



«Анализ транскриптомных данных»

Лекция #6.

Транскриптомика одиночных клеток

Серёжа Исаев

аспирант ФБМФ МФТИ
аспирант MedUni Vienna

Содержание курса

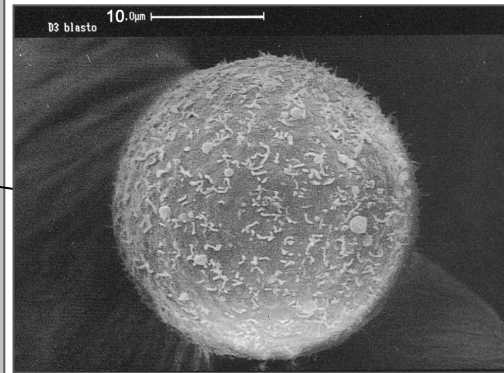
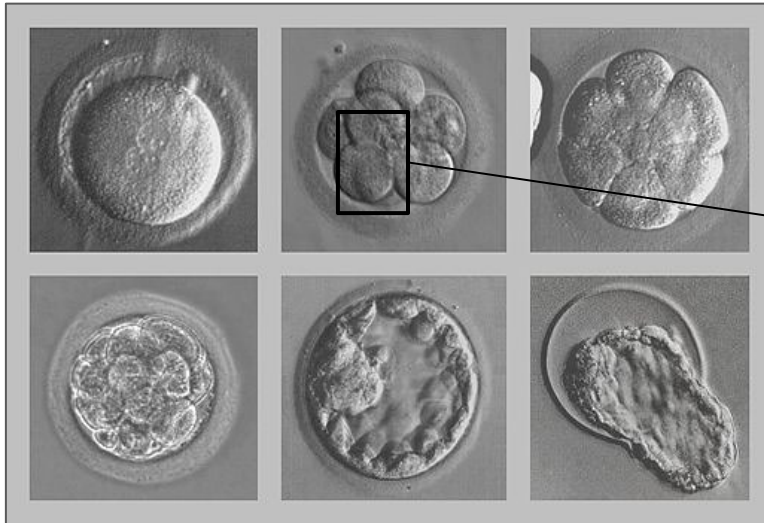
1. Bulk RNA-Seq:

- a. экспериментальные подходы,
- b. выравнивания и псевдовыравнивания,
- c. анализ дифференциальной экспрессии,
- d. функциональный анализ;

1. Single-cell RNA-Seq:

- a. **экспериментальные подходы,**
- b. отличия от процессинга bulk RNA-Seq,
- c. методы снижения размерности,
- d. кластера и траектории,
- e. мультимодальные омики одиночных клеток.

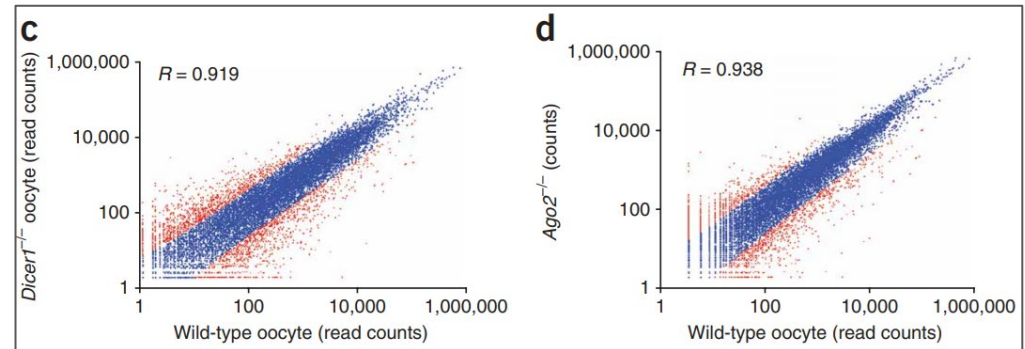
Tang et al., 2009 — первая работа



Бластомер. Источник:
<https://www.ehd.org/>

Сравнение профилей
экспрессии нормального
бластомера и бластомера с
нокаутами из Tang et al. 2009

Оплодотворённая яйцеклетка, восьмиклеточная стадия,
стадия адгезии, морула, бластоцист, зона вылупления.
Источник: <http://nobelprize.org/>

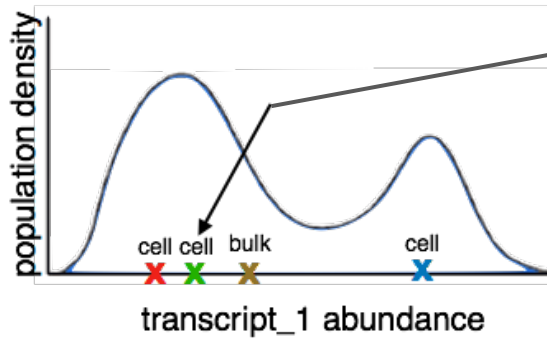




	Bulk RNA -Seq	scRNA -Seq
Начало	2008	2009
Экспрессия	средний уровень экспрессии	распределение уровней экспрессии
Количество транскриптов	~15-20 000 на образец	~200-10 000 на клетку
% Транскриптома	80-95%	10-50%

Bulk RNA - Seq

	Exp
Gene1	100
Gene2	5.5
...	
Gene N	0.5



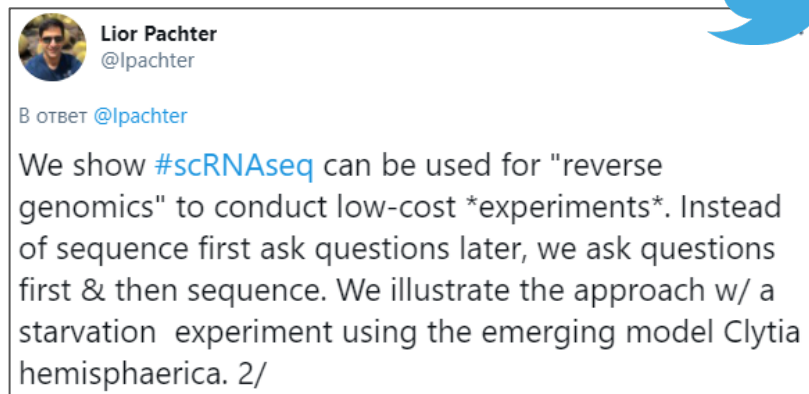
scRNA -Seq

	Cell1	Cell2	...	Cell K
Gene1	3	0		2
Gene2	0	2		1
...				
Gene N	0	13		2

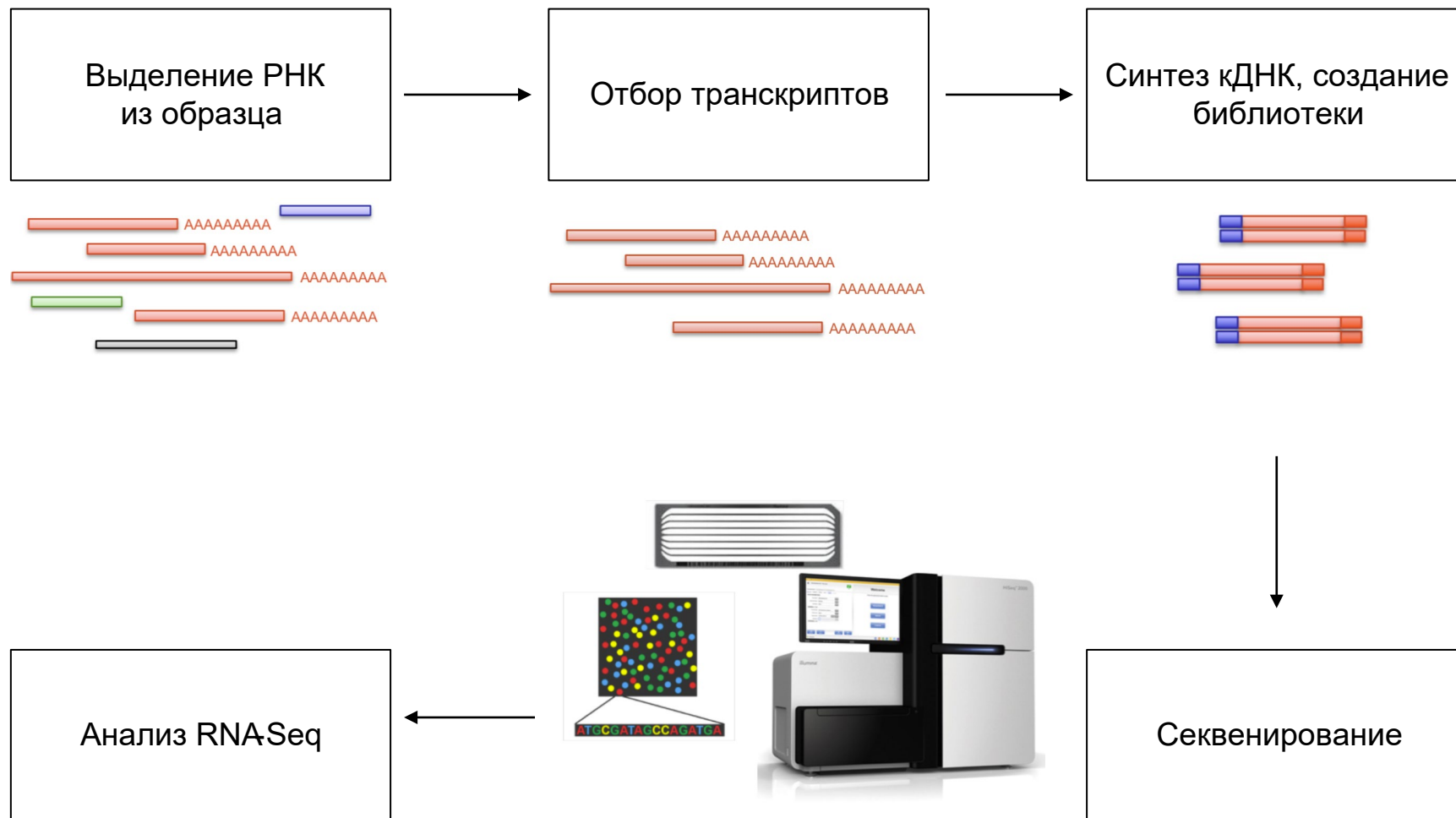


Планирование эксперимента

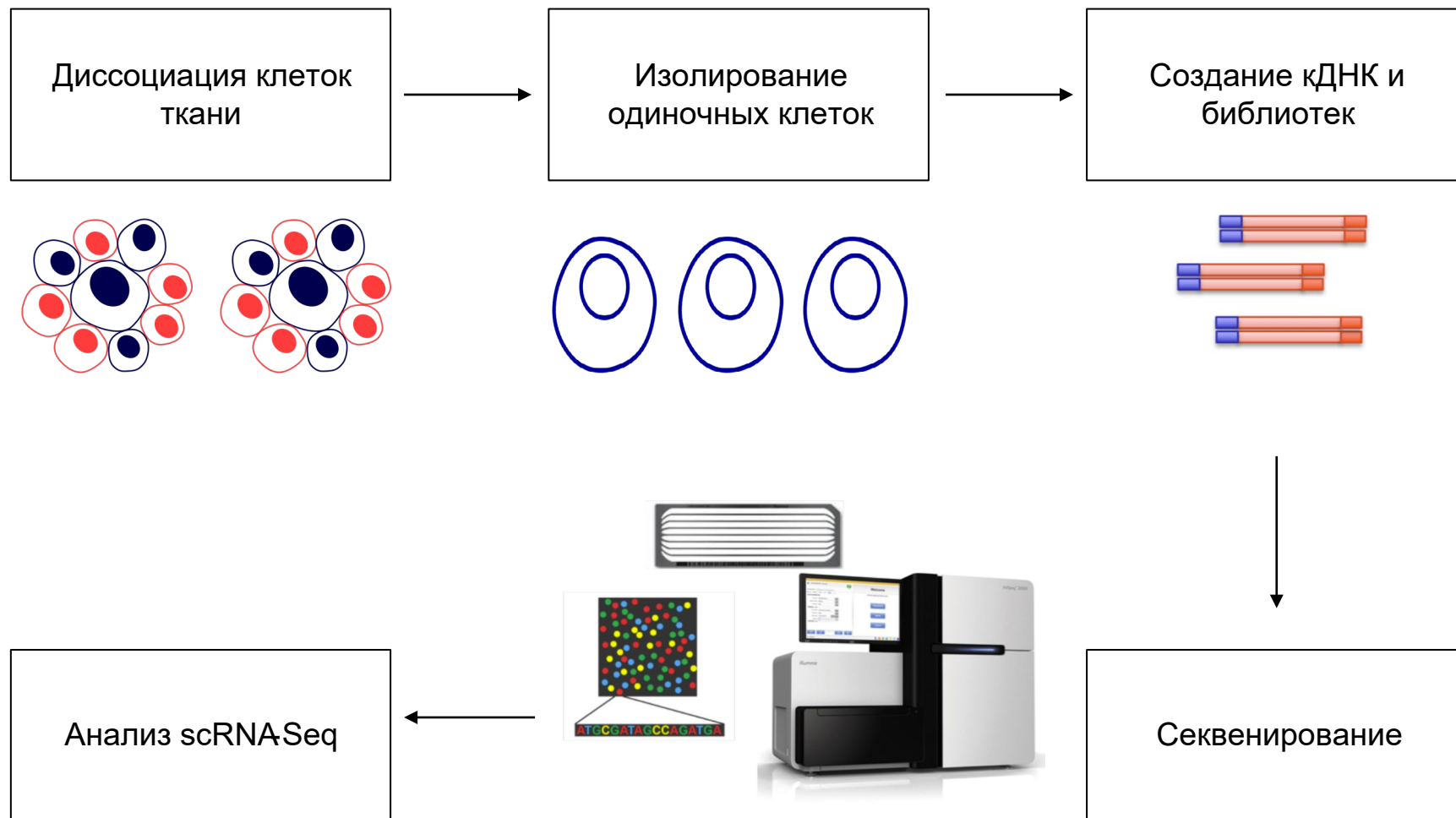
Сначала задайте вопросы— **какое именно явление я хочу изучить?** и **какая у меня гипотеза?** — и только потом ставьте эксперимент. Это касается не только scRNA-Seq, но и вообще любых исследований.



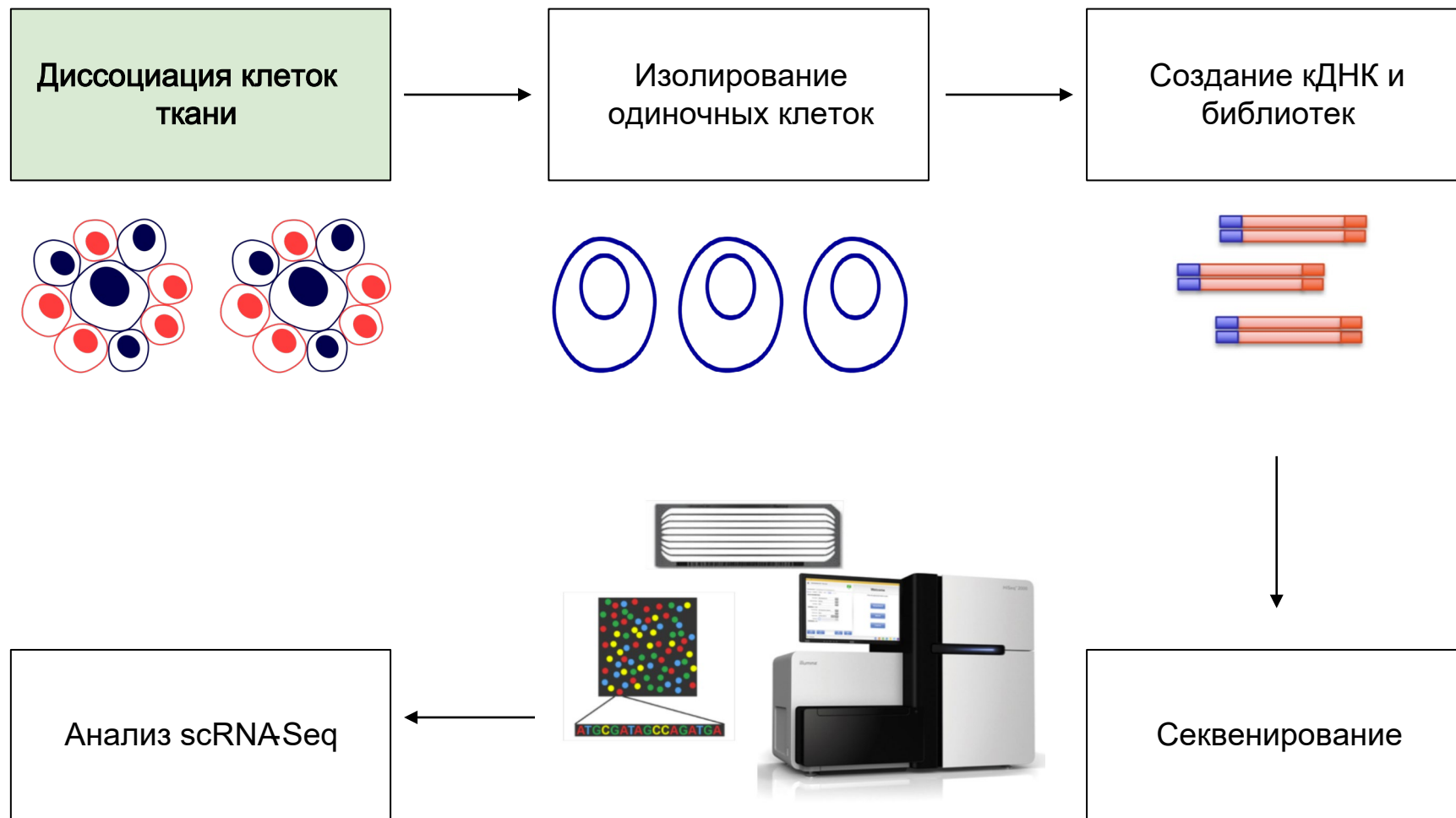
Общая схема эксперимента RNA -Seq



Общая схема эксперимента scRNA -Seq



Общая схема эксперимента scRNA -Seq

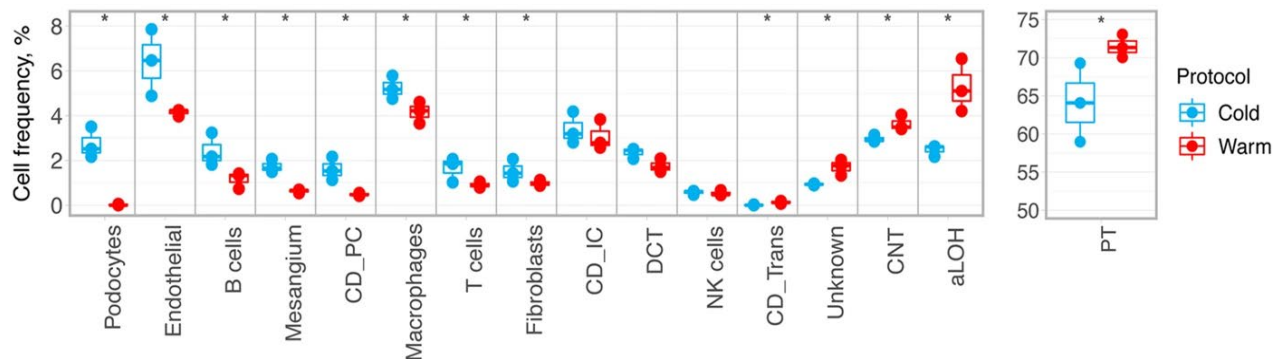


Диссоциация клеток

В основном клетки в изучаемых тканях находятся в “сцепленном” состоянии (они соединены при помощи молекул адгезии и т. п.). Для того, чтобы их “расцепить”, необходимо провести диссоциацию ткани:

- диссоциация при нагревании (напр., Multi-tissue dissociation kit 2) — может вызвать активацию транскрипции генов теплового шока,
- диссоциация на холоду (с использованием протеазы *Bacillus Licheniformis*).

Сравнение методов диссоциации ткани из Denisenko et al., 2020. Некоторые клеточные типы не детектируются при диссоциации “горячим” методом



Создание клеточного атласа всего организма

Диссоциация ткани— это один из самых важных шагов при пробоподготовке scRNA-Seq. Во время этой процедуры клетки могут

1. умереть (и тогда мы увидим смещённый клеточный состав),
2. изменить свой экспрессионный профиль (и тогда мы увидим тот же клеточный состав, но не в нативном состоянии),
3. диссоциировать неполностью (и тогда мы увидим большое количество дублетов).

Для каждой ткани используется собственный протокол диссоциации. И это является очень большой проблемой для создания пан-тканевого клеточного атласа.

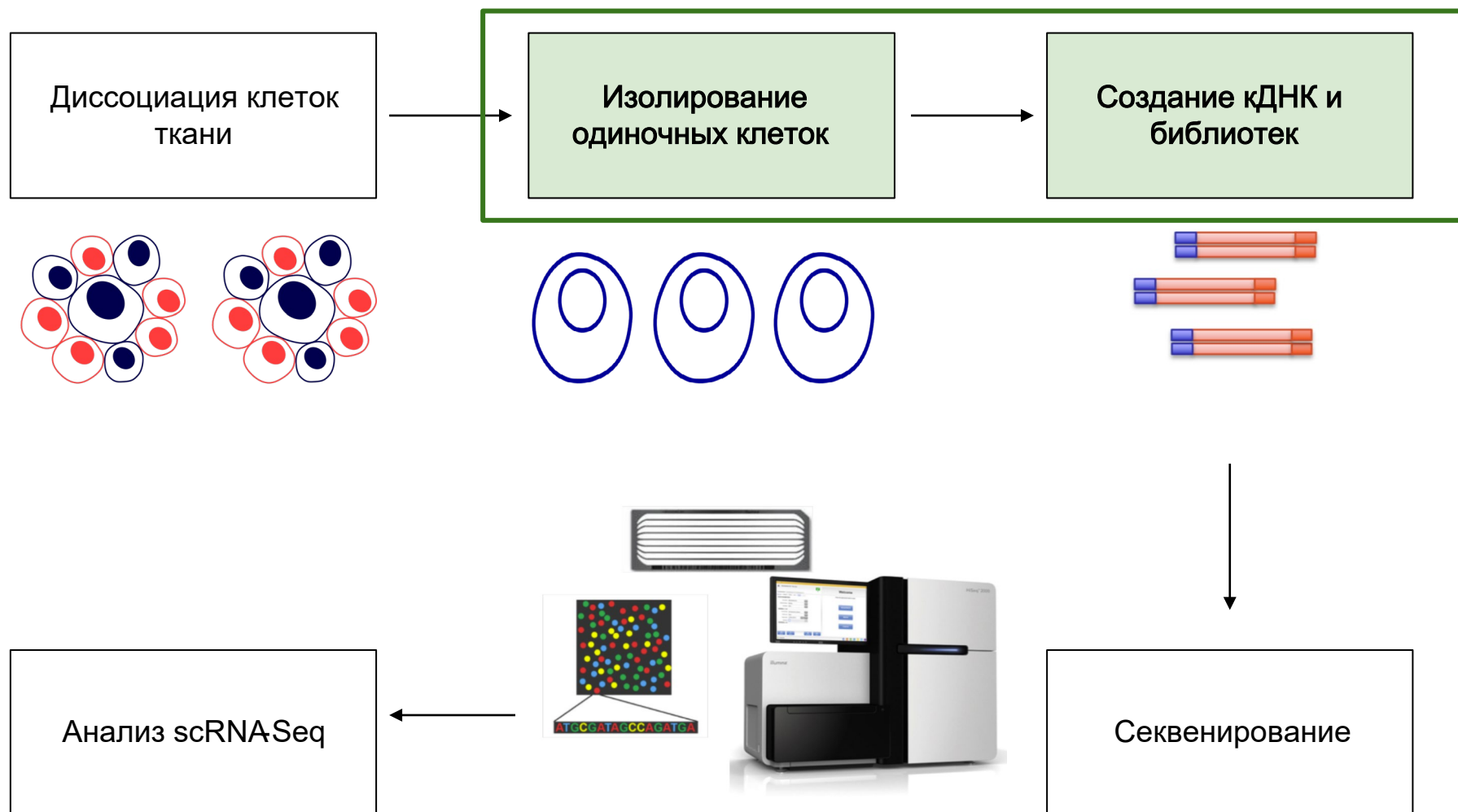


scRNA-Seq vs. snRNA-Seq

- Профилирование ядер из крупных клеток (> 40 мкм), которые не проходят через микрофлюидику
- Позволяет профилировать отдельные ядра, выделенные из замороженных тканей, отделяя получение ткани от немедленной обработки образца
- snRNA-Seq может также обрабатывать образцы, которые не могут быть успешно диссоциированы, даже если они свежие, из-за хрупкости клеток

Ядра имеют меньшее количество мРНК по сравнению с клетками, и их сложнее обогатить для конкретных интересующих типов клеток.

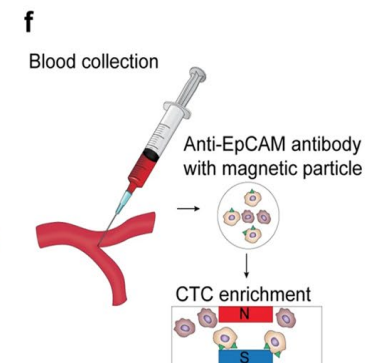
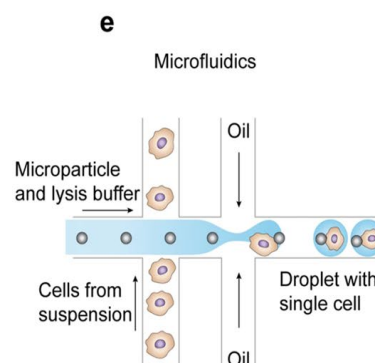
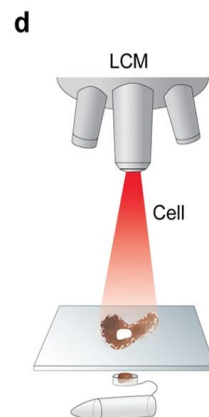
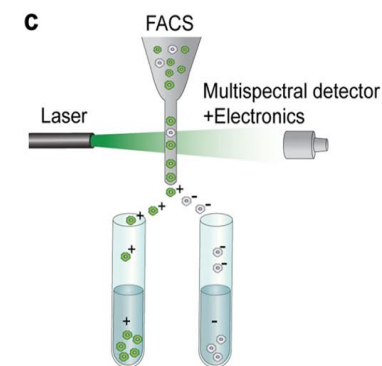
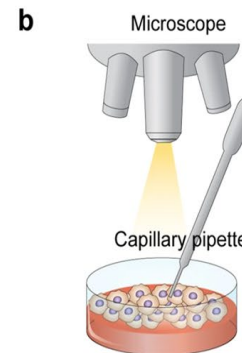
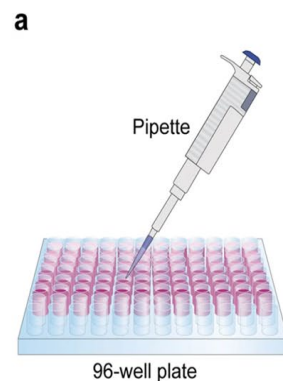
Общая схема эксперимента scRNA -Seq



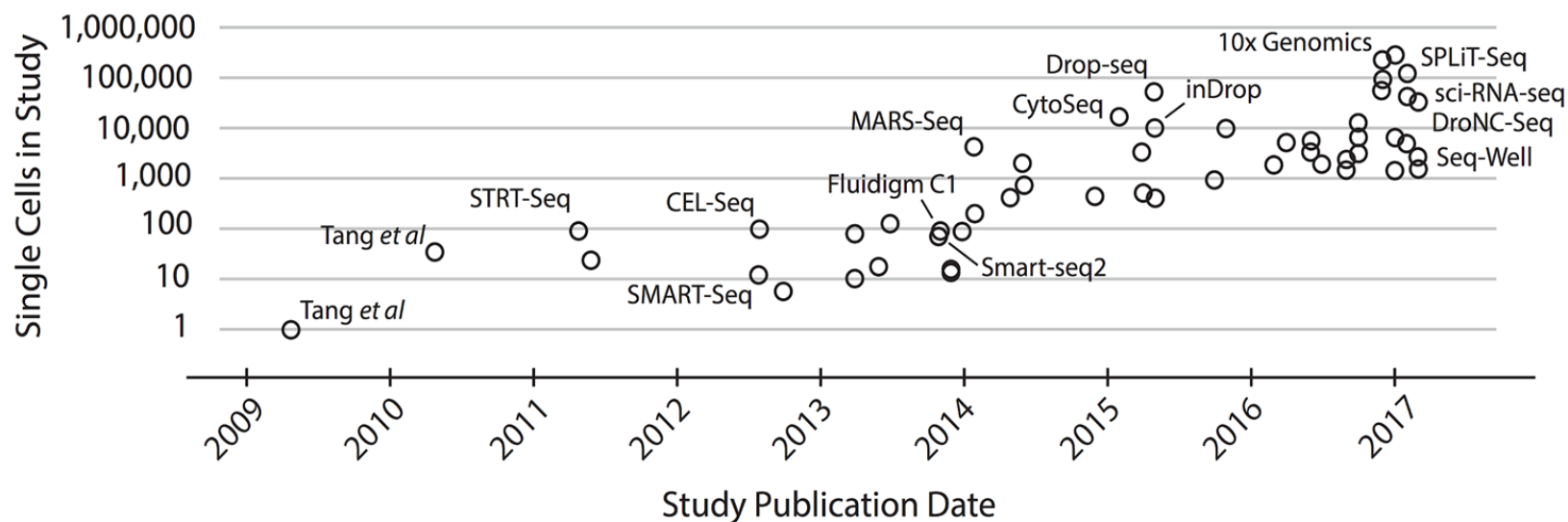
Изолирование одиночных клеток

Существует множество различных способов изолировать одиночные клетки

Как правило, стадия изолирования одиночных клеток очень тесно связана с дальнейшими стадиями подготовки библиотек, поэтому рассмотрим их вместе

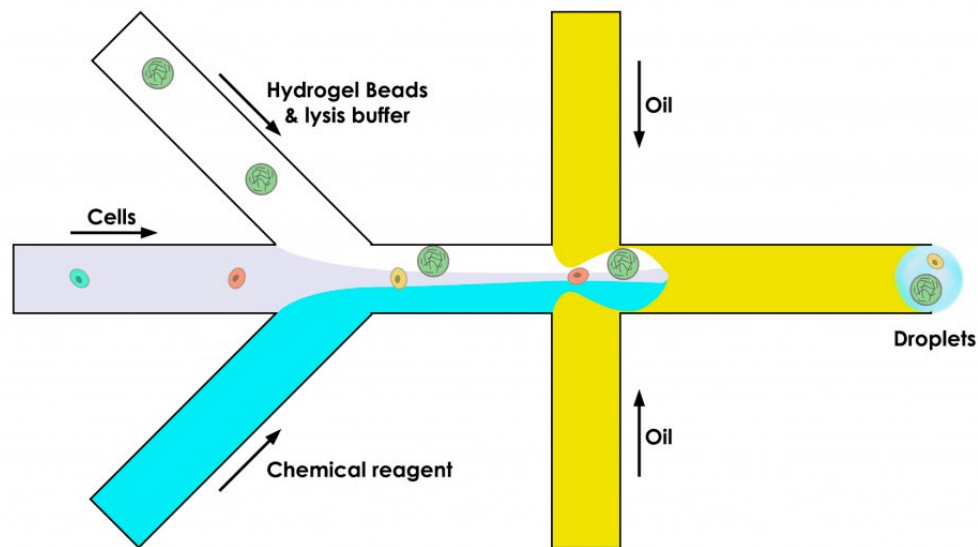


История развития методов scRNA -Seq



Droplet -based (капельные) методы

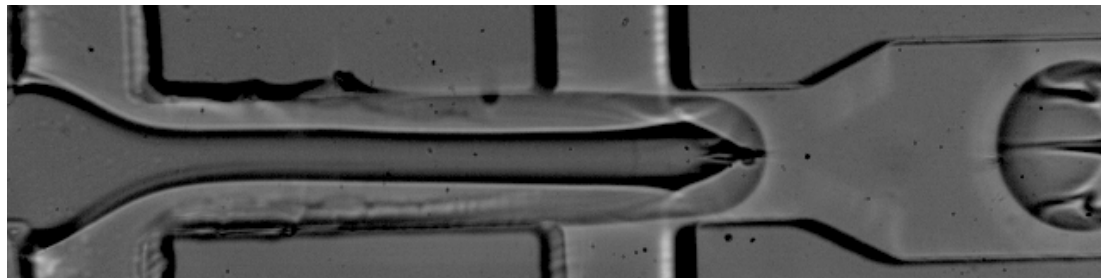
Капельные методы основаны на том, что клетки изолируются друг от друга, поступая по капиллярам в масляную фракцию и образуя там отдельные компартменты, содержащие необходимые реагенты и одну клетку



Источник: <http://mccarrolllab.org/dropseq/>

Droplet -based (капельные) методы

Капельные методы основаны на том, что клетки изолируются друг от друга, поступая по капиллярам в масляную фракцию и образуя там отдельные компартменты, содержащие необходимые реагенты и одну клетку

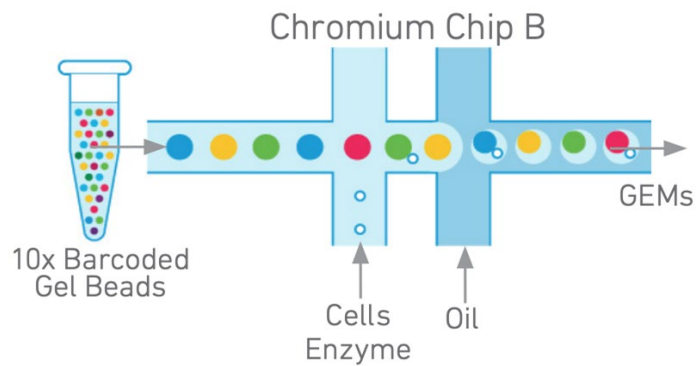


Источник: https://www.elveflow.com/microfluidic-reviews/droplet-digital-microfluidics/drop-seq/#_ftn4

10x Chromium

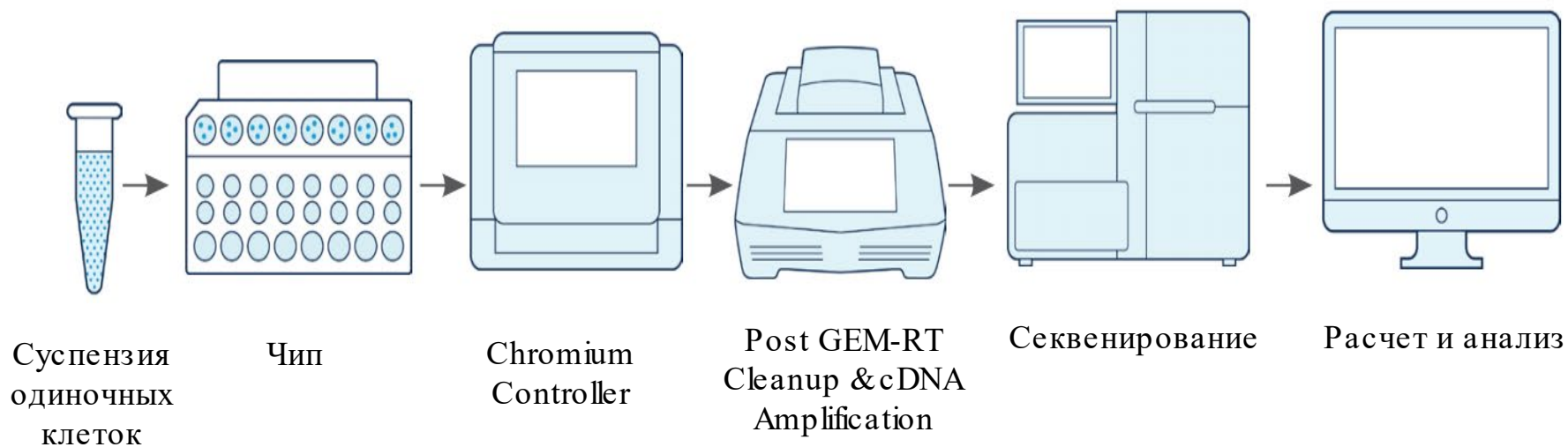
Источник: 10xgenomics.com

Контроллер 10x Chromium является сейчас одной из самых популярных платформ для создания библиотек scRNA-Seq



Процесс пробоподготовки

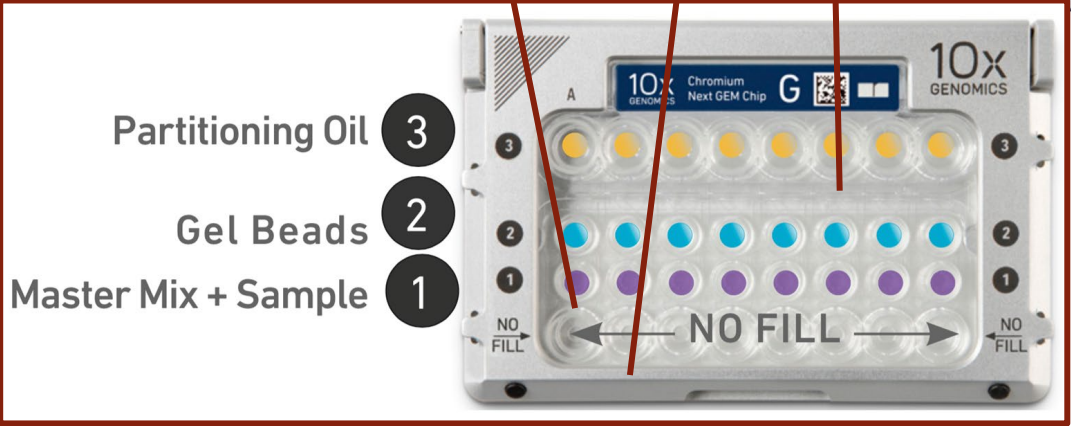
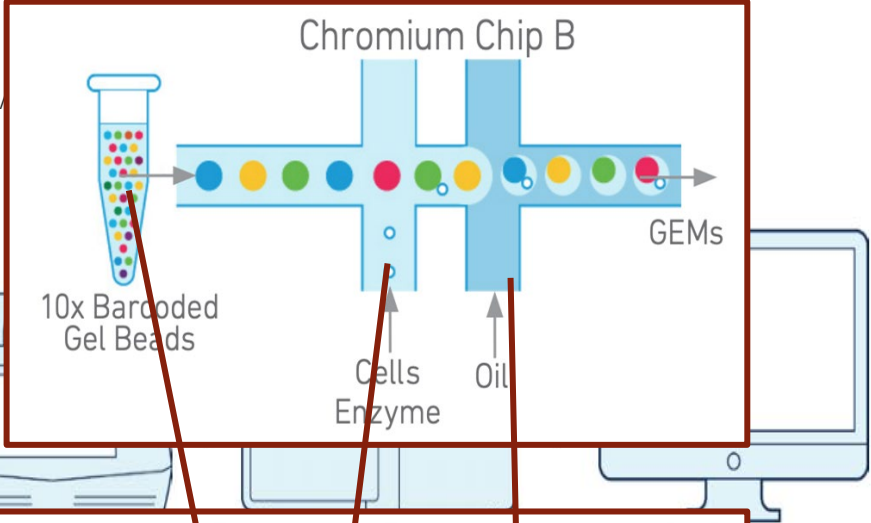
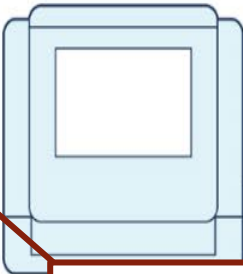
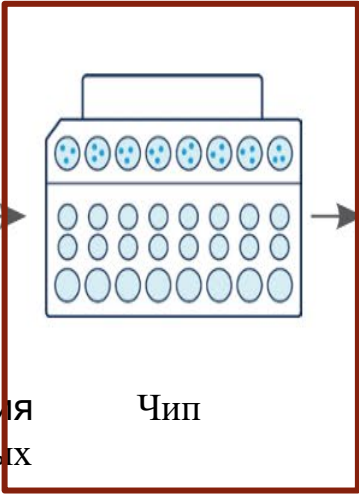
3' Gene Expression ~\$1480/образец (WES ~150\$/образец)



Процесс пробоподготовки

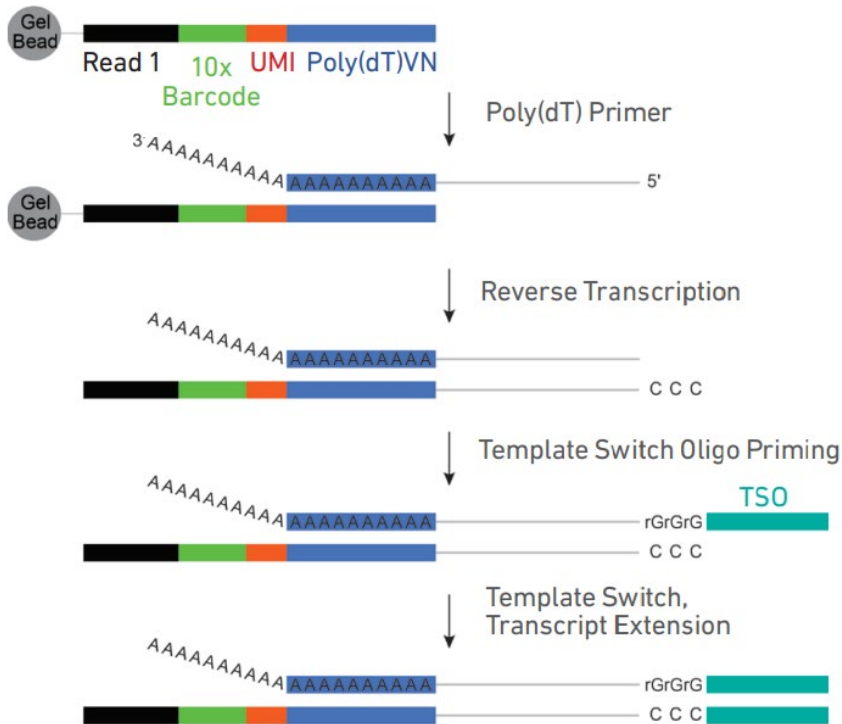
3' Gene Expression ~\$1480

Суспензия
одиночных
клеток



анализ

10x v3 3' Gel Beads

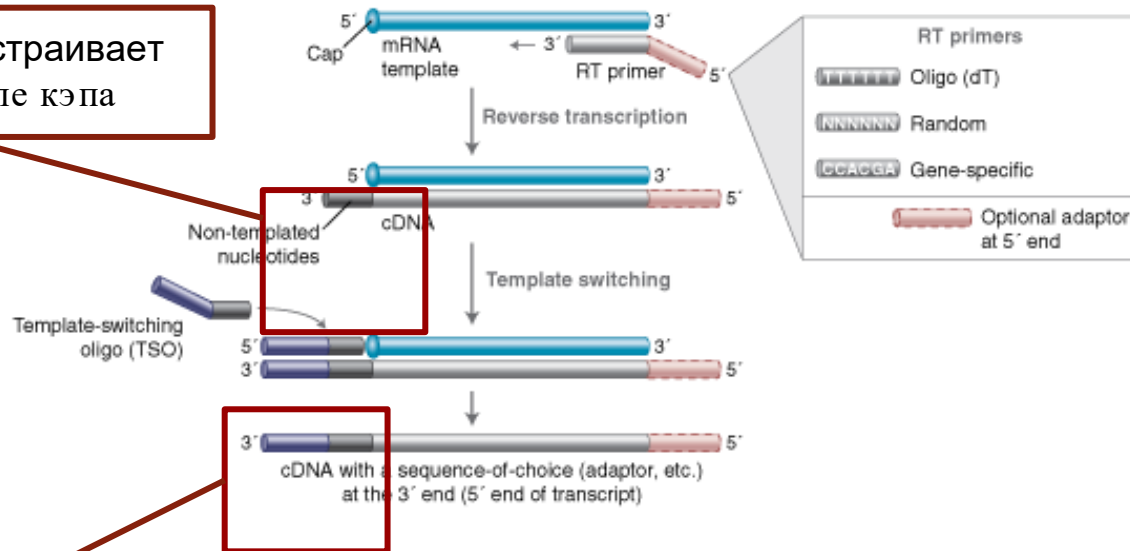


К каждому шарикю прикреплён уникальный праймер, который состоит из

1. Праймера Illumina TruSeq Read 1,
2. **Баркода** (последовательности, которая одинакова у всех праймеров данного шарика, однако различается между всеми шариками),
3. **UMI** (последовательности, которая уникальна для всех праймеров данного шарика, но может повторяться между шариками),
4. Poly(dT)-последовательности.

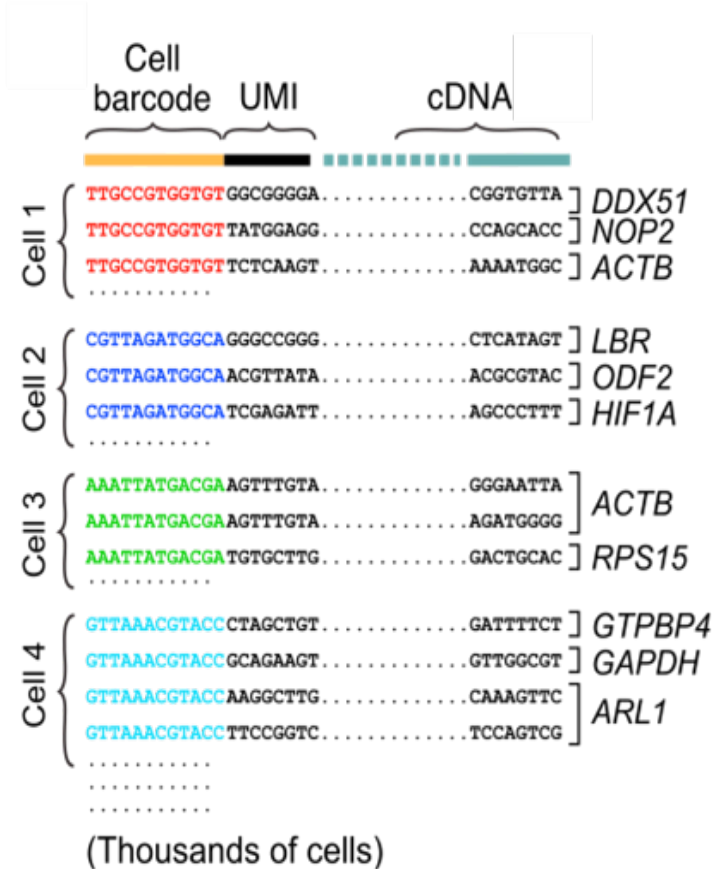
Template Switch Oligo (TSO)

Полимераза достраивает
ССС строго после кэпа



После гибридизации TSO и
ССС происходит смена
матрицы синтеза

Баркоды и UMI



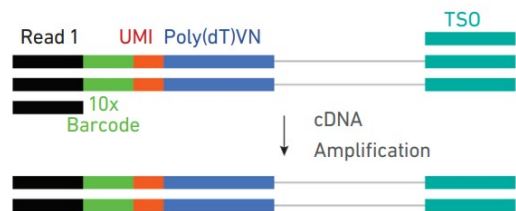
Последовательность баркода, как и UMI, будет в итоге отсеквенирована

Последовательность баркода определяет клетку, к которой мы отнесём данный транскрипт

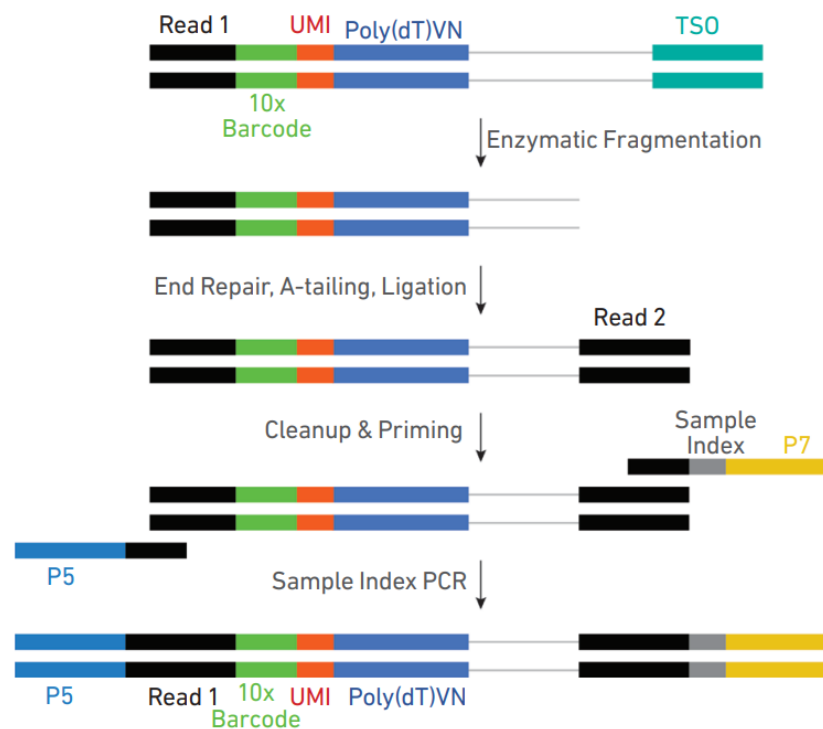
Последовательность UMI позволяет определить ПЦР-дубликаты (amplification bias — это достаточно большая проблема в случае, когда у нас мало РНК)

Подготовка библиотек для секвенирования

ПЦР



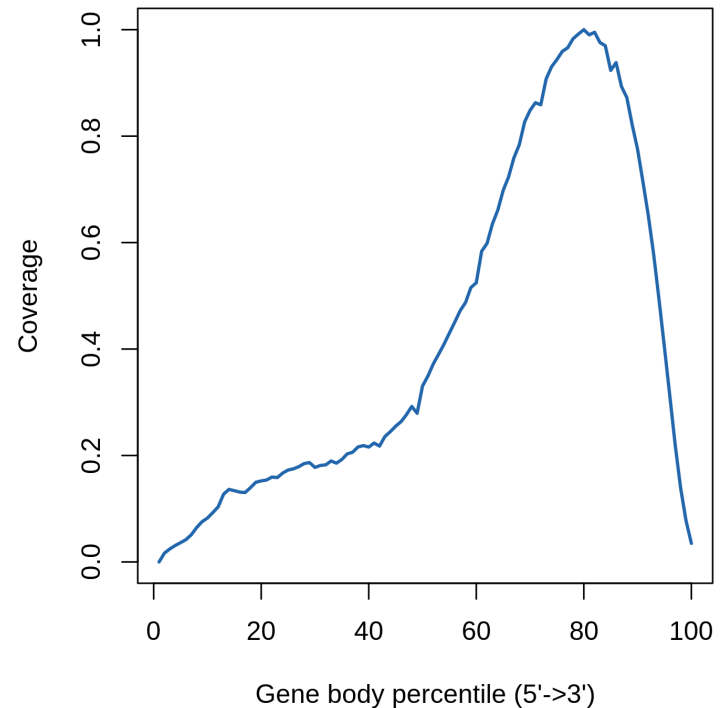
Подготовка библиотеки



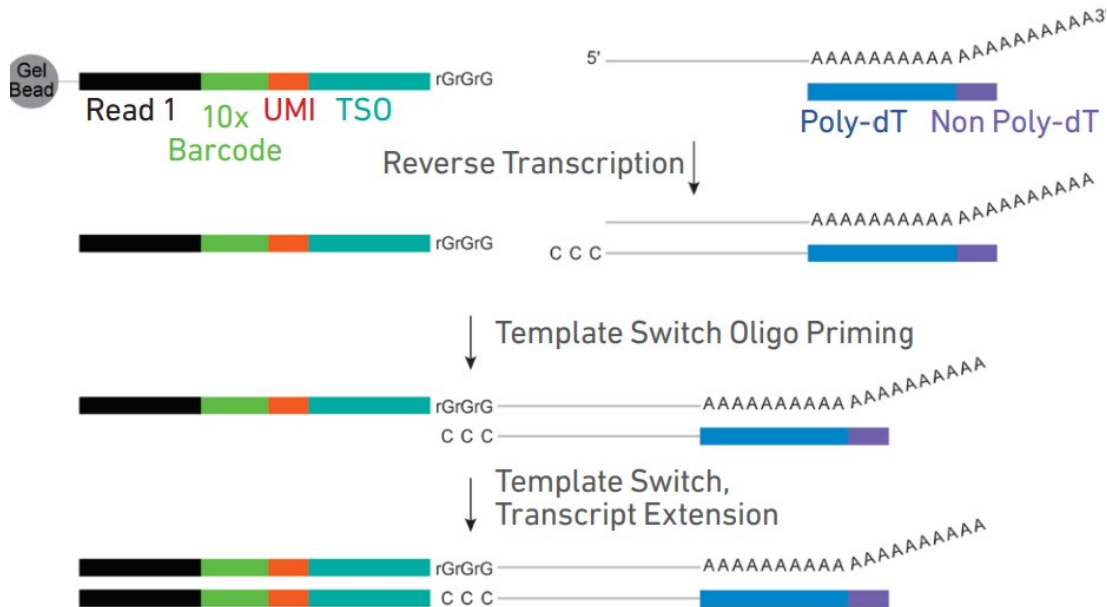
Покрытие транскрипта ридами (3' -протокол)

Несмотря на TSO, у нас присутствует стадия фрагментации кДНК. Более того, после этой стадии пришивается только один из концов, праймер для секвенирования другого конца всегда зафиксирован на 3'-конце последовательности. Как итог у нас возникает неравномерность в покрытии транскрипта ридами.

Источник: https://liulab-dfci.github.io/MAESTRO/example/RNA_infrastructure_10x/RNA_infrastructure_10x.html



10x v3 5' Gel Beads



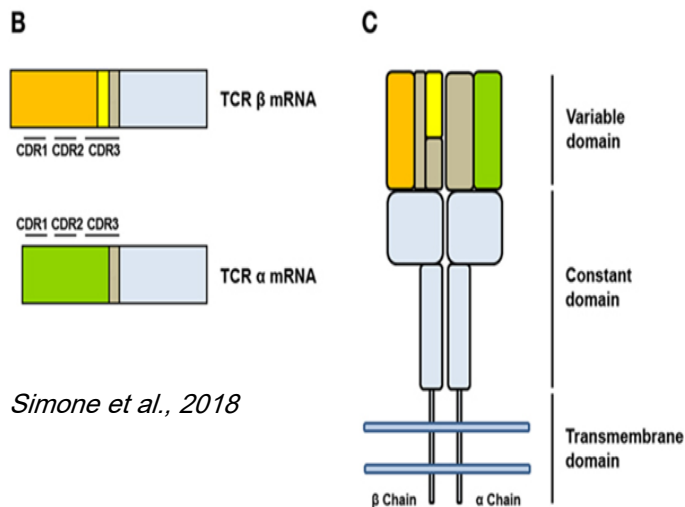
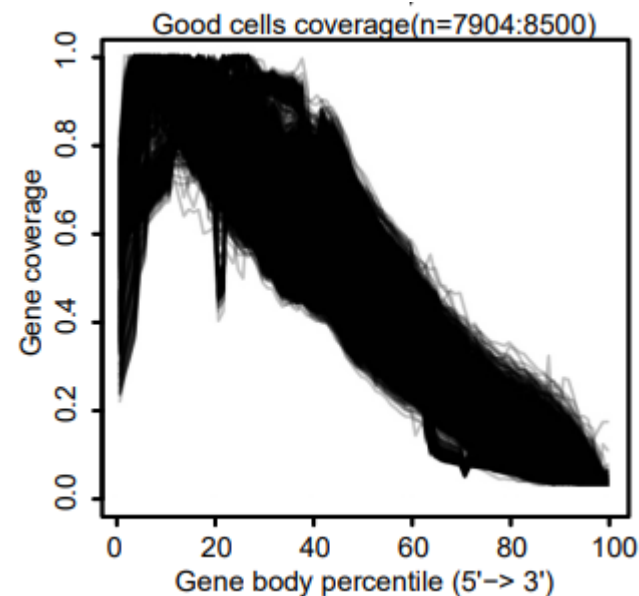
Бывает так (когда? зачем?), что нам катастрофически необходимо хорошее покрытие на 5'-конце транскриптов

Эlegantное решение данной проблемы — это праймер не из баркода-UMI-oligo(dT), а из баркода-UMI-TSO

Покрытие транскрипта ридами (5' -протокол)

В случае с 5'-протоколом также наблюдается неравномерность покрытия транскрипта прочтениями, однако уже в сторону 5'-конца транскрипта

Обогащение 5'-концов транскрипта необходимо тогда, когда нам нужно дополнительно обогатить библиотеку V(D)J-фрагментами для определения T- или B-клеточных рецепторов иммунных клеток

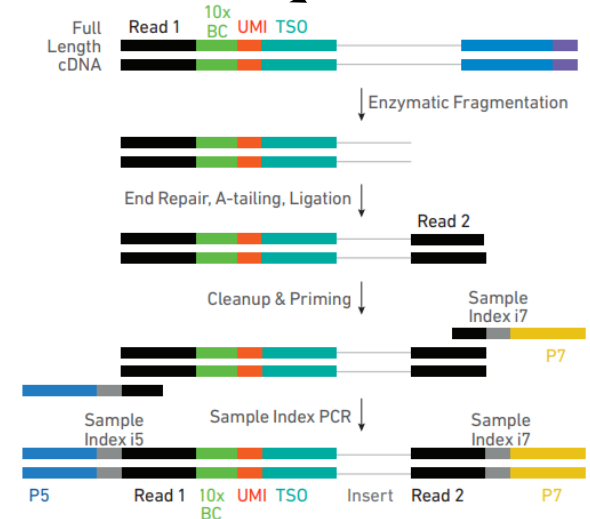
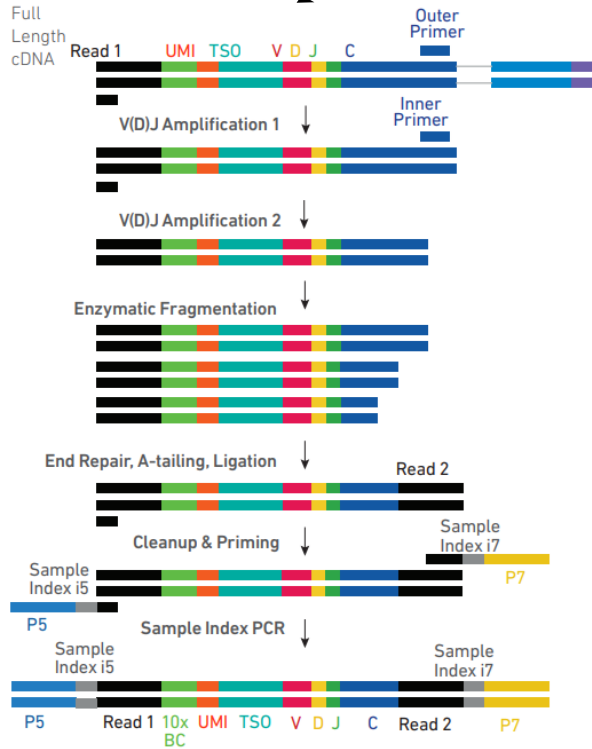


Simone et al., 2018

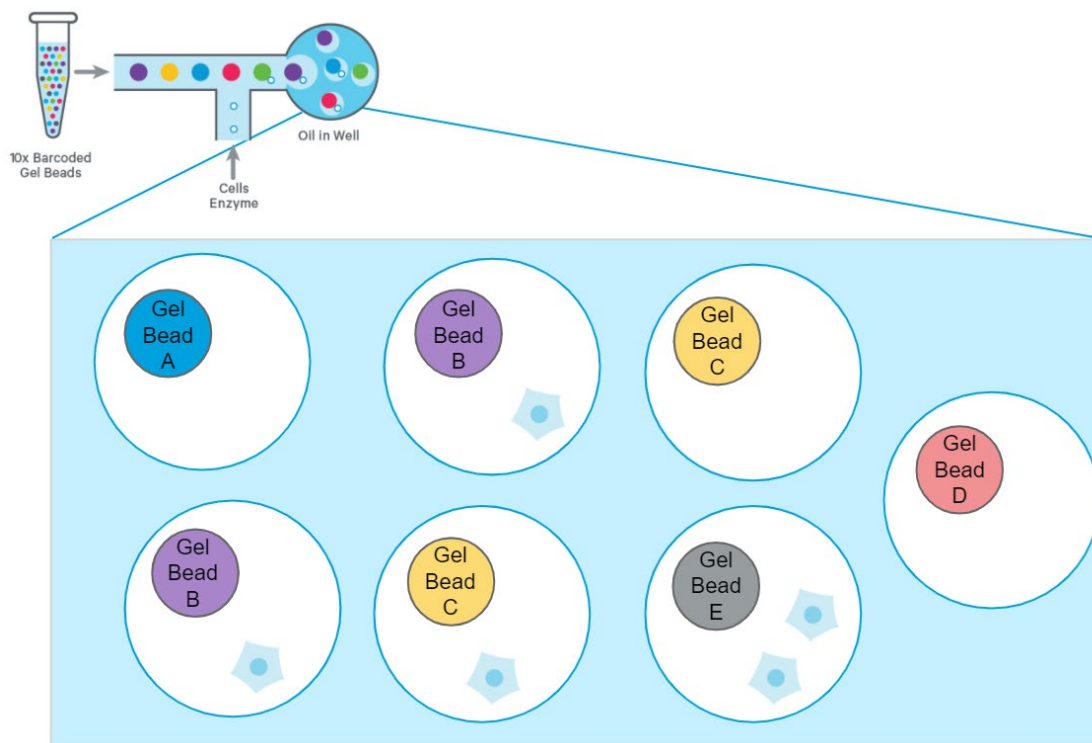
Abugessaisa et al., 2019

V(D)J-библиотека

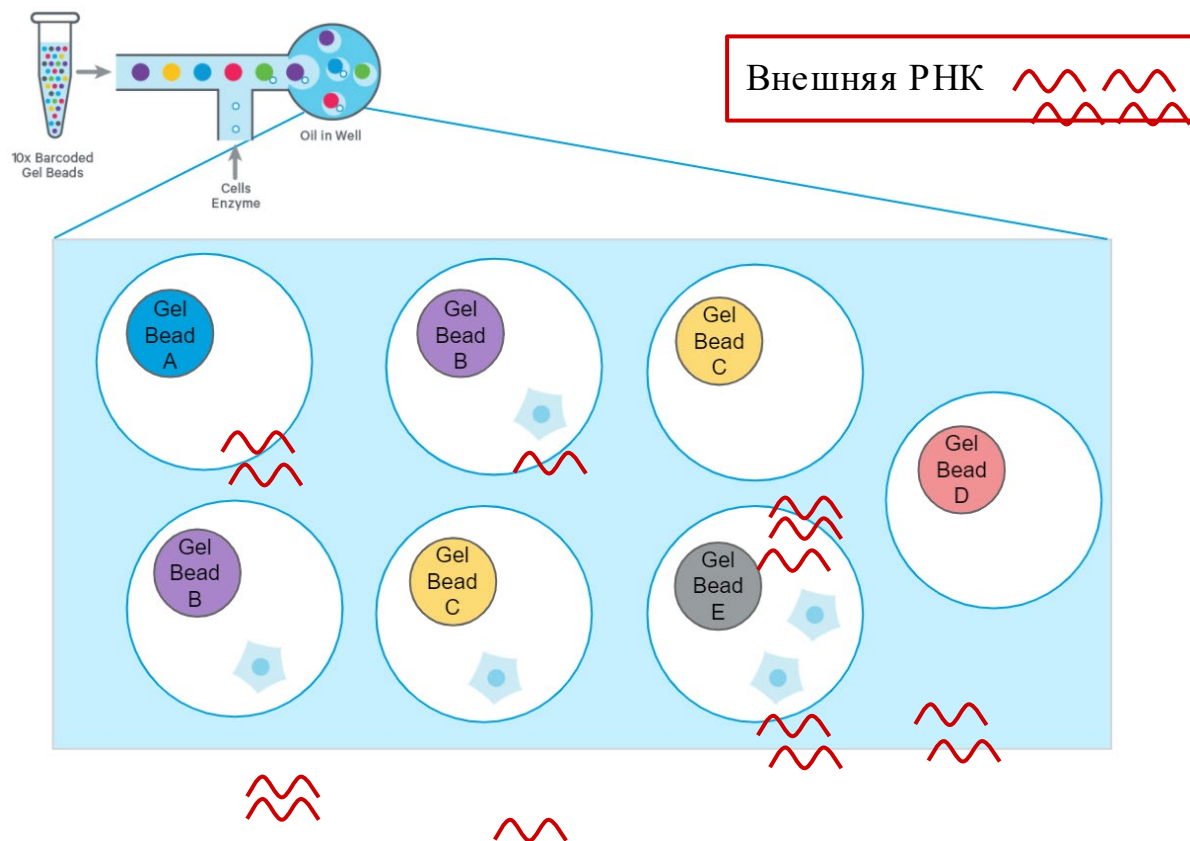
5'-GEX библиотека



Пустые капли и дублиеты



Пустые капли и дублиеты

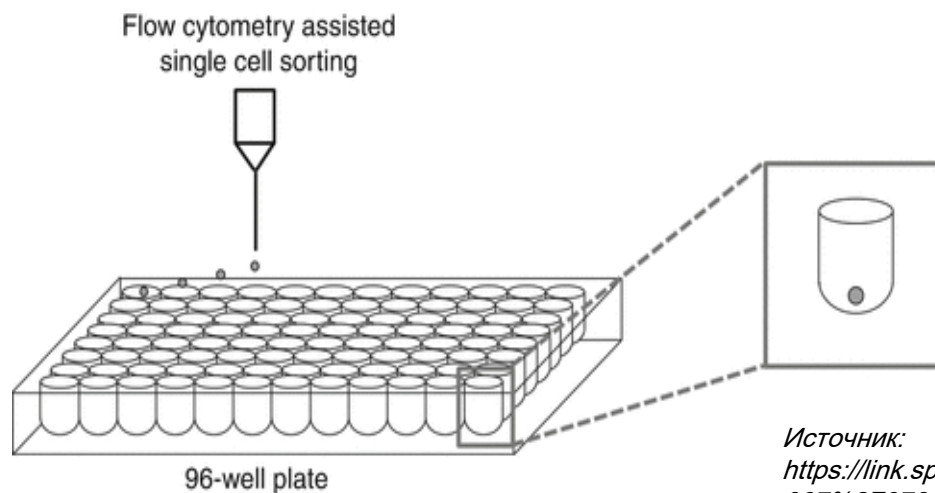


Smart -seq

Разделение клеток на лунки при помощи сортера

Существует ряд методов, которые требуют изолирования одиночных клеток при помощи клеточного сортера (например, методы класса Smart-seq)

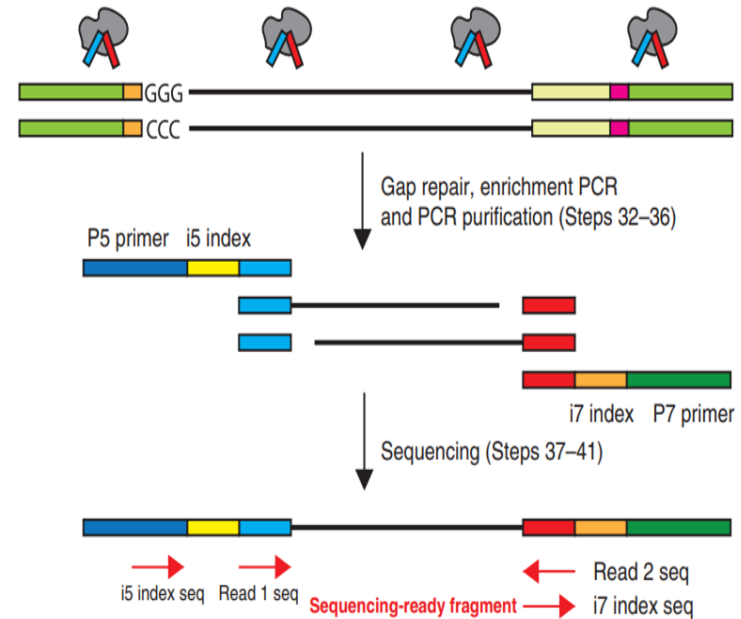
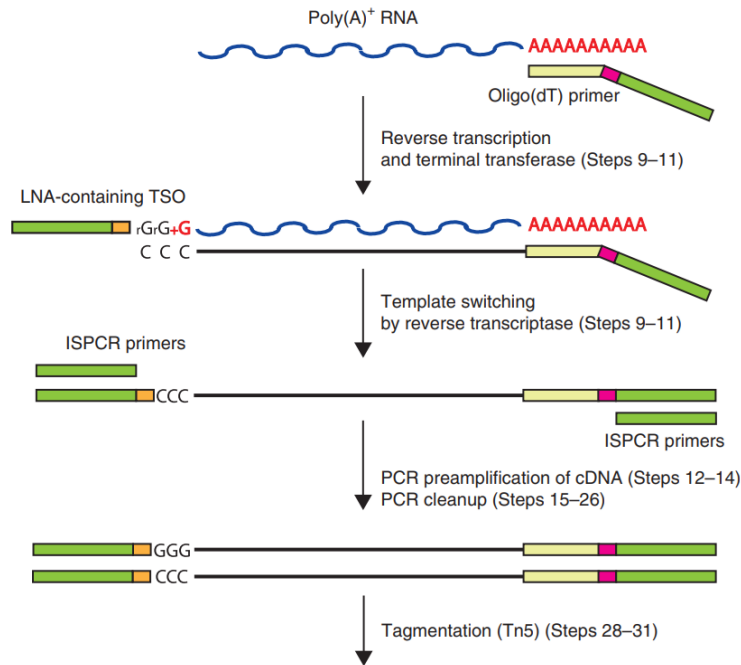
Главная проблема таких методов в ограниченном числе клеток, которые можно отсеквенировать за раз



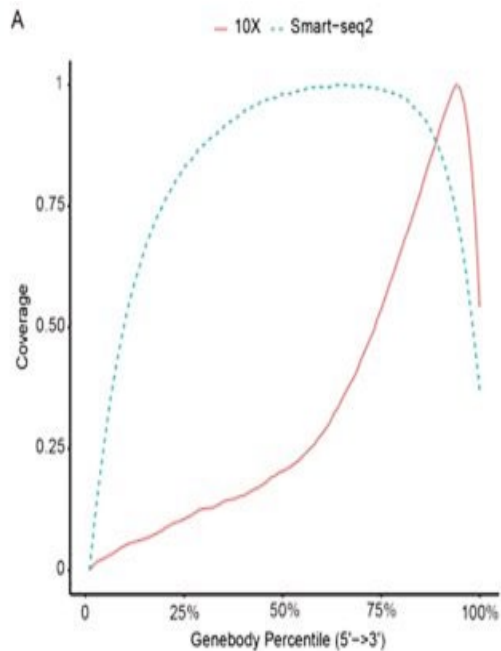
Источник:
https://link.springer.com/referenceworkentry/10.1007%2F978-1-4419-9863-7_625

Smart-seq2

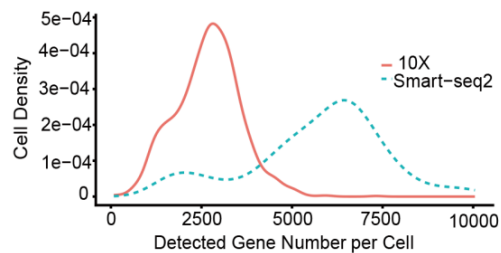
Контроль за ПЦР-дубликатами не ведётся (отсутствуют UMI), а идентичность клеток определяется образец-специфичными адаптерами для секвенирования (отдельный на каждую лунку)



Smart-seq2 vs. 10x Chromium GEX



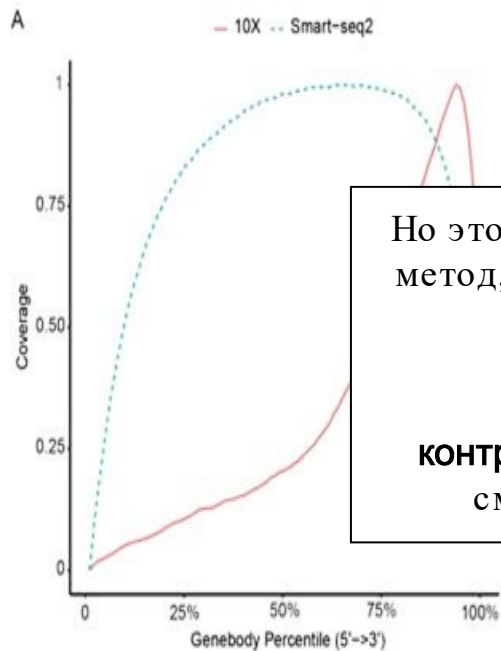
Smart-seq2 позволяет достичь более равномерного покрытия, чем 10x Chromium



Smart-seq2 охватывает экспрессию большего числа генов, чем 10x Chromium

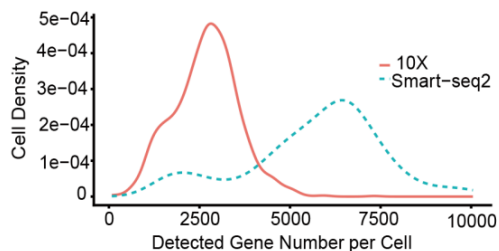
Smart-seq2 vs. 10x Chromium GEX

Источник: <https://daydaynews.cc/en/science/single-cell-transcriptome-smart-seq-2-or-10x-g-c.html>



Но это гораздо более **дорогой** и **трудоёмкий** метод, поэтому чаще вместо него используют 10x Chromium

Также Smart-seq2 **не позволяет контролировать ПЦР -дубликаты** и часто смещает анализируемые экспрессии

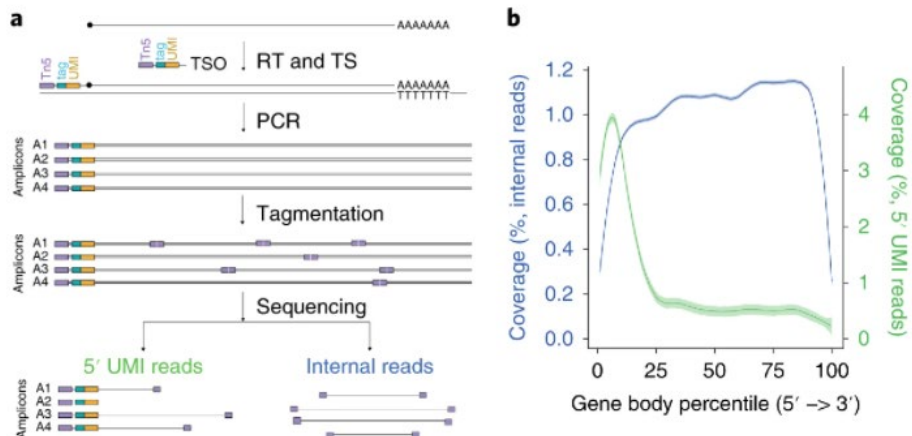


Smart-seq2 охватывает экспрессию большего числа генов, чем 10x Chromium

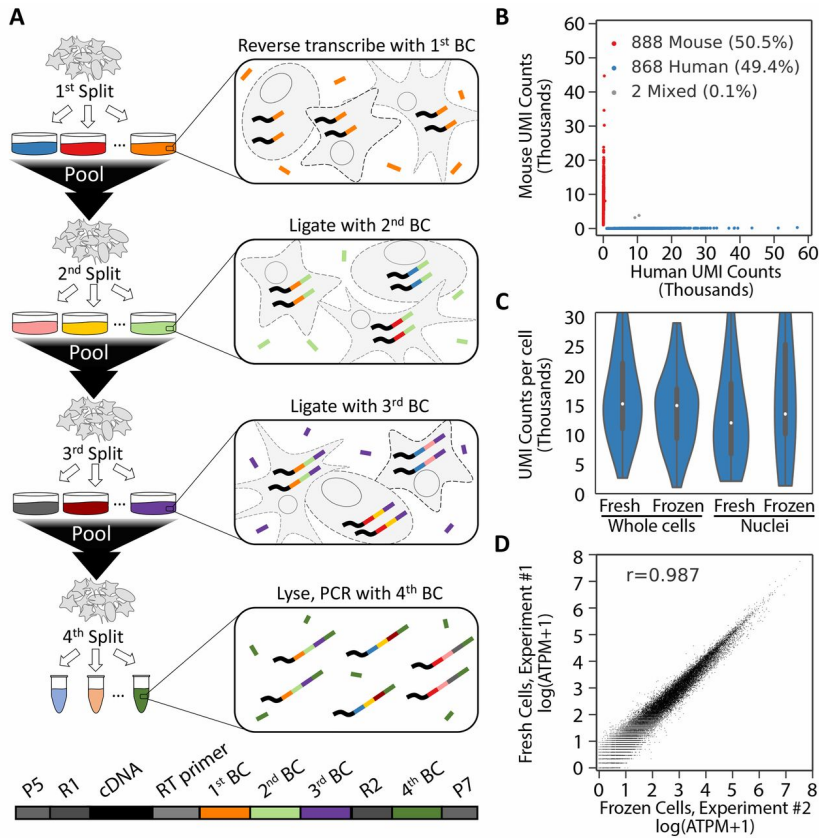
Smart-seq3

Добавлены UMI, перед которыми содержится специальный тег, который позволяет распознать последовательность UMI

Как итог мы имеем как контроль за ПЦР-дубликатами, так и полное покрытие “внутренними” ридами, что важно, например, в случае, когда нам хочется изучить мутации



Parse Biosciences Evercode (ex SPLiTSeq)



PRODUCTS ▾

TECHNOLOGY

Introducing The Parse Single Cell Whole Transcriptome Solution



The Parse Single Cell Whole Transcriptome Kit is the most scalable single cell RNA-seq solution on the market, allowing you to profile 100,000 cells and 48 samples together in one run.

LEARN MORE

REQUEST A QUOTE