

单细胞多组学研究新革命

——10x Genomics 单细胞解决方案



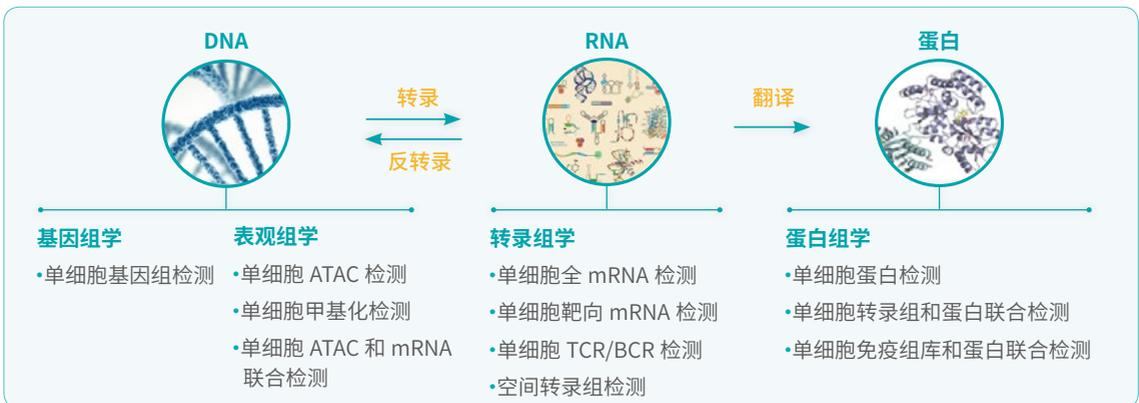
博奥晶典单细胞测序平台介绍 >>>

博奥晶典作为国内第一批引进 10x Genomics 平台的公司，率先在国内开展上万级通量的单细胞转录组测序服务。目前已经完成了 5,000 多个样品、几百种不同样品类型的服务，覆盖的物种和样品类型包括人和小鼠的肝脏、肺脏、皮肤、心脏、脑、肾脏、血液、卵巢、神经，以及鸡、斑马鱼、猪、水稻、拟南芥、油菜、白菜、橄榄等，是目前国内大规模单细胞测序经验丰富的公司。

博奥晶典于 2019 年 12 月同时获得了单细胞转录组、单细胞 ATAC、单细胞免疫组库 3 个服务产品的官方 CSP 认证，并于 2020 年 9 月获得了空间转录组产品的官方 CSP 认证，成为目前国内唯一一家同时获得 4 项 10x Genomics 平台服务官方认证的公司。



博奥晶典支持单细胞测序文章分别发表在 *Cell*、*Circulation*、*Cell Stem Cell*、*Journal of Hepatology*、*Cell Research*、*GUT*、*Nature Communications*、*PNAS*、*Cell Reports*、*Cancer Research* 等期刊，应用领域涉及细胞图谱绘制、类器官、生殖发育、干细胞、血管老化、血管异质性、肿瘤异质性、肿瘤免疫治疗、疾病机制研究等。至此，博奥晶典已累计支持客户发表单细胞高分文章 24 篇，影响因子 322.386 分，是目前国内支持发文最多、累计影响因子最高的公司。



目录 >>>

01 单细胞转录组测序

1. 技术原理	01
2. 分析展示	02
3. 产品优势	03
4. 送样要求	03
5. 应用方向	03
6. 应用案例	04

02 单细胞免疫组库测序

1. 技术原理	13
2. 分析展示	13
3. 产品优势	14
4. 应用方向	14
5. 应用案例	15

03 单细胞 ATAC 测序

1. 背景介绍	19
2. 技术原理	19
3. 分析展示	20
4. 产品优势	21
5. 送样要求	21
6. 应用方向	21
7. 应用案例	21

04 单细胞表面蛋白检测

1. 技术原理	26
2. 产品优势	26
3. 应用方向	26

05 单细胞靶向基因检测

1. 技术原理	27
2. 产品优势	27
3. 应用方向	27

1 单细胞转录组测序

技术原理

10x Genomics 单细胞转录组测序是一种在单细胞水平对 mRNA 进行高通量测序分析的新技术，为单细胞转录组研究提供更具扩展性的平台。其基于 10x Genomics 平台，一次性能够分离 500-10,000 个单细胞，并能够将分离的单个细胞中的微量 mRNA 通过高效扩增后再进行高通量测序，有效地解决了组织样本无法破解的细胞异质性难题，有助于发现新的细胞类型；并基于大量的单细胞基因表达数据，可进行细胞表达特征聚类、亚群表达特征分析、标志物筛选等方面的研究，是一种高效的细胞基因表达水平的检测技术，在生殖、免疫、干细胞分化、肿瘤异质性、神经系统发育以及脑发育等研究领域有着广泛的应用。

10x Genomics 单细胞转录组测序是建立在微流控平台，将带有条形码与引物的凝胶珠和单个细胞包裹在油滴中；接下来在每个油滴内，凝胶珠溶解，细胞裂解释放 mRNA，通过逆转录产生用于测序的带条形码的 cDNA；液体油层破坏后，cDNA 后续进行文库构建，然后使用 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基因表达数据，从而实现在单细胞水平进行表达测序的目的。

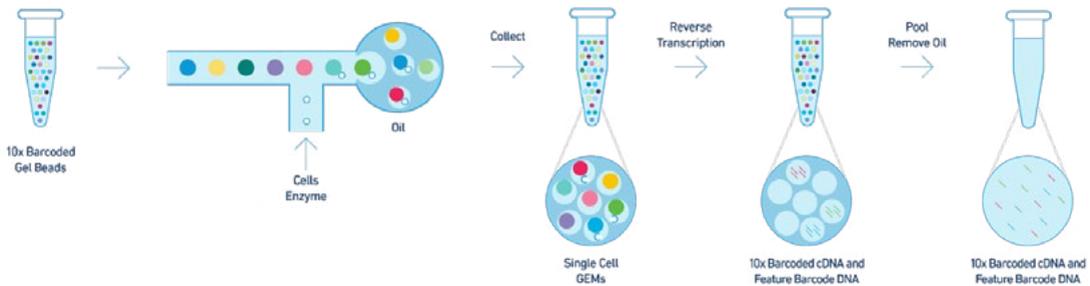


图 1. 单细胞转录组检测原理

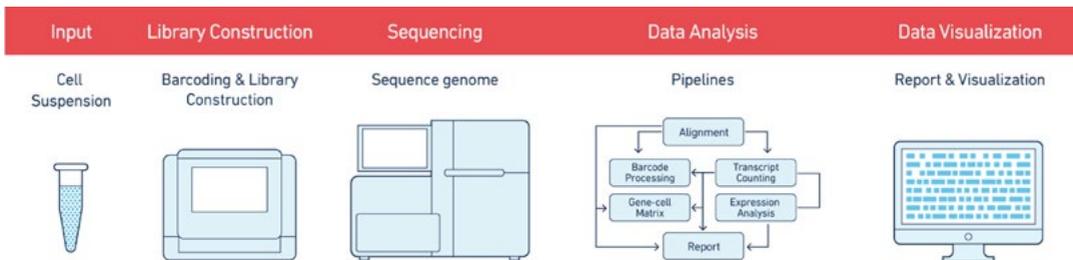


图 2. 单细胞转录组实验流程

分析展示

● 细胞聚类

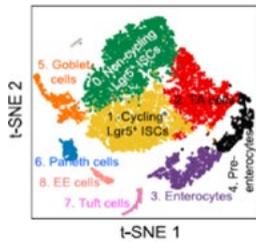


图 3. 细胞分群图

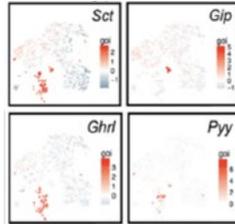


图 4. 不同亚群 Marker 基因

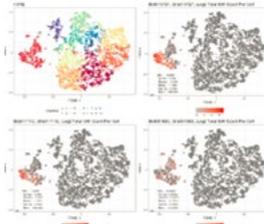


图 5. 亚群 TOP 差异基因

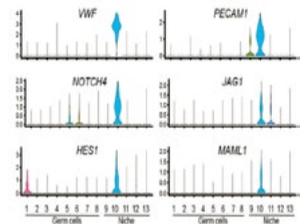


图 6. 小提琴图

● 富集分析

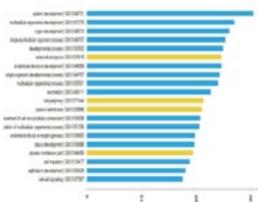


图 7. GO 富集分析

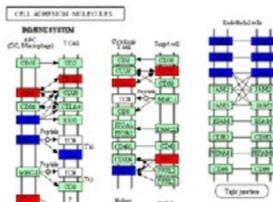


图 8. KEGG 富集分析

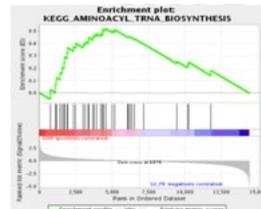


图 9. GSEA 富集分析

● 细胞轨迹分析

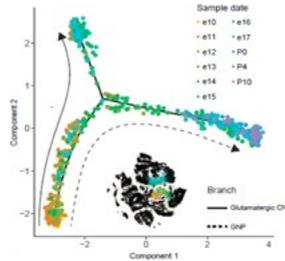


图 10. 拟时间序列分析



图 11. RNA Velocity 分析

● 细胞互作分析



图 12. 细胞关联图

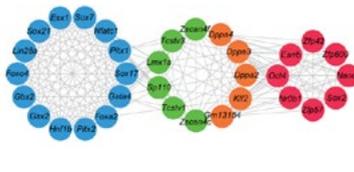


图 13. 基因相关性网络图

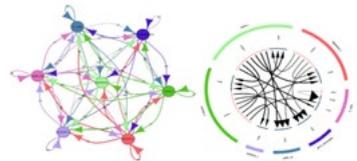


图 14. 细胞通讯分析

产品优势

细胞选取灵活	每个样本细胞数可达 500-10,000 个，细胞选取灵活
项目周期短	20min 内实现对上万个细胞的封装，2 天内即可完成细胞悬液制备、单细胞捕获、扩增及建库，且可同时获得上万个细胞的分析结果，大大缩短项目周期
细胞捕获效率高	单个细胞捕获率高达 65%，高效获取每个细胞中的基因表达
真正大规模单细胞测序	单个液滴捕获到多个细胞的概率极低，严格质控，利用 barcode 信息及 UMI 去除含多个细胞数据，实现真正的大规模单细胞测序
低成本	相较于其他单细胞平台，如 Fluidigm C1 平台、已推的 Illumina Bio-Rad Single Cell Solution 平台或传统人工操作扩增方法等，成本大幅降低
应用范围广	对细胞类型无限制，已成功应用于识别细胞周期、肿瘤细胞异质性、鉴定罕见细胞类型、免疫细胞分型、疾病分型等领域
丰富的项目经验	首家引入 10x Genomics 平台，已完成 5,000+ 样品，100+ 组织类型，支持发文 24 篇，累计影响因子 322.386 分

送样要求

样品类型	质量要求	保存运输
新鲜细胞悬液 / 单细胞核悬液、新鲜组织、新鲜血液、培养细胞、冻存细胞等	300-600 cell/ μ l，体积大于 100 μ l，细胞活性大于 90%，细胞直径小于 40 μ m	新鲜样品湿冰运输 冻存样品干冰运输

应用方向

- 1 人类细胞图谱构建
- 2 肿瘤异质性研究
- 3 干细胞发育以及分化
- 4 免疫反应研究
- 5 神经系统发育研究
- 6 器官发育研究

应用案例 - 晶典支持

胚胎发育
Generation of Blastocyst-like Structures from Mouse Embryonic and Adult Cell Cultures
单细胞测序研究小鼠胚胎及类囊胚发育
期刊: *Cell* 发表时间: 2019.10 影响因子: 38.637 发表单位: 北京大学

• 研究背景

单细胞测序技术发现的关键分子验证仍然需要大量的胚胎完成，而胚胎体外重组技术使用的两种类型细胞仅能够重现囊胚期之后的胚胎结构，无法探索早期发育的生物学现象。是否可以利用干细胞构建早期发育的胚胎，更精准地模拟哺乳动物早期发育过程及分子机制目前尚无报道。

• 材料和方法

1. 类囊胚体外培养 2. 类囊胚和自然受精囊胚中收集的 2,700 多个细胞进行了 10x 单细胞测序

• 研究结果

1. 利用 EPS 多能干细胞分化培养胚泡样结构

研究人员将分离的小鼠 EPS 细胞接种到微孔中（每个微孔 5 个细胞），形成小的聚集体。通过建立 KSOM-ETS 的条件培养基，同时联用小分子处理 EPS 细胞，获得与小鼠胚胎 E3.5 自然受精囊胚形态相似的类型囊胚结构。进一步培养后，可以从单个 EPS 细胞中产生克隆性 EPS 囊胚。

E3.5 小鼠囊胚有两种细胞系，即外滋养层（TE）和内细胞团（ICM）。通过免疫荧光实验验证类囊胚也有这两种早期胚泡谱系。

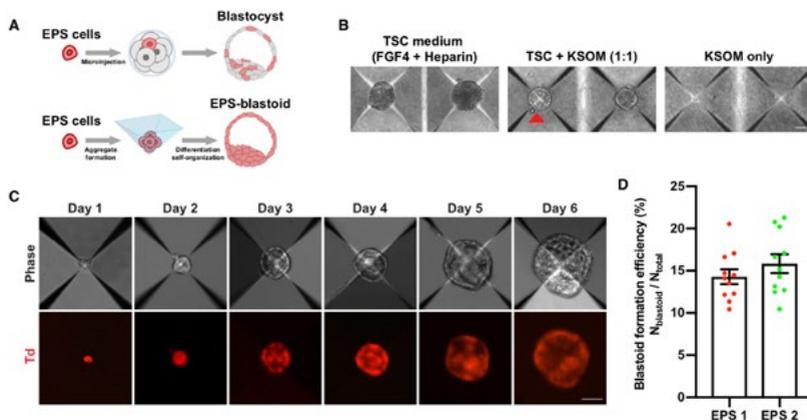


图 15. EPS 细胞培养分化为 EPS 囊胚

2. EPS 囊胚形成概述了植入前发育的关键过程

团队研究了在类囊胚的形成过程中，早期植入前发育的关键细胞和分子事件。在种植后的 4h 内，细胞之间连接松散，种植后 18 小时左右，细胞开始形成紧密的聚集体，种植后的第 3 天，75% 细胞聚集体呈现 PAR6 富集的极化特征。证实了类囊胚的形成过程中发生了早期植入前发育的致密化及极化特征。

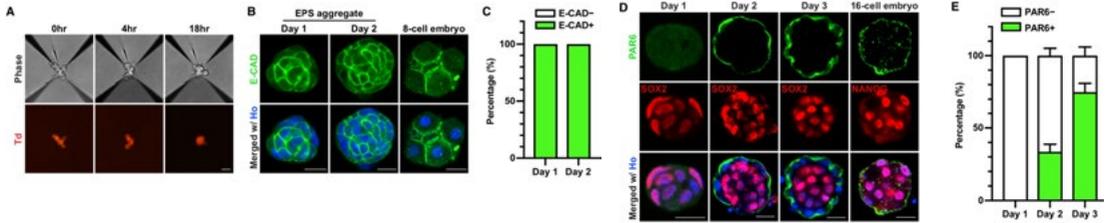


图 16. 类囊胚形成过程中细胞的致密和极化特征

3. 单细胞测序分析类囊胚和自然受精囊胚在各个谱系中的异同

团队利用单细胞 RNA 测序技术，对类囊胚和自然受精囊胚中收集的 2,700 多个细胞进行了单细胞测序。分析显示，类囊胚和自然受精囊胚的细胞基本上重叠在一起。聚类后共分为 7 个细胞亚群，其中 4 个亚群由类囊胚和自然受精囊胚共享。

对差异表达基因进行功能注释发现，在类囊胚和自然受精囊胚之间的内细胞团 ICM 或外胚层 EPI 谱系鉴定出 53 个差异表达基因，这些差异表达基因富含与干细胞维持、繁殖和 DNA 甲基化相关的功能。在类囊胚和自然受精囊胚之间鉴定出 67 个差异表达基因，并且这些差异表达基因大多与囊泡运输和内吞有关。对于滋养外胚层 TE 谱系，在两个样本之间仅发现两个差异表达基因存在显著差异。

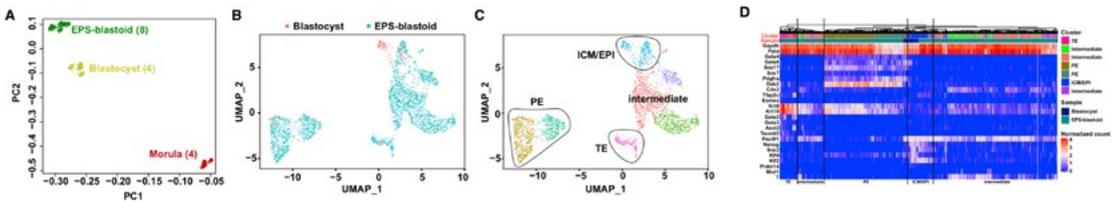


图 17. 单细胞测序分析类囊胚和自然受精囊胚差异

• 研究结论

类囊胚包含受精囊胚中具备的三种原始细胞类型。单细胞转录组测序分析显示类囊胚与受精囊胚有相似的基因表达特征。进一步实验证明，类囊胚可以在体外发育成类似于早期植入后胚胎的结构。研究人员认为，通过进一步优化体系并结合基因编辑技术，能够获得功能更加完整的类囊胚，发育到形成不同器官原基的阶段，从而成为类器官的种子，可以用作器官移植的重要来源。

体细胞重编程
Single-Cell RNA-Seq Reveals Dynamic Early Embryonic-like Programs during Chemical Reprogramming
单细胞转录组测序研究体细胞化学诱导重编程过程
期刊: *Cell Stem Cell* 发表时间: 2018.06 影响因子: 20.860 发表单位: 北京大学

• 研究背景

如何在体外获得具有生理功能的体细胞对于再生医学而言是个重要问题，近年来细胞系的重编程让问题的解决看到了希望。化学介导的重编程更是获得了众多研究资源的青睐。相比于传统转基因方法介导的重编程，化学方法解决了内源基因的修改所导致的潜在致突变及致癌风险，同时化学小分子兼具了细胞膜穿透性、可逆性、可控性和易于制造等诸多优点。

• 材料和方法

1. 样本来源: 小鼠胚胎成纤维细胞
2. 技术方法: 10x 单细胞转录组测序 + 转录组测序 + 全基因组甲基化测序

• 研究结果

1. 发现了新的细胞亚群 Ci2C-like

在 XEN-like 细胞向 CiPS 细胞转变过程中，存在一群表达谱上高度类似胚胎发育早期二细胞期的细胞群，并命名为 Ci2C-like (chemically induced two-cell embryo-like) 细胞。进一步全基因组甲基化测序发现 Ci2C-like 细胞的 DNA 甲基化修饰被显著擦除，从表观遗传的角度证明了 Ci2C-like 细胞群体与二细胞胚胎的高度相似性。更重要的是，作者发现 Ci2C-like 相关基因的表达与重编程潜能呈现十分显著的正相关，进一步的功能实验证明了它们在重编程后期发挥的关键正向作用。在此基础上，通过改进小分子的处理方式，更有效地促进了 Ci2C-like 相关基因的激活，从而大大加速了重编程进程，使化学重编程的诱导周期从 40 天缩短至 16 天（不传代诱导）。

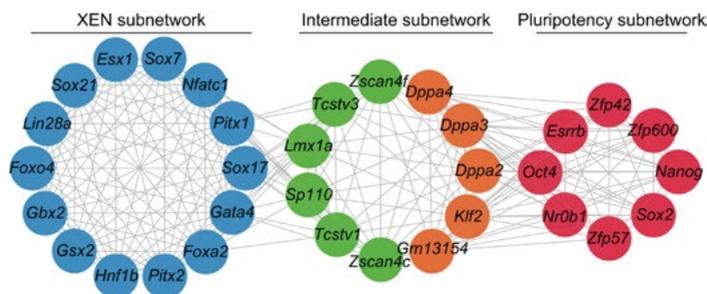


图 18. 从 XEN 样状态高编程为多能性状态的基因调控网络

2. 在基因水平解释了重编程的过程

通过构建拟时间序列，发现了重编程过程中基因表达的变化。解释了体细胞诱导化学重编程的机制。

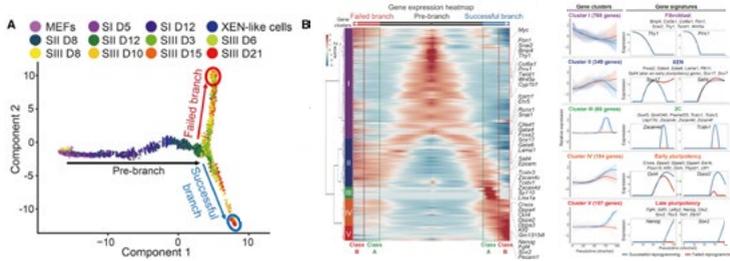


图 19. 拟时间序列分析重建化学重编程的轨迹

• 研究结论

该研究首次在单细胞水平描绘了小分子诱导体细胞重编程过程的具体分子路径，阐明了 XEN-like 细胞向 CiPS 细胞转变的具体分子机制，发现了 Ci2C-like 细胞在多能性获得中的关键作用，并进一步优化了重编程体系。

肿瘤异质性
Dissecting transcriptional heterogeneity in primary gastric adenocarcinoma
by single cell RNA sequencing
单细胞转录组测序研究胃腺癌单细胞转录异质性
期刊: *GUT* 发表时间: 2020.06 影响因子: 19.819 发表单位: 解放军第五医学中心

• 研究背景

胃腺癌 GA 是最常见的消化道肿瘤之一，其具有高度的分子异质性和形态学异质性，受多种遗传和环境因素影响。而胃腺癌分子和细胞异质性鲜有从单细胞层面进行解析，从单细胞分析层面解析胃癌异质性对于精确诊断、治疗方案确立和预后评估具有重要意义。

• 材料和方法

1. 9 个胃腺癌样本，3 个良性样本共 12 个样本进行 10x 单细胞转录组测序

• 研究结果

1. 胃腺癌细胞图谱绘制

通过对 5 个肠道胃腺癌样本（其中 1 个为 EBV 感染），3 个混合型胃腺癌样本，1 个弥散型胃腺癌样本，

3. 单细胞转录组数据揭示主细胞，颈部细胞以及 SPEM 细胞之间的关系

对恶性细胞进行重新聚类共分为 4 个亚群，分别为表面细胞，主细胞，颈部细胞以及 SPEM 细胞。免疫组化显示主细胞，颈部细胞以及 SPEM 细胞存在相同的组织且存在一定位置关系。拟时间序列分析发现主细胞可以转分化为黏膜颈部细胞，然后再分化为 SPEM。此结果首次在单细胞水平描述了主细胞的潜在分化途径，以及分化为化生细胞的潜能。

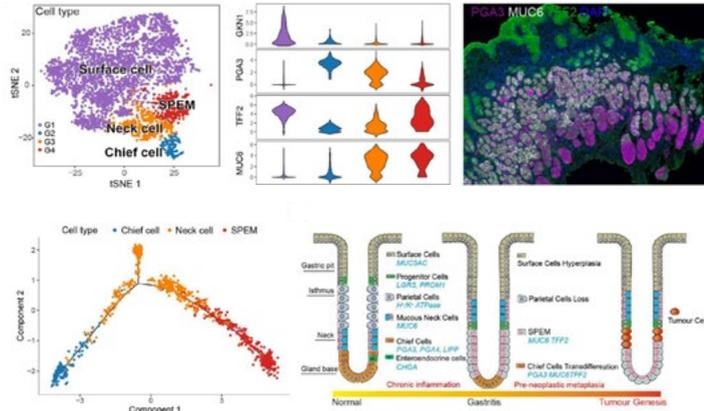


图 22. 主细胞、颈部细胞以及 SPEM 细胞之间的关系

4. 胃腺癌恶性细胞异质性

对 5,635 个恶性细胞进行聚类分析，发现了 5 个显著的细胞亚群。C1 几乎全部来自扩散型样本 (DGC)，C2 主要来自肠道样本 (IGC)，C3 来自混合型 (MGC) 和肠道样本，C4 来自一个肠道样本 (IGC3)，C5 来自 EBV 患者 (IGC5)。IGC1 和 IGC4 等患者中存在高度的瘤内分化异质性，IGC1 和 IGC4 的恶性细胞表现出相似的由低分化到高分化的伪时间轨迹。表明 IGC1 和 IGC4 中不同的细胞群可能代表两个不同的分化阶段。TCGA 预后分析发现低分化程度的胃肿瘤可能更具侵袭性。

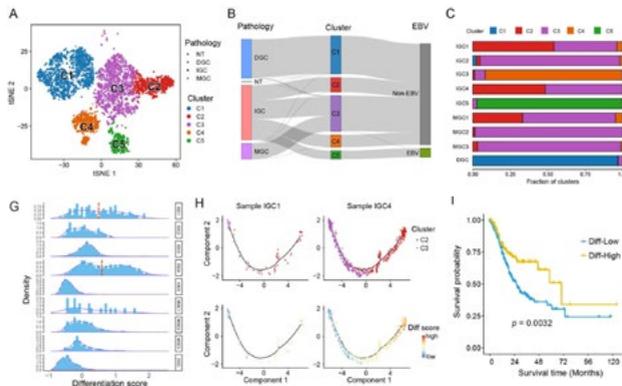


图 23. 胃腺癌恶性细胞异质性

• 研究结论

文章利用无偏颇的单细胞转录组测序技术构建了全方位的胃癌表达谱图谱，建立了一种新型的区分良恶性上皮细胞的分类方法。着眼于非恶性上皮细胞，阐述了胃化生细胞的起源。着眼于恶性上皮细胞，构建了一种量化细胞分化程度的计算方法，并揭示分化程度与胃癌的预后密切相关。发现了一种新型的胃癌类型：主细胞主导型胃癌，并在大规模数据库中验证了这种类型胃癌的存在。总之，研究结果为剖析胃癌异质性、胃癌预后和解析胃癌化生演变进程提供了宝贵的数据资源。

心血管异质性

Aortic heterogeneity across segments and under high fat/salt/glucose conditions at the single-cell level

单细胞测序解析不同喂养条件小鼠主动脉细胞异质性

期刊: *National Science Review* 发表时间: 2020.05 影响因子: 16.693

发表单位: 江南大学无锡医学院

• 研究背景

主动脉是人体最大的动脉。在解剖学上，主动脉分为升主动脉、主动脉弓、胸主动脉、腹主动脉等4部分，不同的解剖结构导致主动脉管内的血流动力学微环境不同；不同的饮食习惯会扰乱不同细胞类型的内稳态从而会影响主动脉。从单细胞水平深入研究不同主动脉段的异质性，有助于了解每种细胞类型对生物力学微环境变化的响应以及主动脉4个区段对于不同喂养条件的响应。

• 材料和方法

1. 13个主动脉血管（4个升主动脉、3个主动脉弓、3个胸主动脉、3个腹主动脉）样本进行10x单细胞转录组测序

• 研究结果

1. 主动脉血管细胞图谱绘制

通过对正常及不同喂养条件（高盐、高脂、高糖）的主动脉血管、主动脉血管4个区段样本进行单细胞测序，绘制了一个比较全面的单细胞转录组图谱。研究共测得216,612个细胞，并对细胞进行了聚类分析，得到35个细胞亚群，鉴定了每个亚群的marker基因。根据基因表达相似性，将其分为10个细胞类群，即上皮细胞（ECs）、血管平滑肌细胞（SMCs）、T淋巴细胞、B淋巴细胞、髓细胞、成纤维细胞、周皮细胞、间皮细胞、施万细胞和红细胞，其中，SMCs、成纤维细胞、周皮细胞占比最高。

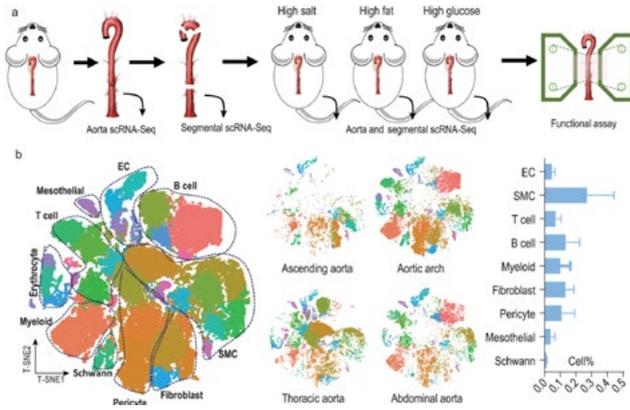


图 24. 主动脉血管单细胞图谱

2. 主动脉 4 个区段细胞类型时空异质性

通过对主动脉 4 个区段分别进行单细胞测序，探索 4 个区段间的异质性。结果表明，4 个区段均包含上述 10 个主要细胞类型，但 4 个区段中各个亚群细胞数量占比不同。相对其他区段，免疫细胞（尤其是巨噬细胞）、施万细胞、周皮细胞在正常主动脉弓中占比更高，这在免疫荧光染色的结果中也得到了验证。

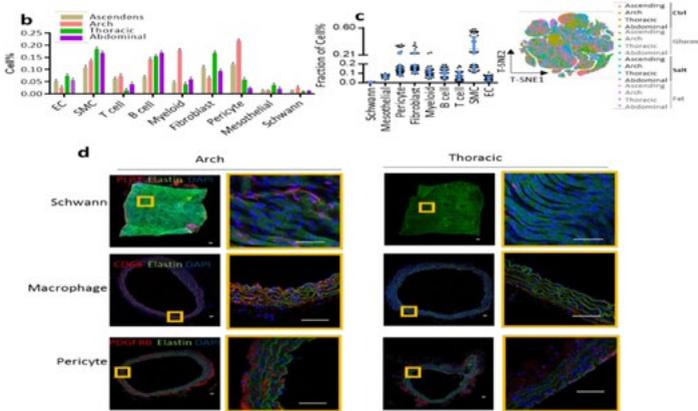


图 25. 主动脉 4 个区段细胞类型时空异质性

3. 细胞互作网络分析

为了研究不同主动脉细胞亚群之间的相互作用关系，使用 CellPhone DB 数据库绘制了细胞互作网络图，通过预测每个细胞亚群差异表达的受体和配体，建立亚群之间的相互作用关系。

对正常主动脉组织的细胞互作分析表明，基质细胞与 ECs、SMCs，ECs 与 SMCs 高度相关；间皮细胞与 SMCs、ECs 和基质细胞的高度相关也表明它们具有生理学功能上的内在联系，值得进一步研究。

对危险条件下的腹主动脉组织的细胞互作分析表明，SMCs 与 ECs 和基质细胞的相互作用显著降低，这

三种细胞类型内部的几个细胞亚型间交互也显著降低。这些变化可能会是高脂、高盐、高糖等危险因素造成的心血管损伤的重要信号。

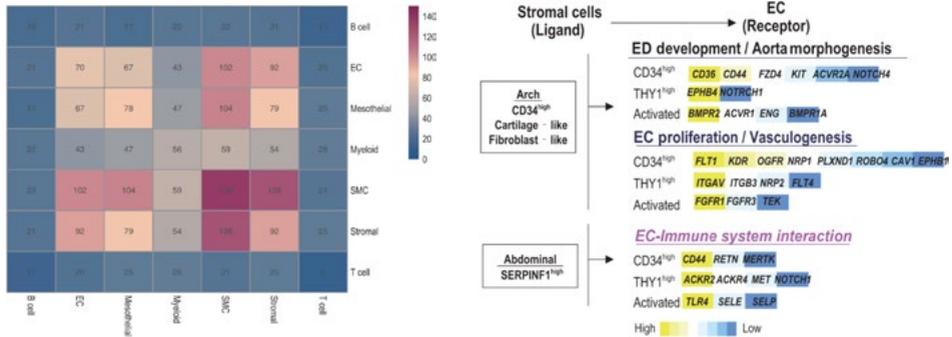


图 26. 细胞交互网络分析

4. 主动脉对不同喂养条件的响应

高盐、高脂、高糖饮食通常被认为是导致心血管疾病的主要危险因素，为了研究主动脉血管对 3 种危险因素的响应，对 3 种喂养条件下的小鼠主动脉及 4 个区段进行了单细胞测序。结果表明，小鼠主动脉会对 3 种喂养条件作出不同的响应。不同喂养条件下的主动脉细胞类型占比不同。危险条件下，主动脉血管中成纤维细胞和周皮细胞占比显著提高，尤其是胸主动脉和腹主动脉区段。髓细胞和 T 细胞的占比分别提高大约 25% 和 20%，主动脉弓和腹主动脉变化明显。免疫细胞的变化趋势与动脉粥样硬化小鼠一致。这些变化在免疫荧光染色的结果中也得到了验证。

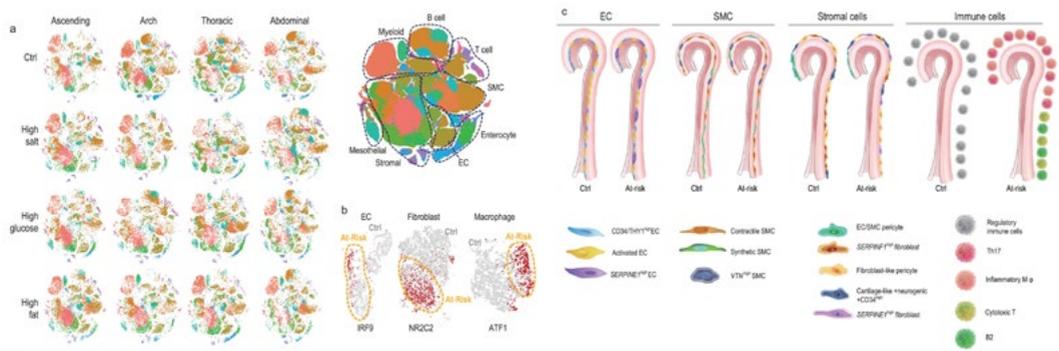


图 27. 主动脉对不同喂养条件的响应

• 研究结论

文章利用无偏颇的单细胞转录组测序技术构建了全方位的主动脉异质性图谱，研究了正常喂养条件和危险喂养条件（高脂、高盐、高糖）的主动脉细胞类型和基因表达差异，结合细胞交互分析，有助于为临床治疗心血管疾病寻找新的治疗靶点。

• 单细胞免疫组库数据分析

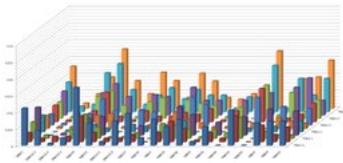


图 34. V(D)J 基因使用频率统计



图 35. BCR 重链和轻链匹配信息

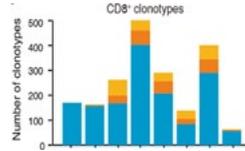


图 36. 亚群克隆型统计



图 37. 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

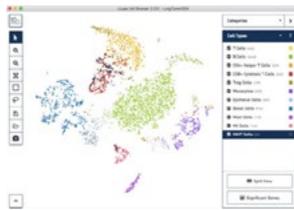


图 38. 基于克隆型信息重建细胞亚群

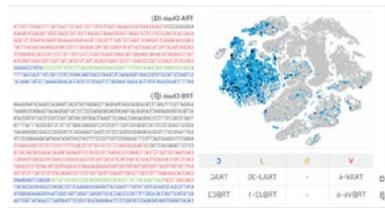


图 39. 单个亚群克隆型表达分析

 产品优势

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
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
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
首家引进	博奥晶典国内首家引进 10x Genomics 平台
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
丰富的项目经验	博奥晶典已完成 5,000+ 样本，100+ 样本类型实验，可解离人和小鼠心脏、脾脏、肺脏等组织类型

 应用方向

- 1 肿瘤免疫
- 2 感染性疾病
- 3 自身免疫病
- 4 炎症
- 5 移植和免疫重建
- 6 疫苗和抗体
- 7 发育与分化研究
- 8 生物标记物
- 9 免疫治疗

应用案例

胸腺图谱

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: 2020.02 影响因子: 41.845

• 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 10x 单细胞转录组测序
2. 出生后: 儿童、成人胸腺组织进行 10x 单细胞转录组测序
3. 小鼠胸腺组织进行 10x 单细胞转录组测序

• 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。

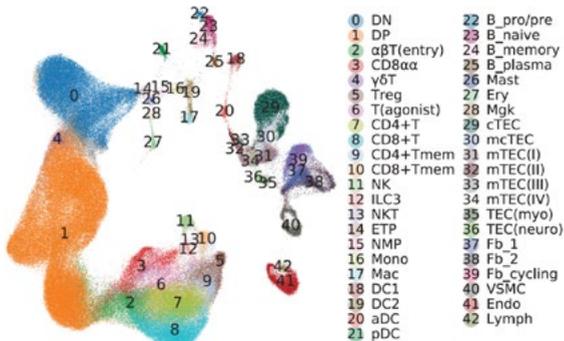


图 40. 胸腺细胞分群图

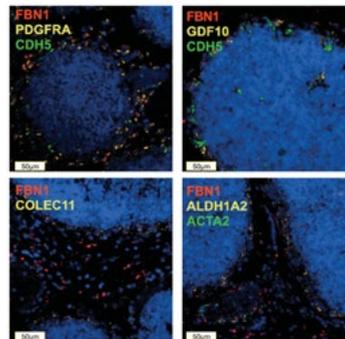


图 41. 细胞亚群组织定位

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。

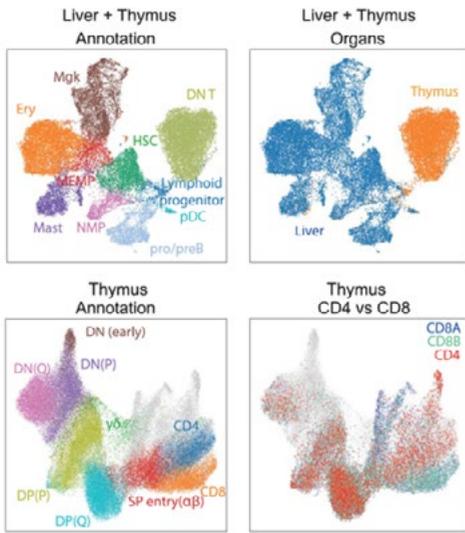


图 42. T 细胞发育轨迹构建

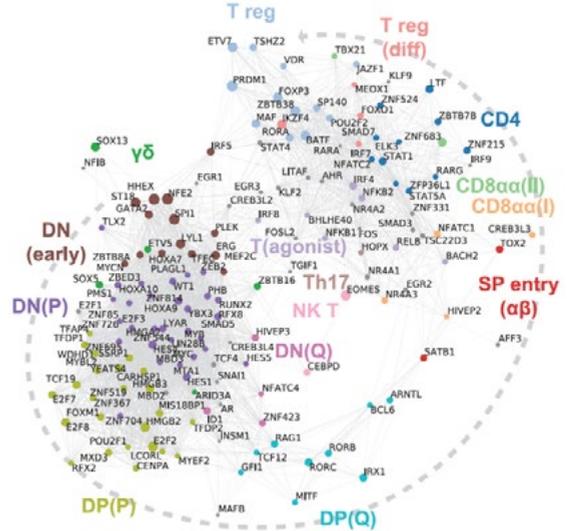


图 43. 转录因子调控网络

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。

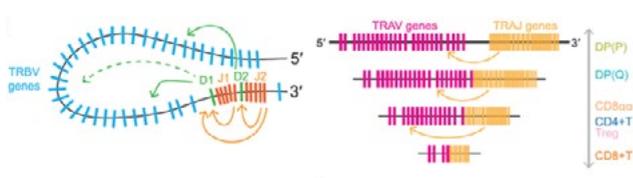


图 44. V(D)J 基因重组偏好性

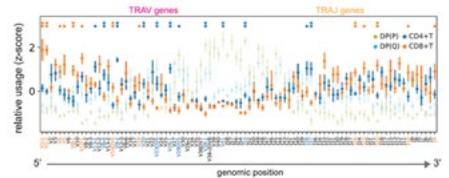


图 45. V(D)J 基因使用频率

• 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。

免疫治疗
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: 2020.02 影响因子: 30.13

• **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 10x 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。

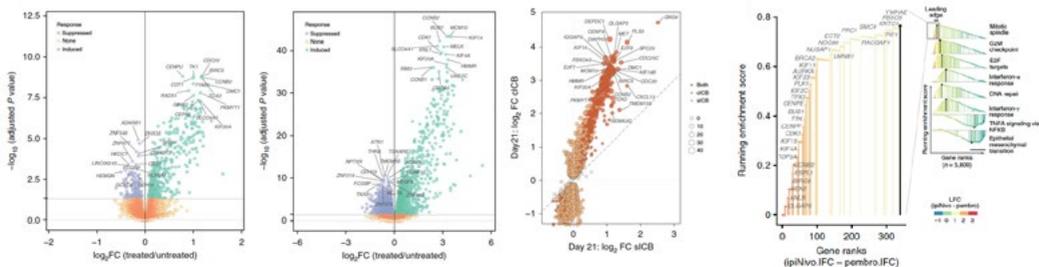


图 46. 黑色素瘤患者对 ICB 响应的转录组特征

3 单细胞 ATAC 测序

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。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，是一种快速灵敏的表现遗传学研究技术。

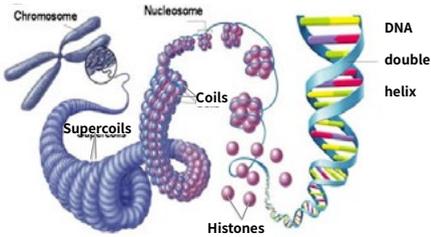


图 50. 染色质可及性

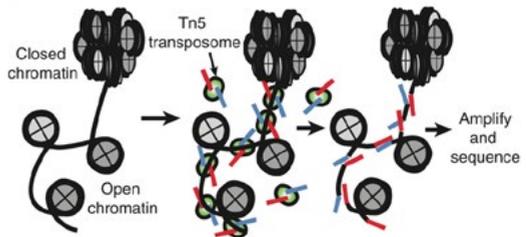


图 51. ATAC 测序技术

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。

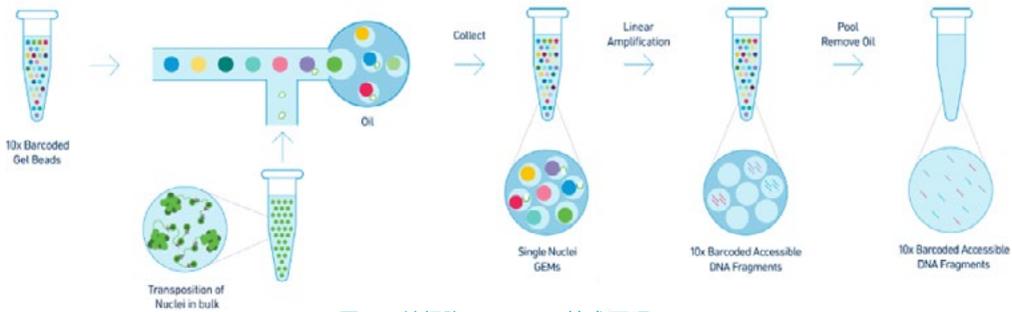


图 52. 单细胞 ATAC-seq 技术原理

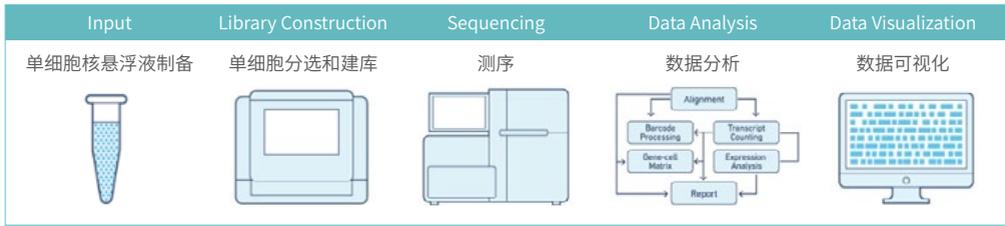


图 53. 单细胞 ATAC-seq 实验流程

分析展示

• 单细胞 ATAC 基本分析展示

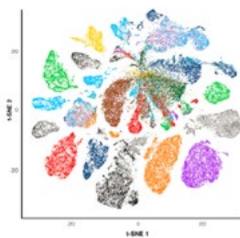


图 54. 细胞分群图

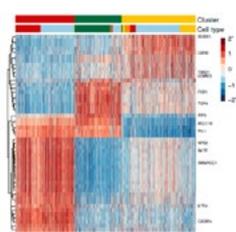


图 55. 亚群特征转录因子聚类图

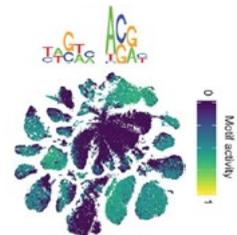


图 56. Motif 位点分析图

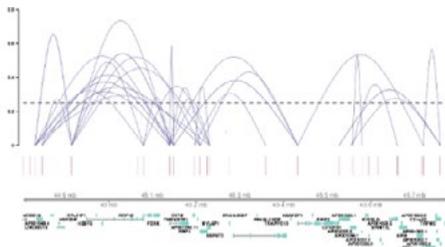


图 57. Peak 峰共可及性分析

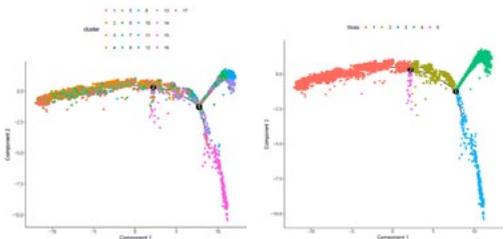


图 58. 拟时间序列分析

• 单细胞 ATAC 与单细胞转录组联合分析展示

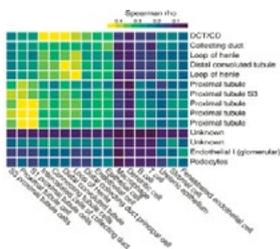


图 59. 亚群相关性图

单细胞 ATAC 数据与单细胞转录组数据细胞类型相关性分析

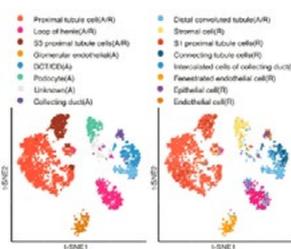


图 60. 细胞类群预测图

单细胞 ATAC 数据与单细胞转录组数据共同注释细胞类型

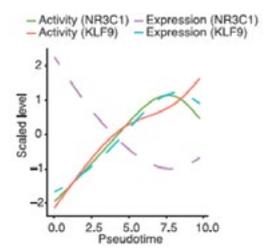


图 61. 转录因子调控曲线图

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

产品优势

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%
超大数据量	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

送样要求

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 / μ L；体积大于 50 μ L；核膜完整性较好	细胞浓度为 500-2,000 个细胞 / μ L；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

应用方向

- 1 干细胞发育
- 2 肿瘤异质性
- 3 免疫研究
- 4 神经科学
- 5 生物标志物
- 6 基因调控

应用案例

T 细胞衰竭
 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: 2019.08 影响因子: 31.558

• 研究背景

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。

● 材料和方法

- 16 个健康个体的 PBMC 和 BMMC 进行 10x 单细胞 ATAC 测序
- 7 个 PD-1 阻断治疗前后的基底癌患者进行 10x 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。

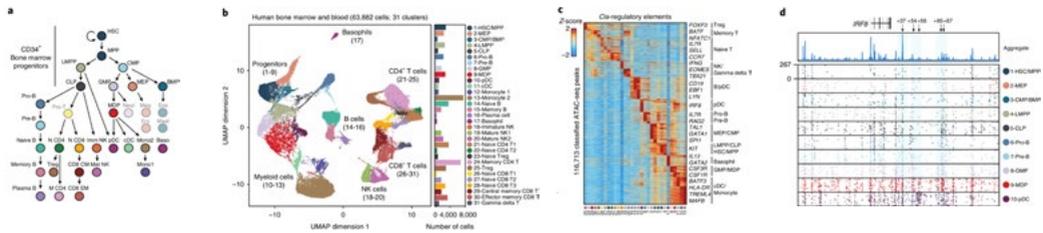


图 62. 造血细胞染色质可及性分析

2. 免疫细胞系调控轨迹

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。

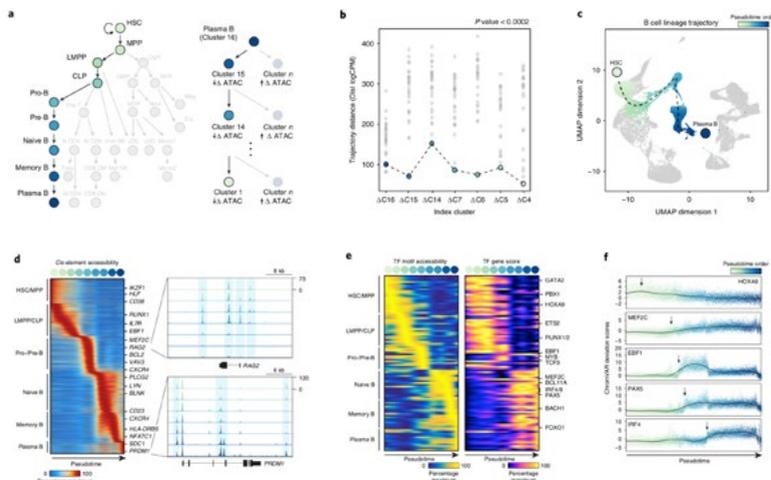


图 63. B 细胞调控轨迹分析

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小区状态变化。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。

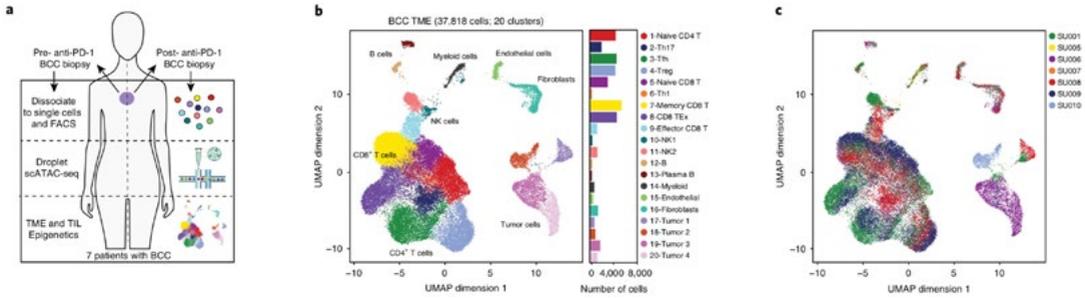


图 64. 肿瘤免疫细胞染色质可及性分析

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。

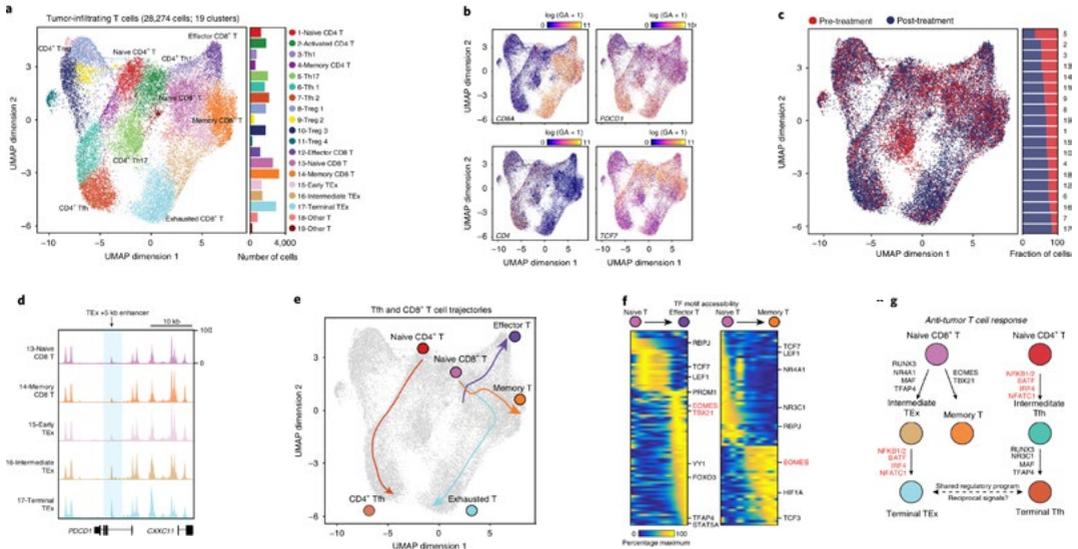


图 65. T 细胞衰竭机制分析

• 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 细胞衰竭机制

单细胞转录组 + 单细胞 ATAC 绘制发育图谱

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: 2020.02

• 材料和方法

1. 30 个眼触角盘样品进行 10x 单细胞转录组测序

2. 30 个眼触角盘样品进行 10x 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。

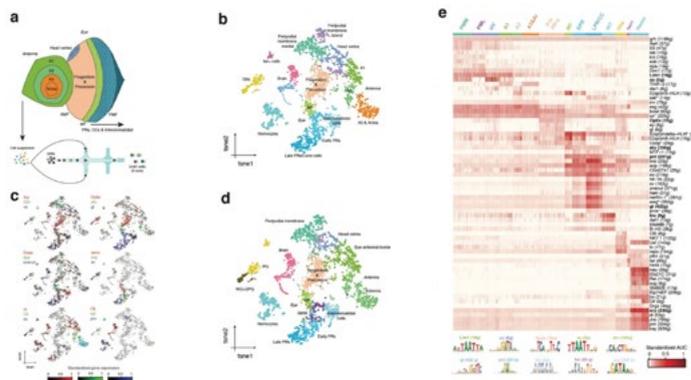


图 66. 果蝇眼触角盘单细胞转录组分群结果

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。

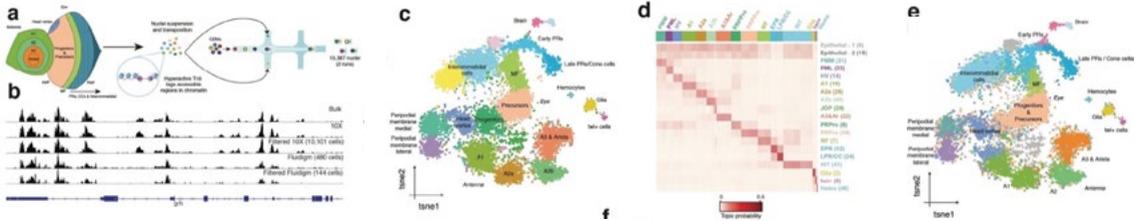


图 67. 果蝇眼触角盘单细胞 ATAC 分群结果

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。

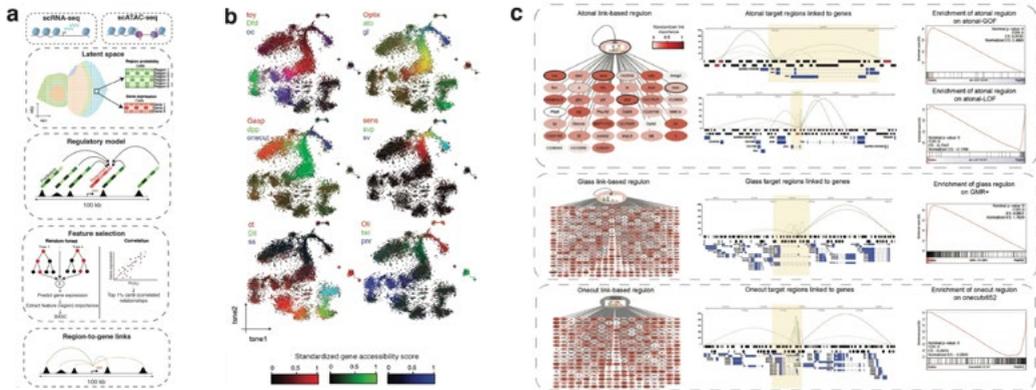


图 68. 增强子的靶向调控揭示基因的表达调控网络

• 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

4 单细胞表面蛋白检测

技术原理

单细胞 RNA-seq 可以从单细胞水平实现对大量基因表达进行检测的目的，然而因为转录后调控的存在，基因与蛋白的表达往往并不一致，了解基因调控和单细胞异质性往往同时需要 RNA 和蛋白表达的信息。10x Feature Barcoding 技术，可同时完成对每个样本 500-10,000 个细胞的基因表达和细胞表面蛋白表达的检测，有利于更好的理解复杂的生物体系统。

10x Feature Barcoding 技术的凝胶珠 (Gel beads) 共有 3 种捕获序列。分别为：3' 表达捕获序列 (poly(dT) 引物序列)，表面蛋白文库捕获序列 Capture 1 (Feature Barcode 序列)，CRISPR 筛选中使用的序列 Capture 2。与抗体偶联的细胞与凝胶珠，通过 10x Genomics 平台形成油包水结构 (GEMs)。接下来，凝胶珠溶解释放出 3 种引物序列，细胞裂解释放 mRNA，接着 3' 表达引物和 Capture 1 引物分别捕获 mRNA 和蛋白标记序列，形成 cDNA，cDNA 后续进行文库构建。通过数据分析得到同一个细胞的基因表达和表面蛋白表达信息。

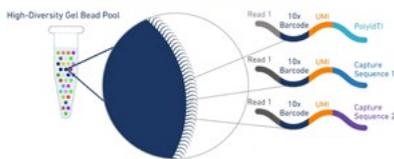


图 69. 10x Feature Barcoding 技术原理

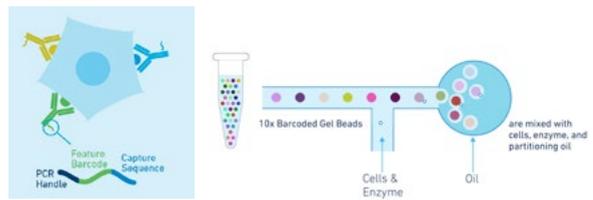


图 70. 10x Feature Barcoding 实验流程

产品优势

高灵敏度	一个细胞可以实现多种表面蛋白的检测
提高细胞亚群分辨率	同时检测基因和蛋白，提高细胞类型的分辨率
识别可变剪切体	可以通过蛋白表达信息区分基因的可变剪切体

应用方向

- 1 肿瘤生物标志物
- 2 免疫反应研究
- 3 细胞图谱绘制
- 4 疾病通路研究

5 单细胞靶向基因检测

技术原理

单细胞靶向基因检测是在单细胞转录组、单细胞免疫组库、空间转录组文库的基础上，使用特异性探针靶向富集关注的基因，然后对靶向基因文库进行二代测序，分析这些关键基因的表达情况。整体实验流程如下图：

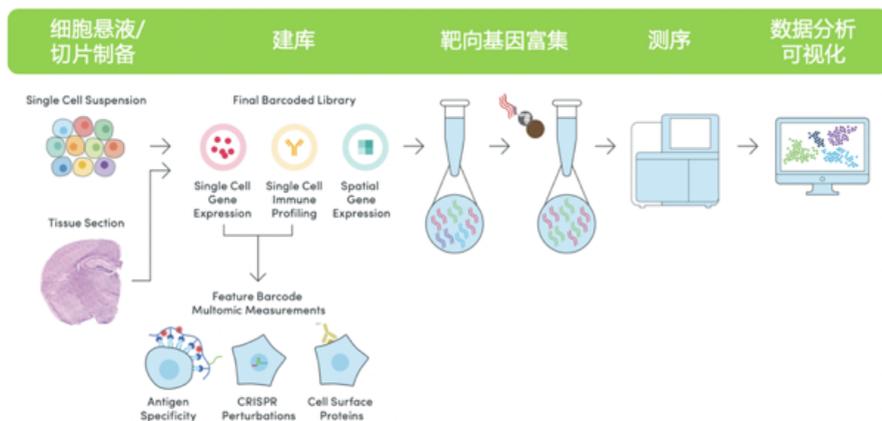


图 71. 单细胞靶向基因检测实验流程

产品优势

提高实验效率	专注靶向基因，数据分析效率大大提高
降低测序成本	相对 WTA 检测，靶向检测的成本可降低 80% 以上
获得信息全面	可获得同一个细胞的全转录组数据和靶向基因检测数据
多产品兼容	单细胞转录组测序、单细胞免疫组库测序、空间转录组测序等多产品兼容
Panel 设计灵活	可检测商业化 panel，也可接受个性化定制 panel
用户友好	个性化 panel 定制软件、数据分析可视化软件方便用户操作

应用方向

- 1 肿瘤异质性与形态学研究
- 2 疾病治疗干预响应
- 3 大规模筛选靶向验证
- 4 肿瘤微环境
- 5 发育与分化研究
- 6 新药研发

博奥晶典单细胞平台支持发文列表

题目	杂志	发表时间	影响因子	关键词
Generation of Blastocyst-like Structures from Mouse Embryonic and Adult Cell Cultures	<i>Cell</i>	2019.10	38.637	单细胞测序, 类囊胚, 发育
A unique population of regulatory T cells in heart potentiates cardiac protection from myocardial infarction	<i>Circulation</i>	2020.10	23.603	单细胞测序, 心肌梗死
Single-Cell RNA-Seq Reveals Dynamic Early Embryonic-like Programs during Chemical Reprogramming	<i>Cell Stem Cell</i>	2018.6	20.86	单细胞测序, 体细胞化学重编程
Single cell transcriptomic architecture and intercellular crosstalk of human intrahepatic cholangiocarcinoma	<i>Journal of Hepatology</i>	2020.6	20.582	单细胞测序, 肝内胆管癌
Tracing the first hematopoietic stem cell generation in human embryo by single-cell RNA sequencing	<i>Cell Research</i>	2019.9	20.507	单细胞测序, 造血干细胞
Transdifferentiation of tumor infiltrating innate lymphoid cells during progression of colorectal cancer	<i>Cell Research</i>	2020.5	20.507	单细胞测序, 结肠直肠癌, ILCs
The Msi1-mTOR pathway drives the pathogenesis of mammary and extramammary Paget's disease	<i>Cell Research</i>	2020.5	20.507	单细胞测序, 派杰氏病
Single-cell landscape of immunological responses in patients with COVID-19	<i>Nature Immunology</i>	2020.8	20.479	单细胞测序, 新冠肺炎, 免疫学研究
Dissecting transcriptional heterogeneity in primary gastric adenocarcinoma by single cell RNA sequencing	<i>GUT</i>	2020.6	19.819	单细胞测序, 胃癌, 图谱
Aortic heterogeneity across segments and under high fat/salt/glucose conditions at the single-cell level	<i>National Science Review</i>	2020.5	16.693	单细胞测序, 主动脉, 心血管疾病
Adaptive immune responses to SARS-CoV-2 infection in severe versus mild individuals	<i>Signal Transduction and Targeted Therapy</i>	2020.08	13.493	单细胞测序, 新冠肺炎, 免疫学研究
A single-cell transcriptomic landscape of primate arterial aging	<i>Nature Communications</i>	2020.5	12.121	单细胞测序, 动脉, 衰老
Single-cell RNA sequencing reveals compartmental remodeling of tumor-infiltrating immune cells induced by anti-CD47 targeting in pancreatic cancer	<i>Journal of Hematology & Oncology</i>	2019.11	11.059	单细胞测序, 胰腺癌, 免疫治疗
Macrophage ABHD5 suppresses NF-κB-dependent matrix metalloproteinase expression and cancer metastasis	<i>Cancer Research</i>	2019.8	9.727	单细胞测序, 肿瘤转移
Pulmonary alveolar type I cell population consists of two distinct subtypes that differ in cell fate	<i>PNAS</i>	2018.2	9.412	单细胞测序, 肺泡发育
A 3D Atlas of Hematopoietic Stem and Progenitor Cell Expansion by Multi-dimensional RNA-Seq Analysis	<i>Cell Reports</i>	2019.4	8.109	单细胞测序, 斑马鱼造血组织
CD24: a marker of granulosa cell subpopulation and a mediator of ovulation	<i>Cell Death and Disease</i>	2019.1	6.304	单细胞测序, 颗粒细胞, 发育
High-dimensional single-cell analysis delineates radiofrequency ablation induced immune microenvironmental remodeling in pancreatic cancer	<i>Cell Death and Disease</i>	2020.7	6.304	单细胞测序, 胰腺癌, 射频消融术
Single-cell RNA sequencing reveals the landscape of early female germ cell development	<i>FASEB Journal</i>	2020.7	4.966	单细胞测序, 卵母细胞, 发育轨迹
Single-Cell Transcriptomes Reveal Characteristic Features of Mouse Hepatocytes with Liver Cholestatic Injury	<i>Cells</i>	2019.9	4.366	单细胞测序, 肝损伤
Increased Connexin36 Phosphorylation in All Amacrine Cell Coupling of the Mouse Myopic Retina	<i>Frontiers in Cellular Neuroscience</i>	2020.5	3.921	单细胞测序, 近视
Identification of diverse cell populations in skeletal muscles and biomarkers for intramuscular fat of chicken by single-cell RNA sequencing	<i>BMC Genomics</i>	2020.11	3.594	单细胞测序, 鸡, 骨骼肌
<i>ARHGAP36</i> regulates proliferation and migration in papillary thyroid carcinoma cells	<i>JME</i>	2020.10	3.562	单细胞测序, 甲状腺癌
Liquid Biopsy-Based Single-Cell Transcriptome Profiling Characterizes Heterogeneity of Disseminated Tumor Cells from Lung Adenocarcinoma	<i>Proteomics</i>	2020.3	3.254	单细胞测序, 肺腺癌, DTCs

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>

