



卜鹏程,中国科学院生物物理研究所研究员,博士生导师。国家“青年千人计划”和中科院“百人计划”入选者。2007年博士毕业于中国科学院生物物理研究所,获得中国科学院院长优秀奖、中国科学院优秀毕业生。博士期间,主要从事单克隆抗体治疗肿瘤血管生成机理的研究,研究成果荣获2014年北京市科学技术奖一等奖。2008~2010年在加州大学伯克利分校从事博士后研究,2010~2016年先后加入康奈尔大学和杜克大学任Research Associate和Senior Research Scientist。2017年加入中国科学院生物物理研究所任研究员,主要从事肠炎及肠癌的发生发展、非编码RNA与疾病以及肿瘤代谢方面的研究。近5年来以第一作者或通讯作者在*Cell Stem Cell*、*Cell Metabolism*、*Nature Communications*、*Molecular Systems Biology*、*eLife*等期刊上发表多篇论文。

http://www.ibp.cas.cn/ktzz/ktzz_AG/201609/t20160927_4669311.html

单细胞转录组测序技术发展及应用

晁珊珊 卜鹏程*

(中国科学院核酸生物学重点实验室,中国科学院生物物理研究所,北京 100101)

摘要 生物组织由多种异质性细胞组成,单个细胞之间的差异可能会对多细胞生物的功能产生深远影响。近年来开发的单细胞RNA-seq技术可以对单个细胞进行无偏、可重复、高分辨率和高通量的转录分析。相对于传统的群体细胞的转录组分析,单细胞RNA-seq技术从另外一个维度了解转录组信息,揭示生物组织的细胞构成、转录组动力学以及基因间的调节关系。随着细胞捕获、分子生物学和生物信息学等关键技术的发展和完善,其在生物学和医学领域的应用将会越来越广泛。该文对单细胞RNA-seq技术的发展历史和应用进行了阐述。

关键词 单细胞; 转录组测序; 细胞亚群; 基因表达图谱

Application of Single-Cell RNA-seq: An Update Review

Chao Shanshan, Bu Pengcheng*

(Key Laboratory of RNA Biology, Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract Biological tissue consists of a variety of heterogeneous cells and the differences between individual cells have profound effects on the function of multicellular organisms. The developed single-cell mRNA-sequencing technology in recent years can conduct unbiased, repeatable, high-resolution and high-throughput transcriptomic analysis of individual cells. Compared with traditional bulk populations of cells analysis, single-cell

国家自然科学基金(批准号: 31771513)、中国科学院B类先导科技专项(批准号: XDB29040000)和科技部重点研发计划(批准号: 2017YFA0504103)资助的课题

*通讯作者。Tel: 010-64889588, E-mail: bupc@ibp.ac.cn

This work was partly supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31771513), the Strategic Priority Research Program of the Chinese Academy of Sciences (Grant No.XDB29040000) and the Chinese Ministry of Science and Technology (Grant No.2017YFA0504103)

*Corresponding author. Tel: +86-10-64889588, E-mail: bupc@ibp.ac.cn

网络出版时间: 2019-06-13 17:56:43

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.q.20190613.1756.020.html>

RNA-sequencing technology enables us to understand transcriptomic information from another dimension, revealing the composition of biological tissues, the transcriptomic dynamics and the regulatory relationships between genes. With the development and improvement of key technologies in cell capture, molecular biology and bioinformatics, their applications in biology and medicine will be more and more popular. In this review, we discuss the development history and applications of single cell mRNA-sequencing.

Keywords single cell; mRNA-sequencing; cell subset; gene expression profile

1660年, Robert Hooke和Anton van Leeuwenhoek发明显微镜后,第一次将细胞描述为生命的基本结构单元^[1],人们开始对单个细胞产生兴趣。自此以后,越来越多的研究者开始对细胞的结构及功能方面进行研究。转录组分析是将基因型与细胞表型联系起来的一种强有力的战略。随着分子生物学技术的飞速发展,人们对转录组学的研究不再局限于群体细胞水平,而是精确到单细胞水平。众所周知,生物组织所具有的普遍特征是细胞异质性^[2]。常规的多细胞水平的转录组学的研究需要大量细胞,并且其研究结果反应的是群体细胞基因表达的平均值,而这个平均值掩盖了数量较少的细胞亚群的表达信息,因而难以区分群体细胞中不同细胞亚群的转录特征^[3]。因此,为了满足研究的需要,单细胞转录组测序技术得到了迅猛发展。

1 单细胞RNA-seq技术的建立与发展

2009年, Tang等^[4]首次报道了在单个细胞中基于高通量测序的对mRNA转录组学完全无偏倚的研究方法。这种早期单细胞转录组学的研究方法,只适用于对少量珍贵细胞基因表达的深度分析。2011年, Islam等^[5]建立了单细胞标记的逆转录测序方法,即STRT-seq(single-cell tagged reverse transcription sequencing),这是一个高度多路复用的方法,能够在逆转录过程中给每个细胞加上条形码,从而能够大规模检测各种混合细胞样本,如异质性很高的肿瘤细胞样本。在此之后,2012年由美国和瑞典的科学家共同开发了一种新的单细胞测序技术Smart-seq(switching mechanism at 5' end of the RNA transcript),这是一项具里程碑意义的技术。这种技术能够检测mRNA的全长,在转录本的序列覆盖度上有所改善。但这种方法的缺点是不具有链特异,具有转录本长度偏向性,对于超过4 Kb的序列不能高效转录^[6]。此外,同一年, Hashimshony等^[7]开发出了另一种单细胞测序方法CEL-seq(cell expression

by linear amplification and sequencing),此方法是一种采用线性扩增的测序方法,其线性扩增的主要优势是错误率比较低,扩增后DNA的双端深度测序能够准确检测两条链的序列。此方法添加条形码后混合实现了许多不同单细胞的多重分析和研究。这种方法的缺点是具有强烈的3'端偏好。2013年, Picelli等^[8]又将Smart-seq技术做了一些改进,新的技术称为Smart-seq2,在新技术中使用了锁核酸(locked nucleic acid)、更高浓度的MgCl₂以及甜菜碱。它不再需要纯化步骤,可大大提高产量,但其只能对具有poly(A)尾巴的mRNA进行扩增和检测。

随着技术的发展与完善,单细胞RNA-seq至此进入了高通量与自动化时代。同样在2013年,第一台商业化单细胞制备系统Fluidigm C1面世,该系统能自动捕获细胞悬液中单个细胞并完成Smart-seq操作。但该系统所使用的微流体芯片不能重复使用,成本也最高。2014年, Jaitin等^[9]建立了名为MARS-seq(massively parallel single cell RNA-seq)单细胞测序的方法,该方法可用于分析数千个单个细胞的体内转录状态。在2015年,哈佛大学的两个团队将微流体技术引入单细胞RNA-seq方法中,分别开发出Drop-seq^[10]和inDROP^[11]两种方法。这两种技术都利用微流体装置将带有条形码的微珠和细胞一起装入微小的液滴,条形码随后会连接到反转录后的cDNA上。Drop-seq由哈佛医学院Steven McCarroll领导的团队开发,inDrop方法是由哈佛大学的系统生物学家教授Marc Kirschner领导开发的。Drop-seq的微珠库中有1 600万个条形码,而inDrop方法只产生约15万个条形码,因此inDrop每次运行处理的细胞数更少,但inDrop捕获细胞的比例更高,因此适用于少量细胞样本。到2017年后,10×Genomics公司和Fred Hutchinson癌症研究中心开发出一种新的单细胞RNA测序方法,可实现数千个免疫细胞的分析。10×Genomics平台基于微滴的核酸条形码分配系统,这

个系统提供了数以百万级的携带唯一DNA条形码的微滴，通过微流控技术，将带有条形码和引物的凝胶珠与单个细胞包裹在油滴中。凝胶珠在每个油滴内溶解，细胞裂解释放mRNA，通过逆转录产生用于测序的带条形码的cDNA。液体油层破坏后，cDNA一分为二，后续同时进行基因表达和免疫组库文库构建。即可一次性获得大量单细胞的基因表达和免疫组库数据。

由于单细胞RNA-seq技术所产生的费用高昂，当该技术实现高通量后，人们开始思考怎样降低使用该技术时的成本。2017年同年，Gierahn等^[12]开发了一种便携式的单细胞转录组测序技术Seq-Well。研究人员创建了纳米孔阵列，每个纳米孔可捕获一个细胞和一个条形码珠子，以进一步捕获RNA片段。纳米孔用半透膜密封，允许破坏细胞所需的化学物质通过，而同时保证RNA不流失，RNA结合珠子后被移除并进行测序。使用该过程每个细胞的成本小于1美元。2018年，Han等^[13]建立了一套名为Microwell-seq高通量单细胞测序平台。该平台采用琼脂糖材料的高通量单细胞捕获系统，使得单细胞测序文库的构建成本降低了一个数量级。一个月后，美国艾伦研究所及华盛顿大学的科学家联合开发了一项全新的单细胞转录组测序技术，该技术名为SPLiT-seq(图1)。SPLiT-seq技术无需对单个细胞进行分离，这些细胞将被作为其自身的RNA“隔离室”，细胞池会被分成多个组，并将组合条形码添加到它们的RNA中。这个过程会重复多次，为每个细胞的RNA引入一个独特的组合条码，可以特异性地标记超过100万个细胞^[14]。

单细胞转录组测序技术从最初只能检测几个细胞到现在单次实验可以同时检测数十万个细胞，显著提高了实验效率。同时，建库及测序过程中不同环节的改进使得成本不断降低、有效信息量不断增加，这些都是单细胞RNA-seq技术在短短几年内所取得的令人瞩目的成绩。例如所需试剂体积和消耗降低，单次实验所能检测的细胞显著增加。在单细胞转录组建库过程中有三个环节非常重要，第一是在单细胞中非靶向扩增整个转录组，第二是单个细胞的分离，第三是一次研究所能同时处理的细胞数量。

2 单细胞RNA-seq应用

随着单细胞RNA-seq技术的不断发展，其在生物学和医学领域也得到了越来越广泛的应用。单细胞RNA-seq技术最先应用于哺乳动物早期胚胎发育的研究^[16-18]，之后又相继在组织器官发育^[19-21]、免疫学^[22-24]及肿瘤治疗^[25-27]等领域得到了广泛的使用(图2)。人们可以通过单细胞RNA-seq技术探索细胞异质性，发现新的细胞类型和标记基因，从而对生命科学有了更深一层的更加全面的理解。

2.1 胚胎发育

在胚胎发育的早期阶段，受精卵会经历广泛的转录调节和表观遗传重编程过程，从而形成内胚层、中胚层和外胚层三个主要细胞群体。由于早期胚胎发育阶段细胞数量有限，这对于研究早期基因调控和细胞干性的维持是一个挑战。随着单细胞RNA-seq技术的出现，Tang等^[16]首次分析了体外囊胚期内细胞团向多能胚胎干细胞转变过程中转录组重编程

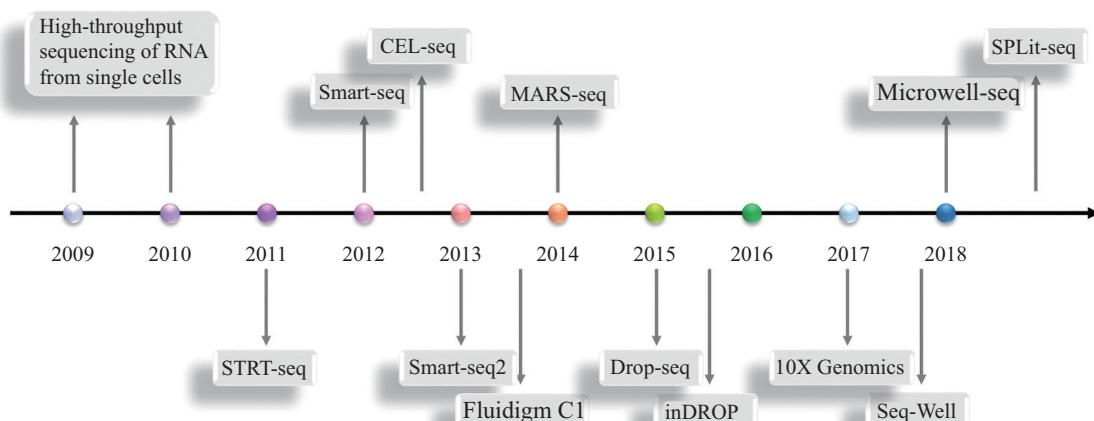


图1 单细胞RNA-seq技术发展的时间轴

Fig.1 Timeline of milestones in single-cell RNA sequencing

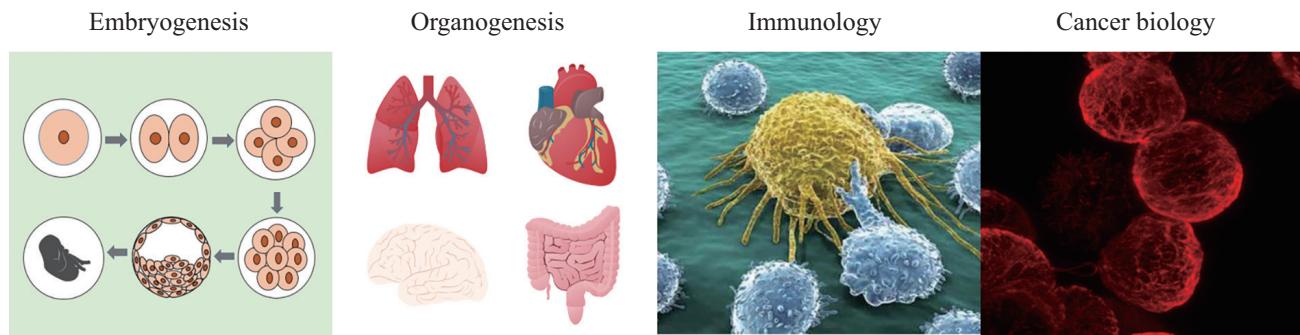


图2 单细胞RNA-seq技术在生物学和医学领域的应用

Fig.2 The applications of single-cell RNA-seq in biological and medicine research

的过程。2013年, 小鼠和人类着床前胚胎的高精度单细胞转录组图谱陆续完成^[28-29]。2017年, Li等^[30]又利用单细胞RNA-seq技术系统阐述了人类胚胎生殖细胞及其微环境细胞发育过程中的基因表达图谱及其调控机理。近期, 在*Science*上一连发表了三篇研究, 研究人员用单细胞测序技术分别在斑马鱼和蛙早期胚胎发育过程中建立了基因表达动态图谱, 将相关数据以几分钟到几小时的时间间隔组合在一起, 对细胞进行逐个描述, 并观察胚胎最终形成的过程, 揭示了单个细胞构建整个生物体的完整过程^[31-33]。综上所述, 单细胞RNA-seq技术能够分析并阐明胚胎发育早期细胞数量极少的情况下其内部复杂的转录调控和表观遗传重编程过程。

2.2 组织器官发育

在大多数组织中, 传统的细胞分型是根据已有的细胞标记将细胞分入不同的群体中, 这种方法受限于已知的几十个标记基因。单细胞RNA-seq技术则不依赖于已知的标记, 而是通过分析单个细胞转录组精细地识别出各种细胞类型, 同时能够发现新的细胞类型以及标记基因。2014年, Treutlein等^[19]应用单细胞RNA-seq方法首次对肺上皮细胞的发育进行了研究, 追踪了肺祖细胞发育分化成肺泡并参与调节气体交换的过程, 还确定了数百种新的标记, 用于区分四种主要的细胞类型, 最终他们运用单细胞RNA-seq技术对肺泡发育分化过程进行了细胞谱系重建。在另一项研究中, DeLaughter等^[20]从小鼠胚胎发育的七个不同阶段提取心脏细胞样本, 将其分为三类已知的细胞——心肌细胞、内皮细胞和成纤维细胞, 并利用单细胞RNA-seq技术检测了单个细胞基因活性随时间的变化, 提供了一个时间和空间的图谱, 描绘了心脏四个腔室中不同细胞群的发展。

2017年, Haber等^[21]发布了首张高分辨率的小肠上皮细胞基因表达图谱, 解析了肠道细胞产生的激素等其他信号物质, 并为肠道如何应对病原体入侵提供了新的线索。随着单细胞技术的进一步发展与应用, 近年来相继报道了肺^[19]、心脏^[20]、脑^[34-35]、肾脏^[36-37]、小肠^[21]等多种组织器官的单细胞转录组图谱, 其无偏好性的细胞分群优势及易于发现新的细胞标记的特点都将有力推动发育生物学的研究。

2.3 免疫系统

免疫系统可以分为固有免疫和适应性免疫, 由大量的各种各样的细胞类型所组成。这些细胞在体内协调分工, 识别和清除外来抗原。由于这些细胞对于抗原的应答具有复杂的异质性, 因此又可以被分为很多亚型。尽管一些主要的细胞类型已经被大家所熟知, 但是在对抗原的反应中, 大多数细胞类型的转录异质性仍然是不为人知的。通过使用单细胞RNA-seq技术, Bjorklund等^[22]发现了四种不同的ILC(innate lymphoid cell)亚群, 根据细胞表面标记不同, 将CD127⁺ ILC分为ILC1、ILC2、ILC3和NK细胞四个群体, 并且发现了这些亚群中隐藏的转录特征, 揭示了不同的亚群可能具有不同的功能。2017年的一项研究中, Zhang等^[23]通过对超过5 000个T细胞的单细胞测序数据及分析, 首次在单细胞水平上描绘了肝癌微环境中的免疫图谱。研究发现, 肝癌内存在大量肿瘤组织特异的克隆增生的T细胞, 但是这些细胞大多处于耗竭状态, 从而揭示了肿瘤细胞逃逸免疫监视的原因^[23]。研究还描绘了初始T细胞向耗竭状态的发展轨迹, 并在耗竭性CD8⁺ T细胞亚群中发现了一类FOXP3⁺抑制性T细胞的存在, 提出了耗竭T细胞会进一步发展成抑制性T细胞的潜在可能^[23]。除此以外, 近期有报道证明, 虽然

CD4⁺辅助性T细胞通常在免疫反应中扮演中间角色,通过分泌细胞因子等协助其他类型的免疫细胞参与免疫反应,但在某些情况下,比如存在慢性病毒感染,一部分的CD4⁺辅助性T细胞会变成细胞毒性T细胞^[24]。

2.4 肿瘤研究

肿瘤细胞是由正常细胞积累突变进化而来的,而由于肿瘤细胞之间基因突变或表达谱的不同,使瘤内细胞多样化形成不同类型或同一类型细胞中的不同亚型。这种肿瘤内部的异质性影响了患者的临床诊断和治疗。单细胞RNA-seq的方法为描述克隆多样性和了解罕见细胞在癌症进展过程中的所发挥的作用提供了强有力的新工具。循环肿瘤细胞群(CTC簇)存在于癌症患者的血液中,但其对转移的贡献并没有很好地定义。Maheswaran等^[25]对乳腺癌病人循环肿瘤细胞进行单细胞测序,表明CTC簇是由原位肿瘤细胞的多种细胞组合而成的,通过plak蛋白依赖的细胞间黏附作用结合在一起,组成肿瘤细胞簇后进入外周血中,它们对癌症的转移扩散有很大的贡献。星形细胞瘤和少突胶质细胞瘤都被认为是不治之症。这两种肿瘤被认为是由支持和保护神经元的神经胶质细胞的亚型发育而来的,但在遗传学、外观和基因表达方面都有所不同。Venteicher等^[26]对星形胶质瘤样本和少突胶质瘤样本进行了单细胞转录组测序,研究人员发现,两种肿瘤都含有三种癌症细胞:非增殖性细胞(nonproliferating cells)、类神经干细胞(resemble neural stem)和祖细胞(progenitor cells)。其中的非增殖细胞被细分为星形胶质细胞样和少突胶质细胞样。而不同之处主要是遗传学差异以及肿瘤微环境(如特异性免疫细胞丰度等)的组成。此外,Puram等^[27]采用单细胞RNA-seq的方法分析了来自头颈鳞状细胞癌的细胞。他们通过分析构建出头颈癌中存在的所有不同细胞的图谱。该图谱揭示,原发性头颈部肿瘤和它们的转移瘤中的很多种不同类型的癌细胞和非癌细胞,并指出EMT会让这些细胞由整齐排列的块状结构转化为不规则的延伸到周围环境中的结构。这些发现提供了关于头颈癌如何转移的重要线索,提示了头颈部肿瘤短暂地“借用”正常胚胎发育中的这个过程来入侵附近的组织并进行扩散,而且这些发现则可能适用于类似的癌症,如乳腺癌、前列腺癌和肺癌等。

3 单细胞RNA-seq技术应用的限制因素

近些年,随着单细胞RNA-seq技术的快速发展,分离和处理单个细胞变得越来越容易,从口吸管的使用到全自动化的微流体系统分离单个细胞,大大缩短了获取细胞的时间,提高了工作效率。但是,使用早期口吸管等人工操作的方式能够尽可能多的利用细胞材料,而当使用微流体系统分离单个细胞时,细胞悬液中只有一小部分细胞能够被捕获,因此采用相应方法时所提供的细胞样本量必须足够多。其次,对于一些组织来说获取细胞悬液是非常困难的,而细胞悬液或组织的储存也是具有挑战性的。最近有研究已经提出了从组织(包括冰冻组织和固定组织)中提取细胞核,并对单个细胞核进行测序以简化细胞悬液的制备。最后,测序的成本仍然高得让人望而却步,因为研究涉及成千上万的细胞,即使是在低测序深度的情况下也会产生高昂的费用。以上因素都限制了单细胞RNA-seq技术的普遍使用,也是未来需要解决的问题。

4 结语与展望

单细胞RNA-seq技术使我们对生物多样性和数量极少的罕见细胞有了更进一步的理解,这些都是很难从大量的组织样本中获知的。在过去的5年里,单细胞RNA-seq技术对许多不同的生物学领域产生了广泛的影响,其应用范围包括:(1)发现新的细胞类型和标记基因;(2)追踪细胞谱系;(3)揭示正常组织器官或肿瘤内部的异质性。随着人们对单细胞测序技术应用需求的不断提高,最近该领域不断涌现出新的研究进展,Shendure等^[38]开发了一种可以同时分析数千个单细胞中表观基因组和转录组的新方法,这种联合分析方法名为“sci-CAR”。“sci”代表单细胞组合标记(single-cell combinatorial indexing)技术是一种研究大量单细胞的方法,该技术有效地将sci-ATAC-seq和sci-RNA-seq组合,将RNA测序与染色质可及性相结合,帮助揭示某些遗传机制的关联及调控机制,从而更全面地了解各种细胞类型及功能。

最后,虽然单细胞RNA-seq技术的应用仍然相对较新,但它已经对生物学许多领域产生了巨大的影响,极大地推进了我们对人类疾病的基本理解。随着单细胞RNA-seq相关方法变得更加精炼、更高通量、更廉价,未来几年该技术将在基础研究和临床实验中得到更广泛的使用。

参考文献 (References)

- 1 Gest H. The discovery of microorganisms by Robert Hooke and Antoni Van Leeuwenhoek, fellows of the Royal Society. *Notes Rec Roy Soc* 2004; 58(2): 187-201.
- 2 Kalisky T, Blainey P, Quake SR. Genomic analysis at the single-cell level. *Annu Rev Genet* 2011; 45: 431-45.
- 3 Lu W, Fuchou T. Recent progress in single-cell RNA-Seq analysis. *Yi Chuan* 2014; 36(11): 1069-76.
- 4 Tang F, Barbacioru C, Wang Y, Nordman E, Lee C, Xu N, et al. mRNA-Seq whole-transcriptome analysis of a single cell. *Nat Methods* 2009; 6(5): 377-82.
- 5 Islam S, Kjallquist U, Moliner A, Zajac P, Fan JB, Lonnerberg P, et al. Characterization of the single-cell transcriptional landscape by highly multiplex RNA-seq. *Genome Res* 2011; 21(7): 1160-7.
- 6 Ramskold D, Luo S, Wang YC, Li R, Deng Q, Faridani OR, et al. Full-length mRNA-Seq from single-cell levels of RNA and individual circulating tumor cells. *Nat Biotechnol* 2012; 30(8): 777-82.
- 7 Hashimshony T, Wagner F, Sher N, Yanai I. CEL-Seq: single-cell RNA-seq by multiplexed linear amplification. *Cell Rep* 2012; 2(3): 666-73.
- 8 Picelli S, Bjorklund AK, Faridani OR, Sagasser S, Winberg G, Sandberg R. Smart-seq2 for sensitive full-length transcriptome profiling in single cells. *Nat Methods* 2013; 10(11): 1096-8.
- 9 Jaitin DA, Kenigsberg E, Keren-Shaul H, Elefant N, Paul F, Zaretzky I, et al. Massively parallel single-cell RNA-seq for marker-free decomposition of tissues into cell types. *Science* 2014; 343(6172): 776-9.
- 10 Klein AM, Mazutis L, Akartuna I, Tallapragada N, Veres A, Li V, et al. Droplet barcoding for single-cell transcriptomics applied to embryonic stem cells. *Cell* 2015; 161: 1187-201.
- 11 Macosko EZ, Basu A, Satija R, Nemesh J, Shekhar K, Goldman M, et al. Highly parallel genome-wide expression profiling of individual cells using nanoliter droplets. *Cell* 2015; 161(5): 1202-14.
- 12 Gierahn TM, Wadsworth MH, 2nd, Hughes TK, Bryson BD, Butler A, Satija R, et al. Seq-Well: portable, low-cost RNA sequencing of single cells at high throughput. *Nat Methods* 2017; 14(7): 395-8.
- 13 Han X, Wang R, Zhou Y, Fei L, Sun H, Lai S, et al. Mapping the mouse cell atlas by Microwell-Seq. *Cell* 2018; 172(5): 1091-107,e17.
- 14 Rosenberg AB, Roco CM, Muscat RA, Kuchina A, Sample P, Yao Z, et al. Single-cell profiling of the developing mouse brain and spinal cord with split-pool barcoding. *Science* 2018; 360(6385): 176-82.
- 15 Hochgerner H, Lonnerberg P, Hodge R, Mikes J, Heskol A, Hubeschle H, et al. STRT-seq-2i: dual-index 5' single cell and nucleus RNA-seq on an addressable microwell array. *Sci Rep* 2017; 7: 1-8.
- 16 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.
- 17 Yan L, Yang M, Guo H, Yang L, Wu J, Li R, et al. Single-cell RNA-Seq profiling of human preimplantation embryos and embryonic stem cells. *Nat Struct Mol Biol* 2013; 20(9): 1131-9.
- 18 Xue Z, Huang K, Cai C, Cai L, Jiang CY, Feng Y, et al. Genetic programs in human and mouse early embryos revealed by single-cell RNA sequencing. *Nature* 2013; 500(7464): 593-7.
- 19 Treutlein B, Brownfield DG, Wu AR, Neff NF, Mantalas GL, Espinoza FH, et al. Reconstructing lineage hierarchies of the distal lung epithelium using single-cell RNA-seq. *Nature* 2014; 509(7500): 371-5.
- 20 DeLaughter DM, Bick AG, Wakimoto H, McKean D, Gorham J M, Kathiriya IS, et al. Single-cell resolution of temporal gene expression during heart development. *Developmental Cell* 2016; 39(4): 480-90.
- 21 Haber AL, Biton M, Rogel N, Herbst RH, Shekhar K, Smillie C, et al. A single-cell survey of the small intestinal epithelium. *Nature* 2017; 551(7680): 333-9.
- 22 Bjorklund AK, Forkel M, Picelli S, Konya V, Theorell J, Friberg D, et al. The heterogeneity of human CD127⁺ innate lymphoid cells revealed by single-cell RNA sequencing. *Nature Immunology* 2016; 17(6): 740.
- 23 Zheng CH, Zheng LT, Yoo JK, Guo HH, Zhang YY, Guo XY, et al. Landscape of infiltrating T cells in liver cancer revealed by single-cell sequencing. *Cell* 2017; 169(7): 1342-56.e16.
- 24 Patil VS, Madrigal A, Schmiedel BJ, Clarke J, O'Rourke P, de Silva AD, et al. Precursors of human CD4⁺ cytotoxic T lymphocytes identified by single-cell transcriptome analysis. *Sci Immunol* 2018; 3(19): pii: eaan8664.
- 25 Aceto N, Bardia A, Miyamoto DT, Donaldson MC, Wittner BS, Spencer JA, et al. Circulating tumor cell clusters are oligoclonal precursors of breast cancer metastasis. *Cell* 2014; 158(5): 1110-22.
- 26 Venteicher AS, Tirosh I, Hebert C, Yizhak K, Neftel C, Filbin MG, et al. Decoupling genetics, lineages, and microenvironment in IDH-mutant gliomas by single-cell RNA-seq. *Science* 2017; 355(6332): pii: eaai8478.
- 27 Puram SV, Tirosh I, Parikh AS, Patel AP, Yizhak K, Gillespie S, et al. Single-cell transcriptomic analysis of primary and metastatic tumor ecosystems in head and neck cancer. *Cell* 2017; 171(7): 1611-24.e24.
- 28 Yan LY, Yang MY, Guo HS, Yang L, Wu J, Li R, et al. Single-cell RNA-seq profiling of human preimplantation embryos and embryonic stem cells. *Nat Struct Mol Biol* 2013; 20(9): 1131-9.
- 29 Xue ZG, Huang K, Cai CC, Cai LB, Jiang CY, Feng Y, et al. Genetic programs in human and mouse early embryos revealed by single-cell RNA sequencing. *Nature* 2013; 500(7464): 593-7.
- 30 Li L, Dong J, Yan LY, Yong J, Liu XX, Hu YQ, et al. Single-cell RNA-seq analysis maps development of human germline cells and gonadal niche interactions. *Cell Stem Cell* 2017; 20(6): 858-73.e4.
- 31 Wagner DE, Weinreb C, Collins M, Briggs JA, Megason SG, Klein AM. Single-cell mapping of gene expression landscapes and lineage in the zebrafish embryo. *Science* 2018; 360(6392): 981-7.
- 32 Briggs JA, Weinreb C, Wagner DE, Megason S, Peshkin L, Kirschner MW, et al. The dynamics of gene expression in vertebrate embryogenesis at single-cell resolution. *Science* 2018; 360(6392): pii: eaar5780.
- 33 Farrell JA, Wang Y, Riesenfeld SJ, Shekhar K, Regev A, Schier AF. Single-cell reconstruction of developmental trajectories during zebrafish embryogenesis. *Science* 2018; 360(6392): pii:

- eaar3131.
- 34 Lake BB, Ai R, Kaeser G , Salathia NS, Yung YC, Liu R, *et al.* Neuronal subtypes and diversity revealed by single-nucleus RNA sequencing of the human brain. *Science* 2016; 352(6293): 1586-90.
- 35 Wang X, Allen WE, Wright MA, Sylwestrak EL, Samusik N, Vesuna S, *et al.* Three-dimensional intact-tissue sequencing of single-cell transcriptional states. *Science* 2018; 361(6400): pii: eaat5691.
- 36 Brunskill EW, Park JS, Chung E, Chen F, Magella B, Potter SS. Single cell dissection of early kidney development: multilineage priming. *Development* 2014; 141(15): 3093-101.
- 37 Park J, Shrestha R, Qiu CX, Kondo A, Huang SZ, Werth M, *et al.* Single-cell transcriptomics of the mouse kidney reveals potential cellular targets of kidney disease. *Science* 2018; 360(6390): 758-63.
- 38 Cao J, Cusanovich DA, Ramani V, Aghamirzaie D, Pliner HA, Hill AJ, *et al.* Joint profiling of chromatin accessibility and gene expression in thousands of single cells. *Science* 2018; 361(6409): 1380-5.