

利用单细胞测序技术追踪胚胎发育中细胞的演变过程

王萍

北京大学生物医学前沿创新中心, 北京未来基因诊断高精尖创新中心, 北京大学生命科学学院, 北京 100871

E-mail: wangping589@126.com

在生命形成过程中, 如何从单一的受精卵产生多种细胞类型、组织以及器官, 并且将它们组装在一起形成一个完整的个体是生物学最重要的奥秘之一。在胚胎发育过程中, 细胞的分裂和逐步分化是最基本的生物学事件, 揭示这一过程中不同细胞类型的产生方式将对深刻理解个体发育具有重要的意义。过去几十年来, 研究人员利用遗传标记的方法对部分器官中特定细胞类型的形成过程进行了深入的分析, 然而由于技术方面的限制, 在大时间尺度上对整个胚胎的发育进程进行全面的追踪仍然十分困难。近年来, 以单细胞测序技术、基因编辑技术以及计算生物学为代表的新兴生物学方法, 为研究人员提供了新的工具, 极大地拓展了我们对不同生物学问题的可操作性, 使得我们对于胚胎发育过程中的重要生物学事件有了更加清晰的认识。现在, 一种将单细胞测序技术与基因编辑技术以及计算工具相结合的方法, 正在向人们展现到目前为止关于脊椎动物胚胎发育最为详细的细胞命运转变图谱。2018年4月, *Science*^[1]杂志以新闻报道的形式对当月在该杂志上发表的3篇文章进行了深度介绍, 展现了这些新技术在研究胚胎发育过程中的巨大应用前景。在这3篇文章中, 研究人员报道了他们对大多数发育中的斑马鱼或青蛙胚胎细胞内的基因表达进行多个时间点测序分析的结果。他们将这些以几分钟到几小时间隔获得的数据拼接在一起, 通过构建细胞命运转变图谱, 揭示了不同类型细胞的形成过程, 完整地展现了脊椎动物胚胎发育过程。

在个体发育过程中, 胚胎期的多能性细胞如何逐步分化为成体中特定的细胞类型是最为关注的事件。到目前为止, 我们仍然没有得到一个完整的关于脊椎动物胚胎发育过程中细胞发生的图谱。Wagner等人^[2]利用单细胞转录组测序技术对来自斑马鱼胚胎发育第一天的9万多个单细胞进行了分析。在每一个斑马鱼胚胎中, 研究人员对其中17%~97%的细胞进行了测序, 成功地覆盖到了所有分化状态下的细胞。基于全部细胞的转录本, 研究人员希望将不同时间下的细胞状态连接起来构建完整的细胞分化转变轨迹。因此他们开发了一种基于图形的算法工具将具有相同生物学差异的连续时间点组合在一起。基于这一算法, 他们构建了在斑马鱼胚胎发育第一天, 有关体轴建成、三胚层形成以及早期器官发生的细胞状态图谱。研究人员发



王萍 生物物理学博士, 毕业于北京大学生命科学院。研究生期间利用基因编辑技术实现了对活细胞内特定染色质的标记。同时, 借助单细胞转录组测序技术构建了人类胚胎期肾脏发育过程中的基因表达图谱, 并利用这一技术系统分析了成年人肾病发生与发展过程中病变细胞中基因的表达特征。

相关工作发表于 *Cell Research*, *Cell Reports*。

现, 所绘制的细胞发育状态图谱仍然不能完全揭示单个细胞在发育过程中的细胞状态转变过程。因此, 为了在单细胞水平上追踪体内细胞谱系发生过程中细胞状态的转变过程, 研究人员开发了 Tracerseq, 利用 Tol2 转座酶系统将一段 20 bp 可编辑的 DNA 片段以及绿色荧光蛋白随机的插入斑马鱼基因组中。通过分析可编辑 DNA 片段的序列变化模式, 研究人员详细地记录了斑马鱼胚胎发育过程中, 不同细胞谱系中前体细胞如何逐步分化为不同的细胞类型, 同时也展现了不同细胞谱系在发育过程中的相互关联。

在胚胎发育过程中, 细胞状态的转变反映了多能干细胞向不同类型细胞的分化, 这一过程始终伴随着基因表达特征的变化。因此鉴定细胞命运转变过程中转录本的变化轨迹对于理解脊椎动物胚胎的发育至关重要。在另一项研究中, Farrell 等人^[3]就对斑马鱼的胚胎发育轨迹进行了深入的研究。他们利用 Drop-seq 对来自 694 个斑马鱼胚胎的 38731 个细胞进行了单细胞转录组测序分析。这 3 万多个单细胞覆盖了从合子基因表达到早期体节发生共 12 个胚胎发育时期。在该研究中, Farrell 等人^[3]开发了一套被称为 URD 的计算工具。与扩散映射不同, URD 以一种新的方法将细胞在拟时间上进行排序, 通过构建一个完整的分支树展现胚胎发育过程中 25 种类型细胞的分化过程。利用 URD 构建的发育分支树系统地展现了发育早期, 在原始生殖细胞、膜套层细胞以及卵裂球中已经形成了不同的分化轨迹。然而, 在卵裂球的早期发育过程中, 研究发现, 除了外胚层细胞与中内胚层细胞的分化产生差异外, 体轴中

胚层与其余中内胚层的分化也产生了差异,表明卵裂球细胞早期基因的表达不仅能够调控三胚层的产生,同时也能够调节体轴和非体轴中内胚层的产生。此外,他们发现一些处于发育分支点的细胞已经开始表达多种能够决定其子代细胞命运的调控基因。对位于体轴中胚层分支节点上细胞的基因表达进行分析也发现了这些过渡态细胞由脊索向脊索前板的命运转变。

在胚胎中引入特定的基因突变为我们了解胚胎细胞命运的特化过程提供了独特的视角。在这项研究中, Farrell 等人^[3]认为,单细胞转录组测序或许能够在全基因组水平上更快地检测突变对发育所造成的影响。研究人员利用 Smart-seq2 对 325 个 *MZoop* 突变的斑马鱼胚胎细胞以及 1047 个正常细胞进行测序分析,发现在整个转录本水平上,尽管在发育过程中造成了异常的发育信号,但是突变细胞在发育轨迹上仍然被划分为正常的细胞状态。Farrell 等人^[3]的研究成果构建了脊椎动物胚胎发育过程中基因表达的轨迹变化图谱,解析了斑马鱼胚胎发育过程中不同类型细胞产生的特化过程。

在另一项研究中, Briggs 等人^[4]采用类似的方法对蛙胚的发育进行了研究。利用基于微流控的单细胞转录组测序方法,研究人员从 10 个不同的发育时间点收集了超过 13 万个非洲爪蟾细胞进行单细胞转录组测序。研究者首先分析了每一个发育时间点所对应的细胞类型及其基因的表达特征,在发育第一天的蛙胚中共鉴定出 69 种已知的细胞类型,同时发现了这 10 个发育时间点各自对应的 259 个基因表达簇。过去的研究已经在一定程度上揭示了蛙胚的发育过程,基于已有的蛙胚发育过程,作者开发了一套新的计算工具分析了在发育过程中不同细胞之间基因表达的相似性。通过计算细胞之间基因表达的相似性从而找到某类细胞最有可能的前体细胞,进而以此建立完整的细胞状态转变图谱。基于这一细胞状态转变图谱,研究人员发现部分细胞的产生,例如内皮细胞/成血管细胞的产生要比我们之前研究所认识到的要早,揭示了细胞状态图谱对于理解早期细胞发生的重要性。

1 利用单细胞测序技术和可编辑的 DNA 示踪物追踪胚胎发育

来自哈佛大学由 Allon Klein, Marc Kirschner 和 Sean Megason 领导的团队^[2-4]对斑马鱼和青蛙的胚胎发育进行了全面的分析。在对斑马鱼的研究中, Wagner 等人^[2]分析了大约 92000 个斑马鱼细胞,对来自 7 个不同胚胎时期的基因表达数据进行了分析。他们从受精后 4 h 的胚胎开始收集一直到受精后 24 h 的胚胎结束,在这一时间点斑马鱼中基本的器官已经开始形成。每个细胞中的基因表达模式揭示了该类细胞的发育方向以及它们最终的细胞身份。为了追踪细胞及其子代细胞如何随时间的推移而发生改变,

研究人员在部分斑马鱼胚胎的单细胞中引入了具有遗传指示作用的基因示踪物:利用细胞注射的方法将许多特异的 DNA 小片段注入细胞质中。当细胞随着胚胎的发育而不断分裂时,这些细胞条码将进入细胞核内并整合到染色体中。实验结束后,每一个谱系中的细胞中都会产生一个特定的细胞条码组合。通过将组合细胞条码信息与基因表达模式结合起来,研究人员就能够随着发育时间追踪细胞命运的变化从而发现单一的受精卵如何产生各种特定的细胞类型,例如心脏、神经和皮肤。而在对热带爪蟾的研究中, Briggs 等人^[4]对来自受精后 5~22 h 的 10 个胚胎期细胞进行了单细胞转录组测序。他们的团队最终读取了 137000 个细胞的 mRNA。基因的表达活性表明,即使在青蛙胚胎似乎还处在一个未分化的细胞团时,这个胚胎中的细胞就已经开始表现出他们终末分化细胞的特征,就像一段尾芽中的细胞一样。

Klein 和 Megason 团队的研究具有极大的挑战性,因为脊椎动物的形态构成和发育过程更加复杂,发育生物学家们已经对这两类脊椎动物进行了长达几十年的研究,这在一定程度上证明了整个研究的难度和复杂性。然而,研究人员还是设法追踪到了成千上万个细胞及其子代细胞的新身份。正如柏林医学系统生物学研究所的发育生物学家 Robert Zinzen^[1]所评价的,这一研究成果确实让人震惊。在这两项研究中,研究人员均利用单细胞转录组测序技术对来自不同时期的胚胎细胞进行了分析,记录了每个细胞中基因表达的特征,并分别建立了斑马鱼和热带爪蟾胚胎期细胞的基因表达图谱。在此基础上,两个研究组分别利用每个单细胞中基因的表达规律模拟建立了细胞状态转变的过程。在细胞谱系建立过程中, Wagner 等人^[2]向斑马鱼胚胎中注入了可编辑的分子标签,通过记录分子标签的特征构建了完整的细胞发育谱系。而在对热带爪蟾的研究中, Briggs 等人^[4]利用转录因子的保守性,分析了胚胎发育过程中不同谱系的形成过程。这两篇文章为我们进一步研究更为复杂个体的胚胎发育以及器官形成提供了重要的方法学参考。

2 利用单细胞测序技术和计算工具追踪胚胎的发育

由哈佛大学发育生物学家 Alexander Schier 领导的团队^[2]开发出了一套计算方法实现了在不断成熟的斑马鱼中细胞中对转录本变化的追踪。研究者在早期胚胎发育的前 9 h 中,每隔 45 min 进行一次取样并分析了每个细胞的 mRNA。通过鉴定完全分化细胞的基因表达特征,以及分析与完全分化细胞在发育时间上最接近的胚胎中哪些细胞与完全分化细胞具有最相似的基因表达特征,研究人员利用这套计算软件重建了每一个细胞的发育轨迹。这套计算系统以此来反向推演至每一个胚胎时期,直至系统发生

树的底部——那些处于正在形成中的、未分化的细胞。通过生物学重建的方法,研究人员展现了从最初的单细胞胚胎逐步产生 25 种主要细胞类型的完整过程。

过去的研究认为,一旦细胞开始沿着将要形成的路径发育,那么在这一发育过程中细胞就不会偏离这条既定的生长轨迹。然而 Farrell 等人^[3]在研究中发现,一些斑马鱼细胞在中途改变了发育轨迹形成了一种新的细胞,这暗示了“真正的细胞发育谱系要比我们曾经认为的更加复杂”。

与前面两个团队的研究思路不同, Schier 团队的研究更加注重利用计算生物学的方法来构建胚胎发育过程。在确定热带爪蟾胚胎发育过程中 25 种主要的细胞类型以及这些类型的细胞在发育轨迹中的位置后,研究人员通过计算相邻发育时间点的细胞之间基因表达特征的相似性确定了不同细胞在发育过程中的先后关系。同时,研究人员在最后也利用荧光原位杂交的方法对部分结果进行了验证,进一步证实了结论的可靠性。这种利用计算的方法对数据进行挖掘同时结合染色验证的研究手段值得借鉴。

这 3 个团队的研究成果不仅展现了脊椎动物胚胎发育过程中细胞命运转变的过程,也为干细胞科学家和组织工程学家提供了一本参考书。充分理解胚胎发育过程中调控不同类型细胞形成的分子机理,将对体外诱导培养形成不同类型的细胞以及器官类似物具有直接的指导作用。

3 单细胞测序技术与其他前沿技术的结合在生命科学研究中拥有巨大的应用前景

近年来,单细胞测序技术的不断发展极大地推动了发育生物学的进展,揭示了许多新的观点。在过去近 10 年的研究中,多个课题组利用单细胞转录组测序技术、单细胞甲基化测序技术,以及单细胞多组学测序技术对人类生殖细胞、原始生殖细胞,以及多种人类胚胎期器官的发育过程进行了系统性的研究,深刻地展现了胚胎发育过程中关键性的调控过程以及这一过程中细胞命运的决定方式^[5-7]。同时,基因编辑技术的蓬勃发展也为发育生物学的研究提供了新的研究手段。来自华盛顿大学 Jay Shendure 课题组^[8]、哈佛大学 George Church 研究组^[9]、加州理工学院的 Long Cai 课题组^[10]率先利用 CRISPR 技术实现了对胚胎发育过程中不同类型细胞的产生进行了追踪,建立了完整的细胞发育谱系。可以看出,以单细胞测序技术、基因编辑技术为代表的新兴生物学方法为研究人员提供了新的工具,极大地拓展了我们对不同生物学问题的可操作性,使得我们对于胚胎发育过程中的重要生物学事件有了更加清晰的认识。

随着单细胞测序技术的不断发展,细胞通量的逐步增加,使得我们可以在获取有限样本的情况下,尽可能多地去研究不同细胞中基因的表达特征。然而,由于不同的方法学之间以及疾病个体之间存在的差异会导致在细胞类

群划分的过程中产生严重的批次效应,使得我们无法对某类重要细胞的分子特征作出全面的解析。因此,近年来以 Marioni 研究组^[11]和 Satija 研究组^[12]为代表的多个研究组不断地开发了新的计算方法来消除批次效应,实现对数据更好的利用。

为了展现胚胎发育过程中细胞状态的转变以及在此过程中细胞状态特征性基因的连续变化, Wagner 等人^[2]并没有使用通过降维的方法将所有细胞投射到二维平面的研究策略。他们开发了基于图形的计算方法,将具有相同生物学特征的连续时间点结合成一个节点,同时将与该节点的基因表达特征最相近的其他节点相连接,构建了斑马鱼胚胎发育过程中完整的细胞状态转变图谱。而 Farrell 等人^[3]则开发了 URD 来构建转录本的变化轨迹。URD 利用近邻算法计算了不同转录本之间的表达距离,并将具有类似基因表达模式的细胞结合在一起。随后,为了研究细胞的分化过程,研究人员根据发育过程指定了细胞分化的起点并通过计算不同细胞到发育起点之间的基因表达距离构建了发育拟时间。在此基础上,作者进一步计算了每一群细胞向发育起始位点随机移动的偏好性,将每一群细胞的发育轨迹连接起来形成了一个完整的胚胎发育分支树。利用 URD 所构建的发育轨迹在不依赖发育先验知识的前提下展现了不同细胞之间基因表达随时间的变化轨迹。近年来,为了在单细胞水平上追踪细胞谱系的变化,多个研究组采取了不同的研究手段分析了在疾病发生时细胞类型的转变。如 Ludwig 等人^[13]通过检测细胞内线粒体基因组中的突变,记录了细胞类型的转变过程;而 Galen 等人^[14]在研究急性髓性白血病的发病过程中,则利用三代测序的方法检测转录本中的点突变来寻找细胞癌变的过程。通过数学建模和计算分析的方法对数据进行深度挖掘,将帮助我们更好地理解发育过程以及疾病的发生与发展。

因此,如何合理地组合不同的研究方法将对解决生物学中的重要科学问题起到巨大的帮助作用。对个体中的活细胞进行实时的追踪和分析,将使我们能够更加全面地了解不同类型细胞的产生以及个体的发育过程。

由 Klein, Megason, Kirschner 以及 Schier 领导的研究团队^[2-4]分别将单细胞转录组测序、计算分析和基因编辑的方法进行结合,对来自不同发育时间的胚胎细胞进行大规模的分析,构建了由单细胞胚胎向多细胞个体发育的完整过程。这些研究成果充分展现了单细胞测序技术在全面解析细胞类型转变、器官形成以及个体发育中的巨大潜力。然而,如何将 these 研究方法进一步应用于哺乳动物的个体发育中仍有待研究。在 Wagner 等人^[2]的研究中,研究人员借助可编辑的分子条码系统实现了细胞发育谱系的建立。然而,要注意的是,基因编辑技术,特别是 CRISPR 技术中普遍存在的脱靶效应以及由此带来的 RNA 编辑,都会对后续转录本的分析产生一定的影响,这将对准确鉴定细胞中基因的表达特征产生干扰,提示我们在哺乳动物

细胞的使用中仍需谨慎。同时我们看到,在这3篇文章中研究人员都没有在细胞水平上对所得到的结论进行大量的验证。然而近年来不同研究组所开发的高通量多色原位荧光杂交技术已经能够实现在组织中同时对几百甚至上千个基因进行标记^[15]。因此,进一步将单细胞转录组测序以及多色荧光原位杂交的方法进行结合,将对目前现有的结论进行更进一步的证明,同时也将有助于新发现的产生。

上述3个团队的研究成果为我们提供了一种新的研究思路,对于我们进一步解析哺乳动物的器官形成甚至癌症的发生和发展,都具有重要的借鉴意义。长期以来,许多重大疾病的发生和发展对人类健康和国民经济的发展产生了严重的负面影响。然而到目前为止,关于这些重大疾病,特别是癌症、糖尿病等对人类健康生存构成直接威胁的疾病的发病机制仍不明确。现阶段,世界各国的研究人员已经开始大规模的将单细胞测序技术应用于重大疾病

的研究中,尤其是在癌症的研究中产生了许多新的发现,对寻找在癌症发生以及治疗中具有关键作用的调控因子和靶点具有重要的意义。目前,关于正常细胞如何逐步变化发生癌变以及癌变的细胞如何发生转移及扩散,是癌症研究中的几个关键问题,特别是从癌细胞形成到逐步发展为具有高度异质性的癌细胞群体的过程中,这3个团队的研究无疑为解决这样的问题提供了重要的方法学依据。利用大规模的单细胞转录组测序分析发现,在基因表达特征上具有相似性的细胞类群,进而确定不同类群细胞的状态。借助扩散映射以及近邻算法等计算方法,我们能够进一步推测不同状态的细胞之间潜在的随机移动,发现细胞和细胞之间在命运转变过程中的关联。这种建立细胞谱系分支树的研究方法将明确地揭示在癌症的发生以及发展过程中,单个细胞中转录本的变化轨迹,帮助我们在分支树中找到关键的细胞命运转变节点。针对这些节点中的细胞进行更进一步的深入研究将对癌症的治疗起到重要的作用。

推荐阅读文献

- 1 Pennisi E. Chronicling embryos, cell by cell, gene by gene. *Science*, 2018, 360: 367
- 2 Wagner D E, Weinreb C, Collins Z M, et al. Single-cell mapping of gene expression landscapes and lineage in the zebrafish embryo. *Science*, 2018, 360: 981–987
- 3 Farrell J A, Wang Y Q, Riesenfeld S J, et al. Single-cell reconstruction of developmental trajectories during zebrafish embryogenesis. *Science*, 2018, 360: eaar3131
- 4 Briggs J A, Weinreb C, Wagner D E, et al. The dynamics of gene expression in vertebrate embryogenesis at single-cell resolution. *Science*, 2018, 360: eaar5780
- 5 Yan L Y, Yang M Y, Guo H S, et al. Single-cell RNA-Seq profiling of human preimplantation embryos and embryonic stem cells. *Nat Struct Mol Biol*, 2013, 2: 1131–1139
- 6 Li L, Dong J, Yan L Y, et al. Single-cell RNA-Seq analysis maps development of human germline cells and gonadal niche interactions. *Cell Stem Cell*, 2017, 20: 858–873
- 7 Guo F, Yan L Y, Guo H S, et al. The transcriptome and DNA methylome landscapes of human primordial germ cells. *Cell*, 2015, 161: 1437–1452
- 8 McKenna A, Findlay G M, Gagnon J A, et al. Whole-organism lineage tracing by combinatorial and cumulative genome editing. *Science*, 2016, 353: aaf7907
- 9 Kalhor R, Kalhor K, Mejia L, et al. Developmental barcoding of whole mouse via homing CRISPR. *Science*, 2018, 361: eaat9804
- 10 Frieda K L, Linton J M, Hormoz S, et al. Synthetic recording and *in situ* readout of lineage information in single cells. *Nature*, 2017, 541: 107–111
- 11 Haghverdi L, Lun A T L, Morgan M D, et al. Batch effects in single-cell RNA-sequencing data are corrected by matching mutual nearest neighbors. *Nat Biotechnol*, 2018, 36: 421–427
- 12 Butler A, Hoffman P, Smibert P, et al. Integrating single-cell transcriptomic data across different conditions, technologies, and species. *Nat Biotechnol*, 2018, 36: 411–420
- 13 Ludwig L S, Lareau C A, Ulirsch J C, et al. Lineage tracing in humans enabled by mitochondrial mutations and single-cell genomics. *Cell*, 2019, 176: 1325–1339
- 14 Galen P, Hovestadt V, Wadsworth M H, et al. Single-cell RNA-seq reveals aml cellular hierarchies relevant to disease progression and immunity. *Cell*, 2018, 176: 1265–1281
- 15 Eng C H L, Lawson M, Zhu Q, et al. Transcriptome-scale super-resolved imaging in tissues by RNA seqFISH. *Nature*, 2019, 568: 235–239

Summary for “利用单细胞测序技术追踪胚胎发育中细胞的演变过程”

Tracing embryonic development through single-cell sequencing analysis

Ping Wang

Biomedical Pioneering Innovation Center, Beijing Advanced Innovation Center for Genomics, College of Life Sciences, Peking University, Beijing 100871, China

E-mail: wangping589@126.com

The gradual formation of various tissues and organs from a single fertilized egg is precisely regulated in spatial and temporal manner during the embryonic development. A comprehensive understanding about the cell fate decision of different cell types is one of the key questions in developmental biology. However, limitations in biotechnology have severely restricted us to well understand the whole process of embryonic development in the past decades, leading to many unresolved questions that still need further exploration. In the last few years, rapid development of emerging technologies, which are represented by single-cell sequencing, gene editing and computational biology have immensely expanded our accessibility to many challenging questions that could hardly be resolved in the past. Continuous modifications of these methods also make it possible for us to reveal the key regulatory processes in embryonic development and disease progression more comprehensively. Meanwhile, the combination of these different biotechnologies is providing us a more flexible way to carry out in-depth investigations of many basic problems in embryonic development and even the occurrence of diseases.

Recently, researchers from three different groups applied high throughput single-cell RNA sequencing methods combined with computational tools to trace the transcriptional changes during vertebrate embryo development. In a study on zebrafish embryo development, through analyzing more than 90000 single cells, researchers highlighted the cell transition process during body axis patterning, different germ layer formation as well as organogenesis. Meanwhile, another zebrafish study constructed a branching tree based on large scale single-cell RNA-seq data, revealing the transcriptome trajectories during the formation of the 25 different cell types, highlighting how progenitor cells gradually differentiate to specific cell types. Besides, another group applied microfluidics based single-cell sequencing method and analyzed above 130000 cells from whole frog embryo. They identified 259 gene expression clusters that were corresponded to 10 different time points, providing a landscape of cell states during the formation of all cell lineages. These studies combined single-cell sequencing and computation tools or gene editing tools to track the cell fate transition in zebrafish and frog embryo development. By recording the gene expression atlas of each single cell that collected from multiple fetal stages, they tracked the cell type formation and cell fate decision cell-by-cell, constructing entire cell lineages in embryonic development.

In recent years, the emerging of new technologies greatly expanded our insights in many key biological events, leading us a more comprehensive understanding of development and human disease. The constantly development of single-cell RNA-seq and computational tools play very important roles in life science, especially in embryo development and cell differentiation, identifying novel sub-cell types as well as their function in development. In disease pathology analysis, especially in cancer studies, applying single-cell RNA-seq immensely revealed the heterogeneity of cancer cells, highlighted the molecular features of these disease related cells, paving new ways to better understand the pathogenesis of human disease. These studies revealed the great potential of single-cell sequencing in solving important biological questions, and they also provided a novel approach to investigate the onset and progression of many diseases.

embryonic development, single-cell sequencing, gene editing, computational biology

doi: 10.1360/TB-2019-0202