

# 基于单细胞靶向测序探究基因碱基突变的方法

赵利楠<sup>1</sup>, 王娜<sup>1</sup>, 杨国良<sup>2</sup>, 苏现斌<sup>1</sup>, 韩泽广<sup>1</sup>

1. 上海交通大学, 系统生物医学研究院, 系统生物医学教育部重点实验室, 上海 200240
2. 上海交通大学医学院附属仁济医院泌尿科, 上海 200127

**摘要:** 分析基因碱基突变是探究肿瘤细胞克隆演化的研究方法之一。目前,常取组织不同区域的群体细胞测序,基于群体水平的基因碱基突变频率等信息绘制出肿瘤的克隆演化过程。但是,该方法易遗失低频突变,并且组织群体细胞类型不单一,不能代表特定细胞群体的克隆演化过程。本研究以前列腺基底细胞癌(prostate basal cell carcinoma, BCC)为例,建立了一种探究肿瘤单细胞的基因碱基突变方法,实现了基于单细胞基因碱基突变分析肿瘤细胞的克隆演化过程。首先通过 HepG2 细胞优化了单细胞全基因组扩增方法,其次用 Fluidigm 公司的微流控芯片捕获 BCC 单细胞进行全基因组扩增,然后通过外显子组测序获得 *SCUBE3* 和 *MST1L* 基因碱基突变信息。通过单细胞靶向扩增和 Sanger 测序,成功在 BCC 单细胞中检测到 *SCUBE3* 和 *MST1L* 基因碱基突变信息。本研究建立的方法为肿瘤细胞的克隆演化研究提供了一种可靠的技术方案。

**关键词:** 肿瘤细胞; 基因碱基突变; 克隆演化; 单细胞

## A method for reliable detection of genomic point mutations based on single-cell target-sequencing

Linan Zhao<sup>1</sup>, Na Wang<sup>1</sup>, Guoliang Yang<sup>2</sup>, Xianbin Su<sup>1</sup>, Zeguang Han<sup>1</sup>

1. Key Laboratory of Systems Biomedicine (Ministry of Education), Shanghai Center for Systems Biomedicine, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China
2. Department of Urology, Renji Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200127, China

**Abstract:** The analysis of genomic point mutations is one of the research strategies to explore the clonal evolution of tumor cells. At present, clonal evolution of tumor cells is mainly determined by bulk sampling and sequencing of different sections of the tumor. Since this approach analyzes a mixture of different cell types, it may not accurately represent the clonal evolution of specific tumor cell populations and likely miss low frequency mutations, especially when the sequencing depths are not sufficient. To address this issue, we have developed a strategy to analyze genomic point mutations from prostate basal cell carcinoma (BCC) tissues at single-cell resolution. Firstly, we optimized the single-cell

收稿日期: 2020-04-26; 修回日期: 2020-06-02

基金项目: 上海交通大学科技创新专项资金项目(编号: 2019TPA09)和国家自然科学基金青年项目(编号: 81802806)资助[Supported by Shanghai Jiao Tong University Scientific and Technological Innovation Funds (No. 2019TPA09), and the National Natural Science Foundation of China (No. 81802806)]

作者简介: 赵利楠, 在读硕士研究生, 专业方向: 肝癌单细胞测序。E-mail: zlnsju2017@sjtu.edu.cn

通讯作者: 韩泽广, 教授, 研究方向: 肿瘤(肝癌)发病机制研究和单细胞测序。E-mail: hanzg@sjtu.edu.cn

DOI: 10.16288/j.ycz.20-046

网络出版时间: 2020/6/19 15:47:01

URI: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20200619.1449.001.html>

whole genome amplification procedure with HepG2 cells. Then the single cells from BCC tissue were captured by a microfluidic chip of Fluidigm and processed for whole-genome amplification. Both *SCUBE3* and *MST1L* genomic mutations were obtained by whole exome sequencing. Finally, we examined the genomic mutations through single-cell targeted amplification and Sanger sequencing. The established method successfully reconfirmed the mutations of *SCUBE3* and *MST1L* in BCC at single cell level. The strategy established in this study could provide a useful tool for determining the clonal evolution of tumor cells based on genomic mutations at single-cell resolution.

**Keywords:** tumor cell; mutation; clonal evolution; single-cell

肿瘤组织内部除了含有血管、基质细胞和浸润的免疫细胞外,还包含具有不同遗传变异的肿瘤细胞,故而肿瘤是一种高度异质性的疾病<sup>[1,2]</sup>。此外,肿瘤在形成过程中,其内部的肿瘤细胞因含有不同的突变组合而形成不同的亚克隆群体,且克隆群体会不断进化以适应环境<sup>[3]</sup>。遗传异质性结合表观遗传异质性等因素会引起肿瘤细胞的表型异质性,进而形成了不同肿瘤细胞对治疗的反应或本身的转移能力不同,最终导致抗药性或复发<sup>[4]</sup>。为此,揭示肿瘤内部的克隆结构演变规律,将有助于理解其发生发展机制,为今后癌症患者的个性化治疗提供理论基础。

目前,研究肿瘤组织内部细胞克隆结构演化的方法之一是对不同区域取样进行群体水平的外显子测序,通过检测基因突变的发生频率(variant allele frequency, VAF)从而探索肿瘤细胞的发生发展过程<sup>[5,6]</sup>。该方法存在的不足之处在于,群体细胞中不仅含有肿瘤细胞,而且同时混有其他类型细胞,这很容易导致肿瘤细胞中特有的所占比重较少的突变信息被掩盖<sup>[7]</sup>。单细胞全外显子测序可以有效解决这一问题,但考虑到测序成本问题一般难以大规模应用,部分研究者以单细胞靶向测序作为替代方案<sup>[8-10]</sup>。

利用单细胞靶向测序技术,本研究建立了一种优化的有效靶向分析大规模单细胞中特定碱基突变的方法。通过结合组织酶解方法、微流控单细胞分离、多重置换扩增(multiple displacement amplification, MDA)、外显子组测序和单细胞靶向扩增技术组建了探究肿瘤单细胞水平基因碱基突变的方法。首先以 HepG2 细胞为例优化 MDA 技术,并将建立的方法应用到一例人类前列腺基底细胞癌(prostate basal cell carcinoma, BCC)患者的肿瘤样本,通过对混

合单细胞样品全外显子测序结果分析找到 BCC 肿瘤细胞中存在的克隆碱基突变点,并在单细胞水平上通过靶向扩增及 Sanger 测序验证该突变的存在,从而为绘制肿瘤细胞克隆演化过程奠定基础(图 1)。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

HepG2 肝细胞癌细胞系来自 ATCC。人类前列腺基底细胞癌(prostate basal cell carcinoma, BCC)样本来自上海交通大学医学院附属仁济医院。

### 1.2 单细胞悬液的制备

组织样本用剪刀剪碎,加入胶原酶 IV 于 37°C 孵育 30~120 min,经 70  $\mu\text{m}$  滤膜除去消化不完全组织和裂解红细胞后以 100 g 离心 5 min,再进行洗涤重悬获得单细胞悬液。制备的单细胞悬液经计数及细胞直径测量后用于后续的单细胞分离、捕获、基因组扩增、生物信息分析和靶基因扩增及验证等。

### 1.3 单细胞捕获及全基因组扩增

单细胞由美国 Fluidigm 公司的 C1 芯片捕获,单次最多可捕获 96 个单细胞。单个细胞的 DNA 不易于目的基因的扩增,采用 MDA 技术对芯片捕获到的单细胞进行全基因组放大可以有效用于靶向扩增。

### 1.4 外显子组测序与基因碱基突变分析

C1 芯片捕获单个 BCC 细胞后,首先完成单细胞的全基因组放大,再分别吸取 2  $\mu\text{L}$  单细胞的基因组放大产物进行混合,可获得单细胞水平的群体基

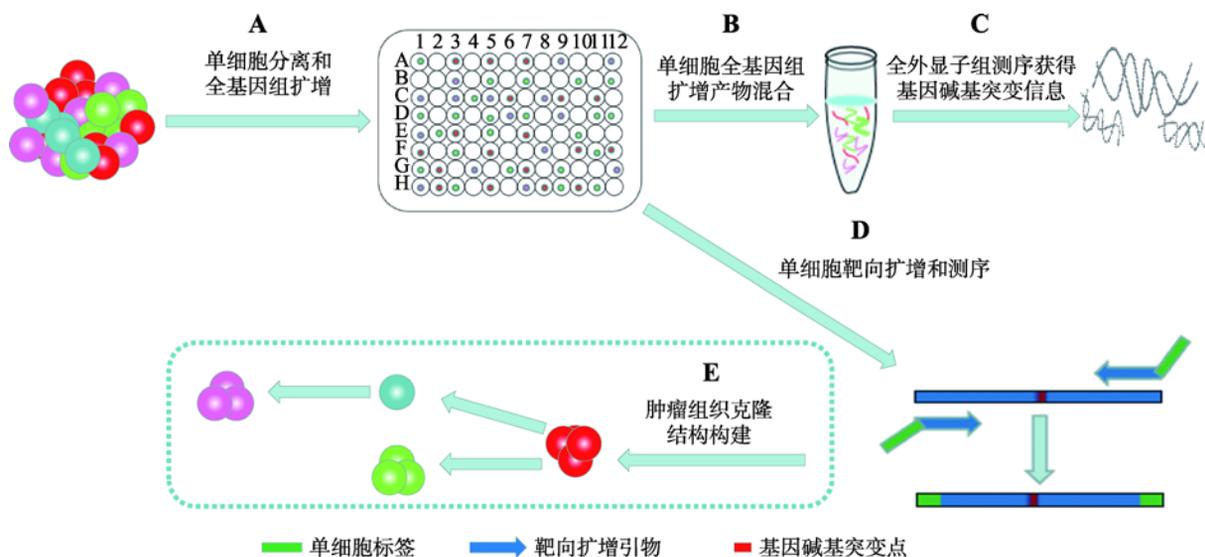


图 1 单细胞水平靶向检测肿瘤基因碱基突变的技术流程

Fig. 1 Workflow of targeted detection of genomic mutations in tumor cells at single-cell resolution

A: 肿瘤组织单细胞分离和单细胞全基因组扩增; B: 取等体积肿瘤单细胞基因组放大产物获得混合样品; C: 混合基因组产物进行全外显子测序经生物信息分析获得基因碱基突变列表; D: 选取目的基因并根据碱基突变位点设计引物, 以肿瘤单细胞基因组产物为模板进行靶向扩增和测序; E: 基于单细胞碱基突变信息绘制肿瘤细胞的克隆演化过程。

因产物样本。将捕获到的 BCC 单细胞全基因组扩增产物混合样品进行外显子组测序(whole exome sequencing, WES) (测序深度~200×)<sup>[11]</sup>, 且测序数据采用本课题组构建的分析流程处理获得基因突变列表<sup>[12]</sup>。测序数据已上传至 NCBI SRA 数据库, 登录号: PRJNA607168, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/PRJNA607168>。

### 1.5 引物序列与合成

利用 Primer3 网站设计引物, 用于扩增检测 *SCUBC3* 基因第 35213742 位碱基和 *MSTIL* 基因第 17084321 位碱基的突变情况。引物设计原则是: 在碱基突变位点的上下游约 100 bp 设计引物。采用

Primer Premier 5.0 软件设计 *ACTB* 基因的实时荧光定量 PCR (quantitative real time PCR, q-PCR) 引物。本文所使用引物的相关信息如表 1 所示。

### 1.6 目的基因靶向扩增与测序分析

通过对混合样品的全外显子测序数据分析获得突变基因列表信息, 选取目的基因 *SCUBC3* 和 *MSTIL* 进行单细胞靶向扩增与测序分析验证。以 BCC 单细胞基因组扩增产物为模板, 用设计的基因引物分别扩增目的片段即包含 *SCUBC3* 基因第 35213742 位碱基和 *MSTIL* 基因第 17084321 位碱基。

根据琼脂糖凝胶电泳的结果判断扩增效果, 然后将每 3 个单细胞的目的基因扩增产物混合一起,

表 1 引物序列信息

Table 1 Sequences of the primers used in this study

引物名称	引物序列(5'→3')	扩增产物长度(bp)	用途
<i>SCUBE3</i>	F:AGGGTGTGTGTATGCGAAGG	253	碱基突变验证
	R:GGCCTCGCTTGTCTTGAAGT		
<i>MSTIL</i>	F:TTACCCGTACCTGCAGTGAG	287	碱基突变验证
	R:GACAACCTGGGAGGATGTGA		
<i>ACTB</i>	F:TCTCGCAGCTCACCATGGAT	363	内参基因
	R:TGCTCGATGGGGTACTTCAG		

进行 Sanger 测序。通过将测序片段序列与目的基因的匹配参考片段序列比对, 若发现目的基因的特定位点碱基发生突变, 则分别将该样品的 3 个单细胞靶向扩增产物送去 Sanger 测序, 最终确定基因碱基突变具体发生在哪些单细胞中。

## 1.7 统计分析

数据分析均由 GraphPad Prism 6.0 软件完成统计并作图。

## 2 结果与分析

### 2.1 单细胞全基因组扩增条件优化及验证

#### 2.1.1 单细胞全基因组扩增条件优化

MDA 技术是一种进行单细胞全基因组扩增放大的方法, 它可对全基因组进行高保真的均匀扩增, 扩增出 10~100 kb 大小的片段, 常用于单碱基变异 (single nucleotide variation, SNV) 分析研究肿瘤克隆结构<sup>[13-15]</sup>。但是 MDA 技术也有一些缺点, 特别是显著的非特异扩增, 空白对照也会产生核酸产物。

此前有报道通过紫外光照射可以有效消除试剂及外界环境中的外源核酸污染<sup>[16,17]</sup>, 为确定最适且有效降低外源核酸污染的紫外光照射时间, 本研究以试剂盒中 gDNA (人基因组 DNA) 为扩增模板即实验组, 等体积纯净水为空白对照组进行 MDA 技术

优化实验。通过紫外光照射 MDA 试剂 0 min、15 min、30 min、60 min 探索减少非特异性核酸扩增的最佳条件。结果显示, 实验组的核酸扩增产物浓度远远大于空白对照组(图 2A), 并且当用紫外光照射 MDA 相关试剂 30 min 时, 可以有效显著地减少非特异性核酸扩增(图 2B)。

#### 2.1.2 HepG2 单细胞全基因组扩增

通过对 HepG2 单细胞全基因组扩增验证优化条件的准确性, 首先将 HepG2 细胞制备成单细胞悬液, 并以 166~250 cells/ $\mu$ L 的浓度加入 C1 芯片进行单细胞捕获。单次 C1 芯片具有 96 个单细胞捕获小室, 可制备 96 个单细胞。为避免 C1 芯片细胞小室捕获到多个细胞, 利用较低的起始细胞密度, 并通过显微镜观察确认每个小室捕获到单个细胞, 本次共捕获到 47 个 HepG2 单细胞。

随后将经紫外光照射 30 min 后的 MDA 试剂输入 C1 芯片的单细胞捕获小室进行核酸扩增, 利用 Qubit 测得每个单细胞捕获小室的核酸扩增产物浓度(图 3A)。扩增结果显示捕获到单细胞的核酸扩增产物浓度(有细胞组)显著性高于无单细胞存在的核酸扩增产物浓度(无细胞组) (图 3B)。本研究选取人类内参基因 *ACTB* 设计引物, 利用 q-PCR 对有细胞组和无细胞组 *ACTB* 基因的核酸模板量进行分析。扩增曲线结果显示, 无细胞组的 q-PCR 反应结束后无扩增曲线出现, 可能是由于无细胞组的核酸浓度

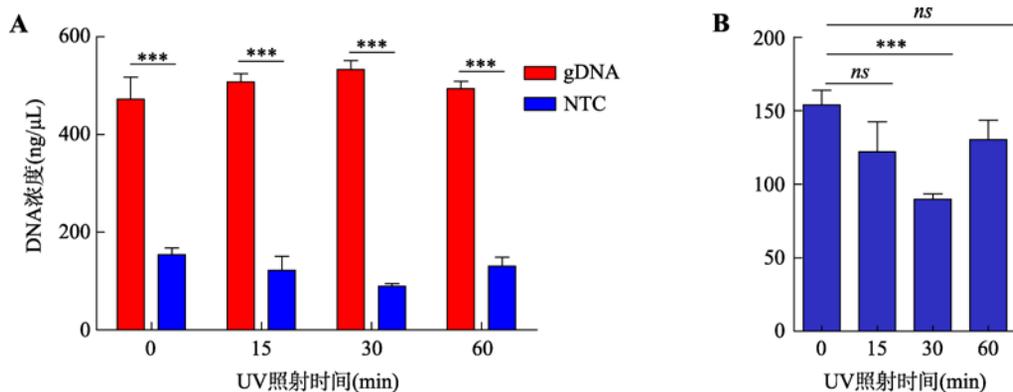


图 2 通过紫外照射降低外源核酸污染对 MDA 扩增条件进行优化

Fig. 2 Optimization of MDA by UV exposure to reduce contaminating nucleic acids

A: MDA 扩增结果, gDNA 表示人基因组 DNA 为模板, NTC 表示以等体积水为模板; B: 紫外光(UV)照射 MDA 试剂不同时间段非特异性扩增结果。\*\*\*  $P < 0.001$ ; ns: 表明无显著差异。

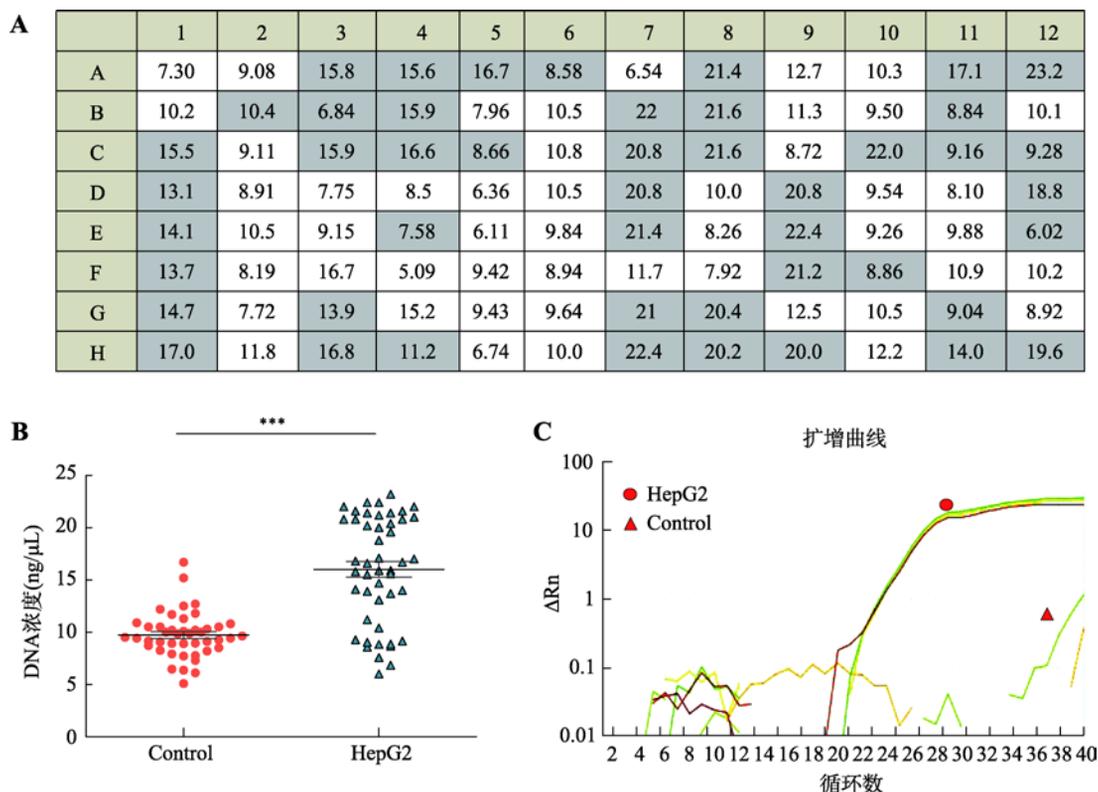


图 3 HepG2 单细胞全基因组放大结果

Fig. 3 Single-cell whole genome amplification of HepG2

A: HepG2 单细胞全基因组扩增产物核酸浓度( $\text{ng}/\mu\text{L}$ ), 灰色背景: 有细胞(47 个孔), 白色背景: 无细胞(49 个孔); B: 有细胞组(HepG2)与无细胞组(Control)核酸浓度比较; C: *ACTB* 基因 q-PCR 扩增曲线图结果展示。\*\*\*  $P < 0.001$ 。

偏低或者模板为降解的核酸片段导致(图 3C)。以上实验结果证实, 本研究优化的 MDA 方法可以显著的降低外源核酸的干扰, 并对单细胞基因组进行有效的扩增。

## 2.2 BCC 单细胞的全基因组扩增和碱基突变分析

### 2.2.1 BCC 单细胞捕获及全基因组扩增

将计划进行单细胞分析的 BCC 组织剪碎, 用胶原酶 IV 处理并通过膜过滤、离心及细胞重悬获得单细胞悬液(图 4A)。利用 C1 芯片同样以  $166 \sim 250 \text{ cells}/\mu\text{L}$  的浓度对细胞悬液进行单细胞捕获(图 4B)。本次捕获到 53 个 BCC 单细胞, 且在显微镜下观看 Fluidigm C1 芯片捕获到的单细胞大部分形态正常, 加入紫外光照射处理的 MDA 试剂进行单细胞全基因组扩增, 保证有效减少非特异性核酸扩增的干扰。最后通过 Qubit 测得每个单细胞的基因组

扩增产物浓度, 结果显示捕获到 BCC 单细胞的基因组被成功扩增放大(图 4C), 而扩增产物浓度的差异可能由于裂解或扩增效率不同造成。

### 2.2.2 BCC 外显子组测序及生物信息分析

分别吸取扩增的 BCC 单细胞全基因组扩增产物各  $2 \mu\text{L}$  混合, 并开展外显子组测序(测序深度  $\sim 200\times$ )<sup>[11]</sup>。测序数据用本课题组构建的成熟分析流程处理, 以 Burrows-WheelerAligner (BWA) 进行序列比对, 以 Genome Analysis Toolkit (GATK)检测遗传变异, 以 SnpEff 对遗传变异进行注释, 最后获得突变基因列表<sup>[18-20]</sup>。通过生物信息分析发现 *SCUBE3* 和 *MSTIL* 基因均发生碱基突变(表 2), 且 *SCUBE3* 测序深度为  $281\times$ , *MSTIL* 测序深度为  $493\times$ 。

### 2.2.3 靶向扩增及 Sanger 测序验证

为了在单细胞水平进一步验证混合样品外显子组测序发现的基因碱基突变点, 分别以每个 BCC 单

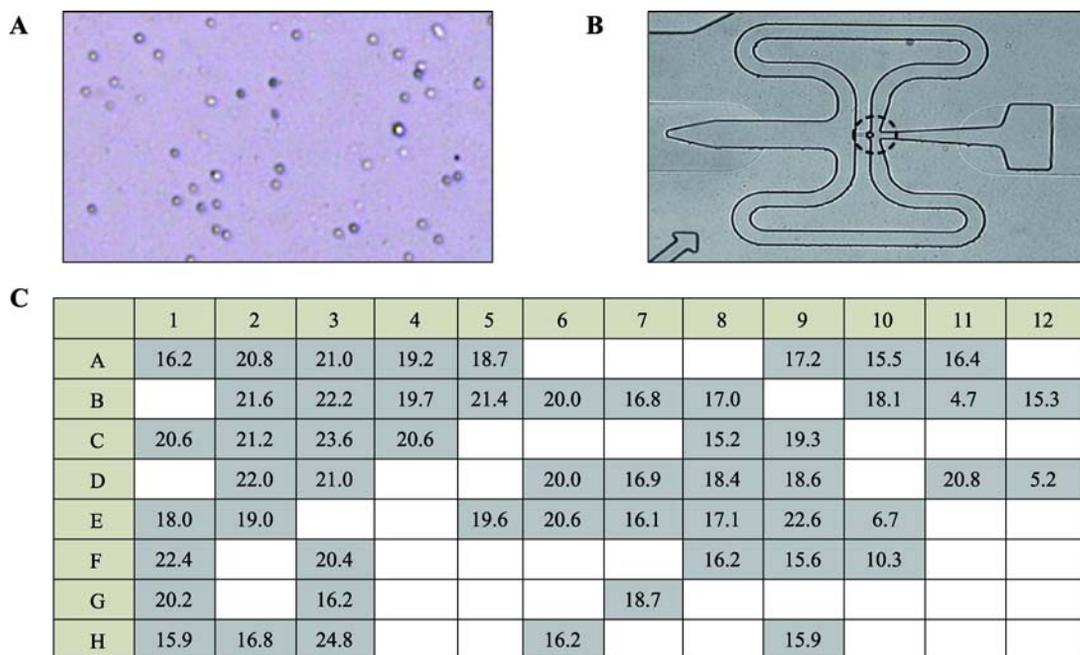


图 4 BCC 单细胞全基因组扩增

Fig. 4 Single-cell whole genome amplification of BCC

A: BCC 单细胞悬液; B: C1 芯片捕获 BCC 单细胞; C: BCC 单细胞全基因组扩增产物浓度(ng/μL)。

表 2 基因突变信息

Table 2 List of the gene mutation in this study

基因名称	染色体	突变位点	参考碱基	突变碱基	突变发生频率(VAF)
<i>SCUBE3</i>	6	35213742	C	T	0.302491103
<i>MSTIL</i>	1	17084321	A	G	0.170385396

细胞全基因组为模板, 利用 PCR 对 *SCUBE3* 和 *MSTIL* 基因进行引物扩增, 电泳结果显示分别成功扩增出 43 个和 44 个 BCC 单细胞的 *SCUBE3* 和 *MSTIL* 基因目的条带(图 5A, 图 6A)。

按顺序将扩增产物每 3 个样品取等体积混合一起作为一个样品进行 Sanger 测序。测序结果显示 *SCUBE3* 基因扩增产物的第 5 个混合样品中 *SCUBE3* 基因第 35213742 位碱基有较高的 C→T 突变, 但第 6 个混合样品的相同位点没有突变发生(图 5B)。为了进一步在单细胞水平验证, 分别将混合样品的 3 个单细胞目的片段扩增产物进行 Sanger 测序, 测序图谱显示第 5 个混合样品的第 2 个 BCC 单细胞(4A)发生 C→T 突变, 而第 6 个混合样品的第 1 个 BCC 单细胞(4C)*SCUBE3* 基因第 35213742 位碱基未发生碱基突变(图 5C)。

同时, 本研究也检测到 *MSTIL* 基因扩增产物的

第 6 个混合样品中 *MSTIL* 基因第 17084321 位碱基发生 A→G 突变, 但第 4 个混合样品的相同位点没有突变发生(图 6B)。单细胞测序结果显示, 第 6 个混合样品的第 3 个 BCC 单细胞(5A)发生 A→G 突变, 而第 4 个混合样品的第 1 个 BCC 单细胞(3A)未发生碱基突变(图 6C)。

为了排除本文检测到的基因碱基突变由基因靶向扩增和 Sanger 测序过程引入, 进一步观察其他两个单细胞的目的基因碱基突变情况, 发现 *SCUBE3* 基因在 Mix-5-1-*SCUBE3* 细胞, *MSTIL* 基因在 Mix-6-*MSTIL* 其他两个单细胞中的特定位置碱基也分别发生相同突变, 但它们相互对照无突变组的其他两个单细胞没有发生突变(附图 1, 附图 2)。同时, 考虑到基因靶向扩增和 Sanger 测序过程引入碱基突变是随机的, 因此同时在多个单细胞中同时引入特定位置相同碱基突变的可能性不大。以上结果说明

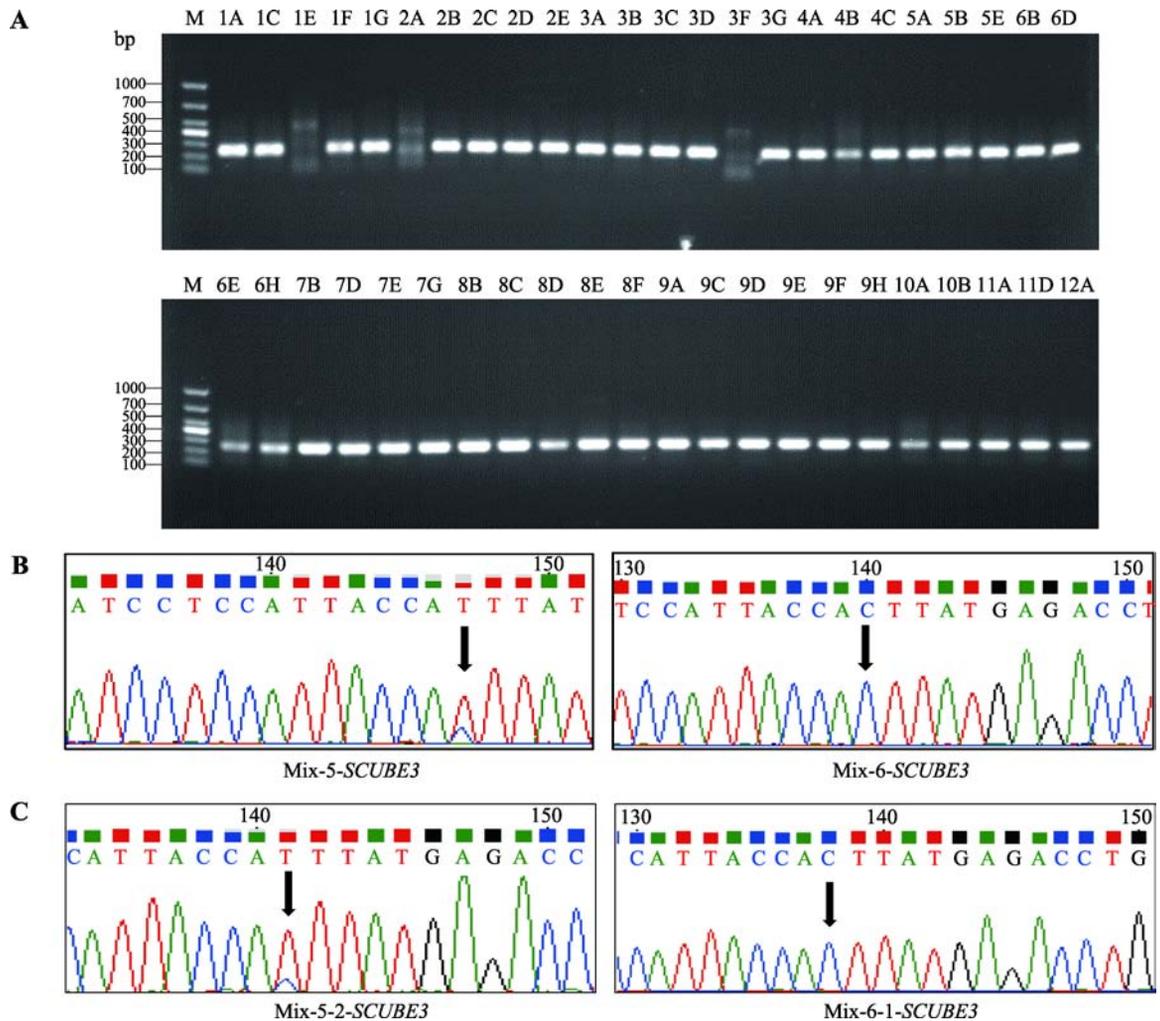


图 5 *SCUBE3* 基因靶向扩增结果和 Sanger 测序图谱

Fig. 5 Target amplification and Sanger sequencing of *SCUBE3* gene

A: *SCUBE3* 基因靶向扩增产物结果。泳道 1A~12A: BCC 单细胞 96 孔板位置编号; M: DL1000 marker。B、C: *SCUBE3* 基因靶向扩增产物 Sanger 测序图谱。Mix-X-Y-基因: Mix 代表 3 个 BCC 单细胞目的基因靶向扩增产物混合样品, X 代表混合样品的排序号, Y 代表混合样品中 BCC 单细胞的排序号。

基于单细胞水平靶向扩增与测序, 本研究建立的方法可以有效检测肿瘤单细胞水平的基因碱基突变。

### 3 讨论

肿瘤内部的高度异质性是导致高致死率和耐药性的一个关键因素<sup>[21]</sup>。因此, 在单细胞水平探究肿瘤内部的克隆演化可以有效地帮助人们了解肿瘤的发生发展, 为肿瘤的早期诊断和干预提供理论基础。随着单细胞测序技术的出现, 在单细胞水平分析肿瘤的演变过程可以提高人们对肿瘤内部细胞克隆亚

群的了解, 但测序成本限制了单细胞测序技术的大规模应用。针对上述问题, 本研究基于单细胞靶向扩增和测序技术建立探究肿瘤单细胞水平基因碱基突变的方法, 其优点在于: (1)可以减少研究样本中低频突变的损失; (2)可以靶向分析大规模单细胞中特定点突变; (3)有效降低外源核酸非特异性扩增产物的干扰。

目前, 单细胞全基因组扩增有多种方法, MDA 由于使用的 Phi29 聚合酶具有 3'→5'的外切酶活性及校正功能, 是所有扩增方法中公认的保真性最好和最适合进行点突变检测的方法<sup>[22-25]</sup>。本研究所使用

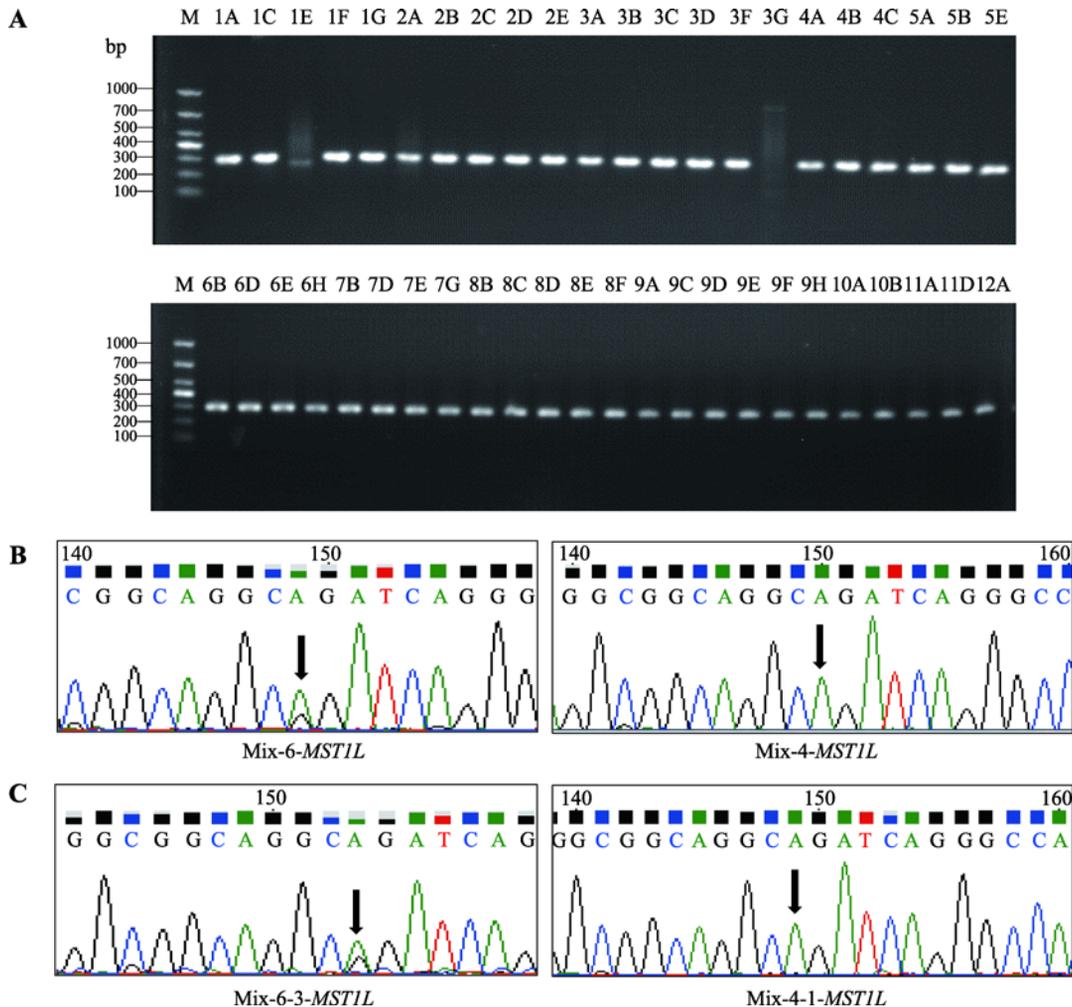


图 6 *MSTIL* 基因靶向扩增结果和 Sanger 测序图谱

Fig. 6 Target amplification and Sanger sequencing map of *MSTIL* gene

A: *MSTIL* 基因靶向扩增结果, 泳道 1A~12A: BCC 单细胞 96 孔板位置编号, M: DL1000 marker; B~C: *MSTIL* 基因靶向扩增产物 Sanger 测序图谱, Mix-X-Y-基因: Mix 代表 3 个 BCC 单细胞目的基因靶向扩增产物混合样品, X 代表混合样品的排序号, Y 代表混合样品中 BCC 单细胞的排序号。

的人类 BCC 单细胞 MDA 扩增产物的混合全外显子组测序分析显示突变的 VAF 数值在 0.5 左右波动<sup>[11]</sup>, 说明 MDA 过程中不太可能通过非特异扩增丢失关键的突变, 但有可能影响细胞突变频率低的突变。同时, 本研究展示的 BCC 单细胞 *SCUBE3* 基因和 *MSTIL* 基因的 Sanger 测序图谱中除突变点外的其他位点可作为技术对照, 证明 MDA 扩增过程没有引入非特异的假阳性突变。此外, 已有研究表明紫外光照射 60 min 可以有效降低 MDA 扩增试剂中残留 DNA 的污染<sup>[26]</sup>, 本研究对 MDA 的条件进行优化, 实验结果提示紫外光照射 MDA 试剂 30 min 为最佳条件。分析实验结果产生差异的原因可能是: (1)不

同批次单细胞扩增试剂中残留的 DNA 污染量不同。Woyke 等<sup>[26]</sup>以 *E. coli* DNA 进行条件优化, 而本研究以 illustra GenomiPhi V2 DNA Amplification Kit (GE Healthcare, 25660031)中自带 gDNA (人基因组 DNA)进行条件优化; (2)实验操作流程或者环境中的 DNA 污染浓度不同。本研究以肝癌细胞系 HepG2 为例进一步验证了 MDA 优化条件的可靠性, 结果依旧支持本文所得结论, 即紫外光照射 MDA 试剂 30 min 可以有效减少外源核酸非特异性扩增的影响 (图 3B)。以上结果提示, 紫外光照射 MDA 试剂主要是为了去除扩增试剂中或环境中的 DNA 污染, 与单细胞类型关系不大。

本研究建立的基于微流控芯片 MDA 技术、全外显子测序和 Sanger 测序技术相结合的方法可以有效针对肿瘤单细胞进行基因点突变检测, 有助于肿瘤异质性问题研究。另外, 本研究所建立的方法可以结合流式分选等技术进行细胞类型挑选(肿瘤细胞、肿瘤干/祖细胞等), 可以有效地避免因其他类型细胞的干扰降低对低频突变的检测, 有利于对特定细胞群体的克隆演化过程进行探索。此外, 该方法可以通过扩大样本量, 例如设计带有细胞标签的靶向扩增引物并结合第二代测序技术, 实现高通量的靶向分析大规模单细胞中的特定点突变以达到对肿瘤克隆结构进行重构的目的, 为肿瘤克隆演化的研究提供了切实可行的方案。

## 附录:

附图详见文章电子版 [www.chinagen.cn](http://www.chinagen.cn)。

## 参考文献(References):

- [1] Terry S, Buart S, Chouaib S. Hypoxic stress-induced tumor and immune plasticity, suppression, and impact on tumor heterogeneity. *Front Immunol*, 2017, 8: 1625. [DOI]
- [2] Junttila MR, de Sauvage FJ. Influence of tumour micro-environment heterogeneity on therapeutic response. *Nature*, 2013, 501(7467): 346–354. [DOI]
- [3] Greaves M, Maley CC. Clonal evolution in cancer. *Nature*, 2012, 481(7381): 306–313. [DOI]
- [4] Marusyk A, Almendro V, Polyak K. Intra-tumour heterogeneity: a looking glass for cancer? *Nat Rev Cancer*, 2012, 12(5): 323–334. [DOI]
- [5] Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, Math M, Larkin J, Endesfelder D, Gronroos E, Martinez P, Matthews N, Stewart A, Tarpey P, Varela I, Phillimore B, Begum S, McDonald NQ, Butler A, Jones D, Raine K, Latimer C, Santos CR, Nohadani M, Eklund AC, Spencer-Dene B, Clark G, Pickering L, Stamp G, Gore M, Szallasi Z, Downward J, Futreal PA, Swanton C. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N Engl J Med*, 2012, 366(10): 883–892. [DOI]
- [6] Brunner SF, Roberts ND, Wylie LA, Moore L, Aitken SJ, Davies SE, Sanders MA, Ellis P, Alder C, Hooks Y, Abascal F, Stratton MR, Martincorena I, Hoare M, Campbell PJ. Somatic mutations and clonal dynamics in healthy and cirrhotic human liver. *Nature*, 2019, 574(7779): 538–542. [DOI]
- [7] Zong CH, Lu SJ, Chapman AR, Xie XS. Genome-wide detection of single-nucleotide and copy-number variations of a single human cell. *Science*, 2012, 338(6114): 1622–1626. [DOI]
- [8] Gawad C, Koh W, Quake SR. Dissecting the clonal origins of childhood acute lymphoblastic leukemia by single-cell genomics. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111(50): 17947–17952. [DOI]
- [9] Hou Y, Song LT, Zhu P, Zhang B, Tao Y, Xu X, Li FQ, Wu K, Liang J, Shao D, Wu HJ, Ye XF, Ye C, Wu RH, Jian M, Chen Y, Xie W, Zhang RR, Chen L, Liu X, Yao XT, Zheng HC, Yu C, Li QB, Gong ZL, Mao M, Yang X, Yang L, Li JX, Wang W, Lu ZH, Gu N, Laurie G, Bolund L, Kristiansen K, Wang J, Yang HM, Li YR, Zhang XQ, Wang J. Single-cell exome sequencing and monoclonal evolution of a JAK2-negative myeloproliferative neoplasm. *Cell*, 2012, 148(5): 873–885. [DOI]
- [10] Xu X, Hou Y, Yin XY, Bao L, Tang AF, Song TL, Li FQ, Tsang S, Wu K, Wu HJ, He WM, Zeng L, Xing MJ, Wu RH, Jiang H, Liu X, Cao DD, Guo GW, Hu XD, Gui YT, Li ZS, Xie WY, Sun XJ, Shi M, Cai ZM, Wang B, Zhong MM, Li JX, Lu ZH, Gu N, Zhang XQ, Goodman L, Bolund L, Wang J, Yang HM, Kristiansen K, Dean M, Li YR, Wang J. Single-cell exome sequencing reveals single-nucleotide mutation characteristics of a kidney tumor. *Cell*, 2012, 148(5): 886–895. [DOI]
- [11] Su XB, Long Q, Bo JJ, Shi Y, Zhao LN, Lin YX, Luo Q, Ghazanfar S, Zhang C, Liu Q, Wang L, He KY, He J, Cui XF, Yang JYH, Han ZG, Yang GL, Sha JJ. Mutational and transcriptomic landscapes of a rare human prostate basal cell carcinoma. *Prostate*, 2020, 80(6): 508–517. [DOI]
- [12] Huang J, Deng Q, Wang Q, Li KY, Dai JH, Li N, Zhu ZD, Zhou B, Liu XY, Liu RF, Fei QL, Chen H, Cai B, Zhou BP, Xiao HS, Qin LX, Han ZG. Exome sequencing of hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma. *Nat Genet*, 2012, 44(10): 1117–1121. [DOI]
- [13] Gunderson KL, Steemers FJ, Lee G, Mendoza LG, Chee MS. A genome-wide scalable SNP genotyping assay using microarray technology. *Nat Genet*, 2005, 37(5): 549–554. [DOI]
- [14] Wang Y, Waters J, Leung ML, Unruh A, Roh W, Shi XQ, Chen K, Scheet P, Vattathil S, Liang H, Multani A, Zhang H, Zhao R, Michor F, Meric-Bernstam F, Navin NE. Clonal evolution in breast cancer revealed by single nucleus genome sequencing. *Nature*, 2014, 512(7513): 155–160. [DOI]

- [15] Lasken RS. Genomic DNA amplification by the multiple displacement amplification (MDA) method. *Biochem Soc Trans*, 2009, 37(Pt 2): 450–453. [DOI]
- [16] Gefrides LA, Powell MC, Donley MA, Kahn R. UV irradiation and autoclave treatment for elimination of contaminating DNA from laboratory consumables. *Forensic Sci Int Genet*, 2010, 4(2): 89–94. [DOI]
- [17] Archer E, Allen H, Hopwood A, Rowlands D. Validation of a dual cycle ethylene oxide treatment technique to remove DNA from consumables used in forensic laboratories. *Forensic Sci Int Genet*, 2010, 4(4): 239–243. [DOI]
- [18] Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 2014, 30(15): 2114–2120. [DOI]
- [19] Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics*, 2009, 25(14): 1754–1760. [DOI]
- [20] Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, Marth G, Abecasis G, Durbin R. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics*, 2009, 25(16): 2078–2079. [DOI]
- [21] Feng RM, Zong YN, Cao SM, Xu RH. Current cancer situation in China: good or bad news from the 2018 Global Cancer Statistics? *Cancer Commun (Lond)*, 2019, 39(1): 22. [DOI]
- [22] Lähnemann D, Köster J, Szczurek E, McCarthy DJ, Hicks SC, Robinson MD, Vallejos CA, Campbell KR, Beerenwinkel N, Mahfouz A, Pinello L, Skums P, Stamatakis A, Attolini CS, Aparicio S, Baaijens J, Balvert M, Barbanson B, Cappuccio A, Corleone G, Dutilh BE, Florescu M, Guryev V, Holmer R, Jahn K, Lobo TJ, Keizer EM, Khatri I, Kielbasa SM, Korbel JO, Kozlov AM, Kuo TH, Lelieveldt B, Mandoiu II, Marioni JC, Marschall T, Molder F, Niknejad A, Raczkowski L, Reinders M, Ridder J, Saliba AE, Somarakis A, Stegle O, Theis FJ, Yang H, Zelikovsky A, Mchardy AC, Raphael B J, Shah SP, Schönhuth A. Eleven grand challenges in single-cell data science. *Genome Biol*, 2020, 21(1): 31. [DOI]
- [23] Gawad C, Koh W, Quake SR. Single-cell genome sequencing: current state of the science. *Nat Rev Genet*, 2016, 17(3): 175–188. [DOI]
- [24] Huang L, Ma F, Chapman A, Lu SJ, Xie XS. Single-cell whole-genome amplification and sequencing: methodology and applications. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 2015, 16: 79–102. [DOI]
- [25] Yao YX, La YF, Di R, Liu QY, Hu WP, Wang XY, Chu MX. Comparison of different single cell whole genome amplification methods and MALBAC applications in assisted reproduction. *Hereditas(Beijing)*, 2018, 40(8): 620–631.  
姚雅馨, 喇永富, 狄冉, 刘秋月, 胡文萍, 王翔宇, 储明星. 不同单细胞全基因组扩增方法的比较及 MALBAC 在辅助生殖中的应用. *遗传*, 2018, 40(8): 620–631. [DOI]
- [26] Woyke T, Sczyrba A, Lee J, Rinke C, Tighe D, Clingenpeel S, Malmstrom R, Stepanauskas R, Cheng JF. Decontamination of MDA reagents for single cell whole genome amplification. *PLoS One*, 2011, 6(10): e26161. [DOI]

(责任编辑: 王晓群)

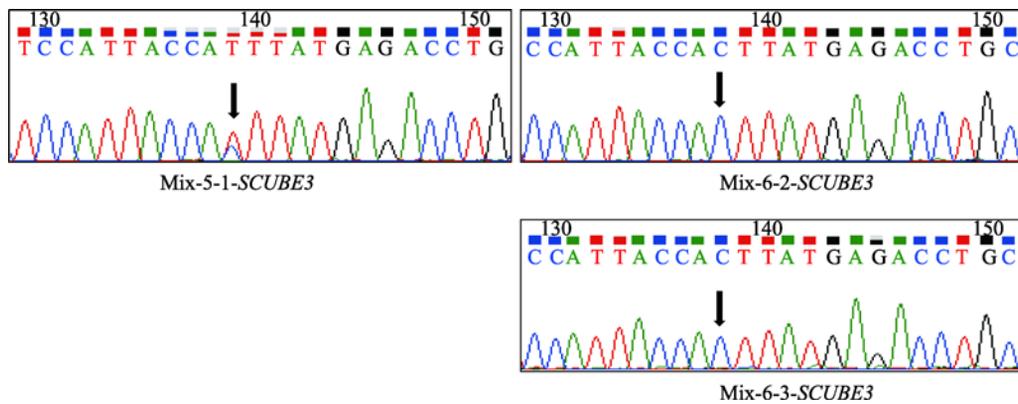
附录 :

1、*SCUBE3*: Chr.6:35,213,612~35,213,872 Chr.6:35213742 C→T

AGGGTGTGTGTATGCGAAGGgggagccttgtcagaatgattctcttgcctataccccaccaccagctgtacagcccagttctaggaggcttgg  
gtagcctgcctgtctctactgacctgtcttgccttcccagatccccatcctccattaccaCttatgagacctgccagacctacgagcgtcccattgccttactg  
ccgttccaggaagctctgatcaACTTCAAGACAAGCGAGGCC

2、*MSTIL*: Chr.1:17,084,143~17,084,429 Chr.1:17084321 A→G

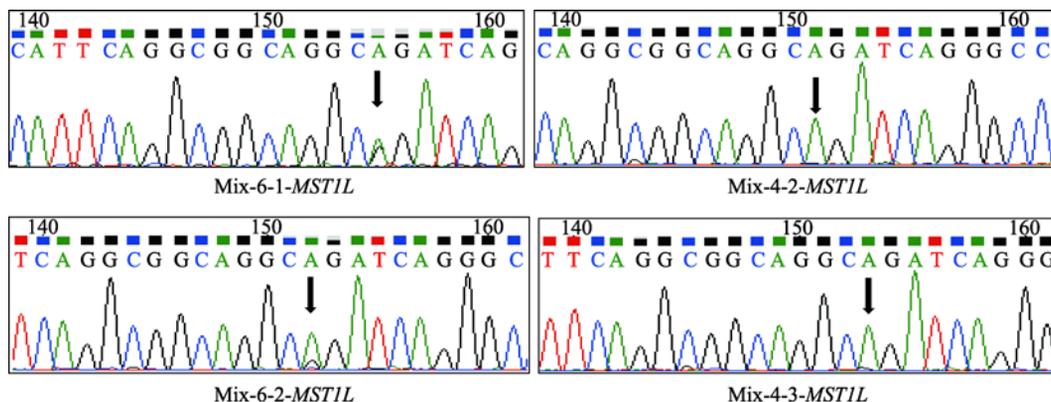
TTACCCGTACCTGCAGTGAGgggaatgggagagaaggagacggctctggaggaagatccagggtgggctctctggccaccagcagctctgtgca  
ctatgctttaccttggctcaccaccagctgcaatctcacacttggctcctgga  
ggcaccacatacattcaggcggcaggcAgatcaggggccacacgctgggtcagggtcacagatctttaacagaatgggggactcagggtctgaggccacaagg  
ctcagccccaccTCACATCCTCCAGGTTGTC



附图 1 *SCUBE3* 基因靶向扩增结果和 Sanger 测序图谱

Supplemental Fig. 1 Target Amplification and Sanger sequencing of *SCUBE3* gene

*SCUBE3* 基因靶向扩增产物 Sanger 测序图谱, Mix-X-Y-基因: Mix 代表 3 个 BCC 单细胞目的基因靶向扩增产物混合样品, X 代表混合样品的排序号, Y 代表混合样品中 BCC 单细胞的排序号。



附图 2 *MSTIL* 基因靶向扩增结果和 Sanger 测序图谱

Supplemental Fig. 2 Target Amplification and Sanger sequencing map of *MSTIL* gene

*MSTIL* 基因靶向扩增产物 Sanger 测序图谱, Mix-X-Y-基因: Mix 代表 3 个 BCC 单细胞目的基因靶向扩增产物混合样品, X 代表混合样品的排序号, Y 代表混合样品中 BCC 单细胞的排序号。