



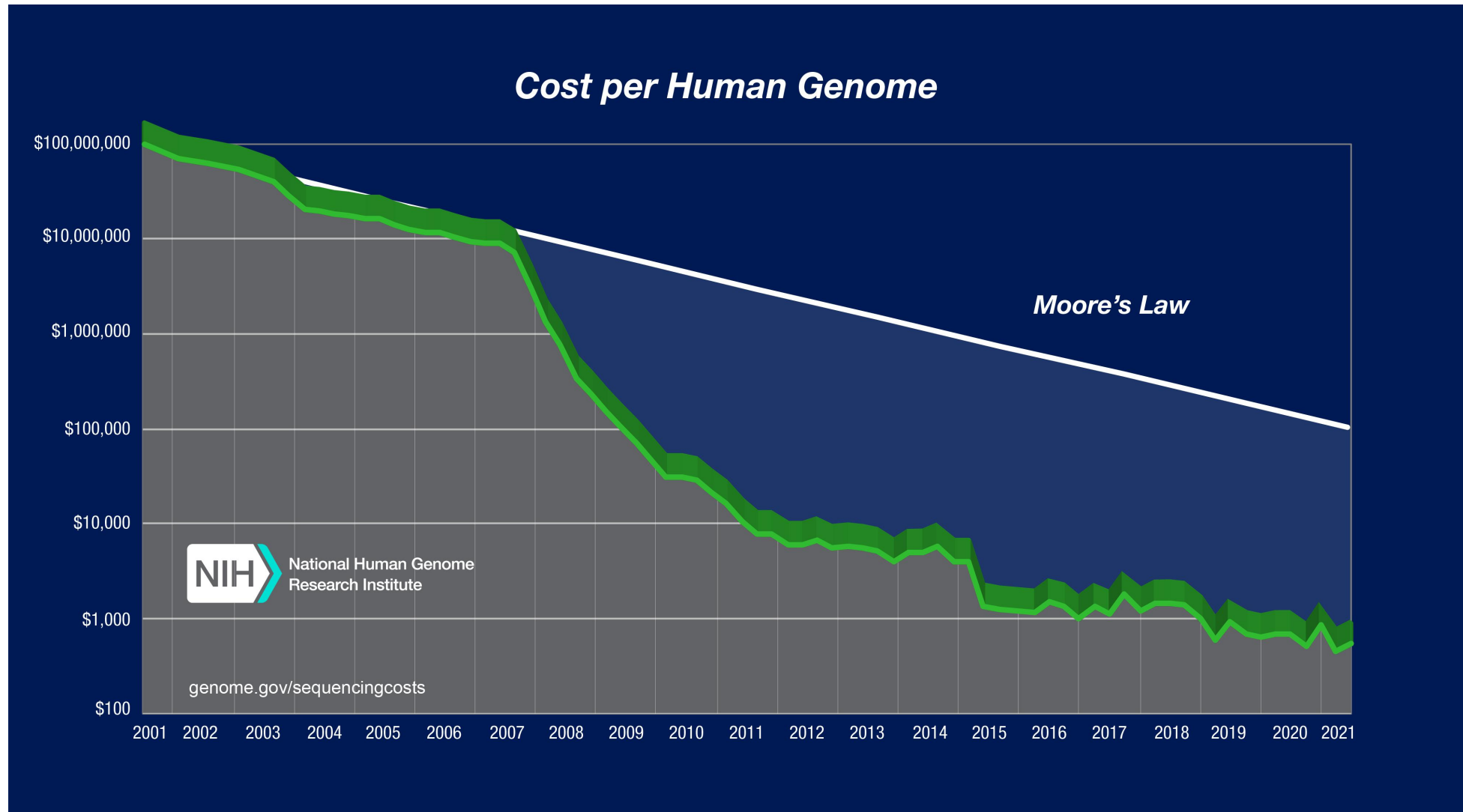
浙江大学  
ZHEJIANG UNIVERSITY

# 单细胞分离分选； 单细胞悬制备、扩增和测序技术（2）

王永成 研究员

浙江大学良渚实验室

# 基因测序技术的发展



# 基因测序技术

## 一代测序 (代表: sanger测序)

第一代测序由英国的生物化学家, 弗雷德里克·桑格 (Frederick Sanger) 发明, 在桑格法测序中, 由双脱氧核苷三磷酸 (ddNTP) 造成的DNA聚合反应终止现象是实现测序的核心, 因此也被称为双脱氧终止法测序。

## 二代测序 (代表: illumina、华大)

下一代测序技术 (Next -generation sequencing technology), 又称高通量测序技术 (High-throughput sequencing), 可以一次性并行对几十万到几百万条DNA分子进行序列测定。

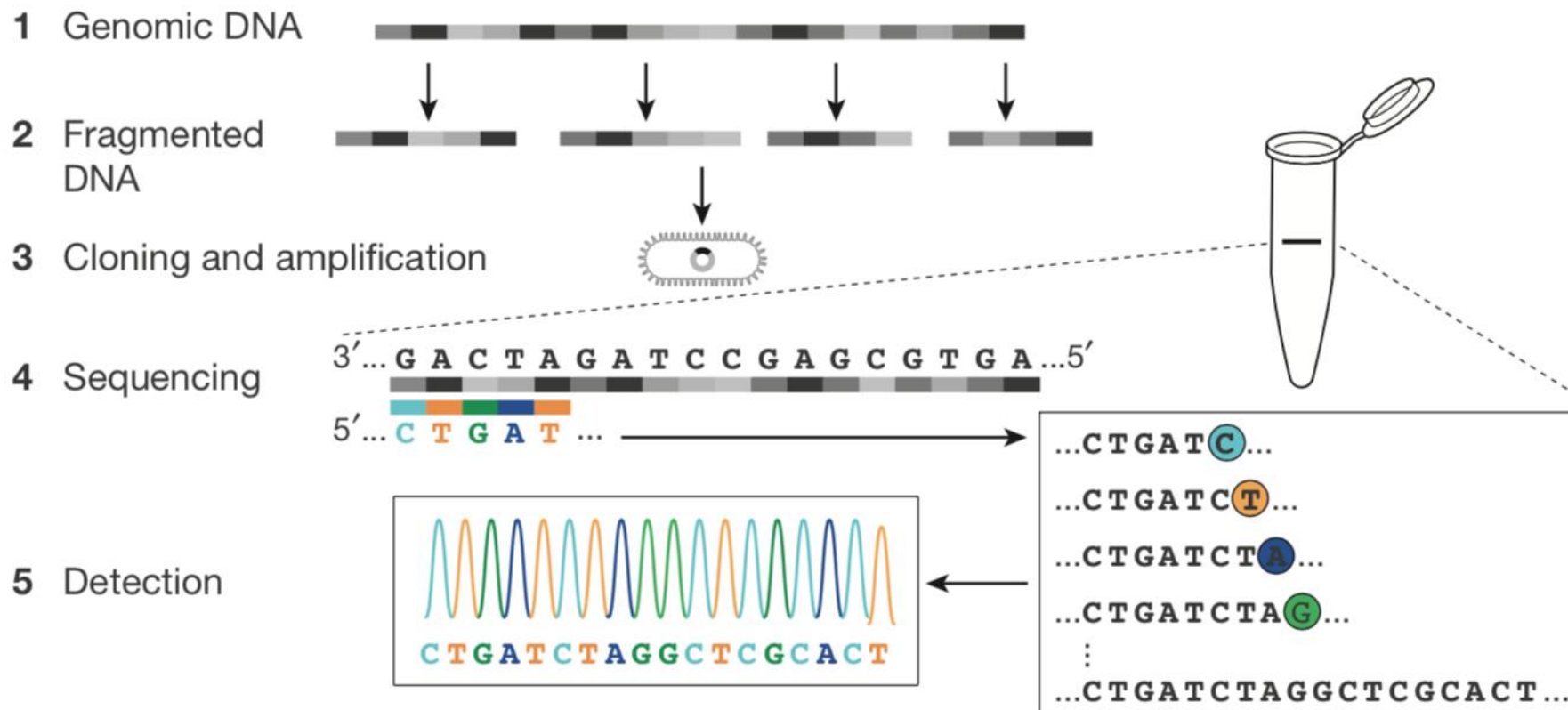
## 三代测序 (代表: PacBio、Oxford Nanopore )

Nanopore最长的读长可达3万个碱基, 是目前最长的测序技术, 同时可以测到DNA上的甲基化修饰, 测序的速度也很快。

# 一代基因测序技术 (Sanger)

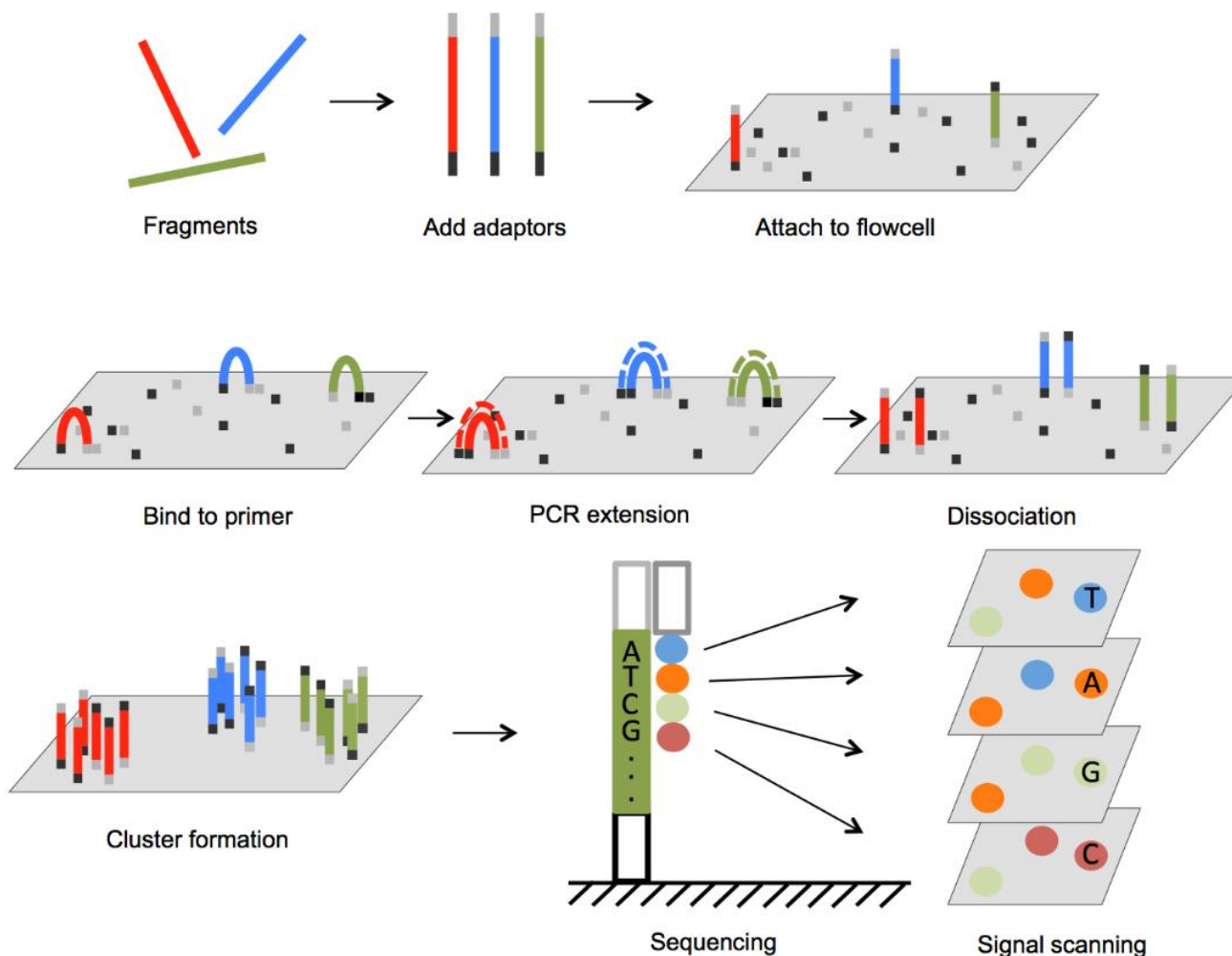
基于第一代测序技术的测序仪几乎都是采用Sanger提出的链终止法。链终止法测序的核心原理是ddNTP的2'和3'端都不含羟基，因此在合成核酸链的过程中无法形成磷酸二酯键，从而导致DNA合成反应中断。

## First generation sequencing (Sanger)



## 二代基因测序技术 (Illumina)

Illumina测序技术的原理是将DNA分子随机地固定在一块玻璃芯片上,然后通过PCR扩增,使其形成一个小的DNA簇。接着,通过荧光标记的核苷酸逐个加入到DNA链上,每次加入一个核苷酸后,就会发出一个荧光信号,这个信号会被检测器检测到并记录下来。



**NovaSeq 6000**

# 二代基因测序技术（华大-Complete Genomics）

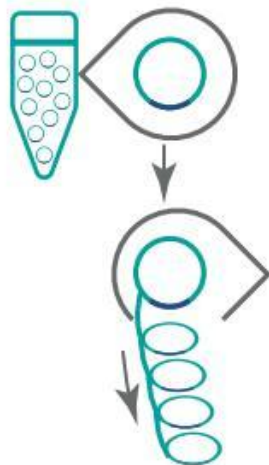
华大DNBSEQ测序平台采用的是DNB（DNA Nanoball，DNA纳米球核心测序技术，独特的线性扩增模式。完成模版扩增后，DNB将转载到Patterned Array（规则阵列）上进行测序。



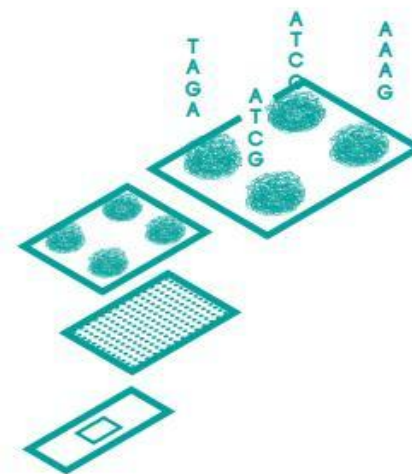
华大智造DNBSEQ-T7测序仪

## DNA纳米球测序技术——线性扩增无错误累积

- ↑ 高准确性
- ↓ 低重复序列率
- ↓ 低标签跳跃率



线性扩增模式  
无 PCR 累计错误



纳米级阵列位点设计  
测序精度高且不产生信号干扰



# 国产华大测序技术的崛起

## 声明

时间：2022-05-07

作者：华大智造

我们很高兴看到，美国特拉华州地区法院的陪审团判决支持了我们的全部请求，包括：

1. 因美纳 (Illumina) 故意对华大智造 (MGI) 的 "双色测序技术 (Two-color sequencing technology)" 专利侵权。
2. 因美纳 (Illumina) 反诉中提到的专利全部被判无效。
3. 华大智造 (MGI) 获得3.34亿美元赔偿。

保护知识产权对全球生命科技企业都非常重要，也是华大智造一直所坚持的价值观。我们愿和同道一起，致力于通过技术创新来推动行业发展，给世界更多选择的权利。我们将继续坚持开放包容，践行基因科技造福人类。

华大智造

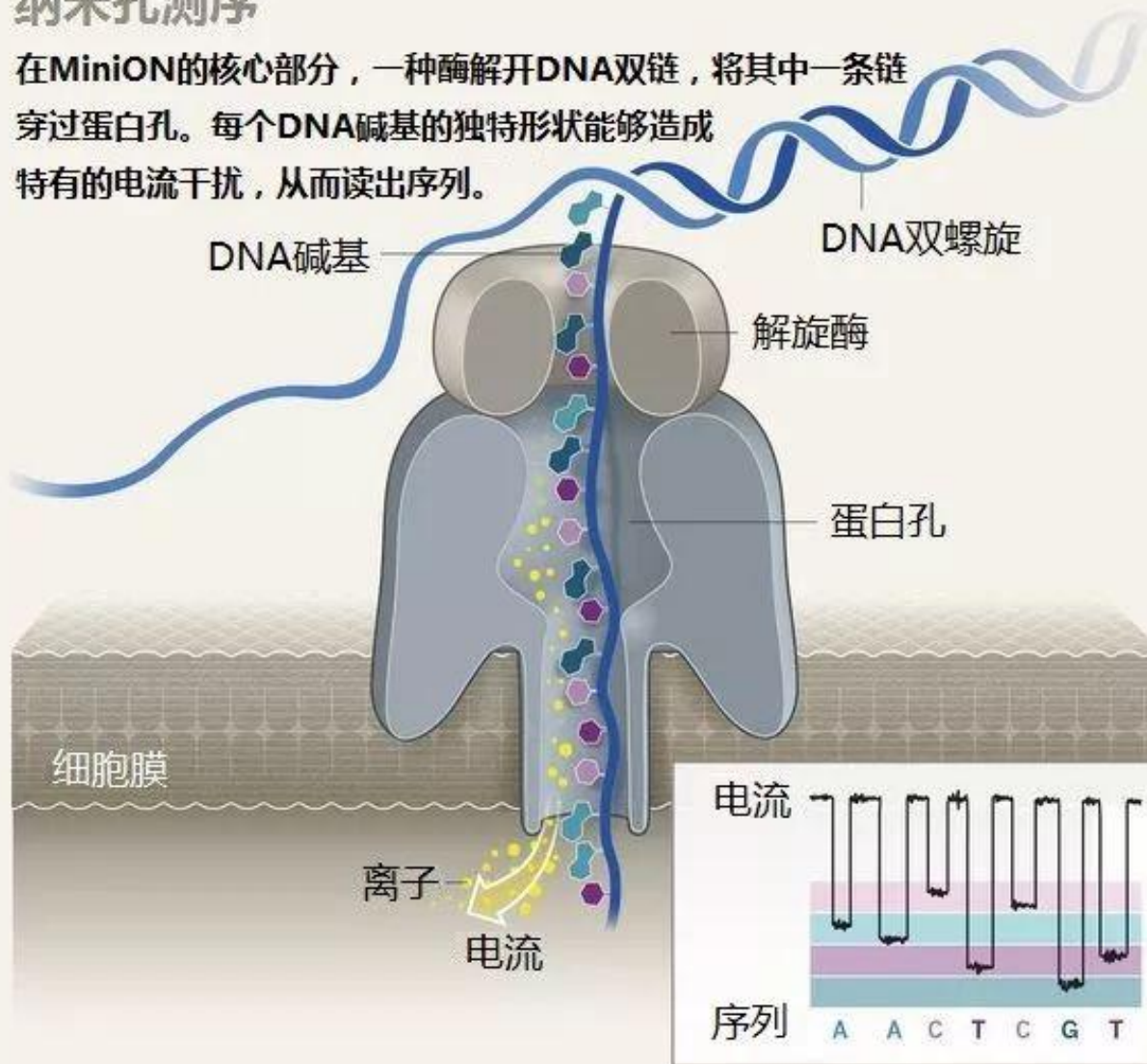
2022年5月7日

# 三代基因测序技术（Oxford nanopore）



## 纳米孔测序

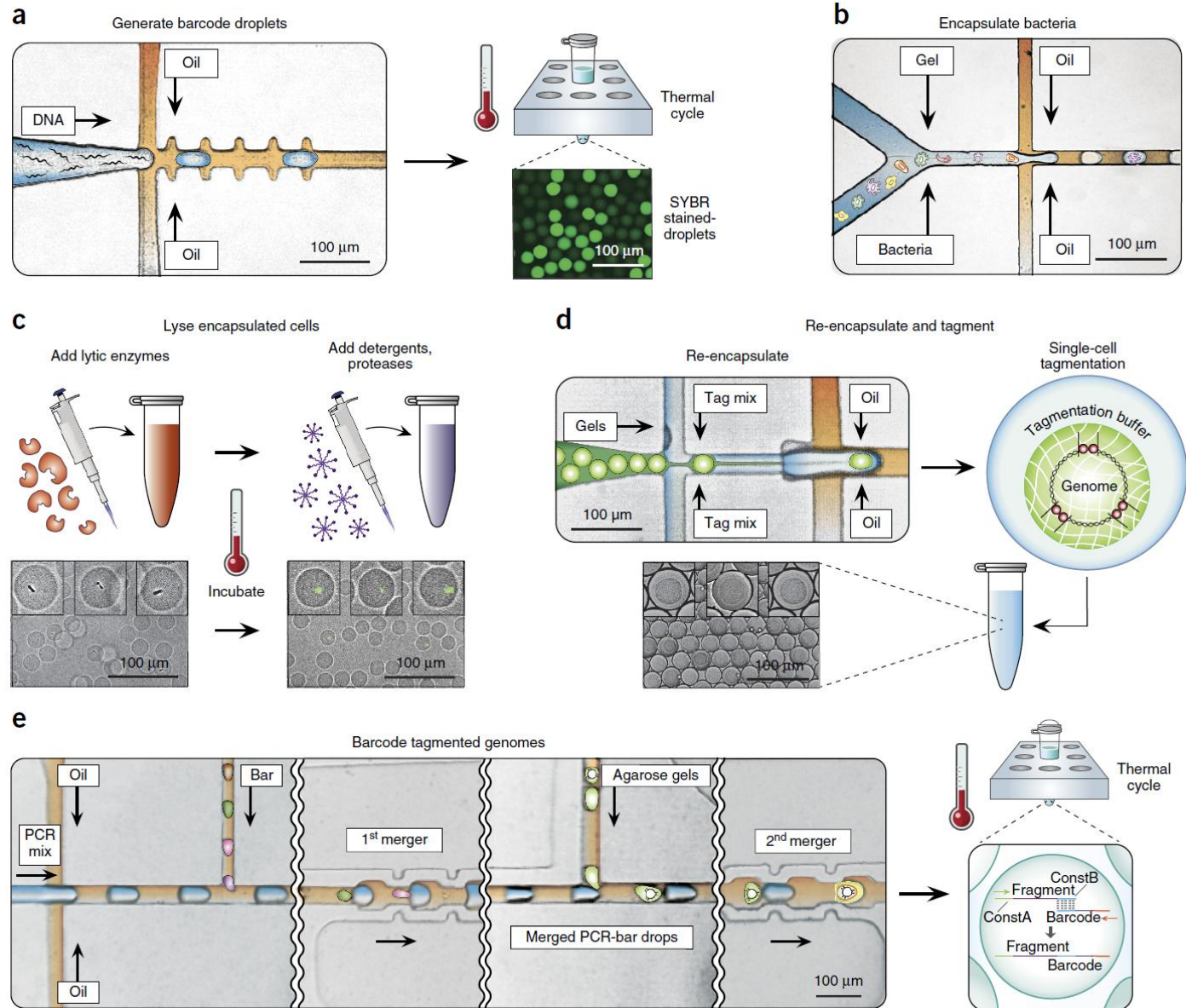
在MiniON的核心部分，一种酶解开DNA双链，将其中一条链穿过蛋白孔。每个DNA碱基的独特形状能够造成特有的电流干扰，从而读出序列。





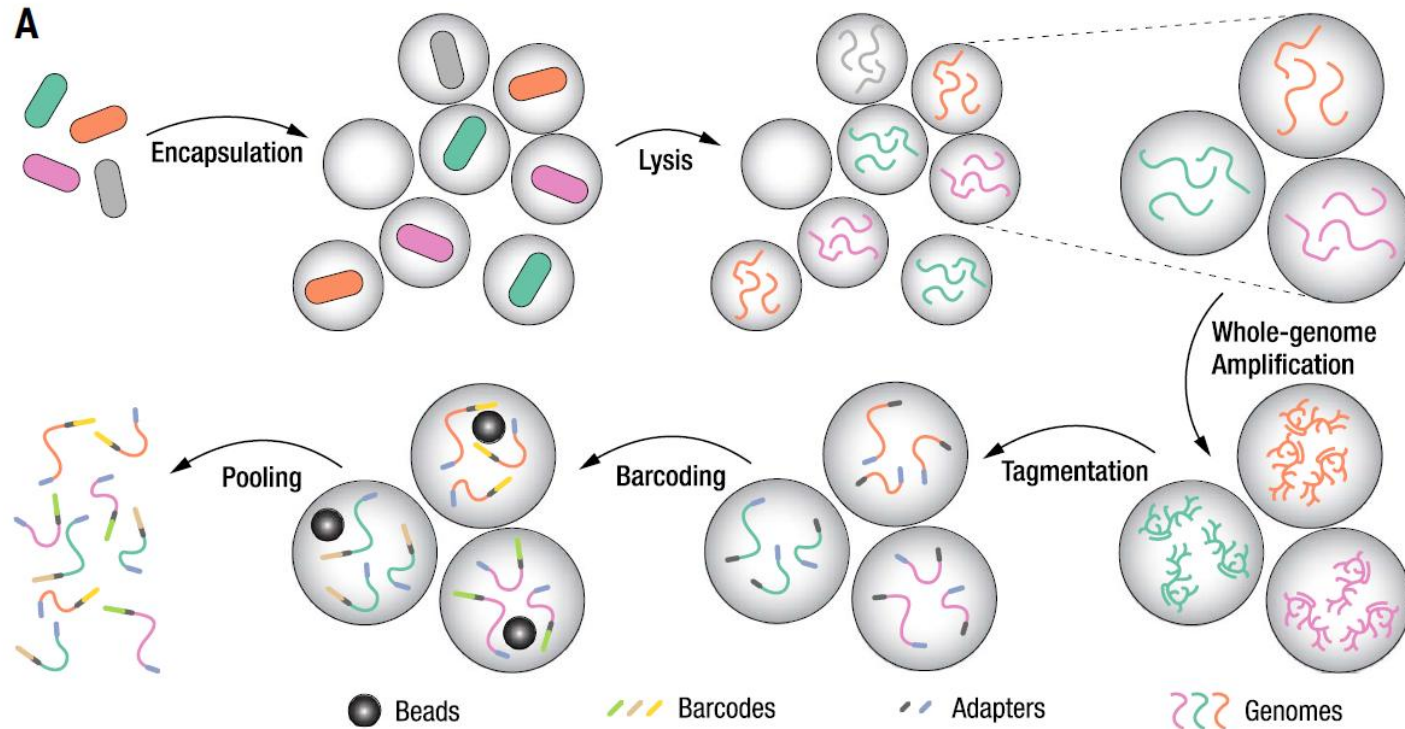
- 细菌的尺寸小，分离成单菌困难
- 细菌聚集和较低细菌量
- 复杂的细菌细胞壁
- 单细菌mRNA含量较低且缺少poly A尾巴，rRNA含量多
- 单细菌基因组DNA扩增难度大

# 单细菌基因组测序技术——SiC-seq

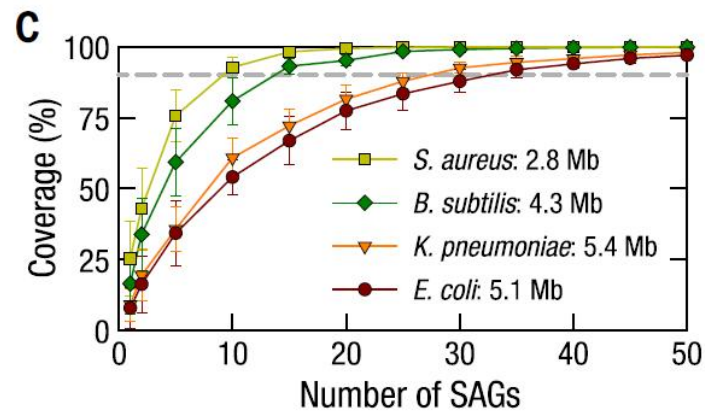
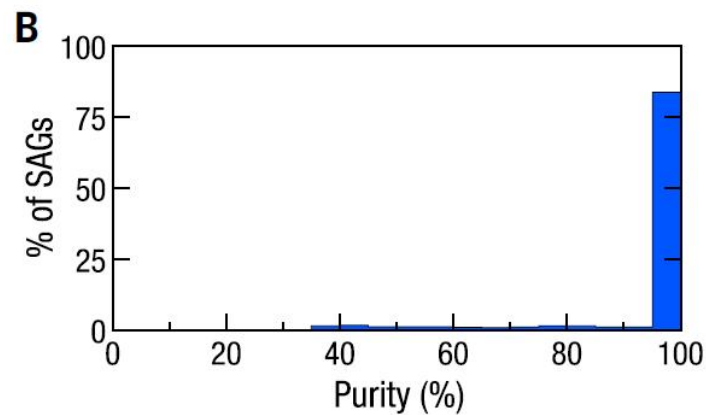


- 将单个细胞封装在熔融的琼脂糖微滴中，聚合后提供半渗透基质固定细菌细胞，在微流体设备中处理这些微凝胶，以生成用于测序的单细胞基因组文库

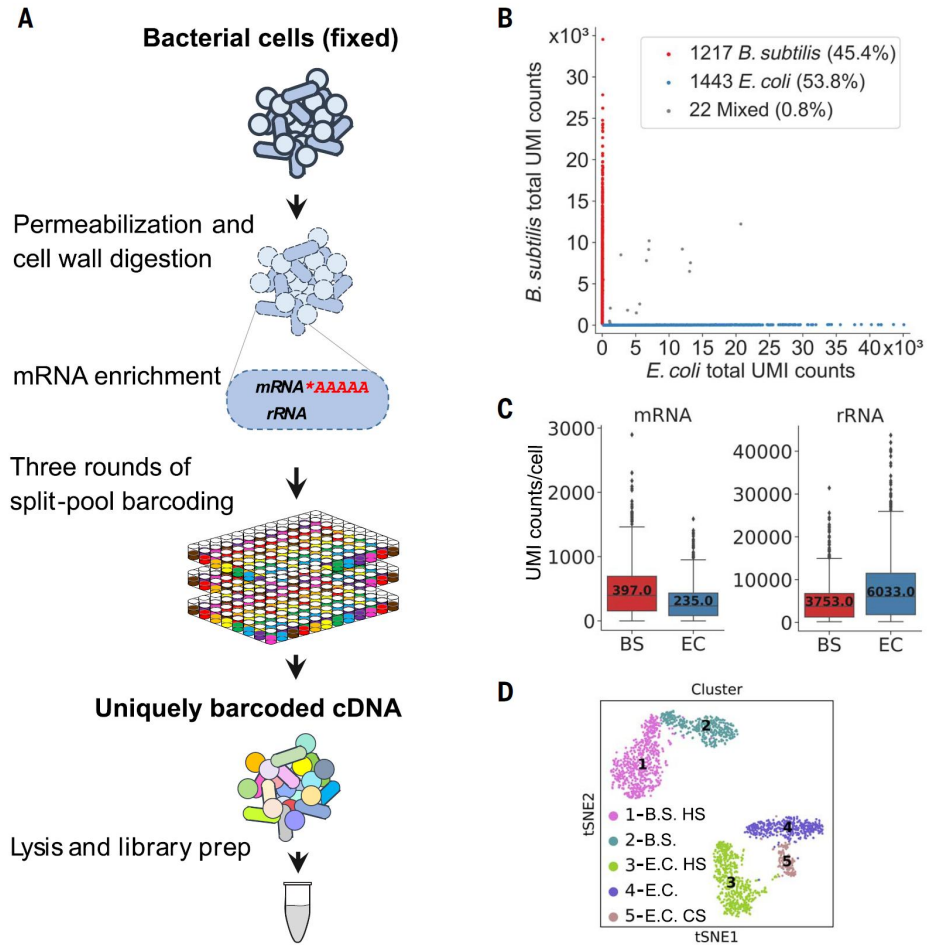
# 单细菌基因组测序技术——Microbe-seq



- 将单个细菌封装在含有裂解试剂的油包水中，液滴在微流控装置中与其他试剂进行一系列合并步骤，以执行基因组扩增

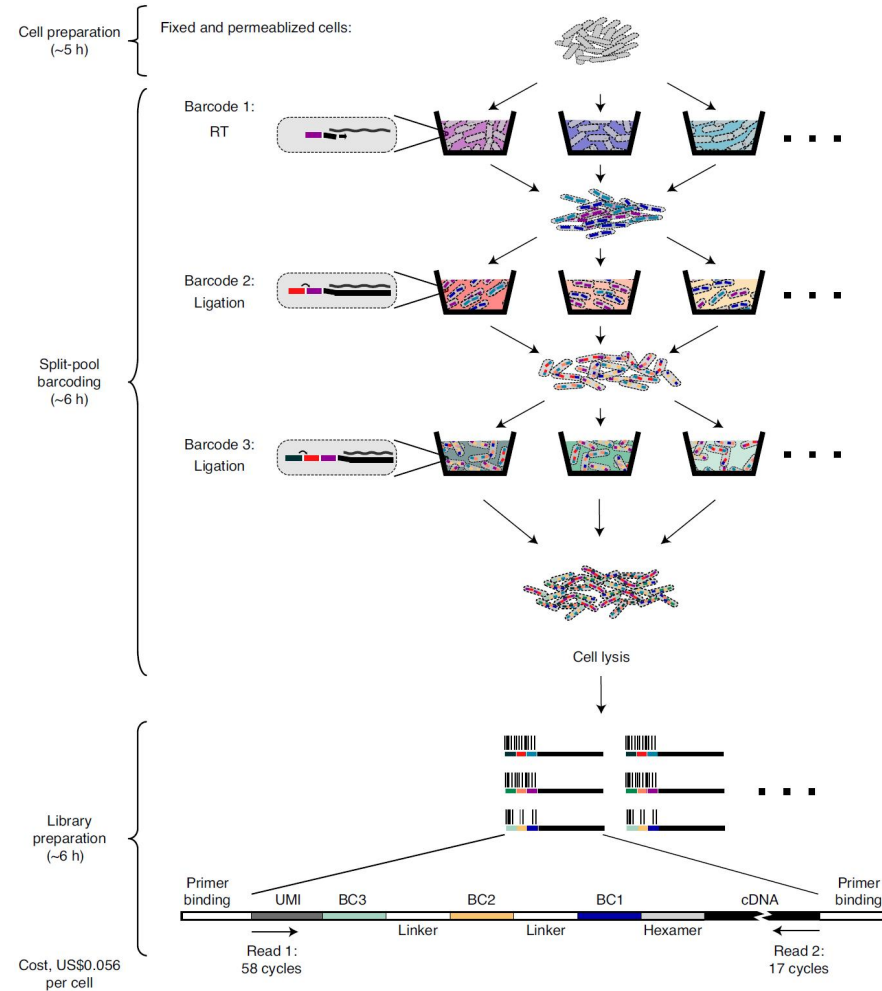


## MicroSPLiT



Kuchina et al., *Science*, 2021

## PETRI-seq



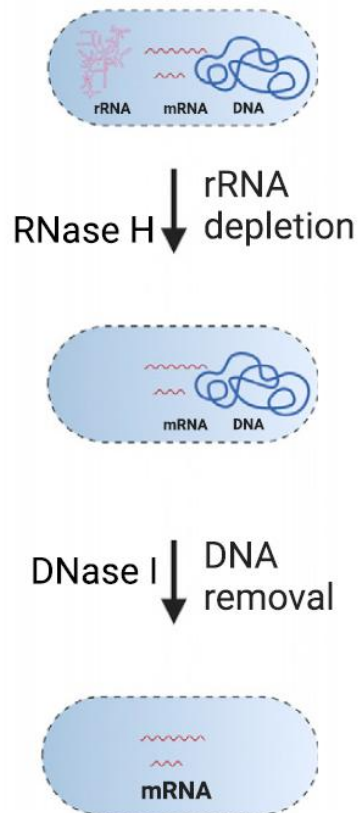
➤ 两种技术手段原理类似，均是通过Split-pool的方式实现单个细菌细胞的标记，来完成原核细胞的单细胞RNA测序。

Blattman et al., *Nat. Microbiol.*, 2020

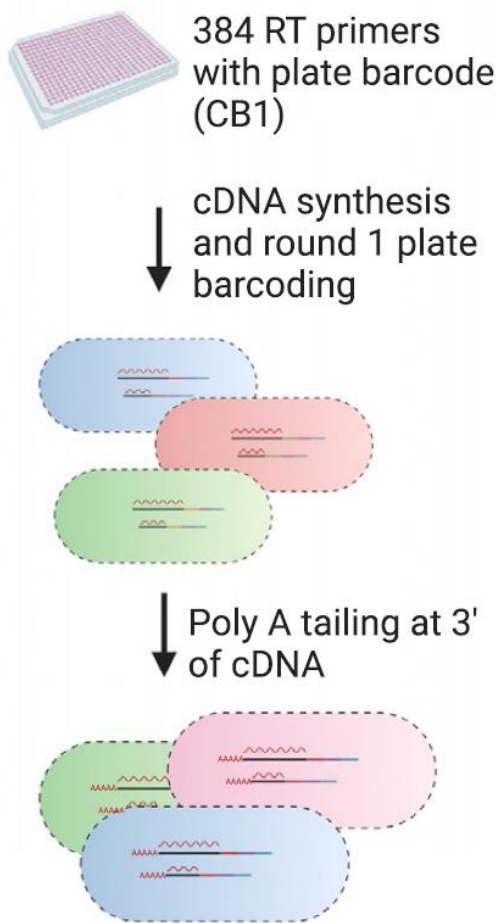


# 单细菌转录组测序技术-BacDrop

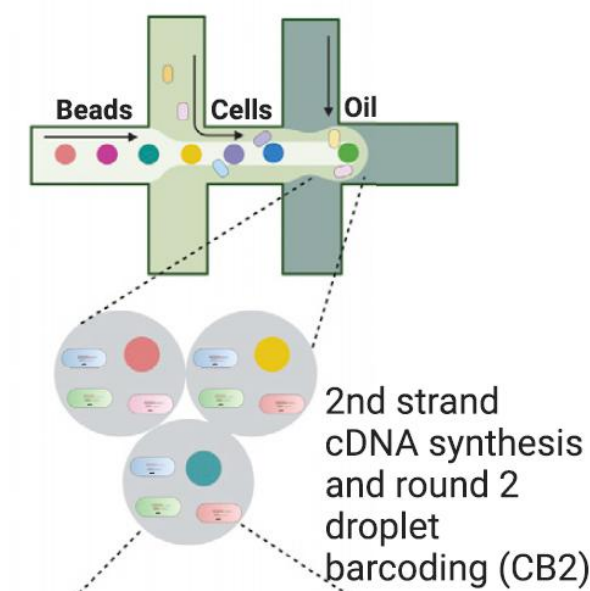
## 1. rRNA and DNA depletion in fixed and permeabilized cells



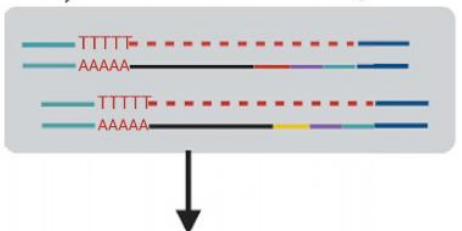
## 2. Reverse Transcription



## 3. Droplet generation and round 2 droplet barcoding



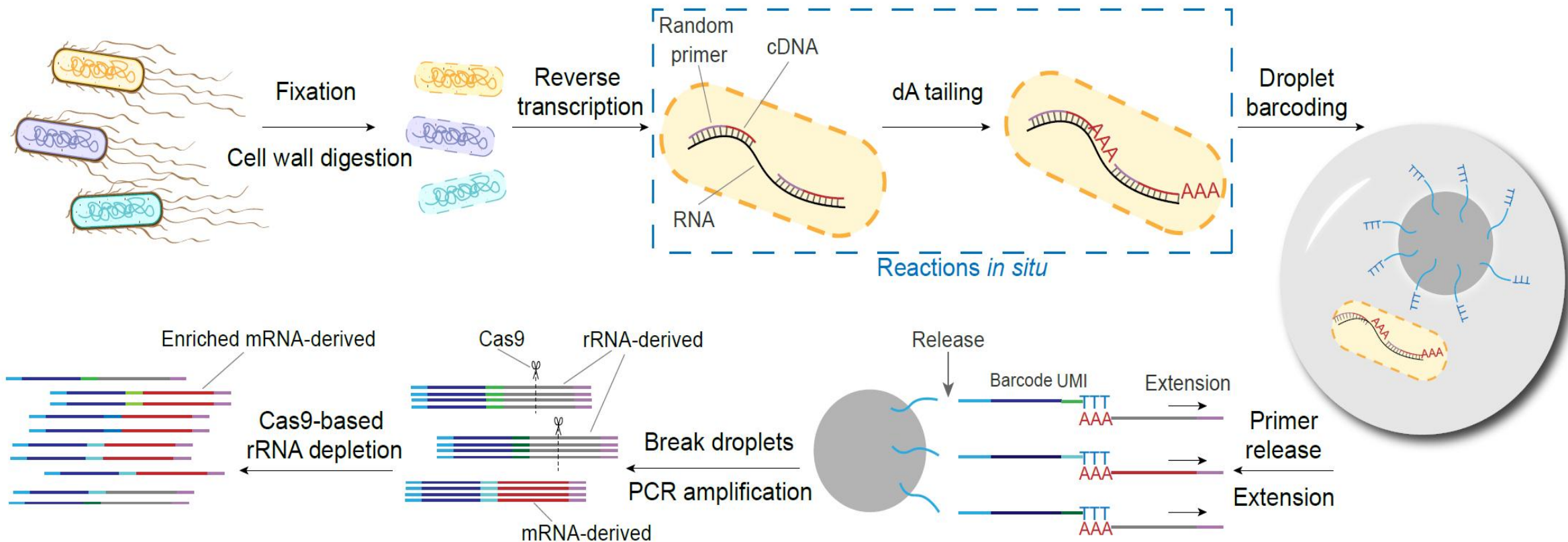
## 4. cDNA amplification and Library construction



- 一种基于细菌液滴的大规模平行scRNA-seq技术。
- 每个液滴中可加载3-6个细胞，并借助“板状条形码”（plate barcoding）和“液滴条形码”（droplet barcoding）组合用于唯一识别细胞

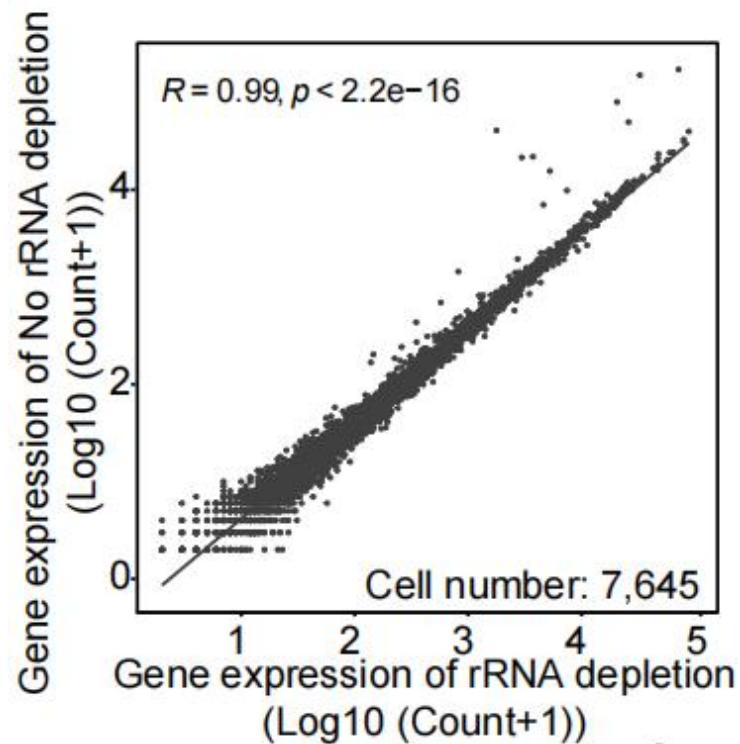
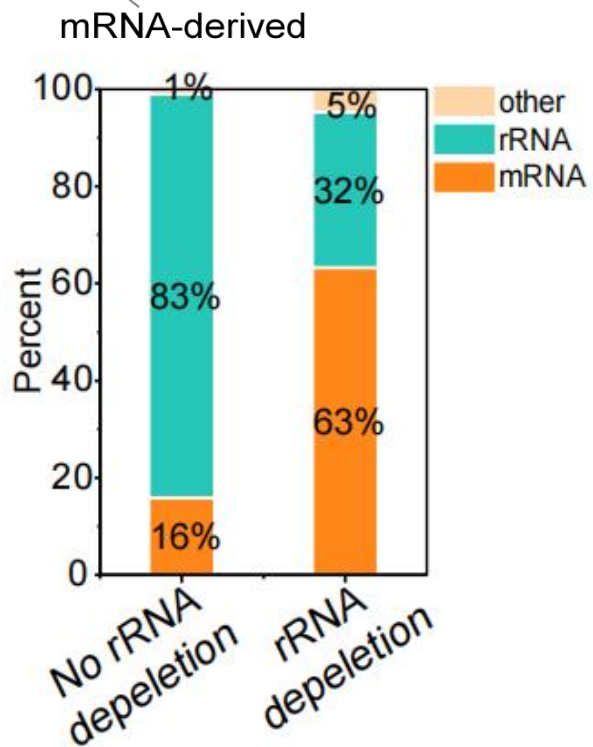
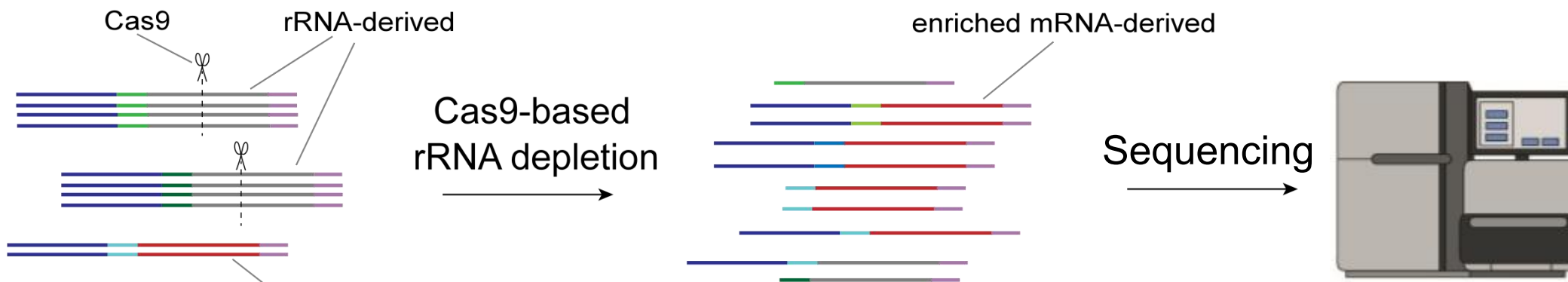


# 单细菌转录组测序技术-smRandom-seq

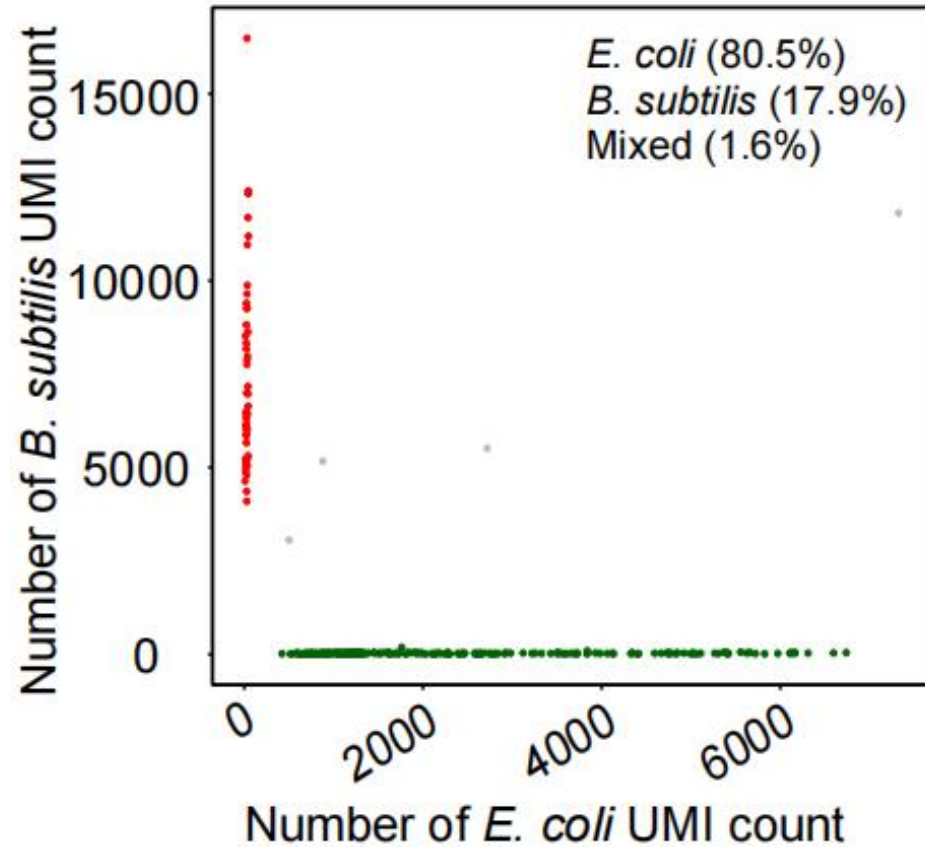


- 基于随机引物的单细胞全长转录组扩增技术，突破性的实现了微生物单细胞转录组检测，实现高通量单细菌分析。
- 单个细菌中可以检测到数百至数千个基因，对于细菌RNA的检测灵敏度高，交叉污染小。

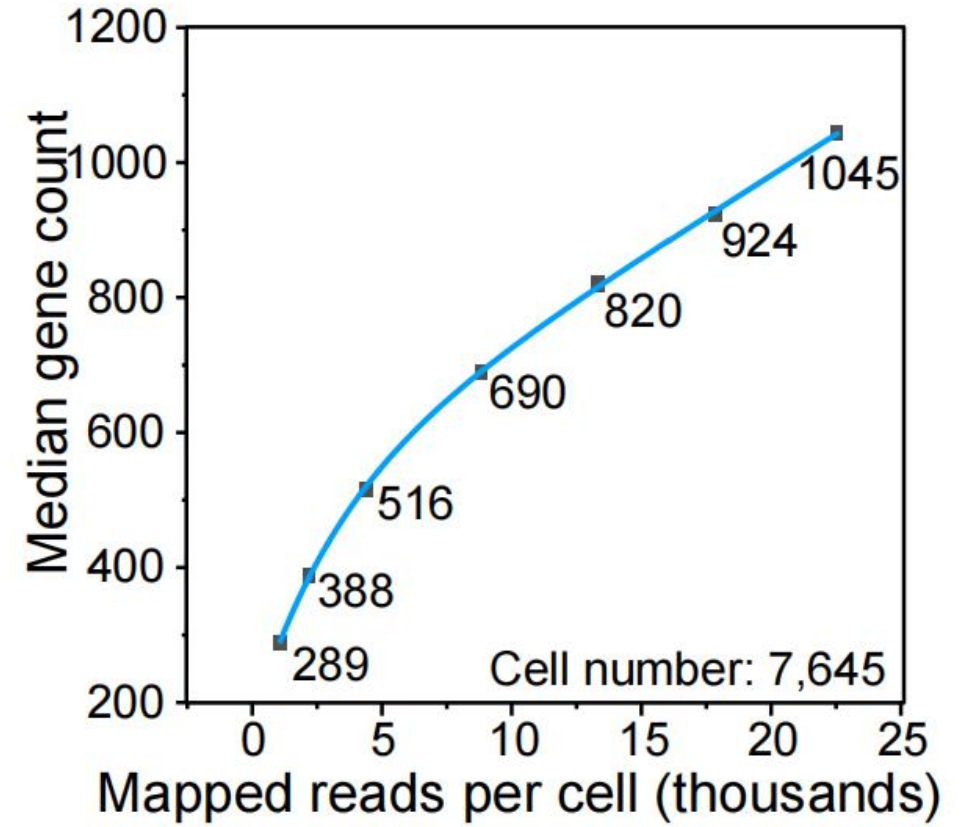
# 单细菌转录组测序技术-smRandom-seq



Two-species mixing experiment

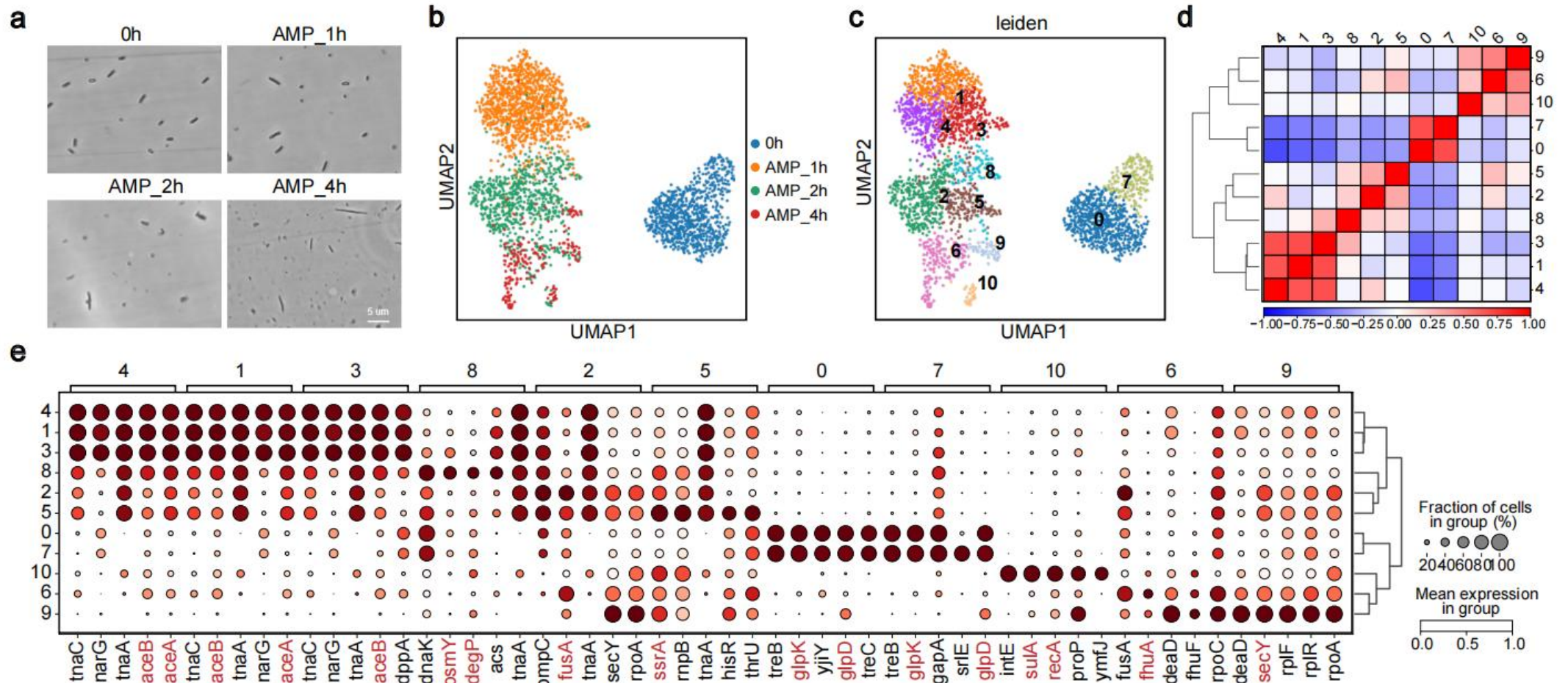


Gene counts for single E.coli





# 单细菌转录组测序技术-smRandom-seq





### 新兴技术面临的挑战：

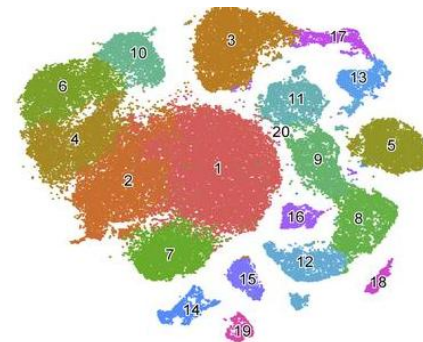
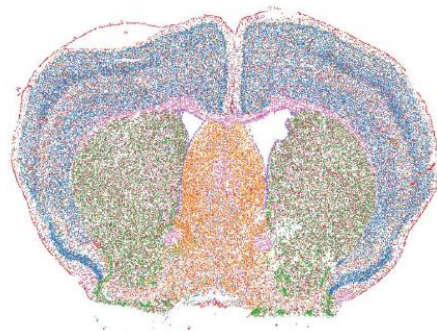
- 发现偏差和表型特征（例如：细菌大小和细胞壁结构的多样性）
- 特定生态系统中的细菌聚集和较低细菌量
- 尚难以用于临床和生理学相关的人类微生物组样本





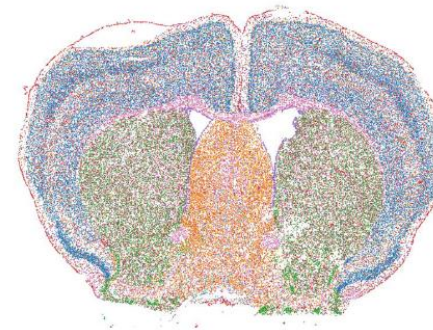
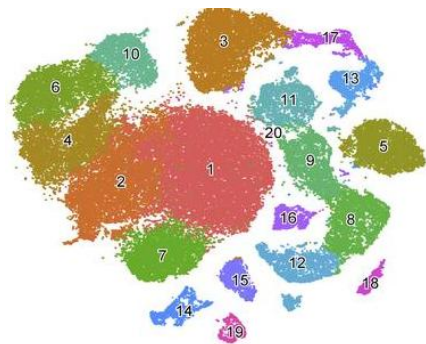
### What we get by scRNAseq

单细胞转录组



### What we need to answer all the questions

空间转录组





## Commercially Available or Commercializing Spatial Platforms



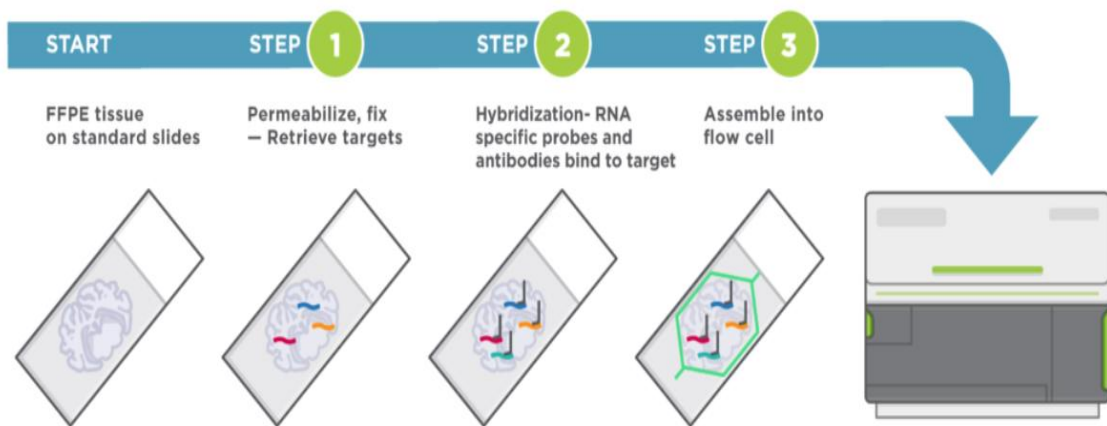
### Imaging-based

- Molecular Cartography (Resolve Bios.)
- MERSCOPE (Vizgen)
- Xenium (10X genomics)
- CosMx SMI (Nanostring)

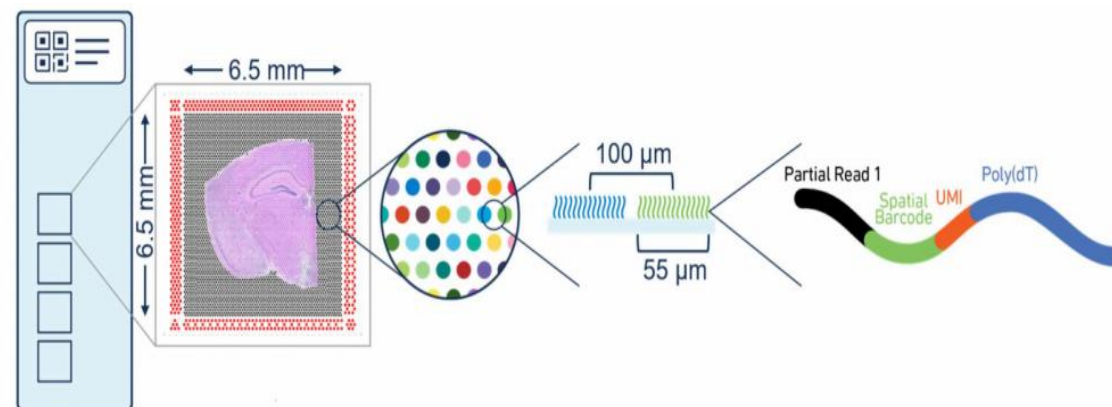
### Sequencing-based

- 10X Visum (10X genomics)
- GeoMx DSP (Nanostring)
- BMKMANU S1000 (BMKGENE)
- Stereo-seq (Complete Genomics)

## Imaging-based (Example)

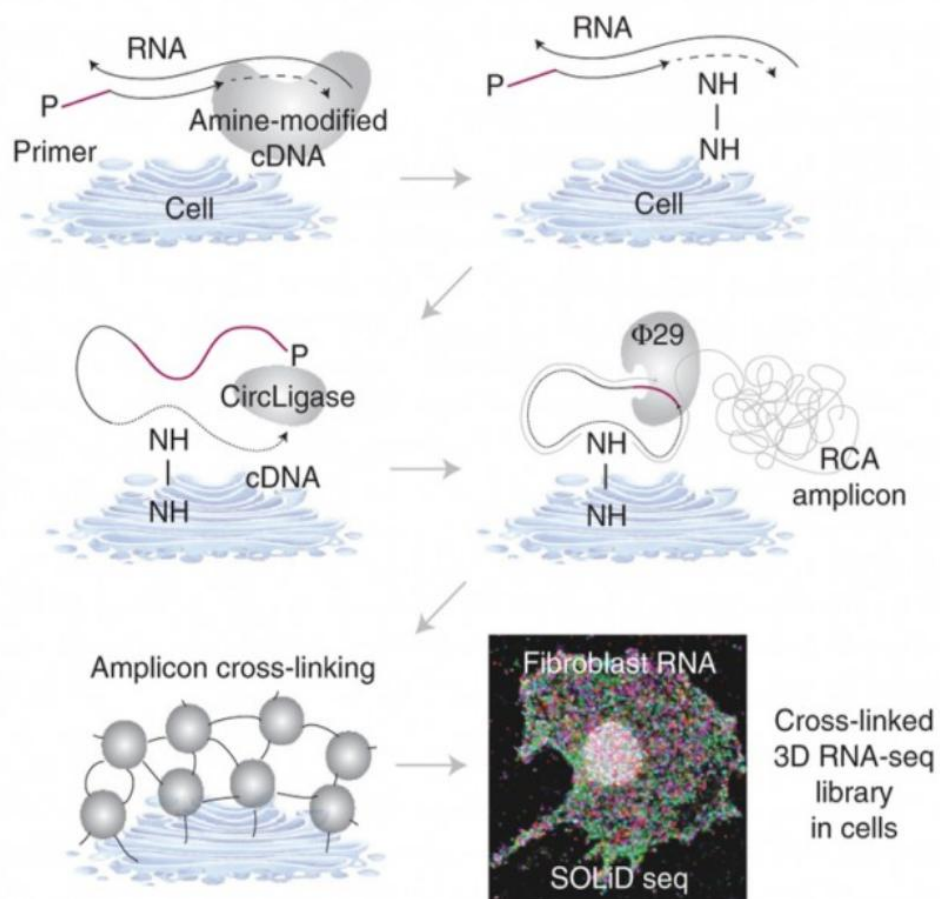


## Sequencing-based (Example)



# 空间转录组成像技术-FISSEQ

**a** 5' phos- **TCTCGGGAACGCTGAAGA** NNN NNN -3' RT primer  
3'- **A\*G\*AGCCCTTGCGACTTCT** -5' RCA primer  
5' phos- **TCTCGGGAACGCTGAAGA** -3' Sequencing primer



- 一种非靶向的方法，将RNA转化为交联的cDNA扩增子，然后在共聚焦显微镜上进行测序。
- 利用随机六聚体引物在固定细胞中逆转录RNA，然后通过cDNA的环化以非靶向方式生成测序文库。
- 提高了原位测序技术的检测通量，能获得全基因组范围的基因表达图谱，包括基因表达，RNA剪接和转录后修饰等，同时保留了它们的空间位置信息。

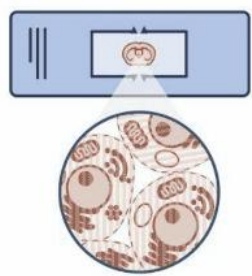
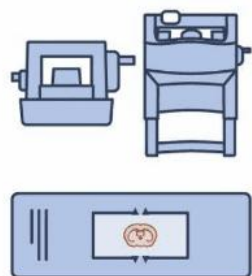
# 空间转录组成像技术-10X Genomics Xenium

## Sample Preparation

## Probe Hybridization, Ligation, & Amplification

FF or FFPE Tissue Sections  
on Xenium slides

Fixation & Permeabilization (FF) or  
Deparaffinization & Decrosslinking (FFPE)

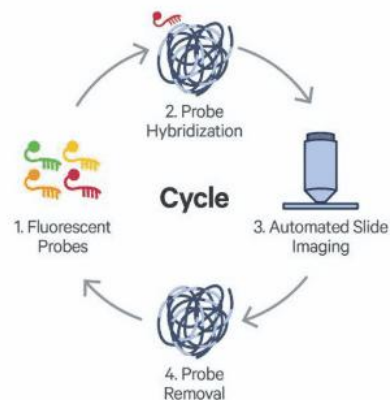


Ligation &  
Primer Hybridization for Amplification

## Fluorescent Probe Hybridization, Imaging, & Decoding

## Data Visualization

Xenium  
Analyzer



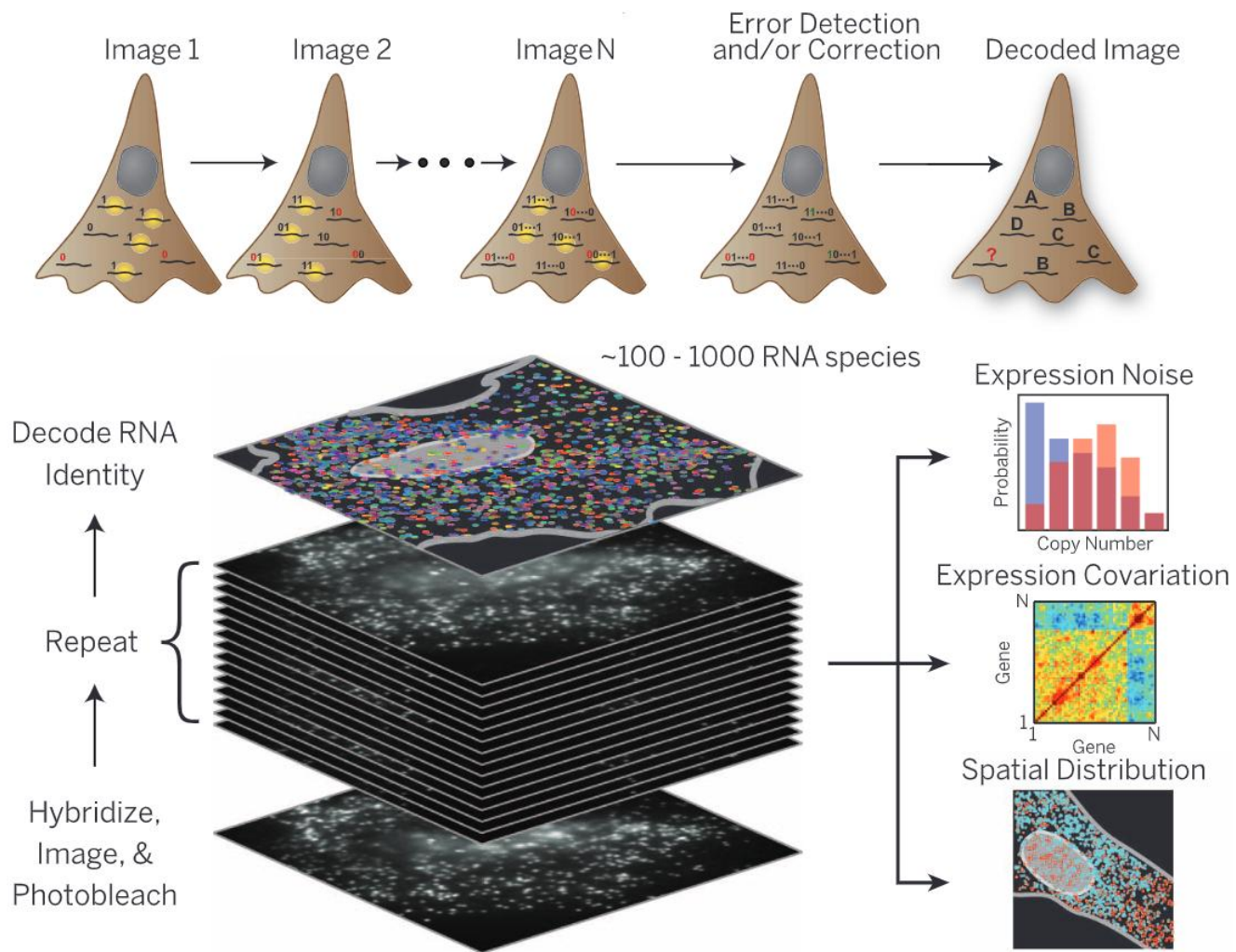
Cycle



- Xenium平台基于FISSEQ技术发展而来。
- 采用高度特异且灵敏的可环化锁式探针来检测感兴趣的RNA转录本。
- 直接通过多轮荧光成像的方式，以单细胞/亚细胞分辨率，对数百个RNA靶点进行检测，实现在亚细胞分辨率水平检测靶基因在组织原位中的表达。

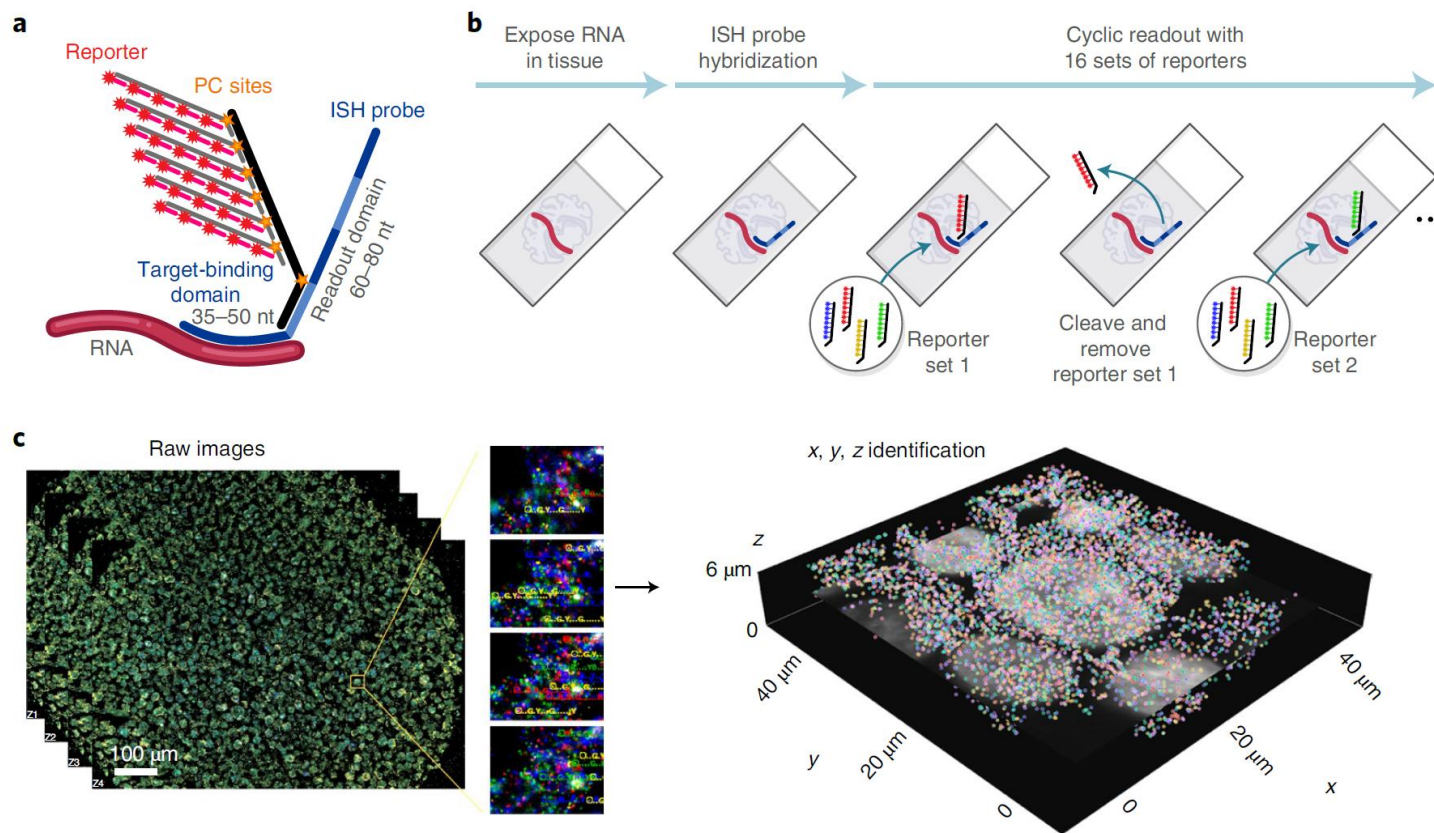


## MERFISH: multiplexed error-robust fluorescence in situ hybridization



- 多重**荧光原位杂交技术**：可以鉴定单个细胞中数千种RNA的拷贝数和空间定位。
- 用一组编码探针标记每个细胞RNA，其中包含结合RNA的靶向序列和结合荧光标记读出探针的读出序列，利用组合标签、连续成像等技术来提高检测通量，并通过二进制条形码来抵消单分子标记和检测错误。
- Vizgen公司进行商业化。

# 空间转录组成像技术-NanoString CosMx SMI

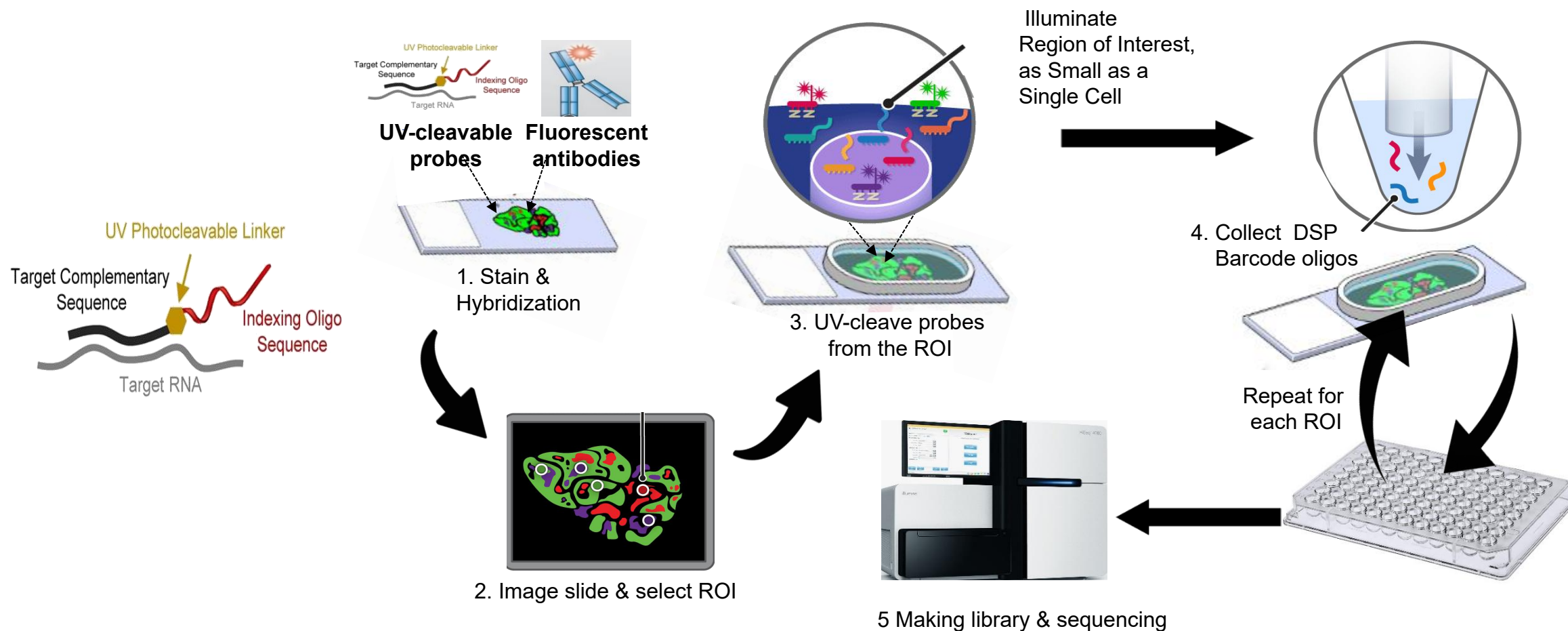


- 一个高分辨率的、原位的单细胞 RNA 或蛋白空间成像系统。
- 通过进行荧光分子条形码的多个核酸杂交循环，以亚细胞分辨率测量完整生物样品中RNA和蛋白质。
- 可以对 RNA或者蛋白做多种组学的检测，可以对 FFPE 切片样本、新鲜冷冻组织切片、组织微阵列、类器官等多种样本做检测。

# 空间组学测序技术-NanoString GeoMx DSP

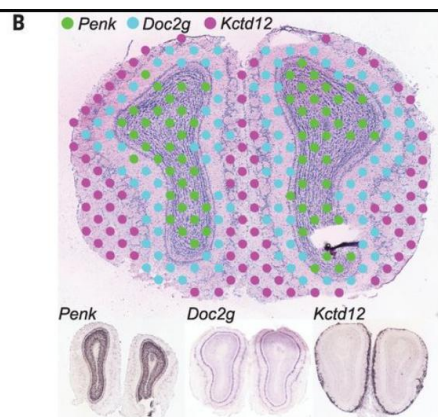
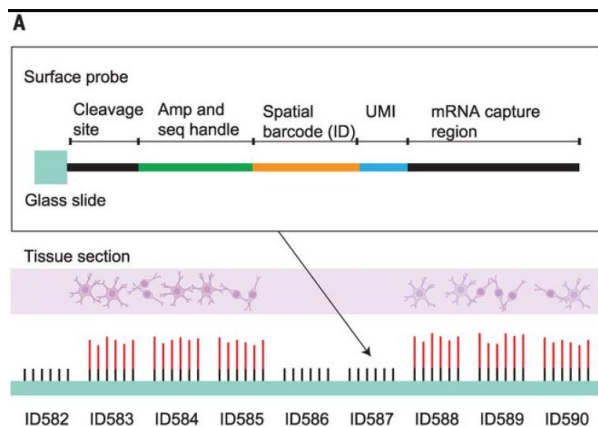
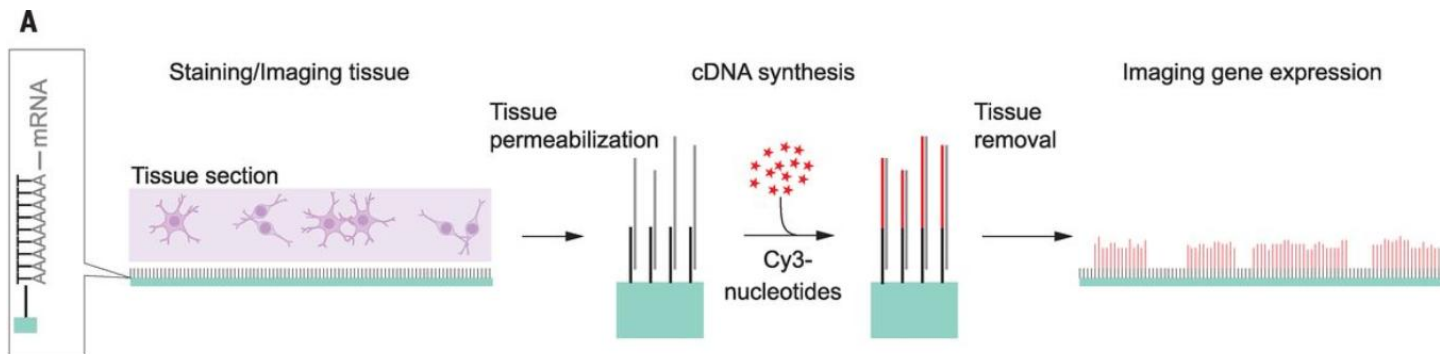
**GeoMx DSP:** 将蛋白质组的多重定量信息与组织原位信息进行整合，可在一张石蜡组织切片上实现多达上百种蛋白质的原位共分析。

➤ 通过核酸探针偶联的抗体对靶蛋白质进行原位捕获，再通过特殊的光解离释放核酸探针，运用nCounter数字标签技术实现计数定量，从而直接反映出靶蛋白质的丰度。





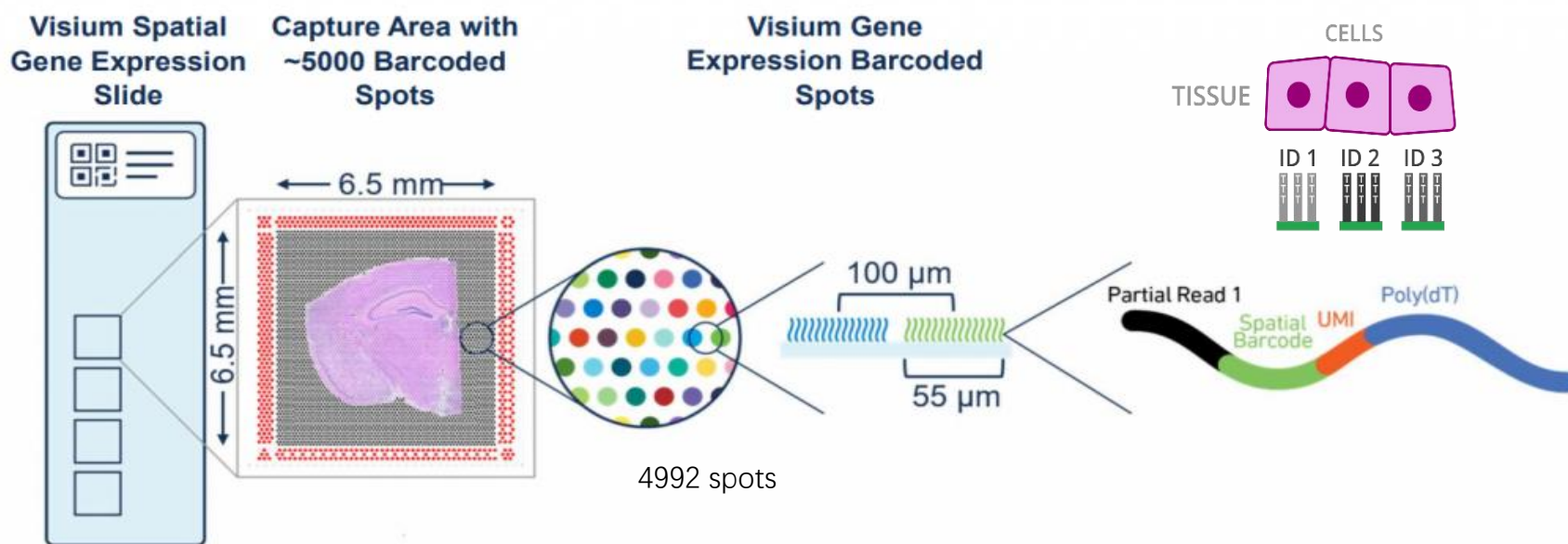
# 空间转录组测序技术-Spatial transcriptomics



- 基于原位捕获RNA的空间转录组学技术，将RNA测序技术与空间切片技术结合，在亚细胞水平对切片进行测序。
- 表面覆盖着含barcode寡核苷酸的载玻片，可与组织切片中的mRNA结合，继而追踪确定每条mRNA在组织中的位置。
- 利用基因芯片技术将位置信息保留在芯片上，再利用二代测序技术对组织中的RNA进行测序，从而生成了组织切片上完整的基因表达图像。

# 空间转录组测序技术-10X Genomics Visium

**Visium:** 在组织原位检测全转录组基因表达的一种技术，使得我们在检测基因表达水平的同时，获得基因在组织内部空间表达的位置信息。Visium平台由Spatial transcriptomics技术发展而来。

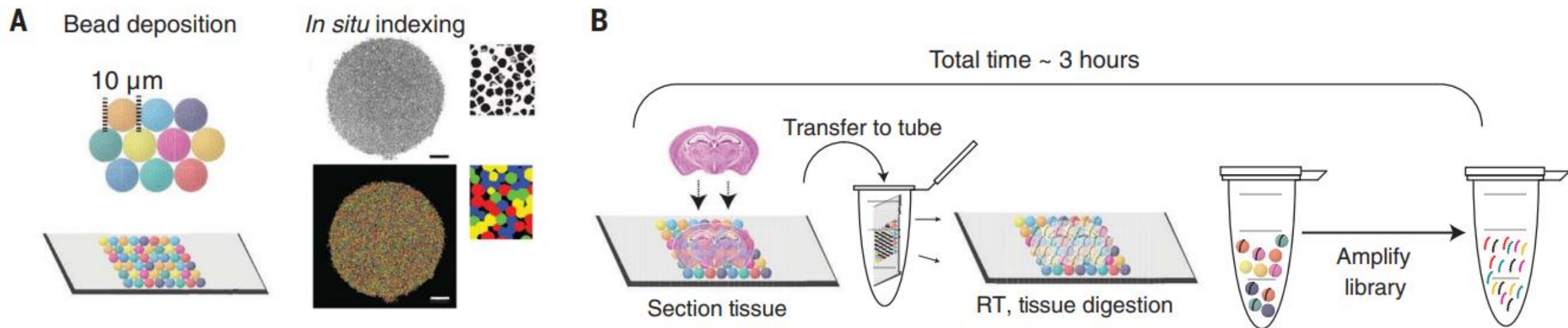


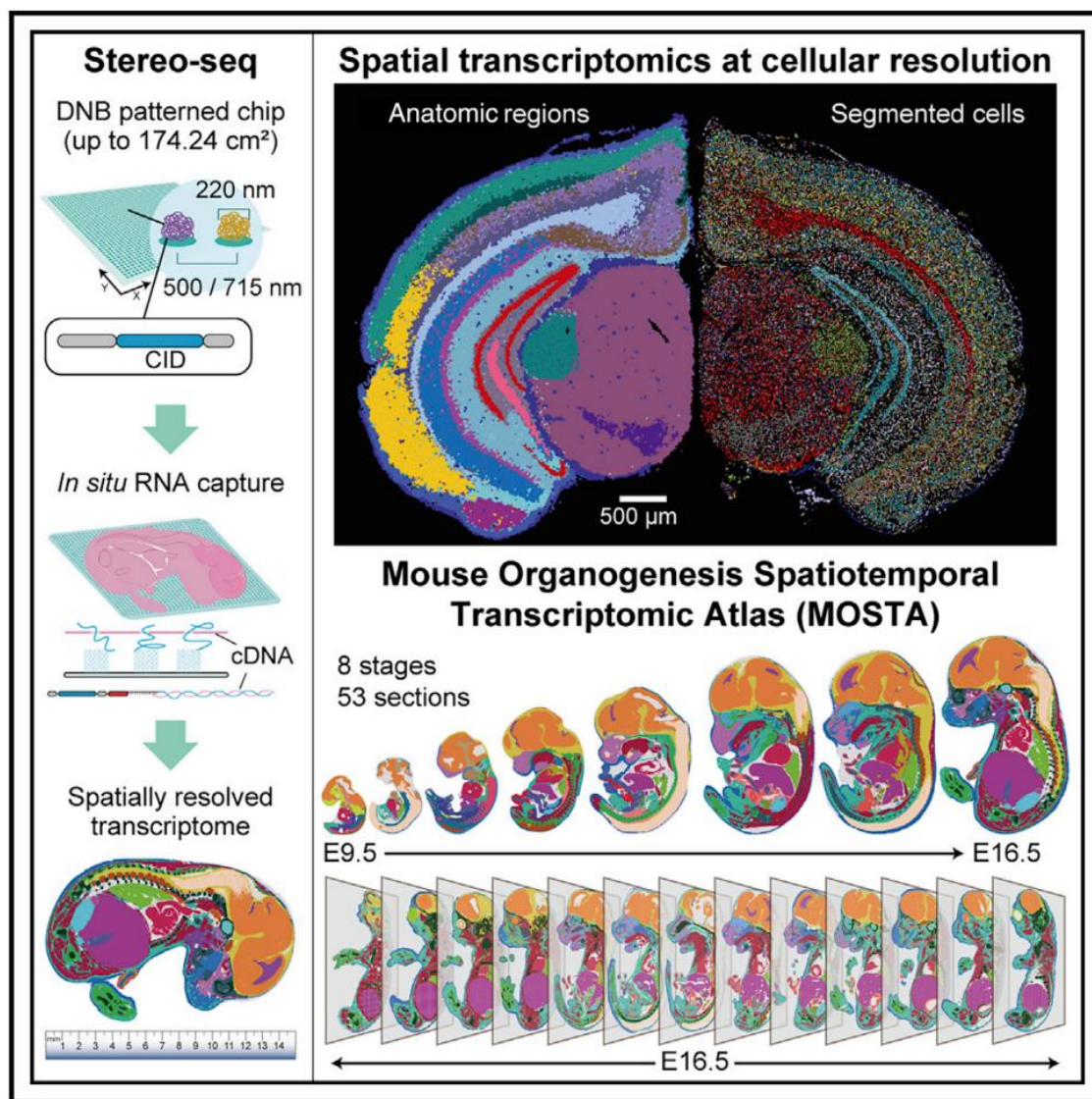
- 将新鲜的冷冻组织切片成像，观察组织结构，将切片置于含有RNA捕获探针载玻片上。
- 对组织切片进行固定和透化，使RNA释放，结合相应的捕获探针。
- 以捕获的RNA为模板合成cDNA，制备测序文库，将制备好的文库上机测序并进行数据可视化。



## 空间转录组测序技术-Slide-seq

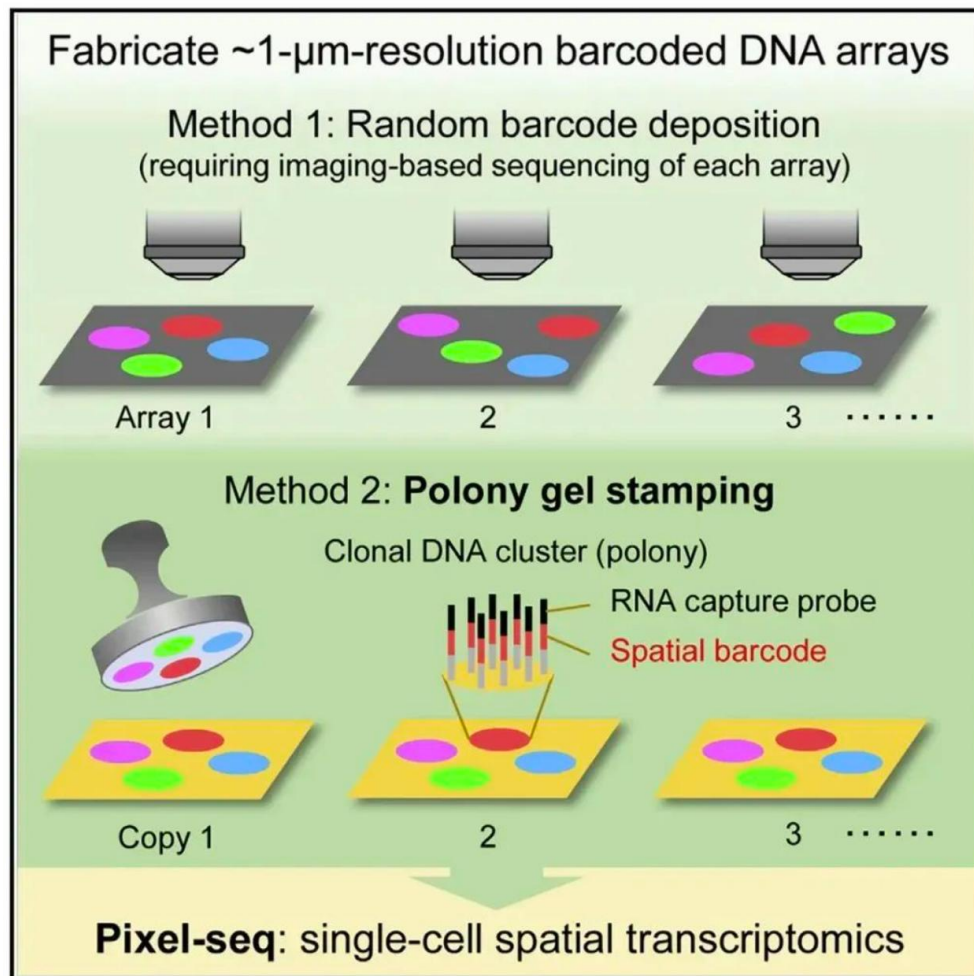
**Slide-seq:** 这是一种将组织切片中的RNA转移到表面的方法，表面覆盖有已知位置的DNA条形码珠，通过测序可以推断出RNA的位置。





- 一种基于 DNB（DNA 纳米球）的空间分辨转录组技术，具有全基因组覆盖、细胞分辨率、高灵敏度和大视野。
- 将DNA纳米阵列和组织RNA捕获相结合，以细胞分辨率实现大视场的空间转录组测序，从而能够解剖空间细胞类型的异质性。
- 应用该技术建立了小鼠器官发生时空转录图谱 (MOSTA)，该图谱以单细胞分辨率和高灵敏度描绘了小鼠器官发生过程中转录变异的动力学和方向性。

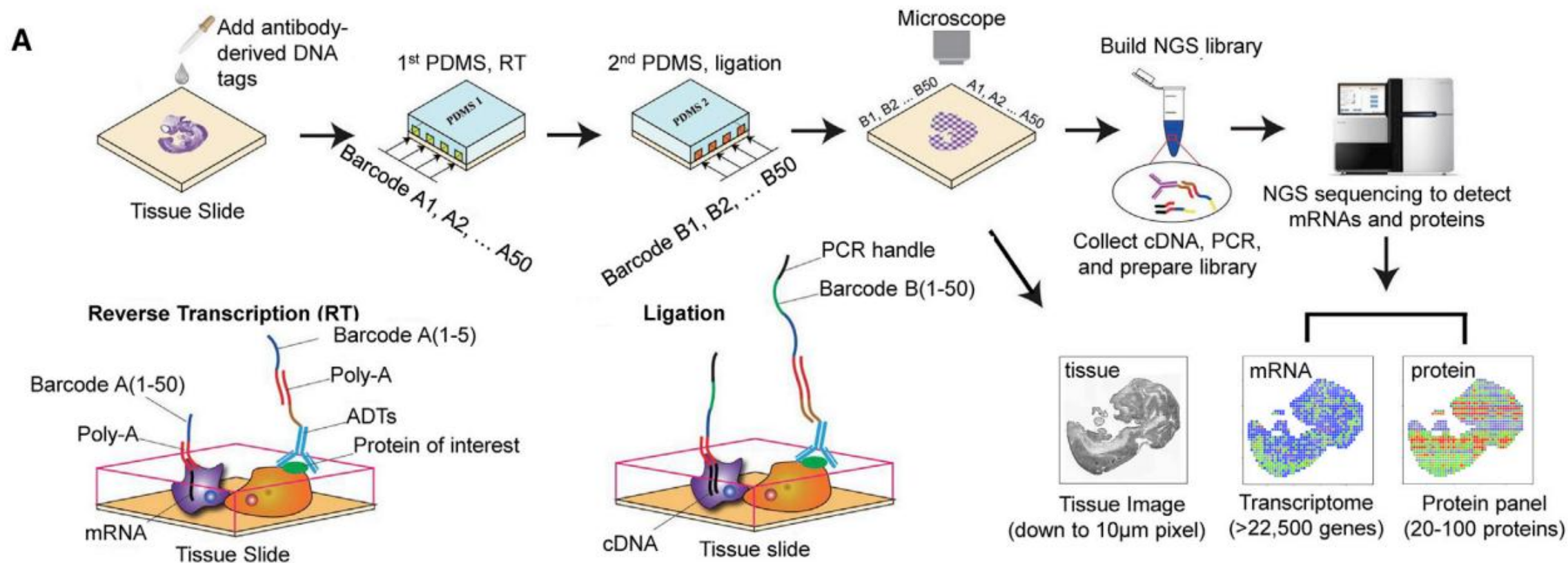
**Pixel-seq:** 在聚丙烯酰胺凝胶表面重复印刷分辨率到达1微米的高密度DNA芯片（**polony gel**），并将其运用于空间转录组学。



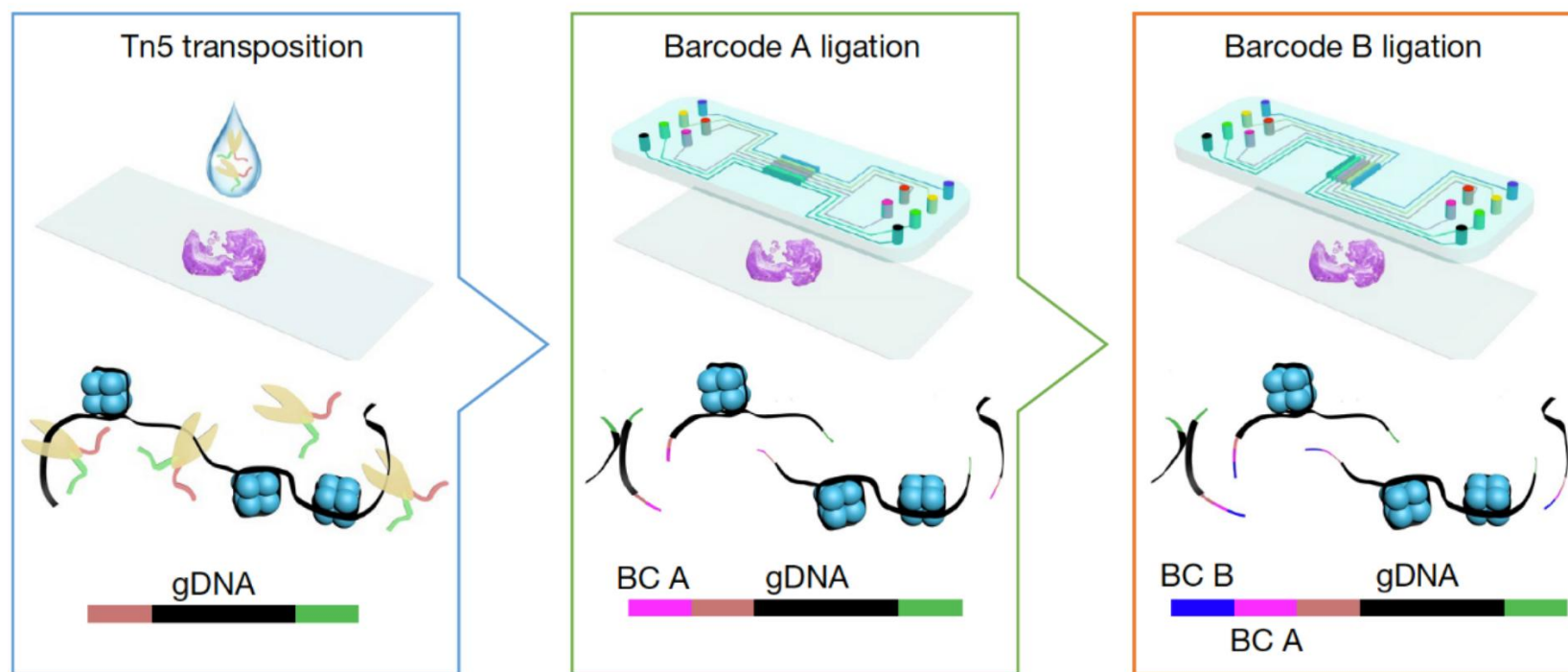
- polony gel芯片的点阵由连续且均匀分布、平均直径约为1微米的DNA簇构成，更适合观测连续完整的生物组织结构；
- polony gel芯片的聚丙烯酰胺胶基底可以把模板的扩散控制在小于1微米的范围内，防止了细胞之间转录模板的扩散，进一步提高了空间组学的分辨率，基本达到了单细胞水平。



**DBiT-seq:** 利用微流控芯片技术, 对切片组织进行编码, 通过在组织中使用确定性条形码进行空间组测序, 从而实现在切片组织中共同绘制mRNA和蛋白质定位。



**Spatial-ATAC-seq**：利用微流控技术将组织进行空间二维编码，并与ATAC-seq技术进行结合，实现了全基因组尺度的染色质可及性分析，实现了对于组织环境中表观遗传机制的全基因组图谱分析。







- 亚微米的分辨率
- 检测灵敏度提升
- 大尺度解析
- 多组学检测
- 成本降低

# Thank you !

