

# 单细胞转录组测序技术及其在秀丽隐杆线虫中的应用

赵金玲<sup>1, 3</sup> 安磊<sup>1, 3</sup> 任晓亮<sup>1, 2</sup>

(1. 中国科学院海洋研究所 海洋生物分类与系统演化实验室, 青岛 266071; 2. 青岛海洋科学与技术试点国家实验室 海洋生物学与生物技术功能实验室, 青岛 266237; 3. 中国科学院大学, 北京 100049)

**摘要:** 单细胞转录组测序技术使人们摆脱了细胞异质性问题干扰, 从而在单个细胞水平实现对基因表达及转录调控机制的探索, 以及对不同细胞亚群和特殊细胞类型的识别, 对系统发育领域的研究具有重要意义。传统模式生物秀丽隐杆线虫 (*Caenorhabditis elegans*) 由于体细胞数目固定、细胞分化路径清晰等特点, 近年来成为了单细胞转录组学研究的重要模型。本文对目前单细胞转录组测序技术的发展现状进行综述, 总结其在秀丽隐杆线虫的细胞谱系分析、单细胞轨迹推断以及神经元细胞图谱等研究工作中的应用情况, 并对未来的研究方向作进一步展望。

**关键词:** 单细胞转录组测序; 秀丽隐杆线虫; 细胞谱系

DOI:10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2022-1190

## Development of Single Cell Transcriptome Sequencing Technology and Its Application in *Caenorhabditis elegans*

ZHAO Jin-ling<sup>1, 3</sup> AN Lei<sup>1, 3</sup> REN Xiao-liang<sup>1, 2</sup>

(1. Laboratory of Marine Organism Taxonomy and Phylogeny, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071;  
2. Laboratory for Marine Biology and Biotechnology, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266237;  
3. University of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049)

**Abstract:** Single cell transcriptome sequencing technology enables people to get rid of the interference of cell heterogeneity, thus realizing the exploration of gene expression and transcriptional regulation mechanism at single cell level, as well as the recognition of different cell subpopulations and special cell types, which is of great significance to the research in the field of phylogeny. The traditional model organism *Caenorhabditis elegans* has become an important model for single-cell transcriptomic research in recent years because of its fixed number of somatic cells and clear trajectory of cell differentiation. This paper summarizes the development of single-cell transcriptome sequencing technology and its application in the research of cell lineage analysis, single-cell trajectory inference and neuronal cell Atlas of *C. elegans*, and further prospects the future research direction.

**Key words:** single-cell RNA sequencing; *Caenorhabditis elegans*; cell lineage

单细胞转录组测序 (single-cell RNA sequencing, scRNA-seq) 是以单细胞分辨率对转录组进行扩增与测序的一项技术, 可以动态反映细胞的功能和类型, 筛查复杂和罕见的细胞群, 追踪不同细胞系的

发育轨迹<sup>[1]</sup>。以往研究表明, 单个细胞的基因表达模式即使在遗传上同质的细胞群体内部也具有很大程度的细胞间差异<sup>[2-3]</sup>, 而传统的转录组测序技术 (bulk RNA-seq) 难以分辨此类差异, scRNA-seq 则

收稿日期: 2022-09-26

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目 (41906081), 青岛海洋科学与技术试点国家实验室海洋生物学与生物技术功能实验室人才支持计划项目 (YJ2019N002)

作者简介: 赵金玲, 女, 硕士研究生, 研究方向: 线虫遗传发育与转录调控; E-mail: zhaojl21@qdio.ac.cn

通讯作者: 任晓亮, 男, 博士, 副研究员, 研究方向: 线虫遗传发育与转录调控; E-mail: xlrn@qdio.ac.cn

可以有效解决上述的细胞异质性问题<sup>[4]</sup>。2009年 Tang 等<sup>[5]</sup>优化了单细胞转录组测序方法,并在小鼠卵裂球和卵母细胞中鉴定了许多以前未知的剪接连接点(splice junctions),首次实现了单细胞水平的转录组测序分析工作。2019年, Ryu 等<sup>[6]</sup>利用 scRNA-seq 绘制了拟南芥幼苗根单个原生质体的转录组图谱,提供了单细胞水平的基因表达图谱,证明了这一技术应用于植物研究的可行性。2021年 Le 等<sup>[7]</sup>将 scRNA-seq 与 CRISPR 技术结合用于乙型肝炎感染研究,在其他高丰度基因存在的情况下,成功获取了低丰度乃至罕见基因的表达信息。近年来,单细胞空间转录组测序技术<sup>[8]</sup>和基于第三代测序平台<sup>[9]</sup>的单细胞转录组测序技术获得了快速发展,拓宽了 scRNA-seq 的应用范畴。目前基于单细胞水平的转录组学研究工作已在肿瘤学<sup>[10]</sup>、发育生物学<sup>[11]</sup>和神经科学<sup>[12]</sup>等领域广泛开展,表现出重要的应用价值。

秀丽隐杆线虫是第一个拥有完整基因组序列的多细胞生物<sup>[13]</sup>,其生命周期短(25℃条件下从卵发育到成虫仅需3 d)、体型小(新孵化的幼虫长约0.25 mm,成虫长约1 mm)且身体透明,是真核生物遗传学和发育生物学领域的重要模式生物<sup>[14-15]</sup>。近年来,随着单细胞转录组测序技术的发展,秀丽隐杆线虫凭借其独特的优势,比如体细胞数量固定、细胞分化谱系清晰等特点,为优化单细胞转录组测序技术的实验操作以及数据分析流程提供了高效的检测模型。基于秀丽隐杆线虫的单细胞转录组学研究工作,一方面促进了该项技术的进一步完善,另一方面加深了人们对多细胞生物的基因动态表达、分子调控机制、生长发育机制以及寿命与衰老等问题的理解。

本文将对 scRNA-seq 的发展现状以及其在秀丽隐杆线虫中的应用情况进行介绍,并对未来的研究方向作进一步展望。

## 1 单细胞转录组测序技术概述

完整的 scRNA-seq 实验流程包括单细胞分离与捕获、文库构建、高通量测序和数据分析四部分<sup>[16]</sup>。常用的单细胞分离与捕获方法包括有限稀释<sup>[17]</sup>、免疫磁性细胞分选<sup>[18]</sup>、荧光激活细胞分

选<sup>[19]</sup>(fluorescence-activated cell sorting, FACS)、微流体、显微操作以及激光捕获显微解剖<sup>[20]</sup>(laser capture microdissection, LCM)等。细胞数量较少的生物样本可以采用移液微操作或 LCM 的方法分离单细胞,上述方法的单细胞捕获率高、费用低,但费时费力、通量偏低。细胞数量较多的生物样本需要固定组织,制备细胞悬浮液,从而分离与捕获单细胞。制备细胞悬浮液可通过一组特定的酶或机械力或两者结合来对组织进行解离。解离效率一般会受到细胞类型、组织类型和发育阶段的影响,解离过程会导致细胞内源性转录的改变进而影响细胞活力,需要提前测试<sup>[21]</sup>。添加转录抑制剂可减少解离导致的转录改变<sup>[22]</sup>。单细胞分离和捕获方法因不同生物体、组织或细胞特性而异<sup>[23]</sup>,可以通过分离整个细胞、细胞特异性细胞核、细胞特异性细胞器或表达特异性标记蛋白的细胞等不同策略来完成<sup>[24]</sup>。2018年, Brasko 等<sup>[25]</sup>开发了计算机辅助显微镜分离(computer assisted microscopy isolation, CAMI)技术,结合图像分析算法、机器学习和高通量显微镜技术识别单细胞,通过 LCM 或显微操作进行自动无中断收集,提高了通量和准确性。2020年, Lamanna 等<sup>[26]</sup>构建了可用于组学的单细胞数字微流控分离平台(digital microfluidic isolation of single cells for-omics, DISCO),研究人员可借此选择特定细胞,识别单核苷酸水平上的变异,并将单细胞测序数据与其基于免疫荧光的表型相关联,对具有环境依赖性的罕见细胞群的深入分析具有重要的应用价值。

文库构建需要提取单细胞中的 mRNA 并反转录为 cDNA,进而扩增测序<sup>[27]</sup>。起始 cDNA 往往需要扩增至纳克级才能满足高通量测序建库要求<sup>[28]</sup>。目前常用的单细胞转录组扩增方法有 PCR 法和体外转录线性扩增<sup>[28]</sup>。利用 PCR 法的 scRNA-seq 技术有 Smart-Seq/Smart-Seq2<sup>[29]</sup>、10× Chromium<sup>[30]</sup>、Drop-seq<sup>[31]</sup>、SCRB-seq<sup>[32]</sup>、Seq-Well<sup>[33]</sup>以及 sci-RNA-seq<sup>[34]</sup>等。利用体外转录线性扩增的技术有 CEL-seq<sup>[35]</sup>、CEL-seq2<sup>[36]</sup>、inDrops<sup>[37]</sup>以及 MARS-seq<sup>[38]</sup>等。在文库构建过程中,可以对每个细胞的 mRNA 用细胞条形码或独特的分子标识符(unique molecular identifier, UMIs)<sup>[39]</sup>进行标记。分子标识符可用于区分测序所得 reads 是来源于同一 mRNA 分子还是

来自同一基因转录的不同 mRNA 分子的扩增拷贝。但在实际操作过程中,使用细胞条形码与分子标识符标记均可能会出现“假信号”,即出现未标记真正的单细胞或者与多个单细胞配对的情况,混淆下游分析,需要在后期数据分析过程中进行相应的处理来减少上述情况的干扰。

为了研究不同单细胞测序技术的适用范围,Ding 等<sup>[40]</sup>选取人类和小鼠细胞系的混合物、人外周血单核细胞(PBMCs)及小鼠皮层核(mouse cortex nuclei)3种样本类型,并开发了通用的 scumi 计算管道,对2种低通量(Smart-seq2和CEL-seq2)和5种高通量(10×Chromium、Drop-seq、Seq-Well、inDrops以及sci-RNA-seq)方法进行了比较。结果显示,在测序灵敏度方面,两种低通量方法 Smart-seq2 和 CEL-Seq2 在检测基因变异和鉴定 mRNA 剪接亚型方面表现相似。对于需要较高灵敏度的研究,这两种方法明显优于高通量方法。在测序用时方面,10×Chromium 耗时最短,Smart-seq2、CEL-Seq2 和 inDrops 耗时最长。在测序成本方面,Drop-seq、Seq-Well 和 inDrops 成本最低,Smart-seq2 因为在文库制备过程中没有池化成本最高,sci-RNA-seq 的成本效益随着单细胞或细胞核数量的增加而提升。

数据分析流程的关键是确定差异表达发生在哪个(亚)细胞类型<sup>[41]</sup>。细胞状态的变化以及实验操作都可能对 scRNA-seq 数据的质量造成影响<sup>[42-43]</sup>,因此,在数据分析过程中,scRNA-seq 数据需要经过预处理、归一化、降维与可视化等一系列关键步骤,消除技术影响和系统偏差,从而揭示出研究人员感兴趣的生物信号<sup>[44]</sup>。预处理就是将原始测量数据转换为基因表达矩阵,便于后续的数据分析与挖掘。随机 RNA 丢失、单细胞层次的扩增偏好性以及文库测序不完整等原因均会在 scRNA-seq 数据中引入背景噪音和技术差异。针对背景噪音可以进行算法过滤,针对技术差异可通过数据归一化加以解决<sup>[44]</sup>。数据归一化又分为样本内归一化和样本间归一化,样本内归一化可定量每个基因相对于样品内其他基因的表达水平,样本间归一化可消除因测序深度或文库大小不同造成的不均匀性<sup>[45]</sup>。最后对高维数据进行降维与可视化,适当的降维不仅可以进一步

去除背景噪音,还可以辅助细胞聚类、谱系重建等诸多下游分析流程;可视化流程可以对 scRNA-seq 数据集进行总结,并创建二维图,便于人们发现具有独特功能的细胞集群以及稀有细胞类型。

## 2 单细胞转录组测序技术发展的新方向

### 2.1 单核转录组测序技术

单核转录组测序技术(single nucleus RNA sequencing, snRNA-seq)只捕获细胞核中的 mRNA 进行测序,相比常规的 scRNA-seq,有效解决了组织保存和细胞分离的相关问题<sup>[46]</sup>。一方面,借助 snRNA-seq 技术从复杂的组织和器官中分离细胞核比分离完整的细胞更加容易,使得 snRNA-seq 技术可广泛应用于真核生物不同界的物种<sup>[47]</sup>。另一方面,利用 snRNA-seq 技术还可以深入了解核特异性的调控机制<sup>[47]</sup>。此外,传统单细胞转录组测序技术在细胞解离过程中有可能诱导应激基因的表达,进而导致细胞转录模式因实验操作行为发生改变,而使用 snRNA-seq 能够将人工操作造成的转录应激反应最小化<sup>[47]</sup>。

2016 年 Lacar 等<sup>[48]</sup>通过 snRNA-seq 技术分析了激活神经元中的即刻早期基因(immediate early genes, IEGs)的表达情况,从而对体内神经元激活模式提供了新的见解。2020 年, Koenitzer 等<sup>[49]</sup>通过对比小鼠肺细胞的 snRNA-seq 和 scRNA-seq 数据发现, snRNA-seq 减少了分离偏差、提升了稀有细胞类型检测能力。Weber 等<sup>[50]</sup>于 2021 年对 19 名死于新冠肺炎并快速接受尸检的人员和 7 名对照人员的肺部共约 11.6 万个细胞核进行了 snRNA-seq, 确定了细胞组成、细胞转录状态和细胞间相互作用的实质性变化,为评估新冠肺炎并发症及治疗方案提供了重要依据。2022 年 Gupta 等<sup>[51]</sup>对人类白色和棕色脂肪细胞谱系中的前脂肪细胞和成熟脂肪细胞分析表明,相较于 scRNA-seq, 尽管 snRNA-seq 技术缺乏细胞质 mRNA 的信息,但仍然能够广泛鉴别出由 scRNA-seq 所能识别的脂肪细胞类型。snRNA-seq 技术突破了对样本来源以及类型的限制,尤其适用于心脏<sup>[52]</sup>、肾脏<sup>[53]</sup>、脑<sup>[54]</sup>、植物细胞<sup>[55]</sup>等组织,对于人类临床试验<sup>[56]</sup>、遗传学研究<sup>[57]</sup>和大型器官的精确细胞图谱绘制<sup>[58]</sup>等工作有重要意义。



## 2.2 基于第三代测序平台的单细胞转录组测序技术

基于二代测序(next generation sequencing, NGS)平台的scRNA-seq读长较短,后续的拼接过程可能会引入很多系统性误差,无法有效检测基因组的结构变异以及转录本的构型变化<sup>[59]</sup>。将scRNA-seq与第三代测序技术(third generation sequencing, TGS)相结合,可直接读取反转录全长cDNA,获取高质量的单个RNA分子的序列,不仅可以显著提高单核苷酸位点变异(single nucleotide variant, SNV)检测的可靠性和分辨率,还可以进一步揭示基因可变剪接和新转录本等转录组学特征,从而描述不同细胞的基因表达特性<sup>[60-61]</sup>。

目前第三代测序技术以Pacific biosciences(PacBio)和Oxford nanopore technologies(ONT)两家测序公司为代表<sup>[59]</sup>。PacBio拥有独特的单分子实时测序技术<sup>[62]</sup>(single molecule real time, SMRT),原理是将SMRTbell模板与DNA聚合酶固定在零模波导(zero mode waveguide, ZMW)中,由不同染料标记的核苷酸经过ZMW时会发生碱基配对,分析荧光波长和峰值可确定碱基种类,根据碱基通过ZMW的时间可推测碱基修饰位点<sup>[63]</sup>。基于ONT的纳米孔测序技术利用马达蛋白牵引RNA或DNA分子通过纳米孔,这一过程中各类碱基因电荷性质不同产生相应的电流信号,以此推测碱基种类,带有修饰的碱基位点也可通过相应的电流信号进行检测,从而实时获得序列信息<sup>[64]</sup>。ONT主要测序仪产品有PromethION<sup>[65]</sup>、GridION<sup>[66]</sup>、MinION<sup>[67]</sup>及Flongle<sup>[68]</sup>。其中MinION作为便携型的商业化测序仪,曾用于西非病毒暴发期间埃博拉病毒样本的现场分析<sup>[69]</sup>。PacBio的Iso-seq技术可以多次读取同一条cDNA序列并完成测序,因此测序准确率更高并且在发现转录组复杂性和鉴定基因同工型(gene isoform)等应用方面有较好的表现。而ONT除了可以将mRNA转换为cDNA进行测序之外,还可以直接对mRNA测序并检测mRNA上的修饰情况,避免PCR扩增导致的信息缺失<sup>[70]</sup>。三代测序技术为研究转录本可变剪接<sup>[71-73]</sup>、纠正错误拼接基因<sup>[74]</sup>、分析选择性多聚腺苷酸化事件(alternative polyadenylation, APA)<sup>[71]</sup>、鉴定新基因与lncRNA<sup>[72]</sup>

等工作提供了支持。近年来,研究人员尝试将单细胞转录组学技术与三代测序平台相结合,将全长转录组学的研究推向单细胞水平层面,2018年Gupta等<sup>[75]</sup>将Illumina 3'测序技术与Iso-Seq技术相结合,并利用10x Genomics平台开发了单细胞RNA异构体测序(single-cell isoform RNA sequencing, Scisr-seq)技术,用来分析鉴定组织中的不同单细胞类型,研究人员精确鉴定了小鼠小脑块状组织的神经元、星形胶质细胞以及小胶质细胞,并揭示了远剪接位点(distant splice sites)在不同细胞类型中的特异性组合模式<sup>[76-77]</sup>,修正了小鼠Gencode数据库中的基因组注释信息<sup>[75]</sup>。2020年Fan等<sup>[61]</sup>将传统的scRNA-seq技术与ONT相结合,开发了SCAN-seq(single-cell amplification and sequencing of full-length RNAs)技术,并以此为基础明确区分了小鼠植入前胚胎不同发育阶段的细胞,鉴定出9 338个基因的27 250个未注释转录本。研究结果表明,相比基于NGS平台的scRNA-seq,SCAN-seq在确定单个细胞内等位基因的特异性基因表达模式方面具有更高的灵敏度<sup>[61]</sup>。同年Lebrigand等<sup>[78]</sup>提出了ScNaUmi-seq技术,通过将ONT技术、细胞条形码标记方法与独特分子标志符分配策略相结合,达到在高测序深度下获取高精度全长转录本信息的目的,通过分析小鼠胚胎大脑中的转录本亚型多样性,展现了这一技术在单细胞水平上分析RNA剪接和单核苷酸多态性的能力。

## 2.3 单细胞空间转录组技术

常规的scRNA-seq会破坏原组织样本中细胞间的相互连接,从而丢失各个细胞的空间位置信息,而空间转录组技术则弥补了这一缺陷<sup>[79]</sup>。单细胞空间转录组学技术能够同时提供转录组信息和空间信息,反映转录后修饰对于翻译过程和蛋白质水平的影响,有助于理解正常和病理状态下的细胞特性<sup>[8]</sup>。空间定位是决定细胞命运的关键,相比于传统的空间转录组技术,单细胞空间转录组技术最大的不同在于首先获取细胞并进行位置信息编码<sup>[80]</sup>。编码方法涵盖了基于条形码珠阵列、显微切割、单分子荧光原位杂交、条形码原位靶向以及混合分离的技术,近年也出现了许多不同技术组合使用的情

况<sup>[80]</sup>。基于条形码珠阵列的编码方法包括 HDST (high-definition spatial transcriptomics) 与 Slide-seq 技术。HDST 技术从空间条形码珠阵列上的组织学切片中捕获 RNA<sup>[81]</sup>。Slide-seq 技术则将 RNA 从组织切片转移到 DNA 条形码珠表面<sup>[82]</sup>。显微切割技术包括 LCM<sup>[83]</sup> 与 Geo-seq (geographical position sequencing) 技术,其中 Geo-seq 技术结合了 scRNA-seq 和 LCM,使研究人员可以借由少量细胞分析空间转录组信息,目前已应用于小鼠早期胚胎、小鼠脑和病理肝脏的空间转录组学研究<sup>[84]</sup>。单分子荧光原位杂交技术以 seqFISH (sequential fluorescence *in situ* hybridization, seqFISH) 和 MERFISH (multiplexed error-robust FISH) 为代表,seqFISH 能够准确检测单个细胞中的转录产物,并对单细胞中的新生转录产物进行原位可视化 (*in situ* visualization)<sup>[85-86]</sup>。MERFISH 使用组合标签、连续成像等技术来提高检测通量,可以在单个细胞中鉴定数千种 RNA 的拷贝数和空间定位,是一个高度多重化的 smFISH (single-molecule FISH) 成像方法<sup>[87]</sup>。条形码原位靶向技术以 FISSEQ (fluorescence *in situ* sequencing)<sup>[88]</sup>、ISS (*in situ* sequencing FISH)<sup>[89]</sup> 以及 STARmap (spatially-resolved transcript amplicon readout mapping)<sup>[90]</sup> 等技术为代表,可以对固定组织或细胞样本中的 mRNA 进行直接测序。基于混合分离技术的有 SPLiT-seq (split pool ligation-based transcriptome sequencing)<sup>[91]</sup>、PETRI-seq<sup>[92]</sup> 与 DBIT-seq<sup>[93]</sup> 等。其中 SPLiT-seq 技术支持多路复用<sup>[91]</sup>,还可以用于从福尔马林固定的石蜡包埋组织中剖析单核<sup>[94]</sup>,存储细胞进行未来实验<sup>[48]</sup>。

2015 年 Satija 等<sup>[95]</sup> 发布了 Seurat 分析工具,利用 R 语言工具包整合 scRNA-seq 数据和标记基因的远侧杂交结果推断细胞位置,并以解离的斑马鱼 (*Barchydanio rerio* var) 胚胎为研究对象推断出了转录组范围内的空间模式图。2021 年 Srivatsan 等<sup>[96]</sup> 提出了 Sci-SPACE 技术,将寡聚阵列引入组织切片,利用 scRNA-seq 的部分识别条形码进行标记和成像,进而捕获位置信息,在保留单细胞分辨率的同时,在更大尺度上解决了空间异质性问题。2022 年 5 月 Chen 等<sup>[97]</sup> 提出了 Stereo-seq 技术,这一技术通过结合 DNA 纳米球芯片 (DNA nanoball

(DNB)-patterned arrays) 和原位 RNA 捕获技术实现单细胞空间转录组测序,并应用这一技术解析了小鼠胚胎发育中晚期器官发生的基因空间表达模式,完成了小鼠器官发育时空转录组图谱。同一时期 Wang 等<sup>[98]</sup> 对果蝇晚期胚胎和幼虫的所有阶段进行 Stereo-seq 并生成了对应时期的单细胞空间转录组图谱,Xia 等<sup>[99]</sup> 利用单细胞 Stereo-seq 技术解析了拟南芥叶片上下表皮细胞间细微的转录组差异并将单细胞位置和转录组信息成功整合。2022 年 11 月 McKellar 等<sup>[100]</sup> 发布了 STRS (spatial total RNA-sequencing) 技术,通过原位 RNA 标记实现空间总 RNA 测序,进而捕获编码 RNA、非编码 RNA 和病毒 RNA,这一技术适用于新的 RNA 或非宿主转录物等未知 RNA 分析,通过 STRS 文库中的未剪接转录本或新转录本还可以实现单个细胞的转录轨迹预测 (表 1)。

### 3 单细胞转录组测序技术在秀丽隐杆线虫中的应用

#### 3.1 细胞谱系分析以及单细胞轨迹推断

细胞谱系是指受精卵经过不断的细胞分裂,产生包含不同细胞类型胚胎的细胞分裂序列<sup>[101]</sup>。在胚胎发育过程中细胞相互协调,彼此间建立联系进而形成个体,关于如何实现这种协调的一个普遍假设是,每个细胞的行为是由一组 RNA 混合物决定的<sup>[102]</sup>。谱系中细胞的转录组引导细胞随时间推移分化成特定细胞类型,因此通过 scRNA-seq 直接测定单个细胞的基因表达模式,对于理解细胞谱系的形成过程,以及比较不同种类动物早期发育间的演化关系具有重要意义。如果把单细胞转录组看作是细胞某个过程中某一时间点的静态快照,将快照级联就相当于细胞状态持续变化过程的再现,称为“伪时间轨迹”<sup>[103]</sup>。单细胞轨迹推断通过分析单细胞转录组的动态变化情况,进而描述细胞状态的详细变化过程和关键过渡点,为揭示新的调控因子提供参考<sup>[104]</sup>。借助 RNA velocity 可增加所推断的伪时间的真实性<sup>[105]</sup>。RNA velocity 即 mRNA 丰度的变化,常用模型有 velocity 和 scVelo,可同时访问细胞状态、转录组运动方向及速度并检测瞬时表达的基因<sup>[106-107]</sup>。单细胞基因表达分析还可以通过

表 1 单细胞空间转录组测序技术

Table 1 Single cell spatial transcriptome sequencing technologies

| 名称<br>Name | 空间编码方法<br>Spatial encoding method | 目标<br>Target | 靶向性<br>Approach | 研究对象<br>Subjects of research | 亚细胞水平<br>Subcellular | 参考文献<br>Reference |
|------------|-----------------------------------|--------------|-----------------|------------------------------|----------------------|-------------------|
| HDST       | 条形码珠阵列                            | mRNAs        | 否               | 小鼠嗅觉细胞                       | 是                    | [ 87 ]            |
| Slide-seq  | 条形码珠阵列                            | mRNAs        | 否               | 小鼠脑                          | 否                    | [ 88 ]            |
| LCM        | 显微切割                              | mRNAs        | 否               | 小鼠脊髓                         | 否                    | [ 90 ]            |
| Geo-seq    | 显微切割                              | mRNAs        | 否               | 小鼠早期胚胎                       | 否                    | [ 91 ]            |
| seqFISH    | 单分子荧光原位杂交                         | RNA          | 是               | 小鼠脑、嗅球                       | 是                    | [ 94 ]            |
| MERFISH    | 单分子荧光原位杂交                         | RNA          | 是               | 人的大脑皮层                       | 是                    | [ 96 ]            |
| FISSEQ     | 条形码原位靶向                           | mRNAs        | 否               | 人原代成纤维细胞                     | 是                    | [ 97 ]            |
| ISS        | 条形码原位靶向                           | mRNAs        | 是               | 人乳腺癌组织                       | 是                    | [ 98 ]            |
| STARmap    | 条形码原位靶向                           | mRNAs        | 是               | 小鼠脑组织切片                      | 是                    | [ 99 ]            |
| SPLiT-seq  | 混合分离                              | RNA          | 是               | 小鼠大脑和脊髓细胞                    | 否                    | [ 100 ]           |
| PETRI-seq  | 混合分离                              | mRNAs        | 是               | 细菌                           | 是                    | [ 101 ]           |
| DBiT-seq   | 混合分离                              | mRNAs        | 是               | 小鼠胚胎                         | 否                    | [ 102 ]           |

Monocle3 工具包进行，实现细胞聚类及分类、细胞计数、基因差异表达分析及单细胞轨迹构建<sup>[108]</sup>。传统模式动物秀丽隐杆线虫是研究胚胎发育、繁殖和衰老的一种强大而成熟的模型，目前人们已绘制出秀丽隐杆线虫完整的发育细胞谱系和神经元连接体<sup>[109-110]</sup>。借助 scRNA-seq 技术，研究人员可以摆脱传统转录组学研究的限制，在单细胞水平层面深入揭示秀丽隐杆线虫的细胞谱系形成过程以及特定类型细胞的分化轨迹。

2012 年 Hashimshony 等<sup>[35]</sup>开发了一种通过多路线性扩增的 scRNA-seq 技术：CEL-Seq。在体外转录线性扩增 mRNA 之前进行条形码标记和样本汇集，从而解决了 mRNA 起始量少的问题。利用 CEL-Seq 技术对秀丽隐杆线虫早期胚胎发育过程进行研究，研究人员成功实现了在复杂组织中对不同类型细胞群体的转录组分析鉴定工作。2016 年 Tintori 等<sup>[102]</sup>针对秀丽隐杆线虫胚胎从受精卵发育到 16 个细胞阶段的过程，分离捕获各阶段细胞进行 scRNA-seq，完成了秀丽隐杆线虫早期发育的转录谱系，展示了在早期发育阶段每个细胞的全基因组转录本丰度信息，同时还提供了一个可供访问的交互式数据可视化工具。该研究解答了每个细胞中的合子基因组如何差异激活的问题，挖掘了对发育过程至关重要的相关基因。2017 年 Cao 等<sup>[34]</sup>开发了单细胞组合索引 RNA 测序技术（single-cell combinatorial indexing

RNA sequencing, sci-RNA-seq），通过组合索引策略分析单个细胞或细胞核的转录组，这一技术降低了细胞处理过程对细胞状态或 RNA 完整性的干扰，减少了批量效应。研究人员借助这一技术，发布了秀丽隐杆线虫 L2 幼虫期的单细胞转录组目录<sup>[34]</sup>，并对各细胞类型中的 marker 基因做了更为深入的总结（表 2）。Fernandes 等<sup>[111]</sup>于 2020 年提出了一种分离和制备秀丽隐杆线虫单细胞悬浮液的方案，这一方案基于 FACS 技术，利用高度同步化发育的秀丽隐杆线虫 L1 幼虫，实现了对稀有类型细胞的有效纯化。该方案缩短了单细胞悬浮液的制备时间，减少了 FACS 分选时由于压力和活细胞的损失而产生的转录效应，并能够有效分离罕见细胞类型<sup>[111]</sup>。2022 年，Niu 等<sup>[112]</sup>开发了一个计算框架，来研究在秀丽隐杆线虫原肠胚形成和器官形成的早期发育过程中，基因表达调控、形态发生与细胞信号网络和细胞集体行为的动态关系，使研究人员可以更好地理解基因表达如何在单细胞和组织规模上调控秀丽隐杆线虫的胚胎发生过程。2021 年 Wang 等<sup>[113]</sup>综合了包含秀丽隐杆线虫在内的 7 个动物物种的 scRNA-seq 数据，定义了一个细胞图谱的概要，并构建了一个跨物种细胞类型的进化层次模型，描述了细胞类型多样性及其起源的路线图。这一研究揭示了动物进化过程中细胞类型的保存和分化过程，进一步扩大了比较基因组学的研究范畴。



表 2 末端细胞类型注释的标记基因

Table 2 Marker genes for terminal cell type annotations

| 细胞类型 Cell type                            | 标记基因 Marker genes                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
|-------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 肌肉和中胚层 Muscle and mesoderm                | <i>ceh-13, ceh-34, cup-4, cwn-1, dmd-4, dsc-1, egl-20, ehv-3, exp-1, eya-1, glb-26, hlh-1, hlh-8, let-381, lgc-26, mig-1, mls-1, myo-3, pal-1, sfrp-1, unc-30, unc-62, unc-39</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| 咽 Pharynx                                 | <i>aff-1, agr-1, ceh-2, ceh-6, ceh-19, ceh-22, ceh-45, cwn-2, dmd-4, elt-4, eyg-1, fos-1, glr-8, gly-15, hlh-6, inx-12, inx-20, irx-1, lec-8, let-23, lys-8, mlt-8, mlt-11, nhr-25, nhr-67, nhr-239, pax-1, phat-1, phat-2, phat-5, ref-1, ser-2, slt-1, spp-7, tnc-2, tni-4, tnt-4, ttx-1, unc-62, unc-129, W05B10.4</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| 导管和气孔 Duct and pore                       | <i>aff-1, ceh-37, grl-2, irx-1</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| 肠 Intestine                               | <i>ceh-37, cpr-1, faah-1, irg-7, pal-1, pbo-4, psa-3, ZC204.12</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| 皮下组织和侧线细胞                                 | <i>ahr-1, bus-4, bus-8, bus-12, ceh-13, ceh-16, ceh-32, egl-17, elt-1, elt-3, elt-6, lin-12, lin-39, lin-44, mab-5, pax-3, plx-2, rnt-1, slt-1, tbx-2, tbx-8, tbx-9, unc-62, unc-130, vab-3, vab-7</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| Hypodermis and seam cells                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| 胶质细胞和排泄细胞                                 | <i>aat-1, aff-1, aqp-7, ceh-6, ceh-32, ceh-37, eak-3, eak-6, grd-15, grl-18, grl-12, grl-2, hlh-11, inx-12, inx-13, irx-1, kcc-3, let-23, lim-6, mls-2, mlt-8, mlt-13, nas-31, nhr-25, pros-1, qua-1, sdf-9, ser-2, slt-1, sym-1, unc-62, wrt-6, F52E1.2, F16F9.3, K08D12.4, K09F5.6</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| Glia and excretory cells                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| 早期胚胎、生殖腺和直肠                               | <i>glh-1, nos-1, pgl-1</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| Early embryo, germline and rectum         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| 纤毛神经元 Ciliated neurons                    | <i>agr-1, bas-1, cat-2, cat-4, capa-1, ceh-13, ceh-19, ceh-36, che-1, cil-7, eng-2, cog-1, cwn-2, dac-1, daf-11, dat-1, deg-1, dhc-3, dyla-1, flp-3, gcy-8, gcy-9, gcy-11, gcy-18, gcy-23, gcy-31, gcy-32, gcy-33, gcy-35, gcy-36, gcy-37, ns-6, klp-6, nhr-6, nhr-67, nhr-216, ocr-1, ocr-4, odr-7, osm-10, pax-2, pcrg-1, pdf-1, sox-2, sptf-1, srb-6, srd-23, srh-74, ssu-1, tba-6, tba-9, tbx-2, trx-1, ttx-1, unc-42, unc-62, xbx-9, C47D2.1, F15A4.5, F09E8.8, K04D7.6, M04B2.6, R102.2</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| 非纤毛神经元和纤毛神经元                              | <i>ceh-6, che-7, dop-1, flr-4</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| Non-ciliated neurons and ciliated neurons |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| 非纤毛神经元 Non-ciliated neurons               | <i>acc-1, acc-2, ace-3, acr-15, acr-16, acr-23, acy-2, alr-1, aptf-1, ast-1, bus-18, ceh-6, ceh-10, ceh-17, ceh-24, ceh-27, ceh-31, ceh-32, ceh-34, ceh-43, ceh-63, ceh-75, cex-1, deg-3, des-2, dop-5, eat-4, egl-5, egl-20, fax-1, flp-1, flp-2, flp-4, flp-9, flp-11, flp-12, flp-13, flp-18, flp-22, gbb-1, gbb-2, gcy-35, glb-17, glc-3, glr-1, glr-2, glr-3, glr-4, glr-5, glr-6, glr-8, gpa-2, gpa-14, hlh-13, hlh-14, hlh-34, ins-1, inx-19, irx-1, lad-2, lim-4, lim-6, lin-11, lin-44, lite-1, mab-9, mbr-1, mec-1, mec-3, mec-7, mec-17, mgl-1, mls-2, mod-5, nhr-67, nlp-7, nlp-12, nlp-15, nlp-17, nmr-2, nob-1, odr-2, pdf-1, pks-1, rig-3, rig-4, rig-5, ser-2, ser-4, ser-6, slt-1, snet-1, snf-11, sox-2, sox-3, tbh-1, tbx-2, tdc-1, tmc-1, ttx-3, tuk-16, unc-3, unc-4, unc-6, unc-7, unc-17, unc-25, unc-29, unc-30, unc-42, unc-46, unc-47, unc-62, unc-86, unc-130, vab-7, vab-8, vab-15, zig-5, C35B1.7, F26A10.1, F59E11.7, F17C11.2, K07C5.9, Y43F8B.20</i> |
| 直肠细胞 Rectal cells                         | <i>ceh-6, ceh-27, daf-6, dve-1, egl-20, egl-38, elt-3, mab-9, mom-2, nac-2, nhr-25, pal-1, pha-4, ref-2, tat-4</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |

3.2 神经元特异性表达机制的研究

不同类型的神经元拥有许多共同的功能，同时又各自具备不同的特征，建立单细胞分辨率的基因表达谱有助于深入了解不同类型神经元之间的差异<sup>[114]</sup>。秀丽隐杆线虫由于其独特的结构，非常适合进行神经系统，尤其是突触连接性的研究<sup>[115]</sup>。运用 scRNA-seq 对秀丽隐杆线虫神经元细胞进行分析，有助于将神经元特异性功能和解剖特性与具体的分子特征联系起来，进而解析整个神经系统中单个神经元的活动规律。

2021 年 Ben-David 等<sup>[116]</sup> 利用 scRNA-seq 技

术，在秀丽隐杆线虫中筛查了细胞类型特异性的反式 eQTL 热点 (cell-type-specific trans expression quantitative trait loci hotspots)，这些 eQTL 热点可以影响相关类型细胞的核心通路表达途径。研究人员同时发现了神经系统中的单细胞特异性 eQTL 效应，包括在两个独立的神经元中具有相反效应的 eQTL。这一工作表明，借助 scRNA-seq 技术，人们可以由全基因组范围的 eQTL 定位揭示表型变异的分子基础，分析疾病风险和其他复杂性状变异。同年 Taylor 等<sup>[114]</sup> 使用 FACS 从秀丽隐杆线虫 L4 幼虫期个体中分离出神经元细胞并进行 scRNA-seq，发

现每种神经元类型都是由神经肽编码基因和神经肽受体的不同组合所定义的。研究结果提供了神经元特异性基因表达与整个神经系统的结构和功能之间的全面联系,表明每种类型的神经元在发送和接收信号中具有不同的作用,为神经元连接和功能的遗传基础研究奠定了基础。2020年Sun等<sup>[117]</sup>为研究剪接网络中功能相关靶点,选取秀丽隐杆线虫的“触觉神经元”进行转录组测序发现,保守的剪接调控因子MEC-8/RBPMS是触觉神经元功能的必需基因。这一工作对阐明特定细胞类型中功能相关调控目标的未来研究具有指导意义,有助于探索秀丽隐杆线虫单个神经元进行多感觉整合的具体机制。

#### 4 总结与展望

单细胞转录组测序技术使我们得以深入了解细胞多样性,并探索多细胞生物遗传信息的动态表达过程,随着相关工作的开展,一些新的测序技术与分析流程也在不断被开发出来。ATAC-seq (assay for transposase accessible chromatin with high throughput sequencing) 技术可以识别基因组中的染色质开放区域,而scATAC-seq<sup>[118]</sup>技术(single cell assay for transposase accessible chromatin with high throughput sequencing)将传统ATAC-seq流程与微流体或细胞索引技术相结合,在传统ATAC-seq的基础上通过条形码实现细胞核标记与分选<sup>[119]</sup>。其数据可分析基因活性,也可与scRNA-seq数据及其他组学数据集成进行多组学研究<sup>[120-121]</sup>。基于细胞索引的sciATAC-seq (single-cell combinatorial indexing assay for transposase accessible chromatin using sequencing)将裂解细胞的细胞核放置在带有独特条形码转座子的96孔板中并汇集在一起,进行荧光激活细胞分选(FACS)<sup>[118]</sup>。2021年Durham等<sup>[122]</sup>使用sciATAC-seq技术收集秀丽隐杆线虫L2幼虫的单细胞染色质可及性数据,并利用一种新的Dirichlet分配算法,提供了推定细胞类型特异性基因调控位点的新图谱。近年来科研人员在scATAC-seq的基础上陆续开发出了Pi-ATAC (protein-indexed scATAC-seq)<sup>[123]</sup>、uATAC-seq (nano-well ATAC-seq)<sup>[124]</sup>及dsciATAC-seq (droplet microfluidics scATAC-seq with cellular indexing)<sup>[125]</sup>等技术。Pi-ATAC<sup>[123]</sup>同时测

量同单个细胞的表位蛋白质和活性DNA调控元件,直接将细胞表型或微环境与表观遗传图谱相联系。uATAC-seq<sup>[124]</sup>在scATAC-seq基础上通过纳米级液体沉积系统减小测序体积,降低试剂成本,具有高度的可扩展性,非常适合多组学分析。dsciATAC-seq<sup>[125]</sup>同时结合细胞索引与微流体,增加了细胞吞吐量及基于微流体的scATAC-seq的读取深度。在选择scATAC-seq之前,综合考虑实验设备的可用性、与分析软件的兼容性、细胞吞吐量及研究目的非常重要。

2020年Sun等<sup>[117]</sup>通过对秀丽隐杆线虫胚胎细胞进行scRNA-seq,鉴定出94个未被报道过的调节基因表达的非编码RNA(non-coding RNA, ncRNA),并对ncRNA是否影响胚胎发生过程中相应基因的时空表达进行了探索。除此之外,科研人员开始尝试对多种单细胞测序技术进行组合,通过单细胞多组学测序(single cell multi-omics sequencing, sc multi-omics-seq)分析确定基因型-表型相关性<sup>[126]</sup>。例如ScTrio-seq(单细胞三组学测序)技术同时在单细胞水平对基因组拷贝数变异(CNVs)、DNA甲基化组和转录组实现了三重组学测序<sup>[127]</sup>。这一研究思路一方面可用于分析单个细胞间的谱系关系,帮助了解肿瘤潜在的治疗靶点,另一方面可通过DNA与RNA中突变的相互验证进行基因诊断筛查<sup>[128-129]</sup>。单细胞水平多组学测序技术的开发也将为秀丽隐杆线虫的相关研究提供新的平台。针对秀丽隐杆线虫领域不断涌现的单细胞转录组学研究成果,2022年WormBase发布了两个数据分析工具,分别用于集成数据集的交互差异表达分析(scdefg)以及基因表达可视化处理(Wormcells),方便研究人员对已发表的秀丽隐杆线虫scRNA-seq数据进行深入挖掘<sup>[130]</sup>。目前,单个神经元如何检测不同类型的外界刺激,如何处理多种感觉模式并产生不同行为的具体机制尚不清楚,秀丽隐杆线虫作为研究神经元功能机制的重要模型,结合scRNA-seq技术或许可以在将来为神经元决策机制以及多模态研究工作提供强大的助力。相关工作有可能阐明包括人类在内的高等生物多感觉整合的基本规则,对于探索头晕、迷失方向和平衡问题等神经疾病的病因具有重要意义。



## 参考文献

- [1] Hwang B, Lee JH, Bang D. Author Correction: single-cell RNA sequencing technologies and bioinformatics pipelines [J]. *Exp Mol Med*, 2021, 53 ( 5 ) : 1005.
- [2] Huang S. Non-genetic heterogeneity of cells in development: more than just noise [J]. *Development*, 2009, 136 ( 23 ) : 3853-3862.
- [3] Tay S, Hughey JJ, Lee TK, et al. Single-cell NF-kappaB dynamics reveal digital activation and analogue information processing [J]. *Nature*, 2010, 466 ( 7303 ) : 267-271.
- [4] Stark R, Grzelak M, Hadfield J. RNA sequencing: the teenage years [J]. *Nat Rev Genet*, 2019, 20 ( 11 ) : 631-656.
- [5] Tang FC, Barbacioru C, Wang YZ, et al. mRNA-Seq whole-transcriptome analysis of a single cell [J]. *Nat Methods*, 2009, 6 ( 5 ) : 377-382.
- [6] Ryu KH, Huang L, Kang HM, et al. Single-cell RNA sequencing resolves molecular relationships among individual plant cells [J]. *Plant Physiol*, 2019, 179 ( 4 ) : 1444-1456.
- [7] Le C, Liu YM, López-Orozco J, et al. CRISPR technique incorporated with single-cell RNA sequencing for studying hepatitis B infection [J]. *Anal Chem*, 2021, 93 ( 31 ) : 10756-10761.
- [8] Wei Y, Zhang XD, Hu MM, et al. Advances in spatial transcriptome technologies [J]. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 2022, 49 ( 3 ) : 561-571.
- [9] Ma LF, Li HY, Lan JP, et al. Comprehensive analyses of bioinformatics applications in the fight against COVID-19 pandemic [J]. *Comput Biol Chem*, 2021, 95: 107599.
- [10] Tirosh I, Venteicher AS, Hebert C, et al. Single-cell RNA-seq supports a developmental hierarchy in human oligodendrogloma [J]. *Nature*, 2016, 539 ( 7628 ) : 309-313.
- [11] Holmes G, Gonzalez-Reiche AS, Lu N, et al. Integrated transcriptome and network analysis reveals spatiotemporal dynamics of calvarial suturogenesis [J]. *Cell Rep*, 2020, 32 ( 1 ) : 107871.
- [12] Wahane S, Zhou XX, Zhou X, et al. Diversified transcriptional responses of myeloid and glial cells in spinal cord injury shaped by HDAC3 activity [J]. *Sci Adv*, 2021, 7 ( 9 ) : eabd8811.
- [13] C elegans Sequencing Consortium. Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology [J]. *Science*, 1998, 282 ( 5396 ) : 2012-2018.
- [14] Bargmann CI. Neurobiology of the *Caenorhabditis elegans* genome [J]. *Science*, 1998, 282 ( 5396 ) : 2028-2033.
- [15] Corsi AK, Wightman B, Chalfie M. A transparent window into biology: a primer on *Caenorhabditis elegans* [J]. *Genetics*, 2015, 200 ( 2 ) : 387-407.
- [16] Wheeler MB. Taking the pain out of writing objectives [J]. *J Nurs Adm*, 1981, 11 ( 5 ) : 12.
- [17] Fuller SA, Takahashi M, Hurrell JG. Cloning of hybridoma cell lines by limiting dilution [J]. *Curr Protoc Mol Biol*, 2001, Chapter 11: Unit11.8.
- [18] Legut M, Sanjana NE. Immunomagnetic cell sorting [J]. *Nat Biomed Eng*, 2019, 3 ( 10 ) : 759-760.
- [19] Gross A, Schoendube J, Zimmermann S, et al. Technologies for single-cell isolation [J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16 ( 8 ) : 16897-16919.
- [20] Decarlo K, Emley A, Dadzie OE, et al. Laser capture microdissection: methods and applications [J]. *Methods Mol Biol*, 2011, 755: 1-15.
- [21] Li HJ. Single-cell RNA sequencing in *Drosophila*: technologies and applications [J]. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*, 2021, 10 ( 5 ) : e396.
- [22] Hrvatin S, Hochbaum DR, Nagy MA, et al. Single-cell analysis of experience-dependent transcriptomic states in the mouse visual cortex [J]. *Nat Neurosci*, 2018, 21 ( 1 ) : 120-129.
- [23] Sanz E, Yang LH, Su T, et al. Cell-type-specific isolation of ribosome-associated mRNA from complex tissues [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106 ( 33 ) : 13939-13944.
- [24] Zeb Q, Wang C, Shafiq S, et al. An overview of single-cell isolation techniques [M] //Single-Cell Omics. Amsterdam: Elsevier, 2019: 101-135.
- [25] Brasko C, Smith K, Molnar C, et al. Intelligent image-based *in situ* single-cell isolation [J]. *Nat Commun*, 2018, 9 ( 1 ) : 226.
- [26] Lamanna J, Scott EY, Edwards HS, et al. Digital microfluidic isolation of single cells for-Omics [J]. *Nat Commun*, 2020, 11 ( 1 ) : 5632.
- [27] Eckert KA, Kunkel TA. DNA polymerase fidelity and the polymerase chain reaction [J]. *PCR Methods Appl*, 1991, 1 ( 1 ) : 17-24.
- [28] Wen L, Tang F. Plenany session: genetics [J]. *Med J Aust*, 1971, 2 ( 14 ) : 37-39.
- [29] 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.
- [ 30 ] Baran-Gale J, Chandra T, Kirschner K. Experimental design for single-cell RNA sequencing [J]. Brief Funct Genomics, 2018, 17 ( 4 ) : 233-239.
- [ 31 ] 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.
- [ 32 ] 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.
- [ 33 ] Aicher TP, Carroll S, Raddi G, et al. Seq-well: a sample-efficient, portable picowell platform for massively parallel single-cell RNA sequencing [J]. Methods Mol Biol, 2019, 1979: 111-132.
- [ 34 ] Cao JY, Packer JS, Ramani V, et al. Comprehensive single-cell transcriptional profiling of a multicellular organism [J]. Science, 2017, 357 ( 6352 ) : 661-667.
- [ 35 ] 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.
- [ 36 ] Hashimshony T, Senderovich N, Avital G, et al. CEL-Seq2: sensitive highly-multiplexed single-cell RNA-Seq [J]. Genome Biol, 2016, 17 ( 1 ) : 77.
- [ 37 ] Klein AM, Macosko E. InDrops and Drop-seq technologies for single-cell sequencing [J]. Lab Chip, 2017, 17 ( 15 ) : 2540-2541.
- [ 38 ] 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.
- [ 39 ] Fu Y, Wu PH, Beane T, et al. Elimination of PCR duplicates in RNA-seq and small RNA-seq using unique molecular identifiers [J]. BMC Genomics, 2018, 19 ( 1 ) : 531.
- [ 40 ] Ding JR, Adiconis X, Simmons SK, et al. Systematic comparison of single-cell and single-nucleus RNA-sequencing methods [J]. Nat Biotechnol, 2020, 38 ( 6 ) : 737-746.
- [ 41 ] Ma WJ, Sharma S, Jin P, et al. LRcell: detecting the source of differential expression at the sub-cell-type level from bulk RNA-seq data [J]. Brief Bioinform, 2022, 23 ( 3 ) : bbac063.
- [ 42 ] Gustafsson J, Held F, Robinson JL, et al. Sources of variation in cell-type RNA-Seq profiles [J]. PLoS One, 2020, 15 ( 9 ) : e0239495.
- [ 43 ] Choudhary S, Satija R. Comparison and evaluation of statistical error models for scRNA-seq [J]. Genome Biol, 2022, 23 ( 1 ) : 27.
- [ 44 ] Chu SK, Zhao SL, Shyr Y, et al. Comprehensive evaluation of noise reduction methods for single-cell RNA sequencing data [J]. Brief Bioinform, 2022, 23 ( 2 ) : bbab565.
- [ 45 ] Oshlack A, Robinson MD, Young MD. From RNA-seq reads to differential expression results [J]. Genome Biol, 2010, 11 ( 12 ) : 220.
- [ 46 ] Fischer J, Ayers T. Single nucleus RNA-sequencing: how it's done, applications and limitations [J]. Emerg Top Life Sci, 2021, 5 ( 5 ) : 687-690.
- [ 47 ] Jovic D, Liang X, Zeng H, et al. Single-cell RNA sequencing technologies and applications: a brief overview [J]. Clin Transl Med, 2022, 12 ( 3 ) : e694.
- [ 48 ] Lacar B, Linker SB, Jaeger BN, et al. Nuclear RNA-seq of single neurons reveals molecular signatures of activation [J]. Nat Commun, 2016, 7: 11022.
- [ 49 ] Koenitzer JR, Wu HJ, Atkinson JJ, et al. Single-nucleus RNA-sequencing profiling of mouse lung. reduced dissociation bias and improved rare cell-type detection compared with single-cell RNA sequencing [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2020, 63 ( 6 ) : 739-747.
- [ 50 ] Weber C. COVID-19 lung atlas [J]. Nat Cell Biol, 2021, 23 ( 11 ) : 1108.
- [ 51 ] Gupta A, Shamsi F, Altemose N, et al. Characterization of transcript enrichment and detection bias in single-nucleus RNA-seq for mapping of distinct human adipocyte lineages [J]. Genome Res, 2022, 32 ( 2 ) : 242-257.
- [ 52 ] Hu P, Liu J, Zhao JJ, et al. Single-nucleus transcriptomic survey of cell diversity and functional maturation in postnatal mammalian hearts [J]. Genes Dev, 2018, 32 ( 19/20 ) : 1344-1357.
- [ 53 ] Barwinska D, El-Achkar TM, Ferreira RM, et al. Molecular characterization of the human kidney interstitium in health and disease [J]. Sci Adv, 2021, 7 ( 7 ) : eabd3359.
- [ 54 ] Lake BB, Ai RZ, Kaeser GE, et al. Neuronal subtypes and diversity revealed by single-nucleus RNA sequencing of the human brain [J]. Science, 2016, 352 ( 6293 ) : 1586-1590.
- [ 55 ] Conde D, Triozzi PM, Balmant KM, et al. A robust method of nuclei

- isolation for single-cell RNA sequencing of solid tissues from the plant genus *Populus* [J]. *PLoS One*, 2021, 16 ( 5 ) : e0251149.
- [ 56 ] Nandy A, Gangopadhyay S, Mukhopadhyay A. Individualizing breast cancer treatment-The dawn of personalized medicine [J]. *Exp Cell Res*, 2014, 320 ( 1 ) : 1-11.
- [ 57 ] Patel AG, Chen X, Huang X, et al. The myogenesis program drives clonal selection and drug resistance in rhabdomyosarcoma [J]. *Dev Cell*, 2022, 57 ( 10 ) : 1226-1240.e8.
- [ 58 ] Gaublotte JT, Li B, McCabe C, et al. Nuclei multiplexing with barcoded antibodies for single-nucleus genomics [J]. *Nat Commun*, 2019, 10 ( 1 ) : 2907.
- [ 59 ] Hu TS, Chitnis N, Monos D, et al. Next-generation sequencing technologies: an overview [J]. *Hum Immunol*, 2021, 82 ( 11 ) : 801-811.
- [ 60 ] Moldèus P, Rahimtula A. Metabolism of paracetamol to a glutathione conjugate catalyzed by prostaglandin synthetase [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1980, 96 ( 1 ) : 469-475.
- [ 61 ] Fan XY, Tang D, Liao YH, et al. Single-cell RNA-seq analysis of mouse preimplantation embryos by third-generation sequencing [J]. *PLoS Biol*, 2020, 18 ( 12 ) : e3001017.
- [ 62 ] Jayakumar V, Sakakibara Y. Comprehensive evaluation of non-hybrid genome assembly tools for third-generation PacBio long-read sequence data [J]. *Brief Bioinform*, 2019, 20 ( 3 ) : 866-876.
- [ 63 ] Rhoads A, Au KF. PacBio sequencing and its applications [J]. *Genom Proteom Bioinform*, 2015, 13 ( 5 ) : 278-289.
- [ 64 ] Garalde DR, Snell EA, Jachimowicz D, et al. Highly parallel direct RNA sequencing on an array of nanopores [J]. *Nat Methods*, 2018, 15 ( 3 ) : 201-206.
- [ 65 ] De Coster W, De Rijk P, De Roeck A, et al. Structural variants identified by Oxford Nanopore PromethION sequencing of the human genome [J]. *Genome Res*, 2019, 29 ( 7 ) : 1178-1187.
- [ 66 ] Tshiabuila D, Giandhari J, Pillay S, et al. Comparison of SARS-CoV-2 sequencing using the ONT GridION and the Illumina MiSeq [J]. *BMC Genom*, 2022, 23 ( 1 ) : 319.
- [ 67 ] Lu HY, Giordano F, Ning ZM. Oxford nanopore MinION sequencing and genome assembly [J]. *Genom Proteom Bioinform*, 2016, 14 ( 5 ) : 265-279.
- [ 68 ] Jeck WR, Iafrate AJ, Nardi V. Nanopore flongle sequencing as a rapid, single-specimen clinical test for fusion detection [J]. *J Mol Diagn*, 2021, 23 ( 5 ) : 630-636.
- [ 69 ] Quick J, Loman NJ, Duraffour S, et al. Real-time, portable genome sequencing for Ebola surveillance [J]. *Nature*, 2016, 530 ( 7589 ) : 228-232.
- [ 70 ] Byrne A, Beaudin AE, Olsen HE, et al. Nanopore long-read RNAseq reveals widespread transcriptional variation among the surface receptors of individual B cells [J]. *Nat Commun*, 2017, 8: 16027.
- [ 71 ] Abdel-Ghany SE, Hamilton M, Jacobi JL, et al. A survey of the sorghum transcriptome using single-molecule long reads [J]. *Nat Commun*, 2016, 7: 11706.
- [ 72 ] Wang B, Tseng E, Regulski M, et al. Unveiling the complexity of the maize transcriptome by single-molecule long-read sequencing [J]. *Nat Commun*, 2016, 7: 11708.
- [ 73 ] Żmieńko A, Satyr A. Nanopore sequencing and its application in biology [J]. *Postepy Biochem*, 2020, 66 ( 3 ) : 193-204.
- [ 74 ] Wang TT, Wang HY, Cai DW, et al. Comprehensive profiling of rhizome-associated alternative splicing and alternative polyadenylation in moso bamboo (*Phyllostachys edulis*) [J]. *Plant J*, 2017, 91 ( 4 ) : 684-699.
- [ 75 ] Gupta I, Collier PG, Haase B, et al. Single-cell isoform RNA sequencing characterizes isoforms in thousands of cerebellar cells [J]. *Nat Biotechnol*, 2018, 36: 1197-1202.
- [ 76 ] Fededa JP, Petrillo E, Gelfand MS, et al. A polar mechanism coordinates different regions of alternative splicing within a single gene [J]. *Mol Cell*, 2005, 19 ( 3 ) : 393-404.
- [ 77 ] Fagnani M, Barash Y, Ip JY, et al. Functional coordination of alternative splicing in the mammalian central nervous system [J]. *Genome Biol*, 2007, 8 ( 6 ) : R108.
- [ 78 ] Lebrigand K, Magnone V, Barbry P, et al. High throughput error corrected Nanopore single cell transcriptome sequencing [J]. *Nat Commun*, 2020, 11 ( 1 ) : 4025.
- [ 79 ] Eisenstein M. How to make spatial maps of gene activity - down to the cellular level [J]. *Nature*, 2022, 606 ( 7916 ) : 1036-1038.
- [ 80 ] Zhou Y, Jia ET, Pan M, et al. Encoding method of single-cell spatial transcriptomics sequencing [J]. *Int J Biol Sci*, 2020, 16 ( 14 ) : 2663-2674.
- [ 81 ] Vickovic S, Eraslan G, Salmén F, et al. High-definition spatial transcriptomics for *in situ* tissue profiling [J]. *Nat Methods*, 2019, 16 ( 10 ) : 987-990.
- [ 82 ] Rodriques SG, Stickels RR, Goeva A, et al. Slide-seq: a scalable



- technology for measuring genome-wide expression at high spatial resolution [ J ] . Science, 2019, 363 ( 6434 ) : 1463-1467.
- [ 83 ] Nichterwitz S, Chen G, Aguila Benitez J, et al. Laser capture microscopy coupled with Smart-seq2 for precise spatial transcriptomic profiling [ J ] . Nat Commun, 2016, 7: 12139.
- [ 84 ] Chen J, Suo SB, Tam PP, et al. Spatial transcriptomic analysis of cryosectioned tissue samples with Geo-seq [ J ] . Nat Protoc, 2017, 12 ( 3 ) : 566-580.
- [ 85 ] Shah S, Lubeck E, Zhou W, et al. *In situ* transcription profiling of single cells reveals spatial organization of cells in the mouse *Hippocampus* [ J ] . Neuron, 2016, 92 ( 2 ) : 342-357.
- [ 86 ] Eng CL, Lawson M, Zhu Q, et al. Transcriptome-scale super-resolved imaging in tissues by RNA seqFISH [ J ] . Nature, 2019, 568 ( 7751 ) : 235-239.
- [ 87 ] Fang RX, Xia CL, Close JL, et al. Conservation and divergence of cortical cell organization in human and mouse revealed by MERFISH [ J ] . Science, 2022, 377 ( 6601 ) : 56-62.
- [ 88 ] Lee JH, Daugharthy ER, Scheiman J, et al. Highly multiplexed subcellular RNA sequencing *in situ* [ J ] . Science, 2014, 343 ( 6177 ) : 1360-1363.
- [ 89 ] Ke RQ, Mignardi M, Pacureanu A, et al. *In situ* sequencing for RNA analysis in preserved tissue and cells [ J ] . Nat Methods, 2013, 10 ( 9 ) : 857-860.
- [ 90 ] Wang X, Allen WE, Wright MA, et al. Three-dimensional intact-tissue sequencing of single-cell transcriptional states [ J ] . Science, 2018, 361 ( 6400 ) : eaaf5691.
- [ 91 ] Rosenberg AB, Roco CM, Muscat RA, et al. Single-cell profiling of the developing mouse brain and spinal cord with split-pool barcoding [ J ] . Science, 2018, 360 ( 6385 ) : 176-182.
- [ 92 ] Blattman SB, Jiang WY, Oikonomou P, et al. Prokaryotic single-cell RNA sequencing by *in situ* combinatorial indexing [ J ] . Nat Microbiol, 2020, 5 ( 10 ) : 1192-1201.
- [ 93 ] Liu Y, Yang MY, Deng YX, et al. High-spatial-resolution multi-omics sequencing via deterministic barcoding in tissue [ J ] . Cell, 2020, 183 ( 6 ) : 1665-1681.e18.
- [ 94 ] Thomsen ER, Mich JK, Yao ZZ, et al. Fixed single-cell transcriptomic characterization of human radial glial diversity [ J ] . Nat Methods, 2016, 13 ( 1 ) : 87-93.
- [ 95 ] Satija R, Farrell JA, Gennert D, et al. Spatial reconstruction of single-cell gene expression data [ J ] . Nat Biotechnol, 2015, 33 ( 5 ) : 495-502.
- [ 96 ] Srivatsan SR, Regier MC, Barkan E, et al. Embryo-scale, single-cell spatial transcriptomics [ J ] . Science, 2021, 373 ( 6550 ) : 111-117.
- [ 97 ] Chen A, Liao S, Cheng MN, et al. Spatiotemporal transcriptomic atlas of mouse organogenesis using DNA nanoball-patterned arrays [ J ] . Cell, 2022, 185 ( 10 ) : 1777-1792.e21.
- [ 98 ] Wang MY, Hu QN, Lv TH, et al. High-resolution 3D spatiotemporal transcriptomic maps of developing *Drosophila* embryos and larvae [ J ] . Dev Cell, 2022, 57 ( 10 ) : 1271-1283.e4.
- [ 99 ] Xia KK, Sun HX, Li J, et al. The single-cell stereo-seq reveals region-specific cell subtypes and transcriptome profiling in *Arabidopsis* leaves [ J ] . Dev Cell, 2022, 57 ( 10 ) : 1299-1310.e4.
- [ 100 ] McKellar DW, Mantri M, Hinchman MM, et al. Spatial mapping of the total transcriptome by *in situ* polyadenylation [ J ] . Nat Biotechnol, 2022: 1546-1696 ( Electronic ) .
- [ 101 ] Packer JS, Zhu Q, Huynh C, et al. A lineage-resolved molecular atlas of *C. elegans* embryogenesis at single-cell resolution [ J ] . Science, 2019, 365 ( 6459 ) : eaax1971.
- [ 102 ] Tintori SC, Osborne Nishimura E, Golden P, et al. A transcriptional lineage of the early *C. elegans* embryo [ J ] . Dev Cell, 2016, 38 ( 4 ) : 430-444.
- [ 103 ] Qiu XJ, Rahimzamani A, Wang L, et al. Inferring causal gene regulatory networks from coupled single-cell expression dynamics using scribe [ J ] . Cell Syst, 2020, 10 ( 3 ) : 265-274.e11.
- [ 104 ] Trapnell C, Cacchiarelli D, Grimsby J, et al. The dynamics and regulators of cell fate decisions are revealed by pseudotemporal ordering of single cells [ J ] . Nat Biotechnol, 2014, 32 ( 4 ) : 381-386.
- [ 105 ] Bergen V, Lange M, Peidli S, et al. Generalizing RNA velocity to transient cell states through dynamical modeling [ J ] . Nat Biotechnol, 2020, 38 ( 12 ) : 1408-1414.
- [ 106 ] La Manno G, Soldatov R, Zeisel A, et al. RNA velocity of single cells [ J ] . Nature, 2018, 560 ( 7719 ) : 494-498.
- [ 107 ] Bergen V, Soldatov RA, Kharchenko PV, et al. RNA velocity-current challenges and future perspectives [ J ] . Mol Syst Biol, 2021, 17 ( 8 ) : e10282.
- [ 108 ] Qiu XJ, Mao Q, Tang Y, et al. Reversed graph embedding resolves complex single-cell trajectories [ J ] . Nat Methods, 2017, 14 ( 10 ) :

- 979-982.
- [ 109 ] Sulston JE. *Caenorhabditis elegans*: the cell lineage and beyond (Nobel lecture) [ J ] . *Chembiochem*, 2003, 4 ( 8 ) : 688-696.
- [ 110 ] Arnatkeviciūtė A, Fulcher BD, Pocock R, et al. Hub connectivity, neuronal diversity, and gene expression in the *Caenorhabditis elegans* connectome [ J ] . *PLoS Comput Biol*, 2018, 14 ( 2 ) : e1005989.
- [ 111 ] Fernandes Póvoa EE, Ebbing ALP, Betist MC, et al. An optimized dissociation protocol for FACS-based isolation of rare cell types from *Caenorhabditis elegans* L1 larvae [ J ] . *MethodsX*, 2020, 7: 100922.
- [ 112 ] Niu B, Bach TN, Chen XY, et al. Computational modeling and analysis of the morphogenetic domain signaling networks regulating *C. elegans* embryogenesis [ J ] . *Comput Struct Biotechnol J*, 2022, 20: 3653-3666.
- [ 113 ] Wang JJ, Sun HY, Jiang MM, et al. Tracing cell-type evolution by cross-species comparison of cell atlases [ J ] . *Cell Rep*, 2021, 34 ( 9 ) : 108803.
- [ 114 ] Taylor SR, Santpere G, Weinreb A, et al. Molecular topography of an entire nervous system [ J ] . *Cell*, 2021, 184 ( 16 ) : 4329-4347.e23.
- [ 115 ] Seifert M, Schmidt E, Baumeister R. The genetics of synapse formation and function in *Caenorhabditis elegans* [ J ] . *Cell Tissue Res*, 2006, 326 ( 2 ) : 273-285.
- [ 116 ] Ben-David E, Boockvar J, Guo LH, et al. Whole-organism eQTL mapping at cellular resolution with single-cell sequencing [ J ] . *eLife*, 2021, 10: e65857.
- [ 117 ] Sun Y, Yu QC, Li L, et al. Single-cell RNA profiling links ncRNAs to spatiotemporal gene expression during *C. elegans* embryogenesis [ J ] . *Sci Rep*, 2020, 10 ( 1 ) : 18863.
- [ 118 ] Baek S, Lee I. Single-cell ATAC sequencing analysis: from data preprocessing to hypothesis generation [ J ] . *Comput Struct Biotechnol J*, 2020, 18: 1429-1439.
- [ 119 ] Shi PY, Nie YG, Yang JW, et al. Fundamental and practical approaches for single-cell ATAC-seq analysis [ J ] . *aBIOTECH*, 2022, 3 ( 3 ) : 212-223.
- [ 120 ] Satpathy AT, Granja JM, Yost KE, et al. Massively parallel single-cell chromatin landscapes of human immune cell development and intratumoral T cell exhaustion [ J ] . *Nat Biotechnol*, 2019, 37 ( 8 ) : 925-936.
- [ 121 ] Stuart T, Butler A, Hoffman P, et al. Comprehensive integration of single-cell data [ J ] . *Cell*, 2019, 177 ( 7 ) : 1888-1902.e21.
- [ 122 ] Durham TJ, Daza RM, Gevirtzman L, et al. Comprehensive characterization of tissue-specific chromatin accessibility in L2 *Caenorhabditis elegans* nematodes [ J ] . *Genome Res*, 2021, 31 ( 10 ) : 1952-1969.
- [ 123 ] Chen XQ, Litzenburger UM, Wei YN, et al. Joint single-cell DNA accessibility and protein epitope profiling reveals environmental regulation of epigenomic heterogeneity [ J ] . *Nat Commun*, 2018, 9 ( 1 ) : 4590.
- [ 124 ] Mezger A, Klemm S, Mann I, et al. High-throughput chromatin accessibility profiling at single-cell resolution [ J ] . *Nat Commun*, 2018, 9 ( 1 ) : 3647.
- [ 125 ] Lareau CA, Duarte FM, Chew JG, et al. Droplet-based combinatorial indexing for massive-scale single-cell chromatin accessibility [ J ] . *Nat Biotechnol*, 2019, 37 ( 8 ) : 916-924.
- [ 126 ] Hu YJ, An Q, Sheu K, et al. Single cell multi-omics technology: methodology and application [ J ] . *Front Cell Dev Biol*, 2018, 6: 28.
- [ 127 ] Hou Y, Guo HH, Cao C, et al. Single-cell triple omics sequencing reveals genetic, epigenetic, and transcriptomic heterogeneity in hepatocellular carcinomas [ J ] . *Cell Res*, 2016, 26 ( 3 ) : 304-319.
- [ 128 ] Shapiro E, Biezuner T, Linnarsson S. Single-cell sequencing-based technologies will revolutionize whole-organism science [ J ] . *Nat Rev Genet*, 2013, 14 ( 9 ) : 618-630.
- [ 129 ] Vermeesch JR, Voet T, Devriendt K. Prenatal and pre-implantation genetic diagnosis [ J ] . *Nat Rev Genet*, 2016, 17 ( 10 ) : 643-656.
- [ 130 ] da Veiga Beltrame E, Arnaboldi V, Sternberg PW. WormBase single-cell tools [ J ] . *Bioinform Adv*, 2022, 2 ( 1 ) : vbac018.

(责任编辑 张婷婷)