

DOI: 10.16781/j.CN31-2187/R.20230446

• 专题报道 •

单细胞多组学技术和应用

张静, 江燕, 訾晓渊*

江苏省单细胞测序工程技术研究中心, 南京市高通量单细胞测序工程技术研究中心, 南京 210016

[摘要] 单细胞多组学技术是指结合多种不同的生物学技术, 对单个细胞进行多方面的分析和研究, 从而获得更全面、更准确的单细胞数据。该技术包括单细胞基因组学、单细胞转录组学、单细胞蛋白质组学、单细胞表观组学等。单细胞多组学技术的发展为我们提供了一种更加精确理解生物体内复杂的细胞类型和功能的方式, 尤其是对于异质性细胞群体中少数的特殊细胞类型如干细胞或罕见癌细胞, 具有非常重要的应用价值。通过融合不同技术获得的信息, 单细胞多组学可以更准确地描述单个细胞在多个生命事件和过程中的状态与变化, 为生命科学的研究提供更加全面和深入的视角。本文系统概述了目前代表性单细胞多组学技术的发展现状, 总结了其在生物学研究中的重要应用和巨大潜力。

[关键词] 单细胞测序; 单细胞多组学; 基因组学; 转录组学; 蛋白质组学; 表观组学; 异质性

[引用本文] 张静, 江燕, 訾晓渊. 单细胞多组学技术和应用[J]. 海军军医大学学报, 2024, 45(2): 161-167. DOI: 10.16781/j.CN31-2187/R.20230446.

Single-cell multiomics technology and applications

ZHANG Jing, JIANG Yan, ZI Xiaoyuan*

Jiangsu Single-cell Sequencing Engineering Technology Research Center, Nanjing Engineering Research Center for High-Throughput Single-cell Sequencing, Nanjing 210016, Jiangsu, China

[Abstract] Single-cell multiomics, involving various biological techniques for multifaceted analysis and research on a single cell to generate more comprehensive and accurate single-cell datasets, includes single-cell genomics, single-cell transcriptomics, single-cell proteomics, single-cell epigenetics, etc. Single-cell multiomics technology provides a more precise way to comprehend the complex cell types and functions, particularly for the more specialised cell types within the heterogeneous cell populations, such as stem cells or rare cancer cells, which have very important application value. By integrating information from different technologies, single-cell multiomics can more accurately characterise the state and changes of a single cell during multiple life events and processes, providing a more comprehensive and in-depth perspective for life science research. This article provides a systematic overview of the current representative single-cell multiomics technologies and summarizes their important application and potential in biological research.

[Key words] single-cell sequencing; single-cell multiomics; genomics; transcriptomics; proteomics; epigenetics; heterogeneity

[Citation] ZHANG J, JIANG Y, ZI X. Single-cell multiomics technology and applications[J]. Acad J Naval Med Univ, 2024, 45(2): 161-167. DOI: 10.16781/j.CN31-2187/R.20230446.

传统上, 细胞都是在群体中被研究, 故无法准确地揭示细胞之间的差异, 尤其对于少数遗传或表型变异的细胞也难以检测和分析。为了突破传统生物学研究方法的局限性, 以更加精确、细致的方式了解复杂的生命活动, 单细胞测序应运而生^[1]。通过单细胞测序技术, 研究者可以在高精度、高通量的情况下分析每个细胞, 区分细胞类型、鉴定细胞功能、预测细胞拷贝数变异、了解细胞间的分化关

系、研究细胞间的互作关系, 进而揭示样本间的差异机制^[2-6]。

单细胞测序可以揭示细胞间异质性, 展现出同一细胞类型在不同状态下基因表达、表观遗传和代谢等方面的差异。通过单细胞测序技术可以获得每个细胞的完整信息, 从而揭示细胞异质性和复杂性。单细胞测序还可以确定细胞类型, 这对于研究细胞功能及某些情况下需要准确地确定每个细胞的

[收稿日期] 2023-08-07 [接受日期] 2023-12-13

[作者简介] 张静, 博士. E-mail: zhangjing@singleronbio.com

*通信作者 (Corresponding author). Tel: 025-57922289, E-mail: zixiaoyuan@singleronbio.com

类型和功能^[6-10]至关重要。例如在研究肿瘤时,最初仅有少量的突变细胞可以驱动肿瘤发展,通过单细胞测序可以检测到这些极少数的突变细胞并深入研究其特征。同时,单细胞测序可以探索生命发展过程,如从单个受精卵到成熟的组织和器官的不断分化和分裂过程,及比较不同发育阶段细胞间的差异,从而更好地理解生命的发展过程^[11]。

随着单细胞技术的发展,研究范围从转录组扩展到了基因组^[12-14]、表观组^[15-23]、蛋白质组^[24]等多个组学水平,由此诞生了多项单细胞多组学技术。

1 单细胞多组学技术的特点和应用场景

在肿瘤发生等复杂的生物过程中,异质性同时存在于基因组、转录组、表观组、免疫组等多层面,基因相同的肿瘤细胞可能具有不同的DNA甲基化、基因表达、克隆扩增等,常需要基于单个细

胞进行多个组学技术联合才能更加准确地将它们分类为不同亚群,揭示更深层的生物学机制。基于此,研究人员开发出了可同时捕获2种或2种以上单细胞组学的测序技术——单细胞多组学技术。

单细胞多组学技术能多层次、多角度地描绘细胞间的异质性,挖掘各层组学之间的直接和潜在联系,从而更加全面和系统地描绘细胞的状态和命运^[25],与单组学相比,多组学更侧重对细胞完整信息的采集,因此可以更好和更全面地反映细胞特征^[26]。比如,联合单细胞转录组与基因组可以发现细胞遗传变异的多样性;联合单细胞转录组和蛋白质组可以发现蛋白表达的特异性等(表1)。单细胞多组学技术是单细胞分析技术发展的前沿,也是单组学技术发展的必然趋势。本文系统概述了目前代表性单细胞多组学技术的发展现状和未来趋势,总结了其在生物学研究中的重要应用和巨大潜力,以期与各科学研究提供参考。

表1 单细胞多组学技术相关研究概况

Tab 1 Overview of related studies on single-cell multiomics

Method	Data types provided	Publication year	Reference
Genome and transcriptome sequencing	DNA, RNA	2015	[27]
Genomic DNA-mRNA sequencing	Genomic DNA, mRNA	2015	[28]
Target sequencing	Genomic and coding DNA, mRNA	2019	[29]
Hi-C and RNA sequencing employed simultaneously	DNA, RNA	2023	[30]
Single-cell chromatin accessibility and transcriptome sequencing	Chromatin accessibility, RNA	2019	[31]
Methylome and transcriptome sequencing from single cells	DNA methylation, mRNA	2016	[32]
Proximity ligation assisted yield-enhancing RNA detection	mRNA, protein	2016	[33]
RNA expression and protein sequencing	mRNA, protein	2017	[34]
Cellular indexing of transcriptomes and epitopes by sequencing	mRNA, protein	2017	[35]
Intranuclear cellular indexing of transcriptomes and epitopes by sequencing	mRNA, protein	2021	[36]
Improved single-cell chromatin overall omic-scale landscape sequencing	DNA, DNA methylation, chromatin accessibility, RNA	2019	[37]
Single-cell nucleosome, methylation and transcription sequencing	DNA, DNA methylation, chromatin accessibility, RNA	2018	[38]
Single-cell triple omics sequencing	DNA, DNA methylation, RNA	2016	[39]
Sequencing of nuclear protein epitope abundance, chromatin accessibility and the transcriptome in single cells	Chromatin accessibility, mRNA, protein	2022	[40]

2 几种单细胞多组学技术简介

2.1 联合单细胞基因组和转录组 联合单细胞基因组和转录组技术是对单个细胞的基因组和转录组进行平行分析,从而使体细胞变异和基因表达差异联系起来。基因组信息可用于构建细胞系进化树,这对于理解正常发育、疾病病因和进展非常重要。目前已经开发了几种对基因组和转录组进行

单细胞多组学分析的方法,包括单细胞基因组与转录组测序(genome and transcriptome sequencing, G&T-seq)^[27]、基因组DNA-mRNA测序(genomic DNA-mRNA sequencing, DR-seq)^[28]、Target测序(Target sequencing, TARGET-seq)^[29]及同时检测Hi-C和RNA测序(Hi-C and RNA sequencing employed simultaneously, HiRES)^[30]等。

2015年Macaulay等^[27]利用G&T-seq技术对

220 个小鼠和人类细胞进行了测序,首次观察到当细胞丢失或获得染色体拷贝时该区域的基因表达也会出现相应的变化(减少或增加)。通过 DR-seq 技术,研究者也发现细胞间转录数变异较大的基因通常与拷贝数减少的位点相关,反之亦然,这意味着拷贝数变异可以驱动单细胞间基因表达的变异^[28]。TARGET-seq 技术于 2019 年由 Rodriguez-Meira 等^[29]提出,是一种新的单个肿瘤细胞表征基因分型和转录组测序的方法。该技术首先将单细胞温和地裂解后高温灭活蛋白酶,然后将互补 DNA 和基因组 DNA 的特异性引物添加到混合物中进行反转录和 PCR,所得互补 DNA 和扩增混合物用于制备基因分型文库和转录组文库并进行测序。通过该技术揭示了骨髓增生性肿瘤干细胞和祖细胞中的转录和遗传肿瘤异质性,为突变和非突变细胞的失调途径提供了见解,可用于肿瘤内异质性的确定性分析以及治疗抗性肿瘤亚克隆的鉴定和表征^[29]。

在高等真核生物中,基因组在细胞核内的三维空间构象对细胞功能至关重要,如增强子常常通过三维空间相互作用对远端目的基因的转录活性起调控作用。三维基因组水平上的异常也被发现与包括癌症在内的多种疾病的发生密切相关。然而,三维基因组与基因表达的整体关系仍然存在争议。2023 年 Liu 等^[30]报道了一种新型单细胞多组学技术 HiRES,首次基于测序方法实现了在单细胞水平对转录组和三维基因组的同时检测。HiRES 技术首先在细胞群体水平进行原位反转录和染色质构象捕获,通过流式分选得到单细胞,再对每个单细胞进行扩增后测序。利用该技术对小鼠胚胎样本进行测试,揭示了在谱系演化过程中特异性染色质相互作用与转录调控和细胞功能密切相关。

2.2 联合单细胞表观基因组和转录组 单细胞转录组和表观组联合的双组学技术不仅可以鉴别细胞类型和状态,还可以揭示控制基因表达的机制。单细胞转录组技术主要通过 RNA 测序技术检测单个细胞的基因表达,而表观组则包括 DNA 甲基化、染色质修饰和蛋白质修饰等多个方面,可通过亚硫酸氢盐测序(bisulfite sequencing, BS-seq)^[23]、利用转座酶研究染色质可及性的高通量测序(assay for transposase accessible chromatin with high-throughput sequencing, ATAC-seq)^[41]和染色质免疫共沉淀测序(chromatin immunoprecipitation

sequencing, ChIP-seq)^[42]等技术检测。将以上这 2 类数据联合分析可以揭示更加全面、准确的细胞调控机制和表观修饰特征。单细胞转录组和表观组联合具有广泛的应用前景,例如抗肿瘤药物研发、神经科学研究和发育生物学研究等领域,该技术可通过大规模单细胞测序数据和精细的表观组分析,为研究人员深入了解单个细胞的异质性、发展阶段和功能状态等提供有力支持。

传统的表观组学技术(如 BS-seq、ATAC-seq 等)常常无法区分不同细胞类型之间的异质性,而单细胞转录组学则可以对不同细胞类型的基因表达进行测定。但单细胞转录组学方法中 RNA 分子的放大和扩增会导致失真和噪音,影响数据的准确性,为了解决这一问题,研究者们开发出单细胞的甲基化和转录组测序(methylome and transcriptome sequencing from single cells, scM&T-seq)技术^[32]。与传统的甲基化和转录组测序相比,scM&T-seq 同时结合了微小规模的 DNA 甲基化酶处理和单细胞测序技术,可以在单细胞水平上同时测定 DNA 甲基化和基因表达,从而揭示单个细胞的表型、基因调控机制及其表观修饰特征。Angermueller 等^[32]于 2016 年利用该技术首次实现了在单个细胞中研究特定基因甲基化与其转录的关系,且通过分析 61 只小鼠胚胎干细胞证实启动子甲基化与单个细胞中的转录呈负相关,但不同细胞中这种调控关系的强度并不相同。

Liu 等^[31]2019 年报道了单细胞染色质可及性和转录组测序(single-cell chromatin accessibility and transcriptome sequencing, scCAT-seq)技术,该技术也可同时检测染色质可及性及同一单个细胞内转录组。scCAT-seq 采用核质分离的方案进行 mRNA 和细胞核开放染色质的捕获,同时以加入外源载体 DNA 的方式降低染色质 DNA 的损失,并基于 ATAC-seq 和 Smart 测序第 2 版^[43]的建库原理完成染色质可及性和全长转录组 2 个组学信息的测序,通过该技术构建了第 1 个早期胚胎中染色质可及性和转录组整合的单细胞图谱。

2.3 联合单细胞转录组和蛋白质组 单细胞转录组和蛋白质组联合的双组学技术是将单细胞的转录组和蛋白质组同时分析的一种技术,它可以在单细胞水平上探测基因表达和蛋白表达之间的关系,并揭示细胞内复杂的生化过程和信号传递网络。通过

该技术可以获得更全面、更准确的单细胞信息,同时揭示细胞内分子之间的复杂相互作用。此外,通过该技术还可以了解不同细胞状态下基因表达和蛋白质表达之间的动态变化,以及转录后修饰和蛋白质修饰之间的关系,从而对细胞发育、疾病诊断和药物研发等领域提供深入的认识。

Frei 等^[33]最早尝试了转录组与蛋白质组联合组学技术,2016年其报道了邻位连接辅助提高RNA检测(proximity ligation assisted yield-enhancing RNA detection, PLAYR)技术。该技术是通过流式细胞仪和质谱仪对单个细胞中的转录本进行高度多重定量,并可同时进行标准蛋白质抗体染色的技术。在PLAYR技术中,蛋白质和RNA分别被不同金属核素的抗体和核素标记的探针标记,利用流式细胞技术测量核素,可以每秒在数千个细胞中同时检测40多种不同的蛋白质表位和RNA靶点。

Peterson 等^[34]报道的RNA表达和蛋白质测序(RNA expression and protein sequencing, REAP-seq)技术可同时测量单个细胞中的蛋白质和mRNA。该技术通过与标准流式细胞术方法相似的原理标记细胞,即用DNA条形码连接的抗体代替荧光团,在流量和质量上取得了重大进步,不仅消除了由荧光标记的光谱重叠所施加的限制,而且因为使用测序作为读数而不是通过PCR读数,DNA条形码可提供多达6万个唯一标识。REAP-seq技术利用逆转录酶的DNA聚合酶活性,在同一反应中可以同时延伸标记抗体的条形码,合成来自mRNA的互补DNA。用核酸内切酶I降解连接蛋白抗体双链DNA上未结合的单链寡核苷酸,还可以防止来自不同细胞的抗体条形码和细胞条形码之间的串扰。此外,将硫酸葡聚糖添加到条形码抗体标记的缓冲液中,可以减少带负电荷的DNA条形码与细胞表面的非特异性结合,并使用同种型对照确定背景噪声的阈值。相对PLAYR技术,REAP-seq的优点是高通量,可一次检测80多种抗体和超过20000个基因,还可鉴定和表征未知的细胞表型。

转录组和细胞表位索引测序(cellular indexing of transcriptomes and epitopes by sequencing, CITE-seq)能够同时测定单细胞转录本与表面蛋白表达,于2017年由Stoeckius 等^[35]首次报道,是一种基于DNA标签化抗体的单细胞转录组与膜蛋白质组表征技术。与荧光流式和质谱流式技术不同,CITE-

seq所使用的单克隆抗体修饰有一段单链DNA,这段序列包括PCR引物区、条形码区以及一段多聚腺苷酸。CITE-seq技术结合了单细胞转录组和流式细胞术的优势,能够同时测量单个细胞的基因表达和表面蛋白标记,从而可以对单个细胞进行更全面和深入的分析。传统的单细胞转录组技术可以揭示细胞内RNA表达的差异,然而并不能推断不同细胞群的功能差异。而CITE-seq技术通过在细胞膜上带有特定表面蛋白标记的抗体来刻画细胞亚群及其表型分布,增强了对细胞功能的理解和描述,有助于获取形态学、功能以及表型等多方面的信息。通过CITE-seq技术可以检测的蛋白质种类数量较多,一般可达到数十种甚至上百种,有助于在单个细胞层面上研究复杂的生命科学问题,在肿瘤免疫学、神经科学以及干细胞与发育生物学等领域具有重大意义。

2021年Chung 等^[36]报道了一种核内转录组和表位细胞索引测序(intranuclear cellular indexing of transcriptomes and epitopes by sequencing, inCITE-seq)的单细胞多组学技术,可以实现对细胞核内蛋白和RNA的同时检测。包括转录因子在内的细胞核内蛋白本身具有核酸吸附特性,因此在使用DNA标签化抗体时会出现严重的非特异性结合,通过优化缓冲液引入硫酸葡聚糖来封闭DNA标签化抗体,可极大提高检测的特异性。

2.4 三重和高阶单细胞多组学 为了充分探索细胞间异质性,研究者还开发了三重和高阶单细胞多组学技术。2017年,Guo 等^[44]报道了单细胞染色质整体基因组景观测序(single-cell chromatin overall omic-scale landscape sequencing, scCOOL-seq)技术,首次在单细胞内、全基因组范围内多层观察染色质的可及性和DNA甲基化,突出了DNA甲基化和染色质状态的不同模式和功能。该研究在国际上率先发展了对一个单细胞同时进行染色质状态、DNA甲基化、基因组拷贝数变异,以及染色体倍性的全基因组测序技术,并采用这一技术在单细胞分辨率上系统、深入地解析了小鼠着床前胚胎发育过程中表观基因组重编程的关键特征,以及染色质状态与DNA甲基化之间的互动关系。2019年,Gu 等^[37]利用单细胞DNA甲基化文库构建方法即单细胞不加尾和不连接方法对已有的scCOOL-seq技术进行了系统性改进,使得升级版scCOOL-seq多组

学测序技术在保留高准确度和高精度的同时,显著提高了测序读段的比对率。

单细胞核小体、甲基化和转录组测序是一种三组学技术,于2018年由Clark等^[38]报道,可对转录组、甲基化组和染色质的可及性进行联合分析。2019年,Argelaguet等^[45]利用该技术从小鼠早期胚胎中分离了4个不同发育时期的单细胞,还绘制了小鼠原肠胚中染色体可及性、DNA甲基化和RNA表达的单细胞多组学图谱。该技术可以应用于多个领域,在生命科学领域中用于研究基因表达调控过程中的DNA甲基化修饰机制,从而帮助研究者更好地了解细胞的分化、重编程和发育等过程;在疾病生理学领域用于研究癌症和其他疾病中的相关基因组和表观遗传学变化,并为疾病的诊断和治疗提供新的思路。

单细胞三组学测序方法是从同一个单细胞中同时获取3种组学高通量测序信息,并从单细胞水平发现肝癌细胞在3种组学上存在密切相互关联的高度异质性^[39]。该技术通过选择性裂解细胞膜,将细胞质中的mRNA与完整细胞核中的基因组DNA分开,揭示单个细胞内基因区域DNA甲基化程度与基因表达有着很强的正相关性,且甲基化发生在不同的基因区域上会对基因表达有不同的调控作用。研究者们还发现基因组DNA的拷贝数与该区域上的基因表达有很强的正相关性,即DNA拷贝数较多的区域其上的基因表达量也随之增高,反之亦然,从而在单细胞水平上证明了基因表达的剂量效应。

单细胞中核蛋白表位丰度、染色质可及性和转录组的测序(sequencing of nuclear protein epitope abundance, chromatin accessibility and the transcriptome in single cells, NEAT-seq)技术可对单细胞中的核蛋白表位丰度、染色质可及性和转录组进行测序,是一种能够在单细胞中量化核蛋白以及ATAC-seq和RNA测序的方法^[40]。该技术使用GFP转染、染色分选、抗体偶联,然后让单链DNA结合蛋白与寡抗体相结合并进行寡抗体染色,最后制备单细胞文库,进行测序和测抗体寡核苷酸。NEAT-seq可以在生物学上测量转录因子水平连续变化的分子后果,同时对一组蛋白质进行相关设置。由于核蛋白包含许多参与基因调控的蛋白质,因此,将核蛋白水平与表观遗传和转录状态联

系起来为研究基因调控机制提供了一种强有力的方法^[40]。

3 单细胞多组学测序技术的前景与展望

单细胞多组学测序技术是一种新兴的技术,结合了基因组、转录组、表观组和蛋白组等不同细胞水平的信息,可以深入了解单个细胞的生物学特征。单细胞多组学测序技术可以在单细胞水平上进行高通量分析,在许多领域中具有广阔的应用前景。在医学研究领域,单细胞多组学测序技术已被用于研究多种疾病,如癌症、自身免疫性疾病和神经系统疾病等^[46-51]。通过单细胞多组学测序分析,我们可以深入了解每个单个细胞的生物学特征,揭示疾病发生和发展的机制,进而为疾病诊断、治疗和预测提供基础依据。在农学领域,单细胞多组学测序技术可以帮助我们了解植物的多级生长调控机制和抗性基因的调节机制,对于选育抗逆品种和提高农产品产量具有重要意义^[52]。此外,单细胞多组学测序技术还可以应用于生物研究领域,例如在发育和分化过程中探索细胞命运决定机制,分析微生物群落的多样性和功能等。随着单细胞多组学测序技术的不断发展和完善,它将会在越来越多的领域得到应用,为研究者们提供更好的手段去探寻生命科学的奥秘,帮助人们更深入地理解和治疗各种疾病。

[参考文献]

- [1] TANG F, BARBACIORU C, WANG Y, et al. mRNA-Seq whole-transcriptome analysis of a single cell[J]. *Nat Methods*, 2009, 6(5): 377-382. DOI: 10.1038/nmeth.1315.
- [2] HAN L, ZI X, GARMIRE L X, et al. Co-detection and sequencing of genes and transcripts from the same single cells facilitated by a microfluidics platform[J]. *Sci Rep*, 2014, 4: 6485. DOI: 10.1038/srep06485.
- [3] NAVIN N, KENDALL J, TROGE J, et al. Tumour evolution inferred by single-cell sequencing[J]. *Nature*, 2011, 472(7341): 90-94. DOI: 10.1038/nature09807.
- [4] XUE Z, HUANG K, CAI C, et al. Genetic programs in human and mouse early embryos revealed by single-cell RNA sequencing[J]. *Nature*, 2013, 500(7464): 593-597. DOI: 10.1038/nature12364.
- [5] PORAN A, NÖTZEL C, ALY O, et al. Single-cell RNA sequencing reveals a signature of sexual commitment in malaria parasites[J]. *Nature*, 2017, 551(7678): 95-99.

- DOI: 10.1038/nature24280.
- [6] TRAVAGLINI K J, NABHAN A N, PENLAND L, et al. A molecular cell atlas of the human lung from single-cell RNA sequencing[J]. *Nature*, 2020, 587(7835): 619-625. DOI: 10.1038/s41586-020-2922-4.
- [7] HASHIMSHONY T, WAGNER F, SHER N, et al. CEL-seq: single-cell RNA-seq by multiplexed linear amplification[J]. *Cell Rep*, 2012, 2(3): 666-673. DOI: 10.1016/j.celrep.2012.08.003.
- [8] ISLAM S, KJÄLLQUIST U, MOLINER A, et al. Highly multiplexed and strand-specific single-cell RNA 5' end sequencing[J]. *Nat Protoc*, 2012, 7(5): 813-828. DOI: 10.1038/nprot.2012.022.
- [9] JAITIN D A, KENIGSBERG E, KEREN-SHAUL H, et al. Massively parallel single-cell RNA-seq for marker-free decomposition of tissues into cell types[J]. *Science*, 2014, 343(6172): 776-779. DOI: 10.1126/science.1247651.
- [10] SASAGAWA Y, NIKAIDO I, HAYASHI T, et al. Quartz-Seq: a highly reproducible and sensitive single-cell RNA sequencing method, reveals non-genetic gene-expression heterogeneity[J]. *Genome Biol*, 2013, 14(4): 1-17. DOI: 10.1186/gb-2013-14-4-r31.
- [11] GOHIL S H, IORGULESCU J B, BRAUN D A, et al. Applying high-dimensional single-cell technologies to the analysis of cancer immunotherapy[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2021, 18(4): 244-256. DOI: 10.1038/s41571-020-00449-x.
- [12] LIM J, CHIN V, FAIRFAX K, et al. Transitioning single-cell genomics into the clinic[J]. *Nat Rev Genet*, 2023, 24(8): 573-584. DOI: 10.1038/s41576-023-00613-w.
- [13] BOLAND B S, HE Z, TSAI M S, et al. Heterogeneity and clonal relationships of adaptive immune cells in ulcerative colitis revealed by single-cell analyses[J]. *Sci Immunol*, 2020, 5(50): eabb4432. DOI: 10.1126/sciimmunol.abb4432.
- [14] PENKAVA F, VELASCO-HERRERA M D C, YOUNG M D, et al. Single-cell sequencing reveals clonal expansions of pro-inflammatory synovial CD8 T cells expressing tissue-homing receptors in psoriatic arthritis[J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 4767. DOI: 10.1038/s41467-020-18513-6.
- [15] JIN W, TANG Q, WAN M, et al. Genome-wide detection of DNase I hypersensitive sites in single cells and FFPE tissue samples[J]. *Nature*, 2015, 528(7580): 142-146. DOI: 10.1038/nature15740.
- [16] CUSANOVICH D A, DAZA R, ADEY A, et al. Multiplex single cell profiling of chromatin accessibility by combinatorial cellular indexing[J]. *Science*, 2015, 348(6237): 910-914. DOI: 10.1126/science.aab1601.
- [17] BUENROSTRO J D, WU B, LITZENBURGER U M, et al. Single-cell chromatin accessibility reveals principles of regulatory variation[J]. *Nature*, 2015, 523(7561): 486-490. DOI: 10.1038/nature14590.
- [18] NAGANO T, LUBLING Y, VÁRNAI C, et al. Cell-cycle dynamics of chromosomal organization at single-cell resolution[J]. *Nature*, 2017, 547(7661): 61-67. DOI: 10.1038/nature23001.
- [19] FLYAMER I M, GASSLER J, IMAKAEV M, et al. Single-nucleus Hi-C reveals unique chromatin reorganization at oocyte-to-zygote transition[J]. *Nature*, 2017, 544(7648): 110-114. DOI: 10.1038/nature21711.
- [20] RAMANI V, DENG X, QIU R, et al. Massively multiplex single-cell hi-C[J]. *Nat Methods*, 2017, 14(3): 263-266. DOI: 10.1038/nmeth.4155.
- [21] STEVENS T J, LANDO D, BASU S, et al. 3D structures of individual mammalian genomes studied by single-cell Hi-C[J]. *Nature*, 2017, 544(7648): 59-64. DOI: 10.1038/nature21429.
- [22] GUO H, ZHU P, WU X, et al. Single-cell methylome landscapes of mouse embryonic stem cells and early embryos analyzed using reduced representation bisulfite sequencing[J]. *Genome Res*, 2013, 23(12): 2126-2135. DOI: 10.1101/gr.161679.113.
- [23] SMALLWOOD S A, LEE H J, ANGERMUELLER C, et al. Single-cell genome-wide bisulfite sequencing for assessing epigenetic heterogeneity[J]. *Nat Methods*, 2014, 11(8): 817-820. DOI: 10.1038/nmeth.3035.
- [24] BUDNIK B, LEVY E, HARMANGE G, et al. SCoPE-MS: mass spectrometry of single mammalian cells quantifies proteome heterogeneity during cell differentiation[J]. *Genome Biol*, 2018, 19(1): 161. DOI: 10.1186/s13059-018-1547-5.
- [25] OGBEIDE S, GIANNESI F, MINCARELLI L, et al. Into the multiverse: advances in single-cell multiomic profiling[J]. *Trends Genet*, 2022, 38(8): 831-843. DOI: 10.1016/j.tig.2022.03.015.
- [26] BAYSOY A, BAI Z, SATIJA R, et al. The technological landscape and applications of single-cell multi-omics[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2023, 24(10): 695-713. DOI: 10.1038/s41580-023-00615-w.
- [27] MACAULAY I C, HAERTY W, KUMAR P, et al. G&T-seq: parallel sequencing of single-cell genomes and transcriptomes[J]. *Nat Methods*, 2015, 12(6): 519-522. DOI: 10.1038/nmeth.3370.
- [28] DEY S S, KESTER L, SPANJAARD B, et al. Integrated genome and transcriptome sequencing of the same cell[J]. *Nat Biotechnol*, 2015, 33(3): 285-289. DOI: 10.1038/nbt.3129.
- [29] RODRIGUEZ-MEIRA A, BUCK G, CLARK S A, et al. Unravelling intratumoral heterogeneity through high-sensitivity single-cell mutational analysis and parallel

- RNA sequencing[J]. *Mol Cell*, 2019, 73(6): 1292-1305.e8. DOI: 10.1016/j.molcel.2019.01.009.
- [30] LIU Z, CHEN Y, XIA Q, et al. Linking genome structures to functions by simultaneous single-cell Hi-C and RNA-seq[J]. *Science*, 2023, 380(6649): 1070-1076. DOI: 10.1126/science.adg3797.
- [31] LIU L, LIU C, QUINTERO A, et al. Deconvolution of single-cell multi-omics layers reveals regulatory heterogeneity[J]. *Nat Commun*, 2019, 10: 470. DOI: 10.1038/s41467-018-08205-7.
- [32] ANGERMUELLER C, CLARK S J, LEE H J, et al. Parallel single-cell sequencing links transcriptional and epigenetic heterogeneity[J]. *Nat Methods*, 2016, 13(3): 229-232. DOI: 10.1038/nmeth.3728.
- [33] FREI A P, BAVA F A, ZUNDER E R, et al. Highly multiplexed simultaneous detection of RNAs and proteins in single cells[J]. *Nat Methods*, 2016, 13(3): 269-275. DOI: 10.1038/nmeth.3742.
- [34] PETERSON V M, ZHANG K X, KUMAR N, et al. Multiplexed quantification of proteins and transcripts in single cells[J]. *Nat Biotechnol*, 2017, 35(10): 936-939. DOI: 10.1038/nbt.3973.
- [35] STOECKIUS M, HAFEMEISTER C, STEPHENSON W, et al. Simultaneous epitope and transcriptome measurement in single cells[J]. *Nat Methods*, 2017, 14(9): 865-868. DOI: 10.1038/nmeth.4380.
- [36] CHUNG H, PARKHURST C N, MAGEE E M, et al. Joint single-cell measurements of nuclear proteins and RNA *in vivo*[J]. *Nat Methods*, 2021, 18(10): 1204-1212. DOI: 10.1038/s41592-021-01278-1.
- [37] GU C, LIU S, WU Q, et al. Integrative single-cell analysis of transcriptome, DNA methylome and chromatin accessibility in mouse oocytes[J]. *Cell Res*, 2019, 29(2): 110-123. DOI: 10.1038/s41422-018-0125-4.
- [38] CLARK S J, ARGELAGUET R, KAPOURANI C A, et al. scNMT-seq enables joint profiling of chromatin accessibility DNA methylation and transcription in single cells[J]. *Nat Commun*, 2018, 9: 781. DOI: 10.1038/s41467-018-03149-4.
- [39] HOU Y, GUO H, CAO C, et al. Single-cell triple omics sequencing reveals genetic, epigenetic, and transcriptomic heterogeneity in hepatocellular carcinomas[J]. *Cell Res*, 2016, 26(3): 304-319. DOI: 10.1038/cr.2016.23.
- [40] CHEN A F, PARKS B, KATHIRIA A S, et al. NEAT-seq: simultaneous profiling of intra-nuclear proteins, chromatin accessibility and gene expression in single cells[J]. *Nat Methods*, 2022, 19(5): 547-553. DOI: 10.1038/s41592-022-01461-y.
- [41] SATPATHY A T, SALIGRAMA N, BUENROSTRO J D, et al. Transcript-indexed ATAC-seq for precision immune profiling[J]. *Nat Med*, 2018, 24(5): 580-590. DOI: 10.1038/s41591-018-0008-8.
- [42] KELLEY D Z, FLAM E L, IZUMCHENKO E, et al. Integrated analysis of whole-genome ChIP-seq and RNA-seq data of primary head and neck tumor samples associates HPV integration sites with open chromatin marks[J]. *Cancer Res*, 2017, 77(23): 6538-6550. DOI: 10.1158/0008-5472.can-17-0833.
- [43] PICELLI S, BJÖRKLUND Å K, FARIDANI O R, et al. Smart-seq2 for sensitive full-length transcriptome profiling in single cells[J]. *Nat Methods*, 2013, 10(11): 1096-1098. DOI: 10.1038/nmeth.2639.
- [44] GUO F, LI L, LI J, et al. Single-cell multi-omics sequencing of mouse early embryos and embryonic stem cells[J]. *Cell Res*, 2017, 27(8): 967-988. DOI: 10.1038/cr.2017.82.
- [45] ARGELAGUET R, CLARK S J, MOHAMMED H, et al. Multi-omics profiling of mouse gastrulation at single-cell resolution[J]. *Nature*, 2019, 576(7787): 487-491. DOI: 10.1038/s41586-019-1825-8.
- [46] STEPHENSON E, REYNOLDS G, BOTTING R A, et al. Single-cell multi-omics analysis of the immune response in COVID-19[J]. *Nat Med*, 2021, 27(5): 904-916. DOI: 10.1038/s41591-021-01329-2.
- [47] KARTHA V K, DUARTE F M, HU Y, et al. Functional inference of gene regulation using single-cell multi-omics[J]. *Cell Genom*, 2022, 2(9): 100166. DOI: 10.1016/j.xgen.2022.100166.
- [48] YAN R, GU C, YOU D, et al. Decoding dynamic epigenetic landscapes in human oocytes using single-cell multi-omics sequencing[J]. *Cell Stem Cell*, 2021, 28(9): 1641-1656.e7. DOI: 10.1016/j.stem.2021.04.012.
- [49] WANG Y, XIE H, CHANG X, et al. Single-cell dissection of the multiomic landscape of high-grade serous ovarian cancer[J]. *Cancer Res*, 2022, 82(21): 3903-3916. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-21-3819.
- [50] LONG Z, SUN C, TANG M, et al. Single-cell multiomics analysis reveals regulatory programs in clear cell renal cell carcinoma[J]. *Cell Discov*, 2022, 8: 68. DOI: 10.1038/s41421-022-00415-0.
- [51] PAN D, JIA D. Application of single-cell multi-omics in dissecting cancer cell plasticity and tumor heterogeneity [J]. *Front Mol Biosci*, 2021, 8: 757024. DOI: 10.3389/fmolb.2021.757024.
- [52] ZHANG L, HE C, LAI Y, et al. Asymmetric gene expression and cell-type-specific regulatory networks in the root of bread wheat revealed by single-cell multiomics analysis[J]. *Genome Biol*, 2023, 24(1): 65. DOI: 10.1186/s13059-023-02908-x.