



单细胞三维基因组学技术与前沿进展

梁伯源^{1,2†}, 徐鹤铭^{2†}, 陈玉洁², 邢栋^{2*}

1. 清华大学生命科学学院, 北京 100084

2. 北京大学生物医学前沿创新中心, 北京 100871

† 同等贡献

* 联系人, E-mail: dxing@pku.edu.cn

收稿日期: 2025-05-01; 接受日期: 2025-05-26; 网络版发表日期: 2025-06-06

摘要 真核生物染色质的高度有序空间架构是基因组功能行使的结构基础. 以高通量染色质构象捕获技术(high-throughput chromosome conformation, Hi-C)为核心的三维基因组学研究, 系统阐释染色质多层次折叠的三维组织形式. 单细胞三维基因组技术突破群体细胞平均化局限, 实现单细胞水平染色质空间构象解析, 为揭示发育分化与肿瘤异质性等生物学过程提供新维度认知. 整合多组学策略可有效克服单一维度局限, 阐明染色质空间动态与基因调控的因果关系. 本文系统综述三维基因组学关键技术原理及染色质特征结构, 重点剖析单细胞分辨率技术的核心优势, 并展望多组学整合策略在基因调控网络解析中的发展前景, 旨在为领域研究者提供技术演进的全景视角.

关键词 三维基因组学, 单细胞三维基因组学, 多组学

真核细胞中, 基因组DNA通过精巧的折叠形成致密的染色质结构, 动态调控着基因表达、DNA复制等核心生命活动. 长久以来, 科学家们始终在探索一个关键问题: 长达两米的DNA如何有序地压缩在微米级的细胞核内? 这种空间组织形式又如何灵活地协调不同的生物学功能? 这些问题的解答不断推动着三维基因组学领域的技术革新^[1].

三维基因组学是研究基因组在细胞内的三维构象及其功能的一个新兴学科. 2009年, 高通量染色体构象捕获(high-throughput chromosome conformation capture, Hi-C)的出现, 将全基因组空间结构的检测带入一个新的时代^[2,3]. 该技术通过捕捉染色质空间邻近的DNA片段, 首次实现全基因组三维结构的定量解析.

随着技术进步, 从早期群体细胞分析到近年单细胞分辨的实现, 成功揭示传统群体细胞检测手段无法捕捉的细胞间染色质构象异质性, 标志着该领域进入单细胞精度的新纪元^[4,5].

本文将从三个层面展开论述: 首先, 介绍三维基因组学的基础技术原理与发展历程, 解析染色质区室化、拓扑结构域等经典发现; 其次, 聚焦单细胞技术突破, 通过了解染色质空间组织的新发现及其创新性实验设计方案, 阐明单细胞三维基因组学相较于传统群体细胞研究在揭示细胞异质性、解析动态调控网络方面的独特优势; 最后, 针对当前多组学整合研究趋势, 重点探讨单细胞三维基因组与转录组、表观组的联合分析策略及前沿应用. 通过串联技术发展、生物学发现与

引用格式: 梁伯源, 徐鹤铭, 陈玉洁, 等. 单细胞三维基因组学技术与前沿进展. 中国科学: 生命科学, 2025, 55: 1108–1120

Liang B Y, Xu H M, Chen Y J, et al. Single-cell 3D genomics technologies and frontier advances (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2025, 55: 1108–1120, doi: 10.1360/SSV-2025-0139

跨组学整合, 本文旨在为领域研究者提供技术演进的全景视角。

1 三维基因组学技术的发展

长久以来, 人们对染色质三维结构的研究都依赖于显微观察。从早期人们利用光学显微镜观察染色体的形态以及异染色质的分布, 到利用荧光原位杂交 (fluorescence *in situ* hybridization, FISH) 技术观察特定基因在细胞核内的位置^[6]。然而, 传统显微手段受限于分辨率与通量, 仅能获取局部静态信息。直至高通量测序技术出现后, 才实现全基因组水平的高分辨率三维结构解析。

三维基因组研究的里程碑始于2002年Dekker团队开发的染色质构象捕获技术(chromosome conformation capture, 3C)。该技术通过物理交联、酶切连接与

定量分析三个核心步骤, 实现染色质空间互作位点的特异性检测^[7]。在此技术框架基础上, 后续衍生出靶向捕获特定位点与多位点互作的4C技术(circular chromosome conformation capture)^[8], 实现中等通量检测的5C技术(chromosome conformation capture carbon copy)^[9], 以及全面解析全基因组互作网络的Hi-C技术^[10]。这些方法共同构成基于邻近连接原理的技术体系, 其中Hi-C因其高通量特性成为三维基因组研究的核心手段^[3]。

经典Hi-C实验通过以下核心步骤实现染色质空间互作捕获(图1A)^[11]: (i) 甲醛交联固定染色质空间构象; (ii) 限制性内切酶消化后, 对酶切末端进行补平与生物素标记; (iii) 稀释条件下进行分子内连接, 使空间邻近的DNA片段形成嵌合连接体; (iv) 超声破碎DNA并通过链霉素亲和素磁珠特异性富集含生物素标记的连接产物; (v) 构建高通量测序文库, 最终通过生物信息

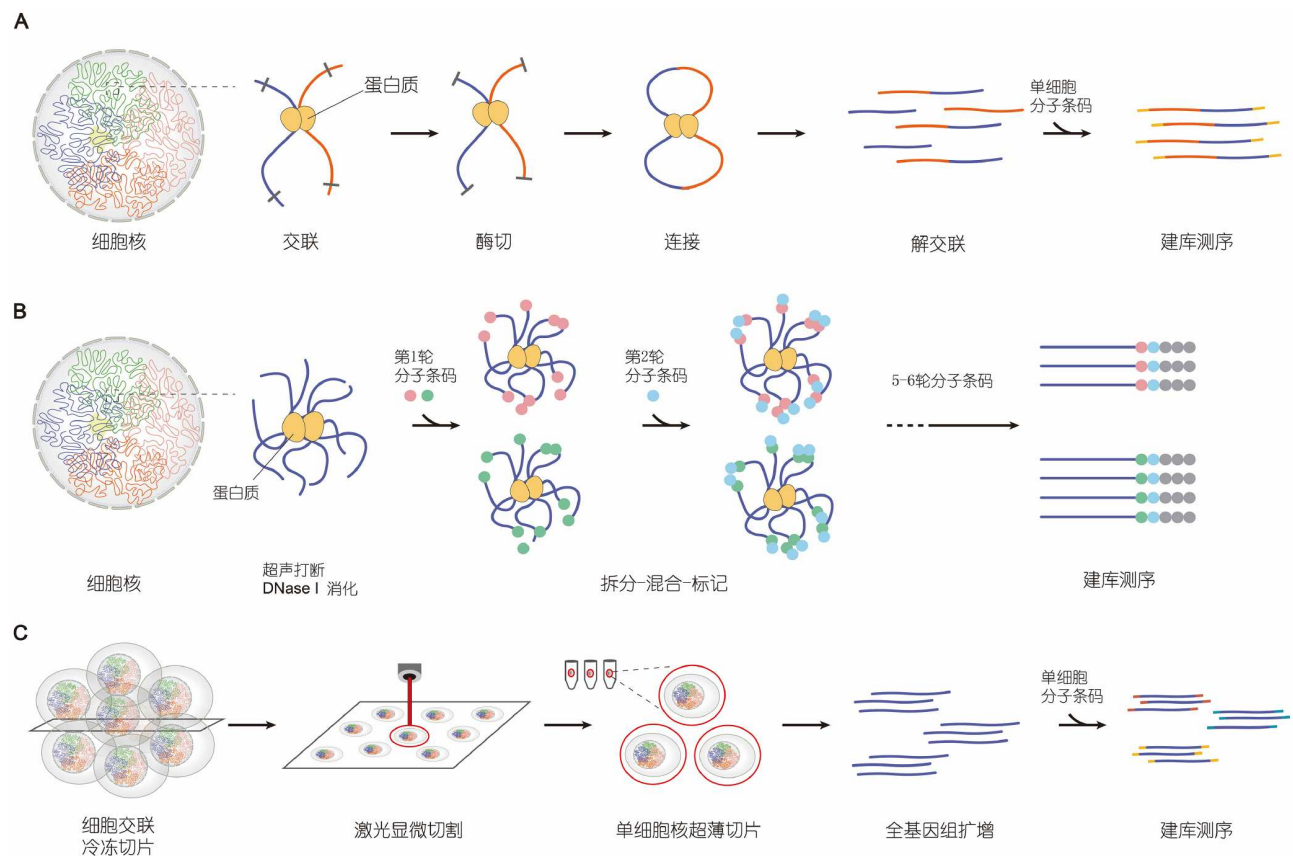


图 1 基于高通量测序的三维基因组学技术方法原理图。A: 基于邻近连接的方法(Hi-C); B: SPRITE; C: GAM

Figure 1 Schematic illustration of 3D genomics technologies based on high-throughput sequencing. A: Proximity ligation-based method (Hi-C); B: SPRITE; C: GAM

学分析识别线性距离远但空间邻近并接触的基因组互作位点(contact), 进而重构出整个基因组的三维结构。

近年来也涌现出一系列非邻近连接的三维基因组研究方法, 其中最有代表性的是SPRITE (split-pool recognition of interactions by tag extension)^[12]和GAM (genome architecture mapping)^[13]. SPRITE是将交联后的细胞核超声粉碎后, 使得染色质断裂成许多小团的DNA-蛋白质复合物, 再对每个DNA-蛋白复合物进行多轮拆分-混合-标记(split-and-pool barcoding)操作, 赋予空间共定位片段相同分子条形码, 从而系统性解析多组分染色质互作网络(图1B). ChIA-Drop与SPRITE原理相似, 但使用不同的方法进行标记复合物条码标记^[14]. GAM则创新性地结合冷冻切片与统计学建模, 通过分析超薄切片(~200 nm)内DNA片段的共定位频率反推三维空间邻近关系(图1C). 成像技术领域同样取得突破: 单分子定位显微术将FISH分辨率提升至~20 nm, 染色体示踪技术更可实时观测染色质动态构象变化^[15]. 这些方法与Hi-C形成技术互补, 共同构建多尺度三维基因组解析体系。

2 染色质三维结构的基本特征

2.1 染色体疆域

染色体疆域(chromosome territory)的发现是三维基因组学的重要基石^[16]. 20世纪80年代, FISH技术首次证实哺乳动物间期染色体在核内呈区域性分布而非随机弥散^[17-20]. 这种空间排布模式类似被挤压在一起的许多纸团, 而非缠绕在一起的多股麻绳. Hi-C数据进一步验证该现象: 同一染色体内部互作频率显著高于跨染色体间互作, 即使对于线性距离超过千万碱基对的远端染色体区域亦是如此^[21,22]. 哺乳动物细胞中, 染色体疆域通常呈现拓扑隔离的椭球体结构, 相邻染色体间形成界面接触区而非结构缠结(图2A), 这种空间组织模式在维持染色质结构连续性的同时, 确保染色体功能的独立性^[23,24].

2.2 A/B区室

Hi-C技术进一步揭示间期染色体的多层次空间组织特征. 在染色体疆域内部, 染色质进一步形成A/B区室化(A/B compartment)结构, 其空间划分与常染色质(转录活跃)和异染色质(转录沉默)的功能状态高度相

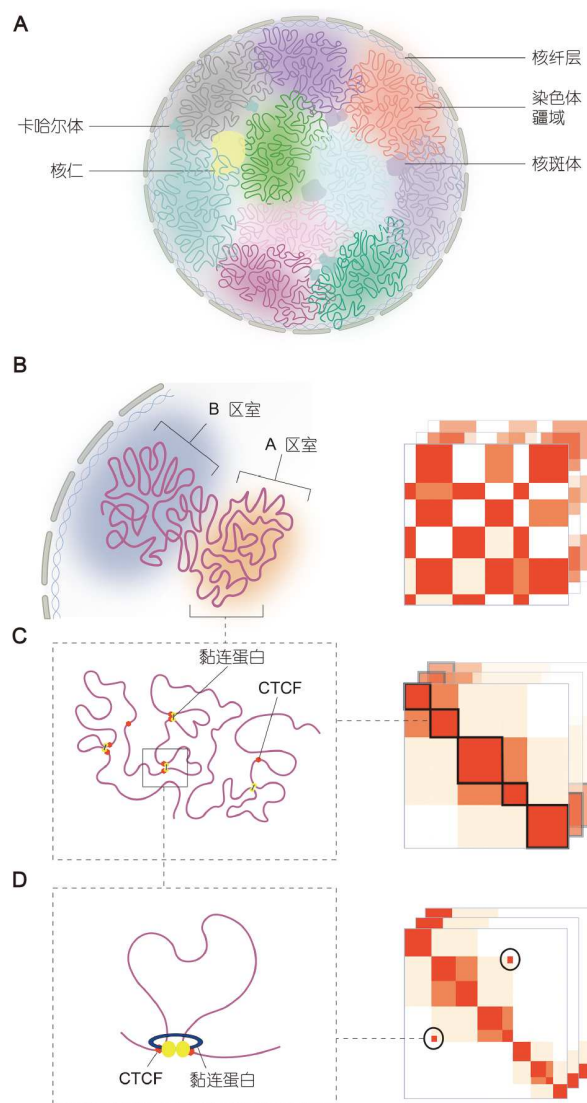


图2 真核生物染色体的层次折叠结构与接触图谱模式图. A: 染色体疆域; B: A/B区室; C: 拓扑关联结构域; D: 染色质环
Figure 2 Hierarchical folding structures of eukaryotic chromosomes and patterns of contact maps. A: Chromosome territories; B: A/B compartments; C: topologically associating domains; D: chromatin loops

关^[10]. A区室富含高表达基因, 呈现开放染色质特征; B区室则富集沉默基因, 对应致密染色质区域. 在Hi-C互作矩阵中, 这种区室化特征表现为跨数百万碱基的棋盘状交互模式: 同一区室内部呈现高频互作, 而A/B区室间互作显著受限(图2B)^[21]. 值得注意的是, 这种区室化格局具有细胞类型特异性, 其动态重组与细胞分化过程中的转录重编程密切相关。

2.3 拓扑关联结构域

进一步对高分辨率Hi-C接触矩阵分析显示, 染色体区室内存在大量亚结构, 在接触矩阵中呈现沿对角线的三角形高互作区域, 称为拓扑关联结构域(topologically associating domain, TAD)(图2C)^[25-27]. TAD的典型尺度为数十万至数百万碱基对, 其内部染色质位点优先发生空间互作, 而跨TAD的远程互作显著减少. TAD边界通常富集绝缘蛋白CCCTC结合因子(CCCTC-binding factor, CTCF)及黏连蛋白复合体, 基于“环挤出”(loop extrusion)模型的理论框架被证实为TAD形成的关键机制——黏连蛋白介导的DNA环动态延伸直至受阻于CTCF锚定位点^[28], 但众多研究也发现不同物种与细胞类型中TAD的成因可能不同^[29-33]. TAD被认为在不同细胞类型和物种之间趋于保守, 但需要注意的是, TAD划分受算法参数影响显著, 单细胞水平是否存在稳定TAD结构尚存争议^[34,35].

2.4 染色质环

在最小尺度上, 染色质的基本结构单位是由146个碱基对的DNA缠绕组蛋白八聚体形成的核小体, 核小体通过有序组装形成染色质纤维, 进而通过空间折叠形成染色质环(chromatin loop)^[24]. 染色质环在Hi-C接触矩阵中表现为一个离散的信号点, 其两端基因组位点的空间距离远小于线性序列间距(图2D). 功能型染色质环(如增强子-启动子环)通过介导远端调控元件与靶基因的特异性互作, 直接参与转录调控过程^[36]; 而结构型染色质环(如黏连蛋白复合体介导的环)则主要维持染色质的物理稳定性. 在黏连蛋白复合体、核纤层蛋白等的作用下也会形成结构性染色质环. 值得注意的是, 染色质环的精确解析可能为揭示顺式调控元件与靶基因的时空特异性互作提供关键结构基础.

3 单细胞三维基因组技术

群体三维基因组学研究因细胞异质性平均化效应, 难以解析细胞类型特异性或动态变化的结构特征^[37,38]. 单细胞三维基因组技术的突破性进展, 已经在哺乳动物胚胎^[39,40]、肿瘤^[41]、大脑^[42-44]、视网膜与嗅觉上皮^[45]等组织, 以及果蝇^[46,47]、水稻^[48]等物种中都观察到细胞类型特异的三维结构特征. 这种细胞种类特异性的结构同时也揭示使用三维基因组数据划分细

胞类群的可行性, 例如利用A/B区室信息, Tan等人^[42]在鼠脑样本中鉴定出13种主要的神经元和神经胶质细胞类型.

此外, 单细胞分析可以避免同步化处理, 从而重构出更接近真实情况的连续过程. 比如X染色体失活过程既发生在分裂旺盛的胚胎发育早期, 染色质结构又极受细胞周期影响, 而对小鼠胚胎干细胞的单细胞Hi-C分析能够精准检测到X染色体在分裂期的结构变化特征, 与X染色体失活过程中长程相互作用分阶段增强的过程^[49]. 单细胞Hi-C技术也成功准确捕捉到细胞周期中G1期到有丝分裂前区室化与短程相互作用的增强^[50], 精细胞^[51]、卵细胞^[52]以及受精卵^[53-55]发育过程中基因组特征结构的消失与重构、植物配子体发育^[56]等高异质性的细胞动态过程.

单细胞分辨率数据还对经典群体研究结论具有重要修正意义. 早期单细胞Hi-C研究揭示: 虽然染色体区室等宏观结构在细胞群体中呈现高度一致性, 但长程染色质互作存在显著的细胞间异质性^[22]. 对小鼠单倍体胚胎干细胞三维结构的重构发现, A/B区室和核纤层相关结构域的分布在不同细胞之间是较为保守的, 但TAD和染色质环结构在同类细胞的不同个体间存在极大差异^[57]. 单细胞中TAD结构的高度动态性, 尤其在边界处高度变化的现象也被之后的单细胞Hi-C研究与成像手段进一步证实^[58-60].

3.1 单细胞三维基因组技术的发展

单细胞三维基因组技术的发展历程体现着方法学的持续革新. 2009年单细胞转录组技术的诞生^[61], 为单细胞组学研究奠定基础框架. 2013年, Nagano团队^[22]通过显微操作分离细胞核, 首次实现单细胞Hi-C技术突破, 在每个细胞中捕获到数万个接触点, 并成功解析小鼠X染色体三维结构. 在此之后, 单细胞Hi-C实验流程被多个实验室进一步优化. 2017年, Flyamer等人^[52]开发的snHi-C采用原位Hi-C的方法, 删除生物素修饰与富集的步骤, 将单个细胞中捕获的接触数提升至十万数量级, 并实现单细胞核起始的实验设计. 与此同时, Nagano等人^[52]引入多限制性内切酶体系与Tn5转座酶建库策略, 显著提升实验效率^[50]. 随后的DLO Hi-C利用MmeI限制酶特性, 通过片段长度筛选替代传统生物素富集, 有效降低背景噪音^[62,63].

在技术灵敏度和分辨率方面, 单细胞Micro-C通过

微球菌核酸酶精细切割染色质, 将空间分辨率提升至千碱基级别^[64]. 而scNano Hi-C整合纳米孔测序的长读长优势, 首次在单细胞水平实现多重互作节点的同时检测^[65]. 值得关注的是, 谢晓亮团队^[66]开发的Dip-C技术通过整合单核苷酸多态性信息, 首次揭示二倍体细胞单倍型特异的染色质三维构象, 为等位基因特异性调控研究提供新视角. 这些方法革新逐步突破单细胞三维基因组研究的核心瓶颈——从低通量、高噪音到高分辨率的技术跨越, 为解析细胞异质性背后的三维基因组动态奠定方法基础.

3.2 单细胞三维基因组技术原理

相较于批量实验, 单细胞三维基因组学实验需要克服的一个重要困难在于如何分离细胞并获得单细胞数据. 物理分离法作为单细胞三维基因组研究的经典策略, 其核心在于通过流式细胞分选或显微操作技术从异质细胞悬液中精准分离单个细胞(图3A和B). 该技术路线的核心优势在于普适性: 通过核酸条形码标记单细胞基因组, 可兼容多种实验体系. 为确保数据可靠性, 需在实验全程维持细胞核结构完整性, 因此经典单细胞Hi-C方案通常在群体细胞预处理阶段(如限制性酶切与邻近连接)后实施单细胞分离, 以最大限度保留染色质空间信息. 当前多数单细胞Hi-C研究采用此类“群体预处理-单细胞分选”策略. 但对于需在实验初始阶段分离单细胞的特殊体系(如配子细胞研究), 可通过水凝胶包埋固定或微流控芯片辅助分选等技术实现单细胞低损耗操作^[52,56]. 这些改良方案通过物理限域作用替代传统离心步骤, 可以有效降低微量样本

的DNA损失率.

传统物理分选方法虽操作简便, 但通量受限显著: 基于96孔板的单次分选仅能处理数十个细胞, 大规模研究需重复操作. 为此发展的商业化高通量平台突破这一瓶颈, 其技术路线呈现多样化发展, 其中ICELL8 cx, Fluidigm C1以及Chromium GEM-X是目前常见的三种商业化高通量组学实验平台(图3C). 以微孔板分选为核心的ICELL8 cx平台通过微流控技术实现单细胞精准分配至纳升级反应孔, 单次实验可处理上千细胞. 相比之下, Fluidigm C1系统借助微加工芯片构建独立微反应室, 实现单细胞隔离与平行处理. 而Chromium GEM-X平台则采用液滴封装策略, 通过微流控技术将单细胞与DNA条形码微球共包裹, 大幅提升通量至万细胞级. Droplet Hi-C与dscHi-C就是在原位Hi-C后利用Chromium平台染色质可及性试剂盒进行单细胞建库实现高通量单细胞Hi-C实验, 成功解析小鼠脑发育及肿瘤演进中的三维基因组动态^[41,67]. 这类高通量平台通过标准化操作流程, 将单细胞三维基因组研究的通量提升两个数量级, 显著降低单细胞数据获取成本.

除商业化平台, 拆分-混合(split-and-pool)作为一种重要实验方法, 为高通量单细胞组学研究提供创新路径(图3D). 该策略起源于多肽库合成领域^[68], 单细胞组学借鉴这一方法, 其核心逻辑在于通过多轮样本拆分-条形码标记-混合重组操作, 使每个细胞获得独特的核酸标签组合, 从而无需物理分选即可实现单细胞信息追溯^[69]. 2017年, Ramani团队^[70,71]首次将该策略与Hi-C技术融合, 开发出sciHi-C技术, 一次实验

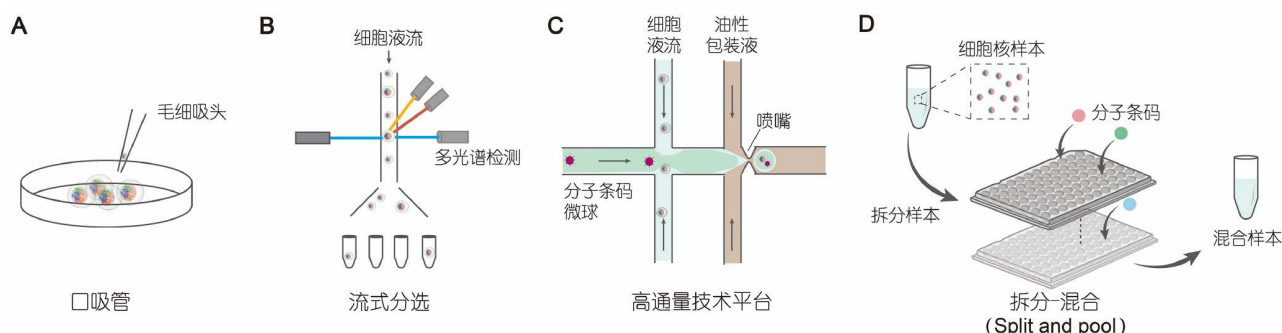


图3 分离单细胞的技术手段. A: 口吸管精确物理分离; B: 流式分选快速物理分离; C: 高通量技术平台添加单细胞条码; D: split-and-pool高通量添加单细胞条码

Figure 3 Techniques for isolating single cells. A: Precise physical isolation using a mouth pipette; B: rapid physical isolation by flow cytometry sorting; C: high-throughput experiment platform for single-cell barcoding; D: split-and-pool strategy for high-throughput single-cell barcoding

就能获得数千细胞的Hi-C图谱。他们采用单细胞组合编码(single-cell combinatorial indexed, sci)策略, 这种方法是基于split-and-pool的原理, 将每次拆分与混合操作融合进Tn5转座酶打断、建库等操作中, 从而减少连接标签的额外操作^[72]。类似原理在染色质高阶互作解析中同样体现价值: SPRITE技术通过多轮拆分-混合循环对染色质复合物进行分子标记, 其单细胞版本通过预标记策略实现细胞身份识别^[39], 进一步拓展该策略的应用维度。

3.3 基于成像方法的单细胞三维基因组技术

除了基于高通量测序的方法, 成像技术的飞速发展单细胞三维基因组研究提供全新的视角。成像手段可以直接观测到单细胞结构以及基因位点的空间分布, 但传统FISH技术受限于空间分辨率与观测位点数量^[73]。而超高分辨率显微术与多重标记策略的结合突破这些限制。首先, 超高分辨率成像技术的出现极大地改善光学衍射极限(阿贝极限^[74])导致的空间分辨率不足的问题。根据实现原理, 超高分辨率显微镜可以分为两类^[75]。第一类是集成成像方法, 使用形成特定图案的光照对部分区域进行荧光激发或耗竭, 从而减小衍射干扰, 比如受激发射损耗显微镜(stimulated emission depletion, STED)^[76,77], 以及饱和结构照明显微镜(saturated structured illumination microscopy, SSIM)^[78,79]; 第二种是单分子成像方法, 在每次拍摄时随机激活衍射极限区域内的单个分子, 然后从测量的所有单个荧光团的位置重建具有亚衍射极限分辨率的图像, 比如随机光学重建显微镜(stochastic optical reconstruction microscopy, STORM)^[80]和光激活定位显微镜(photoactivated localization microscopy, PALM)^[81]。

多重标记策略解决FISH方法观测位点数量低的问题。FISH技术通常只能使用几种荧光颜色通道, 难以满足重构基因组连续序列空间排布所需的千级以上数量的位点探测需求^[82]。多重标记策略采用双步杂交, 使用有限数量的二级DNA荧光探针杂交一级探针, 并利用微流控系统通过二级探针的连续多轮杂交和成像, 从而极大地提高探测通量^[83]。基于这一策略开发的染色质示踪(chromatin tracing)技术能够重建长片段DNA的轨迹: 通过级联探针标记体系实现多轮检测: 一级探针携带特异性DNA序列, 二级荧光探针杂交一级探针后实现信号放大, 通过多轮标记-淬灭不同的

二级探针, 单次实验可解析数百个基因组位点的空间分布^[84]。2016年, 首篇染色质示踪研究通过靶向设计千个探针, 成功绘制人20, 21, 22和X染色体的百万碱基分辨率的染色质三维空间互作图谱^[85]。目前, DNA-MERFISH^[86], DNA-seqFISH+^[87,88], ORCA^[89], Hi-M^[90], MINA^[91]等成像手段已经能在选定区域内达到数千碱基、纳米水平的分辨率, 是未来研究单细胞三维基因组学的重要手段(表1)。

4 单细胞三维基因组与多组学前沿

三维基因组学的一个重要局限在于, 其研究主要聚焦于染色质空间结构的解析, 难以直接揭示结构变化与基因功能调控之间的因果关系。从海量的空间接触信息中识别具有生物学意义的调控性互作, 仍然面临显著挑战。已有研究结果也表明, 仅凭三维结构信息往往难以从生理功能的角度对细胞类型进行有效划分^[101]。单细胞多组学分析在一定程度上克服这一问题。由于可以在同一细胞中同时获取不同组学层面的信息, 实现数据的高度匹配, 这一点是传统的群体细胞实验难以实现的。将三维基因组结构信息与转录组、表观基因组等反映基因表达调控的组学数据进行联合分析, 不仅有助于区分细胞群体, 还能更深入地解释三维结构变化的机制及其功能意义(图4)。此外, 多组学方法还可以以某一组学为锚点, 整合其他维度的信息, 开展更高层次的单细胞组学研究^[102]。综上所述, 多组学策略极大地拓展三维基因组学的研究维度, 已成为当前该领域的重要发展方向。

4.1 单细胞转录组与三维基因组

基因组三维结构的变化与基因表达密切相关, 但二者之间的因果关系仍不明确。通过在捕获染色质三维结构的同时进行转录组测序(RNA sequencing, RNA-seq), 可以依据不同功能类群的基因表达特征更为准确地识别细胞类型, 并将特定基因与其调控元件之间空间距离的变化与基因表达水平进行关联分析。

HiRES 是首个实现单细胞三维基因组与转录组联合分析的研究^[95], 借助转录组信息, HiRES描述早期发育过程中基因组三维结构的动态变化, 并识别出细胞类型特异性的关键结构特征。此外, 在分析小鼠胚胎中与转录变化存在关联的细胞差异性三维结构位

表 1 基于高通量测序的单细胞三维基因组学技术汇总

Table 1 Overview of high-throughput sequencing-based single-cell 3D genomics technologies

方法	发表时间	技术要点
single-cell Hi-C ^[22]	2013	首次实现单细胞Hi-C.
snHi-C ^[52]	2017	原位Hi-C方法, 可以单细胞核起始.
improved single-cell Hi-C ^[50]	2017	多限制性内切酶体系、使用Tn5转座酶建库.
sciHi-C ^[70]	2017	split-and-pool策略实现高通量单细胞Hi-C.
Dip-C ^[66]	2018	整合单核苷酸多态性信息, 揭示二倍体细胞单倍型特异性三维空间结构.
sn-m3C-seq ^[92]	2019	耦合原位Hi-C与亚硫酸氢盐转化, 实现单细胞三维基因组+5mC分析.
Methyl-HiC ^[93]	2019	耦合原位Hi-C与亚硫酸氢盐转化, 实现单细胞三维基因组+5mC分析.
s3-GCC ^[94]	2021	split-and-pool策略实现高通量单细胞Hi-C, 开发尿嘧啶接头转换方法提升建库过程捕获率.
scSPRITE ^[39]	2022	采用split-and-pool策略实现高通量单细胞SPRITE.
Single-cell DLO Hi-C ^[62]	2022	利用MmeI限制酶特性, 通过片段长度筛选替代生物素富集.
HiRES ^[95]	2023	整合原位Hi-C与逆转录, 实现单细胞核三维基因组+转录组分析.
scCARE-seq ^[96]	2023	整合原位Hi-C与逆转录, 实现单细胞核三维基因组+转录组分析.
scNano Hi-C ^[65]	2023	采用第三代测序技术, 长读长检测多重互作节点.
scMicro-C ^[64]	2023 (bioRxiv)	使用微球菌核酸酶精细切割染色质, 提升空间分辨率.
LiMCA ^[97]	2024	核质分离方法实现三维基因组+转录组分析
GAGE-seq ^[98]	2024	采用split-and-pool策略, 实现高通量单细胞核三维基因组+转录组分析.
MUSIC ^[99]	2024	结合split-and-pool 添加单细胞标签与10× Genomics液滴法添加单分子标签, 分析DNA-RNA 高阶相互作用.
Droplet Hi-C ^[41]	2024	使用10× Genomics高通量平台, 实现高通量Hi-C, 以及拷贝数变异、染色体外DNA、转录组的分析.
dscHi-C ^[67]	2025	使用10× Genomics高通量平台并优化方案, 实现高通量Hi-C, 与三维基因组+转录组分析.
ChAIR ^[100]	2025	融合ChIA-Drop的远程互作富集策略与10× Genomics高通量平台, 实现单细胞三维基因组+染色质可及性+转录组分析.

点时, HiRES观察到在时序上三维结构的变化广泛先于基因表达变化, 为证明三维基因组对基因激活的调控作用提供关键证据. 随后, scCARE-seq采用类似策略, 进一步分析细胞周期相关基因的转录与染色质结构变化之间的时序关系, 发现细胞周期中启动子-增强子相互作用的增强能够引起基因组转录水平的增加^[96]. LiMCA则通过核质分离的方法进行双组学测序. 由于细胞质中mRNA拷贝数较高, 该方法在分选单细胞后裂解细胞膜, 利用含部分细胞质的上清进行转录组分析, 而将细胞核用于单管Hi-C实验^[97]. LiMCA通过研究表达水平不同的嗅觉受体基因与增强子之间的空间位置关系, 揭示嗅觉感觉神经元中“单细胞表达单一嗅觉受体”这一表型背后的空间调控机制. GAGE-seq技术采用split-and-pool策略, 实现Hi-C与RNA-seq双组学测序的高通量版本^[98]. 此外, Droplet Hi-C和dscHi-C在10× Genomics Chromium GEM-X平台的ATAC实验方案基础上进行优化, 实现高通量单细胞Hi-C与RNA-seq的联合测序^[41,67]. 基于SPRITE 技术开发的RD-

SPRITE则在单分子水平捕捉RNA与DNA的空间高阶相互作用, 揭示非编码 RNA在核内功能区室形成中的潜在调控作用^[103]. 近期发表的MUSIC方法结合split-and-pool添加单细胞标签与10× Genomics液滴法添加单分子标签, 融合两种高通量策略, 对衰老过程中单细胞水平的 DNA-RNA高阶相互作用进行系统分析^[99]. 这些技术突破推动三维基因组研究从关联分析向机制解析的进一步转变.

4.2 单细胞表观组与三维基因组

DNA胞嘧啶5'甲基化(5'-methylcytosine, 5mC)是哺乳动物中最常见的DNA碱基修饰形式, 其动态修饰模式与顺式调控元件活性及基因转录调控高度耦合. 三维基因组学通过解析染色质空间构象动态, 为揭示表观遗传修饰与基因表达的空间协同调控机制提供独特视角. Methyl-HiC与sn-m3C-seq技术通过耦合亚硫酸氢盐转化与Hi-C建库策略^[92,93], 在单细胞水平实现染色质互作网络与5mC修饰景观的同步解析. 基于技

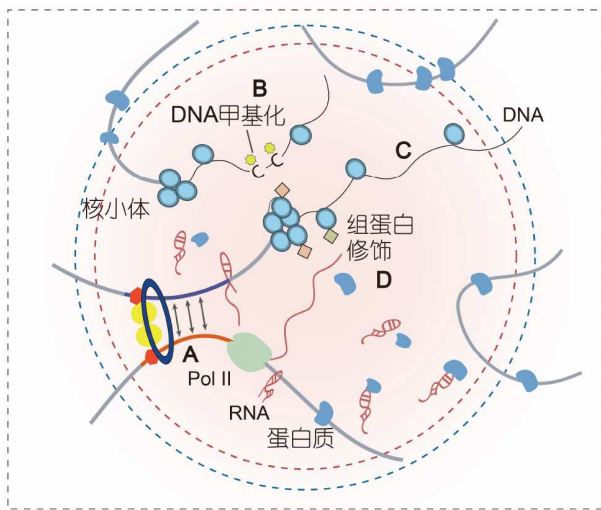


图 4 单细胞三维基因组学与其他组学. A: 增强子与靶基因邻近激活转录; B: 甲基化修饰的活性调控元件与靶基因接触发挥功能; C: ATAC标定开放区域, 观察激活的调控元件与基因间的位置关系; D: 增强或抑制活性的组蛋白修饰影响空间邻近的调控元件与基因

Figure 4 Single-cell 3D genomics integrated with other omics approaches. A: Enhancers activate transcription by spatial proximity to their target genes; B: methylation-modified regulatory elements interact with target genes to exert their functions; C: open chromatin regions identified by ATAC are used to examine spatial relationships between active regulatory elements and genes; D: histone modifications that enhance or repress activity influence the spatial proximity between regulatory elements and genes

术优化, Ecker团队^[43]应用sn-m3C-seq系统绘制人脑单细胞三维表观基因组图谱, 揭示29种神经细胞类型特有的染色质结构-甲基化共调控模式, 证实特定DNA甲基化修饰对染色质拓扑区室化的定向调控作用。

三维基因组多组学技术还可以通过特异性富集或者添加单分子标签, 将不同组学数据精确匹配。其中, 染色质可及性测序(assay for transposase-accessible chromatin using sequencing, ATAC-seq)作为表观遗传研究的重要工具, 利用Tn5转座酶对开放染色质区域的特异性标记, 可精准解析转录因子结合位点与染色质开放区动态^[104]。基于此开发的多组学整合技术ChAIR, 通过融合ChIA-Drop的远程互作富集策略与10× Genomics平台分子条形码系统, 首次实现单细胞水平三维基因组、染色质可及性与转录组三模态联合分析, 证明细胞中启动子与远端调控元件建立相互作用, 随后启动子区域染色质开放, 最终激活基因转录的基因表达调控时序, 并且不同细胞周期阶段三者之间的响应速度不同^[100]。此外, 群体细胞层面的技术

迭代同样值得关注: HiCAR通过Tn5转座酶插入位点定向捕获开放区域邻近序列^[105]; ChIATAC在Hi-C后进行Tn5插入, 再用生物素富集互作开放位点^[106]; Trac-loop与其改进版本Hi-TrAC则是设计一种双端包埋的插入序列, 形成二价Tn5转座复合体, 插入并连接两个临近的开放位点^[107,108]。此外, ChIA-PET^[109], HiChIP^[110], ChIA-Drop^[14]等技术通过抗体介导的靶向富集策略, 解析特定表观修饰或转录因子相关的染色质互作网络。需要指出的是, 该类技术体系虽通过靶向富集(如抗体介导的特异性捕获)或分子标签引导(如转座酶插入位点限定)提升目标区域分辨率, 但此类策略导致检测范围受限于预设的功能元件或开放区域, 可能会对非靶向区域染色质互作信息检测造成一定偏差。

4.3 基于成像方法的多组学

成像技术在空间多组学整合中展现出独特优势。FISH技术通过多模态探针设计, 可在单次实验中同步解析染色质三维构象、RNA空间分布及蛋白质定位信息。最新进展表明, 基于多轮标记-淬灭策略的多模态FISH技术已实现三维基因组构象、转录组及蛋白质组的同步解析, 其空间分辨率可达亚细胞器水平^[15]。这种原位多组学策略为揭示染色质动态与基因表达调控的空间偶联机制提供关键方法支撑。

5 展望

测序技术的突破性进展推动三维基因组学在过去二十年实现跨越式发展。从群体细胞分析到单细胞分辨率的实现, 技术迭代不断突破空间尺度的限制, 使研究者得以深入解析染色质的多层级组织结构。单细胞组学的引入进一步使构建个体化的三维基因组图谱成为可能, 为揭示发育分化、疾病进程等生物过程中的细胞异质性提供全新视角。然而, 相较于转录组等较为成熟的单细胞组学领域, 三维基因组研究仍面临数据积累不足、机制解析不清等挑战。例如, 拓扑关联结构域(TAD)的单细胞动态性, 以及细胞类型特异性三维结构的调控机制等关键科学问题仍亟待深入探索。

三维基因组学的发展高度依赖于技术的进步。基于高通量测序的研究方法经过近二十年的演进已日趋

成熟,但在分辨率、通量与成本之间仍难以兼顾,特别是在单细胞层面,如何克服数据稀疏性的同时提升分辨率,仍是技术发展的重要瓶颈。为解决这一问题,基于成像的方法展现出良好前景。与测序方法需借助算法间接重构染色质空间结构不同,成像技术能够直接观察基因组在核内的空间定位,具备可视化的独特优势。目前部分新兴成像方法的分辨率已基本可与Hi-C类技术相媲美,若能在成本控制与操作门槛方面进一步优化,有望在未来获得更广泛的应用。

此外,单细胞三维基因组学的另一核心挑战在于染色质结构本身难以直接与功能建立联系,导致现阶段许多研究仍停留于现象描述层面,缺乏对结构形成机制及其功能意义的深入探讨。单细胞多组学技术为

解决该问题提供新的方向。近两年发表的三维基因组与转录组、染色质可及性的多组学研究逐步证实,增强子-启动子相互作用的建立激活基因转录的调控模式在不同细胞中广泛存在。但这些研究结果中基因表达对三维基因组变化响应情况的差异性,也暗示基因组三维结构与转录之间的调控网络可能更为复杂,并在不同分化轨迹的细胞间存在差异。研究不同组织与发育过程中三维基因组与基因表达调控之间关系,将是多组学方法下一步的应用热点。未来,通过整合更多类型的组学信息,系统解析细胞三维基因组结构的成因,并探索生命活动与疾病过程中结构功能之间的潜在联系,将成为单细胞三维基因组学发展的关键重点。

参考文献

- 1 Ulianov S V, Tachibana-Konwalski K, Razin S V. Single-cell Hi-C bridges microscopy and genome-wide sequencing approaches to study 3D chromatin organization. *BioEssays*, 2017, 39: 1700104
- 2 Kempfer R, Pombo A. Methods for mapping 3D chromosome architecture. *Nat Rev Genet*, 2020, 21: 207–226
- 3 Pedrotti S, Castiglioni I, Perez-Estrada C, et al. Emerging methods and applications in 3D genomics. *Curr Opin Cell Biol*, 2024, 90: 102409
- 4 Furlan-Magaril M, Várnai C, Nagano T, et al. 3D genome architecture from populations to single cells. *Curr Opin Genet Dev*, 2015, 31: 36–41
- 5 Ulianov S V, Razin S V. The two waves in single-cell 3D genomics. *Semin Cell Dev Biol*, 2022, 121: 143–152
- 6 Jerković I, Cavalli G. Understanding 3D genome organization by multidisciplinary methods. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2021, 22: 511–528
- 7 Dekker J, Rippe K, Dekker M, et al. Capturing chromosome conformation. *Science*, 2002, 295: 1306–1311
- 8 Zhao Z, Tavoosidana G, Sjölander M, et al. Circular chromosome conformation capture (4C) uncovers extensive networks of epigenetically regulated intra- and interchromosomal interactions. *Nat Genet*, 2006, 38: 1341–1347
- 9 Dostie J, Richmond T A, Arnaout R A, et al. Chromosome Conformation Capture Carbon Copy (5C): a massively parallel solution for mapping interactions between genomic elements. *Genome Res*, 2006, 16: 1299–1309
- 10 Lieberman-Aiden E, van Berkum N L, Williams L, et al. Comprehensive mapping of long-range interactions reveals folding principles of the human genome. *Science*, 2009, 326: 289–293
- 11 Lafontaine D L, Yang L, Dekker J, et al. Hi-C 3.0: improved protocol for genome-wide chromosome conformation capture. *Curr Protocols*, 2021, 1: e198
- 12 Quinodoz S A, Bhat P, Chovanec P, et al. SPRITE: a genome-wide method for mapping higher-order 3D interactions in the nucleus using combinatorial split-and-pool barcoding. *Nat Protoc*, 2022, 17: 36–75
- 13 Beagrie R A, Scialdone A, Schueler M, et al. Complex multi-enhancer contacts captured by genome architecture mapping. *Nature*, 2017, 543: 519–524
- 14 Zheng M, Tian S Z, Capurso D, et al. Multiplex chromatin interactions with single-molecule precision. *Nature*, 2019, 566: 558–562
- 15 Yang T, Wang S. Image-based 3D genomics through chromatin tracing. *Nat Rev Methods Primers*, 2024, 4: 1–2
- 16 Cremer T, Cremer M. Chromosome territories. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2010, 2: a003889
- 17 Zorn C, Cremer C, Cremer T, et al. Unscheduled DNA synthesis after partial UV irradiation of the cell nucleus. *Exp Cell Res*, 1979, 124: 111–119
- 18 Cremer T, Cremer C, Baumann H, et al. Rabl's model of the interphase chromosome arrangement tested in Chinese hamster cells by premature chromosome condensation and laser-UV-microbeam experiments. *Hum Genet*, 1982, 60: 46–56
- 19 Cremer T, Cremer C, Schneider T, et al. Analysis of chromosome positions in the interphase nucleus of Chinese hamster cells by laser-UV-

- microirradiation experiments. *Hum Genet*, 1982, 62: 201–209
- 20 Manuelidis L. Individual interphase chromosome domains revealed by *in situ* hybridization. *Hum Genet*, 1985, 71: 288–293
 - 21 Fortin J P, Hansen K D. Reconstructing A/B compartments as revealed by Hi-C using long-range correlations in epigenetic data. *Genome Biol*, 2015, 16: 180
 - 22 Nagano T, Lubling Y, Stevens T J, et al. Single-cell Hi-C reveals cell-to-cell variability in chromosome structure. *Nature*, 2013, 502: 59–64
 - 23 Cremer T, Cremer C. Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells. *Nat Rev Genet*, 2001, 2: 292–301
 - 24 Misteli T. The self-organizing genome: principles of genome architecture and function. *Cell*, 2020, 183: 28–45
 - 25 Dixon J R, Selvaraj S, Yue F, et al. Topological domains in mammalian genomes identified by analysis of chromatin interactions. *Nature*, 2012, 485: 376–380
 - 26 Nora E P, Lajoie B R, Schulz E G, et al. Spatial partitioning of the regulatory landscape of the X-inactivation centre. *Nature*, 2012, 485: 381–385
 - 27 Sexton T, Yaffe E, Kenigsberg E, et al. Three-dimensional folding and functional organization principles of the *Drosophila* genome. *Cell*, 2012, 148: 458–472
 - 28 Mohanta T K, Mishra A K, Al-Harrasi A. The 3D genome: from structure to function. *Int J Mol Sci*, 2021, 22: 11585
 - 29 Fudenberg G, Abdennur N, Imakaev M, et al. Emerging evidence of chromosome folding by loop extrusion. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 2017, 82: 45–55
 - 30 Rao S S P, Huang S C, Glenn St Hilaire B, et al. Cohesin loss eliminates all loop domains. *Cell*, 2017, 171: 305–320.e24
 - 31 Hug C B, Grimaldi A G, Kruse K, et al. Chromatin architecture emerges during zygotic genome activation independent of transcription. *Cell*, 2017, 169: 216–228.e19
 - 32 Ghavi-Helm Y, Jankowski A, Meiers S, et al. Highly rearranged chromosomes reveal uncoupling between genome topology and gene expression. *Nat Genet*, 2019, 51: 1272–1282
 - 33 Kaushal A, Mohana G, Dorier J, et al. CTCF loss has limited effects on global genome architecture in *Drosophila* despite critical regulatory functions. *Nat Commun*, 2021, 12: 1011
 - 34 Bonev B, Cavalli G. Organization and function of the 3D genome. *Nat Rev Genet*, 2016, 17: 661–678
 - 35 Chi Y, Shi J, Xing D, et al. Every gene everywhere all at once: high-precision measurement of 3D chromosome architecture with single-cell Hi-C. *Front Mol Biosci*, 2022, 9: 959688
 - 36 Schoenfelder S, Fraser P. Long-range enhancer-promoter contacts in gene expression control. *Nat Rev Genet*, 2019, 20: 437–455
 - 37 Wu X, Yang X, Dai Y, et al. Single-cell sequencing to multi-omics: technologies and applications. *Biomark Res*, 2024, 12: 110
 - 38 Zhang Y, Li G. Advances in technologies for 3D genomics research. *Sci China Life Sci*, 2020, 63: 811–824
 - 39 Arrastia M V, Jachowicz J W, Ollikainen N, et al. Single-cell measurement of higher-order 3D genome organization with scSPRITE. *Nat Biotechnol*, 2022, 40: 64–73
 - 40 Rappoport N, Chomsky E, Nagano T, et al. Single cell Hi-C identifies plastic chromosome conformations underlying the gastrulation enhancer landscape. *Nat Commun*, 2023, 14: 3844
 - 41 Chang L, Xie Y, Taylor B, et al. Droplet Hi-C enables scalable, single-cell profiling of chromatin architecture in heterogeneous tissues. *Nat Biotechnol*, 2024, doi: 10.1038/s41587-024-02447-1
 - 42 Tan L, Ma W, Wu H, et al. Changes in genome architecture and transcriptional dynamics progress independently of sensory experience during post-natal brain development. *Cell*, 2021, 184: 741–758.e17
 - 43 Tian W, Zhou J, Bartlett A, et al. Single-cell DNA methylation and 3D genome architecture in the human brain. *Science*, 2023, 382: eadf5357
 - 44 Liu H, Zeng Q, Zhou J, et al. Single-cell DNA methylome and 3D multi-omic atlas of the adult mouse brain. *Nature*, 2023, 624: 366–377
 - 45 Tan L, Xing D, Daley N, et al. Three-dimensional genome structures of single sensory neurons in mouse visual and olfactory systems. *Nat Struct Mol Biol*, 2019, 26: 297–307
 - 46 Sun Q, Perez-Rathke A, Czajkowsky D M, et al. High-resolution single-cell 3D-models of chromatin ensembles during *Drosophila* embryogenesis. *Nat Commun*, 2021, 12: 205
 - 47 Ulianov S V, Zakharova V V, Galitsyna A A, et al. Order and stochasticity in the folding of individual *Drosophila* genomes. *Nat Commun*, 2021, 12: 41
 - 48 Zhou S, Jiang W, Zhao Y, et al. Single-cell three-dimensional genome structures of rice gametes and unicellular zygotes. *Nat Plants*, 2019, 5: 795–800

- 49 Bonora G, Ramani V, Singh R, et al. Single-cell landscape of nuclear configuration and gene expression during stem cell differentiation and X inactivation. [Genome Biol](#), 2021, 22: 279
- 50 Nagano T, Lubling Y, Várnai C, et al. Cell-cycle dynamics of chromosomal organization at single-cell resolution. [Nature](#), 2017, 547: 61–67
- 51 Xu H, Chi Y, Yin C, et al. Three-dimensional genome structures of single mammalian sperm. [Nat Commun](#), 2025, 16: 3805
- 52 Flyamer I M, Gassler J, Imakaev M, et al. Single-nucleus Hi-C reveals unique chromatin reorganization at oocyte-to-zygote transition. [Nature](#), 2017, 544: 110–114
- 53 Collombet S, Ranisavljevic N, Nagano T, et al. Parental-to-embryo switch of chromosome organization in early embryogenesis. [Nature](#), 2020, 580: 142–146
- 54 Du Z, Zheng H, Huang B, et al. Allelic reprogramming of 3D chromatin architecture during early mammalian development. [Nature](#), 2017, 547: 232–235
- 55 Ke Y, Xu Y, Chen X, et al. 3D chromatin structures of mature gametes and structural reprogramming during mammalian embryogenesis. [Cell](#), 2017, 170: 367–381.e20
- 56 Song Z, Xia Q, Yang M, et al. Dynamic changes in 3D chromatin structure during male gametogenesis in *Arabidopsis thaliana*. [Genome Biol](#), 2025, 26: 27
- 57 Stevens T J, Lando D, Basu S, et al. 3D structures of individual mammalian genomes studied by single-cell Hi-C. [Nature](#), 2017, 544: 59–64
- 58 Bintu B, Mateo L J, Su J H, et al. Super-resolution chromatin tracing reveals domains and cooperative interactions in single cells. [Science](#), 2018, 362: eaau1783
- 59 Li X, Zeng G, Li A, et al. DeTOKI identifies and characterizes the dynamics of chromatin TAD-like domains in a single cell. [Genome Biol](#), 2021, 22: 217
- 60 Finn E H, Pegoraro G, Brandão H B, et al. Extensive heterogeneity and intrinsic variation in spatial genome organization. [Cell](#), 2019, 176: 1502–1515.e10
- 61 Tang F, Barbacioru C, Wang Y, et al. mRNA-Seq whole-transcriptome analysis of a single cell. [Nat Methods](#), 2009, 6: 377–382
- 62 Lin D, Xu W, Hong P, et al. Decoding the spatial chromatin organization and dynamic epigenetic landscapes of macrophage cells during differentiation and immune activation. [Nat Commun](#), 2022, 13: 5857
- 63 Lin D, Hong P, Zhang S, et al. Digestion-ligation-only Hi-C is an efficient and cost-effective method for chromosome conformation capture. [Nat Genet](#), 2018, 50: 754–763
- 64 Wu H, Zhang J, Tan L, et al. Extruding transcription elongation loops observed in high-resolution single-cell 3D genomes. [bioRxiv](#), 2023, 2023: 529096
- 65 Li W, Lu J, Lu P, et al. scNanoHi-C: a single-cell long-read concatemer sequencing method to reveal high-order chromatin structures within individual cells. [Nat Methods](#), 2023, 20: 1493–1505
- 66 Tan L, Xing D, Chang C H, et al. Three-dimensional genome structures of single diploid human cells. [Science](#), 2018, 361: 924–928
- 67 Wu H, Wang M, Zheng Y, et al. Droplet-based high-throughput 3D genome structure mapping of single cells with simultaneous transcriptomics. [Cell Discov](#), 2025, 11: 8
- 68 Furka Á. Combinatorial chemistry: 20 years on... [Drug Discov Today](#), 2002, 7: 1–4
- 69 Rosenberg A B, Roco C M, Muscat R A, et al. Single-cell profiling of the developing mouse brain and spinal cord with split-pool barcoding. [Science](#), 2018, 360: 176–182
- 70 Ramani V, Deng X, Qiu R, et al. Massively multiplex single-cell Hi-C. [Nat Methods](#), 2017, 14: 263–266
- 71 Ramani V, Deng X, Qiu R, et al. Sci-Hi-C: a single-cell Hi-C method for mapping 3D genome organization in large number of single cells. [Methods](#), 2020, 170: 61–68
- 72 Cusanovich D A, Daza R, Adey A, et al. Multiplex single-cell profiling of chromatin accessibility by combinatorial cellular indexing. [Science](#), 2015, 348: 910–914
- 73 Bouwman B A M, Crosetto N, Bienko M. The era of 3D and spatial genomics. [Trends Genet](#), 2022, 38: 1062–1075
- 74 Abbe E. Beiträge zur Theorie des Mikroskops und der mikroskopischen Wahrnehmung. [Archiv f mikrosk Anatomie](#), 1873, 9: 413–468
- 75 Huang B, Babcock H, Zhuang X. Breaking the diffraction barrier: super-resolution imaging of cells. [Cell](#), 2010, 143: 1047–1058
- 76 Klar T A, Hell S W. Subdiffraction resolution in far-field fluorescence microscopy. [Opt Lett](#), 1999, 24: 954–956
- 77 Hell S W, Wichmann J. Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence

- microscopy. *Opt Lett*, 1994, 19: 780–782
- 78 Gustafsson M G L. Nonlinear structured-illumination microscopy: wide-field fluorescence imaging with theoretically unlimited resolution. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102: 13081–13086
- 79 Heintzmann R, Jovin T M, Cremer C. Saturated patterned excitation microscopy—a concept for optical resolution improvement. *J Opt Soc Am A*, 2002, 19: 1599–1609
- 80 Rust M J, Bates M, Zhuang X. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM). *Nat Methods*, 2006, 3: 793–796
- 81 Betzig E, Patterson G H, Sougrat R, et al. Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution. *Science*, 2006, 313: 1642–1645
- 82 Zhuang X. Spatially resolved single-cell genomics and transcriptomics by imaging. *Nat Methods*, 2021, 18: 18–22
- 83 Chen K H, Boettiger A N, Moffitt J R, et al. Spatially resolved, highly multiplexed RNA profiling in single cells. *Science*, 2015, doi: 10.1126/science.aaa6090
- 84 Hu M, Wang S. Chromatin tracing: imaging 3D genome and nucleome. *Trends Cell Biol*, 2021, 31: 5–8
- 85 Wang S, Su J H, Beliveau B J, et al. Spatial organization of chromatin domains and compartments in single chromosomes. *Science*, 2016, 353: 598–602
- 86 Su J H, Zheng P, Kinrot S S, et al. Genome-scale imaging of the 3D organization and transcriptional activity of chromatin. *Cell*, 2020, 182: 1641–1659.e26
- 87 Takei Y, Yun J, Zheng S, et al. Integrated spatial genomics reveals global architecture of single nuclei. *Nature*, 2021, 590: 344–350
- 88 Takei Y, Zheng S, Yun J, et al. Single-cell nuclear architecture across cell types in the mouse brain. *Science*, 2021, 374: 586–594
- 89 Mateo L J, Murphy S E, Hafner A, et al. Visualizing DNA folding and RNA in embryos at single-cell resolution. *Nature*, 2019, 568: 49–54
- 90 Cardozo Gizzi A M, Cattoni D I, Fiche J B, et al. Microscopy-based chromosome conformation capture enables simultaneous visualization of genome organization and transcription in intact organisms. *Mol Cell*, 2019, 74: 212–222.e5
- 91 Liu M, Lu Y, Yang B, et al. Multiplexed imaging of nucleome architectures in single cells of mammalian tissue. *Nat Commun*, 2020, 11: 2907
- 92 Lee D S, Luo C, Zhou J, et al. Simultaneous profiling of 3D genome structure and DNA methylation in single human cells. *Nat Methods*, 2019, 16: 999–1006
- 93 Li G, Liu Y, Zhang Y, et al. Joint profiling of DNA methylation and chromatin architecture in single cells. *Nat Methods*, 2019, 16: 991–993
- 94 Mulqueen R M, Pokholok D, O’Connell B L, et al. High-content single-cell combinatorial indexing. *Nat Biotechnol*, 2021, 39: 1574–1580
- 95 Liu Z, Chen Y, Xia Q, et al. Linking genome structures to functions by simultaneous single-cell Hi-C and RNA-seq. *Science*, 2023, 380: 1070–1076
- 96 Qu J, Sun J, Zhao C, et al. Simultaneous profiling of chromatin architecture and transcription in single cells. *Nat Struct Mol Biol*, 2023, 30: 1393–1402
- 97 Wu H, Zhang J, Jian F, et al. Simultaneous single-cell three-dimensional genome and gene expression profiling uncovers dynamic enhancer connectivity underlying olfactory receptor choice. *Nat Methods*, 2024, 21: 974–982
- 98 Zhou T, Zhang R, Jia D, et al. GAGE-seq concurrently profiles multiscale 3D genome organization and gene expression in single cells. *Nat Genet*, 2024, 56: 1701–1711
- 99 Wen X, Luo Z, Zhao W, et al. Single-cell multiplex chromatin and RNA interactions in ageing human brain. *Nature*, 2024, 628: 648–656
- 100 Chai H, Huang X, Xiong G, et al. Tri-omic single-cell mapping of the 3D epigenome and transcriptome in whole mouse brains throughout the lifespan. *Nat Methods*, 2025, 22: 994–1007
- 101 Wang J, Ye F, Chai H, et al. Advances and applications in single-cell and spatial genomics. *Sci China Life Sci*, 2024, 68: 1226–1282
- 102 Baysoy A, Bai Z, Satija R, et al. The technological landscape and applications of single-cell multi-omics. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2023, 24: 695–713
- 103 Goronzy I N, Quinodoz S A, Jachowicz J W, et al. Simultaneous mapping of 3D structure and nascent RNAs argues against nuclear compartments that preclude transcription. *Cell Rep*, 2022, 41: 111730
- 104 Grandi F C, Modi H, Kampman L, et al. Chromatin accessibility profiling by ATAC-seq. *Nat Protoc*, 2022, 17: 1518–1552
- 105 Wei X, Xiang Y, Peters D T, et al. HiCAR is a robust and sensitive method to analyze open-chromatin-associated genome organization. *Mol Cell*, 2022, 82: 1225–1238.e6
- 106 Chai H, Tjong H, Li P, et al. ChIATAC is an efficient strategy for multi-omics mapping of 3D epigenomes from low-cell inputs. *Nat Commun*,

- 2023, 14: 213
- 107 Lai B, Tang Q, Jin W, et al. Trac-looping measures genome structure and chromatin accessibility. *Nat Methods*, 2018, 15: 741–747
- 108 Liu S, Cao Y, Cui K, et al. Hi-TrAC reveals division of labor of transcription factors in organizing chromatin loops. *Nat Commun*, 2022, 13: 6679
- 109 Fullwood M J, Ruan Y. ChIP-based methods for the identification of long-range chromatin interactions. *J Cell Biochem*, 2009, 107: 30–39
- 110 Mumbach M R, Rubin A J, Flynn R A, et al. HiChIP: efficient and sensitive analysis of protein-directed genome architecture. *Nat Methods*, 2016, 13: 919–922

Single-cell 3D genomics technologies and frontier advances

LIANG BoYuan^{1,2†}, XU HeMing^{2†}, CHEN YuJie² & XING Dong^{2*}

¹ School of Life Sciences, Tsinghua University, Beijing 100084, China

² Biomedical Pioneering Innovation Center (BIOPIC), Peking University, Beijing 100871, China

† Contributed equally to this work

* Corresponding author; E-mail: dxing@pku.edu.cn

The highly ordered chromatin architecture in eukaryotic nuclei provides the structural foundation for genome function. Advancements in 3D genomics technologies, particularly chromatin conformation capture (Hi-C), have systematically decoded the hierarchical folding principles of chromatin. Single-cell 3D genomic approaches circumvent population-averaging limitations, resolving cell-to-cell heterogeneity in chromatin architecture and offering unique insights into developmental processes and oncogenic transformation. Integration with multi-omics addresses the technical constraints of single-modal analysis, establishing causative links between spatial chromatin dynamics and transcriptional regulation. This review delineates fundamental methodologies in 3D genomics, evaluates the technical merits of single-cell approaches, and discusses emerging paradigms for multi-omics integration in deciphering gene regulatory networks, offering researchers a comprehensive panorama of technological evolution in this field.

3D genomics, single-cell 3D genomics, multi-omics

doi: [10.1360/SSV-2025-0139](https://doi.org/10.1360/SSV-2025-0139)