

Principle of Single Cell Sequencing Technology and Its Application in Biomedical Research

Jiao Wang¹ Wei Li²

1. Lanzhou University Second Hospital, Lanzhou, Gansu, 730000, China

2. Gansu University of Traditional Chinese, Lanzhou, Gansu, 730000, China

Abstract

Single-cell sequencing (SCS) is a second-generation sequencing method designed to analyze differences in genetic and protein information between cells, obtain genetic information about microorganisms that are difficult to culture at the single-cell level, and better understand their specific roles in the microenvironment. By sequencing the whole genome, transcriptome and epigenome of individual cells, the complex heterogeneous mechanisms involved in the occurrence and progression of diseases can be revealed, further improving the diagnosis of diseases, prognostic prediction and monitoring of the effects of drug therapy. This review introduces the principle of single cell sequencing and its application in biomedical research, and looks forward to its future development prospects.

Keywords

single cell sequencing; genome; transcriptome; principle; application

单细胞测序技术原理及其在生物医学研究中的应用

王娇¹ 李伟^{2*}

1. 兰州大学第二医院, 中国·甘肃·兰州 730000

2. 甘肃中医药大学, 中国·甘肃·兰州 730000

摘要

单细胞测序 (SCS) 是第二代测序方法, 主要用于分析细胞间遗传和蛋白质信息的差异, 获取单细胞水平难以培养的微生物的遗传信息, 并更好地了解它们在微环境中的具体作用。通过对单个细胞的全基因组、转录组和表观基因组测序, 可以揭示参与疾病发生和发展的复杂的异质机制, 进一步提高疾病的诊断、预后预测和药物治疗效果的监测。这篇综述介绍了单细胞测序技术的原理及其在生物医学研究中的应用, 并展望了未来的发展前景。

关键词

单细胞测序; 基因组; 转录组; 原理; 应用

1 简介

1977年, 弗雷德里克·桑格发明了桑格测序, 因此耗时13年、耗资30亿美元完成的“人类基因组计划”基本上在2003年完成了整个人类基因组的测序^[1]。在我们生命的起点, 一个单细胞受精卵在我们体内发育成37.2万亿个细胞, 22种组织, 但是还存在更多的细胞亚型和细胞状态^[2]。为了获取高分辨率的细胞类型、数量、位置、关系和分子表达信息, 准确描述、定义健康和疾病的细胞组成及状态, 一项具有时代意义的研究——人类细胞图谱 (human cellatlas,

HCA) 计划被提出^[3]。2009年开发了第一个单细胞测序技术 (single-cell sequencing, SCS)^[4], 克服了传统测序的这些缺点。从此, 基于全方位、多层次以及高通量的单细胞测序技术应运而生。近年来, 单细胞组学测序技术已经解决了许多问题, 并给干细胞领域带来了革命性的变化。单细胞测序技术不仅能更加精确地测量细胞内的基因表达水平, 而且能检测到罕见非编码RNA和微量基因表达子^[5]。

2 单细胞测序技术概述

单细胞测序技术主要涉及以下四个步骤: 单细胞分离、核酸扩增、高通量测序和数据分析, 其中单细胞分离和核酸扩增是核心技术。

2.1 单细胞分离

单细胞测序的第一步是从组织样本中分离单个细胞, 以获得合格的单细胞悬液。用于单细胞分离的技术

【作者简介】王娇 (1994-), 女, 中国江苏沭阳人, 本科, 主管护师, 从事脑血管相关疾病的护理研究。

【通讯作者】李伟 (1988-), 男, 中国甘肃兰州人, 硕士, 主治医师, 从事中医药防治肿瘤的基础研究。

方法很多,包括连续稀释、微操作、荧光激活细胞分选 (fluorescence-activated cell sorting, FACS)、免疫磁分离 (IMS)、激光捕获显微切割 (laser capture microdissection, LCM) 和微流控平台 (microfluidics) [6]。这些方法各有优缺点,前市场上较成熟的商业单细胞测序分离方法主要有 10X Genomics 公司的 Chromium (液滴法) 及 BD 公司的 Rhapsody (微孔法),都是集细胞分选、细胞溶解、标记建库于一体的方法 [7]。

2.2 核酸扩增

与传统技术从细胞群体中提取的核酸不同,单个细胞中 DNA 或 RNA 的含量在 pg (单位重量,相当于 $1/1 \times 10^{12}$ g) 的范围内,这远远低于任何测序技术所需的量。因此,通过全基因组扩增 (WGA) 和全转录组扩增 (WTA),高保真、无偏倚地扩增足够拷贝数的 DNA 或 RNA 成为单细胞测序的关键 [8]。

2.3 高通量测序

高通量测序,又称深度测序或下一代测序,是测序技术发展的一个里程碑,这种方法可以同时对数百万个 DNA 分子进行测序,使全面分析物种的转录本和基因组成为可能。单细胞测序主要包括单细胞基因组测序 (DNA 测序)、转录组测序 (RNA 测序) 和表观遗传学测序,揭示细胞在不同阶段的功能和特征的不同方面 [9,10]。基因组测序包括对靶细胞的全基因组序列进行非选择性的、统一的扩增,然后使用外显子捕获技术和高通量测序。转录组测序旨在获得特定器官或组织在一定状态下的几乎所有转录本,特别适合于研究胚胎发育早期高度异质性的干细胞和细胞群体。然而,表观遗传测序可以展示基因调控的不同方面,包括 DNA 甲基化、组蛋白修饰、染色质结合结构、调控蛋白以及染色体空间结构和转录复合体的形成之间的相互作用 [11,12]。

2.4 数据分析

对高通量数据的准确解释是基因测序和精准医学的核心。单细胞测序数据分析的基本过程类似于传统的排序分析。CSC 数据的分析主要有两种方法:一种是通过实验方法或计算机算法对核酸文库进行标准化,以减少扩增偏差;另一种是将密切相关的单细胞测序数据结合在一起进行分析 [13]。混合分析可以显著提高样本的平均覆盖率。同时,SmashCell、VELVET-SC、SPADS 等生物信息学分析软件能够在一定程度上克服覆盖不均的问题,能够高效地完成序列拼接和数据分析,为数据处理提供了极大的便利 [14]。

3 单细胞测序技术应用

单细胞测序技术已应用于胚胎学、免疫学、肿瘤学和微生物学等多个领域。近年来,单细胞测序方法甚至影响到病原微生物检测、传染病诊断、宿主免疫反应评估和抗体筛选等领域 [15,16]。以下部分将主要介绍单细胞测序技术在生物医学领域的应用。

3.1 肿瘤研究领域

单细胞测序技术能发现肿瘤组织内的肿瘤亚群,并进行亚群之间分析探索肿瘤异质性、耐药性等,分析肿瘤形成时间轴及演化过程,绘制肿瘤细胞图谱,完成谱系追踪 [17]。近年来,许多研究发现了与肿瘤发生相关的新的异常基因和细胞亚群,这些基因和细胞亚群对于使用单细胞测序技术进行肿瘤的发展是必不可少的。2016年, Yang 等人在 3 名膀胱癌患者的肿瘤组织中进行了单细胞测序,在肿瘤干细胞 (CSC) 群体中检测到了 6 个与肿瘤发生相关的新基因。他们的结果还表明, ARID1A、GPRC5A 和 MLL2 的突变增加了非肿瘤干细胞的自我更新能力,并促进了肿瘤的发生 [18]。2014年, Ting 等从胰腺癌小鼠模型的 CTCs 和原发病变中分离出单个细胞,他们的结果显示, CTCs 中干细胞相关基因 *Aldh1a2* 和 *Igfbp5* 在上皮-间质界面的转录浓集显著增加,他们还发现,细胞外基质基因在人类和小鼠的 CTC 中都高度表达,后来被证实与胰腺癌的远处转移密切相关 [19]。

3.2 免疫学领域

机体对抗原的免疫反应是相当复杂和异质性的,因此,单细胞测序技术能揭示免疫细胞特异性和功能并研究对应的分子机制,分析免疫细胞亚群和细胞间网络,探索免疫系统作用机制以及差异,发现免疫细胞的潜在功能。例如, Shalek 等人对 18 个树突状细胞进行了测序,以检测内毒素通过针对 5' 端保守区的 RNA 转录机制诱导的免疫反应 [20]。到目前为止,单细胞测序技术已被用于鉴定稀有 T 细胞、分析细胞黏附分子和研究固有淋巴细胞的异质性。Holt 等人通过单细胞测序技术在人类中鉴定出罕见的 CD4+T 细胞。这些研究表明,单细胞测序技术可以揭示免疫细胞的基因表达网络、异质性和随机性表达等遗传信息,为研究免疫性疾病提供更多的治疗选择奠定了理论基础。

3.3 生长发育领域

在哺乳动物早期胚胎发育阶段,细胞太少,无法系统地利用它们的特征,随着单细胞测序技术在临床研究中的应用,可以对细胞进行分类,跟踪器官发育过程并识别发育过程中的特异性细胞谱系标志物。单个胚胎细胞可以通过组成分析或非监督聚类等生物信息学分析准确地分类,这表明植入前胚胎细胞既呈现动态的转录变化,也呈现规律性的转录变化。斯坦福大学的研究小组对一名 40 岁男子的 91 个精子进行了测序,并通过将精子基因组序列与该男子的二倍体细胞基因组序列进行比较,在每个精子细胞中发现了 25~36 个新的单核苷酸突变。通过分析 2-细胞期小鼠胚胎的单细胞转录本,揭示了对高强度光照的综合反应,包括形态变化、长期损伤效应和细胞内损伤修复机制。这些研究结果也可能代表着在生物体水平上理解多效性发育障碍,以及详细研究基因和调控序列在发育中的微妙作用的重要一步。

3.4 病原微生物检测与传染性疾病

病原微生物和宿主细胞的基因组和转录组研究可以通

过单细胞技术在单细胞水平上进行。单细胞测序可以显示未培养微生物的代谢潜力、相互作用和进化状态，这将极大地有助于自然界微生物新物种的鉴定，并推动人类微生物组计划的发展。同时，这种方法很可能检测到未知病原微生物和耐药菌株的出现，并可用于跟踪病原体的耐药性，从而更准确、更及时地诊断传染病。单细胞基因组学方法已被广泛应用于传染病研究领域，用于研究单个细胞的病毒感染动力学、病原体的耐药性和传播痕迹等现象，或检查靶或非靶病原体基因组的回收和鉴定未知病原菌。Combe 等人通过对 90 个水泡性口炎病毒感染的单个细胞的 881 个病毒点进行测序，发现在单个感染单位中确实存在病毒基因组的多个遗传差异。最近，应用包括病毒的单细胞 RNA 测序方法，对 6 名登革热患者和 4 名健康对照患者病程早期的数千个单个外周血单核细胞的转录本进行了分析，并对携带病毒 RNA 的不同白细胞亚型进行了表征，这可能从多方面阐明人类自然登革热感染与任何组织和病毒感染之间的关系，并提出预测严重登革热的候选生物标记物。可见，单细胞测序技术有助于阐明病原微生物与宿主之间的相互作用机制，在未来，将极大地促进传染病的预防和控制。

4 总结和展望

在完成人类基因组计划后，科学家们提出了一项人类细胞图谱计划，旨在完成人体 37 万亿个细胞的绘制。单细胞测序技术可以准确地研究单个细胞，将是这一项目的重要推动力。单细胞测序技术绘制的细胞图谱有助于人们区分不同的细胞类型，并了解细胞之间的关系。人们可以在单细胞水平上进一步了解生理过程和病理机制，以寻找新的诊断标志物或新的治疗靶点，这将为提高该病的诊断和治疗水平提供实践依据。此外，空间分辨转录组学技术将能够表征组织中细胞的空间组织，这可能会彻底改变组织功能和疾病病理学的研究。通过单细胞测序技术可以实现个性化诊疗，及时监测和评估精准医学，加强传染病防控，将在医疗卫生领域取得更加丰硕的成果，并将成为帮助人类治疗疾病和探索生命科学不可或缺的技术。

参考文献

[1] HEDLUND E, DENG Q. Single-cell RNA sequencing: Technical advancements and biological applications [J]. *Mol Aspects Med*, 2018, 59: 36-46.

[2] GAWAD C, KOH W, QUAKE S R. Single-cell genome sequencing: current state of the science [J]. *Nat Rev Genet*, 2016,17(3): 175-188.

[3] REGEV A, TEICHMANN S A, LANDER E S, et al. The Human Cell Atlas [J]. *Elife*, 2017, 55(1): 285-289.

[4] TANG F, BARBACIORU C, WANG Y, et al. mRNA-Seq whole-transcriptome analysis of a single cell [J]. *Nature methods*, 2009, 6(5): 377-382.

[5] PROSERPIO V, LONNBERG T. Single-cell technologies are revolutionizing the approach to rare cells [J]. *Immunol Cell Biol*, 2016, 94(3): 225-229.

[6] CHI K R. Singled out for sequencing [J]. *Nature Methods*, 2014, 11(1): 13-17.

[7] 路大峰,罗正汉,汪春晖.单细胞测序技术原理及其应用研究进展[J].*中华卫生杀虫药械*,2021,27(3):280-284.

[8] YASEN A, AINI A, WANG H, et al. Progress and applications of single-cell sequencing techniques [J]. *Infect Genet Evol*, 2020, 80: 104198.

[9] 刘朋虎,林冬梅,林占熿,等.DNA测序技术及其应用研究进展[J].*福建农业学报*,2012,27(10):1130-1133.

[10] CLARK S J, SMALLWOOD S A, LEE H J, et al. Genome-wide base-resolution mapping of DNA methylation in single cells using single-cell bisulfite sequencing (scBS-seq) [J]. *Nat Protoc*, 2017, 12(3): 534-547.

[11] ZHANG X, MARJANI S L, HU Z, et al. Single-Cell Sequencing for Precise Cancer Research: Progress and Prospects [J]. *Cancer Res*, 2016, 76(6): 1305-1312.

[12] BUENROSTRO J D, WU B, LITZENBURGER U M, et al. Single-cell chromatin accessibility reveals principles of regulatory variation [J]. *Nature*, 2015, 523(7561): 486-490.

[13] BANKEVICH A, NURK S, ANTIPOV D, et al. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing [J]. *J Comput Biol*, 2012, 19(5): 455-477.

[14] OLSON N D, LUND S P, COLMAN R E, et al. Best practices for evaluating single nucleotide variant calling methods for microbial genomics [J]. *Front Genet*, 2015, 6: 235.

[15] BRUNSKILL E W, PARK J S, CHUNG E, et al. Single cell dissection of early kidney development: multilineage priming [J]. *Development*, 2014, 141(15): 3093-2101.

[16] LOVETT M. The applications of single-cell genomics [J]. *Hum Mol Genet*, 2013, 22(R1): R22-26.

[17] 刘慧萍,崔恒,昌晓红.单细胞测序技术在恶性肿瘤研究中的应用进展[J].*中国肿瘤临床*,2020,47(7):365-368.

[18] YU C, YU J, YAO X, et al. Discovery of biclonal origin and a novel oncogene SLC12A5 in colon cancer by single-cell sequencing [J]. *Cell Res*, 2014, 24(6): 701-712.

[19] YANG Z, LI C, FAN Z, et al. Single-cell Sequencing Reveals Variants in ARID1A, GPRC5A and MLL2 Driving Self-renewal of Human Bladder Cancer Stem Cells [J]. *Eur Urol*, 2017, 71(1): 8-12.

[20] Földy C, DARMANIS S, AOTO J, et al. Single-cell RNAseq reveals cell adhesion molecule profiles in electrophysiologically defined neurons [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2016, 113(35): E5222-5231.