

单细胞技术在干细胞研究中的应用

董芳 袁卫平 程涛*

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

摘要 干细胞是具有自我更新和分化潜能的异质性细胞群体。基于细胞群体水平的干细胞研究不能满足深入认识干细胞生物学本质及实际应用的需要。近年来, 单细胞相关技术不断发展和成熟, 并正在干细胞基础研究及其相关领域中获得迅速应用。该文以造血干细胞为主要例举, 就实验研究中常用的单细胞分离、单细胞克隆分析、单细胞移植、单细胞实时定量PCR及单细胞测序等技术原理及其应用进行综述。

关键词 单细胞技术; 干细胞; 造血干细胞; 异质性; 克隆分析

Applications of Single Cell Technologies in Stem Cell Research

Dong Fang, Yuan Weiping, 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)

Abstract Stem cells are a heterogeneous cell population characterized by their ability of self-renewal and differentiation. Stem cell research at the cell population level can not meet the demand for further understanding the biology and its applications. Recently, the single cell-based technologies are rapidly applied and advanced in stem cell and related studies. This review highlights the current technologies on single cell separation, single cell clonal assay, single cell transplantation, single cell real-time PCR and single cell sequencing with an emphasis on their applications, as exemplified in hematopoietic stem cell research.

Key words single cell technology; stem cell; hematopoietic stem cell; heterogeneity; clonal analysis

干细胞是具有自我更新和多向分化潜能的未分化细胞。体内或体外研究表明, 干细胞具有表型及功能的异质性, 这一特性也决定了其不同的分化和再生能力^[1-5]。由于分离纯化方式的限制, 人们对于干细胞的认识大都是基于群体水平进行的。越来越多的证据表明, 干细胞自我更新及分化的分子机制以及与干细胞功能失调的相关疾病的产生都是在单细胞水平发生的^[5-7], 基于异质性的干细胞群体的

研究结果显然具有较大局限性。近年来, 单细胞相关技术的发展为异质性细胞群体在单细胞水平的研究奠定了重要基础。本文以造血干细胞(hematopoietic stem cell, HSC)为主要例举, 就当前研究中常用的单细胞技术、最新发展及其应用进行综述。

1 单细胞分离技术

基于单细胞水平实验的首要条件是准确获得

收稿日期: 2012-09-04 接受日期: 2012-10-16

科技部重大国际合作项目(批准号: 2010DFB30270、2010CB945204)、国家医药重大专项(批准号: 2011ZX09102-010-04)、国家自然科学基金(批准号: 30825017、90913018)和天津科委中瑞国际重大项目(批准号: 09ZCZDSF03800)资助的课题

*通讯作者。Tel: 022-23909166, E-mail: chengtao@ihcams.ac.cn

Received: September 4, 2012 Accepted: October 16, 2012

This work was supported by the Ministry of Science and Technology of China (Grant No.2010DFB30270, 2010CB945204), the Major National Pharmaceutical Project (Grant No.2011ZX09102-010-04), the National Natural Science Foundation of China (Grant No.30825017, 90913018) and Research Funds from the Tianjin Science and Technology Commission for International Project of China and Sweden (Grant No.09ZCZDSF03800)

*Corresponding author. Tel: +86-22-23909166, E-mail: chengtao@ihcams.ac.cn

状态良好的单个细胞。目前,应用的方法主要是有限稀释法、荧光激活细胞流式分选(fluorescence activated cell sorting, FACS)及显微操作3种方法。这些方法各有利弊,应用领域也有所不同。顾名思义,有限稀释法主要是通过将细胞进行一系列的倍比稀释最终获得单个细胞,主要应用于不同组织的干/祖细胞在体外克隆形成分析^[8-10],这一方法比较传统,不需特殊设备,目前仍被广泛应用,但该方法依赖于梯度稀释计算,并非直观下的单细胞分离。FACS是利用流式细胞仪,借助于细胞表面标记或细胞特性对特定群体的细胞进行分选,从而获得单个或群体细胞的方法。例如,借助于FACS可将具有多种表面标记的长期造血干细胞(long term hematopoietic stem cell, LT-HSC)、中期HSC(intermediate term HSC, IT-HSC)和短期HSC(short term HSC, ST-HSC)及各系造血祖细胞(hematopoietic progenitor cell, HPC)从骨髓的群体细胞中分选出来,获得准确的单个细胞进行后续实验^[11-13]。虽然这一方法费用昂贵,过程复杂,分选过程会对细胞活性和状态产生一定的影响,但是此实验技术成熟,标准统一,所得单细胞准确度较高,也利于不同实验室实验研究的比较,是现代研究中单细胞分离的主要技术方法^[14]。显微操作则是利用显微操作仪或联合显微镜与口吸管(mouth pipette)直观地实现单个细胞分离的方法,主要适用于目的细胞所在的细胞群体较小而不适合用FACS进行直接分离的情况。虽然比较耗时,而且需要事先对相关的技术进行培训,但这一方法能够快速高效地控制单个细胞的吸取与释放,而且对于细胞的活性和状态影响不大,尤其在分离胚胎期的内细胞团或单个胚胎干细胞(embryonic stem cell, ESC)及HSC时被广泛采用^[15]。例如,比较单个细胞发生分裂后的两个子代细胞的特性及功能时就需要借助显微操作方法^[16]。而对于研究某类有特定表型的单个细胞还需先用FACS分选出群体细胞再联合显微操作而实现。在具体研究中一般是根据实验目的及实验设计选择一到两种方法操作。

2 单细胞克隆形成分析

克隆形成分析是通过将分离出的干细胞接种于富含特定成分的培养基或琼脂中来观察细胞自我更新及分化潜能的研究方法,主要应用于体外分析肿瘤细胞或肿瘤干细胞(cancer stem cell, CSC)和

HSC的自我更新与多向分化能力^[17]。在对CSC的研究中,单细胞克隆形成分析通过将单个肿瘤细胞接种于特定的培养基或琼脂中培养,对形成克隆的效率及形态进行统计和观察,以便发现CSC样细胞群体。例如,对来源于同一乳腺癌细胞系的细胞进行单细胞克隆分析发现,单克隆形成细胞比部分克隆及多克隆形成细胞具有更高的增殖潜能,提示单克隆形成细胞中可能含有CSC的亚群体^[18]。

与实体瘤中的应用不同,造血系统研究中广泛采用的单细胞克隆形成分析具有两大特点,一是对单个HSC进行液体培养,二是根据克隆的形态及表面标记的表达来分析HSC向不同造血谱系的分化能力。与传统的半固体培养基相比,单细胞液体克隆培养最大的优势是所形成的克隆不会与邻近的克隆混合,从而在单个克隆水平确切反映HSC的增殖和分化能力^[19]。由于在液体培养基中所加入的细胞因子的不同,故HSC向不同谱系的分化能力亦会出现差别,当需要研究某一特定细胞因子对HSC分化能力的影响时,单细胞克隆形成分析即成为首选的分析方法。Ema等^[20]已经利用该方法检测了多种不同的细胞因子组合对HSC增殖分化的影响,结合单个HSC的体内功能验证从而确定出干细胞因子(stem cell factor, SCF)和促血小板生成素(thrombopoietin, TPO)是体外环境中维持HSC干性的最佳组合,为HSC的体外培养和扩增提供了研究的基础。同时,在研究不同表面标记的HSC群体及不同分裂方式所产生的HSC子代细胞的分化潜能方面,单细胞克隆分析也为检测提供了直观的证据^[16,21]。

3 单细胞移植

单细胞移植目前已成功用于HSC(包括小鼠和人)、小鼠乳腺干细胞、前列腺干细胞及多种CSC的研究^[22-24],但应用较多并且重复性较高的还是HSC单细胞移植。HSC移植是临床上治疗多种血液系统疾病最有效的方法,也是实验中检测HSC是否具有自我更新能力的“金标准”。HSC单细胞移植是利用HSC的多向分化和重建造血能力,将单个(one single cell) HSC加之一定数量的保护细胞(也称为竞争细胞,一般选择与受体同源的全骨髓细胞)一同移植给致死剂量照射的受体,在移植后不同时间点检测受体外周血中供体来源细胞的重建情况。根据供体细胞的重建率来计算重建单位(repopulating units,

RUs)^[25]、竞争性重建单位(competitive repopulating units, CRUs)^[26]及平均干细胞活性(mean activity of stem cells, MAS)^[27]等参数,用于反映HSC重建活性和HSC数量以及在不同群体间比较HSC的质量等。保护细胞的推荐剂量是 $(1\sim 2)\times 10^5$ 全骨髓细胞^[28],因为这些细胞包含有最少数目的HSC和HPC,足以维持受致死剂量照射的小鼠的存活。而且,如果使用同样数目的保护细胞也便于不同实验室结果的比较^[29-30]。但是,保护细胞的数量越大,检测单个HSC功能的敏感性就越低^[19]。

该技术最大的难点在于确保单个HSC成功移植。有文献报道^[19],用小鼠单个CD34⁺KSL检测HSC长期重建的成功率为20%~40%,这可能是由于不同实验中对HSC的纯化效率不同导致的。Osawa等^[31]首次用单个CD34^{low/neg}的HSC细胞移植证明其可长期重建整个造血系统。相对于群体细胞移植,单细胞移植可以更准确地反映单个HSC的造血重建能力。例如,Ena等^[32]利用单细胞移植分析了正常小鼠与Lnk^{-/-}小鼠的单个HSC的骨髓重建及自我更新能力,发现Lnk可通过负调节HSCs的自我更新信号通路而控制HSCs的数量。单细胞移植还用于研究HSC的异质性。尽管利用多种表面标记可以对HSCs进行纯化,但是通过单细胞移植检测其自我更新及多向分化能力发现原始HSCs仍然具有异质性^[21],主要体现为重建效率及分化谱系方面的差异。另外,利用单细胞移植检测HSC分裂能力及子代细胞的自我更新能力可以反向推导HSC分裂方式及向不同谱系定向分化等^[16]。最近,加拿大科学家Dick研究组成功实现了单个人HSC(表型CD49f⁺)在免疫缺陷鼠体内的成功移植^[33],但其成功率还较低,有待进一步优化移植模型。

4 单细胞实时定量PCR

利用PCR技术在单细胞水平检测DNA或RNA早有报道^[34-36],可在一定程度上进行半定量检测。单细胞实时定量PCR技术是通过设计高度特异性的探针,利用单细胞PCR仪在单细胞水平高通量检测多种基因表达的技术。由于单个细胞的RNA含量处于pg级,用传统的RNA提取方法会被丢失,所以单细胞PCR的原理是通过分选单个细胞于微量裂解液中,首先对样品RNA进行逆转录,再利用Taqman探针对样品cDNA中的靶基因进行预扩增,之后利

用单细胞PCR仪在动态微阵列芯片上检测不同基因的表达水平^[37]。在继承了PCR技术的高敏感性和高特异性的基础上,目前单细胞实时定量PCR技术具有两大特点,一是样品用量少,只要一个细胞即可进行分析,适用于含有异质性的细胞群体中的单个细胞分析,比如HSC、胚胎干细胞(embryonic stem cell, ESC)及诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cell, iPSC)等;二是高通量检测,以BioMark公司的微流体单细胞PCR仪为例,一次检测可实现48个样品的48种基因(48×48)或96×96的检测。而集成化的微流体分析系统将单细胞PCR的各个步骤集成在一起,一次操作即可完成300个样品的检测,在实现高度的自动化并保证检测的一致性同时降低了实验成本^[38]。

单细胞实时定量PCR技术已经广泛应用于发育生物学、合成生物学及分子医学方面,尤其适用于被检测样本的来源极其有限的情况下。例如,对hESC进行单个细胞的mRNA表达和多个转录因子的共调节检测,可分析与hESC分化相关的重要的内在分子机制^[38]。利用单细胞实时定量PCR对人iPSC进行转录谱的分析发现,与具有全能性的hESC相比,hiPSC也表达高水平的全能性相关基因和细胞表面抗原,但是这些基因转录水平的差异较大,而且hiPSC分化相关基因的表达也有很大差异,表明hiPSC存在异质性,临床实践应用hiPSC前必须对此现象和机理有更深入的了解和实验培养上的掌控调节^[39]。同时,对肿瘤样品中的单个细胞的转录因子进行检测可筛查出与肿瘤发生相关的基因表达谱,分析和比较不同细胞染色体的异质性与肿瘤发生的联系等,从而为利用单细胞基因表达谱分析进行肿瘤的临床诊断提供了新方法^[40]。

5 单细胞测序技术

尽管第二代测序技术的发展使人类对疾病相关的基因组变异的认识越来越深刻,但是由于多种疾病尤其是肿瘤性疾病发生多是在单克隆水平发生的,使对单个细胞核苷酸水平变异的检测成为必要。单细胞测序主要涉及单细胞基因组测序和转录组测序两方面,分别针对单个细胞的DNA和RNA进行序列分析和比较,进而揭示基因组和转录组的变化。

5.1 单细胞基因组测序

单细胞全基因组测序技术是在单细胞水平对全基因组进行扩增与测序的一项新技术。其原理是

将分离的单个细胞的微量全基因组DNA进行扩增, 获得高覆盖率的完整的基因组之后通过外显子捕获进而高通量测序用于揭示细胞群体差异和细胞进化关系。从方法学角度来看, 获得高覆盖率高保真性的全基因组扩增产物是准确全面的测序结果的保障。多重置换扩增(multiple displacement amplification, MDA)利用随机引物和等温扩增可以获得高保真的DNA大片段, 已经成为单细胞全基因组扩增的首选^[41]。但该方法也并非无可厚非^[42], 其主要的缺陷在于非平衡的基因组覆盖率、扩增偏倚、嵌合序列及非特异扩增等^[44]。尽管各种改进的策略正在逐步减少这些缺陷, 高覆盖率、高保真性及高特异性的扩增仍然是亟待解决的问题。另外, 对测序得到的大量数据结果的专业分析也是一个重大的挑战。

单细胞全基因组测序正在从基础研究走向临床应用。2011年, Navin等^[43]利用DOP全基因组扩增(whole-genome amplification, WGA)及DNA测序对单个乳腺癌细胞进行了拷贝数变异的分析, 进而推断出细胞的群体结构和肿瘤的进化过程。但是由于该方法的基因覆盖率较低, 而且不能在单个核苷酸的分辨率上评价单个肿瘤细胞的遗传学特征, 故并不能检测在肿瘤发展过程中发挥重要作用的单个核苷酸的变化。2012年, 我国的华大基因公司首次利用以MDA为基础的单细胞测序技术对原发性血小板增多症(essential thrombocythemia, ET)病人的单个骨髓细胞进行了测序并分析, 筛查出在ET发病和进展中的驱动基因, 从而证实ET为单克隆来源的疾病。同时, 也将该方法与经典方法进行比较, 从而建立了具有高敏感性、高特异性、假阳性率低等特点的单细胞测序方法, 为分析疾病的遗传学结构特征及克隆进化过程提供了新的思路^[44]。同样的方法也用于分析单个肾癌细胞的单核苷酸突变特征, 从而在更高的分辨能力上为评价基因改变的复杂性提供了更为优化的方法^[45]。

5.2 单细胞转录组测序

对单个细胞转录组的分析由Brady等^[46]和Eberwine等^[47]分别利用基于PCR技术的对单个细胞cDNA的指数扩增和基于T7 RNA连接酶体外转录(*in vitro* transcription)的线性扩增进行了初步的探索。2006年, Kurimoto等^[48]改进了单细胞cDNA扩增方法, 将定向的PCR扩增与线性扩增相结合, 对单个ESC进行了单细胞cDNA microarray分析, 在高覆盖率和

准确性的前提下, 使基因表达的代表性和再现性都有了明显的提高。而随着测序技术的发展, Tang等^[49]将单细胞cDNA扩增技术和新一代测序技术相结合而首次创立的单细胞RNA测序分析应用于单个小鼠的卵裂球, 最终发现了芯片未检测到的5 200多个基因和1 800个可变剪切点。相比而言, 单细胞cDNA microarray分析技术成熟, 成本低廉, 尤其适用于分析已知基因上调或下调的一般转录信息, 但是该系统相对比较封闭, 对于未知基因的检测无能为力, 并且不能提供mRNA的确切长度和序列; 而单细胞RNA测序则是一个开放的系统, 能够提供更加详细和准确的转录信息, 尤其可对未知基因的转录进行检测, 但是该方法价格昂贵, 并且对于结果的分析需要强大的计算机系统提供保障。在实际操作中应该根据实验目的权衡选择。

单细胞转录组分析主要用于在全基因组范围内挖掘基因调节网络, 尤其适用于存在高度异质性的干细胞及胚胎发育早期的细胞群体。与活细胞成像系统相结合, 单细胞转录组分析更有助于深入理解细胞分化、细胞重编程及转分化等过程及相关的基因调节网络^[50]。例如, Tang等^[51]追踪了从小鼠胚胎内细胞团发育成胚胎干细胞的几个不同阶段的基因表达变化, 清晰地反映了细胞处于不同阶段的分子特征差异, 并发现了多个在内细胞团发育时表达的转录本异构体及miRNA, 这些对于调控单细胞的转录网络及细胞对不同信号和培养条件的反应至关重要。将此技术应用于临床, 理论上可以在生理或病理情况下连续追踪基因表达的动力学变化, 从而监测疾病的进展。单细胞转录组分析的另一应用领域是发现亚细胞成分的基因表达谱, 例如对在神经元的轴突或树突部分特异表达的基因的转录组的分析, 这些基因往往对细胞的生物学功能发挥着重要作用^[52]。但是, 鉴于目前的技术手段, 单细胞转录组测序仍然存在覆盖率低的弊端, 导致除mRNA以外的长非编码RNAs难以检测, 并且不能区分正义链与反义链^[49]。最近发展的单分子测序技术无需逆转录和扩增步骤而直接对单个细胞的全长mRNAs进行测序, 从而准确地检测基因不同的剪切亚型的表达水平^[53]。我们相信随着技术的发展这些局限性会被逐步优化和改进。

不难看出, 单细胞测序技术正逐渐从实验研究方法成为指导临床的有利工具, 为基础研究向临床

转化搭建了桥梁。单细胞测序技术的应用将深入揭示异质性细胞群体(如ESC、iPSC及HSC等)在疾病发生发展中的作用,从而利于对疾病的认识、预防及治疗等^[54-55]。

6 总结与展望

技术与方法的发明和改进是理论研究中重大发现的基石与承载。在单细胞水平研究干细胞的生命活动曾经是难以想象的,而在今天,单细胞移植、单细胞实时PCR及单细胞测序等相关技术的应用已为干细胞领域的研究提供了更高的平台,以深入分析干细胞生物学功能的维持及干细胞在相关疾病的发生发展中作用的相关机制。单细胞相关技术方法的应用会为干细胞基础研究揭开新的篇章、发现新的成果、形成新的理论,更有望提高对干细胞及肿瘤相关疾病的认知,进而转化为新的诊断方法、预防措施和治疗手段。

参考文献 (References)

- Copley MR, Beer PA, Eaves CJ. Hematopoietic stem cell heterogeneity takes center stage. *Cell Stem Cell* 2012; 10(6): 690-7.
- Haug JS, He XC, Grindley JC, Wunderlich JP, Gaudenz K, Ross JT, *et al.* N-cadherin expression level distinguishes reserved versus primed states of hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell* 2008; 2(4): 367-79.
- Dykstra B, Kent D, Bowie M, McCaffrey L, Hamilton M, Lyons K, *et al.* Long-term propagation of distinct hematopoietic differentiation programs *in vivo*. *Cell Stem Cell* 2007; 1(2): 218-29.
- Graf T, Stadtfeld M. Heterogeneity of embryonic and adult stem cells. *Cell Stem Cell* 2008; 3(5): 480-3.
- Shackleton M, Quintana E, Fearon ER, Morrison SJ. Heterogeneity in cancer: Cancer stem cells versus clonal evolution. *Cell* 2009; 138(5): 822-9.
- Sarry JE, Murphy K, Perry R, Sanchez PV, Secreto A, Keefer C, *et al.* Human acute myelogenous leukemia stem cells are rare and heterogeneous when assayed in NOD/SCID/IL2Rgamma-deficient mice. *J Clin Invest* 2011; 121(1): 384-95.
- Lottaz C, Beier D, Meyer K, Kumar P, Hermann A, Schwarz J, *et al.* Transcriptional profiles of CD133+ and CD133- glioblastoma-derived cancer stem cell lines suggest different cells of origin. *Cancer Res* 2010; 70(5): 2030-40.
- Bull ND, Bartlett PF. The adult mouse hippocampal progenitor is neurogenic but not a stem cell. *J Neurosci* 2005; 25(47): 10815-21.
- Ziegler AN, Schneider JS, Qin M, Tyler WA, Pintar JE, Fraidenreich D, *et al.* IGF-II promotes stemness of neural restricted precursors. *Stem Cells* 2012; 30(6): 1265-76.
- Rota LM, Lazzarino DA, Ziegler AN, Leroith D, Wood TL. Determining mammosphere-forming potential: Application of the limiting dilution analysis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2012; 17(2): 119-23.
- Benveniste P, Frelin C, Janmohamed S, Barbara M, Herrington R, Hyam D, *et al.* Intermediate-term hematopoietic stem cells with extended but time-limited reconstitution potential. *Cell Stem Cell* 2010; 6(1): 48-58.
- Sitnicka E, Bryder D, Theilgaard-Monch K, Buza-Vidas N, Adolfsson J, Jacobsen SE. Key role of flt3 ligand in regulation of the common lymphoid progenitor but not in maintenance of the hematopoietic stem cell pool. *Immunity* 2002; 17(4): 463-72.
- Forsberg EC, Serwold T, Kogan S, Weissman IL, Passegue E. New evidence supporting megakaryocyte-erythrocyte potential of flk2/flt3+ multipotent hematopoietic progenitors. *Cell* 2006; 126(2): 415-26.
- Yilmaz S, Singh AK. Single cell genome sequencing. *Curr Opin Biotechnol* 2012; 23(3): 437-43.
- Tang F, Hajkova P, Barton SC, O'Carroll D, Lee C, Lao K, *et al.* 220-plex microRNA expression profile of a single cell. *Nat Protoc* 2006; 1(3): 1154-9.
- Takano H, Ema H, Sudo K, Nakauchi H. Asymmetric division and lineage commitment at the level of hematopoietic stem cells: Inference from differentiation in daughter cell and granddaughter cell pairs. *J Exp Med* 2004; 199(3): 295-302.
- Clarke MF, Dick JE, Dirks PB, Eaves CJ, Jamieson CH, Jones DL, *et al.* Cancer stem cells—perspectives on current status and future directions: AACR workshop on cancer stem cells. *Cancer Res* 2006; 66(19): 9339-44.
- Liu TJ, Sun BC, Zhao XL, Zhao XM, Sun T, Gu Q, *et al.* CD133(+) cells with cancer stem cell characteristics associates with vasculogenic mimicry in triple-negative breast cancer. *Oncogene* 2012; doi: 10.1038/onc.2012.85.
- Ema H, Morita Y, Yamazaki S, Matsubara A, Seita J, Tadokoro Y, *et al.* Adult mouse hematopoietic stem cells: Purification and single-cell assays. *Nat Protoc* 2006; 1(6): 2979-87.
- Ema H, Takano H, Sudo K, Nakauchi H. *In vitro* self-renewal division of hematopoietic stem cells. *J Exp Med* 2000; 192(9): 1281-8.
- Morita Y, Ema H, Nakauchi H. Heterogeneity and hierarchy within the most primitive hematopoietic stem cell compartment. *J Exp Med* 2010; 207(6): 1173-82.
- Leong KG, Wang BE, Johnson L, Gao WQ. Generation of a prostate from a single adult stem cell. *Nature* 2008; 456(7223): 804-8.
- Shackleton M, Vaillant F, Simpson KJ, Stingl J, Smyth GK, Asselin-Labat ML, *et al.* Generation of a functional mammary gland from a single stem cell. *Nature* 2006; 439(7072): 84-8.
- Quintana E, Shackleton M, Sabel MS, Fullen DR, Johnson TM, Morrison SJ. Efficient tumour formation by single human melanoma cells. *Nature* 2008; 456(7222): 593-8.
- Harrison DE, Jordan CT, Zhong RK, Astle CM. Primitive hematopoietic stem cells: Direct assay of most productive populations by competitive repopulation with simple binomial, correlation and covariance calculations. *Exp Hematol* 1993; 21(2): 206-19.
- Szilyvassy SJ, Humphries RK, Lansdorp PM, Eaves AC, Eaves CJ. Quantitative assay for totipotent reconstituting hematopoietic stem cells by a competitive repopulation strategy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87(22): 8736-40.
- Ema H, Nakauchi H. Expansion of hematopoietic stem cells in

- the developing liver of a mouse embryo. *Blood* 2000; 95(7): 2284-8.
- 28 Perry JM, Li L. Functional assays for hematopoietic stem cell self-renewal. *Methods Mol Biol* 2010; 636: 45-54.
- 29 Lawrence HJ, Christensen J, Fong S, Hu YL, Weissman I, Sauvageau G, *et al.* Loss of expression of the *Hoxa-9* homeobox gene impairs the proliferation and repopulating ability of hematopoietic stem cells. *Blood* 2005; 106(12): 3988-94.
- 30 Liang Y, Jansen M, Aronow B, Geiger H, van Zant G. The quantitative trait gene *latexin* influences the size of the hematopoietic stem cell population in mice. *Nat Genet* 2007; 39(2): 178-88.
- 31 Osawa M, Hanada K, Hamada H, Nakauchi H. Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell. *Science* 1996; 273(5272): 242-5.
- 32 Ema H, Sudo K, Seita J, Matsubara A, Morita Y, Osawa M, *et al.* Quantification of self-renewal capacity in single hematopoietic stem cells from normal and *Lnk*-deficient mice. *Dev Cell* 2005; 8(6): 907-14.
- 33 Notta F, Doulatov S, Laurenti E, Poepl A, Jurisica I, Dick JE. Isolation of single human hematopoietic stem cells capable of long-term multilineage engraftment. *Science* 2011; 333(6039): 218-21.
- 34 Cheng T, Shen H, Giokas D, Gere J, Tenen DG, Scadden DT. Temporal mapping of gene expression levels during the differentiation of individual primary hematopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93(23): 13158-63.
- 35 Brady G, Billia F, Knox J, Hoang T, Kirsch IR, Voura EB, *et al.* Analysis of gene expression in a complex differentiation hierarchy by global amplification of cDNA from single cells. *Curr Biol* 1995; 5(8): 909-22.
- 36 Zhang L, Cui X, Schmitt K, Hubert R, Navidi W, Arnheim N. Whole genome amplification from a single cell: Implications for genetic analysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89(13): 5847-51.
- 37 Sanchez-Freire V, Ebert AD, Kalisky T, Quake SR, Wu JC. Microfluidic single-cell real-time PCR for comparative analysis of gene expression patterns. *Nat Protoc* 2012; 7(5): 829-38.
- 38 White AK, VanInsberghe M, Petriv OI, Hamidi M, Sikorski D, Marra MA, *et al.* High-throughput microfluidic single-cell RT-qPCR. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108(34): 13999-4004.
- 39 Narsinh KH, Sun N, Sanchez-Freire V, Lee AS, Almeida P, Hu S, *et al.* Single cell transcriptional profiling reveals heterogeneity of human induced pluripotent stem cells. *J Clin Invest* 2011; 121(3): 1217-21.
- 40 Stahlberg A, Kubista M, Aman P. Single-cell gene-expression profiling and its potential diagnostic applications. *Expert Rev Mol Diagn* 2011; 11(7): 735-40.
- 41 Blanco L, Bernad A, Lazaro JM, Martin G, Garmendia C, Salas M. Highly efficient DNA synthesis by the phage phi 29 DNA polymerase. Symmetrical mode of DNA replication. *J Biol Chem* 1989; 264(15): 8935-40.
- 42 Pinard R, de Winter A, Sarkis GJ, Gerstein MB, Tartaro KR, Plant RN, *et al.* Assessment of whole genome amplification-induced bias through high-throughput, massively parallel whole genome sequencing. *BMC Genomics* 2006; 7: 216.
- 43 Navin N, Kendall J, Troge J, Andrews P, Rodgers L, McIndoo J, *et al.* Tumour evolution inferred by single-cell sequencing. *Nature* 2011; 472(7341): 90-4.
- 44 Hou Y, Song L, Zhu P, Zhang B, Tao Y, Xu X, *et al.* Single-cell exome sequencing and monoclonal evolution of a *JAK2*-negative myeloproliferative neoplasm. *Cell* 2012; 148(5): 873-85.
- 45 Xu X, Hou Y, Yin X, Bao L, Tang A, Song L, *et al.* Single-cell exome sequencing reveals single-nucleotide mutation characteristics of a kidney tumor. *Cell* 2012; 148(5): 886-95.
- 46 Brady G, Barbara M, Iscove NN. Representative *in vitro* cDNA amplification from individual hemopoietic cells and colonies. *Methods Mol Cell Biol* 1990; 2: 17-25.
- 47 Eberwine J, Yeh H, Miyashiro K, Cao Y, Nair S, Finnell R, *et al.* Analysis of gene expression in single live neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89(7): 3010-4.
- 48 Kurimoto K, Yabuta Y, Ohinata Y, Ono Y, Uno KD, Yamada RG, *et al.* An improved single-cell cDNA amplification method for efficient high-density oligonucleotide microarray analysis. *Nucleic Acids Res* 2006; 34(5): e42.
- 49 Tang F, Barbacioru C, Nordman E, Li B, Xu N, Bashkurov VI, *et al.* RNA-Seq analysis to capture the transcriptome landscape of a single cell. *Nat Protoc* 2010; 5(3): 516-35.
- 50 Tang F, Lao K, Surani MA. Development and applications of single-cell transcriptome analysis. *Nat Methods* 2011; 8(4 Suppl): S6-11.
- 51 Tang F, Barbacioru C, Bao S, Lee C, Nordman E, Wang X, *et al.* Tracing the derivation of embryonic stem cells from the inner cell mass by single-cell RNA-Seq analysis. *Cell Stem Cell* 2010; 6(5): 468-78.
- 52 Tietjen I, Rihel JM, Cao Y, Koentges G, Zakhary L, Dulac C. Single-cell transcriptional analysis of neuronal progenitors. *Neuron* 2003; 38(2): 161-75.
- 53 Treffer R, Deckert V. Recent advances in single-molecule sequencing. *Curr Opin Biotechnol* 2010; 21(1): 4-11.
- 54 Zhao R. From single cell gene-based diagnostics to diagnostic genomics: Current applications and future perspectives. *Clin Lab Sci* 2005; 18(4): 254-62.
- 55 Klein CA, Holzel D. Systemic cancer progression and tumor dormancy: Mathematical models meet single cell genomics. *Cell Cycle* 2006; 5(16): 1788-98.