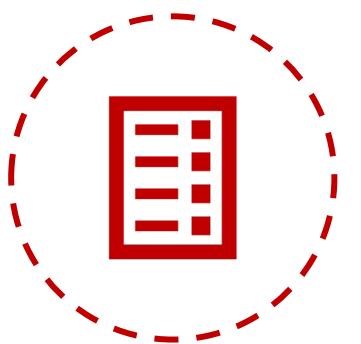




单细胞测序技术在植物研究中的应用

王 鹏

科技服务事业部



01

单细胞测序技术介绍

02

单细胞测序在植物中的应用

03

单细胞测序中的关键点

04

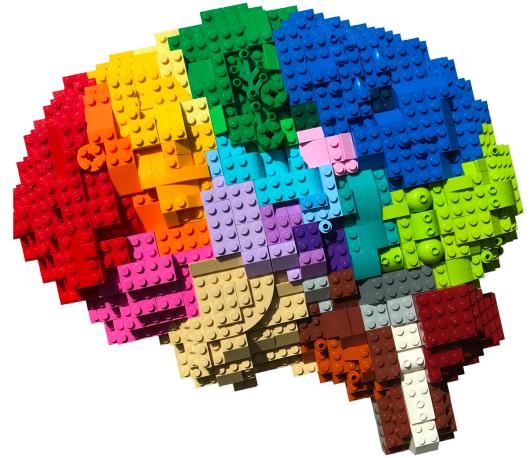
解离测试和样品准备

01



单细胞测序技术介绍

各转录组学比较



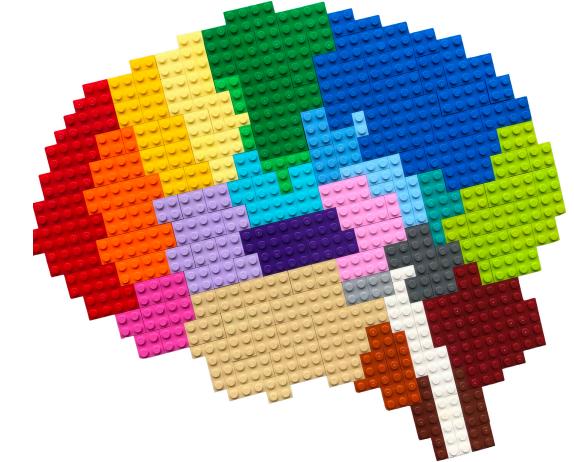
Tissue or organ



Bulk RNA-seq



Single-cell RNA-seq

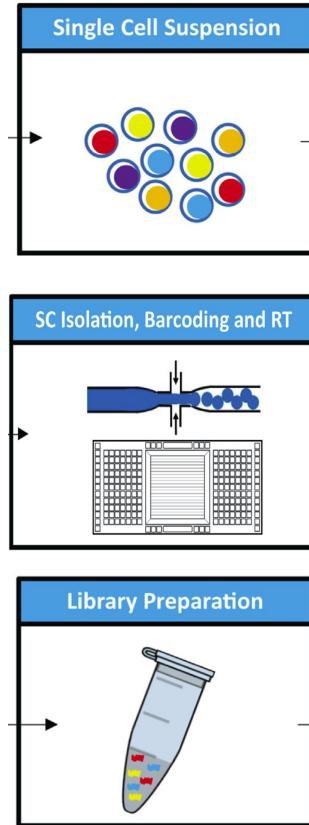


Spatial Transcriptomics



- Bulk RNA-seq : 某一组织中哪些基因高表达/低表达 ?
- ScRNA-seq : 高/低表达的基因在哪些细胞中存在 ?
- Spatial transcriptomics : 这些细胞在组织中的哪个位置 ?

单细胞测序的工作流程



湿实验

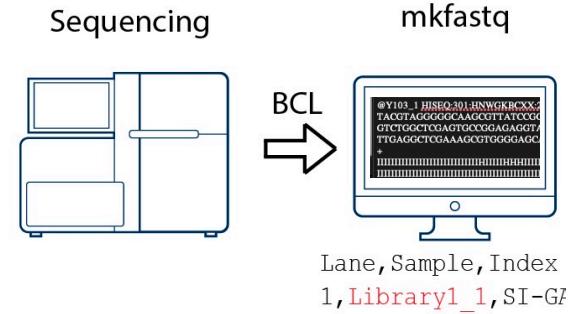
Step1：单细胞（核）悬液制备

Step2：单细胞（核）的捕获

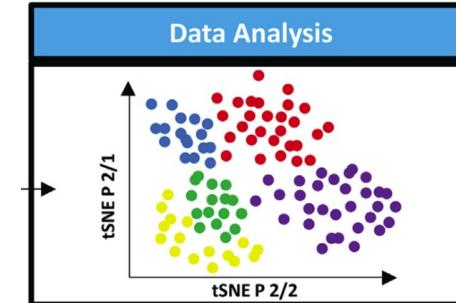
Step3：细胞裂解和反转录

Step4：文库制备和测序

Step5：下游数据分析

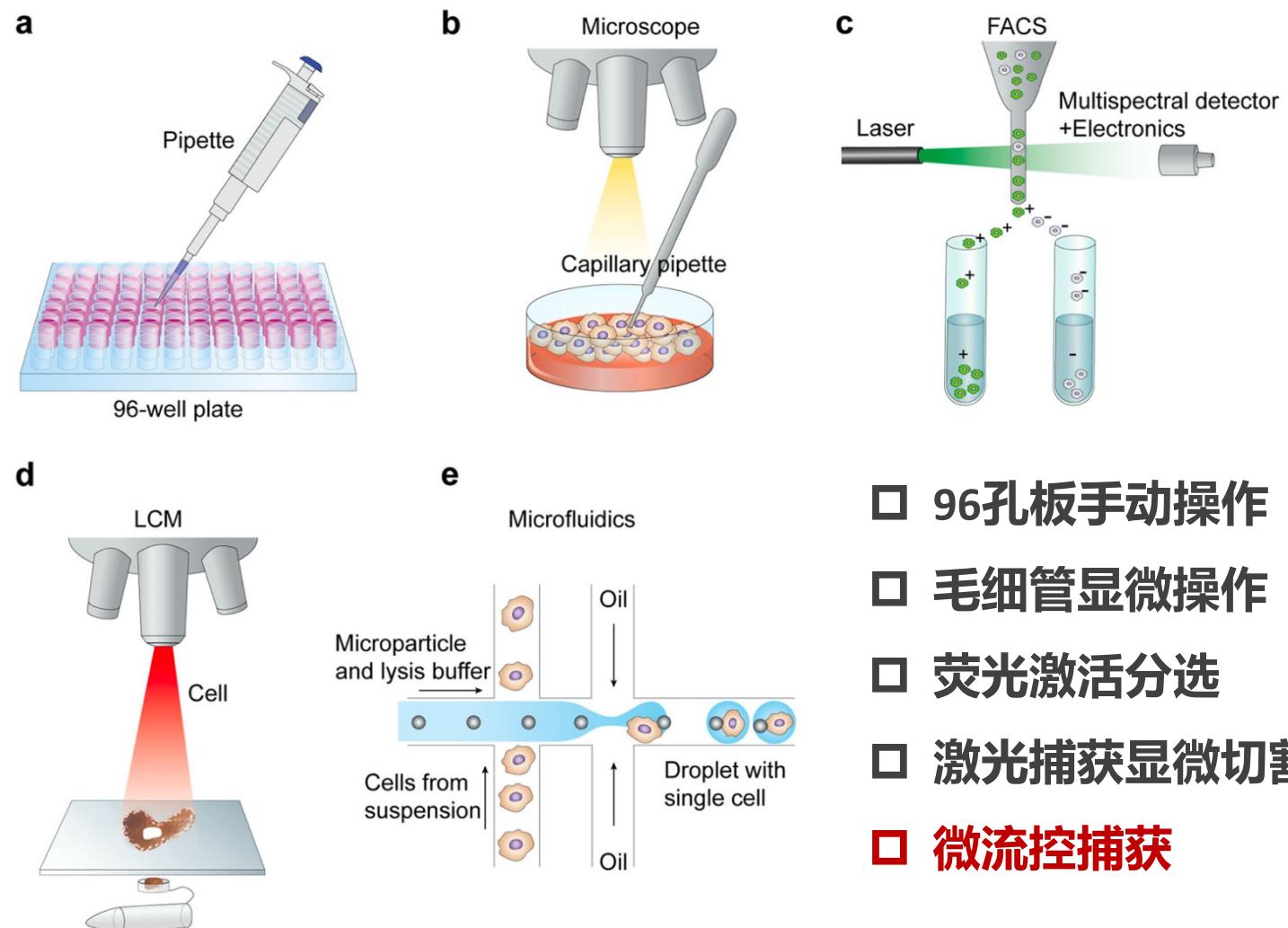


干实验



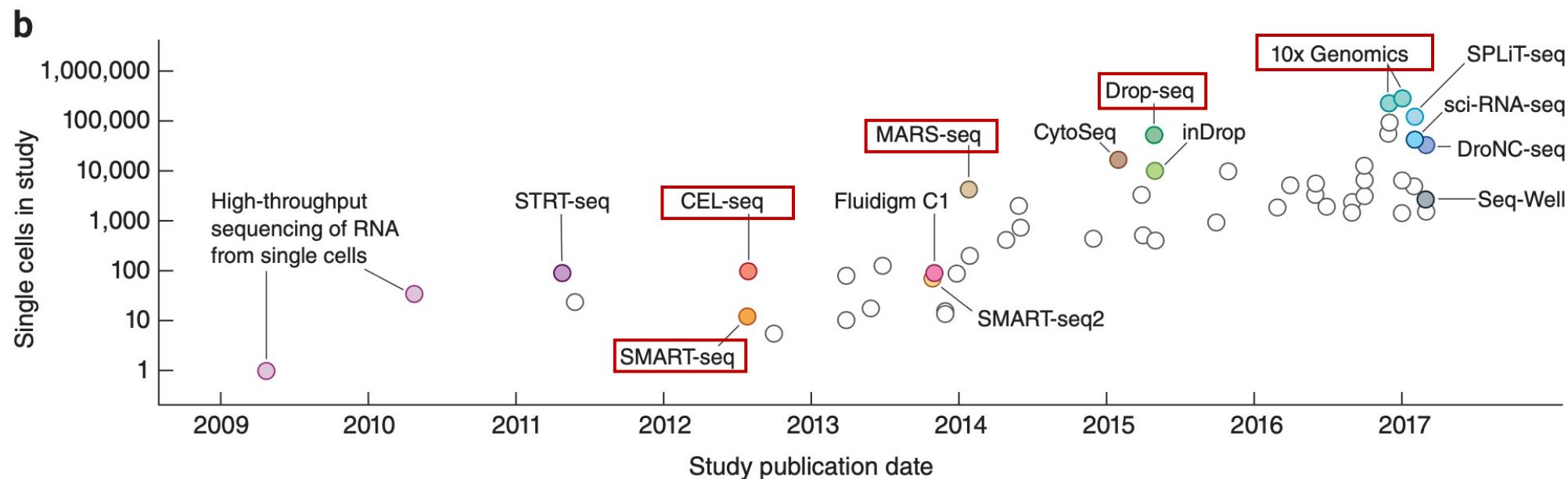
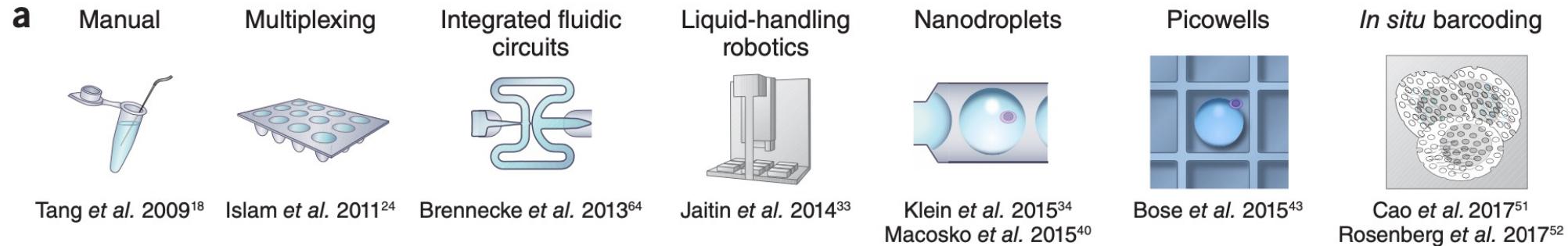
实现高通量测序的基础是能够捕获大量的单细胞并进行文库制备

单细胞捕获技术

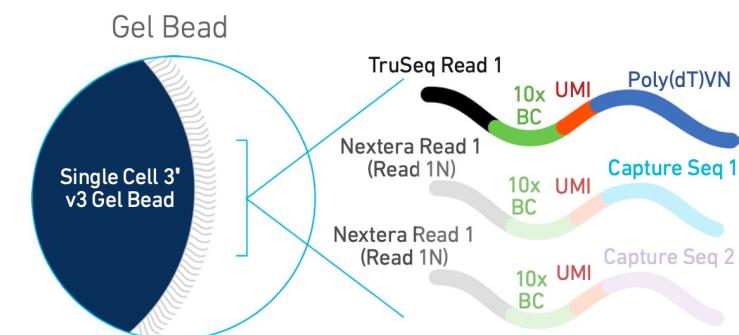
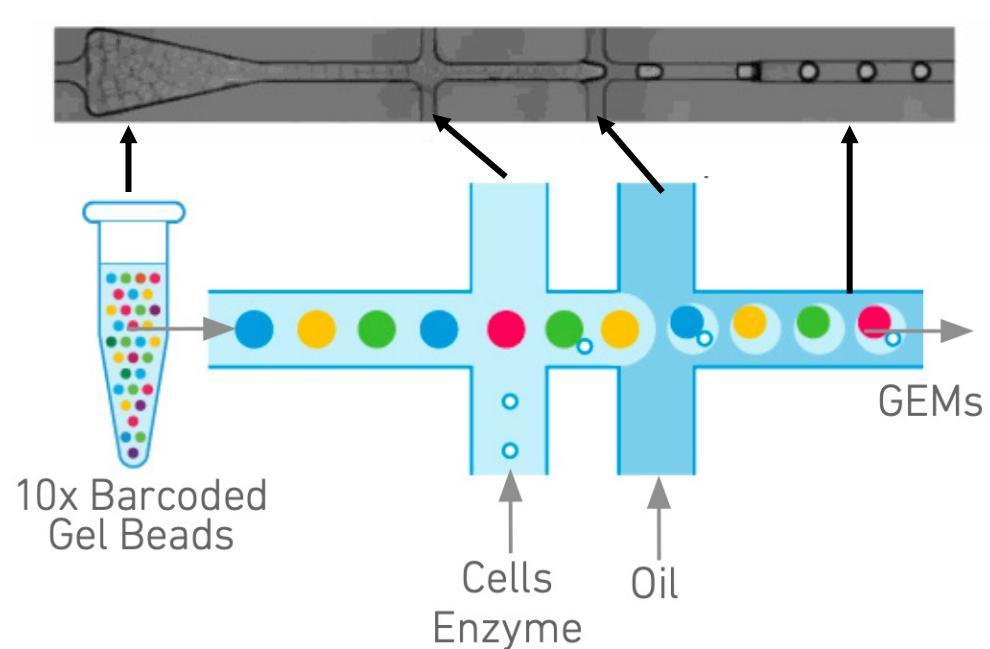


- 96孔板手动操作
- 毛细管显微操作
- 荧光激活分选
- 激光捕获显微切割
- 微流控捕获

单细胞测序技术



微流控细胞捕获 (10x Genomics)

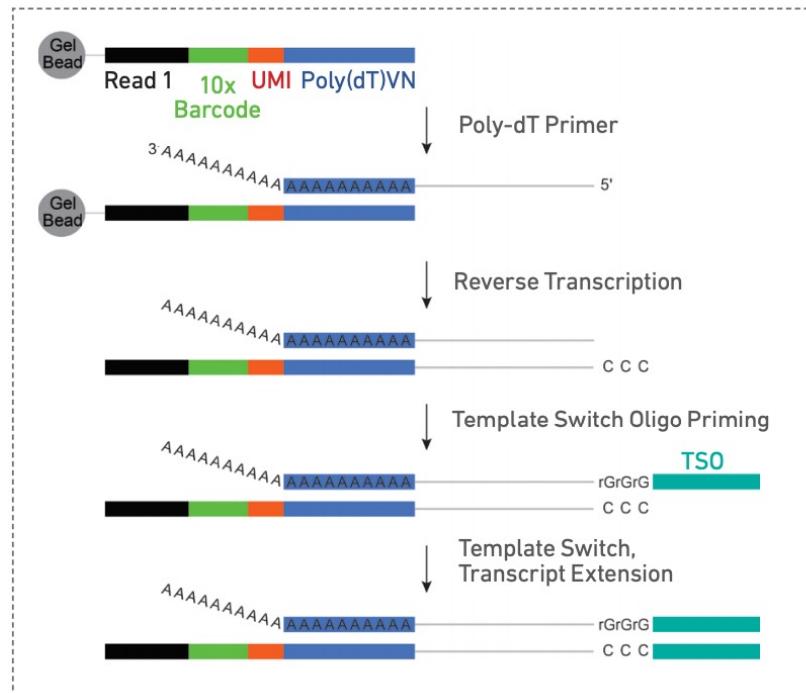


Barcode : 16bp ; UMI : 12bp ; Poly(dT) : 30bp

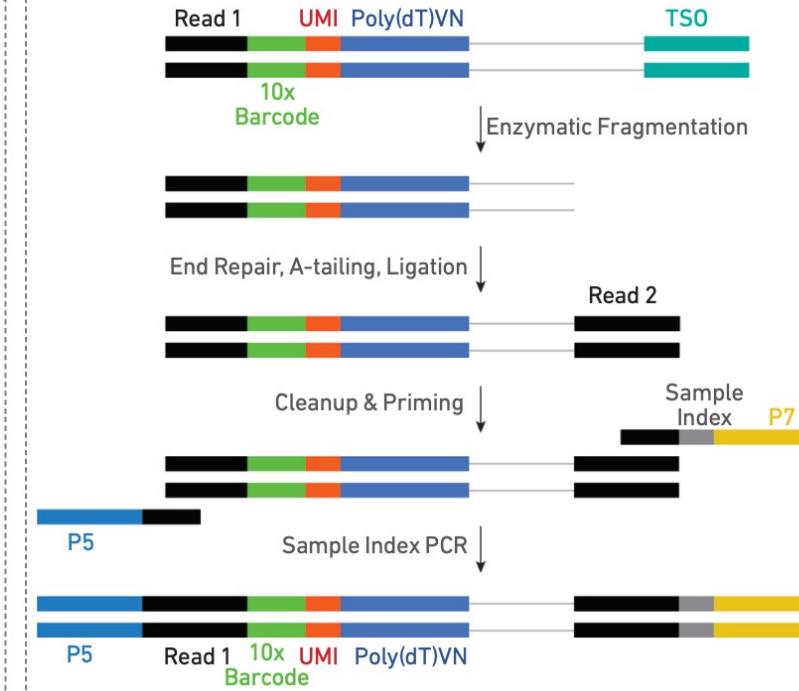


scRNA-seq文库构建

Inside individual GEMs



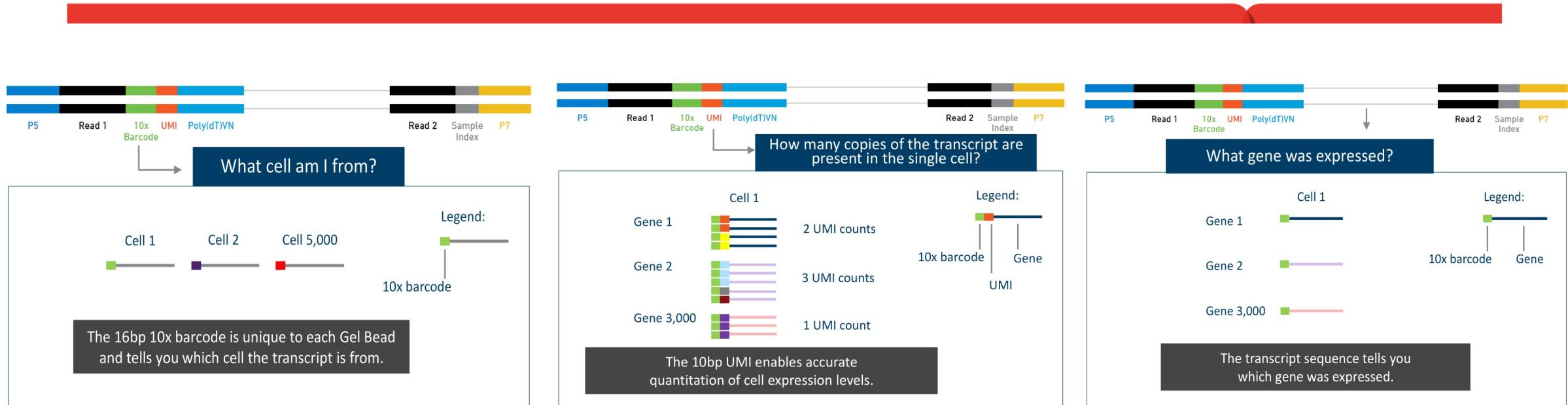
Pooled amplified cDNA processed in bulk



Step1：细胞裂解，微滴捕获mRNA；Step2：反转录（MMLV：**莫罗尼鼠白血病病毒**）并加Cs；Step3：加TSO
(template switching oligs) 合成第二链(cDNA)；Step4：加入cDNA的前后引物，扩增出全长cDNA；Step5：
使用片段酶将cDNA打断并尾部加A；Step6：加入Illumina Truseq adaptor进行连接；Step7：加入库PCR引物，扩
增建库

https://teichlab.github.io/scg_lib_structs/methods_html/10xChromium3.html

文库结构和测序数据量



10x Barcode = Cell

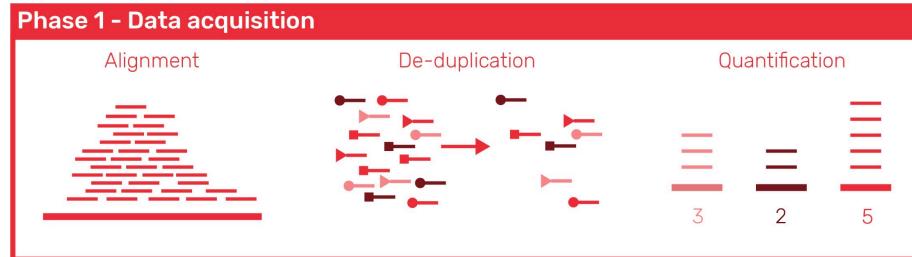
12bp UMI = Transcript Count

Insert = Gene Being Expressed

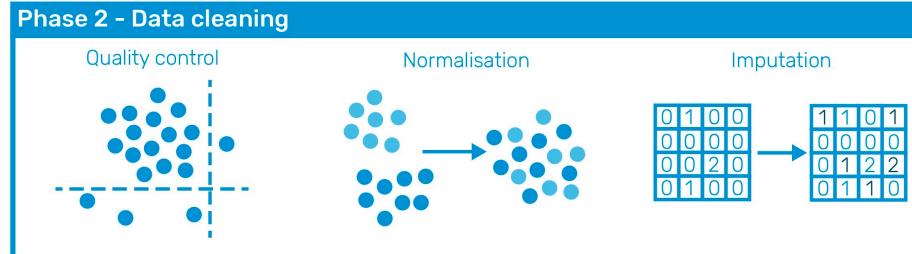
- 一般情况下，推荐一个样本测1000-10000个细胞，但需要根据不同细胞类型来定
- 推荐每个细胞测100,000条reads，应用PE150的测序策略，即得每个细胞 $\geq 30M$ 数据量
- 测序存在一定饱和性，适当加大测序数据量可提高基因的检出率

scRNA-seq数据分析流程

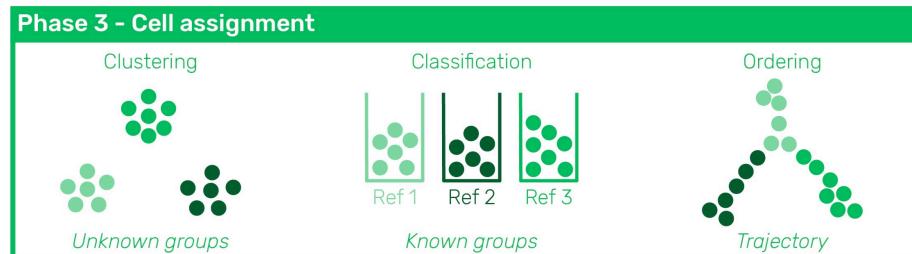
数据
获取



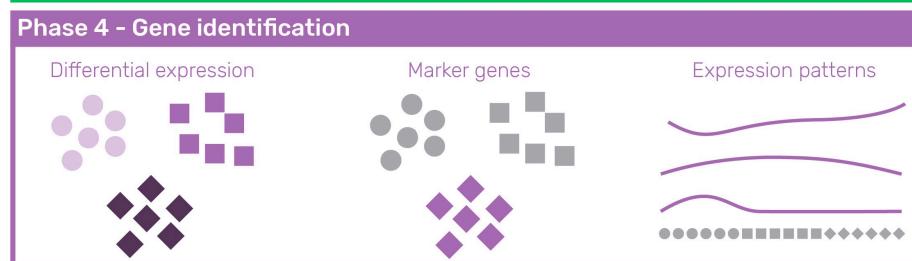
数据
质控



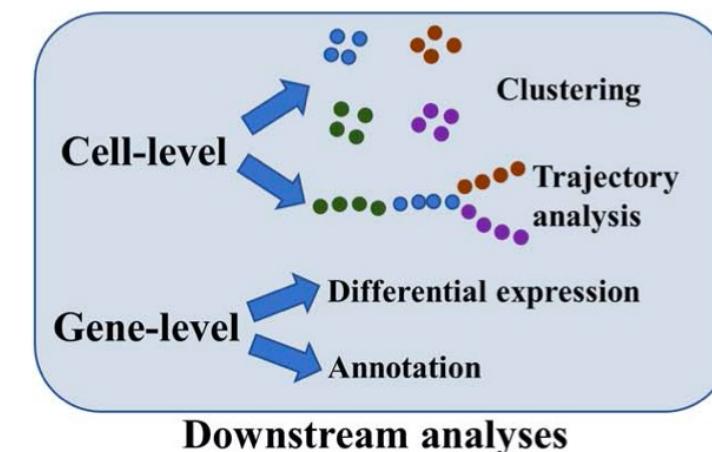
细胞
聚类



基因
分析



	Cell1	Cell2	...	CellN
Gene1	3	2	.	13
Gene2	2	3	.	1
Gene3	1	14	.	18
...
GeneM	25	0	.	0

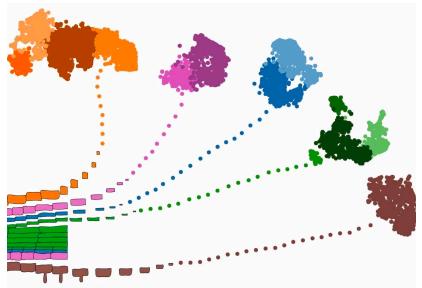


02



单细胞测序在植物中的应用

应用方向

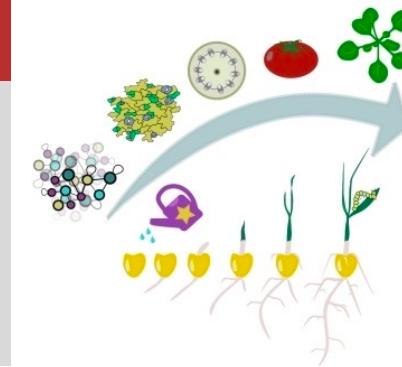


图谱绘制

有什么类型的细胞？是否有更精细的亚型？

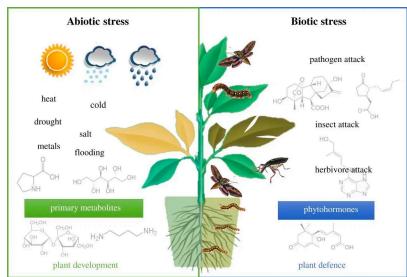
发育研究

组织是如何发育的？不同的细胞类群如何演变？



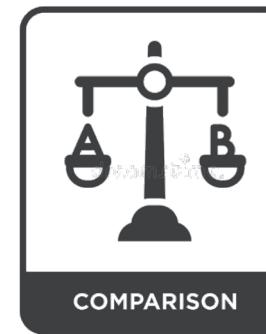
胁迫反应

高盐、高旱和高寒下，组织细胞如何反应？



比较研究

不同物种细胞图谱区别；实验处理后前后的差异



植物单细胞文章

植物单细胞转录组文章汇总1

物种	时间	发表杂志	影响因子	技术方法	研究材料
拟南芥	2019/02	Plant physiology	6.902	10X Genomics	拟南芥根尖
拟南芥	2019/03	Developmental Cell	10.092	10X Genomics	拟南芥根尖
拟南芥	2019/03	Plant Cell	9.618	10X Genomics	拟南芥根尖
拟南芥	2019/04	Molecular Plant	12.084	10X Genomics	拟南芥根尖
水稻	2020/01	BioRxiv		10X Genomics	水稻幼苗
拟南芥	2020/06	Molecular Plant	12.084	10X Genomics	拟南芥幼苗子叶
拟南芥	2020/09	Science	41.845	10X Genomics	拟南芥根尖
水稻	2020/12	Molecular Plant	12.084	10X Genomics	水稻根尖
玉米	2020/12	PNAS	9.412	10X Genomics	玉米茎尖

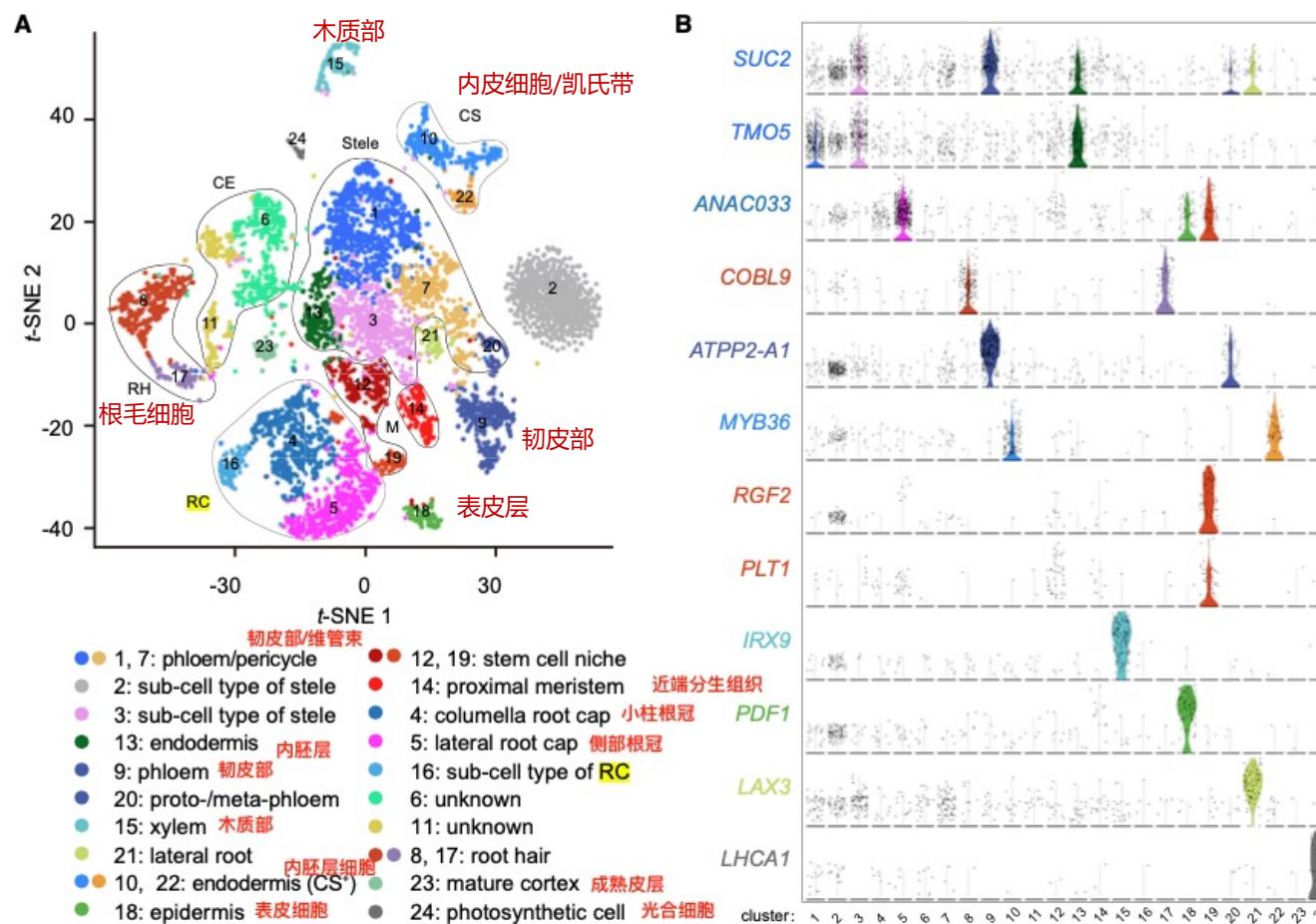
植物单细胞文章

植物单细胞转录组文章汇总2

物种	时间	发表杂志	影响因子	技术方法	研究材料
玉米	2021/01	Developmental Cell	10.092	10X Genomics	玉米花序器官
拟南芥	2021/01	Plant Cell	9.618	10X Genomics	拟南芥叶片维管
玉米	2021/01	Plant Cell	9.618	10X Genomics	玉米维管束
拟南芥	2021/03	Developmental Cell	10.092	10X Genomics	拟南芥茎尖
拟南芥	2021/03	Molecular Plant	12.084	10X Genomics	拟南芥根
水稻	2021/04	Nature Communications	12.121	10X Genomics	水稻根
拟南芥	2021/04	Plant Cell	9.618	10X Genomics	拟南芥根
拟南芥	2021/04	Developmental Cell	10.092	10X Genomics	拟南芥叶片

应用方向-图谱绘制

- 拟南芥根部的细胞异质性（精细亚型；新类群；功能精细化）

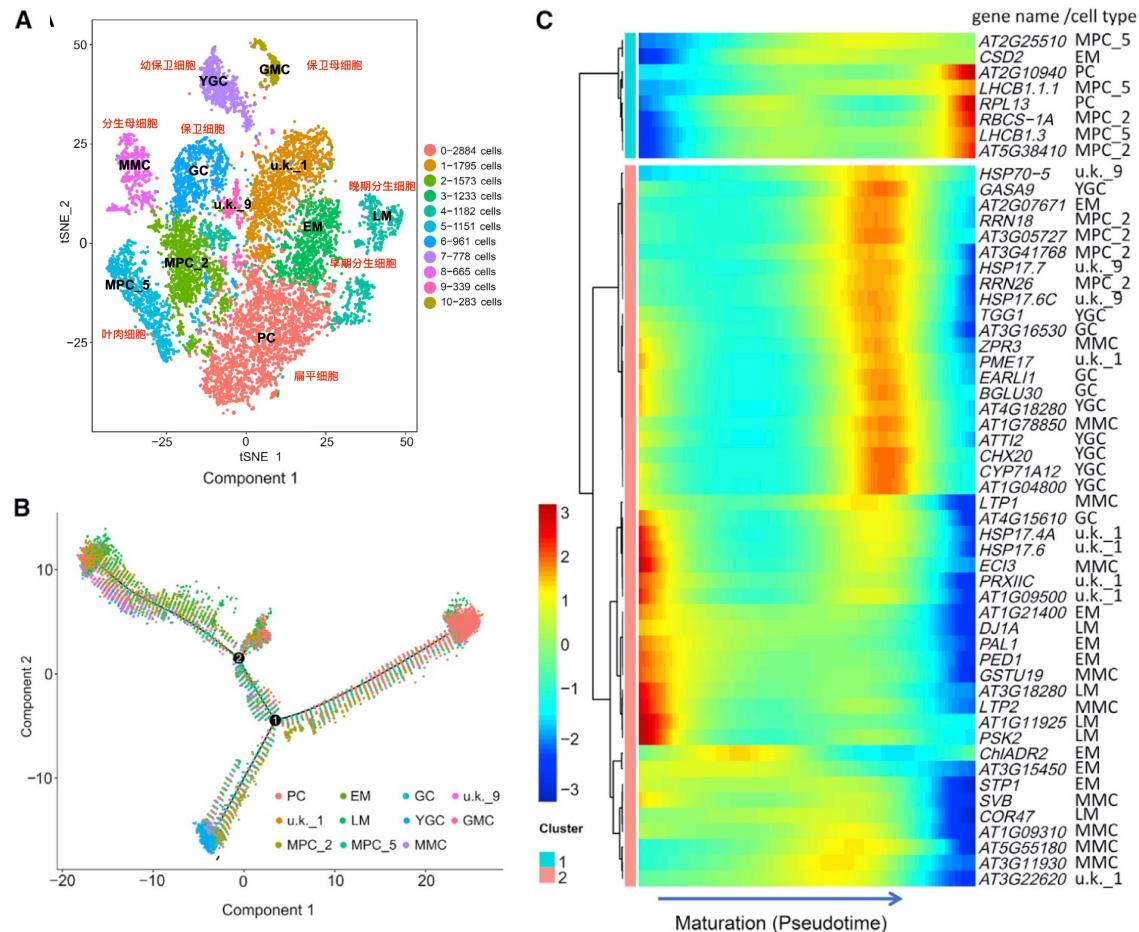


15000个细胞，过滤后得到7695个细胞

- 共得到24个cluster，通过已发表的103个marker基因去注释得到具体细胞类型（中柱、根冠、根毛、韧皮部、内皮层、分生、木质部、表皮、侧根）
- 细胞亚型：cluster1（有机磷酸酯和氨基酸代谢过程）和7（RNA修饰和核苷酸代谢）；10（细胞壁合成）和22（内膜系统和离子转运）
- 新类群：cluster24（光合细胞），根部的某些细胞可能具有与叶肉细胞类似的光合作用

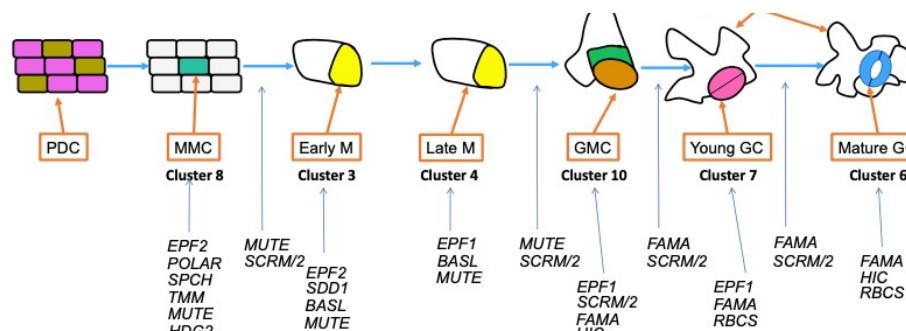
应用方向-发育研究

● 叶片中气孔细胞的发育



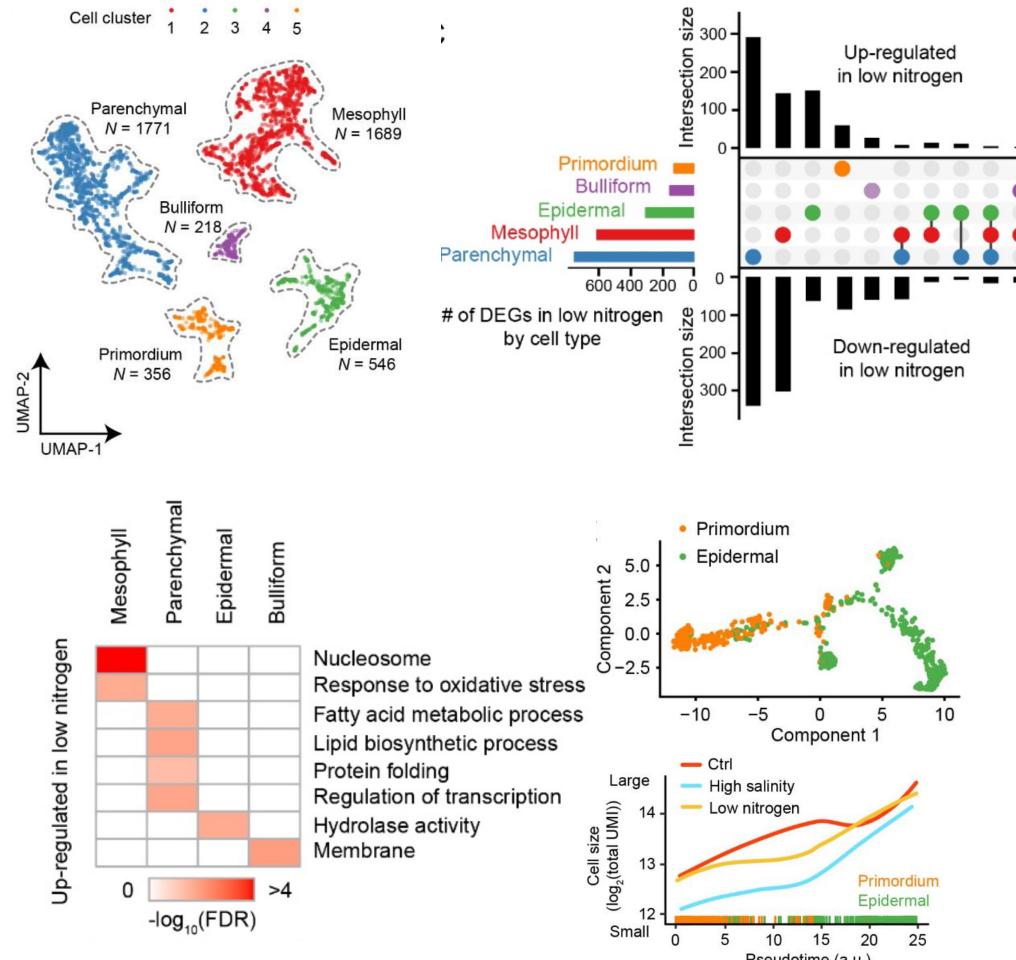
5日龄的拟南芥幼苗的子叶

- 1) 13 999个细胞聚类成10个cluster (多marker进行细胞类型的鉴定 : 分生细胞 , 扁平细胞 , 叶肉细胞 , 保卫细胞)
- 2) MMCs (分生母细胞) 分化成GCs (保卫细胞) 和 PCs (扁平细胞) , 但MPCs (叶肉细胞) 的两个簇2和5散在多个时间点 , 叶肉的发育具有其复杂性
- 3) BPC1和BPC6 (生长、发育和应激反应) 通过共表达调节TFs , 进而调节叶片气孔的发育。



应用方向-胁迫反应

● 非生物因素胁迫下细胞的响应



对照+高盐+低氮处理，地上组织（茎、鞘）

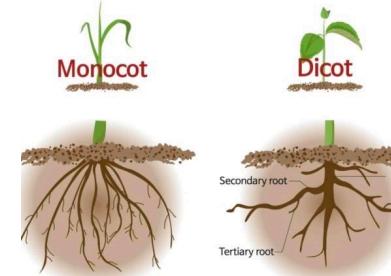
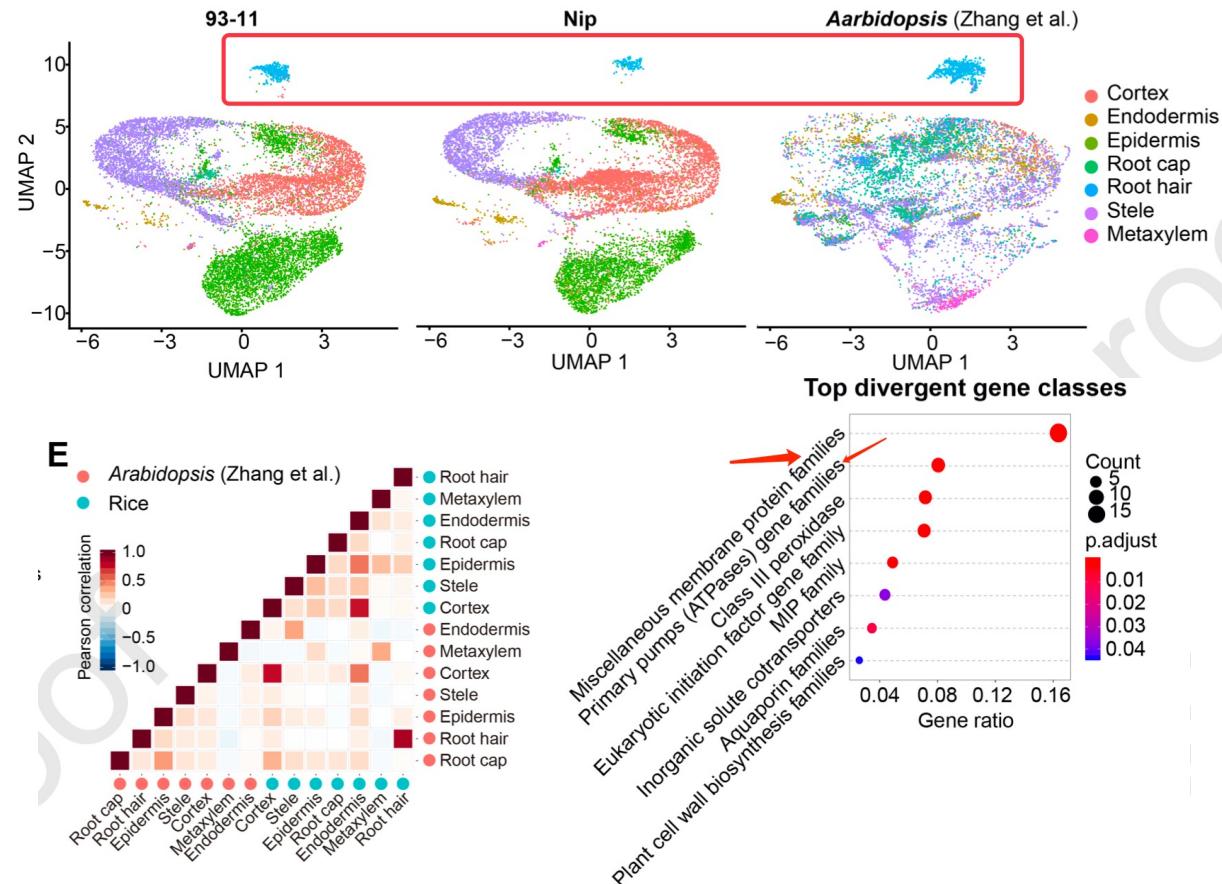
- 1) 4580个细胞，根据特异表达基因和功能注释到5个类群（叶肉、薄壁、泡状、原基和表皮）
- 2) 不同的细胞类型中的DEGs具有一定的异质性（薄壁细胞响应最强）
- 3) GO分析表明，低氮条件下，叶肉细胞中更多富集的是氧化应激反应的基因
- 4) 在原基细胞到表皮细胞的发育过程中，高盐下，细胞有所缩小；低氮下，原基细胞出现延迟膨胀



原基细胞延迟膨胀的原因？
胁迫下细胞类型中激素的响应？

应用方向-比较研究

● 不同种间的细胞图谱和功能差异



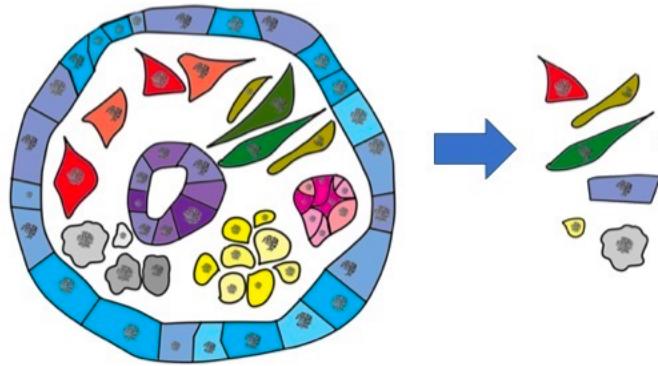
- 1) 水稻和拟南芥的根毛细胞簇具有较高的一致性。
(富含脯氨酸样蛋白1 (PRPL1, 拟南芥根毛发育的调控基因) 同样在水稻的根毛细胞中也有表达)
- 2) 其它组织 (表皮、内胚层、中柱和根冠) 的基因表达谱有所分化 (水稻和拟南芥的UMAP图不重叠的原因)
- 3) 将分化基因进行GO注释,发现具有**编码膜蛋白**和**初级泵**的功能,该基因家族的分化可能是导致水稻和拟南芥根系形态分化的主要原因。

03



单细胞测序中的关键点

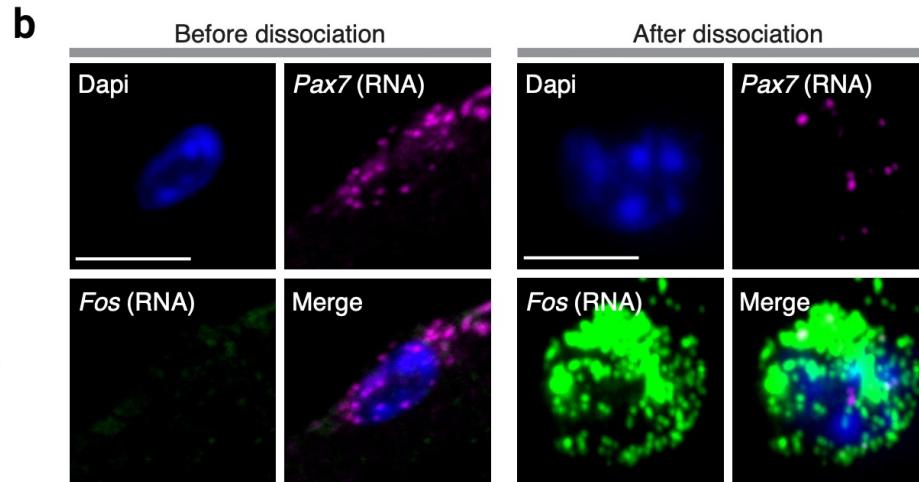
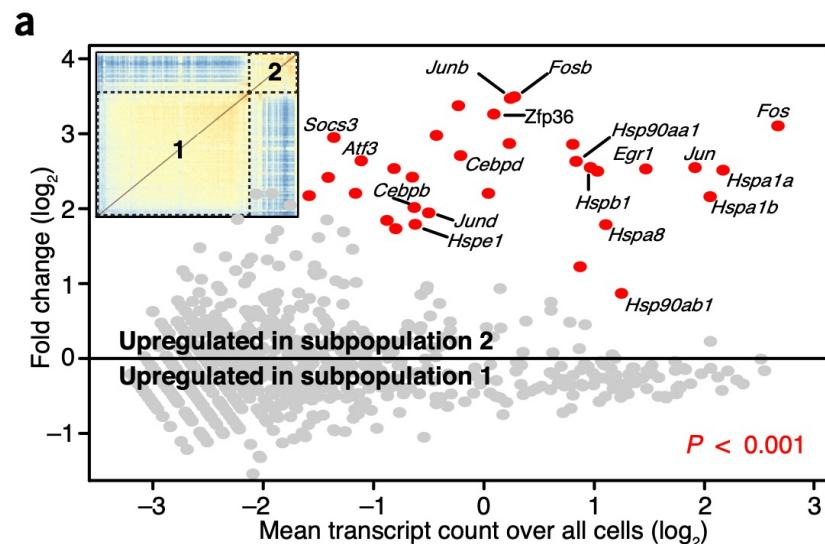
前期实验-悬液制备



细胞活性和完整性

- 不完整解离导致细胞成团
- 太重的解离会损伤细胞
- 解离影响细胞类群的鉴定
- 解离会引入转录的变化

- 酶的选取
- 消化时间
- 碎片过滤
- 细胞活率



10.1038/nmeth.4437

前期实验-悬液制备

酶的选取

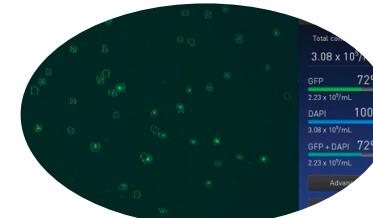
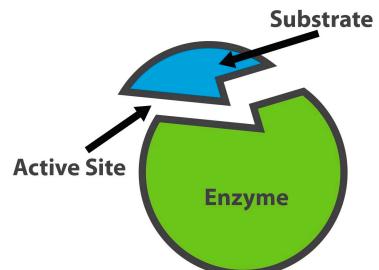
- 半纤维素酶
- 纤维素酶
- 果胶酶
- 离析酶

碎片过滤

- 低速离心+缓冲液清洗
- 密度梯度离心
- 流式细胞仪

细胞计数

- 细胞计数板
- 明场计数
- 荧光计数



前期实验-细胞捕获前的注意事项

- 细胞大小，在7~30um
- 细胞活率 $\geq 85\%$
- 细胞浓度 $\geq 1 \times 10^6$ Cells/mL
- 细胞团及碎片<5%
- 悬液中不可含Ca²⁺和 Mg²⁺

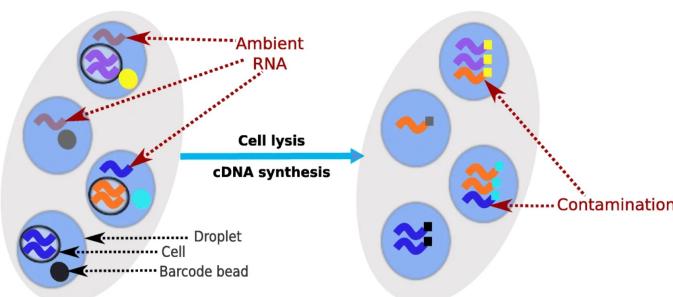
太小：影响捕获率；太大：容易堵塞孔道

死细胞太多，导致太多低表达/背景RNA

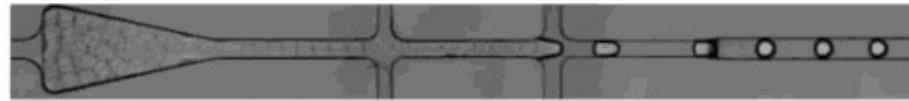
浓度不足：捕获细胞少，饱和度不够
浓度太高：浪费数据，增加双细胞率

细胞团和碎片会影响后续数据分析

Ca和Mg是逆转录酶的抑制剂

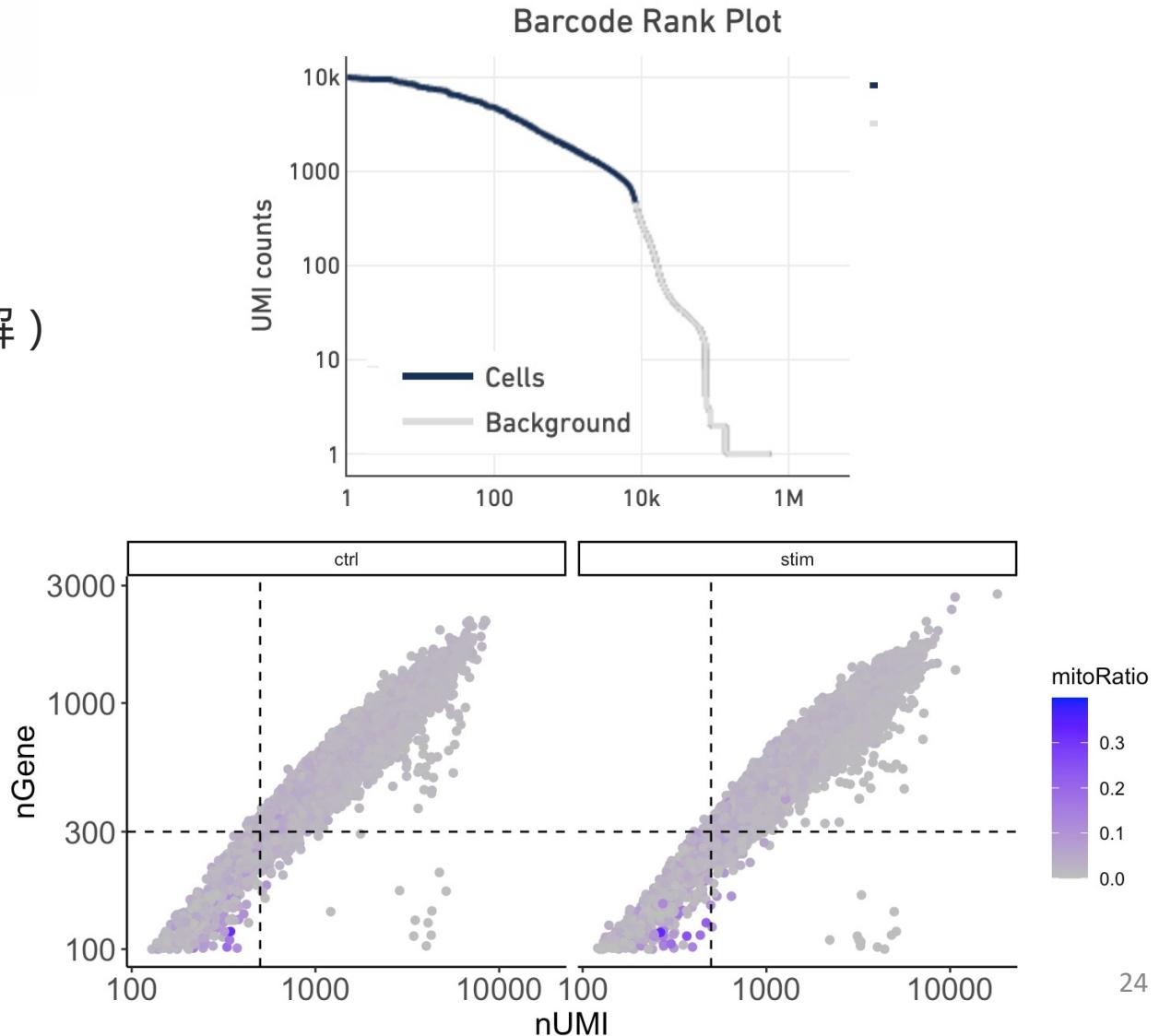


生信分析-质控过滤

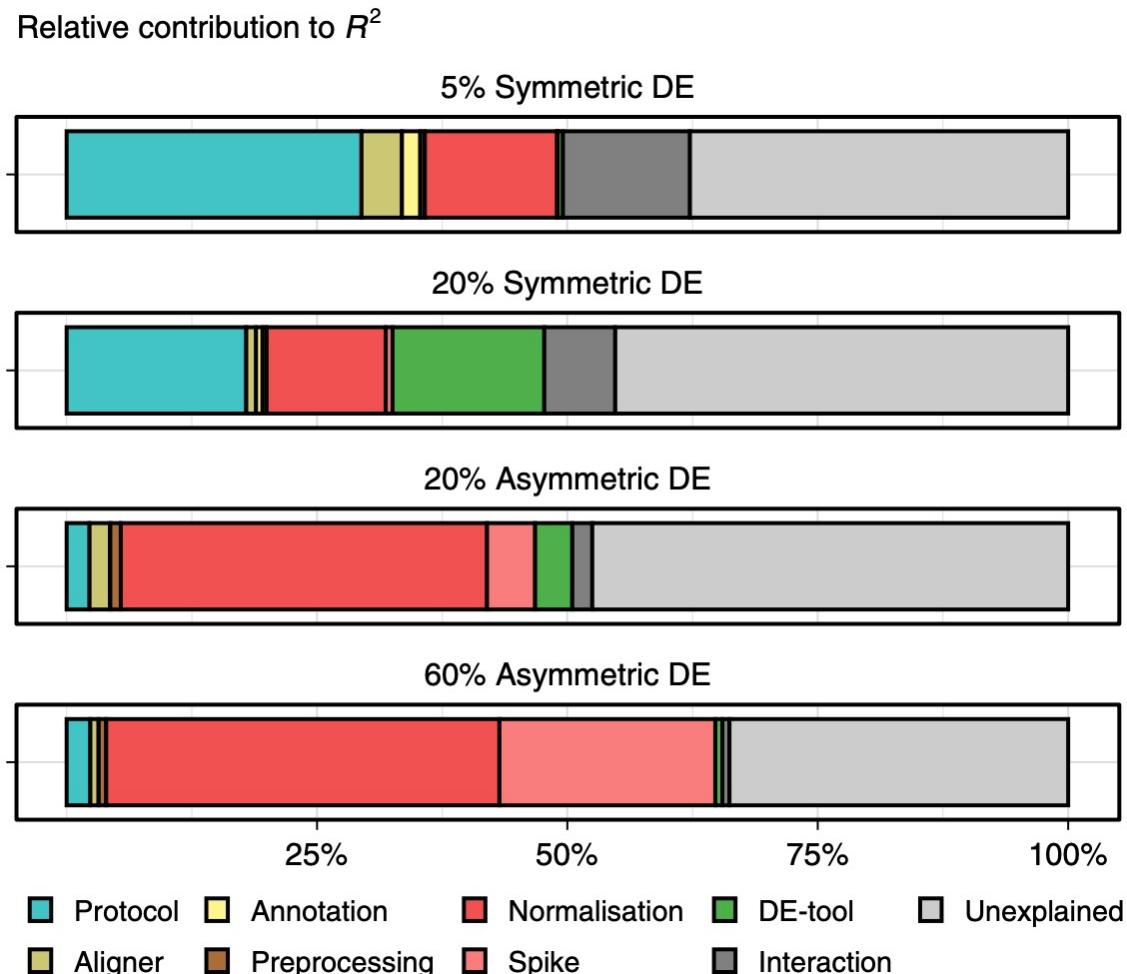


- 液滴中有多个细胞，UMI检测数过高
- 液滴中无细胞，但有背景RNA（假细胞）
- 高线粒体基因：样本质量差（凋亡或溶解）
- 低分布基因：如只在0.1%的细胞中表达

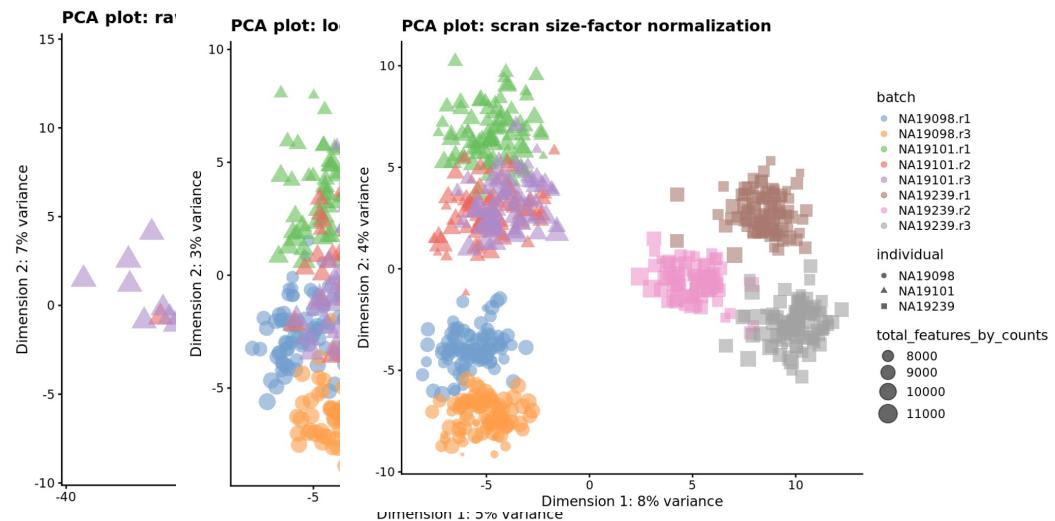
Multiplet Rate (%)	# of Cells Loaded	# of Cells Recovered
~0.4%	~800	~500
~0.8%	~1,600	~1,000
~1.6%	~3,200	~2,000
~2.3%	~4,800	~3,000
~3.1%	~6,400	~4,000
~3.9%	~8,000	~5,000
~4.6%	~9,600	~6,000
~5.4%	~11,200	~7,000
~6.1%	~12,800	~8,000
~6.9%	~14,400	~9,000
~7.6%	~16,000	~10,000



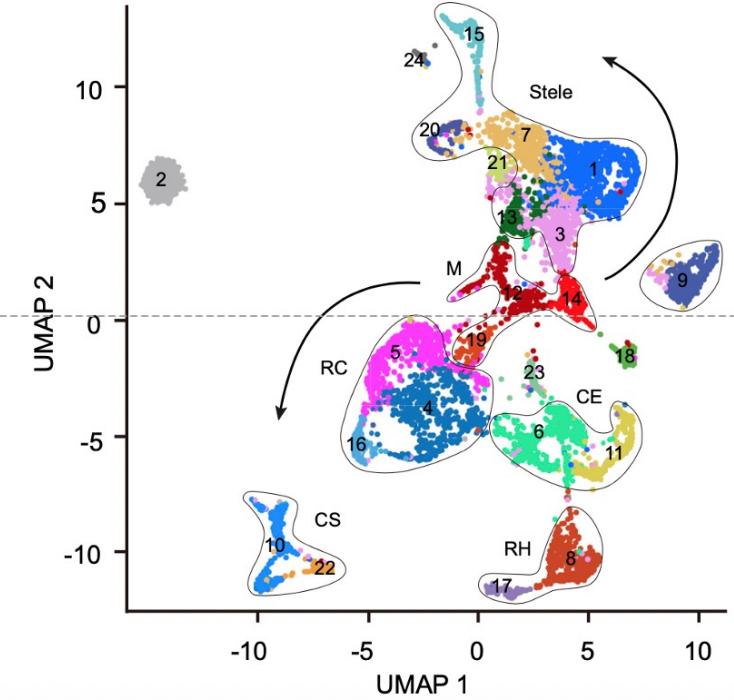
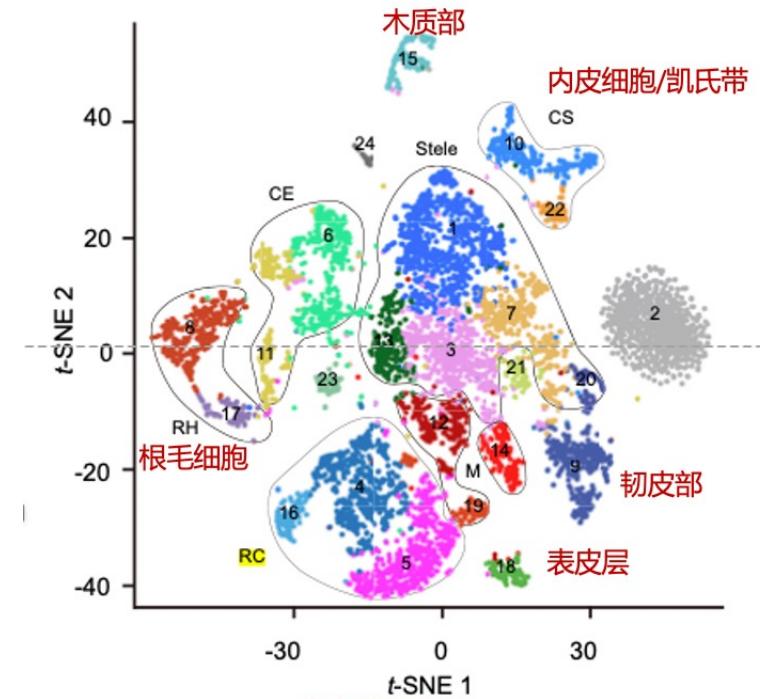
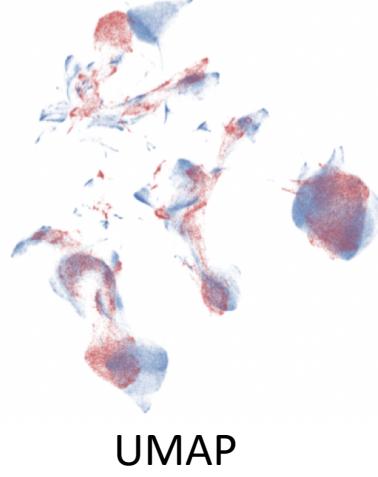
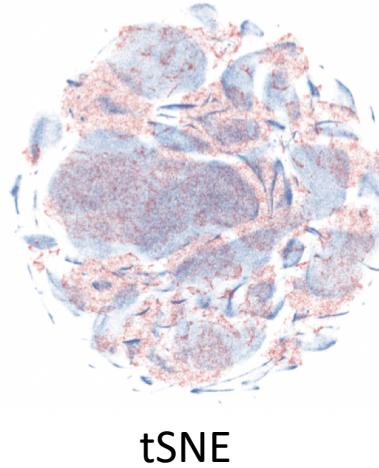
生信分析-数据标准化



Normalisation is overall the most influential step. Because we tested a nearly exhaustive number of ~3000 possible scRNA-seq pipelines, starting with the choice of library preparation protocol and ending with DE-testing, we can estimate the contribution of each separate step to pipeline performance for our different DE-settings (Fig. 1b). We used a beta regression model to explain the variance in pipeline performance with the choices made at the seven pipeline steps (1) library preparation protocol, (2) spike-in usage, (3) alignment method, (4) annotation scheme, (5) preprocessing of counts, (6) normalisation and (7) DE-tool as explanatory variables. We used the



生信分析-tSNE or UMAP



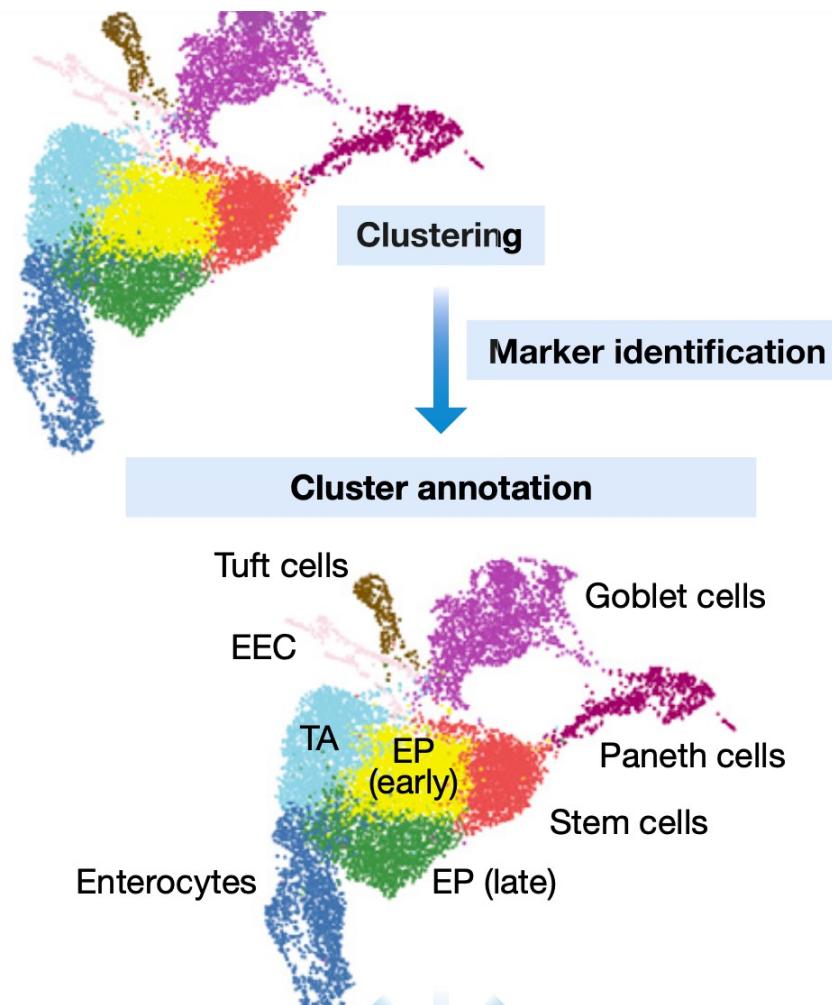
doi: 10.1038/nbt.4314

doi: 10.1016/j.molp.2019.04.004

doi: 10.1016/j.molp.2021.01.001

- ✓ UMAP的细胞分群更加明显
- ✓ UMAP可揭示细胞发育轨迹

后期实验-Marker鉴定



细胞聚类到细胞身份，还有很长一段距离...

必须先有一个参考基因组及其注释信息

无Marker数据库

有Marker数据库

差异分析找Marker

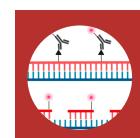
差异分析找Marker

文献报道的Marker

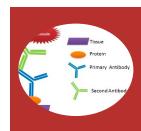
与数据库比对

实验证Marker

可不用实验证



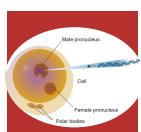
1. RNA原位杂交



2. 免疫荧光



3. 免疫组化



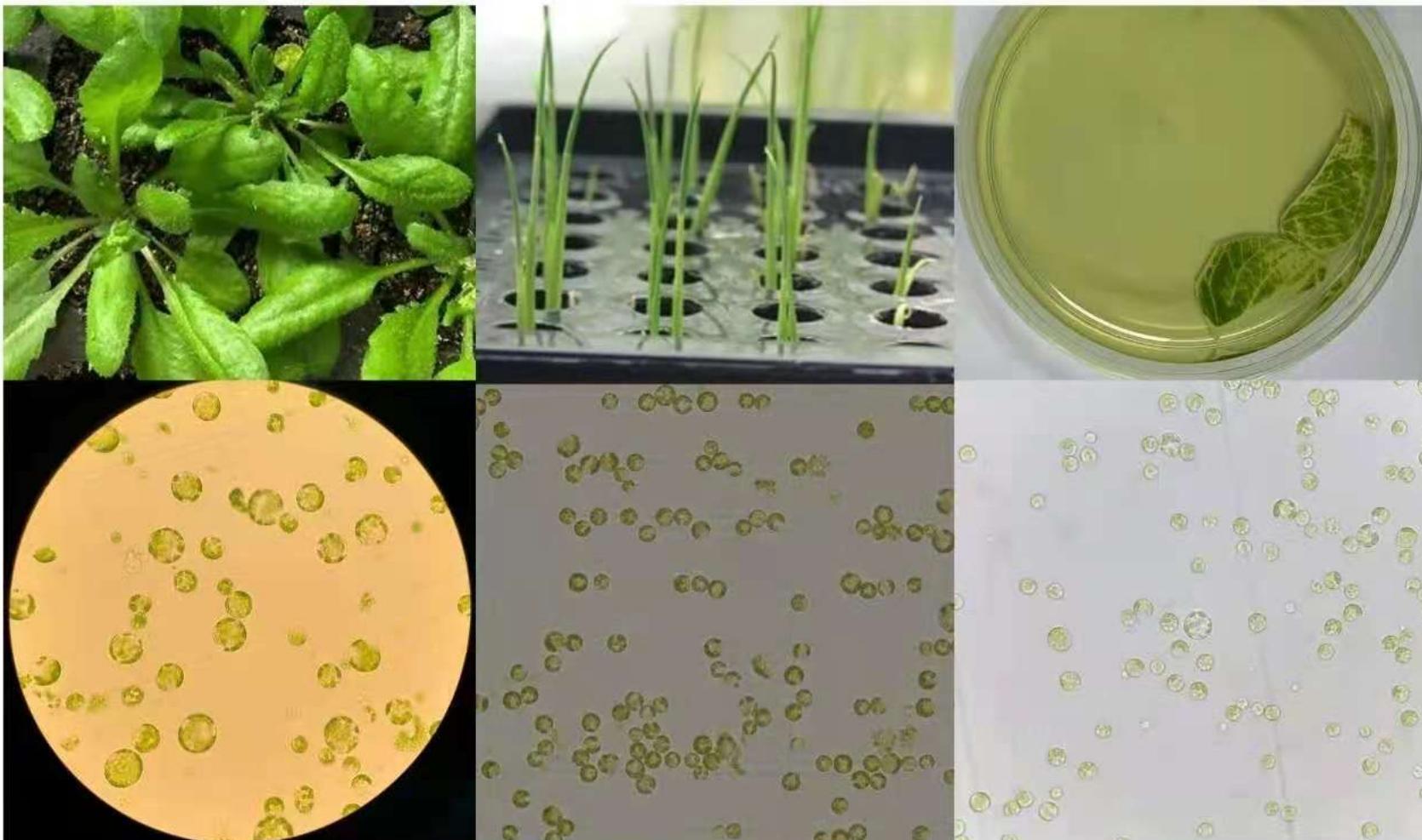
4. 转基因技术

04



解离测试和样品准备

原生质体制备



拟南芥叶片原生质体
(活率 $\geq 90\%$, 碎片<10%)

水稻茎原生质体
(活率 $\geq 95\%$, 碎片<10%)

大豆叶片原生质体
(活率 $\geq 95\%$, 碎片<10%)

样品准备

组织要**新鲜**；解离要**迅速**；建库要**及时**

上门服务

拟南芥根和叶、大豆叶片、水稻幼茎，预约上门解离并建库，制备好的原生质体悬液，可预约上门建库

样本寄送

活苗常温寄送，确保植株寄送到实验室后，组织无明显萎蔫和坏死，生长状况良好；如果样本量较多，可先寄送活苗测试后上门实验

公司平台

作为亚洲最全的高通量测序中心，贝瑞基因拥有19台PacBio Sequel II，6台BioNano Saphyr、2台BioNano Irys、14台Illumina NovaSeq 6000、14台Illumina Hiseq 2500、**21台10x Genomics**、40台NextSeq CN500，科研力量雄厚、项目管理完善、质控体系严格，为科学研究提供了丰富的平台保障。



NovaSeq 6000



HiSeq 2500



NextSeq 500



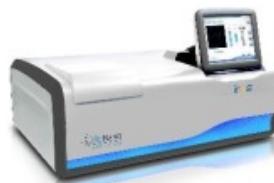
MiSeq



PacBio Sequel



BioNano Saphyr



BioNano Irys



10x Genomics

地点	投放仪器
北京	17
武汉	1
上海	1
成都	1
广州	1



Thank You!



官方网站



官方微信

www.berrygenomics.com

TCGATCGA GATCGATCGATCGATCGATCG
GATCGATCGATCGATCGATCGATCGATCG
CGATCGATCGATCGATCGATCGATCGATCGATCG

