

直接捕获向导RNA，带来可扩展的组合式单细胞CRISPR筛选

加州大学旧金山分校的研究人员以及10x Genomics的科学家介绍了一种新方法，可通过直接捕获并测序单细胞内的向导RNA来简化CRISPR筛选，而不再需要单独的索引转录本。对向导RNA的直接捕获实现了单细胞水平的准确鉴定，并为研究人员测试组合式的CRISPR扰动并检测所产生的细胞表型打开了大门。这种同时捕获和分析向导RNA及其对转录组影响的可扩展方法是在10x Genomics结合了Feature Barcode技术的单细胞基因表达解决方案上实现的。JM Replogle et al., *Nat. Biotechnol.* 2020.

研究快照

研究问题：

直接捕获向导RNA如何提高单细胞CRISPR筛选的规模？
相对于以前的方法，直接捕获向导RNA的性能如何？
单细胞分辨率的CRISPR筛选如何增强我们对复杂生物学的了解？

研究领域： CRISPR筛选

物种： 人类

样本类型： K562人类癌细胞系

10x Genomics 的产品

结合了Feature Barcode技术的Chromium单细胞基因表达解决方案v3*

- Chromium Single Cell 3' GEM, Library & Gel Bead Kit v3
- Chromium Single Cell 3' Feature Barcode Library Kit
- Chromium Chip B Single Cell Kit
- Chromium i7 Multiplex Kit
- Cell Ranger Analysis Pipelines

* v3.1 Next GEM技术也支持该检测

实验流程

在大规模的CRISPR筛选中直接并准确鉴定向导RNA

- 在向导RNA内设计独特的捕获序列，不干扰向导活性
- 利用单细胞基因表达v3凝胶珠上存在的Feature Barcode引物捕获向导RNA
- 通过计算将向导RNA的标识分配到各个细胞

直接捕获向导RNA与通过配对的向导条形码间接检测向导RNA (GBC Perturb-seq) 的比较

- 在K562细胞中筛选五个CRISPRi文库
- 每个实验的测序深度与2500万条索引序列的读取深度匹配
- 比较不同方法的捕获率、向导标识的分配以及转录应答
- 通过向导RNA标识对单细胞的tSNE投影进行注释

为什么进行单细胞分析？

CRISPR筛选提供了一次有效检测数千个基因扰动的机会，其通量仅仅受到所选择的表型筛选方法的限制。使用单细胞测序，转录变化的筛选可以与向导RNA的鉴定同时进行。如今，向导RNA的直接捕获以及单细胞基因表达分析可以通过结合Feature Barcode技术的Chromium单细胞基因表达解决方案来实现。

结果

以往的单细胞CRISPR筛选方法包括采用独特向导条形码的Perturb-seq (GBC Perturb-seq) 或CROP-seq，这些方法需要载体来表达多聚腺苷化的索引转录本以及非聚腺苷化的向导RNA。这就限制了单细胞CRISPR筛选的规模，让组合式扰动难以实现，或根本无法实现。通过分液微滴中的特殊捕获序列和独特的RT条形码，有望克服这些挑战，从而实现向导RNA的直接捕获（图1）。

捕获率、向导标识分配和转录应答的比较表明，直接捕获向导RNA的效果与GBC Perturb-seq相当，甚至更好。直接捕获有着更高的捕获率，具体取决于所使用的向导RNA (sgRNAs¹高4.1倍，sgRNAs²高0.56倍，图2) 和同等的向导标识分配 (GBC Perturb-seq为89%，而直接捕获方法为84-94%)。另外，目标敲除的表现也相当 (GBC Perturb-seq为90%，而直接捕获方法为94%)。

重要的是，在CRISPR扰动后，这些方法测得的转录应答一致，表明向导RNA中捕获序列的添加不影响细胞反应。除了差异表达基因的紧密关联外，两种方法的聚类分析均能适当地分离细胞（图3）。

更多文献

1. JM Replogle et al., Combinatorial single-cell CRISPR screens by direct guide RNA capture and targeted sequencing. *Nat. Biotechnol.* (2020). doi.org/10.1038/s41587-020-0470-y

如欲查看完整的文献列表，请访问 [10xgenomics.com/publications](https://www.10xgenomics.com/publications)



获取最新资讯

请关注 10x Genomics 公众号

请访问 [10xgenomics.com/cn](https://www.10xgenomics.com/cn) 了解更多

© 2020 10x Genomics, Inc. FOR RESEARCH USE ONLY. NOT FOR USE IN DIAGNOSTIC PROCEDURES.
LIT000069-CN Rev B Research Snapshot: Single Cell CRISPR Screens

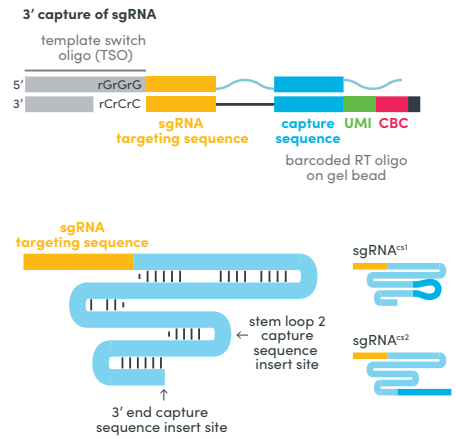


图1. 直接捕获向导RNA的设计示意图。凝胶珠上的RT寡核苷酸包括捕获序列1或2、唯一分子标识符(UMI)和细胞条形码(CBC)。图中同时显示了捕获序列1 (sgRNAs¹) 和捕获序列2 (sgRNAs²) 的位置，sgRNAs¹位于茎环上，而sgRNAs²位于向导RNA的3'端。

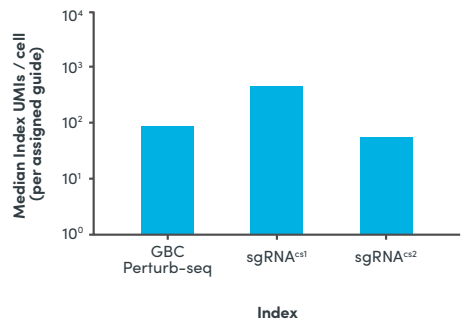


图2. 索引捕获率的比较。与GBC Perturb-seq相比，直接捕获向导RNA可以检测每个细胞中更多的索引UMI。

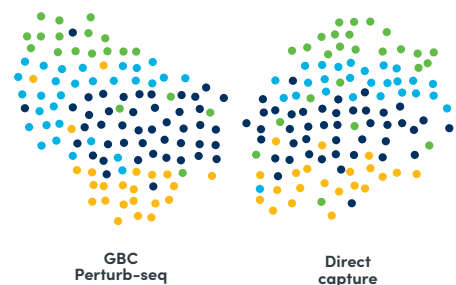


图3. 比较GBC Perturb-seq和直接捕获这两种方法中CRISPRi筛选后的单细胞tSNE投影。根据向导标识对细胞进行颜色编码 (深蓝色 = 阴性对照)。