

一种单细胞转录组测序方法及其应用

技术领域

本发明属于生物技术领域，涉及单细胞测序领域，具体而言涉及一种单细胞转录组测序方法及其应用。

背景技术

目前使用最广泛的高通量单细胞转录组测序技术是 10X Genomics 公司开发的基于液滴微流控平台的单细胞测序技术，该技术可实现数千个细胞的标记、测序和分析，获得单细胞水平的基因表达谱，实现细胞亚群的划分和细胞亚群间差异表达基因的检测，与之类似的技术还有 inDrop 技术和 Drop-seq 技术。

10X Genomics 转录组测序技术的基本操作和原理为（参见图 1）：将样本制备成单细胞悬浮液（其中的细胞活性需高于 90%，细胞浓度一般约为 700~1200 个细胞/ μL ），之后通过微流控平台将带有条形码（Barcode）和引物的单个编码微球（编码微球由凝胶珠和凝胶珠上连接的一段引物构成）与单个细胞包裹在油滴中；在每个单个液滴中，凝胶珠溶解，细胞裂解释放 mRNA，通过反转录产生用于测序的带条形码和 UMI 信息的 cDNA；破碎液滴油层后收集 cDNA 进行扩增，制备 cDNA 文库，然后使用 Illumina 测序平台对文库进行测序检测，从而获得大量单细胞的基因表达数据。

上述测序技术中使用的凝胶珠上连接的引物序列包含四个部分：Illumina TruSeq Read 1 测序引物、16 nt 的条形码、12 nt 的 UMI 和 30 nt 的 Poly（dT）反转录引物，其中 TruSeq Read 1 测序引物为一段已知的短肽核苷酸序列，用于后续的上机测序；Barcode 则与微珠一一对应，共有 400 万种 Barcode；UMI 是

由随机碱基组成的一段序列，每个 DNA 分子都有自己的 UMI 序列，其作用在于混合测序时区分不同的样本（即区分哪些测序得到的序列是来自于同一个原始 cDNA 分子）；Poly（dT）反转录引物则是含有 30 个 T 碱基的同聚 DNA 片段，用于捕获有 polyA 尾的转录本。

以 10X Genomics 为代表的高通量单细胞转录组测序技术中使用的反转录引物均为 Poly（dT）反转录引物，因此只能获得部分 3' 端转录本信息，并且无法检测到不含有 polyA 的 RNA（包括损伤的 mRNA 片段和不含 polyA 的 miRNA、lncRNA 等），这导致该技术在应用中灵敏度很低，通常只有少于 10% 的 mRNA 可被检测到。同时，该技术对 RNA 质量的要求较高，如果想要获得较好的测序结果，测序样本的细胞活率大于 80%，采用冻存或固定样本时测序的效果往往很差。此外，由于细菌的 RNA 不带有 polyA，现有高通量单细胞转录组测序技术因而无法用于细菌的转录组测序。

发明内容

为了解决上述问题，在第一个方面，本发明的目的在于提供一种单细胞转录组测序方法，所述方法包括：将待测细胞样本制备成单细胞悬液后用固定液固定；和使用反转录引物在固定后的单个细胞的 RNA 上进行原位反转录反应合成 cDNA 第一条链。

在具体的实施方案中，本发明的所述反转录引物可以是反转录随机引物、针对目标 RNA 序列设计的反转录引物或反转录随机引物和针对目标 RNA 序列设计的反转录引物的混合物。优选地所述反转录引物是反转录随机引物。

在具体的实施方案中，本发明的方法还可以包括在反转录获得的 cDNA 第一条链的尾端加上捕获接头，所述捕获接头与编码微球上的捕获接头互补链的

序列互补，所述捕获接头是已知序列的任意片段，优选地所述捕获接头是 Poly (dA) 片段，Poly (dT) 片段，Poly (dG) 片段或 Poly (dC) 片段。

在具体的实施方案中，本发明的方法还可以包括在加上所述捕获接头后将所述单个细胞和单个所述编码微球包含在单个腔室中以形成单细胞分隔并在所述单个腔室中合成 cDNA 第二条链。

在具体的实施方案中，本发明的方法还可以包括在合成所述 cDNA 第二条链后对双链 cDNA 进行 PCR 扩增及建库和测序。

在具体的实施方案中，本发明的方法使用的编码微球上的单链 DNA 中可以包含上游扩增引物互补片段、条形码、UMI 和捕获接头互补链；优选地所述条形码可以是一个或多个条形码；更优选地可以是三个条形码。

在具体的实施方案中，本发明的方法中可以使用微流控芯片或微孔板完成所述单细胞分隔。

在具体的实施方案中，本发明的方法中所用的固定液可以是单纯固定液或混合固定液；优选地所述单纯固定液可以包括但不限于多聚甲醛、甲醛、福尔马林、甲醇、丙酮、乙醇、醋酸、苦味酸、铬酸、重铬酸钾和升汞；优选地所述混合固定液可以包括但不限于醋酸-酒精混合液、福尔马林-醋酸-酒精液和包因氏固定液。

在具体的实施方案中，本发明的方法包括：将待测细胞样本制备成单细胞悬液后用固定液固定；使用反转录引物在固定后的单个细胞的 RNA 上进行原位反转录反应合成 cDNA 第一条链；在反转录获得的 cDNA 第一条链的尾端加上捕获接头，所述捕获接头与编码微球上的捕获接头互补链的序列互补；在加上所述捕获接头后将所述单个细胞和单个所述编码微球包含在单个腔室中以形成单细胞分隔；在所述单个腔室中合成 cDNA 第二条链以形成双链 cDNA；和

对所获得的双链 cDNA 进行 PCR 扩增及建库和测序。

在第二个方面，本发明的目的在于提供第一个方面中的方法在单细胞、单细胞核、单个微生物的全转录组测序中的应用，优选地所述应用可以是微生物学、基础医学、临床医学、农学、细胞生物学、免疫学、发育生物学、病理学、神经生物学及发育、遗传学、干细胞、肿瘤、生殖健康、宏基因组学及微生物生态、新药研发领域中的应用。

在第三个方面，本发明的目的在于提供一种诊断或治疗方法，所述方法包含通过第一方面的单细胞转录组测序方法进行基因测序。

与现有技术相比，本发明的测序方法具有以下优点：

(1) 本发明的方法可测量的细胞样本的类型更广，可应用于真核细胞的单细胞和单细胞核、原核生物（细菌、放线菌、立克次氏体、衣原体、支原体、蓝细菌和古细菌等）、单细胞藻类、病毒等；

(2) 本发明的方法不仅可适用于新鲜样本，也可应用于细胞活性较低的固定样本、冰冻保存样本、石蜡包埋样本（FFPE）等；

(3) 本发明的方法可以检测编码 RNA 和多种形式的非编码 RNA 并获得完整的转录组图谱，进行转录组水平定量、基因差异表达、交替剪接、基因融合、RNA 互作等分析；

(5) 对比目前的微流控单细胞 RNA 测序技术，在同等测序深度下本发明的方法的 RNA 检测灵敏度更高。

附图说明

图 1 是现有的 10X Genomics 单细胞转录组测序方法的原理示意图。

图 2 是本发明的单细胞转录组测序方法的原理示意图。

图 3 是本发明中使用的编码微球的结构示意图。

图 4 是采用本发明方法处理大肠杆菌样本并进行测序的结果。A. 显微镜下溶菌酶降解细胞壁后的大肠杆菌；B. 显微镜下反转录反应后的大肠杆菌；C. qPCR 实验的扩增曲线；D. 核酸凝胶电泳图；E. 大肠杆菌中的基因检出数。

图 5 是采用本发明方法对大肠杆菌和枯草芽孢杆菌的混合样本进行测序的结果；单细胞中比对到不同菌种基因组上的 UMI 数目散点图，其中 UMI 数即为测序计数出来的 cDNA 分子数目，图中每个点代表一个细胞，浅色的点代表的细胞中几乎只含有枯草芽孢杆菌的 cDNA，深色的点代表的细胞中几乎只含有大肠杆菌的 cDNA，黑色的点代表的细胞为有污染的细胞。

图 6 是采用本发明方法对人鼠细胞系混合样本进行测序的结果；其中 A. 采用本发明的方法对人鼠细胞系混合样本测序得到的小鼠单细胞基因检出数；B. 采用现有 10X Genomics 等七种测序方法对人鼠细胞系混合样本测序得到的小鼠单细胞基因检出数；C. 测序结果中小鼠单细胞基因的测序读长 (Reads) 在参考基因组不同区域的分布情况；D. 测序结果中小鼠单细胞基因的测序读长在参考基因 5'-3' 上的分布均匀性统计图。

图 7 是采用本发明方法对小鼠肝脏组织石蜡包埋组织 (FFPE) 样本进行测序的结果；其中 A. 显微镜下解离后的小鼠肝脏组织细胞核；B. 显微镜下反转录反应后的小鼠肝脏组织细胞核；C. qPCR 实验的扩增曲线；D. 核酸凝胶电泳图；E. 小鼠肝脏组织细胞核中的基因检出数。

图 8 是采用本发明方法对烟草细胞核样本进行测序准备的结果。A. 显微镜下解离后的植物细胞核；B. 显微镜下反转录反应后的植物细胞核；C. qPCR 实验的扩增曲线；D. 核酸凝胶电泳图。

图 9 是采用本发明方法对衣藻和蓝藻样本进行测序准备的结果。A. 显微镜

下降解细胞壁后的衣藻和蓝藻；B. 显微镜下反转录反应后的衣藻和蓝藻；C. qPCR 实验的扩增曲线；D. 核酸凝胶电泳图。

图 10 是采用本发明方法对不同类型固定液固定的细胞样本进行测序准备的结果；A. 显微镜下反转录反应后的 3T3 细胞；B. qPCR 实验的扩增曲线；C. 核酸凝胶电泳图。

图 11 是采用本发明方法对 cDNA 链尾端加不同捕获接头片段的细胞样本进行测序准备的结果；其中 A. qPCR 实验的 CT 值；B. 核酸凝胶电泳图。

发明详述

本发明的实施方案提供一种单细胞全 RNA 测序方法，该方法中使用反转录引物在固定后的单细胞上结合目标 RNA 发生原位反转录反应，之后在反转录合成的第一条 cDNA 链尾端加上捕获接头，随后制成包含单个编码微球、单个细胞和反应试剂的单个腔室，在单个腔室中编码微球通过捕获接头互补链与第一条 cDNA 结合并进行延伸反应，合成带有条形码标记的 cDNA 第二条链，最后对获得的双链 cDNA 进行 PCR 扩增和高通量测序（如图 2 所示）。本申请的测序方法可与微流控技术相结合建立高通量高灵敏度的单细胞转录组测序平台。

定义

本文中的单细胞包括但不限于真核细胞的单细胞/单细胞核、原核生物（细菌、放线菌、立克次氏体、衣原体、支原体、蓝细菌和古细菌等）、单细胞藻类、病毒等。

本文中的细胞样本包括但不限于细胞的固定样本、冰冻保存样本、石蜡包埋样本（FFPE）等。

本文中的 RNA 包括能检测的编码 RNA 和多种形式的非编码 RNA，例如 miRNA、lncRNA、siRNA、circRNA 等。

本文中的条形码（Barcode）片段是指一串用于区分不同细胞的碱基序列，作为细胞标签，要求这段碱基序列是稳定的、可合成的、且变异性高的。一般可自行设计或可在条形码库中选择合适的条形码片段。目前市场上主流的两款单细胞测序技术 10X Genomics 和新格元的条形码库可以分别在其开源的定量软件 Cellranger 和 CeleScope 中查到。

本文中的反转录随机引物由 PCR 下游扩增引物互补片段连接一个 6 个随机碱基序列（即 5'-下游扩增引物互补片段扩增引物片段-NNNNNN-3'，N = dG, dA, dT 或 dC）组成，其中 6 个随机碱基序列可与目标 RNA 序列结合，下游扩增引物互补片段则用于在 PCR 扩增反应中与下游扩增引物结合。

下文中将对本申请测序方法中的主要步骤进行概括性描述。

编码微球的准备

本发明中的编码微球上的单链 DNA 由上游扩增引物互补片段、条形码、UMI（unique multiplex index）和捕获接头互补链组成（参见图 3）。上游扩增引物互补片段在 PCR 扩增反应中与上游扩增引物结合；条形码用于对同一细胞中的 cDNA 进行标记；UMI 为一段随机序列，用于标记每一个原始 cDNA；捕获接头互补链在 cDNA 第二条链合成反应中与连接在第一条 cDNA 链上的捕获接头结合。本发明的实施方案中的编码微球可以采用 10X Genomics、1CellBio、新格元、BD Rhapsody 等的单细胞测序试剂盒中的微球。

样本预处理

制备单细胞悬液：本发明的实施方案中可对应不同类型的细胞样本选择相

应的消化酶，以将细胞样本制备成单细胞悬液。比如对于培养细胞可用胰酶/EDTA 消化成单个细胞；对于新鲜组织可用相应的消化酶（如肌肉组织选择胶原酶 I 和分散酶、肝脏组织选择胶原酶 IV）消化后经过滤、洗涤制备成单细胞；对于冰冻保存样本需要先将样本在 25~60℃ 水浴锅中快速融化；对于石蜡包埋样本（FFPE）需要先用二甲苯或其他环保型脱蜡剂脱蜡，再进行解交联；对于单细胞核转录组测序，需要先对单细胞样本用强非离子表面活性剂（NP-40 等）处理裂解细胞膜。

固定单细胞：本发明的实施方案中将待测细胞样本制备成单细胞悬液后用固定液固定。一般使用固定液处理样本，将细胞/细胞核内部大分子（RNA、蛋白质等）结构固定，使其在后续实验过程中保持完整的单细胞/细胞核形态、结构及组成，并且 RNA 能稳定地固定在细胞/细胞核内。操作时可根据不同样本类型特点，选择合适的固定液，固定液包括但不限于多聚甲醛、甲醛、福尔马林、甲醇、丙酮、乙醇、醋酸、苦味酸、铬酸、重铬酸钾、升汞等单纯固定液，以及醋酸-酒精混合液、福尔马林-醋酸-酒精液、包因氏固定液等混合固定液。以及不同的固定时间，例如 15 min~30 min 或者过夜。

反转录

本发明的实施方案中在固定后的细胞的 RNA 上通过多次结合反转录引物发生原位反转录反应，其中的反转录引物可以根据不同实际要求进行设计，可以是例如反转录随机引物或同时加反转录随机引物和 Poly (dT) 引物，还可以是针对特定基因的靶标引物等。反转录体系中还可加入 10% TritonX-10 对细菌的细胞膜起通透作用，使反应试剂可以更容易地进入细菌内部。

加捕获接头

反转录后的第一条 cDNA 链 3' 尾端需要加一个捕获接头使其能与编码微

球单链 cDNA 上的捕获接头互补链结合以进一步合成 cDNA 第二条链。本发明的实施方案中可以通过末端转移法在第一条 cDNA 链尾端加上 Poly (dA)、Poly (dT)、Poly (dG) 或 Poly (dC) 作为捕获接头；也可以通过 DNA 连接法在第一条 cDNA 链尾端加上一段特定的捕获接头；也可以采用模板置换法，在反转录步骤使用反转录酶在反转录后的第一条 cDNA 链尾端加上三个 dC 作为捕获接头。而相对地，编码微球单链 cDNA 上的捕获接头互补链可作相应调整。

单细胞分隔

本文中的单细胞分隔一般是指形成包括单个编码微球、单个细胞、反应试剂的单个腔室。为了完成后续合成 cDNA 第二条链的延伸反应，所述单个腔室中的延伸反应试剂通常包括 DNA 聚合酶、dNTPs 和反应缓冲液。本发明的方法中可以根据不同细胞的大小和类型，设计不同的微流控芯片产生微液滴进行单细胞分隔或使用微孔板（microwell）技术进行单细胞分隔。一般根据测序所需检测的细胞数量收集相应数量的单液滴或者制备相应数量的微孔。

合成 cDNA 第二条链

编码微球连接的单链 cDNA 上的捕获接头互补链与加在第一条 cDNA 链上的捕获接头结合，随后在 DNA 聚合酶作用下延伸合成 cDNA 的第二条链。所获得的 cDNA 的第二条链含有上游扩增引物互补片段、条形码、UMI、捕获接头互补链以及 cDNA 序列。

构建文库及高通量测序

首先用磁珠法纯化出上一步延伸反应后的原始双链 cDNA，加入上游引物和下游引物以及 PCR 扩增反应的试剂，对原始双链 cDNA 进行 PCR 扩增。用磁珠法纯化 PCR 扩增产物，采用 TA 克隆连接接头建库法对 PCR 扩增产物进行

末端修复和加 A 尾，连接上接头（adapter）。构建好的文库可用 Illumina 测序平台或华大智造测序平台进行高通量测序。PCR 扩增反应的上游引物和下游引物分别根据编码微球单链 cDNA 上的上游扩增引物互补片段和反转录随机引物中的下游扩增引物互补片段设计并合成。

具体实施方式

为使本发明实施例的目的、技术方案和优点更加清楚，下面将结合本发明实施例中的附图，对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述，显然，所描述的实施例是本发明的一部分实施例，而不是全部的实施例。

基于本发明中的实施例，本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动的前提下所获得的所有其他实施例，都属于本发明保护的范围。

下面结合附图并通过具体实施方式来进一步说明本发明的技术方案。

实施例 1：大肠杆菌样本测序

样本预处理

分别取约 100 万个不同菌株（1、2、3、4）大肠杆菌验证本发明专利可用于细菌样本的单细胞转录组测序，加入含 0.05% Tween-20（购于上海生工生物有限公司）的 PBS 缓冲液（PBST）洗三次，通过震荡和过滤去掉团聚的细菌，使样本中的细菌形成单细菌悬液，加入 1%多聚甲醛（购于北京索莱宝科技有限公司），置于 4℃固定过夜。固定结束的细菌样本用 PBST 缓冲液洗三次，加入溶菌酶（购于美国 Thermo Fisher Scientific 公司）裂解细胞壁，37℃处理 15 分钟，加入 PBST 缓冲液洗三次。

反转录

预处理后的样本中加入含反转录酶（购于美国 Thermo Fisher Scientific 公司）、反转录反应缓冲液、dNTPs（购于北京索莱宝科技有限公司）、反转录随

机引物（由上海生工生物有限公司合成）、10% TritonX-10（购于上海生工生物有限公司）的反转录-通透反应试剂进行反转录反应，每 50 ul 的反转录反应体系用于每 50 万单细菌。反应结束后加入 PBST 缓冲液洗三次。

加捕获接头

反转录后的样本中加入末端转移酶（购于美国 Thermo Fisher Scientific 公司）、dCTP（购于上海生工生物有限公司）和反应缓冲液，37℃ 孵育 30 分钟，使第一条 cDNA 链的 3' 尾端加上 Poly (dC) 捕获接头片段。反应结束后加入 PBST 缓冲液洗三次。显微镜下进行镜检，结果显示在裂解完细胞壁和反转录反应后，大肠杆菌样本仍可以保持分散、完整的单细菌形态（参见图 4A）。

单细胞分隔

对每个样本进行计数，调整其细菌浓度为 200~400 个/ul。将细菌样本、延伸反应试剂（包括 DNA 聚合酶（购于美国 Thermo Fisher Scientific 公司）、dNTPs 和反应缓冲液）、编码微球（购于美国 1CellBio 公司）、油相（含 0.2% 表面活性剂的电子氟化液 7500，购于美国 3M 公司）分别加入注射器中，通过软管分别与微流控芯片的对应入液口连接，设置合适的流速，形成包含单个细菌、单个编码微球、延伸反应试剂的油包水单液滴，收集约 200 ul 的单液滴。

合成 cDNA 的第二条链

将收集的单液滴分装到不同管中后进行延伸反应，以在单液滴中合成带条形码标记的 cDNA 第二条链。延伸反应结束后在各个管中加入 20% PFO（含 20% 1H,1H,2H,2H-Perfluorooctanol 的电子氟化液 7500，购于美国 Sigma-Aldrich 公司）以将单液滴破碎，通过磁珠法（磁珠购于美国 Beckman Coulter 公司）纯化提取管中的 cDNA。

构建文库及高通量测序

取部分双链 cDNA (200~400 个细胞) 作为模板进行 qPCR 实验检测捕获到的总 cDNA 含量, 结果显示得到 CT 值约为 17 (参见图 4B)。根据得到 CT 值计算合适的扩增循环数 (一般取 CT 值加 3 个循环), 将剩余其他管中的 cDNA 样本进一步通过 PCR 扩增反应将编码的 cDNA 扩增至合适的总含量 (约 100 ng)。取 3 ul 扩增产物进行核酸电泳, 结果显示得到弥散状条带, 条带大小分布主要为 200~500 bp (参见图 4C), 说明本发明方法从大肠杆菌样本中捕获的 cDNA 捕获率高、覆盖范围广, 可用于后续高通量测序。

取 100 ng 扩增后的 cDNA 采用 TA 克隆连接接头建库法进行末端修复和加 A 尾, 连接上接头 (建库试剂盒购于美国 Illumina 公司)。构建好的文库用 Illumina 测序平台进行高通量测序。测序结果显示, 在单个大肠杆菌中可以测到基因数目分布在 1000~3000 (参见图 4E), 基本包含了大肠杆菌中表达的所有基因, 说明本发明方法可应用于细菌的单细胞转录组测序, 且灵敏度高。

实施例 2: 大肠杆菌和枯草芽孢杆菌混合样本测序

取约 100 万个大肠杆菌和枯草芽孢杆菌混合样本验证应用本发明专利进行单细胞转录组测序的准确性。用上文实施例 1 中描述的方法进行样本预处理、反转录、加捕获接头、单细胞分隔、合成 cDNA 第二条链、构建文库及高通量测序。测序结果显示, 经过基因组比对后大肠杆菌和枯草芽孢杆菌混合样本中总共检测到 251 个细菌, 其中有 4 个细菌中既含有大肠杆菌的 cDNA 又含有枯草芽孢杆菌的 cDNA, 这通常是由于两个细菌进入同一个液滴所造成的, 其余的细菌中几乎只含有大肠杆菌 cDNA 或含有枯草芽孢杆菌 cDNA, 总体污染率大概小于 2% (参见图 5)。说明应用本发明专利进行单细胞转录组测序准确性高, 可以很好地将样本中混合的大肠杆菌和枯草芽孢杆菌分开, 物种间交叉污

染少。

实施例 3：人鼠细胞系混合样本测序

取约 100 万个-80℃冻存的人鼠细胞系混合样本（50% 人 HEK293 细胞和 50% 小鼠 3T3 细胞），取出冻存的细胞样本于 37℃水浴锅中快速解冻，加入 PBS 缓冲液洗三次，加入 1%多聚甲醛，置于 4℃固定过夜。固定结束的细胞冻存样本加入 PBST 缓冲液洗三次。随后参照上文实施例 1 中描述的方法进行反转录、加捕获接头、单细胞分隔、合成 cDNA 第二条链、构建文库及高通量测序。进行基因组比对后分离出小鼠 3T3 细胞的数据，结果显示本发明方法在冻存细胞样本中可以检测小鼠单细胞基因数目分布在 4000~10000（参见图 6A）；文献 Systematic comparison of single-cell and single-nucleus RNA-sequencing methods（单细胞和单细胞核 RNA 测序方法的系统比较，Jiarui Ding 等人，Nat Biotechnol. 2020 June ; 38(6): 737–746.）中报道用七种现有技术单细胞转录组测序方法（七种测序方法包括 2 种基于微孔板的低通量方法（Smart-seq2 和 CEL-Seq2）和 5 种高通量方法（10x Chromium, Drop-seq, Seq-Well, inDrops 和 sci-RNA-seq））对人鼠细胞系混合样本（50% 人 HEK293 细胞和 50% 小鼠 3T3 细胞）进行测序，将采用本发明方法检测的小鼠单细胞测序结果与上述七种方法检测的小鼠单细胞的测序数据相比，在相同测序深度下，本发明测序方法的灵敏度达到了 Smart-seq2 等低通量单细胞测序方法，远高于 10X Genomics（10X Chromium）等高通量单细胞测序方法（参见图 6B）。测序比对结果显示小鼠单细胞的测序读长分布在参考基因组不同区域，包括编码 RNA、基因间区域、内含子间、非翻译区（参见图 6C），说明采用本发明专利可以对全转录组进行测序；测序比对结果显示小鼠单细胞的测序读长在参考基因的 5'-3'上分布

均匀（参见图 6D）。

实施例 4：小鼠肝脏组织石蜡包埋组织（FFPE）样本测序准备

取约 20 mg 小鼠肝脏组织的石蜡包埋样本，首先对石蜡包埋样本进行脱蜡和复水处理，加入细胞裂解液将组织裂解成单个细胞核，加入 PBST 洗三次。随后参照上文实施例 1 中描述的方法进行反转录、加捕获接头、单细胞分隔、合成 cDNA 第二条链、构建文库及高通量测序。结果显示，从 FFPE 样本中成功分离的单个分散细胞核在反转录反应后仍可以保持分散、完整的单细胞核形态（参见图 7A, B）。获得纯化的双链 cDNA 产物后，取部分 cDNA（约 100 个细胞核）作为模板进行 qPCR 实验检测捕获到的总 cDNA 含量，得到 CT 值约为 10（图 7C），这表明本发明方法对 FFPE 样本单细胞核中 cDNA 捕获率较高。根据 CT 值对 cDNA 产物进行 PCR 扩增（15 个循环），取 3 ul 扩增产物进行核酸电泳，得到弥散状条带，条带大小分布主要为 200~500 bp（图 7D），表明本发明方法对 FFPE 样本单细胞核中捕获到 cDNA 捕获率高、覆盖范围广，可用于后续测序。测序结果显示，本发明方法在 FFPE 样本单个细胞核中可以检测到 2000~3000 个基因（参见图 7E），说明本发明方法可应用于 FFPE 样本的单细胞核转录组测序。

实施例 5：烟草细胞核样本测序准备

用单细胞制备仪将新鲜烟草样本解离成单细胞核（参见图 8A），取约 100 万烟草细胞核样本，加入 PBS 缓冲液洗三次，加入 1%多聚甲醛，置于 4℃固定过夜。固定结束后将烟草细胞核样本用 PBST 缓冲液洗三次。随后参照上文实施例 1 中描述的方法进行反转录、加捕获接头、单细胞分隔、合成 cDNA 第

二条链、构建文库。结果显示，反转录反应后，烟草细胞核样本仍可以保持分散、完整的单细胞核形态（参见图 8B）。qPCR 实验结果得到烟草细胞核的 CT 值约为 16（参见图 8C），这表明本发明方法可以捕获较多的烟草细胞核样本中 cDNA。核酸凝胶电泳结果得到弥散状条带，条带大小分布主要为 150~300 bp（图 8D），表明本发明方法从烟草细胞核样本单细胞中捕获到的 cDNA 捕获率高、覆盖范围广，可用于后续测序。

实施例 6：衣藻和蓝藻混合样本测序准备

分别取约 100 万个衣藻和蓝藻样本验证本发明专利可用于衣藻和蓝藻样本的单细胞转录组测序。衣藻和蓝藻样本中加入 PBS 缓冲液洗三次，加入 1%多聚甲醛，置于 4℃固定过夜。固定结束后将衣藻和蓝藻样本用 PBST 缓冲液洗三次。对于衣藻样本，加入含 4%纤维素酶、0.5%果胶酶、0.3 mol/L 甘露醇，pH=6.5 的细胞壁酶解液，37℃处理 15 分钟，加入 PBST 缓冲液洗三次。对于蓝藻样本，加入溶菌酶裂解细胞壁，37℃处理 15 分钟，加入 PBST 缓冲液洗三次。裂解完细胞壁的衣藻和蓝藻样本随后参照上文实施例 1 中描述的方法进行反转录、加捕获接头、单细胞分隔、合成 cDNA 第二条链、构建文库。结果显示，在裂解完细胞壁和反转录反应后，衣藻和蓝藻样本仍可以保持分散、完整的单细胞形态（参见图 9A、B）。qPCR 实验结果得到衣藻样本的 CT 值约为 17，蓝藻样本的 CT 值约为 17（图 9C），这表明本发明方法对衣藻和蓝藻样本中 cDNA 捕获率均较高。核酸凝胶电泳结果得到弥散状条带，条带大小分布主要为 200~500 bp（图 9D），表明本发明方法从衣藻和蓝藻样本单细胞中捕获到的 cDNA 捕获率高、覆盖范围广，可用于后续测序。

实施例 7：对小鼠 3T3 细胞系样本进行测序准备（采用不同固定液和不同捕获接头）

分别取 4 组培养的小鼠 3T3 细胞系验证应用不同固定液处理样本的效果。在细胞培养皿中加入胰酶在 37℃消化 3 分钟，将其消化成单个细胞，加入 PBS 缓冲液洗三次，分别加入 1%多聚甲醛、70%乙醇、丙酮、1%醋酸（样本编号为 1、2、3、4），置于 4℃固定过夜，固定结束后加入 PBST 洗三次。随后参照上文实施例 1 中描述的方法进行反转录、加捕获接头、单细胞分隔、合成 cDNA 第二条链、构建文库。结果显示不同类型固定液固定的细胞样本在反转录反应后均能保持完整的单细胞形态（参见图 10A）。本发明方法对不同类型固定液固定的细胞样本的 cDNA 捕获率均较高（参见图 10B），得到弥散状条带，条带大小分布主要为 200~500 bp（参见图 10C），说明本发明方法从不同类型固定液固定的细胞样本中捕获的 cDNA 捕获率高、覆盖范围广，均可用于后续高通量测序。

另外分别取 7 组培养的小鼠 3T3 细胞系验证在 cDNA 第一条链尾端加不同捕获接头的效果。在细胞培养皿中加入胰酶在 37℃消化 3 分钟，将其消化成单个细胞，加入 PBS 缓冲液洗三次，加入 1%多聚甲醛，置于 4℃固定过夜，固定结束后加入 PBST 洗三次。取 6 组固定后的细胞样本根据上文实施例 2 描述的方法进行反转录反应。取 4 组反转录结束后的细胞样本中分别加入 dATPs, dTTPs, dGTPs 和 dCTPs, 以及末端转移酶和反应缓冲液，在 37℃孵育 30 分钟，分别在 cDNA 尾端加上 Poly (dA)、Poly (dT)、Poly (dG) 和 Poly (dC) 作为捕获接头片段。另取 2 组反转录结束后的细胞样本中加入 DNA 连接酶、特定的捕获接头片段以及反应缓冲液，在 37℃孵育 30 分钟，在 cDNA 尾端加上特定的捕获接头片段。另取 1 组固定结束后的细胞样本，加含反转录

酶 (Moloney Murine Leukemia Virus,)、反转录随机引物、dNTPs、反转录反应缓冲液、10% TritonX-10 的反转录-通透反应试剂进行反转录反应, 反转录结束后即在 cDNA 尾端加上三个的 dC 作为捕获接头片段。加完捕获接头的细胞样本根据上文实施例 4、5、6 中描述的方法进行单细胞分隔、合成 cDNA 第二条链、构建文库。结果显示不同捕获接头片段的细胞样本的 CT 值范围为 12~13, 说明本发明方法中使用不同捕获接头片段均可在细胞中捕获较多 cDNA (参见图 11A), 凝胶电泳结果显示得到弥散状条带, 条带大小分布主要为 200~500 bp (参见图 11B), 说明本发明方法中使用不同捕获接头片段在细胞中捕获的 cDNA 捕获率高、覆盖范围均较广, 均可用于后续高通量测序。

以上显示和描述了本发明的基本原理和主要特征和本发明的优点。本行业的技术人员应当了解, 在本发明不受上述实施例的限制, 上述实施例和说明书中的描述只是说明本发明的原理, 在不脱离本发明精神和范围的前提下, 本发明还会有各种变化和改进, 这些变化和改进都落入要求保护的本发明范围内。本发明要求保护范围由所附的权利要求书及其等效物界定。

权利要求书

- 1、一种单细胞转录组测序方法，其特征在于，所述方法包括：
将待测细胞样本制备成单细胞悬液后用固定液固定；和
使用反转录引物在固定后的单个细胞的 RNA 上进行原位反转录反应合成 cDNA 第一条链。
- 2、如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，其中所述反转录引物是反转录随机引物、针对目标 RNA 序列设计的反转录引物或反转录随机引物和针对目标 RNA 序列设计的反转录引物的混合物。
- 3、如权利要求 1 或 2 所述的方法，其特征在于，所述方法还包括在反转录获得的 cDNA 第一条链的尾端加上捕获接头，所述捕获接头与编码微球上的捕获接头互补链的序列互补；所述捕获接头是已知序列的任意片段，优选地所述捕获接头是 Poly (dA) 片段，Poly (dT) 片段，Poly (dG) 片段或 Poly (dC) 片段。
- 4、如权利要求 3 所述的方法，其特征在于，所述方法还包括在加上所述捕获接头后将所述单个细胞和单个所述编码微球包含在单个腔室中以形成单细胞分隔并在所述单个腔室中合成 cDNA 第二条链。
- 5、如权利要求 4 所述的方法，其特征在于，所述方法还包括在合成所述 cDNA 第二条链后对双链 cDNA 进行 PCR 扩增及建库和测序。
- 6、如权利要求 3-5 中任一项所述的方法，其特征在于，所述方法使用的编码微球上的单链 DNA 中包含上游扩增引物互补片段、条形码、UMI 和捕获接头互补链；优选地所述条形码是一个或多个条形码；更优选地是三个条形码。
- 7、如权利要求 3-6 中任一项所述的方法，其特征在于，所述方法中使用微流控芯片或微孔板完成所述单细胞分隔。

8、如权利要求 1-7 中任一项所述的方法，其特征在于，其中所述固定液是单纯固定液或混合固定液；优选地所述单纯固定液包括但不限于多聚甲醛、甲醛、福尔马林、甲醇、丙酮、乙醇、醋酸、苦味酸、铬酸、重铬酸钾和升汞；优选地所述混合固定液包括但不限于醋酸-酒精混合液、福尔马林-醋酸-酒精液和包因氏固定液。

9、如权利要求 1-8 中任一项所述的方法在单细胞、单细胞核、单个微生物的全转录组测序中的应用；优选地所述应用是在微生物学、基础医学、临床医学、农学、细胞生物学、免疫学、发育生物学、病理学、神经生物学及发育、遗传学、干细胞、肿瘤、生殖健康、宏基因组学及微生态、新药研发领域中的应用。