

## 伯豪生物单细胞组学研究整体解决方案

作为国内单细胞组学研究整体解决方案的提供者和领导者，伯豪生物已经建立起了完整的单细胞水平的研究平台，贯穿起基因组、转录组、表观组、蛋白组、免疫组等多组学交叉领域，也整合了包括 SMART-Seq 在内的多种经典单细胞测序技术和包括 Rhapsody™在内的创新单细胞分析技术，涵盖单细胞基因组测序、单细胞转录组测序、单细胞 ATAC 测序、单细胞转录组和蛋白质标志物平行分析等等。

值得一提的是，伯豪生物专注于打造从单细胞测序样品的保存、制备、测序到生物信息学分析的完整闭环，已经自主研发并商业化了国内外首个单细胞测序组织保存液，不仅可大大延长应用于单细胞测序的离体组织的保存时间，还可有效保持其单细胞活性和基因表达水平。同时，为了更好地服务多元化的研究项目，伯豪生物也开发并优化了一整套覆盖多物种、多组织和多类型的样品处理、测序和分析体系，技术资质和水平国内领先。

## 伯豪特色

6 年的单细胞服务经验，协助客户在 Cell Research、Nature Neuroscience 等杂志上发表文章。

拥有三大单细胞测序服务平台，包括低通量的 SMART-seq，以及高通量的 10X genomics 和 BD Rhapsody 的单细胞 RNA 测序服务平台。

**自主研发的单细胞组织保护液，保证了新鲜组织样本的低温存储和运输。**

▲伯豪生物单细胞组学研究保存液

▲单细胞测序组织保存液

▲单细胞测序细胞保存液

▲单细胞 ATAC-seq 组织保存液

▲单细胞 ATAC-seq 细胞保存液

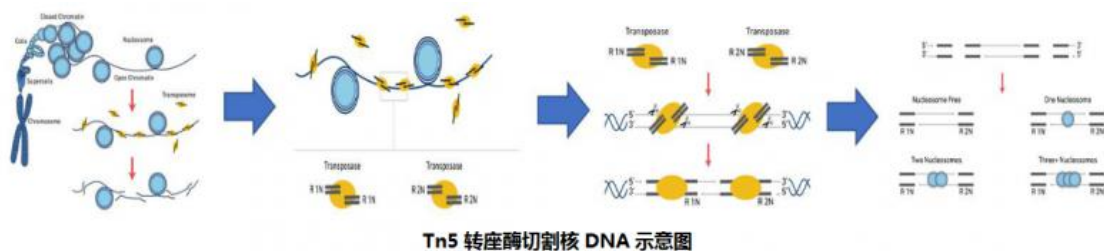
累计成功完成 30 余种组织类型的单细胞悬液制备（包括人外周血液细胞，临床组织及大小鼠组织或器官）。针对单细胞悬液制备过程中遇到的主要问题，如死细胞比例高、活性达不到上机要求；细胞形态异常；细胞消化不完全、聚集成团、碎片偏多、红细胞比例偏高等，公司单细胞测序团队通过已经积累的经验，为客户提供合理化的建议，提高单细胞测序的成功率。

完善的数据处理方法，及个性化的分析方法。

## 一、单细胞 ATAC-seq

染色质开放程度，反映了染色质的转录活性状态，是研究基因表达调控的重要方向，在表观遗传图谱绘制、细胞分化和发育及各类疾病的发生发展研究中具有重要的作用。

单细胞 ATAC-seq ( Assay for transposase Accessible Chromatin with high throughput sequencing at the single cell level ) 是指在单细胞水平上检测开放染色质的方法。其原理为基于 Tn5 转座酶对片段化 DNA 和整合入活化的调控区域的高敏感性。目前，单细胞 ATAC-seq 技术可应用于肿瘤异质性、免疫微环境、神经科学、胚胎发育、细胞分化等领域的研究。



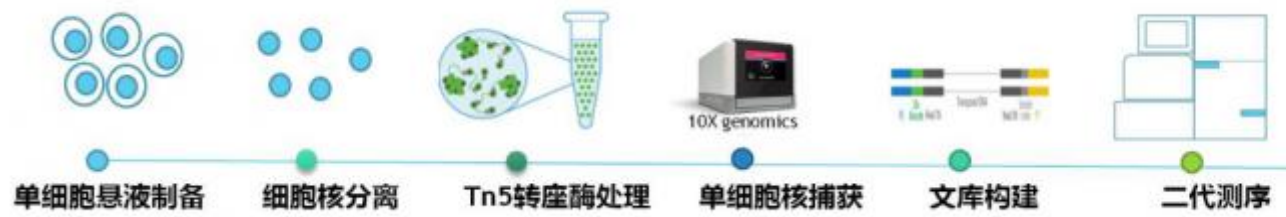
## 单细胞 ATAC-seq 检测平台



### 参数：

- 在单细胞水平上研究表观基因组学
- 低线粒体读取 ( <2% 人 B 淋巴细胞 )
- 一个通道可捕获 500- 10000 个核
- 细胞核捕获率高达 65%
- 细胞核可以从细胞系、原代细胞、新鲜和低温保存的样品中分离得到

## 单细胞 ATAC-seq 流程



## 样本要求

类型：细胞系，原代细胞，冻存细胞，新鲜组织等

来源：血液提取、磁珠富集、流式富集、组织解离等

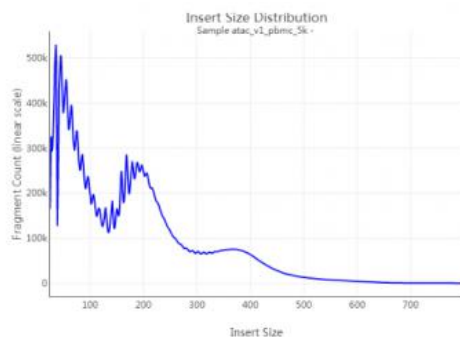
样本量：细胞  $>1 \times 10^5$  细胞 / 样本

细胞活率：大于 80%，越高越好

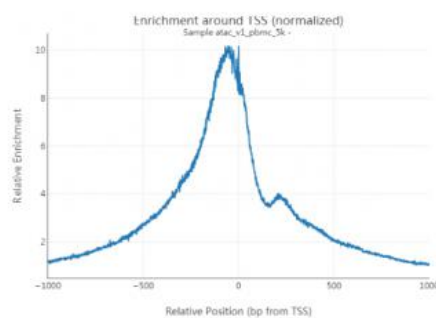
数据量：25M reads pair/sample

## 数据分析

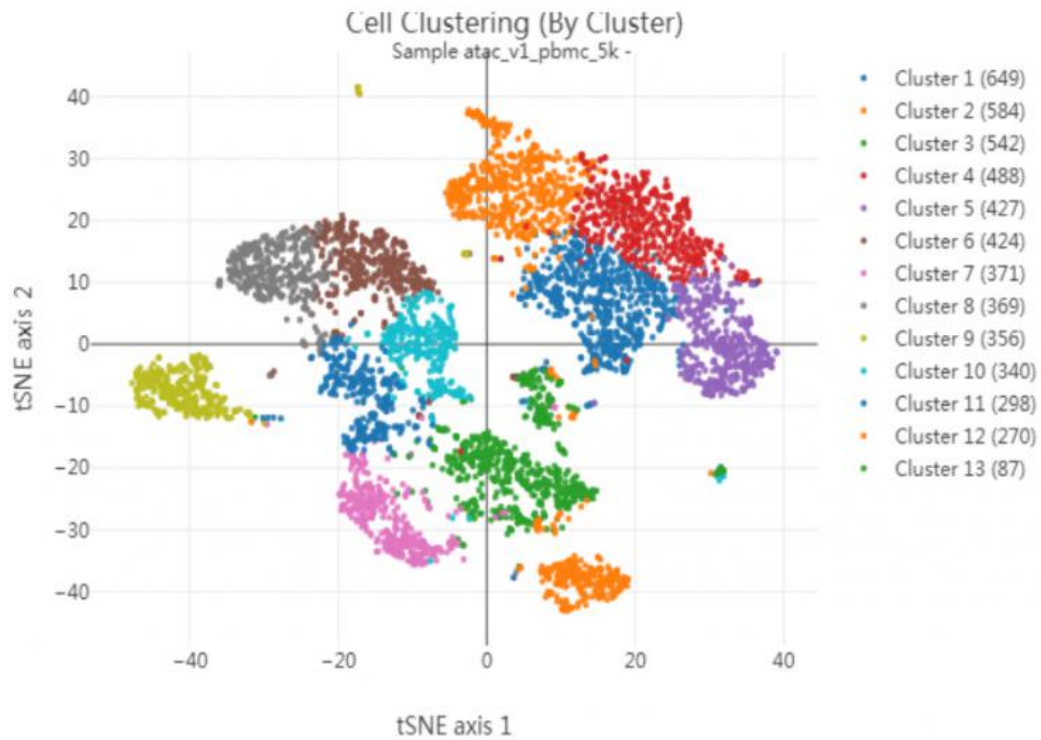
包括数据预处理，基础分析和高级分析，部分分析结果展示如下：



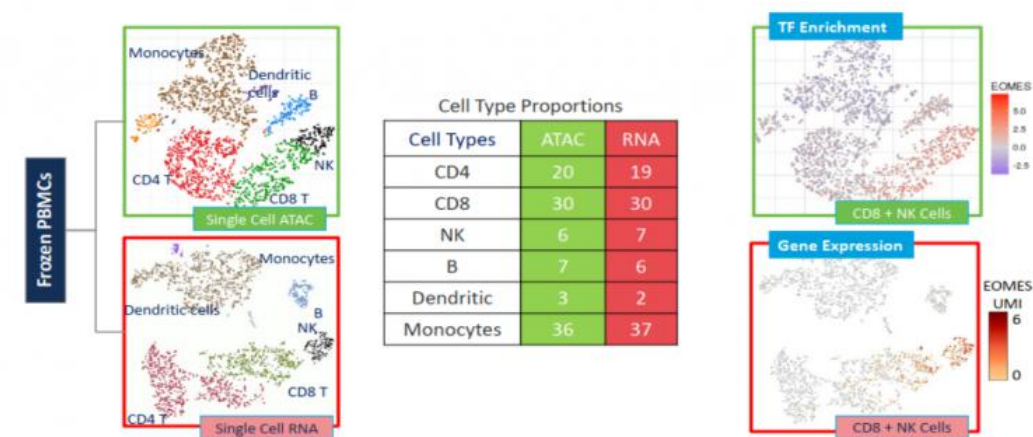
插入序列分析



TSS 富集分析



## 细胞分群



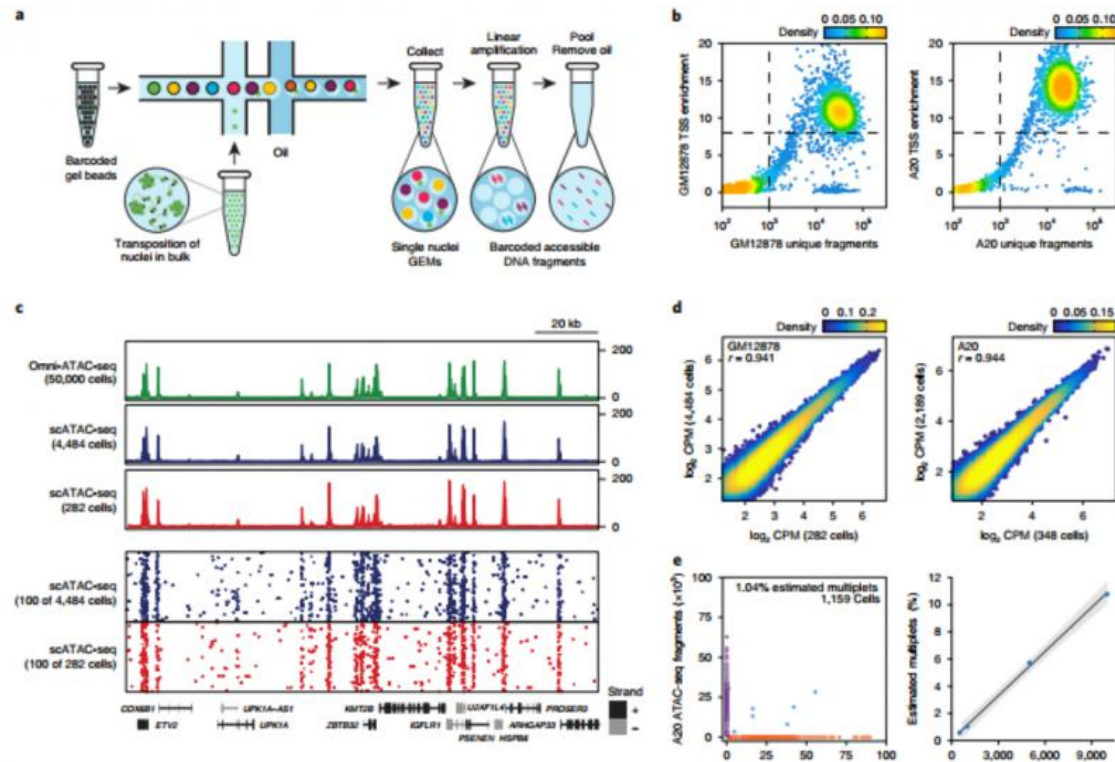
## 单细胞 ATAC 与单细胞 5' 基因表达的整合分析

## 案例解析题目：

# 人类免疫细胞发展以及瘤内 T 细胞衰竭大规模平行单细胞染色质景观分析

要理解复杂的组织，就需要对基因调控的单细胞结构进行精确和大规模的解构。在这里，研究人员使用单细胞 ATAC 测序 (single cell ATAC-seq) 来评估一个大规模并行的基于液滴的方法在单细胞中映射转座酶可达染色质的性能。作者应用 single cell ATAC-seq 获得了 20 多万个人类血液和基底细胞癌单细胞的染色质谱。在血液中，single cell ATAC-seq 的应用使细胞类型特异性顺式和反式调控元件的无标记识别、疾病相关增强子活性的映射和细胞分化轨迹的重建成为可能。在基底细胞癌中，single cell ATAC-seq 的应用揭示了肿瘤微环境中恶性细胞、基质细胞和免疫细胞的调控网络。对程序性细胞死亡前后的一系列肿瘤活检的 single cell ATAC-seq 谱进行分析，发现治疗反应性 T 细胞亚群的染色质调节因子，并揭示了控制肿瘤内 CD8+ T 细胞衰竭和 CD4+ T 滤泡辅助细胞发育的共同调控程序。作者预期 single cell ATAC-seq 将使基因调控因子在不同生物系统间的无偏好发现成为可能。





原文出处：Satpathy A T, Granja J M, Yost K E, et al. Massively parallel single-cell chromatin landscapes of human immune cell development and intratumoral T cell exhaustion[J]. BioRxiv, 2019: 610550.

## 二、单细胞 RNA 测序

单细胞转录组测序 ( Single-cell RNA-sequencing ) 是指在单细胞水平上对 RNA 进行高通量测序和分析的新技术。不同于常规 Bulk Sequencing ( 组织或细胞群测序 ) 得到的结果只是大量细胞的平均表达水平，单细胞测序能够深入挖掘细胞特异性的信息。目前，单细胞测序已广泛应用于肿瘤异质性、免疫微环境、神经科学、胚胎发育、细胞分化等领域的研究。

## 伯豪特色

16 年的单细胞服务经验，协助客户在 Cell Research、Nature Neuroscience 等杂志上发表文章。

拥有三大单细胞测序服务平台，包括低通量的 SMART-seq，以及高通量的 10X genomics 和 BD Rhapsody 的单细胞 RNA 测序服务平台。

自主研发的单细胞组织保护液，保证了新鲜组织样本的低温存储和运输。

累计成功完成 30 余种组织类型的单细胞悬液制备（包括人外周血液细胞，临床组织及大小鼠组织或器官）。针对单细胞悬液制备过程中遇到的主要问题，如死细胞比例高、活性达不到上机要求；细胞形态异常；细胞消化不完全、聚集成团、碎片偏多、红细胞比例偏高等，公司单细胞测序团队通过已经积累的经验，为客户提供合理化的建议，提高单细胞测序的成功率。

完善的数据处理方法，及个性化的分析方法。

## 技术参数

### SMART-seq

1. 建库起始量：1~100 cells；
2. 测序模式：Illumina HiSeq PE150；
3. 推荐数据量： $\geq 6$  Gb/ 样本。



## 10X genomics & BD Rhapsody

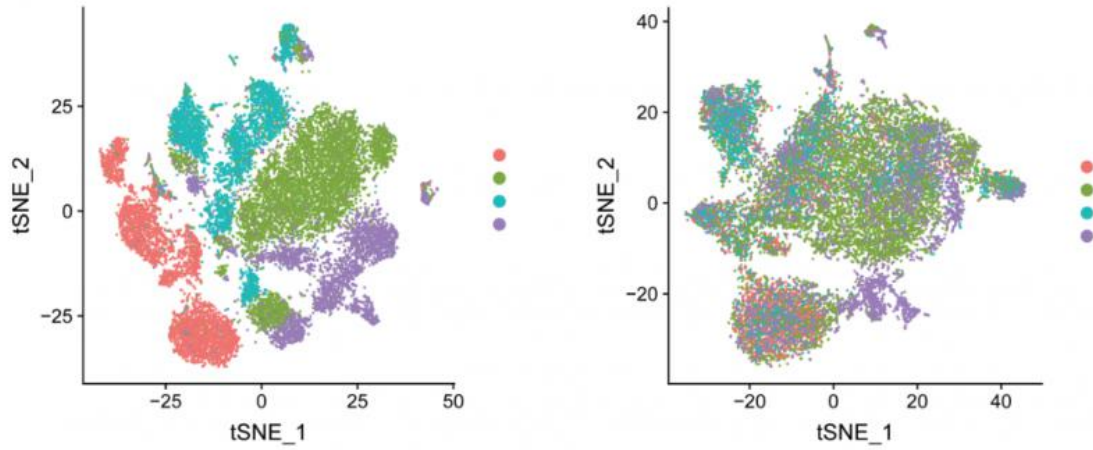
1. 总量  $> 10^5$  目标细胞个数 (最少 10,000 个细胞) ;
2. 浓度 500-1,000 个 / $\mu\text{L}$  ;
3. 细胞间无粘连 (成团率  $< 5\%$ ) ;
4. 无大于 40 $\mu\text{m}$  的细胞碎片或其他颗粒物 ;
5. 细胞成活率应大于 80% (台盼蓝染色检测) ;
6. 不存在逆转录抑制剂和非细胞的核酸分子。

## 服务流程

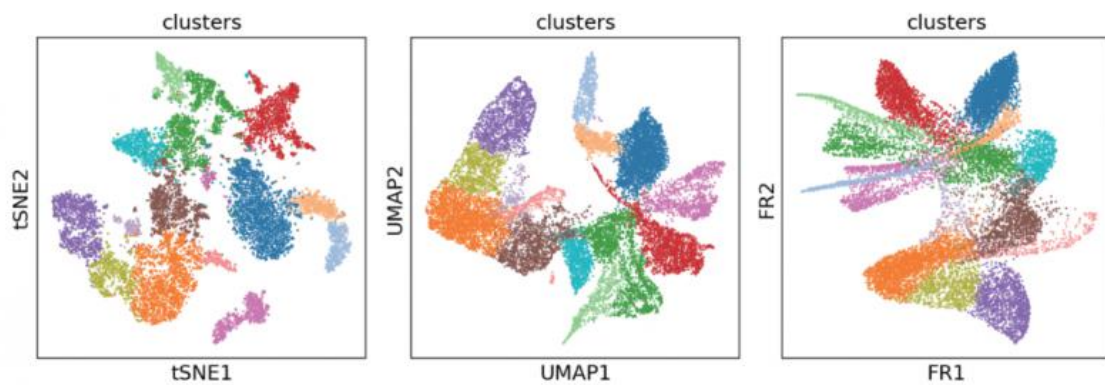


## 数据分析

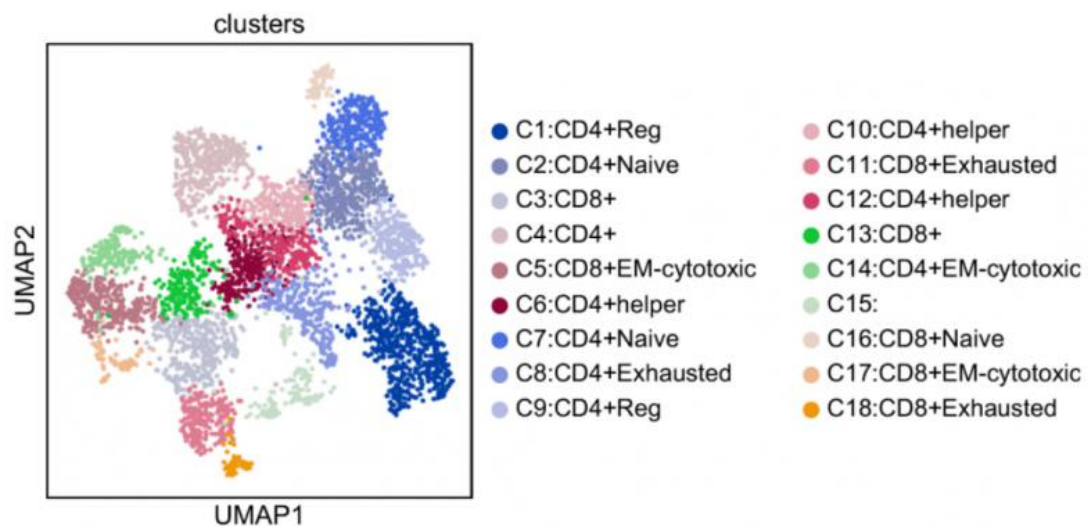
包括数据预处理，基础分析，高级分析和个性化分析，部分分析结果展示如下：



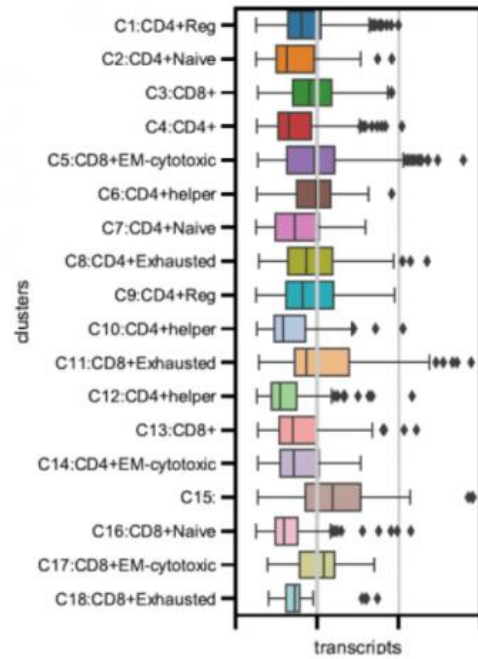
### 消除批次效应



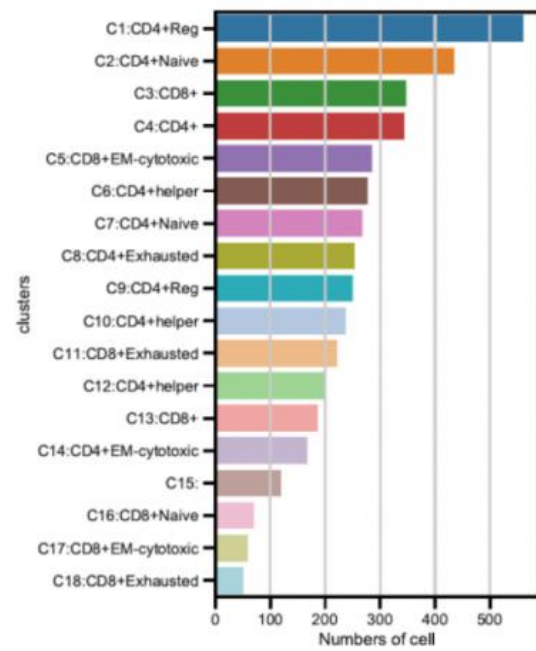
### 细胞亚群聚类及可视化



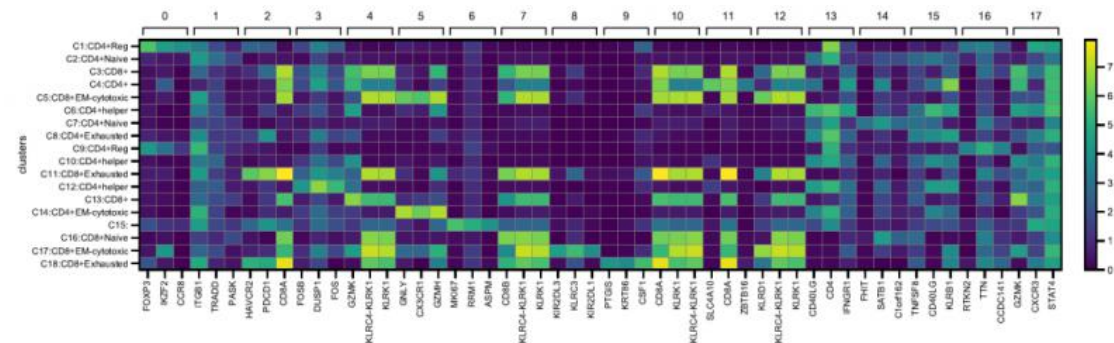
### 细胞类群注释



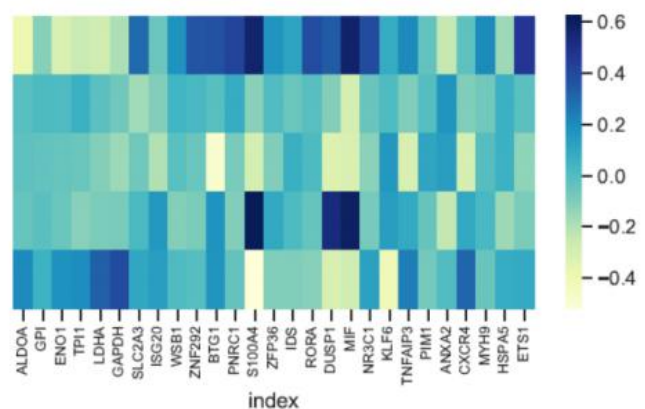
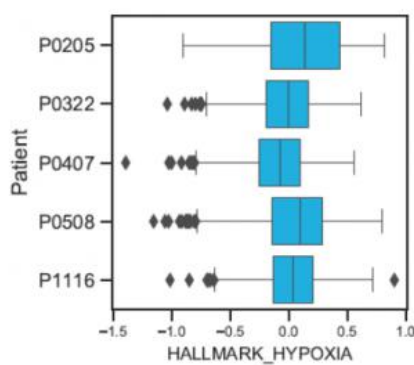
不同 cluster 转录本表达丰度分布统计



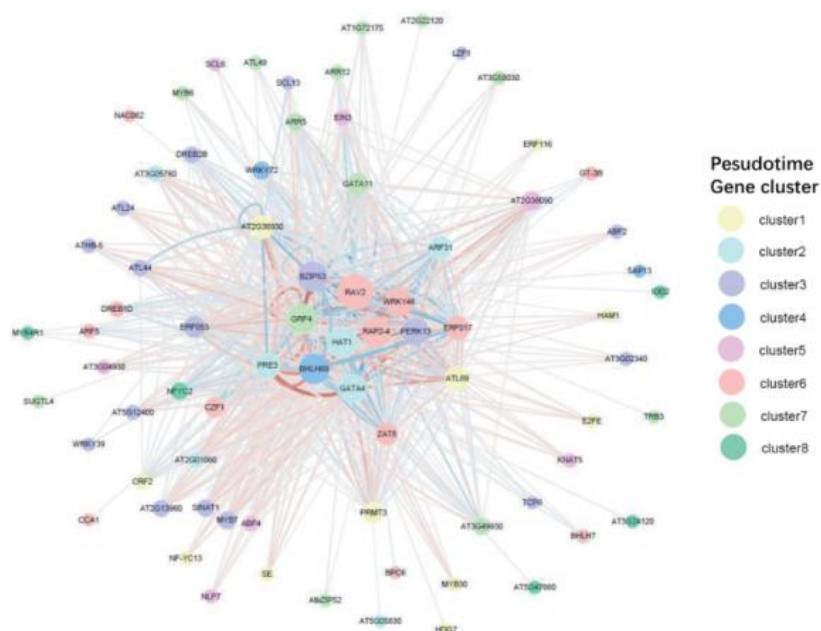
不同 cluster 细胞数目统计



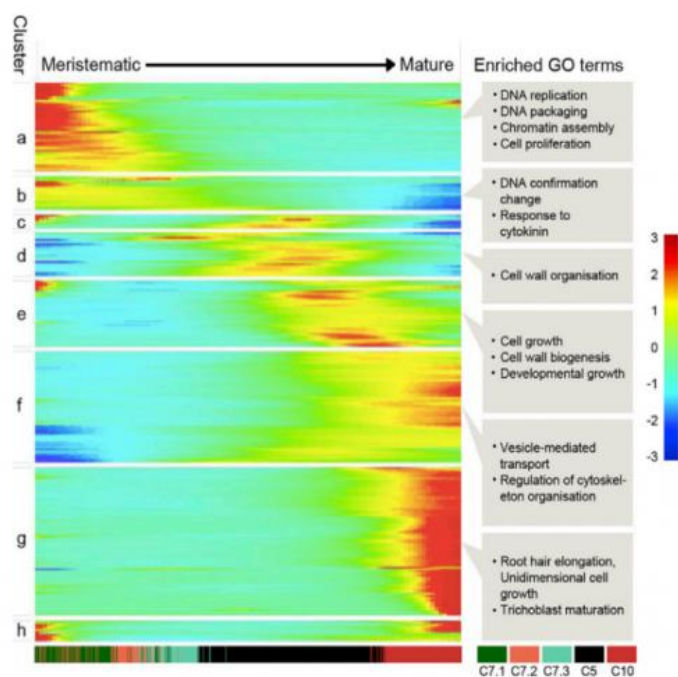
Marker 基因分析



患者之间的代谢特征差异分析



拟时序分化转录因子调控网络



拟时序 GO 功能注释

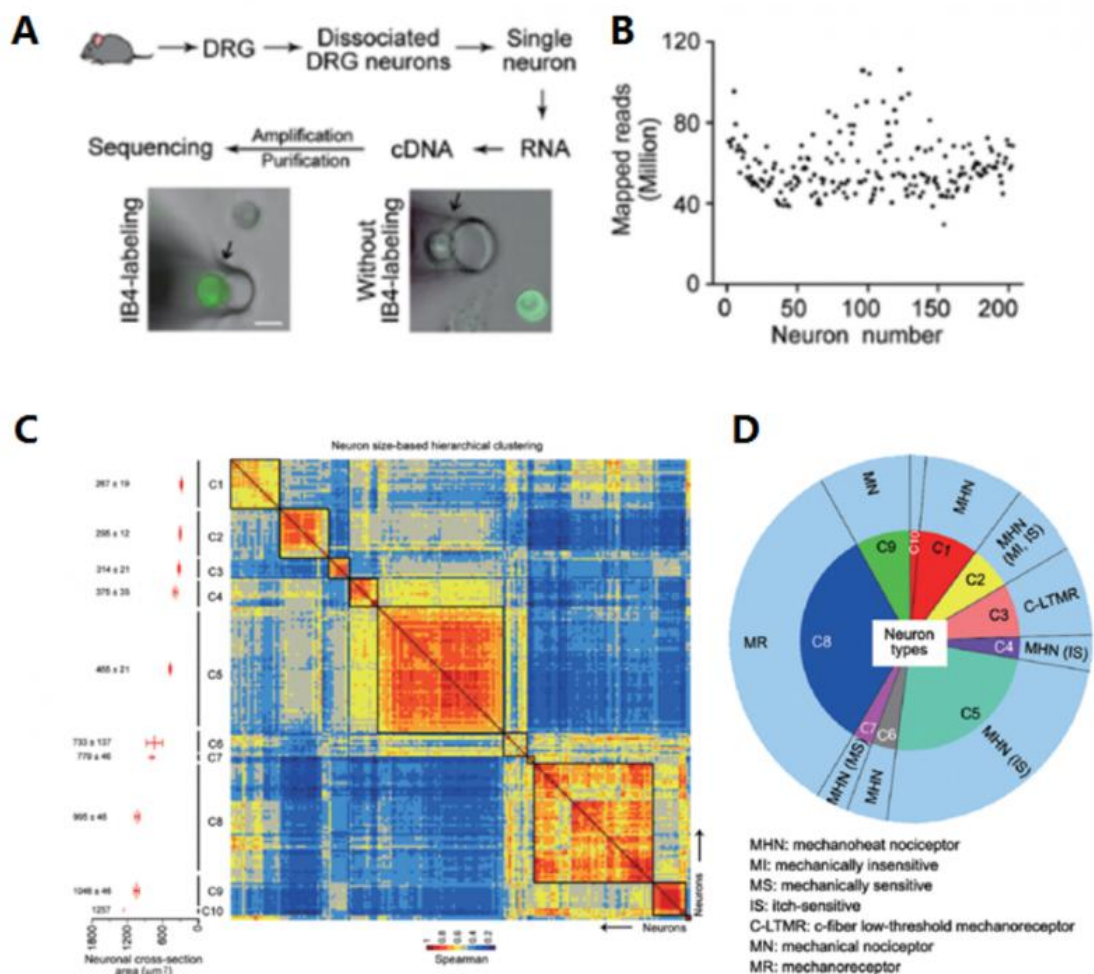
## 案例解析案例展示案例一（神经生物学，使用技术 SMART-seq）

伯豪生物助力中国科学院上海生命科学研究院神经科学研究所张旭院士研究组，通过高覆盖度的单细胞测序和以神经元大小为参考的层次聚类，对小鼠背根



神经节初级感觉神经元进行了分类，又通过全细胞膜片钳在体记录结合单细胞 PCR 方法可检测各类初级感觉神经元对外周皮肤刺激的反应。该工作通过高覆盖的单细胞测序对初级感觉神经元进行了重新分类，并且建立了基因表达与在体内功能的相互关系。该成果已经发表在了 2015 年 12 月的国际知名期刊 Cell Reasarch (影响因子 11.981) 上。该研究中单细胞测序及数据分析服务由上海伯豪生物技术有限公司提供。

原文出处：Li CL, Li KC, Wu D, et al. Somatosensory neuron types identified by high-coverage single-cell RNA-sequencing and functional heterogeneity. Cell Res. 2015, 26(1):83-102.

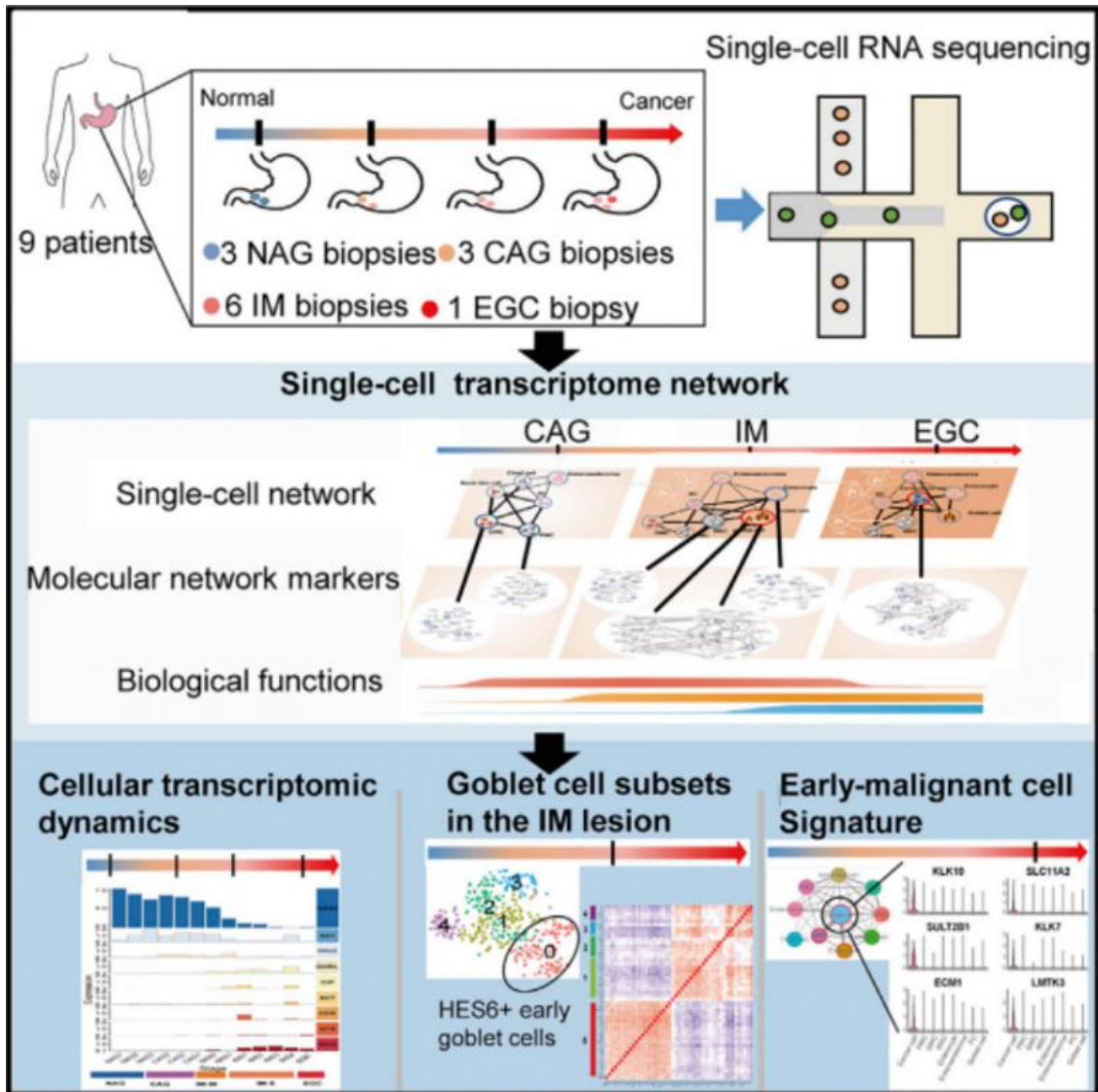


## 案例二（疾病不同进程的细胞组成差异，10X genomics）

肠型胃癌以癌前病变为主，包括慢性萎缩性胃炎和肠上皮化生。在这项研究中，作者构建了一个单细胞图谱，包含了 32,332 个来自胃窦粘膜活检的高质量细胞。然后，作者构建了一个基于细胞和分子特征的单细胞网络。研究发现在上皮化生过程中，腺体黏液细胞趋向于获得肠样干细胞表型，作者将 OR51E1 作为早期恶性病变中独特内分泌细胞的标记。作者还发现，HES6 可能标记杯前细胞簇，可能有助于早期化生的鉴定。最后，作者确定了一组 EGC 特异性标记，对 EGC 的准确诊断具有临床意义。作者的研究提供了无与伦比的见解，以了解人类胃细胞组在癌前和早期恶性病变。

原文出处：Zhang P, Yang M, Zhang Y, et al. Dissecting the Single-Cell Transcriptome Network Underlying Gastric Premalignant Lesions and Early Gastric Cancer. Cell reports, 2019, 27(6): 1934-1947. e5.





## 应用方向

## 肿瘤异质

Kim C, Gao R, Sei E, et al. Chemoresistance Evolution in Triple-Negative Breast Cancer Delineated by Single-Cell Sequencing. Cell 2018, 173(4):879-893.

## 肿瘤免疫微环境

Zheng C, Zheng L, Yoo JK, et al. Landscape of Infiltrating T Cells in Liver Cancer Revealed by Single-Cell Sequencing. Cell 2017, 169(7):1342-1356.

神经科学

Li CL, Li KC, Wu D, et al. Somatosensory neuron types identified by high-coverage single-cell RNA-sequencing and functional heterogeneity. Cell Res 2015, 26(1):83-102.

## 胚胎发育

Li L, Dong J, Yan L, et al. Single-Cell RNA-Seq Analysis Maps Development of Human Germline Cells and Gonadal Niche Interactions. Cell Stem Cell

## 细胞分化

Bach K, Pensa S, Grzelak M, et al. Differentiation dynamics of mammary epithelial cells revealed by single-cell RNA sequencing. Nat Commun 2017, 8(1):2128.

## 三、单细胞免疫组库测序

10X genomics 提供了全面的单细胞免疫分析方案，可以在单细胞细胞基础上同时检测人类或小鼠的适应性免疫反应和数以万计的 T 细胞和 B 细胞的免疫系统。通过精简的工作流程，可以实现从样品到文库准备、免疫测序和软件分析全套解决方案，揭示 T 和 B 细胞多样性、V(D)J 重组和免疫细胞分析。

### 单细胞免疫组库检测平台



#### 参数：

- 可获得高数量的包含有效的 V-J 对的 T 细胞或 B 细胞
- 可同时检测单细胞的 mRNA 表达(5')及 VDJ
- 每个样本的细胞数(100 - 10,000 个)
- 细胞核捕获率高达 65%
- 细胞数目灵活,无最低限制
- 低双细胞率：0.9% per 1,000 cells

### 单细胞免疫组库测序流程



## 应用领域

基础免疫学

肿瘤免疫和免疫治疗

自身免疫性疾病和炎症性疾病

传染病和疫苗研究

移植和免疫重建

## 样本要求

类型：细胞系，原代细胞，新鲜组织等

来源：血液提取、磁珠富集、流式富集、组织解离等

样本量：细胞  $>1 \times 10^5$  细胞 / 样本

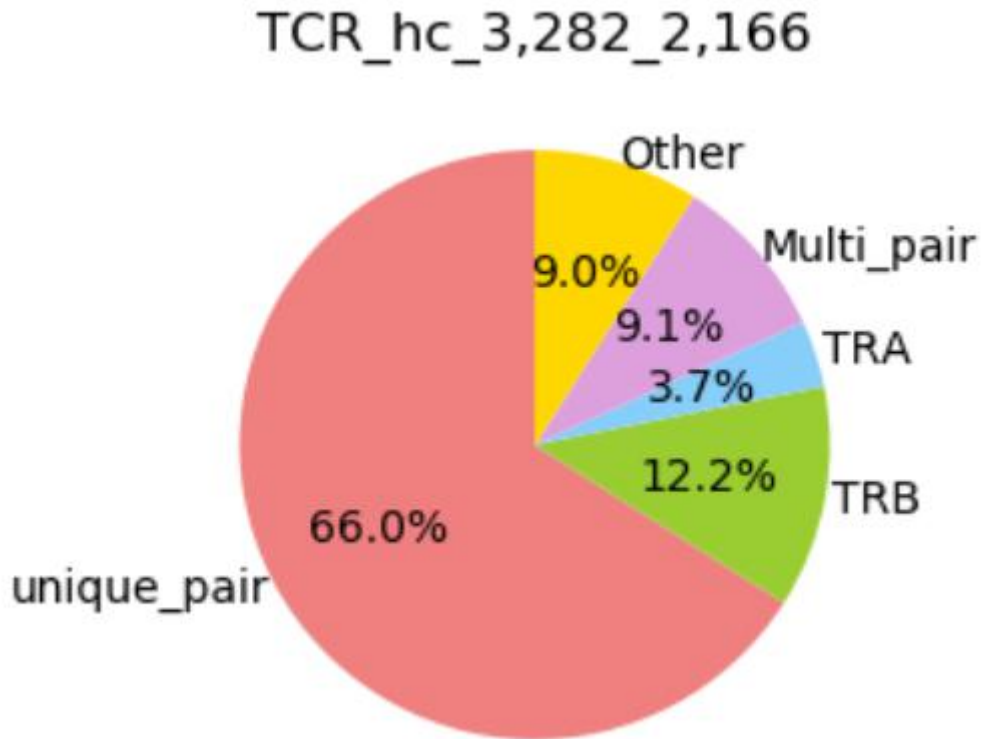
细胞活率：大于 80%，越高越好

数据量：5K read pairs/cell

## 数据分析

### 数据过滤及统计：

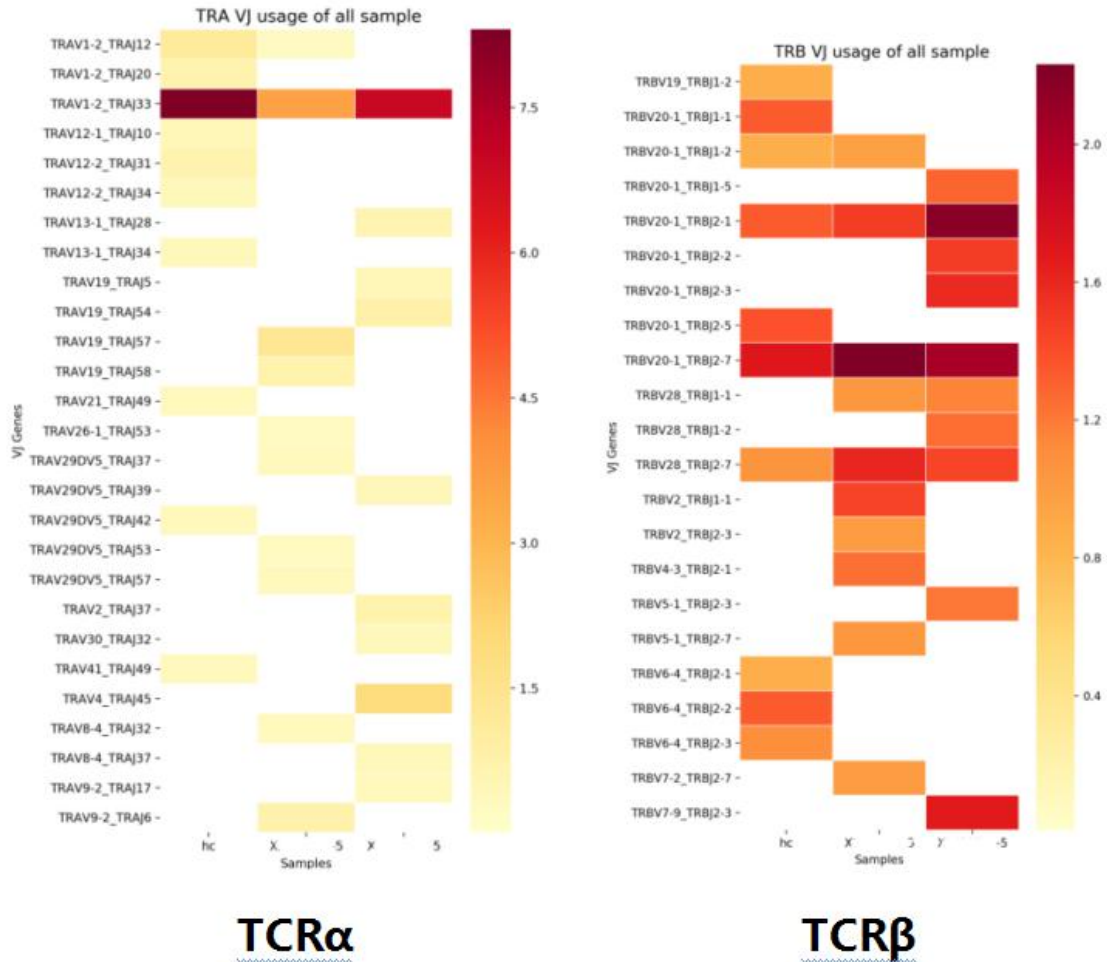
保留只含有唯一一对 TRA 和 TRB 且测到 RNA 表达的细胞进行后续分析。



#### 样本间 VJ 使用情况比较：

每个样本分别取  $\alpha$  和  $\beta$  排名前十的 VJ 组合，所有样本取并集画 VJ 使用率热图。

对比不同样本的 VJ 使用情况可以看到 VJ 使用的特异性。



## 多样性指数等统计

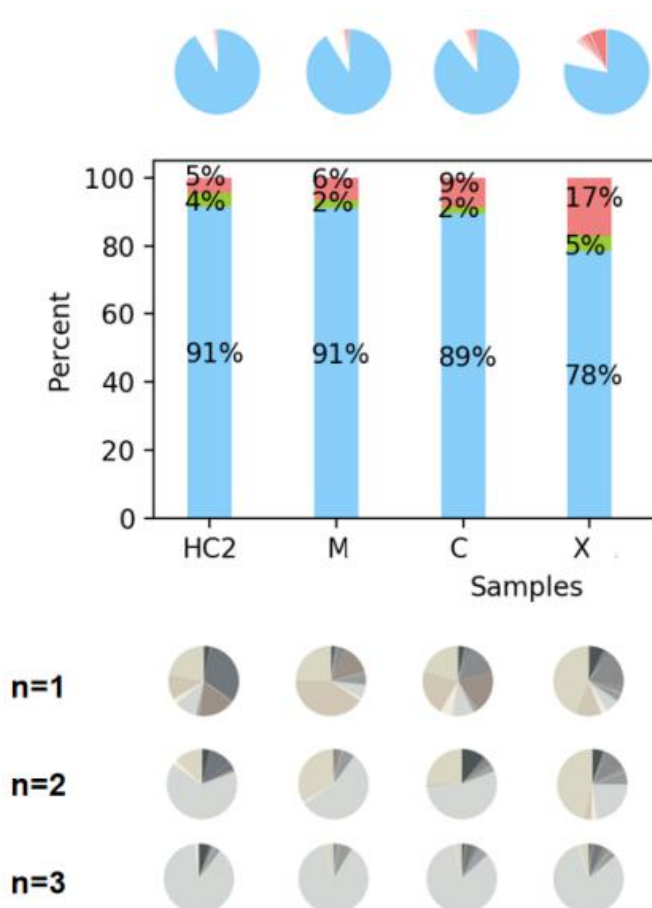
对样本进行多样性分析，多样性指数和均一度如下表所示：

Samples	Shannon's Diversity Index	Number of clone	Evenness
HC	7.55	1,994	0.99
G	8.61	6,128	0.99
K	7.33	3,413	0.90

## 不同细胞类型的克隆扩增分析

结合单细胞 RNA 测序的注释结果，对每个样本针对不同类型的细胞群进行克隆扩增分析。如下饼图，针对不同的克隆扩增（ $n=1, n=2, n \geq 3$ ）情况分别统计，不同颜色表示不同类型的细胞类型所占比例。





## 案例解析

### 题目：人类免疫细胞发展以及瘤内 T 细胞衰竭大规模平行单细胞染色质景观分析

原发性肿瘤上皮细胞与内源性同系肿瘤浸润淋巴细胞 (TILs) 作为内聚单位的共培养尤其难以实现。研究人员运用空气 - 液体界面 (ALI) 方法从 >100 个人活组织切片或小鼠肿瘤中培养出患者来源的器官样体 (PDOs)，在具有同基因免疫能力的宿主中作为肿瘤上皮细胞，并嵌入天然免疫细胞。10X Genomics Chromium 平台通过同时检测基因表达及免疫组库图谱发现，PDOs 肿瘤浸润淋巴细胞准确地保留了原发性肿瘤 T 细胞受体 (TCR) 的图谱。至关重要的是，人类和小鼠的 PDOs 成功地通过 anti-PD1 和 / 或 anti-PDL1 扩展和激活肿瘤抗

[illegible]

## 免疫细胞的 5'V(D)J 和 5'RNA-seq 检测

原文出处：Neal J T, Li X, Zhu J, et al. Organoid modeling of the tumor immune microenvironment[J]. Cell, 2018, 175(7): 1972-1988. e16.