

像看电影一样了解细胞“前世今生”

科学家成功实现活细胞转录组测序

● 本报记者 刁雯蕙

在婴儿呱呱坠地之前,受精卵是如何发育成复杂个体的?为什么正常细胞会慢慢变成癌细胞?

细胞是生命的基本单位,了解它的过去、现在和未来不仅有助于人们了解正常发育的过程,也对理解疾病的产生和发展至关重要。然而,“看清”细胞的“前世今生”仍然存在显著的技术困难。

近日,中国科学院深圳先进技术研究院合成生物学研究所研究员陈万泽作为共同第一作者在《自然》发表长文,介绍了研究团队在国际首创的活细胞转录组测序技术(Live-seq)。该技术首次让单细胞进行转录测序后依然能保持细胞存活,实现了活细胞全基因表达的连续观测。

“该研究实现了使用 Live-seq 技术对同一个活细胞多次分离部分细胞质进行多次转录组测序的可行性,表明这一技术有望在将来用于构建单个活细胞的转录组系列变化动态。该研究为单细胞转录组测序提供了全新的研究策略,为我们理解生命过程的动态变化提供了强有力的手段,是这一领域的又一重大突破。”北京大学生命科学学院教授汤富酬评论道。

不杀死细胞就能测序

人体内的细胞拥有几乎一样的基因组,但是为什么能够产生多种多样的细胞?基因组中数万个基因的表达与否和表达量的高低,很大程度上决定了细胞的种类和功能,比如神经细胞、免疫细胞、各种肿瘤细胞等。

如果知道细胞不同时间的基因表达的变化,就能够了解细胞的过去、现在和未来。

当前,单细胞转录组测序技术是了解细胞状态的重要手段。就像看一张“高清照片”,通过单细胞测序能够看清细胞现在所有基因的表达状态。但是,这些技术在理解细胞状态“电影”般的动态变化上却面临很大的挑战。

“利用单细胞转录组测序技术观测细胞状态的前提是将细胞裂解,提取其中的 RNA 来测定每个基因表达量

的高低,这样就不可避免地杀死了细胞。”陈万泽说,“此外,使用单细胞测序技术也只能了解到一个细胞当下的状态,却不能获得它的过去,也无法知晓它将来的功能。”

通过近7年的努力,陈万泽与合作者开发了活细胞转录组测序技术 Live-seq,其核心是通过对活细胞中的部分细胞质进行微创提取,并对极其微量的细胞质 RNA 进行扩增,在单细胞转录组测序后依旧保持细胞的存活和功能,从而实现细胞动态变化的跟踪。

论文通讯作者、瑞士洛桑联邦理工学院教授 Bart Deplancke 表示,该技术兼具全基因表达分辨率和动态解析能力,是目前对单细胞转录组直接动态测量、偶联细胞现有状态及其后续表型的唯一解决方案。

两次碰壁,终于“钓”出 RNA

如何在不杀死细胞的前提下看到细胞的动态变化?

“我们首先想到的是外泌体,它是细胞向外面吐出来的小泡,里面有蛋白、RNA 等物质。如果我们把单个细胞的外泌体都收集起来,再对其中的 RNA 进行测量,或许就可以在某种程度上反映细胞状态而又不杀死细胞。”陈万泽说。

单个细胞中仅有 10 皮克 RNA,相当于 1 克的一千亿分之一,而细胞外泌体中的 RNA 更是少之又少。研究团队设计了微流控芯片来完成单细胞捕获、外泌体收集等过程,发现由于外泌体中的 RNA 数量太少,根本无法实现单细胞分子水平的观测。

随后,陈万泽尝试利用在生命科学领域非常小众的原子力显微镜——它有一个很尖的硅探针,多用来检测物质表面性质。研究团队对探针进行表面活化、修饰、洗脱等改造后,让其能够把细胞中的 RNA“钓”出来。

“这种探针很细,对细胞的损伤很小,就像‘鱼钩’一样,改造后可以把细胞中的 RNA‘钓’出来,又能保证细胞继续存活。我们改造了数十个探针后,结果只在两个细胞上成功‘钓’到了基

因。”陈万泽回忆道,当时购买一个原子力显微镜探针需要 800 美元,研究成本太高,成功率太低,让这项研究再次受阻。

瑞士洛桑联邦理工学院学科交叉氛围浓厚。在一次偶然的学术交流中,陈万泽与导师了解到,瑞士苏黎世联邦理工学院的 Julia Vorholt 实验室开发了一种特殊的原子力显微镜,能够吸出一部分细胞质。

一番交流后,两个课题组一拍即合,展开了联合攻关。联合团队对一系列实验过程进行了优化,解决了 RNA 降解、低温下的快速操作、超微量样品转移、采样通道清洗避免交叉污染、图像下追踪细胞等多种问题,以保证实验结果的可靠性。

联合团队利用重新改造后的 Live-seq,对 5 种类型共 295 个细胞进行了测序,发现 Live-seq 能够有效区分不同类型的细胞,且平均每个细胞能检测到约 4112 个基因的表达信息。

仅对少量的细胞质进行测序,是否就能确定细胞的状态?“我们平行比较了单细胞测序结果,发现活细胞测序结果与普通的单细胞测序结果高度吻合,证明 Live-seq 能够很好地体现细胞的全转录组状态。”陈万泽说。

细胞的存活率又如何保证呢?

“原子力探针尖端只有几百个纳米大小,而且能和细胞膜密封,对细胞损伤极小。吸取约 5%至 50%的细胞质后,细胞体积可以快速恢复到正常水平,存活率在 85%至 89%之间,细胞能进行正常分裂。通过一系列的功能分析和分子表征,我们没有发现 Live-seq 对细胞状态有显著影响。”陈万泽表示。

对此,审稿人在评审意见中也写道:“由于细胞测序后仍旧存活,Live-seq 首次实现对同一个细胞全基因表达的连续测量。”

细胞测序史从“高清图片”到“高清电影”的跨越

在细胞观测技术史上,显微成像和基因编辑介导的分子记录等技术不仅



活细胞测序记录细胞变化示意图。

图片来源: Duygu Koldere Vilain

能观察细胞水平的生长、分裂、死亡等过程,还能观测细胞中的单个或几个基因指标。

2009 年,单细胞转录组测序技术为更系统、全面地定义细胞类型和状态提供了变革性手段。但人们仍然只能观察到细胞的静态状态,无法连续观测细胞动态或者检查细胞后续的表型。

如果把利用单细胞转录组测序技术观测细胞比喻为看一张细胞在分子水平的高清图片,那么利用 Live-seq 观测细胞就好比看一部高清电影,能够看见细胞的“前世今生”。

“Live-seq 可以回答细胞的过去怎样决定它的现在,不仅知道细胞中为何存在差异,还知道这些差异从何而来。”陈万泽介绍道。

在验证实验中,团队利用 Live-seq 直接测定了同一个巨噬细胞在不同时间的状态变化,发现细胞起始状态的少数基因的表达差异和噪声(如 Nfkb, Gsn 等)是决定细胞后续反应差异的重要原因。相对而言,普通的单细胞转录组无法找到这些规律。

陈万泽表示,尽管 Live-seq 仍然存在诸多挑战,需要进一步完善,比如低通量、暂不能在体内应用、在高度极化且 mRNA 分布不均的细胞中无法实现全细胞转录组测序、对细胞更多次的采样还需进一步研究等,但该技术首次实现了活细胞连续观测,为单细胞测序技术发展带来了更多可能性。未来,团队将进一步提高 Live-seq 技术的实用性。

相关论文信息: <https://doi.org/10.1038/s41586-022-05046-9>