单细胞转录组测序技术及在哺乳动物上的应用

寇佳怡^{1, 2} 王玉玲² 曾睿琳^{1, 2} 兰道亮^{2, 3}

(1. 西南民族大学青藏高原研究院, 成都 610041; 2. 西南民族大学畜牧兽医学院, 成都 610041; 3. 青藏高原动物遗传资源保护与利用教育部重点实验室, 成都 610041)

摘要: 哺乳动物的器官是由多种细胞类型组成, 它们通过细胞间的相互作用来发出信号, 以维持体内平衡和确保机体发育。传统转录组测序是以大量细胞或组织为研究样本, 反映的是细胞总体上转录组特征, 不能分析单个细胞的基因表达情况, 而单细胞 RNA 测序 (single-cell RNA sequencing, scRNA-seq) 技术的发展为揭示单个细胞转录组特征提供了有效方法。本文通过对 scRNA-seq 平台、scRNA-seq 主要技术类型及 scRNA-seq 在哺乳动物上的应用展开综述。

关键词: 单细胞转录组测序; 哺乳动物; 细胞类型; 异质性

DOI: 10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2022-0094

Application of Single-cell Transcriptome Sequencing in Mammalian

KOU Jia-yi^{1, 2} WANG Yu-ling² ZENG Rui-lin^{1, 2} LAN Dao-liang^{2, 3}

(1. Institute of Qinghai-Tibetan Plateau, Southwest Minzu University, Chengdu 610041; 2. School of Animal & Veterinary Sciences, Southwest Minzu University, Chengdu 610041; 3. Ministry of Education of Key Laboratory of Qinghai-Tibet Plateau Animal Genetic Resource and Utilization, Southwest Minzu University, Chengdu 610041)

Abstract: Mammalian organs are composed of many cell types. They send signals through cell-cell interactions to maintain homeostasis and ensure body development. Traditional transcriptome sequencing takes a large number of cells or tissues as research samples, reflecting the overall transcriptome characteristics of cells, but cannot analyze the gene expression of a single cell. The development of single cell RNA sequencing (scRNA-seq) provides an effective method for revealing the characteristics of single cell transcriptome. In this paper, the scRNA-seq platform, the main types of scRNA-seq technologies and the applications of scRNA-seq in mammals are reviewed.

Key words: single cell transcriptome sequencing; mammalian; cell types; heterogeneity

细胞是所有生物体的基本单位, 所有细胞的功能及细胞之间、细胞与非细胞之间的相互作用决定了机体内所有组织和器官的生理机能^[1]。目前, 人们对细胞类型起源、进化和多样性等方面的研究已取得了一定进展, 但还不够深入。同时, 对于哺乳动物体内细胞类型的数量还未形成普遍共识^[2-3]。哺乳动物的器官是由多种细胞类型所组成, 它们通过配体-受体的相互作用来发出信号, 以维持体内平衡和确保机体的发育, 而单细胞 RNA 测序 (single-cell RNA sequencing, scRNA-seq) 的数据有助于解

析这种细胞间的相互作用^[4]。典型的 scRNA-seq 由 6 个步骤组成: 单细胞和 RNA 的分离、逆转录、扩增、文库生成和测序。近年来, scRNA-seq 已广泛应用于各个领域, 随着二、三代测序技术不断发展和迭代^[5], scRNA-seq 已成为有效评估单个细胞转录组的有力方法^[6]。

1 转录组和单细胞转录组

为了理解生命现象的本质, 阐明构成生物体的细胞生物学机制是重要的。RNA 在细胞生物过程中发挥重要功能, 转录组是指在特定的细胞类型、组

收稿日期: 2022-01-21

基金项目: 西南民族大学中央高校基本科研专项资金资助项目 (2021NYXS93)

作者简介: 寇佳怡, 女, 硕士研究生, 研究方向: 动物生物学; E-mail: 1076365466@qq.com

通讯作者: 兰道亮, 男, 博士, 研究方向: 高原动物生殖生理与繁殖; E-mail: landaoliang@163.com

织或生物体中为特定的生理或病理条件而转录得到的一套完整的基因转录本, 它可以提供与细胞表型直接相关的信息。转录组学的研究目的在于解释基因组功能的输出, 比较在特定条件下的细胞或组织, 以确定其基因表达的变化^[7]。然而转录并不是一个连续的过程, 它发生在短时间内, 并且因基因而异^[8]。同样的, 在同一类型的细胞中, 基因在哪些细胞中表达, 在何种程度上表达, 都存在异质性。对于基因表达的变化程度无论是随机的还是有规律的, 无论它是否驱动或促进生物变化, 都是人们争论的焦点, 也是单细胞分析的重点^[9]。

近年来, scRNA-seq 已成为量化单个细胞转录组范围内 mRNA 表达的主要方法。它不仅能够对异质细胞群进行详细分析, 还能用于揭示谱系关系和发现新的细胞类型。传统意义上研究细胞的特征在于形态学观察或解析每种细胞类型的分子组成, 而 scRNA-seq 可以通过转录组的聚类促进这些细胞的分类, 即使仅有一个细胞, scRNA-seq 也能识别出异质细胞类型和分子状态^[10]。传统的 RNA-seq (RNA sequencing) 忽略了单个细胞之间的差异, 并将细胞群视为是同质的, 而 scRNA-seq 可识别单个细胞的亚群, 能够用于表征亚群结构和转录调控机制, 并了解疾病和免疫学的进展^[11]。使用 RNA-seq 的方法, 每个基因的平均表达水平可以在组织的所有细胞中获得, 而组织样本的细胞和遗传异质性可以用 scRNA-seq 精确量化^[12]。

scRNA-seq 作为表征单个细胞的强大工具, 不仅可以描述分子细胞表型或细胞“状态”, 还能预测细胞间的相互作用和细胞状态的转变^[13]。RNA-seq 的传统技术测量样本中细胞的平均基因表达并识别样本条件之间的差异, 而 scRNA-seq 测量单个细胞的基因表达并可以识别一个或多个样本中细胞之间的差异^[10]。单细胞基因表达的大规模调查有可能揭示稀有细胞群和谱系关系, 但需要有效的细胞捕获和 mRNA 测序方法^[14]。

2 scRNA-seq 技术

2.1 scRNA-seq 平台

目前, 国内外研究机构使用的大规模单细胞转录组测序平台主要有 5 种: Illumina® Bio-Rad®

Single-Cell Sequencing Solution、BD Rhapsody™、10x Genomics、ICELL8 Single-Cell System 和 C1™ 单细胞全自动制备系统。各平台各有特点, Illumina® Bio-Rad® Single-Cell Sequencing Solution 的优点在于操作简单, 一次性可测 8 个样本, 测序成本相对较低, 但缺点是捕获效率低, 仅为 3%, 可研究单细胞在组织功能、病情进展和治疗反应方面的协同作用。ICELL8 Single-Cell System 的优点是工作流程较简便, 每次运行可分离 500–1 000 个细胞, 通量高, 周期快, 并在一定程度上降低了测序成本, 但该平台的细胞捕获效率只有 30%。C1™ 单细胞全自动制备系统的优点是可以获取到转录组的全长信息, 但是缺点是通量低、周期慢、操作较困难和价格较贵。而 10x Genomics 和 BD Rhapsody™ 更广泛的被应用于发育、免疫和疾病等研究领域, 可以根据其需求进行选择 (表 1)。

表 1 10x Genomics 和 BD Rhapsody™ 的选择

Table 1 10x Genomics and BD Rhapsody™ options

Items	10x Genomics	BD Rhapsody™
单细胞分离	微流控芯片, 油包水	蜂巢板 (scanner 检测)
通量	同时测 8 个样本	最多可测 4 个样本
细胞活性	85% 以上	65% 以上
细胞直径	小于 40 μm	小于 40 μm
表面蛋白检测	可以	可以
Single Cell ATAC-SEQ	可以	不能

现阶段, 高通量单细胞测序平台主要是基于序列标签来识别单细胞, 其核心技术是给每个细胞添加一个独特的分子标识符 (unique molecular identifier, UMI), 在测序时把携带相同 UMI 的核酸序列视为来自同一个细胞。10x Genomics 采用微流控技术原理分选单细胞, 将单细胞悬液样品和带有标签的凝胶珠, 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, 每个单细胞的 cDNA 文库会带有 UMI; 最后, 将所有的单细胞 cDNA 文库混在一起进行文库构建和测序, 再通过数据分析、识别标签, 区分来自特定单细胞的 mRNA 序列。与其他高通量捕获平台相比, 10x Genomics 的优点是细胞捕获效率高、周期快速, 成

本最低且操作简便,但是 10x Genomics 也存在一定的局限性,如仅对 3' 端进行测序,成本昂贵,覆盖率相对较低^[15]。BD Rhapsody™ 采用微孔捕获技术原理分选单细胞,在微孔中一个细胞与一个标签标记的磁珠匹配;细胞裂解,mRNA 被磁珠上的标签序列捕获;然后将捕获了 mRNA 的磁珠进行回收,并完成 cDNA 合成、建库和测序;最后通过数据分析,根据标签序列来区分不同细胞的 mRNA 序列。BD Rhapsody™ 的优点是可实现多样本混合捕获,它不仅具备成像系统,还能观察细胞相关信息和实现转录组-蛋白组联合分析。

2.2 scRNA-seq 主要技术类型

scRNA-seq 已经成为鉴定和表征细胞类型、状态、谱系的核心工具^[16-17]。至今,已有超过 10 种的 scRNA-seq 技术被研究报道,因为每种技术构建文库的方法不同(如何标记原始细胞的转录本),所以其测序表现存在一定差异。目前被广泛应用的 scRNA-seq 技术有: Smart-seq、Smart-seq2、SCRB-seq、CEL-seq、MARS-seq、Drop-seq。这些方法在使用 UMI 序列方面有所不同,因为 UMI 序列可以区分来自原始 mRNA 分子的片段和 cDNA 扩增过程中产生的复制片段。但是各种方法的数据处理是相同的,每种方法给定的细胞数量可用于比较灵敏度、准确度、精密度、功率和成本效率^[18]。随着对原有方法的不断改进和新方法的发展,scRNA-seq 将成为一个快速发展的领域^[19]。下面我们就这 6 种 scRNA-seq 做了简单的介绍。

2.2.1 Smart-seq Smart-seq 是用 oligo dT 引物启动逆转录和随后的扩增,在此基础上添加几个无模板的 C 核苷酸,以生成第一个单细胞转录组,再将把这些单细胞的 cDNA 文库杂交到微阵列上的方法^[20]。它的优点是序列覆盖度较好,可实现对选择性转录本异构体和 SNV 的检测,能够提高 mRNA 5' 端的覆盖率^[21]。

2.2.2 Smart-seq2 Smart-seq2 是对 Smart-seq 中逆转录、模板切换和预扩增 3 个步骤改进后的版本,其优化了每个单细胞生成 cDNA 文库的产量和长度^[22-23]。该技术不仅能够产生全长的 cDNA,在整个转录本中有良好覆盖率,还能使用单核苷酸多态

性(single nucleotide polymorphism, SNP)检测基因型和等位基因的特异性表达。并且该技术非常适用于处理罕见的种群实验,因为其不受细胞大小、形状、同质性或总数的限制。虽然它可用现成的试剂进行测序,所需成本低,但是其耗费的时间增长,会增加技术的可变性^[24]。

2.2.3 SCRБ-seq SCRБ-seq 与 Smart-seq 相似,均是通过 PCR 的方式对扩增 cDNA 进行扩增,但与 Smart-seq 不同的是,SCRБ-seq 是采用 UMI 对 RNA 的 3' 端进行富集,而 Smart-seq 则是对 mRNA 的全长进行分析。与其他 scRNA-seq 技术相比,SCRБ-seq 具有成本极低、步骤简单、通量高等优势,用大多数实验室现有的常规设备即可完成^[25]。早在 2018 年就有研究^[26]在 SCRБ-seq 的基础上优化了它的灵敏度和效率,将其称为 mcSCRБ-seq。

SCRБ-seq 的主要流程为^[27]:(1)用 FACS 进行单细胞分选后,将其加入微孔中;(2)裂解细胞,反转录为 cDNA,引物部分含有 oligo dT、UMI、barcode 以及 PCR 的引物;(3)第二链的扩增,主要采用 PCR 的方式进行扩增;(4)进一步对扩增后产物进行 PCR 指数扩增;(5)PCR 产物片段化并进行 3' 端富集;(6)建库测序。

2.2.4 CEL-seq CEL-Seq^[28]是一种采用体外转录法(*in vitro* transcription, IVT)进行扩增的测序方法,该技术将 T7 启动子连在 oligo dT 引物上,可以在 cDNA 合成后进行 IVT,是一种灵敏,准确,可重复的 scRNA-seq 技术。与其他 scRNA-seq 技术相比,其优势在于它能够利用 IVT,增加其重复性。该技术可以在 2-3 d 内准备数十个样本进行测序,因为它能将许多样本汇集到一个单一的 IVT 中,这大大减少了扩增和下游处理的实际操作时间。但是 CEL-Seq 的局限性在于对 mRNA 有特异性和有强烈的 3' 端偏好。目前,已有 CEL-Seq 的优化版—CEL-seq2,该方法的灵敏度提高了 3 倍,成本更低,所需动手时间更少^[29]。

2.2.5 MARS-seq MARS-seq 是一种在 CEL-seq 的基础上实现高通量的技术。但与 CEL-seq 不同的是,MARS-seq 在单细胞分离时,主要采用的是 FACS 流式分选,而 CEL-seq 采用的是细胞稀释法。MARS-seq^[30]是基于 3' 末端计数的 mRNA 测序方法,来生

成 cDNA 转录本 (非全长)。在最初的逆转录步骤中, 这些 cDNA 被标记上 barcode 和 UMI, 然后通过 IVT 进行合并和扩增。运用 MARS-Seq 不仅可以快速了解生物在正常或疾病状态下组织和器官的细胞类型和细胞状态, 还能将其与全基因组转录谱结合起来。鉴于多细胞组织固有的随机性和不均一性, MARS-Seq 对于证明生物体内的生物学功能至关重要。与其他 scRNA-seq 技术相比, 当细胞数量较小时, MARS-seq 具有测序成本优势。

2.2.6 Drop-seq Drop-seq 是利用微流控装置将带有条形码的微珠和细胞一起装入微液滴中进行平行分析的方法。微珠含有带条形码的寡核苷酸, 用于捕获多腺苷酸化 RNA (polyA), 并为每个 mRNA 转录本添加一个共同的 UMI^[31]。Drop-seq 不仅可以检测数以千计的细胞, 同时还能测定转录本的来源细胞。与其他 scRNA-seq 技术相比, 当细胞数量较大时, Drop-seq 具有测序成本优势。

Drop-seq 的主要流程^[32]为: (1) 从组织中分离细胞, 制备单细胞悬浮液; (2) 将每个细胞与一个微粒共封装在液滴中; (3) 将细胞分离成液滴后裂解细胞; (4) 在微粒子上捕获细胞的 mRNAs, 形成 STAMPs (附着在微粒子上的单细胞转录体); (5) 在一次反应中对数千个 STAMPs 进行逆转录、扩增和排序; (6) 使用 STAMP 条形码推断每个转录体的细胞来源。

3 scRNA-seq 的应用

scRNA-seq 已经成为解析细胞组成和表征复杂组织的分子特性的革命性方法, 并已广泛应用于发育学、免疫学、疾病等研究领域^[33], scRNAseq 的最新进展也使我们对视网膜、下丘脑、皮层、肠、血液、心脏、肺和其他器官有了更深刻的分析^[34]。单细胞分析技术促进了人们对细胞的认识, 也使生物学发展实现了质的飞跃。下面我们探讨了 scRNA-seq 这一新兴领域在哺乳动物发育学、免疫学和疾病方面的研究进展。

3.1 在发育学方面的应用

脑细胞发育的跨物种比较不仅能改变我们对脑发育和系统发育的理解, 还能加深我们对神经种群之间进化机制的了解。已经有研究表明 scRNA-

seq 可以通过层次聚类 and 主成分分析 (principal component analysis, PCA) 等方法, 识别种群中的新细胞类型和发育状态。例如, Armand 等^[35]探究了在小鼠和人类大脑的发育阶段, 其神经元和神经胶质细胞的形成; 而 Nimmo 等^[9]识别了脾脏和骨髓中树突状细胞的亚群。除此之外, scRNA-seq 在观察哺乳动物早期胚胎发育方面已经具有非常重要的作用。See 等^[24]报道了由胎肝驱动的人胚胎造血系统和免疫系统发育过程的单细胞图谱。而 Zhang 等^[36]通过分析猪睾丸中雄性生殖细胞和体细胞的转录组, 表征了猪精子发生的图谱, 这为雄性生殖细胞发育的研究提供了宝贵的信息。目前, 有研究团队利用 scRNA-seq 分析了人类着床期胚胎的基因表达网络和 DNA 甲基化景观^[37]。这不仅加深了我们对人类胚胎植入复杂分子机制的理解, 还有助于推动未来胚胎发育和生殖医学的发展。而 Behringer 等^[38]发现在胚胎发育期间过度表达 MIS (mullerian inhibiting substance) 的转基因雌性小鼠性腺发育不全, Meinsohn 等^[39]为了探究 MIS 抑制卵泡发育的机制, 对出生后用 MIS 处理过的新生儿卵巢进行 scRNA-seq, 结果不仅揭示了多种细胞类型中细胞状态的特殊变化, 还表明 MIS 是通过抑制细胞增殖而抑制了新生儿卵泡的发育。

近年来, scRNA-seq 的迅速发展使人们对哺乳动物繁殖的研究迈出一大步。为了提高体外培养的卵母细胞的发育能力, 人们进行了多种技术和方法的研究。Liu 等^[40]已经证实了 *CDC5L* 对猪卵母细胞成熟和早期胚胎发育至关重要。对家畜良种快速扩繁的实际需求及其胚胎体外生产效率低的现状, 郭芹芹等^[41]采用 scRNA-seq, 对谷胱甘肽处理后的牛体外受精胚胎进行转录组测序, 揭示其在早期胚胎抗氧化方面的功能。Soto 等^[42]通过 scRNA-seq 鉴定牛胎儿性腺, 解析了牛原始生殖细胞 (primordial germ cells, PGCs) 的发育机制, 并证明了牛和人类生殖细胞之间的相似性, 而 Lavagi 等^[43]揭示了牛第 2 天和第 3 天胚胎中单细胞转录组图谱的异质性, 表明在胚胎基因组激活阶段, 卵裂球发育不同步。还有研究已经把 scRNA-seq 作为揭示生物有机体多种性状和机制的一种强有力工具, 例如, 对天祝白牦牛生长期表皮细胞谱系以及真皮细胞谱系在毛囊

发育中的分化轨迹^[44]和对绵羊毛囊发育分化和羊毛弯曲潜在分子机制的研究^[45]。

3.2 在免疫学方面的应用

免疫系统由细胞、组织和器官组成，它们介导宿主对病原体的防御。免疫细胞可以根据特定的表面标记物分为不同的类型。然而，并不是所有的免疫细胞类型都可以通过表型标记来分析，因为其中许多细胞是由多个细胞系表达的，在炎症过程中有差异调节^[46]。最近几年，scRNA-seq在解析免疫反应方面非常重要，可用于免疫学研究以解决以前未被认识到的细胞异质性，并揭示关于免疫功能中基因调控的关键途径。为了阐明肺部浸润免疫细胞的复杂性，Wang等^[47]通过使用scRNA-seq来分析小鼠模型（类固醇抗性恶化）肺中的免疫细胞，对鉴定的20个免疫亚群的特征基因进行了详细的检测，其结果对于研究肺部的适应性和先天免疫细胞的特征至关重要。特别是2019年新冠肺炎的爆发，为了解析新冠肺炎，scRNA-seq也被应用于COVID-19的研究^[48-49]。例如，Ren等^[50]创建了一个包含146万个细胞的综合免疫图谱，揭示了患者细胞因子风暴的特征，这对理解和控制COVID-19具有重要意义。

3.3 在疾病方面的应用

疾病被认为是细胞内在变化、细胞间通讯变化、细胞类型比例失衡和组织结构紊乱的结果^[1]。与RNA-seq相反，scRNA-seq能捕获细胞间的异质性，能更好的对疾病进行分层和治疗^[6]。

目前，scRNA-seq主要被集中应用于对癌症的研究，因为肿瘤细胞仅占肿瘤组织的一小部分，传统的RNA-seq无法检测到肿瘤细胞中确切的细胞和分子变化^[51-52]。而scRNA-seq可以解析实体肿瘤的复杂性，能够表征细胞的多样性和异质表型状态。近几年，scRNA-seq已被用于研究肿瘤各个阶段发展的遗传和分子特征，包括不同组织样本间异质基因的表达。例如，成人肾细胞癌分子机制的探究^[53]，小鼠胰腺导管腺癌发病机制中基因表达差异和细胞异质性的研究^[54]，肝细胞癌（hepatic cell carcinoma, HCC）中肿瘤浸润免疫细胞跨组织的动态过程^[55-56]，DNA损伤反应中结肠癌细胞系的分子异质性^[57]和对转移性黑色素瘤不同基因型和表型状态的剖析^[58]

等都为当前癌症免疫治疗和靶向治疗提供了新的见解。其次，scRNA-seq也被用来区分肿瘤的细胞类型，例如，恶性腹膜癌单细胞图谱的构建^[59]，肿瘤浸润B淋巴细胞图谱的构建^[60]，胶质母细胞瘤模型和细胞谱系的构建^[61]，人类和小鼠原发性胰腺导管腺癌（pancreatic ductal adenocarcinoma, PDAC）肿瘤细胞群的表征^[62-64]，还有研究^[65]发现肿瘤细胞的组成是确定PDAC亚型的重要因素。最后，scRNA-seq还可以用于研究不同类型癌症的肿瘤微环境（tumor microenvironment, TME），例如急性髓性白血病^[66]、乳腺癌^[67]、胰腺导管腺癌^[68]、非小细胞肺癌^[69]、HCC^[60, 70]和肺腺癌^[71]，其中肺腺癌通常在转移期被发现，远处转移是肺癌死亡的主要原因，但是目前对于转移性肺癌及其相关微环境方面的研究仍然知之甚少，利用scRNA-seq数据，将有助于更好地理解TME在肿瘤进展中的作用以及未来免疫治疗的潜在靶点^[72]。TME中肿瘤细胞和免疫细胞之间的相互作用在癌症发展过程中很重要，传统的方法主要在大块肿瘤水平上进行研究，在提供TME中单个细胞的精确信息方面具有局限性。然而，scRNA-seq能够详细的描述癌症的免疫景观和肿瘤异质性，免疫景观和细胞间相互作用的分析能够促进癌症的治疗。

4 总结与展望

scRNA-seq已经被用于描绘远端肺上皮细胞谱系树，并识别谱系特异性调控因子^[14]。单细胞转录组学揭示细胞和分子通路的潜力目前刚被认识到。在未来几年，随着RNA-seq方法的不断更新，scRNA-seq将会彻底改变我们对各种组织中细胞机制的理解。我们相信，重建高等生物的有机细胞谱系树，会造成整个有机科学革命性的变化。当然，在这样一个多样化、迅速发展和跨学科的领域中，不可能一次性涵盖过去几年进行的所有工作。

新的挑战正在出现，一些旧的挑战仍然存在。除了大量RNA-seq实验中存在的噪音和偏差之外，scRNA-seq存在的问题还包括生物来源和技术/系统来源的问题，例如细胞周期、细胞大小、细胞捕获效率低、材料降解和样品污染等。这些实验偏差和限制将导致整个转录组的覆盖不均匀或存在零覆盖

区域^[11]。除此之外, 还需要开发标准化算法和人工智能来精细地注释细胞群, 因为传统的 scRNA-seq 表达分析依赖于高质量等基因组注释。现如今, 以当前的 scRNA-seq 技术进行细胞图谱项目和高通量扰动筛选也是具有挑战性的^[73], 但随着各种测序平台及算法的产生, 多领域技术的进步和融合, 我们相信 scRNA-seq 必将会有更新的突破和发展。

参考文献

- [1] Schiller HB, Montoro DT, Simon LM, et al. The human lung cell atlas : a high-resolution reference map of the human lung in health and disease [J] . *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2019, 61 (1) : 31-41.
- [2] Arendt D. The evolution of cell types in animals : emerging principles from molecular studies [J] . *Nat Rev Genet*, 2008, 9 (11) : 868-882.
- [3] Vickaryous MK, Hall BK. Human cell type diversity, evolution, development, and classification with special reference to cells derived from the neural crest [J] . *Biol Rev Camb Philos Soc*, 2006, 81 (3) : 425-455.
- [4] Cain MP, Hernandez BJ, Chen JC. Quantitative single-cell interactomes in normal and virus-infected mouse lungs [J] . *Dis Model Mech*, 2020, 13 (6) : dmm044404.
- [5] 巴黎根·达列力汗, 常铤晋, 汪富文, 等. 单细胞转录组测序技术及其应用研究进展 [J] . *家畜生态学报*, 2021, 42 (11) : 1-5. Dalielihan B, Chang TJ, Wang FW, et al. Research progress on single cell RNA sequencing technology and its application [J] . *J Domestic Animal Ecol*, 2021, 42 (11) : 1-5.
- [6] Zhu Y, Huang YH, Tan Y, et al. Single-cell RNA sequencing in hematological diseases [J] . *Proteomics*, 2020, 20 (13) : e1900228.
- [7] Kan MY, Shumyatcher M, Himes BE. Using omics approaches to understand pulmonary diseases [J] . *Respir Res*, 2017, 18 (1) : 149.
- [8] Raj A, van Oudenaarden A. Nature, nurture, or chance : stochastic gene expression and its consequences [J] . *Cell*, 2008, 135 (2) : 216-226.
- [9] Nimmo RA, May GE, Enver T. Primed and ready : understanding lineage commitment through single cell analysis [J] . *Trends Cell Biol*, 2015, 25 (8) : 459-467.
- [10] Yamada S, Nomura S. Review of single-cell RNA sequencing in the heart [J] . *Int J Mol Sci*, 2020, 21 (21) : 8345.
- [11] Zhang HN, Lee CAA, Li ZL, et al. A multitask clustering approach for single-cell RNA-seq analysis in Recessive Dystrophic Epidermolysis Bullosa [J] . *PLoS Comput Biol*, 2018, 14 (4) : e1006053.
- [12] Chambers DC, Carew AM, Lukowski SW, et al. Transcriptomics and single-cell RNA-sequencing [J] . *Respirology*, 2019, 24 (1) : 29-36.
- [13] Heijink IH, Kuchibhotla VNS, Roffel MP, et al. Epithelial cell dysfunction, a major driver of asthma development [J] . *Allergy*, 2020, 75 (8) : 1902-1917.
- [14] Pollen AA, Nowakowski TJ, Shuga J, et al. Low-coverage single-cell mRNA sequencing reveals cellular heterogeneity and activated signaling pathways in developing cerebral cortex [J] . *Nat Biotechnol*, 2014, 32 (10) : 1053-1058.
- [15] Peng XL, Moffitt RA, Torphy RJ, et al. De novo compartment deconvolution and weight estimation of tumor samples using DECODER [J] . *Nat Commun*, 2019, 10 (1) : 4729.
- [16] Haque A, Engel J, Teichmann SA, et al. A practical guide to single-cell RNA-sequencing for biomedical research and clinical applications [J] . *Genome Med*, 2017, 9 (1) : 75.
- [17] Wu AR, Wang JB, Streets AM, et al. Single-cell transcriptional analysis [J] . *Annu Rev Anal Chem (Palo Alto Calif)*, 2017, 10 (1) : 439-462.
- [18] Ziegenhain C, Vieth B, Parekh S, et al. Comparative analysis of single-cell RNA sequencing methods [J] . *Mol Cell*, 2017, 65 (4) : 631-643. e4.
- [19] Svensson V, Vento-Tormo R, Teichmann SA. Exponential scaling of single-cell RNA-seq in the past decade [J] . *Nat Protoc*, 2018, 13 (4) : 599-604.
- [20] Goetz JJ, Trimarchi JM. Transcriptome sequencing of single cells with Smart-Seq [J] . *Nat Biotechnol*, 2012, 30 (8) : 763-765.
- [21] Ramsköld D, Luo SJ, Wang YC, et al. Full-length mRNA-Seq from single-cell levels of RNA and individual circulating tumor cells [J] . *Nat Biotechnol*, 2012, 30 (8) : 777-782.
- [22] Picelli S, Faridani OR, Björklund AK, et al. Full-length RNA-seq from single cells using Smart-seq2 [J] . *Nat Protoc*, 2014, 9 (1) : 171-181.
- [23] Picelli S, Björklund ÅK, Faridani OR, et al. Smart-seq2 for

- sensitive full-length transcriptome profiling in single cells [J] . Nat Methods, 2013, 10 (11) : 1096-1098.
- [24] See P, Lum J, Chen JM, et al. A single-cell sequencing guide for immunologists [J] . Front Immunol, 2018, 9 : 2425.
- [25] Ni J, Hu CS, Li H, et al. Significant improvement in data quality with simplified SCRB-seq [J] . Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai) , 2020, 52 (4) : 457-459.
- [26] Bagnoli JW, Ziegenhain C, Janjic A, et al. Sensitive and powerful single-cell RNA sequencing using mcSCRB-seq [J] . Nat Commun, 2018, 9 (1) : 2937.
- [27] Soumillon M, Cacchiarelli D, Semrau S, et al. Characterization of directed differentiation by high-throughput single-cell RNA-Seq [J] . bioRxiv, 2014. DOI : 10. 1101/003236.
- [28] Hashimshony T, Wagner F, Sher N, et al. CEL-Seq : single-cell RNA-Seq by multiplexed linear amplification [J] . Cell Rep, 2012, 2 (3) : 666-673.
- [29] Hashimshony T, Senderovich N, Avital G, et al. CEL-Seq2 : sensitive highly-multiplexed single-cell RNA-Seq [J] . Genome Biol, 2016, 17 : 77.
- [30] Jaitin DA, Kenigsberg E, Keren-Shaul H, et al. Massively parallel single-cell RNA-seq for marker-free decomposition of tissues into cell types [J] . Science, 2014, 343 (6172) : 776-779.
- [31] Biočanin M, Bues J, Dainese R, et al. Simplified Drop-seq workflow with minimized bead loss using a bead capture and processing microfluidic chip [J] . Lab Chip, 2019, 19 (9) : 1610-1620.
- [32] Macosko EZ, Basu A, Satija R, et al. Highly parallel genome-wide expression profiling of individual cells using nanoliter droplets [J] . Cell, 2015, 161 (5) : 1202-1214.
- [33] Ren XW, et al. Reconstruction of cell spatial organization from single-cell RNA sequencing data based on ligand-receptor mediated self-assembly [J] . Cell Res, 2020, 30 (9) : 763-778.
- [34] Raredon MSB, et al. Single-cell connectomic analysis of adult mammalian lungs [J] . Sci Adv, 2019, 5 (12) : eaaw3851.
- [35] Armand EJ, Li JH, et al. Single-cell sequencing of brain cell transcriptomes and epigenomes [J] . Neuron, 2021, 109 (1) : 11-26.
- [36] Zhang LK, Li FY, et al. Single-cell RNA-sequencing reveals the dynamic process and novel markers in porcine spermatogenesis [J] . J Anim Sci Biotechnol, 2021, 12 (1) : 122.
- [37] Zhou F, Wang R, Yuan P, et al. Reconstituting the transcriptome and DNA methylome landscapes of human implantation [J] . Nature, 2019, 572 (7771) : 660-664.
- [38] Behringer RR, Cate RL, Froelick GJ, et al. Abnormal sexual development in transgenic mice chronically expressing müllerian inhibiting substance [J] . Nature, 1990, 345 (6271) : 167-170.
- [39] Meinsohn MC, Saatcioglu HD, Wei LN, et al. Single-cell sequencing reveals suppressive transcriptional programs regulated by MIS/AMH in neonatal ovaries [J] . Proc Natl Acad Sci USA, 2021, 118 (20) : e2100920118.
- [40] Liu XM, Wang YK, Liu YH, et al. Single-cell transcriptome sequencing reveals that cell division cycle 5-like protein is essential for porcine oocyte maturation [J] . J Biol Chem, 2018, 293 (5) : 1767-1780.
- [41] 郭芹芹, 等. 牛体外受精胚胎抗氧化相关的长链非编码 RNA 表达谱 [J] . 畜牧兽医学报, 2017, 48 (7) : 1229-1240.
- Guo QQ, et al. Long non-coding RNA profiling in bovine embryos treated with glutathione during *in vitro* culture [J] . Chin J Animal Vet Sci, 2017, 48 (7) : 1229-1240.
- [42] Soto DA, Ross PJ. Similarities between bovine and human germline development revealed by single-cell RNA sequencing [J] . Reproduction, 2021, 161 (3) : 239-253.
- [43] Lavagi I, Krebs S, et al. Single-cell RNA sequencing reveals developmental heterogeneity of blastomeres during major genome activation in bovine embryos [J] . Sci Rep, 2018, 8 (1) : 4071.
- [44] 叶娜. 基于单细胞转录组测序对天祝白牦牛生长期毛囊转录图谱的构建 [D] . 兰州 : 西北民族大学, 2021.
- Ye N. Construction of transcription map of hair follicles in growing period of Tianzhu white yak based on single cell transcriptome sequencing [D] . Lanzhou : Northwest University for Nationalities, 2021.
- [45] Wang SH, Wu TY, Sun JY, et al. Single-cell transcriptomics reveals the molecular anatomy of sheep hair follicle heterogeneity and wool curvature [J] . Front Cell Dev Biol, 2021, 9 : 800157.
- [46] See P, Lum J, Chen JM, et al. A single-cell sequencing guide for immunologists [J] . Front Immunol, 2018, 9 : 2425.
- [47] Wang LL, Netto KG, Zhou LJ, et al. Single-cell transcriptomic analysis reveals the immune landscape of lung in steroid-resistant asthma exacerbation [J] . Proc Natl Acad Sci USA, 2021, 118 (2) : e2005590118.
- [48] Wen W, Su WR, Tang H, et al. Immune cell profiling of COVID-19

- patients in the recovery stage by single-cell sequencing [J] . *Cell Discov*, 2020, 6 : 31.
- [49] Zhao ZX, Zhao Y, Zhou YQ, et al. Single-cell analysis identified lung progenitor cells in COVID-19 patients [J] . *Cell Prolif*, 2020, 53 (12) : e12931.
- [50] Ren XW, Wen W, Fan XY, et al. COVID-19 immune features revealed by a large-scale single-cell transcriptome atlas [J] . *Cell*, 2021, 184 (7) : 1895-1913. e19.
- [51] Guo JY, Hsu HS, et al. Serglycin in tumor microenvironment promotes non-small cell lung cancer aggressiveness in a CD44-dependent manner [J] . *Oncogene*, 2017, 36 (17) : 2457-2471.
- [52] Su SC, Chen JN, et al. CD10⁺ GPR77⁺ cancer-associated fibroblasts promote cancer formation and chemoresistance by sustaining cancer stemness [J] . *Cell*, 2018, 172 (4) : 841-856. e16.
- [53] Zhang L, Li ZY, Skrzypczynska KM, et al. Single-cell analyses inform mechanisms of myeloid-targeted therapies in colon cancer [J] . *Cell*, 2020, 181 (2) : 442-459. e29.
- [54] Hosein AN, Huang HC, Wang ZN, et al. Cellular heterogeneity during mouse pancreatic ductal adenocarcinoma progression at single-cell resolution [J] . *JCI Insight*, 2019, 5 (16) : e129212.
- [55] Zhang QM, He Y, Luo N, et al. Landscape and dynamics of single immune cells in hepatocellular carcinoma [J] . *Cell*, 2019, 179 (4) : 829-845. e20.
- [56] Zheng CH, Zheng LT, Yoo JK, et al. Landscape of infiltrating T cells in liver cancer revealed by single-cell sequencing [J] . *Cell*, 2017, 169 (7) : 1342-1356. e16.
- [57] Park SR, Namkoong S, Friesen L, et al. Single-cell transcriptome analysis of colon cancer cell response to 5-fluorouracil-induced DNA damage [J] . *Cell Rep*, 2020, 32 (8) : 108077.
- [58] Tirosh I, Izar B, Prakadan SM, et al. Dissecting the multicellular ecosystem of metastatic melanoma by single-cell RNA-seq [J] . *Science*, 2016, 352 (6282) : 189-196.
- [59] Wang RP, Dang MH, Harada K, et al. Single-cell dissection of intratumoral heterogeneity and lineage diversity in metastatic gastric adenocarcinoma [J] . *Nat Med*, 2021, 27 (1) : 141-151.
- [60] Ho DW, Tsui YM, Chan LK, et al. Single-cell RNA sequencing shows the immunosuppressive landscape and tumor heterogeneity of HBV-associated hepatocellular carcinoma [J] . *Nat Commun*, 2021, 12 (1) : 3684.
- [61] Nefel C, Laffy J, Filbin MG, et al. An integrative model of cellular states, plasticity, and genetics for glioblastoma [J] . *Cell*, 2019, 178 (4) : 835-849. e21.
- [62] Peng JY, Sun BF, Chen CY, et al. Single-cell RNA-seq highlights intra-tumoral heterogeneity and malignant progression in pancreatic ductal adenocarcinoma [J] . *Cell Res*, 2019, 29 (9) : 725-738.
- [63] Elyada E, Bolisetty M, Laise P, et al. Cross-species single-cell analysis of pancreatic ductal adenocarcinoma reveals antigen-presenting cancer-associated fibroblasts [J] . *Cancer Discov*, 2019, 9 (8) : 1102-1123.
- [64] Hosein AN, Huang HC, Wang ZN, et al. Cellular heterogeneity during mouse pancreatic ductal adenocarcinoma progression at single-cell resolution [J] . *JCI Insight*, 2019, 5 (16) : e129212.
- [65] Lin W, Noel P, Borazanci EH, et al. Single-cell transcriptome analysis of tumor and stromal compartments of pancreatic ductal adenocarcinoma primary tumors and metastatic lesions [J] . *Genome Med*, 2020, 12 (1) : 80.
- [66] Zheng GXY, Terry JM, et al. Massively parallel digital transcriptional profiling of single cells [J] . *Nat Commun*, 2017, 8 : 14049.
- [67] Azizi E, Carr AJ, Plitas G, et al. Single-cell map of diverse immune phenotypes in the breast tumor microenvironment [J] . *Cell*, 2018, 174 (5) : 1293-1308. e36.
- [68] Lambrechts D, Wauters E, Boeckx B, et al. Phenotype molding of stromal cells in the lung tumor microenvironment [J] . *Nat Med*, 2018, 24 (8) : 1277-1289.
- [69] Chen J, Tan Y, Sun FH, et al. Single-cell transcriptome and antigen-immunoglobulin analysis reveals the diversity of B cells in non-small cell lung cancer [J] . *Genome Biol*, 2020, 21 (1) : 152.
- [70] El-Serag HB. Hepatocellular carcinoma [J] . *N Engl J Med*, 2011, 365 (12) : 1118-1127.
- [71] He D, Wang D, Lu P, et al. Single-cell RNA sequencing reveals heterogeneous tumor and immune cell populations in early-stage lung adenocarcinomas harboring EGFR mutations [J] . *Oncogene*, 2021, 40 (2) : 355-368.
- [72] Chen ZC, Zhao MN, Li M, et al. Identification of differentially expressed genes in lung adenocarcinoma cells using single-cell RNA sequencing not detected using traditional RNA sequencing and microarray [J] . *Lab Invest*, 2020, 100 (10) : 1318-1329.
- [73] Datlinger P, et al. Ultra-high-throughput single-cell RNA sequencing and perturbation screening with combinatorial fluidic indexing [J] . *Nat Methods*, 2021, 18 (6) : 635-642.