



## 2020年单细胞行研报告





# 报告说明

## 报告宗旨

面向专业人士免费传播，推动单细胞技术科学普及和推广、转化应用及创新创业的专业行研报告。

## 面向对象

对单细胞有一定基础了解的政策制定者、临床医生、创业者和投资者、科研工作者（器械耗材、实验设计、生物信息、新药研发等）、跨界人士以及其他对单细胞技术和转化应用有浓厚兴趣的专业人士。

## 内容范围

内容上，围绕单细胞市场背景、技术、应用及产业分析展开（考虑篇幅，除特别说明，检测方面以测序为主、质谱为辅展开）。时间上，基于近年的信息梳理、归纳和预测，立足于 2019-2020 年，展望未来 3 年发展趋势。地理上，以中国大陆地区的市场范围为主，对照全球的市场环境和产业格局综合分析。

## 更多需求

基于“使连接产生价值，用数据看见未来”的理念，我们尽可能严谨、客观、细致地进行收集信息和分析，信息源于基因慧旗下 GeneMail 资讯、《大咖论健》、产业大数据平台 YourMap、专家顾问、市场调研及联合撰写团队提供的信息等合规素材。但由于行业特殊性和信息披露的时效性等因素，内容难免存在不足，信息颗粒度可能无法满足所有场景，如有错漏，欢迎您向我们反馈；如需了解更多范围和更细颗粒度内容，请联络我们定制行研报告。

## 法律声明

本报告由北京基因界科技信息咨询有限公司（以下简称“基因慧”）联合合作方研究的成果，旨在推动单细胞科技普及、转化应用和创新创业。本报告版权归基因慧所有。未经基因慧的书面授权，任何机构、个人不得以任何形式使用、复制和传播本报告的任何部分用于商业目的。学术研究和引用时请注明来自基因慧。

基因慧未受聘于任何企业从事此报告研究。本报告不得解释为基因慧专业的医疗决策、产业咨询及投融资等意见，亦不得解释为基因慧对个别产品、机构前景的观点。读者接收本报告即视为同意以下声明：任何机构或个人在引用本报告信息时，须对本报告的数据和结果进行独立调查和判断；由于信息时效性，基因慧对本报告所含信息的准确性或完整性不作任何担保或保证，且明确声明对任何机构和个人不承担基于本报告决策而产生的任何责任。

# 目录



## 第一部分 背景 12

### 第一章 行业环境 13

- 1.1 技术背景 13
- 1.2 政策环境 21
- 1.3 市场背景 23

## 第二部分 技术应用 27

### 第二章 单细胞应用 28

- 2.1 肿瘤 28
- 2.2 生殖健康 32
- 2.3 免疫性疾病 35
- 2.4 干细胞生物学 37
- 2.5 神经生物学及发育 39
- 2.6 宏基因组学及微生态 42
- 2.7 新药研发 43

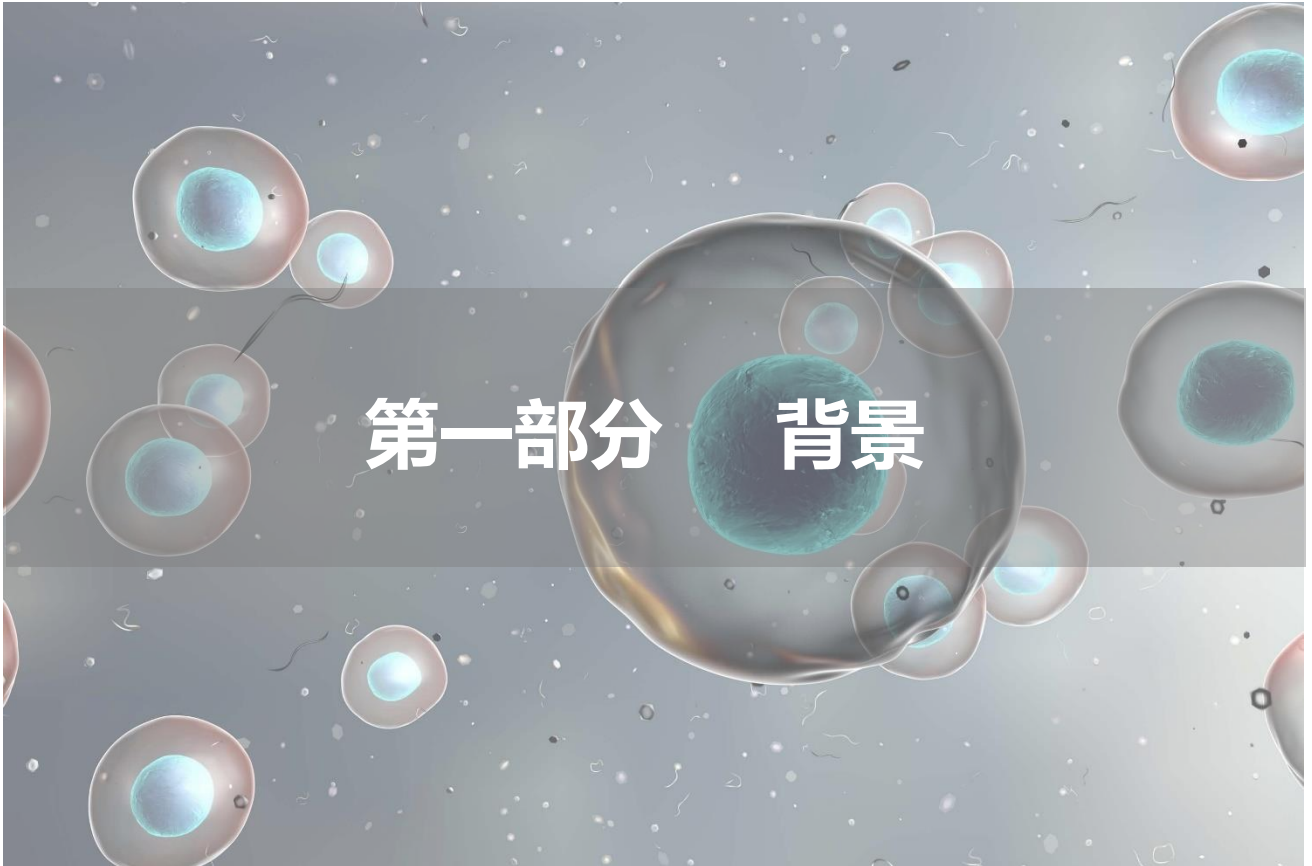
### 第三章 单细胞测序技术及流程 45

- 3.1 单细胞悬液制备 45
- 3.2 单细胞分选和文库制备 45
- 3.3 单细胞高通量测序 54
- 3.4 生物信息分析和数据解读 54

### 第四章 其它单细胞技术 60

- 4.1 质谱流式细胞技术 60
- 4.2 单细胞多组学技术 65
- 4.3 多重原位分析及其他空间技术 68
- 4.4 细胞系谱测定 71

<b>第三部分 产业及投融资</b>	<b>73</b>
<b>第五章 产业图谱</b>	<b>74</b>
5.1 单细胞产业图谱	74
5.2 产业链及代表企业	75
5.3 未满足的需求	83
<b>第六章 投融资</b>	<b>85</b>
6.1 海外单细胞投融资案例分析	85
6.2 我国单细胞投融资分析	86
6.3 单细胞投资趋势	87
<b>第四部分 现状及展望</b>	<b>89</b>
<b>第七章 重难点分析</b>	<b>90</b>
<b>第八章 发展及展望</b>	<b>92</b>



## 第一章 行业环境

### 1.1 技术背景

细胞是生物体结构和功能的基本组成单位。单细胞研究能够从更高分辨率和时空结构上解码生命。从 300 多年前直观的形态观测、10 年前组学研究到近三年的高通量检测，单细胞相关技术正加速基础研究转化应用。2013-2020 年，单细胞测序技术多次被 Science、Nature 等学术期刊评价为年度重点技术，正引领新一轮生物医学领域的技术革命。

#### （一）单细胞研究发展历程

继“人类基因组计划”之后，群体基因组和个体基因组得到了前所未有的发展，但在细胞层面，相同基因组的同类型细胞、癌细胞及癌旁细胞的异质性和微环境等科学问题仍然无法回答。每种细胞类型不同的谱系、发育阶段、独特的功能，决定着细胞对其他细胞和微环境不同的应答，从而对组织和器官产生不同的影响。

传统的测序研究，获得的是细胞群体的总体平均特征，因此，在数量上占据优势的细胞群的特征更容易外显，而那些数量稀少的细胞所蕴含的低丰度特征往往会被淹没在浩瀚的强势信号中。俗话说，真理往往掌握在少数人手里，那么如何能让高价值的“少数派报告”走进研究者的视野呢？分离单个细胞进行研究，就能够以更高的分辨率揭示细胞间的差异及其在微环境中的功能情况。

2017 年 10 月“人类细胞图谱计划（Human Cell Atlas, HCA）”正式公布，致力于描述一个健康人体的所有人类细胞的参考图谱，是高通量单细胞研究产业化的里程碑。我们对细胞领域的研究，从“显微观测细胞的直观形态结构”到“分析细胞的基因和蛋白表达来描述细胞特征”，从“群体细胞总体特征研究”到“单个细胞异质性研究”，从“单细胞转录组”到“单细胞多组学”再到“时间序列和空间位置信息”，单细胞分析技术的应用已经渗透到了肿瘤免疫、生殖健康和感染性疾病干预等诸多领域。10 年来，基于单细胞的研究和分析技术突飞猛进。

#### 阶段 1：显微观测

1665 年显微镜发明，通过显微成像，人们可直观地观察到细胞的形态结构特征，还可通过 HE 染色、免疫组化及免疫荧光等常用的显色方法观察感兴趣的目标对象。但显微观测可观察的细胞数量比较有限（细胞通量低），通常为几个到几十个，且仅仅只能观察到由个别基因表达所驱动的特异性细胞表型特征（靶标多重性低）。



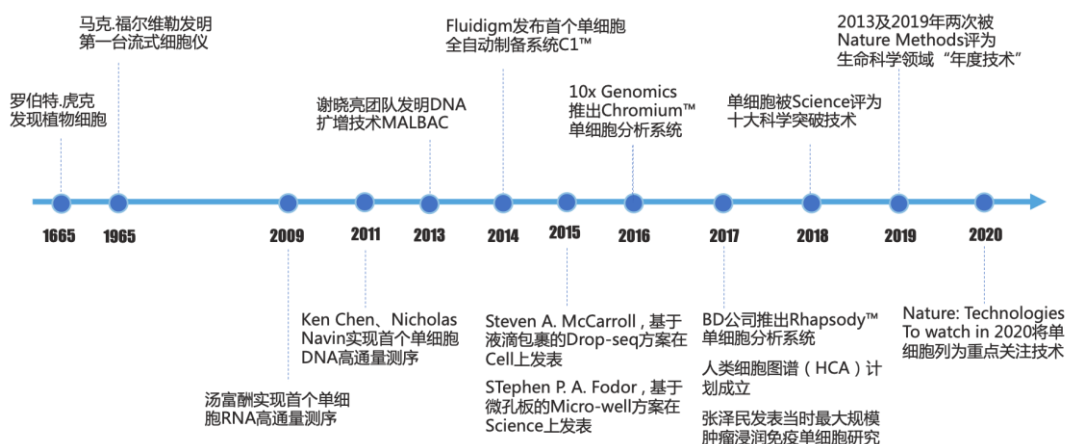


图 1-1 单细胞研究发展重大历程

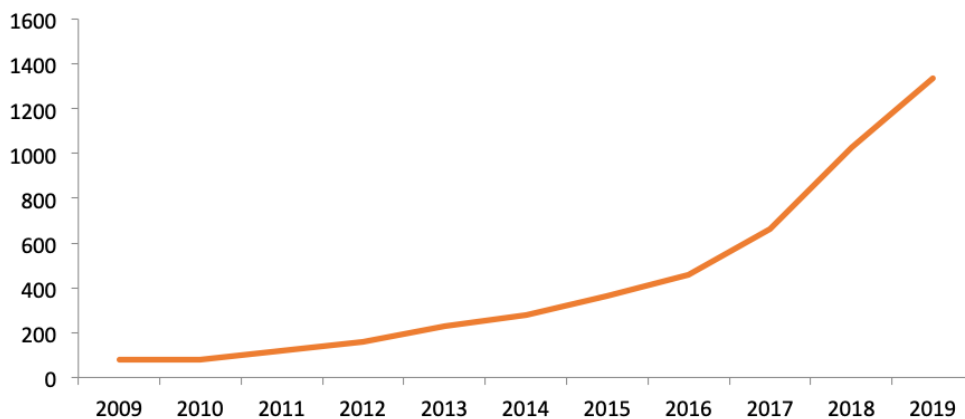


图 1-2 单细胞研究文献发表数量增长趋势（2009-2019）

## 阶段 2：流式细胞术分析

1965 年流式细胞术诞生，借助流式细胞术，可在细胞分子水平上通过单克隆抗体对单个细胞进行多参数的定量分析来描述细胞特征，可以高速分析上万个细胞（细胞通量高），并能同时从一个细胞中测得多个参数（多重性有所提高，但参数类型比较局限在群体特征，且重数有限），实现了大量细胞的多参数分选。

## 阶段 3：低通量单细胞转录组分析

2009 年，北京大学汤富酬教授发表了首个单细胞痕量 mRNA 建库测序方案，通过设计单个细胞的捕获、裂解、mRNA 富集建库和 NGS 测序等流程，实现了单细胞水平的全基因表达测序（多重性高）。但受细胞分离技术和高昂成本所限，该方案只能检测少量细胞的单细胞基因表达（细胞通量低），故适合

稀有细胞的研究，如生殖细胞、神经细胞、循环肿瘤细胞（CTC）等。

#### 阶段 4：高通量单细胞转录组分析

2015 年，Steven A. McCarroll 等研究者在 Cell 上发表了基于微滴包裹单细胞和捕获磁珠技术（磁珠上富含寡核苷酸细胞识别标签和捕获 mRNA 序列的 polyT 结构）的 Drop-Seq 方案，标志着单细胞转录组测序进入高通量时代，单个细胞的 mRNA 建库成本大幅降低，使得大规模的单细胞研究成为可能，研究者的热情达到了前所未有的高度；同年，Stephen P. A. Fodor 等研究者在 Science 上发表了基于微孔板分散和分隔单细胞及捕获磁珠技术的 Cyto-Seq 方案，实现了高通量的单细胞转录组建库和测序。这两种方案整合了基于微滴或微孔的单细胞捕获、建库及高通量测序，实现了对大量细胞（细胞通量高）的全基因表达分析（多重性高），后来也分别被商业化，形成了目前市场上单细胞研究技术的两大领导品牌，10x Genomics 和 BD Rhapsody。

#### 阶段 5：空间转录组分析

高通量单细胞转录组测序虽然将分析的分辨率提高到了单细胞水平，但由于经历了组织消化和单细胞悬液制备等实验流程，细胞的原始空间位置无法被追踪，而空间维度的信息往往在研究疾病病理学和细胞互相作用等问题时非常有价值，这就进一步催生了对技术创新的需求。

2019 年，10x Genomics 公司推出了创新的 Visium 空间转录组测序解决方案，旨在研究空间解析的全转录组 mRNA 表达，不仅可从组织切片中获取细胞的转录组信息，而且可进一步测得其转录本所在的位置信息，开启了一个全新的阶段。

空间分析技术同样经历了从低通量到高通量的进化。早期，研究者通过激光捕获显微切割技术（LCM）可从目标组织切片上的特定位置捕获单个或多个细胞，再进行转录组测序即可实现空间单细胞转录组测序。但这种方法单次检测的细胞数量非常有限（细胞通量低）且成本高昂，还不可避免的会对细胞造成一定的损伤，因而应用有局限性。随着 10x Genomics Visium 空间分析技术的面世，高通量的空间转录组分析技术逐渐走向了成熟，可一次性原位检测整张切片上所有细胞的基因表达。不过，Visium 也并非十全十美，由于其芯片上位置标签覆盖密度的局限性，造成测得的转录本定位信息无法精确到单细胞水平——即邻近细胞的不同转录本可能共享了相同的位置信息——因此定位分辨率还比较模糊，亟待未来的技术进步去解决。

#### 阶段 6：单细胞多组学分析

在单细胞转录组测序技术快速发展的同时，单细胞多组学分析技术也在迅猛发展。单一组学研究的片面性在于只检测基因调控网络中的局部，而无法准确推测其复杂的全局风险。因此，在一次实验中，同时对单细胞内的两种或两种以上的分子进行联合检测，就能够提供更全面、更完整的分析视角，适

合复杂调控网络的研究。2020年1月份，加州大学圣地亚哥分校任兵教授应邀在 Nature Methods 上发表了年度专栏文章《Single-cell multimodal omics: the power of many》，综述了单细胞多组学实验技术的发展。BD Biosciences 的 scWTA/Target panel+Abseq 作为最早单细胞多组学概念的组合进入市场。

目前，单细胞多组学检测已涵盖转录组、基因组、表观组、免疫组、蛋白组等多个组学水平，从检测通量和分析质量的角度，可分为两大类：

第一类是低通量高质量分析，例如在单细胞水平进行 DNA-RNA、DNA 甲基化-RNA、核小体定位-DNA 甲基化-RNA、开放染色质-RNA 以及 DNA 甲基化-3D 染色质高级结构等联合检测。这些技术能够从单个细胞中获取较高覆盖度及准确度的多组学信息，但有通量低和成本高的缺点，故适用于获取难度较大的珍贵样品的高质量分析。

第二类是高通量低质量分析，例如小向导 RNA (sgRNA) -RNA、细胞表面蛋白-RNA 以及开放染色质-RNA 联合检测等。这些方法主要适用于针对异质性较高的组织样品进行大规模单细胞分析，具有通量高、单个细胞平均成本低等优势，但相比第一类方法具有数据基因组覆盖度低的缺点。目前，高通量单细胞多组学分析普遍面临基因组覆盖度较低的问题，并且缺乏能够同时检测组蛋白修饰和 RNA 表达量，以及同时检测转录组和蛋白组的技术，解决这些问题需要进一步的方法优化以及新技术开发。此外，若在单细胞表观组测序的同时能保留每个细胞的空间分布信息，则可为研究异质性组织中细胞类型特异性基因调控网络提供全新的角度。

研究阶段	检测的细胞数量	检测内容	局限性
显微镜观测分析	少量细胞	显微镜下细胞的形态结构特征	观察的细胞数量有限
流式细胞术分析	大量细胞	大量细胞的群体特征分选；定性定量测量细胞特征	属于细胞群体特征
低通量单细胞转录组分析	少量单细胞	单个细胞的基因表达信息	统计学意义小，一次只能检测一个细胞，且单个细胞的检测成本较高
高通量单细胞转录组分析	大量单细胞	大量单个细胞的基因表达信息	缺乏空间信息，基因组覆盖度较低（非全长转录本检测）
空间转录组分析	根据方法不同有差异	组织原位的基因表达信息	高通量空间转录组测序的位置分辨率尚不能精确到单细胞水平，且多组学整合仍有挑战

单细胞多组学分析	大量单细胞	大量单个细胞的多组学信息	高通量单细胞多组学分析的基因组覆盖度较低（非全长转录本检测）；某些组学信息无法和其它组学信息同时获取
----------	-------	--------------	--

表 1-1 单细胞研究不同阶段对比

## （二）单细胞测序技术简介

单细胞测序是在单个细胞水平对细胞的基因表达等信息进行检测。与传统测序不同，我们需要先将实体组织或体液中的细胞群分离成单个细胞，再通过对提取的 DNA 或 RNA 进行一定倍数的扩增使其达到现有测序技术的最低检测水平，用于基因组和转录组测序，或直接对单个细胞进行表观遗传学测序，从而检测出细胞的异质性等关键信息。而传统的测序则是在群体细胞水平上进行的，最终得到的测序信号值其实是多细胞的平均水平，故而丢失了异质性的信息。

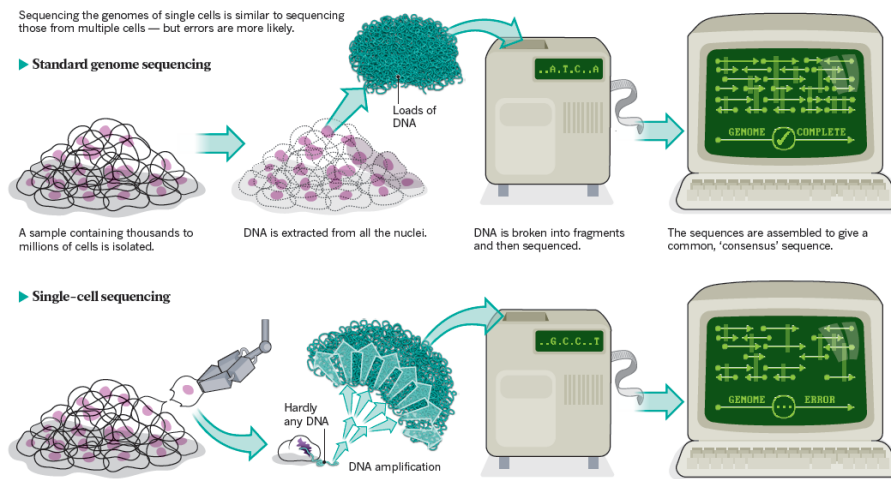


图 1-3 单细胞测序与传统测序方法的区别（来源/Nature）

目前主要有两种策略来实现单细胞测序。

第一种是将单个细胞分离出来，并独立构建测序文库，最终进行测序，可以通过流式细胞术（含微流体芯片）、或者激光捕获显微切割（LCM）来实现。流式细胞术主要运用于细胞样品，激光捕获显微切割技术主要应用于组织切片样品。不过，将单细胞挨个分离出来再分别建库测序，通量非常低，成本也非常高。尤其随着研究的深入，待测单细胞的个数增长迅速，测序成本几乎呈线性提升，限制了这种方法的大规模应用。

为了克服这个困难，出现了第二种策略：基于标签（Barcode）的单细胞识别。其核心思想是，给每个细胞加上独一无二的标签序列，在测序的时候，把携带相同 Barcode 的序列视为来自同一个细胞。

这种策略通过一次建库，可以测得上千个单细胞的信息。例如，对于转录组测序来说，由于 mRNA 测序前需要做逆转录，那么只需要在 poly T 引物的 5' 端加入 Barcode(图 1-4)；将单细胞悬液样品和带有 Barcode 的水凝胶珠子，通过微流体芯片，包裹在一个微滴之中；在微滴中进行逆转录反应后，每一个单细胞的 cDNA 文库带上了独一无二的 Barcode（蓝色部分）；最后，将所有单细胞 cDNA 文库混在一起进行文库构建和测序，再通过数据分析，识别 Barcode，区分来自特定单细胞的 mRNA 序列。

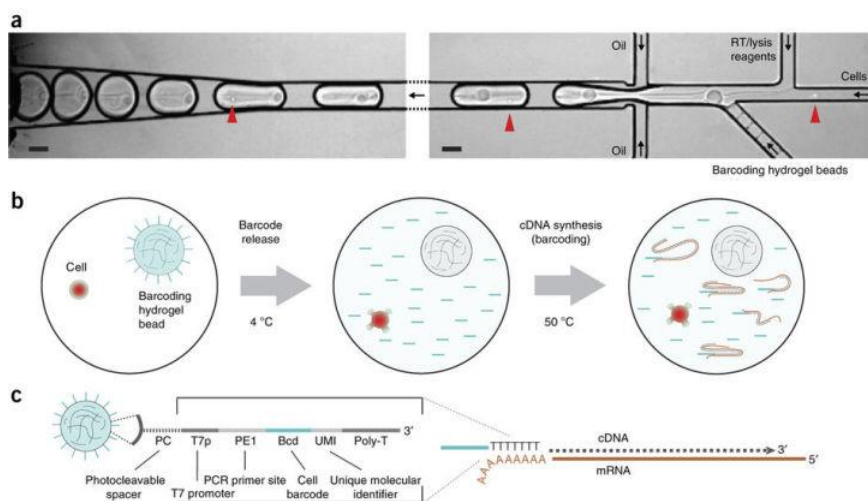


图 1-4 单细胞转录组测序原理示意（来源/Nature Protocols）

单细胞测序的实验流程主要包括单细胞悬液制备、单细胞/单细胞核制备、分选和文库制备、测序和生信分析等部分。每一部分的具体细节将在后文技术部分进行详细阐述。

自 2009 年单细胞转录组测序技术问世以来，单细胞高通量测序技术发展迅速，部分人工操作已被自动化工作站所取代，研究范围也从单一的转录组扩展到转录组与基因组、表观组和蛋白组整合的多组学水平。

### （三）单细胞测序技术难点

#### 高成本

单细胞测序的实验流程较为复杂，且产业链上游的设备和试剂厂商比较集中，形成了较强的议价能力，因此给下游服务商、应用开发商和终端用户都造成了一定的成本压力。高成本导致单细胞技术无法被大规模使用。例如对于由大量细胞组成的组织，成本限制会使研究者牺牲样品的完整性，妥协次要的技术参数，故而一定程度上会影响研究的质量，难以得到全面的、高质量的精细细胞图谱；而对于稀有细胞的检测也同样面临着单个细胞的研究成本过高的问题，难以放大研究规模。

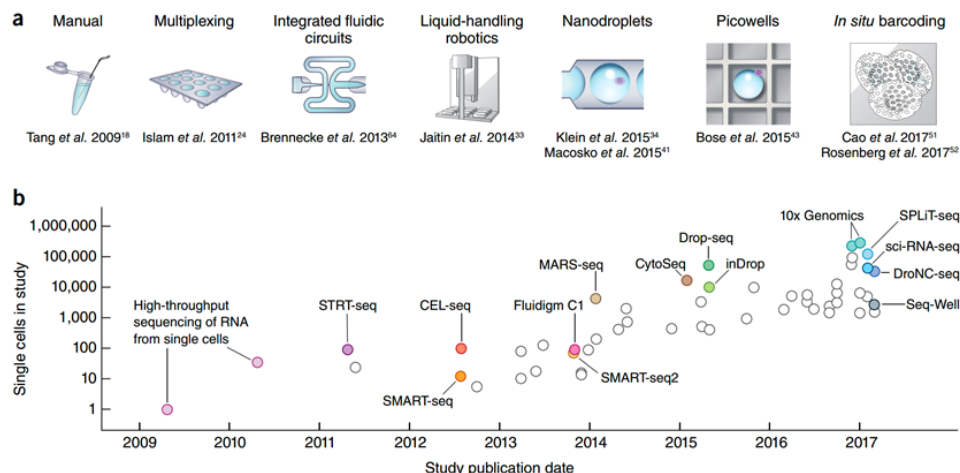


图 1-5 单细胞转录组测序发展历程（来源/Nature protocols 2018, 13:599）

图 a：代表性的细胞分离技术与操作条件

图 b：不同时间出现的代表性技术的细胞通量

## 设备依赖和时效性

单细胞测序技术在转化应用上的难点主要体现设备依赖和时效性的矛盾上。一方面，单细胞的捕获和建库流程完全依赖特定设备导致单细胞建库门槛较高，并最终体现在成本上。另一方面，单细胞测序对样品的细胞活性和数量都有着比较高的要求，需要样品离体时间不能过长，有一定的新鲜度，且不能冷冻保藏，如此对样品处理的时效性提出了极高的挑战。在中心化检测模式下，虽然大规模集中检测可以均摊仪器和试剂的成本，但对样品的新鲜保存和快速寄送提出了很高的要求；而在去中心化的终端检测模式下，虽然样品的细胞活性和数量得到了保障，但高昂的仪器和试剂采购成本往往会让研究者望而却步。

## 自动化工作流程

传统的单细胞检测方法主要是通过组装的开放式系统来生产数据，即通过微流控系统、试剂盒，各种技术模块组合起来生产数据。目前，国内大多数服务商和应用开发商均以这种方式主自建产品、流程或提供服务。相比之下，BD、10x Genomics 等公司推出的一体机，不仅操作简单，容易学习，还能减少人为操作带来的潜在错误和偏差，因而市场占有率较高。显然，对于实验流程不熟悉、技能和经验都比较缺乏的终端用户，易于操作的一体化仪器自然显得更为友好。

## 细胞分离和捕获效率

细胞分离过程要尽可能地保持细胞活性，减少对细胞转录组的影响，从而确保实验的成功率和数据的高质量。目前，市场上现有设备的细胞捕获效率还参差不齐，很多设备的捕获效率还有待提高，初

始细胞数量要求还需降低，从而提高检测的有效率和灵敏度等，这对于诸如肿瘤穿刺样品在内的许多珍贵样本都尤为重要。

## 生物信息学分析

目前常用的标准生信分析流程能对单细胞转录组测序的数据进行基础的分析，但还无法胜任细胞时序发育推断、细胞间相互作用预测、以及多种单细胞技术联合分析及内涵挖掘等复杂的分析工作，导致不少单细胞研究还停留在基础的数据堆砌阶段。此外，许多创新的、突破性的研究往往需要根据研究目的进行专门的算法设计和优化，这就需要大量的高素质生信人才的投入，但遗憾的是，目前这样的高端人才资源在市场上还非常缺乏。

### （四）单细胞测序技术发展趋势

综上所述，单细胞测序技术未来或将往更低的成本和样品要求，更高的通量、精度、准确度和基因组覆盖度，更精简的流程和自动化，以及更多的组学联合分析（包括时空维度整合）的方向发展。

横向上，整合目前较为成熟的转录组与其他组学技术，可在同一个细胞上实现转录组、基因组、表观组、蛋白组等多组学的全面检测。此外，通过与原位捕获、荧光标记和显微切割等平台技术的结合，可实现对一块组织中所有细胞的空间属性和相互作用的测定。

纵向上，将多组学及空间组学与时序分析相结合，可实现时空维度上的单细胞多组学研究。

实验技术上，珍贵的人体冻存组织样本、很难制备成高质量单细胞悬液的组织样本、或单细胞体积大小超过了设备微滴或微孔限制的样本都无法成功进行建库，主要的原因包含细胞的活性达不到上机的要求，或者部分仪器硬件参数的局限性造成了细胞捕获效率的大幅下降。为了降低单细胞测序对样品活性的要求和技术平台的局限性，目前已有企业开发了单细胞核测序技术，通过机械方法抽提和分离细胞核进行建库和测序，成功绕过了单细胞悬液制备过程中高损耗的酶解消化等实验步骤，有效提高了实验的容错性。

数据分析上，单细胞测序相比传统测序产生的数据量更为庞大复杂，并且测序深度还将继续提升，对数据分析的需求也会与日俱增。目前，单细胞大数据的存储、处理和挖掘方面的挑战均已成为制约单细胞领域发展的瓶颈，市场亟待标准化、自动化和智能化的单细胞分析软件的开发，目前已有一些企业在这方面取得了不错的进展。此外，深度学习等人工智能算法也被逐渐应用到单细胞分析领域，并取得不错的成果。例如 2019 年 10 月，Nature 子刊上发表了清华大学张强锋课题组的研究成果，他们利用人工智能深度学习的方法将分析问题从复杂稀疏的高维染色质开放图谱空间投射到了简单抽象

的低维特征空间，提升了分析效率。随着单细胞分析软件的成熟和人工智能算法的引入，单细胞测序技术必将加速新药研发和精准诊疗的进程。例如，北京大学张泽民教授团队通过单细胞转录组测序及分析，与药企合作刻画肿瘤免疫图谱和微环境，为潜在的免疫治疗策略及其作用机理提供线索和证据，提高了新药研发效率，这些工作均已在 Cell 和 Nature 等多个权威期刊上发表。

## 1.2 政策环境

自 2009 年起，单细胞测序技术获得了高速发展，期间突破性的技术层出不穷，大多数技术突破及商业化应用都先在国外实现。其中，又以北美地区发展最为领先，这得益于美国国立卫生研究院 (NIH) 及美国国家研究基金 (NSF) 政策上和经济上的支持。过去的十几年，NIH 和 NSF 对该领域投入了大量资金，社会资金亦提供了一定支持。据统计，NIH 自 2008 年开始加大单细胞领域投入，在 2017 年单年投入开始超过 1 亿美元，截止 2019 年累计投入接近（不完全统计）16 亿美金。

时间	重要事件列举
2012 年	单细胞分析计划 (SCAP) 总体目标是加快跨领域创新方法的发现，开发和翻译，以分析生物相关的原位细胞群体的异质性，在 2012 年至 2017 年得到了 NIH 基金的支持；
2016 年	扎克伯格夫妇成立的基金会 Chan Zuckerberg Initiative (CZI) 宣布将在未来十年内投入 30 亿美元资助推动基础科学研究，其中包括“人类细胞图谱计划” (the Human Cell Atlas)；
2019 年	NIH 成立人类生物分子图谱计划 (HuBMAP)，未来 7 年开发一个可广泛获取的框架，以通过支持技术开发、数据采集和详细的空间制图，以单细胞分辨率全面地绘制人体图谱。

表 1-2 单细胞领域的重要事件举例

我国在单细胞研究领域的投入起步较晚。2016 年，国家重点研发项目“精准医学研究”明确提出单细胞组学技术的研发以及在重大及罕见疾病临床研究和治疗中的应用。尽管如此，我国科学家仍在该领域取得了系列成绩，包括在关键技术、行业影响力及产业化中。例如，汤富酬教授在 2009 年发表知名的单细胞 RNA-Seq 测序分析成果，单细胞专家张泽民教授教授入选 Cell 学术顾问委员会成员，近三四年国内开始出现涌现一批拥有自主知识产权的新兴单细胞技术公司。

时间	重要事件列举
2009 年	汤富酬发表了首个单个细胞的痕量 RNA 建库测序方案
2012 年	北京大学谢晓亮教授团队发明了单细胞扩增技术 MALBAC



2014 年	首个“MALBAC 婴儿”在北医三院诞生。截止 2020 年国内超过一千对夫妇成功地避免了单基因遗传疾病的后代传递
2017 年	“人类细胞图谱计划” 首批拟资助的 38 个项目正式公布，清华大学张学工负责的项目入选；北京大学张泽民教授组发表当时最大规模的肿瘤浸润免疫单细胞研究
2019 年	浙大医学院郭国骥团队开发的 Microwell-Seq 方法；多家以单细胞为核心的企业诞生

表 1-3 我国在单细胞测序领域的重要事件例举

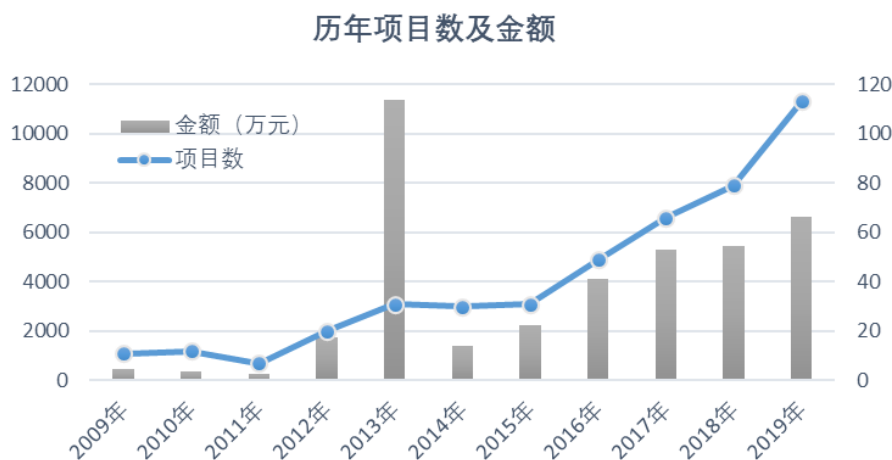


图 1-6 近 10 年 NSFC 对单细胞技术的投入项目数及金额

(注：2013 年数据偏高源于 3 个约 9000 万总额的项目)

截止目前，我国国家自然科学基金（NSFC）累计投入单细胞领域约 4 亿元人民币，重点用于技术研发及肿瘤、生殖、循环系统领域的临床转化应用。

2020 年，新冠疫情爆发并在全球蔓延，针对疫情精准快速检测及有效抗体疫苗的快速研发迫在眉睫，而单细胞技术就在此次疫情中体现了其在面对流行性疾病等重大公共安全事件时所具有的特殊作用。例如，同济大学附属东方医院的团队就通过单细胞测序技术分析本次疫情当中病毒潜伏期长及确诊患者没有明显症状的原因；深圳三院张政团队探究了支气管肺泡灌中免疫细胞的单细胞属性；而北京大学谢晓亮教授团队则通过单细胞技术加速了针对新冠病毒的高结合强度抗体的筛选。基于创新驱动的科技新兴产业将是经济增长的持续动力，单细胞技术作为生物技术领域前沿的方向之一，需要获得更多政策支持和科研基金投入。

## 1.3 市场背景

### (一) 应用场景

目前单细胞测序技术已广泛应用于生物学各个基础研究领域。其临床应用转化也已在多个领域开展了深入探索，包括肿瘤、生殖健康、免疫系统疾病、感染性疾病（微生物）等领域。目前单细胞相关临床试验的目的主要是评估单细胞测序在诊断、治疗和监测各种类型的癌症和感染（包括 HIV，肝炎和流感）中的价值，以及在器官和干细胞移植手术中提高成功率的应用等。其在肿瘤和辅助生殖等领域的研究成果也已应用于临床。以肿瘤学研究和转化为例，通过对肿瘤组织和外周血的数千个单细胞进行测序，不仅可揭示实体瘤内及其免疫微环境的细胞群类型、异质性和克隆演变，还有助于辅助指导临床上的病理诊断、治疗方案的选择及评估、耐药和复发转移监测等。在辅助生殖领域，基于 MALBAC 扩增技术的单细胞基因组测序已被应用于第三代试管婴儿的胚胎植入前染色体非整倍体检测（PGS）。2020 年 2 月，国内首个“胚胎植入前染色体非整倍体检测试剂盒”（国械注准：20203400181）获批上市，标志着我国三代试管 PGS 正式进入合规化、有证时代。

在新冠疫情中，单细胞测序技术也被广泛应用于新病毒的人体器官易感性和感染性损伤研究，以及治疗性和预防性抗体的筛选工作。例如，北京大学谢晓亮教授团队联合相关医疗及科研单位，通过高通量单细胞测序技术，从康复期病人的血浆里结合病毒的抗体序列中，找到 14 个高活性的中和抗体。接下来，他们将从这 14 个候选抗体中找到最理想的特效抗体制成药物。

应用方向	应用领域	应用对象	支付来源	成熟度
科研服务	科研服务	科研机构	科研经费	☆☆☆☆
临床服务	肿瘤的早筛、监察、诊断、治疗	医疗机构	医保/个人	☆☆
	辅助生殖、产前诊断、遗传病治疗			☆☆☆
	临床微生物检测和治疗			☆
	免疫性疾病临床诊断和治疗			☆
	神经系统疾病诊断和治疗			☆
	器官和干细胞移植手术			☆
新药研发	靶标筛选和功能验证 药效及药物动力学评估 精准开发适应症及伴随诊断	药企研发中心	药企	☆☆
其他	法医	司法机构	机构	☆☆☆
	医美	医疗机构	个人	☆

表 1-4 单细胞应用场景举例

## （二）市场规模

根据基因慧预测，2020 年全球单细胞分析市场规模估计为 26.8 亿美元，预计在 2019 至 2026 年以 16.9% 的年复合增长率增长。国内市场规模预计 35 亿人民币，主要影响因素为技术迭代、成本控制、研发投入和产业链的协同整合等。

## （三）市场发展阶段及竞争格局

### 市场发展阶段

单细胞科研服务属于相对成熟市场，2019 年我国自然科学基金批准 113 个相关项目，经费合计 6606 万元。主要竞争仍然在临床应用端，临床市场随着传统测序行业的孵化，生殖等领域处于成熟上升期，而肿瘤、免疫、神经、干细胞等其他领域均处于市场萌芽期，具有高成长潜力。此外，将单细胞技术用于制药市场，进行药物靶标筛选和验证、药效和动力学评估、适应症和伴随诊断开发等亦处于早期阶段，并拥有巨大潜力。

### 竞争格局

单细胞测序是 NGS 精细和深度测序的应用场景之一，也是多技术和多学科的交叉应用，目前正处于早期发展阶段，尚未形成稳定的竞争格局，与此同时，快速发展的技术和市场巨大的想象空间正持续吸引着各大企业及细分头部企业进场。

产业链上游为仪器和试剂提供方，包括单细胞/单细胞核制备、分选、建库和测序。国外的解决方案提供商，例如 BD、10x Genomics 和 Illumina 等占据着主要的市场份额，其中单细胞制备、分选及建库的核心考量指标是单细胞通量和捕获效率等。国内企业进场较晚，华大智造在 2019 年刚刚推出便携式单细胞系统整套装置，新格元在 2020 年 6 月刚推出单细胞测序文库构建系统，战略意图明显。

产业链中游的单细胞测序服务提供方则更为分散。一部分为头部基因测序服务企业，他们主要通过购买 BD 和 10x Genomics 等公司的单细胞平台来提供单细胞测序数据生产服务，扩充其原有科技和临床市场的服务；而另一部分为专注于单细胞实验和分析技术服务及细分领域应用的企业，主要借助上述平台开发科研和临床应用产品及服务，竞争差异化体现在其研发实力及报证资质等方面。

产业链下游目前尚未成型，集中在科研机构、临床科研平台及药企研发中心等，大部分以科研合作的方式共同进行科学发现、技术迭代和研发项目等，少部分基于单细胞测序技术的辅助，探索临床转化和试验，应用于辅助生殖和精准肿瘤等领域。

参与方的市场突破仍基于技术驱动，包括纵向技术迭代和横向管线扩充。此外，成本控制、单细胞通量和样本通量提升、多组学分析和产品报证等也是重要驱动因素。国内企业在仪器和系统试剂方面稍有落后，但在分析方法上同步甚至领先于全球水平，在样本资源和产业链资源具有一定的优势，面临头部企业的竞争压力下，产品化和并购战略或将成为主要旋律。更多内容详见产业图谱分析部分。

#### （四）发展驱动因素

##### 生产价格

单细胞测序仪器、试剂、耗材、技术服务的高昂价格是首要因素。一个组织样本的单细胞数据生产费用约 2 万-4 万。高成本限制了市场的扩展，近几年单细胞测序行业成本的下降趋势，有望在未来几年实现类似传统基因检测的超摩尔定律。

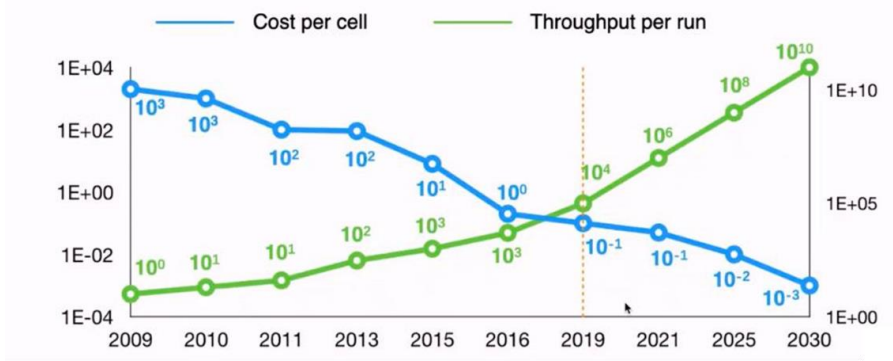


图 1-7 单细胞通量和成本指数的变化

（过去 10 年，单细胞通量不断上升，成本以超摩尔定律下降）

##### 技术迭代

目前单细胞测序技术在快速迭代优化中，体现在降低成本、提高通量、提升细胞分离及捕获效率、开发生物信息分析算法、实现自动化等。实现技术的差异化创新，并快速完成产品验证，将可能占领主要市场。更多内容详见报告其他章节。

##### 知识产权

10x Genomics 作为早期进入市场的企业，近几年深陷与包括 Bio-Rad、Becton Dickinson、Cellular Research 等企业的专利纠纷，在这方面的费用支出不断增加，并且影响到部分市场。市场参与方在专

利等知识产权的布局应投入战略资源，避免专利复杂的雷区，特别是新成立的企业。

### 传统基因检测的市场普及

传统基因检测的普及将为单细胞测序市场未来快速增长起到夯实基础的作用。随着传统基因测序检测成本的持续下降，基因测序服务的市场渗透率将逐步提高，其在遗传病、生殖、肿瘤、感染等领域的应用探索将加快市场教育的成熟，随着终端科研和临床等方面的认知普及和相关监管部门经验的不断提升，将为单细胞测序技术在临床等应用市场奠定扎实的基础。

### 生物医药企业发展的速度

随着国家大力扶持生物医药创新和深化医疗体制改革，各大药企纷纷加强了对原研创新的重视，持续加大资源投入。单细胞测序的时空高分辨率可助力企业的新药研发，如肿瘤领域的成药靶点筛选和验证、肿瘤生物标志物谱和早筛模型构建、分子分型和伴随诊断、药效和药物动力学评估、新抗原筛选和免疫治疗研发等方面，有很大的转化应用潜力。

### 宏观政策的引导

正如上述政策环境分析，目前单细胞测序应用市场处于初步阶段，以技术驱动为主。技术迭代及转化离不开研发投入及产业发展，需要相关科研基金及社会资本的支持。宏观政策的引导将起到关键的作用，除了支持研发投入之外，带动产学研协同效应也非常重要。



## 第二部分 技术应用

## 第二章 单细胞应用

### 2.1 肿瘤

#### (一) 肿瘤基础研究

肿瘤内部异质性可能在癌细胞的侵袭、转移和耐药性演变中发挥重要作用。单细胞测序能够在单个细胞水平上研究肿瘤的内部异质性、癌细胞的克隆发展和进化、早期癌症的侵袭、癌细胞的突变率和突变类型，追踪癌细胞的转移和扩散、了解癌症治疗过程中癌细胞的耐药性演变、揭示肿瘤微环境等。

随着单细胞测序技术的高速发展，其研究范围从转录组逐渐扩展到基因组、表观组和蛋白组等，并被大量地应用于各种类型癌症的基础研究，包括乳腺癌、膀胱癌、前列腺癌、肾癌、肺癌、结直肠癌、肝癌、骨髓增生性肿瘤、急性髓系白血病等等（表 2-1）。这极大地促进了癌症的基础研究和临床应用。

肿瘤类型	技术方向	单细胞分离方法	扩增方法	参考文献
乳腺癌	CNV	FACS	GenomePlex WGA4	Navin N et al. Nature 2011
肾癌	WES	Manual	REPLI-g Mini Kit (MDA)	Xu X et al. Cell 2012
血小板增多	WES	Manual	REPLI-g Mini Kit (MDA)	Hou Y et al. Cell 2012
青少年急性淋巴细胞白血病	Targeted DNA sequencing	Fluidigm C1 (microfluidic)	GenomePhiv2 MDA kit	Gawad C et al. Proc Natl Acad Sci USA 2014
恶性胶质瘤	RNA-seq	FACS	SMARTer Ultra Low RNA Kit	Patel AP et al. Science 2014
成神经细胞瘤	Targeted DNA sequencing	Silicon Biosystems DEPArray	AMPLI1	Carpenter EL et al. Front Oncol 2014
乳腺癌	CNV	Manual	GenomePlex WGA4	Demeulemeester J et al. Genome Biol 2016
肝癌	RNA-seq, DNA methylation, CNV	Manual	scTrio-seq	Hou Y et al. Cell Res 2016
转移性黑色素瘤	RNA-seq	FACS	Smart-seq2	Tirosh I et al. Science 2016
间胶质瘤	RNA-seq	FACS	Smart-seq2	Tirosh I et al. Nature 2016

急性髓性白血病	RNA-seq	Fluidigm C1(microfluidic)	SMART-Seq v4 Ultra Low Input RNA kit	Yan B et al. Oncol Lett 2017
乳腺癌	RNA-seq	Fluidigm C1(microfluidic)	SMARTer Ultra Low RNA Kit	Chung W et al. Nat Commun 2017
结直肠癌	RNA-seq	Fluidigm C1(microfluidic)	SMARTer Ultra-Low RNA Kit	Li H et al. Nat Genet 2017
恶性胶质瘤	RNA-seq	Fluidigm C1(microfluidic)	SMARTer Ultra-Low RNA Kit	Lee J-K et al. Nat Genet 2017
神经胶质瘤	RNA-seq	FACS	Smart-seq2	Venteicher AS et al. Science 2017
严重浆液性卵巢癌	RNA-seq	Fluidigm C1(microfluidic)	SMARTer Ultra-Low RNA Kit	Winterhoff BJ et al. Gynecol Oncol 2017

表 2-1 使用单细胞技术的部分癌症基础研究

## (二) 肿瘤早筛

肿瘤早筛，是指用科学、快速、简便的方法，从恶性肿瘤高危人群中，在尚未出现明显症状时，通过主动筛查，发现早期恶性肿瘤，从而提高治愈率。例如，针对循环肿瘤细胞（CTC）的液体活检是目前常用的肿瘤早筛方法之一，CTC 的单细胞测序已应用于一系列癌症中（表 2-2）。

肿瘤类型	技术方向	CTC 提取方法	单细胞分离方法	扩增方法	参考文献	
结直肠癌	Targeted sequencing	DNA	CellSearch	Manual	GenomePlex	Heitzer E et al. Cancer Res 2013
肺癌	WES, WGS, CNV		CellSearch	Manual	MALBAC	Ni X et al. Proc Natl Acad Sci USA 2013
乳腺癌	Targeted sequencing (PIK3CA)	DNA	CellSearch	Silicon Biosystems DEPArray	Amplii1	Pestrin M et al. Mol Oncol 2014
乳腺癌	Targeted sequencing (PIK3CA and TP53)	DNA	FACS	FACS	Amplii1	Neves RPL et al. Clin Chem 2014
乳腺癌	Targeted sequencing (TP53)	DNA	CellSearch	Silicon Biosystems DEPArray	Amplii1	Fernandez SV et al. Breast Cancer Res 2014
前列腺癌	RNA-seq		CTC-iChip	Manual	mRNA-Seq	Miyamoto DT et al. Science 2015
前列腺癌	WGS		NanoVelcro chip	Laser capture microdissection	MDA	Jiang R et al. Oncotarget 2015



乳腺癌	Targeted sequencing	DNA	CellSearch	Silicon Biosystems DEPArray	Amplii1	De Luca F et al. Oncotarget 2016
多发性骨髓瘤	Targeted sequencing	DNA	RosetteSep	Manual	REPLI-g Mini Kit (MDA)	Lohr JG et al. Sci Transl Med 2016

表 2-2 使用单细胞技术的部分 CTC 研究

2013 年在对肺癌 CTC 的单细胞研究中发现 CNV (基因拷贝数变异) 谱与同一患者的转移灶相一致, 而 SNP (单核苷酸多态性) 在细胞间存在异质性 [Ni X et al. Proc Natl Acad Sci USA 2013]。据此, 理论上可以使用单细胞测序技术来进行肿瘤早筛, 鉴定癌症的具体亚型, 判断癌症是否发生转移。但与目前临床已在应用的其他癌症早筛方法相比 (如表 2-3), 单细胞 CTC 筛查的成本高、检测流程复杂, 其临床应用还有很大的挑战, 仍需进一步研究及开发。

癌症类型	早筛方法	是否无创	检测材料	准确度	适用人群	检测复杂程度	检测成本
乳腺癌	乳腺钼靶筛查	是	无	较高	45 岁-75 岁女性	容易	低
乳腺癌	基因检测	是	血液	较高	有家族史女性	容易	低
宫颈癌	HPV 检测	是	阴道分泌物	较高	21 岁以上女性	容易	低
宫颈癌	子宫刮片	否	刮片材料	较高	有性生活女性	侵入式, 较复杂	低
胃癌/结肠癌	钡餐/粪便检测	是	-	较高	50 岁以上人群	容易	一般
食管癌/胃癌/肠癌	胃镜/肠镜	是	-	较高	50 岁以上人群	侵入式, 较复杂	较高
肺癌	CT	是	-	较高	55-75 岁吸烟人群	容易	较高
固体癌	B 超/彩超	是	-	较高	所有人群	容易	低
肝癌	甲胎蛋白	是	血液	一般	有家族史或肝炎人群	容易	低
侵入性较强型肿瘤/转移性肿瘤	CTC	是	血液	较高	肿瘤患者/有家族史	复杂	高
侵入性较强型肿瘤/转移性肿瘤	CTC 单细胞	是	血液	高	肿瘤患者/有家族史	复杂, 暂未进入临床应用	高

乳腺癌/卵巢癌/结直肠癌/甲状腺癌/肺癌等	cfDNA	是	血液	高	肿瘤患者/有家族史	容易	较高
-----------------------	-------	---	----	---	-----------	----	----

表 2-3 不同癌症早筛方法的比较

### （三）肿瘤临床诊断

确定癌症异质性和转移性的特征有助于癌症的临床诊断，对癌症组织和 CTC 进行单细胞测序在解析这个问题上表现出巨大的潜力。

对于癌症组织，通过对肿瘤免疫微环境（TIME）的鉴定，确定癌细胞的亚群分类、组织分布特征、肿瘤内群体细胞异质性以及肿瘤细胞的分子标记物，有助于癌症的临床诊断。目前，基于单细胞测序技术，研究人员已经绘制了肺癌、结直肠癌、肾癌、乳腺癌、黑色素瘤等多种癌症的细胞图谱。

此外，由于 CTC 与肿瘤的转移相关性比较强，CTC 单细胞测序可以阐明初级肿瘤与二级肿瘤之间的关联。在这样的背景下，不同类型癌症（如乳腺癌、肺癌、胰腺癌、结直肠癌等）的 CTC 单细胞图谱被陆续绘制，为 CTC 单细胞测序用于癌症临床诊断提供了基础。

### （四）肿瘤临床治疗

肿瘤异质性、耐药性演变、免疫逃逸等是影响癌症治疗效果的三大重要因素，单细胞测序可以用于评估上述因素，帮助医生决策最佳的肿瘤治疗方案。

肿瘤细胞的单细胞测序可以为癌症治疗方案的调整和药物开发提供依据。北京大学张泽民教授课题组和美国安进（Amgen）公司在单细胞水平对结直肠癌患者的肿瘤微环境进行详细描述[Zhang L et al. Cell. 2020]，揭示了靶向髓系细胞的免疫治疗策略潜在的作用机理，并提及了髓系靶向免疫疗法目前正在临床实验中应用。考虑 mRNA 和蛋白组丰度之间存在的差异，单细胞蛋白组学也被利用于对癌症疗效的评估，例如评估黑色素瘤患者抗 PD-1 免疫治疗前后免疫细胞的功能状态[Luigi Fattore et al. Cell Death Dis. 2019]。此外，scRNA-seq（单细胞转录组测序）还能为抗肿瘤药物的开发提供新的目标。Jang 等人对不同病程的多发性骨髓瘤进行 scRNA-seq [Jang, J. S et al. Blood Cancer. 2019]，筛选出 44 个较低总生存率相关的高表达基因，这些基因可作为多发性骨髓瘤的潜在药物靶标。

基于 CTC 的单细胞测序也可用于癌症疗效的评估。乳腺癌患者 CTC 的研究结果表明，HER2 状态存在异质性，这可能有助于耐药性的发展[Jordan NV et al. Nature. 2016]，同时 CTC 已经被证明可以预测乳腺癌[Antonarakis ES et al. N Engl J Med. 2014]和前列腺癌[Antonarakis ES et al. JAMA oncol. 2015] [Wallwiener M et al. BMC Cancer. 2014] 的治疗效果。

## 2.2 生殖健康

### (一) 精子发育

精子的生成在时间和空间上有着复杂而有序的过程。现代社会男性生殖障碍的比例越来越高，而不育症的男性患上睾丸癌和前列腺癌的风险比正常男性更高[Guo J et al. Cell Stem Cell. 2017]。

1) 对精子进行单细胞测序，有助于了解精子成熟过程中基因重组的特征。Lu S 等人使用多次退火循环扩增技术(MALBAC[Hou Y et al. Cell. 2013])，对精子进行单细胞全基因组 DNA (scDNA-seq) 测序，首次实现了高覆盖度的单精子的全基因组测序[Lu S et al. Science. 2012]。Hinch AG 等人对小鼠精子进行 scDNA-seq，绘制了精子的高分辨率交叉图谱和重组阶段的特异性分子特征[Hinch AG et al. Science. 2019]。

2) 从单细胞水平上重建精子发育过程中细胞分化的转录和表达顺序，对破译男性相关的生殖障碍有着重要的意义。Guo J 等人利用 scRNA-seq 的方法，首次从单细胞层面上描绘了精子干细胞在正常发育过程中所经历的多阶段过程，同时从基因角度诠释了男性不育症的原因[Guo J et al. Cell Stem Cell. 2017]。此外，Wang M 等人对正常成年男性和梗阻性无精症患者的睾丸组织进行了 scRNA-seq，从单细胞角度阐明了人类精子发生过程中的基因表达调控网络和细胞转变 (cell fate transition) 的路径，为无精症的分子诊断和临床治疗提供了全新的视角[Wang M et al. Cell Stem Cell. 2018]。

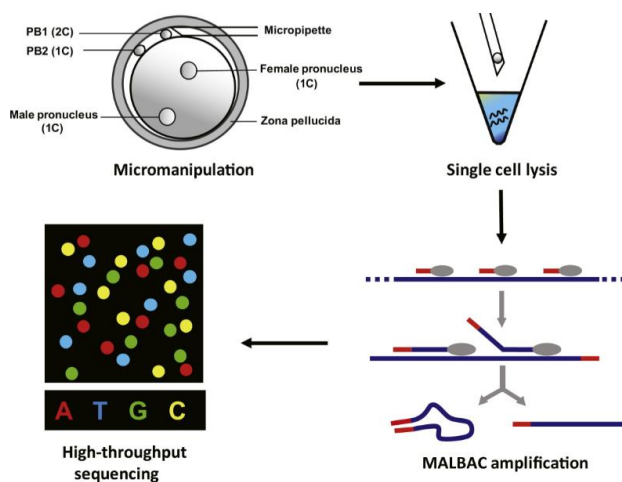


图 2-1 基于 MALBAC 扩增进行单细胞全基因组 DNA 测序的基本流程

[Hou Y et al. Cell. 2013]

3) 对精子进行单细胞测序也有助于探索疾病机制。一项研究显示，对有正常后代及自闭症后代的人类男性精子进行单细胞 DNA 和 RNA 测序，从单细胞水平鉴定精子是否发生自闭症相关的基因变异

及基因表达差异[Tomoiaga D et al. NPJ Genom Med. 2020]，发现精子中确实存在遗传变异。这可用于分析单个精子细胞转录组的基因表达和突变动力学，为疾病机制提供更深层次的见解。

## （二）卵子发育

卵子是人体最大的细胞，在单细胞研究中有着天然的优势。卵细胞的单细胞测序可用于研究卵子发育过程及卵巢疾病对卵子发育的影响。

1) 从单细胞水平上研究卵细胞成熟的原理。Zhao H 等人通过对体外成熟和体内成熟的卵细胞进行 scRNA-seq 发现[Zhao H et al. Antioxid Redox Signal 2019]，代谢通路的改变是体内外成熟卵母细胞的最典型差异，代谢通路关键分子 ACAT/HADHA-DPYD 有助于维持卵母细胞发育潜能。

2) 单细胞测序可以探索激素导致的排卵异常。小鼠卵母细胞的 scRNA-seq 数据发现[Wang H et al. Nat Commun. 2019]，组蛋白去乙酰化酶可以促进体外卵母细胞的成熟，为解析女性不孕提供新的方向。

3) 单细胞测序可用于探索卵巢相关疾病对卵细胞发育的影响。对卵巢子宫内膜异位症病人的卵细胞和健康人卵细胞进行 scRNA-seq[Ferrero H et al. Hum Reprod. 2019]，发现差异表达的一些基因与卵细胞的低质量有关，证实了卵巢疾病与女性不孕的相关性。

4) 单细胞测序研究卵巢衰老机制。2020 年 3 月，北京大学汤富酬教授课题组与合作者利用高精度单细胞转录组测序技术[Si Wang et al. Cell, 2020]，首次绘制了食蟹猴卵巢的单细胞衰老图谱；同时利用人类卵巢细胞研究体系，发现增龄伴随的抗氧化能力的下降是灵长类卵巢衰老的主要特征之一。该项研究在单细胞分辨率下更为精确地揭示灵长类动物卵巢衰老的机制之一，确定了人类及其他灵长类动物卵巢衰老的生物标志物，为开发延缓卵巢衰老及相关疾病的干预策略奠定了理论基础。

## （三）胚胎早期发育

人类胚胎在前两个月是最容易流产的时期。对胚胎细胞的单细胞测序，有助于探索胚胎的发育机制和影响胚胎发育的因素，为保障胚胎正常发育提供理论支持。

1) 单细胞测序探索胚胎早期发育机制。汤富酬实验室和北医三院乔杰实验室合作通过对人类体外培养受精卵进行单细胞 DNA 或 RNA 测序[Zhou F et al. Nature. 2019]，发现一些细胞在植入后会更快地发生甲基化。小鼠、斑马鱼和青蛙早期胚胎的单细胞研究深刻地展示了胚胎发育中一些关键性过程（表 2-4）。

物种	技术手段	研究对象	参考文献
人	单细胞 DNA 或 RNA 测序	植入人体前、植入中、植入后的胚胎细胞	Zhou F et al. Nature. 2019
小鼠	单细胞 RNA 测序	早期胚胎	Cheng S et al. Cell Rep. 2019

斑马鱼	单细胞 RNA+基因编辑	胚胎	Wagner D E et al. Science. 2018
斑马鱼	单细胞 RNA+基因编辑	胚胎	Farrell J A et al. Science. 2018
青蛙	单细胞 RNA+基因编辑	胚胎	Briggs J A et al. Science. 2018

表 2-4 部分胚胎发育领域的单细胞研究

2) 评估环境因素对胚胎发育的影响。对有无尼古丁下人类胚胎干细胞衍生的胚状体进行 scRNA-seq 发现 [Guo H et al. Stem Cell Reports 2019], 尼古丁诱导胚状体细胞系发生特异性反应和细胞间通讯失调, 提示尼古丁对胚胎干细胞分化有直接的不良影响, 为评价药物和环境毒性对人胚胎发育的影响提供了一种新的方法。

#### (四) 辅助生殖

单细胞技术有助提高试管婴儿成功率。试管婴儿是重要的辅助生殖手段, 目前已经发展到第四代, 总体活胎分娩率在 40% 左右, 不同试管婴儿技术所对应的适应症和成功率均不相同, 第三代以前整体成功率仅约为 35%。从第三代开始, 加入了胚胎植入前的遗传学诊断, 使整体成功率大幅提高 (约 80%)。目前, 胚胎植入前遗传学筛查 (PGS) 和胚胎植入前遗传诊断 (PGD) 主要使用的技术有两种, 都与单细胞技术相关: MALBAC (以及更新的 LIANTI 技术) 和 MDA (多重置换扩增), 分别由北京大学、北医三院 [Huang J et al. Fertil Steril. 2014] 和华大基因 [Xu Y et al. Clin Chem. 2015] 主导研发, 显示了单细胞测序技术在植入前遗传学诊断临床实践中的潜力。

此外, 体外成熟的卵母细胞发育潜能较差, 流产率相对较高, 且尚无有效改善措施。基于单细胞测序对体内外成熟的卵细胞进行比较, 为辅助生殖的持续优化提供了理论基础 [Zhao H et al. Antioxid Redox Signal 2019]。

目前而言, 受限于价格昂贵、大众认知不足、临床应用不成熟以及监管严格 (表 2-5), 基于单细胞技术的辅助生殖在我国的应用并不广泛, 相关产业还有很大的上升空间。

医院名称	医院级别	所属省份	资质获批年份
北京大学第三医院	三级甲等	北京市	2012 年获得 PGD、PGS
山西省妇幼保健院	三级甲等	山西省	2013 年获得 PGD, 2014 年获得 PGS
上海国际和平妇幼保健院	三级甲等	上海市	2014 年获得 PGD、PGS
江苏省人民医院	三级甲等	江苏省	2013 年获得 PGD、PGS

南京鼓楼医院	三级甲等	江苏省	2014 年获得 PGD
浙江大学医学院附属妇产科医院	三级甲等	浙江省	2013 年获得 PGD、PGS
安徽医科大学第一附属医院	三级甲等	安徽省	2013 年获得 PGD、PGS
山东大学附属生殖医院	未评级	山东省	2014 年获得 PGD
郑州大学第一附属医院	三级甲等	河南省	2011 年获得 PGD
中信湘雅生殖与遗传专科医院	三级甲等	湖南省	2013 年获得 PGD、PGS
中南大学湘雅医院	三级甲等	湖南省	2013 年获得 PGD、PGS
中山大学附属第一医院	三级甲等	广东省	2014 年获得 PGD
重庆市妇幼保健院	三级甲等	重庆市	2015 年 PGD

表 2-5 国内 13 家第一批拥有胚胎植入前筛查资质的医院统计

## （五）产前诊断

孕妇血浆中胎儿游离细胞以及单细胞技术的发展，为单细胞的无创产前诊断提供了可能。日本科研人员从母体外周血样本中提取了游离的胎儿 CD45-CD14 细胞[Sato T et al. J Mol Diagn 2020]，使用 scDNA-seq 对男女胎儿的遗传信息进行了识别，展现了单细胞无创产前诊断的潜力。目前单细胞无创产前诊断尚未进入临床阶段。

## 2.3 免疫性疾病

### （一）探索免疫机制

免疫反应的效率取决于参与免疫过程中高异质性免疫细胞的协同。单细胞技术可用于分析免疫细胞亚群和细胞间网络（图 2-2），探索免疫系统作用机制以及不同个体、物种的差异。

1) 利用单细胞技术探索不同组织免疫细胞的特征。对肺、淋巴结、骨髓和血液中分离的人类 T 细胞进行 scRNA-seq[Szabo PA et al. Nat Commun. 2019] 发现，免疫细胞具有高异质性和不同的功能反应，不同组织位置上人类 T 细胞的持久性和功能各具差异。对斑马鱼的免疫成分单细胞研究[表 2-6] 为群体进化的研究提供了参考。

2) 利用单细胞技术发现新细胞类型和细胞状态[Nguyen A et al. Front. Immunol. 2018]。对数百个扁桃体先天性淋巴细胞（ILC）和自然杀伤细胞（NK）进行单细胞转录组测序发现[Björklund Å. K

et al. Nat. Immunol. 2016], 细胞可分为 ILC1、ILC2、ILC3 和 NK 四类, 而 ILC3 细胞亚群可以被继续分为三个亚群。Villani 等人[Villani A.-C et al. Science. 2017]对健康人细胞的 scRNA-seq 发现, 占比 2-3%的树突细胞亚群可以进一步区分为浆细胞样树突细胞和 CD138+传统树突细胞。

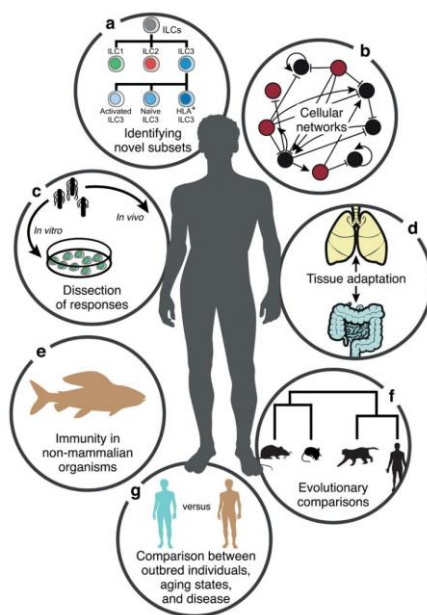


图 2-2 免疫学中的单细胞基因组学

[Stubington MJT et al. Science. 2017]

物种	研究对象	应用技术	参考文献
斑马鱼	T 细胞、自然杀伤细胞、髓样细胞	scRNA-seq	Carmona S.J et al. Genome Res. 2017
斑马鱼	Th2	scRNA-seq	Dee C.T. et al. J. Immunol. 2016
斑马鱼	Treg	scRNA-seq	Kasheta M et al. J. Exp. Med. 2017
斑马鱼	罕见先天性淋巴细胞(之前仅在哺乳动物中发现)	scRNA-seq	Vivier E et al. Cell. 2018

表 2-6 斑马鱼免疫细胞单细胞研究

## (二) 免疫性疾病研究

观察免疫细胞在健康和病理环境中的组成和发展轨迹, 有助于了解人类疾病的发生和发展[Anna M et al. Essays Biochem. 2019]。对脾脏和血液进行 scRNA-seq 发现, 小鼠和人在器官和物种之间存在相似性(图 2-6) [Crinier A et al. Immunity. 2018], 为利用小鼠来研究人类生理学和疾病奠

定了理论基础。炎症肠病（IBD）患者结肠间充质细胞的 scRNA-seq 数据[Kinchen J et al. Cell. 2018]，确认了肠间质通过重塑而促进了 IBD 炎症和功能障碍。Lonnberg 基于 scRNA-seq 重建了疟疾模型小鼠 Th1 和 Tfh 细胞的发育轨迹[Lonnberg T et al. Sci. Immunol. 2017]，并证明了 Galectin-1（半乳糖凝集素 1）在支持 Th1 分化中的 T 细胞内在作用。此外，针对一些药物适用于多种免疫性疾病的现象，单细胞技术有助于了解不同免疫性疾病之间的共性。

### （三）免疫性疾病临床诊疗

免疫性疾病的单细胞研究可以为临床诊断和治疗提供重要的理论依据。Yu Y 等人对小鼠骨髓祖细胞进行单细胞 RNA 测序[Yu Y et al. Nature. 2016]，发现了 PD-1 高表达的先天性淋巴细胞（PD-1<sup>hi</sup>-ILC）。在小鼠流感感染模型中注射缺乏 PD-1 抗体的 PD-1<sup>hi</sup>-ILCs 后，细胞因子水平降低并阻断了木瓜蛋白酶诱导的急性肺部炎症。对小鼠和人关节炎模型的 scRNA-seq 数据研究中发现，多细胞类型的网络中心具有丰富的与关节炎相关的基因变异，可以优先作为靶点[Gawel, D et al. Genome Med 2019]。

结合单细胞基因组学、新兴的空间方法、免疫组库分析、多重免疫表型以及已建立的功能分析方法，将从根本上改变对感染、自身免疫、过敏和炎症中免疫功能和功能障碍的认识，并推动治疗进展[Stubington MJT et al. Science. 2017]。

## 2.4 干细胞生物学

### （一）干细胞分化与发育

诱导多能干细胞（induced Pluripotent Stem Cell, iPSC）是将成体细胞通过重编程技术而获得的，一种类似胚胎干细胞样特性的多潜能细胞。但是体细胞重编程的效率不高，只有一小部分细胞成为 iPSC。这导致获取 iPSC 需要极高的成本。使用单细胞技术对 iPSC 进行研究，有助于追踪干细胞分化和发育的过程，提高重编程效率，降低 iPSC 的应用成本。

对不同阶段小鼠 iPSC 细胞进行 scRNA-seq[Buganim, Y et al. Cell. 2012]发现，Esrrb、Utf1、Lin28 和 Dppa2 的表达比 Fbxo15、Fgf4 和 Oct4 的表达更能预测细胞是否进入 iPSC 阶段；对胚胎不同时间线上的单细胞转录组和表观组测序[Cacchiarelli, D et al. Cell. 2015]，可观察早期胚胎发育的模式基因；对主动脉内皮的 scRNA-seq [Lukowski SW et al. Cell Rep. 2019]，可确定血管内祖细胞和分化细胞之间的层次关系；对正在分化中的 iPSC 进行 scRNA-seq [Cuomo ASE et al. Nat Commun. 2020] 揭示了基因表达的动态遗传效应。



## （二）干细胞鉴定

胚胎干细胞（ESC）等各类干细胞与身体其他细胞之间的精确关系仍然没有明确定义，研究人员通过对不同类型干细胞的单细胞分析，可以对干细胞进行有效的分类、特征和功能鉴定。

汤富酬教授等人[Tang, F et al. Cell Stem Cell. 2010]对胚胎干细胞进行单细胞转录组测序，首次阐明了人内细胞团（ICM）向ESC转变的精确变化，揭示编码代谢因子的改变以及编码表观遗传抑制因子的增加。此外，也有大量研究在不同层次对干细胞的种类和特性进行了研究（表2-7）。

物种	研究对象	应用技术	主要研究内容	参考文献
人	胚胎干细胞	scRNA-seq	人类内细胞团向人类ESC转变的过程	Tang, F et al. Cell Stem Cell. 2010
小鼠	胚胎干细胞	scRNA-seq	探索在不同的化学和遗传干扰下小鼠PSC的转录异质性	Kumar RM et al. Nature. 2014
人	脂肪间充质干细胞	scRNA-seq	CD142+ ABCG1+细胞以旁分泌的方式抑制体内和体外脂肪细胞的形成	Schwalie PC et al. Nature. 2018
小鼠	室管膜细胞	scRNA-seq	室管膜细胞不具有神经干细胞功能	Shah PT et al. Cell. 2018

表 2-7 干细胞部分研究成果

## （三）基于干细胞的疾病研究与治疗

对干细胞进行单细胞分析，可以更好地理解疾病相关分子的潜在分泌途径，从而对疾病发生机制有全新的了解。

目前，基于干细胞的单细胞测序已被用于疾病的研究。有研究通过对人诱导多能干细胞（iPSC）的单细胞测序（[Liao M. C et al. J. Neurosci. 2016]，图2-6），测定了与AD（阿尔茨海默病）发病相关的核心分子——淀粉样 $\beta$ （ $a\beta$ ）和可溶性淀粉样前体蛋白 $\alpha$ （sAPP $\alpha$ ），揭示了分子动态范围，发现了APP裂解的复杂性；对慢性粒细胞白血病（CML）患者的scRNA-seq发现，慢性粒细胞白血病癌症干细胞CML-SCs具有异质性[Giustacchini A et al. Nat Med. 2017]，为CML造血破坏与临床结局的关系提供了新的见解。

在单细胞水平上深入了解疾病机制或疾病治疗相关细胞信息，可指导针对相关细胞类型的新治疗策略开发。对间充质干细胞（MSCs）进行scRNA-seq[Huang, Y. et al. Cell Death Dis. 2019]发现，MSCs异质性受细胞周期状态的控制且异质性有限。用IFN $\gamma$ 和TNF $\alpha$ 对MSC进行预处理后，MSCs的基因表达呈现出均匀变化。由此，为疾病治疗中MSCs的标准化提供了参考。

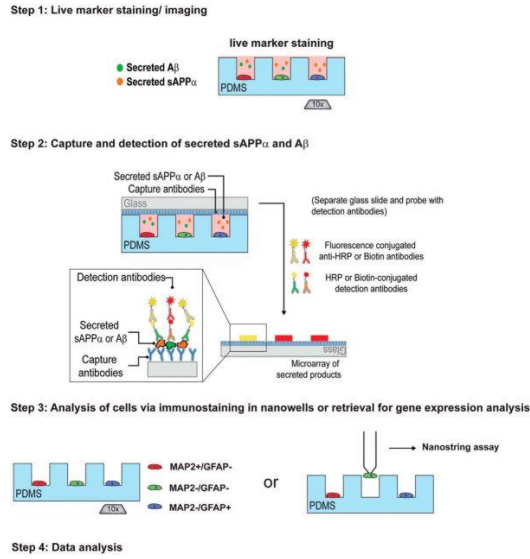


图 2-3 单细胞技术检测 APP 裂解产物过程图

## 2.5 神经生物学及发育

### (一) 神经系统的基础研究

神经系统结构和功能复杂。基于单细胞技术对大脑不同组织进行解析，可以从细胞水平上了解神经系统的结构、发育和发展过程。

研究者对妊娠 8 周到 26 周的人类前额叶皮层进行 scRNA-seq [Zhong S et al. Nature. 2018]，鉴定了 6 种主要神经细胞中的 35 个细胞亚型及这些细胞的发育轨迹 (图 2-7)。该研究为了解妊娠早期和中期人类前额叶皮质的发育提供了一个蓝图，系统剖析了前额叶皮质功能的细胞基础和分子调控机制。

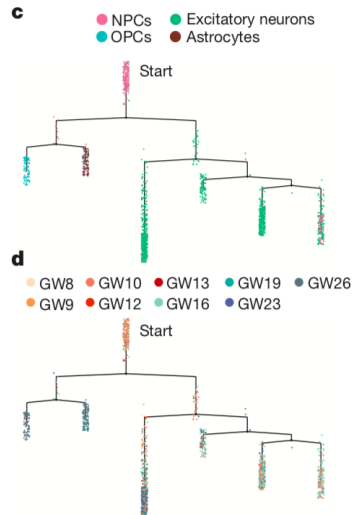


图 2-4 基于单细胞数据分析预测的人类前额叶皮层细胞的发育轨迹 [Zhong S et al. Nature. 2018]

其他研究人员也基于不同物种的不同神经组织或大脑组织，使用单细胞技术对神经发育轨迹和衰老过程等进行了研究（表 2-8）。

物种	脑域	应用技术	主要研究内容	参考文献
小鼠	大脑皮质、海马体	scRNA-seq	脑细胞类型与特征	Zeisel A et al. Science. 2015
小鼠	纹状体	scRNA-seq	脑细胞类型与特征	Gokce O et al. Cell Rep. 2016
人	大脑皮层六个不同区域	scRNA-seq	大脑皮层神经元细胞的分类	Lake BB et al. Science. 2016
人	前额叶皮层	scRNA-seq	前额叶皮层神经细胞类型与发育轨迹	Zhong S et al. Nature. 2018
海马	静止神经干细胞及后裔	scRNA-seq	神经细胞发展轨迹与分子特征	Shin J et al. Cell Stem Cell. 2015
果蝇	不同寿命期果蝇大脑	scRNA-seq	衰老过程中脑细胞的转录变化	Davie K et al. Cell. 2018
小鼠	心室下区	scRNA-seq	衰老小鼠神经源性龕中内皮细胞和小胶质细胞的转录变化	Dulken B.W. Nature. 2019

表 2-8 脑区和神经组织的单细胞研究

## （二）神经细胞分类

大脑包含高度复杂的神经细胞类型和细胞亚型[Fuzik J et al. Nat Biotechnol. 2016]。scRNA-seq 可用于识别神经细胞类型和亚型，并发现新的细胞特异性标记。

中科院神经所张旭院士团队和伯豪生物合作利用 scRNA-seq 对小鼠背根神经节的体感神经元进行分类[Li C et al. Cell Research. 2016]，采用微流控 scRNA-seq 和荧光活化细胞分离对纹状体进行分析，发现了不同的细胞亚群[Gokce O et al. Cell Rep. 2016]；同时发现新的基因标记可区分中棘神经元的不同细胞亚群。其他物种的神经组织或大脑组织也从单细胞水平上进行了分类和特征鉴定（表 2-9）。

物种	脑域	应用技术	主要研究内容	参考文献
小鼠	腰椎背根神经节	scRNA-seq	功能异质性鉴定体感神经元类型	Li C et al. Cell Research. 2016
小鼠	大脑皮质、海马体	scRNA-seq	鉴定脑细胞类型与细胞标记基因	Amit Zeisel et al. Science. 2015
人	体外培养的六个分	scRNA-seq	神经细胞间的相互作用与细胞亚	Shang Z et al.

	化时间点的神经祖细胞		群特征	Gigascience. 2018
啮齿动物	外周神经系统	scRNA-seq	局部细胞-细胞通讯网络；自身免疫性神经炎由细胞网络导致	Wolbert J et al. PNAS. 2020

表 2-9 神经细胞的单细胞研究

### （三）神经系统疾病研究与治疗

神经退行性疾病与神经细胞的衰老和功能退化有关，单细胞技术有助于神经系统疾病的机制研究。

单细胞技术可用于评估体细胞突变对神经系统的影响。胎儿神经前体细胞的 scDNA-seq 发现，发育过程中的氧化损伤导致细胞突变率增加[Bae T, et al. Science. 2018]；老年人神经细胞的体细胞突变与衰老过程、脑区特异性突变和氧化损伤的 DNA 修复相关，暗示致病性体细胞突变也可导致神经发育和退行性疾病[Lodato M.A, Science. 2018] [Insel T.R et al. Mol Psychiatry. 2014] [McConnell M.J et al. Science. 2017]。

对神经系统疾病有关的细胞进行单细胞研究，可以为疾病治疗提供参考方向。对大脑干细胞进行 scRNA-seq [Kalamakis G et al. Cell 2019]，发现神经干细胞活性在衰老过程中不会降低，而利基衍生的炎症信号和 Wnt 拮抗剂则会抑制神经干细胞活性。因此理论上，清除抑制神经干细胞活性的物质将是潜在的治疗神经退行性疾病方案。对阿尔兹海默病（AD）和帕金森（PD）患者脑细胞的单细胞研究为这两种疾病的治疗提供了新方向（表 2-10）。

物种	疾病	应用技术	主要研究内容	参考文献
小鼠	阿尔兹海默病	scRNA-seq	淀粉样 $\beta$ ( $A\beta$ ) 斑块附近细胞与神经退行性疾病相关	Keren-Shaul H et al. Cell. 2017
小鼠 CK-p25	阿尔兹海默病	scRNA-seq	淀粉样 $\beta$ ( $A\beta$ ) 斑块附近细胞与神经退行性疾病相关	Mathys H et al. Cell Rep. 2017
人	阿尔兹海默病	scRNA-seq	疾病早晚期脑细胞的表达变化	Mathys H et al. Nature. 2019
人	帕金森	scRNA-seq	多巴胺能神经元中内质网应激相关的基因 HDAC4 表达发生变化，与疾病进展有关，为潜在药物靶点	Lang C et al. Cell Stem Cell. 2019
人	多发性硬化症	scRNA-seq	皮质神经元损伤和胶质细胞活化有关的特异性表达改变	Schirmer L. et al. Nature. 2019
人	孤独症	scRNA-seq	上层兴奋性神经元和小胶质细胞被确定为受该疾病影响的易感细胞类型	Velmeshev D et al. Science. 2019

表 2-10 神经系统疾病的单细胞研究

## 2.6 宏基因组学及微生物生态

### (一) 宏基因组组装和物种、功能注释

宏基因组组装的难点在于数据序列短、复杂性高、微生物种类繁多而比例不一；单细胞宏基因组的组装能够有效应对这些困难。

目前已有多种单细胞宏基因组组装的软件被开发出来，对未培养微生物有着极高的分辨率，例如 Meta-IDBA, IDBA-UD, MetaVelvet, metaSPAdes 和 Ray Meta 等。基因序列经这些工具进行组装后，可以进一步通过 Bambus2 来生成 scaffold。在这些工具的帮助下，目前研究者完成了对奶牛胃部微生物 [Stewart RD et al. Nat Commun. 2018]、人肠道菌群 [Almeida, A et al. Nature. 2019] 等微生物宏基因组的组装。

使用宏基因组和单细胞基因组进行联合组装，能够显著改善组装结果的连续性和完整性。宏基因组数据可以恢复 DNA 提取过程中丢失的基因组，而单细胞基因组可以为宏基因组组装提供线索 [Xu Y et al. Protein Cell. 2018]。基于这种策略，已有多种包括海洋细菌谱系 SAR86 [Dupont CL et al. ISME J. 2012] (图 9)、产甲烷菌 [Blainey PC et al. FEMS Microbiol Rev. 2013] 和卵硫菌属 [Marshall IPG et al. Appl Environ Microbiol. 2012] 在内的多种微生物 [Nobu MK et al. ISME J. 2015] 被组装出来。总体来说，宏基因组学和单细胞基因组学的结合，代表了对环境中未培养的微生物宏基因组进行组装的新方向。

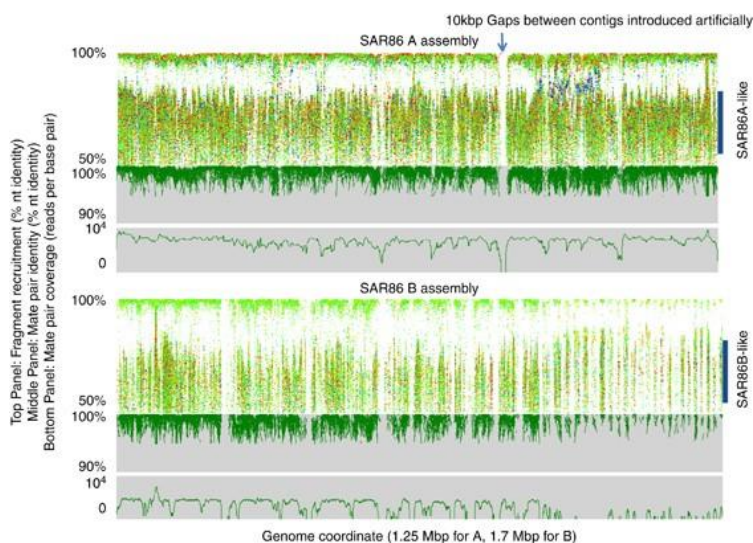


图 2-5 SAR86 海洋细菌谱系组装效果

基于单细胞可以对微生物进行分类和功能注释。Becraft 等人使用单细胞基因组学对地热泉微生物 *Calescamantes* 进行了有效的分类 [Becraft ED et al. Appl Environ Microbiol. 2015]。使用数据库 RAST 和软件 Prokka、Roary 则可对微生物进行注释。

## （二）病毒-宿主相互作用机制研究

病毒与宿主的相互作用，包括感染、共生和捕食，可以动态改变宿主的进化、多样性和代谢潜能，最终影响相互作用自身[De Smet J et al. Nat Rev Microbiol. 2017]。单细胞基因组学可以用于对单个病毒-宿主的相互作用进行明确的鉴定和机制研究。

Yoon 等人[Yoon HS et al. Science. 2011]从自然状态下的 Picozoan 原核细胞中发现新的纳米病毒。Roux 等人[Roux S et al. Elife. 2014]对未培养的伽马蛋白细菌分支 SUP5 进行单细胞分析发现，其中三分之一的细胞受到尾病毒或微虹膜噬菌体的感染。Labonté 等人[Labonte JM et al. ISME J. 2015]采用单细胞测序的方法在海洋细菌和古细菌基因组中，鉴定了 20 种病毒的序列，其中至少有 4 种噬菌体-宿主相互作用具有晚期裂解感染的特征。

## （三）微生物鉴定与筛选

单细胞技术可以用于高效地分析从不同环境中收集的基因组数据，进而发现微生物新的分支和物种。Eloe 等人[Eloe-Fadrosh, E et al. Nat Commun. 2016]从单细胞基因组数据中，发现了一种仅在高温 pH 中性地热泉中新细菌门“氮假丝酵母”。de la Cruz Peña 等人[de la Cruz Peña MJ et al. Viruses. 2018]通过对人类唾液样本中口腔的病毒群落进行单细胞测序，将唾液病毒分成了大约 200 个主要病毒簇。

单细胞基因组学可以用于探索微生物亚种之间的差异。Kashtan 应用单细胞测序对海洋蓝藻原氯球菌进行研究 [Kashtan N et al. Science. 2014]，发现原球菌是由数百个具有不同“基因组主干”的亚群组成，且至少在几百万年前就已经分化。Chijiwa, R 等人利用大规模平行的单细胞基因组测序技术（SAG-gel 平台）[Chijiwa, R et al. Microbiome. 2020]，从菊粉喂养前后的小鼠肠道微生物分离了 267 株细菌且各有明确的标志基因，为微生物的筛选提供了充分依据。

## 2.7 新药研发

在单细胞水平上分析基因表达模式更有可能为药物靶标和生物标记物的发现提供更多的信息 [Valdes-Mora, F et al. Front. Immunol 2018]，为提高靶向治疗效果和降低治疗副作用提供更精准的方向。

单细胞技术可用于构建疾病特异性和细胞特异性的药物筛选模型。2009 年 Brouzes 等人将单个细

胞与药物样品封装在独立水性微滴中，对细胞活力和生长进行定量评分，检测药物样品的细胞毒性 [Brouzes E et al. PNAS 2009]。韩国三星基因组研究所使用 scRNA-seq [Kyu-Tae Kim et al. Genome Biol. 2016]，对转移性肾癌的治疗方案进行了综合性评估。检测发现药物靶向通路的激活在原发部位和转移部位之间以及单个癌细胞之间有相当大的差异，据此提出了一种联合靶向治疗转移癌细胞的方案。体外和体内实验验证了这种策略治疗效果显著高于单一疗法。

单细胞技术可以探索特定细胞，为新药物的开发提供了方向。在本章前面的各个应用部分，对单细胞技术在癌症、疾病治疗方面的应用，例如耐药性、药物疗效、新药研发方向等进行了讨论，在此不再详述。

目前药物发现过程中的筛选环节存在局限性。Sanjay R 等人发布的 sci-Plex 技术 [Srivatsan SR et al. Science. 2020] 利用核哈希技术来分析和量化单个细胞中的基因表达，以应对单个细胞分辨率下的数千种样品的干扰。这项技术有望用于癌症、感染、产前医学和其他研究药物的发现。

## 第三章 单细胞测序技术及流程

单细胞测序实验及分析的流程一般包括：单细胞悬液制备、单细胞分选、文库制备、高通量测序和生物信息分析。下面，将对流程中的每个步骤进行详细介绍。

### 3.1 单细胞悬液制备

对于单细胞测序，制备单细胞悬液是实验和数据分析的基础。下图为外周血样本、组织样本、贴壁细胞三种样本单细胞悬液制备基本流程。

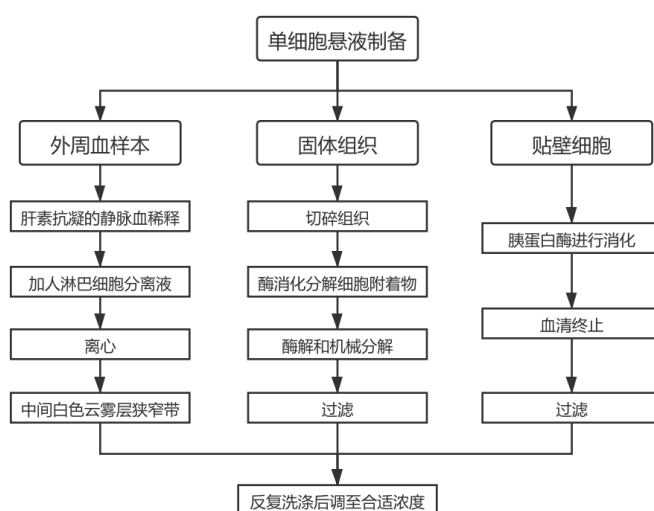


图 3-1 单细胞悬液制备流程图

在悬液制备的过程中，外周血样本不需要酶参与；固体组织由于有多种附着物，需要根据情况添加特定的酶进行酶解；对于不同器官的组织也需采取合适的方案来制备单细胞悬液。

对于大多数类型的细胞，单细胞悬液的制备并不困难，悬液的质量主要取决于实验人员的操作水平。在悬液制备过程中，细胞活性、组织类型、杂质等都将影响悬液的最终质量，需要注意的事项有：选取合适的缓冲液；处理样本时动作温和，采用宽口枪头缓慢吹打单细胞悬液；可使用细胞筛去除成团细胞及较大的组织碎片；可用密度梯度离心或去除碎片的试剂盒去除碎片；可用流式细胞仪等分选活细胞，配合镜检等以提高活率。

### 3.2 单细胞分选和文库制备

#### （一）单细胞分选



单细胞分选有多种方法，实际使用时需根据样品的实际情况和研究目的来选择合适的方法，表 3-1 为目前主要的单细胞分选方法。

名称	主要操作	分选细胞数量	效率	使用场景
Pipette	移液管反复稀释	少	低	样本极少时推荐使用
Microscope	以显微镜引导毛细吸管提取	少	低	早期胚胎或未培养的微器官中提取细胞的经典方法
FACS	流式细胞分选	多	高	最常用的策略：当目标细胞表达的标记物水平很低时，FACS 也是首选方法
LCM	激光系统从固体样品中分离细胞	少	低	福尔马林固定、石蜡包埋或冷冻固定的固体样品
Microfluidics	微流控	多	高	样品消耗低、分析成本低、对介质的固体污染非常敏感
CTC 富集	用抗体结合的磁珠识别 CTC 细胞	少	高	分离 CTC 细胞的首选手段
Piezo-dropping	压力波从毛细管中注入液滴	少	较高	仅在空气中发挥作用
SODA robot	由注射泵控制连接有玻璃微管吸管的注射器	较多	高	操作要求高，最先进的设置但很难常规应用

表 3-1 主要的单细胞/单细胞核制备方法

## （二）单细胞文库的制备

单细胞文库的制备根据单细胞组学的不同有着不同的建库方式，这里简单介绍转录组、基因组、表观组、抗体建库关键点。

### 1) 单细胞转录组建库

单细胞转录组测序 (scRNA-seq) 文库制备的常见步骤主要为三步：1) 反转录第一条链；2) 第二条链合成；3) cDNA 扩增。

下图 (图 3-2) 是对目前主要采用的六种单细胞转录组建库方式的比较，在不同的步骤上均有一定的差异，使用时需根据实际情况进行选择。

建库过程中扩增方式的不同，会有不同的影响。PCR 为非线性扩增，效率取决于序列；IVT 为线性扩增，需要对 RNA 多一轮反转录，造成额外的 3' 偏差。例如 CEL-seq (包括 CEL-seq2)、Drop-seq、Microwell-seq、MARS-seq 等方法对 3' 端具有偏向性，而 Smart-seq (包括 Smart-seq2)、seq-well、SCRB-seq 等则偏向于全长转录组。

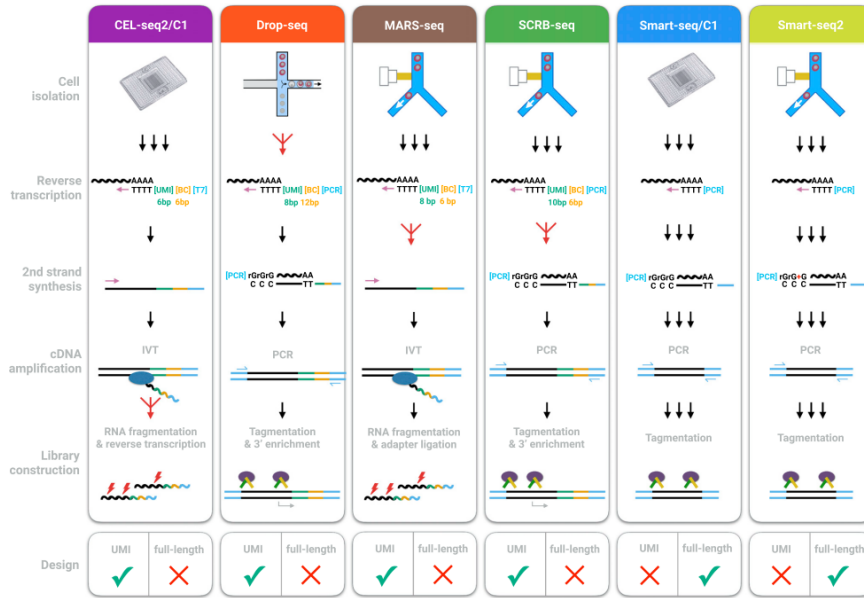


图 3-2 六种主要单细胞转录组测序方法文库制备比较

scRNA-seq 建库过程中的重要挑战是 mRNA 捕获效率低和建库成本高。通常，细胞会在低渗缓冲液中溶解，使用 poly (dT) 引物对 mRNA 加上 poly (a) 以捕获 mRNA。但由于泊松式抽样，只有 10-20% 的转录本在这个阶段反向转录。mRNA 捕获效率低是现存的 scRNA-seq 方法中的一个重要挑战，需要一种更高效的细胞溶解策略。

深入的单细胞分析需要对大量细胞进行分析。基于测序成本的考虑，大部分方法只关注转录本的 5' 或 3' 端。在反转录步骤中加入了独特的分子标识符 (UMIs) 或条形码 (随机 4-8 bp 序列) 后，可以有效地消除 PCR 偏差，从而提高准确性。然而，目前基于 UMI 标签的方法对依然是对转录本的 5' 端或 3' 端进行测序，因此不适合于等位基因特异性表达或亚型使用。对全长转录组进行测序的 Smart-seq2，可以分析等位基因特异性表达，但单个细胞的测序成本与普通 RNA 测序成本相近，而建库成本则远远高于普通 RNA 测序，总体成本上远高于基于 Microwell/Droplet 的测序方法。

综上所述，各种建库方法在成本、适用性、测序深度、覆盖度等方面都具有差异，具体应用时的选择还需根据研究目的进行针对性的选择，或者结合使用。

## 2) 单细胞基因组建库

### ① DOP-PCR

DOP-PCR (Degenerate Oligonucleotide Primed PCR)，即退化寡核苷酸引物 PCR，该技术使用简并引物，可以结合到 DNA 任何部位，从而通过随机扩增得到全基因组序列。引物的 3' 端为 6bp 退化寡核苷酸，5' 端为正常的碱基。3' 端和 DNA 链随机结合，最初几个循环退火温度要低 (30°C 左右)，然

后延伸直到 5' 端引物配对处。该技术的缺点是扩增后的基因组覆盖度不好，这是由于其指数扩增导致的扩增均一性差，覆盖度也就随之变差。但这种方法可以对 pg 级别的起始量进行扩增，因此在扩增模版起始量非常低的情况下，可以用于预扩增，然后结合其他方法再扩增。

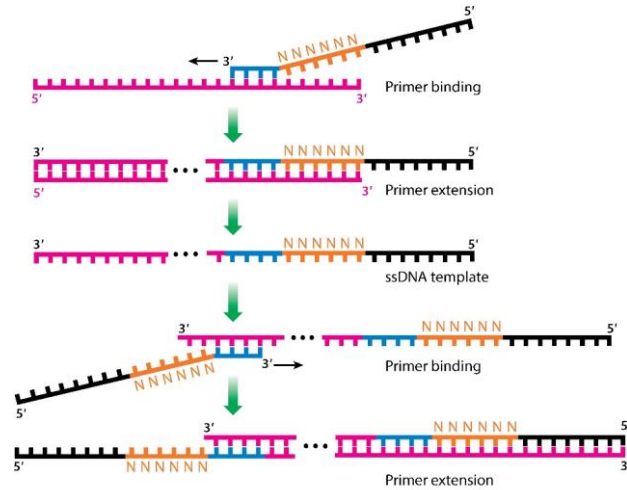


图 3-3 DOP-PCR 技术原理

[Lei H et al. Annual Review of Genomics & Human Genetics, 2015]

## ② MDA, ddMDA, eMDA 和 TruePrime

MDA (Multiple Displacement Amplification), 即多重置换扩增技术, 使用多种引物六聚体和  $\phi 29$  DNA 聚合酶进行结合与扩增。引物六聚体是由 6 个随机核苷酸组成。 $\phi 29$  DNA 聚合酶是一种高保真聚合酶, 具有 3' 到 5' 外切酶校读能力, 且具有特殊的多重置换和连续合成特性。反应时, 引物六聚体先随机结合到 DNA 模版上, 在  $\phi 29$  DNA 聚合酶调节下延伸。当遇到另一条新链随机引物时,  $\phi 29$  DNA 聚合酶替换引物, 继续延伸形成支链结构, 新的引物和聚合酶会在支链上重新结合延伸, 所形成的 DNA 片段一般为 50~100kb。MDA 的扩增覆盖度高于 DOC-PCR, 但均为指数扩增, 故仍存在扩增偏倚性的问题。

为了克服偏倚性缺陷, 在 MDA 基础上出现了 ddMDA, eMDA, TruePrime 等技术。ddMDA, eMDA 都是在通过把扩增分散到数百万的小液滴中完成, 实现提升扩增均一性和纠正偏倚性的目的; TruePrime 则是将 MDA 中的随机六聚体引物替换为一个以 DNA 为模板的引物合成酶, 从而提高扩增均一性。

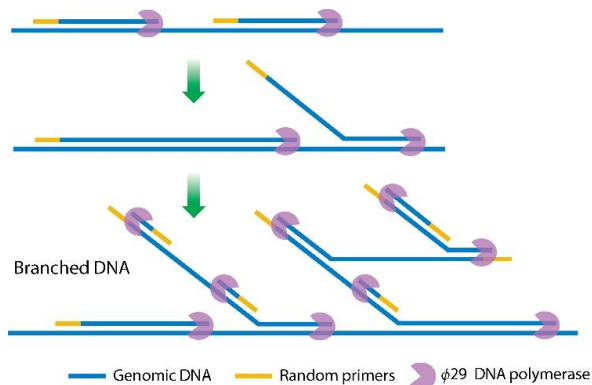


图 3-3 MDA 技术原理

[Lei H et al. Annual Review of Genomics & Human Genetics, 2015]

### ③ MALBAC

MALBAC (Multiple Annealing and Looping-Based Amplification Cycles), 即多次退火环状循环扩增技术, 它通过在八聚体引物随机引物 5' 端多加了 27 个固定的碱基序列的方式引入线性扩增和指数扩增特性, 从而保证每一个被扩增的片段扩增倍数相对均一, 降低了扩增的偏倚性, 同时为之后的 PCR 指数扩增提供确定的双端引物。MALBAC 可将 pg 级别的模版量扩增至  $\mu\text{g}$  级别, 从而更容易检测到较短的 DNA 序列变异。

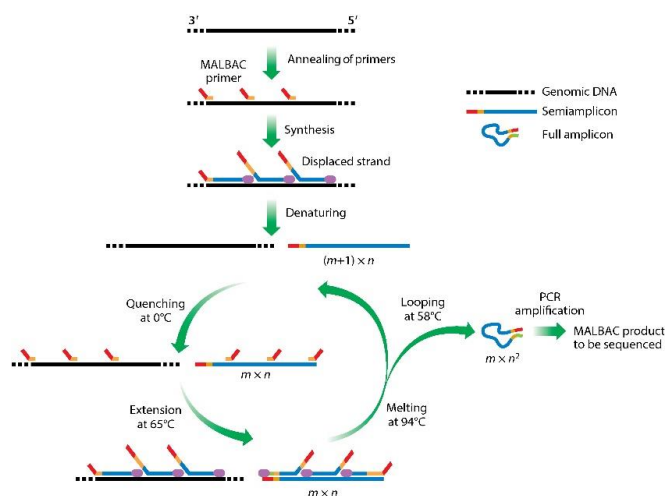


图 3-4: MALBAC 技术原理

[Lei H et al. Annual Review of Genomics & Human Genetics, 2015]

### ④ LANTI

通过引入线性扩增特性, MALBAC 技术在一定程度上限制了随机指数扩增的程度, 但扩增偏倚性仍

然存在。为了完全消除指数扩增带来的偏倚性，中美研究人员联合研制出一种纯线性扩增技术 LIANTI (Linear Amplification via Transposon Insertion)。研究者利用 Tn5 转座酶结合 LIANTI 序列，然后用 Tn5 转座酶复合体去随机插入单细胞基因组 DNA，经过类似正常 Tn5 建库过程之后，用转录获得大量线性扩增的转录本，再经过逆转录之后得到大量的扩增产物，就进行常规的建库测序操作。

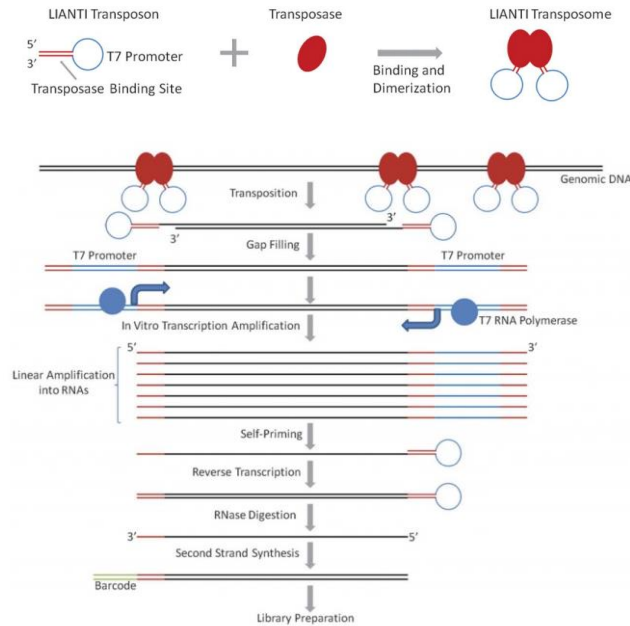


图 3-5 LIANTI 技术原理 [Chen, C et al. Science]

单细胞基因组经 LIANTI 技术扩增后，噪音非常小，并且在同等测序量 (~90 Gbp) 的前提下获得高达 97% 的基因组覆盖度。高均匀性使得测量拷贝数的空间分辨率得到巨大提升，检测到 100 kb 甚至更小尺度范围内的碱基微缺失微重复。这意味着能更有效、更精准地检测出更多遗传疾病。此外，由于使用了更高效的 DNA 聚合酶，单碱基扩增错误率被降低至  $10^{-7}$  以下。

### 3) 单细胞表观组建库

表观遗传学是控制基因活动的时间和空间的机制，与 DNA 序列无关，在胚胎发生、分化、谱系特征和癌症进化中发挥着至关重要的作用。单细胞表观基因组学技术与 RNA 表达和 SNP 数据相结合，进而确定表观遗传学在基因精确调控中的机制作用。近年来，多种单细胞表观组测序技术被开发出来，使我们能够以前所未有的分辨率了解表观基因组异质性。

Method	Sample	Raw Data (Gb)	Coverage (%)	Allele Dropout Rate (ADO)	False Negative Rate (FNR)
Bulk	Bulk1*	119	*Bulk1 is the standard for comparison		
	Bulk2	138	99.9	0	0.003
LIANTI	BJ1	86	97.0	0.175	0.459
	BJ2	99	96.6	0.186	0.463
	BJ3	65	91.4	0.299	0.620
MDA (Qiagen)	Q1	82	88.1	0.329	0.609
	Q5	84	80.0	0.438	0.673
	Q9	90	91.8	0.249	0.540
MALBAC (Yikon)	YK1	91	72.0	0.477	0.708
	YK2	96	72.6	0.443	0.673
	YK5	96	73.4	0.436	0.659
DOP-PCR (Sigma)	S3	83	47.9	0.765	0.871
	S4	82	45.0	0.801	0.910
	S5	86	41.1	0.816	0.901
MDA (GE)	GE2	96	90.6	0.304	0.615
	GE4	129	92.0	0.281	0.588
	GE10	90	76.5	0.444	0.706
MALBAC-like (Rubicon)	R3	82	56.9	0.646	0.821
	R7	82	68.4	0.494	0.758
	R9	86	54.1	0.684	0.843

表 3-2 各种单细胞全基因组建库测序方法的比较[Chen, C et al. Science]

### ① scATAC-Seq

染色质转座酶可接近性单细胞测序分析 (scATAC-Seq)，是通过将微流体分选和Tn5 转座酶切割结合起来，用于绘制单细胞基因组中可接近区域的试验方案。scATAC-Seq会在建库过程中加入的Tn5 转座酶将对染色质可开放区域进行剪切，并通过测序条形码标记染色质开放区域。标记的DNA片段经过纯化，并通过细胞特异性条形码扩增，以完成建库。随后，将来自所有单细胞的文库混合，进行后续的测序和分析。

### ② scBS-Seq、scWGBS、scM&T-Seq

单细胞亚硫酸氢盐测序 (scBS-Seq) 和单细胞全基因组亚硫酸氢盐测序 (scWGBS) 是基于亚硫酸氢盐测序 (BS-Seq) 和全基因组亚硫酸氢盐测序 (WGBS)，加入亚硫酸氢盐接头标记 (PBAT) 的改进版本，从而能够以单细胞分辨率检测基因组DNA中的甲基化胞嘧啶。这两种方法的建库过程中，基因组DNA要经过亚硫酸氢钠处理以片段化DNA。随后使用含有衔接子序列和9个随机核苷酸的3' 延伸寡核苷酸引发互补链合成。该步骤执行多次，并以最大化标记的DNA链数量生成每个片段的多个副本。捕获标记的链后，将第二个衔接子进行类似整合，并使用索引引物进行PCR扩增以完成建库。

单细胞甲基化组和转录组测序 (scM&T-Seq) 则是基于scBS-Seq，结合Smart-Seq2和对单个细胞进行表观遗传学和基因表达模式平行分析。scM&T-Seq基于G&T-Seq构建，但不使用MDA进行DNA测序，而是使用scBS-Seq来解读DNA甲基化模式。首先，单个细胞被分离出来并单个裂解。随后，使用链霉

亲和素偶联mRNA捕获引物将mRNA与DNA链物理分隔。然后分别使用Smart-Seq2和scBS-Seq的建库方式分别处理mRNA与DNA以完成建库。

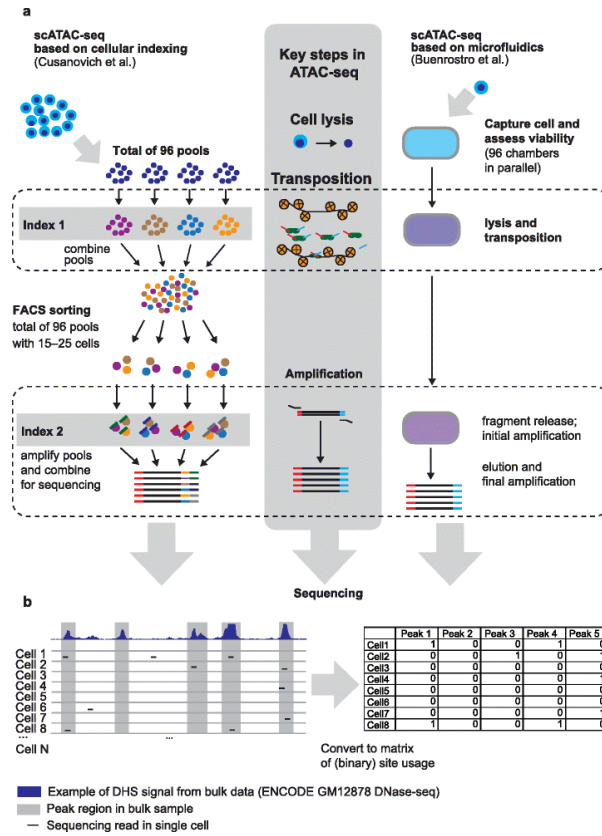


图 3-6 scATAC-Seq 技术原理概览 [Pott, S et al. Genome Biol]

### ③ scRRBS

单细胞简化代表性亚硫酸氢盐测序 (scRRBS) 利用一种或多种限制酶处理基因组DNA，进行序列特异性片段化，再用亚硫酸氢盐处理片段化的基因组DNA，最后进行测序。该方法对启动子区和重复序列区等甲基化水平较高的位置尤其有效。

### ④ Drop-ChIP-Seq

基于液滴的单细胞染色质免疫沉淀测序 (Drop-ChIP-Seq) 通过微流体、唯一的分子条形码以及NGS来分析单个细胞的染色质状态。首先，将单个细胞分离到含有裂解缓冲液和MNase的液滴中，随后将其与其他带有不同寡核苷酸的液滴融合。这些寡核苷酸带有细胞特异性条形码、测序接头和限制位点的序列。DNA连接酶也与液滴融合用来完成标记过程。接下来，将载体染色质加入混合液滴中，随后进行标准染色质免疫沉淀测序 (ChIP-Seq) 过程。

## ⑤ scHi-C

单细胞染色质构象捕获测序（scHi-C）是一种以单细胞分辨率分析染色质相互作用的方法。在该方法中，单细胞被分离后使用甲醛交联 DNA-蛋白质复合物，再将样本片段化，连接并消化DNA。然后将得到的 DNA片段进行 PCR 扩增并测序。

## 4) 抗体文库制备

如需同时检测膜表面蛋白和样本混样分析时，需要进行抗体文库制备。这里以BD AbSeq为例。

具体操作是，在上样之前根据实验需求分别用BD Rhapsody AbSeq panel和Sample Tag抗体进行抗体染色，再将染色后的细胞放入BD Rhapsody系统上捕获单细胞。将BD Rhapsody系统中捕获了单细胞信息的磁珠进行回收，利用BD Rhapsody建库试剂盒进行文库构建，文库构建流程如图所示。将构建好的文库进行二代测序。测序得到的原始数据利用SevenBridges的pipeline进行数据处理和过滤，获得可视化分析的表达矩阵。

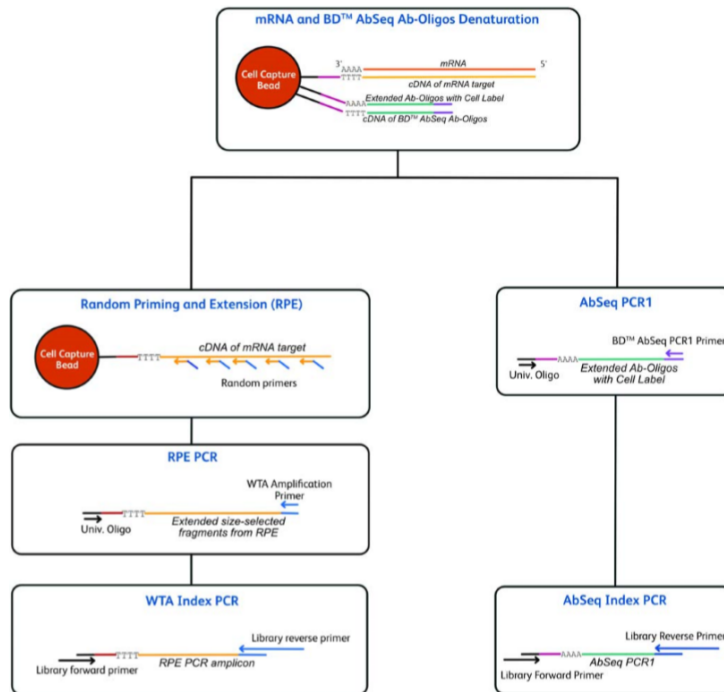


图 3-7 BD Rhapsody mRNA WTA 和 AbSeq 建库流程



### 3.3 单细胞高通量测序

单细胞建库完成后进入测序环节。目前，常用于单细胞高通量测序仪厂商由 Illumina 主导，MGI 在加速进入市场。

Illumina 在 2017 年推出 NovaSeq 测序系统，这让单细胞测序的成本大大下降，并推动了大规模的单细胞测序项目（如人类细胞图谱计划、人类生物分子图谱计划等）。2020 年，Illumina 推出的新产品 NextSeq 1000&2000 测序系统将单细胞应用列为重要应用之一，NextSeq 2000 系统支持机载、本地和云端的分析软件，使用户能够灵活地分析数据。机载 DRAGEN(Dynamic Read Analysis for Genomics) Bio-IT 平台可提供准确的超快速二级分析方案。DRAGEN 平台采用了优化的硬件加速算法，可用于各种基因组分析解决方案，包括 BCL 转换、基因组定位、序列比对、序列排序、重复标记和变异检出。DRAGEN 使用了一流的流程算法，帮助初级用户和高级用户突破数据分析的瓶颈，减少他们对外部生信专家的依赖。用户可以减少大量用来作生信分析的时间和精力，更多地关注结果。

单细胞测序实验选择的测序系统主要取决于研究的问题和规模。具体的测序环节这里不再赘述，敬请参考基因慧曾发布的《2020 基因行业报告》或即将发布的《2021 基因行业报告》。

### 3.4 生物信息分析和数据解读

对于不同的单细胞测序技术的数据分析，除因建库方式的不同，而数据预处理阶段与 scRNA-seq 类似外，后续的分析更多地立足于研究目的而进行。以下重点针对带 barcode 的 scRNA-seq 数据分析进行阐述，主要分为五个部分。

#### (一) 数据预处理

参照 Malte 等人发布的 pipeline 进行阐述 [Malte D Luecken et al. Mol Syst Biol 2019]。

首先是数据质控，有三个主要的 QC 变量，单独考虑这三个细胞 QC 变量中的任何一个都可能导致对细胞信号的错误解读。考虑到多变量细胞 QC 的依赖性，筛选出更可靠的过滤参数。可通过测试 QC 指标来确定数据集的质量，但不应通过调整 QC 阈值以人为地改善统计检验的结果。

第二个阶段是对数据进行标准化。经过 Luyi Tian 等人的评测发现 [Tian L et al. Nat Methods. 2019]，Linnorm+SAVER 进行组合可以得到最佳的数据标准化和 imputation 结果。

第三个阶段是数据整合，以消除单细胞实验过程中带来的生物过程影响、技术因素影响、以及批次效应并进行数据整合，最终尽可能地通过数据展示单个细胞真实的表达情况，而 MNNs 整体上表现最佳。

第四个阶段是差异分析、降维和可视化。在降维上，t-SNE 是使用最广泛的方法。最后通过表达热

图、富集分析等，将不同细胞亚群、细胞亚群表达图谱、marker 基因通路富集等结果可视化展示出来。

对于不带 barcode 的 scRNA-seq 数据，例如 SMART-seq2 的数据，前期数据质控方面可参考 bulk RNA-seq，在此不再赘述。

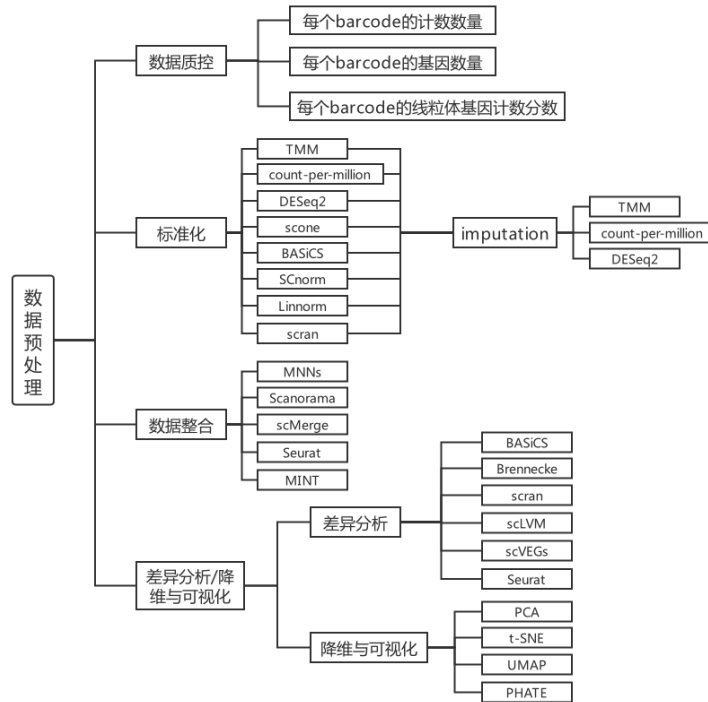


图 3-8 含 barcode 的 scRNA-seq 数据预处理流程

## (二) 细胞水平分析和基因水平分析

在细胞水平上，聚类分析中，Seurat 在单细胞数据集中表现最好，RaceID3 在更加复杂的细胞混合数据集中表现突出。轨迹分析中，Monocle2 默认使用 DDR-tree，这样会导致很多细胞被放置在轨迹两端而不是在轨迹上，没有反映真实的情况，但确实能够反映正常的细胞分化情况。

在基因水平上，主要通过比较各个细胞亚群中基因差异表达情况，基因功能富集分析，以及基因网络分析，进一步分析各个细胞亚群 marker 基因的功能。

除以上常规分析外，逐渐也有研究者 [Wirka, R.C. et al. Nat Med 2019] 将单细胞测序的结果同以往全基因组关联分析 (GWAS) 的结果结合起来，并进行了 QTL 的分析，以更好地对数据进行解读。



图 3-9 细胞水平与基因水平分析

### (三) 主要数据库介绍

在单细胞数据分析过程中，有大量的数据库被利用到，以下简列部分数据库供参考。

数据库	网址	主要内容和功能
GEO	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/</a>	单细胞测序原始数据和表达矩阵主要上传网站
ebi	<a href="https://www.ebi.ac.uk/arrayexpress">https://www.ebi.ac.uk/arrayexpress</a>	单细胞测序原始数据和表达矩阵另一上传网站
GTEx	<a href="https://www.gtexportal.org/home/datasets">https://www.gtexportal.org/home/datasets</a>	各种组织、细胞的表达数据，SNP 与基因表达的关联分析结果 (eQTL)
SCPortalen	<a href="http://single-cell.clst.riken.jp/">http://single-cell.clst.riken.jp/</a>	单细胞元数据、细胞图像和序列信息
SCDevDB	<a href="https://scdevdb.deepomics.org">https://scdevdb.deepomics.org</a>	发育途径中差异表达的单细胞数据
CellMarker	<a href="http://biocc.hrbmu.edu.cn/CellMarker/">http://biocc.hrbmu.edu.cn/CellMarker/</a>	人体不同组织不同细胞 marker 基因
STRING	<a href="http://string-db.org/cgi/input.pl?sessionId=5MdThaU7r9oc&amp;input_page_show_search=on">http://string-db.org/cgi/input.pl?sessionId=5MdThaU7r9oc&amp;input_page_show_search=on</a>	基因网络
GO	<a href="http://geneontology.org/">http://geneontology.org/</a>	GO 数据库
KEGG	<a href="https://www.genome.jp/kegg/">https://www.genome.jp/kegg/</a>	Pathway 数据库

表 3-3 主要数据库介绍

#### （四）生物信息软件及平台介绍

以下是各大机构推出的代表性单细胞生物信息软件主要信息。

软件名称	开发机构	获取方式	平台适用性	主要分析内容
Cell Ranger	10x Genomics	免费	10x Chromium	scRNA-seq、ATAC-seq 的原始数据比对、质控、表达矩阵构建；数据标准化；降维和聚类分析
Loupe Cell Browser	10x Genomics	免费	10x Chromium	可视化和分析
Partek Flow	Partek	许可证	无	scRNA 数据完整数据分析和可视化
Qlucore Omics Explorer	Qlucore	许可证	无	scRNA 数据过滤，降维，聚类和可视化
mappa Analysis Pipeline	Takara Bio	免费	Takara ICell8	scRNA 原始数据比对和表达矩阵构建
hanta R kit	Takara Bio	免费	Takara ICell8	比对数据的聚类和分析
Singular Analysis Toolset	Fluidigm	免费	Fluidigm C1 / Biomark	scRNA 差异表达数据分析和可视化
SeqGeq	FlowJo/BD Biosciences	许可证	无	数据标准化和 QC，降维和聚类，分析和可视化
Seven Bridges	Seven Bridges BD Biosciences	许可证	BD Rhapsody / Precise	基于云平台的原始数据比对、QC 和表达矩阵构建
BD™ Data View	BD Biosciences		BD Rhapsody	用于聚类可视化和消除多重态数据以获得清晰的差异化基因表达
Tapestri Pipeline/Insights	Mission Bio	免费	Mission Bio Tapestri	单细胞数据分析
BD Rhapsody	BD Biosciences	免费	BD Rhapsody	用于数据比对，QC 和表达矩阵构建
BaseSpace SureCell	Illumina	许可证	Illumina SureCell libraries	原始数据比对和矩阵构建
OmicSoft Array Studio	Qiagen	许可证	无	原始数据比对，QC 和表达矩阵构建，降维和聚类
OmniAnalyzer	百奥智汇	许可证	通用	数据比对、质控、差异表达、降维和聚类，相关性分析，拟时分析，免疫组库分析

表 3-4 各大厂商开发的单细胞数据分析平台

各大厂商开发的工具解决了初期数据分析的需求，但由于数据和分析要求的复杂性，并不能满足所有需求。据此，单细胞研究人员也开发了大量生物信息分析软件（如数据预处理流程图中所列软件），

以应对不同的数据和情况。下表展示目前主要的几种降维分析所用的工具。

工具名称	开发者	获取方式	数据要求	主要特点	年份
PCA	Hotelling H	免费	无	线性降维，保留原始数据特征	1933
t-SNE	van der Maaten, L. & Hinton, G	免费	无	使用 t-分布领域嵌入算法，将高维分布点的距离，用条件概率来表示相似性。高低维数据可视化是不容易分辨，训练的时间也比较长	2008
UMAP	McInnes L, et al.	免费	无	非线性降维，UMAP 计算更快，能更好地反映高纬结构	2018
PHATE	Kevin R. Moon, et al.	免费	无	非线性结构的可视化方法；保持了数据中的一系列模式，包括连续的进程、分支和集群；通过降噪，可以发现占比更小的亚群	2019

表 3-5 单细胞降维分析主要工具

PCA 作为最古老的降维方法，在单细胞数据分析中依然可以得到有效利用，但目前 scRNA-seq 中使用最广泛的还是 t-SNE。由于算法本身的特性，t-SNE 在可视化时不能清晰地对高维和低维数据展示出来，可能造成一些使用者的困扰。如下图中 CD8 T 细胞亚群的分布映射到平面上被 CD4 T 细胞亚群分成了两部分，UMAP 则可以避免这个问题。PHATE 则可以通过降噪发现占比极小的细胞亚群，相对更适用于对同一细胞类型的亚型分析。据此，在降维分析过程中，选取哪个工具还需根据数据的实际情况而定。

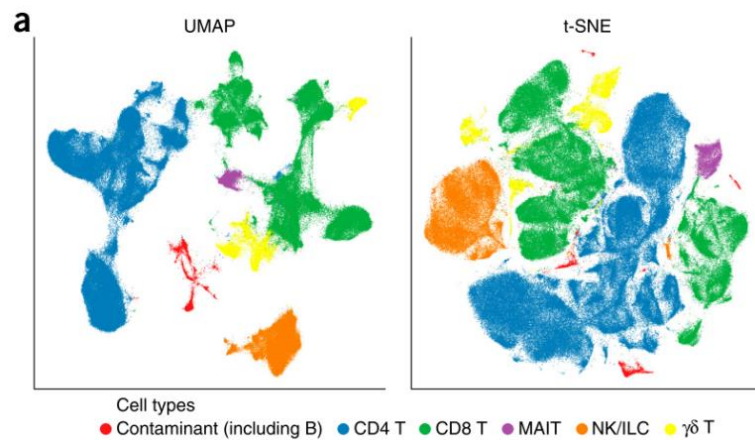


图 3-10 UMAP 和 t-SNE 降维分析效果比较图 [Kalluri AS. et al. Circulation. 2019]

### （五）生物信息的重难点

单细胞技术的广泛应用产生了大量的数据，如何对数据进行有效的处理并得到理想的结果是生物信息的难点，以下为单细胞数据分析过程中常见的一些问题：

- a. 原始数据的质控：如数据预处理部分所述，选择合适的数据质控阈值对最终结果有重大的影响。
- b. 数据的标准化：选取合适的方法进行标准化，有利于减少误差，Linnorm+SAVER 进行组合可以得到最佳的数据标准化和 imputation 结果。
- c. 批次效应：在进行数据整合时需考虑实验、平台、测序等不同批次的问题，减少数据偏差。
- d. 差异分析：差异分析的工具以及阈值直接关系到聚类效果与细胞亚群 marker gene 的鉴定。
- e. marker gene 鉴定：细胞亚群 marker gene 数量的设定直接影响聚类效果。
- f. 分析工具选择：如降维工具分析所述，需根据实际情况选择恰当工具。
- g. 数据解读：经过数据分析将细胞进行了分类以及 marker gene 鉴定，如何对数据进行有效解读以及整合以往其他组学研究结果，是后续单细胞数据分析亟需解决的问题。
- h. 个性化数据分析：对细胞时序发育推断、细胞间相互作用预测、多种单细胞技术联合分析等需要设计算法进行个性化数据分析。目前缺乏相应的高层次生物信息研发人才。

## 第四章 其它单细胞技术

近年来单细胞行业的发展主要得益于单细胞测序技术的发展。但与此同时，其它单细胞技术也在高速发展，其中有很多能够与单细胞技术互补，为各领域的研究提供更加全面、更加深层的信息。

### 4.1 质谱流式细胞技术

#### (一) 质谱流式技术 (Mass Cytometry)

在肿瘤微环境研究，疾病中的免疫应答、胚胎发育等科学研究，常常希望同时获得单细胞中多种不同蛋白质的表达情况。流式技术是用来实现这一目的的经典单细胞技术，即通过对单细胞的多参数检测来对样本进行亚群和功能分析，可以同时分析百万个细胞。

#### 1) 质谱流式技术原理

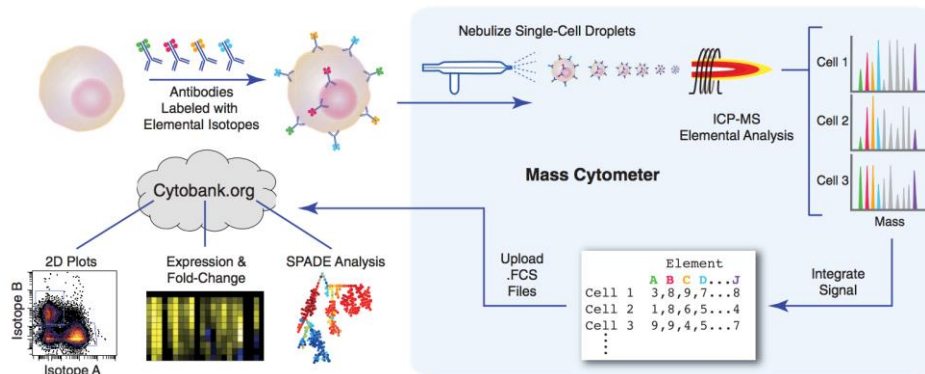


图 4-1 质谱流式细胞术分步骤原理

质谱流式技术采用金属标签偶联抗体，并且用质谱检测器来检测不同金属元素的信号。现有的质谱流式技术有 135 个检测通道，目前已开发的可检测金属元素达 50 余种，所以能在同一管细胞样品中对单细胞同时检测 50 余种细胞参数。质谱流式技术中标记抗体的金属标签采用的是相对原子质量介于 75~209 的金属元素，以镧系金属为主，不使用稀有元素、带有放射性元素及生物体内自由的金属元素，这样能够避免背景信号，有效保护实验人并且控制成本。此外现有技术可用钯金属来标记不同样本，最多实现 20 种不同样本混合入一管中进行同步实验，有效避免了不同样本实验操作之间的差异，并且能够缩短实验时间。

细胞悬液与带有金属元素标签的抗体结合后，在质谱流式仪中细胞先经过雾化器，形成一个个单细胞小液滴，进入高温的等离子体炬管（Inductively coupled plasma, ICP）并且经过偏转电极筛选掉电子后所有元素都成为带一个正电荷的离子，之后四极过滤器（Quadrupole deflector）按照离子质量进行过滤，只有达到 75Da 以上的元素才通过进入后续的检测通道。所有带一个电荷的正离子在到达检测器之前需经过一个加速器，所有加速只取决于质量。因而达到检测器的速度即反映出离子质量，检测器可以精确到 ns 的分辨率检测出来每一种离子的到达时间（Time-of-flight, TOF）。基于以上原理，质谱流式技术对于金属元素的检测能够达到 1 Da 的分辨率，有效避免了不同金属元素之间干扰。

## 2) 质谱流式技术流程

包括抗体 Panel 设计、抗体选择与验证、细胞悬液制备与染色、样本上机和数据分析等五个步骤。

抗体 Panel 设计是挑选出单细胞需要检测的细胞参数，一般将细胞类型相关的标记蛋白和研究所需的信号通路相关蛋白结合，最大化利用现有的金属元素标签。设计完 Panel 后需要选择适宜的抗体进行信号验证，测试抗体的最佳实验条件。之后即可进行样本的细胞悬液制备与抗体染色实验，一般一管样本用一百万的细胞，上机过程中根据研究所需选择的细胞数，管中所有样本都可上机。质谱流式的数据分析可采用 Cytobank 软件，在该软件中可便捷地进行可视化操作，实现细胞筛选、聚类 and 热图分析等目的，也可以通过 R 编程语言实现更多个性化的分析。

## 3) 质谱流式技术应用

质谱流式技术在肿瘤、免疫、转化医学、干细胞、药理研究等方向取得了大量研究成果。质谱流式技术被美国国家肿瘤研究中心（NCI）组织的 CIMAC-CIDC Immuno-Oncology Biomarkers Network 选择在临床试验中进行细胞分析中的首选工具。CIMAC-CIDC 是抗癌登月计划的一部分，癌症免疫监视与分析中心（CIMAC）和癌症免疫学数据共享中心（CIDC）的合作旨在推进新的免疫疗法，为癌症患者带来更大的利益。

在基础科研方面，质谱流式技术可用于细胞分型、信号通路研究、组织或肿瘤的微环境研究等。最新数据统计（截止 2020 年 5 月），已有超过 1000 篇发表的学术文章应用了质谱流式技术。在医学科研应用方面，该技术可以用于疾病相关的生物标记物诊断，为疾病的发生、发展、复发预测提供及时有效的信息。并且可用于免疫分型，免疫系统动态监测以及对特定人群如孕妇、胎儿提供免疫特征分析。在药物开发方面，质谱流式技术用于监测用药后的细胞反应，药物对于免疫系统的影响分析，辅助临床试验患者的疾病的分型分级等。



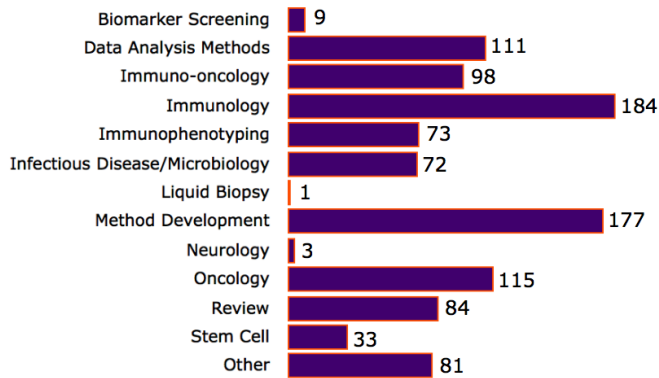


图 4-2 质谱流式已发表文章涉及领域 (来源/Fluidigm)

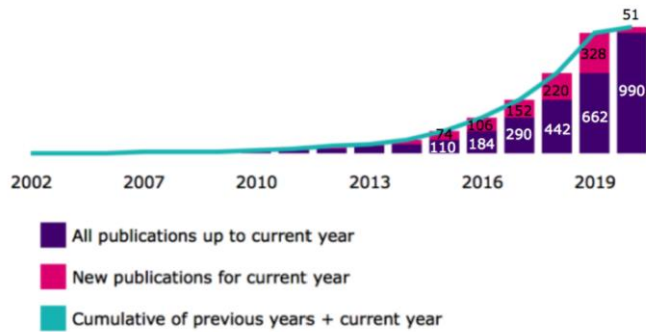


图 4-3 应用质谱流式技术已发表的学术文章 (来源/Fluidigm)

#### 4) 质谱流式技术服务代表企业

DVS Sciences 公司是最早开发质谱流式仪的公司，开发了 CyTOF 和 CyTOF2 仪器及相关的试剂。2014 年 Fluidigm 公司收购了 DVS Sciences，因而拥有质谱流式的专利技术。Fluidigm 公司基于其 Helios 质谱流式系统推出了一系列细胞分型和信号通路相关的研究 Panel，开发了上百种应用于质谱流式技术的金标抗体。例如，Maxpar® Direct™ 一站式免疫分型系统能够助力研究人员应用 CyTOF 技术，轻松量化人 PBMC 和全血样本中 37 种不同的免疫细胞亚群组成，这为临床诊断中的免疫分型和对免疫系统研究都提供了极大便利。

此外，Helios 平台也在肿瘤研究方面有着广泛的应用。利用该技术对黑色素瘤患者进行单细胞分析检测，发现转移性黑色素瘤患者外周血中的单核细胞 (classical monocytes) 可能是检测抗 PD-1 免疫检查点疗法起效的潜在生物标志物。除了筛查生物标记物，科学家们还可以利用 Helios 研究组织和肿瘤微环境的细胞相互作用。国内目前也有专门提供质谱流式技术服务的公司，如普罗亭和宸安生物。

## （二）成像质谱流式技术（Imaging Mass Cytometry, IMC）

大部分单细胞技术都是将组织消化为单细胞悬液后进行后续的实验，这样将无法获取细胞在组织中的空间位置信息，而细胞的空间信息对于研究细胞之间的相互作用和组织微环境的形成等有重要意义。在质谱流式技术基础上发展起来的成像质谱流式技术则能实现了原位流式检测。

与质谱流式技术类似，质谱成像也是采用金属标签偶联抗体，通过 TOF 方法来分辨不同的金属元素，然而不同之处在于，质谱成像技术应用于组织切片，能够还原细胞的空间位置，实现单细胞原位多参数分析。该技术一般采用厚度为 5-8  $\mu\text{m}$  的石蜡或者冰冻切片，在切片上完成多抗体孵育，之后在质谱成像仪中样品被紫外激光以  $1\mu\text{m}^2$  为单位剥蚀，然后样品经过离子化过程后被质谱检测器检测到各个金属元素的信号，得到的金属元素信号被计算机处理后以不同颜色的形式呈现，得到类似于荧光染色图片的结果。质谱成像数据一般用 MCD Viewer, Cell Profiler 和 histoCAT 三个软件处理，根据研究需要得到相应的细胞聚类 and 蛋白表达分析热图等。

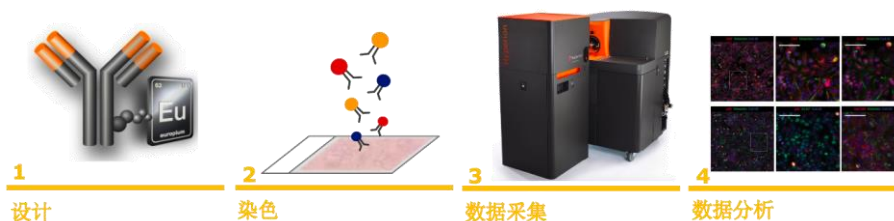


图 4-4 成像质谱流式实验流程

Fluidigm 公司的最新 Hyperion 质谱流式系统，同时拥有 Helios 质谱流式系统和 Hyperion 成像型质谱流式系统，能够实现质谱流式细胞技术和成像型质谱流式技术的切换。Hyperion 系统能够在获得单细胞多参数信息的基础上同时展现出细胞的空间结构，和可视化细胞的位置信息，这对于组织的微环境研究有着重要意义。2020 年 4 月最近发表在《Nature Cancer》上的研究利用 IMC 技术分析来自 METABRIC 队列中 483 例肿瘤标本的 37 种蛋白，实现了对乳腺癌病人的精准分型。此外，近期北京佑安医院肝病研究所利用 IMC 技术分析了两例新冠肺炎重症患者的肺组织样本，对肺组织浸润免疫细胞类型及疾病进展过程中的肺损伤机理进行了探索性研究。

## （三）质谱流式技术与其他流式技术比较

在传统流式基础上发展起来的另一项流式技术是光谱流式（Spectral flow cytometry）。光谱流式技术同样使用的是带有荧光基团抗体，不同之处在于其采用光谱仪和检测器阵列代替了传统流式的

反射器、滤光器和光电倍增管。光谱流式能够检测 400-900 nm 的全光谱信号，荧光染料的发射光谱被分成几十段，从而有了几十个可被分析的参数。与传统流式相比，光谱流式能够检测到微弱的自发荧光，通过其特异性光谱特征将自发荧光信号去除。同时，即使发射光谱相近的荧光素，由于其光谱波形不同，也能够被光谱流式仪器解析出来，因而光谱流式可以做到 40 色以上的多通道分析。

光谱流式技术最早由普渡大学（Purdue University）学者 2004 年提出，2007 年获得专利。索尼公司在 2011 年获得普渡大学的光谱技术专利许可，随后开发全球首款全光谱流式细胞仪。目前光谱流式的代表产品是索尼公司的全光谱流式细胞分析仪 ID700 和 Cytek 公司的 Aurora 全光谱流式细胞仪。

与光谱流式相比，质谱流式的优势在于可开发的通道更丰富，通道之间无信号干扰。无需进行补偿计算。此外，近几年推出的成像型质谱流式系统实现了原位流式检测，在获取细胞的多通道信息的同时还还原了细胞的空间位置，对于细胞互作、组织内微环境的研究提供了重要信息。

技术名称	技术特点	优势	局限	代表厂商及产品
质谱流式	抗体标签为金属元素；检测系统为 ICP 质谱检测器。	通道可增加至上百个；通道之间无干扰，无需计算补偿； 金属标签数目多，背景极低； 可做成像质谱流式，实现原位流式分析，获得细胞的空间位置信息； 多样化的数据分析方式。	价格较高；样品被气化，无法收集分选样品； 样品采集速度相对较慢	Fluidigm (Hyperion 质谱流式系统)
传统流式	抗体标签为荧光基团；检测系统为激光器和光电倍增管；滤光片逐步收集不同波长区间的信号。	细胞样品可以被依据需求分选出来，后续可继续培养；价格相对较低； 样品采集速度快。	检测通道有限； 通道易串色，需复杂的补偿计算； 样品可能有自发荧光	BD (BD LSRFortessa™ 等)； Beckman (Navios 等)； Agilent (xCELLigence 等)； 赛默飞 (Attune NxT 等)
光谱流式	抗体标签为荧光基团；收集 400-900 nm 全光谱信号，无需滤光片，检测器阵列进行检测，采用光谱解析技术。	能够检测到微弱的自发荧光，并通过特异性光谱特征去除； 能够解析波长相近的荧光素，检测超 40 色荧光信号； 细胞样品可以分选出来； 同参数检测成本低于传统流式。	采用多荧光通道时实验设计较为复杂； 选择通道较多时需要单染样品来辅助分析，增加实验时间	Sony (全光谱流式细胞分析仪 ID7000) Cytek (Aurora 全光谱流式细胞仪)

表 4-1 不同流式技术比较

## 4.2 单细胞多组学技术

从技术的角度看，随着单细胞测序技术的发展，其研究范围不再局限于转录组，而是扩展到了基因组、免疫组、表观组、蛋白组等多组学水平，研究对象涉及染色质、DNA、表观、转录因子、组蛋白、细胞表面蛋白等多种分子信息。基于单细胞多组学数据，细胞既可以通过来自相似细胞群的参考数据集中现有的细胞类型注释进行聚类，也可以执行无监督聚类来识别相似细胞组，并利用其它分子层面数据来进行更精细的划分。

例如转录组数据可用于鉴定不同细胞类型或状态之间差异表达的基因，基因组数据能够在单细胞水平检测基因拷贝数变化、单碱基突变、插入缺失及等信息，染色质可及性数据可用于鉴定可及区域和富集的 DNA 基序，表观组数据可用于鉴定不同细胞类型或状态之间的差异甲基化区域，蛋白质组数据可用于了解细胞间相互作用等。此外，近年来新出现的空间转录组测序方法及其数据整合算法，提供了细胞的空间信息，为单细胞测序技术进行了补充。

而从应用角度看，在肿瘤发生等复杂的生物过程中，异质性同时存在于基因组、转录组、表观组、免疫组等多层面，基因相同的肿瘤细胞可能具有不同的 DNA 甲基化、基因表达、克隆扩增模式，因此常需要多组学技术才能更加准确地将它们分类为不同亚群，揭示更深层的生物学机制。

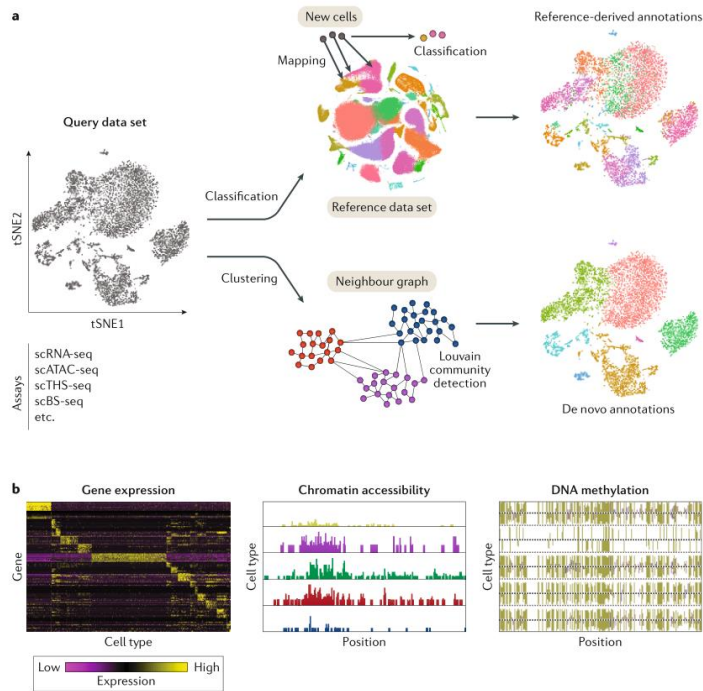


图 4-5 多组学数据整合下的细胞聚类与注释

[Tim et al. Nature Reviews Genetics. 2018]

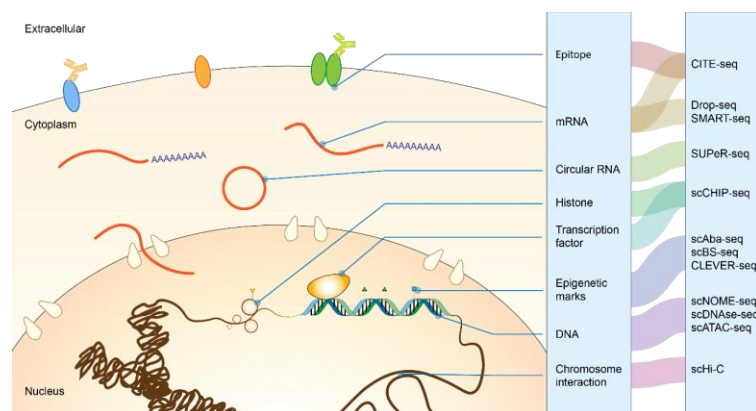


图 4-6 单细胞测序技术扩展到多组学和多分子水平

[Ren et al. Genome Biology 2019. 19:211]

### (一) 单细胞免疫组测序

免疫组库是指在特定时间段内，机体所有有功能的 T 细胞和 B 细胞总和。人体的适应性免疫系统主要依靠于 T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞表面上的 T 细胞受体 (TCR) 和 B 细胞受体 (BCR)，其受体上的互补决定区 (CDR) 与 MHC-抗原肽分子进行识别并特异性结合。BCR/TCR 存在一块区域叫作互补决定区 (CDR)，由 CDR1、CDR2、CDR3 组成，CDR1 和 CDR2 都是由 V 基因编码，而 CDR3 是由 V、D、J 三个基因编码形成，所以 CDR3 多样性程度最高，是主要参与抗原识别的区域。

免疫组库测序 (Immune Repertoire sequencing (IR-SEQ)) 是以 T/B 淋巴细胞为研究目标，通过多重 PCR 或 5' RACE 技术特异性扩增决定 B 淋巴细胞受体 (BCR) 或 T 淋巴细胞受体 (TCR) 多样性的互补决定区 (CDR3 区)，再结合高通量测序技术，全面评估免疫系统的多样性，深入挖掘免疫组库与疾病的关系。免疫组库测序技术应用非常广泛，目前已经在肿瘤预后评价、白血病微小残留病变监测、自身免疫性疾病诊断和疾病生物标志物开发等方面取得了一定的进展。

单细胞免疫组库测序是在免疫组库测序加入单细胞分选技术，在单细胞水平进行的免疫组库测序，可在免疫组库测序提供的信息基础上，揭示细胞的免疫异质性信息，更加全面、深入地揭示肿瘤、疾病中的免疫机制。

### (二) 单细胞蛋白质组学

尽管单细胞基因组和转录组能够揭示单细胞水平的 DNA 和 RNA 结构，但是在细胞内主要发挥功能的成分是蛋白质，因而研究单细胞蛋白质组学成为新兴领域。单个细胞中蛋白质的总量通常小于 1ng，

比用于常规蛋白质组分析的量至少减少 100 倍，而且数以千计的蛋白质具有高度的动态范围和化学计量，因而单细胞蛋白质组学目前还存在诸多难点，技术仍处于早期发展阶段。前文介绍的质谱流式技术和其他流式技术都是目前已有的重要单细胞蛋白质组学技术。

目前，单细胞蛋白质组学技术主要对细胞表面蛋白进行检测，通过类似流式细胞术的表面抗体标记技术，将细胞的免疫表型与转录组学得到的细胞群相匹配。不同于流式细胞术的荧光标记抗体，单细胞表型的蛋白质组学使用寡核苷酸耦合抗体，从而不受限于荧光通道和荧光补偿，可以在单细胞表面标记上百种甚至上千种蛋白，从而显著提高基于流式细胞术和质谱流式的单细胞蛋白质组通量。

主流的单细胞蛋白质组的检测有 BD 公司的 AbSeq 和 Biolegend 公司的 TotalSeq。

BD 公司的 AbSeq 平台，结合 BD 公司的 Rhapsody，将单细胞表面标记和测序相结合，基于细胞表面标记的 Hashtag 抗体，能够对不同样品来源的细胞进行 barcode 标记，提高通量、降低成本。此外如 4.2 章所述，有自身对应的转录组和免疫组后续流程。同为 Rhapsody 系统，使用的蜂巢板技术是依靠细胞重力自由沉降，避免了 10x Genomics 系统中存在的碰撞，所以对于起始细胞活性要求较低。此外，BD™ AbSeq 抗体-寡核苷酸复合物利用寡核苷酸测序来获得多重蛋白检测，用于单细胞水平的多组学分析，使得研究者可以在同一实验中同时检测蛋白质（抗体-抗原相互作用分析）和 mRNA 表达。BD 多样本分析试剂盒，同样利用抗体偶联样本标签(寡核苷酸序列)对不同来源样本进行标记，然后混样进行检测，可以显著降低时间成本和实验成本(最多可实现 12 个样本的同时检测)，还可以通过样本标签识别多细胞数据，提高单细胞数据质量。

Biolgend 的 TotalSeq 技术是目前应用最广泛的单细胞蛋白质组方案。TotalSeq 无缝对接现有的单细胞 RNA 测序工作流程中，包括 Drop-Seq 和 10x Genomics 提供的工作流程，如 Cellranger 等，使数据分析效率显著提高。同时提供三类不同的寡核苷酸偶联抗体：TotalSeq A, B, C，分别对应 10x Genomics 的单细胞转录组和免疫组的应用。现有的表面标记抗体超过一千种，能够对单细胞的免疫表型进行全面解读。同时开发 cell-hashing 的技术，使用 hashtag 抗体对不同样本进行标记，从而在后续分析中通过去卷积的方法获得对应样品的数据信息，显著提高输入样品的通量和实验成本。此外，Biolegend 提供预制混合好的冻干抗体组合，使用方便且通量提高。

平台	特点	对应的单细胞转录组平台	通量
BD AbSeq	有基于表面蛋白的样本标签抗体，能够对不同来源样品进行标记，提高通	BD Rhapsody 分析系统	BD 目前提供近 500 种人或小鼠抗体-寡核苷酸组合。样本标签 12 种，最多

	量。同属 Rhapsody 平台，有自身对应的转录组和免疫组后续流程，各组学数据可同一 pipeline 进行分析。		可同时进行 12 个样本的检测。所有抗体-寡核苷酸都是同一种形式，方便选取。
<b>Biologend TotalSeq</b>	在获得转录组信息的同时，可以获得免疫组如 B 细胞和 T 细胞受体的序列；有基于细胞表面的标记的 Hashtag 抗体，能够对不同样品来源的细胞进行 barcode 标记，在后续分析中通过去卷积的方法获得对应样品的数据信息，显著提高输入样品的通量；对细胞群的定量能力高	10x Genomics Chromium 3' 单细胞转录组（TotalSeqA 和 TotalSeqB）和 5' 单细胞免疫组（TotalSeqC）	TotalSeqA - 1091 个表面标记蛋白 TotalSeqB - 155 个表面标记蛋白 TotalSeqC - 293 个表面标记蛋白 (基于 2020.5 官方公布的数据)

表 4-2 单细胞蛋白质组平台比较

### 4.3 多重原位分析及其他空间技术

传统流式细胞技术和质谱流式技术的广泛应用，使我们能快速且高通量地检测不同的细胞亚群。但这些流式技术对单细胞检测的主流应用多限于对细胞表面或胞内蛋白的检测，且限于特异性抗体的使用。同样的问题也存在于基于免疫荧光的生物成像技术。然而，在肿瘤以及其他疾病，包括基础的细胞功能研究中，越来越多的研究发现一些非编码 RNA (non-coding RNA) 的表达起关键作用。此外，在许多单细胞水平的研究中，mRNA 的水平和蛋白表达并不能完全相关联。因此，在传统流式细胞技术以及荧光成像的基础上，能够检测细胞蛋白表达的同时，检测相关的 RNA 水平技术成为此类实验的关键以及发展方向之一。

同时，在单细胞测序技术快速发展的今天，对于单细胞的多组学测序已经可以在大部分实验室实现，但是每个细胞以及细胞内的核酸分子都不是一个“孤岛”，它们的空间定位很大程度上影响了其功能或基因的表达。最典型的例子是中枢神经系统，不同区域的神经元细胞严格执行不同的功能，并且相互协调，从而在基因表达的基础上了解细胞的空间定位尤为重要。此外，空间定位除了上述提到的细胞在组织中的空间定位，也包括核酸分子在细胞内的空间定位，染色质的空间建构等胞内的空间分析。

因此，基于二代测序技术的细胞基因表达的原位 (in situ) 分析技术，包含细胞或分子的空间信息，在近些年也迅速发展。这些空间技术能够在一定层面上补充单细胞测序所丢失的空间信息，与单细胞测序技术共同使用时，能够获得组织、细胞、分子等多水平更加全面的信息，从而准确全面的揭示生物学过程、解答生物学问题。

### （一）多重原位分析技术 —— RNA 的胞内空间定位

PrimeFlowRNA 是一种较早出现的基于流式细胞术的新型原位杂交技术，在单细胞水平上通过流式检测细胞表面和胞内蛋白的同时，可实现最多四种 RNA 的检测。其很好地兼容标准流式抗体染色，通过传统流式细胞仪就可以达到较高通量细胞内的个别 RNA 检测，并且可以用于单细胞水平上快速对感染细胞内病毒 RNA 的检测。其优点在于与流式细胞术兼容，不需要额外的仪器，成本低速度快。然而目前限于 Alexa Fluor 647, 568, 488 和 750 最多同时四个通道对 RNA 的检测，虽然同时对细胞的 RNA 和蛋白进行分析，但是同流式细胞术相同，对细胞的空间信息开发有限。

与 PrimeFlowRNA 类似，如同组织的免疫荧光成像对流式细胞术的互补一般，揭示了 RNA 分子的空间信息的技术也应运而生——基于显微成像的单分子原位杂交技术 smFISH (single - molecule fluorescence in situ hybridization)。

smFISH 使用荧光标记的互补 DNA 寡核苷酸来检测胞内特定序列的 RNA，克服了传统酶联探针荧光信号扩散从而分辨率不足的问题，以及直接荧光标记探针大部分荧光基团敏感度不足的问题。Arjun Raj 等使用更多数量的短核苷酸 ( $10^5$ mer) 进一步提高了检测的灵敏度，并且通过成像对 RNA 招募探针的荧光进行统计，可以对 RNA 空间的表达进行定量分析。因此被广泛应用于转录的延伸、基因的可变剪接、胞内等位基因的表达差异及 RNA 定位等研究领域。由此延伸而来的 osmFISH (cyclic smFISH)，通过多轮的原位杂交实现更多 RNA 分子同时监测。在每轮原位杂交图像采集之后，通过甲酰胺溶解去除检测的探针，为下一轮原位杂交做准备。通过这种手段，可以对每个基因的图像分别进行分析，高表达的基因不会影响低表达基因的检测，提高了同时检测的通量。

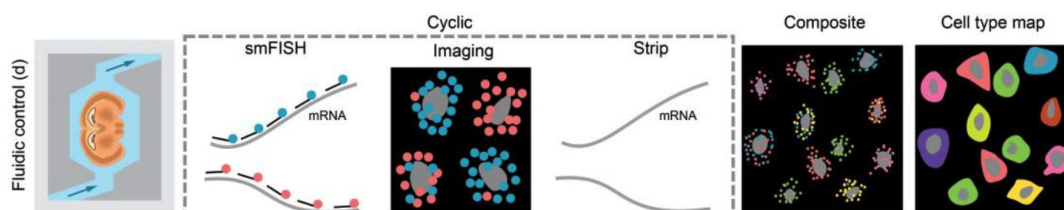


图 4-7 osmFISH 流程示意图 [来源/Nature Methods]

MERFISH (multiplexed error robust FISH) 技术是 smFISH 的大规模高通量形式，由庄小威 (Xiaowei Zhuang) 团队首先报道，通过给不同 RNA 分配不同的寡核苷酸 barcode 组合来降低脱靶和背景荧光，可以达到更高通量 (高达 1000) 的 RNA 同时检测。此外，类似的技术还有 STARmap, seqFISH 等，也同时可以整合胞内 RNA 的表达和定位技术。原理类似，都是基于寡核苷酸的原位杂交。



## （二）空间转录组技术 —— 细胞的组织空间定位

细胞内基因的表达有特定的时间和空间特征，单细胞测序技术收集不同时间点的细胞进行测序，纵向捕捉细胞基因表达的时间进程：如疾病进程，衰老进程的研究。如前文所述，细胞的空间信息无法通过传统的测序技术获得，而原位杂交技术能处理组织的大小及细胞数目，同时检测 RNA 的数目有限（即使可以高达  $10^3$  的数量级，但是和 RNA 测序相比，普通测序深度即可以捕捉大于  $10^4$  数量级的基因）。近期不断完善的空间转录组技术很好地补充了这个缺陷，在获得高通量转录组数据的同时，根据细胞的 barcode 还原细胞的组织空间定位。空间转录组技术首先应用于神经科学的研究，现在也被广泛应用于免疫学、肿瘤学领域，为不同微环境中，细胞的空间特异性基因的表达提供全面的信息。

空间转录组基本原理和流程如图所示，前期步骤与免疫荧光组织切片相同，将要进行空间转录组分析的组织切片附着于特殊的组织透化芯片上。每个芯片组织附着区域上有 5000 个带有位置坐标（spatial barcode）的寡核苷酸位点，每个位点含有数以百万计的带有 ploydT 寡核苷酸，用来捕捉组织切片细胞的 mRNA（polyA）。进行免疫荧光成像之后，通过组织透化释放 RNA，细胞释放的 RNA 可以被 ploydT 捕捉，并且在原位进行 cDNA 的合成。洗脱 cDNA 后进行测序文库的构建，后续测序文库的构建过程与普通二代测序类似。

由于芯片上的寡核苷酸链带有原位捕捉到的 RNA 的空间坐标信息，因此测序后根据 barcode 的序列可以还原出细胞在组织切片的位置。空间转录组的技术首先是由 Jonas Fris é n, Joakim Lundeberg, Patrik Ståhl 等 2016 年在瑞典斯德哥摩开发及应用，并成立了 Spatial Transcriptomics 推出相应的寡核苷酸切片。但由于流程复杂，相关试剂都需要从其他供应商购买，没有形成很好的试剂盒商业化生产。许多关键的步骤在没有操作经验的实验室由于试剂的差异难以重复，所以自 2016 年后没有被大规模应用。

2018 年 12 月 10x Genomics 收购 Spatial Transcriptomics 后，后于 2019 年推出 Visium 系列试剂盒，空间转录组解决方案才在更多实验室得以应用。并且 10x Genomics 提高了切片上寡核苷酸位点的密度从而提高了捕捉能力以及分辨率：根据组织类型和细胞大小的不同，每个点平均捕获 1-10 个细胞，但仍然达不到单细胞的标准。

技术	特点	转录组分辨率	检测通量
单细胞 RNAseq	捕捉尽可能多的单细胞转录本	单个细胞	芯片每条 lane 可以检测 3000-10000 个细胞
空间转录组	记录位置信息	1-10 个细胞	芯片每个切片区域 5000 个位点

表 4-3 单细胞转录组和空间转录组参数比较

2019年，Broad研究所Fei Chen和Evan Macosko团队也开发了类似的Slide-seq，不同的是他们使用包装了带有位置坐标的DNA barcode的10um磁珠排列在玻片上，捕获组织之后，磁珠与玻片分离，与用于单细胞RNAseq的Drop-seq类似的方法进行后续的测序。Slide-seq与Visium试剂盒相比捕捉组织切片的大小可以调整，通量可以更高，理论上成本更低，但是目前没有商品化。

空间转录组的优点如前文所述，能精确记录细胞的位置信息，使得转录组的分析更好与组织形态的特征关联，更有利于对转录组数据的科学注解。并且如果对同一个组织进行空间转录组分析和单细胞RNAseq，可以将空间转录组的数据和单细胞RNAseq的数据互相映射，进行整合分析。虽然实验本身分辨率难以达到单细胞水平，但在生物信息学角度与RNAseq数据相互整合，就能够在一定程度上提高其分辨率，甚至达到单细胞水平。

### （三）染色质空间结构分析技术 ——染色质DNA的空间定位

转录组测序可以为我们提供基因表达的时间和定量信息，通过基因差异表达分析以及差异基因的功能分析，我们可以获取不同样品或处理之间细胞状态的变化规律，例如病毒感染会影响哪些细胞基因的表达，而这些基因是与什么功能通路相关，从而了解病毒的靶点和免疫系统的作用机制。然而，基因组学的另一个层次是转录调控，转录组测序的局限性不能够告诉我们那些差异表达的基因是由哪些转录因子来调控的，调控的机制是什么。

表观遗传学在这个层次中将基因组与其功能性输出联系起来，提供预测转录调控的信息。单细胞表观基因组方法可以识别开放或封闭的染色质，包括核小体定位。从这些可以推断出某些转录因子结合的可能性或不与细胞内的特定DNA序列结合。目前主流的关于单细胞染色质空间结构分析的技术包括单细胞ATACseq，单细胞ChIP-seq以及单细胞HiC等。这些技术已在第三章进行过介绍，在此不再赘述。

## 4.4 细胞系谱测定

2017年，“人类细胞图谱计划”（Human cell atlas, HCA）发布，它是继人类基因组计划（Human Genome Project）之后最大的国际生物学合作项目，旨在建立一个健康人体中所有的人类细胞参考图谱，为人体内的40万亿细胞绘制“地图”，获得细胞的类型、数量、位置、关系和分子组成等信息，用来描述和定义健康和疾病的细胞基础。人类细胞图谱将有助于回答人类生物学各个领域的问题，从细胞分类到组织结构，从发育生物学到细胞分化，从生理平衡到其相关的分子机制。

2018 年，单细胞水平细胞谱系追踪技术更是被 Science 杂志评为当年十大科学突破之首。

对于这一技术，我国科学家也有所建树。2020 年 3 月，浙江大学医学院郭国骥团队在 Nature 杂志上公布绘制成功世界首个人类细胞图谱，首次从单细胞水平上全面分析了胚胎和成年时期的人体细胞种类，系统性地绘制了涵盖八大系统的人类细胞图谱，建立了 70 多万个单细胞的转录组数据库，鉴定了人体内 100 多种细胞大类和 800 多种细胞亚类。

基因编辑工具 CRISPR-Cas9 技术也可用于细胞谱系追踪，Cas9 核酸酶被导向 RNA 引导到特定的条形码区域，进行剪切和随后的修复过程中引入以个独特的插入或缺失突变，相当于给 DNA 带上了特异的“条形码”，这种引入的突变随着细胞分裂增殖而逐渐积累，然后通过对单细胞的分析可以根据子细胞中的突变条形码来追踪细胞谱系的发展。该技术已经成功应用于斑马鱼、老鼠和线虫的谱系追踪中。

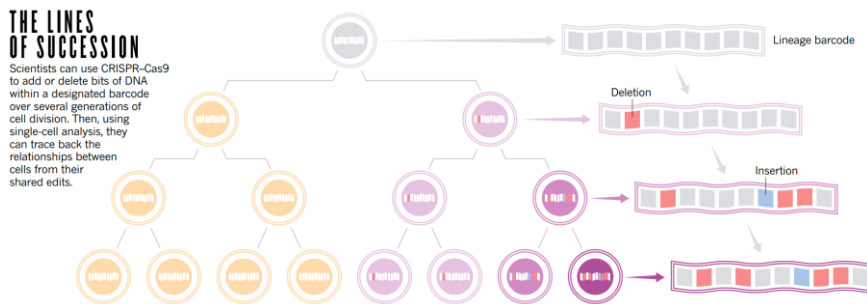
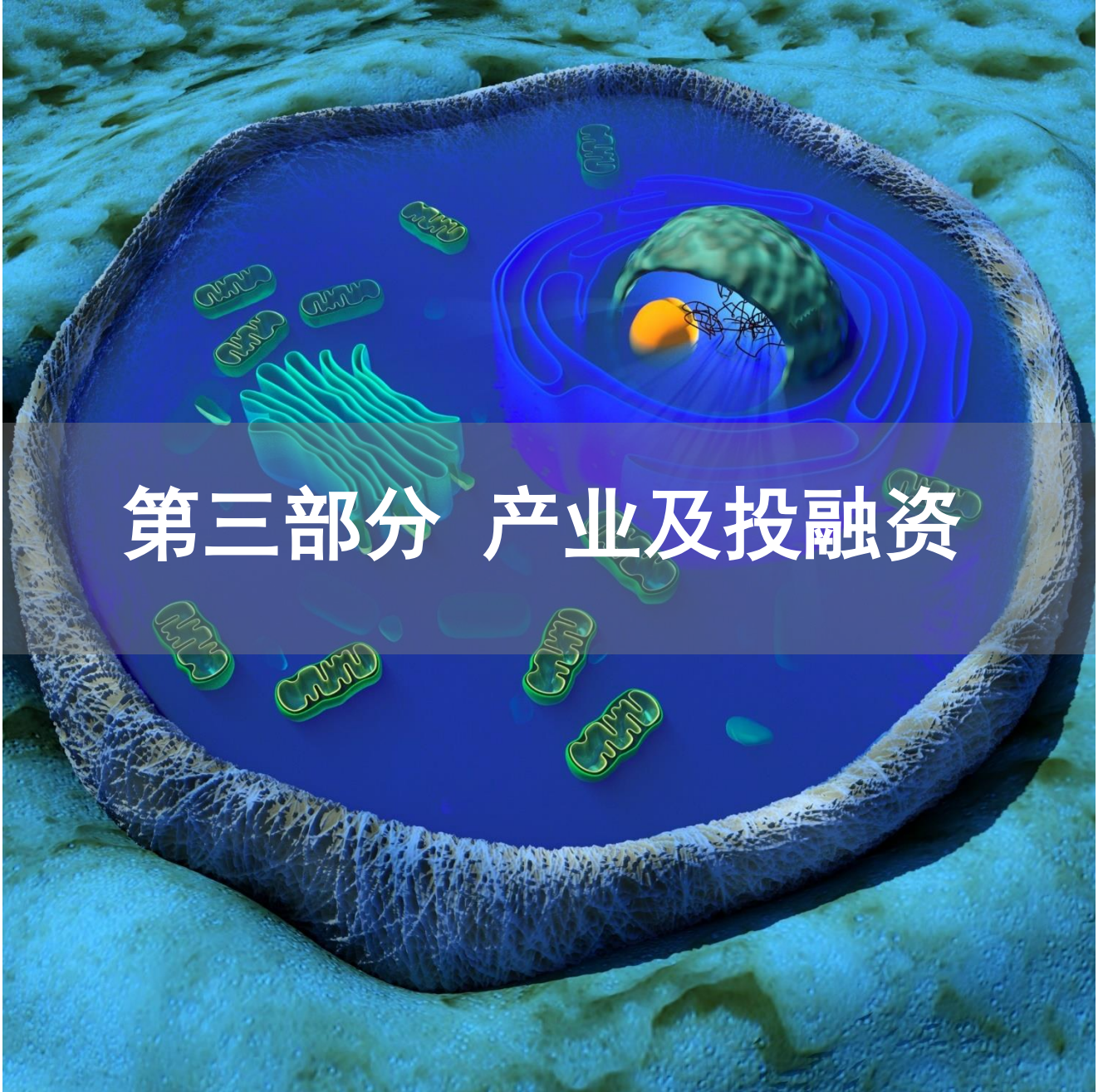


图 4-8 Crispr-Cas9 技术应用于细胞谱系追踪（来源/Nature）



## 第三部分 产业及投融资

## 第五章 产业图谱

### 5.1 单细胞产业图谱

单细胞作为生命健康研究的前沿方向，随着微流控、高通量测序和质谱等技术发展而发展，严格来说，目前还没有达到产业或行业的规模，但已初具完整产业链形态，这里我们把单细胞产业上中下游进行聚合，以“产业”的维度整体来分析，并绘制出单细胞产业图谱（如图 5-1）。



图 5-1 单细胞产业图谱

早期的单细胞以 RT-PCR 技术为主，后续逐渐被测序（单细胞基因组和转录组等）取代，逐渐从低通量发展到高通量（加以蛋白组方面的质谱技术等）。

全球单细胞测序技术研发从 2009 年开始起步，里程碑事件是汤富酬教授发表了世界第一篇单细胞 mRNA 测序的文章。2012 年后，美国单细胞高通量测序公司 10x Genomics 和 Mission Bio 相继成立。2013 年，Fluidigm 公司推出了全球第一款单细胞 RNA 测序自动化样品制备系统。2017 年，BD Biosciences 发布了 BD Rhapsody 单细胞分析系统，克服了传统方法学上的局限性，能够对成千上万个单细胞的数百个表达基因同时进行数字定量。

国内单细胞测序技术的应用从 2014 年开始起步，大部分在科研阶段，部分临床应用在初步探索阶

段，包括胚胎植入前遗传学检测（PGS/PGD）、外周循环肿瘤细胞检测（CTC）等。例如 2015 年 12 月，国内首例应用单细胞扩增技术（MALBAC）同时进行 PGD/PGS，并成功阻断了遗传性耳聋的健康双胞胎在解放军总医院诞生。2016 年 2 月，国内首例采用单细胞高通量测序技术阻断了婴儿家族性甲状腺癌遗传的第三代试管婴儿顺利诞生。具体产业链及代表企业分析如下。

## 5.2 产业链及代表企业

单细胞测序主要如下工作流程：单细胞制备、单细胞分离和文库制备、测序、生物信息分析。分为上游（单细胞制备、分选、文库制备和测序）、中游（测序服务和生物信息分析）和下游分析（应用）。

### （一）上游：单细胞分选

单细胞制备是单细胞测序的第一步，必须要制备高质量的单细胞悬液。样本制备的具体方案因组织类型各异，例如血样，可以采用密度梯度离心的方法；对于组织样本，通常采用机械法或酶解法，常用的消化酶包括 accutase, elastase, collagenase 以及商业化包装的组合酶。

伯豪生物是市场上较早提供单细胞悬液制备服务的公司，目前开展了人外周血液细胞：如单核细胞（PBMC）、淋巴细胞和粒细胞等；肿瘤样本：如肝癌、胃癌、肺癌、乳腺癌、卵巢癌、宫颈癌、肾癌等肿瘤组织；活检组织样本：如肝，肺，肾，皮肤等组织；以及多种大、小鼠组织或器官的单细胞悬液制备。针对珍贵冻存人组织样本及很难制备高质量的单细胞悬液的一些组织样本，伯豪生物可绕过酶解消化等步骤，通过机械方法抽提细胞核，进行单细胞核测序，可获得更好的数据质量和更高成功率。

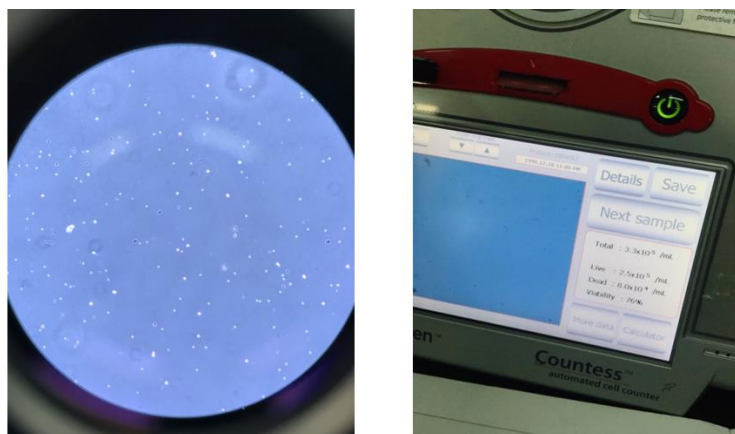


图 5-1 单细胞悬液制备（左：样本细胞悬液镜检；右：细胞活性测定）

在单细胞分选和建库方面，目前市面上主流的平台厂商包括 BD Biosciences 和 10x Genomics。

10x Genomics 的仪器发布时间较早,2016 年就推出了具有代表性 Chromium 单细胞分析系统和试剂盒, BD 在次年也紧接着推出了 Rhapsody 单细胞分析系统和试剂盒。不过,相比 10x Genomics, BD Rhapsody 的捕获效率更高,因此可适当降低对起始样品的活性要求。自 1973 年为世界带来第一台商用流式细胞仪以来, BD Biosciences 已逐步形成了可提供从单细胞分选、单细胞分析到单细胞多组学应用的“三大单细胞技术平台”。

还有一些技术平台因其独树一帜的应用特色在市场上占据一席之地, Fluidigm 就是其中的典型代表,其在 2012 年就推出了 C1 单细胞全自动制备系统,至今还是经典产品。相比 BD 和 10x 平台, C1 的系统开放性、兼容性和可扩展性较好,可支持用户在其平台上做自定义开发,丰富单细胞的应用生态。此外, BD 和 10x 平台都采用 UMI (Unique Molecular Identifier) + CL (Cell Label) 技术进行单细胞及初始转录本的标记,与 SMART-Seq + Fluidigm C1 相比,可使大规模 scRNA-Seq 的基因表达定量结果几乎不会受 PCR 偏好影响而更精确,且可实现更高的细胞通量(10000 个细胞 vs. 100 个细胞)。

以 BD Rhapsody 技术为例,利用卡式芯片在磁性的寡核苷酸条形码标记的微球上实现单细胞捕获和 mRNA 转录本的分子标签,然后将这些微球合并到单个管中用于 cDNA 扩增和文库构建。可满足 100~10000 个细胞的自动分选、扩增及建库。

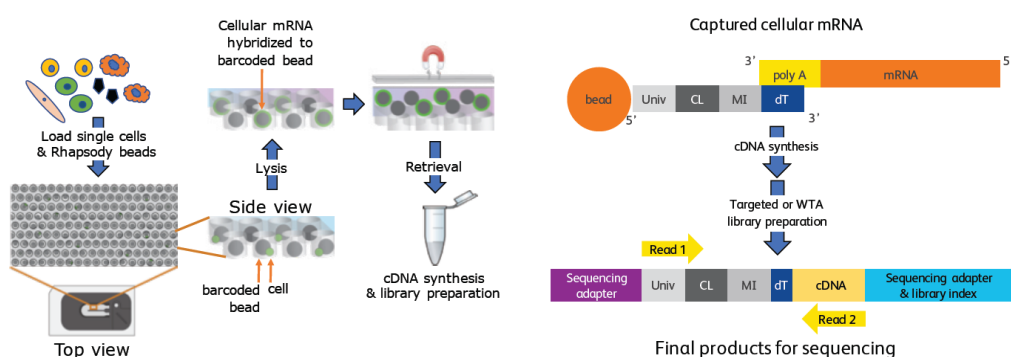


图 5-2 BD Rhapsody 技术原理

此外,该技术使用带有寡核苷酸的高质量抗体 (Ab-oligos),这条寡核苷酸带有抗体特异的条形码,细胞在经过 Ab-oligos 标记后,可在单细胞水平同时获得转录组和蛋白表达。

除以上企业, Mission Bio 公司在 2017 年推出 Tapestri 平台,对单细胞 DNA 和蛋白质同时测序。

国内致力于开发基于微流控的单细胞分析系统的企业较少,包括新格元生物、万乘基因等,试剂盒研发企业包括寻因生物等。2018 年 2 月,浙江大学医学院干细胞与再生医学中心的郭国骥教授团队在 Cell 上刊文,宣布自主研发国产化的高通量单细胞测序平台 Microwell-Seq,有望将单个细胞测序成

本降低至 2 元，目前尚未投入商用。

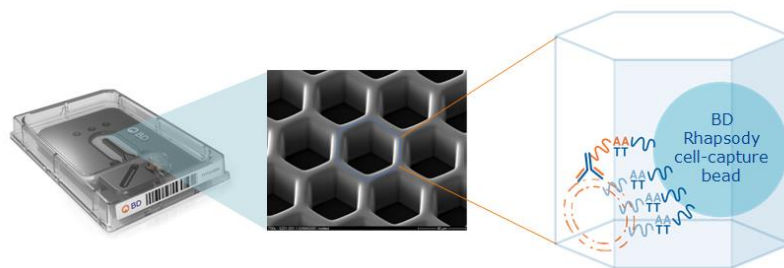


图 5-3 单细胞 mRNA 与蛋白同时测序

## （二）上游：单细胞文库制备及质控

在单细胞制备和分选后，根据转录组、基因组、表观组等不同单细胞组学的应用需求，可采用不同的方法进行文库制备，包括使用商用试剂盒和结合单细胞分选平台。

试剂盒方面，以单细胞基因组测序为例，单细胞分选后的建库流程包含全基因组扩增（WGA）以及常规基因组测序文库的制备等步骤。其中又以 WGA 最为关键，不仅要求较高的扩增效率，还要求良好的覆盖均一性和较低的扩增错误率及偏好，通常会采用商用的 WGA 试剂盒进行，供应商有 Sigma-Aldrich、Qiagen、亿康基因（Yikon）等，一般都是基于多重置换扩增（MDA）、多次退火环状循环扩增（MALBAC）和简并寡核苷酸引物 PCR（DOP-PCR）等原理。而对于单细胞转录组测序，基于试剂盒的建库流程以 SMART-Seq 和 SMART-Seq2 最为经典。这两种技术均是在单细胞分选后进行全反转录扩增（WTA）获得单细胞 cDNA 文库，再进行 cDNA 预扩增（可选）或直接采用常规基因组测序文库的制备等步骤。SMART-Seq 和 SMART-Seq2 由 Illumina 公司、路德维格癌症研究所的理查德桑德伯格实验室和卡罗林斯卡医学院共同开发，目前由 TaKaRa 子公司 Clontech 实际经营。

结合平台方面，BD Rhapsody 和 10x Genomics Chromium 除了能够高效地进行单细胞分选之外，也已经集成了后续所需的建库流程，包括单细胞反转录扩增、cDNA 预扩增和测序文库的构建，使得整个工作流程的效率大大提高。当然，这些平台亦需配套专门的试剂盒来完成整个文库制备的工作流程。

对于单细胞测序数据的产出量和质量，影响的因素有很多，例如单细胞分离效果、提取的 DNA 或 RNA 的质量、扩增出的全基因组（转录组）的覆盖度和一致性、文库的质量、上机前的文库量等。因此，为了得到更高的数据产出及质量，单细胞测序整个流程中各个步骤的质检必不可少。在中华医学会主办的《中华医学杂志》发表的《二代测序技术在肿瘤精准医学诊断中的应用专家共识》中，明确提出“应对抽提后和文库构建后的核酸样本进行质控”。



目前，为了确认 NGS 文库的大小分布，一般使用琼脂糖凝胶电泳和微流控片段分析仪作为主要手段。为了确认浓度，还需要配备实时荧光定量 PCR 仪和 Qubit 荧光定量仪。对于一般医生而言，从文库制备到质量控制的操作是一系列复杂的手工作业。而且单样本的两项质控的总体成本高，是临床基因检测应用的第一步痛点。

对于全自动文库质控平台，包括美国 Agilent 的 2100 Bioanalyzer、国产 BIOPTIC 的 Qsep（厚泽生物独家代理）。相对而言，Qsep 系列全自动核酸片段分析仪利用毛细管电泳原理进行核酸分离，可以提供从 gDNA、RNA 到 cDNA 再到文库的全自动质检解决方案，助力单细胞测序实验，以得到良好的测序结果。在 500bp 范围之内，Qsep 系列全自动核酸片段分析仪的分辨率可达到 1%，该设备最低检测限为 1pg/ $\mu$ L，对于样本浓度极低的用户也是非常友好的。此外，通量灵活，可以检测 1-100 间任意个数的样本；仪器的软件操作简单，初学者培训 5 分钟即可上手。

### 质检内容主要包括：

#### 1) 单细胞 RNA 样本的质控

在 qPCR 实验前的 RNA 样本质量控制部分，完整的 RNA 是保证实验成功和优异重复性的重要保障。我们如何对 RNA 质量进行把控，继续反转录，因此对单细胞 RNA 样本进行质控就更为重要。完整的 RNA 质控需要对降解程度、纯度和浓度进行质量检测分析。很多平台可以对 RNA 进行不同层面的质检。Qubit 与 Nanodrop 等类似仪器可通过检测荧光或者吸光值来得到核酸的浓度，但无法区分 RNA 和 DNA，同样无法判断样本的完整性。

Qsep 系列全自动核酸片段分析仪基于毛细管电泳原理，可以快速高效地完成 RNA 样本检测，包括 total RNA, mRNA, gRNA, micro RNA 以及外泌体 RNA 等，可检测 1-6000nt 片段大小的样本，应用广泛。Qsep 不仅可以对 28S/18S 进行清晰的电泳分析，还可以根据检测出的片段分布情况给出完整性评分 RQN（值越高代表样本完整性越好）。除了峰图，还可给出 28S/18S 比值与 DV200，用于 RNA 质量的辅助判断。

#### 2) 单细胞 cDNA 样本的质控

构建高质量文库对 mRNA 的完整性的要求比较高，理论上讲必须是带有帽子结构和 Poly A 结构的全长 mRNA 且反转录完全，才能进入文库中。反转录完成后点样检测 cDNA 的浓度及分子量分布是很重要的。因此在 RNA 质控合格后进行逆转录得到 cDNA 同样需要进行质控。Qsep 系列全自动核酸片段分析仪可对 cDNA 样本进行检测，通过 smear 分析功能判断样本的主要片段分布。而且具有较高灵敏度，最低检测限可达 pg/ $\mu$ L，对一些低浓度的 cDNA 弥散样本可以进行很好的检测。

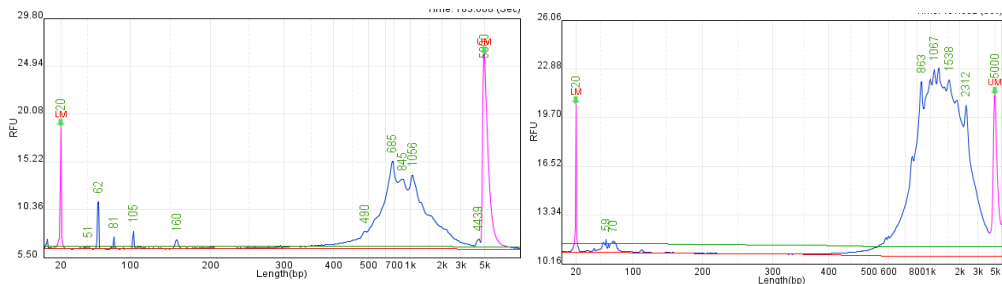


图 5-4 cDNA 检测结果图

### 3) 单细胞测序文库质控

单细胞测序得到的文库需检测样本的接头残留情况以及判断文库片段大小。在质量检测合格后就可以进行测序上机了。判断文库是否合格主要对文库长度、文库准确定量以及污染物进行检测。

文库长度是文库检测的关键步骤。Qsep 系列全自动核酸片段分析仪是进行文库长度检测的常用仪器。仪器可以自动吸样进行毛细管电泳，根据 DNA 片段大小被分离开来。一般来说，好的文库应呈现出单一的圆滑的峰，而且接近正态分布，长度范围在 150-700bp 之间。同时可以判断样本中是否存在引物二聚体或接头残留。

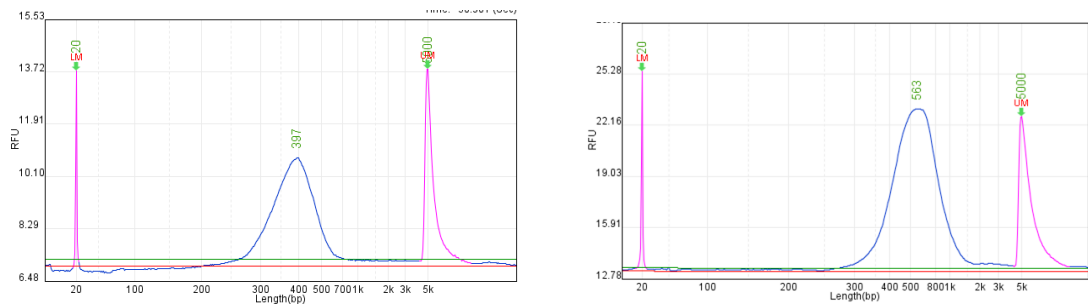


图 5-5 文库检测结果图

## (三) 上游：单细胞测序/质谱平台

### 单细胞测序

在经过单细胞分选、捕获、扩增和建库后，即可进行测序。针对基因组、RNA 组、表观组等分析。目前单细胞主流测序平台以 Illumina 为主，早在 2016 年，10x Genomics 的单细胞分析 GemCode 推出后，与 Illumina 及 QIAGEN 达成上游战略合作。2 年后，华大智造（MGI）旗下的测序仪开始和 10x Genomics 展开合作。

限于篇幅这里以 Illumina 测序平台为例重点介绍单细胞测序系统。目前，适用于单细胞测序研究的 Illumina 测序系统包括：NextSeq™ 2000、NextSeq™ 550、NovaSeq™ 6000 和 iSeq™ 100 等。



图 5-6 适用于单细胞测序研究的 Illumina 测序系统

在分离出的活性单细胞中提取遗传物质，并制备文库，就可以进行测序步骤。所有 Illumina 测序平台均采用边合成边测序（SBS）技术，全球 90% 以上的测序数据都是基于该技术产生的。

Illumina SBS 技术是一种专利方法，能以大规模并行的方式在单个碱基掺入不断延伸的 DNA 链时，对其进行检测。Illumina 测序系统单次运行可输出的数据范围从 30 万碱基到数万亿碱基不等，取决于仪器的类型和配置。虽然 Illumina 测序系统都能够对单细胞文库进行测序，但是单细胞测序实验选择的测序系统主要取决于研究的问题和规模。

系统名称	特点	适用单细胞的应用场景
NextSeq™ 2000 系统	提供两种规格的流动槽和多种读长的试剂配置；内置 FPGA 硬件加速或云端生物信息分析工具实现基因组二级分析；每次运行产出数据 300Gb；搭载试剂卡盒、带有射频识别条码的耗材、全自动机载簇生成和自动化运行设置。	单细胞 RNA 测序、单细胞 ATAC 测序、单细胞 DNA 测序、单细胞多组学平行测序（CITE-seq, scG&T-seq, scM&T-seq, scTrio-seq, REAP-seq, CRISP-seq 等）和空间转录组测序等多种文库。
NextSeq™ 550 系统	台式 NGS 系统，可以快速、简单和经济地进行高通量测序。NextSeq 550 系统适用于研究实验室，不需要专用的设备。	支持中通量至高通量的测序应用，是小规模单细胞测序研究的理想选择。
NovaSeq™ 6000 系统	Illumina 迄今为止有最强大、操作简便、可扩展且可靠的高通量测序平台，可提供高品质的数据。它提供了多种流动槽类型和运行配置，从 SP 流动槽的 8 亿条 reads 到 S4 流动槽（单端测序模式）的 100 亿条 reads。	大规模筛选研究的理想选择，例如药物筛选、细胞图谱研究和其他大规模实验。
iSeq™ 100 系统	Illumina 产品组合中最小巧、经济的测序系统。	适合在 NovaSeq 6000 系统上进行全面的测序运行之前进行文库质控，这样可以得到更一致的结果，确保实验成功。

表 5-1 Illumina 测序系统适用的单细胞应用场景

## 单细胞蛋白质组质谱

除了上文提到的 BD Rhapsody 可同时实现对 mRNA 和蛋白质测序外，通过质谱流式细胞术 (Mass Cytometry), TOF-SIMS, MALDI 等技术等也可以对单细胞蛋白质组进行分析，一方面无需进行蛋白标记，另一方面可实现多组分的同时精确定量分析。平台包括 BD 公司的 FACSCalibur 和 Fluidigm 公司的 CyTOF 等。国内单细胞蛋白分析的代表企业包括宸安生物和普罗亭等，宸安生物专注单细胞质谱流式诊断设备、试剂和软件开发，普罗亭则以服务为主。限于篇幅原因不作展开。

### (三) 生物信息分析方案

随着单细胞测序的普及，大量待分析的单细胞测序数据被产生出来，使得单细胞研究的难题从实验转移到了数据分析上。如前文已介绍，目前适用于的 Chromium 系统输出结果的 Cell Ranger 及其分析 R 包 Seurat，虽然能够对单细胞转录组测序的数据进行最基础的分析，但对细胞时序发育推断、细胞间相互作用预测、多种单细胞技术联合分析等复杂分析都不支持，远远无法满足科研上的需要。这主要是因为这些复杂分析都需要根据研究目的而进行独特设计，无法进行标准化的编码。同时，很多公司虽然具备引进设备的资金，却缺乏能够对测序数据进行深层次解读的人才。

由于单细胞分析的前沿性，目前专注于单细胞生物分析的企业较少，国内的以百奥智汇为代表，海外企业包括 Bioturing、Scaillyte 等。

其中，百奥智汇在学术带头人张泽民教授的指导下，聚集了国内外顶尖高校毕业的生物信息学人才，落脚北京和美国旧金山。目前具有国际前沿的单细胞测序数据解读能力，提供对新亚群的识别、细胞谱系刻画、细胞时序发育推断、细胞间相互作用预测、多种单细胞技术联合分析等高级分析服务。同时，百奥智汇还开发出了相应的分析软件 OminiBrowser 和 OmniAnalyzer，可对单细胞数据进行多种复杂分析。此外，百奥智汇还建立了具有庞大数据量的单细胞数据库，目前涵盖超过 400 项单细胞研究、逾 700 个数据集，为进一步的数据挖掘和寻找药物靶标提供可能。而国外企业如 Bioturing，也开发出了单细胞浏览器，可对已发表的单细胞数据进行可视化、细胞注释等分析。

### (四) 单细胞服务整体解决方案

以上能看出，从单细胞悬液/单细胞核制备、分选、建库、质控、测序到生信分析等流程，涉及诸多复杂实验和分析环节。因此市场对单细胞实验和分析服务的整体解决方案有比较明确的需求，对科研人员尤为重要。这方面国内代表企业包括伯豪生物、诺禾致源、华大基因等。以伯豪生物为例，伯豪生物在单细胞测序领域的研究开始于 2013 年，是国内最早提供单细胞测序相关研究服务的公司之一。

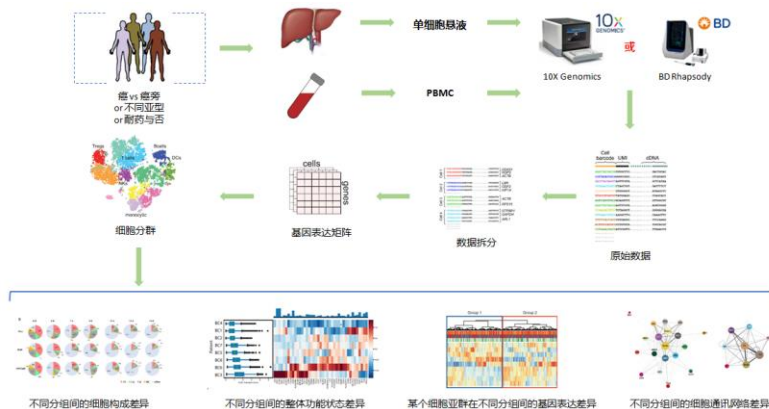


图 5-7 伯豪生物的单细胞实验设计和项目流程

伯豪生物集中研发力量联合攻关，自主研发了单细胞应用组织样本保护液（伯优），完善了不同组织或器官的单细胞悬液制备方法，建立了严格的质量控制体系，积累了丰富的经验。针对单细胞悬液制备过程中遇到的主要问题，如死细胞比例高、活性达不到上机要求；细胞形态异常；细胞消化不完全、聚集成团、碎片偏多、红细胞比例偏高等，团队通过实验摸索、经验积累及开发创新的单细胞核抽提技术，有效克服了上述难题，提高了单细胞测序的成功率。目前伯豪生物已具备三大单细胞技术平台（BD Biosciences, 10x Genomics 和 SMART-Seq）和单细胞多组学分析能力。



图 5-8 伯豪生物具备三大单细胞技术平台

伯豪生物建立和完善了单细胞测序的数据处理方法，主要有细胞亚群聚类及可视化，亚群的类型注释，疾病相关新亚群的鉴定。分析亚群的标志基因，寻找疾病相关的标志物。从多个层面对细胞亚群进行功能注释（多数据库功能富集、特定疾病相关通路分析、GSEA 功能注释、拟时序分析、细胞通讯等），解释疾病的发生和发病机制，寻找潜在的药物治疗靶点。也可以根据客户的课题设计和需求，

设计和开发个性化的分析方法和流程，助力客户发表高水平研究论文。

多年的服务过程中，伯豪生物积累了大量项目经验。2015 年与张旭院士合作，发表了国内第一篇神经科学领域单细胞测序文章 (Li C L et.al., Cell Research, 2015)，2018 年助力中科院杨辉课题组发表神经科学领域的单细胞测序文章 (Zhou H et.al., Nature Neuroscience, 2018)。2019 年 1 月，伯豪生物协助顾炎博士在 Nature Medicine 发表文章 (Gu Y et al. Nature Medicine, 2019, 25(2): 312.)，揭示肿瘤驯化的 B 淋巴细胞及其抗体对淋巴结转移前肿瘤微环境的形成发挥关键作用。

### 5.3 未满足的需求

#### (一) 单细胞研究应用场景



图 5-9 单细胞用户所在机构

基于基因慧初步的调研，目前单细技术应用主要集中在基础研究（54%）和临床科研（41%），药企研发仅占 5%，仍有很大的市场开拓空间。

#### (二) 单细胞分选技术

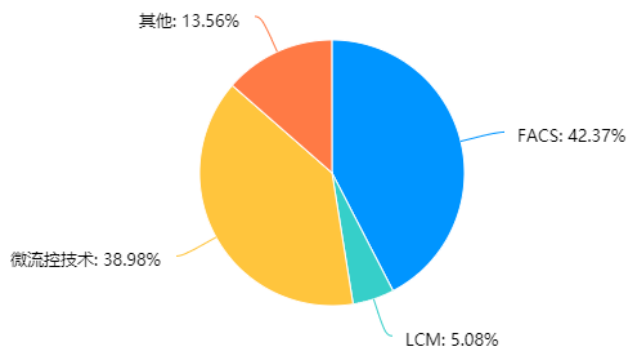


图 5-10 单细胞分选技术的筛选

在单细胞分选平台上，目前科研人员以 FACS（42%）和微流控技术（39%）为主。

对于目前的单细胞分选平台，未满足的需求包括：

- ① 降低对操作人员的技术要求，提高批次通量和处理细胞数，缩短实验流程时间。
- ② 降低仪器和配套试剂的成本。
- ③ 提升仪器的自动化水平，减少人工干预。
- ④ 保留细胞的空间位置信息，提高捕获细胞的能力，尤其是特种细胞。。
- ⑤ 对样品中细胞活性和数量要求比较苛刻，且对数据质量的影响较大，需要有更好地容错性和稳定性。
- ⑥ 基于多组学应用需求进行单细胞分选和建库，例如整合单细胞基因组和转录组测序需求进行单细胞的分选和建库。

### （三）单细胞测序平台

据调研，超 95%的科研人员采用 Illumina 单细胞测序平台，如 NovaSeq、HiSeq4000、NextSeq500 等。

对于目前的单细胞测序平台，未满足的需求包括：

- ① 测序结果的数据规模应该缩小，利于后续分析。
- ② 测序数据应该在普通计算机上就能分析。
- ③ 在实验室方便操作，且能获得足够的测序通量和深度，可作细胞数量较多的单细胞实验，成本可控。

### （四）常用的单细胞分析软件

据调研，常用的单细胞分析软件包括 cellranger, seurat, monocle 和 SeqGeq, Cytobank, Loupe, ASAP。

对于目前的单细胞分析软件，未满足的需求包括：

- ① 希望上手快，操作简单，不需要长时间专业培训；
- ② 计算速度快，一次操作分析数据量大；
- ③ 能够有更多个性化的分析功能，呈现结果的方式简洁明了；
- ④ 兼顾通用性和灵活性，既有降维、聚类等生信可视化分析，也包含基础性的统计分析。

### （五）对整体成本和性能参数的需求

- ① 个人检测成本在 5000 元以下，单细胞检测成本达到 1 元以下；
- ② 操作能流程化和标准化，对操作人员的要求较低；
- ③ 能对同一个细胞的 DNA、RNA、蛋白同步分离并得到相关数据；
- ④ 检测成本跟其他临床项目相仿，能够指导早筛和治疗并监测疗效。

## 第六章 投融资

### 6.1 海外单细胞投融资案例分析

时间	公司	领域	金额 (百万美元)	轮次	投资方
2020.5	Celsee	单细胞检测平台	/	收购	Bio-Rad
2020.1	BioSkryb	单细胞分析耗材	11.5	种子轮	Anzu Partners, Wilson Sonsini Goodrich & Rosati.
2019.12	Cellarity	单细胞药物发现	50	A 轮	Flagship Pioneering
2019.9	10x Genomics	单细胞检测平台	390	IPO	/
2019.3	Cytana	单细胞分选技术	3.4	A 轮	High-Tech Gr ü nderfonds
2018.12	Mission Bio	单细胞检测平台	30	B 轮	Agilent Technologies, Cota Capital, LAM Capital, Mayfield
2018.7	Mission Bio	单细胞检测平台	10	A 轮	Mayfield Fund, Tech Coast Angels, StartX, Keiretsu Forum, Life Science Angels
2015.8	Cellular Research	单细胞检测平台	/	收购	BD

表 6-1 单细胞国外企业融资情况

从近年的海外的单细胞企业投融资案例可以看出：

#### 1) 单细胞投融资事件集中在早期（A 轮和 B 轮）

单细胞发展仍处于萌芽期,应用阶段以科研为主。从 2009 年高通量单细胞测序发展以来,技术迭代和产业化的速度不容忽视。在投资方里,以硅谷为基础的风险投资机构为主。可以看到硅谷创业环境中产融业态对新兴技术研发和转化的作用,尤其是对单细胞这类前沿、高成本、长期投入的领域至关重要,因为研发转化和市场教育存在一定周期。

#### 2) 投资机构以战略投资为主

在投资(并购)方里,主要是以 BD、Bio-Rad、Agilent 为代表的产业机构。除了横向补充产品线的原因,也包括纵向连接基因组和单细胞等耦合效应,尤其是对于疾病诊疗和新药研发。未来很可能不会



有基因行业和单细胞行业，类似今天不会再讨论互联网行业一样，因为他们都将或已经成为基础设施。基因组、蛋白组、单细胞、代谢组、微生物组将以曲折向前的大势发展，构成数字生命健康的大数据集和赋能其他行业的工具集。

### 3) 投融资赛道主要集中在单细胞检测设备及耗材

这体现了生产工具仍是单细胞领域的发力点。尤其是早在 2015 年 BD 收购 Cellular Research，将后者的单细胞基因组学分析工具，与自身具有行业标杆影响力的流式细胞仪整合成极具优势的工作平台，形成高达 80% 的单细胞捕获效率外，同时检测单个细胞的 mRNA 水平与蛋白水平。而类似 Cellarity 的“单细胞+药物发现”的赛道，是未来单细胞迎合市场需求、加速科技成果转化的方向，也受到以价值投资为主的资本关注。

## 6.2 我国单细胞投融资分析

时间	公司	领域	金额 (人民币)	轮次	投资方
2019.12	和卓生物	单细胞辅助生殖服务	数千万	A 轮	中金资本
2019.11	亿康基因	单细胞辅助生殖服务	2.2 亿	C 轮	金裕资本，越秀产业基金，中原九基金，交通银行科技股权投资基金
2019.11	极客基因	单细胞生物信息分析	未披露	未披露	海创菁英
2019.10	寻因生物 (SeekGene)	单细胞测序试剂盒	数千万	Pre-A 轮	德联资本
2019.9	宸安生物	单细胞肿瘤检测平台	数千万	A+ 轮	BV 百度风投
2019.8	高诚生物	单细胞制药	4.8 亿	C 轮	IDG 资本、红杉资本中国、Kite Ventures
2019.6	百奥智汇	单细胞生物信息分析	未披露	A 轮	IDG 资本
2019.6	新格元	单细胞测序平台	近亿	Pre-A 轮	夏尔巴资本，华创资本、元禾原点、峰瑞资本
2019.3	万乘基因	单细胞测序平台	500 万	天使轮	合力投资
2019.1	宸安生物	单细胞肿瘤检测平台	5600 万	A 轮	ETP、晨兴资本、火山石资本
2018.10	寻因生物 (SeekGene)	单细胞测序试剂盒	未披露	天使轮	真格基金
2018.7	锐讯生物	单细胞 PCR	1300 万	Pre-A 轮	明势资本、真格基金和火山石资本

2018.5	浚惠生物	单细胞肿瘤检测	数千万	Pre-A	安龙基金
2018.5	新格元	单细胞测序平台	数千万	天使轮	元禾原点，峰瑞资本

表 6-2 单细胞国内企业融资情况

从近年我国的单细胞企业投融资事件初步统计 14 起，总金额约 10.49 亿元。

### 1) 投融资阶段主要在天使轮和 Pre-A 轮，稍晚于海外企业

主要原因与市场教育和认知有关，特别是市场终端以及风险投资。投融资企业所在赛道和海外类似，集中在单细胞检测设备及耗材。

### 2) 投资事件集中在 2019 年，得益于上游设备厂商进入中国市场

虽然早在 2014 年，Fluidigm 公司生产的 C1™ 单细胞全自动制备系统和 BioMark™ HD 基因分析系统开始在清华大学基因组与合成生物学平台启用，2016 年 10x Genomics 的第二代产品 Chromium 引进中国。但真正推动国内产业机构跟进的事件，要追溯到 2018 年 3 月 BD Rhapsody 单细胞捕获系统登录中国市场，在单细胞通量和捕获效率指标上增强了市场信心。同时，2019 年 9 月 10x Genomics 的上市对国内投资机构也有一定的推动作用。

### 3) 投资者也是以战略投资为主

目前国内该领域的投资主要是以战略投资为主，进行产业扩张。例如，参与创立安龙基因等机构的安龙基金，以及近年来建立生命健康投资版图的 BV 百度风投等。

## 6.3 单细胞投资趋势

### 1) 单细胞投资的黄金五年

单细胞技术已从实验室走向商业化，在 2016 年-2019 年完成第一阶段市场教育，即科研应用，于 2020 年获得空前关注。接下来单细胞将在资本和技术双轮驱动下推动进一步高通量、低成本和应用扩展。基因慧认为，2020-2025 年是单细胞投资的黄金五年，一方面是产业链逐步完善的孵化阶段；另一方面，伴随传统基因组学的同质化竞争（例如肿瘤精准医疗），单细胞成为头部企业的第二曲线。

### 2) 优选赛道：单细胞检测设备、生物信息分析工具、报证产品

目前单细胞的头部产业机构聚集在检测设备、耗材和分析服务。其中设备和耗材以 BD Biosciences、

10x Genomics 等为主，国内机构以新格元为例于 2020 年发布国产建库系统，未来仍需更多上游厂商的孵化，主要集中在效率优化和成本降低。在上游设备研发迭代的同时，生物信息分析工具（包括软件、数据库等）将成为重要的差异化因素之一。而扩展市场渠道，进一步普及应用，将延续其他类似领域的报证产品方向。

### 3) 单细胞应用领域获得更高估值

从技术周期看，单细胞检测及分析仍在早期阶段，将涌现出一批“Me too”的产业机构跟进。同时，单细胞应用领域正引起头部机构及细分领域龙头关注。例如“单细胞+辅助生殖”的亿康基因、贝康医疗、和卓生物，“单细胞+药物发现”的 Cellarity 和高诚生物，“单细胞+肿瘤检测”的宸安生物和浚惠生物等获得资本肯定。由于单细胞新兴技术在传统成熟市场的价值杠杆，聚焦单细胞应用领域的企业也获得更高估值，当然伴随更大的挑战。

### 4) 并购和早期风险投资并行

从资本角度，无论是基因组、单细胞还是其他新兴的数字生命健康方向的创业机构，可能和其他领域有不同的产业范式。特别的是产业孵化和成长过程中的势能非连续性，例如，早期风险投资和并购同步发生。这是因为作为细分领域的企业，在单细胞的检测设备、分析等方面，仍需在资本支持下持续研发至少 3-5 年以上，才能成长为头部企业；而与此同时，现阶段涵盖单细胞及其他领域的跨界企业，在以并购的方式进行其产业布局，从而完成护城河的建设。例如，2015 年 BD 收购 Cellular Research，2016 年 Juno 收购 AbVitro，2020 年 Bio-Rad 收购 Celsee 等。基因慧预计，未来 3 年国内外将会发生类似的单细胞战略并购。

A microscopic image showing a cell with a bright yellow nucleus being manipulated by a thin needle. The cell is surrounded by other cells, some of which are out of focus. The background is dark, making the cell and the needle stand out.

## 第四部分 现状及展望

## 第七章 重难点分析

### （一）实验技术重难点

为了获得高质量的单细胞进行测序，必须充分了解样本类型并根据具体的样本来优化实验操作。如果方法不当，细胞基因表达谱可能会出现变化，甚至部分对环境较为敏感的细胞会出现死亡，并在裂解后向周围环境释放，从而造成检测中的背景噪音，从而影响单细胞数据的质量。因此实验过程中需要尽量避免细胞死亡和裂解，不断优化制备条件，加快实验流程，减少对样本细胞的刺激。另外，对于冻存人组织样本及拿不到理想单细胞悬液的组织类型，应着重考虑单细胞核抽提技术的开发。

目前虽然微流控技术的应用使得单细胞的通量能达到上万个细胞，然而不论是液滴微流控还是微孔分选技术都需要大量的细胞样本，这对于一些难以获取的珍稀样本并不友好。而且目前大多数的高通量转录组平台只能实现 3' 或者 5' 端测序，无法获取更为丰富的全长转录本信息。此外，单细胞由于 DNA 和 RNA 含量都是皮克级别，因而检测到的总基因数相对较低，而且在扩增过程中由于捕获效率的问题，仍然会存在着扩增偏向性问题，如小片段可能有更大概率被富集，这都会影响数据分析。

就各个单细胞组学技术而言，目前单细胞表观组学方法是发展相对不成熟的技术，还面临较多挑战。scATAC-seq 技术上存在较低的文库复杂度，对组织解析高敏感度等问题。单细胞甲基化测序技术存在着低通量和基因组覆盖率较低的问题。如前文所述，空间转录组目前还达不到单细胞的分辨率。虽然 10x Visium 系列产品大大提高了首代 Spatial Transcriptomics 产品可以达到的分辨率，但是其仍在平均 10 个细胞左右的瓶颈。

要达到更高的分辨率，首先需要提高每个位点包含的寡核苷酸密度。然而，每个位点能包含的寡核苷酸数量目前是有限。其次，即使提高核苷酸的密度，在组织透化裂解细胞释放 RNA 过程中，由于细胞与细胞直接紧密相连，在溶液中有 RNA 扩散的现象，因此临近细胞的 RNA 总是会互相污染，导致分辨率不能达到像基于液滴的单细胞 RNAseq 的水平。一方面，采取更优化的组织透化技术，使用扩散较慢的缓冲液可以在保证细胞充分透化的基础上，防止 RNA 的扩散；另一方面，更重要的是在提高寡核苷酸密度的同时，需要提高其捕获能力和速度，才能在最大程度上防止邻近细胞 RNA 的扩散从而提高分辨率。因此，如何提高寡核苷酸链的捕获能力和速度，是空间转录组技术发展的重要突破点。

单细胞多组学分析能够为研究者提供更全面的单细胞信息，但目前的多组学分析方法通量较低，近期有研究通过细胞进行多重标记的方法来实现高通量的基因组和转录组同步测序(Yin et al. 2019)。

## （二）单细胞测序数据处理较难

与传统测序相比，单细胞测序会产生更大的背景噪声数据，因为单细胞的 DNA 或 RNA 起始量太小，扩增和捕获时微小的偏差经过多重扩增后会被放大，在细胞间产生与生物学意义无关的巨大差异。例如，即使是高表达的转录本也可能由于捕获效率的原因被错过，从而导致了假阴性结果。而一些低表达的基因也可能由于扩增而被富集，导致数据失真。

其次，不同样本间产生的批次效应也是处理单细胞数据时的一个难点。批次效应 (Batch effect) 即是独立建库测序的样本间的天然差异，有时候很难与真实的生物学差异区分开。如果实验设计不合理，也有可能产生较大的批次效应。而且，有时候分析出来的细胞间差异可能是源于细胞尺寸、细胞周期状态和其他一些因素，这给细胞类型鉴定也带来了一定的困难。

此外，单细胞测序技术常将数千个细胞加上细胞标签而混合在一起实验，在数据分析过程中对这些细胞进行解码也是巨大的挑战。目前常采取两种方法来检测技术导致的差异，一是将 Bulk RNA 样本稀释至单细胞的水平 (约 10-50pg)，添加至单细胞样本中。第二种方法是添加一些外源的 RNA 分子来作为内参。但是两种方法都分别存在着技术上难操作、外源 RNA 分子和所研究的 RNA 分子特性不一样等问题。细胞分群算法，细胞亚群注释，细胞亚群的 marker 基因筛选及细胞亚群整体功能均需及时优化。

目前大部分单细胞数据分析都是基于编程语言如 R 语言，Python 等，这对生物学家的要求较高，也在实验人员和生物信息分析人员之间造成了一定的壁垒。目前计算生物学家们开发了一些可视化的生物信息操作工具，如来自 FlowJo 的商业化 SeqGeq 软件包、来自 Garmire 集团的 Granatum 和来自瑞士联邦理工学院 Bart Deplancke 实验室的 ASAP (自动单细胞分析流程)。这些工具提供相对简单的交互式工作流程，促进了生物学多个领域工作人员的交流。目前的工具能解决部分问题，但无法适应个性化的分析，未来期待更多简洁、易操作且准确有效的工具被开发出来。

## （三）单细胞多组学联合分析难度大

除了实验技术层面的挑战，单细胞组学数据的分析也是重难点。面对海量的单细胞测序和流式数据，如何将单细胞的多组学信息与其细胞表型和功能结合起来是生物信息分析的难点，对于科学研究和临床应用都有着重要意义，但是目前的联合分析一般局限于两种或者三种组学。

## （四）单细胞相关专业人才匮乏

单细胞技术涉及微流控、极微量分析定量、海量数据分析等核心技术，对人员能力要求很高，目前多应用于科研，产业化程度并不高。同时，相对于普通的测序技术，当前的单细胞测序成本较高，还不适合于大规模的临床应用。亟需研发人才降低成本、优化流程，开发更多工具，推动转化应用。

## 第八章 发展及展望

### （一）技术发展趋势：分选效率和通量，高通量的多组学研究

未来单细胞技术发展的主要趋势是提高单细胞分选效率和通量、实现高通量的多组学研究，开发更多自动化的单细胞技术平台，这些都将有助于降低单细胞技术的成本和技术门槛。对于新兴的单细胞蛋白组和空间组学，更多维的蛋白组学参数分析和更高分辨率的空间组学研究都是未来技术的发展方向。同时，将单细胞多组学研究和组织的 3D 解剖结合也是未来技术发展的重要趋势。

单细胞技术所产生的海量信息解读是目前的难点，不断涌现的新兴的单细胞技术如质谱流式，空间转录组数据等也都需要新兴的生物信息分析工具。随着更多的单细胞细胞图谱被解析，单细胞数据库不断被丰富，我们期待着计算生物学家们开发出更多准确有效的算法和软件。

### （二）未来技术转化趋势

随着近十年的发展，目前单细胞技术已经在科研领域有着广泛的应用，包括很多转化方面的研究，如肿瘤免疫、伴随诊断、药物开发、疫苗研究等，这些领域都是未来技术转化的方向。

#### 肿瘤治疗领域临床转化

早发现对于肿瘤治疗起着至关重要的作用，目前对肿瘤的早筛依赖于成像技术和病理学分析。对癌症高风险人群如长期长期抽烟史人群，有乳腺癌家族史人群等进行肿瘤早筛尤为重要。癌症发生后，在癌症起源附近的体液中存在游离的循环肿瘤细胞 (Circulating tumor cells, CTCs)，例如膀胱癌和前列腺癌患者的尿液，鼻咽癌患者的唾液，子宫内膜癌和胰腺癌患者的腹腔冲洗液。CTC 可以用于肿瘤早筛及作为肿瘤转移的检测指标，他们同样存在高异质性，通过单细胞 DNA-seq 或 RNA-seq 同样可以实现捕获到更精准的 CTC 细胞信息，辅助疾病治疗。

其次，单细胞技术有助于个性化治疗。每个病人的肿瘤细胞都有特异抗原，存在特异的基因型，现有的普通测序技术并不能解决肿瘤组织的异质性问题。通过单细胞技术可预测肿瘤病人的特异性抗原，对肿瘤病人免疫治疗前进行免疫分型，实现个性医疗。有些肿瘤通过传统方法难以找到最初的起源部位，通过单细胞技术能够深入了解肿瘤的起源部位，为治疗提供有效信息。在病人的诊断、阶段性治疗后和转移复发等多个阶段，单细胞技术可以更精准地进行风险评估。针对肿瘤细胞或者肿瘤微环境的单细胞测序，能更好地监测病人的肿瘤发展、评估转移复发风险、药物反应等，实现更精准的治疗。

## 新药和疫苗开发

新药开发是一项需要耗费大量时间和财力的工作，从寻找靶点到发现候选药物，然后进行无数的筛选和优化，在满足毒理，代谢分布，药剂合成，有效性，各种临床试验等等各项指标后，才可能得到一种新药。许多疾病如肿瘤都有高度的异质性，这给药物靶点的寻找带来了很大的挑战。

通过单细胞技术来研究病人之间的异质性以及病人内细胞的异质性，能够更精准地发现真正的致病靶点，为新药研发带来突破。此外，由于异质性还会导致不同患者对药物的反应不同，很多药物都只在部分患者中有效，而在其他患者中会出现耐药性。单细胞技术同样能够用于病人的耐药性检测，发现耐药的细胞亚群和机制，指导医生进行更好的联合用药。单细胞技术在疫苗开发领域同样有着广阔的应用前景。通过单细胞转录组和免疫组库测序，结合蛋白组学技术，可以快速评估患者疫苗注射后的免疫应答反应，发现抗原特异性的细胞亚群，有助于加速疫苗研发进程。

## 其他领域

单细胞技术还广泛应用于微生物研究领域，包括对肠道微生物菌群的研究，发掘出有特定功能的肠道微生物，研究肠道菌群对多种疾病的影响。同样，还可用于环境微生物的监测，发现土壤和海洋中稀有的微生物，研究特定微生物的功能和应用前景。此外，单细胞技术还广泛应用于神经科学领域，例如探索神经元细胞亚型及其与阿尔兹海默症、帕金森、精神分裂症、抑郁症等疾病的发病机制等神经科学分析，我们也期待着单细胞技术未来能够转化于这些疾病的治疗中。

未来单细胞技术将逐渐向临床转化，为健康监控，诊断和疾病治疗贡献巨大力量，为精准医疗和再生医学奠定基础。相信未来，随着技术的不断升级，单细胞技术的成本降低至医疗可接受水平指日可待，单细胞技术也将在临床上实现大规模应用。

## （二）未来产业发展趋势

单细胞技术产业的发展涉及到上游的试剂开发、微流控设备、微孔芯片、高通量测序仪研发等。目前单细胞技术的试剂和设备成本仍然很高，随着越来越多的公司和科研团队加入这一产业，试剂和设备成本将逐渐降低。同时，随着技术的普及和广泛应用，中下游的单细胞技术服务产业也会蓬勃发展。

## 测序仪的小型化和便捷化

数十年来随着测序仪的高速发展，测序成本正以超摩尔定律下降，围绕更高通量、更长读长、更低成本、更便捷的基因测序技术和场景发展，在 NGS 方面，Illumina、Thermo Fisher 等知名企业迎来华



大智造等国产公司的入局，推动行业生态进一步完善。

此外，以单分子荧光测序和单分子纳米孔测序为原理的测序技术（例如 Pacific Biosciences 和 Oxford Nanopore）得到快速发展，其超长读长、灵活便捷的特点为单细胞测序技术带来更广泛的应用场景，目前在成本和特异性上正研发迭代，从科研逐步向临床拓展。国内类似齐碳生物、安序源等企业纷纷跟进单分子测序研发。

### 单细胞国产化及细分领域头部企业崛起

随着单细胞技术的发展和市场教育加速，单细胞市场已初具规模。以新格元为代表的企业开始推出国产建库系统，亿康基因等基于单细胞拓展辅助生殖应用，可以预见单细胞国产化会进一步加速，主要体现在建库的环节。得益于国内产业业态及临床科研需求，或可诞生细分领域头部企业。

虽然单细胞应用仍在早期，但对于新药研发等前景，是细胞分辨率上解决异质性以及溯源的较好解决方案之一。国外药企较早涉及，并通过投资等方式深入市场。

### 巨头并购和大数据资产

以全球最大医疗技术及医疗设备公司之一的 BD 为例，发展史是一部并购史。对于单细胞产业化，与传统基因检测行业及其他领域有相关技术重叠（例如测序、生物信息分析等）。因此，巨头并购将成为行业发展动力和初创企业的挑战。类似基因检测的发展，单细胞的发展将伴随检测成本、捕获效率的提高，而走向临床，同时形成相关应用领域的单细胞图谱。届时未来积累的大数据将成为机构的核心资产，而接下来便到了所有数字生命健康领域发展的一个节点，技术转化平台。因此，从中期来看，设备和试剂为主导，长期来看，数据中心资源及数据挖掘及转化是核心竞争力。

附：缩略词对应中英文检索表

英文简称	英文全称	中文名
/	Mass Cytometry	质谱流式
ICP	Inductively coupled plasma	电感耦合等离子体
/	Quadrupole deflector	四极感过滤器
TOF	Time-of-flight	飞行时间测定法
IMC	Imaging Mass Cytometry	成像质谱流式技术
/	Spectral flow cytometry	光谱流式技术
scRNA-seq	Single cell transcriptome sequencing	单细胞转录组测序
FACS	Fluorescence-activated cell sorting	流式分选
LCM	Laser Capture Microdissection	激光捕获显微切割
IFC	Integrated Fluidic Circuit	微流体芯片
GEM	Gel Bead in Emulsion	油滴包裹凝胶珠
CNVs	Copy number variations	基因拷贝数变异
SNVs	Single-nucleotide variants	单核苷酸变异
gDNA	Genomic DNA	基因组 DNA
DOC-PCR	Degenerate Oligonucleotide Primed PCR	/
MDA	Multiple displacement amplification	多重置换扩增法
MALBAC	Multiple Annealing and Looping-Based Amplification Cycles	/
scRRBS	Single cell reduced representation bisulfite sequencing	/
scBS-seq	Single cell bisulfite sequencing	/
scWGBS	Single cell whole genome bisulfite sequencing	/
scG&T-seq	Single cell genome and transcriptome sequencing	单细胞基因组和转录组同步测序
scM&T-seq	Single-cell methylome and transcriptome sequencing	单细胞甲基化组和转录组同步测序
scTrio-seq	Single-cell triple omics sequencing	单细胞三组学测序
scNOMe-seq	Single-cell nucleosome occupancy and methylome sequencing	/
scCOOL-seq	single-cell COOL-seq	/
CITE-seq	Cellular Indexing of Transcriptomes and Epitopes by sequencing	/
CTCs	Circulating tumor cells	循环肿瘤细胞
ncRNA	non-coding RNA	非编码 RNA
smFISH	Single-molecule fluorescence in situ hybridization	单分子原位杂交技术
MERFISH	multiplexed error robust FISH	/
ATAC-seq	Assay for transposase accessible chromatin sequencing	染色质开放区域测序