



单细胞核酸组学技术的突破与发展

孙中兴¹, 李卓宁¹, 唐寅¹, 方东^{1,2*}

1. 浙江大学生命科学研究院, 浙江省肿瘤分子细胞生物学重点实验室, 杭州 310058

2. 浙江大学医学院附属第二医院肿瘤内科, 教育部癌症预防与干预重点实验室, 杭州 310058

* 联系人, E-mail: dfang@zju.edu.cn

收稿日期: 2025-04-16; 接受日期: 2025-05-21; 网络版发表日期: 2025-06-06

摘要 细胞异质性是驱动多细胞系统实现功能分化、精度调控和环境适应的基础。群体水平测序将细胞信号平均处理, 难以揭示个体差异, 掩盖关键亚群与调控变化过程。单细胞组学技术可以在单细胞水平获取多种组学信息, 使细胞状态的真实多样性得以被精确解析。目前单细胞技术已从转录组扩展至表观组、空间组及多组学整合。本文梳理了近年来建立的单细胞测序技术, 并主要介绍不同技术取得的突破与创新。

关键词 细胞异质性, 单细胞组学, 转录组, 表观组, 空间组学

即使处于相同微环境中, 不同细胞因其在转录活性、表观修饰等内在分子特征的差异而呈现出多种命运选择。深入理解这类“个体内差异”现象, 是解析细胞命运决定机制、揭示疾病发生本质及重建发育路径的关键。传统的高通量测序技术提升了研究人员获取细胞内分子信息的能力, 促进了对细胞调控网络的系统理解。然而, 该类技术通常基于大量细胞的混合分析, 其结果反映的是群体的平均信号, 难以捕捉单个细胞个体之间的真实差异, 限制了对细胞异质性的精确理解。

为突破这一限制, 科研界普遍认为需要将单个细胞“作为独立样本”进行精准分析。围绕该目标, 研究人员建立了一系列单细胞组学技术, 为探索细胞异质性提供了重要的技术手段。当前单细胞组学技术聚焦于两个核心问题: 一是如何对每个细胞来源的分子进行准确追踪, 即细胞编码; 二是在极其有限的分子起

始量下, 高效地获取有效信息。前者通过不同的细胞编码策略(如单细胞单独反应或多轮随机编码)实现单细胞身份的区分, 后者则依赖于文库构建流程的优化, 尽可能捕捉细胞内丰度极低的分子信息。围绕这两方面的不断突破, 单细胞组学从最初的转录组拓展至如今的表观基因组、空间组及多组学整合体系, 在揭示细胞异质性的分子机制方面提供了更多维度以及更系统的解析方案。

1 单细胞转录组测序

单细胞转录组测序(single-cell RNA sequencing, scRNA-seq)是一种通过分析单个细胞内的转录组信息, 以揭示细胞异质性、发育轨迹及疾病机制的关键技术。2009年研究人员首次完成了八个小鼠囊胚 scRNA-seq^[1], 标志着该技术的初步建立。其依赖于两

引用格式: 孙中兴, 李卓宁, 唐寅, 等. 单细胞核酸组学技术的突破与发展. 中国科学: 生命科学, 2025, 55: 1087–1107

Sun Z X, Li Z N, Tang Y, et al. Advances and breakthroughs in single-cell nucleic acid omics (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2025, 55: 1087–1107, doi: 10.1360/SSV-2025-0107

个关键方向的突破: 一是反转录环节的优化, 研究者通过改善反转录过程或反转录酶从而实现在微量mRNA(messenger RNA)起始浓度下, 稳定获得高质量的cDNA(complementary DNA); 二是文库扩增流程的优化, 尤其是降低了PCR(polymerase chain reaction)导致的扩增偏倚, 提升了文库的均一性. 该项工作首次验证了scRNA-seq的可行性, 也为后续scRNA-seq技术的发展奠定了基础. 早期scRNA-seq中, 研究者多采用分选单细胞到单管中进行单独反应实现细胞编码过程, 例如口吸管分选或FACS(fluorescence activated cell sorting)的方式. Smart-seq(switching mechanism at 5' end of RNA template sequencing)^[2]通过带有条形码的引物对单细胞进行单独反应从而实现细胞编码过程. 优化后的Smart-seq2^[3]在反转录过程中使用了模板转换引物(template switching oligo, TSO), 提升了反转录的效率. 在这一过程中, 研究者利用M-MLV(moloney murine leukemia virus reverse transcriptase)反转录酶在到达mRNA 5'端会形成带有三个胞嘧啶(CCC)结构的特点, 设计了含有3个核糖鸟苷(rGrGrG)的TSO接头与其结合并延伸, 在不依赖接头连接的情况下完成cDNA 5'端接头添加, 从而获取了全长转录本. 此外, Smart-seq2还使用甜菜碱以及热循环反转录的方式提高了cDNA扩增的效率, 并结合Tn5转座酶建库机制, 实现了文库构建流程的实质性简化. 为避免PCR指数扩增中会造成的重复序列对测序结果的影响, mcSCR-seq(single-cell RNA barcoding and sequencing)^[4]在引物中引入了UMI(unique molecular identifier)序列, 为每个原始mRNA分子赋予唯一标签, 从而在数据分析中有效去除PCR重复, 提高表达量的准确性. scRNA-seq实验流程中基于FACS的方法往往通量有限, 且对分选精度与试剂质量要求较高, 从而导致实验成本较高, 此类方法适用于对少量样品深入解析的小规模研究.

在不牺牲检测灵敏度的前提下, 为降低设备依赖性 & 试剂消耗量, 研究人员建立了一系列微孔板平台的单细胞测序技术, 例如CytoSeq^[5], Seq-Well^[6]和Microwell-Seq(microwell-based single-cell RNA sequencing)^[7]等. 这些技术采用稳定性较好的材料形成仅有一个细胞大小的微孔阵列实现单细胞之间的物理隔离. 此外, 通过尺寸与微孔阵列精确匹配的条形码磁珠, 高效地完成单细胞编码过程. 这类方法的优势在于操作流程简单, 不依赖专门的设备分选细胞. 然而,

其固有的局限性较为明显, 例如, 不同细胞类型需要匹配不同尺寸微孔板, 同时磁珠捕获效率、细胞沉积效率等因素仍影响整体文库质量.

为进一步提升通量并降低成本, Drop-seq(droplet-based single-cell RNA sequencing)^[8]与inDrop(indexing droplets)^[9]等基于微流控平台技术构建的“油包水”液滴微反应体系, 将细胞、条形码磁珠与反应液封装于微米级油滴中, 在每个油滴里形成独立的反应体系. 这种方式在高通量捕获细胞的同时实现细胞编码过程. 其优势在于反应体积极小、试剂消耗低、操作自动化程度高, 可在较低成本下实现上万个细胞的并行分析, 广泛应用于组织发育、疾病微环境及免疫系统研究. 进一步发展出的PIP-seq(particle-templated instant partition sequencing)^[10]则采用乳化振荡替代微流控芯片的方式形成液滴结构, 在保留高通量特性的前提下同时避免了对昂贵设备的依赖, 进一步降低了使用门槛和总体成本.

尽管微孔板与微流控的方式提升了scRNA-seq单细胞分选的通量与灵敏度, 但仍依赖将细胞物理隔离的设备与操作平台. 为了突破这一瓶颈, 研究者提出了“分选-混合”(split-pool)的细胞编码方式: 先将少量的细胞在独立管中单独反应(split), 通过带有条形码的引物进行cDNA一链合成, 完成第一次的细胞编码过程. 而后将细胞混合(pool), 混合之后再次将细胞分选在独立管中进行cDNA第二链合成, 同时使用不同的条形码对细胞进行第二轮编码. 通过多轮条形码叠加的方式, 最终使每一个单细胞具有唯一的条形码组合. 代表方法如SPLiT-seq(split pool ligation-based single-cell transcriptome sequencing)^[11], sci-RNA-seq(single-cell combinatorial indexing RNA sequencing)^[12]以及sci-RNA-seq3^[13]等.

随着技术的不断演进, 细胞编码策略与不同新兴技术相融合. 例如, RevGel-seq(reverse emulsion gel-based single-cell RNA sequencing)^[14]通过水凝胶物理隔离单细胞, 预示着未来scRNA-seq有望与材料工程融合发展, 进一步拓展新的反应平台. scifi-RNA-seq(single-cell combinatorial fluidic indexing RNA sequencing)^[15]将“分选-混合”策略与微流控融合, 使测序通量达到百万级, 同时保持较低成本, 为超高通量的scRNA-seq研究提供了有效的技术手段.

在scRNA-seq中, 测序数据的准确性不仅依赖于

精确的细胞编码过程, 转录本信息的准确、高效获取同样至关重要. 根据对转录本不同区域的捕获方式, scRNA-seq文库构建策略大致可分为3'端测序、5'端测序与全长转录本测序三类. 其中, 3'端测序技术如 Drop-seq^[8], inDrop^[9], STRT-seq(single-cell tagged reverse transcription sequencing)^[16]等, 具有流程简洁、适用于高通量操作等特点. 此类技术通常采用带有不同条形码的oligo(dT)的引物捕获mRNA 3'端, 在反转录过程的同时完成细胞编码过程. 5'端测序方法包括C1 CAGE(C1 single-cell cap analysis of gene expression)^[17], scBCR-seq(single cell B cell receptor sequencing)^[18], FIPRESCI(fluorescence imaging-based parallel RNA and epitope single-cell identification)^[19]等, 此类方法能够保留并扩增mRNA 5'端结构, 适用于启动子区域的分析^[19]. 然而, 5'端测序方式对文库构建流程与模板完整性要求较高, 故而适用范围相对较小. 全长转录本测序方式则以Smart-seq系列为代表, 在检测灵敏度和覆盖率上实现了提升, 但其仅能检测含poly(A)的mRNA并且需要较高质量的RNA. 为突破poly(A)依赖所带来的物种与转录本类型局限, 研究者使用了基于随机引物的文库构建方式, 如SUPeR-seq(single-cell universal poly(A)-independent RNA sequencing)^[20], snRandom-seq(droplet-based snRNA sequencing technology)^[21]和snHH-seq(high-throughput and high-sensitivity single-nucleus total RNA sequencing)^[22]. 这些技术可兼容多种RNA类型同时维持了较高的扩增效率. MATQ-seq(multiple annealing and dC-tailing-based quantitative single-cell RNA-seq)^[23]进一步融合随机引物与oligo(dT)引物, 并结合MALBAC(multiple annealing and looping-based amplification cycles)线性扩增方式, 在提升转录本多样性的同时, 有效降低了PCR所产生的非特异扩增, 增强了文库的均一性. RamDA-seq(random displacement amplification sequencing)^[24]通过设计特异性的“非随机引物”, 靶向覆盖mRNA上多种保守结构区域, 实现超过10 kb长转录本的完整扩增, 适用于复杂RNA结构研究. 此外, 基于探针杂交的策略如snPATHO-seq(single-cell pathology sequencing)^[25]虽在特定应用(如病理样本)中具有优势, 但其在覆盖范围与信号一致性方面不及随机引物类技术. 在早期scRNA-seq文库构建过程中, 双链cDNA反转录后常

通过机械剪切或酶切方式打断. 例如, CEL-Seq(cell encapsulation sequencing)^[26], CEL-seq2^[27]与MARS-seq(multiplexed amplification and restriction-based sequencing)^[28]采用T7 RNA聚合酶介导的体外转录策略, 以线性扩增提高特异性. 近年来, 使用Tn5转座酶直接作用于cDNA/mRNA杂交链的方式, 如SHERRY(sequential hybridization enabled RNA recovery and sequencing)^[29], 可在完成cDNA一链合成后直接建库, 显著简化流程并提升了建库灵敏度.

随着scRNA-seq技术的日趋成熟, 研究者的关注重点逐渐从静态转录组拓展至转录动态过程的解析以及向非真核系统中的适用性. 例如, scGRO-seq(single-cell genome-wide RNA orientation sequencing)^[30]在细胞裂解后引入标记性核苷(如Br-UTP)进行体外延伸反应, 仅标记处于活跃转录状态的RNA聚合酶, 从而捕获新生RNA转录本. NASC-seq(new transcriptome alkylation-dependent single-cell RNA sequencing)^[31]通过在活细胞状态下加入4sU标记物提高了对新生转录本检测的灵敏度与准确性. 进一步地, 研究者开始突破对转录层面的依赖, 尝试在单细胞尺度上实现对翻译过程的解析. scRibo-seq(single-cell ribosome sequencing)^[32]通过结合核酸酶切位保护、小RNA文库构建以及片段长度富集等步骤, 将整个流程整合为一步反应, 显著提高了现有核糖体检测技术的灵敏度和可扩展性, 从而实现了单细胞中翻译活跃区域的定位与检测. Ribo-lite(low-input Ribo-seq)^[33]则引入Tn5酶辅助的文库构建策略, 显著简化了单细胞核糖体检测的实验流程, 同时提升了检测的灵敏度与通量. 上述方法为单细胞层面的翻译调控研究提供了新的技术路径与研究视角.

相较于真核细胞, 细菌和其他微生物的细胞尺寸更小、RNA总量少且缺乏poly(A)等特征^[34]. 针对这些挑战, BaSiC-RNA-seq(bacterial single-cell RNA sequencing)^[35], PETRI-seq(prokaryotic expression profiling by tagging RNA *in situ* and sequencing)^[36], ProBac-seq(probe-based bacterial sequencing)^[37], smRandom-seq(droplet-based high-throughput single-microbe RNA-seq assay)^[38]这些技术广泛采用如甲醇或乙醇的预固定处理方式, 可以在保持RNA完整性的前提下渗透细胞壁, 配合酶解或热裂解的方式实现高效的RNA释放, 同时随机引物的使用可以捕获大量非poly(A)特

性RNA分子, 从而实现了细菌或微生物的单细胞测序.

综上所述, scRNA-seq技术已从最初的低通量、依赖专用设备的小规模方法, 发展为多样化、高通量、适应多类细胞与RNA类型的平台体系(表1). 未来的发展方向将持续聚焦于通量提升、流程简化、非poly(A) RNA检测及转录动态与翻译过程的解析, 推动其在多样生物系统中的广泛应用与深度探索.

表 1 单细胞转录组测序技术

Table 1 Catalog of single-cell RNA-seq

技术名称	单细胞检测到基因数	检测通量	适用范围
CytoSeq	1000~2000	数千个细胞	3'转录本测序
Seq-Well			
Microwell-Seq	1000~2000	数万个细胞	3'转录本测序
Drop-seq	1000~2500	数千到数万个细胞	3'转录本测序
RevGel-seq	1000~3000	数万个细胞	3'转录本测序
InDrop	1000~4000	数万个细胞	3'转录本测序
PIP-seq			
SPLiT-seq	1000~7000	数十万个细胞	3'转录本测序
sci-RNA-seq	1000~6000	数万个细胞	3'转录本测序
STRT-seq	3000~7000	数十到数百个细胞	3'转录本测序
sci-RNA-seq3	5000~8000	数百万个细胞	3'转录本测序
scifi-RNA-seq			
C1 CAGE	3000~5000	数百个细胞	5'转录本测序
FIPRESCI	2000~5000	数十万个细胞	5'转录本测序
scBCR-seq (B细胞受体检测)	1000~5000	数万个细胞	5'转录本测序
Tang' 2009, Smart-seq	2000~5000	数十个细胞	全长转录本测序
CEL-Seq			
Smart-seq2	3500~9000	数百个细胞	全长转录本测序
mcSCRB-seq			
SUPeR-seq	6000~10000	数百个细胞	全长转录本测序
MATQ-seq			
MARS-seq, SHERRY	1000~3000	数千个细胞	全长转录本测序
CEL-seq2	3000~5000	数千个细胞	全长转录本测序
RamDA-seq	7000~12000	数千个细胞	全长转录本测序
snRandom-seq	3000~6000	数千到数万个细胞	全长转录本测序
snHH-seq			
snPATHO-seq	2000~4000	数百个细胞	新生RNA检测
NASC-seq			
scGRO-seq	1000~3000	数千个细胞	新生RNA检测
scRibo-seq, Ribo-lite	1000~3000	数千个细胞	翻译组测序
BaSiC-RNA-seq	1000~3500	数千个细胞	细菌转录本测序
PETRI-seq			
ProBac-seq	2000~6000	数十万个细胞	细菌转录本测序
smRandom-seq			

2 单细胞表观基因组测序技术

表观基因组包括DNA甲基化、染色质可及性、组蛋白修饰以及三维基因组构象等多种层面的调控机制, 在细胞异质性调控中发挥了重要作用. 然而在细胞中, 表观基因组信号通常存在丰度低、信噪比差、结合能力弱以及分子拷贝数少等特点^[39]. 因此, 如何在

单细胞分辨率下准确获取这些微弱信号, 成为解析细胞异质性调控机制的关键问题. 早期研究者采用了一管式(one-tube)实验策略, 通过减少洗脱和转管的次数, 降低由静电吸附作用导致的核酸样品损耗, 完成了少量或者微量的表观修饰信息检测^[40]. 此后, 随着细胞编码策略以及Tn5转座酶的使用, 单细胞表观基因组检测方式不断演进, 最终建立了多种单细胞表观基因组的检测方式.

2.1 单细胞DNA甲基化测序技术

DNA甲基化是重要的表观遗传修饰形式之一, 通常指胞嘧啶第5位碳原子形成5-甲基胞嘧啶(5-methylcytosine, 5mC). 5mC主要富集在启动子区域, 其甲基化状态常与转录沉默等密切相关^[41]. 早期甲基化检测主要依赖亚硫酸氢盐将未甲基化的胞嘧啶转化为尿嘧啶. 然而这一过程会造成DNA降解导致检测效率低. 为克服这一难题, 研究人员建立了在亚硫酸氢盐处理后再连接接头的PBAT(post-bisulfite adaptor tagging)方法^[42], 有效避免了亚硫酸氢盐反应过程中接头序列降解带来的检测效率低的问题. 代表性方法, 如scBS-seq(single-cell bisulfite sequencing)^[43]通过在亚硫酸氢盐打断DNA后进行多轮扩增, 并在3'端加上测序接头, 实现了单细胞的全基因组甲基化检测. 然而多轮扩增带来了大量引物二聚体污染, 影响文库质量与数据准确性. 为优化这一过程, snmC-seq(single nucleus methylated cytosine sequencing)^[44]与snmC-seq2^[45]进一步引入随机引物以及进行线性扩增的方式, 降低引物二聚体干扰同时提高了检测灵敏度. 尽管如此, PBAT系列方法通常需要全基因组深度测序, 导致测序成本较高. 为提升效率与成本控制, 研究者发展了基于限制性酶切与亚硫酸盐转换结合的RRBS(reduced representation bisulfite sequencing)策略^[46], 在此基础上通过一管式实验流程建立的scRRBS(single-cell reduced representation bisulfite sequencing)^[47]减少了DNA转移带来的损耗. 后续如QRRBS(quantitative RRBS)^[48]通过引入UMI标记机制改善了扩增准确性. MscRRBS(multiplexed single-cell reduced representation bisulfite sequencing)^[49]与scTAM-seq(single-cell targeted analysis of the methylome)^[50]结合甲基化敏感性酶切与条形码策略, 在保持特异性的同时进一步降低了建库成本.

为了从根本上避免亚硫酸氢盐处理带来的DNA

降解, Cabernet(carrier-assisted base-conversion by enzymatic reaction with end-tagging)^[51]技术引入胞苷脱氨酶, 该酶可以特异识别未甲基化的胞嘧啶并将其转化为尿嘧啶, 而5mC因其含有甲基修饰, 不会成为该酶的底物, 从而实现甲基化位点的区分^[52]. Cabernet的实验过程中还结合了Tn5转座酶进行细胞编码, 同时在DNA产物纯化过程中加入了载体DNA(carrier DNA)从而减少了纯化过程中DNA的损耗. 该方法提升了检测的灵敏度与数据完整性, 甚至可以具备检测稀有的5hmC(5-hydroxymethylcytosine)的能力.

综上, 单细胞甲基化检测技术正朝着更高通量、更低损耗及非破坏性标记方向发展, 逐步拓展可检测的修饰类型与基因组覆盖范围(表2).

2.2 单细胞染色质可及性测序技术

染色质可及性反映了染色质结构的开放程度, 决定了转录因子、增强子与启动子等调控元件之间发生物理接触的可能性. 细胞间或细胞群体内部染色质可及性的差异, 是驱动细胞异质性的重要机制之一. 传统的染色质可及性检测方式, 如DNase-seq^[53]或MNase-seq^[54,55]依赖对细胞固定与酶切处理, 流程复杂难以应用在单细胞体系. 转折点出现在Tn5转座酶的广泛应用. Tn5转座酶可以精确识别染色质开放区域的同时实现基因组打断以及测序接头连接. 基于Tn5转座酶建立的染色质可及性检测方法, 如scATAC-seq(single-cell assay for transposase-accessible chromatin sequencing)^[56]技术成为单细胞染色质可及性分析的主流方式, 其可以结合多种细胞分选策略, 如微流控或分选-混合等^[57,58], 实现大规模细胞染色质可及性检测. 为获得更丰富的染色质开放结构信息, scNanoATAC-seq(single-cell assay for transposase-accessible chromatin on Nanopore sequencing platform)^[59]进一步将scATAC-seq与纳米孔测序平台相结合, 能够在单细胞水平下直接获取染色质的开放区域的长片段信息. 在此基础上, 结合更高效的细胞分选以及更精确的细胞编码方式建立的scNanoATAC-seq2^[60], 进一步提升了测序数据质量与检测通量. 该方法不仅减少了细胞损失, 还提升特异信号检测与空间定位能力, 为理解染色质构象、调控元件和单细胞异质性提供了高分辨率数据支持.

综上所述, 单细胞染色质可及性技术正朝着高通

表 2 单细胞DNA甲基化测序技术

Table 2 Catalog of single-cell DNA methylation sequencing

技术名称	检测甲基化位点数	检测通量	适用范围
scBS-seq	单细胞约100万	数百个细胞	DNA甲基化
scRRBS	单细胞100万~200万	数百个细胞	DNA甲基化
MscRRBS	单细胞约40万	数百个细胞	DNA甲基化
snmC-seq	单细胞约40万	数百个细胞	DNA甲基化
snmC-seq2	单细胞200万~400万	数千到上万个细胞	DNA甲基化
scTAM-seq (特定位点检测)	单细胞约650~1000个特定位点	数万个细胞	DNA甲基化
Cabernet	共约800万~1000万	数百至数千个细胞	DNA甲基化 (5mC, 5hmC)

量、高分辨率与多维信息融合方向发展(表3)。新一代方法通过结合长读长测序、精准细胞编码与空间定位, 不仅拓展了可检测区域范围, 也显著提升了对复杂调控结构的解析能力。

2.3 单细胞蛋白染色质结合位点检测技术

蛋白质与染色质的结合位点通过特定蛋白、组蛋白修饰或转录因子的调控, 影响染色质的可塑性和基因表达活性, 在细胞异质性的形成与维持过程中发挥着关键作用^[61]。然而, 蛋白质与染色质的结合在基因组中分布稀疏、信号强度弱、与染色质的结合时间短且亲和力低等特点, 导致其在单细胞水平的检测面临较大技术挑战。传统的检测方式依赖ChIP-seq(chromatin immunoprecipitation sequencing), 该方法需经甲醛交联、基因组打断、抗体免疫富集以及同源重组的接头连接方式等步骤, 这些过程往往效率较低而且测序背景较高, 因此ChIP-seq实验需要大量的细胞^[39,62]。

为解决样本损耗大与建库灵敏度低的问题, 研究者早期建立了STAR ChIP-seq(small-scale TELP-assisted rapid ChIP-seq)^[40]。该方法采用一管式实验流程, 将所有反应集中在一个管中, 最大程度减少洗脱和转管的次数, 从而降低了样品的损耗。同时STAR ChIP-seq采用TELP(tailing extension ligation and PCR)建库的方式, 在DNA 3'末端添加多聚T尾(poly-dT)或多聚A尾(poly-dA), 避免了接头连接的干扰, 提高建库灵敏度与扩增效率, 实现了在少量细胞(~200个左右)的组蛋白修饰检测。与此类似的, Stacc-seq(small-scale Tn5-assisted chromatin cleavage with sequencing)^[63]通过将不同抗体与带有不同条形码的pA/G-Tn5预先组装, 并

采用一管式的实验方式, 避免了样品DNA损失的同时提高了检测的信号强度。为进一步实现单细胞水平的组蛋白修饰检测, 科研人员不断优化实验流程, itChIP-seq(indexing and tagmentation-based ChIP-seq)^[64]采用Tn5转座酶在打断基因组的同时完成接头插入, 克服了传统接头反应效率低下的问题, 简化了整体实验流程提高了实验效率完成了单细胞组蛋白修饰的检测。

在传统以ChIP为基础的组蛋白修饰检测实验中, 基因组超声破碎或酶切常导致低亲和力的蛋白-DNA复合物解聚, 造成有效信号丢失。虽然甲醛交联可以避免这一问题, 但其交联效率低, 而且会引入非特异蛋白, 进而导致有效信号捕获率下降且测序背景噪声升高。为克服这一难题, 研究者建立了原位免疫酶切技术。该技术通过温和的方式裂解细胞膜, 保留了细胞核的完整性, 在蛋白-DNA相互作用的天然状态下进行抗体富集。随后使用protein A-MNase融合蛋白, 利用protein A与抗体Fc区域结合的能力, 定向引导MNase对抗体识别区域异性切割^[65], 此类相关技术如scChIC-seq(single-cell chromatin immunocleavage sequencing)^[66], uli-CUT&RUN(ultra-low-input cleavage under targets and release using nuclease)^[67], iscChIC-seq(indexing single-cell immunocleavage sequencing)^[68]等。这些技术避免了甲醛交联, 在高效完成样品处理以及文库构建的同时, 提高了检测的灵敏度与准确性并有效降低了测序的背景噪声。近年来, 新建立的技术将protein A/G与Tn5转座酶相融合, 实现了抗体结合、基因组打断与接头连接的同步操作, 进一步提高了文库的一致性与检测灵敏度^[69], 代表性技术如scCUT&-

Tag(single-cell cleavage under targets and tagmentation)^[70], ACT-seq(antibody-guided chromatin tagmentation sequencing)^[71]以及CoBATCH(combinatorial barcoding and targeted chromatin release)^[72]. TACIT(targeted accessibility and chromatin interaction tracking)^[73]则结合甲醇固定与一管式的实验方式, 进一步提升了抗体富集的效果与检测的准确性.

转录因子是基因表达调控的核心之一, 其在染色质中的结合位点对细胞命运决定与功能维持具有关键作用. 然而, 与组蛋白修饰相比, 转录因子在基因组中的结合位点更为稀疏, 且结合强度较弱, 因而对检测方法的灵敏度和特异性提出了更高要求. 为实现单细胞层面的转录因子结合位点检测, 研究者在已有组蛋白修饰检测策略的基础上, 进一步优化了抗体富集流程、基因组打断体系以及文库扩增方法, 发展出一系列具有转录因子检测能力的单细胞测序技术. 例如, sciTIP-seq(single-cell combinatorial indexing targeted insertion of promoters sequencing)^[74]在抗体识别目标位点后, 于邻近基因组区域插入T7启动子, 通过体外转录代替传统的PCR扩增步骤, 实现了对结合区域的线性扩增, 从而显著提升检测灵敏度. 该方法结合“分选-混合”的细胞编码策略, 实现了高通量、低背景的单细胞转录因子结合位点检测. 此外, FOODIE(footprinting with deaminase)^[75]方法用脱氨酶将细胞基因

组DNA上胞嘧啶直接转化为尿嘧啶, 在PCR扩增和二代测序后检测为胸腺嘧啶, 而转录因子结合位点内的胞嘧啶不会被转化, 从而实现了转录因子接近核苷酸的高分辨率检测. 该方法在降低背景噪声的同时提高了对低丰度转录因子的检测能力.

综上所述, 单细胞水平下的蛋白-DNA结合检测技术正向更高通量、更高灵敏度及适应不同蛋白类型(组蛋白修饰与转录因子)的方向发展(表4). 通过抗体富集策略、基因组打断方式和线性扩增体系的不断优化, 相关技术在低丰度靶向检测等方面实现了关键突破.

2.4 单细胞三维基因组检测技术

染色质空间三维结构是调控基因表达的重要结构基础, 涵盖拓扑相关结构域、A/B区室及染色体间互作等多层级三维结构. 不同细胞之间在染色质空间折叠方式上的差异, 驱动了细胞功能多样性以及异质性的形成^[76]. Hi-C(high-throughput chromosome conformation capture)技术是在全基因组范围检测染色质相互作用的主要方式^[77]. 而单细胞Hi-C(single-cell high-through chromosome conformation capture, scHi-C)技术则面临两个核心挑战: 首先, 染色质互作事件本身在空间中呈现低频、瞬时且高度随机的特性, 导致信号稀疏, 常规交联反应效率低并伴随显著的非特异性背景;

表 3 单细胞染色质可及性测序技术

Table 3 Catalog of single-cell chromatin accessibility sequencing technologies

技术名称	单细胞检测唯一测序片段数量	检测通量	适用范围
scATAC-seq	~5000个峰	数百个细胞	染色质可及性
scNanoATAC-seq	2000~7000个峰	数千个细胞	染色质可及性
scNanoATAC-seq2	3000~10000个峰	数千个细胞	染色质可及性

表 4 单细胞蛋白染色质位点检测技术

Table 4 Catalog of single-cell protein-chromatin interaction profiling sequence technologies

技术名称	单细胞检测唯一测序片段数量	检测通量	适用范围
uli-CUT&RUN	数千个峰	数十个细胞	蛋白染色质定位
ACT-seq, scChIC-seq	2000~8000个峰	数百个细胞	蛋白染色质定位
iscChIC-seq	1000~4000个峰	数千个细胞	蛋白染色质定位
CoBATCH, TACIT	2000~6000个峰	数千个细胞	蛋白染色质定位
scCUT&Tag	数千到数万个峰	数千个细胞	蛋白染色质定位
sciTIP-seq	5000~30000个峰	数千个细胞	蛋白染色质定位(转录因子)
FOODIE	数千个峰	数万个细胞	蛋白染色质定位(转录因子)

其次,文库构建过程中有效信息的扩增效果差,制约了测序的数据质量^[78].为应对上述挑战,早期scHi-C^[79]技术在细胞核内进行染色质交联、限制性内切酶切、生物素标记等步骤,随后将细胞核通过口吸管分选到单管中进行细胞编码,这种方式提高了空间信息的准确性和特异性.然而,这种方式依赖生物素亲和富集片段化DNA,这一过程常因亲和力不足导致DNA片段的回收效率低,限制了文库的复杂度.为简化流程并提升文库丰富度,snHi-C(single-nucleus Hi-C)^[80]在酶切打断后直接进行建库分析,省略了片段富集环节,从而提升了检测的丰度.然而这种方式需要大量的测序数据的支撑,无形之中增加了实验成本. Dip-C(diploid chromatin conformation capture)^[81]创新性地采用含有多重条形码的Tn5转座酶,实现了在切割染色质的同时完成接头引入.这种方式提升了文库丰富度与基因组比对率,并且简化了实验流程、降低了测序成本.在通量提升方面,scSPRITE(single-cell split-pool recognition of interactions by tag extension)^[82]采用“分选-混合”的细胞编码方式,实现了对上千个单细胞染色质互作事件的高分辨率、高覆盖度的全基因组染色质结构信息.

不同于全基因组检测染色质三维结构的Hi-C技术,ChIA-PET(chromatin interaction analysis by paired-end tag sequencing)^[83]在研究与特定蛋白质相关的功能性染色质互作方面具有更高分辨率.该技术可以在多细胞水平上,通过ChIP富集与目标蛋白结合的DNA片段,而后原位连接空间邻近的片段,接着完成去交联、蛋白去除和DNA提取,利用MmeI酶切并获得包含“tag-linker-tag”结构的配对末端标签,可精确解析3D染色质结构中的转录因子结合位点与功能性互作关系.近年来,基于微流控平台发展的ChIA-Drop(chromatin interaction analysis via droplet-based and barcode-linked sequencing)^[84]能够在单分子精度解析多重

染色质互作.

综上所述,单细胞染色质三维结构研究正朝着高通量、高分辨率与特异性互作检测方向发展(表5).新技术通过优化细胞编码、简化建库流程及引入条形码策略,不仅拓展了空间互作信息的覆盖范围,也显著提升了对功能性染色质结构的解析能力.

3 单细胞核酸多组学测序技术

细胞命运的决定与异质性的建立是一个涉及多层次、动态调控的复杂生物学过程.其调控网络覆盖表观遗传修饰、转录活性动态变化及蛋白质相互作用等多个层面.传统单组学测序技术虽可揭示某一特定层面的分子机制,但难以还原多组学间的相互调控关系.在此背景下,如何高效且准确地分离这些信息,是单细胞多组学分析的核心问题之一^[85,86].对细胞编码的过程也逐渐演化为区分单个细胞的同时区分单个细胞中不同的遗传信息.

3.1 单细胞表观遗传多组学技术

单细胞表观组学技术通过整合DNA甲基化、染色质可及性、染色质结合蛋白和三维染色质结构等多层分子信息,为解析细胞异质性形成过程中的分子驱动机制提供了有效的技术手段.近年来,随着实验方法与建库策略的持续更新,研究人员建立了多种单细胞多组学测序技术,逐步实现了多个表观维度与转录状态的信息的同步获取.

针对DNA甲基化与转录组的多组学研究,scMT-seq(simultaneous single-cell methylome and transcriptome sequencing)^[87]通过裂解细胞后手动分离细胞核,从而将同一细胞中的DNA与mRNA分别提取并构建相应文库,实现了单细胞层面上甲基化与转录组信息的同步获取. Smart-RRBS(Smart reduced representation

表5 单细胞蛋白染色质位点检测技术

Table 5 Catalog of single-cell protein-chromatin interaction profiling sequence technologies

技术名称	单细胞检测染色质互作信息数量	检测通量	适用范围
scHi-C	数千到数万对	数百个细胞	三维基因组
Dip-C	数万到数十万对	数十个细胞	三维基因组
scSPRITE	数千对	数千个细胞	三维基因组
ChIA-Drop (特定蛋白质)	数千个特定互作信息	数千个细胞	三维基因组

bisulfite sequencing)^[88]进一步引入还原性限制性内切酶与UMI标记策略,提升了对CpG位点的覆盖度与准确性. scTrio-seq2(single-cell triple omics sequencing)^[89]则整合了基因表达、拷贝数变异和DNA甲基化信息,实现了单细胞中三种组学数据检测的一致性与灵敏度. 基于DNA甲基化酶能够识别开放染色质区域的特性,研究者们将其用于染色质可及性与DNA甲基化检测同步检测,从而建立了多种单细胞多组学技术,例如, scCOOL-seq(chromatin overall omic-scale landscape sequencing)^[90]和scNOMeRe-seq(single-cell nucleosome occupancy, methylome and RNA expression sequencing)^[91]等. 随着技术的进步,进一步发展出如 scChARM-seq(single-cell chromatin accessibility, RNA barcoding, and DNA methylation sequencing)^[92]和 snmCAT-seq(single-nucleus methylcytosine, chromatin accessibility, and transcriptome sequencing)^[93]等联合检测方法,可在单细胞中同时获取DNA甲基化与染色质开放程度. 在scNMT-seq(single-cell nucleosome, methylation and transcription sequencing)^[94]中,研究者分别处理DNA与RNA: DNA部分依次经GpC甲基转移酶处理、亚硫酸盐转化与建库,分别获得CpG甲基化与染色质可及性信息; RNA采用Smart-seq2方式建库,实现转录组信息获取. 该方法实现了在单细胞中同时检测DNA甲基化、染色质可及性与基因表达三个组学层面的研究.

然而,由于CpG甲基化酶依赖特定的甲基化位点,而且在亚硫酸氢盐处理过程中会导致DNA降解,所以上述方法在检测染色质可及性方面上仍有很大进步空间. Tn5转座酶可以有效识别染色质开放区域,其广泛使用增加了染色质可及性检测的准确性. 基于Tn5转座酶, Sci-CAR-seq(Sci-CAR effectively combines sci-ATAC sequencing)^[95]通过微孔板物理隔离单细胞,并在温和条件下裂解细胞的方式. 实验过程中对染色质开放区域使用Tn5转座酶进行细胞编码,通过“分选-混合”方式对转录组信息进行细胞编码,成功实现了对染色质开放区域与转录活性的联合分析. 然而Sci-CAR-seq常伴有组学之间的交叉污染. 为了克服这个问题, SHARE-seq(single-cell high-throughput ATAC and RNA expression sequencing)^[96]在酶切后引入链霉素和素磁珠富集转录本,实现了转录本信息与染色质可及性信息的分离,降低了组学之间的数据污染,提高了

信息获取的准确性与灵敏度. SNARE-seq(single-nucleus chromatin accessibility and mRNA expression sequencing)^[97]与ISSAAC-seq(*in situ* sequencing hetero RNA-DNA-hybrid after assay for transposase-accessible chromatin-sequencing)^[98]结合微流控或原位编码体系,进一步推动了该类方法的进展.

组蛋白修饰作为调控染色质状态与转录活性的关键机制,是多组学整合的重要维度. CoTECH(combinatorial target enrichment and chromatin hybridization)^[99]和Paired-tag(parallel analysis of individual cells for RNA expression and DNA from targeted tagmentation by sequencing)^[100]通过pA/G-Tn5转座酶酶切或“分选-混合”的细胞编码策略,实现了转录组与表观基因组信息的同步获取. scSET-seq(single-cell same cell epigenome and transcriptome sequencing)^[101]则在同一单细胞内完成核质分离,对转录组与表观基因组分别建库分析,实现在同一单细胞中获得两种组学信息的获取. scPCOR-seq(single-cell profiling of chromatin occupancy and RNAs sequencing)^[102]通过使用pA-MNase同样实现了同一细胞中组蛋白修饰与细胞核转录组信息的获取. 研究者们通过将带有不同条形码的pA/G-Tn5与特异性抗体预先组装,建立了如CUT&Tag2for1^[103], Multi-Tag(multiple target identification by tagmentation)^[104]和CoTACIT(combined TACIT)^[73]等单细胞多种组蛋白修饰同步检测方式. Nano-CUT&Tag(nano-body-based single-cell CUT&Tag)^[105]结合10x Genomics进一步提高了单细胞中检测多种组蛋白修饰的通量. 类似的方式还有NTT-seq(nanobody-tethered transposition followed by sequencing)^[106]和uCoTarget(ultra-high-throughput combined tagmenting enrichment for multiple epigenetic proteins in the same cells)^[107]等. 这些技术均实现了在单细胞内同时检测多种组蛋白修饰.

除组蛋白修饰的分析外, ScDam&T-seq(single-cell DNA adenine methylation and transcription sequencing)^[108]和EpiDamID(epigenetic DNA adenine methyltransferase identification)^[109]技术利用Dam甲基转移酶与目标蛋白结合,在其结合的染色质区域引入甲基化修饰,同时进行转录组建库,实现了蛋白-DNA互作与转录组信息的同步获取. 这些技术的出现,进一步拓宽了我们对细胞内表观遗传调控机制的理解.

染色质的三维空间构象直接影响基因调控元件之间的接触概率, 参与基因表达调控. ScMethyl-HiC(single-cell Methyl-HiC)^[110]和snm3C-seq(single-nucleus methyl-3C sequencing)^[111]将Hi-C与DNA甲基化测序相结合, 实现了在单细胞水平上对染色质互作与DNA甲基化的联合分析. HiRES(Hi-C and RNA-seq employed simultaneously)^[112]在流程上融合了Hi-C交联、限制性酶切、接头连接与反转录流程, 首次在同一细胞中联合获取染色质三维互作信息与表达谱数据, 为构建空间调控网络提供了技术支持. ChIATAC(chromatin interaction analysis with Tn5-assisted chromatin accessibility)^[113]进一步将ChIA-PET的原位连接机制与Tn5转座酶标记结合, 实现了染色质互作与染色质可及性的联合分析. ChAIR(chromatin accessibility interaction and RNA expression)^[114]技术则通过液滴微流控平台整合染色质可及性、三维基因组结构及基因表达信息, 可在单次实验中获取十万级别的单细胞多组学数据, 为解析三维表观基因组如何参与调控转录提供了高通量、高分辨率的研究工具.

综上, 单细胞多组学技术正持续突破信息整合、通量提升与检测维度拓展的瓶颈, 逐步实现DNA甲基化、染色质可及性、蛋白结合、空间构象与转录活动的同步解析, 为揭示细胞命运决定与表观调控机制提供强大工具与系统性视角(表6).

3.2 CRISPR筛选与基因表达或者染色质可及性的联合检测

CRISPR(clustered regularly interspaced short palin-

dromic repeats)技术为基因组学研究提供了精准、高效的干预手段. 将其与单细胞测序技术相结合, 扩展了对基因调控与表型关系的解析深度. 通过在单细胞水平追踪基因编辑引发的多组学层面的分子变化, 研究者可更系统地构建CRISPR干扰与表型变化之间的直接联系, 推动精准功能注释、调控网络重构与疾病机制解析的发展^[115].

CRISPR技术通常依赖特定序列的单向导RNA(single guide RNA, sgRNA). 研究者通过分析确定细胞内转入的sgRNA序列, 从而建立表型与CRISPR干扰之间联系. 早期技术主要聚焦于在高通量CRISPR筛选与单细胞转录组测序, 构建基因干扰与转录表达的对应关系. 例如CROP-seq(CRISPR droplet sequencing)^[116]将sgRNA序列嵌入可转录的3'端非编码区(3'UTR)结构, 使其在转录组建库时直接被捕获, 简化了sgRNA识别与表达信息整合流程. 该技术可与10x Genomics平台兼容, 显著提升通量. Perturb-seq^[117]则在sgRNA序列框架中加入条形码标签, 结合高通量微流控平台, 实现了CRISPR扰动与基因表达的大规模分析. 随着CRISPR筛选体系的成熟, 研究者进一步将其与单细胞表观组学整合, 探索CRISPR干扰对染色质结构的直接调控作用. 典型方法如Perturb-ATAC(perturbation-indexed assay for transposase-accessible chromatin using sequencing)^[118]在CRISPR基础上进行单细胞ATAC-seq测序, 通过读取染色质开放区域与sgRNA信息, 能够获取CRISPR扰动对染色质可及性的影响. Spear-ATAC^[119]通过优化sgRNA条形码的设计, 提高了检测效率与细胞通量. CRISPR-sciATAC(single-cell pertur-

表6 单细胞核酸多组学测序技术

Table 6 Catalog of single-cell nucleic acid multi-omics sequencing technologies

技术名称	检测通量	适用范围
scMT-seq, Smart-RRBS	数十到数百个细胞	转录组与DNA甲基化
scCOOL-seq scNOMeRe-seq	数十到数百个细胞	染色质可及性与DNA甲基化
CUT&Tag2for1, MulTI-Tag CoTACIT, Nano-CUT&Tag NTT-seq, uCoTarget	数百到数千个细胞	多种蛋白染色质结合位点
scSET-seq, Paired-tag scPCOR-seq, CoTECH ScDam&T-seq, EpiDamID	数百到数千个细胞	蛋白染色质结合位点与转录组
Sci-CAR-seq, SHARE-seq SNARE-seq, ISSAAC-seq	数万个细胞	染色质可及性与转录组
scChARM-seq, scNMT-seq	数百个细胞	染色质可及性、DNA甲基化与转录组
snmCAT-seq	数千个细胞	染色质三维结构、DNA甲基化与转录组

bations with an accessibility read-out using scATAC-seq)^[120]进一步融合“分选-混合”细胞编码方式,显著提高了检测通量,为大规模检测提供了有力支撑。

综上,CRISPR与单细胞组学技术的融合,正在由转录层面的扰动检测拓展至染色质可及性等多组学维度(表7)。实现了基因功能解析的系统化、精准化与高通量化,为揭示复杂调控网络与疾病机制提供了强大工具。

4 空间组学技术的发展与演进

空间组学是一类将分子组学信息与组织空间位置相结合的技术,能够在组织中原位解析基因表达和调控元件的空间分布特征。相比传统组学技术,空间组学无需组织解离,能在保持组织结构完整性的基础上,提供细胞状态与微环境之间的空间关联信息,已广泛应用于发育、肿瘤、神经及免疫等研究领域^[85,121]。

近年来,空间组学的发展经历了从成像到测序、从组织水平到单细胞分辨率的不断演进。早期的空间原位杂交技术通过特异性探针靶向标记核酸,并通过荧光成像获取组织中的分子空间分布,具有高分辨率但通量有限^[122]。随后,结合一代测序发展的空间原位测序技术,可在组织切片中直接获取分子序列和位置信息,提高了检测通量^[123]。随着高通量测序平台的普及与发展,研究者建立了空间显微切割测序技术,通过显微切割感兴趣的区域,并结合组学测序分析,提升了空间解析精度与特异性^[78]。近年来,通过借鉴单细胞测序中的条形码策略,发展出空间条形码标记技术。该类方法通过在玻片上预设具有空间坐标信息的条形码,从而实现组织中分子的空间位置标记与信息捕获,该策略的分辨率已接近至亚细胞水平,推动了空间组学的高通量和高精度发展^[124]。本章将重点围绕空间显微切割测序以及空间条形码标记介绍相关技术的发展与突破。

4.1 空间原位显微切割技术

空间原位显微切割技术是最早实现空间定位与高通量测序相结合的空间组学方法之一。其核心原理是通过激光显微切割精确分离感兴趣区域将组织制备为切片,随后对这些区域进行RNA提取和测序。这一策略实现了空间信息的保留与分子数据获取的初步融

表 7 CRISPR筛选与基因表达或者染色质可及性测序技术
Table 7 Catalog of CRISPR screening with gene expression or chromatin accessibility profiling

技术名称	检测通量	适用范围
Perturb-ATAC	数千个细胞	CRISPR扰动与染色质可及性
CROP-seq, Perturb-seq	数万个细胞	CRISPR扰动与转录本
Spear-ATAC CRISPR-sciATAC	数万个细胞	CRISPR扰动与染色质可及性

合,为后续空间组学技术的发展奠定了基础。代表性方法如Tomo-seq(transcriptome tomography sequencing)^[125]通过对组织进行连续切片并逐层测序,成功构建了斑马鱼胚胎的三维转录组图谱。为进一步提升空间分辨率并解析组织中细胞异质性,研究者将显微切割与单细胞RNA测序技术结合,发展出多种高精度空间转录组方法。其中,immuno-LCM-RNAseq(immuno-laser capture microdissection coupled with RNA sequencing)^[126]引入了免疫标记步骤,通过特异性抗体标记特定细胞类型后,结合激光切割精确提取目标细胞群体进行RNA测序。这种策略提高了对组织中稀有细胞或功能特异性细胞的空间识别能力,适用于研究细胞类型特异性空间表达模式。与此类似的STRP-seq(spatial transcriptomics by reoriented projections and sequencing)^[127]采用甲醛固定的组织切片,提升了样本处理的稳定性与实验的实用性,进一步拓展了显微切割技术在实际应用中的适用性。

除了物理切割方法,基于光激活区域标记的策略也为空间定位提供了更为灵活的解决方案。TIVA-tag(transcriptome *in vivo* analysis)^[128]通过在组织中特定区域中引入光敏探针,实现更加精细的mRNA空间特异性捕获,PIC(photo-isolation chemistry)^[129]采用类似机制,也可实现精细的空间表达数据采集。ZipSeq^[130]则通过在单个细胞上引入空间条形码,为单细胞级别的空间定位提供了更高分辨率的编码能力。

4.2 条形码原位标记技术

条形码原位标记技术是一种在组织切片中预设具有空间坐标信息的条形码序列,从而实现对组织特定分子的原位捕获与空间信息编码的策略,是当前空间转录组研究中应用最广泛的技术体系之一。

条形码原位标记技术最早可追溯至2016年。研究

者们首次提出了空间转录组技术(spatial transcriptomics, ST), 该技术在玻片表面铺设已知序列的引物阵列, 通过反转录赋予组织中的mRNA空间位置信息^[124], 首次实现了转录组与空间位置信息的同时获取。空间转录组技术的核心在于如何在玻片上预设带有空间信息的条形码引物。随着技术的发展, 研究者通过优化条形码在玻片上的合成方式(如密度控制、排列精度提升和随机编码策略), 不断提高空间分辨率, 使得空间定位更加精细、信号获取更加准确。为了突破分辨率瓶颈, Slide-seq^[131]技术引入了直径约10 μm 的带有空间条形码的磁珠, 并将其高密度铺设于玻片上。当组织切片置于其上后, 磁珠可就近捕获扩散的mRNA, 将空间分辨率提升至细胞亚层级。其后续版本Slide-seqV2^[132]在磁珠单位面积上通过连接更多条形码以及延长oligo(dT)长度提高了mRNA分子捕获的特异性, 增强了测序灵敏度。HDST(high-definition spatial transcriptomics)^[133]进一步缩小磁珠尺寸, 将空间分辨率提升至约2 μm , 实现亚细胞级别的空间定位。10x Genomics公司在原本的Visium基础上进一步建立了Visium HD^[134], 将分辨率由原来的100 μm 提升至2 μm 。同时Visium HD使用了规则阵列条形码组合, 相较于HDST使用的随机阵列的条形码组合, 其定位更精确, 数据结构更标准。但是, 基于磁珠的方式在分辨率提升的同时常面临测序通量与空间均匀性的权衡问题。为兼顾分辨率、操作灵活性与多组学扩展能力, 研究者提出了基于微流控芯片辅助的空间条形码策略DBiT-seq(deterministic barcoding in tissue for spatial omics sequencing)^[135]。该方法通过在玻片的XY轴方向分别设置宽度约10 μm 的微流控通道, 将带有不同条形码的液体在组织表面交叉注入并对mRNA进行原位连接, 在组织原位上构建二维空间坐标系。该方法不仅简化了实验流程, 同时提升了空间标定的稳定性与分辨率。值得一提的是, DBiT-seq可在条形码注入液中加入抗体, 实现对转录组与蛋白质组的同时检测, 拓展了空间多组学的研究能力。Pixel-seq(polony-indexed library-sequencing)^[136]则采用DNA聚合酶催化反应, 将条形码序列信息固定在弹性体交联的聚丙烯酰胺凝胶表面, 并通过“印章式”方式将条形码结构直接转印至组织切片。该方法大幅度降低了成本, 并提高了条形码阵列制作的一致性和效率。华大基因建立的Stereo-seq(spatial enhanced resolution omics-sequen-

cing)^[137]技术, 实现了分辨率与成像面积的进一步突破方面。该技术采用DNA纳米球作为条形码载体, 通过将超高密度阵列化的DNA纳米球铺设于玻片上, 构建大规模空间条形码网络。该技术不仅将空间分辨率提升至目前已报道的最高水平(约500 nm), 同时具备大视野成像能力, 适用于大组织样本的全景空间分析。

综上, 空间原位显微切割技术则依赖激光切割精确提取特定区域, 适用于高精度空间表达分析。条形码原位标记技术通过在组织切片中预设空间编码, 实现对分子的原位捕获与定位, 具备高通量、可扩展、多组学兼容等优势; 两类技术在分辨率、通量与检测精度方面不断取得突破, 推动空间组学迈向更高维度的综合解析(表8)。

4.3 空间多组学技术

空间多组学技术通过在空间坐标系统中整合不同组学层级(基因组、表观基因组、转录组、蛋白质组、翻译组和代谢组)数据, 推动了“中心法则”向“时空中心法则”的转变^[85]。

空间基因组技术通过原位成像或测序手段, 在空间背景下解析染色质结构、DNA序列及其调控状态。Hi-M(high-throughput imaging of multiplexed oligopaint FISH)^[138]基于原位多重荧光杂交, 结合高分辨率成像, 在单细胞水平实现染色体三维构象与转录活性位点的空间共定位。其核心在于以荧光探针标记多个DNA区域, 通过高分辨显微成像还原三维染色质结构, 并关联其转录功能。Slide-DNA-seq^[139]在Slide-seq平台基础上, 通过在磁珠上附加能够捕获基因组DNA片段的寡核苷酸, 实现组织切片贴附后DNA的原位捕获与空间编码, 最终通过测序获得DNA序列的空间分布图谱。

空间表观组技术是将染色质状态信息(如开放性 or 特定修饰)原位捕获并赋予空间位置信息。MER-FISH(multiplexed error-robust fluorescence *in situ* hybridization)^[140]通过荧光成像识别染色质修饰的空间分布。随着高通量测序技术的发展, 以测序为核心的空间表观组方法提供了更丰富的分子信息。Spatial-ATAC-seq(spatially resolved chromatin accessibility profiling of tissue sections using next-generation sequencing)^[141]通过将带有不同条形码的Tn5转座酶预先组装, 并通过微流控通道注入组织切片中, 使其原位插入至开放染色质区域, 实现了同时获取染色质可及性和

表 8 空间转录组技术发展

Table 8 Catalog of spatial transcriptomics technologies

技术名称	检测精度	适用范围
Tomo-seq	组织级	空间转录组
immuno-LCM-RNAseq STRP-seq	组织级或单细胞级	空间转录组
TIVA-tag, PIC, ZipSeq Slide-seq, Slide-seqV2 HDST, Visium HD DBiT-seq	单细胞级	空间转录组
Pixel-seq, Stereo-seq	分子或亚细胞级	空间转录组

空间位置信息. Spatial CUT&Tag(spatially resolved cleavage under targets and tagmentation)^[142]进一步结合抗体识别与pA-Tn5转座酶,能够对特定表观修饰位点进行原位识别与空间编码. MISAR-seq(microfluidic indexing-based spatial assay for transposase-accessible chromatin and RNA-sequencing)^[143]在此基础上结合 Spatial-ATAC与空间转录组流程,利用微流控同时递送Tn5与mRNA结合的条形码,捕获开放染色质同时记录区域内mRNA表达,实现了染色质可及性与基因表达的空间联合建图,是表观组与转录组空间多组学融合的代表性技术.

空间蛋白质组技术通常借助带有不同条形码的抗体,通过杂交或扩增实现蛋白质的空间定位与定量. Stereo-CITE-seq^[144]可同时捕获组织内mRNA与蛋白表达的空间信息. 与之类似的, Spatial-CITE-seq(spatial co-indexing of transcriptomes and epitopes for multi-omics mapping by highly parallel sequencing)^[145]也可以完成蛋白-转录双组学空间信息获取. RIBOmap(ribosome-bound mRNA mapping)^[146]为当前少数实现空间翻译组学分析的方法之一. 其原理是在组织切片中,通过抗体富集核糖体并结合原位反转录实现空间位置编码,将翻译活跃区域的空间信息记录并测序,实现转录-翻译结合的空间信息解析. 空间代谢组学通过结合成像质谱与空间编码,实现对代谢物的空间解析. SEAM(spatial single nuclear metabolomics)^[147]技术在组织原位释放代谢物后进行编码,结合质谱成像记录其空间分布. ScSpaMet(single cell spatially resolved metabolic)^[148]则将单细胞代谢检测能力与空间信息整合,通过微区分析与代谢探针嵌合,将代谢活动与组织结构对齐,揭示代谢状态与局部环境的相互作用.

综上,空间多组学技术通过整合多层组学信息与高精度空间定位手段,实现了多组学联合解析(表9). 其不断突破精度与整合能力,帮助研究者对复杂组织功能、细胞状态及调控网络的系统理解,推动“中心法则”向“时空中心法则”的深化演进.

5 总结与展望

单细胞组学技术的发展历程经历了从“如何识别每一个细胞”到“如何精准获取其多层次分子信息”的不断突破. 已由最初的转录组扩展至表观组学、空间组学和多组学整合,构建起对细胞状态、功能与调控网络的系统性理解. 在技术不断发展过程中主要围绕两个核心问题: 一是如何准确标记每一个细胞,实现高通量、高特异性的细胞编码过程; 二是如何在极微量的起始材料中稳定获取高质量、多维度的分子信息. 需要说明的是,本文的关注重点在于单细胞组学技术本身的原理、策略与技术演化过程,而非具体生物学应用,旨在为技术体系的系统理解与方法优化提供清晰框架(图1).

在细胞编码方式上,单细胞组学技术从起初依赖物理分选单个细胞建立独立反应的低通量模式^[1],逐渐过渡到微孔板^[5,6]与微流控^[9,57]分选的中高通量,随后“分选-混合”^[13,95]的细胞编码方式再次提升了单次实验中可并行分析的细胞数量. 新一代编码方式日益趋于模块化、低成本、自动化,正在打破样本、组织和设备的限制.

与此同时,微量信息获取也经历了从最初依赖PCR的大量扩增,到优化反转录反应与线性扩增的发

表 9 空间多组学技术

Table 9 Catalog of spatial multi-omics technologies

技术名称	检测精度	适用范围
Spatial-ATAC-seq	单细胞级	空间染色质可及性
Spatial CUT&Tag	单细胞级	空间表观基因组
MISAR-seq	单细胞级	染色质可及性与空间转录本
Stereo-CITE-seq	亚细胞级	空间转录本与空间蛋白质组
SEAM	亚细胞级	空间代谢组
scSpaMet	亚细胞级	空间代谢组与空间蛋白质组
Hi-M, Slide-DNA-seq	分子级	空间基因组与空间转录本
MERFISH	分子级	空间染色质结构
RIBOmap	分子级	空间翻译组

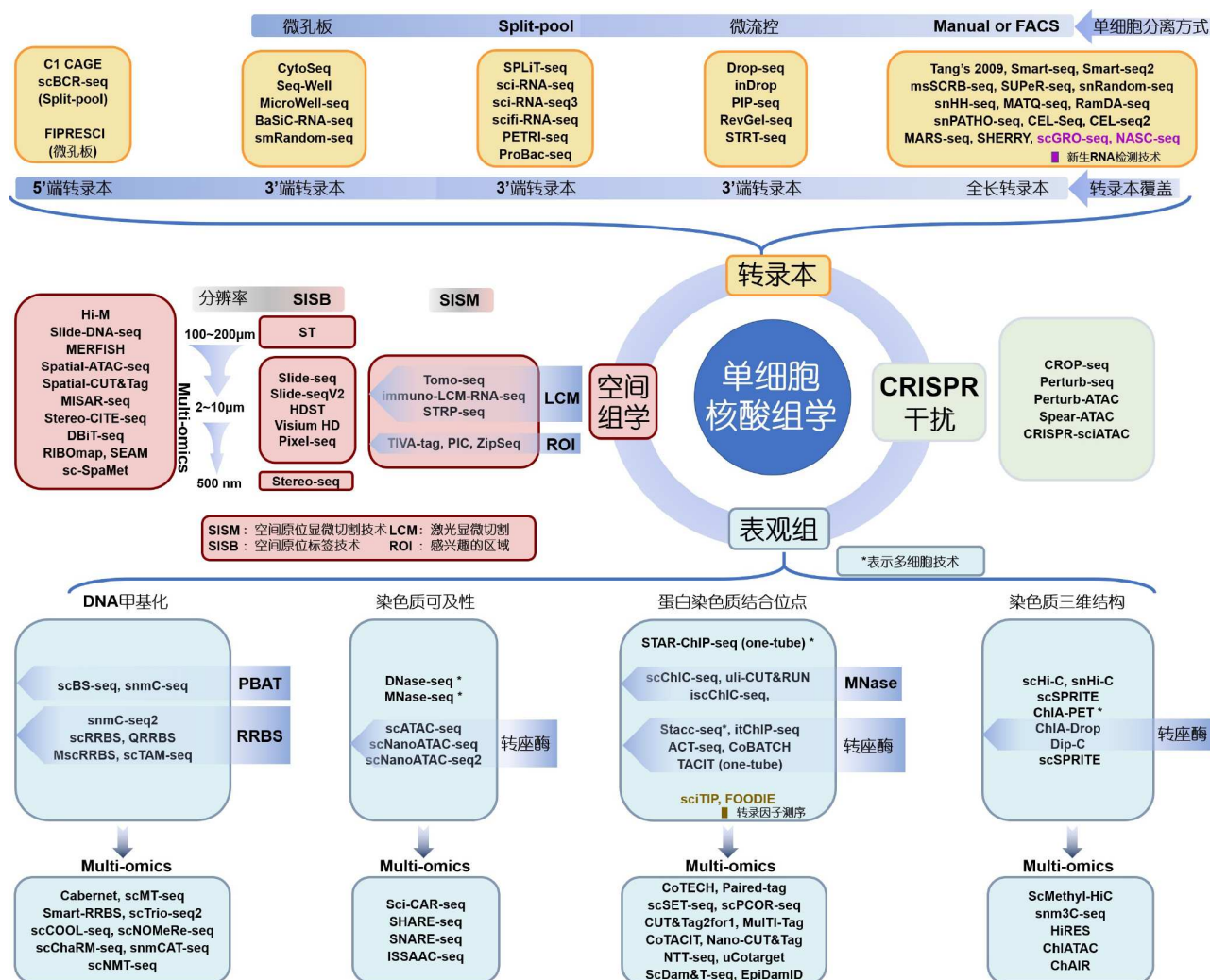


图 1 单细胞核酸组学技术
Figure 1 Single-cell nucleic acid omic technologies

展。尤其是Tn5转座酶的引入, 对单细胞组学技术起到了极大的推动作用, 它不仅提高了文库构建效率, 还可以广泛用于染色质可及性检测、蛋白染色质定位和三维基因组结构鉴定等多个体系, 成为连接转录、表观、三维结构的重要酶学工具, 显著提升了对微量信息的获取能力。

在空间组学方向, 相关技术经历了从原位杂交和显微切割的开始阶段, 逐渐发展出空间条形码体系, 推动空间组学的分辨率从百微米级跃升至亚细胞尺度。目前空间组学技术不再局限于表达图谱的可视化, 而是融合转录、表观、蛋白乃至代谢等多组学层面, 构建出具有空间背景的多模态分子图谱, 并且这一趋

势已从二维切片扩展至三维重建, 并朝向动态监测的方向发展。

未来单细胞组学技术的演进方向将从扩展细胞通量和组学维度, 进一步迈向单分子分辨率的信息捕获与细胞动态过程的精准解析。在“单细胞单分子信息获取”层面, 技术目标是实现对每一个核酸或蛋白分子的定性、定量与空间定位。无需扩增的直接测读技术(如纳米孔测序、原位质谱或单分子荧光), 叠加高保真的单分子标记技术, 从而实现对细胞内全部分子的原位识别。

在“单分子动态信息解析”方面, 当前技术尚难捕捉分子的合成、转运、修饰与降解等过程的动态变

化。未来亟需构建具有动态标记能力的编码策略, 引入可记录分子状态变化的方法, 并结合实时成像或活细胞单分子探针, 实现对关键调控事件追踪。上述技术的融合将推动单细胞组学从结构化图谱构建迈向动态过程解析, 使我们得以在单细胞、单分子、时间序列

三维空间中还原生命活动的真实状态。

综上所述, 单细胞与空间组学正从“表达图谱”走向“调控网络”, 从“静态观察”走向“空间-时间动态成图”。多组学、多维度、高通量的测序框架将深度驱动我们对生命系统的结构、功能与演化的全面理解。

参考文献

- 1 Tang F, Barbacioru C, Wang Y, et al. mRNA-Seq whole-transcriptome analysis of a single cell. *Nat Methods*, 2009, 6: 377–382
- 2 Ramsköld D, Luo S, Wang Y C, et al. Full-length mRNA-Seq from single-cell levels of RNA and individual circulating tumor cells. *Nat Biotechnol*, 2012, 30: 777–782
- 3 Picelli S, Björklund Å K, Faridani O R, et al. Smart-seq2 for sensitive full-length transcriptome profiling in single cells. *Nat Methods*, 2013, 10: 1096–1098
- 4 Bagnoli J W, Ziegenhain C, Janjic A, et al. Sensitive and powerful single-cell RNA sequencing using mcSCR-seq. *Nat Commun*, 2018, 9: 2937
- 5 Fan H C, Fu G K, Fodor S P A. Combinatorial labeling of single cells for gene expression cytometry. *Science*, 2015, 347: 1258367
- 6 Gierahn T M, Wadsworth Ii M H, Hughes T K, et al. Seq-Well: portable, low-cost RNA sequencing of single cells at high throughput. *Nat Methods*, 2017, 14: 395–398
- 7 Han X, Wang R, Zhou Y, et al. Mapping the mouse cell atlas by Microwell-Seq. *Cell*, 2018, 172: 1091–1107.e17
- 8 Macosko E Z, Basu A, Satija R, et al. Highly parallel genome-wide expression profiling of individual cells using nanoliter droplets. *Cell*, 2015, 161: 1202–1214
- 9 Klein A M, Mazutis L, Akartuna I, et al. Droplet barcoding for single-cell transcriptomics applied to embryonic stem cells. *Cell*, 2015, 161: 1187–1201
- 10 Clark I C, Fontanez K M, Meltzer R H, et al. Microfluidics-free single-cell genomics with templated emulsification. *Nat Biotechnol*, 2023, 41: 1557–1566
- 11 Rosenberg A B, Roco C M, Muscat R A, et al. Single-cell profiling of the developing mouse brain and spinal cord with split-pool barcoding. *Science*, 2018, 360: 176–182
- 12 Cao J, Packer J S, Ramani V, et al. Comprehensive single-cell transcriptional profiling of a multicellular organism. *Science*, 2017, 357: 661–667
- 13 Cao J, Spielmann M, Qiu X, et al. The single-cell transcriptional landscape of mammalian organogenesis. *Nature*, 2019, 566: 496–502
- 14 Komatsu J, Cico A, Poncin R, et al. RevGel-seq: Instrument-free single-cell RNA sequencing using a reversible hydrogel for cell-specific barcoding. *Sci Rep*, 2023, 13: 4866
- 15 Datlinger P, Rendeiro A F, Boenke T, et al. Ultra-high-throughput single-cell RNA sequencing and perturbation screening with combinatorial fluidic indexing. *Nat Methods*, 2021, 18: 635–642
- 16 Islam S, Kjällquist U, Moliner A, et al. Characterization of the single-cell transcriptional landscape by highly multiplex RNA-seq. *Genome Res*, 2011, 21: 1160–1167
- 17 Kouno T, Moody J, Kwon A T J, et al. C1 CAGE detects transcription start sites and enhancer activity at single-cell resolution. *Nat Commun*, 2019, 10: 360
- 18 Goldstein L D, Chen Y J J, Wu J, et al. Massively parallel single-cell B-cell receptor sequencing enables rapid discovery of diverse antigen-reactive antibodies. *Commun Biol*, 2019, 2: 304
- 19 Li Y, Huang Z, Zhang Z, et al. FIPRESCI: Droplet microfluidics based combinatorial indexing for massive-scale 5'-end single-cell RNA sequencing. *Genome Biol*, 2023, 24: 70
- 20 Fan X, Zhang X, Wu X, et al. Single-cell RNA-seq transcriptome analysis of linear and circular RNAs in mouse preimplantation embryos. *Genome Biol*, 2015, 16: 148
- 21 Xu Z, Zhang T, Chen H, et al. High-throughput single nucleus total RNA sequencing of formalin-fixed paraffin-embedded tissues by snRandom-seq. *Nat Commun*, 2023, 14: 2734

- 22 Chen H, Fang X, Shao J, et al. Pan-cancer single-nucleus total RNA sequencing using snHH-Seq. [Adv Sci](#), 2024, 11: 2304755
- 23 Sheng K, Cao W, Niu Y, et al. Effective detection of variation in single-cell transcriptomes using MATQ-seq. [Nat Methods](#), 2017, 14: 267–270
- 24 Hayashi T, Ozaki H, Sasagawa Y, et al. Single-cell full-length total RNA sequencing uncovers dynamics of recursive splicing and enhancer RNAs. [Nat Commun](#), 2018, 9: 619
- 25 Wang T, Roach M J, Harvey K, et al. snPATHO-seq, a versatile FFPE single-nucleus RNA sequencing method to unlock pathology archives. [Commun Biol](#), 2024, 7: 1340
- 26 Hashimshony T, Wagner F, Sher N, et al. CEL-Seq: single-cell RNA-Seq by multiplexed linear amplification. [Cell Rep](#), 2012, 2: 666–673
- 27 Hashimshony T, Senderovich N, Avital G, et al. CEL-Seq2: sensitive highly-multiplexed single-cell RNA-Seq. [Genome Biol](#), 2016, 17: 77
- 28 Jaitin D A, Kenigsberg E, Keren-Shaul H, et al. Massively parallel single-cell RNA-Seq for marker-free decomposition of tissues into cell types. [Science](#), 2014, 343: 776–779
- 29 Di L, Fu Y, Sun Y, et al. RNA sequencing by direct tagmentation of RNA/DNA hybrids. [Proc Natl Acad Sci USA](#), 2020, 117: 2886–2893
- 30 Mahat D B, Tippens N D, Martin-Rufino J D, et al. Single-cell nascent RNA sequencing unveils coordinated global transcription. [Nature](#), 2024, 631: 216–223
- 31 Hendriks G J, Jung L A, Larsson A J M, et al. NASC-seq monitors RNA synthesis in single cells. [Nat Commun](#), 2019, 10: 3138
- 32 VanInsberghe M, van den Berg J, Andersson-Rolf A, et al. Single-cell Ribo-seq reveals cell cycle-dependent translational pausing. [Nature](#), 2021, 597: 561–565
- 33 Xiong Z, Xu K, Lin Z, et al. Ultrasensitive Ribo-seq reveals translational landscapes during mammalian oocyte-to-embryo transition and pre-implantation development. [Nat Cell Biol](#), 2022, 24: 968–980
- 34 Westermann A J, Vogel J. Cross-species RNA-seq for deciphering host-microbe interactions. [Nat Rev Genet](#), 2021, 22: 361–378
- 35 Wang J, Chen L, Chen Z, et al. RNA-seq based transcriptomic analysis of single bacterial cells. [Integr Biol](#), 2015, 7: 1466–1476
- 36 Blattman S B, Jiang W, Oikonomou P, et al. Prokaryotic single-cell RNA sequencing by *in situ* combinatorial indexing. [Nat Microbiol](#), 2020, 5: 1192–1201
- 37 McNulty R, Sritharan D, Pahng S H, et al. Probe-based bacterial single-cell RNA sequencing predicts toxin regulation. [Nat Microbiol](#), 2023, 8: 934–945
- 38 Xu Z, Wang Y, Sheng K, et al. Droplet-based high-throughput single microbe RNA sequencing by smRandom-seq. [Nat Commun](#), 2023, 14: 5130
- 39 Wen L, Tang F. Recent advances in single-cell sequencing technologies. [Precis Clin Med](#), 2022, 5: pbac002
- 40 Zhang B, Zheng H, Huang B, et al. Allelic reprogramming of the histone modification H3K4me3 in early mammalian development. [Nature](#), 2016, 537: 553–557
- 41 Liu F, Wang Y, Gu H, et al. Technologies and applications of single-cell DNA methylation sequencing. [Theranostics](#), 2023, 13: 2439–2454
- 42 Miura F, Enomoto Y, Dairiki R, et al. Amplification-free whole-genome bisulfite sequencing by post-bisulfite adaptor tagging. [Nucleic Acids Res](#), 2012, 40: e136
- 43 Smallwood S A, Lee H J, Angermueller C, et al. Single-cell genome-wide bisulfite sequencing for assessing epigenetic heterogeneity. [Nat Methods](#), 2014, 11: 817–820
- 44 Luo C, Keown C L, Kurihara L, et al. Single-cell methylomes identify neuronal subtypes and regulatory elements in mammalian cortex. [Science](#), 2017, 357: 600–604
- 45 Luo C, Rivkin A, Zhou J, et al. Robust single-cell DNA methylome profiling with snmC-seq2. [Nat Commun](#), 2018, 9: 3824
- 46 Chan M M, Smith Z D, Egli D, et al. Mouse ooplasm confers context-specific reprogramming capacity. [Nat Genet](#), 2012, 44: 978–980
- 47 Guo H, Zhu P, Wu X, et al. Single-cell methylome landscapes of mouse embryonic stem cells and early embryos analyzed using reduced representation bisulfite sequencing. [Genome Res](#), 2013, 23: 2126–2135
- 48 Wang K, Li X, Dong S, et al. Q-RRBS: a quantitative reduced representation bisulfite sequencing method for single-cell methylome analyses. [Epigenetics](#), 2015, 10: 775–783
- 49 Gaiti F, Chaligne R, Gu H, et al. Epigenetic evolution and lineage histories of chronic lymphocytic leukaemia. [Nature](#), 2019, 569: 576–580
- 50 Bianchi A, Scherer M, Zaurin R, et al. scTAM-seq enables targeted high-confidence analysis of DNA methylation in single cells. [Genome Biol](#), 2022, 23: 229
- 51 Cao Y, Bai Y, Yuan T, et al. Single-cell bisulfite-free 5mC and 5hmC sequencing with high sensitivity and scalability. [Proc Natl Acad Sci USA](#),

- 2023, 120: e2310367120
- 52 Pecori R, Di Giorgio S, Paulo Lorenzo J, et al. Functions and consequences of AID/APOBEC-mediated DNA and RNA deamination. *Nat Rev Genet*, 2022, 23: 505–518
- 53 Boyle A P, Davis S, Shulha H P, et al. High-resolution mapping and characterization of open chromatin across the genome. *Cell*, 2008, 132: 311–322
- 54 Schones D E, Cui K, Cuddapah S, et al. Dynamic regulation of nucleosome positioning in the human genome. *Cell*, 2008, 132: 887–898
- 55 Yuan G C, Liu Y J, Dion M F, et al. Genome-scale identification of nucleosome positions in *S. cerevisiae*. *Science*, 2005, 309: 626–630
- 56 Buenrostro J D, Wu B, Litzenburger U M, et al. Single-cell chromatin accessibility reveals principles of regulatory variation. *Nature*, 2015, 523: 486–490
- 57 Lareau C A, Duarte F M, Chew J G, et al. Droplet-based combinatorial indexing for massive-scale single-cell chromatin accessibility. *Nat Biotechnol*, 2019, 37: 916–924
- 58 Chen X, Miragaia R J, Natarajan K N, et al. A rapid and robust method for single cell chromatin accessibility profiling. *Nat Commun*, 2018, 9: 5345
- 59 Hu Y, Jiang Z, Chen K, et al. scNanoATAC-seq: a long-read single-cell ATAC sequencing method to detect chromatin accessibility and genetic variants simultaneously within an individual cell. *Cell Res*, 2022, 33: 83–86
- 60 Li M, Jiang Z, Xu X, et al. Chromatin accessibility landscape of mouse early embryos revealed by single-cell NanoATAC-seq2. *Science*, 2025, 387: eadp4319
- 61 Bannister A J, Kouzarides T. Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res*, 2011, 21: 381–395
- 62 Park P J. ChIP-seq: advantages and challenges of a maturing technology. *Nat Rev Genet*, 2009, 10: 669–680
- 63 Liu B, Xu Q, Wang Q, et al. The landscape of RNA Pol II binding reveals a stepwise transition during ZGA. *Nature*, 2020, 587: 139–144
- 64 Ai S, Xiong H, Li C C, et al. Profiling chromatin states using single-cell itChIP-seq. *Nat Cell Biol*, 2019, 21: 1164–1172
- 65 Meers M P, Bryson T D, Henikoff J G, et al. Improved CUT&RUN chromatin profiling tools. *eLife*, 2019, 8: e46314
- 66 Ku W L, Nakamura K, Gao W, et al. Single-cell chromatin immunocleavage sequencing (scChIC-seq) to profile histone modification. *Nat Methods*, 2019, 16: 323–325
- 67 Hainer S J, Bošković A, McCannell K N, et al. Profiling of pluripotency factors in single cells and early embryos. *Cell*, 2019, 177: 1319–1329. e11
- 68 Ku W L, Pan L, Cao Y, et al. Profiling single-cell histone modifications using indexing chromatin immunocleavage sequencing. *Genome Res*, 2021, 31: 1831–1842
- 69 Kaya-Okur H S, Wu S J, Codomo C A, et al. CUT&Tag for efficient epigenomic profiling of small samples and single cells. *Nat Commun*, 2019, 10: 1930
- 70 Bartosovic M, Kabbe M, Castelo-Branco G. Single-cell CUT&Tag profiles histone modifications and transcription factors in complex tissues. *Nat Biotechnol*, 2021, 39: 825–835
- 71 Carter B, Ku W L, Kang J Y, et al. Mapping histone modifications in low cell number and single cells using antibody-guided chromatin tagmentation (ACT-seq). *Nat Commun*, 2019, 10: 3747
- 72 Wang Q, Xiong H, Ai S, et al. CoBATCH for high-throughput single-cell epigenomic profiling. *Mol Cell*, 2019, 76: 206–216.e7
- 73 Liu M, Yue Y, Chen X, et al. Genome-coverage single-cell histone modifications for embryo lineage tracing. *Nature*, 2025, 640: 828–839
- 74 Bartlett D A, Dileep V, Handa T, et al. High-throughput single-cell epigenomic profiling by targeted insertion of promoters (TIP-seq). *J Cell Biol*, 2021, 220: e202103078
- 75 He R, Dong W, Wang Z, et al. Genome-wide single-cell and single-molecule footprinting of transcription factors with deaminase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2024, 121: e2423270121
- 76 Preissl S, Gaulton K J, Ren B. Characterizing cis-regulatory elements using single-cell epigenomics. *Nat Rev Genet*, 2023, 24: 21–43
- 77 Lieberman-Aiden E, van Berkum N L, Williams L, et al. Comprehensive mapping of long-range interactions reveals folding principles of the human genome. *Science*, 2009, 326: 289–293
- 78 Wang J, Ye F, Chai H, et al. Advances and applications in single-cell and spatial genomics. *Sci China Life Sci*, 2025, 68: 1226–1282
- 79 Nagano T, Lubling Y, Stevens T J, et al. Single-cell Hi-C reveals cell-to-cell variability in chromosome structure. *Nature*, 2013, 502: 59–64
- 80 Flyamer I M, Gassler J, Imakaev M, et al. Single-nucleus Hi-C reveals unique chromatin reorganization at oocyte-to-zygote transition. *Nature*,

- 2017, 544: 110–114
- 81 Tan L, Xing D, Chang C H, et al. Three-dimensional genome structures of single diploid human cells. *Science*, 2018, 361: 924–928
- 82 Arrastia M V, Jachowicz J W, Ollikainen N, et al. Single-cell measurement of higher-order 3D genome organization with scSPRITE. *Nat Biotechnol*, 2022, 40: 64–73
- 83 Li G, Cai L, Chang H, et al. Chromatin Interaction Analysis with Paired-End Tag (ChIA-PET) sequencing technology and application. *BMC Genomics*, 2014, 15: S11
- 84 Zheng M, Tian S Z, Capurso D, et al. Multiplex chromatin interactions with single-molecule precision. *Nature*, 2019, 566: 558–562
- 85 Vandereyken K, Sifrim A, Thienpont B, et al. Methods and applications for single-cell and spatial multi-omics. *Nat Rev Genet*, 2023, 24: 494–515
- 86 Baysoy A, Bai Z, Satija R, et al. The technological landscape and applications of single-cell multi-omics. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2023, 24: 695–713
- 87 Hu Y, Huang K, An Q, et al. Simultaneous profiling of transcriptome and DNA methylome from a single cell. *Genome Biol*, 2016, 17: 88
- 88 Gu H, Raman A T, Wang X, et al. Smart-RRBS for single-cell methylome and transcriptome analysis. *Nat Protoc*, 2021, 16: 4004–4030
- 89 Bian S, Hou Y, Zhou X, et al. Single-cell multiomics sequencing and analyses of human colorectal cancer. *Science*, 2018, 362: 1060–1063
- 90 Guo F, Li L, Li J, et al. Single-cell multi-omics sequencing of mouse early embryos and embryonic stem cells. *Cell Res*, 2017, 27: 967–988
- 91 Wang Y, Yuan P, Yan Z, et al. Single-cell multiomics sequencing reveals the functional regulatory landscape of early embryos. *Nat Commun*, 2021, 12: 1247
- 92 Yan R, Cheng X, Guo F. Protocol for scChARM-seq: simultaneous profiling of gene expression, DNA methylation, and chromatin accessibility in single cells. *STAR Protocols*, 2021, 2: 100972
- 93 Luo C, Liu H, Xie F, et al. Single nucleus multi-omics identifies human cortical cell regulatory genome diversity. *Cell Genomics*, 2022, 2: 100107
- 94 Clark S J, Argelaguet R, Kapourani C A, et al. scNMT-seq enables joint profiling of chromatin accessibility DNA methylation and transcription in single cells. *Nat Commun*, 2018, 9: 781
- 95 Cao J, Cusanovich D A, Ramani V, et al. Joint profiling of chromatin accessibility and gene expression in thousands of single cells. *Science*, 2018, 361: 1380–1385
- 96 Ma S, Zhang B, LaFave L M, et al. Chromatin potential identified by shared single-cell profiling of RNA and chromatin. *Cell*, 2020, 183: 1103–1116.e20
- 97 Chen S, Lake B B, Zhang K. High-throughput sequencing of the transcriptome and chromatin accessibility in the same cell. *Nat Biotechnol*, 2019, 37: 1452–1457
- 98 Xu W, Yang W, Zhang Y, et al. ISSAAC-seq enables sensitive and flexible multimodal profiling of chromatin accessibility and gene expression in single cells. *Nat Methods*, 2022, 19: 1243–1249
- 99 Xiong H, Luo Y, Wang Q, et al. Single-cell joint detection of chromatin occupancy and transcriptome enables higher-dimensional epigenomic reconstructions. *Nat Methods*, 2021, 18: 652–660
- 100 Zhu C, Zhang Y, Li Y E, et al. Joint profiling of histone modifications and transcriptome in single cells from mouse brain. *Nat Methods*, 2021, 18: 283–292
- 101 Sun Z, Tang Y, Zhang Y, et al. Joint single-cell multiomic analysis in Wnt3a induced asymmetric stem cell division. *Nat Commun*, 2021, 12: 5941
- 102 Pan L, Ku W L, Tang Q, et al. scPCOR-seq enables co-profiling of chromatin occupancy and RNAs in single cells. *Commun Biol*, 2022, 5: 678
- 103 Janssens D H, Otto D J, Meers M P, et al. CUT&Tag2for1: a modified method for simultaneous profiling of the accessible and silenced regulome in single cells. *Genome Biol*, 2022, 23: 81
- 104 Meers M P, Llagas G, Janssens D H, et al. Multifactorial profiling of epigenetic landscapes at single-cell resolution using Multi-Tag. *Nat Biotechnol*, 2023, 41: 708–716
- 105 Bárcenas-Walls J R, Ansaloni F, Hervé B, et al. Nano-CUT&Tag for multimodal chromatin profiling at single-cell resolution. *Nat Protoc*, 2024, 19: 791–830
- 106 Stuart T, Hao S, Zhang B, et al. Nanobody-tethered transposition enables multifactorial chromatin profiling at single-cell resolution. *Nat Biotechnol*, 2023, 41: 806–812

- 107 Xiong H, Wang Q, Li C C, et al. Single-cell joint profiling of multiple epigenetic proteins and gene transcription. *Sci Adv*, 2024, 10: eadi3664
- 108 Markodimitraki C M, Rang F J, Rooijers K, et al. Simultaneous quantification of protein-DNA interactions and transcriptomes in single cells with scDam&T-seq. *Nat Protoc*, 2020, 15: 1922–1953
- 109 Rang F J, de Luca K L, de Vries S S, et al. Single-cell profiling of transcriptome and histone modifications with EpiDamID. *Mol Cell*, 2022, 82: 1956–1970.e14
- 110 Li G, Liu Y, Zhang Y, et al. Joint profiling of DNA methylation and chromatin architecture in single cells. *Nat Methods*, 2019, 16: 991–993
- 111 Lee D S, Luo C, Zhou J, et al. Simultaneous profiling of 3D genome structure and DNA methylation in single human cells. *Nat Methods*, 2019, 16: 999–1006
- 112 Liu Z, Chen Y, Xia Q, et al. Linking genome structures to functions by simultaneous single-cell Hi-C and RNA-seq. *Science*, 2023, 380: 1070–1076
- 113 Chai H, Tjong H, Li P, et al. ChIATAC is an efficient strategy for multi-omics mapping of 3D epigenomes from low-cell inputs. *Nat Commun*, 2023, 14: 213
- 114 Chai H, Huang X, Xiong G, et al. Tri-omic single-cell mapping of the 3D epigenome and transcriptome in whole mouse brains throughout the lifespan. *Nat Methods*, 2025, 22: 994–1007
- 115 Bock C, Datlinger P, Chardon F, et al. High-content CRISPR screening. *Nat Rev Methods Primers*, 2022, 2: 8
- 116 Datlinger P, Rendeiro A F, Schmidl C, et al. Pooled CRISPR screening with single-cell transcriptome readout. *Nat Methods*, 2017, 14: 297–301
- 117 Jin X, Simmons S K, Guo A, et al. *In vivo* Perturb-Seq reveals neuronal and glial abnormalities associated with autism risk genes. *Science*, 2020, 370: eaaz6063
- 118 Rubin A J, Parker K R, Satpathy A T, et al. Coupled single-cell CRISPR screening and epigenomic profiling reveals causal gene regulatory networks. *Cell*, 2019, 176: 361–376.e17
- 119 Pierce S E, Granja J M, Greenleaf W J. High-throughput single-cell chromatin accessibility CRISPR screens enable unbiased identification of regulatory networks in cancer. *Nat Commun*, 2021, 12: 2969
- 120 Liscovitch-Brauer N, Montalbano A, Deng J, et al. Profiling the genetic determinants of chromatin accessibility with scalable single-cell CRISPR screens. *Nat Biotechnol*, 2021, 39: 1270–1277
- 121 Amaral P, Carbonell-Sala S, De La Vega F M, et al. The status of the human gene catalogue. *Nature*, 2023, 622: 41–47
- 122 Femino A M, Fay F S, Fogarty K, et al. Visualization of single RNA transcripts *in situ*. *Science*, 1998, 280: 585–590
- 123 Lee J H, Daugharthy E R, Scheiman J, et al. Fluorescent *in situ* sequencing (FISSEQ) of RNA for gene expression profiling in intact cells and tissues. *Nat Protoc*, 2015, 10: 442–458
- 124 Ståhl P L, Salmén F, Vickovic S, et al. Visualization and analysis of gene expression in tissue sections by spatial transcriptomics. *Science*, 2016, 353: 78–82
- 125 Junker J P, Noël E S, Guryev V, et al. Genome-wide RNA tomography in the zebrafish embryo. *Cell*, 2014, 159: 662–675
- 126 Zhang X, Hu C, Huang C, et al. Robust acquisition of spatial transcriptional programs in tissues with immunofluorescence-guided laser capture microdissection. *Front Cell Dev Biol*, 2022, 10: 853188
- 127 Schede H H, Schneider C G, Stergiadou J, et al. Spatial tissue profiling by imaging-free molecular tomography. *Nat Biotechnol*, 2021, 39: 968–977
- 128 Lovatt D, Ruble B K, Lee J, et al. Transcriptome *in vivo* analysis (TIVA) of spatially defined single cells in live tissue. *Nat Methods*, 2014, 11: 190–196
- 129 Honda M, Oki S, Kimura R, et al. High-depth spatial transcriptome analysis by photo-isolation chemistry. *Nat Commun*, 2021, 12: 4416
- 130 Hu K H, Eichorst J P, McGinnis C S, et al. ZipSeq: barcoding for real-time mapping of single cell transcriptomes. *Nat Methods*, 2020, 17: 833–843
- 131 Rodriques S G, Stickels R R, Goeva A, et al. Slide-seq: a scalable technology for measuring genome-wide expression at high spatial resolution. *Science*, 2019, 363: 1463–1467
- 132 Stickels R R, Murray E, Kumar P, et al. Highly sensitive spatial transcriptomics at near-cellular resolution with Slide-seqV2. *Nat Biotechnol*, 2021, 39: 313–319
- 133 Vickovic S, Eraslan G, Salmén F, et al. High-definition spatial transcriptomics for *in situ* tissue profiling. *Nat Methods*, 2019, 16: 987–990
- 134 Oliveira M F, Romero J P, Chung M, et al. Characterization of immune cell populations in the tumor microenvironment of colorectal cancer

- using high definition spatial profiling. *bioRxiv*, 2024, 597233
- 135 Liu Y, Yang M, Deng Y, et al. High-spatial-resolution multi-omics sequencing via deterministic barcoding in tissue. *Cell*, 2020, 183: 1665–1681.e18
- 136 Fu X, Sun L, Dong R, et al. Polony gels enable amplifiable DNA stamping and spatial transcriptomics of chronic pain. *Cell*, 2022, 185: 4621–4633.e17
- 137 Chen A, Liao S, Cheng M, et al. Spatiotemporal transcriptomic atlas of mouse organogenesis using DNA nanoball-patterned arrays. *Cell*, 2022, 185: 1777–1792.e21
- 138 Cardozo Gizzi A M, Cattoni D I, Fiche J B, et al. Microscopy-based chromosome conformation capture enables simultaneous visualization of genome organization and transcription in intact organisms. *Mol Cell*, 2019, 74: 212–222.e5
- 139 Zhao T, Chiang Z D, Morriss J W, et al. Spatial genomics enables multi-modal study of clonal heterogeneity in tissues. *Nature*, 2022, 601: 85–91
- 140 Su J H, Zheng P, Kinrot S S, et al. Genome-scale imaging of the 3D organization and transcriptional activity of chromatin. *Cell*, 2020, 182: 1641–1659.e26
- 141 Deng Y, Bartosovic M, Ma S, et al. Spatial profiling of chromatin accessibility in mouse and human tissues. *Nature*, 2022, 609: 375–383
- 142 Deng Y, Bartosovic M, Kukanja P, et al. Spatial-CUT&Tag: spatially resolved chromatin modification profiling at the cellular level. *Science*, 2022, 375: 681–686
- 143 Jiang F, Zhou X, Qian Y, et al. Simultaneous profiling of spatial gene expression and chromatin accessibility during mouse brain development. *Nat Methods*, 2023, 20: 1048–1057
- 144 Liao S, Heng Y, Liu W, et al. Integrated spatial transcriptomic and proteomic analysis of fresh frozen tissue based on Stereo-seq. *bioRxiv*, 2023, 538364
- 145 Liu Y, DiStasio M, Su G, et al. High-plex protein and whole transcriptome co-mapping at cellular resolution with spatial CITE-seq. *Nat Biotechnol*, 2023, 41: 1405–1409
- 146 Zeng H, Huang J, Ren J, et al. Spatially resolved single-cell translomics at molecular resolution. *Science*, 2023, 380: eadd3067
- 147 Yuan Z, Zhou Q, Cai L, et al. SEAM is a spatial single nuclear metabolomics method for dissecting tissue microenvironment. *Nat Methods*, 2021, 18: 1223–1232
- 148 Hu T, Allam M, Cai S, et al. Single-cell spatial metabolomics with cell-type specific protein profiling for tissue systems biology. *Nat Commun*, 2023, 14: 8260

Advances and breakthroughs in single-cell nucleic acid omics

SUN ZhongXing¹, LI ZhuoNing¹, TANG Yin¹ & FANG Dong^{1,2*}

¹ Zhejiang Provincial Key Laboratory for Cancer Molecular Cell Biology, Life Sciences Institute, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China

² Department of Medical Oncology, Key Laboratory of Cancer Prevention and Intervention, Ministry of Education, The Second Affiliated Hospital, Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310058, China

* Corresponding author; E-mail: dfang@zju.edu.cn

Cellular heterogeneity is fundamental to functional specialization, precise regulation, and environmental adaptability in multicellular organisms. Traditional bulk sequencing often captures average signals from cell populations, making it difficult to identify individual differences and obscuring important subpopulations and dynamic regulatory events. In contrast, single-cell omics technologies offer high-resolution profiling of various molecular layers at the individual cell level, uncovering the complex nature of cellular states. These technologies have progressed from transcriptomics to encompass epigenomics, spatial omics, and integrated multi-omics methods. This review focuses on the latest advancements in single-cell sequencing technologies, highlighting significant breakthroughs and innovations in the field.

cellular heterogeneity, single-cell omics, transcriptome, epigenome, spatial omics

doi: [10.1360/SSV-2025-0107](https://doi.org/10.1360/SSV-2025-0107)