

单细胞测序技术及其在植物中的研究进展

何其邹洪^{1,2} 鄂一岚^{1,2} 李瑞丽^{1,2*}

¹北京林业大学林木分子设计育种高精尖创新中心, 北京 100083;

²北京林业大学生物科学与技术学院, 林木育种国家工程实验室, 北京 100083)

摘要 传统的测序技术基于大量的样本, 其结果只能反映样本中所有细胞基因表达的整体水平而无法揭示单个细胞之间的基因表达异质性。单细胞测序作为一项新兴技术为解决上述问题提供了新思路。目前, 单细胞测序的研究主要集中于动物细胞, 关于植物单细胞测序的研究还相对较少。该文阐述了单细胞测序技术的发展史及关键技术, 并对其在植物细胞中的应用进展进行总结, 为今后系统开展植物单细胞的基因组和转录组测序的研究提供理论参考。

关键词 单细胞; 高通量测序; 植物; 基因组; 转录组

Single-Cell Sequencing Technology and Its Research Progress in Plant cells

HE Qizouhong^{1,2}, E Yilan^{1,2}, LI Ruili^{1,2*}

¹Beijing Advanced Innovation Center for Tree Breeding by Molecular Design, Beijing 100083, China; ²National Engineering Laboratory for Tree Breeding, College of Biological Sciences and Technology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China)

Abstract Traditional sequencing technology requires bulk sample to provide an average view of gene expression and ignore the information of gene expression heterogeneity between individual cells. Single-cell sequencing, as an emerging technology, provides new ideas for solving the above problems. Currently, this technique has been widely used in animal cell studies, but fewly used in plants cell. This review mainly focuses on the development history and key technologies of single-cell sequencing technology, with special emphasis on the research progress in plant cells, which will provide valuable information for further study on plant single-cell genome and transcriptome sequencing.

Keywords single-cell; high-throughput sequencing; plant; genome; transcriptome

2003年4月15日, 国际人类基因组组织正式宣布人类基因组计划全部完成, 标志着生命科学的研究已经进入后基因组时期, 各类基因组和转录组测序技术相继发展。常规的基因组或者转录组测序以成千上万细胞为样本, 检测结果为多个细胞基因表达的总体水平, 仅能反映被检测样本中表达量较高基因的表达情况, 而表达量低的基因其表达信息往

往被覆盖^[1]。单细胞测序以单个的细胞作为检测单位, 可以获得单个细胞的基因组或者转录组信息, 在研究某些特异的细胞以及发现新的细胞类型方面具有重要意义^[2]。

单细胞测序技术主要包括以下4个步骤: 单细胞样品制备、DNA扩增、DNA测序以及生物信息学分析^[3-4](图1)。目前, 单细胞测序已经广泛应用于动物

收稿日期: 2019-09-16 接受日期: 2019-11-06

国家自然科学基金面上项目(批准号: 31970182、31670182)、中央高校基本科研业务费专项(批准号: 2019ZY29)和国家重点研发计划(批准号: 2016YFD0600102)资助的课题

*通讯作者。Tel: 13426330885, E-mail: liruli@bjfu.edu.cn

Received: September 16, 2019 Accepted: November 6, 2019

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31970182, 31670182), the Fundamental Research Funds for the Central Universities (Grant No.2019ZY29) and the National Key Research and Development Program of China (Grant No.2016YFD0600102)

*Corresponding author. Tel: +86-13426330885, E-mail: liruli@bjfu.edu.cn

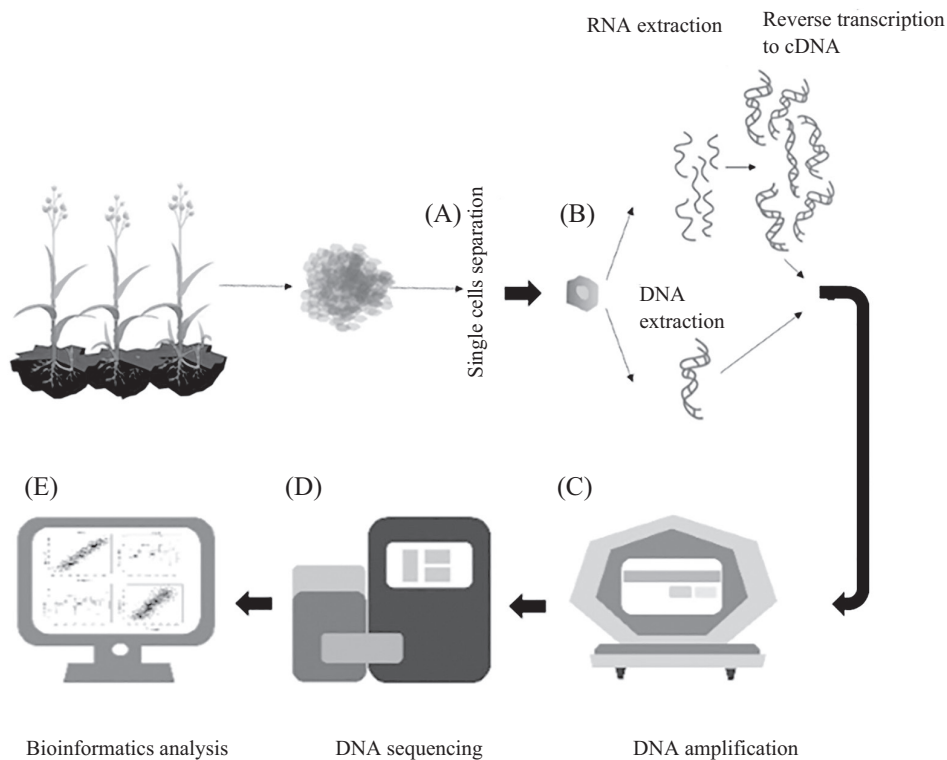
URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5233>

细胞的研究中, 主要包括细胞间基因表达异质性分析、拟时轨迹分析和稀有细胞类型鉴定等方面^[5], 相对动物细胞而言, 单细胞测序在植物细胞的研究中还应用较少, 因为植物细胞壁的存在给单细胞分离与获取增加了难度^[6]。尽管人们已经认识到大规模单细胞测序技术在植物细胞研究中的潜力, 但是目前报道的植物单细胞测序的研究仅涉及有限数量的细胞以及较少的物种^[7-8]。本文对单细胞测序的发展史、主要技术及其在植物细胞领域的应用进展进行总结。

1 单细胞测序发展史

早在20年前, 关于单细胞转录组的研究就已经开展, VAN GELDER等^[10]通过指数富集的方法, 利用PCR技术富集单个细胞的全部cDNA, EBERWINE等^[11]通过线性富集的方法, 利用T7 RNA聚合酶在体外富集单个细胞的全部cDNA。最初, 上述获取单细胞转录组的方法主要用于研究哺乳动物的神经系统, 因为神经系统的细胞类型丰富, 细胞之间基因

表达差异大^[12]。2005年, RAGHUNATHAN等^[13]利用 Φ 29 DNA聚合酶, 经多重置换扩增(multiple displacement amplification, MDA)将单个细菌的基因组DNA扩增了50亿倍, 并对一个16S rRNA进行了准确测序。近年来, 高密度DNA微阵列芯片的商业化生产^[14-17], 促进了单细胞基因芯片技术的发展; 但是基因芯片技术只能检测目前已经被发现的基因, 不能发掘新基因^[1]。2009年, TANG等^[18-19]首次报道了单细胞转录组深度分析(single-cell RNA-seq, scRNA-Seq), 以小鼠4细胞时期的胚胎作为单细胞转录组测序材料, 相对于微阵列技术, scRNA-Seq多检测了75%的基因表达, 并确定了1 753个以前未发现的剪接方式, 此外, scRNA-Seq还能够对单细胞转录本精确定量, scRNA-Seq除了可以检测已知转录本, 还能够发掘新的基因。最近, 又出现了许多关于检测单细胞转录组的方法, 比如: PMA-Seq(Φ 29-mRNA amplification and sequencing)^[20]、Smart-Seq(switching mechanism at 5' end of the RNA transcription sequencing)^[21]、STRT-Seq(single-cell tagged reverse tran-



A: 将植物组织分离为单个细胞; B: 获得单个细胞的DNA或者RNA; C: 扩增DNA或cDNA, 构建测序文库; D: 基因组/转录组文库测序; E: 测序结果进行生物信息学分析。

A: separate plant tissue into individual cells; B: obtain DNA or RNA from a single-cell; C: amplify DNA or cDNA to construct a genomic or transcriptome sequencing library; D: Genomic/transcriptome library sequencing; E: sequencing results for bioinformatics analysis.

图1 单细胞测序流程(根据参考文献[9]修改)

Fig.1 Single-cell sequencing process (modified from reference [9])

scription sequencing)^[22]等。随着单细胞技术的发展,其准确性和检测范围将会不断提升和扩大。

研究者对于单细胞基因组也进行过许多探索,尤其在第二代测序技术发展起来后,单细胞基因组测序得到迅速发展,2011年,NAVIN等^[23]首次对人类乳腺癌患者的单细胞全基因组进行测序,这是第一例人类细胞的全基因组测序研究。2013年,HOU等^[24]对人类卵母细胞进行单细胞全基因组测序。这些初步的研究开创了单细胞基因组测序这一生物学新领域,在过去近10年里单细胞基因组测序取得了巨大的发展。目前,单细胞基因组测序受到了越来越多的关注,特别是在稀有样品的研究中发挥重要作用,例如,2015年,YAN等^[25]以人类胚胎细胞为单细胞基因组测序的材料,首次提出了一种集成的基于NGS(next-generation sequencing)的PGD(preimplantation genetic diagnosis)/PGS(preimplantation genetic screening)程序,可以同时并直接检测致病突变、染色体异常和连锁分析,这一程序的应用使两名不携带其父母的单基因疾病的健康女婴得以诞生。

2 单细胞测序主要技术

2.1 单细胞分选技术

单细胞分选是进行单细胞测序的第一步,只有分离出单个并且具有活性的细胞才能进行后续的建库、测序分析等工作。目前常见的单细胞分选技术有:流式细胞分选技术、显微操作分选技术、连续稀释分选技术、微流控分选技术和激光捕获显微切割分选技术(表1)。

根据分选通量的高低,上述几种单细胞分选技术可分为低通量单细胞分选和高通量单细胞分选两类。其中,低通量单细胞分选包括连续稀释分选技术、显微操作分选技术和激光捕获显微切割分选技术。连续稀释分选法通过对细胞悬液进行一系列梯度稀释,当细胞悬液被稀释到适宜的浓度就能得到单细胞悬液^[26]。显微操作分选法在光学显微镜下即可完成,首先将制备的单细胞悬液稀释至合适的浓度,然后在光学显微镜下挑选出目标细胞,最后利用口吸管将细胞吸出即可完成单细胞分选。激光捕获显微切割分选法,也被称为光学镊子法,需要把特定组织固定到热塑膜涂片上,使用高度聚焦的激光束在倒置显微镜下切割待分选的目标细胞^[27-28]。

高通量单细胞分选技术包括流式细胞分选技术和微流控分选技术。流式细胞分选需要依赖荧光探针或者特异的染料,待分选的细胞只有具有荧光标记或者被染色才能通过流式细胞仪分选为单个细胞,具有分选通量高、分选特异性强等特点^[29],是一种比较经典的单细胞分离方法。微流控分选技术使用具有极小体积反应室的微流控芯片,其尺寸大小与细胞一致,能够有效地分选出单个细胞。此外,该技术还能集成另外的操作元件,不但能够完成单细胞分选,还可以进行后续单细胞基因组或转录测序,为单细胞研究提供了一种通量高、效率高的解决方案^[30]。

2.2 单细胞全基因组扩增

高通量测序对DNA样本的初始量有一定要求,单个细胞基因组DNA的含量远远达不到测序要求,因此需要对单细胞基因组DNA进行扩增。早期经

表1 几种常见单细胞分选技术比较

Table 1 Comparison of several common single-cell sorting techniques

单细胞分选 Single-cell sorting	适用样品 Applicable sample	优点 Advantage	缺点 Disadvantage	通量 Throughput	参考文献 Reference
Serial dilution	Cell suspension	Simple and easy to implement, low equipment requirements and low cost	Complex gradient calculations and easy to sort errors	Low	[27,31]
Microscopic	Cell suspension	Simple steps, low cost and no expensive equipment	Small number of cells can be isolated but high-throughput sorting is not possible	Low	[32]
Laser capture microdissection	Animal or plant tissue	Ability to select specific target cells for cutting sorting, which takes less time	Laser beam may damage sorted target cells	Low	[27]
Flow cytometry	Labeled cell	The sorting flux is high and the sorting specificity is strong	The operation steps are cumbersome and the equipment requirements are high	High	[29]
Microfluidic	Cell suspension	High sorting throughput, high sorting efficiency, and extremely low sample demand	High equipment requirements and high cost	High	[30]

典的单细胞全基因组扩增基于PCR反应, 较早的全基因组扩增方法有IRS-PCR(interspersed repetitive sequence PCR)和LA-PCR(ligation-anchored PCR), 前者通过特定的引物以已知的重复序列作为目标进行PCR反应, 后者将含有特定PCR引物位点的寡核苷酸连接到片段化的模板上, 然后将模板进行PCR扩增^[33-34]。1992年, ZHANG等^[35]开发了引物延伸预扩增法(primer-extension pre-amplification, PEP), 在体外通过使用15碱基随机寡核苷酸混合物重复引物扩增单个单倍体细胞中存在的大量DNA序列。简并寡核苷酸引物PCR(degenerate oligonucleotide-primed PCR, DOP-PCR)也是一类以PCR为基础的全基因组扩增技术, DOP-PCR扩增采用简并引物对模板扩增, 可以省去IRS-PCR技术中将含有特定PCR引物位点的寡核苷酸连接到片段化的模板上这一过程, 相比于LA-PCR以已知的重复序列作为目标, DOP-PCR扩增对模板序列是否部分已知没有要求^[36]。

虽然基于PCR反应的全基因组扩增技术能够有效地扩增单细胞基因组, 但是上述扩增方法存在覆盖率低(约10%)、效率低、扩增偏倚性严重、等位基因丢失等缺陷^[37]。受到细菌或者病毒DNA滚环扩增机制的启发, 有研究者报道了多重置换扩增(multiple displacement amplification, MDA)技术, MDA是将随机引物退火到变性DNA上, 然后在 Φ 29 DNA聚合酶或嗜硬脂芽孢杆菌(*Bacillus stearothermophilus*, Bst)DNA聚合酶的催化下, 在恒温下进行链置换合成DNA反应^[38-40]。与基于PCR反应的全基因组扩增技术相比, MDA基因组覆盖率高(大于90%), 扩增偏倚性少^[37,39], 是目前比较主流的全基因组扩增的方法之一。但是MDA也具有不足之处, 例如基因组的覆盖不均一、等位基因丢失等现象, 因此, MDA不能检测出拷贝数变异(copy number variation, CNV)^[41]。为了解决覆盖不均一等问题, 结合MDA和基于PCR反应的扩增方法, 2012年, ZONG等^[42]报道了一种新的扩增方法——多重退火和基于环状循环扩增(multiple annealing and looping-based amplification cycles, MALBAC), 该技术引入准线性预扩增, 以减少非线性扩增带来的偏倚, 并且大大降低了等位基因丢失率, 能够进行CNV和单核苷酸变异(single nucleotide variation, SNV)检测。2015年, FU等^[43]报道了乳液全基因组扩增(emulsion whole-genome amplification, eWGA), 将单细胞基因组包裹到皮升级别的油滴中,

每个油滴仅含有少量DNA片段, DNA片段的扩增在微小的油滴中进行, 使片段间的扩增差异达到最小, 该方法适用于所有的全基因组扩增, 也能进行CNV和SNV检测。2017年, CHEN等^[44]报道了一种改进的全基因组扩增技术——通过转座子插入的线性扩增(linear amplification via transposon insertion, LIANTI), 首先将单细胞基因组DNA在转座酶的作用下随机片段化, DNA片段被LIANTI转座子标记, 然后在DNA聚合酶的作用下将单链T7启动子环在每个片段两端转化为双链T7启动子, 在体外经T7RNA聚合酶转录得到基因组RNA, 经过逆转录、RNase消化和第二链合成, 形成具有独特分子条形码标记的双链LIANTI扩增子, 该扩增子可以代表单细胞原基因组DNA的扩增产物, 用于后续DNA文库制备和下一代测序。上述各类全基因组扩增技术各有其优劣之处, 表2列出了各类技术的主要特征。

2.3 单细胞转录组扩增

相对于单细胞全基因组扩增, 单细胞转录组扩增相对容易, 因为一个基因会产生多个转录本, 目前, 用于单细胞转录组扩增的方法主要有PCR扩增法、 Φ 29 DNA聚合酶扩增法、体外转录扩增法等^[48](表3)。

PCR扩增法根据合成第二条cDNA链采用的方法不同, 可以细分为末端加尾法、模板转换法和随机引物法(SMA)^[1]。BRADY等^[49]首先应用末端加尾法进行cDNA扩增, 在合成第一条cDNA链后, 使用一条5'端为特殊锚定序列, 3'端为oligo(dT)的引物, 即可合成第二条带有特定锚定序列的cDNA链。模板转换法是基于反转录酶的模板转换功能和末端转移酶功能。RAMSKOLD等^[50]报道了一种采用模板转换法进行单细胞转录组测序的方法——Smart-Seq, 该方法使用oligo-dT引物, 通过小鼠白血病病毒逆转录酶对带有poly A尾的单细胞RNA进行逆转录。当逆转录进行到mRNA的5'端时, 逆转录酶发挥末端转移酶的活性, 在新合成的第一条cDNA链的3'端加上几个非模板链的核苷酸, 经过特殊设计的SMARTer II A oligo引物可以与上述新增的几个核苷酸进行配对, 此时逆转录酶发挥模板转换活性, 以新合成的第一链cDNA为模板, 开始第二条cDNA链的合成。随机引物法通过使用由几个寡核苷酸构成的随机引物来合成第二条cDNA链^[20]。

Φ 29 DNA聚合酶扩增法此前被应用于全基因组扩增, 因为此扩增方法需要较长的模板链(通常大

表2 各类单细胞全基因组扩增技术比较

Table 2 Comparison of various single-cell whole genome amplification techniques

全基因组扩增 Whole genome amplification	扩增方法 Amplification method	聚合酶 Polymerase	优点 Advantage	缺点 Disadvantage	CNV检测 CNV detection	参考文献 Reference
IRS-PCR	PCR-based amplification	Taq DNA polymerase	Fast and sensitive, only a small amount of DNA can be used for reaction	Low genome coverage and amplification bias	No	[37,45]
LA-PCR	PCR-based amplification	Vent DNA polymerase, Deep Vent DNA polymerase, Pfu DNA polymerase, KlenTaq5 DNA polymerase	Long amplified fragment with high fidelity	Uneven coverage, prone to amplification errors	Yes	[46-47]
PEP-PCR	PCR-based complete random primer amplification	Taq DNA polymerase	Low initial sample demand	Low amplification efficiency and amplification bias	No	[35]
DOP-PCR	PCR-based partial random primer amplification	Taq DNA polymerase	Low initial sample demand	Amplification bias	No	[2,36]
MDA	Multiple displacement amplification	Φ 29 DNA polymerase	High genomic coverage (greater than 90%) with low amplification bias	Uneven genomic coverage and allele loss	No	[37-38] [41]
MALBAC	Multiple annealing and circular loop- based amplification	Bst DNA polymerase, Taq DNA polymerase	Low amplification bias, high genome coverage and low allele loss rate	Non-specific amplification	Yes	[42]
eWGA	Multiple displacement amplification	Φ 29 DNA polymerase	Higher genomic coverage	Operation is cumbersome	Yes	[43]
LIANTI	Transposon insertion linear amplification	Q5 DNA polymerase	High genomic coverage and low amplification bias	Amplification bias	Yes	[2,44]

表3 3种转录组扩增策略的比较

Table 3 Comparison of three transcriptome amplification strategies

转录组扩增策略 Transcriptome amplification strategy	扩增技术 Amplification tech- nique	聚合酶 Polymerase	优点 Advantage	缺点 Disadvantage	参考文献 Reference
PCR amplification	Brady/Tang method, Smart-Seq, Smart- Seq2, STRT-Seq, SMA	Taq DNA polymerase, Φ 29DNA polymerase	High amplification efficiency and high molecular capture efficiency	Specific temperatures are required to cause non-specific amplification, and PCR index amplification is likely to cause experimental bias	[1-2, 20, 49-50]
Φ 29 DNA polymerase amplification	PMA	Φ 29DNA polymerase	DNA degradation is avoided without the need for high temperature conditions	Low amplification uniformity	[1-2,20,27, 52]
CEL-Seq (cell expres- sion by linear amplifica- tion and sequencing)	CEL-Seq	T7RNA polymerase	Linear amplification is used to avoid errors caused by exponential amplification	Low amplification efficiency	[1-2,51]

于3 Kb)才能完成扩增。基于对模板链的特殊要求, PAN等^[20]设计了一个巧妙的策略将 Φ 29 DNA聚合酶扩增法应用于检测少量细胞甚至是单个细胞的转录组,首先在环化酶的作用下使细胞内的小片段转录

本自我环化形成环状分子,然后在 Φ 29 DNA聚合酶的作用下进行滚环扩增,使用此策略可以对小片段转录本进行扩增。

体外转录扩增法以单细胞逆转录反应作为起

表4 植物单细胞测序研究
Table 4 Plant single-cell sequencing application

测序类型 Sequencing type	材料 Material	主要结果 Main result	参考文献 Reference
Single-cell genome sequencing	Maize	Construction of high-resolution recombination map of maize tetrad microspores	[58]
	Maize	Revealing continuous chromosome breaks that occur after meiosis of maize gametophytes may result in haplotypes in embryos	[59]
Single-cell transcriptome sequencing	Moss	Combined expression of genes involved in shoot patterning and asymmetric cell division accompanies the transition from uniplanar to triplanar meristematic growth in moss	[61]
	Maize	Reconstruction of the developmental process of male meiosis in maize	[62]
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	A single-cell resolution gene expression map of the first generation <i>Arabidopsis</i> roots was constructed	[6]
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Reconstruction of single-cell developmental trajectories and identification of various cell-specific marker genes	[63]
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Construction of spatiotemporal developmental trajectories of <i>Arabidopsis</i> root cells	[64]
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Revealing the high heterogeneity of <i>Arabidopsis</i> root cells, and identifying the expression of intermediate state during root cell differentiation at single-cell resolution	[65]	

始, 使用特殊的引物(引物含5'-T7启动子-Illumina测序接头-独特的条形码序列-polyT-3)逆转录得到cDNA, 然后于体外在T7RNA聚合酶的作用下以上述反转录得到的cDNA作为模板, 转录得到RNA并建立RNA文库^[51]。此方法以线性扩增的方法代替PCR指数扩增, 避免了PCR指数扩增带来的实验误差。

2.4 高通量测序

单细胞基因组或者转录组文库构建好之后, 需要对文库DNA进行测序分析。高通量测序(high-throughput RNA sequencing)被广泛应用于上述DNA文库的测序分析中, 目前, 高通量测序技术包括第二代和第三代测序技术。第二代高通量测序主要基于Illumina公司的Solexa聚合酶合成测序技术、ABI公司的寡聚物连接检测测序(sequencing by oligo ligation detection, SOLiD)以及Roche公司的焦磷酸测序技术, 第二代高通量测序技术因其相对较低的测序成本和高的测序效率而被应用于生物、医学等研究领域^[53-54]。第三代高通量测序利用单分子测序技术实现边合成边测序并且不依赖PCR扩增技术, 可以有效地避免PCR指数扩增产生的误差, 此外, 第三代高通量测序技术在SNP检测和稀有突变检测等方面也有应用^[53]。

3 单细胞测序在植物中的应用

单细胞测序技术早期应用于动物细胞的研究,

例如在肿瘤、干细胞、发育生物学等领域已有广泛的研究。KURIMOTO等^[6]通过单细胞转录组测序, 检测出看似同质小鼠囊胚细胞的基因表达差异。通过高通量单细胞转录组测序, HAN等^[55]成功绘制了人类多能干细胞的分化通路。2019年, ZHOU等^[56]对65例人胚胎着床前后8 000多个单个细胞进行了系统分析, 首次阐述了人类胚胎植入过程基因表达调控网络以及DNA甲基化的变化规律。由于细胞壁的存在, 植物单细胞分选相对困难, 早期单细胞测序在植物细胞中的应用相对较少。近年来, 随着单细胞分选技术和高通量测序技术的发展, 植物单细胞测序的研究也逐渐增加, 关于植物单细胞测序的主要研究进展总结于表4。

3.1 单细胞基因组测序在植物中的应用

单细胞基因组扩增技术的发展使得分析单个细胞基因组成为可能, 目前有关单细胞基因组测序的研究相对较少, LI等^[57]以玉米为材料进行过有关植物单细胞基因组测序的研究, 2015年, 发表了国际上首篇关于植物单细胞基因组测序的研究论文, 该论文描述了一种从单个四分体中分离出4个小孢子并进行单细胞基因组测序的简便方法, 通过单细胞基因组测序构建了高分辨率的重组图谱, 发现同源重组在基因组中分布不均匀, 更可能发生在基因区域而不是基因间区域; 对基因组交换的检测表明, 大多数重组都可以发生转化。2017年, LI等^[58]分别从玉

米花粉粒中分离出3个细胞核,从四分体中分离出4个小孢子,通过Illumina公司HiSeq 3000平台将分离的细胞核和小孢子用于单细胞全基因组测序,其研究结果表明配子体减数分裂后发生的连续染色体断裂可能导致胚胎单倍体化。此外,基于亚硫酸氢单细胞测序(single-cell bisulfite sequencing, scBS-seq)对高度甲基化的DNA片段测序效率低,2019年,LI等^[59]开发了亚硫酸氢盐转化的随机整合片段测序技术(bisulfite-converted randomly integrated fragments sequencing, BRIF-seq),该技术能提高高度甲基化DNA片段的测序效率并且具有高基因组覆盖率,利用BRIF-seq发现玉米的四分体之间可能发生非同时的甲基化重编程。

3.2 单细胞转录组测序在植物中的应用

相较于植物单细胞全基因组测序,单细胞转录组测序的研究相对较早。LIECKFELDT等^[60]在2008年利用玻璃毛细管分离了拟南芥的基底细胞、表皮细胞和表皮毛细胞的单个细胞;并且通过RT-PCR对单个细胞的转录组进行富集,然后将上述3类单细胞内的不同基因的表达分为67种类型,并且在上述3类细胞内均发现了参与解毒和硫代谢的相关基因表达。2015年,FRANK等^[61]利用激光捕获显微切割技术分离出苔藓的顶细胞和芽细胞的单个细胞并且进行单细胞转录组测序,该研究通过单细胞转录组测序发现,超过4 000个基因在苔藓的顶细胞和芽细胞中存在表达差异,并且在苔藓分支过程发生的细胞线性分裂转变到向三平面分裂过程中,伴随着参与芽形成和不对称分裂相关的基因表达。2019年,NELMS等^[62]对144个0.3~1.5 mm的玉米孢子细胞和花粉母细胞进行单细胞转录组测序,揭示了玉米雄性减数分裂的转录编程。

近几年来,随着高通量测序技术的发展,植物高通量单细胞转录组测序也得到了进一步的发展,通过分析数以千计的单细胞转录组信息,可以进行细胞聚类分析,拟时轨迹分析、标记基因鉴定等。RYU等^[6]利用10× Genomics Chromium平台一共获取了超过10 000个拟南芥根细胞的原生质体并测定了每个原生质体的转录组,通过对这些细胞的转录组信息进行聚类分析,将上述细胞分为9个簇并且鉴定了不同的细胞亚群和罕见的细胞类型(例如静止中心细胞);此外,他们还通过对根表皮细胞的转录组分析确定了细胞的发育轨迹。同样以拟南芥的根细胞作为实验材料,JEAN等^[63]分离了3 121个根细胞并进行

高通量转录组测序,利用Monocle 3分析了上述细胞的转录组数据并且完成了单细胞发育轨迹的重构以及各类细胞特异性的标记基因的鉴定,此外,该研究还对受过热胁迫的种子生出的根进行了单细胞转录组测序,解决了长期存在的细胞类型间对非生物应激反应可能的异质性问题。DENYER等^[64]通过单细胞转录组测序技术构建了拟南芥根细胞的单细胞RNA表达图谱,能够捕获主要细胞类型的时空表达信息并且揭示新的调控因子。2019年,ZHANG等^[65]发表了国内首篇关于植物单细胞转录组分析的研究论文,该研究以拟南芥根尖作为实验材料,通过高通量单细胞RNA测序分析发现拟南芥根细胞在转录水平存在高度异质性,此外,通过聚类分析,他们将拟南芥的根尖细胞分为了24个细胞簇并且鉴定出了每一个细胞簇所特有的标记基因,并且每一个细胞簇都具有不同的离子同化模式和激素反应模式。

4 展望

单细胞测序已经取得了众多研究成果,尤其在动物细胞研究中已经得到了广泛的应用。近年来,植物领域的单细胞测序也有了一定发展。因其以单个细胞作为检测单位,该技术在研究某些特殊类型的细胞或者稀有细胞方面具有广泛的应用前景,例如检测树木形成层细胞的基因表达谱、分析花粉萌发过程不同时期转录组水平的变化等研究。但是,目前单细胞测序技术还存在一些缺陷,例如微量起始样本的扩增问题、信号检测过程的噪音问题、实验步骤繁琐等。另外值得注意的是,目前很多关于植物单细胞测序的研究都是将组织酶解为单个的原生质体后进行单细胞测序,这在一定程度上分离了细胞与其位置背景,使得后续的单细胞转录组分析缺乏关于细胞环境和位置的关键信息;为了解决这一问题,SATIJA等^[66]介绍了一种通过将单细胞RNA-seq数据与原位RNA模式整合来推断细胞定位的计算策略——Seurat,Seurat能够正确地识别不同的细胞簇并且定位不同的细胞亚群。今后,随着技术提升,单细胞测序会朝着更高通量,更加灵敏、精确检测的方向发展,成为更好揭示细胞的异质性以及从细胞水平解释生物学问题的有力工具。

参考文献 (References)

- [1] 文路, 汤富酬. 单细胞转录组高通量测序分析新进展[J]. 遗传

- (WEN L, TANG F C. Recent progresses in single-cell transcriptome analysis [J]. *Hereditas*, 2014, 36(11): 1069-76.
- [2] 李丽娟, 师书玥, 张村宇等. 单细胞转录组测序技术原理及其应用[J]. *中国畜牧杂志*(LI L J, SHI S Y, ZHANG C Y, et al. Principle and application of single-cell transcriptome sequencing [J]. *Chinese Journal of Animal Science*), 2019, 55(2): 15-21.
- [3] CHEN X, LOVE J C, NAVIN, N E, et al. Single-cell analysis at the threshold [J]. *Nat Biotechnol*, 2016, 34(11): 1111-8.
- [4] GAWAD C, KOH W, QUAKE S R. Single-cell genome sequencing: current state of the science [J]. *Nat Rev Genet*, 2016, 17(3): 175-88.
- [5] HWANG B, LEE J H, BANG D. Single-cell RNA sequencing technologies and bioinformatics pipelines [J]. *Exp Mol Med*, 2018, 50(8): 96.
- [6] RYU K H, HUANG L, KANG H M, et al. Single-cell RNA sequencing resolves molecular relationships among individual plant cells [J]. *Plant Physiol*, 2019, 179(4): 1444-56.
- [7] EFRONI I, IP P L, NAWY T, et al. Quantification of cell identity from single-cell gene expression profiles [J]. *Genome Biol*, 2015, 16(1): 9.
- [8] EFRONI I, BIRNBAUM K D. The potential of single-cell profiling in plants [J]. *Genome Biol*, 2016, 17(1): 65.
- [9] YUAN Y, LEE H, HU H, et al. Single-cell genomic analysis in plants [J]. *Genes*, 2018, 9(1): 50.
- [10] VAN GELDER R N, VON ZASTROW M E, YOOL A, et al. Amplified RNA synthesized from limited quantities of heterogeneous cDNA [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87(5): 1663-7.
- [11] EBERWINE J, YE H, MIYASHIRO K, et al. Analysis of gene expression in single live neurons [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89(7): 3010-4.
- [12] TANG F C, LAO K, SURANI M A. Development and applications of single-cell transcriptome analysis [J]. *Nat Methods*, 2011, 8(4 Suppl): 6-11.
- [13] RAGHUNATHAN A, FERGUSON H R JR, BORNARTH C J, et al. Genomic DNA amplification from a single bacterium [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2005, 71(6): 3342-7.
- [14] KLEIN C A, SEIDL S, PETAT-DUTTER K, et al. Combined transcriptome and genome analysis of single micrometastatic cells [J]. *Nat Biotechnol*, 2002, 20(4): 387-92.
- [15] TIETJEN I, RIHEL J M, CAO Y, et al. Single-cell transcriptional analysis of neuronal progenitors [J]. *Neuron*, 2003, 38(2): 161-75.
- [16] KURIMOTO K, YABUTA Y, OHINATA Y, et al. An improved single-cell cDNA amplification method for efficient high-density oligonucleotide microarray analysis [J]. *Nucleic Acids Res*, 2006, 34(5): e42.
- [17] HARTMANN C H, KLEIN C A. Gene expression profiling of single-cells on large-scale oligonucleotide arrays [J]. *Nucleic acids Res*, 2006, 34(21): e143.
- [18] TANG F C, BARBACIORU C, WANG Y, et al. mRNA-Seq whole-transcriptome analysis of a single-cell [J]. *Nat Methods*, 2009, 6(5): 377-82.
- [19] TANG F C, BARBACIORU C, NORDMAN E, et al. RNA-Seq analysis to capture the transcriptome landscape of a single-cell [J]. *Nat Protoc*, 2010, 5(3): 516-35.
- [20] PAN X H, DURRETT R E, ZHU H Y, et al. Two methods for full-length RNA sequencing for low quantities of cells and single-cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(2): 594-9.
- [21] RAMSKÖLD D, LUO S, WANG Y C, et al. Full-length mRNA-Seq from single-cell levels of RNA and individual circulating tumor cells [J]. *Nat Biotechnol*, 2012, 30(8): 777-82.
- [22] ISLAM S, KJÄLLQUIST U, MOLINER A, et al. Characterization of the single-cell transcriptional landscape by highly multiplex RNA-seq [J]. *Genome Res*, 2011, 21(7): 1160-7.
- [23] NAVIN N, KENDALL J, TROGE J, et al. Tumor evolution inferred by single-cell sequencing [J]. *Nature*, 2011, 472(7341): 90-4.
- [24] HOU Y, FAN W, YAN L, et al. Genome analyses of single human oocytes [J]. *Cell*, 2013, 155(7): 1492-506.
- [25] YAN L, HUANG L, XU L, et al. Live births after simultaneous avoidance of monogenic diseases and chromosome abnormality by next-generation sequencing with linkage analyses [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112(52): 15964.
- [26] 徐晓丽, 吴凌娟, 鄢仁祥. 单细胞全基因组扩增技术与应用[J]. *生物化学与生物物理进展*(XU X L, WU L J, YAN R X. Single-cell whole genome amplification technology and application [J]. *Progress in Biochemistry and Biophysics*), 2019, 46(4): 342-52.
- [27] 朱翔, 浦春, 武其文. 单细胞转录组测序的方法原理及应用[J]. *分子诊断与治疗杂志*(ZHU X, PU C, WU Q W. Principle and application of single-cell transcriptome analysis [J]. *Journal of Molecular Diagnostics and Therapy*), 2016, 8(01): 61-5.
- [28] SALIBA A E, WESTERMANN A J, GORSKI S A, et al. Single-cell RNA-seq: advances and future challenges [J]. *Nucleic Acids Res*, 2014, 42: 8845-60.
- [29] SHIELDS C W T, REYES C D, LOPEZ G P. Microfluidic cell sorting: a review of the advances in the separation of cells from de-bulking to rare cell isolation [J]. *Lab Chip*, 2015, 15(5): 1230-49.
- [30] 吴春卉, 姜有为, 程鑫. 微流控芯片在单细胞捕获中的应用[J]. *科技导报*(WU C H, JIANG Y W, CHENG X. Microfluidic chips for single-cell trapping [J]. *Science & Technology Review*), 2018, 36(16): 39-45.
- [31] BULL N D. The adult mouse hippocampal progenitor is neurogenic but not a stem cell [J]. *J Neurosci*, 2005, 25(47): 10815-21.
- [32] KIRKNESS E F, GRINDBERG R V, YEE-GREENBAUM J, et al. Sequencing of isolated sperm cells for direct haplotyping of a human genome [J]. *Genome Res*, 2013, 23(5): 826-32.
- [33] LEDBETTER S A, NELSON D L, WARREN S T, et al. Rapid isolation of DNA probes within specific chromosome regions by interspersed repetitive sequence polymerase chain reaction [J]. *Genomics*, 1990, 6(3): 475-81.
- [34] TROUTT A B, MCHEYZER-WILLIAMS M G, PULENDRAN B, et al. Ligation-anchored PCR: a simple amplification technique with single-sided specificity [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89(20): 9823-5.
- [35] ZHANG L, CUI X, SCHMITT K, et al. Whole genome amplification from a single-cell: implications for genetic analysis [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89(13): 5847-51.
- [36] TELENUS H, CARTER N P, BEBB C E, et al. Degenerate oligonucleotide-primed PCR: general amplification of target DNA by a single degenerate primer [J]. *Genomics*, 1992, 13(3): 718-25.
- [37] WANG Y, NAVIN N E. Advances and applications of single-cell sequencing technologies [J]. *Mol Cell*, 2015, 58(4): 598-609.
- [38] DEAN F B, NELSON J R, GIESLER T L, et al. Rapid amplification of plasmid and phage DNA using ϕ 29 DNA polymerase and multiplyprimed rolling circle amplification [J]. *Genome Res*, 2001,

- 11(6): 1095-9.
- [39] DEAN F B, HOSONO S, FANG L, et al. Comprehensive human genome amplification using multiple displacement amplification [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(8): 5261-6.
- [40] SPITS C, CAIGNEC L E, MARTINE De R, et al. Whole-genome multiple displacement amplification from single-cells [J]. *Nat Protoc*, 2006, 1(4): 1965-70.
- [41] HU P, ZHANG W, XIN H, et al. Single-cell isolation and analysis [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2016, 4: 116.
- [42] ZONG C, LU S, CHAPMAN A R, et al. Genome-wide detection of single-nucleotide and copy-number variations of a single human cell [J]. *Science*, 2012, 338 (6114): 1622-6.
- [43] FU Y, LI C, LU S, et al. Uniform and accurate single-cell sequencing based on emulsion whole-genome amplification [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112(38): 11923-8.
- [44] CHEN C, XING D, TAN L, et al. Single-cell whole-genome analyses by linear amplification via transposon Insertion (LIANTI) [J]. *Science*, 2017, 356(6334): 189-94.
- [45] MAZUREK G H, REDDY V, MARSTON B J, et al. DNA fingerprinting by infrequent-restriction-site amplification [J]. *J Clin Microbiol*, 1996, 34(10): 2386-90.
- [46] BARNES W M. PCR amplification of up to 35-kb DNA with high fidelity and high yield from lambda bacteriophage templates [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91(6): 2216-20.
- [47] EBERWINEJ, SUL J Y, BARTFAI T, et al. The promise of single-cell sequencing [J]. *Nat Methods*, 2014, 11(1): 25-7
- [48] 文路, 汤富酬. 单细胞转录组分析研究进展[J]. *生命科学(WEN L, TANG F C. Recent progresses in single-cell transcriptome analysis [J]. Chinese Bulletin of Life Sciences)*, 2014, 26(3): 228-33.
- [49] BRADY G, BARBARA M, ISCOVE N N. Representative *in vitro* cDNA amplification from individual hemopoietic cells and colonies [J]. *Methods Mol Cell Biol*, 1990, 2: 17-25.
- [50] RAMSKÖLD D, LUO S, WANG Y C, et al. Full-length mRNA-Seq from single-cell levels of RNA and individual circulating tumor cells [J]. *Nat Biotechnol*, 2012, 30(8): 777-82.
- [51] HASHIMSHONY T, WAGNER F, SHER N, et al. CEL-Seq: single-cell RNA-Seq by multiplexed linear amplification [J]. *Cell Rep*, 2012, 2(3): 666-73
- [52] 刘维瑜, 金春莲. 多重置换扩增——一种新的全基因组扩增技术[J]. *国际遗传学杂志(LIU W Y, JIN C L. Multiple displacement amplification (MDA)-a new genome amplification (MGA)method [J]. International Journal of Genetics)*, 2007, 30(4): 265-8.
- [53] 唐琴, 唐秀华, 孙威江. 转录组学技术及其在茶树研究中的应用[J]. *天然产物研究与开发(TANG Q, TANG X H, SUN W J. Review on the application of transcriptomics approach in Tea Plant (*Camellia sinensis*) [J]. Natural Product Research and Development)*, 2018, 30(05): 1-12.
- [54] 祁云霞, 刘永斌, 荣威恒. 转录组研究新技术: RNA-Seq及其应用[J]. *遗传(QI Y X, LIU Y B, RONG W H. RNA-Seq and its applications: a new technology for transcriptomics [J]. Hereditas)*, 2011, 33(11): 1191-202.
- [55] HAN X, CHEN H, HUANG D, et al. Mapping human pluripotent stem cell differentiation pathways using high throughput single-cell RNA-sequencing [J]. *Genome Biol*, 2018, 19(1): 47.
- [56] ZHOU F, WANG R, YUAN P, et al. Reconstituting the transcriptome and DNA methylome landscapes of human implantation [J]. *Nature*, 2019, 572(7771): 660-4.
- [57] LI X, LI L, YAN J. Dissecting meiotic recombination based on tetrad analysis by single-microspore sequencing in maize [J]. *Nat Commun*, 2015, 6: 6648.
- [58] LI X, MENG D, CHEN S, et al. Single nucleus sequencing reveals spermatid chromosome fragmentation as a possible cause of maize haploid induction [J]. *Nat Commun*, 2017, 8(1): 991.
- [59] LI X, CHEN L, ZHANG Q, et al. BRIF-Seq: bisulfite-converted randomly integrated fragments sequencing at the single-cell level [J]. *Mol Plant*, 2019, 12(3): 438-46.
- [60] LIECKFELDT E, SIMON-ROSLIN U, KOSE F, et al. Gene expression profiling of single epidermal, basal and trichome cells of *Arabidopsis thaliana* [J]. *J Plant Physiol*, 2008, 165(14): 1530-44.
- [61] FRANK M H, SCANLON M J. Cell-specific transcriptomic analyses of three-dimensional shoot development in the moss *Physcomitrella patens* [J]. *Plant J*, 2015, 83(4): 743-51.
- [62] NELMS B, WALBOT V. Defining the developmental program leading to meiosis in maize [J]. *Science*, 2019, 364(6435): 52-6.
- [63] JEAN-BAPTISTE K, MCFALINE-FIGUEROA J L, ALEX-ANDRE C M, et al. Dynamics of gene expression in single root cells of *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Cell*, 2019, 31(5): 993-1011.
- [64] DENYER T, MA X, KLESEN S, et al. Spatiotemporal developmental trajectories in the arabidopsis root revealed using high-throughput single-cell RNA sequencing [J]. *Dve Cell*, 2019, 48(6): 840-52.
- [65] ZHANG T Q, XU Z G, SHANG G D, et al. A single-cell RNA sequencing profiles the developmental landscape of arabidopsis root [J]. *Mol Plant*, 2019, 12(5): 648-60.
- [66] SATIJA R, FARRELL J A, GENNERT D, et al. Spatial reconstruction of single-cell gene expression data [J]. *Nat Biotechnol*, 2015, 33(5): 495-502.