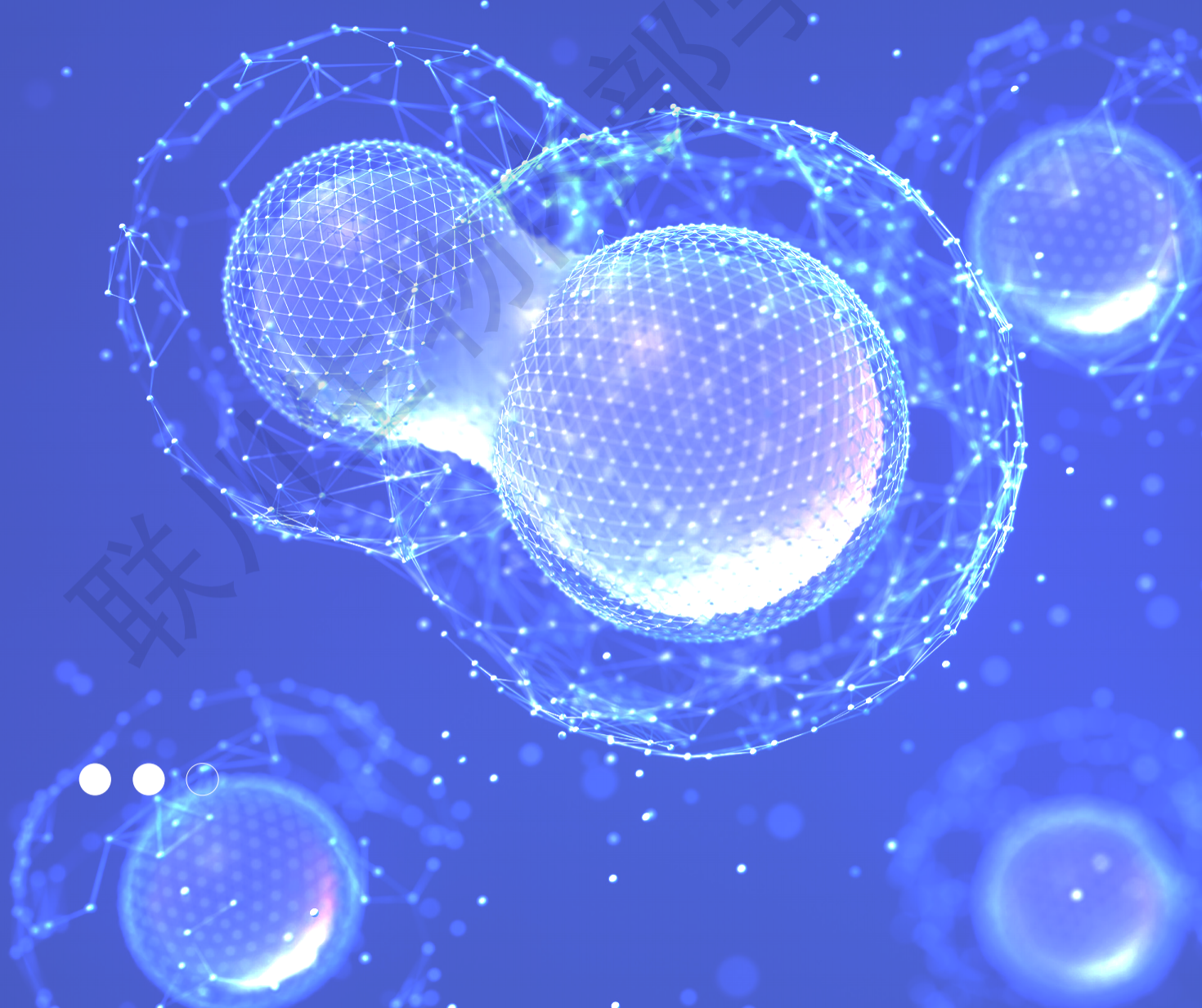




# FFPE单细胞&空间转录组 技术研究手册

TECHNICAL MANUAL



# 目录 CONTENTS

---

<b>FFPE单细胞和空间转录组的研究进展</b> .....	2
一、FFPE单细胞的研究进展.....	2
二、FFPE空间转录组的研究进展 .....	2
<b>FFPE样本单细胞和空间转录组技术原理</b> .....	10
一、FFPE样本单细胞技术原理.....	10
二、FFPE样本空间转录组技术原理 .....	11
<b>FFPE样本单细胞和空间转录组的样本要求、储存及运输条件</b> .....	13
一、FFPE样本单细胞样本要求、储存及运输条件.....	13
二、FFPE样本空间转录组样本要求、储存及运输条件 .....	13
<b>FFPE单细胞和空间转录组技术优势</b> .....	17
一、FFPE单细胞技术优势 .....	17
二、FFPE空间转录组技术优势.....	18
<b>FFPE单细胞和空间转录组分析流程</b> .....	19
一、FFPE单细胞分析流程 .....	19
二、FFPE空间转录组分析流程.....	20
<b>FFPE单细胞和空间转录组结果展示</b> .....	21
一、FFPE单细胞测序的数据分析 .....	21
二、FFPE空间转录组结果展示.....	27
<b>FFPE单细胞和空间转录组案例解析</b> .....	33
一、单细胞多组学.....	33
二、FFPE单细胞和空间转录组联合分析.....	37
<b>FFPE单细胞和空间转录组国自然研究热点解析</b> .....	41
一、FFPE单细胞国自然研究热点解析 .....	41
二、FFPE空间转录组国自然研究热点解析.....	42



# FFPE单细胞和空间转录组的研究进展

## 一、FFPE单细胞的研究进展

单细胞测序技术从问世起，就受到了科学界和产业界的极大关注，该技术在描述样本中细胞图谱信息具有独特的优势，能够高通量、快速地拿到每个细胞的基因表达信息。单细胞测序技术已经成为探究复杂组织中细胞类型、分子变化和细胞功能的重要手段，已广泛应用于临床医药和动植物领域的研究。

然而，单细胞技术依然面临诸多挑战，其中最大的困境是，目前绝大部分高通量单细胞测序平台对待测样本的细胞活性要求较高，但临床的大部分样本为冻存或福尔马林固定、石蜡包埋 (FFPE) 处理的组织，细胞活性极低，很难利用现有的单细胞技术进行有效检测。目前火热的单细胞测序市场，同质化竞争严重，而在临床方面又尚未找到大规模应用的突破口，单细胞市场期待着下一轮技术创新带来研究瓶颈的突破！

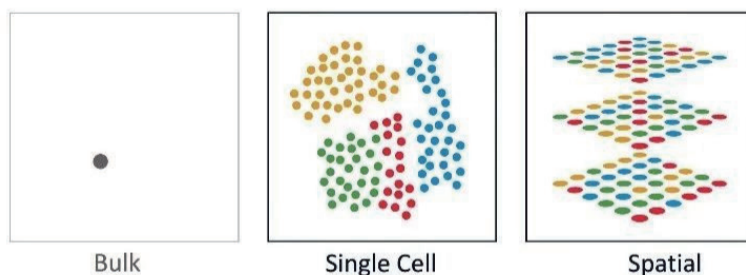
## 二、FFPE空间转录组的研究进展

细胞是多细胞生物的基本构成单位，其空间位置是其分子特性的关键决定因素。因此，深入了解不同组织中异质细胞的空间分布和基因表达的空间模式，将有助于我们深入了解生理和疾病机制。单细胞测序为我们提供了一个全新的视角来了解不同类型细胞的分子多样性以及它们的不同状态，该技术能够绘制出构成多细胞生物组织器官中的细胞清单，但是由于该方法需要将细胞解离，细胞在组织中的原始位置信息会丢失，因此单细胞测序难以在组织架构层次绘制出中详细的细胞图谱以及细胞间的关系。为了更好地理解多细胞生物的细胞和组织功能，需要在生理、形态和解剖背景以及空间结构中绘制细胞图谱。这凸显出更全面的原位转录分析的需要，以便了解复杂的生物系统如何运作。

CNS杂志及其子刊每年都会总结一年中的研究成果，根据每个领域的重大发现，推选出最有价值的技术为年度技术。2018年的“单细胞转录组技术”、2019年的“单细胞多组学技术”，以及2020年的“空间转录组技术”，说明了单细胞和空间组学技术巨大的价值，对于更好地理解生理和疾病细胞、分子和空间的关键信息来说至关重要！

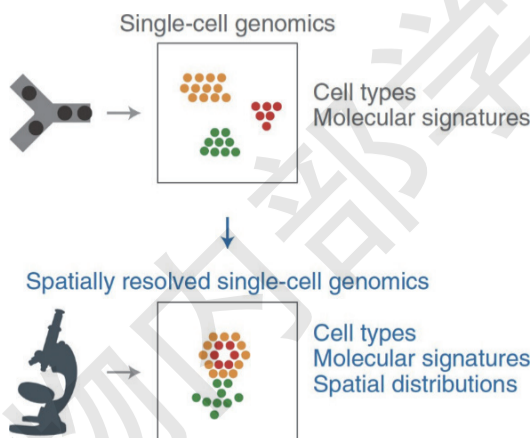
### 2.1 什么是空间转录组？

空间转录组 (Spatial Single Cell Transcriptome) 是一种能够将RNA表达情况直接在组织层面进行解析的新型单细胞测序技术。这种技术能够将一定范围内组织切片上所有RNA表达信息一网打尽。相比于Bulk RNA-seq (也就是我们所说的常规转录组) 以及单细胞转录组，空间转录组彻底将分辨率提升到了空间水平。



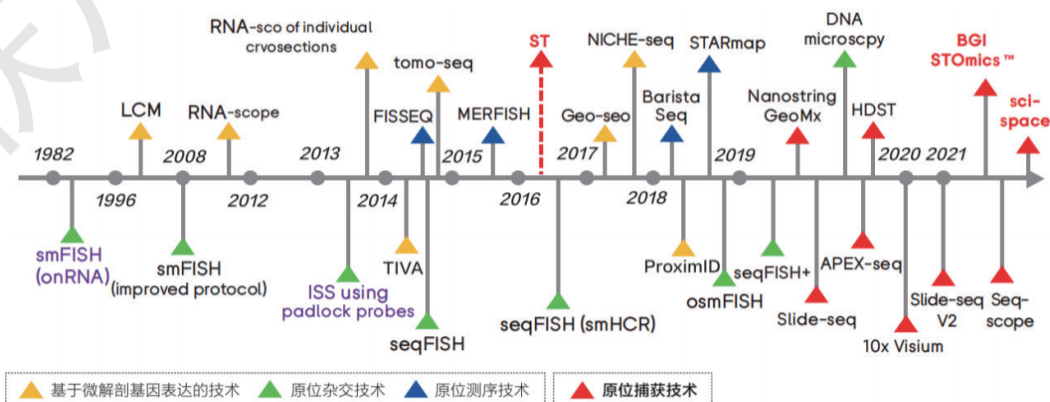
由于单细胞测序在组织解离的过程中，将组织消化成单细胞悬液，这个过程单个细胞中RNA表达在空间上的信息已经丢失。在后期，科研人员仍需重新在研究的组织上利用RNA FISH探针或免疫组化的方式进行验证。空间转录组技术能够利用将带有 oligodT 磁珠的反转录引物直接附着在组织切片表面，继而使得后期获取RNA在组织某个部位表达成为可能。

在诸如传统的单细胞转录组测序已经无法满足研究人员对大规模RNA在组织部位表达进行解析的需求下，空间转录组应运而生。通过空间转录组技术可获取组织中具体位置的转录信息，为研究和诊断提供有效数据支撑。



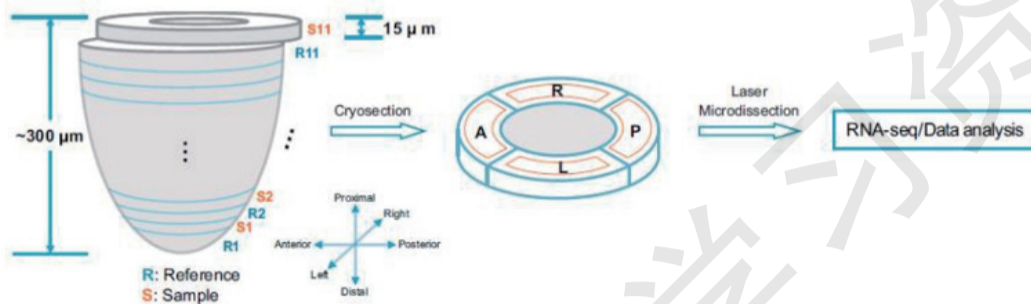
## 2.2 空间技术的发展历程

空间组学技术依据通量主要分为两类，低通量包括微解剖基因表达技术、原位杂交技术和原位测序技术，高通量为基于空间条形码的技术，包括 Nanostring、10x Visium、Slide-seq、STOmics、Seq-scope、sci-Space。下图是空间技术的发展历程：



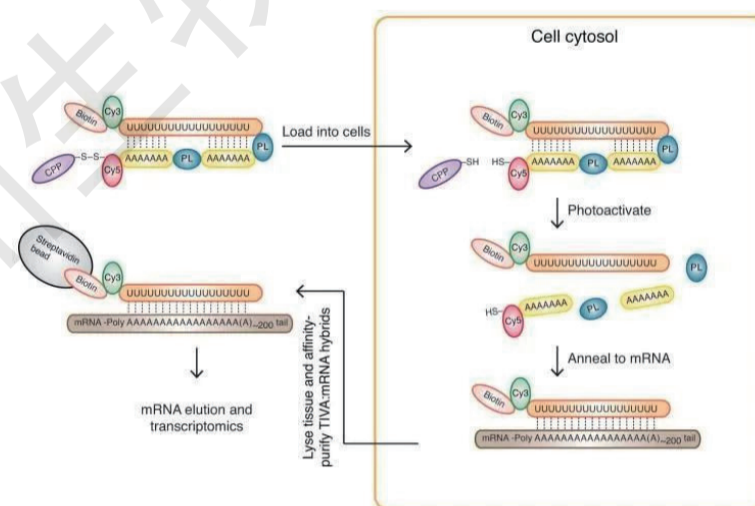
## (1) 微解剖基因表达技术

这种方法的代表技术是基于激光捕获显微切割 (LCM, laser capture microdissection) 的 Geo-seq 技术, 由中科院上海生化与细胞所景乃禾课题组于 2017 年开发并发表在《Nature Protocols》。Geo-seq 建立在 LCM 和单细胞 RNA-seq 技术上, 将这两种技术结合起来, 分析小到 10 个单细胞组织区域的转录组。Geo-seq 简要工作流程是: 收集到的样本使用 OCT 包埋, 然后进行冷冻切片和染色。利用 LCM 收集目标细胞 (保持 LCM 样品的 RNA 质量是至关重要), 然后裂解细胞 (scRNA-seq 使用的温和裂解缓冲液调整以适应复杂的 LCM 样品) 进行 RT 并使用改良的 Smart2-seq 协议来扩增 cDNA, 质控合格的 cDNA 进行文库构建。



Geo-seq 流程

另一种代表技术是 2014 年发表在《Nature Methods》上的 TIVA (transcriptome in vivo analysis) tag 技术。TIVA 是一项能够实现活细胞空间转录组学的技术。它通过细胞穿透肽, 将一个光激活的生物素标签引入活细胞中。通过对选定的区域或单细胞进行光激活, poly(U) 序列暴露出来, 并与细胞 mRNA 的 poly-A 尾退火。之后利用链霉亲和素与标签上的生物素相结合, 可以收集捕获的 mRNA, 进一步用于 RNA-seq。虽然它可以应用于活体组织, 但它的主要限制是其通量低, 一次只能分析少数单个细胞。此外, 对活组织的应用限制了它在模型系统分析中的应用。

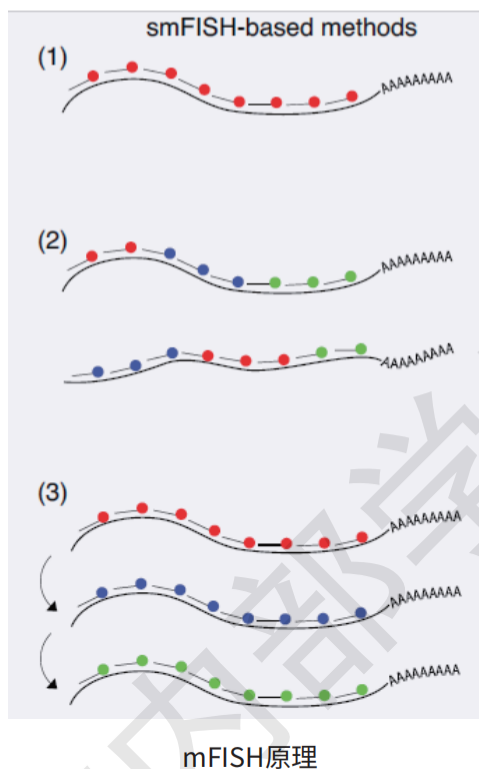


TIVA 原理



## (2) 原位杂交技术

代表技术如单分子荧光原位杂交(smFISH, single molecule fluorescence in situ hybridization)方法, 通过利用多个短的、20 bp长的低聚核苷酸探针库(每个探针通常用一个荧光团标记), 实现转录本原位定量。通过这些荧光探针在目标RNA上的特异性积累, 荧光显微镜可以将单个转录本视为衍射受限点, 获得目标转录本的原位信息和定量信息。

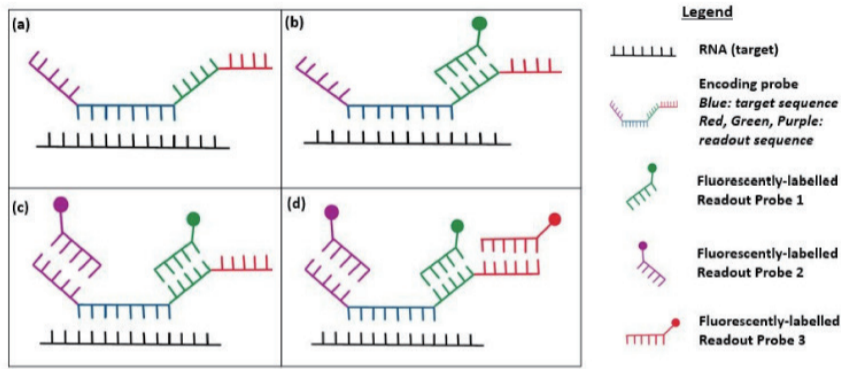


seqFISH是一种多路smFISH方法, 通过连续几轮杂交、成像和探针剥离, 多次检测单个转录本。然而, 杂交轮数的增加需要增加smFISH探针的数量, 这使得seqFISH既昂贵又耗时。

2011年, Advanced Cell Diagnostics推出了商业化的RNAscope芯片。该检测的核心是探针设计, 两个相邻的 "Z-probes" 与目标RNA转录物结合, 形成所需的结合位点, 供后续的放大分子杂交使用。2019年7月, 同时检测RNA靶点的最大数量增加到12个。低倍数RNAscope还与成像质粒细胞仪(IMC)相结合, 用金属标签代替荧光团对DNA进行杂交。随后, 将金属结合的抗体添加到同一组织切片, 并进行金属丰度的质细胞测量, 允许同时进行RNA和蛋白质评估。

## (3) 原位测序技术

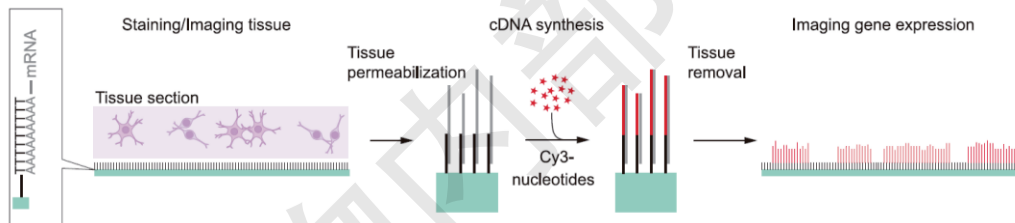
MERFISH (multiplexed error-robust fluorescence in situ hybridization) 是由smFISH改良而来, 由哈佛大学庄小威课题组推出, 采用基于条形码的组合标记方法进行多轮杂交, 以确保高水平的荧光信号亮度, 同时可以检测到的大量RNA, 能够在单个细胞中鉴定数千种RNA的拷贝数和空间定位。他们使用组合标签、连续成像等技术来提高检测通量, 还通过error-robust编码方案, 来抵消单分子标记和检测错误。



MERFISH技术原理

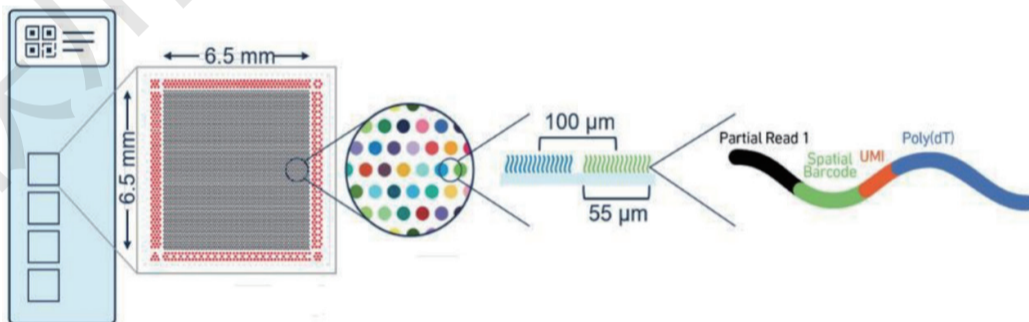
#### (4)空间条形码高通量技术

典型技术是2016年由瑞典卡罗琳斯卡研究所学者发表在《Science》上的ST (Spatial Transcriptomics) 技术, 并且在同年研究人员成立了Spatial公司。ST技术的主要原理是将H&E染色后的冰冻组织切片覆盖在芯片上并成像, 芯片上分布大量spot(每个spot含有数百万条探针), 组织透化后释放出的mRNA被芯片上的捕获探针捕获并标记, 然后经过RT、cDNA扩增和文库构后高通量测序, 最后将数据回归到组织中实现整体组织的全局检测。这种方式能最大程度地保留空间信息, 又能最大限度检测转录信息。



ST技术原理

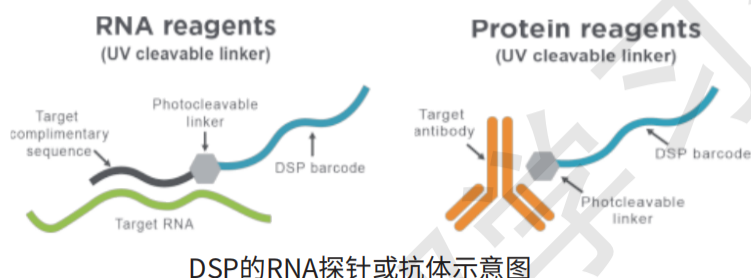
该技术目前标准的分辨率为 $100\mu\text{m}$ ,也就是在一个spot内有几十个细胞。2018年,10x Genomics在意识到空间转录组学的巨大潜力后迅速收购了Spatial公司对技术进行了优化, 在2019年11月正式推出空间转录组学产品Visium。Visium使用的芯片上每个spot的直径缩小为 $55\mu\text{m}$ , 一般要求的切片厚度是 $10\text{-}20\mu\text{m}$ ,因此分辨率可以达到1-10个细胞。



10x Visium芯片示意图

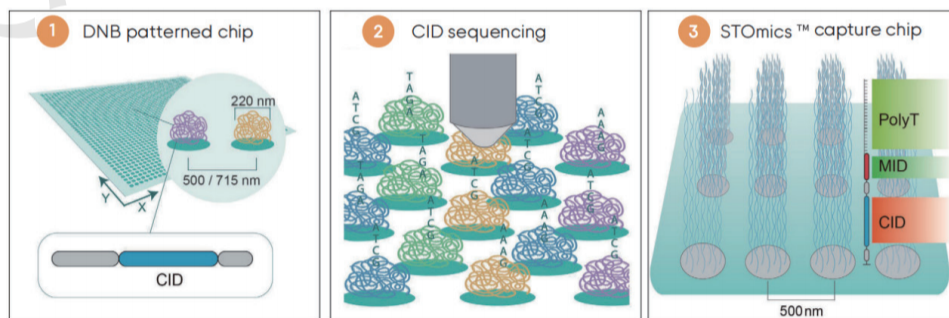
另一种技术是NanoString开发的数字空间分析技术DSP (GeoMx Digital Spatial Profiler) 平台, 通过将组织病理学、免疫学与分子技术相结合获得多个特定目标区域中多组学靶标信息, 实现对冰冻组织或石蜡组织切片上蛋白和基因信息的原位检测。DSP技术允许在切片中选择ROI (region of interest) 区域, 研究者可预先挑选自己感兴趣的区域, 再进行后续的研究, 这样一个偏向于研究者主观意愿的描述也昭示了DSP技术极强的靶向性。

DSP技术mRNA探针主要包括:1) 探针序列, 使探针可以与目标mRNA进行互补结合;2) 索引序列, 包含正向和反向PCR引物结合位点, 用于NGS建库过程中的序列扩增和接头连接, 14nt UMI序列用于丰度定量, 12nt probe ID用于鉴定基因;3) UV连接点, 连接探针序列和索引序列, 并可在紫外照射的情况下断开, 释放索引序列。对于蛋白的定量, 则是将探针序列替换为抗体, 通过抗体识别和靶向蛋白, 再通过索引序列来完成定量。正是这种依赖探针的方式降低了对mRNA完整度的需求, 使DSP技术可以兼容冰冻包埋样本和石蜡包埋样本。



此外, 华大自主研发的STOmics™时空转录组, 基于DNA纳米球技术(DNANano Ball, DNB), 号称可以实现同一样本在组织、细胞、亚细胞、分子“四尺度”同时进行空间转录组分析。该技术通过时空芯片捕获组织中的mRNA, 并通过空间条形码(Coordinate ID, CID)还原回空间位置, 实现组织原位测序。

该技术原理是将数十亿含有随机条形码序列 (CID, 用于区分不同DNB) 的单链线球状DNA纳米球 (DNB) 沉积到经光刻蚀刻的经修饰的芯片上。通过华大DNBSEQ技术对固定在芯片上的DNB进行测序, 得到CID序列构成, 构建CID与DNB坐标位置的一一对应关系。通过与CID杂交, 在每个DNB链接分子编码 (Molecular ID, MID用于区分不同转录本) 和含有寡核苷酸的 PolyT 序列。下一步通过将新鲜氮气冷冻组织切片加载到芯片表面, 然后进行固定、渗透捕获组织切片中的 mRNA, 最后进行逆转录和扩增。收集扩增后的cDNA作为制备文库的模板, 与CID一起进行测序。对测序数据进行计算分析, 可以实现空间分辨的转录组学研究, 其分辨率为220nm (spot直径220nm, 两个DNB中心点间距为500nm), 标准 1\*1 cm芯片上包含4亿个DNB。



STOmics™技术原理



从物种上看，空间转录组的研究对象主要集中于动物，尤其是人和小鼠身上，得益于医学研究的重要性及小鼠作为模式生物的特殊地位。动物研究对象还包括其他哺乳动物如猪，以及鸟类。从组织类型上看，也呈现了多样性的特点。已经涵盖了诸如大脑、心脏、肾脏、乳腺、胰脏及肝脏等器官组织，体现了空间转录组技术在动物组织分析上的普适性。详见：空间转录组五年回望：文献小结 | 空间转录组专题。

植物领域仅在早期有拟南芥花序、杨树叶芽及冷杉雌球果的研究报告，主要原因是植物细胞中的特殊结构（液泡及细胞壁）导致冷冻切片过程中较难获得高质量的切片，且相对动物细胞，木质化程度较高的植物细胞RNA更难透化。但对于普通组织如叶片，并不存在较难的技术瓶颈。近期在bioRxiv上就刊登了来自耶鲁大学的研究人员利用Visium平台在空间层面

上分析马齿苋叶片光合代谢途径的研究论文。随着技术的不断发展，未来植物空间转录组的应用潜力值得期待！

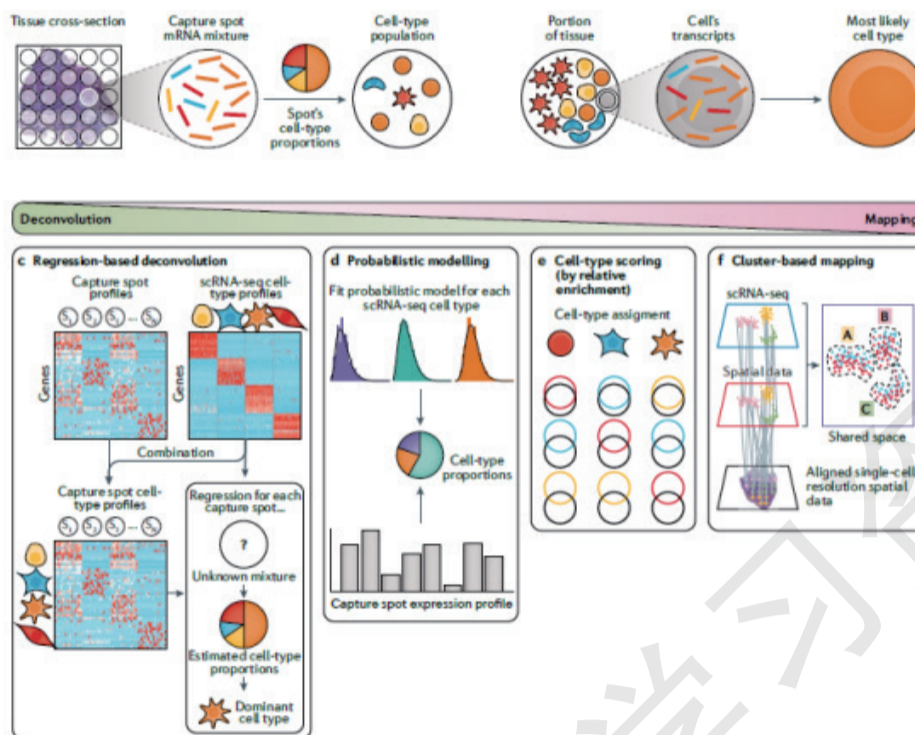
对于具体的应用领域，癌症研究、神经生物学、发育生物学以及免疫学是最常见的研究方向。肿瘤微环境，神经系统的复杂性，器官发育过程中细胞位置与细胞命运的关系，免疫相关细胞的浸润状况，体现了空间信息在这些研究领域的重要性，决定了空间转录组技术是解决这些研究领域关键问题的重要工具。

## 2.3 空间转录组&单细胞联合应用

由于空间转录组的分辨率仍不能达到单细胞程度，一些研究人员将空间转录组技术与单细胞技术结合，并开发出了一系列单细胞转录组结合空间转录组的联合分析方法，如多模式相交分析 (Multimodal Intersection Analysis)，基于seurat的打分方法 (seurat AddModuleScore) 等。目前的整合方法大体可以分成两种主要方法，即反卷积 (deconvolution) 和映射 (mapping)。

反卷积方法根据单细胞数据，从单个ST spot中转录的mRNA混合物分离出离散的细胞亚型。实现反卷积主要有两种思路，一是推断一个特定ST spot中的细胞亚型比例，二是对一个特定的ST spot进行打分已确定其与单个细胞亚型的对应程度。基于推断方式的反卷积方法需要估计每个细胞类型在特定捕获点的比例，常用的方法是采用基于统计回归的模型。而打分方法则往往基于贝叶斯统计框架，将概率分布于单细胞数据的基因技术分布相结合，评估细胞类型检测的准确性、敏感性、特异性以及整体相关性。目前，单细胞转录组与基于spatial barcoding的空间转录联合分析多采用反卷积的方法。

映射的基本思路是以单细胞分辨率创建空间分辨率的细胞类型映射，主要见于单细胞转录组与基于原位技术的空间转录组 (High-plex RNA imaging, HPRI) 联合分析。映射分析首先需要将指定的基于单细胞转录组的细胞亚型定位到HPRI图谱上的每个细胞，常见的算法是首先将细胞聚类集成到低维空间中，通过对聚类的群体检测得到细胞类型，之后将每个单细胞定位到组织特定的生态位或区域划分。



单细胞-空间转录组联合分析的两种方法:反卷积与映射

## 2.4 FFPE空间转录组

在疾病病理检测中,FFPE 标本成为重要的资源,有助于研究人员发现疾病病理形态、分子变化,进而辅助诊断和治疗。FFPE切片可以检测疾病的可视化特征,可以与有价值的临床数据关联起来,如患者信息记录、使用的药物,甚至临床预后结果等。FFPE技术凭借着保存时间长、可关联临床及多组学数据等诸多优点,是医学病理和机制研究、药物发现和回顾性研究的宝贵资源。

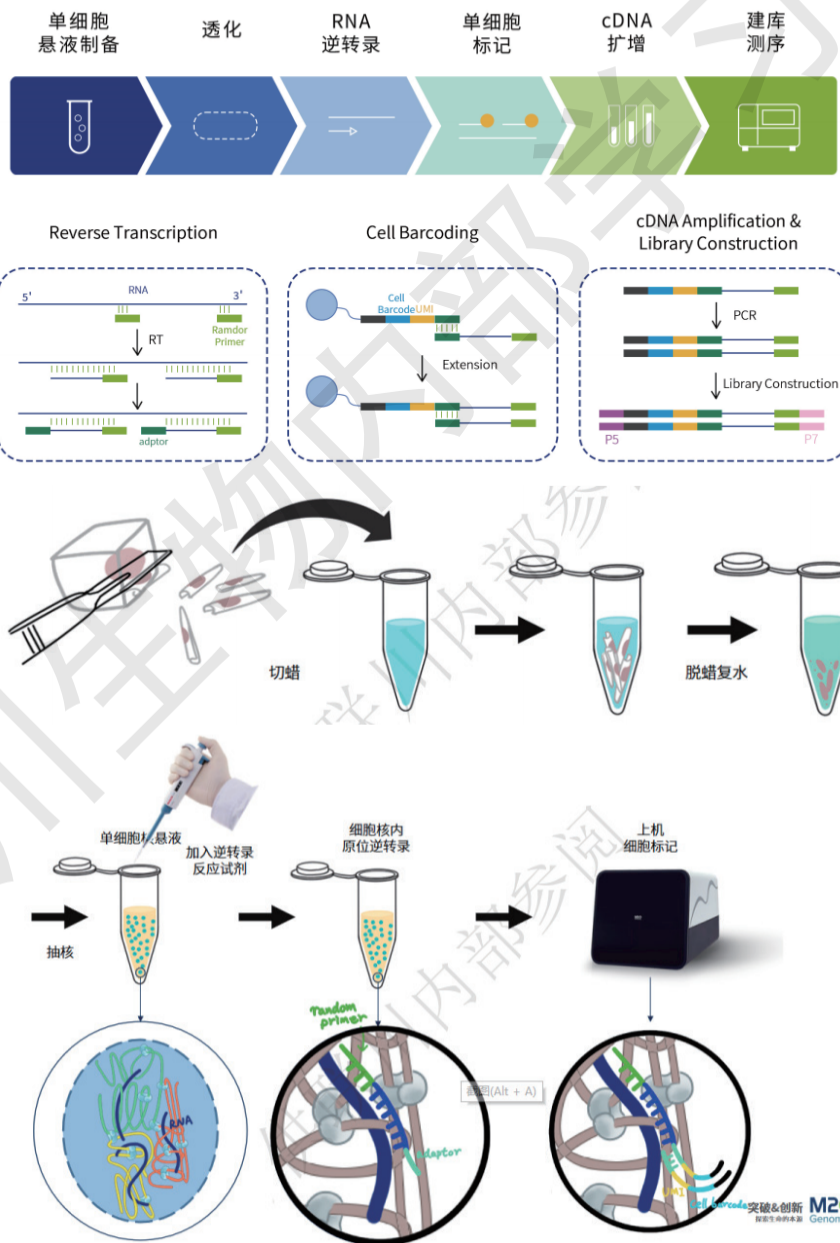
空间转录组测序不断突破技术壁垒,Visium FFPE就是其中之一,将组织学技术的优势与RNA测序的高通量和发现能力融入FFPE组织样本中。FFPE空间转录组的技术升级,将极大拓宽病理学研究的应用范围!在大量的临床研究中,尤其是对于病程长,预后不确定的疾病,如肿瘤,往往会使用FFPE样本进行验证,或开展回顾性研究。

# FFPE样本单细胞和空间转录组技术原理

## 一、FFPE样本单细胞技术原理

FFPE样本均存在RNA降解情况，经典的mRNA降解通用模型中，Poly(A)尾变短（即脱腺苷化）时，poly(A)结合蛋白PABPC从mRNA上释放下来，mRNA随即被降解。而传统单细胞技术基于PolyA进行RNA捕获，因此只能进行新鲜组织检测，对FFPE等固定样本检测效果较差。

M20 Seq技术基于随机引物原理，即使RNA分子有一定程度降解，没有poly(A)结构，仍可捕获RNA分子后进行细胞标记，在VITA平台上实现FFPE样本的单细胞转录组测序。





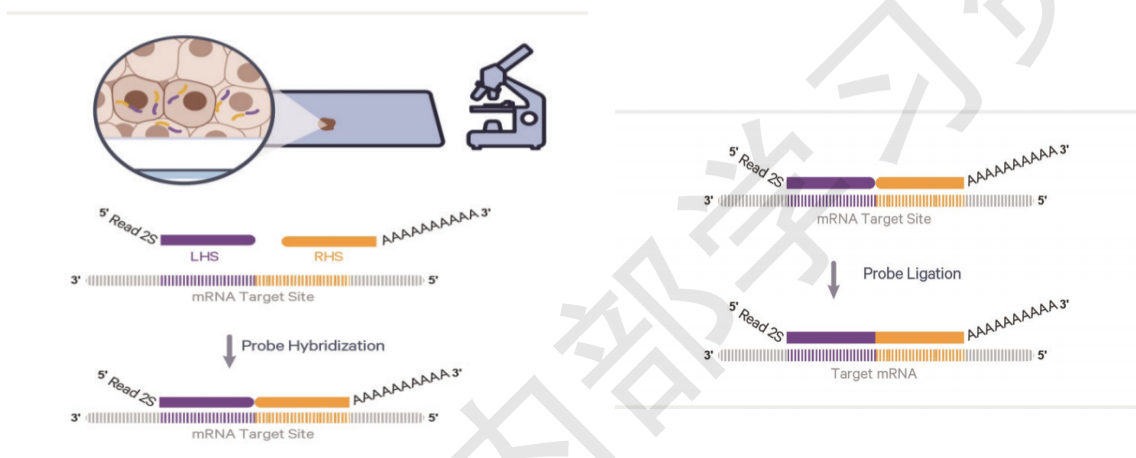
## 二、FFPE样本空间转录组技术原理

**1、样本准备:**将FFPE组织切片放置在Visium基因表达玻片上,并进行组织学成像(通过H&E染色获得形态背景);

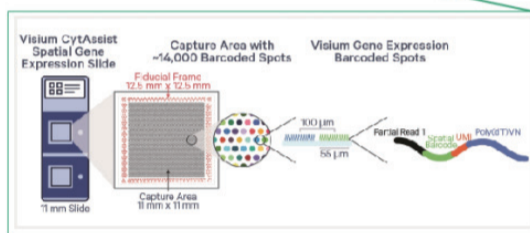
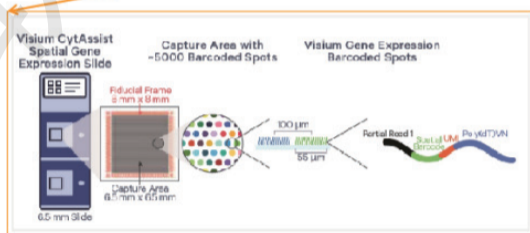
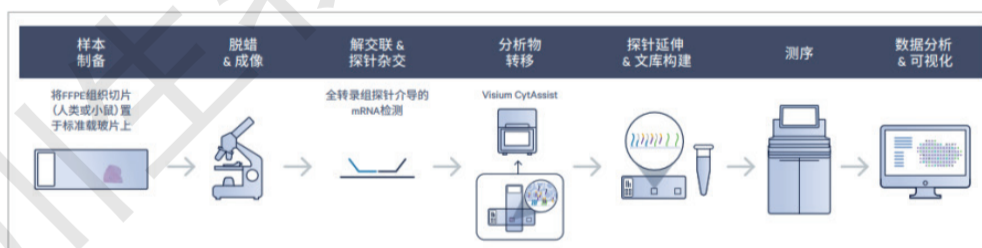
**2、探针杂交:**Visium FFPE 玻片上的每个捕获区都有一个阵列,其中含有与RNA结合的捕获探针(RTL)。RTL有两段组成分别是LHS(左端探针)和RHS(右端探针)。左端探针有read 2结构,右端探针有polyA结构。探针杂交后,mRNA的两段连续探针只有同时被杂交之后才会进行连接,若只有其中一段被捕获,则无法进行建库,显著降低假阳性结果,RTL探针组确保了高特异性和高灵敏度;

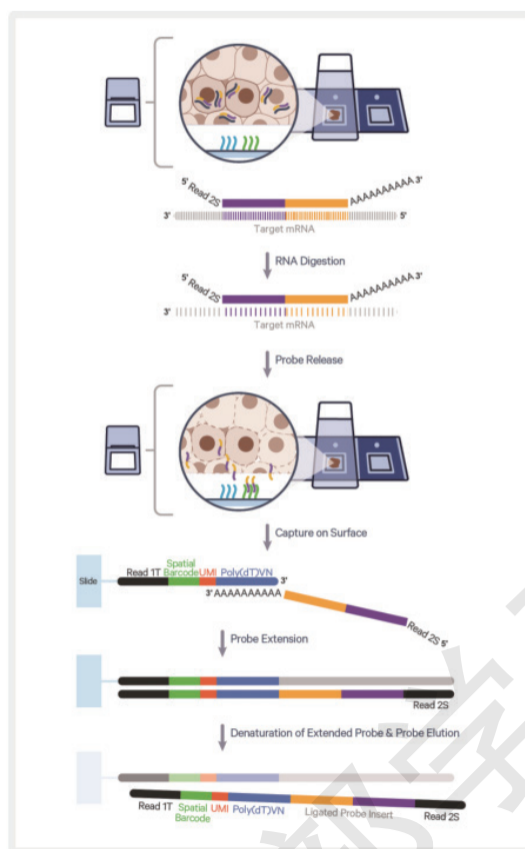
左端探针 (LHS):Read 2S(提供扩增引物的结合位点) + 与mRNA互补配对序列

右端探针 (RHS):PolyA(与捕获序列的poly(dT)结合) + 与mRNA互补配对的序列



**3、组织透化及文库构建:**对组织进行透化处理,以释放连接的探针对,使其与玻片上的捕获探针(UMI和Barcode)杂交,从而实现基因表达信息的捕获,从而制备测序文库;





4、**数据可视化:**通过特有的分析软件将空间层面的基因表达结果和形态学的结果结合在一起，进行可视化展示；

标准的Visium FFPE流程

1 样本制备	2 脱蜡 & 染色/成像		3 探针杂交		4 透化 & 探针释放	5 探针延伸 & 转移到收集管	6 文库构建
将FFPE组织切片 (人类或小鼠) 置于Visium玻片上	脱蜡	IF 或 H&E	解交联	全转录组探针介导的mRNA 检测	RNA消化、探针释放和捕获	探针延伸、洗脱和qPCR	SI-PCR、纯化和质检
	-1.5 h	>1 h	-15 h	过夜	-2 h	-2 h	-2 h

Visium CytAssist的FFPE流程

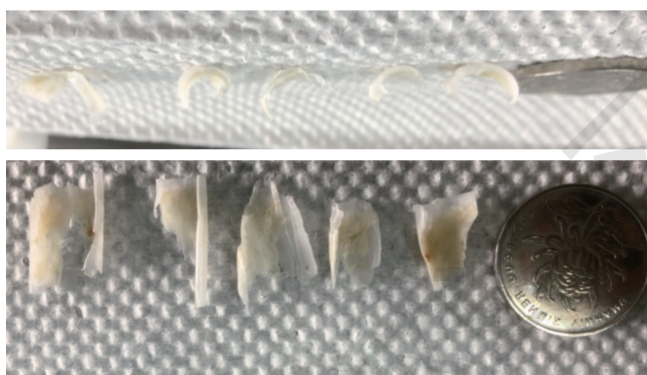
1 样本制备	2 脱蜡 & 染色/成像		3 探针杂交		4 透化 & 探针释放	5 探针延伸 & 转移到收集管	6 文库构建
将FFPE组织切片 (人类或小鼠) 置于标准载玻片上	脱蜡	IF 或 H&E	解交联	全转录组探针介导的mRNA 检测	① 将标准载玻片和Visium玻片放入仪器中 ② 明场图像捕获 ③ RNA消化、探针释放和捕获	探针延伸、洗脱和qPCR	SI-PCR、纯化和质检
	-1.5 h	>1 h	-15 h	过夜	-1 h	-2 h	-2 h

标准的Visium FFPE流程 VS Visium CytAssist的FFPE流程

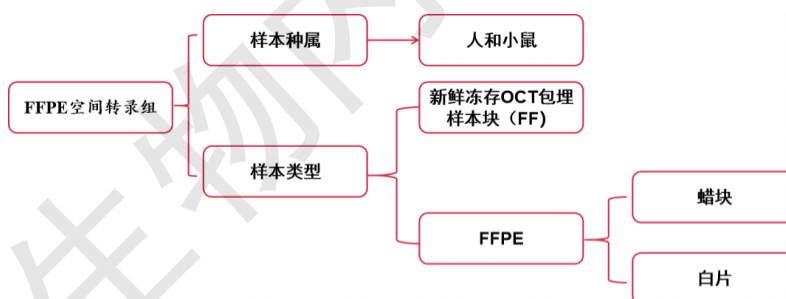
## FFPE样本单细胞和空间转录组的样本要求、储存及运输条件

### 一、FFPE样本单细胞样本要求、储存及运输条件

被包埋组织体积需 $>0.5\text{cm}^3$  (参考黄豆粒大小), 如不方便提供蜡块, 可切石蜡卷5-6卷, 每卷厚度 $\sim 50\mu\text{m}$ , 切片太薄容易导致细胞数量少, 并且有可能使细胞核破碎。样本细胞数量少可以提供多一些石蜡卷。将石蜡卷放入1.5 mL EP管中, 常温运输。



### 二、FFPE样本空间转录组样本要求、储存及运输条件



#### 2.1 异戊烷-液氮速冻OCT包埋法

##### 组织大小:

Visium 空间转录组表达芯片的捕获面积为  $6.5\text{mm} \times 6.5\text{mm} / 11\text{mm} \times 11\text{mm}$ , 应选择最佳的取材位置和组织大小。

##### 组织预处理:

新鲜组织样本取下后迅速用预冷的PBS溶液或生理盐水进行冲洗, 去除组织表面残留, 然后用干净的吸水纸吸干组织表面液体。如有液体残留, OCT包埋后, 组织表面形成冰晶, 影响切片效果; 若过度吸干, 则会引起组织脱水, 影响组织形态。(建议冰上操作)



## 组织冰冻：

提前将所需要使用的器材在干冰上预冷至少30min。金属烧杯中加入约三分之二的异戊烷，然后放入液氮容器(液氮液面与异戊烷液面相平)中,使其充分接触,孵育约15分钟；

用预冷的细胞铲(实验刮刀)将新鲜组织浸没在异戊烷中,速冻约1min至组织完全冷冻；

组织冷冻后放入密封冻存管内并放置在干冰上待OCT包埋，若不能马上进行包埋可将组织于-80℃下保存。采用异戊烷而不是液氮的原因是液氮的沸点低，组织直接放入液氮后会沸腾，在组织周围产生气穴,导致组织降温过程中不同区域降温不同,改变组织内部形态甚至碎裂,影响组织形态。

## OCT包埋：

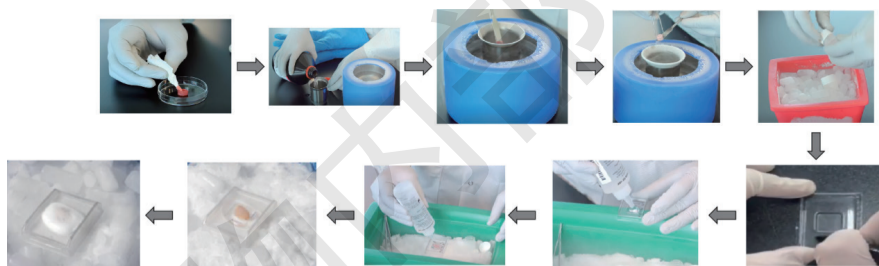
取一个适当大小的冷冻模具,在加入OCT和组织之前,对冷冻模具进行组织方向的标记；

冷冻模具内注入预冷的OCT,OCT的量要完全覆盖模具底层且不能有气泡；

使用预冷镊子,将冷冻的组织放入OCT中,可适当调整组织的位置,用OCT覆盖暴露的组织表面。确认没有气泡,特别是组织附近不能有气泡；

立即将含有组织和OCT的冷冻模具放在干冰上；

OCT完全冻结,将OCT包埋的组织块放入干冰上待切片,或密封保存于-80℃。



Tips: 不密封保存会使组织脱水或损伤

## 2.2 新鲜包埋异戊烷-液氮速冻法

组织大小:同上

组织预处理:同上

### 组织包埋：

将组织用OCT进行覆盖,确保组织表面没有气泡；

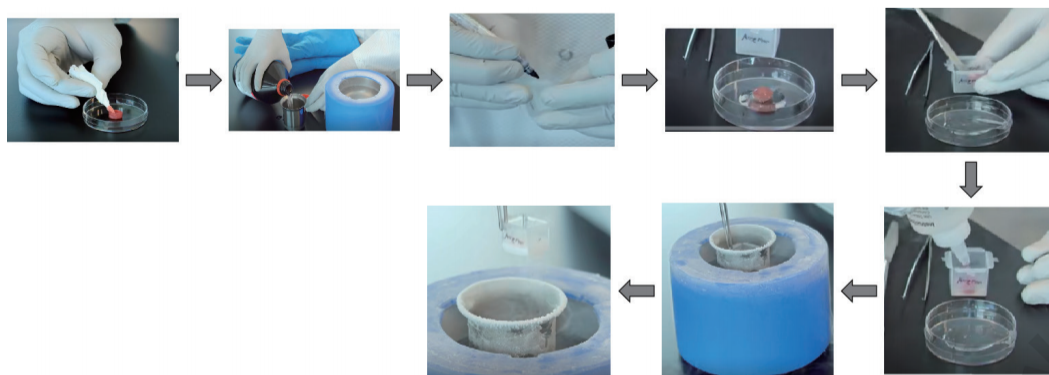
取一个适当大小的冷冻模具,在加入OCT和组织之前,对冷冻模具进行组织方向的标记；

用细胞刮刀小心将包裹OCT的组织放入冷冻模具内；

模具内填充OCT,确保组织全部覆盖且组织附近不能有气泡；

用镊子将模具放入已孵育的异戊烷中,但不能完全浸没；

OCT完全冻结,将OCT包埋的组织块放于干冰上待切片,或密封储存在-80℃中。



## 2.3 新鲜组织包埋干冰速冻法

组织大小:同上

组织预处理:同上

组织包埋:

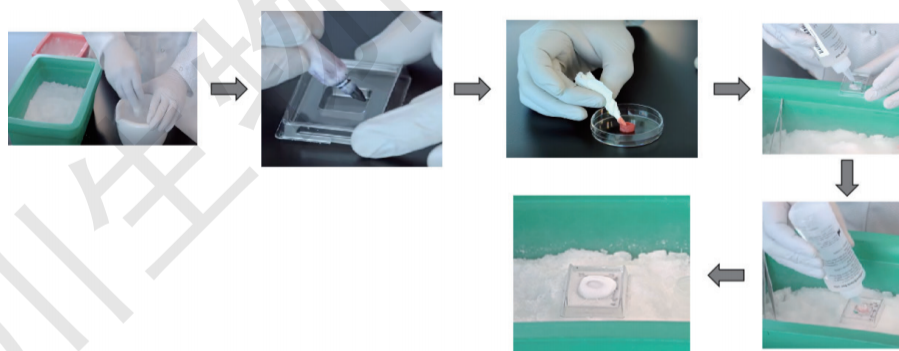
取一个适当大小的包埋盒,在加入OCT和组织之前,对包埋盒进行组织方向的标记;

包埋盒内注入预冷的OCT,OCT的量要完全覆盖模具底层且不能有气泡;

使用预冷细胞铲,将组织放入OCT中,可适当调整组织的位置,用OCT覆盖暴露的组织表面。确认没有气泡,特别是组织附近不能有气泡;

立即将含有组织和OCT的包埋盒放在干冰上;

OCT完全冻结,将OCT包埋的组织块放入干冰上待切片,或密封保存于-80°C。

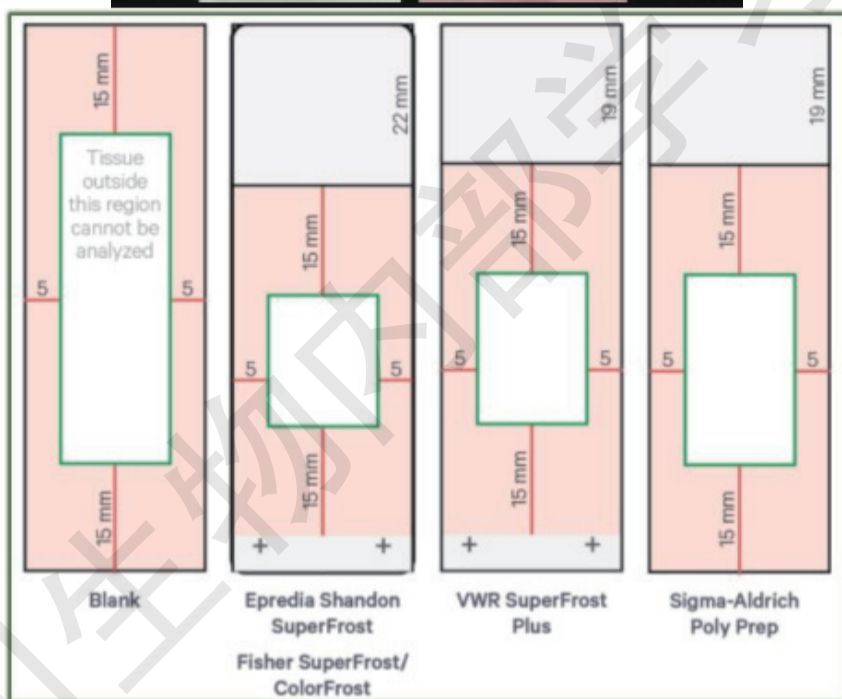


## 2.4 甲醛固定石蜡包埋组织(FFPE)--蜡块

甲醛固定石蜡包埋组织(FFPE)--白片玻片要求:首选10x官方推荐品牌;国产世泰(防脱组化片),玻片厚度1mm。

切片厚度:推荐5 $\mu$ m/片;10x内部测试3-10 $\mu$ m贴片位置:见下图

切片数量:手术组织(一般面积不小于0.5cm\*0.5cm),不少于5片(以5 $\mu$ m/片计);穿刺组织,不少于10片。



Slide Brand and Name	Item Part Number	Length(mm)	Width(mm)	Thickness(mm)
EpreDia Shandon Colorfrost Plus Slides	6776214	75	25	1
Fisher SuperFrost Slides	12-544-7	75	25	1
Sigma-Aldrich Poly-Prep Slides	P0425-72EA	75	25	1
VWR SuperFrost Plus Slides	48311-703	75	25	1

# FFPE单细胞和空间转录组技术优势

## 一、FFPE单细胞技术优势

**(1) 全长转录组测序:**单细胞全长RNA测序可实现对基因突变、基因融合、拷贝数变异、非编码RNA、可变剪接等的研究,这将为研究和检测癌症等基因突变疾病带来全新的分析技术和工具化产品。

**(2) 全物种:**无论是细菌等原核生物细胞,还是人类、动物、植物等真核生物细胞,都可以通过M20 Seq进行测序。

**(3) 全样本类型:**不仅可用于新鲜组织、冻存组织,还可以完美解决FFPE样本难以进行单细胞转录组测序的难题,使研究不再受限于样本类型、时间、地域,更适合实验室中心化检测模式。

**(4) 高灵敏度:**M20 Seq大幅度提高了单细胞测序的基因检出数。以新鲜组织、冻存组织和FFPE样本为例,单个细胞的中位基因检出数分别可达到5000、3500和2500,并且展现出巨大的可优化潜力。

**(5) 超高通量:**细胞捕获数大幅提高,最高可达到百万级,是现有单细胞测序技术通量的百倍以上。

跨平台兼容性:在液滴与微孔技术平台均能获得优异的检测效果。



目前M20平台已对临床实测招募几十种不同组织类型样本进行检测,肺、肝、心、脑、乳腺组织等项目经验较为丰富。以下展示了M20 Seq实测数据情况:

物种	人	人	人	人	人	人	人	人	小鼠
FFPE组织类型	肝癌	肝癌	肝癌	乳腺癌	肺癌	肺癌	鼻咽癌	鼻咽癌	肝
保存时间(年)	1	1	2	1	3	1	1	1	1
测序数据量(G)	44.5	61.6	55.8	103.2	78.8	109.5	150.5	162	166.2
细胞数	4868	8499	995	5568	7107	5682	4436	20341	1003
基因中位数	2102	1975	5090	2424	853	2053	1785	1594	7244
基因总数	40057	43529	38165	43972	39514	40524	49248	44005	36799



## 二、FFPE空间转录组技术优势

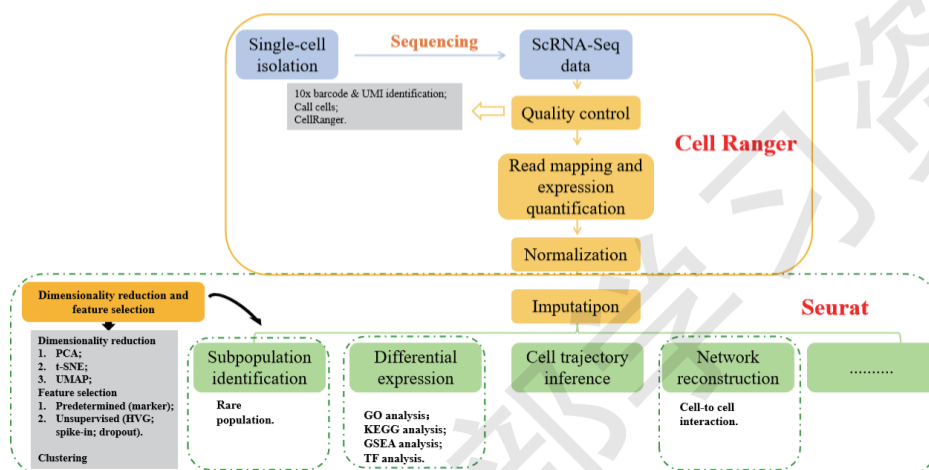
- 将转录组和蛋白质组分析物从标准载玻片自动转移到Visium玻片的捕获区域,简化样本处理;
- 无需在Visium玻片上直接切片,将样本兼容性扩展到贴有切片的载玻片;
- 通过标准的组织学技术预先筛选组织切片,选择出最有生物学意义的切片,从而最大限度地获得Visium实验的见解;
- 使用CytAssist专用玻片和试剂,每次运行可从最多两张FFPE组织切片中精确捕获分析物,而时间不到一小时;
- 人DV200的质控要求降为>30%,允许检测更多长期保存的高度降解的样本,样本兼容性更高;
- 新增加了大面积11mm \* 11mm捕获区域,捕获面积更大,可能性更多;
- 三对探针对捕获,基因检出效率大大增加;
- 更高的组织粘附性,无需进行复杂的预实验。



# FFPE单细胞和空间转录组分析流程

## 一、FFPE单细胞分析流程

### 1.1 FFPE单细胞测序的分析流程图



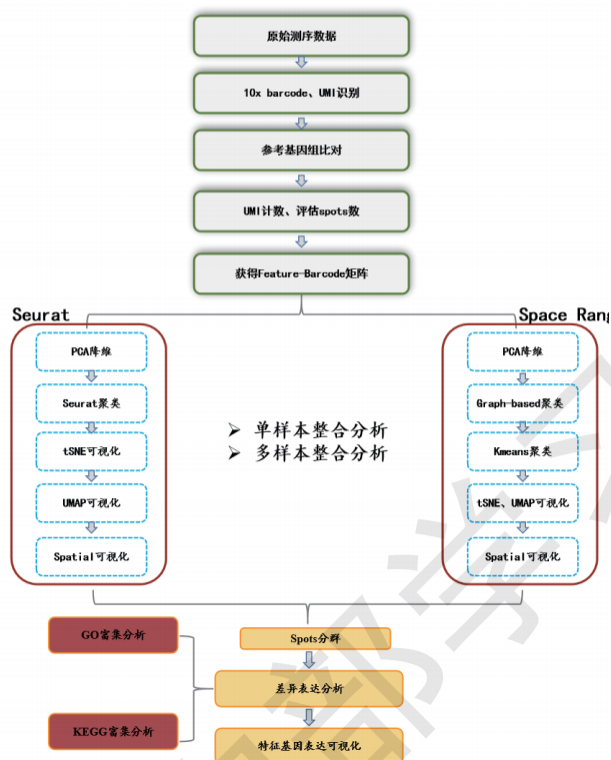
### 1.2 FFPE单细胞测序的数据分析内容

分析类别	分析内容
数据质控	整体质控 细胞基因数、UMI数、线粒体基因表达分布（过滤前、后） UMI数量与基因数量相关性分析 Top基因分布
细胞聚类及可视化	t-SNE聚类及可视化 UMAP聚类及可视化
样本/Cluster差异分析	细胞聚类差异分析 样本/Cluster间基因特异性分析
批次效应去除	去除因不同时间取样、上机等引入到干扰
细胞聚类定义	SingleR定义细胞类型 t-SNE聚类可视化细胞类型 UMAP聚类可视化细胞类型
Marker基因展示	Heatmap Column graph图 RidgePlot图 Dot plot图 Feature_plot图 violin图
拟时序分析	拟时序状态轨迹分析 细胞cluster状态轨迹分布分析 拟时序轨迹分布相关TOP100基因分析及可视化 拟时序轨迹分布特定基因分析及可视化
RNA速率 (RNA velocity)	估算RNA随时间变化的速率，作为预测因子预测细胞命运

分析类别	分析内容
细胞互作	基于表达相关性（聚类图、热图） 基于Scanpy 基于diffusion map 基于配体-受体互作
细胞周期分析	不同细胞Cluster细胞周期分布 细胞周期分布Feature_plot图
发育、分化阶段基因数量分布	拟合分析不同分化、发育阶段基因表达数量
单细胞-Bulk相关性分析	与Bulk RNA-seq联合分析
基因差异分析	差异基因火山图 样本基因表达MA图
功能富集分析	GO富集 KEGG富集 GSVA GSEA
基因互作	基因功能网络富集 基因-基因互作图
WGCNA	基因共表达模块分析
单细胞CNV分析	Sample/细胞cluster与Module相关性分析 分析肿瘤细胞基因组拷贝数变异

## 二、FFPE空间转录组分析流程

### 2.1 FFPE空间转录组的分析流程图



### 2.2 FFPE空间转录组的数据分析内容

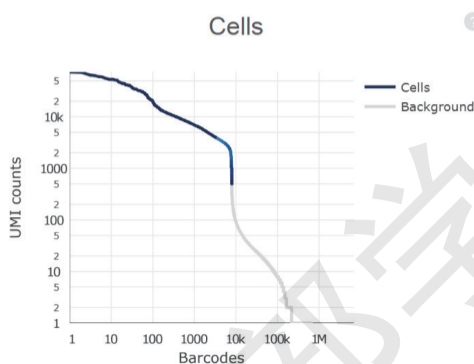
分类	分析内容
Space Ranger原始数据预处理及统计	单切片原始数据评估 单切片数据校正: cell barcode和UMI进行校正 参考基因组比对 有效细胞数过滤 单切片spot基因表达谱
空间转录组单切片分群及差异表达分析	单切片spot群体k-means聚类分析及可视化 单切片spot群体Graph-based聚类分析及可视化 获取每个亚群差异高表达的基因 每个亚群的Top20基因聚类分析 亚群的Top20基因表达热图
空间转录组单切片Seurat分群及差异表达分析	单切片spot聚类分析, 包含tSNE和UMAP结果 获取每个亚群差异高表达的基因 每个亚群的Top20基因聚类分析 亚群的Top20基因表达热图
基因注释分析	GO注释分析 KEGG注释分析 Disease注释分析 (仅限于人)
差异基因富集分析	GO富集分析 KEGG富集分析 Disease富集分析 (仅限于人) Reactome富集分析 GSEA富集分析
蛋白互作网络	蛋白互作网络
转录因子预测	转录因子预测

# FFPE单细胞和空间转录组结果展示

## 一、FFPE单细胞测序的数据分析

### 1.1 质控

M20对原始数据进行数据质量统计，并比对参考基因组，统计展示细胞捕获数、细胞基因检测中位数、有效数据率、测序饱和度、基因组 Mapping 率等信息。



### 1.2 细胞聚类及可视化

#### t-SNE

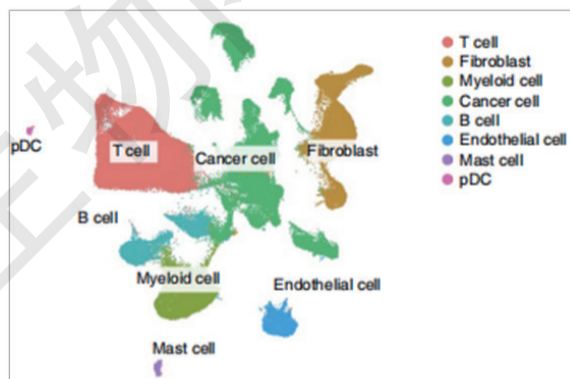
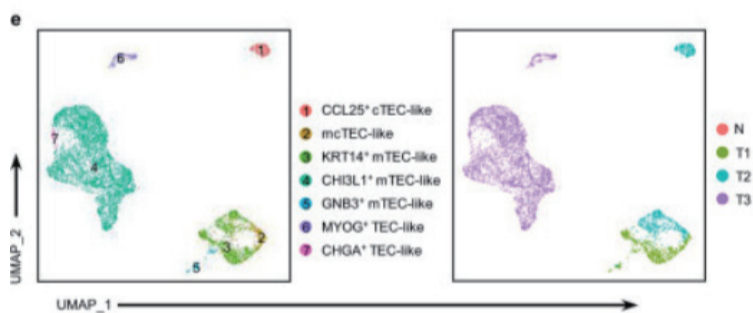


图 乳腺癌 t-SNE图谱

高通量单细胞测序数据的一个显著特点就是数据量较大，一次能反映的细胞数量多。因此，通过降维和可视化去展示细胞数据特征是一个非常重要的工作。单细胞降维的图形一般常用的是 t-SNE 和 UMAP。上图右是聚类分析后的 tSNE 分群展示，其中每一种颜色代表了 cluster 后鉴定到的一种细胞群，散点代表每一个细胞，图中的数字代表了该群的cluster 编号。从上图可以得知，一共分到了 23 个不同的细胞群。同理，我们也会给出当前单细胞分析降维展示的 UMAP 图（下图所示），各颜色和散点代表的含义与上图的 tsne图一致。上图左每一种一色代表一个样本。

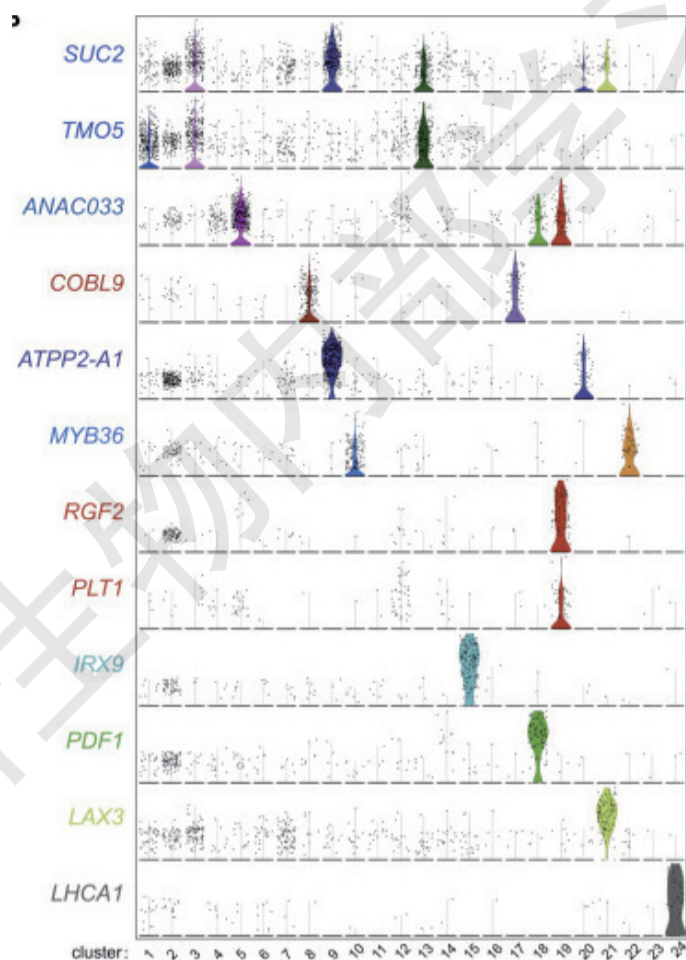


## UMAP



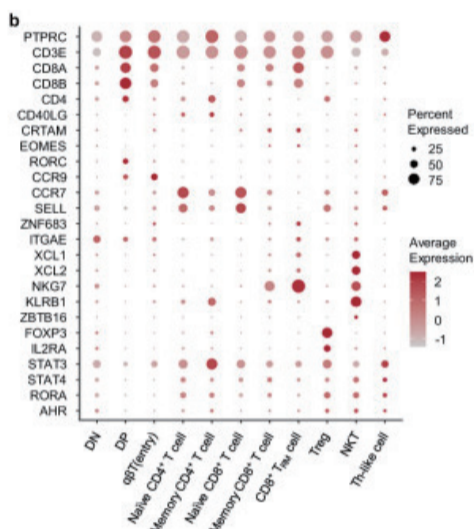
### 1.3 Marker 基因展示

#### Violin plot



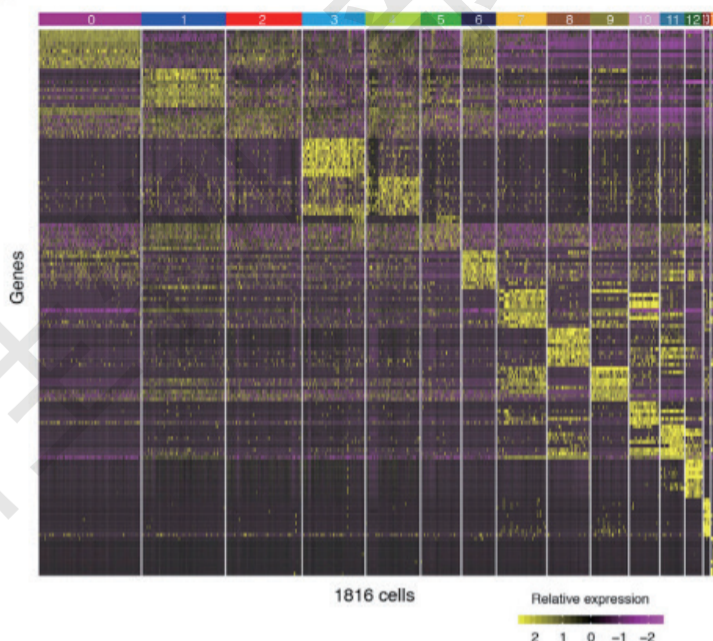
小提琴图可以反映亚群中各个细胞的标记基因表达量分布，也可以来衡量该基因作为某一个子群的 marker 基因的特异性。一般来说，比较好的 marker 基因的特异性都是比较好的，常用于细胞类型的验证。理论上最终挑选的 marker 基因要在其所属的细胞类型中的绝大多数细胞中都有较高的表达，而在其他细胞类群中只有少部分细胞有表达。X 轴是不同 cluster；Y 轴是基因的表达水平。

## Dot plot



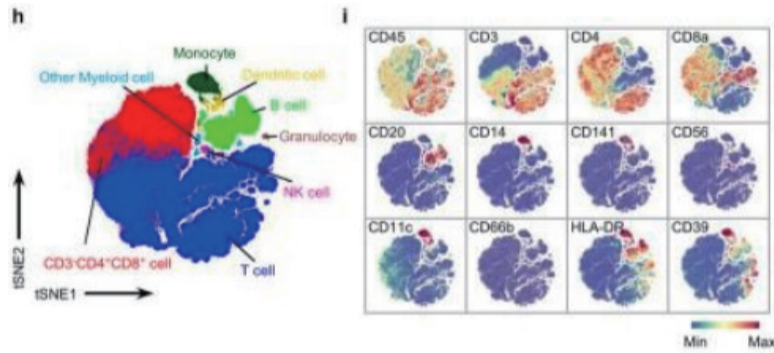
X轴是标记基因名称;Y轴是细胞 cluster 名称;气泡大小代表在某个 cluster 中表达标记基因的细胞数目占该 cluster 中所有细胞数目的比例,气泡越大则代表比例越高;气泡颜色代表标记基因在细胞亚群中的表达丰度均值,气泡颜色越深代表标记基因在该亚群中的平均表达量越高。

## 热图



热图综合反映基因表达水平、表达标记基因的细胞亚群的分布及细胞亚群中表达标记基因的细胞数量,是进行标记基因呈现的主要方式。上图展示了对细胞聚类分析后鉴定到的每一个分群进行差异基因鉴定,每个群选择特异的差异基因做的热图,y轴代表了每一个细胞,并且按照 cluster 的特定编号来排序的.x轴代表了差异基因。热图中的颜色代表了基因的表达水平,从紫色到黄色代表基因表达水平从低到高,顶部渐变色代表不同细胞。

## Feature\_plot

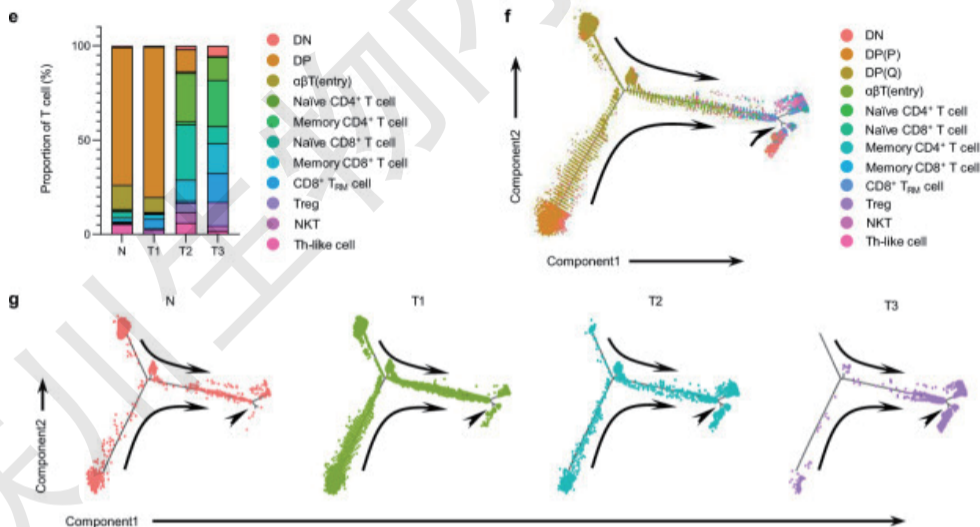


Feature\_plot 图展示特定基因在细胞聚类图 (t-SNE 或 UMAP) 中的分布,颜色深浅表示基因在细胞内的表达量高低。可通过 marker gene 的在某类细胞中的标记情况,进而来判断细胞的实际类型。并且,还可以查看在不同样本中的表达情况。

## 1.4 拟时序分析

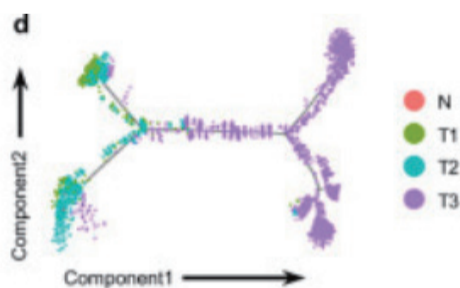
拟时间序列 (Pseudotime) 简称拟时序,它是一种测量细胞在一个生物学过程如细胞分化中进展程度的方法,它是对一个生物学过程的抽象,描述了一个细胞当前状态和时间轨迹的起始状态之间的最短路径的距离。

### 拟时序轨迹分析



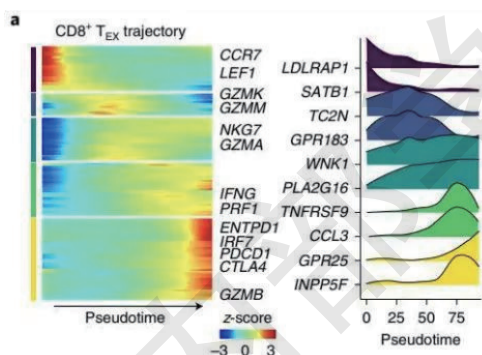
图中的每个点代表一个细胞,横纵坐标代表降维后的成分,具有相似细胞状态的细胞被聚到一起,每个分支点代表着一个可能的细胞生物学过程决策点(该图中有 2 个分支点)。不同的颜色代表了不同的细胞分化状态,可以结合各个区段的分化状态进而找到它们的共性,比如,共表达的特异性基因等。

### 细胞 cluster 状态轨迹分布分析



该图为按照细胞聚类信息进行颜色标注(如果您已经对每个 cluster 进行了细胞鉴定,也可以基于具体的细胞进行着色)。通过这样的方式,我们可以查看不同类型的细胞在轨迹结构上所处的分支位置,从而对细胞的分化等有一个推断。

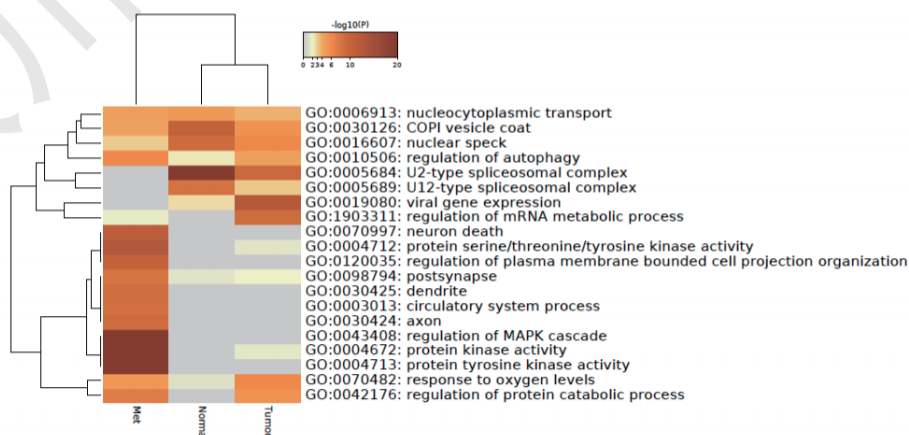
### 拟时序轨迹分布相关基因分析及可视化



确定了分化起点之后,拟时序分析软件可以模拟出每个细胞所处的分化时间,并一热图形式构建随着分化时间表达逐渐升高或降低的基因,该图展示了细胞状态分化相关的命运决定基因的表达情况,从蓝色到红色表示表达量从低到高。

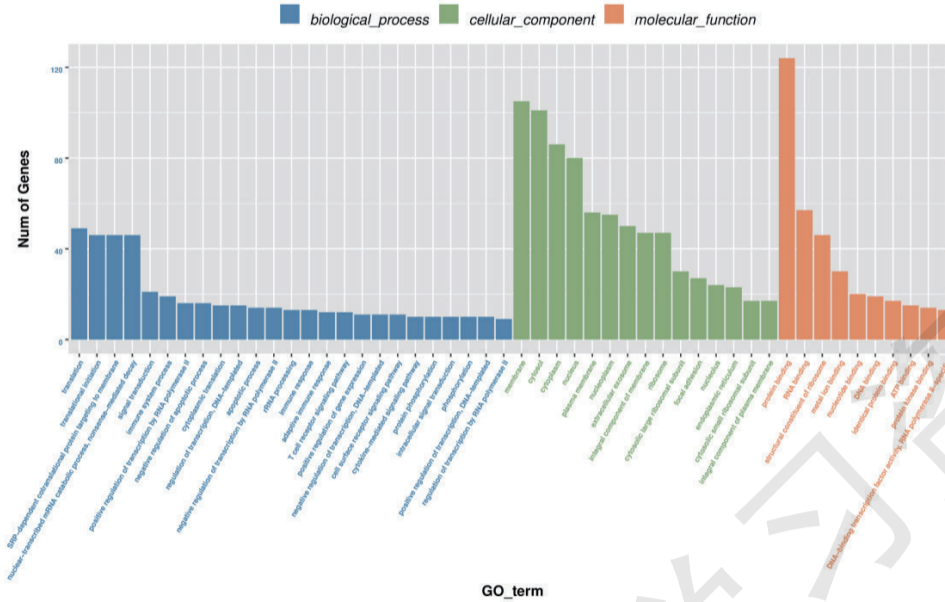
## 1.5 功能分析

### GO功能分析





纵坐标代表不同的 GO term, 横坐标是样本名, 颜色深浅表示 GO 的富集程度。

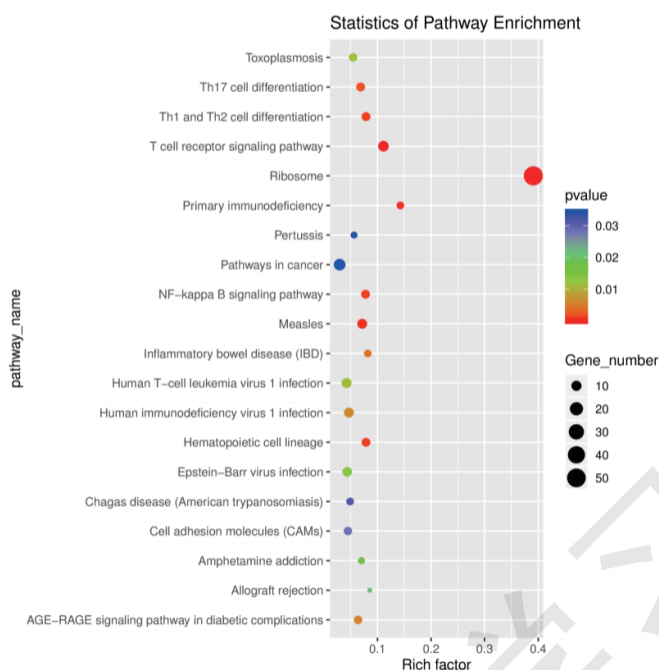


GO 富集性分析结果柱状图反映在生物过程 (biological process)、细胞组分 (cellular component) 和分子功能 (molecular function) 富集的 GO term 上差异基因的个数分布情况。横坐标表示 GO term, 纵坐标表示每个 GO term 对应的差异基因数目, 不同的颜色表示 GO 的三大分类。



横坐标的 Rich factor 表示位于特定 GO 的差异基因个数 / 位于特定 GO 的总基因数, Rich factor 越大, GO 富集程度越高。圆圈大小表示 GO 对应的差异基因数目, 圆圈颜色表示 GO 富集程度的 p 值大小。

## KEGG功能分析

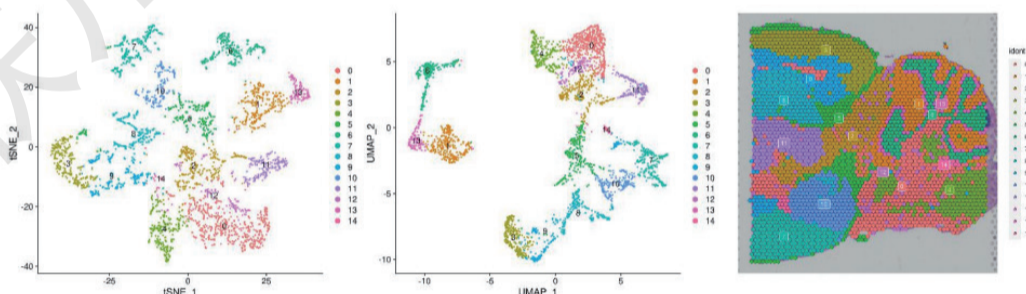


横坐标的 Rich factor 表示位于特定 KEGG 的差异基因个数 / 位于特定 KEGG 的总基因数, Rich factor 越大, KEGG 富集程度越高。圆圈大小表示 KEGG 对应的差异基因数目, 圆圈颜色表示 KEGG 富集程度的 p 值大小。

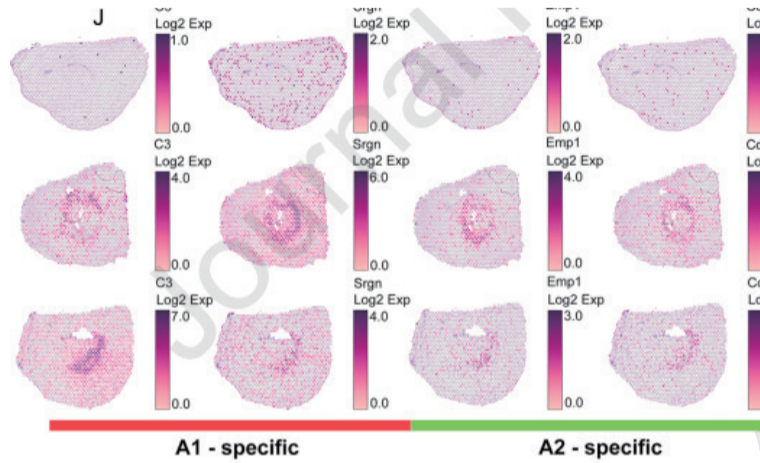
## 二、FFPE空间转录组结果展示

### 2.1 细胞分群及可视化

Seurat 使用 SCTransform 对基因的表达进行归一化, 然后进行 PCA 降维分析。受 Graph-based 的聚类方法的启发, Seurat 将 spots 嵌入图形结构中, 例如 K-nearest neighbor (KNN) 图, 边缘绘制在具有相似基因表达模式的 spots 之间, 然后尝试将该图分解为高度互连的准亚群。软件首先在 PCA 空间中构建一个基于欧几里德距离的 (KNN) 图, 并根据 Jaccard 距离中的共享重叠来优化任意两个 spot 之间的边缘权重。



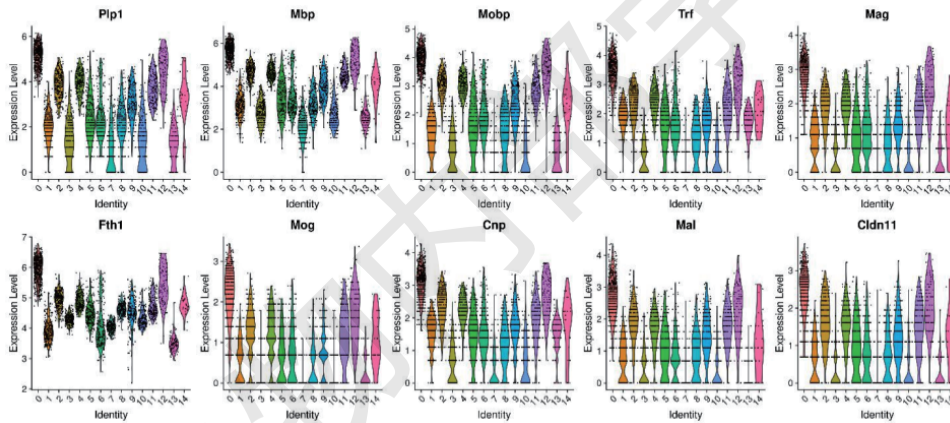
左图为基于 t-SNE 降维算法得到的二维坐标信息, 不同颜色代表不同亚群, 中间图为基于 UMAP 降维算法得到的二维坐标信息, 右图为 spot 的空间位置对应的 cluster 信息。



每个亚群的 spots 用红色点重点突出,可以区分单个亚群的空间定位。

## 2.2 Marker 基因分析

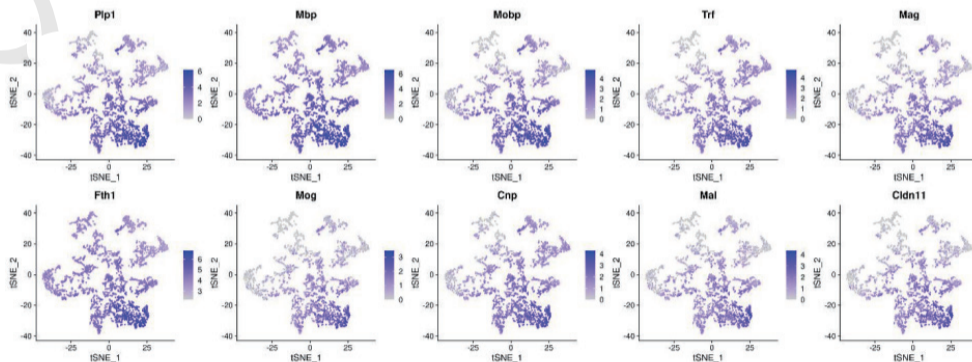
### Marker 基因表达小提琴图



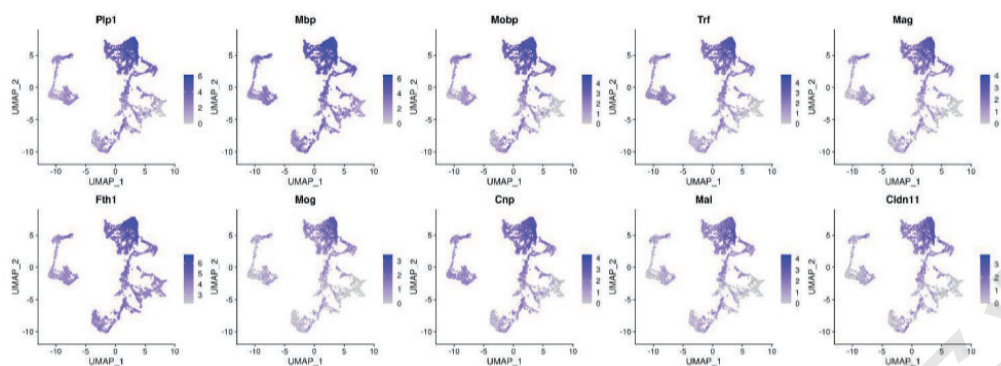
横坐标为各个亚群,纵坐标为每个亚群中基因的表达水平。小提琴图展示了任意位置的密度,可以知道哪些位置的密度较高。

### Marker 基因表达映射图

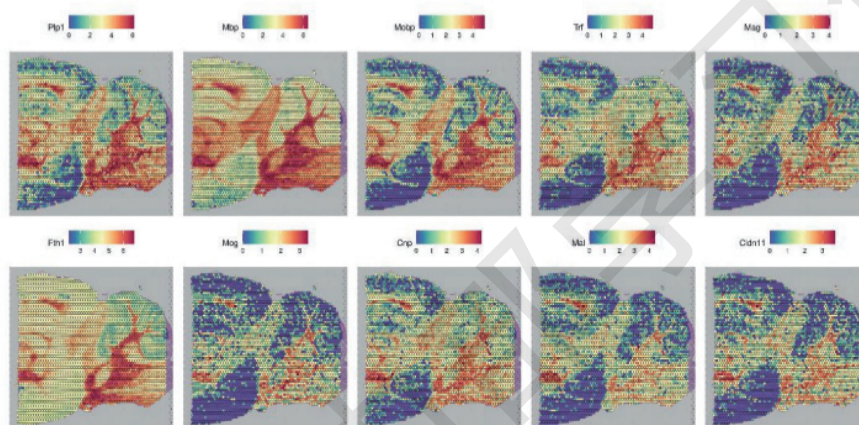
#### tSNE



## Umap

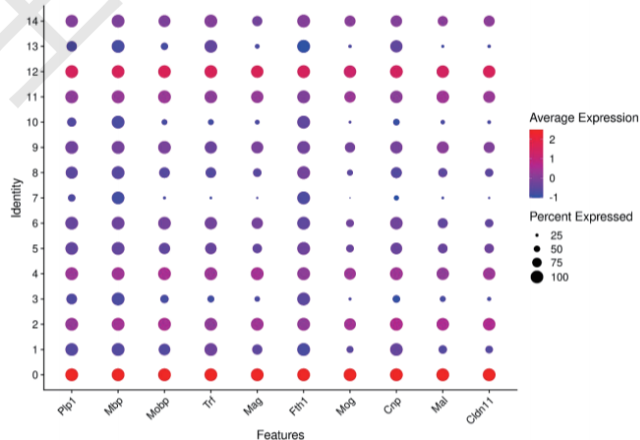


## Spatial 图



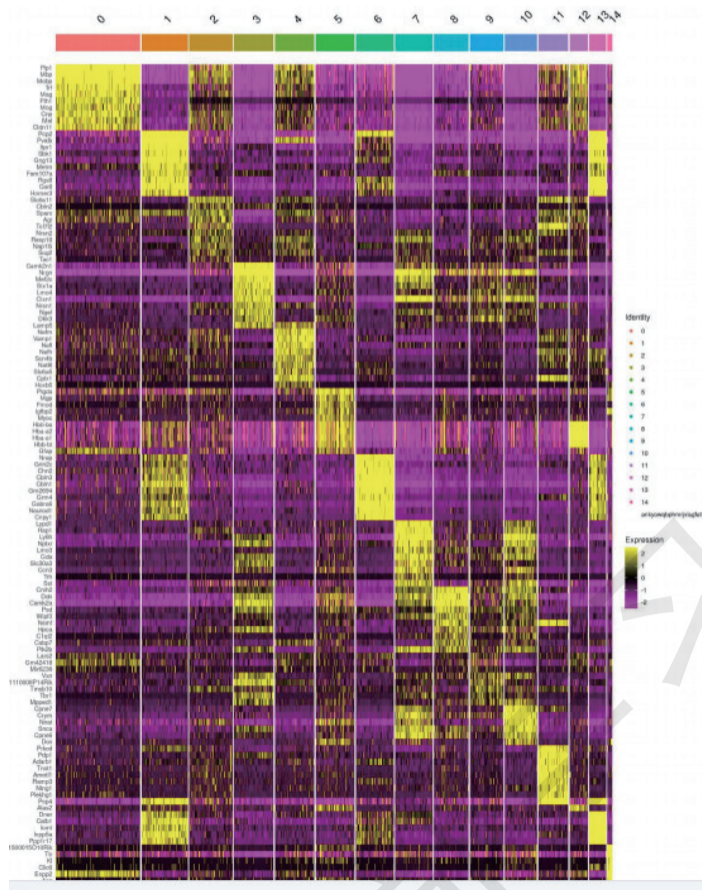
上图的坐标轴对应于由 t-SNE 算法产生的二维空间坐标，每个点代表一个 spot，颜色有灰到蓝，表示基因表达水平逐渐升高；中间图的坐标轴对应于由 UMAP 算法产生的二维空间坐标；下图为对应 spot 的空间位置及基因在不同空间位置的表达情况。

## Marker 基因表达 dotplot 图



横轴为标记基因名称，纵轴为 cluster 编号，气泡大小代表基因在某个亚群中表达的 spots 数目占该亚群所有 spots 数目比例，气泡越大代表比例越高；气泡颜色表示标记基因在亚群中的表达丰度均值，不同颜色表示不同的表达量。

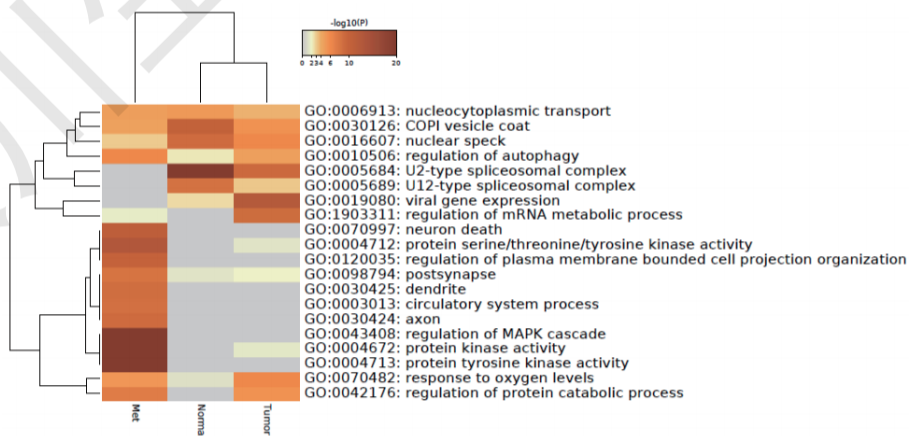




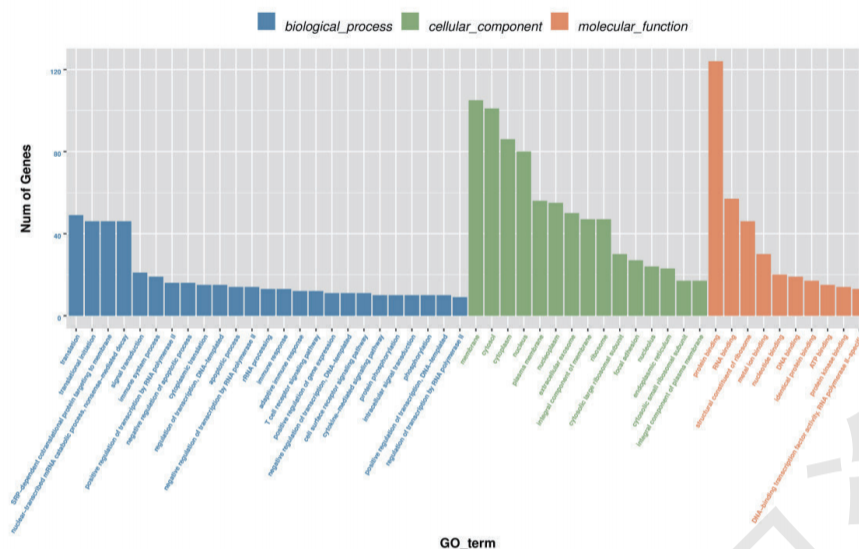
每一行为 1 个基因, 每一列为 1 个 spot, 每个格子为 spot 对应的基因表达情况, 颜色从黄色到玫红色, 表示基因表达水平逐渐降低。

## 2.3 功能富集分析

### GO 功能分析



纵坐标代表不同的 GO term, 横坐标是样本名, 颜色深浅表示 GO 的富集程度。

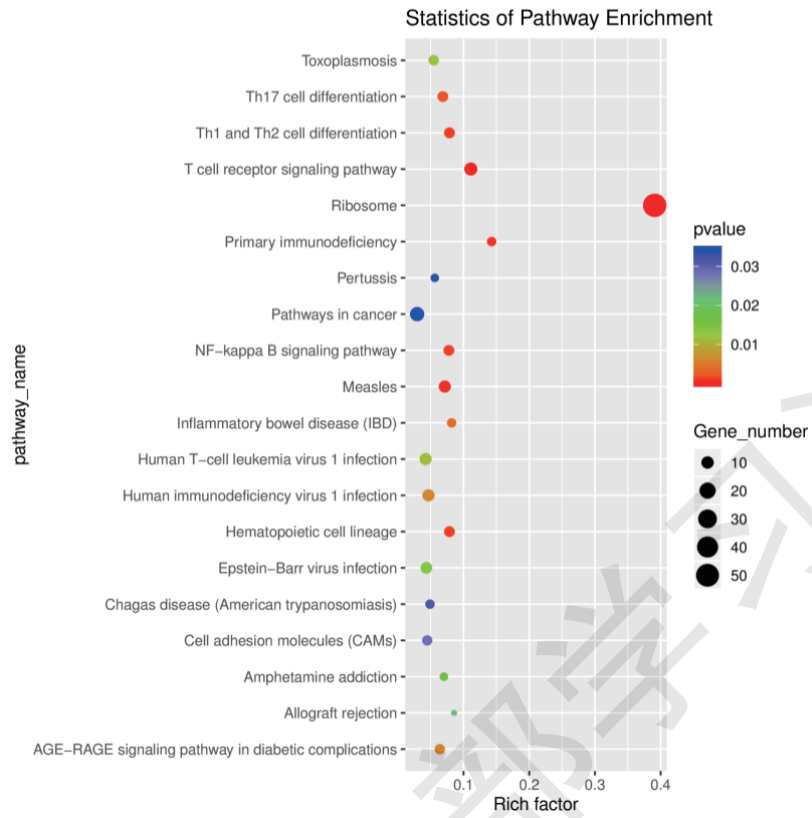


GO 富集性分析结果柱状图反映在生物过程 (biological process)、细胞组分 (cellular component) 和分子功能 (molecular function) 富集的 GO term 上差异基因的个数分布情况。横坐标表示 GO term，纵坐标表示每个 GO term 对应的差异基因数目，不同的颜色表示 GO 的三大分类。



横坐标的 Rich factor 表示位于特定 GO 的差异基因个数 / 位于特定 GO 的总基因数, Rich factor 越大, GO 富集程度越高。圆圈大小表示 GO 对应的差异基因数目, 圆圈颜色表示 GO 富集程度的 p 值大小。

## KEGG功能分析



横坐标的 Rich factor 表示位于特定 KEGG 的差异基因个数 / 位于特定 KEGG 的总基因数, Rich factor 越大, KEGG 富集程度越高。圆圈大小表示 KEGG 对应的差异基因数目, 圆圈颜色表示 KEGG 富集程度的 p 值大小。

# FFPE单细胞和空间转录组案例解析

## 一、单细胞多组学

Spatial proteogenomics reveals distinct and evolutionarily conserved hepatic macrophage Niches

影响因子:66.85

研究手段:scRNA-seq、snRNA-seq、CITE-Seq和ST RNA-seq

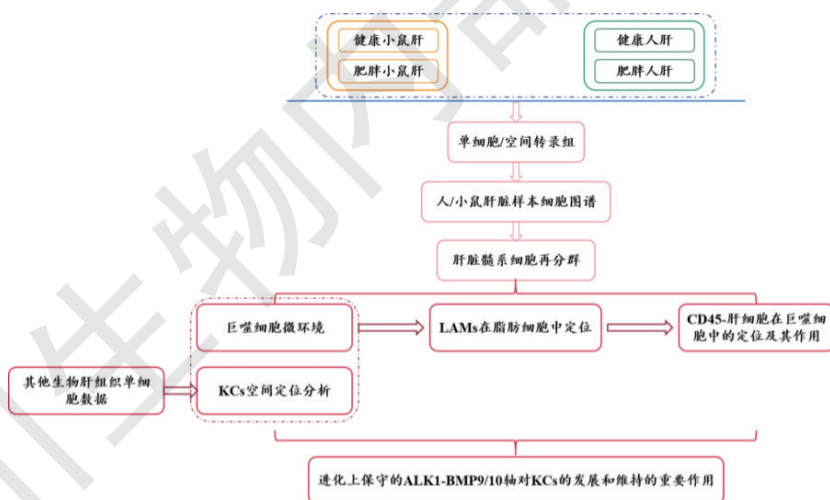
发表期刊:Cell

实验设计:

两种消化策略:消化策略1:体外消化+单细胞测序;消化策略2:体内消化+单细胞测序;并与单核转录组数据进行了对比。

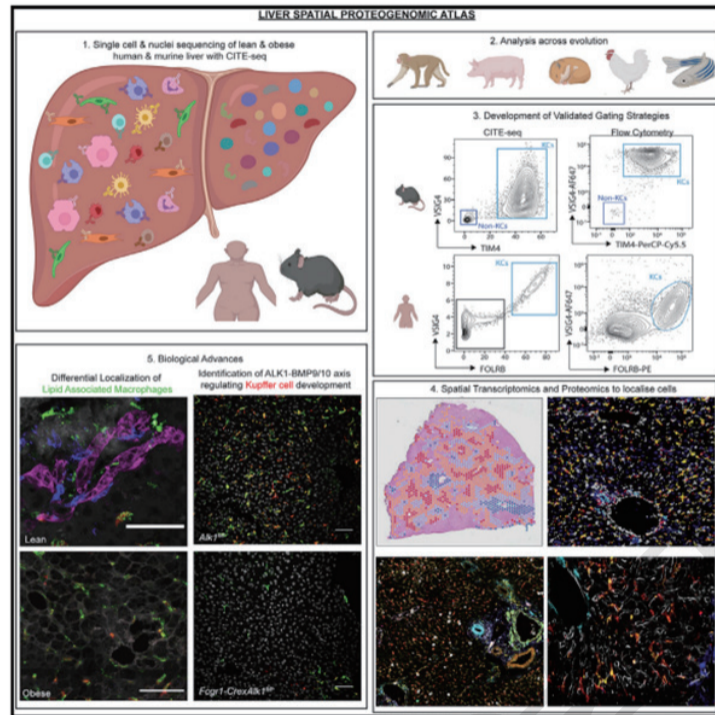
空间转录组测序:人和小鼠肝脏组织样本进行空间转录组测序;

单细胞测序:人、小鼠样本进行单细胞和单核转录组测序;猕猴、猪、仓鼠、鸡、斑马鱼的肝脏组织采用单细胞转录组测序。



作者探究了CD45-细胞在调节细胞表型中的作用。NicheNet分析揭示了LAM很少有特定的配体-受体对,提示局部因素,如代谢物,而不是独特的细胞-细胞相互作用可能驱动LAM表型。与此一致,用乙酰化低密度脂蛋白培养的BM单核细胞表达LAM相关基因,表明脂类在诱导LAM表型中起主导作用。相反,对于KCs,作者发现在人类和小鼠之间有多个配体受体对是保守的。且KCs(ALK1)和星状细胞(BMP9/10)之间的ALK1-BMP9/10信号在7个物种中都是保守的,并且可能会控制其他保守的KC基因表达。并通过基因敲除实验进行了验证。总之,这验证了NicheNet的预测,并证明了进化上保守的ALK1-BMP9/10轴对KCs的发展和维持的重要作用。





A single-cell map of intratumoral changes during anti-PD1 treatment of patients with breast cancer

影响因子:87.241

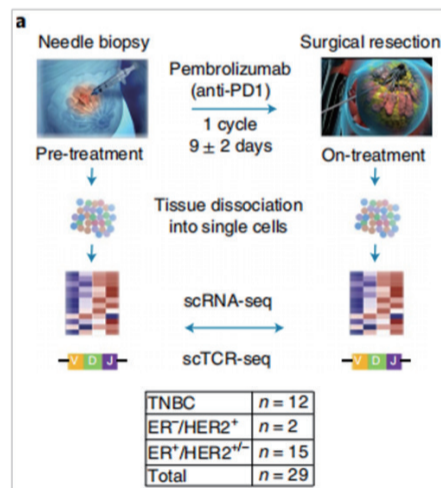
研究手段:scRNA-seq、RNA-seq、CITE-Seq

发表期刊:Nature Medicine

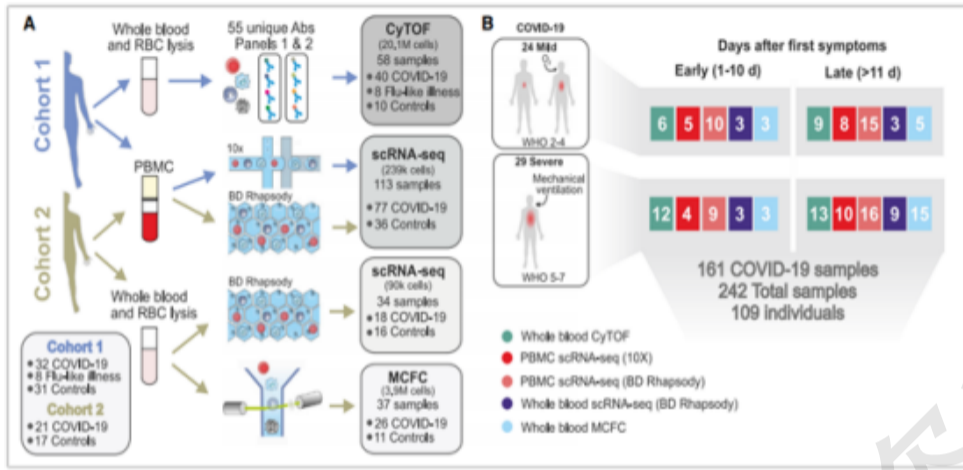
实验设计:

队列1:第一组非转移性、未经治疗的原发性浸润性乳腺癌患者在术前约 $9 \pm 2$ 天接受了一剂量的Keytruda或抗PD1治疗;

队列2:第二组患者接受了为期20-24周的新辅助化疗,术前随后使用派姆单抗。在两个队列中,在抗PD1治疗前立即(“治疗前”)收集一个肿瘤活检,而在随后的手术中收集另一个活检(“治疗中”)。

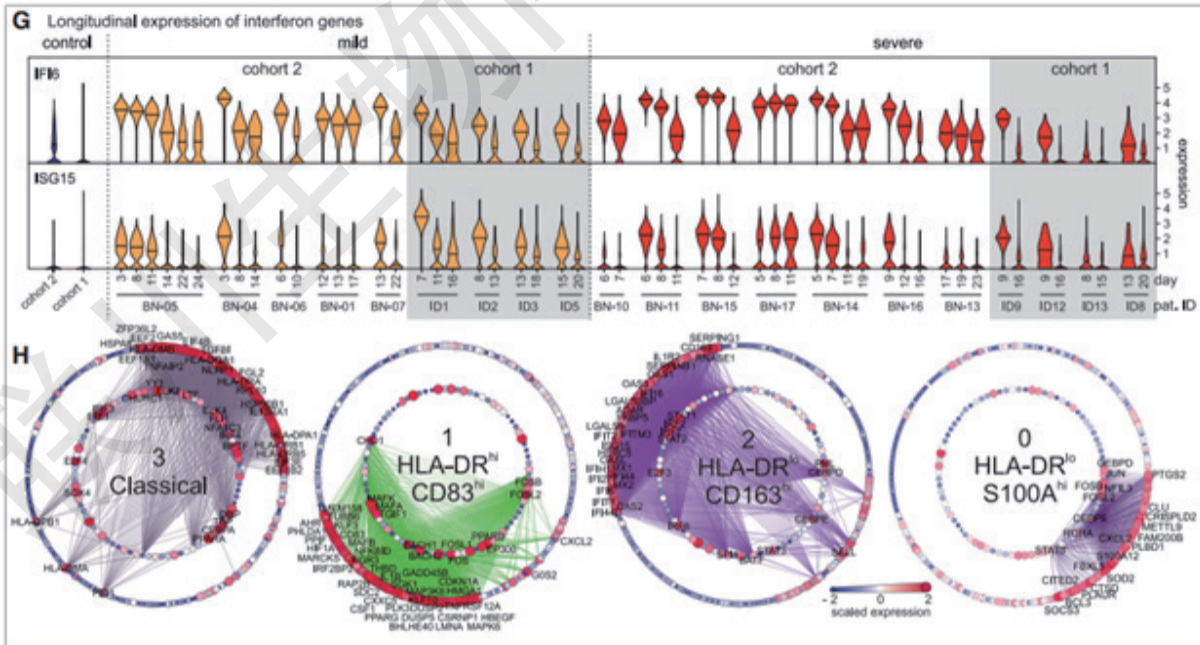






作者通过 scRNA-seq 分析了 COVID-19 相关的单核细胞表型改变。HLA-DR 低表达和 S100A12 和 CXCL8 高表达为标志的单核细胞簇 (簇3, HLA-DR<sup>lo</sup>S100Ahi) 与重症 COVID-19 密切相关。进一步作者对队列2的PBMC数据集的单核细胞进行了再分群分析, 共鉴定到7个亚群。此外, 从 COVID-19 患者中分离出的血液单核细胞对 LPS 刺激的细胞因子反应迟钝, 特别是来自严重 COVID-19 患者的单核细胞。这表明 HLA-DR<sup>lo</sup> 单核细胞簇 (0、2和6) 几乎只在严重的 COVID-19 中检测到。

接下来, 作者分析了队列2中每个患者的时间依赖性簇占比。在所有轻症 COVID-19 病例中均发现了活化的 HLA-DR<sup>hi</sup>CD83<sup>hi</sup> 单核细胞 (簇1)。相比之下, HLA-DR<sup>lo</sup>CD163<sup>hi</sup> 单核细胞 (簇2) 主要存在于重症疾病早期, 而 HLA-DR<sup>lo</sup>S100A<sup>hi</sup> 单核细胞 (簇0) 主要存在于疾病晚期。ISG 表达水平在早期时间点最高, 并随着时间的推移持续下降, 这清楚地表明 COVID-19 中的 IFN 反应与疾病的严重程度和时间呈负相关。相比之下, 重症 COVID-19 患者中 HLA-DRA 和 HLA-DRB1 的表达在早期就明显下降, 并持续了一段时间。综上所述, 单核细胞表型的动态变化与 COVID-19 疾病的严重程度和发病时间相关。





## 二、FFPE单细胞和空间转录组联合分析

Tertiary lymphoid structures generate and propagate anti-tumor antibody-producing plasma cells in renal cell cancer

影响因子:43.474

研究手段:Spatial Gene Expression for FFPE

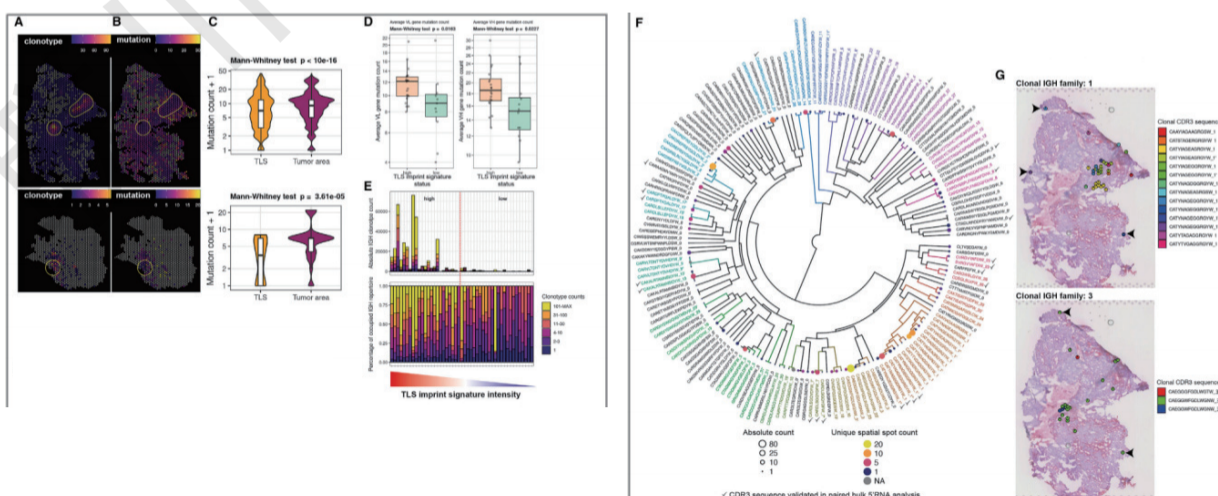
发表期刊:Immunity

B细胞成熟亚型和PCs在TLS中的共定位暗示了原位B细胞适应性免疫的产生。为了证明这一点，作者研究BCR的核苷酸序列。

MiXCR鉴定到了一系列独特的克隆型。在TLS+肿瘤中发现了最多的独特克隆型和总Ig计数。在TLS区域也发现了数量最多的独特轻链克隆型。通过测量Ig轻链序列V区突变计数与V种系基因的比较来评估B细胞的成熟度。V基因突变数中值在TLS区域显示低至中值水平，而在肿瘤区域，大多数高度突变的序列距离TLS较远。尽管如此，在TLS区域检测到包括高度突变序列在内的全范围突变，而大多数距离TLS较远的Ig转录本富集在高度突变序列中，这表明TLS中发生了体细胞高突变，并提示突变的PCs在整个肿瘤中扩散。作者进一步探究了47个ccRCC肿瘤中50个转录组的轻和重链突变计数，分为TLS高和TLS低。无论是VL还是VH基因，高TLS肿瘤的整体体细胞高突变水平显著高于低TLS肿瘤。为了确定体细胞高突变是否伴随着克隆型选择，作者研究了大量50个转录组数据的IgH库。高TLS的样本库既表现出大量的克隆型总计数，也表现出更高比例的克隆型。事实上，30%的高TLS肿瘤被鉴定超过100次的克隆型所占据，而在低TLS肿瘤中只有1%，这表明在高TLS样本中存在持续的免疫反应。

最后，为了确定扩增的IgH克隆型的克隆关系和位置，作者对30个空间转录组进行了克隆性评估。克隆性定义为VH基因家族相同，JH基因相同，CDR3长度相同，VH序列之间CDR3核苷酸序列最大差异为15%。共鉴定出31个克隆家族，具有2至16个独特成员。在一个科中，一些克隆可以在多达20个不同的空间位置检测到多达80次。在基因表达芯片上定位的IgH克隆型表明了同一家族的克隆型富集在TLS附近，并在远端随机分布。

在TLS低的样本中，检测到的克隆型数量非常低，阻碍了Ig转录本的分析，也证明了肿瘤内PCs主要是在TLS中生成。总之，这些数据证实原位TLS介导的成熟，允许选择、克隆扩增和被选择的PCs在肿瘤的不同区域内分布。





# Single cell profiling of primary and paired metastatic lymph node tumors in breast cancer patients

影响因子:17.694

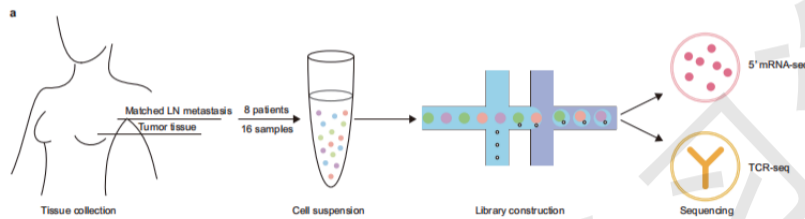
研究手段:FFPE空间转录组和单细胞免疫组测序

发表期刊:Nature communications

## 实验设计:

单细胞免疫组样本:8例未治疗的乳腺癌亚型患者的LNMTs和PTs配对组织;

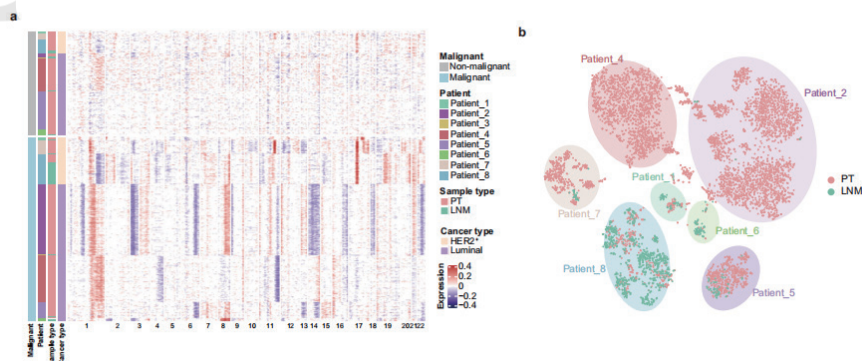
FFPE空间转录组样本:4例未治疗的乳腺癌亚型患者的LNMTs

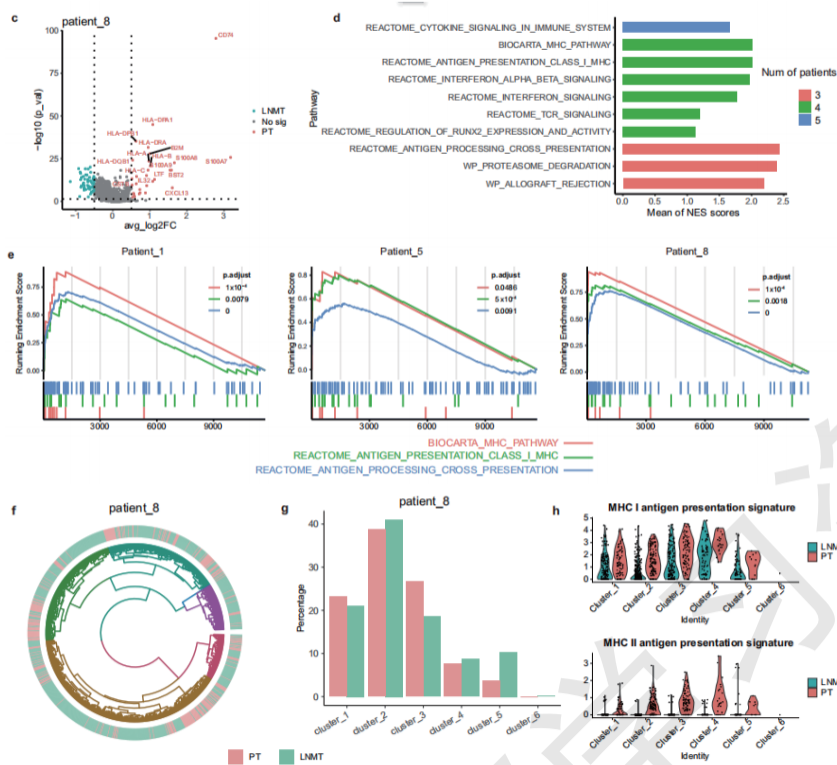


为了表征恶性上皮细胞的特征。根据CNVs将其分为恶性上皮细胞和非恶性上皮细胞。根据上皮细胞恶性程度评分的分布情况,分离恶性细胞和非恶性细胞。CNVs的热图在患者之间表现出相当大的差异,在相同的患者中,甚至在不同的组织中也观察到相似的模式。来自同一患者的恶性细胞表现出类似的CNV模式,提示恶性细胞来自同一起点。

为了进一步了解淋巴结转移的恶性细胞的特征,作者比较了每个组织中至少有20个细胞的LNMTs和PT患者的恶性细胞的转录组特征。很少有显著的基因在患者之间共享。且研究发现与PT患者相比, LNMT中的抗原呈递基因如CD74、HLA-DRA和B2M大多下调。同样,作者还发现患者5的LNMT中HLA-B和HLA-C表达下调。

为了进一步确认下调的抗原呈递途径是否与恶性细胞的CNV克隆有关。作者根据每个患者的CNV相似性对恶性细胞进行聚类,然后比较PT和LNMTs中每个CNV克隆的DEG。结果发现患者8中属于不同CNV簇的恶性细胞在转移能力方面没有差异。患者8不同CNV簇中的恶性细胞也在抗原呈递途径中富集。抗原呈递基因主要可分为MHC I类和MHC II类分子。通过比较不同CNV集群中PT和LNMT中两种类型的抗原提呈,发现在患者8的不同CNV集群中, LNMT中MHC I和MHC II类分子均下调。患者5的LNMT中MHC I基因下调, MHC II基因未下调。这些结果表明,恶性细胞迁移到LNMT可能导致低抗原呈递基因,从而导致免疫逃避机制,这为乳腺癌恶性细胞转移的特征提供了新见解。





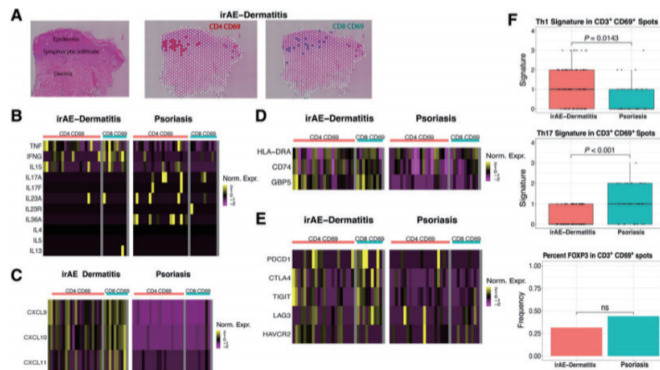
### Checkpoint Blockade-Induced Dermatitis and Colitis Are Dominated by Tissue-Resident MemoryTCells and Th1/Tc1 Cytokines

影响因子:17.694

研究手段:FFPE空间转录组

发表期刊:Cancer Immunol Res

作者利用空间转录组学分析了7例irAEs结肠炎病例的独立队列。在图3A中，结果显示了h&e染色的irAEs结肠炎和TRM细胞的空间分布 (CD4/CD8+CD69+ spots) 的代表性图谱。这些病例的结果还显示了与Th1/Tc1反应相关的细胞因子和趋化因子的上调，包括IFNG、TNFA、CXCL9、CXCL10和CXCL11。同样，从结果中还观察到IFN诱导的基因和检查点分子的上调。在irAEs病例中，可见IL15的表达，而TRM细胞需要IL15才能分化和存活。最后通过将该结果与8个健康结肠样本进行了比较，发现Th1/Tc1细胞因子、CXCL9-11、ifn诱导的基因和检查点分子在irAE结肠炎中的表达比在健康结肠样本中更明显。在irAEs皮炎和irAEs结肠炎中上调最多的是ITGA4，在银屑病中几乎不表达，在健康结肠中较少见。



Intratumor heterogeneity and T cell updates Chock for exhaustion in primary CNS lymphoma

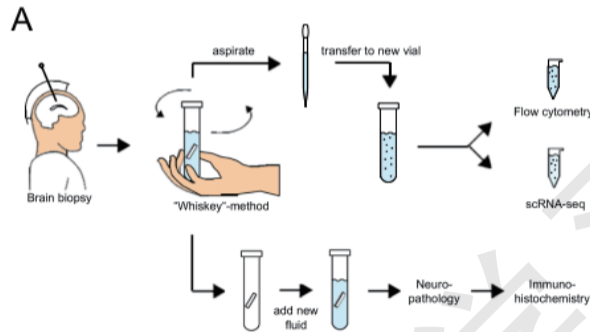
影响因子:17.694

研究手段:FFPE空间转录组、单细胞免疫组测序和CITE-seq

发表期刊:Genome medicine

实验设计:

针对活检材料、血液和脑脊液 (CSF) 中释放的 PCNSL 细胞进行了流式细胞术、单细胞转录组 (scRNA seq) 测序、B 细胞受体测序 (scBCR) 和 CITE-seq, 并对活检样本进行了 FFPE 空间转录组学分析。

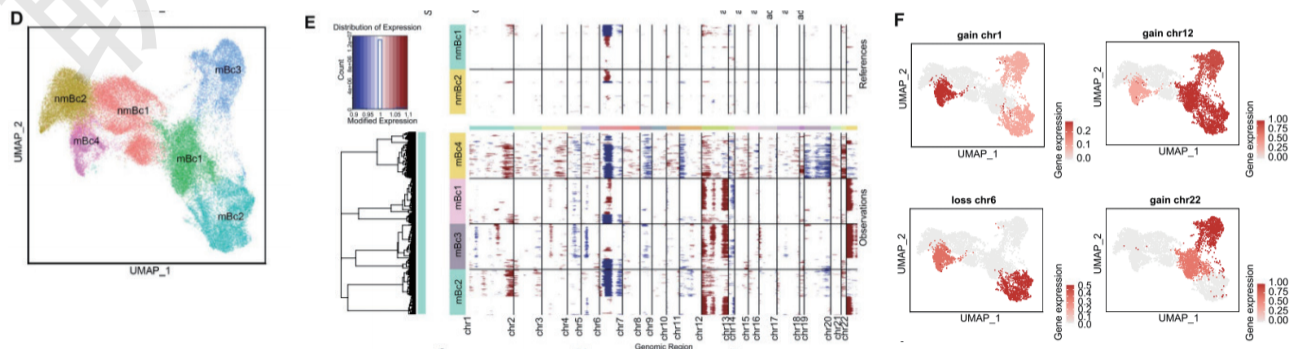


作者通过将 “Whiskey Method” 与 scRNA-seq 相结合来更好地表征 PCNSL。通过对两名患者 (患者1和患者2) 进行立体定向活检时, 对活检和外周血细胞进行了 scRNA-seq 和 scBCR。此外, 收集了患者1复发时的脑脊液, 并对该患者的血液和活检材料进行了 CITE 测序。

通过标记基因的表达对主要聚类进行了注释, 鉴定到两大簇表达 Bc 标记物, 暂定为非恶性 Bc (nmBc) 和恶性 Bc (mBc) (CD19, MS4A1/CD20, CD79B)。

根据流式细胞仪, CD27 和 CD38 在 mBc 中表达增加, 而 SDC1/CD138 表达缺失, 这在 PCNSL 中是已知的。此外, 还鉴定到两个具有单核细胞和粒细胞标记物的髓系簇 (髓系 1-2: LYZ, S100A12, CD14, LYVE1, MRC1) 和一个具有 mDC1 标记物的簇 (mDC1: CLEC9A, XCR1, BATF3)。最后, 还鉴定到一个 T/NK 细胞簇 (Tc: CD3E, TRAC, IL7R, NKG7), 一个血小板细胞簇 (PLT: CLU, GNG11, PPBP, GP9) 和一个少突胶质细胞簇 (oligo: PLP1, MBP, MAG)。同时, 并在一个患者中使用 CITE-seq, 在蛋白质水平上确定了主要细胞群的身份。

进一步, 为了更好地理解 PCNSL 的肿瘤内异质性, 通过对 mBc 和 nmBc 簇中的所有细胞进行细胞亚群分析, 更详细地研究了 B 细胞簇。作者鉴定了 4 个注释为恶性簇 (mBc1-4), 它们显示了 PCNSL 中常见的染色体畸变, 包括 1、12 和 22 号染色体的获得和 6 号染色体的丢失。



# FFPE单细胞和空间转录组自然研究热点解析

## 一、FFPE单细胞自然研究热点解析

2023年伊始，国自然申请也即将拉开序幕。你是否苦于找不到研究方向抓头挠腮？国自然还有哪些新的研究热点？“天之骄子”的单细胞测序技术面临哪些挑战？医院中海量的FFPE样本库能开展单细胞研究吗？

我们重点关注医学上一类丰富的样本资源--FFPE (Formalin Fixation and Paraffin Embedding) 样本，FFPE样本库是当之无愧的病理科“瑰宝”，因为它们承载着众多疾病相关信息。FFPE也是目前长期保存病理样本的金标准，据不完全统计，在过去的几十年中，全世界医院和样本库已经存档了超过10亿的FFPE生物样品，其中，也包括动物组织的FFPE存档。在疾病病理检测中，FFPE标本成为重要的资源，有助于研究人员发现疾病病理形态、分子变化，进而辅助诊断和治疗。FFPE切片可以检测疾病的可视化特征，可以与有价值的临床数据关联起来，如患者信息记录、使用的药物，甚至临床预后结果等。FFPE技术凭借着保存时间长、可关联临床及多组学数据等诸多优点，是医学病理和机制研究、药物发现和回顾性研究的宝贵资源。

尽管FFPE保存样本对生命科学研究来说是革命性的，但这种处理方式会破坏DNA/ RNA分子，基本上会出现严重的降解情况。甲醛固定和组织包埋实验会降解FFPE组织中的RNA，形成高度碎片化的低完整性的RNA分子，通常RNA完整性指数 (RIN) < 2.5。这让转录组层面的依赖于逆转录扩增的常规实验方法很难有效捕获到多数转录本片段。另外有研究表明，FFPE保存的样本，随着保存年限的增加，其可研究的核酸有效利用率越低。石蜡块存储4-6年后，荧光法测定的DNA量减少到47%，而且只有11%的DNA是可扩增的。FFPE样本核酸保留度和核酸完整性的限制成为阻碍科研及临床研究者进一步探索这类样本中蕴含的宝贵信息，使得FFPE样本无法最大程度发挥自身的价值，从而沦为沉睡的“宝藏”。

随着技术突破，FFPE单细胞测序已经成为了新的研究方向，RNA降解样本无法开展单细胞研究成为了过去式。在国自然研究课题中，涉及到诸多热门技术，诸如单细胞、空间组学（转录组、代谢组、蛋白组）、Olink、非编码RNA (miRNA、lncRNA、circRNA)、修饰组学（甲基化、乙酰化、磷酸化、泛素化、糖基化）、肿瘤微生物组、血液微生物组等等，依旧是研究人员非常青睐的高通量技术。随着FFPE单细胞技术门槛被踢开，会有更多研究人员开发FFPE样本的研究潜力，宝藏样本的迸发式涌出将成为大趋势！小编检索了近几年国自然科学基金资助的研究目录，2022年，包括浙江大学、北京大学已经有FFPE单细胞或空间组学相关技术的研究课题。相信2023年往后，将会涌现更多基于FFPE标本开展单细胞研究的课题。



## 二、FFPE空间转录组自然研究热点解析

空间转录组技术是近几年新颖的备受研究人员青睐的原位高通量测序技术，就如同单细胞测序一样，空间转录组的热度居高不下！在国自然申报课题中，“空间转录组”的字眼一直是高频词汇。据不完全统计，仅2020年和2021年与空间转录组相关的研究资助金额就达到1264万，申报的课题组主要集中在北京、广州、上海、杭州、成都、西安、吉林等城市的学校、科研院所等单位，研究领域主要涉及到肿瘤机制研究、胚胎发育、免疫、疾病发生和算法开发等方向。具体申报课题信息如下所示：

从国自然资助金额上看，空间转录组技术是如此被“偏爱”！你是否也在考虑自己的研究课题中是否加上空间转录组技术？你是否对这个技术还有很多疑问？别担心，接下来我们将详细解析！

### 2.1 空间转录组应用总览

从物种上看，空间转录组的研究对象主要集中于动物，尤其是人和小鼠身上，得益于医学研究的重要性及小鼠作为模式生物的特殊地位。动物研究对象还包括其他哺乳动物如猪，以及鸟类。从组织类型上看，也呈现了多样性的特点。已经涵盖了诸如大脑、心脏、肾脏、乳腺、胰脏及肝脏等器官组织，体现了空间转录组技术在动物组织分析上的普适性。详见：空间转录组五年回望：文献小结 | 空间转录组专题。

植物领域仅在早期有拟南芥花序、杨树叶芽及冷杉雌球果的研究报告，主要原因是植物细胞中的特殊结构（液泡及细胞壁）导致冷冻切片过程中较难获得高质量的切片，且相对动物细胞，木质化程度较高的植物细胞RNA更难透化。但对于普通组织如叶片，并不存在较难的技术瓶颈。近期在bioRxiv上就刊登了来自耶鲁大学的研究人员利用Visium平台在空间层面上分析马齿苋叶片光合代谢途径的研究论文。随着技术的不断发展，未来植物空间转录组的应用潜力值得期待！

对于具体的应用领域，癌症研究、神经生物学、发育生物学以及免疫学是最常见的研究方向。肿瘤微环境，神经系统的复杂性，器官发育过程中细胞位置与细胞命运的关系，免疫相关细胞的浸润状况，体现了空间信息在这些研究领域的重要性，决定了空间转录组技术是解决这些研究领域关键问题的重要工具。

### 2.2 FFPE空间转录组应用总览

在疾病病理检测中，FFPE标本成为重要的资源，有助于研究人员发现疾病病理形态、分子变化，进而辅助诊断和治疗。FFPE切片可以检测疾病的可视化特征，可以与有价值的临床数据关联起来，如患者信息记录、使用的药物，甚至临床预后结果等。FFPE技术凭借着保存时间长、可关联临床及多组学数据等诸多优点，是医学病理和机制研究、药物发现和回顾性研究的宝贵资源。

空间转录组测序不断突破技术壁垒，Visium FFPE就是其中之一，将组织学技术的优势与RNA测序的高通量和发现能力融入FFPE组织样本中。FFPE空间转录组的技术升级，将极大拓宽病理学研究的应用范围！在大量的临床研究中，尤其是对于病程长，预后不确定的疾病，如肿瘤，往往会使用FFPE样本进行验证，或开展回顾性研究。

10x Visium FFPE解决方案目前针对小鼠(约2万个基因)和人(约1.8万个基因)的基因数据库设计了探针,每一个基因(人和小鼠),都预先设计了一对probe以靶定RNA的特定序列,LHS(左端探针)带有read2序列,用以后续PCR扩增,RHS(右端探针)带有polyA序列,用以后续被玻片上的探针捕获结合,通过probe与组织内RNA杂交,将RNA信息转移到probe上,再将探针两端连接形成完整的DNA链。之后降解杂合RNA链,然后透化释放连接的probe,完成信息捕获过程。

相信随着单细胞和空间转录组测序技术的不断发展,针对存在已经降解的FFPE样本进行高通量测序,开展回顾性实验会成为2023年国自然申请的新热点。





杭州联川生物技术股份有限公司

LC-Bio Technologies (HangZhou) Co.,Ltd

电话：0571-87662413 网址：[www.lc-bio.com](http://www.lc-bio.com)

地址：杭州经济技术开发区6号大街260号中自科技园16幢4层