



单细胞测序 加速新药研发 解决方案

伯豪生物工业渠道部

WWW.SHBIO.COM

☎ 800-820-5086

技术服务热线:021-5895 5370

网址:www.shbio.com

邮箱:market@shbio.com

地址:上海张江高科技园李冰路151号



服 务 科 技 创 新 护 航 人 类 健 康

伯豪生物—关注药物研发

COMPANY INTRODUCTION 关于伯豪生物



上海伯豪生物技术有限公司(以下简称伯豪生物)位于上海张江高科技园区药谷,是生物芯片上海国家工程研究中心的有机组成部分,专注于提供领先的生物医药和疾病诊断技术创新、产品及服务。

伯豪生物深耕基因检测技术研发十余载,拥有38项知识产权、发明专利和软件著作权,获得国家基因检测技术应用示范中心(高发肿瘤及遗传性疾病基因检测示范中心)、上海市高新技术企业、浦东新区企业研发机构、院士专家工作站、上海市研发公共服务平台、上海市服务外包公共服务平台、上海名牌、上海科技小巨人企业等资质认证,下属子公司拥有医疗机构执业许可证和医疗器械经营许可证。



伯豪生物系统化的技术平台和高质量的服务体系得到了广大客户认可和合作伙伴的高度评价。公司平台陆续获得了国际知名高通量技术厂商Illumina、Affymetrix、Agilent、ABI、BD、10x Genomics的技术服务中心认证。先后获得“诺华(CNIBR)优秀供应商奖(Supplier Award 2012)”、“Agilent公司亚太区最佳服务供应商”和“Affymetrix公司优秀服务商”等称号。2019年,伯豪生物携手BD(中国)成立单细胞研究联合实验室。



2021伊始,伯豪生物整合单细胞平台技术资源,为制药企业和生物技术公司量身打造出单细胞测序(加速)新药研发的解决方案,希望与全球各大药企及生物技术公司携手致力于新药筛选/验证、免疫治疗、协同治疗以及疫苗的相关研究,通过降低药物研发成本,加速研发进程等共同推进生物医药研发产业的发展。

伯豪生物国内外客户分布图



超过**3000**家的国内科研机构、医院
18家以上跨国制药企业(包括排名前**10**位的跨国制药企业)



SHANGHAI
BIOTECHNOLOGY CORPORATION
QUALITY CONTROL SYSTEM

伯豪生物质量控制体系

伯豪生物建立了规范化的质量控制体系,通过了ISO9001:2015质量技术体系的认证,并参照GLP-L的标准,通过156个SOP文件对项目、样品、实验过程、生物信息分析过程、数据信息管理、保密等进行严格指控。

- **质量标准严格:**QA系统为您的实验全程护航,实验严格按照156个SOP文件进行。
- **实验记录完备:**严格的流水线作业项目管理流程,保证所有实验记录可供回溯。
- **多重实验质控:**实验室QC、数据分析QC、项目管理QC—3重QC,减少低质量数据。

02 实验过程的质量控制

质量标准严格:
QA系统为您的实验全程护航,实验流程严格按照156个SOP文件(中英双语版)进行。

- ▶ SOP (ADM)
- ▶ SOP (LAB)
- ▶ SOP (IT)
- ▶ Record of Documentation Development/Revision
- ▶ Record of Document Review
- ▶ Record of Deviation Report
- ▶ Record of Laboratory Incident Report
- ▶ Record of ADM SOPs
- ▶ Record of Equipment Calibration
- ▶ Record of SOP Training
- ▶ Record of SOP Distribution and Return
- ▶ QA Auditing Schedule
- ▶ QA Audit Report
- ▶ Corrective Action Plan
- ▶ Withdrawal SOPs

Selected Administration SOPs

- S0001 Quality Objective
- S0002 Quality Assurance
- S0003 Document Controls
- S0006 QA Auditing Procedures
- S0007 Security Assurance
- S0008 Staff Training Management
- S0009 QA Management Archival Process and Security
- S0010 Records Management
- S0011 Deviation Management
- S0012 Laboratory Incidents Reports
- S0014 Supplier Assessment and Management
- S0015 Management of Customer Complaints
- S0016 Proficiency Testing
- S0017 Business Continuity/Recovery Plan
- S0019 Handling of Fraud
- S0020 Contract Review Process
- S0021 Customer Satisfaction Survey
- S0022 Genechip Data Analysis
- S0025 Service Management Process
- S0027 Management of Purchase Process
- S0028 Project Report and SAS System Management Procedure
- S1044 Procedures for Sample Receiving, Storage, Delivery and Destroy

实验记录完整:
严格的流水线作业项目管理流程,保证所有实验记录可追溯。

多重实验质控:
实验室QC、数据分析QC、项目管理QC—3重QC,减少低质量数据的产生。

01 样品运输和储存的质量控制



03 结果数据运输和储存的质量控制

结果报告

项目总结报告(打印版)

数据分析报告

结果报告(电子版)

800-820-5086服务热线协助您对结果报告进行解读

申请开通平台账号,上传数据
SOP流程控制,保障账户及数据安全

IT系统
严格保护数据分析,储存、备份、传输的安全性

数据备份系统
China Telecom,江苏无锡



目录 CONTENTS

01 第一部分 前言

01 单细胞测序在药物研发中的应用

03 第二部分 技术方法和平台

03 单细胞RNA测序

06 单细胞TCR/BCR测序

08 单细胞ATAC测序

09 单细胞多组学

19 第三部分 数据分析

19 单细胞RNA数据分析

21 单细胞TCR/BCR数据分析

21 单细胞ATAC数据分析

22 单细胞多组学数据分析

23 第四部分 应用方向和案例

23 药物靶点发现及验证

25 免疫治疗

27 协同治疗

28 疫苗开发

31 第五部分 单细胞(核)悬液制备解决方案

31 单细胞悬液制备服务

32 单细胞抽核服务

33 伯优®单细胞测序组织保存液

36 伯优®细胞核分离试剂盒



第一部分 前言

单细胞测序在药物研发中的应用

单细胞测序是在单个细胞水平对细胞的分子信息进行检测。与传统测序不同,我们需要先将实体组织或体液中的细胞群分离成单个细胞,再通过对DNA或RNA进行一定倍数的扩增使其达到现有测序技术的最低检测水平,用于基因组和转录组测序,或直接对单个细胞进行表观遗传学测序,从而检测出细胞的异质性等关键信息。而传统的测序则是在群体细胞水平上进行的,最终得到的测序信号值其实是多细胞的平均水平,故而丢失了异质性的信息。2011年, Nature Methods将单细胞测序列为当年度值得期待的技术之一^[1];2013年1月, Science杂志将单细胞测序列为年度最值得关注的六大领域榜首^[2];2014年1月, Nature Methods将单细胞测序列为“Method of the Year 2013”^[3]。2020年1月6号Nature Methods将单细胞多组学评为了“Method of the Year 2019”^[4],并在线发表5篇相关文章。目前,单细胞测序已广泛应用于肿瘤异质性、免疫微环境、神经科学、胚胎发育、细胞分化等领域的研究。

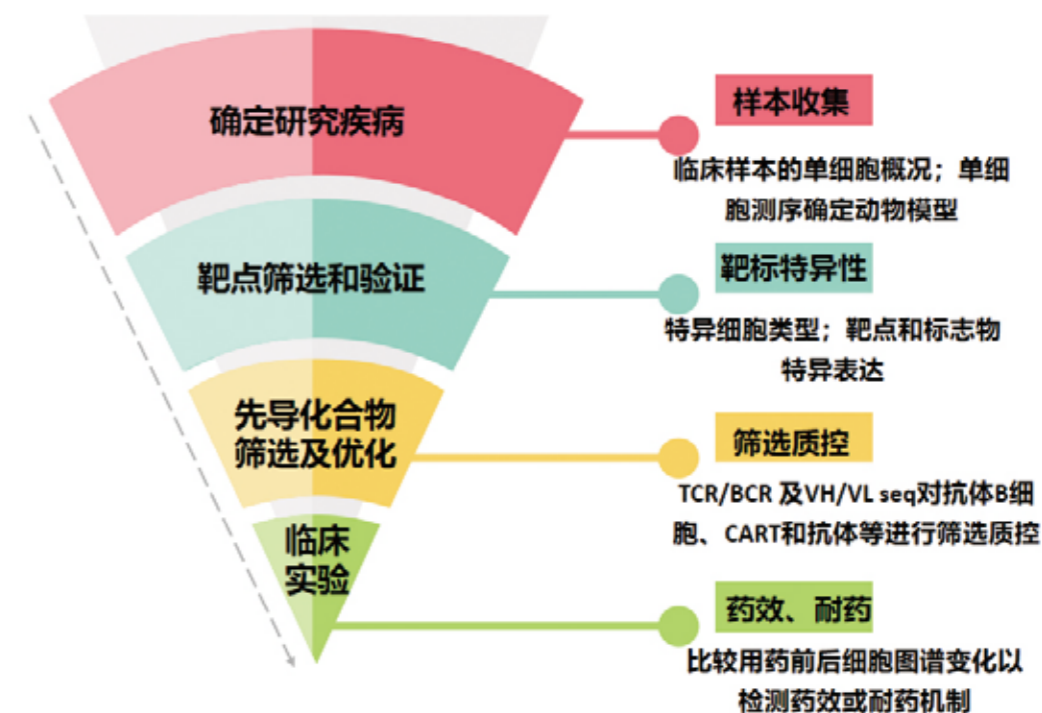
Editorial | Published: 06 January 2020

Method of the Year 2019: Single-cell multimodal omics

Nature Methods 17, 1(2020) | Cite this article

2018年以来,越来越多的药物研发机构开始注意到单细胞测序技术在药物研发上的优势。首先是通过分析不同病人样本的单细胞图谱来挖掘潜在的靶点(细胞、通路和分子),主要是在RNA和蛋白水平上筛选及验证细胞特异性表达的靶点。其次,探究病人组织微环境中细胞类型与分子特征的相关性,如靶标与特定的免疫细胞或基质细胞、信号通路、空间位置、受体配体等的相关性,从而更好地确定靶点的作用方式及细胞-细胞相互作用。一旦确定了靶点,需将候选模型与病人的单细胞表达谱进行比较,以确定最匹配的模型。并且单细胞测序还能用于进一步探究细胞构成及基因表达在用药前后的变化,及治疗有效/无效之间的差异,以评估治疗过程及新药物的有效性;此外,对不同药物及其组合进行单细胞测序比较,还可筛选最佳治疗组合。

单细胞测序技术以其高通量、高分辨率的特点,使人们开始意识到它在药物研发中的巨大潜力,包括在单细胞水平上进行高通量地药物靶点筛选、药代动力学分析、药效评价等,极大地缩减药物发现周期、节约新药研发成本。单细胞测序技术为药物研发注入新的希望,有助于药物研发机构优化新药研发管线。



驱动药物开发的单细胞测序技术



第二部分 技术方法和平台

01 单细胞RNA测序

单细胞转录组测序 (Single-cell RNA-sequencing) 是指在单个细胞的水平上对RNA进行高通量测序和分析的新技术。在基因表达层面上, 不同的细胞具有独特的转录组, 即便是那些看似相同的细胞群, 细胞之间的RNA水平上却差异巨大。单细胞转录组测序技术有别于常规的RNA测序, 由于受到检测的灵敏度等技术限制, 常规方法所使用的材料都是组织或一群细胞的混合物, 即Bulk Sequencing。因而得到的结果只是大量细胞的平均数据, 或者只是这群细胞的代表性信息, 而单个细胞特异性的信息往往被掩盖。

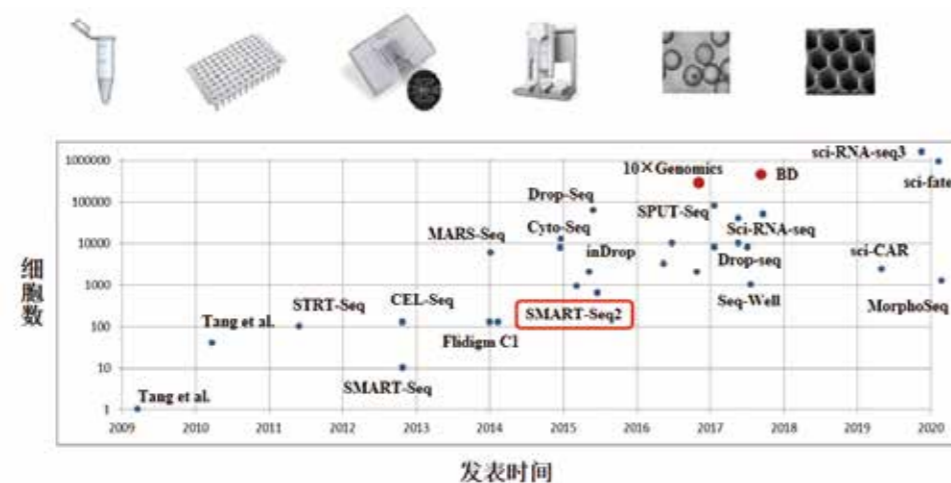
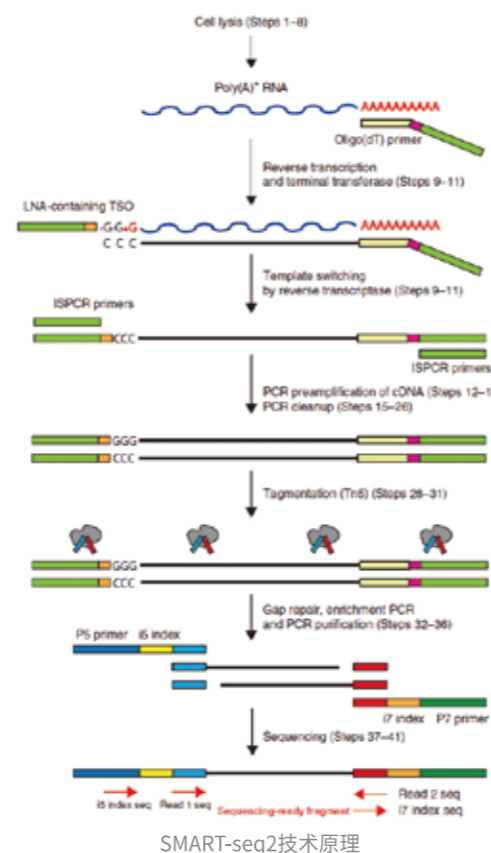


图 单细胞RNA测序技术的发展

1、SMART-seq

2012年, 由美国和瑞典的科学家共同开发了称为Smart-Seq (Switching mechanism at 5' end of the RNA transcript) 的技术^[5]。在2013年, Nature Methods杂志上报告了新的方案, 被称为Smart-Seq2^[6], 随后在2014年他们公布了详细的操作流程^[7]。获取单细胞并裂解细胞后, 含有oligo-dT的引物与mRNA的poly-A结合, 逆转录酶MMLV进行逆转录, 逆转录酶到达mRNA 5'末端时, MMLV的末端转移酶活性会在第一链cDNA的3'末端增加额外的胞嘧啶, 这时TSO引物3'末端的rGrG+G结合到第一链末端的胞嘧啶, 然后以第一链cDNA为模板进行延伸合成互补的第二链, 全长cDNA经过PCR扩增后进一步进行测序文库的构建。



SMART-seq2技术原理

■ 技术优势

- ◎ 起始量低
1个细胞起始, 适用于难以满足10x Genomics等平台起始细胞量要求的样本。
- ◎ 覆盖度高
覆盖cDNA的全长序列, 每个细胞能够获得上万个基因的表达信息。
- ◎ 信息全面
除了获得基因表达信息, 数据能够用于可变剪接, cSNP等分析, 以及带poly-A结构的lncRNA研究。

■ 文库结构



图 SMART-seq2文库示意图

■ 建议测序深度及参数

指标	参数
测序深度	6Gb/cell
测序类型	PE150

2、10x Genomics Chromium

10x Genomics公司的Chromium系统利用8通道的微流体交叉系统, 将含barcode的凝胶珠 (Gel Beads)、细胞和酶的混合物、油三者混合, 形成GEMs (油包水的微体系)。GEMs形成后, 细胞裂解, 凝胶珠自动溶解释放大量barcode序列, 随后mRNA逆转录产生带有10x barcode和UMI信息的cDNA, 构建标准测序文库, 其中10x barcode用于区分细胞, UMI用于区分mRNA分子。

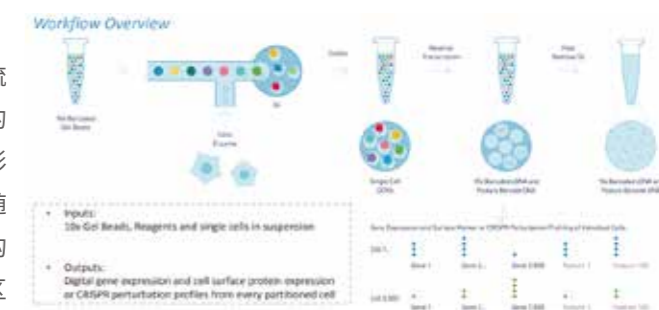


图 10X Genomics技术原理

■ 技术优势

- ◎ 通量高
一张芯片具有8个独立的通道, 可供8个样本同时上机, 每个通道最高可捕获10000个细胞。
- ◎ 捕获率高
单细胞捕获效率高达65%, 多细胞比例<0.9% (1,000个细胞中)。
- ◎ 延展性强
除了获得单细胞mRNA的信息, 还提供了单细胞TCR/BCR、单细胞表面蛋白、单细胞ATAC等多种解决方案。

文库结构

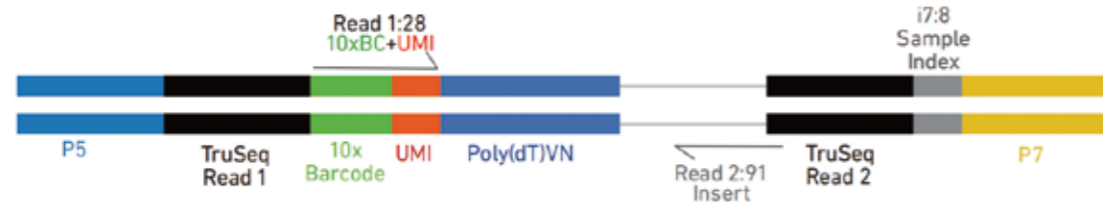


图 10x Genomics 3' gene expression文库示意图

建议测序深度及参数

指标	参数
测序深度	20,000~50,000 reads/cell
测序类型	PE150

3、BD Rhapsody

BD Rhapsody技术利用卡式芯片(微孔板)在磁性的寡核苷酸条形码标记微球上实现单细胞捕获和mRNA转录本的分子标签,然后将这些微球合并到单个管中用于cDNA扩增和文库构建。可满足100~10000个细胞的自动分选、扩增及建库。

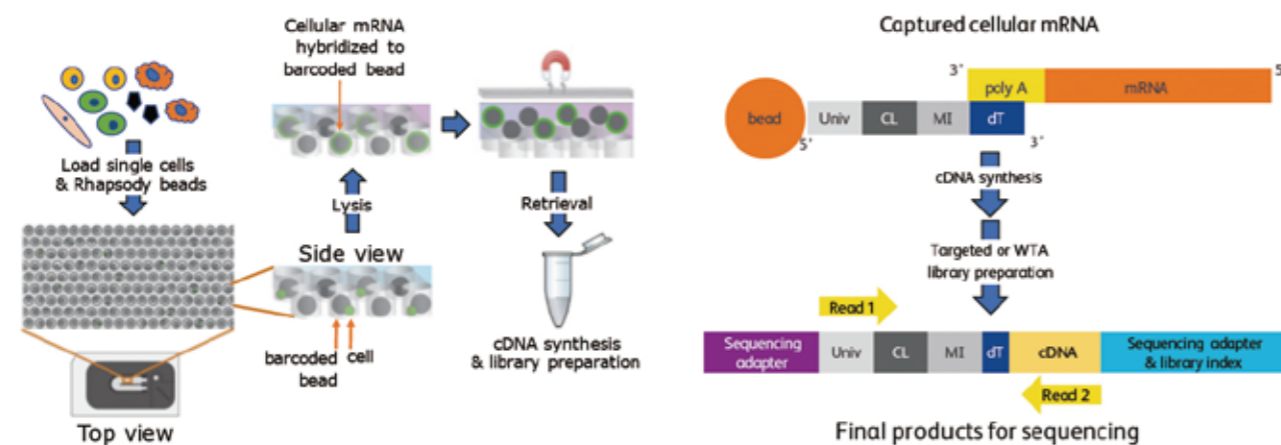


图 BD Rhapsody术原理

技术优势

- ◎ 高效
每个样本可测100~10000个细胞;
2天内完成细胞悬液制备、单细胞捕获、扩增以及建库。
- ◎ 灵活
抗体标签技术可实现多样本混合捕获;
可选择全转录组测序或目标基因测序。
- ◎ 可靠
利用成像系统对单细胞捕获过程进行质控;
单细胞捕获效率高达80%, 多细胞比例<1% (1,000个细胞中)。
- ◎ 整合
可同时检测单个细胞的mRNA水平与蛋白水平。

文库结构

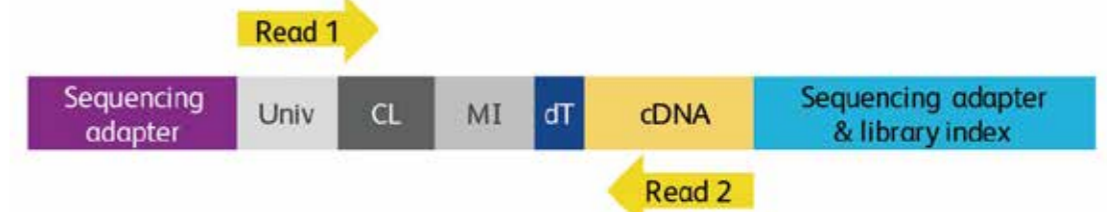


图 BD Rhapsody基因表达文库示意图

建议测序深度及参数

指标	参数
测序深度	20,000~50,000 reads/cell
测序类型	PE150

02 单细胞TCR/BCR测序

免疫组库 (Immune Repertoire, IR) 是指体内T淋巴细胞和B淋巴细胞多样性的总和,反映机体免疫系统在特定时间段内应对外界刺激应答的能力。基于10x Genomics的单细胞系统,可实现高通量的单细胞转录组和V(D)J测序。不但可以将TCR/BCR双链匹配,而且能够同时获得基因表达信息。

技术原理

10x Genomic单细胞免疫组库测序与单细胞RNA测序一样,通过微流控系统将有引物和条形码的凝胶珠与单个细胞包裹在油滴中;接下来在每个油滴内,凝胶珠溶解,细胞裂解释放mRNA,通过逆转录产生带有10x barcode和UMI信息的cDNA。破油(Breaking Emulsions)之后,取两份cDNA,后续同时进行基因表达和免疫组库的文库构建。其中TCR或者BCR的V(D)J序列通过设计在C区的巢式引物进行PCR富集;而mRNA的信息,与10x Genomics 3' mRNA文库不同,保留的是5'端的信息。测序后即可一次性获得大量单细胞的基因表达和免疫组库数据。

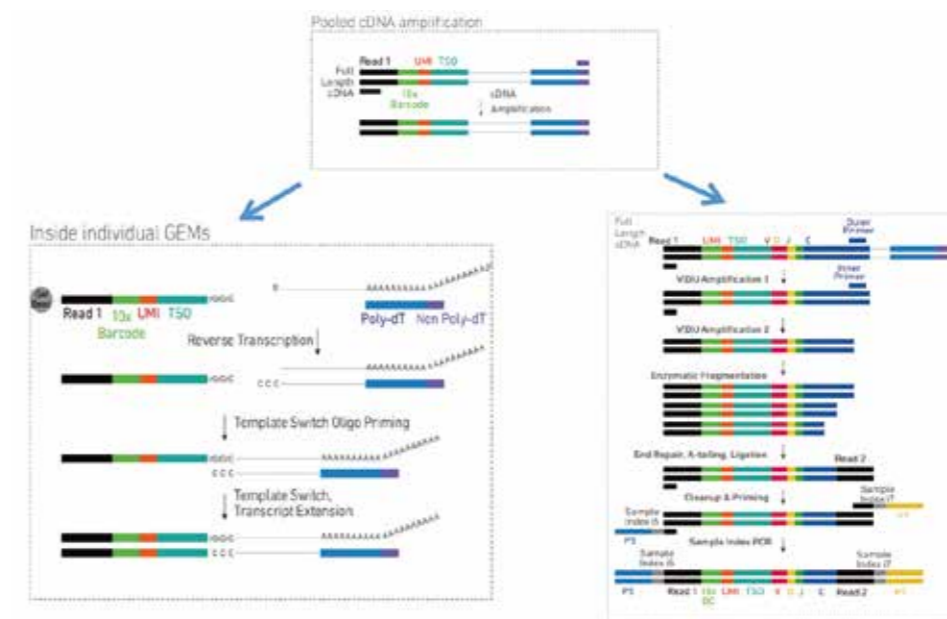


图 10x Genomics技术原理

技术优势

◎ 通量高

一张芯片具有8个独立的通道,可供8个样本同时上机,每个通道最高可捕获10000个细胞。

◎ 分辨率高

可获得真正单细胞水平的免疫组库信息,并且可匹配TCR/BCR的双链。

◎ 信息全面

可同时获得单个细胞匹配的mRNA和TCR/BCR信息。

文库结构

5' gene expression文库:



图 10x Genomics 5' gene expression文库示意图

V(D)J文库:



图 10x Genomics V(D)J文库示意图

建议测序深度及参数

指标	参数
测序深度-5' mRNA	20,000~50,000 reads/cell
测序深度-TCR/BCR	5,000~10,000 reads/cell
测序类型	PE150

03 单细胞ATAC测序

单细胞ATAC测序 (Aaasay for transposase Accessible Chromatin with high throughput sequencing at the single cell level) 翻译成中文是在单细胞水平上通过高通量测序技术来研究染色质开放程度(也叫染色质的可及性)。染色质开放程度(染色质的可及性),反映了染色质的转录活性状态,是研究基因表达调控的重要方向,在表观遗传图谱绘制、细胞分化和发育及各类疾病的发生发展研究中具有重要的作用。

2018年10月,10x Genomics推出的Chromium单细胞ATAC解决方案提供了一种全面的、可扩展的方法来研究分析单个样本中成百上千个细胞中染色质的开放情况。通过转座酶对混合的细胞核悬液进行核DNA的切割,然后使用微流控芯片将溶液中的细胞核包裹到油滴中,形成纳米级的凝胶珠状乳液(GEMs)。采用10x条形码,对每个细胞核切割的DNA加上唯一的条形码。通过文库构建,测序,最终根据10x条形码将测序得到的序列关联到每个单独的细胞核上。

实验流程

• 转座酶切割核DNA

细胞核悬浮液在包括转座酶的混合液中孵育。转座酶进入细胞核,优先在染色质的开放区域将DNA片段化。同时,将测序接头序列添加到片段化的DNA片段的末端。

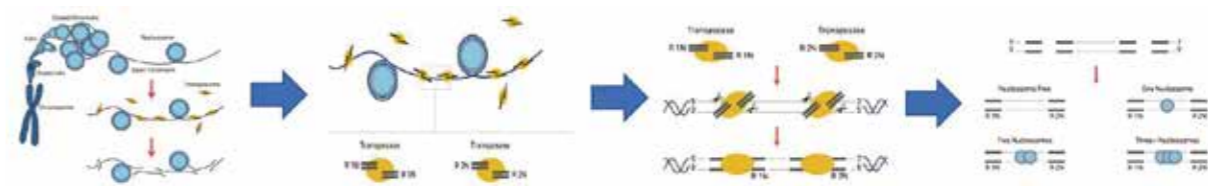


图 转座酶切割DNA示意图

• GEM生成及Barcode添加

GEMs生成后,凝胶珠会溶解释放出含有(i) Illumina P5序列、(ii) 16nt 10x条形码序列和(iii) Read 1 (Read 1N)序列的寡核苷酸。这些核苷酸序列会与片段化的DNA,以及混合液进行混合。后续经过热循环后生成含有10x barcode的单链DNA。经过孵育后,对GEMs进行破油处理,所有GEMs中的含有10x barcode的单链DNA混合在一起,并进行回收。

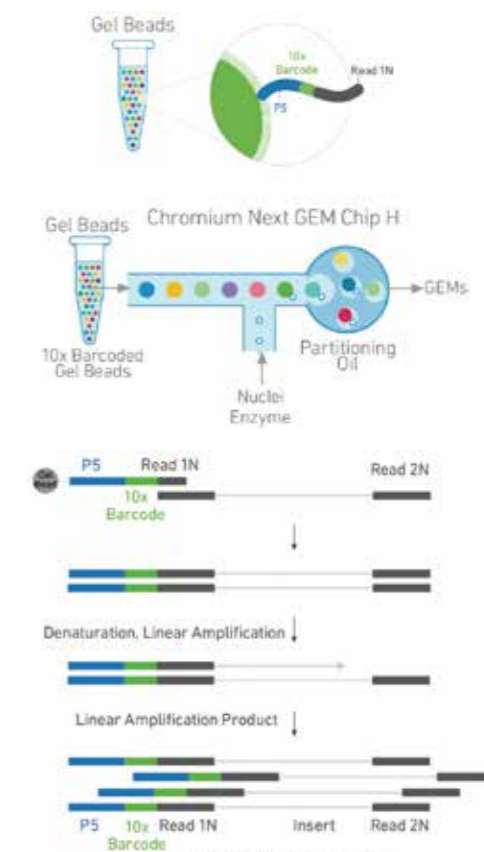


图 10x Barcoded DNA Fragments

GEMs生成后,凝胶珠会溶解释放出含有(i) Illumina P5序列、(ii) 16nt 10x条形码序列和(iii) Read 1 (Read 1N)序列的寡核苷酸。这些核苷酸序列会与片段化的DNA,以及混合液进行混合。后续经过热循环后生成含有10x barcode的单链DNA。经过孵育后,对GEMs进行破油处理,所有GEMs中的含有10x barcode的单链DNA混合在一起,并进行回收。

• 破油后的纯化

使用硅烷磁珠清除破油反应混合物中残留的生化试剂。固相可逆固定(SPRI)珠子用于从样本中消除未使用的10x条形码。

• 测序文库的构建及质检

通过PCR将P7接头以及样本的标签(Index N)添加到文库的两端,最终形成包含有P5和P7接头序列的文库,用于Illumina桥式PCR扩增。

■ 文库结构

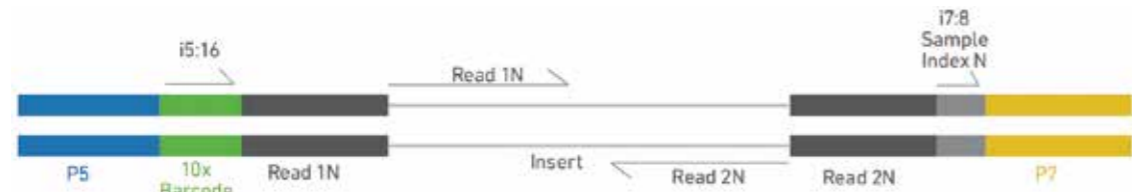


图 ATAC文库组成示意图

■ 建议测序深度及参数

指标	参数
测序深度	25,000~50,000 reads/nucleus
测序类型	PE150, dual-index (双index测序)

■ 技术优势

- ◎ 流程精简时效快:可检测单细胞转录调控区域中的开放性染色质。
- ◎ 通量高:每个通道500-10000个细胞核。
- ◎ 效率高:细胞核捕获率高达65%。
- ◎ 适用范围广:经验证适用于原代细胞,冻存细胞,新鲜组织等。
- ◎ 信息分析:获取信息量大,可精细化分析。
- ◎ 同一份样本可实现单细胞ATAC、mRNA、TCR/BCR同时测序,并整合数据。

04 单细胞多组学

单细胞测序技术的进步使得多组学检测成为可能,这里指的是在一个实验中同时测量多种分子水平的能力,或整合来自多个实验的不同组学数据集的能力。由于其在揭示细胞功能、发现跨染色体关系和记录动态生物事件方面的巨大影响,2019年Nature Methods将单细胞多组学列为年度技术^[4]。为了使单细胞测序技术更好地服务药物开发,除了RNA表达谱还需要检测每个细胞其他分子层面的信息,例如通过检测治疗后特异性T细胞状态的克隆扩增,联合单细胞RNA-seq,可以识别出肿瘤特异性T细胞。

新型测序技术能够对数千个单细胞的表面蛋白标记物进行测定,可将蛋白质表面分子的表达丰度纳入分析,同时还能够对相同单细胞中的mRNA进行测序。这些蛋白质表面分子包括细胞类型的标记(如CD45,CD8, CD4等),共刺激和共抑制受体(如GITR和CD137)等。以同样的方式,治疗单抗的潜在靶细胞的特征可以通过标记它的二抗,然后进行scRNA-seq。这本质上是对治疗单克隆抗体结合的相关细胞进行索引和分析。另一个相关的信息层是细胞的表观遗传状态,最近技术的发展是在单细胞中同时进行表观遗传和基因表达检测。

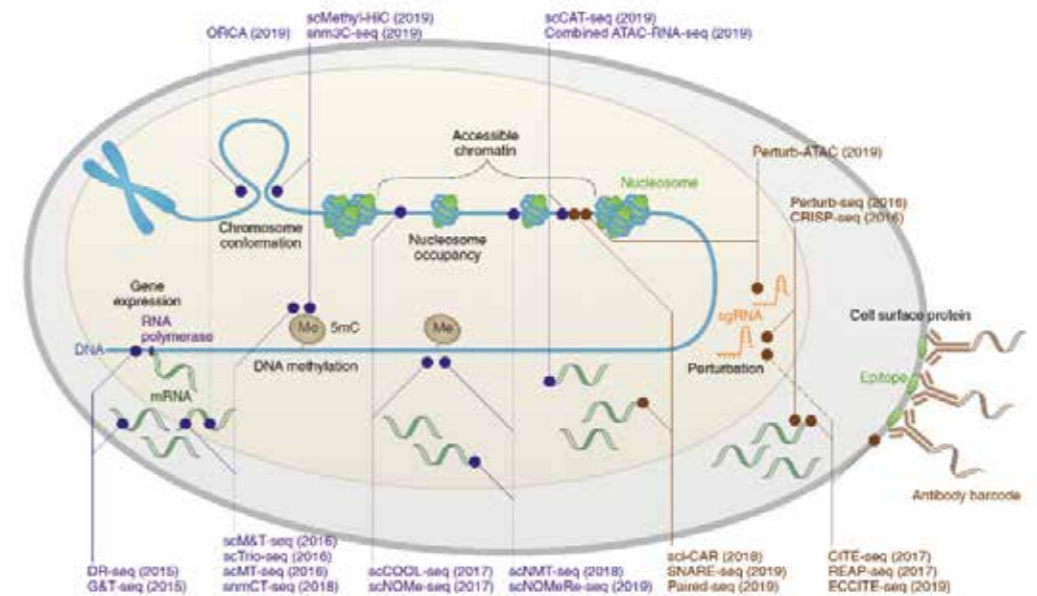


图 单细胞多组学研究^[6]

4.1 单细胞RNA+表面蛋白

单细胞技术发展的最初集中在单细胞RNA测序(scRNA-seq)上,它可以剖析转录组的异质性,揭示给定复杂组织中以前未知的细胞类型或细胞状态。研究人员很快意识到,scRNA-seq与另一种生物分子特征的结合,如蛋白质质谱,提供的信息不仅仅是其组成部分的总和;联合分析RNA和蛋白质水平,可以帮助我们能够更好地分辨转录差异较小的细胞亚群。

(1) BD AbSeq 同时检测单个细胞的mRNA和蛋白水平

BD公司推出的BD AbSeq,能够同时分析数千个单细胞中的RNA和蛋白质,完整揭示出基因和蛋白在生物学系统中的作用。具体来说, BD AbSeq使用独特的寡核苷酸偶联每个抗体(Ab-oligos),这条寡核苷酸带有抗体特异的条形码(Ab-specific barcode, ABC),在文库制备的过程中可有效扩增。之后利用新一代测序对ABC进行解码,可估计蛋白质的丰度。BD Rhapsody平台利用微孔技术来分离单个细胞,并捕获mRNA和Ab-oligo。然后,利用文库扩增试剂产生平行的RNA和BD AbSeq测序文库。经过Illumina测序仪的测序,可获得RNA和蛋白表达的数据。

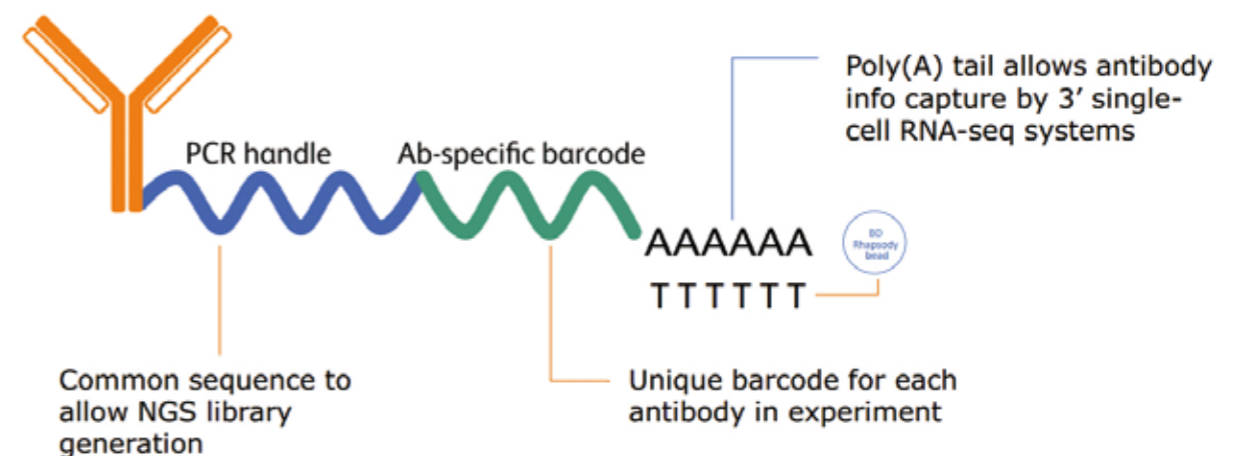


图 BD AbSeq抗体设计示意图

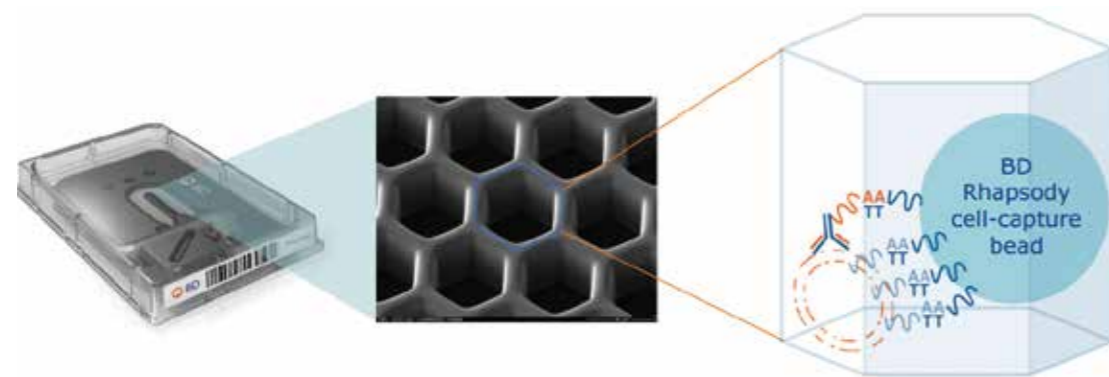


图 BD AbSeq放大示意图

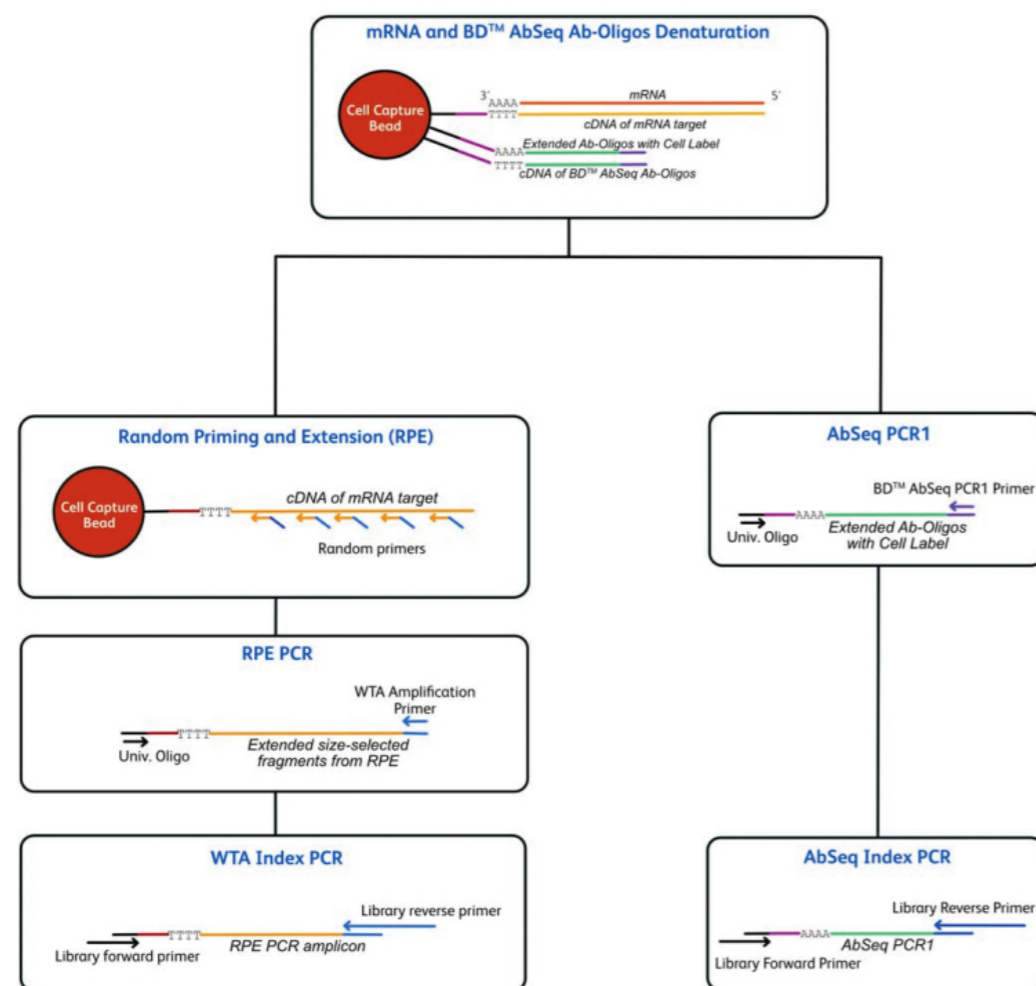


图 3' mRNA与Abseq同时建库

■ 建议测序深度及参数

指标	参数
测序深度-3' mRNA	20,000~50,000 reads/cell
测序深度-Abseq	200-400 reads/antibody/cell
测序类型	PE150

30 pre-titrated antibodies								
Specificity	Clone	Oligo ID	Specificity	Clone	Oligo ID	Specificity	Clone	Oligo ID
CD3	UCHT1	AHS0231	CD45RA	H1100	AHS0009	CD196 (CCR6)	11A9	AHS0034
CD4	SK3	AHS0032	CD56	NCAM16	AHS0019	CD197 (CCR7)	2-L1-A	AHS0273
CD8	SK1	AHS0228	CD62L	DREG-56	AHS0049	CD272	J168-540	AHS0052
CD11c	B-Ly6	AHS0056	CD127	HIL-7R-M21	AHS0028	CD278	DX29	AHS0012
CD14	MPHIP9	AHS0037	CD134	ACT35	AHS0013	CD279	EH12.1	AHS0014
CD16	3G8	AHS0053	CD137	4B4-1	AHS0003	CD357 (GITR)	V27-580	AHS0104
CD19	SJ25C1	AHS0030	CD161	HP-3G10	AHS0205	CD366 (TIM-3)	7D3	AHS0016
CD25	2A3	AHS0026	CD183 (CXCR3)	1C6/CXCR3	AHS0031	HLA-DR	G46-6	AHS0035
CD27	M-T271	AHS0025	CD185 (CXCR5)	RF882	AHS0039	IgD	IA6-2	AHS0058
CD28	L293	AHS0138	CD186 (CXCR6)	13B 1E5	AHS0148	IgM	G20-127	AHS0198

BD AbSeq Immune Discovery Panel

*更多抗体见附件

(2) 10x Feature Barcoding同时检测单个细胞的mRNA和蛋白水平

10x Genomics推出Feature Barcoding技术对单细胞的蛋白组进行检测。对每个抗体用独特的寡核苷酸序列 (Antibody Barcode) 进行标记, 这样可将检测蛋白序列转化为检测核苷酸序列。10x Gel Beads 捕获序列与抗体寡核苷酸中Capture序列进行互补配对, 富集抗体连接的寡核苷酸序列, 进行扩增延伸, 将10x barcode标签加到寡核苷酸链上。10x Gel Beads oligo同时捕获同一细胞内的mRNA, 利用密度离心将细胞表面蛋白寡核苷酸与10x单细胞转录组cDNA分离, 通过构建两个文库可以分别对蛋白和mRNA进行测序和定量。

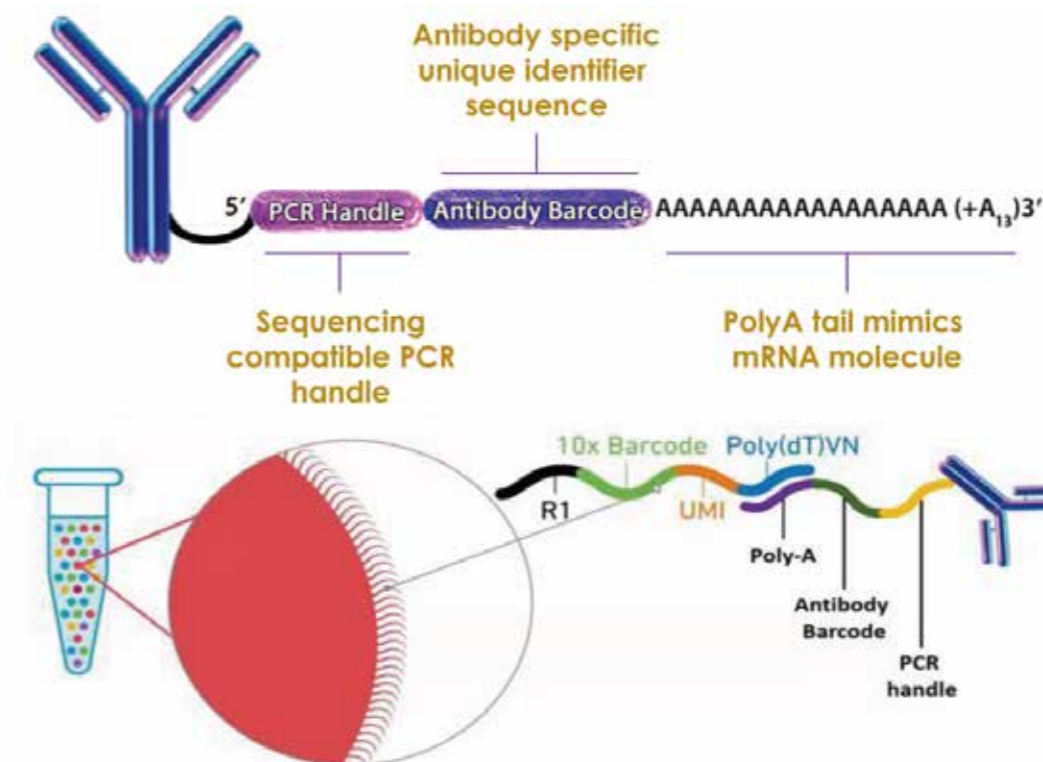


图 10x Feature Barcoding抗体设计及原理示意图

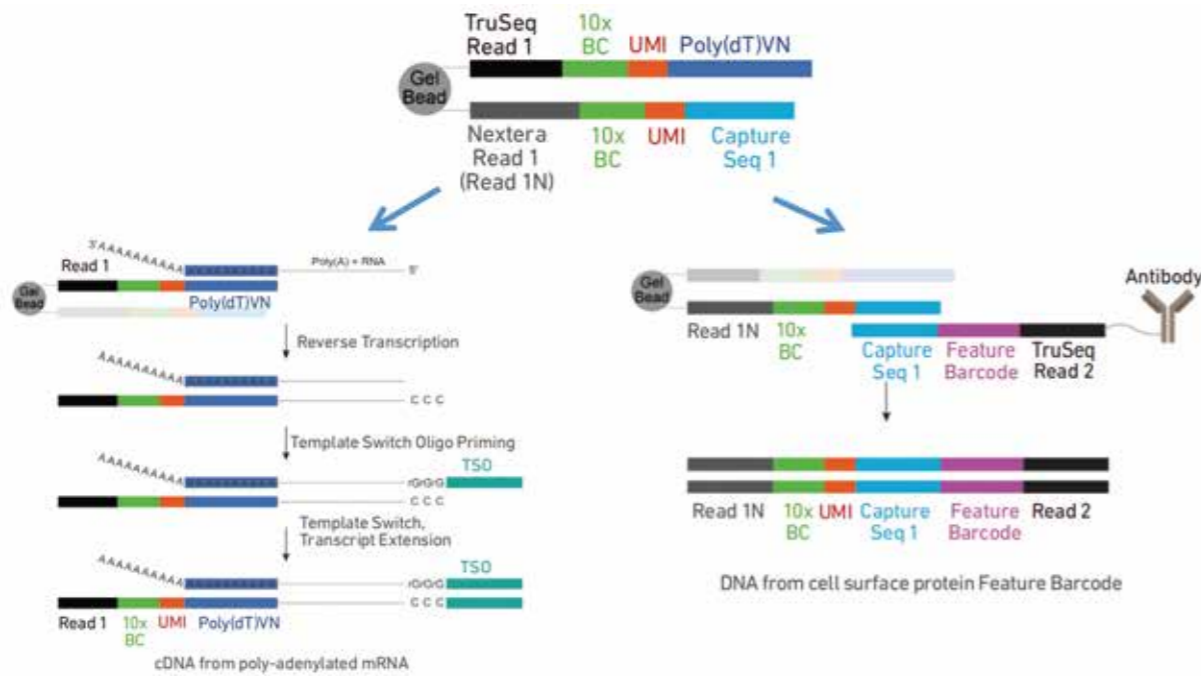


图 mRNA与表面蛋白同时建库

文库结构

3' gene expression文库:

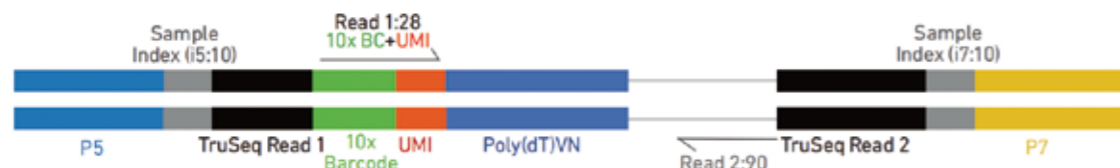


图 10x Genomics 3' gene expression文库示意图

表面蛋白文库:

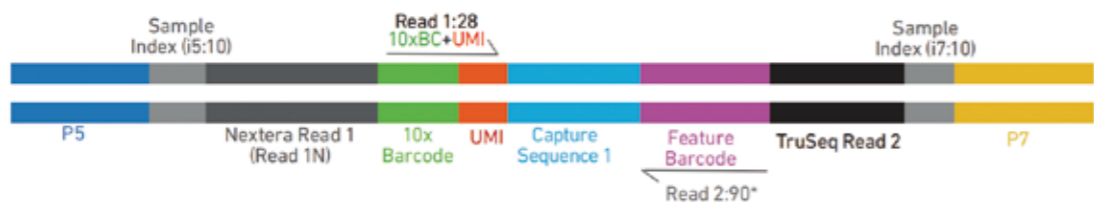


图 10x Genomics Cell Surface Protein文库示意图

建议测序深度及参数

指标	参数
测序深度-3' mRNA	20,000~50,000 reads/cell
测序深度-Surface Protein	5,000~10,000 reads/cell
测序类型	PE150

10x Feature Barcoding所用抗体是由Biolegend开发生产,其抗体产品统称为TotalSeq™。TotalSeq™又分为TotalSeq™-A、

TotalSeq™-B和TotalSeq™-C其对应关系如下:TotalSeq™-A和10x Genomics 3' v2和v3试剂盒匹配,也适用于任何基于poly-A尾巴捕获的单细胞分析平台,如Bio-Rad ddSeq, Fluidigm C1, Celsee Genesis, Drop-seq等;TotalSeq™-B和10x 3' V3或V3.1的试剂盒匹配。TotalSeq™-C和10x 5' V(D)J的试剂盒匹配。

TBNK Panel

- CD3
- CD4
- CD8
- CD11c
- CD14
- CD16
- CD19
- CD45
- CD56 (NCAM)

Cat_Num	Long_Description	Size
399901	TotalSeq™-A Human TBNK Cocktail	5 tests
399902	TotalSeq™-B Human TBNK Cocktail	5 tests
399903	TotalSeq™-C Human TBNK Cocktail	5 tests

TBNK panel

CD80	CD3	CD194	CD140b	CD152	CD366	CD370	CD137	CD18	CD207	CD307e	GPR56
CD86	CD8	CD4	EGFR	CD223	CD272	XCR1	CD254	CD28	CD49a	CD319	HLA-E
CD274	CD56	CD44	CD146	KLRG1	CD278	Notch 1	CD163	TSLPR	CD49d	CD99	CD82
CD273	CD19	CD14	CD324	CD27	CD58	Integrin β7	CD83	CD38	CD73	CLEC12A	CD101
CD275	CD33	CD16	IgM	CD107a	CD96	CD268	CD357	CD127	TCR Va7.2	CD257	CD360
CD270	CD11c	CD25	CD5	CD95	CD39	CD42b	CD124	CD45	TCR Vδ2	CD352	CD88
CD252	CD34	CD45RO	TCR γ/δ	CD134	CD178	CD54	CD13	CD22	TCR Vy9	CD94	Podocalyxin
CD137L	CD269	CD279	CD183	HLA-DR	CX3CR1	CD62P	CD184	CD71	TCR Va24-Ja18	CD150	CD224
CD155	HLA-A,B,C	TIGIT	CD195	CD1c	CD24	CD119	CD2	B7-H4	CD305	Ig light chain κ	CD258
CD112	CD117 (c-kit)	CD20	CD32	CD11b	CD21	TCR α/β	CD226	CD26	LOX-1	Mac-2	DR3
CD47	CD10	CD335	CD196	CD64	CD11a	Notch 3	CD29	CD204	CD158b	CD58j	Mouse IgG1, κ Isotype Ctrl
CD70	CD45RA	CD294	CD185	CD141	CD79b	CD106	CD303	CD144	CD209	CD23	Mouse IgG2a, κ Isotype Ctrl
CD30	CD123	CD45R/B220	CD103	CD1d	CD66a/c/e	CD122	CD49b	CD1a	CD158e1	Ig light chain λ	Mouse IgG2b, κ Isotype Ctrl
CD48	CD7	CD326	CD69	CD314	CD244	CD267	CD81	CD304	CD158f	HLA-A2	Rat IgG2b, κ Isotype Ctrl
CD40	CD105	CD31	CD62L	CD66b	CD235ab	CD62E	CD98	CD36	CD337	GARP	Rat IgG1, κ Isotype Ctrl
CD154	CD201	Podoplanin	CD197	CD35	CD206	FcεRIα	IgG Fc	CD158	CD336	CD328	Rat IgG2a, κ Isotype Ctrl
CD52	CD49f	CD140a	CD161	CD57	CD169	CD41	IgD	CD325	CD307d	TCR Vβ13.1	Armenian Hamster IgG Isotype Ctrl

Totalseq-C系列human panel (197个抗体+7个同型)

CD3	CD34	XCR1	CD152	CD140a	TCR Va2	integrin β7	CD117 (c-kit)	CD122 (IL-2Rβ)	CD300LG (Nepmucin)	CD370 (CLEC9A, DNCR1)
CD4	CD38	CD80	CD163	CD301b	TCR Vy2	MERTK (Mer)	CD134 (OX-40)	CD124 (IL-4Rα)	CD62P (P-selectin)	IL-33Rα (IL1RL1, ST2)
CD5	CD39	CD83	CD207	CD45.1	TCR Vy3	TCR β chain	CD15 (SSEA-1)	CD127 (IL-7Rα)	Ly-6G/Ly-6C (Gr-1)	H-2Kb bound to SIINFEKL
IgD	CD40	CD86	CD49a	CD45.2	TCR γ/δ	CD150 (SLAM)	CD182 (CXCR2)	CD169/Siglec-1	Mac-2 (Galectin-3)	TER-119/Erythroid Cells
IgM	CD43	CD8a	CD49b	CD90.1	MadCAM-1	CD192 (CCR2)	CD183 (CXCR3)	CD172a (SIRPα)	CD1d (CD1.1, Ly-38)	CD93 (AA4.1, early B lineage)
CD14	CD44	ESAM	CD49d	CD90.2	Siglec H	CD197 (CCR7)	CD185 (CXCR5)	CD326 (Ep-CAM)	CD21/CD35 (CR2/CR1)	Mouse IgG1, κ isotype Ctrl
CD19	CD45	CD103	CD49f	CX3CR1	TCR Va8.3	CD198 (CCR8)	CD223 (LAG-3)	TCR Vβ5.1, 5.2	CD252 (OX40 Ligand)	Mouse IgG2a, κ isotype Ctrl
CD20	CD54	CD106	CD62L	FcεRIα	TCR Va8.3	CD278 (ICOS)	CD335 (NKP46)	TCR Vβ8.1, 8.2	CD204 (Scavenger R1)	Mouse IgG2b, κ isotype Ctrl
CD23	CD61	CD11a	F4/80	IL-23R	CD45R/B220	CD278 (ICOS)	CD366 (Tim-3)	CD107a (LAMP-1)	CD273 (B7-DC, PD-L2)	
CD24	CD63	CD11b	Ly-51	NK-1.1	CD55 (DAF)	CD279 (PD-1)	CD185 (CXCR5)	CD326 (Ep-CAM)	CD274 (B7-H1, PD-L1)	
CD25	CD68	CD11c	Ly-6C	TCR γδ	CD95 (Fas)	CD357 (GITR)	TIGIT (Vstm3)	CD170 (Siglec-F)	CD304 (Neuropilin-1)	
CD27	CD69	CD135	Ly-6G	CD16/32	CD200 (OX2)	CD64 (FcγRI)	VISTA (PD-1H)	TCR Va11.1, 11.2	CD317 (BST2, PDCA-1)	
CD31	CD73	CD137	Tim-4	I-A/I-E	CD206 (MMR)	KLRG1 (MAFA)	CD115 (CSF-1R)	CD138 (Syndecan-1)	CD309 (VEGFR2, Flk-1)	

Totalseq-C系列mouse panel (135个抗体+3个同型)

*更多panel见附件

4.2 单细胞ATAC+RNA

单细胞多组学ATAC+基因表达, 是对数千个细胞中每一细胞内的染色质可及性和RNA同时检测的新技术。通过这项技术能够测定调控区域对基因表达的影响, 从而在目标细胞内实现信息的关联。单细胞多组学ATAC + 基因表达是从单细胞核悬液开始的, 用转座酶对大量细胞核进行转座, 这种酶优先切割开放染色质区域中的核DNA, 然后将转座后的细胞核分成液滴, 也称为GEM, 其中单个凝胶珠 (Gel Bead) 含有唯一的10x条形码。在GEM内, 唯一的条形码与单个细胞核内的mRNA和转座DNA片段相连接。孵育后, 溶解GEM并混合, 然后进行纯化、预扩增和文库构建。混合后的GEM制备出两个文库, 一个用于RNA测序, 另一个用于ATAC分析。根据两种分子信息可以更深入地表征复杂的细胞群, 捕获细胞异质性, 发现驱动细胞分化、发育以及疾病发生的基因调控相互作用, 是单细胞多组学研究的有力工具。

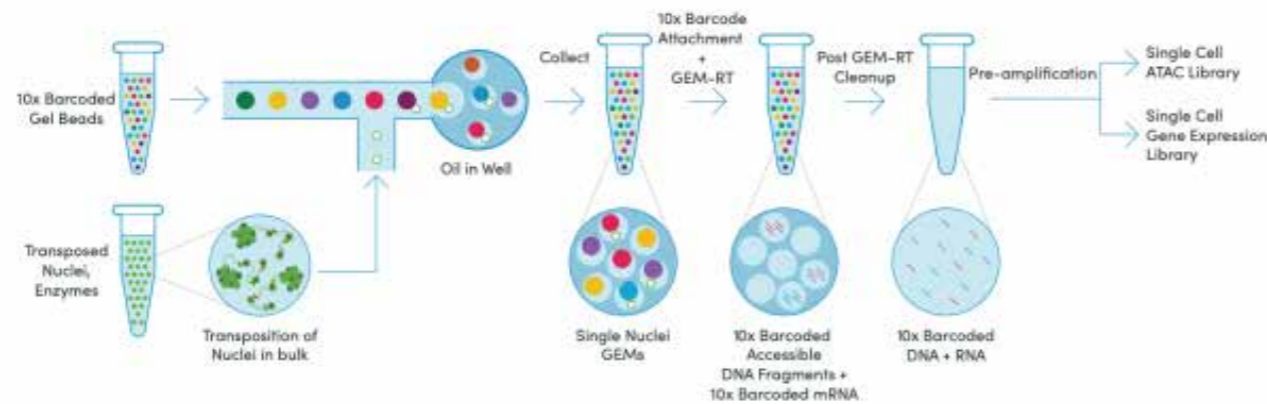


图 Chromium单细胞多组学ATAC+基因表达原理示意图

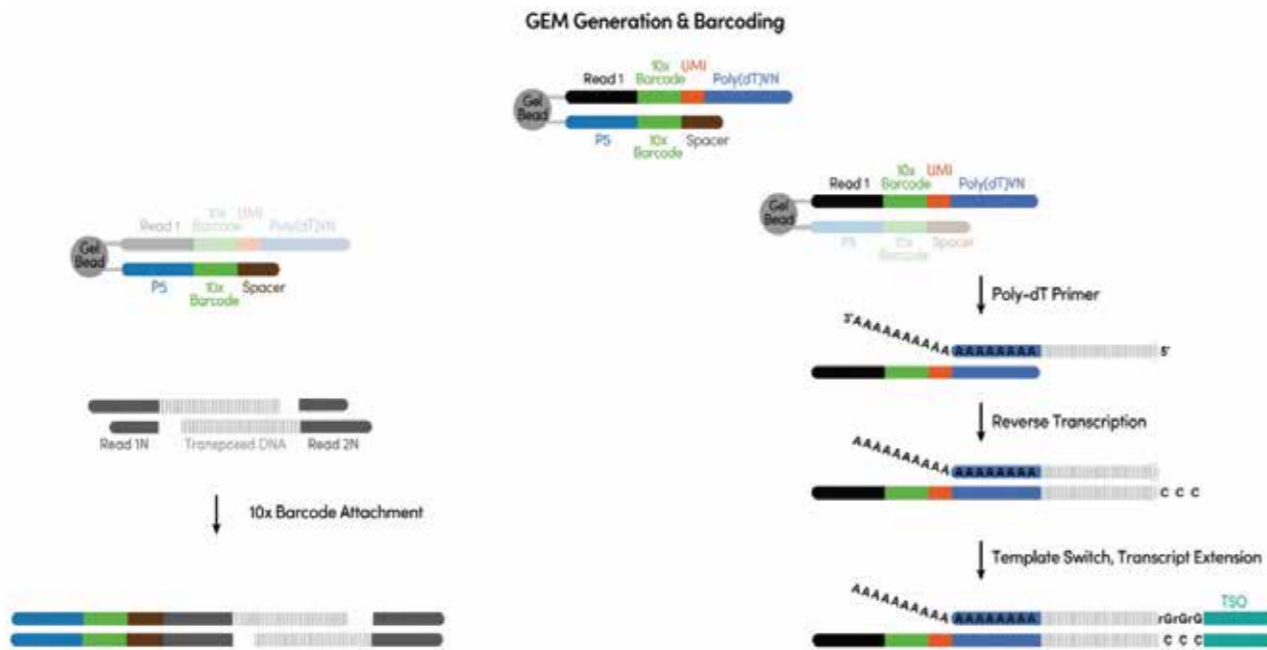


图 10x Genomics 3' mRNA与ATAC同时建库

文库结构

3' gene expression文库:

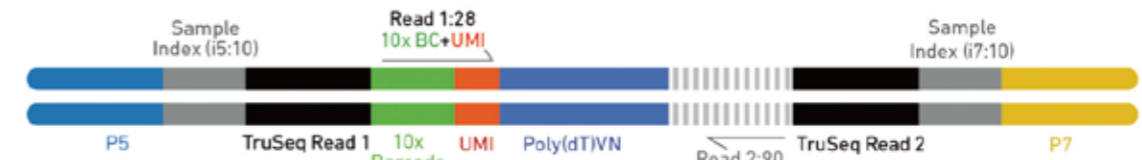


图 10x Genomics 3' gene expression文库示意图

ATAC文库:

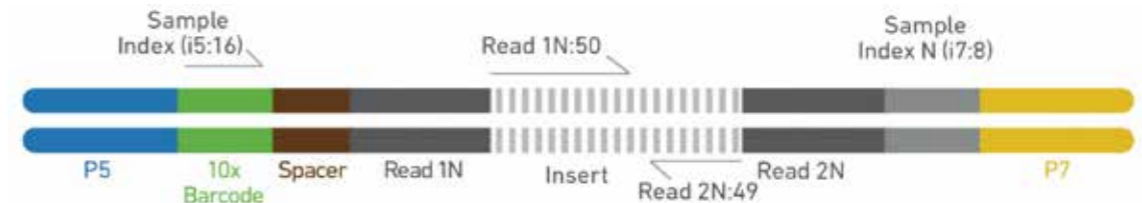


图 10x Genomics ATAC文库示意图

建议测序深度及参数

指标	参数
测序深度-3' mRNA	20,000~50,000 reads/cell
测序深度-ATAC	25,000~50,000 reads/cell
测序类型	PE150

4.3 免疫多组学

(1) 抗原特异性 T 细胞分析

T细胞是适应性免疫系统的关键组成部分, 参与抗原识别介导的免疫应答的启动。T细胞受体 (TCRs) 位于T细胞表面, 是一种异二聚体蛋白质, 包含一个 α 链和一个 β 链。TCR可以特异性识别并结合抗原呈递细胞 (APC) 表面的主要组织相容性复合体 (MHC) 呈递的特异性抗原肽 (pMHC), 每一对特定TCR可以特异性识别一种类型的pMHC。

Immudex公司的dCODE™ Dextramer®技术可以为MHC Dextramer®试剂添加独特的DNA条形码, 从而实现对抗原特异性T细胞标记和检测。dCODE™ Dextramer®技术除了对抗原进行特异性的条形码标记之外, 同时还在pMHC复合体上引入了PE荧光基团。当抗原特异性细胞的比例非常低时, 可使用流式分选富集抗原特异性T细胞。

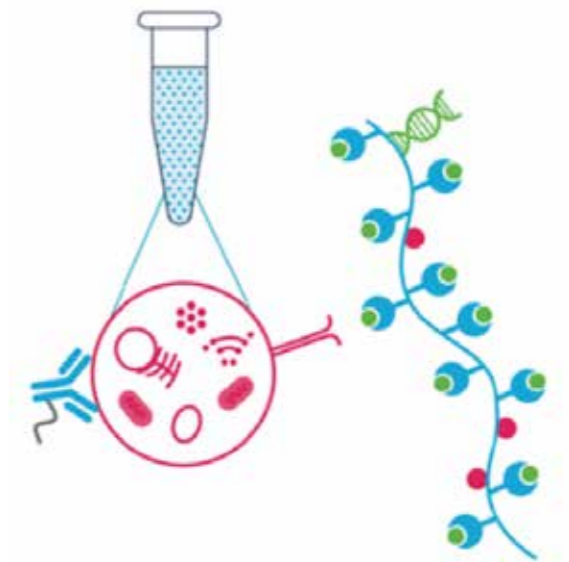


图 Immudex公司的pMHC多聚体和10x Genomics免疫多组学

下游可以直接使用 10x Genomics 的免疫多组学解决方案,分析免疫细胞在抗原结合状态下的转录谱、表面蛋白表达、配对的特异性 TCR 序列信息以及T细胞结合的特异性抗原种类和数量等。将为基础免疫学研究和临床实践中,基于 TCR 的诊断方法和免疫疗法等领域提供新的思路和方法。

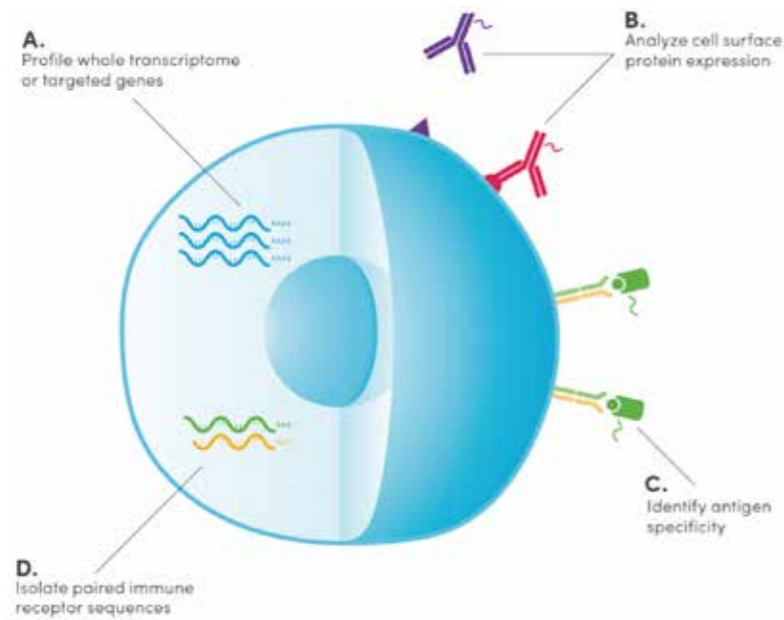


图 10x Genomics免疫多组学解决方案

另一种类似的方法是BioLegend公司的Flex-T™。Flex-T™ MHC Tetramer是利用T细胞表面的TCR受体能与特异性小肽结合的特性,人工构建MHC-多肽复合物。单个MHC-肽复合物对TCR分子的亲和力较弱,而多个MHC-肽复合物通过与Streptavidin聚合形成Flex-T™ MHC Tetramer多聚体,亲和力显著提高,且因复合物上具有荧光素等标记物,还可使用流式细胞仪等富集抗原特异性T细胞。如果下游对单细胞测序,则可将MHC-肽复合物与同时标记Oligo及荧光基团的Streptavidin(即Streptavidin-PE-Oligo)形成MHC-Tetramer, MHC-Tetramer接着用于样本细胞标记,最后通过测序平台获得的Oligo信息识别抗原特异性T细胞相应的抗原肽表位。

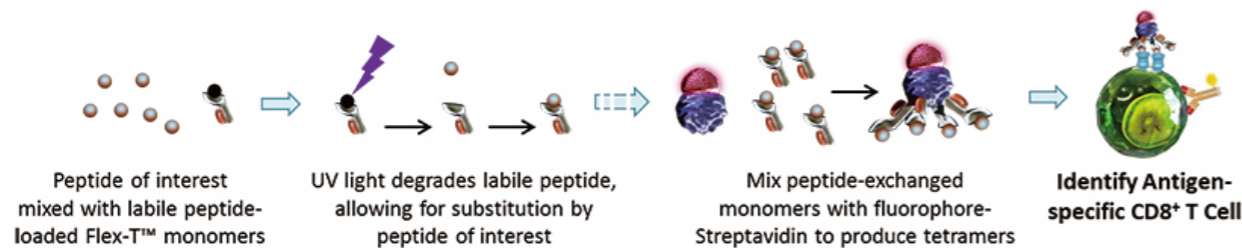


图 BioLegend Flex-T™的实验流程

(2) 抗原特异性B细胞分析

每个B细胞产生一种抗体,这种抗体具有独特的表位特异性。LIBRA-seq技术能够捕获识别抗原特异性B细胞,同时获得这些B细胞的基因表达谱和对应的BCR序列,可为抗体研发、疫苗和免疫疗法的发展提供完整的解决方案。下图展示了LIBRA-seq的原理,首先,使用特异性DNA条形码和荧光(PE)对特定的抗原进行标记,接着单细胞样品与条形码标记后的抗原进行混合孵育。与特异的抗原具有反应的B细胞在样品中的占比往往非常低,在单细胞测序前需要对抗原特异性B细胞进行富集。下游可以直接使用 10x Genomics免疫多组学解决方案,进行抗原结合状态下的B细胞转录谱以及抗原与抗体的互作分析等研究。

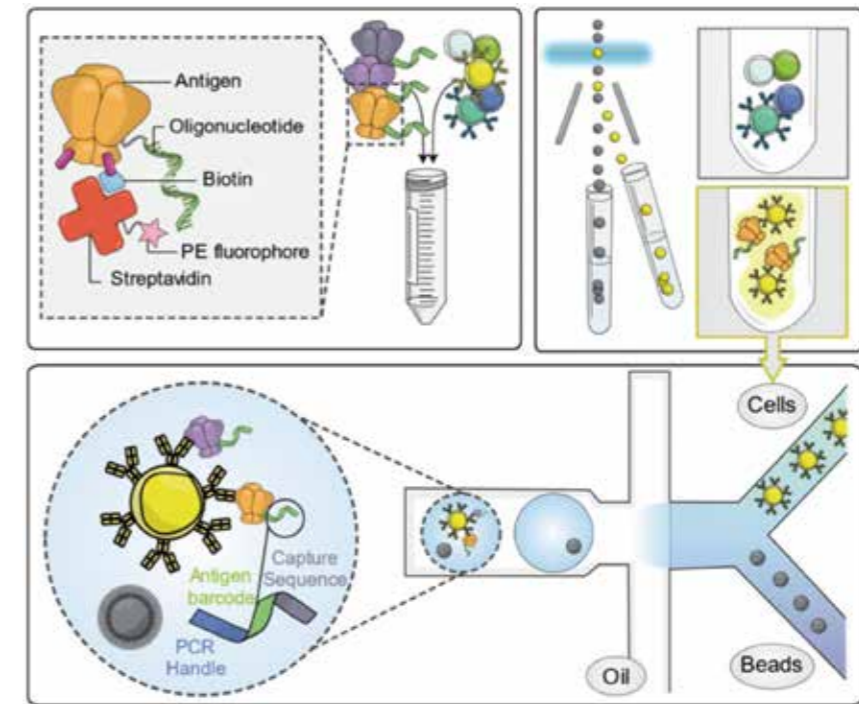


图 抗原特异性 B 细胞分析的原理

参考文献:

- [1]. Souza N D. Genetics: Single-cell genetics[J]. Nature Methods, 2013, 10(9):820.
- [2]. Pennisi E. The biology of genomes. Single-cell sequencing tackles basic and biomedical questions[J]. Science, 2012, 336(6084):976-977.
- [3]. Authors N. Method of the year 2013[J]. Nature Methods, 2014, 11(1):1.
- [4]. Method of the Year 2019: Single-cell multimodal omics[J]. Nature Methods, 2020, 17(1):1.
- [5]. Ramskold D, Luo S, Wang Y C, et al. Full-length mRNA-Seq from single-cell levels of RNA and individual circulating tumor cells[J]. Nature Biotechnology, 2012, 30(8):777-782.
- [6]. Picelli S, Björklund, Åsa K, et al. Smart-seq2 for sensitive full-length transcriptome profiling in single cells[J]. Nature Methods, 2013, 10(11):1096-1098.
- [7]. Picelli S, Faridani O R, Björklund S K, et al. Full-length RNA-seq from single cells using Smart-seq2[J]. Nature Protocols, 2014, 9(1):171-181.
- [8]. Zhu C, Preissl S, Ren B. Single-cell multimodal omics: the power of many[J]. Nature Methods, 2020, 17(1):11-14.

第三部分 数据分析

01 单细胞RNA数据分析

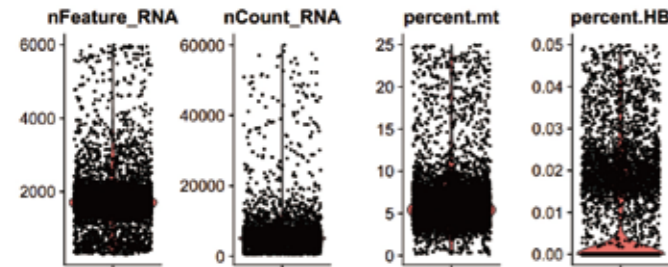


图 数据质控及过滤

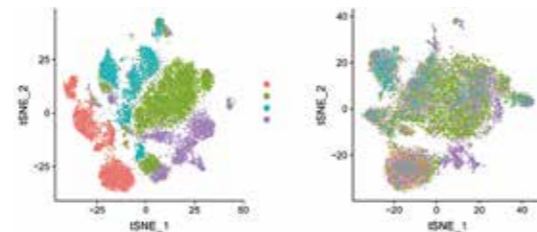


图 去除批次效应

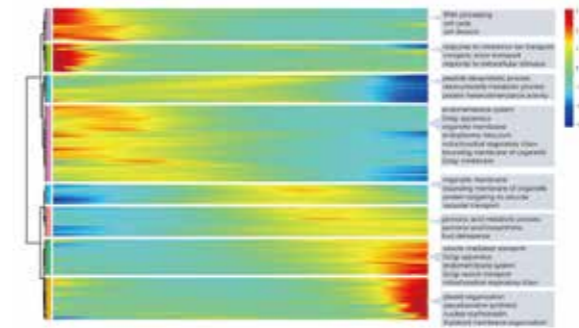


图 拟时序GO注释

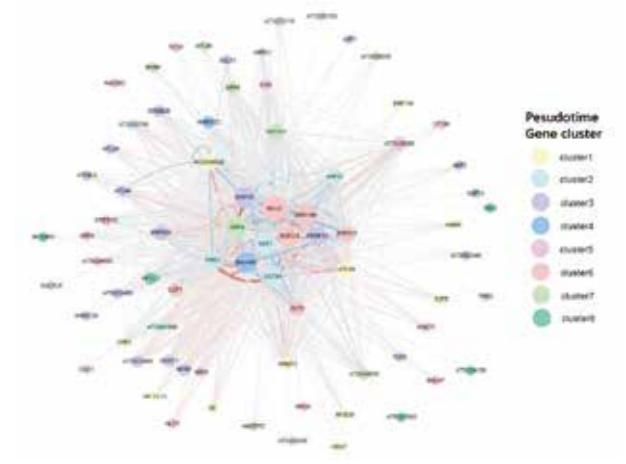


图 拟时序分化转录因子调控网络

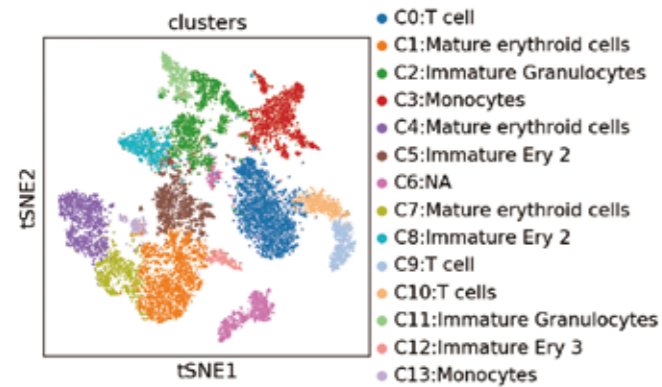


图 细胞亚群注释

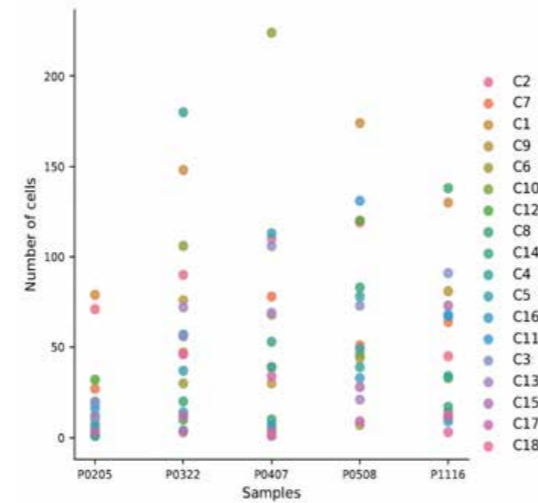


图 样本间的细胞构成差异

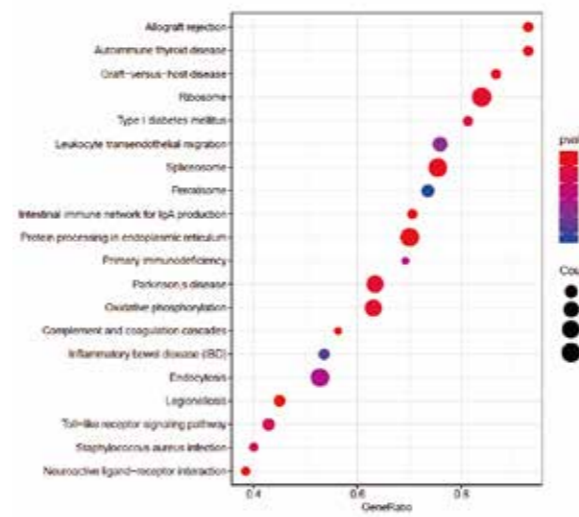


图 细胞亚群的功能富集分析

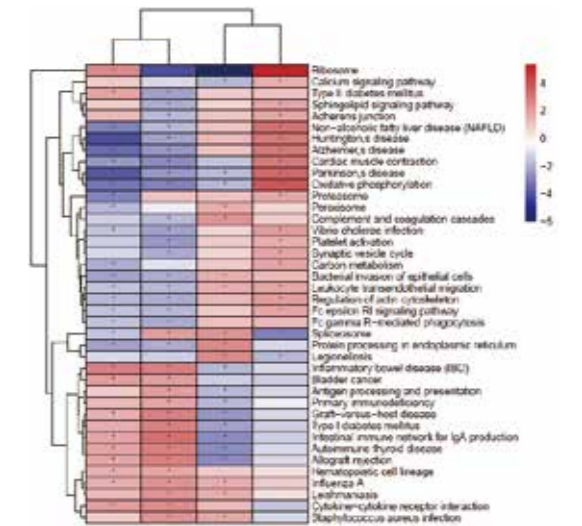


图 细胞亚群的功能富集在样本间的差异

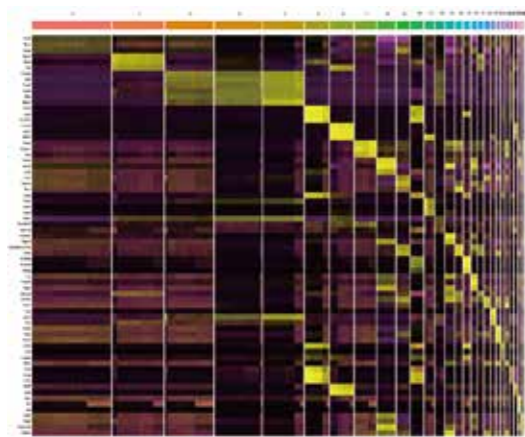


图 Marker基因分析

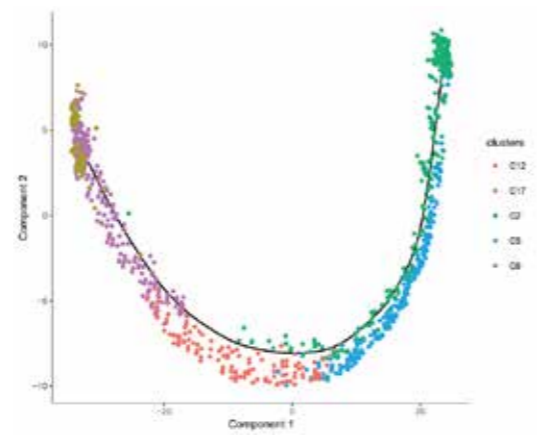


图 拟时序分析

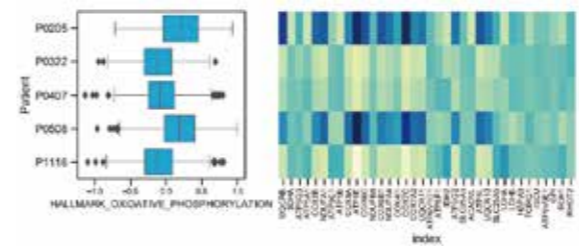


图 样本间的功能差异分析

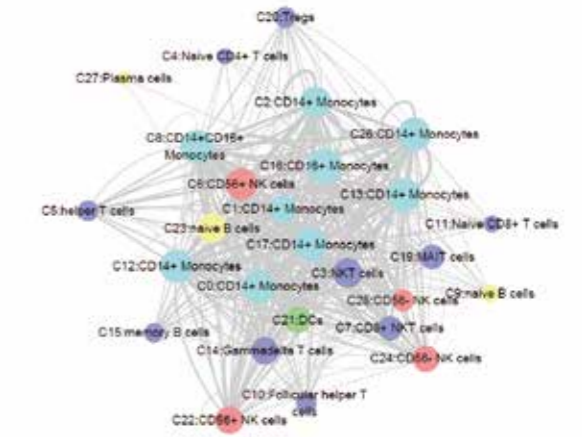


图 细胞通讯网络

02 单细胞TCR/BCR数据分析

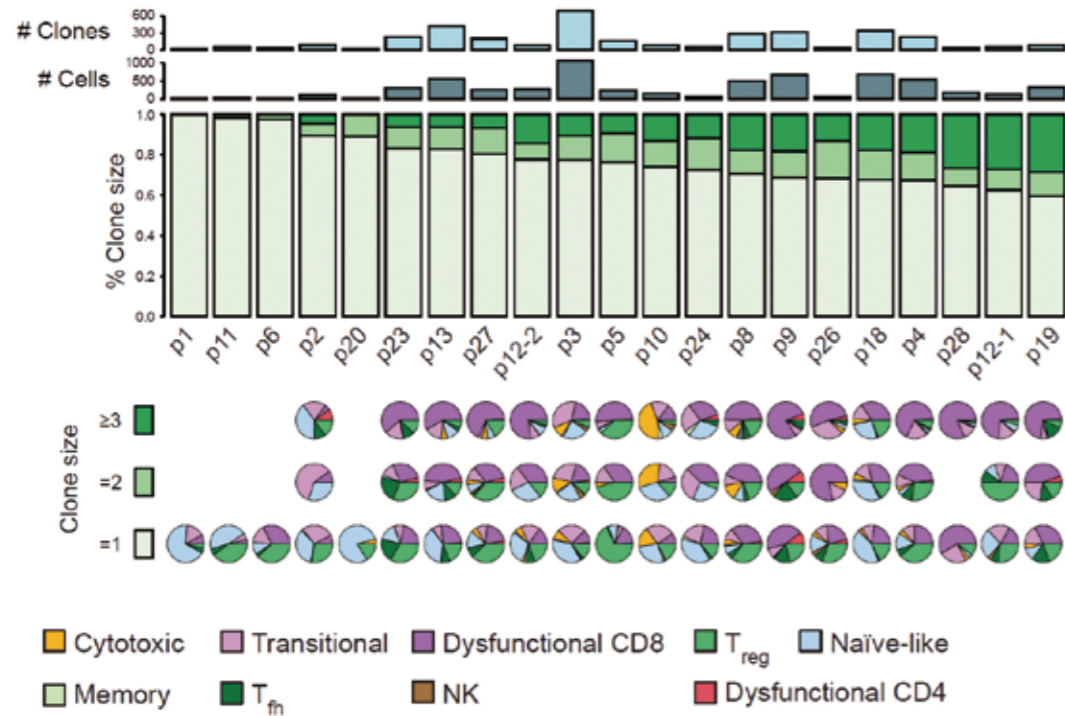


图 T细胞的克隆扩增^[1]

03 单细胞ATAC数据分析

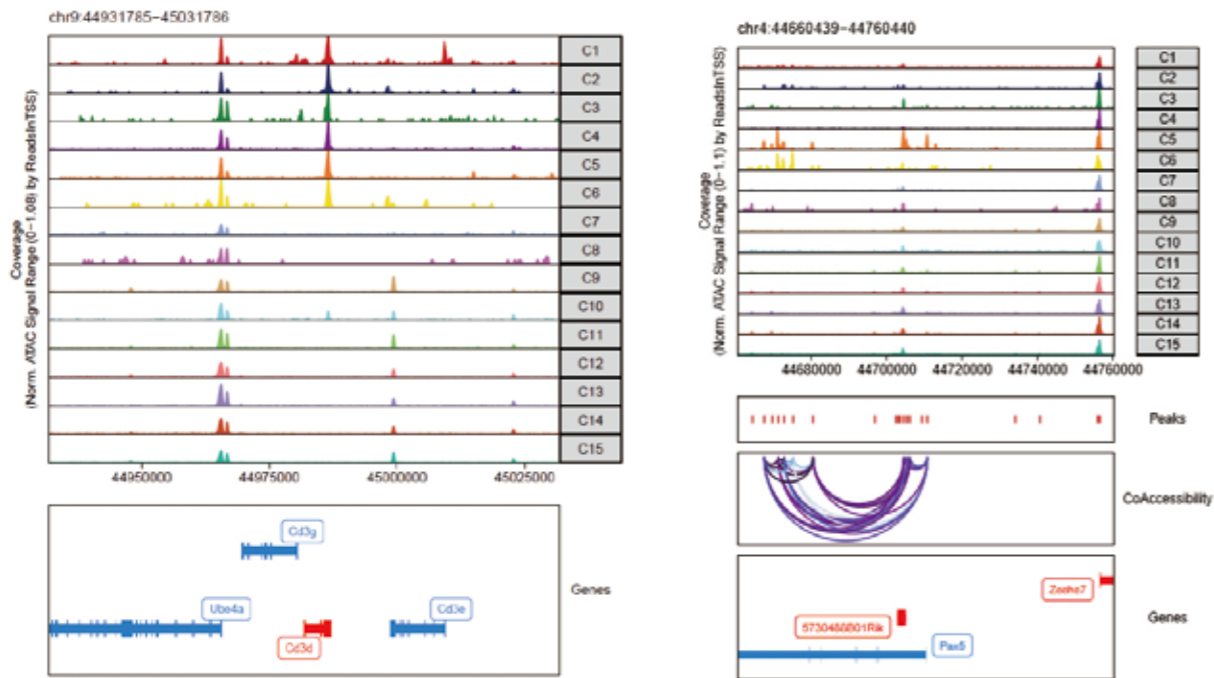


图 Top marker 局部染色体开放状态可视化

图 指定的基因peak共开放展示图

04 单细胞多组学数据分析

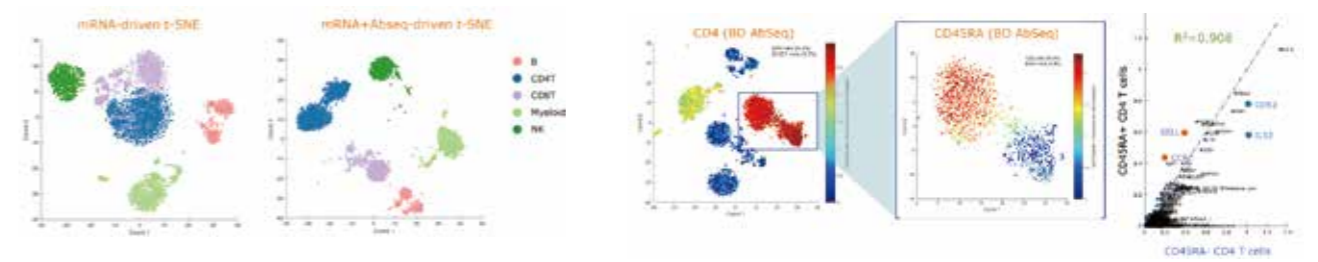


图 AbSeq数据分析-细胞聚类更精确

图 AbSeq 有利于深入分析基因表达差异

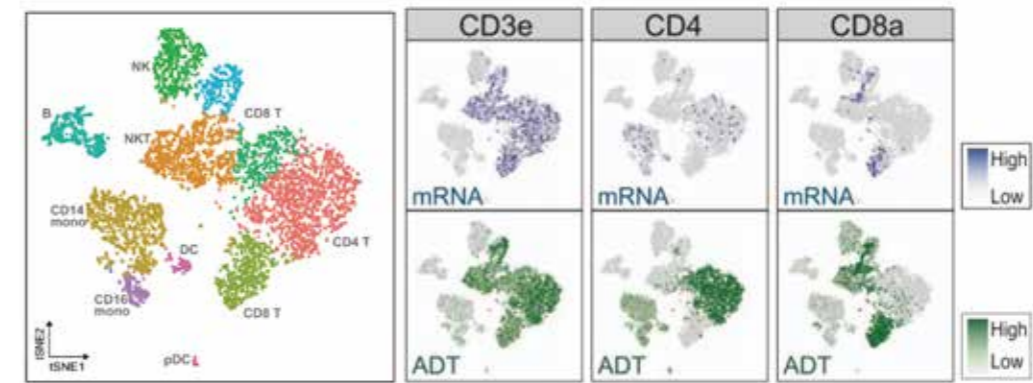


图 10x Feature Barcoding可改善单细胞RNA测序中的dropout 问题

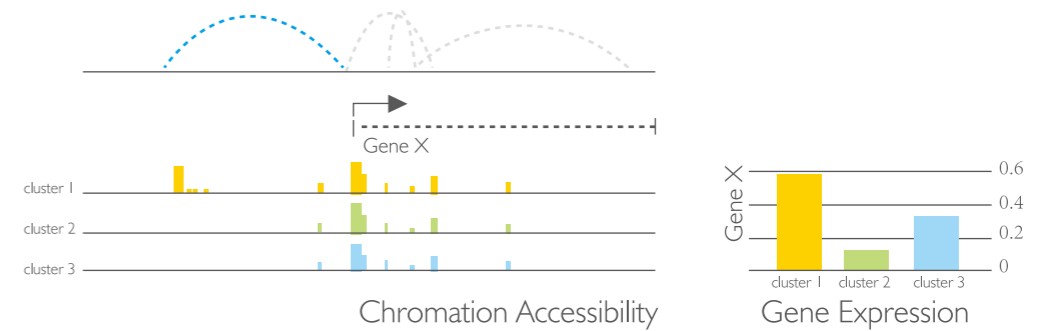


图 单细胞多组学ATAC+基因表达可在目标细胞内实现调控区域与基因表达信息的关联

参考文献

[1]. Li H, Van d L A M, Yofe I, et al. Dysfunctional CD8T Cells Form a Proliferative, Dynamically Regulated Compartment within Human Melanoma[J]. Cell, 2018, 176(4):775-789.

第四部分 应用方向和案例

01 药物靶点发现及验证

案例1:

高级别浆液性卵巢癌 (high-grade serous ovarian carcinoma) 是致死率最高的妇科恶性肿瘤。目前对浆液性卵巢癌的治疗方案创新极其受限, 主要原因之一就是缺乏一个稳定的肿瘤分子分型体系。2020年2月10日, 牛津大学Weatherall分子医学研究所Ahmed A. Ahmed实验室和曼彻斯特大学Christopher Yau研究组在Cancer Cell (IF=26.6) 杂志发表相关研究论文^[1]。这项研究通过深度单细胞RNA测序技术Smart-Seq2刻画了人输卵管上皮组织, 共测序了约6000个主要来自非卵巢癌病人的正常输卵管上皮细胞 (非癌细胞), 发现并验证了输卵管上皮内的6种新细胞亚型, 包括4种分泌细胞亚型, 1种分泌-纤毛中间态细胞亚型以及1种特殊的组织原位T细胞。非癌症病人和癌症病人的输卵管上皮细胞都有Cellcycle, EMT, Differentiated和KRT17 cluster四个亚群的细胞。通过分析发现TCGA和AOCs数据库很大比例的样本都可以通过52个marker基因 (7 differentiated markers, 10 KRT17 cluster markers, 12 EMT markers, 15 cell-cycle markers, 和8 ciliated markers) 形成的panel进行主要分群。研究者们进一步发现“分解”分析 (deconvolution) 中的EMT (epithelial-mesenchymal transition, 上皮-间质转化) 细胞状态的比例和病人预后显著负相关, 12个EMT marker显示表达比例越高的病人其生存期越低, 且这一相关性在九个独立数据库中都可被重复出来。为了进一步证明EMT及其他四种细胞状态的信号可来自于癌细胞, 研究者们利用激光捕获显微切割技术 (LCM) 获取了纯度更高的肿瘤样本, 并进行了转录组测序, 对LCM样本数据分析重现了在TCGA等公共数据库里的发现, 并通过免疫荧光染色在组织切片和卵巢癌细胞系KURAMOCHI中进行了验证。总之, 这项研究利用单细胞测序定义了一个肿瘤分子分型体系, 对卵巢癌的预后分析带来重要影响。

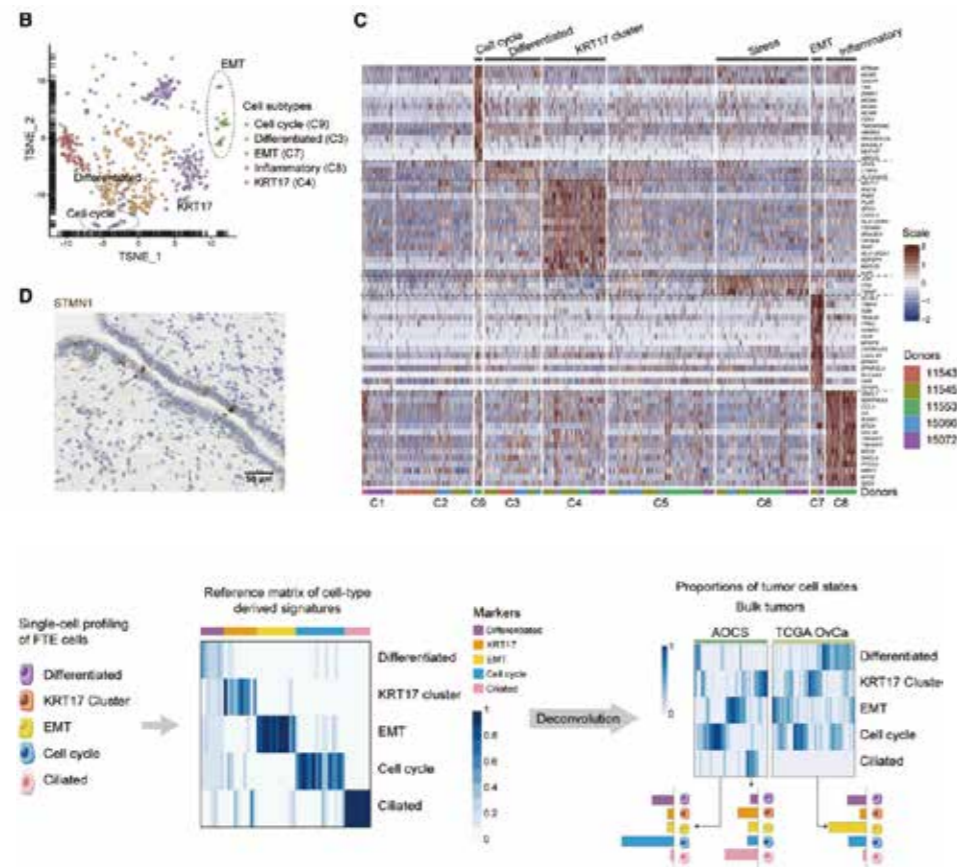
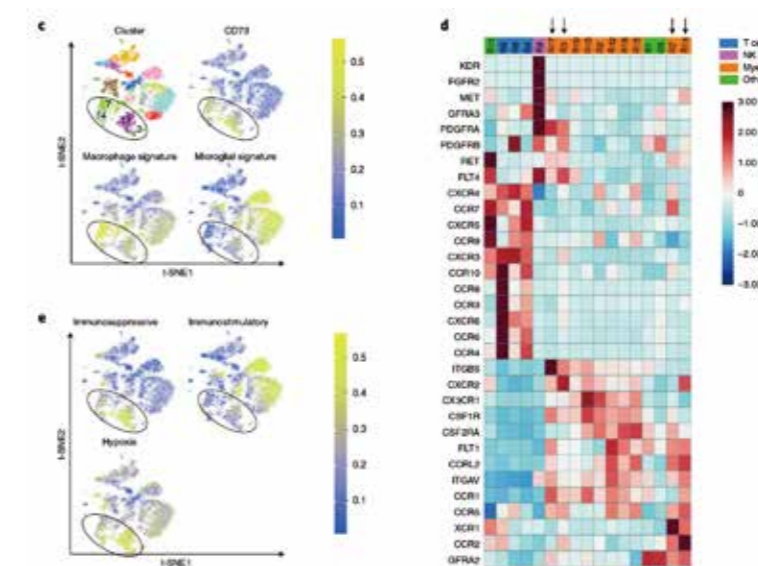


图 52个marker基因形成的panel可进行主要分群^[1]

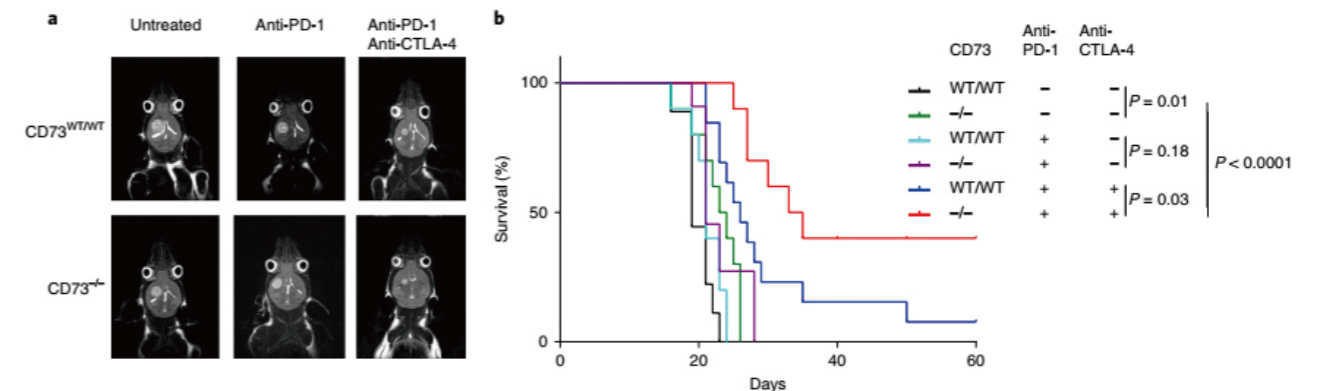
案例2:

CD73是一个抗肿瘤的热门靶点。免疫检查点疗法 (ICT), 例如抗CTLA-4和抗PD-1/PD-L1已经极大地变革了人们对多种肿瘤的治疗方式。但是临床上只对部分特定肿瘤类型的患者提供持久的抗肿瘤反应, 肿瘤特异性免疫检查点靶向的机制基础尚不清楚。为了深入了解肿瘤特异性免疫调节靶点, 来自美国德克萨斯大学MD安德森癌症中心Padmanee Sharma研究团队通过分析多种病人来源的5种不同类型肿瘤中浸润的免疫细胞分型, 发现了神经胶质瘤中特异性存在CD73 (hi) 的巨噬细胞。研究团队对四个GBM肿瘤进行了单细胞RNA测序^[2], 细胞分成了17个亚群, 包含了4个CD3+T细胞和10个CD3-CD68+髓系细胞。在10个CD3-CD68+髓系细胞中, 其中有4个是CD73 (hi)。ScRNA-seq显示CD73 (hi) 髓系细胞富含免疫抑制基因, 并且具有与常驻小胶质细胞特征不同的特征。将CD73巨噬细胞的基因与癌症基因组图谱 (TCGA) 中的胶质母细胞瘤样本进行比较, 结果表明CD73高表达的巨噬细胞的基因特征与存活率下降相关。研究人员分析了5名接受过PD-1抑制剂Keytruda治疗和7名未接受过PD-1抑制剂治疗的胶质母细胞瘤患者, 均发现了表达CD73的巨噬细胞簇, 说明抗PD-1治疗没有使胶质母细胞瘤的微环境发生明显改变。



图在GBM小鼠模型中, CD73的缺失增强了ICT的疗效^[2]

为验证CD73是否可以在GBM治疗中作为一种联合治疗的靶点。研究人员在WT和CD73-/-小鼠中构建GL261 GBM肿瘤模型, CD73的缺失可以通过调控肿瘤内髓系细胞的亚群改变而提高小鼠生存。同时, CD73的缺失可以提高GBM小鼠模型对抗PD-1和抗CTLA-4联合治疗的响应, 提高了iNOS+免疫刺激巨噬细胞和颗粒酶B+ CD8 T细胞在瘤内比例。肿瘤微环境中存在多种免疫检查点, 该研究通过对多种不同类型肿瘤细胞浸润免疫细胞分析, 发现不同免疫检查点的存在是有肿瘤类型特异性的, 其中CD73hi髓系细胞亚群, 特异性出现在GBM中, 靶向CD73分子可提高机体对免疫检查点疗法的响应和疗效。

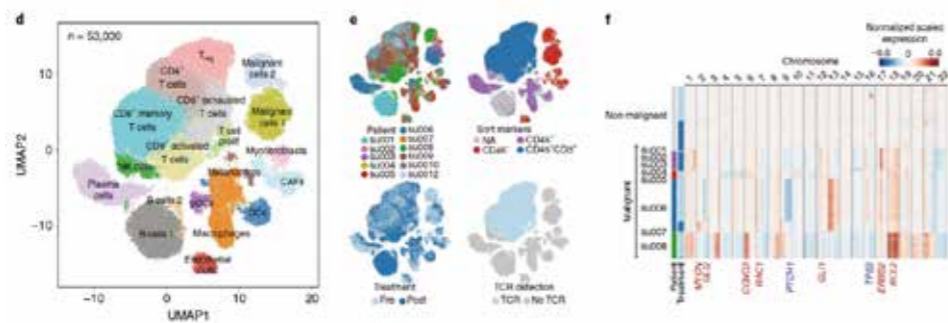


图在GBM小鼠模型中, CD73的缺失增强了ICT的疗效^[2]

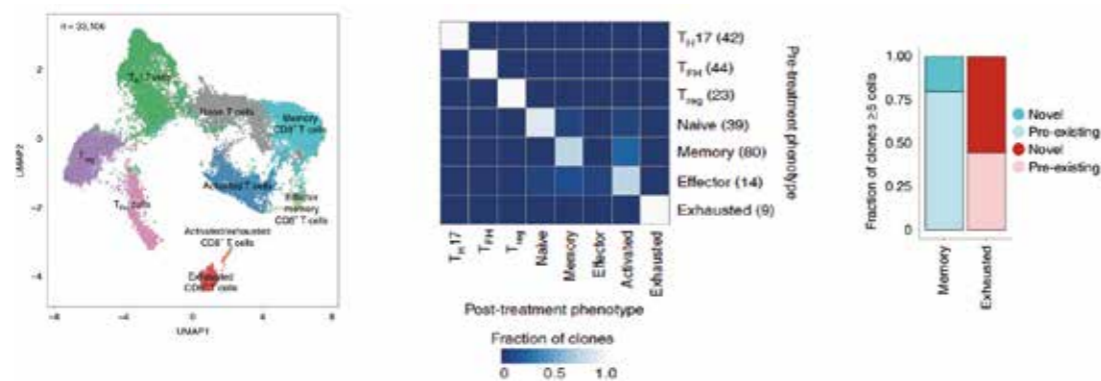
02 免疫治疗

2.1. 抗体药PD1/PDL1

肿瘤浸润性淋巴细胞 (tumor infiltrating lymphocytes, TIL): 浸润在肿瘤内的淋巴细胞, 以T细胞为主, 也含有其他免疫细胞。由于里边含有能够识别杀伤肿瘤的T细胞 (肿瘤反应性T细胞, tumor reactive T cells) 而备受关注。阻断T细胞抑制性检查点受体的免疫疗法已经改变了癌症患者的临床护理。然而T细胞对检查点阻断的反应是否依赖于预先存在的肿瘤浸润淋巴细胞的再激活或新T细胞的募集尚不清楚。2019年一项发表于Nature Medicine上的研究从11位诊断为基底细胞癌患者接受PD-1抑制剂治疗前后的组织标本中获取T细胞进行RNA 单细胞测序和TCR测序, 以研究PD-1抑制剂是否通过肿瘤浸润T细胞的“再激活”或是通过招募新的T细胞到达肿瘤区域发挥抗肿瘤效应^[3]。

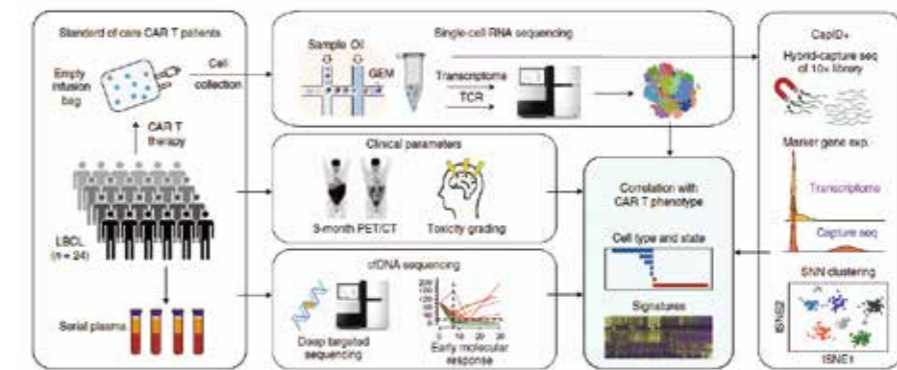
图 11 例患者治疗前后所有肿瘤细胞聚类^[3]

这项研究的重点是免疫细胞, 尤其是浸润性免疫细胞, 以及治疗前后的变化, 以了解克隆性T细胞对PD-1抗体治疗的反应。因此研究人员把所有的33106个肿瘤浸润性T细胞做了个更细致的分类, 包括表达CD4的调节性T细胞 (Treg) 细胞, 滤泡辅助性T (TFH) 细胞, T辅助细胞17 (TH17) 细胞; 以及表达CD8的Naive T 细胞, 记忆T细胞, 效应记忆T细胞, 活化T细胞, 慢性活化/耗竭T细胞, 中度耗竭/活化细胞。进一步分析发现, 在PD-1抗体治疗之后, 滤泡辅助性T细胞, 以及活化, 耗竭和耗竭/活化的CD8阳性T细胞的频率增加, 并且耗竭T细胞的克隆水平明显更高。更让研究人员感到意外的是, 对于同一个患者而言, 治疗后记忆T细胞和效应T细胞频繁转换为活化状态, 但是治疗前的耗竭T细胞却没有变成治疗后的非耗竭表型。这表明, 即使在PD-1抗体治疗后, 已经耗竭的肿瘤浸润T细胞也很难再变成活化状态。此外, 研究人员还观察到一个有趣的现象, PD-1抗体治疗后才出现的耗竭性T细胞表现出了新的TCR特异性。为了分析外周血中是否存在新发现的肿瘤浸润性T细胞, 研究人员给患者的血液样品做了TCR测序, 发现35.5%新肿瘤浸润性T细胞可以在PD-1抗体治疗后的外周血中找到, 而在治疗前的外周血中只能找到11.8%的新肿瘤浸润性T细胞, 不过治疗前的肿瘤里面却没有新肿瘤浸润性T细胞。总的来说, 与“冷”肿瘤相比, “热”肿瘤之所以响应PD-1抗体的治疗, 可能是由于“热”肿瘤自身的特性, 让它能够不断吸引新T细胞进入, 而不是重新激活已有的肿瘤浸润性T细胞。这项研究让我们对免疫检查点抑制剂的作用机制有了新的认知, 这对临床治疗和疗效的检测都有一定的价值和意义。

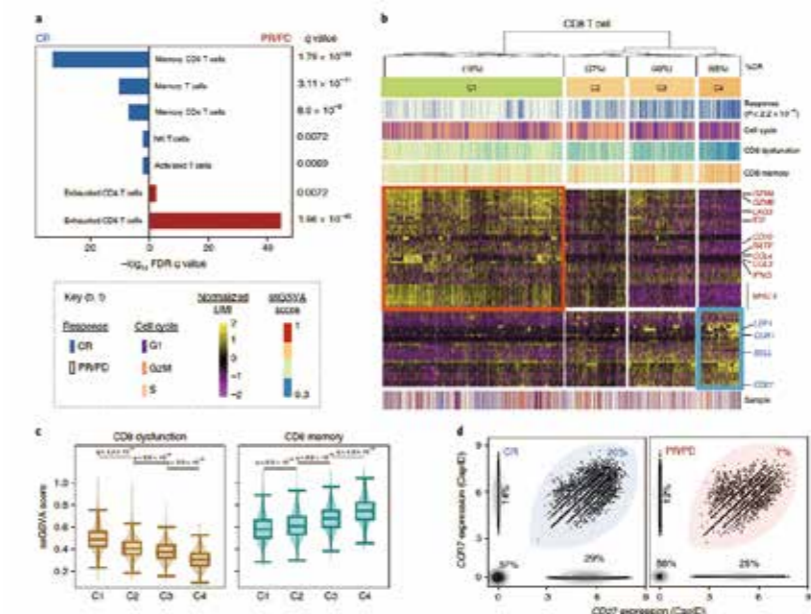
图 肿瘤浸润性T细胞(左)、耗竭的肿瘤浸润T细胞很难再变成活化状态(中)以及治疗后衰竭CD8+ T细胞的克隆库被新型克隆所取代(右)^[3]

2.2 细胞治疗

目前, 以CD19为靶点的CAR-T细胞治疗已被证明对复发性、难治性B细胞恶性肿瘤如B细胞非霍奇金淋巴瘤 (NHL)、急性淋巴细胞白血病 (ALL) 和慢性淋巴细胞白血病 (CLL) 有显著的治疗作用^[4]。虽然抗CD19 CAR-T细胞治疗的早期结果令人欣喜, 但是只有不到一半的患者出现了长期的缓解, 这意味着大多数患者在接受治疗后要么没有反应要么出现了复发。CAR-T细胞治疗在不同患者中出现的这些差异的原因到底是什么? 2020年10月5日在线发表在《Nature Medicine》杂志上的文章探讨了这一问题。对24例大B细胞淋巴瘤 (LBCL) 患者输注自体CAR-T细胞后, 研究人员对137,326个残留的细胞进行了全转录组scRNA-seq^[5]。

图 13 工作流程图^[5]

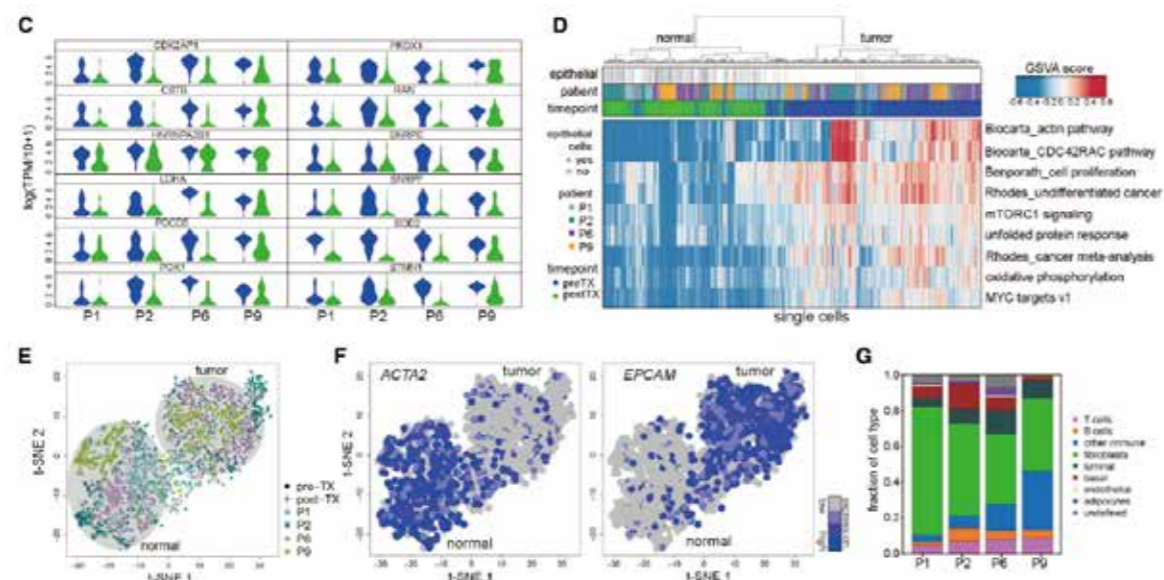
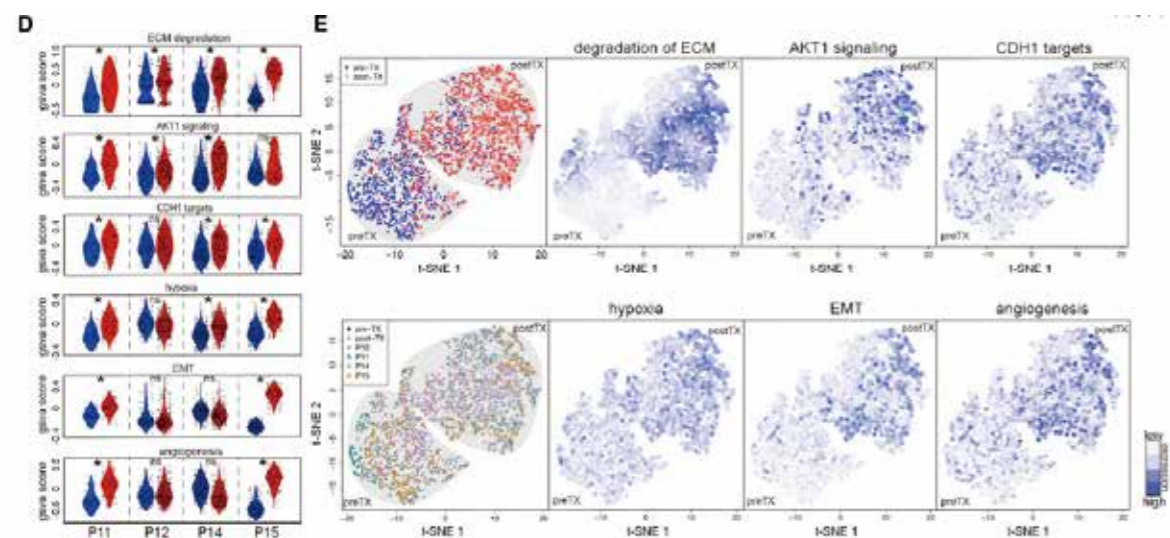
比较全部恢复 (CR) 患者和疾病进行/部分恢复 (PR/PD) 患者输注产物的细胞类型和功能状态, 研究人员发现PR/PD患者的输注产物中衰竭的CD8和CD4 T细胞显著富集, 而CR患者的输注产物中记忆CD8 T细胞显著富集。CR患者和PR/PD患者CD8 T细胞的差异表达基因 (DEG) 鉴定出4类细胞群, 这些差异表达基因大多与CD8 T细胞的激活和衰竭有关, 虽然每个细胞群都包含来自所有患者的细胞, 但是来自CR患者的细胞的相对比例在各个细胞群之间存在显著差异。CD4 T细胞的DEG分析和聚类也表现出类似结果, 不同的是增殖相关基因和周期细胞在CR患者的高频细胞聚类中表达较高。由此强调了与临床疗效相关的CAR-T细胞输注产物细胞的重要转录特征。研究表明输注的CAR T细胞产物的细胞和分子多样性是导致抗CD19-CAR-T细胞治疗的LBCL患者疗效和毒性差异的主要因素, 与输注产物相关的可量化表型可通过在其产生过程中富集所需的、或消除不期望的细胞群体或功能状态而发挥作用。对离散细胞群导致反应不良或高毒性的机制的了解, 可能有助于发现治疗干预的途径, 从而提高疗效, 降低CAR-T细胞输注后的毒性。

图 CD8+ T细胞细分及功能富集^[5]

03 协同治疗

在临床前或临床试验中,单细胞表达谱的分子分辨率可用于描述联合免疫治疗中潜在的协同、加性、中性或拮抗的细胞和分子活性。三阴性乳腺癌(TNBC)是一种常对化疗产生耐药性的恶性乳腺癌,这种耐药性是由于化疗对预先存在的克隆的选择还是化疗期间获得了新的基因突变导致是一个长久未解决的问题。为了探究这个问题,科学家们利用单细胞RNA-seq、单细胞DNA-seq和全外显子测序研究了20名TNBC患者在接受新辅助化疗(NAC)期间的基因及表达变化,相关研究成果2018年发表在《Cell》上^[6]。

深度外显子测序发现10位患者NAC导致clone消失,而10位患者治疗后clone一直存在,利用单细胞基因组测序探究拷贝数变异,鉴定耐药基因。对不同治疗时期的肿瘤细胞进行差异表达基因分析发现,所有消退型患者在治疗后12个已知的癌症基因均下调,部分信号通路也下调。结合分析肿瘤细胞和正常细胞,发现治疗后正常细胞亚群中ACTA2表达水平高,治疗前肿瘤细胞亚群中EPCAM表达水平高。探究持续型患者的表型进化,对每个患者进行差异表达分析,仅有少量显著基因(MYC, ERBB3, KIT, PI3KR1)已知与肿瘤相关,但耐药基因在治疗后出现了高度富集。

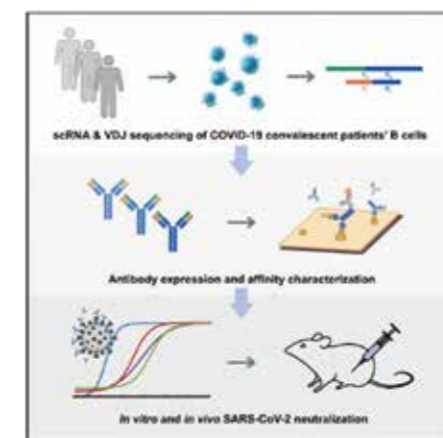
图 工作流程图^[6]图 CD8T细胞细分及功能富集^[6]

04 疫苗开发

4.1 病毒疫苗

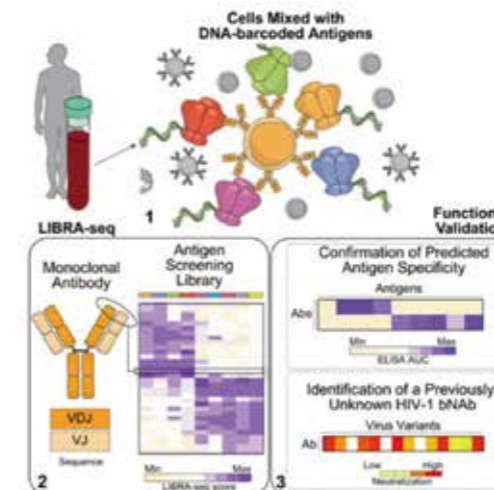
案例1:

谢晓亮教授团队利用高通量单细胞RNA和VDJ测序平台,从60位康复期病人身上筛选出8558种病毒蛋白结合抗体序列,成功找出14株高活性的中和抗体。其中编号为BD-368-2的抗体表现突出,在假病毒实验中的半抑制浓度(IC50)达到1.2 ng/mL (8pM);在军事医学研究院P3实验室进行的真病毒实验中,IC50达到15 ng/mL (100pM)。中和抗体体内抗病毒实验进一步证实,利用hACE2转基因小鼠模型,感染SARS-CoV-2后给予BD-368-2的治疗使病毒载量下降~2400倍。而注射BD-368-2后可完全抑制小鼠的病毒感染,达到预防效果。研究团队还利用冷冻电镜得到新冠病毒Spike三聚体与中和抗体的高分辨率3.8Å三维结构密度图。数据显示,抗原上的中和抗体表位与ACE2的结合位点重合,从而揭示出中和作用的结构基础。此外,研究人员还证明了可以根据CDR3H结构的相似性来选择SARS-CoV-2中和抗体^[7]。

图 利用高通量单细胞RNA和VDJ测序筛选中和抗体^[7]

案例2:

范德比尔特大学的研究组在Cell杂志上发表文章^[8],提出了一种名为LIBRA-seq的新的测序技术。作者构建了一个特殊的抗原库,将抗原连接上DNA条码和用于流式细胞术分选的荧光标签。接下来,将这个库与富含B细胞的样本共孵育。最后,将带有荧光标签的抗原和与之结合的B细胞共同分选出来,并进行测序,从而得到BCR-抗原序列图谱。利用LIBRA-seq,研究人员绘制了来自两名HIV感染者的数千个B细胞的抗原特异性图谱,许多HIV和流感特异性抗体的预测特异性得到证实。这项技术可以有效地绘制BCR序列及其对应的特异性抗原图谱,在抗体研发和疫苗制备领域具有广泛的应用。

图 LIBRA-seq及功能验证流程^[8]

4.2 肿瘤个性化疫苗

NeoVax是一种新抗原(Neoantigen)肿瘤疫苗,主要新抗原为靶点。新抗原通常是肿瘤细胞在发生发展过程中,随机突变产生的新的蛋白质或多肽,一般特异性表达于肿瘤细胞中但不存在与正常组织细胞中。因此,新抗原也成为了肿瘤免疫治疗的理想靶点。早在2017年,美国Dana Farber癌症研究所应用NeoVax治疗恶性黑色素瘤患者,并取得的良好疗效。6名高复发风险的患者在术后18周开始接受NeoVax疫苗治疗。在接种后的2年多时间内,4名患者未发现肿瘤复发;另外2名恶性黑色素瘤伴肺转移的患者,在接种疫苗后复发,随即开始接受PD-1单抗药物的治疗,最终也获得完全缓解并处于无疾病进展状态^[9]。为了进一步探究NeoVax肿瘤疫苗的远期临床疗效及其机制,研究人员对上述6名患者及新入组的2名患者进行长期随访。在术后4年多(55个月)的中位数随访中,8名患者全部存活,其中3名患者仍未出现复发。复发的5名患者中,2名IV期患者接受pembrolizumab(PD-1单抗)治疗后完全缓解(2017年已报道),1名患者接受了手术切除且未发现疾病证据(NED),2名患者发展为不可切除的转移性疾病。

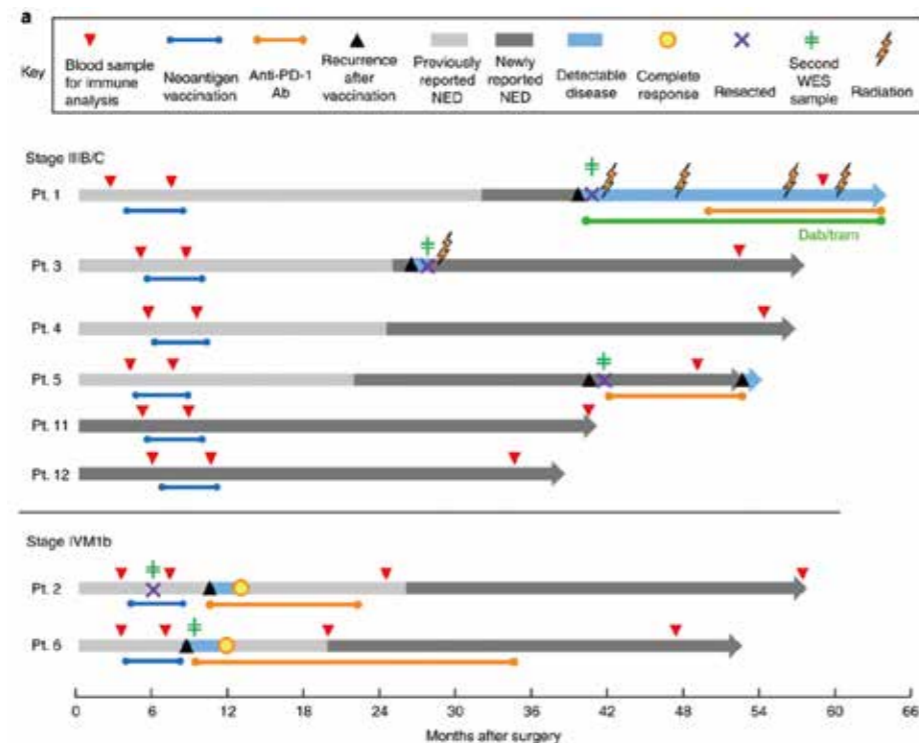


图 利用高通量单细胞RNA和VDJ测序筛选中和抗体^[10]

对于如此令人兴奋的长期临床疗效,研究人员期望揭示患者体内的变化和机制。研究人员首先试图确定NeoVax疫苗诱导的特异性T、细胞在外周血中的功能状态是如何演变的。他们对新抗原特异性T细胞,尤其是CD4⁺T细胞的特征进行了跟踪和分析。结果发现,NeoVax疫苗诱导的新抗原特异性CD4⁺T细胞表现出记忆性和细胞毒性特征。进一步分析了这些患者的T细胞,发现这些患者体内不仅产生了靶向最初的目标新抗原的特异性T细胞,而且还扩展到识别其他与黑色素瘤相关的新抗原,起到了更强更持久的抗肿瘤效果^[10]。

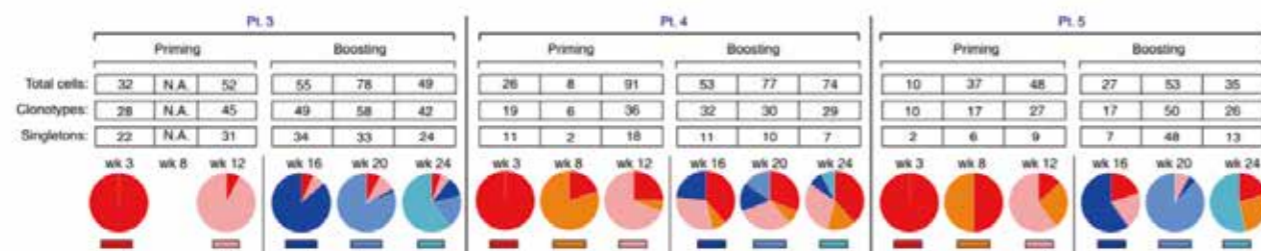


图 CD8T细胞细分及功能富集^[10]

参考文献

- [1]. Hu Z, Artibani M, Alsaadi A, et al. The Repertoire of Serous Ovarian Cancer Non-genetic Heterogeneity Revealed by Single-Cell Sequencing of Normal Fallopian Tube Epithelial Cells[J]. Cancer Cell, 2020, 37(2):226-242.
- [2]. Goswami S, Walle T, Cornish A E, et al. Immune profiling of human tumors identifies CD73 as a combinatorial target in glioblastoma[J]. Nature Medicine, 2020, 26(1):1-8.
- [3]. Li X, Wang M, Xiang R. Clonal replacement of novel T cells: a new phenomenon in the tumor microenvironment following PD-1 blockade[J]. Signal Transduction and Targeted Therapy, 2019, 4:43.
- [4]. Neelapu Sattva S, Locke Frederick L, Bartlett Nancy L, et al. Axicabtagene Ciloleuce CAR T-Cell Therapy in Refractory Large B-Cell Lymphoma[J]. New England Journal of Medicine, 2017, 377:2531-2544.
- [5]. Deng Qing, Han Guangchun, Puebla-Osorio Nahum, et al. Characteristics of anti-CD19 CAR T cell infusion products associated with efficacy and toxicity in patients with large B cell lymphomas[J]. Nature Medicine, 2020, 26:1878-1887.
- [6]. Kim C, Gao R, Sei E, et al. Chemoresistance Evolution in Triple-Negative Breast Cancer Delineated by Single-Cell Sequencing[J]. Cell, 2018, 173(4):879-893.
- [7]. Yunlong Cao, Bin Su, Xianghua Guo, et al. Potent Neutralizing Antibodies against SARS-CoV-2 Identified by High-Throughput Single-Cell Sequencing of Convalescent Patients' B Cells[J]. Cell, 2020, 182(1):73-84.
- [8]. Setliff I, Shiakolas A R, Pilewski K A, et al. High-Throughput Mapping of B Cell Receptor Sequences to Antigen Specificity[J]. Cell, 2019, 179(7):1636-1646.
- [9]. Ott PA, Hu Z, Keskin DB, et al. An immunogenic personal neoantigen vaccine for patients with melanoma[J]. Nature, 2017, 547(7662):217-221.
- [10]. Zhuting Hu, Donna E Leet, Rosa L Allesøe, et al. Personal neoantigen vaccines induce persistent memory T cell responses and epitope spreading in patients with melanoma[J]. Nature Medicine, 2021, 27(3):515-525.

第五部分 单细胞(核)悬液制备解决方案

01 单细胞悬液制备服务

开展单细胞RNA测序实验的第一步,通常要制备高质量的单细胞悬液。样本制备的具体方案因样本类型而异,例如血样,可以采用密度梯度离心的方法;对于组织样,通常采用机械法或酶解法,常用的消化酶包括 accutase, elastase, collagenase 以及商业化包装的组合酶。为了获得活性较高的单细胞悬液,必须充分了解样本类型并根据具体的样本来优化实验操作。方法不当,细胞基因表达谱可能会出现变化,甚至部分对环境较为敏感的细胞会出现死亡,并在裂解后向周围环境释放游离RNA造成检测中的背景噪音,从而影响单细胞数据的质量。因此实验过程中需要尽量避免细胞死亡和裂解,不断优化制备条件,加快实验流程,减少对样本细胞的刺激。

■ 样本要求

(1) 组织样本

客户根据项目设计的要求,采集临床手术样本或者动物模型样本。取材后,将组织切成0.3cm×0.3cm小块(不超过0.5cm×0.5cm),可以收集4-5小块组织,重量约200-400mg,迅速放入伯豪生物提供的组织保存液中,组织保护液务必提前4°C预冷,组织应完全浸没在组织保存液中,避免气泡,封口膜封闭管口,置于冰上或4°C短暂存放。

注意:组织保存液的体积应不小于采集样本体积的5倍,日常存放于4°C冰箱保存;严禁液氮速冻或放在-20°C、-80°C冰箱中保存。

(2) 血液样本

采用EDTA抗凝管收集血液,血液采集量5ml;

采集好的血液应置于冰上或4°C短暂存放;

注意避免溶血以及凝血。

■ 能够提供悬液制备的样本类型

大小鼠					
序号	组织名称	活性	序号	组织名称	活性
1	脾脏	>90%	13	耳蜗基底膜	>90%
2	肺、肺移植瘤	>90%	14	胃粘膜	>90%
3	肝脏	>90%	15	背根神经节	>90%
4	血液	>90%	16	胰腺	>80%
5	肾脏	>90%	17	心脏	>90%
6	胃	>90%	18	门静脉	>80%
7	皮肤	>90%	19	前列腺	>80%
8	骨髓	>90%	20	脊髓	>90%
9	肠	>80%	21	牙齿根部软组织	>90%
10	大脑皮层(成年鼠、胚胎鼠)	>90%	22	淋巴结	>90%
11	海马	>90%	23	眼睑	>90%
12	视网膜、角膜	>90%			

斑马鱼		
序号	组织名称	活性
1	心脏	>90%

临床样本					
序号	组织名称	活性	序号	组织名称	活性
1	脾脏	>90%	26	角膜	>90%
2	肝癌	>90%	27	肾癌	>90%
3	血液	>90%	28	胆管	>90%
4	肺癌	>90%	29	胎盘、胎盘原位滋养细胞瘤	>90%
5	乳腺癌	>90%	30	海马	>90%
6	宫颈癌	>90%	31	鼻息肉、鼻粘膜	>90%
7	皮肤	>80%	32	胚胎神经干细胞	>90%
8	结肠癌	>90%	33	类器官	>90%
9	食管癌	>90%	34	卵巢癌	>90%
10	脑	>90%	35	前列腺癌	>90%
11	口腔癌	>90%	36	胶质瘤、脑膜瘤、颅咽管瘤	>90%
12	脂肪	>90%	37	肺穿、肾穿、脑穿、胸骨穿、前列腺穿刺样本、淋巴结穿刺	>80%
13	肾上腺	>90%			
14	血管	>90%	38	胃粘膜	>90%
15	骨髓	>90%	39	咽喉癌	>80%
16	肺癌	>80%	40	肠系膜	>90%
17	子宫内膜	>90%	41	视网膜	>90%
18	睾丸癌	>90%	42	鼻粘膜	>90%
19	扁桃体	>90%	43	胆道	>90%
20	甲状腺癌	>90%	44	尤文肉瘤、骨肉瘤	>90%
21	垂体瘤	>90%	45	胰腺癌	>90%
22	胆囊癌	>90%	46	膀胱癌	>90%
23	心脏、心脏瓣膜	>90%	47	血管瘤	>80%
24	肌腱	>90%	48	胸水	>90%
25	胃癌	>90%	49	韧带	>80%

鸡					
序号	组织名称	活性	序号	组织名称	活性
1	肾上腺	>90%	5	腺胃	>90%
2	下丘脑	>90%	6	肌胃	>80%
3	垂体	>90%	7	肌肉	>80%
4	肝脏	>90%	8	软骨	>80%

02 单细胞抽核服务

序号	组织名称	序号	组织名称	序号	组织名称
1	肝脏(组织、穿刺)	8	乳腺	15	淋巴瘤
2	心脏(人,小鼠、斑马鱼、爪蛙)	9	腰椎	16	脂肪
3	海马	10	视网膜	17	囊肿
4	脊髓	11	视神经	18	肌腱
5	大脑皮层	12	背根神经节	19	肌肉
6	下丘脑	13	胰腺	20	植物
7	胶质瘤	14	骨		

■ 悬液制备实例

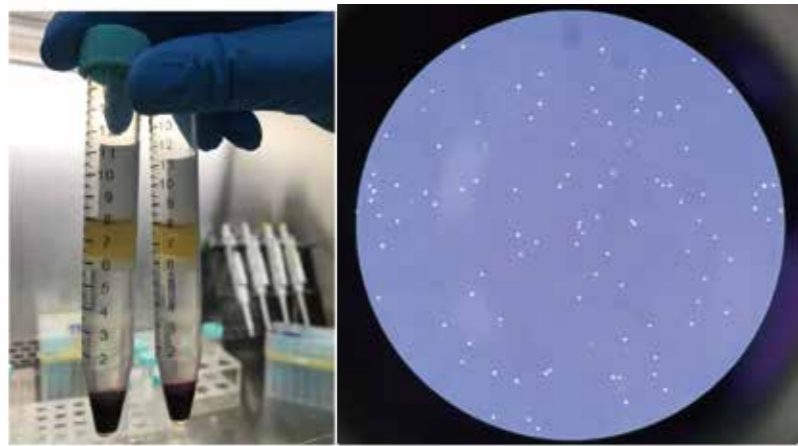


图 血液密度梯度离心分离PBMC和粒细胞(活率95%)



图 肝癌(活率92%)

图 口腔鳞癌(活率92%)

图 人脑皮层(活率92%)

03 伯优®单细胞测序组织保存液

为保证细胞活力,单细胞测序目前多采取仪器上门的服务模式,取下新鲜组织后,样本即刻被制备成单细胞悬液,并在短时间内完成上机。然而临床样本具有很多制约因素,比如病人手术时间不确定,取样时间很难提前预约,仪器无法及时到达客户端;肿瘤样本有时需要等待病理结果确认;医院不具备组织消化的条件等。样本的制备与运输难,在一定程度上限制了单细胞技术应用。为了解决这些问题,我们集中研发力量联合攻关,自主研发了组织保存液,能够使样本安全到达伯豪生物实验室,然后由我们的专业人员提供悬液制备、单细胞测序和数据分析的全套服务。

■ 产品介绍

本产品可用于人和动物的新鲜组织样本的低温存储和运输,4°C条件下72小时内可保持细胞活性。保存后的组织样本可直接用于单细胞悬液制备,无需复苏等操作。经测试验证,经本产品保存的新鲜组织样本,制备成单细胞悬液后可用于目前主流单细胞测序平台,包括10x Genomics和BD Rhapsody。

- ◎ 货号: 21903-10
- ◎ 产品规格: 10 × 2ml
- ◎ 储存条件: 2-8° C 避光保存
- ◎ 本产品仅供研究使用

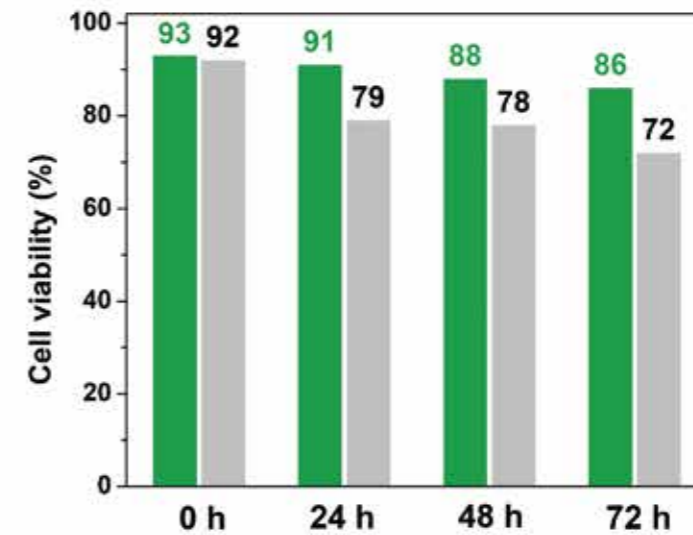


图 单细胞测序组织保存液

■ 性能测试

- ◎ 细胞活性

新鲜组织样本在 4° C 条件下, 72 小时内可保持细胞活性。



- 伯豪单细胞测序组织保存液
- 竞品组织保存液

图 小鼠脾脏细胞活性测试(4°C, 24-72h)



图 不同组织的细胞活性测试(4°C, 2-60h)

◎ 基因表达测试

通过基因芯片, 对新鲜组织和保存后的组织进行基因表达检测, 相关性超过 0.95, 结果表明, 在 4°C 条件, 组织保存液能够维持转录组的稳定性。

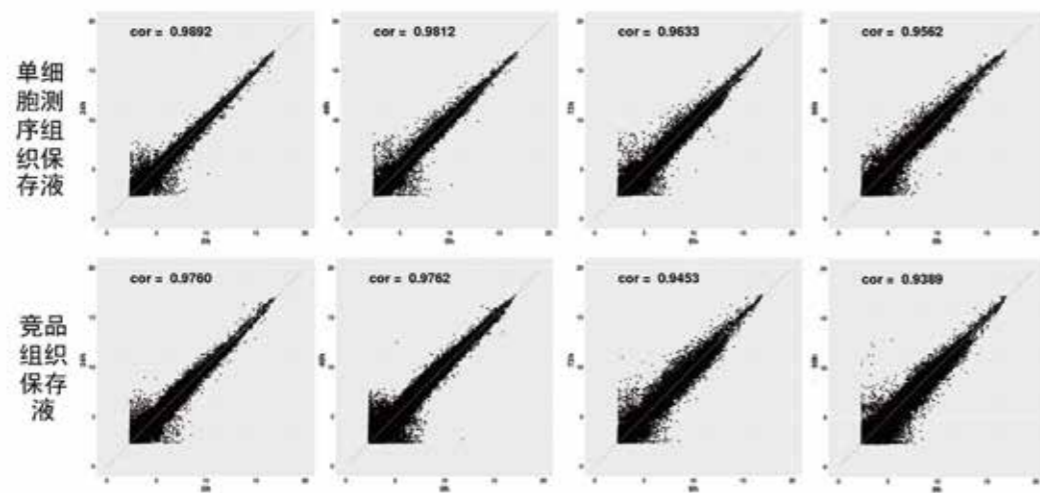


图 基因表达稳定性测试(4°C, 24-96h)

■ 操作说明

Step 1 采集人临床组织样本或动物模型样本。采集后迅速将新鲜组织切成0.3cm×0.3cm小块(务必不超过0.5×0.5cm), 可收集4-5小块组织, 重量约200-400 mg。

Step 2 迅速将组织小块放入保存液中, 每管可放置1-2块。
注意: 组织样本应完全浸没在保存液中, 并避免气泡。

Step 3 将保存管盖拧紧, 使用封口膜封好。

Step 4 将保存管置于4°C冰箱或装有冰袋的泡沫箱避光保存及运输。
注意: 避免剧烈震荡, 避免保存管与冰袋接触。

Step 5 待组织消化和单细胞悬液制备时, 将组织取出后直接进行后续的实验操作, 无需复苏。
注意: 不可在-20°C及-80°C等冰箱冷冻保存。严禁使用干冰或液氮等冷冻运输。

取样尺寸

组织切成0.3cm×0.3cm小块(务必不超过0.5×0.5cm)

04 伯优®细胞核分离试剂盒

组织样本制备细胞核悬液流程适用于人或其他哺乳动物新鲜及冻存组织样本。通过裂解细胞膜, 释放细胞核的同时保持细胞核膜的稳定。优化的细胞核重悬液能够有效维持细胞核膜的完整和染色质的空间结构稳定。



■ 产品应用

制备的细胞核悬液可用于:

- ◎ 染色质可及性分析 (scATAC-seq/bulk ATAC-seq);
- ◎ 核转录组测序 (snRNA-seq/bulk RNA-seq) 等相关实验。

■ 竞品对比测试

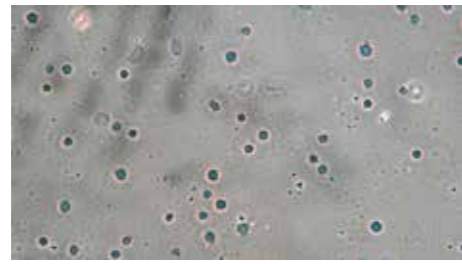


图 伯优®细胞核分离试剂盒

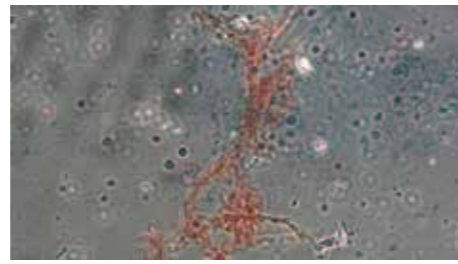


图 竞品细胞核分离试剂盒

伯优®细胞核分离试剂盒已被测试用于多种哺乳动物新鲜及冰冻组织的细胞核提取,如小鼠肝脏、心脏、大脑皮层、丘脑、海马、延髓等,人肝脏(癌和癌旁)、松果体、胶质瘤组织等

■ 结果图片

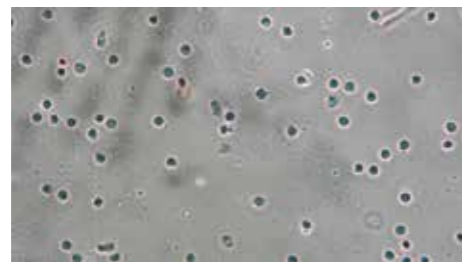


图 小鼠脑组织

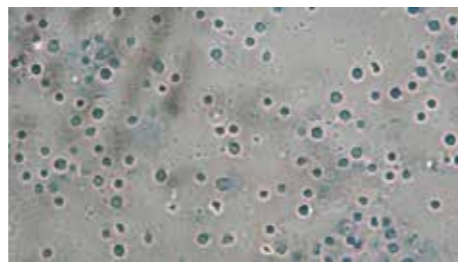


图 小鼠肝组织

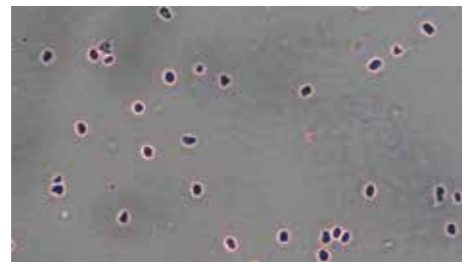


图 人脑组织

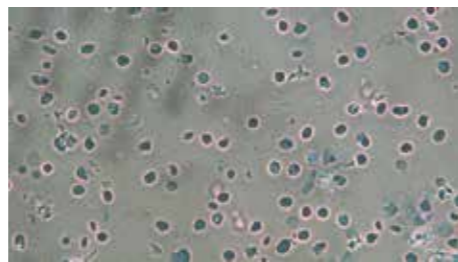


图 人肝组织

■ 产品列表

货号	产品名称	规格
52009-10	伯优® 细胞核分离试剂盒	10rxn

注:该产品仅供科研使用。

附件2 Totalseq panel

Totalseq-A Human Universal cocktail包含的检测指标:154个常规marker+9种同型

CD3	CD19	CD21	CD26	CD146	NKp80	CD95 (Fas)	CD272 (BTLA)	CD81 (TAPA-1)	HLA-DR, DP, DQ	CD158 (KIR2DL1/S1/S3/S5)
CD8	CD33	CD54	CD63	CD62L	CD131	CD155 (PVR)	CD278 (ICOS)	CD305 (LAIR1)	CD107a (LAMP-1)	CD73 (Ecto-5'-nucleotidase)
CD7	CD14	CD41	CD36	CD161	CD116	CD56 (NCAM)	CD58 (LFA-3)	CD319 (CRACC)	CD112 (Nectin-2)	CD275 (B7-H2, B7-RP1, ICOSL)
CD4	CD16	CD43	CD72	CD11b	CD45RA	CD49f	CD192 (CCR2)	CD352 (NTB-A)	CD57 Recombinant	CD169 (Sialoadhesin, Siglec-1)
IgM	CD25	CD83	CD93	CD11a	CD45RO	CD79b (Igβ)	CD267 (TACI)	CD152 (CTLA-4)	Ig light chain κ	Mouse IgG1, κ isotype Ctrl
CD5	CD20	CD13	CD99	CD42b	HLA-DR	CD244 (2B4)	CD150 (SLAM)	CD268 (BAFF-R)	Ig light chain λ	Mouse IgG2a, κ isotype Ctrl
CD2	CD31	CD29	CD94	CD163	CX3CR1	integrin β7	CD85j (ILT2)	CD122 (IL-2Rβ)	CD328 (Siglec-7)	Mouse IgG2b, κ isotype Ctrl
IgD	CD32	CD61	CD84	CD49b	FcεRIα	CD200 (OX2)	CD101 (BB27)	CD226 (DNAM-1)	CD270 (HVEM, TR2)	Rat IgG2b, κ isotype Ctrl
CD9	CD69	CD55	CD23	CD49a	TCR α/β	CD88 (C5aR)	TIGIT (VSTM3)	CD303 (BDCA-2)	CD62P (P-Selectin)	Rat IgG1, κ isotype Ctrl
IgE	CD27	CD18	CD82	CD49d	TCR Vδ2	CD194 (CCR4)	CD335 (Nkp46)	CD127 (IL-7Rα)	CD103 (Integrin αE)	Rat IgG1, λ isotype Ctrl
CD86	CD1c	CD28	CD74	LOX-1	CLEC12A	CD279 (PD-1)	CD183 (CXCR3)	CD115 (CSF-1R)	CD274 (B7-H1, PD-L1)	Rat IgG2a, κ isotype Ctrl
CD47	CD64	CD38	CD37	CD109	HLA-A,B,C	CD195 (CCR5)	CD185 (CXCR5)	CD172a (SIRPα)	CD304 (Neuropilin-1)	Rat IgG2c, κ isotype Ctrl
CD48	CD35	CD45	CD154	CD142	TCR Vα7.2	CD196 (CCR6)	CD223 (LAG-3)	CD354 (TREM-1)	CD141 (Thrombomodulin)	Armenian Hamster IgG Isotype Ctrl
CD40	CD39	CD22	CD11c	CD162	CD44	KLRG1 (MAFA)	CD314 (NKG2D)	CD151 (PETA-3)	CD119 (IFN-γ R α chain)	
CD52	CD24	CD71	CD123	GPR56	Podoplanin	CD134 (OX40)	CD137 (4-1BB)	CLEC1B (CLEC2)	CD158e1 (KIR3DL1, NK1)	

Totalseq-C Human Universal cocktail包含的检测指标:130个常规marker+7种同型

CD86	CD14	CD107a	CD42b	CD45	CD19	CD195	CD278	CD13	CD158e1	Mouse IgG1, κ isotype Ctrl
CD274	CD16	CD95	CD54	CD22	CD33	CD32	CD58	CD2	CD319	Mouse IgG2a, κ isotype Ctrl
CD270	CD25	CD134	CD62P	CD71	CD11c	CD196	CD39	CD226	CD99	Mouse IgG2b, κ isotype Ctrl
CD155	CD45RO	HLA-DR	CD119	CD26	HLA-A,B,C	CD185	CX3CR1	CD29	CLEC12A	Rat IgG2b, κ isotype Ctrl
CD112	CD279	CD1c	TCR α/β	CD36	CD45RA	CD103	CD24	CD303	CD352	Rat IgG1, κ isotype Ctrl
CD47	TIGIT	CD11b	CD122	CD158	CD123	CD69	CD21	CD49b	CD94	Rat IgG2a, κ isotype Ctrl
CD48	CD20	CD64	CD267	CD49a	CD7	CD62L	CD11a	CD81	Ig light chain κ	Armenian Hamster IgG Isotype Ctrl
CD40	CD335	CD141	FcεRIα	CD49d	CD105	CD161	CD79b	IgD	CD85j	
CD154	CD31	CD1d	CD41	CD73	CD49f	CD152	CD244	CD18	CD23	
CD52	CD146	CD314	CD137	TCR Vα7.2	CCR4	CD223	CD169	CD28	Ig light chain λ	
CD3	IgM	CD35	CD163	TCR Vδ2	CD4	KLRG1	integrin β7	CD38	CD328	
CD8	CD5	CD57	CD83	LOX-1	CD44	CD27	CD268	IL-7Rα	GPR56	
CD56	CD183	CD272	CD124	CD158b	HLA-E	CD82	CD101	CD88	CD224	

Totalseq-A系列mouse panel

CD4	CD69	JAML	CD103	FcεRIα	PIR - A/B	CD357 (GITR)	CD117 (c - kit)	TCR Vβ8.1, 8.2	CD159a (NKG2AB6)	4 - 1BB Ligand (CD137L)
CD5	CD86	DLL1	CD106	NK - 1.1	Notch 4	CD150 (SLAM)	CD15 (SSEA - 1)	TCR Vβ5.1, 5.2	Ly - 6G/Ly - 6C (Gr - 1)	CD85k (gp49 Receptor)
CD3	CD28	CD40	CD152	CD45.2	Siglec H	CD196 (CCR6)	CD335 (Nkp46)	CD172a (SIRPa)	CD62P (P - selectin)	TER - 119/Erythroid Cells
IgM	CD24	CD31	CD163	CD45.1	MAdCAM - 1	KLRG1 (MAFA)	CD134 (OX - 40)	CD169/Siglec - 1	CD300LG (Nepmucin)	H - 2Kb bound to SIINFEKL
IgD	CD14	CD61	CD49b	CD90.1	rat XCR1	CD195 (CCR5)	TCR Vγ1.1/Cr4	CD326 (Ep - CAM)	CD138 (Syndecan - 1)	Folate Receptor β (FR - β)
CD9	CD48	CD51	CD207	P2RY12	rat CD29	CD197 (CCR7)	CD183 (CXCR3)	DR3 (TNFRSF25)	Mac - 2 (Galectin - 3)	TLR4 (CD284)/MD2 Complex
CD2	CD71	CD94	CXCR4	CX3CR1	CD45R/B220	CD192 (CCR2)	CD200R (OX2R)	CD226 (DNAM - 1)	CD21/CD35 (CR2/CR1)	CD120b (TNF R Type II/p75)
CD8a	CD41	Ly - 6C	Tim - 4	CD301b	CD55 (DAF)	CD201 (EPCR)	CD314 (NKG2D)	IL - 21 Receptor	CD1d (CD1.1, Ly - 38)	Panendothelial Cell Antigen
CD44	CD36	CD11b	CD11a	CD140a	CD95 (Fas)	CCR3 (CD193)	CD185 (CXCR5)	CAT - 1 (SLC7A1)	CD252 (OX40 Ligand)	CD93 (AA4.1, early B lineage)
CD54	CD38	Ly - 6G	CD105	Ly - 49A	CD200 (OX2)	CD194 (CCR4)	TIGIT (Vstm3)	CD124 (IL - 4Ra)	CD274 (B7 - H1, PD - L1)	Mouse IgG1, κ isotype Ctrl
CD73	CD63	CD49f	P2X7R	GITR - L	TCR β chain	CD278 (ICOS)	CD182 (CXCR2)	CD202b (Tie - 2)	CD204 (Scavenger R1)	Mouse IgG2a, κ isotype Ctrl
CD19	CD68	CD49d	Ly49H	CD16/32	integrin β7	CD199 (CCR9)	CD253 (TRAIL)	Ly - 6A/E (Sca - 1)	CD304 (Neuropilin - 1)	Mouse IgG2b, κ isotype Ctrl
CD45	CD83	CD135	Ly49G	I - A/I - E	CD8b (Ly - 3)	CD272 (BTLA)	CD186 (CXCR6)	CD371 (CLEC12A)	CD317 (BST2, PDCA - 1)	Rat IgG2b, κ isotype Ctrl
CD25	ESAM	CD102	Ly49D	TCR γ/δ	CD79b (Igβ)	CD26 (DPP - 4)	CD365 (Tim - 1)	CD107a (LAMP - 1)	CD273 (B7 - DC, PD - L2)	Rat IgG1, κ isotype Ctrl
CD23	CD22	CD11c	CD49a	TCR Vγ3	MERTK (Mer)	CD270 (HVEM)	CD157 (BST - 1)	CD205 (DEC - 205)	CD309 (VEGFR2, Flk - 1)	Rat IgG1, λ isotype Ctrl
CD43	CD39	CD62L	Ly108	TCR Vγ2	ENPP1 (PC1)	CD198 (CCR8)	CD115 (CSF - 1R)	CD215 (IL - 15Ra)	CD370 (CLEC9A, DNDR1)	Rat IgG2a, κ isotype Ctrl
CD27	CD80	F4/80	CD160	Notch 1	CD155 (PVR)	CD178 (FasL)	CD127 (IL - 7Ra)	CD170 (Siglec - F)	IL - 33Ra (IL1RL1, ST2)	Rat IgG2c, κ isotype Ctrl
CD20	CD34	CD137	CD90.23	CD200R3	CD279 (PD - 1)	CD366 (Tim - 3)	CD122 (IL - 2Rβ)	CD339 (Jagged 1)	CD300c/CD300d/MAIR - II	Armenian Hamster IgG Isotype Ctrl

更多Panel及抗体列表
请扫二维码

