 注射后，一部分小鼠仍对 Poly I:C 表现出极大的抵抗力。这些小鼠保持活跃，垂体细胞转录组的测序数据与对照小鼠一样正常。这使我们相信，在进行以下实验之前，必须进行行为测试和细胞因子测试。根据我们的协议，如果在行为测试和血液细胞因子测试中，鼠标碰巧显示出对 Poly I:C 注射的抗性，我们将不会对鼠标执行单细胞测序。

我们将尝试找到一种更稳定的方法来建立病毒/细菌感染的小鼠模型。

4.3 验证炎症条件下生物标志物

剖析垂体功能性单细胞命运的变化，并验证炎症条件下分泌激素的功能以及生物标志物。

4.3.1 假设

单细胞 RNA 测序技术的快速发展为我们提供了高效的工作流程，即使我们以前的基因知识有限或猜测工作繁重，也使我们能够获取单个细胞的转录信息。这项技术已在科学研究的各个方面使用。例如，在开发领域，它扩展了我们在个体开发过程中的知识，并帮助我们识别了未知的细胞标志物和多种细胞类型。在癌症领域，这项技术已帮助我们识别癌症类型，并帮助进行特定的医学诊断和个性化治疗。

单细胞 RNA 测序技术对免疫研究也有很大影响。例如，最近，对免疫细胞的研究表明，即使是从看似均一的种群中衍生出来的，单个细胞在其基因表达，蛋白质水平或表型输出方面也可能表现出对外部刺激的不同反应。麻省理工学院和哈佛大学的研究小组使用单细胞 RNA 测序方法发现，LPS 处理后，骨髓来源的树突状细胞（BMDC）在每个细胞中的基因表达和剪接模式都有很大的差异。显然，单细胞技术可用于发现小区与小区网络之间的各种功能或响应。这些对健康和疾病组织的初步研究为我们进一步研究免疫刺激反应的单个细胞功能铺平了道路。

在这里，我们将使用免疫刺激来研究炎症激发是否会导致参与免疫应答的垂体细胞转录的改变。我们将使用不同剂量的相同免疫刺激，并将免疫刺激在不同时间点应用于小鼠。根据我们的初步数据，我们想知道当垂体单细胞受到免疫刺激时是否存在命运改变点。我们相信，每种炎症都有一个独特的生物标志物，经过仔细的数据分析，可以得到用于免疫诊断的标志物。在此过程中，我们将尝试基于单细胞转录组测序分析寻找垂体中未知的分泌激素，并通过 RNA 原位杂交或免疫染色找出激素的靶向脑区域。

4.3.2 研究方法与技术路线

(1) 给小鼠外周注射高剂量或低剂量的 LPS，在不同时间点应用刺激剂，以探索细菌对小鼠的影响

我们仅使用雄性小鼠来保证实验数据的一致性，并避免雌性激素引起的可能干扰。将两个月大的小鼠随机分配至治疗组，并以每公斤体重 50 mg（高剂量）和

每公斤体重 10 mg（低剂量）的剂量腹膜内（i.p.）注射 LPS。对于每剂 LPS，我们将采用两种不同的时间范围，一种是 6 小时（急性反应较长时间），另一种是 3 小时（急性反应较短时间）。免疫刺激后，将对小鼠进行野外试验，并从眼眶中收集全血。垂体细胞的单细胞测序将随后进行。我们将通过解剖提取垂体小鼠，并将细胞消化成单细胞悬液。然后，我们将使用基于 smart-seq2 测序的单细胞转录组分析方法来获得响应 LPS 给药的垂体单细胞转录谱，并分析剂量和时间尺度对垂体细胞的影响。

(2) 给小鼠外周注射高剂量或低剂量的 Poly I:C，在不同的时间应用刺激，以探索病毒对小鼠的影响

如上所述，我们仅使用雄性小鼠进行实验。将两个月大的小鼠随机分配至治疗组，并以 20 mg / kg 体重（高剂量）和 10mg / kg 体重（低剂量）的剂量腹膜内（ip）注射 poly I:C。Poly I:C 的剂量我们将使用两种不同的时间尺度，一种是 6 小时（急性反应较长时间），另一种是 3 小时（急性反应较短时间）。在免疫刺激后，对小鼠进行免疫进行野外测试，并从轨道收集全血。垂体细胞的单细胞测序将随后进行。我们将使用 smart-seq2 获得响应 poly I:C 给药的垂体单细胞转录谱，并分析剂量和时间尺度对垂体细胞的影响。

(3) 给小鼠外周注射高剂量或低剂量的 TNF- α ，以探讨促炎作用对小鼠的影响

我们使用雄性小鼠进行实验。将两个月大的小鼠随机分配至治疗组，并以每千克体重 500 μ g 的剂量腹膜内（ip）注射促炎性 TNF- α （小鼠，Sigma），并等待 6 小时和 1 mg / kg 体重，等待 6 小时。注射免疫刺激后，我们测试小鼠的运动能力并从眼眶中提取全血以进行垂体单细胞 RNA 测序。我们将使用 smart-seq2 获得对高剂量或低剂量 TNF- α 响应的垂体细胞的转录谱（图6）。

(4) 对四种药物治疗的转录谱进行数据分析

根据测序结果，我们将使用 t-SNE（t 分布随机邻居嵌入）对我们收集的转录谱进行分组和分类，并使用垂体细胞标记物验证测序数据。将制作细胞谱图，以找出炎症治疗与基因表达谱之间的关系。如果我们能够在不同的免疫挑战条件和不同的免疫刺激时间尺度下鉴定出特定的炎症生物标记，那将是理想的。

(5) 通过原位杂交，细胞因子 Elisa 或 Western blot 验证炎症测序结果

收集数据后，我们将使用 RT PCR 或原位杂交来验证测序数据。如果观察到未知的分泌激素，我们将尝试通过免疫染色鉴定其靶标大脑区域或通过体外筛选测

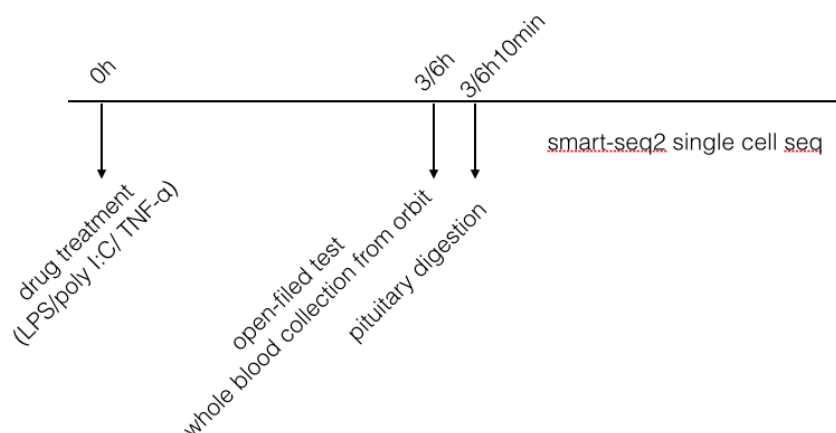


图 6 实验工作流程

定法找到其靶标受体。

4.3.3 可行性分析及潜在问题讨论

我们期望观察在不同的免疫挑战条件下获得的特异性生物标志物。但是，主要问题是数据批处理效果和数据质量。因为我们使用移液器收集单个细胞，所以收集到的细胞可能会有偏差。而且，由于长的细胞采摘时间，细胞活力将被削弱。不同的人 and 不同的操作时间将导致对细胞的未知影响。为了降低主观效果，将需要对细胞分类进行更多的实践以缩短拣选时间，并且必须优化细胞拣选工作流程。我们还将每次都准备更多的细胞库以降低批次效应。

5 毕业论文的进度安排

(1) 1 月初

进行文献收集，并阅读所收集的文献，进一步了解关于垂体近年来的单细胞测序研究，从而进一步改进解离获取垂体细胞的方法，完善自己的研究实验方案。

(2) 1 月中旬至 2 月底

根据拟定好的实验方案收集相应数据，并进行数据分析，尝试挖掘垂体细胞在系统炎症状态下转录组状态变化。

(3) 3 月初到 5 月初

进行毕业论文写作，并依据写作中的不足，添加相应实验进行完善。准备答辩。

6 毕业论文的主要参考文献

- [1] LIU S, TRAPNELL C. Single-cell transcriptome sequencing: recent advances and remaining challenges[J]. F1000Research, 2016, 5.
- [2] JUNKER J P, van OUDENAARDEN A. Every cell is special: genome-wide studies add a new dimension to single-cell biology[J]. Cell, 2014, 157(1): 8–11.
- [3] KURIMOTO K, YABUTA Y, OHINATA Y, et al. An improved single-cell cDNA amplification method for efficient high-density oligonucleotide microarray analysis[J]. Nucleic acids research, 2006, 34(5): e42–e42.
- [4] TANG F, BARBACIORU C, WANG Y, et al. mRNA-Seq whole-transcriptome analysis of a single cell[J]. Nature methods, 2009, 6(5): 377–382.
- [5] RAMSKÖLD D, LUO S, WANG Y-C, et al. Full-length mRNA-Seq from single-cell levels of RNA and individual circulating tumor cells[J]. Nature biotechnology, 2012, 30(8): 777–782.
- [6] PICELLI S, BJÖRKLUND Å K, FARIDANI O R, et al. Smart-seq2 for sensitive full-length transcriptome profiling in single cells[J]. Nature methods, 2013, 10(11): 1096–1098.
- [7] ISLAM S, KJÄLLQUIST U, MOLINER A, et al. Characterization of the single-cell transcriptional landscape by highly multiplex RNA-seq[J]. Genome research, 2011, 21(7): 1160–1167.
- [8] HAMMOND T R, DUFORT C, DISSING-OLESEN L, et al. Single-cell RNA sequencing of microglia throughout the mouse lifespan and in the injured brain reveals complex cell-state changes[J]. Immunity, 2019, 50(1): 253–271.
- [9] KEREN-SHAUL H, SPINRAD A, WEINER A, et al. A unique microglia type associated with restricting development of Alzheimer's disease[J]. Cell, 2017, 169(7): 1276–1290.
- [10] LI Q, CHENG Z, ZHOU L, et al. Developmental heterogeneity of microglia and brain myeloid cells revealed by deep single-cell RNA sequencing[J]. Neuron, 2019, 101(2): 207–223.
- [11] MASUDA T, SANKOWSKI R, STASZEWSKI O, et al. Spatial and temporal heterogeneity of mouse and human microglia at single-cell resolution[J]. Nature, 2019,

566(7744): 388–392.

- [12] MASUDA T, AMANN L, SANKOWSKI R, et al. Novel Hexb-based tools for studying microglia in the CNS[J]. *Nature Immunology*, 2020, 21(7): 802–815.
- [13] MATCOVITCH-NATAN O, WINTER D R, GILADI A, et al. Microglia development follows a stepwise program to regulate brain homeostasis[J]. *Science*, 2016, 353(6301).
- [14] CHEN Q, LESHKOWITZ D, BLECHMAN J, et al. Single-cell molecular and cellular architecture of the mouse neurohypophysis[J]. *Eneuro*, 2020, 7(1).
- [15] CHEUNG L Y, GEORGE A S, MCGEE S R, et al. Single-cell RNA sequencing reveals novel markers of male pituitary stem cells and hormone-producing cell types[J]. *Endocrinology*, 2018, 159(12): 3910–3924.
- [16] HO Y, HU P, PEEL M T, et al. Single-cell transcriptomic analysis of adult mouse pituitary reveals sexual dimorphism and physiologic demand-induced cellular plasticity[J]. *Protein & Cell*, 2020: 1–19.
- [17] FLETCHER P A, SMILJANIC K, MASO PRÉVIDE R, et al. Cell type-and sex-dependent transcriptome profiles of rat anterior pituitary cells[J]. *Frontiers in Endocrinology*, 2019, 10: 623.
- [18] TRAAG V A, WALTMAN L, van ECK N J. From Louvain to Leiden: guaranteeing well-connected communities[J]. *Scientific reports*, 2019, 9(1): 1–12.
- [19] SVENSSON V, VENTO-TORMO R, TEICHMANN S A. Exponential scaling of single-cell RNA-seq in the past decade[J]. *Nature protocols*, 2018, 13(4): 599–604.
- [20] SCHMIDT W M, MUELLER M W. CapSelect: a highly sensitive method for 5' CAP-dependent enrichment of full-length cDNA in PCR-mediated analysis of mRNAs[J]. *Nucleic acids research*, 1999, 27(21): e31–i.
- [21] HASHIMSHONY T, SENDEROVICH N, AVITAL G, et al. CEL-Seq2: sensitive highly-multiplexed single-cell RNA-Seq[J]. *Genome biology*, 2016, 17(1): 77.
- [22] KIVIOJA T, VÄHÄRAUTIO A, KARLSSON K, et al. Counting absolute numbers of molecules using unique molecular identifiers[J]. *Nature methods*, 2012, 9(1): 72–74.
- [23] PAN X, DURRETT R E, ZHU H, et al. Two methods for full-length RNA sequencing

for low quantities of cells and single cells[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2013, 110(2): 594–599.

[24] CHAPMAN A R, HE Z, LU S, et al. Single cell transcriptome amplification with MALBAC[J]. PLoS One, 2015, 10(3): e0120889.

[25] SELYE H. Stress and the general adaptation syndrome[J]. British medical journal, 1950, 1(4667): 1383.

指导老师意见：

指导老师（签名）：

年 月 日