目录

[项目管理信息 2](#_Toc67846115)

[医院方人员构成 2](#_Toc67846116)

[合作模式 2](#_Toc67846117)

[检查TLB亚型对SLE发病和缓解的贡献，并解析内在机制 2](#_Toc67846118)

[选题依据 2](#_Toc67846119)

[实验设计 2](#_Toc67846120)

[技术路线 3](#_Toc67846121)

[单细胞测序的技术细节 5](#_Toc67846122)

[检查TLB亚型作为细胞标记，预测SLE治疗后病情缓解与否的潜力 5](#_Toc67846123)

[选题依据 5](#_Toc67846124)

[实验设计 6](#_Toc67846125)

[技术路线 6](#_Toc67846126)

# 项目管理信息

## 医院方人员构成

机构：协和 + 全国CTD整治规范中心

总指挥：曾小峰，李梦涛（实际全权负责的老师）

一线人员：钱君岩等

## 生物信息方人员构成

机构：北大BIOPIC

总指挥：高歌

一线人员：丁阳，夏辰睿，林媛等

## 合作模式

周一晚19：00定期讨论

常驻人员：钱君岩，丁阳，夏辰睿

非常驻人员：高歌

# 检查TLB亚型对SLE发病和缓解的贡献，并解析内在机制

## 选题依据

（待补）

## 实验设计

1. 基于SLE病人治疗前后、以及健康对照个体的单细胞转录组+TCR+BCR配对数据，检测TLB细胞亚型分布是否与SLE发病、治疗有明显关联
2. 检查人TLB细胞自身是否能诱发SLE或类似免疫现象
3. 检查人TLB细胞中哪些功能元件决定了其能够诱发SLE
4. 检查人TLB细胞可能从何种细胞发育而来，并用其解释SLE病因
5. 在动物模型上证明TLB的功能

## 技术路线

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **课题内容** | **相关试验** | **能做的机构** | **备注** |
| 在细胞层次上检测TLB及其亚型在病人中的含量 | 流式细胞（把TLB细胞及其亚型提出来） | 协和 |  |
| 单细胞测序 | 贝瑞 | 关于单细胞测序的技术细节请参考下一节 |
| 体外免疫细胞培养（需要能够留住这种细胞，不要一提出来就死掉而来不及做实验） | ？ | 具体试验内容待定 |
| Bulk RNA-Seq（对提出来的细胞进行转录组测定，用来支撑单细胞转录组的检测结果） | 诺禾 |  |
| 检查人TLB细胞自身是否能诱发SLE或类似免疫现象 | 体外细胞-细胞刺激实验（比如，把TLB混入比如B细胞群体后可以诱发B细胞释放大量干扰素？） | ？ | 具体试验内容待定 |
| 检查人TLB细胞中哪些功能元件决定了其能够诱发SLE | 细胞表面蛋白（组？）测定（或其他能够检测表面重要免疫蛋白的方法，从而确定） | ？ | 具体试验内容待定 |
| siRNA干扰（敲除某基因转录本） | 协和 |  |
| 载体过表达（过表达某基因转录本） | 协和 |  |
| （如果想要做到CNS级别的话需要挖通具体通路，比如：【相比健康人，SLE病人的TLB中某增强子开放，导致某基因激活而让TLB大幅刺激别的细胞产生干扰素】。此时试验方案依赖于前面定位的具体基因，现在暂时还没法确定） |  | 具体试验内容待定 |
| 检查人TLB细胞可能从何种细胞发育而来，并用其解释SLE病因 | （待定，但是需要体外免疫细胞培养。如果前述结果发现TLB（的某个亚型）只在病理下出现并对疾病有贡献，那么这部分估计是要回答的） | ？协和 | 具体试验内容待定 |
| 在动物模型上证明TLB的功能 | 小鼠SLE模型培养和病情检测 | 协和 |  |
| 将小鼠TLB细胞打入小鼠SLE模型（或者其他诱发TLB的方法也可） | 协和 |  |

### 单细胞测序的技术细节

以下除样本收集外的所有技术细节由贝瑞提供。

|  |  |
| --- | --- |
| **步骤** | **技术细节** |
| 样本收集 | 1. 暂时计划3治疗前+3治疗后+6健康对照，但公司根据协和过往单细胞文章，建议每组测5-8个病人 2. 病人会调动多中心资源，召集到协和抽血，优先考虑纯表型个体（并发症单一的）但是没法完全控制 3. 对照会控制性别、年龄、南北方来源 4. 治疗前数据可在3-6个月内集齐，治疗后的单细胞数据需在治疗6个月后测定、因而可在1年内集齐 |
| 建库 | 1. 计划每份样本至少测定8000个细胞（辰睿给出的下界），通量240GB。公司可以保证测到至少下界那么多的细胞量。    1. 具体操作上是先指定一个细胞量，然后实际测定该细胞量+-30%的细胞。已测完的样本有10000个细胞，但当时是按照5000个细胞去测定的。 2. 建库后上机前可以-80度最多放3个月 |
| 上机 | 1. 实验员可以保证一样 2. 机器是Novaseq 6000。很难保证每次用同一个。    1. 但可以包lane测定，即指定一台机器的一条lane，这条lane只用来测此课题样本。一条lane通量850GB，故每次最多可以上3个240GB样本。缺点是每次需要凑齐3个样本才能测一次。    2. 若不包lane，则来一份样本测一次，那么从提供样本到获得fastq最多18天，其中建库完毕到出fastq最多10天。 3. 试剂目前定为V3.1。考虑到课题周期为1年，可以提前向公司预定后期V3.1试剂，以避免后期10X不生产V3.1试剂而无法测序。 |
| 其他 | TCR、BCR假阴性问题（即每个细胞大概有多大概率测丢TCR、BCR）需待公司查资料确认 |

# 检查TLB亚型作为细胞标记，预测SLE治疗后病情缓解与否的潜力

## 选题依据

（待补）

## 实验设计

1. 联系多中心收集病人表型及血样，CD79A+CD3D流式富集TLB后测bulk RNA-Seq
2. 统计检验，排除性别、年龄、南北方因素、原发症（此项能否很好排除待定）后看TLB能否对SLE治疗后病情缓解起到较好预测效果

## 技术路线

|  |  |
| --- | --- |
| **课题内容** | **细节** |
| 对照组要求 | 考虑皮肤粘膜受累病人，此类病人症状轻，算是基线 |
| 样本收集 | 1. 计划先做低中高三种病情病人各10例的预实验    1. 单中心收的话两周内可以集齐样本，多中心会慢一些 2. 将来至少要收集百余病人，具体量级待定 |
| Bulk RNA-Seq设计 | 1. 贝瑞负责，3000元一份。 2. 辰睿正在查如果富集TLB测bulk RNA-Seq的话需要抽多少血。 |