

李钰洁, 陈洪波, 徐珂, 等. 单细胞 RNA 测序在畜禽遗传育种中的研究进展 [J]. 畜牧与兽医, 2024, 56 (3): 124-131.

LI Y J, CHE H B, XU K, et al. Progress in research on single cell RNA sequencing in genetics and breeding of livestock [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2024, 56 (3): 124-131.

单细胞 RNA 测序在畜禽遗传育种中的研究进展

李钰洁¹, 陈洪波², 徐珂², 何小丽³, 乔木¹, 吴俊静¹, 彭先文¹, 梅书棋¹, 徐忠^{1*}

(1. 湖北省农业科学院畜牧兽医研究所/动物胚胎工程及分子育种湖北省重点实验室, 湖北 武汉 430064;

2. 武汉轻工大学动物科学与营养工程学院湖北省家畜种业技术创新中心, 湖北 武汉 430023;

3. 庙岭畜牧兽医站, 湖北 鄂州 436031)

摘要: 单细胞 RNA 测序 (single cell RNA sequencing, scRNA-seq) 是在单细胞水平上实现高通量测序的技术, 可以用来研究特定细胞亚群基因表达的异质性, 帮助我们识别未知或稀有的细胞类型, 并为进一步的研究奠定基础。scRNA-seq 技术的进步使其在肿瘤、临床医学和发育生物学等领域得到了广泛应用, 但在畜禽育种中的研究还较少。本文介绍了 scRNA-seq 一般流程, 着重阐述了其在畜禽的生殖分化、毛囊发育和肌肉生成等方面的研究现状以及前景, 以期 scRNA-seq 在畜禽遗传育种中的研究和应用提供理论依据。

关键词: scRNA-seq; 畜禽; 遗传育种

中图分类号: S813 **文献标志码:** A **文章编号:** 0529-5130(2024)03-0124-08

Progress in research on single cell RNA sequencing in genetics and breeding of livestock

LI Yujie¹, CHEN Hongbo², XU Ke², HE Xiaoli³, QIAO Mu¹, WU Junjing¹,

PENG Xianwen¹, MEI Shuqi¹, XU Zhong^{1*}

(1. Hubei Key Laboratory of Animal Embryo Engineering and Molecular Breeding/Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Hubei Academy of Agricultural Sciences, Wuhan 430064, China;

2. Hubei Province Livestock Seed Industry Technology Innovation Center, School of Animal Science and Nutritional Engineering, Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430023, China;

3. Miaoling Animal Husbandry and Veterinary Station, Ezhou 436031, China)

Abstract: Single cell RNA sequencing (scRNA-seq) is a high-throughput sequencing technique at the single cell level, which can be used to study the heterogeneity of gene expression in specific cell subsets, help us to identify unknown or rare cell types, and lay a foundation for further research. With its progress, the scRNA-seq technology has been widely used in the fields of oncology, clinical medicine and developmental biology, but it is rarely used in research on livestock and poultry breeding. This paper introduces the general process of scRNA-seq, focusing on its research status and prospect in research on reproductive differentiation, hair follicle development and muscle production of livestock and poultry, in order to provide theoretical basis for research and application of scRNA-seq in livestock and poultry genetics and breeding.

Keywords: scRNA-seq; livestock; genetics and breeding

测序技术发展源于 1970 年, 在几十年间, 各种测序方法经历了快速演变, 并被应用于各种特定的研究方向, 为复杂的生物系统提供了许多宝贵的理论依

据。单细胞测序技术主要由单细胞基因组测序 (single cell DNA sequencing, scDNA-seq), 单细胞 RNA 测序 (single cell RNA sequencing, scRNA-seq) 和单细胞表观基因组测序这三类测序构成, 在肿瘤、发育生物学、微生物学、神经科学等领域发挥重要作用, 正成为生命科学研究关注的焦点。2017 年 10 月 16 日, “人类细胞图谱计划” 首批拟资助的 38 个项目正式公布, 单细胞测序进入繁荣的新时代。近年来单细胞基因组测序通过研究单细胞分辨率的基因组突变

收稿日期: 2023-04-23; 修回日期: 2023-12-25

基金项目: 湖北省农业科技创新中心创新团队项目 (2021-620-000-001-018); 湖北省自然科学基金项目 (2022CFB918); 国家生猪产业技术体系项目 (CARS-35)

第一作者: 李钰洁, 女, 硕士研究生

* 通信作者: 徐忠, 博士, 助理研究员, 研究方向: 动物遗传育种, E-mail: xz8907@163.com。

测序分析,初步探索了人类胚胎和器官发育谱系图谱。单细胞表观基因组测序可以从单细胞染色质状态、三维基因组、组蛋白修饰和转录因子结合等方面研究细胞表观遗传调控机制。转录组测序是研究基因表达的主要手段,被广泛应用于畜禽功能基因挖掘和分子遗传网络调控机制研究中。传统的转录组测序是在多细胞基础上进行的,实际得到的是大量细胞基因表达数据的平均值。scRNA-seq是在单细胞水平对转录组进行高通量测序分析,研究单个细胞的行为及其内部基因表达情况,可以揭示细胞群体差异和细胞发育谱系关系^[1]。与传统转录组测序技术相比,scRNA-seq能检测出混杂样品测序所无法获得的细胞异质性信息^[2],进行新细胞的鉴定,成为了不同领域中研究细胞异质性的有效工具^[3]。自2009年首个单细胞转录组测序技术发布以来^[4-5],scRNA-seq已被越来越广泛地应用于基础科学研究中。目前单细胞测序技术在畜禽遗传育种上的研究迅速,为提高育种效率提供新的理论技术,促进畜牧产业的发展。本文对scRNA-seq技术的流程要点及其在畜禽遗传育种中的应用进展进行综述,分析目前研究存在的挑战,为畜禽相关研究提供理论依据。

1 单细胞 RNA 测序技术

scRNA-seq是对单个细胞进行转录组范围的分析,需要分离和裂解单细胞,将其RNA逆转录为cDNA,然后扩增cDNA以生成高通量测序文库。随着测序技术的不断发展,scRNA-seq数据的快速生成克服了大量RNA序列对样本中所有细胞的基因表达进行平均的缺陷,避免了单个细胞特性的丢失,能够根据单个细胞的表达谱特性对个体进行高精度的鉴别,并能够传达出基因间的调控关系,追踪发育过程中不同细胞谱系的轨迹。目前使用的scRNA-seq技术几乎都包含了单细胞悬液制备、单细胞分离、文库构建与测序及数据分析这四个步骤。

1.1 单细胞悬液的制备

实体组织通常采用机械法,简单无污染,但人工机械裂解组织会由于动作幅度和速度差异使活细胞的获得率有差异,且容易造成细胞损伤。酶消化法^[6-8]是使组织间和细胞间的连接水解,但其孵育条件的控制有一定难度,固体组织细胞易结成团,细胞得率低,且组织的酶消化会影响scRNA-seq数据分析的基因表达伪影,适合的样本种类包括肝脏、肾脏、心肌等。机械-酶消化法是两种方法的组合,可在许多情况下用来缩短整体处理时间。

1.2 单细胞分离

制备的单细胞悬液可以依据其样本的特点,选择

有限稀释法、显微操作法、激光捕获显微切割、荧光激活流式分选以及微流控装置^[9-10]等方法分离为单个细胞。其中有限稀释法是一种常用的分离单细胞的方法,它通过人工或机器操作移液来稀释细胞悬液,虽然操作简单,但效率不高,成功率也较低。显微操作法可以分离出特定的细胞,但是对操作要求很高,通量小。激光捕获显微切割^[11]是利用激光切割并捕获细胞,容易破坏细胞所含的遗传物质。荧光激活流式分选是一种利用不同荧光探针来标记目标细胞的技术,可在短时间内通过检测器分离,通量高,但是操作需要大量的细胞^[12]。微流控装置分离,是在封闭的微流控设备中执行细胞捕获、分选和裂解,最大限度减少了操作过程中受到外源RNA和核糖核酸酶污染的机会^[13],且通量大,效率高。目前使用最广泛的是基于液滴的微流体,包括inDrop、Drop-seq^[14]和10× Genomics三个技术。inDrop细胞捕获效率极低,适用于分析非常小的组织样本,10× Genomics获得的数据比Drop-seq质量更高^[15]。10× Genomics目前是最主流的选择,但当样本比较丰富时,Drop-seq成本相对低一些,相反,当进行低丰度转录本的检测或需要自定义试验方案时,选择inDrop比较合适^[16]。

1.3 单细胞文库构建及测序

由于不能直接对RNA进行测序,所以需要先逆转录单个细胞中的RNA并获取cDNA链,并进一步通过扩增获得大量单个细胞中的RNA的cDNA,制备基因测序文库,然后对细胞进行测序获得基因表达数据。

目前,10× Genomics公司应用液滴微流控技术的测序平台以其极高的细胞通量与较低的价格被广泛应用,它能大规模且准确反转录出单个细胞的基因并完成测量,一次测序可以捕捉到约80 000个细胞,并且单细胞覆盖度高。通过分别捕获单个细胞并裂解,然后进行逆转录以选择mRNA并获得cDNA。随后,将扩增出的cDNA用于测序文库的制备,即通过生成液滴,使用带有条形码的珠上引物来区分单个细胞,并应用独特的分子标识符(UMI)进行偏差校正。10× Genomics公司的Chromium系统^[17]将含寡核苷酸barcode^[18]序列的凝胶珠(Gel Beads)首先与细胞和试剂混合,随后在微流控交界处与油-表面活性剂溶液混合,形成GEMs(油包水的微体系)。之后细胞裂解,凝胶珠自动溶解释放大量barcode序列,每个逆转录产生的cDNA分子包含一个UMI信息^[19]和每个GEM共享的条形码,对含barcode的cDNA进行PCR扩增,构建标准测序文库,识别细胞的为10× barcode,识别mRNA分子的为UMI。

1.4 单细胞 RNA 测序数据分析

越来越多的生物信息分析方法被开发出来专门用于 scRNA-seq 数据的分析与理解。由于 scRNA-seq 原始数据存在一些缺点，包括高水平的噪声、过度分散、表达序列的检测率低、稀疏性和较低的转录材料捕获等，所以需要一些统计方法和生物信息学技术工具来提取相关信息^[20]。其中涉及的主要步骤是质量控制 (QC)、归一化、降维、聚类、可视化 (t-SNE) 结果和差异表达分析 (DEA)^[21] (图 1)。目前单细胞分析用到的软件主要是 FastQC、Cell ranger 和 Seurat、Monocle。QC 是单细胞 RNA 测序数据的预处理步骤，从数据中删除低质量的细胞，去除低质量

的碱基^[1]。Cell ranger 是 10× Genomics 的数据分析软件，可直接输入 Illumina 原始数据 (raw base call, BCL) 输出表达定量矩阵、降维、聚类以及可视化结果。t-SNE^[22] 是一种降维技术，将多维数据非线性的转换为低维数据，和主成分分析 (PCA) 差异在于 PCA 在实现数据降维的同时，也实现了噪声去除，而 t-SNE 主要用于数据展示，将不能可视化的多维数据降维到低维，进行数据的可视化展示。聚类工具 (如 Seurat)^[23] 用于识别样本中的细胞类型，进行细胞集群分析。轨迹分析工具 (如 Monocle)^[24] 被用于研究基因如何在发育过程中变化，分析单细胞基因的表达数据，来推断细胞发展轨迹^[25]。

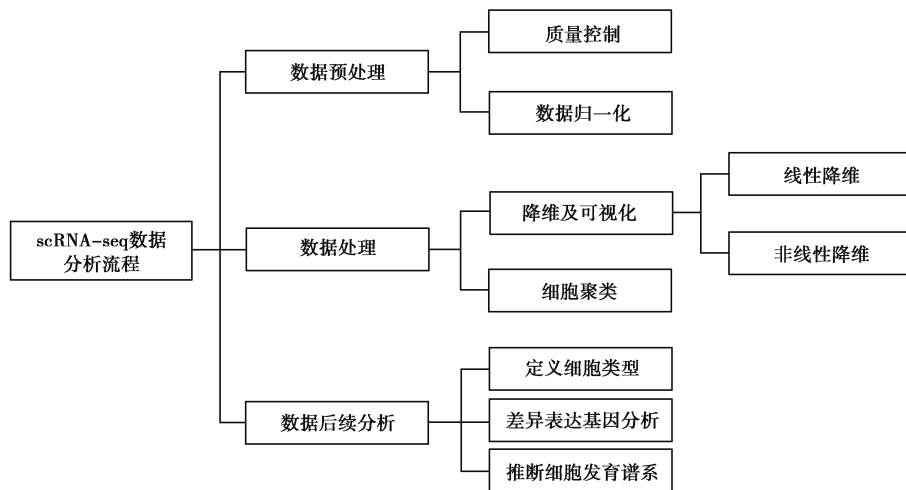


图 1 scRNA-seq 数据分析

2 单细胞 RNA 测序技术在畜禽遗传育种中的应用

单细胞 RNA 测序技术已被广泛应用于医药、肿

瘤、生殖、免疫、组织器官等医疗领域，在动物遗传育种方面的研究和应用也愈加广泛。本文以物种分类 (表 1) 对单细胞 RNA 测序技术在畜禽领域的研究进行综述。

表 1 scRNA-seq 在畜禽中的研究

物种	组织	测序平台	主要发现及关键基因	细胞数	分析工具	年份	参考文献
猪	卵母细胞	IlluminaHiseq 2000	CDC5L 对猪卵母细胞成熟和早期胚胎发育重要	4 790	GO, KEGG 富集	2018	[26]
	睾丸细胞	10× Genomics	精原细胞分化及新标记 CD99 和 PODXL2	16 966	Cell ranger	2021	[27]
	精原细胞	10× Genomics	CDH1 和 CD99 为未分化精原细胞的潜在分子标记, PODXL2 为分化精原细胞的潜在分子标记	16 791	Monocle2	2021	[28]
	肌肉细胞	10× Genomics	Ca ²⁺ 浓度低是瘦肉型猪脂肪沉积少的重要原因	7 918	Cell ranger	2020	[29]
	脂肪细胞	10× Genomics	猪皮下和肌内脂肪共有的特异表达 PI15, 猪肌内前体脂肪细胞中特异表达 TNNI2 和 ACTN2	30 016	Cell ranger	2021	[30]

续表1

物种	组织	测序平台	主要发现及关键基因	细胞数	分析工具	年份	参考文献
猪	睾丸细胞	10× Genomics	UHRF1/2、DNMT1/3A/3B 在体外和体内胚胎的表达水平和变化趋势存在很大差异	16 966	Seurat	2021	[31]
	胸腰椎和肋骨原基	IlluminaHiSeq 2000	发育中的 TV 和 LV 细胞组成及 HOXA10 表达的差异	360	Seurat, dplyr, umap, Monocle2	2021	[32]
	子宫内膜组织	10× Genomics	胚胎着床分子机制, HBE1 和 HBZ 在红系细胞中唯一表达, PEG10 在滋养层细胞中唯一表达	12 415	CellChat, Cell Ranger, Metascape v7.4	2022	[33]
牛	胚胎和囊胚	SCRB-Seq	揭示牛胚胎单细胞转录组特征异质性, CDX2, NANOG, GATA6 等	175	SC3R, M3Drop R	2018	[34]
	牛瘤胃上皮组织细胞	10× Genomics	瘤胃组织上皮细胞类型及其在断奶期间的发育情况, SLC16A1, SLC4A9	7 479	Cell ranger	2021	[35]
	卫星细胞	10× Genomics	牛卫星细胞的组成及其在成肌潜力方面的异质, PAX7, PAX3, MYOD1 等	19 096	Cell ranger	2021	[36]
	毛囊单细胞	10× Genomics	牦牛生长期表皮细胞谱系以及真皮细胞谱系在毛囊发育中的分化轨迹, KRT14, SBSN, LHX2 等	12 000	Cell ranger, Seurat, Monocle	2021	[37]
羊	睾丸生殖细胞	10× Genomics	绵羊精子发生过程中各种细胞类型转录水平变化, EZH2, SOX18, SCP2 等	11 772	Cell ranger	2021	[38]
	毛囊	10× Genomics	对绵羊毛囊发育和绵羊育种有重要意义, IGFBP3 和 VCAN	15 830	Cell ranger, Seurat, Monocle	2021	[39]
	卵巢卵泡颗粒细胞	10× Genomics	山羊卵泡 GC 的基因表达模式, ASIP, INHA, IGFBP2 等	5 272	Cell ranger	2021	[40]
	睾丸	IlluminaHiSeq 4000	为山羊的精子发生和睾丸体细胞的发育提供新见解, TKTL1 和 AES	11 753	Cell ranger, seurat, Monocle	2021	[41]
鸡	胸肌	IlluminaHiSeq 4000	鸡骨骼肌的肌肉发生和脂肪形成的增生与肥大阶段的异质性, APOA1 和 COL1A1	13 452	CapitalBio Technology, STAR, Seurat, Kobas 3.0	2020	[42]
	生殖细胞	IlluminaNovaseq-6000	证实了鸡生殖细胞的性别发育阶段和轨迹, DAZL	17 780	Cell ranger, STAR, Seurat, Palantir	2022	[43]
马	BALF 细胞	Illumina Novaseq-6000	可能促进对马呼吸系统疾病 (如马哮喘) 免疫机制的了解, CD163, CD2, MS4A1 等	4 631	Cell ranger, Seurat	2022	[44]

2.1 单细胞 RNA 测序在猪遗传育种上的应用

单细胞转录组测序可以用于猪生殖发育领域, 扩大猪优秀品种遗传资源, 改良猪的重要性状。在猪的生殖细胞领域, Liu 等^[26]对猪生精囊段的卵母细胞进行 scRNA-seq, 发现 155 个基因在亮甲酚蓝阴性和阳性的卵母细胞之间有明显的差异表达, 证明 CDC5L 在猪卵母细胞的成熟与早期胚胎发育时期很重要, 研究结果为家畜良种快速扩繁和改善胚胎体外生产效率提供重要依据。Zhang 等^[27]为描述猪精子发生图谱, 通过单细胞 RNA 测序对约 16 966 个猪睾丸细胞进行分析, 确定了猪睾丸中不同细胞类型在猪精子生成中

有明显差异表达基因, 鉴别出未分化和分化精原细胞新的细胞表面标记分别是 CD99 和 PODXL2, 对研究猪的精原细胞分化可能有帮助。雷佩佩^[28]研究揭示了猪精原细胞的异质性, 筛选出了 CDH1 和 CD99 为未分化精原细胞的潜在分子标记, 而分化的精原细胞其潜在分子标记是 PODXL2, 这为更深入的研究猪精原细胞分化和精子发生提供了理论依据。

随着人们生活水平的提高, 猪肉风味成为重点研究的经济性状, 尤其是猪的骨骼肌与猪脂肪细胞的发育。Qiu 等^[29]利用单细胞 RNA 测序, 证实瘦肉型猪在骨骼肌中保留的肌系细胞比例高于肥胖型猪, 且

瘦肉型猪肌系细胞的细胞质和内质网中的 Ca^{2+} 浓度都较低,阐述了瘦肉型猪脂肪沉积少的重要原因。张恣^[30]鉴定了猪皮下和肌内前体脂肪细胞的亚群及潜在的细胞特异性标记基因,对两种组织关键细胞类型进行比较分析,发现了其共有的特异表达 PI15 的多能干细胞和猪肌内前体脂肪细胞中特异表达 TNNI2 和 ACTN2 的成肌细胞,丰富了对猪皮下和肌内脂肪生成过程的认识,为猪肉品质改良提供了理论依据。

另外在胚胎方面的研究, Du 等^[31]通过对体外受精 (IVF) 或孤雌生殖激活 (PA) 的猪早期胚胎中获得的单个子代和囊胚的转录组进行了分析,发现 IVF 组内的差异表达基因与 PA 组内的差异表达基因不同, DNA 甲基化因子 (UHRF1/2 和 DNMT1/3A/3B) 在体外和体内胚胎的表达水平和变化趋势存在很大差异,对研究胚胎发育至关重要的基因和通路提供重要支持。Li 等^[32]研究了猪胸腰椎、肋骨原基的单细胞转录组图谱,分析了发育中的猪胸腰椎和肋骨原基细胞组成及 HOXA10 表达的差异,这为研究胚胎成骨和发育提供了理论依据。Tian 等^[33]针对猪胚胎在着床期流失的问题,利用 scRNA-seq 研究了与胚胎植入相关细胞类型的基因表达轨迹, HBE1 和 HBZ 在红系细胞中唯一表达, PEG10 在滋养层细胞中唯一表达,将为破解猪胚胎着床的分子机制提供帮助。这些研究成果可以为优秀猪种繁育和猪肉品质改良等相关研究提供理论和实践基础。

2.2 单细胞 RNA 测序在牛遗传育种上的应用

对牛的生殖细胞、胚胎和脂肪细胞的研究有利于提高优秀种牛的繁育水平。在牛上实施单细胞转录组学分析,为研究单个细胞在复杂性状中的作用提供理论支持。Lavagi 等^[34]研究发现,牛在第 2 天与第 3 天其胚胎单细胞转录组图谱存在异质性,同源异行框基因 CDX2 调控牛胚泡中的多个滋养细胞基因, NANOG 和 GATA6 分别是外胚层和原始内胚层第 2 次世系分离的两个关键基因, SALL1 (参与多能性) 和 FOSL1 (参与滋养外胚层发育) 的胚胎转录在 16 细胞阶段开始,证实了胚泡发育在胚胎的基因组激活时期是不同步的。Gao 等^[35]分别从断奶前后的两个荷斯坦小牛瘤胃上皮组织中获得了 5 064 个和 1 372 个单个细胞的 scRNA-seq 数据,确认了不同细胞簇的细胞类型及其标记基因。将它们与人类和小鼠胃上皮细胞进行比较确认细胞身份。这项研究为在牛中实施单细胞转录组学分析做出了初步努力,并对牛瘤胃组织上皮细胞类型及其在断奶期间的发育情况做出了阐述,唯一高表达 SLC16A1 和 SLC4A9 的细胞类型可能在挥发性脂肪酸吸收中发挥重要作用,揭示了单细胞水平的细胞类型在复杂性状中的作用。

在牛的脂肪、毛囊上的研究有利于了解牛肌肉和毛绒性状的发生,帮助提升牛分子育种水平。Lyu 等^[36]利用 scRNA-seq 技术分析了牛的卫星细胞的组成,支持牛卫星细胞是由转录和成肌状态不同的亚群组成的假说以及牛的肌肉内脂肪来源于纤维脂肪生成细胞的假说。证明了牛的卫星细胞在成肌潜力方面是异质的,分析了卫星细胞 (PAX7、PAX3)、成肌细胞 (MYOD1、MYF5)、纤维脂肪生成 (FAP) 细胞 (PDGFRA) 和分化的成肌细胞或肌细胞 (MYOG) 的标志物的富集表达,利于了解支配牛骨骼肌组成、发育和生长的遗传与生理机制,改善牛骨骼肌质量。叶娜^[37]利用 scRNA-seq 揭示天祝白牦牛在生长期其表皮细胞谱系和真皮细胞谱系在毛囊发育中的分化轨迹,研究了牦牛生长期其毛囊发育过程所涉及到的表皮细胞 (KRT14、KRT15)、毛干细胞 (LHX2)、上皮分化细胞 (SBSN、KRTDAP、KRT1、KRT10) 等,为牦牛的毛绒性状的分子育种方面提供理论研究基础。上述研究可以更好的理解牛的生殖发育机制,改善牛的肌肉品质。

2.3 单细胞 RNA 测序在羊遗传育种上的应用

目前 scRNA-seq 技术在羊上的研究主要在生殖细胞发育、毛囊发育等方面。对绵羊睾丸、羊毛的毛囊异质性和羊毛卷曲分子机制的研究, Yang 等^[38]从成年绵羊睾丸的 11 772 个细胞中收集 scRNA-seq 数据,经过鉴定,发现绵羊生殖细胞有几种不同的类型,确定了一些特异性标记基因,如 EZH2、SOX18、SCP2、PCNA 和 PRKCD,这为绵羊精子发生的全面单细胞转录组学研究提供了新的见解。Wang 等^[39]利用单细胞 RNA 测序技术揭示了毛囊细胞的分化和空间特征,同时通过鉴定和分析直毛与卷毛在特定细胞中的异质表达,发现 IGFBP3 与 VCAN 有相同的表达模式,认为它们与毛乳头细胞的聚集性生长特征密切相关,阐明了羊毛弯曲的分子机制,为研究绵羊毛囊发育生物学和绵羊的育种提供帮助。

在山羊中, Li 等^[40]采用 scRNA-seq 分析了吉宁灰山羊群体不同阶段卵泡颗粒细胞 (GC) 的基因表达及其标记基因,发现不同群体之间的基因表达差异在不同发育阶段非常明显,许多标记基因在不同发育阶段也差异表达, ASIP 和 ASPN 在 GCs 早期高表达, INHA、INHBA、MFG8 和 HSD17B1 在 GCs 生长期高表达, IGFBP2、IGFBP5 和 CYP11A1 在晚期高表达。这些标记基因可以作为山羊卵泡 GC 发育的参考基因,这可能有助于揭示卵母细胞发育潜力。在山羊睾丸细胞中的研究中, Yu 等^[41]将奶山羊睾丸组织分离成单细胞进行 scRNA-seq 测序,分析其精子发生和体细胞发育过程,通过检测和筛选,确定了精原细

胞中的特定候选标记基因 (TKTL1 和 AES), 发现的新特征基因可为雄山羊生殖提供重要分子标记, 为奶山羊育种研究提供理论与技术支持。以上研究可以为绵、山羊生殖和绵羊毛囊发育提供新的理解。

2.4 单细胞 RNA 测序在鸡遗传育种上的应用

scRNA-seq 技术在家禽上研究较少, Li 等^[42]首次用单细胞 RNA 测序技术分析鸡骨骼肌在肌肉发生和脂肪形成的增生与肥大阶段的异质性, 筛选和鉴定肌肉脂肪特异性表达基因, 提供了骨骼肌中肌细胞和脂肪细胞的细胞特异性表达基因, APOA1 和 COL1A1 基因被鉴定为鸡肌肉脂肪细胞的 Marker 基因, 为肌肉脂肪的生成提供新的见解, 有助于研究鸡肉品质性状分子标记的开发。Rengaraj 等^[43]将一种新的生殖细胞示踪方法运用到转基因鸡模型中, 通过 CRISPR/Cas9 基因编辑将绿色荧光蛋白 (GFP) 插入到鸡生殖细胞特异性标记基因 DAZL (鸡生殖细胞发育与维持的关键因子) 中, 构建了 DAZL::GFP 转基因鸡, 再分离纯化雄性和雌性生殖细胞, 利用 scRNA-seq 进行分析, 可以研究禽类生殖细胞发育过程中特有的机制、转录图谱和细胞异质性, 与上述在骨骼肌中的研究共同为改善鸡肉品质和了解禽类生殖发育提供新的思路。

2.5 单细胞 RNA 测序在其他畜禽遗传育种上的应用

马产业是我国畜牧业的重要组成部分。目前 scRNA-seq 除了在猪、牛、羊和鸡等常见畜禽上有应用, 对马也有研究进展。Sage 等^[44]将 scRNA-seq 技术用来探索冷冻的马支气管肺泡灌洗液 (BALF) 的细胞组成, 对从患哮喘马中分离出的 4 631 个细胞进行分析, 确定了 16 个主要细胞类型群: 单核/巨噬细胞 (CD163、CD68)、T 细胞 (CD2、CD3D、CD3E、CD3G)、B/浆细胞 (MS4A1、CD79A、CD79B)、树突状细胞 (CD83、CCR7)、中性粒细胞 (TG、RGS2、LILRA5、CSF3R) 和肥大细胞 (LTC4S、HPGDS、GCSAML、MS4A2), 核糖体蛋白基因在 T 细胞和 B 浆细胞中高度表达。研究结果表明, scRNA-seq 技术适用于冷冻保存的马 BALF 细胞, 可以识别其主要细胞群体以及未探索研究过的 T 细胞和巨噬细胞亚群, 这可能对马呼吸系统疾病 (如马哮喘) 的免疫机制提供理论依据。

3 总结与展望

能够准确进行细胞亚群分类以及识别是现在亟需解决的技术挑战。scRNA-seq 涉及到与群体 RNA 测序相关的更高水平的技术噪声和数据复杂性, 干扰了细胞聚类和标记识别的准确性, Song 等^[45]描述了有

更好聚类性能的基于 entropy subspace 分离的降噪聚类 (ENCORE) 的细胞聚类算法, 减少 scRNA-seq 分析中的噪声并提高细胞聚类的准确性, 但发现 ENCORE 在运行过程中消耗内存较大, 这也提示了细胞聚类算法的一个研究机遇。

如何整合其他的技术与单细胞转录组一起分析也是目前的一个挑战。目前, scRNA-seq 方法很少能够传达有关转录过程的实时信息, 并且每个细胞的 RNA 图谱只能被分析一次^[46], Erhard 等^[47]提出一种单细胞疏基连接的 RNA 烷基化代谢标记测序技术 sc-SLAM-seq, 能更好理解单细胞水平转录活性的差异。scRNA-seq 没有转录物在组织中的空间信息, 因此 scRNA-seq 与空间转录组学^[48]的整合可以产生组织中细胞亚群的高分辨率图谱。如 Biancalani 等^[49]提出一种 Tangram 方法, 将 sc/snRNA-seq 数据与包括 MERFISH、STARmap、smFISH、空间转录组学和组学图像等数据相结合^[50-52], 可映射任何类型的 sc/snRNA-seq 数据。目前在人和小鼠上已经有 scRNA-seq 与 scATAC-seq 的组合研究^[53-55], 期待之后在畜禽上能有研究进展, 促进未来遗传育种技术发展。相信随着科技的不断发展, scRNA-seq 的研究会更加广泛, 而不仅限于应用于肿瘤、免疫和神经发育等生物医学领域^[56]。

参考文献:

- [1] HWANG B, LEE J H, BANG D. Single-cell RNA sequencing technologies and bioinformatics pipelines [J]. *Exp Mol Med*, 2018, 50 (8): 1-14.
- [2] 康彦东, 王兴东, 郭韶珂, 等. 单细胞测序技术及其在畜牧科学研究中的应用 [J]. *中国牛业科学*, 2022, 48 (4): 41-45.
- [3] SVENSSON V, VENTO-TORMO R, TEICHMANN S A. Exponential scaling of single-cell RNA-seq in the past decade [J]. *Nat Protoc*, 2018, 13 (4): 599-604.
- [4] FUCHOU T, CATALIN B, YANGZHOU W, et al. mRNA-Seq whole-transcriptome analysis of a single cell [J]. *Nat Methods*, 2009, 6 (5): 377-382.
- [5] 彭巍, 贾可欣, 张子敬, 等. 单细胞测序技术及其在畜禽遗传育种中的应用研究新进展 [J]. *中国畜牧杂志*, 2022, 58 (10): 44-49.
- [6] GE W, TAN S J, WANG S H, et al. Single-cell transcriptome profiling reveals dermal and epithelial cell fate decisions during embryonic hair follicle development [J]. *Theranostics*, 2020, 10 (17): 7581-7598.
- [7] REICHARD A, ASOSINGH K. Best practices for preparing a single cell suspension from solid tissues for flow cytometry [J]. *Cytometry A*, 2019, 95 (2): 219-226.
- [8] YI S, KIM H J, KOO B S, et al. Efficient dissociation protocol for generation of single cell suspension from human thyroid tissue for single cell RNA sequencing [J]. *Endocrinol Metab (Seoul)*, 2022,

- 37 (4): 698–700.
- [9] GROSS A, SCHOENDUBE J, ZIMMERMANN S, et al. Technologies for single-cell isolation [J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16 (8): 16897–16919.
- [10] KRISTIN O T, NINIB B. Introduction to single-cell RNA sequencing [J]. *Curr Protoc Mol Biol*, 2018, 122: e57.
- [11] HODNE K, WELTZIEN F A. Single-cell isolation and gene analysis: pitfalls and possibilities [J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16 (11): 26832–26849.
- [12] PAN Y, CAO W, MU Y, et al. Microfluidics facilitates the development of single-cell RNA sequencing [J]. *Biosensors (Basel)*, 2022, 12 (7): 450.
- [13] STREETS A M, ZHANG X, CAO C, et al. Microfluidic single-cell whole-transcriptome sequencing [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, 111 (19): 7048–7053.
- [14] MACOSKO E Z, BASU A, SATIJA R, et al. Highly parallel genome-wide expression profiling of individual cells using nanoliter droplets [J]. *Cell*, 2015, 161 (5): 1202–1214.
- [15] ZHOU W M, YAN Y Y, GUO Q R, et al. Microfluidics applications for high-throughput single cell sequencing [J]. *J Nanobiotechnology*, 2021, 19 (1): 312.
- [16] ZHANG X, LI T, LIU F, et al. Comparative analysis of droplet-based ultra-high-throughput single-cell RNA-seq systems [J]. *Mol Cell*, 2019, 73 (1): 130–142.
- [17] ZHENG G X, TERRY J M, BELGRADER P, et al. Massively parallel digital transcriptional profiling of single cells [J]. *Nat Commun*, 2017, 8: 14049.
- [18] CHO C S, XI J, SI Y, et al. Microscopic examination of spatial transcriptome using Seq-Scope [J]. *Cell*, 2021, 184 (13): 3559–3572.
- [19] KIND D, BASKARAN P, RAMIREZ F, et al. Automation enables high-throughput and reproducible single-cell transcriptomics library preparation [J]. *SLAS Technol*, 2022, 27 (2): 135–142.
- [20] DAS S, RAI A, RAI S N. Differential expression analysis of single-cell RNA-seq data: current statistical approaches and outstanding challenges [J]. *Entropy (Basel)*, 2022, 24 (7): 995.
- [21] KE M, ELSHENAWY B, SHELDON H, et al. Single cell RNA-sequencing: a powerful yet still challenging technology to study cellular heterogeneity [J]. *Bioessays*, 2022, 44 (11): e2200084.
- [22] KOBAK D, BERENS P. The art of using t-SNE for single-cell transcriptomics [J]. *Nat Commun*, 2019, 10 (1): 5416.
- [23] BUTLER A, HOFFMAN P, SMIBERT P, et al. Integrating single-cell transcriptomic data across different conditions, technologies, and species [J]. *Nat Biotechnol*, 2018, 36 (5): 411–420.
- [24] TRAPNELL C, CACCHIARELLI D, GRIMSBY J, et al. The dynamics and regulators of cell fate decisions are revealed by pseudo-temporal ordering of single cells [J]. *Nat Biotechnol*, 2014, 32 (4): 381–386.
- [25] QI R, MA A, MA Q, et al. Clustering and classification methods for single-cell RNA-sequencing data [J]. *Brief Bioinform*, 2020, 21 (4): 1196–1208.
- [26] LIU X M, WANG Y K, LIU Y H, et al. Single-cell transcriptome sequencing reveals that cell division cycle 5-like protein is essential for porcine oocyte maturation [J]. *J Biol Chem*, 2018, 293 (5): 1767–1780.
- [27] ZHANG L, LI F, LEI P, et al. Single-cell RNA-sequencing reveals the dynamic process and novel markers in porcine spermatogenesis [J]. *J Anim Sci Biotechnol*, 2021, 12 (1): 122.
- [28] 雷佩佩. 基于单细胞测序解析猪精原细胞的异质性 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2021.
- [29] QIU K, XU D, WANG L, et al. Association analysis of single-cell RNA sequencing and proteomics reveals a vital role of Ca²⁺ signaling in the determination of skeletal muscle development potential [J]. *Cells*, 2020, 9 (4): 1045.
- [30] 张焱. 猪皮下和肌内前体脂肪细胞亚群鉴定及其关键分子特征研究 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2021.
- [31] DU Z Q, LIANG H, LIU X M, et al. Single cell RNA-seq reveals genes vital to *in vitro* fertilized embryos and parthenotes in pigs [J]. *Sci Rep*, 2021, 11 (1): 14393.
- [32] LI J, WANG L, YU D, et al. Single-cell RNA sequencing reveals thoracolumbar vertebra heterogeneity and rib-genesis in pigs [J]. *Genomics Proteomics Bioinformatics*, 2021, 19 (3): 423–436.
- [33] TIAN Q, HE J P, ZHU C, et al. Revisiting the transcriptome landscape of pig embryo implantation site at single-cell resolution [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2022, 10: 796358.
- [34] LAVAGI I, KREBS S, SIMMET K, et al. Single-cell RNA sequencing reveals developmental heterogeneity of blastomeres during major genome activation in bovine embryos [J]. *Sci Rep*, 2018, 8 (1): 4071.
- [35] GAO Y H, FANG L Z, BALDWIN R L 6th, et al. Single-cell transcriptomic analyses of dairy cattle ruminal epithelial cells during weaning [J]. *Genomics*, 2021, 113 (4): 2045–2055.
- [36] LYU P, QI Y, TU Z J, et al. Single-cell RNA sequencing reveals heterogeneity of cultured bovine satellite cells [J]. *Front Genet*, 2021, 12: 742077.
- [37] 叶娜. 基于单细胞转录组测序对天祝白牦牛生长期毛囊转录图谱的构建 [D]. 兰州: 西北民族大学, 2021.
- [38] YANG H, MA J Y, WAN Z, et al. Characterization of sheep spermatogenesis through single-cell RNA sequencing [J]. *FASEB J*, 2021, 35 (2): e21187.
- [39] WANG S, WU T, SUN J, et al. Single-cell transcriptomics reveals the molecular anatomy of sheep hair follicle heterogeneity and wool curvature [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 800157.
- [40] LI Z, WANG J, ZHAO Y, et al. scRNA-seq of ovarian follicle granulosa cells from different fertility goats reveals distinct expression patterns [J]. *Reprod Domest Anim*, 2021, 56 (5): 801–811.
- [41] YU X W, LI T T, DU X M, et al. Single-cell RNA sequencing reveals atlas of dairy goat testis cells [J]. *Zool Res*, 2021, 42 (4): 401–405.
- [42] LI J, XING S, ZHAO G, et al. Identification of diverse cell populations in skeletal muscles and biomarkers for intramuscular fat of chicken by single-cell RNA sequencing [J]. *BMC Genom*, 2020, 21 (1): 752.
- [43] RENGARAJ D, CHA D G, LEE H J, et al. Dissecting chicken germ cell dynamics by combining a germ cell tracing transgenic chicken model with single-cell RNA sequencing [J]. *Comput Struct Biotechnol J*, 2022, 20: 1654–1669.
- [44] SAGE S E, NICHOLSON P, PETERS L M, et al. Single-cell gene expression analysis of cryopreserved equine bronchoalveolar cells [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 929922.

- [45] SONG J, LIU Y, ZHANG X, et al. Entropy subspace separation-based clustering for noise reduction (ENCORE) of scRNA-seq data [J]. *Nucleic Acids Res*, 2021, 49 (3): e18.
- [46] LI H. Single-cell RNA sequencing in drosophila: technologies and applications [J]. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*, 2021, 10 (5): e396.
- [47] ERHARD F, BAPTISTA M A P, KRAMMER T, et al. scSLAM-seq reveals core features of transcription dynamics in single cells [J]. *Nature*, 2019, 571 (7765): 419-423.
- [48] STÄHL P L, SALMÉN F, VICKOVIC S, et al. Visualization and analysis of gene expression in tissue sections by spatial transcriptomics [J]. *Science*, 2016, 353 (6294): 78-82.
- [49] BIANCALANI T, SCALIA G, BUFFONI L, et al. Deep learning and alignment of spatially resolved single-cell transcriptomes with Tangram [J]. *Nat Methods*, 2021, 18 (11): 1352-1362.
- [50] WANG X, ALLEN W, WRIGHT M, et al. Three-dimensional intact-tissue sequencing of single-cell transcriptional states [J]. *Science*, 2018, 361 (6400): eaat5691.
- [51] CODELUPPI S, BORM L E, ZEISEL A, et al. Spatial organization of the somatosensory cortex revealed by cyclic smFISH [J]. *Nat Methods*, 2018, 15 (11): 932-935.
- [52] CHEN K H, BOETTIGER A N, MOFFITT J R, et al. Spatially resolved, highly multiplexed RNA profiling in single cells [J]. *Science*, 2015, 348 (6233): aaa6090.
- [53] ANDUEZA A, KUMAR S, KIM J, et al. Endothelial reprogramming by disturbed flow revealed by single-cell RNA and chromatin accessibility study [J]. *Cell Rep*, 2020, 33 (11): 108491.
- [54] XU H, YU H, LIU L, et al. Integrative single-cell RNA-seq and ATAC-Seq analysis of peripheral mononuclear cells in patients with ankylosing spondylitis [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 760381.
- [55] LYU P, HOANG T, SANTIAGO C P, et al. Gene regulatory networks controlling temporal patterning, neurogenesis, and cell-fate specification in mammalian retina [J]. *Cell Rep*, 2021, 37 (7): 109994.
- [56] WILLIAMS C G, LEE H J, ASATSUMA T, et al. An introduction to spatial transcriptomics for biomedical research [J]. *Genome Med*, 2022, 14 (1): 68.

· 信息 ·

倡导健康养殖新理念 解读疫病防控新技术 欢迎订阅 2024年《畜牧与兽医》

ISSN 0529-5130, CN 32-1192/S

《畜牧与兽医》月刊由教育部主管、南京农业大学主办。1935年创刊，由原中央大学畜牧兽医系编辑出版，著名兽医学家罗清生教授任主编，至今已有89年的办刊历史。始终遵循“为社会服务，为畜牧生产服务”和“理论与实践相结合，普及与提高并举”的办刊宗旨。本刊连续入选中国科技核心期刊（中国科技论文统计源期刊）、《中文核心期刊要目总览》，先后荣获华东地区优秀期刊、江苏期刊方阵双效期刊、江苏省优秀科技期刊、全国高校优秀期刊、全国畜牧兽医类优秀期刊等。

读者对象：畜牧、兽医科技工作者和大专院校师生等。

主要内容：主要刊登畜牧、兽医两学科各领域的研究报告、文献综述等。主要栏目有遗传繁育、动物营养、环境卫生、基础兽医、预防兽医、临床兽医和专题综述等。

征订办法：本刊为月刊，大16开，定价：28.00元，全年12期共336.00元。邮发代号：28-42，全国各地邮局均可订阅。邮局漏订者可直接汇款至本刊杂志社补订。

地 址：江苏省南京市卫岗1号南京农业大学内 邮 编：210095

电话：025-84395701（编辑部） E-mail: muyizz@njau.edu.cn