评述

单细胞转录组测序技术新进展及其在造血系统研究中的应用

杨子宁^{*}, 郝莎^{*}, 程涛^{*}

中国医学科学院&北京协和医学院血液病医院(血液学研究所), 实验血液学国家重点实验室, 天津 300020

^{*} 联系人, E-mail: haosha@ihcams.ac.cn; chengtao@ihcams.ac.cn

收稿日期: 2019-08-15; 接受日期: 2019-09-20; 网络版发表日期: 2020-01-08

国家重点研发计划(批准号: 2016YFA0100600, 2017YFA0103400, 2018YFA010701)、国家自然科学基金创新研究群体项目(批准号: 81421002)、

中国医学科学院医学与健康科技创新工程项目(批准号: 2016-I2M-1-017)、实验血液学国家重点实验室开放课题(批准号: Zk17-01)资助

摘要 单细胞测序技术凭借其能全面反映细胞群体异质性这一优势, 近年来发展迅速. 其中, 单细胞转录组测序技术提供了在分子水平上对细胞作分类或表征的替代方法, 在发育生物学、神经科学、血液学、免疫及癌症等研究领域均展示出了广泛的应用前景. 本文总结了近年来单细胞转录组测序技术的主要发展趋势, 并列举了该技术在造血系统中的应用.

关键词 单细胞, 异质性, 转录组, 高通量测序, 造血系统

随着测序技术水平的不断提升, 测序通量逐步提高, 测序成本也随着方法的优化大大降低, 对各项组学测序数据的分析已成为生物学及医学研究领域常用的实验手段. 单细胞转录组测序技术的出现, 提供了在分子水平上表征单细胞的新方法, 可全面还原出细胞特征及群体间差异, 更为精确地解析细胞群体的异质性, 尤其适用于分析珍稀样本和高度异质性细胞群体^[1]. 在特定的发育阶段或生理、病理条件下, 该技术能够实现对单个细胞间分子调控、基因功能元件等差异的动态剖析, 是深入理解发育分化、疾病发展等问题的重要手段. 在发育生物学、神经科学、血液学、免疫及癌症等领域均有广泛应用前景^[2,3]. 2013年, 单细胞测序入选*Nature Methods*杂志评选的年度方法学进展^[4].

造血系统是支持机体正常生理活动的重要组成部分, 参与衰老、疾病及肿瘤发生等过程^[5]. 其中, 造血干细胞(hematopoietic stem cell, HSC)作为产生各类血细胞的源头, 其在表型、功能和定位上都存在异质性^[6], 使得造血系统在发育、谱系分化和调控等方面的研究还存在很多疑问. 单细胞测序技术为人们在单细胞尺度下对造血系统进行进一步深入解读提供了新的策略. 本文总结了近年来单细胞转录组测序技术的主要发展趋势, 并列举了该技术在造血系统中的应用.

1 单细胞转录组测序技术的基本原理及发展

自2009年Tang等人^[7]首次报道单细胞转录组测序

引用格式: 杨子宁, 郝莎, 程涛. 单细胞转录组测序技术新进展及其在造血系统研究中的应用. 中国科学: 生命科学, 2020, 50: 287–295
Yang Z N, Hao S, Cheng T. Advances in single-cell transcriptome sequencing technology and its application in hematopoietic system research (in Chinese). *Sci Sin Vitae*, 2020, 50: 287–295, doi: 10.1360/SSV-2019-0030

分析方法起,近十年来相关技术的创新及应用飞速发展,测序通量已由几十个细胞增长到数十万个,测序成本大幅降低,技术局限也逐一突破^[8](图1)。以单细胞的捕获方式为例,相关技术的研发方向趋于更高的自动化程度及样本的大批量处理,如Fluidigm C1^[9]系统可在同一张芯片上完成细胞捕获、裂解、逆转录及预扩增的全过程。2015年,哈佛医学院的研究人员将微流控技术结合纳升级液滴和条码微珠,推出Drop-seq^[10]和inDrop^[11]技术,微珠直接捕获mRNA(messenger RNA),全部反应均在一个液滴中完成,产物浓度更高,且成本大大降低。2017年,Zheng等人^[12]提出10x GemCode技术,该技术将条码反应液滴以油滴封装,反转效率更高,且样本量可提高至十万个。目前常用的10x Genomics ChromiumTM系统便是基于该技术。

单细胞cDNA(complementary DNA)文库的构建流程主要由4个环节组成:单细胞捕获及裂解、逆转录、cDNA扩增和文库建立(图2)。获得单细胞后,如何将极少量的mRNA逆转录、扩增得到可检测量的cDNA,并能尽量高效率、低偏倚地完整保留转录组信息,是单细胞cDNA文库构建流程中的关键。早期的转录本扩增策略以PCR扩增为主,随后很多技术则选择了线性扩增或拟线性扩增,如CEL-seq^[13],PMA^[14](Phi29-mRNA amplification),SMA^[14](semirandom primed PCR-based mRNA transcriptome amplification)和多次退火环状循环扩增技术^[15](multiple annealing and loop-

ing-based amplification cycles, MALBAC)等以规避逆转录产物长度偏倚。但考虑到技术整体的稳定性和效率,以STRT-seq^[16]和Smart-seq^[17]为代表的模板切换法PCR扩增现已成为最常用的单细胞cDNA文库扩增策略,广泛应用于商业化平台及新型技术中。

2 单细胞转录组测序技术的发展新趋势

2.1 更丰富的样本选择

单细胞转录组测序在样本的选择上十分苛刻,一般取新鲜标本制成一定浓度的单细胞悬液,要求细胞活性高、黏连少,这就使得冻存样本、轻微固定样本、尸体标本以及难消化的组织块等的应用受限。2013年,Grindberg等人^[18]首次尝试比较了小鼠的单个神经细胞和单个细胞核内转录组的差异,发现二者检出的基因表达差异相似。这就提示在处理复杂样本时,无需考虑胞质损失带来的问题,可直接分离单个细胞核及核内mRNA来体现细胞转录状态。此外,胞质内核糖体的去除还能减少组织解离后假基因的表达。2016年,Aviv Regev实验室和张峰实验室^[19]联合推出Div-Seq,在已有单核转录组测序技术的基础上优化了聚类算法。2017年,他们再次发表“升级版”的DroNc-seq^[20],改进了细胞核分离方法,不再依赖FACS(fluorescence activated cell sorting),实现了大规模、高通量的测序以及实验流程的进一步简化。单核

图1 单细胞转录组测序技术发展时间线(网络版彩图)

Figure 1 Timeline showing progress and improvement in single-cell transcriptome sequencing technology (color online)

图 2 单细胞转录组测序技术操作流程(以Smart-seq为例). A: 流式分选捕获单细胞; B: 模板切换法逆转录得到cDNA; C: PCR扩增; D: 文库制备测序及数据分析

Figure 2 Workflow of single-cell transcriptome sequencing technology (using Smart-seq as an example). A: Sorting single cell by FACS; B: reverse transcription by template-switch strategy; C: PCR amplification; D: library establishment, sequencing and data analysis

转录组测序技术丰富了样本的选择, 能够满足更多的临床需求, 如组织活检、病理细胞图谱绘制等。

2.2 更低廉的技术成本

单细胞转录组测序技术由于单细胞分离难、无酶要求高、测序通量大等原因导致建库及测序费用一直居高不下, 限制了其大规模应用。2018年初, 接连发表的Microwell-seq^[21]和SPLiT-seq^[22]就通过对单细胞获取及cDNA扩增环节的创新设计, 将单个细胞的转录组建库、测序成本降低至0.01~0.02美元, 测序通量更是达到10万个单细胞以上。

浙江大学郭国骥实验室报道的Microwell-seq^[21]采用CytoSeq^[23]的微孔阵列及条码序列磁珠捕获单细胞mRNA, 不依赖FACS或其他微滴、微流控单细胞捕获平台, 而是直接将单细胞悬液和条码序列磁珠加至琼脂糖微孔阵列板中。每个微孔容纳一个细胞和一个条码磁珠, 逆转录反应后即每个细胞的转录组加上唯一的条码标记, 随后将产物混合做后续处理, 大大降低了单细胞建库成本, 适合大规模应用及细胞群体图谱绘制。另外, 2017年发表的同类型技术Seq-Well^[24]还将微孔阵列板的各部分根据需要设计不同的选择性官能团包被, 如表面覆半透膜及壳聚糖修饰, 加快裂解速

率并相对避免了单个细胞间的交叉污染; 微孔内部包被聚谷氨酸, 可防止mRNA的非特异性结合, 使得整个体系更为精致严谨。

与Microwell-seq技术同期, SPLiT-seq^[22](split-pool ligation-based transcriptome sequencing)是又一项高通量低成本测序技术, 其核心为“split-pool”标签连接以及细胞内逆转录。“split-pool”即“拆分和重组”, 最早来自Drop-seq^[10]中微珠表面包被条码序列的合成方法, 是将微珠随机分为A, G, C, T四组并连接对应的脱氧核苷酸, 之后再四组混合均匀重新分组, 以此类推进行12次重复就可以获得4¹²个不同的12碱基条码序列。SPLiT-seq就是利用这种拆分重组的形式为转录本加上多重标签序列, 提高单次操作的样本量, 降低了技术成本。细胞内逆转录是将轻微固定后的样本在完全裂解前加入逆转录反应体系, 逆转录酶及引物等可穿膜在细胞内部完成第一链cDNA的合成。既无需设计每个细胞单独的条码序列, 也无需将单细胞分隔至独立的反应体系中, 使用常规离心管或孔板即可根据样本量自行设计标签序列的种数和连接反应次数。这两项技术的创新为开展大规模测序提供了技术保障, 但同时也存在上样细胞损耗高、测序深度浅、实验操作繁琐等劣势。

2.3 单细胞多组学测序

就单细胞而言, 如何深入挖掘其更多的组学信息, 成为科学家们的又一关注焦点. 2015年, 针对同一单细胞的基因组和转录组平行测序的DR-Seq^[25]和G&t-seq^[26]先后问世, DR-Seq采取先逆转录、预扩增, 再将产物一分为二的策略; G&t-seq则是利用生物素化的多聚T引物将mRNA率先从基因组DNA中分离. 两种组学信息的整合不仅能揭示基因组变异对基因表达水平的影响, 还可对细胞基因组谱系树作进一步的转录组注释. 2016年, 汤富酬实验室^[27]报道scTrio-seq, 可同时分析单个细胞的基因组拷贝数变异(copy-number variations, CNV)、DNA甲基化组和转录组. 该法应用于人肝癌细胞, 可根据基因组CNV信息检测癌细胞亚群, 并基于三元组学信息推断亚群的恶性程度和转移潜能, 适于研究细胞群体在发育和癌症中的异质性.

2017年, CITE-seq^[28]与REAP-seq^[29]接连发表, 两种方法都是基于商业化单细胞转录组测序平台设计针对细胞膜表面不同蛋白的DNA条码抗体, 上样前预先将该抗体与单细胞悬液孵育, 逆转录体系中的多聚T引物会分别与mRNA及抗体条码DNA的多聚A序列结合, 即将蛋白组信息转换为可测序的DNA碱基信息. 此类方法除可凸显单细胞间表型差异、细化异质性细胞群体外, 还能消除普通流式分选中荧光标记的光谱重叠或质谱流式中稳定同位素可用数量所带来的限制, 使得数十到数百个抗体的大规模免疫表型分型成为可能.

前不久, Buenrostro等人^[30]发表最新研究将检测单细胞染色质开放性的scATAC-seq与单细胞转录组测序技术联合使用, 首次绘制了各类造血干/祖细胞基于染色质开放性的图谱, 并预测了各类细胞群体的分化轨迹, 结合转录组信息还将转录因子的表达变化与顺式调控元件处的染色质开放性变化相关联, 通过其相关程度来靶向基因. 但略显遗憾的是, 此项工作是利用不同的单细胞样本分别进行染色质开放性检测和转录组测序, 相信随着技术水平的提高, 最终能够实现在同个单细胞的平行实验.

2.4 原位单细胞转录组测序

原位单细胞转录组测序即借助显微操作、荧光标记成像等手段记录单细胞的空间位置信息, 同时捕获

该细胞进行转录组测序, 从而进一步阐明细胞与细胞间的相互作用. 2016年, Silberstein等人^[31]发表相关研究, 将DiI标记的长周期造血干细胞移植至经照射的GFP(green fluorescent protein)小鼠体内, 两天后取股骨的新鲜切片, 通过特殊的原位酶消化及微吸管技术在荧光生理显微镜下将红色标记细胞的近端和远端间充质细胞分离出来作单细胞转录组测序, 分析相对位置与其表达的细胞表面标志物或分泌因子间的关系, 促进了对造血微环境调控的理解. 2017年问世的NICHE-seq^[32]则将可光激活的荧光标记、双光子激光扫描显微镜(two-photon laser scanning microscopy, TPLSM)以及FACS三种技术结合应用, 移植普通荧光标记的“地标”细胞, 并根据它们的定位将目标细胞照射激活, 流式分选单细胞进行转录组测序. 选取小鼠B细胞滤泡或腹股沟淋巴结作为目的微环境, 能够鉴定罕见的微环境特异性免疫亚群及其基因表达, 对单细胞在组织中的空间位置有极高的重现性.

总之, 随着单细胞测序技术的不断更新和发展, 其应用将会在解析细胞群体异质性、揭示微环境中细胞群体间关系、追踪疾病的发生发展等研究中发挥更加重要的作用(各类单细胞转录组测序具体技术参数的汇总及特点比较见表1).

3 单细胞转录组测序技术在造血系统研究中的应用

作为研究历史最长且最为深入的一类成体干细胞, HSC及其子代细胞所共同构成的“金字塔”式的造血分化级联是十分经典的干细胞分化模型: 不同自我更新能力的造血干/祖细胞依次构成造血分化的主干部分, 之后根据分化谱系的差异分为淋巴系统和髓系两大分支并生成最终的功能细胞^[33](图3A). 近来很多研究在此基础上利用功能学方法对造血分化的模型做出了修正, 如淋系、髓系分化潜能存在关联性^[34], 巨核细胞的分化路径^[35,36], 多能祖细胞具有多个功能亚群^[37]等. 本实验室^[38]的前期工作也通过单细胞分离及移植实验证明了造血干细胞功能及表型上的高度异质性. 而单细胞转录组学研究则能进一步在发现新的细胞亚群、造血转录调控网络的补充和完善以及建立造血系统尤其是造血干/祖细胞的转录组特征及参考(reference)等方面发挥强有力的作用.

表 1 单细胞转录组测序技术的汇总比较

Table 1 Summary of single-cell transcriptome sequencing technology

技术名称	细胞捕获方法	扩增策略	目的mRNA	细胞总数(个)	技术特点	参考文献
scRNA-seq	口吸管/FACS	末端加尾法PCR	全长	1~100	灵敏度高, 3'端偏倚较严重	[7]
STRT-seq	口吸管/FACS	模板切换法PCR	5'末端	1~100	避免3'端偏倚, 稳定高效, 成本较高	[16]
Smart-seq	口吸管/FACS	模板切换法PCR	全长	1~100	避免3'端偏倚, 稳定高效, 成本较高	[17]
CEL-seq	口吸管/FACS	体外转录	3'末端	1~100	避免片段长度偏倚, 反应效率较低	[13]
PMA	口吸管/FACS	滚环扩增	全长	1~100	避免片段长度偏倚, 反应效率较低	[14]
SMA	口吸管/FACS	半随机引物PCR	全长	1~100	避免片段长度偏倚, 反应效率较低	[14]
Fluidigm C1	微流控系统	模板切换法PCR	全长	100~1000	操作简便, 仪器芯片价格昂贵	[9]
MALBAC-RNA	口吸管/FACS	MALBAC	全长	1~100	避免片段长度偏倚, 扩增效率低	[15]
Drop-seq	微珠液滴系统	模板切换法PCR	3'末端	>1000	通量较高, 产物浓度高, 依赖微流控装置	[10]
inDrop	微珠液滴系统	体外转录	3'末端	>1000	通量较高, 产物浓度高, 依赖微流控装置	[11]
10x GemCode	微珠液滴系统	模板切换法PCR	3'末端	~10000	高通量, 操作简便, 测得基因数少	[12]
DroNc-seq	微珠液滴系统	模板切换法PCR	3'末端	>10000	适用于冻存样本, 损失胞质数据	[20]
Microwell-seq	琼脂糖微孔板	模板切换法PCR	全长	~10000	成本低, 操作复杂, 测得基因数少	[21]
SPLiT-seq	细胞内逆转录	模板切换法PCR	全长	>10000	成本低, 样本得率低, 操作复杂	[22]
NICHE-seq	TPLSM, FACS	体外转录	3'末端	>1000	原位单细胞测序, 依赖特定细胞及仪器	[32]

随着单细胞转录组测序技术在造血领域的逐步应用, 这种以分化潜能为等级、淋髓两系划分明确的造血分化模式的问题渐渐凸显. 按照以往经典的细胞表面标志分选得到的各类群干/祖细胞, 无论淋系、髓系, 在单细胞转录组测序分析时, 都表现出高度的异质性, 存在多个亚群^[39-42]. 2015年, Bert-hold实验室^[42]将单细胞转录组测序、流式索引分选和单细胞移植技术相结合, 寻找HSC的自我更新能力与基因表达模式、细胞表面标志间的关系. 同年, Paul等人^[41]发表在*Cell*杂志上的工作利用单细胞转录组测序对早期髓系祖细胞群体进行分析, 将传统定义的共同髓系祖细胞及其下游的粒系-单核系祖细胞和巨核-红系祖细胞详细划分为18种亚群, 并发现其对红细胞、巨核细胞、单核细胞等下游细胞均具有不同程度的转录特异性. 2017年, Villani等人^[43]选取正常人外周血样本并对其进行单细胞转录组测序, 结合功能及表型特点, 将树突细胞重新划分为6个亚群, 并新增加两个单核细胞亚群, 进一步拓展了人体免疫细胞图谱及临床治疗新靶点.

单细胞转录组测序技术能放大关键调控因子在异质性群体中的表达差异, 是补充和完善造血转录调控

网络的有利工具. 以*Cebpa*为例, 2015年, Paul等人^[41]发现, *Cebpa*是区分粒系-单核系和巨核-红系的主要转录因子, 而后又对*Cebpa*敲除小鼠模型中的髓系祖细胞再次进行单细胞转录组测序, 比对后显示, 中性粒细胞、嗜碱性粒细胞和单核细胞完全缺失, 而红系祖细胞则显著增加, 表明*Cebpa*可作为粒系-单核系细胞命运的早期调节因子, 以及在缺乏适当的谱系决定性转录因子的情况下, 髓样细胞可能表达淋巴细胞和红细胞基因. 2018年, Giladi等人^[44]则利用将单细胞转录组测序技术与CRISPR(clustered regularly interspaced short palindromic repeats)基因编辑技术相结合的CRISP-seq进一步证实, *Cebpa*是调控进入髓系命运的关键因子, *Irf8*和*PU.1*的缺失会阻止后期向单核细胞或粒细胞命运的分化.

随着单细胞转录组测序通量的逐步提高, 人们不再局限于对某个祖细胞分支或某类成熟细胞的单细胞转录图谱的探究, 而是更为关注整个造血系统尤其是造血干/祖细胞的转录组特征. 2015年, Kowalczyk等人^[45]对8~12周龄小鼠和2岁左右衰老小鼠的长周期HSC、短周期HSC、多能祖细胞进行单细胞转录组测序, 评估造血干/祖细胞的转录异质性以及其在稳态造血中随年龄的变化, 即建立了造血干/祖细胞在稳态下

图 3 造血分化模型的革新. A: 造血分化树模型(MPP: 多能祖细胞; CMP: 共同髓系祖细胞; MEP: 巨核-红系祖细胞; GMP: 粒-巨噬细胞祖细胞; CLP: 共同淋系祖细胞); B: 造血干细胞的连续分化模型(ME: 巨核-红系路径; GM: 粒-巨噬细胞路径; Lym: 淋系路径)

Figure 3 Innovation of hierarchical models of hematopoiesis. A: A model of the haematopoietic differentiation tree (MPP: multipotent progenitors; CMP: common myeloid progenitor; MEP: megakaryocyte-erythroid progenitor; GMP: granulocyte-macrophage progenitor; CLP: common lymphoid progenitor); B: a continuum of haematopoietic differentiation (ME: megakaryocyte-erythroid path; GM: granulocyte-macrophage path; Lym: lymphoid path)

的正常及衰老图谱. 2016年, Nestorowa等人^[40]将单细胞转录组测序的样本量扩大到1600余个造血干/祖细胞, 建立了12个类群造血干/祖细胞的单细胞表达图谱, 为造血分化研究提供了较为系统的单细胞转录组数据参考. 刘兵实验室^[46,47]在造血发育方面的相关工作同样以单细胞转录组测序为手段, 分析小鼠胚胎主动脉-性腺-中肾(aorta-gonad-mesonephros, AGM)区的内皮细胞、pre-HSC和胎肝中的HSC, 发现mTORC2信号通路以及H19长非编码RNA在HSC早期形成阶段中的关键作用, 同时也补充了HSC在胚胎造血时期的单细胞转录图谱.

近年来, 单细胞转录组测序搭配新的数据计算方法, 能够通过转录组的相似性将单细胞按照人为设定的分化时间点排列, 从而虚拟重建细胞间关系. 结合以上建立稳态造血单细胞转录组图谱的相关工作, 越来越多的研究团队提出造血分化是一个连续性的过程(图3B), 具体体现在低偏向未分化的造血干/祖细胞向谱系限制细胞的逐渐分化, 以及分子水平上细胞分裂基因受抑和谱系特异性基因激活的统筹^[44,48,49]. 这种假说强调造血干/祖细胞的异质性, 是对传统造血

分化模型的一大创新, 但同时也存在与细胞表面标志的脱轨、过于依赖单细胞转录组测序等问题, 还需要从表观修饰等层面进行完善^[50,51].

4 单细胞转录组测序技术的前景展望

单细胞转录组测序技术的发展速度之快, 可谓“日新月异”. 随之不断涌现的还有大量生物信息数据分析方法、新的分析工具, 它们能够处理更加庞杂的测序数据, 解决更为繁复的生物学问题, 但同时也需要以高质量的文库构建为前提, 二者相辅相成, 缺一不可. 而在建库方法的选择上, 样本细胞数与测得基因数、低成本与易操作往往不能兼得, 许多“高通量”的技术都存在细胞损耗率高、测序深度浅等缺陷. 由于单细胞转录组测序技术自身的性质: 样本量大、产物浓度低又易降解, 即便实验流程已进一步简化, 也还是无法避免操作繁琐、试剂耗材昂贵、稳定性差等问题, 在实际操作中仍需要投入大量的人力物力. 因此在设计课题框架时要明确研究目的和科学问题, 根据需求谨慎选择合适的方法, 切勿盲目, 顾此失彼.

造血系统研究对单细胞转录组测序技术的应用是尤为成功的范例, 过去的理论在单细胞尺度下得到了证明或新的解读, 教科书上的经典知识体系也受到了挑战. 随着稳态下造血分化模式的革新, 今后在疾病或应激条件下的造血分化模式的探究也将大步向前, 并结合多种单细胞功能实验, 进一步解析造血干/祖细胞的表型、功能异质性及调控机制. 一直以来, 稳态及疾病下的造血系统与造血微环境间的关系也是该领域研究的重点^[52]. 借助原位单细胞转录组测序技术, 可以将测序信息还原至目的细胞所处的造血微环境, 更加直观地阐释细胞间的相互作用. 在临床应用方面, 多种血液系统疾病的发生以单个细胞为单位, 单细胞转录组测序技术能够鉴别恶性造血中的罕见细胞亚群

及基因突变, 对开发诊断标记物、血液肿瘤靶向治疗的探索具有较大潜力.

未来, 随着单细胞领域研究的不断深入, 人们不会满足于单一组学信息的获取, 单细胞转录组测序技术将会在“多组学”方向进一步发展, 使其尽可能整合单个细胞的各个组学特征, 利用先进的生物信息分析方法进行大规模的数据统计模拟. 而根据各学科研究特点, 单细胞转录组测序技术的设计也将更为多样化, 尝试获得更多的时间、空间信息^[53,54], 并结合CRISPR Screen检测技术深入探究分子机制^[55,56]. 单细胞转录组测序技术的应用前景无疑是光明的, 随着方法学的优化创新, 相信单细胞转录组测序技术会持续推动生命科学进步, 造福人类健康.

参考文献

- 1 Trapnell C. Defining cell types and states with single-cell genomics. *Genome Res*, 2015, 25: 1491–1498
- 2 Wang Z, Gerstein M, Snyder M. RNA-Seq: A revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet*, 2009, 10: 57–63
- 3 Kumar P, Tan Y, Cahan P. Understanding development and stem cells using single cell-based analyses of gene expression. *Development*, 2017, 144: 17–32
- 4 Chi K R. Singled out for sequencing. *Nat Methods*, 2014, 11: 13–17
- 5 Copley M R, Beer P A, Eaves C J. Hematopoietic stem cell heterogeneity takes center stage. *Cell Stem Cell*, 2012, 10: 690–697
- 6 Chen C, Hao S, Cheng T. Heterogeneity of hematopoietic stem cell (in Chinese). *Chin J Hematol*, 2015, 36: 878–882 [陈晨, 郝莎, 程涛. 造血干细胞异质性. *中华血液学杂志*, 2015, 36: 878–882]
- 7 Tang F, Barbacioru C, Wang Y, et al. mRNA-Seq whole-transcriptome analysis of a single cell. *Nat Methods*, 2009, 6: 377–382
- 8 Kolodziejczyk A A, Kim J K, Svensson V, et al. The technology and biology of single-cell RNA sequencing. *Mol Cell*, 2015, 58: 610–620
- 9 Wu A R, Neff N F, Kalisky T, et al. Quantitative assessment of single-cell RNA-sequencing methods. *Nat Methods*, 2014, 11: 41–46
- 10 Macosko E Z, Basu A, Satija R, et al. Highly parallel genome-wide expression profiling of individual cells using nanoliter droplets. *Cell*, 2015, 161: 1202–1214
- 11 Klein A M, Mazutis L, Akartuna I, et al. Droplet barcoding for single-cell transcriptomics applied to embryonic stem cells. *Cell*, 2015, 161: 1187–1201
- 12 Zheng G X Y, Terry J M, Belgrader P, et al. Massively parallel digital transcriptional profiling of single cells. *Nat Commun*, 2017, 8: 14049
- 13 Hashimshony T, Wagner F, Sher N, et al. CEL-Seq: Single-cell RNA-Seq by multiplexed linear amplification. *Cell Rep*, 2012, 2: 666–673
- 14 Pan X, Durrett R E, Zhu H, et al. Two methods for full-length RNA sequencing for low quantities of cells and single cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110: 594–599
- 15 Chapman A R, He Z, Lu S, et al. Single cell transcriptome amplification with MALBAC. *PLoS ONE*, 2015, 10: e0120889
- 16 Islam S, Kjällquist U, Moliner A, et al. Characterization of the single-cell transcriptional landscape by highly multiplex RNA-seq. *Genome Res*, 2011, 21: 1160–1167
- 17 Ramsköld D, Luo S, Wang Y C, et al. Full-length mRNA-Seq from single-cell levels of RNA and individual circulating tumor cells. *Nat Biotechnol*, 2012, 30: 777–782
- 18 Grindberg R V, Yee-Greenbaum J L, McConnell M J, et al. RNA-sequencing from single nuclei. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110: 19802–19807
- 19 Habib N, Li Y, Heidenreich M, et al. Div-Seq: Single-nucleus RNA-Seq reveals dynamics of rare adult newborn neurons. *Science*, 2016, 353: 925–928

- 20 Habib N, Avraham-Davidi I, Basu A, et al. Massively parallel single-nucleus RNA-seq with DroNc-seq. *Nat Methods*, 2017, 14: 955–958
- 21 Han X, Wang R, Zhou Y, et al. Mapping the mouse cell atlas by Microwell-seq. *Cell*, 2018, 173: 1307
- 22 Rosenberg A B, Roco C M, Muscat R A, et al. Single-cell profiling of the developing mouse brain and spinal cord with split-pool barcoding. *Science*, 2018, 360: 176–182
- 23 Fan H C, Fu G K, Fodor S P A. Combinatorial labeling of single cells for gene expression cytometry. *Science*, 2015, 347: 1258367
- 24 Gierahn T M, Wadsworth M H, Hughes T K, et al. Seq-Well: Portable, low-cost RNA sequencing of single cells at high throughput. *Nat Methods*, 2017, 14: 395–398
- 25 Dey S S, Kester L, Spanjaard B, et al. Integrated genome and transcriptome sequencing of the same cell. *Nat Biotechnol*, 2015, 33: 285–289
- 26 Macaulay I C, Haerty W, Kumar P, et al. G&T-seq: Parallel sequencing of single-cell genomes and transcriptomes. *Nat Methods*, 2015, 12: 519–522
- 27 Hou Y, Guo H, Cao C, et al. Single-cell triple omics sequencing reveals genetic, epigenetic, and transcriptomic heterogeneity in hepatocellular carcinomas. *Cell Res*, 2016, 26: 304–319
- 28 Stoeckius M, Hafemeister C, Stephenson W, et al. Simultaneous epitope and transcriptome measurement in single cells. *Nat Methods*, 2017, 14: 865–868
- 29 Peterson V M, Zhang K X, Kumar N, et al. Multiplexed quantification of proteins and transcripts in single cells. *Nat Biotechnol*, 2017, 35: 936–939
- 30 Buenrostro J D, Corces M R, Lareau C A, et al. Integrated single-cell analysis maps the continuous regulatory landscape of human hematopoietic differentiation. *Cell*, 2018, 173: 1535–1548.e16
- 31 Silberstein L, Goncalves K A, Kharchenko P V, et al. Proximity-based differential single-cell analysis of the niche to identify stem/progenitor cell regulators. *Cell Stem Cell*, 2016, 19: 530–543
- 32 Medaglia C, Giladi A, Stoler-Barak L, et al. Spatial reconstruction of immune niches by combining photoactivatable reporters and scRNA-seq. *Science*, 2017, 358: 1622–1626
- 33 Akashi K, Traver D, Miyamoto T, et al. A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature*, 2000, 404: 193–197
- 34 Adolfsson J, Månsson R, Buza-Vidas N, et al. Identification of Flt3⁺ lympho-myeloid stem cells lacking erythro-megakaryocytic potential. *Cell*, 2005, 121: 295–306
- 35 Sanjuan-Pla A, Macaulay I C, Jensen C T, et al. Platelet-biased stem cells reside at the apex of the haematopoietic stem-cell hierarchy. *Nature*, 2013, 502: 232–236
- 36 Yamamoto R, Morita Y, Ooehara J, et al. Clonal analysis unveils self-renewing lineage-restricted progenitors generated directly from hematopoietic stem cells. *Cell*, 2013, 154: 1112–1126
- 37 Pietras E M, Reynaud D, Kang Y A, et al. Functionally distinct subsets of lineage-biased multipotent progenitors control blood production in normal and regenerative conditions. *Cell Stem Cell*, 2015, 17: 35–46
- 38 Wang X F, Dong F, Hao S, et al. Single cell transplantation—Golden standard of hematopoietic stem cell heterogeneity study (in Chinese). *Sci Sin Vitae*, 2017, 47: 1353–1362 [王晓芳, 董芳, 郝莎, 等. 造血干细胞功能异质性研究的“金标准”——单细胞移植技术的建立和优化. 中国科学: 生命科学, 2017, 47: 1353–1362]
- 39 Alberti-Servera L, von Muenchow L, Tsapogas P, et al. Single-cell RNA sequencing reveals developmental heterogeneity among early lymphoid progenitors. *EMBO J*, 2017, 36: 3619–3633
- 40 Nestorowa S, Hamey F K, Pijuan Sala B, et al. A single-cell resolution map of mouse hematopoietic stem and progenitor cell differentiation. *Blood*, 2016, 128: e20–e31
- 41 Paul F, Arkin Y, Giladi A, et al. Transcriptional heterogeneity and lineage commitment in myeloid progenitors. *Cell*, 2016, 164: 325
- 42 Wilson N K, Kent D G, Buettner F, et al. Combined single-cell functional and gene expression analysis resolves heterogeneity within stem cell populations. *Cell Stem Cell*, 2015, 16: 712–724
- 43 Villani A C, Satija R, Reynolds G, et al. Single-cell RNA-seq reveals new types of human blood dendritic cells, monocytes, and progenitors. *Science*, 2017, 356: eaah4573
- 44 Giladi A, Paul F, Herzog Y, et al. Single-cell characterization of haematopoietic progenitors and their trajectories in homeostasis and perturbed haematopoiesis. *Nat Cell Biol*, 2018, 20: 836–846

- 45 Kowalczyk M S, Tirosh I, Heckl D, et al. Single-cell RNA-seq reveals changes in cell cycle and differentiation programs upon aging of hematopoietic stem cells. *Genome Res*, 2015, 25: 1860–1872
- 46 Zhou F, Li X, Wang W, et al. Tracing haematopoietic stem cell formation at single-cell resolution. *Nature*, 2016, 533: 487–492
- 47 Zhou J, Xu J, Zhang L, et al. Combined single-cell profiling of lncRNAs and functional screening reveals that H19 is pivotal for embryonic hematopoietic stem cell development. *Cell Stem Cell*, 2019, 24: 285–298.e5
- 48 Velten L, Haas S F, Raffel S, et al. Human haematopoietic stem cell lineage commitment is a continuous process. *Nat Cell Biol*, 2017, 19: 271–281
- 49 Macaulay I C, Svensson V, Labalette C, et al. Single-cell RNA-sequencing reveals a continuous spectrum of differentiation in hematopoietic cells. *Cell Rep*, 2016, 14: 966–977
- 50 Laurenti E, Göttgens B. From haematopoietic stem cells to complex differentiation landscapes. *Nature*, 2018, 553: 418–426
- 51 Zhang Y, Gao S, Xia J, et al. Hematopoietic hierarchy—An updated roadmap. *Trends Cell Biol*, 2018, 28: 976–986
- 52 Cheng H, Cheng T. Hematopoietic stem cell niches (in Chinese). *Sci Sin Vitae*, 2017, 47: 1242–1252 [程辉, 程涛. 造血微环境研究进展与发展方向. 中国科学: 生命科学, 2017, 47: 1242–1252]
- 53 Xue Y, Liu D, Cui G, et al. A 3D atlas of hematopoietic stem and progenitor cell expansion by multi-dimensional RNA-Seq analysis. *Cell Rep*, 2019, 27: 1567–1578.e5
- 54 Schofield J A, Duffy E E, Kiefer L, et al. TimeLapse-seq: Adding a temporal dimension to RNA sequencing through nucleoside recoding. *Nat Methods*, 2018, 15: 221–225
- 55 Mimitou E P, Cheng A, Montalbano A, et al. Multiplexed detection of proteins, transcriptomes, clonotypes and CRISPR perturbations in single cells. *Nat Methods*, 2019, 16: 409–412
- 56 Datlinger P, Rendeiro A F, Schmidl C, et al. Pooled CRISPR screening with single-cell transcriptome readout. *Nat Methods*, 2017, 14: 297–301

Advances in single-cell transcriptome sequencing technology and its application in hematopoietic system research

YANG ZiNing, HAO Sha & CHENG Tao

State Key Laboratory of Experimental Hematology, Institute of Hematology and Blood Disease Hospital Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Tianjin 300020, China

Recent years have witnessed the rapid development of single cell sequencing technology, which could reveal the mystery of the heterogeneity of cell populations. Single-cell transcriptome sequencing technology offers us an alternative method to classify or characterize cells at the molecular level, which enables its broad application in various fields of research, such as developmental biology, neuroscience, hematology, immunity and cancer. In this paper, we will review the main development and trends of latest single cell transcriptome sequencing technology, and its applications in hematopoietic system is presented.

single cell, heterogeneity, transcriptome, high throughput sequencing, hematopoietic system

doi: [10.1360/SSV-2019-0030](https://doi.org/10.1360/SSV-2019-0030)