

高通量单细胞测序 科研指南

应用篇

High-throughput single-cell sequencing
scientific research guide



以生物科技 成就他人 造福大众

欧易生物发展里程碑

DEVELOPMENT HISTORY

2009年

上海欧易生物医学科技有限公司注册成立

2014年

荣获国家高新技术企业

2016年

成立上海晶准医药子公司, 进入分子诊断领域

2017年

控股上海鹿明生物, 创建全组学服务平台

2019年

加入企业上市培育库

2021年

完成A轮及A+轮过亿元融资

单细胞事业部简介

DEPARTMENT INTRODUCTION

发展历程

2021

3月 成立暨南大学联合实验室
8月 获得 10x Genomics CSP 双认证
11月 引进 Chromium X系统
12月 客户文章突破50篇

2019

8月 首篇客户文章见刊 Immunity
12月 引进 BD Rhapsody™ 系统

2020

1月 成立单细胞事业部
7月 成立北京联合实验室
8月 首例植物叶片高通量单细胞测序文章

2018

7月 单细胞平台筹备
8月 引进10x Genomics平台

单细胞事业部成立于2018年, 现已成为欧易生物最为核心的部门之一。拥有多套10x Genomics和BD Rhapsody™等主流的高通量单细胞分选平台, 是10x Genomics公司授权的单细胞基因表达和空间转录组双平台认证的服务提供商, 在北京、广州等地协同科研院所成立联合实验室。

部门成员50余人, 博士学历5人, 硕士及以上学历人员比例达40%以上; 拥有300m²独立实验室, 可完成样本处理、细胞分选、文库构建和空间转录等实验。

单细胞事业部成立至2021年底, 已完成1000+个项目、8000+例样本的单细胞解离与测序, 参与或协助客户发表50余篇高水平文章。欧易生物单细胞事业部致力于为广大科研工作者提供周到、贴心、专业的技术服务, 专注于以客户的口碑铸就品牌形象。

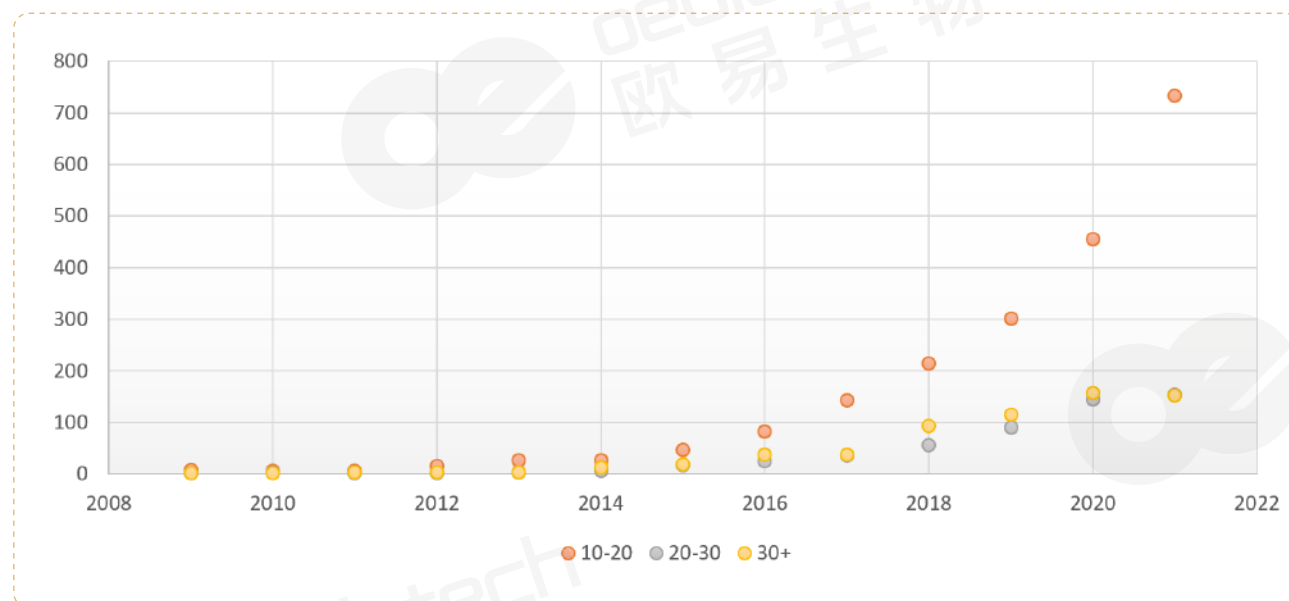
课题想要提升**创新性，**
却不知道自己的**研究方向**怎样和当下的科研热点有机结合

想要全面了解单细胞测序的基础知识，
以及在文章和项目申请中的**应用现状**
相关**单细胞技术**只限于了解，
不知该如何设计课题和文章
自己已经构思好临床问题，却不知**如何结合**单细胞技术

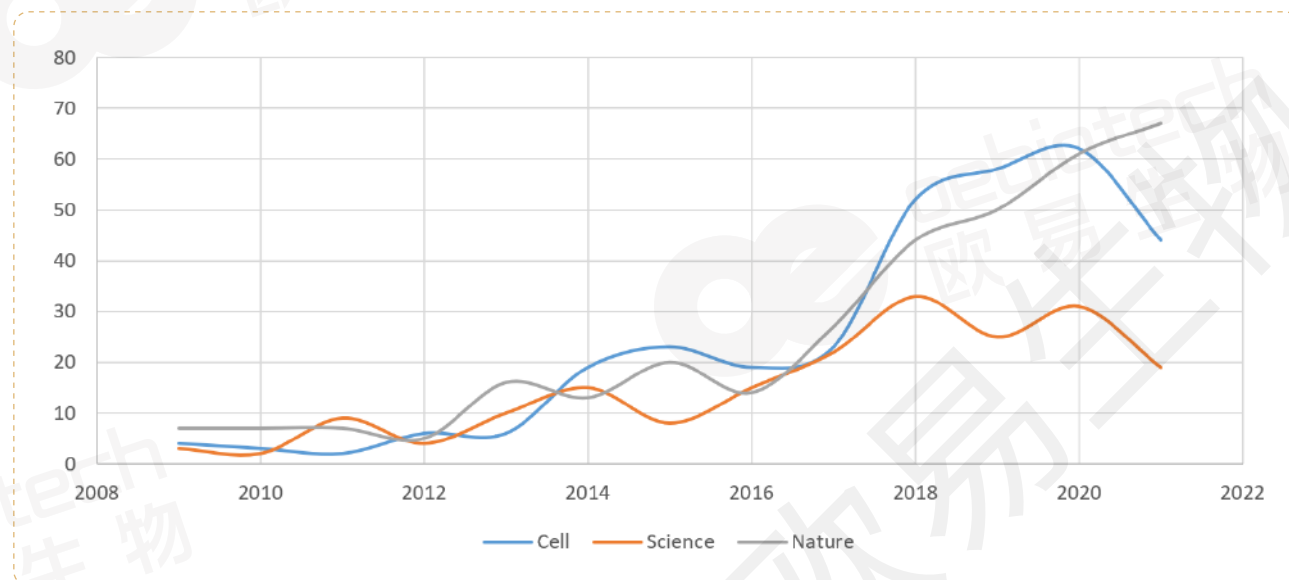
不知道自己的**临床方向**
应该采集何种样本、使用什么品系的细胞
相关单细胞知识**只限于了解**，
不知可以发现和解决什么科学问题？
可以为课题带来哪些帮助？



单细胞转录组历年文章发表情况



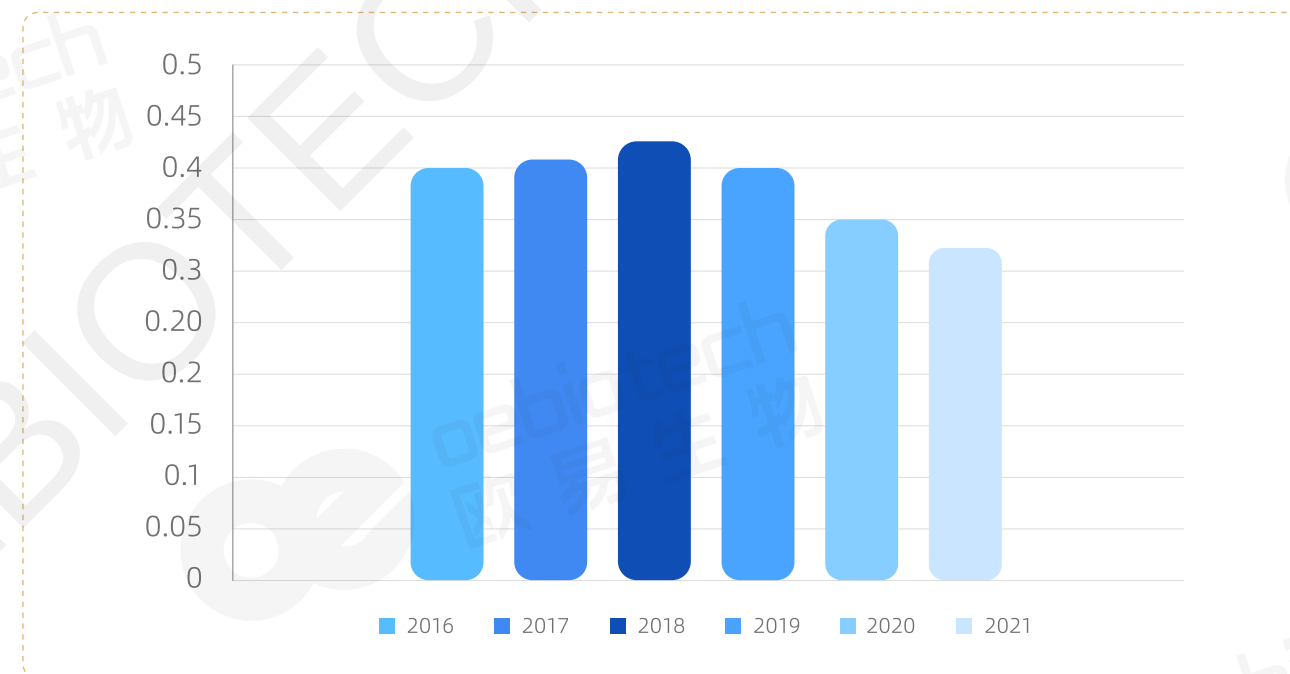
CNS历年单细胞文章数目统计



* PubMed: ("single cell"[Title/Abstract]) & ("Cell | Nature | Science"[Journal])

随着高通量单细胞技术的成熟和应用的普及，
高分文章发表比例逐年递减，单细胞课题设计复杂程度逐渐上升

IF>10文章占比



* PubMed: ("single cell"[Title/Abstract]) & ("RNA"[Title/Abstract])

肾脏类器官 细胞图谱

样本设置: iPSC培养
结果验证: QPCR、免疫荧光

Cell Stem Cell
2018.12

肾脏的时空免疫 细胞图谱

样本设置: 14个成人和6个幼儿
结果验证: 免疫荧光

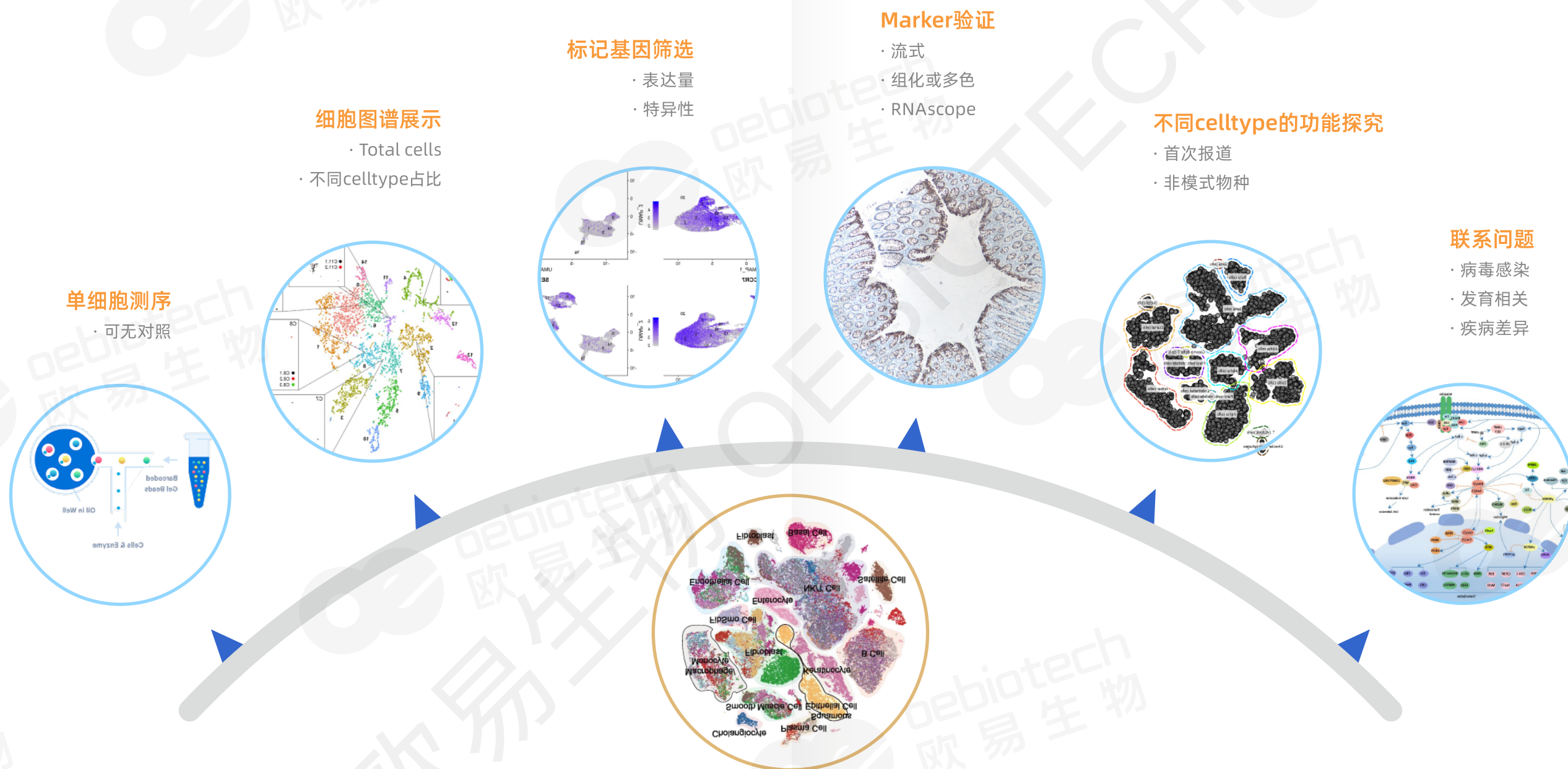
Science
2019.09

肾脏纤维化 细胞图谱

样本设置: CD10阳筛和阴筛
其他组学: BULK ATAC-SEQ
结果验证: 原位RNA杂交、QPCR、类器官敲除模型

Nature
2021.01

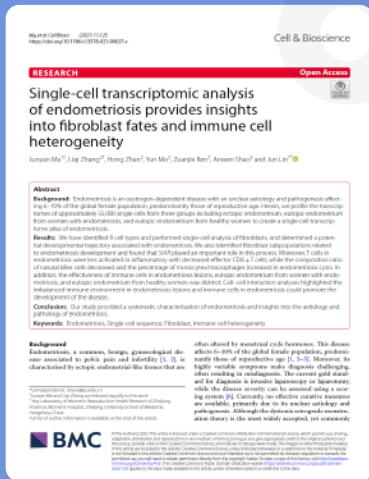
单细胞文章总体思路 - 图谱类型



细胞图谱类型的文章有以下几个点可以关注：

1. 样本本身新颖性：尤其农口来说，目前细胞图谱形式文章依然是比较大的突破口；
2. 医口项目的细胞图谱形式文章无论本身做的是人样本还是模型样本，最好能够和临床疾病关联在一起，比如找到和疾病关联的亚群，突出重点；
3. 关注多物种细胞图谱的一致性：如人鼠细胞亚群的一致性分析；
4. 多组学联合图谱：如ATAC+RNA这种多组学多角度探究细胞图谱。

图谱类型1 (IF < 10) : 子宫内膜异位症的探究



- 期刊: CELL & BIOSCIENCE
- IF: 7.133
- 时间: 2021.07
- 样本类型: 子宫内膜 (在位、异位、正常)
- 样本数量: 每组3例重复, 共9例

HIGHLIGHT

本文针对子宫内膜异位症进行图谱分析, 着重探究了异位症患者中成纤维亚群和免疫亚群的特征, 主要内容总结如下

- 异位症患者与在位正常子宫的成纤维亚群分化命运不同, 并证实STAR的关键作用;
- 异位症患者中CD8+T减少, 导致炎症程度降低;
- 异位症患者NK降低, 单核/巨噬比例增加。

细胞间通讯分析

1. 异位内膜FB产生高验证因子水平高于正常细胞, 配体在M细胞中表达
2. 异位内膜免疫细胞和FB细胞的相互抑制作用
3. 异位内膜中粘附因子, 生长因子和血管生成因子高表达

NK/M的亚型分析

异位内膜的NK亚型主要与白细胞激活和迁移相关
异位内膜中, 伤口愈合/血管生成相关M细胞增加
异位内膜中, 免疫应答相关细胞减少

免疫细胞的分析

- T细胞活性降低
- NK细胞占比明显降低
- M细胞占比明显升高

样本: 子宫内膜

- 异位内膜 n=3
- 在位内膜 n=3
- 正常内膜 n=3

细胞图谱展示

- total cells展示
- 不同celltype占比分析

子宫内膜 异位症探究

成纤维亚型分析

- 在位和正常相似性比较高, 与异位内膜差异很大
- FB亚型拟时序分析, 三组FB具有共同的来源, 但最终命运不同

T亚型的异质性探究

1. CD4+T的拟时序分析
 - CD4亚型的分化具有两种命运
 - 异位内膜占比高的亚型与稳态有关, 说明异位内膜中T细胞激活减少
2. CD8+T的不同命运
 - CD8+T具有三种分析命运 · fate1与异位内膜相关, 指向细胞毒性减弱

图谱类型2 (10 < IF < 20)：成人15个组织器官图谱分析



- 期刊: GENOME BIOLOGY
- IF: 13.583
- 时间: 2020.12
- 样本类型: 15种不同器官
- 样本数量: 1例男性成人供体, 共15例

HIGHLIGHT

- 针对1例男性成人的15个组织器官绘制了单细胞转录图谱;
- 共鉴定252种细胞亚型, 主要细胞类型包括T、B、髓系、上皮细胞和基质细胞, 以及新型COCH+成纤维细胞和FibSmo细胞;
- T细胞和B细胞受体库的比较与轨迹分析揭示了不同组织中具有不同发育状态的T和B细胞的直接克隆共享;
- 新的细胞标记物、转录因子和配体-受体对被认为具有潜在的维持人体细胞在组织间稳态的功能。

细胞间通讯分析

- 骨髓细胞和上皮的互作可能和肿瘤与迁移相关
- stromal与CD8+T的互作, 说明了stromal对T细胞迁移的趋化作用
- 不同组织中各细胞类型的通讯关系, 说明他们存在潜在的信号交流作用

上皮和STROMAL特征分析

- 上皮亚型分析
 - ① 上皮具有34种亚型, 其中19种具有组织异质性
 - ② GO功能分析, 不同亚型执行不同的功能
 - ③ 某些消化器官与非消化器官的上皮更相似, 聚类更紧密
 - ④ 各亚型的转录因子筛选
- stromal亚型分析
 - ① 不同组织器官中EC的表达特征存在差异
 - ② 鉴定FibSmo细胞的存在 (荧光双染)

髓系特征分析

- 不同器官髓系亚型分布特征分析
- 组织巨噬细胞的两种来源分析, 其中胚胎巨噬通过局部扩张参与组织巨噬的分化
- 髓系各细胞转录因子的筛选, 非经典单核细胞和巨噬细胞共享多个激活的TFs, 如TCF7L2、STAT1、KLF3、NR1H3和SPIC等

样本: 15种组织器官

1例男性成人供体

细胞图谱展示

- total cells展示
- 不同celltype在不同器官中的分布存在异同

成人15个 组织器官 图谱分析

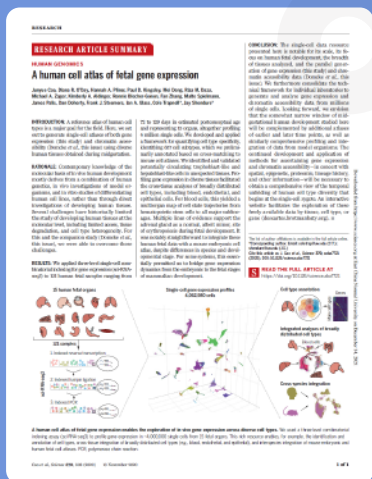
T细胞亚型分析

- CD4+T亚型的发育分析
- CD8+T亚型的发育分析
- TF分析显示, 不同的TF共同调节T细胞的发育所有组织器官中, 与CD4+T相比, CD8+T的克隆型具有广泛的共享和扩增, 但多样性更低
- 所有组织器官中, 与CD4+T相比, CD8+T的克隆型具有广泛的共享和扩增, 但多样性更低

B细胞和浆细胞的特征分析

- 除了食管和直肠, B细胞比浆细胞占优势
- TCL1A作为浆细胞的新marker被筛选
- B细胞和浆细胞的转录活性相似, 但具有不同的表达模式
- B细胞和浆细胞在各器官中的共享较少; 与浆细胞相比, B细胞的过度扩张能力降低

图谱类型3 (IF > 20) : 人类胎儿细胞图谱分析



- 期刊: SCIENCE
- IF: 47.728 · 时间: 2020.11
- 样本类型: 72-129天胎儿的
15种不同器官
- 样本数量: 121例

HIGHLIGHT

本文属于多组学联合分析的内容, 对15种不同胎儿的组织器官进行单细胞转录组和染色质可及性分析, 文章的主要内容包括以下几个方向:

- 鉴定出胎儿的77种细胞类型, 发现54种细胞具有器官特异性, 23种具有共性;
- 血液相关细胞类型的谱系发育分析、鉴定罕见亚群, 并针对特定细胞筛选标志基因;
- 人和小鼠发育谱系的整合分析, 支持人和小鼠保守细胞类型的发育谱系一致性。

人和小鼠发育谱系的整合

1. 人和小鼠谱系发育细胞的整合分析
2. 保守细胞类型标志基因的表达分析等, 支持人和小鼠发育谱系的一致性

血液相关亚型鉴定和谱系发育分析

1. 所有器官的血细胞重聚类, 发现罕见亚群
2. 与肝脏血细胞整合聚类, 发现同种细胞高度重合, 验证聚类结果
3. 共享细胞的标志基因筛选和血细胞占比分析
4. 肾上腺红细胞和巨噬细胞分化特征分析

组织间细胞的整合和未鉴定细胞类型的探究

1. 所有轮廓组织中细胞类型的集成可视化
2. 通过算法匹配、marker基因等, 注释部分细胞亚型

人类胎儿 细胞图谱分析

72-129DAYS 胎儿15种组织器官

15种组织器官的细胞图谱展示

1. 共77种细胞类型
2. 54种具有器官特异性, 23种具有共性

细胞亚型分析

1. 对任何组织中>1000的细胞进行无监督聚类, 得到657个亚型
2. 利用小鼠细胞图谱注释人类细胞亚型, 606亚型被注释

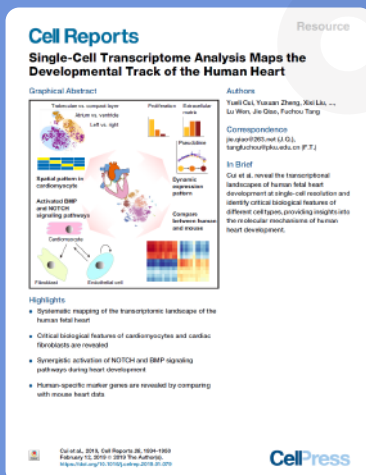
单细胞文章总体思路 - 非图谱类型



非图谱文章课题设计注意事项:

1. 尽管“撞车”要比细胞图谱文章少一些,但是依旧建议需要注意样本创新性,如果是常规模型样本可以加入不同时间点的药物处理,如果是临床样本不仅可以进行疾病组和正常组比较,也可以做不同疾病亚型比较等;如果样本上没法创新,也可以考虑技术创新,如加入空间转录组和空间代谢组这些新技术;2. 文章一定要有落脚点,落脚点就是最大的创新;3. 落脚点的关键在于所需要突出的分子或者细胞群体需要有湿实验验证;4. 临床样本尤其注意样本重复数目的重要性。此外,分析的细胞类型不在多,而在精,避免将文章做成疾病“图谱”。

生长发育类型 (IF < 10) : 人类心脏发育



- 期刊: CELL REPORTS
- IF: 9.423
- 时间: 2019.02
- 样本类型: 3个阶段的心脏胚胎
- 样本数量: 18例

HIGHLIGHT

本文是针对人类胚胎心脏进行的单细胞转录组测序分析, 旨在探究心脏发育过程的特征, 主要的内容包含以下四个部分:

- 人类胎儿心脏转录组景观的系统定位;
- 揭示心肌细胞和心脏成纤维细胞的关键生物学特征;
- 心脏发育过程中NOTCH和BMP信号通路的协同激活;
- 通过与小鼠心脏数据的比较, 揭示了人类特有的标记基因。

人和小鼠胎心表达谱存在显著差异

发育过程中的信号调节

心脏发育受到NOTCH,BMP等信号通路的调控

瓣膜细胞的亚型分析

- 1.Vic亚型
 - 瓣膜间质细胞(vic)具有两种不同表达模式的亚型
 - Vic与凋亡相关, 随着发育过程, 凋亡基因表达增加
- 2.EC亚型
 - EC存在4种亚型
 - EC主要发生在胚胎晚期阶段, 提示瓣膜重构的发生

心脏成纤维亚型分析

- 心脏成纤维存在2种亚型
- 拟时序分析揭示成纤维发育过程的4种基因表达模式
 - G1基因集与横纹肌发育相关
- TF共表达网络和免疫染色验证横纹肌发育过程基因

人类胚胎心脏 的发育探究

实验分组

- 心脏发育早期 (5-7W)
- 心脏发育中期 (9-17W)
- 心脏发育晚期 (20-15W)

图谱分析

- 胚胎心脏的细胞类型鉴定
- 不同celltype的占比情况
- 不同celltype具有不同的表达特征和功能

CMs特征分析

- 心肌细胞具有不同亚型, 不同亚型具有区域特异性
- CM-V, CM-A亚型标志基因的鉴定
- 心房心室发育相关转录因子的鉴定

CM亚型的发育特征

- CM-V, CM-A亚型的发育特征一致
- 发育过程中存在3种基因表达模式, 且功能不同
- ECM过程参与心脏发育
- ECM过程基因的免疫染色验证

致病机制类型 (10 < IF < 20)：免疫检查点阻断对卵巢癌治疗的影响



- 期刊: CANCER RESEARCH
- IF: 12.701
- 时间: 2021.01
- 样本类型: 高级别浆液性卵巢癌及类器官
- 样本数量: 13例

HIGHLIGHT

- 双特异性抗体诱导NK细胞从惰性向更具活性和细胞毒性的表型转变, 暗示NK细胞是目前ICB诱导的HGSC免疫应答中缺失的关键成分;
- 双特异性抗体诱导CD8 T细胞亚群在治疗后从naïve转变为更活跃和细胞毒性祖细胞衰竭表型, 揭示了HGSC中的CD8 T细胞群对ICB反应;
- 通过T/NK状态变化的研究, 找到可能会提高HGSC的疗效的抑制剂BRD1。

体外验证实验

- NK细胞系中, 采用bay299抑制BRD1的表达, 发现染色质可及性发生显著改变
 - Bay299引起了CDK9启动子区域染色质可及性的改变
- Bay299诱导的染色质重塑在体外NK细胞中引起了更强的细胞毒性和活性状态

T亚型轨迹分析和关键基因筛选

- 双特异性抗体处理后, NK和T中的BRD1被显著下调
- BRD1对关键免疫细胞的调控, 与免疫细胞关键TF的改变相关

多种处理方式影响培养类器官的免疫谱系

- 三种ICB治疗后的类器官进行单细胞测序分析
 - 发现各免疫细胞在三种治疗方式之后全部存在, 数量相当
 - 针对治疗后的T亚型进行无监督聚类发现具有15种不同的转录特征
- 双特异性抗体增强了T细胞和NK细胞的细胞毒性, 减少了T细胞的衰竭

PD-1/PD-L1
免疫检查点阻断(ICB)对
卵巢癌治疗的探究

高级别浆液性卵巢癌 (HGSC)

- 抗PD-1抗体处理的类器官
- 抗PD-L1抗体处理的类器官
- PD-1,PD-L1同时处理的类器官

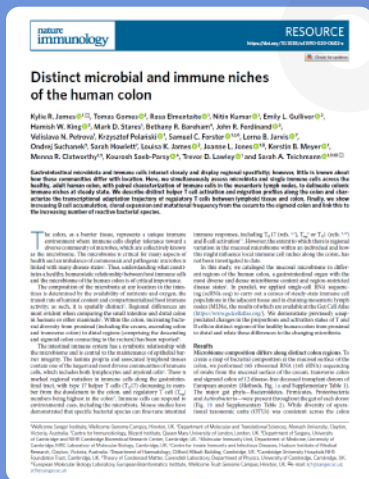
HGSC类器官与其母体肿瘤的免疫微环境类似

- 流式细胞术分析发现类器官与母体免疫细胞占比相似
- 单细胞转录组测序分析发现, 母体和类器官免疫图谱重合性较高

ICB抗体在共培养中可重复诱导IFN γ 的产生

- 与单特异性抗体处理相比, 双特异性抗体诱导最强的IFN γ 产生
- 双特异性抗体具有较强的诱导CD107A+CD8 T细胞和NK细胞的功能

细菌/病毒感染类型 (IF > 20)：微生物群落对免疫微环境的影响



- 期刊: NATURE IMMUNOLOGY
- IF: 25.606
- 时间: 2020.03
- 样本类型: 盲肠、横结肠、乙状结肠、肠系膜淋巴结
- 样本数量: 12例

HIGHLIGHT

通过单细胞scRNA-seq和微生物16S rRNA数据进行结合, 分析了在稳态下肠道内区域适应性免疫细胞组成和功能方面的重要性, 区域适应性免疫细胞的变化与微生物群落组成差异之间具有一致性, 这些免疫细胞和微生物在结肠稳定状态下的区域特异性可能为理解不同肠道趋向性的机制提供了一个方向。

IgA响应乙状结肠中丰富的微生物群落

- 与盲肠和横结肠的细菌相比, 来自乙状结肠的细菌更大比例与IgA结合呈阳性
- 乙状结肠中IgA结合细菌的多样性低于盲肠
- 乙状结肠的IgA+浆细胞对丰富且不均匀的细菌群落有反应
- BCR分析显示MLNs中记忆细胞表达IgA1和IgM, 结肠浆细胞主要表达IgA2
- BCR及重链突变频率分析显示, 与原始卵泡B细胞相比, 这些细胞类型的体细胞突变更多
- BCR克隆扩张分析认为远端结肠比近端结肠的体液免疫反应更为活跃

B细胞的转录调控分析

- 不同结肠的转录图谱分析, 乙状结肠高表达CD27(已验证)
- BCR分析显示MLNs中记忆细胞表达IgA1和IgM, 结肠浆细胞主要表达IgA2
- BCR及重链突变频率分析显示, 与原始卵泡B细胞相比, 这些细胞类型的体细胞突变更多
- BCR克隆扩张分析认为远端结肠比近端结肠的体液免疫反应更为活跃

结肠CD4+Treg的轨迹分析

- MLNs中的Treg细胞亚群主要为中央Treg细胞和效应Treg细胞
- 预测结肠中Treg细胞主要聚集成三个群:
KLRB1+Treg、非淋巴组织Treg细胞、淋巴组织样Treg细胞
- Treg细胞沿MLNs中静息态的中央Treg细胞向结肠中具有高度调节性Treg细胞进行转变, 并发现不同表达模式的关键基因

单细胞联合16S测序解析人结肠免疫微环境差异

实验分组

- 盲肠 · 横结肠 · 乙状结肠 · 肠系膜淋巴结

结肠粘膜表面微生物组成分析

- 杆菌、厚壁菌、变形菌和放线菌遍布每个供体的肠道
- 乙状结肠中类杆菌更为普遍
- 大肠杆菌和志贺菌在远端结肠中更为丰富

肠系膜淋巴结 (MLNs) 及结肠组织免疫细胞图谱绘制

- 鉴定到25种免疫细胞类群
- 发现T细胞和B细胞的活化和记忆状态在结肠和MLNs之间存在显著差异
- TH17细胞主要存在于盲肠中, 其次为横结肠、乙状结肠, TH1细胞则相反

结肠不同区域Th细胞的转录异质性

- 三种结肠组织CD4+效应T细胞亚型之间具有转录相似性, 而MLNs与周围组织的差异则较大
- 三种结肠组织中的近端结肠CD4+效应T细胞中TANK分子高表达, 而乙状结肠中KLF2高表达
- TCR分析显示, TH1和TH17亚型之间共享克隆群

全国巡回讲座

线上 & 线下火热开展中

4 +

4余年深耕积累，
打造一流单细胞科研服务能力

50 +

50余篇客户文章产出，
体现一流单细胞科研服务水平

8000 +

超8000例样本处理经验，
提供一流单细胞科研服务保障