

利用华大智造DNBSEQ-T7测序仪构建斑马鱼胚胎发育时空转录组图谱

本应用简报介绍了某研究团队使用华大研究院STOmics基因表达试剂盒结合华大智造DNBSEQ-T7测序仪构建了斑马鱼胚胎发育的时空转录组图谱，明确了特定组织中的共表达的基因模块和配体受体对的空间分布，并进一步结合华大智造DNBelab C4便携式单细胞系统构建了空间分辨的细胞发育轨迹¹。

推荐应用：前沿技术 - 时空组学

推荐机型：DNBSEQ-T7RS

- 实现时空转录组图谱构建

基于 STOmics 基因表达试剂盒 S1 结合 DNBSEQ-T7 测序平台可实现斑马鱼胚胎发育的时空转录组图谱的构建。

- 多个维度上性能表现优异

转录组捕获芯片具有纳米级空间分辨率、厘米级全景视野、较高的捕获效率和灵敏度等特点。

- 实验与数据分析流程一站式服务

实验流程耗时短，从组织切片到测序文库仅需 8 小时，测序数据可使用一体化云分析平台进行数据分析。



背景介绍

脊椎动物的胚胎发育是一个错综复杂的动态过程。在胚胎发育的过程中，在某段很短的时间内，基因表达变化会十分强烈，细胞状态的转换也会非常频繁。转录因子、形态因子、信号通路和来自细胞外基质的信号等因素，在决定细胞生长及分化方面起着关键作用²⁻⁴。这些调控因子如何在空间上相互作用，以精确诱导这些细胞呈现出不同的形态、出现在不同的空间位置、实现不同的功能，进而构成复杂的脊椎动物胚胎，是关于胚胎发生的基本问题，需要进一步研究。

斑马鱼是一种广泛使用的研究脊椎动物胚胎发育的模式生物，其具备快速发育、胚胎透明度高以及对物理和基因操作的可及性等利于研究的优点。如今，测序技术的进步使模式生物在发育过程中的单细胞图谱的组装成为可能，进而使全基因组的多模态信息分析得以实现，包括单个细胞的基因表达、表观遗传状态和蛋白质水平^{5, 6}。然而，发育中的斑马鱼转录组状态如何在时间和空间上相互关联仍然难以捉摸，由于目前空间转录组技术的限制，复杂组织中不同细胞类型的空间关系仍然不为人知。

研究描述

目前通过原位杂交技术仅可探究发育过程中特定基因的表达图谱，而无法获取整体转录组的变化⁷，而另一项基于切片整体测序的技术 Tomo-seq 丢失了组织切片的空间信息⁸。华大研究院推出基于自主研发的 Stereo-seq 技术的时空组学产品 STOmics 基因表达试剂盒，可进行原位 RNA 捕获，并实现了基因与影像同时分析⁹。与当前其他技术相比，Stereo-seq 在相同的精度下，具备更灵敏和更强的 mRNA 捕获能力。该技术作为新时代分子“显微镜”，为重新认知器官结构、生命发育、物种演化和人类疾病提供了底层工具，将推动继显微镜和 DNA 测序技术以来的生命科学领域第三次科技革命。鉴于此，本研究基于 Stereo-seq 技术对斑马鱼的胚胎细胞进行了研究并利用华大智造 DNBSEQ-T7 测序仪获取相关测序数据，得到了其时空转录组图谱、亚细胞类型和空间基因模块及配体受体的空间分布。

实验方法

样本制备

用镊子除去斑马鱼胚胎的卵膜并于 4 °C 条件下于多聚甲醛溶液中过夜保存，之后在 -20 °C 通过甲醇进行至少两小时脱水，将脱水后的组织样品包埋在 OCT 包埋剂中进行矢状切片，用于 Stereo-Seq 的文库制备与测序。

Stereo-Seq文库制备与测序

使用 STOmics 基因表达试剂盒 S1 构建 Stereo-seq 文库。大致流程为：将组织切片贴合在 Stereo-seq 芯片上，在 -20 °C 甲醇中孵育 30 min 后进行核酸染色和成像。为增加组织细胞通透性，受精后 18 h 之内的组织切片在 37 °C 条件下进行了 3 min 的透性化处理，而受精后 18 h 和 24 h 的组织切片则进行了 5 min 的细胞透性化处理。

RNA 反转录成 cDNA 后，利用磁珠对 cDNA 进行提纯，随后依照该试剂盒说明书构建好单细胞 RNA-Seq 测序文库并利用华大智造 DNBSEQ-T7 测序仪完成双端测序 (read 1:50 个碱基，read 2:100 个碱基)。

斑马鱼胚胎采集以及单细胞分离

将约 250-1000 个斑马鱼胚胎转移至含有蛋白酶 E 的培养皿中培养，孵化之后使用 trypsin-EDTA 溶液解离，分散在 BSA/PBS 中得到单细胞悬液，用于单细胞 RNA 文库的构建及测序。

单细胞RNA文库构建及测序

通过华大智造研发的高通量单细胞建库试剂盒 (940-000047-00) 结合华大智造 DNBelab C4 便携式单细胞系统，将单细胞悬液分散包裹在液滴中，在室温下进行培养并捕获细胞释放的 mRNA。液滴破乳后使用磁珠回收 mRNA，反转录后通过 PCR 纯化滚环扩增制备 DNB 用于信号放大，最终在华大智造测序仪 DNBSEQ-T7 上进行了双端测序 (read 1:41 个碱基，read 2:100 个碱基，样品索引:10 个碱基)。

数据分析

由 15*15 DNA 纳米球捕获的转录本被合并为一个 bin 15 并视为一个基本分析单元，其 ID 为在捕获芯片上的空间坐标，来自同一胚胎的切片整合为一组，通过 R 软件包 Seurat 和基于高通量单细胞平台开发的分析软件 DNBelab C Series HT-scRNA -analysis-software 依次进行以下数据分析：数据质控，无监督聚类分析，标志基因分析，拟时序分析，基因模块分析，配体受体距离分析。

样本采集	文库制备和测序	生信分析	结果分析
斑马鱼胚胎	 STOmics基因表达试剂盒S1 DNBSEQ-T7基因测序仪	Seurat DNBelab C Series HT-scRNA-analysis -software	无监督聚类分析 标志基因分析 拟时序分析 基因模块分析 配体受体距离分析

结果

时空转录组捕获质量检测

对时空转录组测序数据进行定量分析和空间映射,在约 10 μm 的网格尺寸下,时空转录组捕获的转录本与原始组织切片的分布呈现高度一致性 (图 2B, C)。展现出了 Stereo-seq 的高捕获完备

率和高空间分辨率, 其平均基因捕获数约≥300, 平均 UMI 捕获数≥500 (图 2G), 满足后续分析的需求。

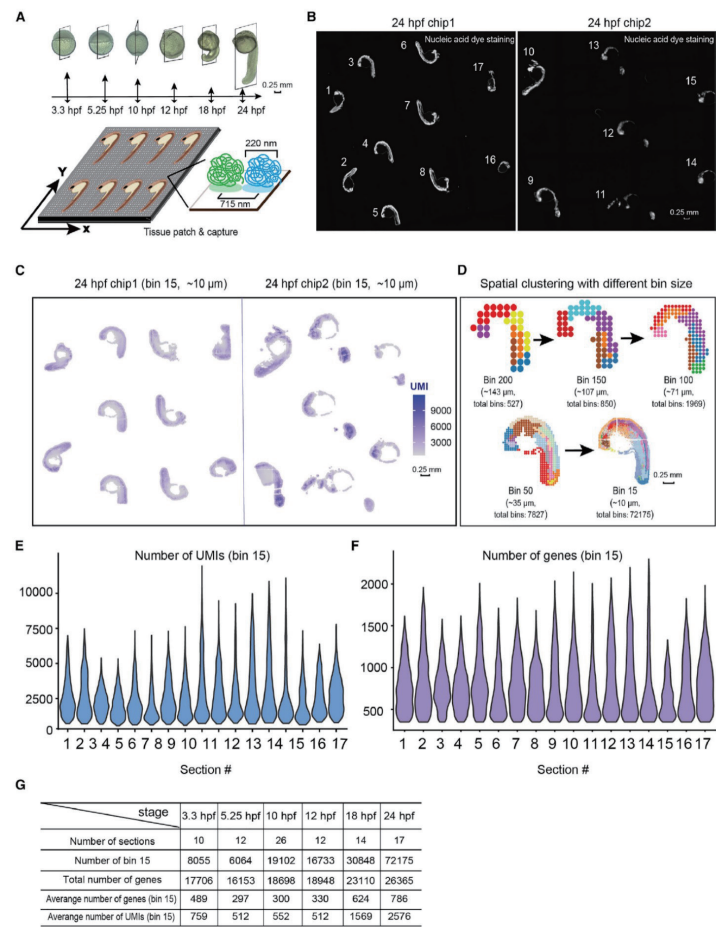


图2. 不同发育时期的斑马鱼胚胎切片样本在Stereo-seq下的时空转录组捕获

斑马鱼胚胎发育的时空转录组分析结果展示

时空转录组的无监督聚类分析揭示了胚胎发育过程中的不同组织的空间分布与解剖学一致（图 3A），且捕获到的高密度信息可用于更深层的聚类分析以揭示不同的亚细胞类型分布,如胚叶细胞和前肾细胞亚型和及其标志基因（图 3B-E）。通过

Hotspot 分析时空转录组挖掘出发育过程中共表达的基因模块，这些基因模块在发育过程中执行特定功能(图 4A)，且表现出与各类群空间分布的一致性(图 4B,C)。

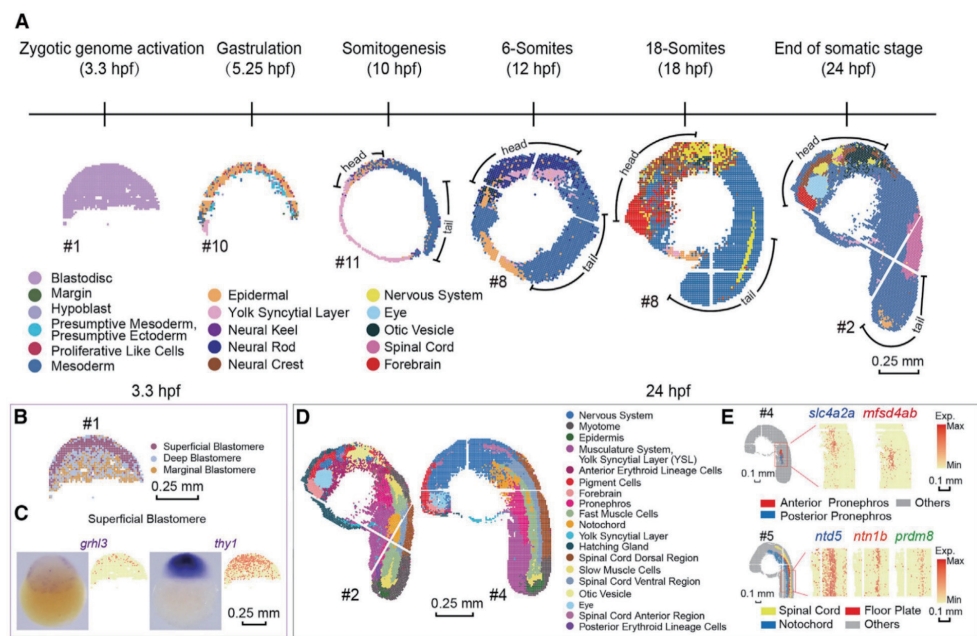


图3. 斑马鱼胚胎发育的时空转录组图谱

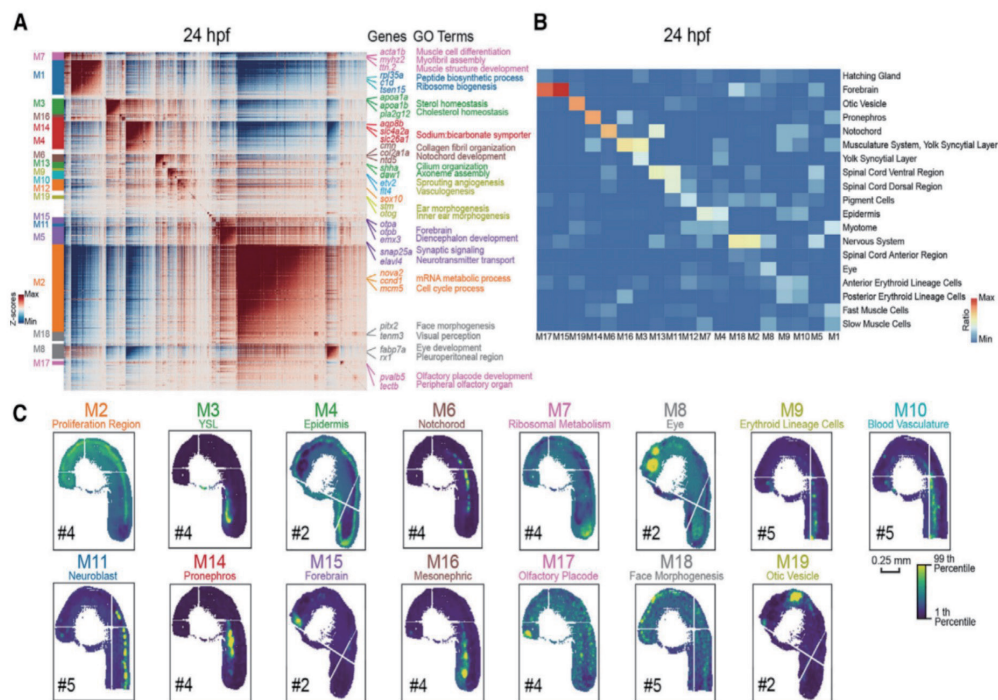


图4. 基因模块的功能及与细胞类群空间分布的联系

结合单细胞转录组测序技术及拟时序分析，时空转录组可用于构建胚胎细胞的时空发育轨迹（图 5A），图 5B 展示了斑马鱼胚胎的中央神经系统分支和色素细胞分支的发育轨迹，并将其映射至时空转录组中构建空间分辨的细胞发育轨迹图谱

（图 5C）。时空转录组还可用于计算配体受体对的相对空间距离（图 6A，B），以揭示这些配体受体对相互作用的时间窗口和细胞类型（图 6C），并可探究配体的潜在受体。

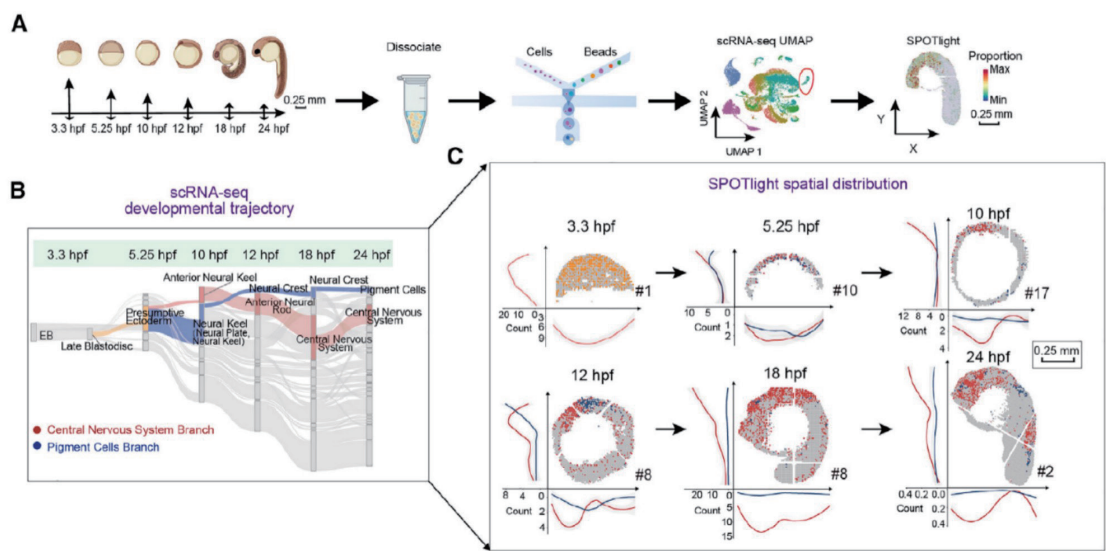


图5. 空间分辨的胚胎细胞发育轨迹的构建

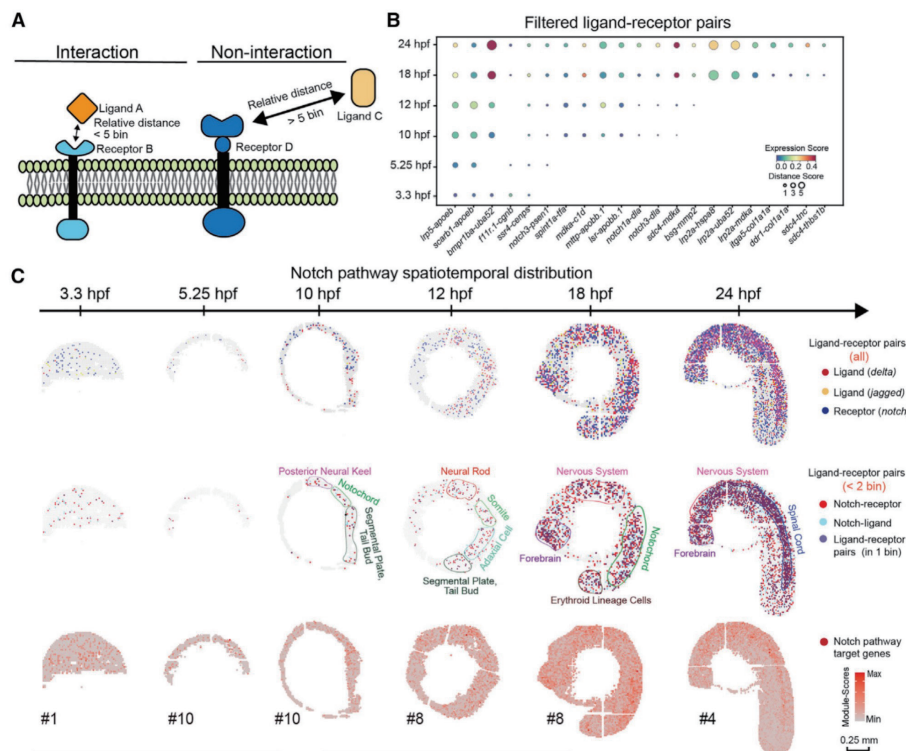


图6. 配体受体对的相对空间距离及与信号通路的关系

总结

在此应用案例中，研究人员构建了斑马鱼胚胎发育过程中的时空转录组图谱，探究了亚细胞类型、空间基因模块和配体受体对的空间分布，并结合单细胞测序技术构建了空间分辨的细胞发育轨迹。华大研究院自主研发的 STOmics 基因表达试剂盒、DNBelab C4 便携式单细胞系统和华大智造自主研发的 DNBSEQ-T7 测序仪能够在斑马鱼胚胎发育过程中进行时空转录组的高精度、高密度捕获，单细胞转录组的捕获和测序，用于研究发育过程中的细胞和分子机制。



基因测序仪 DNBSEQ-T7RS

文献引用

1. Liu, C. et al. Spatiotemporal mapping of gene expression landscapes and developmental trajectories during zebrafish embryogenesis. *Dev Cell* 57, 1284-1298 e1285, doi:10.1016/j.devcel.2022.04.009 (2022).
2. Bardot, E. S. & Hadjantonakis, A. K. Mouse gastrulation: Coordination of tissue patterning, specification and diversification of cell fate. *Mech Dev* 163, 103617, doi:10.1016/j.mod.2020.103617 (2020).
3. Marlow, F. L. Setting up for gastrulation in zebrafish. *Curr Top Dev Biol* 136, 33-83, doi:10.1016/bs.ctdb.2019.08.002 (2020).
4. Vining, K. H. & Mooney, D. J. Mechanical forces direct stem cell behaviour in development and regeneration. *Nat Rev Mol Cell Biol* 18, 728-742, doi:10.1038/nrm.2017.108 (2017).
5. Cao, J. et al. Comprehensive single-cell transcriptional profiling of a multicellular organism. *Science* 357, 661-667, doi:10.1126/science.aam8940 (2017).
6. Trevino, A. E. et al. Chromatin accessibility dynamics in a model of human forebrain development. *Science* 367, doi:10.1126/science.aay1645 (2020).
7. Sprague, J. et al. The Zebrafish Information Network (ZFIN): the zebrafish model organism database. *Nucleic Acids Research* 31, 241-243, doi:10.1093/nar/gkg027 %J Nucleic Acids Research (2003).
8. Holler, K. et al. Spatio-temporal mRNA tracking in the early zebrafish embryo. *Nature Communications* 12, 3358, doi:10.1038/s41467-021-23834-1 (2021).
9. Chen, A. et al. Spatiotemporal transcriptomic atlas of mouse organogenesis using DNA nanoball-patterned arrays. *Cell* 185, 1777-1792 e1721, doi:10.1016/j.cell.2022.04.003 (2022).

推荐订购信息

产品类型	产品名称	产品货号
仪器	基因测序仪 DNBSEQ-T7RS	900-000236-00
软件	数据中心一体机	900-000444-00
建库试剂	DNBelab C 系列高通量单细胞 RNA 文库制备试剂盒套装 V2.0	940-000519-00
测序试剂	DNBSEQ-T7RS 高通量测序试剂套装 (FCL PE100)V2.0	1000028455

深圳华大智造科技股份有限公司

深圳市盐田区北山工业区综合楼11栋

☎ 4000-688-114

🌐 www.mgi-tech.com

✉ MGI-service@mgi-tech.com

股票简称：华大智造

股票代码：688114



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所有，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。

版本：2022年10月版

撰稿：程广耀 许小杰 杨旻琦

责任编辑：王其伟

审稿：江遥