

MGISEQ-2000在10x Genomics 单细胞测序方面的应用

华大智造MGISEQ-2000应用案例

■ 亮点



高兼容性

华大智造利用文库转换技术与10x Genomics的Chromium系统相配合，达成10x Genomics单细胞测序技术与华大智造DNBSEQ平台完美兼容



高测序数据质量

华大智造独有的DNBSEQ™技术具有高准确性、低重复序列率、低标签跳跃的重要特性，可始终扩增原版DNA，避免错误积累，并兼具测序信号强度和准确性，以实现最高效准确的大规模并行测序



灵活测序方法选择

MGISEQ-2000测序仪采用双载片平台，在双载片独立运行的基础上，支持不同规格的载片，提供更全面更灵活的测序体验

■ 背景

单细胞组学技术的发展，为我们理解系统生物学提供了强有力的工具。华大智造实现DNBSEQ™测序技术和10x Genomics单细胞技术结合，华大智造测序产品兼容Chromium系统的同时保留其独特的测序技术优势，在MGISEQ-2000测序平台上的单细胞RNA测序数据表现十分出色，展现出华大智造DNBSEQ测序平台的开放性与灵活性，为单细胞研究者提供更多的选择空间和更有价值的产品。

■ 应用案例 单细胞测序揭示COVID-19患者支气管肺泡免疫细胞图谱¹

近年来，单细胞测序发展迅速，广泛应用于科学和医疗研究，涵盖发育生物学、微生物学、免疫学和肿瘤学等多个领域。《自然-医学》发表了国家感染性疾病临床医学研究中心张政、复旦大学附属上海市公共卫生中心章树业、以色列魏兹曼研究所Ido Amit以及深圳市第三人民医院刘磊等研究人员的研究成果，报告了新冠患者的呼吸系统的异常免疫反应。该研究通过对新冠患者支气管肺泡灌洗液（BALF）样本的免疫细胞进行分析，揭示了新冠病毒SARS-CoV-2所触发的免疫反应背后的潜在机制。

实验方法

样本信息

文章对来自深圳市第三人民医院的感染COVID-19患者支气管肺泡灌洗液（BALF）样本的单细胞测序数据进行了分析，其中包括6例重症感染患者样本和3例中症感染患者样本。同时还检测了3例健康对照样本及一个公开可用的BALF健康对照样本（GSM3660650）。

qRT-PCR检测

在不同的时间点采集住院患者的咽喉拭子、痰液、鼻拭子、肛门拭子及BALF。采用QIAamp RNA病毒试剂盒（Qiagen）提取样品总核酸，采用国家食品药品监督管理局批准的SARS-CoV-2检测商用试剂盒（GeneoDX）进行qRT-PCR检测。每个qRT-PCR检测都提供了一个阈值周期（Ct）值，表明超过该阈值的周期数为阳性。Ct值≤37为阳性，否则为阴性。Ct值>37的标本会进行重测。如果重复结果与初始结果相同或在37-40之间，则认为标本呈阳性。如果重复Ct检测不到，则认为标本为阴性。

BALF细胞分离

BALF的处理均在冰上进行，并在2小时内完成。BALF通过100 μ m尼龙细胞过滤器去除细胞团和碎片后，离心上清液，将细胞重悬在冷却的PRMI 1640完全培养基中。重症COVID-19感染患者的BALF中含有的细胞 ($1.25 \times 10^5 \sim 2.25 \times 10^6$ 细胞 ml^{-1})，比中症病例 ($6.63 \times 10^3 \sim 5.6 \times 10^4$ 细胞 ml^{-1}) 和健康对照组 ($1.17 \times 10^4 \sim 2.1 \times 10^4$ 细胞 ml^{-1}) 的要多。在0.4%台盼蓝中进行细胞计数，离心并在浓度为 $2 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$ 的情况下重悬细胞。

ScRNA-seq和TCR-seq捕获、文库构建和测序

健康样本 (HC1-GC3) 采用10x Genomics公司的Chromium Single Cell 3' Reagent kits进行单细胞捕获和下游文库构建。所有COVID-19患者均采用10x Genomics公司的Chromium Single Cell V(D)J Reagent kits建库。构建的文库进行转换后在MGISEQ-2000平台上进行测序。

ScRNA-seq数据比对和样本聚合

使用Cell Ranger软件套件 (v.3.1.0) 进行样本拆分、barcode处理和单细胞5' UMI计数。为检测SARS-CoV-2的reads，将人GRCh38和SARS-CoV-2基因组 (严重急性呼吸综合征冠状病毒2分离株Wuhan-Hu-1, 全基因组, GenBank MN908947.3) 整合，构建定制化参考序列。

差异基因表达分析

使用Seurat v.3中的MAST进行差异基因表达分析。对于每一簇巨噬细胞和T细胞，都产生了相对于所有其他细胞的差异表达基因 (DEGs)。在中度病例 (n=3) 中，使用带有默认参数的MAST计算扩增和未扩增CD8⁺T细胞的DEGs。

结果

研究结果发现巨噬细胞在不同细胞群中的组成和表达均有很大差异，其分布表现出分组差异性。重症患者BALF样本中巨噬细胞和中性粒细胞的浓度要高于中症患者，但是髓样树突状细胞 (mDCs)、浆细胞样树突状细胞 (pDCs) 和T细胞比例减少。重症患者具有更高水平的炎症细胞因子和趋化因子，这表明新冠肺炎重症患者的肺部存在高度促炎性巨噬细胞微环境。

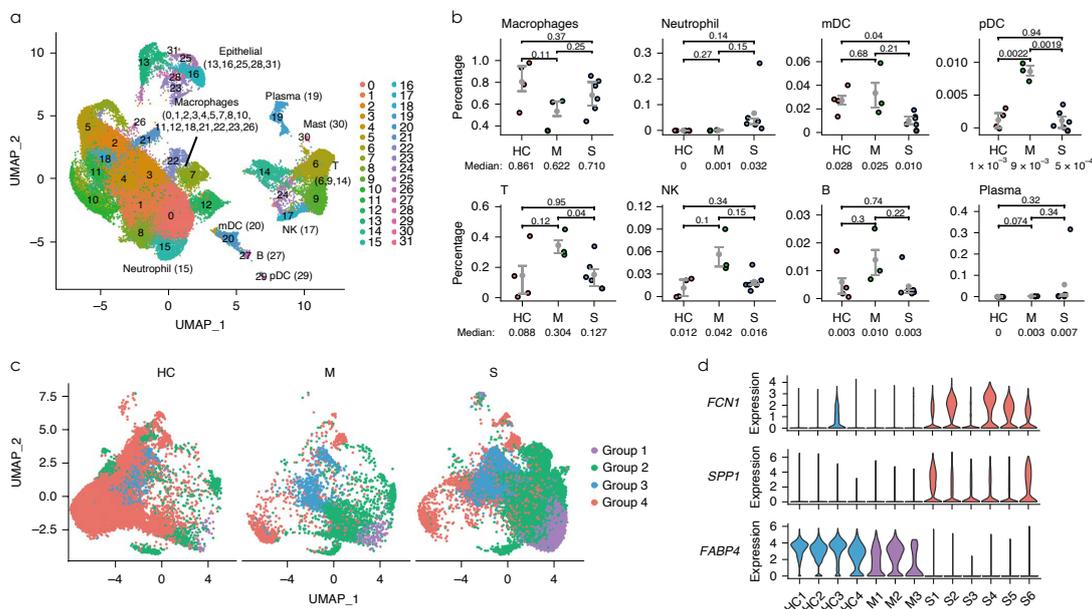


图1 新冠重症患者支气管肺泡免疫功能失调

- 在BALF中主要细胞类型和相关簇的UMAP。
- 主要BALF免疫细胞类型在健康对照组 (HC) 和中症 (M) 和重症 (S) COVID-19感染患者中的比例 (双侧学生t分布检验)。
- 对照组 (n=4) 和患者 (中症, n=3; 重症, n=6) 的四个巨噬细胞组的UMAP投影。
- 每个样本中BALF巨噬细胞对 *FCN1*、*SPP1* 和 *FABP4* 的表达。

此外，根据单个T细胞的TCR测序分析，结果发现重症患者BALF样本中的CD8⁺T细胞扩增较少，增殖较多，表型异质性较强，而具有组织驻留和高度扩增特征的CD8⁺T细胞效应因子在中度感染患者的BALF中存在较大比例。对症状严重程度不同的患者BALF中炎症因子的表达进行分析，发现重症患者具有更高的炎症细胞因子表达（IL6, IL8, IL1 β ）。scRNA-seq测序数据显示，严重症状的病人巨噬细胞中具有更高的趋化因子表达（CCL2, CCL3, CCL4, CCL7）。这些数据表明，表现出严重症状的COVID-19患者的肺巨噬细胞可能通过CCR1和CXCR2招募炎症性单核细胞和中性粒细胞来促进局部炎症，而中度COVID-19感染患者的巨噬细胞通过CXCR3和CXCR6产生更多的T细胞趋化因子。

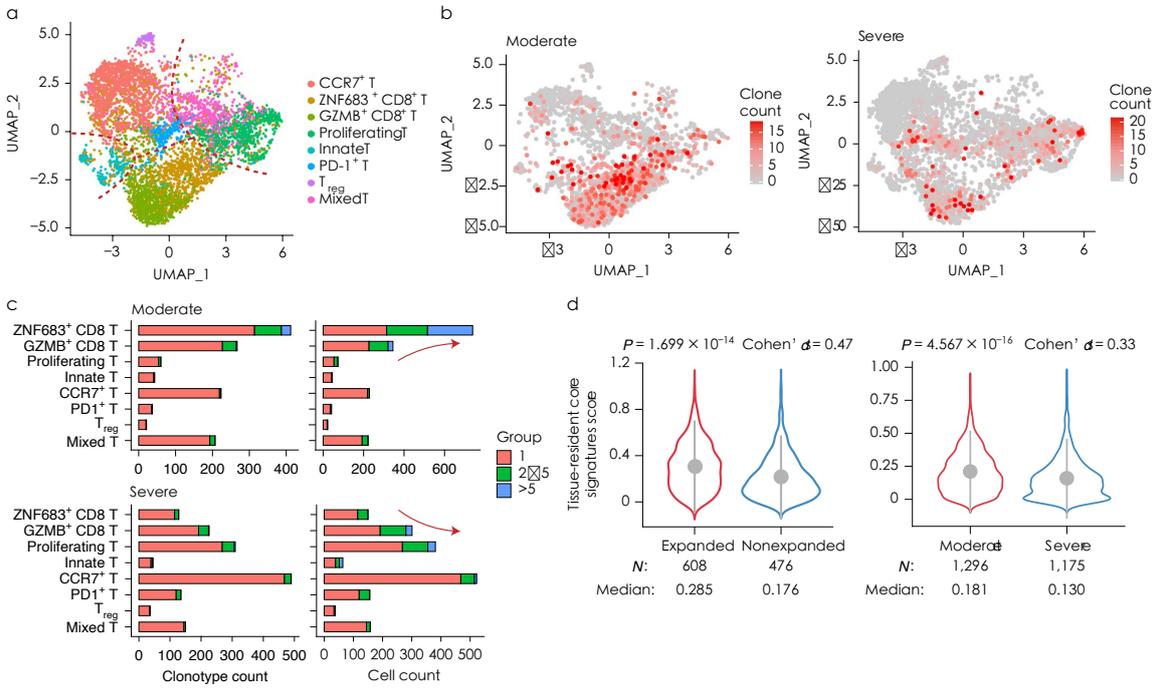


图2 COVID-19患者BALF样本中T细胞克隆扩增

- a. 在COVID-19患者中BALF衍生T细胞聚簇（n=8，排除样本S3）。虚线将UMAP划分成CD4⁺T细胞（上）、CD8⁺T细胞（下）、天然T细胞（左）和增殖T细胞（右）。
- b. 从COVID-19患者克隆扩增的T细胞的UMAP投射。
- c. 中、重症/危重症患者T细胞亚群的克隆扩增状况。如图显示了克隆型计数（左）和细胞计数（右）。
- d. 由中症感染患者中扩增对比未扩增的BALF CD8⁺T细胞得到组织驻留signature score和中症患者对比重症/危重症患者中CD8⁺T细胞得到的signature score。b-d中，中症n=3，重症n=5。

综上所述，该研究通过单细胞RNA测序，对不同症状严重程度的COVID-19患者和健康人的支气管肺泡灌洗液免疫细胞进行了表征。严重症状患者支气管肺泡灌洗液中富含促炎单核细胞来源的巨噬细胞，而中症患者样本具有高度克隆扩增的CD8⁺T细胞。这张支气管肺泡免疫微环境图显示了COVID-19潜在的发病机制和恢复机制。

结论

在该研究中，研究人员在单细胞测序平台进行单细胞测序，成功绘制出COVID-19患者支气管肺泡免疫细胞的单细胞图谱，揭示了COVID-19发病机理和恢复的潜在机制，为寻找疾病的免疫干预策略提供了重要线索。

使用单细胞文库转化试剂盒（App-A）和MGISEQ-2000RS高通量测序试剂套装（App-A）可以将10x Genomics构建的单细胞文库转化到MGISEQ-2000平台上进行测序，产出高质量的样本序列信息，为用户提供更多样，更灵活的测序方法选择。

参考文献

1. Liao M, Liu Y, Yuan J, et al. Single-cell landscape of bronchoalveolar immune cells in patients with COVID-19[J]. Nature medicine, 2020, 26(6).



■ 订购信息

设备

产品	规格	货号
基因测序仪MGISEQ-2000RS	台	900-000035-00

文库转化试剂盒

产品	规格	货号
MGI Easy通用文库转换试剂盒 (App-A)	16 RXN	1000004155

测序试剂

产品	最大支持循环数	货号
MGISEQ-2000RS 高通量测序试剂套装 (App-A) (PE100)	220 Cycles	1000005662
MGISEQ-2000RS 高通量测序试剂套装 (App-A) (PE150)	320 Cycles	1000014051
MGISEQ-2000RS 高通量快速测序试剂套装 (App-A FCS PE100)	220 Cycles	1000023781
MGISEQ-2000RS 高通量快速测序试剂套装 (App-A FCS PE150)	320 Cycles	1000023782

深圳华大智造科技股份有限公司

MGI-service@mgi-tech.com | www.mgi-tech.com | 4000-688-114 | 深圳市盐田区北山工业区综合楼及11栋2楼

仅供研究使用

版权声明: 本手册版权属于深圳华大智造科技股份有限公司。未经本公司书面许可, 任何其他个人或组织不得以任何形式将本手册中的各项内容进行复制, 拷贝, 编辑或翻译为其他语言。本手册中所有商标或标识均属于深圳华大智造科技股份有限公司及其提供者所有。