博奥晶典
CapitalBio Technology

博奥晶典 10x Genomics 单细胞 ATAC 测序

北京博奥晶典生物技术有限公司

1 ATAC 背景介绍

染色质开放区：真核生物染色体是由 DNA 分子包裹组蛋白形成的核小体结构通过一系列折叠过程而形成的。有一些经染色质重塑后呈现出松散状态的区域被称为染色质开放区或染色质可及性区域（Open chromatin），而 DNA 复制和基因转录都发生在这些区域 (图 1)。因此获取这些信息有利于我们了解开放区域对基因表达的调控，更好的理解生物调控。

ATAC-seq，(Assay for transposase-accessible chromatin with high-throughput sequencing)：使用 Tn5 转座酶切割染色质的开放区域，同时加上测序引物 (adapter) 进行高通量测序 (图 2)，是一种快速灵敏的表观遗传学研究技术。

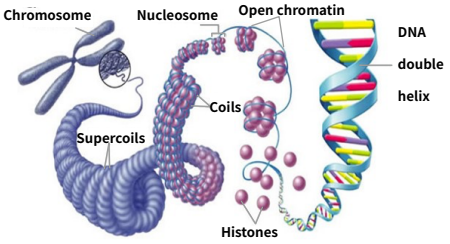

图 1 染色质可及性

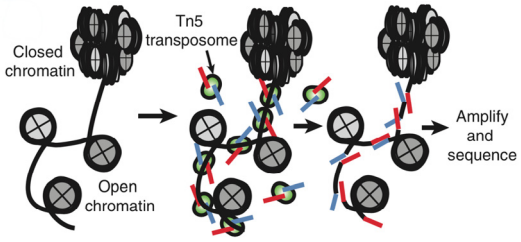

图 2 ATAC 测序技术

2 单细胞 ATAC 技术原理

10x Genomics 单细胞 ATAC 技术可以在单细胞水平对细胞染色质开放区域进行检测。首先，转座酶进入细胞核，并优先在染色质的开放区域切割 DNA，同时在 DNA 片段的末端添加测序引物；其次，带有条形码的凝胶珠在油滴内对每个细胞内的 DNA 片段进行 barcode 标记，带有 barcode 标签的 DNA 进行后续文库构建；最后，Illumina 测序平台对文库进行测序检测，即可一次性获得大量单细胞的 DNA 染色质开放区域数据（图 3，图 4）。

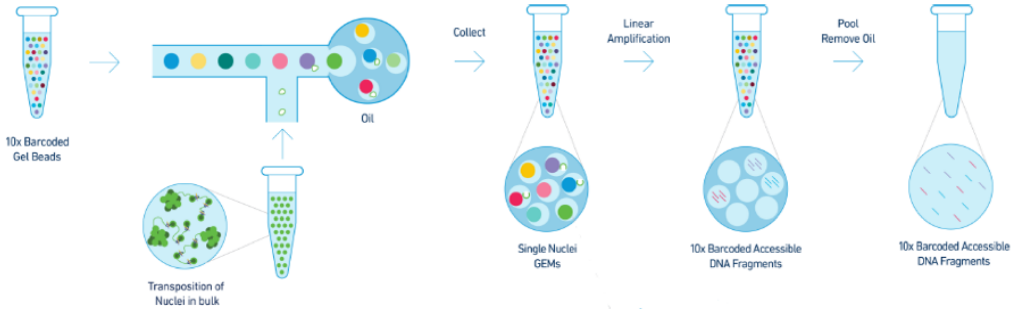

图 3 博奥晶典单细胞 ATAC-seq 技术原理

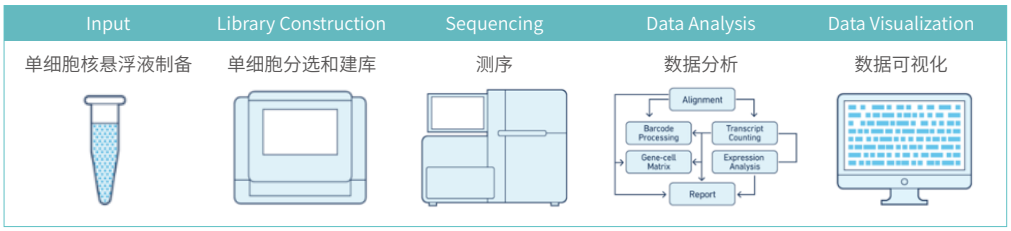

图 4 博奥晶典单细胞 ATAC-seq 实验流程

3 单细胞 ATAC 样本要求

单细胞核悬浮液	单细胞悬浮液	保存运输
细胞核浓度为 3,000-5,000 个细胞核 / μL；体积大于 50μL；核膜完整性较好	细胞浓度为 500-2,000 个细胞 /μL；细胞总数大于 10^6；细胞活性大于 90%	新鲜样品冰块保存，湿冰运输；冻存样品干冰运输

4 单细胞 ATAC 基本分析展示

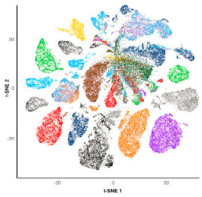

图 5 细胞分群图

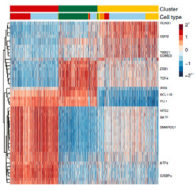

图 6 亚群特征转录因子聚类图

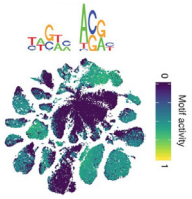

图 7 Motif 位点分析图

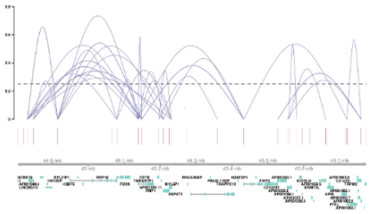

图 8 Peak 峰共可及性分析

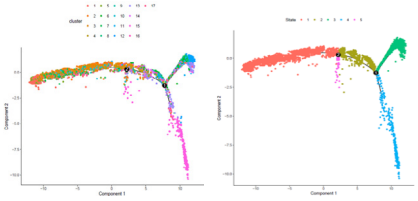

图 9 拟时间序列分析

5 单细胞 ATAC 与单细胞转录组联合分析展示

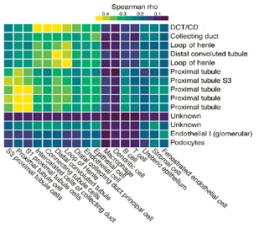

图 10 亚群相关性图

单细胞 ATAC 数据与单细胞转录组数据细胞类型相关性分析

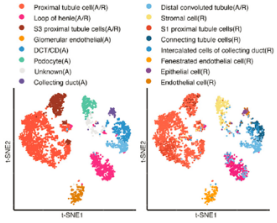

图 11 细胞类群预测图

单细胞 ATAC 数据与单细胞转录组数据共同注释细胞类型

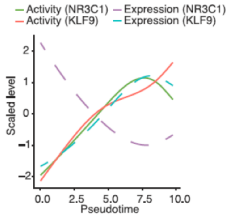

图 12 转录因子调控曲线图

单细胞 ATAC 数据与单细胞转录组数据联合分析预测转录因子的调控作用

6 平台优势

超低污染	线粒体 DNA 的 reads 数＜ 2%
超高通量	每个微流孔通道一次性可捕获 500-10,000 个单细胞核
超高捕获效率	每个样本细胞核捕获效率达到 65%
超多数据量	获得染色质所有开放染色质区域，不局限于某个转录因子
超低成本	相较于其他单细胞核捕获平台或传统酶切方法，价格大幅降低

7 应用方向

干细胞发育

肿瘤异质性

免疫研究

神经科学

生物标志物

基因调控

8 应用案例

单细胞转录组测序可以帮助我们了解细胞的异质性，解析细胞在生命发育过程中的基因表达变化。而单细胞 ATAC 技术可以通过对染色质可及性的检测从基因表观层面解释基因表达变化发生的根本原因。

Massively parallel single-cell chromatin landscapes of human immune cell development and intratumoral T cell exhaustion

单细胞 ATAC 技术研究肿瘤 T 细胞衰竭机制

期刊：*Nature Biotechnology*　发表时间：2019 年 8 月　影响因子：31.864

• 材料和方法

1、16 个健康个体的 PBMC 和 BMMC 进行 10x Genomics 单细胞 ATAC 测序

2、7 个 PD-1 阻断治疗前后的基底癌患者进行 10x Genomics 单细胞 ATAC 测序

• 研究结果

1. 人类造血细胞染色质可及性研究

16 个健康个体的 PBMC（外周血单核细胞）和 BMMC（骨髓单核细胞）共 61,806 个细胞进行单细胞 ATAC 分析。结果共分为 31 个亚群。早期造血祖细胞到晚期造血祖细胞表现为连续分化。在骨髓细胞和浆细胞样树突状细胞出现特异性可及性。因此自身免疫疾病可能与基因的染色质可及性有关。

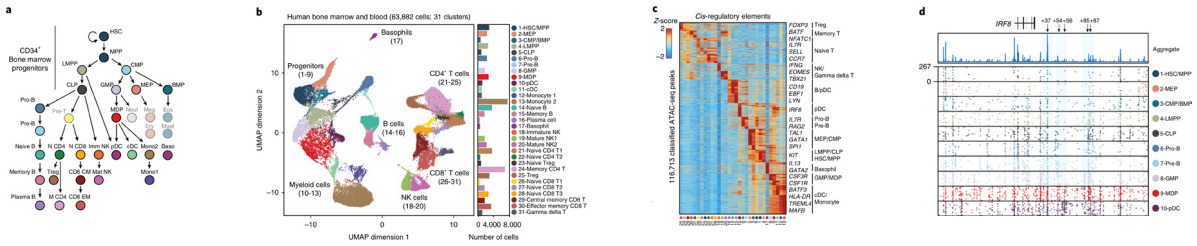

图 13 造血细胞染色质可及性分析

2. 免疫系调控轨迹

拟时间序列分析来识别血浆 B 细胞分化过程中顺式元件和反式调节因子的阶段特异性活动。发现 B 细胞发育的每个阶段都存在特定的动态调控元件。且在发育早期和晚期具有不同的调控元件。表明 ATAC-seq 数据可识别细胞分化的顺式和反式调节因子。

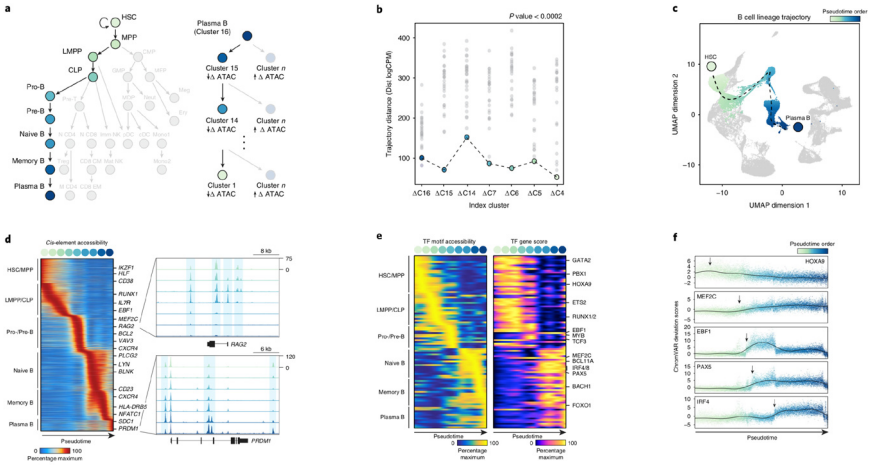

图 14 B 细胞调控轨迹分析

3. 肿瘤内免疫细胞的染色质可及性

对 7 个 PD-1 阻断治疗前后基底癌患者的 37,818 个细胞进行了单细胞 ATAC 测序，发现来自不同患者的基质细胞和免疫细胞聚集在一起，肿瘤细胞群表现出患者特异性，反映了由患者特异性基因组改变驱动的细胞状态变化。推测与肿瘤发生相关的重要调节因子在免疫细胞中存在不同的激活调控机制。

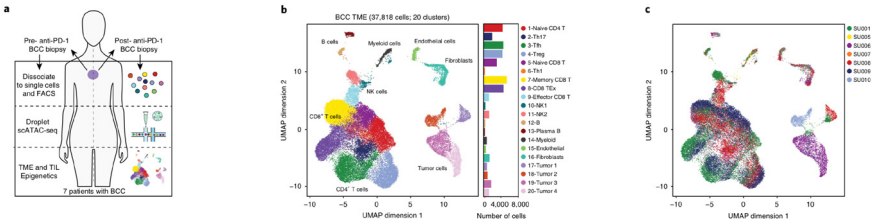

图 15 肿瘤免疫细胞染色质可及性分析

4.PD-1 阻断后 T 细胞衰竭的表观遗传

对 23,274 个 T 细胞进行重新分群共鉴定出 19 个 T 细胞亚群，根据调控元件在不同 T 细胞亚群中的表现阐述了 T 细胞衰竭机制。T 细胞衰竭伴随着染色质可及性的全局重构，并且这种细胞状态所占据的表观遗传状态与大多数其他公认的 T 细胞状态一样明显。拟时间序列结果显示调控元件在不同亚群中的表现揭示了 T 细胞衰竭机制。

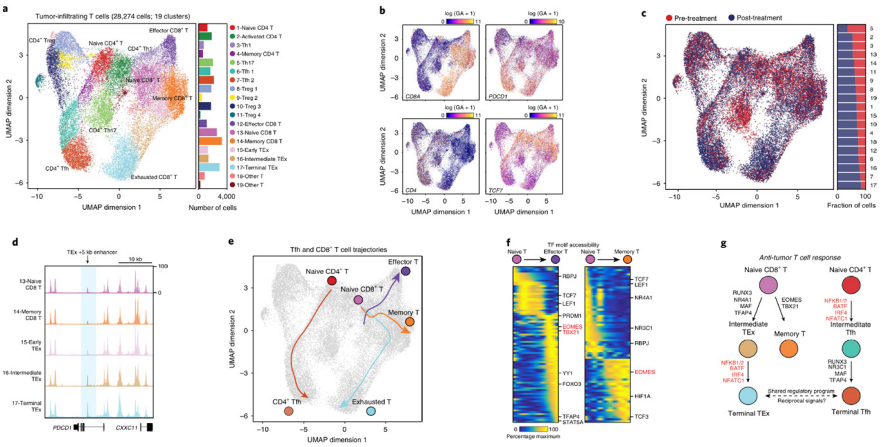

图 16 T 细胞衰竭机制分析

• 研究结论

1、发现了人类造血过程中重要的顺式和反式调控元件，绘制疾病相关增强子活性的图谱，重建从祖细胞分化为多种罕见免疫细胞类型的轨迹

2、阐述了基底细胞癌中，肿瘤微环境中恶性、间质和免疫细胞类型的调控结构，揭示了 T 细胞衰竭机

Identification of genomic enhancers through spatial integration of single-cell transcriptomics and epigenomics

通过单细胞转录组学和表观基因组学的空间整合鉴定基因组增强子

期刊：*bioRxiv*　发表时间：2020 年 2 月

• 材料和方法

1、30 个眼触角盘样品进行 10x Genomics 单细胞转录组测序

2、30 个眼触角盘样品进行 10x Genomics 单细胞 ATAC 测序

• 研究结果

1. 眼触角盘单细胞转录组图谱

通过对果蝇第三龄幼虫眼触角盘进行单细胞转录组测序及分析，获得 3,531 个细胞，17 个亚群；采用 SCENIC 利用 motif 及 ChIP-seq 数据来推断眼触角盘中主要的基因调控网络，鉴定出 175 个调控子，其中大多数调控子具有细胞类型特异性。

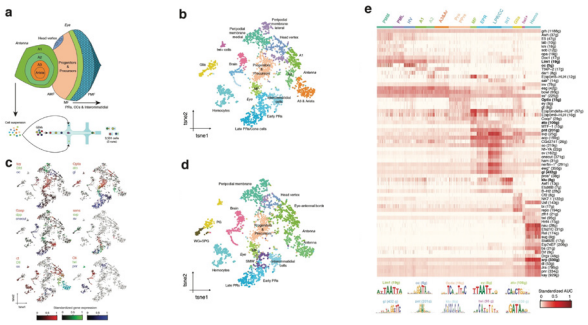

图 17 果蝇眼触角盘单细胞转录组分群结果

2. 眼触角盘单细胞 ATAC 图谱

10x 单细胞 ATAC 测序获得 15,387 个高质量细胞核数据，共得到 22 个细胞亚群；细胞类型从 scRNA-seq 映射到 scATAC-seq 的细胞簇时，某些细胞群分配给下一个发育簇，这种滞后效应是由于在分化过程中，染色质可及性改变可能稍早于转录表达的改变导致的。

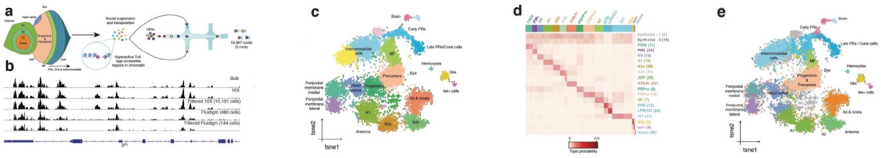

图 18 果蝇眼触角盘单细胞 ATAC 分群结果

3. 单细胞多组学空间整合揭示基因组增强子信息

分析发现 77%的增强子活性与染色质可及性相关，但是部分增强子需要辅助因子才能发挥作用。开发了一种模型推断增强子与基因的关系，预测详细的基因调控网络。预测得到的 161 个调控因子中，有 91 个与 SCENIC 的预测结果一致。

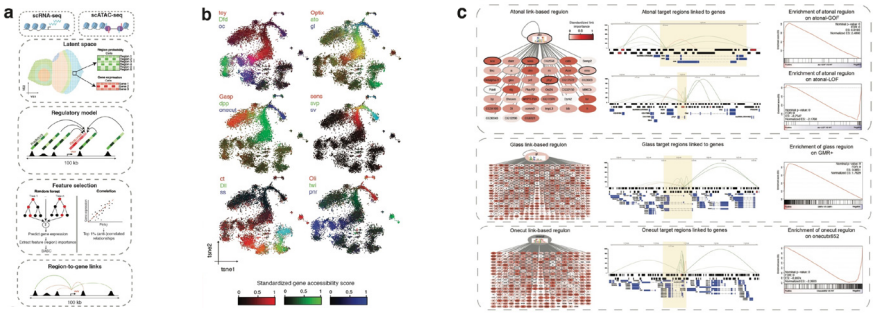

图 19 增强子的靶向调控揭示基因的表达调控网络

• 研究结论

1、文章提出了一种空间整合单细胞多组学数据的方法，生成了第一张果蝇眼触角盘组织的虚拟空间图

2、整合单细胞 RNA-seq 及单细胞 ATAC-seq 数据，开发了一种新的方法来预测增强子信息及推断基因调控网络

KYFW-2020-003 V1.0

©2020 CapitalBio Technology. All rights reserved.

博奥晶典控股成员

博奥检验 CapitalBio MedLab　博奥木华基因 CapitalBio Genomics　博奥新景 CapitalBioDx　博奥颐和 CapitalBio eHealth

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