

荧光分析仪在单细胞测序中的应用

1. 单细胞测序

单细胞测序 (Single Cell Sequencing): 简称 SCS, 是指从单个细胞提取 DNA 或 RNA 样品进行 DNA 或 RNA 的测序。该技术自 2009 年问世, 2013 年被 Nature Methods 评为年度技术以来, 越来越多地被应用在科研领域。2015 年以来, 10X Genomics、Drop-seq、Micro-well、Split-seq 等技术的出现, 大大降低了单细胞测序的成本门槛。目前, 单细胞测序技术已广泛应用在肿瘤异质性研究、干细胞发育和分化、人类细胞图谱构建、神经系统发育、免疫方向、胚胎细胞发育研究、疾病分型等多方面。

2. 单细胞测序的优势

与传统高通量测序相比, 单细胞测序一次检测量可达 100-200Gb, 包含 1000~6000 个不同细胞的基因表达, 超高通量可以对 6000~10000 个单细胞转录组分析。它的优势也体现在以下几点:

- ①能准确区分细胞群体, 并进行细胞类别间的比较;
- ②能找到稀有细胞的表达情况;
- ③准确分析每一个细胞的基因表达;
- ④能对于微环境中的细胞间关系进行分析解读;
- ⑤从表达量, 细胞量, 细胞组成等多角度对样本进行分析。

3. 单细胞测序的不同技术

①斯坦福大学 Stephen Quak 研发的基于芯片技术的单细胞测序, 该技术设计了一种路线, 用液体载运细胞通过一连串显微管道和微阀门, 当细胞挨个进入各自的小空位时, 它们的 DNA 就会被提取出来, 经过复制用于进一步分析。该方法不仅能分离细胞, 还能用化学试剂将细胞混合起来, 通过检测反应过程中的荧光发射获得它们的基因编码。所有这些都能够在芯片上完成, 不仅操作简单, 而且成本效益高。目前应用在研究精子细胞的重组和突变率。

②美国科学院院士谢晓亮教授研发的多重退火和成环循环扩增技术, 通过降低 PCR 扩增偏倚, 使得单细胞中 93% 的基因组能够被测序。这种方法使得检测单细胞中较小的 DNA 序列变异变得更容易, 因此能够发现个别细胞之间的遗传差异。这样的差异可以帮助解释癌症恶化的机制, 生殖细胞形成机制, 甚至是个别神经元的差异机制。

③深圳华大基因研究院研发的基于多重置换扩增 (MDA) 的单细胞测序, 该方法不仅具有更高的分辨率和基因组覆盖度, 而且具有更好的敏感性和特异性。该方法从单核苷酸水平上为各种复杂疾病和生物学过程的研究开辟了新思路。

④加拿大英属哥伦比亚大学 Peter Lansdorp 研发的 Strand-seq 技术, 该方法能分别对单细胞的双亲 DNA 模板链进行测序, 获得高分辨率的姊妹染色体交换图谱, 检测到基因重排, 从而发现细胞复制过程中 DNA 序列的翻转或交换。利用 Strand-seq 方法, 研究人员完成了单链 DNA 测序, 并发现了首个基因组压力和不稳定性的痕迹。

4. 单细胞测序的实验流程

- ①采集细胞样品: 用酶消化的方法获取单细胞消化悬液;
- ②细胞计数和活性检测: 检测单细胞悬液中细胞的活性状态, 并完成细胞计数, 计算上样量。对细胞质量的要求是: 细胞活性大于 70%, 浓度为 500~2000 个细胞/ μl , 上机细胞数不高于 10000 个。
- ③单细胞分离: 将单细胞悬液标记特定的 barcode, 用单细胞捕获设备捕获。
- ④单细胞建库: 通过 RNA 反转录、PCR 等步骤获得可以上机测序的 DNA 文库。
- ⑤上机测序: 使用测序平台对单细胞转录文库进行高通量检测。
- ⑥数据分析: 对测序结果进行分析和解读。

5. Countstar Rigel 荧光分析仪在单细胞测序中的应用

单细胞测序过程中需要对细胞进行浓度和活率的精确计数，多数细胞样本是从组织中消化下来的，含有更多地细胞碎片和杂质，传统的计数方法不能排除这些杂质和碎片的干扰。Countstar Rigel 全自动荧光分析仪是一款基于图像法检测、配合多荧光通道，通过采集图像中的细胞信息，进行定量分析。它将荧光显微成像与统计学群体分析结合于一身，既能提供细胞群的统计数据，又可以获得单个细胞的图像，从而提供细胞形态学信息。它结合 AO（吖啶橙）和 PI（碘化丙啶）两种核酸染料，通过荧光染色和图像识别法对细胞浓度和活率进行精确计数（如图 1），有效地排除细胞碎片和杂质的干扰（如图 2），并提供多种导出格式（如图 3），是单细胞测序过程中的好伙伴。

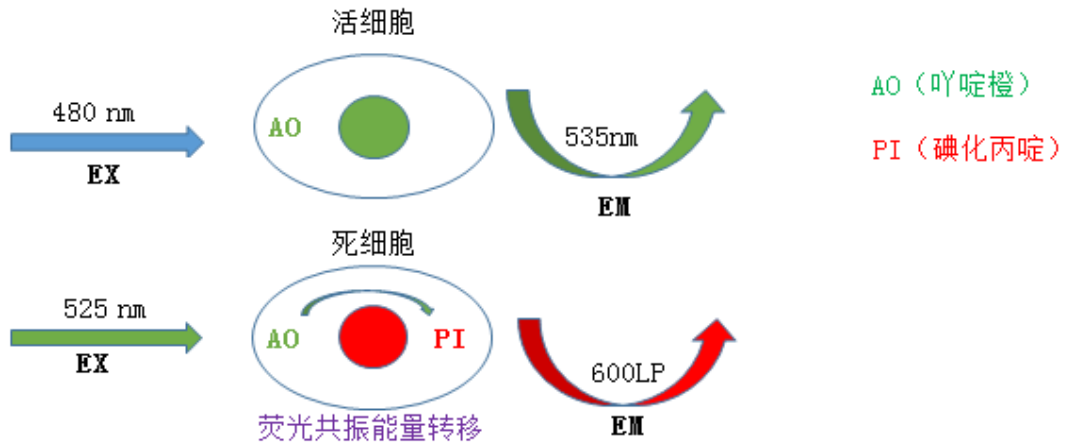


图 1. AO/PI 活率检测原理

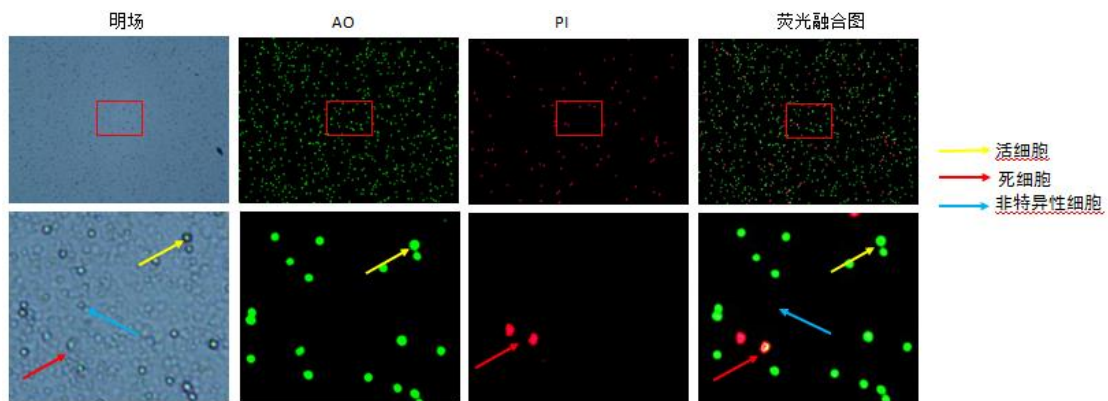


图 2. Countstar Rigel 分析仪检测的图片

实验名称	样品ID	槽位	细胞活率	总细胞浓度	活细胞浓度	死细胞浓度	总细胞个数	活细胞个数	死细胞个数	平均直径
test1		3 Chamber3	88.84	1.02E+07	9.07E+06	1.13E+06	6733	5987	746	
test1		2 Chamber2	88.76	1.02E+07	9.04E+06	1.15E+06	6724	5967	757	
test1		1 Chamber1	89.41	1.15E+07	1.03E+07	1.22E+06	7586	6780	806	

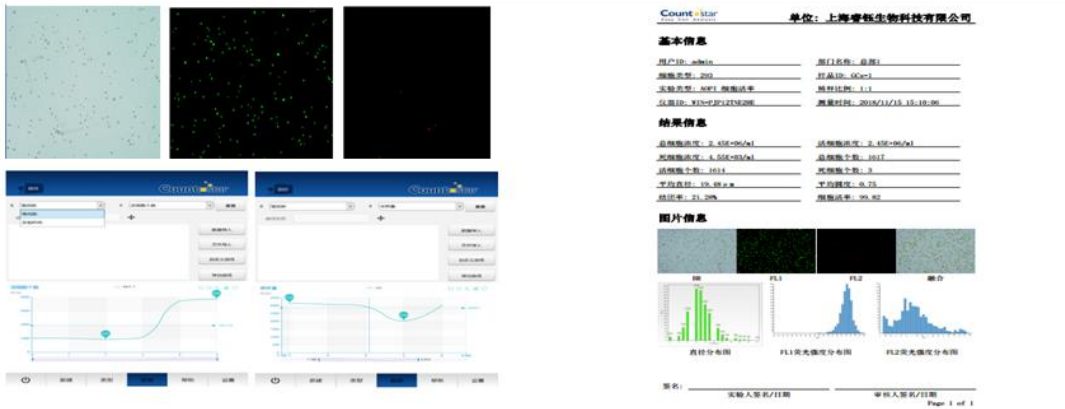


图 3. Countstar Rigel 分析仪导出的不同数据格式