

10x Genomics 单细胞免疫组库测序



1 技术原理

10x Genomics 单细胞免疫组库测序产品，使用油滴包裹的技术原理，一次实验可以同时检测 500~10,000 个细胞的 mRNA 基因表达联合 TCR/BCR 多样性信息。既可以通过单细胞转录组信息发现一块组织内细胞的异质性，还可以通过检测 TCR 和 BCR 的克隆型来了解不同状态下生物体的免疫系统组成，辅助自身免疫病、炎症、感染性疾病、肿瘤免疫等研究，加速了我们对机体免疫系统的理解。

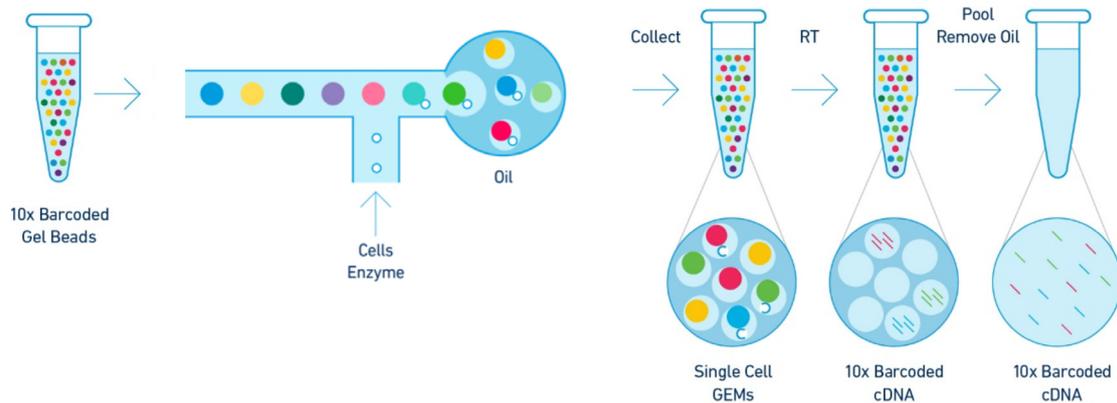


图 1 单细胞免疫组库测序技术原理



图 2 单细胞免疫组库测序项目流程

2 产品优势

① 高通量

一次实验可以同时获取 500~10,000 个细胞的转录组和免疫组数据

② 更全面的信息

可以获取 V(D)J 全长序列和 TCR 的 α 、 β 链以及 BCR 重链、轻链的配对信息

③ 一站式服务

博奥晶典提供从样品处理到数据可视化一站式服务

④ 首家引进

博奥晶典国内首家引进 10x Genomics 平台

⑤ 实验质量认证

博奥晶典单细胞免疫组库测序已获得 10x Genomics 官方 CSP 认证证书

⑥ 丰富的项目经验

博奥晶典已完成 2,000+ 样本, 100+ 样本类型实验, 可解离人和小鼠心脏、脾脏、肺脏等 60+ 种组织类型

3 分析结果展示

• 单细胞转录组数据分析

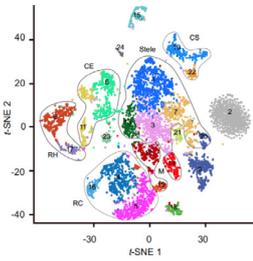


图 3 细胞分群图

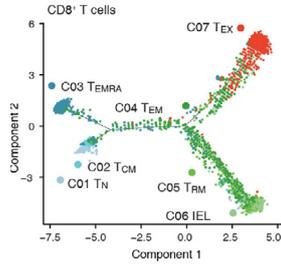


图 4 拟时间序列分析



图 5 蛋白互作网络分析

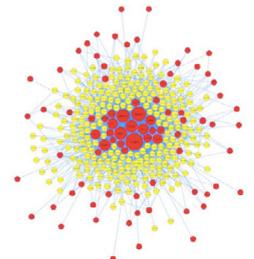


图 6 转录因子注释分析

• 单细胞免疫组库数据分析

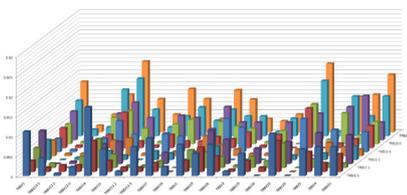


图 7 V(D)J 基因使用频率统计

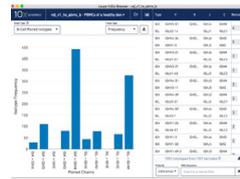


图 8 BCR 重链和轻链匹配信息

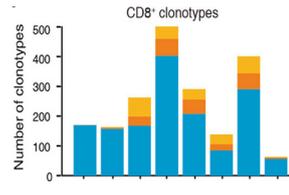


图 9 亚群克隆型统计

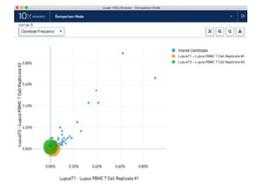


图 10 多样本比较分析

• 单细胞转录组与单细胞免疫组库联合分析

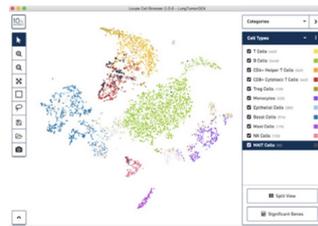


图 11 基于克隆型信息重建细胞亚群

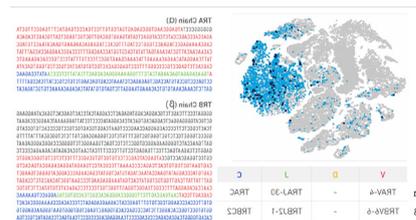


图 12 单个亚群克隆型表达分析

4 应用方向

肿瘤免疫

感染性疾病

自身免疫病

炎症

移植和免疫重建

免疫系统发育与分化

疫苗和抗体

生物标记物

5 应用案例

A cell atlas of human thymic development defines T cell repertoire formation

单细胞转录组 + 免疫组库测序绘制首张人类胸腺细胞图谱

期刊: *Science* 发表时间: 2020 年 2 月 影响因子: 41.037

研究背景

胸腺是 T 细胞发育和 T 细胞受体 (TCR) 库形成的关键器官, 有助于形成适应性免疫。T 细胞的发育与胸腺微环境中各种细胞类型的相互协调密不可分。因此, 绘制一个全面的胸腺细胞图谱对于全面了解人体免疫系统至关重要。

材料和方法

- 1、孕期: 7-17 周的胚胎和胎儿胸腺组织进行 scRNA+TCR 测序
- 2、出生后: 儿童、成人胸腺组织进行 scRNA+TCR 测序
- 3、小鼠胸腺组织进行单细胞测序

研究结果

1、绘制人类胸腺图谱

研究人员对 15 个孕期 7-17 周的胚胎和胎儿胸腺组织、9 个儿童和成人的胸腺组织进行单细胞测序。经过数据过滤后, 最终得到 255,901 个单细胞, 绘制出一个全面的胸腺发育图谱, 并对细胞类型进行了注释, 鉴定出 42 个细胞亚群。研究鉴定出 2 个成纤维细胞和 2 个上皮细胞新亚群, 并使用原位测序 (RNA smFISH) 技术确定了其在胸腺中的空间位置。

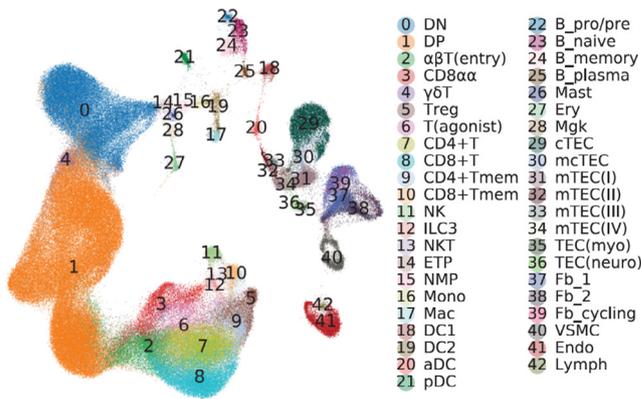


图 13 胸腺细胞分群图

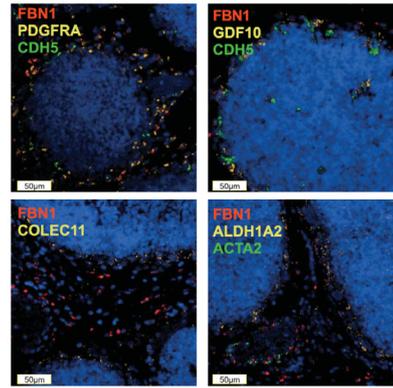


图 14 细胞亚群组织定位

2、构建 T 细胞发育轨迹

基于单细胞转录组结果, 构建了 T 细胞的发育轨迹, 包括传统 T 细胞 (conventional T cell) 和非传统 T 细胞 (unconventional T cell), 绘制了 T 细胞谱系发育相关转录因子调控网络图。

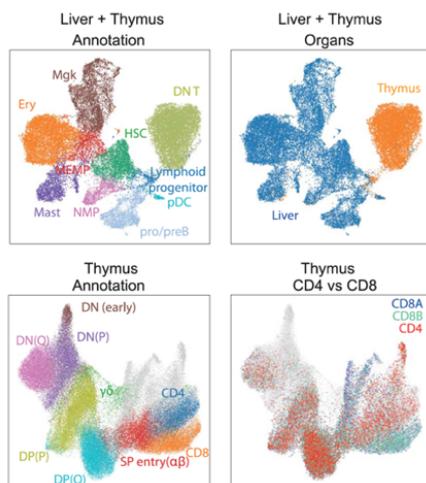


图 15 T 细胞发育轨迹构建

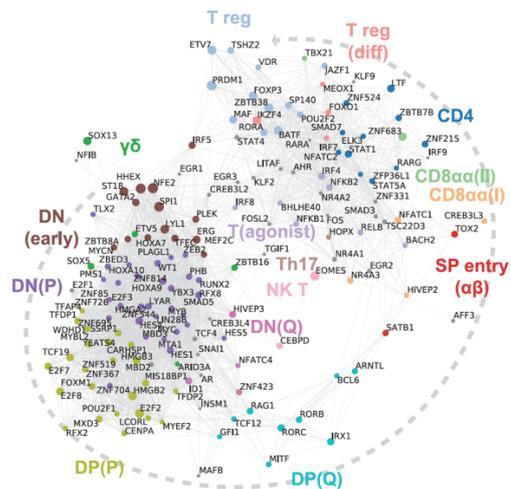


图 16 转录因子调控网络

3、TCR 重组和选择偏好性研究

通过分析单细胞转录组和单细胞 TCR 测序的数据，发现在 TCR 形成过程中，V(D)J 基因的使用具有很强的偏好性，并在多种 T 细胞亚群中进行了验证。这种偏好性的存在使机体可以应对不同的 pMHC 组合，可能会极大的影响机体对抗原的响应。

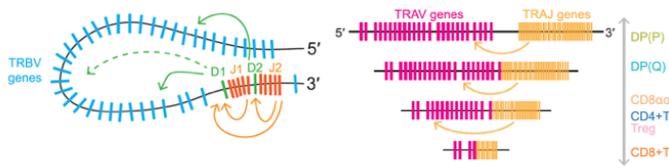


图 17 V(D)J 基因重组偏好性

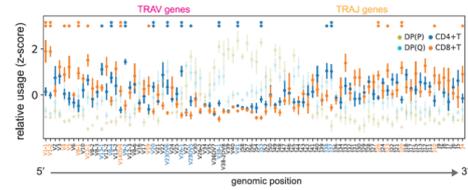


图 18 V(D)J 基因使用频率

• 研究结论

该研究绘制了首张人类胸腺单细胞转录组图谱，刻画了胸腺组织微环境中 T 细胞的发育轨迹，并使用 RNA smFISH 对细胞亚群进行了空间定位。这一成果为胸腺类器官体外培养及肿瘤免疫治疗等领域提供了理论依据。

Peripheral CD8+ T cell characteristics associated with durable responses to immune checkpoint blockade in patients with metastatic melanoma

单细胞转录组 + 免疫组库测序筛选免疫检查点抑制剂持续响应的患者血液标志物

期刊: *Nature Medicine* 发表时间: 2020 年 2 月 影响因子: 30.641

• 研究背景

免疫检查点抑制剂 (ICB) 在黑色素瘤治疗上已经取得较大的进展，已应用于临床的 ICBs 包括 CTLA-4 单抗、抗 PD-1 及其配体 PD-L1 单抗等。但不同的患者对其响应不同，因此找到患者对 ICB 的应答敏感性及其耐药机制极其重要。ICB 治疗敏感性可以由突变负荷 (TMB)、淋巴细胞浸润等肿瘤属性预测；而目前免疫治疗过程中，缺乏对外周血标志物有效性的评估。

• 材料和方法

- 1、对治疗前后队列 (55 名患者) 样本进行转录组测序
- 2、对 8 个治疗后样本进行单细胞测序

• 研究结果

1、治疗前后转录组变化

通过对黑色素瘤患者治疗前 (day0) 与治疗后 21 天 (day21) 进行转录组测序，发现抗 PD-1、抗 CTLA-4 联合治疗 (cICB) 与单独抗 PD-1 (sICB) 患者差异基因存在部分交集，能够引起相似的功能效应。

cICB 治疗与 sICB 治疗比较：对接受 2 种方案治疗的患者观察发现，大多数的差异基因会在患者接受 sICB 治疗的第 4 个疗程中消失，而 cICB 联合治疗的患者仍有稳定的差异基因表达。提示从转录组水平看，cICB 治疗效果可能更加稳定。接着 GSEA 分析差异基因 (cICB 组 vs. sICB 组) 参与的信号通路，推测 cICB 治疗可能会增强细胞增殖、抑制炎症发生。

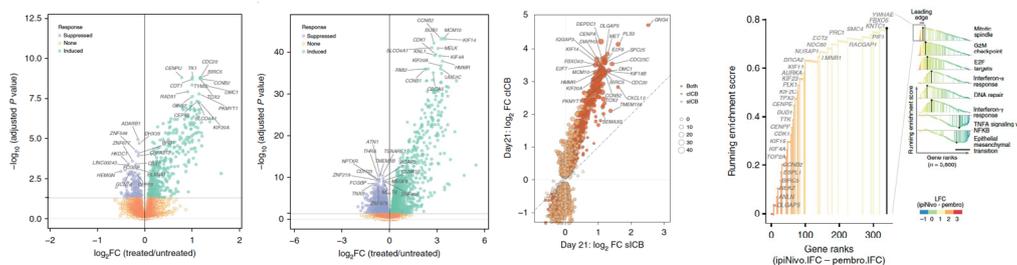


图 19 黑色素瘤患者对 ICB 响应的转录组特征

2、识别患者长期响应的相关信号通路

将治疗 6 个月设定为关键的时间节点，根据患者接受 ICB 治疗 6 个月时有无响应分为响应组与进展组。对 CD8+T 细胞 RNA-seq 数据分析结果显示：患者长期响应的机制与 TCR 信号通路、G2/M 转换正相关；与 MAPKK、Toll 样受体信号通路负相关。

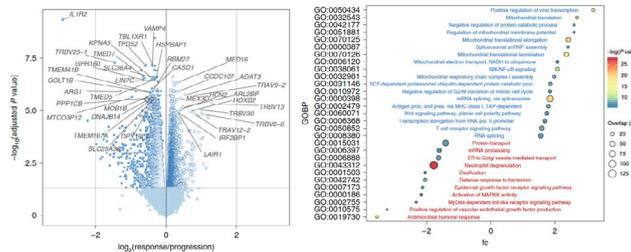


图 20 响应组与进展组差异基因火山图（左）、GOBP 分析关键信号通路（右）

3、特定细胞亚群基因表达鉴定

对 8 个治疗后患者 PBMC 样本进行单细胞测序，得到 4 个细胞亚群，其中 cluster 4 有效应性记忆 T 细胞的特征，并与 cluster 1 中一少部分细胞共同构成 large 克隆 TCR 的 T 细胞。large 细胞群与其余细胞亚群相比，large 克隆 TCR 的 T 细胞有独特的细胞毒性表达谱。这些细胞可能是黑色素瘤患者 ICB 药物应答过程中的关键机制。

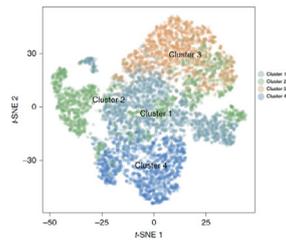


图 21 单细胞测序分群图

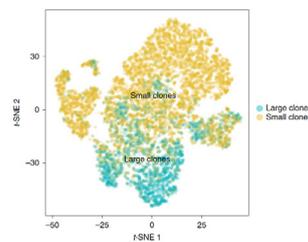


图 22 亚群克隆型注释

• 研究结论

本研究通过对转移性黑色素瘤患者样本进行转录组分析、TCR 分析与单细胞测序，证实了效应性记忆 T 细胞在 ICB 治疗过程中，黑色素瘤患者持续响应的重要作用。结果表明，外周血 CD8+ T 细胞可作为转移性黑色素瘤免疫检查点抑制剂持续响应的血液标志物，将为未来临床更加精准的用药提供很好的指导。

参考文献：

- [1] Park J, Botting R A, Conde C, et al. A cell atlas of human thymic development defines T cell repertoire formation[J]. *Science*, 2020, 367(6480).
- [2] Fairfax B P, Taylor C A, Watson R A, et al. Peripheral CD8+ T cell characteristics associated with durable responses to immune checkpoint blockade in patients with metastatic melanoma.[J]. *Nature Medicine*, 2020, 26(2): 193-199.
- [3] Zhang L, Yu X, Zheng L, et al. Lineage tracking reveals dynamic relationships of T cells in colorectal cancer[J]. *Nature*, 2018, 564(7735): 268-272.

博奥晶典控股成员



北京博奥晶典生物技术有限公司

地址：北京市经济技术开发区科创六街生物医药园 C 座 邮编：101111 电话：010-69002900 传真：010-69002988 客服：400-9968-999
http://www.capitalbiotech.com

