说明书

发明名称: 一种处理组织样本的方法和高通量单细胞亚细胞结构转录组测序的方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域，具体涉及一种处理组织样本的方法和高通量单细胞亚细胞结构转录组测序的方法。

背景技术：

[0002] 高通量单细胞核转录组测序是近些年比较热门的研究方面，具有非常广的应用场景。

[0003] 中国专利申请CN202210174619.9和CN202210550351.4的snRandom-seq方法中，分离组织的细胞核，使用甲醛固定细胞核并将核酸(DNA和RNA)和蛋白质交联。然后将细胞核作为容器进行逆转录反应，逆转录引物可以结合RNA逆转录产生cDNA，新生的cDNA与RNA互补链一起交联在细胞核内。然后在cDNA末端添加捕获接头。收集细胞核使用微流控系统进行单细胞核分隔，液滴中包裹一个标签微球和细胞核，微球携带的标签序列可以和cDNA捕获接头配对结合，在聚合酶作用下完成二链合成，使cDNA获得标签序列。破乳收集水相样本并从中纯化出cDNA，通过PCR进行cDNA富集和测序文库构建，进行高通量测序和分析。

[0004] 但是snRandom-seq由于离心次数较多，细胞核离心回收效率不稳定、细胞核与离心管和枪头间的粘连损耗较大，所以对细胞核起始量要求较高；细胞核间的粘连问题比较严重，导致不同群之间有较多交叉弥散信号，影响后续分析的准确性。同时组织中不同类型细胞的细胞核大小不一，在多次离心过程中会因为离心速度对细胞核大小进行多次筛选，使细胞类型分布异常。需要寻找更优的方法来实现高通量单细胞核转录组测序。

发明内容：

[0005] 基于上述需要求，本发明提供种一种处理组织样本的方法和高通量单细胞亚细胞结构转录组测序的方法。本发明通过对组织样本进行优化的透化处理后，在组织中进行原位RNA标记和添加捕获接头，然后从组织中解离出亚细胞结构进行单细胞亚细胞结构分隔，实现高通量单细胞转录组测序。

[0006] 本发明首先提供一种处理组织样本获得亚细胞结构的方法，其包括如下步骤：

[0007] S1-1：将组织样本进行固定和透化处理；

[0008] S1-3：对组织样本的RNA进行标记，具体是将组织样本浸泡在标记试剂中，标记试剂包括核苷酸链、工具酶和反应缓冲液，通过核苷酸链与RNA片段结合，核苷酸链结合到RNA链后发生聚合反应或连接反应，使核苷酸链携带RNA信息和捕获接头；

[0009] 优选地，通过逆转录实现对组织样本的RNA进行标记和接头添加；具体是通过添加逆转录酶、核苷酸链、反应缓冲液进行RNA标记，通过添加末端转移酶和一种脱氧核糖核苷三磷酸进行捕获接头添加；

[0010] S1-4：在组织样本中加入解离液，然后对组织片进行分散处理，离心除上清得到亚细胞结构。

[0011] 其中S1-1中，对组织样本进行固定和透化的顺序没有限制，所述固定是将组织中的核酸分子交联在组织中。所述透化中使组织间隙、生物膜具有通透性，可以让蛋白、核酸分子通过。

[0012] 具体地，S1-1具体操作方法为：例如，对于石蜡样本，进行脱蜡、水化和透化处理；对于固定样本，进行透化处理；对于新鲜或冻存组织样进行固定和透化处理，优选所述透化处理是表面活性剂、酶、酸、高温或其组合处理，所述固定中采用的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、升汞，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、包因氏固定液；

[0013] 更优选地，将固定后的组织样本浸泡在透化试剂中进行处理，或者在70℃-90℃温度下处理。

[0014] 在具体实施方式中，透化处理采用透化试剂为蛋白酶，优选地是1mg/ml胃蛋白酶的0.1M盐酸溶液；所述处理是置于35-39℃(36-38℃，具体为37℃)反应5-30分钟，例如8-12分钟，具体为10分钟；

[0015] 优选地，所述蛋白酶可以为胃蛋白酶、胰蛋白酶、中性蛋白酶、木瓜蛋白酶或胶原酶中的一种或多种。

[0016] 在一个具体实施方式中，在S-1和S-3步骤之间还包括S-2步骤：对组织样本中的单链DNA采用封闭试剂进行封闭，所述封闭方式包括使用聚合酶补齐单链DNA变成双链，或者使用DNA酶降解DNA单链，更优选地通过加入DNA聚合酶、封闭引物、dNTP和反应缓冲液，进行封闭反应实现；

[0017] 优选地，所述封闭试剂为含1～10U/μl DNA聚合酶、5～50mM封闭引物、1～10mM dNTPs、1X DNA聚合酶缓冲液；所述封闭反应是于35-39℃(36-38℃，具体为37℃)反应20～45分钟。

[0018] 在一个具体实施方式中，S1-3中，所述核苷酸链是polyT序列，靶基因序列，随机序列或其组合，所述随机序列可以是由2种碱基组成，3组碱基组成或4种碱基组成；所述工具酶可以是逆转录酶、聚合酶、连接酶、转座酶、末端转移酶或其组合。

[0019] 在一个具体实施方式中，S1-3中是于8-60℃(36-38℃，具体为37℃)孵育1-8小时，优选为3-5小时，具体为4小时。

[0020] 在一个具体实施方式中，S1-4中的解离液为表面活性剂、盐离子溶液、解离酶或其混合物，所述解离酶选自蛋白酶K、胶原酶、中性蛋白酶、胰蛋白酶、弹性蛋白酶、透明质酸酶、木瓜蛋白酶；所述盐离子溶液选自PBS、HEPES、TRIS或SSC缓冲液；所述表面活性剂选自NP-40、IGEPAL®CA-630、TritonX-100、Tween-20、Tween-80、CHAPS去污剂、Brij-58、辛基硫代葡萄糖苷(OTG)；

[0021] 优选地，解离液含有0.5%-2%NP-40离子表面活性剂、1-5mM$MgCl_2$的2X SSC缓冲液、0.1-15mg/ml蛋白酶K；

[0022] 优选实施方式中，S1-4中所述对组织样本进行分散处理是通过机械作用将组织破碎，解离出亚细胞结构；优选地，采用匀浆将组织破碎，更具体地，匀浆是加入杜恩斯匀浆器中进行匀浆，均浆10-30次；

[0023] 优选实施方式中，S1-4中分离的亚细胞结构是细胞核。

[0024] 任选地，进一步包括纯化得到亚细胞结构的步骤，优选地是用缓冲液洗，再采用10-40μm细胞筛进行过滤，去除组织残渣；另外优选地，S1-1至S1-4每一步在进行下一步时采用缓冲液洗涤2-5遍，优选为3遍；所述缓冲液选自PBS、HEPES、TRIS或SSC缓冲液；

[0025] 在一些具体实施方式中，所述组织样本以组织片的形式，具体的组织片的厚度为5-100μm，优选为10-60μm。

[0026] 本发明也提供一种高通量单细胞亚细胞结构转录组测序的方法，其包括采用所述的方法获得的亚细胞结构进行高通量单细胞亚细胞结构转录组测序的步骤。

[0027] 具体实施方式，采用微流控液滴或微孔板系统进行亚细胞结构分割，当采用微流控液滴系统进行亚细胞结构分割时，其具体步骤如下：

[0028] S2-1将所述亚细胞结构的样本、延伸反应试剂、编码微球、油相分别与微流控芯片的对应入液口连接，形成包含单细胞亚细胞结构、单个编码微球、延伸反应试剂的油包水单液滴，收集单液滴，形成单个腔室包含单细胞亚细胞结构的细胞分隔；

[0029] S2-2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；

[0030] S2-3延伸反应结束后将单液滴破碎，纯化提取管中的cDNA，进行PCR扩增；

[0031] S2-4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，

[0032] 用建库试剂盒连接上接头；

[0033] S2-5构建好的文库用Illumina测序平台进行高通量测序。

[0034] 更多具体的实施方式中，S2-1中是通过软管分别与微流控芯片的对应入液口连接；S2-3中取部分cDNA作为模板进行qPCR实验检测捕获到的总cDNA含量。

[0035] 本发明在单细胞亚细胞结构测序前期样本处理时，通过对组织的前期透化处理，使组织间质和生物膜的通透性增强，然后通过核苷酸链与组织块中RNA进行杂交，对细胞中的RNA进行捕获标记。针对组织的操作避免了在细胞亚细胞结构处理过程中存在的大量离心过程。组织中亚细胞结构的大小不一，在多次离心过程中会因为离心速度对细胞亚细胞结构大小进行多次筛选，亚细胞结构

的离心回收效率不同，并且亚细胞结构操作过程中在离心管和枪头中的粘连损耗也比较大，亚细胞结构间的粘连也更多，导致操作不便也影响最终的效果。

[0036] 在对细胞亚细胞结构中的RNA进行标记时需要使用多种试剂，切换不同试剂前需要使用缓冲液清洗掉之前的试剂，减少残留试剂对下一步反应的干扰。常规清洗过程使用的移液管口径在0.36-1.5mm左右，所以现有技术需要使用离心富集亚细胞结构才可以防止亚细胞结构在清洗过程中被移液器误吸。本发明的细胞亚细胞结构RNA标记阶段还停留在组织中，组织的尺寸超过常规的移液管口径，可以直接用口径0.36-1.5mm移液管吸弃废液，不需要担心移液器吸走组织块，减少清洗过程中的离心操作。本发明样本在完成RNA标记后再解离成亚细胞结构，只需要2-3次离心清洗操作。相比现有的技术，减少离心次数，降低离心过程对亚细胞结构产生的损伤，提高了亚细胞结构的回收效率，提高了细胞类型的完整性，减少离心过程产生的亚细胞结构团聚。

[0037] 现有主流高通量单细胞转录组测序技术：常规微流控10XGenomics，inDrop，Drop-seq；固定样本MATQ-DropSEQ(美国专利，WO 2023/034913 A2)和snRandom-seq(中国专利CN202210174619.9)。与MATQ-DropSEQ，snRandom-seq(固定样本)相比，本发明对单细胞亚细胞结构的离心操作步骤少，降低离心过程对亚细胞结构产生的损伤，提高了亚细胞结构的回收效率，提高了细胞类型的完整性，减少离心过程产生的亚细胞结构团聚；且本发明对组织进行操作，可以分析新鲜、冻存、固定和FFPE样品，适用于多种组织类型，便于开展自动化。

附图说明：

[0038] 图1为本发明实验流程示意图。

[0039] 图2为snRandom-seq实验流程示意图。

[0040] 图3为原位逆转录示意图。

[0041] 图4为原位捕获接头添加示意图。

[0042] 图5微流控芯片示意图。

[0043] 图6为本发明和snRandom-seq小鼠脑样本测序基因分布图。

[0044] 图7为本发明和snRandom-seq小鼠脑样本tSNE分群。

[0045] 图8为本发明和snRandom-seq小鼠脑样本分群类型比较。

[0046] 图9为本发明使用不同单细胞核解离方式分析胃样本的结果。

[0047] 图10为本发明处理冻存小鼠脑样本的结果。

[0048] 图11单细胞核糖体和线粒体测序分析。

[0049] 图12为实施例6中分析微量肝穿刺FFPE样本的结果。

[0050] 图13为实施例7中一次实验并行分析两个肾脏FFPE样本的结果。

[0051] 图14为实施例8中使用模板置换策略添加捕获接头分析乳腺FFPE样本的结果。

具体实施方式：

[0052] 下面通过具体实施方式对本发明做进一步的阐述，以期更好的理解本发明，但不构成对本发明的限制。

[0053] 实施例1：FFPE组织样本的处理及获得细胞核

[0054] 准备小鼠脑FFPE样本，使用切片机切50um组织片，分成两份，各1片。用镊子将组织片转移到1.5ml离心管中，加入1ml环保型脱蜡液(索莱宝，YA0031)，置于恒温混匀仪中(佑宁，HH-100)，室温下500转10分钟，直接使用移液器(口径0.75 mm，biosharp 1ml枪头)吸弃脱蜡液，加入新的脱蜡液，重复1-2次至脱蜡完成。脱蜡结束后直接使用移液器吸弃脱蜡液，依次加入梯度浓度的乙醇(100%、95%、80%、70%、50%、30%)进行复水，脱水过程直接使用移液器吸弃废液。

[0055] 本发明操作如下(图1)：复水后将组织片浸泡在透化试剂中(1mg/ml胃蛋白酶(Sigma)，0.1M盐酸)，置于37℃，10分钟。用PBST清洗3次，以下组织片操作过程直接使用移液器吸弃废液。加入封闭试剂(含DNA聚合酶(1～10U/μl)、封闭引物GAGAATGTGAGTGAAGATGTATGGTGANNNNNNN(5～50mM)、dNTPs(1～10mM)、1X聚合酶反应缓冲液、RNA酶抑制剂)，置于PCR仪37℃反应20～45分钟，封闭结束后用PBST洗三遍。将组织片浸泡在逆转录试剂(包含逆转录酶、逆转录反应缓冲液、dNTPs，逆转录引物GGAGTTGGAGTGAGTGGATGAGTGATGNNNNNNN)进行逆转录(图3)，反应结束后用PBST洗三遍。在样本中加入末端转移酶、dATP和反应缓冲液，37℃孵育30分钟(图4)。反应结束后用PBST洗三遍。在组织片中加入1ml单细胞核解离液，单细胞核解离液为含0.5～2%NP-40离子表面活性剂、$MgCl_2$(1～5mM)的2X SSC缓冲液。将组织片和解离液混合物加入杜恩斯匀浆器中进行匀浆，均浆10～30次，冰上静置处理5～15分钟，均浆

后的混合物中加入100μl蛋白酶K(0.1～15mg/ml),25～50℃反应5～30分钟，使用10-40μm细胞筛对细胞核进行过滤，去除组织残渣，离心吸弃上清，并用洗涤液重复离心洗三遍。取部分细胞核用细胞核特异性染料DAPI染色后在显微镜下观察计数。

[0056] 作为对照，采用现有技术中的snRandom-seq方法(图2)，其操作按照文献High-throughput single nucleus total RNA sequencing of formalin-fixed paraffin-embedded tissues by snRandom-seq(杂志naturecommunications 2023)描述进行操作，包括组织核解离、封闭、原位逆转录、捕获接头添加，清洗后用于微流控液滴包裹。具体包括：将复水后的组织片浸泡在900μl单细胞核解离液(1X PBS buffer,0.1% Triton X-100,1U/μL RNase Inhibitor)中，放入杜恩斯匀浆器中进行匀浆，均浆30次，冰上静置处理10分钟，均浆后的混合物中加入100μl蛋白酶K(10mg/ml),37℃反应5分钟，使用40μm细胞筛对细胞核进行过滤，去除组织残渣，离心吸弃上清，并用PBST重复离心洗2遍。取部分细胞核用细胞核特异性染料DAPI染色后在显微镜下观察计数。取100万细胞核，离心，用25.5μl PBST悬浮细胞核，加入封闭反应试剂(2μl T4DNA聚合酶(1～10U/μl)、5μl封闭引物(10uM)、5μldNTPs(100mM)、10μl 5X聚合酶反应缓冲液、2.5μlRNA酶抑制剂)。置于PCR仪37℃反应30分钟，封闭结束后用PBST离心吸弃上清洗3遍。收集细胞核悬浮在22.5μlPBST中，加入逆转录试剂(包含2.5μl逆转录酶、10μl 5X逆转录反应缓冲液、2.5μldNTPs，10μl随机序列逆转录引物，2.5μlRNA酶抑制剂)进行逆转录，反应温度是12次循环(8-42度)，42度30分钟。逆转录完成后收集细胞核用PBST离心吸弃上清洗3遍去除多余引物。用39μlPBST悬浮细胞核，在样本中加入0.5μl末端转移酶、0.5μldATP和10μl末端转移酶反应缓冲液，37℃孵育30分钟。反应结束后用PBST离心吸弃上清洗三遍。用10um细胞筛对细胞核进行过滤，去除团块，取部分细胞核用细胞核特异性染料DAPI染色后在显微镜下观察计数备用。

[0057] 实施例2：单细胞核分隔和高通量测序

[0058] 将本发明方法所制备的细胞核和snRandom-seq方法制备的细胞核，使用相同条件进行微流控液滴生产。

[0059] 将50μl单细胞核样本和50μlOptiPrep(sigma)混匀制备细胞核悬浮液，配置100μl延伸反应试剂(包括7.5μlDNA聚合酶、7.5μlRnaseH(NEB)，7.5μlUSER(NEB)，7.5μldNTPs，20μl 10x聚合酶反应缓冲液，50μlddH$_2$0)。100μl细胞悬液、100μl延伸反应试剂、50μl编码微球、200μl 7500油分别加入注射器中，通过软管分别与微流控芯片(图5)的对应入液口连接，设置合适的流速，形成包含单个单细胞核、单个编码微球、延伸反应试剂的油包水单液滴，收集单液滴，形成单个腔室包含一个单细胞的细胞分隔。

[0060] 将收集的单液滴分装到不同200μl离心管中，置于PCR仪中反应(程序：37度1小时，50度30分钟，60度30分钟，75度20分钟)，进行延伸反应，其中RnaseH将RNA消化掉将cDNA从细胞核释放出来，USER将微球上的标签序列切下来，游离的标签序列通过接头序列和cDNA结合，聚合形成带条形码标记的cDNA第二条链。延伸反应结束后加入PFO将单液滴破碎，通过磁珠法纯化提取管中的cDNA。取部分双链cDNA作为模板进行qPCR实验，通过CT值来评估捕获到的总cDNA含量。剩余的cDNA进行PCR扩增，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，用建库试剂盒连接上接头。构建好的文库用Illumina测序平台进行高通量测序。

[0061] 测序结果显示比较snRandom-seq和本发明方法对同一个小鼠脑FFPE样本的检测，限定相同的测序数据量(相近测序深度和细胞数)，根据基因组gtf注释文件，统计mapping到coding、intron、intergenic等不同区域的reads数，检测到的基因数，基因类型相似性较高(图6)(参考RSeQC:quality control of RNA-seq experiments)，且本发明方法检测到更多的编码RNA，间区更低，有更多的有效基因信息用于下游分析。将数据进行聚类分析(参考Seurat软件官网说明https://satijalab.org/seurat/)，本发明在分群上更为干净(图7)，snRandom-seq由于离心次数较多，细胞核间的粘连问题比较严重，不同群之间有较多交叉弥散信号，影响后续分析的准确性。通过对图7中细胞类型的数量统计，可以发现snRandom-seq离心次数过多会导致细胞类型分布不均匀，多种细胞类型数量较少(图8)，本发现获得的细胞类型更均匀，多样。

[0062] 实施例3：单细胞核解离方式比较

[0063] 使用实施例1中所述本发明方案，对胃FFPE样本进行脱蜡、复水、透化、封闭、逆转录、加接头反应。然后将组织块分成两份，一份加入的细胞核解离液为表面活性剂，使用匀浆器破碎组织，使用10-40μm细胞筛对细胞核进行过滤，去除组织残渣，使用PBST离心清洗3次获得单细胞核，标记为机械解离组；第二份加入细胞核解离液包含表面活性剂和蛋白酶K(0.1～15mg/ml),25～50℃反应5～30分钟，使用移液器吹打辅助解离，使用10-40μm细胞筛对细胞核进行过滤，去除组织残渣，使用PBST离心清洗3次获得单细胞核，标记为酶解离组。将两组细胞核按照实施例2所述进行单细胞核转录组分析。结果如图9所示，两种解离方式都可以获得比较好的单细胞分群(图9之a图)，并且两组检测到的基因高度一致(图9之b图)，细胞类型分布也比较一致(图9之c图)。

[0064] 实施例4:冻存样本的处理和单细胞核分析

[0065] 准备小鼠冻存脑组织，使用切片机切取30um组织片，使用4%PFA固定组织15 min，使用PBST清洗组织片3次，直接使用移液器吸弃废液。将组织片浸泡在透化试剂中(含0.1% Triton-100，PBS)，置于4℃，10分钟。使用PBST清洗3次，直接使用移液器吸弃废液。将组织片浸泡在逆转录试剂(包含逆转录酶、逆转录反应缓冲液、dNTPs，逆转录引物)进行逆转录，反应结束后用PBST洗三遍，直接使用移液器吸弃废液。在样本中加入末端转移酶、dATP和反应缓冲液，37℃孵育30分钟。反应结束后用PBST洗三遍，直接使用移液器吸弃废液。在组织片中加入1ml单细胞核解离液，单细胞核解离液为含0.5～2%NP-40离子表面活性剂、MgCl2(1～5mM)的2X SSC缓冲液，蛋白酶K(0.1～15mg/ml)。将组织片和解离液混合物加入杜恩斯匀浆器中进行匀浆，均浆10～30次，25～50℃反应5～30分钟，使用10-40μm细胞筛对细胞核进行过滤，去除组织残渣，离心吸弃上清，并用PBST重复离心洗3遍。将细胞核按照实施例2所述进行单细胞核转录组分析。结果如图10所示，冻存小鼠脑组织可以获得清晰的单细胞分群(图10)。

[0066] 实施例5:单细胞核糖体和线粒体测序分析

[0067] 使用实施例1中所述本发明方案，对乳腺FFPE样本进行脱蜡、复水、透化、封闭、逆转录、加接头反应。在组织片中加入解离液，解离液中含有胶原酶，使用匀浆器破碎组织，37℃孵育30分钟，使用10-40μm细胞筛进行过滤，去除组

织残渣，使用PBST离心清洗3次获得单细胞核线粒体核糖体复合物，按照实施例2所述进行微流控分隔和测序分析。结果如图11所示，分离的亚细胞结构中保留了大量的核糖体和线粒体，单细胞核线粒体核糖体复合物具有比较好的聚类分群，其中约有59.8%的信号来自核糖体，在编码RNA信号中线粒体比例也比较高。

[0068] 实施例6：穿刺样本的单细胞核转录组分析

[0069] 取肝脏穿刺样本FFPE 2-3卷，使用实施例1中所述方法，进行脱蜡、复水、透化、封闭、逆转录、加接头反应。在对组织片进行操作过程中，由于组织片较小，吸弃液体前需要使用桌面离心机短暂离心收集组织。然后使用实施例1中所述的方法对穿刺样本进行细胞核解离和清洗，收集细胞核，计数。按照实施例2所述进行微流控分隔和测序分析。测序数据如下表1所示，结果如图12所示，针对微量的穿刺样本，本发明的方案也可以有效地进行单细胞核转录组分析，肝穿刺样本可以获得清晰的单细胞分群。

[0070] 表1

原始数据（G）	原始read数（M）	比对read数	细胞数	read：UMI	read中位数	UMI中位数	基因中位数	线粒体比例中位数（%）
10.7	35.7	31.4	8363	1.1	778	672	494	6.47

[0071] 实施例7：FFPE样本的并行单细胞核转录组分析

[0072] 取2个人肾脏FFPE切片样本各一卷，使用实施例1中所述的方法，进行脱蜡、复水、透化、封闭、逆转录、加接头反应。其中2个样本使用的逆转录引物携带不同的标签序列(逆转录引物结构：PCR接头+标签序列+RNA结合序列GAGA ATGTGAGTGAAGATGTATGGTGA+GAAGGAAT+NNNNNNN；GAGAATGTGAGTGAAGATGTATGGTGA+GATGAATG+NNNNNNN)，逆转录后2个样本混合在一起进行后续的加接头和细胞核的解离、清洗、计数操作。按照实施例2所述进行微流控分隔和测序分析。测序数据如表2所示，可以在测序数据中依据逆转录引物上的标签序列将原始数据进行拆分，获得两个样本的数据。结果如图13所示，两个样本都有效地进行了单细胞核转录组分析，可以获得清晰的单细胞分群。

[0073] 表2

原始数据（G）	原始 read 数（M）	样本	比对 read 数	细胞数	read：UMI	read 中位数	UMI 中位数	基因中位数	线粒体比例中位数（%）
23.3	77.6	NO.1	19.2	9209	1	311	304	228	14.77
		NO.2	35.6	4575	1	588	574	396	11.61

[0074] 实施例8：通过模板置换加捕获接头的单细胞核分析

[0075] 取乳腺FFPE样本1卷,使用实施例1中所述的方法进行脱蜡、复水。然后用0.1M HCl洗3遍，TE(pH 9.0)洗1遍，重悬于TE(pH 9.0)中金属浴95℃中处理30min，缓慢降至室温，再用2XSSCT(常温)洗3遍。将组织片浸泡在逆转录试剂中(包含逆转录酶、逆转录反应缓冲液、dNTPs，逆转录引物，以及模板置换引物)进行逆转录(模板置换引物结构：TTTTTTTTTTTTTTTTrGrG/iXNA_G/)，反应结束后用PBST洗三遍。在组织片中加入1ml单细胞核解离液，单细胞核解离液为含0.5～2%NP-40离子表面活性剂、$MgCl_2$(1～5mM)的2X SSC缓冲液。将组织片和解离液混合物加入杜恩斯匀浆器中进行匀浆，均浆10～30次，冰上静置处理5～15分钟，均浆后的混合物中加入100μl蛋白酶K(0.1～15mg/ml),25～50℃反应5～30分钟，使用10-40μm细胞筛对细胞核进行过滤，去除组织残渣，离心吸弃上清，并用洗涤液重复离心洗三遍。取部分细胞核用细胞核特异性染料DAPI染色后在显微镜下观察计数。按照实施例2所述进行微流控分隔和测序分析。测序数据如下表3所示。结果如图14所示，通过模板置换，而不是通过末端转移酶加ployA，也可以有效地在单细胞核cDNA末端添加捕获接头，实现单细胞核转录组分析，获得清晰的单细胞分群。

[0076] 表3

原始数据（G）	原始 read 数（M）	比对 read 数	细胞数	read：UMI	read 中位数	UMI 中位数	基因中位数	线粒体比例中位数（%）
7.2	23.9	19.6	2830	1.6	690	435	355	9.63

工业实用性

[0077] 本发明获得的亚细胞结构对于高通量单细胞亚细胞结构转录组测序十分有利，因此具有很大实用价值。

权利要求书

[权利要求 1] 一种处理组织样本获得单细胞亚细胞结构的方法，其特征在于，包括如下步骤：

S1-1：将组织样本进行固定和透化处理；

S1-3：对组织样本的RNA进行标记，具体是将组织样本浸泡在标记试剂中，标记试剂包括核苷酸链、工具酶和反应缓冲液，通过核苷酸链与RNA片段结合，核苷酸链结合到RNA链后发生聚合反应或连接反应，使核苷酸链携带RNA信息和捕获接头；

优选地，通过逆转录酶实现对组织样本的RNA进行标记，具体是通过添加逆转录酶、核苷酸链、反应缓冲液进行RNA逆转录产生携带RNA信息标记的cDNA，通过添加末端转移酶和一种脱氧核糖核苷三磷酸进行cDNA捕获接头添加，或者通过模板置换在细胞cDNA末端添加捕获接头；

S1-4：在组织片中加入解离液，然后对组织片进行分散处理，离心除上清得到亚细胞结构；所述亚细胞结构是细胞核、细胞器(如线粒体、核糖体、溶酶体、内质网、高尔基体)、细胞质凝聚物、质体、溶酶体、细胞分泌的物理结构(如细胞外囊泡)或其组合；优选地，亚细胞结构是细胞核。

[权利要求 2] 如权利要求1所述的方法，其特征在于，其中所述组织样本的原始样本是石蜡包埋样本、冻存样本、新鲜样本、冷藏样本、固定液保存样本或样本保存液保存样本、穿刺样本；

S1-1具体操作方法为：对于石蜡包埋样本，进行脱蜡、水化和透化处理；对于固定样本，进行透化处理；对于新鲜或冻存组织样进行固定和透化处理；

优选地，所述透化处理是表面活性剂、酶、酸、高温或其组合处理，所述固定中采用的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、升汞，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、包因氏固定液；

更优选地，所述透化处理是将组织样本浸泡在透化试剂中进行处理，或者在70℃-90℃温度下进行处理。

[权利要求 3] 如权利要求2所述的方法，其特征在于，S1-1中的透化处理采用蛋白酶处理，优选地是1mg/ml胃蛋白酶的0.1M盐酸溶液；所述处理是置于35-39℃(36-38℃，具体为37℃)反应5-30分钟，例如8-12分钟，具体为10分钟；

优选地，所述蛋白酶可以为胃蛋白酶、胰蛋白酶、中性蛋白酶、木瓜蛋白酶或胶原酶中的一种或多种。

[权利要求 4] 如权利要求1所述的方法，其特征在于，在S-1和S-3步骤之间还包括S-2步骤：对组织样本中的单链DNA采用封闭试剂进行封闭，所述封闭方式包括使用聚合酶补齐单链DNA变成双链，或者使用DNA酶降解DNA单链，更优选地通过加入DNA聚合酶、封闭引物、dNTP和反应缓冲液，进行封闭反应实现；

优选地，所述封闭试剂为含1～10U/μl DNA聚合酶、5～50mM封闭引物、1～10mM dNTPs、1X DNA聚合酶反应缓冲液；所述封闭反应是于35-39℃(36-38℃，具体为37℃)反应20～45分钟。

[权利要求 5] 如权利要求1所述的方法，其特征在于，S1-3中核苷酸链是polyT序列，靶基因序列，随机序列或其组合，所述随机序列可以是由2种碱基组成，3种碱基组成，4种碱基组成；所述工具酶可以是逆转录酶、聚合酶、连接酶、转座酶、末端转移酶或其组合。

[权利要求 6] 如权利要求1所述的方法，其特征在于，S1-3中进行RNA标记是在8-60℃(36-38℃，具体为37℃)孵育1-8小时，优选为3-5小时，具体为4小时。

[权利要求 7] 如权利要求1所述的方法，其特征在于，S1-4中的解离液为表面活性剂、盐离子溶液、解离酶或其混合物，所述解离酶选自蛋白酶K、胶原酶、中性蛋白酶、胰蛋白酶、弹性蛋白酶、透明质酸酶、

木瓜蛋白酶；所述盐离子溶液选自PBS、HEPES、TRIS或SSC缓冲液；所述表面活性剂选自NP-40、IGEPAL®CA-630、TritonX-100、Tween-20、Tween-80、CHAPS去污剂、Brij-58、辛基硫代葡萄糖苷(OTG)；

优选地，解离液含有0.5%-2%NP-40离子表面活性剂、1-5mMMgCl$_2$的2X SSC缓冲液、0.1-15mg/ml蛋白酶K。

[权利要求 8] 如权利要求1所述的方法，其特征在于，S1-4中所述对组织样本进行分散处理是通过机械作用将组织破碎，解离出亚细胞结构；优选地，采用匀浆将组织破碎，组织碎片于25-50℃反应5-30分钟。

细则 26, 19.03.2025

[权利要求 9] 如权利要求8所述的方法，其特征在于，进一步包括纯化得到的亚细胞结构的步骤，优选地是用缓冲液洗，再采用10-40μm细胞筛进行过滤，去除组织残渣；另外优选地，S1-1至S1-4每一步在进行下一步时采用缓冲液洗涤2-5遍，优选为3遍；所述缓冲液选自PBS、HEPES、TRIS或SSC缓冲液。

细则 26, 19.03.2025

[权利要求 10] 如权利要求1至9任一项所述的方法，其特征在于，所述组织样本来以组织片的形式，具体的组织片的厚度为5-100μm，优选为10-60μm；

任选地，所述组织样本是标记不同逆转录引物上的标签序列的两种或多种样本混合样本。

[权利要求 11] 一种高通量单细胞亚细胞结构转录组测序的方法，其特征在于，包括采用如权利要求1至10任一项所述的方法获得的亚细胞结构进行高通量单细胞亚细胞结构测序的步骤。

[权利要求 12] 如权利要求11所述的方法，其特征在于，采用微流控液滴或微孔板系统进行单细胞亚细胞结构分割；

优先地，采用微流控液滴系统进行单细胞亚细胞结构分割步骤如下：

S2-1将所述亚细胞结构的样本、延伸反应试剂、编码微球、油相分别与微流控芯片的对应入液口连接，形成包含单细胞亚细胞结

构、单个编码微球、延伸反应试剂的油包水单液滴，收集单液滴，形成单个腔室包含单细胞亚细胞结构的分隔；

S2-2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；

S2-3延伸反应结束后将单液滴破碎，纯化提取管中的cDNA，进行PCR扩增；

S2-4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，用建库试剂盒连接上接头；

S2-5构建好的文库用Illumina测序平台进行高通量测序。