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

一般不错的工作：存在性-功能-机制和/或临床应用

高歌老师认为：

1. **存在性，目前数据集上有了，但是还没纯化出来。目前技术细节没摸清，所以需要先搞定《-协和集中精力做的（最好能养活）**
   1. **最好是一次性流式全部分好，这样后面可以大幅提升病人个体。但是需要有好的抗体。建议现在先把TLB一整个整出来**
   2. **初治病人：**
      1. **一份血-PBMC单细胞**
         1. **可以用来看转录调控网络**
      2. **一份血-FACS挑TLB及其三种亚型**
         1. **最好能培养（可以做很多功能试验）（也可以作为最后用药部分验证）**
         2. **辰睿提供一下三种亚型marker**
      3. **最好能用小鼠SLE模型预实验**
2. **功能上，BCR可以看下 取多工具交集（注：现在CITE-Seq等可能可以在计算上帮忙把这个事情做好）《-这边集中做**（但动物模型如果胡家志老师那边可以做的话那可以提前，或者协和那边马上就有模型那也可以马上做：拿一个小鼠SLE模型看看里面有没有TLB细胞）
3. 机制和临床应用《-等一等
4. 注：还可以考虑筛药
5. 另：33人SLE数据可以尝试去申请，走lncRNA的umbrella
6. **把钱博拉到胡家志老师讨论会里（周三下午15：00）**

|  |  |
| --- | --- |
| 对照组1要求（这是单细胞的对照） | 考虑SLE皮肤粘膜受累病人（相当于SLE不带PAH），此类病人症状轻，算是基线。这个要看BCR是否针对皮肤粘膜 |
| 对照组2 | 亚洲（最好是中国），汉族，女性，20-50岁，PBMC |

另外，写项目计划时，按照工作大框架分解内容，然后计算和实验写2列

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（目前往后排是因为暂时没有很好小鼠资源）

## 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 | 可能会对同一份血样同时测单细胞、测bulk、培养细胞 |
| 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。       1. 高歌老师觉得哪个快哪个好。怕的是【1】一开始提样本时弄丢了TLB，所以最好FACS sorting确认一下【2】 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，搞清楚SLE-PAH治疗后病情没有缓解（SLE好了，PAH没好）的可能原因

## 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、原发病后看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** |
| 时间点 | 治疗6个月之后 |
| 样本收集 | 1. 计划先做“治疗达标和未达标“2种病情病人各10例的预实验    1. 单中心收的话一个月内可以集齐样本    2. 不需要多中心 2. 将来至少要收集百余病人，具体量级待定 |
| Bulk RNA-Seq设计 | 1. 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。**看诺和回复。** |