中国科学: 化学
SCIENTIA SINICA Chimica
chemcn.scichina.com
《中国科学》杂志社
SCIENCE CHINA PRESS
评 述
环境化学与生态毒理学国家重点实验室专刊

单细胞分析技术在人类细胞图谱计划中的应用

刘念[1,2], 王园园[1,2], 胡新笑[1,2], 何滨[1,2], 曲广波[1,2], 史建波[1,2], 胡立刚[1,2*], 江桂斌[1,2]

1. 中国科学院生态环境研究中心, 环境化学与生态毒理学国家重点实验室, 北京 100085
2. 中国科学院大学, 北京 100049
*通讯作者, E-mail: lghu@rcees.ac.cn

收稿日期: 2018-04-08; 接受日期: 2018-07-04; 网络版发表日期: 2018-09-21
国家自然科学基金(编号: 91743203、21677153)、千人计划青年项目、中国科学院战略性先导科技专项(B类) (编号: QYZDB-SSWSLH034)资助

摘要 2016年10月人类细胞图谱计划正式启动, 该计划旨在区分不同类型的细胞及其在人体内的位置, 研究激活、分化等细胞行为的分子机制, 定义病理表征和标记分子. 人类细胞图谱的建立将推动对人类健康和疾病诊断、监测、治疗的发展, 从而促进对生命最基本单元的理解. 建立系统的单细胞分析方法是完成人类细胞图谱的重要前提和保证. 微流控细胞分离、单细胞DNA/RNA测序、细胞原位分析、质谱流式细胞分析等技术已经逐渐建立并用于单细胞分析. 然而人类细胞图谱仍然面临诸多挑战, 需要具有更高灵敏度和准确度的分析方法以及高效的数据处理技术. 本文简要介绍了人类细胞图谱计划的发展现状及现有单细胞分析技术, 并对挑战所需的新技术提出了展望.

关键词 人类细胞图谱, 单细胞分析, 挑战

1 引言

人体是一个由约37万亿个细胞构成的复杂系统. 细胞作为生命体的核心单元, 被认为是从基因型到表现型的关键中间体. 为全面理解人类生物学, 并为人类的健康保护和疾病防治提供可靠的生物医学信息, 亟需建立以细胞类型和细胞状态为主要概念的综合信息库, 该信息库包括空间维度和时间维度上的细胞的稳定特征、瞬时属性、细胞数量以及相互联系等信息, 以及包括不同健康状况、不同基因型、不同生活方式和生活环境下的细胞特征差异, 即细胞图谱(图1是人类细胞图谱示意图). 但由于目前技术的局限性和研究目标的分散性, 已有的细胞分类研究成果呈现出较低系统性. 近年来随着单细胞高通量分析技术的快速发展, 完善人类细胞图谱已被提上科研日程.

2016年10月, 人类细胞图谱计划(human cell atlas)由Broad研究所和Sanger研究所发起. 人类细胞图谱计划的意义在于, 它将用于识别细胞类型, 解释遗传变异体, 定义病理表征和标记, 并促进相关试剂如抗体、探针等的开发, 协助制定样品制备、实验方法、信息结构和数据分析等多个步骤的标准方法. 这一计划将涉及生物学、医学以及相关技术开发和计算(包括数据分析、软件工程和可视化)等多个领域. 基于对不同人类群体样本研究的需求, 该计划呼吁全球科学家共同

引用格式: Liu N, Wang Y, Hu X, He B, Qu G, Shi J, Hu L, Jiang G. The application of single-cell analysis technology in human cell atlas. *Sci Sin Chim*, 2018, 48: doi: 10.1360/N032018-00093

© 2018 《中国科学》杂志社



图 1 人类细胞图谱示意图(网络版彩图)
Figure 1 General profile of Human cell Atlas (color online).

参与. 目前进行该计划研究的关键技术和计算方法已广受关注[1], 2017年7月, 关于计算工具、可视化和基准数据集等为期一年的开发项目, 在Chan Zuckerberg研究所的推动下也已正式启动. 2017年10月Chan Zuckerberg基金会公布了首次资助的38个细胞图谱项目(https://www.chanzuckerberg.com/human-cell-atlas), 包括大脑、免疫、组织处理、肠胃、皮肤和技术发展6个方面. 清华大学张学工团队是中国唯一入选的团队, 负责对单细胞测序数据归一化、差异分析、聚类分析以及表示方式等核心问题的生物信息学方法的系统研究. 2018年3月8日, 国际人类细胞图谱会议在英国剑桥Wellcome Genome Campus举办, 详细讨论了细胞图谱的研究进展. 2018年4月, Chan Zuckerberg基金会再次公布了85个资助项(https://www.chanzuckerberg.com/human-cell-atlas/comp-tools), 以期发展协同计算工具, 并合理呈现和展示细胞图谱数据.

对细胞类型进行鉴定和分析是建立细胞图谱的关键环节. 根据基因组或者转录组对细胞进行分类是目前普遍接受的方法. 细胞图谱的解析需要结合多种技术手段, 其中建立单细胞分析平台对细胞进行分离和鉴定是构建细胞图谱的前提. 单细胞分析即分析单个细胞的组分, 该技术需要结合细胞分离技术和细胞生物分子包括mRNA、蛋白质、DNA等的检测技术, 绘制细胞图谱需要整合不同维度的数据, 原位检测技术及基因编辑技术为细胞的空间及功能鉴定提供了重要的手段, 而基于荧光抗体或金属标记抗体与抗原结合对组织进行表位成像从另一方面提供了思路, 同时建立系统的数据库也是促进细胞图谱应用的重要途径.

2 单细胞分离技术

单细胞分离技术包括手动分离、流式细胞分选和微流控芯片分离等. 手动分离方法又包括极限稀释和手动挑拣. 极限稀释通过不断稀释细胞悬浮液实现细胞间的分离, 并获取单细胞. 该方法效率低且准确度差, 获得单个细胞的概率遵循泊松分布. 手动挑拣分离单细胞需借助显微操纵仪完成, 通过显微镜观察细胞, 同时手动移动微滴管, 吸取需要的细胞, 转移至特定容器, 该方法可以准确挑拣特定细胞, 但是分离效率低. 流式细胞术是常用的单细胞分离前处理手段, 其原理是利用激光系统和光学系统对单个细胞的散射信号和荧光信号进行检测从而获得细胞信息, 进而分类和分离细胞. 散射信号与细胞大小、形态、内部结构等密切相关, 而荧光信号来源于荧光抗体标记, 反映了细胞表面或内部蛋白种类信息, 以此对细胞进行分类. Jaitin等[2]利用荧光流式分选将细胞接种到384微孔板中, 实现了单细胞分离. 该方法具有自动化程度高、分离速度高、重复性好的优点. 微流控单细胞分离技术以其样品需要量小及易于操控的特点得到越来越多的应用, 并以此开发了微滴分离、微孔板分离等高通量的分离技术, 大大提高了单细胞分离效率. Manz等[3]在1990年首次建立了微流控技术用于化学传感分析. 而后微流控技术开始被应用于生物分析[4]和单细胞分离[5]. 微流控细胞分离技术根据分离原理可分为阀门控制分离、电泳分离、微孔分离和微滴分离等. 哈佛医学院的研究人员利用微滴分离技术分析分离小鼠胚胎干细胞从而进行单细胞RNA测序分析. 该技术在芯片前端多个进样口分别同时引入细胞、反转录试剂、

细胞溶解液及含有标记条码油性载体，保证单个细胞进入一个水凝胶达到单细胞分离的效果[6]. 目前微流控芯片已广泛应用于单细胞分离，Shen等[7]利用微流控芯片建立了自动和选择性操作细胞的方法，分离速率可达300个/min.

微流控细胞分离技术在应用方面具有明显优势，不仅样品消耗量小、成本低、操作简单，而且也具有快速检测、高通量的特点，目前已广泛应用于单细胞分析样品的前期分离和制备.

3 单细胞分析技术

单细胞分析是鉴定细胞类型和分析细胞组分的关键环节. 单细胞层面的RNA测序技术、DNA测序技术以及蛋白质鉴定技术是单细胞分析的主要技术. 近几年同时获得单个细胞的转录组和基因组序列信息的组合技术也发展迅速，实现了同时检测几百至几千个细胞的单细胞蛋白质组成和染色体特征或染色体突变，为建立细胞图谱提供了坚实的技术支撑.

3.1 单细胞DNA分析技术

细胞间基因的组成及突变存在着巨大的差异，分析单个细胞DNA和表观遗传信息是鉴定细胞类型的重要方式. 近几年随着“后基因组测序时代”的发展，单细胞RNA测序和蛋白质组学分析发展迅速，已被广泛应用于细胞类型发现和鉴定. 单分子技术推进蛋白质功能和特征的研究，为单细胞异质性分析和鉴定提供依据. 依托质谱流式技术高通量和高准确度的特点，结合使用多种表面抗体和胞内抗体，为细胞图谱绘制提供大量表型数据.

1993年，Küppers等[8]从单个人源B细胞中提取了重组V基因，并对其进行了扩增测序，建立了单细胞的分子分析方法，而后该技术继续发展，也促进了单细胞DNA测序技术的出现. 单细胞DNA测序技术包括全基因组测序、外显子组测序、靶向重测序等，全基因组测序能够获得整个基因组的信息，可以检测DNA变异、插入或缺失以及拷贝数改变和其他结构变异，是目前应用最广泛的单细胞测序技术.

常用的单细胞全基因组测序技术有多重退火和成环循环扩增测序、双端测序技术、多重置换扩增测序[9]等. 2012年谢晓亮团队[10]开发了多重退火和成环循环扩增技术(MALBAC)，该技术在添加扩增引物后首先进行拟线性扩增，再进行指数扩增. 该方法可以降低序列偏好性，并且能够覆盖单个细胞93%的基因组. 2013年Voet等[11]建立了单细胞双端DNA测序技术(single-cell paired-end genome sequencing)，该技术大大降低了测序错误率并保证较高的基因覆盖率. 该技术的原理是根据在末端配对的全基因组扩增和映射假象之间发现异常匹配，即可分辨基因拷贝数变化以及断点和构架变异.

近几年单细胞DNA测序逐渐实现高通量和低成本. Vitak等[12]利用单细胞组合标记技术(SCI-seq)深入分析了单个细胞拷贝数变异(CNV)，采用锂辅助核小体耗尽(LAND)和SDS交联(xSDS)方法，清除与DNA结合的蛋白质并保证细胞核的完整性，从而得到精准的CNV测序结果. 该方法可同时建立上千低通量单细胞的CNV检测文库，从而可同时分析10000个单细胞，大大降低了文库构建成本，增加了检测通量. 该方法可应用于肿瘤细胞检测和不同类型细胞的表观遗传差异.

3.2 单细胞RNA分析技术

单细胞RNA-seq技术根据基因表达谱对细胞进行鉴定和分析. 单细胞RNA测序技术按测序方式分两种，一是先反转录为cDNA，后利用二代测序技术测序；二是利用单分子测序技术，直接对RNA分子进行分析. 1992年Eberwine等[13]首次对单个神经元细胞进行转录组分析；2009年Tang等[14]开发了单细胞全转录组分析技术，该技术在反转录第一条cDNA后，加入多聚腺苷酸尾作为Oligo-dT引物，从而合成第二条cDNA，接着进行聚合酶链式反应(PCR)扩增，最后利用自动测序仪进行测序. 单分子测序技术包括SMRT测序技术[15]和纳米孔单分子技术[16]. 单分子测序技术避免了前期繁琐的反转录过程，操作简单，通量高. 因此单分子测序技术逐渐得到广泛关注，发展迅速.

高通量单细胞RNA测序技术需结合高效的单细胞分离技术和后续准确的测序分析. 哈佛医学院的研究人员通过微流控芯片将带有条码的微珠和细胞一起装入微小的液滴，建立了快速、廉价、高通量的单细胞RNA-seq方法[6]. 将细胞捕捉到溶解液、反转录(RT)试剂和条码标记的寡核苷酸引物组成的微滴中，细胞在微滴中被溶解并释放出mRNA，利用条码标记的寡

核苷酸引物将其合成出带有标记的cDNA，接着利用CEL-seq[17]对释放出的cDNA进行测序. 在这一技术中，控制每个微滴中带有不同的条码引物十分关键. 细胞被不同条码标记后即生成水凝胶微球，为了保证细胞标记的有效性，水凝胶微球文库需要一定的规模，增加标记条码的数量是最直接的手段. 目前, 标记条码数量基本满足要求(147456种)，通过光激发实现共价键结合还能进行有效扩增. 另一方面，提高细胞被单个捕捉的效率也很重要. 微流控芯片通道较大的横截面积(60×80 μm^2)使得细胞的大小不影响被捕捉的概率. 另外, 利用滤器以及流式细胞仪对细胞进行过滤可以有效降低细胞之间聚集的现象. 目前该系统1 h能够捕获4000~12000个细胞，每100 μL的混合液中被条码标记的细胞数能达到2000~3000个. 2016年Habib等[18]基于Nuc-Seq技术(一种高通量的单核单细胞RNA测序技术)创建了适用于神经细胞的Div-Seq技术，可适用于冰冻或者固定后的神经细胞检测. 在此基础上Habib等[19]继续开发了DroNc-Seq单核RNA测序方法，能够实现大规模单细胞RNA测序，并且可应用于复杂样品测序. 灵敏高效的测序技术是细胞类型鉴定的强大工具，2017年Villani等[20]利用单细胞RNA测序技术发现了一种新的人血树突状细胞和单核细胞.

RNA原位分析能够获取细胞空间信息，是细胞图谱绘制的重要依据，包括原位标记、原位杂交以及原位测序技术.

原位标记法利用空间可分辨的条码对RNA进行标记，对细胞或者RNA进行分离后，通过测序技术找到特异性标记条码进而将特定的RNA/细胞与图像中的进行匹配. 另外, 利用光学标记对细胞进行标记的空间重构的方法也在发展完善中. RNA原位杂交技术中，单分子成像(MERFISH)技术以及扩展显微技术都可对RNA进行空间分辨的高通量分析. MERFISH是一种高度多重化的单分子原位杂交成像技术，可以在单细胞水平上对数以千计的RNA样品实现空间分辨的多重化分析，可使用组合标签、连续成像等技术来提高检测通量，还可通过一种误差修正的编码方案(error-robust encoding schemes)解决单分子标记以及测定的误差，并以图像为基础，对RNA进行标识及空间分布分析[21]. 另外，还可通过化学裂解去除连续两轮单分子原位杂交成像之间的荧光信号、增加成像的视场以及采用多色成像蛋白质原位定位等方法提高测定通量[22]. 利用扩展显微术对生物样品实现纳米尺度的成像，使生物样品微小的结构细节可以通过样品的折射成像而放大. 在样品内部合成可发生物理性膨胀的多聚物，将位于样品内的特定标签直接共价锚定到聚合物网络，可以使间隔比光学衍射极限更近的标签被各向同性地分离并进行光学解析. 扩展显微技术突破了衍射极限，在体外细胞或者脑组织中的侧向分辨率可达约70 nm[23]. RNA原位荧光测序技术(FISSEQ)是新一代的测序技术[24]，它将RNA原位杂交以及全基因组RNA测序原理相结合，可在生物活体中或培养条件下对细胞内的RNA实现实时测序，实现RNA单分子水平上的空间定位. 另外，将单细胞RNA测序与RNA原位杂交结合, 也能实现RNA原位分析[25].

3.3 单细胞蛋白质组学分析技术

单细胞蛋白质组学技术是指对单个细胞的蛋白质表达量和表达种类进行检测，分析不同细胞的表达差异, 从而鉴定细胞类型, 也可对病变细胞进行筛查.

常用的单细胞蛋白质组学检测技术包括化学蛋白质组学和流式细胞技术. 化学蛋白质组学应用化学探针研究蛋白质功能和机制[26]. 流式细胞技术是在分子水平上利用单克隆抗体对单细胞表面或胞内蛋白进行定性和定量分析，具有速度快、灵敏度和准确度高等特点, 目前是细胞分析的重要手段.

流式细胞技术分荧光流式技术和质谱流式技术两种. 荧光流式技术利用荧光抗体标记细胞蛋白, 通过荧光信号获得蛋白信号，可用于检测细胞分型[27]、细胞分裂[28]等. 基于质谱流式技术的分析方法是利用金属同位素标记的抗体与抗原特异性结合，通过质谱进行成像，就可以实现对目标高灵敏度、高通量的测定. 选用生物样品中不含有的金属元素，可以消除生物样品基体的干扰. 并且, 基于质谱的高灵敏度, 各个标记金属同位素之间的干扰很小, 因此, 基于流式质谱的成像方法克服了免疫荧光显微术的很多不足，能够对单种细胞实现40多种参数的高通量测定[29~31]. Krieg等[32]利用该技术检测黑色素瘤患者外周血的免疫细胞分型以及PD-1抗体治疗12周之后的变化，从而预测免疫治疗反应.

3.4 组合单细胞分析技术

目前大多数单细胞分析技术只能检测DNA、

RNA、甲基化或蛋白质一种分子信息. 组合分析技术可同时获得单细胞的多种分子信息, 可以更全面地分析细胞类型和细胞状态.

将单细胞DNA测序技术与单细胞RNA测序技术结合能够发现不同细胞之间表观遗传学差异并且揭示这些差异性和转录组差异的关系. Macaulay等[33]利用单细胞G&T (genome & transcriptome)测序技术对基因组序列以及全长mRNA进行了分离和测序. 他们利用生物素化寡聚-dT引物磁珠将单细胞的poly(A)RNA从DNA中分离出来, 接着对基因组和转录组同时进行扩增和测序. 利用外部RNA加入法(ERCC)对RNA的捕捉及扩增的效率进行评价. 缩甲醛亚硫酸氢盐测序法(scBS-seq或scRRBS)能够对全基因组的甲基化DNA进行分离, Angermueller等[34]在此法的基础上建立了单细胞M&T (DNA methylation & transcription)测序技术, 实现了对单细胞中的DNA甲基化及RNA水平的同步测定, 揭示了基因组甲基化与转录组之间的关系. Frei等[35]开发了RNA邻位连接技术 (proximity ligation assay for RNA, PLAYR)技术, 该技术利用质谱流式细胞仪实现了同时检测上百万单细胞蛋白质信息和转录组信息.

3.5 单细胞原位分析技术

单细胞原位分析是获得细胞空间位置的关键技术. 这里主要介绍基于荧光或质谱的成像技术.

免疫荧光显微技术具有200 nm的空间分辨率, 可以对亚细胞结构进行区分, 但是免疫荧光显微技术存在生物本底干扰、荧光猝灭以及荧光染料激发光谱间重叠等问题[36]. Zrazhevskiy等[37]利用连续周期组织染色法对生物组织进行了每周期5种荧光抗体的测定, 在周期间隔之间, 利用热变性、化学试剂以及光漂白技术进行荧光消除, 以进行下一周期的荧光标记及观察, 但是由于每个周期用时较长, 对生物样品的测定结果容易产生变化.

基于质谱的成像技术主要有成像质谱流式技术(IMC)[38]和多参数离子束成像技术(MIBI). IMC将激光熔样系统(LAS)与电感耦合等离子体时间飞行质谱(ICP-TOF-MS)相结合, 构建了流式质谱系统(CyTOF), 通过使用同位素标记的探针和ICP-MS检测实现高通量检测; MIBI利用了二级质谱技术, 首先双等离子管产生初级离子束, 这些初级离子束再将与抗体结合的金属元素转变为金属离子(称为二级离子), 二级离子再由扇形磁场质谱进行分析及测定[39].

近些年来, 利用荧光抗体及多通道金属标记抗体与抗原结合而对组织进行表位成像的技术发展迅速, 该成像技术主要基于质谱流式技术或者免疫荧光显微技术. 这些技术能够同时检测多个细胞中的多种抗原, 在具有组织差异的单细胞层面上为我们提供了研究正常或者病理过程的较系统的方法.

4 数据库建立及图谱绘制

4.1 数据库建立

单细胞检测技术会产生包括DNA序列、RNA序列、蛋白质组以及细胞空间位置等海量的数据, 对这些数据进行分析, 用生物信息学的方法从中筛选出有用的信息为建立细胞图谱数据库提供有效数据.

Sanger研究所与欧洲生物信息协会共同建立了单细胞基因组学的生物信息中心(http://www.singlecell-bioinformatics.org), 该中心包含大量相关数据库及分析软件, 其中主要的功能包括对单细胞基因组学的数据进行归一化和处理, 建立质量控制标准以排除破损细胞或其他异常样品的干扰, 下一步的计划是通过建模找出单细胞多样性或排除非生物方面的干扰因素. 例如, Brennecke等[40]构建了一种定量统计方法, 将单细胞实验中由仪器产生的高水平的噪声与真实的生物变异区分开来. 基于细胞之间在转录组学上的差异, Vallejos等[41]用统计学及机器学习的方法回溯及量化这些因素, 与此同时更多聚类分析方法也不断被开发出来, 以便对细胞类型和状态进行确定, 并且筛选出特异性标记基因.

4.2 细胞图谱绘制

细胞图谱的绘制是在细胞类型鉴定的基础上, 对其空间和功能进行定位和阐述, 对不同阶段的细胞特征进行描述, 对细胞间的联系和作用进行说明. 主要技术手段有原位分析及基因编辑技术, 前者采用单分子成像、扩展显微术、质谱成像及原位测序等技术对细胞实现空间或者功能上的鉴定, 而后者通过单细胞中分子分析和添加或删除细胞中的基因去深入理解细胞的功能, 为细胞图谱在疾病及临床上的应用奠定基础.

5 对于分析技术的挑战

尽管目前迅速发展的单细胞分析技术促进了细胞类型的鉴定和细胞状态的分析，但细胞图谱的建立仍然面临诸多挑战. 如何区分不同细胞类型和不同细胞状态，如何获取细胞在连续空间和连续时间维度上的信息，如何探究细胞间的相互作用网络以及生物功能，以及如何提取细胞的关键属性并标准化处理从而建立细胞图谱数据库和绘制一个综合细胞索引图，这些都是非常重要且需要解决的问题. 目前人类细胞图谱计划处于发展初期，而第一步需要完成的任务是发展和完善单细胞分析技术. 细胞图谱的完成需对器官、组织以及单细胞逐级分析，由于组织器官由细胞构成，因此第一步是将组织解离为单细胞悬液，进一步分离为单细胞，利用单细胞分析技术鉴定细胞类型. 因此单细胞分析技术是细胞图谱的基础技术. 单细胞分析技术在图谱中的应用从细胞分离、细胞鉴定到数据分析、图谱绘制以及单细胞原位分析等方面依次展开(图2).

虽然近几年单细胞分析技术发展迅猛，但是仍存在诸多问题, 下面将依次介绍.

单细胞分离是保证单细胞分析准确度的前提. 由于细胞容易聚集成团，且细胞体积非常小，哺乳动物细胞直径一般低于30 μm[42]，因此对分离技术的灵敏度要求高. Kim等[43]利用细胞大小差异分离了常规血细胞和MCF7乳腺癌细胞，准确度可达到90%，但是该方法不适用于分离细胞大小相近的体细胞. Klein等[6]利用标记了的凝胶微球分离细胞，得到单个细胞的基因组序列信息. 但是该方法效率低，每次只能分离70~90个细胞，并且凝胶微球的细胞覆盖率只有10%左右，另一方面有些凝胶微球中还存在两个甚至多个细胞. 单细胞分离不可避免地会对细胞造成损伤和改变，影响单细胞分析结果，高效、精确、无损的单细胞分离技术是大家努力追求的目标.

细胞类型鉴定从DNA/RNA、蛋白质及其功能以及细胞功能和细胞特征等方面展开. 转录组测序技术中准确的RNA扩增非常重要. 单个细胞的DNA或者RNA含量非常低，因此需要全基因组扩增，这个过程容易引入错配、缺失等误差[21]. Marcus等[44]利用微流体芯片分离单细胞mRNA，反转录合成cDNA片段，然后进行PCR扩增, 最后进行测序. 扩增技术的准确度亟待改进以适应蓬勃发展的单细胞测序技术，保证测序结果的完整性和准确度. 对于单分子测序技术，实现低含量RNA或DNA的直接检测，可避免扩增步骤带来的误差, 但是该技术对仪器的灵敏度要求高, 微小污染就会明显影响结果, 很难得到较为可靠的数据.

蛋白质是细胞功能的执行者，是基因表达最终的表现，不同状态不同类型细胞的蛋白质组均存在差异. 每种蛋白质产生的数量很少，因此要对每种蛋白质分别进行检测难度大. 在质谱流式的应用中，细胞表面的抗体标记是识别和鉴定细胞的主要依据和方式[45],

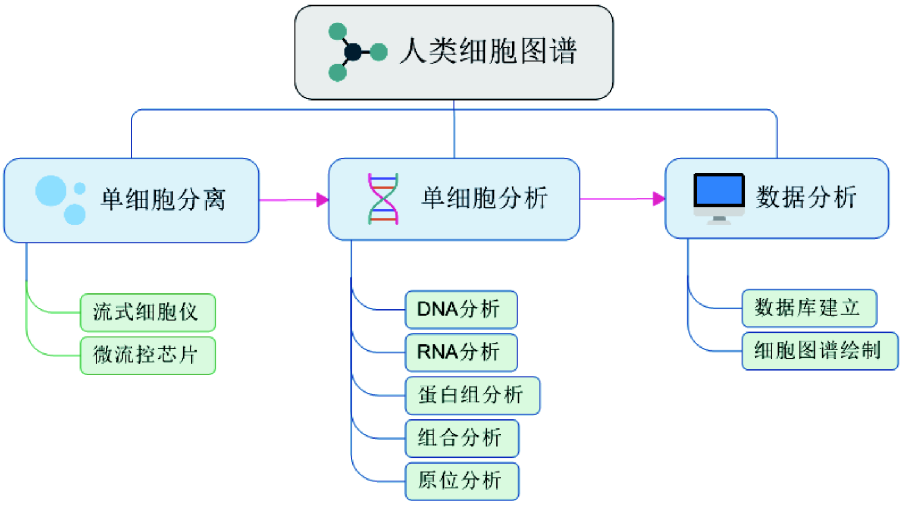


图 2 目前人类细胞图谱技术总结(网络版彩图)
Figure 2 Techniques summary of Human cell Atlas (color online).

这也为发现新的细胞类型提供了机会. 而对于含量非常低的蛋白, 质谱流式达不到检测灵敏度. 另外目前可用的抗体数有限, 有待开发新的抗体.

蛋白质功能分析是鉴定细胞的一个依据, 按照细胞在组织、器官、人体发挥不同作用从而分析和鉴定细胞类型. 记忆T细胞具有免疫记忆, 效应T细胞能够释放细胞因子[46]. 基于分子标记的单分子技术具有分析速度快、消耗样品少等优势, 标记核苷酸片段可以鉴定基因突变位点[47], 连接微型电极能够分析胞吐功能[48], 连接荧光分子可以实现原位成像[49]. 但是由于单分子信号微弱很难达到足够的检测灵敏度, 因此大多数单分子技术的应用受到限制.

细胞原位分析能获得细胞空间位置信息. 常用技术有RNA/DNA原位标记和测序[24]、蛋白荧光原位分析、质谱流式原位成像等技术. 单细胞原位分析前处理简单, 可直接对组织或器官中的细胞进行标记染色分析, 避免了单细胞分离时对细胞造成未知的改变和损伤. 单细胞原位分析技术关键是寻找合适的标记探针, 如质谱流式技术利用金属抗体标记细胞、DNA/RNA分子杂交需要核苷酸或脱氧核苷酸探针[47], 因此完善细胞标记信息库并制备相应标记探针能够促进细胞类型鉴定和空间定位, 为细胞图谱的建立提供基础信息, 但灵敏度和准确度以及通量都有待提高.

单细胞分析技术将产生海量单细胞序列和组学以及空间位置信息. 高效分析数据并挖掘有用信息是细胞图谱建立的难点和重点. 目前大多数研究者主要利用生物信息学根据研究目的选择相应的数据分析方式, 对于细胞类型鉴定, 主成分分析和*t*分布式随机相邻嵌入分析, 能够降低数据维度, 解析大量数据中细胞的具体信息. Achim等[25]开发了一种计算方法, 可用于分析原位杂交基因测序信息库, 比较各个细胞的RNA序列, 得到细胞空间联系和空间分布. 通过计算机数据分析, 也可得到蛋白分子之间的作用机制、连接位点等相关信息[50]. 开发强大的数据处理方法, 快速提取细胞的主要特征, 鉴定细胞类型, 同时对比细胞数据, 建立细胞间的联系, 得到细胞空间和功能分布的网状结构, 是人类细胞图谱计划面临的巨大挑战.

人类细胞图谱的绘制需要建立人体细胞分布的坐标体系, 包括空间维度和时间维度的坐标, 包括在不同疾病状态、生活环境和不同暴露水平下的分布特征. 细胞图谱的建立极大依赖于单细胞分析技术和数据处理技术. 高灵敏度、高通量和高准确度的分析技术是获取图谱信息的关键, 而强大的计算机数据处理方法, 整合并归一化数据是图谱建立的关键.

6 总结

人体是一个非常庞大的细胞聚集体, 包含了成千上万的细胞种类, 包括不同阶段以及病变的细胞类型, 如癌细胞、肿瘤细胞. 人类细胞图谱计划是深入研究人体生物学和造福人类健康的又一项重大工程, 亦如人类基因组计划, 在分析难度上又有别于人类基因组计划. 人类细胞图谱提供一份详细的人体细胞信息索引图, 为人体深度分析以及人类的疾病预防和治疗提供重要参考. 单细胞分析技术的不断推进, 将会促进人类细胞图谱的迅速建立和完善.

参考文献

1 Rozenblatt-Rosen O, Stubbington MJT, Regev A, Teichmann SA. *Nature*, 2017, 550: 451–453

2 Jaitin DA, Kenigsberg E, Keren-Shaul H, Elefant N, Paul F, Zaretsky I, Mildner A, Cohen N, Jung S, Tanay A, Amit I. *Science*, 2014, 343: 776–779

3 Manz A, Graber N, Widmer HM. *Sensor Actuat B-Chem*, 1990, 1: 244–248

4 Reyes DR, Iossifidis D, Auroux PA, Manz A. *Anal Chem*, 2002, 74: 2623–2636

5 Wheeler AR, Throndset WR, Whelan RJ, Leach AM, Zare RN, Liao YH, Farrell K, Manger ID, Daridon A. *Anal Chem*, 2003, 75: 3581–3586

6 Klein AM, Mazutis L, Akartuna I, Tallapragada N, Veres A, Li V, Peshkin L, Weitz DA, Kirschner MW. *Cell*, 2015, 161: 1187–1201

7 Shen Y, Song Z, Yan Y, Song Y, Pan X, Wang Q. *Micromachines*, 2017, 8: 172

8 Küppers R, Zhao M, Hansmann ML, Rajewsky K. *EMBO J*, 1993, 12: 4955–4967

9 Dean FB, Hosono S, Fang L, Wu X, Fawad Faruqi A, Bray-Ward P, Sun Z, Zong Q, Du Y, Du J, Driscoll M, Song W, Kingsmore SF, Egholm M, Lasken RS. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99: 5261–5266

10 Zong C, Lu S, Chapman AR, Xie XS. *Science*, 2012, 338: 1622–1626

11 Voet T, Kumar P, Van Loo P, Cooke SL, Marshall J, Lin ML, Zamani Esteki M, Van der Aa N, Mateiu L, McBride DJ, Bignell GR, McLaren S, Teague J, Butler A, Raine K, Stebbings LA, Quail MA, D'Hooghe T, Moreau Y, Futreal PA, Stratton MR, Vermeesch JR, Campbell PJ. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41: 6119–6138

12 Vitak SA, Torkenczy KA, Rosenkrantz JL, Fields AJ, Christiansen L, Wong MH, Carbone L, Steemers FJ, Adey A. *Nat Methods*, 2017, 14: 302–308

13 Eberwine J, Yeh H, Miyashiro K, Cao Y, Nair S, Finnell R, Zettel M, Coleman P. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89: 3010–3014

14 Tang F, Barbacioru C, Wang Y, Nordman E, Lee C, Xu N, Wang X, Bodeau J, Tuch BB, Siddiqui A, Lao K, Surani MA. *Nat Methods*, 2009, 6: 377–382

15 Levene MJ, Korlach J, Turner SW, Foquet M, Craighead HG, Webb WW. *Science*, 2003, 299: 682–686

16 Manrao EA, Derrington IM, Laszlo AH, Langford KW, Hopper MK, Gillgren N, Pavlenok M, Niederweis M, Gundlach JH. *Nat Biotechnol*, 2012, 30: 349–353

17 Hashimshony T, Wagner F, Sher N, Yanai I. *Cell Rep*, 2012, 2: 666–673

18 Habib N, Li Y, Heidenreich M, Swiech L, Avraham-Davidi I, Trombetta JJ, Hession C, Zhang F, Regev A. *Science*, 2016, 353: 925–928

19 Habib N, Avraham-Davidi I, Basu A, Burks T, Shekhar K, Hofree M, Choudhury SR, Aguet F, Gelfand E, Ardlie K, Weitz DA, Rozenblatt-Rosen O, Zhang F, Regev A. *Nat Meth*, 2017, 14: 955–958

20 Villani AC, Satija R, Reynolds G, Sarkizova S, Shekhar K, Fletcher J, Griesbeck M, Butler A, Zheng S, Lazo S, Jardine L, Dixon D, Stephenson E, Nilsson E, Grundberg I, McDonald D, Filby A, Li W, De Jager PL, Rozenblatt-Rosen O, Lane AA, Haniffa M, Regev A, Hacohen N. *Science*, 2017, 356: eaah4573

21 Chen KH, Boettiger AN, Moffitt JR, Wang S, Zhuang X. *Science*, 2015, 348: aaa6090

22 Moffitt JR, Hao J, Wang G, Chen KH, Babcock HP, Zhuang X. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113: 11046–11051

23 Chen F, Tillberg PW, Boyden ES. *Science*, 2015, 347: 543–548

24 Lee JH, Daugharthy ER, Scheiman J, Kalhor R, Yang JL, Ferrante TC, Terry R, Jeanty SSF, Li C, Amamoto R, Peters DT, Turczyk BM, Marblestone AH, Inverso SA, Bernard A, Mali P, Rios X, Aach J, Church GM. *Science*, 2014, 343: 1360–1363

25 Achim K, Pettit JB, Saraiva LR, Gavriouchkina D, Larsson T, Arendt D, Marioni JC. *Nat Biotechnol*, 2015, 33: 503–509

26 Xu F, Zhao H, Feng X, Chen L, Chen D, Zhang Y, Nan F, Liu J, Liu BF. *Angew Chem*, 2014, 126: 6848–6851

27 Blue ML, Daley JF, Levine H, Schlossman SF. *J Immunol*, 1985, 134: 2281–2286

28 Lyons AB, Parish CR. *J Immunol Methods*, 1994, 171: 131–137

29 Bandura DR, Baranov VI, Ornatsky OI, Antonov A, Kinach R, Lou X, Pavlov S, Vorobiev S, Dick JE, Tanner SD. *Anal Chem*, 2009, 81: 6813–6822

30 Bendall SC, Simonds EF, Qiu P, Amir ED, Krutzik PO, Finck R, Bruggner RV, Melamed R, Trejo A, Ornatsky OI, Balderas RS, Plevritis SK, Sachs K, Pe'er D, Tanner SD, Nolan GP. *Science*, 2011, 332: 687–696

31 Ornatsky O, Bandura D, Baranov V, Nitz M, Winnik MA, Tanner S. *J Immunol Methods*, 2010, 361: 1–20

32 Krieg C, Nowicka M, Guglietta S, Schindler S, Hartmann FJ, Weber LM, Dummer R, Robinson MD, Levesque MP, Becher B. *Nat Med*, 2018, 24: 144–153

33 Macaulay IC, Haerty W, Kumar P, Li YI, Hu TX, Teng MJ, Goolam M, Saurat N, Coupland P, Shirley LM, Smith M, Van der Aa N, Banerjee R, Ellis PD, Quail MA, Swerdlow HP, Zernicka-Goetz M, Livesey FJ, Ponting CP, Voet T. *Nat Methods*, 2015, 12: 519–522

34 Angermueller C, Clark SJ, Lee HJ, Macaulay IC, Teng MJ, Hu TX, Krueger F, Smallwood SA, Ponting CP, Voet T, Kelsey G, Stegle O, Reik W. *Nat Methods*, 2016, 13: 229–232

35 Frei AP, Bava FA, Zunder ER, Hsieh EWY, Chen SY, Nolan GP, Gherardini PF. *Nat Methods*, 2016, 13: 269–275

36 Wilson SM, Bacic A. *Nat Protoc*, 2012, 7: 1716–1727

37 Zrazhevskiy P, Gao X. *Nat Commun*, 2013, 4: 1619

38 Giesen C, Wang HAO, Schapiro D, Zivanovic N, Jacobs A, Hattendorf B, Schüffler PJ, Grolimund D, Buhmann JM, Brandt S, Varga Z, Wild PJ, Günther D, Bodenmiller B. *Nat Methods*, 2014, 11: 417–422

39 Angelo M, Bendall SC, Finck R, Hale MB, Hitzman C, Borowsky AD, Levenson RM, Lowe JB, Liu SD, Zhao S, Natkunam Y, Nolan GP. *Nat Med*, 2014, 20: 436–442

40 Brennecke P, Anders S, Kim JK, Kołodziejczyk AA, Zhang X, Proserpio V, Baying B, Benes V, Teichmann SA, Marioni JC, Heisler MG. *Nat Methods*, 2013, 10: 1093–1095
41 Vallejos CA, Richardson S, Marioni JC. *Genome Biol*, 2016, 17: 70
42 Varsano G, Wang Y, Wu M. *Cell Rep*, 2017, 20: 397–410
43 Kim J, Cho H, Han SI, Han KH. *Anal Chem*, 2016, 88: 4857–4863
44 Marcus JS, Anderson WF, Quake SR. *Anal Chem*, 2006, 78: 3084–3089
45 Wong MT, Ong DEH, Lim FSH, Teng KWW, McGovern N, Narayanan S, Ho WQ, Cerny D, Tan HKK, Anicete R, Tan BK, Lim TKH, Chan CY, Cheow PC, Lee SY, Takano A, Tan EH, Tam JKC, Tan EY, Chan JKY, Fink K, Bertoletti A, Ginhoux F, Curotto de Lafaille MA, Newell EW. *Immunity*, 2016, 45: 442–456
46 Brodin P, Jojic V, Gao T, Bhattacharya S, Angel CJL, Furman D, Shen-Orr S, Dekker CL, Swan GE, Butte AJ, Maecker HT, Davis MM. *Cell*, 2015, 160: 37–47
47 Ma F, Ren M, Zhang C. *Sci China Chem*, 2017, 60: 1285–1292
48 Zhou J, Jiang D, Chen HY. *Sci China Chem*, 2017, 60: 1277–1284
49 Zhan S, Lou X, Xia F. *Sci China Chem*, 2017, 60: 1267–1276
50 Gromiha MM, Yugandhar K. *Prog Biophys Mol Biol*, 2017, 128: 33–38

The application of single-cell analysis technology in human cell atlas

Nian Liu[1,2], Yuanyuan Wang[1,2], Xinxiao Hu[1,2], Bin He[1,2], Guangbo Qu[1,2], Jianbo Shi[1,2], Ligang Hu[1,2*], Guibin Jiang[1,2]

[1] *State Key Laboratory of Environmental Chemistry and Ecotoxicology, Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China*
[2] *University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China*
**Corresponding author (email: lghu@rcees.ac.cn)*

Abstract: The Human Cell Atlas was founded on October 2016 and the project aims to identify all cell types and their positions in human body, investigate molecular mechanism of cell behaviors such as activation and differentiation, and define pathological characteristics and molecular markers. The Human Cell Atlas will promote the development of disease diagnosis, surveillance and treatment, and lead to a better human health. Also, it will advance our knowledge of cell, and the fundamental unit of life. A systematic strategy of single-cell analysis is the key step towards the final Human Cell Atlas. Although various techniques, i.e., microfluidic single-cell analysis, single-cell sequencing of DNA/RNA, *in situ* single-cell analysis and Mass Cytometry have been developed, numerous challenges remain, especially for those featuring high sensitivity, high accuracy, and high-performance in data process. The article briefly introduced the Human Cell Atlas and its status, and discussed challenges in techniques.

Keywords: Human Cell Atlas, single-cell analysis, challenges

doi: 10.1360/N032018-00093