



中国科学院水生生物研究所
INSTITUTE OF HYDROBIOLOGY, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES

中科院水生所

单细胞测序技术及应用

分析测试中心
柴小翠
2020.08.28

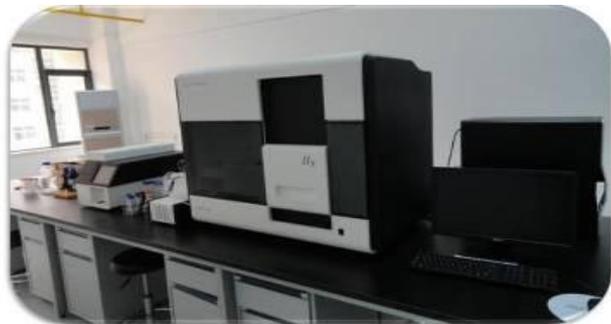
报告内容

- 一、基因组技术平台情况简介**
- 二、单细胞测序技术的基本流程**
- 三、单细胞测序技术实验设计**
- 四、单细胞测序技术的应用**

报告内容

- 一、基因组技术平台情况简介**
- 二、单细胞测序技术的基本流程**
- 三、单细胞测序技术实验设计**
- 四、单细胞测序技术的应用**

基因组技术平台情况简介



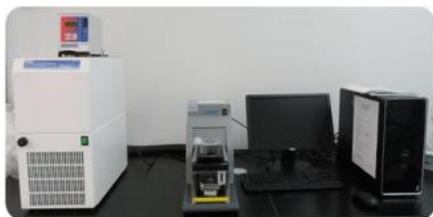
高通量DNA测序仪



Miseq 长片段高通量测序系统



Nextseq500高通量测序系统



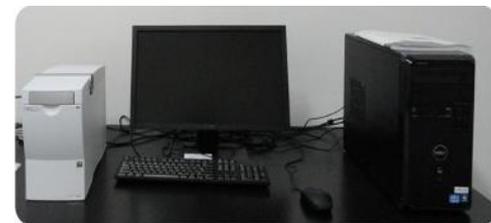
DNA剪切仪



核酸片段回收仪



脉冲场电泳系统



生物分析仪



基因组组装分析仪



Qubit荧光计

核酸提取--建库--测序--数据分析
全流程配套基因组技术服务

基因组技术平台情况简介



细胞和组织采集系统

低通量

细胞数量： <100 个
建库策略：Smart-seq2



C1单细胞自动制备系统

中通量

细胞数量： <1000 个
建库策略：Smart-seq2



10X Genomics 全基因组解码系统

高通量

细胞数量： $> 1 \times 10^5$ 个
建库策略：3' 端

实现单细胞分选/富集
稀有/大量--全长/3' --测序--数据分析
全流程配套单细胞测序技术服务

基因组技术平台情况简介



Roche定量PCR仪



微滴式数字PCR仪



MassARRAY核酸质谱分析系统



全自动核酸纯化系统



移液工作站



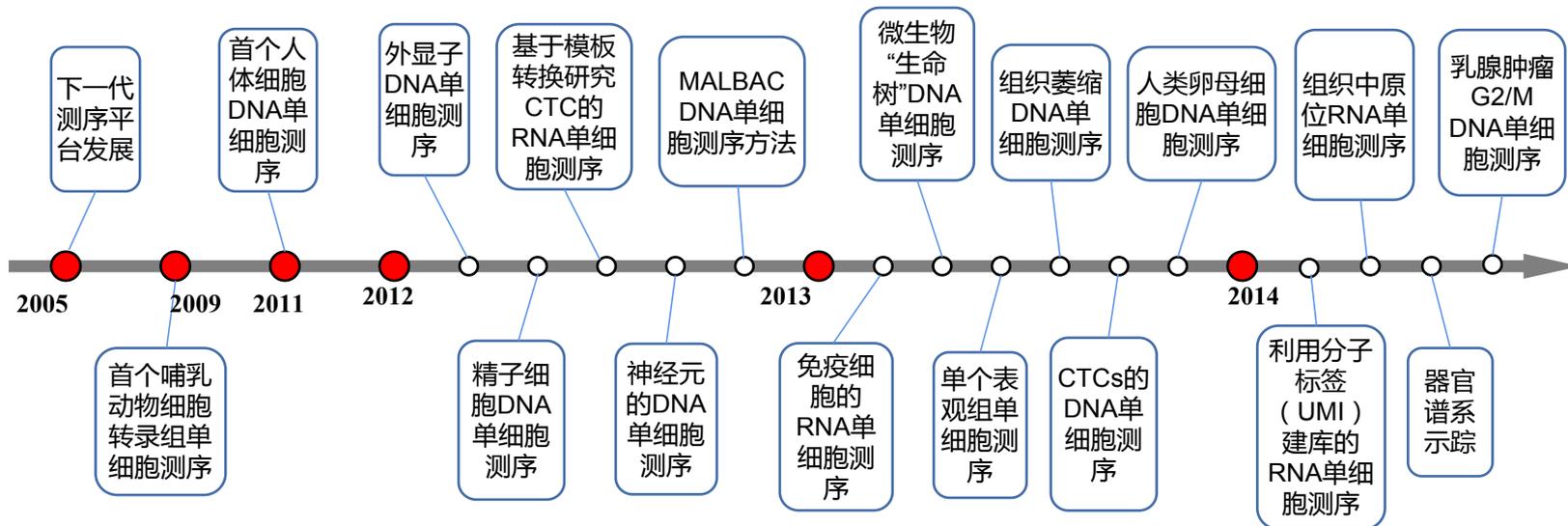
多重基因表达分析系统

核酸提取--绝对定量—多重表达—SNP/甲基化
完整核酸定量分析技术服务

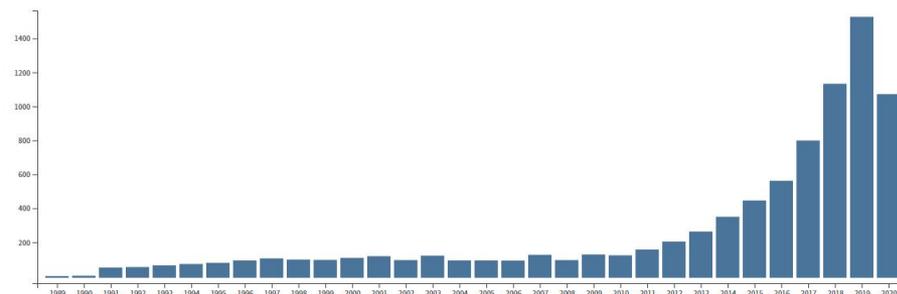
报告内容

- 一、基因组技术平台情况简介
- 二、单细胞测序技术的基本流程**
- 三、单细胞测序技术实验设计
- 四、单细胞测序技术的应用

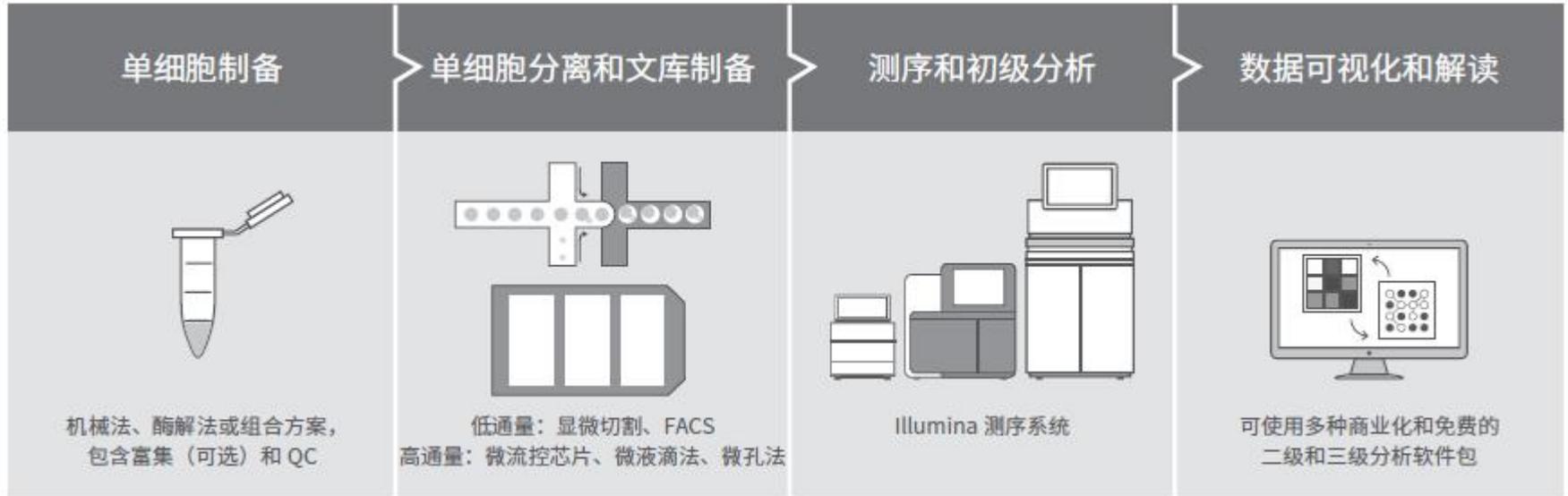
单细胞测序的发展



出版物总数
8,421 分析



单细胞测序的基本流程



单细胞悬液制备

组织细胞裂解

方法/方案	描述
机械法	通过切割、切块、移液器吹打等方法机械切割和破坏组织
酶解法	使用胶原酶、胰蛋白酶、中性蛋白酶、弹性蛋白酶等多种酶来消化组织，裂解蛋白键
组合方案	在自动化系统的帮助下，机械法和酶解法可以依次或同时进行，实现更广泛的裂解

富集（可选）

方法/方案	描述
离心	通过密度梯度离心，根据细胞大小、形状或密度富集细胞
基于磁珠的富集	通过磁珠结合抗体的阳性/阴性筛选来富集感兴趣的细胞群（包括活细胞）
流式细胞荧光分选	通过荧光基团/荧光素结合抗体的阳性/阴性筛选来富集感兴趣的细胞群（包括活细胞）
微流体细胞分选	利用基于荧光基团/荧光素结合抗体的阳性/阴性筛选的低压微流体，来富集感兴趣的细胞群

质量控制

方法：细胞计数仪、流式细胞仪；

评估指标：细胞大小、活率、是否有聚集物、浓度是否合适。

单细胞分离

低通量单细胞分离方法

方法/方案	描述
梯度稀释	梯度稀释细胞悬液至每孔一个细胞
口吸移液	使用玻璃毛细管分离单细胞
显微操作	用自动微量移液管分离单细胞
激光捕获显微切割	用激光从组织切片中分离单细胞
流式细胞荧光分选	使用电荷分离含有单细胞的微滴

高通量单细胞分离方法

方法/方案	描述
微流控系统	微流控芯片分离流动槽中的细胞
微液滴平台	利用微液滴制备装置将单细胞分离到微液滴中，然后裂解并捕获目标DNA/RNA
微孔	通过芯片中的微孔捕获单细胞
组合标签	经过两轮随机分配至微孔板，结合转座酶进行标记，可以使完整细胞核标记上独特的条形码

文库制备及测序

单细胞分析的扩增方法

	扩增策略
转录组	全长RNA-Seq、mRNA末端标签扩增、靶向panel、IR-Seq
基因组	MDA、MALBAC、DOP-PCR、靶向panel
表观基因组	ATAC-seq、HiC
蛋白质检测	AbSeq、CITE-Seq

文库及测序

根据测序平台进行建库，文库构建完成后进行文库质检及测序。

数据分析



报告内容

- 一、基因组技术平台情况简介
- 二、单细胞测序技术的基本流程
- 三、单细胞测序技术实验设计
- 四、单细胞测序技术的应用

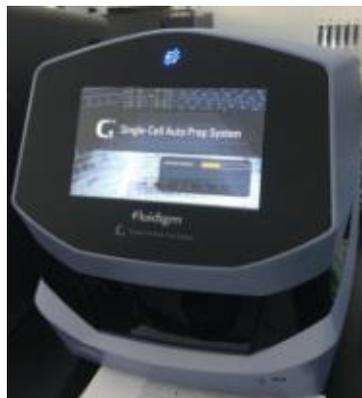
单细胞测序技术实验设计



细胞和组织采集系统

低通量

细胞数量： < 100 个
建库策略：Smart-seq2



C1单细胞自动制备系统

中通量

细胞数量： < 1000 个
建库策略：Smart-seq2



10X Genomics 全基因组解码系统

高通量

细胞数量： $> 1 \times 10^5$ 个
建库策略：3' 端

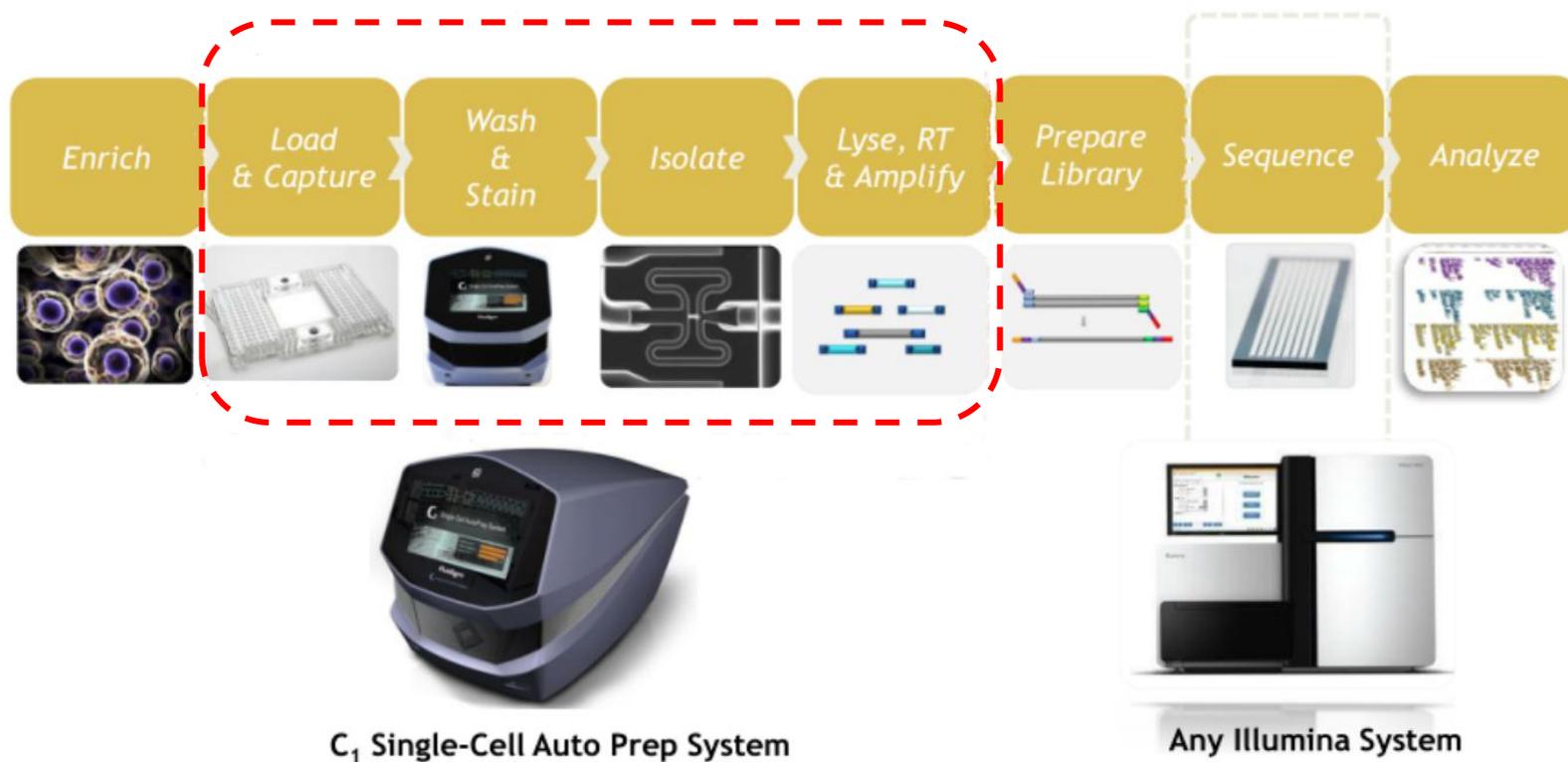
细胞和组织采集系统



该系统以脉冲负压为动力，毛细管为采集工具，可以和大部分倒置显微镜兼容，根据细胞的形态，位置或荧光标记，从贴壁细胞培养快速而有效地分离特异性细胞，也可以从悬浮细胞培养采集单细胞和从三维细胞培养采集单个多细胞团。

- 1、对微切割的样品要求不需要固定,可切割：新鲜冷冻组织、蔗糖处理的组织、新鲜活组织。
- 2、样品采集过程不涉及化学，热，激光和辐射处理：对细胞影响很小，保证细胞的活性和完整性，所分离的组织或细胞可以提取高质量的DNA，RNA和蛋白质，供下游研究使用。

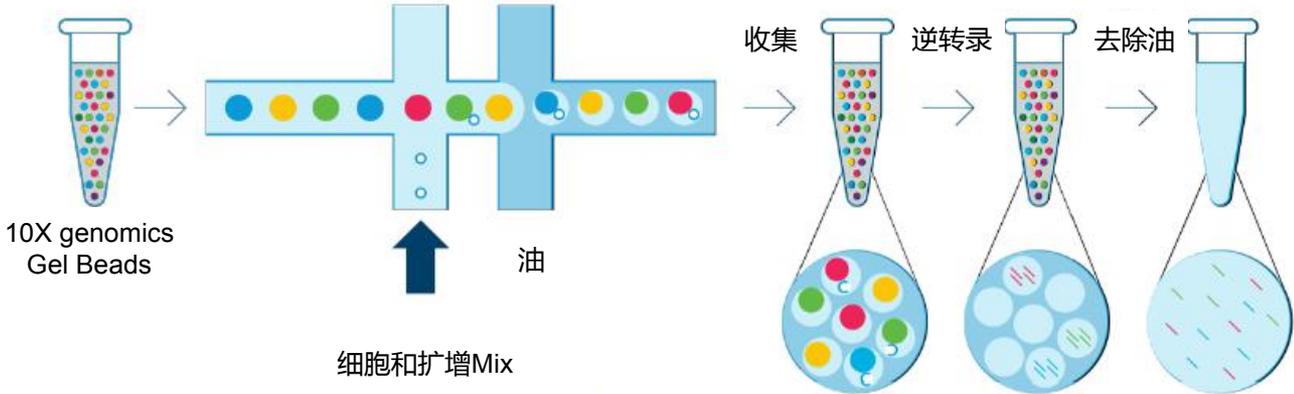
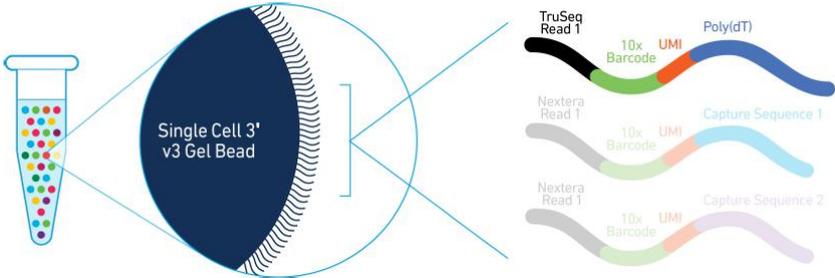
C1单细胞自动制备系统



优势：

- 一体化：完整的自动化流程一步操作实现从细胞捕获、制备到核酸样本的获取，极大程度去除污染风险和人工操作误差；
- 准确：视觉验证捕获单细胞的准确性，自动化系统降低人为误差，提高数据稳定性、平行性；
- 灵活：可扩展到全转录组及各种发现，如DNA-seq、ATAC-seq；
- 简便：以优化的流水线工作流程和直观的界面简化细胞分离和制备过程；
- 快速：10小时内完成从细胞上样到样本收集全过程。

10X Genomics 全基因组解码系统



10X Genomics 全基因组解码系统

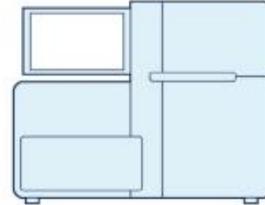
细胞悬液



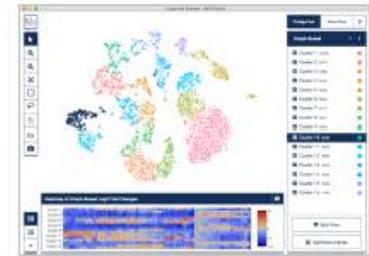
文库构建



测序



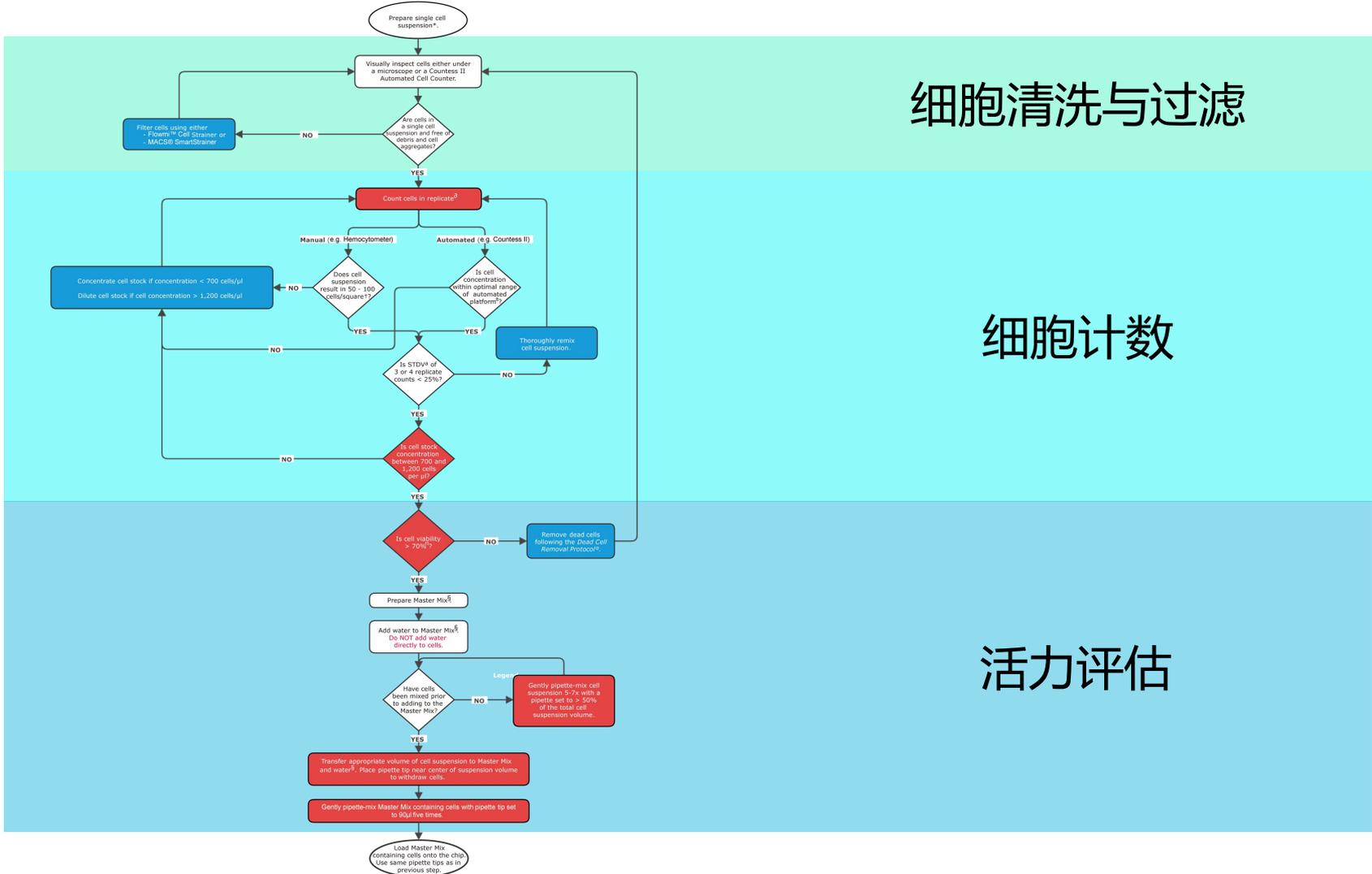
数据分析和可视化



优势：

- 超高细胞通量：微流体“双十字”交叉系统为8通道系统，每个通道最高可捕获10000细胞，8通道一次可检测细胞范围为500-80000个细胞；
- 细胞捕获效率高：单个细胞捕获效率高达65%，可准确鉴别稀有细胞类型，利于稀有样本或小细胞量类型样本研究；
- 多态率低：多态率（同一个GEM包含2个及2个以上细胞）低于0.9%/1000细胞。

样品前处理--制备细胞悬液



细胞清洗与过滤

细胞计数

活力评估

样品要求及悬浮液制备过程中注意事项

- 1、细胞大小 $<40\ \mu\text{m}$ ，若细胞大于 $40\ \mu\text{m}$ ，可考虑采用细胞核进行测序；
- 2、输入细胞悬液应含有70%以上的活细胞，减少细胞聚集物、死细胞、非细胞核酸和潜在的逆转录抑制剂；
- 3、当死细胞 $>30\%$ 时，建议进行细胞过滤，离心等操作去除死细胞，最终细胞总数 $>1\times 10^5$ ，细胞浓度在 $700\text{-}1200\ \text{cells}/\mu\text{l}$ ；
- 4、在实验过程中应最大限度地保持细胞活力，尽量缩短细胞制备时间，准确地测量输入细胞浓度；
- 5、在对细胞进行清洗和计数后，细胞悬液应当保存于冰上，直至用于后续的上机和文库制备步骤。在理想情况下，一旦制备好样品，应在 $30\ \text{min}$ 内进行下游步骤。

新鲜冷冻人鼠细胞系混合物

1:1 细胞混合物



离心去上清



重悬细胞



细胞计数



转移到冷冻管，
-80 °C 冷冻 > 4 h



液氮保存

复苏细胞



转移到离心管中



细胞清洗及过滤



细胞计数



上机

细胞核悬液

预冷Lysis Buffer溶解细胞



用预冷的Nuclei Wash and Resuspension Buffer清洗及再悬浮细胞核



细胞计数 > 1000 cells/ μ l



细胞过滤（除碎片、死细胞）



细胞计数 > 1000 cells/ μ l



上机

分离小鼠胚胎神经组织

神经组织



去除培养基至刚好没过组织



2 mL木瓜蛋白酶溶液



37 °C , 20 min 孵育 ,
并轻轻搅拌



研磨组织

沉淀碎片



细胞清洗及过滤



细胞计数



上机

肿瘤组织

预冷1XDPBS清洗肿瘤组织并剪碎



加入酶混合液放入组织处理器处理



离心并去除上清



重悬沉淀



70 μm 膜过滤



离心，重悬沉淀



加入1X红细胞去除液



4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育10 min



加预冷Wash Buffer



离心，重悬沉淀

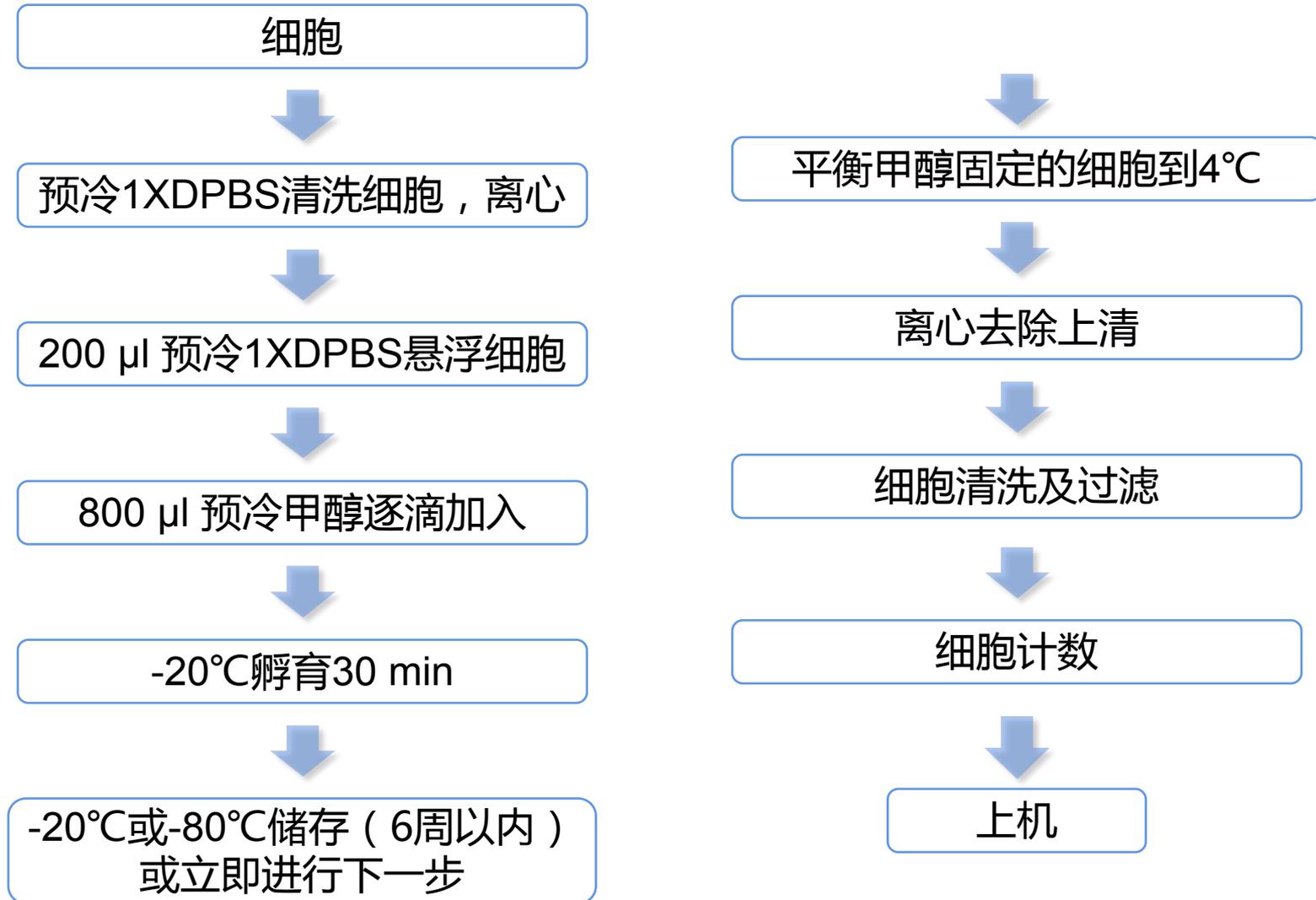


细胞计数



上机

甲醇固定细胞



苔原原生质体悬浮液



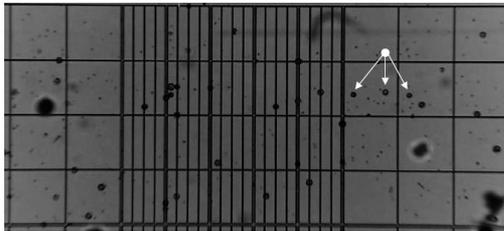
加入酶解液



恒温摇床 (85 rpm) ,
25°C酶解1h



500 rcf , 10min

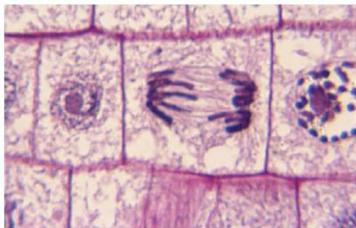


报告内容

- 一、基因组技术平台情况简介
- 二、单细胞测序技术的基本流程
- 三、单细胞测序技术实验设计
- 四、单细胞测序技术的应用

主要应用

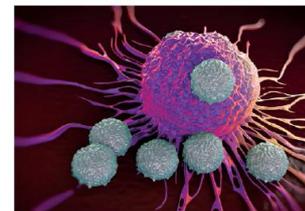
等位基因-特定基因表达



神经生物学



免疫学



植物生物学



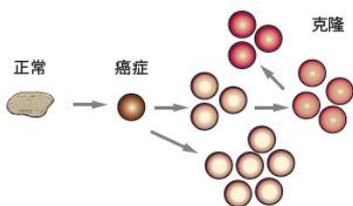
单细胞转录组测序技术



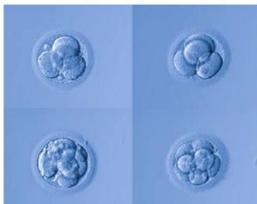
干细胞发育及分化研究



癌症



发育生物学



法医学



宏基因组学

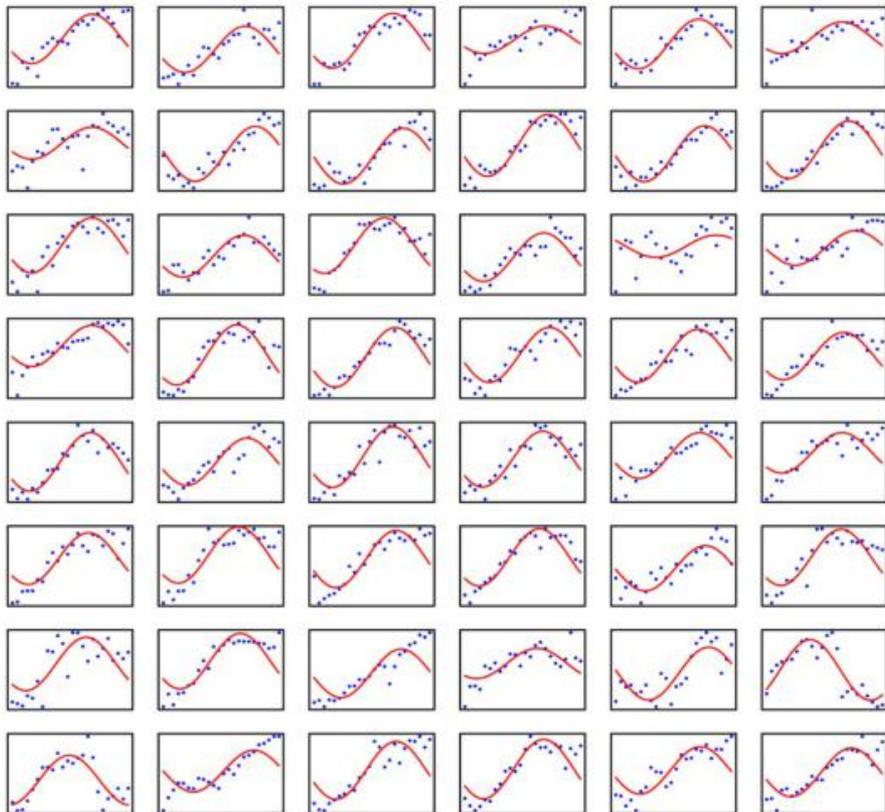


光照对斑马鱼胚胎细胞昼夜节律振荡的影响

METHODS AND RESOURCES

Single-cell in vivo imaging of cellular circadian oscillators in zebrafish

Haifang Wang^{1,2}, Zeyong Yang^{3,4,5}, Xingxing Li⁶, Dengfeng Huang^{1,2}, Shuguang Yu^{1,2}, Jie He^{1,2*}, Yuanhai Li^{6*}, Jun Yan^{1,2,7*}



发表时间：2020

研究对象：斑马鱼头部

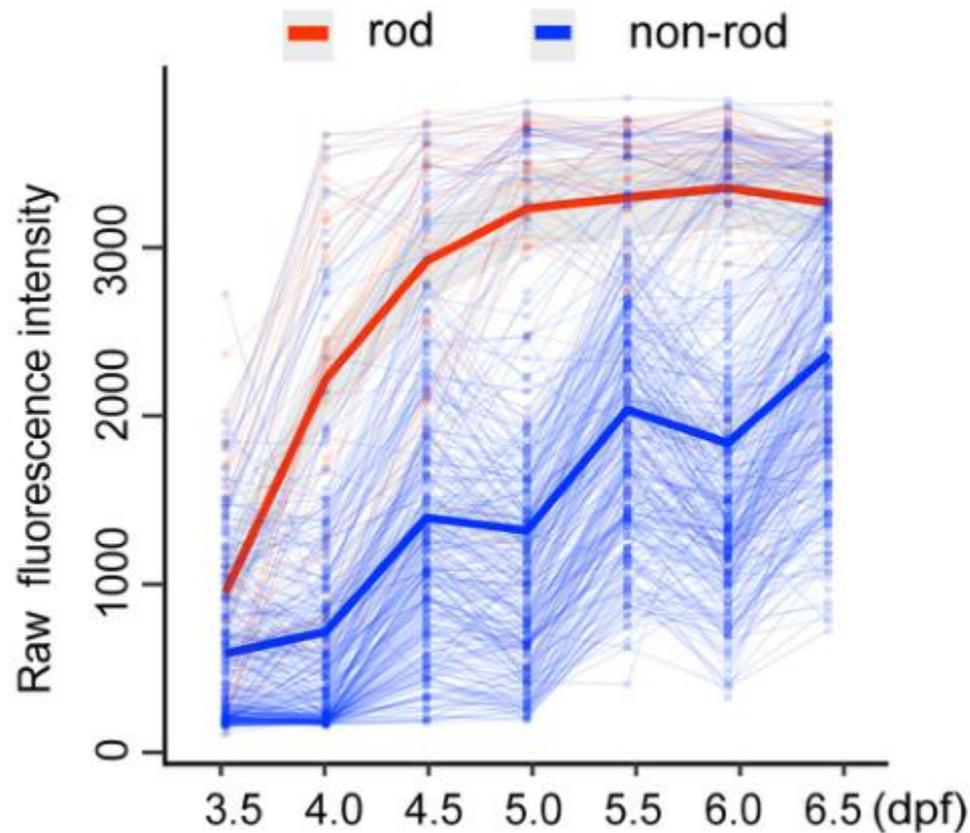
分离方法：10X Genomics

建库策略：3' 端

测序平台：Novaseq 6000

观察到松果体48个追踪细胞中有39个显示出昼夜节律振荡，表明nr1d1:VNP-fish可以在连续成像下报告细胞的昼夜节律振荡。

光照对斑马鱼胚胎细胞昼夜节律振荡的影响



杆状细胞的基线表达水平高于非杆状细胞，斑马鱼幼虫松果体感光细胞经历了叠加在细胞类型特异性发育轨迹上的昼夜节律振荡。

IDH突变型胶质瘤基因表达差异

Decoupling genetics, lineages, and microenvironment in IDH-mutant gliomas by single-cell RNA-seq

Andrew S. Venteicher^{1,2,3,*}, Itay Tirosh^{2,*,†}, Christine Hebert^{1,2}, Keren Yizhak^{1,2}, Cyril Neftel^{1,2,4}, Mariella G. Filb...

+ See all authors and affiliations

Science 31 Mar 2017;
Vol. 355, Issue 6332, eaai8478
DOI: 10.1126/science.aai8478

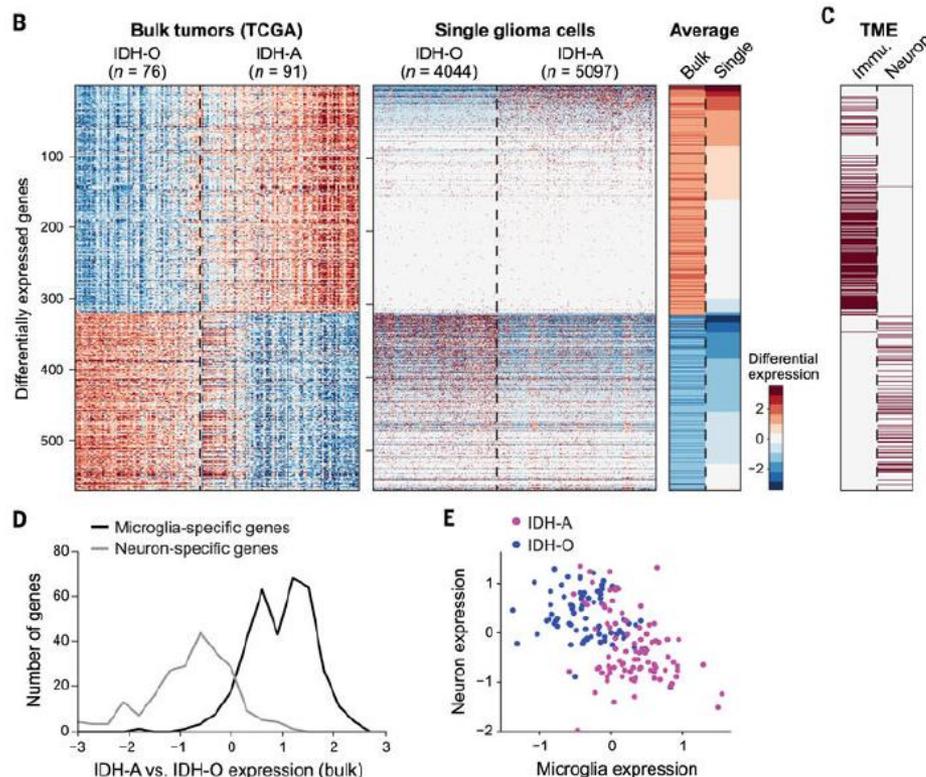
发表时间：2017

研究对象：胶质瘤单细胞

分离方法：流式细胞荧光分选

建库策略：Smart-seq2

测序平台：Nextseq 500



1、IDH 突变型胶质瘤的2 个不同亚型星形胶质细胞瘤和少突胶质细胞瘤中的基因表达存在差异。

2、单细胞RNA-Seq表明，基因表达差异是由特征肿瘤事件和肿瘤微环境组成所致。

小鼠体感神经元图谱及转录特征

nature

Article | Published: 08 January 2020

The emergence of transcriptional identity in somatosensory neurons

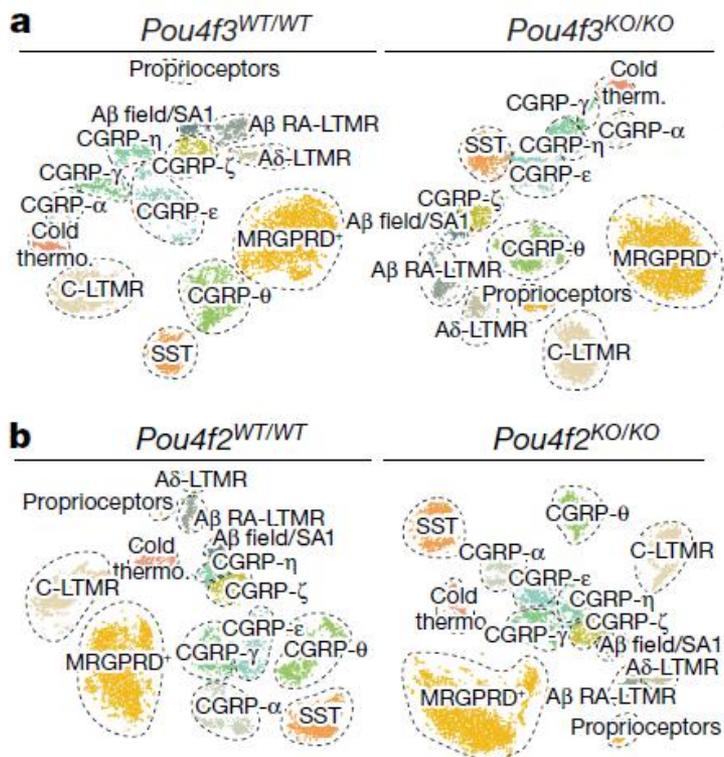
发表时间：2020

研究对象：小鼠体感神经元

分离方法：10X Genomics

建库策略：3' 端

测序平台：NextSeq 500



- 1、体感神经发生导致神经元处于转录非特化状态，其特征是转录因子的共同表达，随着发育的进行，这些转录因子被限制在选择亚型上。
- 2、从广泛到受限的转录因子协调维持其表达亚型特异性基因表达机制。
- 3、发现支持了一个模型，在这个模型中，从中间和最终靶区发出的信号通过调节受亚型限制的转录因子的选择，将细胞从转录非特化状态过渡到转录独特的亚型，从而促进神经元的多样化。

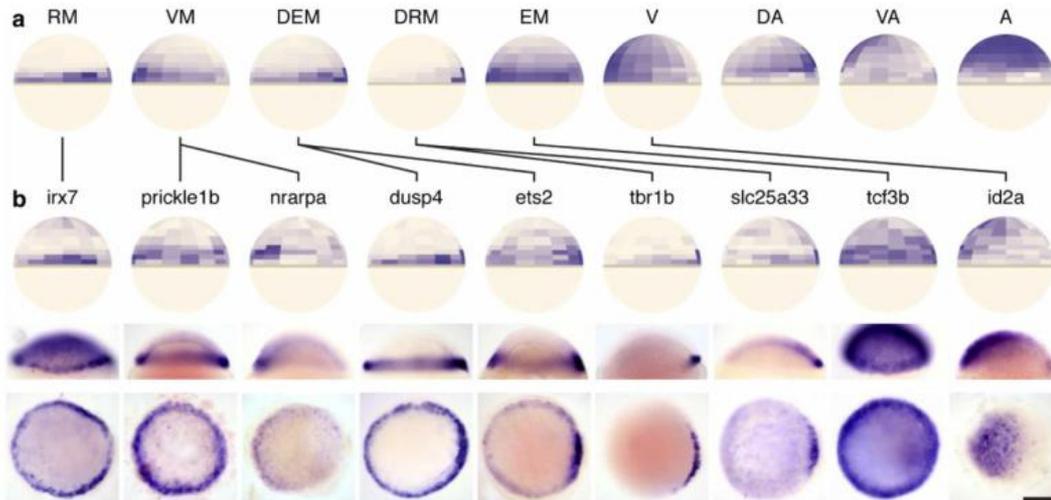
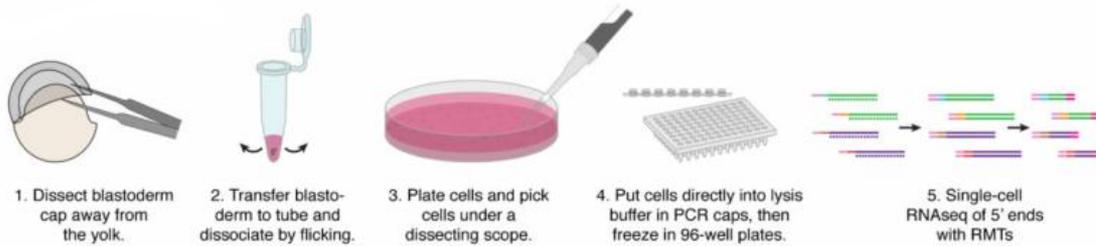
斑马鱼空间模式全转录图构建

Published in final edited form as:

Nat Biotechnol. 2015 May ; 33(5): 495–502. doi:10.1038/nbt.3192.

Spatial reconstruction of single-cell gene expression

Rahul Satija^{1,2,3,*}, Jeffrey A. Farrell^{4,*}, David Gennert¹, Alexander F. Schier^{1,4,5,6,7,†}, and Aviv Regev^{1,8,†}



发表时间：2015

研究对象：斑马鱼胚胎

分离方法：手工操作

建库策略：Smart-seq

测序平台：Hiseq 2000

研究通过空间绘制从斑马鱼胚胎分离的851个单个细胞并创建空间模式的全转录组图对Seurat进行了验证。Seurat可正确定位细胞的罕见亚群，并可绘制空间受限细胞以及表达模式更分散的细胞。

维生素A-维甲酸调节造血干细胞休眠

Cell

Vitamin A-Retinoic Acid Signaling Regulates Hematopoietic Stem Cell Dormancy

Nina Cabezas-Wallscheid,^{1,2,12,*} Florian Buettner,^{3,12} Pia Sommerkamp,^{1,2} Daniel Klimmeck,^{1,2} Luisa Ladel,^{1,2} Frederic B. Thalheimer,⁴ Daniel Pastor-Flores,⁵ Leticia P. Roma,⁵ Simon Renders,^{1,2} Petra Zeisberger,^{1,2} Adriana Przybylla,^{1,2} Katharina Schönberger,^{1,2} Roberta Scognamiglio,^{1,2} Sandro Altamura,⁶ Carolina M. Florian,⁷ Malak Fawaz,⁴ Dominik Vonficht,^{1,2} Melania Tesio,^{1,2} Paul Collier,⁸ Dinko Pavlinic,⁸ Hartmut Geiger,⁷ Timm Schroeder,⁹ Vladimir Benes,⁸ Tobias P. Dick,⁵ Michael A. Rieger,⁴ Oliver Stegle,^{3,11} and Andreas Trumpp^{1,2,10,11,13,*}

发表时间：2020

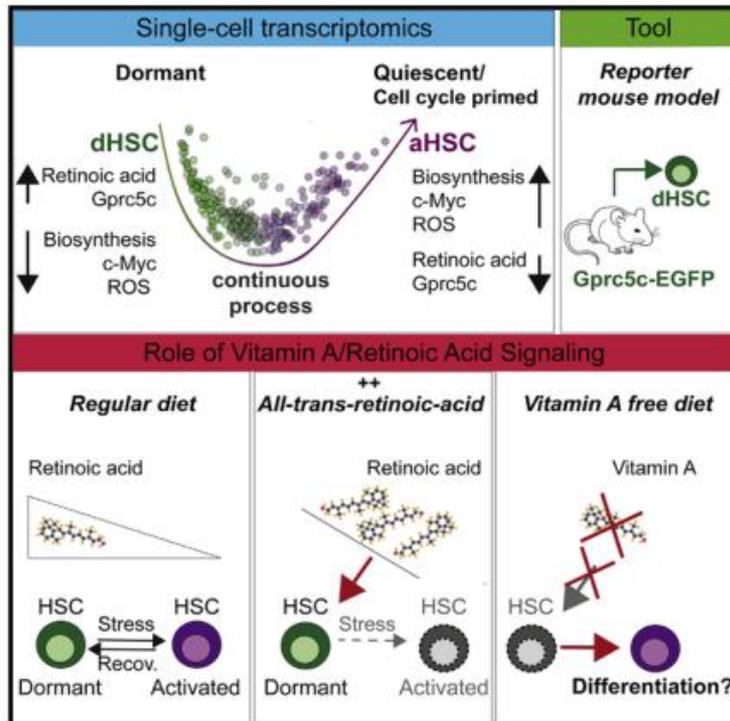
研究对象：小鼠造血干细胞

分离方法：荧光激活细胞分选

C1单细胞自动制备系统

建库策略：Smart-seq2

测序平台：Hiseq 2500



- 1、单细胞转录组数据表明，休眠HSC 的特征是Myc 基因表达水平低，维甲酸基因表达水平高。
- 2、休眠HSC 表达了低水平的基本生物合成通路所需的基因，而休眠HSC 转化为激活HSC 的特征是生物合成基因表达持续升高

CAR-T细胞的克隆动力学和单细胞转录谱分析



ARTICLE

<https://doi.org/10.1038/s41467-019-13880-1>

OPEN

Clonal kinetics and single-cell transcriptional profiling of CAR-T cells in patients undergoing CD19 CAR-T immunotherapy

发表时间：2020

研究对象：B细胞恶性肿瘤

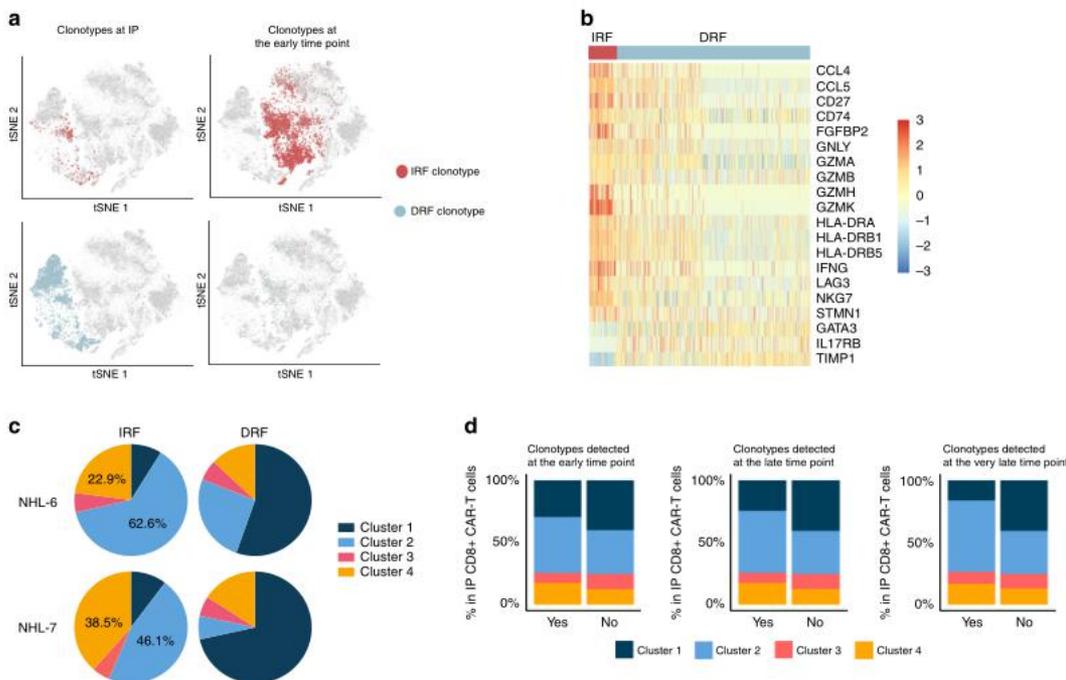
分离方法：流式细胞荧光分选

10X Genomics

建库策略：5' 端转录组

V (D) J 文库

测序平台：HiSeq 2500



- 1、TCRB测序显示，CAR-T细胞克隆多样性在IPs中最高，输注后下降。
- 2、scRNA-seq表明，输注后扩增的克隆主要来源于输注的细胞毒性和增殖基因表达更高的簇。
- 3、发现了与CAR-T细胞注射后行为相关的转录机制。

生理性血脑转运功能随着年龄的增长而受损

Article

Physiological blood–brain transport is impaired with age by a shift in transcytosis

<https://doi.org/10.1038/s41586-020-2453-z>

Received: 20 June 2019

Accepted: 21 May 2020

Published online: 1 July 2020

 Check for updates

Andrew C. Yang^{1,2,3}, Marc Y. Stevens^{3,4}, Michelle B. Chen¹, Davis P. Lee³, Daniel Stähli³, David Gate³, Kévin Contrepois⁵, Winnie Chen³, Tal Iram³, Lichao Zhang⁶, Ryan T. Vest^{3,7}, Aisling Chaney^{3,4}, Benoit Lehallier³, Niclas Olsson^{8,14}, Haley du Bois³, Ryan Hsieh³, Haley C. Cropper^{3,4}, Daniela Berdnik³, Lulin Li³, Elizabeth Y. Wang³, Gavin M. Traber⁸, Carolyn R. Bertozzi^{2,9,10}, Jian Luo^{3,11}, Michael P. Snyder⁵, Joshua E. Elias⁶, Stephen R. Quake^{1,6}, Michelle L. James^{3,4,12} & Tony Wyss-Coray^{2,3,9,12,13} 

发表时间：2020

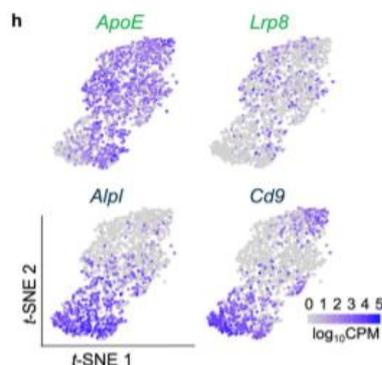
研究对象：小鼠

分离方法：流式细胞荧光分选

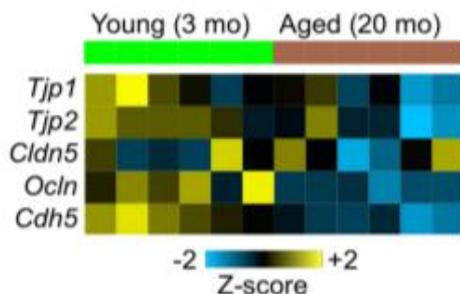
10X Genomics

建库策略：Smart-seq2 & 3' 端

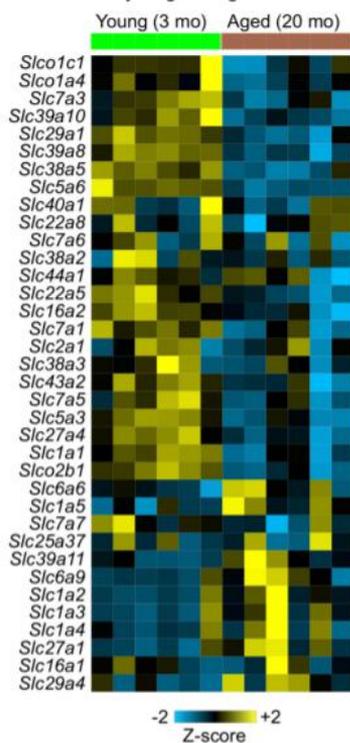
测序平台：NextSeq 550



i Tight junction gene expression in young and aged BECs



j Solute carrier family gene expression in young and aged BECs



1、血浆蛋白很容易渗透到健康的脑实质，由血脑屏障特异性转录程序维持运输。

2、发现生理性蛋白质在健康大脑中的转运程度、随着年龄的增长广泛的血脑屏障功能障碍的机制以及增强药物传递的策略。

大西洋和太平洋原绿球藻基因组种群结构差异

ORIGINAL ARTICLE

Fundamental differences in diversity and genomic population structure between Atlantic and Pacific *Prochlorococcus*

Nadav Kashtan^{1,2}, Sara E Roggensack², Jessie W Berta-Thompson², Maor Grinberg¹, Ramunas Stepanauskas³ and Sallie W Chisholm^{2,4}

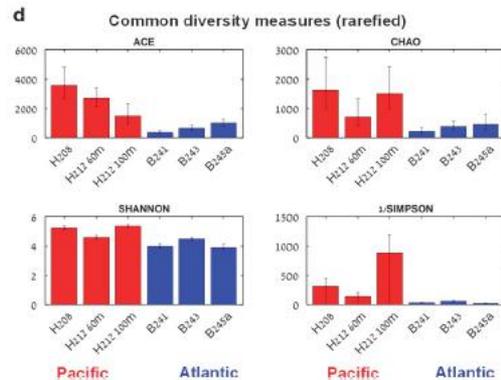
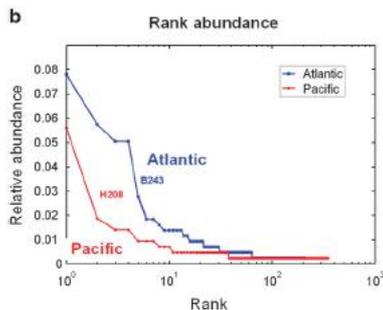
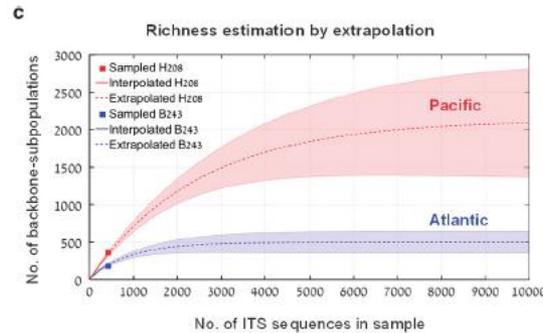
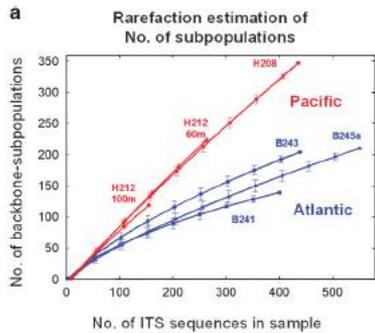
发表时间：2017

研究对象：环境中原绿球藻

分离方法：流式细胞荧光分选

扩增建库：MDA

测序平台：Illumina GAIIx



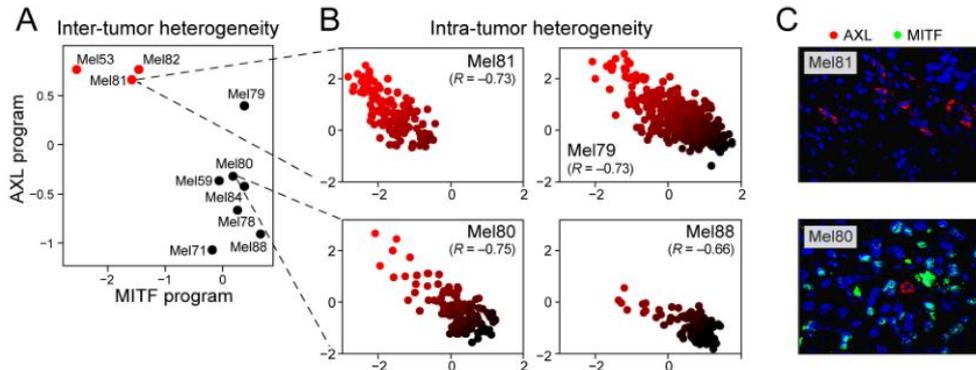
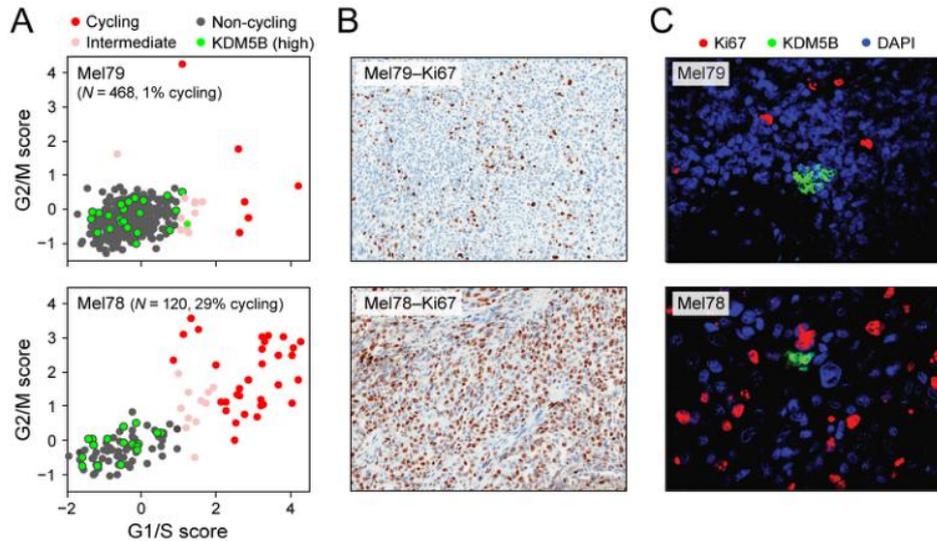
- 1、太平洋的种群比大西洋的更为多样，由明显更为共存的亚种群组成，而缺乏优势亚种群。
- 2、来自这两个地点的原绿球藻似乎是由具有不同基因组主干的不重叠的不同亚群组成的，可能反映了不同的海洋特定微生态位。
- 3、系统发育密切相关的菌株携带与海洋相关的营养物质获取基因，可能反映了海洋之间主要选择压力的差异。

黑色素瘤的细胞生态体系及对靶向和免疫治疗的影响

Published in final edited form as:

Science. 2016 April 8; 352(6282): 189–196. doi:10.1126/science.aad0501.

Dissecting the multicellular ecosystem of metastatic melanoma by single-cell RNA-seq



发表时间：2019

研究对象：黑色素瘤

分离方法：流式细胞荧光分选

建库策略：Smart-seq2

测序平台：NextSeq 500

- 1、发现同一肿瘤内的恶性细胞显示出与细胞周期、空间关系和耐药性相关的转录异质性。
- 2、同一肿瘤包含具有MITF 高表达水平的细胞，以及具有低MITF 水平和AXL 激酶水平升高的细胞（易于发生早期耐药性的细胞）。浸润的T 细胞分析揭示了排除程序、与T 细胞活化/ 扩张的联系和患者变异性。

拟南芥植物细胞基因表达图谱

Plant Physiology

Single-Cell RNA Sequencing Resolves Molecular Relationships Among Individual Plant Cells^{1[OPEN]}

Kook Hui Ryu,^a Ling Huang,^b Hyun Min Kang,^c and John Schiefelbein^{a,2,3}

^aDepartment of Molecular, Cellular, and Developmental Biology, University of Michigan, Ann Arbor, Michigan 48109

^bSalk Institute for Biological Studies, La Jolla, California 92037

^cDepartment of Biostatistics, University of Michigan, Ann Arbor, Michigan 48109

ORCID IDs: 0000-0002-0400-4493 (K.H.R.); 0000-0002-5135-6088 (L.H.); 0000-0002-3631-3979 (H.M.K.); 0000-0002-0560-5872 (J.S.).

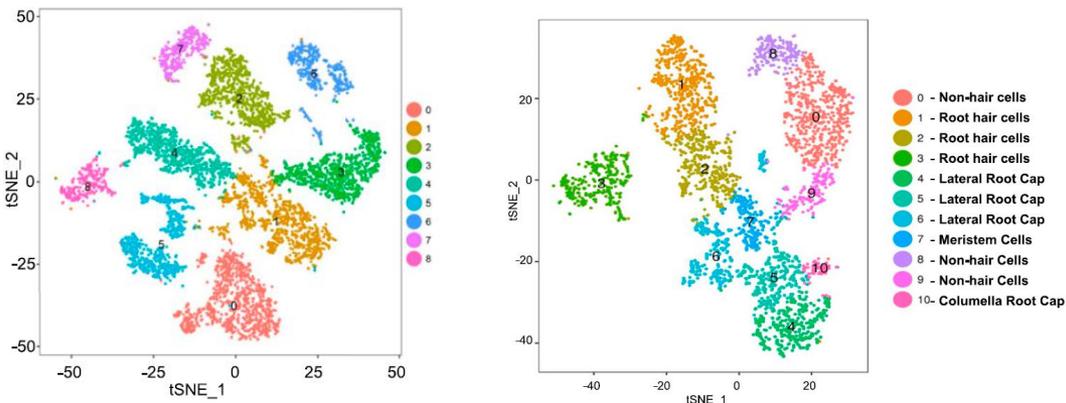
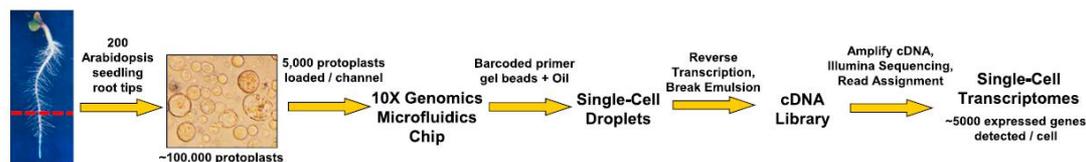
发表时间：2019

研究对象：拟南芥根尖

分离方法：10X Genomics

建库策略：3' 端

测序平台：HiSeq 4000



1、对超过10000个拟南芥根细胞的原生质体（过滤后得到7552个细胞）进行单细胞转录组测序，细胞聚类分群得到9个主要的细胞亚群；

2、进一步分析表皮组织数据，研究根毛细胞和非毛细胞的分化。将表皮组织和根冠组织细胞重新聚类，得到11个细胞亚群。

单细胞测序技术服务内容

服务内容		方法/仪器	送样要求
单细胞转录组分析	全长转录组	人工操作/C1单细胞自动制备系统	细胞活率在90%以上；动物组织需解离成单细胞悬液，植物细胞需制成原生质体；细胞直径小于40 μm ，细胞直径过大的样品，可以制备细胞核悬液；
	3'端/5'端转录组	C1单细胞自动制备系统/10X Genomics 全基因组解码系统	
单细胞基因组分析	全基因组	人工操作/C1单细胞自动制备系统	

谢 谢 !



乔志仙

TEL : 68780783

MAIL : qzhxian@ihb.ac.cn

柴小翠

TEL: 68780783

MAIL: chaixiaocui@ihb.ac.cn

向浩

TEL : 68780783

MAIL : 563982746@qq.com