



Nature | 开发活细胞转录组测序技术

时间: 2022-08-18 来源: 合成所

文本大小: 【大|中|小】 【打印】

唯一不变的就是变化本身，对细胞而言亦是如此。一个受精卵发育为一个复杂个体，正常体细胞变成肿瘤细胞，细胞作为生命的基本单位，其状态的动态变化既是健康发育的基础也是疾病产生的原因。从光学显微镜对细胞形态变化的观察，到绿色荧光蛋白对细胞基因、表达定位等变化的追踪，再到分子记录器在基因组中稳定写入曾经发生的分子事件，以及单细胞转录组测序的发展允许了细胞全转录组的变化拟时序推测，每一次细胞动态变化记录的技术变革都极大的推动了细胞生物学的发展。同时，应当认识到，既有的方法要么受限于对细胞形态或者少数几个基因的动态表征，要么依赖于拟时序分析中多种在实际细胞体系中可能无法满足的假设，我们目前还没不能直接地测量细胞全转录组状态变化。

nature

Explore content v About the journal v Publish with us v

nature > articles > article

Article | Open Access | Published: 17 August 2022

Live-seq enables temporal transcriptomic recording of single cells

Wanze Chen, Orane Guillaume-Gentil, Pernille Yde Rainer, Christoph G. Gäbelein, Wouter Saelens, Vincent Gardeux, Amanda Klaeger, Riccardo Dainese, Magda Zachara, Tomaso Zambelli, Julia A. Vorholt & Bart Deplancke

Nature (2022) | Cite this article

Metrics

文章上线截图

文章上线链接: <https://www.nature.com/articles/s41586-022-05046-9>

8月17日，中国科学院深圳先进技术研究院与瑞士洛桑联邦理工学院Bart Deplancke课题组、苏黎世联邦理工学院Julia Vorholt课题组的合作成果以article长文的形式在Nature上发表。题目为“Live-seq enables temporal transcriptomic recording of single cells”。

深圳先进院合成生物学研究所陈万泽研究员（原瑞士洛桑联邦理工学院博士后）、Orane Guillaume-Gentil、Bart Deplancke和Julia Vorholt为共同第一作者。

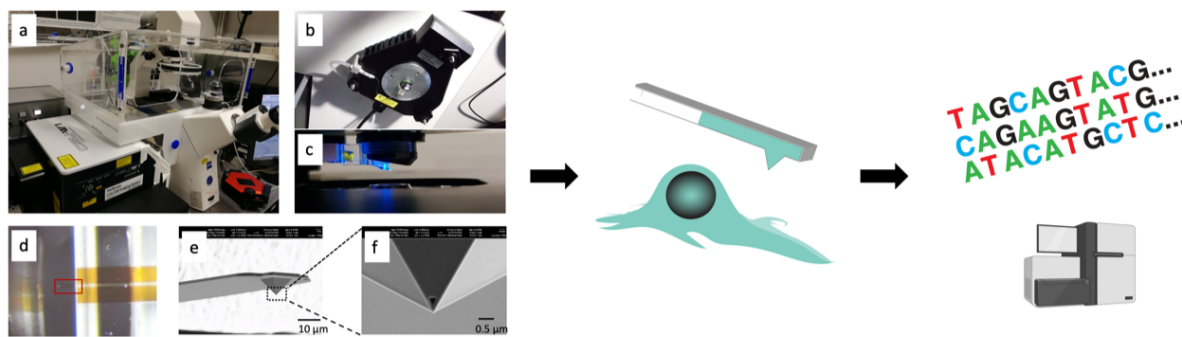
这项研究开发了活细胞转录组测序技术（Live-seq），首次实现了让单细胞进行转录组测序后依然能够保持细胞存活。该技术兼具全基因表达分辨率和动态解析能力，是目前对单细胞转录组直接动态测量、偶联细胞现有状态和其后续表型的唯一解决方案。

基因表达程序的变化是细胞对外源和内源刺激反应的重要表现。对单个细胞的连续观测一直是细胞对刺激反应、变化的重要研究手段，活细胞成像应该是最早的方法。随着显微成像技术的发展和荧光标记手段的进步，显微成像已经可以实现从体外细胞培养到体内环境下对基因表达的动态观测。基因编辑技术的发展促进了分子记录器的出现。通过细胞原生的或者人工合成的基因线路，对刺激的感应并将信息写入基因组，实现对历史分子事件的记录。这些技术的发展和运用，促进了细胞生物学的研究，如活细胞成像已经成为了现代细胞生物学实验室的常用的一种手段；分子记录器虽然出现不久，但是它在体内多场景的适用性和稳定性上有很大的潜力。但是，它们在记录基因表达上有一个共同的限制：在一个细胞中只能同时记录一个或几个基因的表达。

另一方面，自2009年汤富酬首创了单细胞mRNA测序以来，我们不再只依靠少数几个基因的表达来了解细胞类型，而可以用整个转录组的状态来更加系统全面的定义细胞类型和状态。单细胞转录组变革了我们对细胞状态异质性的解析能力，推动了发育生物学、肿瘤细胞学、免疫学和干细胞生物学等各个领域的发展。然而，我们只能测量细胞的静态状态，无法像前述的活细胞成像那样连续观测细胞的动态或者检查细胞后续的表型。为了克服这个限制，多种基于计算或者标记的方法被开发出来，这些方法基于一个共同的假设：群体的静态分布可以模拟个体的动态运动。通过不同的数学模型和/或对新旧RNA的标记等手段，把转录组相似的细胞连接起来产生一条轨迹来代表一个细胞的变化路径。这些方法提供了大量有意义的生物学认

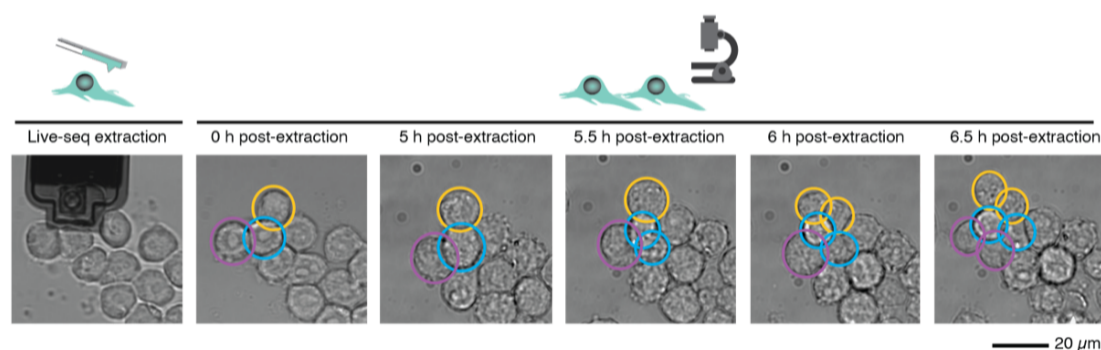
知，但是同时值得注意的是，由于这些方面的前提假设在复杂细胞系统不一定能被满足，其提供的变化路径应该被解读为一种统计学上的预期，而非细胞真正变化的轨迹。而这些限制的根本原因是单细胞测序时裂解杀死了细胞，因而无法连续测量。

针对这个挑战，陈万泽研究员和合作者此次开发了活细胞转录组测序（Live-seq），在进行单细胞转录组测序后，依旧保持细胞的存活和功能。该技术核心是对部分细胞质进行微创地提取，并对其微量的细胞质RNA进行扩增。具体地，该技术整合改造了多种跨学科技术（如图一）：1）具备纳米级移动分辨率和皮牛顿力学灵敏度的原子力显微镜，实现超精密显微操作；2）亚皮升级别的微/纳流控通道和液压调节系统，实现微量（约1皮升）样品提取和转移；3）纳米级的、中空可定量的、可和细胞膜无缝密封的特殊探针，可以实现微创的细胞质提取；4）相耦合的实时跟踪成像和细胞培养系统，可以长时间锁定同一个细胞；5）高灵敏度的RNA扩增测序；6）对前述步骤的无缝整合。



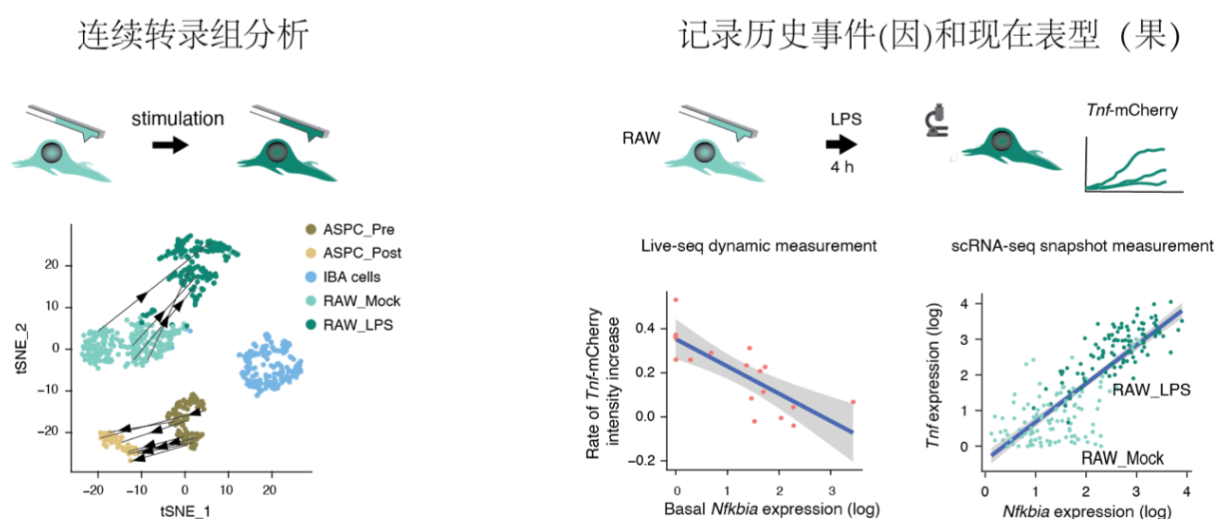
图一 Live-seq的基本原理

Live-seq只是对少量的细胞质进行测序，其结果是否能代表细胞的状态？为了回答这个问题，作者对多种类型和状态的细胞进行活细胞测序，并平行地和单细胞测序结果进行比较。结果显示活细胞测序结果和单细胞测序结果高度吻合，证明了Live-seq能够很好的体现细胞的全转录组状态。另一个疑问就是这个过程是否会改变细胞状态甚至杀死细胞。首先，作者对包括干细胞在内的多种细胞类型进行评估，发现绝大部分细胞在Live-seq后仍然存活。同时，细胞分裂依然能够正常进行（图二）。然后，通过对巨噬细胞对细菌脂多糖LPS刺激的反应和脂肪干细胞分化过程的观测，发现细胞的反应没有因Live-seq有明显变化。最后着，对接受和未接受细胞质提取的细胞全转录组进行比较，也未发现大量的基因表达变化。这些结果显示，Live-seq没有对细胞的活性和功能产生较大影响。



图二 Live-seq对细胞的影响。黄色的细胞被提取了细胞质，蓝色和紫色的细胞没有被处理。

由于细胞测试后仍旧存活，Live-seq首次实现对同一个细胞全基因表达的连续测量。作为概念验证，Live-seq直接测定了同一个巨噬细胞和脂肪干细胞在刺激前后的变化路径（如图三显示）。Live-seq可以回答细胞怎样的过去决定了它的现在。即使是单克隆来源的巨噬细胞对细菌脂多糖的反应依旧有很大的异质性。利用这个模型，作者展示起始状态的少数基因的表达差异和噪音（如Nfkbia, Gsn等）是决定细胞后续反应差异的重要原因，同时处于细S期的细胞对刺激反应也更弱。对应的，普通的单细胞转录组无法找到这些规律。



图三 活细胞测序的新可能：（左图）对同一个细胞转录组的连续分析；（右图）偶联细胞起始的转录组状态（因）和后续细胞对刺激的反应（果）。

Live-seq仍然有多个缺点。比起高通量的单细胞转录组，Live-seq还是一个低通量的手段；Live-seq目前还不能在体内应用；在高度极化而mRNA分布不均的细胞（如神经细胞）中，Live-seq可能无法体现全细胞转录组；更加多次的采样对细胞的干扰还需要更多的研究。通过未来持续的发展，如自动化提高通量、通过和双光子显微镜联用运用于体内样品等，这些缺点有望得到改善和克服。尽管仍然有很多不足，Live-seq第一次使得对活细胞的连续观测成为可能，希望这个可能可以催生更多新的可能。

该研究得到了国家重点研发计划及深圳合成生物创新研究院的支持。

专家评论

卢健森（北京大学汤富酬实验室博士） | 汤富酬（北京大学生命科学学院教授）

解析细胞在生长发育以及应对外界刺激等过程中在基因表达层面的动态变化特征，是发育生物学领域的重大问题。近年来，随着单细胞组学测序技术以及相应的生物信息学分析方法的迅猛发展，越来越多的方法被应用于胚胎发育过程中细胞分化谱系和发育路径的构建。然而，要在单细胞分辨率准确地描绘胚胎发育路径，仍具有很大挑战性。

目前对细胞分化路径的研究主要有两类研究策略：（1）采用活细胞实时成像和谱系重构等方法得到在胚胎发育的细胞增殖、分化、迁移过程中候选基因的动态变化；（2）采用在不同时间点平行进行单细胞转录组测序的方法推断在胚胎发育的细胞增殖、分化、迁移过程中所有表达基因（转录组）的动态变化。前者由于实验方法的限制往往只能对少数几个基因的表达进行实时示踪，难以对全转录组的上万个基因的表达动态进行分析。而后者采用的单细胞转录组测序需要裂解被分析的细胞，因而无法在保留该活细胞的情况下检测其基因表达情况。也就是说，如果保持目标细胞存活就无法分析其转录组；如果要分析目标细胞的转录组就需要杀死该细胞（无法保持该目标细胞存活）。所以，目前基于单细胞转录组测序来重构细胞分化轨迹的方法需要基于一个前提假设，就是将单个细胞的转录组状态（通过单细胞RNA-seq测序可以获得）视为同一细胞类型在动态变化过程中的一个无偏快照（snapshot）。在此基础上依据不同基因的共表达情况（Qiu et. al, 2017），或是mRNA剪接模式的单向变化（RNA velocity）（La Manno et. al, 2018）等构建出细胞分化轨迹。目前仍然缺少在对一个单细胞进行转录组分析后仍然保留该活细胞以用于后续功能和表型分析的方法。

近日，瑞士洛桑联邦理工学院Bart Deplancke课题组的陈万泽（已在中科院深圳先进技术研究院建立独立课题组）等人发表了基于流体力显微镜（FluidFM）的保留活细胞（不需要杀死目标细胞）的单细胞转录组测序方法Live-seq。该方法通过对活细胞进行部分细胞质RNA取样，结合优化了的超低起始量mRNA的扩增方法，实现了在不杀死目标细胞（保留活细胞）的情况下对该细胞进行转录组测序。利用该方法，作者研究了RAW246.7巨噬细胞在初始状态下对LPS刺激的响应情况。

有意思的是，作者还实现了使用Live-seq技术对同一个活细胞多次分离部分细胞质进行多次转录组测序的可行性，表明这一技术有望在将来用于构建单个活细胞的转录组系列变化动态。当然，该技术也存在改进的空间，例如细胞质提取的过程目前依赖于体外FluidFM的操作。未来能否进一步简化操作流程，能否将该技术应用到体内胚胎发育的研究中，还需要进一步的探索。总之，该研究为单细胞转录组测序提供了全新的研究策略，为我们理解生命过程的动态变化提供了强有力的手段，是这一领域的又一重大突破。

PI与课题组简介：

陈万泽，研究员，博士生导师，现就职于中国科学院深圳先进技术研究院合成生物学研究所。2013年于厦门大学获得博士学位（师从细胞生物学家韩家淮院士），2015年于瑞士洛桑联邦理工学院从事博士后研究（师从Bart Deplancke教授），2021年入职中科院深圳先进技术研究院。以第一作者身份在Nature, Nature Cell Biology, Nature Communications, Cell Research, JBC等杂志上发表多篇学术论文。

实验室通过对细胞命运决定机制进行研究，探讨这些过程在正常生理和病理下的作用，提高我们对细胞命运的理解，继而尝试对细胞命运进行干预，为疾病的治疗提供可能的策略和参考价值。实验室的特色：注重多学科交叉的新技术开发，比如首创了活细胞测序技术。该技术使单细胞进行转录组测序后仍能保持活性，是目前在时间维度对同一个细胞进行直接连续观测的唯一手段。此外还有多个单细胞分析新技术已经进入应用阶段，这些新技术为细胞命运决定机制的研究和功能改造提供了独特的研究视角。

实验室主页：<http://isynbio.siat.ac.cn/view.php?id=416>

课题组长期招募热爱探索和富有韧性的博士后、硕博研究生、研究助理。有意申请者请将个人简历以邮件方式发送至wz.chen@siat.ac.cn。

更多招聘详情可查阅：[中科院深圳先进院合成所陈万泽课题组诚聘生物信息学、造血干细胞方向-博士后/研究助理/技术员 \(qq.com\)](#)

机构设置	研究队伍	学院	科学研究	合作交流	研究生/博士后	科研支撑	产业化	科学传播
机构简介	人才概况	计算机科学与控制工程学院	IBT介绍	国际合作	教育概况	实验动物管理	运行结构	工作动态
院长致辞	人才招聘	生物医学工程学院	论文	院地合作	招生信息	分析测试中心	转移转化	科普园地
理事会	人才动态	生命健康学院	专利		教学培养	实验室建设...	投资基金	科学教育
现任领导		药学院	项目		联合培养	日常环保工作	案例分享	
历任领导		合成生物学院	科研道德与伦理		学生活动		专利运营	
机构导航		材料科学与能源工程学院	集成技术期刊		博士后			



版权所有 中国科学院深圳先进技术研究院 粤ICP备09184136号-3

地址：深圳市南山区西丽深圳大学城学苑大道1068号 邮编：518055 电子邮箱：info@siat.ac.cn

